嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫

計畫編號：CNPH94-03

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切

子計畫 1 主持人：王四切

子計畫 2 主持人：黃秀琴

子計畫 3 主持人：唐自強

執行單位：藥學系

中華民國 95 年 2 月 27 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

子計畫(1)：北冬蟲夏草對小鼠睪丸之萊氏細胞 TM3 中睪固酮生合成之影響

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫

計畫編號：CNPH94-03

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切 副教授

計畫主持人：王四切 副教授

計畫參與人員：陳秋蘭 助理教授；石成展

執行單位：藥學系

中華民國 95 年 2 月 27 日

前言

冬蟲夏草在中國傳統醫藥中用來當作滋補草藥已經有段相當久時間，有許多研究發現它具有重要藥理活性。根據傳統醫書記載：冬蟲夏草味甘、性溫、補益腎肺。在中醫學上它被用來當作益腎補陽的功用上，增加性慾及性功能。最近，成功大學醫學院副教授黃步敏的研究報告中冬蟲夏草菌絲體在小白鼠體內及體外培養細胞均有促進睪固酮生合成作用。

冬蟲夏草又稱蟲草、中華蟲草，屬於麥角菌目、麥角菌科、蟲草屬，屬於真菌，是菌類與昆蟲的結合。主產於四川、青海、西藏等地。冬蟲夏草寄生於蝙蝠蛾科昆蟲綠蝙蝠蛾幼蟲上，並吸收幼蟲的營養，而快速繁殖，稱為蟲草真菌。當菌絲慢慢成長的同時，幼蟲也隨著慢慢長大，而鑽出地面。直到菌絲繁殖至充滿蟲體，幼蟲就會死亡，此時正好是冬天，就是所謂的冬蟲。而當氣溫回升後，菌絲體就會從冬蟲的頭部慢慢萌發，長出像草一般的真菌子座，稱為夏草。當子囊成熟時，孢子會散出，再次尋找蝙蝠蛾的幼蟲作為寄主，這就是冬蟲夏草的循環。野生冬蟲夏草的子實體下端會附有昆蟲幼蟲的乾枯外殼，外殼內實為於存的菌絲體。外殼內的菌絲體會逐漸退化，因此自古以來認為冬蟲夏草的價值來自於子實體。所含主要成份有蟲草多醣體(cordycepic polysaccharide)、蟲草素(cordycepin) 、 蟲草酸(cordycepic acid)、腺甘酸(adenosine)腺嘌呤(adenine)、次黃嘌呤(hypoxanthine)等，且在冬蟲夏草與北冬蟲夏草所佔的比例不同(1)。

冬蟲夏草與北冬蟲夏草是少數中國中草藥確認具有功效者。但在價格上北蟲草比冬蟲夏草便宜許多。

北冬蟲夏草來自於東北的長白山上，不同於冬蟲夏草。與冬蟲夏草皆屬於真菌。北冬蟲夏草是由菌類與昆蟲之蛹發育而成，故又稱北蟲草。

冬蟲夏草在許多文獻上刊載具有許多重要的藥理活性功能(2)：成功大學醫學院副教授黃步敏在研究報告中顯示，男性性功能與體內雄性激素有關，雄性激素是由睪丸中的萊氏細胞所分泌出，在實驗中，以未成熟小鼠為實驗對象，觀察冬蟲夏草對雄性激素的影響，實驗中發現在低濃度時會有刺激雄性激素的分泌量的增加，但濃度稍高之後，雄性激素分泌量反而降低(2-6), 冬蟲夏草增加生殖活性功能且具有恢復受損的生殖功能(4)；具有降低血糖功能(1)；治療腎功能障礙及腎衰竭(1) ；可以抑制腫瘤細胞的生長(7，8)；具有抗氧化功能(9，10) ；調整免疫反應之功能(11，12)；具有降低血壓與血管擴張的活性(13)；增加肝臟活性(14，15) 等

冬蟲夏草在文獻的刊載中，以未成熟與成熟實驗小鼠為對象，觀察冬蟲夏草對於睪固酮(testosterone)濃度變化及小鼠睪丸(testis)重量的影響，在實驗中發現，未成熟小鼠睪固酮(testost erone)濃度變化明顯地比成熟小鼠增加；但是冬蟲夏草對於小鼠睪丸重量並無顯明的作用。

睪固酮(testosterone)是主要的雄性激素，是由睪丸(testis)、卵巢(ovary) 、腎上腺皮質(adrenal cortex)所合成而來；負責男性第二性徵的發育與維持，也具有重要蛋白質的合成代謝與促進生長作用;血漿中睪固酮(testosterone)含量用來評估男性生殖腺低落與荷爾蒙補充治療；也當作女性體內雄性素過高的指標。

在生理學的角度，睪固酮(testosterone)對於男性性功能方面具有重要影響：(1) 在細精管中進入賽氏細胞，透過賽氏細胞促進精子的生成；(2)引發男性附屬生殖器官的分化，並維持其功能；(3)產生性慾，並可能加強侵略性

行為。所以睪固酮含量增加，相對的精子數量也會增加，也表示著睪丸造精能力增加。

睪固酮的生合成是受到下視丘及腦下垂體所前葉調控。下視丘會釋放促性腺激素釋放荷爾蒙(GnRH)作用在腦下垂體前葉，腦下垂體前葉釋放黃體激素(LH)作用在萊氏細胞(Leydig cell)，萊氏細胞製造並分泌睪固酮至血中。當血中睪固酮含量過高時，會啟動負回饋調控機制，會抑制下視丘及腦下垂體所前葉，使 GnRH、LH 無法釋放出來，使睪固酮可以恢復到正常值。

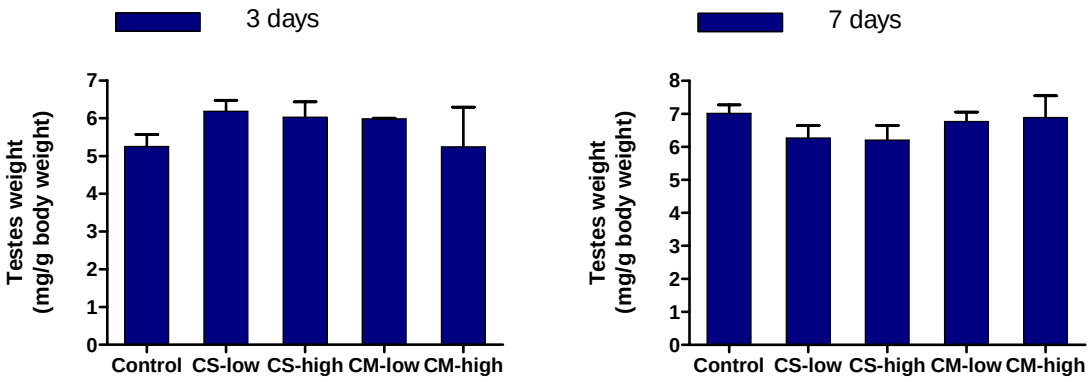
北冬蟲夏草與冬蟲夏草雖產地不同，但其主成分再經過分析後並無明顯差異(1，16)，最近有利用人工栽培方式培養出北冬蟲夏草子實體，因此計畫研究北冬蟲夏草對於男性性功能及抗氧化功能方面的影響。利用人工培養的北蟲夏草的子實體測試其對小鼠的精原細胞 GC-1 spg 的影響。首先，先看其對精原細胞是否具有毒殺作用；若無，則看其對精原細胞是否有促進增生的能力。

實驗方法

萃取睪固酮-取適當量的小鼠血清，加入乙醚，混合均勻，取上層有機液，再將有機液至放在抽器櫃內靜置揮發，待揮發完全只剩下無色殘留物。再將 diluted extrate buffer 加入，振搖，使其能與殘留物充分混合均勻。這個方法是以 enzyme conjugate 與未知濃度的睪固酮檢品在具有抗體附著的 plate 中去競爭固定結合位置的操作準則。首先，將檢品或標準溶液加入在 microplate，之後再加入 diluted enzyme conjugate 反應，在室溫下利用振搖機混合培養一小時，在培養過程中，內部正在進行競爭結合位置。用 diluted wash buffer 來清洗全部未結合物質，重複三次，結合的 diluted enzyme conjugate 在 substrate 加入後三十分鐘，發現理想的顏色-藍色。定量測驗結果，是經由每個 well 和標準溶液在 630nm 吸光值的 ELISA 測量比較而得。結果中，顏色發展的範圍，與檢品中的睪固酮或標準品的數量呈反比。例如:檢品中睪固酮不存在，會產生明顯的藍色；反之，睪固酮存在，會產生淡藍色或無顏色反應。

結果與討論

由於 TM3 所釋放出之睪固酮含量過低，低過偵測靈敏度，因此改採以小鼠為實驗對象。在第七天顯示北冬蟲夏草在高劑量有明顯抑制的效果，其可能是血中睪固酮含量過高時，會啟動負迴饋調控機制，使睪固酮分泌量也隨之降低所致。在睪丸重量與睪固酮含量並無明顯關聯性。



睪丸重量

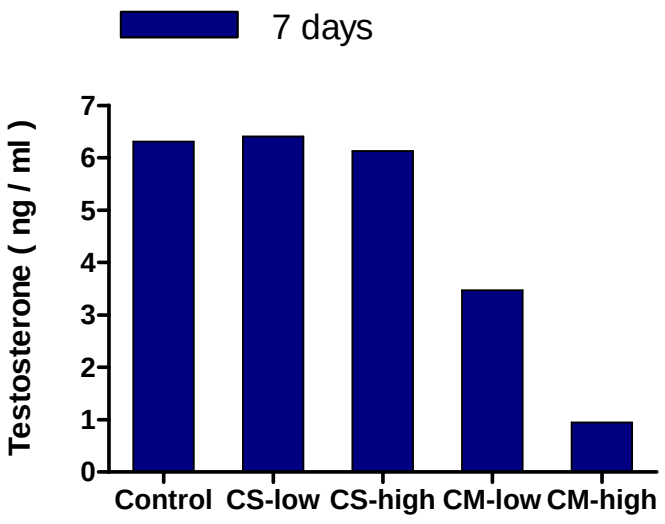
Control:對照組

CS-low:中華蟲草低劑量(0.02mg/g)

CS-high:中華蟲草高劑量(0.2mg/g)

CM-low:北蟲草低劑量(0.02mg/g)

CM-high:北蟲草高劑量(0.2mg/g)



睪固酮含量

參考文獻

1. Huang LF. Liang YZ. Guo FQ. Zhou ZF. Cheng BM. Simultaneous separation and determination of active components in Cordyceps sinensis and Cordyceps militaris by LC/ESI-MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 33(5):1155-62, 2003.*
2. Huang YL, Leu SF, Liu BC, Sheu CC, Huang BM. In vivo stimulatory effect of Cordyceps sinensis mycelium and its fractions on reproductive functions in male mouse. *Life Sciences. 75(9):1051-62, 2004.*
3. Hsu CC, Huang YL, Tsai SJ, Sheu CC, Huang BM. In vivo and in vitro stimulatory effects of Cordyceps sinensis on testosterone production in mouse Leydig cells. *Life Sciences. 73(16):2127-36, 2003.*
4. Hsu CC, Tsai SJ, Huang YL, Huang BM. Regulatory mechanism of Cordyceps sinensis mycelium on mouse Leydig cell steroidogenesis. *FEBS Letters. 543(1-3):140-3, 2003* .
5. Chen YC, Huang YL, Huang BM. Cordyceps sinensis mycelium activates PKA and PKC signal pathways to stimulate steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Internat. J. Biochemi. Cell Biol., 37(1):214-23, 2005.*
6. Huang BM, Hsiao KY, Chuang PC, Wu MH, Pan HA. Tsai SJ. Upregulation of steroidogenic enzymes and ovarian 17beta-estradiol in human granulosa-lutein cells by Cordyceps sinensis mycelium. *Biol. Reproduct. 70(5):1358-64, 2004.*
7. Shin KH, Lim SS, Lee S, Lee YS, Jung SH, Cho SY. Anti-tumour and immuno-stimulating activities of the fruiting bodies of Paecilomyces japonica, a new type of Cordyceps spp. *Phytother. Res. 17(7):830-3, 2003.*
8. Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Yu, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Antitumor activity of cordycepin in mice. Clin. Exper. Pharmaco. Physio., 31 (Supplement 2):S51-S53.
9. Li SP. Su ZR. Dong TT. Tsim KW. The fruiting body and its caterpillar host of Cordyceps sinensis show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. *Phytomedicine. 9(4):319-24, 2002.*
10. Li SP, Zhao KJ, Ji ZN, Song ZH, Dong TT, Lo CK, Cheung JK, Zhu SQ, Tsim KW. A polysaccharide isolated from Cordyceps sinensis, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced

injury. *Life Sciences. 73(19):2503-13, 2003.*

11. Kuo YC, Tsai WJ, Shiao MS, Chen CF, Liu CY. Cordyceps sinensis as an immunomodulatory agent. *Am. J. Chin. Med., 24 (2): 111-125, 1996.*
12. Yang LY, Huang WJ, Hsieh HG, Lin, Ching Y. H1-A extracted from Cordyceps sinensis suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Labora. Clin. Med., 141(1):74-83, 2003.*
13. Chiou WF, Chang PC, Chou CJ, Chen CF. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of Cordyceps sinensis. *Life Sciences. 66(14):1369-76, 2000.*
14. Wang BE. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J. Gastroentero. Hepato., 15 Supplement:E67-E70, 2000.*
15. Nan JX, Park EJ, Yang BK, Song CH, Ko G, Sohn DH. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of Cordyceps militaris on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Arch. Pharmacal. Res., 24(4):327-32, 2001.*
16. Yu R, Wang L, Zhang H, Zhou C, Zhao Y. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured Cordyceps militaris. *Fitoterapia. 75(7-8):662-6, 2004.*
17. Jiao H, Soejima Y, Ohe Y, Saijo NA. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immnol. Methods, 153: 265-266, 1992.*

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

子計畫(2)：北冬蟲夏草活性成分之研究

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫

計畫編號：CNPH94-03

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切 副教授

計畫主持人：黃秀琴 副教授

計畫參與人員：游慧美講師、蔡欣潔同學

執行單位：藥物科技研究所

中華民國 95 年 2 月 27 日

一、 前言

中華冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)為我國的一種名貴野生中藥材，具有補虛損、益精氣、保肺、益腎、止血化痰，滋補強壯之功效。近年研究發現有鎮靜、耐缺氧、抗炎、降壓、改善心肌缺血，增加人體免疫功能和有一定的抗炎效果。由於天然來源稀少，價格昂貴，因此，人們致力於尋找天然冬蟲夏草的代用品，一方面尋找同屬類似品，另一方面進行蟲草菌絲體的研究，以求能得到大量培養且成分類似之代用品。

北冬蟲夏草(*C. militaris* (L. ex Fr.) Link)又名蛹蟲草，為真菌蛹蟲草的菌核及子實體，寄生於鱗翅目(Lepidoptera)昆蟲的死蛹上，所成蛹體及子實體之複合體。近十年來，經人工培養成功出子實體，及在藥性成分，藥理作用，功能及臨床之研究上發現與天然的冬蟲夏草基本一樣，而成為中華冬蟲夏草之代用品。

本研究是取材於國內自行培育成功之北冬蟲夏草子實體，經由多醣抽取及純化後以苯酚－硫酸比色法測定其含量，並提供與子計劃1及3之北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究。

二、材料與方法

(一)材料

I. 由富享生技公司培育之北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris* (L.ex Fr.) Link)子實體粉末，以 CM 表示。

II. 標準品

1. 葡萄糖標準品：購自 Sigma comp.，純度為 99.5%。

III. 試藥與溶媒

95%Etanol、Ether、Chloroform、Isopentanol、Naphthol、conc-Sulfuric acid。

IV. 儀器與設備

Soxhlet extractor、分光光度計(Hitachi U-2001)、離心機(Hitachi O5P-21)、定量量瓶、均質器(Vortex-2)。

(二)方法

I.多醣抽提與精製

精秤約 25g
↓250ml Ether，Soxhlet extractor reflux 1hr.
取藥渣，蒸發 Ether
↓80% EtOH 250ml，overnight
↓reflux 2hrs，2 次
↓過濾
取藥渣
↓400mlH2O，80℃攪拌 2hrs.
↓離心，重複 3 次
↓合併上清液
↓減壓濃縮至約 100ml
↓Sevag 法 deprotein
↓過濾
取濾液
↓＋4 倍之 95%EtOH
↓靜置，overnight
↓離心
取沉澱物
↓以無水酒精；acetone；ether 依次洗滌
↓低溫減壓乾燥
CM 多醣(0.7397g)

II.標準曲線製備

A. 葡萄糖標準貯存溶液製備

精稱葡萄糖標準品 13.2mg 於 100ml 量瓶中，加水稀釋至刻度，混均。作為葡萄糖標準貯存溶液。

B. 5% Naphthol 溶液製備

稱取 5g Naphthol 各加 50ml 之 H_2O 及 EtOH 溶解，即為 5% Naphthol 溶液。

C. 葡萄糖標準曲線製備

試管數 / 試劑	1	2	3	4	5	Blank	CM1※	CM2※
Glucose std. stock sol.(m	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	0.00	0.50	1.00
H_2O(ml)	1.25	1.00	0.75	0.50	0.25	1.50	1.00	0.50
5% Naphthol(ml)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
c-H_2SO_4(ml)	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
mix.								
Stand 10min.								
mix.								
30℃，w.b.20min.								
Determ. Abs. at 490nm	0.289	0.523	0.638	0.822	0.975	0.00	0.419	0.654

※為 CM 多醣精秤 1.7mg，加水稀釋至 10ml。

D. 換算因子的測定

精確秤取 CM 多醣 1.7mg 置於 10ml 量瓶中，加水稀釋至刻度，混均。分別精確吸取此溶液 0.5 及 1.0ml，依葡萄糖標準曲線製備方法操作，測定吸光值，從回歸方程式中求出多醣供試液中葡萄糖濃度，依下式計算換算因子 f ＝ **1.634**

$f = W/(C \times D)$　　W 為多醣質量(mg)

C 為多醣稀釋液中葡萄糖濃度(mg/ml)

D 為多醣的稀釋因素

E. 樣品溶液製備及各樣品含量測定

a.樣品溶液製備

CM 精確秤取約 5g

↓50mlH2O w.b.100℃，1hr

↓過濾

取濾液

↓重覆上步驟 3 次

合併濾液

↓減壓濃縮至約 100ml

↓加 3 倍量 EtOH

↓靜置

↓離心

沉澱物

↓以無水酒精；acetone；ether 依次洗滌

↓低溫減壓乾燥至恆量

CM 粗多醣，精稱 CM 8mg/100ml

b.樣品含量測定

精確吸取 CM 粗多醣各樣品溶液 1.0ml，於 10ml 刻度試管中，依葡萄糖標準曲線繪製法操作，測定葡萄糖含量，依下式計算 CM 中多醣含量

多醣含量(%)＝C × D × *f* / W × 100

C：樣品中葡萄糖濃度(mg/ml)

D：樣品的稀釋倍數

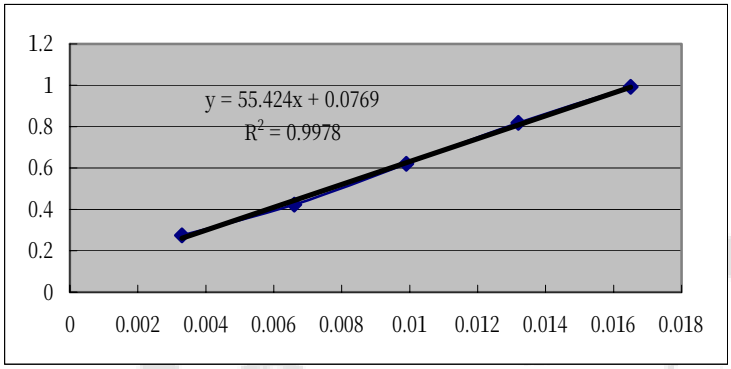
f：換算因子

W：樣品重量

三、結果

I.葡萄糖標準曲線圖

葡萄糖標準品 0.003～0.015mg/ml 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=55.424x - 0.0769$($R^2=0.9978$，n=2)



II. CM(北冬蟲夏草)多醣含量

樣 品	多醣含量(%)
CM	2.46

四、結論

國內自行研發成功之北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)子實體，以 Sevag 法去除蛋白質之多醣萃取法抽取多醣，並利用苯酚－硫酸法測定多醣含量，提供子計劃(1)及(3)之對老鼠細胞之造精作用及肝細胞之抗氧化評估試驗。以了解北冬蟲夏草之造精及抗氧化活性作用。

五、參考文獻

1. D. Wang，L. Lin，C. L. Yuan，M. Xu，L. J. Wang，Chinese Traditional and Herbal Drugs，2002，33(10)，p.896～897。
2. 余曉斌、羅長才、繆靜，Chinese Traditional and Herbal Drugs，2002，33(12)，p.1086～1087。
3. 劉曉河、梁惠花、譚曉紅，Chinese Traditional and Herbal Drugs，2002，34(6)，p.519～520。
4. H. M. Yu，T. C. Tang，C. L. Chen，T. C. Wang，K. Ling，H. H. Lin and S. C. Huang，The 20th Symposium on Natural Products，2005，p.72。
5. C. H. Chuang，H. M. Yu，S. C. Huang，T. C. Wang，C. L. Chen，K. Ling，T. C. Tang，The 20th Symposium on Natural Products，2005，p.73。

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

北冬蟲夏草對細胞之造精能力與抗氧化功能評估之研究

子計畫(3)：利用電化學法分析北冬蟲夏草對 HepG2 肝細胞中抗氧化成分 GSH 含量之研究

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫

計畫編號：CNPH 94-03

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切 副教授

子計畫主持人：唐自強 副教授

計畫參與人員：莊清訓；劉俊傑

執行單位：藥學系

中華民國 95 年 2 月 25 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

利用電化學法分析北冬蟲夏草對 HepG2 肝細胞中抗氧化成分 GSH 含量之研究

計畫編號：CNPH 94-03

執行期限：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

主持人：唐自強　嘉南藥理科技大學 藥學系

摘　要

本研究擬發展多壁層奈米碳管工作電極對於 HepG2 肝細胞中，抗氧化成分之 GSH 含量進行偵測之研究，以應用於毛細管電泳分離後，作為高靈敏度偵測之電化學分析裝置。並與以往學者所用金汞工作電極偵測之效果，進行比較。

簡　介

在生化樣品偵測上，電化學分析法(Electrochemical Analysis)相較於常用的 UV/Vis 光度分析法，具有更高的靈敏度及更低的偵測極限特性，與同樣具有高靈敏度、低偵測極限的螢光分析法相比較，則可省卻了昂貴的激發光源，以及分析物必須具有螢光發色基團的限制。因此電化學分析法結合其他分離系統，如 HPLC、毛細管電泳分離等，對於微量樣品中有效成分之分析研究，成為一種良好的分析偵測工具。

GSH(Glutathione)為生物體內常見以及非常重要的抗氧化成分，而體內含量多寡及與其氧化物 GSSG(Glutathione disulfide)之間的比例，往往可作為生物體健康狀態指標之一。

以往研究學者使用電化學法對於生物體內 GSH、GSSG 之分析，多利用金-汞工作電

極之安培分析法(Amperometry Method)進行測定，具有良好的分析結果，然而由於汞金屬具有毒性，及其長時期穩定性(long-term stability)效果不佳，對於數量龐大的常規樣品分析(routing analysis)，偵測靈敏度有逐漸下降的趨勢，而影響分析結果。後來許多研究學者發展出以多孔性石墨(Porous Graphite)為工作電極之庫倫分析法(Coulometry Method)，藉由電極再生方式，改善了工作電極長時期穩定性的問題，並且可得到更低的偵測極限。

雖然庫倫分析法可改善安培分析法長時期偵測穩定性不佳的問題，但是所使用的工作電極系統價格昂貴，並且分析樣品適用範圍比安培分析法小，因此應用性受到限制。

近年來使用多壁層奈米碳管(Multi-Wall Nanotube)作為工作電極的研究文獻有逐漸增加的趨勢，這是與多壁層奈米碳管具有高穩定性、高電子傳遞速率，及本身為碳結構，與生物體中之生化分子有良好的親和性，因此使用多壁層奈米碳管工作電極作為安培分析法的偵測器，可具有極高的靈敏度及穩定性，並且價格不貴，可適用於一般實驗室之電化學安培偵測系統。

本研究計畫擬參考相關文獻所記載，發展以電化學分析方法為偵測系統，使用多壁層奈米碳管工作電極對 GSH、GSSG 之分析進行研究，進而結合毛細管電泳分離之高效率分離能力，建立對 HepG2 肝細胞中具有強力抗氧化能力的 GSH 及其氧化物 GSSG 含量，進行常態分析的生物樣品偵測系統，並用以評估市售北冬蟲夏草之萃取液，對於 HepG2 肝細胞製造 GSH 能力的影響，提供各界作為分析檢驗的參考依據。

研究方法

樣品製備

參考相關文獻所記載，對於經加入北冬蟲草萃取物培養之 HepG2 肝細胞內 GSH 含量，進行毛細管電泳分離及電化學法偵測。

毛細管電泳分離系統

參考文獻所記載，以適當之磷酸鹽緩衝溶液及氫氧化鈉溶液，對樣品進行分離。

奈米碳管電極對 GSH/GSSG 偵測之研究

將碳纖維工作電極以拋磨劑拋光後，置於甲醇溶液中，以超音波震盪器清洗 30 秒後，用純水沖洗，如此反覆 3 次，風乾備用。

將適量多壁層奈米碳管配置於 DMF 溶劑中均勻懸浮後，取 1 μL 懸浮液滴加於工作電極表面，靜置待其乾燥後，即成為奈米碳管工作電極。

將奈米碳管工作電極置於鉑離子溶液中，以循環伏特安培法將鉑電鍍於奈米碳

管電極表面成為奈米碳管/鉑工作電極。

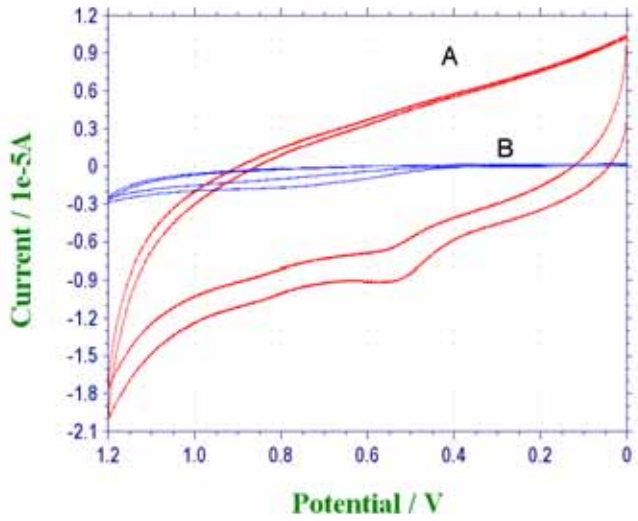
分別將各式製備電極在標準溶液中以循環伏特安培法對 GSH、GSSG 之氧化還原特性進行探討，並以流體動力式伏特安培法選取適當之安培法偵測電位，最後結合毛細管電泳分離系統對 HepG2 肝細胞中之 GSH 以及 GSSG 進行偵測。

結果與討論

分別以碳纖維電極(B)及奈米碳管/鉑電極(A)對 GSH 之 CV 測定如圖所示，由圖中可知奈米碳管/鉑電極對 GSH 偵測訊號相對於碳纖維電極，具有相當大之催化性氧化電流產生，因此應用在毛細管電泳分離偵測系統上，可具有良好效果。

依據文獻記載，對細胞中之 GSH 含量分析，可利用線上細胞溶解（lysing）方式進行單細胞 GSH 含量分析，方法為先在毛細管中充滿 NaOH 溶液，而待測細胞樣品配置在 PBS 溶液中，經施加電壓將細胞送入毛細管中後，則細胞在強鹼中約 5 秒內即可溶解，釋出 GSH 而進行電泳分離。

本研究已經完成 GSH 標準溶液之毛細管電泳分離、奈米碳管/鉑電極電化學偵測測試，近期內待 HepG2 肝細胞完成以北冬蟲草萃取液培養之程序後，即可進行 HepG2 肝細胞之單細胞 GSH 含量分析，以驗證北冬蟲草萃取液對細胞增近抗氧化能力的效用。



參考文獻

1 Tommaso, R.I.; Cataldi, D. N., J. Chromatography A, 1066 (2005) 133–142
2 Huang, T. H.; Kuwana, T.; Warsinke, A., Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 1107/1113
3 Zhanga,W. ; Wana,F.; Zhua, W. ; Xua, H., Yeb, X. Chengb, R.; Jina, L.-T., J. Chromatography B, 818 (2005) 227–232
4 Wang , W.; Xin ,H.; Shao ,H.; Jin, W.; J. Chromatography B, 789 (2003) 425–429
5 Shin, K. H.; Lim, S. S.; Lee, S. H.; Lee, Y. S.; Cho, S. y., Annals New York Academy of Sciences, pp261-273
6 Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R.; Biochem. Pharmacol. 64(2002)105
7 Mates, L. M. ; Perez-Gomez, C.; Blanca, M. Clin. Chim. Acta 296(2000)1
8 Bocchi, C.; Careri, M.; Groppi, F. Mangia, A.; Manini, P.; Mori, G., J Chromatogr. A 753(1996)157
9 Chen, B. L.; lSelegue, J. P. Anal. Chem. 74(2002)4774
10 Park, S.; Srivastava, D.; Cho, K., Nano Lett. 3(2003)1273
11 Luo, H. X.; Shi, Z. J.; Li, N. Q.; Gu, Z. N.; Zhuang, Q. K.; Anal. Chem. 73(2001)915
12 Zhao, G. C.; Zhang, L.; Wei, X. W.; Yang, Z. S., Electrochem. Commun. 5(2003)825