嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

尿液中 CH_2Cl_2 代謝物之方法分析研究

計畫類別：v 個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：CNIS-91-11

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 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：工安系

中華民國　92 年　2 月 26 日

一、前言

二氯甲烷是一種無色為、揮發性及不然性之液體，是一種極佳之溶劑，為一般工業常用之有機溶劑。蒸氣會刺激眼睛、皮膚及上呼吸道，進入人體後可導致皮膚炎，影響血紅素運氧之功能，已被歸類為對人體可疑之致癌物。本研究之目的為發展一簡便的生物偵測方法，測定暴露二氯甲烷之勞工尿液中代謝物。

飛機飛行約五年後通常就須重新噴漆，其第一步驟包括將漆從機身去除，再重新噴漆，而剝漆及噴漆作業中二氯甲烷是剝漆之主要成分之一。實驗中以頂空固相微萃取及氣相層析質譜儀，分析航太工業剝漆作業暴露勞工之尿中代謝物，SPME 纖維 75 μm carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)效果最佳，在萃取平衡時間，脫附時間，添加鹽類的條件下，找尋最佳之萃取效率與靈敏度。並以檢量線範圍之線性關係，二氯甲烷之偵測極限、樣品添加回收率、變異係數及樣品於冰箱保存之回收率評估方法之可行性。

二、實驗內容

2.1 實驗設備與材料

2.1.1 藥品

本實驗使用藥品為二氯甲烷 (99%，Merck)、KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate, GC 級)、K_2HPO_4 (potassium hydrogen phosphate anhydrous, GC 級, 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 ×0.25mm 管徑，膜厚 0.25 μm。氣相層析儀注入口溫度為 250℃，昇溫條件為起始溫度為 50℃，維持 2 分鐘後，以每分鐘 20℃上升至 200℃後，終溫停留 1 分鐘，全程分析時間為 11 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℃，採用 70eV，電子撞擊游離方式分析，掃瞄質量範圍 m/z 為 50~250。

3.1.3 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, 如圖 1, 本實驗採取直接萃取法，攪拌石轉速為每分鐘 1000 轉，萃取時間為 10 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 μm)、PA(85 μm)、PDMS/DVB(65 μm)、CAR/PDMS (75 μm)、CW/DVB(65 μm)、DVB/CAR/PDMS(50/30 μm)等 fiber 進行實驗分析。

2.2 尿液的處理及保存

將空白尿液搖盪均勻，靜置於冰箱冷藏一天後，取上清液於 4℃下保存。

2.3 實驗步驟

首先 fiber 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。接著將 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 2。

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，結果以 CAR/PDMS 的吸附量最高，DVB/ CAR/PDMS 及 PDMS/DVB 兩者次之。本研究即選用以 CAR/PDMS 為吸附靜相來分析尿液中丙烯晴。

3.1.2 吸附平衡時間

振盪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)，受樣品攪拌方式而有所影響。

取含二氯甲烷之上層澄清尿液 2 mL 置於 4 mL 小瓶子，以 CAR/PDMS 靜相頂空吸附，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可知二氯甲烷在 10 min 時已趨於平穩狀態，，因此選用 10 min 之振盪吸附平衡時間為本實驗的攪拌吸附平衡時間。

3.1.3 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、Na_2CO_3、$CaCO_3$、NH_4Cl、$MgSO_4$、$CaCl_2$、Na_2SO_4、$(NH_4)_2SO_4$ 分別添加於含二氯甲烷之尿液中，以 CAR/PDMS 靜相吸附，氣相層析脫附，結果待測物吸附量會隨著鹽類添加而增加，其中添加 NaCl 比未添加 NaCl 的吸附量高 3 倍。而由實驗測試三次結果觀察其穩定性非常良好。由於添加 700 mg 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 650 mg 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，以 SPME 萃取空白尿液樣品及含二氯甲烷晴尿液樣品之 GC/MS 圖譜顯示空白尿液圖中沒有與添加二氯甲烷尿液樣品之二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，可以很容易地從圖譜庫搜尋，對含二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二氯甲烷尿液溶液進行吸附平衡測試，將濃度 2.0-300 ng/mL 與測得吸附量作圖，有線性關係，此時 R^2 亦可達 0.995 以上，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。

3.2.3 樣品添加回收率及穩定性

將尿液中添加二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所得之回收率在 88.4% ~ 100 %間，。穩定性分析結果 C.V 值皆在 6.0%左右，穩定性相當良好，此結果顯示此方法適宜分析尿液中二氯甲烷。

3.2.4 偵測極限

將含二氯甲烷濃度 0.002 ppm 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 0.27 ng/mL。此結果顯示此方法足以對暴露在二氯甲烷環境下勞工之生物代謝尿液分析。

四、結論

本研究使用 SPME 具有的取樣、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、再線性佳等優點，來分析尿液中未活化代謝物二氯甲烷。首先我們確定了 CAR/PDMS 披覆靜相以 10 分鐘的振盪吸附在添加 650 mg NaCl 在尿液中進行吸附平衡可達最佳萃取效果。以方法適用性的評估而言，檢量線 R^2 達 0.999 以上、平均回收率為 104%、偵測極限為 0.0054 μg/mL 及 C.V. 為 10~15%，穩定性良好。因此，以 SPME 為樣品前處理，減少繁瑣的步驟、分析時間，是適宜對暴露在二氯甲烷環境下勞工之生物代謝尿液分析之方法。