

嘉南藥理科技大學
生物科技系

碩士論文

探討檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用

Study on the interaction between Arecoline and Glutathione

指導教授：楊 竹 茂 博士

研究 生：蕭 捷 元

中華民國九十六年七月二十日

嘉南藥理科技大學生物科技系
Department of Biotechnology
Chia-Nan University of Pharmacy and Science

碩士論文
Thesis for the Degree of Master

探討檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用
Study on the interaction between Arecoline and Glutathione

指導教授：楊 竹 茂 博士 (Dr. Jwu-Maw Yang)
研究 生：蕭 捷 元 (Chieh-Yuan Hsiao)

中華民國九十六年七月二十日

July 20, 2007

嘉南藥理科技大學
碩士學位考試委員會審定書

本校 生物科技系 碩士班 蕭捷元 君

所提論文 探討檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用

Study on the interaction between arecoline and glutathione

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：吳炳男 博士

高雄醫學大學藥理研究所 教授兼所長

林美惠 博士

嘉南藥理科技大學生物科技系 副教授

楊竹茂 博士

嘉南藥理科技大學藥學系 副教授

指導教授：楊竹茂 博士

嘉南藥理科技大學藥學系 副教授

系主任（所長）：張俊勳

中華民國 九十六年七月



嘉南藥理科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於嘉南藥理科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

同意立即開放

同意一年後開放，原因是：_____

同意二年後開放，原因是：_____

同意三年後開放，原因是：_____

以非專屬、無償授權嘉南藥理科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生簽名： 蕭捷元

論文名稱： 探討檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用

指導教授： 楊竹茂 博士

系所： 生物科技系

學號： S9415001

日期：民國 九十六 年 九 月 十二 日

備註：

1. 本授權書請填寫並以黑色筆親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法有關規定辦理。

中文摘要

過去研究顯示，檳榔鹼和穀胱甘肽之間的交互作用與口腔癌的致病機制有關，然而兩者交互作用的機轉至目前尚未完全徹底闡明。本研究的主要在研究並探討檳榔鹼和穀胱甘肽兩者之間交互作用的機轉。

首先以高壓液相層析法(HPLC)測定兩者在 pH=2~12 之緩衝溶液中濃度的變化。結果發現兩種化合物在酸性緩衝溶液(pH=2.0~6.0)中，幾乎無反應，然而在 pH>7.0 時兩者即能產生顯著的交互作用，亦即兩者濃度在 20 分鐘的反應時間內以非線性方式逐漸降低，此交互作用反應在 pH 8.0 與 9.0 時達到最高，且其反應在 5 分鐘內即顯著快速發生。然而，在 pH>10.0 以上時，可見部分檳榔鹼被水解成檳榔次鹼，而使得兩者之間的交互作用呈現稍微減低的現象。

其次，兩者在交互作用中可能產生的反應加成物，也經一系列步驟加以萃取、分離並純化。其純度則以 HPLC 方法證實。

最後，反應加成物另以 LC/MS/MS 方法加以分析。由第一次撞擊所得結果顯示，在 pH=8.0 的緩衝溶液中所形成的反應加成物其主要的斷片質量為 463m/z；在 pH=10.0 緩衝溶液中所形成的反應加成物則得到三種主要的斷片質量，分別為 463m/z、449m/z 與 420m/z；而在 pH=12.0 時，反應加成物主要的斷片質量為 449m/z。綜合一次及二次撞擊所得的主要斷片質量數據，顯示至少有三種不同的加成物在其交互作用之反應中形成，本研究除

了解析出其個別化學結構式外，並同時闡明其可能的反應程序機轉。

關鍵字：穀胱甘肽、檳榔鹼、交互作用、加成物、反應程序。

Abstract

Previous studies have demonstrated that the interaction between Arecoline and Glutathione may be associated with the etiologic causes of oral cancer, however, the mechanisms have not precisely clarified till present. The aim of this study is to investigate and to clarify the possible mechanisms of the interaction.

Initially, the changes of concentrations of both compounds in buffers with pH range from 2~12 were quantitatively determined by HPLC. The results of the interaction between both compounds in various pH values of buffer solutions found that there were nearly nonreactive in the acidic environment, whereas the significantly rapid interactive reactions were evoked in the buffer solutions with pH>7.0, where we found that the concentrations of both compounds were rapidly decreased within 20 minutes with non-linear patterns. The maximum reactions were occurred at pH 8~9 within 5 minutes. However, when the pH of buffers solution were higher than 10.0, a small portion of Arecoline could be hydrolyzed to Arecaidine, thus the interactive reactions were found to be slightly decreased.

Subsequently, the possible adducts formed in the interacting reaction were then isolated and purified. Their purities were confirmed with HPLC.

Eventually, the adducts were further analyzed with LC/MS/MS. The results of first collision showed that a major fragment mass of adduct formed in pH=8.0 buffer solution was 463 m/z; three major fragments of the adduct formed in pH=10.0 buffer solution were obtained and their masses were 463 m/z, 449 m/z and 420 m/z, respectively; the major fragment of adduct formed at pH=12 had a mass of 449 m/z. Getting together, from the data including those produced in the second collisions at least of three possible adducts could be formed in the interactive reactions and their chemical structures were determined. The possible reaction schemes were also elucidated.

Keywords: arecoline, glutathione, interaction, adduct, reaction scheme.

誌 謝

寫到這裡，意味著我已上完了兩年的碩士班進修課程，完成論文的撰寫及通過學位口試。能如此的順利首先要感謝我的指導教授同時也是我二技時期班導師楊竹茂博士的鼓勵與悉心的指導，這兩年當中我學習到許多實驗的方法及技巧，不但在課業上有所助益外，同時對我在工作能力上亦是大大的提昇。論文口試委員高醫藥理所所長吳炳男博士在口試及論文缺失上指正良多和林美惠博士在論文上給了我許多良好的建議跟補充，整理後更加的完善與紮實，由衷的感謝兩位老師。

此外，要感謝的是同是生科碩專班的林南海學長，海哥不但也是我二技時期的同班同學也是我在工作上的輔導長官，有了他的鼓勵，我才有機會進入生科碩專班就讀，並恭賀他順利的考取中興大學生物科學研究所博士班；同時謝謝二技同學們的加油打氣以及同是P102研究室的學妹淑雯、學弟家福在實驗上的協助；生科碩專班的同班同學沈醫師、佳樂、麗卿、麗香、元薇、桂容、長霓、佳惠感謝你(妳)們的愛戴讓我在嘉藥求學從五專、二技到碩士班三個階段皆有當上班代以及在課業上互相的加油打氣，希望大家畢業後在事業上能有更進一步的發展。

接著謝謝天一藥廠的長官們的提携讓我機會員能夠在職進修碩士班，以及品管部的同事素峯、玉珍、阿妙、素梅、毓蓁姐、郁婷謝謝妳們這兩年當中，我上課不在公司上班的時段分擔了我部份的工作。

最後，更感謝爸、媽您們的支持及諒解兩年的假日不能陪伴您們，所以一併謝謝弟弟靜隆、憲聰；弟媳乙文；姪子俊平、仲旻在假日裏陪伴您們倆位老人家。還有這兩年當中在許多地方有幫忙到我的人，不論是親友、同事一併獻上我最誠摯的謝意。

捷元 謹誌於嘉南藥理科技大學

民國九十六年七月

目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	IV
本文目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
縮寫表.....	XII
第一章 緒論.....	1
1-1 文獻回顧.....	1
1-2 研究動機與目的.....	5
第二章 材料與方法.....	6
2-1 材料與儀器.....	6
2-1-1 試藥.....	6
2-1-2 溶液的配製.....	7
2-1-3 儀器設備.....	8
2-2 實驗方法.....	11
2-2-1 檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用.....	11
2-2-1-1 檳榔鹼和檳榔次鹼的含量測定.....	12
2-2-1-2 穀胱甘肽的含量測定.....	12

2-2-2 檳榔鹼和穀胱甘肽在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中之動力反應.....	13
2-2-3 檢測檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0 、 10.0 及 12.0 緩衝溶液中加成物之分離純化與分析.....	14
2-2-4 LC/MS/MS 測定檳榔鹼與穀胱甘肽加成物的分子量.....	15
2-2-4-1 LC/MS 之檢測.....	15
2-2-4-2 MS/MS 之檢測.....	16
第三章 結 果.....	18
3-1 檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用.....	18
3-1-1 檳榔鹼和檳榔次鹼的含量測定.....	18
3-1-2 穀胱甘肽的含量測定.....	19
3-2 檳榔鹼和穀胱甘肽在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中之動力反應.....	19
3-3 檢測檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0 、 10.0 及 12.0 緩衝溶液中加成物之分析.....	20
3-4 LC/MS/MS 測定檳榔鹼與穀胱甘肽加成物的分子量.....	20
3-4-1 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物.....	20
3-4-2 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物....	21
3-4-3 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物....	21
第四章 討 論.....	22

第五章 結 論.....23

參考文獻.....24

圖目錄

第一章 緒論

圖 1.檳榔生物鹼之結構式.....26

圖 2.Glutathione 之結構.....26

圖 3.Glutathione 之生合成路徑圖.....27

第三章 結果

圖 4.Arecoline 和 Arecaidine HPLC 層析圖譜.....28

圖 5.Arecoline 標準溶液檢量線圖.....29

圖 6.Arecaidine 標準溶液檢量線圖.....30

圖 7.Gluthione 標準溶液檢量線圖.....31

圖 8.Arecoline 與 Glutathione 在不同 pH 值之間的交互作用

Arecaidine/Arecoline 含量統計.....32

圖 9Arecoline 與 Glutathione 在不同 pH 值之間的交互作用 Glutathione

含量統計圖.....33

圖 10 pH=8.0(A)和 pH=12(B)緩衝溶液中，Arecoline 與 Arecaidine 反應之動力曲線圖.....34

圖 11. pH=8.0(A)和 pH=12.0(B)緩衝溶液中，Arecoline 和 Glutathione 交互作用之動力反應曲線圖.....35

圖 12.檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0 緩衝溶液中之動力反應曲線

圖.....	36
圖 13. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=8.0 緩衝溶液中，加成物滯留時 間在 6.62 分鐘之 HPLC 層析圖譜.....	37
圖 14. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=10.0 緩衝溶液中，加成物滯留時 間在 4.55 分鐘之 HPLC 層析圖譜.....	38
圖 15. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=12.0 緩衝溶液中，加成物滯留時 間在 7.90 分鐘之 HPLC 層析圖譜.....	39
圖 16. pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 檢測的層析圖譜.....	40
圖 17. 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經 由 LC/MS 的檢測，在 14.07 分鐘波峰其質量斷片圖.....	41
圖 18. 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經 由 LC/MS 的檢測在 17.52 分鐘波峰其質量斷片圖.....	42
圖 19. MS/MS 分析加成物 463m/z[Adduct] ⁺ 質量斷片圖.....	43
圖 20. pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 檢測的層析圖譜.....	44
圖 21. 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經 由 LC/MS 的檢測，在分鐘波峰其質量斷片圖.....	45
圖 22. 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，	

經由 LC/MS 的檢測,在分鐘波峰其質量斷片圖.....	46
圖 23. MS/MS 分析加成物 $449m/z[Adduct]^+$ 質量斷片圖.....	47
圖 24. pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物, 經由 LC/MS 檢測的層析圖譜.....	48
圖 25. 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物, 經由 LC/MS 的檢測, 在分鐘波峰其質量斷片圖.....	49
圖 26. 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物, 經由 LC/MS 的檢測, 在分鐘波峰其質量斷片圖.....	50
圖 27. MS/MS 分析加成物 $420m/z[Adduct]^+$ 質量斷片圖.....	51
圖 28. 檳榔鹼與穀胱甘肽加成反應可能的路徑.....	52

縮寫表

OSF	Oral Submucous Fibrosis
GSH	Glutathione
ATP	Adenosine triphosphate
SOD	Superoxide dismutase
LC/MS/MS	High performance triple quadrupole mass spectrometer
PIC-B7	1-Heptane sulfonic acid sodium salt
EDTA	Ethylenedinitrilo teracetic acid disodium salt dihyarate
OPT	O-phthaldehyde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

第一章 緒論

1-1 文獻回顧

根據行政院衛生署統計 2005 年以癌症為國人十大死因的第一位，而其中口腔癌為癌症死亡率的第六位，單就男性而言是居於第四位。在以往的研究報告中均已證實嚼食檳榔為罹患口腔癌(口腔鱗狀上皮細胞癌 Oral squamous cell carcinoma, OSCC)之主要的因素⁽¹⁻⁹⁾。

人類嚼食檳榔的習慣已存在有相當久的歷史，估計全世界約有 600 萬人口有長期嚼食習慣^(2,5)，包括的國家有非洲的新幾內亞、拉丁美洲國家等其中以亞洲分佈最多如印度、巴基斯坦、孟加拉、東南亞的泰國、菲律賓、中國大陸南方各省及台灣^(3,5)。

檳榔嚼食的方式及組成隨著國家地區民情的不同而有所不同，檳榔的配方也隨之改變，在台灣檳榔的組成均以檳榔子 (Areca nut、Betel nut)為主要成分，另外尚有荖葉 (Leaf of Piper betel Linn)、荖花 (Inflorescence Piper betle)、熟石灰 (Slaked lime)或荖藤 (Piper betel flower or fruit)及甘草蜜、中藥及香料等。荖藤中所含有的黃樟素 (Safrole) 及丁香酚 (Eugenol) ，其中黃樟素為嚼食檳榔時氣味的主要來源。荖葉則含有丁香油、單寧酸 (Tannins) 、纖維、脂肪、醣類、過渡金屬元素，但不含黃樟素⁽¹⁾。

由這些成分所組成的檳榔統稱爲檳榔嚼塊(Betel quid)。大致上台灣地區嚼食的方式又有兩種：一種是白灰檳榔是以整顆檳榔子外包裹上白灰的荖葉，俗稱包葉檳榔；白灰是由品質優良的石灰經過多次水洗加工，再經酒浴製備而來。另一種是紅灰檳榔則是以新鮮的檳榔子剖半，夾著一小段荖花並塗抹上紅灰而組成，俗稱青仔檳榔；紅灰是由白灰、甘草蜜及其他個家秘方調製而成。檳榔子爲檳榔樹的果實，含有許多植物鹼，主要成分包括多酚化物(polyphenolic compounds)、檳榔生物鹼 (Areca alkaloid)、粗纖維、脂肪、糖類等。而檳榔生物鹼包括檳榔鹼(Arecoline)、檳榔次鹼(Arecaidine)、Guvacine、Guvacolin 等(圖 1)，其中最重要的是 Arecoline，具有促進副交感神經系統機能之作用及中樞神經抑制作用使瞳孔縮小、腺體分泌增加。臨床上有以 Arecoline 之製劑作爲動物用條蟲、蛔蟲的驅蟲藥。在眼科以 Arecoline HBr 1% 溶液做爲瞳孔收縮劑及降眼壓劑用於治療青光眼。而 Arecoline 在一般劑量下有發汗、興奮及增加唾液之作用，所以食用檳榔後，往往有生津止渴、提神、禦寒等功效^(1,3)。

嚼食檳榔對口腔組織包括牙齒、牙齦以及口腔粘膜均有不良的影響，尤其是對於口腔粘膜的危害更爲嚴重，因爲會引起各種不同程度的粘膜組織變化、如白斑症(Leukoplakia)、口腔粘膜下纖維化症(Oral submucous fibrosis，OSF)等癌前期病變，更進而轉變爲口腔癌⁽¹⁾。

在過去的一些研究中均指由嚼食檳榔所引發之 OSF 可能的原因，大致上有檳榔的細胞毒性作用、發炎反應、金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 與組織蛋白抑制酶轉換不平衡、纖維蛋白溶解系統 (Fibrinolytic system) 受到抑制等因素有關^(2,3,4,6,9)。其中 Arecoline 對人類正常口腔粘膜細胞纖維母細胞方面所造成細胞毒性傷害係經由消耗掉細胞中穀胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的量使 Glutathione 失去作用所造成⁽²⁾。

Glutathione，早在 1888 年就被 Ee-Rey-Paihade 發現，但一直到 1920~30 年間，科學家們才開始揭露 Glutathione 的神祕面紗，更是到了近 20 年，Glutathione 在防老化、防癌方面的效果引起醫學界的高度重視。

Glutathione 的形成：所有哺乳類動物細胞內 Glutathione 的合成是從它之前驅物的胺基酸經由經過兩個 ATP 依賴性的反應途徑開始進行。Glutathione 是一種三勝肽化合物 (Tripeptide)，由三種胺基酸組合而成，分別為穀胺酸 (Glutamic acid, Glutamate)，半胱胺酸 (Cysteine)，以及甘胺酸 (Glycine) (圖 2)。在第一個反應過程中，先經過酵素 γ -Glutamyl-cysteine synthetase 之催化下，把 Glutamate 和 Cysteine 連結而形成 γ -Glutamyl-cysteine 之雙肽。第二個即最後的合成途徑是經過酵素 Glutathione synthetase 之催化後把 Glycine 引入雙肽結合而形成 Glutathione (γ -Glu-Cys-Gly) (圖 3)。而當這三種胺基酸在細胞內合成為 Glutathione 後，所產生最主要的生化作用有三：(1) 當做抗氧化劑 (Antioxidant)、(2) 當做

解毒劑（Detoxifier） 、(3)免疫系統的增強劑（Enhancer） 。

當身體內的自由基大量產生時(如輻射線、吸煙、激烈運動後)，需要 Glutathione 來捕捉並消滅自由基，以免臟器的損壞，嚴重可導致癌症的發生。長期服用成藥或食物中的農藥殘毒也需要Glutathione 的解毒作用來清除。而免疫系統差或是體弱多病的人，他們細胞內的Glutathione相對的就減少，因此，提昇Glutathione 可以增強免疫系統的防禦能力，降低疾病的發生以及細菌的感染。

Glutathione，它在人體體內所扮演的角色，在醫學界一直備受重視。若在電腦上搜尋，單單在過去三年間，由各大醫學或研究單位所發表有關 Glutathione 的研究報告，就有超過三萬六千多份。到底 Glutathione 的重要性在哪裡呢？經醫學界證明，若人體體內 Glutathione 降低，有可能帶來如下之情形：(1).體內解毒與排毒能力降低：肝臟是人類中含 Glutathione 最高的器官，這與肝臟的排毒能力成正比。若體內 Glutathione 降低，煙、酒、藥物或環境中的污染物等等，都無法有效的被肝臟代謝掉；相對的，這些外來物對身體造成的傷害反而會加強。(2).免疫力降低：Glutathione 是人體免疫系統中最有利的武器。缺乏 Glutathione，免疫細胞（T 細胞及巨噬細胞等）無法有效消滅細菌、病毒及寄生蟲等等的侵擾，人體防禦能力如同虛設，感冒及大大小小的病痛就如同家常便飯。(3).癌症發生率之升高：20 世紀人人聞之色變的癌症，早已被醫界證明與 Glutathione 之降低有直接密切

之關係。當體內的 Glutathione 降低時，正常細胞較容易因環境污染所引起的化學毒素活化產生突變，形成癌細胞，進而導致癌症的發生。(4).抗氧化力降低、體內氧化壓力不平衡：生化界及醫學界早已知道穀胱甘肽是體內抗氧化壓力最有強的武器，雖然不少人日常會補充維他命 C、E、胡蘿蔔素、SOD 等抗氧分子，但是最終仍需 Glutathione 的幫助，才能中和游離基的破壞力^(3,11,12,13)。

1-2 研究動機與目的

由於 Arecoline 會耗盡口腔粘膜細胞中 Glutathione 的含量而導致細胞受損，甚至使細胞受傷害進而產生癌病變⁽³⁾。所以本研究主要以動力學方法證實上述機轉，並且證實 Arecoline-Glutathione 之間交互作用為 pH 依賴性 (pH-dependent)。此外，另嘗試以 LC/MS/MS 方法將 Arecoline-Glutathione 所形成的加成物分離，並依據其質量譜解析其可能的構造式，並同時闡明其可能的反應程序機轉。

第二章 材 料 與 方 法

2-1 材料與儀器

2-1-1.試藥：

檳榔鹼，Arecoline • HBr (Acros，Beigium)

穀胱甘肽，L-Glutathione reduced，Glutathione (Sigma-Alorich，USA)

氯化鉀，KCl (Merck，Germany)

氫氧化鉀，KOH (Merck，Germany)

鹽酸，HCl (Merck，Germany)

醋酸鈉，Sodium acetate， $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck，Germany)

醋酸，Acetic acid (Merck，Germany)

磷酸，Phosphatic acid (Merck，Germany)

磷酸氫二鈉，di-Sodium hydrogen phosphate， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck，

Germany)

氫氧化鈣，Calcium hydroxide， $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Merck，Germany)

正庚基磺酸鈉塩，1-Heptane sulfonic acid sodium salt，PIC-B7 (Merck，
Germany)

Ethyenedinitrilo teracetic acid disodium salt dihyarate，EDTA (Merck，
Germany)

O-phthaldehyde，OPT (Merck，Germany)

甲醇，Methanol (Merck, Germany)

乙腈，Acetonitrile (Merck, Germany)

Imidazole (Merck, Germany)

甲酸，HCOOH (Merck, Germany)

純水，Mini-Q Pure water (Home maker)

2-1-2. 溶液的配製

pH=2.0 氯化鉀-鹽酸緩衝溶液：

- (1) 秤取氯化鉀 0.05 M 約 3.728 g 溶於 25 ml Milli-Q 純水中。
- (2) 量取 37% 鹽酸 8.5 ml。
- (3) 將上述(1)及(2)兩者混合，用 Milli-Q 純水調整其體積至 80 ml。
- (4) 用 1N 鹽酸或 1N 氢氧化鉀溶液調整 pH 至 2.0 ± 0.05 。
- (5) 再加純水使體積為 100 ml。

pH= 4.0、5.0 醋酸緩衝溶液：

- (1) 各秤取醋酸鈉 0.05 M 約 6.804 g 分別溶於 80 ml Milli-Q 純水中。
- (2) 以 1N 醋酸溶液調整 pH 至 4.0 ± 0.05 ； 5.0 ± 0.05 。
- (3) 再加純水使體積為 100 ml。

pH=6.0~10.0 磷酸緩衝溶液：

- (1) 各秤取磷酸氫二鈉 0.05M 約 8.90 g 溶於 80 ml Milli-Q 純水中。
- (2) 以 10%磷酸溶液分別調整至 pH 6.0±0.05；7.0±0.05；8.0±0.05；9.0±0.05；10.0±0.05。
- (3) 再加純水使體積為 100 ml。

pH=12.0 氢氧化鈣飽和溶液：

- (1) 於 100 ml Milli-Q 純水中加入氫氧化鈣 3 g 使成為飽和溶液 pH=12.0 ± 0.5,取上清液備用。

2-1-3.儀器設備：

2-1-3-1.酸鹼度測定儀 (pH meter)

廠牌：SUNTEX

型號：SP-701

2-1-3-2.水浴鍋 (Water bath)

廠牌：FIRSTEK

型號：B206

2-1-3-3.移液吸管 (Transferpette)

廠牌：BRAND

型號：100~1000ul

2-1-3-4. 加熱攪拌器

廠牌：Frago

型號：HMS-102

2-1-3-5. 高效能液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

2-1-3-5-1. 廠牌：SHIMADZU

系統控制器 (System controller) 型號：SCL-10A

自動注射器 (Auto injector) 型號：SIL-10A

幫浦 (Pump) 型號：LC-10AD

紫外光-檢測器 (UV-VIS detector) 型號：SPD-10A

層析管 (Column) 廠牌：E-Merck

型號：Purosphere RP-18(5 um), 250 x 4 mm

2-1-3-5-2. 廠牌：HITACHI

幫浦(Pump) 型號：L-2130

光二極體陣列檢測器(Photo Diode array detector) 型號：L-2450

微量注射器(Microinjector) 廠牌：HAMITO

型號：Microliter -25ul

層析管(Column) 廠牌：E-Merck

型號：LichroCART CN(5 um), 250 x 4 mm

2-1-3-6.螢光光度計 (Spectrofluorophotometer)

廠牌：SHIMADZU

型號：RF-1501

2-1-3-7.超純水製造機 (Water purification systems)

廠牌：MILLIPORE

型號：Milli-Q

2-1-3-8.減壓濃縮機 (Rotary Evaporator,)

廠牌：PANCHUM

型號：RE600

2-1-3-9.超音波振盪器 (Supersonic-oscillator)

廠牌：DELTA

型號：DC400

2-1-3-10. 三段四極串聯式液相層析質譜儀 (High performance triple quadrupole mass spectrometer)

2-1-3-10-1. HPLC 廠牌：Agilent

幫浦(Pump) 型號：Agilent 1100 G1312A

自動注射器 (Auto injector) 型號：Agilent 1100 G1329A

層析管保溫箱 (Column oven) 型號：Agilent 1100 G1316A

層析管(Column) 廠牌：SUPELTMSIL

型號：LC- CN (3um), 150 x 2.1 mm

2-1-3-10-2. 質譜儀 Mass Spectrometer

廠牌：AB Sciex Instruments 型號：API 4000

2-2 實驗方法

2-2-1. 檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用：

為了瞭解在不同 pH 值中 Arecoline 與 Glutathione 之間交互作用所產生含量變化的情形，將等濃度的 Arecoline 與 Glutathione 分別置於不同 pH 值(範圍分別為 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0)之緩衝溶液中，並於 37°C 水浴鍋中反應 20 分鐘，再分別利用 HPLC 及螢光光度計測量 Arecoline 與 Glutathione 的量。

方法：(1). 秤取等摩耳濃度($5.0 \mu \text{mole/ml}$) 的 Arecoline (HBr salt) 和 Glutathione 置於三角錐瓶中，並溶於已配製好不同 pH 值之緩衝溶液中。

(2). 將裝有混合液的三角錐瓶置於 37°C 水浴鍋中反應 20 分鐘。

(3). 反應終了時加入 1N HCl 使之終止反應。

(4). Arecoline 和 Glutathione 分別使用高效能液相層析儀和螢光光度計進行定量分析。

(5). 另外再以上述相同的方法，分別將 Glutathione 單獨在各種不同的 pH 緩衝液不加 Arecoline 中進行反應，最後再進行 Glutathione 的

含量測定。

【緩衝溶液】

pH=2.0：使用氯化鉀-鹽酸緩衝溶液；

pH=4.0；5.0：使用醋酸緩衝溶液；

pH=6.0~10.0：使用磷酸緩衝溶液；

pH=12.0：使用氫氧化鈣飽和溶液。

2-2-1-1. 檳榔鹼和檳榔次鹼的含量測定：

由於 Arecoline 本身即含有少量之 Arecaidine，所以同時測定 Arecoline 和 Arecaidine 的含量：

儀器： 利用 HPLC (LC 10AD, SHIMADZU) 配備自動注射器

層析管： Purosphere RP-18($5 \mu \text{m}$), 250 x 4 mm (E-Merck)

檢測器：UV 檢測器

移動相： 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (內含有 5mM PIC B7),
pH=5.0/Acetonitrile=85/15

流速： 1 ml/min

內部標準品：Imidazole

檢測器波長：UV 215 nm

2-2-1-2. 穀胱甘肽的含量測定：

由於 Glutathione 在 UV 215 nm 下並無吸光值，故利用螢光光度計來檢量其含量。

儀器：螢光光度計(Spectrofluorophotometer RF-1501,Shimadzu)

方法：(1).吸取 0.1 ml 的反應液，以 pH=2.0 之氯化鉀-鹽酸緩衝溶液稀釋定量至 10 ml 。

(2).再吸取上述(1)之稀釋液 0.1 ml 加入 1.8 ml pH=8.0 磷酸緩衝溶液 (內含有 5 mM EDTA),混合均勻，再加入 0.1 ml OPT(o-phthaldehyde;1 mg/ml, MeOH),於室溫中靜置 15 分鐘。

(3).再將反應液放入螢光光度計中使用波長 350 nm 至 420 nm 測量螢光物質的強度。

(4).利用已知濃度的 Glutathione (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 及 1.25 ug/ml)；依上述步驟操作，並做出標準液檢量線，再由檢量線算出反應液中最終 Glutathione 的濃度。

2-2-2. 檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中之動力反應：

由 Arecoline 與 Glutathione 之間的交互作用的反應中，觀察到當 pH 值在酸性的範圍中 Arecoline 消耗 Glutathione 的量是相當少量，甚至在 pH 值小於 5.0 時 Areceoline 與 Glutathione 幾乎是沒有反應的，當 pH=8.0~9.0 時 Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量最多，而在偏強鹼性的 pH=12.0 時

Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量比在弱鹼性 pH=8.0 時要來的少。所以分別選擇在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中觀察 Arecoline 和 Glutathione 交互作用的動力反應情形。

方法：(1). 稱取等莫耳濃度($5.0 \mu \text{mole/ml}$) 的 Arecoline (HBr salt) 和 Glutathione 裝有三角錐瓶中並分別溶於 pH=8.0 之磷酸緩衝溶液和 pH=12.0 之氫氧化鈣飽和溶液中。

- (2). 將裝有混合液的三角錐瓶置於 37°C 水浴鍋中反應。
- (3). 分別在反應第 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 和 60 分鐘時，用移液吸管吸取 0.1 ml 反應液進行 Arecoline、Arecaidine 和 Glutathione 的含量測定。
- (4). 另外再單獨稱取 $5 \mu \text{mole/ml}$ 的 Arecoline 分別溶於 pH=8.0 之磷酸緩衝溶液和 pH=12 之氫氧化鈣飽和溶液中不加 Glutathione 進行上述(2)及(3)的反應及測定 Arecoline 和 Arecaidine 的含量。

2-2-3. 檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0、10.0 及 12.0 緩衝溶液中加成物之分離純化與分析：

爲了證明 Arecoline 與 Glutathione 之間在鹼性的條件下反應會有加成物產生，故分別在 pH=8.0、10.0、12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應並利用配有光二極體陣列檢測器的 HPLC 進行反應加成物分析。

方法：(1). 秤取等莫耳濃度(5 mmole/ml) 的 Arecoline (HBr salt) 和 Glutathione 置於三角錐瓶，分別溶於 pH=8.0、10.0 之磷酸緩衝溶液中；pH=12.0 則溶於氫氧化鈣飽和溶液中。

(2). 置於攪拌器上進行反應 30 分鐘後，反應液經減壓濃縮至乾。

(3). 加入 20 ml 冰的 95% EtOH 經超音波振盪 3 分鐘將反應加成物萃取出來，醇液用濾紙過濾，濾液再加入 30 ml 乙醚使加成物析出，再靜置使之沈澱。

(4). 將上層澄清液倒掉，再重複操作一次上述(3)步驟。

(5). 再倒掉上層澄清液，沈澱物加 1 ml Mini-Q 純水溶解之，再用移液吸管吸取 0.1 ml 加 Mini-Q 水稀釋至 1 ml，再以 HPLC 進行加成物的分析。

(6). 儀器：HPLC (L-2130，HITACHI)

層析管：LC-CN(3 um), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

檢測器：光二極體陣列檢測器(L-2450，HITACHI)

移動相：Mini-Q H₂O

流速：0.1 ml/min

檢測器波長：190 nm

2-2-4. LC/MS/MS 測定檳榔鹼與穀胱甘肽加成物的分子量^(13,14,15,16)：

將實驗 2-2-5 在不同 pH 值中純化分離出來之加成物，利用 LC-MS-MS 測定加成物分子量。

2-2-4-1.LC/MS 之檢測：

儀 器：HPLC (Agilent 1100)

層析管：LC-CN(3 um), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

溫 度：20

移動相：1% HCOOH

注射量：10 ul

流 速：0.1ml/min

時 間：25 min

質譜儀：(API 4000, AB Sciex Instruments)

掃瞄範圍：100~600 m/z,amu

掃瞄頻率：0.4 sec

溫 度：450

2-2-4-2.MS/MS 之檢測：

質譜儀：(API 4000, AB Sciex Instruments)

掃瞄範圍：pH=8.0 之加成物：463 m/z,amu

pH=10.0 之加成物：420 m/z,amu

pH=12.0 之加成物：449 m/z,amu

掃瞄頻率：0.4 sec 掃瞄溫度：450

第三章 結 果

3-1. 檳榔鹼與穀胱甘肽之間的交互作用：

為了瞭解在不同酸鹼度中 Arecoline 與 Glutathione 之間交互作用所產生含量變化的情形，所以將等濃度的 Arecoline 與 Glutathione 分別置於不同 pH 值(範圍分別為 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0)之緩衝溶液中，並於 37°C 水浴鍋中反應 20 分鐘，再分別利用 HPLC 及螢光光度計測量 Arecoline 與 Glutathione 的量。

3-1-1. 檳榔鹼和檳榔次鹼的含量測定：

利用 HPLC 進行 Arecoline 和 Arecaidine 的含量測定結果發現：Arecaidine、內部標準品 Imidazone 和 Arecoline 滯留時間分別為 1.957min、2.601min 和 4.119min(圖 4)。依不同濃度標準溶液分析 Arecoline 和 Arecaidine 其所得之檢量線皆呈直線之線性關係，相關系數分別為 $r=0.99988$ (圖 5)及 $r=0.99994$ (圖 6)。

3-1-2. 穀胱甘肽的含量測定：

利用螢光光度計測量 Glutathione 與 OPT 所形成螢光物質的吸收強度，再由 Glutathione 標準溶液檢量線換算出 Glutathione 的含量，其所得之檢量線皆呈直線之線性關係，相關系數分別為 $r^2=0.9995$ (圖 7)。

由以上 Arecoline 與 Glutathione 含量測的結果發現當 pH 值在酸性的範圍中 Arecoline 消耗 Glutathione 的量是相當少量，甚至在 pH 值小於 5.0 時 Arecoline 與 Glutathione 幾乎是沒有反應的，當 pH=8.0~9.0 時 Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量最多，而在偏強鹼性的 pH=12.0 時 Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量比在弱鹼性 pH=8.0 時要來的少(圖 8)，又當 Glutathione 單獨在各種不同的 pH 值緩衝液不加 Arecoline 中進行反應，進行 Glutathione 的含量測定結果發現 Glutathione 的含量在各種不同的 pH 值緩衝液並無明顯的變化(圖 9)。

3-2. 檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中之動力反應：

當 Arecoline 在 pH=8.0 的緩衝溶液中不含 Glutathione 單獨反應，其含量不會隨著反應時間增加減少(圖 10-A)；但是在 pH=12.0 的緩衝液中 Arecoline 單獨反應其含量會隨著反應時間增加而且很快的減少，相對的 Arcainine 的含量會隨著反應時間增加而且很快的增加(圖 10-B)。由 Arecoline 與 Glutathione 之間交互作用的實驗所產生含量變化的情形中發現，當 pH=8.0~9.0 時 Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量最多，而在偏強鹼性的 pH=12.0 時 Arecoline 所消耗掉 Glutathione 的量比在弱鹼性 pH=8.0 時要來的少。所以分別選擇在 pH=8.0 和 12.0 緩衝溶液中觀察 Arecoline 和 Glutathione 交互作用的動力反應情形。結果發現在含有 Glutathione 在 pH=8

的反應液中 Arecoline 的含量會隨著反應時間增加而呈現出很快且較多量的減少(圖 11-A)；在 pH 值=12.0 的反應液中 Arecoline 的含量亦會隨著反應時間增加而且減少但是減少的量要比在 pH=8.0 的反應液中來得少(圖 11-B)。從 pH=8.0 緩衝溶液中的動力反應實驗結果，顯示其反應並非呈現線性反應而是呈曲線反應，且在反應的前 10 分鐘反應是快速進行(圖 12)。

3-3. 檳榔鹼與穀胱甘肽在 pH=8.0、10.0 及 12.0 緩衝溶液中加成物之分析：利用配有光二極體陣列檢測器的 HPLC 進行分析 Arecoline 與 Glutathione 之間在 pH=8.0、10.0、12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，由層析圖中得知 Arecoline 與 Glutathione 加成物滯留時間在 pH=8.0 時為 6.62 分鐘(圖 13)、在 pH=10.0 時為 4.55 分鐘(圖 14)、在 pH=12.0 時為 7.90 分鐘(圖 15)。

3-4. LC/MS/MS 測定檳榔鹼與穀胱甘肽加成物的分子量：

3-4-1. 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物：

在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，層析圖譜在 14.07 分鐘及 17.52 分鐘有波峰出現(圖 16)，其質量譜在 463m/z 均有波峰出現 (圖 17,18)。再由 MS/MS 分析加成物 463m/z [Adduct]⁺，分別出現 334m/z [Adduct-Glutamate]⁺、188m/z [Adduct-GSH+S]⁺、156m/z [Adduct-GSH=Arecoline]⁺ (圖 19)。故推測 Arecoline

與 Glutathione 在 pH=8.0 緩衝溶液中加成物之分子量有可能是 463m/z。

3-4-2. 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物：

在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，層析圖譜在 12.57 分鐘和 14.70 分鐘及 18.55 分鐘有波峰出現(圖 20)，在 12.57 分鐘和 14.70 分鐘並無顯著的質量□片出現(圖 21)，在 18.55 分鐘出現的波峰有 449m/z 的質量□片出現 (圖 22)。再由 MS/MS 分析加成物 449m/z [Adduct]⁺，分別出現 320m/z [Adduct—Glutamate]⁺、176m/z [Adduct—GSH+S]⁺ (圖 23)。故 Arecoline 與 Glutathione 在 pH=12.0 緩衝溶液中加成物之分子量可能是 449m/z[Adduct]⁺。

3-4-3. 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物：

在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，層析圖譜在 13.97 分鐘及 17.67 分鐘有波峰出現(圖 23)，其質量□片在 463m/z、449m/z、420m/z 均有波峰出現 (圖 25,26)。故推測 Arecoline 與 Glutathione 在 pH=10.0 緩衝溶液中加成物之分子量 463m/z、449m/z、420m/z 皆有可能是其反應的加成物。再由 MS/MS 分析加成物 420m/z [Adduct]⁺，分別出現 145m/z [Adduct—GSH+S]⁺、114m/z[Adduct—GSH]⁺ (圖 27)。

第四章 討 論

在過去衆多研究與實驗中，均已證實檳榔成分中之 Arecoline 會造成細胞的癌化現象，而 Arecoline 將細胞內 Glutathione 含量消耗掉與癌化的機轉有關，由本實驗中再次得到證實。

此外，在 LC/MS/MS 方法分析中，由第一次撞擊所得結果顯示，在不同 pH 值緩衝溶液中所形成的反應加成物其主要的斷片質量亦有所不同。綜合一次及二次撞擊所得的主要斷片質量數據，顯示至少有三種不同的加成物在其交互作用之反應中形成。

過去的研究中也曾探討過 Arecoline 的代謝產物即為 Arecoline 與 Glutathione 加成物，只是早期是利用濾紙色層析法、紅外線光譜儀來確認代謝物之分子式⁽¹⁷⁾。拜科技進步之賜，本實驗利用 HPLC 及配有 Diode array detector 並具定性及定量的功能，能正確將加成物分離出來；再配合串聯式液相層析質譜儀能更精確的測定出加成物的分子質量。所以對於探討在不同 pH 值中 Arecoline 與 Glutathione 交互作用的反應程序有實質上的幫助。

第五章 結 論

在不同酸鹼值中，Arecoline 與 Glutathione 之間交互作用及動力反應實驗中，結果均顯示 Arecoline 的確會將 Glutathione 的量消耗掉，且是在 pH=8.0 弱鹼性的環境下消耗 Glutathione 的量最多。在 pH>10.0 強鹼環境中，Arecoline 會快速水解成 Arecaidine，由於 Arecoline 的量減少相對的消耗掉 Glutathione 的量也減少。故可以證實 Arecoline 與 Glutathione 之間交互作用確實具有酸鹼依賴性。另外，從 Arecoline 與 Glutathione 在不同酸鹼值緩衝溶液加成物的反應、純化及質譜分析分析結果中顯示至少有三種不同的加成物在其交互作用之反應中形成，可以得知加成反應程序機轉是存在的(圖 28)，並且加成產物是可以被分離出來。

參考文獻

1. Huang JF, Chen CC, Tsai CC. The effects of betel nut alkaloids on human oral fibroblasts. *Chia-nan Annual Bulletin*. 1994;20:123-137.
2. Chang MC, Ho YS, Chan CP *et al*. Areca nut extract and arecoline induced the cell cycle arrest but not apoptosis of cultured oral KB epithelial cells: association of Glutathione, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis*. 2001; 22(9):1527-1535.
3. Chang BE, Liao MH, Kuo YP, Chen CH. Developmental Toxicity of Arecoline, the Major Alkaloid in Betel Nuts, in Zebrafish Embryos. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004;70:28-36.
4. Lai KC; Lee TC. Genetic damage in cultured human keratinocytes stressed by long-term exposure to areca nut extracts. *Mutat Res*. 2006;599:66-75.
5. Dasgupta R, Saha I, Pal S *et al*. Immunosuppression, hepatotoxicity and depression of antioxidant status by arecoline in albino mice. *Toxicology*. 2006; 227:94-104.
6. Lee PH, Chang MC, Chang WH *et al*. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: Regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis. *Toxicology*. 2006; 220:81-89.
7. Cox S, Piatkov I, Vickers ER, Ma G. High-performance liquid chromatographic determination of arecoline in human saliva. *J Chromatogr A*. 2004; 1032:93-95.
8. Jeng JH, Tsai CI, Hang LJ *et al*. Arecoline Cytotoxicity on Human Oral Mucosal Fibroblasts Related to Cellular Thiol and Esterase Activities. *Food Chem Toxicol*. 1999; 37:751-756.
9. Chatterjee A, Deb S. Genotoxic effect of arecoline given either by the peritoneal or oral route in murine bone marrow cells and the influence of N-acetylcysteine. *Cancer Lett*. 1999; 139:23-31.
10. Kyto V, Lapatto R, Sarate A *et al*. Glutathione depletion and cardiomyocyte apoptosis in viral myocarditis. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34:167-175.
11. Kawakami SK, Gledhill M, Achterberg EP. Determination of phytochelatins and Glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection. *Trends Analyt Chem*. 2006; 25:13-3142.
12. Michelet F, Gueguen R, Leroy P *et al*. Blood and Plasma Glutathione Measured in Healthy Subjects by HPLC. *Clin Chem*. 1995; 41:1509-1517.
13. Fan Y, Schreiber EM, Giorgianni A, Yalowich JC, Day BW. Myeloperoxidase-Catalyzed Metabolism of Etoposide to Its Quinone and Glutathione Adduct Forms in HL60 Cells. *Chem res toxicol*. 2006;

19:937-943.

14. Yu LJ, Chen Y, Deninno MP, O'Connell TN, Hop CE. Identification of a novel Glutathione adduct of diclofenac, human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33:484-488.
15. Pauluhn J, Brown WE, Hext P, Leibold Edgar, Leng G. Analysis of biomarkers in rats and dogs exposed to polymeric methylenediphenyl disocyanate (pMIDI) and its glutathione adduct. *Toxicology.* 2006;222:202-212.
16. Kinoshita K, Ochi T, Toshihide S, Kita K, Kaise T. Glutathione plays a role in regulating the formation of toxic reactive intermediates from diphenylarsinic acid. *Toxicology.* 2006;225:142-149.
17. Boyland E, Nery R. Mercapturic acid formation during the metabolism of Arecoline and Arecaidine in the rat. *Biochem J.* 1969;113:123-130.

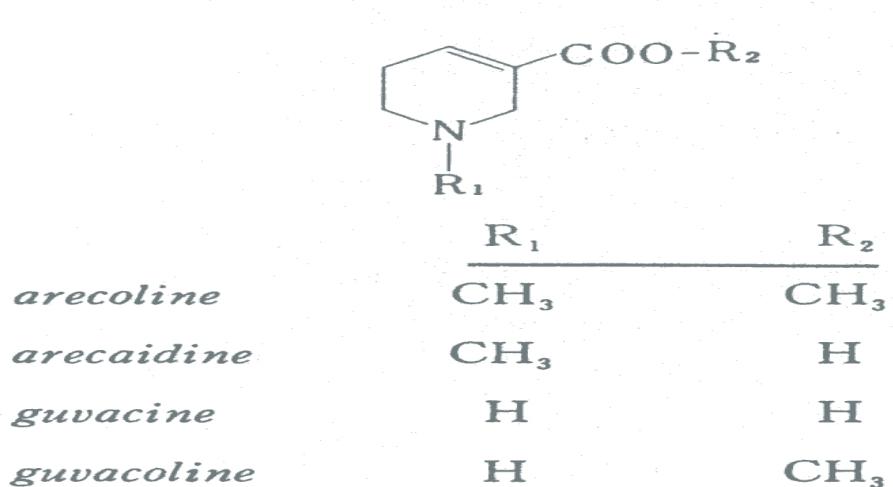


圖 1. 檳榔生物鹼之結構式。

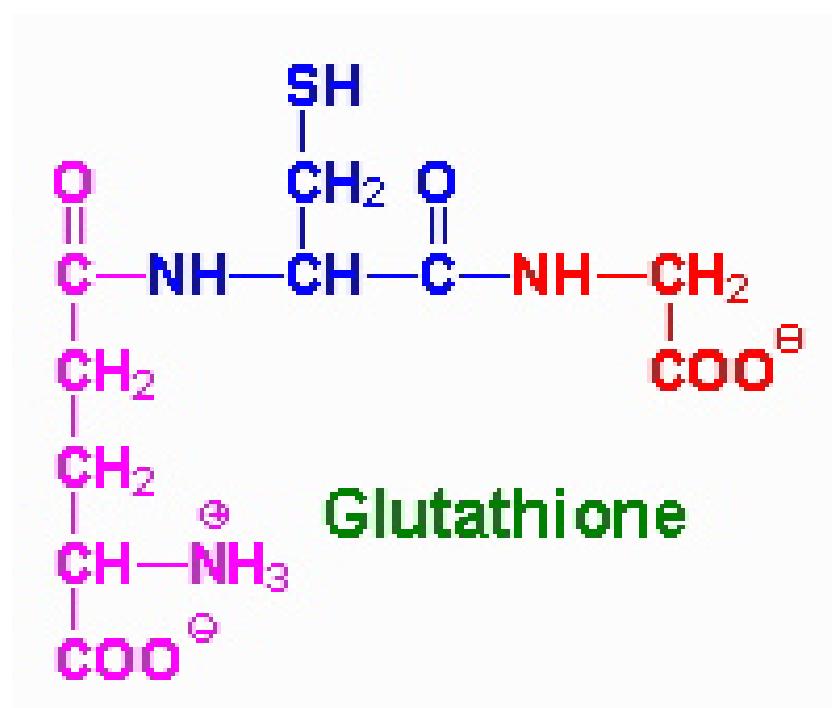


圖 2. Glutathione 之結構。

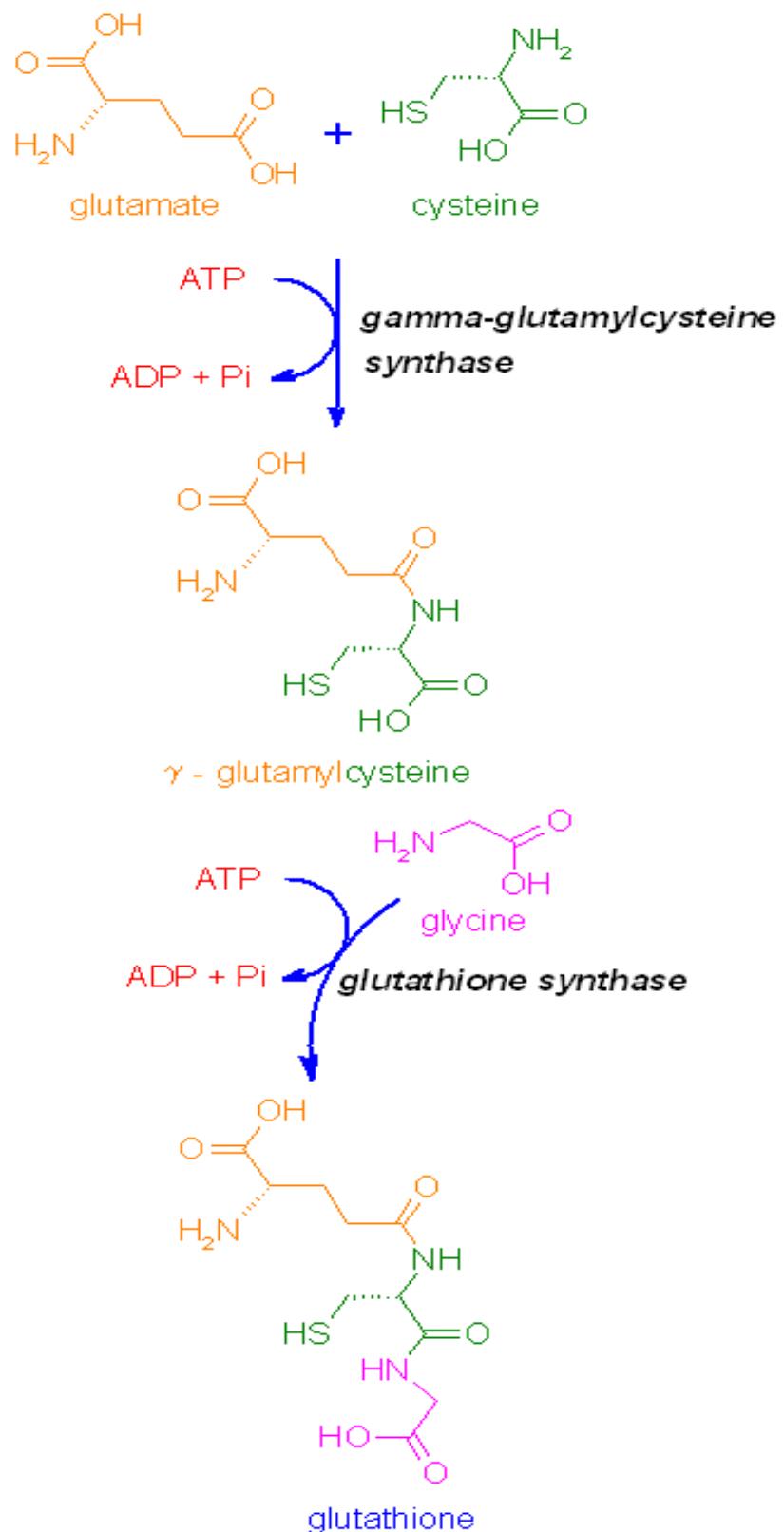


圖 3.Glutathione 之生合成路徑圖。

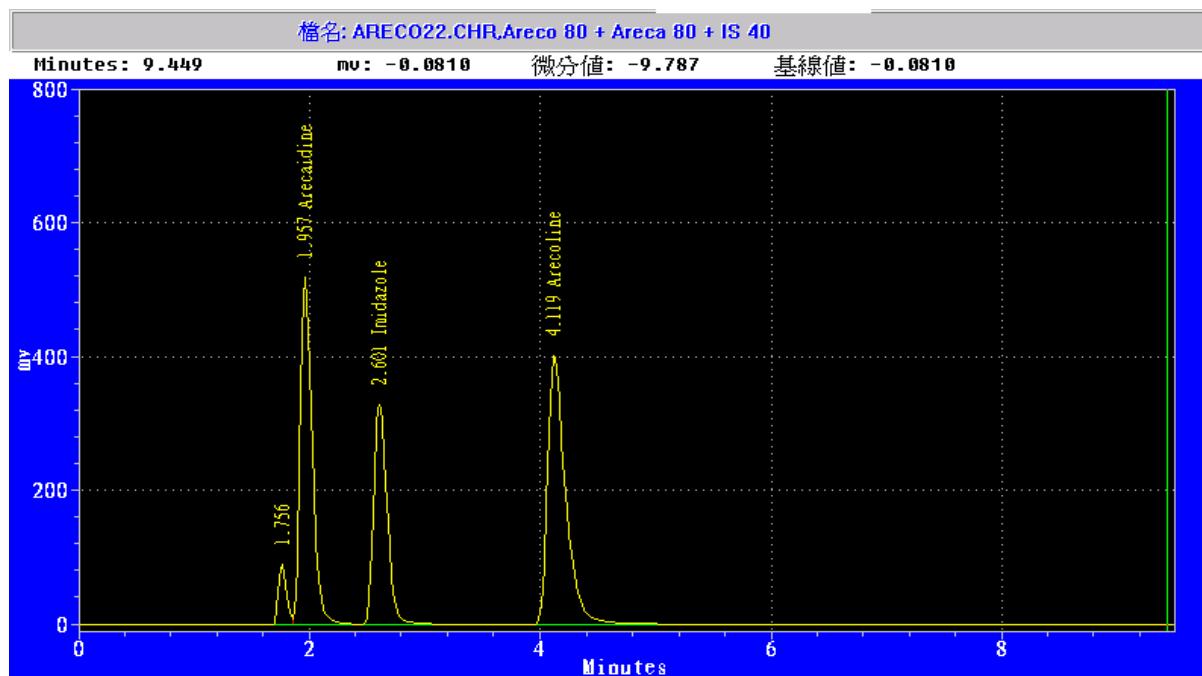


圖 4. Arecoline 和 Arecaidine HPLC 層析圖譜。

層析管： Purosphere RP-18($5 \mu m$), 250 x 4 mm (E-Merck)

移動相： 0.05M 磷酸緩衝溶液 (內含有 5mM PIC B7),

pH=5.0/Acetonitrile=85/15

流速： 1 ml/min

內部標準品： Imidazole

檢測器波長： UV 215 nm

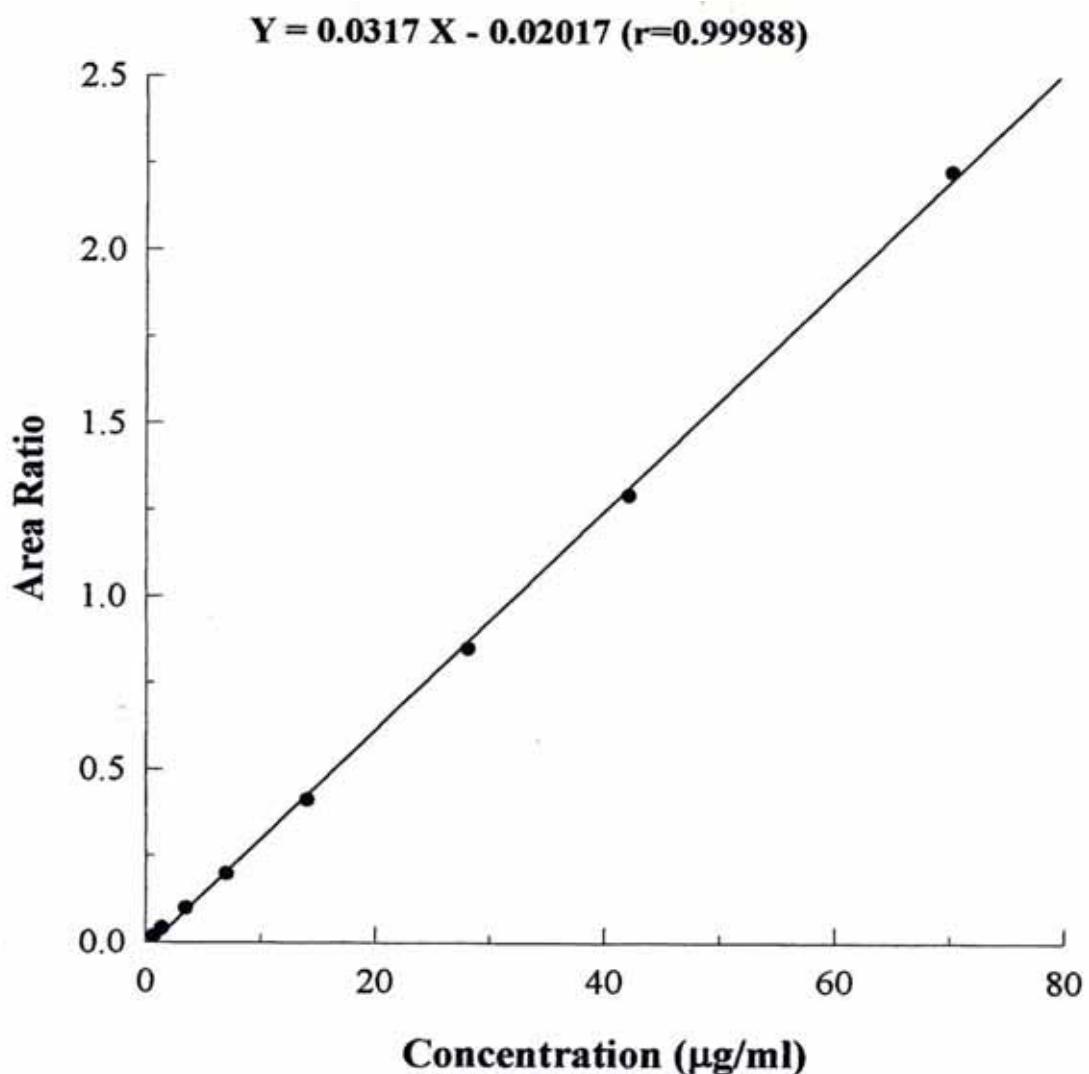


圖 5. Arecoline 標準溶液檢量線圖。

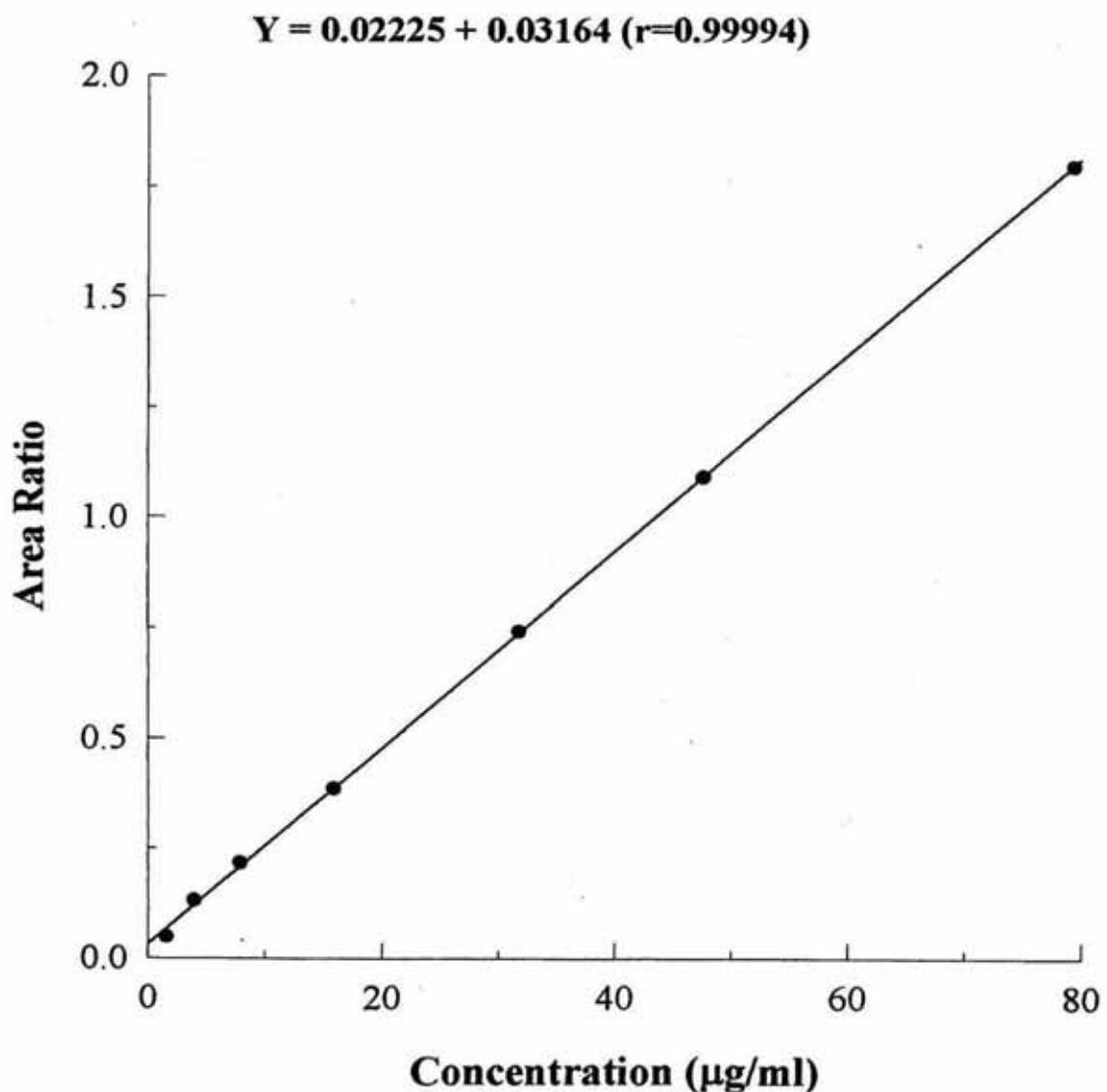


圖 6. Arecaidine 標準溶液檢量線圖。

$$Y = 207.31 X + 3.2196 \quad r^2 = 0.9995$$

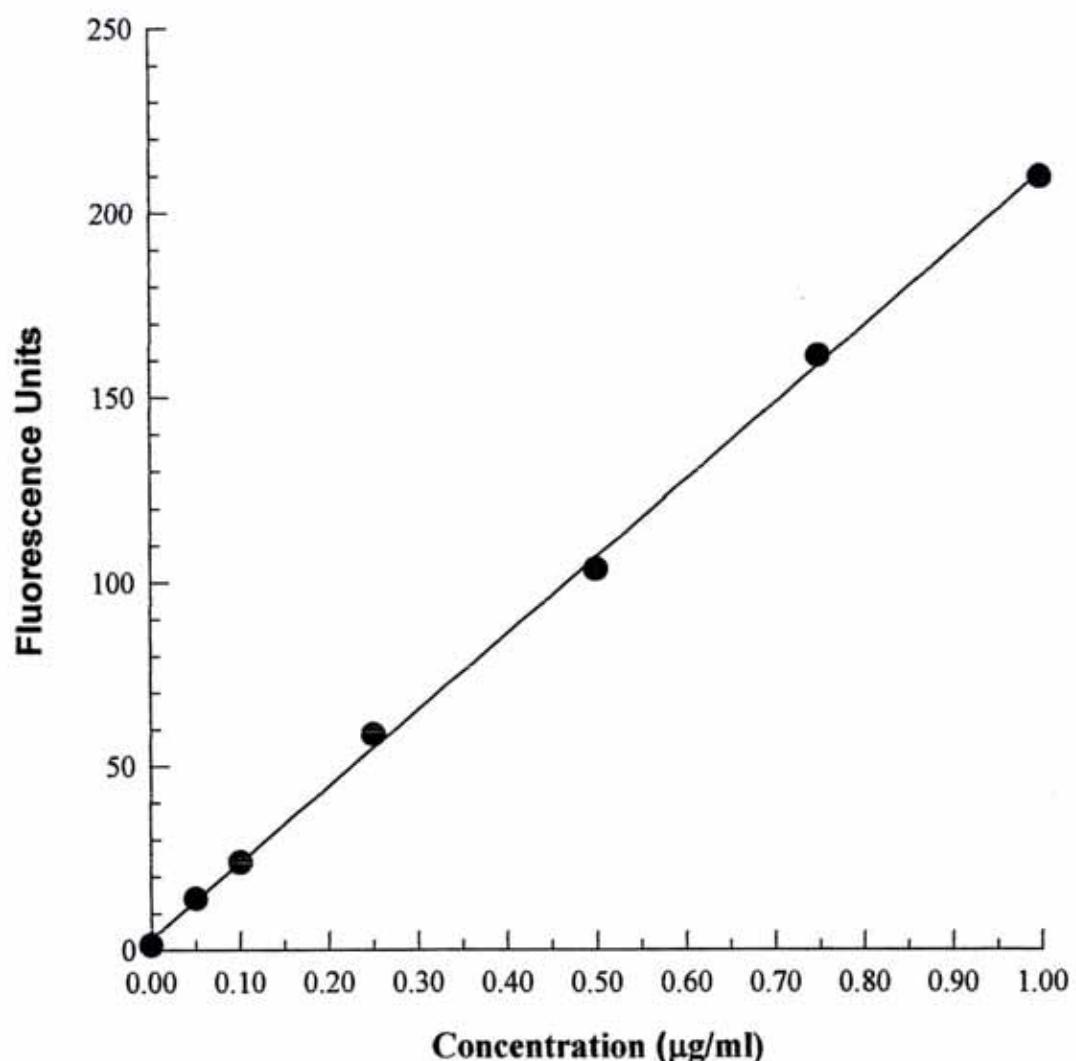


圖 7.Glutathione 標準溶液檢量線圖。

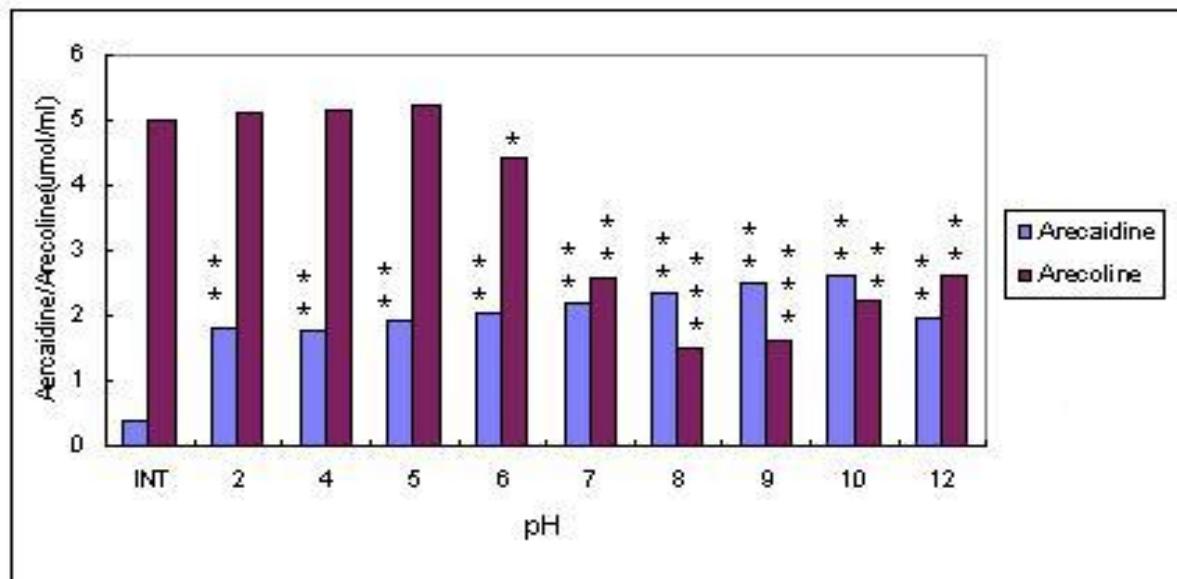


圖 8. Arecoline 與 Glutathione 在不同 pH 值之間的交互作用中 Arecaidine/Arecoline 含量統計圖。

等濃度($5.0 \mu \text{mol/ml}$)之 Arecoline 和 Glutathione 在 37°C 中反應 20 分鐘後利用 HPLC 檢測 Arecolone 與 Arecaidine 的含量。

Bars are the means of triplicate determinations:

* Statistically significant, as compared to initial concentration, $p < 0.05$.

** Statistically significant, as compared to initial concentration, $p < 0.01$.

*** Statistically significant, as compared to initial concentration, $p < 0.0001$.

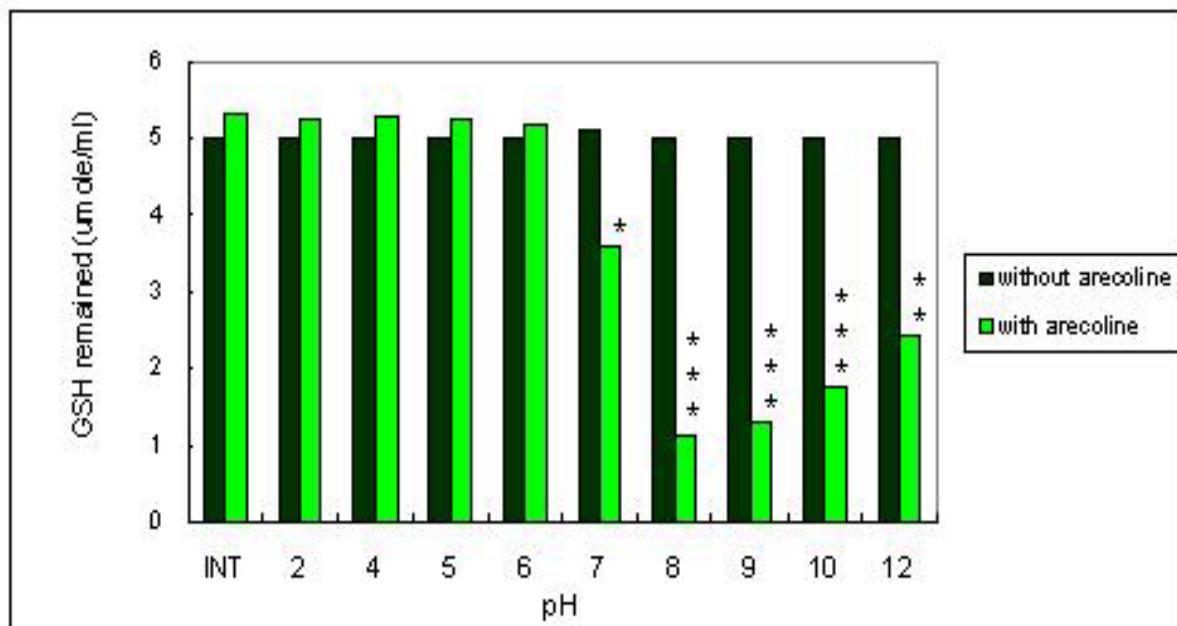


圖 9. Arecoline 與 Glutathione 在不同 pH 值之間的交互作用 Glutathione 含量統計圖。

等濃度($5.0\mu\text{mol/ml}$)之 Arecoline 和 Glutathione 在 37°C 中反應 20 分鐘後利用螢光光度計檢測 Glutathione 的含量。

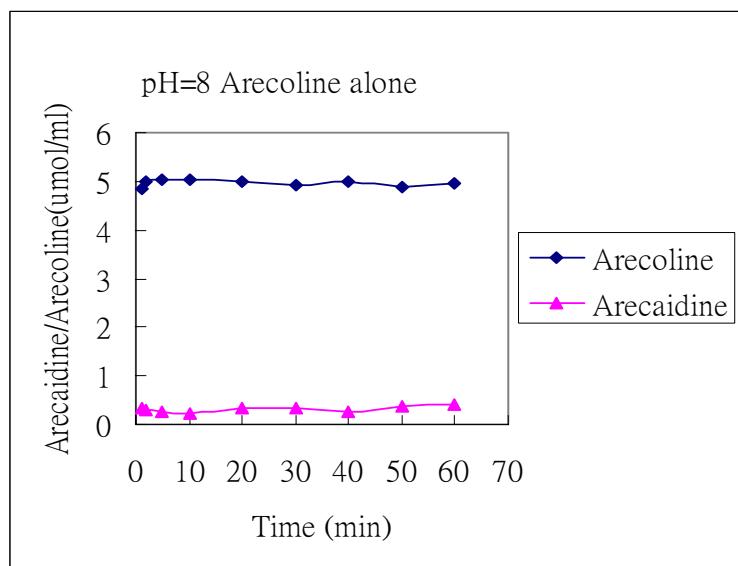
Bars are the means of triplicate determinations:

* Statistically significant, as compared to initial concentration, $p<0.05$.

** Statistically significant, as compared to initial concentration, $p<0.01$.

*** Statistically significant, as compared to initial concentration, $p<0.0001$.

A.



B.

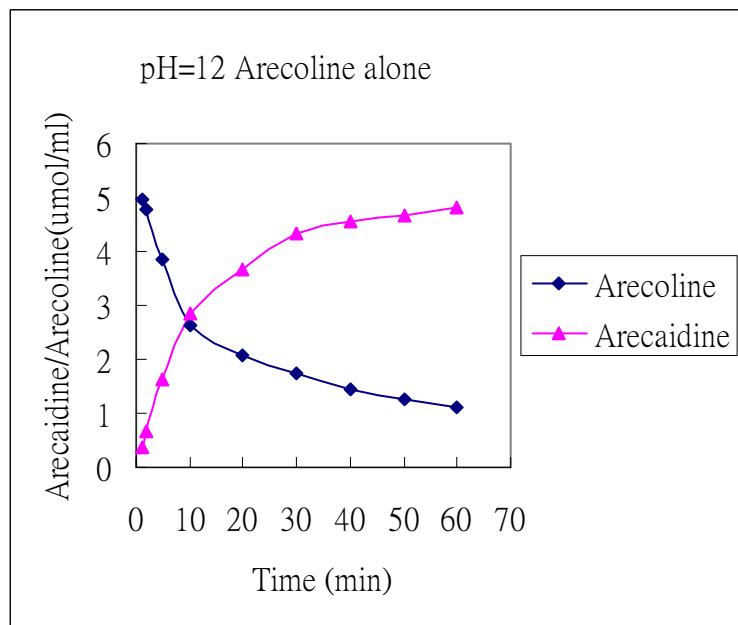
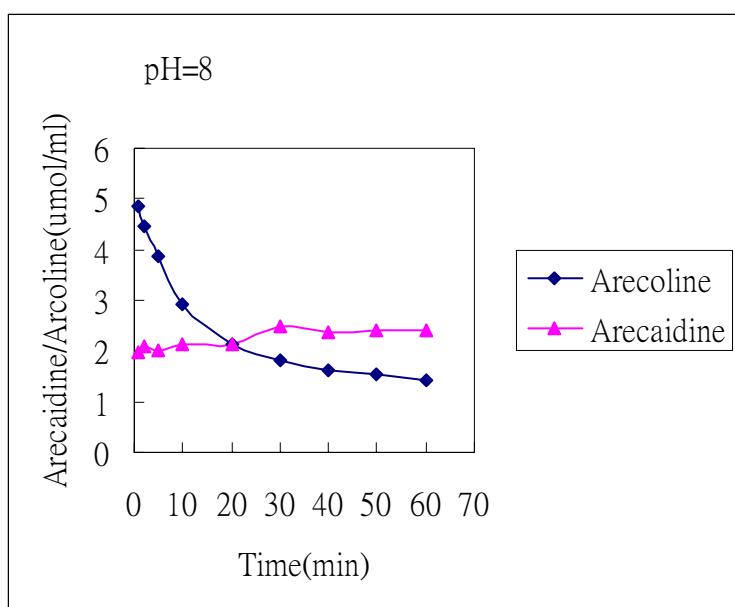


圖 10. pH=8.0(A)和 pH=12.0(B)緩衝溶液中，Arecoline 與 Arecaidine 反應之動力曲線圖。

Arecoline 分別在 pH=8.0 和 pH=12.0 緩衝溶液不含 Glutathione，於 37°C 水浴鍋中反應 60 分鐘後利用 HPLC 檢測 Arecoline 與 Arecaidine 的含量。

A.



B.

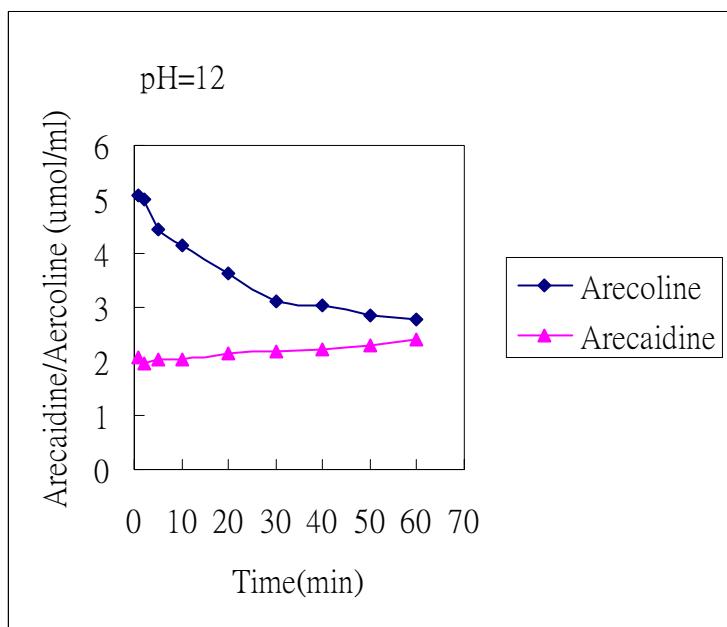


圖 11. pH=8.0(A)和 pH=12.0(B)緩衝溶液中，Arecoline 和 Glutathione 交互作用之動力反應曲線圖。

於 37°C 水浴鍋中反應 60 分鐘後利用 HPLC 檢測 Arecolone 與 Arecaidine 的含量。

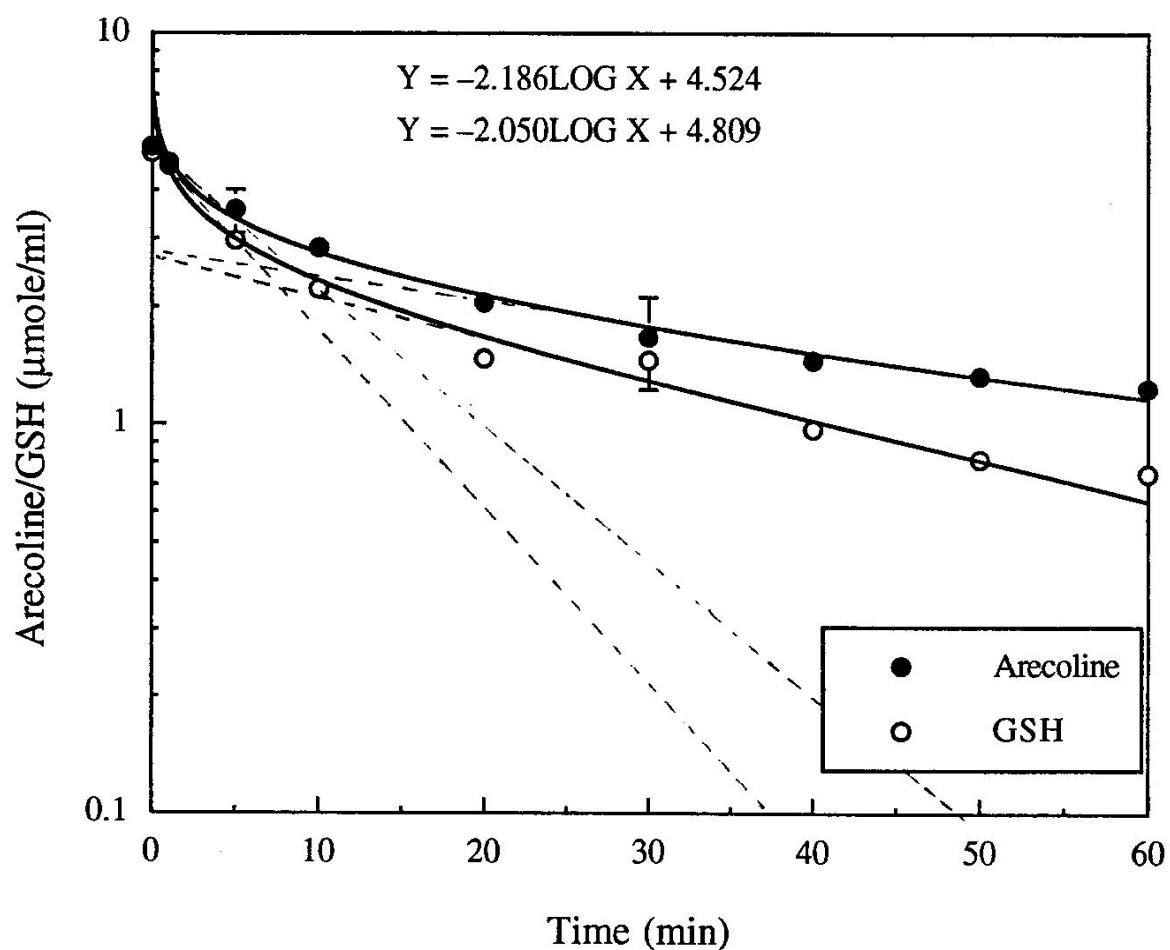


圖 12. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=8.0 緩衝溶液中之動力反應曲線圖。

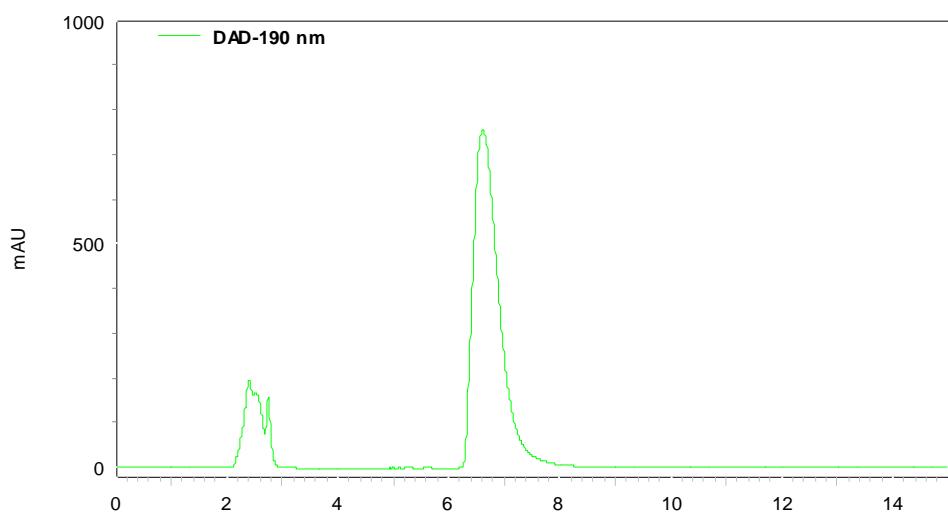


圖 13. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=8.0 緩衝溶液中，加成物滯留時間在 6.62 分鐘之 HPLC 層析圖譜。

層析管：LC-CN (3 μm), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

檢測器：光二極體陣列檢測器(L-2450, HITACHI)

移動相：Mini-Q H₂O

流速：0.1 ml/min

檢測器波長：190 nm

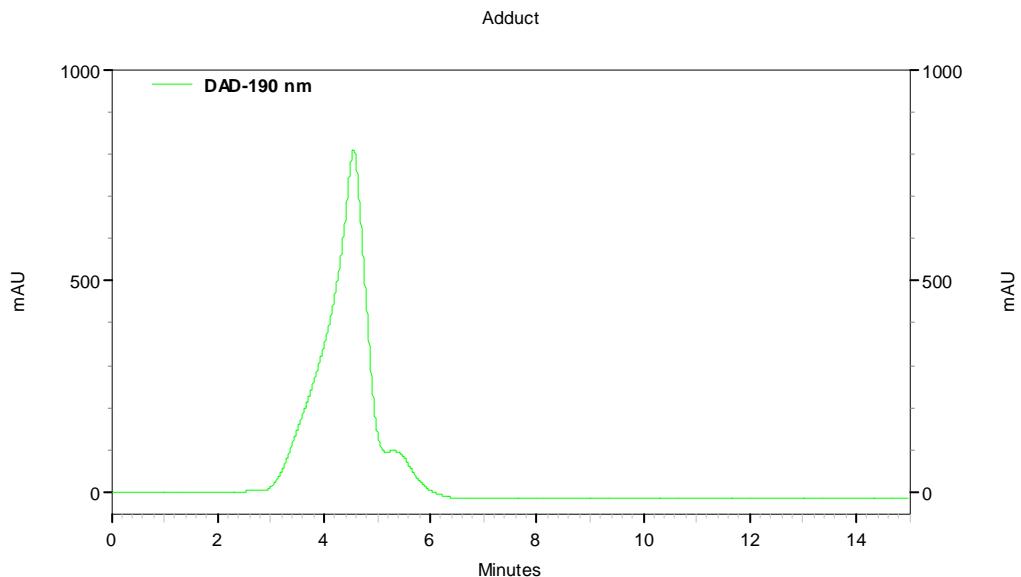


圖 14. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=10.0 緩衝溶液中，加成物滯留時間在 4.55 分鐘之 HPLC 層析圖譜。

層析管：LC-CN (3 μm), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

檢測器：光二極體陣列檢測器(L-2450, HITACHI)

移動相：Mini-Q H₂O

流速：0.1 ml/min

檢測器波長：190 nm

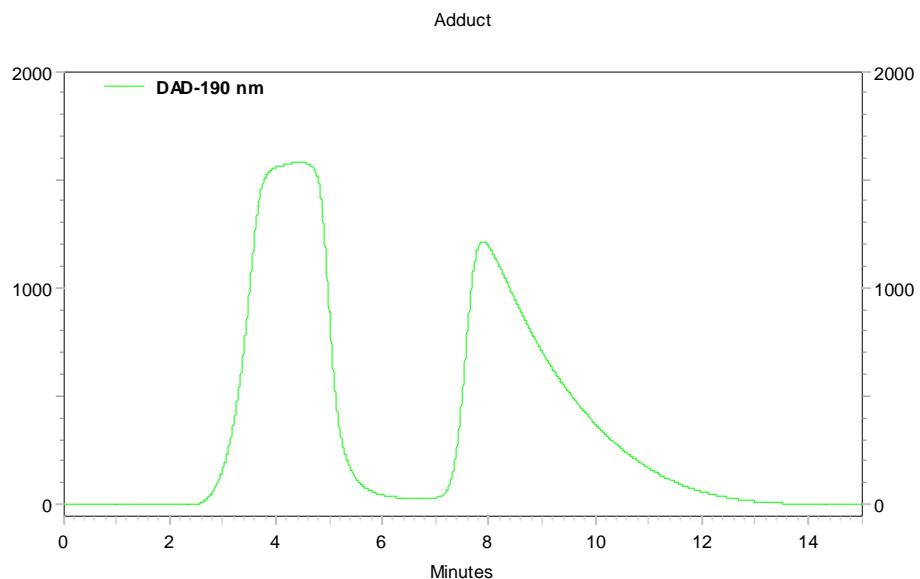


圖 15. Arecoline 與 Glutathione 在 pH=12.0 緩衝溶液中，加成物滯留時間在 7.90 分鐘之 HPLC 層析圖譜。

層析管：LC-CN (3 μm), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

檢測器：光二極體陣列檢測器(L-2450, HITACHI)

移動相：Mini-Q H₂O

流速：0.1 ml/min

檢測器波長：190 nm

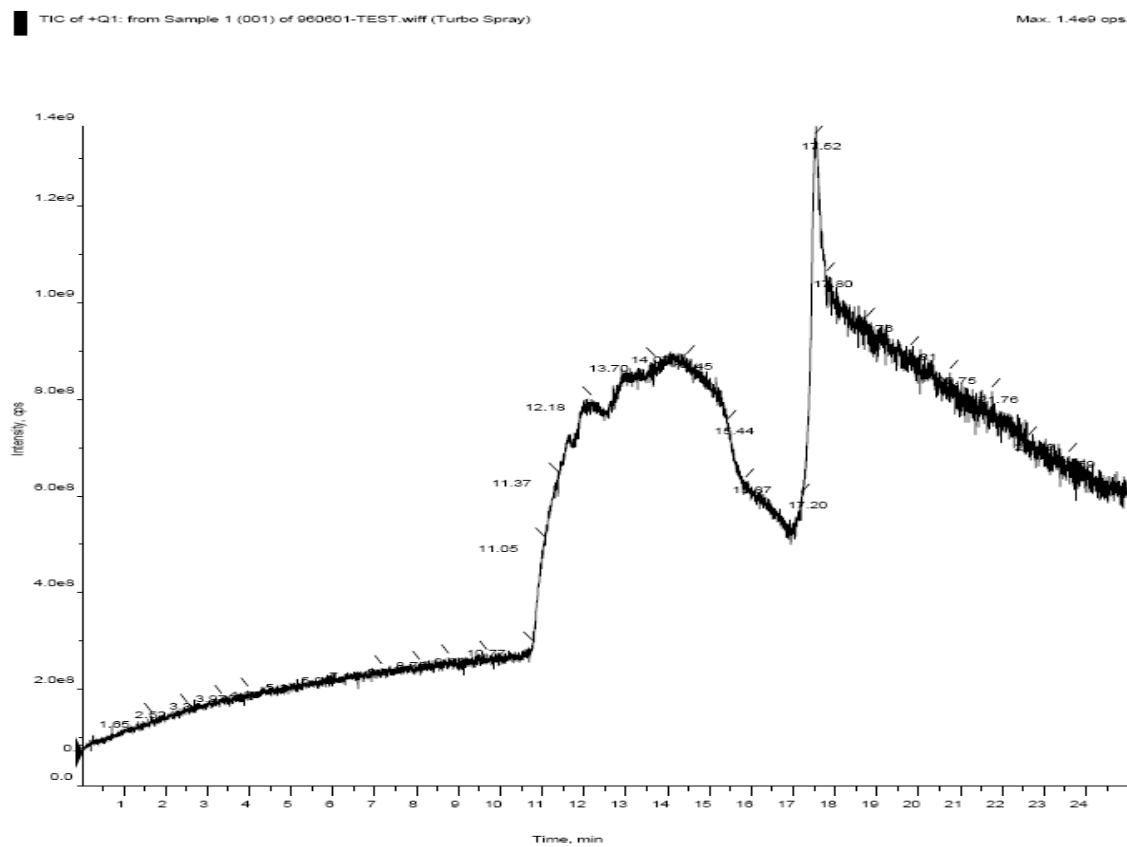


圖 16. pH=8 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 檢測的層析圖譜。

層析管：LC-CN (3 μ m), 150 x 2.1 mm (SUPELLOSILTM)

溫 度：20

移動相：1% HCOOH

注射量：10ul

流速：0.1ml/min

時 間：25 min

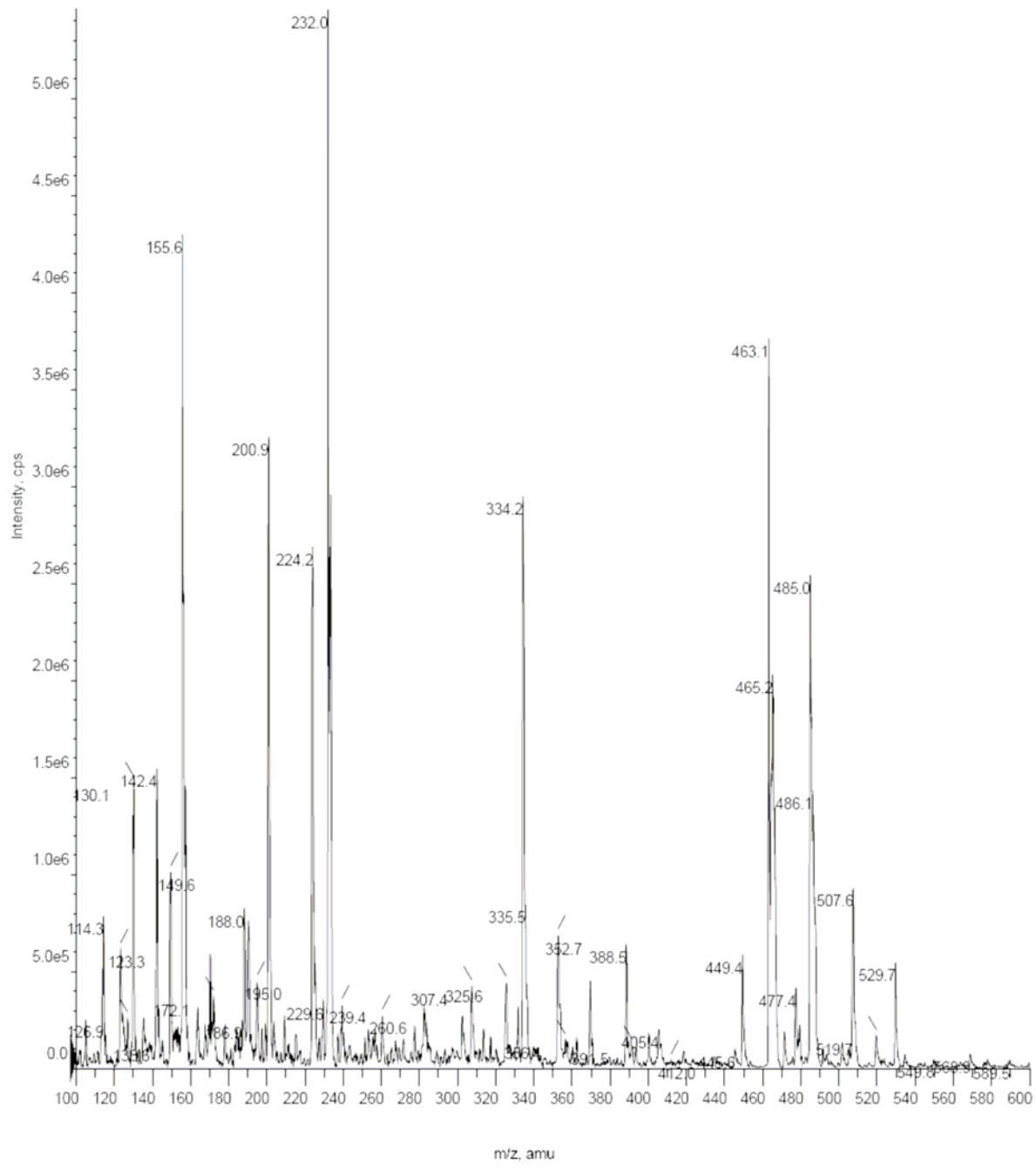


圖 17. 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，在 14.07 分鐘波峰其質量□片圖。

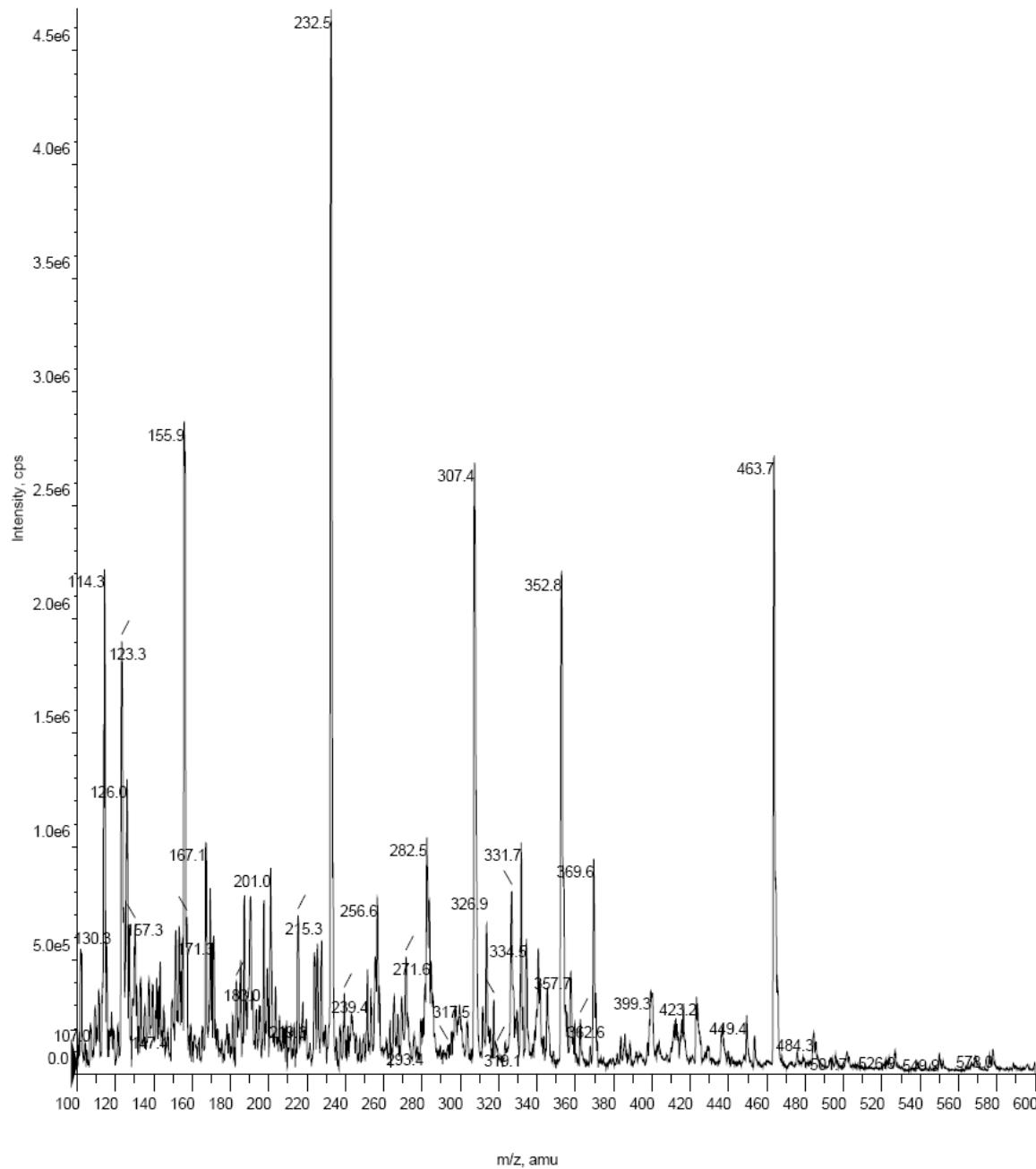


圖 18. 在 pH=8.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測在 17.52 分鐘波峰其質量□片圖。

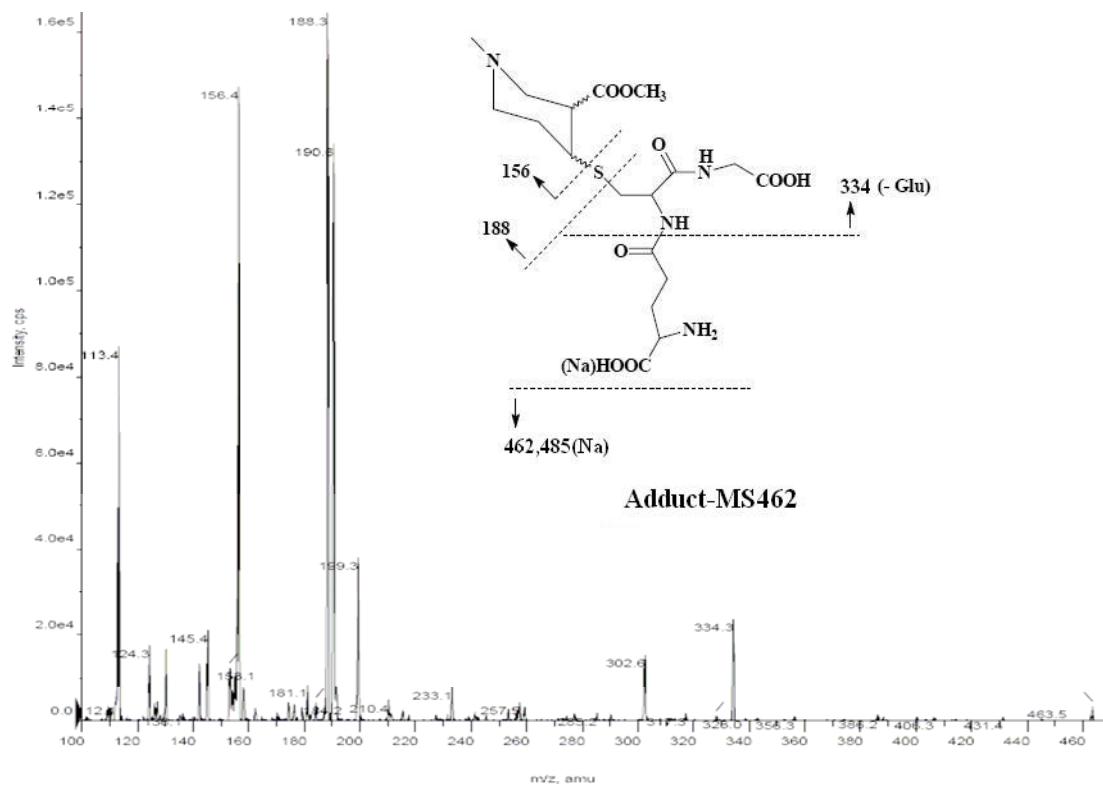


圖 19. 在 pH=8.0 MS/MS 分析加成物 $463\text{m/z}[\text{Adduct}]^+$ 質量□片圖。

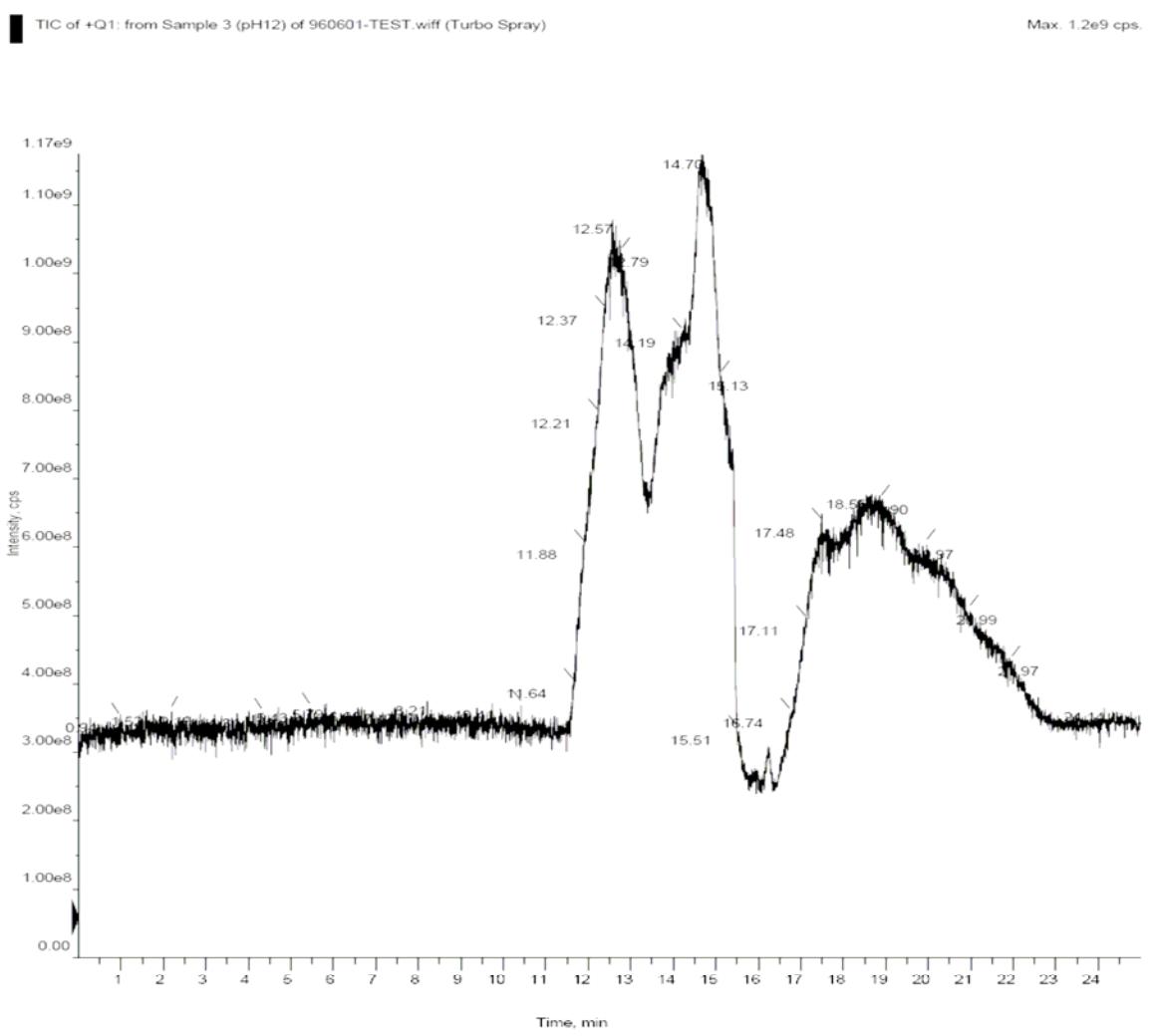


圖 20. pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 檢測的層析圖譜。

層析管：LC-CN(3 μ m), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

溫 度：20

移動相：1% HCOOH

注射量：10 μ l

流 速：0.1 ml/min

時 間：25 min

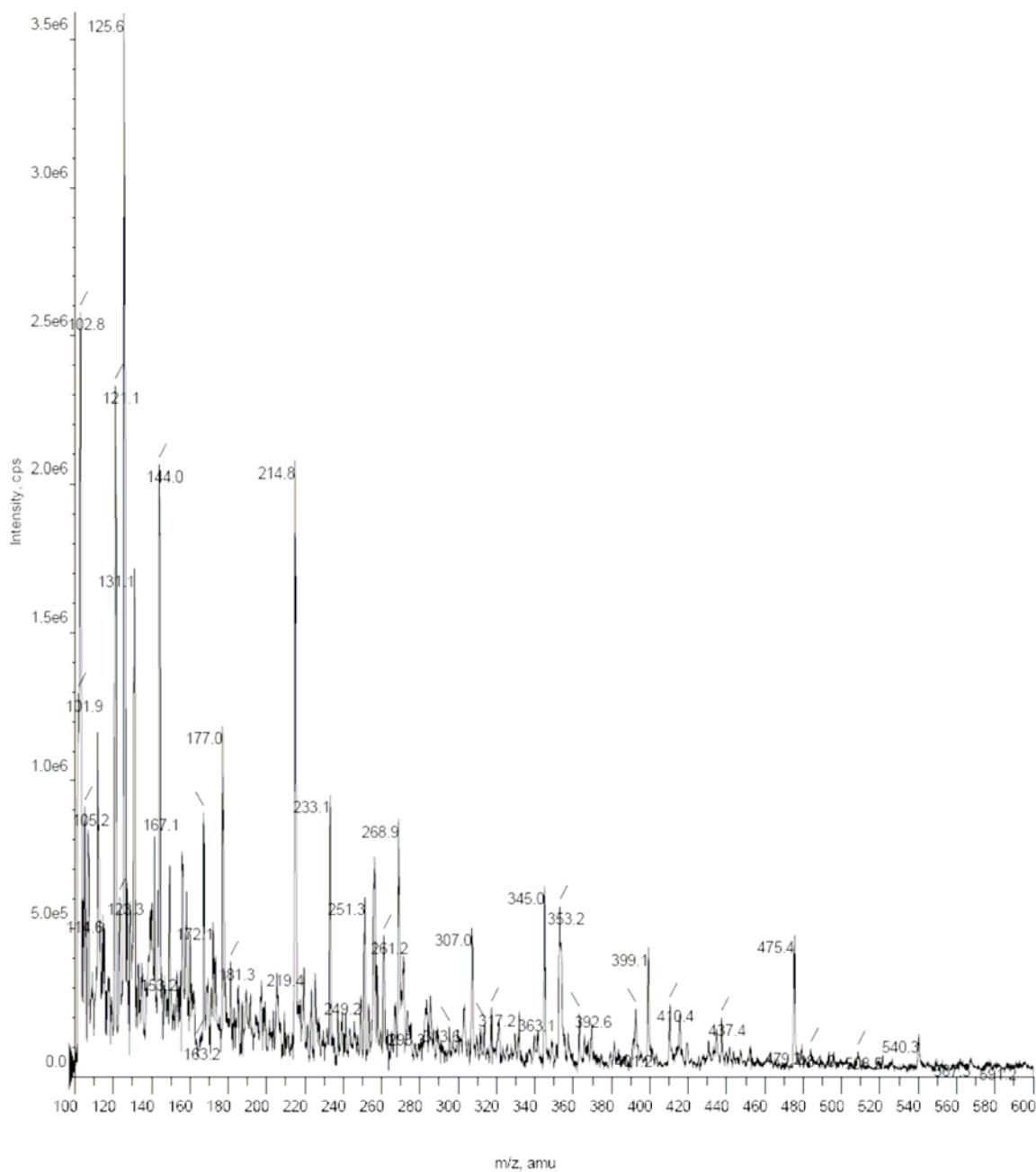


圖 21. 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，在 12.57 至 14.70 分鐘波峰其質量□片圖。

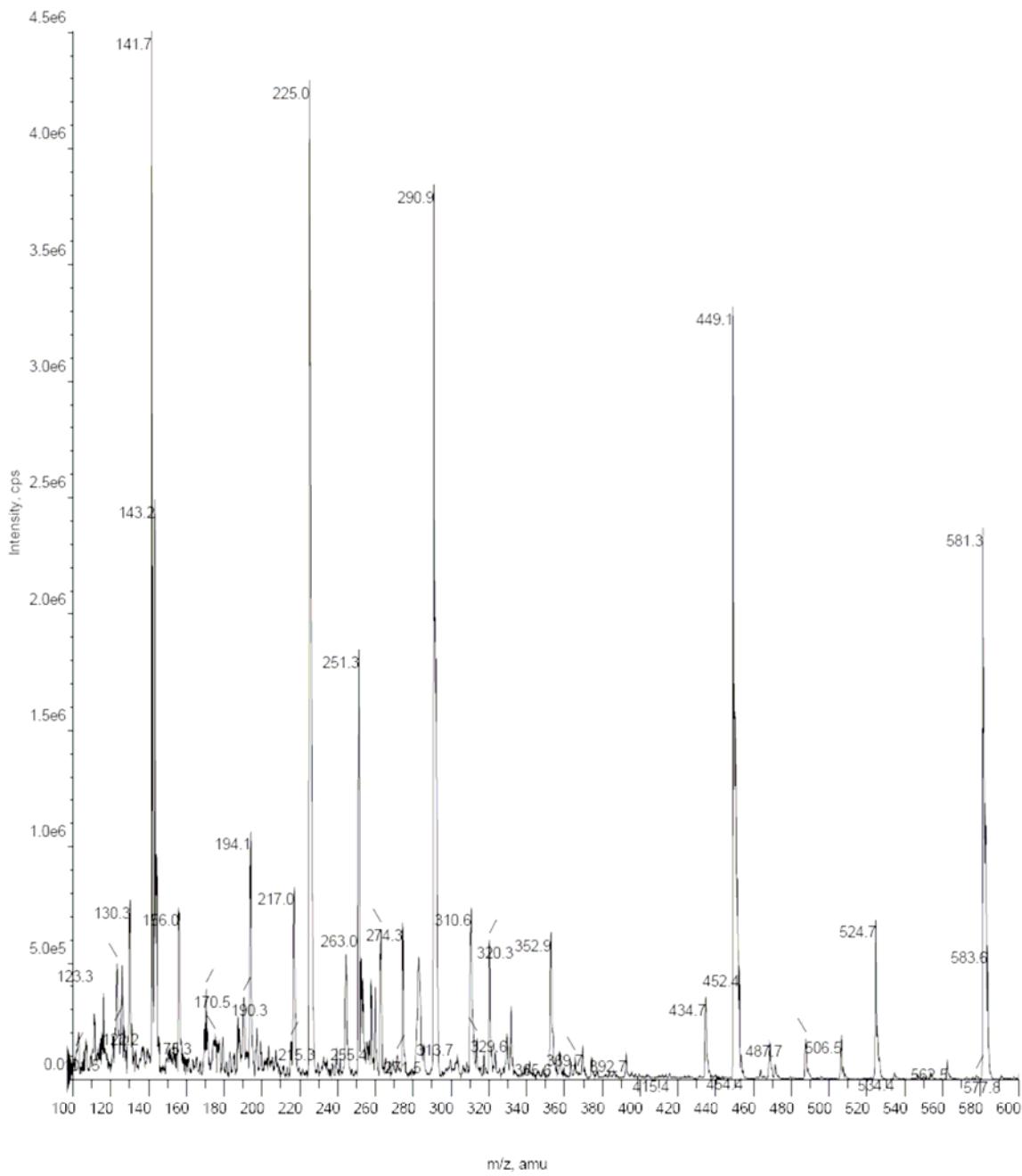


圖 22. 在 pH=12.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，在 16.55 分鐘波峰其質量□片圖。

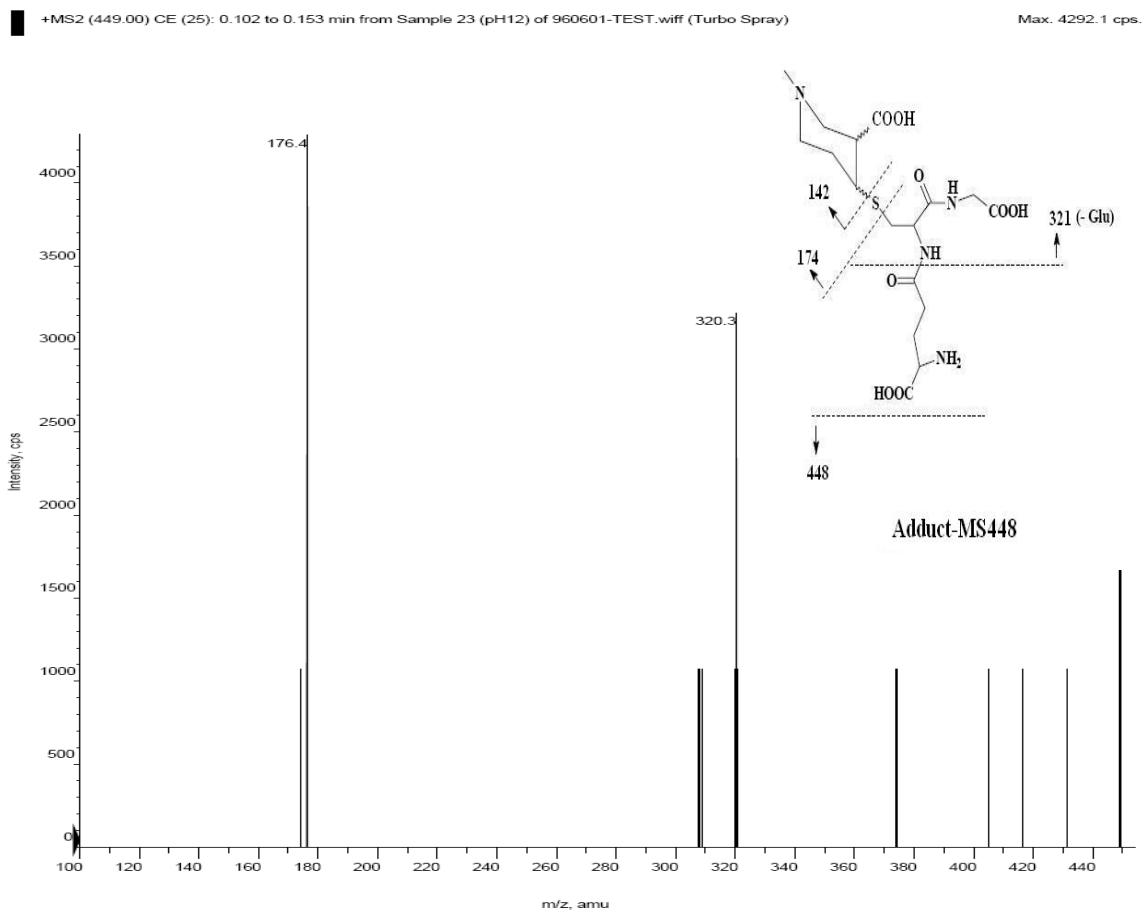


圖 23. 在 pH=12.0 MS/MS 分析加成物 449m/z[Adduct]⁺質量□片圖。

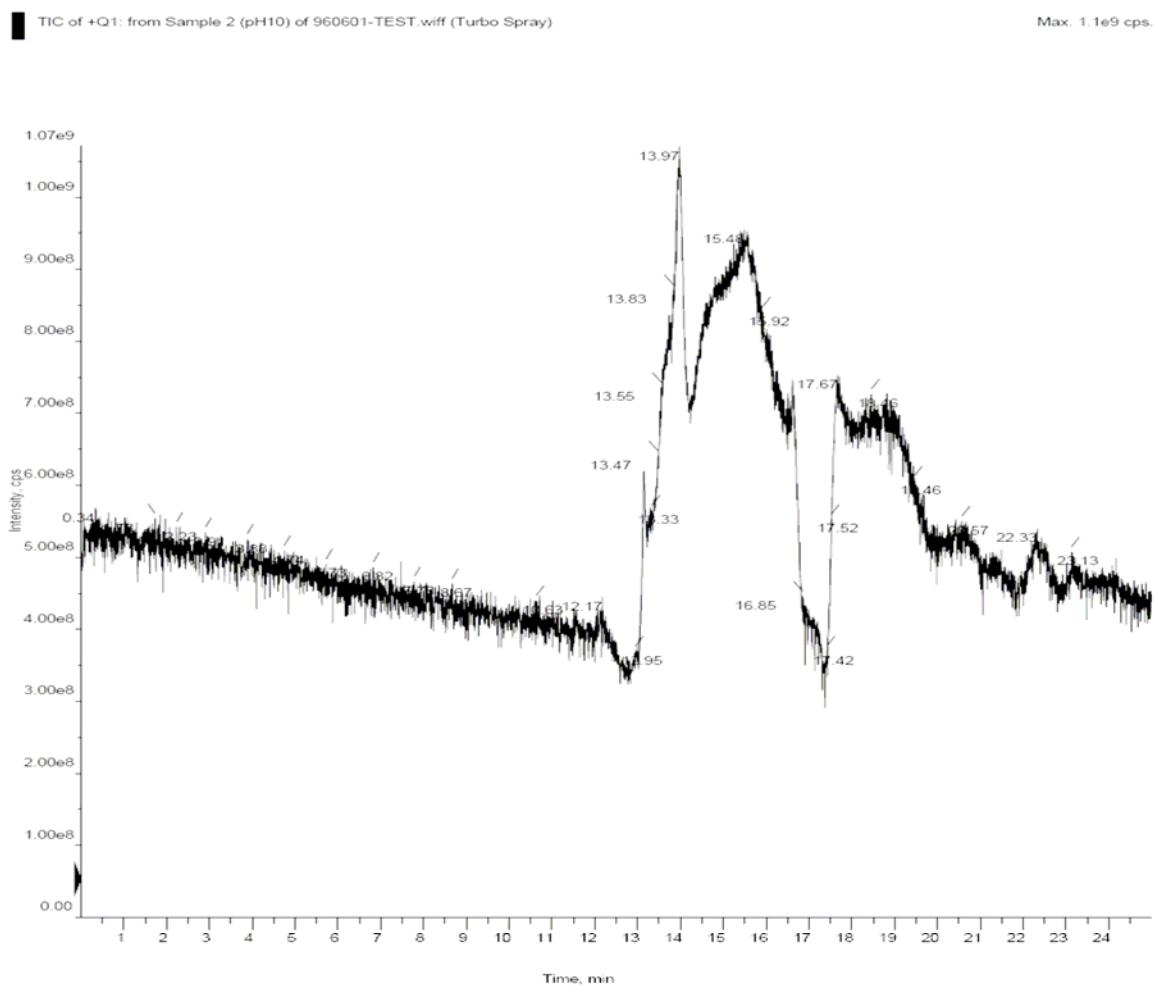


圖 24. pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 檢測的層析圖譜。

層析管：LC-CN (3 μ m), 150 x 2.1 mm (SUPELOSILTM)

溫 度：20

移動相：1% HCOOH

注射量：10 μ l

流 速：0.1 ml/min

時 間：25 min

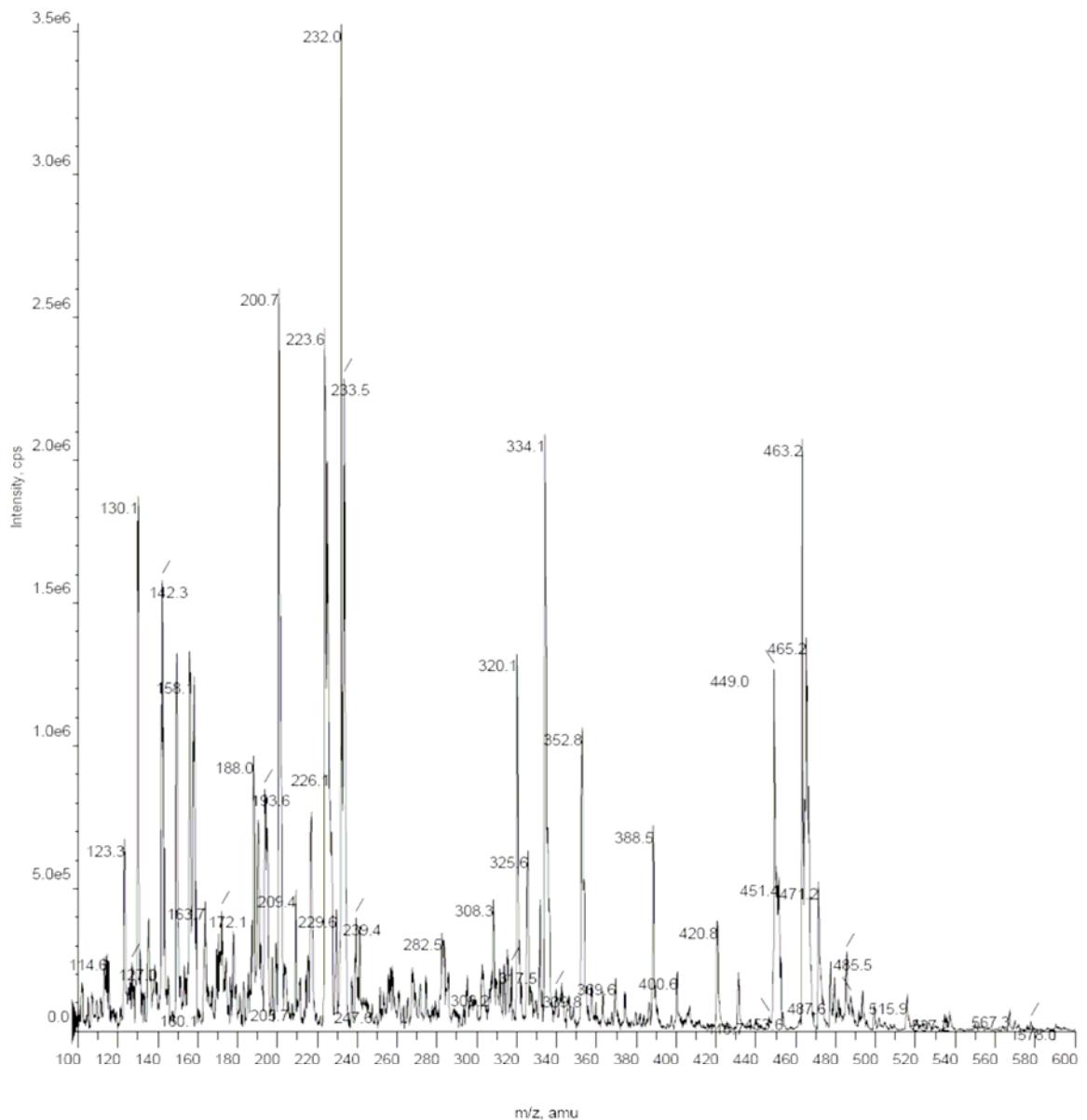


圖 25. 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，在 13.97 分鐘波峰其質量□片圖。

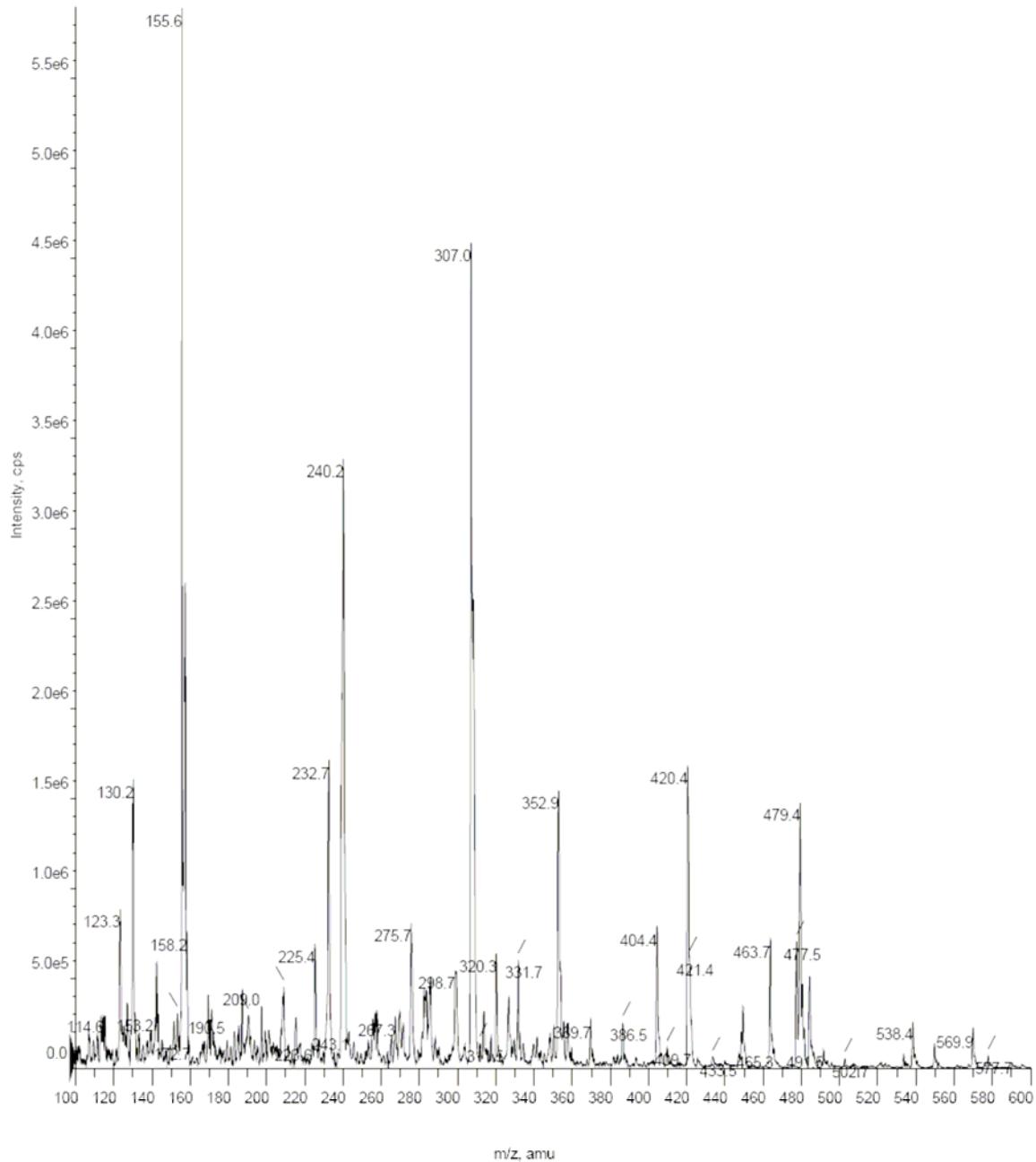


圖 26. 在 pH=10.0 緩衝溶液中進行交互作用反應時所產生的加成物，經由 LC/MS 的檢測，在 17.67 分鐘波峰其質量□片圖。

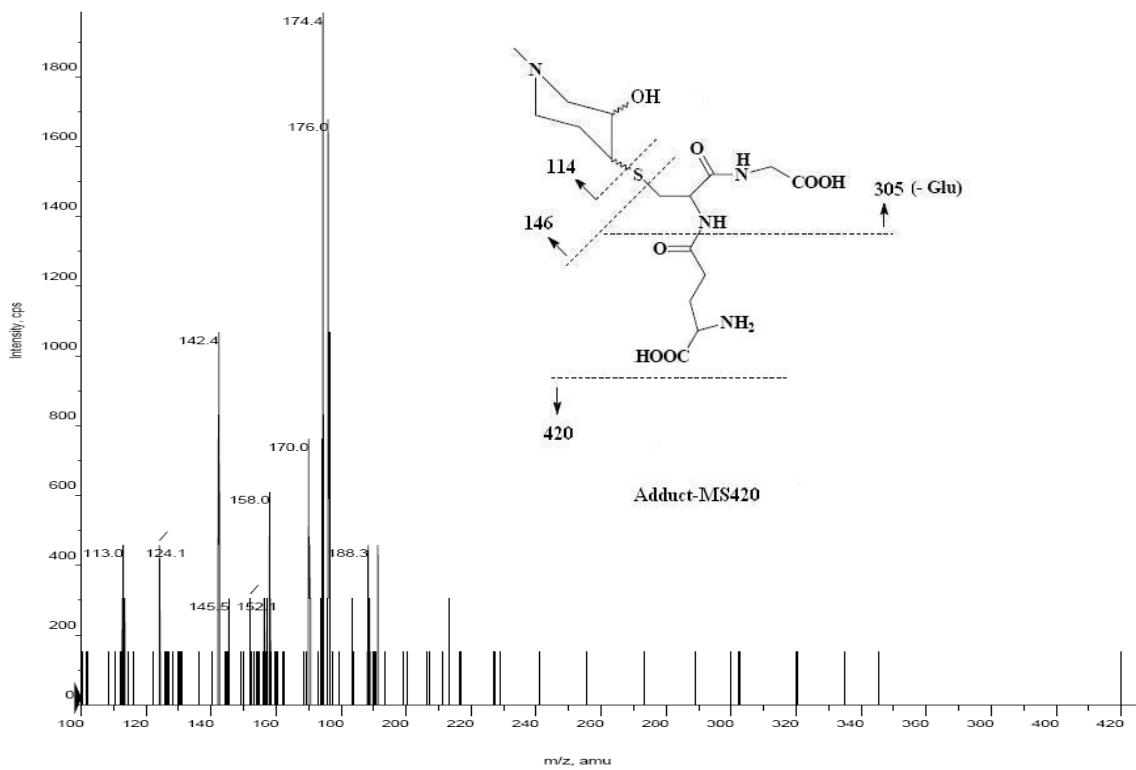


圖 27. 在 pH=10.0 MS/MS 分析加成物 420m/z[Adduct]⁺質量□片圖。

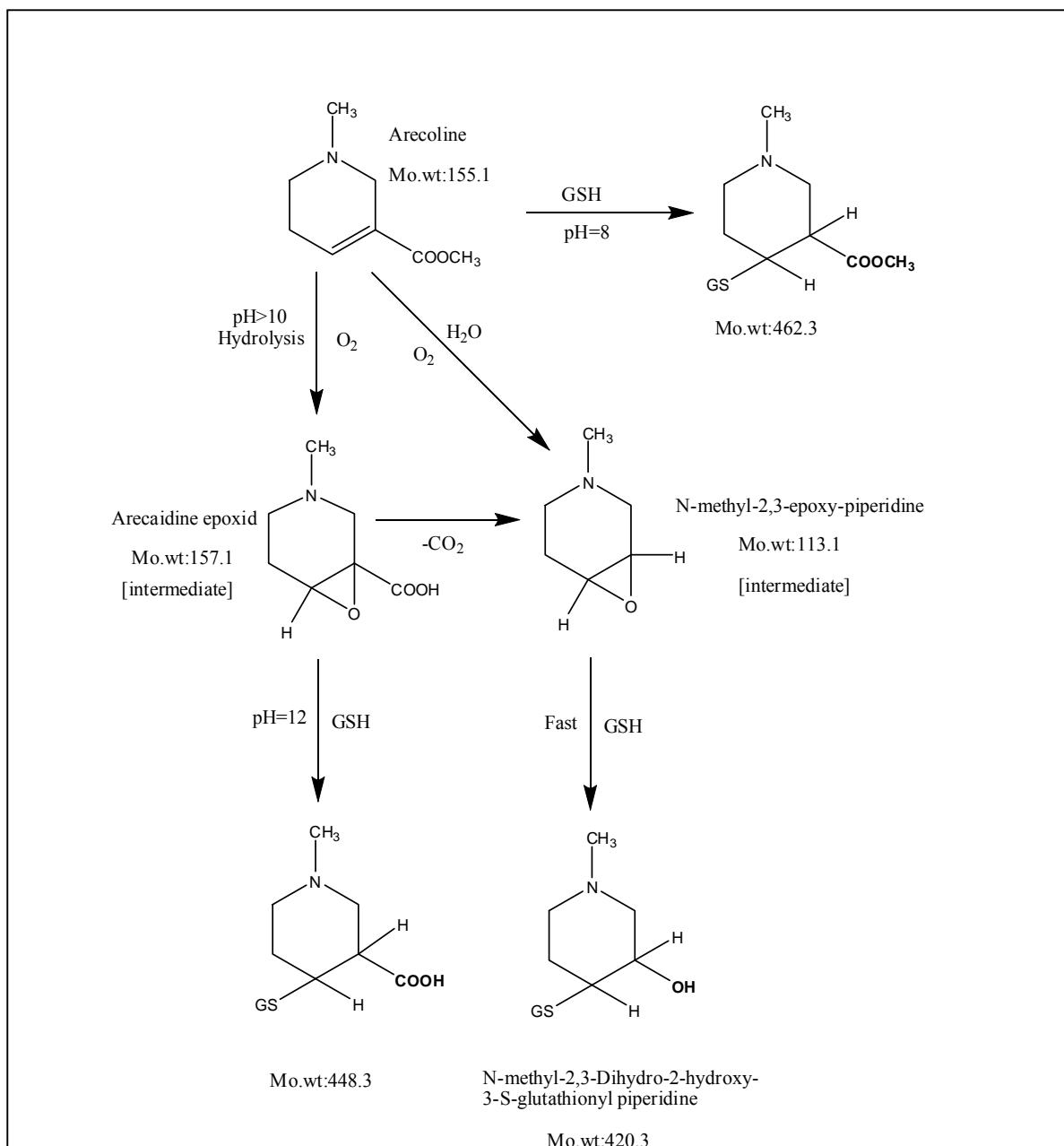


圖 28. Arecoline 與 Glutathione 加成反應可能的路徑。