

以 HPLC-ICP/MS 分析尿液中砷的化合物

Detection of inorganic arsenic species in urine by High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma / Mass Spectrometry

謝雨靜 檢測員/正修科技大學環境毒物與新興汙染物研究中心

金屬砷是一種廣泛存在地表中的自然元素，同時也是一種天然有毒的過渡金屬，對人體而言是非必須而且會累積的毒性元素。在地表中常以硫化砷的型態存在，砷的型態多以五價存於自然環境和食物當中，藉由飲食、呼吸與皮膚接觸而吸收進入人體。砷元素可分成有機砷及無機砷兩大類，海產類的食物大多含有有機砷(砷甜菜鹼Arsenobetain)的成分，有機砷類的化合物對人體的毒性較低，且在人體中1~2天內會經由代謝作用從尿液排體外。而無機砷通常可分為三價砷arsenite (As^{3+})及五價砷arsenate (As^{5+})的砷化合物，在生物體內砷價數可互相轉變。(Mingsheng et al., 1998; Brown et al., 1989) 無機砷的化合物主要是經由呼吸道或攝入進入人體中，而經由皮膚吸收進入人體途徑的非常微量。

美國國家科學研究院(NAS)的研究顯示，無機 As^{3+} 化合物及 As^{5+} 化合物是主要影響人體健康的砷化合物，尤其以三價砷的毒性較為顯著，相較於 As^{3+} 與 As^{5+} 的毒性， As^{3+} 的毒性大 60 倍；而無機砷比有機砷更大了近 100 倍，因此攝取過量的無機砷化合物容易堆積在人體的肝臟、腎臟及膽中，造成人體健康的危害。

無機的 As^{3+} 及無機 As^{5+} 的砷化合物，在進入人體後會被代謝成單甲基砷酸(monomethylarsonic acid, MMA)及二甲基砷酸(dimethylarsinic acid, DMA)，尿液為其主要的代謝途徑，因此尿液中的砷物種包含了有機砷與無機砷的部分，無機砷部分為 As^{3+} 、 As^{5+} ，有機砷部分為 MMA 及 DMA。故可針對此 4 種砷化合物，進行尿液中的濃度分析，作為人體慢性無機砷中毒的指標。(Buchet JP et al., 1982)

通常在電子工業、半導體業、染料業、殺蟲劑製造、陶瓷業及顯影劑製造等產業鏈中，常以砷作為生產製程的原料，因此其製程人員較易接觸到砷的化學藥劑或含砷的相關原料，而主要攝入人體的途徑通常是吸入揮發性氣態的砷及吃入含砷的食物，長時間暴露在這些危險環境中的作業人員，需定期作砷的檢測。(HG Seiler et al., 1994)

原子吸收光譜(AAS)為早期較廣泛使用的砷物種分析技術(Sturgeon RE et al., 1989; Blais JS et al., 1990; Beauchemin D et al., 1988)，以氫化原子吸收光譜法(HG/AAS)對砷進行分析可提高偵測靈敏度。以層析技術對砷物種進行分析的研究在八十年代以後相當普遍，其中又以高效能液相層析(HPLC)技術為主(Urasa IT et al., 1987; Bulska E et al., 1993; Spall WD et al., 1986)，主要在於層析技術可以成功地將各類型砷化合物分離，所搭配的偵測器以 AAS 及感應耦合電漿-原子發散光譜(ICP/OES)最多。由於技術的精進，HPLC 與 AAS 之介面問題已被克服並應用於分析測定工作。Bernhard (Bernhard W et al., 1984)對於 HG/AAS 深入研究，發現先將 As^{5+} 還原成 As^{3+} 後再加以氫化，會比直接將 As^{5+} 氫化理想，除了氫化反應較

容易進行外，干擾問題亦會獲得改善，所以建議在實際應用時，應將 As^{5+} 分離後先行還原，再加以氫化。另外，因為 ICP 之原子化溫度相當高，所有的分析化合物都會被離子化、原子化和熱激發。所以在砷物種之測定上不須先將砷氫化，在應用上較為方便。最近發展的分析技術有以 ICP/MS 作為研究砷物種的工具，以 HPLC-ICP/MS 來進行無機砷與有機砷之物種分析。

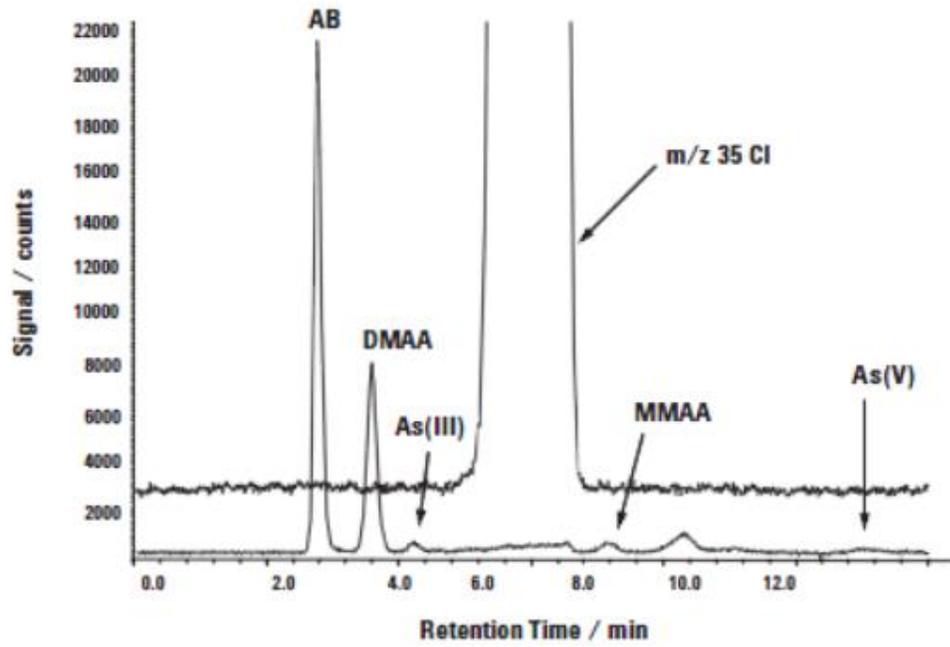
人體砷暴露量也可以使用生物偵測，利用血液中砷（數小時）與尿液中砷（數日）含量作為短期暴露量指標，而以頭髮中砷含量作為長期暴露量指標。無機砷暴露主要以尿液排出，故尿液中砷為最重要的生物偵測暴露指標。尿液中砷化合物中主要有 60~80% 是由無機砷轉化成雙甲基砷，10~20% 轉化成單甲基砷，而 10~20% 則會保留原無機砷的化合物。另外海藻中有機砷在人體內也會轉換成雙甲基砷與單甲基砷，而干擾雙甲基砷與單甲基砷生物偵測指標的專一性(Ma M et al., 1998; Francesconi KA et al., 2002)。職業性無機砷暴露應以尿中無機砷物種為暴露指標。

本研究中砷物種之分離使用 Agilent 1200 Series HPLC Gradient Isocratic Pump (G1310A) 及 Standard Autosampler (G1329A) 等設備。Agilent 7900 ICP-MS 作為本研究砷物種分析之偵測設備。ICP-MS 除了利用 Omega lens 將離子由 ICP Sampling Cone-Skimmer Cone 的主軸導離以避免光子的干擾外，並以八極柱反應腔 (Octopole reaction cell, ORC) 來降低多原子離子的干擾。在八極柱反應腔中藉導入少量的氬氣，由於多原子離子的截面積比單原子離子來得大，因此與氬氣原子撞擊的機率較大。藉由撞擊可以將多原子離子加以分離而達到降低其干擾的目的；或者藉由撞擊適度的降低多原子離子的動能，再於八極柱出口調升電位以隔離多原子離子，而達到降低其干擾的目的。

利用 HPLC-ICP/MS 進行砷物種分析時，有兩種可能的質譜干擾來源，一為樣品基質，另一個為 HPLC 移動相基質。在人體尿液檢體中，含有相當多的氯離子。在樣品導入電漿時，可能會被還原成氯原子並與電漿中 Ar^+ 結合，成為質量電荷比 75 的多原子離子 ($ArCl^+$)。此離子對於砷離子 (As^+ 質量電荷比也是 75) 的偵測，造成某種程度上的干擾。此類基質的質譜干擾可有效地藉由 HPLC 將氯離子層析波峰與砷物種層析波峰加以分離。若是前述方法效果不彰，則需以調整質譜儀的撞擊反應參數來降低此類的基質干擾。此外，HPLC 移動相中基質的質譜干擾問題，亦可選擇氯離子雜質含量 (<0.0005%) 較低的 NaH_2PO_4 來配製移動相溶液。

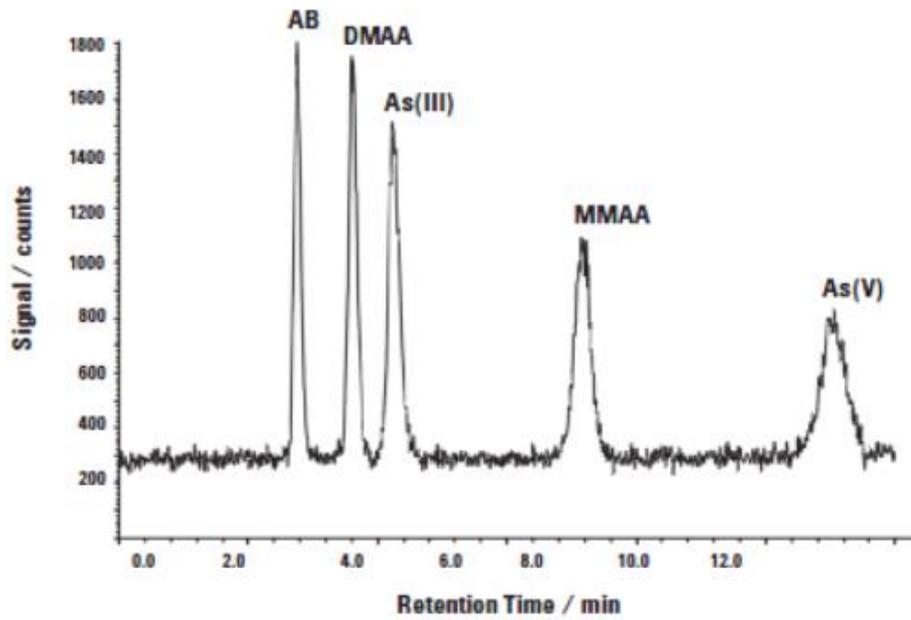
為了解尿液中氯對於砷物種 HPLC-ICP/MS 分析的干擾情形，圖一為未稀釋的 NIES CRM No.18 (其中可能含 As^+ 與 $ArCl^+$) 之層析圖，這樣的圖譜比較可以了解 $ArCl^+$ 在圖譜中是否對砷物種的檢測造成波峰重疊的干擾。再與圖二中四種砷物種層析波峰滯留時間比較，均有波谷將其隔離。所以在本研究使用的 HPLC-ICP/MS 分析條件下，尿液中含氯應不會對於檢體樣品中砷物種分析造成圖譜波峰重疊的干擾情形。

Chromatogram of undiluted NIES CRM No.18



圖一、未稀釋的 NIES CRM No.18

5 μ g/L each As Standard Solution



圖二、5 μ g/L Each As Standard Solution

本文研究 HPLC-ICP/MS 分析技術，建立尿液中砷物種之分析方法。該技術中，尿液樣品只需過濾前處理即可分析，樣品層析時間也在 15 分鐘以內，可快速應用在了解職業性砷暴露的程度及勞工個人體質對於砷代謝的影響情形。

審稿者：傅雅靖 組長/正修科技大學環境毒物與新興污染物研究中心

參考文獻：

- Mingsheng Ma and X. Chris Le. "Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation", *Clinical Chemistry*, 44(3), 539-550. (1998)
- Brown K.G., Boyle K. E., Chen C. W., Gibb H. J., "A dose-response analysis of skin cancer from inorganic arsenic in drinking water", *Risk Anal*, 9(4), 519-28, (1989)
- Buchet J. P., Lauwerys R., Mahieu P., Geubel A. "Inorganic arsenic metabolism in man" *Arch. Toxicol. Suppl.* 5:326-327. (1982)
- Hans S., Astrid S., Helmut S., "Handbook on metals in clinical and analytical chemistry" New York: Marcel Dekker (1994)
- Sturgeon R. E., Siu K. W. M., Willie S. N., Berman S. S., "Quantification of arsenic species in a river water reference material for trace metals by graphite furnace atomic absorption spectrometric techniques" *Analyst*, 114:1393-6. (1989)
- Blais J. S, Momplaisir G-M, Marshall W. D, "Determination of arsenobetaine, arsenocholine and tetramethylarsonium cations by liquid chromatography-thermochemical hydride generation-atomic absorptionspectrometry" *Anal Chem*, 62:1161-6. (1990)
- Beauchemin D., Bednas M E., Berman S. S., McLaren J. W., Siu K. W. M., Sturgeon R. E, "Identification and quantitation of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace element" *Anal Chem*, 60:2209-12. (1988)
- Urasa I. T., Ferede F., "Use of direct current plasma as an element selective detector for simultaneous ion chromatographic determination of arsenic(III) and arsenic(V) in the presence of other common anions" *Anal Chem*, 59:1563-6. (1987)
- Bulska E., Tschöpel P., Broekaert J. A. C., Tölg G., "Different sample introduction systems for the simultaneous determination of As, Sb and Se by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry" *Anal Chim Acta*, 271:171-81. (1993)
- Spall W. D., Lynn J. G., Andersen J. L., Valdez J. G., Gurley L. R., "High-performance liquid chromatographic separation of biologically important arsenic species utilizing on-line inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometric detection" *Anal Chem*, 58:1340-4. (1986)
- Bernhard W., Marianne M., "Influence of the valency state of arsenic on the degree of signal depression caused by copper, iron and nickel" *Analyst*, 109:573-5. (1984)
- Ma M., Le X. C., "Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation", *Clinical Chemistry* 44: 539-49. (1998)
- Francesconi K. A., Tanggaard R., McKenzie C. J., Goessler W., "Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar" *Clinical Chemistry* 48: 92-101. (2002)