

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

子計畫一：土壤及井水中之腐植酸及其錯合砷之分析(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2745-B-040-008-URD

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學職業安生衛生學系

計畫主持人：陳建良

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94年5月17日

子計畫 1 -- 土壤及井水中之腐植酸及其錯合砷之分析

第一年期中期報告

一. 工作項目

本子計畫第一年預期完成以電層析法及毛細管電泳法分析腐植酸聚合物及其裂解單體，目前已修飾完成適合電層析法分析腐植酸聚合物之三種 monolithic 固定相毛細管 9 種裂解單體之毛細管電泳分析以及腐植酸聚合物裂解設備和方法之建立，未來將針對真實樣品分析其可能之腐植酸化學組成。

二. 研究成果

(A) 三種 monolithic 固定相毛細管之修飾合成：

一般以液相層析法分析聚合物分子是使用 GPC (gel permeation chromatography)，然而與 CGE (capillary gel electrophoresis) 相較，其樣品負載量及其管柱效率皆較不利，所以本研究自行合成三種新式毛細管，將來嘗試分析腐植酸之聚合或寡聚合物。以下分別為其合成步驟：

(1) 聚苯乙烯固定相：

1. 準備數內徑為 75 μ m、外徑為 375 μ m、全長為 50cm 之毛細管。
2. 以 0.2mol/L NaOH，並將壓力設定為 40psi，沖洗毛細管一小時。
3. 以水沖毛細管兩小時，使流出液體之 pH 值為 7.0。
4. 通過氮氣 30 分鐘，使毛細管乾燥。
5. 將 1ml 的 -MARS 與 1ml 的 methanol 混和，再注射至毛細管中。
6. 用橡膠塞子密封毛細管兩端，置於室溫 12 小時以上。
7. 以 methanol 和水分別沖洗殘留物 30 分鐘。
8. 將 styrene(5.0%)、divinylbenzene(10%)、2-acrylamido-2methylpropanesulfonic acid(5.0%)、toluene(80%)依其體積比混合。〈此液後簡稱為 A 液〉
9. 取 A 液之 1%(w/v) 的 AIBN (2,2'-azo-bis-isobutyronitrile) 加入 A 液。
10. 將 A 液注射至毛細管中，定位於 36cm 處。
11. 將毛細管兩端密封，放入烘箱，溫度設定為 70 ，置放 24 小時。

12. 將 A 液也同第 10 步驟操作，以便將來以紅外線或表面積量測分析。
13. 以 methanol 沖洗毛細管之殘留物 30 分鐘，壓力設定為 40psi。
14. 以 5kV 之低電壓，注入 5×10^{-3} mol/L、pH=8.82 之 Tris buffer 一小時。

(2) 聚甲基丙烯酸酯固定相 A：

1. 將 0.36g 的水、 3.24g 的 1-propanol+1,4-butanediol 的混合物，緩慢混合成 ternary porogenic solvent。
2. 將 0.0024g 的 AIBN (azobisisobutyronitrile)、 0.96g 的 EDMA (ethylene dimethacrylate)、 1.4356g 的 butyl methacrylate、 0.00432g 的 AMPS(2-acrylamido-2methyl-1-propanesulfonic acid)，以上述溶液混合溶解。
3. 氮氣脫氣 10 min 以去除氧氣。
4. 用注射器取一些上述的液體移到毛細管柱裡(把 50cm 的管柱填滿 30cm)，末端用橡皮塞塞好。毛細管放到 60 的水浴中，靜置 20 個小時。沖洗毛細管 5 個小時即完成。

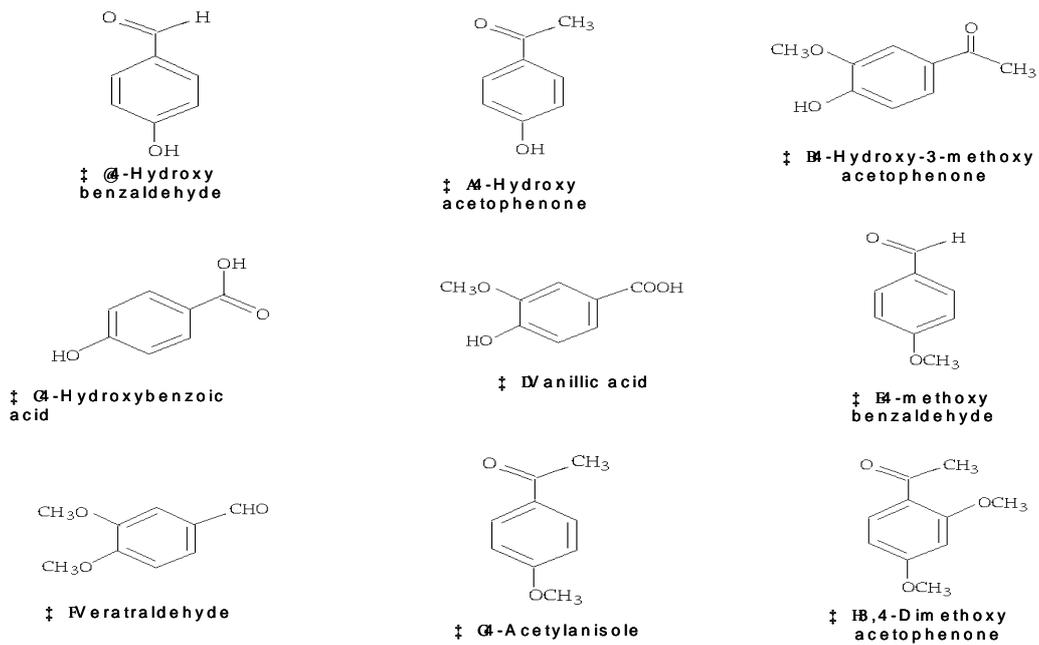
(3) 聚甲基丙烯酸酯固定相 B：

1. 毛細管用 1M 的 NaOH 溶液沖洗 20 分鐘,再用水清洗,直到出來的溶液 pH=7。
2. 用甲醇沖洗 10 分鐘,用氮氣通過在 60 的 GC 爐使之乾燥。
3. 將 γ -MAPS/MeOH 溶液用注射器注入毛細管。
4. 將兩端用橡膠密封,在 45 的 GC 爐中維持一整夜。
5. 依次用 MeOH 和水將毛細管內的殘留試劑洗掉。
6. AIBN(12mg)溶解在 2mL 的 EDMA。
7. 經過調製的 porogenic 溶液(混合 50%1-propanol 和 50%1,4-butanediol)
8. 甲基丙烯酸單體、EDMA 及 porogenic 分別依照比例用 10 μ m、50 μ m 和 100 μ m 混合在一起。
9. 上述總共 160 μ m 的混合物用注射器吸取到 γ -MAPS 修飾之毛細管 35 cm 內。
10. 結束後毛細管用橡膠密封,然後再將毛細管用 60 的水水浴四小時。
11. 最後先用甲醇沖洗完,再用水沖洗即完成。

(B) 9 種裂解單體之毛細管電泳分析:

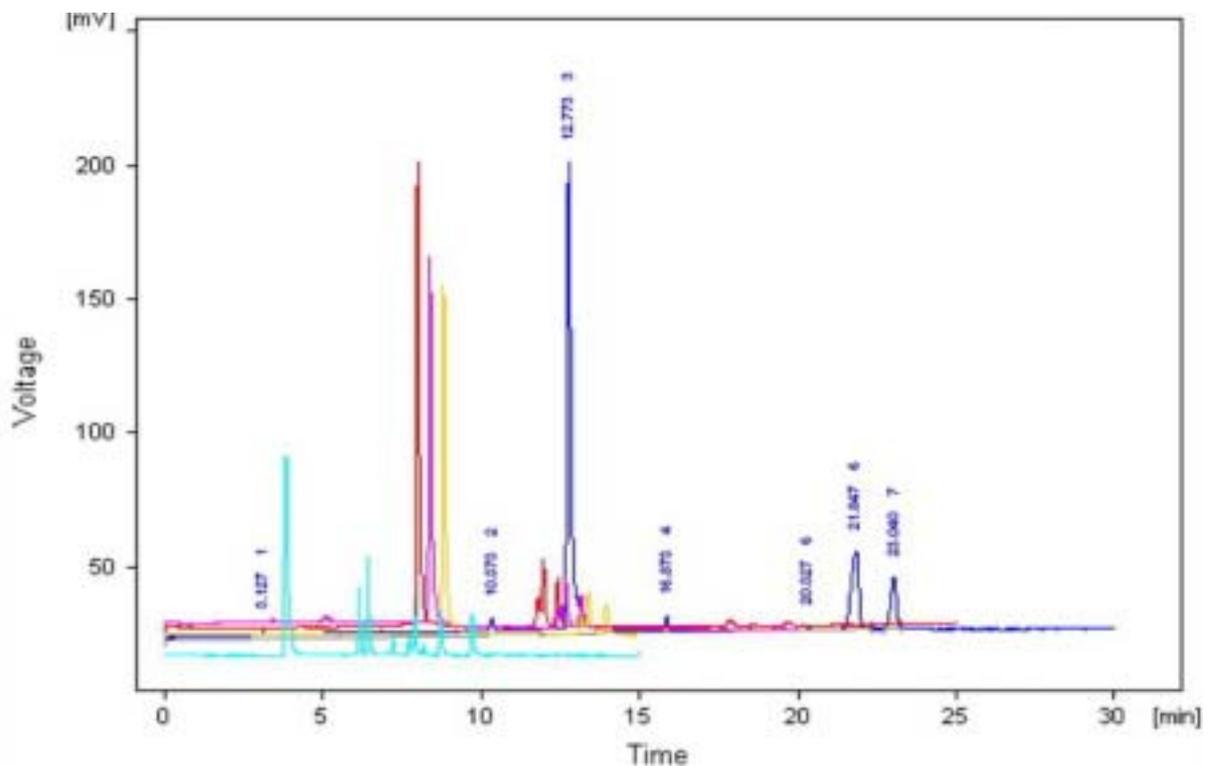
溶於甲醇之 9 種腐植酸單體樣品的化學結構列於下圖一。

圖一 9種腐植酸單體的化學結構

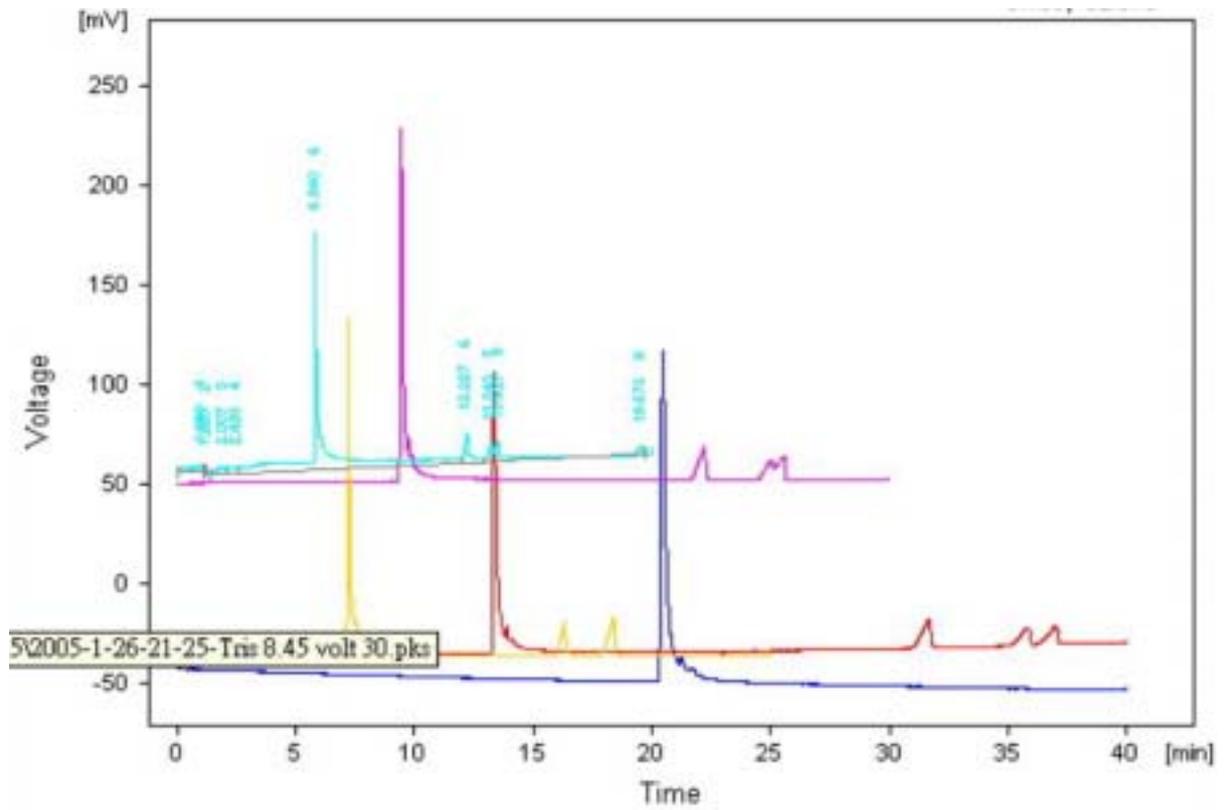


在操作電壓 5、10、15、20 及 25 kV 條件下，首先配製 100 mM pH 8.08、8.45 及 8.88 的 Tris 緩衝溶液為沖提液，其電層析圖譜分別列於下圖二 四，其中最佳是 25 kV 下 pH 8.08 之條件(圖五)。

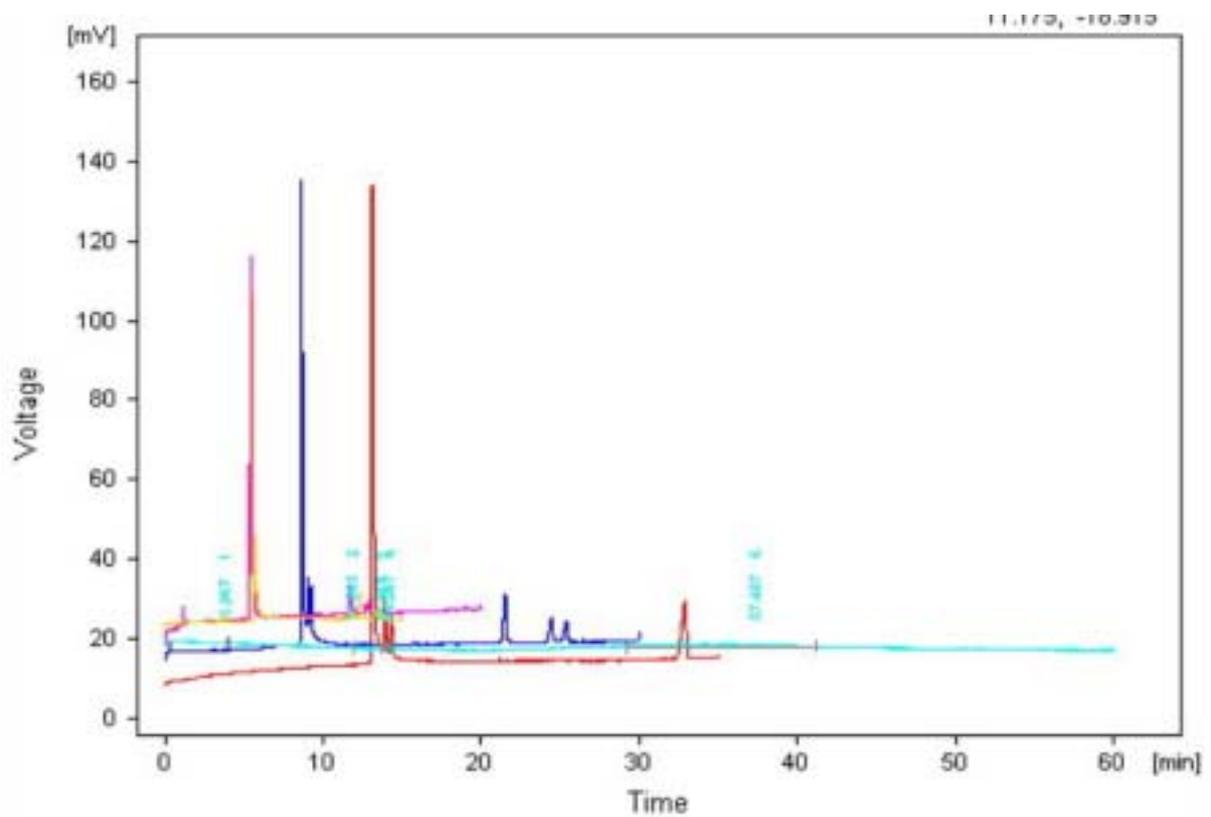
圖二 Tris pH 8.08



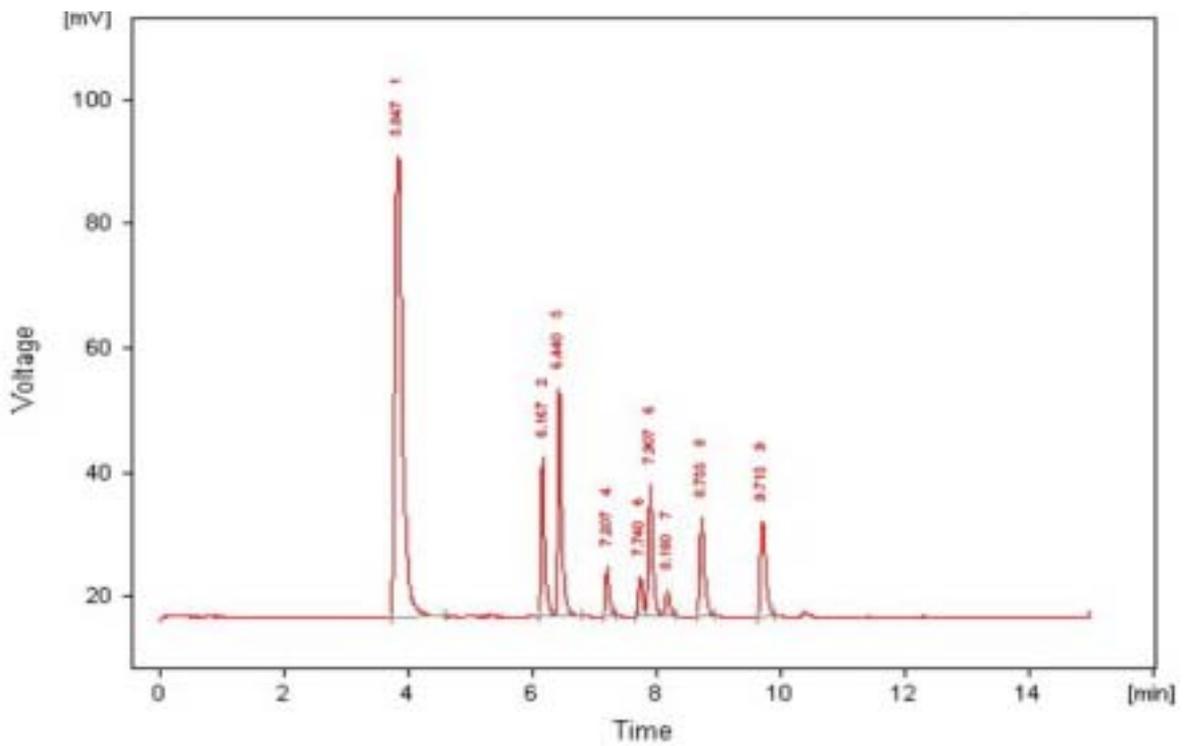
圖三 Tris pH 8.45



圖四 Tris pH 8.80

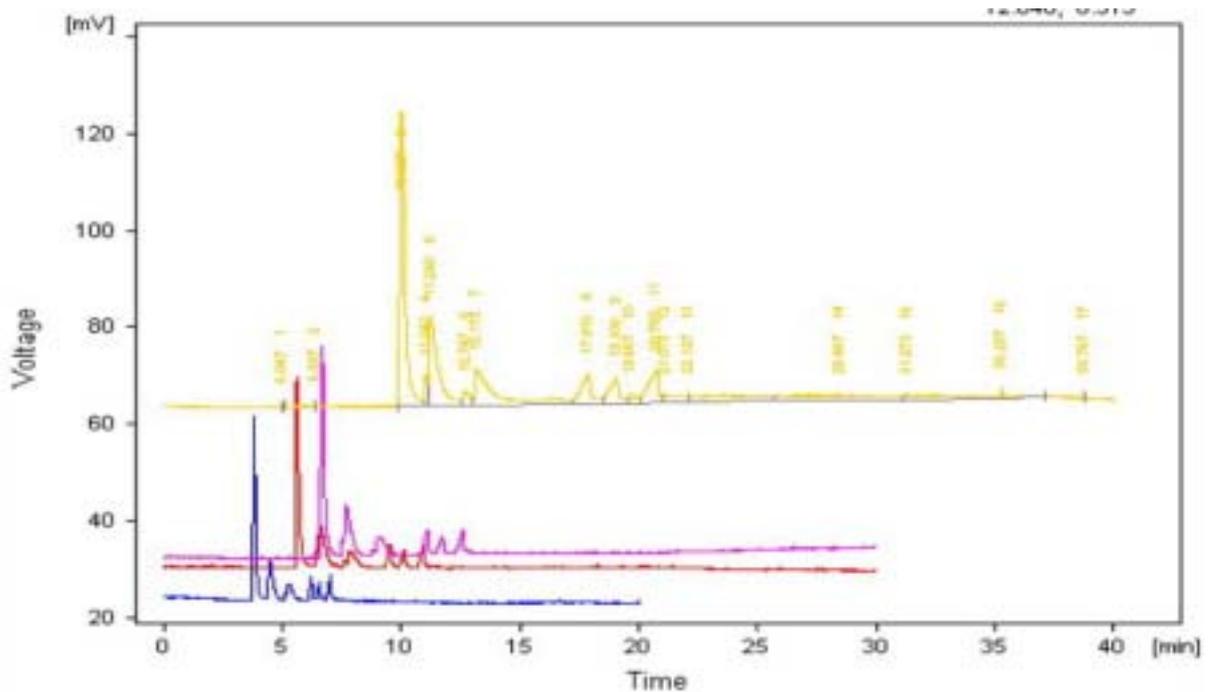


圖五 Tris buffer, pH 8.08, 25 kV

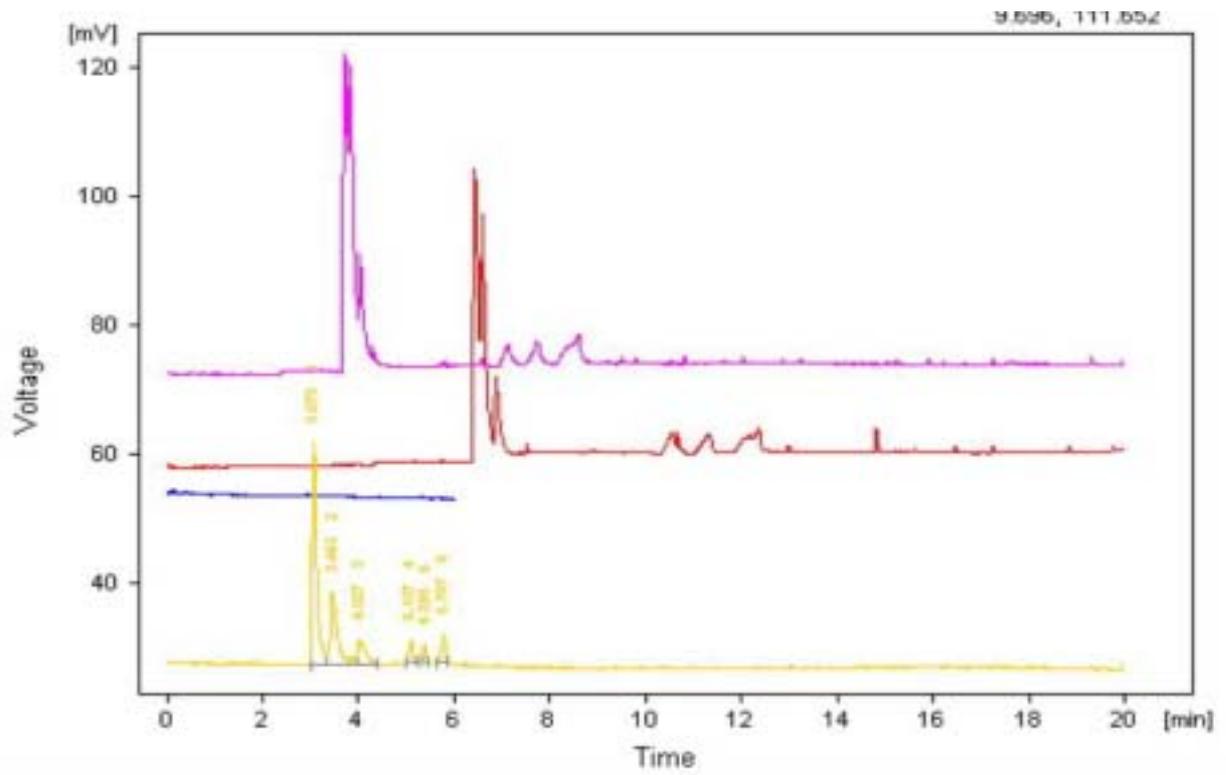


在操作電壓 10、15、20 及 25 kV 條件下，配製 100 mM pH 8.08、8.45 及 8.82 的 EDTA 緩衝溶液為沖提液，其電層析圖譜分別列於下圖六 八，其中最佳是 15 kV 下 pH 8.82 之條件(圖九)。

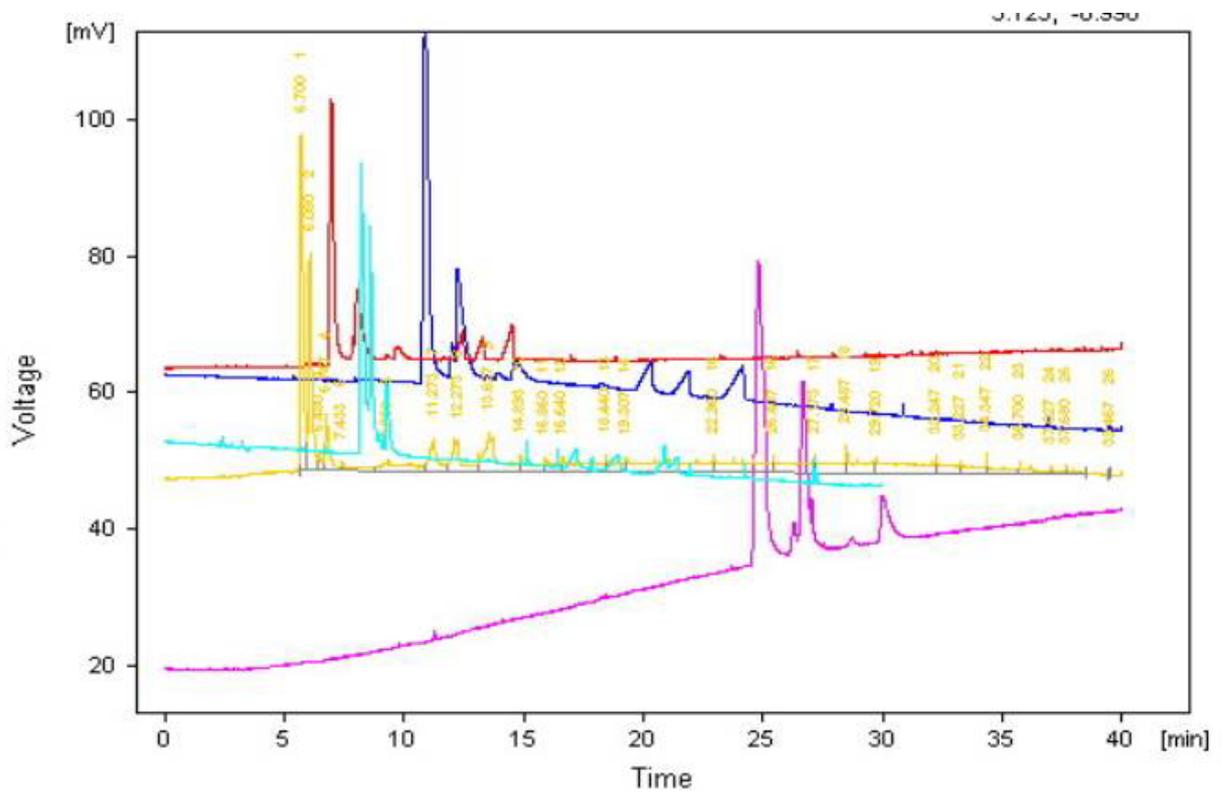
圖六 EDTA pH 8.08



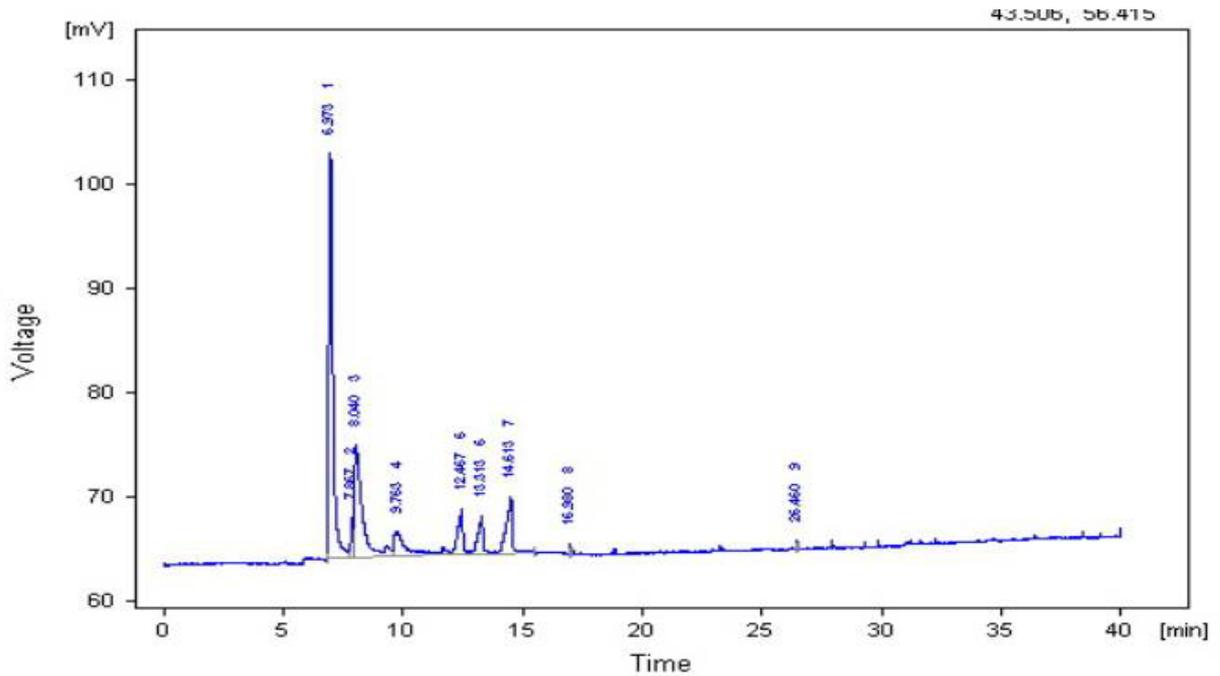
圖七 EDTA pH 8.40



圖八 EDTA pH 8.82

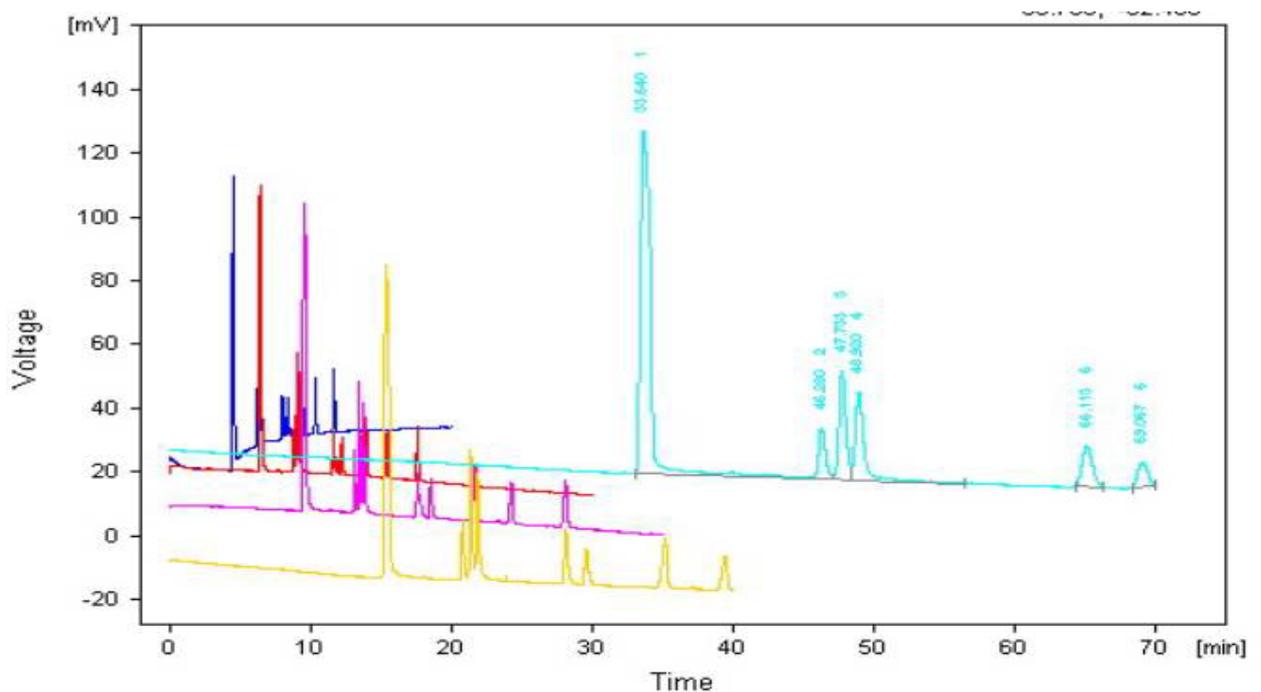


圖九 EDTA pH 8.82, 15 kV

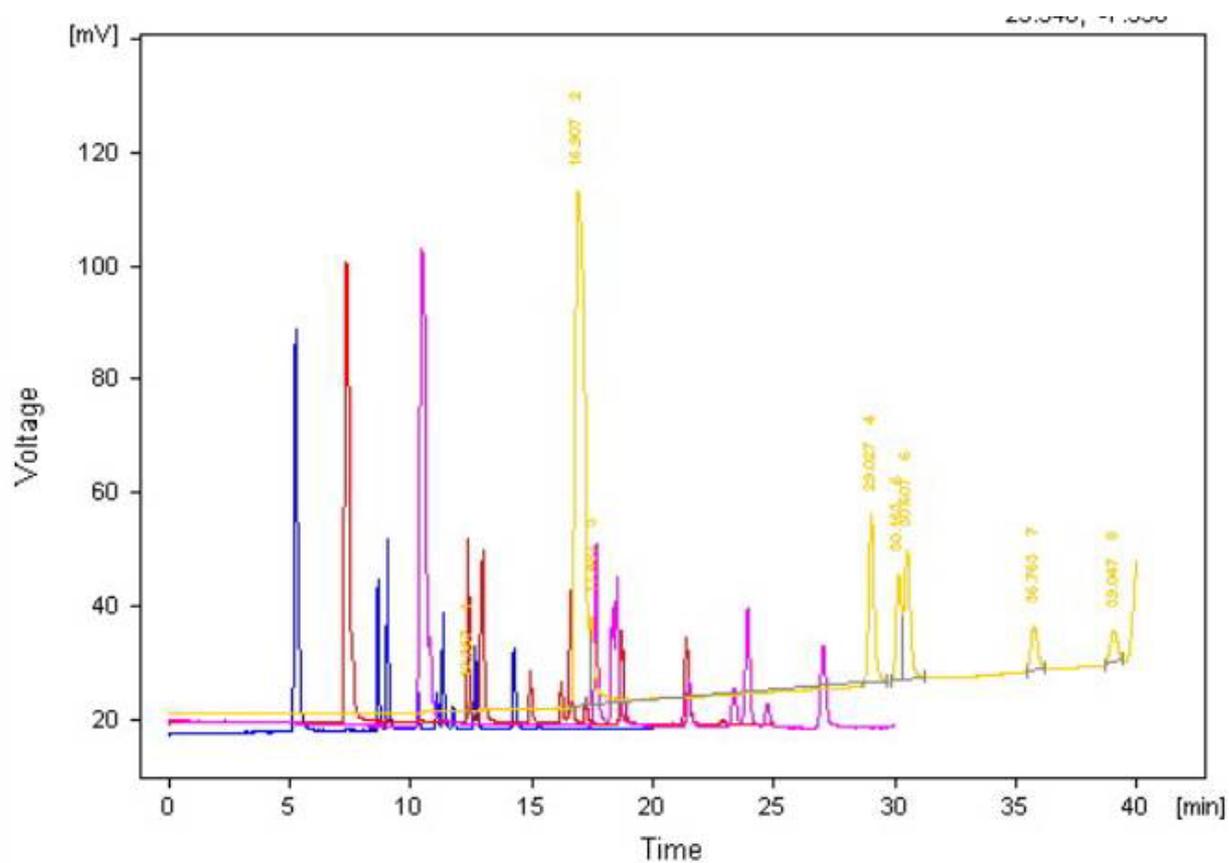


在操作電壓 5、10、15、20 及 25 kV 條件下，配製 100 mM pH 7.92、8.40 及 8.80 的硼酸緩衝溶液為沖提液，其電層析圖譜分別列於下圖十 十二，其中最佳是 15 kV 下 pH 8.40 之條件 (圖十三)，而這也是目前所有變數之最佳值，未來也將以此為條件對裂解後之腐植酸進行單體分析。

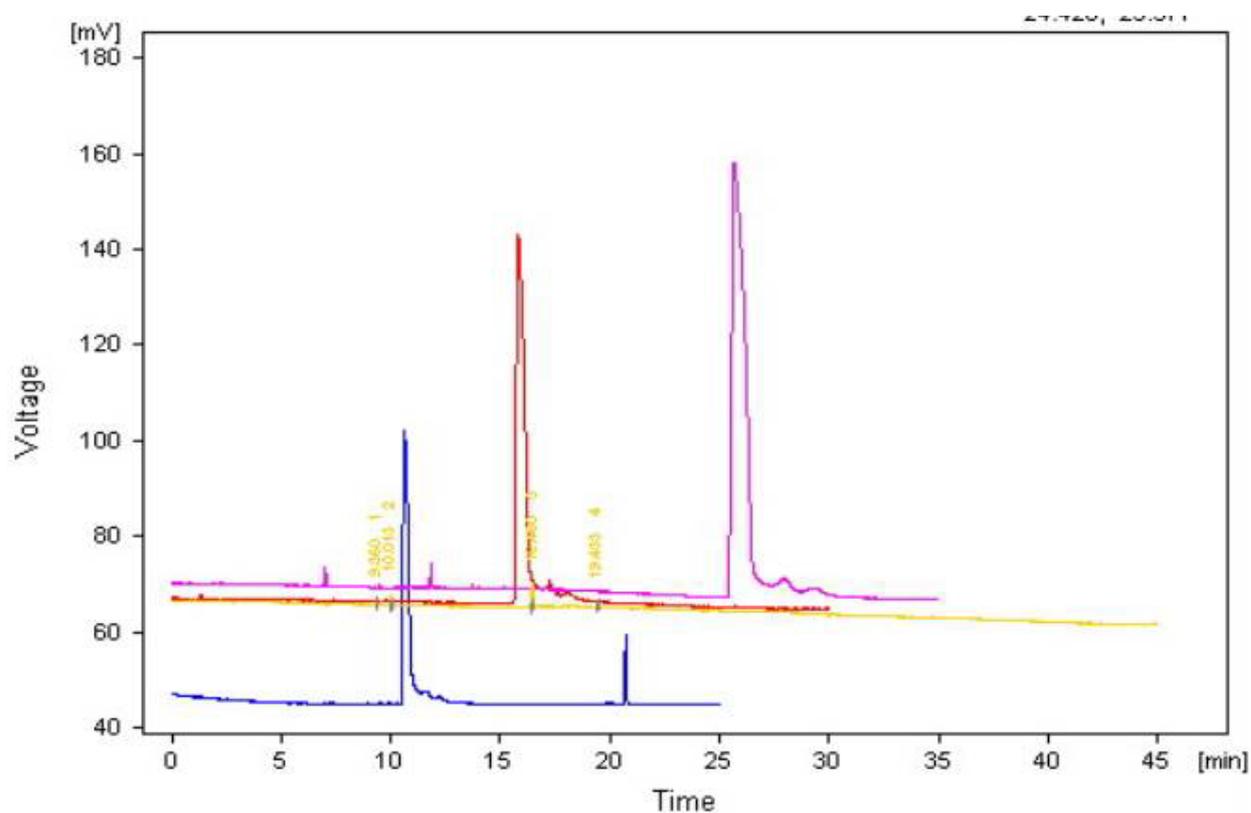
圖十 borate pH 7.92



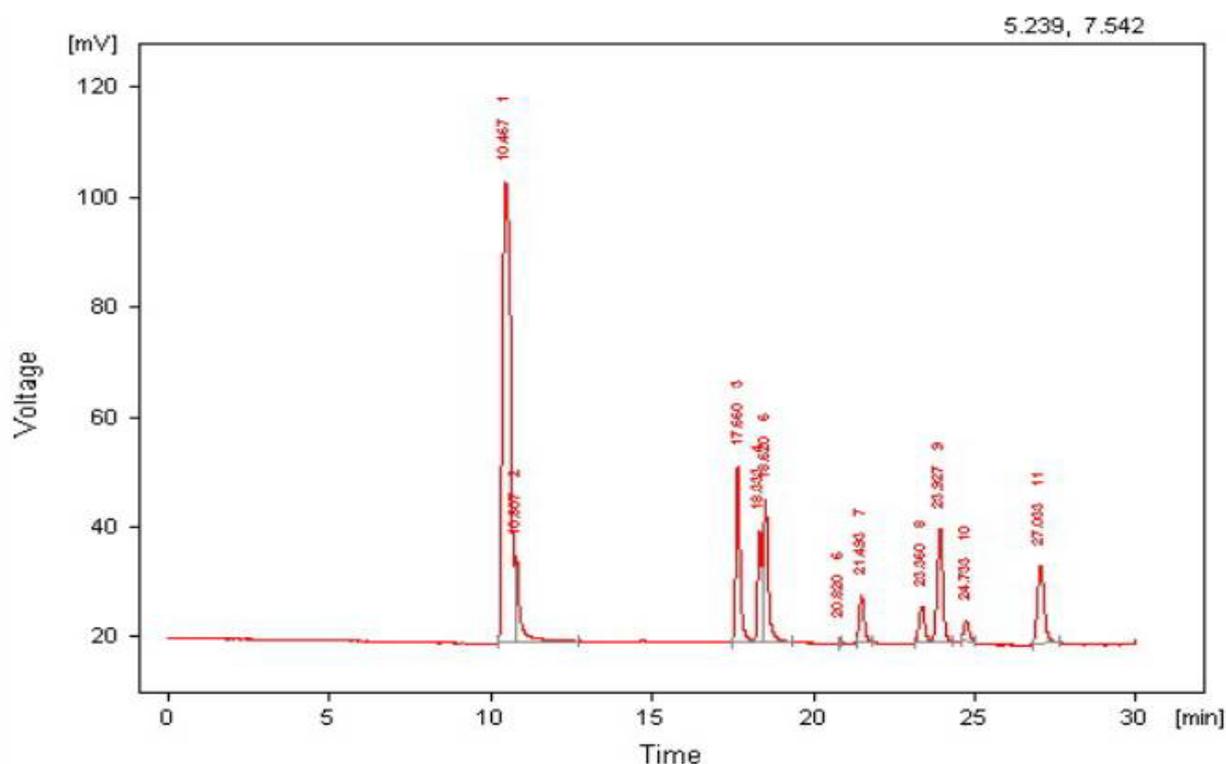
圖十一 borate pH 8.40



圖十二 borate pH 8.80



圖十三 borate pH 8.4, 15 kV



Peak identification: (1): system peak; (2): 4-Hydroxy benzaldehyde; (3): 4-Hydroxy acetophenone; (4): 4-Hydroxy-3-methoxy acetophenone; (5): 4-Hydroxybenzoic acid; (6) ghost peak; (7) Vanillic acid; (8): 4-methoxy benzaldehyde; (9): Veratraldehyde; (10): 4-Acetylanisole; (11): 3,4-Dimethoxy acetophenone.

(C) 聚合物裂解設備和方法之建立

腐植酸樣品可經以下反應裂解成寡聚合或單體，再由已架構之電層析或毛細管電泳系統分析。

1. 25 克土壤或井水樣品置於密封的鐵氟龍小瓶，再以鋼製的 bomb 保護。
2. 將 1 克 CuO ammonium iron(II) sulfate hexahydrate $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 75 mg 8% hydroxide sodium 7ml 等加入樣品中，以氮氣壓力密封。
3. 將 bomb 置於攝氏 150 度烤箱 4 小時，此時，CuO 的氧化作用便開始。
4. 經冷卻後，將反應產物及以 4% NaOH 30ml 清洗 bomb 後一齊置入 50ml 的離心管內。
5. 離心之後的上澄清液要保留下來，下沉澱物以 4% NaOH 10ml 清洗。
6. 上澄清液和清洗沉澱物後之萃取液混合，以 6M HC 使其酸性化至 pH 值為 1。
7. 減壓濃縮後之固體，經乙醚萃取溶解。乙醚蒸發後，其固體殘渣以 5ml 甲醇溶解之。
8. 甲醇溶液以 22um 的濾紙過濾，放入密封小瓶中，置於氮氣壓下、攝氏 4°C 黑暗中。