

出國報告（出國類別：研究）

農、漁、畜產品中有機污染物檢測及安全評估技術之交流及研習

服務機關： 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

姓名職稱： 張耿瑞 助理研究員

李悅怡 助理研究員

派赴國家： 日本

出國期間： 102.8.12-102.9.1

報告日期： 102.10.22

摘要

為強化環境及動物組織基質中有機污染物、農藥、重金屬、添加物、毒物代謝質體學及野生動物毒物中毒等分析毒理領域之檢測新技術及了解相關防治策略，於 102 年 8 月 12 日至 9 月 1 日間共 21 日，赴「日本北海道大學獸醫學院環境毒理研究室」，參與分析毒理等國際課程，研習動物臟器組織、水產物及非洲底泥中持久性有機污染物、重金屬和動物中 Cyto-P450 酵素活性試驗等分析技術與檢驗流程。本次研習由北海道大學獸醫環境科學講座及副研究科長石塚真由美教授和其實驗室研究人員，親自帶領指導，本所計畫研究人員並實地觀摩及操作相關分析試驗程序，應用精密儀器等設備進行相關分析，並透過國際課程的修讀，得以充分瞭解其應用學理並與實務結合，此行收穫豐碩，有助於本所分析毒理領域之提升與加強。

目 次

摘要	第 2 頁
目次	第 3 頁
第一章、目的	第 4 頁
第二章、過程	第 5 頁
第三章、交流及研習內容	第 7 頁
第四章、心得	第 20 頁
第五章、建議	第 24 頁
第六章、參考文獻	第 25 頁
附件一、動物組織中有機氯農藥殘留分析檢驗方法	
附件二、動物組織中助孕素及雄性素分析檢驗方法	
附件三、汞分析-大鼠血液/組織採樣方法	

第一章、目的

人為合成的有機化合物已廣泛分佈於自然環境中，這些污染物會破壞生態平衡與對物種多樣性造成危害，並且可能對人類健康產生威脅。這些較難被生物所分解或本身物化性質十分穩定、不易降解的有機化學污染物，會從環境中透過食物鏈，累積在生物體內，而國內雖早已禁用持久性有機氯農藥，但有機化學污染物是否仍蓄積在國內農業生產及飼養環境上，造成國內作物及畜禽水產品污染，以及相關背景資料皆相當有限。本所雖已建立部份基質中持久性有機污染物分析方法，如水產物中有機氯農藥包含可氯丹、地特靈、滴滴涕、毒殺芬、安特靈、飛佈達、阿特靈、六氯苯、滅蟻樂、十氯酮、靈丹、五氯苯、安殺番，以及水產物和其育成用飼料的戴奧辛、多氯聯苯及多溴聯苯醚含量，然而有機污染物眾多且國內作物種類繁多，畜禽水產品分析基質多樣，皆大大增加分析及開發方法的時間，為了解其它動物基質如鳥類中持久性有機氯污染物殘留檢測、重金屬含量分析及毒物代謝酵素分析等技術，建構本土性背景調查資料，並確保檢測準確性，有必要強化實驗室人員之操作實務，唯透過鄰近國家的技術交流及研習，除能有效提升分析及縮短方法開發時間，因應國內相關重大事件的發生，並可培育一國際性的研究團隊，支援並協助鄰近國家相關事件的處理及檢測，爰研提本計畫，前往日本北海道大學獸醫學院環境安全實驗室，交流及研習相關分析毒理實驗，並參與國際學程相關課程的研修，將習得的分析方法及學理，傳承給實驗室相關人員以利奠定相關基礎及應用技術。

第二章、過程

日期	交流及研習地點	交流及研習內容
8 月 12 日	台灣桃園→日本札幌	1. 去程 2. open meeting (16:00-17:30)
8 月 13 日	北海道大學獸醫學院	Core Curriculum for chemical hazard control 2013 1. Environmental chemical analysis (上午；Dr. Ikennaka, Dr.Nakayama, Dr. Mizukawa, Hokkaido Univ) 2. Clinical toxicology (下午；Prof. Takiuchi, Hokkaido Univ) 3. 參訪獸醫教學醫院
8 月 14 日	北海道大學獸醫學院	Core Curriculum for chemical hazard control 2013 1. Environmental chemical analysis (Dr. Ikennaka, Dr.Nakayama, Dr. Mizukawa, Hokkaido Univ)
8 月 15 日	北海道大學獸醫學院	Core Curriculum for chemical hazard control 2013 1. Environmental chemical analysis (Dr. Ikennaka, Dr.Nakayama, Dr. Mizukawa, Hokkaido Univ)
8 月 16 日	北海道大學獸醫學院	Core Curriculum for chemical hazard control 2013 1. Environmental chemical analysis (上午；Dr. Ikennaka, Dr.Nakayama, Dr. Mizukawa, Hokkaido Univ) 2. In silico analysis: Docking simulation (下午；Prof. Tada, Tokyo Univ)
8 月 19 日	北海道大學獸醫學院	Core Curriculum for chemical hazard control 2013 1. 實驗數據分析(上午；Dr. Ikennaka, Dr.Nakayama, Dr. Mizukawa, Hokkaido Univ)： 1.1 大鼠肝、腎、肺等臟器中汞含量 1.2 鮭魚、鮭魚、野鳥肝臟等有機氯農藥殘留分析 2. Immune toxicology (下午；Dr, Nakamura, Dr. Yoshida)
8 月 20 日 ~ 8 月 22 日	北海道大學獸醫毒性學研究室	大鼠及野鳥肝臟中 Cyto-P450 酵素活性試驗(DVM, Aksorn)
8 月 23 日	北海道大學獸醫毒性學研究室	1. 分析鮭魚、鮭魚、雞肉及豬肉中重金屬含量之前處理及儀器分析(上午)

日期	交流及研習地點	交流及研習內容
		2. Cyto-P450 酵素活性試驗數據結果分析及討論(下午)
8月26日	北海道大學獸醫毒性學研究室	1. 分析底泥(Suwa, Nile Delta)中重金屬含量之前處理及儀器分析(上午) 1. Real-time PCR for PHEN1-7: RNA 萃取(下午)
8月27日	北海道大學獸醫毒性學研究室	1. Real-time PCR for PHEN1-7: RNA 轉置 cDNA 2. 鮭魚、鮭魚、雞肉、豬肉及底泥中重金屬分析數據討論(下午)
8月28日	北海道大學獸醫毒性學研究室	Real-time PCR for PHEN1-7:增幅及數據結果討論
8月29日	北海道大學獸醫毒性學研究室	Genotype frequency of the ALDH2 polymorphism 試驗
8月30日	北海道大學獸醫毒性學研究室	1. Genotype frequency of the ALDH2 polymorphism 試驗及結果討論(上午) 2. close meeting

第三章、交流及研習內容

一、「Fostering global leaders in veterinary science toward contributing to “one health”」課程：

(一)課程內容及授課師資：

課程內容		師資
1.	LC(GC)/MS-MS 之簡介及分析毒理 相關實驗操作：The basics of LC/MS/MS (如附件；實驗操作流程如附件)；	Yoshinori Ikenaka (池中良德), PhD Graduate School of Veterinary Medicine Environmental Veterinary Science Laboratory of Toxicology
2.	重金屬污染簡介及相關實驗操作； Metal Pollution (如附件；實驗操作流 程如附件)	Shouta Nakayama (中山翔太), DVM, PhD Graduate School of Veterinary Medicine Environmental Veterinary Science Laboratory of Toxicology
3.	臨床毒理學；Clinical Toxicology (如 附件)	Mitsuyoushi Takiguchi, DVM, PhD (獸醫教學醫院院長); The chief of teaching animal hospital of Graduate School of Veterinary Medicine Laboratory School of Veterinary Medicine
4.	軟體模擬：IN Silico analysis: Docking simulation (如附件)	Yukio Tada, PhD; The University of Tokyo Open Innovation Center for Drug Discovery
5.	免疫毒理學：Immunotoxicology relating to the environmental health	Takahiko Yoshida, MD, PhD Asahikawa Medical University Department of Health Science
6.	免疫毒理學： Immunotoxicology-Functional Anatomy	Kazuichi Nakamura, DVM, PhD (The author of Immunotoxicology Strategies for Pharmaceutical Safety Assessment, Wiley, Shionogi & Co., Ltd).

(二)課程說明：

本課程先簡介環境化學物質之種類，包含農藥、重金屬等，並介紹定性及定量的試驗方法，同時對 LC/MS/MS 及 GC/MS(該系所並無 GC/MS/MS)等儀器做原理及差異等說明，並以相關試驗來加強參與者的基礎印象。

1. LC/MS/MS 之簡介：該系所具備之 Mass Spectrometer 試驗儀器包括有 Shimadzu LCMS-8030 及 Thermo DSQ II。授課教師於課堂中說明液相層析質譜儀的特性，液相層析質譜儀適用於分析熱不穩定 (thermal unstable)、極性 (polarity)、非揮發性 (non-volatile) 及生物大分子 (biomacromolecular) 等化合物，具備高靈敏度 (high sensitivity)、高選擇性 (high selectivity)、高質量解析度 (high mass resolution) 及低樣品用量 (low sample consumption) 等優點。而質量分析器則是依離子或帶電荷碎片的質荷比不同來做分離，更可以選擇只讓特定質荷比的離子通過，無法通過的離子或碎片會因撞擊分析器的內壁而去除。最後課程總結 LC/MS/MS 之應用面非常廣泛，甚至已有報告指出其可使用於定量如毒物代謝酵素 CYP 等不同酵素之蛋白質體量。

本所目前使用的 LC/MS/MS 分析儀器，為因應不同分析基質及藥劑，因此相較交流的實驗室儀器數量多且廠牌多元，如目前殘管組 LC/MS/MS 儀器有 Waters Xevo/Premier LC/MS/MS、AB 4000 QTRAP LC/MS/MS 及 Agilent 6410B LC/MS 等用於委託檢驗，及作物及水產物基質中農藥殘留分析，而 AB 4000 QTRAP LC/MS/MS 也同時用於水產物中殘留動物用藥檢驗分析。



講者講課情形

2. GC/MS 之簡介：GC/MS 與 LC 或 LC/MS 儀器不同處及分析原理主要差異如下

(1)GC/MS 之動相通常為氮氣或氫氣，但 LC/MS 之為動相則通常為甲醇或水。

(2)由於要使待測物質先轉化為氣態，分析物先在注射部經過加熱氣化後，再由載流

氣體（動相）攜帶分析物通過層析管柱（靜相），因分析物在動相及靜相的分布不同，且依其蒸氣壓之不同及對靜相之選擇性不同而得以分離。因此在進行分析前需先了解待測物之特性，方可選擇適用儀器，如蛋白質或 DNA 便無法以 GC 分析。

(3)氣相質譜儀的離子源是電子撞擊電離源(electron impact)，它藉由離子化室燈絲加熱產生游離電子，並經加速後撞擊氣化之樣品分子，一般有機物之游離能約 7~15 eV，當電子能量超過此值即可使分子開始離子化，形成分子離子(molecular ion)或母離子(parent ion)，增加電子的能量即增加母離子產量，但能量過大反而會造成化學鍵斷裂形成分子碎片。



講者授課情形

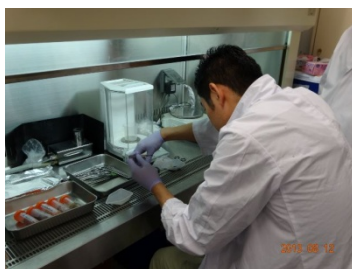
3. 臟器、組織中有機氯農藥残留實驗操作流程及相關補充：因部份有機氯農藥已列入斯德哥爾摩公約中歸類為持久性有機污染物，如：安特靈、地特靈等，因此交流的實驗室，提供參與課程學員實做檢測鮭魚、鮭魚、野鳥肝臟等樣本基質中有機氯農藥残留實驗，讓參與上課學員加強分析實驗。分析過程先將組織秤重後加入適量的無水硫酸鈉，混合均勻後再加入 TMX 100 μ l (200 ppb)作為內標，再置於索式萃取的濾筒內後，再加入丙酮與己烷混合溶液(1:3/V:V) 160 ml，同時再加入樣品置於索式萃取儀內進行萃取。將索式萃取儀萃取出之液體以無水硫酸鈉及正己烷於玻璃棉花及漏斗去除水分及親水物質，以減壓濃縮機將其濃縮至約 3ml，再加入正己烷至 10 ml，取 2 ml 以吹氮濃縮裝置、氮氣產生器(乾燥濃縮後，可計算組織之脂質重量。另外 8 ml 萃取液以矽酸鎂吸附管柱(florisil column chromatography)進行淨化，利用二氯甲烷及己烷 100 ml (3:7/V:V)以每秒 1 滴之流速將檢體中低極性物質沖提出。將沖提出之物質再次以減壓濃縮機處理後，加入癸烷後以吹氮濃縮裝置、氮氣產生器乾燥濃縮，最後取少量置於樣品瓶後即可 GC/ECD 上機分析。

本所開發之方法目前以乙腈為萃取溶劑配合 SPE 管柱做為前處理步驟，兩者方法檢測藥劑皆可包含列為斯德哥爾摩公約中之持久性有機氯農藥，檢測極限皆可低於 0.1ppm 以下，但本所開發方法，前處理時間約為 4 小時多，相較該實驗室前處理需

6 小時以上，節省許多前處理時間。



SOXTERM (OCP)



組織秤重情形



Florisil column chromatography 操作情形

4. 重金屬污染簡介，汞元素及賀爾蒙分析相關實驗操作：本課程先簡介人類因重金屬污染之歷史，並提及在日本曾發生之水俣病(Minamata disease)及痛痛病 (Itai-itai disease)，之後並簡介南美因礦產而造成人類重金屬暴露。該實驗室以贊巴威之礦場作為研究材料，以附近之土壤及牛隻肝臟，分析重金屬鉛及鎘之含量，最後歸結出鉛及鎘之污染確實來自於礦場。

授課教師也一併介紹分析重金屬之儀器種類，包括原子吸收光譜儀、火焰式原子吸收光譜儀、感應耦合電漿原子發射光譜儀等。



講者授課情形

5. 臟器中汞、賀爾蒙分析實驗操作流程及相關補充：近期重金屬污染與內分泌干擾作用具關聯性已被許多研究證實，交流實驗室除分析重金屬污染外，並探討重金屬對於內分泌干擾作用，以求得重金屬污染對環境及生物體之全盤影響分析。流程主要為將不同含量之汞以肌肉注射予 Wistar 大鼠，之後將大鼠秤重後以 CO₂ 及 sevoflurane 麻醉，自後腔靜脈採血，並採檢及秤重肺、肝、腎、脾、睪丸、腦；汞含量測量則使用儀器：mercury analyzer (NIC-MA-3000)，各臟器稱取小於 0.05 g 之檢體重量，標號後置於分析儀器內分析汞含量；由於此儀器是利用汞加熱至 600 °C

後，以汞蒸氣型態檢測其含量，每個檢體檢測時間約 6-8 分鐘，該實驗室汞分析原理及流程，與本所方法相似，唯本所尚未應用於水產物外的動物基質。

針對荷爾蒙含量之分析，本所並未建立實驗方法，然而對於內分泌干擾作用研究而言，以物質分析方法如 HPLC、LC/MS 等儀器相較免疫分析方法來的準確及迅速，因此自交流實驗室學習荷爾蒙含量之分析，對本所發展之內分泌毒理學研究有莫大助益。

本次交流習得分析荷爾蒙流程如下：臟器中助孕素(17-OH Progesterone)及雄性素(testosterone)檢測，先稱取性腺等臟器 0.5g 後加入 PBS 均質，加入乙醚以離心萃取，上清液再以吹氮濃縮裝置乾燥後，加入丙酮與己烷混合溶液 (1:1)，再以低溫離心機離心後，上清液移入樣品瓶再以 LC/MS/MS 8030 分析。所得數值可作為各組之比較分析依據 (依據該實驗室之前之實驗結果，助孕素及雄性素應隨汞量之增加而減少)。



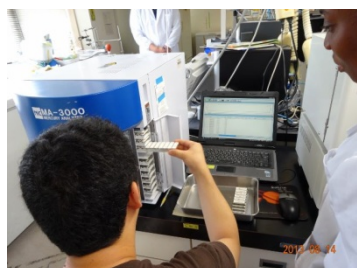
不同含量之汞以肌肉注射予 Wistar 大鼠



mercury analyzer (NIC-MA-3000)



檢體編號輸入



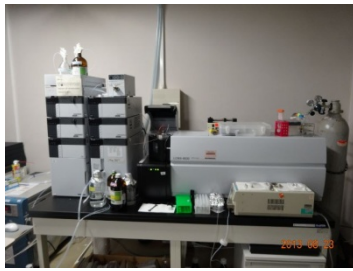
將檢體置入儀器



檢體均質化以萃取 17-OH Progesterone 及 testosterone



萃取程序操作



ESI/MS/MS (Schimadzu LC/MS 8030)



ESI/MS/MS (Schimadzu LC/MS 8030)



ESI/MS/MS (Schimadzu LC/MS 8030)之真空裝置

6. 臨床毒理學：本課程簡介該校獸醫教學醫院近期臨床上所遇到的病例，如有機磷中毒病例，並參觀該校教學醫院，包含內外科及臨床檢驗科等。



參觀獸醫教學醫院情形



國際學員及講者

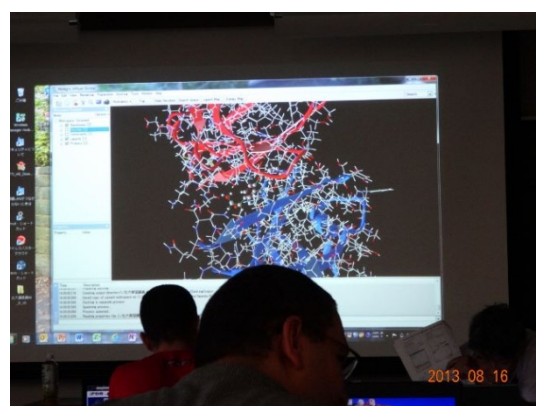
7. 分子模擬軟體 (silico analysis): Docking simulation 軟體模擬：本課程使用之模擬軟體為 Molegro Virtual Docker (CLC bio, Northern Science Consulting Inc.網址：http://www.northernsc.co.jp/MV_ref.php)；課程先簡介模擬軟體之原理，原理為利用分子及分子間之能量改變 (如 Gibbs energy change, ΔG 、enthalpy change, ΔH 、Entropy changes, ΔS 、hydrophobic effects、isothermal titration calorimetry, ITC、surface Plasmon resonance, SPR)，預測小分子與蛋白質間之相互作用。主要用途包括：預測及分析蛋白質與配體 (ligand)之交互作用、分析分子與受體之活性、確定分子之相似性、以結構建構迴歸及分類模式、農藥作用機制預測；其中在蛋白質與配體之交互作用所扮演的角色可預測可能的結合位置、蛋白質結合部位之彈性、結合預測視覺化、於預測前修復或改變支鏈等等。課程並簡要介紹其他模擬軟體，如 molecular dynamics (MD): AMBER、Thermodynamic integration (TI): Amber/Gibbs、MM-PBSA method: molecular mechanics poisson Boltzmann Surface Area、QSAR、MP-CAFE: massively parallel computation of absolute binding FrEe energy、FMO:

Fragment molecular orbital、PIEDA: pair interaction energy decomposition analysis 等。課程的最後並讓學員以甲狀腺素及受體進行實際操作模擬，並求得 ΔG 值以了解分子與蛋白質間之關係。

本所備有具類似功能之軟體 (DS; Discovery Studio Visualizer); 然而所內之應用目的為建立新藥物與受體鍵結能力模擬，以開發新藥物，並無北海道大學獸醫學院分析毒理實驗室使用 Molegro Virtual Docker 軟體功能多元，所內未來若經費需求可配合並有意朝此領域發展，建議可另購買課程所介紹之 Molegro Virtual Docker，以比較參考使用，並可應用於農藥與內分泌干擾作用之研究 (如農藥及受體之結合篩選，模擬後再行實際實驗以減少篩選時間及增加篩選效率)。



講者講課情形



模擬軟體操作情形

8. 免疫毒理學：環境健康及個體健康與相關與免疫學關係之研究開始於 1970 蓬勃發展，本所對農藥對免疫之影響研究主要聚焦於過敏反應，並建立符合 GLP 之試驗方法，此課程之講課教授群於臨床免疫學有豐富經驗，所介紹之研究雖未列於國際規範中，但可作為本所對於免疫學研究之參考。本課程先介紹由於近代思想及環境的改變，毒理學已從高劑量急性致死研究漸漸的延伸至中低劑量長期反應研究，包括早期偵測或是預防等觀念等等，之後介紹免疫系統/反應之定義及相關疾病；而免疫毒理學則是免疫器官或免疫細胞的組織學或形態學改變，免疫組織與內分泌系統及神經系統息息相關，免疫反應中液態免疫 (humoral immunity) 及細胞免疫更是需維持在平衡之狀態。由於免疫學上 *in vitro* 方法常可表現 *in vivo* 之情形，故甚至可用於評估長期暴露少量有害物質之影響。In vitro 的方法中以 Jerne Nordin PFC (plaque forming cell) assay 最為常被應用，其原理將標誌之綿羊紅血球細胞給予小鼠，之後再取小鼠之胸線或脾臟細胞與綿羊紅血球同時至於 plate 上，最後計算形成 plaque 之多寡。另外還有 LLNA，將藥劑給予小鼠後再以細胞計數儀計算有經 ^3H -Thymidine

標定之細胞。最後則是 **allergy-oriented methods**，其偵測延遲及即時過敏反應。講者介紹其近期發表之免疫毒性試驗如：調查於半導體工廠之工人其砷含量及淋巴細胞增生程度，並以小鼠做為機制探討模式、**Formaldehyde** 的免疫毒性探討，試驗使用小鼠做為呼吸暴露試驗系統，觀察其免疫反應；並另使用魚隻作為免疫毒性之機制探討模式、針對日本部份都市之 3 歲小孩，進行免疫學之調查。



講者講課情形

另針對免疫功能與解剖之相關性，課程主要介紹包括淋巴器官之型態與功能、淋巴細胞受體之藥理作用及繁殖及發育之免疫毒理學，先介紹淋巴器官之型態與功能：胸腺及脾臟形態與功能，並介紹免疫細胞型態及形成免疫之概要，之後敘述淋巴細胞受體之藥理作用，針對淋巴細胞受體之藥理作用主要針對 **Toll-like receptors**，在人類可將辨認不同物質之 **Toll-like receptors** 約分為 10 種，而利用此機制之藥物主要分為 3 種：針對 **TLRs7,8,9** 之藥物、針對 **TLR-3** 之藥物 (**ds siRNA**)、針對細胞膜 **TLRs2,4,5** 之藥物。講者特別舉 **prostaglandin E2** 及 **cannabinoids** (皆為免疫調節之藥物)作為機制講解範例。

而本所亦針對農藥對繁殖及發育有大量研究，該課程教授並介紹其未來擬列於國際規範之免疫學試驗，尤其是繁殖及發育之免疫毒理學。由於懷孕時母體與胚胎間不會形成免疫容忍，機制包括 **T cell**、**uNK cell**、**trophoblast** 之 **CD95L**、**leukemia inhibitory factor**、**Th1/Th2** 等等之調控機制。在懷孕後期大鼠之周邊免疫器官方開始發育，脾臟及淋巴結則於出生後發育，淋巴細胞則於出生後 7 天出現，第 28 天達成鼠之數目，由於發育之時間點與人類稍有不同，故在投藥觀察時須注意，通常免疫發育之試驗多在懷孕第 7 日及第 17 日間給藥，人類與大鼠的免疫發育不同點包括：**compartment** 之形成人類於懷孕第 125 日，大鼠則為第 14 日；人類 **Ig-M** 製造

細胞於懷孕第 100 天形成，大鼠則為出生後 7 天方形成。最新針對發育免疫毒性之試驗期程由 Halsapple 等於 2005 年提出。

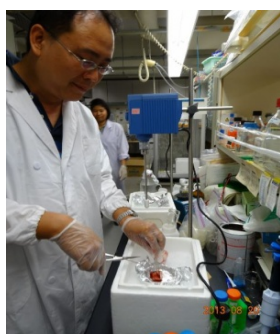


講者講課情形

二、哺乳類農藥代謝

(一)Cyto-P450酵素活性

外源性化學物質如農藥等於哺乳類個體代謝最重要之酵素為 P450 酵素，然而該酵素與農藥間之關係並非僅代謝關係，許多農藥亦可透過不同之機制造成該酵素之增減，進而影響個體健康，甚或影響內分泌及繁殖與發育，本所針對繁殖相關的酵素如 aromatase 具多年研究經驗，研究方法多為免疫分析，藉由此次交流，習得研究 P450 酵素的非免疫分析相關技術，未來可應用於農藥對健康影響之研究，該實驗室主要研究 P450 的方式為活性測試，先萃取蛋白質檢測其濃度，之後再檢測其活性，microsomes (S9)萃取流程為將肝臟組織以重量 3 倍體積之 potassium phosphate buffer (0.1M, pH7.4)或 KCl (1.15%)溶液於冰上均質 5 次，均質後以 9000 x g，4°C 離心 20 分鐘，之後取上清液以 34000 rpm，4°C 離心 70 分鐘，將上清液去除後，剩下之沉澱物以 potassium phosphate buffer 或 KCl 溶液再次均質後重複，最後將上清液去除後，剩下之沉澱物再以 potassium phosphate buffer 或 KCl 溶液均質後分裝於 1.5 ml 之離心管，以液態氮快速冷凍後置於 -80°C 備用。



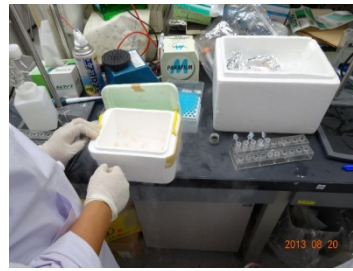
組織均質化處理



9000 x g，4°C 離心

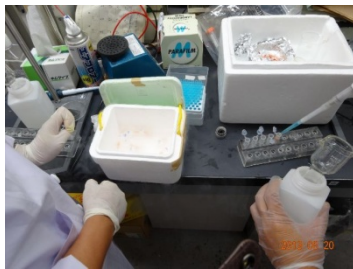


34000 rpm，4°C 離心



液態氮快速冷凍

測量蛋白質濃度以Lowry method為主，先以1 N NaOH及BSA製備標準溶液，起始濃度為400 $\mu\text{g/ml}$ ，2倍連續稀釋4次，最後每濃度取500 μl ，取製備好之S9以100倍及10倍連續稀釋，並重複3次，並取最後稀釋濃度500 μl ，將溶液A (2% Na_2CO_3 : 0.5% CuSO_4 ，50 : 1，V/V) 500 μl 加入所有欲測檢體 (須注意由低濃度加至高濃度，且須控制使加入時間間隔一致，以便之後受測時間一致)，10分鐘後加入溶液B (Folin : DDW，1 : 1，V/V) 5 ml，30-60分鐘後以spectrometer (750 nm)偵測吸光值並換算濃度。



實驗操作情形



反應後檢體呈色之情形

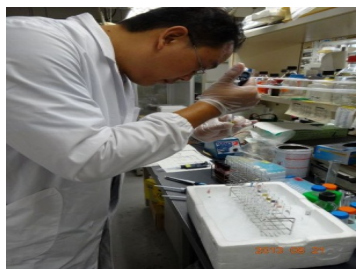


spectrometer

酵素 UGT 以 HPLC-FD 偵測，試驗原理為物質經 CYP 及 UGT (UDP-glucuronosyltransferase)轉化後，再由 HPLC 偵測其產物量：先將 microsome 以磷酸鉀緩衝液稀釋為 4 mg/ml，加入 1%膽酸 (cholic acid)及酸鉀緩衝液，冰上作用 30 分鐘使 UGT 萃出 (每檢體總量為 50 μl : microsome 12.5 μl 、cholic acid 2.5 μl 、buffer 35 μl)；phase I 作用：加入 MgCl_2 (100 mM)及 potassium phosphate buffer 後，將檢體分裝再加入不同濃度 (0.5 mM、1 mM、2.5mM、3.75 mM、5.0 mM)的 OH-pyrene。(每濃度 OH-pyrene 其檢體總量為 97.5 μl : microsome+膽酸 50 μl 、 MgCl_2 5 μl 、OH-pyrene 1 μl 、buffer 41.5 μl)，於 37°C 水浴槽將檢體預熱 (需精確依照之後作用反應時間)；phase II 作用：每 sample 加入 2.5 μl 之 UDPGA (100 mM)，作用 10 分鐘，每管加入 400 μl 之 methanol 以停止作用，2000rpm 離心 10 分鐘，取上清液至少 10 μl ，以 HPLC-FD 偵測最後檢測結果以 PRISM 軟體分析。

本所目前尚未建立 Cyto-P450 酵素分析方法，藉由研習此偵測方法，未來如有需要可

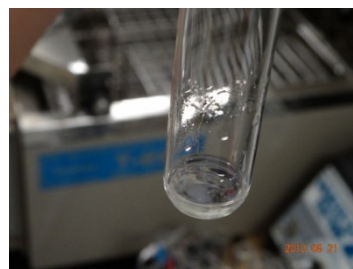
依此技術進行相關分析研究，並可作為農藥影響健康之研究。



Phase I 作用之實驗操作



Phase II 作用之實驗操作



離心後上清液及沉澱蛋白質之情形

(二)以即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)偵測農藥代謝酵素之消長

代謝酵素之消長除了以活性之增減來偵測外，隨著即時聚合酶連鎖反應的發明使得偵測方式又有了新發展，本所雖備有即時聚合酶連鎖反應相關設備，但未以此方法偵測代謝酵素，藉由此次交流機會，可做為未來農藥對生物體影響的研究利器，並可作為內分泌干擾作用中代謝酵素 mRNA 表現之偵測方式。操作流程包括 RNA 萃取、cDNA 轉置、real time PCR 偵測。在 RNA 萃取流程方面，先將培養細胞之上清液去除後，加入適量之 Tryzol，並分裝置於 ependorff，再將細胞置於 tissuelyser 處理約 30 秒 (可加入 beads，使細胞破碎效果更好)，加入適量 chloroform 震盪 30 秒，置於室溫 2 分鐘後以 12000 x g 室溫離心 20 分鐘，收集透明層至另一 ependorff 後，加入 isopropanol (與 chloroform 之加入體積比率約為 4:5)，震盪後再以 12000 x g 室溫離心 20 分鐘，去除上清液後加入 70%之 ethanol 1 ml，震盪後 12000 x g 室溫離心 20 分鐘，去除上清液後加入二次蒸餾水使 RNA 溶於水中 (如不易溶解可以 54°C 水浴 15 分鐘，但會影響 RNA 之品質)，最後測定 RNA 之濃度及品質 (方法：可以電泳操作，應有 2 條 band，如為 1 條以下，則 RNA 已被分解；以 nanodrop machine 測量，應可得 2 peaks；可以 spectrometer 230-280 nm 光波測量，O.D.值應於 1.4-1.8 之範圍內)，本試驗以 nanodrop machine (spectrometer)測量，測量時每檢體僅需 1 μ l，每檢體間需以拭鏡紙擦拭機體裝載處。而在 Cdna 轉置方面，可選擇整 RNA (1 μ g/ μ l 或 5 μ g/ μ l；最終 cDNA 的濃度則分別稀釋 2 倍及 5 倍)或最後產品 cDNA 之濃度，但如調整 cDNA 之濃度，則在 real time PCR 上機前還需再檢測濃度，加入 oligo DT 0.5 μ l 及 RNA 及水 6.5 μ l，置於 thermocycler denaturation 70°C 10 分鐘，待冷卻至 4°C 後再置於冰上 5 分鐘；配置 RT MIX，每檢體分別需要 4 μ l、8 μ l、1 μ l 之 RT buffer、dNTP、reverse transcriptase；enzyme 最後再加入並僅能稍 vortex，最後加入 RT MIX 後進行 RT reaction，以 thermocycler 進行 42°C 50

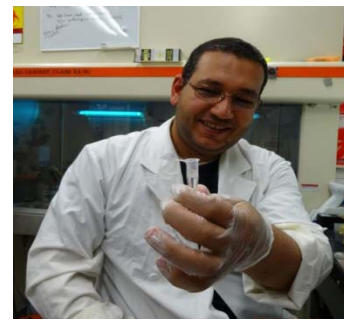
分鐘、99°C 5 分鐘、4°C 冷卻之反應模組。以 real time PCR (AB, StepOnePlus realtime PCR system)偵測時，先將 DNA 稀釋為 500 ng/μl，配製 master mix，其中包括 buffer、forward primer、reverse primer、ddw 分別為 5、0.2、0.2、2.6 μl，將 8 μl 之 master mix 及 2μl 之 DNA 置入 real time PCR 專用 ependorff 後即可上機偵測，設定 real time PCR 之反應模組包括 holding stage (denaturation，通常為 95°C 10 分鐘)、cycling stage (denaturation 及 annealing，通常分別為 95°C 15 秒鐘及 60°C 1 分鐘；可進行 35-40 cycles) 及 melting curve stage (95°C 15 秒、60°C 1 分鐘、95°C 15 秒；1 cycle)，反應完畢後進行判讀。



tissuelyser



加入適量 chloroform



加入 isopropanol 後之分層情形



nanodrop machine (spectrometer)



nanodrop machine (spectrometer)測量情形



以 nanodrop machine 測量，可得 2 peaks



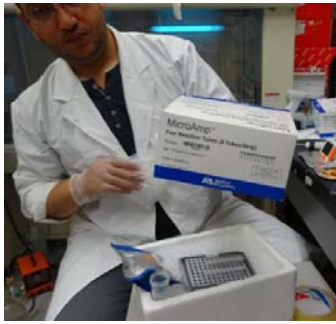
加入 RT MIX



RT reaction (thermocycler)



AB, StepOnePlus realtime PCR system



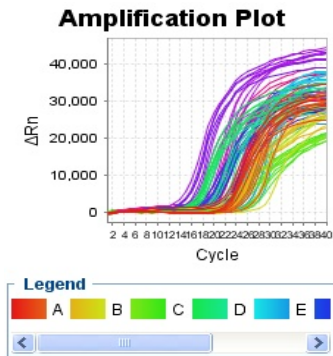
real time PCR 專用
ependorff



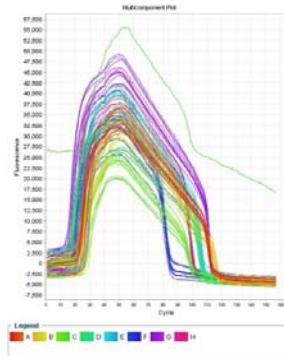
master mix buffer (為
SYBER Green 呈色系統)



檢體上機偵測情形



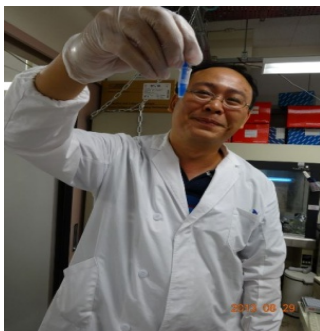
結果分析



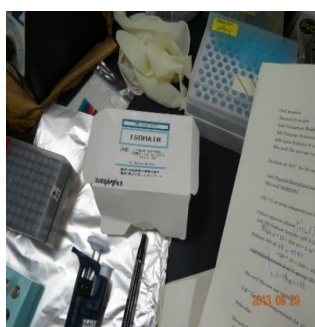
結果分析

(三)基因型與代謝檢測-SNPs (single nucleotide polymorphisms)-Genotype frequency of the ALDH2 polymorphism 檢測

由於交流實驗室除了環境毒理方面具多年研究經驗，其於結合環境毒理及人類流行病學之研究方法亦多有涉獵，該實驗室具備了偵測人類代謝酵素基因型檢測技術-SNPs，雖然此項快速偵測技術可應用於農藥與人體健康及流行病學，然而因本所不易取得人體檢體，故近期內無法應用此項技術，但如未來有機會參與流行病學之研究，則可作為研究方法之一。SNPs 檢測流程包括 genomic DNA 萃取、PCR 及電泳；其流程如下：將血液或細胞檢體以 ISOHAIR 之套組 (包括 buffer、lysis buffer、enzyme)抽取 genomic DNA，再以 PCR 偵測 ALDH2 之 mutant type 及 wild type，最後經電泳後即可判定結果型別 (台灣之 mutant 及 wild 之 genotype 約 W/W 50%、W/M 41%、M/M 9%)。



檢體取得



ISOHAIR 套組



實驗過程

第四章、心得

此次的日本交流及研習行程感謝國立北海道大學環境科學講座及兼任副研究科長-石塚真由美教授在繁忙的工作中，安排非常詳盡又豐富的一連串分析毒理主題課程以及實務的分析毒理試驗，讓我們有許多觀摩交流及相互討論的機會。除了實際參與分析毒理的試驗，和來自不同國家的學生、助理、博士後研究人員討論分析方法的差異性，也學習到由不同的觀點解決面臨的問題。

本所研究人員對於本次參與的北海道大學核心課程及參與的實驗，相關心得敘述如下：

分析毒理及環境毒理核心課程

分析毒理核心課程係為北海道大學針對國際學生，於每年7月至8月開設之一系列分析毒理領域課程，內容包含生物統計、基礎毒理學、應用毒理學、臨床毒理學、免疫毒理、流行病學、環境分析、環境評估、風險評估、放射線實務、藥理學、野生動物醫學等課程，而參與授課的師資群，皆為該領域的傑出學術或民間機構人員，因此該課程除部份學生參與外，每年也吸引北海道大學或北海道其他地區學校老師前來參與，該核心課程可說是北海道大學極為著名的學程之一，由於該系具備上述領域之頂尖科學能力，因此將此些研究能量應用於近年來漸受重視之環境毒理可謂水到渠成。

近代環境毒理科學之興起可追溯至西班牙的哲學家 Mattieu Orfila (1815)，其發表了大量相關於毒理、化學物及分析等著作，之後隨著 1850 年代有機砷的使用及 19 及 20 世紀工業的發展及進步，漸漸使人類發現工業、農業化學物質對於環境的生物有著莫大的影響，進而使人類反思化學物質對人類本身的不良影響，並形成了環境毒理科學。然而研究環境毒理科學不僅需要傳統毒理學技術，也需要其他研究技術，包括了化學、物理學及生物學等等，探討研究時不僅需要考慮毒理學及單一個體反應，亦需要考慮到對族群的影響，甚或是對多個族群的影響，因此針對指標生物 (biological indicators) 的毒理學研究及分析是環境毒理科學的重要基礎。

本所研究人員由於行程、時間安排及研究目的等因素，僅參與環境分析、臨床毒理學、免疫毒理學等課程，並未參與該實驗室針對環境毒理之指標生物採樣活動；環境分析課程之安排從分析儀器介紹、前處理、儀器操作等一連串從理論至實務面的課程，而臨床毒理學、免疫毒理雖僅於課堂中教授，但講師除以理論授課外，更搭配臨床病例介紹及討論，實為一堂豐富且充實的課程，對於未來所內若有意規劃國際研討

會或相關學術課程，可參考並借鏡此一模式，並可進一步參與指標生物相關研究，以利未來環境毒理更進一步之研究。

有機氯農藥殘留分析

持久性有機污染物對人類健康及環境生態有很大的衝擊，且已有許多證據證明多種有機氯劑農藥具有環境殘留性及致腫瘤、致畸胎性。有機氯劑農藥在自然環境中會自然衰減，但值得注意的是經由食物鏈所造成的生物濃縮效應，然而相較於國外已有許多這方面的調查研究，國內僅有部份針對環境中有機氯農藥的報告，其中 Wang 等人(2000)研究指出 1970 年代於台灣河川水中可檢出有機氯劑滴滴涕、地特靈、靈丹及阿特靈等，而 1990 年代後已極少檢出，但 1990 年代於魚貝類中仍可檢出有機氯劑滴滴涕及阿特靈。另外，周等人(2003)利用 GC-ECD 儀器檢測 98 件魚貝類樣品之有機氯劑殘留量，其中有 1 件檢出 4,4'-DDE (0.013 ppm) 和 5 件 4,4'-DDT (含量範圍 0.004~ 0.019 ppm)，而本所的歷年調查結果(2000-2013 年)雖部份市售水產物中檢出地特靈、安特靈及滴滴涕，然檢出水產樣品中極多數有機氯劑皆低於 0.1 ppm。

本次交流的各项實驗中，在動物基質中有機氯殘留分析方面，該實驗室開發之方法，經過基質添加及回收率試驗等確效試驗，已可應用於魚肉、鳥類及嚙齒類臟器等多樣化基質，對於未來應用於分析國內動物基質樣品，將可節省許多技術建立所需時間，然該技術其前處理除以丙酮與己烷做為萃取溶劑外，萃取過程涉及索式萃取儀等步驟，前處理時間需時超過 6 小時，而所內方法目前以乙腈為萃取溶劑配合 SPE 管柱做為前處理步驟，雖前處理時間可縮短至 4 小時內，然目前僅用於水產物魚體基質中有機氯殘留分析，待未來完成多種基質確效試驗後，將可評估多方面應用之可能性。

重金屬和性賀爾蒙分析

重金屬在自然界中，會經由岩石風化和陸地水土流失而產生，然而這些重金屬直接釋放到環境中的含量非常小，一般導致重金屬污染之原因，大多因為工業、農業及採礦等所產生含有未處理的重金屬廢水、廢氣及廢棄物排放到大自然環境中，而重金屬中又以砷、鎘、鉻、銅、汞、鎳、鉛、鋅等對人體危害甚重，如曾經發生於台灣西南沿岸地區的烏腳病，即為長期飲用含砷量過高之飲用水所造成，而銅污染即曾引發台灣西部沿海的養殖牡蠣之綠牡蠣事件，汞污染物質最有名的事件發生在1956年日本水俣漁村，造成相當高比率的人死亡，因而有水俣病（Minimata disease）之稱，而鎘中毒事件，最有名的事件發生在1968年日本富山鎘米中毒引起痛痛病(Itai-itai disease)。

高劑量的重金屬暴露除直接造成急性毒性，而近年來低劑量長期重金屬暴露亦有許多先進的研究顯示與內分泌干擾作用有關：

(1) 砷

除了自然存在於岩石及風化產物外，含砷農藥的使用也會造成土壤蓄積多量的砷，研究顯示，砷具致變異性，並使膀胱、肺及皮膚相關癌症風險增加；其可與醣皮質受體及動情素受體結合，並抑制下游基因表現，因此被認為具致糖尿病及影響神經及生殖系統。

(2) 鎘

除了自然存在之鎘外，農業肥料及含鎘農藥的施用亦常造成土壤中含多量的鎘，鎘可與動情素及雄性素受體結合，並干擾固醇生成作用，不僅影響性別分化，更為害造精作用，並經由內分泌干擾作用甚至使乳癌之風險增加。

(3) 汞

依據研究顯示，我國大氣的汞排放量於2010年達1.41公噸，我國人民不僅經由吸入而使汞進入體內外，吃食海洋魚類及米類亦是接觸來源；而汞不僅是神經系統及致畸胎物質，研究顯示有機及無機汞可蓄積於下視丘、腦下垂體、甲狀腺、腎上腺皮質、睪丸及卵巢，進而影響內分泌系統並影響性成熟。

(4) 鎳

其影響胰臟之胰島細胞，造成胰島素抗性，進而造成糖尿病；另外其可抑制生長荷爾蒙之分泌。

(5) 鉛

其對卵巢及腎上腺相關之固醇生成有顯著影響，不僅顯著抑制助孕素及可體松之合成，對動情素及睪固酮更有雙向的影響（低劑量刺激，高劑量抑制），不僅使動情素受體減少，更對固醇相關之P450 CYP19酵素 (aromatase)有顯著抑制效應，最終影響發育、受孕率及受精率。

(6) 鋅

鋅為動情素受體binding finger的重要分子，其與其他重金屬之混合使用可造成動情素相關之內分泌干擾作用。

本次交流實驗室其主要以分析環境及動物基質中鈾、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅、鋅、砷、鉛等重金屬為主，因北海道地區北方小島常見天堂鳥等候鳥，為了解其相關

基礎資料，所以其動物基質包含野生候鳥及部份實驗大鼠臟器，而環境基質因北海道大學與部份非洲國家如甘比亞、尚比亞、奈及利亞等國有國際合作關係，所以該實驗室常至非洲採集底泥樣本，分析其中重金屬含量。另因重金屬中砷、鎘、汞、鉛等可能對繁殖系統影響甚重，所以該實驗室在分析動物基質中重金屬含量時，也會一併分析性腺內的助孕素及睪固酮等性賀爾蒙，本所對於重金屬分析仍以作物、環境基質及部份水產物為主，而對於其重金屬可能影響的標的器官，所內目前無這方面的研究，藉由此次機會一併習得其它基質中重金屬和性賀爾蒙分析技術，有利於未來多方面的應用。而汞於水產物中毒事件，國內已有部份案例發生，其中又以甲基汞的危害較嚴重，然實驗室操作甲基汞分析過程，易造成中毒事件甚至人員死亡，國外已有相關案例報導，因此，未來若計畫允許考慮先分析水產物中的總汞量，待多數樣品超過甲基汞容許上限(迴游性魚類除外應在 0.5ppm 以下，迴游性魚類應在 2.0ppm 以下)後，再進一步分析其甲基汞含量。

農藥代謝試驗

外源化學物質如農藥或藥物進入哺乳類後，是經由第一相及第二項之生物轉化後再行吸收或排泄，其中第一相之轉化酵素最重要的就是 P450 酵素，P450 酵素如其序列之相似性則可再細分，人類的 P450 酵素可分為 18 種及 44 亞種。許多農藥是經 P450 酵素代謝及生物轉化，有些農藥經代謝轉化後對人體之毒性減低，有些則否，譬如有機磷及氨基甲酸鹽類農藥反而經代謝轉化後毒性提高。另一方面農藥亦可經抑制或刺激 P450 酵素進而影響生理及內分泌路徑。探討農藥與代謝酵素 P450 關係之技術及方法包括了酵素活性測定法、酵素蛋白質免疫染色、即時聚合酶連鎖反應檢測 P450 酵素 mRNA 之增減等等，其中即時聚合酶連鎖反應可快速並準確的偵測 P450 酵素之表現，是許多實驗室研究農藥是否抑制或刺激 P450 酵素的快速試驗方式。

本次交流之實驗室對於 P450 酵素與外源物質之關係有長年的研究經驗，不僅對於不同物種之不同種類 P450 酵素進行分析，分析結果可提供動物毒理試驗不同物種之代謝能力參考，亦可作為人類代謝之模型動物選擇參考，各種外源物質所造成的 P450 酵素的增減更可作為內分泌干擾研究及生理研究之依據；因此藉由此次交流機會，不僅習得該實驗室針對內分泌干擾研究的化學分析技術，亦習得代謝研究分析等關鍵技術，有利於本所未來相關試驗的應用。

第五章、建議

本所近年來在水產物和水產物養殖環境基質中，對於持久性有機污染物已有部份研究成果，然在其它動物基質的污染物和重金屬分析，研究方面相對較農作物少，而環顧國內農方政府機關中也並無以此專長為主的單位，因此本所未來若能透過此次研習的技術，並配合本所已建立的相關方法，導入從國內家畜禽的生產環境到家畜禽肉類完整的持久性有機污染物監測調查，並針對污染源周邊的環境基質加強追蹤及產品管控，除能維護消費者健康外，促進國內相關產業的永續經營，更適必有助於本所於國內外研究機構間的能見度。

此次短期交流主要以「分析毒理」為主要研究領域，研習透過不同檢測工具，達成分析的目的，日本等先進國家對於這項領域相當重視，尤其該領域更涉及食品安全等議題，目前世界上對此學術領域稱之為「Foodomics」，反觀台灣雖對於此領域因近年來重大民生議題逐漸重視，唯相較於日本等國，同時集具多領域人才投入此研究，甚至是常規性、例行性檢測或預防，仍稍嫌不足。為使分析毒理更廣泛應用於食品安全上，建構汙染物對健康影響測試方法，增進我國儀器設備及檢測流程，以確保國人食品安全及建構優良安全農業生產環境，持續培育相關之專業技術人才及管理人員，刻不容緩，建議爾後仍應持續進行相關之人才培育及教育訓練。

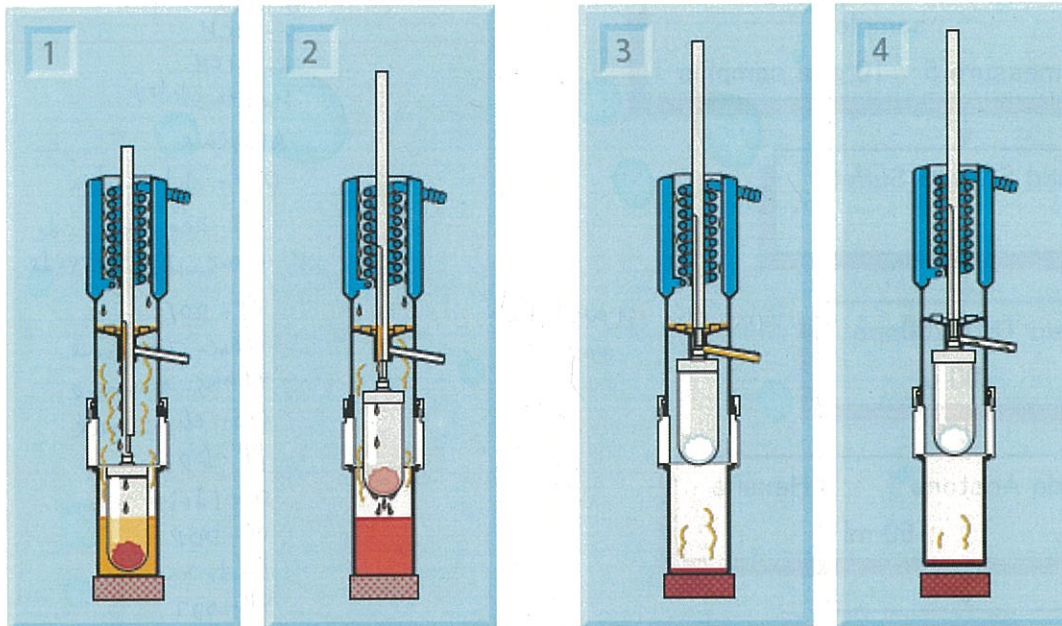
台灣因外交處境問題，對於參與跨國性政府與政府組織間的學術研究，仍有部份受限，特別是涉及當地國家污染性問題，更因種種現實考量，台灣可發揮的空間相對有限，而透過對台灣友善的先進國家學術單位協助，可較順利加入跨國性研究團隊，對於台灣學術研究將可進一步邁向國際化，並適度提供污染國必要的解決方式及援助，更有利於拓展台灣於國際間的外交空間，因此，所內研究人員與先進國家的學術交流或研習，更需繼續維持及加強。

第六章、參考文獻

1. 行政院環境保護署。2013年持久性有機汙染物管制研討會。2013，台北。
2. 周珮如、陳惠章、陳智祥、張碧秋、周薰修。台灣地區魚貝類有機氯劑殘留量調查。藥物食品檢驗局調查研究年報。2003; 21: 266-291。
3. Abass K, Turpeinen M, Rautio A, Hakkola J, Pelkonen Olavi. Metabolism of Pesticides by Human Cytochrome P450 Enzymes In Vitro – A Survey. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. 2012.
4. Abassa K, Lämsä V, Reponena P, Küblbeck J, Honkakoski P, Mattilä S, Pelkonen O, Hakkola J. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*. 2012; 294: 17-26.
5. Chumnantana R, Sakae A. Concentration of residual organochlorine pesticide in the meat of maine [sic] marine animals caught in the coastal waters off Chantaburi, eastern Thailand. *Thai Marine Fisheries Research Bulletin*. 1994; 5: 59-66.
6. Fang G, Chen W, Yao Y, Wang J, Qin J, Wang S. Multi-residue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in environmental samples using solid-phase extraction with cigarette filter followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of high resolution chromatography*. 2012; 35: 534-540.
7. Georgescu B, Georgescu C, Dărăban I S, Bouaru A, Pașcalău S. Heavy Metals Acting as Endocrine Disrupters. *Animal Science and Biotechnologies*. 2011; 44: 89-93.
8. Gerhard I, Waibel S, Daniel V, Runnebaum B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Human Reproduction Update*. 1998; 4: 301-309.
9. Kuranchie-Mensah H, Yeboah PO, Nyarko E, Golow AA. 2013. Studies on organochlorine pesticide residue in fishes from the Densu river basin, Ghana. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013; 90: 421-426.
10. Lin T, Hu L, Shi X, Li Y, Guo Z, Zhang G. Distribution and sources of organochlorine pesticides in sediments of the coastal East China Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 2012; 64: 1549-1555.

11. Liu XJ, Ni IH, Wang WX. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio reiro*. *Water Research*. 2002;36:4563–4569.
12. Okay OS, Karacik B, Henkelmann B, Schramm KW. Distribution of organochlorine pesticides in sediments and mussels from the Istanbul Strait. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2011; 176: 51-65.
13. Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, Gardea-Torresdey J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *International journal of biochemistry*. 2009; 41: 1665-1677.
14. Sun F, Wong SS, Li GC, Chen SN. A preliminary assessment of consumer's exposure to pesticide residues in fisheries products. *Chemosphere*. 2006; 62: 165-171.
15. Veses O, Mosteo R, Ormad MP, Ovelleiro JL. Potential toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in sediments from the Ebro River basin in Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012; 88: 644-650.
16. Wang CH, Liu C. Dissipation of organochlorine insecticide residues in the environment of Taiwan, 1973- 1999. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2000; 8: 149-157.
17. Wright DA, Welbourn P. *Environmental toxicology*. Cambridge University Press. 2009. 2nd edition. Chapter 4. p.97-217.

Soxlet extraction by using SOXTHERM (OCP)



1 Boiling
Rapid solubilisation in boiling solvent.

2 Rinsing
Efficient removal of remaining soluble matter.

3 Recovery
Automatic collection of distilled solvent for re-use.

4 Auto-shut down
The system closes down and the cups are lifted from the hot plate.

Fig.1 Soxtherm

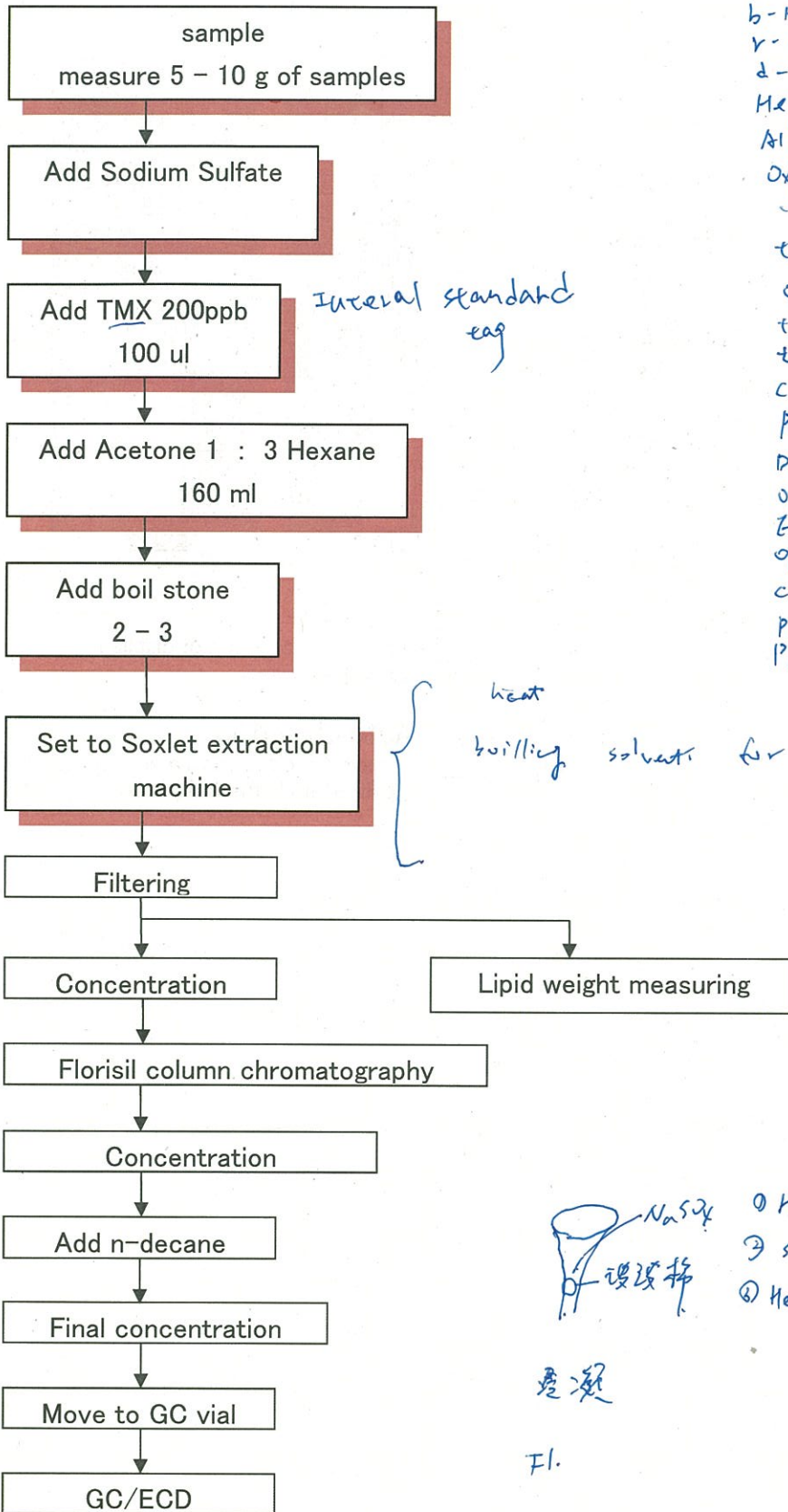
5 gram

30 min → 3hr.

Method

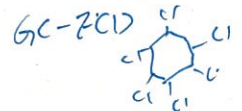
DDT → DDD
PDE
ST.
san
O → DDD
DDE

a-HCH
HCB
b-HCH
γ-HCH
δ-HCH
Heptachlor
Aldrin
oxy-chlordane
cis-Hep-epoxide
trans-Hep-epoxide
op-DDE
trans-chlordane
trans-Nonane
cis-chlordane
PP-DDE
Dieldrin
op-DDD
Endrin
op-DDT
cis-Nonach
PP-DDD
PP-DDT



Internal standard
eag

heat
boiling solvent for 60 mins



① Hexane
② sample
③ Hexane x3 times

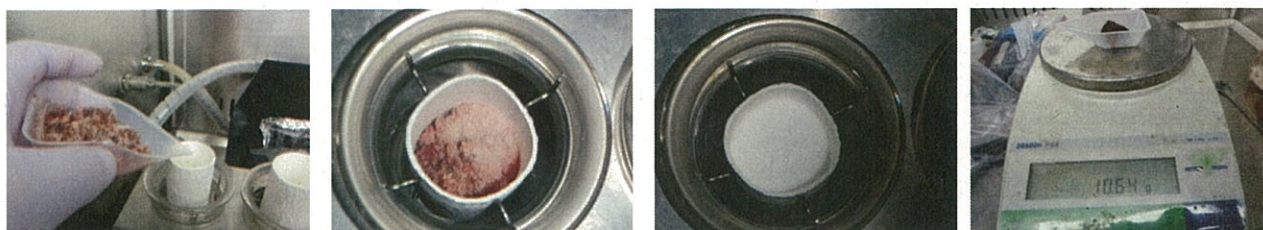
是濃

Fl.

DDT, DDE.

Step.1 Sample preparation

- Measure 5 – 10 g of the samples and cut them into small pieces.
- Add Sodium Sulfate and mix well.
- Move the samples to extraction chamber.
- Cover the sample by Sodium Sulfate.
- Add TMX as internal standard.
- Add 160 mL of Acetone 1:3 Hexane.

**Step .2 Soxlet extraction**

- Open the gas silinder
- Activate cooling water circulation apparatus
- Put 2~3 boiling stone
- Set the extraction chamber to the machine



Clean up (OCP)

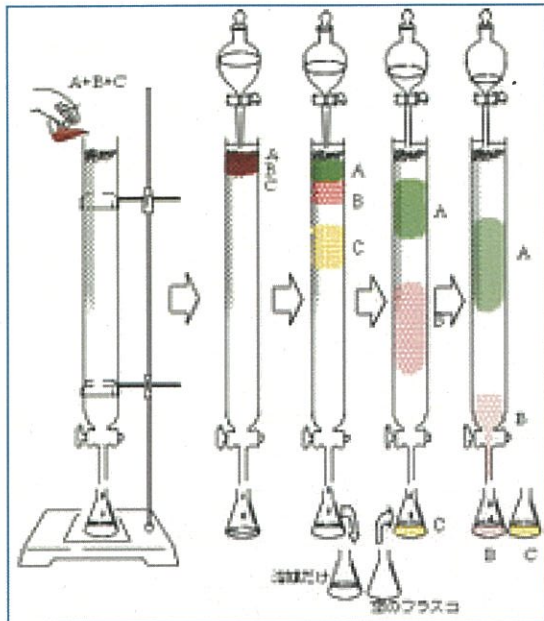


Fig.1 Image for Florisil column chromatography

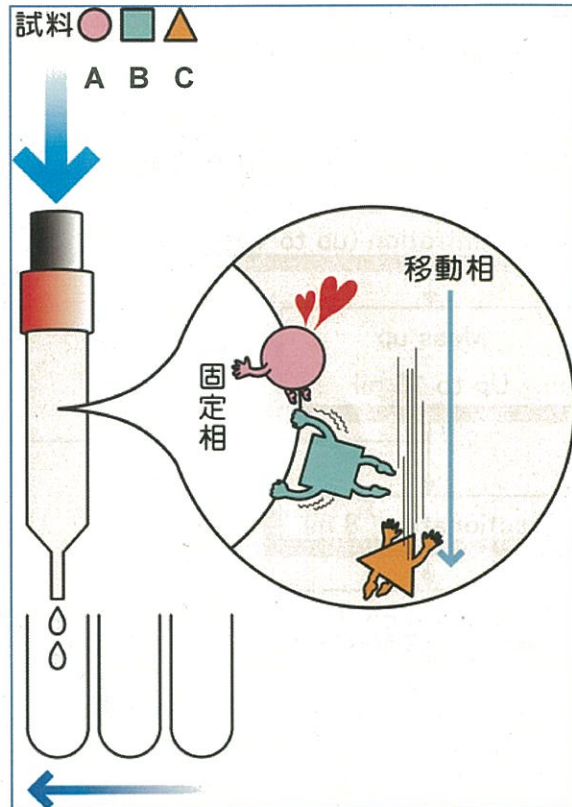


Fig.2 固定相と移動相(溶媒)

【fig.1 と 2 の解説】

A=High polarity chemicals (impurity)

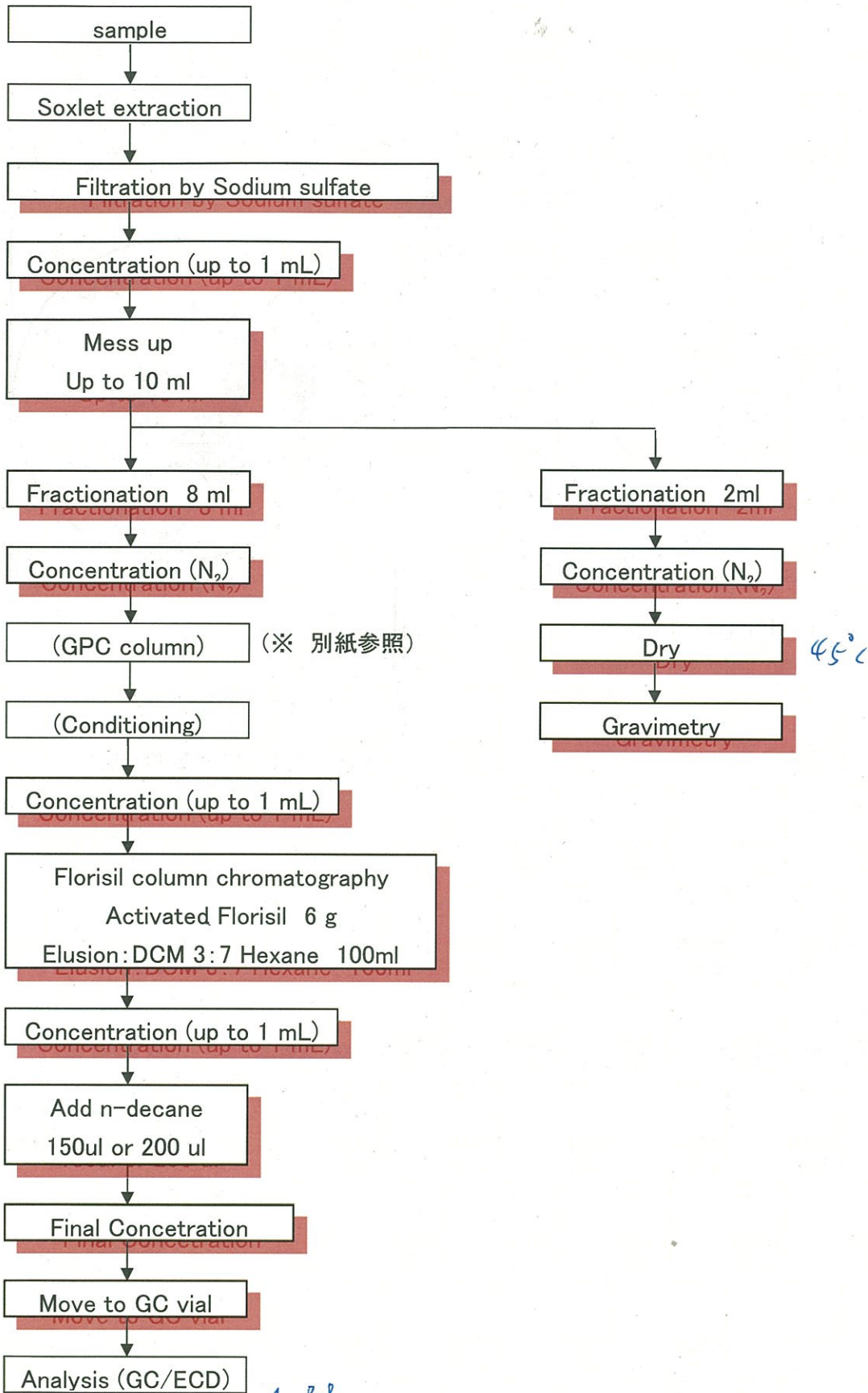
B=Middle polarity chemicals (Target 1)

C=Low polarity chemicals (Target 2)

Solid phase=Florisil (極性やや高い)

Mobile phase (liquid)=Hexane (non polarity) and Dichloromethan (low polarity)

Method

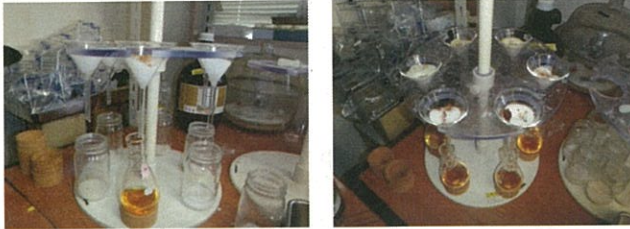


injection: 1ul

→ 1 Pops

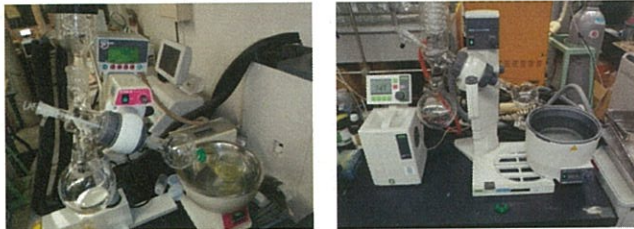
Step.1 Filtering by Sodium Sulfate

- Prepare a funnel and eggplant flask (100 ml), wash with Acetone and Hexane.
- Put the quartz wool and add the Sodium Sulfate.
- Wash with Hexane
- Apply the extract to the filter



Step.2 Concentration (by rotary evaporator)

- Water bath [ON] Set point [37°C]
- Controller [ON] Set point [No.6 Hexane 105mmHg]
- Set the eggplant flask to the rotary evaporator
- Concentrate the extract up to 1 ml.



手順.3 Mess up and fractionation

- Move the extract to the test tube.
- Wash the eggplant flask by Hexane
- Mess up to 10 mL
- Move 2 mL to other test tube (8 mL for analysis, and 2 mL for lipid conc.)



左：試験管 A 右：試験管 B

Step.5-1 Concentration (N₂) 8 mL test tube

- Set point [45]
- Concentrate up to 3 mL

Step.5-2 Concentration (N₂) 2 mL test tube

- Concentrate up to dry ness

Step.6 measure the lipid weight by gravity

- $lip.wt(g) = (after.wt - befer.wt) / \text{Fractionated volume} * \text{Mess up volume} / wet.wt$

Step.7 Open column

- Put the quart wool to the column
- Put the Sodium Sulfate to the column (around 1 cm)
- Measure 6 g of Florisil and covered by Hexane.
- Put the Florisil to the column. *twice via + Hexane*
- Cover the Florisil by Sodium Sulfate (around 1 cm)
- Wash by Hexane *x 3 times*
- Change to eggplant flask (200 mL)
- Apply the extract to the column
- Eluted by 100 ml of DCM 3:7Hexane mix.

- 1. chinese tuna
- 2. bird liver
- 3. Indian ocean tuna
- 4. shell fish
- 5. pig
- 6. salmon



acc lw %w
0.311 4.82919

Step.8 Concentration (by rotary evaporator)

- Same as Step. 2

Step.9 Final concentration (N₂)

- Add n-decane (150 to 200 ul) to the new test tube, and mark the liquid surface.
- Move the extract to the test tube
- Concentrate up to the mark.
- Move to the GC vial

ww	test tube wt	after dry	lipid wt
6.44	12.5998	12.66	0.0622 (1/2)
4.94	12.8826	12.8356	
6.74	12.3251	12.3218	
9.94	12.2182	12.316	414
5.57	12.5562	12.536	
6.94	11.7931	11.921	

附件二、動物組織中助孕素及雄性素分析檢驗方法

Analysis of Progesterone, 17-OH Progesterone, Testosterone

Extraction

- Homogenize each tissue (around 500 mg) by 3 mL of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5)
- Add 5 mL of Diethyl ether to the homogenite and extract by liquid-liquid extraction.
- Move the supernatant to test tube, and concentrate up to dry-ness under the gentle stream of N₂ gas.
- Add 200 ul of ACN : WAT (50 : 50) and move to 1.5 ml tube.
- Centrifuge at 4°C, 15,000 G for 20 min.
- Move 100 ul of supernatant to HPLC vial.

Analysis

- Analysis of Progesterone、17-OH Progesterone、Testosterone was done by HPLC/ESI-MS/MS (HPLC : Sshimadzu LC-20 series, ESI-MS/MS : LCMS-8030)

Condition of HPLC

- ◆ Mobile phase A: 0.1% formic acid water.
- ◆ Mobil phase B: MeOH
- ◆ Flow rate 0.3 ml/min
- ◆ Gradient condition: 0 min – 2 min, B conc. 50% → 2 min – 5 min B conc. を 50%~95% → 5 min – 6.5 min B conc. 95%
- ◆ Column: TSK-GEL Super ODS

Condition of ESI-MS/MS (MRM) *LCMS-8030*

- ◆ Nebulizing Gas 3 L/min, Dry Gas 15 L/min, Heat Block Temp. 400°C, DL plug Temp.250°C
- ◆ Multiple Reaction Monitoring (MRM) conditions

Qualitative

	Target Ion	Polarity	Dwell Time	Q1 PreBias (V)	CE	Q3 PreBias
Progesterone	315.1>97.1	+	100	-15	-30	-19
	315.1>109.1	+	100	-15	-25	-30
17-OH Progesterone	331.1>97.1	+	100	-16	-35	-19
	331.1>109.1	+	100	-16	-30	-19
Testosterone	289.1>97.2	+	100	-14	-25	-19
	289.1>109.2	+	100	-14	-25	-22

RT
5.9
6.0
6.9

	<i>Brain</i>	<i>liver</i>	<i>kidney</i>	<i>tissue</i>
	A1B	A1L ✓	A1K	A1T
A-1				
A-2	X	X	0	0
B-1	0	0	0	0
B-2	X	X	0	0
C-1	0	0	0	0
C-2	X	X	0	0

