

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

利用液相層析儀線上還原螢光法檢測致癌性硝基化合物

Trace Determination of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Liquid Chromatography with On-line Electrochemical Reduction and Fluorescence Detection

計畫編號：NSC 90-2113-M-039-001-

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：郭錦堂 中國醫藥學院環境醫學研究所

一、中文摘要

本研究方法是利用連線高效率液相層析儀/電化學偵測器/螢光偵測器，並配合逆相層析管柱、超音波萃取空氣中浮游粉塵的硝基化合物分析方法的開發。游離液為ACN: Monochloroacetic=7:3 (v/v)，pH=4.7來進行分析。其結果樣品中1-NP, 1,3-DNP, 1,6-DNP 和 1,8-DNP 的萃取率約83%，檢量線線性迴歸(r)值都達0.999以上，而雙基硝基和單基多環芳香羥化合物偵測極限分別為1.0和2.2 pg及高度變異性都小於6%，對實際樣品的應用有相當價值。

關鍵詞：硝基多環芳香羥化合物、超音波萃取、高效率液相層析儀/電化學偵測器/螢光偵測器

Abstract

An efficient clean-up procedure coupled with a high performance liquid chromatography with on-line electrochemical reduction and fluorescence detection was developed to quantify nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) in the airborne particulate. In this process, NPAHs were extracted ultrasonically followed by analyzing by using a reversed phase column with an aqueous eluent containing 70% aqueous acetonitrile and sodium monochloroacetate as a buffer solution. The extraction efficiencies were above 83% for 1-NP, 1,3-DNP, 1,6-DNP and 1,8-DNP and calibration graphs were linear with very good

correlation coefficients ($r > 0.999$) and the detection limits were in the range of 1.0 to 2.2 pg for dinitropyrenes and nitropyrene. The proposed method provides a relatively simple and convenient procedure for determining the NPAHs samples in airborne particulate.

Keywords: Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons; ultrasonic extraction; High performance liquid chromatography; electrochemical reduction; fluorescence detection

二、緣由與目的

世界各國的肺癌都有逐年增加的趨勢，同時都市與鄉村的罹患率又有差別，因此都市型態中之空氣污染物正是目前最關注之問題⁽¹⁻³⁾。空氣中有許多致突變性物質，往往都由不完全燃燒行為，汽車排放廢氣中含有其有害物質以多環芳香羥化合物之最；但有超級致突變物的Nitroarenes也是近年來受到重視話題之一，該物質的產生主要是由柴油車或石化工業直接排放於環境中，尤其石化工業區所排放之有機化合物種類相當複雜，在空氣中容易產生光化學反應，產生二次污染物的Nitroarenes⁽⁴⁾。

在之前的相關研究報導中，發現多環芳香羥化合物濃度在石化工業區並沒有比較高，但是 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 卻是高出許多，由研究顯示 SO_x 和 NO_x 和 O_3 及紫外線量可使多環芳香羥化合物容易轉變成Nitroarenes⁽⁵⁻⁶⁾，國際癌症研究組織IARC (International Agency for Research on

Cancer) 證實 Nitroarenes 的致突變性和致癌性之強度為多環芳香羥化合物的數千到數十萬倍, 有超級致突變物之稱⁽⁷⁾。

針對 Nitroarenes 的分析方法已在十二年前開發出利用的 NaSH 將 NO₂-PAH 還原成 NH₂-PAH 方法, 以螢光檢測器做分析, 此方法敏感度雖極佳, 但樣品處理過程相當複雜, 因此針對 Nitroarene 的分析方法有待進一步研發⁽⁸⁾, 除此也可利用 GC / NIEI / MS 進行偵測, 可是硬體昂貴且難度高, 是無法普及的原因⁽⁹⁾。而樣品萃取方法, 也是一大關鍵, 在以前方法中萃取時間上過於長久且無法同時萃取多個樣本。故本研究是採用高效率液相層析儀/電化學還原/螢光偵測器之方法, 並建立一個簡單、快速、回收率高的萃取方法, 而可以使操作簡單、感度高、精確度高、再現性佳、分析迅速, 可以有效分離出、偵測出 1, 8-DNP、1, 6-DNP、1, 3-DNP 及 1-NP 的分析方法。

三、材料與方法

(1) 標準品

研究所使用的標準品為 1, 8-Dinitropyrene (Aldrich, purity>98%), 1, 6-Dinitropyrene (AssuStandard, purity>99%), 1, 3-Dinitropyrene (Aldrich, purity>99%), 1-Nitropyrene (TCI, purity>98%) 共四種。樣品的萃取液以苯 (TEDIA, A. C. S 級)、乙醇 (TEDIA, HPLC 級), 液相層析儀之移動液以 CH₃CN (TEDIA, HPLC 級) 為主作為分離分析。

(2) 儀器設備及分析條件

以高效率液相層析儀 (Shimadzu LC-10AD 系統) 經由電化學還原 (BAS, LC-4C) 再透過螢光偵測器 (Shimadzu RF-10AXL) 進行自動分析。

(3) 流洗液 (Mobile phase) 的選擇

游離液在高效率液相層析儀來分析物質時, 對物質分離度是一個很重要因素, 參考相關文獻⁽⁶⁾, 最後選擇游離液的比例為 CH₃CN : Monochloro acetic acid sodium (0.1M) = 7:3 (v/v)。並測試在不同鹽類濃度下, 四種物質所得到的反應性, 訂出最適當濃度。

(3) 檢量線製作

製作檢量線時配置 6 點不同濃度之標準品, 混合標準溶液中各分析物含量介於 0.009 μg/ml ~ 7 μg/ml, 進行分析。所得化合物之波峰面積和濃度關係, 建立檢量線。檢量線之形式為 $Y = BX + A$, 其中 Y 為各物質在 HPLC 分析結果圖譜中波峰面積值, X 則為依照上述配置公式計算所得之濃度值。

(4) 環境採樣點、時間及流量

採樣點選擇以固定點中國醫藥學院為主, 時間是自 12 月 3 日至 1 月 3 日連續採樣時間一個月, 每天採集時數為 24 小時。採樣流量為 1100 L/min。

(5) 樣本處理

先裁成 1/2 張濾紙, 至入 50ml 的離心試管, 加乙醇 13ml, 再加入苯 39ml, 然後放置超音波振盪槽中, 冰浴振盪 40 分鐘; 再經離心機離心 (10 分鐘, 3000 rpm/min), 取出上清液 35ml, 經減壓濃縮至 2ml, 取出轉至 10ml 試管, 再用氮氣吹乾, 加 3ml 苯及 4ml NaOH, 進行液液分配。取上清液 2.5ml 至試管中, 以氮氣吹乾加入 0.5ml CH₃CN, 進行分析。

四、結果與討論

(1) Pre-separate column 和 Analytical column 的選擇

本研究選擇 Kaseisorb LC ODS 60-5 φ 4.6 mm×250 mm 做為分析分離管柱, 但是考慮到樣品實際分析時, 產生雜質干擾, 於是加裝 pre-separate column; 選擇以 TOSOH ODS-80TM φ 4.6 mm×150 mm、SUPELCOSIL LC-ABZ φ 4.6 mm×150 mm、TCI LC ODS 60-5 φ 4.6 mm×250 mm 三種分離管柱, 針對它的分離度以及最先物質和最後物質產生的時間做比較, 發現以 TOSOH ODS-80TM φ 4.6 mm×150 mm 為最佳。TOSOH ODS-80TM φ 4.6 mm×150 mm、SUPELCOSIL LC-ABZ φ 4.6 mm×150 mm、TCI LC ODS 60-5 φ 4.6 mm×250 mm 三種分離管柱, 針對它的分離度以及最先物質和最後物質產生的時間做比較, 發現以 TOSOH ODS-80TM φ 4.6 mm×150 mm 為最佳。

(2) 電化學偵測器電位選擇

將四種物質在移動相溶劑中分別做出電位掃描, 發現四種物質的起始電位在 -0.5 ~ -0.6V; 因考慮到工作電極的最大負荷力,

所以利用同一濃度標準品在不同電位下，在螢光偵測器所得反應大小，進行探討。發現以-1.5V的電位為最佳。

(3) 四種還原物質波長的掃描

分別將3種DNP(1,8-DNP、1,6-DNP、1,3-DNP)和1-NP的還原物質，進行螢光波長掃描。所得結果為：1,8-DNP的 E_x 、 E_m 為394、450 nm，1,6-DNP為372、445 nm，1,3-DNP為375、480 nm，1-NP為356、436 nm。

(4) 方法偵測極限

本研究採用ASTM定義，以檢量線之最低濃度製作樣本經過重複分析10次，所得之積分面積取3倍標準偏差除以平均值乘以最低絕對濃度為方法偵測極限(LOD) ($LOD = (3 \times SD / \text{mean}) \times \text{conc}$)。其結果由表五顯示出1,8-DNP、1,6-DNP、1,3-DNP和1-NP具有極低的偵測極限1.03~2.20pg，且變異係數都在標準7%以內。整體來說，此研究分析方法所得到的偵測極限較之前學者所做的還要更低^(6,10,11-13)，顯示出具有好的感度和效度，以利以後在環境中的致癌物質硝基多環芳香烴化合物能更加容易的檢測出來。

(5) 方法添加回收率

本研究取檢量線的高、中、低三點(1.4、0.46、0.153 $\mu\text{g/ml}$)濃度0.5 ml，進行濾紙添加回收率試驗，其結果顯示，1,8-DNP、1,6-DNP、1,3-DNP和1-NP的平均添加回收率為83.5~94.1%；而變異係數為1.97~2.74%

(6) 實際樣品分析

利用此方法來分析樣品時發現部份雜質還是會影響到分離狀況，於是利用四次微分的原理，使受干擾物質影響降到最低。將標準品所得到的圖譜進行四次微分，分別建立面積及高度的檢量線，發現到以高度求得到的r值比面積還要好，所以實際樣品分析以四次微分所得到的高度，來求實際樣品濃度值。利用此研究方法進行實際採樣，經四次微分法，所測得到的。

各化合物濃度分別以中位數、幾何平均值表示，其結果1,8-DNP為97.50、61.84 pg/m^3 ，1,6-DNP為35.52、38.14 pg/m^3 ，

1,3-DNP為59.72、64.72 pg/m^3 ，1-NP為229.00、222.28 pg/m^3 。

(7) 結論

本研究利用高效率液相層析儀 / 電化學還原 / 螢光偵測器分析方法中，電化學偵測器在整個過程來說只是個還原作用，比以電化學偵測器做為檢測較容易穩定、快速，而且檢測下限更好等優點。本研究利用高效率液相層析儀 / 電化學還原 / 螢光偵測器分析方法中，加裝切換裝置及 preseparate column，來分析四種硝基多環芳香烴化合物，可以得到良好的再現性、回收率、精確度、分離度，並且所測得到的偵測極限比之前所使用的高效率液相層析儀/電化學偵測器所測得到的值還要更低，顯示出在整個採樣時間，可以大幅縮短，對環境中的監測能更進步的掌控。因此是一種值得推廣的分析方法。在此次分析結果發現，四種物質中，在標準品分析下可以得到非常良好的相關性，但是在實際分析樣品時，1-NP分離結果是比較不好，常被背景值所遮蓋掉，而考慮到的因素可能是流洗液選擇上問題，因此在這研究中還有很大的探討空間，但是基本上是一個值得推廣研究下去的分析方法。

五、參考文獻

1. H.S. Rosenkrantz ; R. "Mermelstein" : Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal, Mutation Research, Vol. 114, 217-267, 1983
2. A.P. Li, J.S. Dutcher : Mutagenicity of mono-, di- and tri-nitropyrenes in chinese hamster every cell, Mutation Research Lett., Vol. 119, 387-392, 1983
3. S. Takayama, T. Ishikawa, H.S. Nakajina: Lung carcinoma induction in syrian golden hamster by interatracheal instillation of 1,6-dinitropyrene, Jan. L. Cancer Research(Gann), Vol. 76, 457-461, 1985
4. K. Tanabe, H. Matsushita, C.T. Kuo, and S. Imamiya : Determination of carcinogenic nitroarenes in airborne particulates by high performance liquid chromatography

- graphy, J. Japan Soc. Air Pollution, Vol. 21(6), 535-544, 1986
5. H. Lee, S.Y. Su, K.S. Liu et al. : Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulates samples in a tropical monsoon climate area from kaohsiung city taiwan, Environment and molecular mutagenesis, Vol.230, 200-207, 1994
 6. 陳鴻文：大氣中硝基多環芳香烴化合物分析方法及其應用之分析，畢業論文，民國八十五年，七月
 7. J. Lewtas and L.J. Cupitt. The integrated air cancer project : Program overview in Proc.EPA/APCA,555-562, 1991
 8. B.T. Silvestre, B.E. Roy : Fluorescence detection and identification of nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons by on column catalytic reduction to aromatic amines, Analysis Chemistry., Vol.58, 1827-1834, 1986
 9. R. Thomas, U. Kiell, Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by fused silica capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry, Analysis Chemistry, Vol.54, 2256-2260, 1982
 10. K. Hayakawa, Y. Kawaguchi, T. Murahashi, M. Miyazaki : Distributions of nitropyrene and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler, Mutation Research, Vol. 348, 57-61, 1995.
 11. S.M. Rappaport, Z.L. Jin, X.B. XU : High-performance liquid chromatography with reductive electrochemical detection of mutagenic nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons In diesel exhausts, Journal of Chromatography, Vol. 240, 145-154, 1982
 12. Z.L. Jin, S.M. Rappaport. Microbore : Liquid chromatography with electrochemical detection for determination of nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons in diesel soot, Analysis Chemistry, Vol. 55, 1778-1781, 1983
 - 13.K. Hayakawa et al. : Determination of 1,3-,1,6-,1,8-Dinitropyrene and 1-nitropyrene in urban air by high performance liquid chromatography using chemiluminescence detection, Environment Science Technology, Vol.29, 928-932, 1995

