

尿中馬尿酸及甲基馬尿酸-高效能液相層析法

方法編號：BM006	
有害物中文名稱：甲苯 /二甲苯 有害物英文名稱：Toluene / xylene	
空氣中容許濃度：100 ppm(甲苯) 化學文摘社登記號碼：108-88-3 100 ppm(二甲苯) 108-38-3	
分子式：C ₆ H ₅ CH ₃ (甲苯) 分子量：92(甲苯) C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂ (二甲苯) 106(二甲苯)	
標的物中文名稱：馬尿酸及甲基馬尿酸 標的物英文名稱：Hippuric acid 、 Methyl hippuric acids	
參考指標值：見附註(2) 化學文摘社登記號碼：459-69-2	
生物檢體採樣	分析方法
檢體樣本：尿液 採集時機：下班前 採集頻率：見附註(2) 採集器：200 mL 廣口聚乙烯瓶 採集量：50 ~100 mL 樣品保存劑：thymol 約數顆結晶 樣本運送：維持 4°C 以下，24 小時送達實驗室 樣品穩定性：14 天 (4°C) 60 天 (-20°C)	分析儀器：HPLC-UV 高效能液相層析法 待測物：(1)馬尿酸 (2)甲基馬尿酸(o-MHA, m-MHA & p-MHA) 萃取試劑：乙酸乙酯 標準樣品：待測物溶於水溶液 樣品注入量：10 μL 管柱：逆相 C ₁₈ 管柱 移動相：去離子水/乙腈=90/10(V/V) ，含 0.02%冰醋酸 流率：1.5 mL/min 偵測波長：254 nm
精密度與準確度	檢量線
測試範圍：0.2~1.0 mg/mL[1] 精密度：≤ 10% 回收率：詳見方法評估 準確度：未評估	檢量線範圍：0.2~1.0 mg/mL 偵測極限：2.5 μg/mL (HA) 5.0 μg/mL (o-MHA) 6.8 μg/mL (m-MHA & p-MHA) 線性相關係數：> 0.995
干擾： (1)馬尿酸有其他的來源，如食品保存劑、乙基苯(ethylbenzene)和苯乙烯(styrene)。	

●

附註：

(1) para-和meta-之同分異構物在此系統會一同沖提出。(2)根據美國ACGIH建議於下班前採集尿液，BEI值為1.6 g/g Crn，根據勞工安全衛生研究所編號IOSH86-A104研究建議於上班前及下班前採集，再測量尿液Creatinine做校正[2]。(3)適用範圍：馬尿酸和m-甲基馬尿酸是甲苯和二甲苯之主要代謝物。職業性暴露到這些溶劑之一，可藉由尿中這些代謝物的部份萃取來偵測。

●

1. 試藥

- 1.1. 麝香(Thymol), USP
- 1.2. 氯化鈉(Sodium chloride), 試藥級
- 1.3. 濃鹽酸(Hydrochloric acid), 36% W/W, 試藥級
- 1.4. 乙酸乙酯(Ethyl acetate), HPLC級
- 1.5. 馬尿酸(Hippuric acid, HA), 試藥級
- 1.6. 鄰-甲基馬尿酸(o-Methyl hippuric acid), 試藥級
- 1.7. 間-甲基馬尿酸(m-Methyl hippuric acid), 試藥級
- 1.8. 對-甲基馬尿酸(p-Methyl hippuric acid), 試藥級
- 1.9. 移動相, 去離子水/乙腈=90/10(V/V), 含0.02%冰醋酸。
- 1.10. 純氮氣, 99.9%

2. 設備

- 2.1. 250ml的聚乙烯瓶子
- 2.2. 冷凍袋(如冰寶)
- 2.3. 高效能液相層析儀系統包含注射器, 幫浦, 管柱, 備有紫外線偵測器(偵測波長254nm), 電腦處理設備(積分儀), 管柱為14 x 155mm 逆相C₁₈的充填物
- 2.4. 吹氣蒸發器, 備有水浴加熱裝置
- 2.5. 離心機
- 2.6. 分析天秤
- 2.7. 定量吸管(pipette) 10mL
- 2.8. 離心管15mL
- 2.9. 可拋式玻璃試管, 12mm x 75mm
- 2.10. 微量吸管(Micropipettes), 100以及200μL

●

2.11. 微量注射器(Microsyringe)，10 μ L

3. 採樣

3.1. 受試者須事前換下工作服並洗淨雙手，直接將尿液收集於裝有少量麝香結晶的 250 mL 聚乙烯的廣口塑膠瓶中，混合均勻，每一樣品應至少收集 50 mL。將採樣瓶交於採集人員，加上封蓋及貼上樣品標籤。

*注意：每個受試者收集 2 個樣本，一個是上班前一個是下班後。

另也收集未暴露者的尿液樣本當作對照樣品

3.2. 若使用冰寶，先於攜帶式冰箱底層排放一層冰寶而樣品應置於冰寶夾層中。若使用乾冰，採樣前將整塊乾冰以牛皮紙或舊報紙包上數層，再放於攜帶式冰箱帶至採集現場。樣品收集後，將乾冰擊成五公分直徑大小碎塊。先於攜帶式冰箱底層鋪放一層乾冰而樣品應置於乾冰夾層中。樣品應由專人盡快送至實驗室儲存。

*注意：處置乾冰時，應戴低溫手套，以免凍傷。

3.3. 在 4 °C 冰箱中，樣品可維持 14 天。在 -20 °C 冷凍櫃中，樣品維持 60 天。

4. 樣品前處理

4.1. 取樣品依通則程序做肌酸酐(creatinine)濃度(g/L， C_R)測定

4.2. 以定量吸管抽取 1.0 mL 均勻尿液到 15 mL 的離心管

4.3. 加入 40 μ L 濃鹽酸混合均勻，再加入 0.3 g 的氯化鈉，使其過飽和

4.4. 加入 4 mL 乙酸乙酯，搖晃或震盪 2 分鐘

4.5. 以相當於100 \times g 轉速離心5分鐘，以微量定量吸管取200 μ L 之有機層溶液至玻璃試管，再放入約 30 °C 水浴加熱，並和緩通入氮氣氣流

$$RPM = 10^3 \sqrt{RCF / 1.12 r_{\max}}$$

r_{\max} : 離心機轉軸半徑

RPM (Revolutions Per Minute): 離心機轉速

RCF (Relative Centrifugal Force): gravity (g)

4.6. 以 200 μ L 之去離子水加入離心管，使殘留物再度溶解，以備分析

5. 檢量線與品質管制

5.1. 檢量線樣品

5.1.1. 以分析天平量取100.0 mg馬尿酸、甲基馬尿酸各兩份。準備八只乾淨100 mL定量瓶分別裝入約75 mL去離子水，將所秤得樣品分別裝入定量瓶中，使其完全溶解後再以去離子水稀釋制定量瓶刻度，製成1.0 mg/mL儲備溶液。

5.1.2. 加已知量標準品的儲備溶液於10 mL定量瓶中，再以去離子水稀釋至其刻度。所建立之檢量線濃度範圍為0.20~1 mg/mL。檢量線樣品在室溫中可保存7天。

*註:檢量線標準溶液須由兩個不同之儲備溶液配製六點，

一、三、五點來自儲備溶液(A)，而二、四、六點來自儲備溶液(B)，最低點濃度(第一點)與最高點濃度(第六點)濃度須製備三重複樣品;且其分析變異係數(CV)，最低濃度者小於20%，而最高濃度者小於10%。標準溶液、空白樣本、

● 控制組樣本應與檢體一起製備、分析(步驟4.1到4.6)

5.2. 品質管制

5.2.1. 添加樣品-採集5~10 正常人之尿液並予以均勻混合，分成四等分再以標準品添加方式製備基質空白、0.3 mg/mL、0.6 mg/mL及1.0 mg/mL濃度樣品各二個。添加樣品與現場樣品同時做前處理。

5.2.2. 每隔10個樣品，測試一次檢量線標準品，以檢查儀器的狀況是否穩定。

5.2.3. 每10個樣品，至少測試一次添加樣品，以檢查回收率。

$$\text{樣品添加回收率(\%)} = \frac{C_u}{C_{\text{spike}}} \times 100$$

C_u : 尿液中待測濃度($\mu\text{g/mL}$)

C_{spike} : 尿液中標準品添加濃度($\mu\text{g/mL}$)

6. 計算

6.1. 以檢量線樣品分析圖譜之積分面積對其做檢量線。

尿液中待測濃度(C_u)=(積分面積-檢量線截距) \times 稀釋倍數/檢量線斜率

6.2. 計算每克肌酸酐中待測物含量

$$C(\text{g/g Crn}) = \frac{C_u}{C_R} \times 1000$$

C_u : 尿液中待測濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_R : 尿液中肌酸酐濃度(g/L)

7. 數據說明

7.1. 根據美國職業安全衛生研究所(NIOSH)報告，未暴露人員尿液

- 中馬尿酸的上限值為1.0 g/g Crn，而甲基馬尿酸在未暴露的人群中沒有發現[3]。

7.2. Lauwerys以氣相層析儀的分析方法的研究報告指出未暴露人員尿液中馬尿酸的上限值為1.5g/g Crn。他建議“暴露極限”為2.5 g/g Crn[5]。

7.3. Lauwerys建議勞工下工後收集尿液中甲基馬尿酸“暴露極限”為1.5 g/g Crn[5]。

7.4. 根據美國ACGIH建議於下班前採集尿液，BEI值為1.6 g/g Crn[2]。

8. 方法的評估

HA

	添加回收率 (%)	變異係數 (%)	樣本數	添加濃度 (mg/mL)
驗證 1	84.7	5	3	0.17, 0.67, 1.05
驗證 2	96.0	4	3	0.2, 0.61, 1.01
驗證 3	94.7	5	3	0.2, 0.6, 1.0

o-MHA

	添加回收率 (%)	變異係數 (%)	樣本數	添加濃度 (mg/mL)
驗證 1	97.1	9	3	0.17, 0.67, 1.05
驗證 2	101.9	4	3	0.20, 0.60, 1.00
驗證 3	101.4	3	3	0.20, 0.60, 1.00

m,p-MHA

	添加回收率 (%)	變異係數 (%)	樣本數	添加濃度 (mg/mL)
驗證 1	95.7	10	3	0.16, 0.64, 1.01
驗證 2	100.4	1	3	0.20, 0.61, 1.01
驗證 3	91.9	3	3	0.20, 0.60, 1.00

-

參考文獻

- [1] 行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所，1998；”作業場所兩種有害化合物勞工暴露生物偵測技術引進研究計畫”
- [2] “TLVs[®] and BEI[®] based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure indices”, 2007 ; Cincinnati, Ohio: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).104.
- [3] Phipps F., 1994; Hippuric and methyl hippuric acids in urine, Method 8301, Issue 2. In: Eller PM, Cassinelli ME, eds. NIOSH Manual of Analytical Methods, 4th edition. Cincinnati, OH: Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. DHHS (NIOSH) Publication No. 94-113.
- [4] Matsul, H., M, Kasso, and S. Imamura. 1978;“ High Performance Liquid Chromatographic Determination of Hippuric Acid in Human Urine” J. Chromatog. 45:231.
- [5] Lauwerys, R.R.,1983; Industrial Chemical Exposure, “Guidelines for Biological Monitoring”, Biological Publications, Davis, CA,:57-69.
- [6] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2000. Toxicological profile for Toluene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

1. 方法撰寫人員

11.1 方法開發

撰寫日期：民國 97 年 3 月

楊冠洋，基隆省立醫院

11.2 方法評估

王文忻，中國醫藥大學職業安全與衛生學系

毛義方，陽明大學公衛系

賴錦皇，國防醫學院公衛系