嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

尿液中胱胺酸的含量分析

計畫類別：□個別型計畫　　√□整合型計畫

計畫編號：CNOS9510

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

子計畫主持人：李美貴

共同主持人：郭玉萍、黃春美、葉錦芬

執行單位：職安系、醫化系

中　華　民　國　96　年　2　月　26　日

關鍵字：urine, biological monitoring

前言

從尿液、血漿、淚液、水疱內體和微透析組織液等生物流體中分析藥物及其代謝物的含量有助於了解藥物化學的機制，是一很重要的研究領域。例如 Horstkötter 等人[20]以 CE-LIF 和 LC-MS 分離和鑑定尿液中短效型安眠藥(zaleplon)的代謝物；Chang 等人[21]則以 CE-LIF 結合氰化甲烷堆疊技術(acetonitrile stacking technique)應用於血漿中抗癲間藥物(gabapentin, GBP)的分離等；本研究群也曾參與勞工安全衛生研究所建立如尿液中丙烯 腈偵測、二異氰於酸甲酯之偵測方法開發[23]。因為生物檢體中各種代謝產物含量的多寡可以作為人體健康的指標，例如在尿液中不正常濃度的胱胺酸(Cystine)，臨床醫學診斷上代表病患得到胱胺酸尿症(Cystinura) [22]。但一般生物檢體基質複雜且因來源不同內含物分佈變異大，因此需以適當前處理技術將樣品簡單化，所以子計畫(4)擬配合 RTILs 的特殊萃取能力，應用於尿液中胱胺酸含量測定。

實驗設備與材料

1. 藥品

異戊醇(99 ％)：購於 Merck。

乙醇(95％)：購於 Riedel-deHaën。

無水硫酸鈉：購於 Riedel-deHaën。

2. 儀器設備

氣相層析質譜儀(Gas Chromatography Mass Selective Detector)：GC－6890N(G1530N)，Mass－5973 Network，Agilent Technologies。

自動熱脫附儀(Automated Thermal Desorber)：Turbo Matrix ATD，博精儀器股份有限公司。

攪拌石(Stir bar) ：GC 11333 01， Agilent Technologies。

脫附管(Desorptive Tube)：L427-0128，博精儀器股份有限公司

電磁加熱攪拌器：MR 2002，Heidolph

3.儀器條件

ATD 條件

載流氣體(Carry Gas)：氦氣

推動氣體(Impetus Gas)：氮氣

載流氣體壓力：(Carry Gas Pressure)10.0 psi

門閥(Valve)：200 ℃

脫附管溫度(tube temp)：250 ℃

捕集溫度(trap temp)：40 ℃

捕集溫度上下限：最高溫：300 ℃，最低溫：-30 ℃

總分流比(Total split)：4：1

GC 條件

分離管柱：DB-WAX 管柱，0.25 mm 管徑 ×30 長 mm，膜厚 0.5 μm。

流速：1 mL/min。

起始溫度：45℃

滯留時間：2 min

第一階段每分鐘升溫溫度：5℃

中溫溫度：120℃

滯留時間：2 min

第二階段每分鐘升溫溫度：5℃

最終溫度：220℃

滯留時間：10 min

Mass 條件

溫度：280 ℃

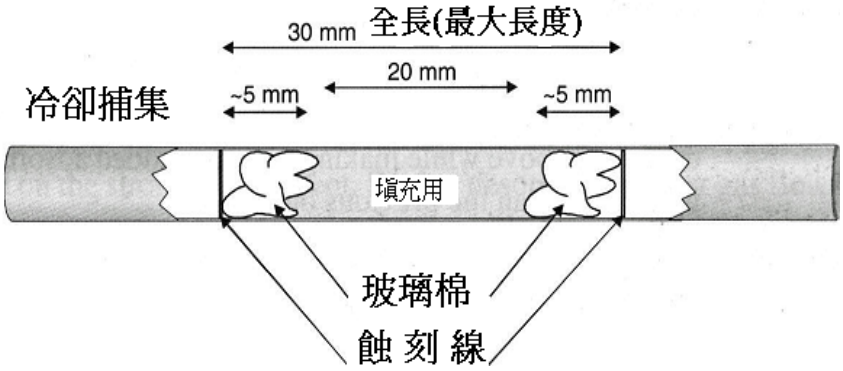
偵測原子量：35~500 amu

4. 實驗步驟

4.1 調態程序（condition）

首先將 stir bar 進行調態程序（condition）清除 stir bar 上的雜質，將 stir bar 先以二次水清洗並置入不鏽鋼 tube 中，在 stir bar 的兩邊填充適量的高級玻璃棉，在玻璃棉旁在各放入一層鐵網，最後兩邊各自蓋上同蓋或鐵氟瓏蓋(如下圖所示)。以二段式脫附法利用氣相層析儀

的高溫將從 SBSE 脫付出的雜質經高燒去除乾淨。



4.2 進行吸附分析

將 stir bar 先以二次水清洗，然後放入含有試樣的小瓶子中依吸附條件進行吸附，吸附完畢後，用鑷子將 stir bar 取出，以無棉絨的衛生紙輕拭乾靜，再將 stir bar 置入不秀鋼 tube 中，stir bar 的兩端各放上高級玻璃棉與鐵網後蓋上鐵氟籠蓋，放在熱脫附儀上，進行熱萃取分析樣品。

實驗結果與討論

1. 最佳萃取條件

1.1 吸附平衡時間

吸附平衡時間測試，是為了建立 Stir Bar 與樣品基質間分配平衡所需要的時間，主要基於分析物之動力學速率常數(kinetic rate constant)，受樣品攪拌的方式有所影響。

將含異戊醇、乙醇、去離子水溶液以 stir bar 靜相浸入樣品中吸附，進行三次重複吸附平衡測試，測試吸附平衡時間分別為 10、20、30、40、50 及 60 分鐘，所得的吸附平衡時間曲線結果如圖 1 所示。由圖可知，隨吸附時間加長，所得訊號亦越強，在 60 分鐘時異戊醇雖未達穩定平衡，但增加變化不大，考慮 stir bar 壽命與實驗時間，本研究以下均以 60 分中作為本實驗的吸附平衡時間。

1.2 脫附時間對異戊醇吸附量的影響

由於 ATD-GC/MS 僅有靜態脫附及動態吸附，不像 SPME-HPLC 分為靜態脫附與動態脫附，為了使吸附物質有效的從 stir bar 上脫附出來，靜態脫附時間測試就是為了建立樣品最有效率的脫附時間。

將 stir bar 靜相浸入樣品中吸附，靜態脫附時間以 2、4、6、8 及 10 分鐘，進行三次重複靜態脫附時間測試，所得靜態脫附時間曲線如圖所示。由圖 2 可知，隨著靜態脫附時間的加長，所得的訊號亦越強，但異戊醇在 6 分鐘時幾乎已達平衡，因此本實驗選用 6 分鐘做為靜態脫附時間。

1.3 鹽類對異戊醇吸附量的影響

添加鹽類可增加溶液離子強度，使有機物在樣品中溶解度降低，提高萃取效果。本實驗選用 Na_2SO_4、NaCl、KCl、NH_4Cl 及無添加鹽類進行測試，比較哪一種鹽類對吸附效果較好，且鹽類添加進樣品

中以飽和為基準。結果如圖 3 所示，樣品吸附面積依次為 Na_2SO_4、KCl、 NaCl、NH_4Cl、no salt，效果最好的鹽類是 Na_2SO_4，故選用 Na_2SO_4 來作為實驗所添加的鹽類。

1.4 pH 值影響

一般而言酸鹼值對萃取效果有無影響決定於分析物之種類，有些化合物會因 pH 值的改變產生不同的解離程度，致使萃取效果發生變異，有些則否。但因本實驗試用藥品僅異戊醇與當稀釋液用的乙醇，pH 值對實驗造成的影響並不大，故省略此步驟。

1.5 吸附溫度對異戊醇吸附量的影響

吸附溫度對異戊醇吸附量的測試，是為了建立 Stir Bar 與樣品基質間分配平衡所需要的溫度，主要基於分析物之熱力學速率常數 (Thermodynamic rate constant)，受樣品攪拌的方式有所影響。

將含異戊醇、乙醇、去離子水溶液以 stir bar 靜相浸入樣品中吸附，進行三次重複吸附平衡測試，測試吸附平衡溫度分別為 20、30、40、50、60 及 70℃，所得的吸附平衡溫度曲線結果如圖 4 所示。由圖可知，隨吸附溫度越高，所得訊號亦越弱，在 20℃時異戊醇吸附

量最大最穩定，但一般室溫即 27℃，故本研究以室溫不加熱作為本實驗的吸附平衡溫度。

1.6 轉速對異戊醇吸附量的影響

電磁加熱攪拌器的轉速對 stir bar 的吸附量有絕對的相關性，攪拌器轉速對異戊醇吸附量的測試，主要基於分析物之動力學速率常數 (kinetic rate constant)，受樣品攪拌的方式有所影響。

將含異戊醇、乙醇、去離子水溶液以 stir bar 靜相浸入樣品中吸附，進行三次重複吸附平衡測試，測試吸附平衡時間分別為 200、400、600、800 及 1000 rpm，所得的轉速對異戊醇吸附量的影響曲線結果如圖所示。由圖 5 可知，攪拌轉速越快，所得訊號亦越強，在 1000 rpm 時異戊醇雖未達穩定平衡，但增加變化量並不大，考慮 stir bar 壽命與實驗時間，並避免 stir bar 過分的與瓶子產生撞擊，本研究以下均以 1000 rpm 中作為本實驗的吸附平衡時間。

2. 分析方法的適用性

2.1 基質效應

為了解紅葡萄酒樣品之基質效應（matrix effect）是否會造成分析上的干擾，因此本實驗分別配置在異戊醇、乙醇、去離子水及異戊醇、乙醇、紅葡萄酒 1:1 之混合液體中，異戊醇檢量線範圍均為 16.23 ppm ~ 243.45 ppm。結果如圖 6 所示。異戊醇/乙醇/去離子水配製的檢量

線 $\mathbf{R^2}$ 達 0.9980，異戊醇/乙醇與紅葡萄酒混合基質配製的檢量線 $\mathbf{R^2}$ 達 0.9956，結果如圖 7 所示。將 2 條檢量線放至一起偏離甚大如圖 8，故初步結果本實驗有基質效應之問題。

2.2　樣品穩定性：

將購自市售紅葡萄酒樣品分析完後添加 40.65 ppm 異戊醇，作為樣品穩定性之測試。穩定性如表所示，變異係數（coefficient of variation，C.V.）為 0.96 ％ ~ 0.98％，穩定性非常良好。

2.3　偵測極限

濃度 8.13 ppm 重複分析七次，計算所得異戊醇之波峰面積比之標準偏差(standard deviation，SD)，取三倍標準偏差，推算其偵測極限(LOD)，所得結果異戊醇為 0.1027 ppb。

3.　真實樣品

選擇一般市售之葡萄酒(法國 騎士堡紅葡萄酒，酒精含量 11.5 ％)，採樣完畢後將其放置於 4 ℃下冷藏保存，直到分析前。

4.　結論

本研究使用 SBSE 具有取樣、萃取、濃縮及導入分析物於一個單

一步驟中之裝置，以及高靈敏度、再現性佳等優點，來分析紅葡萄酒中的異戊醇。我們可以確定以 PDMS/DVB 披覆靜相以 60 分鐘的吸附，添加飽和鹽類 Na_2SO_4 進行吸附平衡可達最佳萃取效果。將不同基質之檢量線放同一表中，發現因面積差異而造成本實驗有基質效應之問題。以方法之適用性的評估而言，異戊醇檢量線 $\mathbf{R^2}$ 達 0.995 以上、偵測極限異戊醇達 0.1027 ppb，穩定性達 0.96 ％ ~0.98％，非常良好。由以上結果可知，以 SBSE 作為樣品前處理技術，減少繁瑣的步驟、分析時間及分析物的流失，且達高靈敏度、再現性佳使偵測極限可達 ppb 以下。

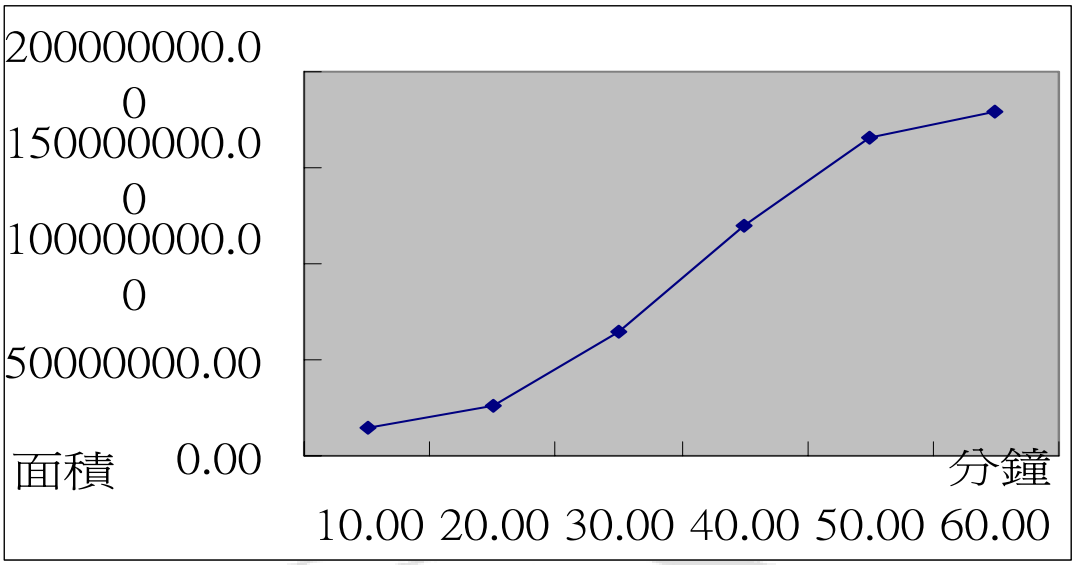


圖 1 吸附時間對異戊醇吸附量的影響

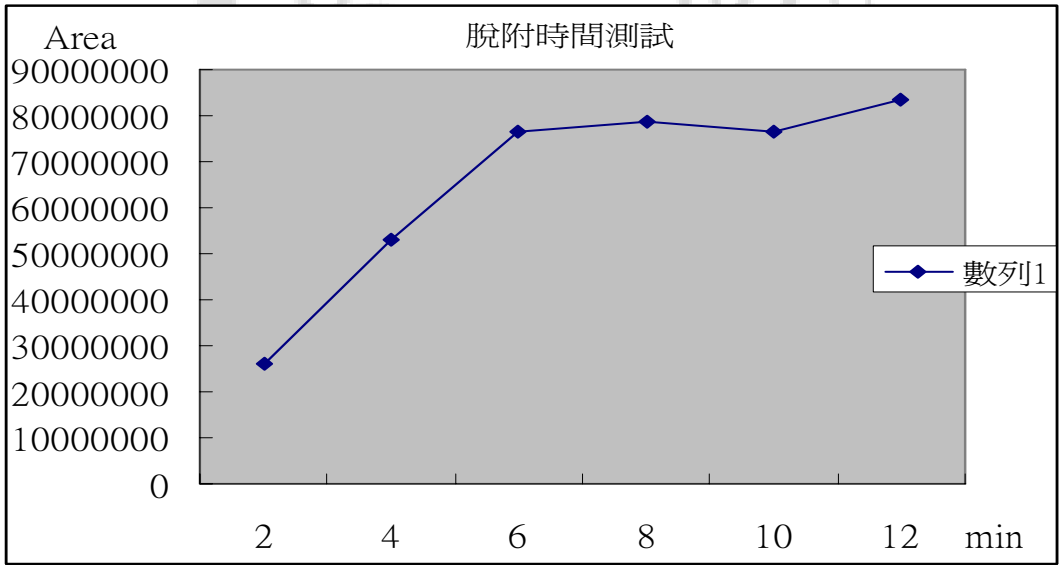


圖 2 脫附時間對異戊醇脫附量的影響

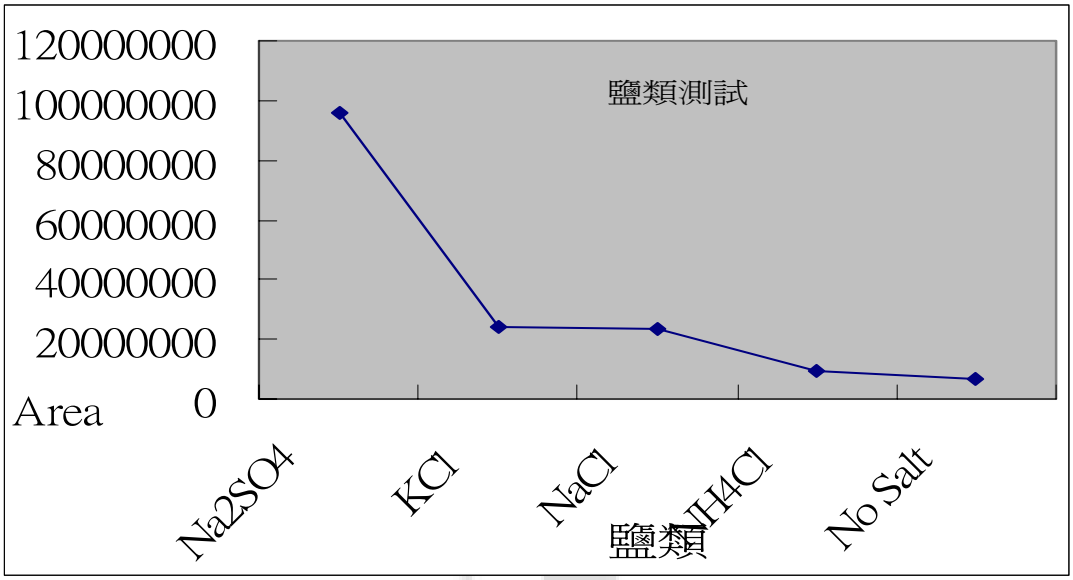


圖 3 鹽類對異戊醇吸附量的影響

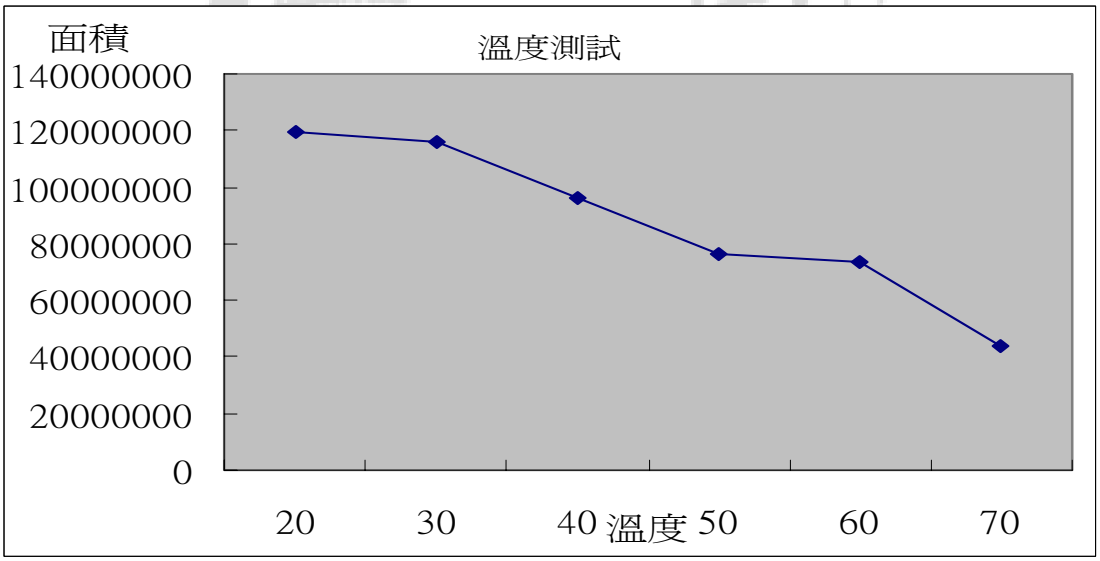


圖 4 吸附溫度對異戊醇吸附量的影響

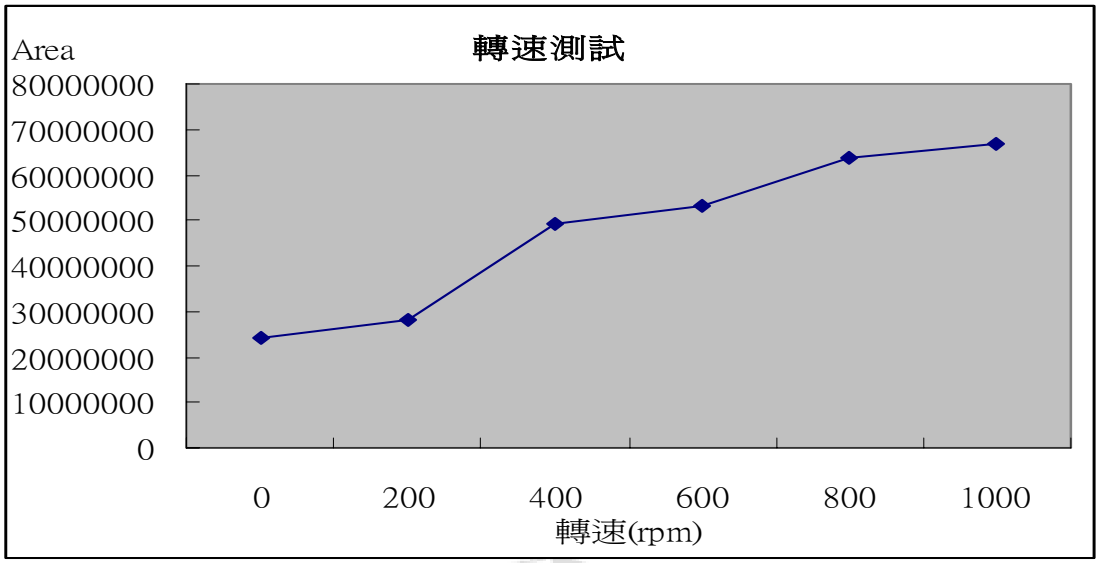


圖 5 轉速對異戊醇吸附量的影響

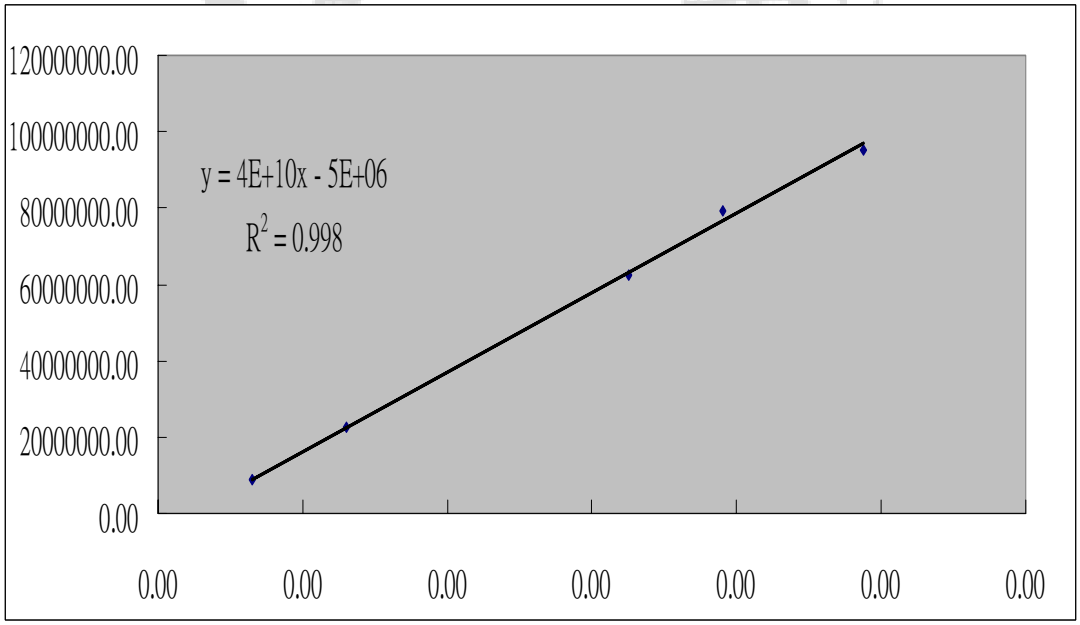


圖 6 基質為水之異戊醇檢量線

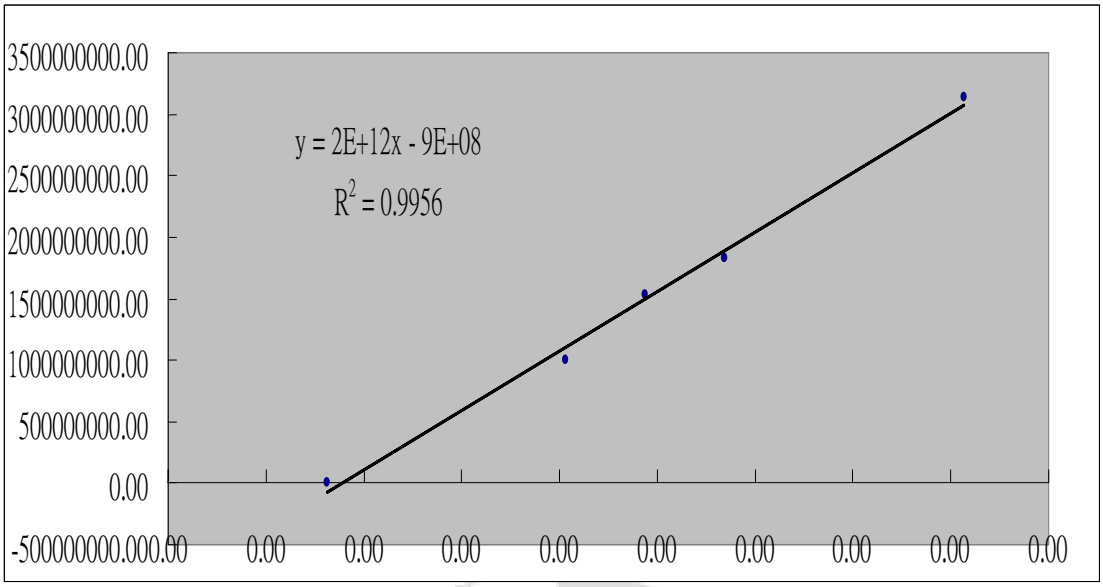


圖 7　基質為紅葡萄酒之異戊醇檢量線

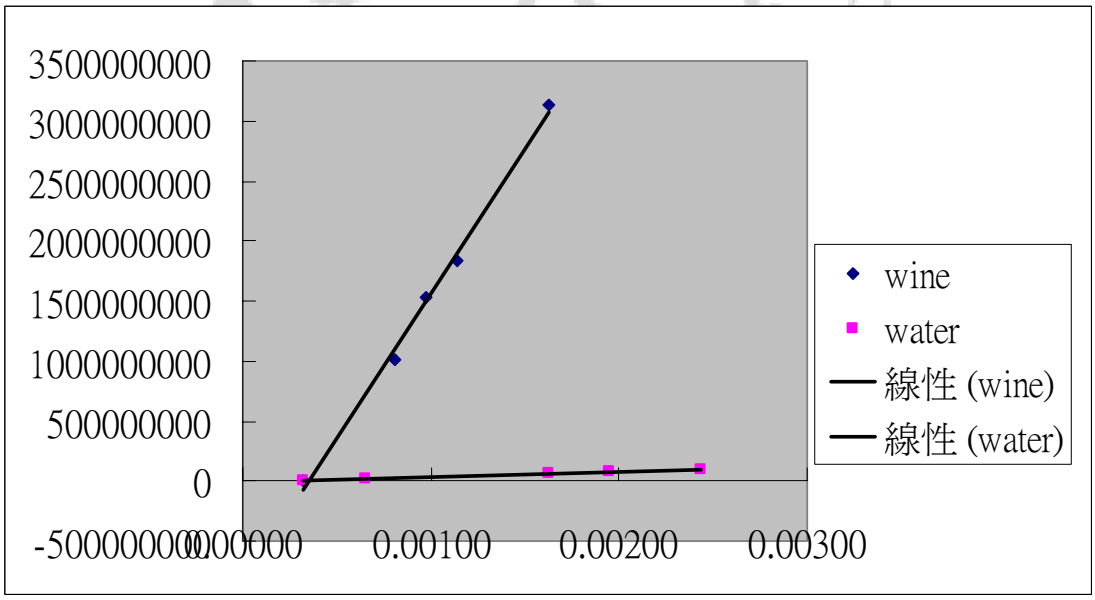


圖 8 基質效應