

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 92-2320-B-002-169

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：黃耀輝 臺大公衛學院職業醫學與工業衛生研究所
計畫參與人員：許家晴

一、中文摘要

本計畫探討個體特性對被攝食到人體內之海產中有機砷代謝物種分佈的影響，以及不同海產食物有機砷攝食量下對尿中總無機砷代謝物種含量所造成的干擾程度。本次研究共徵求 38 名未受砷暴露之健康者進行七天半飲食控制實驗，在第四天晚餐提供 49.9±7.4 g 牡蠣作為有機砷暴露來源。實驗期間第一至第三天收集早晨初尿，之後四天半收集早晨初尿和傍晚各一次尿液來觀察尿中砷代謝的趨勢。最後有 21 名受試者提供全部完整的尿液樣本進行分析。牡蠣樣本與尿液樣本均以感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)量測總砷量，另以高效能液相層析儀 (HPLC) 串聯感應耦合電漿質譜儀進行分析 As^{III}、As^V、MMA、DMA、arsenobetaine(AsBe)、arsenocholine(AsCho)、trimethylarsine oxide(TMAO)、tetramethylarsonium ion(TetMA) 等八種砷物種。結果顯示，攝食牡蠣中有機砷後，尿中代謝物以 DMA 和 AsBe 為主，還有少量 As^{III}、MMA、TMAO 和 TetMA，以及一個未知的砷物種，As^V 和 AsCho 則較少在尿中被偵測到。經過控制單位體重牡蠣攝食量的影響後，尿中總砷和 AsBe 的濃度與性別有關。同時，受試者間對於 DMA 及 AsBe 的吸收代謝能力有個體間差異存在。Mixed Effect Model 分析結果顯示，受試者攝食牡蠣後各日尿中各種砷物種濃度均有明顯上升。此外，應用此模式係數可進一步預測一般受試者食入定量牡蠣後尿中 DMA、AsBe 及總砷濃度的變化趨勢，以評估其對無機砷暴露後尿中砷代謝物種

的干擾程度。

關鍵詞：有機砷、無機砷、牡蠣、液相層析串聯感應耦合電漿質譜儀、砷代謝物種。

Abstract

The aims of the present study were to explore the effects of inter-individual variability on the distribution of urinary organic arsenic metabolites, and to what extent the interference resulting from the intake of seafood organic arsenic on the urinary inorganic arsenic metabolites. Totally 38 healthy volunteers without arsenic exposure were recruited in this seven-and-half-day diet control study, and were served 49.9±7.4 g oyster at the fourth day's dinner as organic arsenic exposure source. First morning urine void were collected during the whole study period while after-shift urine void were collected around dusk of the last 4 days. Finally, 21 participants with complete urine samples were included for further urinary arsenic determination and data analysis. Both oyster and urine samples were analyzed with inductive coupled plasma – mass spectrometry for total arsenic level, and for As^{III}, As^V, MMA, DMA, arsenobetaine (AsBe), arsenocholine (AsCho), trimethylarsine oxide (TMAO), tetramethylarsonium ion (TetMA) by linked with high performance liquid chromatography. Results showed that, after ingesting organic arsenic in oyster, urinary

arsenic species were dominated by DMA and AsBe, while less amounts were found for As^{III}, MMA, TMAO, TetMA, and an unknown arsenic species. As^V and AsCho were seldom detected compared to others. After controlling the oyster intake per unit body weight, gender was shown associated with the urinary total arsenic and AsBe content in urine. Meanwhile, individual variability was demonstrated among the study participants for the DMA and AsBe metabolism. Mixed effect model analysis illustrated that various urinary arsenic metabolites determined in the present study were elevated significantly after oyster ingestion. Besides, using the derived mixed effect model, it is possible to predict the urinary DMA, AsBe and total arsenic levels of a subject ingesting a certain amount of oyster, and the extent it may interfere with the urinary inorganic arsenic metabolites assessment.

Keywords: Organic Arsenic, Inorganic Arsenic, Oyster, HPLC-ICP-MS, Arsenic Metabolites.

二、緣由與目的

自然界與人為產生之無機砷來源對人體可能造成的潛在暴露危害近年來深受各界的重視。因此以尿中砷物種濃度作為監測環境或職業性無機砷暴露的重要生物偵測指標，即為一項不可或缺的方法。但以尿中無機砷代謝物種做為無機砷暴露的生物偵測指標，包括三價砷（arsenite）、五價砷（arsenate）、雙甲基砷酸（dimethylarsinic acid, DMA）、單甲基砷酸（monomethylarsonic acid, MMA）等砷物種的總和，常會受到飲食性海產類食物中有機砷代謝物種的干擾，以致造成誤判。另一方面，人體對海產食物有機砷的

代謝效能似也有明顯的個體間差異，其是否受環境或基因上不同因素、不等程度的影響仍不明朗。本計畫即針對此議題探討個體特性對經攝食之海產中有機砷代謝物種分佈的影響，以及在不同海產食物有機砷攝食量下對尿中總無機砷代謝物種含量所造成干擾的程度，進而釐清海產食物有機砷之攝取對職業性微量無機砷暴露之危害風險評估的影響與干擾。同時，並嘗試瞭解海產食物有機砷在人體內之代謝是否與其他體內不同元素的含量有關。

三、研究方法

本計畫招募共 38 名受試者進行為期七天半的飲食控制實驗。受試者在實驗期間正常作息，並統一由本計畫供餐，以避免攝食含有有機砷的食物。在第四天晚餐提供定量牡蠣作為飲食性有機砷之暴露。除了第四天外，實驗期間其他時間均避免攝食海產。實驗期間第一至第三天收集早晨初尿，以確定體內已排除先前所暴露到的無機砷或有機砷；之後四天半收集早晨初尿和傍晚各一次尿液，來觀察尿中砷代謝物種的變化趨勢。同時並收集受訪者的基本人口學資料、健康史、觀察期間飲食與作息記錄。此外，各受試者在瞭解研究目的與程序後、研究開始進行前也都簽署同意參與計畫之聲明書。全部受訪者中，有提供完整尿液樣本者始納入後續的資料分析，最後共有 21 名受訪者列入資料分析對象。

尿中砷含量分析除了以感應耦合電漿質譜儀量測尿中總砷量，尿中砷物種量測則使用高效能液相層析儀（HPLC）串聯感應耦合電漿質譜儀（ICP-MS）進行分析。使用 HPLC 陰離子交換層析管柱分離 As^{III}、As^V、MMA、DMA 四種砷物種，另以陽離子交換層析管柱分析 arsenobetaine（AsBe）、arsenocholine（AsCho）、trimethylarsine oxide（TMAO）、tetramethylarsonium ion（TetMA）等另外四種砷物種。食物樣本（牡蠣）在經冷凍乾

燥、萃取後以相同方法分析上述八種有機與無機砷物種。

四、結果與討論

全部 21 受試者皆為健康的年輕男女學生，平時皆無抽煙或飲酒習慣；年齡介於 23~30 歲，平均 25.3 ± 1.6 歲；身體質量指數 (BMI) 為 21.9 ± 2.7 。飲食控制計畫中平均每人攝食 49.9 ± 7.4 g 的牡蠣，每人的單位體重攝食量為 0.85 ± 0.16 g/kg。

牡蠣經成分分析後，內含砷物種包括 As^{III} 、MMA、DMA、AsBe、AsCho 和 TetMA 六種砷物種，以及 5 種未知砷物種 ($As_{x1} \sim As_{x5}$)。以 AsBe (32.8%)、 As_{x2} (33.3%)、 As_{x5} (18.7%)、DMA (6.0%) 等含量最高。尿中代謝物則以 DMA 及 AsBe 為主，也有出現 As^{III} 、MMA、TMAO、TetMA 及一個未知的物種 (As_{x4})， As^V 和 AsCho 則較少觀察到 (表一)。

牡蠣經食入後，尿中 DMA 代謝物出現速率較快，在第五天即出現濃度高峰值，而 AsBe 濃度的高峰值則在第六天出現。同時，在食入牡蠣後的每一天，也就是實驗期第五至八天，尿液中總砷與 AsBe 兩者的濃度均具有顯著的相關性

($p < 0.05$)，DMA 則在實驗期第五、六天與尿中總砷濃度具有顯著相關性

($p < 0.05$)。經過控制單位體重牡蠣攝食量的影響後，尿中總砷和 AsBe 的濃度與性別有關 (表二)。另外，AsBe 一直被認為在經飲食攝入人體內後會以未被代謝改變的原狀態下排出 (Le et al., 1994; Yoshida et al., 1998)，並有部分尿中 AsBe 係由 AsCho 代謝而來 (Marafante et al., 1984)。在本次研究計畫中可發現有 18 位受試者在食入牡蠣後，尿中 AsBe 濃度會在第五或第六天達到最高值，但另有 3 位受試者在食入牡蠣後尿中的 AsBe 沒有明顯的上昇趨勢，表示受試者間對於 AsBe 的吸收代謝能力有個

體差異存在。在 DMA 的代謝方面，本研究計畫資料也顯示出受試者個體間的差異。這現象是否受到氧化、還原或水解相關酵素，如細胞色素 (cytochrome) P_{450} 、穀胺基硫 (glutathione) 等的影響，使不同人之間 DMA 的代謝排除高峰時間點不同，值得未來繼續作進一步的探討。另一方面， As_{x4} 和 AsBe ($p < 0.0001$) 及 DMA ($p = 0.0305$) 均具有相關性，表示 As_{x4} 和這兩個代謝物種間，可能由相同的物種代謝而來，抑或是這兩個物種的代謝物。

就受試者的每日平均濃度而言， As^{III} 、MMA 及 As_{x4} 三種砷物種在尿液中的濃度均不高，但出現頻率高，且可看出在食入牡蠣後的實驗期間， As^{III} 和 MMA 之間具有顯著的相關 ($p < 0.05$)。因為 MMA 為 As^{III} 的代謝物，且牡蠣中含有 As^{III} 但未含 MMA，因此尿中的 MMA 應係由 As^{III} 代謝產生，這也符合過去文獻的研究結果 (Hughes, 2002; Vahter, 2002)。

TMAO 和 TetMA 在尿液中被偵測到的頻率較低。若從尿液中出現此兩種砷物種的次數觀之，在受試者食入牡蠣後的實驗期第五天，有 11 位受試者尿中具有 TMAO，頻率明顯高過其他天。過去研究指出人體尿中的 TMAO 應由砷醣 (Arsenosugare, AsSug) 代謝 (Francesconi et al., 2002)、或是 DMA 繼續甲基化而得 (Yoshida et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Cohen et al., 2003)。由於本研究所食用的牡蠣成分中沒有 TMAO，且此次實驗的牡蠣中 DMA 比例 (6.0%) 不足說明尿中 DMA (35~42%) 及 TMAO (6~10%) 的高分佈比例，因此可推測 TMAO 應是在 $As_{x1} \sim As_{x5}$ 等五種未知砷物種中所含的部分 AsSug 中所代謝出來的 TMAO。至於 TetMA，本計畫牡蠣樣本和尿液樣本中均含有 TetMA。現今尚無關於 TetMA 的人體代謝研究，不過在動物實驗中，食入 MMA、DMA、TMAO 和 AsSug 為主的海

藻後，尿中曾有 TetMA 的出現 (Yoshida et al., 1998; Feldmann et al., 2000; Hansen et al., 2003)。本次實驗的牡蠣中砷物種並無包含 MMA 的成分，而尿液中的 DMA、TMAO，也應均有 As_{x1}~As_{x5} 等砷物種中包含的 AsSug 轉化而來的部分。所以本研究尿液樣本中的 TetMA，可能是由 As_{x1}~As_{x5} 等砷物種中所包含的 AsSug 轉化而成，或是牡蠣中的 TetMA 經攝入人體內後未經代謝而以原狀態直接排出至尿液中。

此外，最少被觀察到的尿中砷物種是 As^V 及 AsCho，多數尿液樣本中均測不到這兩種砷物種。

Mixed Effect Model 分析結果顯示，受試者攝食牡蠣後各日尿中各種砷物種濃度均有明顯變化。同時分析結果也顯示，除了受試者的單位體重牡蠣攝食量是影響尿中 DMA、AsBe 及總砷濃度的重要變因外，受試者性別也會對尿中 AsBe 和總砷濃度產生影響 (表二)。應用上述 Mixed Effect Model 所得模式係數可進一步預測一般受試者食入牡蠣後尿中 DMA、AsBe 及總砷濃度的變化趨勢，以估計食入不同單位體重牡蠣攝食量後對尿中砷物種濃度分佈的影響，以及其對無機砷暴露後尿中砷代謝物種的干擾程度。

五、參考文獻

Cohen SM, Le C, Lu X, Cano M, Arnold, LL. Carcinogenicity of dimethylarsenic acid (DMA^V). In: Chappell WR Abernathy CO, Calderon RL, Thomas DJ eds. Arsenic Exposure and Health Effects V. Amsterdam: Elsevier, 2003; 321-335.

Feldmann J, John K, Pengprecha P. Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 368: 116-121.

Francesconi KA, Tanggaard R, McKenzie CJ,

Goessler W. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin Chem* 2002; 48(1): 92-101.

Hansen HR, Raab A, Francesconi KA, Feldmann I. Metabolism of arsenic by sheep chronically exposed to arsenosugars as a normal part of their diet. 1. Quantitative intake, uptake, and excretion. *Environ Sci Technol* 2003; 37: 845-851.

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.

Le XC, Cullen WR, Reimer KJ. Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab and shrimp. *Clin Chem* 1994; 40(4): 617-624.

Marafante E, Vahter M, Dencker L. Metabolism of arsenocholine in mice, rats and rabbits. *Sci Total Environ* 1984; 34: 223-240.

Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 2002; 181-182: 211-217.

Yoshida K, Chen H, Inoue Y, Wanibuchi H, Fukushima S, Kuroda K, Endo G. The Urinary Excretion of Arsenic Metabolites After a Single Oral Administration of Dimethylarsinic Acid to Rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997; 32(4): 416-421.

Yoshida K, Inoue Y, Kuroda K, Chen H, Wanibuchi H, Fukushima S, Endo G. Urinary excretion of arsenic metabolites after long-term oral administration of various arsenic compounds to rats. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54: 179-192.
1. 2000.

表一. 受試者在受試期間之尿中各砷物種濃度 ($\mu\text{g/g creatinine}$)

物種名	第一天		第二天		第三天		第四天		第五天		第六天		第七天		第八天	
	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數	濃度	樣本數
As ^{III}	1.8±1.2	19	1.7±0.6	17	1.9±0.7	19	1.9±0.7	20	2.0±0.7	18	1.8±0.9	18	1.2±0.5	20	1.6±0.9	20
As ^V	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1.5±0.1	3	-	0	0.9	1
MMA	1.7±0.5	20	2.1±0.7	21	2.1±0.7	21	2.0±0.5	20	2.2±0.7	20	2.0±0.5	19	1.4±0.5	21	1.5±0.8	21
DMA	19.1±5.8	21	18.6±5.0	21	15.2±3.5	21	15.1±3.9	21	31.3±8.0	21	23.6±4.8	21	12.2±2.6	21	11.3±3.5	21
AsBe	51.6±47.3	21	22.9±17.6	21	23.1±14.2	21	16.3±10.2	21	19.0±6.5	21	23.3±12.1	21	12.6±7.0	21	11.0±11.0	21
AsCho	0.3±0.3	2	0.1	1	0.2	1	-	0	-	0	0.3	1	-	0	-	0
TMAO	6.4±1.1	3	8.5±2.9	2	0.6	1	11.8	1	5.1±5.0	11	6.7±5.3	4	2.3±1.3	4	5.8±0.0	2
TetMA	2.0±2.6	3	9.7	1	-	0	-	0	1.2±0.5	3	0.4±0.4	4	1.1±1.6	2	-	0
As_x4	2.2±1.8	16	2.4±2.4	12	1.8±1.5	15	1.8±1.5	13	1.7±1.4	15	2.0±1.8	19	1.7±1.2	19	1.3±1.2	12
Total As	88.1±53.8	21	54.8±22.1	21	50.8±16.3	21	42.0±13.2	21	75.2±17.9	21	66.5±20.9	21	35.1±10.6	21	31.5±13.9	21

表二. 受試者基本特性對尿中砷物種濃度影響程度檢定結果

	DMA		AsBe		總砷	
	係數	P 值	係數	P 值	係數	P 值
Day		<0.0001		0.0093		<0.0001
Day 4	0		0		0	
Day 5	17.53	<0.0001	3.59	N.S.	41.41	<0.0001
Day 6	7.89	0.0011	4.17	N.S.	22.47	0.0030
Day 7	-1.80	N.S.	-4.05	N.S.	-2.94	N.S.
Day 8	-3.97	N.S.	-6.34	N.S.	-9.79	N.S.
Gender (男=0, 女=1)	1.33	0.6925	15.73	0.0054	23.75	0.0381
單位體重攝食量(g/kg)	17.10	0.0323	29.86	0.0437	73.25	0.0248

N.S. : 未達統計上之顯著水準。