

尿中苯代謝物苯基硫醇酸自動化淨化裝置暨電灑法串聯式質譜儀法

方法編號：BM002	
有害物中文名稱：苯 化學符號：C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> 八小時日時量平均容許濃度： 5 ppm	有害物英文名稱：Benzene 化學文摘社登記號碼：71-43-2 分子量：78.11
標的物中文名稱： 尿液中苯基硫醇酸 生物暴露指標值： 25 µg/g creatinine	標的物英文名稱： S-phenylmercapturic acid (SPMA) 化學文摘社登記號碼：20640-68-0
<p style="text-align: center;"><b>生物檢體採樣</b></p> <p>檢體樣本：尿液 採集時機：下班時採樣 採集量：20 mL/樣品 採集器：聚乙烯瓶 樣品保存劑：無添加任何試劑 樣品運送方式：冷藏 4 °C 以下 樣品保存溫度：4 °C 以下@8 週</p>	<p style="text-align: center;"><b>分析方法</b></p> <p>分析儀器：自動化淨化裝置暨電灑法串聯式質譜儀 (On-line sample clean-up device with electrospray ionization tandem mass spectrometer, ESI-MS/MS) 待測物：SPMA 內標準品：<sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA</p> <p>自動化淨化裝置設定值： 樣品迴路：200 µL 淨化管柱：C<sub>18</sub> 管柱，長度 55 mm，內徑 2 mm，固相粒徑 3 µm 清洗液：100 % 水 流洗液：100 % 甲醇 流率：600 µL/min 分流比：1/20 (30 µL/min 導入質譜儀)</p> <p>質譜儀設定值： 使用負電模式 (Negative mode) 多重反應監測模式設定值 (前驅離子/產物離子)：m/z 238/109</p>
<p style="text-align: center;"><b>精密度與準確度</b></p> <p>精密度與準確度測試濃度<sup>(1)</sup>： 1/2BEI、1BEI、2BEI</p>	<p style="text-align: center;"><b>檢量線</b></p> <p>檢量線濃度建立點數：5 點 檢量線添加濃度範圍：0.50~100 µg/L 最低量化濃度：0.50 µg/L</p>

回收率：100 ±5.9 % 總變異係數 (CV <sub>T</sub> ) % = 5.59 % 準確度：未評估	
適用範圍：本方法適用於尿液中 SPMA 之分析，其方法靈敏度與偵測下限會與所使用的設備與質譜儀的機種而變化。適用尿液樣品濃度範圍 0.50 ~ 100 µg/L。	
干擾：抗癲癇的藥物-carbamazepine，會在人體中經代謝形成 SPMA。	
附註： (1)美國政府工業衛生技師協會 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)建議的苯 TLV-TWA (Threshold Limit Value - Time Weighted Average)值為 0.5 ppm，TLV-STEL (Threshold Limit Value - Short Term Exposure Limit)值為 2.5 ppm，目前對於苯暴露所建議之生物暴露指標值為尿液中 SPMA 與 t,t-MA (trans,trans-muconic acid)，BEI (biological exposure indices) 各別為 25 µg/g creatinine 與 500 µg/g creatinine。[1]	

## 前言

國際癌症研究中心 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 已經將苯列為 group1 的致癌性物質。許多苯生物偵測之研究指出，苯基硫醇酸 (S-phenylmercapturic acid, SPMA) 是一個具有高特異性的苯暴露生物指標，且 SPMA 與空氣中苯暴露量均有良好的相關性，之相關係數  $r=0.63\sim 0.97$  [2-4]。此外，美國政府工業衛生技師協會 (ACGIH) 亦將 SPMA 定為苯暴露的生物暴露指標值 (BEI)，其值為  $25\ \mu\text{g/g creatinine}$ 。

### 1. 試劑

- 1.1. SPMA 標準品 (>98%)。
- 1.2.  $^{13}\text{C}_6$  SPMA (需自行合成，參考附錄一合成的步驟；此合成步驟由 Melikian 於 1999 年所發表)。
- 1.3. 甲醇 (分析級以上之規格)。
- 1.4. 醋酸 (分析級以上之規格)。
- 1.5. 去離子水，其比電阻 (Specific resistance) 需達  $\geq 18\text{M}\ \Omega\text{-cm}$ 。

### 2. 設備

- 2.1. 針筒幫浦 (syringe pump)：需可提供  $20\text{-}50\ \mu\text{L}/\text{min}$  之流速。
- 2.2. 針筒 (syringe)：需可配合針筒幫浦提供  $20\text{-}50\ \mu\text{L}/\text{min}$  之流速。
- 2.3. 高壓幫浦：需可提供  $0.6\ \text{mL}/\text{min}$  流速之清洗液與流洗液。
- 2.4. 自動進樣器 (autosampler)：可提供  $200\ \mu\text{L}$  之樣品迴路。
- 2.5. 淨化管柱 (cartridge)： $\text{C}_{18}$  層析管柱，長度  $55\ \text{mm}$ ，內徑  $2\ \text{mm}$ ，固相粒徑  $3\ \mu\text{m}$ 。本淨化管柱約可以執行 1000 次的樣本分析。
- 2.6. 六孔切換閥 (switching valve)。
- 2.7. 電灑法離子源 (electrospray ion source)。
- 2.8. 串連式質譜儀 (tandem mass spectrometer)：需可執行多重反應監測模式 multiple reaction monitoring (MRM)。

### 3. 檢體採集、運送及儲存

- 3.1 收集下班時勞工中段尿液  $20\ \text{mL}$  於聚乙烯瓶中。加上封蓋及貼上樣品標籤。
- 3.2 尿液樣本需冷藏運送，儘早送至冰箱儲存。
- 3.3 尿液樣本存放至  $4\ ^\circ\text{C}$  以下 (含  $-20\ ^\circ\text{C}$  以下)，可至 8 週。

#### 4. 檢量線標準溶液配製

4.1 從健康非職業暴露 (non-occupational exposure)者採集尿液樣本，採集後需使用此分析方法定量分析尿液中 SPMA，確定無 SPMA 訊號 [訊號峰之訊雜比 (S/N)需小於 3]之尿液樣本，才可取等量混合。需混合五個以上之無訊號尿液樣本，此混合尿液樣本用來當做檢量線添加基質使用。

4.2 取混合尿液樣本 400  $\mu\text{L}$ ，加入 100  $\mu\text{L}$  之 20  $\mu\text{g/L}$  的內標準品 ( $^{13}\text{C}_6$  SPMA)，再加入 20 % 醋酸 100  $\mu\text{L}$ ，並添加 100  $\mu\text{L}$  SPMA 標準品，再添加去離子水 1300  $\mu\text{L}$ ，然後再將配製好的尿液樣本以 0.2  $\mu\text{m}$  孔徑 PVDF 材質的濾紙過濾後，進行分析。檢量線樣本需每次分析時重新配製。

4.3 檢量線溶液需每日配製至少五點以上，其添加濃度範圍約為 0~100  $\mu\text{g/L}$ 。

#### 5. 同位素內標準品 (Isotope-labeled internal standard)製備

本分析方法須使用同位素標定之 SPMA 當做此分析方法的內標，本方法須自行合成  $^{13}\text{C}_6$  SPMA，其合成步驟參考 Melikian 學者發表的文獻[5]。 $^{13}\text{C}_6$  SPMA 合成步驟與適用性評估在附錄一。

#### 6. 添加樣品 (Spike sample)製備

6.1 以步驟 4.1 之混合尿液，依步驟 4.2 配製 SPMA 濃度接近 1/2BEI、BEI 與 2BEI 之溶液。

#### 7. 試劑空白溶液 (Reagent blank)

7.1 去離子水 1800  $\mu\text{L}$  加入 100  $\mu\text{L}$  之 20  $\mu\text{g/L}$  的內標準品 ( $^{13}\text{C}_6$  SPMA)，再加入 20 % 醋酸 100  $\mu\text{L}$ ，再將此溶液充分混合後，進行空白值之測定。

#### 8. 品質管制

8.1 檢量線製備：取標準溶液進行分析。檢量線線性相關係數 (r)需大於 0.995 以上，才可進行後續的分析；若小於 0.995 時，則需重新配製檢量線溶液並進行分析。

8.2 回收率評估：以添加樣品按檢量線中，以低、中、高三種不同濃度，評估各濃度之回收率；回收率需在  $100 \pm 10\%$  以內。

8.3 精密度評估：以添加樣品按檢量線中，以低、中、高三種不同濃度，以重複分析 3 次，評估各濃度之精密度；精密度以變異係數 (CV) 評估，各濃度之變異係數皆需在 10 % 以內。

## 9. 樣品前處理

取尿液樣本 400  $\mu\text{L}$ ，加入 100  $\mu\text{L}$  之 20  $\mu\text{g/L}$  的內標準品，再加入 20 % 醋酸 (acetic acid) 100  $\mu\text{L}$ ，再添加去離子水 1300  $\mu\text{L}$ ，然後再將配置好的尿液樣本以 0.2  $\mu\text{m}$  PVDF 材質的濾紙過濾，當樣品配置好以後即可使用自動化淨化暨電灑法串聯式質譜儀 (On-line sample clean-up device with ESI-MS/MS) 系統加以分析。

## 10. 儀器分析

### 10.1 分析方法之流程

#### 10.1.1 載入/清洗條件

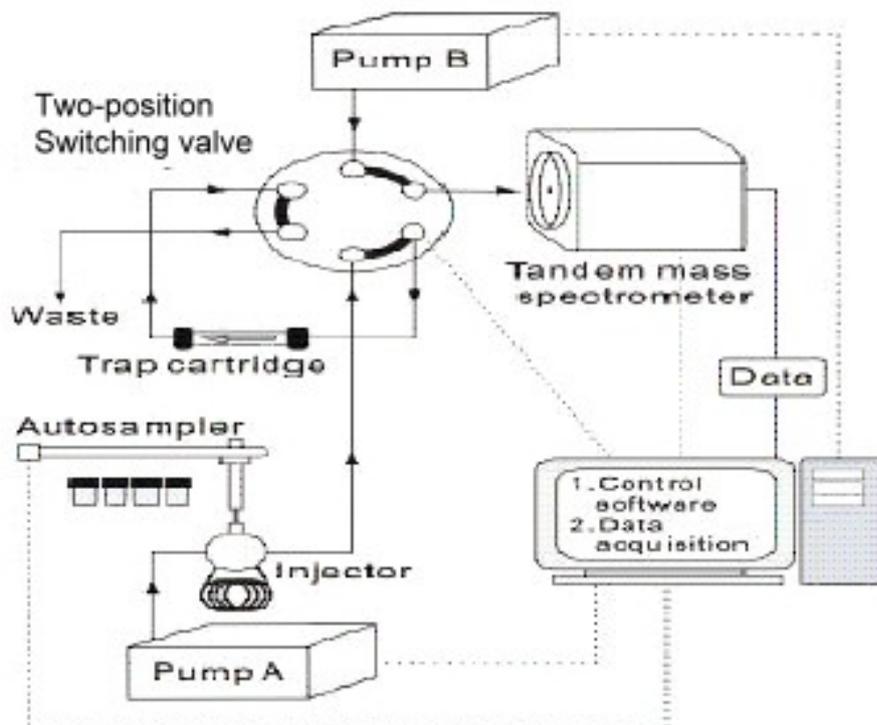


圖 10.1.1 系統示意圖：載入/清洗條件

如圖 10.1.1 所示，在此狀態首先自動進樣器會將尿液樣本經由一 200  $\mu\text{L}$  loop 加以定量，藉由幫浦 A 以流速 600  $\mu\text{L}/\text{min}$  推動 100 % 水，將尿液樣本透過自動進樣器之六孔閥載入一  $\text{C}_{18}$  的淨化管柱中，此時會將尿液中分子態的 SPMA 留在管柱 (trap cartridge) 內；由於尿液中有許多的高水溶性鹽類，為了去除此鹽類對於離子源之干擾，在此系統使用大量的水來清洗管柱中的鹽類，因此管柱在載入樣本後被已最佳化時間(10 分鐘)的水沖洗，將絕大多數的鹽類去除，也因而降低尿液基質所造成的干擾。幫浦 B 所推動的溶液是流速 600  $\mu\text{L}/\text{min}$  100 % 的甲醇，在載入/沖洗狀態下，甲醇並沒有通過管柱，而直接進入分流器後以 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  之流速再進入質譜儀。

### 10.1.2 流洗條件

當尿液樣本留在管柱以去離子水 600  $\mu\text{L}/\text{min}$  沖洗 10 min 後，將六孔閥切換至流洗狀態，此時甲醇會逆向的進入管柱中，由於甲醇的極性較水來的低，因此將管柱中的 SPMA 流洗出來，進入到分流器以 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流速進入質譜儀進行質譜分析。此分流器的比例為 20 分之 1。在此流洗狀態下持續五分鐘，之後再回復到載入/沖洗狀態，進行下一個分析，總共每次分析時間需 15 分鐘。

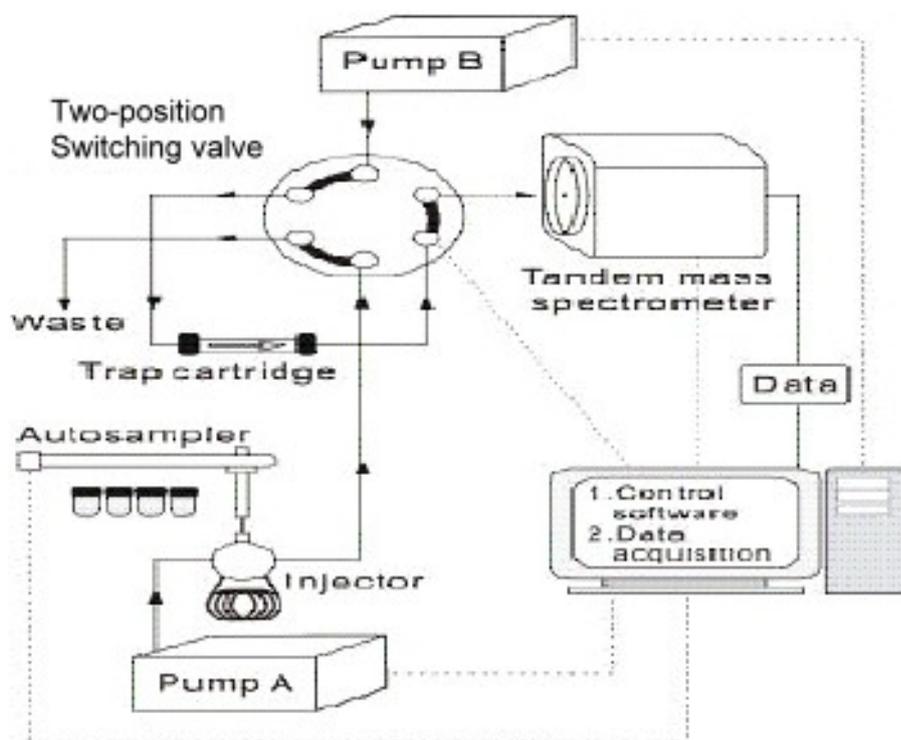


圖 10.1.2 系統示意圖：流洗條件

## 10.2 質譜儀參數的設定與最佳化

在進行儀器分析之前，需要將針對 SPMA 之儀器分析參數做最佳化，以利 SPMA 有最好的分析訊號。這些參數包括電壓參數與離子源參數最佳化。

### 10.2.1 SPMA 與內標準品之前驅離子 (precursor ion) 與產物離子 (product ion)

在負電模式進行離子化之條件下，所得 SPMA 之前驅離子與產物離子分別為 238 m/z 和 109 m/z，而  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 之前驅離子與產物離子分別為 244 m/z 和 115 m/z，離子對決定好以後使用多重反應監測模式 (MRM) 的分析方式進行分析。

### 10.2.2 電壓參數

使用針筒幫浦以 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  的速率連續注入 1~5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SPMA 標準品進入到離子源，使離子源能穩定且連續的提供 SPMA 離子，並使用儀器軟體中自動化調整電壓參數功能之軟體，逐一改變質譜儀內各電壓參數，最後選擇使 SPMA 離子在 MRM 的方式下有最高訊號的電壓參數，供以後分析使用。

### 10.2.3 離子源參數

流動注入法是使用液相層析儀的幫浦，流速定為 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，移動相為甲醇，移動相經過自動進樣器後不接任何管柱，直接進入到離子源區，每調整一單位參數時則注射一單位體積 SPMA 來檢視強度的變化，如此可以由時間對應強度的圖譜，快速的檢視調整參數後對訊號強度的影響，並可以得知訊號與雜訊的比例。調整離子源的位置後，再依序調整霧化氣體、窗簾氣體、渦流氣體 (turbo gas) 與渦流氣體的溫度，如此可以得到最適當的離子源參數。

## 10.3 本分析方法之分析結果

使用本方法分析的結果如圖 10.3.1 所示。在 SPMA 之層析圖中 (m/z 238 $\rightarrow$ 109)，應在 12.3 分之處有一訊號峰，在內標準品方面  $^{13}\text{C}_6$  SPMA (m/z 244 $\rightarrow$ 115) 應在同一時間 12.3 分位置有訊號峰。將此兩者訊號峰之面積積分，以 SPMA 面積/ $^{13}\text{C}_6$  SPMA 面積之比值當做儀器訊號值。

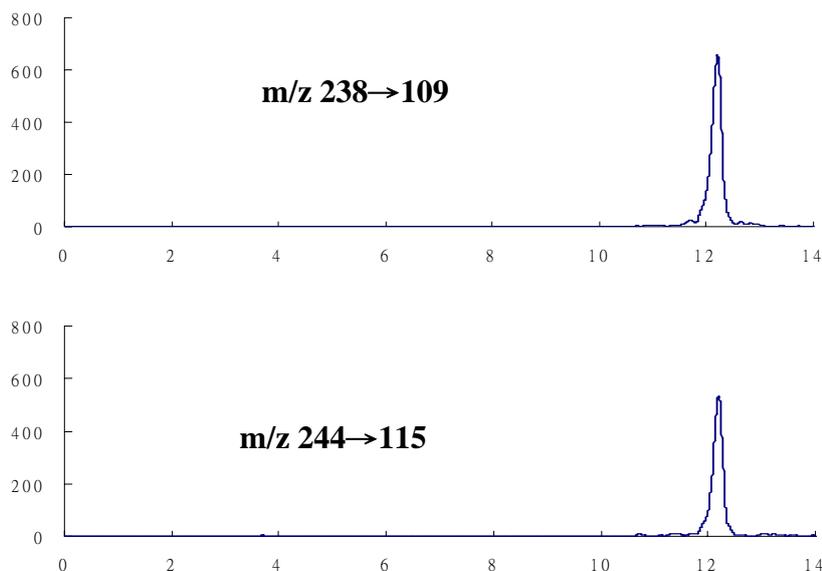


圖 10.3.1 本分析方法分析尿液基質添加樣本之結果。SPMA 在 MRM 模式下的前驅離子與產物離子為 238 與 109。<sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA 在 MRM 模式下的前驅離子與產物離子為 244 與 115。

## 11. 計算

11.1 樣本濃度計算：尿液樣本使用 MRM 模式來同時定量 SPMA 與 <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA，當分析完畢後個別將訊號峰加以積分，SPMA 的訊號峰面積除以 <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA 之訊號峰面積之比值來當作儀器訊號值，再帶入檢量線計算濃度。

公式如下所示：

SPMA 濃度 = [(SPMA 訊號峰面積 / <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA 訊號峰面積) - 檢量線截距] / 檢量線斜率

## 12. 數據說明

12.1 美國 ACGIH 建議的苯 TLV-TWA 值為 0.5 ppm，TLV-STEL 值為 2.5 ppm，目前對於苯暴露所建議之生物暴露指標值為尿液中 SPMA 與 t,t-MA，BEI 各別為 25 μg/g creatinine 與 500 μg/g creatinine。

12.2 一般環境中的苯濃度約小於 1 ppm，根據文獻回顧資料，非職業暴露族群之尿液中 SPMA 濃度為 1.5 - 12.5 μg/g creatinine [6]。

根據本實驗室對於台灣非職業苯暴露族群之調查，其尿液中 SPMA 的濃度為 0.56~13.6  $\mu\text{g/g creatinine}$  [7-8]。

### 13. 方法驗證

本研究發展之分析方法之驗證程序採用勞動部勞動及職業安全衛生研究所於民國 93 年修改的「作業環境中有害物勞工暴露生物偵測分析方法驗證程序第二版」中附錄二之方法評估規範來參考訂定規範，方法評估規範在此探討共有六項，分別為(1)檢量線。(2)方法偵測極限。(3)準確度規定範圍。(4)精密度規定範圍。(5)實驗室間之比對。(6)樣本儲存穩定性。細節條例如下：

#### 13.1 檢量線

收集 5 位以上非職業暴露者的尿液，採集後使用此分析方法定量分析尿液中 SPMA，確定無 SPMA 訊號 [訊號峰之訊雜比 (S/N) 需小於 3] 之尿液樣本，才取等量混合將其尿液均勻混和，以標準品添加方式添加 0~100  $\mu\text{g/L}$  SPMA 選取 5 個濃度做一檢量線，並以  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 當做內標準品。如圖 13.1.1 所示，檢量線的相關係數  $r = 0.9995$ 。

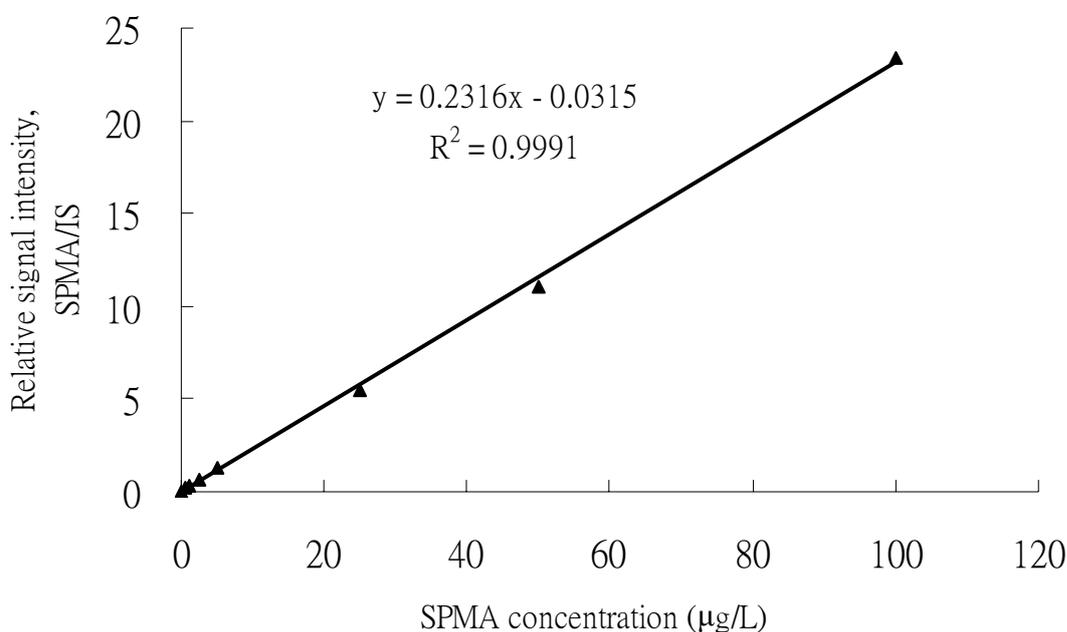


圖 13.1.1 使用  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 當作內標準品之檢量線

#### 13.2 方法偵測極限

以混合尿液樣本添加不同濃度之 SPMA，以驗證程序之方法偵測極限步驟測試，在 0.10 與 0.20  $\mu\text{g/L}$  兩添加濃度個別分析 7 次，所

得之標準差為經過 F-test ( $F=S_1^2/S_2^2$ )計算，直到值小於 3.05 為止，再根據方法偵測極限公式，由檢量線斜率可求得到此方法之偵測極限值。經計算後得到之偵測極限為 0.12  $\mu\text{g/L}$ 。

### 13.3 回收率

此混合尿液經測定後，尿中 creatinine 之濃度為 0.9 g/L，並將混合尿液添加相當於 1/2BEI、1BEI、2BEI 濃度與尿液空白樣本，每一濃度各進行 6 重複分析，當以本研究之方法分析完畢後，所得訊號值帶回檢量線，使用驗證程序之回收率公式計算總平均之回收率，結果如表 13.3.1 所示，相當於 1/2BEI、1BEI、2BEI 三個濃度回收率分別為 92.4 %、96.1 %、93.7 %，而總平均回收率為 94.1 %，都符合在容許範圍 75 %~125 %之間。

表 13.3.1 回收率之結果

濃度 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
11.25 ( $\frac{1}{2}$ BEI)	92.4 %	
22.5 (BEI)	96.1 %	94.1 %
45 (2 BEI)	93.7 %	

### 13.4 精密度

利用準確度中數據計算，結果如表 13.4.1 所示，相當於 1/2BEI、1BEI、2BEI 三個濃度各配製 6 個樣本重複分析，變異係數各別為 4.82 %、5.62 %、6.24 %，而共同變異係數值為 5.59 %，在規範的 25 %之內，顯示出本方法使用了  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 當作內標準品，可以有效的校正儀器與人為的不穩定度，結果顯示本分析方法在三種濃度下都擁有很高的精確度。

表 13.4.1 精密度之結果

濃度 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	變異係數 (%)	共同變異係數 (%)
11.25 ( $\frac{1}{2}$ BEI)	4.82 %	
22.5 (BEI)	5.62 %	5.59 %
45 (2 BEI)	6.24%	

### 13.5 實驗室間之比對

本實驗室在國家衛生研究院中建立本分析方法，在國家衛生研究院所使用的儀器為 PE Atmospheric Pressure Ionization (API) 3000 (SCIEX, Thornill, Canada)，與本實驗室所使用的儀器為同一公司，但不同機型。此外由本實驗室自行配製盲樣交與國家衛生研究院之實驗室測試，盲樣在混合尿液基質中配置，添加濃度為 1/2BEI 與 1BEI，各進行 6 重複分析。結果如表 13.5.1 所示，相對誤差在 10 % 以下，此數據在規範± 25 % 以內，顯示出本分析方法是可以在另一實驗室中建立。

表 13.5.1 國家衛生研究院以本分析方法分析盲樣的結果

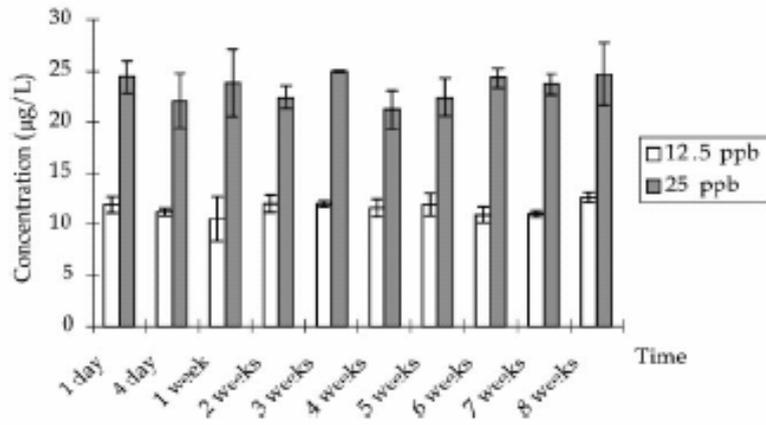
樣本添加濃度 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	number	測定值濃度範圍 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	變異係數 (%)	相對誤差 (%)
11.25 ( $\frac{1}{2}$ BEI)	6	13.5-14.3	2.0 %	10 %
22.5 (BEI)	6	26.2-29.2	4.1 %	9.9 %

### 13.6 樣品儲存穩定性

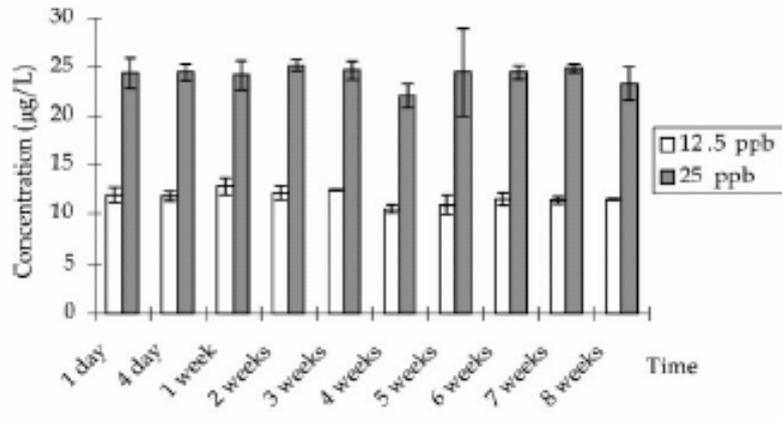
樣本儲存穩定性如圖 13.6.1 所示，圖中縱軸為 SPMA 之濃度，圖中每一數據點都是重複 3 次分析的平均值，上下限為一倍的標準差。圖 A 為 4 °C 樣本儲存方式，圖 B 為 -20 °C 樣本儲存方式，圖 C 為解凍次數對樣本儲存穩定度的影響。採三圖中，每一時間點之濃度皆與第一天的濃度做比較，以求得與第一天相比之回收率。

綜合三圖來說，無論何種儲存方式回收率都維持在很良好的範圍，且天與天之間 (between-day) 與每天 (within-day) 重複量測的變異係數都很良好，都在 10 % 以內。根據結果來說，8 週內 SPMA 以 4 °C 及 -20 °C 儲存回收率皆可以接受，但仍建議儘早分析完畢，以避免儲存時的變異影響較低濃度的量測。

A



B



C

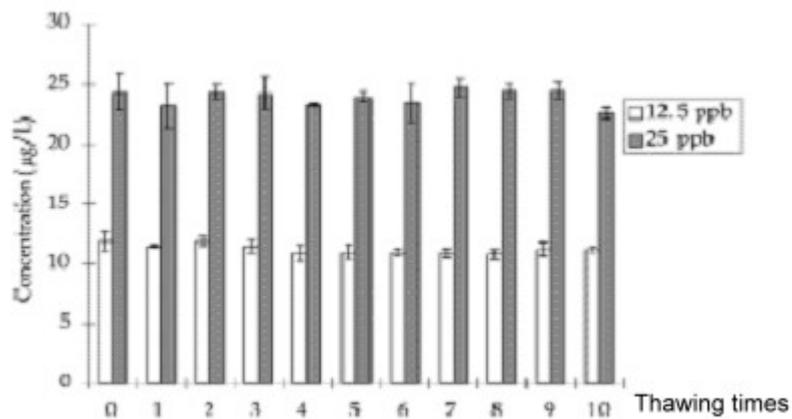


圖 13.6.1 樣本儲存穩定度：(A)以 4 °C 儲存。(B) 以 -20 °C 儲存。(C)解凍次數對穩定度的影響。圖中直方圖之頂點為 3 次重複分析的平均，上下限為 1 倍之標準偏差；以上回收率結果皆落在 25 % 以內。

### 13. 參考文獻

- [1] American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), 2001“Benzene,”USA.
- [2] Popp W, Vahrenholz C, Przygoda H, Brauksiepe A, Goch S, Muller G, Schell C, Norporth K. DNA-protein cross-links and sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes and hydroxyethyl mercapturic acid in urine of ethylene oxide-exposed hospital workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66:325-332.
- [3] Ghittori S, Maestri L, Fiorentino ML, Imbriani M. Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67:195-200.
- [4] Boogaard PJ, van Sittert NJ. Suitability of S-phenyl mercapturic acid and trans-trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. *Environmental Health Perspectives*. 1996; 104:1151-1157.
- [5] Melikian AA, Connor RO, Prahalad AK, Hu P, Li H, Kagan M, Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 1999; 4:719-726.
- [6] Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in Environmental health studies: the case of PAHs and Benzene. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29:129-168.
- [7] Lin LC, Tyan YC, Shih TS, Chang YC, Liao PC. Development and validation of an isotope-dilution electrospray ionization tandem mass spectrometry method with an on-line sample clean-up device for the quantitative analysis of the benzene exposure biomarker S-phenylmercapturic acid in human urine. *Rapid Commun Mass Sp* 2004; 18:1310-1316.
- [8] Liao PC, Li CM, Lin LC, Hung CW. An online automatic sample cleanup system for the quantitative detection of the benzene exposure biomarker S-phenylmercapturic acid in human urine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2002; 26:205-210.

14. 方法撰寫人員      林隆晟、陳婉柔、廖寶琦

撰寫日期：民國 93 年 12 月

## 附錄一

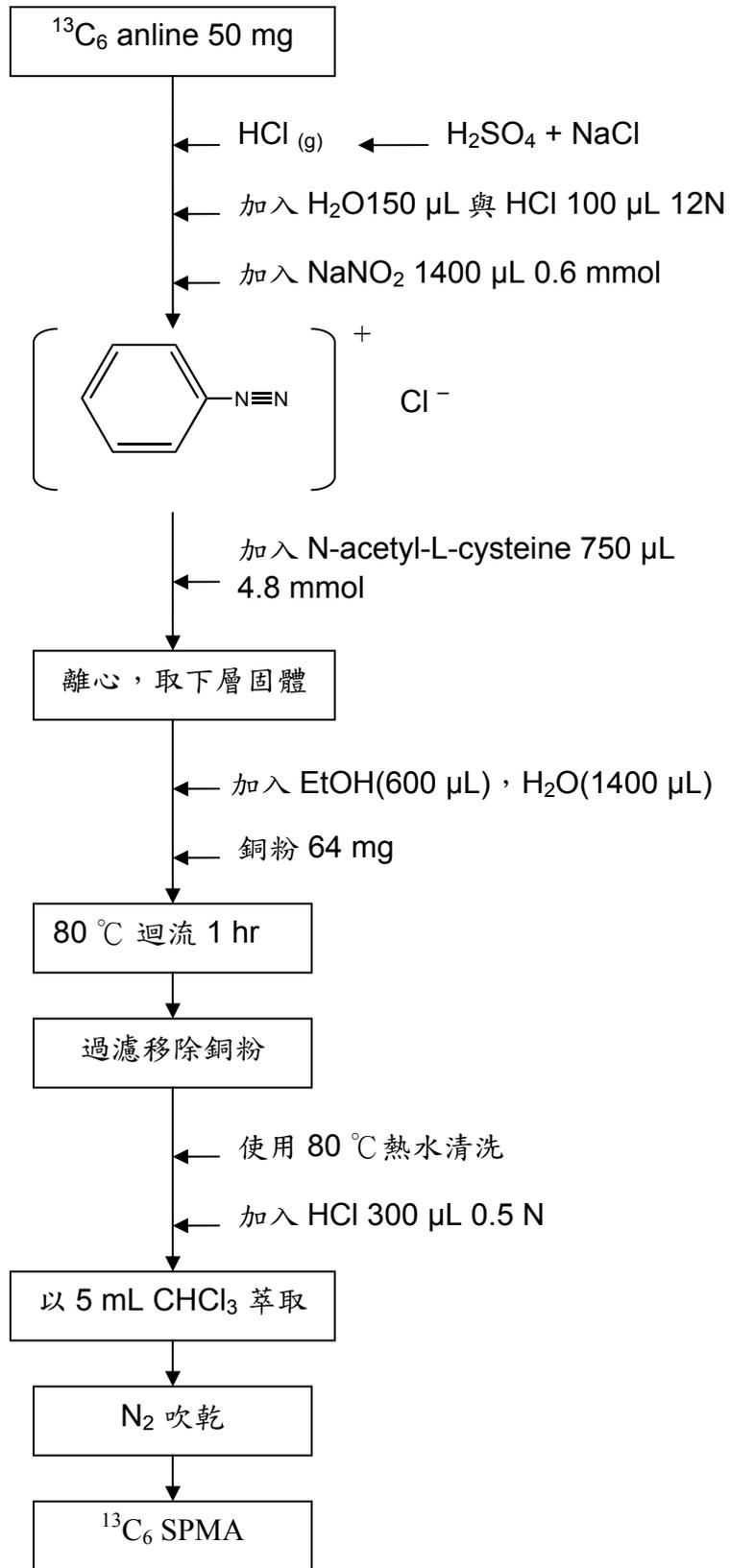
### (1) $^{13}\text{C}_6$ SPMA 合成步驟

圖 A 顯示  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 合成的步驟，合成方式參考 Melikian 於 1999 年所發表文獻中所報導之合成方式，合成步驟如附錄一之圖 A 所示。首先取  $^{13}\text{C}_6$  aniline 50 mg 依序加入 HCl 氣體、150  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ 、100  $\mu\text{L}$  12 N HCl、 $\text{NaNO}_2$  0.6 mmol 1400  $\mu\text{L}$  與 4.8 mmol N-acetyl-L-cysteine 750  $\mu\text{L}$  後離心，取下層固體加入乙醇 600  $\mu\text{L}$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  1400  $\mu\text{L}$  與銅粉 64 mg (銅粉為催化劑)以 80  $^\circ\text{C}$  迴流 1 小時，之後過濾移除銅粉，使用 80  $^\circ\text{C}$  熱水清洗再加入 0.5 N HCl 300  $\mu\text{L}$ ，以 5 mL  $\text{CHCl}_3$  萃取，最後以氮氣吹乾保存，即獲得  $^{13}\text{C}_6$  SPMA，最後以吹乾的狀態下冷藏在 4  $^\circ\text{C}$  的溫度下保存。

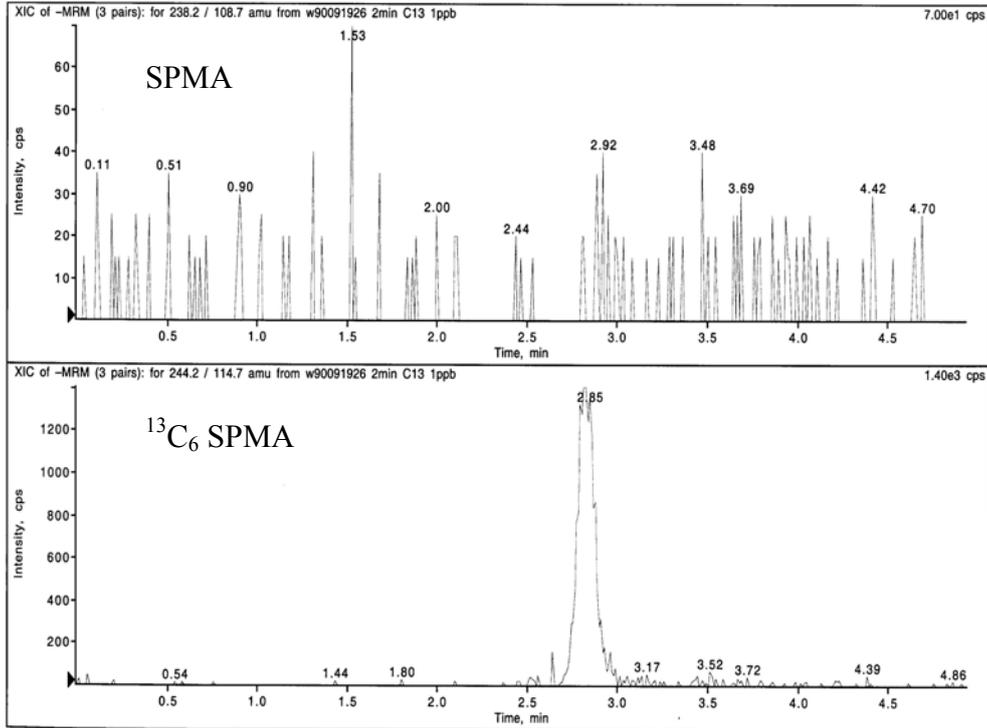
### (2) 內標準品之純度測定

本研究需要自行合成  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 當作內標準品，合成後以本方法以 MRM 的方式檢驗  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 的純度。

檢測結果如圖 B 所示，我們使用質譜儀之 MRM 模式同時監測 SPMA 與  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 的方式分析合成後的  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 樣品，在上方 SPMA 之層析圖都是雜訊，只有在  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 的質譜圖有訊號，並不會對 SPMA 帶來干擾，因此所合成出來的  $^{13}\text{C}_6$  SPMA 純度是利用此方法來用已判定合成內標的純度。



附錄一之圖 A <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA 合成步驟



附錄一之圖 B 使用多重反應監測模式分析 <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA 之結果。上面之層析圖為使用 MRM 模式監測 SPMA。下面之層析圖為使用 MRM 模式監測 <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SPMA。