嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT 94-08

計畫名稱：使用微晶片電泳與化學冷光偵測系統對類固醇分析之研究

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

□整合型計畫　　■個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：王貞雅

子計畫主持人：

中華民國 95 年 2 月 28 日

摘　要

類固醇與其衍生物主要是作為醫療用途，但近來有越來越多的運動員及青少年，為求增進其運動表現或期望快速具有肌肉發達的體型而濫用類固醇藥物。為防止此問題越來越惡化，除了加強宣導此藥物濫用的副作用之外，亦應建立常規檢測此藥物是否遭濫用的方法。

本計畫希望以聚合材料（poly(dimethylsiloxane) (PDMS)）製作微晶片（Microchip），建立於微晶片上同時進行分離、及以化學冷光測定之類固醇偵測系統，以期發展可應用於臨床上大量篩檢控管此藥物之使用。

關鍵詞：微晶片（Microchip）、類固醇（steroid）、化學冷光（chemiluminescence）、poly(dimethylsiloxane)

簡　介

類固醇（steroid）由睪丸素（testosterone）合成代謝而來，1935 年 testosterone 被分離出來，並發現其會增加特定組織的蛋白質合成。睪丸素與其衍生物初始乃是作為醫療用途，但近來有越來越多的運動員及青少年，為求增進其運動表現或期望快速具有肌肉發達的體型而濫用類固醇藥物。濫用類固醇藥物對男性的影響為使精子數降低、睪丸萎縮、乳房增大；對女性則會使得聲音低沉、體毛增多。許多類固醇藥物已相當容易取得，約有 40 種被奧運會禁用。為防止此問題越來越惡化，除了加強宣導此藥物濫用的副作用之外，亦應建立常規檢測此藥物是否遭濫用的方法。

文獻發表檢測類固醇的方法近來多為免疫分析與質譜法。免疫分析法通常一次只偵測一種結構的分析物，不適用於大規模篩檢的應用【1】；Cheng 等作者篩選了八種不同結構的類固醇單株抗體，於玻片上建立 microarray，同時檢測數十種不同結構的類固醇合成藥物，其偵測機制為競爭型免疫反應【2】。分離偵測系統如 LC/MS 可同時偵測多種不同結構的類固醇藥物，但儀器價格昂貴並且樣

品的前處理頗為耗時【3】；GC/MS 則須將類固醇先行衍生成揮發性較佳的化合物【4】。亦有作者發表先以免疫吸附的方法濃縮廢水中的類固醇，再以 HPLC/MS 對其偵測定量，提高偵測的靈敏度【5】。Liu 等作者則發展了結合毛細管層析分離樣品中之類固醇、以 MS 偵測的模式【6】；至目前為止並無以 microchip 分離測定類固醇的文獻發表。Microchip 所需樣品量少、分析速度快、分離與偵測均在一個小小的晶片上完成，亦可作為一微型的反應器，於近二十年間蓬勃的發展，因此本計畫希望建立以 microchip 分離測定類固醇之偵測系統，應用於臨床上大量篩檢控管此藥物之使用。

至目前為止，最常應用於 Microchip 的偵測裝置為質譜儀與雷射激發螢光法，因此二法具有很高的靈敏度，但所需的儀器昂貴且龐大。Nikolaos 等曾以 cerium(IV)-sulphite reaction 化學冷光系統偵測 cortisone【9】。化學冷光不需激發光源，因此沒有背景光源的干擾，儀器設備需求較簡單，具有良好的靈敏度，化學冷光作為毛細管電泳的偵測方法已有許多成功的例子【10, 11】，因此本計畫以化學冷光反應產生偵測訊號。

研究方法

製作 Microchip 常用的材料有玻璃、矽晶片、石英及一些聚合物材料，其中聚合物材料較便宜、製作方法較具彈性、為一般實驗室較可行的應用材料，本計畫以聚合物材料製作 Microchip，建立分離測定類固醇的微晶片。

1. poly(dimethylsiloxane) (PDMS) chip 製作【7】：Sylgard 184 elastomer 活化後分別倒在兩片模子上，一片有分離的通道樣式、一片為平板，聚合反應十分鐘後，將聚合薄層剝下、小心疊合在一起，95℃下烘五小時。
2. 以流動注入系統探討類固醇之化學冷光反應偵測條件：

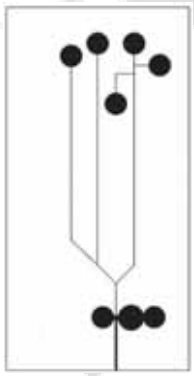
   化學冷光反應：1 mM cerium (IV) solution, 1 mM sulphite solution

   分析物：cortisone, hydrocortisone, dexamethasone

結果與討論

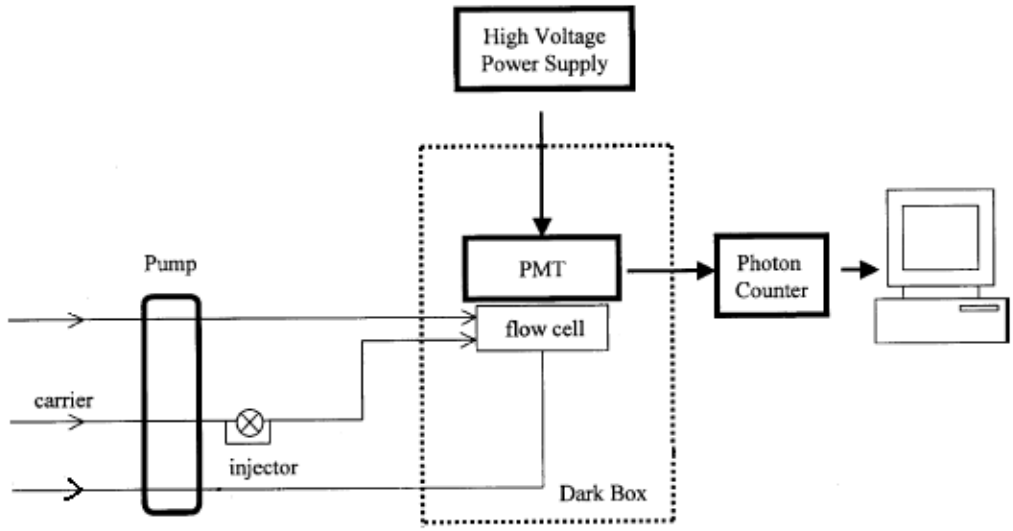
因欲在微晶片上建立 cerium (IV) /sulphite / steroids 化學冷光反應，因此晶片上微流體通道之設計如圖一，有一樣品進入之分離通道，另外二通道為反應試劑匯入之用；化學冷光訊號將於三通道會流處發生並偵測收集。

晶片製作委由成大微奈米中心協助，原擬以光罩讀寫與光蝕刻技術先行在 wafer 上作出微通道模板，但以該中心目前設備欲製成所需線寬遭遇技術上的困難；目前另嘗試以雷射光雕方式製作微通道晶片，並擬以毛細管電泳先行建置分離與偵測系統。



圖一、類固醇化學冷光偵測分析晶片設計

類固醇之化學冷光反應偵測則以流動注入系統先行探討，其系統已建置如圖二。



圖二、類固醇化學冷光偵測流動注入系統。

參考文獻

1. Engvall, E.; Perlman, P. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871-874.
2. Du, H.; Lu, Y.; Yang, W.; Wu, M.; Wang, J.; Zhao, S.; Pan, M.; Cheng, J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6166.
3. Tai, S. S.-C.; Welch, M. J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1008.
4. Kuch, H. M.; Ballschmiter, K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 392.
5. Ferguson, P. L.; Iden, C. R.; McElroy, A. E.; Brownawell, B. J. *Anal. Chem.* **2001,** *73*, 3890.
6. Liu, S.; Griffiths, W. J.; Sjovall, J. *Anal. Chem.* **2003**, *75,* 791.
7. Roman, G. T.; Hlaus, T.; Bass, K. J.; Seelhammer, T. G.; Culbertson C. T. *Anal. Chem.* **2005,** *77*, 1414.
8. Sua, R,; Lin, J.-M,; Uchiyamab, K.; Yamadab M. *Talanta* **2004**, *64*, 1024.
9. Deftereos, N. T.; Calokerinos, A. C.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *290*, 190.
10. Huang, X.-J.; Fang, Z.-L. *Anal. Chim. Acta* **2000,** *414*, 1.
11. Kricka, L. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 305R.