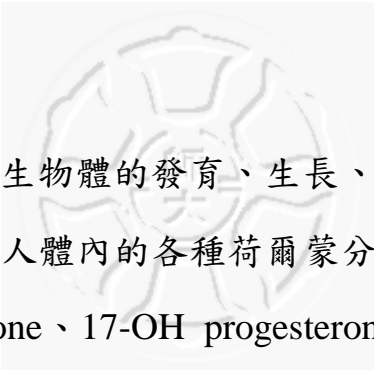


第一章 緒論

1-1 研究目的



類固醇荷爾蒙，對生物體的發育、生長、免疫反應、心血管功能上扮演重要的角色。在人體內的各種荷爾蒙分泌必須適量，不能裏多也不能過少。progesterone、17-OH progesterone、11-deoxycortisol等是醫院用來診斷各項腎上腺功能不健全的指標，而corticosterone、和cortisol及cortisone的濃度高低，可做為判斷生物體受壓情況的指標依據，在面臨各種生理（運動、手術、創傷、疾病、藥物）或心理（興奮、焦慮、憂鬱、悲傷）等狀態的刺激時，神經系統能在數分鐘內，促使ACTH分泌增加，相對刺激腎上腺皮質類固醇的分泌迅速上升，協助生物體應付壓力。

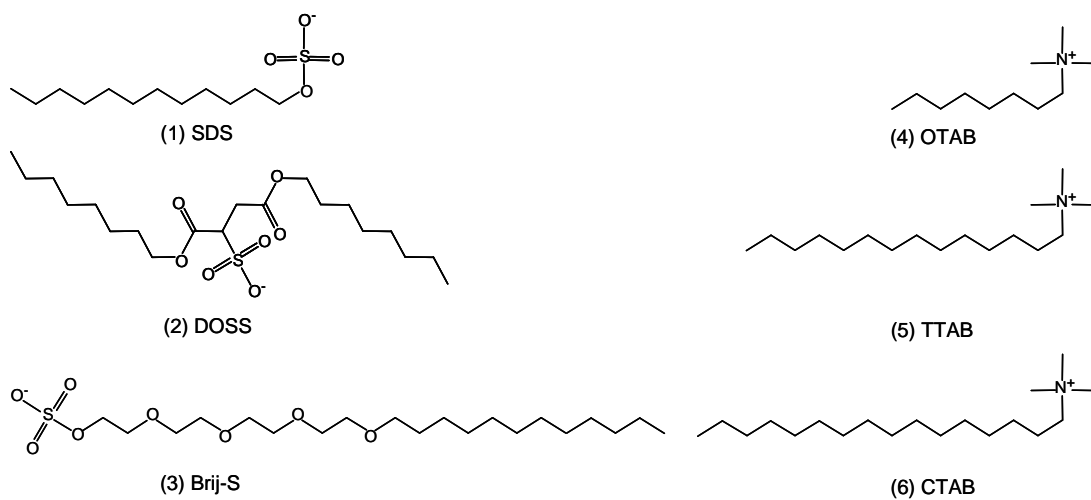
但是固醇激素在生物體內的濃度很低且不穩定，因而在分析定量的技術上是一大挑戰。本實驗的研究重點如下：

- (一)應用毛細管電泳線上濃縮法，開發一個快速有效且具有高靈敏度的偵測技術，應用於檢測類固醇的濃度。
- (二)將所研發的分析技術應用於真實樣品，檢測老鼠血液中的corticosterone及人體尿液中的各項類固醇激素。
- (三)利用 SDS、DOSS、Brij-S 等陰離子界面活性劑及 CTAB、TTAB、OTAB 等陽離子界面活性劑，探討不同界面活性劑對類固醇化合物

掃集及分離的影響。

未來發展的方向，可做為臨床醫學上用來了解身體對壓力因子的反應機制，以及診斷生理狀態的參考指標，並可應用於評估各種天然或合成藥物對於減緩壓力之療效。

A. Surfactants



B. Steroids

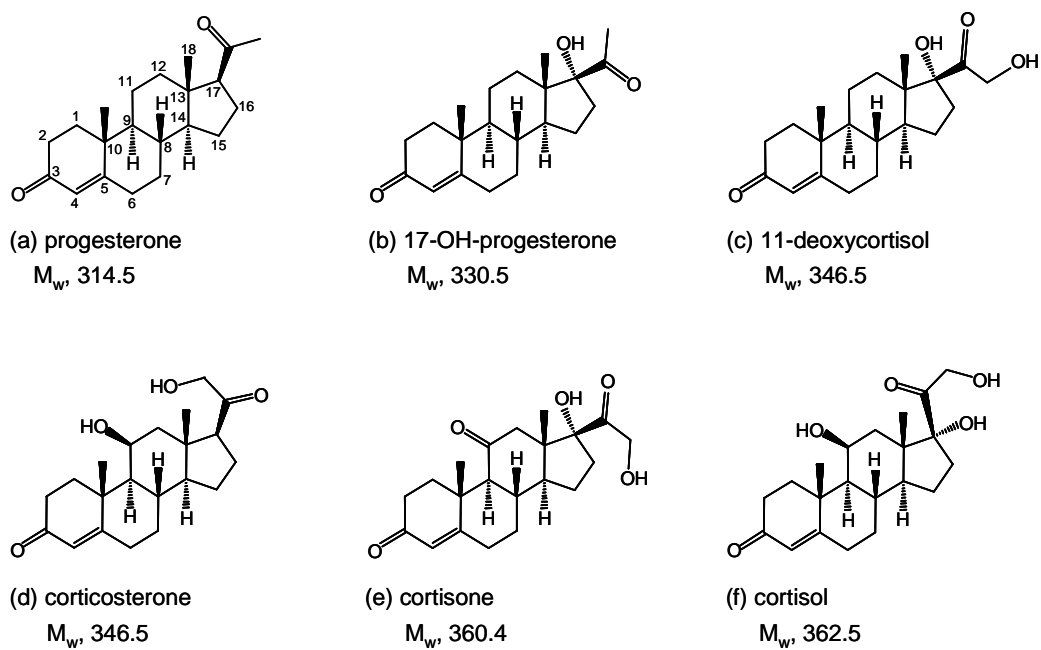


圖 1-1 界面活性劑及分析物結構

Fig. 1-1 Molecular structure of analytes and surfactants

1-2 分析物簡介

Progesterone 又稱為黃體素，是由卵巢的黃體(corpus luteum)或胎盤所分泌，作用於子宮內膜，對女性生理週期有著極重要影響。對正常生理期婦女而言，血清中 progesterone 在濾泡期會維持較低的濃度，進入黃體期後，開始快速上升，約在排卵後的 5~10 天達到最高點。血清中 progesterone 濃度常用來診斷女性黃體期功能不足，評斷卵巢排卵與否，及追朔孕婦懷孕初期的狀態是否穩定，若在血中濃度過低，可能會造成流產。

17-hydroxy progesterone(17-OHP)，17-羥化助孕酮，是 cortisol 的前驅物，通常被用來診斷先天性腎上腺增生 (Congenital adrenal hyperplasia；CAH)，這是一種體染色體隱性遺傳疾病，大多因為缺乏 21-羥化酵素(21-hydroxylase)使糖化及礦化類固醇賀爾蒙合成減少，繼而增加腎上腺皮質素(Adrenocorticotrophic hormone；ACTH)的分泌促使合成過多 Cortisol 的前驅物。先天性腎上腺增生的新生兒篩檢是以測定血片中 17-OHP 的含量為篩檢的指標。

11-deoxycortisol (compound S)，11-去氧皮質醇，是cortisol在生物合成過程中的中間類固醇，其測定是用來診斷及治療因某些腎上腺和腦下垂體腺分泌異常所造成之男性化和高血壓。

哺乳類動物中，由腎上腺分泌的 C-21 類固醇，主要為醛固酮、皮質固酮(corticosterone)和氫基皮質醇(cortisol)，而 corticosterone 和 cortisol 的分泌，視動物不同而有所差異，鳥類、小白鼠、大白鼠幾乎

完全分泌 corticosterone，家犬分泌等量的兩種糖皮質類固酮，而人、貓、羊、猴主要分泌 cortisol。

cortisol 及 corticosterone 皆為糖皮質類固醇，具有上百種的功能，其中主要的功能包括調節蛋白質、醣類及脂肪之新陳代謝、維持血壓及心臟血管功能、減緩免疫發炎反應，並可幫助平衡或對抗胰島素代謝葡萄糖之能力。此外，糖皮質類固醇也屬於神經傳導物質，當身體受到壓力時（任何情況會傷害到身體、引起少數或大量細胞的死亡情形，都叫做壓力，如：不良環境、高低氣溫、繁重工作、悲憤情緒、暴飲暴食、不潔食物、藥物副作用、營養素缺乏、醫療行為、疾病等），藉由神經系統快速傳送訊號，刺激腦下垂體分泌 ACTH，促使腎上腺皮質大量分泌糖皮質類固醇。糖皮質類固醇可活化交感神經—腎上腺髓質系統（sympatho-adrenal system），並維持血管壁對兒茶酚胺（catecholamine）的敏感度，當兒茶酚胺欲分解脂肪，釋放游離脂肪酸時，也非要有糖皮質類固醇的幫忙不可，而游離脂肪酸在緊急狀況下是一種很重要的能源。因此糖皮質類固醇可視為協助身體應付壓力的物質，檢測其含量變化，可用來診斷腎上腺功能的改變、個體活力大小、情緒狀態、對疾病抵抗力，以及整體的健康狀況。

cortisone，可體松，此物質在肝臟由 cortisol 轉化而來，也是壓力性指標荷爾蒙之一，這些內分泌能令人體增加抵抗力以備，應付各種不懷好意的因子。常被使用當醫藥用藥，可抑制炎症反應，解熱及鎮痛，治療過敏性休克，安神及鎮靜，最常被使用於治療痛風、關節炎及皮膚病變。

1-3 激素 (hormone) 簡介

荷爾蒙又稱激素，是由內分泌細胞或神經細胞所分泌的化學物質。生物體內有兩大調節系統，一是內分泌系統，一是神經系統，它們可以偵測生物體內部與外在環境的變化，指揮身體作必要的調整，內分泌系統的協調速率較神經系統緩慢，但作用範圍更為廣泛且持久。這些化學物質經由血液運輸至目標細胞，使這些細胞產生生理變化，包含有細胞分裂、分化、吸收、死亡等。荷爾蒙屬於一種化學傳導物質，只要很微量就可產生有效的反應，例如：控制細胞內化學反應的速率、管制物質進出細胞膜、調節血漿鈣或鈉的含量...等，激素可作為體內化學反應的刺激劑、調節劑、起步劑或催化已經存在的代謝過程，控制生物體內生長、發育、生殖以及物質的平衡機制。

1-3.1 激素的種類

哺乳動物的激素已知約有一百多種，依化學結構及組成的不同，可歸為三大類：(一)類固醇 (steroid)，此類化合物來自於醋酸鹽 (acetate) 及膽固醇 (cholesterol) 的衍生，如：皮質類固醇 (corticosteroids)、雌性激素 (estrogens)、黃體酮 (progesterone) 等；(二)蛋白質及胜肽類 (polypeptide)，其化學結構及分子大小不一，是由胺基酸合成，例如：甲狀腺素 (thyroxine)、升血壓素 (vasopressin) 等；(三)小分子胺 (amine)，此類化合物大致來自於酪氨酸 (tyrosine) 的衍生物，例如：腎上腺素 (epinephrine)、正腎上腺素 (norepinephrine) 及多巴胺 (dopamine)。

1-3.2 激素的作用機制

首先發現激素作用機制的人是於 1971 年獲得諾貝爾生理醫學獎的薩賽蘭(Earl W. Sutherland, Jr)。薩塞蘭首先發現，其實激素本身不會進入細胞，所以也不能直接控制細胞內部各種酵素的活性，於是他懷疑有其他的物質在細胞內作內應，使激素的訊息得以傳遞到細胞內。他發現激素主要是先作用在細胞膜上，然後細胞膜內側就會釋放出一些小分子到細胞內部，事實上正是由這些小分子在調控細胞內種種酵素的活性，以完成細胞激素的反應。於是，他把激素視為體內負責細胞間通訊的「一級訊號」(primary messenger)，而把激素刺激細胞膜後，在細胞內產生的調控分子稱為「二級訊號」(secondary messenger)。

雖然激素可以到達身體的每一處，但是唯有專一的器官或細胞能對激素的刺激加以回應，稱為該激素的目標細胞(target cell)，因為目標細胞中含有專一受體，使激素僅會對其目標細胞產生作用。因為其作用都是經由與細胞膜上特異性受體結合而完成的。這個過程有點類似用鑰匙發動汽車，鑰匙插入特定的鎖孔，啟動的訊號藉著電流傳到引擎而點火發動，如圖 1-2。

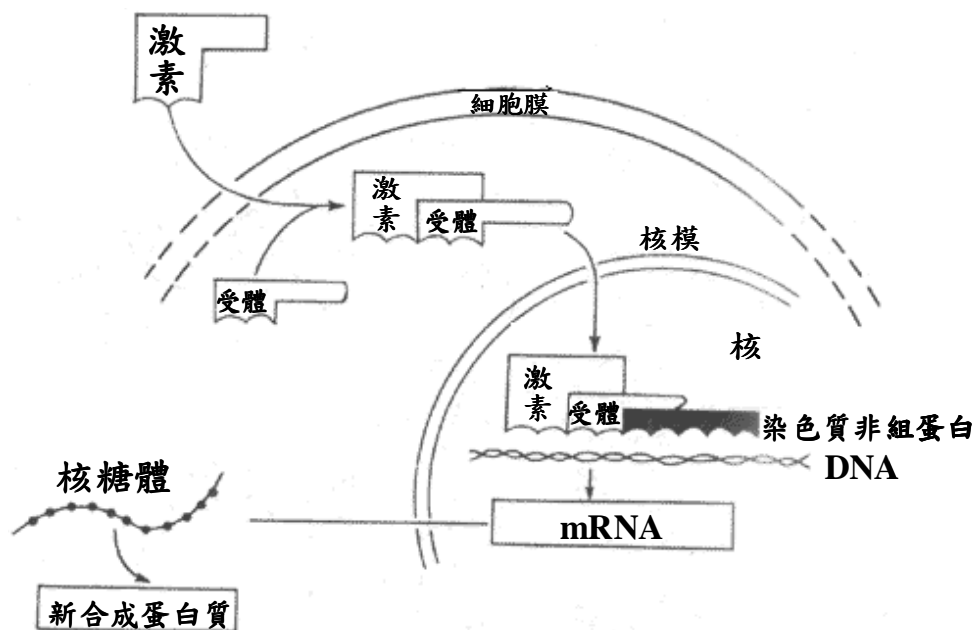


圖 1-2 激素作用機制

Fig. 1-2 The mechanism of hormone action

1-3.3 腎上腺皮質類固醇的分類

腎上腺是由外層的皮質包圍中心部份的髓質組成，皮質和髓質的胚胎來源、細胞成份、分泌激素以及調節的機制都不同，所以雖然位在同一腺體內，卻是兩個獨立的內分泌腺。腎上腺髓質分泌胺類激素，如：腎上腺素、正腎上腺素；腎上腺髓質則分泌類固醇荷爾蒙，以表 1-1 做概略描述。

腎上腺皮質分泌三種激素：(一)糖皮質類固醇 (glucocorticoids)，此類激素對脂肪、碳水化合物和蛋白質的代謝，具有廣泛作用，如：皮質固酮 (corticosterone)、可體松 (cortisone)、氫基皮質酮或稱為皮質醇 (17-hydroxycorticosterone；hydrocortisone；cortisol)；(二)礦物質皮質類固醇 (mineralocorticoids)，可調節電解質代謝、促進鈉離子在體內滯留時間，如：醛固酮 (aldosterone)；(三)性類固醇 (sex steroids)，影響第二性徵發育及調節生殖功能，如：黃體酮 (progesterone)。

表 1-1 哺乳類動物腎上腺分泌激素

Tab. 1-1 Adrenal autacoid of mammiferous animals

腎 上 腺	髓質	腎上腺素	胺類	肌肉脂肪組織	升高血液中葡萄糖的濃度
		正腎上腺素	胺類	血管壁平滑肌	促進血管收縮、增加代謝速率
	皮質	糖皮質類固醇	類固醇	大部份細胞	提高脂肪、碳水化合物和蛋白質代謝
		礦物質皮質類固醇	類固醇	腎臟	促進腎臟對 Na^+ 的再吸收及 K^+ 的排泄
		性類固醇	類固醇	一般細胞	影響性特徵和一般生長

成年哺乳動物的腎上腺皮質主要由三種不同的細胞組成，如圖 1-3 所示：球狀層位於最表層，分泌礦物質皮質類固醇，中層的束狀層和內層的網狀層分泌糖皮質類固醇及性類固醇。腎上腺所製造的類固醇，在人體的發展、生長、免疫反應與心血功能上扮演重要角色，若將腎上腺切除，除非在手術後施以補充，否則生物體將面臨崩潰和死亡。

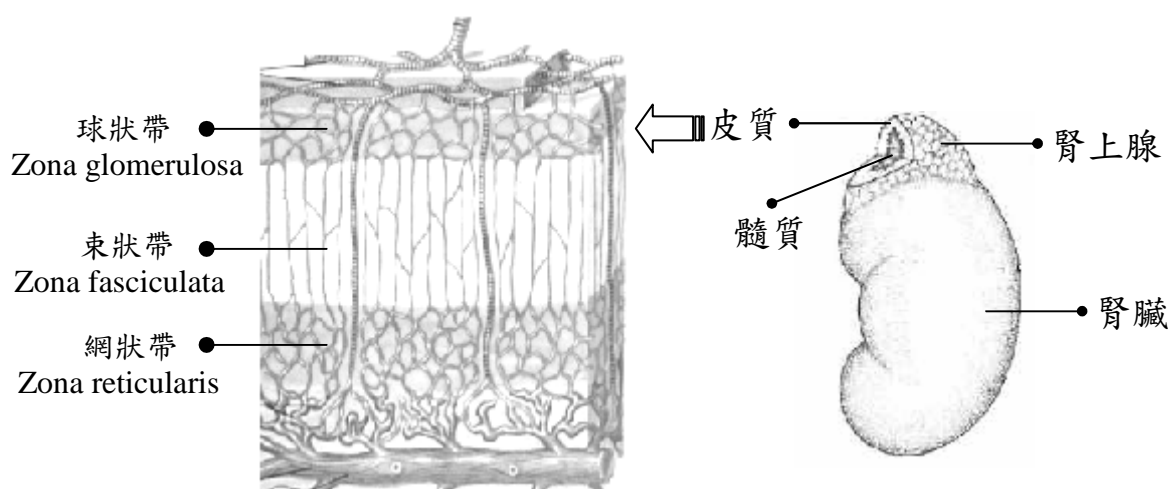


圖 1-3 腎上腺皮質結構圖

Fig. 1-3 The structure of adrenocorticotrop

1-3.4 皮質類固醇的結構和生物合成途徑

類固醇的基本結構為環戊烷多氫菲核，由三個 6 碳己烷環和一個 5 碳戊烷環組成，碳原子序號從 A 環開始，如圖 1-4，腎上腺皮質類固醇有含 19 個及 21 個碳原子二種。C-19 的類固醇如睪固酮 (testosterone) 等性激素；C-21 的類固醇如皮質固酮、氫基皮質酮、可體松等激素。

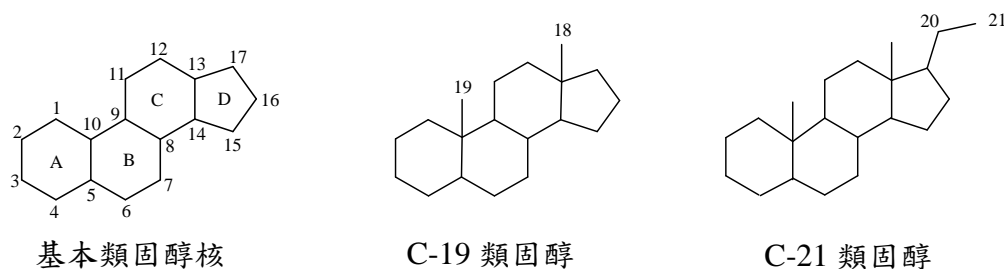


圖 1-4 皮質類固醇的基本結構

Fig. 1-4 Molecular structure of steroids

從食物中攝取及生物體內自行合成的膽固醇，是合成類固醇激素的主要原料，依照產生的激素種類不同，主要有三個生物合成的途徑，如圖 1-5 所示。

1-3.5 皮質類固醇的分泌和調節

當身體受到外界的影響或刺激時，下視丘的腎上腺皮促素釋放激素 (corticotrophin-releasing hormone, CRH)，到達腦下垂體前葉，引起腦下腺分泌促腎上腺皮質激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)，經由血液運送至腎上腺，腎上腺受到 ACTH 的刺激時，貯存於脂小球內的 cholesterol 會被活化成游離狀態，接著被運送到粒腺體中，在粒腺體內作用形成 pregnenolone，再經一連串化學反應產生類固醇激素。當血漿中的腎上腺皮質類固醇含量過多時，會反過來抑制腦垂腺分泌 ACTH，這種調節機制即為回饋控制。

類固醇激素在血液中，大部份會與血漿蛋白結合，以氫基皮質酮為例，有 95 % 以上與 α 球蛋白或白蛋白結合，此部份不具生理活性，可視為激素在血液中的貯存形式，其餘 5 % 在血漿中呈游離狀態，而保

持游離的部份才具有生理活性，可直接作用於細胞組織，稱為 free cortisol。隨著外界環境的改變，結合態和游離態的激素會相互轉換，在血漿中維持平衡，當血漿中游離量增高時，從尿液中排泄的量也會相對增多。

CRH、ACTH、外界刺激（溫度、運動、情緒）及睡眠周期，這些因素同時影響了皮質類固醇在血漿中的含量變化。表 1-2 為人體主要的皮質類固醇分泌量及正常含量的參考值。

礦物質皮質激素途徑

糖皮質激素途徑

性激素途徑

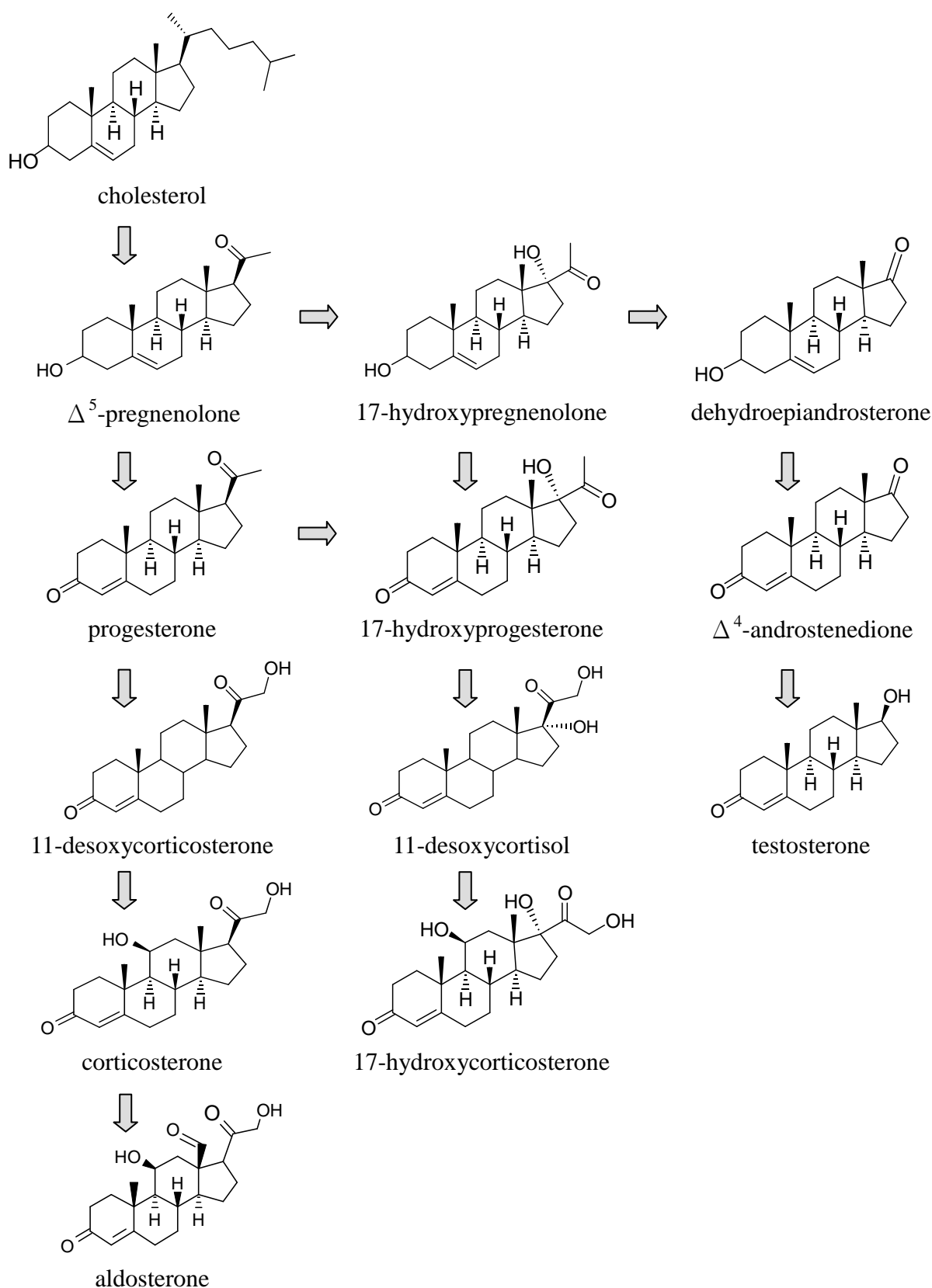


圖 1-5 腎上腺類固醇的生物合成途徑 Fig.1-5 Synthesis pathway of steroids

表 1-2 人體血漿及尿液中類固醇荷爾蒙的含量

Tab. 1-2 Reference value for the concentration of steroids in human plasma and urine

Steroid (Subjects)	Excretion (mg / 24hr)	Plasma	Urine
17-Hydroxycorticosterone	10-40		
8~10AM Adult		5-23 $\mu\text{g/dL}$	
4PM Adult		2-15 $\mu\text{g/dL}$	
Adult			10-100 $\mu\text{g/dL}$
Aldosterone	0.05-0.25		
1~11years		5-70 ng/dL	
Adult		4-30 ng/dL	
Adult men		6-22 ng/dL	
Adult women		5-30 ng/dL	
Dehydroepiandrosterone			
Child		1.0-3.0 ng/mL	
Adult men	15	1.7-4.2 ng/mL	
Adult women	10	2-5.2 ng/mL	
Pregnant women		0.5-12.5 ng/mL	
Estrogens			
Child		0-30 pg/mL	
Adult men		40-115 pg/mL	
Adult women		61-437 pg/mL	
Estradiol			
Adult men		8-36 pg/mL	
Adult women		10-500 pg/mL	
Dexycorticosterone	15-30	6 ng/dL	
Progesterone			
Adult men		13-97 ng/dL	
Adult women		15-70 ng/dL	
Testosterone			
Adult men		700 ng/dL	
Adult women		50 ng/dL	

1-4 類固醇激素的分析法

測定血液及尿液中類固醇激素的含量，對於臨床生理學的診斷，具有重要的意義，但類固醇在生物體內的濃度很微量（~ppb 等級），且分子結構類似，故不易分離，所以在定量分析的技術上，具有很高的困難度。一般常用來分析類固醇含量的方法有下列幾種：

- (一) 放射免疫測定法（radio immunoassay, RIA）[1-2]：傳統臨床上大多用此方法，利用放射性標幟抗原與未標幟抗原，同時在抗體的結合位置產生競爭性反應，來表現相對濃度的關係，是生物學上常見的方法，偵測靈敏度極高，便宜且方便，但特定抗原與不同的固醇類激素結合，都無法達到相同的結合率，導致定量時會有相當程度的複雜性與不準確性，且會有放射性物質造成環境污染的問題。
- (二) 螢光分析法（fluorimetric method）[3-4]：利用抗原和抗體競爭反應的原理，加入有螢光標幟的分子和待測物，與抗體進行競爭反應，最後利用比色法得知未知濃度。但有許多類似的代謝物[5]，和尿液中一些不會溶解的螢光干擾物質[6]，所以測量出來的數值往往會偏高，且此種方法的偵測靈敏度並不高，且需較大量的樣品進行分析。
- (三) 液相層析電灑質譜分析法（LC/ESI-MS）[7-9]：此種方法具有高度的偵測極限，樣品需求量很少，但受限於儀器的價格非常昂貴。

- (四) 氣相層析質譜分析法 (GC/MS) [10-13]：此種方法具有高度的偵測靈敏度，樣品需求量也很少，但大部分類固醇在高溫時會受熱分解，因此在氣相層析前，需先進行複雜的衍生程序。
- (五) 毛細管電泳微胞電動層析紫外光偵測法 (CE/MEKC/UV) [14]：MEKC是毛細管電泳常用的分離模式，可同時分離中性物及離子性物質，利用界面活性劑在緩衝溶液中形成微胞，與分析物的結合度不同，可成功的分離結構相似的類固醇化合物。但紫外光吸收法的偵測靈敏度不佳，需配其他分析技術，如：樣品萃取濃縮處理或線上濃縮電泳模式，才能提高偵測靈敏度。

本研究採用CE/MEKC/UV的方法，並結合線上濃縮的技術 [15-16]，同時具有分離效率佳、速度快、樣品需求量極少、低環境污染、靈敏度高等優點，在研究過程中比較兩種線上濃縮技術，用以提高偵測極限，克服紫外光偵測器靈敏度不佳的缺點。