

尿中砷物種-高效能液相層析結合感應耦合電漿質譜法

方法編號：BM009	
有害物中文名稱：砷 有害物英文名稱：Arsenic 空氣中容許濃度：10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (砷及其化合物，以砷計) 原子式：As(砷) 化學文摘社登記號碼：7440-38-2 原子量：74.92 (砷)	
標的物中文名稱：砷物種 標的物英文名稱：無機砷的尿中代謝物：三價砷[As (III)]、五價砷[As (V)]、MMA (monomethylarsonate)及 DMA (dimethylarsinate) 參考指標值：見附註[1] 化學文摘社登記號碼：--	
<b>生物檢體採樣</b>	<b>分析方法</b>
檢體樣品：尿液 (spotting urine) 採集時機：一週工作下班前(end of workweek) 採集器：250 mL 廣口瓶(聚乙烯材質) 採集量：50 ~100 mL 樣品保存劑：每 100 mL 加入 1 mL 冰醋酸(或 0.35 mL 65%硝酸) 樣品運送：維持 4°C 以下，24 小時內送達實驗室 樣品穩定性：未測定	分析儀器：高效能液相層析(HPLC)結合感應耦合電漿質譜儀 標準樣品：砷物種標準品添加於去離子水 樣品處理：尿液樣品先以及 C <sub>18</sub> 固相萃取管過濾處理 樣品注入量：100 $\mu\text{L}$ 移動相: 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.0 流速: 1.5 mL/min
<b>精密度與準確度</b>	<b>檢量線</b>
測試範圍：10~100 g/L 精密度：2.9 % 回收率：As (III)為 89 %, DMA 為 104.8 %, MMA 為 109.7 %、As (V)為 124.5% [註 2]。 準確度：92.6 % [註 3]	檢量線範圍：10~100 g/L 偵測極限：As (III)為 3.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ , DMA為 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ , MMA為 0.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、As (V)為 1.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。 線性相關係數：大於 0.995
干擾：1.尿液中氬原子會與電漿中氬正一價離子結合而成為質量電荷比 75 的 ArCl <sup>+</sup> 。As <sup>+</sup> 質荷比也是 75，因此 ArCl <sup>+</sup> 會對砷的分析造成一定程度的干擾。此種基質之質譜干擾可藉由 HPLC 有效地將氬離子與砷物種加以分離，再由質譜儀定量分析，或是藉由質譜儀中的撞擊反應來降低樣品基質的干擾。2.另外針對 HPLC 移動相基質對待測物可能造成質譜干擾的問題上，我們選擇氬離子雜質含量低 (<0.0005%) 的 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 來製備移動相溶液。	

附註：

- (1) 美國 ACGIH 訂定尿中無機砷代謝物為  $35 \mu\text{g/L Crm}$ ；加拿大訂定尿中砷為  $<53.1 \mu\text{g/g Crm}$  ( $<80 \mu\text{mol/mol Crm}$ )；芬蘭訂定尿中砷為  $45 \mu\text{g/L Crm}$  ( $0.6 \mu\text{mol/L Crm}$ )；英國衛生安全行政部門(HSE) 訂定尿中砷為  $292 \mu\text{g/g Crm}$  ( $440 \text{nmol/mmol Crm}$ )。
- (2) 回收率數據引用自參考文獻[3]。(3)利用Seronorm Trace Element Urine Ref 201205 測得之As (III)為  $78.0 \pm 1.8 \mu\text{g/L}$ ，DMA為  $6.0 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ ，As (V) 為  $86.4 \pm 1.6 \mu\text{g/L}$ ，合計總量為  $170.4 \mu\text{g/L}$ ，準確度: 92.6 %。

## 1. 試藥

- 1.1. 砷物種標準品：三價砷 ( $\text{As}_2\text{O}_3 >99\%$ )、五價砷 ( $\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O} >98\%$ )、甲基砷 ( $\text{NaMeHASO}_3 >97\%$ )、二甲基砷 ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2 >97\%$ )，經驗證之標準溶液，如CertiPure standard(Merck) 或同等級產品。
- 1.2. 砷原子吸收光譜標準溶液：  $1000 \text{mg/L}$ ，分析級(GR)產品。
- 1.3. 氫化鈉：分析級(GR)產品。
- 1.4. 氫氧化鈉：分析級(GR)產品。
- 1.5. 磷酸二氫鈉：分析級(GR)產品。
- 1.6. sodium EDTA：分析級(GR)產品。
- 1.7. 去離子水，其比電阻值 (specific resistance) 需達  $\geq 18 \text{M}\Omega\text{-cm}$ 。

## 2. 設備

- 2.1 250 mL的聚乙烯瓶
- 2.2. 冷凍袋 (如冰寶)
- 2.3. 高效能液相層析結合感應耦合電漿質譜儀: 高效能液相層析儀包括自動進樣設備，感應耦合電漿質譜儀以八極柱反應腔 (Octopole reaction cell, ORC) 來降低多原子離子的干擾。
- 2.4. 離心機
- 2.5. 震盪器
- 2.6. 定量吸管 (pipette) 5 mL、10 mL
- 2.7. 離心管附蓋子 15 mL
- 2.8. 微量吸管(micropipettes)，100、500 及 1000  $\mu\text{L}$ 。
- 2.9.  $\text{C}_{18}$  固相萃取管：1000 mg, 6 mL。
- 2.10 固相萃取裝置

## 3. 採樣

- 3.1. 受試者須於收集尿液前換下工作服並洗淨雙手，直接將 100 mL 尿液收集於預裝有 1 mL 冰醋酸之廣口塑膠瓶中，混合均勻。將採樣瓶交與採集人員，加上封蓋及貼上樣

品標籤。

3.2.若使用冰寶，先於攜帶式冰箱底層排放一層冰寶而樣品應置於冰寶夾層中。若使用乾冰，採樣前將整塊乾冰以牛皮紙或舊報紙包上數層，再放於攜帶式冰箱帶至現場。樣品收集後，將乾冰擊成約五公分直徑大小碎塊。於攜帶式冰箱底層鋪放一層乾冰而將樣品置於中層，再於樣品上方放置乾冰，樣品應由專人盡快送至實驗室儲存。

\* 注意：處置乾冰時，應戴棉質厚手套，以免凍傷。

#### 4. 檢量線配製

4.1. 砷物種標準品儲備溶液(1000 g/mL)，以五位數天平(範圍: 60 g，最小讀數:0.01 mg)秤取適當重量，三價砷樣品以 4% NaOH 溶液溶解並定量至 100 mL，其他三種砷物種樣品則直接以去離子水溶解並稀釋至 100 mL。以上製備儲備溶液以市售砷原子吸收光譜標準溶液及火焰原子吸收光譜法進行測定，再將四種儲備溶液裝入PE材質樣品瓶中，並存放於 4°C 冰櫃中備用。

4.2. 以微量吸管(micropipette)分別吸取去離子水、4 種砷物種標準品儲備溶液各 1 mL 混合後，用去離子水定量到 10 mL，再以去離子水序列稀釋，製備成檢量線空白樣品與 4 種物種濃度各為 10, 20, 40, 60, 80 及 100  $\mu\text{g/L}$  之檢量線標準品。

#### 5. 樣品前處理

5.1. 尿液樣品先置於震盪器上 30 分鐘，再進行 1500 rpm 15 分鐘離心去除沉澱物。

5.2 取 5 mL 尿液樣品做肌酸酐(creatinine, *Ccrn*)濃度測定。

5.3 尿液檢體樣品分析前，利用固相萃取裝置及  $\text{C}_{18}$  固相萃取管以真空負壓方式去除尿液中蛋白質等有機化合物。

#### 6. 儀器操作步驟

##### 6.1 高效能液相層析儀操作參數

表 1 高效能液相層析儀器操作參數(參考用)

Column	Hamilton PRP-X100 (10 $\mu\text{m}$ , 4.1 mm $\times$ 250 mm)
Mobile phase	30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	0.1 mL
Run time	10 min

[註] Agilent 1100 Series HPLC 含 degasser (G1379A)，gradient QuartPump (G1311A) 及 autosampler (G1313A) 設備

##### 6.2 感應耦合電漿質譜儀操作參數

表 2 Agilent 7500ce ICP-MS 感應耦合電漿質譜儀操作參數(參考用)

	正常模式	氫氣模式
--	------	------

	Normal mode	Hydrogen mode
RF Power	1500 W	1500 W
Sample depth	8 mm	8 mm
Carrier gas	0.85 L/min	0.85 L/min
Make-up gas	0.2 L/min	0.2 L/min
Spray chamber temperature	2 °C	2 °C
Extract 1	0 V	0 V
Extract 2	-160 V	-160 V
Omega bias	-24 V	-24 V
Omega lens	-0.6 V	-0.6 V
Cell entrance	-30 V	-30 V
QP focus	3 V	-11V
Cell exit	-30 V	-44 V
Octopole bias	-7 V	-18 V
OP bias	-3.5 V	-14.5 V
Cell gas flow	0	3.0 mL/min H <sub>2</sub>

## 7.品質管制

- 7.1. 執行項目: 試劑空白分析、重複分析、基質添加分析及(市售)品管樣品分析。
- 7.2. 執行頻率: 20 個樣品 或每批次進行。
- 7.3. 管制範圍: 基質添加分析回收率範圍在 75%~125%，回收率最高值和最低值相差應在 40%之內。品管樣品準確度在 25%，精密度 < 25%。

$$\text{添加回收率(\%)} = \frac{C_{urine}}{C_{spike}} \times 100$$

$C_{urine}$ : 尿液中測量濃度( g/L)

$C_{spike}$ : 尿液中標準品添加濃度( g/L)

## 8.計算

- 8.1. 以檢量線樣品分析圖譜之積分面積對濃度做檢量線，據以計算尿液中待測物濃度。

尿液中待測物濃度( $C_{urine}$ )=[(積分面積-檢量線截距)/檢量線斜率]×稀釋倍數

## 8.2. 計算每克肌酸酐中待測物含量

$$C(\text{g/g Crn}) = \frac{C_{urine}}{C_{crn}} \times 1000$$

$C_{urine}$ : 尿液中測量濃度( g/L)

$C_{crn}$ : 尿液中肌酸酐濃度(g/L)

### 方法的評估

#### (1) 精密度評估

砷物種	樣品數(n)	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	測量值 ( $\mu\text{g/L}$ )	變異係數 (%)
As (III)	3	40	38.0	2.6
As (V)	3	40	38.3	3.3
MMA	3	40	38.3	4.6
DMA	3	40	36.9	3.0

#### (2) 基質添加回收率

砷物種	樣品數(n)	添加濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	測量值 ( $\mu\text{g/L}$ )	添加回收率 (%)
As (III)	3	40	38.0	95.1
As (V)	3	40	38.3	95.8
MMA	3	40	38.3	95.7
DMA	3	40	36.9	92.3

### 參考文獻

- [1] 行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所：利用離子層析進行砷生物偵測，2004。
- [2] ACGIH: TLVs<sup>®</sup> and BEI<sup>®</sup> based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices, 2007; Cincinnati, Ohio: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). p 104.
- [3] 謝俊明、石東生：利用 HPLC-ICP/MS 進行尿中砷物種生物偵測。勞工安全衛生研究季刊 2006；14(3):195-204。

### 方法撰寫人員

1.1 方法開發 撰寫日期：民國 100 年 8 月  
謝俊明，勞工安全衛生研究所

1.2 方法評估  
黃耀輝，台灣大學職業醫學與工業衛生研究所