更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

農藥對血液中Cholinesterase分析法

周薰修、游禎義

以Technicon TM Auto Analyzer測定血液中膽素酯酵素（Cholinesterase，ChE）之活性，可以迅速的了解一個人是否受到農藥之威脅。農藥中磷酸酯或胺甲基酸酯對ChE能發生作用，使該酵素之活性受到阻害（inhibition）。其基本原理是衡量phenol red在比色計中呈色之多寡，是由於基質（Substrate）被水解後，產生醋酸，改變pH值之大小。其檢驗過程迅速，可以在短時間內測定多數量之檢體。其結果準確均一，最適於工廠工人、農民之血液分析用。進一步的構想是用來分析市售蔬菜、水果之農藥殘留。

緒　言

Cholinesterase是血液中多種膽素酯酵素之總稱。其中在哺乳動物神經細胞中專司神經傳達作用之Acetyl choline分解酵素Acetyl Cholinesterase與農藥中磷劑或氨基甲酸鹽劑能發生結合反應[1]。阻害Acetyl Choline傳達之功能，這是農藥中毒最主要之機制之一。

通常acetyl Choline遇acetyl Cholinesterase（AChE）產生加水分解，其反應式如下：

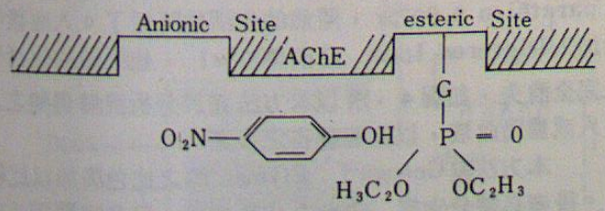
$$(CH_3)_3{}^{+}NCH_2CH_2O\overset{\overset{O}{\|}}{C}CH_3 + H_2O \xrightarrow{AChE}$$

Acetyl choline

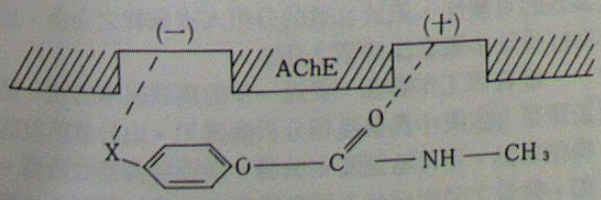
$$(CH_3)_3N^{+}CH_2CH_2OH + CH_3COOH$$

choline　　Acetic acid

至於阻害作用之反應則有機磷酸酯與Acetyl Cholinesterase的表面作用點接觸而起加水分解，磷原子與Acetyl Cholinesterase結合成爲磷酸化如下圖。此阻害反應非常迅速，爲安定之結合狀態，且爲非司逆反應（irreversible reaction）。



氨基甲酸鹽劑是以整個分子與AChE的Anionic Site及esteric Site發生結合作用。此結合力比磷酸化者較弱，具微弱的可逆反應（reversible reaction）。



在分析測定上有Ellman等人之比色法。[2]其反應原理是

$$\text{Acetylthiocholine} \xrightarrow{(enzyme)} \text{Thiocholine} + \text{Acetate}$$

$$\text{Thiocholine} + \text{dithio-bis-nitro-benzoate} \longrightarrow \text{yellow color Hestrin}$$[3]

亦以Acetylcholine與Hydroxylamine之作用。

$$RCOOR' + H_2NOH \longrightarrow RCONHOH + R'OH$$

來衡量Acetylcholine. Feigl等亦提到hydroxylamine之使用[4] Lipmann[5]等則提到反應應在pH6等細節。致於使用自動裝置分析方法，應該算是George D. winter.[6]較爲成功。雖然它亦有很多實驗上之限制，但是用在血清中活性的測定非常方便。Jacob B. Levine[7]亦有較新之分析法，使用5.5-dithio-bis-2-nitro-benzoic acid（DTNB）來衡量基質之水解程度。雖然測定上之靈敏度好，但裝置線路較前者複雜。自動裝置分析法之優點則是檢體用量較少，且可以直接測定抽取之血清或血漿無需經稀釋之步驟。

本研究計畫是以建立分析方法爲第一步，目前業已完竣，正進一步應用在蔬菜農藥殘留測定之篩選用。

材料及方法

(一)試藥

1. 標準品
   膽素酯酵素（Acetyl Cholinesterase）試藥標準品
   5000 units 3.7*mg* protein.
   1360 units／*mg* protein
   4.2 *mg* Solid 1200 units／*mg* Solid
   Sigma Chemical Company U.S.A.
2. Sodium barbital 試藥級
   City Chemical Corporation. U.S.A.
3. Potassium Phosphate（dihydrogen）試藥級
   M & B. Ltd., Dagenham, England.
4. Sodium chloride 試藥級
   Sigma Chemical Company, U.S.A.
5. Saponin 藥檢局試藥
6. Acetylcholine Iodide 試藥級
   Sigma Chemical Company, U.S.A.
7. Phenol red 試藥級
   Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd., Japan.
8. Briz-35 試藥級
   Alpken Chemical Company, U.S.A.
9. 血液—本局試驗用動物血液
10. 血清—醫院提供之人類血清
11. 農藥標準品—本局標準品

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

㈡試藥之配製

1. Buffer (Frawley [8])
   Sodium barbital 0.4124 *gm*
   Potassium Phosphate (dihydrogen) 0.0546 *gm*
   Sodium Chloride 17.535 *gm*
   Saponin 0.100 *gm*
   Briz-35 10 *ml*
   混合加水至 1000 *ml*
2. Substrate
   Acetylcholine Iodide 20 *gm*
   加水至1000 *ml*
3. Phenol red 0.075 *gm*
   Briz-35 10 *ml*
   加水至1000 *ml*
4. Sodium Chloride 100 *gm*
   加水至1000 *ml*
5. Standard Stock Solution
   秤取標準品 Acetyl Cholinesterase 0.08333 *gm*
   加水至 10 *ml* 得100 unit／*ml* 之標準溶液，再依序由上述溶液中取1 *ml*，2 *ml*，3 *ml*，···9 *ml*。
   配製成10.20.30.·····至 90 units／*ml* 之各別標準溶液，存於冷藏庫中備用。

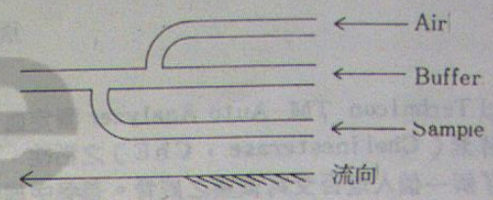
㈢儀器

1. Technicon TM Auto analyzer
2. 按裝零件
   (a) 14. T mixing coil 3個
   (b) D_1 或 A_1 Fitting 1個
   (c) Filter 550 nm 1個
   (d) HO Fitting 2個
   (e) Semipermeable membrane 1個
   (f) Filter 4 1個
   (g) Recorder
   Laboratory Equipment Listed 15 *g*E. U.S.A.
   (h) Heating bath Coil,
   1.6mm ID×40 ft×2個
   (i) Samplng rate gear 40 test／hr.

㈣實驗步驟

將檢體或標準溶液置於圓型檢體輸送盤上（Circular Sampler plate rate 40 test／hr），依預定之間隔自動送入檢體取樣臂下。檢體之吸取是由空氣造成之吸引（aspiration）裝置經管路進入儀器中。本儀器之中心動力是由一衡速的唧筒（proportioning pump）所控制。包括一滾筒連結之轉動鏈條，由於固定擠壓之波動，使液體在聚乙烯管內蠕動推進。液體量多寡之推進，是依據輸送管之粗細。藉各種藥劑經不等容量之介入，使檢體得以分析，其裝置如圖1.

檢體經取樣臂吸入管中之速度爲 0.42 *ml*／min，混入空氣 1.20 *ml*／min 再加入 buffer 2.00 *ml*／min，三者之接合方式依序是



經第一個混合器（mixer）再以 0.80 *ml*／min 之 Acetyl Choline iodide注入混合液中，經第二個混合器再行混合之。混合均勻之全液，流入37.℃之加熱槽，使膽素酯酵素在緩衝液（buffer System）中加水分解，分離出醋酸，其混合液經流入透析槽（Dialyzer）中半透膜（Semipermeable membrane）。分離之醋酸經半透膜與另一條管路流入之指示劑 phenol red 呈退色反應。使顏色由粉紅變成黃色，在比色計（Colorimeter）550 nm下測定其因 pH 值改變之吸光度。在記錄器上得知AChE之活性強度。

結 果 與 討 論

本方法系依據George.D. Winter 所發表之方法加以修飾而建立的。雖然自動分析裝置之設計一直被認爲是一件非常困難的工作，但是從文獻得知都是由前人一步步修飾而來的。本計劃正逢本組購買 Technicon Autoanalyzer 一台，經筆者多次實驗改良才建立本方法。修飾的部分計有比色計之波長以550nm 爲最適當。管線之接著亦詳述於實驗步驟中。爲使分析上更加穩定，在 phenol red 及 Buffer Solution 中加入適量之 Briz-35（約爲 100:1），使每個空氣泡間隔均勻不破碎，爲使敏感度加大指示劑 phenol red 亦加以稀釋爲 0.075 *gm*／1000 *ml*。其標準曲線如圖 2－1 及圖 2－2。本方法自取樣到測定結果需時12.分鐘，如果縮短加熱槽中線圈長度，似可節省時間，值得再加研討。兎子全血中 AChE之分析，如圖 3，其中 A. B. 係全血，C 中加有 Ethyl parathion 0.0038r，D 爲內含 Ethyl parathion 0.0075r，顯然的使活性降低了。人血漿中加入 Dipterex 1ppm 之磷劑30. μl，也明顯的使活性完全消失，如圖 4，所以本方法適於分析接觸農藥之工人或農民血液，以瞭解藥害之多寡。

本方法與 George L. Ellman 等之比色法加以比較。後者必需分別經一步步之化學處理，呈色時間因人爲誤差較難一致。溫度之控制要求嚴格，所以在低溫實驗室中操作是必要的，如果檢體數量多時，對工作人員是一大負擔。在分析上本方法節省了大量人力與時間。其最大優點，爲均一的操作過程，準確性高具有再現性及良好的可變性，適於有效的分析人或動物之全血，血清和紅血球中膽素酯酵素之活性。

筆者因工作需要，更進一步的擬發展本方法，應用於蔬菜，水果中農藥殘留分析篩選用。由於敏感度高，操作簡便，足可迅速鑑定檢體，是否有農藥的殘留。例如，微量之磷劑或氨基甲酸鹽劑存在時，即可迅速使

更多期刊、圖書與影音講座，請至【元照網路書店】www.angle.com.tw

AChE活性受阻。只要與標準品比較，就可衡量出該蔬菜或水果中有否農藥殘留。實爲一方便之鑑定法，惟必需克服的問題是對照檢體之取得，或者是可能影響活性阻礙之其他天然物質這些尙待進一步之研究。

誌　謝

誌謝：

本研究計劃蒙衞生署七十年度影響食品衞生安全因素之專案研究補助，得以順利建立了簡速之分析法。本方法擬發展實際應用於蔬菜、水果類之農藥殘留量之測定。

參考文獻

1. G. Zweig, Editor, Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulators and Food Additives. I. 373. (1963)
2. G.L. Ellman. K.D. Courtney, V.A. Jr. R.M. Featherstone Biochemical Pharmacology 7. 88. (1961)
3. S. Hestrin. J. Biol. Chem., 180, 249, (1949)
4. F. Feigl,V. Anger, O. Frehden, Mikrochemie, 15, 9, (1934)
5. F. Lipmann, L.C. Tuttle, J. Biol. Chem., 161, 415(1945)
6. G.D. Witer, Ann. N.Y. Acad. Sci, 87, 629. (1960)
7. J.B. Levine, R.A. Scheidt, V.A. Nelson, Technicon Symposium "Automation in Analytical Chemistry" N.Y. Sept. 10 (1965)
8. J.P. Frawley, E.C. Hagan, O.G. Fitzhugh, J. Pharm. Exptl. Therapy 105, 156, (1952)

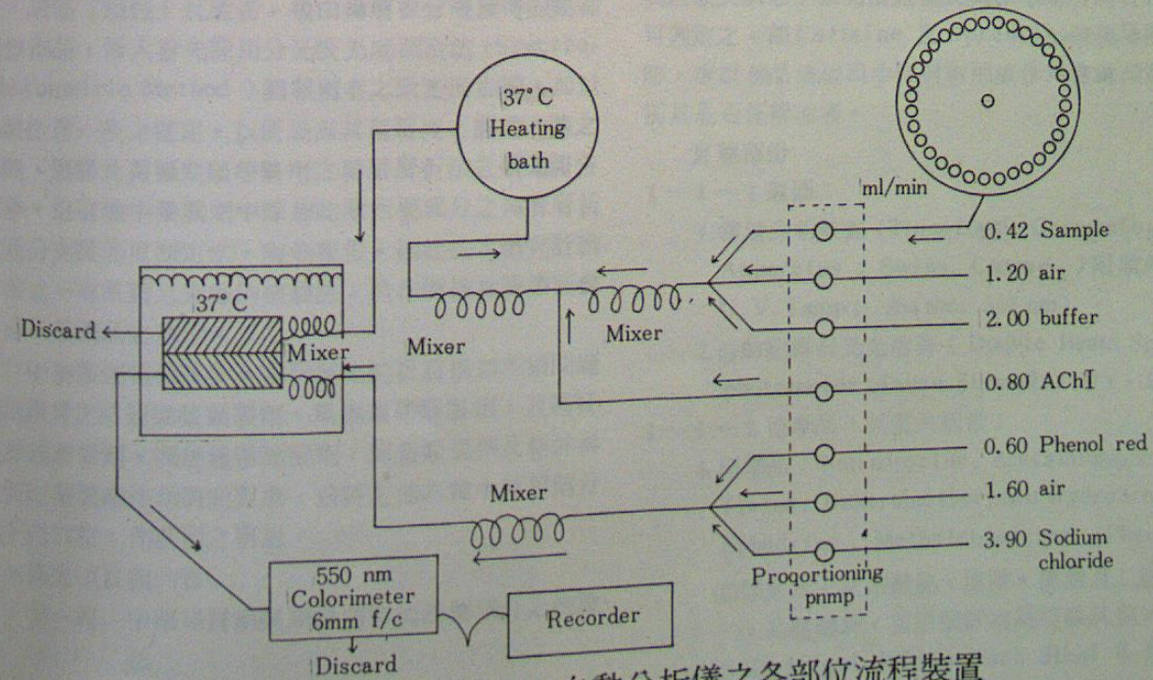


圖1　自動分析儀之各部位流程裝置