

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

三氣甲烷之生物偵側方法研究

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CNIS92-09

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：李美貴

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：職業安全衛生系

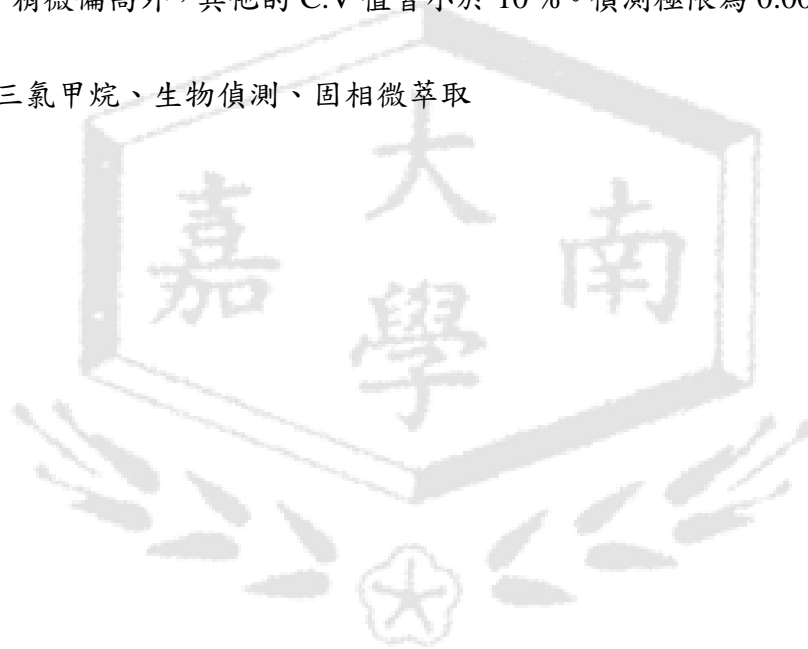
中華民國 93 年 02 月 29 日

## 壹、摘要

三氯甲烷之在工業上應用相當的廣泛，由 Miller 研究指出三氯甲烷經吸收分佈及代謝後，60%是經由呼出 CO<sub>2</sub> 氣體排出，25%是由尿液排出，其中尿液中未活化代謝物三氯甲烷存在尿液尚存有一定比例。本實驗即以尿液中三氯甲烷為生物暴露指標物(BEI)並且利用固相微萃取技術(SPME)為主要的樣品前處理步驟，具有整合萃取及注入分析之裝置等優點。

以 PDMS/DVB 浸入添加 300mgNaCl 的尿液中振盪吸附 30min 後，以 GC/FID 分析之。結果顯示，線性範圍從 0.01~0.3 ppm，R<sup>2</sup> 達 0.996。從尿液、去離子水及混合尿液之檢量線計算各配製濃度之相對回收率均在 73%~98%，所以本實驗三氯甲烷的濃度範圍為 0.01~0.3 ppm 應無明顯的基質效應；但高濃度時可能會有明顯基質效應的發生。而樣品之穩定性分析結果，除低濃度 0.02 ppm 的 C.V 值為 10.1 % 稍微偏高外，其他的 C.V 值皆小於 10 %。偵測極限為 0.0002 μg/mL。

關鍵字：三氯甲烷、生物偵測、固相微萃取



## 貳、實驗內容

### 2.1 實驗設備與材料

#### 2.1.1 藥品

本實驗使用藥品為三氯甲烷(chloroform, 99%, Merck)、NaCl (sodium chloride, GR 級, Merck)

#### 2.1.2 儀器設備及條件

以 HP-5890 型氣相層析儀(GC)連接 HP-5972A 質譜儀(MS)，GC 所使用之分離管柱為 HP-WAX 毛細管柱，60m 長  $\times$  0.25mm 管徑，膜厚 0.25  $\mu$ m。氣相層析儀注入口溫度為 250°C，昇溫條件為起始溫度為 50°C 維持 1 分鐘，加熱至 120°C 維持 1 分鐘後，以每分鐘 20°C 上升至 210°C 後，終溫停留 1 分鐘。載流氣體為高純度氦氣，流速為 1 mL/min。質譜儀檢測器溫度為 280°C，採用 70eV，電子撞擊游離方式分析，掃瞄質量範圍  $m/z$  為 40~250。

#### 2.1.3 固相微萃取法裝置及條件

以 SUPELCO 的 Solid Phase Microextraction Holder 57331 連接 SUPELCO 的 Solid Phase Microextraction Fiber，本實驗採取頂空萃取法，攪拌石轉速為每分鐘 1000 轉，萃取時間為 30 分鐘，熱脫附時間至少 3 分鐘(視情況需要調整)。

#### 2.1.4 SPME-fiber 之種類

以 PDMS(100  $\mu$ m)、PA(85  $\mu$ m)、PDMS/DVB(65  $\mu$ m)、CAR/PDMS (75  $\mu$ m)、CW/DVB(65  $\mu$ m)、DVB/CAR/PDMS(50/30  $\mu$ m)等 fiber 進行實驗分析。

### 2.2 尿液的處理及保存

將樣本收集在裝有收集容器內，混合均勻，利用含有冷凍劑的收集器來運送，冷藏於冰箱，使樣本在分析前能維持在 4°C。

### 2.3 實驗步驟

#### 2.3.1. 樣品處理

取 2-mL 的樣本於含有鐵氟龍攪拌子的 4ml 玻璃小瓶，加入 1.4g 的 NaCl 混和均勻，以矽膠墊片蓋鎖緊，置入溫度穩定之鋁製加熱器加熱。此時將 fiber 插入樣品基質中吸附以達平衡，完成吸附平衡後取出 fiber，注入 GC 注射口進行高溫脫附，並分析之，如圖。Fiber 在插入樣品瓶之前須先進行調態程序(condition)將 fiber 於高溫脫附一定時間，以清除 fiber 內的雜質。

#### 2.3.2. 檢量線製作

加已知量的三氯甲烷標準品於空白尿液樣品中，所建立之檢量線濃度範圍約為 0.001 to 0.3  $\mu$ g/mL，至少配製 5 種不同濃度的標準溶液，以建立檢量線。將標準溶液與試藥空白樣品一起分析，以分析物的波峰面積對分析物的濃度，繪製檢量線。

## 三、結果與討論

### 3.1 最佳萃取條件

#### 3.1.1 披覆固定靜相之種類

影響 SPME 萃取效率的因子包括披覆固定靜相之種類、靜相膜厚、萃取時

間及添加物等。為了比較不同 SPME 披覆固定靜相間萃取效率差異，本研究以市售之五種 fiber 種類進行吸附量測試，其中包括 PDMS、PA、PDMS/DVB、CAR/PDMS 及 CAR/PDMS/DVB。分別於室溫下振盪吸附樣品溶液後，取出 fiber 注入氣相層析儀脫附，脫附溫度依廠商建議不同 fiber 的參考溫度範圍內進行，結果相對吸附效率以 CAR/PDMS 的吸附量最高，PDMS, PA, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS 次之，相較而言以 PDMS 及 PA 兩種 fiber 吸附三氯甲烷幾乎測不到訊號。以 CAR/PDMS 為吸附靜相時之分析物在小孔隙中會發生毛細凝聚現象，使得分析物在此吸附表面不是單層吸附，因此這類型的靜相對三氯甲烷有較高的萃取效率。本研究即選用以 CAR/PDMS 為吸附靜相來分析尿液中三氯甲烷。

### 3.1.2 平衡吸附溫度

平衡吸附之萃取過程中牽涉此兩因素互相競爭，受動力學與熱力學影響，一般溫度增加有利於吸附平衡時間之達成，且使樣品分析物揮發量增加，但亦會造成已吸附於靜相之分析物加速脫附而出，因此選擇適當的溫度是頂空萃取之必要條件。本實驗測試溫度有 30、40、50、60 及 80，結果顯示溫度使 fiber 吸附量隨之增加，但由於並無明顯差異，在兼顧吸附效率及避免溫度太高造成其他較不易揮發之干擾物同時揮發吸附，影響分析測定之判斷，本實驗選擇以 30°C 為頂空萃取分析之溫度。

### 3.1.3 吸附平衡時間

吸附平衡時間是為了建立 fiber 與樣品基質間的分配平衡而所需要的平衡時間，此時間主要基於分析物之動力學速率常數(kinetic rate constant)，受樣品攪拌方式與溫度而有所影響。

取含三氯甲烷之上層澄清尿液 2 mL 置於 4 mL 小瓶子，以 CAR/PDMS 靜相插入樣品瓶進行頂空吸附，分別以 5、10、20、30、40、50 及 60 min 進行吸附測試，所得的吸附平衡時間曲線圖。由圖中可知，DCM 在 10 min 時已趨於平穩狀態，因此選用 15 min 之吸附平衡時間為本實驗的吸附平衡時間。

### 3.1.4 脫附溫度

將含三氯甲烷之尿液，以 CAR/PDMS 靜相頂空吸附 15 min 後注入氣相層析儀脫附，依廠商建議的脫附溫度範圍，選擇溫度 240°C、250°C、260°C、280°C 及 300°C 進行脫附，結果顯示不同的脫附溫度的相對吸附訊號在 70~100% 之間。一般而言若達相當的脫附溫度下，脫附溫度與吸附量無關。因 300°C 為調態(condition)溫度，顧及 fiber 使用壽命下，因此以 250°C 作為本實驗氣相層析儀的脫附溫度。

### 3.1.5 鹽類效應

添加鹽類可增加離子強度使不會解離的有機物在樣品中溶解度降低，強迫進入 fiber 中被吸附，提高萃取效果。本實驗選用常見的鹽類 NaCl 分別添加於含三氯甲烷之尿液中，以 CAR/PDMS 靜相吸附，氣相層析脫附。由結果可知，待測物吸附量會隨著 NaCl 的添加增加而增加，其中添加 NaCl 比未添加 NaCl 的吸

附量高 30%。而由實驗測試三次結果觀察其穩定性非常良好。由於添加 1.4 g 的 NaCl 於尿液中幾乎已達到過飽和，為免樣品基質不同而有所影響鹽類溶解程度不一，因此本實驗以相當於飽和的 1.4g NaCl 添加至樣品尿液中來增加 fiber 吸附量作樣品分析。

### 3.2 分析方法的適用性

為避免殘留及交插干擾之影響，所有 fiber 在分析標準溶液及樣品分析前均做空白分析。由空白尿液層析圖譜顯示沒有與添加三氯甲烷尿液樣品之三氯甲烷有重疊干擾之訊號；而以 GC/MS 分析之全質譜圖譜掃瞄亦可以很容易地從圖譜庫搜尋，對含三氯甲烷尿液樣品定性確認。

為對方法的適用性確認，本研究再以下列的方式驗證

#### 3.2.1 檢量線範圍建立

以 CAR/PDMS 靜相對含不同濃度之三氯甲烷尿液溶液進行吸附平衡測試，將三氯甲烷濃度與測得吸附量作圖。由圖知，濃度 0.001 to 0.3  $\mu\text{m}/\text{mL}$  與吸附量才有線性關係，此時  $R^2$  亦可達 0.996，而高濃度時吸附量不再隨濃度增加而有等量增加，反而趨於平緩，推測原因為靜相 fiber 吸附位置之吸附分析物數量有限，當分析物濃度過高佔滿吸附位置時，fiber 表面積將因吸附趨於飽和而不再增加吸附，致所測得分析物不再隨濃度增加而增加反而趨於平緩。

#### 3.2.2 基質效應

為了解尿液樣品之基質效應 (matrix effect) 是否會造成分析上的干擾，因此本實驗將三氯甲烷分別配製在尿液及去離子水溶液中，三氯甲烷的濃度範圍均為 0.002 to 0.3  $\mu\text{m}/\text{mL}$  之間進行基質效應的測試。結果檢量線幾乎為重疊同一條線。尿液配製的檢量線  $R^2$  達 0.9994；去離子水溶液配製的檢量線  $R^2$  達 0.9999 及，所以在本實驗並無存在基質效應之問題。

#### 3.2.3 樣品添加回收率及穩定性

將尿液中添加濃度分別為 0.006, 0.02, and 0.1  $\text{mg}/\text{l}$  之三氯甲烷作為添加樣品回收率及穩定性之測試。以尿液配製之檢量線計算推得樣品之回收率分析結果如表 2 所示，其中所得之%回收率在 73 - 98 % 間。穩定性分析結果 C.V 值皆在 10 % 左右，穩定性相當良好，此結果顯示此方法適宜分析尿液中三氯甲烷。

#### 3.2.4 偵測極限

將含三氯甲烷濃度 0.006  $\text{mg}/\text{l}$  之尿液重複分析七次，計算得訊號波峰面積之標準偏差 (standard deviation, SD)，取三倍的標準偏差，推估方法偵測極限 (LOD)，所得到的 LOD 為 0.0002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此結果顯示此方法足以對暴露在三氯甲烷環境下勞工之生物代謝尿液分析。