

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

口液中濫用藥物 現場即時檢驗之開發與實證(3/3)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2218-E-040-002-
執行期間：104年09月01日至105年08月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：張耀仁
共同主持人：余豐益
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：姚文法
碩士班研究生-兼任助理人員：陳秀娟
碩士班研究生-兼任助理人員：邱筵庭

中華民國 105 年 11 月 30 日

中文摘要：目前警方路檢或突檢時，常需使用快速而準確的方法來判斷是否使用濫用藥物。尿液雖是目前全世界濫用藥物檢驗最主要的檢體，然而尿液檢體的採集常有其不便之處，除所需時間較長外，監測取尿過程幾乎無法顧及當事者的隱私權，且容易發生掉包、摻假、稀釋等情況。而路檢時更加困難，需要找到可採尿的場所，使得進行監測取尿更為不便。以口水作為藥物濫用檢測之檢體樣本，相較於尿液與血液檢體，具有便利性及即時性之優點。口液檢體的採集不具侵入性、不受時間及地點限制，採集人員也不需接受專業訓練，因此目前歐美國家為了增加公共安全，防止使用了藥物後之藥駕行為，已逐漸採用路檢方式，利用口液檢體，以免疫層析試紙快速檢測各種常見濫用藥物，並發展出現場即時檢驗之掃描器或偵測方法，來達到現場藥物立即檢測之目標。愷他命(KET)是國內濫用程度最大之毒品，然而歐美國家卻不盛行。這使得口水檢驗相關之抗體與評估相當缺乏。因此本計畫主要目標在於開發針對口液分析所需要之KET抗體，並利用此抗體建立高敏感性及專一性的酵素連結免疫分析法，進而開發快速免疫層析試紙分析法。其次是以國內常見毒品LC-MS/MS檢驗方法，進行免疫層析試紙之再檢測與評估。

中文關鍵詞：濫用藥物(毒品)，口液檢驗、愷他命

英文摘要：Oral fluid (OF) is a suitable alternative matrix to test drugs of abuse in drug treatment, workplace, criminal justice, and driving under the influence of drugs (DUID). The main advantages of OF are the simplicity and noninvasiveness of sample collection, that can be easily observed, obviated the need of special restroom facilities and same-sex collectors and making adulteration more difficult. OF may better reflect recent drug use. The parent drug is frequently prominent in OF and may reflect free plasma concentrations, providing a better correlation. This project is to produce specific monoclonal antibodies against common abuse drugs found in Taiwan and development of immunochromatographic strip for oral fluid drug test. Therefore, the first year objective of the present proposal is to produce monoclonal antibodies against ketamine and development of immunochromatographic strip. The assay time for immunostrip is about 5 min which is time saving compared with enzyme-linked immunosorbent assays.

英文關鍵詞：drug of abuse, oral fluid testing, Ketamine

行政院 科技部 補助 專題研究計畫 期中進度報告
 期末報告

唾液中濫用藥物 現場即時檢驗之實證(3/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2218-E-040-002

執行期間：104 年 09 月 01 日至 105 年 08 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：張耀仁

共同主持人：余豐益

計畫參與人員：姚文法

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 105 年 11 月 29 日

摘要

目前警方路檢或突檢時，常需使用快速而準確的方法來判斷是否使用濫用藥物。尿液雖是目前全世界濫用藥物檢驗最主要的檢體，然而尿液檢體的採集常有其不便之處，除所需時間較長外，監測取尿過程幾乎無法顧及當事者的隱私權，且容易發生掉包、摻假、稀釋等情況。而路檢時更加困難，需要找到可採尿的場所，使得進行監測取尿更為不便。以口水作為藥物濫用檢測之檢體樣本，相較於尿液與血液檢體，具有便利性及即時性之優點。口液檢體的採集不具侵入性、不受時間及地點限制，採集人員也不需接受專業訓練，因此目前歐美國家為了增加公共安全，防止使用了藥物後之藥駕行為，已逐漸採用路檢方式，利用口液檢體，以免疫層析試紙快速檢測各種常見濫用藥物，並發展出現場即時檢驗之掃描器或偵測方法，來達到現場藥物立即檢測之目標。愷他命(KET)是國內濫用程度最大之毒品，然而歐美國家卻不盛行。這使得口水檢驗相關之抗體與評估相當缺乏。因此本計畫主要目標在於開發針對口液分析所需要之KET抗體，並利用此抗體建立高敏感性及專一性的酵素連結免疫分析法，進而開發快速免疫層析試紙分析法。其次是以國內常見毒品LC-MS/MS檢驗方法，進行免疫層析試紙之再檢測與評估。

關鍵字：濫用藥物，毒品，唾液檢驗、愷他命。

前言

近年來毒品犯罪情況令人憂心，除了輸入、製造與販售管道大幅增加外，使用的毒品種類、組合與偽裝不斷地翻新，加上濫用族群的年輕化，使得社會耗費極大的人力及資源，包括健康層面的傳染病與醫療利用、毒品犯罪司法層面查緝與矯治等。藥物濫用者更易因工作性質的變更或失業、尋求醫療照護或被捕入獄，而造成整個社會的生產力減少。此外，吸毒後產生之危險行為對公共安全所造成的影響更難以估計。由於個人行為偏差對整體社會型態及公共安全有非常密切的關係，如果毒品及藥物的濫用不能有效的防範或控制，社會的安全以及整體的經濟結構等將會遭受嚴重的威脅，因此「濫用藥物檢驗」的工作就顯得相當重要而迫切。

尿液檢驗是濫用藥物檢驗的主要方法，分為初篩檢驗(screening test)與確認檢驗(confirmatory test)兩個階段，目前國內整體的規劃與執行幾乎與世界同步，可算十分先進。雖然尿液檢驗具有簡單、非侵入性等優點，不過常有取尿等待耗時，需在無法取得攬假的廁所中取尿、以及需防止受檢者進行尿液掉包與攬假等問題，因此司法案件，常需在同性司法人員進行監看下取尿，除了會有「害羞的膀胱」等排尿障礙問題外，更有無法兼顧隱私權的問題。

近年來國外已逐漸發展出利用唾液(Saliva)，或以更精確的名詞--口液(oral fluid)來進行毒品檢驗。雖然口液中主要的組成液體是唾液，但兩者還是有所區分。唾液是指唾液腺所分泌的液體，主要的唾液腺為腮腺(parotid gland)、頰下腺(sublingual gland)及舌下腺(sublingual gland)¹。而口液(oral fluid)則包含口腔中的唾液、黏液細胞和食物的殘渣等等。因此學術上喜歡使用 oral fluid testing (口液檢驗)，而不用 Saliva testing(唾液檢驗)。總之，由於口液容易於收集，可當面取樣，不易發生掉包、摻假、稀釋等作假之情形，且不需像尿液取樣需特別之場所，而取樣人員不太需訓練，而在全程監看下也沒有尷尬之隱私權的問題，最重要是唾液中藥物濃度可以即時反映血液中藥物濃度，因此對現場即時採樣對於毒品防治有極大助益。特別是防範 DUID (driving under the influence of drugs)，警方以路檢進行口液檢驗，根據國外執行 DUID 路檢統計資料，進行濫用藥物路檢可以減少 50%車禍死亡的比例，由此可見其重要性。而警方大規模突檢之娛樂場所，常有大量人數需盤查及篩選時，若可使用採取口液檢體，即時進行快速的現場檢驗，可大幅縮短檢測過程所需要的時間，並有效判定嫌犯是否施用毒品。

在國外，目前已發展了現場即時藥物偵測裝置(on-site drug detection devices)，如 Drager DrugTest、Orasure Uplink、CozartRapiscan、Drugread、DrugWipe、iScreen OFD、OralScreen、Oratect、SalivaScreenTM。上述藥物偵測裝置其檢測原理多為免疫分析法(Immunoassay)，主要利用抗原及其相對應的抗體間具有專一性結合之性質；由於靈敏度高，操作步驟簡單，受檢之唾液樣品不需要特殊前處理即可直接檢測，因此非常適於室內大量樣品篩檢或突檢現場使用，能協助警方在戶外進行唾液中藥物之檢測並在數分鐘得到初步結果，檢測陽性或有疑義的檢體再送達實驗室進一步分析。

由於現場分析主要是以免疫方法進行分析，不免有假陽性之問題，因此現場即時分析剩餘之唾液檢體，一般可經冷藏，帶回實驗室進行進一步分析。唾液檢體之實驗室分析與尿液檢體相似，主要分為兩個階段，首先進行篩檢檢驗，一般而言，篩檢檢驗要求檢驗的速度，採用的方法的需具備反應迅速、操作容易、不必經過前處理等優點，因此一般皆採用酵素免疫分析法為主。經第一階段篩檢，若為陽性或有疑義時進一步進行確認檢驗證實，一般以質譜方法為主，如氣相層析質譜分析法(GC/MS)、液相層析質譜分析法(LC/MS)或更靈敏之串聯式質譜儀(GC/MS/MS 或 LC/MS/MS)。

國內在作濫用藥物確認工作時，常使用 GC/MS 作為檢測工具。然而，由於口液量少，通常不足 1mL，因而實驗室確認檢驗，一般以 LC/MS/MS 進行多重藥物同時分析。GC/MS 在發展多重藥物同時檢驗，常因衍生化過程等先天上的因素，受到限制。隨著液相層析質譜儀的成熟與普及化，近年來有越來越多的濫用藥物改以 LC/MS/MS 來分析生物驗體(如尿液、血液、毛髮及唾液)中之藥物。由於液相層析方法大多不需衍生化步驟，實驗可較為簡單快速，圖譜分析亦較不複雜。液相層析質譜儀在藥物分析上，一般大多需搭配電灑游離法(Electrospray Ionization, ESI)與大氣壓下化學游離法(Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)來進行分析；電噴灑游離法適用於極性藥物之分析，而大氣壓下化學游離法則適用於中低極性藥物分析。

愷他命(KET)是目前國內濫用程度最大之毒品，然而歐美國家卻不盛行。這使得口液檢驗所需之 KET 抗體與相關評估相當缺乏。因此本計畫主要目標在於開發針對口液分析所需要之 KET 抗體，並利用此抗體建立高敏感性及專一性的酵素連結免疫分析法，進而開發快速免疫層析試紙分析法。其次是以國內常見毒品 LC-MS/MS 檢驗方法，進行免疫層析試紙之再檢測與評估。

二、材料與方法

1. 製備 Ketamine (KET) 抗體

1.1 製備不同 Ketamine 接合物

KET 的分子結構屬於小分子化合物，分子量為 237.7 g/mol，一般而言分子量小於 5,000 道爾吞，不易使動物產生免疫反應，此種化合物通稱為半抗原 (hapten)。將半抗原與分子量較大的載體蛋白質結合而具有免疫原性，在本研究當中，我們使用多種不同載體蛋白質，如：鎮眼帽貝血藍蛋白(Keyhole-Limpet Hemocyanin, KLH)、牛血清蛋白質(Bovine serum albumin, BSA)、 γ -globulin (γ -球蛋白)、豬甲狀腺素球蛋白(porcine thyroglobulin, PTG)、牛甲狀腺素球蛋白(Bovine Thyroglobulin, BTG)、辣根過氧化氫酵素(Horse radish peroxidase, HRP) 搭配不同的接合方法，製備抗原，並免疫實驗動物，使其產生對 KET 具有專一性之抗體。

1.1.1 將 KET 衍生 CMO 後利用 EDC/NHS 的方法合成 KET-CMO-載體蛋白

1.1.1.1 KET 衍生 CMO

秤取 5 mg 的 KET 溶於 3 ml reflux solution (reflux solution = pyridine:methanol:d₂H₂O = 1:4:1)與 10 mg CMO 溶於 3 ml reflux solution 混合均勻，置於回流裝置中，加熱至 60°C，反應 2.5 小時後，置於室溫中反應 24 小時，反應時需避光，反應完成後以減壓濃縮將溶液抽乾，並以展開液 (methanol : chloroform : acetic acid = 1 : 9 : 0.5) 回溶。利用正向薄層層析片(TLC silica gel 60 F₂₅₄) 純化 KET-CMO。將 KET-CMO 點在 TLC plate 上，利用展開液展開，於波長 254 nm 下觀察。確定 KET-CMO 所在位置，將其刮下並置於 20 ml 樣品瓶中，以展開液將其混合均勻後靜置 10~15 分鐘，離心 13,000 rpm 5 分鐘，取其上清液，分裝後減壓濃縮將溶液抽乾備用。

1.1.1.2 利用 EDC/NHS 的方法合成 KET-CMO-BSA/ γ -globulin/KLH/HRP

取 KET-CMO (0.2 mg-0.4 mg) 溶於 0.07 ml DMF 中，將 0.8 mg 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC)(以 0.005 ml d₂H₂O 溶解，再加入 0.015 ml DMF)與 0.4 mg N-hydroxysuccinimide(NHS)(溶於 0.02 ml DMF) 緩慢加入，置於室溫下反應 2 小時，分別加入 0.4 mg PTG (溶於 0.3 ml 0.1M carbonate buffer PH

9.6)，置於室溫反應 2 小時後於 4°C 反應 16 小時，以 0.01M PBS (0.01 M NaH₂PO₄，0.01 M NaHPO₄，0.01 M NaCl) 透析三次，並將此抗原儲存於-20 冰箱備用。

1.1.2 將 KET 衍生 Br 利用 KET-Br 上胺基接合載體蛋白

1.1.2.1 KET 衍生 Bromoacetyl bromide

取 5 mg KET、15 mg K₂CO₃ (溶於 toluene 1 ml)，灌入氮氣，在含氮的環境

下加入 0.025 ml bromoacetyl bromide，並於室溫反應 6 小時，反應完成後分裝 KET-Br 並以減壓濃縮將溶液抽乾備用。

1.1.2.2 KET-Br 上胺基接合 BSA

將 1 mg KET-Br 以 0.1 ml 0.01M PBS 回溶，加入 2 ml BSA (溶於 0.3 ml 0.01M PBS)，置於 4°C 反應 16 小時，以 0.01M PBS 透析三次，並將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.1.3 利用乙二胺法 (Ethylenediamine, EDA) 衍生載體蛋白並以甲醛法 (Formaldehyde) 修飾法合成 KET-EDA-載體蛋白

1.1.3.1 利用 EDA 將 BSA 上的羧基衍生成胺基

取 20 mg BSA (溶於 2.5 ml d₂H₂O)、0.08 ml 10% EDA 與 30 mg EDC(以 0.06 ml d₂H₂O 溶解)混合均勻，並將 pH 值調到 5.5，於室溫反應 2 小時後加入 20 mg 的 EDC(以 0.04 ml d₂H₂O 溶解)，置於 4°C 反應 16 小時，以 0.01M PBS 透析三次，將此 EDA-BSA 分裝並冷凍乾燥後備用。

1.1.3.2 將 KET 接合 EDA-BSA

取 3 mg EDA-BSA (以 0.3 ml sodium acetate 回溶)與 1 mg KET，並加入 1μL 的 36.5% 的 formaldehyde 混合均勻，在室溫且避光的環境中反應 72 小時後，置於 4°C 反應 16 小時，以 0.01M PBS 透析三次，並將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.1.4 將 KET 衍生 3-Mercaptopropionic acid (3-PA) 後利用 EDC/NHS 的方法 KET-3PA-載體蛋白

1.1.4.1 Ketamine 衍生 3-PA

取 50 mg KET (以 23 ml absolute ethanol 回溶)，將 111.5 mg 3-PA 與 180 mg KOH 溶於 5 ml absolute ethanol 緩慢加入，並置於回流裝置中，加熱至 80°C，反應 28 小時，利用正向薄層層析片(TLC silica gel 60 F₂₅₄) 將 KET-3-PA 點在 TLC plate 上，以展開液展開，於波長 254 nm 下觀察。確定 KET-3-PA 所在位置，將其刮下並置於 20 ml 樣品瓶中，以展開液將其混合均勻後靜置 10~15 分鐘，離心 13,000 rpm 5 分鐘，取其上清液，分裝後減壓濃縮將溶液抽乾備用。

1.1.4.2 利用 EDC/NHS 的方法合成 KET-3-PA-OVA/KLH

取 1 mg EKT-3-PA 溶於 0.1 ml DMF 中，將 1 mg EDC (以 0.005 ml d₂H₂O 溶解，再加入 0.015 ml DMF)與 0.6 mg NHS (溶於 0.02 ml DMF) 緩慢加入，置於室溫下反應 2 小時，分別加入 4 mg OVA (溶於 1 ml 0.1M carbonate buffer PH 9.6)，置於室溫反應 2 小時後於 4°C 反應 16 小時，以 0.01M PBS 透析三次，並將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.1.5 利用 KET 類似物 6-bromo-2-(2-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone

Hydrobromide (6-Br-KET) 以 EDC 的方法合成 KET-載體蛋白

取 2 mg PTG 溶於 0.3 ml 0.1M Borate buffer PH8.5, 將 3 mg EDC (以 0.009 ml d_2H_2O 溶解, 再加入 0.027 ml DMF) 緩慢加入, 置於室溫下反應 10 分鐘, 再加入 1 mg 6-Br-KET (溶於 0.1 ml DMSO), 灌入氮氣並至於室溫反應 2 小時, 置於 4°C 反應 16 小時, 並以 0.01M PBS 透析三次, 將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.1.6 將 KET 以重氮法(sodium nitrite) 接合載體蛋白

取 10 mg KET (溶於 0.1N HCL 0.4 ml) 並置於 4°C 冰浴中, 將 20 mg $NaNO_2$ (溶於 0.2 ml d_2H_2O) 緩慢加入, 反應 6 小時, 加入 20 mg BSA (溶於 0.1M phosphate buffer PH 8.6), 置於 4°C 反應 16 小時, 並以 0.01M PBS 透析三次, 將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2 製備不同 Norketamine (NKT)接合物

KET 食用後會在人體代謝為 NKT, 分子量為 264.66 g/mol, 分子結構類似於 KET 在本實驗當中, 我們將其與多種不同載體蛋白質搭配不同的接合方法, 製備抗原, 並免疫實驗動物, 使其產生對 KET、NKT 具有專一性之抗體。

1.2.1 利用 Glutaraldehyde 衍生載體蛋白並接合 NKT

1.2.1.1 Glutaraldehyde 衍生載體蛋白

取 2 mg BSA (溶於 0.2 ml d_2H_2O +0.4 ml 0.1M PB 0.15M NaCl PH8), 將其加入 glutaraldehyde (stock 25%), 使其濃度為 1.25%, 置於室溫反應 16 小時, 並以 0.01M PBS 透析三次, 將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.1.2 將 NKT 接合 glutaraldehyde-BSA/KLH

取 1 ml NKT (溶於 0.1 ml DMF), 將 2 mg glutaraldehyde-BSA 緩慢加入, 以 0.5 M sodium carbonate PH9.5 將其溶液 PH 值調為 9, 置於 4°C 反應 16 小時, 再加入 0.1 ml 0.2 M lysine 4°C 反應 1 小時終止反應, 以 0.01M PBS 透析三次, 將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.2 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NKT-CA(PEG)₄-載體蛋白

1.2.2.1 將 NKT 接合 CA(PEG)₄

取 2 mg 的 CA(PEG)₄ 溶於 0.2 mL 0.01 M PBS 中, 接著加入 2.9 mg EDC (以 0.09 ml d_2H_2O 溶解, 再加入 0.021 ml DMF) 和 1.3 mg NHS (溶於 0.013 ml DMF), 在室溫下反應 10 分鐘接著加入 1 mg (溶於 0.1 ml DMF), 在室溫中反應 2 小時, 接著再移至 4°C 中反應 16 小時。

1.2.2.2 將 NKT-CA(PEG)₄ 接合 BSA/KLH

取 2 mg BSA (溶於 0.3 ml 0.1 M Carbonate buffer PH9.6), 加入 2.9 mg EDC (以 0.009 ml d_2H_2O 溶解, 再加入 0.021 ml DMF) 和 1.3 mg NHS (溶於 0.013 ml DMF), 在室溫下反應 1 小時後加入 1 mg NKT-CA(PEG)₄, 在室溫中反應 2 小時, 置於 4°C 反應 16 小時, 並以 0.01M PBS 透析三次, 將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.3 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NKT-載體蛋白

秤取 2 mg protein (溶於 0.3 ml 0.1 M Borate buffer (PH8.5) 中, 緩慢加入 3 mg EDC (溶於 0.006 ml d_2H_2O , 0.021 ml DMF) 與 2 mg NHS (溶於 0.02 DMF), 置於室溫下反應 10 分鐘, 再緩慢加入 1 mg 的 Norketamine (溶於 0.1 ml DMF), 灌入氮氣, 置於室溫反應兩小時後, 放置 4°C 冰箱反應 16~18 小時, 用以 0.01 M PBS 透析

三次，將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.4 將 NKT 衍生 6-Aminohexanoic (6-AHA) 後利用 EDC/NHS 的方法合成 NKT-載體蛋白

1.2.4.1 NKT 衍生 6-AHA

取 1 mg NKT (溶於 0.1 ml DMF) 加入 2 mg 6-AHA (溶於 0.1 ml d₂H₂O)，混合均勻後緩慢加入 2 mg EDC (溶於 0.006 ml d₂H₂O , 0.014 ml DMF)，灌入氮氣，置於室溫反應 1.5 小時後，放置 4°C 冰箱反應 16~18 小時。

1.2.4.2 利用 EDC/NHS 的方法合成 NKT-PTG/BTG/HRP

取 2 mg PTG (溶於 0.3 ml 0.1 M Borate buffer (PH8.5) 中，緩慢加入 3 mg EDC (溶於 0.006 ml d₂H₂O , 0.021 ml DMF) 與 2 mg NHS (溶於 0.02 ml DMF)，置於室溫下反應 10 分鐘，再緩慢加入 1 mg 的 NKT-6AHA，灌入氮氣，置於室溫反應兩小時後，放於 4°C 冰箱反應 16~18 小時，用 0.01 M PBS 透析三次，將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.5 利用 N-(3'-acetylthiopropionamide) (3APA) 衍生 NKT 並以此衍生物接合上 N-succinimidylBromoacetate (NSB) 衍生載體蛋白

1.2.5.1 NSB 衍生 BSA/ γ -globulin/OVA

取 10 mg BSA (溶於 1 ml 0.1M borate buffer PH8.5) 至於冰浴中，加入 5 mg NSB (溶於 0.05 ml DMF) 混合均勻後緩慢加入 10 mg EDC (溶於 0.02 ml d₂H₂O , 0.08 ml DMF)，調整 PH 至 8 (以 1M NaOH 調整)，冰浴中反應 1 小時，放於 4°C 冰箱反應 16~18 小時，以 PH 7 d₂H₂O 透析三次，儲存於 -20 冰箱備用。

1.2.5.2 將 NKT 衍生 3APA

取 5 mg NKT (溶於 0.05 ml DMF)，將 5 mg 3APA (溶於 0.05 ml DMF) 與 8 mg EDC(溶於 0.024 ml d₂H₂O , 0.056 ml DMF) 依序緩緩加入，並加入 0.005 ml pyridine 後置於室溫反應兩小時後，放於 4°C 冰箱反應 16~18 小時，利用正向薄層層析片 (TLC silica gel 60 F₂₅₄) 將 NKT-3APA 點在 TLC plate 上，利用展開液展開，於波長 254 nm 下觀察是否衍生成功。確定 NKT-3APA 衍生成功後再加入 0.2 ml 0.12M potassium carbonate (溶於 80% MeOH20% d₂H₂O)，於氮氣環境下反應 20 分鐘，加入 0.2 ml PH 7 phosphate buffer 停止反應，並將其溶液 PH 調至 7，儲存備用。

1.2.5.3 NKT-3APA 接合 NSB-BSA/ γ -globulin

取 3 mg NSB-BSA 置於 4 ml 樣品瓶，將 1 mg NKT-3APA 緩緩加入，於氮氣環境下反應 16~18 小時，以 0.01 M PBS 透析三次，將此抗原儲存於 -20 冰箱備用。

1.3 製備抗體 (Immunization)

1.3.1 免疫 Balb/c 小鼠

為了製備對 KET 具有專一性的單株抗體，我們將 100 μ g 0.2 ml 的 KET-Protein 或 Norketamine-Protein 與 200 μ l 的費氏完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，以腹腔注射方式免疫 4 週大雌性週 Balb/c 品種的小鼠右側腹腔，2 週後再一次將 100 μ g 0.2 ml(溶於 0.01M PBS) 的抗原注射到小鼠右腹，之後每週採集小鼠血，並離心 13,000 rpm 30 分鐘 4°C 以取得血清，並利用 cdELISA 測試有無對 KET 專一性抗體。

1.3.2 免疫紐西蘭大白兔

為了製備對 KET 具有專一性的多株抗體，我們將 500 μg 1 ml 的 KET-Protein 或 Norketamine-Protein 與 1 ml 的費氏完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，分散注射於紐西蘭大白兔之背部表皮(約分成 20~30 點注射)。注射四週後，將 500 μg 1 ml 的 KET-Protein 或 Norketamine-Protein 與 1 ml 的費氏不完全佐劑 (incomplete Freund's adjuvant) 混合均勻，以皮下注射於紐西蘭大白兔的四肢，並於第五週起於兔子的耳朵動脈採血，純化後利用 cdELISA 測試有無對 KET 專一性抗體。

1.3.3 製備單株抗體

單株抗體生產是將將效價高之抗原免疫過的小鼠脾臟細胞(spleen cell)與骨髓瘤細胞(myeloma cell)進行融合後，形成融合瘤細胞株(hybridoma cell)，利用酵素免疫分析法篩出來具有分泌專一性抗體的融合瘤細胞株後進行單株選殖所得。一旦有了融合瘤細胞株，就可以持續地生產專一性抗體。

1.4 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法『Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA)』

1.4.1 用 EDC/NHS 的方法將 Norketamine 接上辣根過氧化酶(Horseradish peroxidase, HRP)

秤取 4 mg HRP 溶於 0.5 ml 0.1 M Borate buffer (PH8.5)中，緩慢加入 EDC 4 mg (0.005 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, 0.015 ml DMF)與 2 mg NHS (0.02 ml DMF)，置於室溫下反應 10 分鐘，再緩慢加入 0.25 mg 的 Norketamine (0.025 ml DMF)，置於室溫反應兩小時後，放置 4°C 冰箱反應 16~18 小時，用以 0.01 M PBS 透析三次。

1.4.2 cdELISA

在 96 孔盤中，每個微孔加入 0.1 ml 的抗體(稀釋 500 倍)，置於 37°C 反應一小時，

反應完成後以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01M PBS) 清洗盤子四次。加入 0.17 ml blocking buffer (0.1% BSA in 0.01M PBS)，置於 37°C 反應 30 分鐘，反應完成後以 washing buffer 清洗盤子四次。加入 0.05 ml Norketamine 標準品 (0~2000 ng/ml)，同時再加入 0.05 ml Norketamine-HRP (稀釋 20000 倍)，置於 37°C 反應一小時，反應完成後以 washing buffer 清洗盤子四次。加入 0.1 ml TMB substrate，避光反應 15 分鐘，再加入 0.1 ml HCL 終止反應，並以 ELISA reader 測量其再 450 nm 與 650 nm 的吸光值。

結果與討論

(A) 抗體製作

KET 為小分子化合物，其分子量為 237.7 g/mol (圖一)，因此不具免疫原性，為了使實驗動物產生抗體，將 KET 與載體蛋白接合，使其產生免疫原性，並用以免疫 Balb/c 小鼠與紐西蘭大白兔，使其製備成具有專一性單株與多株抗體，以此抗體來建立酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 和開發快速免疫層析試紙分析法。

製備抗體時，由於 KET 結構中並無與載體蛋白接合時常使用的胺基 (-NH₃) 及羧基 (-COOH)，故先將 KET 上的酮基 (=O) 衍生 CMO，再將 CMO 上的羧基利用 EDC 及 NHS 將 KET 與 BSA/ γ -globulin /KLH 接合 (圖二)，利用 KET-CMO-BSA、KET-CMO- γ -globulin、KET-CMO-KLH 分別免疫二隻 Balb/c 小鼠與 KET-CMO-BSA、KET-CMO- γ -globulin 免疫紐西蘭大白兔，其血清中抗體測試並未有明顯的競爭效果。其次利用 KET 結構上甲基 (-CH₃) 衍生 Br，再利用 Br 與載體蛋白上胺基接合 (圖三)，合成

KET-Br-BSA，並以此抗原免疫二隻 Balb/c 小鼠其血清中抗體測試並未有明顯的競爭效果。接著利用乙二胺 (Ethylenediamine, EDA) 上胺基與載體蛋白上羧基接合，並以甲醛 (Formaldehyde) 使 KET 結構上甲基端可與 EDA-載體蛋白接合 (圖四)，合成 KET-EDA-BSA、KET-EDA- γ -globulin，分別將其抗原分別免疫二隻 Balb/c 小鼠與兩隻免疫紐西蘭大白兔，檢測血清中抗體並未有明顯的競爭效果。將 KET 上氯 (-Cl) 與 3-PA 的硫醇基 (-SH) 接合 (圖五)，後利用 EDC/NHS 的方法將 KET-3PA 上羧基與載體蛋白上胺基接合 (圖六)，合成 KET-3PA-KLH、KET-3PA-OVA，並將 KET-3PA-KLH 免疫二隻 Balb/c 小鼠並利用 KET-3PA-OVA 作為非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法測試蛋白，其結果未有明顯的競爭效果。利用 KET 類似物 6-Br-KET 上溴端以 EDC 的方法合成 6-Br-KET-BSA、6-Br-KET-PTG (圖七)，分別將其抗原分別免疫二隻 Balb/c 小鼠與以 6-Br-KET-PTG 免疫紐西蘭大白兔，檢測血清中抗體並未有明顯的競爭效果。將 KET 上胺基 (-NH₂-) 以重氮法接合載體蛋白上胺基接合 (圖八)，合成 KET-BSA 並免疫二隻 Balb/c 小鼠，其結果未有明顯的競爭效果。

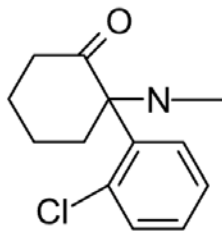
製備 KET 抗體的過程中，由於使用 KET 接合載體蛋白並無法有效生產具有高專一性的抗體，因次利用 KET 類似物 NKT 製備抗原，NKT 結構中具有與載體蛋白接合時常使用的，利用此胺基可與 CA(PEG)₄(圖九)、6-AHA 結構接合 (圖十)，以利與載體以 EDC/NHS 的方法接合，合成 NKT-CA(PEG)₄-KLH、NKT-CA(PEG)₄-BSA、NKT-6AHA-PTG、NKT-6AHA-BTG，以此抗原分別免疫二隻 Balb/c 小鼠，並以 cdELISA 檢測小鼠血清中抗體，其中以 CA(PEG)₄接合的抗原並無法產生具明顯競爭效果的抗體，而以 6-AHA 則可測得有明顯的競爭效果，但抗體效價並不高。因此再以 Glutaraldehyde 與載體蛋白上胺基接合，並利用其羧基與載體蛋白上羧基與 NKT 上胺基接合 (圖十一)，合成 NKT-Glu-BSA、NKT-Glu-KLH，並分別免疫二隻 Balb/c 小鼠，檢測血清中抗體並未有明顯的競爭效果。接著利用 3APA 上羧基與 NKT 胺基接合，以此衍生物與載體蛋白接合 NSB 所露出的溴端接合 (圖十二)，合成 NKT-3APA-NSB-BSA、NKT-3APA-NSB- γ -globulin，分別免疫二隻 Balb/c 小鼠與紐西蘭大白兔，並以檢測小鼠血清中抗體，其結果未有明顯的競爭效果。最後用 EDC/NHS 的方法直接將 NKT 上胺基與載體蛋白上羧基接合 (圖十三)，合成 NKT-BSA、NKT-KLH、NKT-PTG、NKT-BTG、NKT- γ -globulin，分別免疫二隻 Balb/c 小鼠與紐西蘭大白兔並以 cdELISA 檢測是否有對 KET、NKT 具專一性抗體，在紐西蘭大白兔血清中未有明顯的競爭效果，但 Balb/c 小鼠血清中發現有對 KET、NKT 具有專一性的抗體。

KET 與 NKT 分別以不同的方法接合不同的載體蛋白免疫實驗動物後發現，以 NKT 用 EDC/NHS 的方法直接接合載體蛋白可產生具有專一性抗體，其中 NKT-BSA、NKT-KLH、NKT-PTG、NKT-BTG、NKT- γ -globulin，五種不同抗原免疫 Balb/c 小鼠後，免疫 NKT-PTG 的小鼠可產生效價較高，對 KET、NKT 較具專一性的抗體 (圖十四)。因次利用具有專一性抗體之小鼠脾臟細胞(spleen cell)與骨髓瘤細胞(myeloma cell)進行融合後，形成融合瘤細胞株(hybridoma cell)，篩選出具有分泌專一性抗體的融合瘤細胞株後進行單株選殖，並取得編號為 7E9E8 的單株抗體，並以此抗體建立 cdELISA (圖十五)。

本實驗室在建立 cdELISA 過程中，同時開發快速免疫層析試紙，以便未受過專業訓練的人員可以更快速且簡便的分法檢測 KET 與 NKT 在檢體中含量。市面上台塑生醫已有 KET 檢驗試劑套組的販售，因此我們購買此套組測試，利用 KET 標準品 (10、50、100ng/ml) 與 NKT 標準品 (100、500、1000ng/ml) 檢測，結果顯示 KET 濃度高於 50 ng/ml、NKT 濃度高於 500 ng/ml 時，毒素可完全佔據抗體上的抗原結合位，因此抗體-奈米金粒子探針無法與測試區的 KET-protein 接合，因此在試紙上只會觀察到一條紅線 (圖十六)。

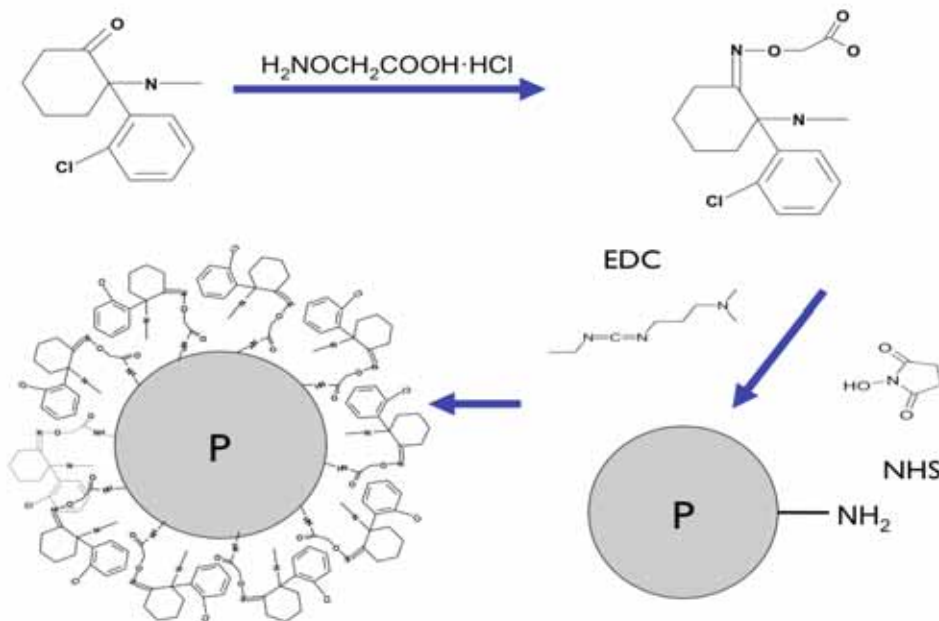
此外在免疫層析試紙的置備中，在單株抗體的製備尚未完成時，我們購買了 Fitzgerald 生產的 Dehydronorketamine antibody 與 Ketamine antibody，利用不同的抗原進行 test line 測試，包含有 KET-3PA-KLH、KET-3PA-OVA、KET-EDA-BSA、NKT-BSA、NKT-KLH、

NKT-6AHA-BSA、NKT-NSB-BSA，而其中以 Dehydronorketamine antibody 所接合的奈米金在 test line 利用 NKT-BSA 時顯色較明顯，因次我們利用不同比例的 NKT-BSA 測試與 KET、NKT 之間的競爭效果，結果顯示在 NKT-BSA 比例為 1:12 以 KET、NKT 進行競爭測試，KET 偵測限制量為 1000ng/ml，NKT 偵測限制量為 500 ng/ml（圖十七）。由於本實驗目前單株抗體的免疫層析試紙開發尚在進行中，若可得找到 KET、NKT 最適合作為 test line 的條件，未來即可開發並量產快速且準確篩檢樣品的 KET 免疫層析試紙。

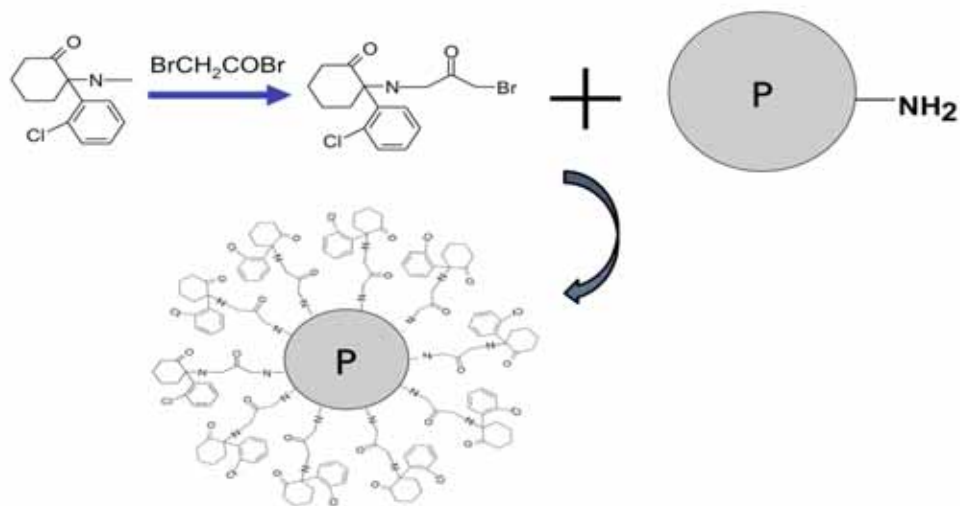


圖一、Ketamine 分子結構圖

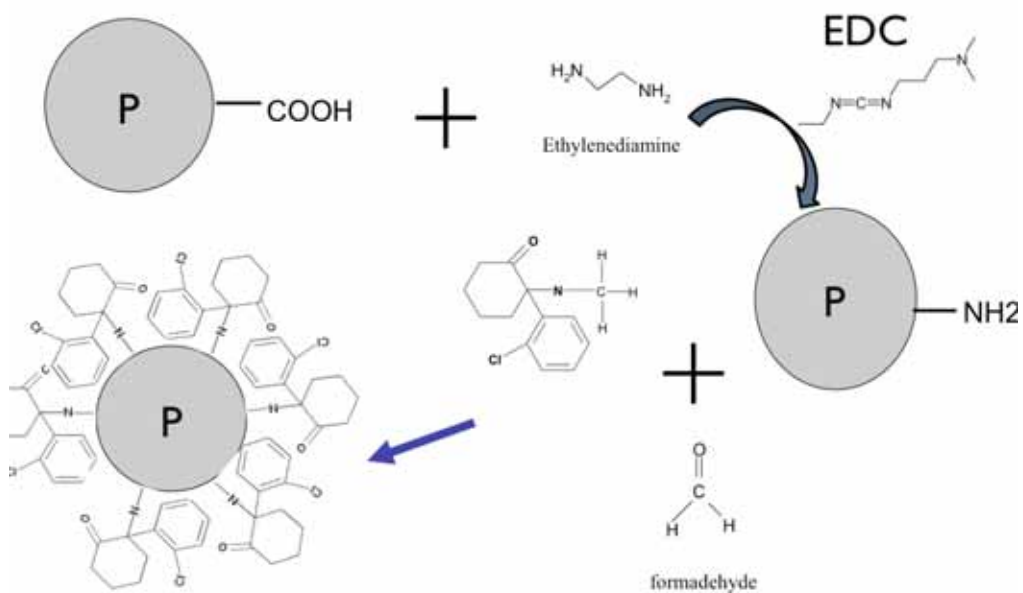
KET 的化學式為 $C_{13}H_{10}ClNO$ ，分子量為 237.7 g/mol。在國內屬於第三級管制藥品。



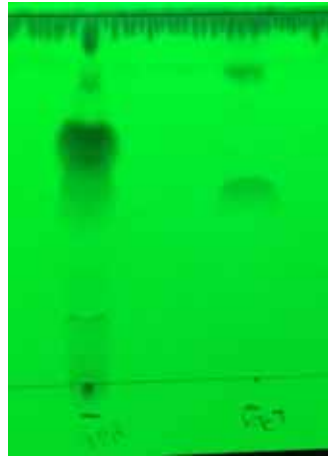
圖二、將 KET 上的酮基（=O）衍生 CMO，再將 CMO 上的羧基利用 EDC 及 NHS 將 KET - CMO 與 protein 接合



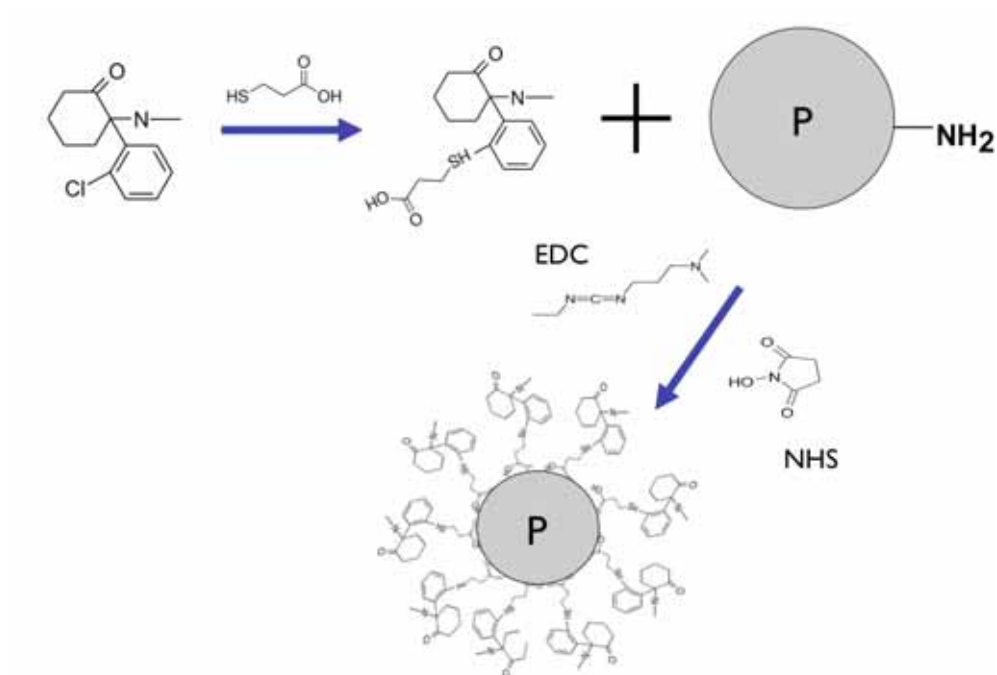
圖三、KET 結構上甲基 ($-\text{CH}_3$) 衍生 Br，再利用 Br 與載體蛋白上胺基接合



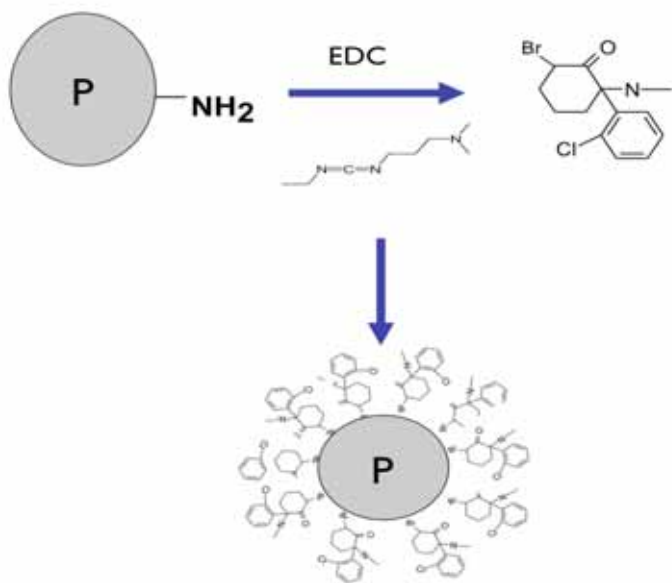
圖四、利用 EDA 上胺基與載體蛋白上羧基接合，並以 Formaldehyde 使 KET 結構上甲基端可與 EDA-載體蛋白接合



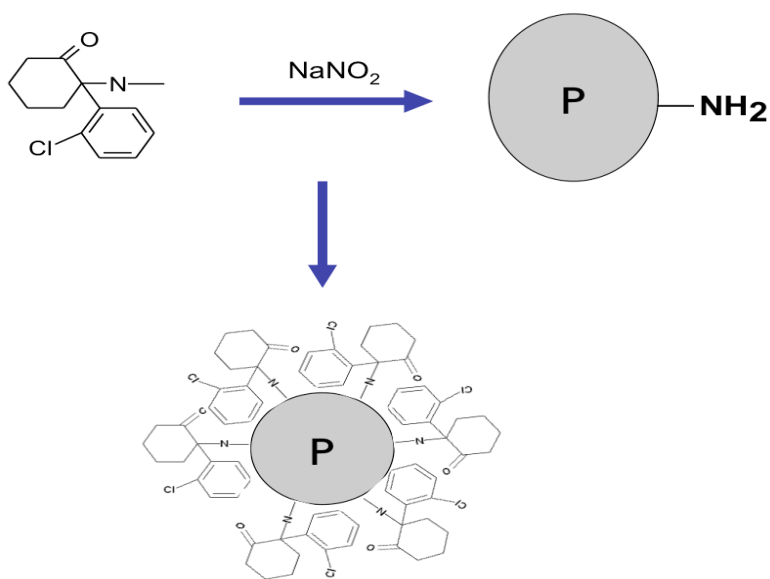
圖五、Ketamine 衍生 3-PA 利用正向薄層層析片 (TLC silica gel 60 F₂₅₄) 將 KET-3-PA 點在 TLC plate 左側，KET 標準品點在右側，以展開液 (methanol : chloroform : acetic acid = 1 : 9 : 0.5) 展開，於波長 254 nm 下觀察。KET-3-PA 與 KET 標準品所跑出高度具有明顯差異，因此可推斷 KET-3-PA 衍生成功。



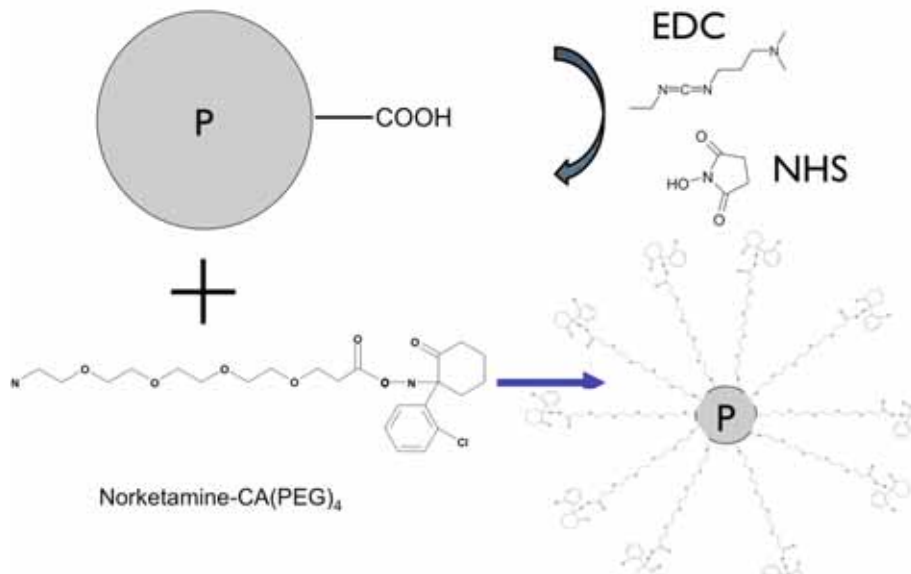
圖六、將 KET 上 CL 與 3-PA 的 SH 接合，接著以 EDC/NHS 的方法將 KET-3PA 上羧基與載體蛋白上胺基接合



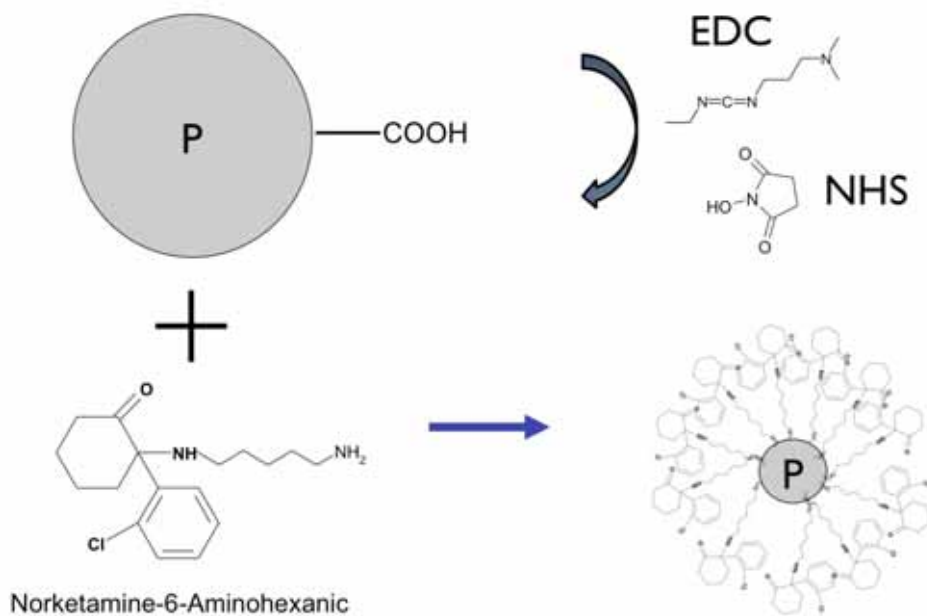
圖七、利用 KET 類似物 6-Br-KET 上溴端以 EDC 的方法與載體蛋白接合



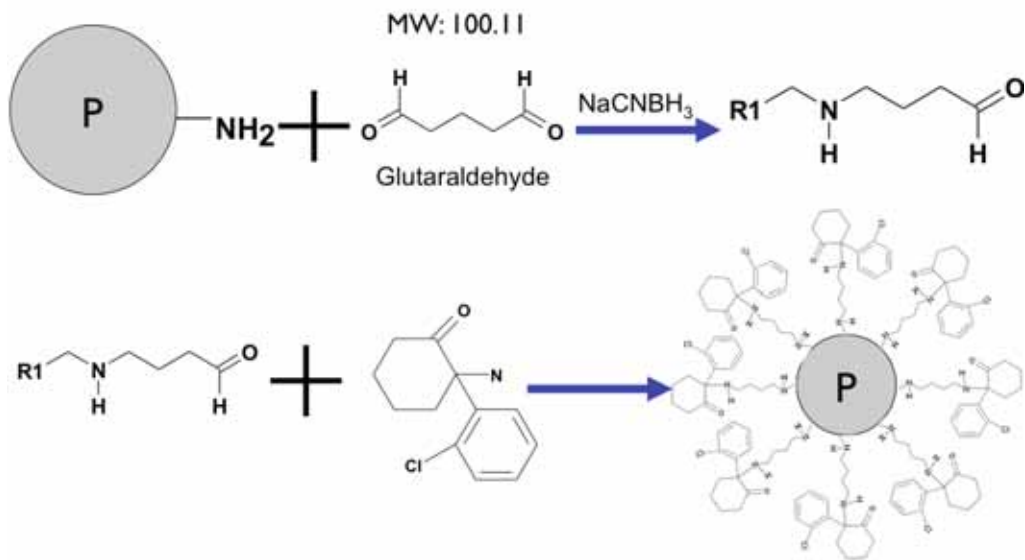
圖八、KET 上胺基以重氮法接合載體蛋白上胺基接合



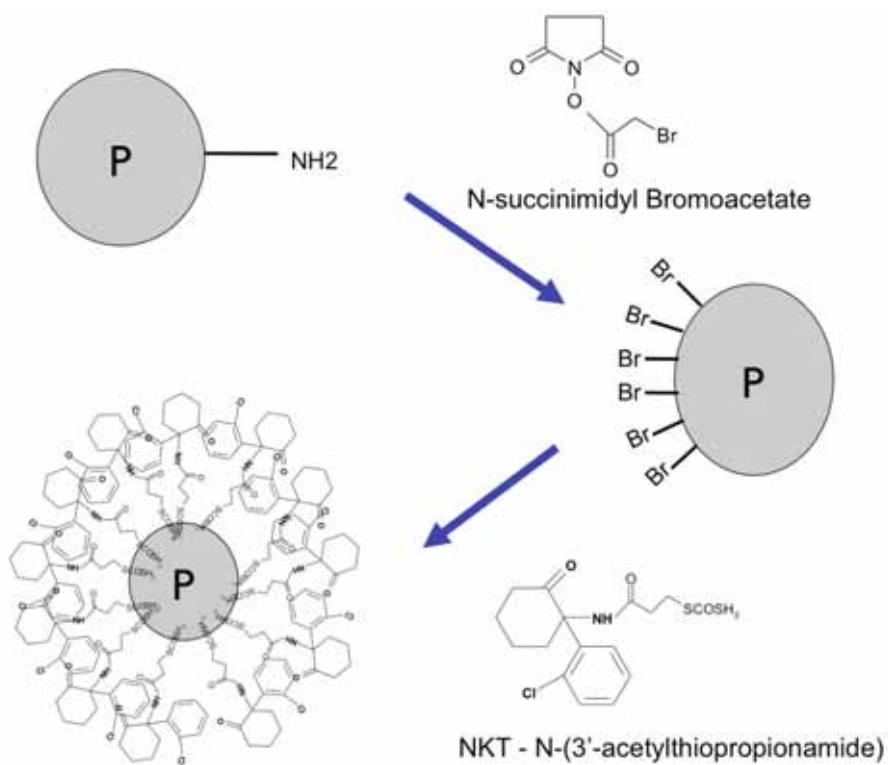
圖九、NKT 上胺基與 CA(PEG)₄ 上羧基接合，並利用 CA(PEG)₄ 上胺基以 EDC/NHS 的方法與載體蛋白接合



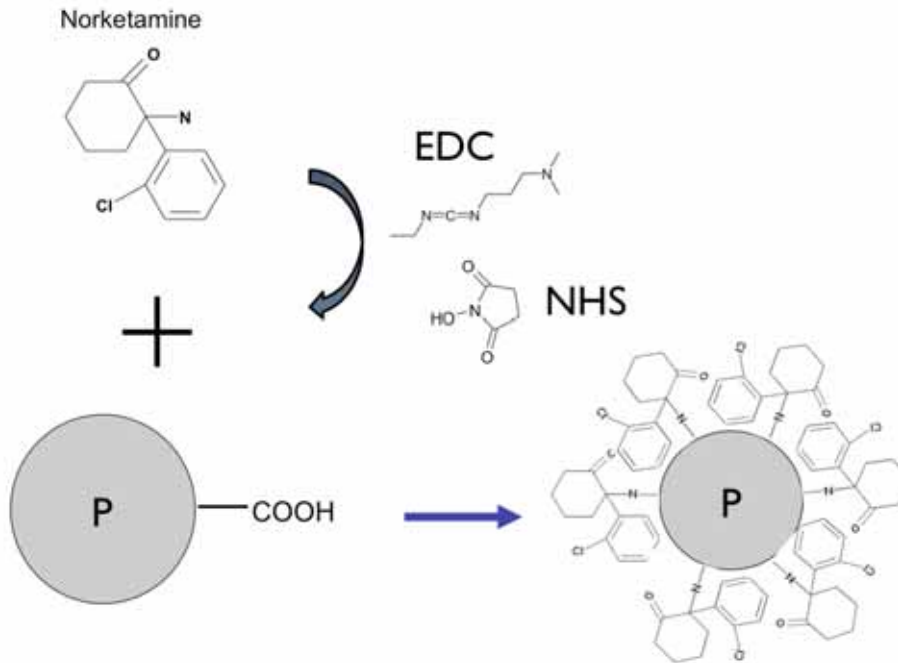
圖十、NKT 上胺基與 6-AHA 上羧基接合，並利用 6-AHA 上胺基以 EDC/NHS 的方法與載體蛋白接合



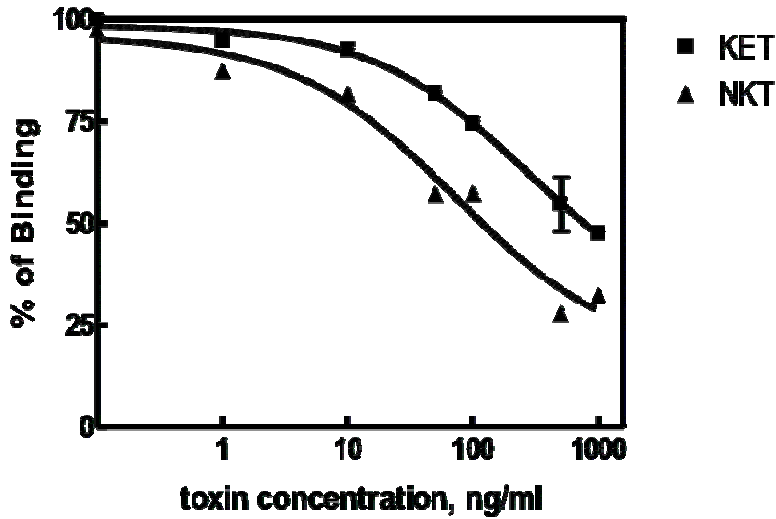
圖十一、以 Glutaraldehyde 與載體蛋白上胺基接合，並利用其羧基與載體蛋白上羧基與 NKT 上胺基接合



圖十二、利用 3A 上羧基與 NKT 胺基接合，以此衍生物與載體蛋白接合 NSB 所露出的溴端接合

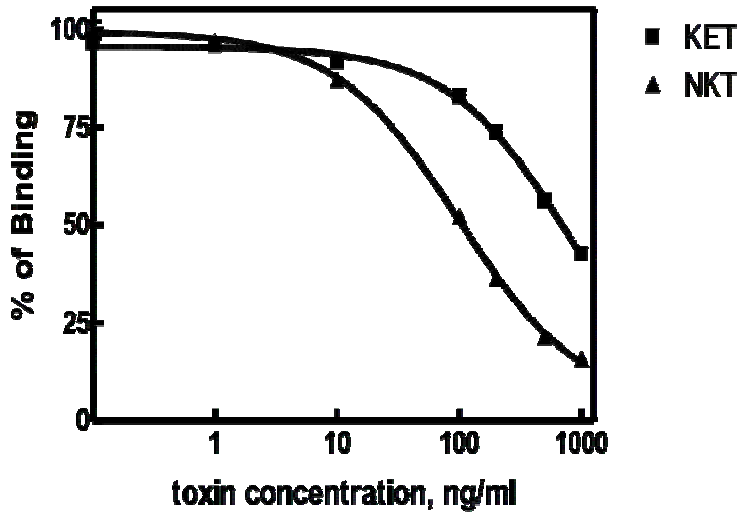


圖十三、以 EDC/NHS 的方法直接將 NKT 上胺基與載體蛋白上羧基接合

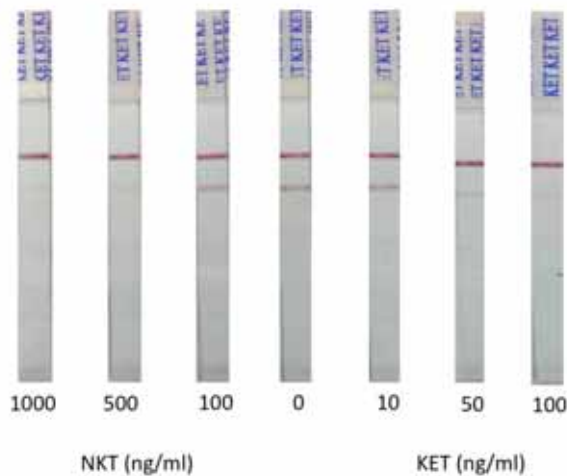


圖十四、單株抗體製備前用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 測試免疫 NKET-PTG 小鼠血清中的多株抗體之專一性 (■) Ketamine (▲) Norketamine

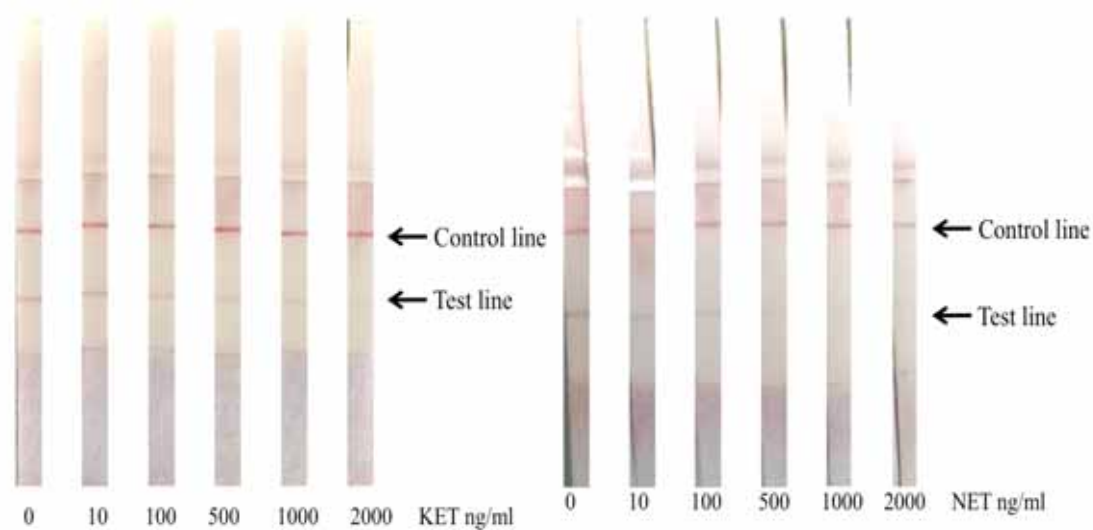
利用小鼠血清中抗體測試 cdELISA，實驗結果如上圖，抑制 50 % 的 NKET-HRP 結合至抗體所需的 KET 和 NKET 標準品濃度(IC50) 為 Ketamine : IC50 = 780 ng/ml，Norketamine : IC50 = 120 ng/ml。



圖十五、以直接競爭型 ELISA (cdELISA) 測試 7E9E8 單株抗體之專一性 (■) Ketamine (▲) Norketamine 利用融合瘤細胞株培養液中抗體測試 cdELISA，實驗結果如上圖，抑制 50 % 的 NKET-HRP 結合至抗體所需的 KET 和 NKET 標準品濃度(IC50) 為 Ketamine : IC50 = 760 ng/ml，Norketamine : IC50 = 100 ng/ml。



圖十六、利用 KET 標準品 (100、50、10 ng/ml) 與 NKT 標準品 (1000、500、100 ng/ml) 檢測，結果顯示 KET 偵測的最低限制量大約為 50 ng/ml、NKT 的偵測最低限制量大約為 500 ng/ml。

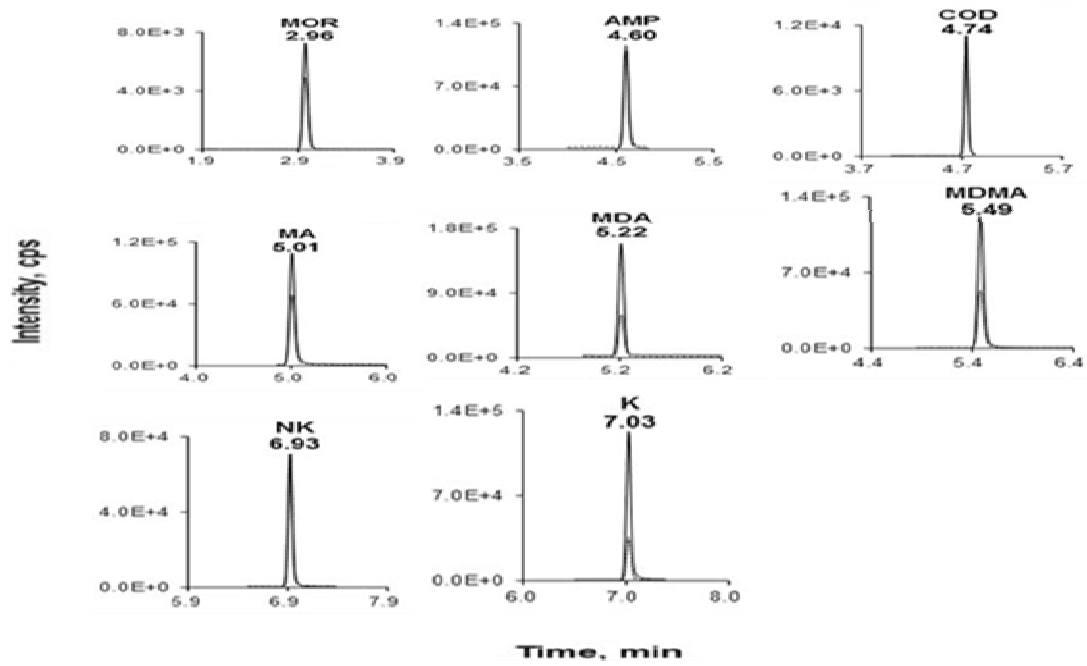


圖十七、利用 KET 標準品(0, 10, 100, 500, 1000, 2000 ng/ml)與 NKT 標準品(0, 10, 100, 500, 1000, 2000ng/ml) 檢測，結果顯示 KET 偵測限制量為 500 ng/ml，NKT 偵測限制量為 100ng/ml。

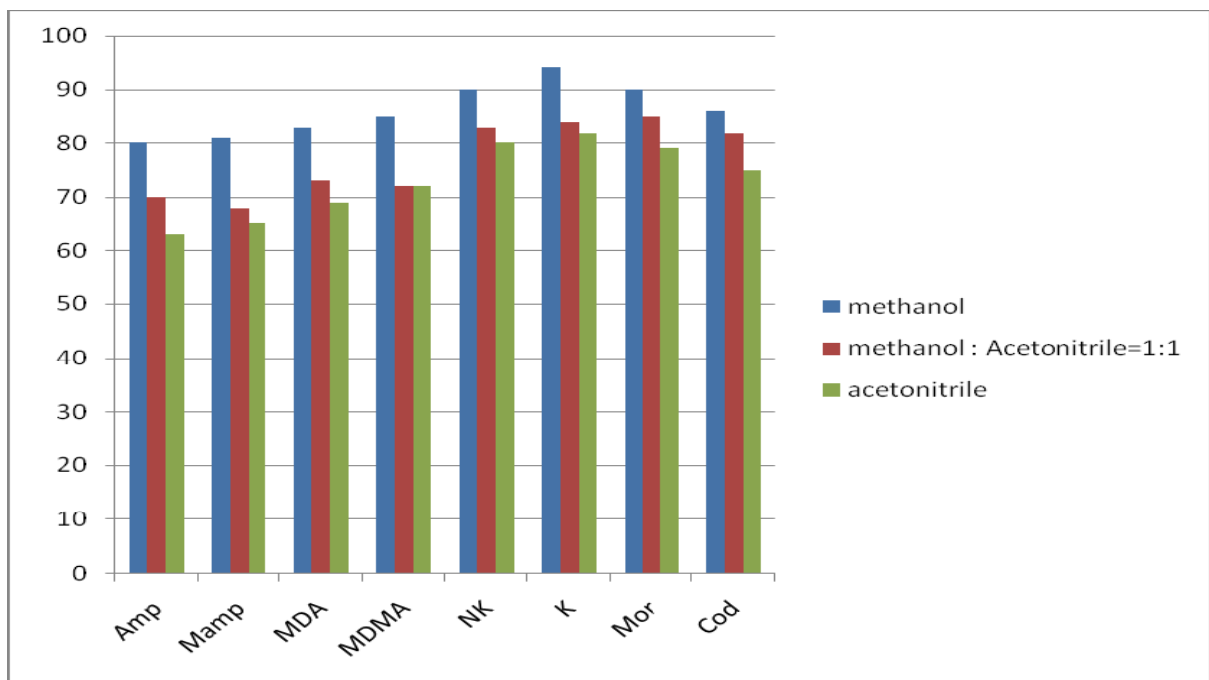
(B) 免疫層析試紙之再檢測評估

其次，本研究是以國內常見毒品 LC-MS/MS 檢驗方法，進行免疫層析試紙之再檢測之評估。研究首先針對 8 種常見濫用藥物與其代謝物，建立 LC ESI MS/MS 的同時分析方法。由於 ESI 是極軟的游離化方法，因此個別藥物與其代謝物的標準品，經由正離子 ESI 全離子掃描分析後，母離子皆是以 $[M+H]^+$ 狀態存在。隨後再透過子離子掃描 (product ion scan)，選定各化合物之母離子 $[M+H]^+$ ，在碰撞室內 (Q2) 進行不同能量 (Collision energy, CE) 的碰撞，來取得該化合物的特異性碎裂圖譜，並從碎裂圖譜中選擇強度最強的 2 個斷片離子，來分別當作 MRM 分析方法中的定量離子及定性離子(如表 1)。研究中使用的高效能之 KINETEX core-shell C18 層析管柱為來進行層析分離，圖十八為 8 種化合物混合標準品溶液之 LC MS/MS 的 MRM 分析圖譜。

而在免疫層析試紙之再檢測評估，我們推測免疫層析試紙之前後吸水片應該仍存有大量的唾液檢體。先前我們曾發展乾尿片方式來儲存尿液，透過打孔機取得孔點 (dried urine spots)，進而以液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)檢驗國內常見濫用藥物。我們針對已經自然乾燥之免疫層析試紙，以不同的溶液進行唾液試片的萃取，隨後利用 LC-MS/MS 模式分析。其回收率實驗評估如圖十九，結果發現以甲醇浸泡回溶有較佳的回收率，(80%以上)。各藥物的方法定量極限為安非他命：1 ng/mL，甲基安非他命：1 ng/mL，MDA：1 ng/mL，MDMA：1 ng/mL，嗎啡：3 ng/mL，可待因：3 ng/mL，去甲基凱他命：0.5 ng/mL，凱他命：0.5 ng/mL。檢量線採 5 點校正濃度為 5, 25, 50, 100, 200 ng/mL。各藥物線性回歸曲線(r^2)皆 ≥ 0.995 。而免疫層析試紙之前後吸水片之評估發現，通常前吸水片之濃度都比後吸水片來的多。我們推測後吸水片可能是使用析水性極佳之高分子吸水材料，因而不易萃取出來。而分析前吸水片已足夠進行確認檢驗。總之，藉由高靈敏 LC MS/MS 的 MRM 掃描分析，8 種常見濫用藥物與其代謝物都具有極佳的分析靈敏度與再現性，本方法利用路檢初篩之唾液試片，大大地簡化傳統唾液檢體之保存與分析之問題，不僅省時也更省成本，同時也符合超高效率檢驗分析之目標。



圖十八. 8 種常見濫用藥物與其代謝物之層析質譜圖



圖十九. 各藥物與代謝物在不同的溶液之萃取回收率

表 1. 各藥物與代謝物之最佳化 LC - MS/MS 質譜參數

Analyte	MRM transitions			Optimum parameters				
	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Ratio (%)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
MA-d5	155.2	92.0	-	10	130	13	26	6
MA	149.8	90.8	100	10	130	13	26	6
	149.8	119.0	60	10	130	13	17	8
AMP-d5	141.2	124.0	-	20	120	6	13	8
AMP	136.0	119.0	85	20	120	6	13	8
	136.0	91.0	100	20	120	6	23	6
MDMA-d5	199.2	164.8	-	10	120	11	17	11
MDMA	194.0	163.0	100	10	120	11	17	11
	194.0	105.0	50	10	120	11	36	7
MDA-d5	185.2	167.8	-	20	110	5	15	11
MDA	180.0	163.0	100	20	110	5	15	11
	180.0	105.0	40	20	110	5	31	6
K-d4	242.0	129.0	-	20	110	10	38	9
K	237.8	125.0	100	20	110	10	38	9
	237.8	206.8	30	20	110	10	18	14
NK-d4	228.0	129.0	-	30	100	7	39	8
NK	224.0	125.0	100	30	100	7	39	8
	224.0	206.8	95	30	100	7	18	14
MOR-d6	292.2	152.2	-	35	150	11	80	11
MOR	286.2	152.2	100	35	150	11	80	11
	286.2	201.0	70	35	150	11	35	6
COD-d3	303.2	215.0	-	35	150	10	35	6
COD	300.2	215.0	100	35	150	10	35	6
	300.2	165.0	75	35	150	10	60	5

參考文獻

行政院衛生署. (2016). 藥物濫用案件稽檢驗資料.

Blencowe, T.; Pehrsson, A.; Lillsunde, P. DRUID. Analytical evaluation of oral fluid screening devices and preceding selection procedures. 2010

Bosker, W. M.; Huestis, M. A. Oral fluid testing for drug of abuse. *Clin. Chem.*, 2009, 55, 1910-1931.

Bush, D. M. (2008). The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: current status and future considerations. *Forensic SciInt*, 174(2-3), 111-119.

Crouch, D. J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic. Sci. Intl.*, 2005, 150, 165-173.

Drummer, O. H. Drug testing in oral fluid. *Clin. Biochem. Rev.*, 2006, 27, 147-159.

Huestis, M. A. Oral Fluid Testing: Promises and Pitfalls. *Clin. Chem.*, 2011, 57, 805-810.

Langei, K.; Engblom, C.; Pehrsson, A.; Gunnar, T.; Ariniemi, K.; Lillsunde, P. Drug testing in oral fluid—evaluation of sample collection devices. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32, 393-401.

Negrusz, A., Adamowicz, P., Saini, B. K., Webster, D. E., Juhascik, M. P., Moore, C. M., & Schlemmer, R. F. (2005). Detection of ketamine and norketamine in urine of nonhuman primates

after a single dose of ketamine using microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

and NCI-GC-MS. *J Anal Toxicol*, 29(3), 163-168.

Vanstechelman, S.; Isalberti, C.; Van der Linden, T.; Pil, K.; Legrand, S.A.; Verstraete, A.G. Analytical evaluation of four on-site oral fluid drug testing devices. *J. Anal. Toxicol.* 2012, 36, 136-140.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/11/30

科技部補助計畫	計畫名稱: 口液中濫用藥物 現場即時檢驗之開發與實證(3/3)
	計畫主持人: 張耀仁
	計畫編號: 104-2218-E-040-002- 學門領域: 毒品快速篩檢技術專案計畫
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：張耀仁			計畫編號：104-2218-E-040-002-			
計畫名稱：口液中濫用藥物 現場即時檢驗之開發與實證(3/3)						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		4		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		1	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
			專書		0	本
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
其他		0				

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	2		
		博士生	1		
		博士後研究員	0		
		專任助理	2		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

愷他命(KET)是目前國內濫用程度最大之毒品，然而歐美國家卻不盛行。這使得口液檢驗所需之KET抗體與相關評估相當缺乏。因此本計畫主要目標在於開發針對口液分析所需要之KET抗體，並利用此抗體建立高敏感性及專一性的酵素連結免疫分析法，進而開發快速免疫層析試紙分析法。其次是以國內常見毒品LC-MS/MS檢驗方法，進行免疫層析試紙之再檢測與評估。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）