

S.C.) 能有運動量增加，但未見奇異行動之出現。然而 cyclazocine 於 3 mg/kg 之用量，均會發現二種刺激活性。本實驗結果顯示 pentazocine 與 cyclazocine 具有共同類似之作用，然其行動活性在本質上有所差異，乃奇異行動之症狀出現及自發運動量之增加作用，亦非完全由相同之作用機構所誘發者。因此，本實驗對於此二種行動刺激活性，也無法否定其具有間接的關連性。

將 pentazocine 及 cyclazocine 單獨投與之結果，及與麻醉性拮抗藥 naloxone 同時併用作注射之結果比較之，顯示其自發運動量增加之作用部分被抑制，所謂部分被抑制即併用投與初期有增強作用，但隨即呈現顯著之抑制作用。本實驗之結果顯示 naloxone 10 mg/kg (S.C.) 對於 pentazocine 及 cyclazocine 所引起之運動量增加作用，未見呈現完全拮抗之效果。另外奇異行動之症狀發現不因由於與 naloxone 之併用而消失。故由本實驗結果證實，誘發此二種行動刺激活性之機構並非完全由同一作用機構所誘發者。

總之，cyclazocine 於一定量 (3 mg/kg) 以上，即能顯著影響其二種行動刺激效果，其與一般代表性麻醉藥拮抗性鎮痛劑 pentazocine 及 nalorphine 所呈現之效果相類似，但其作用較強，尤其奇異行動之出現，以 cyclazocine 最強。又因其會產生雙相性之自發運動量變化 (30 mg/kg)，這種現象和 morphine 之效果相類似，但 morphine 並無奇異行動之症狀出現，故本實驗可以認定 Pentazocine 及 cyclazocine 之行動刺激效果與 morphine 在本質上並不相同。尤以其自發運動量增加作用，當與 naloxone 併用時，僅呈現部分之抑制作用，其對奇異行動之症狀却無法消失。總之，此二種行動刺激效果各由其相異之作用機構所誘發引起者。(本文承濫谷健博士指導，又蒙藤田允信、遠藤任兩先生協助，陳博忠先生惠賜意見，及日本鳥居製藥株式會社提供藥品，特致由衷之謝忱)

總經銷 陽德藥行 台中市雙十路一段111號  
TEL:284975•224975

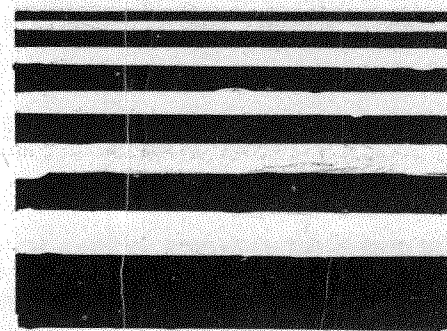
兼營中藥器材 高級藥棚•研粉機•真珠機•乾燥機  
烘麥機•切片機•製丸機•電踏機  
犀角機•搗臼•電動搖篩機

精選原料•科學方法提煉製成 免煎易服•藥效迅速無副作用

順天科學中藥

全國首創 世界風行

# 藥品鑑定學領域外的分析方法(II)



陳勝智

繼筆者在本誌31期所介紹的“藥品鑑定學領域外的分析法(I)”，想在這裡再介紹三種分析法。同樣地，也以簡單易於了解的方式介紹，若想要深入了解的話，請參閱本文所介紹的書籍。

### (III) 放線線免疫學測定法 (radioimmunoassay)

上期已介紹過的螢光免疫學測定法中，也提到了其他種類的免疫學測定法，包括放射線免疫學測定法(RIA)。它們的基本原理(指反應)都是一樣，只是在抗原與抗體之結合量的測定方式上不同而已。

因為RIA似乎比其他幾種盛行，想舉一個實驗例稍加說明。

#### 實驗例

##### (a) 操作過程

- ↓ 含 metanephrine 之檢體溶液或 metanephrine 之標準溶液 (製作檢量線用)，
- ↓ 加以 0.15 M 氯化鈉-0.5 M 硼酸緩衝液 (PH8.5) 稀釋過之抗血清，
- ↓ 加以  $^3\text{H}$  標識之 DL-metanephrine 溶液 (含 0.3 pmole)，
- ↓ 混合均勻，
- ↓ 37° 水浴中 30 分鐘 incubation，
- ↓ 4° 冰箱中放置 2 小時，
- ↓ 用 millipore filter (DA type) 過濾，
- ↓ 濾器以冰冷之上述緩衝液洗淨，
- ↓ 將 membrane 溶於 Scintillator 中用 Scintillation counter 測定放射能。

##### (b) 說明

在這個實驗中，metanephrine 是我們所要測定的成分，是“抗原”，沒有放射性；而以  $^3\text{H}$  標識之 DL-metanephrine 則是具有放射性的。二者都能和抗血清中之抗體發生抗原抗體反應。二者之對於抗體均有競爭性，沒有放射性的 metanephrine (檢體或標準藥物) 愈多，生成的抗原抗體結合物中含放射性者會愈少，反之亦然。所以，我們可以測定游離型抗原及結合型抗原之量從檢量線求未知濃度檢體溶液中 metanephrine 之量。圖一表示四種檢量線的例子，實際測定時做其中之一圖即可。

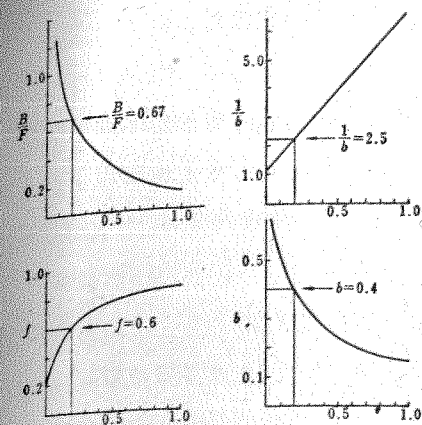


圖1 RIA 之檢量線

橫座標：標準 metanephrine 之量  
B：結合型(抗體-抗原結合物)濃度  
F：游離型抗原濃度  
 $b + f = 1$ 時，b 是結合型比率，f 是游離型比率。

在操作過程中用到的抗血清是怎麼來的，雖非三言二語可講清楚，但稍加說明總是對過程之了解有幫助，故稍微提一下。蛋白，胜等高分子化合物直接輸入動物體中，動物的血清中很自然就會出現抗體；但像 metanephrine 一樣的小分子則需先讓它接上蛋白分子(常用 bovine serum albumin)才會產生抗體。等抗體價達到最高才採血分出血清使用。在大多数的RIA中，抗體可不必分離精製，直接使用血清即可。

實驗例中所使用的 millipore filter 是用來濾取蛋白的。過濾之後，抗體自然是留在 filter 的 membrane 上，若有放射性標識的抗原與之結合了，自然也會留在 membrane 之上，這樣就可把游離型和結合型分開。

至於 Scintillator 及 Scintillation counter 將於稍後介紹。

#### RIA 的特性

(1) 特異性高——RIA 是基於抗體-抗原反應來測定抗原之量的方法，所以和基於化學反應的定量法有別。最大的差別就是在反應的特異性。抗體可說只和其抗原反應，故免疫學測定法的特異性要比化學分析法高出很多。但是並非絕對沒有“Cross reaction”，尤其在製備抗體時，若沒做好動物的選擇，免疫原的構造研究，免疫法的選擇，免疫的期間與過程的設計等，其反應的特異性會降低的。所以要研究一個新的且特異性高的 RIA 並非易事。

(2) 感度高——使用 RIA 可測定的最小量，以 ACTH (副腎皮質刺激激素) 為例是 1 pg ( $1 \times 10^{-12}$  g)。所以 RIA 的感度非一般生物學測定法所能比的。

#### RIA 的應用

既然 RIA 具有高特異性及高的感度，再加上操作簡單，相當適用於複雜的多成分系中微

量物質的測定。因此它在生化學，臨床化學，代謝化學上扮演了一個非常重要的角色。

1959年Yalow及Berson首度使用RIA測定血中insulin之後，RIA有了很大的發展。從高分子的蛋白到低分子的醫藥品（分子太過小則不行，小到何種程度不會生抗體，到目前似未見有人研究）幾乎都可用RIA來測定。最近在植物成分定量上也出現了很多用RIA來測定的方法。由於特異性高的理由，RIA在生藥生理活性成分之定量上將是很有前途的。

### Liquid scintillation Counter

也順便介紹一下liquid scintillation counter。這部儀器是目前廣泛用於RIA的一部儀器。起初以測定 $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{35}\text{S}$ 等核種之 $\beta$ -線而開發的，但現在也可使用於其他多種核種之測定。

此儀器的放射能計數原理是當放射線的能量傳給liquid scintillator後，liquid scintillator立即發出螢光，其光之強度用光電子倍增管轉變成電流加以計數的。

所謂的liquid scintillator是由溶媒及1種或1種以上的溶質所組成（一般，欲測定之放射性物質直接溶於此液中），而溶質當中，除了助溶劑，乳化劑外，都是螢光物質，以波長短者為第一溶質（如圖2中之2,5-diphenyloxazole, PPO），其他稱之為第二溶質（如圖2中之1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)benzene, POPOP）。以圖2為例，第一溶質接收了 $\beta$ -線的能量之後（嚴格地說是 $\beta$ -線之能量先傳給之溶媒，再傳給第一溶質），發出 $3.4 \sim 3.8 \text{ \AA}$ 左右波長之螢光，接着此螢光照射了第二溶質使發出更長的螢光以適應光電子倍增管的檢出。也就是說，第二溶質是用來做為Wavelength

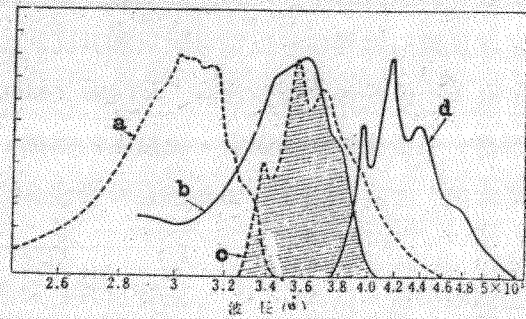


圖2 第一溶質 (PPO) 與第二溶質 (POPOP) 的能量轉移  
a : PPO 的吸收光譜 ; b : PPO 的發光光譜  
c : POPOP 的吸收光譜 ; d : POPOP 的發光光譜

shifter用的。

## (IV) 酵素分析法 (Enzymatic Analysis)

生體成份或進入到體內的藥物在體內會發生反應，主要就是接受酵素的催化才發生的。反應時不需要激烈的條件（高溫或強酸強鹼）是酵素反應的一大特色。其實除此之外，它還有反應特異性高的特色。和抗體抗原反應一樣，酵素對基質的催化是有選擇性，且有立體選擇性的。利用這些特點配以螢光分析法，即可成為適用於複雜的多成分系中酵素或基質的微量分析。目前在生化學、生理學、藥物代謝等方面的研究，都有人在使用這種方法。在實際應用上，臨床化學方面已廣泛採用。

### 酵素活性測定與基質定量之原理

酵素反應的速度由酵素之濃度來決定。在基質過量的條件下，酵素愈多，基質的變化量愈大（單位時間內的生成物愈多）（圖3及圖4之4）。若固定酵素反應時間，在該時間內，由生成物之量可藉檢量線求得酵素之活性。相反地，在酵素過量的條件下（圖4之1）

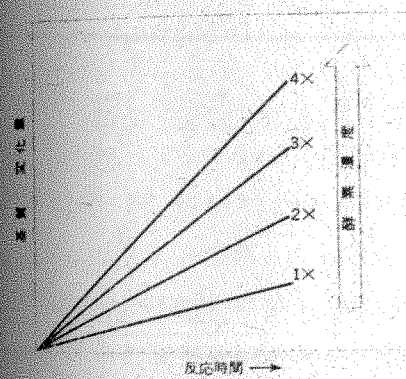


圖3 基質過量時酵素濃度和反應速度的關係

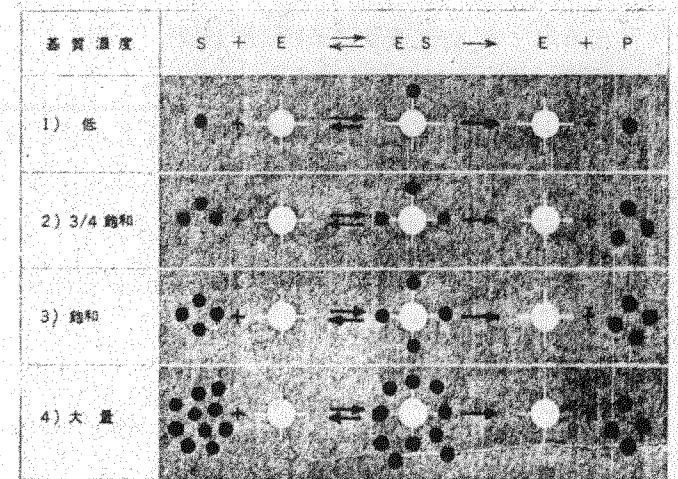


圖4 酵素濃度固定時基質濃度和反應速度的關係

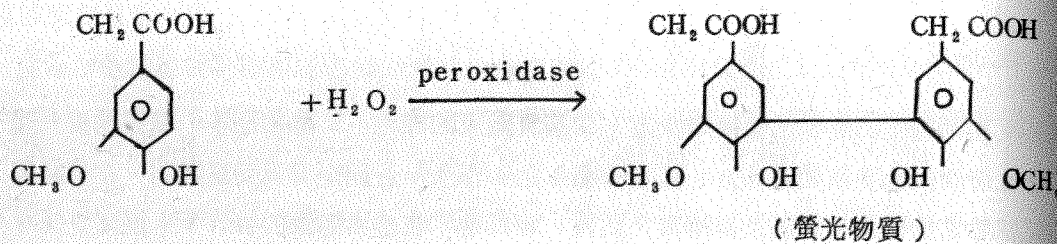
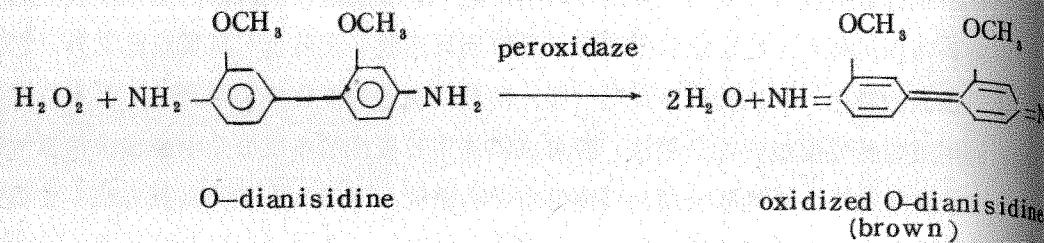
），反應以最大速度進行，在短時間內，幾乎可完成反應。當測定了生成物之量，即可知基質的量。此種基質測定之反應與一般的化學反應並沒兩樣，只是前者沒有酵素的時，反應就不會發生。底下以glucose oxidase為例，做較具體的說明。

$\beta$ -D-glucose在glucose oxidase及氧的共存下會發生下式酵素反應，產生 $\text{H}_2\text{O}_2$

而  $H_2O_2$  可藉另一反應變成有色物質〔式(2)〕或有螢光性的物質〔式(3)〕後，測吸光度或



光度，而後由檢量線即可求得酵素的活性或基質的量。下面介紹血糖測定的操作過程：



- ↓ 0.1 ml 血液或 0.1 ml 標準溶液
- ↓ 加 0.4 ml 水
- ↓ 加 0.3 ml  $Ba(OH)_2$  液及 0.3 ml  $ZnSO_4$  液
- ↓ 離心除去沉澱
- ↓ 上清液取 0.2 ml
- ↓ 加 glucose oxidase 及 O-dianisidine
- ↓ 混合均勻
- ↓  $37^\circ C$ ，放置 35~40 分鐘
- ↓ 加 5.0 ml 50%  $H_2SO_4$
- ↓ 在 535 nm 測吸光度 (A)

$$\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 100 = \text{血糖 mg/100ml 血清}$$

可以說是相當簡單的方法。

### 酵素分析法的應用

目前在許多領域中，利用酵素分析法最多的要算臨床化學了。因為操作簡單，不需像

RIA 那樣貴的測定儀器，又沒有 RIA 之放射性廢物處理之麻煩，使本法很受歡迎。尤其當酵素被固定化（固定在固體上）之後，酵素與基質的反應更適用於 flow injection analysis（檢體在流路進行中，經反應、檢出、記錄，甚至計算系統一氣完成）及酵素電極等，因而單一檢品的分析所需時間大大的縮減。利用酵素分析的自動化儀器（每小時能測定二〇〇~三〇〇個檢品者很多）的開發以來，使酵素分析更是出色。另一方面，舉凡血液，尿中之重要酵素及基質（從其活性或含量可診斷病症者），幾乎都已有測定方法，這大概也是酵素分析法在臨床化學上更形重要的原因吧！

## (V) Enzyme Cycling Method

最後想介紹的是 enzyme cycling method (ECM)。這個分析法應該同屬於酵素分析，不過它的感度要比一般酵素分析高出千萬倍。筆者留日期間有過兩次機會，聽到用這個方法研究的權威東京大學醫學部加藤尚彥先生的演講，因而對此法有了特別的印象。雖然此法與藥師的距離稍遠，但當做趣味知識把它認識一下也不壞，故提出來介紹。

ECM 是腦神經化學領域所開發出來的方法，它由兩種酵素反應組合而成，能用來測定含  $10^{-15}$  mole 以下物質的量。在酵素反應中，欲測定之基質或酵素反應生成物會生出 NAD 或 NADP 或是 CoA, acetyl CoA 的話，該酵素或基質就可藉 ECM 來測定。

### Enzyme cycling method 之原理

圖 5 所示是 CoA cycling 的例子，是由 phosphotransacetylase (PTA) 及 citrate synthase (CS) 兩個酵素反應所組成。若在反應液中，放入過量的 acetyl phosphate 及 oxaloacetate 後，首先由 PTA 的催化，acetyl CoA 就產生，接着藉 CS 的催化，citric acid 隨着等量地產生，此時 acetyl CoA 又回到原來的 CoASH。變回來的 CoASH 再接受 PTA 之催化又產生 acetyl CoA，再經 CS 催化又可產生 citric acid。如此反覆不息 1,000 次（此 cycling 最高可達每小時 37,500 cycle）的話，citric acid 的量就可蓄積到 Co

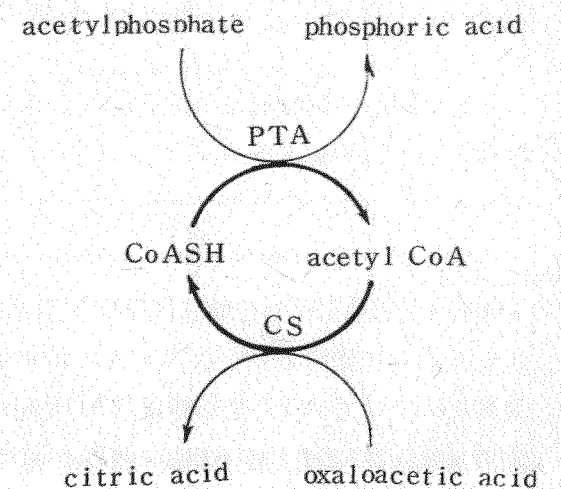
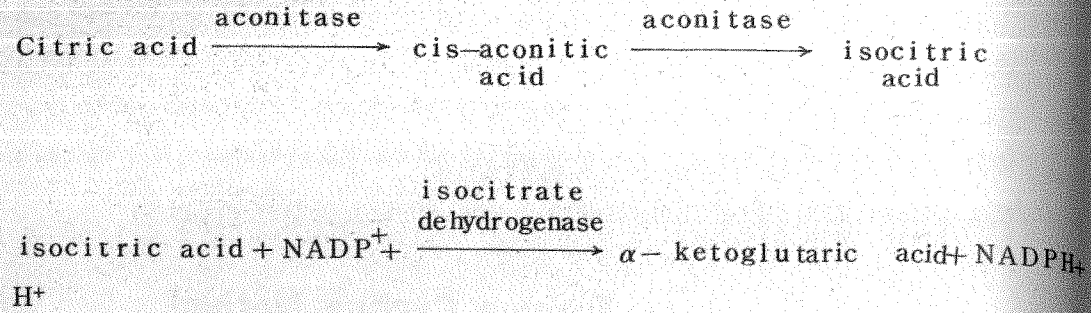


圖 5 CoA cycling

ASH的1,000倍。在讓反應進行到產生足量的citric acid之後，利用下述indicator reaction把citric acid轉變成等量的NADPH以螢光計來測定。



如此，Co A的量再少也可簡單地測定出來。

### Enzyme cycling method之特性

(1)能夠測定微量的物質或酵素活性——單一次的cycling的感度可達 $10^{-15}$  mole，若double cycling可達 $10^{-20}$  mole的感度。在酵素活性的測定上，使反應時間長一點，測定1個分子( $\frac{1}{6.02 \times 10^{23}}$  mole)的hexokinase活性已經有人做到。

(2)和酵素分析一樣，特異性高。

(3)使用其他分析法時，檢品溶液成分複雜，有吸光物質或螢光物質共同存在，這樣就會影響欲測成分之測定。若先把此檢品溶液稀釋200倍後，使用enzyme cycling method的話，雜質也被稀釋200倍之故，欲測成分可簡易地測定，不會被雜質影響。

### Enzyme cycling method之應用

ECM雖不能說能用於所有物質或酵素活性之測定，但很多生體成份或酵素之活性可藉NAD cycling, NADP cycling及CoA cycling等三種cycling來測定。下面再舉ATP之測定為例提供應用上的了解：

圖6表示用hexokinase及dehydrogenase先把ATP全部變成NADPH的反應。也就是說，在反應系統中放入大量之glucose及NADP<sup>+</sup>，在ATP全部變成NADP並用鹼除去過量之NADP<sup>+</sup>後，用NADP cycling來測定NADPH。

另一方面，若把glucose與ATP大量加

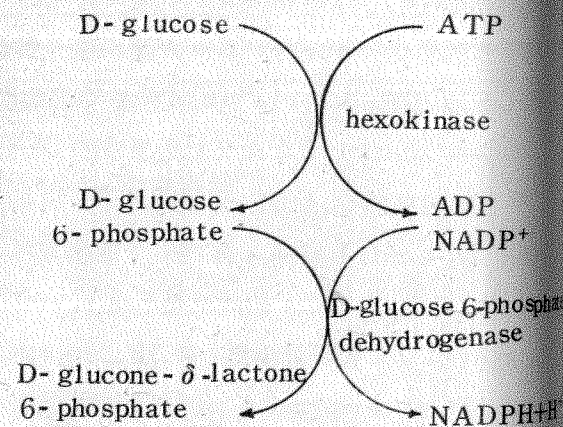


圖6 ATP的測定

入反應系統中(當然NADP<sup>+</sup>及D-glucose 6-phosphate dehydrogenase的量要足夠)也可利用NADP cycling來測定hexokinase的活性。

### 結語

以上所介紹的五種藥品鑑定學領域外的分析法，除第五種外，都可能有接觸的機會。尤其想當臨床藥師時更有了解的必要。本文只提供初淺的入門而已，想做深入的了解可參閱文末所介紹的書籍。

### 參考書籍

- 1 阿南功一等：基礎生化學實驗法，卷4,6，丸善株式會社·東京。
- 2 G.G.Guilbault：Handbook of Enzymatic Methods of Analysis, Marcel Dekker, Ltd., New York and Basel, 1976.
- 3 C.T. Peng：Sample Preparation in Liquid Scintillation Counting, The Radiochemical Centre Ltd., Amersham, England, 1977.

# 潔喉片

## MISHICOPAL TROCHES

Each tablet contains:  
Cetylpyridinium chloride 2mg.  
主治：口炎、扁桃腺炎及口腔感染等症  
唯一用麥芽糖精製，口含時間長

台灣美時化學製藥股份有限公司台北  
台北市復興南路一段130號

美榮藥行 台中市三民路二段61號 TEL:223181