

[illegible]

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫參與人員：陳培詩 博士班研究生

中 華 民 國 90 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

炒菜油煙中含雙官能基醛類之研究：

2-羥基乙醛之採樣分析與毒性研究

計畫編號：NSC89-2314-B-002-414-

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：馬一中 副教授 台灣大學環境衛生研究所

計畫參與人員：陳培詩 博士班研究生 台灣大學環境衛生研究所

摘要

流行病學研究指出，暴露於炒菜油煙可能是造成中國婦女肺癌偏高的一個重要因子。本實驗室針對環境中的醛類調查的研究中，初步分析餐廳經烹調所產生之揮發性有機物質，並於部分的樣品中發現高含量的 2-羥基乙醛。由於此一化合物反應性相當高，也已被證實會造成多種蛋白質的交互連結，如血紅素、核糖核酸酵素 A (RNase A)，因此，2-羥基乙醛很可能在肺癌與其他健康問題方面，扮演很重要的角色。

本篇研究中，期針對 2-羥基乙醛發展出一以衍生試劑為吸收液的衝擊瓶採樣、兩次衍生後以 GC/MS 分析方法。並以簡單的試管中沙門氏菌回復突變測試法來進行測試基因毒性。

Abstract

Epidemiologic investigations of lung cancer among Chinese nonsmoking women have found that exposure to the fumes from cooking process may be an important risk factor. According to earlier studies, fumes from cooking process were found to be genotoxic in several short-term tests. Glycolaldehyde (2-hydroxyacetaldehyde), an α -hydroxyaldehyde, was identified from our earlier analysis of volatile organic component from cooking process. α -Hydroxyaldehyde are highly reactive species that have been implicated in disorders ranging from ischemia-reperfusion injury to DNA damage

and aging. Glycolaldehyde is the one that has already been proved to induce protein-protein crosslinks. In the present study, we try to develop an impinger method using PFBHA [O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylaminehydro-chloride] as absorbant, and an derivatization method using BSTFA (bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide) as derivation agent. The relevance of the genotoxicity of the fumes from cooking process with glycolaldehyde will be tested using simple in vitro Ames test. The results of our study showed that glycolaldehyde is a strong mutagenic compound and may play an important role in Chinese nonsmoking women's lung cancer.

前言

由流病資料顯示(1-3)，烹調所產生的油煙之暴露，被認為是中國婦女與廚師肺癌偏高的一個重要因子。針對此一議題，過去有相當多的研究，但多集中於烹調所產生油煙中，化學致癌物多環芳香烴類(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)與異環胺類(heterocyclic amines, HCAs)的研究(4-5)。由於採樣方法與分析方法的不全面，有許多可能的致癌物質仍尚未被鑑定出。在本實驗室針對環境中的醛類調查的研究中，初步分析餐廳經烹調所產生之揮發性有機物質，並於部分的樣品中發現高含量的 2-羥基乙醛(Glycolaldehyde, HOCH₂-CHO)。由於此一化合物的主要來源為醣類還原與脂質過氧化，均為烹調過程中可能發生之反應，加上經由醣類還原

與脂質過氧化過程所形成之雙官能機醛類，如 2-羥基乙醛 (Glycolaldehyde)、Acrolein、其他 α 、 β 不飽和醛類 (α 、 β unsaturated aldehydes) 等，其反應性相當高，已知在產生 AGEs(advanced glycation end products) 產物 [如 N-(carboxymethyl) lysine] 與氧化性組織傷害上皆扮演者很重要的角色(6-13)，並被認為與蛋白質的交互連結 (crosslinks)、血管疾病、老化與促進發炎部位的組織傷害有關。其中，2-羥基乙醛更是已被證實會造成多種蛋白質的交互連結(14-17)，如血紅素、核糖核酸酵素 A (RNase A)；此外，由已知的醛類的高反應性及 enals 的致癌性來看，2-羥基乙醛亦極可能為致癌物。基於以上原因，加上其反應性高，不易分析，所以實有必要針對烹調油煙中，所產生的 2-羥基乙醛之絕對與相對含量，發展最佳採樣分析方法，並同時針對 2-羥基乙醛進行致突變性毒性測試以及其對整個炒菜油煙致突變性的貢獻度進行探討，並預期此結果應有助於釐清油煙在肺癌形成過程中所扮演的角色。

本計畫的主要目的為選取一對 2-羥基乙醛最佳採樣、衍生、分析方式，並進行安姆氏突變回復性測試(Ames test)，測試其致突變性。

材料方法

沙門氏菌回復突變測試法(Salmonella/microsome reversion assay: Ames test)參照 Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames 1983 (18) 所發表之方法。0.1 毫升供試藥劑溶液與隔夜培養之菌液 0.1 毫升，(經活化處理者，另加 0.5 毫升 S9 混和液) 加入含 0.2 毫升 0.5mM Histidine/biotine 之已融化的 2 毫升軟性瓊脂中，混和均勻後倒在 MA plates 上，培養 48 小時後，計數菌落數。

本實驗選取之菌株為 TA98、TA100 與 TA102，菌種來源為財團法人食品工業發展研究所。待試之試劑為 2-羥基乙醛，分別以不同稀釋倍數溶於二次水中。試驗時，每種濃度重複三次，分別以無試藥處

理與加 20 μ l/plate 之二次水為自然突變的對照組，即負反應對照，另以 0.5 μ l/plate 之 NQNO (4-nitroquinoline-N-oxide) 與 20 μ l/plate 之 NPD (4-nitro-o-phenylenediamine) 分別為 TA98 與 TA100 之正反應對照，而以 1.5 μ l/plate 的 sodium azide 與 2-AF (2-aminofluorene) 分別為 TA102 與加 S9 活化之正反應對照，所有實驗數值只有在正負反應對照均在建議數值範圍內時才予以採納，建議數值範圍如表一。

表一正負反應對照建議數值

		TA98	TA100	TA102
正反應	NQNO	>292		
	NPD	>798		
	Sodium azide			>188
負反應		30-50	120-200	240-320

老鼠肝臟活化酵素製備方法為將 PCBs-Arochlor1254 溶於玉米油配成 200mg/ml，以 500mg/kg 之劑量腹腔注射於體重約 200g 之成熟雄性大白鼠 (Sprague-Dawley 品系)，第五天解剖取肝，以 0.15MKCl 清洗後，組織研磨器研磨，9000 x g 離心 10 分鐘，取上層液為 S9 fraction，-80°C 保存待用。

由於文獻 (20) 指出，預養試驗 (preincubation) 對增加雙官能基醛類敏感度有很大的幫助，所以本試驗有比較有加預養試驗與沒有加預養試驗之差異，預養試驗 (21) 為將 0.1 毫升供試藥劑溶液與隔夜培養之菌液 0.1 毫升，(經活化處理者，另加 0.5 毫升 S9 混和液) 先放置 37°C 震盪保溫 20-30 分鐘後，再加入軟性瓊脂。

在 2-羥基乙醛採樣、衍生與分析部分參考文獻 (19)，以 4 個衝擊瓶串連的方式將衍生試劑 0.1mM PFBHA[O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminehydrochloride] 直接放置於衝擊瓶內，整個採樣過程需在冰下操作，之後放置內標 4-fluorobenzaldehyde 1 μ g/ml，於室溫下放

置 24 小時，視為第一段衍生反應之反應時間，後經 18N 硫酸酸化分別以液相液相萃取與固相萃取方式，進行萃取，經 Na₂SO₄ column 除水，以氮氣吹拂方式濃縮，再加入第二段衍生反應之衍生試劑 BSTFA (bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide)，此段衍生反應溫度為 42°C 時間為 12 小時。

固相萃取方面，採 C8 solid phase cartridges，以 MTBE(methyl-tert-butyl ether) 沖提出產物；而液相液相萃取方面，以 MTBE(methyl-tert-butyl ether) 進行之。衍生試劑的量與時間，與萃取之各項條件均以測試出之最佳條件表示。品保品管方面，重複分析，空白試驗均有進行，包括每一衍生、萃取階段均分別分析，以確認衍生、萃取之效率。

分析方面以氣相層析質譜儀分析 GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) 進行分析。GC 型號為 HP5890，分析管柱為 RTX-5MS(60m, 0.32mm i.d., 0.25 μ m film thickness)，分析條件如下：注射口溫度 280°C 烘箱(oven)溫度為一開始 69°C 停留 1 分鐘，以 5°C/min 升至 100°C，再以 10°C/min 升至 320°C，停留 4 分鐘。GC-MS 的介面 (interface) 溫度為 300°C。在 MS 部分，用 HP5973 電子游離 (electron ionization) Quadruple 質譜儀，掃描之質量範圍為 25-550amu。

結果與討論

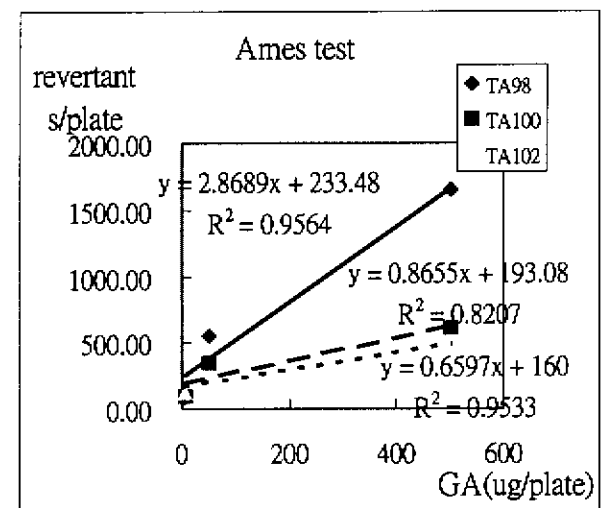
在沙門氏菌回復突變測試法部分，本研究選取之三株標準建議之沙門氏菌分別為 TA98、TA100、TA102，在沒有加 S9 活化的情形下，以 2-羥基乙醛濃度為 50 μ g/ml、500 μ g/ml、5mg/ml 來測試，結果如表二，TA98 中，致突變的菌落數從 2-羥基乙醛濃度為 50 μ g/ml 的 197 colonies/plate 到 2-羥基乙醛濃度 5mg/ml 時的 1760 colonies/plate，其他兩株分別從 239 colonies/plate 到 762 colonies/plate 與 267 colonies/plate 到 627 colonies/plate，以上升的斜率來看，圖一，TA98 上升的斜率為 2.87，TA100 的為 0.87，TA102 則為

0.66；TA98、TA100、TA102 的 R² 值分別為 0.9564、0.8207、0.9533。

表二 2-羥基乙醛在 TA98、TA100、TA102 之致突變性測試結果

		TA98	TA100	TA102
	ug/plate	avg	avg	avg
GA(50ug/ml)	5	196.7	239.0	266.7
GA(500ug/ml)	50	660.0	498.7	376.0
GA(5mg/ml)	500	1760.0	762.0	627.3

在 2-羥基乙醛濃度為 50 μ g/ml、500 μ g/ml、5mg/ml 的範圍中，TA98 的敏感度較 TA100 與 TA102 要好很多，此與文獻 (22) 中是 TA102 對雙官能基醛類最敏感之結果並不一致，不過文獻中探討之雙官能基醛類為含雙鍵之醛類，如丙烯醛等，或長鏈的羥基醛類，與本研究所探討之 2-羥基乙醛結構與反應機制均不盡相同，因此不同菌株的敏感度不同並無不妥。

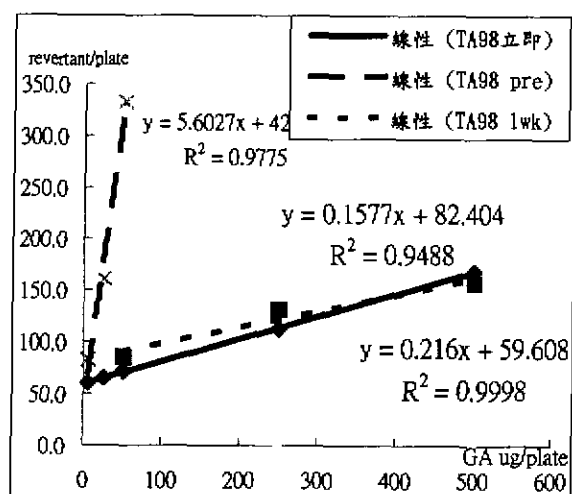


圖一不同濃度之 2-羥基乙醛在 TA98、TA100、TA102 之致突變性測試結果

由於 2-羥基乙醛為一反應性高的化合物，故本實驗針對 2-羥基乙醛溶於二次水之標準溶液的穩定性進行測試，結果如圖二顯示放置冰箱 (4°C) 一星期後之標準溶液與配置後之新鮮溶液立即測試之結果其 Ames test 結果在 TA98 菌系並無顯著性差異 (T test, P=0.3329)，斜率為 0.216

與 0.158，線性方面 R^2 值分別為 0.9998 與 0.9488。在預養試驗測試方面，由圖二可看出有加預養試驗之步驟的結果，前培養步驟增加了菌的敏感度，其斜率由 0.216 上升至 5.603， R^2 值為 0.9775，故對於 2-羥基乙醛而言，預養試驗得確有助於提升其敏感度，但也正因為敏感度的上升，使得正反應對照與較高的兩個濃度產生細胞毒性而死亡。

沙門氏菌回復突變測試法的結果判定部分，以 1986 美國環保署遺傳毒理計畫工作小組 (US EPA Gene-Tox Program) 判定標準，判定正反應結果之條件如下：1. TA98, TA100, TA1535, TA1537, 或 TA1538 五種之一之試驗結果為依據 2. 加 S9 或沒加 S9 之反應任依據有下列 3, 4 項之結果者 3. 至少有兩劑量反應之回復突變數顯著高於 NC，且有劑量效應關係 4. 至少有一劑量之回復突變數顯著高於 NC 的 2 倍以上，依據以上之判定標準，2-羥基乙醛為一具有致突變性之物質。

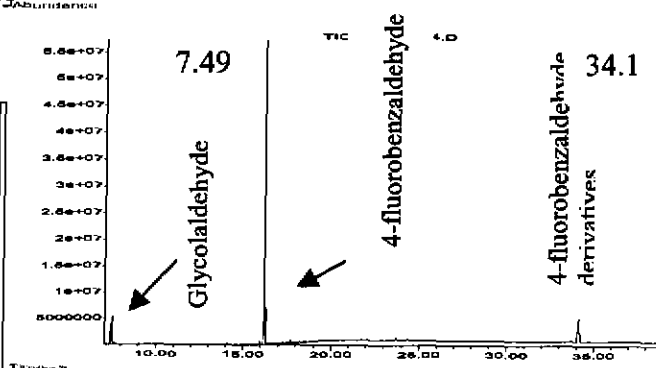


圖二 2-羥基乙醛於 TA98 之測試結果，保存一星期期後之試驗結果與有加入預養試驗之結果

相較於文獻 (20) 的判定方與 1986 美國環保署遺傳毒理計畫工作小組 (US EPA Gene-Tox Program) 判定標準式，本研究中 2-羥基乙醛在 Ames test 之 TA98 菌係之結果應為相當明顯的正反應。除劑量效應關係的線性良好 ($R^2=0.9998$ ，

preincubation $R^2=0.9775$)、有兩個劑量的回復致突變數達自然突變數的兩倍以上，且最高濃度的致突變數為自然突變數的三倍以上，在預養測試中更高達五倍以上。與文獻 (20) 比較，雖其自然突變數較低，仍可看出 2-羥基乙醛之致突變性應高於 Formaldehyde。

在 2-羥基乙醛衍生分析部分，由於兩次衍生試劑、時間、溫度與其他萃取液體等變項過多，導致最後並無法看到我們所預期之衍生產物 PFBHA oxime TMS ether，於是我們試圖尋找不同的溶劑萃取出不同階段的產物，如以 MTBE 萃第一階段之產物如圖三，有看到內標與內標之衍生產物，與 2-羥基乙醛，但卻沒看到 2-羥基乙醛之衍生產物，推測是因衍生試劑已被內標耗盡，也就是衍生試劑的量不足，此一部份，尚有許多問題，需更多的時間與精力進一步研究。



圖三 2-羥基乙醛經第一階段衍生之 GC/MS 圖譜

文獻：

- 1 Ger, P. L., Hsu, W. L., Chen, K. T. 1993.. Anticancer Res. 13, 1491-1450.
- 2 Ng, T. P., and Tan, W. C. 1994. Int. J. Epidemiol. 23, 553-558.
- 3 Gao, Y. T., Blot, W. J., Zheng, W., Ershow, A. G., Hsu, C. W., Levin, L. I., Zhang, R., Fraumeni, J. J. 1987. Int. J. Cancer. 40, 604-609.
- 4 Ivo, F., and Christoph, E. M. 1992. Environ. Health. 18, 287-292.
- 5 Kay, T., Clyde H., Chris, V. N., et. al., 1989. Environ Res. 50, 296-308.

- 6 Cerami, A. 1986. Trends Biochem. Sci. 11. 311-314.
- 7 Papoulis, A., Al-Abed, Y., Bucala, R. 1995. Biochem. 34, 648-655.
- 8 Al-abad, Y., Ulrich, P., Kapurnitu, A., Lolis, , E. and Bucala, R. 1995. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 2929-2930.
- 9 Al-abad, Y., Bucala, R. 1995. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 2161-2162.
- 10 Al-abad, Y., Mitsuhashi, T., Bucala, R. 1996. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 1577-1578.
- 11 Henie, T., Walter, A. W., Haebner, R., Klostermeyer, H. 1994. Lebensm. Unters. Forsch. 199, 55-58.
- 12 Konishi, Y., Hayase, F., and Kato, H. 1994. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1953-1955.
- 13 Fong, Y., Edelstein, D., Wang, E. A., and Brownlee, M. 1993. Diabetologia. 36, 802-807.
- 14 Acharya, A. S., abd Manning, J. M. 1983.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3590-3594.
- 15 Manning, L. R., and Manning. J. M. 1988. Biochem., 27,6640-6644.
- 16 Medeiros, D. M. H. G., Bechara, E. J. H. 1986. Arch. Biochem. Biophys., 248, 435-439.
- 17 Hengstler, J. G., Fushs, J., Gebhard, S., Oesch, F. 1994. Mutat. Res. 304, 229-234.
- 18 Maron D. M. and Ames B. N. (1983) Mutation Res., 173-215
- 19 Spaulding R. S., Frazey P., Rao X., and Charles M. J., (1999) Anal. Chem., 3420-3427
- 20Erwin E., Christoph D., Tilman N., and Doris D., (1992) Environ. Mol. Mutagen. 338-345
- 21 Matsushima T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) in : K.H. Norpoth and R.C. Garner. Short-term test system for detecting carcinogenesis, Springer, Berlin. 273-285
- 22 Lawrence J. M., Holly K. H., Monica C. H., David E. L., Hermann E., and Bruce N. A., (1985) Mutation Res. 25-34