

研究計畫編號：DOH97-NNB-1015

科資中心編號：PG9701-0174

行政院衛生署管制藥品管理局

九十七年度委託科技研究計畫

濫用藥物唾液檢驗之方法開發與探討

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：林克亮

研究人員：張耀仁、劉珈岑、陳素琴、吳雅雪、劉琢玉

執行期間：自 97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日止

*本研究報告僅供參考，不代表本局意見

目 錄

	頁碼
目 錄	I
圖 次	II
表 次	III
中文摘要.....	IV
Abstract	VI
壹、前言.....	07
貳、材料與方法.....	11
參、結果與討論.....	23
肆、結論與建議.....	57
伍、參考文獻.....	59

圖次

	頁碼
圖 1 唾液中 AP、MOR 及 MDMA 之檢量線及 R^2	27
圖 2 唾液中各藥物 GC/MS 層析圖譜。	34
圖 3 唾液真實檢體中各藥物 GC/MS 層析圖譜。	34
圖 4 各藥物之 LC/MS/MS 裂解質譜圖。	42
圖 5 各藥物之 LC/MS/MS 分離層析圖。	54
圖 6 各藥物於 pH 10 與 pH 3 之訊號強度比較圖。	56

表次

	頁碼
表 1 唾液初篩之同日內精密度、準確度	29
表 2 唾液初篩之異日間精密度、準確度	29
表 3 各藥物之 GC/MS 選擇離子	33
表 4 GC/MS 方法確效評估	33
表 5 各藥物之 LC/MS/MS 多重反應監測模式之目標離子	43
表 6 各藥物之 ESI 與 APCI 訊號強度結果比較	44
表 7 各藥物之 LC/MS/MS 目標離子與滯留時間	55
表 8 各藥物於 pH 10 與 pH 3 之訊號強度比較	56
表 9 各藥物於 LC/MS/MS 最低偵測極限值評估	59
表 10 各藥物於 LC/MS/MS 之同日內精密度與準確度評估	59

中文摘要

關鍵字：濫用藥物、唾液檢驗、液相層析串聯質譜儀、氣相層析質譜儀。

本研究主要是發展唾液檢驗，針對常見濫用藥物：甲基安非他命、安非他命、MDMA、MDA、MDEA、6-乙醯嗎啡、可待因、嗎啡、K 他命和古柯鹼，進行之初篩與確認檢驗方法方法開發。

首先，我們以方便、全自動化的 EMIT 酵素免疫分析儀 Olympus AU600，進行唾液中的濫用藥物之初篩檢驗。我們找出唾液中各濫用藥物微量分析之最佳化條件，並精確評估方法之確效性，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度評估...等，皆得到很好的結果。由於當初步篩檢值大於閾值時，才需要做更進一步確認檢驗，因此 EMIT 初篩可迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，達到本研究節省成本及降低檢驗時效性的目的。

其次，本研究將原有之常見毒品毛髮檢驗之 GC/MS 方法，轉移成為唾液確認檢驗方法，並進行方法之確效性評估，包含檢量線建立、回收率評估、偵測極限評估、精密度與準確度評估...等。

由於使用 GC/MS 做為系統性檢驗方法上，因衍生化過程等先天上的因素，使得系統受到限制。隨著液相層析質譜儀(LC/MS)的成熟與普及化，其方法大多不需衍生化步驟，實驗可較為簡單快速。本研究除了建立

初篩檢驗方法外，亦建立 LC/MS/MS 分析方法。實驗首先以 0.1 M Phosphate buffer (pH 5.0) 加入唾液，隨後進行 SPE 萃取，並以 C18 的管柱進行分離，接著以 LC/MS/MS (API3000) 進行 MRM 模式之偵測。實驗結果發現：除可獲得良好的分離效果外，LC/MS/MS 的靈敏度較 GC/MS 有更低的方法偵測極限。

Abstract

keyword : Drug of abuse, Saliva testing, LC/MS/MS,GC/MS

In this study, the Saliva testing had been developed to detect methamphetamine, amphetamine, MDMA, MDA, MDEA, 6-monoacetyl morphine, codeine, morphine, and ketamine. Saliva samples were diluted 1 : 1 with 1M pH 7.4 phosphate buffer, then directly assayed using an enzyme multiplied immunoassay technique(EMIT) : a convenient , time-saving and fairly sensitive semiquantitative screening method by Olympus AU600. An optimized procedure for screening was found, and the developed method was fully validated.

Secondly, GC/MS for hair testing were transferred to saliva testing, and fully validated. Finally, LC/MS/MS for saliva testing had been developed and fully validated. Compared to GC/MS, liquid chromatography-mass spectroscopy (LC/MS) provides a more simplified, effective way to achieve accurate analysis purpose without any sample preparation for the derivation.

The sample was then injected into C18 column for the species separation and analyzed by LC/MS/MS (API3000) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results indicate this method can provide high separation efficiency for those species and the LC/MS/MS can provide the greater limit of detect (LOD) than GC/MS.

壹、前言

尿液檢驗是國內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。一般而言，初篩檢驗要求檢驗的速度，採用的方法需反應迅速、操作容易。測試尿液不必經過前處理，因此一般皆採用酵素免疫分析法在自動化儀器操作下，每小時可完成數百個檢體分析。經第一階段篩檢後，若為陽性或有疑義時，則需進一步以不同的分析原理之分析方法，進行第二階段尿液確認檢驗證實，以免產生誤判現象，氣相層析質譜分析法(GC/MS)是目前最主要的確認方法。尿液樣品經過數步驟的前處理，如水解、萃取、衍生化等，最後打入氣相毛細管柱進行分離，並以質譜儀偵測。

雖然尿液檢驗具有簡單、非侵入性等優點，不過常有：取尿耗時、需在經檢查過的廁所中以及受檢者容易進行掉包、攙假等問題，特別是在 PUB、舞廳及同志派對中帶嫌疑者回警局採尿，動輒近百人，使得採尿工作變得極為繁瑣。近年來國外已逐漸將唾液檢驗(Saliva testing)¹⁻³發展到路檢與濫用藥物採檢，利用唾液易於收集的特性，可當面取樣並全程監察，不需特別之設施場所，沒有尷尬或隱私的問題，且能防止發生作假之情形，最重要是唾液中藥物濃度可以即時反映血液中藥物濃度，因此對於現場及時採樣將有極大助益。

唾液為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)。唾液為無色透明、無味、近中性，為稍具黏度之低滲透液體，其中水的成

分佔 99% 以上，正常人的唾液之 pH 為 6.2~7.4。成人 24 小時的正常唾液分泌量約 1~1.5L，睡眠時分泌量約 0.05mL/min，咳嗽時分泌量約 0.5mL/min，咀嚼時分泌量約 1~3 mL/min 甚至更多。

唾液的分泌的調節屬於神經反射性調節，包括非條件反射 (unconditioned reflex) 和條件反射 (conditioned reflex) 兩種。非條件反射性分泌指進食時，食物對口腔產生機械的、化學的和溫度的刺激，使口腔黏膜和舌的感受器興奮，引起唾液分泌。而進食前，食物的顏色、形狀、氣味、進食環境及有關的語言描述等所產生條件反射，進而引起唾液分泌，則稱為條件反射性分泌。唾液的分泌量無論是在刺激或無刺激條件下，頰下腺的唾液分泌量多，其次為腮腺、舌下腺。但刺激時腮腺唾液分泌量佔全唾液量的百分比最高。

以唾液做濫用藥物檢驗分析的檢體，需確實了解藥物進入唾液之機制。一般而言，毒品經過吸食或施打進入人體後，會經由肝臟分解成各種代謝物，再經由血液循環分佈全身；血液中之游離型藥物可藉由被動擴散 (Passive diffusion)，穿過上皮細胞膜進入唾液。許多研究證明，藥物在唾液中的濃度與在體液中(血液、血漿)藥物濃度相關聯⁴⁻⁵，有些因子會影響藥物進入唾液中，例如：藥物的 pKa、大小、pH、藥物結合蛋白降解、親脂性有相關。原始藥物存在口水中，因為脂溶性可以輕易穿過微血管及腺泡細胞膜進入口水。藥物 pH 不同影響藥物由血漿進入唾液，當藥物為口服或吸入，藥物會殘留在口腔，口腔中可測得高濃度藥物，因此在這些情況下，口水中藥物濃度無法代表血中藥物濃度。

由於毒藥物可經由血液傳遞至唾液中，許多研究嘗試探討各種毒藥物之唾液動力學，以了解各種毒藥物在唾液與血漿中的濃度相關

性。同時，唾液中毒藥物濃度通常可反應出血中藥物之有意義藥理相關數值⁶⁻⁷，因此在醫學上，也增強了以唾液樣品追蹤醫用藥物的興趣。而均針對唾液在刑事鑑識上的應用，在英、德與澳洲也開始使用唾液檢驗於路檢，進行駕駛人是否吸食藥物、毒品之監測。唾液由於採樣容易及不易攙假，也很適合作為查證是否有濫用藥物的檢體。在使用毒藥物後，毒藥物極易從血液轉入唾液，唾液中毒藥物濃度通常反應出在血漿中未與蛋白質結合的毒藥物濃度；然而在血液中之濃度則包含自由的及和蛋白質結合的全部毒藥物。

如同尿液檢驗的程序，亦有人將毛髮檢驗分成初篩及確認檢驗兩部份。目前國外之唾液初篩檢驗主要是使用：酵素免疫分析試劑套組(ELISA kit)，確認檢驗則只要為 GC/MS⁸⁻⁹ 與 LC-MS/MS¹⁰⁻¹⁵ 兩種方法。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，GC/MS 除了有樣品前處理繁雜費時等缺點，在發展系統性檢驗方法上，因衍生化過程等先天上的因素，使得可同時分析藥物的種類受限，更嚴重，在追查未知藥物時，也常不易得到結果。

隨著液相層析質譜儀(LC/MS)的成熟與普及化，近年來有越來越多的濫用藥物改以 LC/MS 及 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。

根據國外文獻報導，在 2002 年，Mortier, KA. 等人¹⁰ 以 LC/ESI-Q-TOF 串聯式質譜儀同時分析唾液中之鴉片類藥物、安非他命類藥物、古柯鹼及其代謝物，最低定量極限(LOQ)可達 2 ng/mL。在 2003 年，Wood, M. 等人¹¹ 發展快速且靈敏之方法分析唾液及血液中之安非他命類藥物，需 50 μ L 的檢體量，經過簡單的前處理步驟，最後以 LC/MS/MS 進行分析，其最低偵測極限(LOD) 亦可達 2 ng/mL。在 2003 年，Dams, R. 等人¹² 發展快速之前處理方法將唾液經過蛋白沉澱前處理後，以 LC/APCI-MS/MS 直接進行分析，可在 35 分鐘同時分析 27 種藥物及其代謝物，LOD 及 LOQ 分別為 0.25~5 ng/mL 及 0.5~20 ng/mL。在 2007 年，Oiestad, E.L. 等人¹³ 利用 LC/MS/MS 進行唾液中藥物之篩檢，可在 14 分鐘同時分析 32 種藥物及其代謝物，最低定量極限為 0.13~7.9 ng/mL。

唾液檢驗真正的挑戰是藥物濃度很微量(數 ng/mL)與採得的唾液數量極為有限(1-2 mL)，因此本研究首先開發免疫初篩分析方法，透過各項儀器參數調整，可以使用常用於尿液檢驗之 EMIT 分析方法，隨後以方法之確效性評估，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度進行樣品之評估。

其次，本研究將轉移過去毛髮檢驗之方法，發展出同時檢測鴉片類藥物、安非他命類藥物及 K 他命之 GC/MS 之唾液檢驗方法。由於唾液中之藥物濃度很微量(ng/mL)，本計畫更嘗試以 API 3000 LC/MS/MS 系統進行卻確效方法之開發，除建立可用之 LC 分離方法，而質譜離子化界面將探討 ESI 與 APCI 兩種常見之大氣壓下游離法。隨後並進行方法之確效性評估，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度...等。

貳、材料與方法

2.1 試劑與藥品

本研究所採用之試劑皆為分析級及試藥級以上。

(一) 試劑：Methanol、dichloromethane、isopropanol、ammonium hydroxide、acetic acid、hydrochloric acid、ethyl acetate、acetone and potassium dihydrogen phosphate，購自 Merck (Darmstadt, Germany)。試劑：Chloroform，購自 J.T Baker。

(二) 免疫試劑：(效期依照包裝上標示，試劑保存於 4 °C 冰箱中)

1. 安非他命類藥物 (針對安非他命與甲基安非他命) 試劑：使用 Microgenics 公司的 DRI Amphetamine Enzyme Immunoassay (cat no. 0017、0018)。Reagent A：antibody/substrate (包含 monoclonal anti-amphetamines antibody、G6P、NAD)；Reagent B：Enzyme conjugate (包含 Amphetamines labeled G6PDH)。

2. 安非他命類藥物 (針對 MDA 與 MDMA) 試劑：使用 Microgenics 公司的 DRI Ecstasy Enzyme Immunoassay (cat no. 100075、100076)。Reagent A：antibody/substrate (包含 monoclonal anti-MDMA antibody、G6P、NAD)；Reagent B：Enzyme conjugate (包含 MDMA labeled G6PDH)。

3. 鴉片類藥物（針對 Morphine 與 Codeine）試劑：

使用 Microgenics 公司的 DRI Opiate Enzyme Immunoassay (cat no. 0135、0136)。Reagent A：antibody/substrate（包含 monoclonal anti-morphine antibody、G6P、NAD）；Reagent B：Enzyme conjugate（包含 morphine labeled G6PDH）。

4. 安非他命類藥物（針對安非他命與甲基安非他命）校正液：

使用 Microgenics 公司的 DRI Low Calibrator (cat no.0034)。
（包含 d-Amphetamine：1000 ng/mL）

5. 安非他命類藥物（針對 MDA 與 MDMA）校正液：

使用 MDA 標準品：購自 Cerilliant (Austin, TX, USA)
（泡製成含 MDA：1000 ng/mL）

6. 鴉片類藥物（針對 Morphine 與 Codeine）校正液：

使用 Microgenics 公司的 DRI Low Calibrator (cat no. 0034)。（包含 Morphine：300 ng/mL）

（三）GC/MS標準品及內標：AP、MA、MDA、MDMA、K、NK、MOR、COD、6-AM、AP-d5、MA-d5、MDA-d5、MDMA-d5、K-d4、NK-d4、MOR-d3、COD-d3 及 6-AM-d3：購自 Cerilliant (Austin, TX, USA).

（四）衍生化試劑：heptafluorobutyric acid anhydride (HFBA)：購自

Sigma (St. Louis , MO , USA).

(五) SPEC · DAU 3mL Columns : 購自 Varian

2.2 溶液製備

(一) 標準品儲存溶液製備 :

分別取 1 mL 之 1 mg/mL 之 AP、MA、MDMA、MDA、K、NK、COD、MOR 與 6-AM 之市售標準溶液置於 10 mL 定量瓶中，加入 50 % 之甲醇溶液至標線，即配製成 0.1 mg/mL 之儲備標準品。本溶液須儲存於 -20°C 中，儲存期限為 12 個月。

(二) 內標準品儲存溶液製備 :

分別取 1 mL 之 1 mg/mL 之 AP-d5、MA-d5、MDMA-d5、MDA-d5、K-d4、NK-d4、COD-d3、MOR-d3 與 6-AM-d3 之溶液置於 10 mL 定量瓶中，加入 50 % 之甲醇溶液至標線，即配製成 0.1 mg/mL 之內標準品工作溶液，隨後分裝於 20 mL 之樣品瓶中。本溶液須儲存於 -20°C 中，儲存期限為 12 個月。

(三) 實驗溶液製備 :

1. 0.1 M Phosphate Buffer : 取 100mL D.I. water 加入 500mL 的定量瓶中，再倒入 6.80 g KH_2PO_4 (Merck 105033.0500) 至標線，最後加入去離子水至標線，當到達標線後輕輕的上下搖動混

合。調整 pH 值各為 4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、8.0、9.0，本試劑在室溫貯存期限為 1 個月。

2. 0.1 M Acetic Acid, pH 3.3: 取 200mL D.I. water 加入 500mL 的定量瓶中，加入 2.9 mL Glacial Acetic Acid，再倒入去離子水至標線，調整 pH 值為 3.3。本試劑在室溫貯存期限為 6 個月。

3. 1% Acidic Methanol: 取 5mL Methanol 加入 10mL 的定量瓶中，再加入 100 μ L HCL，最後再倒入 Methanol 至標線，當到達標線後輕輕的上下搖動混合。本試劑在室溫中可貯存 1 個月。

4. 沖堤溶液: Dichloromethane : 2-propanol: ammonium hydroxide (80:20:2, v/v/v)。注意：本試劑須當日配製。

5. 標準品工作溶液: 取 0.1 mL 之標準品儲備溶液置於 10 mL 定量瓶中，加入 50 % 之甲醇溶液至標線，即配製成 1 μ g/mL 之標準品工作溶液。

6. 內標準品工作溶液: 取 0.1 mL 之內標準品儲備溶液置於 10 mL 定量瓶中，加入 50 % 之甲醇溶液至標線，即配製成 1 μ g/mL 之標準品工作溶液。

2.3 儀器設備

(一) 酵素免疫分析儀：

1. 酵素免疫分析儀 HITACHI 7170

儀器相關規格及主要部位：a. 主機及操作裝置系統 b. 操作簡易螢幕可觸控式操作上機 c. 校正及品管裝置系統 d. 檢體裝置系統 e. 試劑 R1 裝置系統 f. 試劑 R2 裝置系統 g. 洗劑裝置系統 h. 反應盤裝置系統 i. 光學裝置系統 j. 清洗裝置系統 k. 電解質分析裝置系統

2. 酵素免疫分析儀 Olympus AU600

a. 分析方式：Single line-multi test，比色法 b. 處理能力：800 Test/小時 c. 分析方法：One point, Rate, Fixed, 電極法 d. 檢體量：2 μL ~50 μL e. 反應溫度：37 $^{\circ}\text{C}$ f. 波長範圍：340~800 nm，共 13 種 g. 光源：Halogen Lamp 12V/20Wh. 比色方式：後分光 i. 測定間隔：18 秒比色一次 j. 比色點：0~27 點 k. 。

(二) 氣相層析質譜儀：

本研究所使用的氣相層析質譜儀，為安捷倫(Agilent)公司之 6890 型氣相層析儀，搭配 5973 型四極式質譜儀。GC 分析的管柱為 HP-5MS (5% phenyl methyl siloxane, 30.0m, 0.25 mm i.d.)，附載氣體為高純度氦氣(99.999%)。GC 條件設定：a. 烘箱溫度：初溫 150 $^{\circ}\text{C}$ (維持 1 分鐘)，以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率至 280 $^{\circ}\text{C}$ (維持 5 分鐘)。b. 攜帶氣體流速：每分鐘 0.8 mL。c. 檢體注射量：以非分流方式注入 1 μL 。d. 注射器溫度：230 $^{\circ}\text{C}$ 。e. 連接管溫度：280 $^{\circ}\text{C}$ 。

質譜儀設定：a. 離子源溫度：230°C。b. 四極棒溫度：180°C。

(三) 高效液相層析質譜儀：

本研究所使用的高效液相層析儀，為 Shimadzu LC-10AD VP 與 controller SCL-10Avp。搭配液相層析質譜儀，為美商應用生命系統 (Applied Biosystems) 公司之 API 3000 三段四極式串聯質譜儀。

使用層析管柱為 Phenomenex Security Guard C18 4 × 2.0 mm，及 Phenomenex Gemini C18 110A 150 × 2.00 mm，3 μm particle size，Phenomenex Gemini C18 110A 150 × 2.00 mm，5 μm particle size。

2.4 實驗方法及評估

(一) 建立唾液中濫用藥物之初篩檢驗方法

1. 唾液初篩方法：

a. 將校正液 (AP、MDA) 分別以 0.1M phosphate buffer, pH 7.4

Blank Oral Fluid (1:1) 稀釋配製成 0、10、25、50、100 ng/mL 之濃度 (AP、MDA 實際濃度為 0、20、50、100、200 ng/mL)，校正液 (MOR) 配製成 0、10、20、50、100 ng/mL 之濃度 (實際濃度為 0、20、40、100、1000 ng/mL)。

b. 分析 MOR 時 OLYMPUS AU 600 設定條件：Reagent A 120 μL；

Reagent B 120 μL；檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μL。

- c. 分析 MDMA 時 OLYMPUS AU 600 設定條件：Reagent A 60 μL；
Reagent B 60 μL；檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μL。
- d. 分析 AP 時 OLYMPUS AU 600 設定條件：Reagent A 60 μL；
Reagent B 125 μL；檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μL。

(二) 唾液初篩檢驗 之 方法確效評估

1. 酵素免疫分析偵測極限之評估

測定步驟：

- a. 依據儀器標準操作程序與檢測方法之規定先行校正儀器，製備待測物定量用檢量線。
- b. 分析一個適當之空白樣品以確定無殘留現象存在。
- c. 將試劑水或適當溶劑分別裝入 7 個乾淨的樣品容器內，將此每一個容器內之空白樣品視為獨立而個別之待測空白樣品。
- d. 將此 7 個待測空白樣品逕行分析。
- e. 分析完畢 7 個待測空白樣品後，再執行一個品管樣品分析，確認待測物之回收率仍在管制範圍內。
- f. 如下計算前述 7 個待測空白樣品測定值之標準偏差：

$$s = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / n - 1}$$

其中： X_i = 待測空白樣品之個別測定值

\bar{X} = 待測空白樣品測定值之平均值

n = 測定次數 (7 次)

g. 如下計算儀器偵測極限(IDL)：

$$IDL = 3 \times s$$

2. 唾液初篩檢驗 檢量線之建立：

檢量線的建立是定量分析重要的依據。檢量線的點數應至少五點以上，檢量線最低濃度最好大於5倍於方法偵測極限，整條檢量線範圍應該能涵蓋欲測分析物濃度範圍，並計算 R^2 值。

先將所要分析的校正液(AP、MDA)，分別以 0.1M phosphate buffer pH 7.4：Blank Oral Fluid (1：1) 稀釋配製成 0、10、25、50、100 ng/mL 之濃度 (AP、MDA 實際濃度為 0、20、50、100、200 ng/mL)，校正液(MOR)，分別配製成 0、10、20、50、100 ng/mL 之濃度 (實際濃度為 0、20、40、100、200 ng/mL)。直接進入 OLYMPUS AU 600 分析。分析後各以其 ΔOD 值繪製圖表及分析計算 R^2 值。

3. 唾液初篩檢驗 精密度、準確度之評估：

精密度、準確度之評估是為了建立分析結果的可信度，避免人為操作或儀器之誤差。精密度 (Precision) 表示重複測定某物的變動差異程度，經過多次重複測定的結果，若分析數值集中於一狹窄的分佈區域，表示精密度良好。在統計學上常以變動係數 (Coefficient of variation：CV) 表示。將標準偏差 (SD) 除以平均值 (X)，在乘以百分比，即得變動係數。CV 值愈小，表示愈精密。評估分析方法之精密度又可分為：同日內精密度 (Within day precision) 及異日間精密度 (Between day precision)。

而準確度 (Accuracy) 指的是用一個分析方法多次測定後，所獲

得的測定平均值接近實際值的差異百分比(%)，準確度越好反應的是測定值越接近於實際值。

同日內精密度的評估為選取檢量線範圍內低、次低、中、高濃度四點，分別以 0.1M pH 7.4 phosphate buffer : Blank Oral Fluid (1 : 1) 稀釋配製成 10、25、50、100 ng/mL 之濃度 (AP、MDA 實際濃度為 20、50、100、200 ng/mL)，校正液 (MOR)，分別配製成 10、20、50、100 ng/mL 之濃度 (實際濃度為 20、40、100、1000 ng/mL) 各3管，進入OLYMPUS AU 600 分析。分析後計算出3次分析物濃度值的標準差 (SD)，並將所得標準差除以所得3次測定值之算數平均數 (即 SD/mean)，所得比值即為本研究的同日內精密度評估。

異日間精密度的評估：分別以 0.1M pH 7.4 phosphate buffer : Blank Oral Fluid (1 : 1) 稀釋配製成 10、25、50、100 ng/mL 之濃度 (AP、MDA 實際濃度為 20、50、100、200 ng/mL)，校正液 (MOR)，分別配製成 10、20、50、100 ng/mL 之濃度 (實際濃度為 20、40、100、1000 ng/mL) 各5管，以OLYMPUS AU 600 連續分析5天。分析後計算出分析物濃度值的標準差 (SD)，並將所得標準差除以所得測定值之算數平均數 (即SD/mean)，所得比值即為本研究的異日間精密度評估。

準確度的評估：分別以 0.1M phosphate buffer pH 7.4 : Blank Oral Fluid (1 : 1) 稀釋配製成 10、25、50、100 ng/mL 之濃度 (AP、MDA 實際濃度為 20、50、100、200 ng/mL)，校正液 (MOR)，分別配製成 10、20、50、100 ng/mL 之濃度 (實際濃度為 20、40、100、1000 ng/mL) 各 3 管，依本研究分析方法由低濃度開始依序進行儀器分析，經過計算出來的分析物濃度值 (即測定值) 除以原標準品所添加濃度 (即實際值) 所得比值，即為本研究的準確度評估。

(三) 唾液中濫用藥物之 GC/MS 確認檢驗

1. 唾液標準品測試

取標準品 AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 ng/mL，MOR、COD、6-AM 40 ng/mL，在 55°C 條件下用氮氣吹乾，加入衍生化試劑 HFBA 50 μ L 和 EA 50 μ L，在 70°C 烘箱進行 30 分鐘衍生反應，衍生化結束後再次吹乾，並用 EA 50 μ L 回溶，每次打入 2 μ L 進入 GC-EI/MS 分析，確認標準品圖譜。

2. 偵測極限評估

儀器偵測極限(Instrument detection limit (IDL))為待測物之最低量或最小濃度，足夠在儀器偵測時，產生一可與空白訊號區別之訊號者。本研究中，取標準品及其內標，氮氣吹乾、衍生化，衍生化結束後再次吹乾，並用 EA 50 μ L 回溶，每次打入 1 μ L 進入 GC/MS 分析。以待測物其得到訊號與背景值之比值為 3 時 ($S/N=3$)，為該儀器對待測物之最低定性偵測極限。比值為 10 時 ($S/N=10$)，為該儀器對待測物之最低定量偵測極限。

方法偵測極限(Method detection limit (MDL))指待測物在某一基質中以指定檢測方法所能測得之最低濃度。本研究中，秤取空白頭髮 50 mg 之後加入標準品及其內標，隨後經過實驗中設計的前處理方式，將處理過的樣品進行衍生化，衍生化結束後吹乾，並用 EA 50 μ L 回溶，每次打入 1 μ L 進入 GC/MS 分析。以待測物其得到訊號與背景值之比值為 3 時 ($S/N=3$)，為該方法對待測物之最低定性偵測極限。比值為 10 時 ($S/N=10$)，為該方法對待測物之最低定量偵測極限。

3. 唾液檢體檢測

a. 0.5 ml blank saliva, 加入 1 mL 0.1M pH 7.4 Phosphate buffer, 加入標準品 AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 μL 1×10^3 ng/ml 及 MOR、COD、6-AM 40 μL 1×10^3 ng/ml。 b. 加入內標 AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 μL 1×10^3 ng/ml 及 MOR、COD、6-AM 40 μL 1×10^3 ng/ml。 Mix。 c. Rinse 萃取管: 1 mL methanol、1 mL 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer, 將檢體倒入萃取管中。 d. Wash 萃取管: 1 mL deionised water、0.5 mL 0.01M acetic acid pH 3.3、0.5 mL methanol、3 ml acetone :chloroform (1:1), 抽乾萃取管 10-20 inch Hg 5 min。 e. Elute: 加入 1 mL Elution solution(EA : ammonium hydroxide (98:2)), 收集沖出物。 f. 加入 50 μL 1% acid methanol, 震盪。氮氣吹乾。 g. 衍生: 加入 50 μL HFBA 及 50 μL EA, Oven 70°C 30 min。 h. 氮氣吹乾, 50 μL EA 回溶, 打入 2 μL 進入 GC-EI / MS 分析。

(四) 唾液中濫用藥物之 LC/MS/MS 確認檢驗

1. LC 部分:

層析條件移動相A為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10.0), 移動相B為 Acetonitrile 含 0.1% Formic acid, 移動相B調整為在15分鐘內, 由45%升至60%。注射入10 μL , 流速為0.2 mL/min。

2. MS 部分:

分析器為三段四極桿串聯式質譜儀, ESI 正離子模式下以多重反應監測模式(Multiple reaction monitoring, MRM) 偵測。

(1) Source/Gas 參數設定

Nebulizer gas (NEB) : 10 , Curtain gas (CUR) : 10 , Collision gas (CAD) : 6 , IonSpray voltage (IS) : 5000 V , Temperature (TEM) : 300 °C 。

(2) 化合物最佳參數：

將藥物分成安非他命類、嗎啡類、古柯鹼及BEZ，分別尋找出Declustering potential (DP)、Focusing potential (FP)、Entrance potential (EP)及Collision cell exit potential(CXP)之最佳參數，安非他命類的DP為30，FP為100。嗎啡類的DP為40，FP為170。古柯鹼與BZE的DP為40，FP為170。而EP與CXP最佳參數分別為10與15。

3. 唾液檢體檢測

0.5 ml saliva，加入1 mL 0.1M pH 7.4 Phosphate buffer，加入標準品AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 μL 1×10^3 ng/ml及MOR、COD、6-AM 40 μL 1×10^3 ng/ml。 b. 加入內標AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 μL 1×10^3 ng/ml 及MOR、COD、6-AM 40 μL 1×10^3 ng/ml。 Mix。 c. Rinse萃取管：1 mL methanol、1 mL 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer，將檢體倒入萃取管中。 d. Wash萃取管：1 mL deionised water、0.5 mL 0.01M acetic acid pH 3.3、0.5 mL methanol、3 ml acetone :chloroform (1:1)，抽乾萃取管10-20 inch Hg 5 min。 e. Elute：加入1 mL Elution solution (EA : ammonium hydroxide (98:2))，收集沖出物。 f. 加入50 μL 之 1% acid methanol，震盪。氮氣吹乾。 g. 50 μL methanol 回溶。 h. 打入10 μL 進入LC-MS / MS分析。

叁、結果

本計畫針對唾液檢驗的初篩與確認檢驗方法進行開發。由於目前國內濫用藥物的情形日益嚴重，青少年更成為毒品販售的主流。目前國內警方在舞廳、PUB、KTV 及露天音樂會等毒品使用者聚集及吸食的熱門場突檢時，需進行大量的採尿工作極為困擾。唾液檢體採樣容易，可當面取樣並全程監察，不需特別的設施，沒有尷尬或隱私的問題，且能防止發生作假之情形。本研究將以發展國內常見毒品，包含鴉片類藥物（嗎啡、可待因、海洛因）、安非他命類藥物（安非他命、甲基安非他命、MDMA、MDA、MDEA 等）、K 他命之唾液檢體中初篩與確認檢驗方法。

一、 建立唾液檢驗 初篩檢驗方法：

依照美國健康與人類服務部的藥物濫用與心理健康服務署規範，唾液中濫用藥物之陽性閾值為 AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 ng/mL，MOR、COD 為 40 ng/mL，6-AM 為 4 ng/mL。與國內尿液中濫用藥物之初篩檢驗的法規陽性閾值：安非他命類藥物為 500 ng/mL urine，鴉片類藥物為 300 ng/mL urine 相較之下，唾液中濫用藥物之確認閾值約為其 1/10。因此針對唾液來進行初篩檢驗最佳化評估，包括最佳酵素免疫分析儀、篩檢試劑吸取量、檢體吸取量…等，以得到唾液中濫用藥物初步檢驗之最佳化微量分析方式。

其評估結果發現：初篩檢驗設定模式為：選擇 OLYMPUS AU 600 為初篩檢驗儀器；MOR 之最佳微量分析為調整儀器設定條件：

Reagent A 120 μ L、Reagent B 120 μ L、檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μ L；MDMA 之最佳微量分析為調整儀器設定條件：Reagent A 60 μ L、Reagent B 60 μ L、檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μ L；針對 AP 最佳化條件為：調整儀器設定條件：Reagent A 60 μ L、Reagent B 125 μ L、檢體吸取量選擇最大吸取量 50 μ L。

方法的確效性評估對真實樣品的分析有極大的重要性。當我們找到適當的初篩檢驗條件後，我們必須開始評估方法之確效性，包括：最低偵測極限、檢量線建立及準確度與精密度評估等。才能確保以酵素免疫分析儀做為唾液之初篩檢驗是可行的。

(一) 酵素免疫分析偵測極限評估結果

在評估儀器偵測極限時，我們參考了Eleanor I. Miller²⁴等人，在2006年以酵素免疫分析儀評估偵測極限的做法。偵測極限 (Limit of detection: LOD) 之定義為待測物之最低量或最小濃度，足夠在儀器偵測時，產生一可與空白訊號區別之訊號者。亦即該待測物之量或濃度在99%之可信度 (Confidence level) 下，可產生大於平均雜訊之標準偏差3倍之訊號。因此， $LOD=3*SD$ (分析7個待測空白樣品之標準偏差)。

以酵素免疫分析儀 OLYMPUS AU 600 分析唾液中濫用藥物之偵測極限為：AP：3 ng/mL (在此濃度分析之 ΔOD 值大於3倍空白訊號之標準偏差)、MOR：3 ng/mL (在此濃度分析之 ΔOD 值大於3倍空白訊號之標準偏差) 及 MDMA：7 ng/mL (在此濃度分析之 ΔOD 值大於3倍空白訊號之標準偏差)，偵測極限皆小於陽性閾值。

(二) 檢量線建立

檢量線的建立是定量分析重要的依據，整條檢量線範圍應該能涵蓋欲測分析物濃度範圍並計算其 R^2 值。唾液中濫用藥物之確認閾值為AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 ng/mL，MOR、COD 40 ng/mL，而6-AM為4 ng/mL。因此，以分析之最佳化設定條件分別建立AP、MOR及MDMA之檢量線時，需涵蓋閾值範圍。

本研究建立之唾液中濫用藥物檢量線為：AP 之檢量線範圍：0~100 ng/mL（實際濃度為 0~200 ng/mL）， R^2 值：0.9912；MOR 之檢量線範圍：0~100 ng/mL（實際濃度為 0~200 ng/mL）， R^2 值：0.9943；MDMA 之檢量線範圍：0~100 ng/mL（實際濃度為 0~200 ng/mL）， R^2 值：0.9919。（圖1）

(三) 精密度、準確度評估結果

精密度、準確度之評估是為了建立分析結果的可信度，避免人為操作或儀器之誤差。本研究中選取低、次低、中、高濃度四點，AP、MDA 分別配製成 10、25、50、100 ng/mL 之濃度，MOR 配製成 10、20、50、100 ng/mL 之濃度各 3 管，進入 OLYMPUS AU 600 分析。唾液初篩之同日內精密度、準確度如（表 4-1），各濃度 AP 之 CV % 值皆小於 11.11 %，準確度則皆大於 90.00 %；各濃度 MOR 之 CV % 值皆小於 12.80 %，準確度則皆大於 80.00 %；各濃度 MDMA 之 CV % 值皆小於 13.32 %，準確度則皆大於 86.67 %。

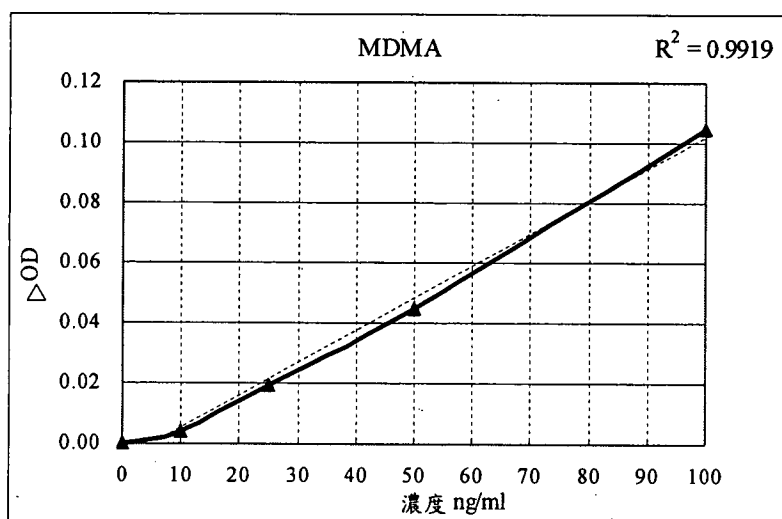
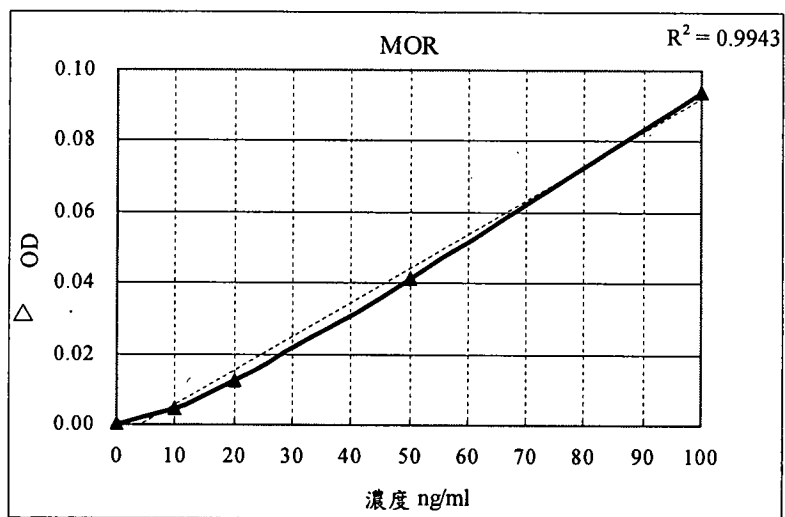
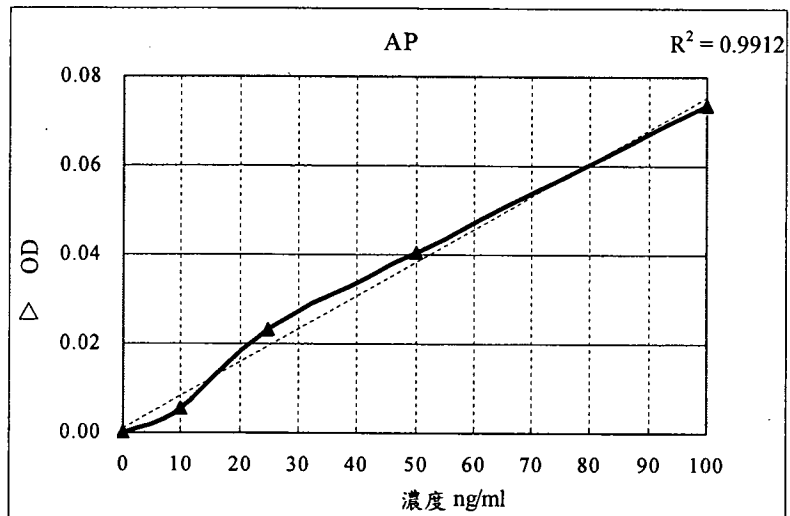


圖 1 唾液中 AP、MOR 及 MDMA 之檢量線及 R^2 值

表 1 唾液初篩之同日內精密度、準確度

ng/ml	MEAN	SD	CV %	ACC %
AP				
10	9.00	1.00	11.11	90.00
25	24.00	2.65	11.02	96.00
50	51.33	2.31	4.50	102.67
100	97.00	2.65	2.73	97.00
MOR				
10	8.00	1.00	12.50	80.00
20	19.67	2.52	12.80	98.33
50	51.00	1.00	1.96	102.00
100	100.33	1.53	1.52	100.33
MDMA				
10	8.67	1.15	13.32	86.67
25	24.33	1.53	6.28	97.33
50	50.33	1.15	2.29	100.67
100	100.67	2.08	2.07	100.67

表 2 唾液初篩之異日間精密度、準確度

ng/ml	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5	MEAN	SD	CV %	ACC %
AP									
10	9.00	10.00	12.00	10.67	12.00	10.73	1.16	10.83	107.33
25	24.00	22.00	26.33	26.33	26.00	24.93	1.70	6.84	99.73
50	51.33	46.00	54.33	55.33	55.00	52.40	3.50	6.68	104.80
100	97.00	91.33	102.33	102.67	104.33	99.53	4.78	4.80	99.53
MOR									
10	8.00	9.67	8.67	9.00	9.33	8.93	0.57	6.42	89.33
20	19.67	21.33	20.33	20.33	20.67	20.47	0.54	2.65	102.33
50	51.00	49.00	48.67	49.67	50.33	49.73	0.85	1.72	99.47
100	100.33	98.33	97.67	99.00	98.00	98.67	0.94	0.96	98.67
MDMA									
10	8.67	12.67	10.67	12.00	11.67	11.13	1.39	12.50	111.33
25	24.33	25.00	25.67	26.33	26.33	25.53	0.78	3.04	102.13
50	50.33	50.00	52.00	51.67	55.00	51.80	1.77	3.42	103.60
100	100.67	100.00	102.33	103.00	103.67	101.93	1.39	1.36	101.93

唾液初篩之異日間精密度、準確度如（表 4-2），異日間各濃度 AP 之 CV % 值皆小於 10.83 %，準確度則皆大於 99.53 %；異日間各濃度 MOR 之 CV % 值皆小於 6.42 %，準確度則皆大於 89.33 %；異日間各濃度 MDMA 之 CV % 值皆小於 12.5 %，準確度則皆大於 101.93 %。

由於唾液腺分泌會受到水的攝取量、情緒、環境、藥物及採集唾液的方法和時間等因素影響，造成唾液檢體的 pH 值及分泌速度變異，進而直接影響進入唾液中游離型藥物之濃度，因此，在本研究中將評估合適之採樣方式。 唾液之收集方法分為很多種，依照文獻分為：

1. 排出法（Draining method）：讓唾液自然由嘴角排出，經似漏斗狀管子收集試管，收集時間到時，將殘餘唾液吐至收集試管。

2. 吐出法（Spit method）：停止吞嚥動作，嘴唇自然閉合，將唾液累積於口底，每 60 秒將唾液吐出，收集至無菌採樣杯中，直到收集結束。

3. 抽吸法（Suction method）：將唾液吸管至於舌下收集至試管，另一端有抽吸裝置，到收集結束時，將吸管繞至前庭及口底收集殘餘唾液；又分為：

a. 張口抽吸法（Open suction method）：

將唾液吸管（Saliva ejector）先放置於後頰前庭處，接著將吸管由前庭處以圓形移動方向繞至口底及舌下約 15 秒，連續收集 2 分鐘，接著換新試管，直到總長 5 分鐘。

b. 閉口抽吸法 (Close suction method) :

將唾液吸管置於舌下，請參與者將嘴唇閉上，收集至第 2 分鐘時換掉試管，並收集至第 5 分鐘

4. 擦吸唾液法 (Swab method) : 放置一根棉棒於舌下腺至收集結束，算出排出唾液量。

本研究之唾液收集方法即採用方便、採樣容易的「吐出唾液法」，請受檢者將唾液累積於口底，每 60 秒將唾液吐出並收集至無菌採樣杯中，直到收集結束。唾液檢體儲存於-20°C 備用。

二、建立唾液檢驗 確認檢驗方法：

建立唾液之初篩檢驗是濫用藥物檢驗的第一步，而經初篩檢驗後，需進一步以不同的原理之分析方法進行驗證，以免產生誤判。唾液中濫用藥物之確認閾值 AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 為 50 ng/mL，MOR、COD、6-AM 為 40 ng/m。而在確認檢驗方面，由於採得的唾液數量極為有限，為了增加唾液濫用藥物檢測能力及廣度，提升濫用藥物檢測品性與分析的效率，本研究將採用同時檢測鴉片類藥物、安非他命類藥物及 K 他命之 GC/MS 方法與 LC/MS/MS 方法。

(A) GC/MS 方法

唾液中濫用藥物之確認閾值 (AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 ng/mL，MOR、COD、6-AM 40 ng/mL) 約 10 倍大於毛髮中濫用藥物之確認閾值 (AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 300 pg/mg hair，MOR、COD、6-AM 200 pg/mg hair)。因此可轉移毛髮檢驗之 GC/MS 方法，進行唾液中確認檢驗方法之確效性評估。

在本研究中，各藥物之GC/MS選擇離子與定量離子，如表3。唾液中濫用藥物GC/MS確認檢驗方法之確效性評估，包含檢量線建立、回收率評估、偵測極限評估、精密度與準確度評估…等。GC/MS方法中取標準品AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 50 ng/mL，MOR、COD、6-AM 40 ng/mL，衍生後打入2 μ L進入GC-EI/MS分析。(圖2)。

而偵測極限評估與檢量線的建立是定量分析重要的依據，而檢量線範圍應該能涵蓋欲測分析物濃度範圍，並計算 R^2 值來評估。各藥物之偵測極限評、檢量線濃度範圍及 R^2 值，如表4。

精密度、準確度之評估是為了建立分析結果的可信度，避免人為操作或儀器之誤差。本實驗中低濃度10 ng/mL、中濃度50 ng/mL、高濃度250 ng/mL之藥物標準品，進行準確度與精密度之評估。結果發現三個測試濃度之精密度CV%值皆小於8.89%。準確度皆達到94%以上。

本研究曾嘗試以GC/MS方法，評估唾液中各藥物(200 ng/mL)於不同儲存溫度下之穩定性，研究初步結果發現：1. 保存效果：加入磷酸緩衝液之保存方式比只單獨儲存唾液，保存效果較佳。2. 冷凍保存(-20°C)比冷藏(4°C)好，而室溫(25°C)最差。3. 各藥物之穩定度：鴉片類藥物較不安定，其中6-AM安定性最差。其次為K它命。而安非他命類藥物(AP、MA、MDMA、MDA、MDEA)保存效果較不受溫度影響，在室溫下三週仍有約84%之穩定度。

表 3 各藥物之 GC/MS 選擇離子 (畫底線者為定量離子)

分析項目	離子	離子	離子
Amphetamine	91	118	<u>240</u>
Amphetamine -d5		123	<u>244</u>
Methamphetamine	118	210	<u>254</u>
Methamphetamine-d5		213	<u>258</u>
MDA	162	375	<u>240</u>
MDA -d5		167	<u>244</u>
MDMA	162	210	<u>254</u>
MDMA -d5		213	<u>258</u>
NK		384	<u>356</u>
NK -d4		388	<u>360</u>
Ketamine	236	370	<u>362</u>
Ketamine -d4		374	<u>366</u>
Morphine		677	<u>464</u>
Morphine -d3		680	<u>467</u>
Codeine		282	<u>495</u>
Codeine -d3		285	<u>498</u>
6-AM		523	<u>464</u>
6-AM -d3		526	<u>467</u>

表 4 各藥物之 GC/MS 方法確效評估

ng/mL	LOD	LOQ	Range (ng/mL)	R ² 值
AP	0.5	2	2~1000	0.998
MA	0.5	2	2~1000	0.997
MDMA	0.5	2	4~1000	1
MDA	0.5	2	4~1000	1
NK	0.5	2	3~1000	0.997
K	0.75	3	3~1000	0.997
MOR	0.75	3	4~800	0.994
COD	0.75	3	4~800	0.989
6-AM	1	4	4~800	0.996

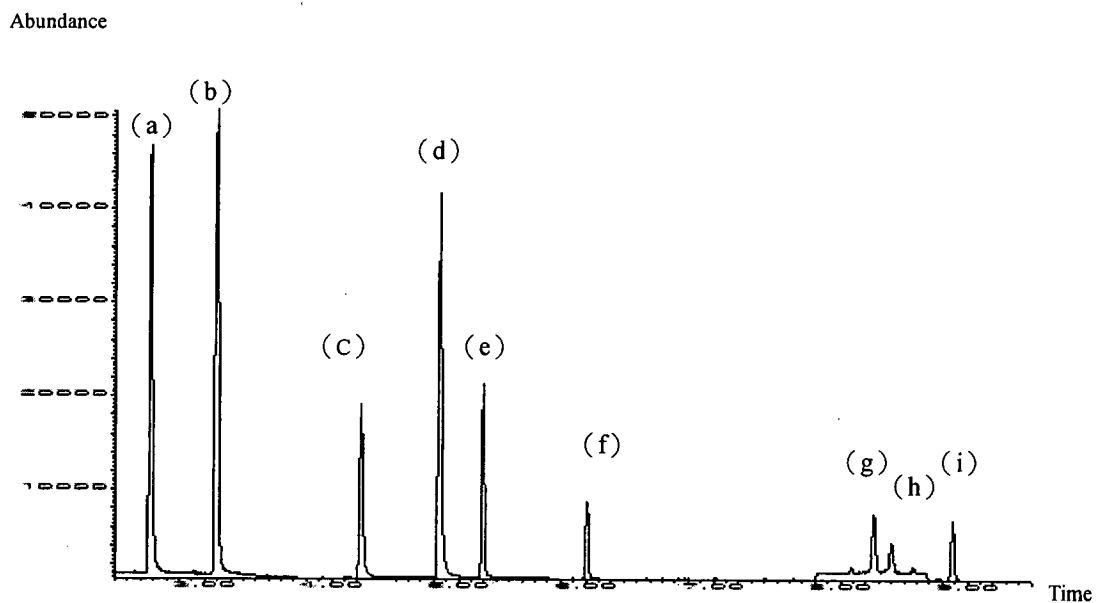


圖 2 唾液中各藥物 GC/MS 層析圖譜。
 (a) AP (b) MA (c) MDA (d) MDMA (e) NK (f) K (g) MOR
 (h) COD (i) 6-AM

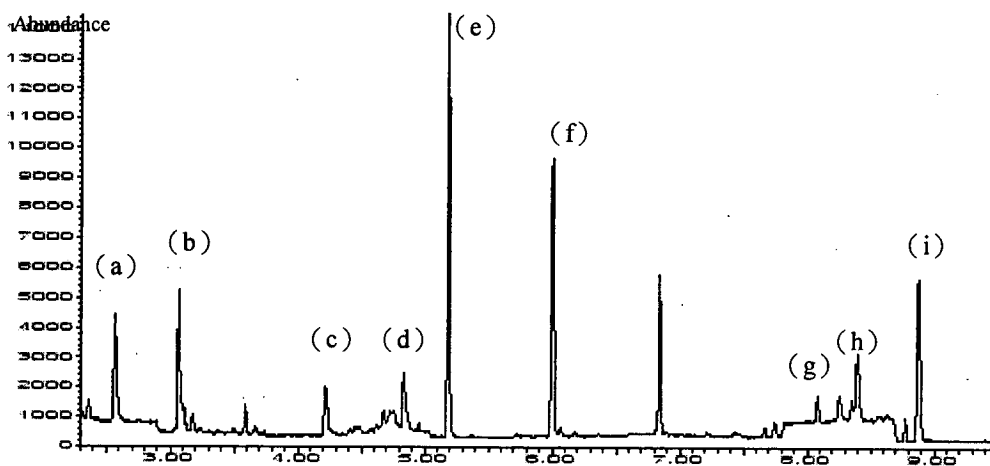


圖 3 真實唾液檢體中各藥物 GC/MS 層析圖譜。
 (a) AP (b) MA (c) MDA (d) MDMA (e) NK (f) K (g) MOR
 (h) COD (i) 6-AM

Time

(B) LC-MS/MS 方法

目前本研究已建立各濫用藥物之標準離子圖譜及產物離子圖譜，將標準品以直接注入法進行質譜分析，分別以ESI 與APCI 兩種離子化之正負離子偵測模式，建立標準分子離子圖譜與二次質譜離子圖譜，並以二次質譜提升其靈敏度，使分析條件最優化，並評估其偵測極限。隨後參考上述之最優化條件，利用reverse-phase C18管柱之HPLC，將藥物依其化學性質進行分離。

(一) ESI 離子模式

ESI 離子化方法主要特色為：(1)適合離子性以至於中極性的分析物。(2)可用於對熱不穩定化合物之分析。(3)訊號強度與分析物濃度呈相關係 (Concentration Dependent)。在 ESI 的分析方法中，首先以 MA、AP、MDA、MDMA、MDEA、K、NK、MOR、COD、6-AM、COC、BZE 之標準品進行儀器分析，將每種標準品配製成 1 ng/ μ L 濃度，以直接注射的方式，每次注射 10 μ L 各別進入質譜儀偵測。

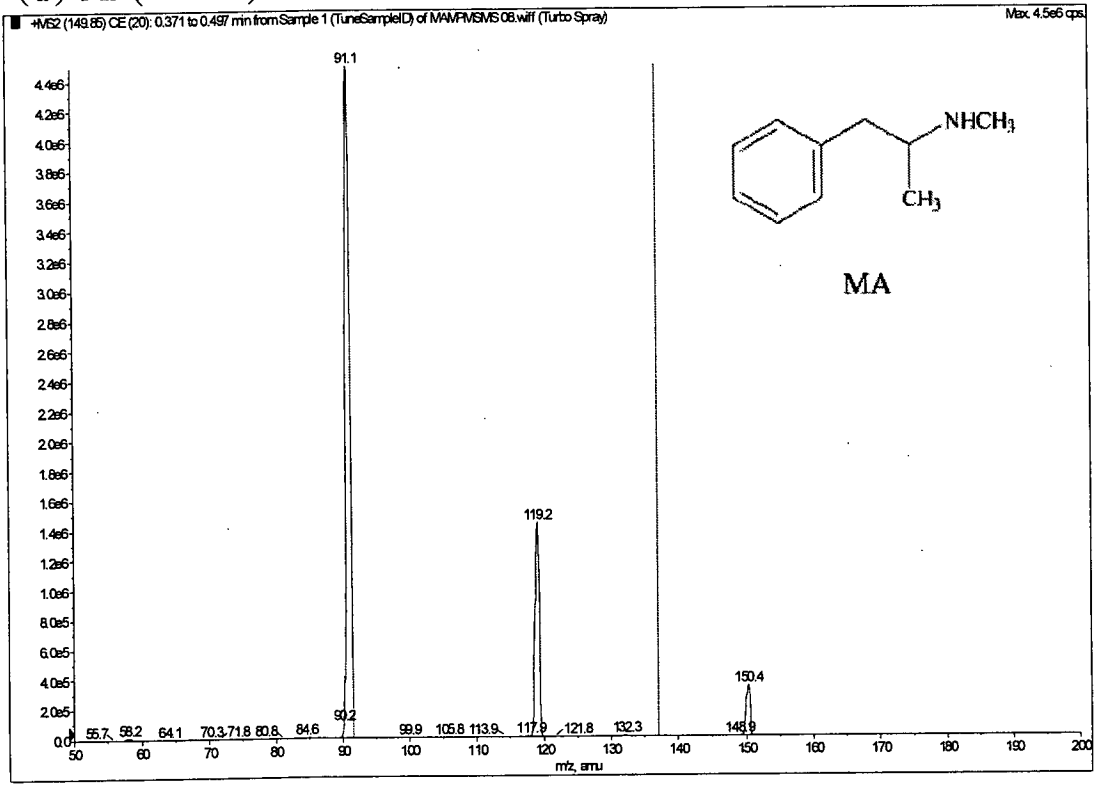
由於 ESI 是極柔軟的游離化方法，因此經由 ESI 正離子分析，通常圖譜以 $[M+H]^+$ 為主。在正離子模式掃描下找到每個分析物強度最佳的分子離子後，接著找出碰撞後二次質譜的最佳產物離子，結果如圖 3-3 所示。MA 使用 20eV 的碰撞能量，碰撞 m/z 150 之母離子 $[M+H]^+$ ，主要離子碎片為 m/z 91 與 119，AP 使用 16eV 的碰撞能量，碰撞 m/z 136 之母離子 $[M+H]^+$ ，主要離子碎片為 m/z 91 與

119, MDMA 使用 20eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 194 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 133 與 163, MDA 使用 15eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 180 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 163, MDEA 使用 22eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 208 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 133 與 163, 6-AM 使用 50eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 328 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 165, COD 使用 55 eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 300 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 165, MOR 使用 50 eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 286 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 165, K 使用 28eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 238 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 125 與 179, NK 使用 23eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 224 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 125 與 207, COC 使用 30eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 304 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 150 與 182, BZE 使用 30eV 的碰撞能量, 碰撞 m/z 290 之母離子 $[M+H]^+$, 主要離子碎片為 m/z 105 與 168。

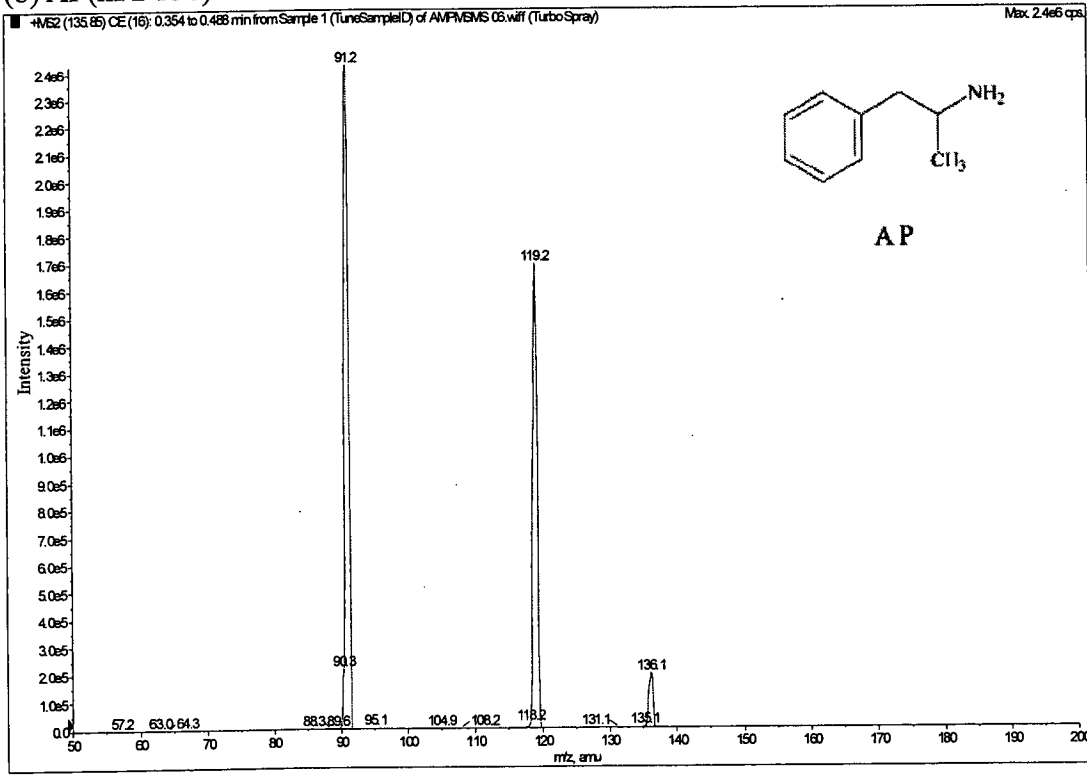
(二) APCI 正離子模式下偵測之結果

APCI 偵測模式主要特色為：(1)可接受較高的動相流速，如傳統液相層析 1 ml/min 的流速。(2)適合中極性至非極性之樣品。(3) 因溶液揮發吸熱及大氣壓下碰撞穩定的效果，APCI 一般以生成分析物之準分子離子為主(軟游離化法)。(4) 對不揮發性的緩衝鹽類具有較高的忍受力。(5) 可接受純水與有機相的動相組成。

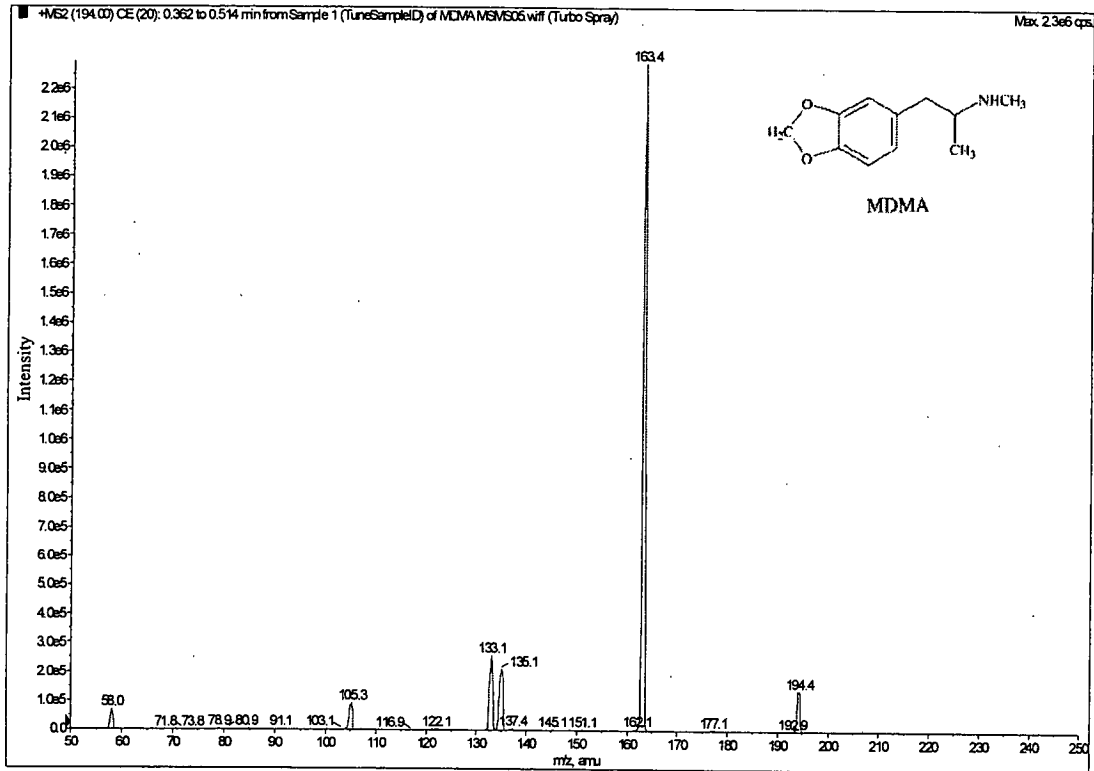
(a) MA(m/z 150)



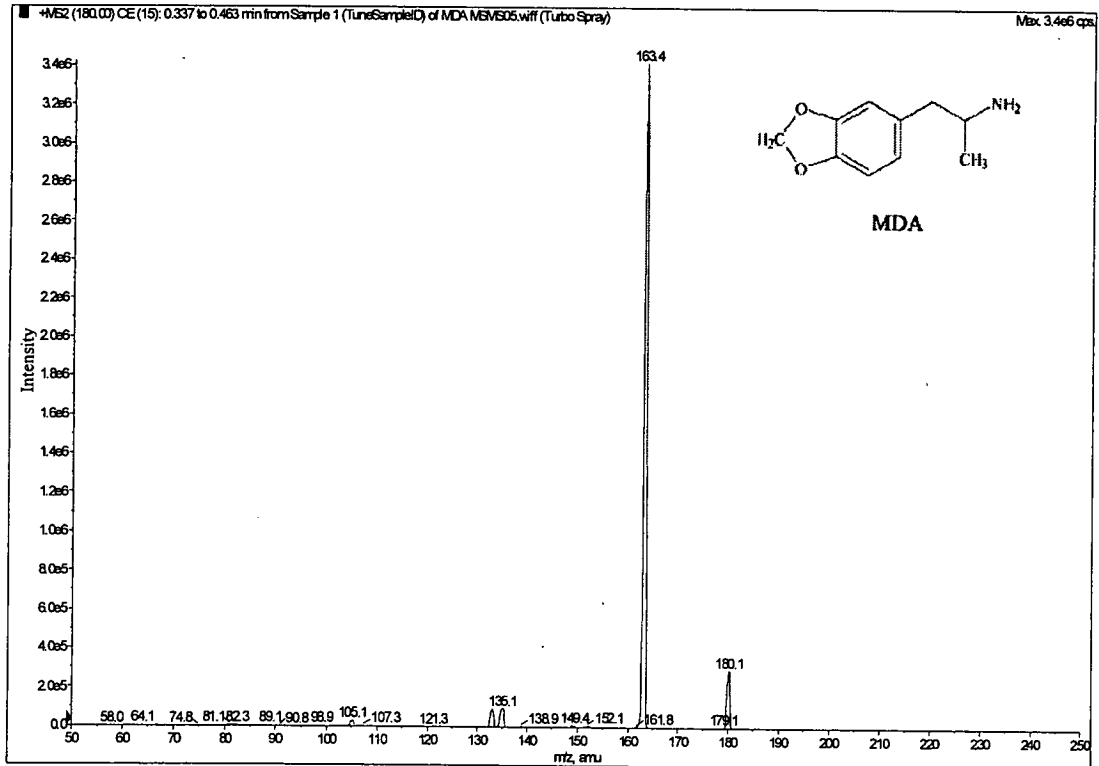
(b) AP(m/z 136)



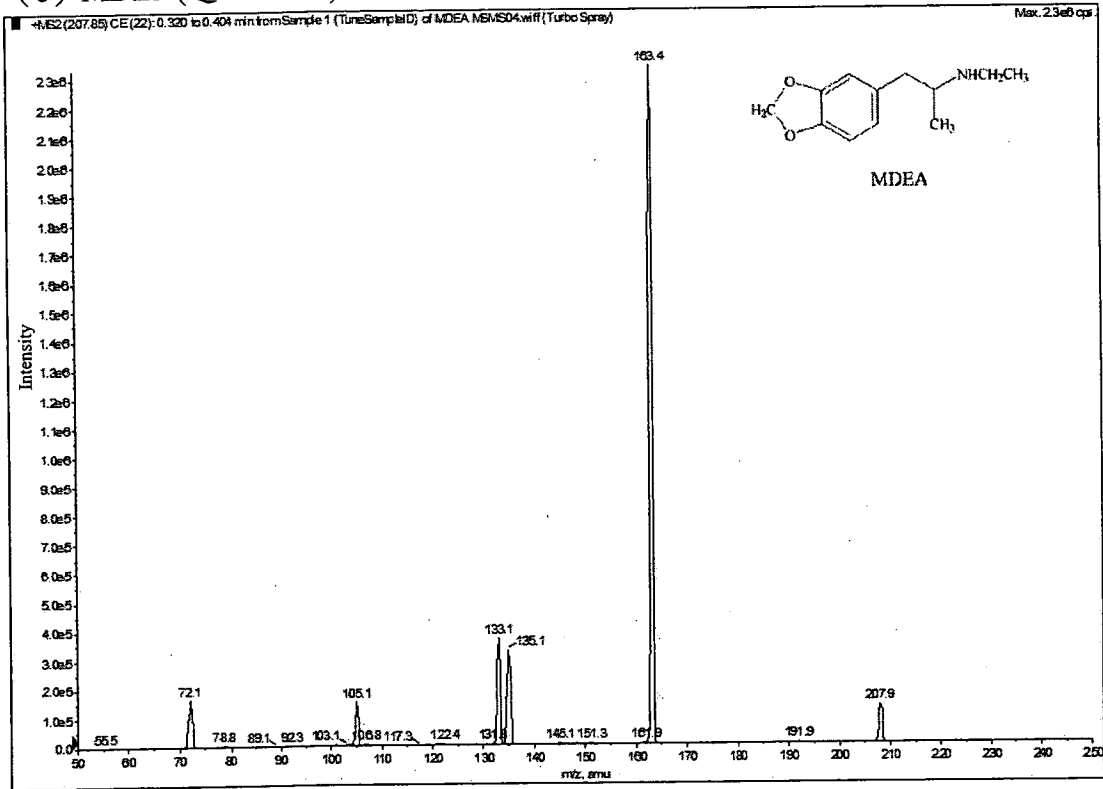
(c) MDMA(m/z 194)



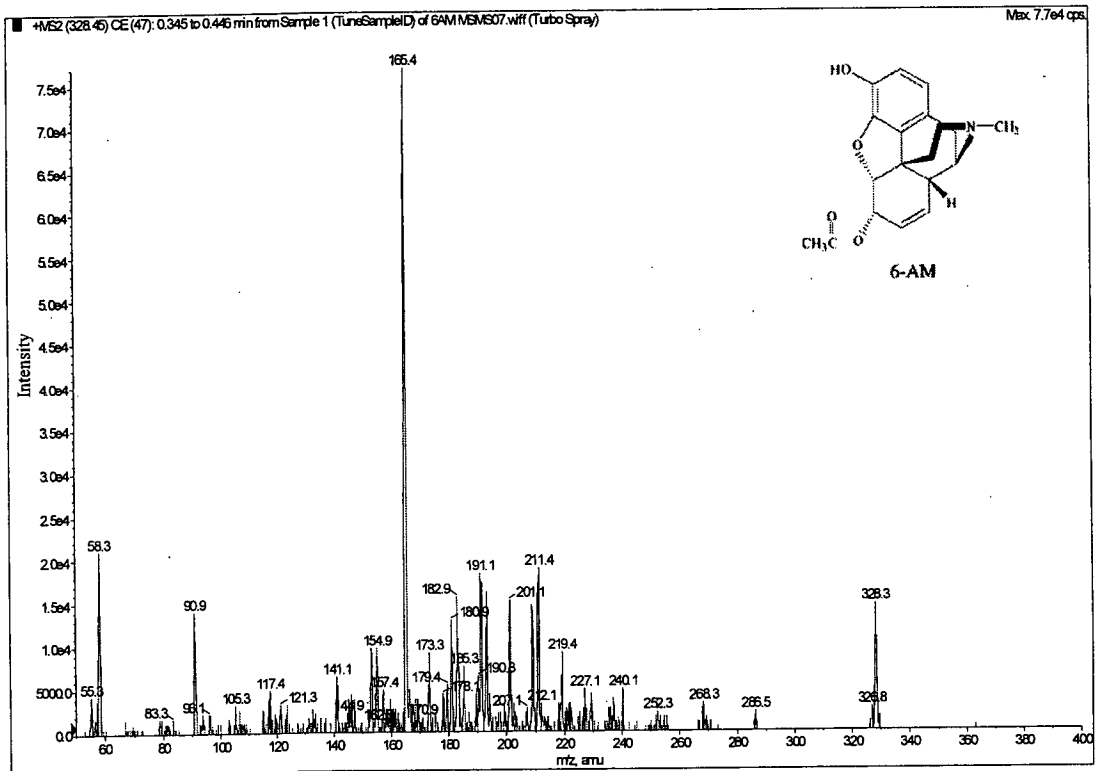
(d) MDA(m/z 180)



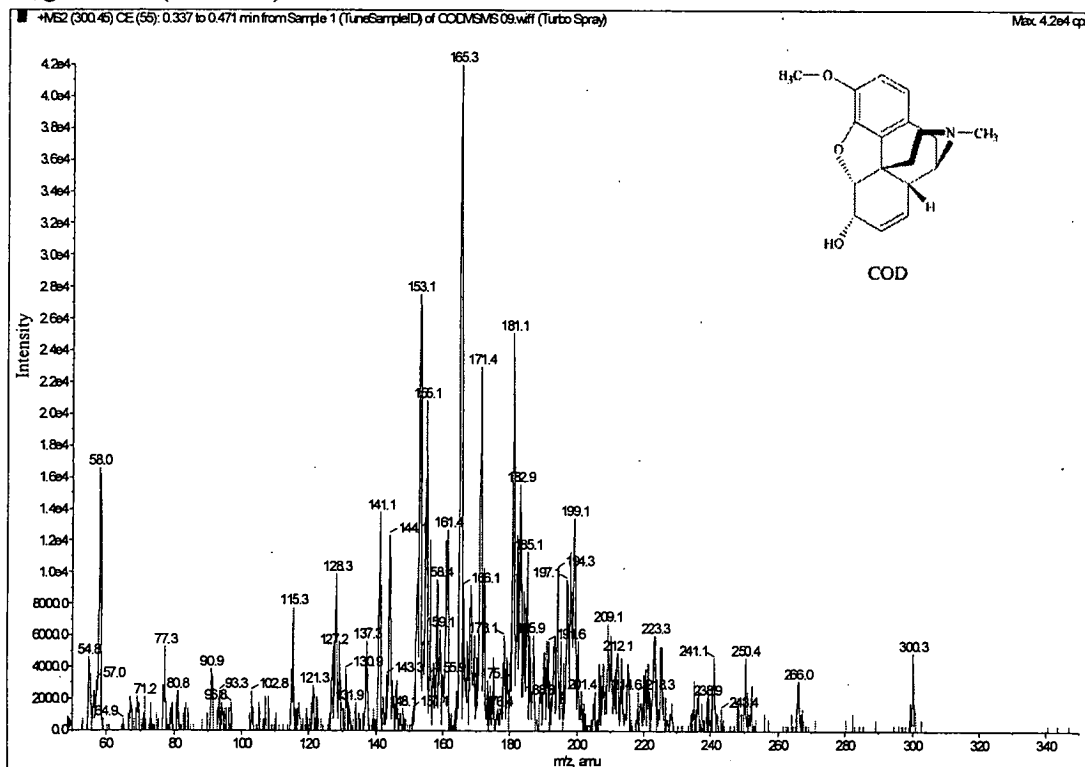
(e) MDEA(選 m/z 208)



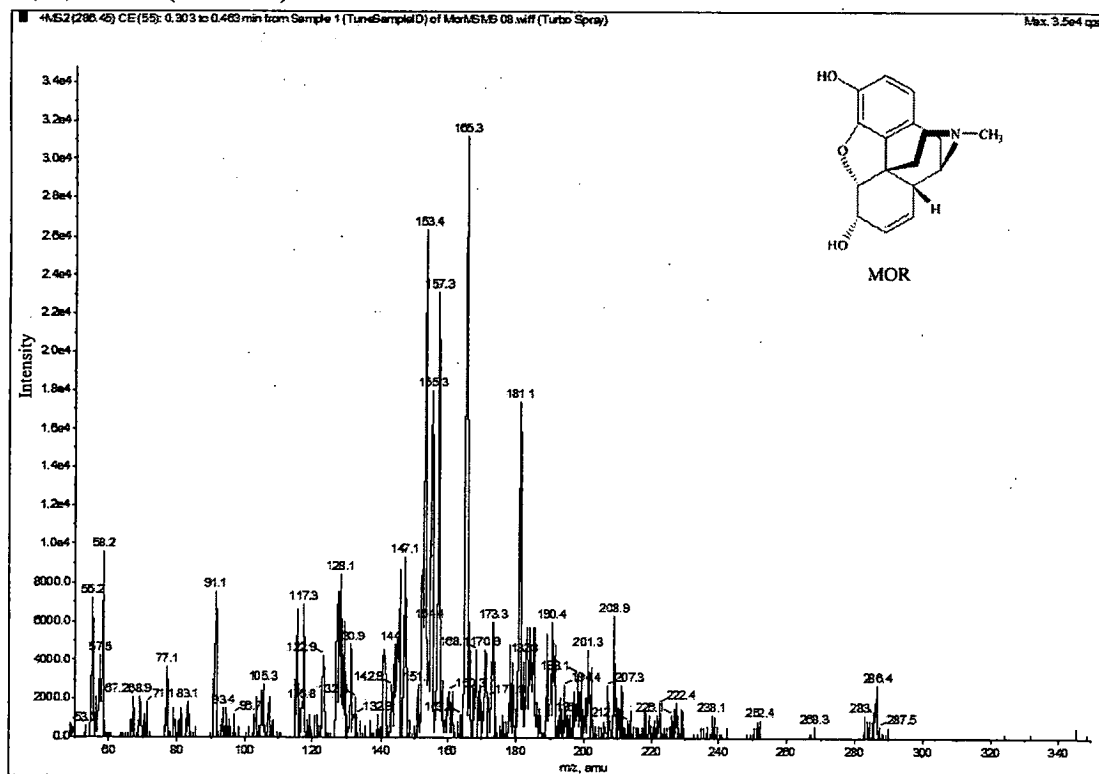
(f) 6-AM(m/z 328)



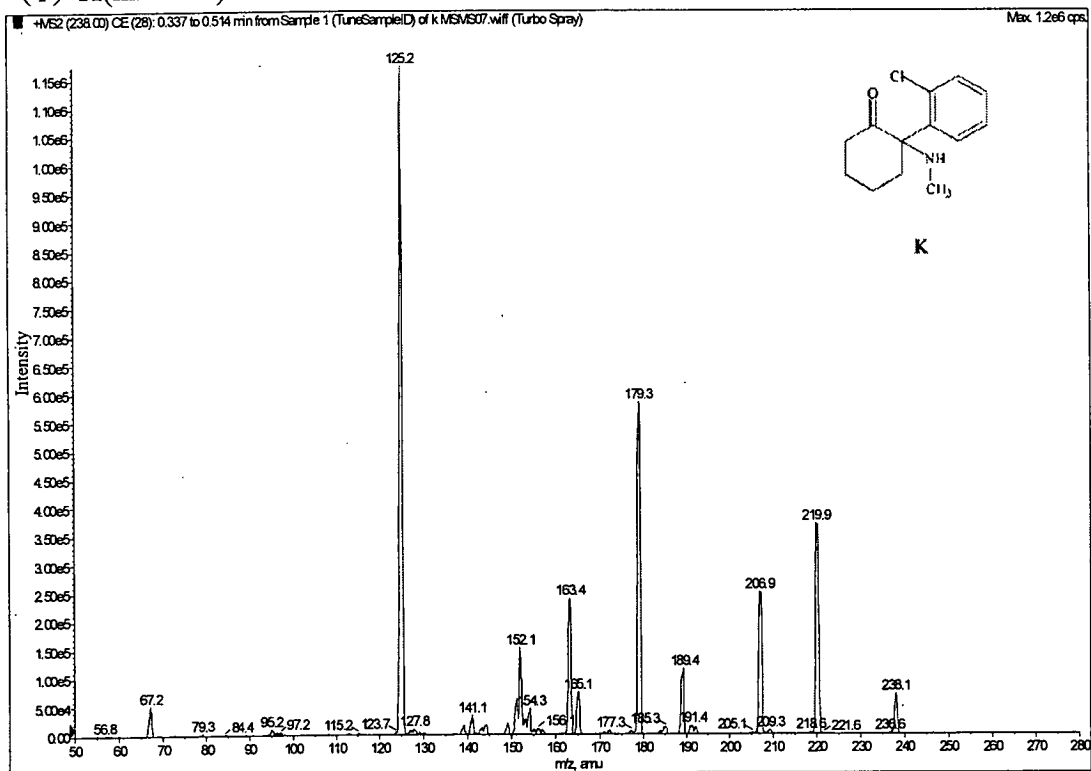
(g) COD(m/z 300)



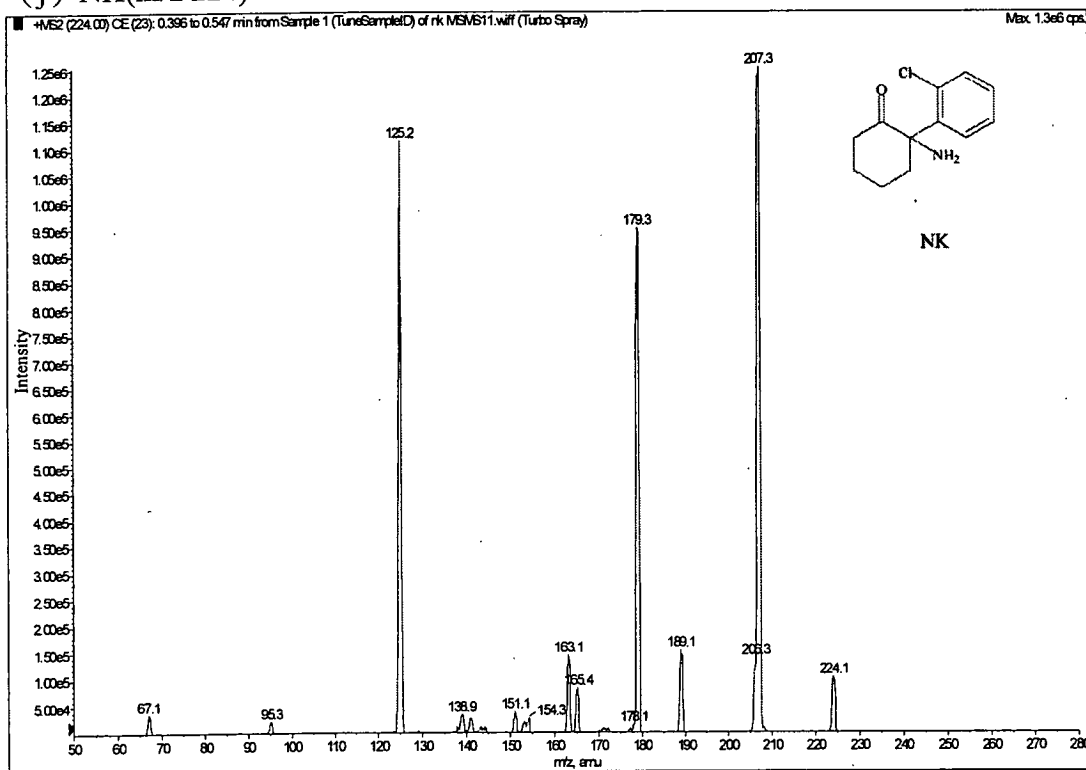
(h) MOR(m/z 286)



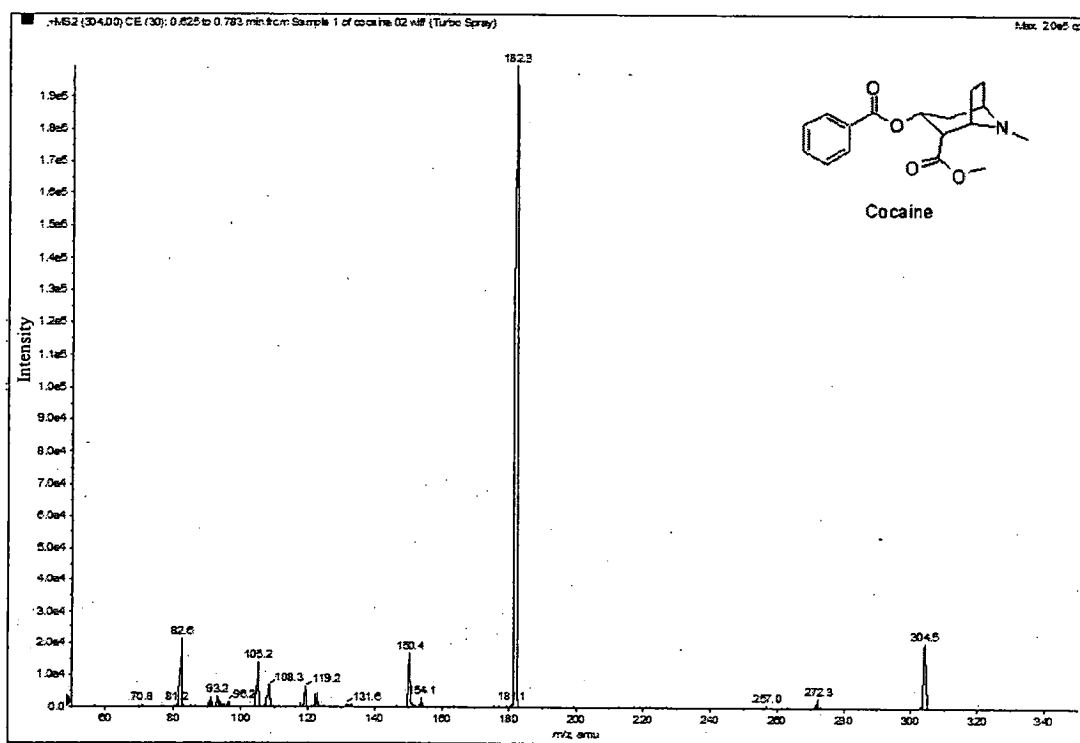
(i) K(m/z 238)



(j) NK(m/z 224)



(k) COC(m/z 304)



(l) BZE(m/z 290)

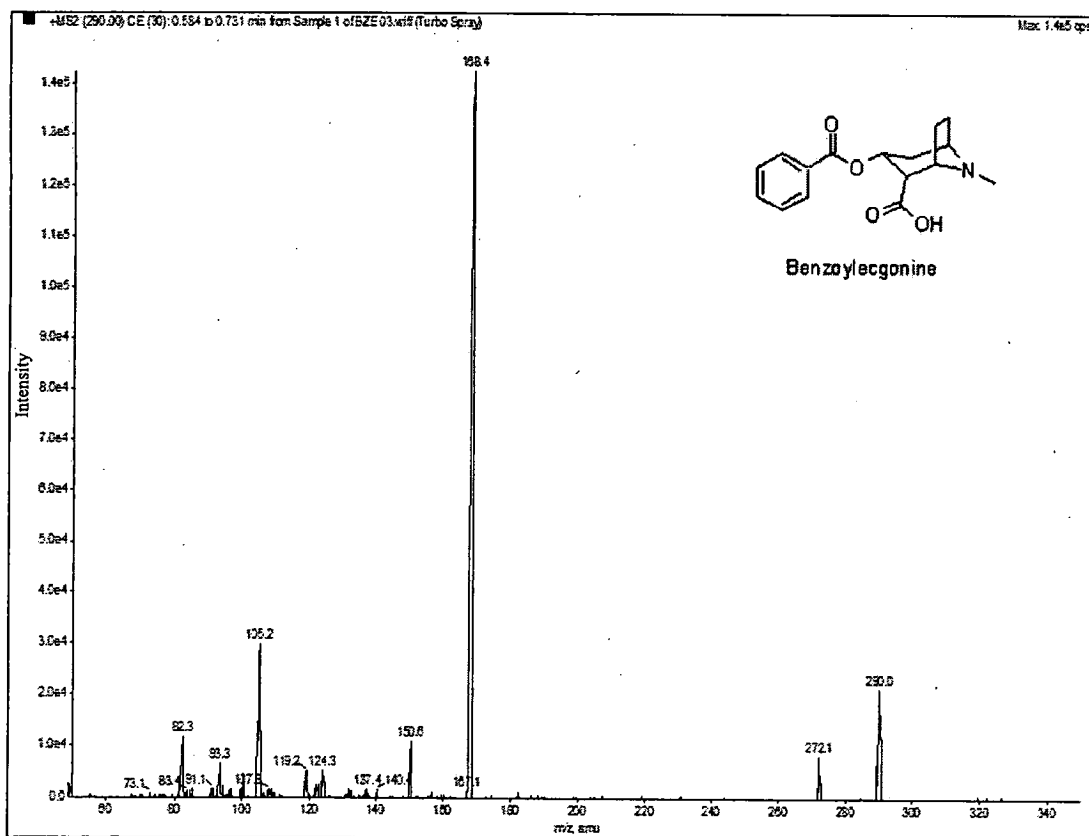


圖 4. 各藥物之 LC/MS/MS 裂解質譜圖。

表 5. 各藥物之 LC/MS/MS 多重反應監測模式之目標離子

Compounds	M.W.	Precursor ion(m/z)	Collision energy	Product ion(m/z)
MA	149.24	150	20	91, 119
AP	135.21	136	16	91, 119
MDMA	193.25	194	20	133, 163
MDA	179.22	180	15	133, 163
MDEA	207.27	208	22	133, 163
6-AM	327.38	328	50	165, 211
COD	299.37	300	55	165, 215
MOR	285.34	286	50	165, 201
K	237.7	238	28	125, 179
NK	223	224	23	125, 207
COC	303.36	304	30	150, 182
BZE	289.33	290	30	105, 168

在 APCI 的分析測試中，同樣將每種藥物之濃度配製 1 ng/μL，以直接注射的方式進入，流速為 600 μL/min，每次注射 10 μL 進入質譜分析。在正離子 APCI 全圖譜掃描模式下，分析的所有藥物皆可在正離子 APCI 模式下偵測，藥物之圖譜皆以 [M+H]⁺ 為主。完成 APCI 之全圖譜掃描，找到每個分析物強度最佳的分子離子後，找出碰撞後二次質譜的最佳產物離子，結果發現子離子的碎裂片段與 ESI 相同。

比較 ESI 與 APCI 強度方面，ESI 訊號強度皆比 APCI 好，差異最大的為 COD、MOR、K、NK，這些藥物在 ESI 下的訊號強度皆比 APCI 好 7~9 倍，差異最小的為 AP 與 MDMA 只有差 1~2 倍，如表 3-6。

表 6 各藥物之 ESI 與 APCI 訊號強度結果比較

	ESI	APCI
MA	4.5E6±1.7E5	8.8E5±7.2E4
AP	2.4E6±7.5E5	1.2E6±1.2E5
MDMA	2.3E6±2.5E5	1.8E6±3.5E5
MDA	3.4E6±1.2E5	5.0E5±2.0E4
MDEA	2.3E6±9.8E5	4.5E5±5.7E4
6-AM	7.7E4±3.8E3	1.6E4±2.8E3
COD	4.2E4±1.7E3	5.2E3±4.9E2
MOR	3.5E4±6.6E3	3.7E3±3.0E7
K	1.2E6±3.9E5	1.5E5±1.5E4
NK	1.3E6±4.9E5	1.7E5±2.8E4
COC	2.0E5±4.5E4	8.1E4±3.2E3
BZE	1.4E5±2.3E4	3.5E4±2.5E3

(三) 液相層析方法之建立

液相層析是藉由混合物中各成分對於靜相(stationary phase)與物質動相(mobile phase)之間移動速率的不同而達到分離效果。其操作的方式是將含待測物之樣品溶於溶劑之中，然後注入，利用幫浦帶動之溶劑流動，使之通過填充有固態分離物質之管柱，藉由待測物在動相與靜相中，移動速率不同分離不同待測物。分離管柱是提供待測物分離之最主要區域，其分離主要方式分為：(1) 分配層析法 (partition chromatography)。(2) 吸附層析法 (adsorption chromatography)。(3) 離子交換層析法 (ion-exchange chromatography)。(4) 大小排除層析法 (size-exclusion chromatography)。

實驗首先參考 2007 年 Øiestad 教授等人發表之文獻¹⁵與 95 年管

制藥品管理局柳家瑞組長「頭髮中濫用藥物之檢驗計畫」¹⁶，使用 Phenomenex Gemini C18 150×2.00 mm，Particle size 5 μm 的管柱，移動相 A 為 10 mM Ammonium acetate (pH 5)，移動相 B 為 Acetonitrile 含 0.1% Formic acid，移動相 B 在 10 分鐘內，由 30% 升至 70%。圖 3-4(a) 為 LC/MS/MS 之層析圖，只有 K 他命與 NK 有分離，而其他藥物幾乎於 3.5 分時出現，層析結果並不理想。

由於本研究分析 MA、AP、MDA、MDMA、MDEA、K、NK、MOR、COD、6-AM 等藥物，皆屬於鹼性藥物，因此參考 2005 年 Wood 教授等人發表之文獻⁴⁰，使用移動相為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10.0)。而本實驗所使用 Phenomenex Gemini C18 層析管柱，其利用聚合終端遮蔽法(Polymer encapsulation)將矽膠表面覆蓋一薄層之矽聚合物(silicone polymer)，再進行化學長鏈之結合。經此種技術處理之層析管較耐鹼性，當移動相的 pH 10 時仍具有相當之安定性，可忍受 pH 1~12。

我們嘗試移動相 A 為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10.0)，移動相 B 為含 0.1% Formic acid 的 Acetonitrile，並且將梯度調整為移動相 B 在 13 分鐘內，由 45% 升至 60%。結果發現，如圖 3-4(b)，在移動相 A 為 pH 10.0，MOR、6-AM、COD、MDA、AP、MDMA、MDEA、MA 都在 3.0~6.0 分鐘出現，K 與 NK 可得到不錯的分離效果，

NK 約 6.8 分出現，K 至 10.8 分出現。若移動相在 pH 7.0、8.0、9.0 時，也可獲得相同的層析效果，就不需使用 pH 10.0 的移動相，因此分別評估移動相 A 在 pH 7.0、8.0、9.0 時，與移動相 B 為含 0.1% Formic acid 的 Acetonitrile。

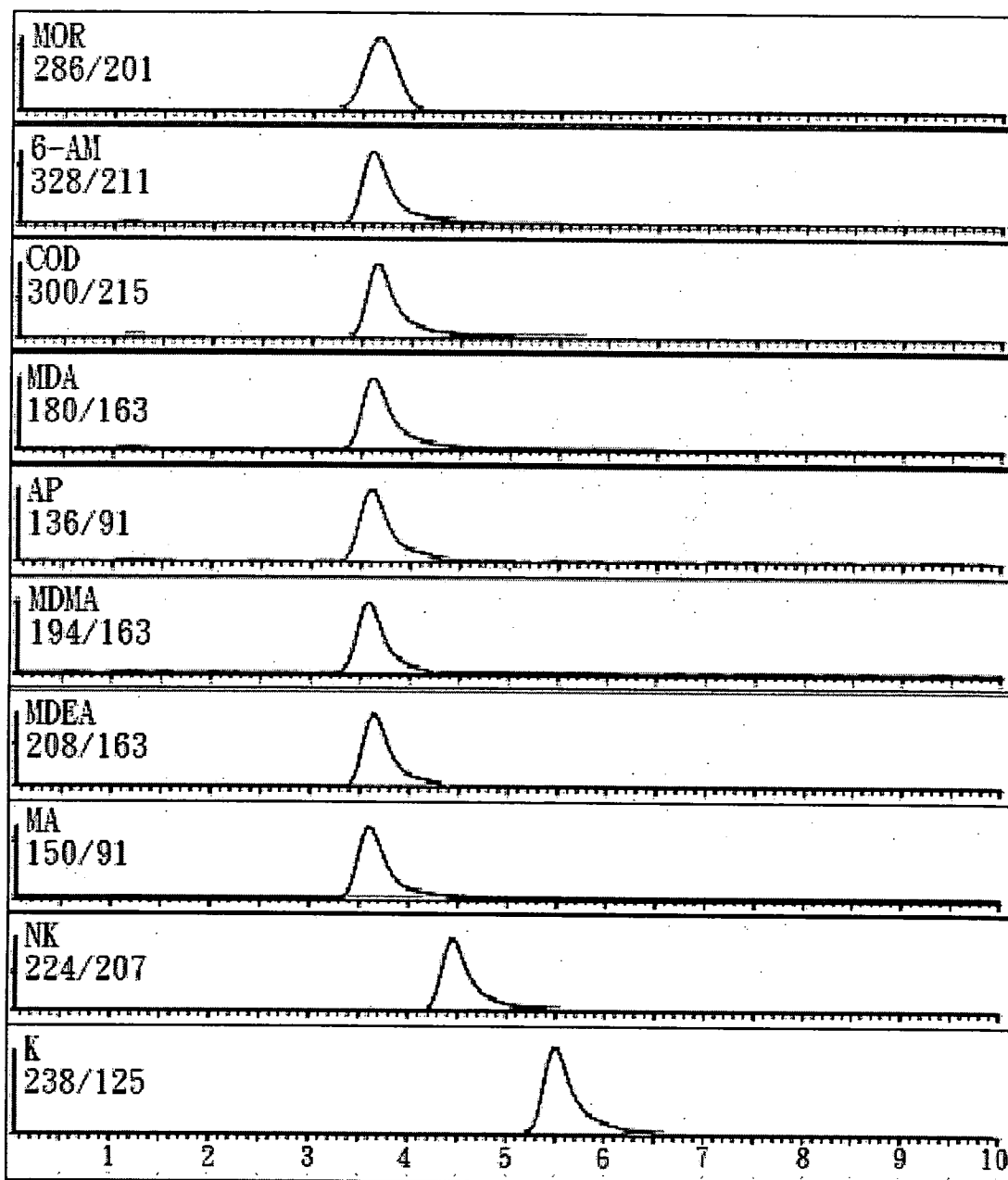
結果發現，圖 3-4(c) 移動相 A 為 pH 7.0，MOR、6-AM、COD、MDA、AP、MDMA、MDEA、MA、NK 都在 3.0~5.0 分鐘出現，沒有明顯的分離，只有 k 在 6 分鐘層析出來可與其他藥物分離。如圖 3-4(d)，移動相 A 為 pH 8.0 的結果與 pH 7.0 相似，只有 K 與其他藥物分離，如圖 3-4(e)，移動相 A 為 pH 9.0，MOR、6-AM、COD、MDA、AP、MDMA、MDEA、MA 都在 3.0~6.0 分鐘出現，NK 與 K 可與其他藥物分離，分別在 6.8 分鐘與 9.9 分鐘出現。

我們發現 MOR、6-AM、COD、MDA、AP、MDMA、MDEA、MA 大約都在 3.0~6.0 分鐘內出現，但隨著 pH 值的增加，每個藥物都有漸漸分離的趨勢，尤其在 pH 10.0 時，NK 與 K 的分離更加明顯，所以決定使用移動相 A 為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10.0)，與移動相 B 為 Acetonitrile 含 0.1% Formic acid 為本實驗的移動相。

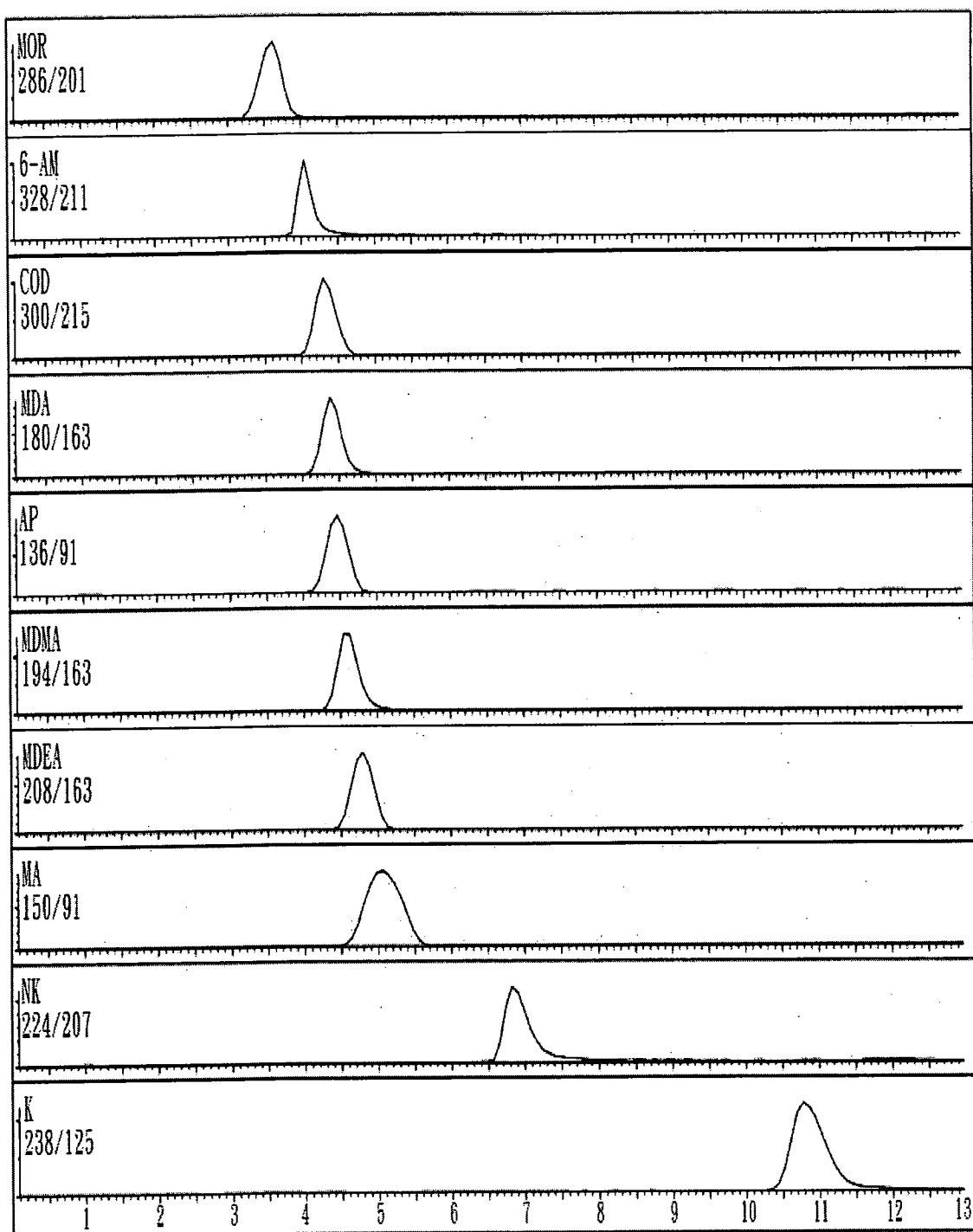
使用 Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm, Particle size 5 μm 的管柱，移動相 A 為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10.0)，移動相 B 為含 0.1% Formic acid 的 Acetonitrile，移動相 B 在 13 分鐘內，

由 45% 升至 60%，所得到的層析結果並不够好，只有 K 與 NK 可以分離，為達到更好的分離效果，將管柱更換成，Particle size 3 μ m Phenomenex Gemini C18 150 \times 2.00 mm，希望可獲得好的分離效果。

層析條件移動相 A 為 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10)，移動相 B 為 Acetonitrile 含 0.1% Formic acid，移動相 B 調整為在 15 分鐘內，由 45% 升至 60%，並且在加入 COC 與 BZE 這兩種藥物，圖 3-4(f) 為 LC/MS/MS 之層析圖，首先流出的藥品是 BZE (滯留時間 4.8 min)，其次為 MOR (滯留時間 5.6 min)，第三是 6-AM (滯留時間 6.9 min)，第四是 COD (滯留時間 7.1 min)，第五是 MDA (滯留時間 8.2 min)，第六是 AP (滯留時間 8.7min)，第七是 MDMA (滯留時間 9.7 min)，第八是 NK (滯留時間 10.1 min)，第九是 MA (滯留時間 10.8 min)，第十是 MDEA (滯留時間 11.3 min)，第十一是 K (滯留時間 13.2 min)，最後是 COC (滯留時間 14.1 min)。我們所使用移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate 為 pH 10，pH 值大於鹼性藥物的 pKa 值時，可增加鹼性藥物滯留於管柱中時間，且 C18 管柱屬於非極性，會抓住較非極性之藥物，而較極性的藥物隨著溶劑先層析出來。BZE、MOR、6-AM、COD 帶有-OH 基，屬於較極性得藥物，它們的 pKa 值小於 pH 10，所以先層析出來。

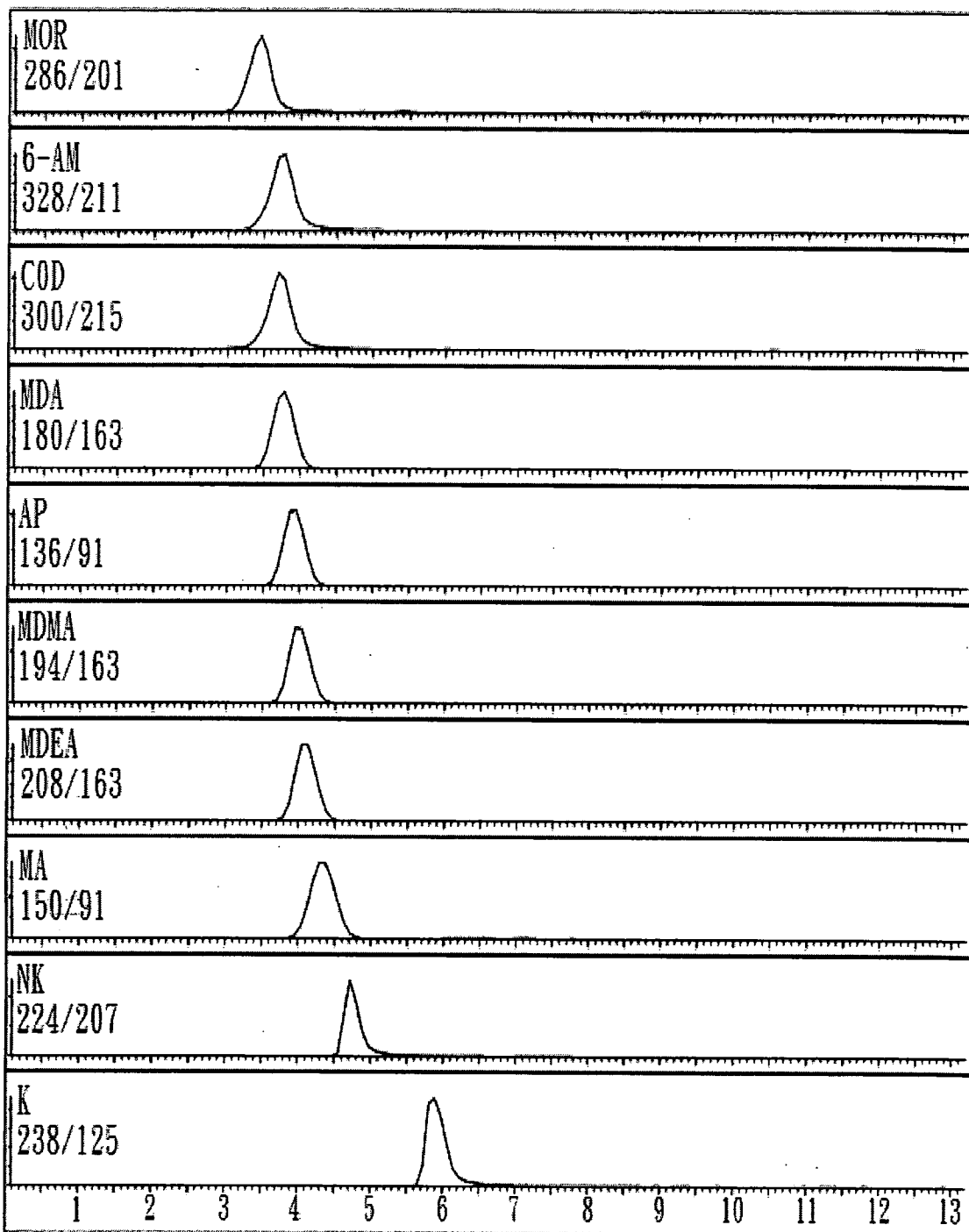


(a) LC/MS/MS層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium acetate (pH 5.0)，
 使用Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 5 μm。

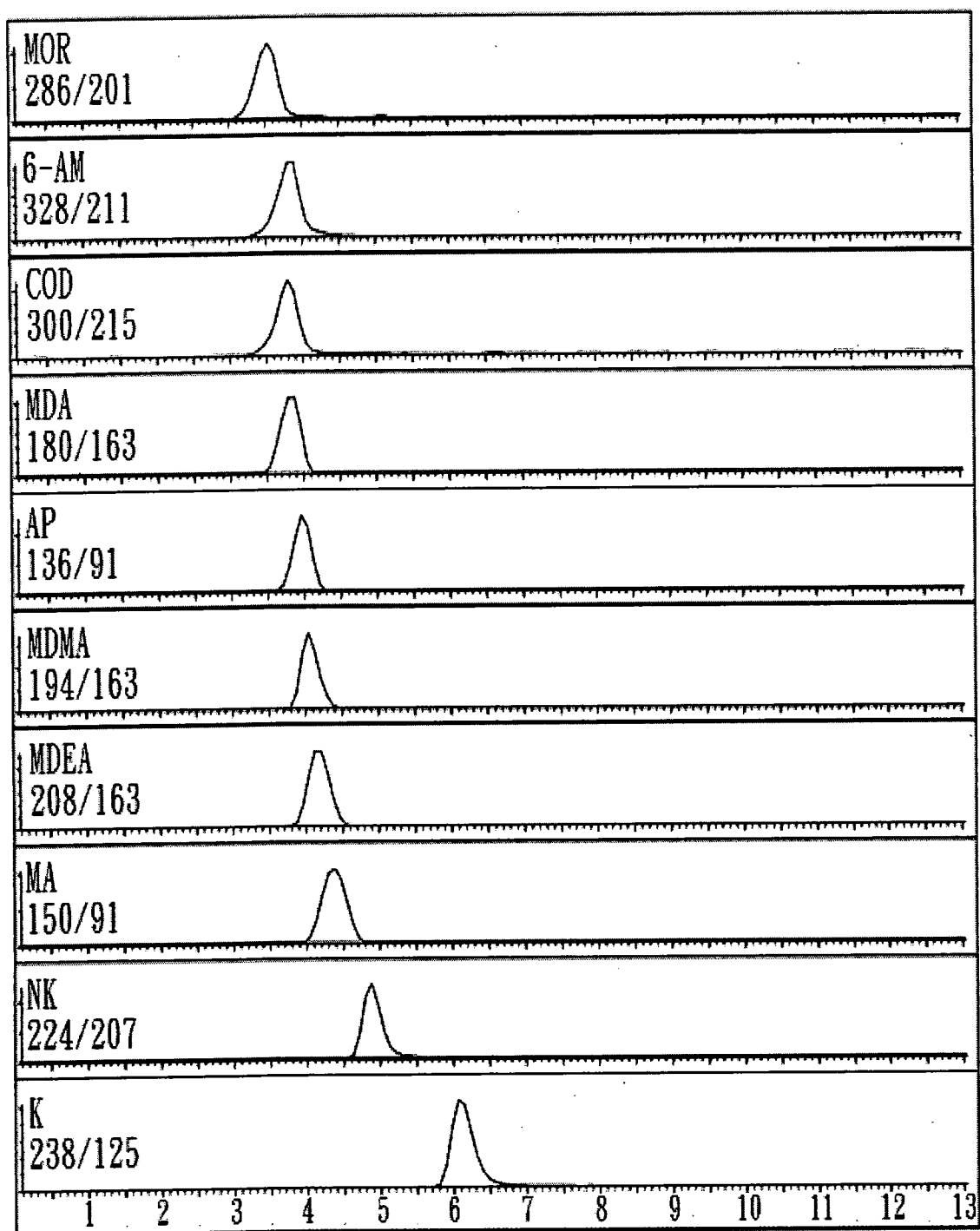


(b) LC/MS/MS層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate

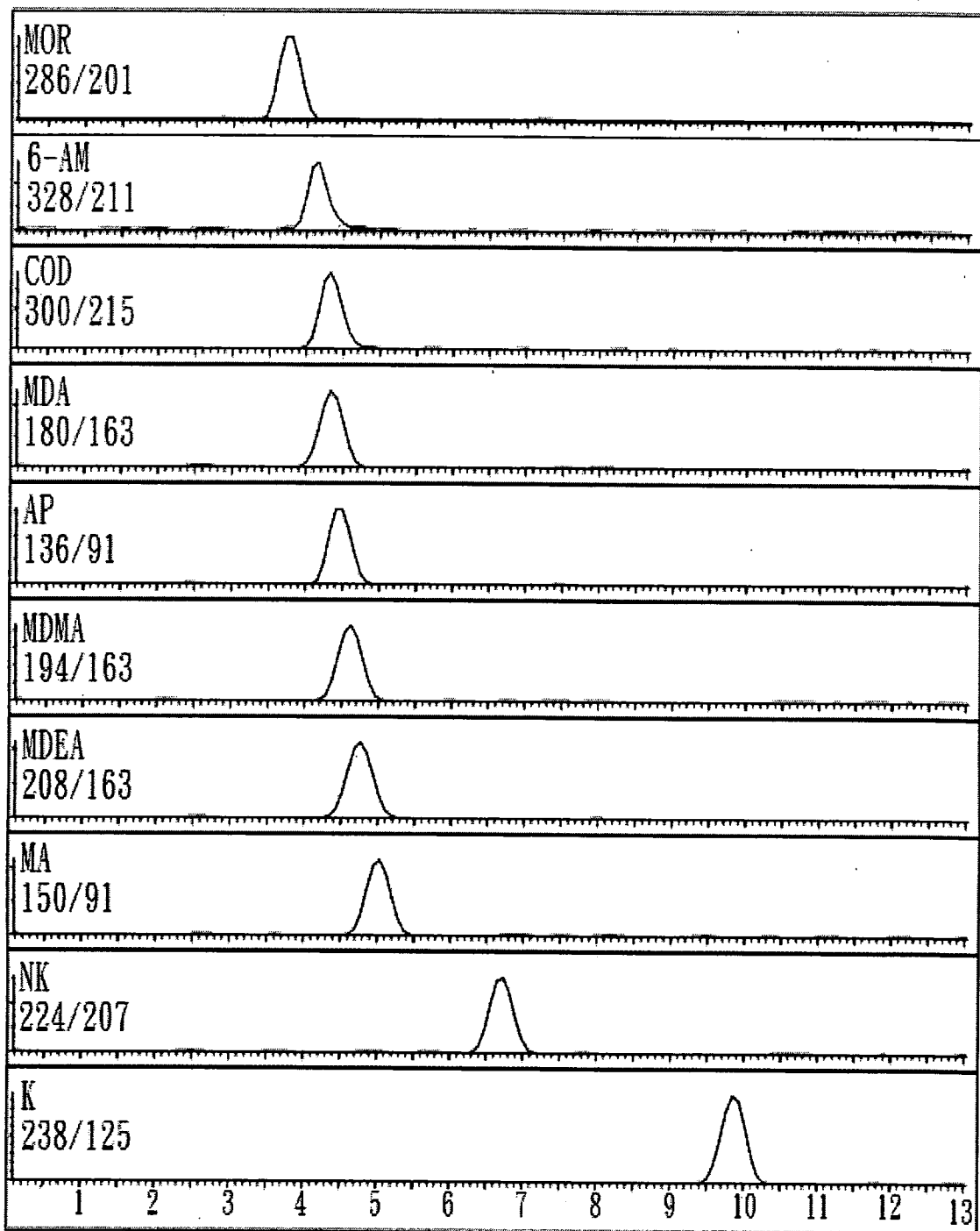
(pH=10)，-Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 5 μm。



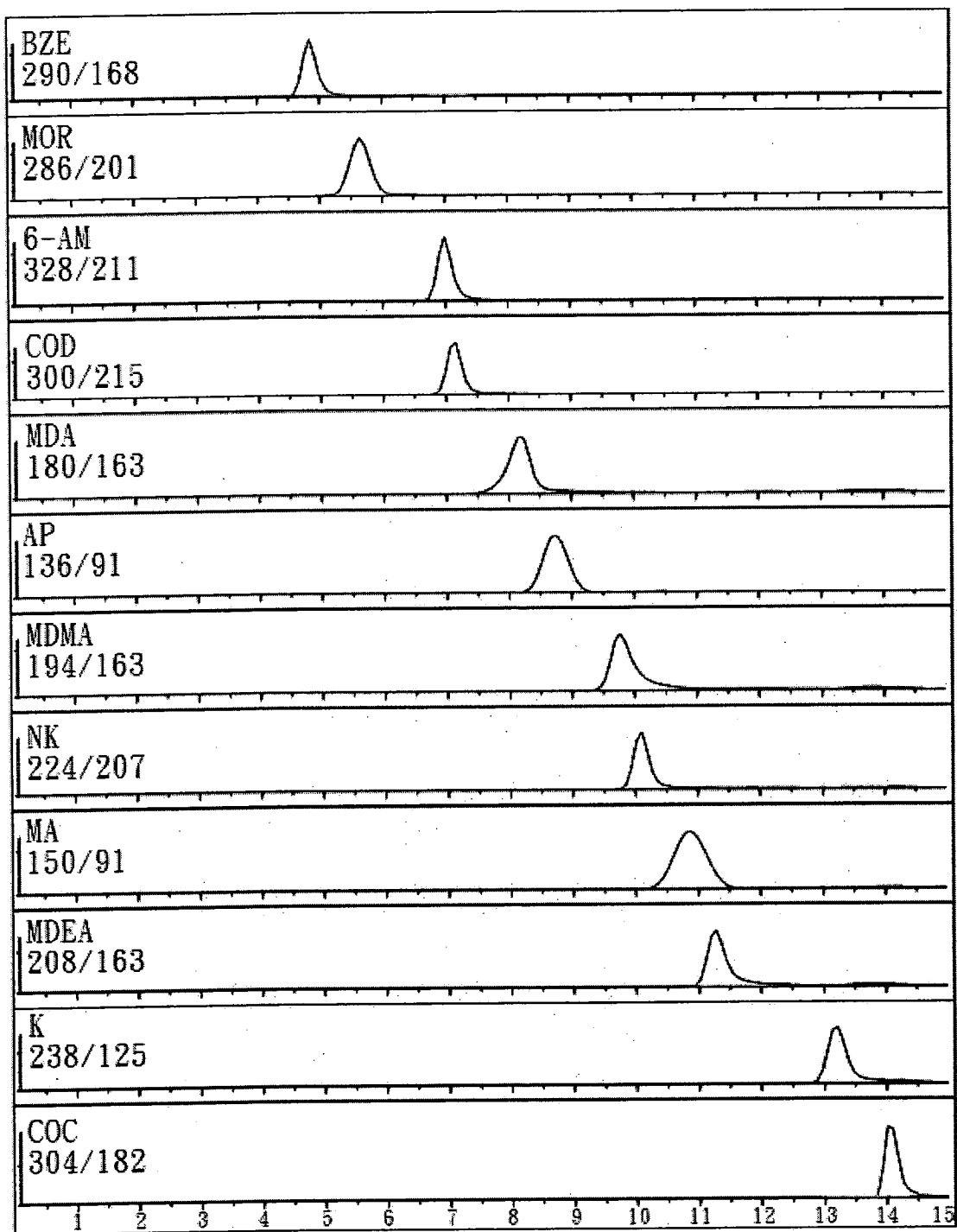
(c) LC/MS/MS層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 7.0)，使用Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 5 μm。



(d) LC/MS/MS 層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 8.0)，使用 Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 5 μm。



(e) LC/MS/MS層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 9.0)，使用Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 5 μm。



(f) LC/MS/MS層析圖，移動相 A 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10)，使用Phenomenex Gemini C18 150 × 2.00 mm，Particle size 3 μm。

圖 5 各藥物之 LC/MS/MS 分離層析圖。

表 7 各藥物之 LC/MS/MS 目標離子與滯留時間

Compounds	Precursor ion(m/z)	Collision energy	Product ion(m/z)	RT (min)
MA	150	20	<u>91</u> , 119	10.8
AP	136	16	<u>91</u> , 119	8.7
MDMA	194	20	133, <u>163</u>	9.7
MDA	180	15	133, <u>163</u>	8.2
MDEA	208	22	133, <u>163</u>	11.3
6-AM	328	50	<u>165</u> , 211	6.9
COD	300	55	<u>165</u> , 215	7.1
MOR	286	50	<u>165</u> , 201	5.6
K	238	28	<u>125</u> , 179	13.2
NK	224	23	125, <u>207</u>	10.1
COC	304	30	150, <u>182</u>	14.1
BZE	290	30	105, <u>168</u>	4.8

* 下方畫橫線為定量離子。

在 ESI 正離子偵測模式下，為了增加電噴灑離子化效率，通常樣品會溶於具有極性的有機溶劑中，如使用 Methanol 或 Acetonitrile 與水的混合溶液，以增加溶劑揮發的速度與降低表面張力。同時在利用 ESI 正離子分析時，常在樣本溶液中加入甲酸 (formic acid) 或乙酸 (acetic acid) 等易揮發的酸，增加靈敏度。

由於實驗所使用的移動相 A 為 pH 10.0 的 10 mM Ammonium bicarbonate，為評估使用較鹼性的移動相是否會造成靈敏度下降，所以評估藥物在 pH 10.0 及 pH 3.0 的移動相下靈敏度改變。

在 pH 10.0，10mM Ammonium bicarbonate : Acetonitrile = 1 : 1 的溶液與 pH 3.0 之 0.1% Formic acid : Acetonitrile = 1 : 1 的溶液下，將 MA、AP、MDA、MDMA、MDEA、K、NK、MOR、COD、6-AM、COC、BZE 之標準品以 100 pg/ μ L 濃度，以直接注射的方式，每次注

射 10 μL 各別進入質譜儀偵測。

結果發現，12 種藥物在 pH 3.0 時，訊號強度比 pH 10.0 好，由圖 3-5 可以發現，雖然 pH 3.0 時訊號強度較高，但訊號強度的差異不大，MA、AP、MDMA、MDA、MDEA、COD、MOR、K、NK、BZE 的訊號強度差異都在 1~3 倍內，而 6-AM 與 COC 差約 4 倍，所以在 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 10) 的移動向中，依然可維持好的感度。

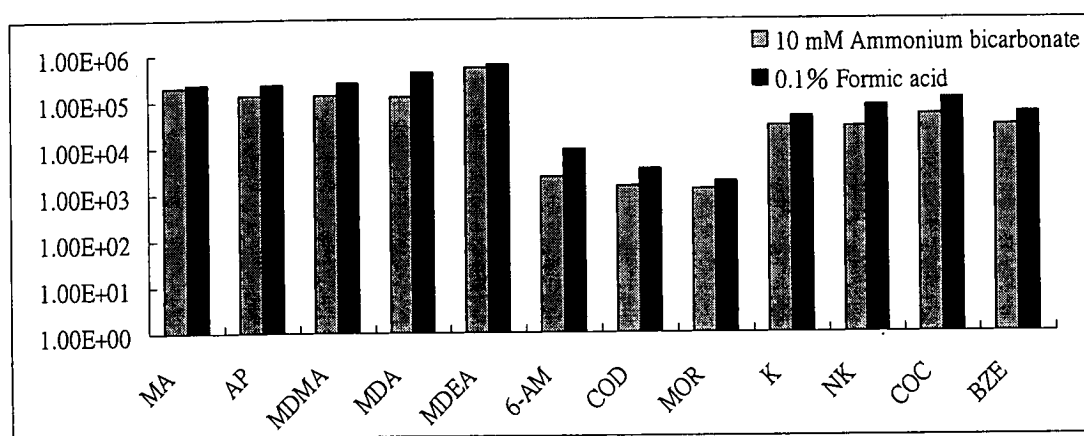


圖 6 各藥物於 pH 10 與 pH 3 之訊號強度比較圖。

表 8 各藥物於 pH 10 與 pH 3 之訊號強度比較 (N=3)

	pH 10.0	pH 3.0
MA	2.00E+05	2.25E+05
AP	1.40E+05	2.40E+05
MDMA	1.40E+05	2.60E+05
MDA	1.30E+05	4.25E+05
MDEA	5.23E+05	6.20E+05
6-AM	2.33E+03	9.50E+03
COD	1.48E+03	3.53E+03
MOR	1.22E+03	1.88E+03
K	2.85E+04	4.70E+04
NK	2.80E+04	7.70E+04
COC	4.95E+04	2.10E+05
BZE	3.00E+04	5.30E+04

(四)方法之確效性評估

當確認 LC/MS/MS 條件後，開始評估方法之確效性，包含：最低偵測極限、準確度及精密度等。分析毛髮中 MA、AP、MDA、MDMA、MDEA、K、NK、MOR、COD、6-AM、COC、BZE 等藥物，以 LC/MS/MS 的分析方法，不需經衍生化步驟即可達到鑑定的目的，因此被視為是極具發展潛力的一項技術。以往在 LC/MS/MS 方法分析的研究較少，且靈敏度不及 GC/MS。幸運的是，隨著 LC/MS/MS 的成熟與普及化，以及在質譜技術的改進下，高靈敏度的質譜儀克服了以往在偵測極限高於法定閾值的困擾，而達到比 GC/EI-MS 更加的靈敏度。

a. 最低偵測極限評估

偵測極限代表分析方法的靈敏度，偵測極限越低，代表分析方法有越佳的靈敏度。本實驗偵測極限的作法是將標準品個別做不同濃度的稀釋，在 LC/MS/MS 以多重反應監測模式 (MRM) 分析，所得圖譜訊雜比大約等於 3 ($S/N \geq 3$)，以這樣的標準視為本研究的最低偵測極限值。如表 7，MA、AP、MDMA、MDA、MDEA、K、NK、COC、BZE 的方法偵測極限分別為 25、25、25、50、25、50、100、25、25 pg/mL，6-AM、COD、MOR 的方法偵測極限分別為 50、50、100 pg/mL；而在最低定量極限方面，定義為所得質譜圖之訊雜比大約等於 10，約為最低偵測極限的 3-4 倍，MA、AP、MDMA、MDA、MDEA、K、NK、COC、BZE 的最低方法定量極限分別為 75、75、75、100、75、75、300、100、100 pg/mg，6-AM、COD、MOR 的最低方法定量極限分別為 75、75、300 pg/mg。

檢量線是定量分析時重要的依據，檢量線需要考慮到工作濃度範圍、線性範圍與最低偵測值。本研究在檢量線建立的實驗將 MA、

AP、MDMA、MDA、MDEA、K、NK，經過 phosphate buffer、SPE 萃取，回溶 100 μL ，每次打入 10 μL 進入 LC/MS/MS 分析，並以多重反應監測模式 (MRM) 進行分析，檢量線之相關係數值 (r^2) 為 0.997~1。

精密度代表重覆測量時，其測量值之間變動程度。本實驗以三種濃度做評估：低濃度 10 ng/mL、中濃度 50 ng/mL、高濃度 250 ng/mL 之藥物標準品，進行準確度與精密度之評估。

1. 同日內的精確度和準確度 (Within-day precision and accuracy)

每個濃度點所得五次分析圖譜，算出五次分析物濃度值，再換算出標準差，並將所得標準差除以所得五次理論值之算術平均數 (即 SD/mean)，所得比值為本實驗的精密度評估。如表 8，在低濃度 10 ng/mL，精密度除了 AP 與 COD 分別為 11.42%、10.39%，其餘藥物的精密度皆於 10% 以下，中濃度 50 ng/mL 與高濃度 250 ng/mL 得到精密度在 10 % 以下，而準確度方面低、中、高濃度都在 10 % 的誤差範圍之內。

表 9 各藥物於 LC/MS/MS 最低偵測極限值評估 (單位為 pg/mL)

	LOD	LOQ
MA	25	75
AP	25	75
MDMA	25	75
MDA	25	100
MDEA	25	75
6-AM	50	150
COD	50	150
MOR	100	300
K	50	100
NK	100	300
COC	25	100
BZE	25	100

表 10 各藥物於 LC/MS/MS 之同日內精密度與準確度評估

	10 ng/mL		50 ng/mL		250 ng/mL	
	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy
	CV %	%	CV %	%	CV %	%
MA	7.77	99.78	1.99	97.97	1.27	100.90
AP	11.42	92.20	2.92	97.94	7.34	105.19
MDMA	4.65	97.91	3.76	100.21	5.81	99.34
MDA	2.07	96.50	3.34	100.44	2.35	98.34
MDEA	7.79	98.07	1.91	99.96	2.15	98.48
6-AM	3.92	96.65	3.70	100.13	3.92	99.61
COD	10.39	99.53	6.08	95.70	6.39	91.34
MOR	7.62	98.95	8.66	99.21	8.95	98.62
K	6.97	99.51	7.11	101.83	6.45	97.52
NK	6.03	99.31	3.99	102.99	3.32	103.20
COC	9.75	105.37	3.33	100.66	1.86	100.75
BZE	2.20	102.59	1.54	98.96	1.30	104.24

肆、結論與建議

目前國內最常見的濫用藥物檢驗方式是尿液檢驗，不過，由於尿液採樣極為耗時，需特別的取樣空間且容易有攙假、稀釋等情形。相較之下，新興的生物檢體如：唾液，不僅檢體採樣容易，且能防止發生作假之情形，近年來已成為監測是否施用非法藥物之重要生物檢體。

在本研究中，我們首度以方便、全自動化的 EMIT 酵素免疫分析儀 Olympus AU600，執行唾液中的濫用藥物之初篩檢驗。在本研究中：我們開發出唾液中濫用藥物微量分析之最佳化條件，並用以評估方法之確效性，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度評估...等，皆得到很好的結果。目前國外之唾液初篩檢驗主要是使用：酵素免疫分析試劑套組(ELISA kit)，本研究發現：透過各項儀器參數調整，可建立常用於尿液檢驗之 EMIT 分析方法，而唾液中濫用藥物之最低偵測極限為：AP：10 ng/mL、MOR：10 ng/mL 及 MDA：12 ng/mL。AP 之檢量線範圍：0~100 ng/mL (實際濃度為 0~200 ng/mL)， R^2 值：0.996；MOR 之檢量線範圍：0~100 ng/mL (實際濃度為 0~200 ng/mL)， R^2 值：0.9989；MDMA 之檢量線範圍：0~100 ng/mL (實際濃度為 0~200 ng/mL)， R^2 值：0.9969。唾液初篩之同日內精密度、準確度 AP 之 CV % 值皆小於 11.11 %，準確度則皆大於 95.00 %；MOR 之 CV % 值皆小於 10.80 %，準確度則皆大於 80.00 %；MDMA 之 CV % 值皆小於 13.32 %，準確度則皆大於 90.67 %。唾液初篩之異日間精密度、準確度 AP 之 CV % 值皆小於 12.83 %，準確度則皆大於 90.53 %；MOR 之 CV % 值皆小於 6.42 %，準確

度則皆大於 89.33 %；異日間各濃度 MDMA 之 CV % 值皆小於 12.5 %，準確度則皆大於 86.93 %。當初步篩檢值大於閾值時，才需要做更進一步確認分析，以利於迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，達到本研究節省成本及降低檢驗時效性的目的。

其次，將原有之常見毒品毛髮檢驗之 GC/MS 方法，轉移成為唾液確認檢驗方法，並進行方法之確效性評估，包含檢量線建立、回收率評估、偵測極限評估、精密度與準確度評估…等。

由於使用 GC/MS 做為系統性檢驗方法上，因衍生化過程等先天上的因素，使得系統受到限制。隨著液相層析質譜儀(LC/MS)的成熟與普及化，其方法大多不需衍生化步驟，實驗可較為簡單快速。本研究除了建立初篩檢驗方法外，亦建立 LC/MS/MS 分析方法。實驗首先以 0.1 M Phosphate buffer (pH 5.0) 加入唾液，隨後進行 SPE 萃取，並以 C18 的管柱進行分離，接著以 LC/MS/MS (API3000) 進行 MRM 模式之偵測。實驗結果發現：除可獲得良好的分離效果外，LC/MS/MS 的靈敏度較 GC/MS 有更低的方法偵測極限。總之，本研究使用 3 種不同方法，進行唾液檢驗：

- (1) 初步篩檢方面，以酵素免疫分析儀(OLYMPUS AU 600)。唾液中濫用藥物之初步篩檢，在調整各項加入免疫試劑與樣品後，偵測極限可達為：AP：3 ng/mL、MOR：3 ng/mL 及 MDMA：7 ng/mL，偵測極限皆小於陽性閾值，可適用於真實檢體之分析。
- (2) 確認檢驗方面：各藥物之 GC/MS 方法：確效評估偵測極限 AP、MA、MDMA、MDA、NK 0.5 ng/mL K、MOR、COD 0.75 ng/mL，6-AM 為 1 ng/mL。而 LC/MS/MS 方法：最低偵測極限值評估 MA、AP、MDMA、MDA、COC、BZE 為 25 pg/mL，K、COD、6-AM 為 50 pg/mL

，NK、MOR 為 100 pg/mL。

- (3) 本研究發現：雖然上述三種方法偵測方法皆充份滿足唾液檢驗之所需之感度，然而 LC/MS/MS 前處理可望更為簡單（類似 EMIT），其靈敏度較 GC/MS 更低，且可用於未知藥物之探討，其未來潛力遠勝於 GC/MS 方法。

伍、參考文獻

1. Kidwell D. A.; Holland J.C.; Athanasis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1998, 713, 111-135.
2. Crouch D.J.; Day, J.; Baudys J. Evaluation of Saliva/Oral Fluid as an Alternate Drug Testing Specimen—Final Report. National Institute of Standards and Technology (NISTR 7139. Gaithersburg MD) 2004, pp. 1-70.
3. Crouch D.J. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* 2006, 27, 147-159.
4. Aps T. K. M. The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005, 150, 119-131.
5. Drummer O.H. Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int.* 2005, 150, 133-142.
6. Toennes, S.W.; Kauert, G.F.; Steinmeyer, S.; Moeller, M.R. Driving under the influence of drugs -- evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Sci Int.* 2005, 152, 149-155.
7. Crouch D.J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* 2005, 150, 165-173.
8. Kolbrich, E.A.; Kim, I.; Barnes, A.J.; Moolchan, E.T.; Wilson, L.; Cooper, G.A.; Reid, C.; Baldwin, D.; Hand, C.W.; Huestis, M.A. Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System: an evaluation of sensitivity, specificity, and efficiency for cocaine detection compared with ELISA and GC-MS following controlled cocaine administration. *J Anal Toxicol.* 2003, 27, 407-411.
9. Cone, E.J.; Presley, L.; Lehrer, M.; Seiter, W.; Smith, M.; Kardos, K.W.; Fritch, D.; Salamone, S.; Niedbala, R.S. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation

- and suggested cutoff concentrations. *J Anal Toxicol.* 2002, 26, 541-6.
10. Mortier, K.A. ; Maudens, K.E. ; Lambert, W.E. ; Clauwaert, K.M. ; Van Bocxlaer, J.F. ; Deforce, D.L. ; Van Peteghem, C.H. ; De Leenheer, A.P. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole -time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002, 779, 321-30.
 11. Wood, M. ; De Boeck, G. ; Samyn, N. ; Morris, M. ; Cooper, D.P. ; Maes, R.A. ; De Bruijn, E.A. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2003, 27, 78-87
 12. Dams, R. ; Murphy, C.M. ; Choo, R.E. ; Lambert, W.E. ; De Leenheer, A.P. ; Huestis, M.A. LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/ MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Anal Chem.* 2003, 75, 798-804.
 13. Oiestad, E.L. ; Johansen, U. ; Christophersen, A.S. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2007, 53, 300-9
 14. Concheiro, M. ; DeCastro, A. ; Quintela, O. ; Cruz, A. Lopez-Rivadulla, M Development and validation of a method for the quantitation of Delta9tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004, 810, 319-24.
 15. Øiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2007, 53, 300–309.
 16. 柳家瑞, 黃明坤, 李聰輝, 賴靖怡, 頭髮中濫用藥物之檢驗. 行政院衛生署管制藥品管理局, 2006.

97 年度計畫執行成果報告表

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱	濫用藥物 唾液檢驗之方法開發與探討		
計畫編號	DOH97-NNB-1015	填寫日期	97.11.12
執行機構	中山醫學大學	計畫主持人	林克亮
計畫期程	<input checked="" type="checkbox"/> 一年期計畫； <input type="checkbox"/> 多年期計畫，共_____年，本年度為第_____年		
原計畫書擬達成目標	<p>1. 唾液檢驗分析方法評估</p> <p>在分析步驟中，現場即時檢驗及初篩檢驗將分別購買現場即時偵測藥物之裝置，並發展 EMIT 免疫分析法。</p> <p>2. 系統性 GC/MS 與 LC/MS/MS 唾液檢體之濫用藥物分析：</p> <p>第二部分將是進行 LC/MS/MS 唾液檢體濫用藥物分析。樣品先經 GC/MS 確認分析，再進行真實唾液檢體系統性 LC/MS/MS 分析，以找出實驗與方法設計上的缺失，累積真實樣品之分析經驗，以使檢測方法能更加完善。</p>		
已達成目標及其他成果	<p>在本研究中，我們首度以方便、全自動化的 EMIT 酵素免疫分析儀 Olympus AU600，執行唾液中的濫用藥物之初篩檢驗。在本研究中：我們開發出唾液中濫用藥物微量分析之最佳化條件，並用以評估方法之確效性，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度評估...等，皆得到很好的結果。當初步篩檢值大於閾值時，才需要做更進一步確認分析，以利於迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，達到本研究節省成本及降低檢驗時效性的目的。</p> <p>其次，將原有之常見毒品毛髮檢驗之 GC/MS 方法，轉移成唾液確認檢驗方法。同時，本研究亦建立 LC/MS/MS 分析方法，並進行方法之確效性評估，包含檢量線建立、回收率評估、偵測極限評估、精密度與準確度評估...等。由於使用 GC/MS 做為系統性檢驗方法上，因衍生化過程等先天上的因素，使得系統受到限制。隨著 LC/MS 的成熟，其方法大多不需衍生化步驟，實驗可較為簡單快速。</p>		

(計畫主持人以條列方式逐項填寫，若篇幅不足，可另附頁說明)

97 年度計畫重要研究成果及對本局之具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫編號：	DOH97-NNB-1015		
計畫名稱：	濫用藥物 唾液檢驗之方法開發與探		
計畫主持人：	林克亮	執行單位：	中山醫學大學

1. 本計畫之新發現或新發明

- (1) 在本研究中，首度開發以方便、全自動化的 EMIT 酵素免疫分析儀 Olympus AU600，進行唾液中的濫用藥物之初篩檢驗，可迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，增加檢驗時效性。
- (2) 將原有之常見毒品毛髮檢驗之 GC/MS 方法，轉移成為唾液確認檢驗方法。
- (3) 建立 LC/MS/MS 唾液確認檢驗方法，未來可進行系統性檢驗。

2. 本計畫對民眾具教育宣導之成果

唾液檢驗具有簡單、非侵入性、易於收集的等優點特性，可當面取樣並全程監察，不需特別之設施場所，沒有尷尬或隱私的問題，且能防止發生作假之情形，最重要是唾液中藥物濃度可以即時反映血液中藥物濃度，因此對於現場及時採樣將有極大助益。

3. 本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

無