

## 第三章 研究儀器和藥品



### 3-1 實驗儀器

#### 3-1.1 毛細管電泳儀器

本實驗使用自組的毛細管電泳紫外光吸收儀器，如圖 3-1 所示，紫外光/可見光吸收儀為 Jasco 廠製的 CE-971 UV，電泳時的吸收波長調整為 247 nm。高壓電源供應器為 Gamma 廠製的 Mode RR30-2R，可依實驗需要調整電壓，範圍 $\pm 0\sim 30$  kV。電泳時使用的毛細管為內徑 50  $\mu\text{m}$  的石英熔矽毛細管柱，毛細管外壁塗有一層用來增加強度的聚醯亞胺，偵測時毛細管上要除去一小段聚醯亞胺保護層，形成一個偵測小窗，電泳時毛細管有效長度及全長分別為 77 cm、90 cm，當毛細管內填充緩衝溶液後，將進樣端通高壓電，偵測端接地，即開始進行電泳層析。為了考量實驗時的安全，整個通高壓電的部份，全部都置於透明壓克力製的絕緣箱中。

樣品的進樣方式是利用虹吸注入法，將進樣端抬高，與偵測端相差 50 cm，樣品注入的速度為 1.74 cm/min。電流的測量是在偵測端串聯一個 1 M $\Omega$  的電阻，然後並聯伏特計來測量其電壓，利用歐姆定律換算，當伏特計量得 1 V 時，相當於串聯毛細管的電流大小為 1  $\mu\text{A}$ 。

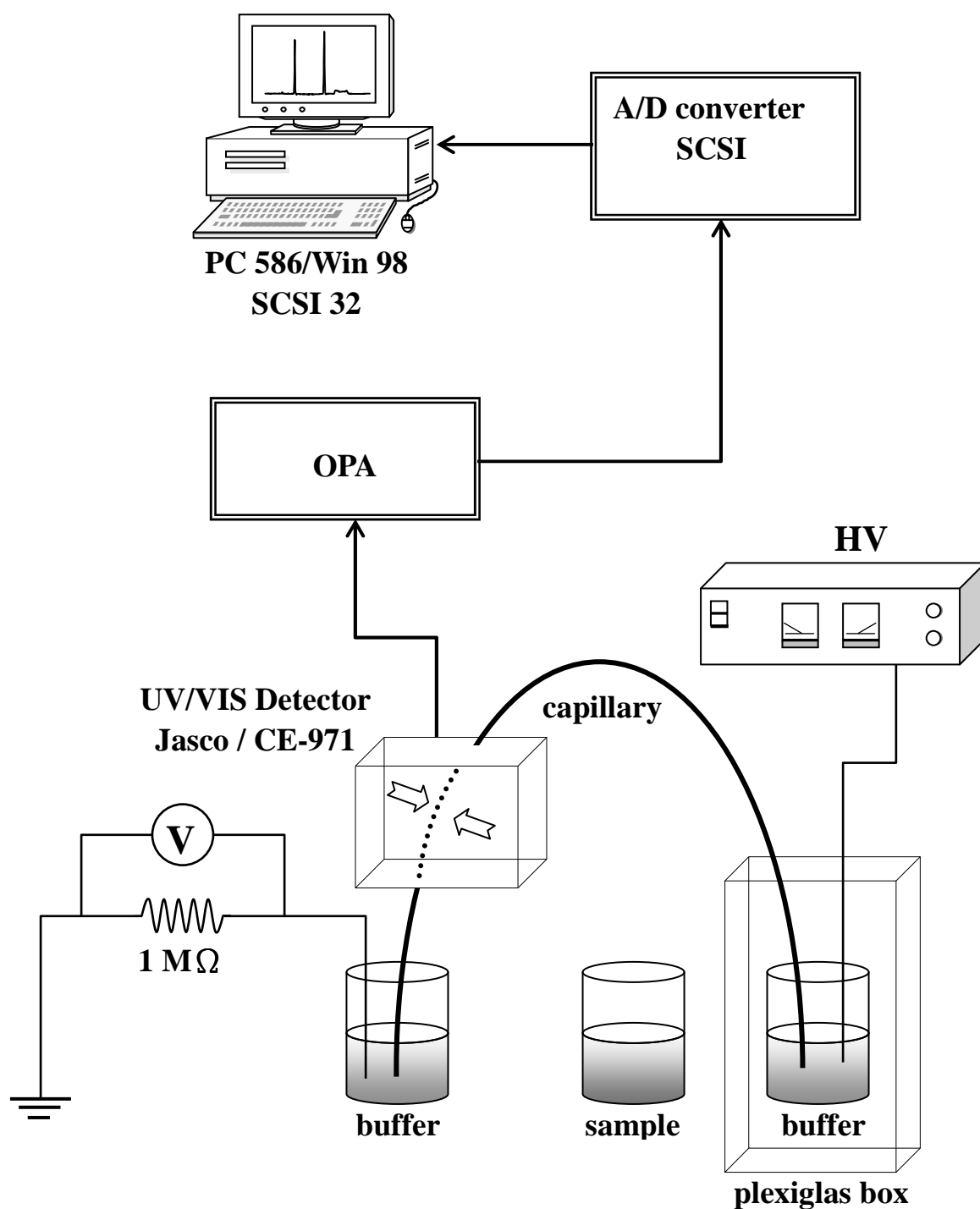


圖 3-1 毛細管電泳紫外光吸收儀器

Fig. 3-1 The instrument of CE-UV

### 3-1.2 訊號放大器

為了增強譜峰的強度，並有效去除雜訊，在紫外光吸收儀器偵器到訊號之後，將光譜訊號送入自組的運算放大器中（operational amplifier, OPA），如圖 3-2 所示，可以增強訊號強度，提升實驗結果的偵測靈敏度。訊號放大的倍率計算如下：

$$\frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}} = \frac{100 \text{ k}\Omega + 100 \Omega}{100 \Omega} = 1001 \text{ 倍}$$

當光譜訊號放大後，再通過類比數位轉換器（A/D）將訊號轉換後，傳入個人電腦，並利用 Advantech VisiDAQ 3.1 軟體進行實驗操作與資料記錄。

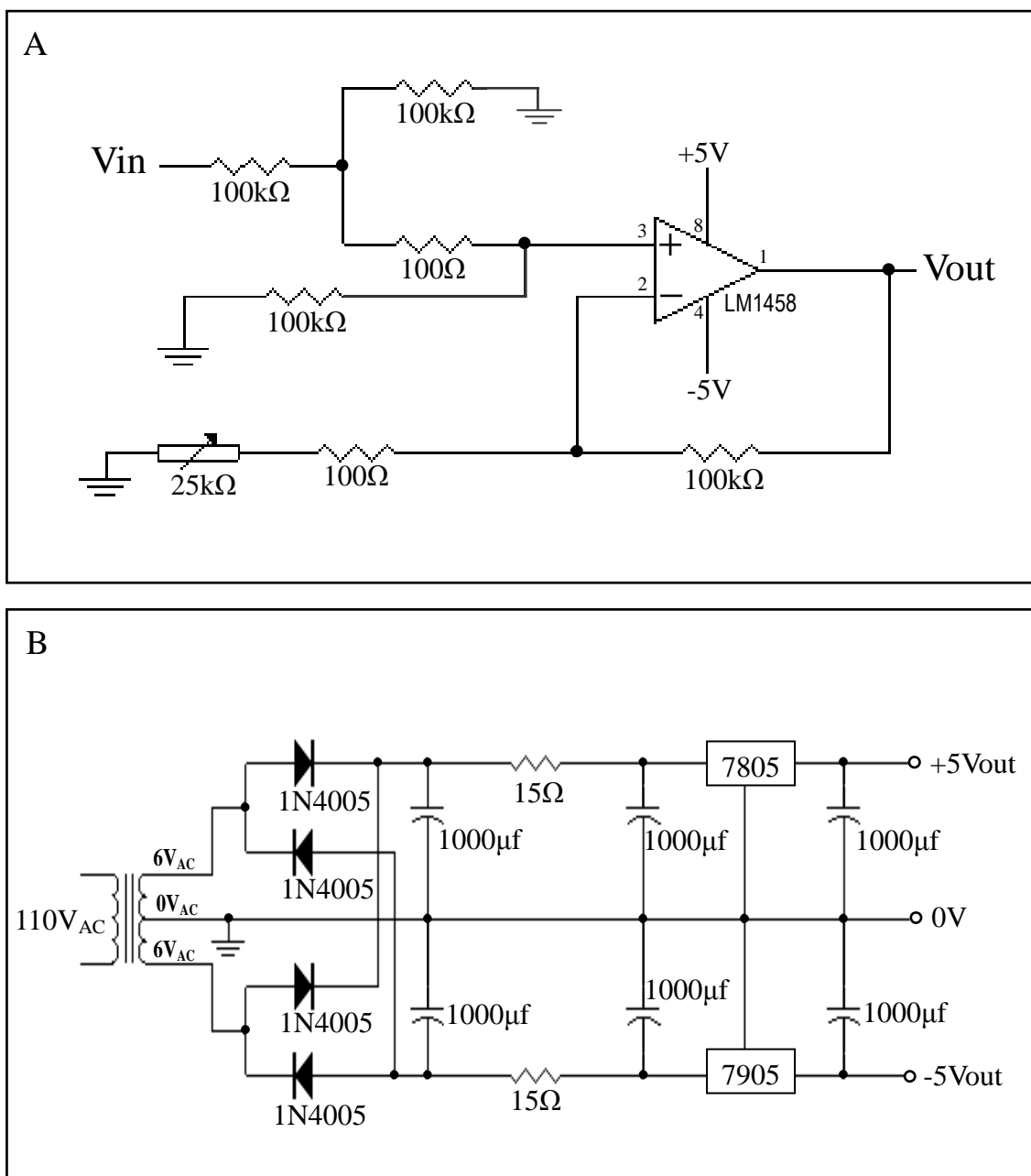


圖 3-2 訊號放大器裝置

Fig. 3-2 The instrument of OPA

(A) 非反向負回授 OPA 的線路

(B) 電源整流變壓器的線路

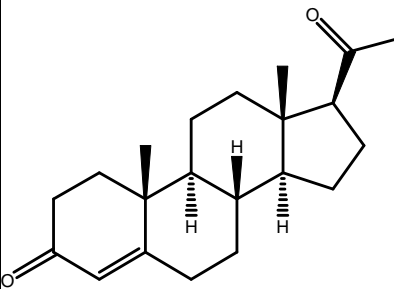
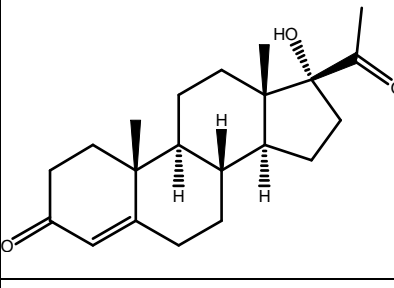
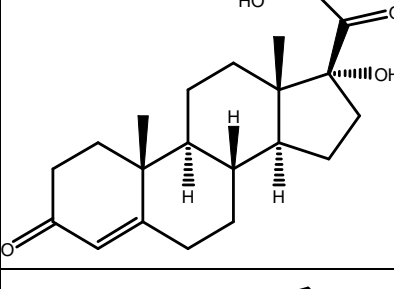
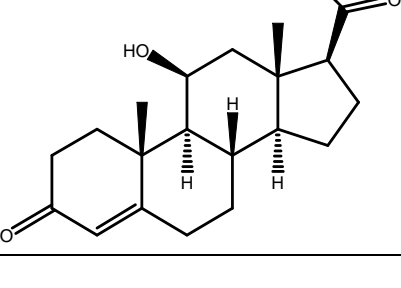
## 3-1.3 儀器及週邊設備列表

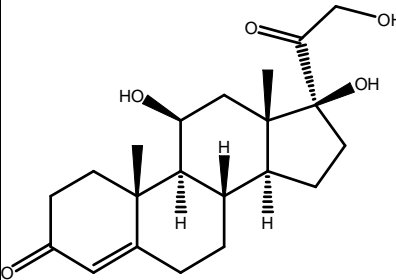
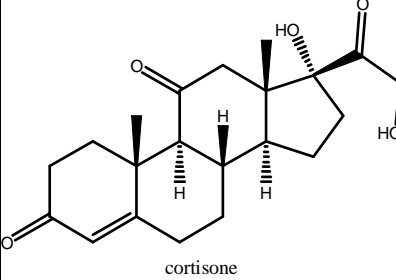
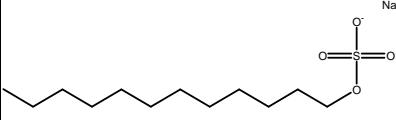
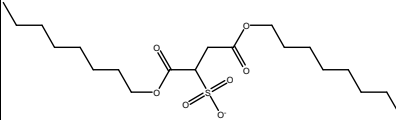
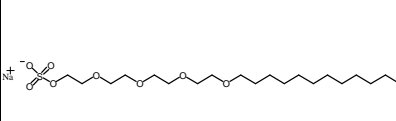
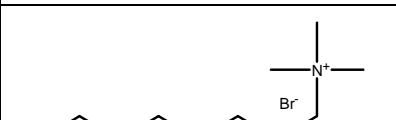
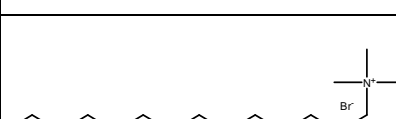
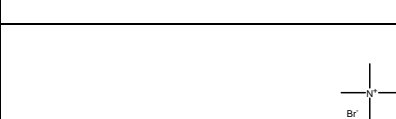
名稱	型號	製造廠商	示意圖或規格
高壓直流 電源供應器	Model RR30-2R	Gamma, FL, USA	$\pm 0-30$ kV, 0-2 mA, reversible
UV/VIS detector	CE-971	Jasco, Japan	wavelength : 190-700 nm
毛細管柱	FS, Undeactivated 160-2650 (2644)	J&W Scientific, CA, USA	I.D. 50 $\mu\text{m}$ . OD 360 $\mu\text{m}$ .
pH meter	PHM201	RADIOMETER COPENHAGEN	玻璃電極
conductivity meter	LF320	WTW, Weilheim, Germany	1.2 V/700 mAh
A/D converter	SCSI	訊華	-----
訊號放大器	自組	-----	
真空幫浦	G-50D	台灣日真	抽氣速度 60 L/min 到達壓力 $10^{-3}$ Torr
加熱攪拌器	SP46925	CIMAREC™	18×18 cm
震盪器	MS1 Minishaker	IKA	200-2500 /min

高速離心機	Micro Centrifuge SD mode	Serial no : 026702	speed : 6000 rpm/min /1.5 ml
超音波 洗淨器	DG-1	MINI	100/110 V 50 W, 50/60 Hz operating frequency 43 kHz
微量天平	ER-120A	AND	max : 120 g d=0.1 mg
微量吸量管	research micropipet	Eppendorf	1000-100 $\mu$ l 100-10 $\mu$ l 10-0.5 $\mu$ l
資料處理 系統	SCSI 32	訊華	-----
PC	自組	-----	586 電腦/Windows 98

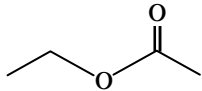
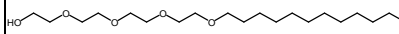
### 3-2 實驗藥品

#### 3-2.1 藥品列表

類別	藥名	廠商	化學式	結構式
分析物	progesterone	Sigma	$C_{21}H_{30}O_4$ (FW 346.5)	
	17-OH progesterone	Sigma	$C_{21}H_{30}O_4$ (FW 346.5)	
	11-deoxycortisol	Sigma	$C_{21}H_{30}O_4$ (FW 346.5)	
	corticosterone	Sigma	$C_{21}H_{30}O_4$ (FW 346.5)	

	17-Hydroxy corticosterone (Cortisol ; Hydrocortisone)	Sigma	$C_{21}H_{30}O_4$ (FW 346.5)	
	cortisone	Sigma	$C_{21}H_{30}O_5$ (FW 362.5)	 cortisone
界面活性劑	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Acros	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	
	Diocetyl sulfosuccinate sodium salt (DOSS)	Acros	$C_{20}H_{37}O_7SNa$	
	Laury Poly (oxyethylene) sulfate (Brij S)	----	$C_{20}H_{41}O_8SNa$	
	Trimethyloctylammonium bromide (OTAB)	Fluka	$C_{11}H_{26}BrN$	
	Tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB)	Acros	$C_{17}H_{38}BrN$	
	Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	Acros	$C_{19}H_{42}BrN$	



其他試藥	Phosphoric Acid	J.T.Baker	$H_3PO_4$	$\begin{array}{c} OH \\   \\ HO-P-OH \\    \\ O \end{array}$
	Trizma hydrochloride (Tris-HCl)	Sigma	$C_4H_{11}NO_3$	-----
	Methyl alcohol (99.9 %)	Acros	$CH_3OH$	-----
	Acetonitrile (ACN)	Acros	$C_2H_3N$	-----
	Ethyl alcohol (99.8 %)	Riedel- deHaen	$C_2H_5OH$	-----
	Ethyl acetate (99.5 %)	Acros	$CH_3COOC_2H_5$	
	Chlorosulfonic acid	Fluka	$H_2SO_3Cl$	$\begin{array}{c} OH \\   \\ O=S=O \\   \\ Cl \end{array}$
	Sodium hydroxide	J.T.Baker	$NaOH$	-----
	tetraethylene glycol dodecyl ether (Brij 30)	Acros	$C_{20}H_{42}O_5$	

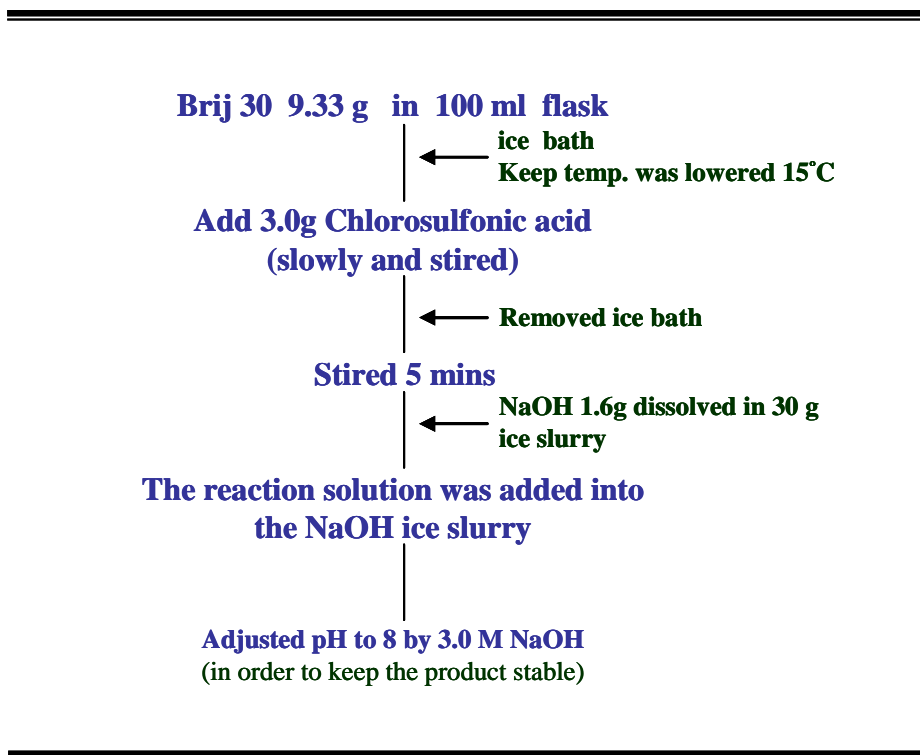


圖 3-3 Brij-S 的合成[75]

Fig. 3-3 Synthesis of Brij-S

### 3-2.2 藥品性質介紹

#### (一) Progesterone (4-pregnene-3,20-dione)

由卵巢黃體或胎盤所分泌，作用於子宮內膜，可用來追溯孕婦懷孕初期是否穩定，若血中濃度過低，可能造成流產；未懷孕婦女可用來評估排卵與否。

#### (二) 17-OH progesterone (17 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnene-3,20-dione)

可診斷先天性腎上腺皮質增生症，也可用來評估女性不孕症和多毛症。

#### (三) 11-deoxycortisol (17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione)

可用來檢測腎上腺皮質增生。

#### (四) Corticosterone (4-pregnene-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dione)

稱為『皮質固酮』，是 ACTH 刺激腎上腺皮質之後，腎上腺皮質分泌出的類固醇。其作用是影響蛋白質、脂質及碳水化合物的代謝，並可調節緊張反應，是鳥類及老鼠體內主要的糖皮質類固醇。

#### (五) 17-Hydroxycorticosterone (4-pregnene-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3, 20-dione)

稱為『氫基皮質酮』，是人類腎上腺皮質主要分泌的糖皮質類固醇，可使血糖上昇、有助於控制脂質、蛋白質代謝及調節壓力反應。

#### (六) Cortisone(4-pregnene-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trione)

婦女早期懷孕時，若承受過重大壓力後，會引起胎兒的先天性畸形，可能身體為了應付巨大的壓力，會分泌較多的兒茶酚胺 (Catecholamine)及腎上腺皮質荷爾蒙—Cortisone；前者會引起血

管收縮，導致胎兒缺氧，而後者在動物實驗上已證實會致畸型。

### 3-3 分析物的取得與處理

#### 3-3.1 老鼠血清樣品來源

老鼠血清樣品由輔仁大學生命科學系-周秀慧教授實驗室提供。實驗所使用的老鼠自國家實驗室動物培育中心購得，品種均為同血統的健康雄性老鼠、出生 12~16 週、體重 25~30 克。動物抵達後，會被置於一乾淨的房間內，以人工調控光照週期，因為荷爾蒙會因為光照週期而有所影響，所以控制 am7:00 ~ pm7:00 12 小時為照光時間，溫度 (25°C)、濕度 (60~70 %) 均適度監控，食物和飲水均按時供給與更換。

老鼠分別餵食毒品 2C-C、2C-B、2C-I、2C-T-2、2C-T-7，每隻老鼠餵食毒品劑量示體重而調整 (10 mg/kg body wt)，另外控制組餵食磷酸鹽溶液 (PBS)。

餵食毒品後，老鼠停止食物和水的供應，餵食毒品 2C-C、2C-B、2C-I 之老鼠於餵食兩小時候抽血，餵食毒品 2C-T-2、2C-T-7 之老鼠則分餵食 1 小時候、2 小時候及 6 小時候抽血。每隻 30 克的老鼠約可取得 1 mL 新鮮的心臟血液，置於 1.5 mL 離心管中以 12000 rpm/min 離心 5 分鐘，取出血清保存於 -18°C 直到電泳分析前。

#### 3-3.2 人體尿液樣品來源

尿液樣品由一位女性實驗者取得，沒有特別限制食物及水的條

件，與早上 8:00~9:00 間取尿，並將尿液樣品以 $-18^{\circ}\text{C}$  冰溫保存。

### 3-3.3 血清及尿液樣品的前處理

血清樣品於電泳實驗前，需先進行液相萃取處理，圖 3-3 為萃取的流程。將血清樣品自冰箱中取出，置於震盪器（1000/min）中混合等待樣品回溫；以甲醇為溶劑配製 150 ppb/MeOH 的 cortisol 溶液，取 30  $\mu\text{L}$  置於樣品瓶中，利用真空幫浦將甲醇完全抽乾，做為分析定量時的內標物；取 30  $\mu\text{L}$  已回溫的血清，置於已備好的內標物樣品瓶中，利用超音波震盪 10 秒，再置於震盪器中搖晃 5 分鐘，使內標物和血清均勻混合；加入 60  $\mu\text{L}$  的乙酸乙酯，再置於震盪器中搖晃 30 分鐘之後，放入高速離心機中（6000 rpm/min）離心 5 分鐘；取出已離心完成的上層液 45  $\mu\text{L}$  置於另一乾淨的樣品瓶中，利用真空幫浦將乙酸乙酯完全抽乾，即可置於  $-18^{\circ}\text{C}$  冰溫保存；要進行電泳時，將萃取完成的樣品加入 20 mM 的磷酸水溶液 45  $\mu\text{L}$ （ $\text{pH}=2.1$  導電度 $=3.5\text{ mS/cm}$ ），置於震盪器中搖晃 5 分鐘備用。

尿液樣品的萃取方法，需將內標物改為 150 ppb/MeOH 的 corticosterone 溶液，其餘步驟和血清樣品均相同。利用此方法萃取分析物時，先加入乙酸乙酯震盪離心後，再將上層液取出，操作時上層液並無法完全吸回，會有部份的損失，且若不慎吸到下層液，易導致進行電泳時發生毛細管阻塞的問題。所以每次實驗大約只能取回 40~45  $\mu\text{L}$  左右的上層液，經計算得萃取回收率分別為：血清 $=78.1\%$ ；尿液 $=64.6\%$ 。

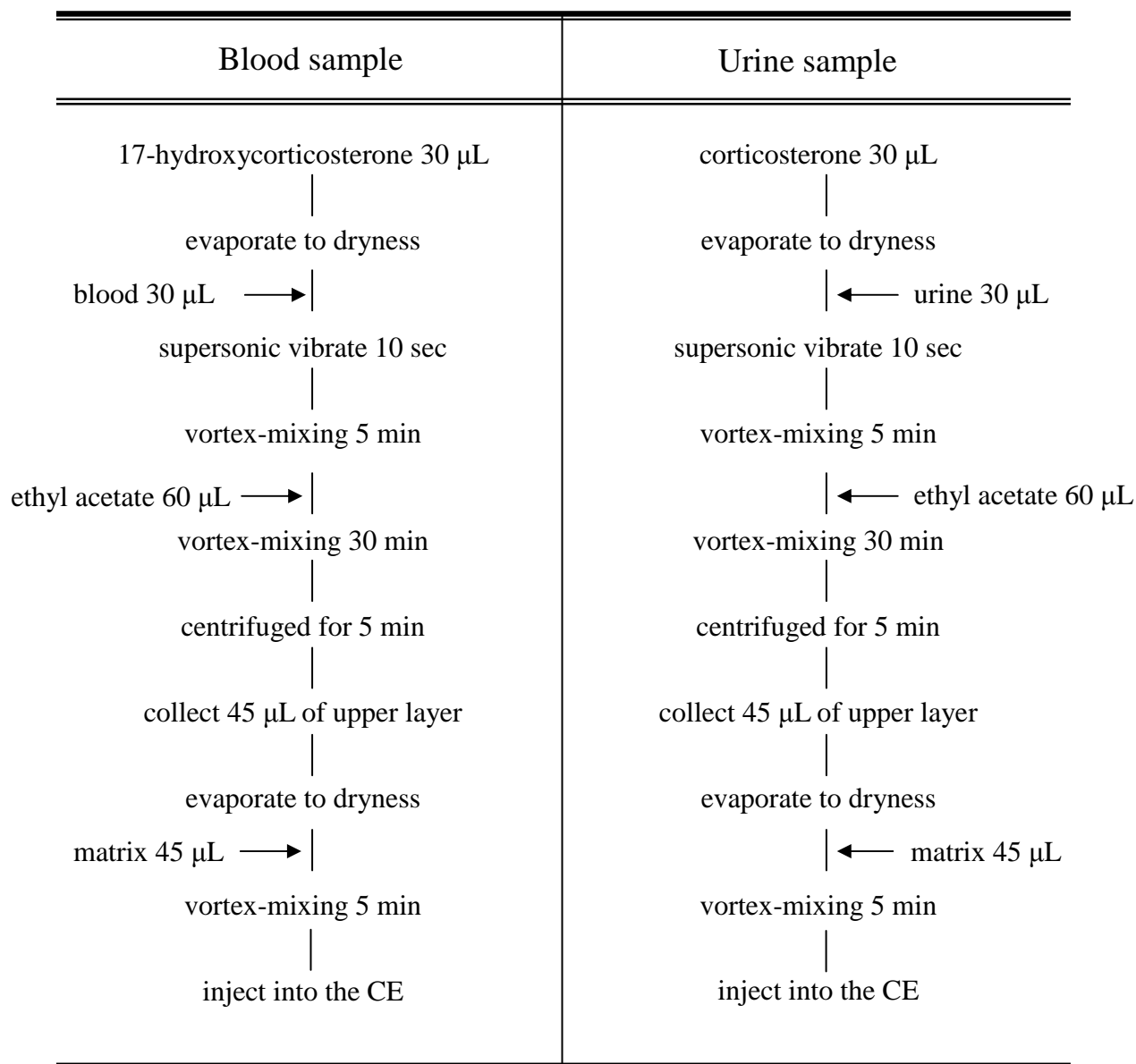


圖 3-4 血清及尿液樣品萃取步驟流程圖

Fig. 3-4 Extraction steps of plasma and urine