

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科
佳作

052204

模擬賽滅寧降解物對體內關鍵酵素之探索

學校名稱：臺北市濯亞國際學院實驗教育機構

作者：	指導老師：
高一 李明恩	陳冠甫 李亞橋

關鍵詞：賽滅寧(Cypermethrin)、降解、酵素

賽滅寧之體內降解與酵素抑制作用

摘要

賽滅寧(Cypermethrin, CYP)是一種被廣泛使用的 II 型合成除蟲菊精類農藥，常利用於蔬果及驅蟲中。已知，攝入高劑量的 CYP 會影響人體健康，並殘留於毛髮、皮膚與脂肪組織之中難以代謝。本實驗藉由鹽酸模擬 CYP 進入體內後受胃酸分解的狀態，檢測其降解產物與方式，並由 CYP 與降解產物的實驗探討是否會對數種與體內疾病相關的酵素發生交互作用，從而對酵素的活性與功能產生抑制作用。實驗發現 CYP 經由強酸會水解為兩種化合物，並對造成阿茲海默症的酵素乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase)產生抑制作用，當 CYP 濃度越高時，抑制性越強，且經由對人類神經母細胞瘤細胞(SH-SY5Y)的毒性實驗發現相對是安全的。希望能藉此研究進一步探討 CYP 對體內酵素作用的影響，並且探索 CYP 降解物對生物體是否帶來潛在的益處。

壹、前言

一、研究動機

為防止農作物遭蟲啃食，農民長期以來大多使用噴灑農藥的方式來預防。而賽滅寧(Cypermethrin, CYP)是一種被大量使用於瓜果類、包葉菜類、稻米等的藥劑，同時也是一種被廣泛使用的殺蟲劑。如果清洗不乾淨會隨著食物進入到人體中，賽滅寧在體內會殘留於脂肪、皮膚、毛髮中尤其是在脂肪組織中不易代謝，且根據文獻中的動物實驗結果得知高濃度的賽滅寧會對神經、內分泌系統造成危害。

已知賽滅寧在體外(*in vitro*)可被酸與鹼分解，在體內(*in vivo*)則透過消化系統降解，並造成負面影響，而賽滅寧的降解物是否有可能在體內扮演正向的角色，是一個值得探討的問題。因此，我們想利用幾個引起疾病的關鍵酵素，例如造成黑色素生成的酪胺酸酶(Tyrosinase)、與阿茲海默、失智相關的重要酵素，能造成神經傳遞物質乙醯膽鹼降解的酵素乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase)、引起心血管疾病的脂質氧化酶(Lipoxygenase)及造成血糖

失調的 α -葡萄糖苷酶(alpha-glucosidase)，研究 CYP 主要代謝物有沒有可能改善慢性代謝性疾病，對人體帶來正面影響。

二、研究目的

探討酸鹼對 CYP 降解的影響，以及降解後是否對體內酵素產生抑制作用，嘗試能否找出 CYP 對人體造成的正面影響

- (一) 驗證 CYP 在不同環境因素下的安定性
- (二) 實驗 CYP 是否會在酸鹼下降解
- (三) 分析 CYP 降解產物
- (四) 實驗 CYP 降解產物對人體酵素影響
- (五) 探討 CYP 對體內的影響

三、文獻回顧

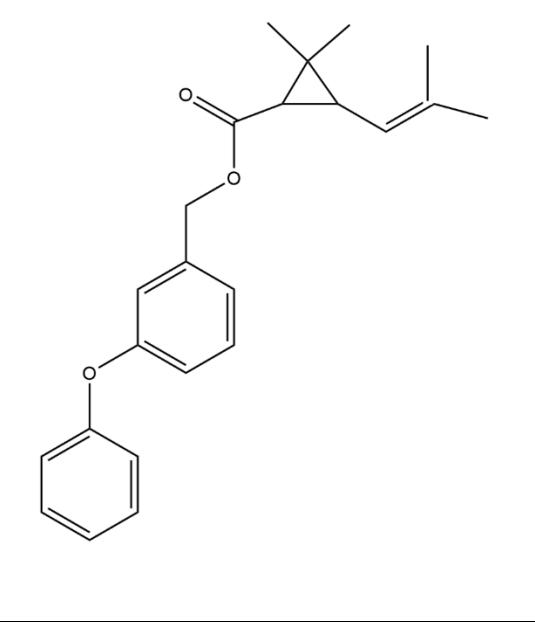
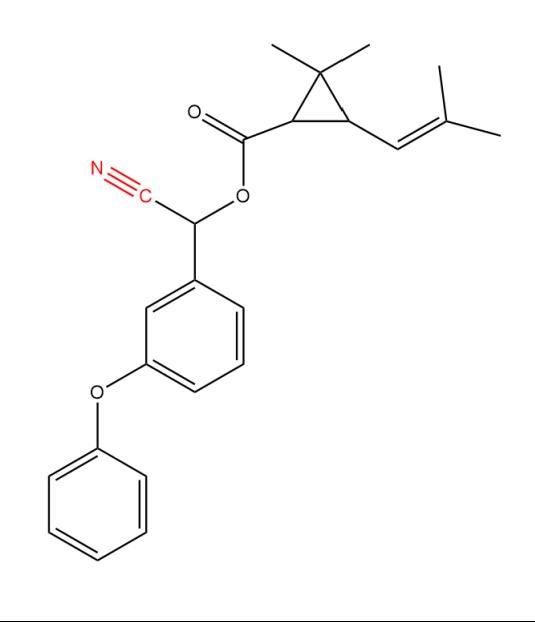
(一) 賽滅寧(Cypermethrin) (CYP)

賽滅寧(CYP)為除蟲菊精類的一種農藥，經常被使用於蔬果與登革熱中，是生活中常見的農藥之一。從 2000 到 2020 年殺蟲劑銷售量為 1 萬 6 千公噸，增加 8% (如圖一)，而賽滅寧在 2000~2005 年間銷售數量更是排名前 10 名，是很重要的使用農藥之一。

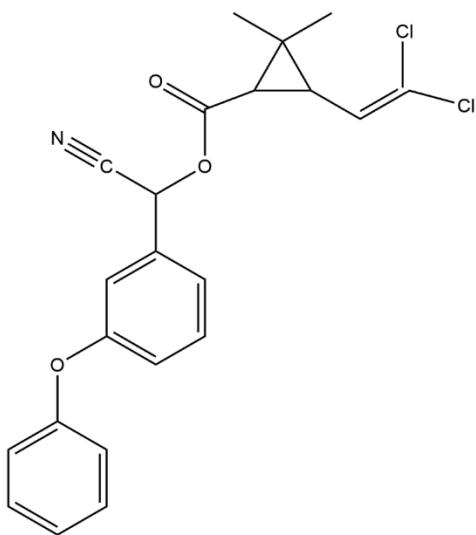
表一、殺蟲劑銷售量 (方麗萍，2021)

年份	2000	2005	2010	2015	2020
殺蟲劑銷售 數量(公噸)	15,248	16,287	15,645	16,170	16,464
殺蟲劑銷售 金額(百萬)	2,283	2,195	3,058	3,398	3,936

(二) 除蟲菊精化學結構

	
圖一、I型除蟲菊精結構示意圖 (在 α 位沒有氰基結構)	圖二、II型除蟲菊精結構示意圖 (在 α 位有氰基結構)

賽滅寧(CYP)結構(CYP 分子式： $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$)



圖三、CYP 結構



圖四、CYP 立體結構

(三) CYP 基本性質

1. CYP 保存與分解

CYP 為脂溶性化合物，需冷藏於-80 度冰箱中。在室溫下一般呈現黃色半固體（膠狀）狀態，熔點位於 60—80 度之間，在 220 度時會分解產生氰化氫、氯化氫等有毒煙霧。一般在 pH 值 3-7 之間處於安定狀態，不易被分解。

2. 暴露與代謝方式

飲食與接觸受汙染土壤為民眾攝入 CYP 的主要方式，其中發現 3 至 6 歲孩童暴露濃度最高。CYP 進入人體後會在胃腸道吸收、分解，進入血液循環後 24 小時內從尿液代謝 40-60%，而膽汁會代謝環丙烷結構，這些代謝途徑適用於大多數動物。未被代謝的 CYP 則會累積脂肪組織、皮膚與毛髮中。

3. 毒性

CYP 會影響神經系統內的鈉離子與氯離子通道，尤其是 II 型 CYP 所含的氰基更容易使電位數量異常增加，導致中樞神經系統過度興奮。而 CYP 與其在體內的降解產物會影響激素受體功能，間接影響了內分泌系統。

貳、研究設備與器材

(一) 器材 (表二)

乳膠手套	燒杯	安全吸頭	玻璃滴管	量筒	樣本瓶	毛細管
展開槽	正向薄層 層析片 (NP TLC)	逆向薄層 層析片 (RP TLC)	衛生紙	精密擦拭紙	鑷子	刮勺
Parafilm 封口蠟膜	分析天平	微量吸管	吸管尖	陶瓷加熱板	水浴鍋	振盪器
超純水系統 EQ7000	電子天平	質譜儀	樣品瓶架	洗瓶	離心瓶	-80 度冰箱

核磁共振儀	管柱	UV 燈	pH 值檢測機	多模式微量盤分析儀	微量盤	八爪微量吸管
-20 度冰箱	離心管	試管架	離心機	超聲波震盪機	濃縮機	96 孔版

(二) 藥品 (表三)

二次水 (ddH ₂ O)	乙醇 (Ethanol)	鹽酸 (Hydrochloric acid)	丙酮 (Acetone)
乙酸乙酯 (Ethyl Acetate)	己烷 (n-Hexane)	硫酸 (Sulphuric acid)	氫氧化鈉 (Sodium Hydroxide)
甲醇 (Methanol)	二氯甲烷 (Dichloromethane)	賽滅寧 (Cypermethrin)	TRIS 緩衝劑 (TRIS Buffer)
碳酸鈉 (Na ₂ CO ₃)	磷酸鹽緩衝液 (Phosphate Buffer)	硼酸 (Boric acid)	磷酸氫鈉 (Na ₂ HPO ₄)
酪胺酸酶 (Tyrosinase)	乙醯膽鹼酯酶 (Acetylcholinesterase)	脂質氧化酶 (Lipoxygenase)	α -葡萄糖苷酶 (alpha-glucosidase)
神經細胞 (SH-SY5Y)	二甲基亞礦 (DMSO)	磷酸二氫鈉 (NaH ₂ PO ₄)	氯仿 (CDCl ₃)

(三) 標準品來源：

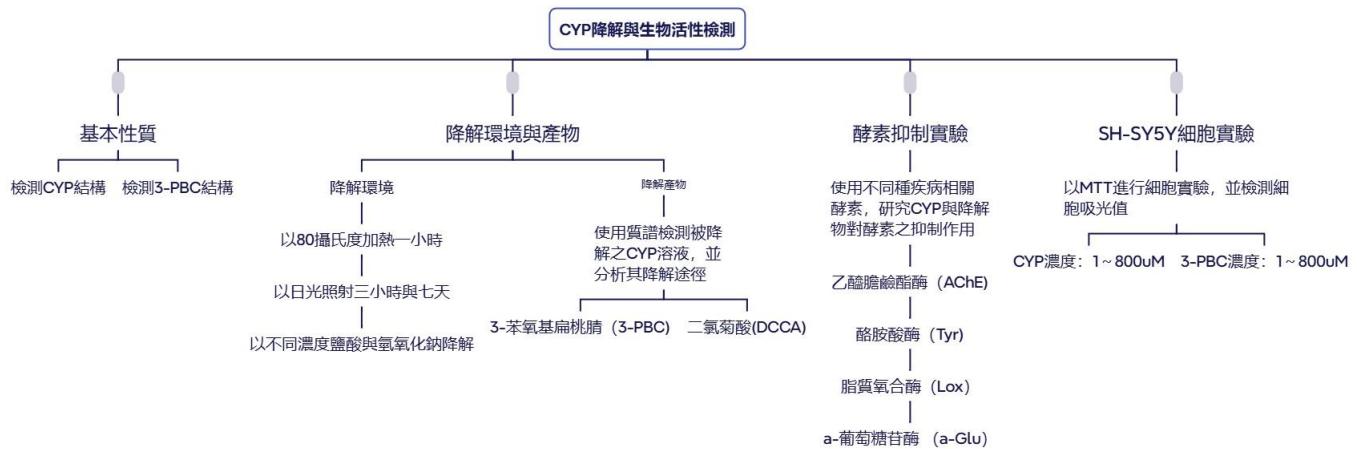
96% 賽滅寧(CYP) 購置於 Thermo Fisher Scientific。

97% 苯氧基苯甲酸(3-PBC) 購置於 ChemScene。

四、圖片來源說明

本研究所有圖片皆由作者以 GraphPad Prism、Excel、ChemDraw、Xmind、MestReNova、Compound Discoverer 軟體自行繪製與拍攝。

參、研究過程與方法



圖五、研究架構圖

(一) 結構確認

1. 確定 CYP 結構

(1) 薄層層析

將 CYP 標準品回溫後取出 30 毫克加入乙醇溶解，並配置成 1 毫升的溶液，待溶解後分別點正向與逆向的 TLC 片。正向 TLC (NP) 的展開液使用 1:1 的己烷與乙酸乙酯，逆向 TLC (RP) 則使用甲醇與二次水作為移動相加至展開槽中。以毛細管吸取配置好的溶液點於層析片上，放入展開槽，等待展開液吸至終點取出，並照射 254nm 光。因賽滅寧含苯環結構，可以吸收 254nm 波長的光，因此照射時應會呈色。接著改變展開液比例至 2:1，重複上述步驟。

(2) 核磁共振儀 (NMR)

將 10mg CYP 加入 CDCl_3 溶解，置入於 NMR 儀器中，並比照文獻所提供的圖譜確定 CYP 結構。

2. 3-PBC 結構檢測

(3) 核磁共振儀 (NMR)

將 10mg 3-PBC 加入 CDCl_3 溶解，置入於 NMR 儀器中，並查詢不同訊號會出現之化合物，並參考其結構。

(二) CYP 降解研究

1. 改變環境參數（溫度與照光）探討 CYP 降解

(1) 將 CYP 與 CYP 加水與二氯甲烷分別進行加熱與照光處理。

A. 將 CYP 溶於水及二氯甲烷溶液放至水浴鍋中以 80 度持續加熱 1 小時（如圖六）

B. 將 CYP 溶於水及二氯甲烷溶液以日光持續照射 3 小時與 7 天。

(2) 將加熱與照光的 CYP 與溶液先以甲醇進行稀釋，然後利用毛細管吸取有機層，分別點於 NP TLC，並以短波長光(short wave)觀察是否有被分解的其他訊號產生（如圖七）。

	
圖六、以 80 度加熱 CYP	圖七、以短波照射 TLC 片檢測是否分解

2. 酸性環境降解

(1) 薄層層析

A. 取出 100 微升加熱過的 CYP 加入 12M 的鹽酸點正向 TLC，步驟

同上，檢測是否被降解。

B. 取 0.5g CYP 與 4ml 甲醇混合溶解，分別各取 1ml 配至濃度為 0.01M、0.1M、1、3M 的鹽酸中。

分別點正向 TLC，展開液以乙酸乙酯、己烷以 1：1、1：3 配置，以毛細管吸取配置好的溶液點於 NP 層析片上，放入展開槽，等待展開液吸至終點取出照光 (254nm) 觀察顯色情況。

(2) NMR 檢測

取最高濃度 12M 鹽酸與 CYP 之化合物反應後，經過中和前處理後進行濃縮凍乾，利用 NMR 儀器進行光譜比較，檢測是否有反應。

(3) 質譜儀檢測

由 TLC 及 NMR 儀器檢測的結果，若出現正向的降解反應，則進行質譜儀檢測，提供更多的實驗結果訊息。

3. 鹼性環境降解

以每毫升含 100 毫克比例配置 0.01M、0.1M、1M、3M 氢氧化鈉+CYP 的化合物（如圖八），使用甲醇增加溶解度，並利用震盪器加速溶解。將不同濃度氫氧化鈉點 TLC，步驟同上。



圖八、0.01M~3M 氢氧化鈉溶液

(三) 酵素抑制作用

1. 乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)活性測試

- Buffer：
 - 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8)
 - Tris buffer 0.05 M (pH 8)

- DTNB : 3 mM 11.9mg/10ml
- Substrate : ATCI (Acetylthiocholine iodide) 0.015 M (final)
- Enzyme : 0.03 unit/mL (final)
- Sample : 500 μ g/mL with 1% DMSO (final)
- Positive control : 2.75 μ g/mL Eserine (final)

(1) 機器設定

- UV-Vis : 405 nm
- Temperature : 37°C
- Test time : 5 min

2. 酪胺酸酶 (Tyrosinase, Tyr)活性測試

- Buffer : 66.7 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ (pH 6.8)
4.3g NaH₂PO₄+4.38g Na₂HPO₄ /100ml ddH₂O
- Substrate : Tyrosine 40 μ g/mL (final)
1mg/10ml (等比例縮放)
- Enzyme : 50 U/mL (final)
250U/ml
- Sample : 500 μ g/mL with 1% DMSO (final)
5mg/100 μ l 100%DMSO
- Positive control : Kojic acid
MW : 142.11 取(7.1055mg/ml) 1.4211mg / 200 μ l 的 100%DMSO 再稀釋
十倍再取 20 μ l+380 μ l buffer

(2) 機器設定

- UV-Vis : 475 nm
- Temperature : 37°C
- Test time : 30 min

3. 脂質氧化酶 (Lipoxygenase, Lox)活性測試

- Buffer : 0.2 M borate buffer (pH 9.0)
Boric acid 1.24g+100ml ddH₂O +NaOH 調
- Substrate : linoleic acid (LA) 67 μ M (final)
1M=280.45g/L 268 μ M=75.04g/L (well X4)
- Enzyme : 167 U/mL (final) 配 668U/ml (wellX4)
- Sample : 100 μ g/mL with 1% DMSO (final)
500 μ g/ml 5%DMSO (wellX5)
- Positive control : Quercetin 125 μ M
3.78mg/ml DMSO 取 30 μ l+570 μ l buffer

(3) 機器設定

- UV-Vis : 234 nm
- Temperature : 25°C
- Test time : 10 min

4. α -葡萄糖苷酶 (alpha-Glucosidase, α -Glu)活性測試

- Sample : 500 μ g/mL buffer
5.05 mg/0.1 ml 100% DMSO 取 66 μ l+ 934 μ l buffer
- Buffer : PBS Buffer 0.1M (pH 6.8)
Na₂HPO₄ : 1.194g+ NaH₂PO₄ : 0.765g+100ml ddH₂O
- Substrate : p-NPG (p-nitrophenyl-A-D-glucopyranoside) 4mM
MW : 301.25 → 1.204 mg/ml buffer
- Na₂CO₃ (267mM)
MW : 106 → 56.604 mg/2ml ddH₂O
- Positive control : Quercetin 20 μ g/mL in DMSO 1mg/0.5 ml DMSO → 30 μ l +970 μ l buffer
- α - glucosidase : 0.8U/ml

5. Result 的計算

- 活性公式：

$$\frac{SE - SB}{CE - CB} \times 100\%$$

$$\frac{\Delta SE \text{ 斜率} - \Delta SB \text{ 斜率}}{\Delta CE \text{ 斜率} - \Delta CB \text{ 斜率}}$$

活性公式主要用來計算樣品對酵素活性或細胞反應的相對抑制率百分比。在此公式中，SE 代表含有測試樣品與酵素的反應值，SB 是樣品本身的背景值（無酵素），CE 是只含酵素的對照反應值，CB 則是對照背景值（無酵素）。透過這個活性公式可以減少誤差，並藉此評估樣品對酵素反應的實際抑制效果。整體而言，這個公式是一種標準化的方式，用於精確衡量測試物質對酵素系統的抑制能力。

 A photograph showing the preparation of a microplate. Various laboratory glassware, including a pink microplate tray, a graduated cylinder, and a pipette, are arranged on a black surface. Handwritten notes are visible on the surface.	 A photograph of a laboratory setup. A white cabinet with a glass door is open, revealing a glass beaker and a small white container inside. A black stand with a glass tube is positioned in front of the cabinet.	 A photograph of a laboratory workstation. A computer monitor displays a software interface, and a white multi-mode microplate reader is connected to the computer. The reader is placed on a black stand.
圖九、準備微量盤	圖十、配置 buffe	圖十一、使用多模式微量盤分析儀測定不同酵素在添加賽滅寧後的活性

(四) SH-SY5Y 細胞存活率試驗 (MTT 分析法)

1. 實驗原理

MTT 分析法利用比色法測量細胞代謝活性，此方法為細胞活力、增殖和細胞毒性的指標，MTT 與活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶作用，形成氧化還原反應產生 Formazan 藍紫色結晶，藉由 DMSO 將紫色結晶溶解，再測定吸光值評估其細胞活性及增殖。

2. 實驗方法

(1) 細胞計數與種盤

首先取出 $20\mu\text{L}$ 繼代後穩定的細胞培養液加入 $20\mu\text{L}$ 的 trypan blue 染劑將細胞染色以利後續進行細胞計數，將染色後的細胞培養液吸收到血球計數盤中，蓋上蓋玻片，並用血球計數器在顯微鏡下觀察計數盤中特定區域的細胞數量。依照計數結果判斷是否加入培養液調整細胞濃度，使細胞濃度為 $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ ，並在 48 孔盤中每格加入 1mL ，置於培養箱中，以攝氏 37 度、95% 空氣 5% 二氧化碳的狀態進行培養 24 小時。

(2) 細胞培養並加入待測樣品

細胞種盤培養 24 小時後，可先透過顯微鏡觀察細胞生長是否良好，接著使用培養液配置最終濃度為 100mM 的 α -MSH 溶液，並在每一格中加入 $500\mu\text{L}$ 的 α -MSH 溶液。將樣品配製成不同的最終濃度：賽滅寧 ($1\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $800\mu\text{M}$)，與空白對照組。細胞下藥時每次取 $500\mu\text{L}$ 加入孔盤中並使其均勻分散，完成後放置於培養箱中，以攝氏 37 度、5% 二氧化碳濃度進行培養 48 小時。

(3) MTT 試驗

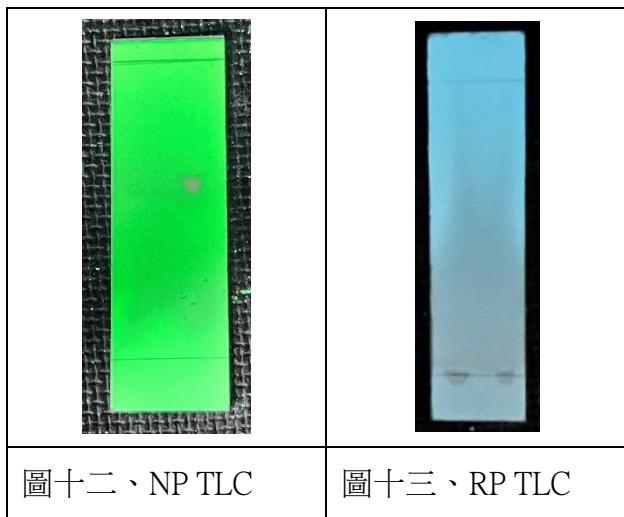
放置 24 小時後，將 48 孔盤自培養箱中取出，吸除原本孔盤中的培養液，再加入 PBS 清洗並吸除。完成後，加入 $450\mu\text{L}$ 的細胞培養液與 $50\mu\text{L}$ 的 MTT 溶液放入培養箱中使其反應 2 小時，MTT 溶液的最終濃度應為 0.5 mg 在 1mL 的 PBS 中，加入 MTT 溶液後應全程避光。2 小時後細胞培養盤從培養箱中取出，吸除溶液後，加入 $200\mu\text{L}$ 的 DMSO 溶解，MTT 反應所產色的紫黑色沉澱物，並放在迴轉式震盪器(Orbital Shaker)上以 60 rpm 之轉速震盪 30 分鐘。

(4) 結果分析

震盪完成後將 $150\mu\text{L}$ DMSO 加入 96 孔盤中，再取 $25\mu\text{L}$ 之紫黑色反應液體加入 96 孔版中進行稀釋。吸光值結果由多模式微孔盤分析儀進行測定，波長設定為 570nm ，並進行細胞存活率的計算。

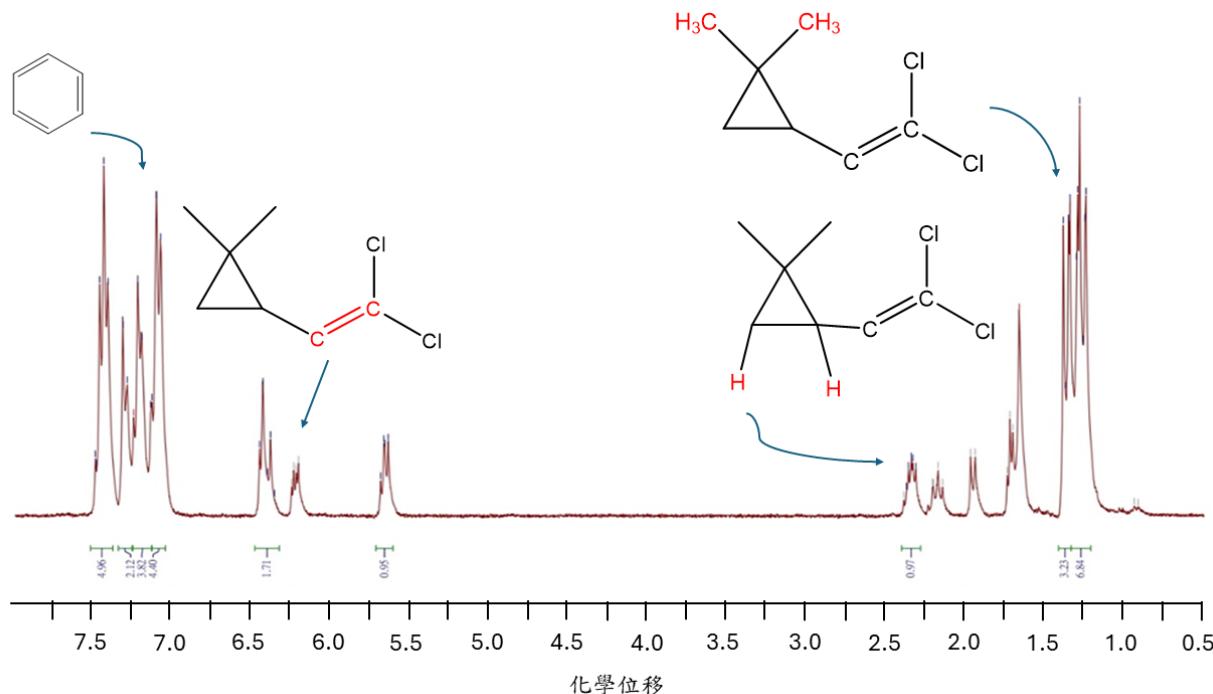
肆、研究結果

(一) 確定 CYP 的 TLC 片呈色是以正向 (NP) TLC 片且以短波 (254 nm) 吸收進行觀測



此實驗研究 CYP 在正向與逆向 TLC 片中的移動。照光後結果顯示在正向 (NP) TLC 片上會有移動且有明顯的短波 (254 nm) 吸收 (如圖十二)，而逆向 (RP) TLC 片則顯色不清楚 (如圖十三)。因此後續 TLC 實驗皆使用正向 TLC 片進行實驗觀察。

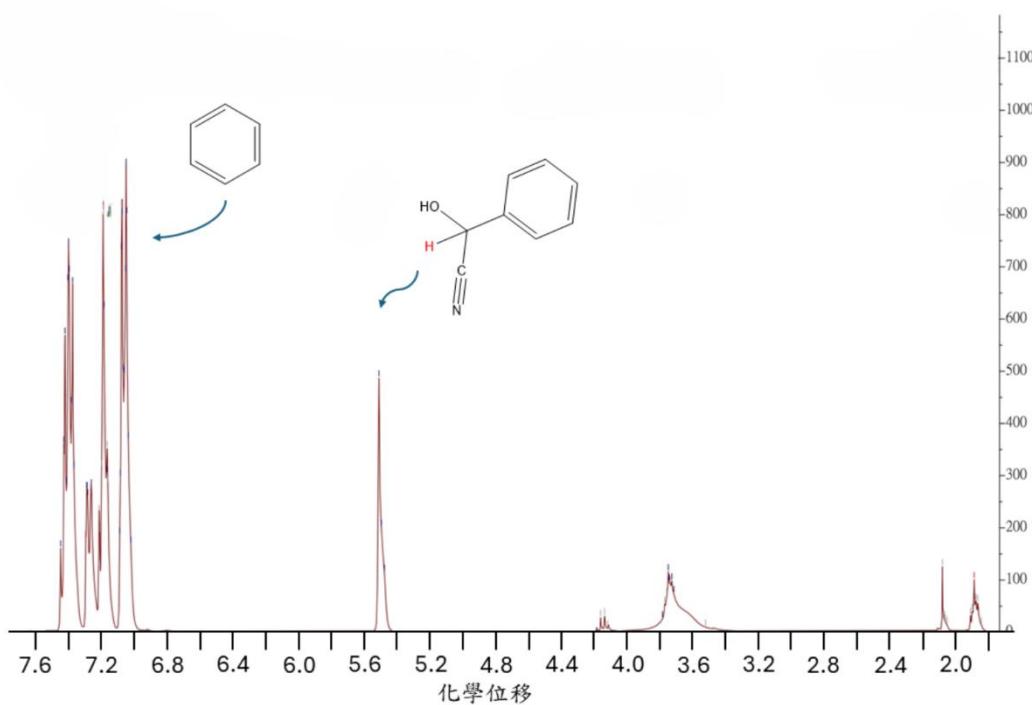
(二) CYP 核磁共振光譜檢測



圖十四、CYP 核磁共振光譜圖

經由核磁共振儀進行 CYP 的結構判定，在訊號 7.5~7.0 時出現苯環結構；6.5~6.25 出現烯類的碳碳雙鍵；在 2.5~2.0 之間出現環丙烷的氫原子，最後則是在 1.5~1.0 出現甲基。在對照文獻後確定此化合物為 CYP，因此所購買的 CYP 標準品是正確的，因此，以便繼續進行後續實驗。

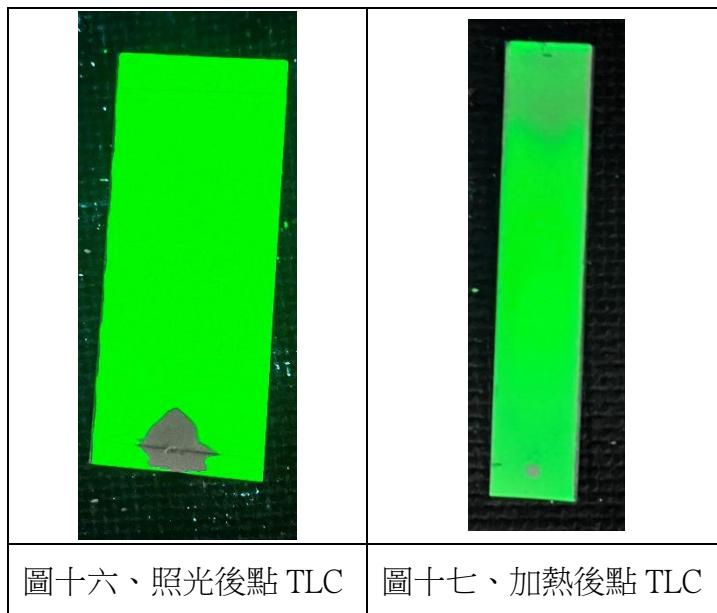
(三) 3-PBC NMR 氢譜



圖十五、3-PBC 氢譜圖

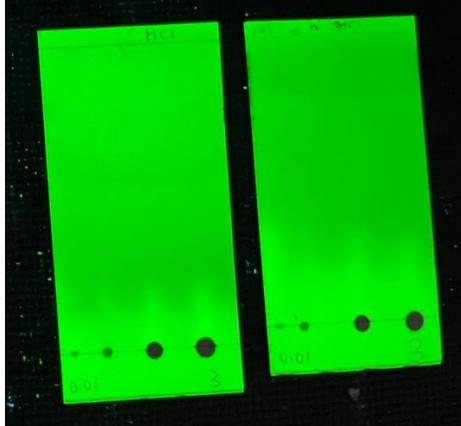
經由核磁共振儀進行 CYP 的結構判定，在訊號 7.6~7.0 時出現苯環結構；5.6~5.2 出現氫原子。在比對其結構後確認此為 3-PBC 之標準品，並可作為其他研究的基礎。

(四) CYP 照光與加熱降解狀況



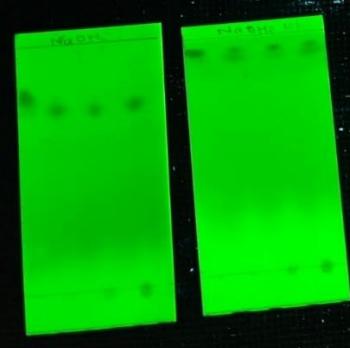
利用照光與加熱使讓 CYP 降解，然而結果顯示照日光與加熱並不會讓 CYP 被降解。

(五) 酸性降解狀況

	
圖十八、0.01, 0.1, 1, 3M 鹽酸的降解狀況	圖十九、12M 鹽酸的降解狀況

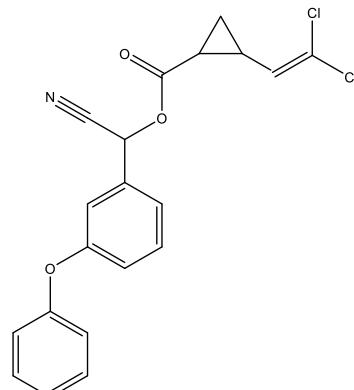
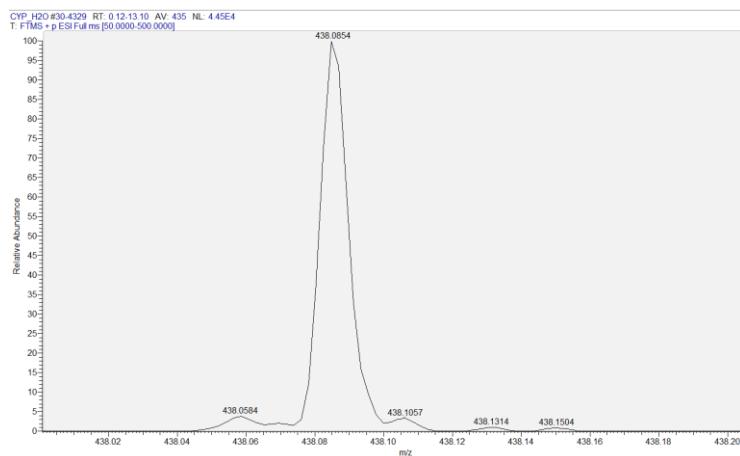
此實驗探討不同濃度鹽酸對 CYP 降解影響，然而結果顯示 12M 鹽酸是唯一有降解的，其餘皆留在起點處。

(六) 鹼性環境降解

		
圖二十、0.01, 0.1, 1, 3M 氫氧化鈉的降解狀況	圖二十一、1M 氫氧化鈉的降 解狀況	圖二十二、1M 氢 氧化鈉泡硫酸碳化 後的降解狀況

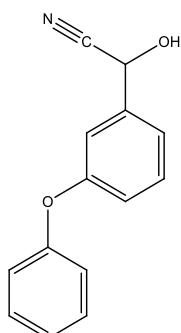
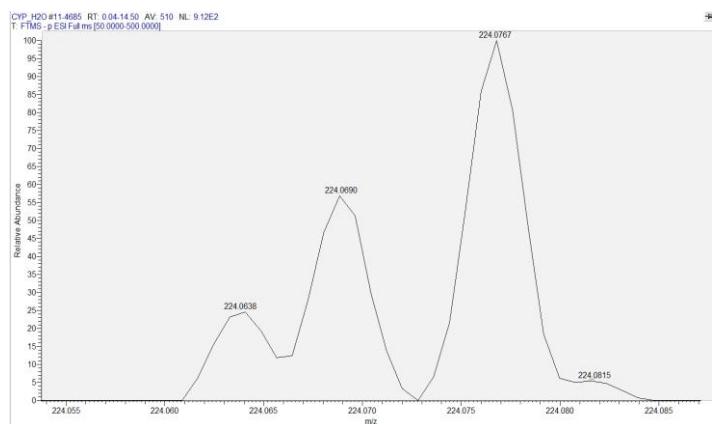
結果顯示，在鹼性環境下無論是 0.01M 或是 3M 濃度皆可使 CYP 被降解成不同物質。根據上述結果得知 CYP 在酸鹼中皆會降解，因此我們藉此模擬 CYP 進入人體後被胃酸分解的情況，來研究其降解物對體內關鍵酵素的影響。

(七) CYP 降解途徑

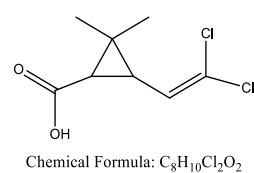
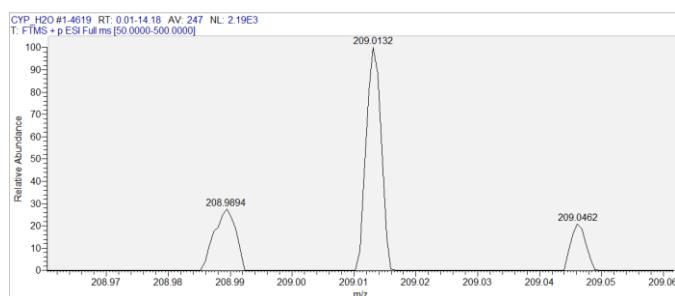


圖二十三、賽滅寧質譜圖

↓



圖二十四、降解物 1 (3-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin)



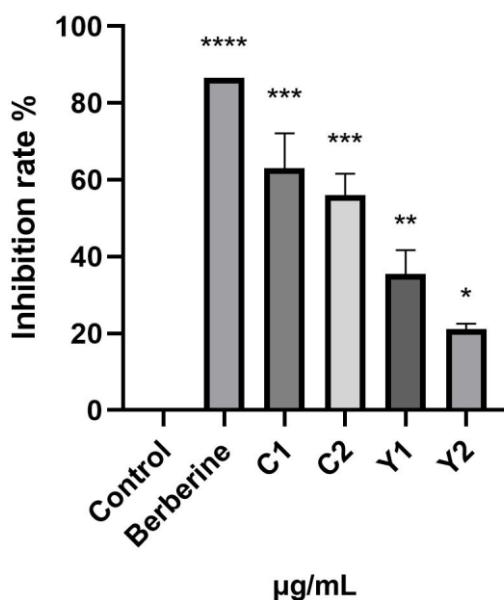
圖二十五、降解物 2(3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid)

將 CYP 加 12M 鹽酸溶液點完 TLC 後使用質譜儀分析其降解產物。因根據 NMR CYP 含有苯環結構，且其較為穩定，因此不容易在苯環分解，推測會在酯鍵的位置水解成兩種化合物。結果顯示，降解方式如同預期，降解後產生兩種化合物分別是 3-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin (如圖二十四) 及 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (如圖

二十五），其降解產物也與其他文獻中所得到的相同，可推測此降解途徑與大多數的降解方式是相同的，在酯鍵的位置進行水解。

(八) CYP 及其降解物對關鍵酵素之影響

CYP 及其降解物對分別對 α -葡萄糖苷酶、脂質氧化酶、酪胺酸酶及乙醯膽鹼酯酶 4 種不同的酵素活性的影響，發現於 $8 \mu\text{g/mL}$ 濃度以下不論是 CYP 或其降解物對於 α -葡萄糖苷酶、脂質氧化酶、酪胺酸酶三種酵素皆沒有抑制活性的效果，但是對於乙醯膽鹼酯酶此酵素，CYP 會隨著濃度增加而有顯著抑制的效果，而其降解物在相同濃度下是具有相對較弱的效果，這是令人驚訝的結果。

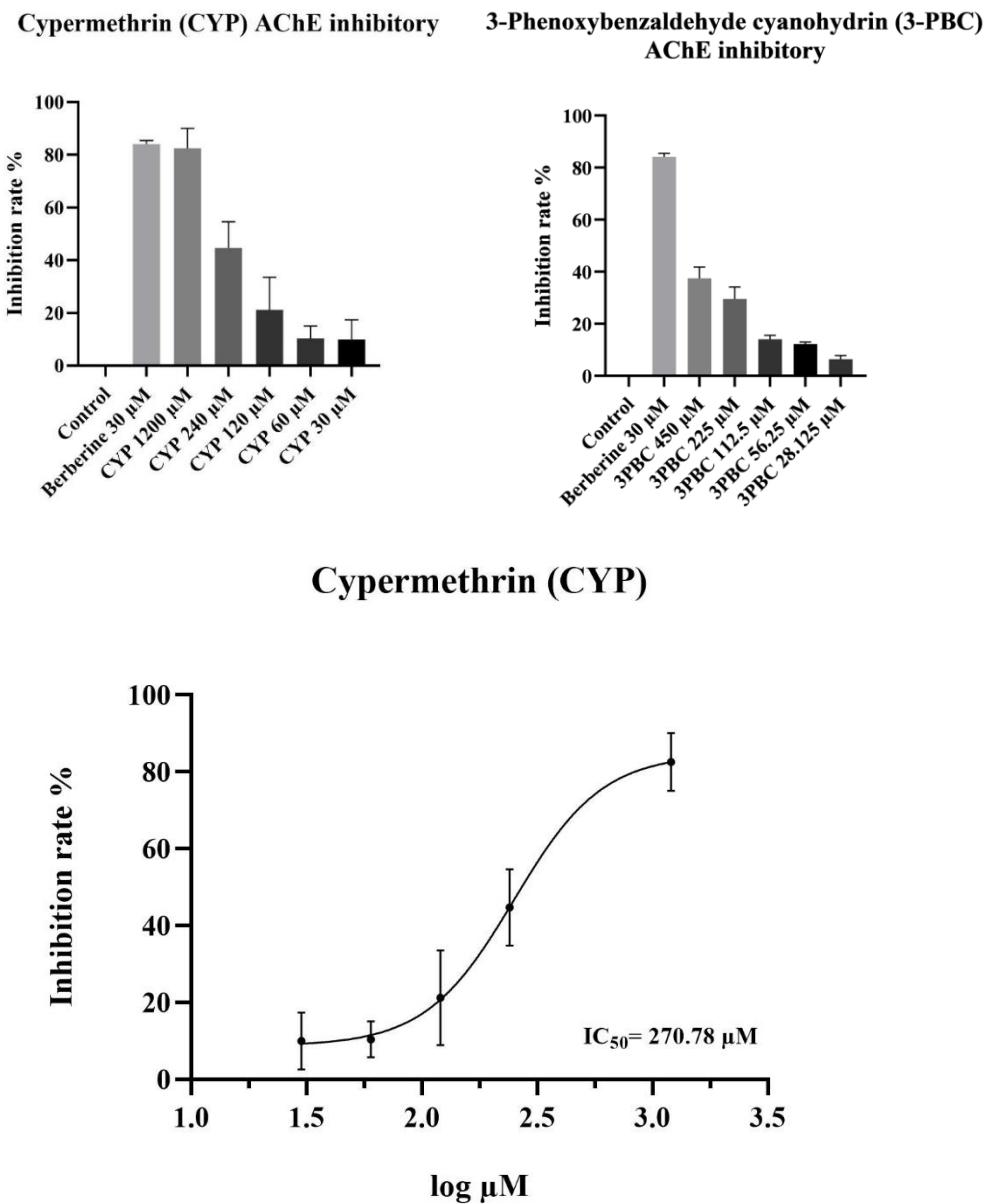


圖二十六、賽滅寧與降解物抑制率比較

如上圖（圖二十六）不同濃度賽滅寧(C1 : $8 \mu\text{g/mL}$ 、C2 : $0.8 \mu\text{g/mL}$)及其降解物(Y1 : $8 \mu\text{g/mL}$ 、Y2 : $0.8 \mu\text{g/mL}$)對於乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase)抑制率的比較。使用 30mM 小蘢鹼作為陽性對照組。與對照組相比，* p 值 <0.05 ，** p 值 <0.01 ，*** p 值 <0.001 ，**** p 值 <0.0001 。

(九) CYP 及 3-PBC 對乙醯膽鹼酯酶之影響

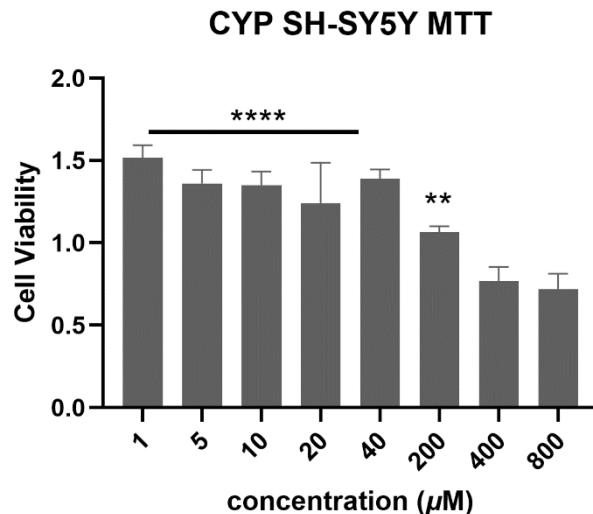
因 CYP 及其降解物皆只對乙醯膽鹼酯酶有抑制作用，故不以其他酵素檢測。在分別檢測兩者後，結果顯示，兩者會隨著濃度增加而有顯著抑制的效果，CYP 之 IC_{50} （半數抑制濃度）為 $270.78 \mu M$ ，3-PBC 在 $300 \mu M$ 時仍無法計算出 IC_{50} ，但可從圖二十七中推測出 3-PBC 之 IC_{50} 大於 $450 \mu M$ 。以 IC_{50} 來看，CYP 所需濃度明顯低於 3-PBC，代表 CYP 具有更好的抑制率。



圖二十七、CYP 與 3-PBC 之酵素抑制率

(十) CYP 與 SH-SY5Y 細胞活性實驗

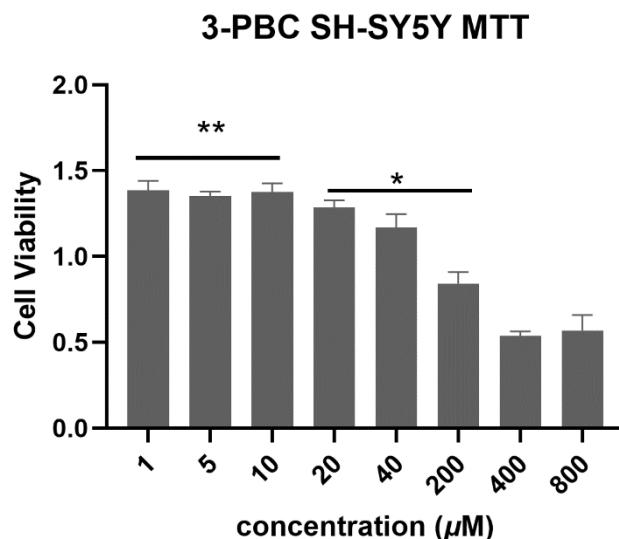
CYP 濃度 1~200 μM 時細胞存活率大於 80%，代表這個範圍的 CYP 對細胞不具毒性，但在 400 μM 時細胞存活率降至 76%，則顯示超過 400 μM 的 CYP 對神經細胞具有輕微毒性。



圖二十八、SH-SY5Y 細胞加入 CYP 的細胞存活率

(十一) 3-PBC 與 SH-SY5Y 細胞活性實驗

3-PBC 濃度在 200 μM 以下時細胞存活率也大於 80%，代表這個範圍的 3-PBC 對細胞不具毒性，並且在 400 μM 時存活率不到 60%，表示 3-PBC 對神經細胞具有中度毒性。



圖二十九、SH-SY5Y 細胞加入 CYP 的細胞存活率



圖三十、細胞反應後的顏色變化狀況

伍、討論

(一) TLC 片及 UV 燈顯色

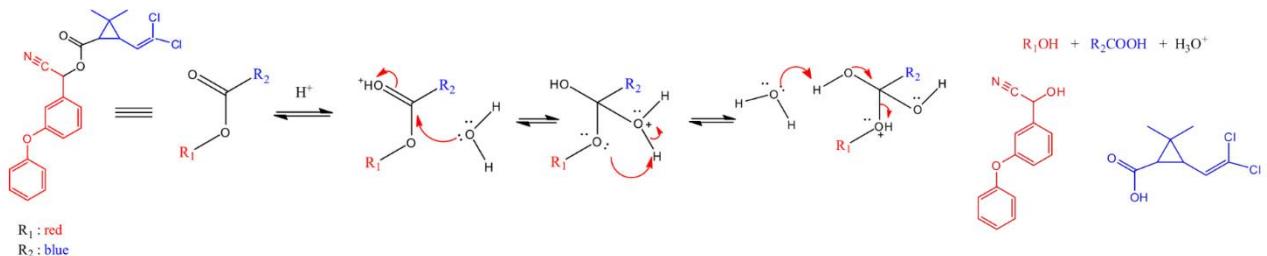
利用 TLC 片進行反應的追蹤是容易進行及快速的方法，對於 CYP 及其降解物的研究，我們使用正向及逆向的 TLC 進行展開，發現正向 TLC 的分離或是經過照 UV 燈後顯示都較逆向 TLC 好，而 UV 燈在長波長及短波長對於 CYP 及其降解物的顯示追蹤，照短波長的顯現效果優於長波長。因此，我們往後就以正向 TLC 片及 UV 燈短波長進行反應的追蹤。

(二) 照光與加熱

根據文獻，CYP 光吸收波長大約為 200nm-300nm 之間，超過則不吸收，故一般日光是無法使賽滅寧降解。而 CYP 結構包含 C-N 鍵使其可耐的溫度較高，導致 80 度的持續加熱無法使 CYP 被降解。故不論是照光與加熱下是無法讓 CYP 降解，增加照光強度或升高加熱溫度有可能讓 CYP 降解，但考慮日常生活的現況，不進行相關探討。

(三) 降解途徑

CYP 在酯鍵位置進行降解，其中透過電子轉移使其降解為兩種化合物。



圖三十一、電子轉移示意圖

R₁與R₂為取代基代表CYP的紅色與藍色部分結構（圖三十一）。鹽酸提供了質子給CYP，而質子會因電子密度與碳氧雙鍵的氧原子結合，使氧原子缺電子。因在水溶液中，水分子會與碳原子結合（結構會相較穩定）使碳氧雙鍵變為單鍵，而缺電子的氧便會獲得電子，但水分子中的氧則變為路易斯酸。單鍵的氧為路易斯鹼會吸引水分子中的氫原子，在氫氧鍵斷掉後電子則會給酸。最後水分子與氫原子結合，碳氧單鍵恢復成雙鍵，連接R₁的氧則會被斷鍵，最後形成R₁OH與R₂COOH和H₃O⁺。

(四) CYP與降解物對酵素之影響

CYP對於身體的負面影響有許多的文獻支持，但因CYP是歸屬於毒性較弱的一類，體內要累積較多的量才會引起不良反應。如果在安全劑量以下CYP與其降解產物是否有不同的影響，因此，進行了四種在體內扮演重要的致病關鍵酵素進行活性測試，期待能在低劑量下影響（抑制）酵素的活性，分別對 α -葡萄糖苷酶、脂質氧化酶、酪氨酸酶及乙醯膽鹼酯酶4種不同的酵素進行測試，發現僅有乙醯膽鹼酯酶會受到CYP與其降解產物的抑制，這初步結果提供了CYP與其降解物似乎對於神經傳導有正向的幫助。

(五) CYP與3-PBC對酵素之影響

在CYP與降解物實驗中發現，在同濃度下CYP之抑制率高於其降解物。但在單獨針對CYP與3-PBC時發現，CYP在IC₅₀下所需濃度為270.78 μM，在同濃度下CYP所抑制率較高，代表CYP之抑制率會高於3-PBC。

(六) CYP 與 3-PBC 之 SH-SY5Y 細胞活性實驗

過去文獻(Martínez, M.-A., 2020)也曾利用 SH-SY5Y MTT 進行實驗，而文獻結果顯示低於 $50 \mu M$ 時對細胞不具有毒性，在 $50 \mu M$ 後則會隨濃度增加而增加毒性。但這次的實驗結果卻與文獻結果有些許差異，同樣使用 SH-SY5Y 細胞在 MTT 細胞存活率的實驗下，大約在高於 $400 \mu M$ 時才使細胞存活率降低(對細胞產生毒性)。而 CYP 降解的 3-PBC 迄今文獻所引的結果仍不清楚，但由本研究中其對於 SH-SY5Y 的細胞存活率類似 CYP 結果。

在酵素實驗中，CYP 於較低濃度下即能達到與 3-PBC 相似的抑制率，顯示其對酵素具有較高的抑制率；而在細胞實驗中，各濃度下 CYP 處理後的細胞存活率皆高於 3-PBC，顯示其細胞毒性相對較低。綜合酵素與細胞結果，CYP 在具備較好抑制率的同時，對細胞的影響較小，推測其相較於 3-PBC 具有較低的毒性。

陸、結論

從對 CYP 基本性質的探討到降解物的分析，為了模擬 CYP 在體內的降解物對於健康的影響，我們以致病的幾種關鍵酵素進行探討，目前初步的數據顯示 CYP 與其降解物對於乙醯膽鹼酯酶有抑制的效果，而在細胞實驗的數據中，呈現出與酵素相同的趨勢，結果皆顯示 CYP 毒性較 3-PBC 低，因此推測這對於神經傳導是有益處亦有可能對於失智狀況的人有些幫助。故，後續我們將進一步利用動物實驗探索。

柒、未來展望

(一) 利用斑馬魚做為動物實驗對象，評估 CYP 與 3-PBC 對其發育影響

(二) 測試 DCCA 對 SH-SY5Y 細胞的影響

(三) 實驗 DCCA 對 AChE 酵素的抑制作用

(四) 實驗 CYP 與 3-PBC 之 SH-SY5Y 細胞毒性

捌、參考資料

方麗萍（2021）。回顧台灣農藥市場20年(2000－2020)。中華民國雜草學會會刊，42(1)，1-5。[https://doi.org/10.6274/WSSROC.202106_42 \(1\).0001](https://doi.org/10.6274/WSSROC.202106_42 (1).0001)

王振宇（2023）。農藥賽滅寧對於肥胖小鼠皮膚發炎與免疫細胞之影響。〔碩士論文。臺北醫學大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統<https://hdl.handle.net/11296/3a3tm5>。

Affam, A. C., & Chaudhuri, M. (2013). Degradation of pesticides chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil in aqueous solution by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Environmental Management*, 130, 160 – 165. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.058>

Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S., & Wang, X. (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 116(1), 58 – 66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq120>

Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1987). The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis-and trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Xenobiotica*, 17(10), 1175 – 1193. <https://doi.org/10.3109/00498258709167410>

He, J., Zhang, K., Wang, L., Du, Y., Yang, Y., & Yuan, C. (2022). Highly efficient degradation of cypermethrin by a co-culture of Rhodococcus sp. JQ-L and *Comamonas* sp. A-3. *Frontiers in microbiology*, 13, 1003820. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003820>

Martínez, M.-A., Lopez-Torres, B., Rodríguez, J.-L., Martínez, M., Maximiliano, J.-E., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., & Ares, I. (2020). Toxicologic evidence of

developmental neurotoxicity of Type II pyrethroids cyfluthrin and alpha-cypermethrin in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111173.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111173>

O'Reilly, A. O., Khambay, B. P., Williamson, M. S., Field, L. M., Wallace, B. A., & Davies, T. G. (2006). Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *The Biochemical journal*, 396(2) 255 – 263. <https://doi.org/10.1042/BJ20051925>

Sadtler, V. M., & Berger, R. G. (1988). ¹H and ¹³C NMR spectra of biologically active compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 26(5), 415 – 420. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260260507>

University of Hertfordshire, Agriculture & Environment Research Unit. (2025). Cypermethrin (Ref : OMS 2002). Pesticide Properties DataBase. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/197.htm>

World Health Organization. (1989). Cypermethrin (Environmental Health Criteria No. 82). World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/40017/9241542829-eng.pdf>

【評語】052204

本研究聚焦於賽滅寧 (Cypermethrin) 的降解及其對體內關鍵酵素的影響，這一課題具有重要的環境和健康意義，尤其是在農藥使用普遍的背景下。研究設計涵蓋了從降解機制到酵素活性測試的多個方面，展示了系統性的思考和科學方法的應用。

可以增加更多國際研究的比較，以強調本研究的獨特性和重要性。賽滅寧代謝物對肝臟關鍵酵素活性抑制、體內抗氧化酵素關聯性分已有相關研究報導，本試驗與前人研究成果之創新性，應該再加以說明，以彰顯本研究的重要性。

在進行酵素活性測試時，增加樣本數量將有助於提高結果的統計學意義，增強研究的可靠性。

結果顯示 CYP 毒性較 3-PBC 低，因此推測這對於神經傳導是有益處，亦有可能對於失智狀況的人有些幫助。這段描述應該再加以修飾以確定結論，或是說明需要在未來要加做那些實驗以釐清這個假設。

考慮到賽滅寧的長期暴露風險，未來可進一步研究其在不同劑量和時間下對人體的長期影響。

這項研究在農藥降解及其對健康影響的探索方面展現了良好的潛力，並在實驗設計及結果呈現上達成正面預期。希望未來能在上述方面進一步改善，讓研究成果更加完善。

作品海報

模擬賽滅寧降解物

對體內關鍵酵素之探索

摘要

本研究探討農藥賽滅寧(Cypermethrin, CYP)及其主要降解產物對生物體的影響。CYP為廣泛使用的II型合成除蟲菊精類農藥，可經酸、鹼、微生物、酵素或光降解。已知高劑量的CYP可能會影響健康，且會殘留於毛髮、皮膚及脂肪中且難以代謝。

本研究分別以不同濃度鹽酸模擬CYP在酸性環境的降解，並以質譜儀(Mass)與核磁共振儀(NMR)鑑定降解產物及推測機制。探討CYP及其降解產物3-苯氧基扁桃腈對數種疾病相關酵素的交互作用及活性抑制效果，發現其對乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)有抑制效果，因此進一步利用神經母細胞瘤細胞株(SH-SY5Y)實驗賽滅寧與3-PBC對細胞之毒性。

實驗結果發現CYP經由強酸會降解為兩種主要化合物，並對誘發阿茲海默症的AChE產生抑制作用，在低劑量(200 μ M)下也對神經細胞不具有毒性。因此，本研究目前的初步結果證實CYP及其降解產物3-PBC對體內酵素與細胞在低劑量下不具毒性，卻能增加對乙醯膽鹼的抑制效果，值得進一步找尋CYP類的化合物在神經退化疾病中的應用價值。

壹、研究動機

近年來，農藥的用量逐年增加，也帶出許多健康議題，而賽滅寧(Cypermethrin, CYP)作為廣泛使用的II型合成除蟲菊精類農藥，常應用於瓜果、葉菜、稻米等作物。若農藥殘留未清除乾淨，可能隨食物進入人體，並累積於脂肪、皮膚、毛髮中，且不易代謝。文獻顯示，高劑量CYP會影響神經與內分泌系統，因此其降解機制與降解產物對生物體的影響值得深入探討，本研究希望藉由數種疾病相關酵素與細胞研究CYP及其降解物對酵素的抑制作用與細胞毒性，藉此找出CYP可能帶來的正面影響。

目前CYP的研究多聚焦於其毒性與降解途徑，但對其降解產物應用的研究仍有限。已知CYP在環境或生物體內可經酸、鹼、光、酵素或微生物降解，主要產物包括3-苯氧基扁桃腈(3-Phenoxybenzaldehyde Cyanohydrin, 3-PBC)及二氯菊酸(3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid, DCCA)。然而，關於3-PBC的毒性與生物活性目前幾乎無相關文獻報導，因此本研究希望進一步探討3-PBC之生物活性，並了解對生物體帶來的潛在影響。

表一、20年內殺蟲劑銷售量與價格變化

年份	2000	2005	2010	2015	2020
殺蟲劑銷售數量(公噸)	15,248	16,287	15,645	16,170	16,464
殺蟲劑銷售金額(百萬)	2,283	2,195	3,059	3,398	3,936

表二、四種疾病相關酵素之介紹

酵素	作用	相關疾病
乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase)	分解神經傳導物質乙醯膽鹼(Ach)成乙酸與膽鹼，降低 Ach 濃度，導致記憶力與認知功能退化，進而誘發失智。	阿茲海默症
α -葡萄糖苷酶(α -Glucosidase)	將寡糖與雙醣分解為葡萄糖，促進腸道吸收。若活性過高會導致血糖快速上升，從而造成糖尿病。	糖尿病、龐貝氏症
酪胺酸酶(Tyrosinase)	負責催化酪胺酸(Tyrosine)轉化成多巴(Dopa)，進而生成黑色素。	黑色素瘤
脂質氧化酶(Lipoxygenase)	催化不飽和脂肪酸氧化，造成動脈硬化，並引發心血管疾病與慢性發炎。	心血管疾病

貳、研究目的

- 一、使用NMR與Mass檢測CYP與降解物結構並比對文獻
- 二、實驗CYP在不同環境下的降解(酸、鹼、照光、加熱、胃蛋白酶)
- 三、探討CYP之降解產物與途徑

- (一) 使用NMR、Mass檢測降解物並比對文獻
- (二) 透過電子轉移推測賽滅寧降解途徑

四、比較不同濃度CYP及其降解物對數種疾病

相關酵素之抑制作用

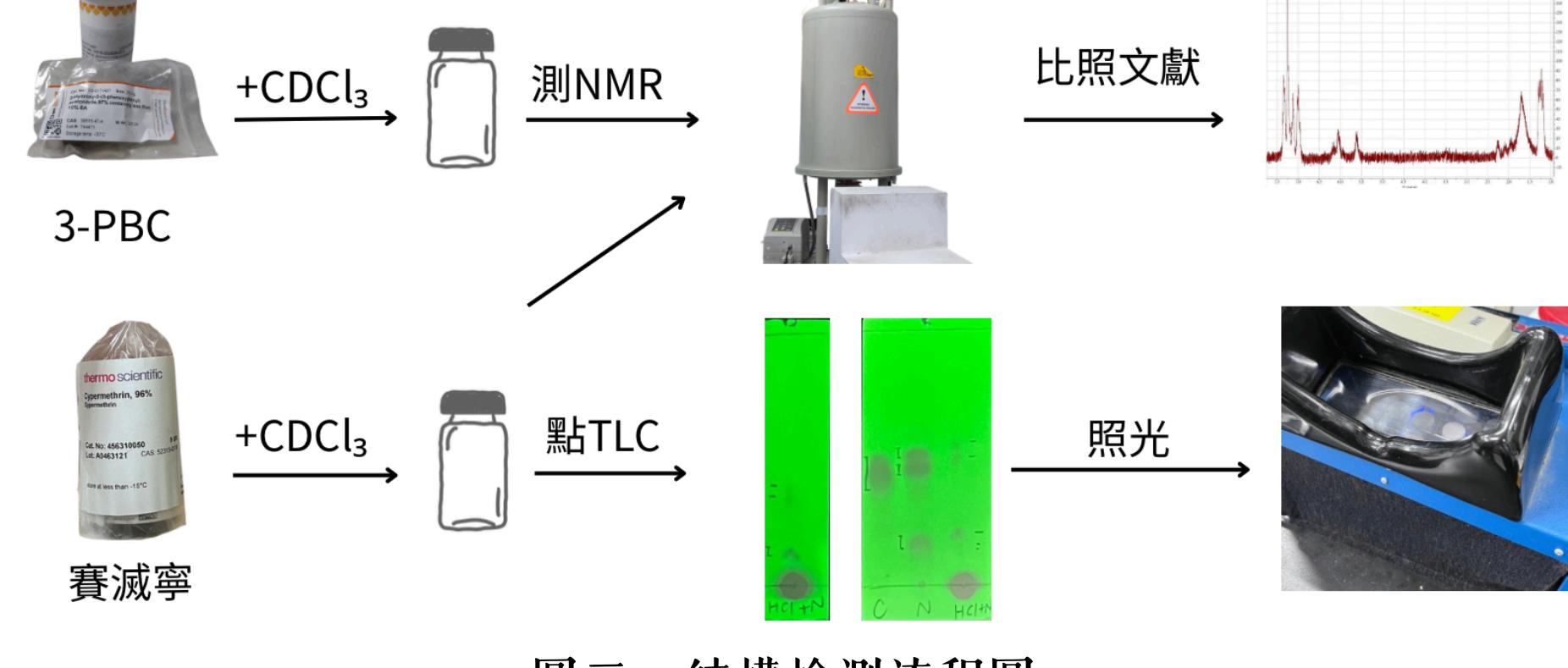
- (一) 乙醯膽鹼酯酶(AChE)
- (二) 酪胺酸酶(Tyr)
- (三) 脂質氧化酶(Lox)
- (四) α -葡萄糖苷酶(α -Glu)

五、實驗CYP及3-PBC對SH-SY5Y細胞之毒性(MTT分析法)

六、實驗CYP及3-PBC對SH-SY5Y細胞之毒性(CCK-8分析法)

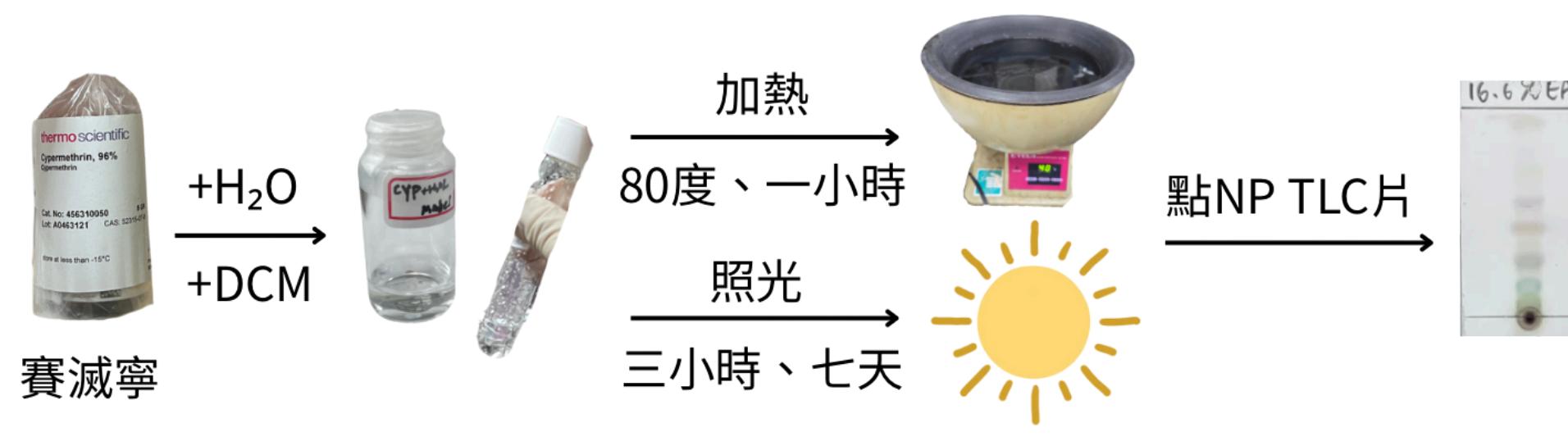
參、研究方法

一、CYP與3-PBC結構檢測



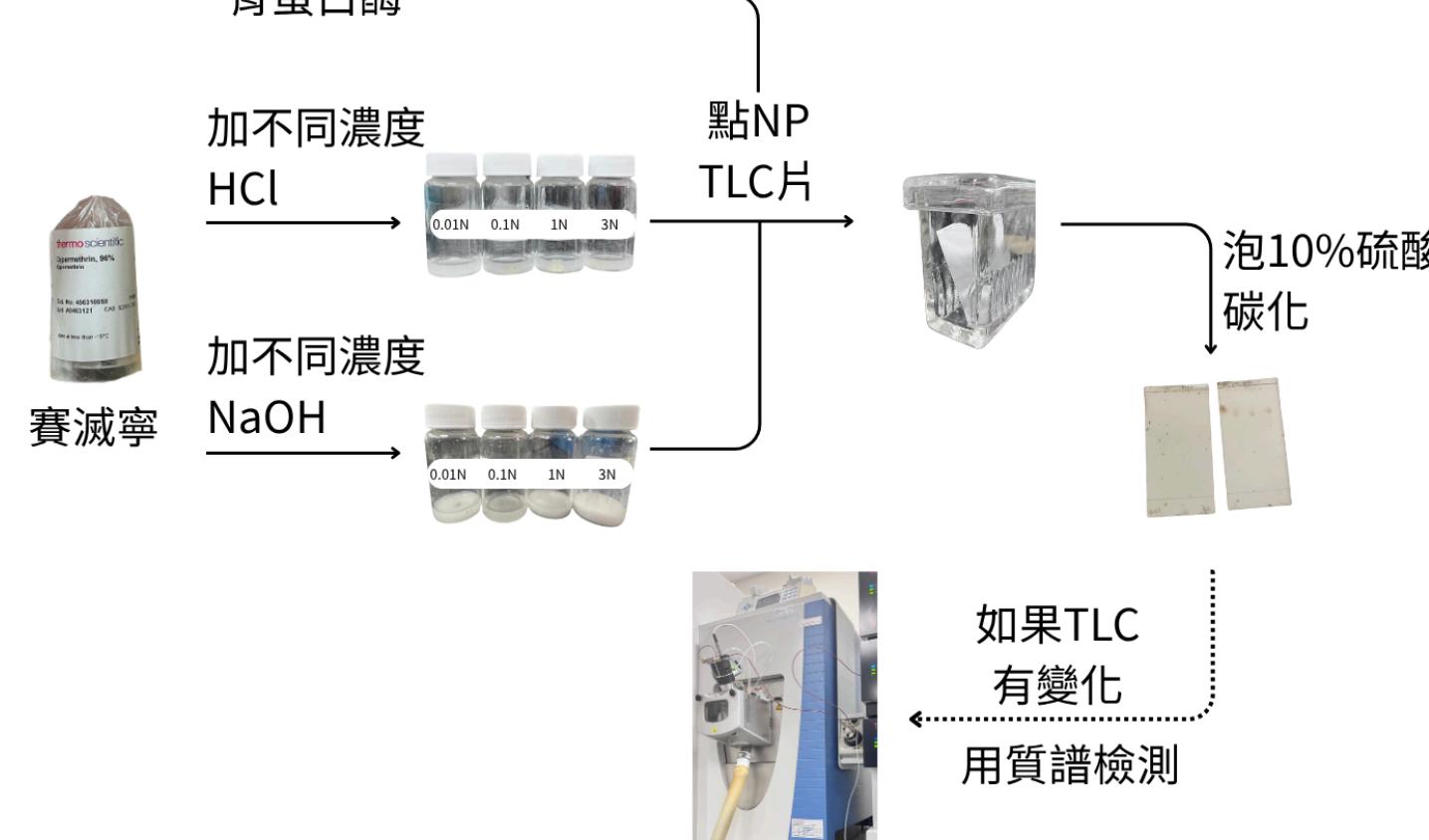
圖二、結構檢測流程圖

二、照光與加熱降解檢測



圖三、照光、加熱降解流程圖

三、酸、鹼、胃蛋白酶環境降解檢測



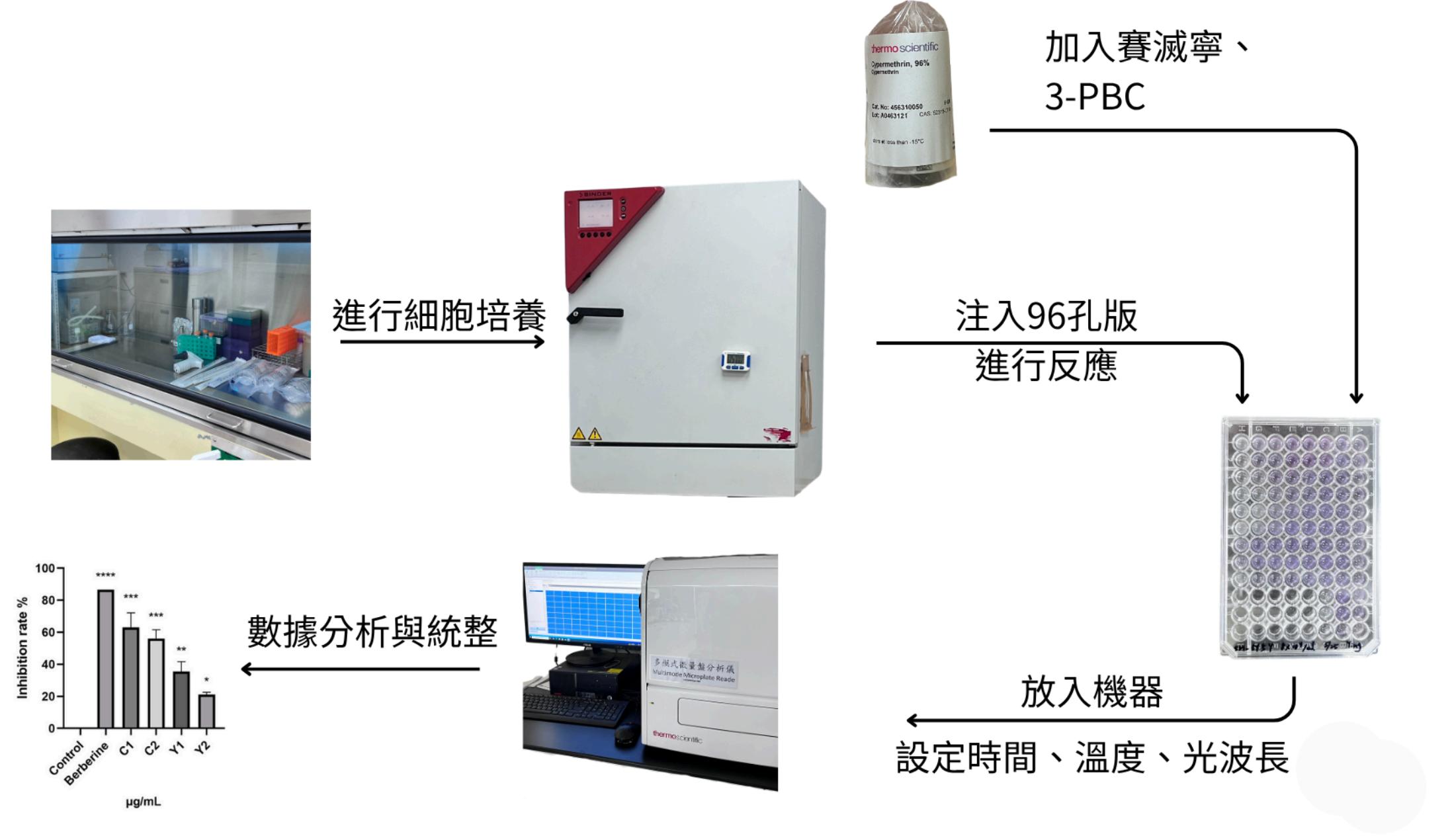
圖四、酸/鹼降解流程圖

四、CYP與3-PBC對AChE之抑制作用檢測



圖五、CYP與3-PBC酵素抑制實驗流程圖

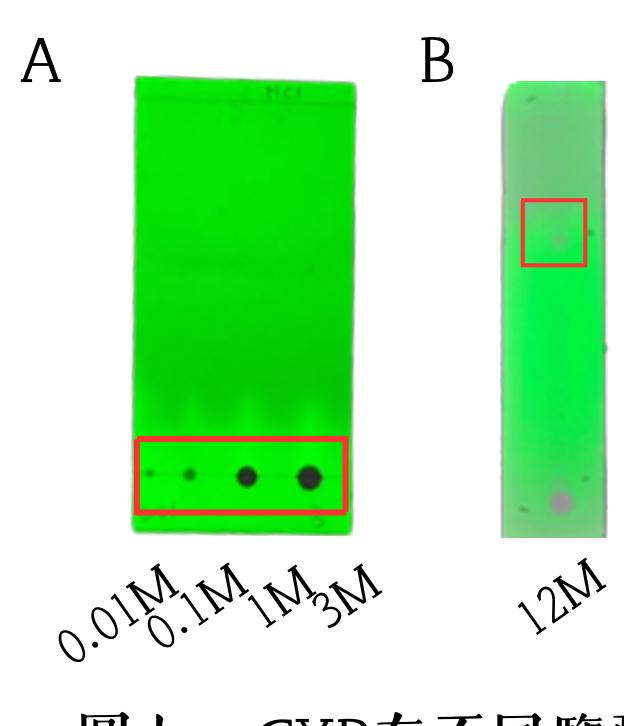
五、CYP與3-PBC對SH-SY5Y細胞之毒性檢測



圖六、CYP與3-PBC細胞毒性實驗流程圖

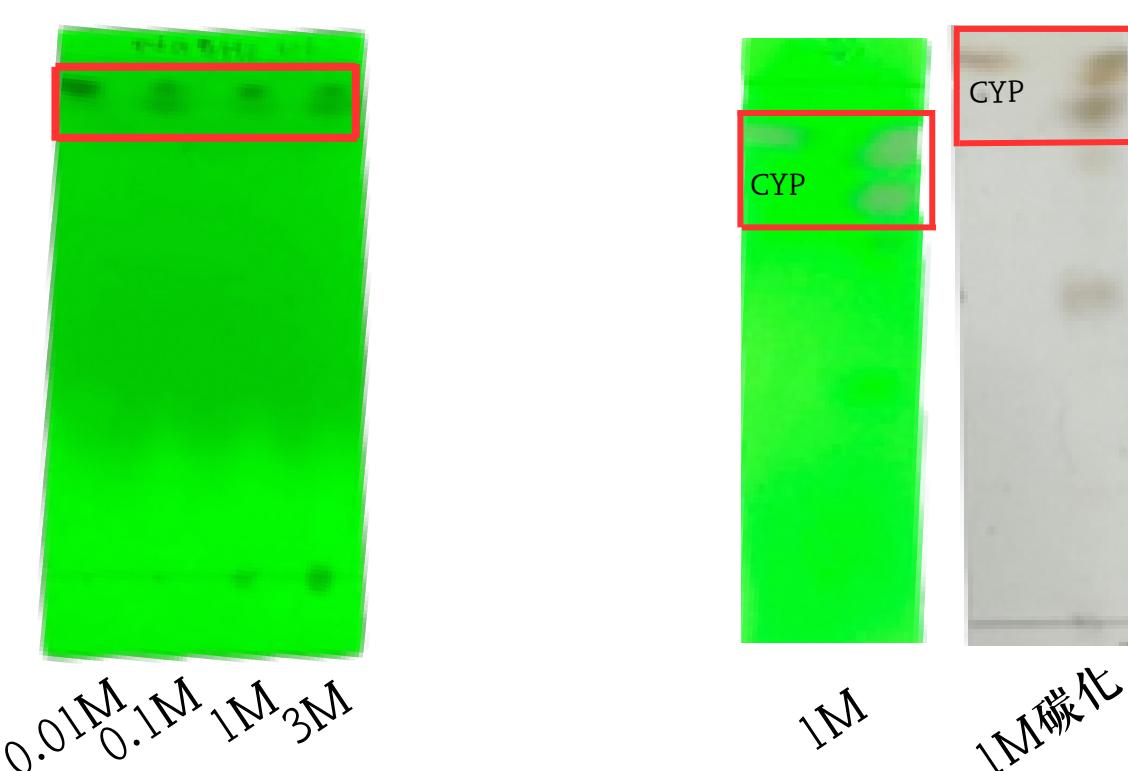
肆、研究結果

一、酸性、鹼性環境降解實驗

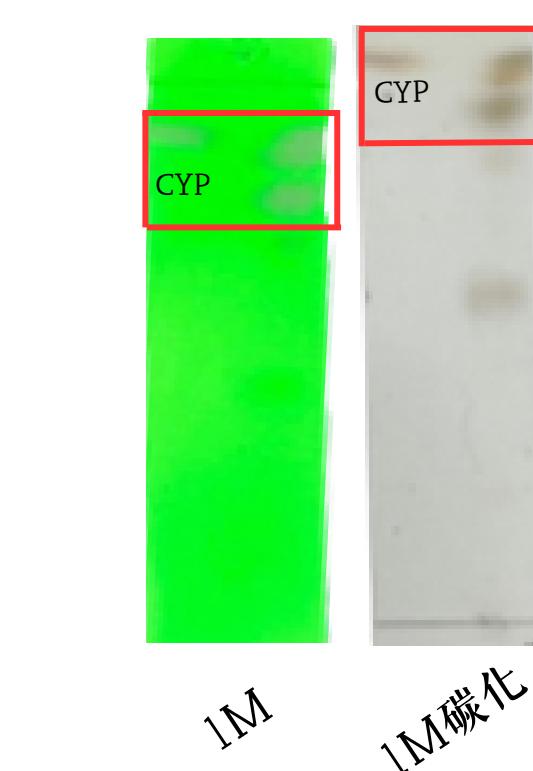


圖七、CYP在不同鹽酸濃度下的TLC片移動

(A)降低HCl濃度至0.01M~3M測試，但TLC片顯示CYP停留於原點。
(B)加入12M鹽酸在CYP中，在TLC上顯示CYP有移動 (CYP被降解)。



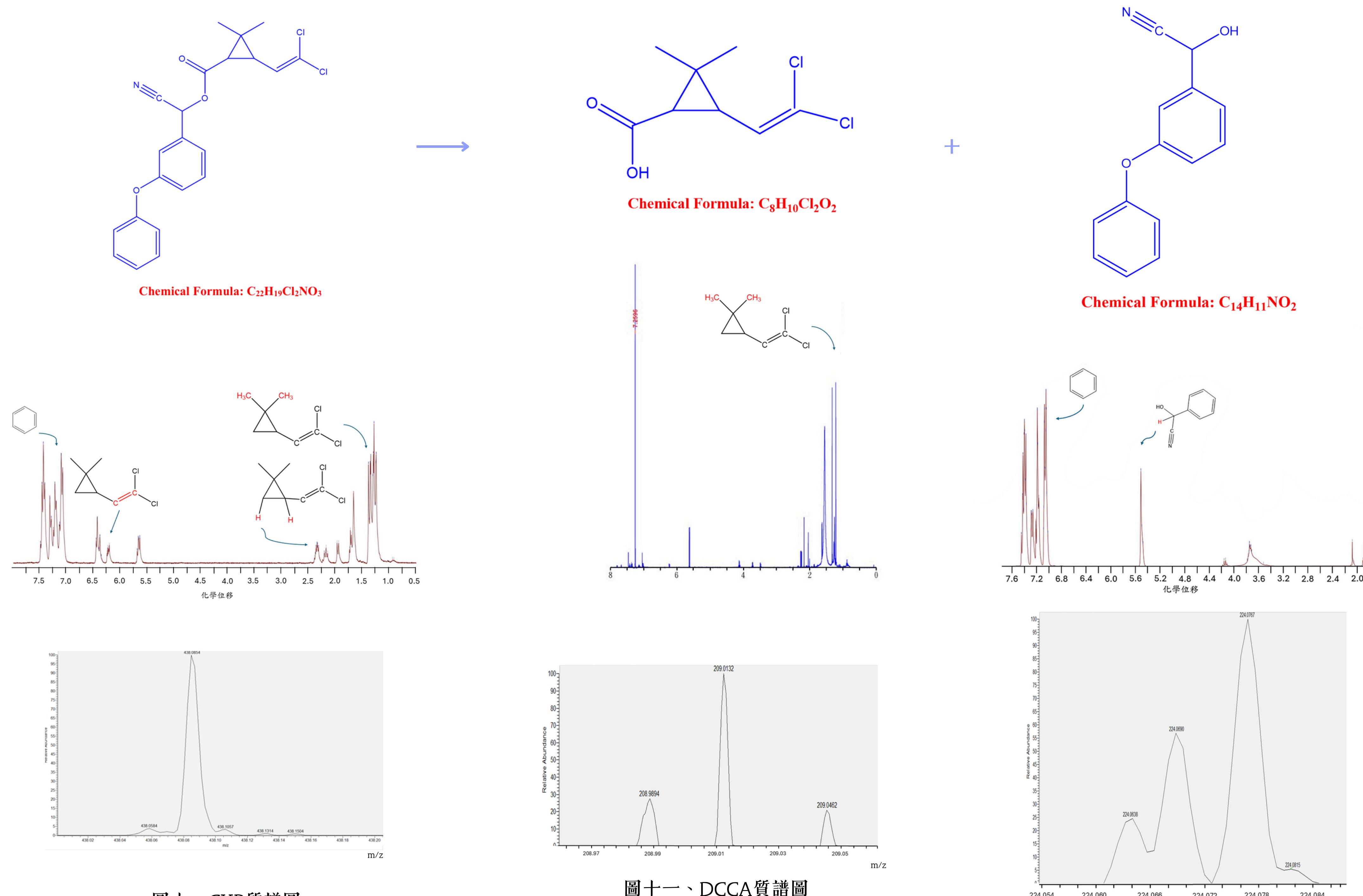
圖八、CYP在不同濃度氫氧化鈉下的TLC片移動



圖九、CYP在1M氫氧化鈉下的TLC片移動與碳化

在鹼性環境下無論是0.01M或是3M濃度皆可使CYP被降解。

二、CYP與降解物結構檢測



圖十、CYP質譜圖

圖十一、DCCA質譜圖

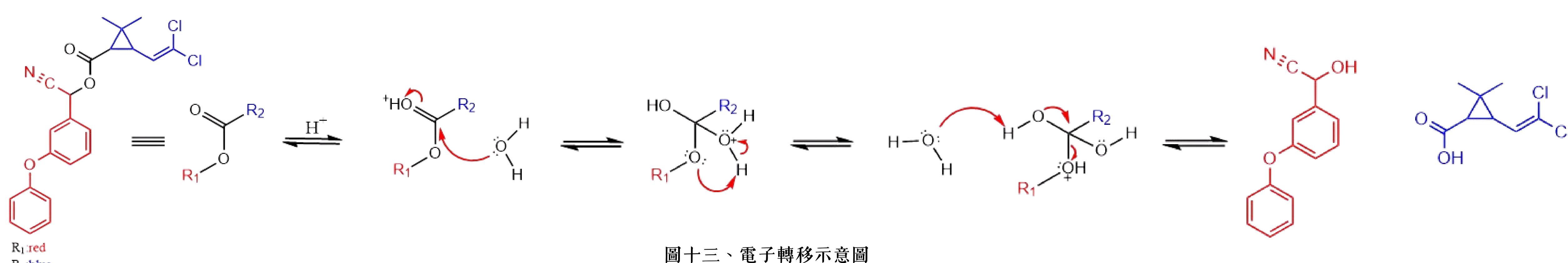
圖十二、3-PBC質譜圖

(一)根據賽滅寧之結構式特性苯環結構較為穩定，不容易在苯環分解，因此推測會在酯鍵的位置降解成兩種化合物。

(二)使用Mass證實CYP降解物：

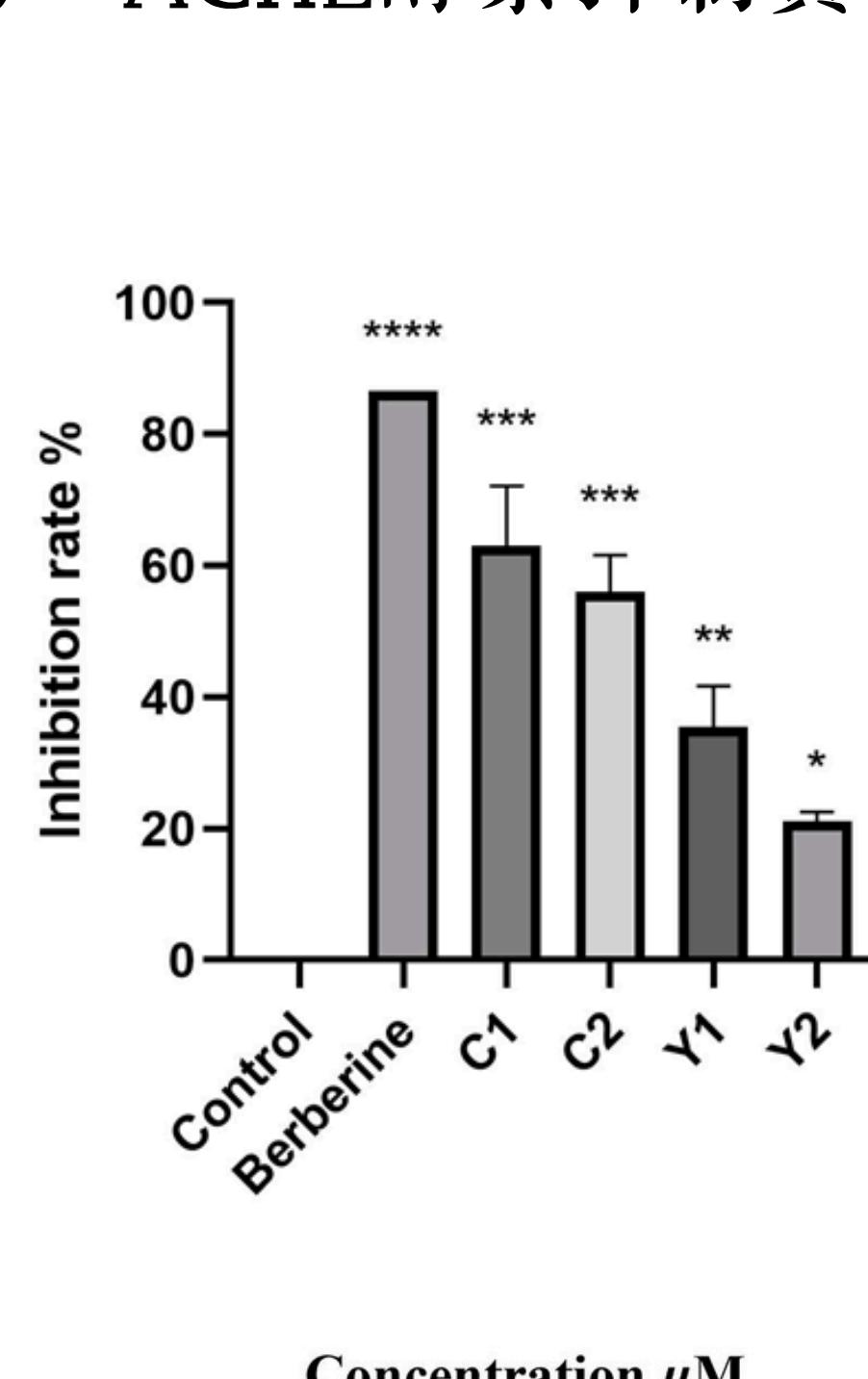
- 3-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin(3-PBC)
- 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid(DCCA)

三、酸性環境下降解途徑

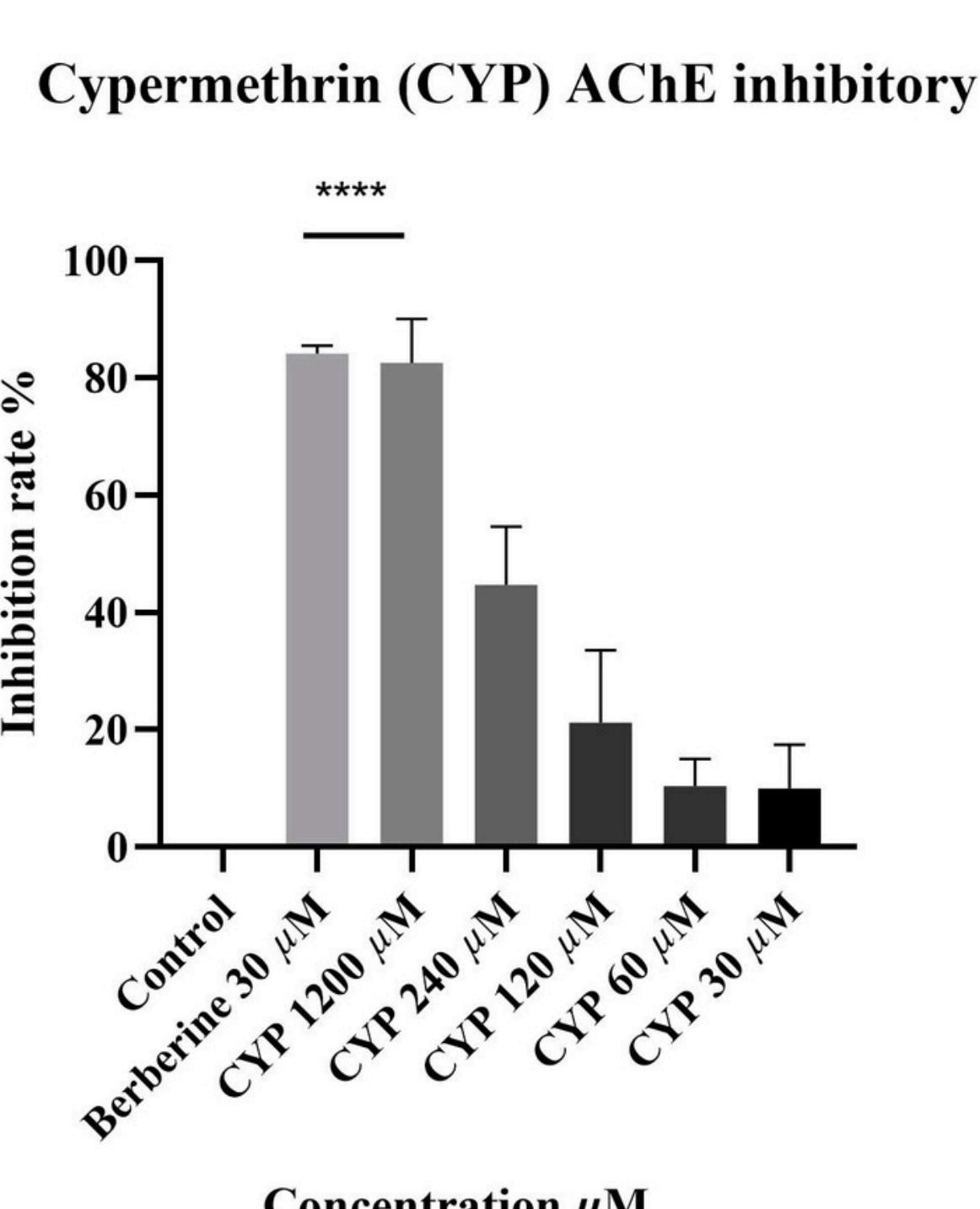


圖十三、電子轉移示意圖

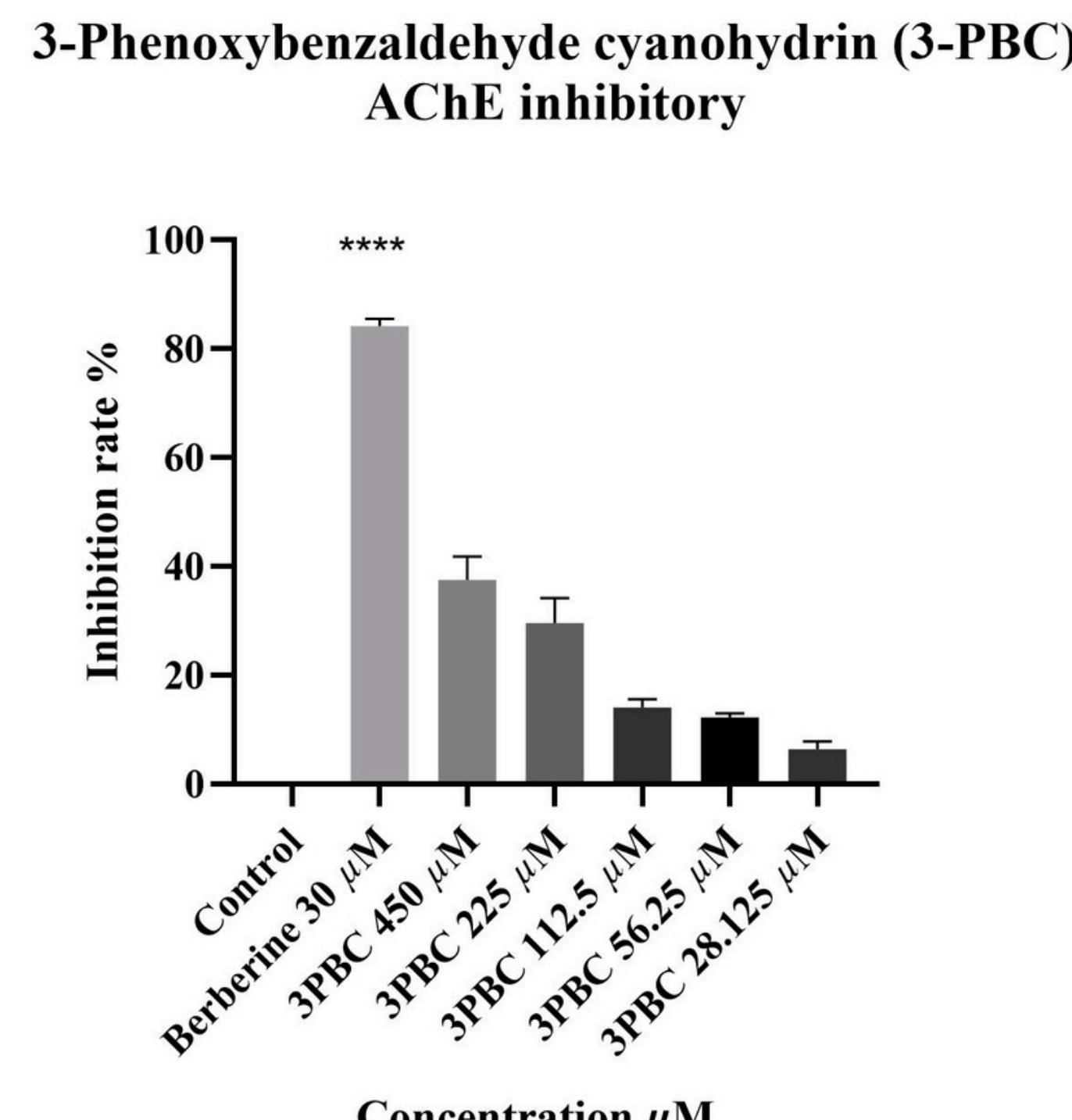
四、AChE酵素抑制實驗



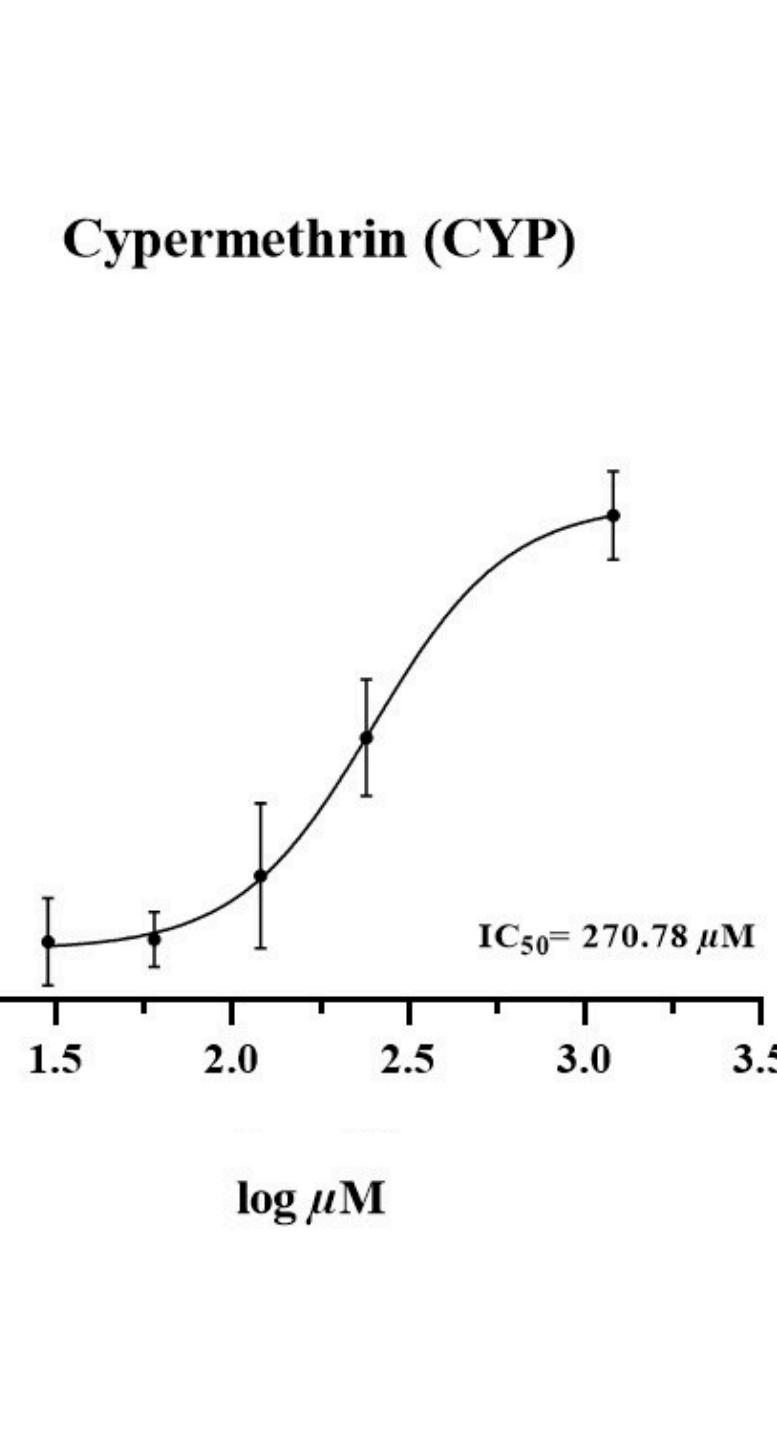
圖十四、賽滅寧與降解物AChE抑制百分率



圖十五、賽滅寧對AChE抑制百分率



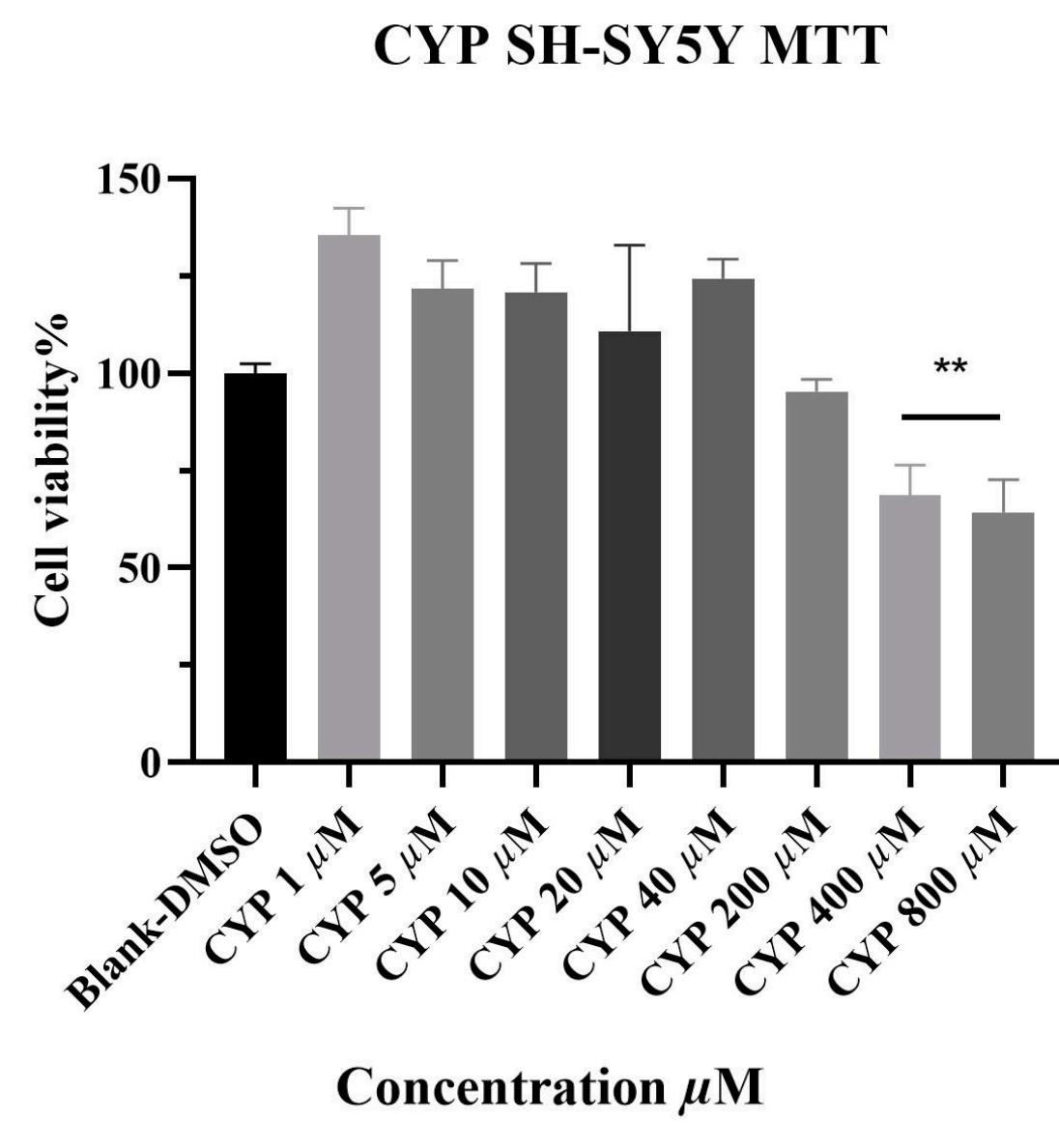
圖十六、3-PBC對AChE抑制百分率



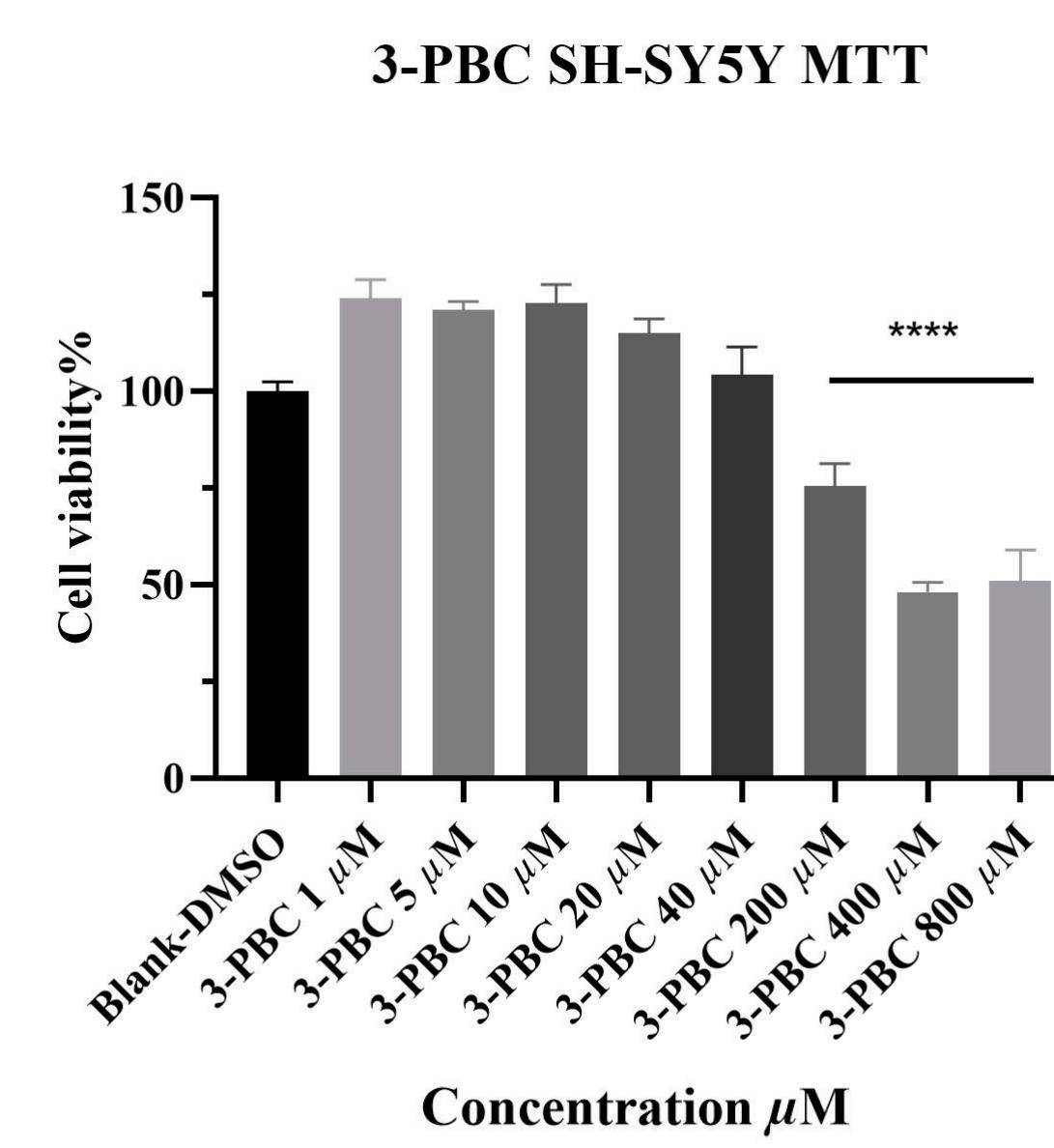
圖十七、賽滅寧IC50推測圖

- (一)不同濃度賽滅寧(C1: 1920 μ M、C2: 192 μ M)、不同濃度降解物(Y1: 3550 μ M、Y2: 355 μ M)。
- (二)賽滅寧與3-PBC隨著濃度增加有顯著的抑制效果。
- (三)根據數據推算出賽滅寧IC₅₀約為270.78 μ M，而3-PBC則是大於450 μ M。在同抑制率下賽滅寧所需濃度較低，代表抑制效果較好。
- (四)統計偏差值： $^*p < 0.05$ ， $^{**}p < 0.01$ ， $^{***}p < 0.001$ ， $^{****}p < 0.0001$

五、SH-SY5Y細胞毒性實驗(MTT)



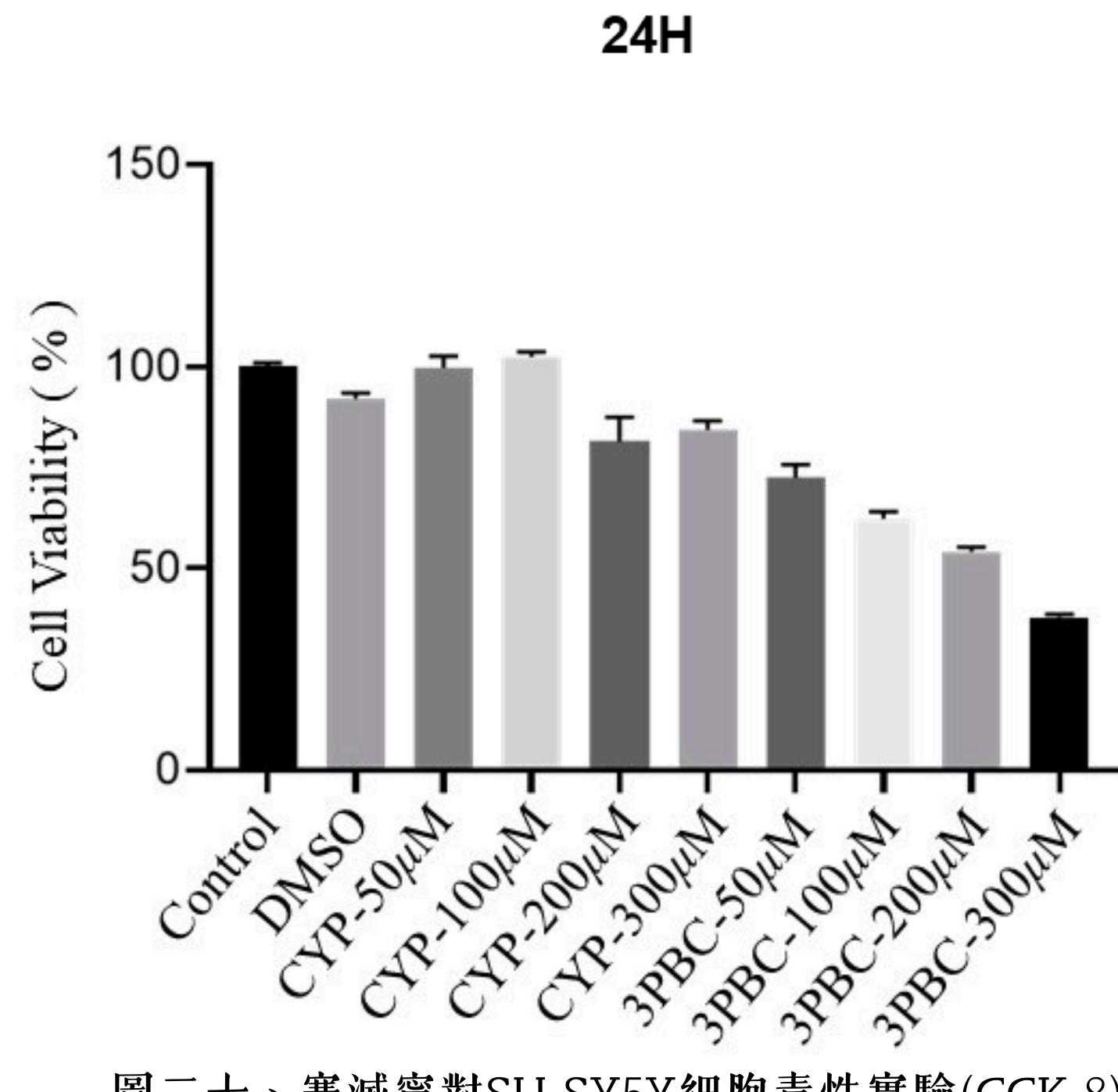
圖十八、賽滅寧對SH-SY5Y細胞毒性實驗(MTT)



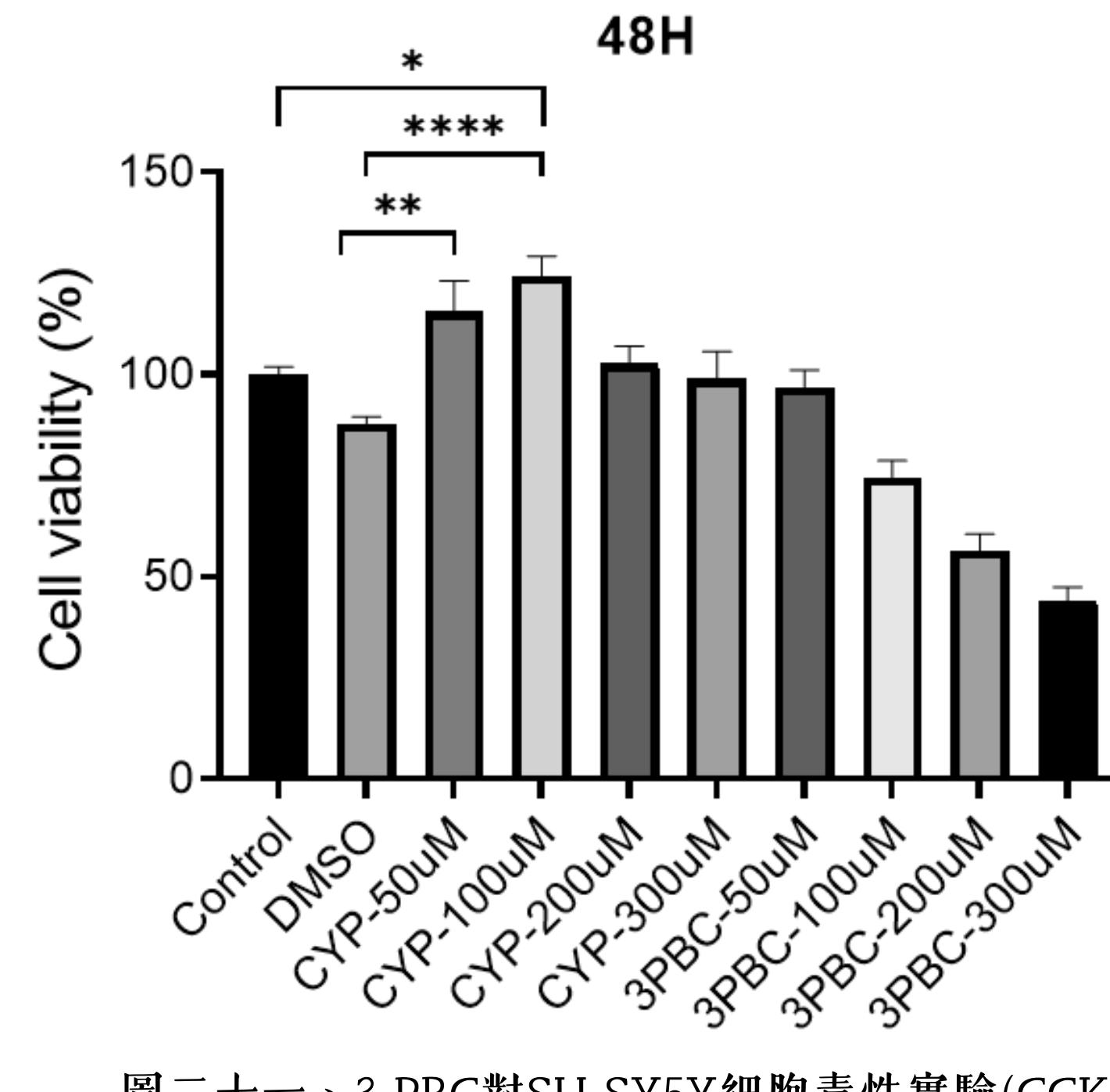
圖十九、3-PBC對SH-SY5Y細胞毒性實驗(MTT)

- (一) 賽滅寧濃度在1-200 μM 時細胞皆大於80%，代表賽滅寧對細胞不具有毒性。在濃度400 μM 時細胞存活率逐漸降低，代表賽滅寧對細胞具有毒性。
- (二) 3-PBC濃度在1-40 μM 時細胞存活率也大於80%，代表對細胞不具有毒性。但當濃度高於200 μM 時細胞存活率已明顯低於80%，代表對細胞具毒性。

六、SH-SY5Y細胞毒性實驗(CCK-8)



圖二十、賽滅寧對SH-SY5Y細胞毒性實驗(CCK-8)



圖二十一、3-PBC對SH-SY5Y細胞毒性實驗(CCK-8)

- (一) 在24H時同濃度之賽滅寧與3-PBC相比，賽滅寧之細胞存活率較高。而在48H時賽滅寧與3-PBC差異更佳顯著，代表賽滅寧對細胞之毒性較3-PBC低。
- (二) 賽滅寧與3-PBC皆部分呈現濃度越高細胞存活率越低的趨勢，代表低劑量下賽滅寧與3-PBC對細胞造成的毒性甚小。

伍、結果與討論

一、CYP環境降解探討

- (一) CYP除了在強酸(12 M)之外，在其他酸性環境中降解相較安定，與文獻所提供的資訊相同。
- (二) CYP在鹼性環境中降解佳，經降解後得到兩個主要的降解產物。

二、經NMR氫譜確認CYP、3-PBC、DCCA之結構，可為其他實驗提供基礎。

三、CYP降解物探討

- (一) 由質譜確認降解物為3-PBC與DCCA，推測是經由酯鍵降解，並透過電子轉移呈現其降解途徑。

四、AChE酵素抑制作用

- (一) CYP與降解物在Tyr、 α -Glu、Lox、AChE四種酵素試驗中，在濃度3,200 μM 時其他酵素則沒有抑制作用只對AChE具抑制效果，與文獻顯示CYP會影響鈉、鈣離子通道，因此推斷其對神經傳導物質抑制酶有影響。

- (二) 在CYP與其降解物3-PBC實驗中，賽滅寧IC₅₀較低於3-PBC的IC₅₀，代表賽滅寧抑制效果較好。

五、SH-SY5Y細胞毒性實驗

- (一) 透過MTT的毒性分析法檢測發現賽滅寧在濃度大於400 μM 時才對細胞產生毒性，代表低劑量下對SH-SY5Y細胞不會有影響。而3-PBC在濃度大於200 μM 時會對細胞產生毒性，相較之下，賽滅寧毒性較3-PBC小。

- (二) CCK-8 毒性分析法與MTT的分析結果一致，再次顯示賽滅寧在低劑量下不會對細胞產生毒性。

六、總結

- (一) 從結果二可得知賽滅寧在酸性環境下(包括pH 2的胃蛋白酶)降解不佳，代表賽滅寧在酸性下不易被降解成3-PBC與DCCA，而結果四與五可得知賽滅寧毒性低於3-PBC，代表若賽滅寧進入體內所產生的毒性相對較低，未來應用層面也較廣。

- (二) 結果四、五顯示低劑量賽滅寧能抑制AChE，同時低劑量的CYP及3-PBC都呈現對細胞的毒性小。而濃度越高時，毒性越大，代表低劑量賽滅寧對神經傳遞或許有益處，這也與過去人們認為農藥一定對人體有害的想法不同，增加了更多賽滅寧對人體有正向影響的可能。

陸、未來展望

一、實驗賽滅寧另一降解物DCCA對AChE酵素的抑制作用與SH-SY5Y細胞毒性。

二、進一步使用斑馬魚實驗賽滅寧與其降解物DCCA與3-PBC對斑馬魚發育影響。

三、進一步使用基因改造阿茲海默症之SH-SY5Y細胞進行活性實驗。

柒、參考資料

- 方麗萍(2021)。回顧台灣農藥市場20年(2000~2020)。中華民國雜草學會會刊，42 (1)，1-5。
[https://doi.org/10.6274/WSSROC.202106_42 \(1\).0001](https://doi.org/10.6274/WSSROC.202106_42 (1).0001)
- Sadtler, V. M., & Berger, R. G. (1988). 1H and 13C NMR spectra of biologically active compounds. Magnetic Resonance in Chemistry, 26 (5), 415-420. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260260507>
- 王振宇(2023)。農藥賽滅寧對於肥胖小鼠皮膚發炎與免疫細胞之影響。[碩士論文。臺北醫學大學]臺灣博碩士論文知識加值系統
<https://hdl.handle.net/11296/3a3tm5>
- University of Hertfordshire, Agriculture & Environment Research Unit.(2025). Cypermethrin (Ref : OMS 2002). Pesticide Properties DataBase. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/197.htm>

圖片來源：皆由作者使用Prism GraphPad、Word、Powerpoint、XMind自行繪製。