

中國醫藥大學

新進教師及研究人員學術研究經費補助成果報告

計畫名稱：毛細管電泳法對 EBDCs 及 ETU 之檢測研究
Determination of EBDCs and ETU by capillary
electrophoresis

計畫編號：CMU -N1- 14

執行期限：99 年 10 月 1 日至 100 年 9 月 30 日

單位名稱：藥學院藥學系

主持人：林宜慧

中華民國 100 年 12 月 26 日

一、前言

現代人重視生活品質，追求健康的消費及環境的保護，對飲食的要求除了強調美味營養外，也特別要求優質安全的農產品，進而帶動有機農產品市場蓬勃的發展。有機農業是一種對環境友善的耕種方式，除可生產安全、優質的農產品供應市場外，亦可降低因農業生產對環境污染之衝擊[1]。然而，因栽種環境與土地上的限制，有機農產品的價格要比一般農產品貴上許多。姑且不去做價格上的考量，如何吃的健康與安心，準確的檢測方法是必須且重要的。

「Dithiocarbamate 類」殺菌劑，也就是俗稱的「有機硫黃」，在市面上的產品包括有富爾邦(ferbam)、得恩地(thiram)、錳乃浦(maneb)、鋅乃浦(zineb)、鋅錳乃浦(mancozeb)、甲基鋅乃浦(propineb)等，最有名的是原羅門哈斯公司所生產的鋅錳乃浦 80%可濕性粉劑「大生 45」，一般農民稱之「大生粉」[2]。Dithiocarbamates 可區分為兩大類，分別是 ethylenebisdithiocarbamates (EBDCs) 類(如 maneb, zineb, 及 mancozeb) 和 dimethyldithiocarbamates(DMDCs)(如 ferbam, ziram, 及 thiram)。EBDCs 為廣效殺菌劑，大量被使用於蔬菜、水果、穀物及其他的農作物中[3]，此類化合物分解生成異硫氰根(-N=C=S)與組成蛋白質的氨基酸分子上的-SH 作用，使蛋白質失去功能，另外重金屬元素部分在細胞內與酵素蛋白質產生鉗合作用(Chelation) 也促進殺菌效力。由於效果好且不易產生抗藥性，防治範圍廣，且對生物的毒性低，不論單劑或混合劑使用非常普遍[4]。該類藥劑於 1950 年代問世以來，全世界每年的使用量高達 30,000 公噸[5]。

雖然普遍認為 EBDCs 對於人類及環境中的動物不具有急毒性，但 ethylenethiourea(ETU) 是由 EBDCs 在環境中降解而得的副產物，在製作香菸、烹煮食物、製成市售飲料時都可能產生，同時它也是植物及動物體代謝 EBDCs 後所得的代謝物[6-8]。它被認為是 EBDCs 致毒性的最大來源。許多研究已證實 ETU 會導致實驗動物產生突變、畸型、腫瘤形成及甲狀腺病變等副作用，且慢性使用 EBDCs 類藥物可能會導致一系列的神經行為病變，包括運動失調、下肢麻痺、痙攣、行為脫序、腦部病變等[9-11]。雖然尚未證實人體中是否有 EBDCs 代謝為 ETU 的代謝途徑，但有多個研究曾經在使用 EBDCs 的農夫尿液中發現 ETU 的存在[9, 12-14]。通常 dithiocarbamates 可經由皮膚、黏膜、呼吸道及腸胃道吸收[10]，在一份針對種植馬鈴薯農夫的研究中指出，ETU 在體內半衰期可達 32-100 hr 之久[14]，使得人們不能去忽略它對健康的影響，如何建立簡單且可信的檢驗方式就變得相當關鍵。

二、研究目的與文獻探討

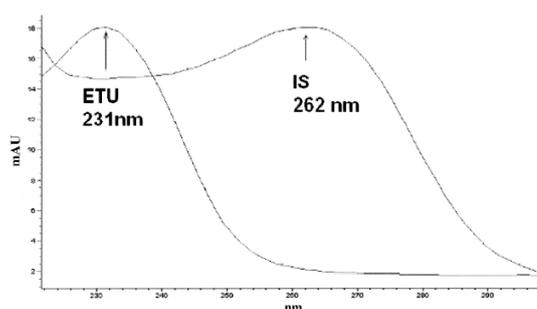
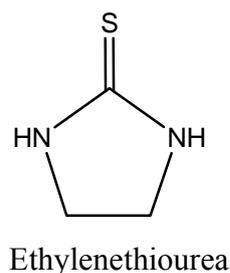
文獻中 EBDCs 的分析方法主要有下列幾種方式。其中美國食品藥物管理局 FDA 最早採用的是非特異性的比色法[15]，它是將藥劑在酸性基質中加熱生成二硫化碳(CS₂) 氣體，導入含胺類及醋酸銅的溶液中形成黃色錯合物，再以 435nm 波長光譜儀偵測。這個方法於 1980 年左右公告為國家標準檢驗方法，無法區分不同類的 dithiocarbamates 藥劑，且在分析過程中必須加入去除含硫化物之干擾物等吸附管或吸附劑之步驟，部分蔬菜如乾香菇、洋蔥、蘿蔔類易造成干擾，造成偽陽性之檢出結果[4]。氣相層析法是主要用來檢測 ETU 的一種方式[16-20]，利用管柱前衍生來增加特異性與提高分析靈敏度，在適當的前處理配合下，偵測極

限可達 10 ppb，較前一種方法快速且可避免多數干擾，但衍生過程耗時而費力，且過程中的升溫動作可能會導致額外的 ETU 產生[10]。高效液相層析法搭配紫外光偵測器、電化學偵測器或質譜儀也被使用[12, 21-26]，於 2003 年公告為國家標準檢驗法，它不受硫化物等干擾，但分析時步驟繁雜，需有經驗分析者始能為之，且分析成本較高[27]。

毛細管電泳法(Capillary Electrophoresis, CE)為新的分析技術，其優勢包括高效率、微量樣品及試劑、易自動化及高通量分析，在許多分析領域中已被作為 HPLC 和 GC 的替代方法。搜尋文獻後尚未發現已建立的利用此法分析 EBDCs 的模式，故本研究之主要目的在於建立簡單靈敏之毛細管電泳分析法來進行 EBDCs 及其代謝物 ETU 之監測，由於免疫分析法專一性不足，GC 及 LC 的分析法多需進行衍生，步驟繁雜，本計劃擬開發新的 CE 分析技術，利用 CE 高分離效率及操作簡易的特性，建立快速且具專一性的檢測方法。

三、研究方法、結果與討論

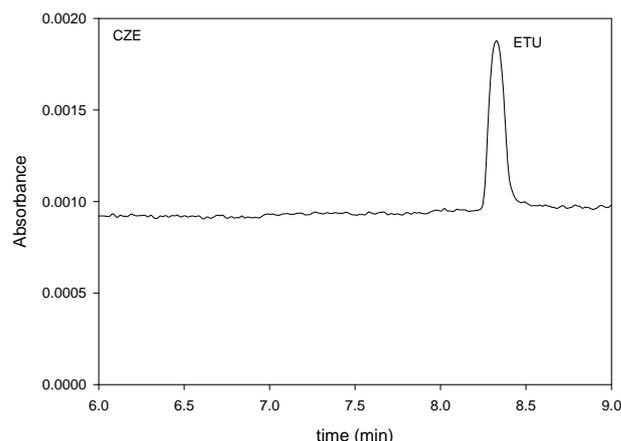
本研究採用毛細管電泳搭配紫外光偵測器的方式進行分析方法的建立。ETU 為 EBDCs 的代謝物，結構及 UV 光譜圖如下所示，可在 UV 214nm 或 220nm 的波長下進行偵測。



UV spectra of ETU with a λ_{max} at 231 nm

毛細管電泳分析條件如下

- (1) Instrument: Beckman P/ACE System MDQ
- (2) Capillary: 50/60 cm \times 50 μ m i.d. uncoated fused silica
- (3) Buffer: 50 mM phosphate, pH 7
- (4) Sample injection: 0.5 psi, 5 s
- (5) Voltage: 20 kV
- (6) UV: 214 nm
- (7) Sample concentration: 100 ng/mL



圖一、CZE 模式下所得之電泳圖

單純以 CE 搭配 UV 的方式進行分析，因受限於毛細管的內徑小，偵測窗光徑短且樣品注入量少，因此在微量樣品分析上，靈敏度反而未比傳統方法好。顧及將來必須將分析方法應用到生物檢品及各式農產品中，我們嘗試以線上樣品堆積技術(on-line sample stacking; on-line preconcentration)來增加分析感度，在經過試驗後，以大體積樣品堆積技術來分析，偵測靈敏度可有效增加。

綜合上述實驗結果，我們建立了簡單檢測ETU的毛細管區帶電泳法，分析條件為磷酸鈉緩衝液(80 mM, pH 7)，分離電壓為20 kV，偵測波長為214 nm，其偵測極限為1 ng/mL，並利用大體積樣品堆積技術，使分析靈敏度增加，現已轉移至尿液基質中進行分析，因尿液中含有許多內生性干擾物，若無法有效去除，將嚴重影響實驗結果，因時間上的關係，後續實驗仍在進行中。本研究已建立一簡單靈敏之毛細管電泳分析法來進行ETU之測定。建立可靠且簡單的分析方法來進行準確鑑識是相當重要的，除可提供品質檢測的依據外，亦可應用於農民生活品質之追蹤。

感謝學校相關研究經費之補助。

四、參考文獻

- [1] 行政院農業委員會農糧署蔡精強, <http://info.organic.org.tw/supergood/ezcatfiles/organic/img/img/721/profile.pdf>.
- [2] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所, <http://www.tactri.gov.tw/htdocs/intro/pcd/pcdfile/Cate/book05/053.pdf>.
- [3] Debarh, I., Moore, N., *J Anal Toxicol* 2002, 26, 216-221.
- [4] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所, <http://www.tactri.gov.tw/htdocs/agripp/931012.asp>.
- [5] El Balkhi, S., Sandouk, P., Galliot-Guilley, M., *J Anal Toxicol* 2005, 29, 229-233.
- [6] Rosenberg, C., Siltanen, H., *Bull Environ Contam Toxicol* 1979, 22, 475-478.
- [7] Ripley, B. D., Cox, D. F., Wiebe, J., Frank, R., *J Agric Food Chem* 1978, 26, 134-136.
- [8] Ripley, B. D., Cox, D. F., *J Agric Food Chem* 1978, 26, 1137-1143.
- [9] Panganiban, L., Cortes-Maramba, N., Dioquino, C., Suplido, M. L., *et al.*, *Environ Health*

Perspect 2004, 112, 42-45.

[10] Houeto, P., Bindoula, G., Hoffman, J. R., *Environ Health Perspect* 1995, 103, 568-573.

[11] Dearfield, K. L., *Mutat Res* 1994, 317, 111-132.

[12] Lindh, C. H., Littorin, M., Johannesson, G., Jonsson, B. A., *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22, 2573-2579.

[13] Startin, J. R., Hird, S. J., Sykes, M. D., *Food Addit Contam* 2005, 22, 245-250.

[14] Kurttio, P., Savolainen, K., *Scand J Work Environ Health* 1990, 16, 203-207.

[15] Horowitz, W., *Association of Official Analysis Chemists* 1975, 117.

[16] Fustinoni, S., Campo, L., Colosio, C., Birindelli, S., Foa, V., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, 814, 251-258.

[17] Dubey, J. K., Heberer, T., Stan, H. J., *J Chromatogr A* 1997, 765, 31-38.

[18] Pastorelli, R., Allevi, R., Romagnano, S., Meli, G., *et al.*, *Arch Toxicol* 1995, 69, 306-311.

[19] Piechocka, J., *Rocz Panstw Zakl Hig* 1987, 38, 424-428.

[20] Nitz, S., Moza, P., Korte, F., *J Agric Food Chem* 1982, 30, 593-596.

[21] Jones, K., Patel, K., Cocker, J., Bevan, R., Levy, L., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009.

[22] Ozhan, G., Alpertunga, B., *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008, 25, 961-970.

[23] Garcinuno, R. M., Fernandez-Hernando, P., Camara, C., *J Chromatogr A* 2004, 1043, 225-229.

[24] Sottani, C., Bettinelli, M., Lorena Fiorentino, M., Minoia, C., *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, 17, 2253-2259.

[25] Doerge, D. R., Yee, A. B., *J Chromatogr* 1991, 586, 158-160.

[26] Massey, R. C., Key, P. E., McWeeny, D. J., *J Chromatogr* 1982, 240, 254-256.

[27] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所,

<http://www.tactri.gov.tw/htdocs/intro/pcd/pcdfile/ChtIndex2.htm>.