

尿磷测定方法的研究

陈世惠

磷及其化合物侵入人体后,在体内被分解为无机磷,少量从呼吸道及汗腺中排出,主要来自肾脏随尿液排出体外,从而使尿液中磷含量增高^[1,2,3]。尿磷测定结果有助于磷中毒的诊断。我们参照文献^[3],结合具体条件对尿中无机磷的测定方法进行了探讨,现将结果报告如下。

1 实验方法

1.1 原理

用三氯乙酸沉淀尿液中蛋白质,加入钼酸试剂与磷生成磷钼酸,再用氨基萘酚磺酸还原成钼蓝,按其显色强度进行比色定量。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 721型分光光度计。

1.2.2 试剂 (1) 标准溶液:称取磷酸二氢钾2.1940克用蒸馏水溶解并稀释至500ml,此液1ml \approx 1mg磷,再配成1mg \approx 40 μ g的应用液。(2) 5%三氯乙酸。(3) 10mol/L硫酸溶液:取浓硫酸14ml,加入50ml蒸馏水内,冷却后再稀释到100ml。(4) 钼酸铵溶液:取钼酸铵3克,溶于10mol/L硫酸溶液84ml内,加水稀释到100ml。(5) 氨基萘酚磺酸试剂:取亚硫酸氢钠6.57克溶于少量水中,加氨基萘酚磺酸0.1克及无水亚硫酸钠1.2克,溶解后稀释到100ml,过滤备用。

1.3 分析步骤

1.3.1 标准曲线的制备 取6支10ml的比色管按表1制备标准系列。

表1 标准工作曲线制备

编号	1	2	3	4	5	6
标准应用液 (ml)	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
5%三氯乙酸 (ml)	4.00	3.95	3.90	3.80	3.70	3.60
钼酸铵溶液 (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氨基萘酚磺酸试剂 (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷含量 (μ g)	0	2	4	8	12	16

将各管充分混匀,在20~30 $^{\circ}$ C室温下放置30分钟,于波长66nm下用1cm比色皿,以蒸馏水为参比液,测定吸光度。以磷含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.2 尿样的分析 取比重为1.010~1.030的尿样1ml加水9ml混匀后取0.2ml于10ml比色管内,加5%三氯乙酸至5ml,混匀,静置10分钟取上清液4ml于另一支10ml比色管内,加钼酸铵溶液1ml及氨基萘酚磺酸试剂1ml,混匀于20~30 $^{\circ}$ C室温下放置30分钟,测量吸光度。

1.3.3 尿磷的计算 由标准曲线求得磷含量,计算公式为

$$\text{尿磷 (mmol/L)} = \frac{\text{磷含量 (mmol)}}{\frac{1}{10} \times 0.2 \times \frac{4}{5} (\text{L})}$$

2 结果与讨论

2.1 尿样的稀释

取晨尿分别稀释5倍、10倍、20倍,测量结果显示,尿液稀释5倍尿磷值过高吸光度测量值不准确,稀释20倍尿磷值太低无法检出,尿液稀释10倍为宜。

2.2 酸度对显色的影响

已还原的磷钼酸络合物之蓝色强度是随H₂SO₄浓度的改变而改变的,其络合物之稳定性随pH之变化而不同,硫酸浓

度增大时,颜色强度有规律地下降^[3]。硫酸浓度对尿磷测定的灵敏度、重现性影响很大。取若干份正常尿混匀后分为4组,加入不同量的磷标准液,分别用20、15、10、5mol/L的硫酸配制钼酸铵溶液,进行显色条件的对照试验,结果表明用10mol/L的硫酸配制钼酸铵试剂显色稳定,能满足尿磷测定所要求的酸度。

2.3 氨基萘酚磺酸用量的选择

各取0.2ml标准液(含磷8 μ g)按本法操作,分别加入0.5、1.0、1.5、2.0ml氨基萘酚磺酸溶液,结果显示:氨基萘酚磺酸用量0.5ml时吸光度值最低,用量1.0、1.5、2.0ml读数趋于稳定,加入1ml氨基萘酚磺酸溶液能使尿磷测定中的磷钼酸完全还原成钼蓝,用量不足,还原不完全。

2.4 方法的线性、检测限和精密度

连续4天按标准曲线的制备进行测定,测定范围0~16 μ g,以吸光度的均值与其对应的磷含量绘制标准曲线,并作直线回归处理,回归方程为: $\hat{y} = 0.0099 + 0.246x$, $r = 0.9997$,检测限为0.067 μ g/ml,计算低、中、高三种浓度的标准差和变异系数,结果见表2。

2.5 回收率试验

取已知磷含量的尿样,分别加入不同量的标准液,按本法进行测定,回收率在92.9%~105.3%,结果见表3。

表2 精密度测试结果

磷 (μg)	吸光度				平均值	CV(%)
2	0.060	0.058	0.064	0.059	0.060	4.3
8	0.203	0.198	0.212	0.207	0.205	2.9
16	0.402	0.398	0.408	0.397	0.401	1.2

2.6 尿样预处理实验

连续3天上、下午取尿样分为两组, 一组用硝酸-高氯酸湿法消化后取样, 一组不消化直接取样, 两组同时用本法测定, 结果见表4. $P > 0.05$, 尿液消化与未消化差异无显著意义。

表4 尿液未消化与消化测定结果

分 类	尿 磷 均 值 (mmol/L)						t 值	P 值
	1	2	3	4	5	6		
未消化组	8.47	11.26	16.11	19.97	23.92	27.78	0.436	> 0.05
消化组	8.96	11.51	14.96	20.96	22.93	29.34		

2.7 样品稳定性试验

用聚乙烯瓶收集比重1.010~1.030的尿样, 加硝酸使其酸化, 酸浓度为1%。将样品分为3组放置于4℃冰箱中, 观

察尿中磷含量的稳定性。于当天, 第3天, 第7天各取一组分析计算各组均值, 相对偏差在10%以内, 尿液经酸化贮于4℃冰箱中可保存一周, 结果见表5。

表5 样品稳定性试验结果

	尿 磷 值 (mmol/L)								均值	相对偏差 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
第1天	8.82	11.10	12.33	16.60	16.85	20.55	24.65	29.58	17.56	—
第3天	8.47	11.42	12.09	15.45	15.29	20.22	23.42	25.15	16.44	6.4
第7天	8.72	11.51	12.91	16.44	16.77	19.23	23.67	28.76	17.25	1.8

2.8 样品干扰试验

根据磷化物作业现场情况及尿中所含的主要微量元素 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{++} 、 Zn^{++} 等对本法测定磷无干扰。乳糜尿、蛋白尿取样稀释后加三氯乙酸出现浑浊, 离心沉淀后可消除干扰。

2.9 实际应用

使用本法做了32例未接触磷与60例接触磷化物工人的尿磷对照试验, $t = 2.44$, $P < 0.05$, 显然未接触磷化物者与接触磷化物工人的尿磷测量值之差异有显著意义, 见表6。

表6 未接触组(I)与接触组(II)尿磷值

分组	例数	范 围	均数	95%上限	t 值	P 值
I	32	5.59~28.04	16.34	27.73	2.44	< 0.05
II	60	5.76~46.23	23.67	40.46		

3 小结

目前尿磷测定多采用自动生化分析仪, 但仪器昂贵不易普及。本文对分光光度法测定尿磷进行了探讨, 实验表明: 尿中无机磷的测定, 尿液不需要消化处理可直接取样分析, 尿液酸化贮于4℃冰箱可保存一周, 取晨尿测定尿磷尿液稀释以10倍为宜; 用10mol/L的 H_2SO_4 配制钼酸铵显色效果较为理想, 显色时间以25℃30分钟为宜; 氨基萘酚磺酸试剂还原稳定, 用量1ml能满足尿磷测定的要求。本法操作简便, 重现性良好, 未接触磷与接触磷化物工人的尿磷测量值有显著差

异。

4 参考文献

- 1 吴执中, 主编. 职业病(上册). 北京: 人民卫生出版社, 1982. 223
- 2 李树林, 编. 毒物的毒理与毒物分析. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 189
- 3 周恒铎, 主编. 职业中毒检验. 北京: 人民卫生出版社, 1976. 12, 334

(收稿: 1998-11-24 修回: 1999-02-10)