

# 反相高效液相色谱法测定尿中 $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚<sup>①</sup>

黎俊宏<sup>②a,c</sup> 李贵荣<sup>c</sup> 唐宏兵<sup>a</sup> 徐晓怡<sup>a</sup> 欧阳运富<sup>a</sup> 王永生<sup>c</sup> 杨红梅<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>(常州市疾病预防控制中心 江苏省常州市泰山路 203 号 213022)

<sup>b</sup>(常州市中心血站 江苏省常州市劳动中路 8 号 213004)

<sup>c</sup>(南华大学公共卫生学院 湖南省衡阳市常胜西路 28 号 421001)

**摘要** 利用反相高效液相色谱法建立了同时检测人尿样中的  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚的新方法。采用 Diamonsil<sup>TM</sup>C<sub>18</sub>(150mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m) 色谱柱分离, 以 *V*(甲醇) : *V*(乙酸铵缓冲液) = 58 : 42 为流动相, 流速为 0.75 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}$ C, 于波长 280nm 处检测。当  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚的浓度分别在 0.120—19.44、0.106—19.44、0.479—27.80  $\mu$ g/mL 和 0.439—27.80  $\mu$ g/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系, RSD 分别为 3.7%—4.3%、2.4%—3.6%、2.7%—4.9% 和 2.9%—3.6% (*n* = 5)。本法用于尿中 4 种物质的同时测定, 回收率分别为 98.8%、103.8%、97.5% 和 105.0%, 结果满意。

**关键词** 反相高效液相色谱; 萘酚; 硝基酚; 尿样

中图分类号: O657.7<sup>+</sup>2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)02-0782-05

## 1 引言

多环芳烃是环境中一类比较典型的有机污染物<sup>[1,2]</sup>, 其具有致癌、致畸、致突变等特性引起人们的普遍关注, 萘是多环芳烃的重要组成成分之一, 在人体内的代谢以  $\alpha$ -萘酚和  $\beta$ -萘酚形式随尿液排出; 酚类化合物也是常见的一类环境污染物, 具有致癌、致畸、致突变的潜在毒性, 各国国家环保局均将酚类化合物列入优先监控的有毒有机污染物名单, 硝基酚就是其中一种重要的受控物, 是人体接触硝基苯类同系物后体内产生的一种代谢产物<sup>[3-6]</sup>, 尿样中这些代谢物浓度的检测对于环境健康风险评估具有重要意义。目前所报道的检测方法主要是高效液相色谱法<sup>[5-8]</sup>, 但所需的分析时间较长, 而且未见同时检测这 4 种物质。本文利用反相高效液相色谱法同时检测人尿样中  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚的含量, 尿中的对硝基酚及萘酚以游离态或以葡萄糖醛酸酯或硫酸酯等结合态存在, 因此, 测定前必须把结合态的对硝基酚及萘酚转化成游离态, 样品经过碱水解, 富集及吹氮浓缩后采用高效液相分离紫外检测器检测, 外标法定量, 15min 内可一次性完成测定。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Dionex P680 高效液相色谱仪(美国戴安公司, 配紫外检测器); UV-8500 紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); AB204-S 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);

① 湖南省自然科学基金(03JJY3030); 湖南省科学技术基金(2008FJ3083)

② 联系人, 手机: (0) 13401359681; E-mail: johnlaijordan@126.com

作者简介: 黎俊宏(1982—), 男, 湖南省郴州市人, 检验师, 硕士研究生, 主要从事卫生检验方面工作。

收稿日期: 2010-05-28; 接受日期: 2010-08-12

Aquapro 纯水机(重庆颐洋有限公司); PB-20(PB-S) 酸度计(德国赛多利斯有限公司); BF-2000 氮气吹干仪(湖南八方世纪公司); DP-01 玻璃抽滤器(天津东康科技有限公司); 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜。

$\alpha$ -萘酚标准液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 称取 1.0000g  $\alpha$ -萘酚(天津市元立化工有限公司), 200mL 甲醇溶解, 用水定容至 1L。使用时进一步用水稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $\beta$ -萘酚标准液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 称取 1.0000g  $\beta$ -萘酚(天津市元立化工有限公司), 200mL 甲醇溶解, 用水定容至 1L, 使用时进一步用水稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 对硝基酚标准液(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 称取 0.5000g 对硝基酚(湖南湘中地质实验研究所), 200mL 甲醇溶解, 用水定容至 1L, 使用时进一步用水稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 间硝基酚标准液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 称取 1.0000g 间硝基酚(天津市标准科技有限公司), 200mL 甲醇溶解, 用水定容至 1L, 使用时进一步用水稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。甲醇(色谱纯); 其他所用试剂均为分析纯。实验用水为超纯水(电阻率: 18M $\Omega\cdot\text{cm}$ )。

## 2.2 色谱条件

色谱柱(Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>柱, 150mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇/乙酸铵缓冲液(pH=4.8, 0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后当天使用)=58:42(V:V); 等度洗脱; 流速: 0.75mL/min; 检测波长: 280nm; 进样量: 20 $\mu\text{L}$ ; 温度: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 检测波长的选择

在 UV-8500 紫外/可见分光光度计上, 以甲醇-乙酸铵(V:V=58:42) 流动相为参比溶液, 分别测定  $\alpha$ -萘酚(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $\beta$ -萘酚(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、对硝基酚(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和间硝基酚(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在 200—400nm 波长范围内的紫外吸收光谱, 结果见图 1。由图 1 可见,  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚 4 种物质分别在 250—325、249—300、252—400nm 和 248—300nm 波长范围内有最大吸收峰。在同时检测 4 种物质时, 若选择较短波长时, 虽然对  $\beta$ -萘酚和间硝基酚有利, 但对  $\alpha$ -萘酚和对硝基酚不利; 反之, 选择较长波长时, 虽对  $\alpha$ -萘酚和对硝基酚有利, 但对  $\beta$ -萘酚和间硝基酚不利。由于 4 种物质在 280nm 处均有较大的吸收, 同时考虑到样本中有很多成分在 230—250nm 处有吸收, 所以, 为获得最大灵敏度和避免干扰, 选取 280nm 作为测定波长。

### 3.2 流动相及流速的优化

比较了反相液相色谱中两种常用的流动相甲醇-水、乙腈-水对待测物检测的影响。由于本实验中, 待测物在两种流动相的灵敏度差别不大, 而乙腈毒性大且价格昂贵。本实验中的流动相选择了甲醇-水。

实验研究了流动相中甲醇含量(体积含量)对各待测物质保留时间及分离度的影响。改变溶剂配比, 使各组分的容量因子( $k$ ) 在适宜范围内。本实验既要考虑 2 种同分异构体尽早出峰, 又要使其  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚各自能尽量分开。实验发现甲醇洗脱  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚的能力较强, 提高甲醇在流动相中的比例, 各保留时间明显缩短。但流动相中甲醇浓度大于 62% 时, 虽然各待测物的出峰时间提前, 但对硝基酚和间硝基酚的基线分离效果不好。减少流动相中甲醇的浓度, 则各待测物出峰时间延长; 当甲醇在流动相中浓度小于 54% 时,  $\alpha$ -萘酚出峰时间超过 20min。本实验选择甲醇与水的比值为 58:42(V:V)。

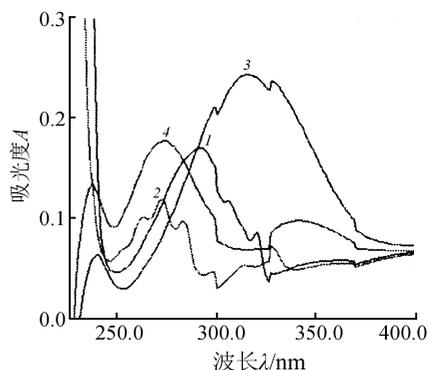


图 1  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚的吸收光谱  
1— $\alpha$ -萘酚; 2— $\beta$ -萘酚;  
3—对硝基酚; 4—间硝基酚。

实验发现,用甲醇-纯水做流动相时,出现待测物峰拖尾现象。当加入适宜 pH=4.8 的乙酸-乙酸铵弱酸性缓冲液后,不仅能得到较对称的色谱峰,还能提高测定灵敏度。其原因可能是弱酸性的流动相能有效控制酚类待测物分子中的羟基电离。当流动相 pH 值小于 4.0 时,虽然待测物出峰时间提前,但同分异构体分离效果不好;当 pH 值大于 5.5 时,待测物出峰时间延后。实验选择流动相 pH 值为 4.8。

对流动相流速分别为 0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1.00 mL/min 进行了实验;结果证明,流速为 0.75 mL/min 时, $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚有良好分离。见图 2 所示。

因此,本实验条件为,流动相甲醇:乙酸铵缓冲液为 58:42(V:V),流速 0.75 mL/min,紫外检测器检测波长 280 nm;进样量 20  $\mu$ L。

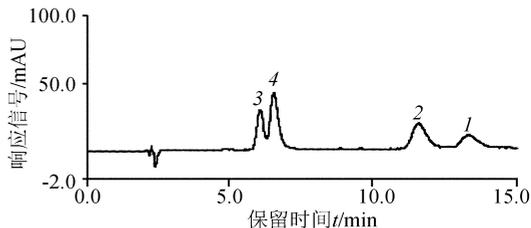


图 2  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚标准溶液的色谱分离图

1— $\alpha$ -萘酚; 2— $\beta$ -萘酚;  
3—对硝基酚; 4—间硝基酚。

### 3.3 柱温的选择

通常,提高柱温可降低流动相的粘度,减少传质阻力;但柱温升高,使分辨率降低,且温度实验以  $\Delta T=5^{\circ}\text{C}$ ,从  $20^{\circ}\text{C}$  到  $40^{\circ}\text{C}$  范围内进行。结果表明,保留时间随温度增加而缩短,当温度在  $40^{\circ}\text{C}$  时,两种萘酚的同分异构体分离效果不好,样本中待测物峰与其他峰也不能分开。本实验选择  $35^{\circ}\text{C}$  柱温。

### 3.4 校准曲线和检出限

取不同体积的  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚标准工作液,用流动相配成不同浓度的标准混合系列溶液。在选定的色谱条件下,进行色谱定量分析,得到各标准待测物的标准色谱图,见图 3。

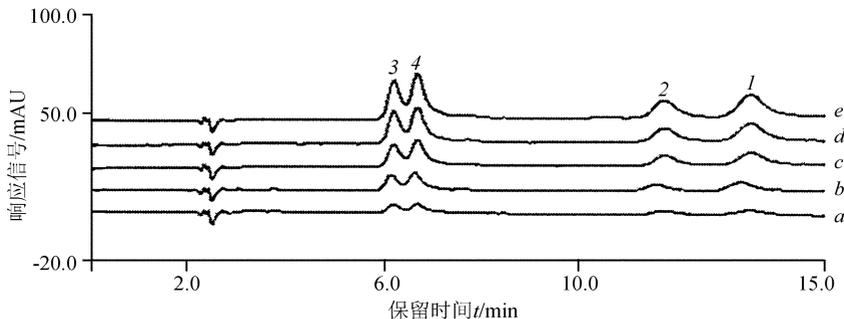


图 3 混合标准溶液的色谱图

1— $\alpha$ -萘酚; 2— $\beta$ -萘酚; 3—对硝基酚; 4—间硝基酚。

a—1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; b—2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; c—3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; d—4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; e—5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

根据信噪比  $S/N=2$ ,测得各组分的检出限,结果见表 1。

表 1 线性方程与相关系数

	保留时间 (min)	线性方程	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
$\alpha$ -萘酚	13.577	$y=4.5101C-0.1200$	0.120—19.44	0.9991	0.062
$\beta$ -萘酚	11.787	$y=3.4300C-0.2100$	0.106—19.44	0.9992	0.071
对硝基酚	6.223	$y=5.4699C-0.1900$	0.479—27.80	0.9995	0.141
间硝基酚	6.698	$y=4.8302C-0.2600$	0.439—27.80	0.9998	0.132

### 3.5 精密度和重复性实验

在线性范围内选择  $0.15\mu\text{g}/\text{mL}$  和  $18.00\mu\text{g}/\text{mL}$  低、高两组浓度的混合标准溶液进行精密度实验,  $20\mu\text{L}$  连续进样 5 次, 记录峰面积和保留时间, 如表 2。结果表明, 在该色谱条件下同时测定  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚具有很高的精确度和重现性。

表 2 峰面积和保留时间的相对偏差

( $n=5$ )

	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相对标准差(%)			
		$\alpha$ -萘酚	$\beta$ -萘酚	对硝基酚	间硝基酚
峰面积	0.15	4.3	3.6	4.9	3.6
	18.00	3.7	2.4	2.7	2.9
保留时间		1.5	2.1	1.3	3.2

### 3.6 共存物质的影响

实验考察了草酸、柠檬酸、尿素、葡萄糖、鸟嘌呤、苯酚等共存物质对  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚测定的影响, 发现这些物质对测定均无影响, 由此可见该法选择性好。

### 3.7 样品处理及测定

样本为职防所提供的化工厂工人下班后的尿样, 结合文献[6, 9, 10]的方法处理: 将尿样充分混匀,  $3000\text{r}/\text{min}$  离心  $20\text{min}$ , 取上清液  $25\text{mL}$  置于  $50\text{mL}$  具塞比色管中, 加入  $12.5\text{mol}/\text{L}$  的氢氧化钠溶液  $5\text{mL}$ , 避光沸水浴  $4\text{h}$  后, 再加入盐酸  $10\text{mL}$ , 继续避光沸水浴  $1\text{h}$ ; 取出, 冷却至室温, 分别取二氯甲烷各  $15\text{mL}$  提取两次, 合并有机相用  $0.45\mu\text{m}$  有机滤膜过滤, 用吹氮仪在  $30^\circ\text{C}$  浓缩至近干, 加  $0.5\text{mL}$  流动相溶解备用。吸取浓缩液  $20\mu\text{L}$  注入 HPLC 分析, 在实验条件下, 以保留时间定性, 以校准曲线法分别测定样本中的  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚含量, 样品图谱见图 4。对样品平行测定 5 次, 取其平均值。同时, 在已知浓度样本中, 分别加入一定浓度的  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚和间硝基酚标准混合溶液, 在实验条件下测定, 计算它们各自的加标回收率。回收率实验测定结果见表 3。

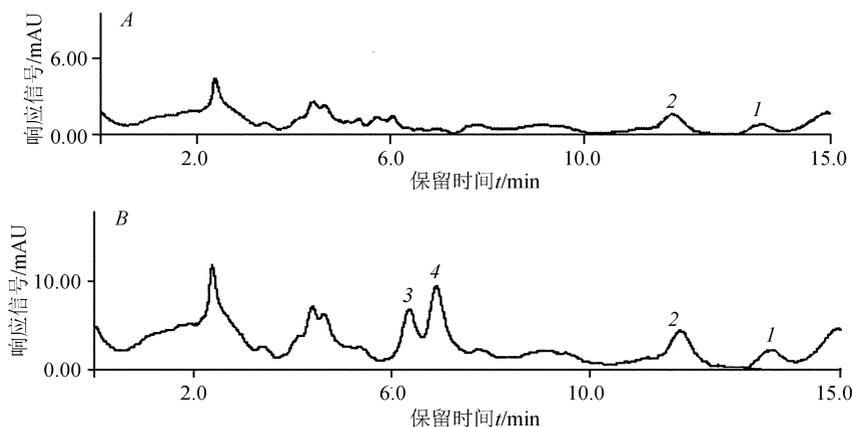


图 4 尿样(A)和尿样加标(B)的色谱图

1— $\alpha$ -萘酚; 2— $\beta$ -萘酚; 3—对硝基酚; 4—间硝基酚。

## 4 结论

本文用反相高效液相色谱法建立了同时测定尿中  $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚、对硝基酚、间硝基酚的新方法, 尿样测定结果满意, 可用于大批量样本的检测。

表 3 回收率测定结果

(n=5)

	测得值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	加标测得值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回收率 (%)	相对标准差 (%)
$\alpha$ -萘酚	0.67	0.80	1.46	98.8	3.1
$\beta$ -萘酚	0.43	0.80	1.26	103.8	3.4
对硝基酚	未检出	0.80	0.78	97.5	—
间硝基酚	未检出	0.80	0.84	105.0	—

## 参考文献

- [1] Peluso M, Srivatanakul P, Munnia A *et al.* DNA Adduct Formation Among Workers in a Thai Industrial Estate and Nearby Residents[J]. *Sci. Total. Environ.*, 2008, **389**(2—3): 283—288.
- [2] Platt K L, Aderhold S, Kulpe K *et al.* Unexpected DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Under Standard Laboratory Conditions[J]. *Mutat. Res.*, 2008, **650**(2): 96—103.
- [3] Sun W, Yang M X, Jiang Q *et al.* Direct Electrocatalytic Reduction of *p*-Nitrophenol at Room Temperature Ionic Liquid Modified Electrode[J]. *Chin. Chem. Lett.*, 2008, **19**(10): 1156—1158.
- [4] Zhao G H, Tang Y T, Liu M C *et al.* Direct and Simultaneous Determination of Phenol, Hydroquinone and Nitrophenol at Boron-Doped Diamond Film Electrode[J]. *J. Chin. Chem.*, 2007, **25**(10): 1445—1450.
- [5] 赵秀娟, 赵艳, 张宇秋等. 尿样中对硝基酚高效液相色谱荧光测定[J]. 中国公共卫生, 2007, **12**(23): 1459—1460.
- [6] 姜汉硕, 张淑琴. 尿中对硝基酚的高效液相色谱测定法[J]. 工业卫生与职业病, 1992, **18**(1): 48—50.
- [7] Preuss R, Angerer J. Simultaneous Determination of 1- and 2-Naphthol in Human Urine Using On-Line Clean-Up Column-Switching Liquid Chromatography-Fluorescence Detection[J]. *J. Chromatogr. B*, 2004, **801**(2): 307—316.
- [8] 蒋淑敏, 傅承光. 痕量硝基酚的反相高效液相色谱电化学检测[J]. 分析化学, 1997, **25**(3): 286—289.
- [9] Ouyang Y F, Wang Y S, Mi X W *et al.* Resonance Light Scattering of 1-Hydroxypyrene-Ethyl-Violet-Anionic Surfactant System and Its Analytical[J]. *J. Anal. Sci.*, 2007, **23**(5): 533—537.
- [10] 王英, 王永生, 曹晓娟等. 高效液相色谱-紫外检测法测定尿中 $\alpha$ -萘酚、 $\beta$ -萘酚和 1-羟基萘[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, **19**(3): 565—566.

## Determination of $\alpha$ -Naphthol, $\beta$ -Naphthol, *p*-Nitrophenol and *m*-Nitrophenol in Human Urine by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

LI Jun-Hong<sup>a,c</sup> LI Gui-Rong<sup>c</sup> TANG Hong-Bing<sup>a</sup>XU Xiao-Yi<sup>a</sup> OUYANG Yun-Fu<sup>a</sup> WANG Yong-Sheng<sup>c</sup> YANG Hong-Mei<sup>b,c</sup><sup>a</sup>(Changzhou Center for Disease Prevention and Control, Changzhou, Jiangsu 213022, P. R. China)<sup>b</sup>(Changzhou Blood Center, Changzhou, Jiangsu 213004, P. R. China)<sup>c</sup>(School of Public Health, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, P. R. China)

**Abstract** A novel method for the determination of  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol, *p*-nitrophenol and *m*-nitrophenol in human urine was established by RP-HPLC. The four objects were separated on Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm, 5 $\mu$ m) using methanol-ammonium acetate buffer solution (*V*:*V*=58:42) as mobile phase and the flow rate was 0.75mL/min. They were detected at 280nm when the column temperature was 35°C. The calibration curves of  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol, *p*-nitrophenol and *m*-nitrophenol showed good linearities in the ranges of 0.120—19.44, 0.106—19.44, 0.479—27.80 $\mu$ g/mL and 0.439—27.80 $\mu$ g/mL, respectively. The RSD were 3.7%—4.3%, 2.4%—3.6%, 2.7%—4.9%, 2.9%—3.6% (*n*=5), respectively. The proposed method was used for the determination of  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol, *p*-nitrophenol and *m*-nitrophenol in human urine. The recoveries of  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol, *p*-nitrophenol and *m*-nitrophenol were 98.8%, 103.8%, 97.5% and 105.0%, respectively. The results are satisfactory.

**Key words** Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography; Naphthol; Nitrophenol; Urine Sample