

研究計畫編號：DOH97-NNB-1012

科資中心編號：PG9701-0112

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

濫用藥物毛髮檢驗：  
初步篩檢與低含量藥物之方法開發

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：張耀仁

研究人員：劉珈岑、李秉鐸、陳俊豫、張元哲

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、結果與討論參.....	27
肆、結論與建議.....	63
伍、參考文獻.....	65

# 圖次

	頁碼
圖1 EMIT分析毛髮中AP、MOR、MDMA 之OD值	(32)
圖2 AP、MOR、MDMA最佳化前後之 $\Delta$ OD值變化	(37)
圖3 毛髮中AP、MOR及MDMA之檢量線及線性相關係數 $R^2$ 值	(40)
圖4 EMIT與GC/MS 相關性評估結果	(48)
圖5 以ROC分析曲線判定AP、MOR、MDMA 最佳Cut-off值	(51)
圖6 :以電灑法(ESI)與奈灑法(nanoESI) 進行初篩分析	(52)
圖7 GC/MS不同注射模式之比較	(57)
圖8 GC/MS PTV-LV不同注射量之比較	(58)
圖9 GC/MS PTV-LV低濃度THCA注射量之比較	(59)
圖10 苯二氮平類藥物之GC/NCI-MS選擇離子監測模式層析圖	(61)

# 表次

	頁碼
表1 分析AP、MOR及MDMA得到之 $R^2$ 值、斜率、截距	(33)
表2 不同儀器分析AP、MOR及MDMA之精密度及準確度	(33)
表3 改變試劑吸取量對不同濃度下之OD值	(34)
表4 AP、MOR、MDMA 之原始設定值及最佳化設定值	(36)
表5 毛髮EMIT初篩之同日內精密度及準確度	(41)
表6 毛髮EMIT初篩之異日間精密度、準確度	(41)
表7 OLYMPUS AU 600及GC/MS分析38個真實毛髮檢體	(43)
表8 GC/MSOLYMPUS AU 600、HITACHI 7170分析毛髮檢體	(46)
表9 不同Cut-off值之AP、MOR、MDMA敏感性及特異性	(50)
表10. 苯二氮平類藥物之GC/NCI-MS 選擇離子監測模式	(51)
表11. 苯二氮平類藥物之方法確效性評估	(62)

# 中文摘要

關鍵字： 濫用藥物、毛髮檢驗、初篩方法、大體積注射。

本計畫針對毛髮檢驗的兩個重要課題，提出解決的方法：計畫第一部分將針對毛髮檢驗初篩方法進行方法開發。基於目前國內毛髮檢驗中缺乏簡易的初篩方法，為增進檢驗的時效性，本計畫目前已成功建立方便可行之EMIT免疫方法，針對常見的濫用藥物及其代謝物如：安非他命類藥物（安非他命、甲基安非他命、MDMA、MDA）、鴉片類藥物（嗎啡、可待因、海洛因）之初篩檢驗方法開發與探討。在毛髮初篩檢驗部份，以0.1M pH 7 phosphate buffer 取出毛髮中濫用藥物，直接以靈敏、方便、全自動化的酵素免疫分析儀Olympus AU600分析。隨後，探討毛髮與唾液中濫用藥物初篩檢驗之最佳化條件，並建立方法之確效性，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度評估...等。隨後，將38個真實檢體分別以EMIT法與GC/MS兩種不同方法測定，並探討其相關性，各相關係數r值為AP：0.9731、MOR：0.9670、MDMA：0.9591。最後，藉由接收操作指標（ROC）方法來評估最可靠之方法初篩閾值，結果發現AP、MDMA閾值可為 500 pg/mg hair，而MOR閾值可低至150 pg/mg hair。

計畫第二部分將針對頭髮中天生低含量之藥物，包含大麻與BZD類藥物。目前已完成GC/NCI-MS之方法評估，並進行大體積注射裝置(PTV-LV) 之方法測試，成功的提升數十倍之靈敏度，有效的突破毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。

## Abstract

keyword : abuse drug, hair testing, screen testing, large volume injection.

This study focused on two important topics of hair testing. The first topic was aimed in hair screen testing. This study had succeeded at present the establishment convenience feasible EMIT immunity method. A convenient · time-saving and fairly sensitive semiquantitative screening method to development screening for amphetamines (amphetamine, AP; methamphetamine, MA; methylenedioxyamphetamine, MDA; methylene dioxymethamphetamine, MDMA; methylenedioxy ethylamphetamine, MDEA) and opiates (morphine, MOR; codeine, COD; 6-acetylmorphine, 6-AM) in human hair. Hair samples were directly extracted into 1M pH 7 phosphate buffer, and saliva samples were diluted 1 : 1 with 1M pH 7.4 phosphate buffer. The extract was assayed using an Olympus AU600. An optimized procedure for screening was found, and the developed method was fully validated. Moreover, the correlation between the results of EMIT semiquantitative screening and the GC-MS determination evaluated for 38 possible drug users' hair specimens was made. The correlation coefficient of AP was 0.9731 · MOR was 0.9670 and MDMA was 0.9591. The optimal cutoff concentration in screening was found by receiver operating characteristic (ROC) analysis to be AP · MDMA : 500 pg/mg hair ; MOR : 150 pg/mg hair.

The second topic was aimed in the the natural low content drugs (THCA and BZD ) in hair .At present a PTV method of the GC/NCI-MS carried on the large volume injection. The success promotion dozens of time of sensitivities, in effective breakthrough hair detection question natural low content drugs in hair.

# 壹、前言

隨著社會進步與經濟發展，臺灣進入富足、開放、自由與多元化的同時，藥物濫用之問題越趨嚴重。層出不窮的新興毒品，吸食人口年輕化，造成家庭社會的更大衝擊；這幾年來更因共用針頭，而造成愛滋病感染，更耗費極大的醫療資源。有鑒於新興濫用藥物種類繁多、成分複雜，濫用藥物檢驗工作常處於拙於應對的窘境。因此，除了再加強檢驗的藥物種類外，採用更有效與更有嚇阻力的檢驗方法已是刻不容緩。

「毒品檢驗」不僅可作為司法判決的依據外，更希望能對吸毒者產生嚇阻作用，使之不敢使用毒品。尿液檢驗是目前國內最常見的濫用藥物檢驗方式<sup>1</sup>，目前各種檢驗技術已趨標準化系統，且有各種商品化的分析試藥及套組上市。不過，由於藥物在體內有一定的代謝時程，尿液檢驗時窗常只有數日而已，因此形成檢驗漏洞。發展毛髮檢驗方法，可增進濫用藥物檢測能力及廣度，提升濫用藥物檢測品質，可明確監測個案是否施用藥物，更可應用於戒治等需求，並作為調查監測藥物濫用之趨勢。

毛髮檢驗有別於其他的生物檢體，能提供長時間性的藥物使用歷程紀錄，可將血液中所含之小分子化合物，如同錄音帶忠實地將藥物紀錄在毛髮內部，被視為目前最佳的輔助生物檢體<sup>2-10</sup>。因此近20年來，毛髮檢體的可回溯性使得其檢驗方法在國外獲得了高度的重視，尤其是在鑑識科學中濫用藥物的檢驗上，毛髮檢驗上常可提供無所遁形的法庭證據<sup>11-14</sup>。

毛髮是由毛囊細胞所生成的，在毛髮生長的過程中，毛囊細胞會

吸收周圍微血管與皮脂腺中的養分，當作原料來編織新的毛髮，因此血液與皮脂腺中的藥品或其代謝物也就一起被編織在毛髮中；由於毛髮中沒有酵素存在，因此在毛髮中的藥物十分穩定，數十年也不會消失。由於可以不斷生長，只要不被剪下，可持續紀錄，因此毛髮檢驗可以進行分段分析，剖析其每個月的吸毒歷程，了解其吸毒歷程，因此只要採取適當的部位加以分析，即可呈現吸毒者在過去的藥物使用的歷程<sup>2,5-6</sup>。初生的頭髮在頭皮底下靠近毛囊的位置，約五到七天才會冒出頭皮；隨著新的毛髮不斷合成，舊的毛髮不斷的往外推出。以頭髮為例，平均每個月以1-1.5公分的長度生長，因此依據頭髮與頭皮的距離，可以追查出一個人大約在何時曾經吸食過毒品。

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。目前國外毛髮檢驗實驗室大多使用ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）進行初篩檢驗。ELISA是異相酵素免疫法（heterogeneous EIA）的一種，其原理主要是利用抗原抗體之間專一性鍵結之特性，對檢體進行檢測；由於結合於固體承載物（一般為塑膠孔盤）上之抗原或抗體仍可具有免疫活性，因此設計其鍵結機制後，配合酵素呈色反應，即可顯示特定抗原或抗體是否存在，並可利用呈色之深淺進行定量分析。ELISA的特色為：抗原—抗體反應不會改變酵素的活性，其靈敏度只比放射免疫分析法（radioimmunoassay, RIA）略低。但因不具輻射危險性，廢棄物處理較容易，操作較為簡易。理論上任何抗原能附在固相者，均可應用ELISA法來測出其抗體。

毛髮檢驗目前另一項挑戰，即是偵測毛髮中低含量的藥物，最有名的代表性例子就是大麻<sup>15-16</sup>。大麻是全世界最普遍的非法藥物之一，全世界約有三億的使用者，為一歷史悠久的濫用藥物，在大麻植物中最富藏的三種成份有大麻酚（CBN）、大麻二酚（CBD）及



四氫大麻酚 (THC) <sup>10,11</sup>。大麻的代謝方式在肝臟中主要以CYP450代謝，其主要代謝物為THC-COOH，在確認檢驗中，偵測出其代謝物大麻酸 (THC-COOH, THCA)，為使用大麻的判斷指標。

但在大麻的毛髮分析中，由於THC-COOH的毛髮併入率 ( Incorporation Rate, ICR ) 卻遠低於其原態藥物，因此在美國NLCP (National Laboratory Certification Program) 即將THCA 閾值定為 0.1 pg/mg-hair，遠遠低於其他藥物之數百 pg/mg-hair的閾值<sup>17</sup>。(如下表)

<u>Initial Test Analytes</u>	<u>Initial Test Cutoff</u>	<u>Confirmatory Test Analytes</u>	<u>Confirmatory Test Cutoff</u>
<u>Cocaine and metabolites</u>	500 pg/mg	Cocaine Benzoyllecgonine Cocaethylene Norcocaine	500 pg/mg 50 pg/mg 50 pg/mg 50 pg/mg
Marijuana metabolites	1 pg/mg	THCA	0.1 pg/mg
<u>Opiate metabolites</u> Codeine/morphine	200 pg/mg	Codeine Morphine	200 pg/mg 200 pg/mg
6-Acetylmorphine	200 pg/mg	6-Acetylmorphine	200 pg/mg
<u>Phencyclidine</u>	300 pg/mg	Phencyclidine	300 pg/mg
<u>Amphetamines</u> AMP/MAMP	500 pg/mg	Amphetamine Methamphetamine	300 pg/mg 300 pg/mg
MDMA	500 pg/mg	MDMA MDA MDEA	300 pg/mg 300 pg/mg 300 pg/mg

此外，鎮靜安眠類藥物，亦是毛髮檢驗目前之另一項挑戰。苯二氮平 (Benzodiazepam,BZD)藥物臨床上使用於安眠、鎮靜、抗焦慮及治療癲癇等用途，早已取代副作用極高之巴比妥藥物，是目前最常用的鎮靜安眠藥物。在BZD類藥物中，Flunitrazepam，即俗稱的FM2，是最受到關注。由於FM2 藥錠快速安眠及完全失憶的效果，成為約會強暴的頭號幫兇。雖然在數天內，尿液中仍可測得BZD類藥物與其

代謝物，然而受害婦女往往要經過數周之心理調適，才會報案，因此使用毛髮檢體進行 BZD 類藥物之檢驗更顯其重要<sup>17-21</sup>，然而此藥物即使經常性使用，毛髮中濃度也只是數十 pg/mg-hair而已，在偵測上已屬不易；若要偵測被下藥迷昏(一次使用)，更常是無能為力，無法幫助被害者取得證據。

本計畫將針對上述毛髮檢驗的兩個重要課題，嘗試提出解決的方案：計畫第一部分將針對毛髮檢驗初篩方法進行方法開發。雖然目前的毛髮免疫初篩方法仍有費工費時的問題，然而毛髮初篩檢驗還是有其必要，透過良好的初篩方法，可迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，減少確認檢驗之負擔，達到增加檢驗時效性的目的。同時，良好的初篩方法可以知道確認檢驗欲分析的藥物為何，濃度高低如何，與藥物在頭髮存在之部位等資訊，因此本研究已建立較方便之免疫初篩方法，並嘗試建立nanoSpray-LC/MS/MS之質譜初篩方法與DESI毛髮表面質譜直接分析之初篩方法。分析之藥物將針對國內常見之藥物：鴉片類藥物（含6-A M、Morphine及Cocaine）、安非他命類藥物（含Methamphetamine及Amphetamine、MDMA及MDA及MDEA）與K他命等進行測試。

計畫第二部分將針對頭髮中天生低含量之藥物，包含大麻與BZD類藥物，進行方法之改進，以提昇檢測該類藥物之靈敏度。目前已完成GC/NCI-MS之方法評估，並進行大體積注射裝置(PTV)之方法評估，可得到數十倍之靈敏度提升，有效突破毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。

# 貳、材料與方法

## 2-1 藥品與試劑

甲醇(Methanol)，乙醇(Eethanol)，異丙醇(Isopropanol)，二氯甲烷(Dichloromethane)，氨水(Ammonium hydroxide)，乙晴(Acetonitrile)，醋酸(acetic acid)，鹽酸(Hydrochloric Acid)，醋酸乙酯(Ethyl acetate)，氫氧化鈉(Sodium Hydroxide)，磷酸鹽緩衝溶液(Potassium dihydrogen phosphate)皆購買自MERCK公司(Darmstadt, Germany)。醋酸銨(Ammonium acetate solution)，碳酸氫銨(Ammonium bicarbonate)，三氟醋酸(Trifluoroacetic acid 99%)、衍生試劑Heptafluoro butyric acid anhydride (HFBA)購買自Sigma公司(MO,USA)。固相萃取管C18-OH(Bond Elut Certify)購買自Varian公司(CA,USA)。

安非他命(Amphetamine, AP)、甲基安非他命(Methamphetamine, MA)、MDA(3,4-Methylenedioxyamphetamine)、MDMA(3,4-Methylenedioxymethamphetamine)、MDEA(3,4-Methylenedioxyethamphetamine)、K他命(Ketamine, K)、Norketamine(NK)、嗎啡(Morphine, MOR)、可待因(Codeine, COD)、6-乙醯嗎啡(6-monoacetyl-morphine, 6-AM)、古柯鹼(Cocaine, COC)、Benzoylcegonine(BZE)及其穩定同位素內標準品( $d_5$ -Amphetamine,  $d_5$ -Methamphetamine,  $d_5$ -MDA,  $d_5$ -MDMA,  $d_5$ -MDEA,  $d_4$ -Ketamine,  $d_4$ -Norketamine,  $d_3$ -Morphine,  $d_3$ -Codeine,  $d_3$ -6-monoacetylmorphine,  $d_3$ -Cocaine,  $d_3$ -BZE)皆購買自Cerilliant公司(Texas, USA)。

免疫試劑：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）

## 2-2 標準品與內標準品儲存溶液製備

### (一) 標準品儲備溶液：

分別取1.0 mL 之1.0 mg/mL 市售預定分析之藥物標準溶液置於10 mL 定量瓶中，以50%甲醇稀釋成10 mL，即配製成0.1 mg/mL之儲備標準品，以微量吸管吸取1.0 mL，並分裝儲存於-20°C之冰箱。

### (二) 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，以50%甲醇稀釋成10 mL，即配製成10 µg/mL 之標準品工作溶液。

### (三) 內標準品儲備溶液：

分別取1.0 mL 之1.0 mg/mL 之預分析藥物氙化溶液置於10 mL 定量瓶中，以50%甲醇稀釋成10 mL，即配製成0.1 mg/mL之儲備內標準品，以微量吸管吸取1.0 mL，分裝於小棕色瓶中，儲存於-20°C之冰箱中。

### (四) 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，以50%甲醇稀釋成10 mL，即配製成10 µg/mL 之內標準品工作溶液。

### (五) 實驗試劑儲存溶液置備：

0.1 M Phosphate Buffer：取 100 mL D.I. water 加入 500 mL 的定量瓶中，再倒入 6.80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( 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值為5.0，本試劑貯存於 4°C 下。

## 2.3 免疫初篩方法評估

### (一) 酵素免疫分析儀：

1. 酵素免疫分析儀HITACHI 7170
2. 酵素免疫分析儀Olympus AU600
3. 氣相層析質譜儀：本研究所使用的氣相層析質譜儀（GC/MS）為安捷倫（Agilent）公司之6890型氣相層析儀，搭配5973 inert型四極式質譜儀。

### (二) 固相萃取回收率評估

以phosphate buffer 浸泡取出毛髮中濫用藥物時，會因不同濃度及pH值之phosphate buffer 而影響其萃取能力，因此需要一一審慎評估，評估步驟如下：

1. 分別配製0.1M pH 4-9之phosphate buffer各1 mL。
2. 各加入標準品AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 300 pg/mg hair，MOR、COD、6-AM 200 pg/mg hair。
3. 萃取
  - a. Rinse萃取管：0.5 mL methanol及0.5 mL pH 6 phosphate buffer。
  - b. 將檢體倒入固相萃取管中
  - c. Wash萃取管：1 mL deionised water，0.5 mL 0.1 M acetic acid，1 mL methanol。
  - d. 抽乾萃取管10-20 inHg 5 min

4. Elute : 加入2 mL Elution solution ( Dichloromethane : 2-propanol : ammonium hydroxide (80:20:2, v/v/v)) , 收集沖出物。
5. 加入AP-d5、MA-d5、MDA-d5、MDMA-d5、K-d4、NK-d4 300 pg/mg hair , MOR-d3、COD-d3及6-AM-d3 200 pg/mg hair。
6. 加入50  $\mu$ L 1% acid methanol , 震盪。
7. 55  $^{\circ}$ C 氮氣吹乾
8. 衍生 : 加入50  $\mu$ L HFBA及50  $\mu$ L EA , Oven 70 $^{\circ}$ C 30 min
9. 55  $^{\circ}$ C 氮氣吹乾 , 加入50  $\mu$ L EA回溶 , 每次打入2  $\mu$ L進入GC-EI/MS 分析。
10. 每一分析做三重覆 , 並與對照組 ( 未經萃取步驟 ) 比較回收率之百分比及其SD值 , 藉此評估不同phosphate buffer對毛髮之萃取能力。

### (三) 毛髮初篩檢驗方法

1. 將校正液 ( AP、MDA ) 以 0.1M pH 7 phosphate buffer配製成0、300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度 , 校正液 ( MOR ) 配製成0、200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度。
2. 評估最佳酵素免疫分析儀 : Hitachi 7170與OLYMPUS AU 600設定相同儀器條件 , Reagent A 125  $\mu$ L ; Reagent B 125  $\mu$ L ; 檢體吸取量則選擇最大吸取量35  $\mu$ L , 分析後並各以其OD值及濃度繪製圖表及計算R<sup>2</sup> 值。
3. 最佳化設定值 : 調整OLYMPUS AU 600儀器設定條件 : Reagent A :

60  $\mu\text{L}$ 、75  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、120  $\mu\text{L}$ 、125  $\mu\text{L}$ ；Reagent B：60  $\mu\text{L}$ 、75  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、120  $\mu\text{L}$ 、125  $\mu\text{L}$ ；檢體吸取量選擇35  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ ，分析後紀錄其OD值變化。

4. 以原始設定值及最佳化設定值分析AP、MOR、MDA，各測定3次，並製表比較其 $\Delta\text{OD}$ 值變化。

### (三) 毛髮之初篩檢驗方法確效評估

#### 1. 酵素免疫分析偵測極限評估

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。LOD主要為用來衡量儀器之偵測能力，且可藉由此數值做為儀器購置、儀器功能比較或檢測方法選用之參考用。

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. 檢量線建立

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 pH 7 phosphate buffer 配製成0、100、300、1000、2000 pg/mg Hair 之濃度，校正液 (MOR)，分別配製成0、100、200、1000、2000 pg/mg Hair 之濃度。直接進入OLYMPUS AU 600 分析。分析後各以其 $\Delta OD$ 值繪製圖表及分析計算 $R^2$ 值。

## 3. 精密度、準確度評估

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，AP、MDA 分別配製成300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度，MOR 配製成200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度各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為AP、MDA分別配製成300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度，MOR配製成200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度各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。

準確度的評估為AP、MDA分別配製成300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度，MOR配製成200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度各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。

#### (四) 真實檢體初篩檢驗之分析

毛髮真實檢體來自於台中監所中濫用藥物受刑人之毛髮，共收集38個真實檢體進行初篩檢驗分析。

1. 去除外部污染：加入2 mL Dichloromethane清洗毛髮檢體震盪5分鐘以去除外部污染，隨後將試管中Dichloromethane倒掉，以氮氣將毛髮中殘留的溶劑吹乾。
2. 前處理：毛髮秤重 50 mg，剪碎 (1-2mm)，置入1 mL 0.1M pH 7 之 phosphate buffer 浸泡，18小時取出、離心後直接進入OLYMPUS AU 600 分析。

## (五) 毛髮中濫用藥物之GC/MS確認檢驗

### 1. 毛髮標準品測試

取標準品AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 300 pg/mg Hair，MOR、COD、6-AM 200 pg/mg Hair，在55°C條件下用氮氣吹乾，加入衍生化試劑HFBA 50  $\mu$ L 和EA 50  $\mu$ 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  $\mu$ L回溶，每次打入2  $\mu$ L進入GC-EI/MS分析，確認標準品圖譜。

### 2. 檢量線建立

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。先將所要分析的標準品（AP、MA、MDA、MDMA、K、NK），分別配製成20、40、60、300、1000 pg/mg Hair 之濃度，再加入內標準品 300 pg/mg Hair。另外標準品（MOR、COD、6-AM），分別配製成40、100、200、400、800 pg/mg Hair 之濃度，再加入內標準品 200 pg/mg Hair，氮氣吹乾後進行衍生化，衍生化結束後再次吹乾，並用EA 50  $\mu$ L 回溶，每次打入1  $\mu$ L進入GC/MS分析。本研究所發展之分析方法使用內標法，以校正儀器訊號之變異與樣品前處理之損失。

### 4. 精密度、準確度評估

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)，乘以百分比，即得變動係數。CV值愈小，表示愈精密。

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，其與接近實際值的差異百分比 (%)，測定值平均值越接近於實際值準，代表確度越好。

在我們的研究中，精密度的評估為選取檢量線低、中、高濃度三點，分別為100、300、1000 pg / mg Hair，各配製3管，將每個濃度點所得到的3次分析圖譜，帶入分析方法建立之檢量線，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精密度評估。

準確度的評估分別為100、300、1000 pg/mg，依本研究分析方法由低濃度開始依序進行儀器分析，儀器所得訊號分別帶入分析方法建立之檢量線，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，即為本研究準確度評估。

#### (六) 初篩檢驗及確認檢驗之方法相關係數評估

當有兩種不同的方法、材料或資料要比較時，必須以相關係數 (Correlation coefficient) 加以評估。相關係數最大值為1，r值如果等於1，且通過原點，表示線性關係完全一致。通常 $r > 0.95$ 即可視為一致；若 $r < 0.95$ 表示兩組不一致。

在本研究中，以EMIT 與 GC/MS兩種不同方法測定相同檢體所得之測定值帶入統計軟體中計算，即得兩種不同方法之相關係數值。

#### (七) ROC (Receiver Operating Characteristic) 分析

統計所有真實檢體偽陽性 (FP：即EMIT初步檢驗分析為陽性，

但是/GC/MS確認檢驗分析為陰性)、偽陰性 (FN: 即EMIT初步檢驗分析為陰性, 但是/GC/MS確認檢驗分析為陽性)、真陽性 (TP: 即EMIT初步檢驗分析為陽性, 而GC/MS確認檢驗分析也為陽性)、真陰性 (TN: 即EMIT初步檢驗分析為陰性, 而GC/MS確認檢驗分析也為陰性)。並計算其敏感性 ( $Sensitivity=TP/(TP+FN)$ ) 及特異性 ( $Specificity=TN/(TN+FP)$ )。將數值帶入ROC 分析中, 以求出以EMIT分析AP、MOR、MDMA之最佳Cut-off值。

## 2.4 脫附電灑法 (DESI) 於毛髮初步檢驗

脫附電噴灑游離設備由實驗室自行組裝, 無控溫及加壓裝置。將裝置加裝在三維離子阱電灑法質譜儀LCQ™ classic (Finnigan MAT; San Jose, CA, USA)之大氣壓下游離介面前端。並搭配額外針式幫浦 (syringe pump) 所改裝之可變速率線性微動載物平台。離子源之氬氣供應與電源供應來自於質譜儀本體。

### (一) 儀器裝置:

(1) 加熱毛細管的延長: 由於LCQ 大氣壓下游離界面在移動及調整上較為不便, 因此採取以一去除了接合塑膠針筒接座部分的 22G 針頭 (內徑48  $\mu\text{m}$ ) 直接插入LCQ的加熱毛細管部份, 可加長3 cm。

(2) 加強進樣真空: 由於(1)步驟將會導致之進入孔內徑縮小, 導致進入分析器的離子數因此減少, 而為了增加進入真空之離子數目, 我們加裝一 Edward30之機械幫浦(rough pump)。使capillary/skimmer 區域的真空從 1.5mTorr 降至 0.8 mTorr。

(3) DESI電灑噴頭組裝: 將一移液管塑膠尖頭(10 $\mu\text{l}$ ) 後端塞入經

剪裁過之septum (GC inlet 用, i.d.=6mm), 使之緊密結合, 再將拉尖至 50 $\mu$ m 之毛細管(內徑50  $\mu$ m, 外徑360  $\mu$ m)穿過菊色 PEEK管(外徑1/16 inch; 內徑0.02 inch), 其中拉尖毛細管負責輸送噴灑液體, PEEK管輸送鞘流氣體(氮氣)。最後將上述自行組裝噴嘴架設於具X、Y、Z 三軸微調平台上, 並將平台上之可動角進行微動調整, 使自行組裝噴嘴調至適當噴灑位置與角度。

(4)可動載物平台: 載物平面使用顯微鏡用載玻片, 置放於穩定平整之線性軌道上, 使軌道移動方向垂直於噴灑方向, 最後使用另一針筒式幫浦, 作為移動速率控制之驅動裝置。

## (二) 實驗評估:

### (1)脫附電噴灑法 直接分析 (Direct analysis)

以馬克筆在載玻片上畫出直徑約1mm的紅色點, 放置在載物台上靜止。取適當長度毛細管(約10cm), 拉製適當口徑的毛細管噴頭, 即直接在毛細管的末端懸掛重物, 以溫度高達1300  $^{\circ}$ C的微型火炬噴槍燒融、拉斷, 此時尖端呈封閉狀, 再以氫氟酸侵蝕5 分鐘, 開口約50  $\mu$ m, 以去離子水沖去內外管殘餘的氫氟酸終止蝕刻。將拉好尖端之毛細管裝置在脫附電噴灑游離噴頭上, 利用針式幫浦以流速每分鐘2 $\mu$ l/min的方式, 將溶劑隨高流速氮氣對準羅丹明B點45度角噴射出。電灑高電壓加至4.5kV, 再調機m/z=443至最佳化。

### (2) 探討脫附電噴灑游離法之參數最佳化

#### 1. 電灑電壓及溶劑推送流速最佳化

在載物台靜止的情況下進行，使用直接分析所建立之最佳化分析器條件，進行噴灑電壓及溶劑推送速率之最佳化。

(a)首先固定溶劑流速在 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  對噴灑電壓進行探討，(1KV-8KV)。結果評估為求取  $m/z$  443之平均值(20 張圖譜)，並進行三次重複性實驗，計算其標準差。

(b)固定電壓在(1)所得出最佳電壓參數，改變其溶劑推送流速。參數改變值為0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、1  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、2  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。結果評估仍為求取  $m/z$  443之平均值(20 張圖譜)，並進行三次重複性實驗，計算其標準差。

## 2. 載物平台移動速率最佳化

使用上述所得之最佳電壓與最佳溶劑流速，在不同載物台移動速率下，連續偵測長為 20mm 的 Rotamine B訊號。參數改變值為 5 mm/min、10 mm/min、20 mm/min、30 mm/min、60 mm/min、100 mm/min。結果評估仍為求取  $m/z$  443之平均值(20 張圖譜)，並進行三次重複性實驗，計算其標準差。

## 2.5 以大體積注射提升毛髮中低濃度藥物之靈敏度

### (一) 大麻之檢驗

#### (1) 分析方法

本方法操作在GC/NCI-MS下，實驗取50  $\mu\text{L}$ 標準品(THCA，1 ng/ $\mu\text{L}$ )及內標準品(1 ng/ $\mu\text{L}$ )，在55 $^{\circ}\text{C}$ 下以氮氣吹乾，隨後加入50  $\mu\text{L}$  PFPA及10  $\mu\text{L}$  HFIP，在70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱進行30分鐘衍生化反應，每次打入1

μL 進入GC/NCI-MS分析，建立個別藥物相關質譜裂解圖譜，與得到可行之GC分離條件。

注射埠溫度為280°C，採用非分流之注射方式，每次注入1μL，升溫程式為：初溫150°C，維持1分鐘後，以20°C/min升至210°C，維持0.1分鐘；以20°C/min升至240°C，維持0.1分鐘；以20°C/min升至250°C，維持0.1分鐘，最後再以20°C/min升至280°C，維持3.7分鐘。總計一次分析時間為12分鐘。

## (2) 使用儀器

Thermo Trace GC Ultra-DSQII 氣相層析質譜儀，氣體流速：Carrier gas flow: 氮氣:1ml/min，Reagent gas flow: 氮氣:2.5ml/min。

PTV-Large Volume mode (升溫程式)

起始溫度為50°C維持0.2分鐘，以每分鐘10°C上升至100°C維持1分鐘 (evaporation)，接著以每分鐘10°C升至250°C維持0.5分鐘 (transfer)，再以每分鐘10°C升至290°C維持12分鐘 (clean)。

(質譜條件)

THCA在NCI下選擇SIM 之目標離子

名稱	分子量	離子	內標
THCA	344	<u>620,472,475</u>	<u>623,475,495</u>



## (二) 苯二氮平類藥物之同時檢驗

### (1) 分析方法

本實驗操作在 GC/NCI-MS 下，方法設計為同時分析 Triazolam、Flunitrazepam、Alprazolam、Diazepam、Nordiazepam、Temazepam、Oxazepam、Lorazepam、Nitrazepam 等 9 個藥物或其代謝物，實驗為各取 100  $\mu$ L 之標準品及內標準品 (1 ng/ $\mu$ L)，在 55 $^{\circ}$ C 下以氮氣吹乾，隨後加入 100  $\mu$ L 衍生化試劑 BSTFA，在 90 $^{\circ}$ C 烘箱進行 30 分鐘衍生化反應，每次打入 1  $\mu$ L 進入 GC/NCI-MS 分析，建立個別藥物相關質譜裂解圖譜與得到可行之 GC 分離條件。

注射埠溫度為 270 $^{\circ}$ C，採用非分流之注射方式，每次注入 1  $\mu$ L，升溫程式為：初溫 150 $^{\circ}$ C，維持 0.5 分鐘後，以 40 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C，維持 0.1 分鐘；最後再以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 295 $^{\circ}$ C，維持 5 分鐘。總計一次分析時間為 15.85 分鐘。下表為 SIM 所選擇離子之質荷比。

BZD 藥物在 NCI 下選擇 SIM 之目標離子

名稱	分子量	離子	內標
Nordiazepam	270	<u>342,234</u>	<u>239,347</u>
Oxazepam	286	<u>268</u>	
Diazepam	284	<u>284</u>	<u>289</u>
Lorazepam	320	<u>302</u>	<u>306</u>
Nitrazepam	281	<u>353</u>	<u>358</u>
Temazepam	300	<u>372</u>	
Flunitrazepam	313	<u>313</u>	<u>320</u>
Alprazolam	308	<u>308</u>	<u>313</u>
Triazolam	342	<u>306</u>	<u>310</u>

## (2) 使用儀器

Thermo Trace GC Ultra-DSQII 氣相層析質譜儀，氣體流速：Carrier gas flow: 氮氣:1ml/min，Reagent gas flow: 氮氣:2.5ml/min。

PTV-LV mode：起始溫度為50°C維持0.2分鐘，以每分鐘14.5°C上升至200°C維持1分鐘(evaporation)，接著以每分鐘10°C升至270°C維持0.5分鐘 (transfer)，再以每分鐘10°C升至270°C維持14分鐘(clean)。

# 叁、結果與討論

## 一、建立毛髮檢驗初篩方法:

### 【1】EMIT免疫初篩方法之建立：

#### 1.1毛髮浸泡方式選擇及固相萃取回收率評估結果

目前常見取出毛髮中濫用藥物的方式有Methanol浸泡、酸水解 (acid hydrolysis)、鹼水解 (alkaline hydrolysis)、緩衝液 (buffer) …等。顧及毛髮檢體量少且得之不易，我們需同時評估並選擇一種對初步篩檢及確認檢驗最適合之毛髮浸泡方式。

毛髮浸泡方式中，以酸或鹼水解浸泡後，毛髮會完全被破壞且呈現墨化均質現象，除了會在初步篩檢時干擾酵素免疫分析儀之比色分析，另外，酸或鹼水解雖然可以完全取出毛髮中濫用藥物，但其強酸強鹼的特性更是會直接破壞藥物結構，例如導致6-AM會水解成MOR，在確認檢驗中無法區分是海洛因或嗎啡濫用。而在過去文獻中<sup>20</sup>指出，使用phosphate buffer 浸泡與0.1N HCL酸水解取出毛髮中濫用藥物，6-AM會水解成MOR的比例分別為 46.4% 及 1.3%。另外，使用Methanol浸泡後做初步篩檢，則會有易揮發導致濃度不準確的問題。因此，在兼顧方便與準確的原則下，我們選擇了以 phosphate buffer 的毛髮浸泡方式，溫和取出毛髮中濫用藥物。隨後，進而審慎評估：不同濃度及 pH 值之 phosphate buffer 之萃取能力與6-AM 之穩定度。每一分析做三重覆，並與對照組（未經萃取步驟）比較回收率之百分比及其SD值，藉此評估出最適用於在本研究中之毛髮萃取之phosphate buffer。

由結果可知AP、MA 在 pH 6 phosphate buffer中回收率最好 (96.56%、103.11%)；MDA在pH 6 phosphate buffer中回收率最好 (98.56%)；MDMA在pH 7 phosphate buffer中回收率最好 (95.67%)；NK、K在pH 6 phosphate buffer中回收率最好 (86.00%、90.78%)；Cod在pH 7 phosphate buffer中回收率最好 (90.50%)；Mor在pH 7 phosphate buffer中回收率最 (82.00%)；6-AM在pH 8 phosphate buffer中回收率最好 (90.00%)。

在過去文獻中，於2003年F.S Romolo等人<sup>22</sup>，同樣以phosphate buffer 浸泡取出毛髮中濫用藥物 (MOR、COD、6-AM、cocaine及 benzoylecgonine)，並評估不同pH值之phosphate buffer 其萃取能力，其結果顯示：Mor在pH 7 phosphate buffer中回收率最 (97.8%)；6-AM在pH 8 phosphate buffer中回收率最好 (98.1%)。Cod在pH 9 phosphate buffer中回收率最好 (93.5%)。其評估結果與本研究評估結果相同，鴉片類藥物皆在phosphate buffer pH 7-9 下回收率最好。

然而，為了提升毛髮中濫用藥物檢測能力與分析的效率，發展同時檢測鴉片類藥物、安非他命類藥物、K他命之初篩檢驗及確認檢驗方法，經評估 phosphate buffer 對毛髮之萃取能力後，我們選擇對所有濫用藥物回收率、萃取能力與6-AM 之穩定度最適合 的0.1M pH 7 phosphate buffer為毛髮浸泡方式。

## 1.2 EMIT 初篩檢驗方法最佳化評估

在國內，尿液中濫用藥物之初篩檢驗的法規陽性閾值為：安非他命類藥物為 500 ng/ml urine，鴉片類藥物為 300 ng/ml urine。而依照

美國健康與人類服務部 (DHHS : U.S. Department of Health and Human Services) 的藥物濫用與心理健康服務署 (SAMHSA : Substance Abuse and Mental Health Services Administration) mandatory guidelines<sup>21</sup>, 毛髮中濫用藥物之確認閾值為AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 300 pg/mg hair, MOR、COD、6-AM 200 pg/mg hair, 約略是尿液陽性閾值的 1/30, 因此相對來說是相當微量。因此, 我們在執行毛髮初步篩檢時, 必須要找出分析之最佳化條件, 包括最佳酵素免疫分析儀、篩檢試劑吸取量、檢體吸取量...等, 以求得最佳化之毛髮初篩之微量分析結果。

首先, 我們以實驗室現有的 Hitachi 7170 酵素免疫分析儀為執行初步篩檢之儀器, 在儀器設定條件部分, 試劑吸取量為: Reagent A 125  $\mu$ L; Reagent B 125 $\mu$ L; 檢體吸取量則設定為35  $\mu$ L。而校正分析方式則設定為廠商建議最適用於毒藥物分析之方法: Sp-line 進行毛髮初篩之微量分析。另外, 將校正液 (AP、MDA) 以 0.1M pH 7 phosphate buffer配製成0、300、600、1200、2000 pg/mg Hair 濃度, 校正液 (MOR) 配製成0、200、600、1200、2000 pg/mg Hair 濃度並分析之。在本研究中皆使用MDA校正液, 而非MDMA校正液, 其原因為: 在台灣毒品市場中, 販毒者有販賣內容物只含MDA的藥錠, 因此吸毒者檢體中也可能只含MDA的成分。然而, 由DRI所製造的MDMA免疫試劑, 經原廠分析後發現, 其對MDA之 Cross reactivity 只有56%, 分析中可能存在偽陰性的風險。為避免偽陰性存在的風險, 我們則選擇以MDA進行分析。分析後紀錄其濃度與OD值之間的變化。

然而, 經多次實驗後, 我們從結果發現, 當以Hitachi 7170分析上述濃度時, 其濃度與OD值之間的變化常會有不穩定且飄移的現

象，較不適合用於執行微量的毛髮中濫用藥物初步篩檢。也因此，我們只好去評估另一款的酵素免疫分析儀(OLYMPUS AU 600)，希望能進行在毛髮初篩之微量檢驗上之適用性。

實驗結果發現：OLYMPUS AU 600在進行在毛髮初篩之微量檢驗上之有較佳的適用性。在Hitachi 7170 與OLYMPUS AU 600之試劑吸取量以及檢體吸取量，皆設定在相同條件下進行分析與比較：Reagent A 125  $\mu$ L；Reagent B 125 $\mu$ L；檢體吸取量則設定為 35  $\mu$ L。

我們比較Hitachi 7170 與OLYMPUS AU 600在執行分析時，其濃度與OD值之間的變化與 $R^2$ ，做為選擇最適用微量分析的酵素免疫分析儀方式。而校正分析方法則設定為該廠商建議之最適用於毒藥物分析之方法。

由上述分析，我們可繪製出AP、MOR、MDMA其OD值比較圖(圖1)，並以線性迴歸法(Linear Regression)評估其對應關係。線性迴歸法是一種估計應變數與自變數間的線性關係的統計分析方式，目的在透過這種關係而以自變數來預測應變數。以迴歸方程式(Regression equation)  $Y = mX + a$ 表示， $m$ 是線性的斜率(Slope)， $a$ 是Y軸的截距(Intercept)。另計算其 $R^2$ 值。 $R^2$ 值又稱為「決定係數」，具有消減誤差比例(PRE: proportion reduced error)之意義，也就是以一個變項預測另一個變項時，所能減少的誤差百分比。舉例來說，若 $R^2 = 0.85$ ，則表示以X來預測Y時，可減少85%的誤差。

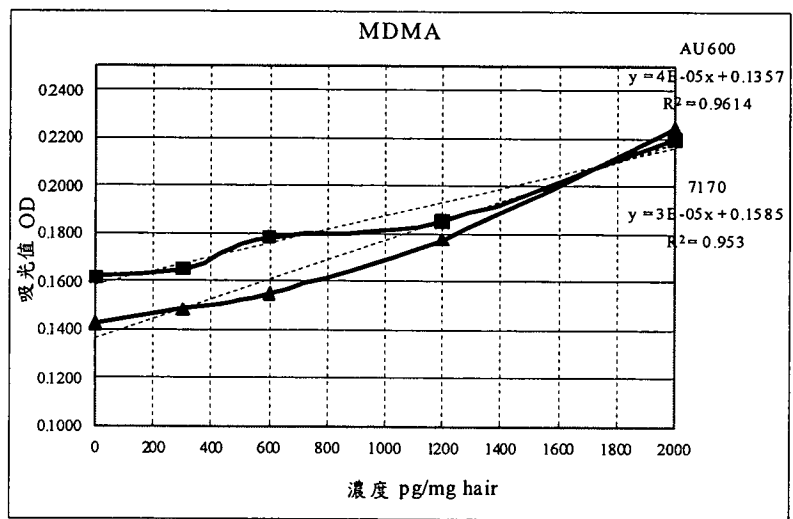
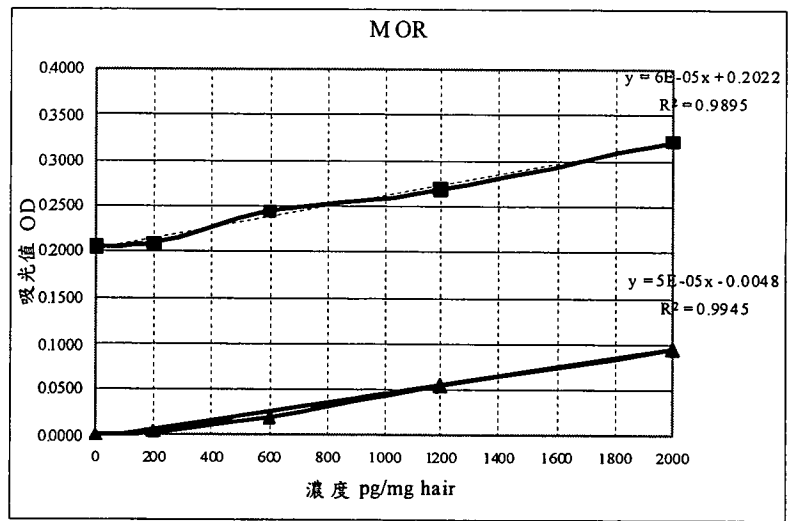
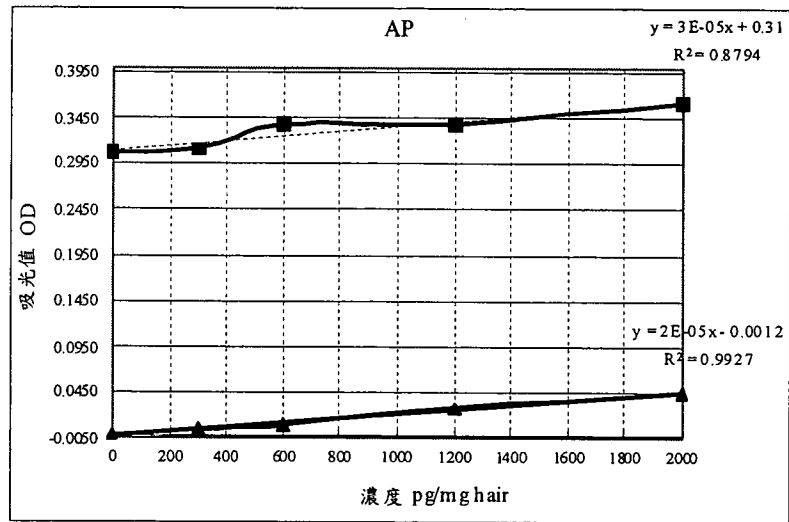
分析AP、MOR或MDMA得到之 $R^2$ 值、斜率、截距列於表1。從圖表中可清楚看到，不論是在分析AP、MOR或MDMA，以OLYMPUS AU 600分析之OD值變化都較Hitachi 7170穩定。在分析AP時，以Hitachi 7170分析所得到之 $R^2$ 值為0.8794，以OLYMPUS AU 600分析

得到之 $R^2$  值為0.9927;分析MOR時,以Hitachi 7170分析得到之 $R^2$  值為0.9895,以OLYMPUS AU 600分析得到之 $R^2$  值為0.9945;分析MDMA時,以Hitachi 7170分析得到之 $R^2$  值為0.953,以OLYMPUS AU 600分析得到之 $R^2$  值為0.9614。

從結果可了解,以OLYMPUS AU 600在進行毛髮中濫用藥物微量分析時,能減少的誤差百分比較以Hitachi 7170要多,也就是說,OLYMPUS AU 600對微量分析的準確度較佳。

另外,由表2可知,分析AP、MOR及MDMA之精密度及準確度時,以OLYMPUS AU 600分析得到結果(CV% 皆小於8.05;Accuracy % 皆大於93.34)皆比以Hitachi 7170佳(CV% 皆小於20;Accuracy % 皆大於33.33)。因此,針對最佳酵素免疫分析儀評估,OLYMPUS AU 600是較適當的選擇。

當確定選擇OLYMPUS AU 600為毛髮中濫用藥物初篩檢驗儀器後,仍需探討OLYMPUS AU 600分析之最佳化條件,才能使儀器發揮微量分析最大效應。而為了避免加入過多的反應試劑導致稀釋效應產生,包括最佳化之篩檢試劑吸取量、檢體吸取量...等,皆須納入評估考量,以求得最佳化之AP、MOR或MDMA微量分析方式。



\* ▲ OLYMPUS AU 600 ■ HITACHI 7170

圖1 EMIT分析毛髮中AP、MOR、MDMA 之OD值



表1 分析AP、MOR及MDMA得到之R<sup>2</sup> 值、斜率、截距

項目	機型	R <sup>2</sup>	斜率	截距
	OLYMPUS AU600	0.9927	2.36622E-05	-0.001183
	HITACHI 7170	0.8794	2.63505E-05	0.30995
	OLYMPUS AU600	0.9945	4.95455E-05	-0.004756
	HITACHI 7170	0.9895	5.88106E-05	0.202232
	OLYMPUS AU600	0.9614	4.11511E-05	0.135656
	HITACHI 7170	0.9530	2.86329E-05	0.158481

表2 不同儀器分析AP、MOR及MDMA之精密度及準確度

HITACHI 7170				
pg/mg hair	MEAN	SD	CV%	Accuracy %
AP				
300	200.00	20.00	10.00	66.67
1200	900.00	40.00	4.44	75.00
MOR				
200	180.00	0.00	0.00	90.00
1200	1173.33	11.55	0.98	97.78
MDMA				
300	100.00	20.00	20.00	33.33
1200	1113.33	11.55	1.04	92.78

OLYMPUS AU600				
pg/mg hair	MEAN	SD	CV%	Accuracy %
AP				
300	340.00	20.00	5.88	113.33
1200	1246.67	30.55	2.45	103.89
MOR				
200	186.67	11.55	6.19	93.34
1200	1213.33	11.55	0.95	101.11
MDMA				
300	286.67	23.09	8.05	95.56
1200	1193.33	11.55	0.97	99.44

首先，將校正液（AP、MDA）以 0.1 M pH 7 phosphate buffer 配製成 0、300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度，校正液（MOR）配製成 0、200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度。另外，在調整檢體吸取量部分，由於毛髮中濫用藥物之確認閾值相當微量，因此必須調整檢體吸取量至 OLYMPUS AU 600 設定極限 50  $\mu$ L，以提供足夠的抗原反應。而在最佳化之篩檢試劑吸取量設定部份，在 OLYMPUS AU 600 使用手冊上規範之最低檢知液量為 150  $\mu$ L，扣除掉極限檢體吸取量 50  $\mu$ L，我們嘗試將試劑吸取量 Reagent A: antibody/substrate ; Reagent B: Enzyme conjugate 做多組測試實驗(表 3)，以 OLYMPUS AU 600 分析後紀錄其 OD 值，以期找出在最少試劑吸取量下，能降低稀釋效應而達到最佳化分析狀態。

表 3-4 改變試劑吸取量對不同濃度下 AP、MOR 及 MDMA 之 OD 值

濃度 (pg/mg hair)		試劑吸取量 ( $\mu$ L)				
		AP 0	AP 100	AP 300	AP 1000	AP 2000
A:60	B:60	×	×	×	×	0.0092
A:75	B:75	×	×	×	-0.0014	0.0329
A:100	B:100	×	×	×	0.00212	0.0553
A:120	B:120	×	-0.0006	0.0065	0.0276	0.0577
A:125	B:125	-0.0005	0.0038	0.0089	0.0284	0.0585
A:60	B:125	0.0129	0.0299	0.0570	0.1090	0.1402
		MOR	MOR	MOR	MOR	MOR
		0	100	200	1000	2000
A:60	B:60	×	×	×	×	×
A:75	B:75	×	×	×	0.0482	0.1058
A:100	B:100	×	×	-0.0014	0.0600	0.1184
A:120	B:120	-0.0023	0.0003	0.0058	0.0602	0.1181
A:125	B:125	0.0004	0.0032	0.0090	0.0592	0.1157
A:60	B:125	×	×	×	0.0072	0.0316
		MDMA	MDMA	MDMA	MDMA	MDMA
		0	100	300	1000	2000
A:60	B:60	0.1040	0.1063	0.1112	0.1475	0.2040
A:125	B:125	0.1408	0.1418	0.1447	0.1577	0.2016

從表3 可清楚了解改變試劑吸取量對AP、MOR及MDMA在不同濃度下之OD值變化。在本研究中發現，分析AP、MOR時，不足量的Reagent A：antibody/substrate（包含monoclonal anti-drugs antibody、G6P、NAD）；Reagent B：Enzyme conjugate（包含Drugs labeled G6PDH），會導致無法進行酵素免疫反應，導致測定不到其OD值變化。

在分析AP部分，當調整儀器設定條件：Reagent A 125  $\mu$ L、Reagent B 125  $\mu$ L即有更好的OD值變化出現。然而，為了減少稀釋效應產生，我們嘗試將Reagent A：antibody/substrate 設定量調整為60  $\mu$ L來參與競爭反應，而Reagent B：Enzyme conjugate保持足量以進行反應。分析後發現，的確可提升微量分析之 $\Delta$ OD值。因此，AP之最佳化微量分析為：調整儀器設定條件：Reagent A 60  $\mu$ L、Reagent B 125  $\mu$ L、檢體吸取量選擇最大吸取量50  $\mu$ L。

在分析MOR部分，當調整儀器設定條件：Reagent A 120  $\mu$ L、Reagent B 120  $\mu$ L即有較佳之OD值變化出現。而為了降低稀釋效應產生，我們嘗試將Reagent A：antibody/substrate 設定量調整為60  $\mu$ L來參與競爭反應，而Reagent B：Enzyme conjugate保持足量以進行反應。在分析後卻發現，同樣的設定模式，在AP分析是可行的，但是針對MOR的分析，假若給予不足量的Reagent A：antibody/ substrate（包含monoclonal anti-drugs antibody、G6P、NAD）卻會導致沒有足夠的substrate（G6P、NAD）進行反應，因此，縱使含有足夠的Reagent B：Enzyme conjugate（包含Drugs labeled G6PDH），也無法將在NAD 轉換成NADH，無法在340 nm 產生吸光值。因此，MOR之最佳化微量分析為：調整儀器設定條件：Reagent A 120  $\mu$ L、Reagent B 120  $\mu$ L、

檢體吸取量選擇最大吸取量50  $\mu\text{L}$ 。

在分析MDMA部分，在OLYMPUS AU 600使用手冊上規範之最低檢知液量為150  $\mu\text{L}$ ，當調整儀器設定條件：Reagent A 60  $\mu\text{L}$ 、Reagent B 60  $\mu\text{L}$ ，即有更佳的OD值變化出現。達到以最少量的試劑吸取量來避免稀釋效應產生。因此，MDMA之最佳化微量分析為：儀器設定條件：Reagent A 60  $\mu\text{L}$ 、Reagent B 60 $\mu\text{L}$ 、檢體吸取量選擇最大吸取量50  $\mu\text{L}$ 。

表4，列出AP、MOR、MDMA 之原始設定值及最佳化設定值。由於毛髮中濫用藥物非常微量，我們在設定檢體吸取量部分，皆從原本的35 $\mu\text{L}$ 改為設定極限檢體吸取量50  $\mu\text{L}$ ，增加1.4倍的藥物抗原量，以增加其與抗體之間的反應。另外，我們也將試劑吸取量減少，降低稀釋效應，使抗原抗體反應更完全。在圖2中我們將AP、MOR及MDMA以原始設定值及最佳化設定值各分析測定3次之 $\Delta\text{OD}$ 值變化。從圖中可了解，在經過最佳化設定分析後，其分析之 $\Delta\text{OD}$ 值變化皆比未經最佳化之 $\Delta\text{OD}$ 值變化明顯，可提升對微量分析的能力。

表4 AP、MOR、MDMA 之原始設定值及最佳化設定值

項目	OLYMPUS AU 600	Reagent A ( $\mu\text{L}$ )	Reagent B ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )
	原始設定值	125	125	35
	最佳化設定值	60	125	50
	原始設定值	125	125	35
	最佳化設定值	120	120	50
	原始設定值	125	125	35
	最佳化設定值	60	60	50

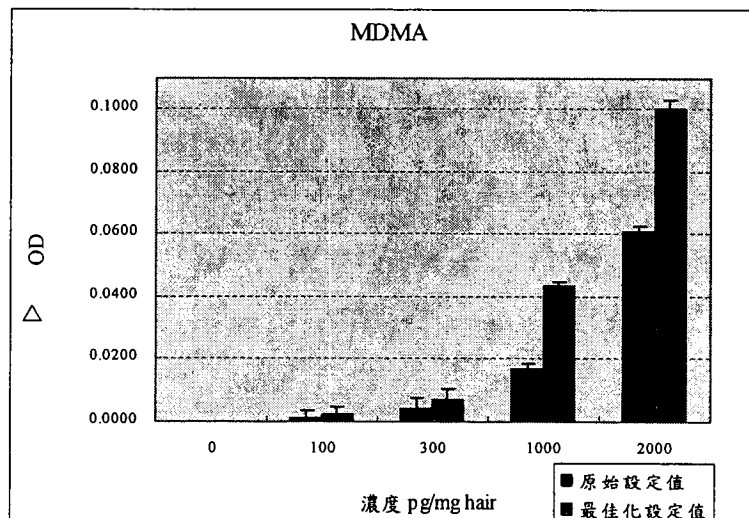
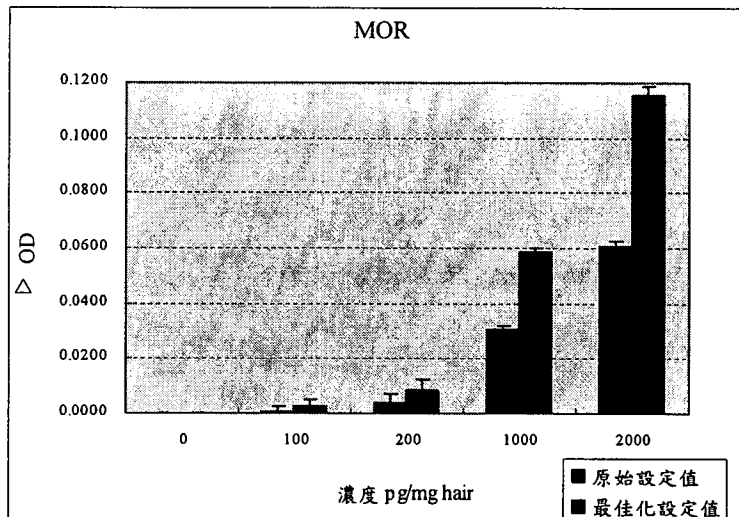
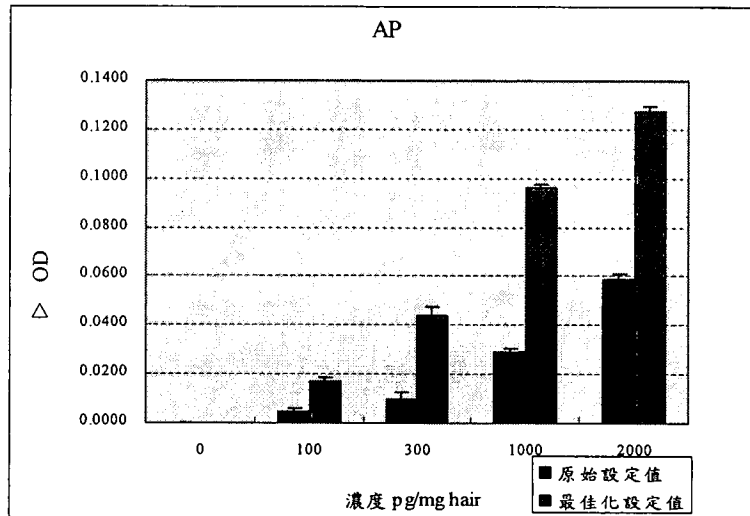


圖2 AP、MOR、MDMA 最佳化前後之 $\Delta OD$ 值變化

### 1.3 初篩檢驗方法確效評估結果

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，我們必須開始建立方法之確效性，包括：檢量線建立、最低偵測極限及準確度與精密度評估...等，才能確保以酵素免疫分析儀做為毛髮之初篩檢驗是可行的。

#### (一) 酵素免疫分析偵測極限評估結果

在評估偵測極限時，我們參考了Eleanor I. Miller<sup>24</sup>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)

本研究中，以酵素免疫分析儀OLYMPUS AU 600分析毛髮中濫用藥物之偵測極限為：AP：25 pg/mg Hair (在此濃度分析之 $\Delta OD$ 值大於3倍空白訊號之標準偏差)、MOR：70 pg/mg Hair (在此濃度分析之 $\Delta OD$ 值大於3倍空白訊號之標準偏差)及MDMA：50 pg/mg Hair (在此濃度分析之 $\Delta OD$ 值大於3倍空白訊號之標準偏差)。偵測極限皆小於毛髮中濫用藥物陽性閾值。

#### (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 $R^2$ 值。毛髮中濫用藥物之確認閾值

為AP、MA、MDA、MDMA、K、NK 300 pg/mg hair，MOR、COD、6-AM 200 pg/mg hair。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。

本研究建立之毛髮中濫用藥物檢量線為：AP 之檢量線範圍：0~2000 pg/mg Hair， $R^2$  值：0.9909；MOR 之檢量線範圍：0~2000 pg/mg Hair， $R^2$  值：0.9990；MDMA 之檢量線範圍：0~2000 pg/mg Hair， $R^2$  值：0.9931。（圖3）

### （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300、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度，MOR 配製成200、600、1200、2000 pg/mg Hair 之濃度各3管，進入OLYMPUS AU 600 分析。毛髮初篩之同日內精密度、準確度如（表3-6），各濃度AP之CV %值皆小於5.88 %，準確度則皆大於93.33 %；各濃度MOR之CV %值皆小於6.19 %，準確度則皆大於93.33 %；各濃度MDMA之CV %值皆小於8.06 %，準確度則皆大於90.00 %。

毛髮初篩之異日間精密度、準確度如（表6），異日間各濃度AP之CV %值皆小於3.49 %，準確度則皆大於90.22 %；異日間各濃度MOR之CV %值皆小於15.81 %，準確度則皆大於92.00 %；異日間各濃度MDMA之CV %值皆小於7.42 %，準確度則皆大於93.33 %。

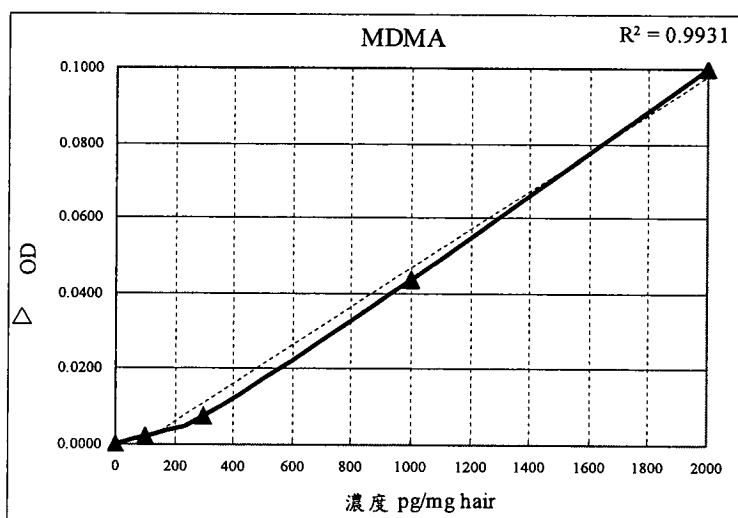
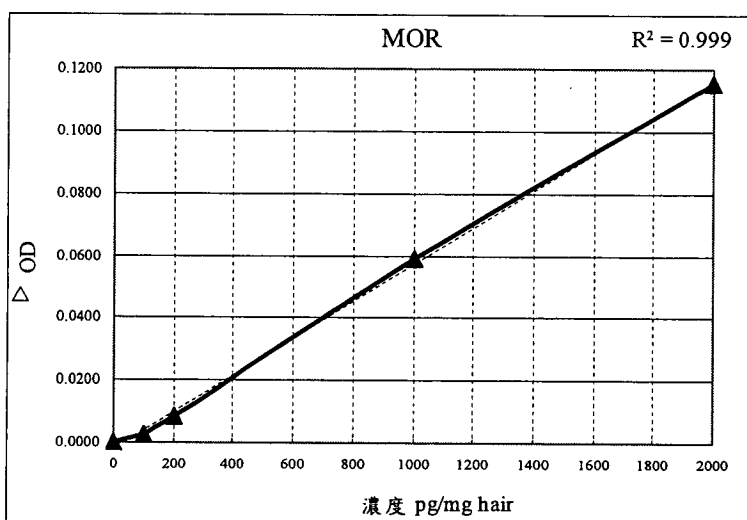
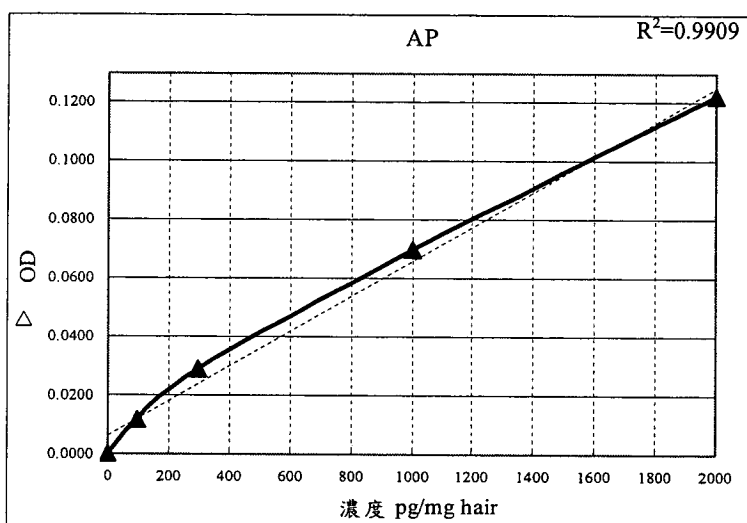


圖3 毛髮中AP、MOR及MDMA之檢量線及線性相關係數 $R^2$  值



表5 毛髮EMIT初篩之同日內精密度及準確度

pg/mg hair	Mean	SD	CV %	Accuracy %
MOR				
200	186.67	11.55	6.19	93.33
600	620.00	20.00	3.23	103.33
1200	1213.33	11.55	0.95	101.11
2000	2026.67	30.55	1.51	101.33
AP				
300	340.00	20.00	5.88	113.33
600	560.00	0.00	0.00	93.33
1200	1246.67	30.55	2.45	103.89
2000	1986.67	11.55	0.58	99.33
MDMA				
300	286.67	23.09	8.06	95.56
600	540.00	0.00	0.00	90.00
1200	1193.33	11.55	0.97	99.44
2000	1993.33	11.55	0.58	99.67

表6 毛髮EMIT初篩之異日間精密度、準確度

pg/mg hair	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5	MEAN	CV %
AP							
300	270.00	270.00	280.00	260.00	273.33	270.67	2.39
600	580.00	530.00	546.67	540.00	540.00	547.33	3.14
1200	1186.67	1173.33	1213.33	1120.00	1106.67	1160.00	3.49
2000	1986.67	1886.67	2000.00	1886.67	1920.00	1936.00	2.51
OPI							
200	193.33	146.67	220.00	153.33	206.67	184.00	15.81
600	566.67	573.33	580.00	573.33	626.67	584.00	3.72
1200	1166.67	1166.67	1186.67	1173.33	1126.67	1164.00	1.72
2000	2026.67	2000.00	2086.67	1986.67	1933.33	2006.67	2.50
MDMA							
300	280.00	280.00	280.00	250.00	310.00	280.00	6.78
600	586.67	566.67	546.67	530.00	653.33	576.67	7.42
1200	1233.33	1160.00	1220.00	1180.00	1200.00	1198.67	2.21
2000	2013.33	1966.67	2033.33	1973.33	1940.00	1985.33	1.69

### 3.4 真實毛髮檢體之比對

建立毛髮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。目前最常用氣相層析質譜分析法( GC/MS )來進行確認檢驗。在本研究中，參考Wu,Y.H.等人之文獻中確認檢驗的方法<sup>25</sup>。然而，不同的是：在文獻中毛髮浸泡方式為Methanol/TFA浸泡；而本實驗則以0.1M pH 7 Phosphate buffer為浸泡方式以取出毛髮中濫用藥物。因此，除了以氣相層析質譜儀建立完整的確認檢驗分析方法外，我們還需要針對毛髮中濫用藥物確認檢驗方法做確效性評估，包含偵測極限評估、檢量線建立、精密度與準確度評估…等，以檢驗微量分析之確效性，進而驗證初篩檢驗之確信度及可行性。

於完整評估方法確效後，我們收集38個毛髮真實檢體，依照實驗步驟，加入1 mL 0.1M pH 7 phosphate buffer浸泡，置放於45°C 18小時。取出離心後，直接以OLYMPUS AU 600做初篩檢驗分析AP、MOR及MDMA。

在表7中，我們以OLYMPUS AU 600及GC/MS分析38個真實毛髮檢體，從得到的數值中發現，在這些真實檢體中，以GC/MS分析AP確認陽性的有16件；MOR陽性有12件；MDMA陽性有11件。其中有7件真實檢體同時為AP及MOR陽性，有4件真實檢體同時為AP及MDMA陽性。

表7 以OLYMPUS AU 600及GC/MS分析38個真實毛髮檢體

編號	儀器	AMP	MAMP	MDA	MDMA	COD	MOR	6-AM
	GC/MS	34	69	20	19	7	ND	ND
	AU600	140		60		40		
	GC/MS	ND	20	ND	ND	6	50	ND
	AU600	60		ND		ND		
	GC/MS	ND	35	ND	4	4	ND	ND
	AU600	60		40		20		
	GC/MS	ND	67	ND	3	5	ND	ND
	AU600	40		20		ND		
	GC/MS	30	81	ND	ND	27	34	ND
	AU600	60		ND		ND		
	GC/MS	ND	ND	53	463	ND	ND	ND
	AU600	ND		740		ND		
	GC/MS	ND	ND	102	2466	ND	ND	ND
	AU600	ND		1600		ND		
	GC/MS	3	7	ND	ND	ND	ND	ND
	AU600	40		ND		ND		
	GC/MS	1546	15576	ND	ND	14	ND	8
	AU600	7680		ND		80		
	GC/MS	264	5120	ND	ND	ND	ND	ND
	AU600	3400		ND		ND		
	GC/MS	1624	10347	ND	ND	513	953	922
	AU600	6980		ND		2580		
	GC/MS	601	6329	2	ND	1117	929	1197
	AU600	4380		ND		3180		
	GC/MS	218	3373	ND	12	ND	42	ND
	AU600	2560		ND		40		
	GC/MS	271	1655	ND	1	826	1296	2851
	AU600	2060		ND		3760		
	GC/MS	ND	ND	ND	13	510	633	782
	AU600	ND		ND		1940		
	GC/MS	ND	ND	ND	4	8	21	35
	AU600	ND		ND		80		
編號	儀器	AMP	MAMP	MDA	MDMA	COD	MOR	6-AM

	GC/MS	586	5638	ND	5	1025	1582	1649
	AU600	4280		ND		3500		
	GC/MS	ND	ND	309	5135	39	10	6
	AU600	ND		3420		ND		
	GC/MS	ND	ND	987	18099	16	33	10
	AU600	ND		3680		ND		
	GC/MS	10	127	ND	ND	145	248	237
	AU600	220		ND		720		
	GC/MS	857	4410	ND	ND	723	850	667
	AU600	3640		ND		2620		
	GC/MS	ND	ND	1137	24426	ND	39	9
	AU600	ND		3660		ND		
	GC/MS	190	1693	ND	ND	96	226	ND
	AU600	1760		ND		460		
	GC/MS	88	12666	ND	ND	ND	ND	ND
	AU600	1460		ND		ND		
	GC/MS	ND	ND	70	1242	13	ND	ND
	AU600	ND		1312		ND		
	GC/MS	298	3390	ND	ND	ND	ND	ND
	AU600	3060		ND		ND		
	GC/MS	1324	14017	102	441	ND	ND	ND
	AU600	7380		860		ND		
	GC/MS	ND	ND	20	130	2	4	12
	AU600	ND		480		ND		
	GC/MS	248	2822	70	230	ND	ND	ND
	AU600	1840		640		ND		
	GC/MS	147	1283	1	487	39	50	75
	AU600	2160		700		120		
	GC/MS	41	500	ND	ND	883	997	803
	AU600	560		ND		1660		
	GC/MS	2	845	329	1393	ND	ND	ND
	AU600	640		880		ND		
	GC/MS	ND	ND	ND	ND	587	576	482
	AU600	ND		ND		860		
	GC/MS	17	184	ND	ND	72	82	70
	AU600	400		ND		140		
編號	儀器	AMP	MAMP	MDA	MDMA	COD	MOR	6-AM
	GC/MS	ND	ND	ND	ND	234	176	554

AU600	ND		ND		580		
GC/MS	ND	ND	ND	ND	182	302	719
AU600	ND		ND		720		
GC/MS	ND	ND	243	3833	45	5	10
AU600	ND		3200		ND		
GC/MS	ND	ND	ND	ND	201	217	186
AU600	ND		ND		520		

另外，為了更進一步評估OLYMPUS AU 600 及 Hitachi 7170對微量分析的適用性，我們取5個真實檢體，除了以OLYMPUS AU 600 及 GC/MS分析外，再以Hitachi 7170分析AP、MOR及MDMA。並以GC/MS確認分析得到的數值為標準，比較兩台酵素免疫分析儀應用於初篩檢驗之可信度（表8）。

從分析結果可知，當以GC/MS為確認方法時，越接近其分析數值者越準確。然而，在表中可以看到，以Hitachi 7170分析AP、MOR及MDMA所得數值皆遠低於GC/MS確認分析數值，約為GC/MS確認分析數值1/2~1/4。因此若以Hitachi 7170進行初步檢驗，則很有可能造成偽陰性，而導致微量分析不準確。反觀以OLYMPUS AU 600分析之數據，除了與GC/MS分析數據相近之外，並且比Hitachi 7170分析數據更接近GC/MS確認方法之數值。也再一次的驗證了OLYMPUS AU 600 較 Hitachi 7170更適合做毛髮中濫用藥物之微量初步分析。

表8 以GC/MS、OLYMPUS AU 600、HITACHI 7170分析真實毛髮檢體

編號	儀器	AMP	MAMP	MDA	MDMA	COD	MOR	6-AM
	GC/MS	190	1693	ND	ND	96	226	ND
	AU600	1760		ND		460		
	H7170	440		ND		200		
	GC/MS	88	12666	ND	ND	ND	ND	ND
	AU600	1460		ND		ND		
	H7170	280		ND		ND		
	GC/MS	ND	ND	70	1242	13	ND	ND
	AU600	ND		1240		ND		
	H7170	ND		1140		ND		
	GC/MS	34	69	20	19	7	ND	ND
	AU600	140		60		40		
	H7170	60		ND		20		
	GC/MS	ND	67	ND	3	5	ND	ND
	AU600	40		20		ND		
	H7170	0		ND		ND		

### 1.5 初篩檢驗方法及確認檢驗方法之相關係數評估結果

當有兩種不同的方法、材料或資料要比較時，必須以相關係數 (Correlation coefficient) 加以評估<sup>23</sup>。相關係數最大值為1，r值如果等於1，且通過原點，表示線性關係完全一致。通常 $r > 0.95$ 即可視為一致；若 $r < 0.95$ 表示兩組不一致。

在本研究中，將真實檢體分別以OLYMPUS AU 600之EMIT法與GC/MS兩種不同方法測定，所得之測定值帶入統計軟體中計算，即得兩種不同方法之相關係數值。接著就畫兩種方法之對應相關圖，以標準法GC/MS為X軸，以要受評估的新法EMIT為Y軸，做成散佈圖。

然而，以GC/MS測定AP，所得之測定值包含了AP及MA；測定MOR，所得之測定值包含了MOR、COD及6-AM；測定MDMA，所

得之測定值包含了MDMA及MDA。因此，在進行相關係數評估前，必須先個別將GC/MS所得測定值相加，再帶入統計軟體中與EMIT測定值評估。

由相關性評估結果(圖4)可知，在AP部分：以EMIT 與 GC/MS兩種不同方法所得測定值之間，其相關係數為0.9731，且通過原點，即代表以此兩種方法測定AP之結果是一致的。在MOR部分：以EMIT 與 GC/MS兩種不同方法所得測定值之間，其相關係數為0.9670，且通過原點，即代表以此兩種方法測定MOR之結果是一致的。但是，在測定MDMA部分：以EMIT 與 GC/MS兩種不同方法所得測定值之間，其相關係數只有0.7969，且並未通過原點，代表以此兩種方法測定MDMA之結果較不相關。

我們觀察其對應值後發現，有多個檢體分析後之對應點的散佈為界外點，並且其共通點皆為：這些真實檢體以GC/MS分析所得到的值都相當高(4076~25563 pg/mg hair)；但是以EMIT分析所得到的值卻非常相近(3200~3680 pg/mg hair)。我們認為，當以EMIT法在進行毛髮中濫用藥物初篩檢驗時，為了盡量降低稀釋效應，在分析MDMA時，Reagent A 及Reagent B 皆只設定60  $\mu$ L。因此，在面對高濃度的待測藥物存在下(大於4000 pg/mg hair)，Reagent B中的抗體已全數與待測藥物結合，並反應完畢，即使有再多的待測藥物，也因為缺乏抗體的供給，無法有抗原抗體結合反應，也無法產生更高的吸光值，導致高濃度測定值之間相關性較差。然而，若將界外點去除後，MDMA相關係數可達到0.9591。也就是說，以EMIT 與 GC/MS兩種不同方法所得測定值結果是一致的。

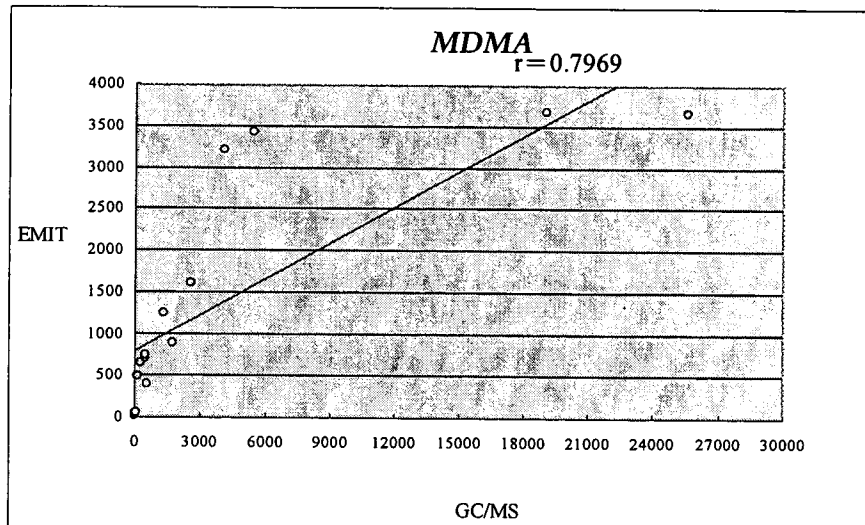
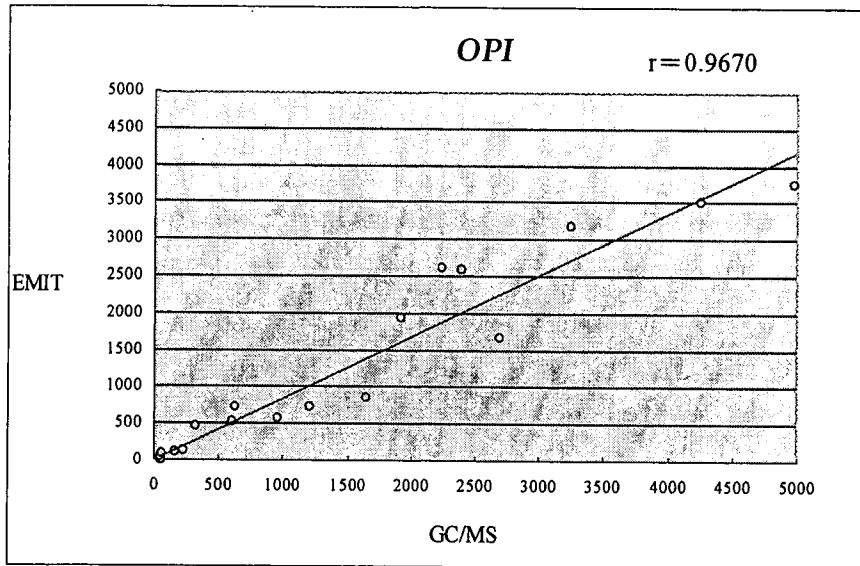
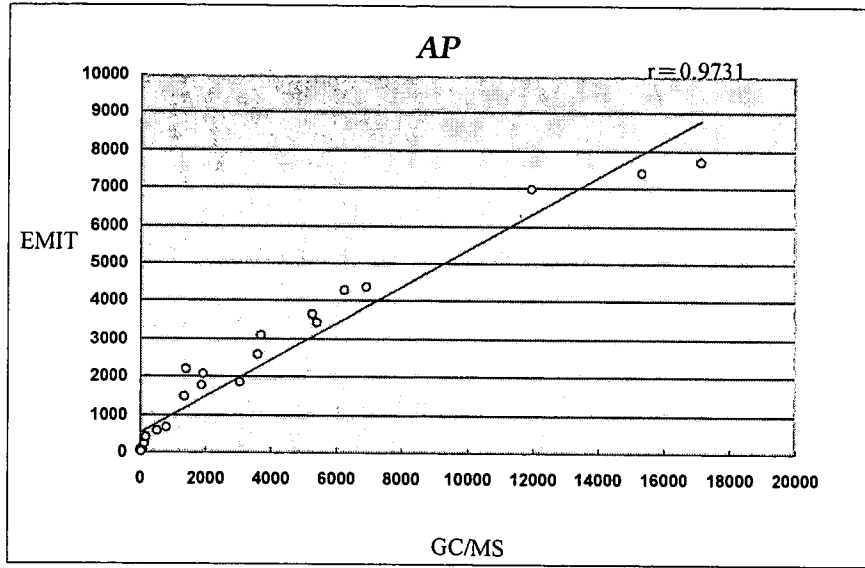


圖4 EMIT與GC/MS相關性評估結果



在不會造成偽陰性的前提之下，已達到初步篩檢的目的：快速篩選、排除陰性的檢體，以達到省時、省成本的目標。雖然以EMIT分析，可測得MDMA之最高分析值只能到 4000 pg/mg hair，卻也已經是MDMA法規陽性閾值的10倍以上，已足夠達到初步篩檢的目的。

## 1.6 初篩檢驗之閾值設定

在本研究中，我們使用接收器操作指標ROC<sup>24</sup> (Receiver Operating Characteristic) 設定初篩檢驗之閾值。以ROC曲線(Receiver Operating Characteristic Curve)來評估診測在醫界已經行之多年。1971年，Lusted把ROC曲線的觀念引介給醫學界，指出ROC曲線是以「X軸與Y軸分別代表偽陽性(FP)診斷與真陽性(TP)診斷」的點狀圖。ROC曲線的用處之一，是提供研究者找出一個較好的反折點(Cut-off point)，使診斷工具的敏感度與精確度能有合理的平衡。

我們以此方法統計分析38個真實檢體中，當AP、MOR、MDMA之初篩檢驗閾值個別設定為150、200、300、400、500 pg/mg hair時，其偽陽性(FP：即EMIT初步檢驗分析為陽性，但是GC/MS確認檢驗分析為陰性)、偽陰性(FN：即EMIT初步檢驗分析為陰性，但是GC/MS確認檢驗分析為陽性)、真陽性(TP：即EMIT初步檢驗分析為陽性，而GC/MS確認檢驗分析也為陽性)、真陰性(TN：即EMIT初步檢驗分析為陰性，而GC/MS確認檢驗分析也為陰性)之個別數目，同時，並計算其敏感性( $Sensitivity = TP / (TP + FN)$ )及特異性( $Specificity = TN / (TN + FP)$ )。將數值帶入ROC曲線中，以求AP、MOR、MDMA之最佳Cut-off值(圖3-5，表3-9)。

在ROC圖中，越靠近左上方代表其敏感性及特異性越好。因此，

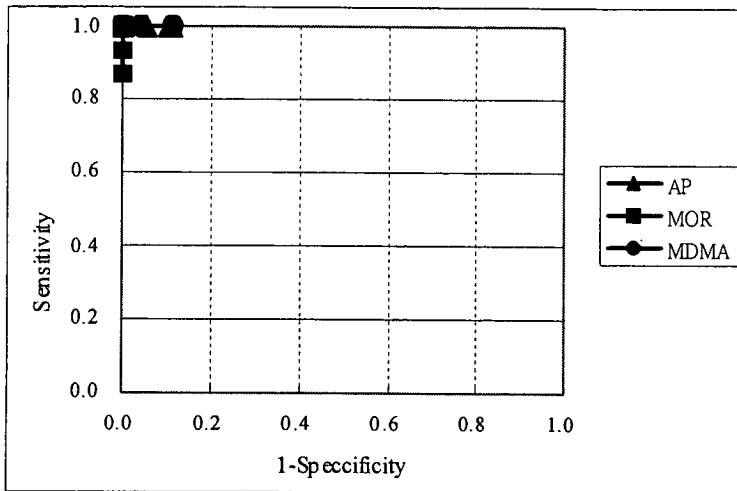
以EMIT法測定AP之初篩檢驗閾值為500 pg/mg hair，即真實檢體初篩檢驗分析值若小於500 pg/mg hair，則可判定為陰性；反之，若大於500 pg/mg hair，則可判定為初篩陽性，需要以GC/MS做更進一步確認分析；測定MOR之初篩檢驗閾值為150 pg/mg hair；測定MDMA之初篩檢驗閾值為500 pg/mg hair。也就是說，真實檢體初篩檢驗分析值若小於各檢驗項目閾值，則可判定為陰性；當分析值大於閾值時，才需要做更進一步確認分析。

根據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，毛髮初篩檢驗之閾值：安非他命類為500 pg/mg hair；嗎啡類為200 pg/mg hair。與本研究中建立的初篩閾值：安非他命類為500 pg/mg hair；嗎啡類為150 pg/mg hair相近，更驗證了以EMIT分析初篩檢驗的可信度。

在本研究中，我們發展出以快速、方便且全自動化的EMIT初篩檢驗來分析毛髮中濫用藥物，並藉由閾值高低，迅速判斷出真實陽性與真實陰性檢體，可達到節省成本及降低檢驗時效性的成果。

表9 不同Cut-off值之AP、MOR、MDMA敏感性及特異性

Cut-off	pg/mg hair	500.0	400.0	300.0	200.0	150.0
	Sensitivity	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1-Specificity	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
	Sensitivity	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0
	1-Specificity	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sensitivity	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1-Specificity	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1



AP : 500 pg/mg hair ; MOR:150 pg/mg hair ; MDMA:500 pg/mg hair

圖5以ROC分析曲線判定AP、MOR、MDMA 最佳Cut-off值

## 【2】 nano-ESI初篩方法之建立：

本部份利用標準之電灑法(ESI)建立初篩方法，並轉移至實驗室自行組裝之奈灑法(nanoESI)上，利用nanoESI之低樣品消耗量的特質，與比一般ESI高靈敏度之特性，以LC/MS/MS各藥物二次質譜的特異性，進行初篩方法的建立。

實驗首先建立數種濫用藥物的標準品之二次質譜圖譜，其中包括安非他命(AMP)、甲基安非他命(MA)、MDA、搖頭丸(MDMA)、K他命、Norketamine、嗎啡、可待因、海洛因與6-AM等常見濫用藥物之二次質譜圖。並在選擇反應模式下偵測(SRM)，以評估各種藥品在DESI分析時之偵測極限；

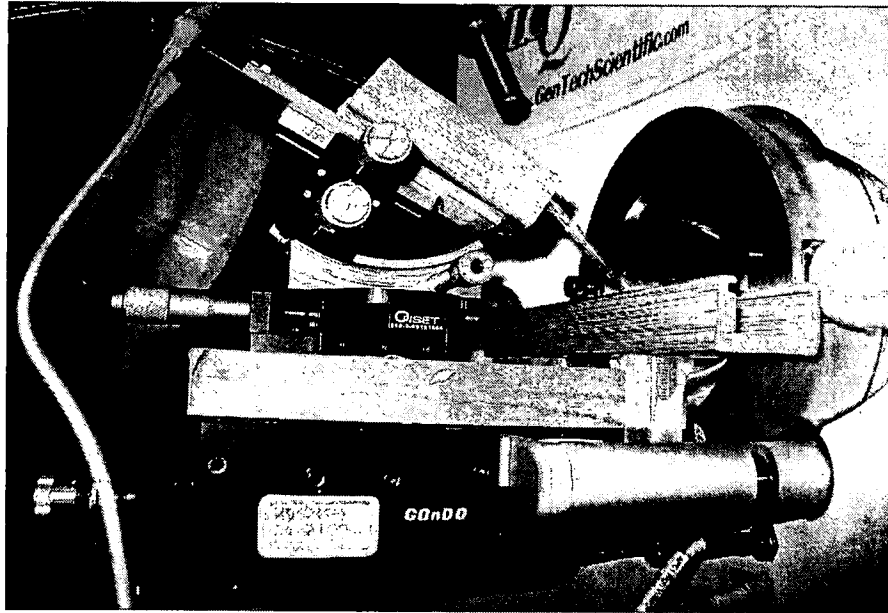


圖6 :以電灑法(ESI)與奈灑法(nanoESI) 進行初篩分析。

### 【3】microDESI初篩方法之建立：

利用本實驗室日前新建立之微區脫附電噴灑游離裝置 (micro-DESI)，進行毛髮表面之微區掃描，利用上節各藥物LC/MS/MS 二次質譜的特異性，可在剝除表皮層之真實毛髮上可以找到含有濫用藥物之區域，達到藥物初篩的目的。本方式除可增加增加確認檢驗之靈敏度，更可減少檢體消耗量，提高時間解析度。

在濫用藥物的偵測中，尿液檢驗最常被用來檢驗判斷吸毒者與否的法庭證據，然而尿液檢驗卻只有數日的時效性，即會被身體所代謝掉：毛髮主要是由毛囊細胞所製造，在毛髮生長的過程中，由於毛囊細胞會吸收周圍微血管的養分來製造新的毛髮，因此血液中的藥品與其代謝物就會同時被編織併入毛髮中。

因此，具時間紀錄性的毛髮檢驗被認為是極具發展潛力的一種檢

驗項目。然而，在傳統的毛髮檢驗上，樣本通常需要量超過25 mg，而且只能以月來追蹤吸食歷史，因此在探討嫌疑犯吸食藥物歷程上，往往需要經過複雜且耗時的實驗過程。脫附電噴灑游離法<sup>25-26</sup>近年來多被探討在法醫鑑識與國土安全上的應用，其特點在於能直接脫附游離化表面物質，並進行質譜偵測，極適合作為判斷表面物質分布情形的方法。我們希望發展以脫附電噴灑游離化方法為基礎的直接偵測方法，並將之應用在毛髮快速篩檢上。

另外，我們希望能以DESI的直接偵測能力，偵測在頭髮中濫用藥物的訊號。並利用穩定直線移動的載物平台，達到微動掃描頭髮中出現濫用藥物的訊號位置，以此回推其生長時間關係與藥物使用之頻率。更能建立濫用藥物身體中代謝與毛髮生長關係。

相較於過去篩檢的方法，DESI具有不需前處理的優勢，且搭配上直譜的高特異性，極有潛力發展成快速篩檢的方法。

實驗首先建立數種濫用藥物的標準品之二次質譜圖譜，其中包括安非他命(AMP)、甲基安非他命(MA)、MDA、搖頭丸(MDMA)、K他命、Norketamine、嗎啡、可待因、海洛因與6-AM等常見濫用藥物之二次質譜圖。並在選擇反應模式下偵測(SRM)，以評估各種藥品在DESI分析時之偵測極限；

為了接近真實頭髮檢體偵測情形，我們在載物台上先製備空白頭髮，以雙面膠帶固定於玻片上。因本實驗室自製之DESI裝置在空間解析度上約為1mm<sup>2</sup>，為確保分析時之訊號穩定及完全，因此將頭髮並排固定，以增加頭髮分析時之面積。之後在同面積範圍點上不同濃度標準品，待其乾燥後進行DESI偵測。

由於DESI之分析能力在於表層物質，而大部分藥物存在於較深

處的皮質層中，因此我們需另進行了毛髮剝皮。我們採用的方式為物理刮除剝皮法，處理方式是將固定在玻片上的頭髮上層直接刮除，以暴露出皮質層。而在經剝皮處理後的頭髮，其訊號總合強度有明顯的提升，質量複雜度也增高，我們的推論是：經剝皮後的頭髮隨著皮質層的暴露，使得大部分物質得以被偵測到，進而增加了DESI在毛髮檢驗上的可能性。

為了確認剝皮效果對藥物偵測的影響，我們進行分層分析，並測量每次刮除後的頭髮剩餘直徑，以掃描式脫附電噴灑游離法進行偵測。受偵測樣本為一K他命煙毒犯之毛髮樣本，頭髮平均直徑為 100 微米，實驗限制樣本長度在兩公分，以 30 mm/min 樣品推送速率掃描。我們分成四次刮除頭髮，每次平均刮除約 20 微米。結果發現：表皮未刮除之強度分布圖譜相似於第四次刮除後之圖譜，且刮除2次到3次的圖譜相似度高，且訊號持續時間較長，單點持續時間約為 0.15 min。最後，我們進行真實煙毒犯毛髮掃描，其毛髮檢體經GC/MS 確認及定量過，結果發現可清楚偵測甲基安非他命、K與6-AM，然而感度約在 500 pg/m，並無法低於美國NLCP (National Laboratory Certification Program) 所定之數百 pg/mg-hair的閾值質要求，由於本實驗所用之LCQ-classic質譜儀為較早之機型，未來若採用DECA或LTQ等較新機型之質譜儀，將可感度達到NLCP閾值之更低要求。

#### **【4】提升毛髮中天生低含量藥物之分析靈敏度**

在微量的毛髮檢體上，由於儀器方法的靈敏度往往扮演著最後關鍵的角色，特別是，因此將GC/EI-MS質譜方法提升至氣相層析/化學游離法質譜儀(GC/CI-MS) 之方法，針對低併入率之大麻代謝物

THCA 與BZD藥物以大體積注射方法，進行靈敏度提升。

由於經由毛髮清洗、取出藥物，萃取、衍生化等步驟後之上機樣本常有50-100  $\mu\text{L}$ 之多，而GC/MS受限於注射口之linear體積，至多只能打入2 $\mu\text{L}$ ，因此本研究計畫以大體積注射裝置(PTV-LV)以增加GC/MS注入量(25-50  $\mu\text{L}$ )來增加感度，以解決毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。

#### 4-1 酸性濫用藥物:大麻酸

在大麻的毛髮分析中，檢驗酸性類濫用藥物：大麻酸(THCA)的毛髮併入率卻遠低於其他藥物，因此在美國NLCP (National Laboratory Certification Program) 即將THCA 閾值定為 0.1 pg/mg-hair，遠遠低於其他藥物之數百 pg/mg-hair的閾值。

由於THC-COOH為含OH基及COOH基之化合物，因此可經BSTFA衍生化，隨後再以GC/EI-MS分析。然而，本研究發現其最低偵測極限約只有40 pg /mg hair。

為了提升大麻酸的靈敏度，改以含有高電子捕捉能力的衍生劑進行衍生化，並以GC/NCI-MS進行分析為目前本實驗室偵測THCA主要之方法。大麻之前處理步驟：秤取50 mg毛髮檢體於另一乾淨玻璃試管中，接著加入1 mL 1M氫氧化鈉(NaOH)及25  $\mu\text{L}$ 內標準品(100 pg/ $\mu\text{L}$ )，在70 $^{\circ}\text{C}$ 溫度下進行30分鐘鹼水解反應，直到毛髮完全溶解如墨汁般。待試管完全冷卻後，加入2 mL (Hexane : Ethyl acetate, 9 : 1, v/v)進行液相萃取，混合震盪20分鐘後，以3000轉離心5分鐘，吸取上層有機層至玻璃試管(大麻酸)，並於55 $^{\circ}\text{C}$ 條件下以氮氣吹乾。隨後

加入衍生化試劑100  $\mu\text{L}$  PFPA及30  $\mu\text{L}$  HFIP，在70°C烘箱進行30分鐘衍生化反應，每次打入2  $\mu\text{L}$  進入GC/NCI-MS分析。

分析 THCA 之氣象層析條件為：起始溫度150°C 維持1分鐘，以每分鐘20°C上升至210°C 維持0.1分鐘，接著每分鐘20°C上升至240°C維持0.1分鐘，以每分鐘20°C上升至250°C維持0.1分鐘，以每分鐘20°C 上升至 290°C 維持 3.7 分鐘。而以衍生化需以 Hexafluoroisopropanol (HFIP) 與 Pentafluoro propionic anhydride (PFPA) 雙衍生化試劑進行。由於THCA為含OH基及COOH基之化合物，實驗以PFPA衍生OH基，HFPOH衍生COOH基進行衍生化，再以GC/NCI-MS 進行分析。以 PFPA/HFPOH 衍生之 THCA，其GC/NCI-MS靈敏度可提高達到2.5 pg/mg hair。然而，與美國NLCP所規定的閾值為 0.1 pg / mg hair，仍有一大段距離。

而據我們目前所知，在美國也只有極少數(1-2個) 實驗室，可以達到如此高敏感度偵測。在這些實驗室目前皆使用氣相層析串聯質譜儀(GC-MS/MS TSQ 7000)為分析儀器，以氮氣之負離子電子捕捉化學游離法(ECNCI)為主要方法，可達到0.05 pg / mg hair之定量極限，才能達成美國NLCP所規定的閾值需求。

我們的構想是以氮氣之負離子電子捕捉化學游離法(ECNCI)為游離方法，但並不採用昂貴且不好維護之氣相層析串聯質譜儀(GC-MS/MS)，而是以一般之GC/MS 搭配大體積注入為分析儀器，希望達到近乎氣相層析串聯質譜儀之感度。由於本年度我們最後購買之GC/MS為 Thermo Trace GC Ultra-DSQII之大體積注射氣相層析質譜儀，目前才剛裝機完成，尚在學習了解中，因此THCA之靈敏度偵測尚未達成熟穩定之階段。目前依工程師建議：PTV-LV條件設定為起



始溫度為50°C維持0.2分鐘，以每分鐘10°C上升至100°C維持1分鐘 (evaporation)，接著以每分鐘10°C升至250°C維持0.5分鐘 (transfer)，再以每分鐘10°C升至290°C (clean)。

結果發現linear之不同即對感度有所影響，注入2  $\mu\text{L}$ 之 1 ng/ $\mu\text{L}$  衍生過之THCA進入GC/ NCI-MS，使用Thermal 一般PTV 專用之 linear 與PTV-LV 專用之linear，後者呈現6倍較高之感度。因此，隨後之實驗皆使用PTV-LV 專用之linear。其次，我們比較注入2  $\mu\text{L}$  與 5  $\mu\text{L}$ 之 1 ng/ $\mu\text{L}$ 衍生過之THCA之差異，結果發現注入量增加2.5倍，感度卻可增加3.6倍。雖然未成等比例之增加，但誤差尚可接受。由於實驗當時尚無可注射更大量之注射針，因而未做更多之比較。

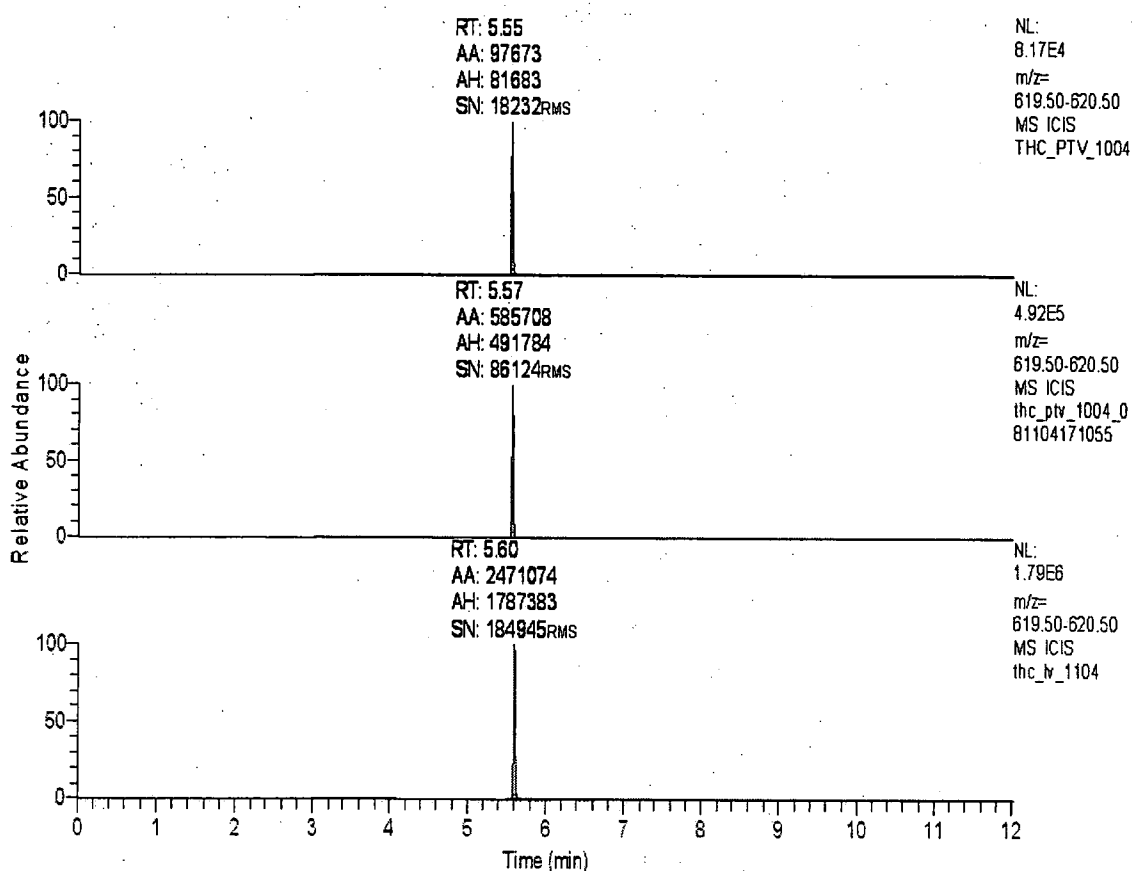


圖7 GC/MS不同注射模式之比較

隨後我們評估低濃度THCA之所需注射量。首先製備大量之 1 pg/mg之衍生過THCA，隨後我們比較3  $\mu$ L、25  $\mu$ L與50  $\mu$ L注入量GC/MS之差異，結果發現注入量由3  $\mu$ L增加到25  $\mu$ L (8.3倍)，感度可增加26.7倍，其呈現3倍比例之增加。而注入量由25  $\mu$ L增加到50  $\mu$ L (2倍)，感度只增加1.67倍，以呈現較低比例之增加。

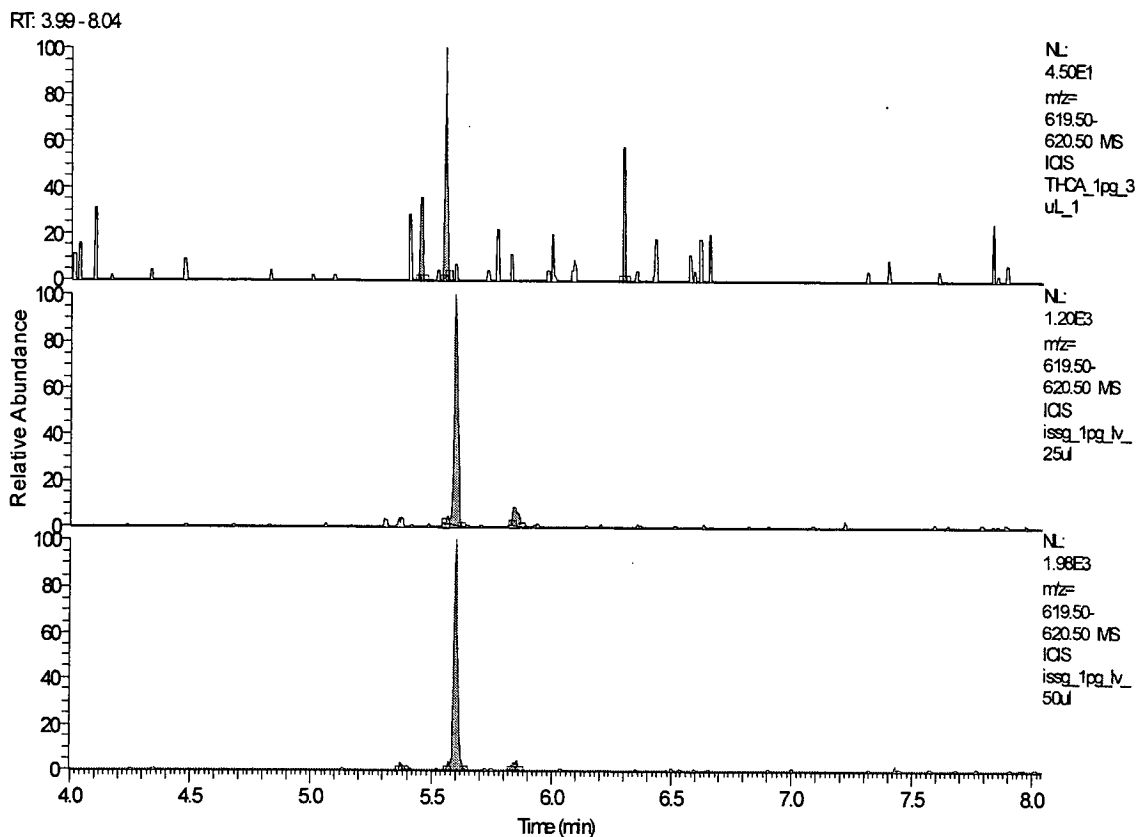


圖8 GC/MS PTV-LV不同注射量之比較

由於相較於25  $\mu$ L注入量，50  $\mu$ L注入量仍有較好訊號量，因此我們即以50  $\mu$ L注入量，進行最低偵測極限之評估。1 pg/mg、0.5 pg/mg、0.1 pg/mg 依序注入評估，發現偵測極限約在0.1 pg/mg。我們發現雖然訊號強度還在 $10^2$ ，但因大體積注入，使雜訊也跟著增加，以至S/N比近乎3。由於GC/MS(Thermo Trace GC Ultra-DSQII)剛完成裝機，目前我們對之PTV-LV操作與了解極為有限，我們認為目前使

用之PTV條件並未最佳化，未來最佳化後應該能將完成定量極限降至0.05 pg/mg，而達成不需使用GC/MS/MS之目標。

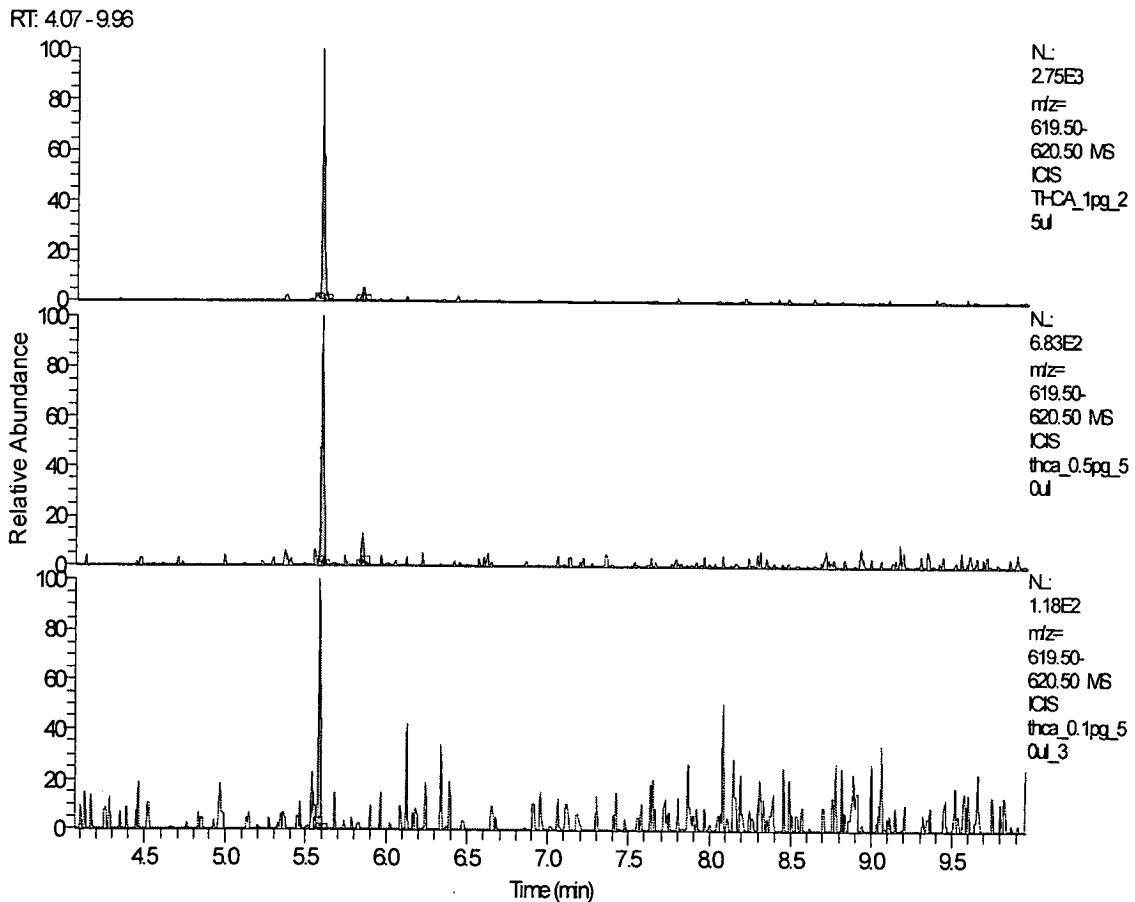


圖9 GC/MS PTV-LV低濃度THCA注射量之比較

## 4-2 苯二氮平類藥物

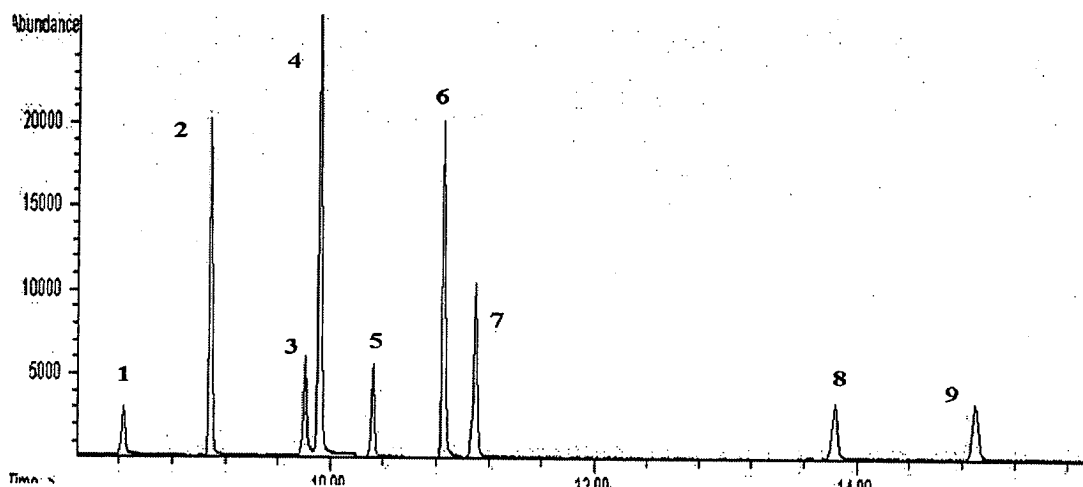
在本計劃針對苯二氮平類藥物的毛髮檢驗中，首先針對Diazepam、Nordiazepam、Temazepam、Oxazepam、Triazolam、Flunitrazepam、Nitrazepam、Alprazolam、Lorazepam等九種藥物及其代謝物，建立GC-NCI/MS檢驗方法。其中，Diazepam、Triazolam、Flunitrazepam、Alprazolam結構上無可衍生化官能基，無法進行衍生

化；而 Diazepam 的代謝物 (Nordiazepam 及 Temazepam) 及 Nitrazepam則含有一個NH基或OH基，可接上一個衍生物；Diazepam 的代謝物(Oxazepam)及Lorazepam各有一個NH基與OH基，可接兩個衍生物劑，因此以矽化反應(BSTFA)進行衍生化反應，表10為選擇離子監測模式。

表10. 苯二氮平類藥物之GC/NCI-MS 選擇離子監測模式

Compound	Ions	Ions of IS	RT (min)
Nordiazepam-TMS	<u>234</u> , 342	<u>239</u> , 347	8.45
Oxazepam-2 TMS	268, <u>357</u>		9.11
Diazepam	<u>284</u>	<u>289</u>	9.83
Lorazepam-2 TMS	<u>302</u>	<u>306</u>	9.94
Nitrazepam-TMS	<u>353</u>	<u>358</u>	10.35
Temazepam-TMS	<u>372</u>		10.88
Flunitrazepam	<u>313</u>	<u>320</u>	11.12
Alprazolam	<u>308</u>	<u>313</u>	13.86
Triazolam	<u>306</u>	<u>310</u>	14.93

因此，秤取50 mg，將毛髮經清洗去除外部污染後，以Soerensen buffer (pH7.6) 為浸泡液進行約18小時之隔天浸泡，隨後進行液相萃取，再加入BSTFA進行衍生化，即可以GC/NCI-MS進行分析。在55 °C下以氮氣吹乾，隨後加入100 µL BSTFA衍生化試劑，在90°C烘箱進行30分鐘衍生化反應，最後打入 2 µL 進入GC/ NCI-MS分析，即可獲得在GC/NCI-MS層析結果圖中，可看到所有預分析藥物(圖10)。GC/ NCI-MS 之升溫程式為起始溫度150°C 維持1分鐘，以每分鐘25°C上升至220°C 維持0.5分鐘，再以每分鐘10°C上升至295°C維持4分鐘，分析時間為15.8分鐘。



1為Nordiazepam，2為Oxazepam，3為Diazepam，4為Lorazepam，5為Nitrazepam，6為Temazepam，7為Flunitrazepam，8為Alprazolam，9為Triazolam

圖10、苯二氮平類藥物之GC/MS選擇離子監測模式層析圖

以標準品來評估苯二氮平類藥物在不同浸泡溶液之回收率，分別以0.1N 鹽酸溶液、甲醇-三氟醋酸、Soerensen buffer (pH7.6)及氫氧化鈉為浸泡溶液，以固相萃取或液相萃取，經BSTFA衍生化後，以GC/MS分析評估。評估結果發現：以Soerensen buffer (pH7.6)即有不錯的結果。而在方法確效性實驗中，回收率皆可達到80%以上。其中Diazepam、Nordiazepam、Oxazepam、Temazepam的最低偵測極限可達到1 pg/mg；Flunitrazepam及Triazolam的最低偵測極限可達到3 pg/mg；Lorzepam及Alprazolam的最低偵測極限可達到5 pg/mg；Nitrazepam 的最低偵測極限可達到0.1 pg/mg (表11)。

Thermo Trace GC Ultra-DSQII，其PTV-LV條件設定為起始溫度為50°C維持0.2分鐘，以每分鐘14.5°C上升至200°C維持1分鐘 (evaporation)，接著以每分鐘10°C升至270°C維持0.5分鐘 (transfer)，再以每分鐘10°C升至290°C維持14分鐘 (clean)，結果發現，注入25  $\mu$ L

進入GC/ NCI-MS分析之結果與注入 2  $\mu$ L分析結果有至少10倍左右之提升。然而，我們發現可進行BSTFA衍生化之苯二氮平類藥物似乎有數十倍或近百倍之提升，而獲得更多的放大倍率。雖然依據物質不滅定律，不應該有數十倍或近百倍之提升，然而，可得到合理之再現性。由於GC/MS剛完成裝機，目前我們對Thermo Trace GC Ultra-DSQII 之PTV-LV操作與原理，了解極為有限，因此將繼續追查其原因。

表11. 苯二氮平類藥物之方法確效性評估

Compound	Correlation Coefficient	Recovery (%)	Spitless下 LOD (pg/mg)	PTV-LV下 LOD (pg/mg)
Nordiazepam	0.997	84.3	1	0.01
Oxazepam	0.999	97.5	1	0.005
Diazepam	0.995	101.2	1	0.1
Lorazepam	0.993	93.1	1	0.01
Nitrazepam	0.997	99.0	5	0.2
Temazepam	0.995	92.1	0.1	0.005
Flunitrazepam	1.000	93.8	3	0.3
Alprazolam	0.997	98.3	5	0.4
Triazolam	0.997	82.6	3	0.3

## 伍、結論與建議

濫用藥物毛髮檢驗在歐美國家已行之有年，由於毛髮可以保存受檢者的吸毒歷程，因此可以彌補尿液檢驗時無法有效回溯追蹤的缺陷，加上毛髮採檢方便又不具侵入性、無需冷藏冷凍，體積小保存運送遠勝於其他檢體。因此，精密的毛髮檢驗技術，可補強尿液檢驗的不足，讓毒品無所遁形，成為刑事科學鑑定的利器。

本計畫將針對毛髮檢驗的兩個重要課題，提出解決的方法：計畫第一部分將針對毛髮檢驗初篩方法進行方法開發。基於目前國內毛髮檢驗中缺乏簡易的初篩方法，為增進檢驗的時效性，本計畫目前已成功建立方便可行之EMIT免疫方法，並進一步成功以ESI與nanoESI之初篩MRM分析模式與毛髮表面質譜直接分析方式(DESI)之初篩方法。計畫第二部分將針對頭髮中天生低含量之藥物，包含大麻與BZD類藥物。目前已完成GC/NCI-MS之方法評估，並進行大體積注射裝置(PTV)之方法評估，可的到數十倍之靈敏度提升，提昇毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。

## 陸、參考文獻

01. Liu RH. Analysis of Drugs of Abuse II .Application in Workplace Drug Urinalysis.1997 Taipei International Forensic Science Symposium, Tapei, Taiwan 1997.
02. Kintz, P. Drug Testing in Hair. 1996.
03. . Cirimele, V.; Kintz, P.; Ludes, B. *J.Chromatogr.B.* 1997, 700, 119-129.
04. Cirimele V, Kintz P, Ludes B. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997 Oct 24;700(1-2):119-29
05. Baptista, M.J. ; Monsanto, P.V. ; Marques, E.G.P. ; Bermejo, A. ; Avila, S. ; Castanheira, A.M. ; Margalho, C. ; Barroso, M. ; Vieira, D.N. *Forensic Sci. Int.* 2002, 128, 66-78.
06. Wilkins. D. ; Haughey, H. ; Cone, E. ; Huestis, M. ; Foltz, R. ; Rollins, D. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19, 483-491
07. Kintz, P. ; Cirimele, V. ; Mangin, P. *J. Forensic Sci.* 1995, 40, 619-622.
08. Hold, K.M. ; Crouch, D.J. ; Wilkins, D.G. ; Rollins, D.E. ; Maes, R.A. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84, 201-209.
09. Kintz, P. ; Cirimele, V. ; Vayssette, F. ; Mangin, P. *J.Chromatogr.B.* 1996, 677, 241-244.
10. Scheidweiler KB, Huestis MA. *Anal. Chem.* 2004, 76, 4358-4363.
11. Moeller, M.R. ; Fey, P. ; Sachs, H.. *Forensic Sci. Int.* 1993, 63, 43-53.
12. Moeller, M.R.. *Ther Drug Monit*, 1996, 18, 444-449.
13. Bost, R.O.. *Forensic Sci. Int.* 1993, 63, 31-42
14. Marsili R, Martello S, Felli M, Fiorina S, Chiarotti M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 1566-1568.
15. Webb KS, Baker PB, Cassells NP, Francis JM, Johnston DE, Lancaster SL, Minty PS, Reed GD, White SAJ. *Forensic Sci.* 1996, 41, 938-946
16. Stanaszek R, Piekoszewski W J. *Anal. Toxicol.* 2004, 20, 77-85.
17. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) mandatory guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs; Notices (Federal Register, April 13, 2004, Vol. 69, No. 71)
18. Villain M, Cheze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P. *Forensic Sci. Int.* 2004, 145, 117-121.
19. Miller, E. I. ; Wylie, F.M. ; Oliver,J.S. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 30, September 2006
20. Van Bocxlaer JF, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Van den Eeckhout EG, De Leenheer AP. *Mass Spectrom. Rev.* 2000; 19: 165



21. Kintz, P. ; Cirimele, V. ; Vayssette, F. ; Mangin, P.J *Chromatogr B Biomed Appl.* 1996 Mar 3;677(2):241-4.
22. Romolo, F.S. ; Rotolo, M.C. ; Palmi, I. ; Pacifici, R. ; Lopez, A. *Forensic Science International* 138 (2003)17–26
23. Zweig, M.H. ; Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.*Clin Chem.* 1993 Apr;39(4):561-77.
24. Navazesh, M.,Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Science*, 1993.694: p.73-77
25. Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. *Science.* 2004 Oct 15;306(5695):471-3.
26. Cody, R B, Laramée, J A, Durst, H D, *Anal. Chem.* 2005, 77, 2297-2302.

# 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)

(計畫主持人以條列方式逐項填寫，若篇幅不足，可另附頁說明)

計畫名稱	濫用藥物毛髮檢驗:初步篩檢與低含量藥物之方法開發		
計畫編號	DOH97-NNB-1012	填寫日期	97.11.14
執行機構	中山醫學大學	計畫主持人	張耀仁
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>一、 建立毛髮檢驗初篩方法：</p> <p>二、 提升毛髮中天生低含量藥物之分析靈敏度：</p>		
已達成目標及其他成果	<p>本計畫將針對毛髮檢驗的兩個重要課題，提出解決的方法：計畫第一部分將針對毛髮檢驗初篩方法進行方法開發。基於目前國內毛髮檢驗中缺乏簡易的初篩方法，為增進檢驗的時效性，本計畫目前已成功建立方便可行之EMIT免疫方法，並近一步成功以ESI與nanoESI之初篩MRM分析模式與毛髮表面質譜直接分析方式(DESI)之初篩方法。計畫第二部分將針對頭髮中天生低含量之藥物，包含大麻與BZD類藥物。目前已完成GC/NCI-MS之方法評估，並進行大體積注射裝置(PTV-LV)之方法評估，可的到數十倍之靈敏度提升，提昇毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。</p>		

# 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-1012		
計畫名稱：	濫用藥物毛髮檢驗:初步篩檢與低含量藥物之方法開發		
計畫主持人：	張耀仁	執行單位：	中山醫學大學

## 1.本計畫之新發現或新發明

- (1) 計畫第一部分將針對毛髮檢驗初篩方法進行方法開發。基於目前國內毛髮檢驗中缺乏簡易的初篩方法，為增進檢驗的時效性，本計畫目前已成功建立方便可行之EMIT免疫方法，
- (2) 計畫第二部分將針對頭髮中天生低含量之藥物，包含大麻與BZD類藥物。目前已完成GC/NCI-MS之方法評估，並進行大體積注射裝置(PTV-LV)之方法評估，可得到數十倍之靈敏度提升，有效突破毛髮中天生低含量藥物之偵測問題。

## 2.本計畫對民眾具教育宣導之成果

由於毛髮可以保存受檢者的吸毒歷程，因此可以彌補尿液檢驗時無法有效回溯追蹤的缺陷，加上毛髮採檢方便又不具侵入性、無需冷藏冷凍，體積小保存運送遠勝於其他檢體。因此，本研究發展精密的毛髮檢驗技術，可補強尿液檢驗的不足，讓毒品無所遁形，成為刑事科學鑑定的利器。

## 3.本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

無