

# 中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1801

胃腸生物有效性體外試驗品管基準與檢測  
方法之研究：以砷污染土壤為例

**Quality control criteria and test method for the  
gastrointestinal in-vitro bioavailability test using  
arsenic-contaminated soils**

所別：環境醫學研究所

指導教授：江舟峰 博士 Chiang Chow-Feng

學生：林家玉 Lin Chia-Yu

學號：9565001

中華民國九十七年七月

## 誌謝

終於要提筆寫最後的致謝，兩年的研究生生活點滴在心，隨著論文的完成即將告一段落，從大學開始做專題到研究所，一路走來，特別要感謝我的指導老師 江舟峰老師耐心的教誨與鼓勵，讓我知道從事研究應有的品質與態度以及待人處事的道理，從中不斷的自我學習與成長，感謝之意，非三言兩語可以表達，學生將銘記在心。

感謝中興大學盧至人老師與林耀東老師，在百忙中審閱論文，於口試期間指導與提供諸多寶貴的建議，受益良多，更讓論文得以更加流暢與完整。同時感謝中國醫藥大學環境醫學研究所全體教師與健康風險管理學系凌明沛老師於平時的指導與解惑，此外要感謝公衛系吳錦景老師在儀器分析上的指導與解惑。

感謝我的好朋友們，特別感謝佳璘和柏佐，在兩年的研生活中，給我課業及生活上的支持與鼓勵，因為有你們讓我在研究所兩年留下不少歡樂的回憶。也要感謝研究室的婷婷學妹、佩芳學妹與厚吾學弟以及研究助理佳蓉與偉翔，大家一起分擔研究室的事務、一起歡樂、互相鼓勵與支持，讓我可以專心理首於論文寫作中，以及大學部活潑好動的學弟妹們，研究室有你們充滿更多的歡樂，在此一併致上我深切的謝意。

最後要感謝家人的支持、包容與鼓勵，讓我有勇氣面對碩士兩年所有的挑戰與考驗，得以順利完成學業與論文之寫作。在此獻上衷心之感謝，並將此研究成果分享給支持我的人！

林家玉 謹誌于中國醫藥大學

2008年7月

## 摘要

為確保土壤及地下水資源的永續利用，世界各國大都訂有土壤重金屬的濃度標準。近年來，我國與歐美先進國家相繼提出污染場址健康風險評估，但在估算具包封度受污土壤健康風險時，其生物有效性 (bioavailability) 大都使用保守情境 (100 % 被人體胃腸吸收)，導致復育成本增加。美國環保署訂定超級基金場址 (Superfund site) 復育標準時，允許考量生物有效性，所謂絕對生物有效係數 (absolute bioavailability factor, ABF) 是指污染物進入血液的劑量與暴露劑量的百分比，相對生物有效係數 (relative bioavailability factor, RBF) 為待測樣品與標準樣品之 ABF 比值。若使用動物實驗評估，程序複雜且昂貴費時，因此美國於 1992 年開始發展一套模擬人體胃腸環境之體外試驗方法。本研究嘗試研擬我國之標準操作方法，建立系統品管基準，特別著重試驗設備與方法之簡化。

本研究參考美國環保署第 VIII 區生物有效性 physiologically based extraction test (PBET) 與前期研究體外試驗方法，第一階段模擬胃消化環境 (pH 1.8)，第二階段模擬小腸環境 (pH 7.0)。文獻中對於體外試驗操作參數與程序，如樣品前處理、溫度、酵素添加量、胃腸相 pH 值與反應時間等參數已漸趨一致，本研究針對尚未深入探討之重要參數進行試驗，以砷酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 與標準土壤 (NIST 2710 soil)，探討蠕動強度、液固比、小腸相萃取時間以及萃取液前處理方式對生物有效性之影響。

本研究建議標準操作程序：首先將樣品經風乾且過篩取粒徑  $< 250 \mu\text{m}$ ，取樣品量 0.5 gm，使用密閉血清瓶，有效容積 500 mL，且採用較易控制轉速之磁力攪拌，速度梯度 (G 值) 為  $470 \text{ sec}^{-1}$ ，同時採用氣控式溫度  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ；第一階段模擬胃消化環境，液固比 1000:1 mL/gm，僅添加 0.15 M NaCl 及 1 % porcine pepsin 製備胃液，以 HCl 溶液調整至  $\text{pH } 1.8 \pm$

0.1，反應 1 小時後，取萃取液經離心去除粒狀物後，以 ICP-MS 分析總砷濃度；第二階段為模擬小腸環境，僅添加 pancreatin 與 bile，以飽合  $\text{NaHCO}_3$  溶液將 pH 調整至  $7.0 \pm 0.1$  做為小腸液，反應 1 小時後，取樣經離心去除粒狀物後，以 ICP-MS 分析總砷濃度。

研究結果顯示，當液固比 1000:1 mL/gm 時，在 95% 信賴水準 (95% CI) 時，三種速度梯度 ( $G=0, 470, 1000 \text{ sec}^{-1}$ ) 對生物有效性無顯著性差異，胃相與腸相之砷酸鈉 ABF 為 82-96%，標準土壤 RBF 分別為 26-35% 與 27-29%。在三種液固比 (200:1, 1000:1, 5000:1 mL/gm) 時，除 NIST 2710 soil 之腸相外，其餘均無顯著性差異，胃相與腸相砷酸鈉 ABF 為 85-101%，標準土壤 RBF 分別為 29-33% 與 25-29%。在砷酸鈉與 NIST 2710 soil 之腸相萃取方面，以第 1 個小時為基準，第 2-11 小時平均濃度之相對誤差皆小於 10%，與前期研究相符，表示以 1 小時做為小腸相萃取時間是合宜的。萃取液前處理試驗中，砷酸鈉與 NIST 2710 soil 之胃與小腸相總砷濃度，95% CI 皆無顯著性差異。綜合上述結果，擬定四種品管基準：(1) 試劑空白砷濃度低於方法偵測極限；(2) 重複樣品管制，相對差異百分比為  $\pm 10\%$ ；(3) 砷酸鈉  $\text{ABF}_G$  與  $\text{ABF}_I$  平均值標準差分別為  $90 \pm 8\%$  與  $90 \pm 5\%$ ；(4) 標準土壤  $\text{RBF}_G$  與  $\text{RBF}_I$  分別為  $35 \pm 2\%$  與  $30 \pm 3\%$ 。

為進一步簡化試驗方法，建議將開放式反應槽改為密閉式；使用可調速磁力攪拌及具載重環磁石，取代昂貴之氬氣攪拌；將水浴溫控改為氣控式，以利試驗觀察與採樣。此外，小腸相萃取不使用吸附劑，萃取液前處理利用高速離心取代壓阻較高之過濾方式。本研究二階段試驗之生物有效性皆低估動物試驗 RBF，建議可將二階段胃腸體外試驗方法改為單相一階段生物有效性萃取 (simplified bioaccessibility extraction, SBET) 試驗方法。

關鍵字：生物有效性、體外試驗、標準操作方法、系統品管基準

## Abstract

In order to preserve underground water resource for sustainable use, most countries in the world have promulgated heavy metal standards for soil. Recently Taiwan and many other countries have proposed a variety of risk assessment methods for site remediation. But most of the methods normally assume 100% bioavailability for contaminated soils. The US Environmental Protection Agency (USEPA) allows for a modification of bioavailability in the Superfund Program. The absolute bioavailability factor (ABF) is defined as the dose percentage of contaminant in soil entering the blood circulation system, while relative bioavailability factor (RBF) is defined as the ABF ratio in percentage between soil samples to the standard sample. Various in-vitro bioavailability test methods based on gastrointestinal physiology have been proposed since 1992. The aim of this study is to propose a standard test procedure for bioavailability focusing on establishing quality control (QC) criteria and simplifying test procedure and apparatus.

This study refers to the physiologically based extraction test (PBET) developed by USEPA Region VIII and the method developed in the early study by our group. The first phase of this method simulates stomach condition (pH 1.8) and the second phase simulates intestinal condition (pH 7.0). Many test parameters proposed in these methods have widely accepted in the literature for sample pretreatment, temperature, enzyme dose, pH, and reaction time. This study used sodium arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) and NIST 2710 soil as the standards to investigate the effect of mixing intensity, liquid to solid (L/S) ratio, extraction time, and extract pretreatment methods for the determination of bioavailability.

Testing at a constant L/S ratio of 1000:1 mL/gm, all the ABFs ( $n = 5$ ) obtained for the 2 phases from the 3 velocity gradients (G) of 0, 470, and 1000 1/sec had no significant difference (95 % CI) for both standards. The ABFs ( $n = 5$ ) from both phases were 82-96 % for sodium arsenate and were 26-35% for the NIST soil. When the test was conducted at a constant G of 470 1/sec with 3 L/S ratios of 200:1, 1000:1, and 5000:1 mL/gm, only the ABFs obtained from the intestinal phase for the standard soil resulted in significant difference ( $p = 0.02$ ). The ABFs ( $n = 5$ ) obtained from both phases were 85-101 % for sodium arsenate and were 25-33 % for

the standard soil. The As concentrations extracted for both standards from the intestinal phase were within 10% of difference for 2-11 hours of extraction time based on the first hour of extraction. Thus 1 hour of extraction appears to be appropriate. Sample pretreatment using centrifugation with or without a follow-up filtration yielded no significant difference. In conclusion, we propose 3 types of QC criteria: (1) a concentration less than the method detection limit (MDL) for the reagent blank; (2) a  $ABF_G$  and  $ABF_I$  of  $90\pm 8\%$  and  $90\pm 5\%$  for sodium arsenate, respectively, (3) a  $RBF_G$  and  $RBF_I$  of  $35\pm 2\%$  and  $30\pm 3\%$  for NIST 7210 soil, respectively.

Based on the test results, this study proposes a standard procedure for the two-phase bioavailability test. The soil sample is first dried by air and sieved for the particle size of 250  $\mu\text{m}$  or less. A 0.5 gram of sample is fed into a serum bottle with a liquid volume of 500 mL at a liquid to solid (L/S) ratio of 1000:1 mL/gm in the stomach phase. A velocity gradient (G) of 500 1/sec is provided using magnetic stirring and a temperature of  $37\pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  is maintained in a air-circulated incubator. The extraction liquid contains 0.15 M of NaCl and 1% of porcine pepsin and the pH is adjusted to  $1.8\pm 0.1$  by HCl stock solution. After 1 hour of extraction, a sample of extract is taken and centrifuged to remove particulate matters. The supernatant is determined for total arsenic. In the intestinal phase, pancreatin and bile are added to the extract liquid and is adjusted to  $\text{pH } 7.0\pm 0.1$  by  $\text{NaHCO}_3$  stock solution. After 1 hour of extraction, a sample extract is taken and centrifuged for the measurement of arsenic.

In order to simply the method, we further propose using magnetic stirring with weighted ring in stead of argon sparging; using air-circulated incubator in stead of water bath for better observation and sample collection; using centrifuging in stead of filtration for extract pretreatment; using one phase of simplified bioaccessibility extraction (SBET) method instead of the two-phase method for a better estimate to the in-vivo method.

Keywords: bioavailability, in-vitro test methods, quality control criteria, standard test procedure

# 目 錄

誌 謝 .....	I
摘 要 .....	II
Abstract.....	IV
目 錄 .....	VI
表目錄.....	VIII
圖目錄.....	IX
第一章 緒論 .....	1
1-1 研究緣起與目的.....	1
1-2 研究內容與架構.....	3
1-3 研究限制 .....	5
第二章 文獻探討 .....	6
2-1 生物有效性與生物可及性之定義.....	6
2-2 胃腸生物有效性體外試驗之簡化趨勢.....	10
2-3 評析不同生物有效性體外試驗方法.....	19
2-3-1 PBET 試驗方法 .....	19
2-3-2 IVG 試驗方法.....	24
2-3-3 SBET 試驗方法.....	29
2-3-4 體外試驗方法簡化說明.....	32
2-3-5 體外試驗之品管基準.....	38
2-4 生物有效性體內與體外試驗之評比.....	40
第三章 研究方法 .....	43
3-1 體外試驗程序與試驗參數.....	43
3-2 生物有效性體外試驗藥劑與設備.....	47
3-3 生物有效性體外試驗之實驗設計.....	48
3-3-1 蠕動強度試驗 (Phase I).....	48
3-3-2 液固比試驗 (Phase II).....	51

3-3-3 小腸相萃取時間試驗 (Phase III).....	52
3-3-4 樣品萃取液前處理試驗 (Phase IV) .....	52
3-3-5 建立系統品管基準 (PhaseV).....	53
3-4 重金屬砷之感應式偶合電漿質譜儀(ICP-MS)分析方法 .....	54
3-4-1 ICP-MS 儀器與操作條件 .....	54
3-4-2 重金屬砷之品質管制.....	56
3-5 數據資料整理與統計分析.....	58
第四章 結果與討論 .....	60
4-1 蠕動強度試驗 (Phase I) .....	60
4-2 液固比試驗 (Phase II).....	65
4-3 小腸相萃取時間試驗 (Phase III).....	71
4-4 樣品萃取液前處理試驗 (Phase IV) .....	73
4-5 建立品管基準 (Phase V).....	75
4-6 研擬胃腸生物有效性體外試驗方法及標準操作程序 .....	78
第五章 結論與建議 .....	85
5-1 蠕動強度試驗.....	86
5-2 液固比試驗.....	87
5-3 小腸相萃取時間試驗.....	89
5-4 樣品萃取液前處理試驗.....	89
5-5 建立系統品管基準.....	90
5-6 研擬胃腸生物有效性體外試驗方法及標準操作程序 .....	90
5-7 其他建議.....	91
參考文獻 .....	93
附錄一：本研究蠕動強度與液固比試驗之砷濃度原始數據.....	99
附錄二：美國 NIST 2710 Montana soil 各元素全量濃度認證.....	100



## 表目錄

Table 2-1 不同土壤來源之胃相(Gastric phase)和腸相(Intestinal phase)砷 RBF 與 ABF 文獻值 .....	11
Table 2-2 一階段胃相生物有效性體外試驗方法(SBET)之沿革表 .....	13
Table 2-3 文獻中不同土壤來源之胃相 As 之 ABF 比較表 .....	18
Table 2-4 PBET 體外試驗方法之參數比較表 .....	20
Table 2-5 IVG 體外試驗方法之參數比較表 .....	25
Table 2-6 SBET 體外試驗方法之參數比較表 .....	30
Table 2-7 本研究生物有效性體外試驗設備與程序簡化表 .....	36
Table 2-8 NIST 2710 soil 於不同體外試驗參數與砷之生物有效性比較 .....	39
Table 2-9 比較文獻中體內與體外試驗生物有效性之迴歸分析 .....	42
Table 3-1 本研究生物有效性體外試驗參數比較表 .....	45
Table 3-2 本研究轉速 (rpm)與 G 值對應表 .....	50
Table 3-3 三種不同液固比之備製量表 .....	51
Table 3-4 ICP-MS 儀器操作條件 .....	55
Table 3-5 本研究 ICP-MS 品質管制基準與實測值比較表 .....	57
Table 4-1 不同速度梯度(G)時砷 ABF 統計比較表 .....	62
Table 4-2 不同速度梯度(G)時 NIST 2710 soil 砷 RBF 統計比較表 .....	62
Table 4-3 本研究 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與文獻參數值及砷 ABF 比較表 .....	64
Table 4-4 不同液固比(L/S)時砷 ABF 統計比較表 .....	67
Table 4-5 不同液固比(L/S)時 NIST 2710 soil 砷 RBF 統計比較表 .....	67
Table 4-6 NIST 2710 soil 於不同體外試驗胃相參數比較表 .....	70
Table 4-7 小腸相於不同 pH 值時萃取時間與總砷濃度比較表 .....	72
Table 4-8 不同萃取液前處理時總砷平均濃度統計表 .....	73
Table 4-9 本研究體外試驗建議管制項目與管制基準 .....	75
Table 4-10 比較本研究群與文獻中品質管制基準 .....	76

## 圖目錄

Figure 1-1	本研究生物有效性體外研究架構流程圖	4
Figure 2-1	影響砷之生物有效性之物化特性示意圖(Ruby et al., 1999)	12
Figure 2-2	比較不同土壤體內(in vivo swine assay)與體外(in vitro SBET assay)試驗相關性(Juhasz et al., 2007a)	17
Figure 2-3	250 mL 底座為 70 $\mu\text{m}$ 網狀 PE 分液漏斗反應槽示意圖 (Ruby et al., 1996)	21
Figure 2-4	120 mL 玻璃圓底管反應槽示意圖(Bruce et al., 2007)	22
Figure 2-5	人類胃腸道在不同部位之停留時間與 pH 值(修改 Dean et al., 2007)	23
Figure 2-6	Canning jar 反應槽示意圖(Rodriguze et al., 1999)	26
Figure 2-7	在 Jersey City 土壤中，不同液固比與砷 ABF 關係(Hamel et al., 1998)	27
Figure 2-8	比較礦區土壤於不同體外試驗方法之小腸相砷 ABF	28
Figure 2-9	125 mL wide-mouth high-density polyethylene (HDPE) bottle 反應槽及攪拌設備示意圖(Drexler, 1999; Kelly et al., 2002)	31
Figure 2-10	本研究群前期研究設計之反應槽體與氣體溫度控制室示意圖(張，2005)	33
Figure 2-11	不同研究中體內與體外試驗砷生物有效性之比較	41
Figure 2-12	比較體內與體外試驗生物有效性文獻值之相關性圖	42
Figure 3-1	本研究體外試驗反應槽體設備	44
Figure 3-2	本研究二階段胃腸相生物有效性體外試驗程序	46
Figure 3-3	rpm 與 G 值之關係圖 (CES, 2002)	49
Figure 3-4	樣品萃取液過濾方法結構示意圖	52
Figure 3-5	砷之檢量線圖	56
Figure 4-1	速度梯度與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 砷 ABF 關係圖	60
Figure 4-2	液固比與 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NIST 2710 soil 砷 ABF 關係圖	65
Figure 4-3	NIST 2710 soil 於不同液固比胃相砷 ABF 之比較圖	69
Figure 4-4	小腸相 1-11 小時萃取時間與總砷濃度關係圖	71

# 第一章 緒論

## 1-1 研究緣起與目的

為確保土壤及地下水資源的永續利用，世界各國大都訂有土壤重金屬的濃度標準。根據我國環保署 (2008) 土壤及地下水整治網站可知，全國目前共有 738 個污染控制場址，20 個污染整治場址，其中以受重金屬污染場址最多。近年來，我國與歐美先進國家也相繼提出受污染場址的健康風險評估，且於初評辦法第六與第七條中，提及污染行為人及土地關係人得以健康風險評估結果作為列管依據 (黃，2006; 楊等，2006; 行政院環保署，2006)，我國已由污染調查邁入風險評估與污染控制整治。但是進行健康風險評估時，並未訂定生物有效性 (bioavailability) 評估方法，而以保守情境 (conservative scenario) 推估致癌與非致癌風險，即假設經由食入暴露，土壤中所含重金屬 100% 進入血液將導致高估風險而提高復育成本 (環保署，2006; Jahasz *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2007)。

美國環保署 (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) 在訂定超級基金場址 (Superfund site) 整治標準時，允許考量生物有效性，美國環保署第 VIII 區與 Exponent 公司組成 Solubility/Bioavailability Research Consortium (SBRC)，針對 As 及 Pb 受污場址，以生物有效性訂定較寬鬆的整治目標，減少復育成本。

所謂生物有效性是毒理學的重要觀念，常應用於生物體內試驗 (in vivo test)，指用來評估具包封度 (如土壤、礦渣等) 中各種毒性污染物 (如 As, Pb 等)，經由食入、吸入等不同暴露途徑，於一定時間後，進入血液循環系統之劑量與暴露劑量的比例，此為絕對生物有效性係數 (absolute bioavailability factor, ABF)，另一個名詞為相對生物有效係數 (relative bioavailability factor, RBF)，為待測樣品與標準樣品之 ABF 比值 (Kelly *et al.*, 2002; 張，2006)。若使用動物實驗評估生物有效性，不僅操作程序複

雜且昂貴費時，美國乃於1992年開始研發模擬人體胃腸環境體外試驗 (in vitro test)方法，針對As, Pb等重金屬進行系統測試 (Ruby *et al.*, 1999)，評估以生物有效性作為風險評估之依據。

本研究參考本研究群前期研究 (張, 2005)所建立之一套胃腸體外試驗設備與方法，以及美國環保署第VIII區生物有效性兩階段PBET (physiologically based extraction test)體外試驗方法 (Ruby *et al.*; 1996)，第一階段模擬胃消化環境 (pH 1.8)，第二階段模擬小腸環境 (pH 7.0)。生物有效性體外試驗研究至今已超過10年，雖然試驗參數與程序已漸趨一致，但仍有需要釐清之問題如：是否應控制胃腸蠕動情況？是否應控制液固比？以及縮短腸相反應時間是否可行？萃取液前處理僅使用離心是否可行？等問題，此為本研究目的之一。

再者，綜觀不同體外試驗研究發現，文獻中普遍未使用標準參考物質 (standard reference material, SRM)建立系統品管基準 (QC criteria)，以致於無法評比不同體外試驗之萃取效率，因此建立系統品管基準為本研究目的之二。最後統整體外試驗結果與系統品管基準，嘗試研擬我國生物有效性體外試驗標準操作方法，特別著重設備與程序之簡化，為本研究目的之三。

## 1-2 研究內容與架構

本研究之整體架構與流程如 Figure 1-1 所示，主要分為三部分：文獻收集與評析、參數試驗與體外試驗標準方法之研擬。本研究於參數試驗上，使用砷酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 以及美國 NIST 2710 土壤作為標準參考樣品，詳細如下說明：

### 1. 在文獻收集與評析方面：

收集有關於生物有效性體外試驗之文獻，首先定義生物有效性與生物可即性，評析並初步簡化生物有效性體外試驗參數與程序，且評比文獻中生物有效性體內試驗與體外試驗之相關性。

### 2. 在參數試驗方面：

為探討生物有效性體外試驗各參數對生物有效性以及總砷濃度之影響，本研究進行 Phase I-V 試驗，分項說明如下：

- (1) Phase I 與 Phase II 為探討試驗參數對生物有效性之影響。Phase I 為不同蠕動強度試驗，G 值分別為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$ ，以磁力攪拌方式模擬胃腸蠕動情況。Phase II 為不同液固比試驗，分別為 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm。
- (2) Phase III 與 IV 為探討試驗參數對總砷濃度之影響。Phase III 為小腸相萃取時間試驗，將萃取時間延長為 11 小時。Phase IV 為萃取液前處理方式，分成離心再過濾與僅離心二種前處理方式。
- (3) Phase V 為利用 Phase I 與 Phase II 之試驗結果，建立系統品管基準，本研究建立試劑空白管制、重複樣品管制、砷酸鈉以及介質標準管制樣品等四種品管基準。

### 3. 在體外試驗標準操作方法之研擬方面：

根據參數試驗結果 (Phase I - Phase IV) 與系統品管基準建立 (Phase V)，簡化試驗方法並研擬我國生物有效性體外試驗標準操作方法。

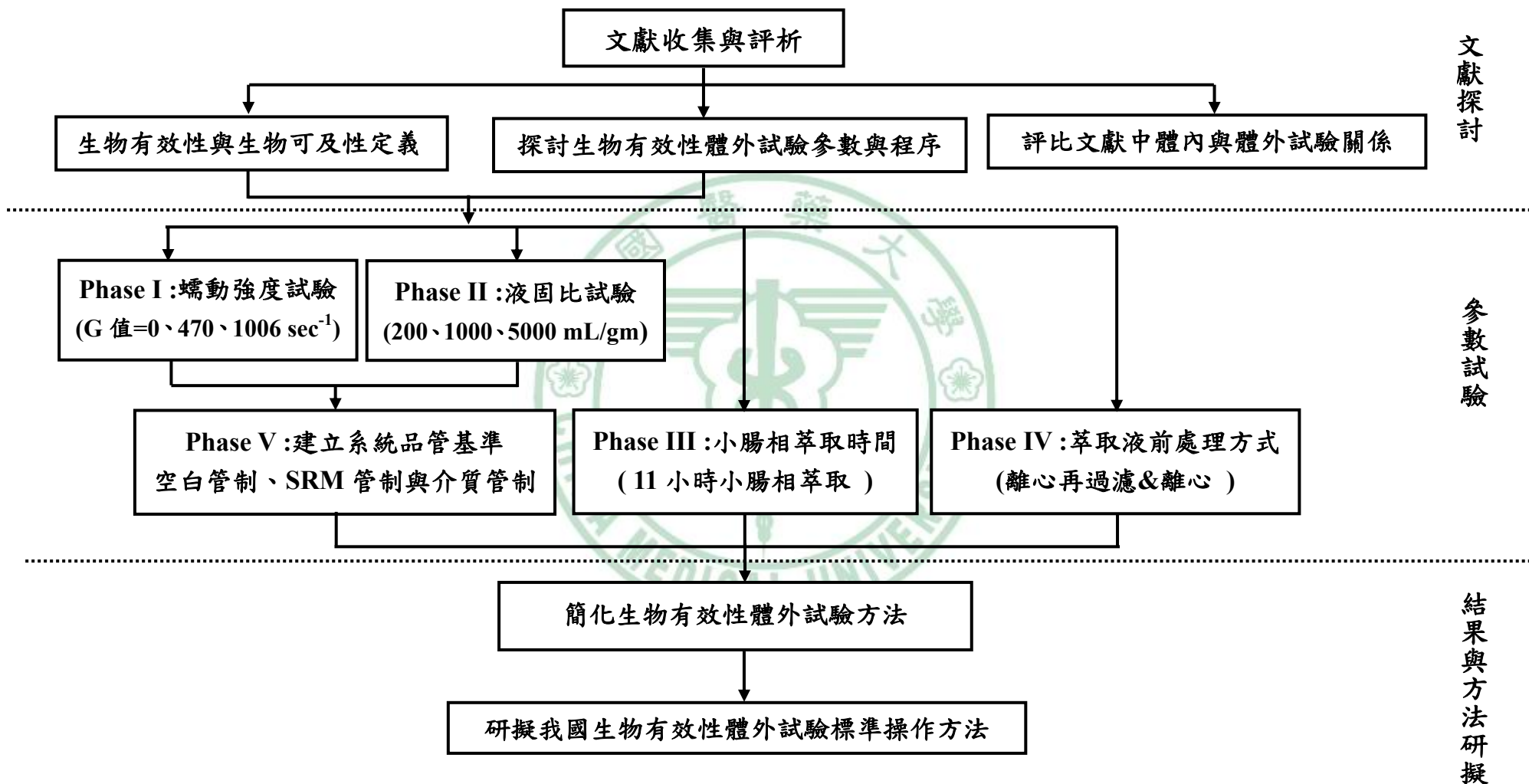


Figure 1-1 本研究生物有效性體外研究架構流程圖

### 1-3 研究限制

綜觀過去使用體外試驗進行生物有效性研究中，大多數文獻皆採集環境中土壤樣品，且 Ruby *et al.* (1999)與 Wragg *et al.* (2002)研究中提及，影響生物有效性之因素有土壤中物化特性，因此文獻中不僅針對實際土壤樣品進行體外試驗外，也分析土壤中物化特性，而相較於本研究僅使用標準土壤 NIST 2710 無干擾因素存在，僅用以進行體外試驗探討各參數對生物有效性之影響，未進行實際土壤樣品之試驗，故無法得知土壤中其他重金屬物質與其物化特性是否會干擾待測物質砷之測定結果，此為本研究限制之一。

此外，綜觀過去進行生物有效性體外試驗研究，有專家學者針對受污土壤，除了進行體外試驗研究外，且為了驗證能以體外試驗結果預測體內動物試驗，也同時進行體內試驗，分析體內與體外試驗之相關性。而本研究僅進行體外試驗來探討不同參數試驗對生物有效性之影響，此為本研究限制之二。

## 第二章 文獻探討

### 2-1 生物有效性與生物可及性之定義

在進行受污土壤之健康風險評估時，生物有效性是量化風險時一個重要參數，傳統上是以孩童手指沾黏而誤食受污土壤，且假設 100% 為人體胃腸道所吸收，會高估風險 (Kelly *et al.*, 2002; Bruce *et al.*, 2007)。所謂生物有效性 (bioavailability) 為毒理學的重要觀念，是指具有包封度介質 (如土壤、礦渣等) 中目標污染物 (如砷)，經特定暴露途徑 (如食入、吸入等) 為生物體分布、吸收、代謝之模式於一定時間後，目標污染物進入血液循環系統的劑量與總暴露量之百分比 (Klasssen, 2001; 張, 2005)。

生物有效性可分為兩部分說明與計算，分別為絕對生物有效性係數 (absolute bioavailability factor, ABF) 與相對生物有效係數 (relative bioavailability factor, RBF)，所謂絕對生物有效係數是指污染物進入血液的劑量與暴露劑量的百分比，如公式(1)所示 (Klasssen, 2001; Kelly *et al.*, 2002; 江等, 2006)。

$$ABF(\%) = \left[ \frac{D_B}{D_T} \right]_P \times 100\% \quad (1)$$

$D_B$  = 進入血液循環系統劑量 (mg)， $D_T$  = 暴露總量 (mg)。P 為暴露途徑 (如食入、吸入等)。在實驗操作上，生物體誤食受污土壤，其污染物會依藥物動力學模式，使進入血液循環系統之濃度隨時間而改變，且在循環過程中，污染物會被分解或排出，要正確推估  $D_B$  並不容易，因此在實務上常使用相對生物有效性係數 (RBF)，以靜脈注射污染物之參考物質的 ABF 為基準，評估待測污染物在不同介質中進入血液系統的相對比例，其優點為減少未能估算污染物在血液中的分解及排出量所引起的誤



差，如公式(2)所示 (Kelly *et al.*, 2002；江等，2006)。

$$RBF(\%) = \frac{ABF_P}{ABF_I} \times 100\% = \frac{\left[ \frac{D_B}{D_T} \right]_P}{\left[ \frac{D_B}{D_T} \right]_I} \times 100\% \quad (2)$$

$ABF_P$ =某暴露途徑 (如食入、吸入等)之  $ABF$ ， $ABF_I$ = 由靜脈注射 (intravenous injection)藉由毒理學建議之參考物質 (如醋酸鉛、砷酸鈉)所得之  $ABF$ ，一般均假設靜脈注射生物有效性為 100 %。

然而，在進行健康風險評估時，若利用體內試驗評估生物有效性，不僅花費成本高且較費時，因此，自 1992 年起專家學者致力於研發生物有效性體外試驗 (in vitro)以取代程序繁瑣之體內試驗，體外試驗則以生物可及性 (bioaccessibility)表示，但一般而言不區別生物有效性與生物可及性這兩名詞，皆以生物有效性表示，意指模擬人體經由食入之暴露途徑，胃腸消化、吸收作用，分別計算胃與小腸階段萃取出污染物的總量與暴露量百分比，公式(3)為體外試驗絕對生物可及性之定義 (Kelly *et al.*, 2002; Caussy, 2003; 張，2005；江等，2006)。

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

$M_Y$ =胃或小腸階段所萃取出之總量 (mg)，利用環檢所公告 NIEA S321.63B, 王水消化法量測)； $M_T$ =污染物在介質中的總量 (mg)。  $C_Y$ =胃或小腸階段所萃取出之濃度 (mg/L)； $V$ =反應槽有效容積 (L)，須分別調整在胃與小腸階段中用以調整 pH 值添加體積，以及進入小腸階段前，胃相萃取液採樣減少之體積； $C_T$  = 污染物在介質中的全量濃度 (mg/kg)； $W_S$ =樣品總量 (kg)。

相對生物可及性是以 Standard Reference Material (SRM)的 ABF 為基準，評估污染物在不同介質中 (如土壤或水體等)溶出的程度，如公式(4)所示 (張，2005；江等，2006)。

$$RBF(\%) = \frac{ABF_X}{ABF_{SRM}} \times 100\% = \frac{\left[ \frac{M_Y}{M_T} \right]_X}{\left[ \frac{M_Y}{M_T} \right]_{SRM}} \times 100\% \quad (4)$$

$ABF_X$ =不同介質之樣品 X 之 ABF， $ABF_{SRM}$ =SRM 之 ABF。本研究係參考前期研究 (張，2005)， $ABF_X$  以標準土壤 NIST 2710 做為待測樣品，而  $ABF_{SRM}$  則參考體內試驗所使用  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$  為 SRM，其原因為  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$  有溶解度大 (5.46 gm/100 mL at 0 °C) 且易被吸收之特性 (Rodriguez *et al.*, 2003; IRIS, 2008)。在體外試驗中，使用 RBF 之優點為可減少因使用不同體外試驗方法，產生不同萃取效率所引起的差異，但文獻中普遍未報告 SRM 之 ABF，也未建立體外試驗之品管基準，因此不利於本研究後續進行評比不同體外試驗研究之萃取效率差異。

最後，在健康風險評估量化估算時，對具有包封度之受污土壤，為正確推估致癌風險，應採用 RBF 做為修正係數而非 ABF，其主要原因為，在 Integrated Risk Information System (IRIS, 2008) 資料庫中，對於砷之毒性因子 CSFs (cancer slope factors)，乃採用飲用水之暴露途徑 (假設砷於水中 100% 被溶解)，作為劑量反應關係之推估值，但在不同介質 (如土壤) 中，不同污染物 (如 As) 之生物有效性不同，若直接使用 IRIS 公告之 CSFs 進行風險估算，會高估風險，導致整治成本提高。鑒於此，對於不同包封度之介質，將生物有效性修正至以砷酸鈉之 SRM 為基準是必要的，即相對生物有效性 (RBF)，本研究係參考本研究群前期研究 (張，2005) 與環保署之土壤及地下水污染場址健康風險評估評析方法所提及之致癌風

險公式，建議進行修正估算終身增加之致癌風險 (excess lifetime cancer risk, ELCR)如公式(5)所示(江等，2006；環保署，2006)。

$$ELCR_{X,i} = \frac{(LID_X) \times (RBF_{X,i})}{(BW) \times (AT)} \times SF_i \quad (5)$$

$SF_i$ =目標污染物 i 之斜率係數 (slope factor,  $(\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{day})^{-1}$ )

$LID_X$ =樣品 X 之終身平均攝入該物質劑量 (lifetime intake dose, mg)

$= (C_T, \text{mg}/\text{kg}) \times (\text{IR}, \text{食入土壤速率}, \text{mg}/\text{day}) \times (\text{EF}, \text{暴露頻率}, \text{day}/\text{year})$

$\times (\text{ED}, \text{暴露期間}, \text{year}) \times (10^{-6}, \text{轉換因子}, \text{kg}/\text{mg})$

$BW$ =受評估族群之平均體重 (kg)

$AT$ =受評估族群之平均餘命日數 (day)



## 2-2 胃腸生物有效性體外試驗之簡化趨勢

在受污土壤風險評估中，生物有效性是一個重要的觀念，若利用體內試驗評估生物有效性，由於體內試驗使用動物進行研究，需要花費較多的成本與時間 (Kelly *et al.*, 2002)。鑒於此，美國早於 1992 年開始著重研發二階段胃腸生物有效性體外試驗方法，研究至今體外試驗各參數也趨於一致，在驗證體內與體外試驗方面也有良好的線性相關。近幾年，有專家學者將二階段生物有效性體外試驗簡化為一階段胃相生物有效性試驗稱為 SBET 試驗方法 (Simplified Bioaccessibility Extraction, SBET)，應用於受污土壤之健康風險評估，以下討論 SBET 試驗方法之沿革與研究成果。

首先彙整前期研究 (張, 2005) 與本研究蒐集 1992 至 2007 年有關於二階段胃腸生物有效性體外試驗之重要文獻，有 Davls *et al.* (1992), Ruby *et al.* (1993; 1996; 1999), Hamel *et al.* (1998), Rogriguze *et al.* (1999), Sarkar *et al.* (2003), 張(2005), Pouschat *et al.* (2006), Bruce *et al.* (2007)，綜合這些文獻主要研究成果如下說明：

1. 文獻中探討受污土壤砷之生物有效性時，根據生物有效性定義，應以 RBF 值表示，但仍有部分文獻以 ABF 值表示 (Hamel *et al.*, 1998; Poushat *et al.*, 2006)，且大部分文獻皆未報告 SRM (砷酸鈉與標準土壤) 之 ABF，欠缺系統品管基準，因此難以評比不同試驗方法之研究結果。
2. 大多數文獻以探討土壤與受污場址中砷與鉛之生物有效性為主，砷之生物有效性變異範圍大，其範圍為 4-55 %，此結果對於訂定整治目標及花費成本影響甚大，如 Table 2-1 所示。
3. 文獻中探討土壤與受污場址中砷之胃腸生物有效性，其胃相 RBF 均較小腸相 RBF 大，如 Table 2-1 所示。

Table 2-1 不同土壤來源之胃相(Gastric phase)和腸相(Intestinal phase)砷 RBF 與 ABF 文獻值

土壤來源	RBF <sub>G</sub>	RBF <sub>I</sub>	ABF <sub>G</sub>	ABF <sub>I</sub>	參考文獻
mining site soil	-	16	-	12	Davls <i>et al.</i> , 1992
residential soil-I	53	52	55	50	Ruby <i>et al.</i> , 1996
residential soil-II	48	46	49	44	Ruby <i>et al.</i> , 1996
House dust-I	33	38	34	36	Ruby <i>et al.</i> , 1996
mining / smelter site -calcine	3.66	3.52	-	-	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999
mining / smeltersite - iron slag	24.8	22.7	-	-	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999
NIST2710	38.6	28.8	39	29	張, 2005
kidston gold mine site soil	14	18	-	-	Bruce <i>et al.</i> , 2007
Jersey City soil	-	-	13	-	Hamel <i>et al.</i> , 1998
NIST 2710	-	-	48	-	Hamel <i>et al.</i> , 1998
near CCA-Treated utilitypoles soils	-	-	36.2	40.7	Pouschat <i>et al.</i> , 2006

4. 相較於體內動物試驗，體外試驗與體內試驗生物有效性有良好的線性相關，但大多數研究中皆低估體內試驗 RBF 達 40%，且 Rogriguze *et al.* (1999) 使用 PBET 試驗方法，研究發現胃相比小腸相階段較能準確推估體內動物試驗砷 RBF ( $R_G=0.83$ , slope=0.88 vs.  $R_I=0.82$ , slope= 0.76)，因此本研究將進一步探討僅使用 SBET 試驗方法之可行性。
5. Ruby *et al.* (1999) 與 Wragg *et al.* (2002) 評析其他文獻，說明影響無機金屬生物有效性之因素包含物化特性與體外試驗方面等因素，如污染物之礦物型態 (mineral form)、粒徑大小 (grain size)、包封度 (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會形成穩定的礦物型態，與砷之氧化物比較 (如 Fe-As oxides、Mn-As oxides 與 Pb-As oxides)，其溶解度較低使生物有效性亦較低。對同一物質而言，粒徑越大，生物有效性越小。在包封程度上，含砷化合物被石英 (quartz) 包封，砷不易溶解使生物有效性較低，但砷化合物若被礦渣 (slag) 包封會使生物有效性提高，如 Figure 2-1 所示。

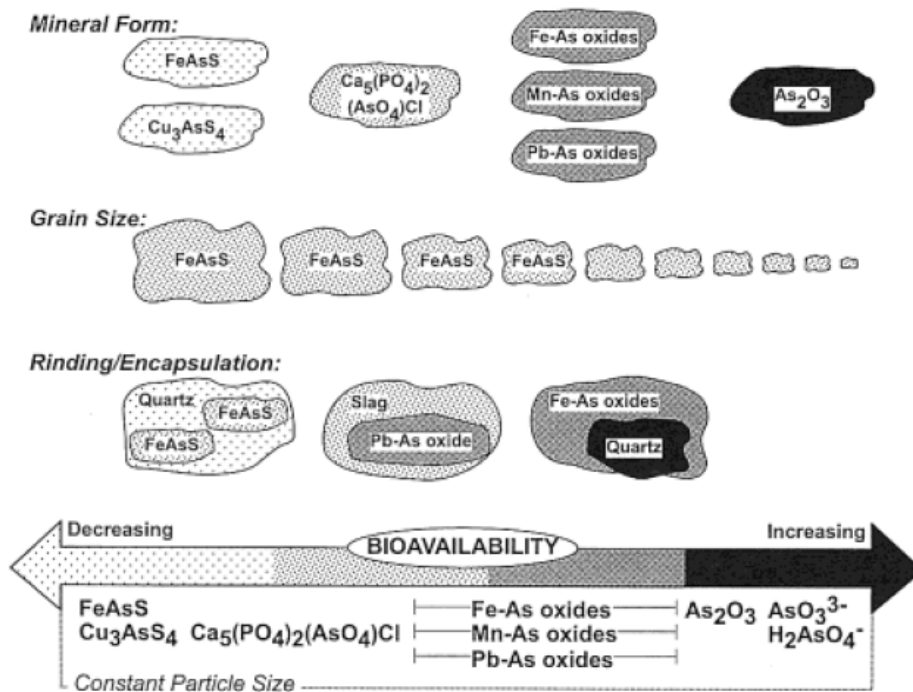


Figure 2-1 影響砷之生物有效性之物化特性示意圖 (Ruby *et al.*, 1999)

6. 胃腸生物有效體外試驗研究發展至今超過 10 年，已詳盡考量人體胃腸消化環境各項參數，試驗參數也漸趨一致，如樣品前處理、溫度控制、胃腸相酵素添加物、胃腸相 pH 值與反應時間等參數，但仍有需要釐清之問題，如：液固比、蠕動強度、小腸相反應時間等，本研究將進一步探討。
7. 體外試驗設備皆為開放式反應槽體，並通入惰性氣體以維持厭氧狀態，不僅花費高昂且試驗程序繁瑣，於第 2-3 節進行討論。

Table 2-2 為本研究彙整近幾年一階段胃相生物有效性體外試驗 (SBET) 方法之沿革與研究成果。SBET 試驗方法為參考 Ruby *et al.* (1996) 所建立之 PBET (physiologically based extraction test) 試驗方法之胃相參數，使用開放性系統之反應槽體，胃相萃取液為 glycine，液固比為 100:1 mL/gm，溫度為 37 °C，震盪 1 小時，文獻中各參數於下一節進行討論。

Table 2-2 一階段胃相生物有效性體外試驗方法(SBET)之沿革表

參考文獻	研究目的	研究成果
Kim <i>et al.</i> (2002)	針對韓國某一廢棄礦區 (Duckum mine), 調查鄰近礦區附近農田與稻田之土壤中含砷與其他毒性重金屬物質 (Cd, Cu, Pb 和 Zn) 之全量濃度與生物有效性。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用 SBET 試驗方法, 模擬人體胃相環境 1 小時後, 農田與稻田之土壤含砷全量濃度, 以農田之土壤含砷濃度較高, 分別為 9.4 mg/kg 與 2.3 mg/kg。</li> <li>2. 在生物有效性方面, As 之 ABF 以農田較稻田高, 分別為 20.1 % 與 17.9 %, 顯示在長時間暴露條件下, 經由食入受污土壤之農夫或當地居民會造成潛在的健康風險危害。</li> </ol>
Lee <i>et al.</i> (2006)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 針對韓國 5 個廢棄礦區 (Dukeum, Dongil, Myungbong, Songchun mines), 調查鄰近礦區附近農田與稻田之土壤中含砷與其他毒性重金屬物質之全量濃度與萃取濃度。</li> <li>2. 接著利用萃取濃度, 估算人體致癌風險值與非致癌風險。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 利用 SBET 試驗方法分析各毒性物質之萃取濃度, 以 Songchun mine 之 As 萃取濃度較大, 農田與稻田之 As 萃取濃度分別為 20.6 mg/kg 與 12.4 mg/kg, 皆遠低於總 As 濃度 (196 mg/kg), 估算 As 之 ABF 分別為 11% 與 6%。</li> <li>2. 再者利用 As 萃取濃度估算致癌風險值, 發現 Songchun mine 相較於其他礦區有較高的致癌風險值為 <math>1.16 \times 10^{-5}</math>, 但仍在可接受風險範圍內 (<math>10^{-6}</math>-<math>10^{-4}</math>), 在非致癌風險商數為 3.6, 已超過可接受範圍 (1.0), 仍會對人體造成潛在性危害。</li> </ol>
Wang <i>et al.</i> (2006)	利用 SBET 試驗方法, 調查城市中路邊土壤之含砷與其他毒性重金屬物質 (Cu, Pb, Zn, Ni, Co, Cr) 之全量濃度與生物有效性。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 土壤樣品在胃相中反應 1 小時後, 砷與其他重金屬之生物有效性, 以 Pb 較高 (71.7 %), Cr 最低 (5.6 %)。</li> <li>2. 雖然 As 含量較 Pb, Cu, Zn 低, 但仍可在道路邊被檢測出, As 萃取濃度與 ABF 分別為 7.5 mg/kg 與 27.3%, 其主要來源為煤燃燒所產生。</li> </ol>

Table 2-2 一階段胃相生物有效性體外試驗方法(SBET)之沿革表(續)

參考文獻	研究目的	研究成果
Juhasz <i>et al.</i> (2007b)	使用 SBET 試驗方法評估 railway corridor , dip site 與 mine site 三個場址中受 As 污染土壤之生物有效性，並探討影響 As 生物有效性之因素。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 提出使用 SBET 試驗方法之理由為，在 pH 值較低之胃相，其溶解度較大，生物有效性相對較高，從 Rogriguze <i>et al.</i> 1999 研究中亦提及，胃相比小腸相較能準確推估動物實驗 RBF (Rogriguze <i>et al.</i>, 1999; Kelly <i>et al.</i>, 2002)。</li> <li>2. 研究發現，railway corridor soils 平均 As 之 ABF 為 34 %，dip site soils 平均 As ABF 為 28 %；mine site soils 平均 As ABF 為 24 %，皆小於 50 %，由此表示經由食入受污土壤之暴露途徑，As 毒性物質並不會 100 % 被人體腸胃道所吸收。</li> <li>3. 藉由土壤物化特性預測體外 As 之生物有效性，利用迴歸模式發現，在 railway 和 mine site 的土壤與總 As 濃度與總 Fe 含量有良好的線性相關 (<math>r^2=0.90</math> and <math>0.98</math>)。</li> </ol>
Juhasz <i>et al.</i> (2007a)	探討體內豬試驗與 SBET 體外試驗之相關性。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 利用 Juhasz <i>et al.</i> (2007b) 所分析之 As ABF 值，從中選取不同土壤之生物有效性範圍為 7 - 75 %，大多小於 50%。</li> <li>2. 利用體內豬試驗進行相關性比較發現，體外試驗與體內試驗有良好的線性相關，表示體外試驗可以準確預測體內 As RBF (<math>r^2=0.92</math>)，</li> <li>3. 利用上述結果，建議可使用便宜且快速之體外試驗方法取代體內試驗方法。</li> </ol>



再者，SBET 試驗方法，對於生物有效性表示方法皆以 ABF 值表示，而非以 RBF 值表示，且未建立品管基準，不易與其他試驗方法評比。

在 2002 年開始專家學者使用 SBET 試驗方法評估受污土壤中生物有效性，並以生物有效性作為健康風險評估之依據，Kim *et al.* (2002)與 Lee *et al.* (2006)為同一研究團隊，針對韓國廢棄礦區，使用 SBET 試驗方法評估受污土壤中含砷與其他毒性重金屬物質 (Cd, Cu, Pb 和 Zn)之全量濃度以及生物有效性。Kim *et al.* (2002)僅針對韓國某一廢棄礦區 (Duckum mine)，調查鄰近礦區附近農田與稻田之土壤中含砷與其他毒性重金屬物質 (Cd, Cu, Pb 和 Zn)之全量濃度與生物有效性，研究結果發現，農田與稻田之土壤含砷平均全量濃度以農田含量較多，分別為 9.4 mg/kg 與 2.3 mg/kg；平均 As ABF 亦以農田較大，分別為 20.1 %與 17.9 %，表示農夫或當地居民，在長時間暴露情況下，經由食入受污土壤之會造成潛在的健康風險危害。

進一步，Lee *et al.*學者於 2006 年針對韓國 5 個廢棄礦區 (Dukeum, Dongil, Myungbong, Songchun mines)，調查鄰近礦區附近農田與稻田之土壤中含砷與其他毒性重金屬物質之全量濃度與生物有效性，研究結果發現，利用 SBET 試驗方法之 As 萃取濃度以 Songchun mine 較大，農田與稻田之 As 萃取濃度分別為 20.6 mg/kg 與 12.4 mg/kg，皆遠低於總 As 濃度 (196 mg/kg)，本研究估算 As ABF 分別為 11 %與 6 %。再者利用 As 萃取濃度估算致癌風險值，發現 Songchun mine 相較於其他礦區有較高的致癌風險值，但仍在可接受風險範圍內 ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$ )。綜合上述 Kim *et al.* (2002)與 Lee *et al.* (2006)研究團隊之結果發現，As ABF 皆小於 50 % 並且遠小於一般假設 100 %被人體胃腸道所吸收之值，表示在量化風險時，若使用 100 %保守情境則會高估風險。

Wang *et al.* (2006)研究，利用 SBET 試驗方法，調查城市中路邊土壤

之含砷與其他毒性重金屬物質 (Cu, Pb, Zn, Ni, Co, Cr) 之全量濃度與生物有效性，研究結果發現，雖 As 含量較 Pb, Cu, Zn 低，但仍可在道路邊檢測出 As 含量，其主要來源為煤燃燒所產生，As 萃取濃度與 ABF 分別為 7.5 mg/kg 與 27.3 %，由此可知 As 來源不僅來自於礦區，煤燃燒也會產生。

Juhasz *et al.* (2007b), Juhasz *et al.* (2007a) 為同一研究團隊，使用 SBET 試驗方法評估 railway corridor, dip site 與 mine site 三個場址中受 As 污染土壤之生物有效性，並探討影響 As 之生物有效性因素，且進一步驗證體內與體外試驗之可行性。此研究團隊提出使用 SBET 試驗方法之理由，在 pH 值較低之胃相，其溶解度較大，生物有效性相對較高 (Rogriguze *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2002)，從 Rogriguze *et al.* (1999) 研究中亦提及，胃相比小腸相較能準確推估動物實驗 RBF，因此僅使用 SBET 試驗方法進行評估 As 之生物有效性。

Juhasz *et al.* (2007a; 2007b) 研究發現，railway corridor soils As ABF 為 6 - 89 %，平均 As ABF 為 34 %；dip site soils As ABF 為 9 - 89 %，平均 As 之 ABF 為 28 %；mine site soils As ABF 為 5 - 36 %，由結果可知，不同場址中，As ABF 均小於 50 %，表示經由食入途徑暴露到受污土壤，並不會 100% 被人體腸胃道所吸收，若進行風險評估量化時，使用保守情境選用 100 %，則會高估風險，產生不確定性且會增加整治成本。此研究亦提及，可藉由土壤物化特性預測體外 As 之生物有效性，利用迴歸模式發現，在 railway 和 mine site 的土壤與總 As 濃度以及總 Fe 含量有良好的線性相關 ( $r^2=0.90$  and  $0.98$ )。再者進一步選取 20 個不同土壤之生物有效性其範圍為 7 - 75 %，利用體內豬試驗進行相關性比較發現，體外試驗與體內試驗有良好的線性相關，表示體外試驗可以準確預測體內 As 之生物有效性 ( $r^2=0.919$ )，如 Figure 2-2 所示，因此可以利用便宜且快速之體外試驗方法

取代體內試驗應是可行的，並應用於人體健康風險評估上。

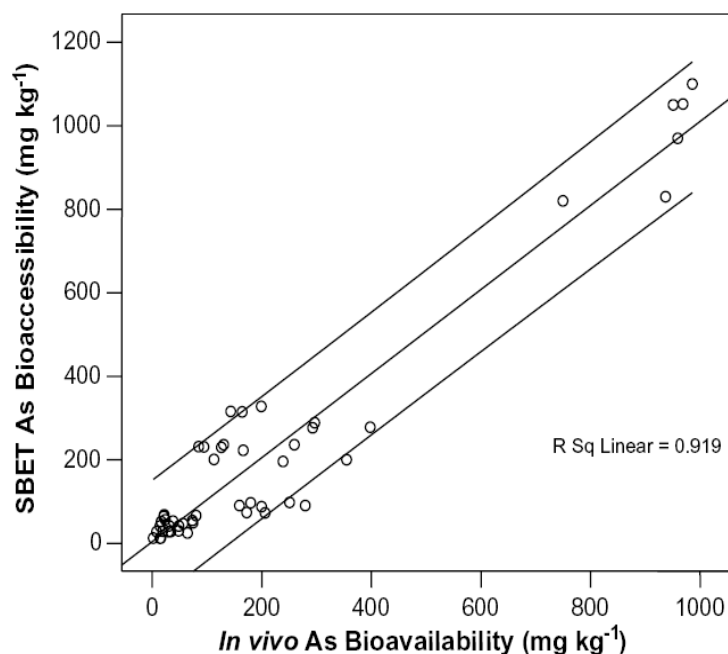


Figure 2-2 比較不同土壤中體內 (in vivo swine assay)與體外 (in vitro SBET assay)試驗相關性 (Juhasz *et al.*, 2007a)

Figure 2-1 與 Table 2-3 為本研究進一步彙整二階段胃腸相與一階段胃相 (SBET)生物有效性體外試驗結果，並比較於不同土壤中砷 RBF 與 ABF，在 Table 2-3 中，由於 SBET 試驗方法皆以 ABF 表示，為能與 SBET 進行比較，本研究將二階段胃腸體外試驗皆以 ABF 值表示，僅 Rodriguez *et al.* (1999)與 Bruce *et al.* (2007)此研究以 RBF 值表示除外。Table 2-1 結果顯示，受污場址中砷污染土壤 As 之 RBF 範圍為 3 - 55 %; Table 2-3 結果顯示不同體外試驗與受污場址中不同土壤來源之胃相砷 As ABF 範圍為 4 - 55 %，由此可知，受污土壤中，不同土壤之生物有效性變異範圍很大，可能受到上述礦物型態與土壤特性等因素所影響。而且大多數研究中，As 之 ABF 與 RBF 均小於 50 %，且生物有效性顯著小於 100 %，表示當人們經由食入土壤之暴露途徑，土壤中所含砷之總濃度並不會全部被人體胃腸道所吸收，因此當量化健康風險時，As 生物有效性若假設 100 %被人體胃腸道所吸收，則會高估風險，增加整治成本。

Table 2-3 文獻中不同土壤來源之胃相 As 之 ABF 比較表

土壤來源	胃相 As ABF (%)	參考文獻
<b>SBET 試驗方法</b>		
mining site soils	13 %-42 %	Casteel <i>et al.</i> , 2001; 2003 Juhasz <i>et al.</i> , 2007
paddy soils	6 %-18 %	Kim <i>et al.</i> , 2002 Lee <i>et al.</i> , 2006
farmland soils	11 %-20 %	Kim <i>et al.</i> , 2002 Lee <i>et al.</i> , 2006
urban roadside soils	27 %	Wang <i>et al.</i> , 2006
railway corridor soils	34 %	Juhasz <i>et al.</i> , 2007b
cattle tick dip site	28 %	Juhasz <i>et al.</i> , 2007b
<b>二階段胃腸生物有效性體外試驗方法</b>		
mining site soils	4 %-48 %	Hamel <i>et al.</i> , 1998 Rodriguez <i>et al.</i> , 1999 張, 2005 Bruce <i>et al.</i> , 2007
copper smelter	34 %-55 %	Ruby <i>et al.</i> , 1996
near CCA-Treated Utility Poles	36 %	Pouschat <i>et al.</i> , 2006

綜合上述所言，美國從 1992 年開始研究生物有效性體外試驗至今已超過 10 年，由於體內試驗需要花費較多的成本與時間，因此各專家學者著重於體外試驗的研發，並進一步驗證體外與體內試驗之相關性，以期能利用體外試驗正確評估體內試驗，並且更嘗試將二階段胃腸生物有效性簡化為一階段胃相生物有效性體外試驗，以作為風險評估的依據，期能降低受污場址之整治成本。

## 2-3 評析不同生物有效性體外試驗方法

生物有效性體外試驗方法，從 1992 年研究至今已超過十年，最終目的為能更精確研擬出一套模擬人體胃腸環境的體外試驗方法，各體外試驗方法已詳細考量人體胃腸生理參數且趨於一致 (Davls *et al.*, 1992; Hamel *et al.*, 1998; Ruby *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2003; Pouschat *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007 *et al.*)。然而，近幾年有專家學者將二階段胃腸生物有效性體外試驗簡化至一階段胃相生物有效性體外試驗，以期能簡化試驗程序 (Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Jahasz *et al.*, 2007; Simth *et al.*, 2008)。本研究統整並評析文獻中各體外試驗方法，大致上可歸類為 PBET、IVG、SBET 等三種體外試驗方法，Table 2-4 至 Table 2-6 分別說明各試驗方法中參數異同處，本研究特別著重於萃取液前處理方法，並統整前期研究 (張，2005)體外試驗方法進行簡化說明，如 Table 2-7 所示。再者，進一步評析各體外試驗方法之品管基準，如 Table 2-8 所示。根據以上描述，分項說明如下：

### 2-3-1 PBET 試驗方法

PBET 體外試驗方法其全名為 physiologically based extraction test，指以生理學為基礎的萃取方法，為兩階段連續萃取以測定人體胃腸環境之生物有效性，特別選用孩童 (<7 歲)此敏感性族群作為研究對象，且容易因手指沾染而誤食土壤為暴露途徑 (Ruby *et al.*, 1993)。

Table 2-4 為近幾年文獻中採用 PBET 體外試驗方法之參數比較表，本研究將試驗參數分為四部分說明，第一部分為樣品前處理、反應槽體型式、樣品重量及食物添加，反應槽體型式包括有效容積、溫度、厭氧及攪拌方式。在樣品前處理部份，樣品粒徑的大小會直接影響生物有效性的試驗結果 Ruby *et al.* (1999), Ruby *et al.* (1993, 1996)與 Bruce *et al.* (2007)均選用土壤樣品粒徑小於 250  $\mu\text{m}$ ，其原因為體外試驗是模擬人類經由食

Table 2-4 PBET 體外試驗方法之參數比較表

相關文獻	Ruby <i>et al.</i> (1993)	Ruby <i>et al.</i> (1996)	Bruce <i>et al.</i> (2007)
試驗參數			
樣品前處理	50°C 烘乾 過篩<250 μm	50°C 烘乾 過篩<250 μm	50°C 烘乾 過篩<250 μm
反應槽型式	250 mL 燒杯	250 mL PE 分液漏斗	120 mL 玻璃圓底管
有效容積	40 mL	40 mL	40 mL
溫度	水浴 37°C	水浴 37°C	水浴 37°C
厭養方式	無使用	1.0 L/ min 氫氣	0.7 L/ min 氫氣
攪拌方式	wrist-action shaker	底座 70 μm 網狀曝氣	不鏽鋼閥曝氣
樣品重量	4 gm	0.4 gm	0.4 gm
食物	無使用	無使用	無使用
胃相萃取			
pH	1.3	空腹 1.3; 平均 2.5; 進食 4.0	空腹 1.3; 平均 2.5; 進食 4.0
液固比(mL/gm)	10:1	100:1	100:1
胃液成分	1.25 g pepsin, 12.5 g sodium citrate, 12.5 g malic acid , 10.5 mL lactic acid 12.5 mL acetic acid	1.25 g pepsin, 0.5 g sodium citrate, 0.5 g malic acid , 420 μL lactic acid 500μL acetic acid	1.25 g pepsin, 0.5 g sodium citrate, 0.5 g malic acid , 420 μL lactic acid, 500μL acetic acid
排空率	2 hr	1 hr	1 hr
小腸相萃取			
pH	7.0	7.0	7.0
小腸液成分	1.75 gm/L bile, 0.5 gm/L pancreatin	1.75 gm/L bile, 0.5 gm/L pancreatin	1.75 gm/L bile, 0.5 gm/L pancreatin
吸附劑	無使用	無使用	無使用
輸送率	2 hr	4 hr	1hr and 3hr
萃取液前處理			
離心	2100×g, 25 min	2100 ×g, 25 min	10000×g, 15 min
過濾	無使用	無使用	0.22μm
分析方法	AAS	ICP-AES	ICP-MS

入暴露途徑進入體內，而粒徑 < 250  $\mu\text{m}$  較容易沾黏於手指而有誤食現象。在反應槽體型式上，均使用不同槽體進行體外試驗，分別有 250 mL 燒杯、250 mL 底座為 70  $\mu\text{m}$  網狀的 PE 分液漏斗 (Ruby *et al.*, 1993; 1996) 如 Figure 2-3 所示，以及 120 mL 玻璃圓底管 (Bruce *et al.*, 2007) 如 Figure 2-4 所示。在溫度控制上，為模擬人體溫度，則利用水浴方式溫度為 37  $^{\circ}\text{C}$  無疑義。為模擬胃腸環境以維持厭氧狀態，Ruby *et al.* (1996) 與 Bruce *et al.* (2007) 皆利用氬氣曝氣方式。在攪拌方式上，為模擬胃腸蠕動情況，Ruby *et al.* (1993; 1996) 與 Bruce *et al.* (2007) 均使用不同的攪拌方式將胃腸相液體與樣品混合攪拌，在 1996 年 Ruby *et al.* 修正 1993 年的攪拌方式，採用 PE 分液漏斗下方孔隙通入氬氣進行曝氣將其內容物混合攪拌，2007 年 Bruce *et al.* 則將氬氣曝氣方式改由上方通入氣體，操作方式較為簡單。

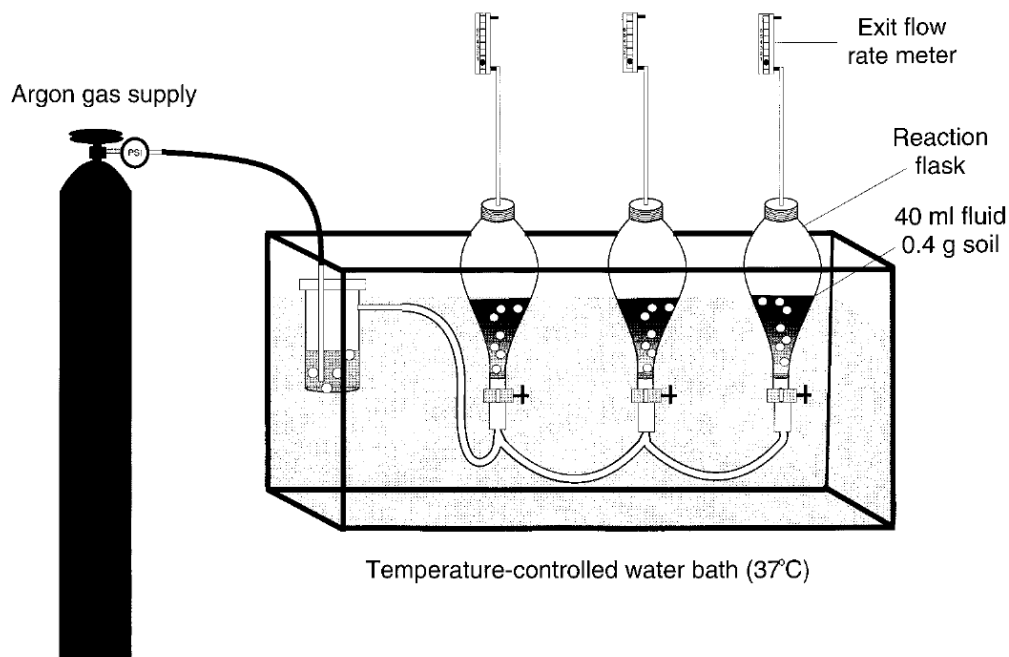


Figure 2-3 250 mL 底座為 70  $\mu\text{m}$  網狀 PE 分液漏斗反應槽示意圖 (Ruby *et al.*, 1996)

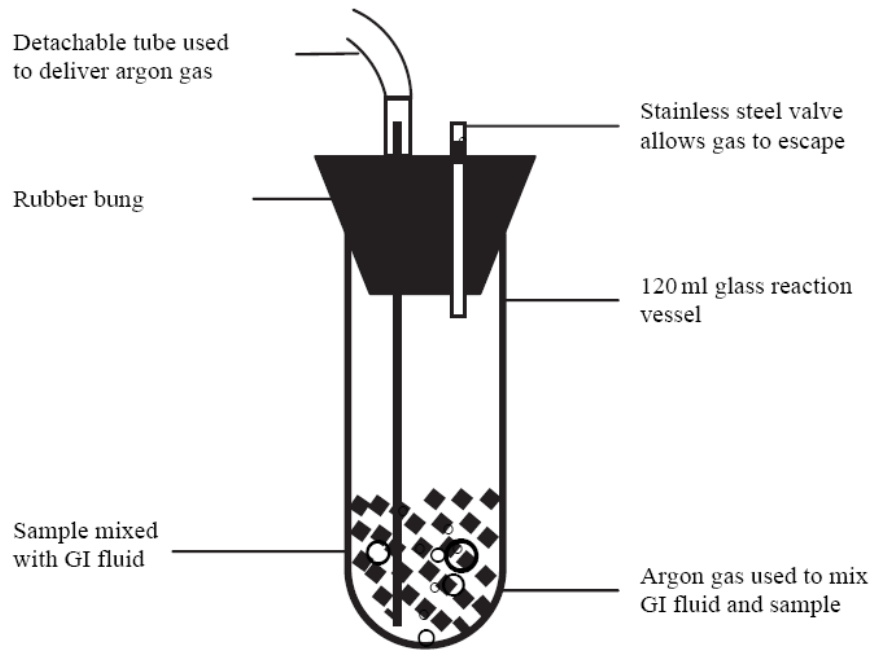


Figure 2-4 120 mL 玻璃圓底管反應槽示意圖 (Bruce *et al.*, 2007)

第二部分為探討胃相萃取環境，包括胃液 pH 值、胃液成分、液固比及胃排空時間，第三部份為探討小腸環境，包括小腸液 pH 值、小腸液成分、吸附劑的使用及小腸輸送時間。此兩部份生理參數皆趨於一致，如胃腸相 pH 值與酵素成分、液固比以及在小腸相中不使用吸附劑等。然而，在生理學理論上，胃液 pH 值範圍為 1.0 - 5.0，在空腹時胃液 pH 值較低 pH 1.7 - 2.0，進食後 pH 值則提高至 pH 4.0 - 5.0；小腸相由十二指腸、空腸與迴腸所組成，pH 值由一開始弱酸至反應完畢則趨於中性，其所需的時間與 pH 值分別為十二指腸：30 - 45 分鐘，pH 4.0-5.5；空腸：1.5 - 2 小時，pH 5.5-7.0；迴腸：5 - 7 小時，pH 7.0-7.5，如 Figure 2-5 所示 (李，1991; Oomen *et al.*, 2002; Intawongse *et al.*, 2006)。然而，比較文獻中胃相於空腹 pH 1.3 與進食 pH 4.0 與平均 pH 2.5 之 ABF 其結果發現，當 pH 越低 ABF 亦越低，顯示 pH 會影響生物有效性 (Ruby *et al.* 1996; Bruce *et al.*, 2007)。另外，在胃相排空率與小腸相輸送率上，Ruby *et al.* (1996)提及 1 小時的胃排空時間上便可消化約 80-90 % 的食物，因此可在後期 Bruce *et*



al. (2007)研究中得知，胃相排空率則採用 1 小時為反應時間；在小腸相輸送時間上較不一致，文獻中範圍為 1 - 4 小時，可能以消化液流經小腸至大腸所需的時間做為小腸輸送時間。第四部份為萃取液前處理方式與分析方法，僅 Bruce *et al.* (2007)使用高速離心再過濾 (孔徑 0.45 $\mu$ m)兩步驟前處理方式，以去除萃取液中懸浮物使分析樣品較澄清，避免上機時懸浮物阻塞孔徑影響分析結果，儀器分析上分別以 ICP-MS、ICP-AES 與 AAS 進行分析，而 ICP-AES 較適合分析高濃度物質，反之 ICP-MS 適合分析低濃度物質且感度較好，偵測極限低。

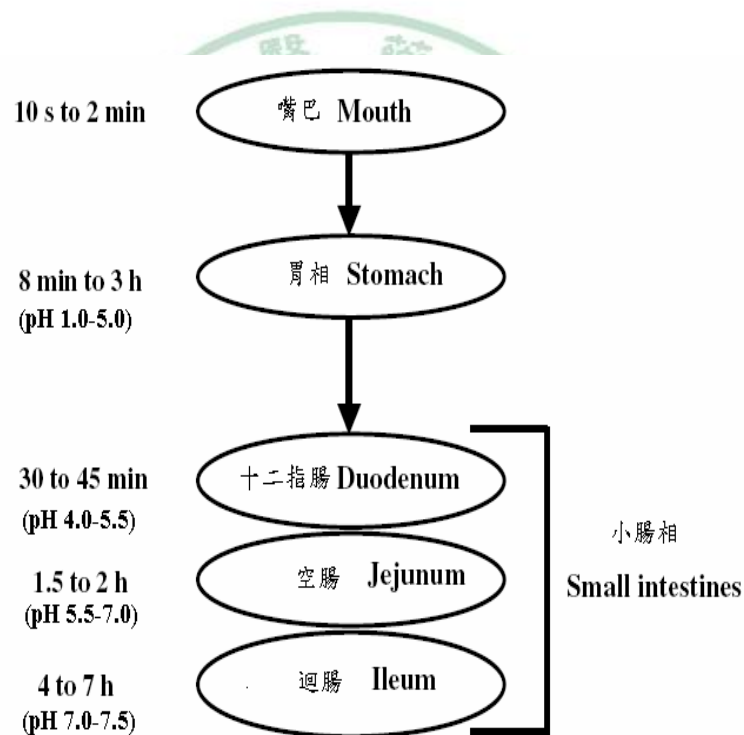


Figure 2-5 人類胃腸道在不同部位之停留時間與 pH 值 (修改 Dean *et al.*, 2007)

### 2-3-2 IVG 試驗方法

IVG 體外試驗方法其全名為 In-vitro gastrointestinal method 為模擬人體胃腸環境，此體外試驗方法文獻中大多探討土壤中砷或者含砷之礦渣、農藥等物質殘留於土壤中之生物有效性，且文獻中亦提及 IVG 試驗方法較 PBET 試驗方法與動物試驗有良好的線性關係 (胃相：R=0.83 vs. 0.51；小腸相：R=0.82 vs.0.75)，並且進一步探討胃相中加入食物 (如麵糰) 與小腸相中加入吸收劑模擬吸收作用對砷之生物有效性影響。(Podriguez *et al.*, 1999; Wragg *et al.*, 2002; Sarkar *et al.*, 2003; Pouschat *et al.*, 2006)。

Table 2-5 為近幾年文獻中採用 IVG 體外試驗方法之參數比較表，本研究將試驗參數分為四部分說明，第一部分為樣品前處理、反應槽體型式、樣品重量及食物添加。在樣品前處理部份，均選用土壤樣品粒徑小於 250  $\mu\text{m}$ 。在反應槽體型式及溫度上，Rodriguze *et al.* (1999) 與 Schroder *et al.* (2004) 均使用玻璃材質容積為 1L 的反應槽體如 Figure 2-6 所示，以及 250 mL 燒杯 (Pouschat *et al.*, 2006) 與 500 mL 血清瓶 (張，2005)。在溫度控制上，則利用水浴方式溫度為 37  $^{\circ}\text{C}$ 。再者，除前期研究 (張，2005) 外，皆利用惰性氣體氮氣或氫氣曝氣方式以及機械式攪拌方式為模擬胃腸之厭氧環境並使胃腸相液體與樣品混合攪拌，在前期研究 (張，2005) 為使用密閉式反應槽體，因此不進行厭氧方式，並使用磁力攪拌方式較機械式攪拌更有效控制攪拌強度。

第二部分為探討胃相萃取環境，包括胃液 pH 值、胃液成分、液固比及胃排空時間，第三部份為探討小腸環境，包括小腸液 pH 值、小腸液成分、吸附劑的使用及小腸輸送時間。由 Table 2-5 可知，此兩部份生理參數，除液固比與小腸相吸附劑外，其餘參數皆一致。在液固比部分，僅前期研究 (張，2005) 使用高液固比 1000:1 mL/gm，其餘皆使用較低液固

Table 2-5 IVG 體外試驗方法之參數比較表

相關文獻 試驗參數	Rodriguze <i>et al.</i> (1999)	Schroder <i>et al.</i> (2004)	張等 (2005)	Pouschat <i>et al.</i> (2006)
樣品前處理	風乾過篩 <250 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <250 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <250 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <300 $\mu\text{m}$
反應槽型式	1 L canning jar	1 L glass jar	500 mL 血清瓶	250 mL 燒杯
有效容積	600 mL	600 mL	500 L	150 mL
溫度	水浴 37°C	水浴 37°C	氣控式 37°C	水浴 37°C
厭養方式	1.0 L/min 氬氣	氬氣	無使用	氬氣
攪拌方式	100 rpm 機械攪拌	100 rpm 機械攪拌	磁力攪拌	100 rpm 機械攪拌
樣品重量	4 gm	4 g	0.5 gm	1 gm
食物	200 gm dough	200 gm dough and no dough	無使用	無使用
胃相萃取				
pH	1.8	1.8	1.8	1.8
液固比 (mL/gm)	150 : 1	150:1	1000:1	150:1
胃液成分	0.15 M NaCl , 1% pepsin	0.15 M NaCl , 1% pepsin	0.15 M NaCl , 1% pepsin	0.15 M NaCl , 1% pepsin
排空率	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr
小腸相萃取				
pH	5.5	5.5	5.5	5.5
小腸液成分	0.35 gm/L bile, 3.5 gm/L pan- creatin	2.10 gm/L bile, 0.21gm/L pan- creatin	1.75 gm/L bile, 0.175 gm/L pan- creatin	3.3 gm/L bile, 0.33 gm/L pan- creatin
吸附劑	iron hydroxide gel	無使用	無使用	無使用
輸送率	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr
萃取液前處理				
離心	10000 rpm, 15 min	5211 $\times$ g, 15 min	3500 rpm, 15 min	無使用
過濾	0.45 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$
分析方法	ICP-HG	ICP-AES	ICP-AES	ICP-MS

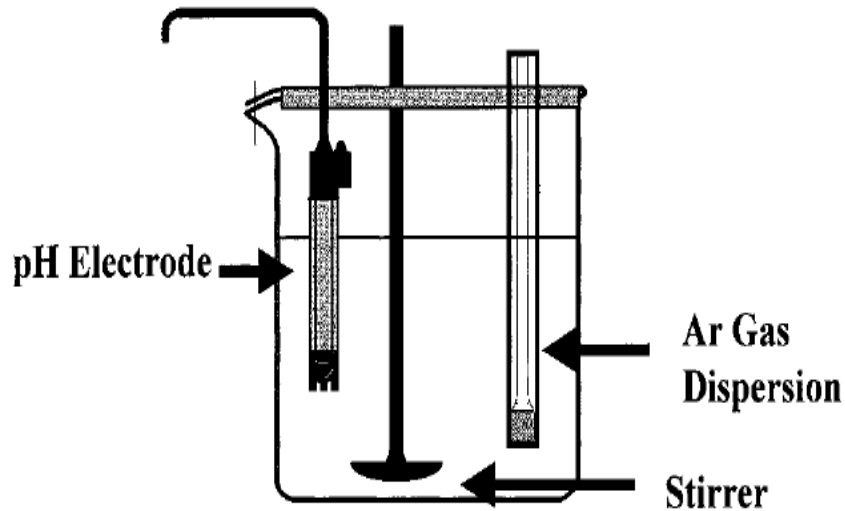


Figure 2-6 Canning jar 反應槽示意圖 (Rodriguze *et al.*, 1999)

比 150:1 mL/gm，然而，文獻中提及不同介質中污染物之溶解度為影響生物有效性之重要參數之一，其溶解度與液固比有關，當人體在飢餓空腹狀態時較傾向於高液固比 (Ruby *et al.*, 1999)。Hamel *et al.* (1998)研究以美國 NIST 2710 標準土壤與 Jersey City 土壤進行胃腸體外試驗比較不同液固比 (100:1 至 5000: 1 mL/gm)對生物有效性之影響，研究結果發現，NIST 2710 土壤樣品於不同液固比時，砷對生物有效性影響較小，但在 Jersey City 土壤中，砷 ABF 會隨液固比升高而增加 ( $R=0.76$ )，因此選擇液固比間 (100:1 至 5000: 1 mL/gm)As ABF 差異較小，介於+12 %與-9 %之 1000:1 mL/gm 當作建議值，如 Figure 2-7 所示。本研究將於後續研究確認 1000:1 mL/gm 液固比當作建議值是否可行。在小腸相吸收劑部分，吸收劑以模擬小腸之吸收作用，Rodriguze *et al.* (1999)比較污染物砷於 IVG 與 IVG-AB 試驗方法中，體外試驗與體內豬試驗之相關性，IVG-AB 是指使用吸收劑對以類似茶包 (tea bag)做為吸附袋將其懸掛在反應瓶中，內含有 iron hydroxide gel (由 0.65 M  $\text{FeCl}_3$  溶液以 2.7 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  中和至 pH 6.0 製備而成)，研究結果發現，IVG 與 IVG-AB 體外試驗方法中，小腸相砷 ABF 與體內豬試驗砷 RBF 呈線性關係 R 值分別為 0.82 (IVG)

與 0.79 (IVG-AB)，表示使用吸附劑以改善吸附效果，對生物有效性影響不大，因此可從 Table 2-4 可發現，往後研究中皆不使用吸收劑進行體外試驗。第四部份為萃取液前處理方式與分析方法，IVG 試驗方法中，大多皆採用高速離心再過濾 (孔徑 0.45  $\mu\text{m}$ ) 此兩步驟前處理方式，最後則選擇 ICP-HG、ICP-AES 與 ICP-MS 等儀器進行分析。

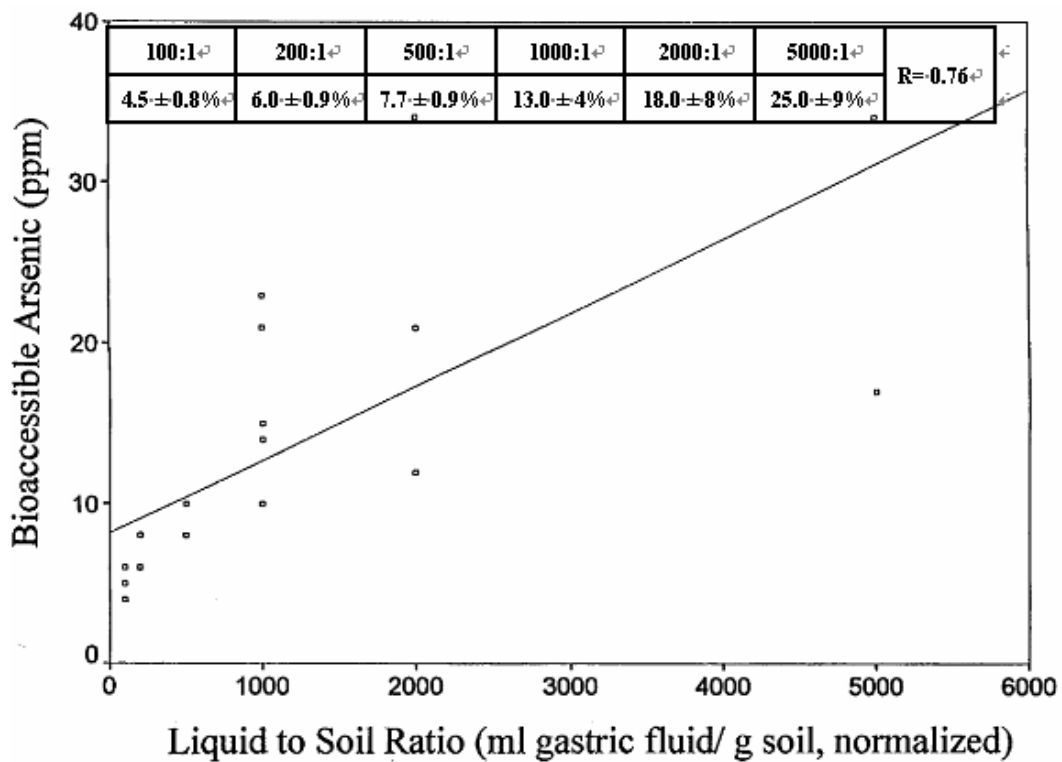


Figure 2-7 在 Jersey City 土壤中，不同液故比與砷 ABF 關係 (Hamel *et al.*, 1998)

再者，比較 IVG 體外試驗方法與 PBET 試驗方法，在胃液成分與胃腸相 pH 值上，IVG 體外試驗方法僅使用 0.15 M NaCl 與 1 % pepsin 備製較 PBET 試驗方法簡單，於小腸相中使用較低之 pH 值為 5.5，相對砷之生物有效性也較 PBET 試驗方法高，但是儘管 pH 5.5 較 PBET 方法 pH 7.0 之萃取效率較高如 Figure 2-8 所示 (Rodriguze *et al.*, 1999)，但 IVG 試驗方法大多研究僅探討砷之有毒物質，若應用到其他重金屬物質仍有疑慮。在胃相排空率與小腸相輸送率上，反應時間 IVG 試驗方法較 PBET 試驗方法一致皆採用 1 小時反應時間，因此本研究將進一步探討使用 1 小時作為反應時間是否可行。

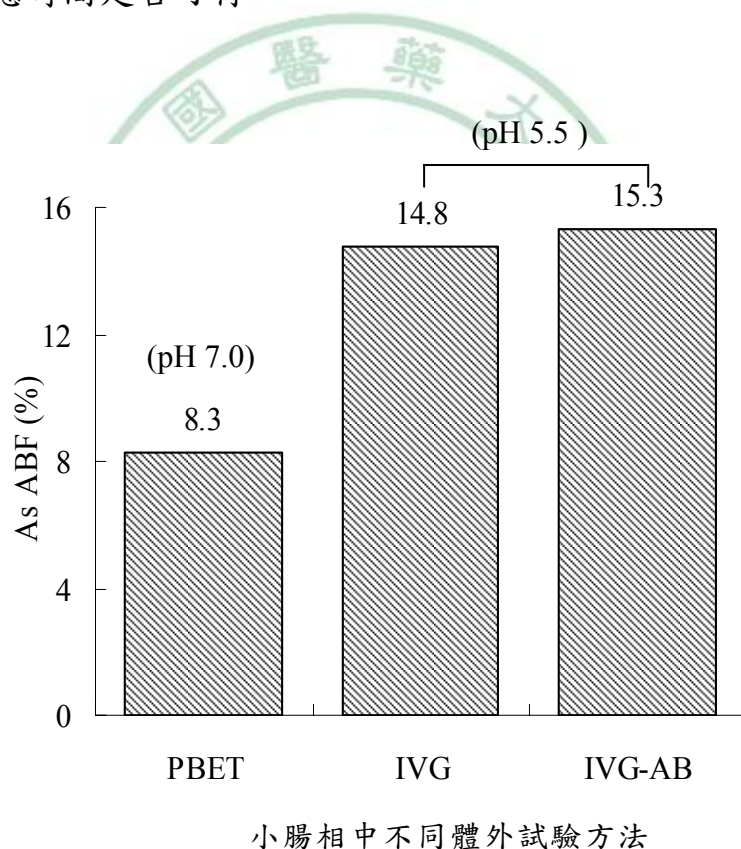


Figure 2-8 比較礦區土壤於不同體外試驗方法之小腸相砷 ABF

### 2-3-3 SBET 試驗方法

SBET 體外試驗方法其全名為 Simplified Bioaccessibility Extraction，此方法為一單相萃取程序僅模擬人體胃相環境，為簡化 PBET 體外試驗方法，近幾年研究學者利用此方法針對礦區場址中受鉛 (Pb)與砷 (As)污染之土壤進行風險評估 (Ruby *et al.*, 1996; Oomen *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2002; Juhasz *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2008)。過去 Ruby *et al.* (1993; 1996; 1999)研究團隊利用 PBET 試驗針對在礦區中受鉛污染之土壤進行體外與體內試驗，研究發現鉛 RBF 與動物實驗呈線性相關 ( $R=0.96$ )，藉由此研究結果，Drexler (1999)學者進一步將 PBET 試驗方法簡化為 SBET 試驗方法並建立標準操作程序。接著，近幾年 Jahasz *et al.* (2007a)研究團隊，則利用 SBET 試驗方法比較礦區中受 As 污染之土壤體外與體內試驗，研究結果亦發現 As ABF 與動物實驗呈線性相關 ( $R=0.96$ )。

Table 2-6 為近幾年文獻中採用 SBET 體外試驗方法之參數比較表，本研究將試驗參數分為三部分說明，第一部分為樣品前處理、反應槽體型式、樣品重量及食物添加。在樣品前處理部份，均選用土壤樣品粒徑小於  $250\ \mu\text{m}$ 。在反應槽體型式及溫度上，分別有兩種反應槽體為廣口 HDPE 瓶 (Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006)以及 125 mL 聚乙烯螺釘帽燒瓶 (Juhasz *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008)，後者反應槽體係參考 Drexler (1999)與 Kelly *et al.* (2002)學者所使用之反應槽體如 Figure 2-9 所示，皆為開放式反應槽體。在溫度控制上，利用水浴方式溫度為  $37\ ^\circ\text{C}$ 。在體外試驗過程中不進行厭氧方式並使用 30 rpm 或 40 rpm 的連續攪拌方式使胃液與樣品混合攪拌。第二部分為探討胃相萃取環境，包括胃液 pH 值、胃液成分、液固比及胃排空時間，此部分生理參數皆一致，胃相 pH 為 1.5，使用低液固比 100:1 mL/gm，胃液成分僅使用氨基乙酸 (glycine)，反應 1 小時。最後在萃取液前處理與分析方法上，僅將萃取液進行過濾

Table 2-6 SBET 體外試驗方法之參數比較表

相關文獻 試驗參數	Kim <i>et al.</i> (2002)	Lee <i>et al.</i> (2006)	Wang <i>et al.</i> (2006)	Juhasz <i>et al.</i> (2007b)	Simth <i>et al.</i> (2008)
樣品前處理	風乾過篩 <180 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <180 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <200 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <250 $\mu\text{m}$	風乾過篩 <250 $\mu\text{m}$
反應槽型式	wide-mouthed HDPE bottle	wide-mouthed HDPE bottle	wide-mouthed HDPE bottle	125 mL 聚乙 烯螺釘帽燒瓶	125 mL 聚乙 烯螺釘帽燒瓶
有效容積	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
溫度	水浴 37°C	水浴 37°C	水浴 37°C	水浴 37°C	水浴 37°C
厭養方式	無使用	無使用	無使用	無使用	無使用
攪拌方式	30 rpm end-over-end rotation	30 rpm end-over-end rotation	30 rpm end-over-end rotation	40 rpm 連續攪拌器	40 rpm 連續攪拌器
樣品重量	1 gm	1 gm	1 gm	1 gm	1 gm
食物	無使用	無使用	無使用	無使用	無使用
胃相萃取					
pH	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
液固比(mL/gm)	100:1	100:1	100:1	100:1	100:1
胃液成分	30.02 gm/L glycine	30.02 gm/L glycine	30.02 gm/L glycine	30.02 gm/L glycine	30.02 gm/L glycine
排空率	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr
萃取液前處理					
離心	無使用	無使用	無使用	無使用	無使用
過濾	0.45 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$	0.2 $\mu\text{m}$	0.22 $\mu\text{m}$
分析方法	ICP	HG-AAS	ICP-MS	ICP-MS	ICP-MS



(孔徑 0.2  $\mu\text{m}$  與 0.45  $\mu\text{m}$ )前處理步驟。綜觀以上三種不同體外試驗方法之萃取液前處理步驟發現並沒有一致，SBET 體外試驗方法相較於 PBET 與 IVG 試驗方法上省略離心此步驟。

鑒於此，本研究將進一步探討萃取液前處理方式是否會影響分析結果以簡化萃取液前處理方式。在儀器分析上 SBET 試驗方法大多使用 ICP-MS 進行分析。

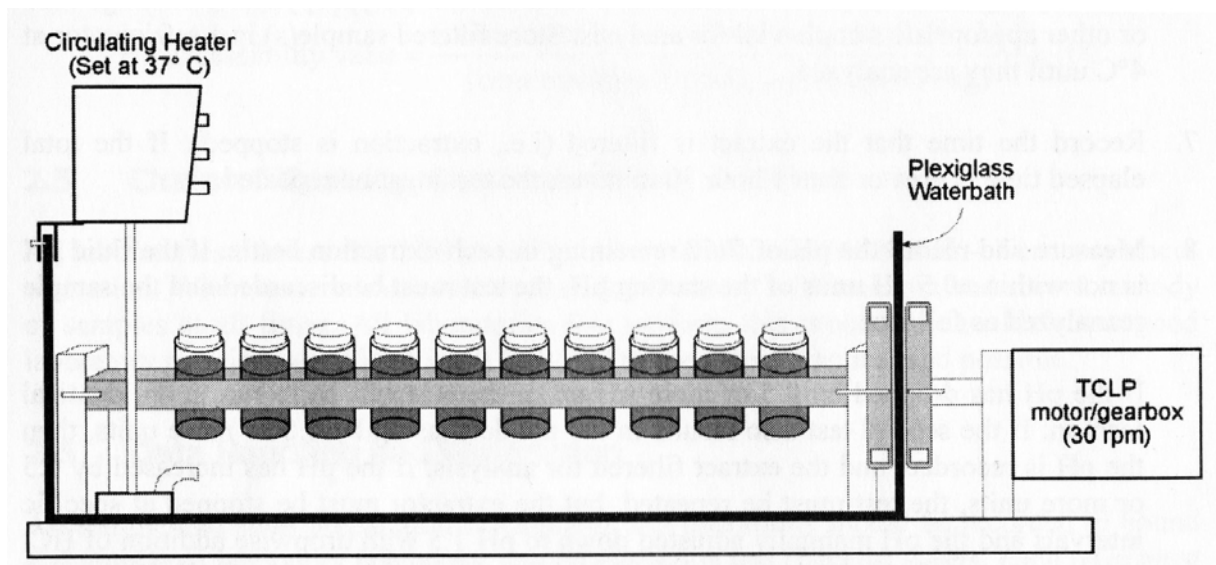


Figure 2-9 125 mL wide-mouth high-density polyethylene (HDPE) bottle 反應槽及攪拌設備示意圖 (Drexler, 1999; Kelly *et al.*, 2002)

#### 2-3-4 體外試驗方法簡化說明

綜觀國外文獻，對於生物有效性體外試驗程序過於複雜且試驗過程中所需的成本高且操作上較費時，因此較不被我國研究學者與業界所重視，鑒於此，本研究綜合上述各節中探討不同體外試驗方法之參數，其生物有效性體外試驗方法主要參考前期研究 (張，2005)的二階段體外試驗程序，特別著重於設備與程序上簡化，設備簡化上包含反應槽設計、溫度控制、攪拌方式與厭氧方式；程序簡化上包含小腸相吸附劑使用、小腸相萃取時間與萃取液前處理步驟，簡化說明如 Table 2-7 所示，本研究將分述如下：

##### (1) 設備簡化部份：

###### A. 反應槽體設計：

在不同體外試驗方法研究中，反應瓶組之設計大多採用開放性的試驗設備，分別有 250 mL 燒杯、PE 分液漏斗、玻璃圓底管、廣口 HDPE 瓶等反應瓶，如 Figure 2-3、2-4、2-6 與 2-9 所示，然而前期研究 (張，2005)則使用密閉系統之反應瓶組 (500 mL 血清瓶)作為體外試驗之反應槽體設備如 Figure 2-10 所示，不僅操作上較為簡易且不易使得待測樣品中有毒物質 (如 Pb、As 等)逸散至空氣中。本研究為安全起見，將文獻中開放性系統之反應槽體設備簡化為使用密閉性系統之反應槽 (500 mL 血清瓶)設備。

###### B. 溫度控制：

在不同體外試驗方法研究中，對於溫度控制上為模擬人體溫度 37 °C，皆使用水浴方式維持人體溫度，但缺點為在實驗過程中不利於觀察與採樣，因此本研究將水浴溫控簡化為氣控式溫控方式，以維持人體溫度。

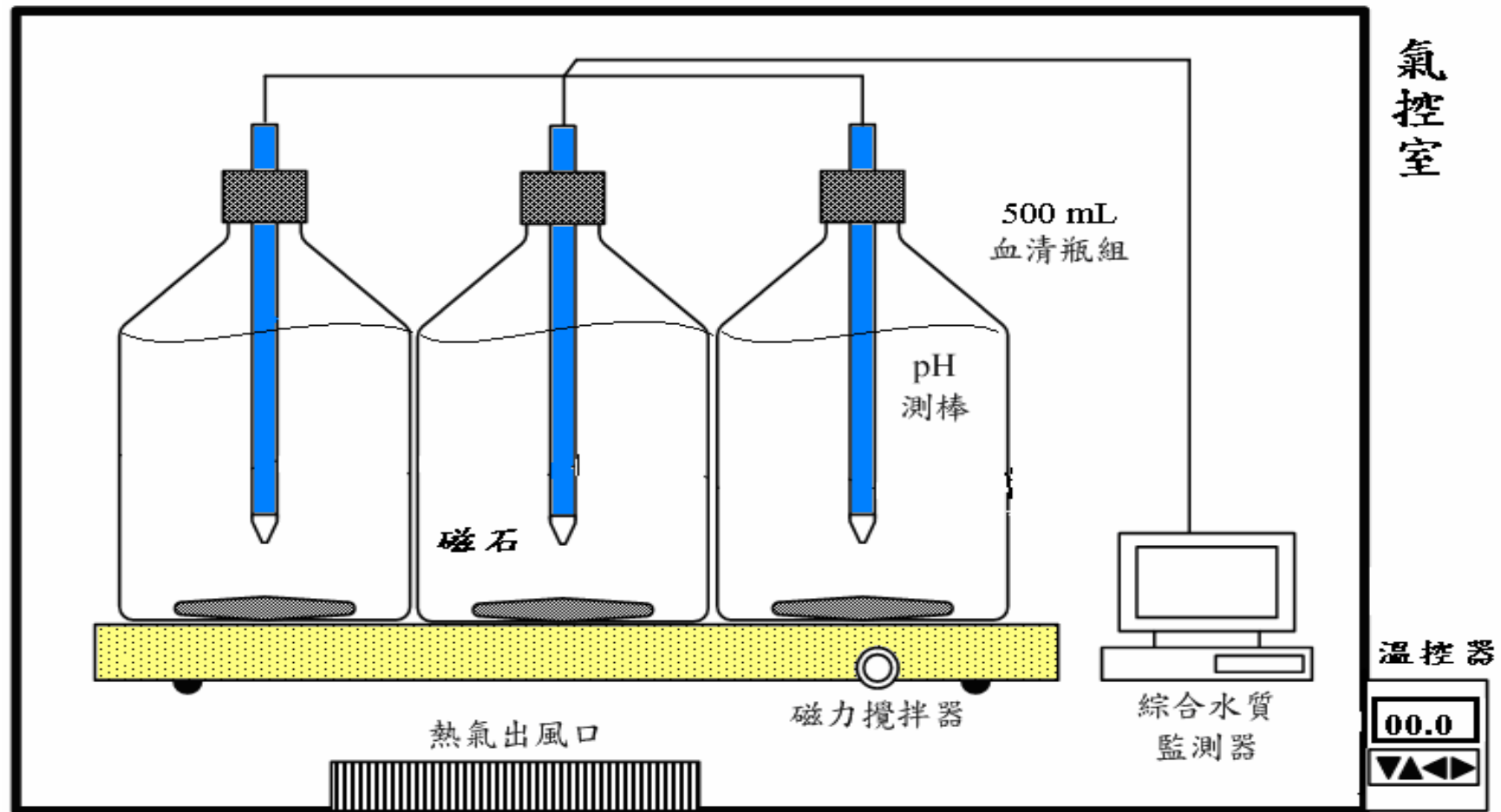


Figure 2-10 本研究群前期研究設計之反應槽體與氣體溫度控制室示意圖 (張，2005)

### C. 攪拌方式：

攪拌方式為模擬人體胃腸蠕動情況，文獻中多以機械式或通入氣體之攪拌方式，將胃腸液與待測樣品進行攪拌混合，但是不適用於密閉式系統之反應槽體。再者，文獻中使用機械式攪拌方式較容易使得待測污染物質在攪拌過程中液散出來，而前期研究 (張，2005) 中使用磁力攪拌方式相較於文獻中攪拌方式，不僅操作簡單、成本低且可以有有效的控制攪拌強度，因此本研究將文獻中大多使用機械式攪拌方式簡化為磁力攪拌方式進行攪拌混合，文獻中也未說明各種攪拌方式效能是否能正確的評估胃腸蠕動情況。

### D. 厭氧方式：

在厭氧方式上，文獻中使用厭氧條件其目的為模擬人體胃腸環境，大多使用惰性氣體氮氣或氬氣曝氣方式維持厭氧狀態，但於整個試驗過程中必須不斷供應氣體，隨反應時間拉長所消耗的氣體量相對增加，成本也會相對提高，在 SBET 試驗方法中可發現，已不使用厭氧方式進行體外試驗且在不進行厭氧方式下，As ABF 與動物實驗也呈線性相關 ( $R=0.96$ ) (Jahasz *et al.*, 2007a)。再者維持厭氧條件是否能有效提昇試驗之準確性，仍待進一步研究，因此，本研究不使用惰性氣體方式維持厭氧方以簡化試驗方法。

## (2) 程序簡化部份：

### A. 小腸相吸附劑：

小腸相吸附劑使用開始於 Rodriguze *et al.* (1999)，於 IVG 試驗方法中，使用吸附劑以模擬小腸相吸收作用，但不易評估是否能正確模擬小腸吸收，且一般而言，體外試驗均低估動物試驗，再者近幾年使用 IVG 方法皆不使用吸附劑即假設吸收率為 100 %，因此，本研究亦不使用吸附劑以簡化試驗程序。

## B. 小腸相萃取時間：

在不同體外試驗方法研究中，僅 PBET 試驗方法對於小腸相萃取時間上較不一致介於 1-4 小時，而 IVG 試驗方法則以 1 小時為反應時間，在前期研究 (張，2005) 中，進行小腸相 11 小時萃取時間每隔 1 小時取樣，研究結果隨小腸相反應時間增加，總砷濃度沒有太大差異，因此以 1 小時做為小腸相萃取時間應達完全反應。根據此結果，本研究將小腸相萃取時間簡化為 1 小時，但由於前期研究之小腸相 pH 值與本研究不同，因此將再進一步探討小腸相 pH 7.0 之萃取時間簡化為 1 小時之可行性。

## C. 萃取液前處理：

在體外試驗研究中，萃取液前處理部份，大多使用高速離心再過濾方式，以去除萃取液中懸浮物，使其較為澄清以避免樣品於上機時阻塞孔徑或產生干擾，影響分析結果，但從前期研究 (張，2005) 中觀察到，進行過濾時萃取液在擠壓過程中，壓阻會逐漸上升而導致不易擠壓，需耗費較大的人力使能完成過濾步驟，鑒於此，本研究將萃取液前處理方法簡化為僅使用高速離心方式取代壓阻過高之過濾方式，並且針對此問題，進一步探討離心再過濾與僅離心之前處理方式對總砷濃度之影響。

Table 2-7 本研究生物有效性體外試驗設備與程序簡化表

簡化參數	文獻參數	本研究參數	簡化說明
<b>設備</b>			
反應槽設計	分液漏斗、燒杯 或廣口 HDPE	密閉式 500 mL 血清瓶	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 文獻中於反應槽體設計較本研究操作複雜。</li> <li>2. 較文獻中開放式反應槽瓶可以減少污染物逸散。</li> </ol>
溫度控制	水浴 (37°C)	氣控式(37°C)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 文獻中使用水浴溫控方式模擬人體溫度較本研究利用密閉式氣控溫控方式利於實驗進行中觀察與採樣。</li> </ol>
攪拌方式	機械式攪拌 或通入氣體	磁力攪拌	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 以模擬胃蠕動情況，文獻中多使用機械攪拌方式，操作複雜且成本高，也未必能確實模擬胃腸蠕動情況。</li> <li>2. 本研究使用磁力攪拌可有效控制攪拌強度，不僅操作簡單且成本低。</li> </ol>
厭氧方式	利用氮氣或氫 氣	不使用	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 文獻中使用惰性氣體維持厭氧狀態，反應時間拉長，所需氣體量相對增加，成本也會提高。</li> <li>2. 在 SBET 試驗中，已不使用厭氧方式進行體外試驗時。</li> </ol>
<b>程序</b>			
小腸相吸附劑	以類似茶包做 吸附袋內含有 iron hydroxide gel	不使用	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 吸附劑為模擬小腸相吸收作用，文獻中提及使用吸附劑不易評估是否能正確模擬小腸相吸收。</li> <li>2. 近幾年研究學者也未使用吸附劑，因此本研究不使用吸附劑以簡化試驗程序。</li> </ol>

小腸相萃取時間	1-4 小時	1 小時	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 乳糜由賁門到迴腸需 1~7 小時，文獻中近幾年研究皆縮短至 1 小時。</li> <li>2. 張(2005)進行小腸相 11 小時萃取時間發現，隨小腸相反應時間增加，總砷濃度無太大差異，則以 1 小時做為小腸相萃取時間應達完全反應。</li> </ol>
萃取液前處理	離心 3500 rpm 與 10000 rpm，15 min，再以 0.2 或 0.45 $\mu\text{m}$ 進行過濾	離心 3500 rpm，15 min	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 文獻中大多進行離心再過濾之前處理步驟，過濾方式，於擠壓過程中，壓阻會逐漸變大不易擠壓，需耗費較大的人力。</li> <li>2. 利用高速離心方式，應可有效將萃取液之懸浮物沉澱至底部。</li> </ol>



### 2-3-5 體外試驗之品管基準

在不同體外試驗方法研究中，大部分的文獻普遍未使用標準參考物質 (SRM)，如砷酸鈉或標準土壤，以建立系統品管基準，以致於無法評比不同體外試驗之萃取效率。僅有部分文獻 (Hamel *et al.*, 1998; Eilckson *et al.*, 2001; Pouschat *et al.*, 2006; 張, 2005) 使用 SRM 進行品管基準，文獻中常用的標準參考土壤有兩種分別為 NIST 2710 與 NIST 2711 (National Institute of Standard and Technology, NIST)，NIST 標準土壤含有相同的土壤基質與物化特性，其粒徑  $< 74 \mu\text{m}$ ，土壤中含有多種的重金屬物質其全量濃度已被公認，並且被各研究室所使用。以砷 (As) 為例，NIST 2710 與 NIST 2711 全量濃度分別為  $626 \pm 38 \text{ mg/kg}$  與  $105 \pm 8 \text{ mg/kg}$ ，NIST 2710 之濃度認證如附錄二所示。

本研究探討文獻中使用 NIST 2710 之標準土壤進行體外試驗之萃取效率，如 Table 2-8 所示。從表中可知，不同體外試驗方法其胃相 ABF 範圍為 28 - 69%，小腸相 ABF 範圍為 25 - 66%，皆以 Eilckson *et al.* (2001) 使用之體外試驗方法萃取效率最高，Pouschat *et al.* (2006) 使用之體外試驗萃取效率最低，進一步探討文獻中體外試驗之參數，其可能原因為受胃相 pH 值與液固比所影響。在 Eilckson *et al.* (2001) 研究中發現，不僅胃相 pH 值較低 (pH 1.4) 且液固比最高 (2000:1)，在 pH 值較低之胃相，土壤中有毒物質較容易被溶解於胃液中，ABF 相對較高且此研究為三相 (唾液-胃相-小腸相) 萃取方法可能會增加萃取效率。從 Hamel *et al.* (1998) 研究可知當液固比越高砷 ABF 也越高，且從 Pouschat *et al.* (2006) 研究中發現，胃相 pH 值較高 (pH 1.8) 與液固比較低 (150:1) 的現象，因此萃取效率較其他研究低。再者，比較液固比相同 (1000:1) 之 Hamel *et al.* (1998) 與張 (2005) 研究中發現，胃相中砷 ABF 分別為 48% 與 39%，但前者研究雖然萃取效率高但並未告知胃相 pH 值，導致無法與後者研究做評比。



Table 2-8 NIST 2710 soil 於不同體外試驗參數與砷之生物有效性比較表

	Hamel <i>et al.</i> (1998)	Eilckson <i>et al.</i> (2001)	張 (2005)	Pouschat <i>et al.</i> (2006)
萃取相	胃-腸 (two-phase)	唾液-胃-腸 (three-phase)	胃-腸 (two-phase)	胃-腸 (two-phase)
攪拌方式	water bath shaker	wrist-action shaker	磁力攪拌	機械攪拌
液固比 (mL/gm)	1000:1	2000:1	1000:1	150:1
pH 值				
胃相	-	1.4	1.8	1.8
腸相	-	5.5	5.5	5.5
ABF (%)				
胃相	48.0	69.4	39.0	27.6
腸相	-	65.9	29.0	25.2

最後，從 Table 2-7 可知，胃腸相 ABF 值變異範圍大，且對於有包封度之土壤，以及根據生物有效性之定義，應以 RBF 值表示較適當，因此本研究建議，於建立系統品管基準時，針對有包封度之土壤應以 RBF 值表示較為適當。

## 2-4 生物有效性體內與體外試驗之評比

在過去針對受砷污染土壤之生物有效性試驗研究中，專家學者多以動物實驗進行評估，包括兔子、猴子與豬，以豬進行體內試驗占大多數，特別是未成熟的豬 (immature swine)，原因為此動物生理反應相似於人類，如砷之代謝反應、營養需求與骨骼發展等。此外，在體型、體重與骨骼比例上相似於孩童此敏感性族群，誤食受污土壤為主要暴露途徑，且以礦區場址為研究地區居多 (Kelly *et al.*, 2002; Juhase *et al.*, 2007a)。由於，使用體內動物試驗進行生物有效性評估，不僅需花費較高成本且較費時，因此專家學者於 1992 年開始著重於體外試驗之研發期能取代體內試驗，減少成本而且快速。因此，近幾年專家學者為了驗證能以體外試驗結果預測體內試驗，同時進行體內與體外試驗並分析兩者試驗間相關性，尤以研究受污土壤鉛較砷多，主要原因為在受污土壤砷中沒有充分的體內試驗資料 (Kelly *et al.*, 2002)。

本研究統整且評析過去數十年，針對受污土壤砷之生物有效性試驗研究中同時進行體內試驗與體外試驗之數據 (Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1996; Rogriguze *et al.*, 1999; Casteel *et al.*, 2001, 2003; Pouschat *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007a)，Figure 2-11 為各個研究中體內與體外試驗砷生物有效性之趨勢圖，文獻中體內試驗以 RBF 值表示，以砷酸鈉作為標準參考物質求得，但在體外試驗中文獻多以 ABF 值表示，僅 Davls *et al.* (1992)與 Rogriguze *et al.* (1999)以 RBF 值表示。從 Figure 2-11 趨勢圖可知，體內試驗 RBF 的平均值約為 25%，RBF 值的 95%信賴區間(95%CI)為 31-19%；體外試驗 ABF 的平均值約為 22%，ABF 值的 95%CI 為 29-16%，且體內試驗 RBF 值與體外試驗 ABF 值均小於 50%，也可發現體外試驗均低估體內動物實驗 (Ruby *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2002)。再者前期研究 (張，2005)評析 Ruby *et al.* (1999)文獻中，統整體內試驗與體外試驗數據，結果顯示體外試驗一般而言低估了豬的體內試驗。

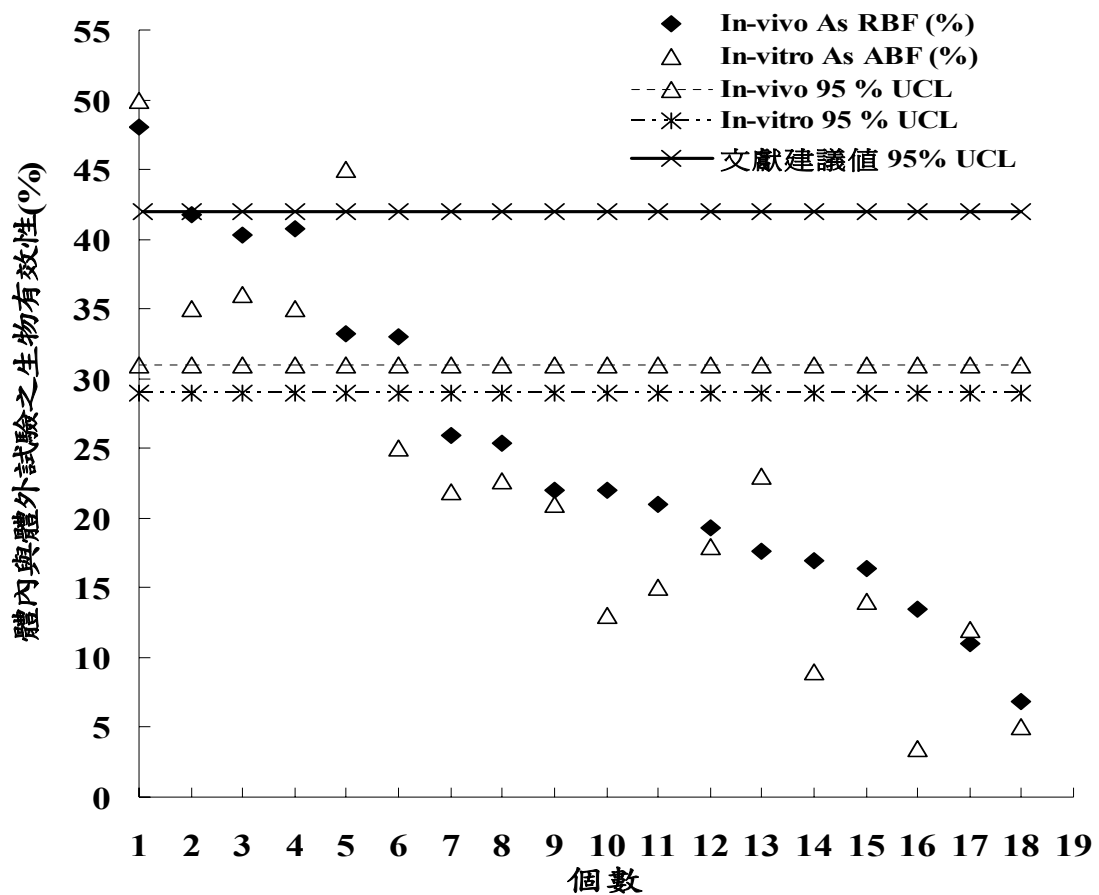


Figure 2-11 不同研究中體內與體外試驗砷生物有效性之比較

在 Casteel *et al.* (2001) 研究中，選取 Superfund site (VBI70) 之土壤樣品，進行體內豬試驗，結果發現 As RBF 平均值為 31 %，95 % UCI 為 42 %，此研究於保守情境下選取 95 % CI 上限值 42 % 為 As RBF 建議值。本研究整合上述研究亦採取保守情境，選取生物有效性最大值，當體外試驗 As ABF 或 RBF 低於體內試驗 As RBF 42 % 時，建議可將二階段胃腸相生物有效性體外試驗簡化為一階段胃相體外試驗。

接著，本研究統整過去數十年同時進行體內試驗與體外試驗之生物有效性之數據進行直線迴歸分析其相關性，雖然生物有效性試驗研究已超過十年，但僅有少數文獻同時針對體內與體外試驗進行迴歸分析，僅 Rodriguze *et al.* (1999)、Castel *et al.* (2001) 與 Juhasz *et al.* (2007a) 等研究，進行體內與體外試驗迴歸分析可知，如 Table 2-9 所示， $R^2$  介於 0.65 - 0.92

Table 2-9 比較文獻中體內與體外試驗生物有效性之迴歸分析

相關文獻	In-vivo As RBF(%)	In-vitro As ABF(%)	迴歸方程式
Rodriguze <i>et al.</i> (1999)	21% - 26%	15% - 21%	$y=0.76x-1.36, R^2=0.67$
Casteel <i>et al.</i> (2001)	18% - 42%	18% - 31%	$y=0.81x+0.05, R^2=0.65$
Juhasz <i>et al.</i> (2007a)	16% - 41%	14% - 35%	$y=0.93x+14.19, R^2=0.92$

，slope 介於 0.76 - 0.93，結果顯示體外試驗 As ABF 與體內試驗 As RBF 皆有良好的線性相關，但體外試驗低估動物試驗達 7 - 24%。再者，本研究試圖將所有文獻中進行體內與體外試驗之數據整合並進行線性迴歸分析，從 Figure 2-12 體內試驗與體外試驗相關性分析可知， $R^2$  為 0.83，slope 為 0.81，顯示體外試驗與體內試驗有良好的線性關係，且體外試驗低估動物實驗達 19% (n=18)，藉由上述結果可知，當體外試驗與體內試驗有良好的線性關係時，可利用便宜且快速之體外試驗方法預測體內試驗之生物有效性，以用來預測人體暴露於砷之健康風險評估。

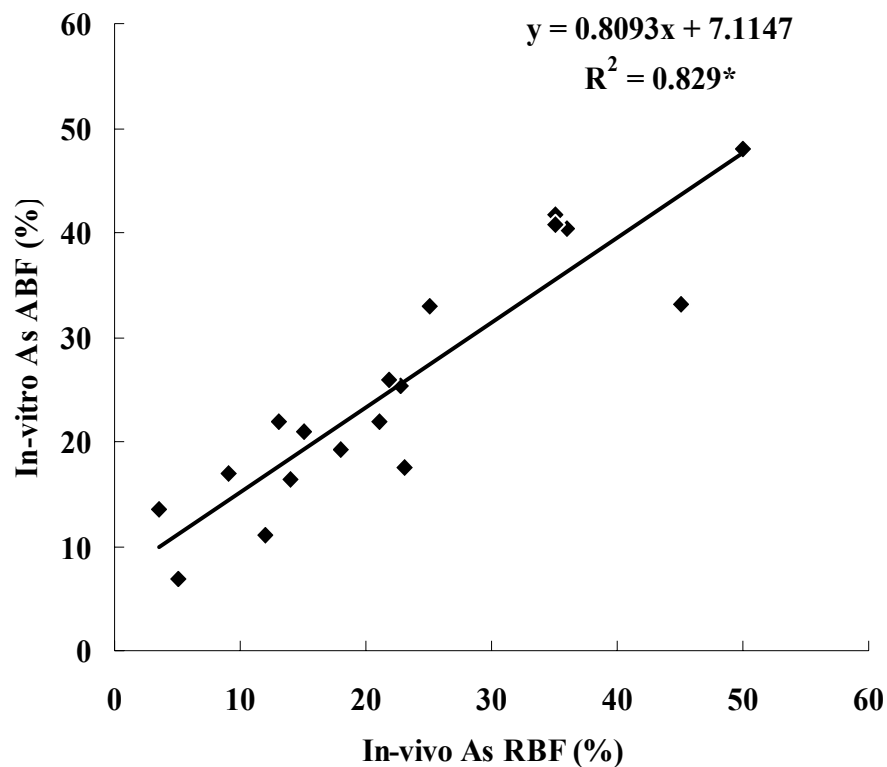


Figure 2-12 比較體內與體外試驗生物有效性文獻值之相關性圖

### 第三章 研究方法

本研究目的為針對受砷污染土壤，探討各試驗參數對生物有效性之影響，並參考試驗結果建立系統品管基準，進而研擬我國生物有效性體外試驗標準方法。以下分四節說明本研究體外試驗程序與試驗參數、實驗設計、ICP-MS 儀器分析方法及數據資料整理與統計方法。

#### 3-1 體外試驗程序與試驗參數

本研究生物有效性體外試驗程序，主要參考前期研究 (張，2005)與 Ruby *et al.* (1996)PBET 體外試驗方法，此方法為簡化美國 EPA Region VIII 建議污染場址復育風險評估之生物有效性體外試驗方法，本研究進而簡化與修改該體外試驗程序，其說明如 Table 3-1 所示。分項說明如下：

##### (1) 樣品前處理部份：

樣品經風乾後，過篩取粒徑小於 250  $\mu\text{m}$ ，以模擬可被手指沾染而誤食之粒徑大小，樣品量取 0.4 - 10 gm，依據液固比 10:1 - 5000:1 mL/gm 比例進行樣品量選取，本研究建議使用樣品量 0.5 gm，液固比 1000:1 mL/gm。

##### (2) 反應槽體設計部份：

本試驗將開放式反應槽改為密閉式 500 mL 血清瓶，可避免污染物逸散，並使用可調速磁力攪拌及具載重環磁石，取代昂貴之氫氣攪拌，可有效控制攪拌強度，同時將水浴溫控改採氣控式溫控方式，以利試驗過程中觀察與採樣，如 Figure 3-1 所示。

##### (3) 胃相試驗部分：

本試驗使用胃相 pH  $1.8 \pm 0.1$ ，以模擬空腹狀態時較低之 pH 值，僅添加 0.15 M NaCl 及 pepsin。Ruby *et al.* (1996)研究，提及人體於反應時間 1 小時可消化 80 - 90 % 的食物，因此本研究將胃相反應時間設定為 1 小時。而且不添加食物以模擬空腹飢餓狀態。

(4) 小腸相試驗部分：

本試驗參考 PBET 試驗方法且為符合人體小腸相之生理條件下，採用小腸相 pH  $7.0\pm 0.1$ ，僅添加 pancreatin 及 bile，反應時間為 1 小時。由於近幾年體外試驗研究中，已不再使用吸附劑模擬小腸相吸收作用，因此本研究不使用吸附劑，以簡化試驗程序。

(5) 萃取液前處理試驗部分：

本試驗使用 3500 rpm 離心，不使用  $0.45\ \mu\text{m}$  進行過濾，由於經離心後之樣品上澄液已無懸浮微粒，因此僅利用離心取代壓阻較高的傳統過濾方式。

綜合上述說明，本研究生物有效性體外試驗程序修改如 Figure 3-2 所示，第一階段用以模擬胃的消化 (gastric phase)，添加 0.15 M NaCl 及 1% porcine pepsin 製備胃液，以濃 HCl 溶液調整至 pH  $1.8\pm 0.1$ ，反應 1 小時後，取胃相之萃取液經離心去除粒狀物後，以 ICP-MS 分析總砷濃度。接著進入第二階段為模擬小腸環境 (intestinal phase)，添加 pancreatin 及 bile，並以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液調整至 pH  $7.0\pm 0.1$  作為小腸液，反應 1 小時後，取小腸相萃取液經相同程序去除粒狀物後，以 ICP-MS 分析總砷濃度。

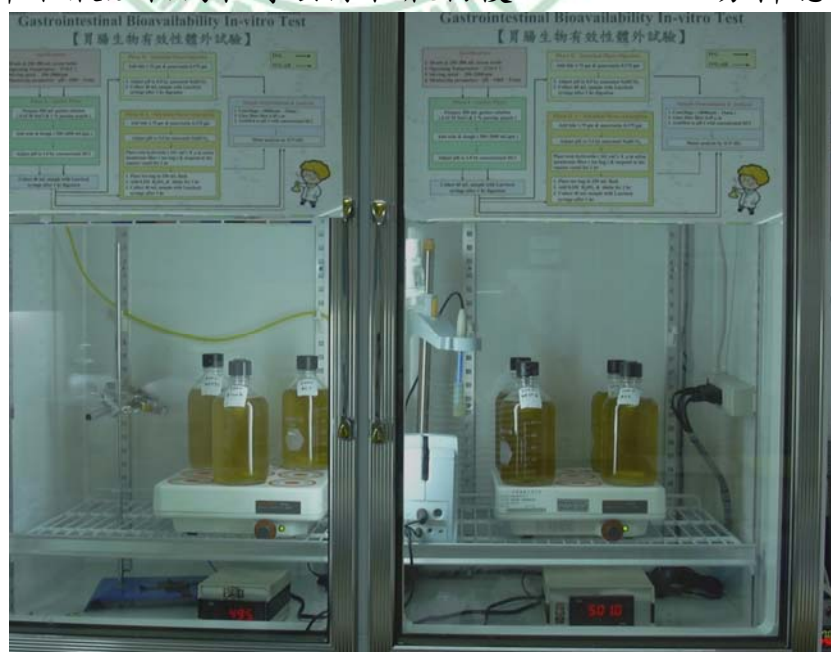


Figure 3-1 本研究體外試驗反應槽體設備

Table 3-1 本研究生物有效性體外試驗參數比較表

參數項目	文獻參數值	本研究參數值	參數說明
樣品前處理	樣品風乾且過篩取粒徑 <math><250\ \mu\text{m}</math>	同意使用	以模擬可被手指沾染且誤食
有效容積	150 - 600 mL 分液漏斗或燒杯	500 mL 血清瓶	以可避免污染物的逸散
溫度控制	水浴 (37°C)	氣控式 (37±0.5 °C)	以利於實驗進行時觀察與採樣
攪拌方式	機械攪拌或曝氣方式	磁力攪拌	可有效控制攪拌強度
厭氧方式	氫氣	不使用	本研究使用密閉反應系統
樣品重量	0.4 - 10 gm	0.5 gm	本研究建議液固比 1000:1 mL/gm
胃相			
pH	pH 1.8	1.8±0.1	1. 以模擬空腹狀態時，有較低之 pH 值 2. 以濃 HCl 溶液調整 pH
胃液	0.15 M NaCl + 1 % pepsin	同意使用	porcine pepsin (activity:800-2500 unit/mg)
液固比	10:1 ~5000:1 mL/gm	1000:1 mL/gm	不添加食物以模擬空腹飢餓狀態
萃取時間	1 hr	同意使用	可消化 80 - 90 % 的食物
小腸相			
pH	5.5 及 7.0	7.0±0.1	以飽和 NaHCO <sub>3</sub> 溶液調整 pH
小腸液	pancreatin 及 bile	同意使用	1. porcine pancreatin: 4X,U.S.P. 2. bile extract:CAS NO. 8008-63-7
吸附劑	使用 iron hydroxide gel 或 strip-coated ferric oxide 以模擬小腸吸收作用	不使用	以簡化試驗程序
萃取時間	1 - 4 hr	1 hr	以簡化試驗程序
萃取液前處理	離心 3500 rpm 與 10000 rpm, 15min, 以 0.45μm 濾紙過濾, 再以濃 HCl 溶液酸化	離心 3500 rpm, 15 min, 但不進行過濾與酸化	1. 以維持胃與小腸相本身之酸鹼值 2. 以簡化試驗程序

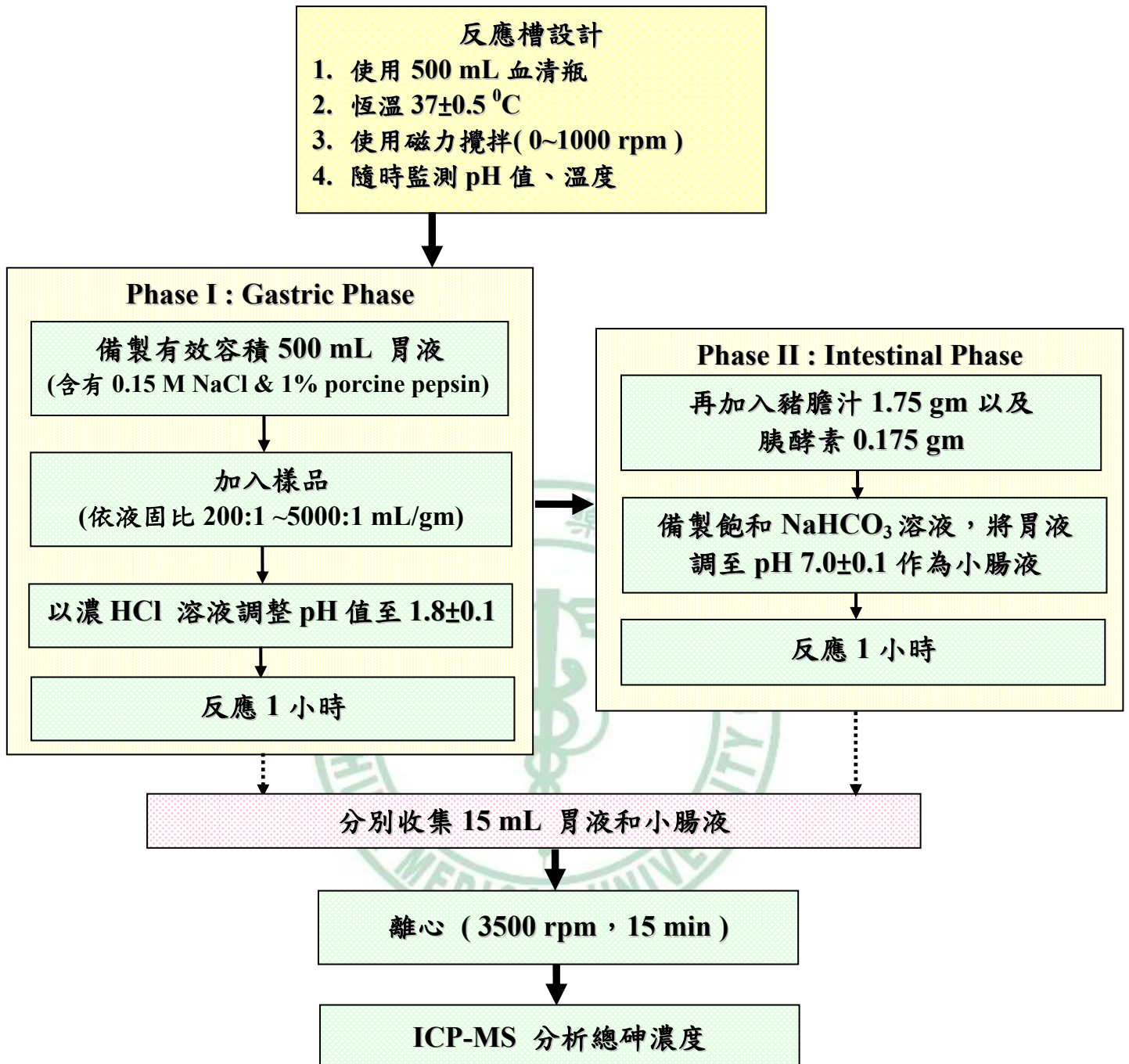


Figure 3-2 本研究二階段胃腸相生物有效性體外試驗程序



### 3-2 生物有效性體外試驗藥劑與設備

本研究進行生物有效性體外試驗所需藥品、試劑與設備分別如下說明：

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  $< 74 \mu\text{m}$ ，砷元素全量濃度為  $626 \pm 38$  (mg/kg)，全量濃度認證如附錄二所示。
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.  $\text{NaHCO}_3$ ：99.5 - 100.3 %，試藥級 (Showa)。
9.  $\text{HNO}_3$ ：69.5 %，試藥級 (Showa)。
10. DI 水：電阻  $> 18\Omega$  (Millipore Milli-Q plus)。
11. 砷標準液：1000 ppm (Merck)。
12. 離心機：15 mL  $\times$  16 pcs, Speed: 4,500 rpm, RCF:  $3,350 \times g$  (HSIANGAI/CN-5100+RS-50 轉盤)。
13. 多點磁力攪拌器：9 點，轉速範圍為 350 - 2000 rpm (Corning, USA/MP9I)。

### 3-3 生物有效性體外試驗之實驗設計

本研究係參考前期研究 (張, 2005) 所建立之體外試驗程序, 如 Figure 3-2 所示, 進一步針對文獻中尚未深入探討之重要參數, 探討體外試驗之各參數對生物有效性之影響。其實驗設部分, 包括蠕動強度 (phase I)、液固比 (phase II)、小腸相萃取時間 (phase III)、萃取液樣品前處理方式 (phase IV), 每一個試驗階段 (phase), 內有三種不同參數試驗, 每種參數試驗除進行六組重複管制樣品 (replication control) 外, 同時進行一組空白管制樣品 (blank control) 測定, 其各試驗階段分述如下:

#### 3-3-1 蠕動強度試驗 (Phase I)

在模擬胃腸蠕動方面, 體外試驗較不易正確模擬, 而文獻中對於胃腸蠕動方式不盡相同, 有機械式攪拌或通氣攪拌等方式如 Table 2-4 至 Table 2-6 所示, 且文獻中也尚未針對胃腸蠕動強度有進一步研究, 鑒於此, 本試驗使用三種不同蠕動強度進行試驗分別為 0、500 及 1000 rpm, 以探討不同蠕動強度對生物有效性之影響, 並固定液固比為 1000:1 mL/gm, 以 Figure 3-2 二階段胃腸相生物有效性體外試驗程序進行試驗。

此外, 根據前期研究 (張, 2005) 對於胃腸之蠕動方式進行深入探討發現, 文獻中 (Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1993, 1996; Hamel *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2003) 未明確說明胃腸之攪拌方式是否能正確評估胃腸蠕動情況, 僅使用轉速 (rpm) 來表示反應槽體之蠕動強度, 本研究也可從近幾年體外試驗文獻中 (Schroder *et al.*, 2004; Pouschat *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007b; Smith *et al.*, 2008) 發現此結果, 但 rpm 易受反應槽有效容積體影響, 因此建議就攪拌原理而言, 使用一般評估反應槽體攪拌強度之速度梯度 (G 值, 單位為  $\text{sec}^{-1}$ ) 表示較為合理。係參考前期研究將 rpm 經由公式推算 G 值, 以探討包封度高的土壤物質, 於不同 G 值中對生物有效性的影響, 推算公式

分述如下說明。

速度梯度公式 (6) (Cerra *et al.*, 1979) :

$$G = \frac{du}{dz} = \sqrt{\frac{P}{\mu V}} \quad (6)$$

其中，G 值指在流體中，兩顆粒間單位距離 (dz) 之速度差 (du)，單位  $\text{sec}^{-1}$ ，P 為功率，單位 W ( $\text{N} \cdot \text{m/s}$ )； $\mu$  為黏度，單位  $\text{N} \cdot \text{s/m}^2$ ；V 為反應槽有效容積，單位  $\text{m}^3$ 。

另前期研究根據 CES (Challenge Environmental System, INC.) 公司使用三種不同種類之磁石進行瓶杯試驗，其中 CES 公司製造大小為  $50 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  具有載重環磁石之研究發現，此款磁石之 P 與 rpm 之公式以及 G 值與 rpm 之關係圖 (CES, 2002)，如 Figure 3-3 所示。

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

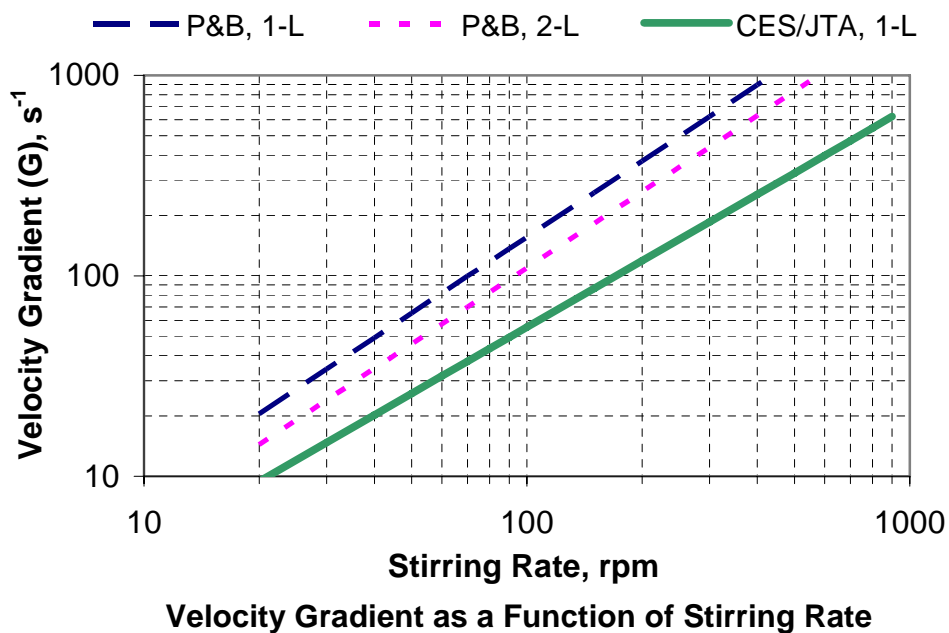


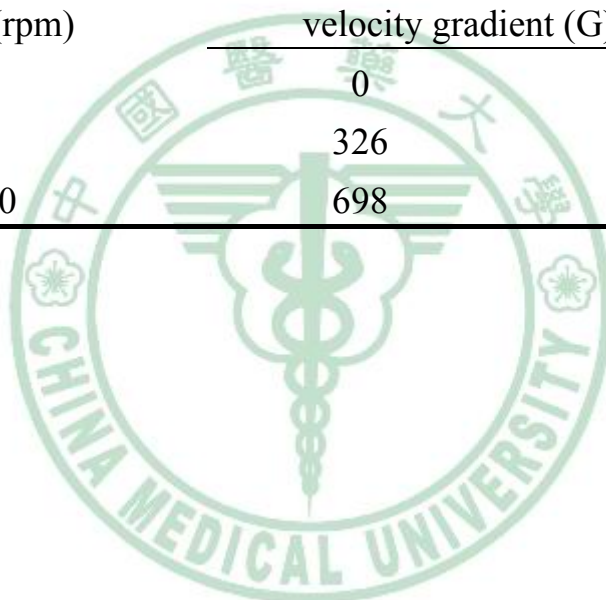
Figure 3-3 rpm 與 G 值之關係圖 (CES, 2002)

另本研究使用之磁石為 CES 公司所製造大小為  $40 \text{ mm} \times 9 \text{ mm}$  具有載重環磁石，但其大小與 CES 公司進行瓶杯試驗所得之 Figure 3-3 所使用之具有載重環之磁石大小不同為  $50 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 。又根據 Lai *et al.* (1975) 研

究提及，P 並不受磁石樣式影響，與磁石的投影面積 (A)有關，即 P 與 A 成正比關係，而由公式 (6)可知，G 值與  $(P)^{1/2}$  成正比，因此推導 G 值與  $(A)^{1/2}$  成正比，又因本研究所使用之有效容積為 0.5 L 與 CES 進行瓶杯試驗之有效容積為 1L 不同，但可由公式 (6)得知，G 值與  $(1/V)^{1/2}$  成正比，最後由上述公式可推導不同轉速對應之 G 值，如 Table 3-2 所示。

Table 3-2 本研究轉速 (rpm)與 G 值對應表

	CES INC. (2002)	本研究
磁石投射面積 (A)	50 mm×10 mm	40 mm×9 mm
有效容積 (V)	1 L	0.5 L
轉速 (rpm)	velocity gradient (G), sec <sup>-1</sup>	
0	0	0
500	326	470
1000	698	1006



### 3-3-2 液固比試驗 (Phase II)

文獻中提及，於不同介質中目標污染物的溶解度是影響生物有效性之重要參數，而溶解度與液固比有關 (Ruby *et al.*, 1999)。理論上，當未達到飽和溶解度前，於相同的有效體積下，液固比越高溶解度越高。正常人每天胃液分泌量大約為 1500 mL，而人體產生飢餓空腹 (fasting) 狀態時，迷走神經會促使胃液分泌 (李, 1991)，可能會產生較高的液固比。

本試驗為簡化體外試驗程序，以不添加食物的飢餓狀態來模擬，液固比選取則參考 Hamel *et al.* (1998) 學者設定之液固比範圍，擬使用三種不同液固比進行試驗，分別為 200:1、1000:1 及 5000:1 mL/gm，反應槽有效體積為 500 mL，依液固比比列計算所需之樣品量，如 Table 3-3 所示，於 Phase II 試驗中，固定蠕動強度 G 值為  $470 \text{ sec}^{-1}$  (500 rpm)，以模擬胃相蠕動情況，探討不同液固比對生物有效性之影響。

Table 3-3 三種不同液固比之備製劑量表

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

### 3-3-3 小腸相萃取時間試驗 (Phase III)

本研究彙整 1992 年至今生物有效性體外試驗參數發現，各研究學者對於小腸相萃取時間並不一致，範圍介於 1-4 小時，如 Table 3-1 所示，因此本試驗探討小腸相萃取時間對  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 總砷濃度之影響，依 Figure 3-2 試驗程序進行，蠕動強度 G 值為  $470 \text{ sec}^{-1}$  (500 rpm)，液固比為 1000:1 mL/gm，小腸相反應時間由 1 小時延長至 11 小時，每隔 1 小時採樣一次，共 11 點，並繪製濃度與時間之趨勢變化圖。

### 3-3-4 樣品萃取液前處理試驗 (Phase IV)

本研究依據環檢所公告之 ICP-MS 分析方法 (NIEA W313.50C)，樣品於採樣後須經  $0.45 \mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾，以去除懸浮粒，再以硝酸溶液酸化水樣至 pH 值  $\leq 2$ ，方能保存六個月，Figure 3-3 為本研究進行萃取液過濾方法示意圖，A 為 20 mL 針筒、B 為內裝置胃相或小腸相之萃取液、C 為  $0.45 \mu\text{m}$  飛碟濾頭、D 為 15 mL 離心管。本研究不進行酸化前處理步驟，以避免破壞胃相與小腸相本身酸鹼值。再者，使用  $0.45 \mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾，再擠壓過程會產生較高的壓阻而不利擠壓，需耗費較大力氣方能過濾完畢，因此，本研究探討離心再過濾與僅離心兩種不同前處理方式對總砷濃度的關係，以簡化萃取液前處理之步驟，依 Figure 3-4 試驗程序進行，蠕動強度 G 值為  $470 \text{ sec}^{-1}$  (500 rpm)，液固比為 1000:1 mL/gm。

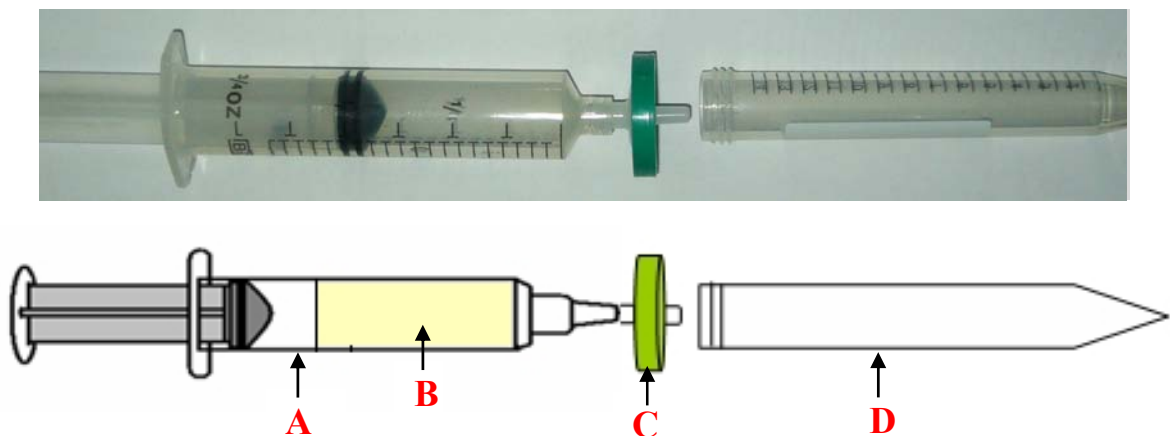


Figure 3-4 樣品萃取液過濾方法結構示意圖

### 3-3-5 建立系統品管基準 (PhaseV)

本研究為了解各體外試驗之信賴度，建議試驗過程中應進行標準管制樣品 (control sample) 之平行測定。綜觀過去學者進行體外試驗方法，由於各試驗程序與參數條件不盡相同，且多數試驗並未進行各種管制樣品平行的測定，導致無法評比不同試驗結果之萃取效率，鑒於此，本研究建立各種管制樣品之品管基準，分別有四種品管基準：試劑空白管制、重複樣品管制、砷酸鈉標準管制以及介質標準管制。試劑空白管制為了解試劑水中是否含有待測污染物。為了解試驗方法之複現性及準確性，應平行測定標準參考物質，並進行六重複試驗，以求得 ABF 之變異係數 (coefficient of variation, CV)。最後進六重複介質標準樣品 (如美國 NIST 標準土壤)，求得 RBF 與 CV，以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，若管制樣品之試驗結果符合品管基準時，才能接受待測樣品的試驗結果。

### 3-4 重金屬砷之感應式耦合電漿質譜儀(ICP-MS)分析方法

#### 3-4-1 ICP-MS 儀器與操作條件

本研究係參考行政院環境保護署環境檢驗所於 2004 年公告之檢測方法，編號 NIEA W313.50C：感應耦合電漿質譜法 (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS)，以分析  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 於胃相和小腸相中萃取液之總砷濃度。本研究所使用 ICP-MS 儀器型號為 Perkin-Elmer SCIEX DRC II，其操作條件如 Table 3-4 所示。

由於本試驗分析之總砷濃度為模擬胃腸相反應 1 小時後之萃取液樣品，由於萃取液內含有酵素成分與胃腸相本身酸鹼值，若萃取液經消化或酸化之前處理，除了易破壞胃液與小腸液本身之 pH 值外，也易溶解被包封的樣品砷，可能導致總砷濃度增加，而高估砷濃度，因此本試驗不進行酸化步驟。又本試驗使用 3500 rpm 進行離心，以取代傳統過濾方法 (以 0.45  $\mu\text{m}$  孔徑過濾)，經離心後之萃取液樣品較為澄清可直接上機分析，不再進行過濾處理，以簡化繁瑣之過濾前處理步驟。同時建立儀器分析之品質管制包括：檢量線查核溶液分析、樣品空白分析、重複樣品分析、品管樣品分析與樣品添加分析等。



Table 3-4 ICP-MS 儀器操作條件

<b>ICP-MS Condition</b>	
Instrument	Perkin-Elmer ELAN DRC II
Torch	Normal "short" type
RF power	1050 W
Plasma gas flow	15 L/min
Auxiliary gas flow	0.85 L/min
Nebulizer gas flow	0.75 L/min
Ion lens setting	
Bassel box plate	-60.62 V
Bassel box lens	3.98 V
Einzel lenses	9.44 V
Photon stop lens	-9.05 V
Sampler orifice diameter	Pt, 1.14 mm
Skimmer orifice diameter	Pt, 0.89 mm
Mass spectrometer pressure	$2.0 \times 10^{-6}$ Torr
<b>Data acquisition</b>	
Dwell time	20 ms
Scanning mode	peak hopping
Sweeps/reading	250
Reading/replicates	1
Number of replicates	4
Points/spectral peak	3
Resolution	high
Peak monitored	m/z <sup>75</sup> As

### 3-4-2 重金屬砷之品質管制

本研究係參考環保署環檢所公告，包括四個部分為檢量線製作、儀器偵測極限、方法偵測極限、品質管制，分述如下：

#### 1. 檢量線 (Calibration curve) 製備：

檢量線製備，係以檢測儀器測定至少五點已知濃度標準品之訊號，求出標準品濃度與訊號間的關係，繪製相關線性圖並計算相關係數，檢量線相關係數需大於等於0.995。本研究使用市售砷標準品 (Merk)，濃度為1000 ppm 單一標準溶液，依序配製檢量線標準濃度為 5、25、50、100、200、400  $\mu\text{g/L}$ 。本試驗砷之檢量線如Figure 3-5所示，其線性方程式為 $y = 2289.8x + 1131.4$ ， $R^2$ 為0.9999，符合方法 $\geq 0.995$ 之規定。

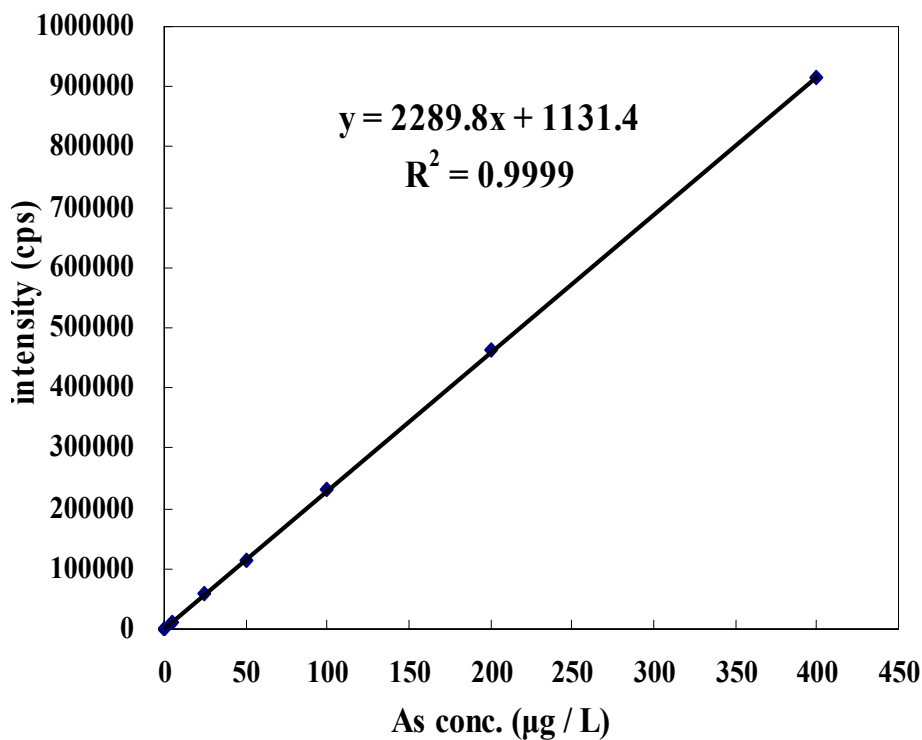


Figure 3-5 砷之檢量線圖

## 2. 儀器偵測極限 (Instrument detection limit, IDL) :

取空白試劑水為樣品溶液，上機分析測得強度值，重覆檢測7次後利用檢量線，將強度值換算成濃度值，計算濃度平均值及標準差，標準差之3倍即為ICP-MS之儀器偵測極限，本研究IDL為0.02 µg/L。

## 3. 方法偵測極限 (Method detection limit, MDL) :

取含有基質之待測物進行七次分析，由其測值計算平均值及標準偏差，標準偏差之3倍即為方法偵測極限，本研究MDL為0.91 µg/L。

## 4. 品質管制 :

本研究所進行之品管管制項目有：檢量線查核溶液分析、試劑空白分析、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值與本實驗之實測值如 Table 3-5 所示。

Table 3-5 本研究 ICP-MS 品質管制基準與實測值比較表

品質管制項目	管制基準	實測值
檢量線查核溶液分析	回收率 90-110%	91-109 %
試劑空白分析	濃度 < 2×MDL	ND.
重複樣品分析	相對差異百分比 ±10%	0.33-1.34 %
品管樣品分析	回收率 80-120%	94-104 %
樣品添加分析	回收率 80-120%	95-107%

ND.= non-detected (MDL=0.91 µg/L)

由 Table 3-5 可知，本實驗之檢量線查核溶液分析回收率為 91-109 %；試劑空白分析濃度均低於 2 倍的 MDL；重複樣品分析相對百分誤差為 0.33-1.34 %；品管樣品分析回收率為 94-104 %；樣品添加回收率為 95-107 %。依上述各項品質管制項目之實測值數據，均符合法規管制標準。

### 3-5 數據資料整理與統計分析

本研究將所有實驗數據資料係使用 Microsoft Office Excel 2003 整理建檔後，再以 SPSS 12.0 版統計分析套裝軟體進行分析。主要運用統計方法包括描述性統計和分析性統計，分述如下：

#### 1. 描述性統計

- Phase I 胃蠕動強度試驗：

計算  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之濃度值，並利用濃度值計算 ABF 與 RBF，再分別表示各組蠕動強度在胃相與小腸相中砷 ABF 平均值、標準差 (SD)及變異係數 (CV)。

- Phase II 液固比試驗：

計算  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之濃度值，並利用濃度值計算 ABF 與 RBF，再分別表示各組液固比在胃相與小腸相中砷 ABF 平均值、標準差 (SD)及變異係數 (CV)。

- Phase III 小腸相萃取時間試驗：

計算  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之濃度值，並計算小腸相中總砷濃度平均值、標準差 (SD)與相對誤差。並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。

- Phase IV 樣品萃取液前處理試驗：

計算  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 胃相與小腸相之濃度值，再分別表示各組萃取液前處理在胃相與小腸相中平均濃度、標準差 (SD)及變異係數 (CV)。

## 2. 分析性統計

- 單變項分析

本研究將  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  胃相與小腸相之 ABF 與 RBF，依各試驗參數，如蠕動強度、液固比、萃取液前處理等變項分層比較，剔除試驗之偏離值 (outlier) 後，由於本試驗樣本數有限，因此採用無母數統計方法 Kruskal-Wallis test (克-瓦二氏單因子等級變異數分析) 進行統計分析，NIST 2170 soil 亦如此。以比較  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 之胃相和小腸相，在 95% 信賴區間 (95% CI) 下，不同試驗參數之 ABF 與 RBF 有無顯著性差異。

- 相關性分析

本研究分析  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2170 soil 之 ABF，在胃腸相中不同試驗參數間之相關性，分別為速度梯度 (G 值為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$ ) 以及液固比 (200:1、1000:1、5000:1 mL/gm)。



## 第四章 結果與討論

### 4-1 蠕動強度試驗 (Phase I)

本研究比較在三種不同速度梯度 (G 值為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$ ) 時， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 兩種樣品對生物有效性之影響。Figure 4-1 為在胃相與小腸相中，不同速度梯度與  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  以及 NIST 2710 soil 之砷 ABF 關係圖，從圖中可分為兩部分說明：

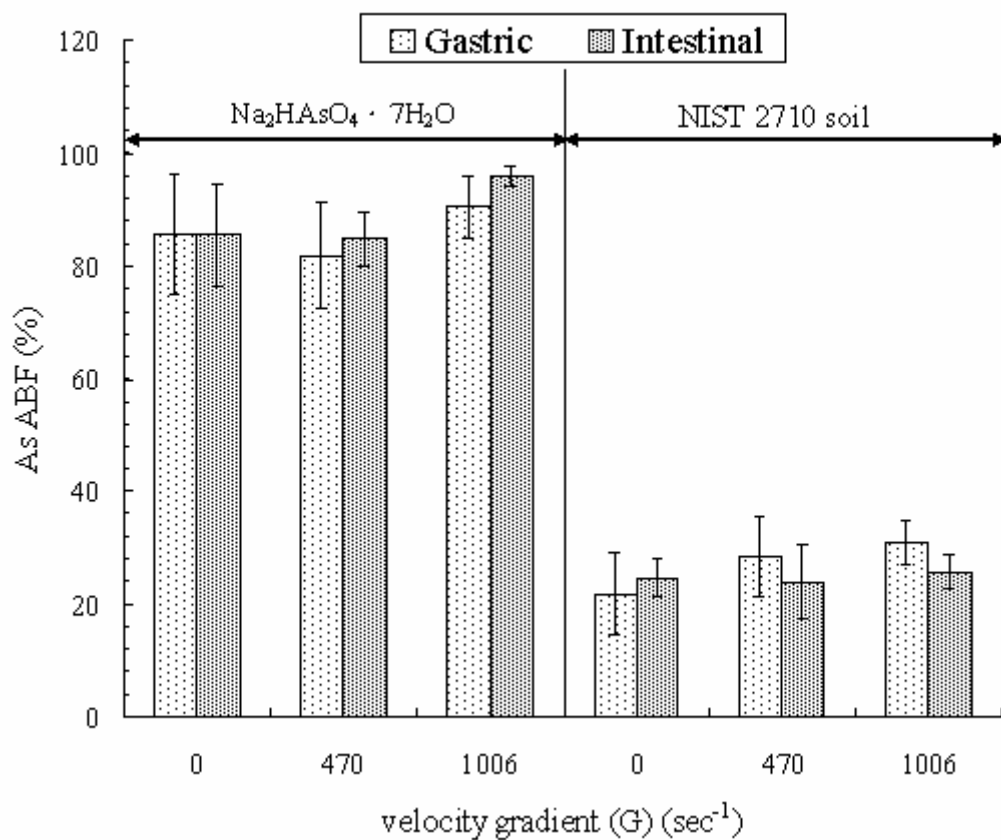


Figure 4-1 速度梯度與  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 砷 ABF 關係圖

- (1) 在  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  部分：胃相中，當 G 值為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$  時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $86 \pm 10\%$ 、 $82 \pm 5\%$ 、 $91 \pm 7\%$ 。當 G 由 0 升至 470  $\text{sec}^{-1}$  時，砷 ABF 下降 4%；當 G 由 470 升至 1006  $\text{sec}^{-1}$  時，砷 ABF 增加 9%，顯示 G 值由 470 升至 1006  $\text{sec}^{-1}$  時砷 ABF 有增加趨勢。在小腸相中，當 G 為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$  時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $86 \pm 9\%$ 、 $85 \pm 7\%$ 、 $94 \pm 3\%$ 。當 G 由 0 升至 470

sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 下降 1 %；當 G 由 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 增加 11 %，顯示 G 值由 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup> 時砷 ABF 有增加趨勢。由此可知，在胃相和小腸相中，當 G 值由 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup>，砷 ABF 有增加趨勢，進一步由相關性分析得知，在胃相與小腸相中，當 G 值由 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup> 時對砷 ABF 影響不大，皆呈中度相關 (R=0.61 vs. 0.69)。且在相同的 G 值 (470 與 1006 sec<sup>-1</sup>) 中，小腸相較胃相似乎有高的砷 ABF 皆增加 3 %。

- (2) 在 NIST 2710 soil 部分：胃相中，當 G 為 0、470、1006 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為 22±9 %、28±2 %、31±6 %。當 G 由 0 升至 470 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 增加 6 %；當 G 從 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 增加 3 %，顯示當 G 值越大，砷 ABF 有增加趨勢大。在小腸相中，當 G 為 0、470、1006 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為 25±5 %、24±3 %、26±3 %，表示當 G 由 0 升至 470 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 僅下降 1 %；當 G 從 470 升至 1006 sec<sup>-1</sup> 時，砷 ABF 增加 2 %，顯示在不同的蠕動強度對砷 ABF 影響不大。由此可知，在胃相和小腸相中，不同蠕動強度對 NIST 2710 soil 之 ABF 雖有增加趨勢但影響不大，進一步由相關性分析得知相關性不大 (R=0.52 vs. 0.14)。且在相同的 G 值 (470 與 1006 sec<sup>-1</sup>) 中，胃相較小腸相似乎有較高的砷 ABF。

Table 4-1 為比較 Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 及 NIST 2710 soil 兩種樣品，在胃與小腸相中，三種不同蠕動強度對砷 ABF 統計比較表，在 Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 部分，不論在 pH 較低之胃相或 pH 較高之小腸相，不同 G 值對砷 ABF 皆沒有顯著性差異 (p value=0.21 vs. 0.10)，且蠕動強度越大，砷 ABF 越高；在 NIST 2710 soil 部分，不同 G 值對胃相與小腸相中砷 ABF 也沒有顯著性差異 (p value=0.54 vs. 0.72)，蠕動強度越大，砷 ABF 增加趨勢

Table 4-1 不同速度梯度(G)時砷 ABF 統計比較表

	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		NIST 2710 soil	
	Gastric <sup>2</sup>	Intestinal <sup>3</sup>	Gastric <sup>2</sup>	Intestinal <sup>3</sup>
<b>G=0 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	85.6	85.5	21.9	24.6
CV (%)	12.5	10.8	41.4	19.1
<b>G=470 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	81.8	84.8	28.4	23.9
CV (%)	6.7	8.6	5.7	14.3
<b>G=1006 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	90.5	94.8	30.8	25.8
CV (%)	7.9	3.6	21.1	12.1
p value	0.21	0.10	0.54	0.72

<sup>1</sup> Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

<sup>2</sup> Testing condition: 37 °C, pH 1.8±0.1, L/S=1000:1 mL/gm and reaction time for 1 hr.

<sup>3</sup> Testing condition: pH 7.0±0.1 and reaction time for 1 hr.

不大。再者 Table 4-2 為在三種不同 G 值中 NIST2710 之砷 RBF 統計比較表，在胃相中，砷 RBF 分別為 25.6 %、34.7 %、34.0 %；在小腸相中，砷 RBF 分別為 28.8 %、28.2 %、26.9 %。且不論在 pH 較低之胃相或 pH 較高之腸相，不同 G 值對砷 RBF 皆無顯著性差異，且胃相 RBF 均高於小腸相 RBF。

Table 4-2 不同速度梯度(G)時 NIST 2710 soil 砷 RBF 統計比較表

	Mixing Intensity (sec <sup>-1</sup> )			p value
	0	470	1006	
RBF <sub>G</sub> <sup>1</sup> (%)	25.6	34.7	34.0	0.054
RBF <sub>I</sub> <sup>2</sup> (%)	28.8	28.3	27.3	0.607

<sup>1</sup> RBF<sub>G</sub>= relative arsenic bioavailability factor at the gastric phase= ABF<sub>NIST 2710 soil</sub> / ABF<sub>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</sub>. Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

<sup>2</sup> RBF<sub>I</sub>= relative arsenic bioavailability factor at the intestinal phase= ABF<sub>NIST 2710 soil</sub> / ABF<sub>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</sub>. Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.



本研究進行三種不同速度梯度 ( $G$  值為 0、470、1006  $\text{sec}^{-1}$ ) 試驗，綜合上述研究結果發現，對  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  而言，在胃相與小腸相中， $G$  值越高，砷 ABF 似乎較高，其可能原因為，砷酸鈉溶解度大 (5.46  $\text{gm}/100\text{mL}$  at  $0^\circ\text{C}$ ) 且包封度較低，不論在 pH 較低之胃相或 pH 較高之小腸相，蠕動強度越大，溶解度越大，使砷 ABF 在  $G$  值 1006  $\text{sec}^{-1}$  較大，但在統計上發現，不論在胃相或小腸相，不同速度梯度對砷 ABF 皆無顯著性差異，表示  $G$  值對 ABF 影響不大。對 NIST 2710 soil 而言，在胃相中，因 pH 較低，包封度變低，而使  $G$  值對 ABF 影響較小，在小腸相中，因 pH 較高，包封度變高，不易溶解，而使  $G$  值對 ABF 較有影響，但在統計上可發現，不論在胃相或小腸相，不同速度梯度對砷 ABF 與 RBF 皆無顯著性差異，表示  $G$  值似乎不是一個重要的實驗參數。

此外，綜觀體外試驗研究中 (Ruby *et al.*, 1996; Rogriguze *et al.*, 1999; Casteel *et al.*, 2001, 2003; Kim *et al.*, 2002; 張, 2005; Wang *et al.*, 2006; Pouschat *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007b)，本研究在 NIST 2710 soil 之砷生物有效性與文獻中土壤之胃腸相砷生物有效性一樣皆小於 55%，表示在健康風險評估上，也說明若使用保守情境 100% 被人體胃腸道所吸收，會高估風險，進而增加整治成本。再者本研究在不同  $G$  值中，胃相砷 RBF (26%、35%、34%) 均大於小腸相砷 RBF (29%、28%、27%)。且低估動物實驗砷 RBF 文獻建議值 42% (Rogriguze *et al.*, 1999; Casteel *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2002; Juhasz *et al.*, 2007a)，表示若將二階段體外試驗簡化為一階段胃相體外試驗應是可行的。

另本研究體外試驗以  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  做為 SRM，但文獻中大多未報告  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  之砷 ABF，僅 2 篇文獻 (Davls *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1996) 以及前期研究 (張, 2005) 有說明，因此相較於文獻體外試驗方法發現，如 Table 4-3 所示。本研究砷 ABF 均低於文獻 Ruby *et al.* (1996)

Table 4-3 本研究  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與文獻參數值及砷 ABF 比較表

	Davls <i>et al.</i> (1992)	Ruby <i>et al.</i> (1996)	張 (2005)	本研究
攪拌方式	Wrist-action shake	底座 70 $\mu\text{m}$ 網 狀曝氣	磁力攪拌 500 rpm	磁力攪拌 500 rpm
液固比(mL/gm)	14:1	100:1	1000:1	1000:1
pH 值				
胃相	1.3	1.3	1.8	1.8
小腸相	7.0	7.0	5.5	7.0
ABF (%)				
胃相	-	103	102	82
小腸相	73	96	99	85
分析方法	GFAAS	ICP-AES	ICP-AES	ICP-MS

與張 (2005)之值高於 Davls *et al.* (1992)小腸相文獻值，根據表中顯示，本研究在胃相砷 ABF 低於 Ruby *et al.* (1996)，可能原因為受胃相 pH 值所影響，本研究胃相 pH 值 1.8 相較於文獻 pH 值 1.3 高，雖使用高液固比，但在 pH 值較高情況下， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  較不易溶解於溶液中，導致有較低萃取效率，進一步可從 Ruby *et al.* (1996)與張 (2005)比較發現，影響砷 ABF 之萃取效率，受 pH 值影響較液固比大。但相較於前期研究 (張，2005)於相同參數條件下，本研究之萃取效率較前期研究低，其可能原因為儀器分析選擇不同，由於本研究分析使用 ICP-MS 分析，其稀釋倍數較 ICP-AES 來得高導致計算原濃度時使檢測誤差放大，或者是保存時間較長而導致 As 污染物之全量濃度降低，須於後續進行確認。再者相較於 Davls *et al.* (1992)研究，本研究 ABF 高於文獻值，可能原因為本研究使用磁力攪拌較文獻使用 Wrist-action shake 較易使反應槽內的溶液完全混合攪拌，使  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  更容易溶解於溶液中，且本研究液固比較文獻值高，Hamel *et al.* (1998)研究中提及，高液固比對砷有較高之 ABF，綜合以上探討，僅提出可能影響之因素，但確切原因需進一步研究。

## 4-2 液固比試驗 (Phase II)

本研究比較在三種不同液固比 (200:1、1000:1、5000:1 mL/gm)時  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 兩種樣品對生物有效性之影響。Figure 4-2 指在胃與小腸相中，不同液固比 (Liquid to Solid ratio, L/S)與  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 之砷 ABF 關係圖，圖中可分為兩部分說明：

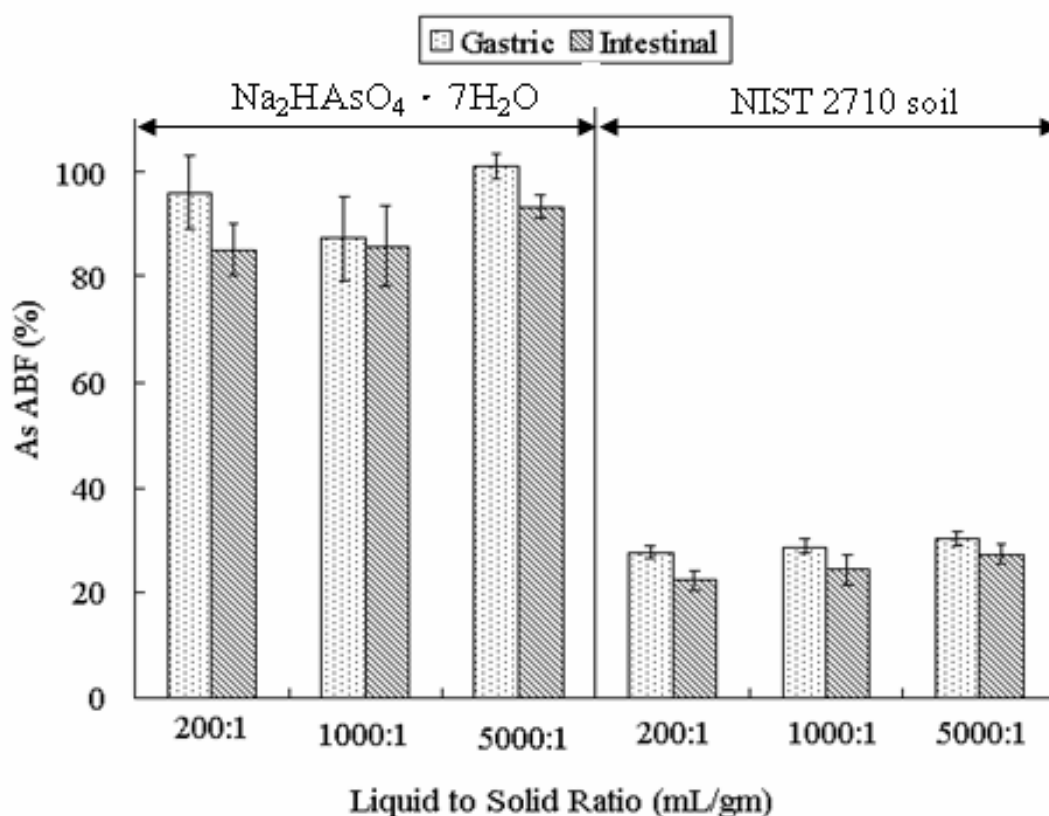


Figure 4-2 液固比與  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 砷 ABF 關係圖

- (1) 在  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  部分：胃相中，當 L/S 為 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $96 \pm 7\%$ 、 $87 \pm 8\%$ 、 $101 \pm 2\%$ 。當 L/S 由 200:1 升至 1000:1 時，砷 ABF 下降 9%；當 L/S 從 1000:1 升至 5000:1 時，砷 ABF 增 14%，顯示當液固比在 1000:1 升至 5000:1 時，砷 ABF 增加趨勢較明顯。在小腸相中，當 L/S 為 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $85 \pm 5\%$ 、 $86 \pm 8\%$ 、 $93 \pm 3\%$ ，顯示當液固比在 1000:1 升至 5000:1 時，砷 ABF

增加趨勢較明顯。由此可知，在胃相和小腸相中，當液固比由 1000 升至 5000 mL/gm，砷 ABF 有增加趨勢，進一步由相關性分析得知，在胃相與小腸相中，當液固比由 1000 升至 5000 mL/gm 時對砷 ABF 影響不大，皆呈中度相關 ( $R=0.46$  vs.  $0.64$ )。再者，比較胃相與小腸相砷 ABF 在相同液固比中，胃相砷 ABF 高於小腸相。

- (2) 在 NIST 2710 soil 部分：胃相中，當 L/S 為 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $28\pm1\%$ 、 $29\pm1\%$ 、 $30\pm1\%$ ，顯示當液固比越大，砷 ABF 增加趨勢不明顯；在小腸相中，當 L/S 為 200:1、1000:1、5000:1 mL/gm 時，砷 ABF 平均值與標準差分別為  $21\pm3\%$ 、 $24\pm3\%$ 、 $27\pm2\%$ ，顯示當液固比越大，砷 ABF 有逐漸增加趨勢。進一步由相關性分析得知，在胃相與小腸相中，不同液固比時對砷 ABF 影響不大，呈中度相關 ( $R=0.59$  vs.  $0.68$ )。再者，比較胃相與小腸相砷 ABF 在相同液固比中，胃相砷 ABF 高於小腸相。

Table 4-4 為比較  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 兩種樣品，在胃與小腸相中三種不同液固比對砷 ABF 統計比較表，在  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  部分，不論在 pH 較低之胃相與 pH 較高之腸相，不同液固比對砷 ABF 皆無顯著性差異 ( $p$  value= $0.07$  v.s.  $0.06$ )。在 NIST 2710 soil 部分，胃相中不同液固比對砷 ABF 沒有顯著性差異 ( $p$  value= $0.06$ )；在小腸相中不同液固比對砷 ABF 有顯著性差異 ( $p$  value= $0.02$ )為限制因子，說明腸相在不同液固比對 As 之 ABF 影響較大，因此在進行二階段體外試驗時，液固比選擇上於保守情境下選擇最大值較適當。再者，Table 4-5 為不同液固比中 NIST 2710 之砷 RBF 統計比較表，在胃相中，砷 RBF 分別為  $28.7\%$ 、 $33.0\%$ 、 $29.8\%$ ，在小腸相中，砷 RBF 分別為  $24.6\%$ 、 $28.4\%$ 、 $29.4\%$ ，且不論在 pH 較低之胃相或 pH 較高之小腸相，不同液固比對砷 RBF 皆無顯著性差異 ( $p$  value= $0.053$  v.s.  $0.203$ )，此外胃相 RBF 皆高於小腸相 RBF。

Table 4-4 不同液固比(L/S)時砷 ABF 統計比較表

	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		NIST 2710 soil	
	Gastric <sup>2</sup>	Intestinal <sup>3</sup>	Gastric <sup>2</sup>	Intestinal <sup>3</sup>
<b>L/S=200:1 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	96.4	85.1	27.5	21.1
CV (%)	7.4	5.9	4.5	8.1
<b>L/S =1000:1 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	87.2	85.8	28.6	24.4
CV (%)	9.1	8.9	4.2	12.2
<b>L/S =5000:1 (n=5)</b>				
ABF <sup>1</sup> (%)	101.0	93.2	30.1	27.4
CV (%)	2.2	2.5	4.5	7.2
p value	0.07	0.06	0.06	0.02*

<sup>1</sup> Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

<sup>2</sup> Testing condition: 37 °C, pH 1.8±0.1, G= 470 sec<sup>-1</sup> and reaction time for 1 hr.

<sup>3</sup> Testing condition: pH 7.0±0.1 and reaction time for 1 hr.

Table 4-5 不同液固比(L/S)時 NIST 2710 soil 砷 RBF 統計比較表

	Liquid to Solid Ratio (mL/gm)			p value
	200:1	1000:1	5000:1	
RBF <sub>G</sub> <sup>1</sup> (%)	28.7	33.0	29.8	0.053
RBF <sub>I</sub> <sup>2</sup> (%)	24.6	28.4	29.4	0.203

<sup>1</sup> RBF<sub>G</sub>= relative arsenic bioavailability factor at the gastric phase= ABF<sub>NIST 2710 soil</sub> / ABF<sub>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</sub>. Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

<sup>2</sup> RBF<sub>I</sub>= relative arsenic bioavailability factor at the intestinal phase= ABF<sub>NIST 2710 soil</sub> / ABF<sub>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</sub>. Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

本研究進行 3 種不同液固比 (200:1、1000:1、5000:1 mL/gm) 試驗，整合上述結果發現，對 Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 而言，在胃相與小腸相中，液固比越高砷 ABF 似乎較高，尤其是液固比 5000:1 mL/gm，但在統計上胃相與小腸相，不同液固比砷 ABF 與 RBF 皆沒有顯著性差異，顯示不同液固比對砷 ABF 影響不大，可能原因為砷酸鈉溶解度大 (5.46 gm/100mL at

0 °C)且包封度較低，不論在 pH 較低胃相或 pH 較高小腸相，液固比對砷之生物有效性影響不大。對 NIST 2710 soil 而言，在胃相中，液固比越高砷 ABF 越高，統計上沒有顯著性差異，但在小腸相中，液固比越高砷 ABF 也相對越高，統計上有顯著性差異，可能原因為在 pH 較低之胃相，包封度降低，溶解度變大，使液固比對胃相砷 ABF 影響較小，在小腸相中，因 pH 值較高，包封度變高，溶解度變小而不易溶解，使液固比對砷 ABF 較有影響，但在不同液固比中小腸相砷 RBF 為 NIST 2710 soil 與 SRM 之 ABF 相除校正值，並沒有顯著性差異，由此可知 NIST 2710 soil 在液固比選擇上需較注意，然而在有包封度之土壤，若僅進行一階段胃相試驗時，液固比似乎不是一個重要的參數條件，但若進行二階段體外試驗時，在小腸相液固比選擇上，應以健康風險評估為考量依據，採用保守情境選擇對砷 RBF 影響較大之液固比。

此外，綜觀體外試驗研究中 (Ruby *et al.*, 1996; Rogriguze *et al.*, 1999; Casteel *et al.*, 2001, 2003; Kim *et al.*, 2002; 張, 2005; Wang *et al.*, 2006; Pouschat *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007b), 本研究 NIST 2710 soil 之砷生物有效性與文獻值皆小於 55%，表示在健康風險評估上，使用生物有效性實測值而不使用 100% 保守情境估計風險，不僅可降低不確定性且會減少整治成本。再者本研究在不同液固比中，胃相砷 RBF 與 ABF 皆較小腸相高且低估動物實驗砷 RBF 文獻建議值 42% (Rogriguze *et al.*, 1999; Casteel *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2002; Juhasz *et al.*, 2007a), 表示若將二階段體外試驗簡化為一階段胃相體外試驗應是可行的。

然而，在過去不同體外試驗研究中，大多使用低液固比 (10:1-150:1 mL/gm)，PBET 與 SBET 體外試驗以使用 100:1 mL/gm 較多 (Ruby *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Juasz *et al.*, 2007b; Bruce *et al.*, 2007)，而 IVG 體外試驗以使用 150:1 mL/gm 較多 (Rodriguze *et al.*, 1999; Pouchat *et al.*, 2006)，僅 Hamel *et al.* (1998) 探討在胃相中不同

液固比範圍 (100:1、200:1、500:1、1000:1、2000:1 與 5000:1 mL/gm)對生物有效性之影響，然而本研究與前期研究則依據 Hamel *et al.* (1998)設定液固比範圍中選取 3 種不同液固比進行探討。Figure 4-3 為文獻與本研究以及前期研究中，NIST 2710 soil 於不同液固比胃相砷 ABF 之比較圖。

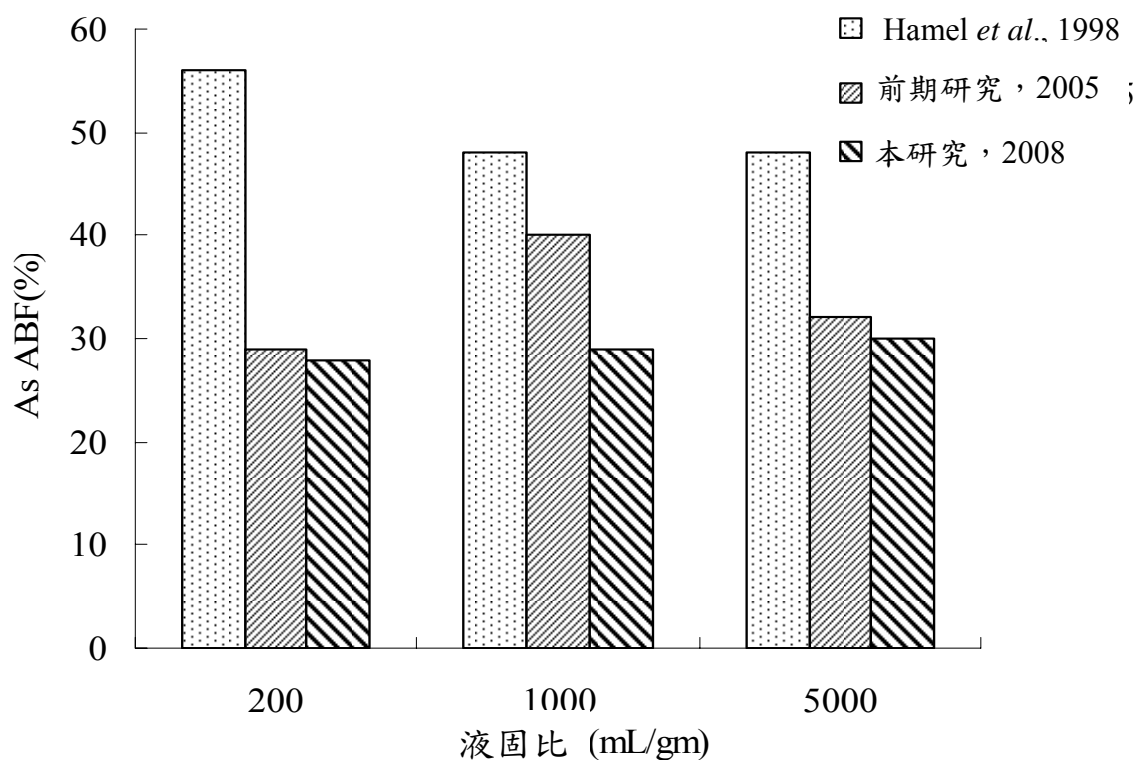


Figure 4-3 NIST 2710 soil 於不同液固比胃相砷 ABF 之比較圖

從 Figure 4-3 中可發現，本研究及前期研究 NIST 2710 soil 之胃相砷 ABF 相較於文獻，在不同液固比中皆低於文獻值，顯示本研究之生物有效性體外試驗在胃相中萃取效率低於文獻值，可能原因為體外試驗設計不同所影響，因此本研究進一步比較各體外試驗參數，如胃蠕動方式、胃液酵素成分、胃相 pH 值、排空比等參數，如 Table 4-6 所示，比較參數發現，可能影響因素有胃相 pH 值與排空率，由於 Hemal *et al.* (1998) 研究中未說明胃相 pH 值，因此無法評比是否受 pH 值影響，但從 Eillckson *et al.* (2001) 研究中，也使用 NIST 2710 soil 進行體外試驗發現，當 pH 值

Table 4-6 NIST 2710 soil 於不同體外試驗胃相參數比較表

	Hamel <i>et al.</i> (1998)	張 (2005)	本研究
攪拌方式	Wrist-action shake	磁力攪拌	磁力攪拌
胃液成分			
NaCl	0.13 M	0.15 M	0.15 M
pepsin	12.8 mg/L	12.5 mg/L	12.5 mg/L
pH 值			
胃相	-	1.8	1.8
排空率	2	1	1

降低至 1.4 時砷 ABF 提高至 69 %，但此研究採用高液固比為 2000:1 mL/gm，因此砷 ABF 可能會受 pH 值所影響。然而在排空率上，文獻值雖較本研究多反應 1 小時，但未有其他文獻可評比，因此造成本研究 ABF 較文獻值低之詳細原因尚待釐清。





### 4-3 小腸相萃取時間試驗 (Phase III)

本研究將小腸相萃取時間由 1 小時延長至 11 小時，每隔 1 小時採樣一次共 11 點，分別分析  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 NIST 2710 soil 兩種樣品之總砷濃度趨勢變化，並以第 1 個小時為基準計算第 2-11 小時平均相對誤差。

從 Figure 4-4 可知，在  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  部分，第 2 個小時相較於第 1 個小時其總砷濃度有明顯下降 8 mg/L 趨勢，在第 2 個小時後，隨著小腸相萃取時間增加，總砷濃度變動幅度似乎沒有太大的差異；在 NIST 2710 soil 部分，第 2 個小時相較於第 1 個小時其總砷濃度有下降 0.02 mg/L 趨勢，在第 2 個小時後，隨著小腸相萃取時間增加，總砷濃度變動幅度不大。

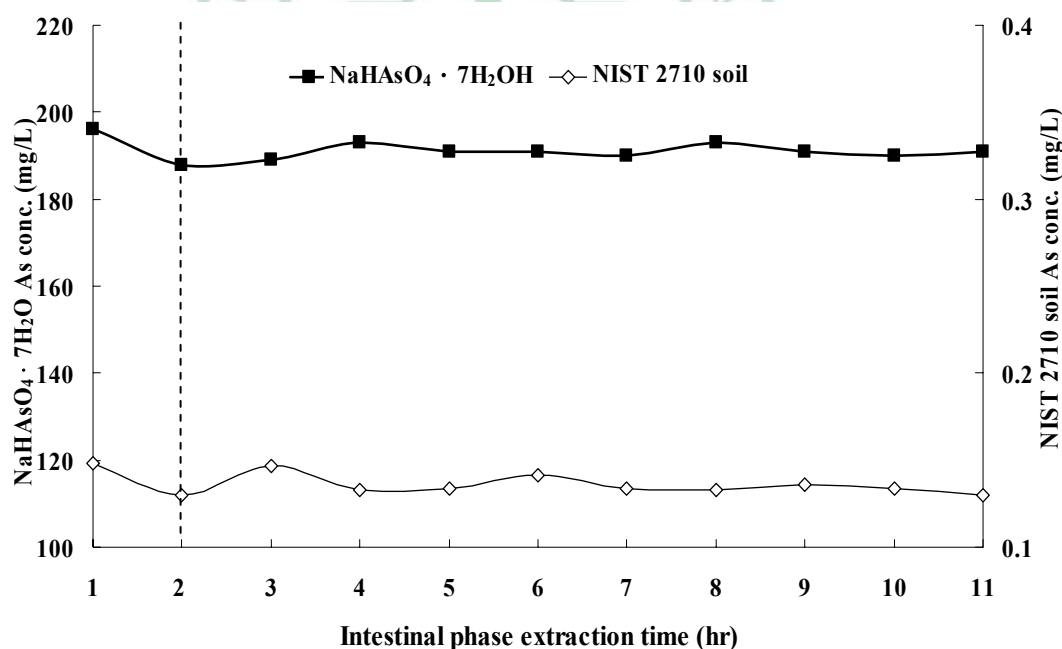


Figure 4-4 小腸相 1-11 小時萃取時間與總砷濃度關係圖

從 Table 4-7 可知，在  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  部分，第 1 小時總砷濃度為 196 mg/L，第 2-11 小時平均濃度為 191 mg/L，而第 2-11 小時總砷濃度相較於第 1 個小時之平均相對誤差為 2.7%。

Table 4-7 小腸相於不同 pH 值時萃取時間與總砷濃度比較表

	本研究(pH 7.0)		前期研究 <sup>3</sup> (pH 5.5)	
	Na <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	NIST 2710 soil	Na <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	NIST 2710 soil
As conc. (mg/L)				
1 hr	196	0.15	253	0.19
2-11 hr <sup>1</sup>	191	0.14	259	0.20
relative error <sup>2</sup> (%)	2.7	8.6	2.3	4.7

<sup>1</sup> Values reported are mean from 2 to 11 intestinal extractable hours

<sup>2</sup> relative error (%) = (| C<sub>i</sub> - C<sub>1</sub> | / C<sub>1</sub>) × 100 %, C<sub>1</sub> = As conc. at first hour; C<sub>i</sub> = As conc. at i hour, i = 2-10.

<sup>3</sup> Values are reported from Chang, 2005.

在 NIST 2710 soil 部分，第 1 小時砷濃度為 0.15 mg/L，而第 2-11 小時平均濃度為 0.14 mg/L，第 2-11 小時總砷濃度相較於第 1 個小時之平均相對誤差為 8.6 %。由此結果可知，Na<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 與 NIST 2710 soil 平均相對誤差皆在 10 % 以內，此結果與前期研究 (張，2005) 相符。然而從 Table 4-7 亦可發現，前期研究 (張，2005) 之總砷濃度皆比本研究總砷濃度高，在體外試驗參數相同情況下僅小腸相 pH 值不同，前期研究小腸相 pH 值為 5.5，本研究為 pH 值為 7.0，從此可知，本研究總砷濃度較低之可能原因受 pH 值所影響，文獻中提及 pH 越低，總砷濃度與生物有效性越高 (Ruby *et al.*, 1999)。

綜合上述結果，於小腸相萃取時間試驗中，以 1 小時為小腸萃取時間應可達完全反應，然而近幾年文獻中使用不同體外試驗方法對於小腸相萃取時間大都採用 1hr 為主 (Rogriguze *et al.*, 1999; Schroder *et al.*, 2004; Pouschat *et al.*, 2006; Bruce *et al.*, 2007)，前期研究 (張，2005) 小腸相萃取時間也為 1 小時，因此本研究則建議小腸相反應時間為 1 小時是可行的，以縮短萃取時間。

#### 4-4 樣品萃取液前處理試驗 (Phase IV)

本研究探討離心再過濾與僅離心兩種前處理方式對  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 之總砷濃度影響。從 Table 4-8 不同萃取液前處理對總砷平均濃度統計表可知，離心再過濾前處理方式，胃相與小腸相之總砷濃度， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  分別為 189.6、127.4 mg/L；NIST 2710 soil 分別為 0.14、0.07 mg/L。僅進行離心前處理方式，胃相與小腸相之總砷濃度， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  分別為 190.2、136.5 mg/L；NIST 2710 soil 分別為 0.20、0.08 mg/L，由結果可知，僅進行離心前處理，總砷濃度雖然較離心再過濾高，但於 95 % CI 下，胃腸相之  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 皆無顯著性差異 ( $p=0.22$  vs.  $0.06$ ;  $p=0.15$  vs.  $0.06$ )，表示此兩種前處理方式對  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 之總砷濃度影響不大。

Table 4-8 不同萃取液前處理時總砷平均濃度統計表

	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		NIST 2710 soil	
	Gastric <sup>3</sup>	Intestinal <sup>4</sup>	Gastric <sup>3</sup>	Intestinal <sup>4</sup>
Centrifuged and filtered <sup>1</sup> (n=5)				
As conc. <sup>2</sup> (mg/L)	189.6	127.4	0.14	0.07
CV (%)	0.42	3.41	1.33	8.30
Centrifuged (n=5)				
As conc. <sup>2</sup> (mg/L)	190.2	132.5	0.20	0.08
CV (%)	0.22	2.47	0.98	7.21
p value	0.22	0.06	0.15	0.06

<sup>1</sup> Samples are filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter.

<sup>2</sup> Values reported are mean for five replicate samples (n=5) at different parameter.

<sup>3</sup> Testing condition: 37 °C, pH 1.8 $\pm$ 0.1, L/S=1000:1 mL/gm, G= 470 sec<sup>-1</sup> and reaction time for 1 hr.

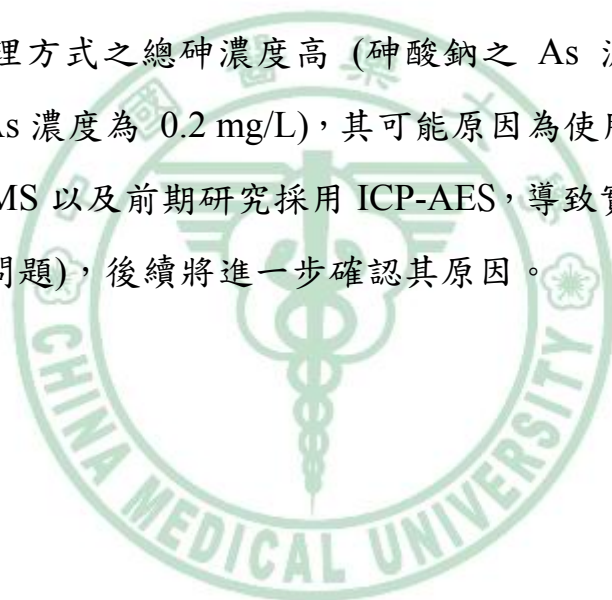
<sup>4</sup> Testing condition: pH 7.0 $\pm$ 0.1 and reaction time for 1 hr.

綜觀不同體外試驗方法，如 PBET 體外試驗、IVG 體外試驗與 SBET 體外試驗等方法，IVG 體外試驗方法多採取離心再過濾前處理方式 (Rodriguze *et al.*, 1999; Schroder *et al.*, 2004; 張, 2005; Pouschat *et al.*, 2006)，而 PBET 與 SBET 體外試驗方法 (Ruby *et al.*, 1993; 1996; Kim *et al.*,

2002; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Bruce *et al.*, 2007; Jahasz *et al.* 2007ab), 多採取離心或者過濾之單一前處理方式, 對於萃取液前處理方法不盡相同, 然而沒有文獻針對萃取液前處理方式進行探討, 因此本研究無法比較各體外試驗於萃取液前處理方式之差異。

根據本研究試驗結果可知, 且在過濾過程中, 萃取液內懸浮物會阻塞過濾膜孔徑, 而導致壓阻會逐漸升高不利擠壓, 因此, 本研究建議僅利用高速離心方式取代壓阻過高之過濾方式, 以簡化試驗程序。

再者, 本研究比較前期研究 (張, 2005) 於  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 之胃相萃取液前處理方式採取離心再過濾, 總砷濃度皆比本研究於不同前處理方式之總砷濃度高 (砷酸鈉之 As 濃度為 245.6 mg/L; NIST 2710 之 As 濃度為 0.2 mg/L), 其可能原因為使用分析儀器不同, 本研究採用 ICP-MS 以及前期研究採用 ICP-AES, 導致實驗分析誤差 (如稀釋倍數提高等問題), 後續將進一步確認其原因。



#### 4-5 建立品管基準 (Phase V)

一般而言，為了解不同體外試驗間之可靠性，應進行標準管制樣品之平行測定 (張，2005)，但綜觀過去體外試驗方法中，多數文獻並未說明各種管制樣品測定結果，僅有部分文獻使用標準土壤 (NIST soil) 進行品質管制 (張，2005; Pouschat *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Juhasz *et al.*, 2007b)，在標準土壤方面，大多使用 NIST 2710 或 2711 標準土壤進行測試，而且也應將砷酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 納入管制樣品，以求解 RBF。但文獻中僅報告標準土壤 ABF，不僅未說明 RBF 且未報告砷酸鈉的 ABF，故無法評比不同體外試驗方法之萃取效率差異。

另本研究係參考江等 (2002) 與前期研究 (張，2005) 建立之系統品管基準，包括試劑空白管制，用以評估試驗過程中試劑是否遭受污染，標準樣品管制為利用砷酸鈉與 NIST 2710 soil 評估標準樣品之萃取效率。本研究將利用試驗結果進行品管基準之建立，其管制基準共有 4 種，如 Table 4-9 所示，試劑空白管制低於兩倍方法偵測極限；重複樣品管制建議值為相對差異百分比 (relative percent difference, RPD) 於  $\pm 10\%$ ；砷酸鈉標準管制建議值，胃相  $\text{ABF}_G$  為  $90 \pm 8\%$ ，小腸相  $\text{ABF}_I$  為  $90 \pm 5\%$ ；介質標準管制建議值，胃相  $\text{RBF}_G$  為  $35 \pm 2\%$ ，小腸相  $\text{RBF}_I$  為  $30 \pm 3\%$ 。

**Table 4-9 本研究體外試驗建議管制項目與管制基準**

	建議管制基準
試劑空白管制	< 2 MDL
重複樣品管制	$\pm 10\%$ RPD <sup>1</sup>
砷酸鈉標準管制	
$\text{ABF}_G$ (n=10)	$90 \pm 8\%$
$\text{ABF}_I$ (n=10)	$90 \pm 5\%$
介質標準管制	
$\text{RBF}_G$ (n=10)	$35 \pm 2\%$
$\text{RBF}_I$ (n=10)	$30 \pm 3\%$

MDL(method detection limit)= 0.91 ppb

<sup>1</sup> 相對差異百分比簡稱為 RPD (relative percent difference)

Table 4-10 比較本研究群與文獻中品質管制基準

	管制基準值				
	本研究	前期研究	Kelly <i>et al.</i> (2002)	Hamel <i>et al.</i> (1998)	Pouschat <i>et al.</i> (2006)
試劑空白管制	< 2 MDL	< MDL	< 5 µg/L	-	-
重複樣品管制	±10 % RPD	±10% RPD	±20% RPD	-	-
磷酸鈉標準管制					
ABF <sub>G</sub>	90 ± 8 %	100 ± 6 %	-	-	-
ABF <sub>I</sub>	90 ± 5 %	100 ± 2 %	-	-	-
介質標準管制					
RBF <sub>G</sub>	35 ± 2 %	40 ± 10 %	56 %	48 %	28 %
RBF <sub>I</sub>	30 ± 3 %	36 ± 10 %	-	-	26 %

Table 4-10 為比較本研究群與文獻中品質管制，本研究與前期研究雖然在管制項目上相同，但於品管基準建議上，本研究比前期研究低，是否因使用不同儀器分析，或是因土壤樣品保存過長，導致土壤樣品中 As 之全量濃度降低，須於後續研究進行確認。但在重複管制基準皆為±10 % RPD，係參考環檢所規定。且相較於其他文獻僅報告標準土壤之 ABF，未報告磷酸鈉之 ABF，也未針對磷酸鈉建立品質管制，因此無法正確評比不同試驗方法之萃取效率差異。

在 Kelly *et al.* (2002) 研究中，管制項目有 5 種，分別為 Reagent blank、Bottle blank、Blank spike、Duplicate 與 SRM (NIST 2711)，本研究未進行 Bottle blank 與 Blank spike 且在 NIST soil 使用上也不同，本研究使用 NIST 2710，其全量濃度 (626 ± 38 mg/kg) 較 NIST 2711 (105 ± 8 mg/kg) 高。然而在添加 (spike) 樣品管制上，本研究係參考環檢所之基質添加樣品 (matrix spike sample) 進行管制，查核回收率。且於建議基準值較 Kelly *et al.* (2002) 為嚴格，在試劑空白管制上，Kelly *et al.* (2002) 建議基準為小於 5 µg/L 相較於本研究小於 2 倍 MDL (0.91 µg/L) 較寬鬆。在重複樣品管制上，Kelly *et al.* (2002) 建議基準為±20 % RPD 相較於本研究為±10 % RPD 也較寬鬆。且在標準土壤管制上，Kelly *et al.* (2002) 以萃取濃度 (0.59±0.09 mg/L) 表示與本研究群以 RBF 表示，較無法正確評估兩者間萃取效率之

差異。

另本研究為進一步探討不同體外試驗之標準土壤 RBF 萃取效率，假設文獻中砷酸鈉 ABF 為 100 %，如 Table 4-10 所示，結果發現，其胃腸相 RBF 範圍為 26 - 56 %，以 Kelly *et al.* (2002) 胃相 RBF 最大，Pouschat *et al.* (2006) 最小，但由於 Kelly *et al.* (2006) 使用標準土壤 NIST2711 與其他文獻使用 NIST 2710 不同，是否因使用 NIST 2711 作為標準土壤其 RBF 萃取效率較高，須於後續進行確認。在相同 NIST 2710 soil 條件下，本研究群與 Hamel *et al.* (1998) 以及 Pouschat *et al.* (2006) 比較發現，RBF 較 Pouschat *et al.* (2006) 高，可能原因為受高液固比 ( $L/S = 1000:1$  vs.  $150:1$  mL/gm) 所影響，相較於 Hamel *et al.* (1998) 之 RBF 相差了 13 %，雖然液固比 ( $L/S=1000:1$  mL/gm) 相同，但 Hamel *et al.*, (1998) 文獻中未報告胃相 pH 值，因此無法評比 RBF 較高之可能原因。



#### 4-6 研擬胃腸生物有效性體外試驗方法及標準操作程序

本研究完成 4-1 至 4-5 節所有生物有效性體外試驗各參數實驗後，根據實驗結果及參考美國體外試驗程序，研擬「胃腸生物有效性體外試驗方法及標準操作程序」，作為政府、業界與學者之參考，本程序內容包括：方法概要、設備與材料、試劑、操作程序、生物有效性計算、品質管制、結果處理與參考文獻，如下說明。

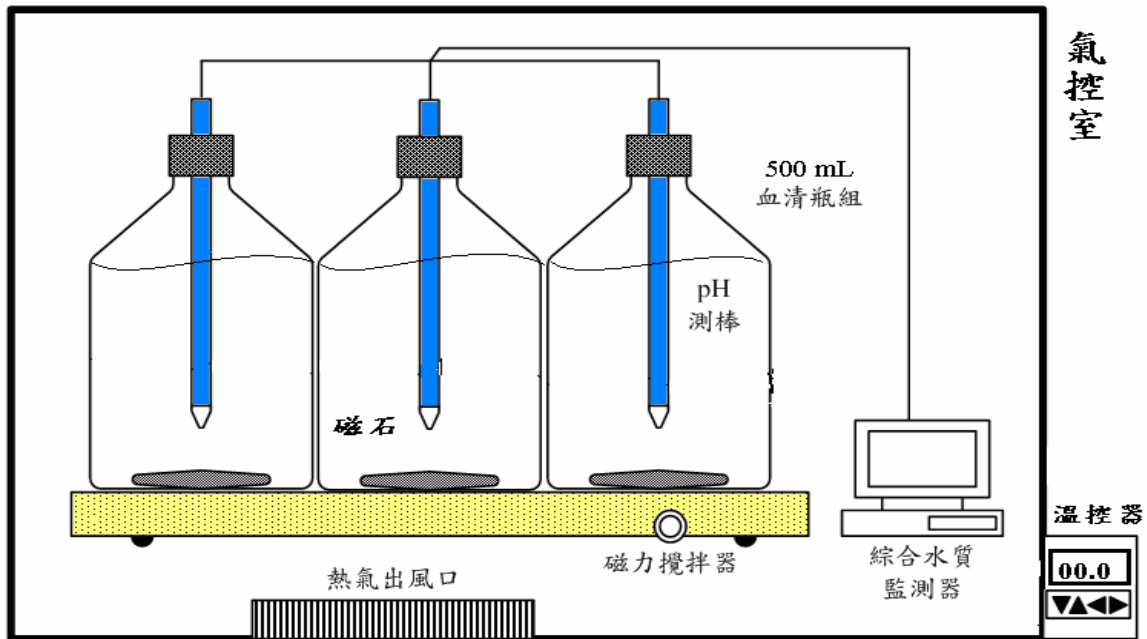
##### 1. 方法概要

本體外試驗標準操作程序為針對受污染土壤，評估土壤重金屬之生物有效性，相較於體內動物試驗，不僅操作簡單快速且成本較便宜。生物有效性指模擬人體經由食入之暴露途徑，胃腸進行消化、吸收作用，分別計算胃與腸相萃取出污染物的總量與暴露量的百分比，稱為絕對生物有效性係數 (absolute bioavailability factor, ABF)，而相對生物有效係數 (relative bioavailability factor, RBF) 為土壤樣品與標準樣品之 ABF 比值。應用在受污土壤健康風險評估上，RBF 是量化致癌風險時一個重要的參數，特別針對敏感性族群，以孩童手指沾黏而誤食受污染土壤，傳統上使用保守情境假設 100 % 為人體胃腸到所吸收，高估風險而提高復育成本。

##### 2. 設備及材料

此試驗方法主要設備為由一組利用氣體溫度控制方式的密閉式反應槽體 (L: 120 cm × W: 65 cm × H: 100 cm) 所構成，槽體內含一個熱氣產生器，利用溫控設定器設定溫度為  $37 \pm 0.5$  °C 使反應槽體內達到恆溫狀態，以及兩組可載重 500 mL 反應瓶之九基座可調速磁力攪拌器，並使用具載重環磁石可有效控制攪拌強度，與一組綜合水質監測儀可連續監測 pH 值、溫度等參數，圖一為生物有效性體外試驗反應槽體設備示意圖。





圖一 生物有效性體外試驗反應槽體設備示意圖

在進行試驗前，所有玻璃器皿必須先使用 10 % 硝酸溶液 (69.5%，試藥級) 浸泡 24 小時後，再依序以自來水及 DI 水 (deionized water, 電阻  $\geq 18 \Omega$ ) 分別沖洗 3 遍以上。清洗乾淨之器皿應適當存放，定容器皿清洗後不得用烘乾方式乾燥。

### 3. 試劑

在進行胃相與腸相萃取過程中，其萃取液之 pH 值分別為 pH  $1.8 \pm 0.1$  作為胃液與 pH  $7.0 \pm 0.1$  作為小腸液，萃取液配製如下說明：

配製胃液方面，首先準備內含磁石之 500 mL 血清瓶，倒入有效容積 500 mL DI 水，添加 1% porcine pepsin (activity 800-2500 unit/mg, Sigma P7000, CAS NO. 9001-75-6) 與 0.15 M NaCl (99.5%，試藥級)，放置磁力攪拌器均勻混合後，以濃 HCl 溶液 (6 N) 調整 pH 值至  $1.8 \pm 0.1$  作為胃液。

配製小腸液方面，在胃相萃取反應後進行配製，接著添加 1.75 gm porcine bile extract (Sigma B8631, CAS NO. 8008-63-7) 與 0.175 gm porcine pancreatin (4X U.S.P., Sigma P1500, CAS NO. 8049-47-6) 均勻混合，以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (1 N) 調整 pH 值至  $7.0 \pm 0.1$  作為小腸液。

## 4. 操作程序

### 4.1 樣品前處理

首先將受污土壤經風乾 (air-dried)方式或者烘乾 (oven-dried)方式 (溫度設定 $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ )，並且過篩取粒徑小於  $250\text{ }\mu\text{m}$  以去除大顆粒雜質，模擬可被手指沾黏且誤食進入人體，特別是孩童此敏感性族群。

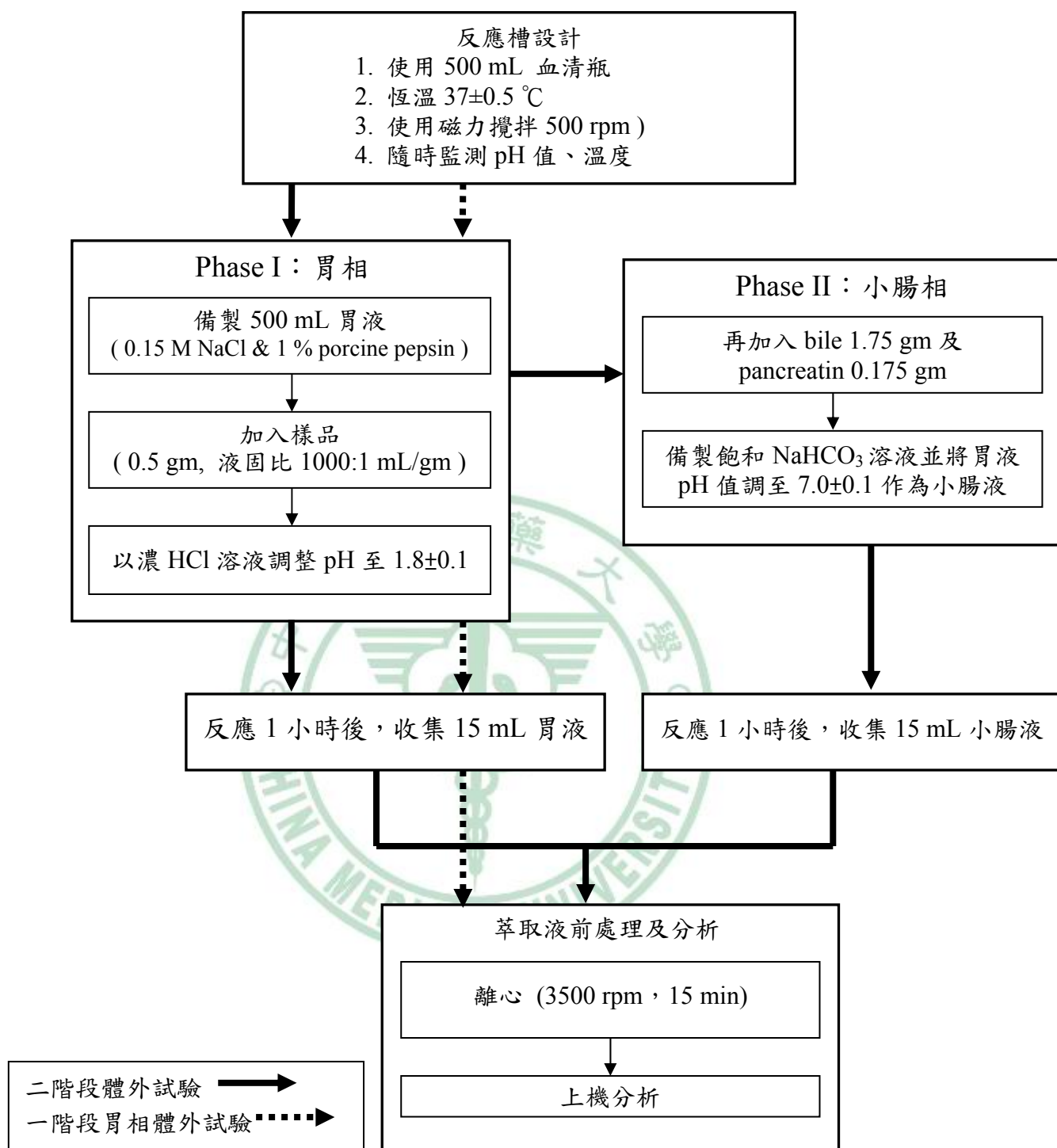
### 4.2 體外試驗萃取操作程序

二階段胃腸相生物有效性體外試驗操作程序，分成二部份說明，第一階段胃相萃取與第二階段小腸相萃取，若僅使用單相之胃相萃取試驗則無須再進行小腸相萃取，如圖二所示。

胃相萃取，使用磁力攪拌器控制 G 值為  $470\pm 150\text{ sec}^{-1}$  ( $500\pm 100\text{ rpm}$ )，溫度為  $37\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，有效容積為  $500\text{ mL}$  密閉血清瓶，添加  $0.15\text{ M NaCl}$  及  $1\%$  porcine pepsin 配製胃液，使用液固比  $1000:1\text{ mL/gm}$ ，土壤樣品量以及管制 (QC)樣品量皆為  $0.5\text{ gm}$ ，以 HCl 溶液調整至  $\text{pH } 1.8\pm 0.1$  作為胃液，反應 1 小時後，取  $15\text{ mL}$  萃取液進行離心前處理 ( $3500\text{ rpm}$ 、 $15\text{ 分鐘}$ )，若離心後上澄液仍有粒狀物可使用過濾方式，以去除粒狀物後，待上機分析。

小腸相萃取，再添加 pancreatin 與 bile，並以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液將 pH 調整至  $7.0\pm 0.1$  作為小腸液，反應 1 小時後，取  $15\text{ mL}$  萃取液進行離心前處理 ( $3500\text{ rpm}$ 、 $15\text{ 分鐘}$ )，若離心後上澄液仍有粒狀物可使用過濾方式，以去除粒狀物後，待上機分析。

胃腸相萃取液之樣本分析，可參考環檢所公告適用於重金屬分析方法，有感應耦合電漿質譜儀 (Inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)、感應耦合電漿原子發射光譜法 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP – AES)以及原子吸收光譜法 (Atomic Absorption, AA)，擇一進行上機分析。



圖二 二階段生物有效性與一階段胃相體外試驗程序

在樣品保存上，若未立即上機分析，離心後的樣本應保存於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中，並且應於一個禮拜內完成分析作業，由於樣品未使用硝酸溶液酸化 pH 值  $\leq 2$ ，以避免改變其酸鹼值，因此無法放置太久。

## 5. 生物有效性計算

體外試驗之生物有效性，指模擬人體經由食入暴露途徑，經由胃腸消化、吸收作用，分別計算胃相與小腸相階段萃取出污染物的總量與暴露量百分比，公式(1)為絕對生物有效性 (absolute bioavailability factor, ABF) 定義：

$$ABF(\%) = \frac{M_Y}{M_T} \times 100\% = \frac{C_Y(\text{mg/L}) \times V(\text{L})}{C_T(\text{mg/kg}) \times W_S(\text{kg})} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

$M_Y$ =胃或小腸相階段所萃取出之總量 (mg)； $M_T$ =污染物在土壤中的總量 (mg)。 $C_Y$ =胃或小腸相階段所萃取出之濃度 (mg/L)； $V$ =反應槽有效容積 (L)，須分別調整在胃與小腸相階段中用以調整 pH 值的添加體積，以及進入小腸階段前，胃相萃取液採樣減少之體積； $C_T$ =污染物在介質中的全量濃度 (mg/kg, 參考環檢所公告 NIEA S321.63B, 王水消化法量測)； $W_S$ =樣品總量 (kg)。

相對生物有效性 (relative bioavailability factor, RBF)是以標準參考物質 (Standard Reference Material, SRM)的 ABF 為基準，評估污染物在不同中介質 (如土壤)溶出的程度，如公式(2)說明：

$$RBF(\%) = \frac{ABF_X}{ABF_{SRM}} \times 100\% = \frac{\left[ \frac{M_Y}{M_T} \right]_X}{\left[ \frac{M_Y}{M_T} \right]_{SRM}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

$ABF_X$ =土壤樣品 X 之 ABF， $ABF_{SRM}$ =SRM 之 ABF。體外試驗  $ABF_{SRM}$  則參考體內試驗所使用  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (砷酸鈉)為 SRM，其原因為  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  有溶解度大 (5.46 gm/100 mL at 0 °C)且易被吸收之特性。在健康風險評估量化上，應參考 RBF 值作為生物有效性修正係數較適當。

## 6. 品質管制 (QA/QC)

在品質管制上分為儀器分析與體外試驗兩部份，儀器分析之品質管制則係參考我國環檢所公告執行，體外試驗之品質管制說明如下：

一般而言，為了解不同體外試驗間之可靠性，應進行標準管制樣品之平行測定，當管制樣品之試驗結果符合品管基準時，才能接受待測樣品的試驗結果，且可評比不同體外試驗方法之萃取效率。體外試驗系統品管基準項目，如表一為建議管制項目與基準所示。

- (1) 試劑空白管制：僅添加胃腸相酵素之空白樣品，以查核在進行體外試驗過程中樣品是否有遭受到污染，每 10 個或每批次樣品至少進行一次。建議管制基準為小於 2 倍方法偵測極限。
- (2) 重複樣品管制：將一個樣品取二等份，依相同前處理與體外試驗萃取過程，每 10 個或每批次樣品至少進行一次，並求相對差異百分比，管制基準為 $\pm 10\%$  RPD。
- (3) 砷酸鈉標準管制：胃與腸相以  $ABF_G$  與  $ABF_I$  表示，每 10 個或每批次樣品至少進行一次。建議管制基準為  $ABF_G$  為  $90 \pm 8\%$ ， $ABF_I$  為  $90 \pm 5\%$ 。
- (4) 介質標準管制：為利用美國環保署公認之標準土壤 NIST 2710 soils 進行樣品管制，胃與腸相以  $RBF_G$  與  $RBF_I$  表示，每 10 個或每批次樣品至少進行一次。建議管制基準為  $ABF_G$  為  $35 \pm 2\%$ ， $ABF_I$  為  $30 \pm 3\%$ 。

表一 生物有效性體外試驗建議管制項目與基準

	建議管制基準
試劑空白管制	$< 2MDL$
重複樣品管制	$\pm 10\%$ RPD
砷酸鈉標準管制	
$ABF_G$	$90 \pm 8\%$
$ABF_I$	$90 \pm 5\%$
介質標準管制	
$RBF_G$	$35 \pm 2\%$
$RBF_I$	$30 \pm 3\%$

## 7. 參考文獻

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.

Drexler JW. Standard Operating Procedure for In-Vitro bioaccessibility leaching. University of Colorado at Boulder, 1999.

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.

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

行政院環保署環檢所：重金屬檢測方法總則 (NIEA M103.01 C)。環署檢字第 0910014627 號公告，2002。

Pouschat P and Zagury GJ. In vitro gastrointestinal bioavailability of arsenic in soils collected near CCA-treated utility poles. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4317-4323.

江舟峰、張芳華、許惠悰：生物有效性體外試驗應用於健康風險評估之問題與展望。台灣公共衛生雜誌 2006，25(1)：1-10。

## 第五章 結論與建議

本研究剖析文獻並參考前期研究成果 (張, 2005), 研究目的為以受砷污染土壤為例, 研擬我國生物有效性體外試驗標準方法。本研究延續前期進一步探討下列四點問題:

1. 前期研究採用 IVG 體外試驗 (Rodriguze *et al.*, 1999) 之小腸相 pH 5.5, 本研究採用 PBET 體外試驗 (Ruby *et al.*, 1996) 之小腸相 pH 7.0, 較高之 pH 值會降低砷之溶解度, 故砷 ABF 與 RBF 也會相對降低。
2. 前期研究將胃相與小腸相之萃取液進行離心 (3500 rpm, 15 min) 再過濾 (0.45  $\mu\text{m}$  飛碟濾頭) 之前處理, 此過濾方式相當費力且耗時, 本研究則將簡化為僅進行離心處理 (3500 rpm, 15 min)。
3. 前期研究砷之檢測採用 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry), 方法偵測極限值為 0.04 mg/L, 本研究則使用 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry), 方法偵測極限為 0.91  $\mu\text{g/L}$ , 其值約為 ICP-AES 之 1/44, 較容易檢測試劑空白樣品是否遭受污染, 但因本研究萃取液為高濃度, 需提高稀釋倍數, 可能因背景誤差傳遞, 高估樣品濃度。
4. 前期研究於樣品管制上進行三重複樣品試驗, 本研究使用六重複樣品試驗, 剔除極端值 (outlier) 後再進行統計分析。

以下針對本研究之試驗結果, 分述其結論與建議如下:

## 5-1 蠕動強度試驗

1. 本研究探討樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與標準土壤樣品 NIST 2710 soil 於不同速度梯度，G 值分別為 0、470 與  $1006 \text{ sec}^{-1}$  對生物有效性之影響，結果如下：
  - (1) 樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，在胃相中不同 G 值對 ABF 無顯著性差 ( $\text{ABF}_G=86\%、82\% \text{ 與 } 91\%$ ,  $p=0.21$ )；在小腸相中，不同 G 值對 ABF 也無顯著性差異 ( $\text{ABF}_I=86\%、85\% \text{ 與 } 94\%$ ,  $p=0.10$ )，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  $0^\circ\text{C}$ ) 高於本試驗濃度，溶解度大且包封度較低，所以不論在 pH 較低之胃相或 pH 較高之小腸相，不同 G 值對 ABF 均無顯著性影響。
  - (2) 標準土壤樣品 NIST 2710 soil，在胃相與小腸相中不同 G 值對 ABF 皆無顯著性差異 ( $\text{ABF}_G=22\%、28\% \text{ 與 } 31\%$ ,  $p=0.54$ ； $\text{ABF}_I=25\%、24\% \text{ 與 } 26\%$ ,  $p=0.72$ )。
  - (3) 在不同蠕動強度試驗中，對有包封度之 NIST 2710 soil 砷  $\text{RBF}_G$  平均值分別為  $26\%、35\% \text{ 與 } 34\%$ ，砷  $\text{RBF}_I$  平均值分別為  $29\%、28\% \text{ 與 } 27\%$ 。且在胃相與小腸相中不同 G 值對 RBF 皆無顯著性差異 ( $P=0.054 \text{ vs. } 0.607$ )。
2. 在不同蠕動強度試驗中，對有包封度之 NIST 2710 soil，胃相中  $\text{ABF}_G$  與  $\text{RBF}_G$  均較小腸相  $\text{ABF}_G$  與  $\text{RBF}_I$  高，且本研究體外試驗結果之胃與腸相 RBF 均低估動物試驗 RBF 文獻值。
3. 綜合上述可知，蠕動強度試驗條件似乎不是一個重要的試驗參數，本研究建議使用一個中間的 G 值為  $470 \text{ sec}^{-1}$  ( $500 \text{ rpm}$ )。



## 5-2 液固比試驗

1. 本研究探討樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與標準土壤樣品 NIST 2710 soil 於不同液固比，分別為 200:1、1000:1 與 5000:1 mL/gm 對生物有效性之影響，結果如下：
  - (1) 樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，在胃與小腸相中不同液固比對 ABF 均無顯性差 ( $\text{ABF}_G=96\%$ 、 $87\%$ 與  $101\%$ ,  $p=0.07$ ； $\text{ABF}_I=85\%$ 、 $86\%$ 與  $93\%$ ,  $p=0.06$ )，可能原因為  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶解度( $5.46\text{ gm}/100\text{ mL at } 0^\circ\text{C}$ )高於本試驗濃度，溶解度大且包封度較低，使液固比對 ABF 影響變小。
  - (2) 標準土壤樣品 NIST 2710 soil，在胃相中不同液固比對 ABF 無顯著性差異 ( $\text{ABF}_G=28\%$ 、 $29\%$ 與  $30\%$ ,  $p=0.06$ )，在小腸相中不同液固比對 ABF 有顯著性差異 ( $\text{ABF}_G=21\%$ 、 $24\%$ 與  $27\%$ ,  $p=0.02$ )，且液固比越高砷 ABF 越高呈中度相關 ( $R=0.59$ )，此結果與張 (2005)及 Hamel *et al.* (1998)研究相符，其可能原因為，對有包封度之土壤受 pH 值影響較大，由於小腸相 pH 值較胃相高 ( $\text{pH } 7.0$  vs.  $\text{pH } 1.8$ )，使包封度變大，溶解度變小，因此液固比在小腸相中對 ABF 影響較大。然而，在不同液固比中，胃相 ABF 均大於小腸相 ABF，若僅進行一階段胃相體外試驗，液固比於胃相中似乎不是一個重要的試驗參數。
2. 在不同液固比試驗中，NIST 2710 soil 砷之  $\text{RBF}_G$  平均值分別為  $29\%$ 、 $33\%$ 與  $30\%$ ，砷  $\text{RBF}_I$  平均值分別為  $25\%$ 、 $28\%$ 與  $29\%$ ，且在胃相與小腸相中不同液固比對 RBF 皆無顯著性差異 ( $P=0.053$  vs.  $0.203$ )。對有包封度之 NIST 2710 soil，胃相  $\text{RBF}_G$  皆較小腸相  $\text{RBF}_I$  大 ( $29\%$  vs.  $25\%$ ;  $33\%$  vs.  $28\%$ ;  $30\%$  vs.  $29\%$ )，且本研究體外試驗結果之胃與腸相 RBF 均低估動物試驗 RBF 文獻值。

3. 綜合上述可知，液固比試驗，在胃相中對生物有效性影響不大，本研究建議若進行一階段胃相體外試驗，可使用液固比中間值 1000:1 mL/gm。若以二階段生物有效性體外試驗作為健康風險評估依據時，仍建議暫定使用在胃相中較大之 RBF 值，液固比為 1000:1 mL/gm。



### 5-3 小腸相萃取時間試驗

1. 小腸相萃取時間第 1 小時與第 2-11 小時之總砷平均濃度，在樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  分為 196 mg/L 與 191 mg/L，其第 2-11 小時之總砷平均濃度相較於第 1 小時之相對誤差為 2.7%。在標準土壤樣品 NIST 2710 soil 第 1 小時與第 2-11 小時之總砷平均濃度分別為 0.15 mg/L 與 0.14 mg/L，其平均相對誤差為 8.6%，兩種樣品之相對誤差皆小於 10%，此結果與張 (2005) 研究相符，且近幾年體外試驗研究中於小腸相萃取時間多採用 1 小時為主，因此本研究建議以 1 小時做為小腸相萃取時間應是可行，以縮短試驗時間。
2. 在文獻中不同體外試驗方法，小腸相 pH 值採用分別有 pH 5.5 與 7.0，根據前期研究與本研究結果發現，小腸相在 pH 值 5.5 弱酸環境下， $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 之總砷濃度與胃腸相 ABF 皆較 pH 7.0 高，從生理學理可知，小腸相由十二指腸、空腸與迴腸組成，當小腸相反應完畢，pH 值趨於中性，因此本研究建議小腸相以 pH 7.0 較符合生理參數條件。

### 5-4 樣品萃取液前處理試驗

1. 本研究進行離心再過濾之前處理方式，樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  之胃相與小腸相之總砷平均濃度分別為 189.6 mg/L 與 127.4 mg/L；NIST 2710 soil 之胃相與小腸相之總砷平均濃度分別為 0.14 mg/L 與 0.07 mg/L，胃相之總砷平均濃度皆高於小腸相。
2. 當僅進行離心前處理方式時，樣品  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  之胃相與小腸相之總砷平均濃度分別為 190.2 mg/L 與 132.5 mg/L，NIST 2710 soil 之胃與小腸相之總砷平均濃度分別為 0.2 mg/L 與 0.08 mg/L，其胃相之總砷平均濃度皆高於小腸相。

3. 在統計分析上，不同萃取液前處理方式於胃與小腸相總砷平均濃度對  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  與 NIST 2710 soil 皆無顯著性差異 ( $p=0.22$  vs.  $0.06$  與  $p=0.15$  vs.  $0.06$ )，因此本研究建議萃取液前處理步驟僅進行離心前處理步驟即可，以簡化試驗程序。

### 5-5 建立系統品管基準

本研究依據試驗結果，進一步建立四種管制樣品：空白管制、重複樣品管制、砷酸鈉標準管制以及介質標準管制，其建議品管基準如下所示：

1. 試劑空白管制濃度應低於兩倍方法偵測極限值，本研究 MDL 為  $0.91 \mu\text{g/L}$ 。
2. 重複樣品管制建議值為  $\pm 10\%$  相對誤差百分比。
3. 砷酸鈉標準管制： $\text{ABF}_G$  平均值  $\pm$  標準差為  $90 \pm 8\%$ ， $\text{ABF}_I$  為  $90 \pm 5\%$ 。
4. 介質標準管制：NIST 標準土壤  $\text{RBF}_G$  平均值  $\pm$  標準差為  $35 \pm 2\%$ ， $\text{RBF}_I$  為  $30 \pm 3\%$ 。

### 5-6 研擬胃腸生物有效性體外試驗方法及標準操作程序

本研究參考美國環保署第 VIII 區生物有效性 PBET 體外試驗方法與前期研究 (張, 2005)，第一階段模擬胃消化環境 ( $\text{pH } 1.8 \pm 0.1$ )，第二階段模擬小腸環境 ( $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ )。在試驗方法簡化上，設備方面，將開放式反應槽改為密閉式，可避免污染物逸散；使用可調速磁力攪拌及具載重環磁石，取代昂貴之氫氣攪拌，並可有效控制攪拌強度；將水浴溫控改採氣控式，以利試驗觀察與採樣。在試驗參數與程序方面，小腸相萃取不使用吸附劑且萃取液前處理可利用高速離心取代壓阻較高的傳統過濾方式。

本研究建議標準操作程序：首先將樣品經風乾且過篩取粒徑  $< 250 \mu\text{m}$ ，使用有效容積  $500 \text{ mL}$  密閉血清瓶並且採用較易控制轉速之磁力攪拌  $G$  值為  $470 \pm 150 \text{ sec}^{-1}$  ( $500 \pm 100 \text{ rpm}$ )，同時採用氣控式溫度  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ；

第一階段模擬胃消化環境，使用液固比 1000:1 mL/gm，取樣品量 0.5 gm，僅添加 0.15 M NaCl 及 1 % porcine pepsin 製備胃液，以 HCl 溶液調整至 pH 1.8±0.1 做為胃液，反應 1 小時後，取萃取液進行離心前處理 (3500 rpm、15 分鐘) 去除粒狀物後，以 ICP 分析總砷濃度；接著進行第二階段為模擬小腸環境，再添加酵素 pancreatin 與 bile，並以飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液將 pH 調整至 7.0±0.1 做為小腸液，再反應 1 小時後，取萃取液進行離心前處理 (3500 rpm、15 分鐘)，以 ICP 分析總砷濃度。最後利用分析之總砷濃度值計算絕對生物有效性 (ABF) 與相對生物有效性 (RBF)。

### 5-7 其他建議

1. 在 Ruby *et al.* (1999) 文獻中提及，粒徑大小為影響生物有效性因素之一，粒徑越小，較容易溶解於液體中，則生物有效性越大，如 Figure 2-1 所示。且在不同體外試驗研究中，對於土壤粒徑大多使用小於 250 μm 進行試驗，以模擬人體容易因手指沾黏而誤食，但仍有少數文獻使用不同土壤粒徑，分別為小於 180、200 與 300 μm，進行體外試驗，然而土壤粒徑大小是否會影響生物有效性，本研究建議後續可進一步探討進行體外試驗時，不同土壤粒徑大小對生物有效性之影響。
2. 在人體胃腸環境中影響毒性物質砷之價數改變，氧化還原電位 (oxidation reduction potential, ORP) 為影響因素，光岡知足 (1978) 研究中指出 ORP 於人體消化系統，各消化器官皆不同，當胃通往小腸相時，ORP 逐漸由正值 (+150 mv) 之氧化狀態轉為負值 (-50 mv) 之還原狀態，因此當砷進入人體後，胃相為氧化狀態以五價砷型態存在，進入小腸相中為還原狀態以三價砷存在，其砷原子有三價砷與五價砷，尤以三價砷最毒，若經由腸相吸收會危害人體健康。另根據前期研究 (張，2005) 結果發現，由胃相至小腸相 ORP 降低，其主要受 pH 所影響，pH 值與 ORP 成反比關係，而 ORP 對生物有效性之影響尚待研究。

3. 綜觀過去進行生物有效性體外試驗時，並未提及胃腸相之氧化還原電位，此外，當土壤樣品由地底下採集至環境中暴露到空氣時，砷的價數會因遇到空氣而產生價數改變，如地底下土壤中砷毒性物質若以三價存在時，採集至環境中產生氧化反應變成五價砷，則不易測得原始之砷價數，因此在進行體外試驗時，容易產生誤差情形而有不確定性存在。因此本研究建議後續研究，可利用化學物種平衡模式(MINEQL+)探討重金屬砷於環境中或人體胃腸相中三價砷與五價砷之分配機理以及對生物有效性之影響。



## 參考文獻

### 外文部分：

- Bruce S, Noller B, Matanitobua V, Ng J. In Vitro Physiologically Based Extraction Test (PBET) and Bioaccessibility of Arsenic and Lead from Various Mine Waste Materials. *J Toxicol Environ Health (Part A)*, 2007; 70: 1700-1711
- Cerra FJ, Maisel JW. *Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse*, second edition, New York: McGraw-Hill 1979; 200 & 875.
- Casteel SW, Weis CP, Brattin WJ, Dunsmore ME, Hammon TL. Relative Bioavailability of Arsenic in Soils from the VBI70 Site. Final report. Washington D.C., USA, 2001.
- Caussy D. Case studies of the impact of understanding bioavailability : arsenic. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003; 56: 164-173.
- Davls A, Ruby MV, Bergstrom PD. Bioavailability of arsenic and lead in soils from the Butte, Montana, mining district. *Environ Sci Technol* 1992; 26: 461-468.
- Drexler JW. Standard Operating Procedure for In-Vitro bioaccessibility leaching. University of Colorado at Boulser, 1999.
- Dean JR, Ma R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere* 2007; 68: 1399-1407.
- Exponent. Assessing the bioavailability of chemicals in soils. Available from: [http://www.exponent.com/practices/enviro\\_nmetal/assessing\\_bioavaility.pdf](http://www.exponent.com/practices/enviro_nmetal/assessing_bioavaility.pdf). (cited 2008/05).
- Ellickson KM, Meeker RJ, Gallo MA, Buckley BT, Lioy PJ. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 40: 128-135.
- Hamel SC, Buckley B, Lioy P J. Bioaccessibility of metals in soils for differ-

- ent liquid to solid ratios in synthetic gastric fluid. *Environ Sci Technol* 1998; 3: 358-362.
- Intawongse M, Dean JR. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *TrAC* 2006; 25(9): 876-886.
- Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchal T, Sansom L, Naidu R. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere* 2007a; 69: 961-966.
- Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchal T, Sansom L, Naidu R. In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. *Chemosphere* 2007b; 69: 67-78.
- Klaassen CD. *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*. 6th Edition. New York: McGraw-Hill. 2001.
- Kim JY, Kim KW, Lee JU, Lee JS. Assessment of As and heavy metal contamination in the vicinity of Duckum Au-Ag mine, Korea. *Environ Geochem Health* 2002; 24: 215-227.
- Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV. *Assessing oral bioavailability of metal in soil*. Columbus, Ohio: Battelle Press. 2002; 4-79.
- Lai RJ, Hudson HE, Sihgley JE. Velocity gradient calibration of Jar-test equipment. *JAWWA* 1975; 67: 553-557.
- Lee SW, Lee BT, Kim JY, Kim KW, Lee SL. Human risk assessment for heavy metals and As concentration in the abandoned metal in mine area, Korea. *Environ Monit Assess* 2006; 119: 233-244.
- Oomen Ag, Hack A, Minekus M, Zeijder E, Cornelis C, Schoeters G *et al.* Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ Sci Technol* 2002; 36: 3326-3334.
- Pouschat P and Zagury GJ. In vitro gastrointestinal bioavailability of arsenic in soils collected near CCA-treated utility poles. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4317-4323.



- 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: 2870-2877.
- 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: 422-430.
- 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: 3697-3705.
- 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: 642-649.
- Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Armstrong FP, Ward DC. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *Environ Qual* 2003; 32: 876-884.
- Roberts SM, Munson JW, Lowney YW, Ruby MV. Relative Oral Bioavailability of Arsenic from Contaminated Soils Measured in the Cynomolgus Monkey. *Toxicol Sci* 2007; 95: 281-288.
- Smith E, Naidu R, Weber J, Juhasz AL. The impact of sequestration on the bioaccessibility of arsenic in long-term contaminated soils. *Chemosphere* 2008; 71: 773-780.
- Sarkar D, Datta R. A modified in vitro method to assess bioavailable arsenic in pesticide-applied soils. *Environ Pollut* 2003; 126: 363-366.
- Schroder JL, Basta NT, Casteel SW, Evans TJ, Payton ME, Si J. Validation of the In Vitro Gastrointestinal (IVG) Method to Estimate Relative Bioavailable Lead in Contaminated Soils. *Environ Qual* 2004; 33: 513-521.

- USEPA. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual (HEEM) (Part A), Interim Final. Washington DC: Office of Emergency and Remedial Response. 1989.
- USEPA. Risk Assessment Guidance for Superfund. Volume I. Human Health Evaluation Manual (Part A). EPA/540/-89/002. Washington DC: USEPA. 1989.
- USEPA. Guidance for Evaluation the Oral Bioavailability of Metal in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. OSWER 9285.7-80. Washington DC: USEPA. 2007.
- USEPA. Database from integrated risk information system (IRIS). Available from: <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0278.htm>. (cited 2008/06)
- Wang XS, Qin Y, Chen YK. Leaching characteristics of arsenic and heavy metals in urban roadside soils using a simple bioavailability extraction test. *Environ Monit Assess* 2007; 129: 221-226.
- Wragg J, Cave MR. In-vitro Method for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in Soils: a Critical Review. R&D Technical Report 2002, P5-062/TR/01.

## 中文部分：

行政院環保署環檢所：感應耦合電漿質譜法(NIEA W313.50C)。環署檢字第 0930042705 號公告，2004。

行政院環保署環檢所：環境檢驗室品質管制指引通則(NIEA-PA101)。環署檢字第 0930072069A 號公告，2004。

行政院環保署環檢所：環境檢驗檢量線備製及查核指引(NIEA-PA103)。環署檢字第 0930072069C 號公告，2004。

行政院環保署環檢所：環境檢驗品管分析執行指引(NIEA-PA104)。環署檢字第 0930072069D 號公告，2004。

行政院環保署環檢所：環境檢驗方法偵測極限測定指引 (NIEA-PA107)。環署檢字第 0930072069G 號公告，2004。

行政院環保署：土壤及地下水污染場址健康風險評估評析方法及撰寫指引。台北：2006。

行政院環保署：土壤及地下水污染控制場址初步評估辦法。環署土字第 0950023629 號公告，2006。

光岡知足：腸內細菌の話。日本：波岩新書出版社，1978: 82。

江舟峰、張芳華、許惠悰：資源性廢棄物生物有效性分析方法之探討。台南：環境分析化學研討會，2004。

江舟峰、張芳華、許惠悰：生物有效性體外試驗應用於健康風險評估之問題與展望。台灣公共衛生雜誌 2006，25(1)：1-10。

江舟峰、林家玉、許惠悰：土壤中砷之生物有效性體外試驗標準操作程序之研擬。高雄：環境分析化學研討會，2008。

行政院環保署：土壤及地下水整治網。<http://sgw.epa.gov.tw/public/index.asp>。引用 2008 年 6 月。

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。

張芳華：廢棄物資源化風險評估：胃腸消化環境中重金屬生物有效性體外試驗。台中市：中國醫藥大學環境醫學研究所碩士論文，2005。

黃萬居：土壤及地下水污染整治法制度變遷之探討。工安環保 2006，32：2-4。

楊登任、劉瑞華、洪淑幸、黃舒平、賴文惠：土壤及地下水污染場址健康風險評估方法。工業污染防治 2006，99：115-132。



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 <sup>-1</sup> )	blank	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (mg/L)					NIST 2710 soil (mg/L)					
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
0												
Gastric phase	ND.	181.6	187.8	188.7	230.0	234.3	0.0837	0.0963	0.1085	0.1928	0.2030	
Intestinal phase	ND.	138.6	146.2	182.0	188.9	192.5	0.1045	0.1060	0.1061	0.1553	0.1559	
470												
Gastric phase	ND.	184.1	187.7	188.4	201.6	215.2	0.1652	0.1736	0.1766	0.1778	0.1927	
Intestinal phase	ND.	148.7	148.8	155.5	184.3	186.1	0.1023	0.1124	0.1152	0.1359	0.1503	
1006												
Gastric phase	ND.	188.7	210.8	223.4	227.4	230.8	0.1616	0.1626	0.1628	0.2322	0.2392	
Intestinal phase	ND.	170.0	180.7	180.9	187.1	191.8	0.1089	0.1118	0.1387	0.1403	0.1404	
Liquid to solid (mL/gm)	blank	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (mg/L)					NIST 2710 soil (mg/L)					
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
200:1												
Gastric phase	ND.	1105.4	1064.9	1071.8	1227.1	1242.4	0.8199	0.8259	0.8598	0.8601	0.9102	
Intestinal phase	ND.	744.9	826.7	829.1	836.8	844.7	0.4766	0.4794	0.4933	0.6002	0.6393	
1000:1												
Gastric phase	ND.	188.4	187.7	215.9	222.4	227.2	0.1736	0.1766	0.1777	0.1778	0.1927	
Intestinal phase	ND.	146.93	147.9	176.3	188.1	183.1	0.1124	0.1125	0.1152	0.1359	0.1503	
5000:1												
Gastric phase	ND.	46.67	47.21	47.97	49.89	48.99	0.0353	0.0365	0.0385	0.0396	0.0401	
Intestinal phase	ND.	33.1	35.5	36.3	36.1	37.4	0.0252	0.0255	0.0278	0.0281	0.0293	

ND.= non-detected (below method detection limit = 0.00091 mg/L)

## 附錄二：美國 NIST 2710 Montana soil 各元素全量濃度認證



National Institute of Standards & Technology

# Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 2710

Montana Soil

Highly Elevated Trace Element Concentrations

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in the analysis of soils, sediments, or other materials of a similar matrix. SRM 2710 is a highly contaminated soil that was oven-dried, sieved, radiation sterilized, and blended to achieve a high degree of homogeneity. A unit of SRM 2710 consists of 50 g of the dried material.

The certified elements for SRM 2710 are given in Table 1. The values are based on measurements using one definitive method or two or more independent and reliable analytical methods. Noncertified values for a number of elements are given in Table 2 as additional information on the composition. The noncertified values should NOT be used for calibration or quality control. Analytical methods used for the characterization of this SRM are given in Table 3 along with analysts and cooperating laboratories. All values (except for carbon) are based on measurements using a sample weight of at least 250 mg. Carbon measurements are based on 100 mg samples.

#### NOTICE AND WARNINGS TO USERS

**Expiration of Certification:** This certification of SRM 2710 is valid, within the measurement uncertainties specified, until 31 December 2011, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate (see *Instructions for Use*). This certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

**Maintenance of SRM Certification:** NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Return of the attached registration card will facilitate notification.

The overall direction and coordination of the analyses were under the chairmanship of M.S. Epstein and R.L. Watters, Jr. of the NIST Analytical Chemistry Division of the NIST Measurement Services Division.

Statistical consultation was provided by S.B. Schiller of the NIST Statistical Engineering Division.

The technical and support aspects involved in the original preparation, certification, and issuance of this SRM were coordinated through the NIST Standard Reference Materials Program by T.E. Gills and J.S. Kane. Revision of this certificate was coordinated through the NIST Standard Reference Materials Program by B.S. MacDonald of the NIST Measurement Services Division.

Willie E. May, Chief  
Analytical Chemistry Division

John Rumble, Jr., Chief  
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 18 July 2003  
See Certificate Revision History on Page 6

## INSTRUCTIONS FOR USE

**Use:** A minimum sample weight of 250 mg (dry weight - see Instructions for Drying) should be used for analytical determinations to be related to the certified values on this Certificate of Analysis.

To obtain the certified values, sample preparation procedures should be designed to achieve complete dissolution. If volatile elements (i.e., mercury (Hg), arsenic (As), selenium (Se)) are to be determined, precautions should be taken in the dissolution of SRM 2710 to avoid volatilization losses.

**Instructions for Drying:** When nonvolatile elements are to be determined, samples should be dried for 2 h at 110 °C. Volatile elements (i.e., Hg, As, Se) should be determined on samples as received; separate samples should be dried as previously described, to obtain a correction factor for moisture. Correction for moisture is to be made to the data for volatile elements before comparing to the certified values. This procedure ensures that these elements are not lost during drying. The weight loss on drying has been found to be in the range of 1.7 % to 2.3 %.

## PREPARATION AND ANALYSIS

**Source and Preparation of Material:** The U.S. Geological Survey (USGS), under contract to NIST, collected and processed the material for SRM 2710. The soil was collected from the top 10 cm (4 in) of pasture land located at Longitude 112° 47' and Latitude 46° 01' along Silver Bow Creek in the Butte, Montana area. The site is approximately nine miles east of the local Anaconda plant and 6.5 miles south of settling ponds that feed the creek. The creek periodically floods, depositing sediment with high concentrations of copper, manganese, and zinc at the collection site. The material was shoveled from a 6.1 m × 6.1 m (20 ft × 20 ft) area into polyethylene bags in cardboard cartons for shipment to the USGS laboratory for processing.

The material was spread on 30.5 cm × 61 cm (1 ft × 2 ft) polyethylene-lined drying trays in an air drying oven and dried for three days at room temperature. The material was then passed over a vibrating 2 mm screen to remove plant material, rocks, and large chunks of aggregated soil. Material remaining on the screen was deaggregated and rescreened. The combined material passing the screen was ground in a ball mill to pass a 74 µm screen and blended for 24 h. Twenty grab samples were taken and measured for the major oxides using X-ray fluorescence spectrometry and for several trace elements using inductively coupled plasma atomic emission analysis to provide preliminary assessment of the homogeneity of the material prior to bottling. The material was bottled into 50 g units and randomly selected bottles were taken for the final homogeneity testing.

**Analysis:** The homogeneity, using selected elements in the bottled material as indicators, was assessed using X-ray fluorescence spectrometry and neutron activation analysis. In a few cases, statistically significant differences were observed, and the variance due to material inhomogeneity is included in the overall uncertainties of the certified values. The estimated relative standard deviation for material inhomogeneity is less than 2 % for those elements for which homogeneity was assessed.

**Certified Values and Uncertainties:** The certified values are weighted means of results from two or more independent analytical methods, or the mean of results from a single definitive method, except for mercury. Mercury certification is based on cold vapor atomic absorption spectrometry used by two different laboratories employing different methods of sample preparation prior to measurement. The weights for the weighted means were computed according to the iterative procedure of Paule and Mandel [1]. The stated uncertainties include allowances for measurement imprecision, material variability, and differences among analytical methods. Each uncertainty is the sum of the half-width of a 95 % prediction interval and includes an allowance for systematic error among the methods used. In the absence of systematic error, a 95 % prediction interval predicts where the true concentrations of 95 % of the samples of this SRM lie. The certified values were corroborated by analyses from nine Polish laboratories cooperating on the certification under the direction of T. Plebanski and J. Lipinski, Polish Committee for Standardization, Measures, and Quality Control. The Polish laboratory work was supported by the Maria Skłodowska-Curie Joint Fund.

Table 1. Certified Values

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

**Noncertified Values:** Noncertified values shown below are provided for information only. An element concentration value is not certified if a bias is suspected in one or more of the methods used for certification, or if two independent methods are not available.

Table 2. Noncertified Values

Element	Mass Fraction (%)	Element	Mass Fraction (mg/kg)
Carbon	3	Bromine	6
		Cerium	57
		Cesium	107
		Chromium	39
		Cobalt	10
		Dysprosium	5.4
		Europium	1
		Gallium	34
		Gold	0.6
		Hafnium	3.2
		Holmium	0.6
		Indium	5.1
		Lanthanum	34
		Molybdenum	19
		Neodymium	23
		Rubidium	120
		Samarium	7.8
		Scandium	8.7
		Strontium	330
		Thallium	1.3
		Thorium	13
		Tungsten	93
		Uranium	25
		Ytterbium	1.3
		Yttrium	23