

尿中肌酐的苦味酸分光光度法

1 原理

尿中肌酐在碱性条件下，与苦味酸反应生成橙红色苦味酸肌酐，在490nm波长下，用分光光度法测定。

2 仪器

- 2.1 塑料瓶，50ml。
- 2.2 具塞比色管，10ml。
- 2.3 容量瓶，10ml，100ml。
- 2.4 分析天平，感量：0.01mg。
- 2.5 数显分光光度计，5mm比色皿。

3 试剂

- 3.1 盐酸（ $\rho_{20}=1.19\text{g/ml}$ ），优级纯。
- 3.2 苦味酸（ $\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO}_2)_3$ ），分析纯。
- 3.3 氢氧化钠（NaOH），分析纯。
- 3.4 肌酐（ $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ ），优级纯。
- 3.5 盐酸溶液（0.1mol/L）：取4.2ml盐酸，加水稀释至500ml。
- 3.6 饱和苦味酸溶液（约15g/L），临用前过滤。
- 3.7 氢氧化钠溶液（100g/L）：称取50g氢氧化钠，用去离子水溶解并稀释至500ml。
- 3.8 碱性饱和苦味酸溶液：临用前按10:1的比例将饱和苦味酸上清液与氢氧化钠溶液混合。
- 3.9 肌酐标准贮备液[$\rho(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})=1.00\text{g/L}$]：准确称取100.00mg肌酐（经110℃干燥2h），加盐酸溶液使其溶解，定量转移入100ml容量瓶中，并用盐酸溶液稀释至刻度。此溶液为1.00mg/ml肌酐标准贮备液。该贮备液置于冰箱4℃冷藏保存可稳定6个月。
- 3.10 肌酐标准应用溶液[$\rho(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})=0.100\text{g/L}$]：将肌酐标准贮备液用水稀释成0.100g/L标准应用溶液。该应用液置于冰箱4℃冷藏保存可稳定1个月。

4 样品的采集、运输和保存

依据《职业卫生生物监测 总则》进行样品采集。采集后的尿液室温运输。4℃条件下保存样品有效期为14天。

5 分析步骤

5.1 仪器操作参考条件

波 长：490nm

比色皿：5mm

5.2 标准曲线的配制和测定

取6支10ml比色管，分别加入标准应用液0ml~1.80ml，用水补足3ml，配成肌酐含量为0 μg ~180 μg 的标准系列溶液。向各管加入2.00ml碱性苦味酸溶液，混匀。于室温下反应20~30min。加水至10ml，混匀后测定。以标准系列0管为参比，于490nm下测定吸光度值。以各标准系列溶液的吸光度值与肌酐含量（ μg ）计算回归方程。

5.3 样品处理和测定

将尿样放至室温混匀，取尿样50 μl 于10ml具塞比色管中，加水3ml。以下步骤同标准系列。用测定标准系列溶液的操作条件，测定样品空白和样品溶液，由回归方程计算出所取尿中肌酐的含量（ μg ）。

6 计算

6.1 按式（1）计算样品中肌酐的浓度：

$$C = \frac{m}{v} \quad \dots \dots \dots (1)$$

式中：C 一样品中肌酐的浓度，g/L；

m — 由回归方程计算得到的所取尿样中肌酐的含量, μg ;

v — 样品测定时所取尿样的体积, μl 。

6.2 按照肌酐或比重校正方法对样品结果进行校正。

7 说明

7.1 方法最低检出限为 $2\mu\text{g}$ (即 0.04g/L) , 定量下限 $4\mu\text{g}$ (即 0.08g/L) ; 方法线性范围为 $2\mu\text{g}\sim 180\mu\text{g}$ (即 $0.04\text{g/L}\sim 3.60\text{g/L}$, 以样品取样体积 $50\mu\text{l}$ 计算)。方法批内精密度范围为 $0.8\%\sim 4.6\%$ (肌酐浓度为 $0.4\text{g/L}\sim 2.8\text{g/L}$), 批间精密度范围为 $2.0\%\sim 4.5\%$ (肌酐浓度为 $0.6\text{g/L}\sim 3.9\text{g/L}$) ; 方法加标回收率范围为 $97.0\%\sim 102.3\%$ (肌酐加标浓度为 $0.4\text{g/L}\sim 1.1\text{g/L}$) 。本法测定中的最小取样量为 $50\mu\text{l}$ 。

7.2 尿样中含有 0.1mg/L 的镍、汞、硒、钒, 0.2mg/L 的铬, 0.3mg/L 的杀虫脒, 0.4mg/L 的镉、对硝基酚, 0.6mg/L 的铅、砷, 1mg/L 的马尿酸及甲基马尿酸, 1.6mg/L 的 2-硫代噻唑烷-4-羧酸, 2mg/L 的氟, 3mg/L 的酚, 100mg/L 的三氯乙酸, 400mg/L 的扁桃酸, 1000mg/L 的苯乙醛酸, 不干扰测定。

7.3 反应温度、苦味酸纯度及其浓度、氢氧化钠浓度均对测定值有影响。反应温度必须控制在 30°C 以下。测定样品的同时制备标准曲线。加水至 10ml 混匀后应尽快完成标准和样品的测定, 从最先开始测定至最后一个样品结束, 整个比色过程必须控制在 30min 内完成。

7.4 由于标准曲线的最高点吸光度超过1, 为保证结果的准确, 应采用数字显示的分光光度计。如果没有 5mm 的比色皿, 也可以采用 10mm 的比色皿, 但此时标准曲线的上限只能做到 $100\mu\text{g}$ 。

(深圳宝安区疾病预防控制中心 尹江伟 武汉市职业病防治院 江金凤 宋为丽 中国预防科学研究院劳动卫生与职业病研究所 虞爱如)