

【化学测定方法】

HPLC法同时测定工作场所空气中 4种有毒物质

李颖, 李峰, 祝福春

(杭州市萧山区疾病预防控制中心, 杭州 311201)

[摘要] 目的: 建立工作场所空气中芳香族胺类有毒物质苯胺、对硝基苯胺、苯酚、邻硝基苯胺的液相色谱分析方法。方法: 用硅胶管吸附采集, 甲醇解吸, 经 Ultimate XB-C₁₈柱分离, 梯度洗脱, 紫外检测器检测, HPLC标准曲线法定量。结果: 4种有毒物质分离完全, 线性、重现性良好, 方法最低检出浓度为 0.13~0.36 mg/L, 室温条件下样品在硅胶管中至少可稳定保存 7 d。结论: 该方法适合工作场所中多种芳香族胺类有毒物质测定。

[关键词] 工作场所; 高效液相色谱; 苯胺; 对硝基苯胺; 邻硝基苯胺; 苯酚

[中图分类号] R134+.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-8685(2008)08-1542-03

Determination of 4 kinds of toxicants in workplace air by HPLC

Li Ying, Li Feng, Zhu Fu-chen

(Xiaoshan Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 311201, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of aromatic amines of aniline, p-nitroaniline, o-nitroaniline, phenol in workplace air by HPLC. **Methods** The toxicants was adsorbed by silica gel tube sampling and solvent desorption using methanol then analyzed by HPLC with Ultimate XB-C₁₈ column, UVD detector, gradient elution. **Results** The 4 kinds of toxicants were separated well. Good linear relationship, sensitivity and reproducibility were obtained. The limit of detection was 0.13~0.36 mg/L. Silica gel tube sampling could at least store 7 days at ambient temperature and its results still remained stable. **Conclusion** The method is suitable to measure 4 kinds of toxicants in the air at a workplace.

[Key words] Workplace; HPLC; Aniline; P-nitroaniline; O-nitroaniline; Phenol

苯胺、苯酚、对硝基苯胺、邻硝基苯胺作为重要的化工原料广泛用于染料制造、橡胶、制药、塑料、油漆等行业, 生产过程带来污染, 进入人体可造成急慢性中毒, 产生高铁血红蛋白症、神经衰弱、贫血、皮炎等人体危害, 及时开展工作场所上述有害物质的监测十分必要。本文在国家卫生部标准 GBZ/T160.72-2004基础上, 结合本实验室现有条件, 以醋酸胺/甲醇为流动相, 梯度洗脱, 通过选用合适的分离条件, 270 nm紫外检测器可对上述成分同时测定, 所用方法未见报导, 且苯胺、对硝基苯胺的检出限均低于卫生部标准方法, 能够满足分析测试要求。

1 材料与方法

1.1 仪器

HP1100型液相色谱仪(美国惠普, 紫外检测器, 四元脱气泵); 溶剂解吸型硅胶管; 5 ml具塞试管; 微量注射器。

1.2 试剂

甲醇, 色谱纯; 苯胺、对硝基苯胺、邻硝基苯胺、苯酚, 色谱纯, 购自国家标准物质研究中心; 醋酸胺, 0.02 mol/L, 使用前过 0.45 μm 微孔滤膜。

1.3 色谱条件

Ultimate XB-C₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm) 色谱柱; 柱温: 室温; 梯度洗脱; 流量 0.8 ml/min; 进样量 10 μl。

1.4 样品采集

在采样现场用砂轮割开硅胶管两端封口, 将采样管的一端垂直连接到采样器的进气口上, 以 200 ml/min 流量采集 15 min 空气样品。采样后将硅胶管两端用密封帽子封好, 带回实验室。

1.5 分析步骤

1.5.1 样品处理 将采过样的前后段硅胶分别倒入溶剂解吸管中, 各加入 2.0 ml 甲醇, 塞紧管盖, 解吸 30 min, 摇匀, 解吸液供测定。

1.5.2 标准曲线绘制 用甲醇分别将苯胺、对硝基苯胺、苯酚稀释成 0.0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml; 邻硝基苯胺稀释成 0.0, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0 μg/ml 标准系列, 上述标准为混合标准。参照仪器操作条件, 将高效液相色谱仪调节至最佳测定状态, 进样 10 μl 每个浓度重复测定 3 次, 取平均峰面积对相应的待测物浓度 (μg/ml) 绘制标准曲线。

1.5.3 样品测定 按测定标准曲线的操作条件测定样品和空白对照解吸液, 以保留时间定性, 测得的样品峰面积减去空白对照后由回归方程计算样品中待测物浓度。

[作者简介] 李颖 (1970-), 女, 副主任检验师, 主要从事理化检验工作。

1.6 计算

$$X = \frac{(C_1 + C_2) \times V}{V_0 \times D}$$

式中:

- X—空气中有毒物质浓度, mg/m³
- C₁, C₂—测得样品解吸液中有毒物质浓度, μg/ml
- V—解吸液体积, ml
- V₀—标准状况下采样体积, L
- D—平均解吸效率, %

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

卫生部颁标准 GBZ/T 160.72-2004 工作场所空气中芳香族胺类化合物的测定方法中, 采用甲醇为流动相, 250 mm, ODS 柱测定, 在本实验室现有几根 ODS 柱下均不出峰; 根据这 4 种化合物的理化性质及参考资料, 实验中我们采用现有 C₁₈ 柱, 流动相选择甲醇 + 醋酸胺 (0.02 mol/L) 梯度洗脱方式, 并就其配比与时间关系进行多组合实验条件摸索, 确定最佳条件如下:

表 1 梯度洗脱条件

T (min)	0.0	8.0	12.0	16.0	19.0	20.0	21.0
NH ₄ Ac (%)	90	60	30	15	0.0	0.0	90

对 230 250 260 270 280 nm 不同波长进行灵敏度比对试验, 结果显示 270 nm 下可获得上述各物质同时测定的最高灵敏度。

其它实验条件: 室温; 进样量 10 μl 流速 0.8 ml/min, 图 1 为在上述色谱条件下的标准色谱图。

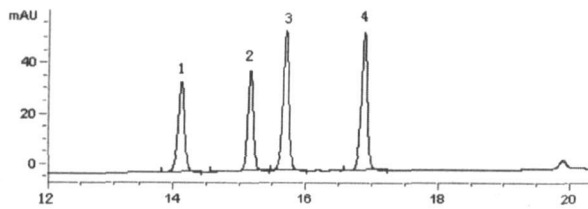


图 1 4种有毒物质混合标准溶液色谱图

1. 苯胺; 2. 对硝基苯胺; 3. 苯酚; 4. 邻硝基苯胺

2.2 方法线性与检出限

取一定量的混合标准液, 用甲醇为稀释液, 按 1.2.3 节的步骤进行测定与统计, 得到的线性方程、相关系数良好。以 3 倍信噪比计算检出限, 若采样体积以 3 L 计可计算出相应最低检出量, 各参数见表 2。

表 2 4种物质的回归分析结果和检出限

项目	保留时间 (min)	回归方程	相关系数 r	检出限 (μg/ml)	最小检出量 (mg/m ³)
苯胺	13.97	Y = 11.87X + 12.8	0.9980	0.43	0.29
对硝基苯胺	14.93	Y = 11.41X + 4.27	0.9999	0.54	0.36
苯酚	15.53	Y = 16.34X + 2.98	0.9999	0.48	0.32
邻硝基苯胺	16.73	Y = 33.15X + 6.23	0.9974	0.19	0.13

2.3 方法精密度试验

取线性范围内的低、高两个浓度在 5 d 内进行 6 次重复测定, 测定结果见表 3。

表 3 4种物质的精密度试验 (n = 6)

项目	苯胺	对硝基苯胺	苯酚	邻硝基苯胺
平均值 (μg/ml)	1.05 19.9	0.981 20.2	0.992 20.1	0.510 9.96
标准偏差 (μg/ml)	0.043 0.54	0.032 0.61	0.039 0.36	0.018 0.10
精密度 RSD (%)	4.1 2.7	3.3 3.0	3.9 1.8	3.6 1.0

2.4 解吸效率试验

将空白硅胶管分 2 组, 每组 6 支, 加入低、中 2 个浓度的混合标准溶液, 迅速套好密封套, 放置 2 h 平衡, 按样品管测定, 同时做空白管, 计算解吸率, 结果见表 4。

表 4 4种物质的解吸效率试验 (n = 6)

项目	加入量 (μg)	测得量 (μg)	解吸效率 (%)	RSD (%)
苯胺	2.0	1.75 ± 0.089	87.5	5.1
	20.0	18.52 ± 0.87	92.6	4.7
对硝基苯胺	2.0	1.97 ± 0.179	98.5	9.1
	20.0	21.78 ± 1.13	108.9	5.2
苯酚	2.0	1.98 ± 0.075	99.0	3.8
	20.0	20.02 ± 0.64	100.1	3.2
邻硝基苯胺	1.0	0.94 ± 0.059	94.5	6.3
	10.0	9.81 ± 0.49	98.1	5.0

2.5 稳定性试验

取空白硅胶管, 分为 5 组, 每组 3 支, 用微量注射器向各硅胶管内加入 10 μg 混合标准, 立即将管的两端套好密封套, 在室温下存放, 分别于当天、第 1、3、7、15 天进行测定, 计算下降率, 详见表 5。试验结果表明样品保存 7 d 内, 组分含量下降率 < 10%, 样品在室温下至少可稳定保存 7 d。

表 5 稳定性试验 (n = 3, m = 5)

放置时间 (d)	0	1	3	7	15	
加入量 (μg)	10	10	10	10	10	
苯胺	测得量 (μg)	9.63	9.52	9.47	9.36	8.17
	回收率 (%)	96.3	95.2	94.7	93.6	81.7
对硝基苯胺	测得量 (μg)	10.07	10.06	10.03	9.96	8.55
	回收率 (%)	100.7	100.6	100.3	99.6	85.5
苯酚	测得量 (μg)	9.99	10.01	9.98	9.88	9.10
	回收率 (%)	99.9	100.1	99.8	98.8	91.0
邻硝基苯胺	测得量 (μg)	9.82	9.89	9.78	9.74	8.68
	回收率 (%)	98.2	98.9	97.8	97.4	86.8

2.6 干扰试验

考虑工作场所现场共存原材料、成品、半成品污染空气中可能含有硝基苯、对硝基苯、甲基苯胺、二甲基苯胺、间苯二酚、对苯二酚等其它芳香族化合物, 模拟现场配制上述物质的

(下转第 1550 页)

表 4 各物质的回收率实验结果 (n=7)

成分	加标量 (μg)	测定值 (μg)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
氢醌	5	4.96	99.2	1.20
	50	51.3	102.6	1.34
苯酚	5	5.13	102.6	2.19
	50	53.5	107.0	1.34
土霉素	14	14.8	105.7	1.26
	140	138	98.6	1.67
盐酸四环素	15	15.7	104.7	1.63
	150	152	101.3	1.21
金霉素	5	5.72	114.4	1.72
	50	55.3	110.6	1.13
氯霉素	10	9.36	93.6	2.84
	100	98.5	98.5	2.06
甲硝唑	5	4.26	85.2	1.77
	50	48.8	97.6	1.21
苯甲酸	5	4.90	98.0	0.57
	50	51.7	103.4	0.75
山梨酸	5	4.92	98.4	0.92
	50	51.4	102.8	0.65
对羟基苯甲酸甲酯	10	10.11	101.1	1.21
	100	103	103.0	1.25
对羟基苯甲酸乙酯	10	10.11	101.1	1.21
	100	106	106.0	1.16

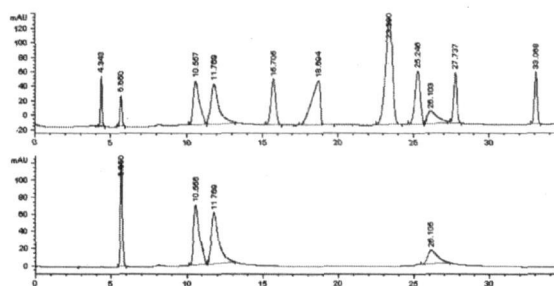


图 1 11种物质的双通道波长的标准 HPLC 色谱图

(上接第 1543 页)

混合标准溶液,在本方法条件下 4种目标物质均能与其它组分良好地分离,共存组分不干扰测定。

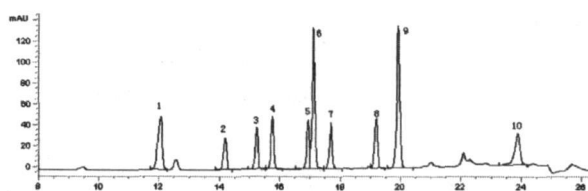


图 2 干扰试验色谱图

1. 间苯二酚; 2. 苯胺; 3. 对硝基苯胺; 4. 苯酚;
5. 邻硝基苯胺; 6. N-甲基苯胺; 7. 硝基苯;
8. 对硝基甲苯; 9. N,N-二甲苯胺; 10. 对苯二酚

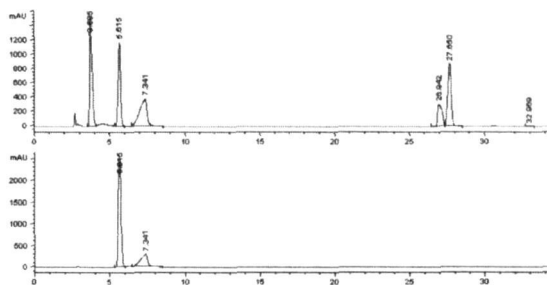


图 2 样品的 HPLC 色谱图

3 小结

本次实验用甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH=4.35) 作为流动相进行梯度洗脱, 能够使氢醌、甲硝唑、四环素、土霉素、苯酚、苯甲酸、山梨酸、氯霉素、盐酸金霉素、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯等 11 种物质得到良好的分离, 且操作简单、方便, 可为化妆品质量监督时提供有力的技术支持。

[参考文献]

- [1] 郑星泉, 周淑玉, 周世伟. 化妆品卫生检验手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 吴大南, 郑和辉, 杨丽华, 等. 祛痘除鳞类化妆品中检出抗生素情况的调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006 16(2): 216-217.
- [3] 化妆品卫生规范 [S]. 2002.
- [4] 杨红, 刘秋华. 化妆品中的氢醌、苯酚确认方法 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005 15(5): 550-551.
- [5] 白艳玲, 张彩虹, 陈剑刚. 化妆品中 8 种防腐剂同时测定的气相色谱法 [J]. 环境与健康杂志, 2004, 21(3): 170-171.
- [6] 刘刚, 赵刚, 王小芳. 气相色谱法分析化妆品中防腐剂 [J]. 色谱, 2002, 20(3): 274-276.
- [7] 刘秋华, 张玉黔, 赵晶, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中的氢醌、苯酚 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(6): 713.
- [8] 靳克林. 高效液相色谱法测定化妆品中防腐剂 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005 15(3): 317.
- [9] 聂西度, 谢华林, 彭书萍. 高效液相色谱法测定化妆品中防腐剂的研究 [J]. 分析科学学报, 2005, 21(2): 231-232.

(收稿日期: 2008-03-31)

3 结论

硅胶管采样, 甲醇解吸后应用高效液相色谱梯度洗脱测定苯胺、苯酚、邻硝基苯胺、对硝基苯胺, 此方法简单, 重现性好, 精密度高, 解吸率高, 抗干扰强, 各试验参数均满足职业卫生检测要求, 适用于工作场所空气中上述 4 种有害物质的测定。

[参考文献]

- [1] GBZ/T160.72-2004. 工作场所空气有毒物质测定芳香族胺类化合物 [S].
- [2] WS1-1996. 车间空气有毒物质测定采样规范 [S].
- [3] WS/T73-1996. 车间空气有毒物质测定研究规范 [S].

(收稿日期: 2008-03-11)