

第一章 緒論

1-1 研究緣起與目的

生物有效性 (bioavailability) 是毒理學的重要觀念，是用來評估污染物經由不同暴露途徑，經一定暴露時間後，目標污染物進入血液循環系統的劑量與暴露劑量之比例 (Ruby *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2002; Caussy D., 2003)，而生物有效性是特別應用於體內試驗 (in vivo)，生物可及性 (bioassessibility) 則應用在體外試驗 (in vitro)，但一般不區別這兩個名詞。在過去，生物有效性的研究已廣泛應用於藥物、食品營養 (Miller *et al.*, 1981) 及牙科材質的領域 (Fusayama *et al.*, 1963; Katz *et al.*, 1975)。晚期，美國要求於超級基金 (Superfund) 場址復育時，需利用生物有效性訂定土壤復育的基準。由於動物實驗評估程序複雜且昂貴費時，而毒性特性溶出程序 (toxicity characteristics leaching procedure, TCLP) 僅適合判定受污土壤是否為有害廢棄物，其缺失有：

- 僅以濃度表示
- 未區別化學物種
- 未考量晶格結構之包封度
- 未考量暴露途徑及反應時間
- 無法有效且準確的模擬人體胃腸環境之反應

因此，美國乃於 1992 年開始發展一套模擬人體胃腸環境之體外試驗方法，以生物有效性作為土壤及地下水復育之健康風險評估準則 (Davls *et al.*, 1992)。但我國於民國 91 年才頒定「資源回收再利用法」，為評估廢棄物資源化產品，特別是廢棄物轉製成的土壤改良劑 (soil conditional) 或有機肥 (organic fertilizer)，我國目前仍採用毒性特性溶出程序

(TCLP)，以判定原料是否為有害事業廢棄物，並不能正確評估資源化產品的健康風險，是故研發有效之風險評估工具，時為當務之急（江等，2004）。

鑑於將廢棄物資源化為土壤改良劑（soil conditional）或有機肥（organic fertilizer）時，目前並無合適的評估方法，本研究乃提議利用生物有效性體外試驗方法作為評估與決策工具。雖然生物有效性試驗方法發展至今已逾 10 年，且文獻中也詳細考量人體胃腸環境之各項試驗參數（Davls *et al.*, 1992; Hamel *et al.*, 1998; Ruby *et al.*, 1993; 1996; Rodriguez *et al.*, 2003），經過歷年的研究，雖然已漸趨一致，但本研究發現仍待釐清的三個參數為：是否應控制氧化還原電位？是否應模擬胃環境之蠕動強度？是否應控制胃之排空比？不僅如此，本研究另發現，對於使用不同的體外試驗方法仍難相互評比，主要是因為並未建立系統品管基準（QC criteria），因此本研究探討四種管制樣品：空白管制、重複管制、代理參考物質（surrogate reference material, SRM）及介質標準（matrix standard），期盼藉由本研究建立簡化且有效的評估程序，並應用於土壤改良劑、受污土壤、食品、中藥、牙材、玩具等以利建立健康風險評估（江等，2005）。

1-2 研究架構

本研究之整體架構圖如圖 1-1 所示，分為 4 個階段進行研究，於 phase I~IV 試驗中以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作為 SRM，擬使用 NIST 2710 soil 為介質標準 (matrix standard)，各階段之研究內容及工作如下：

- 文獻收集與評析：
收集有關生物有效性之國內外相關文獻，並探討胃腸生理學、生物有效性研究之歷史沿革及體外試驗之各項參數。
- 研擬體外試驗程序與操作參數
建立本研究體外試驗之反應槽體、蠕動方式與溫控設備，並簡化二階段之腸相試驗方法
- Phase I 胃腸相氧化還原電位試驗：
探討生物有效性體外試驗中氧化還原電位的變化
- Phase II 蠕動強度試驗：
以磁力攪拌方式模擬胃蠕動，並以速度梯度 (velocity gradient, G) 探討對生物有效性之影響
- Phase III 液固比試驗：
探討 體外試驗中液固比對生物有效性之影響
- Phase IV 小腸相萃取時間試驗：
探討體外試驗中小腸相萃取時間對總砷及生物有效性之影響
- 建立品管基準與標準操作程序 (SOP)：
建立空白管制、重複管制、SRM、介質標準之管制樣品，擬定生物有效性試驗程序
- 建立砷終身致癌風險值估算模式
利用本研究之生物有效性建立砷終身致癌風險估算模式

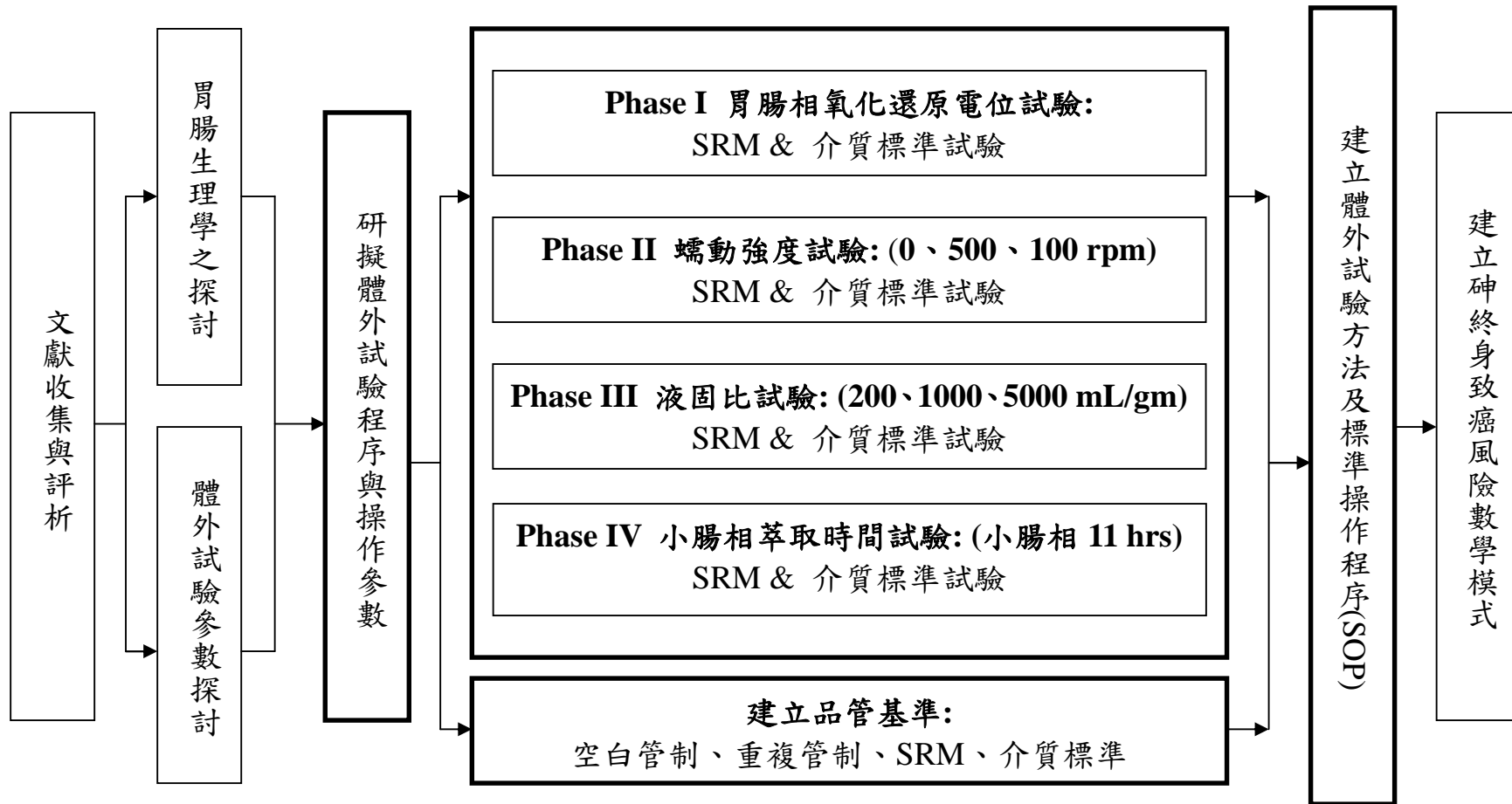


圖 1-1：本研究生物有效性研究架構圖

第二章 文獻探討

2-1 生物有效性與生物可及性

在生物有效性之研究中，為了能夠正確的闡述生物有效性之意涵，實驗操作上必須先明確定義下列各項前提：

- 目標污染物 (target compound)，如砷
- 目標污染物存在之介質 (matrix)，如土壤或水體
- 體內試驗使用之動物及程序或體外試驗的反應槽及程序
- 試驗時使用之代理參考物質 (surrogate reference material, SRM)，如 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或美國 National Institute of Standards and Technology (NIST) 標準土壤

就體內試驗 (動物或人體) 而言，生物有效性是指介質中目標污染物經特定路徑，進入血液之劑量與暴露量之百分比，絕對生物有效性係數 (absolute bioavailability factor, $\text{AB}_{\text{v}}\text{F}$) 可定義如下 (Caussy, 2003; Kelly *et al.*, 2002; Ruby *et al.*, 1999)：

$$\text{AB}_{\text{v}}\text{F}(\%) = \left[\frac{D_{\text{B}}}{D_{\text{T}}} \right]_{\text{P}} \times 100\% \quad (1)$$

其中， D_{B} =進入血液循環系統之劑量 (mg)， D_{T} =暴露之總量 (mg)。公式 (1) 中，下標 P 為某一特定暴露途徑。但在實驗操作上，因進入血液循環系統之污染物濃度隨攝入時間改變，且可能在血液循環過程中，污染物被分解或排出，正確推估 D_{B} 並不容易，實務上均使用相對生物有效性係數 (relative bioavailability factor, $\text{RB}_{\text{v}}\text{F}$)，定義如下：

$$RB_{VF}(\%) = \frac{AB_{VF_P}}{AB_{VF_I}} \times 100\% = \frac{\left[\frac{M_B}{M_T} \right]_P}{\left[\frac{M_B}{M_T} \right]_I} \times 100\% \quad (2)$$

其中 AB_{VF_P} =某特定暴露途徑（如食入、吸入或接觸）之 AB_{VF} ， AB_{VF_I} =藉由靜脈注射（intravenous injection）途徑所得之 AB_{VF} 。一般均假設靜脈注射生物有效性為 100%， RB_{VF} 是以靜脈注射的 AB_{VF} 為基準，評估污染物在不同介質進入血液系統的比例，優點是避免必須估算污染物在血液中的分解及排出量所引起的誤差。

在體外試驗方面，若經由食入途徑，可以利用生物有效性體外試驗程序分別計算在胃及小腸階段中萃取出污染物的總量與暴露總量之百分比（Kelly *et al.*, 2002），一般而言 AB_{SF} 之公式如下（Kelly *et al.*, 2002）：

$$AB_{SF}(\%) = \frac{M_Y}{M_T} \times 100\% = \frac{C_Y(\text{mg/L}) \times V(\text{L})}{C_T(\text{mg/kg}) \times W_S(\text{kg})} \times 100\% \quad (3)$$

其中， M_Y =胃或腸階段所萃取出之總量（mg）； M_T =污染物在介質中的總量（mg，以 EPA Method 3050 或 3051 量測）。 C_Y =胃或腸階段所萃取出之濃度（mg/L）； V =反應槽有效容積（L）； C_T = 污染物在介質中的全濃度（mg/kg）， W_S =樣品總量（kg）。相對生物可及性是以 SRM 的 AB_{SF} 為基準，評估污染物在不同基質（如食物、土壤或水體）溶出的程度，定義如下（Caussy, 2003；Kelly *et al.*, 2002；Ruby *et al.*, 1999）：

$$RB_{SF}(\%) = \frac{AB_{SF_X}}{AB_{SF_{SRM}}} \times 100\% = \frac{\left[\frac{M_Y}{M_T} \right]_X}{\left[\frac{M_Y}{M_T} \right]_{SRM}} \times 100\% \quad (5)$$

其中， AB_{SF_X} =樣品 X 之 AB_{SF} ， $AB_{SF_{SRM}}$ =SRM 之 AB_{SF} 。以砷為例，可使用 $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 為 SRM。 RB_{SF} 的優點為較可避免不同萃取效率所引起的差異。獲得 RBF 後，若欲評估致癌風險，可以利用下列公式推估該物質之終身致癌風險（excess lifetime cancer risk, ELCR）

$$ELCR_{x,i} = \frac{(UCR_i) \times (LID_x) \times (RBF_{x,i})}{(BW) \times (AT)} \quad (5)$$

UCR_i =目標污染物 i 之單位致癌風險 (unit cancer risk, $(mg/kg BW-d)^{-1}$)

LID_x =樣品 X 之平均終身攝入該物質劑量 (lifetime intake dose, mg)

BW =為受評估族群之平均體重 (kg)

AT =該族群總平均終身攝入時間 (day)。

2-2 生物有效性體外試驗重要歷史沿革與成果

表 2-1 為本研究彙整的生物有效性體外試驗重要歷史沿革與研究成果。美國早於 1992 年開始研發胃腸相之生物有效性體外試驗方法，並應用於受污土壤的風險評估，研究成果發現，以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ 為砷與鉛之 SRM 其 ABF 為 73% 及 0.92%，體外試驗之砷 ABF 值與動物試驗 (New Zealand White Rabbits) 無太大差異 (11 % vs. 12 %)；但鉛之體外試驗卻顯著低估動物試驗 (0.18 % vs. 5.6 %) (Davls *et al.*, 1992)。

Ruby *et al.* (1993) 研究，進一步以體外試驗評估 New Zealand White rabbits 鉛的生物有效性，發現鉛體外試驗 RBF 亦低估動物試驗 (New Zealand White Rabbits) 達 19% (5% vs. 24%)，但數據仍相當欠缺，不足以得出不同試驗室統計結論，此外，體外試驗還發現胃腸中的酵素與有機酸皆為影響 Pb 溶解度的重要因子，當酵素或有機酸存在時會促進鉛的螯合作用 (complexation)，螯合強度以 citrate 為最大，其次為 malate、acetate，最小的為 lactate。

Ruby *et al.* (1996)，提議以生理學為基礎的萃取方法 (physiologically based extraction test, PBET) 測定人體胃腸環境之生物有效性，並探討體外試驗之各項參數，並以氫氣曝氣維持厭氧並模擬胃蠕動，胃與小腸階段 pH 分別為 2.5 與 7.0，反應時間分別為 1 與 4 小時。研究發現，以不同介質評估 PBET，鉛之 RBF 值與動物試驗 (Sprague-Dawley rats) 結果雖有良好的線性相關 (slope=0.71； $R^2=0.93$)，但卻低估體內試驗 29%，而砷體外試驗低估動物試驗 (New Zealand White rabbits) 為 18% (50 % vs. 32 %)。

Hamel *et al.* (1998) 並不隸屬於 Ruby *et al.* 的研究群，其在生物有效性的研究領域上，首度探討胃液容積與受污土壤之比例 (liquid to solid

表 2-1：生物有效性試驗方法之重要沿革表

參考文獻	研究目的	研究成果
Davls <i>et al.</i> (1992)	探討土壤中鉛及砷胃腸體外試驗 RBF，並與 New Zealand White Rabbits 試驗比較。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ 為 SRM，ABF 分別為 73 % 與 0.92%。 2. 體外試驗能準確推估砷 ABF (11 % vs. 12 %)，但顯著低估鉛 ABF (0.18 % vs. 5.6 %)。
Ruby <i>et al.</i> (1993)	以體外試驗評估土壤中鉛之生物有效性，並與兔子試驗評比。	體外試驗低估鉛 RBF (5% vs.24%)。
Ruby <i>et al.</i> (1996)	探討影響砷與鉛體外試驗參數。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 將氫氣通入分液漏斗底座進行攪拌並維持厭氧條件。 2. 胃與小腸階段 pH 值分別為 2.5 與 7.0、反應時間分別為 1 與 4 小時，建立 PBET 方法。 3. 鉛 RBF 與動物試驗呈線性相關 (slope=0.71; $R^2=0.93$)，但低估 29%。 4. 砷 RBF 值高估動物試驗 18% (50% vs. 32%)。
Hamel <i>et al.</i> (1998)	探討液固比對生物有效性的影響。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 液固比 100 : 1 (mL/gm) 至 5000 : 1，對鉛、鎳、鎘與鉻生物有效性影響不大，但高液固比砷 ABF 較高 ($R^2=0.58$)。 2. 建議 1000 : 1 為慣用值。
Rodriguez <i>et al.</i> (1999)	模擬成人胃腸環境中砷之生物有效性。使用 iron hydroxide gel 小腸吸收劑，並簡化 PBET 方法。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 胃相之砷 RBF 與動物試驗呈線性關係 (slope=0.88, $R^2=0.69$)，但低估 12%。 2. 小腸相砷 RBF 值之 IVG 與 IVG-AB 試驗與動物試驗呈線性關係 (slope=0.74, $R^2=0.62$; slope=0.76, $R^2=0.67$)，但分別低估 26% 與 24%。 3. IVG-AB 雖然增加小腸吸收，但並無較好之準確性，且胃相較腸相準確。
Ruby <i>et al.</i> (1999)	<ol style="list-style-type: none"> ¹ 評析 64 篇論文，探討無機金屬生物有效性各種體內及體外方法。 ² 討論其應用於訂定受污土壤復育標準與人體健康風險的優缺點。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 影響土壤中目標污染物之生物有效性因素：粒徑大小、晶格形狀、包封程度、胃腸酸鹼值、胃腸蠕動強度。 2. 研究發現受污場址之土壤中，RBF 變異範圍很大，鉛之 RBF 為 3-80 %，砷之 RBF 為 5-50 %。
Sarkar <i>et al.</i> (2003)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 評估含砷的農藥土壤之生物有效性。 2. 簡化小腸吸附劑之備製。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. IVG-AI 之砷 RBF 值較 IVG-S 高約 16 % (slope=1.16, $R^2=0.98$)。 2. 建議使用 strip-coated ferric oxide 簡化 IVG-AB 以提高萃取效率。

raito, 簡稱液固比) 對 ABF 的影響, 如表 2-1 所示, 雖然在過去的研究中發現液固比影響生物有效性, 但多數的研究並未針對此一議題進行研究, 而是選擇使用低液固比進行體外試驗研究。其研究結果發現, 液固比在 100:1 至 5000:1 (mL/gm) 時, 對鉛、鎳、鎘及鉻影響不大。但對砷而言, 高液固比似乎有較高之 ABF ($R^2=0.58$), 但本研究並未使用 SRM, 以致未能與其他研究評比其萃取效率。

Rodriguze *et al.* (1999) 進一步簡化 PBET 方法, 詳盡考量各項人體生理參數, 研擬 in-vitro gastrointestinal method (IVG) 及 in-vitro gastrointestinal method with absorption (IVG-AB) 之體外試驗方法, IVG 為模擬胃及小腸消化作用, IVG-AB 增加了狀似茶包之 iron hydroxide gel 為小腸吸收劑以模擬吸收作用, 並與美國環保署第 VIII 區 immature pig 動物試驗評比, 結果顯示, 在液固比為 150:1 (mL/gm) 時, 胃相砷之 RBF 與動物試驗呈線性關係($\text{slope}=0.88, R^2=0.69$), 小腸相砷 RBF 之 IVG 與 IVG-AB 試驗也分別與動物試驗結果呈線性關係 ($\text{slope}=0.74, R^2=0.62$; $\text{slope}=0.76, R^2=0.67$), 但分別低估動物試驗 26% 與 24%, IVG-AB 雖考量小腸吸收, 但並未顯著改善 IVG, 同時考量腸相 (二階段) 反而更低估僅考量胃相 (一階段) 之 RBF, 這可能是腸相之 pH 值提高至 7.0 後, 反而不利於萃取。

Ruby *et al.* (1999) 評析 64 篇論文, 探討無機金屬生物有效性的各種體內及體外試驗方法, 如表 2-1 所示, 並探討應用於受污土壤復育標準與人體健康風險評估的優點與限制, 以應因當時美國推動 Superfund Site 污染復育工作的需要, 該文提出響生物有效性因素如圖 2-1 所示: 如污染物之礦物型態 (mineral form)、粒徑大小 (grain size)、包封程度 (encapsulation)、胃腸酸鹼值、蠕動速度。就礦物形態而言, 當砷與硫化物結合後, 形成穩定之礦物, 與砷之氧化物比較, 其溶解度較低, 生

物有效性亦較低。而 Fe-As oxide, Mn-As oxide, Pb-As oxide，則介於含硫化物與含氧化物之間。對同一物質而言，粒徑越大，生物有效性越小。在包封程度上，若含砷化合物被石英 (quartz) 包封，砷不易溶解，但若砷化合物被礦渣 (slag) 包封，因礦渣較石英容易分解，生物有效性會較高。

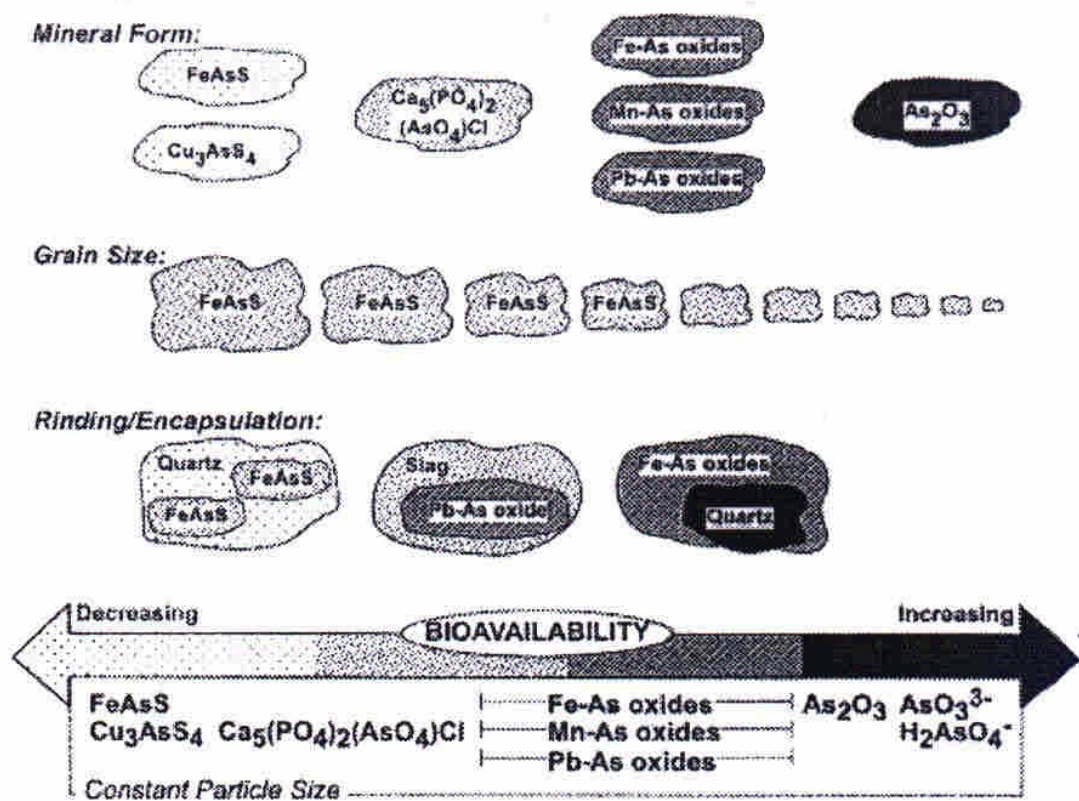


圖 2-1：影響生物有效性之樣品物理及化學特性示意圖 (Ruby *et al.*, 1999)

圖 2-2 與 2-3 為本研究進一步彙整不同土壤砷與鉛之 RBF 值比較圖，結果顯示，各受污場址受污土壤中砷之 RBF 為 5-50 %，鉛之 RBF 為 3-80 %，顯示不同土壤之 RBF 變異很大，可能是受上述礦物型態等因素的影響，同時從圖中可知大多研究皆以二階段之模擬為主，其中大多呈現小腸相之反應結果，但根據文獻中之結果 Rodriguze *et al.* (1999)，胃相比小腸相較能準確推估動物試驗 RBF，因此本研究將進一步僅使用胃階段（一階段）之可行性，以簡化試驗程序。

Sarkar *et al.* (2003) 將體外試驗應用於評估含砷農藥殘留之土壤。評估一階段之 *in vitro* stomach phase (IVG-S) 及二階段 *in vitro* absorbed-intestinal phase (IVG-AI) 方法，該方法與 IVG 及 IVG-AB 類似，最大不同為於第二階段中小腸相中改用 strip-coated ferric oxide 為吸收劑。結果顯示在液固比 150:1 時，IVG-S 與 IVG-AI 之砷 RBF (74% vs. 83%) 呈良好線性相關 (slope =1.16, $R^2=0.98$)，但 IVG-AI 萃取效率較 IVG-S 高出 16%，IVG-AB 不僅簡化小腸吸收劑的備製程序，同時也提高了萃取效率，但該介質並無動物試驗結果，無法進一步其他方法評比。

在美國，生物有效性研究從 1992 年至今已逾 11 年的時間，由於體內試驗花費的成本及時間往往較多，因此各專家學者著重於體外試驗的研發，期能正確評估體內試驗的結果，專家學者積極探討影響體外試驗的各種因素，不斷的改良體外試驗的方法，最終期能僅使用體外試驗，便可正確、精準、有效的評估生物有效性，以作為風險評估的依據。

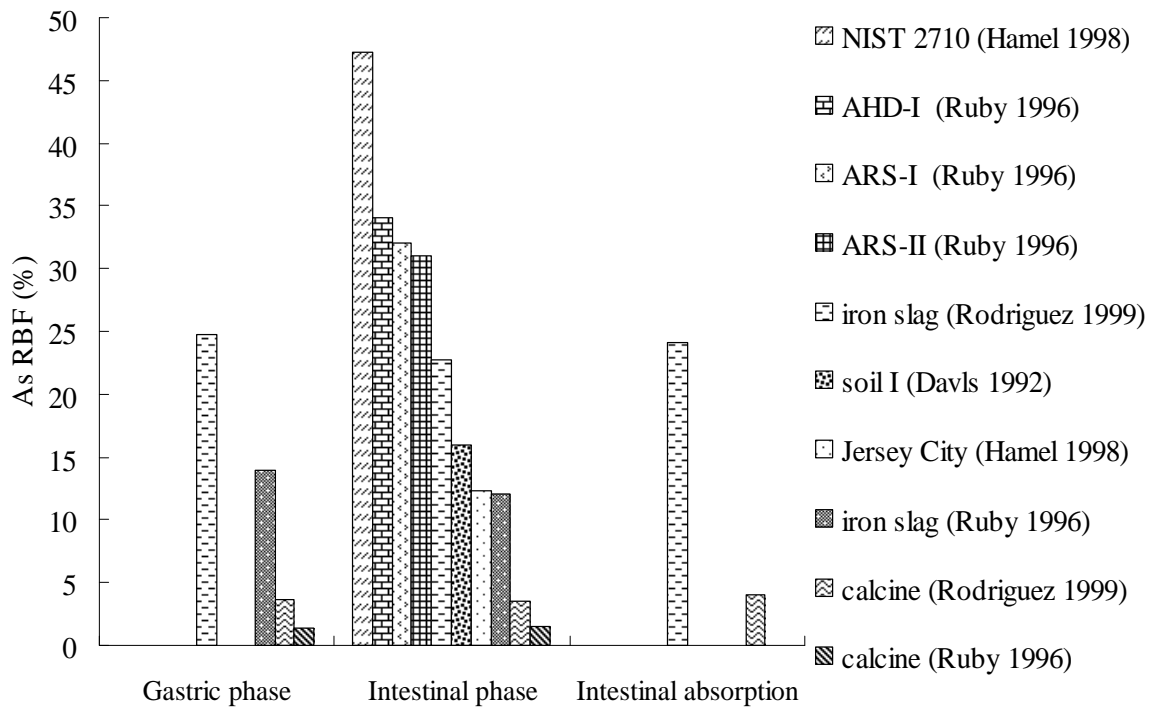


圖 2-2：不同土壤中砷 RBF 之比較圖

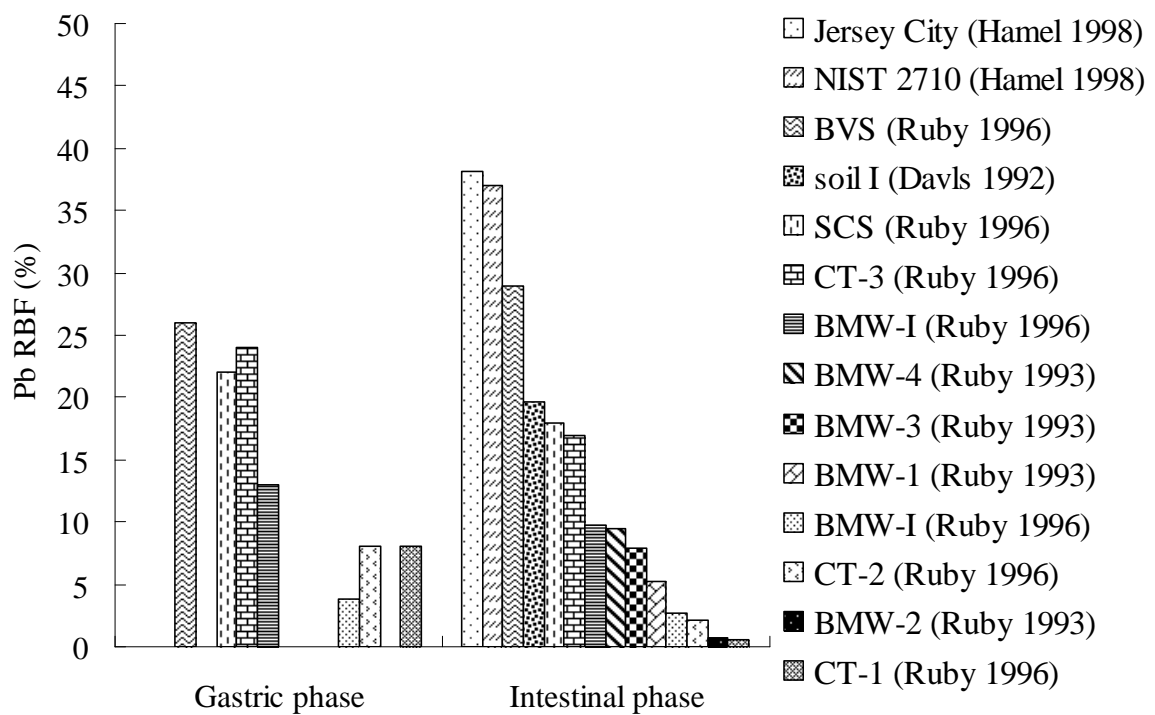


圖 2-3：不同土壤中鉛 RBF 之比較圖

2-3 砷對人體的毒性

本研究是以砷為例，探討體外試驗的生物有效性，本節說明砷在人體中的毒性，包括砷的物理化學性質、吸收、分布及代謝。由週期表中可知砷與氮、磷、銻、鉍同屬 VA 族，在 VA 族中氮與磷屬於非金屬，而銻與鉍為金屬，砷則位於此兩組元素之間，其性質也就介於金屬與非金屬之間，所以屬於兩性元素。砷原子序 33，原子量 74.9。砷的含量在地殼金屬第二十位（World Health Organization, 1981）。砷元素呈灰色或錫白色固體，在潮濕空氣中會變暗，而且易碎。砷具有三種同素異性的元素，有黃色、黑色及灰色三種，其中灰色是最平常且最穩定的型態。無味，具腐蝕性，不溶於水，密度及比重是 5.724（14°C 以下）。熔點在 28 大氣壓下為 87 °C，而在 613 °C 下會直接昇華成氣體（Tchounwou *et al.*, 1999）。世界各國對於無機或有機砷的每日攝取量或飲用水污染濃度均有建議或規範，如世界衛生組織（World Health Organization, WHO）在 1993 年對於飲用水的建議的最大污染濃度（maximum contaminant level, MCL）為 10 µg/L（World Health Organization, 1993）。而美國環保署（Environmental Protection Agency, EPA）也在 2001 將水中砷的法定最高濃度定在 10 µg/L.（Environmental Protection Agency, 2001）。由於砷在許多流行病學的研究中證實對人類具致癌性，所以 International Agency for Research on Cancer（IARC）把砷歸類為 Group 1 致癌物，和美國環保署（Environmental Protection Agency, EPA）Group A 同等級，即屬人類確定致癌物（Tchounwou *et al.*, 1999）。

無機砷進入人體主要經由吸入、食入及皮膚或黏膜滲透吸收；吸入的途徑來自於職業的砷暴露，特別是煉銅礦工人，因吸入空氣中的無機砷，而導致呼吸道癌症死亡的率增加。食入的途徑，為飲用含砷之地下

水井，或是誤食含有害廢棄物的土壤，無機砷經由食入途徑進入人體後，會在器官中進行一系列的吸收、分布及代謝機轉。而這些機轉如下：

1. 吸收

經食入之無機砷，主要為三價及五價無機砷，通常 90 % 以上的無機砷，是經由胃腸道吸收進入體內 (Vahter *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1988)。人體的研究顯示，食入之無機砷 95 % 以上為胃腸道吸收，只有不到 5 % 經由糞便排出體外 (Chen *et al.*, 1988)。吸入無機砷的百分比，會隨著三氧化二砷所吸附的顆粒粒徑大小而有所不同，粒徑超過 10 μm 者，易沉積在上呼吸道，再經由纖毛運動排出，而粒徑在 0.1-1 μm 者，則會沉積於細支氣管及肺泡而被吸收 (Chen *et al.*, 1988)。

2. 分佈

動物試驗顯示，血液中砷的消除效率極快，Vahter *et al.* (1985) 指出，人、狗、老鼠及兔子的血中砷以二次 (biexponential) 或三次 (triexponential) 指數曲線速率消除，第一曲線清除率半衰期為 1-2 小時，同時 90 % 的總量可在第一次曲線中清除。第二及第三曲線清除半衰期則分別為 30 及 200 小時。Heydorn (1970) 報告人體血中砷濃度從高到低依次為紅血球、全血及血漿蛋白。老鼠實驗顯示 (Vahter *et al.*, 1980)，腎臟肝臟、膽汁、腦及皮膚中三價砷含量遠高於五價砷(2-10 倍)，而骨骼中則五價砷含量遠超過三價砷，主要因為骨骼中含大量磷，而五價砷與磷的性質相似。一項針對蘇格蘭未受砷暴露居民體內臟器含砷量研究顯示 (ATSDR, 1989)，頭髮、指甲砷含量遠高於其他器官，內臟中則以肺部砷含量最高。由此可知頭髮及指甲是體內砷蓄積量最高的組織。另有研究指出髮砷及指(趾)甲砷比尿砷更能用於評估長期

的砷暴露 (Yamauchi *et al.*, 1989 ; Garland *et al.*, 1993) , 為長期暴露評估的良好指標。

3. 代謝

從動物試驗 (in vivo) 及體外試驗 (in vitro) 的許多研究指出，無機砷的代謝過程主要於肝臟中進行，此代謝過程基本上是一個甲基化的解毒過程 (Thompson *et al.*, 1993) 。如圖 2-4 所示：

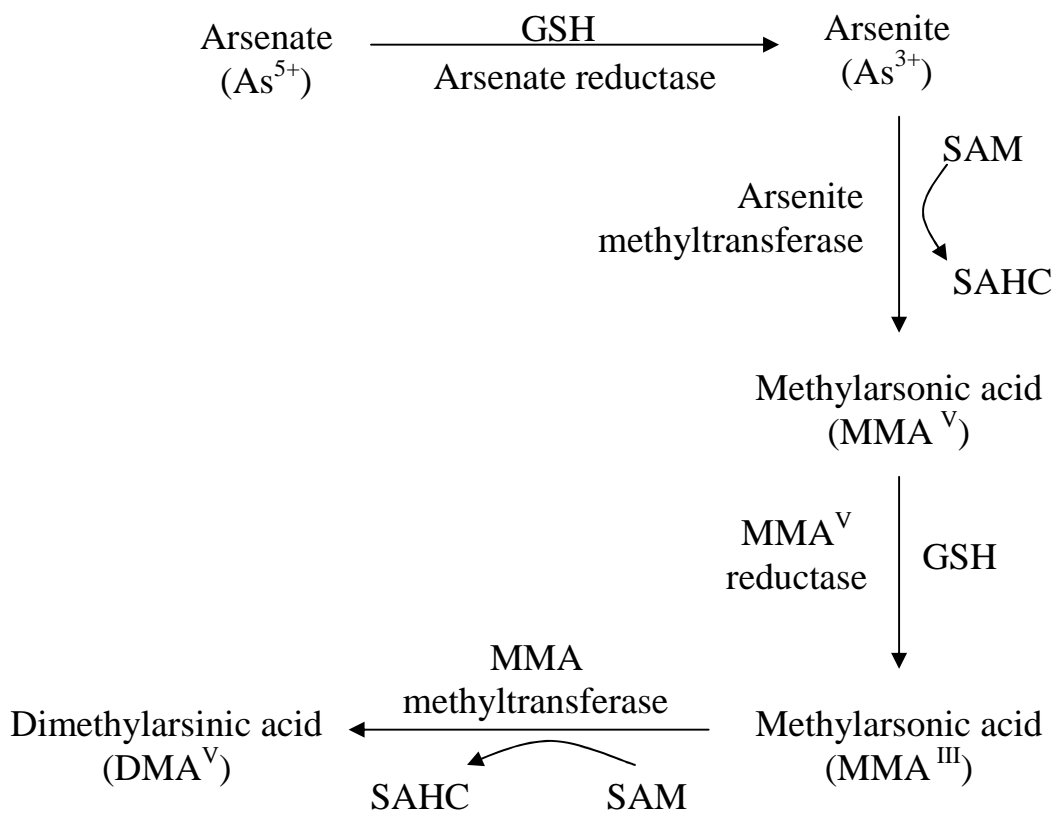


圖 2-4：無機砷在人體中的代謝機轉示意圖

當無機砷進入人體後，五價砷 (arsenate) 需藉由還原酵素 (arsenate reductase) 及麩氨基硫 (glutathione, GSH) 的存在下先還原成三價砷 (arsenite) 後，於肝臟中由 S-核腺甘甲硫胺酸

(S-adenosyl-methionine, SAM) 提供甲基進行甲基化作用，形成五價單甲基砷酸 (methylarsonic acid, MMA^{V})，再經由單甲基砷酸還原酵素 (MMA^{V} reductase) 的作用，還原成三價單甲基砷酸 (monomethylarsonate acid, MMA^{III})，再進行甲基化作用變成五價雙甲基砷酸 (dimethylarsonate acid, DMA^{V}) (Thompson *et al.*, 1993)。無機砷甲基化代謝後的砷物種主要有四種，包括三價無機砷及五價無機砷和被代謝之 MMA 及 DMA，毒性大小依序為三價砷、五價砷、MMA 及 DMA。因此甲基化過程，係將毒性較高的無機砷，代謝為毒性較低的有機砷，有機砷也較易自尿液排出，而達到解毒及清除作用 (Bucher *et al.*, 1981)。

2-4 胃腸生理學

人類的消化道系統開始於口腔、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸而終止於肛門，對於毒理學而言，毒性物質常常藉由食入途徑而引起人體毒性，在生物有效性的體外試驗中，過去研究主要是將重點放在胃腸環境的模擬。因此對於胃腸環境的各項生理機制的了解更是顯現重要。以下介紹胃及小腸的生理特性、運動功能及胃腸消化液。

2-4-1 胃的型態及運動功能

胃位於腹腔左上方，長度約為 20~30 cm，最大橫徑約為 12 cm，正常人的胃容量約為 1~2 L (江，1981)。圖 2-5 說明胃的重要解剖構造，胃可區分為二大部分：(1) 體部 (body)，(2) 胃竇 (antrum)。而底部 (fundus) 位於體部的上端，解剖學者將它視為一個個別的部份，但以生理學的觀點而言，底部只是體部的一部份 (李，1991)。

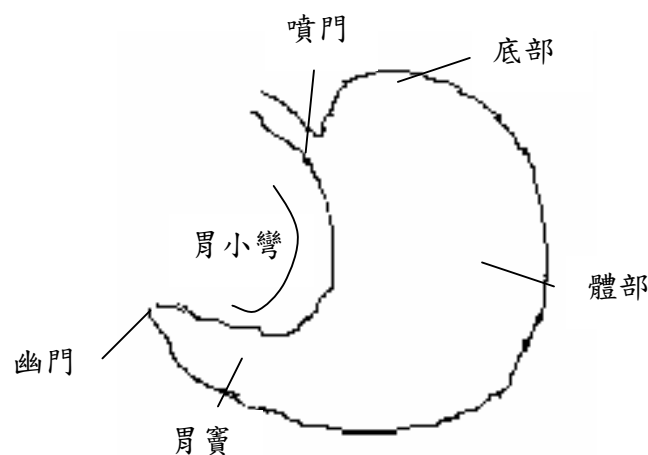


圖 2-5：胃的解剖示意圖

當食物進入胃部後，胃的運動功能有三種；(1) 儲存大量的食物直到其下方的消化道能消化時，(2) 將胃液及食物混合，直到變成半流體的乳糜 (chyme)，(3) 以適當的速度將胃內的食物排空，其速度恰好能使小腸消化、吸收 (李，1991)。當胃排空時就是它最小的時候，但當食入的食物或液體充滿胃時，胃的體積雖然增加，內壓並未增加。這種現象就是胃承受性鬆弛 (receptive relaxation) 的結果，以胃底最明顯；胃容積的增加，大部分都是胃底部鬆弛的結果。這種承受性鬆弛的現象多半是藉由抑制蠕動及減少壓力來完成 (趙，1984)。

此外，趙 (趙，1984) 還指出，胃內容物的運動是藉由肌肉收縮完成。胃體及胃底有有兩種基本形式的收縮，一種是張力性收縮 (tone contraction)。這種收縮可使胃內含物移動。張力性收縮使胃腔內壓力上升約 1~10 cmH₂O。另一種胃收縮是蠕動性收縮 (peristaltic contraction)，在人類，蠕動性收縮通常起自噴門正下方的胃小彎處，愈往下走收縮波越強，最後終止於胃竇。蠕動性的收縮共有三種形式：(1) 有些收縮波通過胃竇時增強，到了幽門處遽然停止；(2) 大部分的蠕動性收縮到了胃竇末端及幽門處時，碰上該處同時發生節段性收縮後一起消失；(3) 少數的蠕動性收縮則在往下走時逐漸減弱，到了胃竇末端就消失不見。最強有力的蠕動性收縮可以將胃內容物排空，較弱的蠕動性收縮則有攪和胃內容物的功能，並使胃內容物與不同部位的胃黏膜接觸。圖 2-6 為胃蠕動性收縮對於胃內容物之圖解示意圖 (陳等，1984)。

A：收縮開始於中胃區，且將胃內容物推向十二指腸。B：當收縮的力量與速度增加時，某些內容物被超越，而被推回胃體部。C：收縮之力量與速度大到足以引起胃室遠端之快速且幾乎完全地關閉。這種收縮會使某些內容物被推入十二指腸。然而大多數胃容物能被推回胃體部。D：介於收縮之間，沒有明顯的胃容物移動發生。

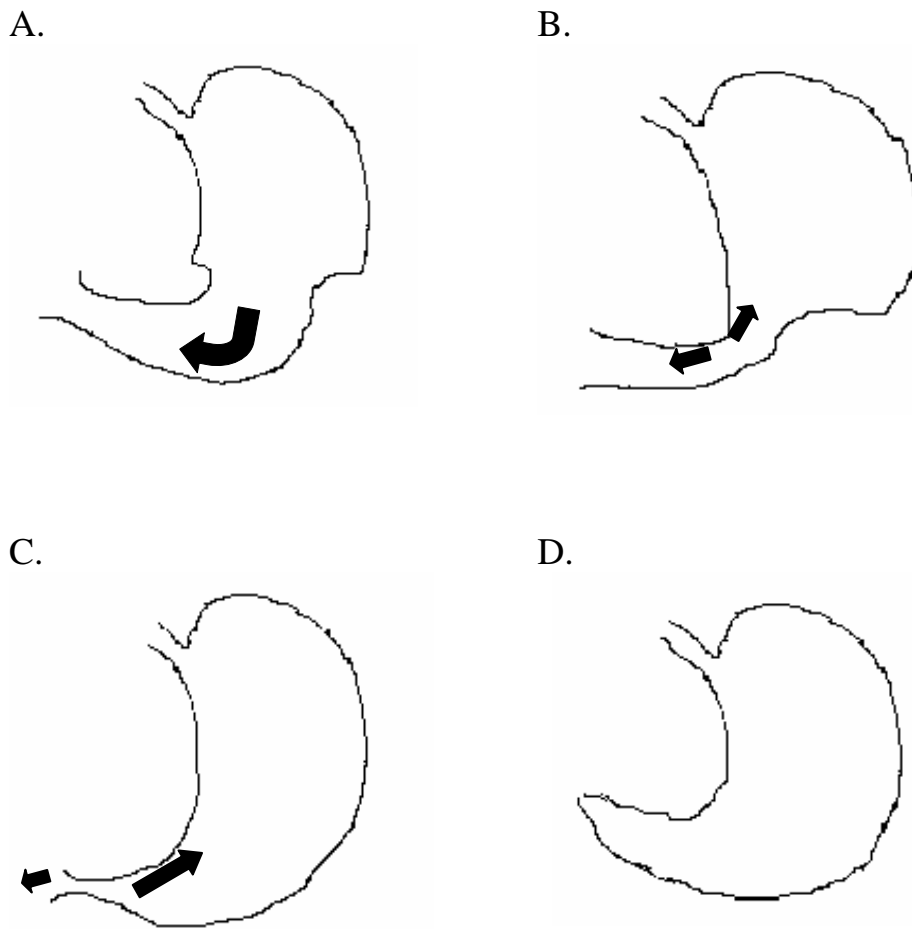


圖 2-6：胃蠕動收縮對內容物作用的圖解（陳等，1984）

2-4-2 小腸的型態及運動功能

小腸的收縮，至少可執行三項機能：(1) 使吃入的食物與消化分泌液及消化酵素充份混合。(2) 使小腸內容物循環轉動，以利其與小腸黏膜之接觸。(3) 使腸內容物傳送方向導向小腸尾端(陳等，1984)。

成人的小腸約長 5~6 公尺，包含十二指腸、空腸及迴腸。小腸的運動方式有分節收縮 (segmentation contraction) 和推進運動 (propulsive movement) 兩種，主要是以分節收縮為主 (李，1991)。圖 2-7 為小腸的分節收縮，當小腸的一段被乳糜充滿脹大時就會激發出局部的環狀收縮，這些收縮的縱距離約為 1 公分，因此這樣的收縮

將小腸分成許多節，這些規則的分節看似香腸一般，當一系列的收縮過去之後，另一系列的收縮隨之而起，但收縮的地點不同，於是這種分段收縮在一分鐘之內就將乳糜切了 8-12 次，如此可以促進食物顆粒與小腸液的混合。而小腸的蠕動是一種向前推動的運動，速度較慢，它可使乳糜向前推進。

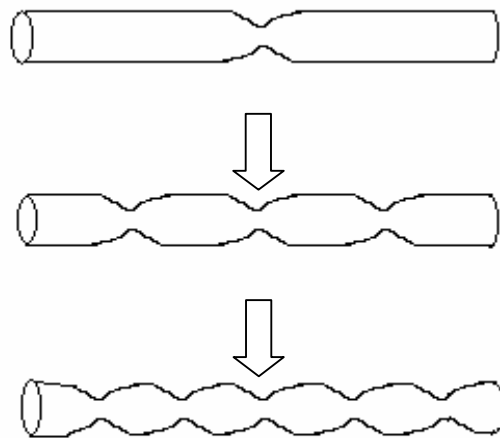


圖 2-7：小腸的分節收縮（李，1991）

2-4-3 胃及小腸的分泌

正常人類的胃，含有大約一百萬個壁細胞，壁細胞可分泌 HCl，其可產生氫離子濃度約 150~160 mEq/L，人類的胃，每天可分泌 1000~2000 mL 的胃液，胃蛋白酶原（pepsinogens）在高酸性的環境下會被活化而轉變成胃蛋白酶，當 pH=1.8~3.5 時，是最適合消化作用的，但在 pH 大於 5 時，其胃蛋白酶分解的能力就會下降甚至被抑制。人類小腸是食物消化及吸收的主要部位，小腸因為特殊結構包括 Kerckring 氏皺摺、絨毛（villi）及微絨毛（microvilli），而使具有吸收作用的上皮表面積大為增加（李，1991）。而小腸的吸收機制有三

種：(1) 被動擴散 (passive diffusion)，(2) 促進性擴散 (facilitated diffusion)，(3) 主動運輸 (active transport) (陳等，1984)。被動擴散主要是受到膜兩側電荷差之影響而產生。促進性擴散就像簡單擴散一樣並不需要來自代謝的能量，被運送的物質由一高濃度區域移向低濃度的區域，促進性擴散與被動擴散區別的特徵，乃是前者較迅速達到平衡，而且其運送具有高度的特異性。而主動運輸與促進性運輸區別處，乃在於主動運輸，其溶質的移動是對抗電化差度，而且依賴代謝產生的能量。

除此之外，每天分泌流入十二指腸的膽汁約為 1000~1500 mL，而胰液量每天約為 1000~2000 mL，胰液可防止十二指腸黏膜受到胃蛋白酶的傷害，同時還可使腸內含物的 pH 值到達胰臟酵素最高活性所需的範圍。膽汁的分泌取決於肝臟分泌膽汁酸，一旦膽汁酸被分泌出來後，首先被儲存於膽囊，直到進食時，便會將膽汁酸排入小腸而參與脂肪的消化與吸收。因此食物進入消化道後便會藉由各種消化酶，以利將食物消化及吸收的作用 (江，1981)。

2-5 生物有效性體內試驗

在過去生物有效性的試驗中，在體內試驗 (in vivo) 部分，專家學者們所使用的動物有 rat、rabbit、swine 及 monkey，在這些動物研究中，以 Swine 為體內試驗者佔大多數。在 Rodriguez *et al.* (1999) 研究中，以 U.S. EPA Region VIII 公認之 swine 為體內試驗之研究對象，評比體外試驗之 IVG 與 IVG-AB 之砷生物有效性，此試驗方法中，male Swine 平均重量為 10~12 kg，並同時將 swine 分成四組，二組餵食不同之土壤 (ex. calcine, slag)；一組餵食 Na_2AsO_4 ；最後一組不餵食以作為對照組，在餵食方式上以 6.25 mg/kg body weight day 為基準，並分別於上下午餵食正餐前 2 小時各餵食 1/2 dose，除此之外，為了能有效將待測樣品餵入，因此在餵食上是將待測樣品置於 5 g dough (似麵團) 中心，以手餵食，已確保 swine 能確實食入欲待測樣品。最初餵食 23~30 mg dose，並且每三天測量 swine 體重，直至最後 3 天餵食約 41~45 mg dose，在採樣分析上，主要是採集 swine 尿液作為分析，以每 3 天採樣一次，(24hr 收集 5 次尿液)，並將收集之 swine 尿液加以過濾，保存於 pH=2 的濃 HCl 中，並用 ICP-HG 分析尿液中的 As。

在 Ruby *et al.* (1999) 的文獻評析中，將過去數十年生物有效性之 swine 試驗與體外試驗研究數據統整，統計結果如圖 2-8 所示，圖 2-8 為 swine 試驗與體外試驗砷 RBF 的比較圖，swine 體內試驗共有 20 組數據，RBF 值是以 Na_2AsO_4 作為標準參考物質而求得，從圖中可知 RBF 的平均值約為 32%，RBF 值的 95% 信賴區間為 44.2~19.3；而體外試驗共有 15 組數據，RBF 的平均值約為 14%，RBF 的 95% 信賴區間為 18.9~8.3，這顯示體外試驗一般而言低估了 swine 的體外試驗。

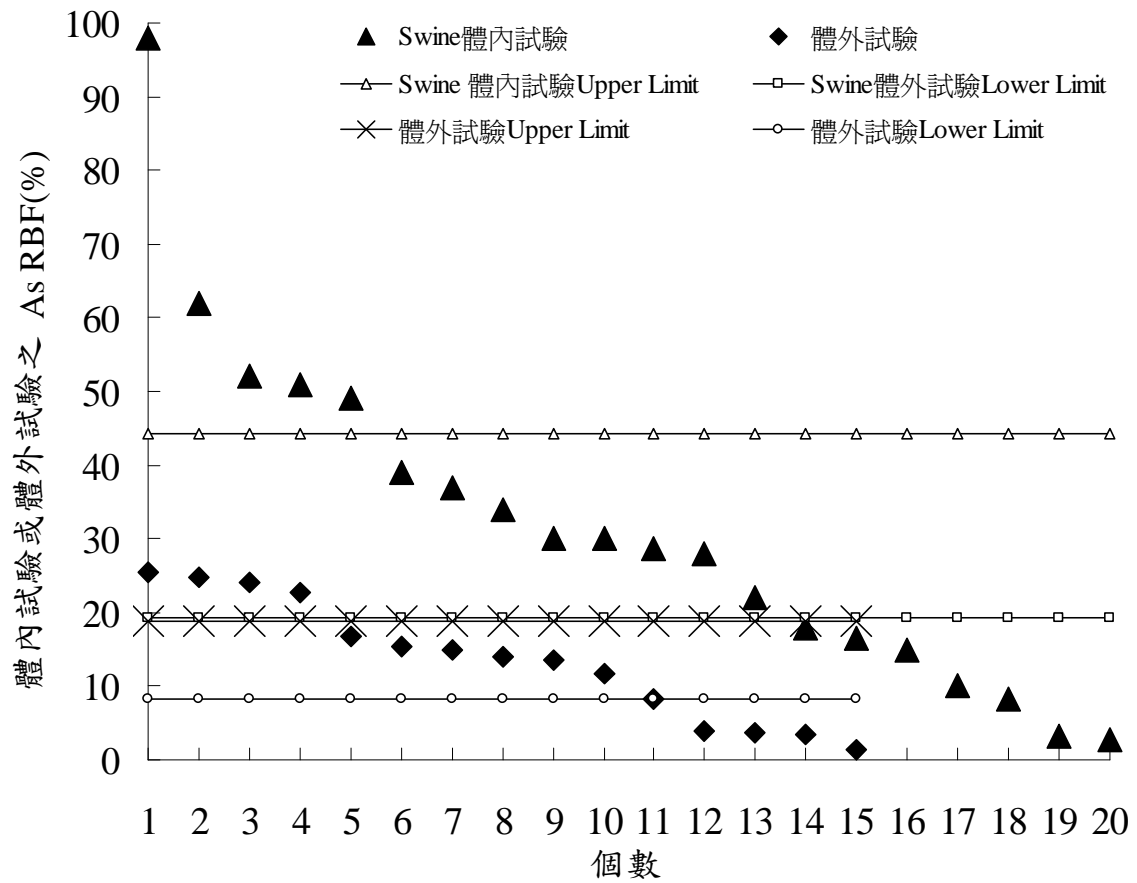


圖 2-8： swine 試驗與體外試驗之 As RBF 比較圖

2-6 生物有效性體外試驗

生物有效性的研究從 1992 年至 2003 年歷經十一年的時間中，專家研究者最終希望能夠研擬出一套更精準、更確實模擬人體胃腸環境的體外試驗 (**In vitro test**)，在眾多的體外試驗方法中無非是希望能夠更進一步的改良各項試驗參數，以期盼達到更貼近人體胃腸生理的體外試驗。表 2-2 為文獻中各種體外試驗生物有效性試驗參數比較表，考量之參數大致分為三部分，第一部分為樣品前處理及反應槽體之設計，包括樣品前處理、反應槽體、溫度、厭氧條件及攪拌方式。第二部份為胃環境之探討，包括胃液 pH、酵素的添加、液固比、食物添加及胃排空時間。第三部份為小腸環境之探討，包括小腸 pH、胰液與膽汁酵素添加量、吸附劑的使用及小腸輸送時間。有關上述之試驗參數分別描述於下：

2-6-1 樣品前處理及反應槽體之設計

A. 樣品前處理

樣品的粒徑大小會直接影響生物有效性的試驗結果，因此在粒徑上的篩選便是重要的一環，根據毒性特性溶出試驗 (TCLP) 之方法，在樣品前處理的方式上將樣品分為固相、液相二種樣品，其中樣品之乾固體含量大於或等於 0.5 % 者視為液相，並使用 0.6-0.8 μ m 玻璃纖維過濾，濾液部份視為 TCLP 之萃取液，固相部份棄置不用；而樣品中乾固體含量小於 0.5 % 者視為固相，經由 0.6-0.8 μ m 玻璃纖維過濾所得之濾液即視為 TCLP 之萃取液，而固相部份必須篩選其粒徑小於 9.5mm 者，以適當之萃取液進行萃取，同樣的經由 0.6-0.8 μ m 玻璃纖維過濾所得之濾液即視為 TCLP 之萃取液。但在 1992 年至 2003 年生物有效性體外試驗中，如表 2-3 所示，Davls *et al.* (1992)、Ruby *et al.* (1993,1996) 及 Rodriguze *et al.* (1999) 均選用粒徑 <250 μ m 的土壤做為樣品，由於體外試驗是模

表 2-2：各種體外試驗生物有效性試驗參數比較表

參考文獻	Davls <i>et al.</i> (1992)	Ruby <i>et al.</i> (1993)	Ruby <i>et al.</i> (1996) (PBET)
試驗參數			
樣品前處理	風乾後<250 μm (可為手指沾食)	風乾後<250 μm (可為手指沾食)	50°C 烘乾 24 hr 過篩<250 μm
反應槽型式	250 mL 燒杯	250 mL 燒杯	250 mL PE 分液漏斗
有效容積	140 mL	40 mL	40 mL
溫度	Water bath 37°C	Water bath 37°C	Water bath 37°C
厭氧方式	無	無	1.0 L/min 氫氣
攪拌方式	wrist-action shaker	wrist-action shaker	底座 70 μm 網孔曝氣
樣品重量	10 gm	4 gm	0.4 gm
胃相萃取 pH	1.3	1.3	空腹 1.3 進食 4.0 平均值 2.5
NaCl	無	無	無
pepsin	無	1.25 gm/L	1.25 gm/L
citrate	無	12.5 gm/L	0.50 gm/L
malate	無	12.5 gm/L	0.50 gm/L
lactic	無	10.5 mL/L	420 μL/L
acetate	無	12.5 mL/L	500 μL/L
液固比 (mL/gm)	14 : 1	10 : 1	100 : 1
食物 排空率	無 2 hr	無 2 hr	無 1 hr 可消化 80~90 %
小腸相萃取 pH	7.0	7.0 (dialysis bag)	7.0
pancreatin	無	0.5 gm/L	0.5 gm/L
bile	無	1.75 gm/L	1.75 gm/L
吸收劑	無	無	無
輸送率	2 hr	2 hr	4 hr 流經小腸至大腸進口 所需時間

表 2-2：各種體外試驗生物有效性試驗參數比較表(續)

參考文獻	Hamel <i>et al.</i> (1998)	Rodriguze <i>et al.</i> (1999) (IVG & IVG-AB)	Sarkar <i>et al.</i> (2003) (IVG-S & IVG-AI)
試驗參數			
樣品前處理	NIST 2710 soil <74 μm Jersey City Composite 150 <d< 250 μm	風乾後<250 μm (可為手指沾食)	無
反應槽型式	Nalgene bottles	1 L canning jar	250 mL 燒杯
有效容積	50~500 mL	600 mL	150 mL
溫度	Water bath 37°C	Water bath 37°C	Water bath 37°C
厭氧方式	無	1.0 L/min 氮氣	氫氣
攪拌方式	Water bath shake	100 rpm 機械攪拌	stirrer 攪拌
樣品重量	0.05 & 0.5 gm	4 gm	1 gm
胃相萃取			
pH	-	1.8	1.8
NaCl	0.13M	0.15 M	0.15 M
pepsin	12.8gm/L	12.5 gm/L	12.5 gm/L
citrate	無	無	無
malate	無	無	無
lactic	無	無	無
acetate	無	無	無
液固比 (mL/gm)	100:1~5000:1	150 : 1	150 : 1
食物	無	200 gm dough	無
排空率	2hr	1 hr	1 hr
小腸相萃取			
pH	無	5.5	7.0
pancreatin	無	0.35 gm/L	0.35 gm/L
bile	無	3.5 gm/L	3.5 gm/L
吸收劑	無	iron hydroxide gel	strip-coated ferric oxide
輸送率	無	1 hr	1 hr

擬經由「食入」途徑進入人體內之試驗，而粒徑 $< 250\mu\text{m}$ 的土壤樣品可為人類手指沾黏且誤食，因此便建議採用粒徑 $250\mu\text{m}$ 為上限。除此之外，在樣品乾燥上使用風乾法是優於烘乾法的，因為加熱容易導致樣品中的待測物質揮發出來，因此利用風乾法較適當。

B. 反應槽體及溫度

在反應槽體的設計上，如表 2-2 所示，Davls *et al.* (1992)、Ruby *et al.* (1993) 及 Sarkar *et al.* (2003) 均使用 250 mL 燒杯作為體外試驗的反應槽，於 1996 年 Ruby *et al.* 在 PBET 的體外試驗方法中改用 250mL 底座為 $70\mu\text{m}$ 網孔的 PE 分液漏斗作為反應槽如圖 2-9 所示，在 1999 年 Rodriguze *et al.* 所設計的 IVG 與 IVG-AB 方法上是利用寬口徑、厚玻璃材質、容積為 1 L 的 canning jar 做為反應槽，如圖 2-10 所示，在這些研究中，反應瓶組之設計大多採用開放性的試驗設備，此開放性之系統容易使得待測樣品中之有毒物質逸散，因此，為安全起見，建議以密閉系統之反應瓶組作為整個試驗的反應槽體設備。另外，在溫度的控制上，為了以模擬人體溫度，因此將反應槽溫度維持在 37°C 。

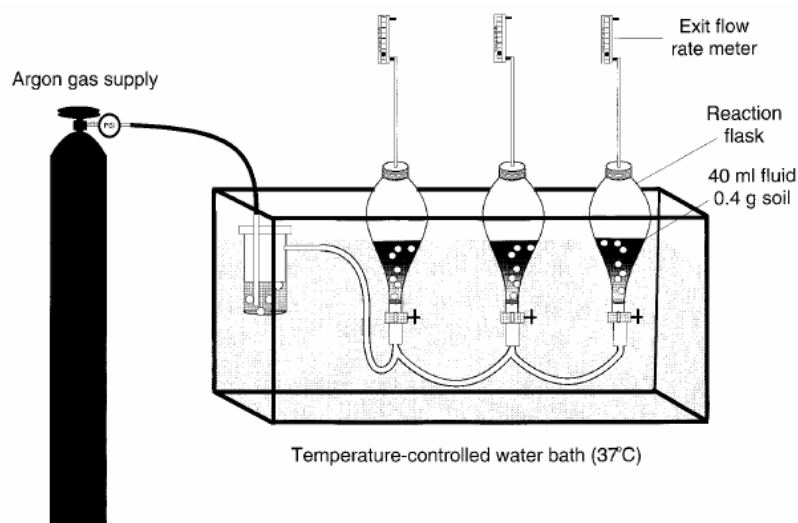


圖 2-9: $70\mu\text{m}$ 網孔的 PE 分液漏斗反應瓶組示意圖 (Ruby *et al.*, 1996)

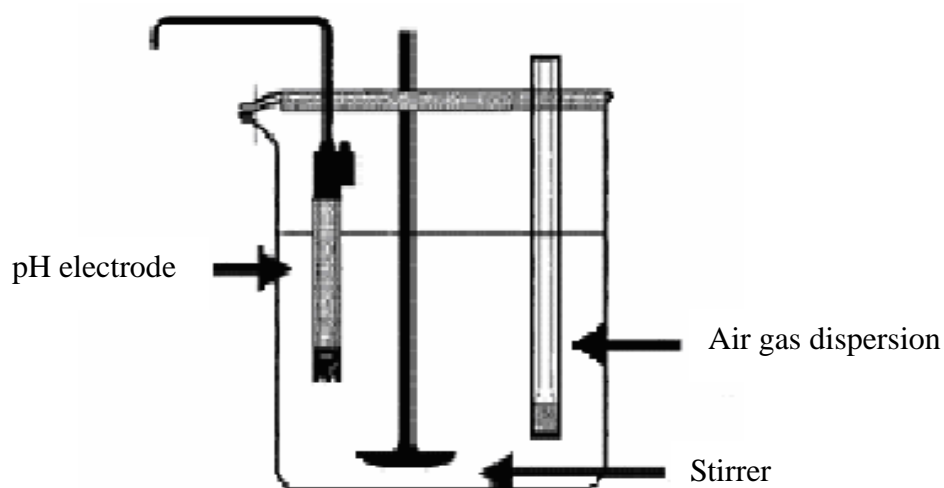


圖 2-10：canning jar 反應瓶組示意圖 (Rodriguze *et al.*, 1999)

C. 厭氧條件

如表 2-2 所示，Davls *et al.* (1992)、Ruby *et al.* (1993) 的體外試驗研究中並未考量反應進行時是否應維持厭氧條件，直到 1996 年為了能模擬胃腸環境，乃將反應槽控制於厭氧狀態，如表 2-2 所示，Ruby *et al.* (1996)、Rodriguze *et al.* (1999) 及 Sarkar *et al.* (2003) 使用 1.0 L/min argon gas 曝氣的方式，使反應瓶中充滿惰性氣體以維持厭氧狀態。但由於整各試驗過程中必須不斷供應 argon gas，加上反應時間長達 2 小時，因此所需的氣體量也相當大，成本也會提高，同時維持厭氧條件是否能有效提昇試驗之準確性，能待進一步研究。除此之外，胃腸環境之氧化還原電位 (oxidation reduction potential, ORP) 在消化系統中，各消化器官均不相同，曾列出消化管各部胃氧化還原電位的值，胃是 +150MV，十二指腸、空腸是 -50MV，迴腸是 -150MV，盲腸為 -200MV，直腸是 -250MV (光岡知足, 1978)。由此發現氧化還原電位的值會順著胃通往直腸的方向，漸漸轉變成負值，而當氧化還原電位為正值時為氧化狀態；為負值時為還原狀態，因此，以砷為例，當砷進入人體後，在胃的氧化狀

態下，會以五價砷的型態存在，而進入小腸後，在小腸的還原狀態下，又會轉變成三價砷，進而由小腸進行吸收。綜合上述發現，三價砷之毒性遠比五價砷大，同時胃腸氧化還原電位也是影響毒性物質之毒性重要因子，但綜觀前人之生物有效性之研究，並未提及胃腸之氧化還原電位，因此，容易導致產生誤差情形。

D. 攪拌方式

生物有效性之體外試驗方法中，主要是模擬人體胃腸的環境，因此在模擬胃的蠕動方式上，如表 2-2 所示，Davls *et al.* (1992) 與 Ruby *et al.* (1993) 的研究於初期時利用 wrist-action shaker 的方式模擬胃的蠕動，到了 1996 年 Ruby *et al.* 的 PBET 試驗方法修正 1993 年之攪拌方式，由 PE 分液漏斗下方之孔隙通入 argon gas，將內容物能攪拌混合。到了 1999 年 Rodriguze *et al.* 在 IVG 與 IVG-AB 的方法上簡化 Ruby (1996) 的方法，採用 100 rpm mechanical mixing，而至 2003 年 Sarkar *et al.* 於 IVG-S 與 IVG-AI 方法上也採用 mechanical mixing。利用 mechanical mixing 的方式作為攪拌時，反應槽不易設計為密閉系統，使得待測污染物在攪拌的過程中容易逸散出來，同時文獻並未能說明各種攪拌效能是否確切評估胃腸之蠕動狀況。

2-6-2 胃環境之探討

A. 胃液 pH

就生理學而言，胃液屬強酸性溶液，pH 範圍為 1.0~4.0，對孩童而言，於空腹時胃液的 pH 1.7~1.8，於進食後胃液的 pH 值會上升，超過 4.0；對成人而言，空腹時胃液的 pH 值約為 2.0，進食後提高至 4.0~5.0。Davls *et al.* (1992) 與 Ruby *et al.* (1993) 以 pH=1.3 作為胃溶液的測定值。而 Ruby *et al.* (1996) 在 PBET 方法中選用

pH=1.3、2.5 及 4.0 做為胃液之測定值，pH=1.3 為胃空腹時的酸鹼值，pH=2.5 為胃溶液之平均值，pH=4.0 為進食後胃的酸鹼值。研究結果發現如圖 2-11 與圖 2-12 所示，圖 2-11 為 pH 與砷生物有效性之關係圖，當 pH 從 1.3 提高至 2.5 時，樣品 Anaconda residential soil no. I (ARS-I) 之 RBF 從 50 % 降至 32 %；Anaconda residential soil no. II (ARS-II) 之 RBF 從 44 % 降至 31 %；平均而言砷 RBF 降低了 16 %；圖 2-12 為 pH 與鉛 RBF 之關係圖，當 pH 從 1.3 提高至 2.5 時，樣品 Butte mine waste no.1 (BMW-I) 之 RBF 從 9.5 % 降至 3.8 %；Butte mine waste no.2 (BMW-II) 之 RBF 從 35 % 降至 13 %；Bartlesville soil (BVS) 之 RBF 從 70 % 降至 26 %；Salt Lake City soil (SCS) 之 RBF 從 83 % 降至 22 %；Copperton tailing no.1 (CT-1) 之 RBF 從 16 % 降至 8 %；Copperton tailing no.2 (CT-2) 之 RBF 從 10 % 降至 6 %；Bingham Creek Channel (CT-3) 之 RBF 從 49 % 降至 24 %；平均而言鉛 RBF 降低了 65 %，從此結果顯示，pH 對生物有效性的測定有重要之影響。Rodriguze *et al.* (1999) 在 IVG 試驗方法以及 Sarkar *et al.* (2003) 的 IVG-S 方法將 pH 設定為 1.8，結果顯示，IVG 的試驗方法中，砷在胃環境之 RBF 分別為 16.7 %，(CV=75.2%)，而 IVG-S 方法中，樣品 Immokalee 之砷 RBF 為 72.8 %；Miollhopper 之砷 RBF 為 39.0 %。

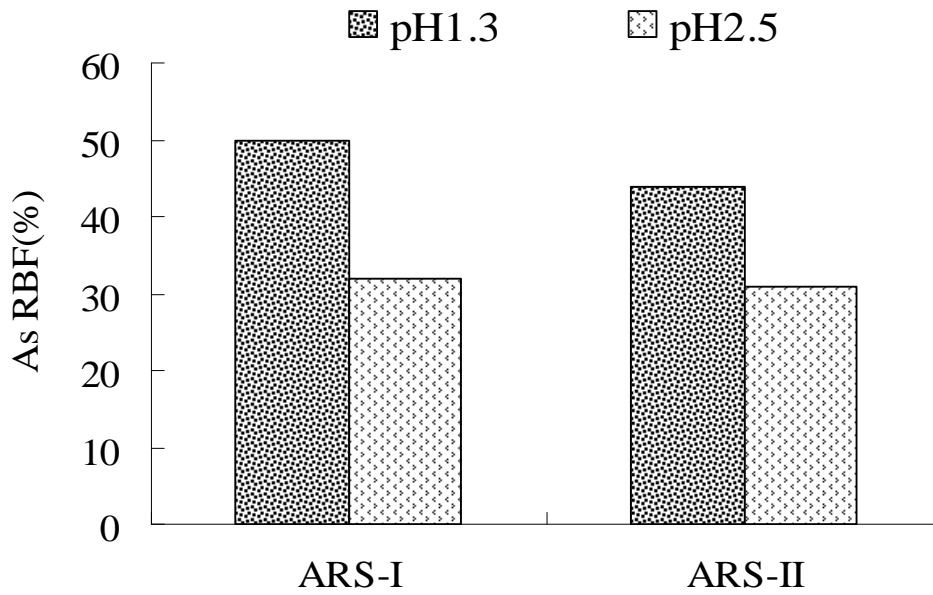


圖 2-11：pH 與砷 RBF 關係圖

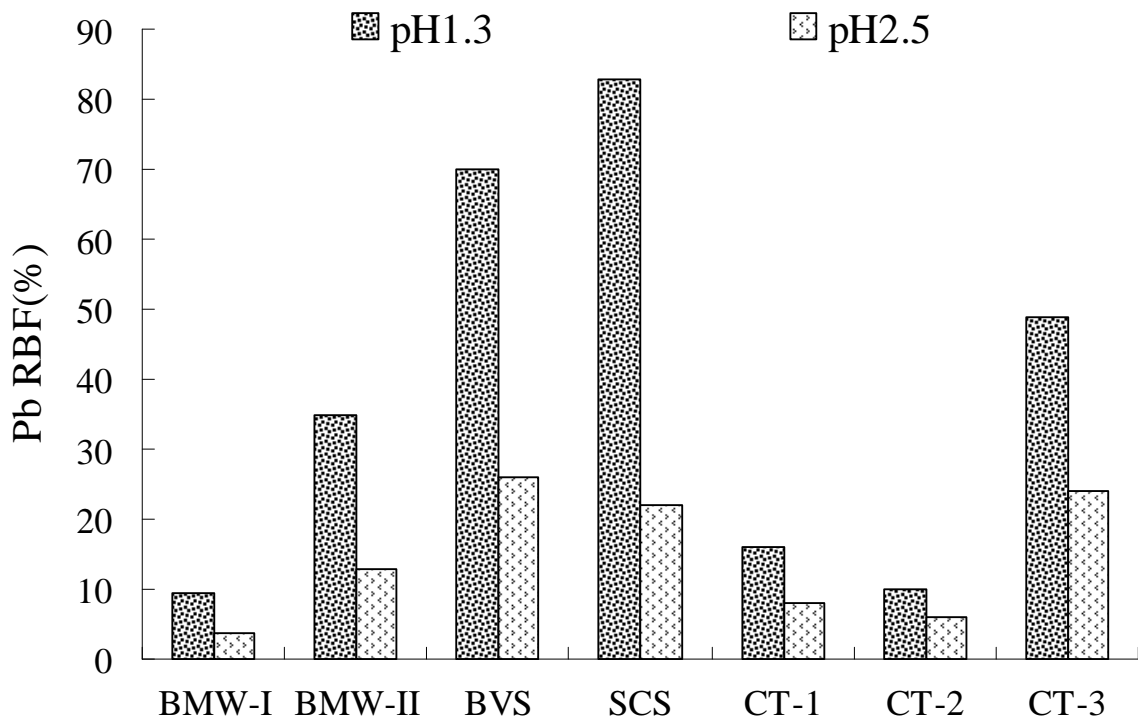


圖 2-12：pH 與鉛 RBF 關係圖

B. 液固比

不同介質中目標污染物的溶解度為影響生物有效性之重要參

數 (Ruby *et al.*, 1999)，而溶解度與液固比有相關。理論上，未達飽和溶解度前，液固比愈高溶解度愈高，又正常人的胃容量約為 1~2 L，平均每天可分泌 1~2 L 的胃液 (江紹基，1981)，因此人體飢餓狀態似乎傾向於高液固比。但過去研究中，如表 2-2 所示，較少詳加探討即選用低液固比 (10~150 mL/gm) (Davls *et al.*, 1992；Ruby *et al.*, 1993；1996；Rodriguez *et al.*, 1999；Sarkar *et al.* 2003)。Hamel *et al.* (1998) 以美國 NIST 標準土壤 (Montana SRM 2710) 與 Jersey City 土壤進行胃腸體外試驗，結果顯示兩土壤之液固比在 100：1~5000：1 mL/gm 時，對鉻、鎘、鎳、鉛之 ABF 影響不大。但對砷而言，如圖 2-13 所示為 Hamel *et al.* (1998) 在不同液固比下砷生物有效性之回歸圖，Jersey City 土壤於高液固比有較高之 ABF。該研究另建議以 1000：1 mL/gm 做為體外試驗之排空比 (fasting ratio)。但使用 fasting ratio 這個專有名詞並不恰當。所謂排空比乃是胃液與食物之比值，而非體外試驗中胃液對毒性物質 (土壤) 之比值，胃中之固相大多為食物所形成之乳糜而非只有誤食之土壤，因此液固比與排空比之意義不同。儘管如此，本研究建議仍以不添加食物的飢餓狀態來模擬以便簡化體外試驗，後續研究應確認 1000：1 mL/gm 液固比是否可作為通用參數值。

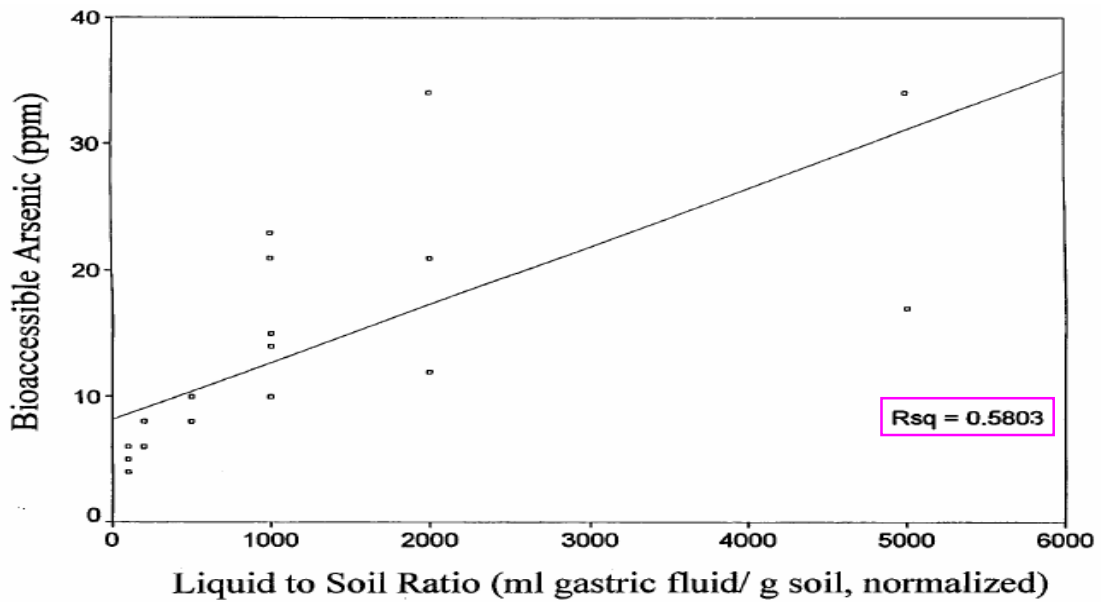


圖 2-13：液固比與砷 RBF 關係圖 (Hamel *et al.*, 1998)

C. 食物添加

對鉛而言，食物的添加會影響其生物有效性，ex.牛奶會抑制鉛的溶解。而過去研究僅只有 Rodriguez *et al.*(1999)探討食物(dough)的添加對砷的生物有效性影響，在 IVG 與 IVG-AB 的試驗中考量食物的添加對砷生物有效性之影響，他們將樣品包覆在 200 gm dough 中（似麵團）後餵入反應瓶中，以 slag 及 calcine 土壤樣品進行體外試驗。結果顯示，在 slag 土壤樣品中，食物的添加與否對砷的生物有效性並無差異（21.1 與 24.4 mg/kg soil）；在 calcine 土壤樣品中，食物的添加反而會增加砷的生物有效性約 60 %（19.7 與 24.3 mg/kg soil）。因此對砷而言，食物的添加對不同土壤樣品之生物有效性會不同，但其作用機制仍不清楚。

D. 胃排空率

一般而言，食物進入胃之後，胃排空的時間約 1~2 小時，表 2-2，Davls *et al.* (1992) 與 Ruby *et al.* (1993) 以 2 小時做為胃排空的時

間，原因是他們皆以 New Zealand White rabbits 評比胃腸體外試驗，評比結果發現 2 小時的時間便能夠使 Pb 的溶解度達到最大。但在後期的研究中，Ruby *et al.* (1996) 在 PBET 的方法上，認為 1 小時的胃排空時間便可足以消化 80~90 % 的食物，因此在後期的研究中，後續研究均採用 1 小時做為反應時間。

2-6-3 小腸反應條件

A. 小腸 pH

一般而言，小腸液 pH 值約為 7.0，如表 2-2 所示，Davls *et al.* (1992)、Ruby *et al.* (1993)、Ruby *et al.* (1996) 均以 7.0 做為小腸液的 pH 值，在 1993 年 Ruby *et al.* 使用含有 3 mL DI water 及 NaHCO₃ 的透析袋 (dialysis bag) 來中和 HCl，並將胃液的 pH 值調整至 7.0±0.2 的小腸液。但 Rodriguze *et al.* (1999) 於 IVG 與 IVG-AB 的方法上，卻使用 pH 為 5.5 作為小腸液的酸鹼值，比先前之研究低了 1.5，但到了 2003 年 Sarker *et al.* 又將小腸液的 pH 值選定為 7.0，顯示最後體外試驗研究小腸環境 pH 值採用 pH7.0。

B. 吸附劑的使用

模擬小腸吸收作用的體外試驗研究一直到 1999 年才開始，表 2-2，1999 年 Rodriguze *et al.* 在 IVG-AB 的方法上，進一步以 tea bag (似茶包) 作為吸附袋並將其懸掛在反應瓶中，tea bag 的面積為 161 cm²，材質為 8 μm nylon membrane filter，同時內含有 10 gm iron hydroxide gel，iron hydroxide gel 是由 0.65M FeCl₃ solution 以 2.7 M NH₄OH 中和至 pH 為 6 備製而成，結果顯示，使用吸附劑的 IVG 試驗方法中，小腸之 RBF 也與豬試驗呈線性相關，slope=0.74，R²=0.62；但不使用吸附劑的 IVG 試驗方法中，小腸之 RBF 與豬試驗呈線性相關且 slope=0.76，R²=0.67，所以使用吸附劑並無改善吸

附效果。而於 2003 年 Sarkar *et al.* 研究中仿照 Rodriguze *et al.* 的 IVG-AB 方法，同時進一步改良吸附劑的備製，Sarkar 的做法是將 40 cm² 纖維濾紙 (filter paper) 撕成片狀後，再塗上 ferric oxide，風乾後的纖維濾紙以邊長 6.5 cm，孔徑 8 μm nylon membrane filter 包裹，懸掛在反應瓶中以模擬小腸的吸收。研究結果顯示，將吸附劑與不使用吸附劑之 RBF 做回歸發現斜率 (slope) 高達 1.16，R²=0.98，大幅提昇吸收效果，同時簡化備製吸附劑的製作。

C. 小腸萃取時間

根據生理學，小腸的推動是藉由蠕動波以 0.5~2 cm/s 的速度向肛門方向推進，小腸前端較快，在小腸末端較慢。由於蠕動波的力量微弱，通常不超過 10 cm，因此乳糜在小腸的淨運動速度為每分鐘 1 cm。即乳糜由噴門到迴盲瓣需要 3~5 小時 (李，1991)。在生物有效性試驗中，如表 2-2 所示，Davls *et al.* (1992) 與 Ruby *et al.* (1993) 在體外試驗中，於小腸輸送時間上皆以 2 小時作為試驗參數，但 Ruby *et al.* (1996) 在 PBET 的試驗方法中則改用 4 小時，即以消化液流經小腸至大腸進口所需的時間做為小腸輸送率。但在 Rodriguze *et al.* (1999) 的 IVG 及 IVG-AB 方法與 Sarkar *et al.* (2003) 的 IVG-S 及 IVG-AI 方法中，卻縮短至 1 小時，是否顯著影響試驗結果，尚待確認。

綜合上述體外試驗參數之探討，其生物有效性試驗程序主要係參考 Rodriguze *et al.* (1999) 的二階段 IVG 及 IVG-AB 體外試驗程序，其試驗程序如下：

- (1) IVG 試驗：將待測樣品置於備製好的胃液中，將 pH 調整至 1.8 模擬胃相，消化 1 小時後收集胃相樣品，再添加豬膽汁及胰酵素，並

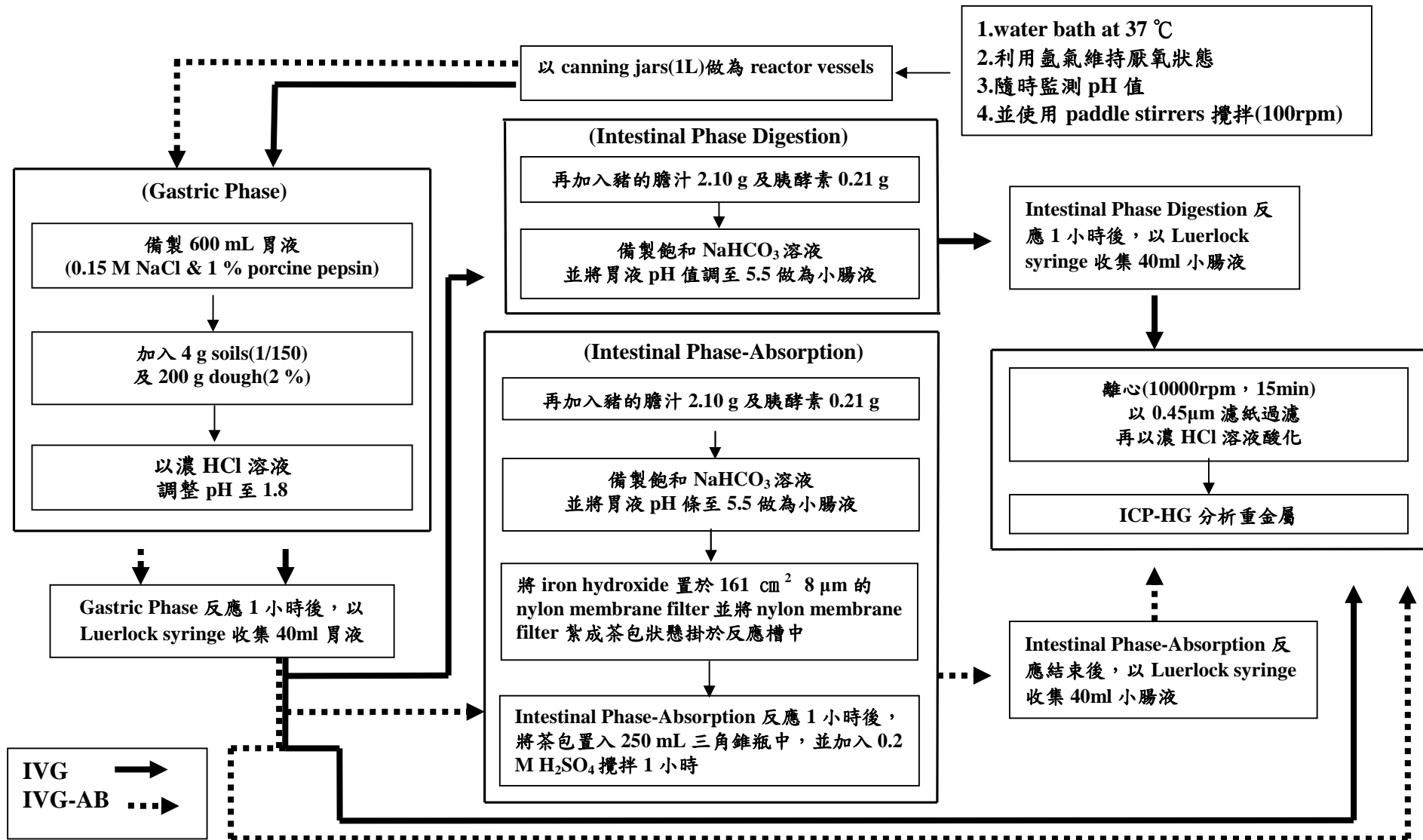


圖 2-14：二階段生物有效性 IVG 及 IVG-AB 體外試驗程序 (Rodriguez *et al.*,1999)

將 pH 調至 5.5 模擬腸相，最後進行消化 1 小時，收集腸相樣品。

(2) IVG-AB 試驗：將待測樣品置於備置好的胃液中，將 pH 調整至 1.8 模擬胃相，消化 1 小時後收集胃相樣品，再加入豬膽汁及胰酵素，再將 pH 調至 5.5 模擬腸相，並以 iron hydroxide gel 模擬腸相吸收作用，1 小時後收集腸相樣品。

最後將所有樣品經離心、過濾並酸化後，以 ICP-HG 分析其重金屬濃度。

雖然上述生物有效性之體外試驗方法之操作參數均詳細考量人體胃腸環境，但仍有若干缺失：

1. 未建立 surrogate reference material (SRM) 之品管基準
2. 未探討使用速度梯度 (velocity gradient, 簡稱 G , $G = \sqrt{P/\mu V}$, 單位 1/s, 其中 P 為功率, 單位 W ($N \cdot m/s$); μ 為黏度, 單位 $N \cdot s/m^2$; V 為反應槽有效容積, 單位 m^3) 模擬胃腸蠕動之可行性
3. 可進一步簡化反應槽設計及厭氧控制方法, 以減少操作成本
4. 未進一步利用 RBF 建立風險評估數學模式

爰此，本研究之目的主要以 As 為例，建立適當之 SRM，如 As 可選用 $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 探討其品管基準（包括 reproducibility, external recovery 及 internal recovery）。其次本研究將修正並簡化 Rodriguez *et al.* (1999) 之生物有效性試驗程序，期盼能夠建立一套準確評估胃腸生物有效性體外試驗方法，本研究修改之部分試驗程序與試驗方法將於下一個章節詳細說明並探討。

第三章 研究方法

本研究主要目的是探討生物有效性體外試驗操作程序，並藉由試驗建立系統品質管制基準，以作為評估廢棄物資源化之參考。以下分 4 節說明本研究體外試驗方法、實驗設計、砷之 ICP-AES 測定法及數據統計分析。

3-1 體外試驗程序與參數

在探討各種體外試驗參數後，生物有效性之胃腸體外試驗程序，如第二章 2-6 節之圖 2-14 所示，該程序主要係參考 Rodriguze *et al.* (1999) 的二階段 IVG 及 IVG-AB 體外試驗程序，本試驗為簡化體外試驗程序，將部份試驗參數與試驗程序修改，表 3-1 為本研究之試驗參數與文獻之比較表，說明如下：

(1) 樣品前處理：

樣品經風乾後，過篩取粒徑 $< 250 \mu\text{m}$ ，以模擬可為手指沾染而誤食者，樣品量 0.4~10 gm，液固比 10~5000 mL/gm，本研究建議使用 0.5 gm，液固比 1000 : 1。

(2) 反應槽體：

本試驗之反應槽設計，改用密閉式 500 mL 血清瓶，可避免污染物的逸散，另使用可調速之磁力攪拌及具載重環磁石，可有效控制攪拌強度，同時將水浴溫控改採氣控溫控，以利試驗進行時觀察與採樣，其反應槽體如圖 3-1 所示。

(3) 胃相試驗：

本試驗使用胃相 pH 1.8，僅添加 NaCl 及 pepsin，反應 1 小時，但不添加食物以模擬飢餓狀態。

(4) 腸相試驗：

本試驗使用小腸相 pH 7.0，僅添加 pancreatin 及 bile，反應 1 小時，但不使用吸收劑。

(5) 萃取樣品前處理與分析：

離心 3500 rpm、0.45 μ m 過濾，並以 ICP-AES 分析砷濃度。

表 3-1：本研究試驗參數與文獻之比較表

項目	文獻值	本研究之參數值	說明
樣品前處理	樣品風乾 粒徑<250 μ m	同意使用	模擬可為手指沾染而誤食者
樣品重量	0.4~10 gm	0.5 gm	本研究建議使用 0.5 gm，液固比 1000：1
液固比	10-5000 mL/gm	1000 mL/gm	不添加食物模擬飢餓狀態
反應槽	150~600 mL 燒杯	500 mL 血清瓶	可避免污染物的逸散
溫度控制	水浴(37°C)	氣控式(37 °C)	以利實驗進行時觀察與採樣
攪拌方式	機械攪拌	磁力攪拌	可有效控制攪拌強度
厭氧方式	氫氣	不使用	本研究採密閉反應系統
胃相			
pH	pH 1.8	同意使用	濃 HCl 溶液調整 pH
胃溶液	0.15 M NaCl+1 % pepsin	同意使用	porcine pepsin (activity:800-2500 unit/mg)
萃取時間	1 hr	同意使用	可消化 80~90 % 的食物
小腸相			
pH	5.5	同意使用	飽和 NaHCO ₃ 溶液調整 pH
小腸溶液	pancreatin + bile 另使用吸收劑模擬小腸吸收作用	僅添加 pancreatin 及 bile，但不使用吸收劑	1. porcine pancreatin: 4X, U.S.P. 2. bile extract: (CAS NO. 8008-63-7) 3. 簡化試驗程序
萃取時間	1~4 hr	1 hr	乳糜由噴門到迴盲瓣需 3~5 小時

因此，本研究體外試驗程序如圖 3-2 所示，為評估試驗結果之信賴性平行於待測樣品另進行管制樣品分析，包括空白樣品、SRM 重複樣品與 Matrix SRM 重複樣品。

本研究所有試驗之藥品與試劑如下：

1. $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ：99.0%，試藥級（Showa）
2. 美國 NIST SRM 2710 Montana soil：粒徑 $<74 \mu\text{m}$ ，各元素全量

濃度認證值如下：

Element	Mass Fraction (%)	Element	Mass Fraction (mg/kg)
Aluminum	6.44 ± 0.08	Antimony	38.4 ± 3
Calcium	1.25 ± 0.03	Arsenic	626 ± 38
Iron	3.38 ± 0.10	Barium	707 ± 51
Magnesium	0.853 ± 0.042	Cadmium	21.8 ± 0.2
Manganese	1.01 ± 0.04	Copper	2950 ± 130
Phosphorus	0.106 ± 0.015	Lead	5532 ± 80
Potassium	2.11 ± 0.11	Mercury	32.6 ± 1.8
Silicon	28.97 ± 0.18	Nickel	14.3 ± 1.0
Sodium	1.14 ± 0.06	Silver	35.3 ± 1.5
Sulfur	0.240 ± 0.006	Vanadium	76.6 ± 2.3
Titanium	0.283 ± 0.010	Zinc	6952 ± 91

3. porcine pepsin：activity 800-2500 unit/mg（Sigma CAS NO. 9001-75-6）
4. porcine pancreatin：4X, U.S.P.（Sigma CAS NO. 8049-47-6）
5. bile extract porcine：（Sigma CAS NO. 8008-63-7）
6. NaCl ：99.5%，試藥級（Showa）
7. HCl ：35.0-37.0%，試藥級（Showa）
8. NaHCO_3 ：99.5-100.3%，試藥級（Showa）
9. HNO_3 ：69.5%，試藥級（Scharlau）
10. DI 水： $>18\Omega$ （Millipore Milli-Q plus）
11. 砷標準液：1000 ppm（Merck）
12. 砷混合標準溶液：100 ppm（Merck）

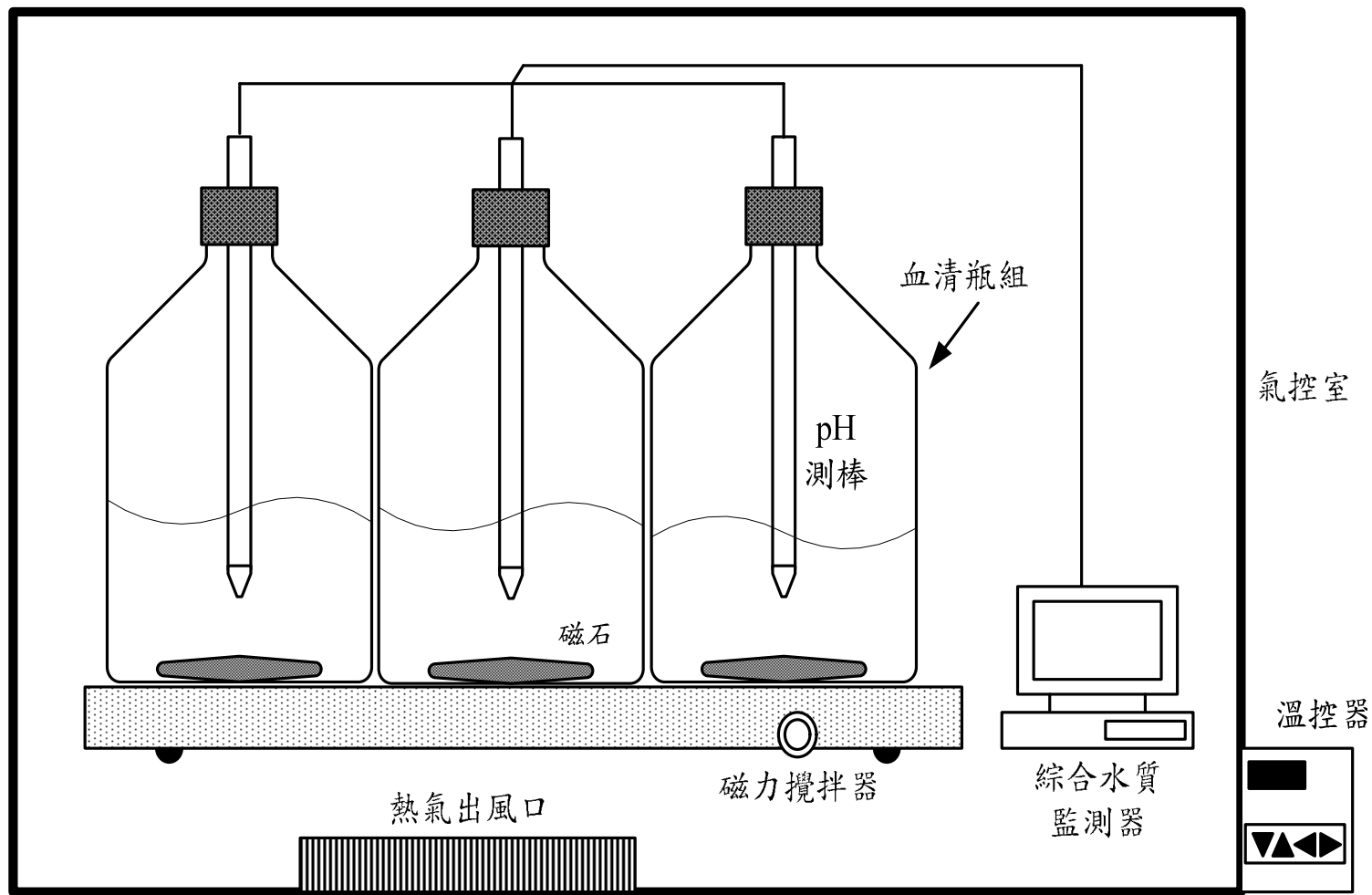


圖 3-1：本研究反應槽及氣體溫度控制室示意圖

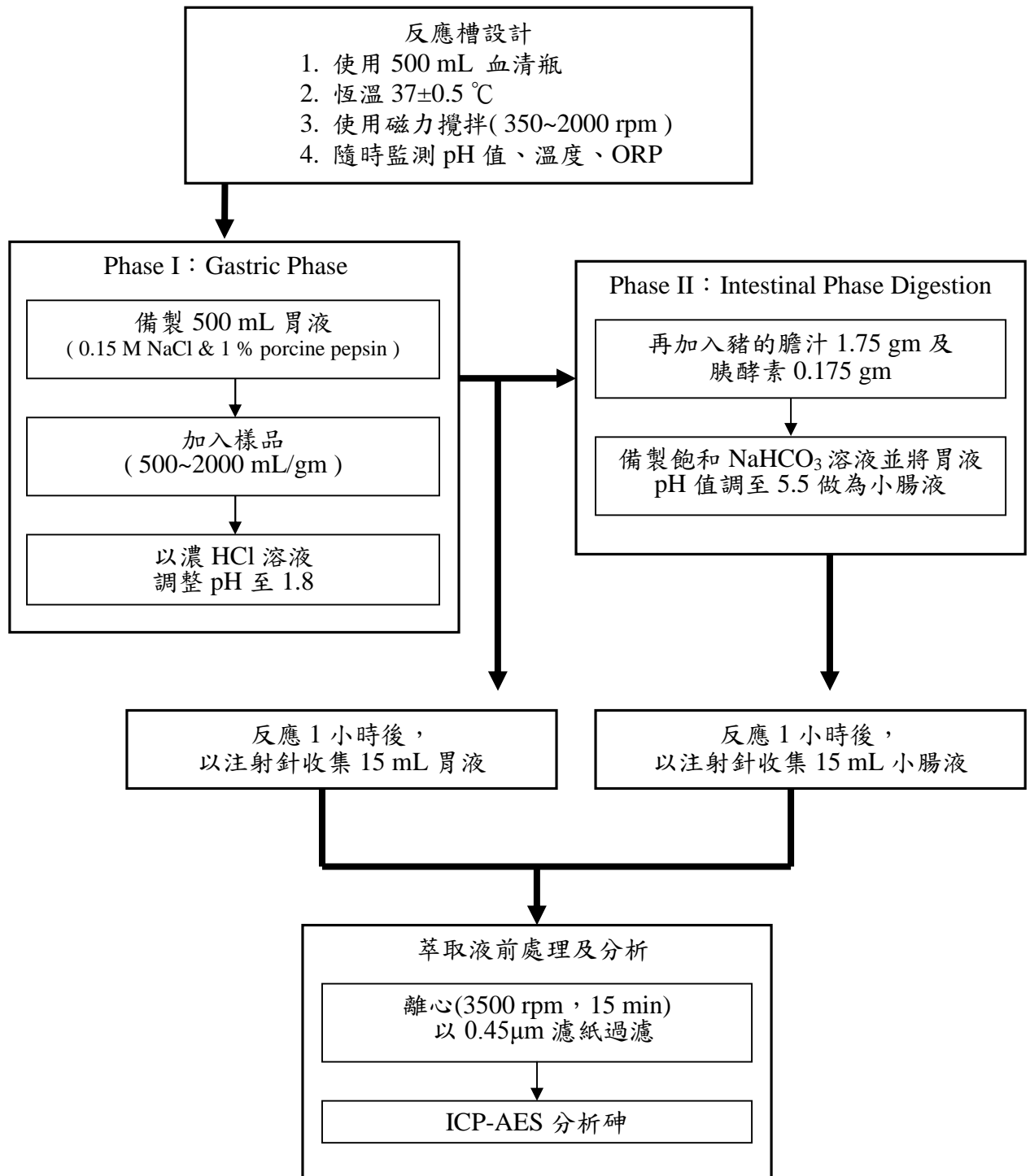


圖 3-2：本研究二階段生物有效性體外試驗之試驗程序

3-2 實驗設計

針對文獻中尚未深入探討之重要參數，本研究進行實驗設計進一步之探討包括 4 個階段：Phase I 氧化還原電位 (ORP)、Phase II 胃蠕動強度、Phase III 液固比、Phase IIII 腸相萃取時間試驗與 Phase V 基質標準樣品之品管試驗。

3-2-1 Phase I 氧化還原電位試驗

pH 值是影響體外試驗相當重要的因素 (Ruby *et al.*, 1993 ; 1996)，為有效模擬人體胃腸環境，過去研究大致同意 pH 分別定為 1.8 與 5.5。但亦有研究指出，在人體消化系統中，在不同的階段有不同的氧化還原電位 (oxidation reduction potential, ORP)，分別為：胃是+150 mv、十二指腸、空腸是-50 mv、迴腸是-150 mv、盲腸為-200 mv、直腸是-250 mv (光岡知足, 1978)。顯示物質由胃通往小腸傳輸時，ORP 值漸漸由正值轉變為負值，即由氧化狀態轉變為還原狀態，導致污染物化學物種之變遷，而改變其毒性，例如 As^{+5} 在還原態時會轉變成毒性較高之 As^{+3} ，ORP 似乎為一項影響生物毒性之重要參數。但過去研究，並未重視此一參數，本試驗監測整個體外試驗過程中之 ORP，並與文獻比較，以決定是否於後續試驗中控制 ORP。

本試驗使用 1 L 具有 4 插孔之圓底玻璃反應瓶作為反應瓶組，以利反應槽維持密閉，如圖 3-3 所示，並依圖 3-2 之生物有效性體外試驗程序進行試驗，並將胃蠕動強度固定為 500rpm 以模擬胃蠕動強度，液固比比例固定為 1000:1，於整個試驗過程中，持續量測 $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 與 NIST 2710 soil 之 pH 值與 ORP。模擬胃蠕動之儀器採用 Corning 公司製型號 MP9I 之九基座多點磁力攪拌器進行試驗，使用 CES (Challenge Environmental System) 公司製造之具有載重環 (SpinRing) 磁石，大小為 40 mm×9 mm，pH 之監測儀器採用 WTW 公司製綜合水質監測器

(Laboratory Mult-Parameter Instruments)，型號為 inoLab[®] Level 3。本款機型具有偵測酸鹼度 (pH)、溶氧量 (DO, mg/L)、電導度 (Conductivity, $\mu\text{s}/\text{cm}$) 的功能，本設備酸鹼度 (pH) 之偵測採用 glass electrode method，準確度可達小數點下三位，誤差值為 ± 0.003 ，氧化還原電位 (ORP) 採用 platinum electrode method，準確度可達小數點以下一位，誤差值為 ± 0.2 ，溫度 ($^{\circ}\text{C}$) 可達小數點以下一位，誤差值為 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

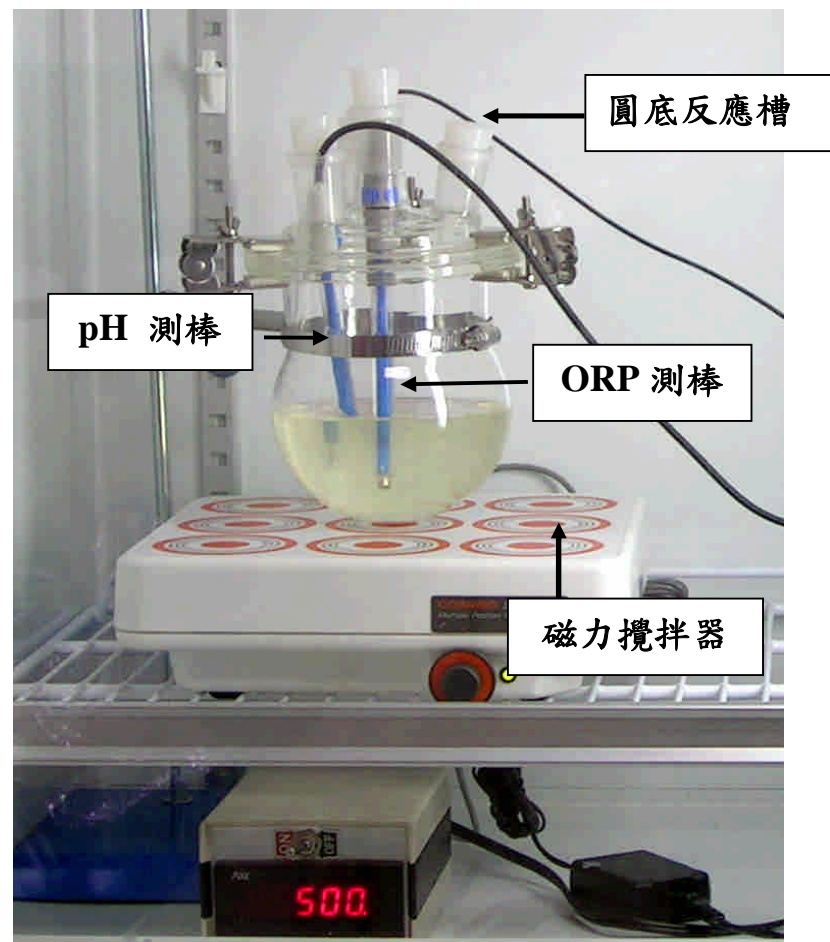
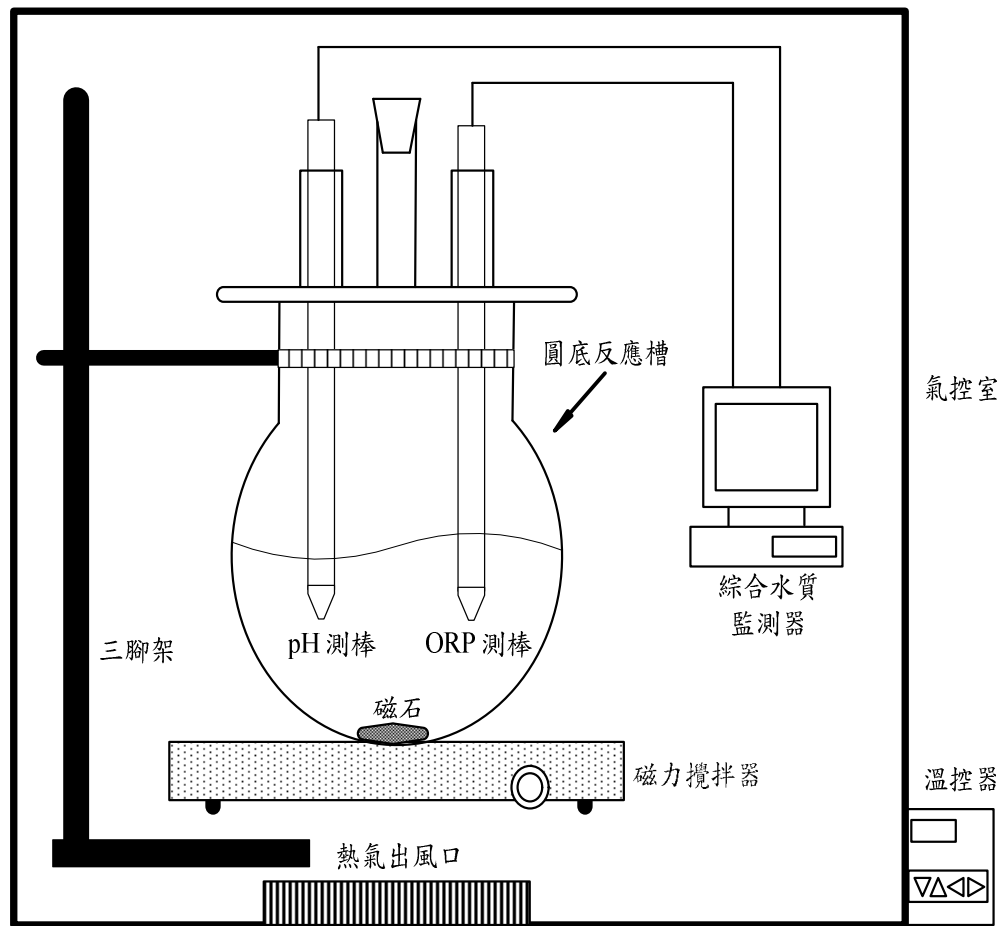


圖 3-3：測定氧化還原電位之反應槽示意圖

3-2-2 Phase II 蠕動強度試驗

生物有效性之體外試驗方法，在模擬胃的蠕動上，早期研究是以 wrist-action shaker 的方式模擬胃的蠕動 (Davls et al., 1993)，爾後改由分液漏斗下方之孔隙通入氮氣 (1 L/min)，以模擬胃蠕動並控制厭氧條件 (Ruby et al., 1996)。最近則採用較簡單之機械攪拌 (100 rpm)，但仍輔以氮氣曝氣 (Rodriguez et al., 1999; Sarkar et al., 2003)。由於人體胃蠕動方式由噴門下方沿著胃小彎處移動而終止於胃竇 (趙有誠, 1984)，不易正確模擬，且文獻中並無胃腸蠕動強度之相關數據，因此，本試驗擬探討模擬胃蠕動強度對生物有效性之影響，使用 3 種不同蠕動強度之轉速進行試驗，分別為 0、500 及 1000 rpm，液固比為 1000:1 mL/gm，以圖 3-2 體外試驗程序進行試驗，三種不同轉速測定之體外試驗過程如下圖所示，在每一轉速的試驗過程中除了進行三組重複管制樣品 (replicate control) 外，還同時進行一組空白管制樣品 (blank control) 之測定，試驗結束後分別量測並計算 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 之濃度並計算其絕對生物有效性係數 (ABF) 與 CV 值。



圖 3-4：0 rpm 體外試驗測試



圖 3-5：500 rpm 體外試驗測試
(渦流深度約 1/4)



圖 3-6：1000 rpm 體外試驗測試
(渦流深度約 6/7)

此外文獻中也並未明確說明各種攪拌方式是否能夠正確評估胃腸之蠕動，不僅如此，文獻中 (Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1993; 1996; Hamel *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2003) 也僅使用 rpm 來表示反應槽體之蠕動強度，但 rpm 易受反應槽有效容積影響，因此攪拌原理而言，使用一般評估反應槽攪拌強度之速度梯度 (G) 較為合理，因此本研究擬採用通用之速度梯度來評估反應槽之攪拌強度，並嘗試將過去文獻之攪拌轉速換算為 G，以探討 G 對包封度 (encapsulation) 高的物質之生物有效性的影響。而速度梯度之公式如下 (Cerra *et al.*, 1979)：

$$G = \frac{du}{dz} = \sqrt{\frac{P}{\mu V}} \quad (7)$$

其中，G 值係指於流體中，兩顆粒間單位距離 (dz) 之速度差 (du)，單位為 1/sec，P 為功率，單位 W (N · m/s)；μ 為黏度，單位 N · s/m²；V

為反應槽有效容積，單位 m^3 ，又本研究依據 CES (Challenge Environmental System, INC.) 公司使用 3 種不同種類之磁石進行瓶杯試驗顯示，其中以 CES 公司製造，大小為 50 mm×10 mm 具有載重環磁石之研究結果發現，此款磁石之功率 P 與 RPM 之關係式及 G 值與 RPM 之關係圖如下 (CES, 2002)：

$$P=1.03\times 10^{-7}\times \text{RPM}^{2.215803} \quad (8)$$

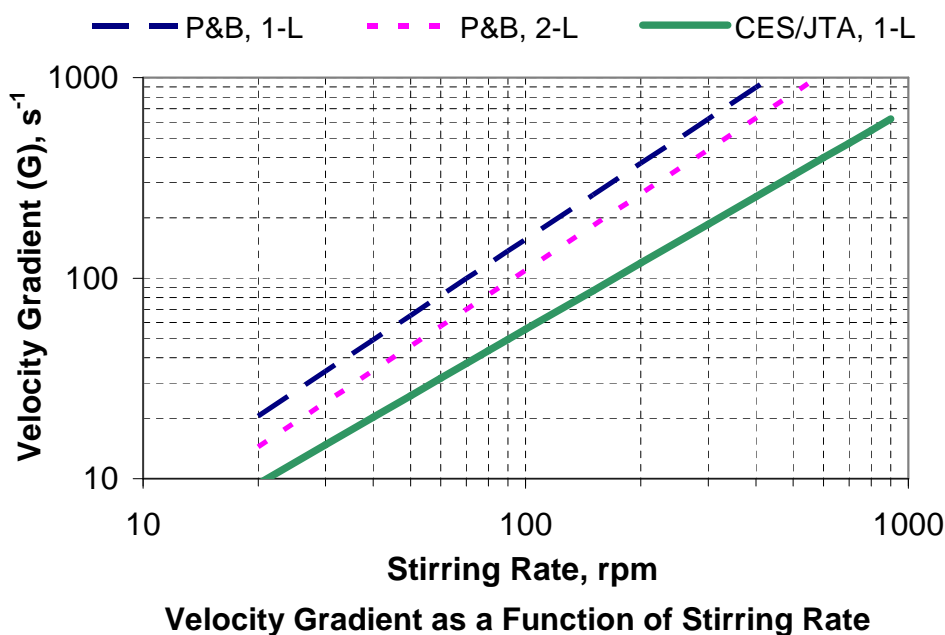


圖 3-7：RPM 與 G 值之轉係圖 (CES. INC, 2002)

此關係圖係使用 CES 公司製大小為 50 mm×10 mm 具有載重環之磁石，而本研究所使用之磁石規格為 CES 公司製大小為 40mm×9mm 具有載重環之磁石，雖並非同一款磁石，但根據 Lai *et al.* (1975) 研究顯示，功率 P 並不受磁石樣式影響，僅與磁石的投影面積 (A) 有關，亦即功率 P 與磁石的投影面積 (A) 成正比，而 G 值與 $(P)^{1/2}$ 成正比，因此可推估出 G 值與 $(A)^{1/2}$ 成正比之關係，又本研究之反應槽有效容積為 0.5 L 與 CES 測試之 1 L 不同，因此根據公式(7)可知 G 值與 $(1/V)^{1/2}$ 成正比關係。根據上述

探討可推算出本研究不同轉速對應之 G 值，如下表所示，於 500 rpm 對應之 G 值為 470 sec⁻¹，1000 rpm 對應之 G 值為 1006 sec⁻¹。

表 3-2：本研究轉速與 G 值對照表

	CES INC., (2002)	本研究
磁石投射面積	50 mm×10 mm	40 mm×9 mm
有效容積	1 L	0.5 L
RPM (rpm)	velocity gradient (G), sec ⁻¹	
0	0	0
500	326	470
1000	698	1006

3-2-3 Phase III 液固比試驗

不同介質中目標污染物的溶解度為影響生物有效性之重要參數(Ruby *et al.*, 1999)，而溶解度與液固比有相關。理論上，未達飽和溶解度前，液固比愈高溶解度愈高，而人體飢餓狀況會有較高液固比。但過去研究較少探討即選用低液固比(10~150 mL/gm)(Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1993; 1996; Rodriguez *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2003)。Hamel *et al.* (1998) 以美國 NIST 標準土壤 (Montana SRM 2710) 與 Jersey City 土壤探討液固比影響，結果顯示液固比在 100:1~5000:1 mL/gm 時，鉻、鎘、鎳、鉛之 ABF 影響不大，但對砷而言，Jersey City 土壤於高液固比似乎有較高之 ABF。而 Rodriguez *et al.*, 1999 探討麵糰 (dough) 的添加對砷的生物有效性影響，以 slag 及 calcine 進行胃腸體外試驗。結果顯示在 slag 中，食物的添加與否對砷 RBF 並無顯著差異；但在 calcine 中，添加麵糰 (200 gm) 提升砷 RBF 約 33~66%，但原因與機制仍不明確。

本試驗以不添加食物的飢餓狀態以便簡化體外試驗，為了探討液固比對生物有效性之影響，本試驗使用 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm 之液固

比進行試驗，不同液固比之備製量，分別如下表所示：

表 3-3：不同液固比之備製表

	Liquid to solid ratio (mL/gm)		
	200:1	1000:1	5000:1
Volume (mL)	500	500	500
Na ₂ HAsO ₄ · 7H ₂ O (mg)	2.5	0.5	0.1
NIST 2710 soil (mg)	2.5	0.5	0.1

有效容積為 500 mL，添加 2.5 gm、0.5 gm 與 0.1 gm 的 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 與 NIST 2710 soil 以分別備製不同液固比，依圖 3-3 之體外試驗程序進行，蠕動強度為 470 sec⁻¹ (500 rpm)，進行三組重複管制樣品 (replicate control) 與一組空白管制樣品 (blank control) 之測定，試驗結束後分別量測 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 與 NIST 2710 soil 之濃度並計算絕對生物有效性係數與 CV 值。

3-2-4 Phase III 腸相萃取時間試驗

本研究彙整過去生物有效性體外試驗參數顯示，小腸相萃取時間較不一致，如表 2-2 及第二章 2-6 小節中小腸相萃取時間之探討，因此本試驗將探討小腸相萃取時間對 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 與 NIST 2710 soil 之總砷濃度影響，依圖 3-3 之試驗程序進行，蠕動強度為 500 rpm，液固比為 1000:1 mL/gm，最大不同為小腸相之反應時間由 1 小時延長至 11 小時，並每隔 1 小時萃取樣品，以探討小腸相萃取時間對砷濃度之變化。

3-2-5 Phase V 基質標準樣品試驗

為了解體外試驗之可靠性，一般而言，試驗時應進行標準管制樣品 (control sample) 之平行測定。綜觀過去研發之體外試驗方法，由於各

試驗程序與條件不盡相同，且多數試驗並未報告各種管制樣品平行的測定結果（Kelley et al., 2002；Davls et al., 1992；Ruby et al., 1993；1996；Rodriguez et al., 1999；Sarkar et al. 2003），導致無法評比不同試驗結果之信賴性或差異，後續的研究應建立各種管制樣品之品管基準。本研究建議參考江等（2002）四種管制樣品：空白管制（blank control）、重複管制（replicate control）、與 SRM 管制（SRM control）及介質標準管制（matrix control）。空白管制是用於了解使用的試劑中是否含有待測污染物，若有，應檢討此污染的來源，若為系統之背景濃度，應可自待測樣品中扣除。為了解試驗方法之複現性及準確性，應平行測定標準樣品（SRM），並進行 3~5 次重複試驗，以求得 ABF 之變異係數（coefficient of variation, CV）。若必須求得 RBF，則應進行 3~5 重複介質標準樣品（如美國 NIST 土壤），亦可決定其 CV 作為評比不同試驗方法萃取效率之依據。當進行待測樣品之測定時，必須平行分析這些管制樣品，而當管制樣品的試驗結果符合品管基準時，才能接受待測樣品的試驗結果。



3-3 砷之 ICP-AES 測定法

3-3-1 儀器方法

本試驗參考 NIEA W311.51B 檢測方法，以感應耦合電漿原子發射光譜法（Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES）分析樣品之砷濃度，由於本試驗主要係分析溶解之砷樣品，於樣品前處理中若進行消化或酸化之步驟，易溶解被包封的砷，而導致樣品砷濃度增加，可能產生砷濃度高估，又本試驗之樣品以先使用 3500 rpm 離心，再以 0.45m 孔徑過濾後之濾液為樣品，因樣品較為澄清，因此本研究在分析砷樣品時，便不進行樣品酸化或消化之前處理步驟，以簡化繁瑣之消化前處理，其儀器設定係參考儀器廠商提供的操作條件，列於表 3-4。

表 3-4：感應耦合電漿原子發射光譜法測定砷之分析條件

儀器參數	操作條件
儀器型號	Thermo IRIS Intrepid II XSP
波長 (nm)	193.759 nm
入射操作能量	1200 W
電漿觀測模式	側向 (Axial)
使用氣體	氬氣 (Ar)
霧化氣體流速	20 psi
輔助氣體流速	1.0 L/min
樣品導入流速	1.75 mL/min

3-3-2 品質管制

1. 檢量線的製作：

取標準溶液進行分析，每個濃度至少需分析三次，砷元素之檢量線至

少需五點，以樣品之平均值建立檢量線，檢量線相關係數需大於0.995以上才能繼續進行分析工作，本研究使用市售砷濃度為1000 mg/L單一標準溶液，依序配製出一系列檢量線標準，濃度為5.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.05及0.01 mg/L。砷標準檢量線如下圖所示，所得結果之線性方程式為 $Y=6.976514X-0.00095$ ， R^2 為0.99996，符合方法 ≥ 0.995 之規定。

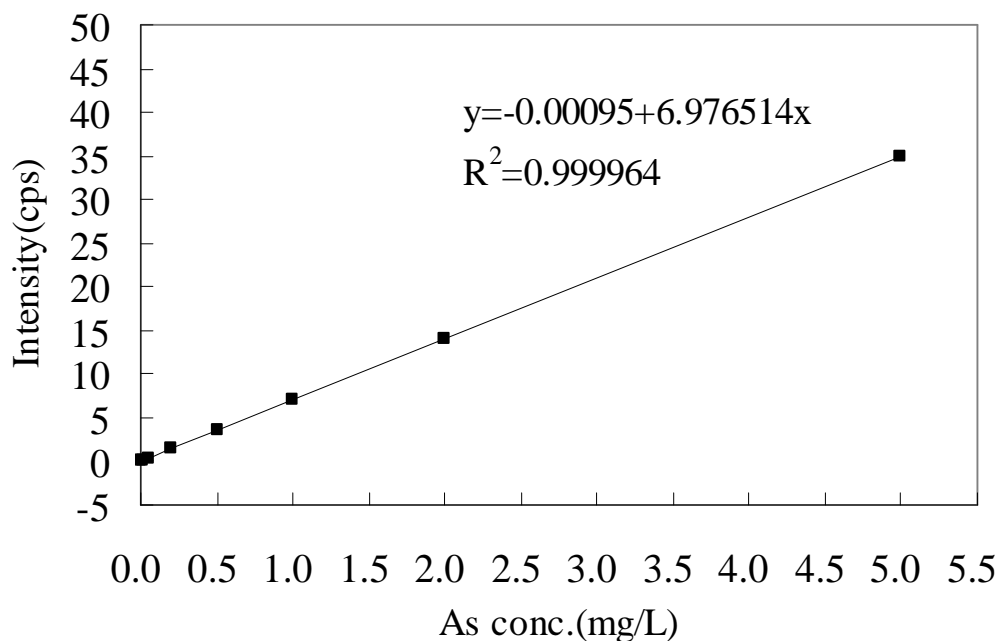


圖 3-8：砷之檢量線

2.儀器偵測極限：

取空白試劑水(Blank)為樣品溶液，直接將樣品注入ICP-AES，測其強度值，重覆上述步驟7次。利用標準檢量線，將強度值換算成濃度值，計算濃度平均值及其標準偏差，標準偏差之3倍即為該ICP-AES之儀器偵測極限，本研究之儀器偵測極限為0.0052 mg/L。

3.方法偵測極限：

取樣品進行七次分析，由其測值計算平均值及標準差，由三倍標準差以檢量線換算出對應之濃度，即求得方法的偵測極限，本研究之方法之偵測極限為 0.0397 mg/L。

4.品質管制：

本研究所進行之品管管制項目有：檢量線檢核溶液分析、樣品空白分析、重複樣品分析、品管樣品分析及樣品添加分析，各品管項目之管制標準與本實驗之實測值如下表 3-5 所示，

表 3-5：本研究砷 ICP-AES 品質管制基準與實測值之比較表

品質管制項目	管制基準	實測值
檢量線檢核溶液分析	回收率 90~110%	102.50~109.25%
樣品空白分析	濃度<2×MDL	ND.
重複樣品分析	相對差異百分比±10%	2.01~2.12%
品管樣品分析	回收率 80~120%	95.99~108.77%
樣品添加分析	回收率 80~120%	105.77~111.21%

ND=non-detected (method detection limit=0.0397mg/L)

由表中可知，檢量線檢核溶液之回收率必須介於 90~110%，本實驗之檢量線檢核溶液回收率為 102.50~109.25%；樣品空白分析之結果必須小於二倍方法偵測極限，本實驗之樣品空白分析濃度為均低於 2 倍偵測極限；重複分析相對差異百分比容許範圍為±10%，本實驗之重複樣品分析相對百分誤差為 2.01~2.12 %；品質管制樣品溶液之回收率必須介於 80~120%，本實驗之品質管制樣品之回收率為 91.9~104.1%；樣品添加分析回收率容許範圍為 80~120%，本實驗之樣品添加回收率為 105.77~111.21%。依上述數據，各項品質管制項目均符合管制標準。

3-4 數據統計分析

1. 本研究實驗數據係使用 Excel 2003 建檔後載入 SPSS 10.0 進行統計分析。

2. 描述性統計

- Phase I 氧化還原電位試驗：

分別繪製整各反應過程中 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2170 soil 之 ORP 與時間之關係圖，並且區別胃相與小腸相之變化，再與文獻比較。

- Phase II 胃蠕動強度試驗：

由 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2170 soil 濃度值計算 ABF，再分別表示各組蠕動強度與胃相與小腸相之砷 ABF 平均數及變異係數 (CV)，並且計算 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之 RBF。

- Phase III 液固比試驗：

由 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2170 soil 濃度值計算 ABF，再分別表示各組液固比與胃相與小腸相之砷 ABF 平均數及變異係數 (CV)，並且計算 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之 RBF，實測濃度低於 MDL 時以 MDL 計算 ABF 及 RBF。

- Phase IIII 小腸相萃取時間試驗：

將小腸相萃取時間分別與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2170 soil 之總砷濃度繪製關係圖，以探討小腸相萃取時間對總砷濃度之影響。

3. 分析性統計

- 單變項分析

1. 將 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 胃與小腸階段之 ABF 依蠕動強度、液固

比等變項分層，以 One Way ANOVA 進行分析比較，如有差異，事後再進行 Bonferroin test，檢定兩兩分層之差異，相對的 NIST 2170 soil 亦如此進行分析。

- 相關性分析

以皮爾森相關係數，分別表示 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2170 soil 之 ABF 與反應階段、蠕動強度及液固比之相關性。

第四章 研究結果

4-1 氧化還原電位測定

本試驗以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 作為待測樣品，於體外試驗中監測 pH 值與 ORP 值，圖 4-1 為兩待測樣品於體外試驗過程中 ORP 之變化圖。

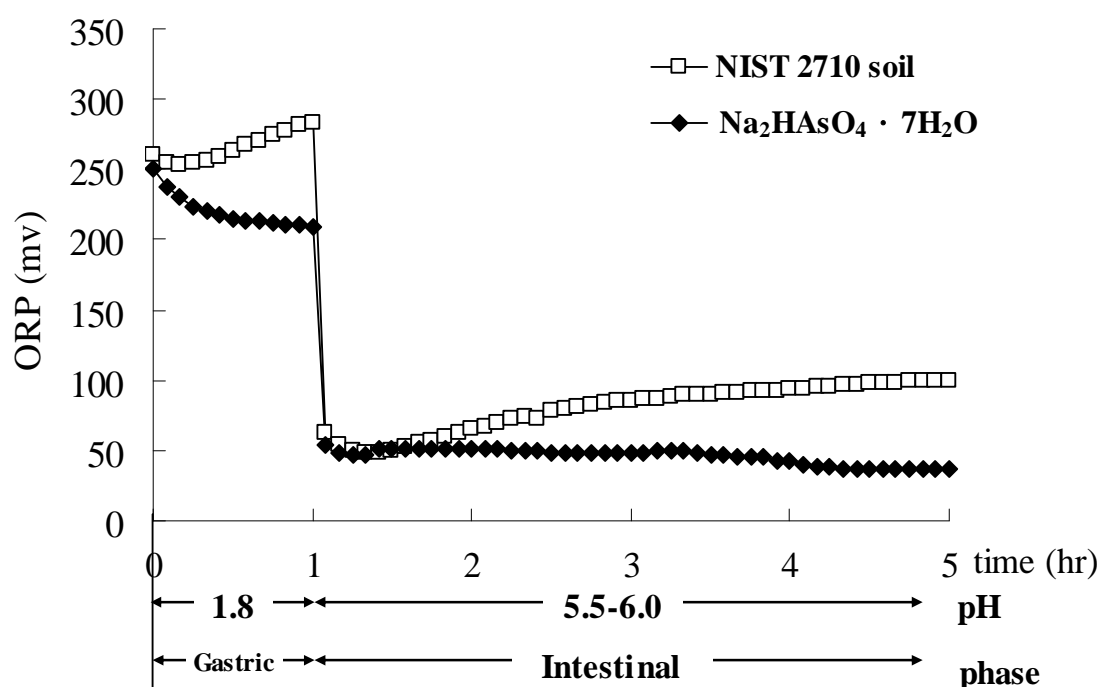


圖 4-1：生物有效性體外試驗 ORP 之變化圖

研究結果發現， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於體外試驗中，最初之 ORP 為+250 mv，當將 pH 調整至 1.8 模擬胃相 1 小時，ORP 值於胃相中逐漸下降為+209 mv，胃相之 ORP 值平均為+220 mv，平均降低了 30 mv，當將 pH 調整至 5.5 並添加豬胰液及膽汁模擬腸相時，ORP 值從+209 mv 瞬間降至+54 mv，當將腸相反應時間延長至 4 小時後發現，腸相之 ORP 值平均為+46 mv，平均而言，於腸相反應中 ORP 降低了 8 mv。

當樣品為 NIST 2710 soil 時，其 ORP 最初為+260 mv，當 pH 調整至

1.8 時，ORP 於胃相隨時間增加而增加，胃相反應 1 小時後，ORP 增加至 +283 mv，平均為 +265 mv，平均增加 5 mv，當將 pH 調至 5.5 時模擬腸相時，ORP 瞬間降至 +63 mv，腸相再經 3 小時的紀錄後，其 ORP 平均為 +80 mv，平均降低 17 mv。

整體而言，生物有效性體外試驗之 ORP 變化與文獻值之比較，如表 4-1 所示，文獻(光岡知足, 1978)中顯示人體的胃相 ORP 值為 +150 mv，但以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 為樣品的體外試驗顯示，胃相之 ORP 值分別為 +220 與 +265 mv，與文獻相較分別高出了 70 mv 與 115 mv；小腸相之 ORP 值分別為 +46 與 +80 mv，與文獻相較分別高出了 96 mv 與 130 mv，較文獻值高出許多。

表 4-1：本研究胃及腸相 ORP 與文獻之比較表

	Gastric phase	Intestinal phase
光岡知足(1978)	+150 mv	-50 mv
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+220 mv	+46 mv
NIST 2710 soil	+265 mv	+80 mv

然而，影響 ORP 之高低的可能因素有很多，於本試驗中 pH 值與溶氧 (DO) 似乎為最大之因素，王 (1995) 於自來水中觀察 pH 與 ORP 之研究中發現，隨著 pH 值逐漸升高，ORP 會逐漸下降，其關係式為 $E_H = 0.4841 - 0.0403[\text{pH}]$ ($R^2 = 0.998$) 如下圖所示，pH 與 ORP 成反比關係，也就是說當 pH 越高時，ORP 值會越低。

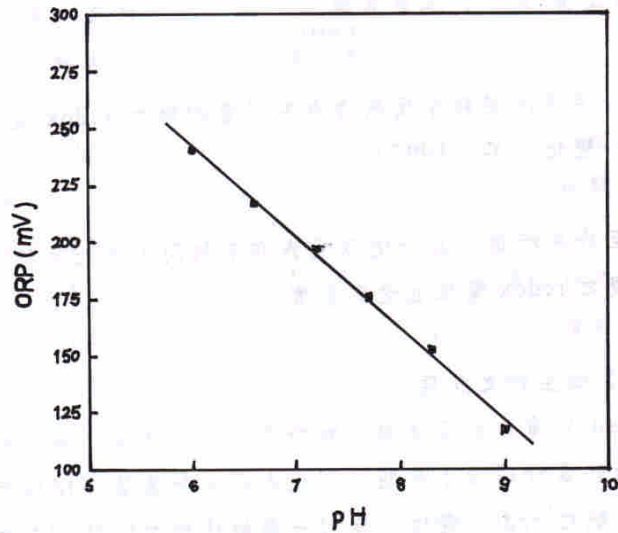


圖 4-2：自來水中 pH 與 ORP 關係圖(王, 1995)

從本研究體外試驗結果及 pH 與 ORP 之關係之探討上得知，在反應槽中由胃相進到腸相時，ORP 值會降低，此原因可能是受 pH 的影響，因此當 pH 值由 1.8 之升至 5.5 時 ORP 會降低，此外由王（1995）之研究亦可驗證，在自來水中 ORP 隨 DO 增加而增加，關係式為 $E_H = 0.1616 + 0.0204 \log[O_2]$ ($R^2 = 0.984$)，如下圖所示，可知 ORP 與溶氧成正比之關係，當溶氧越高，ORP 值便會越高。

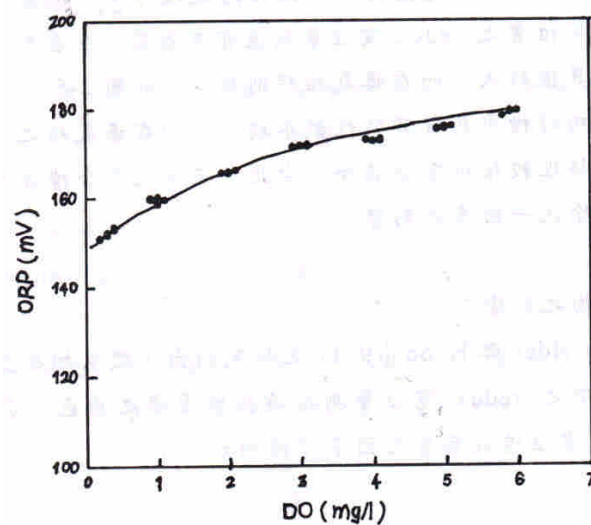


圖 4-3：自來水中 DO 與 ORP 關係圖(王, 1995)

且相較於文獻之 ORP 發現，本研究之氧化還原電位於胃相及小腸相均較高，可能原因為本試驗僅採用密閉之反應槽體之設備維持厭氧狀態，並未另外通入如前人研究之情性氣體（氫氣）維持厭氧，無法達到完全厭氧之狀態，所以在本研究之反應槽內可能尚有溶氧存在，而導致有較高之 ORP，因此對其生物有效性之影響尚待研究，因本研究並未控制 ORP，且毒性物質會隨氧化還原狀態之不同而不同，但本研究並未探討 ORP 對毒性物質之毒性大小之影響，因此建議後續進行厭氧控制，並監測溶氧，以化學平衡模式，評估於不同 ORP 時化學物種 (chemical species) 變化及其毒性。

4-2 蠕動強度試驗

本試驗為探討蠕動強度對生物有效性的影響，於不同速度梯度時均將待測樣品進行3重複試驗，圖4-4為速度梯度(G)與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之砷ABF關係圖，從圖中可知，在胃相中，G為0、470、1006 sec^{-1} 時，砷ABF平均值與標準差分別為 $95 \pm 3.0\%$ 、 $102 \pm 1.0\%$ 、 $102 \pm 1.5\%$ ；從此數據顯示，當G從0 sec^{-1} 增加至470 sec^{-1} ，砷ABF增加了7%，當G從470 sec^{-1} 增至1006 sec^{-1} ，砷ABF並無明顯增加，因此，對於 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在胃相中G越大，砷ABF會越大，且當G達470 sec^{-1} 時，砷ABF便趨於平衡，不會明顯的增加。在小腸相中，G為0、470、1006 sec^{-1} 時，砷ABF平均值與標準差分別為 $100 \pm 0.8\%$ 、 $100 \pm 0.9\%$ 、 $100 \pm 1.5\%$ ，顯示不同蠕動強度之砷ABF並無差異，因此在小腸相中，蠕動強度對砷ABF影響不大。此外，於相同蠕動強度中，相較於胃相與小腸相發現，胃相似乎有較高之砷ABF。

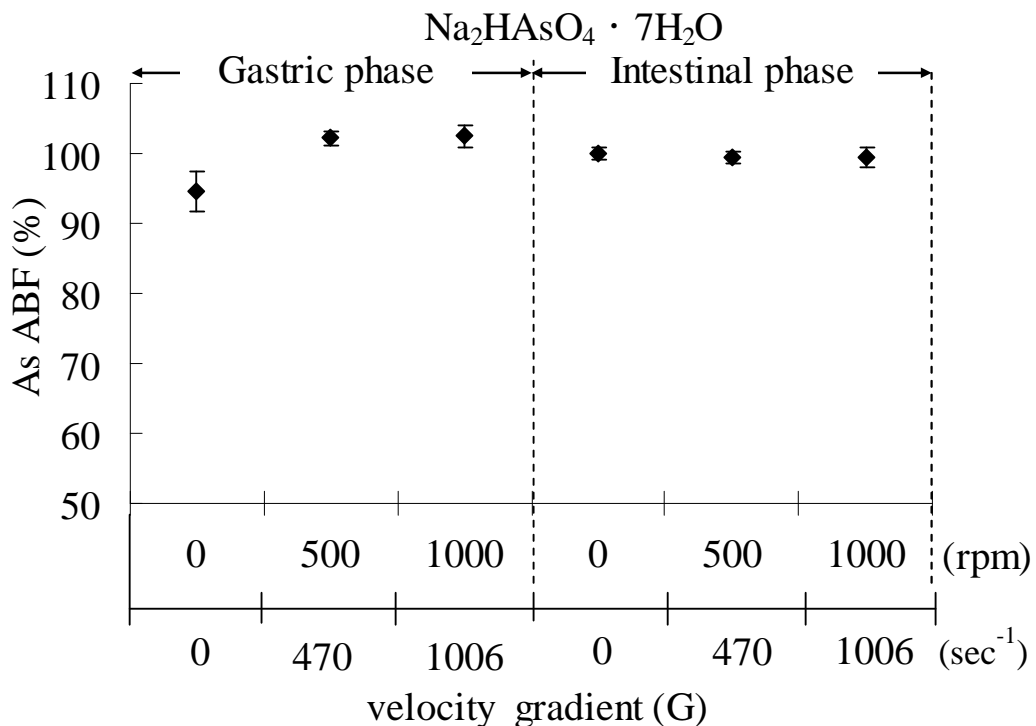


圖 4-4：蠕動強度與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 砷 ABF 之關係圖

圖 4-5 為 G 與 NIST 2710 soil 中砷 ABF 的關係圖，其砷 ABF 為 3 重複試驗之平均值，從圖可知，於胃相中，G 為 0、470、1006 sec^{-1} 之砷 ABF 平均值與標準差分別為 $42\pm 18.0\%$ 、 $40\pm 9.7\%$ 與 $58\pm 11.7\%$ ；於小腸相中，砷 ABF 平均值與標準差也分別為 $40\pm 17.5\%$ 、 $29\pm 0.5\%$ 與 $54\pm 11.6\%$ ，從此數據可知，對於 NIST 2710 soil 而言，於胃相與小腸相中，G 對砷生物有效性之影響不大。此外，於相同 G 值中，胃相似乎較小腸相有較高之砷 ABF。

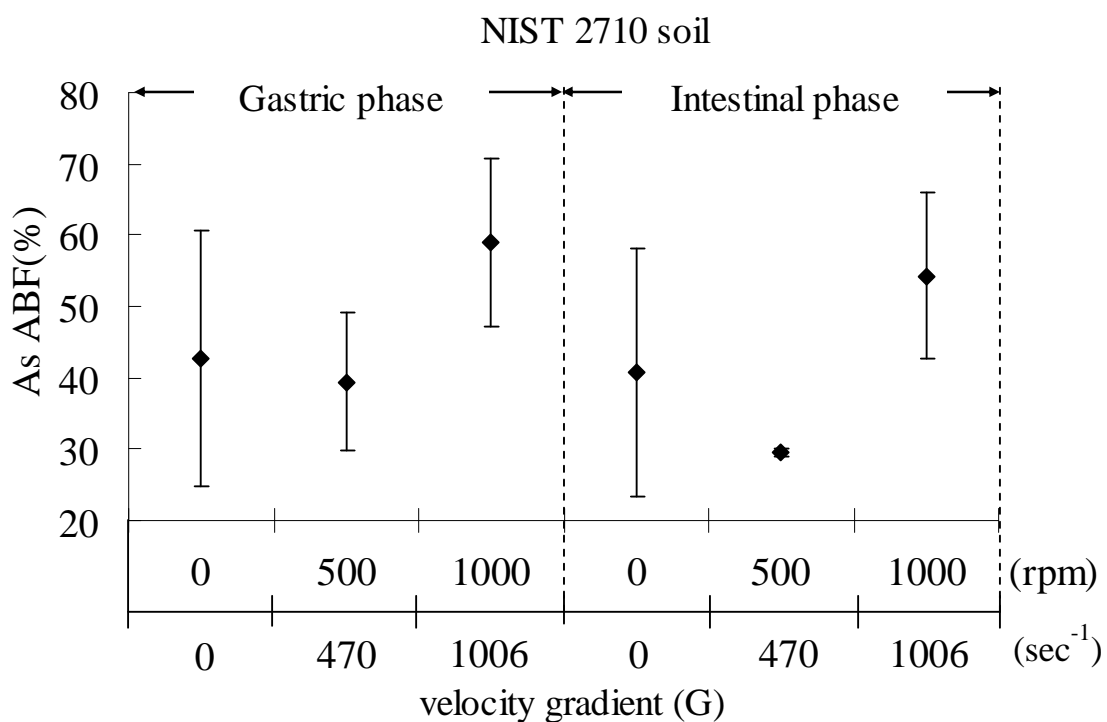
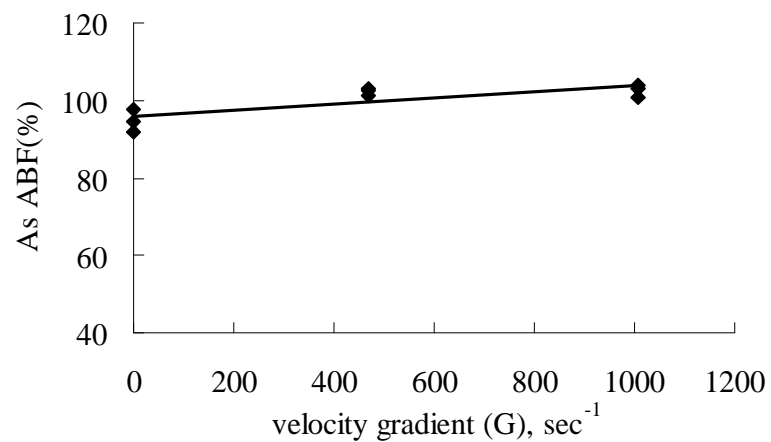


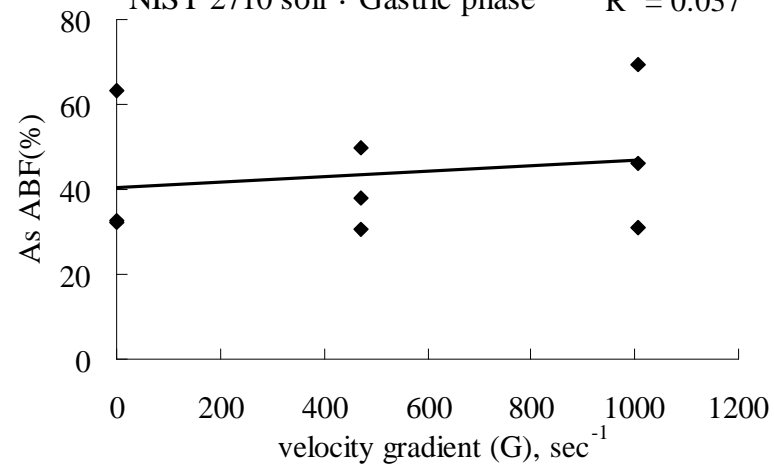
圖 4-5：蠕動強度與 NIST 2710 soil 砷 ABF 之關係圖

整合上述結果，圖 4-6 為 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 砷 ABF 於不同反應階段與 G 值之線性迴歸圖，從圖中可知僅有 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之胃相反應階段，砷 ABF 與 G 呈中度相關 ($R^2=0.62$)，其餘各反應階段之砷 ABF 與 G 並未有良好之關係性。

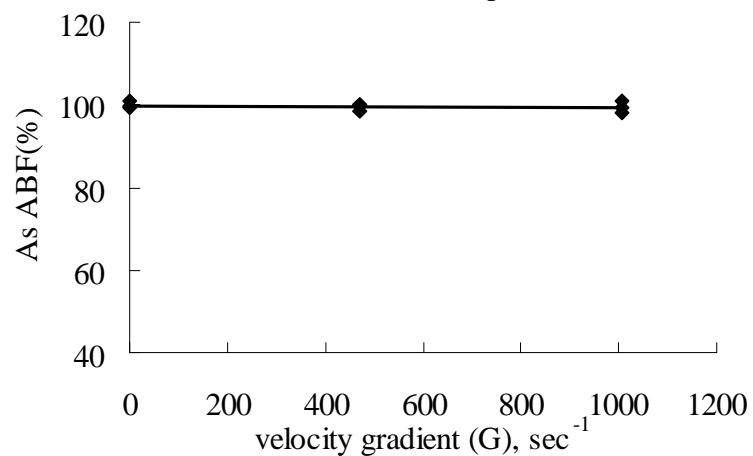
(a) $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Gastric phase $R^2 = 0.6175^*$



(c) NIST 2710 soil : Gastric phase $R^2 = 0.037$



(b) $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Intestinal phase $R^2 = 0.0344$



(d) NIST 2710 soil : Intestinal phase $R^2 = 0.1698$

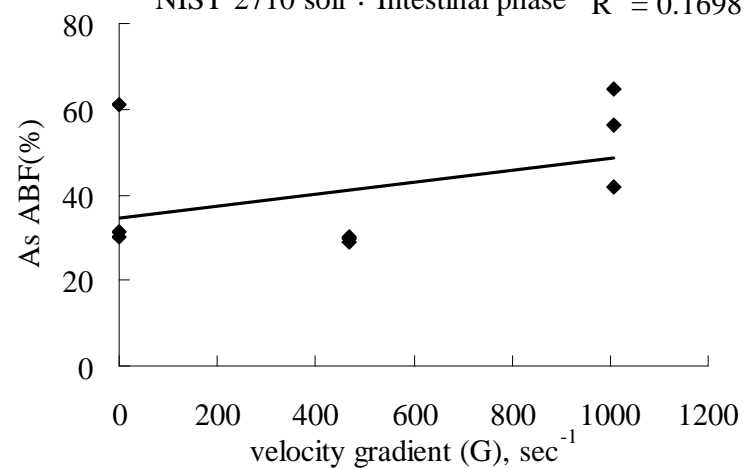


圖 4-6 : G 值與砷 ABF 之迴歸圖(相關性)

表 4-2 為 G 與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 之砷 ABF 之比較表，比較不同 G 對砷 ABF 的影響，從表中可知， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，胃相之砷 ABF 於不同 G 值中有顯著性的差異（94% vs. 102% vs. 102%, p value=0.004），且蠕動強度越大，砷 ABF 越高，而在小腸相中 G 對砷 ABF 並無顯著性差異（p value > 0.05）。對樣品 NIST 2710 soil 而言，不同 G 值對胃及小腸階段之砷 ABF 均無顯著性差異。

表 4-2：不同速度梯度時砷 ABF 之統計比較表

Mixing Intensity (sec^{-1})	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		NIST 2710 soil	
	Gastric	Intestinal	Gastric	Intestinal
0 (n=3)				
ABF ¹ (%)	94.64	99.90	42.69	40.78
CV (%)	3.06	0.80	42.12	42.83
470 (n=3)				
ABF ¹ (%)	102.27	99.44	39.47	29.48
CV (%)	0.97	0.94	24.66	1.96
1006 (n=3)				
ABF ¹ (%)	102.50	99.46	58.95	54.29
CV (%)	1.53	1.48	19.89	21.30
p value ²	0.004*	0.854	0.777	0.115
Two sample ³	a, b			

¹Values reported are mean percent ABF for three replicate samples.

²Mean difference statistics between mixing were generated using One-Way ANOVA test at p=0.05.

³Two-sample mean were compared using Bonferroin test at p=0.05, a=significantly different between 0 and 470 sec^{-1} , b= significantly different between 0 and 1006 sec^{-1} .

* $0.001 \leq \text{P value} \leq 0.01$

此外，不同 G 值中，NIST 2710 soil 相對於 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之砷 RBF，如表 4-3 所示，於胃相分別為 46%、38%、58%，平均為 47%，CV 為 20%，於腸相中分別為 40%、28%、54%，平均為 42%，CV 為 31%。顯示於相同 G 值中，胃相較小腸相有較高之 RBF。

表 4-3：不同速度梯度時 NIST 2710 soil 砷 RBF 之統計比較表

	Mixing Intensity (sec^{-1})			Mean±CV(%) ³
	0	470	1006	
RBF _G ¹ (%)	45.1	38.6	57.5	47.0±20.4
RBF _I ² (%)	40.8	28.8	54.6	41.4±31.2

¹RBF_G= relative arsenic bioavailability factor at the gastric phase(n=3)

²RBF_I= relative arsenic bioavailability factor at the intestinal phase(n=3)

³Mean= As RBF in all mixing group; CV=coefficient of variation

本試驗選用 3 種不同速度梯度進行測試，綜合上述結果發現，對樣品 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 而言，胃相中不同的速度梯度對砷 ABF 有顯著性差異 ($p=0.004$)，且 G 值越高，砷 ABF 也似乎越高，如圖 4-4(a) $R^2=0.62$ ，而於腸相中不同速度梯度對砷 ABF 並無顯著性差異；對樣品 NIST 2710 soil 而言，胃相與腸相中不同速度梯度對砷 ABF 均無顯著性差異，可能之原因為，就 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 而言，因其溶解度大之特性，而使其不論於 pH 較低之胃相或 pH 較高之腸相中，包封度均低，導致 G 值對 ABF 之影響變小，但本研究之胃相有顯著性差異之可能結果為實驗誤差所造成。對樣品 NIST 2710 soil 而言，在胃相時，因 pH 較低，包封度變小，G 值對 ABF 之影響會較小，在高 pH 之腸相時，包封度變大，不易溶解，G 值對 ABF 較有影響，因此對 NIST 2710 soil 而言，即使包封度高，但若僅使用單相之胃相試驗時，G 似乎不是一個重要的實驗條件。

另本研究之體外試驗主要以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 為 SRM，文獻中僅報告一組 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之砷 ABF，因此相較文獻試驗方法 (Davls *et al.*,

1992) 發現，如下表所示：

表 4-4：本研究 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 砷 ABF 與文獻值之比較表

enzyme	本研究			Davls <i>et al.</i> , 1992
	Pepsin 12.5gm/L			No.
Liquid to solid ratio (mL/gm)	1000			14
Mixing	0(s ⁻¹)	470(s ⁻¹)	1006(s ⁻¹)	wrist-action shake
As ABF in gastric phase (%)	95	102	102	-
As ABF in intestinal phase (%)	99.9	99.4	99.4	73

本研究之 ABF 均高於文獻值，顯示本研究之萃取效率較高，根據上表顯示，可能之原因為本研究係使用磁力攪拌較文獻之 wrist-action shake 易於控制蠕動強度，且蠕動強度強易使反應槽內的溶液完全混合攪拌，使 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 更易於溶解於溶液中，而在液固比上本研究使用 1000:1 (mL/gm) 液固比較文獻 14:1 (mL/gm) 高，而高液固比對砷而言似乎有較高之 ABF，另本研究亦使用豬胃液進行消化作用，酵素之消化亦可能使本研究之 ABF 高於文獻，綜合上述探討，僅提出可能影響之因素，但確切之原因仍尚待釐清。

4-3 液固比試驗

本試驗為探討液固比對生物有效性之影響，使用 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 進行液固比試驗，於不同液固比時均將待測樣品進行 3 重複試驗，圖 4-7 為液固比與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 中砷 ABF 的關係圖，研究結果發現，在胃相中，液固比為 200:1、1000:1 與 5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為 $102 \pm 2.4\%$ 、 $103 \pm 1.0\%$ 、 $102 \pm 5.8\%$ ；在小腸相中砷 ABF 平均值與標準差也分別為 $97 \pm 1.1\%$ 、 $100 \pm 0.9\%$ 、 $98 \pm 2.9\%$ ，顯示不同液固比對砷 ABF 之影響不大，且 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於胃相與小腸相之反應階段中，砷 ABF 並不會隨液固比增高而有明顯的增加，但比較胃相與小腸相之砷 ABF 時顯示，胃相之砷 ABF 似乎高於小腸相。

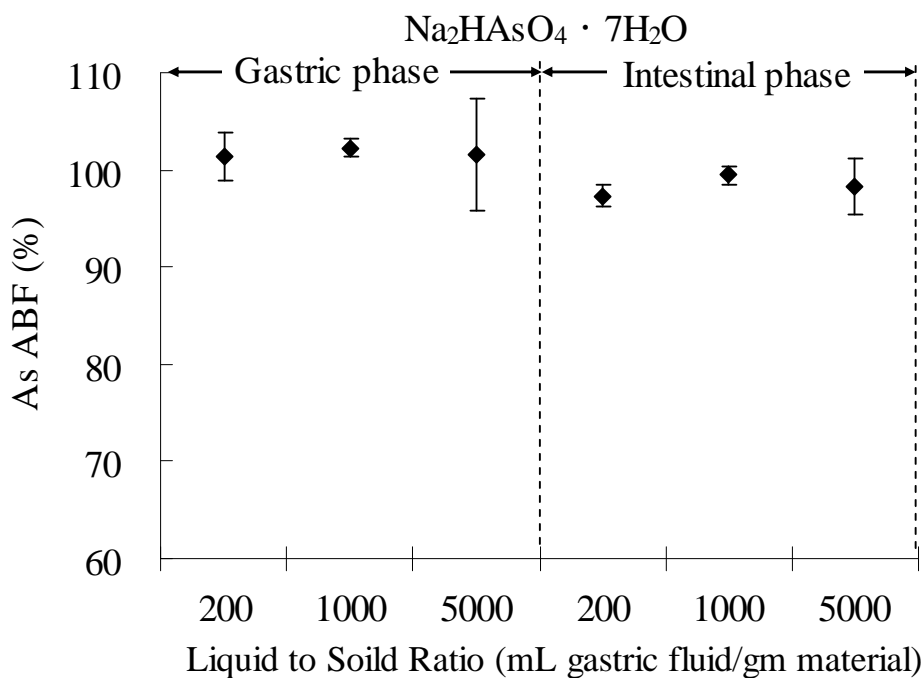


圖 4-7：液固比與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 砷 ABF 之關係圖

圖 4-8 為液固比與 NIST 2710 soil 中砷 ABF 的關係圖，在胃相中，液固比為 200:1、1000:1 與 5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為 $28 \pm 1.1\%$ 、 $39 \pm 9.7\%$ 、 $32 \pm 8.0\%$ ；在小腸相中，砷 ABF 平均值與標準

差也分別為 $26\pm 0.9\%$ 、 $29\pm 0.6\%$ 、 $32\pm 8.0\%$ ，從此數據得知，在胃相中，液固比似乎較不影響砷 ABF，但相對於小腸相，砷 ABF 隨液固比增加而增加。此外，比較胃相與小腸相之砷 ABF 發現，胃相之砷 ABF 似乎高於小腸相。

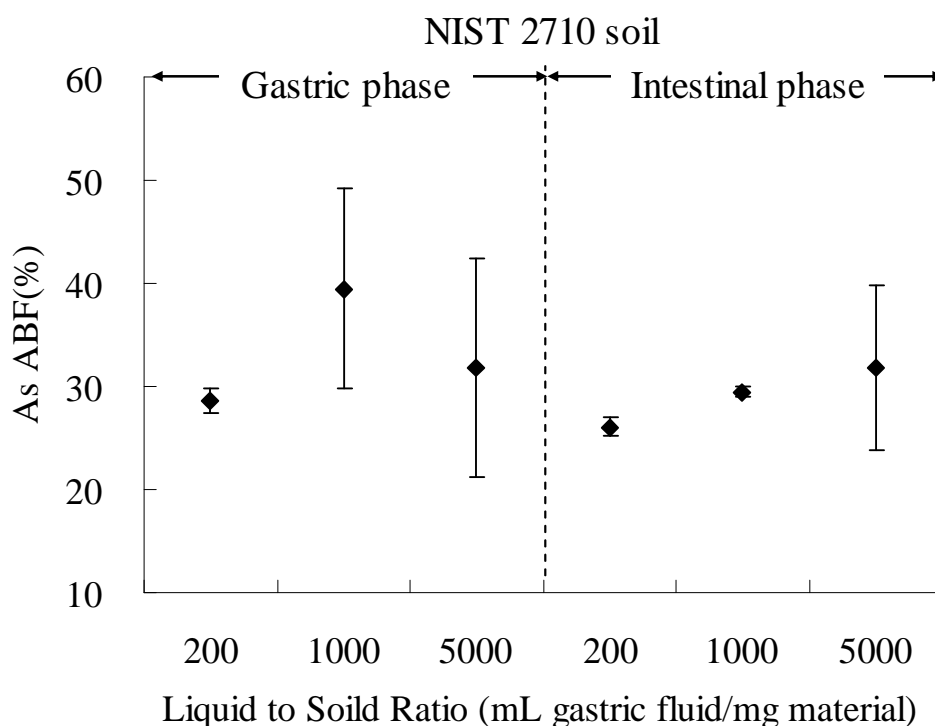


圖 4-8：液固比與 NIST 2710 soil 砷 ABF 之關係圖

綜合上述，圖 4-9 為 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 砷 ABF 於胃相與小腸相中，液固比與砷 ABF 之線性迴歸圖，從圖中可知， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於胃相與腸相時，砷 ABF 與液固比並無良好之關係性，而 NIST 2710 soil 於胃相中也並無良好之關係性，但於小腸相時，砷 ABF 與液固比呈高度相關 ($R^2=0.84$)，顯示 NIST 2710 soil 於小腸相中之液固比越高，砷 ABF 也會越高。

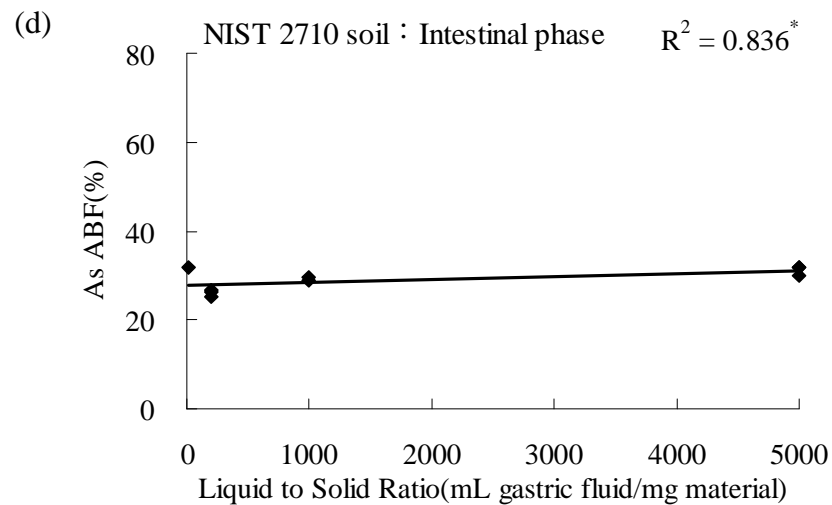
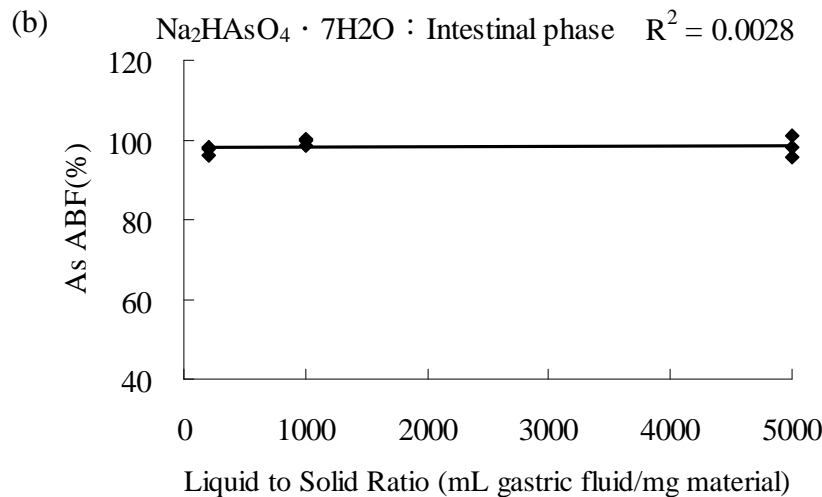
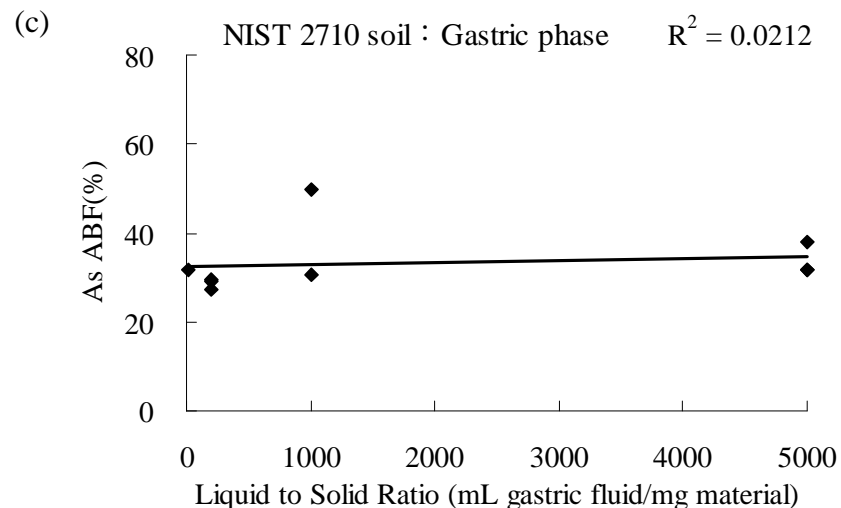
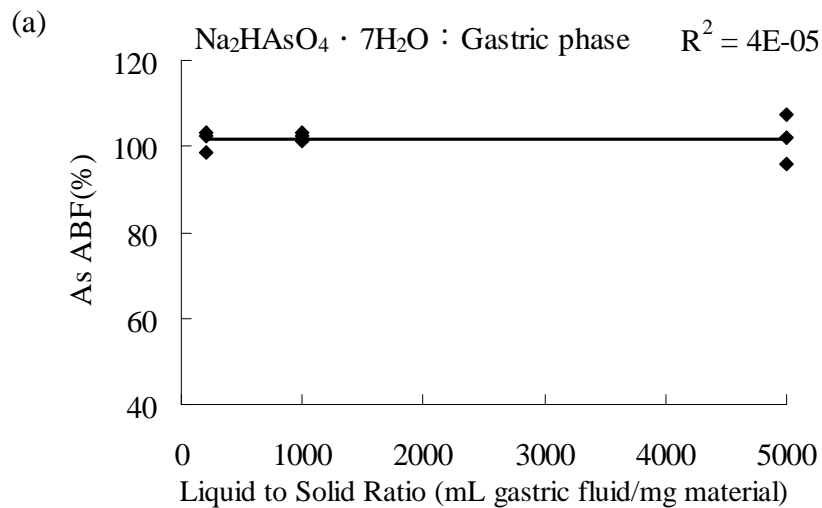


圖 4-9：液固比與砷 ABF 之迴歸圖(相關性)

表 4-5 為不同液固比時 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 之砷 ABF 之比較表，從表中可知，對 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 而言，胃相之砷 ABF 於不同蠕動強度中無顯著性的差異（101.4% vs. 102.3% vs. 101.2%, p value=0.952），而在小腸相中，液固比對砷 ABF 也無顯著性差異（97.3% vs. 99.4% vs. 98.3%, p value=0.400）。在 NIST 2710 soil 中，胃相之砷 ABF 於不同蠕動強度中無顯著性的差異（28.6% vs. 39.4% vs. 31.7%, p value=0.129），但在小腸相中，液固比對砷 ABF 呈顯著性差異（26.0% vs. 29.4% vs. 31.7%, p value<0.001）。

表 4-5：不同液固比時砷 ABF 之統計比較表

Liquid to Solid Ratio(ml /gm)	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		NIST 2710 soil	
	Gastric	Intestinal	Gastric	Intestinal
200:1 (n=3)				
ABF ¹ (%)	101.35	97.26	28.60	26.08
CV (%)	2.36	1.16	3.91	3.27
1000:1 (n=3)				
ABF ¹ (%)	102.27	99.44	39.47	29.48
CV (%)	0.97	0.94	24.66	1.96
5000:1 (n=3)				
ABF ¹ (%)	101.64	98.25	31.73	31.73
CV (%)	5.67	2.85	0.25	0.25
p value ²	0.952	0.400	0.129	<0.001*
Two sample ³				a, b, c

¹Values reported are mean percent ABF for three replicate samples.

²Mean difference statistics between liquid to solid ratio were generated using One-Way ANOVA test at p=0.05.

³Two-sample mean were compared using Bonferroin test at p=0.05, a=significantly different between 200:1 and 1000:1, b= significantly different between 200:1 and 5000:1, c= significantly different between 1000:1 and 5000:1

* P value ≤ 0.001

此外，不同液固比時，NIST 2710 soil 砷 RBF，如表 4-6 所示，於胃相分別為 28%、38%、32%，平均為 32.7%，CV 為 16.4%，於腸相中分別為 26%、28%、32% 平均為 29.3%，CV 為 9.5%，從此數據中顯示，於相同之液固比時，胃相較小腸相有高的 RBF，且於腸相中液固比越高時，砷 RBF 似乎越高。

表 4-6：不同液固比時 NIST 2710 soil 砷 RBF 之統計比較表

	Liquid to Solid Ratio(mL /gm)			Mean±CV(%) ³
	200:1	1000:1	5000:1	
RBF _G ¹ (%)	28.2	38.6	31.3	32.7±16.5
RBF _I ² (%)	26.8	28.8	32.3	29.3±9.5

¹RBF_G= relative arsenic bioavailability factor at the gastric phase(n=3)

²RBF_I= relative arsenic bioavailability factor at the intestinal phase(n=3)

³Mean= As RBF in all Liquid to Solid Ratio; CV=coefficient of variation

本試驗探討 3 種不同液固比對砷生物有效性之影響，綜合上述研究結果發現，對 Na₂HAsO₄·7H₂O 而言，不同液固比對胃相與腸相之砷 ABF 中並無顯著性差異 (p=0.952)，顯示液固比對 Na₂HAsO₄·7H₂O 砷 ABF 並不影響，其可能原因為 Na₂HAsO₄·7H₂O 本身包封度低，溶解度變大，因此液固比對胃相與腸相之 ABF 較不影響，對 NIST 2710 soil 而言，不同液固比對胃相之砷 ABF 並無顯著性差異 (p=0.129)，但對腸相之砷 ABF 有顯著性差異 (p<0.001)，且液固比越高砷 ABF 也似乎越高，如圖 4-9(d) (R²=0.84)，其可能之原因為，胃相 pH 低，降低包封度，而溶解度變大，使得液固比對 ABF 之影響較小，於腸相高 pH 中，包封度增大，樣品之溶解度變小，使得液固比對 ABF 影響大，因此對包封度高之樣品如 NIST 2710 soil，若僅進行單相之胃相試驗時，會因溶解度變大，而使得液固比似乎不是一個重要的實驗條件。

此外，過去研究中 (Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1993; 1996; Rodriguez

et al., 1999 ; Sarkar *et al.*,2003) 大多使用低液固比 (14~150 mL/gm) , 唯 Hamel *et al.*, 1998 選用較大範圍之液固比 (100、200、500、1000、2000、5000 mL/gm) 進行試驗, 以探討液固比對生物有效性之影響。圖 4-10 比較過去研究 (Hamel *et al.*, 1998) 與 NIST 2710 soil 於一階段胃相試驗時 砷 RBF :

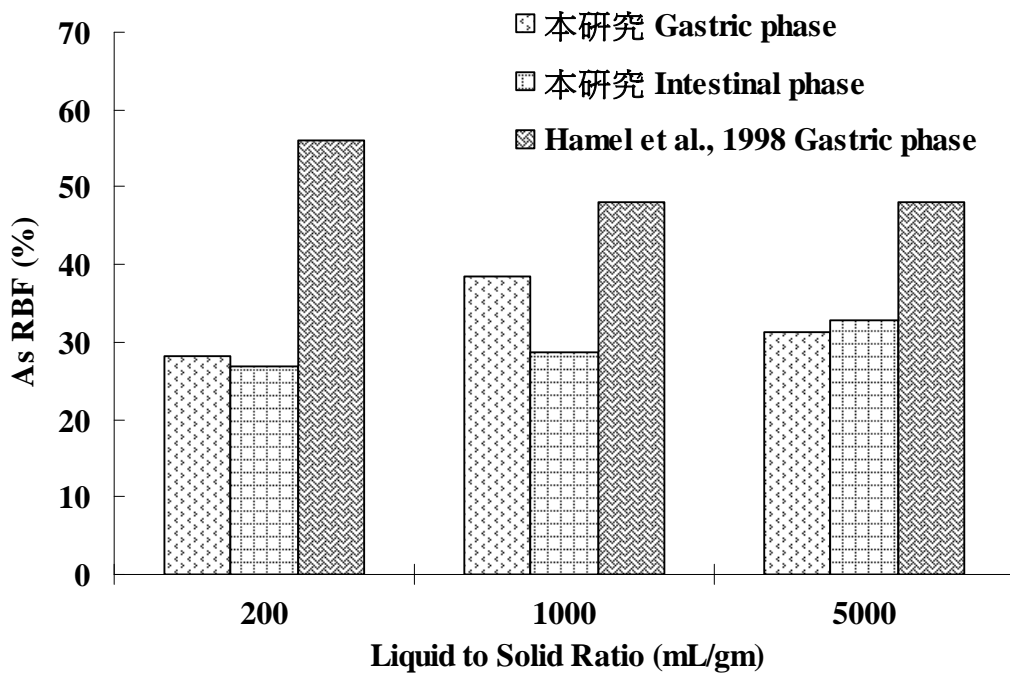


圖 4-10：不同液固比時 NIST 2710 soil 砷 RBF 與 Hamel *et al.*, 1998 之比較圖

從圖中可知本研究 NIST 2710 soil 相較於文獻, 於 200 : 1 (mL/gm) 液固比時砷 RBF_G 分別為 28%與 56% ; 於 1000 : 1 (mL/gm)液固比下分別為 38%與 48% , 於 5000 : 1 (mL/gm)液固比下分別為 32%與 48% , 比較兩研究之結果發現, 本研究一階段胃相試驗中 NIST 2710 soil 砷 RBF 於各組液固比中均低於文獻, 顯示本研究之生物有效性體外試驗之萃取效率低於文獻方法, 但文獻中並未進行二階段腸相試驗, 因此本研究二階段腸相試驗之砷 RBF 雖無法與文獻評比, 但從圖中仍可發現, 本研究體

外試驗包括一階段與二階段之 RBF 均低於文獻，相較於本研究與文獻發現，由於二者之試驗設計不同：胃蠕動方式、胃相反應時間、胃液酵素濃度與液固比之備製方式，如下表所示，又文獻中並無提供 SRM 之 ABF，導致本研究無法與文獻值做評比，因此造成本研究 RBF 較文獻值低之原因仍然尚待釐清。

表 4-7：本研究試驗參數及 RBF 與文獻之比較表

	本研究			Hamel <i>et al.</i> , 1998		
Mixing	磁力攪拌			Water bath shake		
NaCl	0.15M			0.13M		
pepsin	12.5 mg/L			12.8 mg/L		
Gastric phase	1hr			2hr		
Liquid to solid ratio (mL/gm)	Volume (mL)	NIST 2710 soil (mg)	RBF (%)	Volume (mL)	NIST 2710 soil (mg)	RBF (%)
200:1	500	2.5	28	100	0.5	56
1000:1	500	0.5	38	500	0.5	46
				50	0.05	48
5000:1	500	0.1	32	250	0.05	48

又本研究發現文獻中 (Hamel *et al.*, 1998) 之排空比乃是胃液與食物之比值，而非體外試驗中胃液對毒性物質 (土壤) 之比值，因此本研究之液固比與文獻之排空比意義不同，且文獻中 (Rodriguez *et al.*, 1999) 探討麵糰 (dough, 200 gm) 的添加與否對 slag 砷的生物有效性無影響，而樣品 calcine 中，添加麵糰 (200 gm) 提升砷 RBF 約 33-66%，但原因與機制仍不明確，因此本研究液固比主要是以不添加食物進行體外試驗，但因動物試驗均將待測樣品包裹與食物中，因此若與動物試驗評比，體外試驗因無添加食物可能會降低胃腸酵素與待測物質作用之效能，而降低生物有效性。

4-4 小腸相萃取時間試驗

本研究將小腸萃取時間延長為 11 小時，並每隔 1 小時萃取樣品，分別量測 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 NIST 2710 soil 之總砷濃度變化，圖 4-11 為小腸相萃取時間 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 之總砷濃度之關係圖， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於 pH 為 5.5 的小腸相之第 1 小時中，總砷濃度為 253 mg/L，第 2 至 11 小時總砷濃度為 253-260 mg/L，而 NIST 2710 soil 於小腸相之第 1 小時總砷濃度為 0.20 mg/L，第 2 至第 11 小時總砷濃度為 0.19-0.20 mg/L。

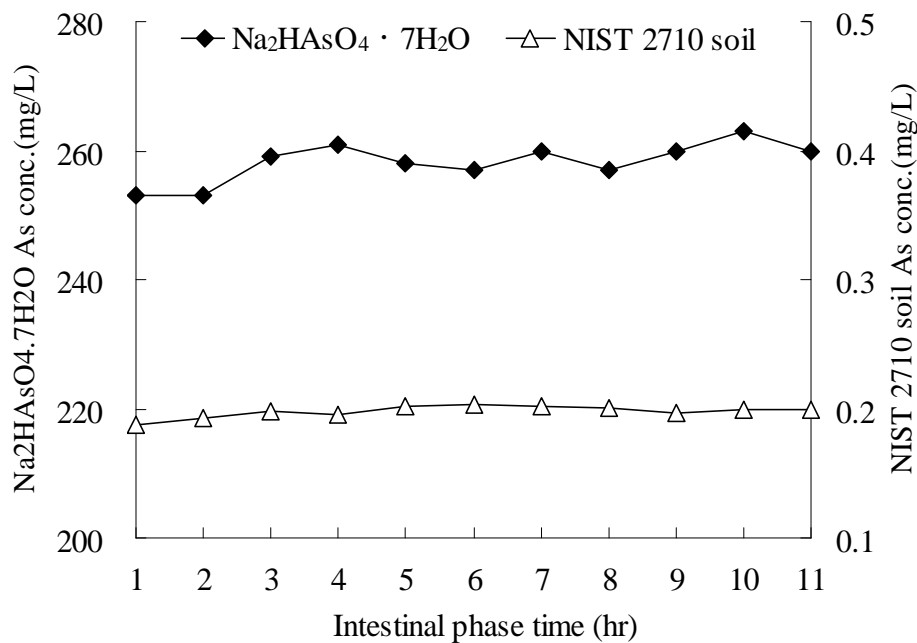


圖 4-11：小腸相萃取時間與總砷濃度之關係圖

此外若以 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 砷濃度以第 1 小時之小腸相總砷濃度為基準，第 2 至第 11 小時總砷濃度相較於第 1 小時之偏差程度，如下表 4-8 所示，平均總砷濃度之偏差為 2.3%，而對 NIST 2710 soil 而言，同樣以第 1 小時總砷濃度為基準，其第 2 至 11 小時總砷濃度相較於第 1 小時，平均總砷濃度偏差 4.7%。

表 4-8：小腸相萃取時間與總砷濃度之關係表

Intestinal phase (hr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mean ¹
Na ₂ HAsO ₄ · 7H ₂ O As conc. (mg/L)	253	253	259	261	258	257	260	257	260	263	260	259
relative error ² (%)	0	0	2.4	3.2	2.0	1.6	2.8	1.6	2.8	4.0	2.8	2.3
NIST 2710 soil As conc. (mg/L)	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
relative error ² (%)	0	0	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	4.7

¹ values reported are from 2 to 11 Intestinal extract hours

² relative error=(C₁-C_i)/C_i *100%, C₁= As conc at first intestinal phase.C_i= As conc at i intestinal phase.

圖 4-12 為小腸相萃取時間與 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 及 NIST 2710 soil 之砷 ABF 之關係圖，從圖中可知，小腸相 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 砷 ABF 於第 1 小時與第 2-11 小時大致相等，平均為 105%。而 NIST 2710 soil 砷 ABF 於第 1 小時相較於第 2-11 小時大致相等，平均約為 30%。上述之結果顯示，對 Na₂HAsO₄ · 7H₂O 與 NIST 2710 soil 而言，小腸相萃取時間為 2-11 小時所萃取之總砷濃度雖然較 1 小時所萃取之濃度高，但其高估的程度僅 2.3~4.7%，隨小腸相反應時間之增加，總砷濃度似乎無太大之差異，因此，於生物有效性體外試驗中，以 1 小時做為小腸相萃取時間應已達完全反應。

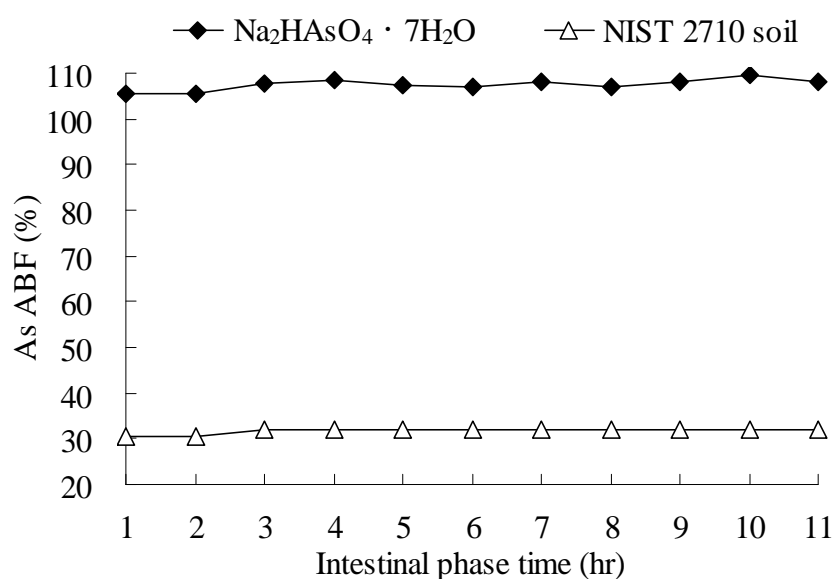


圖 4-12：小腸相萃取時間與砷 ABF 之關係圖

4-5 品管基準分析

為了解體外試驗之可靠性，一般而言，應進行標準管制樣品 (control sample) 之平行測定。綜觀過去研發之體外試驗方法，多數並未報告各種管制樣品測定結果 (Kelley *et al.*, 2002; Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1993; 1996; Rodriguez *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2003)，如 PBET (Ruby *et al.*, 1996)、IVG 與 IVG-AB (Rodriguez *et al.*, 1999)、IVG-S 與 IVG-AI (Sarkar *et al.*, 2003) 僅報告 RBF，但未報告 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的 ABF，且亦未使用一致的標準土壤，故不易評比不同試驗的萃取效率，且由於各試驗程序與條件不盡相同，導致無法評比不同試驗結果。

因此，本研究參考江等 (江等, 2002) 建立之管制樣品有：空白管制、重複管制、SRM 管制與介質標準管制，試劑空白管制是用於了解試驗過程中是否受污染。為了解試驗方法之複現性及準確性，應平行測定 SRM，並進行 3~5 次重複試驗，以求得 ABF 之變異係數 (CV)。若必須求得 RBF，則應進行 3~5 重複介質標準樣品 (如美國 NIST 土壤)，亦可決定其 CV 值，作為評比不同方法的萃取效率。當測定待測樣品時，必須平行分析這些管制樣品，當管制樣品的試驗結果符合品管基準時，才能接受待測樣品的試驗結果。

本研究各項管制項目之實測值如表 4-9 所示，試劑空白分析濃度均低於方法偵測極限，顯示試驗中並無受污染，可接受待測樣品之分析濃度值；SRM 與介質標準重複管制樣品中，於不同蠕動強度與不同液固比試驗中均進行 3 重複試驗，SRM 之重複管制 ABF_G 為 95~102%，標準偏差為 1~6%， ABF_I 為 97~100%，標準偏差為 1~2%，重複試驗均有良好之複現性；而介質標準管制 RBF_G 為 28~58%，標準偏差為 5~10%， ABF_I 為 26~55%，標準偏差為 3~10%。

針對本研究之品管實測值，本研究建議品管基準如下：空白管制樣品

濃度要低於方法偵測極限，才可接受待測樣品之結果；標準砷酸鈉 ABF_G 平均值與標準偏差為 $100\pm 6\%$ ， ABF_I 為 $100\pm 2\%$ ；NIST 標準土壤 RBF_G 平均值與標準偏差為 $40\pm 10\%$ ， RBF_I 為 $36\pm 10\%$ 。

表 4-9：本研究生物有效性體外試驗之管制項目實測值

	實測值	建議管制基準
空白管制	ND.	濃度 < MDL
SRM 標準管制		
ABF_G (n=6)	95~102%, SD=1~6%	100±6%
ABF_I (n=6)	97~100%, SD=1~2%	100±2%
介質標準管制		
RBF_G (n=6)	28~58%, SD=5~10%	40±10%
RBF_I (n=6)	26~55%, SD=3~10%	36±10%

ND.=non-detected (Method Detection Limit=0.0397 mL/gm)

4-6 砷終身致癌風險數學模式

獲得 NIST 2710 soil 砷 RBF 後，便可評估致癌風險，利用第二章 2-1 節之公式(5)便可推估該物質之終身致癌風險 (excess lifetime cancer risk, ELCR)，公式(5)如下：

$$ELCR_{x,i} = \frac{(UCR_i) \times (LID_x) \times (RBF_{x,i})}{(BW) \times (AT)} \quad (5)$$

UCR_i=目標污染物 i 之單位致癌風險 (unit cancer risk, (mg/kg BW-d)⁻¹)

LID_x=樣品 X 之平均終身攝入該物質劑量 (lifetime intake dose, mg)

$$=C_T \times IR \times EF \times ED$$

其中，C_T為目標污染物 i 在樣品 X 中之濃度，單位 mg/gm；IR 為攝取率 (ingestion rate, gm/day)；EF 為暴露頻率 (exposure frequency, day/year)；ED 為暴露期間 (exposure duration, year)

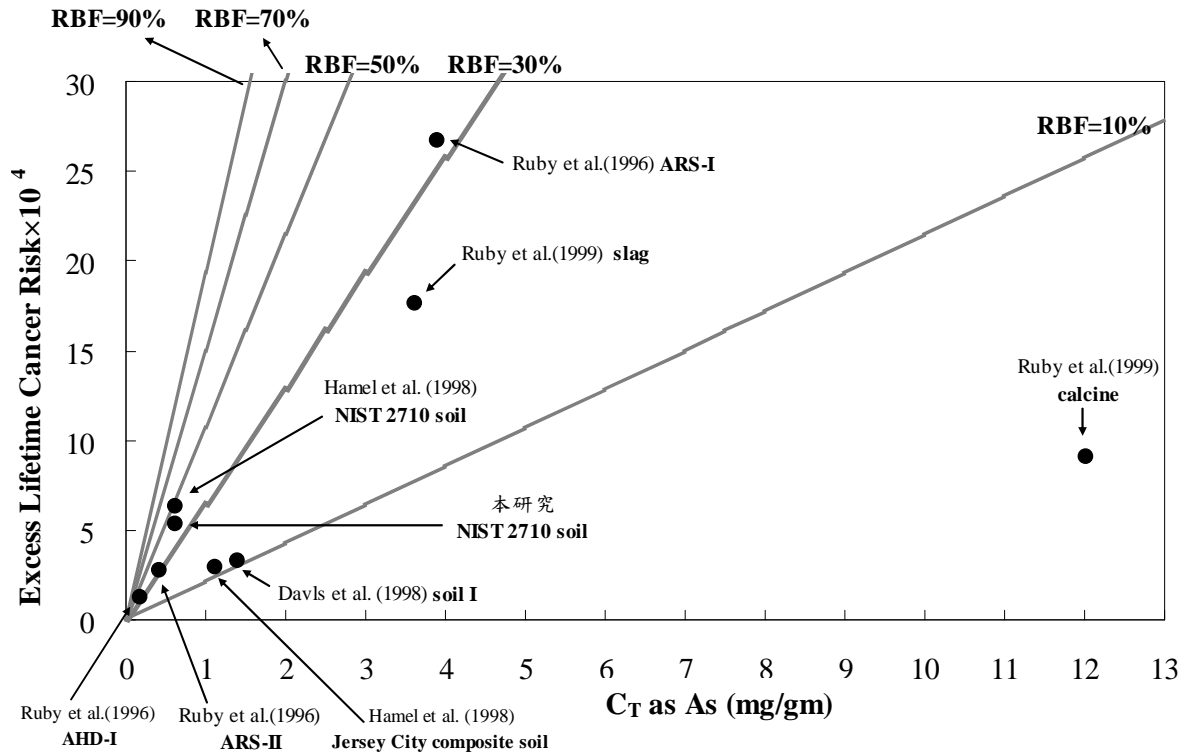
RBF_{x,i}=目標污染物 i 於樣品 X 中之 RBF

BW=為受評估族群之平均體重 (kg)

AT=該族群總平均終身攝入時間 (day)

利用生物有效性體外試驗及上述公式便可求算出不同土壤之 RBF 及土壤中目標污染物之濃度 (C_T) 以建立砷之終身致癌風險估算模式，如下圖所示，此圖為土壤中砷不同全量濃度 (C_T) 及 RBF 對終身致癌風險敏感度分析，主要係以下列之慣用值建構而成：根據美國環保署 Integrated Risk Information System (IRIS, 1998) 資料顯示，砷屬 Group A 為確定人類致癌物，經食入途徑之 UCR 高達 1.5 (mg/kg BW-d)⁻¹，IR 之慣用值 (default value) 為 0.1 gm/day，EF 為 350 days/year，ED 為 24 year (賴, 2003)，BW 為 70 公斤 (賴, 2003)；A_T 為 24 year (賴, 2003)，從圖中可見，於相同

C_T 中，RBF 越高終身致癌風險越高；於相同之 RBF 中， C_T 越高終身致癌風險也會越高。



本研究砷終身致癌風險使用之慣用值如下：

$UCR_{Oral, As} = 1.5 \text{ (mg/kg BW-d)}^{-1}$ (IRIS, 1998)； $IR = 0.1 \text{ gm/day}$ ， $EF = 350 \text{ days/year}$ ， $ED = 24 \text{ year}$ ， $BW = 70 \text{ 公斤}$ ； $A_T = 24 \text{ year}$ (賴, 2003)，

圖 4-13：土壤中砷濃度(C_T)及 RBF 對終身致癌風險之關係圖

而本研究 NIST 2710 soil 砷之 C_T 為 0.626 mg/g ，且其胃相 RBF 平均為 40%。因此根據公式(5)可估算食入 NIST 2710 soil 之砷終身致癌風險如下：

$$\begin{aligned}
 ELCR_{NIST\ 2710\ soil, As} &= \frac{(UCR_{As}) \times (LID_{NIST\ 2710\ soil}) \times (RBF_{NIST\ 2710, As})}{(BW) \times (AT)} \\
 &= \frac{1.5 \left(\frac{\text{kg BW} - \text{day}}{\text{mg}} \right) \times \left(0.626 \frac{\text{mg}}{\text{gm}} \times 0.1 \frac{\text{gm}}{\text{day}} \times 350 \frac{\text{days}}{\text{year}} \times 24 \text{ years} \right) \times 40\%}{70 \text{ kg BW} \times 24 \text{ year} \times 350 \left(\frac{\text{day}}{\text{year}} \right)} \\
 &= 5.36 \times 10^{-4}
 \end{aligned}$$

從上述估算中，求得 NIST 2710 soil 砷的終身致癌風險為 5.36×10^{-4} 。本研究將所獲得 NIST 2710 soil 與文獻中不同物質之終身致癌風險值標示於該圖，從圖中可知，過去研究所使用之物質中，砷 C_T 為 0.01~1.5 mg/gm，RBF 範圍為 10~50%，而 ELCR 為 $1.3 \sim 3.3 \times 10^{-4}$ ，另比較本研究與 Hamel *et al.* (1998) 之 NIST 2710 soil 之 ELCR 發現，因本研究胃相 RBF (40%) 低於文獻值 (47%)，而使得本研究之 ELCR 略低於文獻，但相較於其他物質，NIST 2710 soil 之 ELCR 略高，此外圖中另發現 Ruby *et al.*, (1996; 1999) 之 ARS-I、slag 與 calcine 之總砷濃度(C_T)相當高，其中又以 calcine 最大，其次為 ARS-I，最低為 slag，雖然以 calcine 之 C_T 為最大，但其包封度為 ARS-I > slag > calcine，因此其 RBF 之大小為 ARS-I > slag > calcine，因此在 C_T 與 RBF 均高之情況下，從圖中可明確的發現 ARS-I 之 ELCR 高達 26.74×10^{-4} ，slag 為 17.58×10^{-4} ，calcine 為 9.06×10^{-4} ，因前人研究之物質，大多屬有害物質，因此終身致癌風險值均高出可接受之範圍 ($10^{-6} \sim 10^{-4}$) 甚多，特別是以 ARS-I、slag 與 calcine 之致癌風險值為最高，主要原因乃由於攝入率之慣用值高達 0.1 gm/day 且體重為 70 kg 所產生風險估算之不確定性，因此估算之風險值便高出合理範圍甚多。此外根據上述之公式發現，於不同研究中，若固定 IR 與 BW，EF 與 ED 雖使用之數值不同，但於分子與分母中均會互相抵消，而使得 ELCR 之大小受待測樣品之 C_T 與 RBF 二項參數之影響，若 C_T 與 RBF 之乘積越大，ELCR 會越大，因此於風險值之推估過程中， C_T 與 RBF 為十分重要之影響因子。透過本研究生物有效性研究試驗，已初步建立經由食入途徑中目標污染物砷之終身致癌風險預估模式，於後續研究中仍將陸續以生物有效性體外試驗進行研究，建立 multiple-metal 之終身致癌風險數學模式，作為風險評估之依據。

4-7 小腸吸收作用之模擬

本研究二階段之小腸相萃取使用不吸收之方式進行試驗，主要乃是假設小腸之吸收作用為 100% 吸收而進入血液中，因此，溶解於二階段腸相之砷總量 (M_I) 與待測污染物中砷全量 (M_T) 之比例為腸相之 ABF，但 Rodriguez *et al.* (1999) 主要是以 IVG 與 IVG-AB 進行體外試驗，於 IVG 試驗中，二階段腸相 ABF 之算法與本研究相同，IVG-AB 試驗中，二階段腸相 ABF 為吸收劑吸收之砷總量 (M_{ab}) 與 M_T 之比例，一般而言，小腸之吸收率並非為 100%，因此 $M_I \geq M_{ab}$ ，但比較 IVG 與 IVG-AB 試驗之二階段腸相 RBF 顯示：

1. IVG-AB 試驗中腸相之 RBF 均高於 IVG 試驗 (15.3% vs. 14.8%)，顯示增加了吸收作用之 IVG-AB 試驗提高了萃取效率。
2. 文獻中將二階段腸相之 RBF 與動物試驗做線性迴歸發現，IVG 試驗與動物試驗有良好之線性關係 (slope=0.76, r=0.82)，且 IVG-AB 試驗也與動物試驗成良好之線性關係 (slope=0.74, r=0.79)，雖 IVG 與 IVG-AB 試驗均低估動物試驗，但 IVG 試驗似乎是較能準確推估動物試驗之 RBF。

自上述第一點結果中，雖 IVG-AB 試驗使用小腸吸收作用，提高了萃取效率，但從 IVG 與 IVG-AB 試驗之腸相 RBF 數據可推算出此研究之 $M_I \leq M_{ab}$ ，似乎與理論不符，而結果二之線性迴歸中卻顯示 IVG 比 IVG-AB 試驗較能準確評估動物試驗，經本研究探討後發現此二點結果產生相當大之矛盾，因此對於 Rodriguez *et al.*, (1999) 之研究結論認為使用吸附劑來模擬小腸之吸收作用較能準確評估人體生物有效性實為最大之疑點。但為了能簡化生物有效性之體外試驗程序，本研究以不使用吸

附劑進行腸相萃取試驗，雖本研究未始用吸收劑，無法估算使用吸收劑是否會提升 RBF，但文獻中胃相之 RBF 較接近於動物試驗，且胃相之 RBF 均較腸相高，因此即使不模擬吸收作用，使用一階段胃相之 RBF 仍是較保守的推估。

第五章 結論與建議

本研究參考文獻，研擬一種模擬胃腸環境的兩階段生物有效性體外試驗評估程序，並嘗試自行設計之反應槽與溫控系統進行仍有疑義的操作參數的探討：氧化還原電位、胃蠕動強度、液固比、小腸相萃取時間，藉此研擬系統建立品管基準與砷終身致癌風險數學模式，結論與建議分述如下：

6-1 氧化還原電位之監測

本研究採用密閉式反應槽設計，以不通入氫氣維持厭氧，測量氧化還原電位，對 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 而言胃相 ORP 為 +220 mv，小腸相為 +46 mv，NIST 2710 soil 胃相為 +265 mv，小腸相為 +80 mv，而文獻中發現人體胃相之 ORP 為 +150 mv，小腸相為 -50 mv，探討之結果發現由胃相至小腸相 ORP 降低主要受 pH 影響，pH 越高 ORP 越低，且本研究體外試驗之反應槽雖採密閉系統，並未另外通入惰性氣體（氫氣）維持厭氧，導致反應槽中可能尚有溶氧存在，因 DO 越高 ORP 會越高，使得本研究之 ORP 較人體胃腸環境高出許多，而 ORP 對生物有效性之影響尚待研究，建議後續進行厭氧控制，並監測溶氧，並利用化學物種平衡模式探討三價砷與五價砷在胃腸環境中的分配。

6-2 蠕動強度試驗

1. 本研究探討不同速度梯度（0、470 與 1006 sec^{-1} ）對生物有效性之影響，研究結果顯示，樣品 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於胃相中不同 G 值對 ABF 有顯著性差異（ $\text{ABF}_G=95\%$ 、 102% 與 102% ， $p=0.004$ ），於腸相中無顯著性差異（ $\text{ABF}_I=99.9\%$ 、 99.4% 與 99.4% ， $p>0.05$ ），因 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解度（ $5.46 \text{ gm}/100 \text{ mL at } 0^\circ\text{C}$ ）遠高於本試驗濃度，且不論於 pH 較

低之胃相或高 pH 之腸相中，並無顯著包封度，使得 G 對 ABF 之影響變小，而胃相中 ABF 有顯著性差異，可能原因為本實驗誤差所致，並無其他合理解釋。

2. 本研究探討不同速度梯度 (0、470 與 1006 sec^{-1}) 對生物有效性之影響，研究結果顯示，樣品 NIST 2710 soil 於胃相中不同 G 值時 ABF 無顯著性差異 ($\text{ABF}_G=42\%$ 、 40% 與 58% , $p=0.777$)，於腸相中亦無顯著性差異 ($\text{ABF}_I=40\%$ 、 30% 與 54% , $p=0.115$)，大致而言，蠕動強度似乎不是一個重要的試驗條件，本研究仍建議胃相中 G 值暫訂為 470 sec^{-1} 。
3. 本研究 3 組不同蠕動強度試驗中，NIST 2710 soil 砷 RBF_G 平均為 47% (46% 、 38% 、 58%)，CV 為 20%，砷 RBF_I 平均為 41% (40% 、 28% 、 54%)，CV 為 31%。

6-3 液固比試驗

1. 本研究探討不同液固比 (200、1000 與 5000 mL/gm) 對生物有效性之影響，研究結果顯示，樣品 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於胃相中不同液固比時對 ABF 無顯著性差異 ($\text{ABF}_G=102\%$ 、 102% 與 101% , $p=0.952$)，於腸相中亦無顯著性差異 ($\text{ABF}_I=98\%$ 、 99% 與 98% , $p=0.400$)，可能之原因為本試驗之濃度遠小於 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之溶解度，無顯著包封度，使得液固比對 ABF 之影響變小，液固比似乎不是一個重要的試驗參數。
2. 本研究探討不同液固比 (200、1000 與 5000 mL/gm) 對生物有效性之影響，研究結果顯示，NIST 2710 soil 於胃相中不同液固比時對 ABF 無顯著性差異 ($\text{ABF}_G=28\%$ 、 40% 與 32% , $p=0.129$)，此結果與文獻 (Hamel *et al.*, 1998) 相符；於腸相中有顯著性差異 ($\text{ABF}_I=26\%$ 、 30% 與 32% , $p<0.001$)，且液固比愈高砷 ABF 似乎越高 ($R^2=0.84$)，可能

之原因為腸相 pH 較胃相高，包封度變大，使得液固比對 ABF 之影響變大，而導致腸相之 ABF 有顯著性差異。

3. 根據本研究結果，樣品之包封度受 pH 影響，pH 越低，包封度會越小，溶解度會增大，因此對於包封度較大之樣品，若僅以胃相進行試驗，會因胃相 pH 低，導致包封度降低，而使得溶解度變大，導致液固比可能不是一個重要的試驗條件，本研究仍建議在胃相中液固比暫訂為 1000 mL/gm。
4. 在 200、1000 與 5000 mL/gm 液固比中，本研究 NIST 2710 soil 砷 RBF_G 平均為 32% (28%、38%、32%)，CV 為 16%，砷 RBF_I 平均為 30% (26%、28%、32%)，CV 為 10%，另發現本研究 RBF_G 較 Hamel *et al.* (1998) 50% (56%、46%、48%) 低，但文獻中未提供 SRM 之 ABF，因此無法探討原因。

6-4 小腸相萃取時間試驗

$Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 於小腸萃取時間為 1 小時之砷濃度為 253 mg/L，第 2-11 小時所萃取之總砷濃度平均為 259 mg/L，總砷濃度相對偏差為 2.3%；NIST 2710 soil 小腸相反應時間為 1 小時之砷濃度為 0.19 mg/L，第 2-11 小時所萃取之總砷濃度平均為 0.20 mg/L，總砷濃度相對偏差為 4.7%，雖 1 小時萃取時間之砷濃度有些微低估，但其濃度偏差程度低，於第 1 小時總砷濃度相較於第 2-11 小時之平均濃度似乎無太大之差異，因此於生物有效性體外試驗中，建議以 1 小時做為小腸相萃取時間。

6-5 品管基準分析

本研究建立四種管制樣品：空白管制、重複管制、SRM 管制及介質標準管制，根據本研究砷之生物有效性體外試驗，建議之品管基準為：試劑空白之濃度應低於方法之偵測極限值；標準砷酸鈉 ABF_G 平均值與標

準偏差為 $100\pm 6\%$ ， ABF_I 為 $100\pm 2\%$ ；NIST 標準土壤 RBF_G 平均值與標準偏差為 $40\pm 10\%$ ， RBF_I 為 $36\pm 10\%$ 。

6-6 砷終身致癌風險數學模式

1. 本研究以胃腸消化環境之生物有效性體外試驗進行研究，藉由各物質之 RBF 建立砷終身致癌風險數學模式，研究中發現，使用 IRIS 單位致癌風險係數為 $1.5 \text{ (mg/kg-d)}^{-1}$ ，當攝入率 (IR) 為 0.1 gm/day 且平均體重 (BW) 為 70 kg 時，過去前人研究之不同物質之 ELCR 範圍為 $1.3\sim 26.7\times 10^{-4}$ ，均較可接受範圍 ($10^{-6}\sim 10^{-4}$) 高，但由於上述攝入率高達 0.1 gm/day ，因此估算風險值時實為高出可接受範圍甚多，顯示受污土壤及廢棄物資源化所引起的健康風險是一個值得注意的問題。
2. 本研究發現，若將 IR 與 BW 固定，ELCR 之大小只受待測樣品之 C_T 與 RBF 二項參數影響，若 C_T 與 RBF 之乘積越大，ELCR 會越大，因此於風險值之推估過程中， C_T 與 RBF 為十分重要之影響因子。於後續研究中仍將陸續以生物有效性體外試驗進行研究，建立 multiple-metal 之終身致癌風險數學模式，作為風險評估之依據。

參考文獻

外文部份：

- Agency for Toxic Substances and Diseases Registry(ATSDR) US. Public health service. Toxicological profile for arsenic. Washington DC:US Public Health 1989.
- Buched JP, Lauwerys R, Roel H. Comparision of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single dose of sodium arsenite monomethyl arsonate or dimethyl arsinatate in man. *Int Arch Occup Environ Health* 1981a 1981;48: 71-9.
- Caussy D. Case studies of the impact of understanding bioavailability : arsenic. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;56:164-73.
- Cerra FJ, Maisel JW. *Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse*, second edition, 1979;200&875.
- Challenge Environmental System, INC. *Velocity Gradient for Challenge JTA-200 Jar Testers*. Gainesville, Arkansas, 2002.
- Chen CJ, Wu MM, LEE SS, Wang JD, Cheng SH, Wu HY. Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water: multiple risk factor and related malignant neoplasms of blackfoot disease. *Arteriosclerosis* 1988;8:452-60.
- Davls A, Ruby MV, Bergstrom PD. Bioavailability of arsenic and lead in soils from the Butte, Montana, mining district. *Environ Sci Technol* 1992;26:461-8.
- Environmental Protection Agency. *National primary drinking water regulation ; Arsenic and clarifications to compliance and new source contaminant monitoring ; Final rule*. *US Fed Reg* 66, 2001:6076-7066.
- Garland M, Morris JS, Rosner BA, Stampfer MJ, Spate VL, Baskett CJ, Willett WC, Hunter DJ. Toenail trace element levels as biomarkers : reproducibility over a 6-year period. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*

1993;2:493-7.

Hamel SC, Buckley B, Liroy P J. Bioaccessibility of metals in soils for different liquid to solid ratios in synthetic gastric fluid. *Environ Sci Technol* 1998;3:358-62.

Heydom K. Environmental variation of arsenic levels in human blood determined by neutron activation analysis. *Clin Chim Acta* 1970;28:349-57.

Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV. Assessing oral bioavailability of metal in soil. Columbus, Ohio, USA: Battelle Press, 2002:4-79.

Lai RJ, Hudson HE, Sihgley JE. Velocity gradient calibration of Jar-test equipment. *J AWWA* 1975;67:553-7.

Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Pace LW. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and soils media. *Environ Sci Technol* 1999;33:642-9.

Ruby MV, Davis, A, Link TE, Schoof R, Chency RL, Freeman GB, Bergstrom P. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ Sci Technol* 1993;27:2870-7.

Ruby MV, Davis, A, Schoof R, Eberle S, Sellstone CM. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environ Sci Technol* 1996;30:422-30.

Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Post G, Harnois M, Mosby DE, Casteel SW, Berti W, Carpenter M, Edwards D, Cragin D, Chappell W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ Sci Technol* 1999;33:3697-705.

Sarkar D, Datta R. A modified in vitro method to assess bioavailable arsenic in pesticide-applied soils. *Environ Pollut* 2003;126:363-6.

- Tchounwou PB, Wilson B, Ishaque A. Important consideration in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compound in drinking water. *Review on Environ Health* 1999;14:211-29.
- Thompson DJ. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem-Biol Interact* 1993;88:89-114.
- U.S. EPA. Guidance Manual for the Integrated Exposure Uptake Biokinetic Model for Lead in Children. Washington, D.C:US Environmental Protection Agency, Office of Emergency and Remedial Response. 1994.
- Vahter M, Norin H. Metabolism of ⁷⁴As-labelled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ Res* 1980;21:446-57.
- Vahter M. Metabolism of Arsenic. In: Fowler BA ed. *Biological and Environmental Effects of Arsenic*. New York : Elsevier, 1983:171-98.
- Vahter M, Marafance E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in the rabbit. *Chem-Biol Interact* 1985;56:225-38.
- World Health Organization. *Environmental health Criteria 18 : Arsenic*. Geneva : World Health Organization, 1981.
- World Health Organization. *WHO Guideline for Drinking Water Quality*. Vol. 1 Geneva, Switerland : World Health Organization, 1993.
- Yamauchi H, Takahashi K, Mashiko M, Yamamure Y. Biological monitoring of arsenic exposure of gallium arsenide and inorganic arsenic-exposed worker by detemination of inorganic and its metabolites in urine and hair. *Am Ind Hyg Assoc J* 1989;50:606-12.

中文部份：

- 王前淇：ORP 對固定化污泥反應器操作之影響。國立清華大學化工研究所碩士論文，1995。
- 江舟峰、紀子文、吳勇興：以稀釋法測定生化需氧量之品管基準與最新趨勢。朝陽學報、2002；7：247-59。
- 江舟峰、張芳華、許惠棕：資源性廢棄物生物有效性分析方法之探討。環境分析化學研討會、台南、2004。
- 江舟峰、張芳華、許惠棕：生物有效性體外試驗應用於健康風險評估之問題與展望、台灣衛誌 2005（投稿送審）。
- 江紹基：臨床胃腸病學。上海：上海科學技術出版社，1981；222-7。
- 光岡知足：腸內細菌の話。日本：波岩新書出版社，1978；82。
- 李旺祚、王秀伯：新編 Guyton 生理學下冊，第七版。台北：合記圖書出版社，1991。
- 陳得源、魏秀娟：胃腸生理學，初版。台北：合記圖書出版社，1984；35-65。
- 趙有誠：胃腸疾病學--病態生理研討，初版。台北：合記圖書出版社，1984；64-152。
- 賴俊雄：基礎毒理學，初版。台北：高立圖書有限公司，2003；306。

附錄一：本研究蠕動強度與液固比試驗之砷濃度原始數據

Veolcity Intensity (sec ⁻¹)	blank	Na ₂ HAsO ₄ · 7H ₂ O (mg/L)			NIST 2710 soil (mg/L)		
		1	2	3	1	2	3
0							
Gastric phase	ND.	234.3	220.4	227.1	0.200	0.398	0.204
Intestinal phase	ND.	238.4	239.2	242.1	0.188	0.382	0.196
470							
Gastric phase	ND.	247.5	242.9	246.3	0.192	0.312	0.236
Intestinal phase	ND.	236.2	240.5	239.7	0.180	0.186	0.188
1006							
Gastric phase	ND.	249.4	247.1	242.0	0.382	0.290	0.434
Intestinal phase	ND.	235.6	238.3	242.7	0.352	0.262	0.406

Liquid to solid (mL/gm)	blank	Na ₂ HAsO ₄ · 7H ₂ O			NIST 2710 soil		
		1	2	3	1	2	3
200:1							
Gastric phase	ND.	1230.5	1236.4	1183.9	0.923	0.906	0.856
Intestinal phase	ND.	1178.0	1173.0	1152.5	0.834	0.829	0.786
1000:1							
Gastric phase	ND.	247.5	243.0	246.3	0.192	0.312	0.236
Intestinal phase	ND.	236.2	240.4	239.6	0.180	0.186	0.188
5000:1							
Gastric phase	ND.	51.5	47.0	49.0	0.039	0.039	0.039
Intestinal phase	ND.	48.6	46.0	47.0	0.039	0.039	0.039

ND.=non-detected (method detection limit=0.0397mg/L)

附錄二：砷終身致癌風險數學模式

$$ELCR_{x,i} = \frac{(UCR_i)(LID_x)(RBF_{x,i})}{(BW)(AT)}$$

砷終身致癌風險數學模式

- UCR_i= 1.5 (mg/kg BW)⁻¹
- M= 1 mg/gm
- IR= 0.1 gm/day
- EF= 350 day/year
- ED= 24 year
- LID_x= 840 mg
- BW= 70 kg
- AT= 24 year
- RBF= 10 %
- ELCR= 0.075

C _T	RBF=0.1	RBF=0.3	RBF=0.5	RBF=0.7	RBF=0.9
	ELCR×10 ⁴	ELCR×10 ⁴	ELCR×10 ⁴	ELCR×10 ⁴	ELCR×10 ⁴
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	2.1429	6.4286	10.7143	15.00	19.286
2	4.2857	12.8571	21.4286	30.00	38.571
3	6.4286	19.2857	32.1429	45.00	57.857
4	8.5714	25.7143	42.8571	60.00	77.143
5	10.7143	32.1429	53.5714	75.00	96.429
6	12.8571	38.5714	64.2857	90.00	115.714
7	15.0000	45.0000	75.0000	105.00	135.000
8	17.1429	51.4286	85.7143	120.00	154.286
9	19.2857	57.8571	96.4286	135.00	173.571
10	21.4286	64.2857	107.1429	150.00	192.857
11	23.5714	70.7143	117.8571	165.00	212.143
12	25.7143	77.1429	128.5714	180.00	231.429
13	27.8571	83.5714	139.2857	195.00	250.714