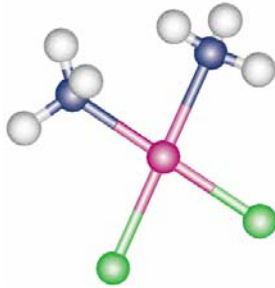


## AA, ICP, ICP/MS 之應用於物種分離

應用工程師 陳嘉佩

### 前言

人類發展至今，對於自然界中重金屬元素分析已有相當程度的了解。早期科學家的研究方向，都偏重於金屬種總量的測量，但隨著研究的深入探討，重金屬總量已經無法滿足現今科學家的需求，因為，重金屬其價數、存在型態會影響毒性、生物利用性、新陳代謝、環境遷移率，故重金屬方面之物種分離已經漸漸地在這樣的需求下開始發展。21世紀期間，很多研究都已經不再侷限於多少(how much)，取而代之的則是什麼型態(what forms)了。



物種分離是一個跨領域的技術，結合了液相層析分析技術(Liquid chromatography analysis technology)與無機分析技術(Inorganic analysis technology)。物種分離技術為將單一重金屬分離出不同之物種，然後再將分離之樣品導入檢測重金屬元素之儀器來做分析，如原子吸收光譜儀(AA)、感應藕荷電漿放射光譜儀(ICP-OES)或感應藕荷電漿質譜儀(ICP-MS)。在液相層析(LC)領域中，可以選擇最佳的分析條件將物種進行分離，但是液相層析中所能提供之偵檢器並不適合偵測無機金屬樣品；在無機分析領域中，可針對無機金屬樣品有良好的偵測，但卻無法完成金屬之物種分離的能力。因此液相層析與無機分析技術便是物種分離之最佳組合。由於液相層析與無機分析技術兩者分別屬於不同分析領，為了將兩種不同領域的硬體(Hardware)結合，PerkinElmer也為此發展出Chromera操作軟體來搭配此兩個硬體。

物種分離發展現至今已趨於成熟，常被應用於醫療檢驗、藥物分析、環境污染等，可用於分析尿液、血液、藥物、環境等不同型態之砷、鉻、汞、溴、硒，如長庚醫院臨床病理科、高雄醫學大學及台北醫學院等單位，配合使用高效能液相層析儀法及流動注入氫

化物產生原子吸收光譜法來分離不同型態的砷、汞，並分別研究其對於癌症、病症、工作環境之間的相關性；藥檢局、國衛院、成大環境資源中心、國立中山大學則是利用高效能液相層析儀法配合感應藕荷電漿質譜儀來進行藥物、檢體、環境分析檢測。



Fig.1. HPLC-FIAS-AAS in Taiwan Application



Fig.2. HPLC-ICP/MS in Taiwan Application

### 砷的應用:

砷為自然界中的元素，對人體來說，為一種非必需但具累積性的毒性元素，其依形態可分為氫化砷(arsine,  $AsH_3$ )、三價砷(arsenite,  $As(III)$ )、五價砷(arsenate,  $As(V)$ )、單甲基砷(monomethylarsonic acid, MMAA)、雙甲基砷(dimethylarsinic acid, DMAA)、arsenobetaine ( $AsB$ )，其中以氫化砷及無機砷最具毒



性。長期暴露或意外暴露於含砷化物的環境中，對於人體健康有非常大的危害，其影像之嚴重性也因所吸入之劑量、途徑、時間及接觸到之化合物型態而有所差異。

表 1. 砷物種的毒性

Arsenic Species		LD <sub>50</sub> in Mice (mg/kg)
Arsenious acid	(AsIII)	4.5
Arsenic acid	(AsV)	14-18
Monomethylarsonate	(MMA)	1,800
Dimethylarsinate	(DMA)	2,600
Arsenobetaine	(AsB)	10,000

台灣以急性砷中毒較為常見，以腹痛、血便、急性腎衰竭、神經病變為主。慢性砷中毒則會在肌肉無力痛、皮膚角質化、色素沈著及癌前期變化；水腫、肝腎傷害及週邊神經炎發生，慢性砷中毒以台南、嘉義沿海的烏腳病最為有名。另外電子業常用砷氣(arsine gas)，則有大蒜味，容易引起大量溶血，急性腎衰竭而死亡。

砷與汞類似，被吸收後容易跟硫化氫根(sulfhydryl)或雙硫根(disulfide)結合而影響細胞呼吸及酵素作用；甚至使染色體發生斷裂。無機砷化物已被國際癌症研究局(International Agency for Research on Cancer, IARC)認定為致癌物。在烏腳病地區肺癌、肝癌、膀胱癌、皮膚癌的比率都較其他地區為高。砷可堆積在內臟中及骨頭、牙齒、頭髮中，很容易被檢測。

尿液中砷濃度可以作為暴露於砷的生物偵測指標。目前人類尿液中存在主要的砷物種有As(III)、As(V)、MMA、DMA、arsenobetaine(AsB)、arsenocholine(AsC)、trimethylarsine oxide(TMAO)及tetra-methylarsonium(TMA<sub>4</sub>)，其中四個較具毒性為As(III)、As(V)、MMA、DMA，以陰離子型態存在。砷的分析技術已非常的普遍、純熟，目前在一些研究單位如長庚醫院臨床病理科、高雄醫學大學、台北醫學院、藥檢局、國衛院、成大環境資源中心等均已成功配合使用高效能液相層析儀法及流動注入氫化物產

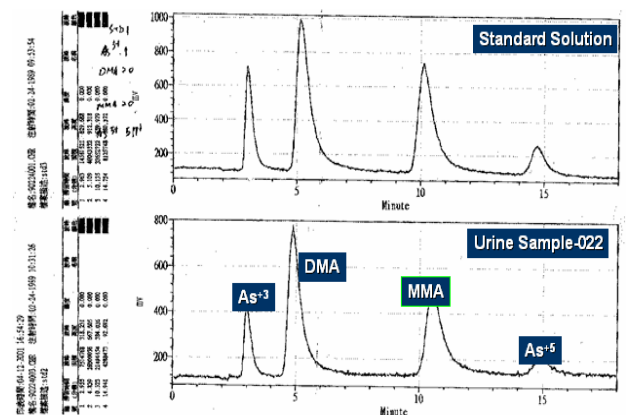
生原子吸收光譜法或是利用高效能液相層析儀法配合感應藕荷電漿質譜儀來研究分析砷化物。高效能液相層析儀法的分離尿液中砷物種的條件如表二、表三所示。

表 2 高效能液相層析儀梯度方法及操作參數

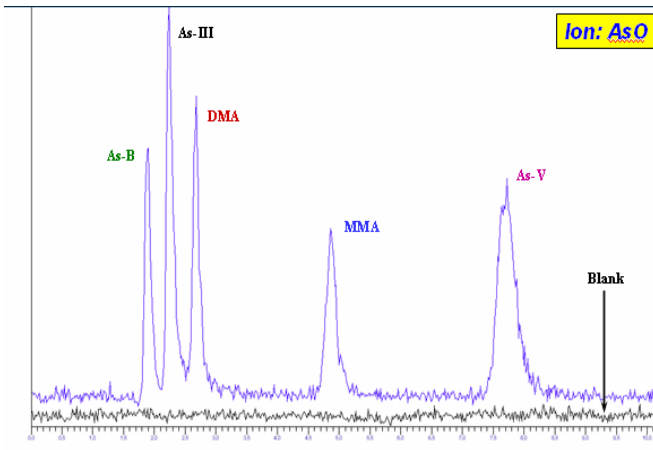
Parameter	Setting
Solvent A	20 mM Ammonium Bicarbonate @ pH 8.5
Solvent B	20 mM Ammonium Sulfate @ pH 7.0
Gradient Profile	6 min at 100% A; Step to 100% B for 12 min
Flow Rate	1.5 mL/min
Column	Anion Exchange, Hamilton PRP-X100, 4.1 mm i.d. x 250 mm, 10 μm
Column Temperature	Ambient
Autosampler Flush Solvent	5% Methanol / 95% DI Type I Water
Sample Injection Volume	100 μL
Re-equilibration Time	15 min
Urine Sample Prep	1:10 with DI Water
Solid Phase Extraction (SPE) Cartridge	3mL Supelclean LC-SAX SPE cartridge (Supelco™) in weak solvent reservoir
Detection	PerkinElmer/SCIEX ELAN 6100
Total Analysis Time	33 min

表 3 高效能液相層析儀單相方法及操作參數

Parameter	Setting
Mobile Phase	10 mM Ammonium Nitrate and 10 mM Ammonium Phosphate (dibasic); pH 9.4
Flow Rate	1.5 mL/min
Run Time	10 min
Column	Anion Exchange, Hamilton PRP-X100, 4.1 mm i.d. x 250 mm, 10 μm
Column Temperature	Ambient
Autosampler Flush Solvent	5% Methanol / 95% DI Type I Water
Sample Injection Volume	100 μL
Urine Sample Prep	1:5 with Mobile Phase
Detection	PerkinElmer/SCIEX ELAN DRC II
Total Analysis Time	10 min



圖三、HPLC-FIAS-AAS 尿液中砷分析結果



圖四、Isocratic chromatograms of five arsenic species (1000 ng/L each) and a blank acquired with the ELAN DRC monitoring  $AsO^+(m/z=91)$

### 汞的應用:

汞的使用在日常生活中相當廣泛，汞元素是作體溫計、血壓計、及各種度量衡工具所必需填充的物質。日光燈管及水銀燈也須填充汞化合物以增加亮度，甚至我們每個人補牙齒所用的汞齊及中藥用來安神鎮靜的硃砂，也是屬於汞的無機化合物。有機汞化合物則用來作殺菌劑農藥，處理種子增加發芽率，甚至加入油漆中預防黴菌生長。海洋中大型魚類如鯊魚、鮪魚等汞含量有的偏高，因此魚翅、魚肉中就可能含有相當量的汞。

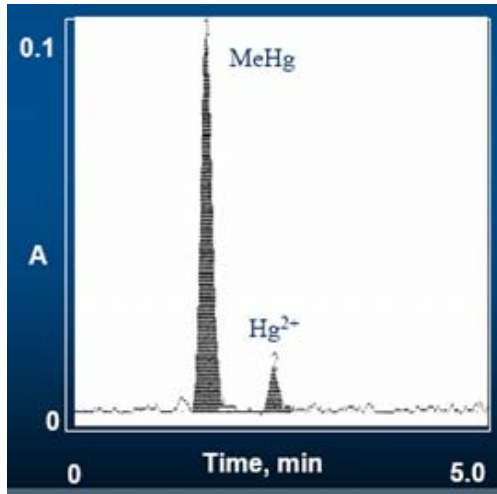
汞元素在室溫即不斷釋放汞蒸氣，很容易經肺吸收到腦部。急性汞蒸氣中毒會在數小時內發生虛弱無力、發冷、流口水、噁心、嘔吐、腹瀉、胸悶、咳嗽等症狀。如果暴露延長，則會發生間質性肺炎，使肺功能產生傷害。汞蒸氣如果慢性長期暴露，則容易四肢發生不自全抖動及行為人格上的改變。病人會易怒、激動、善忘、害羞、沮喪、不穩定及混亂等症狀出現。大量無機汞食入中毒，經常引起腸胃道黏膜傷害大量出血。病人常因此而休克，腎臟傷害及急性腎衰竭發生，少數會發生死亡。長期食入低劑量無機汞會有發生慢性間質性腎炎，導致尿毒症的發生。少數特殊體質者，也可能產生膜狀腎絲球腎炎的腎病症候群。

有機汞中毒最有名的是甲基汞中毒，其中以1953年日本的Minimata disease為最典型的例子。工廠排泄的廢水，經由海底微生物代謝成甲基汞。人與動物經由攝取含甲基汞的魚貝類而中毒，總共900人證實得到此病，90人死亡。中樞腦神經傷害是主要症狀。甲基汞由腸胃吸收而堆積在腦部，主要的症狀有視力障礙、無力、動作無法協調、感覺及聽力喪失、關節痛，智能低下、及不自主抖動。嚴重的病患常全身麻痺而死亡，中毒孕婦所生的胎兒常是畸且智能不足。

汞中毒的機制常是結合酵素的氫硫根(sulfhydryl group)所致，因此汞可以抑制全身許多酵素的活性，進而產生其毒理作用。汞的毒性非常的強，對於人體危害相當大，各個國家針對汞所訂定的生物暴露指標值(BEI)均不相同，以美國ACGIH來說，尿中總無機汞： $35 \mu g/g Crn$ (約  $35 \mu g/L$ )，血中總無機汞： $15 \mu g/L$ ；日本生物偵測指標物：汞和苯基汞以血中汞和尿中汞為主，澆基汞是髮中汞為主。故配合使用高效能液相層析儀法及流動注入氫化物產生原子吸收光譜法或是利用高效能液相層析儀法配合感應藕荷電漿質譜儀來分析研究尿液及血液中不同型態汞是有其必要性。高效能液相層析儀法的分離汞物種 methylmercury 及 dimethylmercury的條件如表四所示。

表4. 高效能液相層析儀單相方法及操作參數

Parameter	Setting
Mobile Phase	3.0% MeOH
	1.5% acetonitrile
Flow Rate	1.5 mL/min
Column	C18 column
	4.6 mm i.d. x 2 50 mm, 10 $\mu m$
Column Temperature	Ambient
Sample Injection Volumn	200 $\mu L$



圖五、 HPLC-ICP/MS 汞分析結果

### 硒的應用

硒是地球自然存在的固態成分，通常可以在岩石與土壤中發現。在環境中不常發現純硒，它通常會與其他物質結合，在岩石中的硒，大部分會與硫礦物或與銀、鉛、銅、和鎳礦等結合。在環境中，硒與氧結合形成幾種物質，最常見的是亞硒酸鈉與硒酸鈉，純的亞硒酸鈉與硒酸鈉是白色或無色的結晶。硫化硒是一種不溶於水、亮黃紅色的粉末，可以用在抗頭皮屑的洗髮精。有些硒的化合物是氣態的，如硒化氫（hydrogen selenide）（也可以叫做氫化硒 selenium hydride），是一種具有令人不悅氣味的無色氣體；雖然其他形式的硒可能存在空氣的粉塵中，但硒化氫可能是唯一在職業場所會引起健康影響的氣狀硒化合物。二氧化硒是一種工業製造的化合物，容易溶於水而形成硒酸，硒酸可以作為槍的藍色清潔劑。

植物易從水中吸收硒化合物，並且轉變成有機硒，例如甲硫胺酸硒（selenomethionine）（純態是一種透明固體）；對人類、動物而言，硒是一種必需的營養素，二者皆可利用有機或無機態的硒；對人體健康有益的硒人類日建議容許量（recommended daily allowance, RDA），男性每天是70微克，女性是每天55微克（微克是百萬分之一公克）。在體內，硒有助於防止氧化引起的組織傷害（有如維他命E的作用）；然而，動物或人類一旦持續攝取超過每日所需硒量的

5-10倍，就會對健康造成危害。大部分進入體內的硒，通常在24小時內，就會離開人體，超過人體所需的量，主要是以尿液，但也有由糞便與呼吸的方式排出。若是暴露量增加，則尿液中的硒也會增加；然而，一旦長期暴露非常高劑量的硒，硒會累積在人體內；主要累積在肝臟、腎臟，和血液、肺臟、心臟與睪丸，也會累積在指甲與頭髮中，依暴露時間的長短與暴露總量而定。

硒依形態可分為Se(IV)、Se(VI)及SeCN，可利用高效能液相層析儀法配合感應藕荷電漿質譜儀來進行物種分離，如圖六所示。

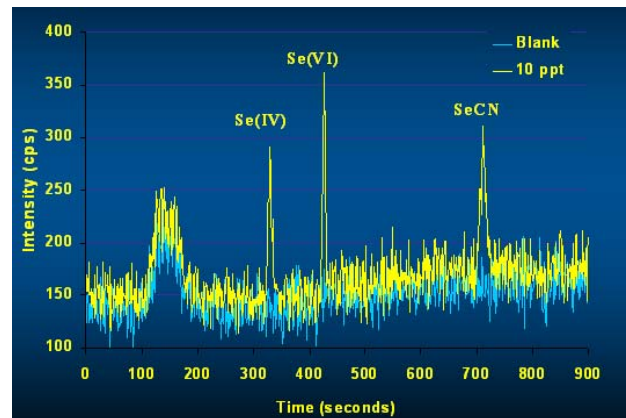


Fig. 6 HPLC-ICP/MS 硒分析結果

### 結論:

物種分離技術的發展，讓整個醫學研究、環境汙染、藥物分析、癌症分析等有更精進的探討，使得人類能更深入了解不同物種之金屬與疾病、環境、癌症等的因果關係，希望也能藉由這些研究發展，為人類帶來更多以前鮮為人知的訊息，以創造更佳的环境及未來。