

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 化學科

(鄉土)教材獎

050214

「食」「尿」未及
—飲食差異對尿液檢體中代謝體變化情形討論

學校名稱：國立武陵高級中學

作者： 高二 陳宇哲 高二 馮 翊	指導老師： 吳佩芳
-------------------------	--------------

關鍵詞：代謝物、尿液檢體、丹磺醯衍生效

摘要

許多人都說飲食習慣對身體影響甚大，因此本實驗想要從尿液檢體中的代謝體，探討其與生理機能的關聯性。本實驗利用質譜分析方式，利用丹磺醯衍生法標定尿液中所含的大量代謝物分子，比較不同個體及不同飲食習慣中代謝體數量與種類上的差異。

在研究後發現葷食菜單的代謝體數量會較素食菜單中多，且同時由於代謝體的種類與數量並無正相關，我們也將兩種不同飲食習慣代謝物進行標定，找出兩種類別中特有的代謝物，並比較分析出三種可能的代謝途徑：葷食菜單為 ”beta-Alanine metabolism”，而素食菜單則會對 ”Histidine metabolism”和 ”Pyrimidine metabolism”造成影響。未來可繼續運用此種分析方式，對各種食物進行分析及研究，分析出各種食物間對人體的利與弊。

壹、研究動機

俗話說：「民以食為天」，飲食一直在人類的生活中扮演非常重要的角色，我們藉由飲食來攝取每天所需的養分，以維持人體機能的進行，所以對人體的影響應該極大。在日常生活中也有很多實際的案例，譬如說，當我們喝了咖啡，上廁所時總是能聞到咖啡的味道，顯示代謝物與飲食間息息相關。正因如此，我們開始對每天放入口中的食物產生好奇，既然飲食與我們身體的健康以及代謝物有關聯，那我們是否能將代謝物與身體健康做連結？我們又能否從代謝體中，回推並進一步分析飲食習慣的差異，甚至是預測疾病的發生。

基於以上種種的原因，我們上網搜尋了一些相關的文獻，發現「飲食習慣對人體代謝物成分的影響」這方面的研究鮮少有人對其有深入的探討。許多素食主義者總是宣稱吃素有益身體健康¹；然而，卻有另外一群人認為人體必須要攝取一定量的肉類食物，以維持正常的生理機能。這個問題一直都有兩派截然不同的說法，因此我們想要自己來一探究竟。配合著化學課程中有關生物體中有機物質的介紹，我們發現可以利用胺基酸標定的質譜分析，分析代謝物，去理解吃素是否真的對身體有益，又或者肉吃太多會對身體產生危害。

貳、研究目的

- 一、比較葷食與素食兩種不同的飲食習慣對人體代謝物數量的影響。
- 二、進食同樣的菜單，比較不同個體的代謝體差異。
- 三、比對找出飲食中的特定代謝物及代謝途徑。

參、研究設備及器材

一、實驗試劑：

(一)碳酸氫鈉 Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

(二)碳酸鈉 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

(三)丹磺醯氯 Dansyl chloride (DNSC)

(四)乙腈 Acetonitrile (ACN)

(五)氫氧化鈉 Sodium hydroxide (NaOH)

(六)甲酸 Formic Acid (FA)

(七)二次水 Distilled Deionized Water

二、實驗器材：

(一) 離心機 (KUBOTA, 5922) 、(Eppendorf centrifuge 5417R)

(二) 微量型離心機 (Thermo Scientific, Heraeus Pico 17)

(三) 微量吸量管 (range: 1-10 mL, 2-20 μL , 20-200 μL , 50-500 μL , 100-1000 μL)



微量吸量管

(四) GV 無菌注射器過濾器(MilliporeSigma SLGV033RS Millex® GV Sterile Syringe Filter

with Durapore® PVDF Membrane, 0.22µm)

(五) 渦流攪拌機 (Scientific Industries, Vortex-Genie 2)

(六) 雜交反應用烘箱 (Firstek, DHO-101)

(七) 紫外光分光光譜儀

(八) 安捷倫液相層析 (Agilent, Liquid Chromatography)

(九) 布魯克質譜儀 (Bruker Impact II)

(十) 冷凍冰箱

(十一) 針筒 (Terumo Syringe)



微量型離心機



渦流攪拌機

三、使用程式與網站

(一) R

(二) Detaanalysis

(三) Draw Venn Diagram <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

(四) MyCompoundID 資料庫-Amines/Phenols-Mass and Retention Time (M-RT) Search

http://www.mycompoundid.org/Compound_MRT/mrt.jsp

(五) MetaboAnalyst <http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>

(六) Reaxys <https://new.reaxys.com/>

肆、研究過程及方法

一、研究方法

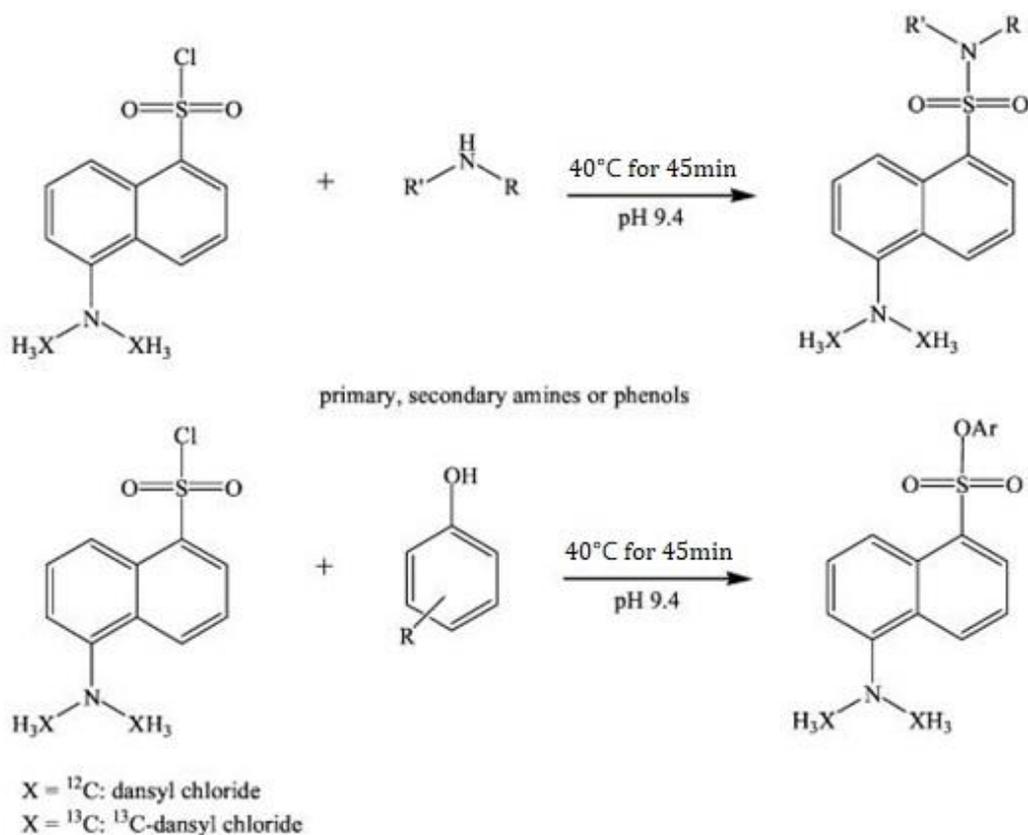


二、反應原理

丹磺醯衍生法 (Dansylation)²

代謝體學(Metabolomics) 是研究特定目標生物體內代謝物分子(Metabolite)的所有組成內容，人體平時所攝取的食物都富有豐富的蛋白質及代謝物，根據人體代謝體資料庫 (Human Metabolome Database)，超過 95%的人體代謝體包含胺基酸、羰基、羥基、羧基³等化學官能基，且人類代謝物中含有多種的胺基酸。而丹磺醯氯 (dansyl chloride) 可

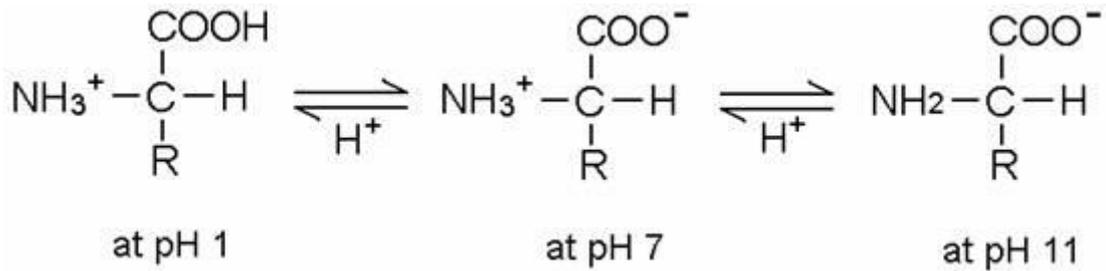
以與一級胺，二級胺和酚羥基反應，在 40°C、pH 值 9.4 - 9.5 之間、反應 45 分鐘之後，上述的三種反應物可被丹磺醯化 (Dansylation)。故在此我們利用丹磺醯氯進行化學標定和檢驗，以增加人體代謝物在質譜儀上偵測之靈敏度。



圖一 丹磺醯衍生法反應式²

丹磺醯氯有兩種，一種是含 C¹² 的較輕分子，另一種則為含 C¹³ 的較重分子。先將各管檢體與較輕的丹磺醯氯反應，再另外混合所有檢體與較重的 C¹³ 進行丹磺醯衍生法成為內標準品，添加到含有 C¹² 標定的各管檢體作為比較的依據。當胺基酸被丹磺醯化之後，我們可以利用 C¹² 和 C¹³ 的原子量差異進行同位素標定。在反應結束之後，多餘的丹磺醯氯可被後來加入的氫氧化鈉反應掉。而其所形成的 dansyl acid (C₁₂H₁₃NO₃S) 並不會干擾到代謝物的偵測。最後，在反應物中加入甲酸，反應掉過多的氫氧化鈉，同時，加酸可使代謝物帶電荷，成為離子態，才可被質譜儀偵測，進行下一步的分析。

在質譜儀中，如果分子量差距 2 (C^{12} 和 C^{13} 的丹磺醯氯分子量相差 2) 的兩個峰值皆有出現，就可以確認被標定完成的代謝物確實存在。最後利用同位素的分子量差，以質譜儀的訊號比對分析代謝物的種類及濃度的差異。同時，此反應的緩衝液必須控制 pH 值在 9.4 - 9.5 間，使得丹磺醯衍生法的反應效率較高，並防止代謝體在次級反應中被水解。



圖二 胺基酸在不同 pH 值的解離狀態

三、 實驗流程

(一) 訂定菜單

兩位受檢者依照下表所訂定的葷食菜單及素食菜單，皆各自食用一個星期的時間來影響代謝。每日固定飲食及飲水量，並於當週的最後三日定時收尿，每日收尿三次：起床後第一泡尿、午餐前、及下午三點。每次收集完的尿液則置於冷凍冰箱中保溫。

表一 實驗設計菜單

葷食菜單		7/22-7/28
早晨	起床後 6:30 第一次集尿	
	集尿後	150 c.c.水
	早餐(7:00)	火腿蛋餅 一份(6 塊)+250c.c 水
	9:00	100 c.c.水
	10:00	100 c.c.水
	11:00	100 c.c.水

中午		12:00 第二次集尿
	午餐(12:30)	麥當勞 麥脆雞套餐 (雞翅一塊 雞胸肉一塊 玉米濃湯) +300c.c 水
	14:00	200c.c 水
下午		15:00 第三次集尿
	16:00	200c.c 水
	晚餐(18:00)	燒肉飯+250c.c 水
	20:00	200c.c 水
	22:00	250c.c 水
總水量：2100c.c.		

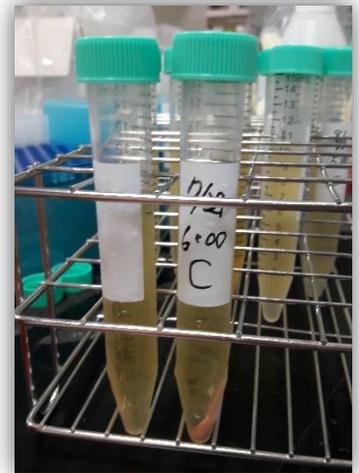
素食菜單

7/29-8/4

早晨		起床後 6:30 第一次集尿
	集尿後	150 c.c.水
	早餐(7:00)	生菜三明治+250c.c 水
	9:00	100 c.c.水
	10:00	100 c.c.水
	11:00	100 c.c.水
中午		12:00 第二次集尿
	午餐(12:30)	素食便當(咖哩炒飯)+300c.c 水
	14:00	200c.c 水
下午		15:00 第三次集尿
	16:00	200c.c 水
	晚餐(18:00)	阿舍乾麵(油蔥)+一盤高麗菜+250c.c 水
	20:00	水果(蘋果一顆)200c.c 水
	22:00	250c.c 水
總水量：2100c.c.		

(二) 過濾尿液檢體

1. 將解凍後的尿液檢體離心十分鐘。
2. 用針筒抽出管內上部澄清檢體以 10ml 分裝。
3. 利用 GV 無菌注射器過濾器進行兩次過濾，以濾掉尿液中的雜質以及較大的分子。
4. 將過濾完的檢體以 2ml 分裝。



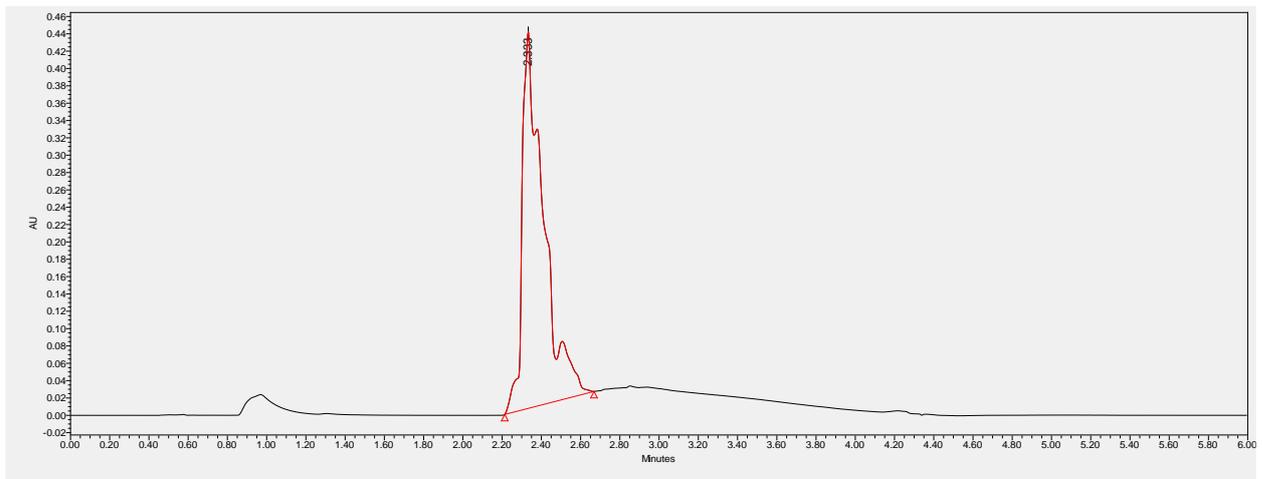
(三) 丹磺醯衍生法 (Dansylation) 步驟

1. 利用二次水 37.5 μ l，將檢體 12.5 μ l 稀釋 4 倍。
2. 加入緩衝溶液(NaHCO₃/Na₂CO₃) 25 μ l。
3. 加入丹磺醯氯與乙腈混合液 (1 mg DNSC/ 80.5 μ l ACN) 75 μ l 後離心。
4. 放入烘箱中搖晃 45 分鐘促其反應，保持 40 °C、200 rpm。
5. 置於冰上 1 分鐘後離心。
6. 加入 250 mM 氫氧化鈉 10 μ l，再將其置於烘箱中 10 分鐘，分解多餘的 DNSC，終止反應。
7. 再加入 42 5mM 甲酸 50 μ l 離心，分解過多的氫氧化鈉。

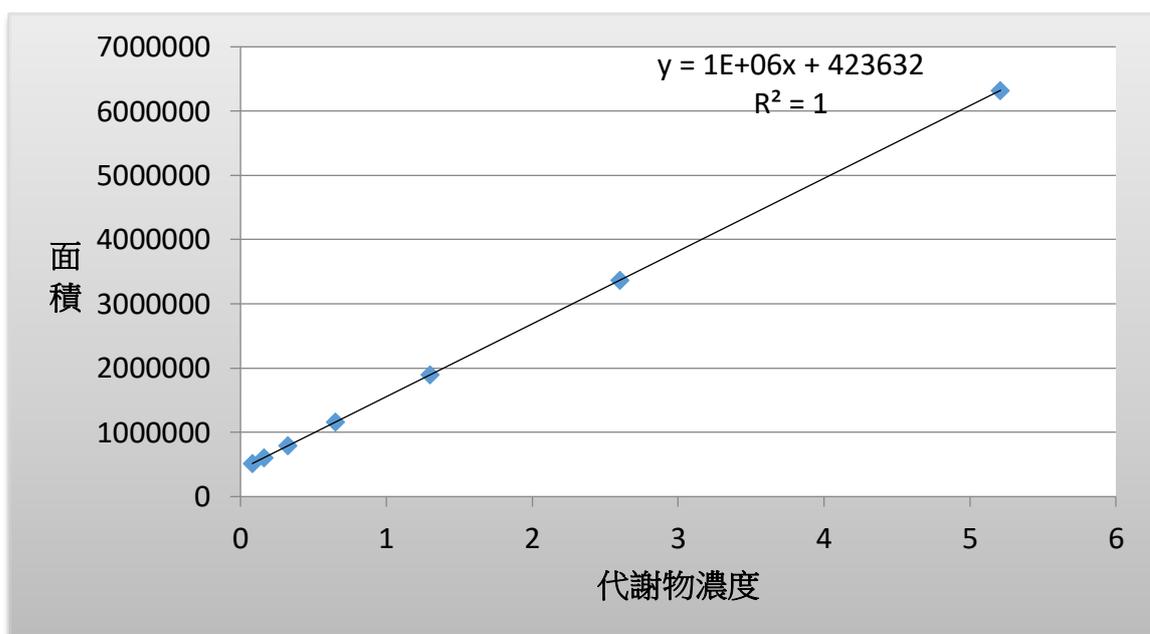


(四) 以 UV 吸收光譜測量被標定的代謝物濃度

1. 將 18 個胺基酸標準品(Sigma)，依序稀釋成 7 個濃度 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.2 和 5.2 mM)，分別進行丹磺醯衍生法 (Dansylation)，再以液相層析，並透過紫外光 (338nm) 吸光峰值，得到標準濃度檢量線。
2. 將標定後的檢體 36 管 (兩人皆食用兩種菜單，各收集三天，一天三管) 依序與標準濃度檢量線進行比對，得出其中的代謝體濃度。



圖三 UV 圖譜 (以檢體一 7/28 中午之圖譜為例)



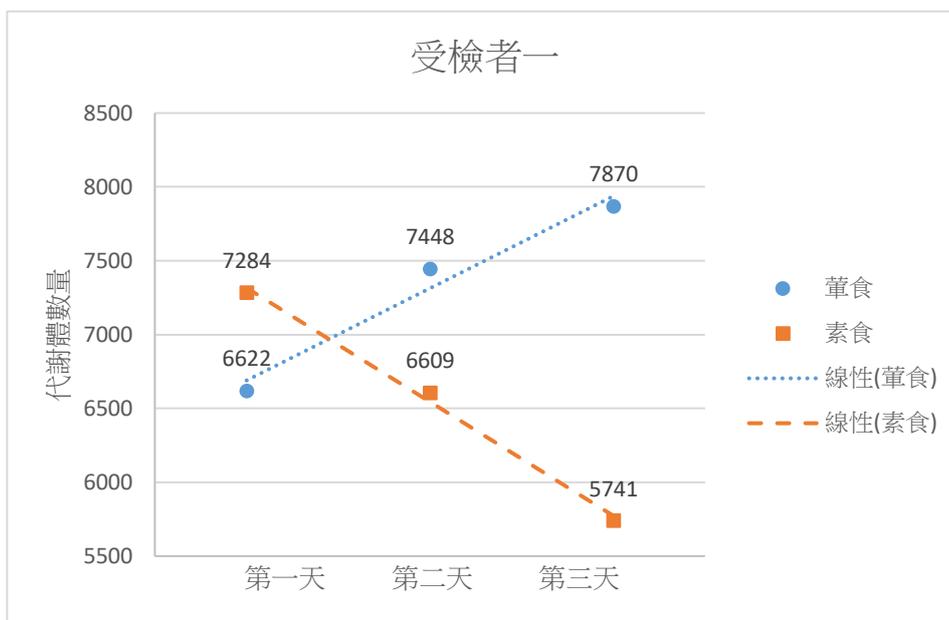
圖四 標準濃度檢量線

伍、研究結果

一、 代謝物數量折線圖及文氏圖

此處的「代謝物數量」是由質譜儀中得來的數據，經過各個時段的三重複驗證，將標準差 30%以下的代謝體視為有效存在，並予以討論。「數量」所代表的是各種代謝物該日出現的次數相加，與後方討論中的「種類」不同。

(一) 受檢者一



圖五 受檢者一代謝物數量分天散佈圖

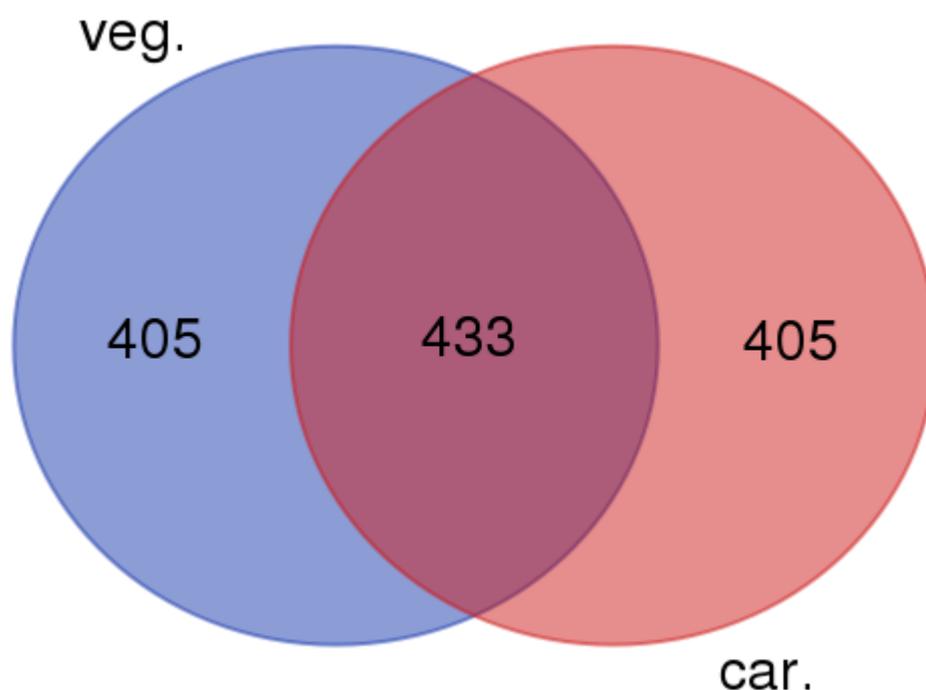
表二 受檢者一葷食及素食代謝物總數表

受檢者一	葷食	素食
總數	21940	19634

(總數=第一天代謝物數量+第二天代謝物數量+第三天代謝物數量)

圖五是將受檢者一同一天同個時段的三管數據進行比對，抓出三管濃度間標準差小於 0.3的代謝物，最後再將三時段數量相加製成的代謝體數量分天散佈圖。

由圖可見，葷食的第一天為 6622 筆，第二天逐漸增加為 7448 筆，到了第三天更增為 7870 筆，代謝體數量呈現日益增加的趨勢。另一方面，素食檢體中的數據，則由 7284 筆掉至第三天剩下 5741 筆。除了第一天以外，葷食檢體的代謝體數量皆較素食檢體多，且差距日漸增加。



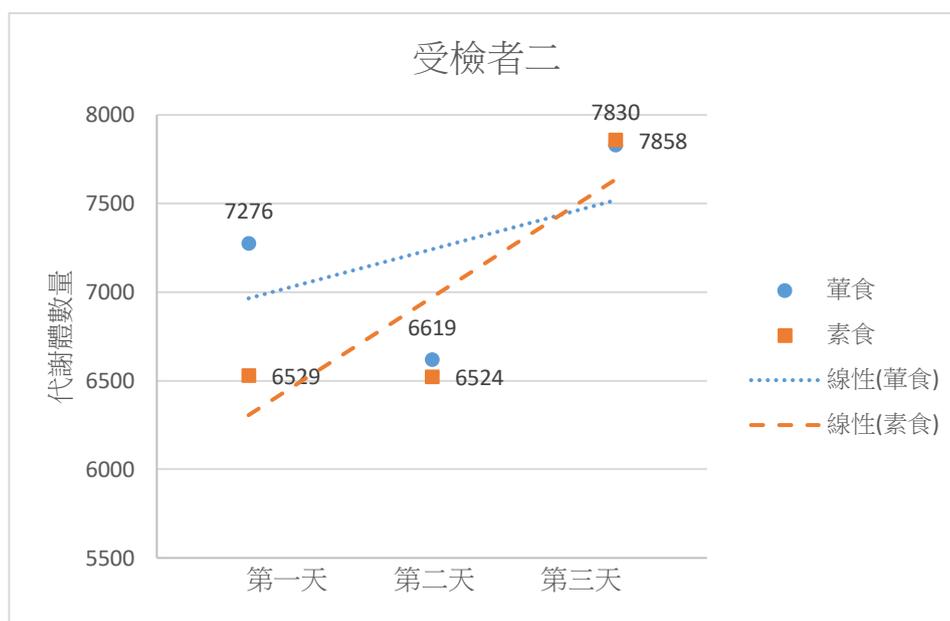
圖六 受檢者一葷食及素食代謝物種類的文氏圖

(car. 代表葷食；veg. 代表素食)

為了比較代謝體之間的重複性及種類，我們將三天的檢體一起篩選，考量到三天會有重複的代謝物出現，所以利用類似文氏圖的方法，先比對葷食的檢體，將檢體一的 9 管葷食檢體上傳至 Draw Venn Diagram 網站，找出都有出現的代謝體，而素食也以同樣的方式比對。最後將這兩大類作成文氏圖討論代謝物的種類，分別列出共同出現及僅在葷食或僅在素食中出現的代謝物數量。

葷食檢體中皆含有的代謝體共有 838 種，在素食中亦是 838 種，但其中有 433 種重複的代謝體，之後我們將會對各自剩下的 405 個代謝物篩選後進行比較分析。

(二) 受檢者二



圖七 受檢者二代謝物數量分天散佈圖

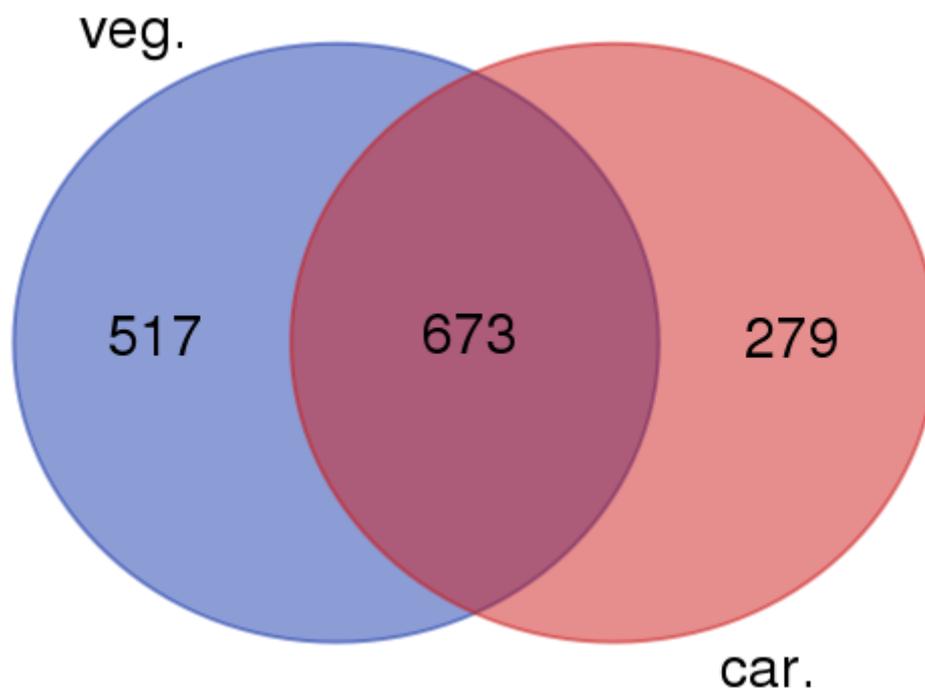
表三 受檢者二葷食及素食代謝物總數表

受檢者二	葷食	素食
總數	21725	20911

(總數=第一天代謝物數量+第二天代謝物數量+第三天代謝物數量)

此圖是將受檢者二篩選過後的代謝體數量分天作成散佈圖。在我們處理此檢體的質譜儀數據時，發現素食第三天下午的第三針幾乎沒有偵測到代謝物，推測是因為尿液檢體中的代謝體含量不足，導致檢體鹽析分層，所以質譜儀抽到第三針時，已經沒有代謝體可抽，故該管我們只用前兩針的數據來篩選分析。

由圖可見，葷食數據中第一天為 7276 筆，第二天為 6619 筆，第三天則增為 7850 筆，**葷食的代謝體數量整體呈現向上增加的趨勢**。而素食檢體中的數據，前兩天大致在 6520 - 6530 之間，第三天卻增至 7858 筆，比吃了同樣久的葷食代謝體含量還高。



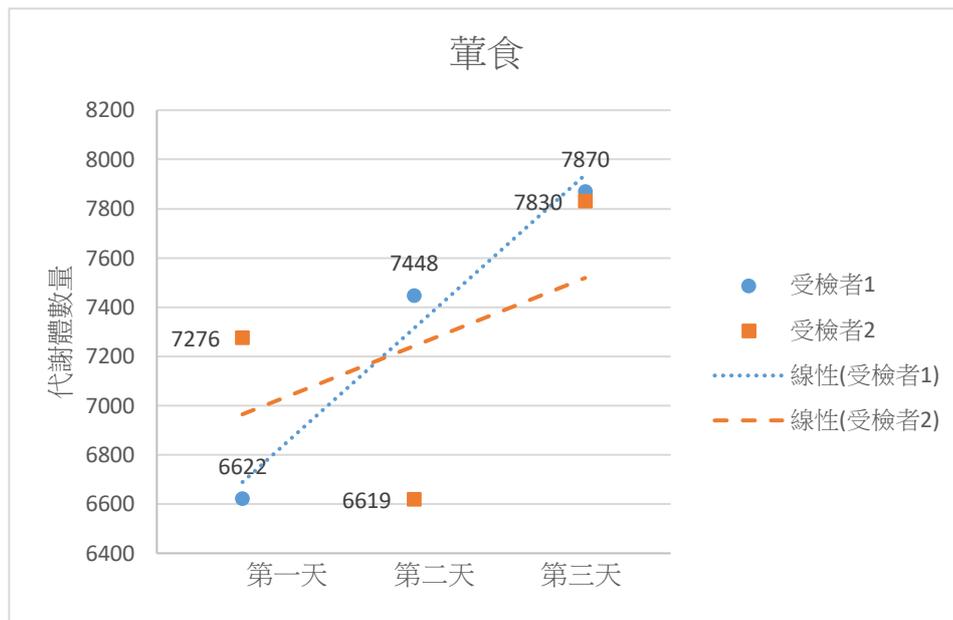
圖八 受檢者二葷食及素食代謝物種類的文氏圖
(car. 代表葷食；veg. 代表素食)

此圖是將受檢者一的 9 管葷食檢體及 9 管素食檢體各自上傳至 Draw Venn Diagram 網站，找出皆有出現的代謝體。篩選過後的代謝體分為葷食和素食兩大類，最後將這兩大類作成文氏圖討論代謝物的種類，分別列出共同出現及僅在葷食或僅在素食中出現的代謝物數量。

葷食檢體中皆含有的代謝體共有 952 種，而素食中亦是 1190 種，其中有 673 種為兩者皆有的代謝體。值得注意的是，只在素食檢體中出現的代謝物比葷食的多出 1.85 倍。

(三) 合併分析——討論葷食和素食間的差別

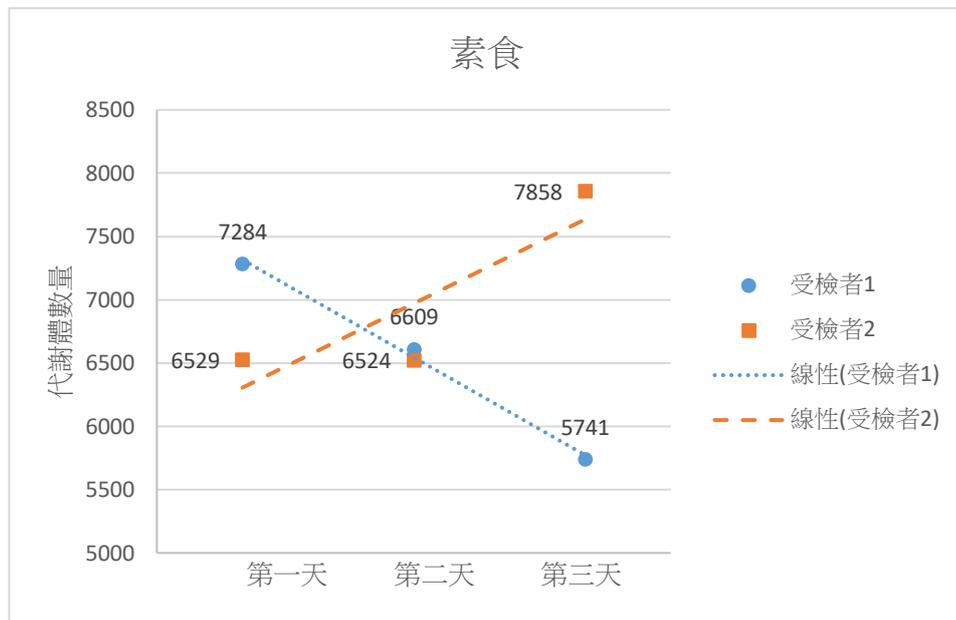
將兩名受檢者的檢體合併進行討論。將受檢者一與受檢者二同個時段的三管數據，合計六管，一起篩選出濃度標準差小於 0.3 的代謝物，最後再將篩選後同一天三個時段的數量相加，製成的代謝體數量分天散佈圖。



圖九 葷食菜單代謝物數量分天散佈圖

上圖為兩個檢體的葷食代謝體數量比較圖。

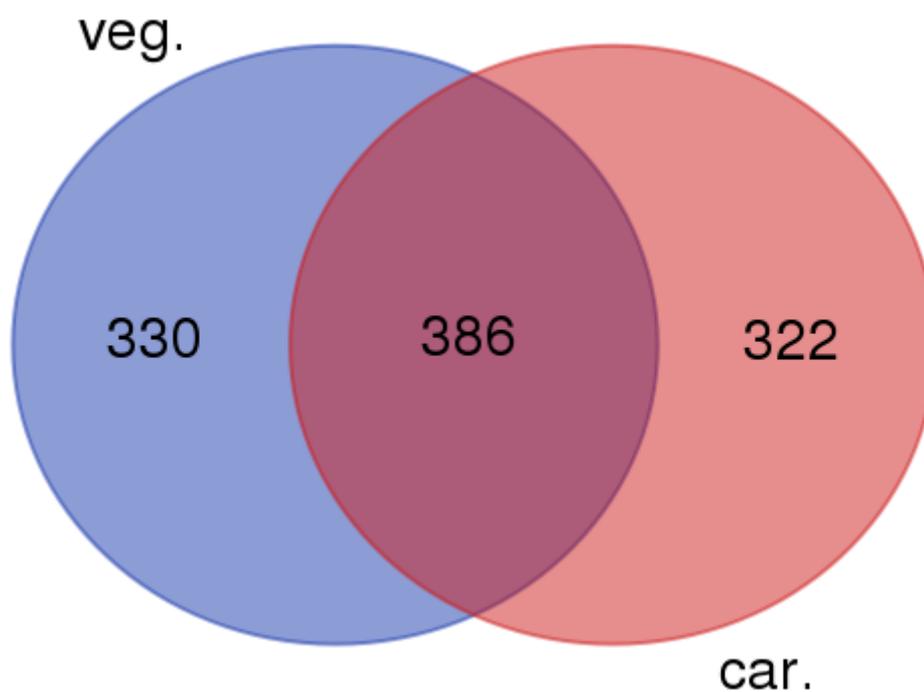
受檢者一與受檢者二在吃葷食食譜之後，代謝物的數量趨勢皆逐漸上升，檢體一從原本的 6622 個，增加到 7870 個，而檢體二則從 7276 個增加到 7830 個，符合我們最初的推測。然而受檢者一與受檢者二的數據卻有些不同，尤其是第二天，因此我們推測是**個體差異**或是**檢體樣本不足**所造成的誤差。



圖十 素食菜單代謝物數量分天散佈圖

上圖為兩個檢體的葷食代謝體數量比較圖。

儘管兩個檢體在第二天的數據非常的接近，但是**整體的趨勢卻是完全相反的**。受檢者一的趨勢符合一開始的假設，日漸下降，然而受檢者二的趨勢卻在意料之外，第三天的代謝體數量竟然比第一多許多。推測為實驗中檢體鹽析導致數量誤差，所以該管數據應不予以使用討論。雖然代謝體的數量有不同，但是還是可以從代謝物的種類找出吃素與吃葷的差異。



圖十一 檢體合併分析 葷食及素食代謝物種類的文氏圖

(car. 代表葷食；veg. 代表素食)

此圖則是先將兩個人的葷食檢體分別利用 [Draw Venn Diagram](#) 網站進行比對，找出 18 管葷食檢體中共同包含的代謝體，同時將素食也以同樣的方式篩選，最後把兩大類作成文氏圖，分別列出共同出現及僅在葷食或僅在素食中出現的數量。

由圖中可知，葷食的有 708 個，素食的則有 716 個共同擁有的代謝體，兩者間重複的部分則有 386 個。我們後續將對只有在葷食檢體中存在或是僅在素食檢體中包含的代謝體進行個別標定分析。

又由上述所列出的三個文氏圖，我們作了表格分析每個區段占總體的比例：

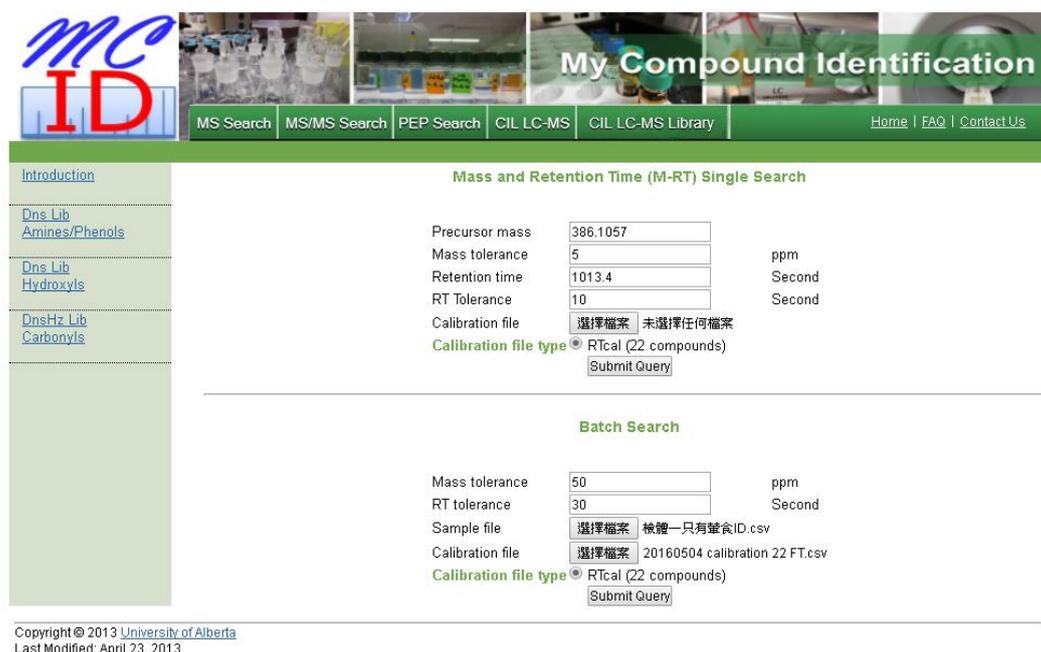
表四 各種討論方法中代謝體所占比例表

	受檢者一		受檢者二		合併分析	
	代謝體 種類	所占比例	代謝體 種類	所占比例	代謝體 種類	所占比例
葷素皆包含	433	34.8%	673	45.8%	386	37.2%
僅素食有	405	32.6%	517	35.2%	330	31.8%
僅葷食有	405	32.6%	279	19.0%	322	31.0%
Total	1243	100.0%	1469	100.0%	1038	100.0%

由上表可知，「葷素皆包含」區段占了受檢者一 34.8%、受檢者二 45.8%，在合併分析中則占 37.2%。「僅素食有」區段則占了受檢者一 32.6%、受檢者二 35.2%、合併分析中的 31.8%。「僅葷食有」區段亦占了受檢者一 32.6%、受檢者二 19.0%、及合併分析中的 31.0%。其中，「葷素皆包含」這個區段內所占的比例在各種討論方法中皆為最高，而「僅素食有」這個範圍內所含的代謝體皆是次高。「僅葷食有」這個範圍內所含的代謝體雖然含量較少，但也有 19%至 32%。

(四) 找出特定代謝物及代謝途徑

將篩選完的葷食及素食代謝體運用其本身的電荷對質量比(mass to charge ratio)和在液相層析質譜儀中的滯留時間，從 MyCompoundID 的資料庫中查出代謝物的總類及結構等相關訊息。將檢體與標準品間的濃度誤差設為 50ppm，而滯留時間誤差設為 30 秒，在誤差範圍內的代謝物皆會被比對出來，再將資料庫中有的這些代謝體進行下一步分析，找出其在人體的反應途徑。



The screenshot shows the MyCompoundID website interface. The main navigation bar includes 'MS Search', 'MS/MS Search', 'PEP Search', 'CIL LC-MS', 'CIL LC-MS Library', 'Home', 'FAQ', and 'Contact Us'. The page is titled 'Mass and Retention Time (M-RT) Single Search'. The search parameters are as follows:

Parameter	Value	Unit
Precursor mass	386.1057	
Mass tolerance	5	ppm
Retention time	1013.4	Second
RT Tolerance	10	Second
Calibration file	選擇檔案 未選擇任何檔案	
Calibration file type	<input checked="" type="radio"/> RTcal (22 compounds)	

Below the single search section is a 'Batch Search' section with the following parameters:

Parameter	Value	Unit
Mass tolerance	50	ppm
RT tolerance	30	Second
Sample file	選擇檔案 檢體-只有葷食ID.csv	
Calibration file	選擇檔案 20160504 calibration 22 FT.csv	
Calibration file type	<input checked="" type="radio"/> RTcal (22 compounds)	

At the bottom of the page, it states: Copyright © 2013 University of Alberta, Last Modified: April 23, 2013.

圖十二 MyCompoundID 的資料庫查詢頁面

各類檢體使用網站比對過後，資料庫中有紀錄的代謝體分別如下：

表五 葷食及素食檢體經比對後所得的代謝物一覽

檢體- 葷食	檢體- 素食
1,3-Diaminopropane	2-Hydroxyphenethylamine - Isomer
2-Phenylglycine	Urocanic acid
m-Aminobenzoic acid	m-Aminobenzoic acid
p-Aminobenzoic acid	p-Aminobenzoic acid

檢體二 葷食	檢體二 素食
1,3-Diaminopropane	1_3-Diaminopropane
Canavanine	2-Aminoisobutyric acid
Canavanine - Isomer	2-Hydroxyphenethylamine - Isomer
	3-Aminoisobutanoic acid
	D-Alpha-aminobutyric acid
	L-Alpha-aminobutyric acid
	p-Aminobenzoic acid
	Urocanic acid

受檢者一的葷食部分共比對出 4 種代謝物，素食部分也比對出 4 種。其中，m-Aminobenzoic acid, p-Aminobenzoic acid 兩種代謝物重複出現，而葷食中獨有的為 1,3-Diaminopropane 和 2-Phenylglycine，素食中獨有的則是 2-Hydroxyphenethylamine – Isomer 和 Urocanic acid。

受檢者二的葷食部分比對出 3 種代謝物，素食部分則比對出 8 種。其中，1,3-Diaminopropane 重複出現，而葷食中獨有的代謝體為 Canavanine 和 Canavanine – Isomer，素食中獨有的則為 2-Aminoisobutyric acid, 2-Hydroxyphenethylamine – Isomer, 3-Aminoisobutanoic acid, D-Alpha-aminobutyric acid, L-Alpha-aminobutyric acid, p-Aminobenzoic acid 和 Urocanic acid。其中，**受檢者二葷食菜單中獨有的”Canavanine”** 可引起「**紅斑性狼瘡**」，恰好受檢者二家族成員中有此種疾病患者，可再次驗證此種分析方式的準確性，也可推斷出**紅斑性狼瘡的高危險族群應盡量避免長期食用油炸肉類**。

將同個體不同飲食方式中重複出現的代謝物刪除後，就葷食與素食分開討論，再使用 MetaboAnalyst 網站來找出代謝途徑。葷食方面利用 1,3-Diaminopropane, 2-Phenylglycine, Canavanine 和 Canavanine – Isomer 搜尋，素食方面則利用 2-Aminoisobutyric acid, 2-Hydroxyphenethylamine – Isomer, 3-Aminoisobutanoic acid, D-Alpha-aminobutyric acid, L-Alpha-aminobutyric acid, p-Aminobenzoic acid 和

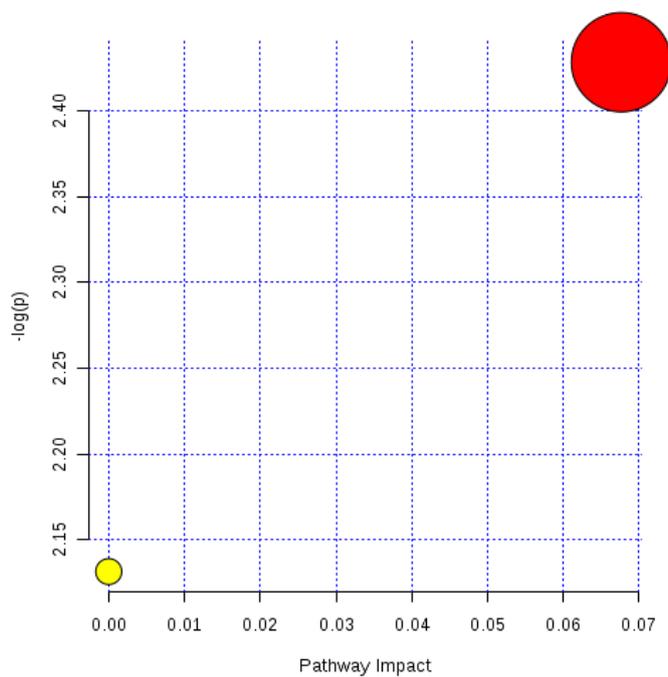
Urocanic acid 搜尋。結果葷食部分得出相對應的代謝路徑為 ”**beta-Alanine metabolism**” ，素食的代謝路徑則比對出兩條，分別為 ” **Histidine metabolism**” 和 ” **Pyrimidine metabolism**” ，相關性及影響程度的表作圖如下：

表六 葷食代謝體代謝途徑

代謝途徑	p-value	-log(p)	影響程度
beta-Alanine metabolism	0.023135	3.7664	0.08236

表七 素食代謝體代謝途徑

代謝途徑	p-value	-log(p)	影響程度
Histidine metabolism	0.08819	2.4283	0.06765
Pyrimidine metabolism	0.11867	2.1314	0



圖十三 素食代謝體兩代謝途徑之相關性及影響程度圖

陸、討論

一、 在菜單中，我們採取較極端的飲食方式（表一），譬如說：葷食該週中午都吃炸雞，而素食則多吃蔬菜水果，盡量採取平日主觀意識下大眾所認定的「健康」及「不健康」進行對照。同時我們也推測，「健康」的飲食中，食物中多為纖維素等物質，鮮少如肉類等含高蛋白質的食材，故被標定到的代謝體含量應較「不健康」的含量少。

二、 同樣個體中葷食與素食的差異

在食用一個禮拜的葷食菜單後，受檢者一中的代謝體數量幾乎呈現線性的增加（圖五），符合一開始的推測：因為肉類含有較多的蛋白質，故有較多的胺基酸可以被標定出來。同時也可以發現，受檢者一食用了一週素食菜單後，代謝體數量顯著降低（圖五），顯示人體的確會因為飲食的差異，而造成代謝體數量的變化。

而受檢者二食用不同食譜各一週後，整體上來說葷食檢體中的代謝體數量還是較素食檢體中多，而葷食也是同樣呈現上升的趨勢（圖七）。然而，受檢者二的素食檢體到了第三天，非但沒有下降還上升。我們推測應該是實驗進行步驟上的誤差，因為該天下午的第三針代謝體不足，所以我們只好用前兩針的分析結果來討論，因此該管並沒有進行三重複驗證，該管數據應不予以使用討論。

另外，受檢者一中的葷食檢體總數較素食檢體多（表二），但葷食與素食各自所含有的代謝體種類比例為 1：1（圖六）；同樣的情況，受檢者二的素食檢體中，雖然代謝體總數較少（表三），但用種類來分，素食的代謝體種類反而是葷食的 1.25 倍，而去除重複出現的代謝體，素食僅有的代謝體種類更是葷食的 1.85 倍（圖八），以上皆可推測出代謝體的種類不與數量呈正相關，代謝物不會在同一天中的每個時段皆出現。

三、 不同個體食用相同食譜的差異比較

受檢者一與受檢者二的葷食及素食代謝體數量的數據有些不同（圖九、圖十），尤其在葷食的第二天更有明顯差別，我們推測應是個體差異或是檢體樣本不足所造成的誤差。另外，無論是將兩受檢者分開討論或是合併解釋，所得的代謝體種類中都還是「葷素皆包含」的區段中最多（表四），可知儘管個體差異及飲食習慣會對人體的代謝物造成影響，人體還是會固定代謝某些代謝物。

四、 合併討論葷食與素食整體差異

葷食菜單及素食菜單代謝物數量分天散佈圖中，葷食檢體的代謝物數量趨勢皆為上升（圖九）。由於葷食菜單中食用大量的肉類，蛋白質的攝取量大，又本實驗方法為利用胺基酸標定來檢測代謝物數量，所以結果符合先前假設，葷食菜單可造成代謝物數量增加。另外，素食的部分，若去除受檢者二第三天鹽析的數據，代謝物數量整體趨勢為下降（圖十），也可說明素食菜單中較為清淡的飲食造成代謝物數量減少。以上皆可明顯顯示出飲食對代謝的確有其影響。

至於合併分析兩個檢體中葷食與素食代謝體種類的文氏圖（圖十一），可再次驗證，葷食與素食各自所含有的代謝體的種類不與數量呈正相關。

但在食用了相同的菜單之後，兩個檢體的數據所佔比例卻相差甚大（表四），表示個體間本身就含有極大的差異，或許菜單本身對人體的代謝物有影響，但是由於影響過小或是個體差異的影響過大，導致兩者的數據有落差。

五、 特殊代謝物及其相關代謝途徑

經分析，葷食會對 ”beta-Alanine metabolism” 代謝途徑造成影響（表五），此代謝途徑與肌肉纖維的緩衝能力有關聯⁴。素食則會對 ”Histidine metabolism” 和 ”Pyrimidine metabolism” 兩種代謝途徑造成影響（表六），而 ”Histidine

metabolism”的相關性與影響程度皆較大（圖十三）。且同時經搜尋後發現，生物體內無法自然合成 Histidine。

而受檢者二葷食菜單中獨有的” *Canavanine* ”可引起「紅斑性狼瘡」，恰好受檢者二家族成員中有此種疾病患者，可再次驗證此種分析方式的準確性，也可推斷出紅斑性狼瘡的高危險族群應盡量避免長期食用油炸肉類。

柒、結論

- 一、飲食與代謝之間有其相關性，不同的飲食習慣會影響代謝，造成代謝體數量的變化。
- 二、代謝體的種類不與數量呈正相關。
- 三、葷食菜單可使代謝物數量增加，而素食菜單可使代謝物數量減少。
- 四、個體的差異對代謝的過程影響甚大，且儘管食用不同菜單，人體還是會固定代謝某些代謝物。
- 五、葷食菜單會對 ” beta-Alanine metabolism”此代謝途徑造成影響；而素食會對 ”Histidine metabolism”和 ” Pyrimidine metabolism”兩種代謝途徑造成影響。
- 六、未來若運用上述研究方法，對各種食物進行分析及研究，便能藉此分析出其所影響的代謝途徑，並進一步探討其對人體所造成的影響，分析出各種食物間對人體的利與弊。

捌、參考資料與其他

- ¹ Yen-Feng Chiu, Chih-Cheng Hsu, Tina H. T. Chiu, Chun-Yi Lee, Ting-Ting Liu, Chwen Keng Tsao, Su-Chun Chuang and Chao A. Hsiung (2015). Cross-sectional and longitudinal comparisons of metabolic profiles between vegetarian and non-vegetarian subjects: a matched cohort study. *British Journal of Nutrition, Volume 114*, Issue 8, pp. 1313-1320
- ² Kevin Guo, Liang Li (2009). Differential ¹²C-/¹³C-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome. *Analytical chemistry, 81* (10), pp 3919–3932
- ³ Shuang Zhao, Xian Luo, and Liang Li (2016). Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. *Analytical chemistry, 88* (21), pp 10617–10623
- ⁴ Guilherme Giannini Artioli, Bruno Gualano, Abbie Smith, Jeffrey Stout and Antonio Herbert Lancha Junio (2010). Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 42* (6):1162-73

【評語】 050214

本實驗有考慮到葷食或素食可能在尿液中生成不同的代謝物，使用質譜儀去標定分析出這些不同的代謝物，並鑑定出有一個代謝物恐引起紅斑性狼瘡疾病不良反應，並推測其源於油炸肉類經由 beta-alanine 代謝途徑而來，有所貢獻。唯研究必須動用大型儀器質譜儀來做這些代謝體” metabolomics” 的研究，這些儀器的使用及分析代謝物的方法，一般高中生不易做到。另外，如果能找出哪一個特定食物來產生不良代謝物，也許對健康更有幫助。

壹、研究動機

我們藉由飲食來攝取每天所需的養分，因此飲食習慣應該對人體影響極大。既然飲食與我們身體的健康以及代謝物有關聯，我們是否能將代謝物與身體健康做連結？而我們又能否從代謝體中，回推並進一步分析飲食習慣的差異。搜尋相關文獻後，我們發現可以利用胺基酸標定的質譜分析，分析代謝物，去理解飲食差異對人體代謝造成的影響。

貳、研究目的

- 一、比較葷食與素食兩種不同的飲食習慣對人體代謝物數量的影響。
- 二、進食同樣的菜單，比較不同個體的代謝體差異。
- 三、比對找出飲食中的特定代謝物及代謝途徑。

參、研究設備及器材

一、實驗試劑：

碳酸氫鈉、碳酸鈉、丹磺醯氯(DNSC)、乙腈、氫氧化鈉、甲酸、二次水

二、實驗器材：

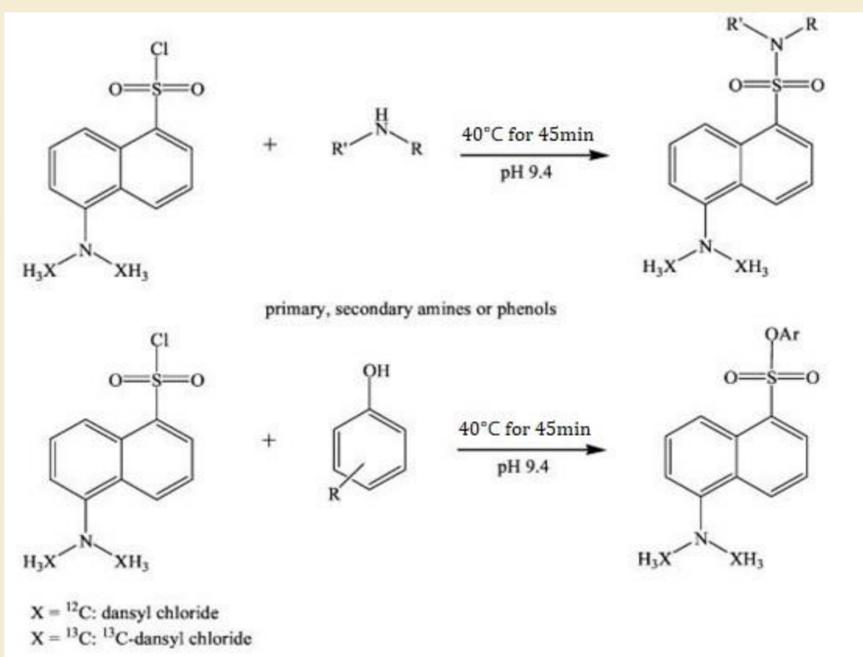
離心機、微量型離心機、微量吸量管、GV無菌注射器過濾器、渦流攪拌機、雜交反應用烘箱、紫外光分光光譜儀、安捷倫液相層析、布魯克質譜儀

三、使用程式與網站：

R、Detaanalysis、Draw Venn Diagram、MyCompoundID資料庫、MetaboAnalyst、Reaxys

肆、研究過程及方法

一、反應原理——丹磺醯衍生法 (Dansylation)



圖一 丹磺醯衍生法反應式

丹磺醯氯有兩種，一種是含C¹²的較輕分子，另一種則為含C¹³的較重分子。當胺基酸被丹磺醯化之後，我們可以利用C¹²和C¹³的原子量差異進行同位素標定。最後，在反應物中加入甲酸，使代謝物成為離子態，才可被質譜儀偵測。

在質譜儀中，如果分子量差距2的兩個峰值皆有出現，就可以確認被標定完成的代謝物確實存在。最後利用同位素的分子量差，以質譜儀的訊號比對分析代謝物的種類及濃度的差異。

二、實驗流程

(一) 訂定菜單

兩位受檢者各自食用一星期的葷食及素食菜單來影響代謝。每日固定飲食及飲水量，並於當週的最後三日定時收尿，每日收尿三次：起床後第一泡尿、午餐前、及下午三點。

(二) 過濾尿液檢體

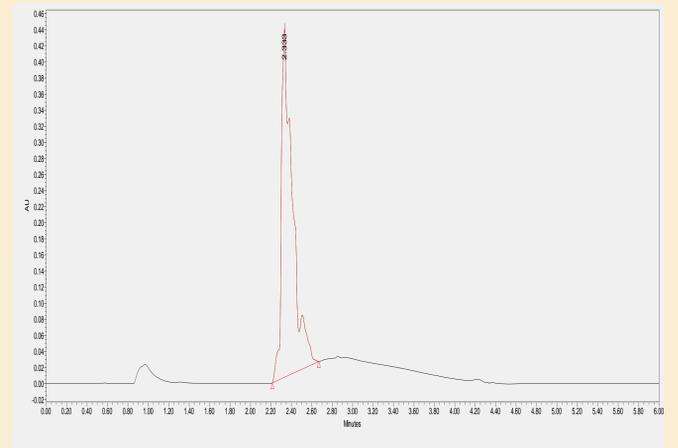
1. 將解凍後的尿液檢體離心十分鐘。
2. 用針筒抽出管內上部澄清檢體以10ml分裝。
3. 利用GV無菌注射器過濾器進行兩次過濾，以濾掉尿液中的雜質以及較大的分子。
4. 將過濾完的檢體以2ml分裝。

(三) 丹磺醯衍生法 (Dansylation) 步驟

1. 利用二次水稀釋4倍後加入緩衝溶液(NaHCO₃/Na₂CO₃) 25μl。
2. 加入丹磺醯氯與乙腈混合液 (1 mg DNSC/ 80.5 μl ACN) 75μl後離心。
3. 放入烘箱中搖晃45分鐘促其反應，保持40 °C、200 rpm。
4. 加入250 mM氫氧化鈉 10 μl，再將其置於烘箱中10分鐘，分解多餘的DNSC，終止反應。
5. 再加入42.5mM甲酸50 μl離心，分解過多的氫氧化鈉。

(四) 以UV吸收光譜測量被標定的代謝物濃度

1. 將18個胺基酸標準品(Sigma)，依序稀釋成7個濃度分別進行丹磺醯衍生法 (Dansylation)，再以液相層析，並透過紫外光(338nm) 吸光峰值，得到標準濃度檢量線。
2. 將標定後的檢體36管(兩人皆食用兩種菜單，各收集三天，一天三管)依序與標準濃度檢量線進行比對，得出其中的代謝體濃度。



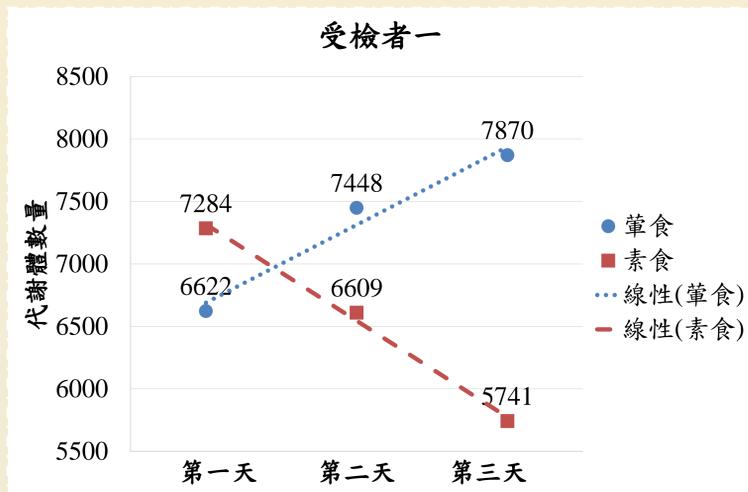
圖二 UV圖譜示例

伍、研究結果

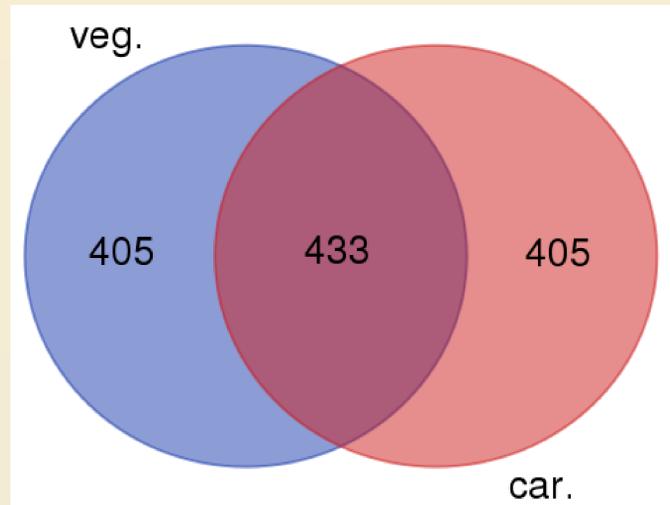
一、代謝體數量折線圖及文氏圖

此處的「代謝體數量」是由質譜儀中得來的數據，經過各個時段的三重複驗證，將標準差30%以下的代謝體視為有效存在，並予以討論。

(一) 受檢者一

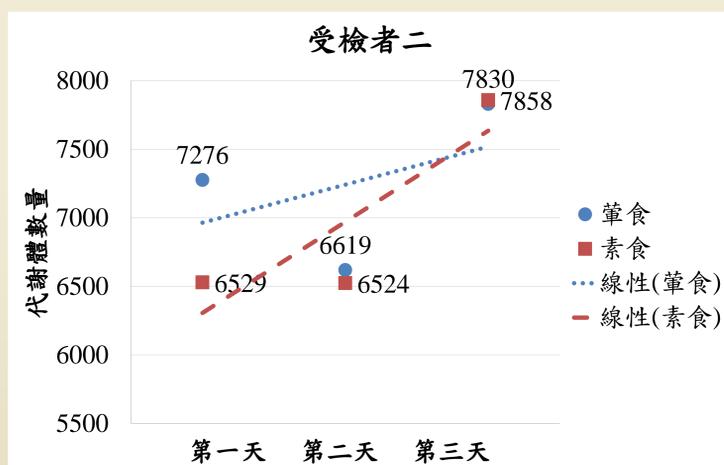


圖五 受檢者一代謝物數量分天散佈圖

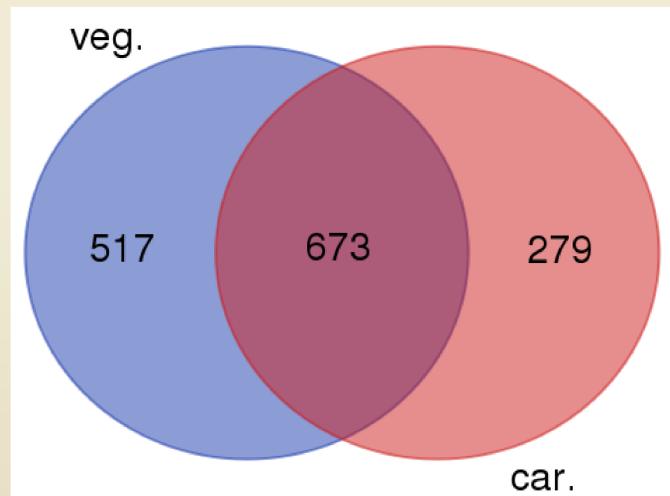


圖六 受檢者一葷食及素食代謝物種類的文氏圖

(二) 受檢者二

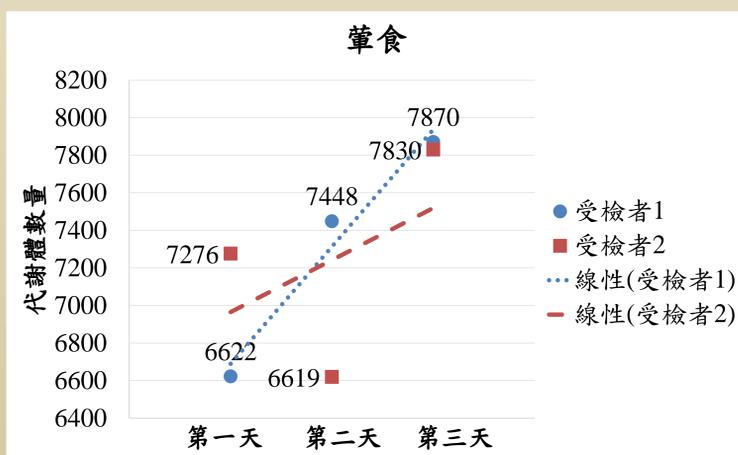


圖七 受檢者二代謝物數量分天散佈圖

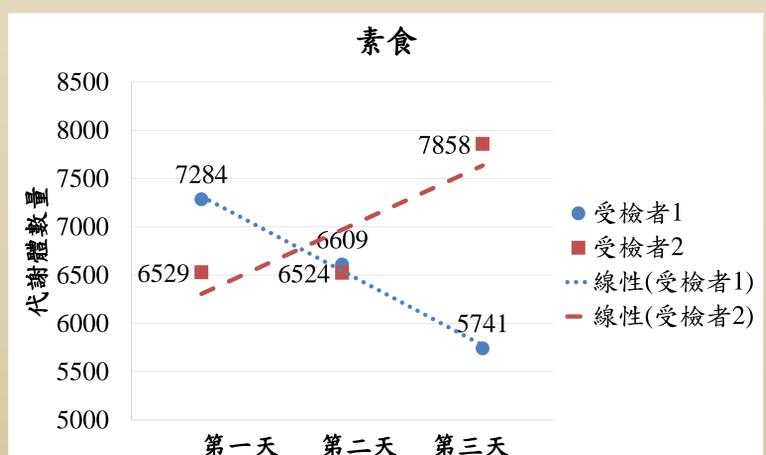


圖八 受檢者二葷食及素食代謝物種類的文氏圖

(三) 合併分析——討論葷食和素食間的差別



圖九 葷食菜單代謝物數量分天散佈圖



圖十 素食菜單代謝物數量分天散佈圖



圖十一 檢體合併分析
葷食及素食代謝物種類的文氏圖

表四 各種討論方法中代謝體所占比例表

	受檢者一		受檢者二		合併分析	
	代謝體 種類	所占 比例	代謝體 種類	所占 比例	代謝體 種類	所占 比例
葷素皆包含	433	34.8%	673	45.8%	386	37.2%
僅素食有	405	32.6%	517	35.2%	330	31.8%
僅葷食有	405	32.6%	279	19.0%	322	31.0%
Total	1243	100.0%	1469	100.0%	1038	100.0%

(四) 找出特定代謝物及代謝途徑

表五 葷食及素食檢體經比對後所得的代謝物一覽

受檢者一 葷食	受檢者一 素食
1,3-Diaminopropane	2-Hydroxyphenethylamine - Isomer
2-Phenylglycine	Urocanic acid
m-Aminobenzoic acid	m-Aminobenzoic acid
p-Aminobenzoic acid	p-Aminobenzoic acid

受檢者二 葷食	受檢者二 素食
1,3-Diaminopropane	1_3-Diaminopropane
Canavanine	2-Aminoisobutyric acid
Canavanine - Isomer	2-Hydroxyphenethylamine - Isomer
	3-Aminoisobutanoic acid
	D-Alpha-aminobutyric acid
	L-Alpha-aminobutyric acid
	p-Aminobenzoic acid
	Urocanic acid

陸、討論

一、同樣個體中葷食與素食的差異

在食用一個禮拜的葷食菜單後，受檢者一中的代謝體數量幾乎呈現線性的增加，而受檢者二的代謝體數量也是同樣呈現上升的趨勢，故符合一開始的推測：因為肉類含有較多的蛋白質，故有較多的胺基酸可以被標定出來。另一方面，受檢者一食用了一週素食菜單後，代謝體數量顯著降低，而若去除受檢者二第三天鹽析的數據，其代謝物數量整體也為下降的趨勢。以上皆可顯示人體的確會因為飲食的差異，而造成代謝體數量的變化。

另外，受檢者一中的葷食檢體總數較素食檢體多，但葷食與素食各自所含有的代謝體種類比例為1:1；同樣的情況，受檢者二的素食檢體中代謝體總數較少，但用種類來分，素食的代謝體種類反而是葷食的1.25倍，以上皆可推測出代謝體的種類不與數量呈正相關，代謝物數量較多的檢體並不代表有較多樣的代謝物種類產生。

二、不同個體食用相同食譜的差異比較

在食用了相同的菜單之後，兩個檢體的數據所佔比例卻相差甚大，表示個體間本身就含有極大的差異，或許菜單本身對人體的代謝物有影響，但是由於影響過小或是個體差異的影響過大，導致兩者的數據有落差。另外，無論是將兩受檢者分開討論或是合併解釋，所得的代謝體種類中都還是「葷素皆包含」的區段中最多，可知儘管個體差異及飲食習慣會對人體的代謝物造成影響，人體還是會固定代謝某些代謝物。

三、特殊代謝物及其相關代謝途徑

經分析，葷食會對” beta-Alanine metabolism” 代謝途徑造成影響，此代謝途徑與肌肉纖維的緩衝能力有關聯。素食則會對” Histidine metabolism” 和” Pyrimidine metabolism” 兩種代謝途徑造成影響，而” Histidine metabolism” 的相關性與影響程度皆較大。且同時經搜尋後發現，生物體內無法自然合成Histidine。

另外，受檢者二葷食檢體中獨有的“Canavanine” 代謝物可對人引起「紅斑性狼瘡」，且受檢者二的家族成員中居然有該疾病患者，未來若運用上述研究方法，對各種食物進行分析及研究，便能藉此分析出其所影響的代謝途徑，並進一步探討其對人體所造成的影響，分析出各種食物間對人體的利與弊。

柒、參考資料

- Yen-Feng Chiu, Chih-Cheng Hsu, Tina H. T. Chiu, Chun-Yi Lee, Ting-Ting Liu, Chwen Keng Tsao, Su-Chun Chuang and Chao A. Hsiung (2015). Cross-sectional and longitudinal comparisons of metabolic profiles between vegetarian and non-vegetarian subjects: a matched cohort study. British Journal of Nutrition, Volume 114, Issue 8, pp. 1313-1320
- Kevin Guo, Liang Li (2009). Differential 12C-/13C-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome. Analytical chemistry, 81 (10), pp 3919-3932
- Shuang Zhao, Xian Luo, and Liang Li (2016). Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. Analytical chemistry, 88 (21), pp 10617-10623