

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發(三) 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 100-2113-M-040-003-  
執行期間：100年08月01日至101年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：張耀仁

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101年10月31日

中文摘要：相對於血液與尿液檢體，毛髮檢體具有採集容易、不具侵入性、不易作假，體積小、無需冷藏冷凍，保存運送十分方便之天生優點，而經長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性。然而，近年來興起代謝體學主要以血液與尿液檢體為主，對於毛髮檢體之研究甚少。

本研究承接去年研究，發覺毛髮可能可以作為 DEHP 暴露之評估之有效檢體。DEHP 是塑膠的最常用的塑化劑，也是公告的環境荷爾蒙，當大量或長期暴露時可能具有生殖毒性的風險。相較於血液與尿液，毛髮屬於長效型的生物檢體，其檢測時窗非常寬廣可從數月至數年以上 因此本研究首先將針對目前 DEHP 5 個主要代謝物：MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 進行液相層析串聯質譜(LC-MS/MS) 的分析方法建立，其次發展至毛髮中將 5 個主要代謝物溫和且有效的自毛髮中取出之浸泡萃取方法，最後進行真實檢體之分析，發現 MEH 濃度範圍 15.3 - 96.2 pg/mg，MEHHP 濃度範圍 2.3 - 13.5 pg/mg，MEOHP 濃度範圍 3.3 - 23.4 pg/mg。總之，本研究發展之方法有效的分析人體毛髮中 DEHP 代謝物在之分布，並可作為 DEHP 暴露評估之有效方法。

中文關鍵詞：代謝體，毛髮，DEHP 代謝物

英文摘要：Comparison to blood and urine specimens, which detects only for several days, hair specimen has the advantages of easy and noninvasive collection, minimizing the risk of sample adulteration, and stored and transported without specific precautions for its native stability. Moreover, it become an important specimen recently due to the several months to years detection window, however, the research of hair metabolomic is extremely scarce.

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is an endocrine disrupting chemical that widely used as the major plasticizer for worldwide plastic products. It can cause the several toxic effects to human with high dose exposure. In response to need of human exposure assessment, different biological specimens are taken into account. Comparison to blood, urine and other specimens, hair is unique in that could determine the time period of chemical exposure after several months to years. Therefore, a reliable and sensitive

analytical method of hair was developed for the determination of five metabolites, MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP and 2cx-MMHP for DEHP exposure. The developed method consists of solution incubation, liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Ten authentic hair specimens were successfully determined and quantitated by developed method. The concentration ranges were 15.3 - 96.2 pg/mg (MEHP), 2.3 - 13.5 pg/mg (MEHHP) and 3.3 - 23.4 pg/mg (MEOHP). 5cx-MEPP and 2cx-MMHP were either lower than LOQ or not be detected in all samples. The developed method can successfully determine these five specific metabolites in human hair.

英文關鍵詞： metabolomic, hair, metabolites of DEHP

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發(III)

※※※

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫  
計畫編號：      NSC 100-2113-M-040 -003  
執行期間：      100年8月1日至101年7月31日

計畫主持人：張耀仁  
計畫參與人員：張元哲、洪維胤

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學 醫學研究所

中華民國 101 年 10 月 28 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

# 長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發

## The development and study of long detection window bio-specimen by mass spectrometry based metabolomics

計畫編號： NSC 99-2113-M-040 -001

執行期限：100年8月1日至101年7月31日

主持人：張耀仁 中山醫學大學 醫學研究所

計畫參與人員：張元哲，洪維胤

### 摘要

相對於血液與尿液檢體，毛髮檢體具有採集容易、不具侵入性、不易作假，體積小、無需冷藏冷凍，保存運送十分方便之天生優點，而經長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性。然而，近年來興起代謝體學主要以血液與尿液檢體為主，對於毛髮檢體之研究甚少。

本研究承接去年研究，發覺毛髮可能可以作為 DEHP 暴露之評估之有效檢體。DEHP 是塑膠的最常用的塑化劑，也是公告的環境荷爾蒙，當大量或長期暴露時可能具有生殖毒性的風險。相較於血液與尿液，毛髮屬於長效型的生物檢體，其檢測時窗非常寬廣可從數月至數年以上 因此本研究首先將針對目前 DEHP 5 個主要代謝物：MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 進行液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)的分析方法建立，其次發展至毛髮中將 5 個主要代謝物溫和且有效的自毛髮中取出之浸泡萃取方法，最後進行真實檢體之分析，發現 MEH 濃度範圍 15.3–96.2 pg/mg，MEHHP 濃度範圍 2.3–13.5 pg/mg，MEOHP 濃度範圍 3.3–23.4 pg/mg。總之，本研究發展之方法有效的分析人體毛髮中 DEHP 代謝物在之分布，並可作為 DEHP 暴露評估之有效方法。

關鍵字：代謝體，毛髮，DEHP 代謝物。

### Abstract

Comparison to blood and urine specimens, which detects only for several days, hair specimen has the advantages of easy and noninvasive collection, minimizing the risk of sample adulteration, and stored and transported without specific precautions for its native stability. Moreover, it become an important specimen recently due to the several months to years detection window, however, the research of hair metabolomic is extremely scarce.

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is an endocrine disrupting chemical that widely used as the major plasticizer for worldwide plastic products. It can cause the several toxic effects to human with high dose exposure. In response to need of human exposure assessment, different biological specimens are taken into account. Comparison to blood, urine and other specimens, hair is unique in that could determine the time period of chemical exposure after several months to years. Therefore, a reliable and sensitive analytical method of hair was developed for the determination of five metabolites, MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP and 2cx-MMHP for DEHP exposure. The developed method consists of solution incubation, liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Ten authentic hair specimens were successfully determined and quantitated by developed method. The concentration ranges were 15.3–96.2 pg/mg (MEHP), 2.3–13.5 pg/mg (MEHHP) and 3.3–23.4 pg/mg (MEOHP). 5cx-MEPP and 2cx-MMHP were either lower than LOQ or not be detected in all samples. The developed method can successfully determine these five specific metabolites in human hair.

Key word: metabolomic, hair, metabolites of DEHP

### 前言

代謝體學 (metabolome) 是近年在系統生物學概念領域中迅速發展起來的新興研究領域。由於生物體內特定的生命現象和許多代謝產物的表現有關，而代謝產物又可視為是基因表現之末端產物。因此，藉由生物體內特定時空內代謝產物表現量的分析，可以推測出該生物體的生理狀況，及其所參與之各種生理、生化途徑之調控機制。此相關的研究方法及領域。而相對於基因體上萬個基因，蛋白質體上百萬個蛋白的分析，代謝體只有數千個化合物的組合，因此相對的簡單，分析的儀器與花費也相對的低。然而，由於化合物種類差異極大，代謝體需要結合數種分析儀器技術。目前所知無一種方法可以涵蓋如此廣泛之範疇。其中質譜儀分析方法 (mass spectrometry, MS) 由於其靈敏度可近乎數 ng/mL 之能力，因此於代

謝體研究上成為主要分析技術之一。

長效期生物檢體，特別是毛髮，是本研究的主要目標，也是目前人類代謝體所未呈現之資訊。毛髮由於可以不斷生長，只要不被剪下，可持續紀錄，因此只要採取適當的部位加以分析，即可呈現過去之代謝體。由於在毛髮生長的過程中，毛囊細胞會吸收周圍微血管的養分來當作原料，編織成新的毛髮，因此出現在血液中的化合物與其代謝物，不管是內源性或外源性極有可能就被編織在毛髮中。

去年(2011年)5月，台灣爆發了非常嚴重的食品安全事件(塑化劑)，當時引起極大社會動盪與許多家長極大的恐慌，主要是擔心塑化劑累積會進而造成女童性早熟，男性睪丸縮小、隱睪症、女乳症。隨後衛生署協調各地醫院與醫學中心加設『塑化劑門診』，並邀請專家進行人體 DEHP 暴露更深入之探討研究，但由於影響因素極多，似乎大多無疾而終。

DEHP 早已被學術界列為環境荷爾蒙 (environmental hormones)<sup>1-2</sup>，使用 DEHP 在各國亦須經申報管理，不過 DEHP 的工業用量著實太大。由於 DEHP 被添加於 PVC 塑膠中並未形成共價鍵結，因此極容易造成人體暴露。環境荷爾蒙早期亦稱為內分泌干擾物質 (endocrine disruptors) 或環境干擾化學物 (environmental disrupting chemicals)。這些化學物質通常是殘留在環境中的微量化學物質，經由食物鏈進入體內，傳送假性化學訊號，扮演假性荷爾蒙，進而影響體內荷爾蒙之分泌，造成內分泌失調，進而改變性向特徵，甚至於阻害生物體生殖機能或引發惡性腫瘤。目前所知，環境荷爾蒙對懷孕期胚胎、新生兒與和幼童影響最大，尤其是，除了在胎兒發育期，影響性別差異外，亦會影響腦組織和中樞神經某些部位的發展。目前更有文獻報導環境荷爾蒙對人體之影響<sup>3-8</sup>，諸如：男性生殖力下降、男性特徵發展缺陷、攝護腺癌機率的增加、女性生殖力下降、乳癌的增加、子宮異位症、免疫系統受損、甲狀腺腫瘤、過動兒、和孩童的學習能力及集中專心問題等，值得注意的是，許多環境荷爾蒙物質都具有脂溶性與不易分解的特性，在環境中分佈、累積並在生物體經食物鍊傳遞下去。因此在1996年出版的「失竊的未來」<sup>9</sup>及1997年出版的「雌性化自然」<sup>10</sup>二本書，具體提供了「文明生活」中疑似「環境荷爾蒙」的七十多種化學物質，(Pentachlorophenyl)、蟲必死(Hexachlorocyclohexane)、可氣丹(Chlordane)、阿特靈(Aldrin)、安特靈(Endrin)、地特靈(Dieldrin)、飛佈達(Heptachlor)、護谷(Nitrofen)、毒殺芬(Toxaphene)、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)與鄰苯二甲酸二丁酯(Di-n-butyl phthalate, DBP)等二種物質則名列其中。

DEHP 在國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IRAC) 中被定為 2B 等級之致癌物，且當大量或長期暴露時可能具有生殖毒性的風險。根據研究發現<sup>1</sup>，利用乳癌細胞株 (MCF-7) 處理 DEHP 時，其具有雌性激素調控的作用。而在動物實驗部分，DEHP 除對懷孕的母鼠造成畸胎與死胎外，且會影響幼鼠的生殖系統發育，因此 DEHP 的暴露已被證實對於動物的睪丸、卵巢與胚胎是具有非常大的生殖毒性<sup>2</sup>。對於人體而言，有文獻指出<sup>13-14</sup>，當受到 DEHP 的長期暴露後，人體內的賀爾蒙可能會受到 DEHP 的調控增加或減少，進而造成幼兒生殖系統發育的影響，產生性早熟、雌性化、陰莖變短等徵狀。

在各國家針對 DEHP 所做的人體毒性風險評估<sup>15</sup>：美國的毒性物質及疾病登記局 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) 分別訂定 0.100 與 0.060 為急性暴露與慢性暴露的最低風險劑量 (Minimal Risk Level, MRL)；加拿大的衛生部門訂定 0.044 mg/kg/day 為每日容許攝取量 (Tolerable Daily Intakes, TDI)；而歐盟的毒害與環境科學委員會 (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, CSTEE) 則規定 DEHP 之 TDI 為 0.050 mg/kg/day；歐洲化學物質管理局 (European Chemicals Bureau, ECB) 針對 DEHP 對於出生小於 3 個月的新生兒與生育年齡的婦女訂定了 0.020 mg/kg/day 的 TDI，而對於出生 3 至 12 個月的嬰兒訂定為 0.025 mg/kg/day，對於一般人則為 0.048 mg/kg/day 的 TDI。因此在環境中到處充斥的塑膠製品，或食品內可能含有的塑化劑添加物，對於人體的暴露評估研究是值得重視且必須的。

DEHP 暴露於人體後，會經由體內代謝成第一級代謝產物 (mono-(2-ethylhexyl)phthalate, MEHP)，而 MEHP 會再代謝出第二級代謝產物 mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate, 5cx-MEPP mono-[2-(carboxymethyl)hexyl]phthalate, 2cx-MMHP mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate, MEHHP 與 mono-(2-ethyl-5-oxy-hexyl)phthalate, MEOHP<sup>16-17</sup>。由於 DEHP 容易受到環境的污染而產生<sup>18</sup>，因此其體內代謝物 MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 是較適合用來評估 DEHP 真正暴露於人體的指標化合物。

從臨床的角度來看，目前 DEHP 暴露評估，主要在血液<sup>19-24</sup>與尿液<sup>25-33</sup>，兩種生物檢體是被研究比較多的，但血液與尿液皆屬於檢測時效較短(數小時至數天)的生物檢體，因此較無法被作為長期暴露評估的應用。因此當時國內兒科學會指出：採取血液與尿液，並無法獲得充分之 DEHP 暴露之評估。相較於血液與尿液，毛髮屬於長效型的生物檢體。

毛髮檢驗目前最常被用於毒品檢驗，然而毛髮中可能會存在 DEHP 及其代謝物嗎？毛髮中若存在 DEHP 代謝物，是否可反映出 DEHP 人體暴露情形？我們發現目前皆無相關文獻。過去我們曾針對出生後需要在加護病房之早產兒，來進行 DEHP 暴露程度和代謝狀況之評估，並發表於 *Pediatric Critical Care Medicine* <sup>34</sup>(2012; May 16. Epub ahead of print (SCI, IF=3.129, Ranking in Pediatrics 9/113=7.96%)。由於早產兒體型嬌小，生理狀況較一般正常幼兒虛弱，出生後在加護病房照護時，長期接觸針頭、點滴管、點滴袋等 DEHP 高含量塑膠，屬於 DEHP 極高暴露風險之族群。當時藉由建立 MEHP、MEHHP 與 MEOHP 之尿液分析方法，瞭解早產兒之尿液中 DEHP 之 3 個指標代謝物之濃度，以評估早產兒代謝能力與 DEHP 暴露程度，並作為追蹤探討之依據。

本研究嘗試探討 (1)毛髮中可能會存在 DEHP 及其代謝物嗎？(2)毛髮中若存在 DEHP 代謝物，是否可反映出 DEHP 人體暴露情形？因此研究將針對目前公認 DEHP 5 個主要代謝產物：MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 進行方法開發，包含液相層析串聯質譜(HPLC MS/MS)的分析發法建立，代謝物如何溫和的自毛髮中取出之方法、濃縮與進一步之去除干擾，進而了解在真實檢體中個主要 DEHP 代謝物在人體毛髮中之分布。

## 結果與討論

### 一、DEHP 代謝物 LC-MS/MS 分析方法建立

#### 1. 質譜方法建立

由於 DEHP 的 5 個代謝產物其結構上皆具有羧酸根 (-COOH)，在 ESI 游離化部分，若使用正離子模式其分析感度並不好，因此使用負離子 (ESI-) 模式較為合適。首先，我們使用各代謝物的標準品溶液 (濃度為 1 µg/mL)，以 infusion (10 µL/min) 方式連續注入質譜，進行化合物的研究分析與質譜參數最佳化。

圖 1 為 MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 的 ESI- 全離子與子離子掃描的質譜圖譜。首先圖 1(A) 為 DEHP 的第一級代謝物 (MEHP) 全離子掃描與其母離子碰撞後產生的 MS/MS 圖譜。MEHP 的原始分子量為 278 Da，而在 ESI- 游離化後會產生丟掉質子的分子離子 (deprotonated molecular ion, [M-H]<sup>-</sup>) 為 m/z 277，因此在 MEHP 的標準品經由全離子掃描下可以看到 m/z 277.0。為建立 MRM 的掃描方法，將 MEHP 的母離子 m/z 277.0 利用子離子掃描，透過不同的能量 (CE) 碰撞，來找出其最強的片段離子。經能量

碰撞條件最佳化後，m/z 134.0 [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 與 127.2 [M-C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 分別在 CE -23 與 -25 下為最強，且碎片離子比例 m/z 134.0 : 127.2 為 100 % : 45 % 左右，因此我們選定 m/z 134.0 為定量離子與 m/z 127.2 為定性離子。

圖 1 (B) 為 MEHP 的進一步代謝產物 (MEHHP)，其全離子掃描可以看到母離子為 m/z 293.0 [M-H]<sup>-</sup>，選擇母離子並進一步碰撞最佳化後，可以觀察到最強的 2 個子離子 m/z 121.1 [M-C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 與 145.2 [M-C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>，分別在 CE 為 -27 與 -21 時，其離子比例為接近一比一左右，因此選擇 m/z 121.1 為定量離子與 m/z 145.2 為定性離子。MEOHP 不同於 MEHHP 的地方，在於其結構支鏈上為酮基 (Ketone)。

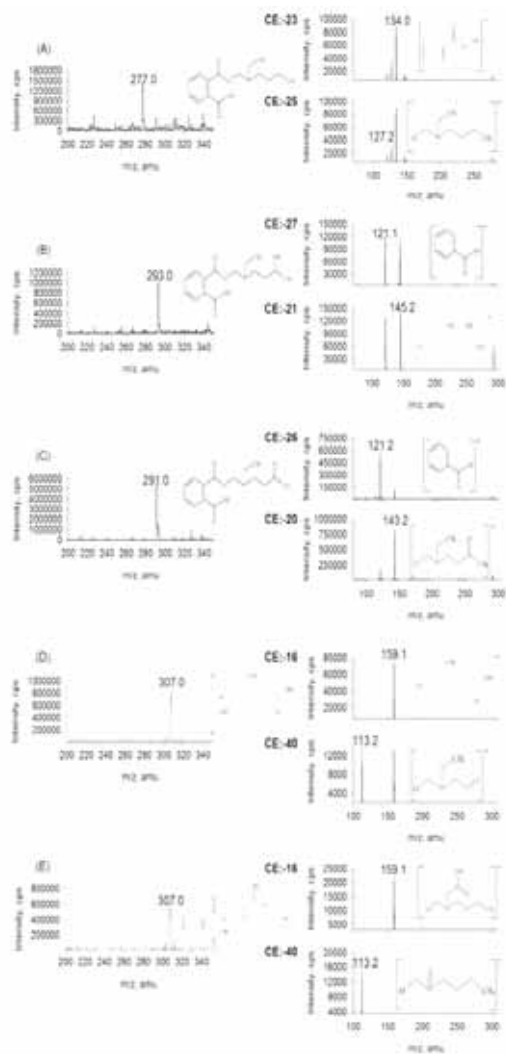


圖 1. DEHP 的 5 個代謝產物 (A) MEHP、(B) MEHHP、(C) MEOHP、(D) 5cx-MEPP 與 (E) 2cx-MMHP 之化學結構與質譜圖譜。

如圖 1(C) 結構圖。而在母離子部分為 m/z 291.0 [M-H]<sup>-</sup>，其子離子為 121.2 [M-C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 與 143.2 [M-C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> 分別在 CE -26 與 -20 時最強，其離子比例也接近一比一左右，於是選擇 m/z

121.2 為定量離子與  $m/z$  143.2 為定性離子。5cx-MEPP (圖 1 (D)) 與 2cx-MEPP (圖 1 (E)) 皆為帶有 2 個羧酸的代謝物，兩者為結構上的同分異構物。5cx-MEPP 與 2cx-MEPP 的母離子皆為  $m/z$  307.0  $[M-H]^-$ ，其主要的碎片離子也相同為 159.1  $[M-C_8H_5O_3]^-$  與 113.2  $[M-C_9H_7O_5]^-$  分別在 CE -16 與 -40 時。雖 2 代謝物產生的子離子相同，但各別的離子比例是有差異的，如 5cx-MEPP 的碎片離子  $m/z$  159.1 : 113.2 (100 % : 15 %) ; 2cx-MMHP 的碎片離子  $m/z$  159.1 : 113.2 (100 % : 80 %)。最後再搭配各項最佳化後的質譜參數包含：DP、FP、EP、CE 與 CXP，來建立 MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 的 MRM 的分析方法，如表 1)。

**Table 1**  
The optimized parameters of LC-MS/MS for five metabolites from DEHP

Analytes	MRM transitions		Optimized parameters				
	Precursor (m/z)	Product (m/z)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
MEHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	280.8	<u>137.0</u>	-40	-165	-10	-23	-7
MEHP	277.0	<u>134.0</u>	-40	-155	-10	-23	-7
		127.2	-40	-165	-10	-25	-6
MEHHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	297.0	<u>124.2</u>	-40	-165	-10	-28	-6
MEHHP	293.0	<u>121.1</u>	-40	-155	-10	-27	-5
		145.2	-40	-165	-10	-21	-7
MEOHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	295.0	<u>124.2</u>	-40	-165	-10	-26	-5
MEOHP	291.0	<u>121.2</u>	-40	-155	-10	-26	-5
		143.2	-40	-155	-10	-20	-6
5cx-MEPP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	310.9	<u>159.1</u>	-40	-180	-10	-16	-8
5cx-MEPP	307.0	<u>159.1</u>	-40	-180	-10	-16	-8
		113.2	-40	-180	-10	-40	-5
2cx-MMHP	307.0	<u>159.1</u>	-40	-180	-10	-16	-8
		113.3	-40	-180	-10	-40	-5

Underlined mass delineates MRM quantification transition.  
MRM—multiple reaction monitoring, DP—declustering potential, FP—focusing potential, EP—entrance potential, CE—collision energy, CXP—collision exit potential.

## 2. LC-MS/MS 分析方法建立

在層析分離部分，我們使用 Phenomenex 公司之 LUNA C18 column packed with 3  $\mu$ m particles (50 mm  $\times$  2.0 mm) (Torrance, CA, USA)，層析條件為移動相 A 為去離子水含有 0.1% 的甲酸，與移動相 B 為甲醇含 0.1% 的甲酸。流速為每分鐘 0.25 mL。梯度條件為 0-0.5 分鐘：維持 40% 的 B；0.5-6.5 分鐘：由 40% 上升至 90% 並維持 0.5 分鐘；最後回到初始梯度條件。圖 2 為 MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 的 LC-MS/MS MRM 分析的萃取離子層析圖譜 (XIC)，其注入體積為 10  $\mu$ L。

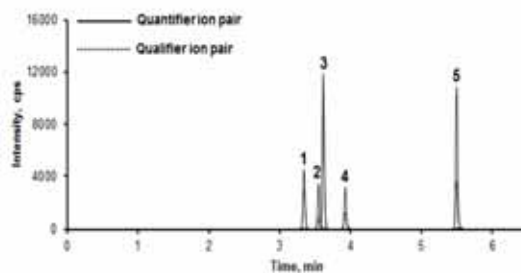


圖 2. DEHP 的 5 個代謝物經 LC-MS/MS 分析後之萃取層析圖譜，依滯留時間順序：(1) 3.42 分鐘 (MEOHP)、(2) 3.64 分鐘 (5cx-MEPP)、(3) 3.74 分鐘 (MEHHP)、(4) 3.99 分鐘 (2cx-MMHP)、(5) 5.66 分鐘 (MEHP)。實線代表定量離子；虛線為定性離子。注入體積為 10  $\mu$ L (注入總重量為 100  $\mu$ g)。

## 二、毛髮中 DEHP 代謝物取出的評估

毛髮檢體屬於固態，因此如何從固態的檢體中完善地取出欲分析化合物，是前處理流程中最為重要。由於目前並無毛髮中的 DEHP 代謝物分析的相關報導，因此我們使用常見的 8 種不同的浸泡溶液，來進行毛髮浸泡取出的評估。實驗評估方式：將混合的真實毛髮檢體，分別浸泡至 0.1 N HCl、0.01 N HCl、0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer, PB) pH 5-8 與有機溶劑甲醇、TFA 有機溶劑甲醇等隔夜浸泡。隨後再取出浸泡液，接著調整 pH 值到 3.0 左右，再加入 2 mL 的乙酸乙酯 (EA) 進行液相萃取，最後以氮氣吹乾並回溶於初始移動相 (40% 的甲醇) 中。而在上述 8 種的浸泡溶液中，除甲醇與甲醇/TFA 混合液，其無法直接進行 EA 萃取，因此取出後先經由吹乾再以緩衝溶液回溶，並調整酸鹼值後再進行液相萃取，最後以塑化劑代謝物的濃度來評估各種不同浸泡溶液之取出能力。

表 2 為浸泡溶液對於混合真實毛髮中的 MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 的取出結果。首先從含酸的水溶液來看，不管是 0.01 N HCl 或 0.1 N 的 HCl，皆可取出少量的 MEHP、MEHHP 與 MEOHP，其中又以 0.01 N HCl 取出結果稍優於較強酸 0.1 N HCl，但在 5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 這兩個代謝物似乎無法被取出。而在 pH 5-8 接近中性的 PB 緩衝溶液中，可以發現取出效果最好為 pH=8 的 0.1 M PB 浸泡溶液，隨著 pH 的增加，MEHP、MEHHP 與 MEOHP 此三個代謝物取出效果越好，但依然無法取出 5cx-MEPP 與 2cx-MMHP。最後在有機溶劑甲醇與甲醇/TFA 混合液部分，當利用甲醇/TFA 混合液浸泡為 8 種浸泡方法最佳，可見到 5cx-MEPP 但仍無法偵測到 2cx-MMHP。



Table 2

The release efficiency of eleven incubation media for five metabolites of DEHP in hair

Incubation media	MEHP		MEHHP		MEOHP		5cx-MEPP		2cx-MMHP	
	Mean (pg/mg)	RSD (%)	Mean (pg/mg)	RSD (%)	Mean (pg/mg)	RSD (%)	Mean (pg/mg)	RSD (%)	Mean (pg/mg)	RSD (%)
0.1 N HCl	9.0	1.2	1.9	0.5	3.2	3.2	N.D.	-	N.D.	-
0.01 N HCl	12.8	1.7	2.1	1.0	3.6	1.7	N.D.	-	N.D.	-
0.1 M PB solution, pH=5	20.4	2.1	2.3	1.8	4.0	2.9	N.D.	-	N.D.	-
0.1 M PB solution, pH=6	28.2	1.4	2.7	2.0	4.5	0.9	N.D.	-	N.D.	-
0.1 M PB solution, pH=7	37.7	1.9	4.4	1.3	4.7	2.5	N.D.	-	N.D.	-
0.1 M PB solution, pH=8	41.1	2.4	4.9	1.5	5.4	1.3	N.D.	-	N.D.	-
Methanol	33.8	2.1	3.1	0.6	4.0	0.7	N.D.	-	N.D.	-
Methanol/TFA <sup>a</sup>	69.8	2.5	6.8	1.1	7.0	1.0	5.1	1.3	N.D.	-

PB-phosphate buffer, TFA-trifluoroacetic acid, RSD-relative standard deviation, N.D.-non-detected.

<sup>a</sup>The mixture of methanol and TFA (8.5:1.5, v/v)

### 三、確效評估

研究確效項目包含：靈敏度、線性、基質效應、回收率、精密度與準確度。首先在靈敏度部分：MEHP、MEHHP 與 MEOHP 的 LOD (S/N>3) 皆為 0.1 pg/mg，5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 則為 0.5 pg/mg；而 LOQ (S/N>10) 部分，MEHP、MEHHP 與 MEOHP 皆為 0.3 pg/mg；5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 則為 1.5 pg/mg。線性評估時，必須將毛髮中背景值考慮進來，藉由將標準品的添加濃度加上背景值濃度來得到檢量線，濃度範圍分別為 0.3-50 pg/mg (MEHP、MEHHP 與 MEOHP) 與 1.5-50 pg/mg (5cx-MEPP 與 2cx-MMHP)，其線性關係值 ( $r^2$ ) 皆大於 0.999。

由於毛髮檢體中含有待測物背景值，因此在基質效應評估時，我們採用同位素內標取代標準品的方式來進行。實驗分為 2 組：A 組為毛髮經前處理後，在最後加入內標準品；B 組為純內標準品不經任何前處理，皆經 LC-MS/MS 分析後，計算 A (內標面積) / B (內標面積) x 100%，以得到基質效應結果。當有毛髮基質存在時，MEHHP、MEOHP 與 5cx-MEPP 的結果呈現小於 10% 的離子抑制 (ion suppression)；而 MEHP 則有較大的抑制現象 (25%)，推測毛髮成分中有許多的脂肪酸，且可能都在層析時間的後段與 MEHP (5.66 分鐘) 共流出來，進而在 ESI 游離化時搶走了大部分的電子。此外，2cx-MMHP 並無同位素內標，因此其基質效應無法進行評估。

回收率部分，因考慮到毛髮中本身就含有待測物，因此評估與傳統方式較為不同，我們皆以毛髮檢體來進行回收率的實驗，分為 2 組：A 組為毛髮檢體一開始添加個別化合物之標準品，經前處理後於氮氣吹乾前再加入內標準品；B 組為毛髮檢體一樣經由前處理後，最後於氮氣吹乾前同時加入標準品與內標準品。實驗評估以 2 個濃度進行，標準品添加濃度分別為 10 ( $Q_{low}$ ) 與 25 ( $Q_{high}$ ) pg/mg，而內標準品濃度皆為 10 pg/mg，進行三重複的實驗。計算方式以 A (S/IS ratio) / B (S/IS ratio) x 100%。MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 的回收率結果範圍皆在 88%-104%

之間，而 RSD 也都在 5% 以內。

在精密度與準確度評估部分(表 3)，利用低 ( $Q_{low}$  10 pg/mg) 與高 ( $Q_{high}$  25 pg/mg) 的標準品添加於毛髮中，並加上其本身毛髮中的背景值濃度，來進行實驗。同日內實驗以一天內重複實驗五次；而異日內實驗以連續的五日進行實驗。首先精密度部分：同日與異日的結果 (CV %) 皆在 10% 以內，唯有 MEHP 的異日結果稍高在 10.2% 左右，代表經多次重複測定後，分析結果皆可集中於某一分佈區域；準確度部分：同日與異日的差異 (Bias %) 皆在正負 5% 以內，除 2cx-MMHP 稍高在 5.1% 左右，代表所測得的濃度是接近於實際添加濃度。

Table 3

Results concerning precision and accuracy of validation experiments

	MEHP		MEHHP		MEOHP		5cx-MEPP		2cx-MMHP	
	$Q_{low}$	$Q_{high}$	$Q_{low}$	$Q_{high}$	$Q_{low}$	$Q_{high}$	$Q_{low}$	$Q_{high}$	$Q_{low}$	$Q_{high}$
Concentration (pg/mg)										
Spiked	10.0	80.0	10.0	80.0	10.0	80.0	10.0	80.0	10.0	80.0
Background (mean±SD)	17.8±1.5		2.7±0.6		3.7±1.0					
Target (mean±SD)	27.8±1.5	97.8±1.5	12.7±0.6	82.7±0.6	13.7±1.0	83.7±1.0	10.0	80.0	10.0	80.0
Precision (CV %)										
Intra-day	3.8	5.7	2.0	2.7	4.5	2.9	5.6	4.3	2.5	1.8
Inter-day	6.7	10.7	5.1	4.4	5.3	3.5	7.5	6.2	4.7	3.9
Accuracy (Bias %)										
Intra-day	2.9	3.5	2.8	3.6	1.9	3.2	-3.1	3.9	4.5	3.8
Inter-day	3.9	4.6	3.0	3.2	-1.8	2.9	1.7	2.2	3.3	4.9

CV-coefficient of variance,  $Q_{low}$ -quality control of low concentration (10 pg/mg),  $Q_{high}$ -quality control of high concentration (80 pg/mg).

### 五、真實樣品分析

在台灣爆發塑化劑風波後，我們收集了 10 個一般人的毛髮檢體，這些檢體經由有機溶劑二氯甲烷洗去毛髮外部汙染後，剪碎並秤重 (25 mg)，再加入 0.1 M pH=10 的  $\text{NaHCO}_3$  緩衝溶液與內標準品 (10 pg/mg) 進行隔夜浸泡，再進行簡單的液相萃取，最後以 LC-MS/MS 分析。

表 4 為 10 個真實樣品中的塑化劑代謝物定量濃度，經由成功地分析與定量後，其毛髮中濃度分布為 MEHP > 5cx-MEPP > MEOHP > MEHHP > 2cx-MMHP，雖然 5 個塑化劑代謝物中，以 MEHP 的濃度最高，但有文獻 [57] 指出 MEHP 非常容易來自環境中 DEHP 的汙染後所產生，因此濃度次高的二級代謝物 5cx-MEPP 與 MEOHP，應是最適合用來當作毛髮中監控 DEHP 人體之暴露指標。

Table 4

The quantitative level of five metabolites of DEHP in ten authentic hair specimens

Subject	Determination concentration (pg/mg)				
	MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
1	96.2	13.5	23.4	<LOQ	N.D.
2	15.3	2.3	3.3	N.D.	N.D.
3	30.2	4.0	6.1	N.D.	N.D.
4	47.4	4.6	7.2	N.D.	N.D.
5	49.2	7.0	9.0	N.D.	N.D.
6	33.5	4.0	5.4	N.D.	N.D.
7	41.7	5.3	9.9	N.D.	N.D.
8	84.3	7.9	16.2	<LOQ	N.D.
9	21.6	4.6	6.3	N.D.	N.D.
10	29.3	3.4	4.9	N.D.	N.D.

N.D.-non-detected, &lt;LOQ-The quantitative concentration was below the LOQ.

## 結論

近年來毛髮檢體在毒品檢驗領域受到極大重視，然而毛髮代謝體研究仍極為稀少。本研究針對毛髮檢體具有長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性。我們成功地發展出分析 DEHP 目前所知主要之五種人體代謝物(MEHP、MEHHP、MEOHP、5cx-MEPP 與 2cx-MMHP)之 LC-MS/MS 分析方法。隨後評估常見之 8 種浸泡溶液，將固態毛髮中的塑化劑代謝物順利取出，並在真實樣品成功地偵測並定量 DEHP 代謝物。由於 MEHP 較易受實驗環境所污染，因此 MEHHP、MEOHP 應是 DEHP 暴露之較佳的評估指標。

## 參考文獻

1. Tickner J. A., Schettler T., Guidotti T., McCally M., and Rossi M., Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices. *Am J Ind Med.*, 2001. 39, 100-111
2. Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., and Sumpter, J. P. A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. *Environ Health Perspect.*, 1995. 103, 582-587.
3. Davis B.J., Maronpot R.R., and Heindel J.J., Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol and Ovulation in Cycling Rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 1994. 128, 216-223.
4. Peters J.M., Taubeneck M.W., Keen C.L., and Gonzalez F.J., Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Induces a Functional Zinc Deficiency During Pregnancy and Teratogenesis. *Teratology*, 1997. 56, 311-316.
5. Rhee G.S., Kim S.H., Kim S.S., Sohn K.H., Kwack S.J., Kim B.H., K. Park L., Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicology in Vitro*, 2002. 16, 443-448.
6. Latini G, De Felice C, Presta G, Paris I, Ruggieri F, and Mazzeo P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 2003;111:1783.
7. Hauser R., and Calafat A.M., Phthalates and human health. *Occup. Environ. Med.*, 2005. 62, 806-818.
8. Hauser R., Meeker J.D., Singh N.P., Silva M.J., Ryan L., Duty S., and Calafat A.M., DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Human Reproduction*, 2007. 22(3) 688-695
9. Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P. *Our Stolen Future*. 失竊的未來 (臺灣譯本), 先覺出版股份有限公司.1999.
10. 黛博拉·卡· 雌性化的自然. 晨星出版社. 2000.
11. Hashimoto Y, Kawaguchi M, Miyazaki K, and Nakamura M. Estrogenic activity of tissue conditioners in vitro. *Dent. Mater.* 2003;19:341-346.
12. Tickner J A, Schettler T, Guidotti T, McCally M, and Rossi M. Health risks posed by use of Di- 2- ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *Am. J. Ind. Med.* 2001;39:100-111.
13. Main K M, Mortensen G K, Kaleva M M, Boisen K A, Damgaard I N, Chellakooty M, Schmidt I M, Suomi A M, Virtanen H E, and Petersen J H. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ. Health Perspect.* 2006;114:270-276.
14. Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, and Takahashi K. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ. Health Perspect.* 2006;114:1643-1648.
15. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, and Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2007;210:623-634.
16. Jaeger RJ, and Rubin RJ, Plasticizers from Plastic Devices: Extraction, Metabolism, and Accumulation by Biological Systems. *Science* 1970. 170 (3956) 460-462
17. Kato K, Silva M J, Reidy J A, and Hurtz D. Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 2004;112:327-330.
18. Hauser R., and Calafat A.M., Phthalates and human health. *Occup. Environ. Med.*, 2005. 62, 806-818.
19. Blount B C, Milgram K E, Silva M J, Malek N A, Reidy J A, Needham L L, and Brock J W. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal. Chem.* 2000;72:4127-4134.
20. Silva M J, Malek N A, Hodge C C, Reidy J A, Kato K, Barr D B, Needham L L, and Brock J W. Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003;789:393-404.
21. Silva M J, Slakman A R, Reidy J A, Preau J L, Herbert A R, Samandar E, Needham L L, and Calafat A M. Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B.* 2004;805:161-167
22. Schmid P and Schlatter C. Excretion and metabolism of di (2-ethylhexyl)-phthalate in man. *Xenobiotica.* 1985;15:251-256
23. Barr D B, Silva M J, Kato K, Reidy J A, Malek N A, Hurtz D, Sadowski M, Needham L L, and Calafat A M. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ. Health Perspect.* 2003;111:1148-1151.
24. Koch H.M., Rossbach B., Drexler H., and Angerer J., Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental Research*, 2003. 93, 177-185
25. H.M. Koch, R. Preuss and J.Angerer, Di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *International journal of andrology*, 2006. 29, 155-165.
26. Koch H M, Bolt H M, and Angerer J. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 2004;78:123-130
27. Koch H M, Bolt H M, Preuss R, and Angerer J. New metabolites of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 2005;79:367-376.
28. Kato K, Silva M J, Brock J W, Reidy J A, Malek N A, Hodge C C, Nakazawa H, Needham L L, and Barr D B. Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2003;27:284-289.
29. Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, and Hori S. Determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2004;804:397-401.
30. Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, Okumura M, Takatori S, Nakazawa H, Izumi S, and Makino T. Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2010;85:92-96.
31. Gaudin R, Marsan P, Ndaw S, Robert A, and Ducos P. Biological monitoring of exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate in six French factories: a field study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2011;84:523-531
32. Pragst F and Balikova M. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta.* 2006;370:17-49.
33. Kintz P. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388:1467-1474.
34. Pen-Hua Su, Yan-Zin Chang, Shu-Li Wang, Hsin-I Haung, Po-Chin Huang, PhD\* Jia-Yuh Chen\* Exposure to Di (2-Ethylhexyl) Phthalate in Premature Neonates in Neonatal Intensive Care Unit in Taiwan *Pediatric Critical Care Medicine* 2012; May 16. Epub ahead of print (SCI, IF=3.129, Ranking in Pediatrics 9/113=7.96%)

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發(三)
	計畫主持人: 張耀仁
	計畫編號: 100-2113-M-040-003- 學門領域: 質譜分析
無研發成果推廣資料	

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：張耀仁		計畫編號：100-2113-M-040-003-					
計畫名稱：長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發(三)							
成果項目		量化			單位	備註(質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數(被接受或已發表)	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>1. 本報告已經書寫成論文，並被 Clinica Chimica Acta 期刊接受。 2. 由於使用毛髮檢體來評估 DEHP 暴露為世界首見，chemical watch 網站特別撰文 加以介紹。</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

## 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

## 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

## 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

相對於血液與尿液檢體，毛髮檢體具有採集容易、不具侵入性、不易作假，體積小、無需冷藏冷凍，保存運送十分方便之天生優點，而經長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性。然而，近年來興起代謝體學主要以血液與尿液檢體為主，對於毛髮檢體之研究甚少。

本研究承接去年研究，發覺毛髮可能可以作為 DEHP 暴露之評估之有效檢體。DEHP 是塑膠的最常用的塑化劑，也是公告的環境荷爾蒙，當大量或長期暴露時可能具有生殖毒性的風險。相較於血液與尿液，毛髮屬於長效型的生物檢體，其檢測時窗非常寬廣可從數月至數年以上 因此本研究首先將針對目前 DEHP 5 個主要代謝物：MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP 與 2cx-MMHP 進行液相層析串聯質譜(LC-MS/MS) 的分析方法建立，其次發展至毛髮中將 5 個主要代謝物溫和且有效的自毛髮中取出之浸泡萃取方法，最後進行真實檢體之分析，發現 MEH 濃度範圍 15.3 - 96.2 pg/mg，MEHHP 濃度範圍 2.3 - 13.5 pg/mg，MEOHP 濃度範圍 3.3 - 23.4 pg/mg。總之，本研究發展之方法有效的分析人體毛髮中 DEHP 代謝物在之分布，並可作為 DEHP 暴露評估之有效方法。本報告已經書寫成論文，並被 Clinica Chimica Acta 期刊接受。由於使用毛髮檢體來評估 DEHP 暴露為世界首見，chemical watch 網站特別加以介紹。