

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(routine 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，對於經加入北冬蟲夏草萃取物培養之 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 μ L 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。

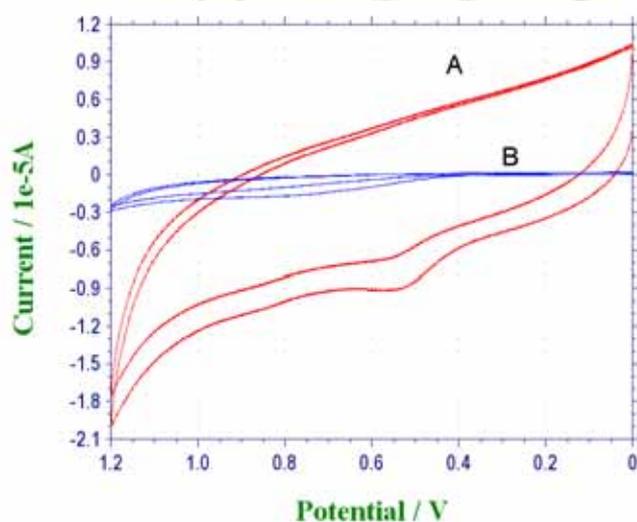
分別將各式製備電極在標準溶液中以循環伏特安培法對 GSH、GSSG 之氧化還原特性進行探討，並以流體動力式伏特安培法選取適當之安培法偵測電位，最後結合毛細管電泳分離系統對 HepG2 肝細胞中之 GSH 以及 GSSG 進行偵測。

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進抗氧化能力的效用。



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

