

利用 LC-ESI-MS 與蛋白質沉澱法檢測人類血漿中
之第二代抗精神疾病藥物

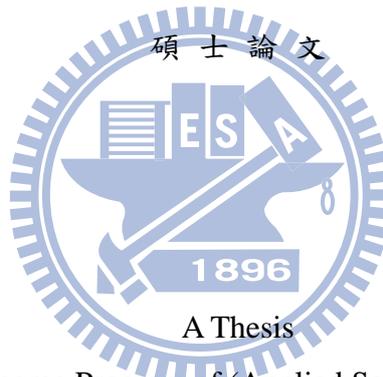
研究生：蕭如君

Student : Ru-June Shiau

指導教授：謝有容

Advisor : You-Zung Hsieh

國立交通大學
理學院 (應用科技) 學程



Submitted to Degree Program of (Applied Science and Technology)
College of Science
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in

Degree Program of (Applied Science and Technology)

August 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

利用 LC-ESI-MS 及蛋白質沉澱法檢測人類血漿中
之第二代抗精神疾病藥物

學生：蕭如君

指導教授：謝有容

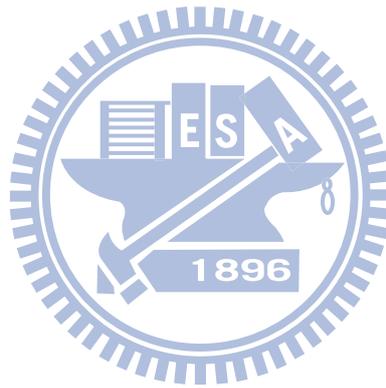
國立交通大學理學院(應用科技)學程

摘 要

Olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 為新一代非典型抗精神疾病藥物。已有許多文獻使用液-液萃取與固相萃取的方式萃取人類全血、血漿與血清中的這些藥物，並以液相層析串聯質譜做檢測。這些方法通常需要繁雜、昂貴且耗時的前處理步驟。在這個研究中，我們希望能以快速並簡單的蛋白質沉澱方式來萃取人類血漿中的這些藥物並以液相層析串聯質譜定量。

首先，我們探討 LC-ESI-MS 的參數，包含乾燥氣體流速、霧化壓力以及毛細管的壓力與溫度。在上述最佳化的條件下使用 20 mM 乙酸銨加入 0.15% 三乙胺，以乙酸調整至 pH 4.0 與乙腈做為移動相以梯度沖提。實驗中以 mirtazapine 做為內標準品，olanzapine、quetiapine、aripiprazole 與 mirtazapine 均以正離子模式偵測。偵測質荷比分別為313、384、448 與 266。Olanzapine 與 quetiapine 範圍在 2.5 至 100 ng/ml 與 100 至 800 ng/ml之間；aripiprazole 範圍在50 至 350 ng/ml 之間有良好的線性關係，相關係數為在 0.9926 至 0.9965 之間。三分析物 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之最低偵測極限分別為 0.94、0.95 與 1.35 ng/ml。

在真實樣品的部分，我們先以 62.5% 的甲醇萃取人類血漿中的 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole，並以 14000 rpm 離心 7 分鐘，取出上清液，加入內標準品，以此作為萃取條件，有良好的回收率與準確性。此方法相較於傳統樣品前處理方式有更簡便的操作步驟同時兼顧良好之準確性與再現性。



Analysis of secondary generation antipsychotics in human plasma by
LC-ESI-MS with protein precipitating pretreatment.

Student: Ru-June Shiau

Advisor: You-Zung Hsieh

A Thesis Submitted to Degree Program of (Applied Science and Technology)

College of Science National Chiao Tung University

Abstract

Olanzapine, quetiapine and aripiprazole were new generation atypical antipsychotics. Several methods have been developed to determinate these drugs in human blood, plasma, or serum with different analyzing methods. For LC/MS, liquid-liquid extraction or solid-phase extraction pretreatments were usually used before analysis. These pretreatment methods were complex, expensive, and time consuming. In this study, a rapid and effective protein precipitating procedure was used for extraction of antipsychotics in human plasma for LC/MS analysis.

First, the parameters of MS including flow rate of dry gas, pressure of nebulize gas, capillary voltage and temperature were optimized for each analytes for best sensitivity. Mirtazapine was added as internal standard which has similar structure construction with analyte olanzapine, quetiapine, and aripiprazole. A three analytes and internal standard were observed under positive mode with m/z 313, 384, 448 and 266 corresponding to related $[M + H]^+$ adducts. By using acetonitrile and H_2O containing 20 mM ammonium acetate and 0.15% triethylamine as mobile phase, 3 analytes and spiked internal standard were separated within 9 minutes. Organic solvents with different polarity were compared for both extracting and interferences removing (most

were serum albumins) efficiency. Methanol was chosen as extraction organic solvent for best recovery and better resolution of HPLC separation. Then, different extraction organic solvent volume was optimized for lowest sample dilution, which affects the signal and sensitivity in MS. Under optimized conditions, all analytes have good linear range from 2.5 to 100 ng/ml, 100 to 800 ng/ml, 50 to 350 ng/ml for olanzapine, quetiapine and aripiprazole separately, which were suitable for actual clinical dosed concentrations. The coefficients of determination (r^2) were between 0.9926 to 0.9965 and the estimated detection limits were 0.94, 0.95 and 1.35 ng/ml for olanzapine, quetiapine and aripiprazole. The analytes performing good recoveries in proposed method in real human serum sample. The method presented in this study was related simple but existed good extraction efficiency for all three analytes and removed most of interferences contained in human serum samples, which providing a better way of sample pretreatment for LC/MS analysis.



誌 謝

三年的光陰轉眼即逝，能夠重新回到校園中進修，學得新的知識與技能，真的充滿感激。首先要感謝的是謝有容教授的指導與包容，讓我學會在做研究時該如何去思考與解決問題，著實受益匪淺。也要感謝承宇學長，給我許多的支持與意見，在遇到困難時，總不吝嗇給與支持與協助。而實驗室的夥伴們，大家的熱情與關懷，真的讓人感到很窩心。

另外，要感謝的是中化製藥研究所吳建和所長、分析室賴傳益主任與實驗室裡的同仁，在這段時間給予我的支持與鼓勵，讓我在工作之餘順利的把學業完成。

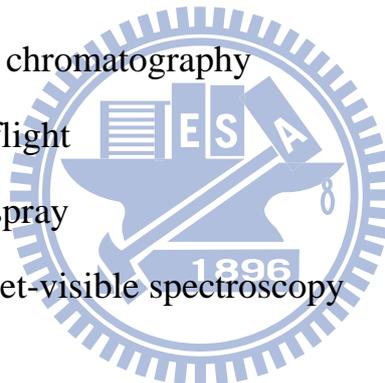
最後，要感謝的是我的家人與朋友，因為你們的陪伴與支持，讓我可以堅持到最後。



縮寫表

縮寫	全文
ADME	absorption、distribution、metabolism、excretion
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
APPI	atmospheric pressure photo ionization
CI	chemical ionization
Conc.	concentration
EC	electrochemical detector
EI	electron impact
EIC	extracted ion chromatogram
ELSD	evaporative light scattering detector
ESI	electrospray ionization
FAB	fast atom bombardment
FD	field desorption
FDA	food and drug administration
FI	field ionization
FTIR	fourier transform infrared spectrometer
GC	gas chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IR	infrared spectrometer
Ki	inhibitory constant
LC	liquid chromatography

LLE	liquid-liquid extraction
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	mass spectrometer
PD	plasma desorption
PPT	protein precipitate
RI	refractive index
RSD	relative standard deviation
SFC	supercritical fluid chromatography
SIMS	secondary ion mass spectrometer
SPE	solid-phase extraction
TIC	total ion chromatography
TOF	time of flight
TS	thermo spray
UV-Vis	ultraviolet-visible spectroscopy

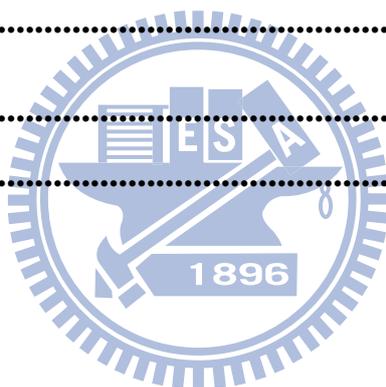


目 錄

摘 要	i
Abstract	iii
誌 謝	v
縮寫表	vi
目 錄	viii
圖目錄	xi
表目錄	xiii
一、 緒論	1
二、 背景與理論介紹	2
2.1 液相層析儀	2
2.1.1 液相層析儀器裝置	2
2.1.1.1 流動相儲存槽與溶劑處理系統	3
2.1.1.2 幫浦系統	4
2.1.1.3 樣品注射系統	5
2.1.1.4 液相層析之分析管柱	6
2.1.1.5 保護管柱	6
2.1.1.6 偵測器	7
2.2 液相層析串聯質譜儀	11
2.3 游離源	12
2.3.1 電灑游離法	14
2.3.2 大氣壓化學游離法	15
2.3.3 大氣壓光學游離法	16
2.4 質量分析器	17
2.4.1 四極柱質量分析器	17
2.4.2 離子阱	18

2.4.3 飛行時間分析器.....	20
2.5 液相層析串聯質譜儀之介面.....	21
2.5.1 液相直接導入介面.....	22
2.5.2 傳送帶介面.....	22
2.5.3 加熱濃縮線.....	22
2.5.4 熱灑法.....	23
2.5.5 粒子束介面.....	23
2.5.6 電灑法介面.....	24
2.5.7 離子灑法介面.....	26
2.6 精神分裂症.....	27
2.7 第二代抗精神疾病藥物.....	27
2.8 分析物簡介與文獻回顧.....	29
2.8.1 Olanzapine	29
2.8.2 Quetiapine.....	30
2.8.3 Aripiprazole.....	31
三、 實驗.....	34
3.1 儀器裝置.....	34
3.2 藥品、試劑與樣品.....	34
3.3 實驗方法.....	34
3.4 液相層析儀條件.....	34
3.5 質譜參數.....	35
3.6 標準品溶液之配製.....	36
3.7 萃取方法.....	38
四、 結果與討論.....	39
4.1 游離源最佳化.....	39

4.1.1 乾燥氣體流量.....	40
4.1.2 霧化壓力之測試.....	41
4.1.3 毛細管電壓.....	42
4.1.4 毛細管溫度.....	43
4.2 萃取條件測試.....	45
4.2.1 不同溶劑測試.....	47
4.2.2 不同溶劑比例.....	49
4.2.3 不同離心時間測試.....	51
4.2.4 定量校正曲線與再現性結果	52
4.3 同日與異日間之回收率與再現性.....	55
4.4 不同實驗室差異.....	58
五、 結論.....	60
六、 參考文獻.....	62



圖目錄

圖 2-1 液相層析儀之組件	3
圖 2-2 液相層析儀之往復式幫浦	4
圖 2-3 樣品注射器示意圖	5
圖 2-4 樣品注射器示意圖	6
圖 2-5 可見光-紫外光偵測器容槽示意圖	9
圖 2-6 質譜儀組成構造示意圖	12
圖 2-7 大氣壓下游離源適用範圍	14
圖 2-8 大氣壓化學游離源示意圖	16
圖 2-9 大氣壓光學游離源示意圖	17
圖 2-10 四極柱質量分析器示意圖	18
圖 2-11 離子阱質譜儀結構示意圖	19
圖 2-12 飛行時間式分析器結構示意圖	20
圖 2-13 電灑游離法離子形成過程	25
圖 3-1 Olanzapine 結構式	36
圖 3-2 Aripiprazole 結構式	37
圖 3-3 Quetiapine 結構式	37
圖 3-4 Mirtazapine (內標準品) 結構式	38
圖 4-1 游離源之乾燥氣體流量比較圖	41
圖 4-2 游離源霧化壓力比較圖	42
圖 4-3 游離源之毛細管電壓比較圖	43
圖 4-4 游離源之毛細管溫度比較圖	44
圖 4-5 標準品檢量線層析圖	45
圖 4-6 萃取條件測試示意圖	47
圖 4-7 分別以甲醇、乙腈、乙醇與異丙醇作為萃取溶劑之回收率	48

圖 4-8 不同溶劑萃取之層析圖	49
圖 4-9 分別以 75、62.5 與 50% (v/v) 的甲醇作為萃取溶劑之回收率	50
圖 4-10 分別以 5、7、10 與 15 分鐘作為離心時間之回收率	51
圖 4-11 Olanzapine 2.5 至 100 ng/ml 之檢量線	53
圖 4-12 Olanzapine 100 至 800 ng/ml 之檢量線	53
圖 4-13 Quetiapine 2.5 至 100 ng/ml 之檢量線	54
圖 4-14 Quetiapine 100 至 800 ng/ml 之檢量線	54
圖 4-15 Aripiprazole 25 至 1600 ng/ml 之檢量線	55
圖 4-16 標準品添加於真實樣品之層析圖	58



表目錄

表 2-1 液相層析儀偵測器之效能表現	8
表 2-2 氣相離子源與脫附離子源	13
表 2-3 於真實樣品中萃取 olanzapine 之相關文獻	30
表 2-4 於真實樣品中萃取 quetiapine 之相關文獻	31
表 2-5 於真實樣品中萃取 aripiprazole 之相關文獻	33
表 3-1 移動相比例	35
表 3-2 質譜儀離子阱之參數	35
表 3-3 檢量線配製濃度	36
表 4-1 檢量線、相關系數、最低偵測極限與再現性	52
表 4-2 同日間標準品添加於真實樣品之回收率與再現性	56
表 4-3 異日間標準添加於真實樣品之回收率與再現性	57
表 4-4 不同實驗室檢測未知濃度之血漿樣品結果	59



一、緒論

研究血漿蛋白的結合率是目前新藥開發上很重要的一項技術，當藥物進入人體後會與血漿中的蛋白做結合。血漿是血液中主要的成分，而血漿中有 90% 是水，其他包含了血漿蛋白、葡萄糖、無機鹽類、激素以及二氧化碳。血漿的主要功能是運送血細胞，同時也是運輸代謝物的主要媒介。藥物人體會經過吸收、分布、代謝與排泄 (ADME, absorption、distribution、metabolism、excretion) 的步驟，要測得藥物在人體內分布的情形就必須檢測血漿中與蛋白質結合的藥物含量。

我們預期檢測的藥物是治療精神分裂症的藥物，一般投藥劑量約在數毫克即可達到療效。因投藥量低在血中測得的濃度並不高，所以必須盡可能的降低檢測極限。質譜儀是目前檢測技術中相對靈敏度較高之分析儀器，本篇實驗中選擇液相層析儀結合質譜儀作為檢測儀器。

因血漿是個複雜的樣品，必須先經過前處理後才能通過層析管柱再進入質譜，以避免對管柱或質譜造成傷害，也可減少基質的干擾並降低偵測極限。一般市面上常見到萃取血漿中的藥物主要為利用液-液萃取與固相萃取方式，而這些萃取的方式繁雜且耗時。我們希望能以更快速且簡便的方式達到檢測的目的，並且有良好的回收率與再現性。

此研究中，我們期望以簡單的蛋白質沉澱方式作為樣品前處理方法。要使蛋白質沉澱，一般可加入酸、鹼、重金屬或是有機溶劑使蛋白質變性。由於使用液相層析串聯電噴灑質譜儀做為分析儀器，所以以有機溶劑作為萃取溶媒可以增加霧化與游離的效率。測試不同的有機溶劑與強度，可以找到最佳的方式作為萃取條件。以期達到快速且有效率的血漿樣品前處理效果，縮短整體的分析時間並達到快速篩檢的目的。

二、背景與理論介紹

2.1 液相層析儀

高效能液相層析 (high performance liquid chromatography) 是利用高壓溶劑幫浦 (high pressure pump) 使移動相 (mobile phase) 進行沖提 (elution)，而在沖提的過程中會帶動溶質流過固定相 (stationary phase)。因樣品中各個分析物的極性不同，在流過管柱時會與固定相的親和力不同，所以滯留時間也有所不同。液相層析法即是以固定相與溶質的相互作用所產生不同的親和力，再加上移動相對溶質的作用力不同，而造成溶質有不同的滯留時間，最後經由檢測器來定性與定量分析物。

液相層析是所有分析性的分離技術中最被廣泛使用的。其靈敏度與準確度高，也很容易自動化操作，並且適合用來分離非揮發性物質或是易熱分解的物質。此法已被廣泛用於各個領域，可分析物質十分廣泛，包括如：核苷酸、胺基酸、蛋白質、碳水化合物、藥物、抗生素、類固醇、殺蟲劑以及各種無機物質[1]。

2.1.1 液相層析儀器裝置

現今液相層析儀大多使用之管柱充填物粒徑約為 3 至 10 μm ，為了可以達到適合的沖提速率，會需要幫浦來達到一定的壓力值。一般液相層析儀的組件如圖 2-1 所示。

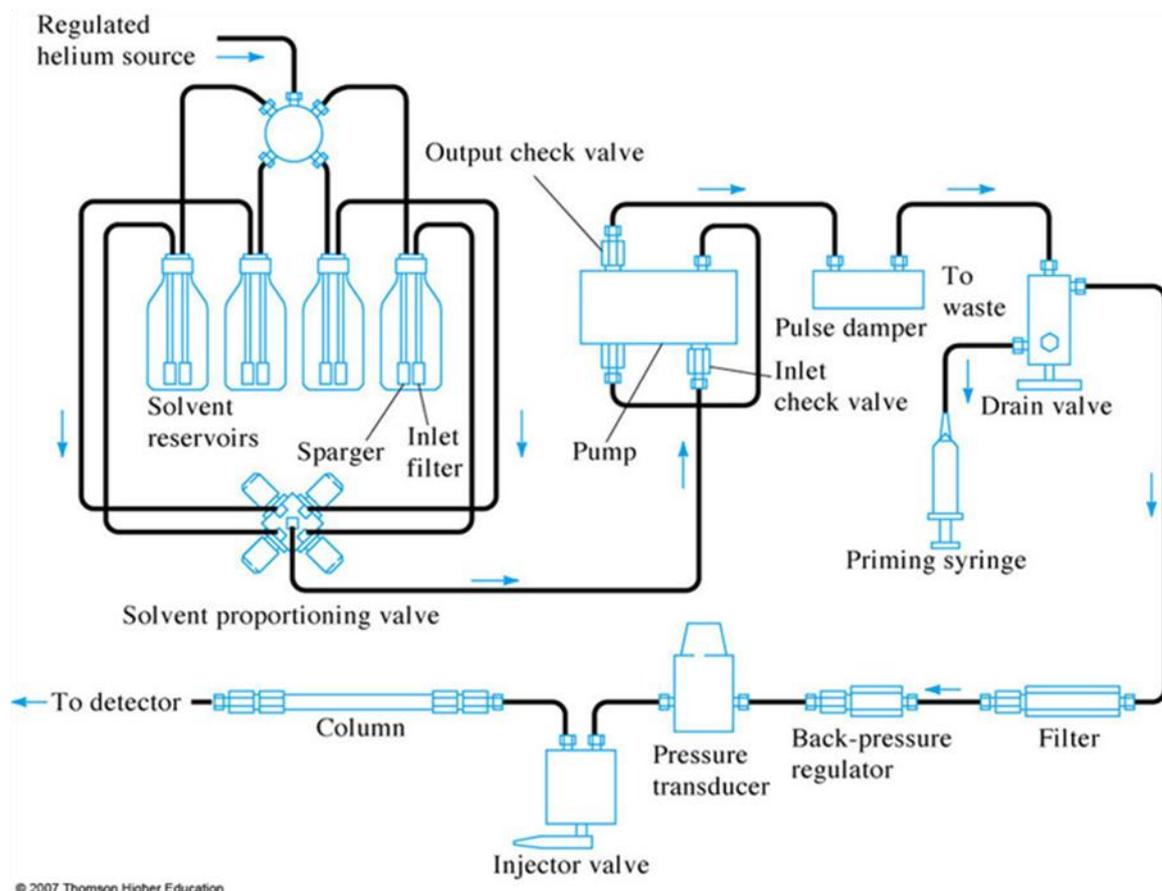


圖 2-1 液相層析儀之組件[2]

2.1.1.1 流動相儲存槽與溶劑處理系統

現今液相層析儀會配有數個溶劑儲存瓶，並且會有除氣與灰塵等裝置。若是溶劑中有氣泡或是灰塵會影響流速與層帶分散，並且也會對偵測器造成影響。除氣的裝置有下列數種：真空拓抽系統、蒸餾系統、加熱與攪拌裝置或是噴氣裝置 (sparging)。而系統中也會裝置可以將灰塵與顆粒性物質過濾排除，以避免對幫浦系統、注射裝置造成傷害或是堵塞管柱。

等位沖提 (isocratic elution) 是指移動相使用單一溶劑或是固定比例溶劑的混合。梯度沖提 (gradient elution) 則是使用兩種或以上極性不同的溶劑系統，且在分離過程中改變其中的組成。可以是持續的變化，也可以使

用一系列的階梯式變化。目前市售的液相層析儀多配有混合槽的裝置，可將溶劑混合。

2.1.1.2 幫浦系統

一般高壓液相層析儀的幫浦應有下列幾點需求：(1) 輸出之壓力應達 6000 psi 以上；(2) 不可有脈衝式輸出現象；(3) 流速應在 0.1 至 10 ml/min；(4) 流速之再現性必須在 0.5% 絕對值以內；(5) 對所使用的溶劑應具有抗腐蝕性。

現今主要使用在液相層析儀的幫浦是往復式幫浦如圖 2-2，通常內有一小槽室，可利用馬達驅動式活塞來回運動以抽取溶劑，並且會配有球型的控制閥，可以控制溶劑流入或是流出。而往復式幫浦的缺點在於會產生脈衝式液流，容易造成基線的不穩，而新型的液相層析儀，採用雙重幫浦或是橢圓形凸輪以便減少讓脈衝現象。往復式幫浦點優點是其具有很小的體積量 (35 至 400 μ l 之間)、具有高輸出壓力、可以進行梯度沖提、擁有大溶劑容量、流速穩定且幾乎不受管柱之逆壓力與溶劑黏性所影響。

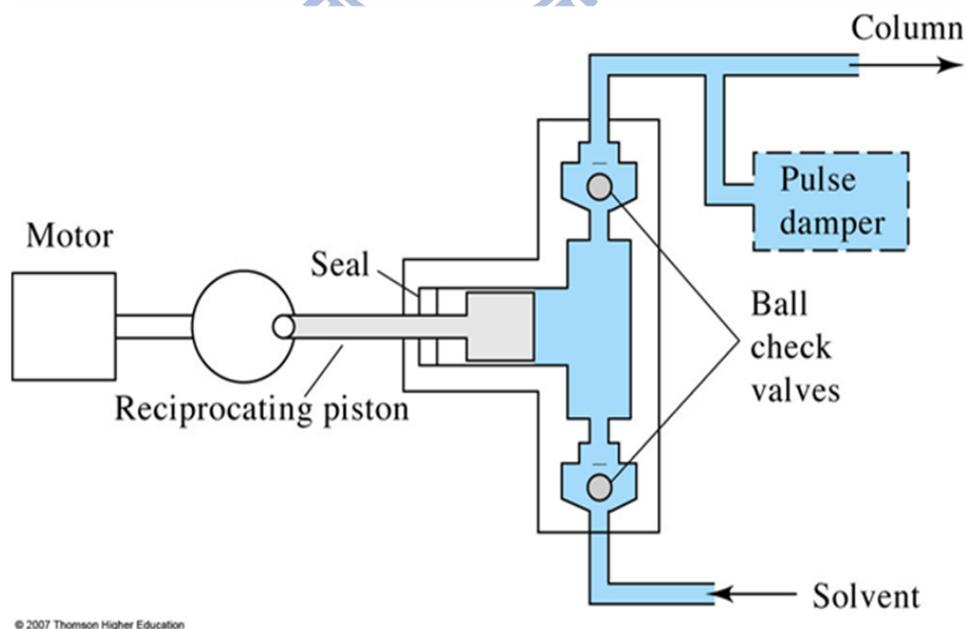


圖 2-2 液相層析儀之往復式幫浦[2]

2.1.1.3 樣品注射系統

在液相層析儀中，大部分所使用的樣品注射器如圖 2-3 與 2-4 所示，其樣品迴路是可以取代的。一般約在 1 至 100 μl 或是更大的樣品量，此種迴路可以在高達 7000 psi 的壓力下導入樣品，並且精密度為數千個百分比。

現今，市售液相層析儀配有自動注射器，此種單元配有注射幫浦，從樣品瓶中抽取樣品注入液相層析儀中，且樣品體積從小於 1 μl 至大於 100 μl 不等。部分還具有樣品儲存室或是具有衍生化反應的設備，也可由電腦自動化操作。

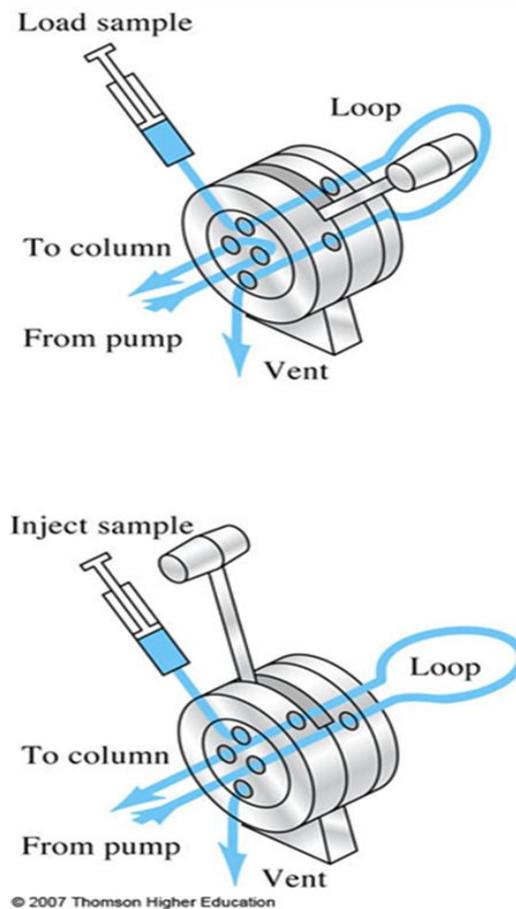


圖 2-3 樣品注射器示意圖[2]

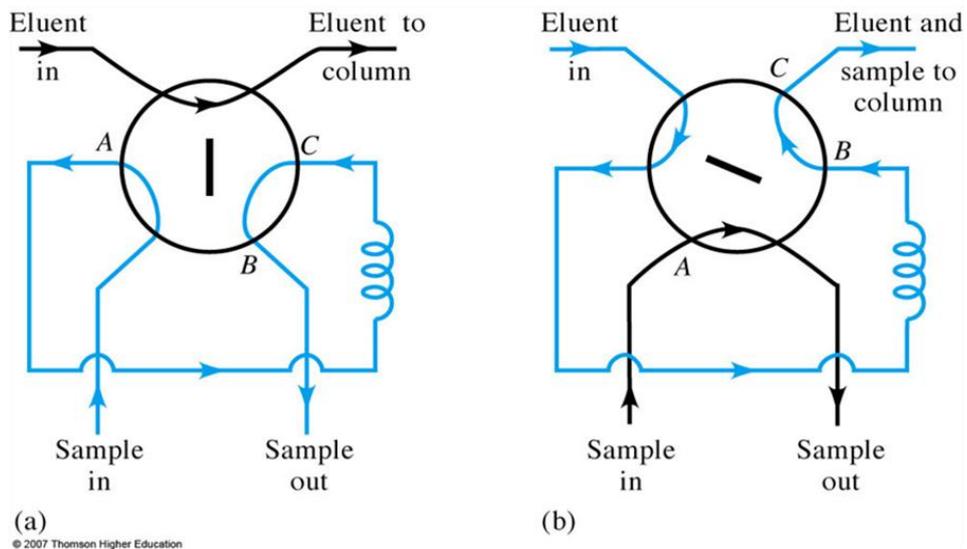


圖 2-4 樣品注射器示意圖[2]

2.1.1.4 液相層析之分析管柱

液相層析儀管柱多由不銹鋼所製成，有時也會由厚壁玻璃管與 聚合物材質所製造。一般管柱長度約在 5 至 25 cm 之間，內徑約在 3 至 5 mm 之間，充填物的顆粒大小約為 3 或 5 μm 。目前常見的管柱類型，長度約為 10 至 15 cm，內徑為 4.6 mm，充填物之顆粒為 5 μm ，此種管柱具有每公尺 40,000 至 70,000 個理論板數。

1980 年開始售有 1 至 4.6 mm 內徑，長度 3 至 7.5 cm 與充填物內徑 3 至 7.5 μm 的管柱。此管柱具有高達 100,000 個理論板數，可以快速分析並且減少溶劑的使用，但相對的，所承受的壓力值也會提高。

2.1.1.5 保護管柱

通常我們會在分析管柱前會接上保護管柱，以去除溶劑中之顆粒與污染物以及會與管柱中固定相形成不可逆鍵結現象的物質，以延長管柱之壽命。保護管柱通常會選擇類似於分析管柱之固定相，而顆粒尺寸會較大以

減少壓力。若保護管柱被汙染，可以重新充填或是再使用一支新的保護管柱，以減少分析管柱的耗損。

2.1.1.6 偵測器

液相層析儀的檢測器有兩種類型。第一種是總體積性質偵測器 (bulk property detectors)，可以感應移動相的折射系數、介電常數或是密度等性質。另一種是溶質性質偵測器 (solute - property)，只會偵測溶質的 UV 吸收值、螢光值或是擴散電流值等不受移動相所影響之性質。表 2-1 列出液相層析儀常使用的偵測器及其性質。



表 2-1 液相層析儀偵測器之效能表現[1]

偵測器	商業化	質量 LOD ^a (一般值)	質量 LOD ^b (以十為單位)
吸收值	是	10 pg	3 -4
螢光值	是	10 fg	5
電化學性	是	100 pg	4 - 5
折射系數	是	1 ng	3
電導值	是	100 pg - 1 ng	5
質譜法	是	< 1pg	5
FTIR	是	1μg	3
光散射性	是	1μg	5
光學活性	否	1 ng	4
元素選擇	否	1 ng	4 - 5
光游離化	否	< 1 pg	4

資料來源：參考自製造商文件；Handbook of Instrument Techniques for Analytical Chemistry, F. Settle, ed., Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997; E. S. Yeung and R. E. Synovec, Anal. Chem., 1986, 58, 1237A.

^a 質量 LOD (偵測極限) 受到化合物種類、儀器類型，以及 HPLC 操作條件等各項所影響，但是在其中所列舉出的數值是，目前市售系統所能達到的一般數值

^b 其一般性數值來自上述之參考文獻

(1) 紫外線-可見光吸收偵測器 (UV-Vis absorbance detector)

一般紫外線-可見光偵測器的容槽為 Z 字形。圖 2-5 所示是紅外線吸收值偵測器，為了將通過管柱後沖提物之擴散現象降到最低，此種容槽之體積必須盡可能的維持很小的體積量。一般體積量在 1 至 10 μl 之間，而容槽的光徑約在 2 至 10 mm 之間。

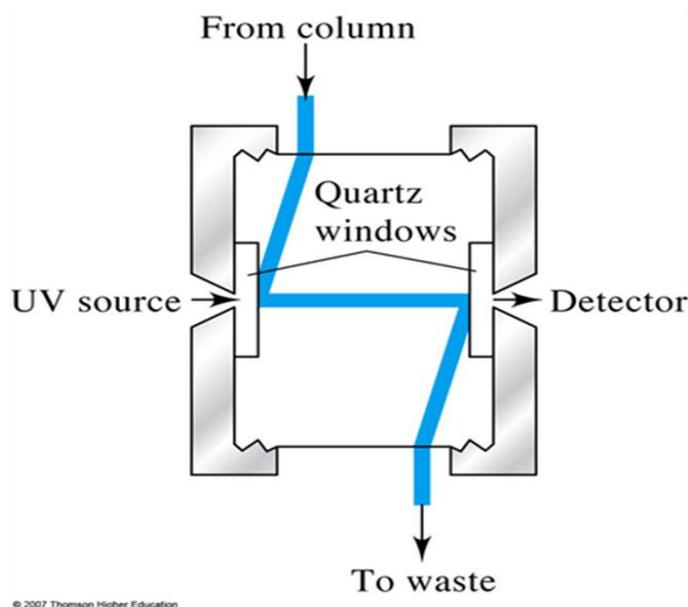


圖 2-5 可見光-紫外光偵測器容槽示意圖[2]

層析圖譜是以時間函數關係將吸收值繪製成的圖形。早期的 UV 吸收值偵測器是以汞燈為光源的濾光片型光度計。大多數的偵測器會使用濾光片分離出 254 nm 的強烈圖譜，某些儀器也可替代濾光片濾出 250、313、334 與 360 nm 譜線。這種偵測器受限於這些波長中的其一波長處，某些儀器是雙波長型的裝置，它們也配有數種濾光片的濾光片轉輪，可以快速的切換，以便於偵測不同的沖提物種。現今，液相層析儀的廠商由光柵光學元件組成之掃描式分光光譜儀所構成的偵測器，部分僅能使用在紫外光範圍，部分則是可涵蓋紫外光至可見光的範圍。

(2) 紅外線吸收值偵測器 (IR absorbance detector)

市面上有兩種紅外線偵測器，一種是濾光片型儀器，另一種是類似於傅立葉轉換儀器 (FTIR)，需使用氯化鈉或是氟化鈣作為窗片的材質。紅外線的容槽類似於此外線的容槽，光徑長度在 0.2 至 1.0 mm 之間，體積約在 1.5 至 10 μl 之間。

使用紅外線偵測器的缺點在於，許多使用的溶劑穿透率都很低，並且，除非使用的是特殊的窗片材質，否則使用水性的移動相很快就會導致窗片惡化的情形。當質譜儀開始被作為液相層析儀的偵測器時，此方法應用以減少了許多。

(3) 螢光值偵測器 (Fluorescence detector)

螢光值偵測器是將光電偵測器置放於與激發光束呈現為 90° 的位置上來觀測螢光值。最簡單的是使用汞激發光源，也可用氬光源與光柵型單光器來分離出螢光。另一種是使用雷射誘導螢光，可增加靈敏度與選擇性。

螢光方法的優點是具有高靈敏度，一般可比大多數的吸收值偵測器提高一個數量的靈敏度。通常會使樣品與試劑形成螢光放射性衍生物，相是二甲基萘磺醯氯能夠與胺基酸、一級胺、二級胺或是酚類等形成螢光放射性物質，可被廣泛的應用在胺基酸偵測工作上。

(4) 折射系數偵測器 (Refractive index detector, RI)

折射系數偵測器對所有的溶質幾乎都有感應性。它們的優點是具有可信度與不會受到流速影響，但它們是高溫度靈敏性的，因此必須將溫度維持在一定的溫度，溫度的變動不可以超過攝氏千分之一。折射系數偵測器的缺點是靈敏度會比大多數的偵測器來得差，並且也無法使用梯度沖提。大多數被使用在醣類的偵測。

(5) 蒸發式光線散射型偵測器 (Evaporative light scattering detector, ELSD)

在液相層析儀中，蒸發式光線散射型偵測器是一種較新型的檢測器。首先經過管柱的沖提物會流入噴霧器中，被氮氣轉化為細霧狀，然後細微液滴會被導入經溫控的噴出管，使移動相產生蒸發現象。之後分析物顆粒的雲霧穿過一束雷射光束中，在與移動相成垂直位置使用矽二極體偵測所

散射之輻射量。此偵測器的優點為對所有非揮發性的溶質都具有感測性，且靈敏度優於折射偵測器，偵測極限約為 0.2 ng/μg。其缺點是移動相只能使用揮發性鹽類。

(6) 電化學偵測器 (Electrochemical detector, EC)

電化學偵測器是以電流法、伏安法、庫倫法與電導法為基礎。只要是具備有特定官能基可發生氧化還原反應者皆可使用此法做偵測。氧化反應如：烴類、疊氮類、醯胺類、胺類、酚類、芳香族烴類與奎林；還原反應如：烯類、酯類、酮類、醛類、共軛酯類、醚類、偶氮化合物、硝基化合物與鹵素。

(7) 質譜偵測器 (Mass spectrometer)

液相層析儀與質譜的結合，可以同時獲得分離與偵測兩種操作的理想合併方式，最主要的問題就是在質譜儀中需要的是氣態樣品，因為我們需要一種介面來將從液相層析儀流出的移動相轉化為氣態，在 2.2.3 液相層析儀串聯質譜裡有詳細的介紹。液相層析儀串聯質譜與傳統液相層析儀不同的地方在於他不僅僅只是依賴滯留時間，此技術能夠對特定的沖提物進行指紋辨識。此串聯方式也可提供分子質量、結構資訊以及進行準確的定量分析操作。對於較為複雜的混合物，可以將兩個質譜儀串聯在一起，大多所使用的質譜儀為三段式四極式系統，或是四極離子阱系統。若要獲得較高的解析度時，可在質譜儀系統的最後一個質量分析器使用飛行式質譜儀。

2.2 液相層析串聯質譜儀

質譜儀是以熱電子撞擊氣體分子，使其產生碎片及離子。經磁場分離後，依據質荷比的不同，達到分離的效果。在 1912 年，J. J. Tomson 建立了世界上第一台質譜儀，並發現了質量數為 22 氖之同位素。1934 年 Harold Urey 利用質譜儀發現氘。1940 年代開始被應用在石化工業。隨著科

技的進步，現今質譜儀不但成為分析必備的工具，並且廣泛的應用在各個領域，如：生物醫藥、環境科學、核子物理等。

質譜儀主要可分為五個部分，分別為導入系統、離子源、質量分析器、偵測器及數據處理系統，如圖 2-6 所示。原理是將待測物轉為氣相離子後，所產生帶電荷的離子或特徵碎片，經過質量分析器時依其質荷比的不同而分開，得到該分子之質譜圖。

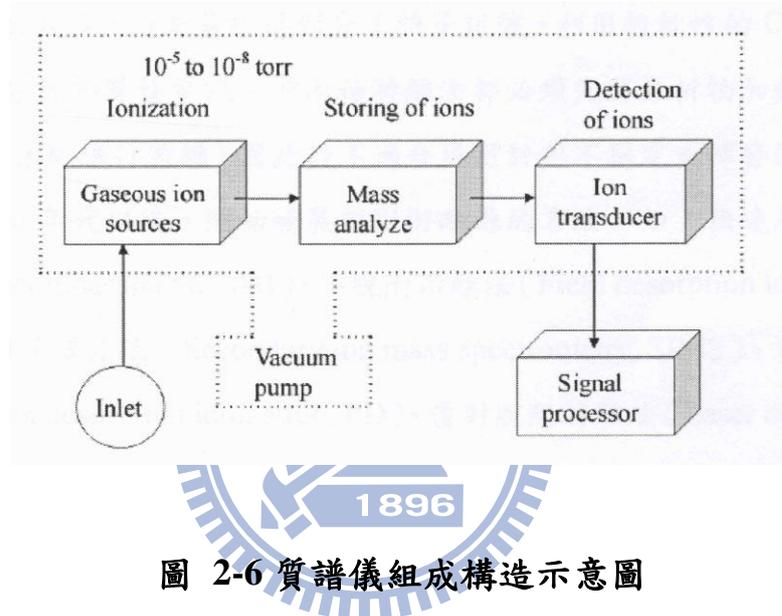


圖 2-6 質譜儀組成構造示意圖

2.3 游離源

質譜分析操作之起始點是氣態分析物離子形成的過程。在表 2-2 列出氣相離子源 (gas-phase source) 與脫附離子源 (desorption source)，氣相離子源是先將樣品予以蒸發，再進行游離化。脫附離子源是將固態樣品或是液態樣品直接換化為氣態離子。離子源也可被區分為硬性離子源 (hard source) 或是軟性離子源 (soft source)。硬性離子源會傳遞較大的能量給予分析物離子，使其處於較高的激發態，所以在鬆弛的過程中會造成化學鍵的斷鍵，產生質荷比較小的分子離子，而軟性離子源只會產生較小的碎片。

表 2-2 氣相離子源與脫附離子源[1]

基礎類型	名稱與簡寫	游離試劑
氣相	電子撞擊(EI)	高能量電子
	化學游離(CI)	試劑氣態離子
	電場游離(FI)	高電壓電極
脫附	電場脫附(FD)	高電壓電極
	電灑游離(ESI)	高能量電場
	基質輔助脫附-游離(MALDI)	雷射光束
	電漿脫附(PD)	來自 ^{252}Cf 的融合碎片
	快速原子撞擊(FAB)	高能量原子束
	二次離子質譜法(SIMS)	高能量離子束
	熱灑游離(TS)	高溫

質量分析器必須在真空條件下進行，因為必須避免離子在質量分析器中互相的碰撞而造成損失。傳統的游離方法都是在高真空下做連結的，如：EI、CI。真空的條件對 GC/MS 並沒有造成太大的困難，但是在 LC/MS 或是 CE/MS，由液相轉變為氣相，會使質譜儀的真空度下降，而大氣壓力下游離法(atmospheric pressure ionization, API) 的出現，確實改善了這個問題。目前常用的大氣壓力下游離法分別是：電噴灑游離法 (electrospray ionization, ESI)、大氣壓化學游離法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、大氣壓光學游離法 (atmospheric pressure photo ionization, APPI)。ESI 與 APCI 較常作為液相層析儀串聯質譜儀的介面。APCI 與 APPI 是在氣相中游離，會有較少的離子抑制 (ion suppression) 或

是離子增強 (ion enhancement) 的現象。APCI 與 APPI 大部分應用於藥物、中性分子、有機化合物或農藥。APPI 易於形成自由基離子，對於非極性的芳香族化合物較適用。而 ESI 從小分子量的藥物到大分子量的胜肽或蛋白質分子皆適用，應用範圍較廣泛，是近幾年來較常被使用的大氣壓下游離法。圖 2-7 為三種游離法分別試用的分子量範圍。

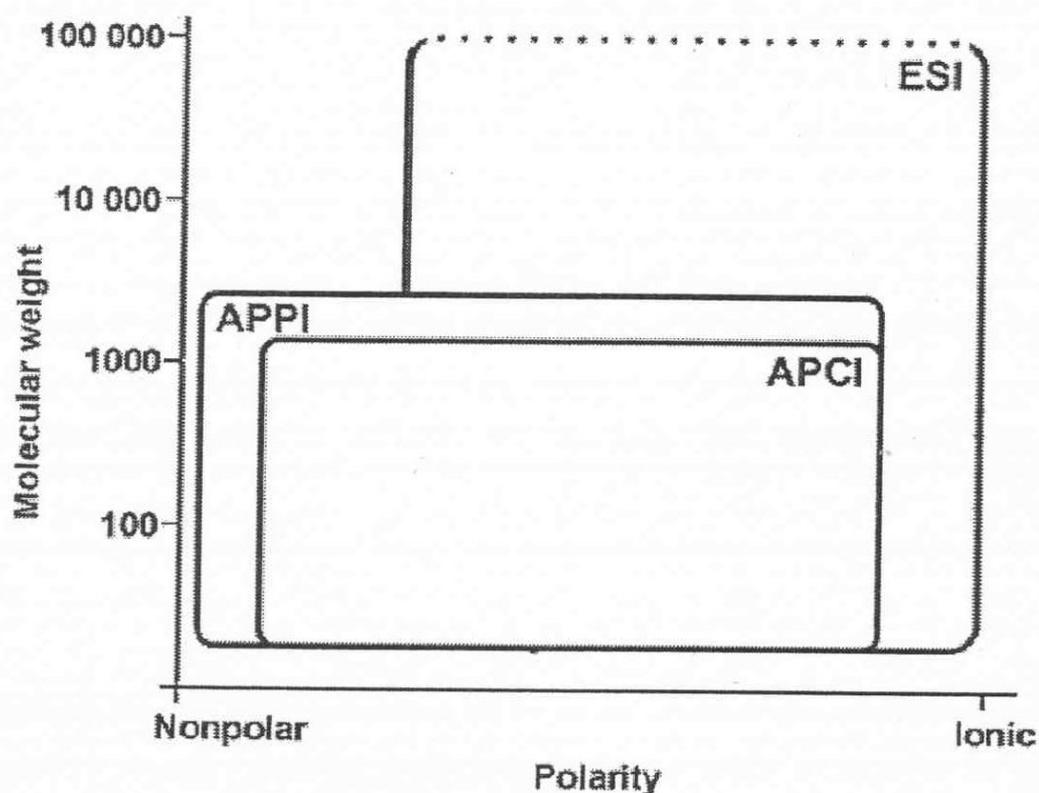


圖 2-7 大氣壓下游離源適用範圍

2.3.1 電灑游離法

電噴灑游離法可被應用在多胜肽、蛋白質、寡核苷酸等分子量在 1 mDa 以上生化分子。電灑法是大氣壓力下將分析物游離，因此所需之氣化溫度並不高，可使分析物保持穩定的狀態，是較為溫和的游離法。此法適合應

用在大分子量或是熱不穩定物質上，且操作簡便，也可作為液相到氣相的介面，因而常將液相層析儀或是毛細管電泳與串聯質譜儀，在 2.2.3.6 電灑法介面中有較詳細的介紹。

2.3.2 大氣壓化學游離法

大氣壓化學法主要應用於質譜串聯液相層析儀，此法是以霧化及去溶劑化使分析物達到游離的方式，並且可容納高容量的移動相。游離過程如圖 2-8 是藉由離子-分子反應 (ion-molecular reaction) 或電子捕捉反應 (electron capture reaction) 將電荷移轉至分析物上。此法會在介面處先加熱溶液，並導入霧化氣體使液滴霧化。當液滴上的溶劑通過加熱區揮發成氣態後，並經過施有高電壓的針尖時，會進行電暈放電 (corona discharge)，使溶劑的氣體分子游離產生質子化的溶劑分子離子。(如：甲醇產生 MeOH_2^+ ；水產生 H_3O^+)，而此溶劑分子離子在與分析物的氣相離子 (M) 碰撞後會產生質子化分子離子 (MH^+)，此即為離子分子反應。

大氣壓化學游離法是在氣相中進行游離化的過程，分析物之分子離子強度訊號由分析物的去溶劑化與分析物與溶劑間的質子親和力 (proton affinity) 來決定。分析物去溶劑化的過程若不完全，會減少分析物氣相分子的形成，降低在離子-分子過程中分析物氣相離子的生成，導致訊號降低。而分析物的質子親和力若是遠超過溶劑分子時，便有利於分析物離子的形成。但若是溶液中有金屬離子的存在 (如：鉀或鈉)，即可能會產生 MK^+ 、 MNa^+ 的訊號。

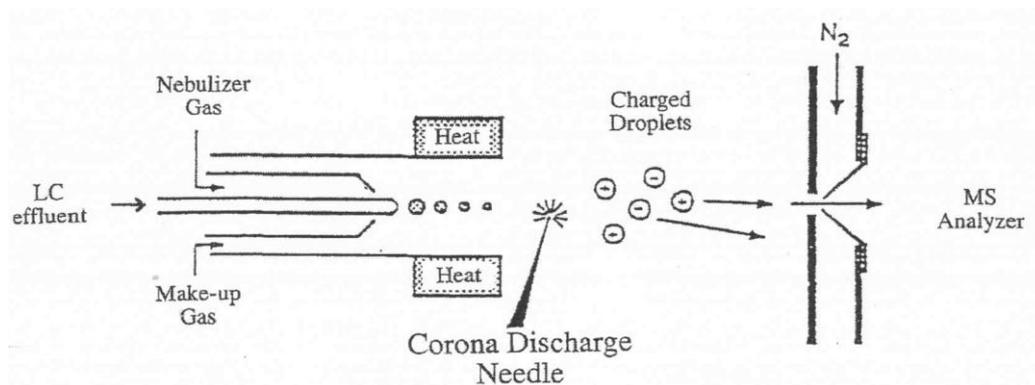


圖 2-8 大氣壓化學游離源示意圖

2.3.3 大氣壓光學游離法

大氣壓光學游離法也可直接與液相層析儀相連，其與大氣壓化學游離法主要的差異在於產生離子的方式。大氣壓光學游離法是以 UV 燈源以具有 10 eV 能量的氬燈 (krypton Lamp) UV 燈源。不同於大氣壓下化學游離法是以針尖施加電壓，使液滴達到游離，如圖 2-9。

此法可將游離效果不好之分析物或質子親和力較差之芳香族化合物，以 UV 燈將霧化的分析物液滴帶電荷。分析物在燈源照射下會產生自由基，吸附氬離子形成分析物離子或是藉由溶劑 (如：甲苯或丙酮) 照光所產生的自由基，再經由電子移轉到分析物上，此溶劑稱為 dopant。

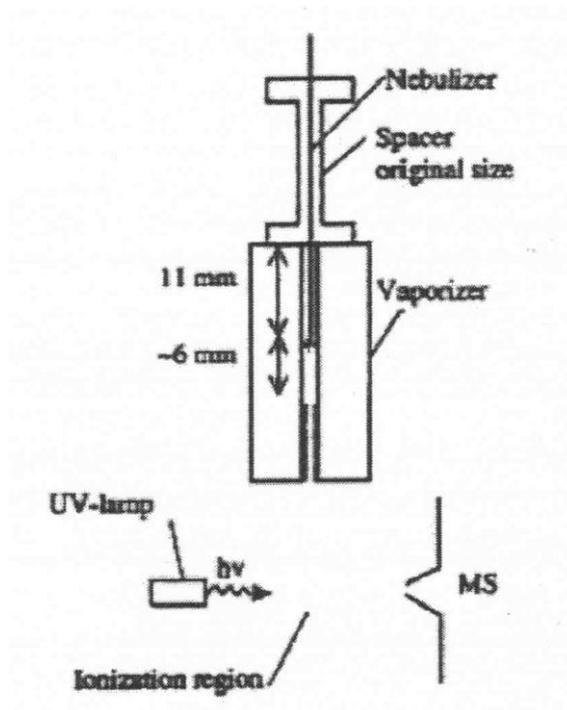


圖 2-9 大氣壓光學游離源示意圖

2.4 質量分析器

質量分析器是依據離子之質荷比 (m/z) 來進行分離的一種儀器。其應具有區分出微小質量差異的能力，並且應讓足夠數量的離子通過，以產生足以被偵測得到的離子電流。以下針對常見的質量分析器做介紹，分別是：四極柱質量分析器 (quadropole)、離子阱 (ion trap) 與時間飛行器 (time of flight, TOF)。

2.4.1 四極柱質量分析器

如圖 2-10，四極柱質量分析器其核心是以四根平行圓柱狀電極所組成，並以對角線排列，其中一對連接可變是直流電壓 (DC voltage) 電源之正端，而另一對連接於負端，並將相差 180° 相位的可變式無線電頻率交流電壓 (radio frequency voltage) 施加在每一對圓柱中。

四極柱質量分析器是以控制直流電壓與交流電壓，來使具有特定質荷比的離子通過。因為不同質荷比的離子具有不同的振動軌跡，只有會隨著電壓穩定振動的離子才可通過四極柱。其他的離子則會在電壓轉換的過程中，因偏離軌道而被電極中和，並且因為電極的極性很容易改變，可藉著快速改變直流電壓與交流電壓做快速掃描。四極柱質譜儀具有體積小、結構簡單、價格便宜、掃描速度快且傳送速率高的優點。

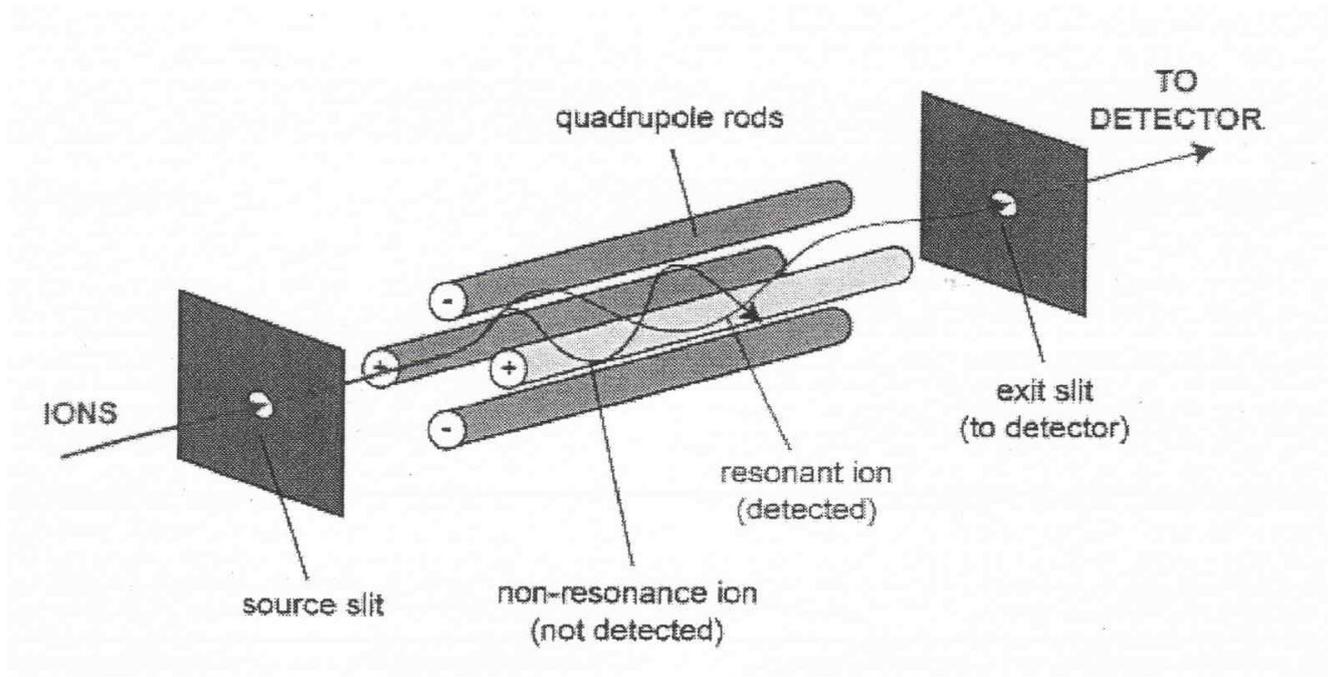


圖 2-10 四極柱質量分析器示意圖[1]

2.4.2 離子阱

離子阱是藉由電場與磁場來形成的氣態陰離子或陽離子，並讓所產生的離子能存在於其中較久，是屬於儲存式的質譜儀。利用離子的形成、儲存、掃描分析均在同一空間進行，具有高靈敏度的特性。離子阱與四極柱質譜儀的原理類似，皆是以電場控制離子運動。只是離子阱除了在 X、Y 軸

方向的電場外，在 Z 軸多加上一個直流電壓與可變式無線電頻率交流電壓，可使特定的離子會被留在阱內，並以 8 字形運動。若增加無線電頻率電壓值時，較重離子的軌道會較安定，而較輕離子則會較不安定，因此會使它們碰撞到環狀電極上。離子阱的結構包含了雙曲線的環狀電極 (ring electrode) 和兩個端蓋電極 (end electrode) 所形成的空間，如圖 2-11。

目前離子阱被用於層析法的偵測器，且能夠偵測各種分析物的質譜。此法具有較為堅固、體積小、偵測極限低以及比其他質量分析器價位更為低廉的優點。它與傳統四極柱分析器比較下主要優勢在於擁有較高掃描性，尤其在串聯質譜法中，因具有較高的離子碰撞誘導率，價格便宜，更適用於環境分析與醫藥臨床所用。

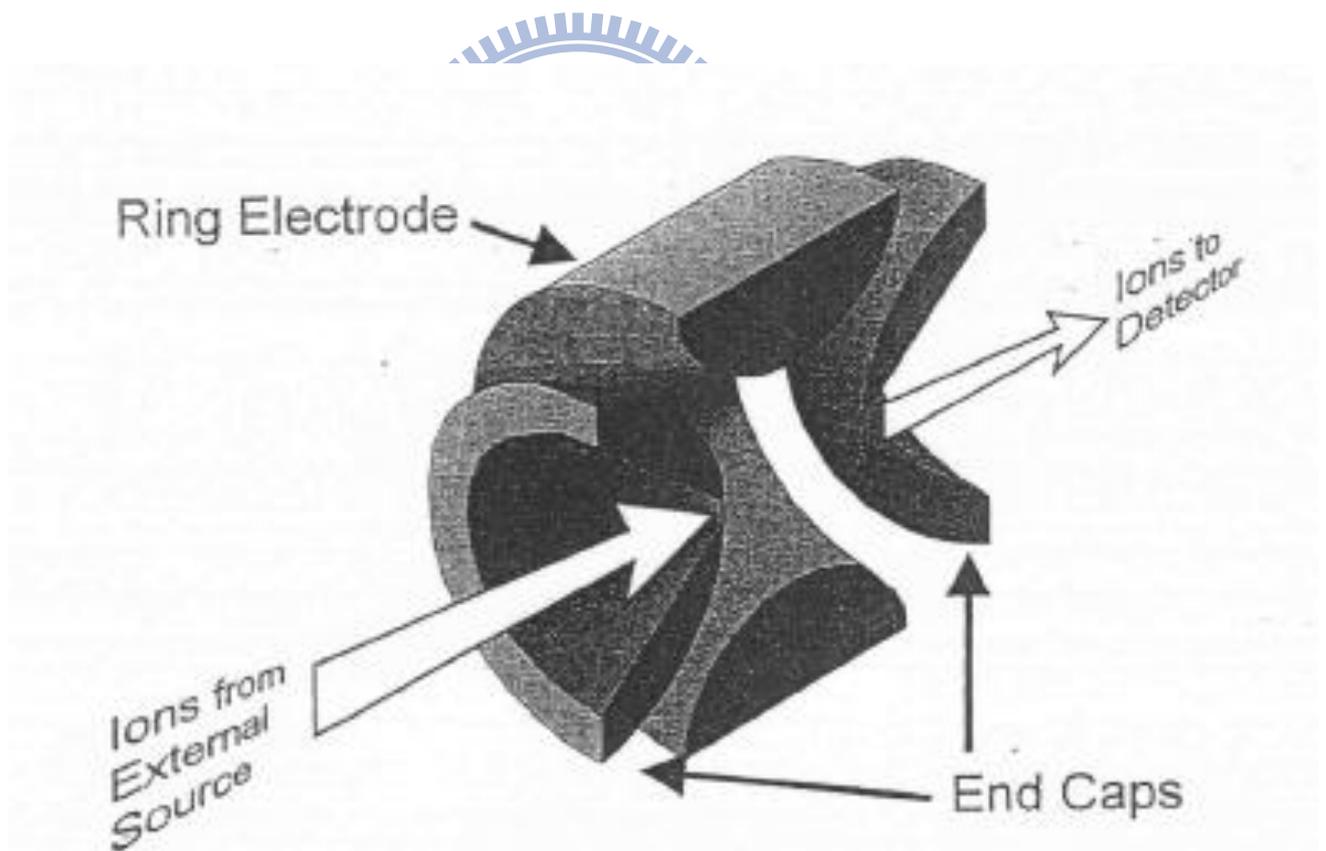


圖 2-11 離子阱質譜儀結構示意圖[3]

2.4.3 飛行時間分析器

飛行時間式分析器是利用電子、二次電子或是雷射釋出之光子等各項短暫脈衝來撞擊樣品，使其產生週期性的電荷離子。一般脈衝頻率在 10 至 15 kHz 之間，接著被 10^4 V 的電場脈衝加速，電場脈衝與游離化脈衝擁有相同的頻率，然後加速的粒子會通過約一公尺長的無電場式飄移管。理論上所有在管中的離子都具有相同的動能值，所以它們在管中的移動速率會與質量成反比，質量輕者會比質量重者較早抵達偵測器，其結構示意圖如圖 2-12。

一般飛行式分析器通常會與 MALDI 串聯，是因為 MALDI 所產生的離子是利用脈衝雷射打在基質的共結晶上所產生的，而雷射也能對飛行式分析器當作起始的開端，其優點在於靈敏度高、掃描速度快並且可偵測的分子量範圍較大。

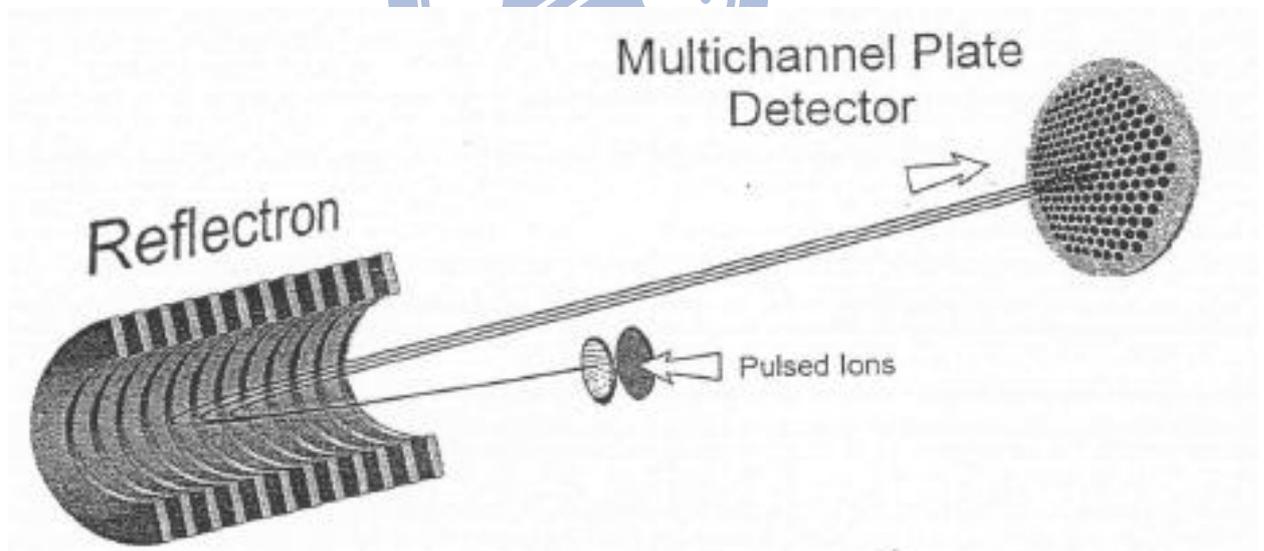


圖 2-12 飛行時間式分析器結構示意圖[3]

2.5 液相層析串聯質譜儀之介面

液相層析儀可結合上不同的偵測器，如：紫外光/可見光 (ultraviolet-visible, UV/Vis detector)、螢光偵測器 (fluorescence detector)、電導度偵測器 (conductivity detector)、折射偵測器 (refractive index detector, RI)、蒸發光散射偵測器 (evaporative light scattering detector) 應用於化學物質的定量，但對於極低濃度的定量或是某些必須經由衍生修飾上特殊基團才可偵測的物質，卻是充滿挑戰的。而現今液相層析儀結合質譜的技術克服了大多偵測器靈敏度不足的問題。質譜儀除了可提供如上述偵測器所有的遷移時間訊息外，也可獲得待測物之分子量，也可藉由再碎裂得到訊息與結構資訊，對於較為複雜的樣品，也可進一步偵測其代謝物或降解物，因此目前質譜儀是液相層析儀相當重要的偵測器。

液相層析儀和質譜結合的分析儀器，是先將樣品經由液相層析使待測物與干擾物分離後，再進入質譜儀中偵測待測物，而對於有相同移動速度的待測物，可藉由選擇離子監控模式 (selected ion monitoring mode, SIM) 或選擇反應偵測模式 (selected reaction monitoring mode, SRM) 對待測物的碎片離子進行分析。

液相層析儀與質譜串聯的特性即質譜儀可以直接分析非揮發性、熱不穩定性或預帶電荷的分子。一般液相層析儀所使用的流速對質譜儀來說是過大的，直接進入質譜儀會對質譜儀的真空度造成影響，首要解決的就是液相層析儀與質譜的介面問題。液相層析儀與質譜儀串聯的困難點在於液相層析儀的操作介面是在室溫下，且樣品與移動相皆為液體，而質譜儀則是在真空環境下操作，因此直接連接首要考慮的是溶劑的處理問題。下面針對液相層析串聯質譜儀的介面做介紹，分別是：液相直接導入介面 (direct liquid introduction interface)、傳送帶介面 (moving-belt interface)、加熱濃縮線 (the heated-wire concentrator)、熱灑法 (thermospray)、粒子束介面 (particle

bean interface)、電灑法界面 (electro-spray interface) 與離子灑法界面 (ion-spray interface)。

2.5.1 液相直接導入介面

若不考慮液相層析儀之流速會造成質譜真空壓力及樣品游離化的問題，最簡單的方式就是兩儀器直接連接。液相直接導入介面的操作，主要是取決於液體流速和進入介面時的熱能，其流速主要受限於質譜儀的幫浦能力，在液體進入介面時，必須要有足夠熱能使其揮發以避免在介面上乾化，常見的液相直接導入介面有毛細管導入 (capillary introduction)、隔膜介面 (diaphragm)、霧化介面 (nebulizing interfaces)、連續流動式快速原子撞擊法界面 (continuous flow FAB interfaces) 與超臨界流體層析介面 (SFC interfaces)。

在液相層析中考慮是分離能力而非質子的親和力，雖然大部分的有機溶劑氣化後均作為反應氣體，但還需注意到一般液相層析所用的非揮發性緩衝鹽類常會在加熱時堵塞毛細管，因此是使用液相直接導入介面的最大限制。

2.5.2 傳送帶介面

傳送帶介面主要是利用一條連續的介面傳送帶，傳送帶是由不鏽鋼或 polyimide 所製成的帶狀，放入密閉的盒子裡，經由液相層析儀流出的附著物在巡迴帶上經過紅外光加熱線將大部分的移動相溶劑去除，並利用兩段式減壓後，進入高真空之離子源，利用高溫將分析物瞬間脫附進入離子源室。

2.5.3 加熱濃縮線

加熱濃縮線是一種傳送設計，傳送溶質至離子源主要是靠液相層析儀的移動相，分析物會附著在線上。在與離子源隔離的地方加熱去除溶劑，再進入離子源，並利用針閥 (needle valve) 控制流速。

2.5.4 熱灑法

熱灑法是利用毛細管連接兩種儀器，再利用加熱的方式於溶劑尚未進入離子源之前揮發。未揮發的溶劑或樣品霧化形成微小的液滴或是顆粒，非揮發性的樣品從帶電荷的微粒離子化。對於揮發性則可直接離子化或是在氣相的狀態下形成離子分子反應。因熱灑法在於液相層析儀與質譜儀間的介面，包含液體的蒸氣與霧化、樣品的離子化、溶劑的除去與推送離子進入質譜儀四個步驟。因此利用熱灑法最重要的是必須考慮到液相層析的條件、離子化技術、蒸發器與離子源溫度。熱灑法成功的作為傳統的液相層析儀的介面，主要的原因是因為此種介面可容許流速 1~3 ml/min。正相 (normal phase)、逆相 (reverse phase)、等位 (isocratic) 或是梯度 (gradient) 沖提的系統皆適用，並不會造成嚴重的板型加寬。

熱灑法式一種柔性離子化的方法，對於熱不穩定的分析物可以形成分子離子。但是對於高分子量的分析物像是胜肽、多醣類等則無法分析。另外，熱灑法雖對大部分的分析物皆可得到分子離子，但斷裂的碎片太少，且所能用的液相層析條件有限，並且儀器的構造太過複雜，不易操作與維修，也是其缺點之一。

2.5.5 粒子束介面

粒子束介面是基於希望能完全去除溶劑的干擾，而可以直接分析樣品而設計的一種介面。其結構有霧化生產器 (aerosol-generator)、去溶劑室 (desolvated chamber) 與粒子束動量分離器 (particle-beam momentum separator)。當液體自液相層析儀之管柱流出後，在通過很小的細孔後，受

到壓力的擠壓造成雷立 (Rayleigh) 值不穩定，使噴灑的液體形成均勻的小水滴，再受到垂直方向的高速氣體流吹拂，小水滴會分散成氣膠微粒，以避免聚在一起。再以高速進入去溶劑室經由熱器碰撞將微粒表面的溶劑去除，並非直接加熱，所以並不會形成熱分解。而在溶劑去除後進入動量分離器，其主要是以動量不同達到分離的效果，氣態的溶劑被幫浦抽走，剩於形成氣態的分析物會進入質譜儀中。

粒子束介面在分析低分子量的分析物時，常會受到溶劑的干擾，而在高極性或高含水量的分析物時，常會需要使用揮發性的緩衝液否則會導致靈敏度較不佳。

2.5.6 電灑法界面

電灑法介面除可作為液相層析儀與質譜儀之介面外，也可作為離子產生的一種方式。電灑法指的是在液體中帶多電荷的離子轉移到氣相的一種游離方式，這是在大氣壓下將溶液經由噴灑蒸發而形成帶有電荷的液滴，此法產生離子需要兩個步驟；首先在大氣壓下，使帶有高電荷的液滴分裂，再來是小液滴蒸發，如圖 2-13 所示。一般電灑質譜儀 (ESI-MS) 的溶液，是由電解質能溶解在雙極性溶劑中所構成的，這些電解質會在溶劑中形成正、負離子。

在毛細管是正電極時，液體中的正電離子會朝液面表面移動，而在外電場影響下，部分負電離子將遠離液體表面，而液體表面在累積過多的正電荷時會形成液體錐 (liquid cone)，在毛細管於較高的電壓時，液體錐會開始噴灑出微小的帶有許多正電荷的液滴，而這些帶有許多正電荷的小液滴，在溶劑的揮發下，導致電荷體積比 (charge-to-volume ratio) 增加。當到達雷立極限值 (Rayleigh limit) 時，液滴的表面張力將無法負荷，因此就會發生庫倫爆炸 (columbic explosion) 的現象。而液滴就會分裂成更小的液

滴。而更小的液滴不斷的重複這個過程，直到所有的溶劑都從分析物中被揮發去除，而留下帶有多電荷的分析物離子為止，如圖 2-13 所示。

電灑法可和液相層析儀或是毛細管電泳 (capillary electrophoresis) 與質譜儀的串聯。並且電灑游離源可以與多種質譜儀相串聯，如：四極柱 (quadrupole)、時間飛行式 (time-of-flight)、離子阱 (ion trap) 與磁場式 (magnetic sector)。

電灑法還有一個主要的優勢，此法可將大分子量的分析物游離後帶上多電荷，而使得質荷比可落在大部份質量分析器所能偵測到的範圍。

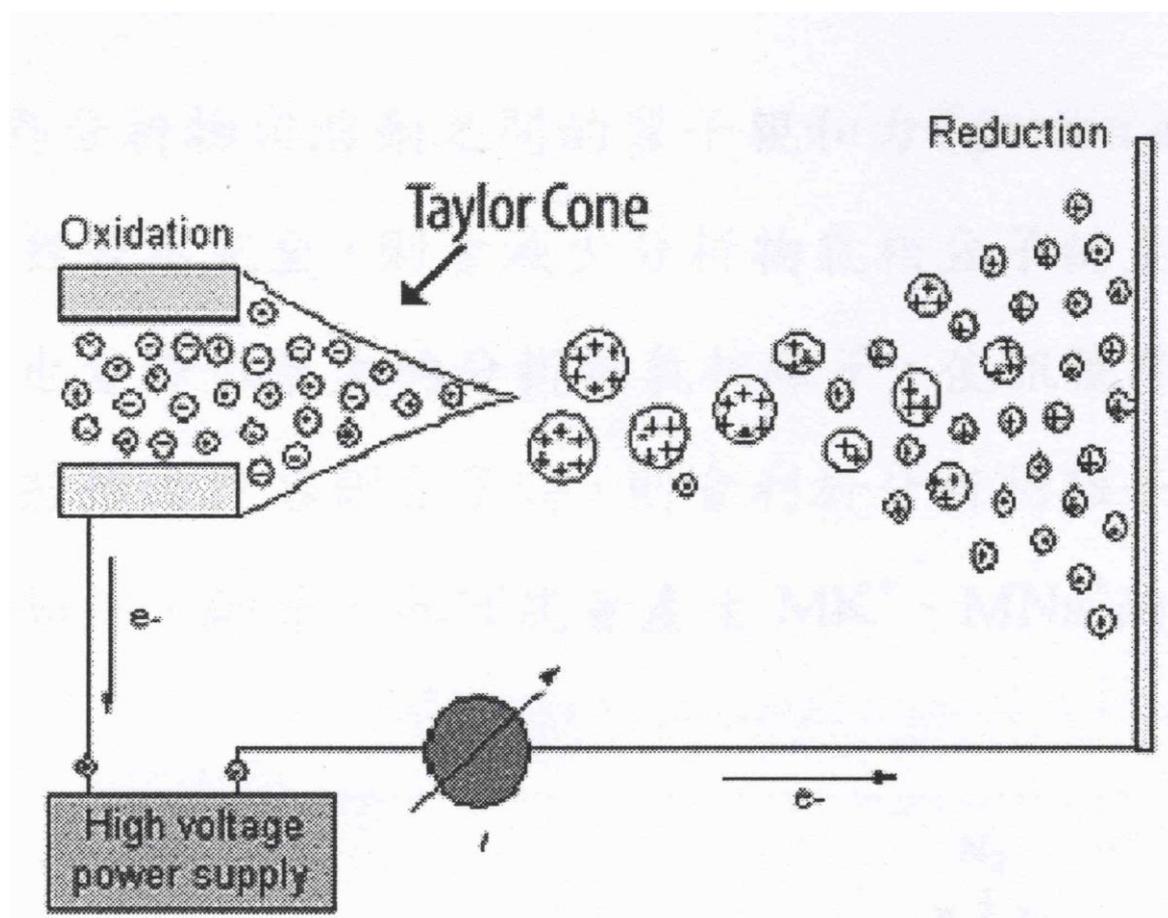


圖 2-13 電灑游離法離子形成過程

2.5.7 離子灑法界面

離子灑法是一種將帶有電荷的液體微粒直接轉變成氣相的離子，離子灑法是在大氣壓下將分析物離子化，且不產生熱分解，與電灑法很相似。熱灑法是利用離子蒸發 (ion evaporation)，是利用加熱的方式，因此無法用於熱不穩定的分析物，而離子灑法可用於極性與熱不穩定的分析物。將其離子化後再進入質譜儀。可以作為液相層析儀或毛細管電泳與質譜儀間的界面，適用於分析複雜的生化樣品。

離子灑法、電灑法與熱灑法都是將液體以噴灑的方式形成帶電荷的霧粒，再由霧粒散射出氣相離子，而這三者最大的差異在於帶電荷霧粒的形成，離子灑法和電灑法產生電荷霧粒的方式是利用高電場使液體表面形成電張力 (electric stress)，而離子灑法與電灑法的差異是在離子灑法中會加上與液體同軸或是垂直的氣體使溶劑脫離。因為加上氣體幫助噴霧的形成，因此可以容許較大的流速和含水量較高的比例的層析條件。即使液相層析流速高達 1 ml/min 也不必加太高的電壓，約在 3 kV 即可形成帶電荷的微粒，並且有氣動式噴霧裝置，可拉長噴灑的毛細管柱與相對電極之間的距離，降低毛細管尖端的電場，可減少電暈放電 (corona discharge) 的現象。而氣體流速與霧化噴嘴的形狀會影響液滴微粒的大小。熱灑法形成微粒的方式不需高電場，只以階段的加熱的方式形成，因此會同時產生正、負電荷微粒，而離子灑法和電灑法是根據高電場的極性，只能產生單一電荷或負電核的微粒。

離子灑法的介面構造與電灑法雷同，只是多一個同軸的氮氣噴霧裝置，雖然如此，離子灑法帶電微粒的形成主要是由氣動噴霧產生，而不是像電灑法中因液滴表面電荷不穩定而形成。帶電荷微粒是在通過蒸發室，液滴因溶劑的揮發而變小，最後只剩下分析物離子進入質譜。離子法介面的靈敏度與樣品的形態有關，若樣品在溶液中已經離子化，靈敏度會相對

提高。液相層析儀的動相中若是含有甲醇或是乙腈可提高訊號，因為甲醇或是乙腈加上水時，可使得氣動式噴霧更容易噴出微滴。離子灑法的介面很容易安裝，但在經過長時間的使用，靈敏度的跳動會很大。尤其是負離子的影響較大，可使用不銹鋼毛細管取代熔融的矽土毛細管加以改善。

2.6 精神分裂症

在 1856 年時，法國醫生 Morel 發現青壯年有精神分裂的症狀，稱為早發癡呆 (clemence precoce)。在 20 世紀時，瑞士精神病學家 E. Bleuler 對此疾病做了仔細的研究，發現本病臨床的主要症狀為聯想障礙 (association)、情感冷淡 (apathy)、缺乏意志 (abulia) 以及內向 (autism)，稱做 "4A" 症狀，並提出精神分裂的概念[4]。

精神分裂症 (schizophrenia) 是非常重大且常見的一種精神病，嚴重時會危急生命，可能會有嚴重自殘與自殺的現象產生。此病好發於青壯年時期，女性發病時間較男性晚[5]。

精神分裂症並非人格分裂，而是指病患與人格脫節，無法分辨現實與幻想。精神分裂症會產生思考、情感、行動方面的障礙，與現實脫離並且影響日常生活。而精神分裂症的主要症狀包含：正性症狀 (positive syndrome) 與負性症狀 (negative syndrome)。正性症狀的表現有：言語混亂、缺乏邏輯、妄想與幻覺。負性症狀的表現有：活動力下降、情感表達下降、注意力不集中與社會參與度不佳[5]。

在患有精神分裂的病患身上，呈現有多巴胺過度活躍的情形。在臨床上一般投以藥物控制病情，主要是抑制多巴胺受體的活性，並且輔以心理治療做輔助，但至今仍無法完全了解病因與治癒方法。

2.7 第二代抗精神疾病藥物

抗精神疾病藥物 (antipsychotics) 又被稱為神經阻滯劑 (neuroleptics) 或強安定劑 (major tranquilizers)。主要適應症為精神分裂症 (schizophrenia)。抗精神疾病藥物在歷史上分為兩個世代，第一代精神疾病藥物 (first generation antipsychotics) 又稱典型抗精神疾病藥物 (typical antipsychotics)。其指標藥物為 haloperidol。其缺點為藥物會引起錐體外症候群 (extrapyramidal symptoms, EPS)。包括藥物所引起巴金森氏症候群 (drug-induced parkinsonism)、急性肌緊張異常 (acute dystonia)、靜坐不能 (akathisia) 以及遲發性運動障礙 (tardive dyskinesia, TD)。

在 1980 年代後，第二代抗精神病藥物 (second generation antipsychotics) 又稱非典型抗精神疾病藥物 (atypical antipsychotics) 陸續上市，對許多使用第一代抗精神疾病治療無效的病人產生療效，也產生較少的錐體外症候群的症狀。第二代藥物包括 amisulpride、aripiprazole、clozapine、olanzapine、quetiapine、risperidone、sertindole、ziprasidone 和 zotepine。第二代抗精神病藥物依藥物對神經傳導物質受體的親和特徵可分為三類：(1) 單純作用於多巴胺受體者，包括：多巴胺 D2/D3 受體拮抗劑 (dopamine D2/D3 receptor antagonist)，如 amisulpride；多巴胺受體部分促進劑 (dopamine receptor partial agonist)，也稱多巴胺系統穩定劑 (dopamine system stabilizer)，如 aripiprazole。(2) 血清素/多巴胺受體拮抗劑 (serotonin dopamine receptor antagonists)，如 risperidone、sertindole 與 ziprasidone。(3) 作用於多種受體的藥物 (multi-acting receptor targeted agents, MARTAs)，如 clozapine、olanzapine、quetiapine 及 zotepine。

2006 年，健保局統計在所有情感性疾病患者的診斷與治療支出中，精神科藥物的支出高達 85 億，並且每年至少以 30% 的速率成長。抗精神疾病藥物在美國有非常的市場，其中使用第二代抗精神疾病藥物已超過 90% 以上。在 2005 年時，美國不分科，最暢銷的藥物第 14、15 與 29 名分為：

quetiapine (產品名：Seroquel 思樂康，2005 年銷售金額為 17.1 億美元)、olanzapine (產品名：Zyprexa 金菩薩，2005 年銷售金額為 15.8 億美元) 與 aripiprazole (產品名：Otsuka Abilify 安立復，2005 年銷售金額為 11 億美元)。在 2004 年時，aripiprazole 與 quetiapine 的成長率分為 47% 和 24.7% (資料來源：Verispanm VONA 2006)。

2.8 分析物簡介與文獻回顧

已有許多文獻針對第二代抗精神病藥物做檢測，一般檢測方式有液相層析儀[6-13]、滴定法[14]、毛細管電泳[9, 15-17]，而層析法的儀器通常接有不同的偵測器，如 UV[10, 18-19]、電化學[10, 20-21]、庫倫[22]與電流[23]以及質譜[6, 8, 11, 24-32]來做檢測。而質譜儀則是相對靈敏的。因此，我們希望能使用液相層析儀串聯質譜來定量血漿中的抗精神病藥物。血漿是血液加入抗凝劑後再經離心，去除掉血球後的上清液。血漿中含有許多的蛋白質，去除後能減少偵測時基質的干擾。一般用於萃取血漿中的藥物方法大多為固相萃取(solid-phase extraction, SPE) 與液-液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE) 的方式。

2.8.1 Olanzapine

Olanzapine 於 1996 年經 FDA 核准在美國上市，是由美國禮來公司生產。其使用量為每日 5 至 20 mg，口服吸收良好，不受食物影響，在 5 至 8 小時可達到血中濃度最高峰。當血中濃度約介於 7 至 1000 ng/ml 時，olanzapine 的血漿蛋白質結合率約為 93%。Olanzapine 主要是與血清蛋白及 α 1-酸糖蛋白 (α 1-acid-glycoprotein) 結合[4]。Olanzapine 對一些接受體有廣泛的藥理作用。在臨床前試驗中，表現出多許多的受體具有親和力 ($K_i < 100$ nM)，如：血清素 5-HT_{2A/2C}、5-HT₃、5HT₆；多巴胺(dopamine) D₁、D₂、D₃、D₄、D₅；膽鹼素毒蕈性接受體 m₁-m₅； α 1-腎上腺素性接受體；

與組織胺 H1 接受體。Olanzapine 為 5HT、多巴胺及膽鹼素毒蕈的接受體 [33]。Olanzapine 常見之萃取方法整理於表 2-3。

表 2-3 於真實樣品中萃取 olanzapine 之相關文獻

樣品	範圍 (ng/ml)	萃取條件	再現性與回收率	最低偵測極限 (ng/ml)	Ref.
血漿與血清	0.2 ~ 50	SPE : Bond Elut C ₂	血漿 : 再現性 : < 7.66% 回收率 : -3.54 ~ 7.52% 血清 : 再現性 : < 8.76% 回收率 : -8.06 ~ 12.46%	-	[24]
血清	1 ~ 1000	SPE : C ₁₈	再現性 : 18% 回收率 : > 80%	-	[25]
全血	100 ~ 2000	SPE : Chem Elut Bond Elut Certify	Chem Elut : 再現性 : 9 ~ 15% 回收率 : 38 ~ 42% Bond Elut Certify : 再現性 : 5 ~ 10% 回收率 : 80 ~ 97%	Chem Elut : 123 Bond Elut Certify : 66	[34]
老鼠腦部	0.2 ~ 100	SPE : Oasis HLB	再現性 : 1.5 ~ 4.6% 回收率 : 94 ~ 97%	0.1	[35]
血漿	2 ~ 200	SPE : 96-well plate Oasis MCX support	再現性 : 4 ~ 8.4% 回收率 : 85.1 ~ 111.7%	-	[28]
血液	5 ~ 500	LLE : n-butanol/cyclohexane (3:47, v/v)	再現性 : 2.9 ~ 12.5% 回收率 : 80.7 ~ 101.2%	-	[6]
血漿	1 ~ 50	LLE : 0.1N NaOH / ether	再現性 : 10.64% 回收率 : 80.1 ~ 91.4%	0.4	[11]
血漿	0.1 ~ 200	LLE : ethyl-acetate	再現性 : ≤ 8.3% 回收率 : 97%	-	[26]
老鼠血漿	2 ~ 500	LLE : isopropyl ether: pentane (70:30)	再現性 : 1.69 ~ 4.98% 回收率 : 90.4 ~ 94.9%	-	[36]
血漿	10 ~ 1000	PPT / dilute : acetonitrile/methanol (9 + 1 by volume)	再現性 : 4.3 ~ 9.2% 回收率 : 185%	-	[29]

2.8.2 Quetiapine

Quetiapine 於 1997 年經 FDA 核准在美國上市，是由美國 AstraZeneca 公司生產。一般有效劑量在每日 400 至 800 mg 之間。活性主要來自於它的原始藥物 quetiapine 及其在人類血漿中的活性代謝物 N-desalkyl quetiapine。Quetiapine 口服吸收良好與血漿蛋白質結合約為 83%，半衰期約為 6 小時[5]。

Quetiapine 及其活性代謝物 N-desalkyl quetiapine 對大腦中血清素 5HT₂ 接受體和多巴胺 D₁ 與 D₂ 接受體具有親和力。並且也對 α -1-腎上腺素性接受體與組織胺接受體具有高度親和力，對 α -2-腎上腺素性與血清素 5HT_{1A} 接受體親和力較低，但是對膽鹼素毒蕈性接受體無明顯的親和力 [37]。Quetiapine 的常見之萃取方法，如表 2-4。

表 2-4 於真實樣品中萃取 quetiapine 之相關文獻

樣品	範圍 (ng/ml)	萃取條件	再現性與回收率	最低偵測極限 (ng/ml)	Ref.
血清	4 ~ 400	SPE : Oasis HLB	再現性 : 1.9 ~ 3.9% 回收率 : 87.7 ~ 93%	1.5	[38]
血清	19000 ~ 1900000	On-line SPE : C2	再現性 : 2.3 ~ 11.1% 回收率 : 97.5 ~ 101.9%	3900	[39]
血漿	2.5 ~ 400	SPE : DSC-MCAX	再現性 : 1.5 ~ 3.5% 回收率 : 93 ~ 94%	0.8	[18]
血漿	1 ~ 382.2	SPE : Oasis HLB	再現性 : \leq 5.6% 回收率 : 107.79 ~ 111.42%	0.3	[30]
血漿	2.5 ~ 500	LLE : 三步驟萃取	再現性 : 3.4 ~ 16.2% 回收率 : 88.8 ~ 108%	-	[10]
血漿	1-50	LLE : 0.1N NaOH / ether	再現性 : 2.2 ~ 13.6% 回收率 : 90.7 ~ 100%	1.0	[11]
血漿	10 ~ 1000	PPT / dilute : acetonitrile/methan ol (9 + 1 by volume)	再現性 : 3.9 ~ 9.1% 回收率 : 99%	-	[29]

2.8.3 Aripiprazole

Aripiprazole 是由 Bristol-Myers 施貴寶及日本 Otsuka 公司所研發，在 2002 年時通過美國 FDA 審查。Aripiprazole 又被稱為 "第三代抗精神疾病藥物" 或 "多巴胺系統穩定劑"。每日劑量在 10 至 30 mg 之間，食物並無明顯的影響，約在 3 至 5 小時內可以達到血漿中藥物濃度高峰，其生物可利用率約為 87%。活性主要來自於它的原始藥物 aripiprazole，較少部分來自於其主要代謝物 dehydro-aripiprazole，平均藥物代謝半衰期約為 75 小時 [5]。

Aripiprazole 對多巴胺 D2、D3，血清素 5-HT1A，血清素 5-HT2A 表現出高親和力 (K_i 值分別為 0.34、0.8、1.7、3.4 nM)；對多巴胺 D4，血清素 5-HT2C、5-HT7、 α 1-腎上腺素性接受體、組織胺 H1 接受體和血清素再吸收部位則呈現中等親和力 (K_i 值分別為 44、15、39、57、61 和 98 nM)。Aripiprazole 對膽鹼素毒蕈性接受體並沒有良好的親和力 ($IC_{50} > 1000$ nM)。Aripiprazole 主要作為多巴胺 D2、和血清素 5-HT1A 接受體的部分作用劑；也是血清素 5-HT2A 接受體的拮抗劑[40]。Aripiprazole 常見之萃取方法，如表 2-5。

表 2-5 於真實樣品中萃取 aripiprazole 之相關文獻

樣品	範圍 (ng/ml)	萃取條件	再現性與回收率	最低偵測極限 (ng/ml)	Ref.
血漿	70 ~ 700	SPE : Cyano	CE : 再現性 : 2.1 ~ 4.5% 回收率 : 91.4 ~ 99%	CE : 35	[16]
			HPLC : 再現性 : 4.4 ~ 4.9% 回收率 : 94.2 ~ 97.3%	HPLC : 25	
血漿	5 ~ 1000	SPE : 96-well plate Oasis MCX support	再現性 : 6.6 ~ 10.3% 回收率 : 105.6 ~ 110.8%	-	[28]
血漿	19.9 ~ 119.6	LLE : aqueous ammonia/ methyl tbutyl ether	再現性 : 2.5 ~ 9% 回收率 : 75.8 ~ 84.1%	-	[31]
血漿	2 ~ 1000	LLE : heptane / isopropanol 98/2	再現性 : 1.5 ~ 18.5% 回收率 : 98.5 ~ 111.5%	-	[41]
血漿	10 ~ 1000	PPT / dilute : acetonitrile/methan ol (9 + 1 by volume)	再現性 : 6.0 ~ 10.9% 回收率 : 95%	-	[29]

上述這些方法都擺脫不了高成本、實驗步驟繁雜與耗時的問題。若能使用更簡便的萃取方法取代固相萃取與液-液萃取的方式，將能大幅節省時間與成本。

三、實驗

3.1 儀器裝置

液相層析儀為使用安捷倫公司 (Agilent Technologies) 之 1100，控制軟體為 Chem Station for LC 3D。質譜儀為布魯克公司 (Bruker Daltonics) 之 Esquire HCT。介面控制軟體為 Esquire Control 6.2 版，分析處理軟體為 ESI Compass 1.3 HCT/esquire Data analysis 4.01 版。注射用六相閥為 Rhodyne Model 9725 injector。分析管柱為購自安捷倫公司 (Agilent Technologies) 之 Zorbax Eclipse XBD-C18， 2.1×150 mm， $5 \mu\text{m}$ 。實驗室所用之去離子水由 Milli-Q 水系統 (Millipore, Bedford, MA, USA) 所提供。超音波震盪器為 DELTA 廠牌之 DC300H 型號。離心機為 Hettich 廠牌之 EBA21。Vortex 為 Thermolyne 廠牌之 37600 Mixer。

3.2 藥品、試劑與樣品

所有試藥皆為分析級。異丙醇 (2-propanol)、乙酸銨 (ammonium acetate) 購自 Merck。乙酸 (acetic acid)、乙腈 (acetonitrile) 與甲醇 (methanol) 購自 Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, Nu, USA)。乙醇 (ethanol) 購自 Shimadzu's pure chemical。三乙胺 (triethylamine) 購自 Riedel-de Haën，olanzapine、aripirizole 與 quetapine 購自 Organosys jubilant。mirtazapine 購自 Aurobindo。

3.3 實驗方法

3.4 液相層析儀條件

分析管柱為 Zorbax Eclipse XBD C18， 2.1×150 mm， $5 \mu\text{m}$ 。前端接上具有相同充填物的保護管柱 Security Guard Cartridge。每次的進樣體積為 $20 \mu\text{l}$ 。移動相 A 為 20 mM 乙酸銨加入 0.15% 三乙胺，以乙酸調整 pH 至

4.0。移動相 B 為 乙腈，以表 3-1 之梯度比例進行沖提，使用之前先以 0.22 μm 的濾膜過濾。

表 3-1 移動相比例

時間(min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	85	15
3	65	35
5	50	50
9	0	100
15	0	100
17	85	15
22	85	15

3.5 質譜參數

實驗所使用的霧化氣體為氮氣，乾燥氣體為氮氣，質譜參數如表 3-2。

表 3-2 質譜儀離子阱之參數

Mode :	Tune source :
Ion Polarity : Positive	HV Capillary : 1500 KV
	Trap drive : 0.9
Trap :	Skimmer : 33.4 V
Scan Begin : 270 m/z	Cap Exit : 175 V
Scan End : 400 m/z	Oct 1 DC : 2.20 V
Max Accu Time : 200 ms	Oct 2 DC : 1.83 V
Averages : 10 (TIC) ; 1 (MRM)	Oct RF : 241.7 V
ICC Target : 20000	Lens1 : -3.5
	Lens2 : -41.5

3.6 標準品溶液之配製

Olanzapine、quetiapine、aripiprazole 與內標準品 mirtazapine 配製 1000 $\mu\text{g/ml}$ 溶於甲醇中，保存於 -4°C 的冰箱中。在進行實驗時稀釋至所需濃度，以正離子模式偵測其 m/z 分別為 313、384、448 與 226。

文獻指出 olanzapine 之治療範圍在 20 至 80 ng/ml 之間，quetiapine 為 70 至 170 ng/ml 之間，aripiprazole 為 50 至 350 ng/ml 之間，因此我們檢量線以此範圍來設定[29]，配製濃度如表 3-3。

表 3-3 檢量線配製濃度

Compound	[M+H] ⁺	Concentration (ng/ml)								
		2.5	12.5	25	50	100	200	400	600	800
OLZ	313	2.5	12.5	25	50	100	200	400	600	800
QTP	384	2.5	12.5	25	50	100	200	400	600	800
ARP	448	4	25	50	100	200	400	800	1200	1600

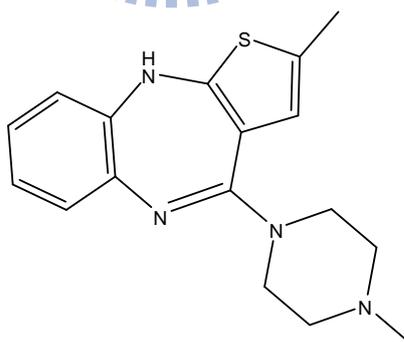


圖 3-1 Olanzapine 結構式

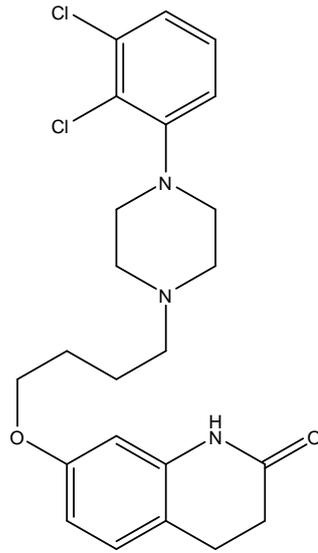


圖 3-2 Aripiprazole 結構式

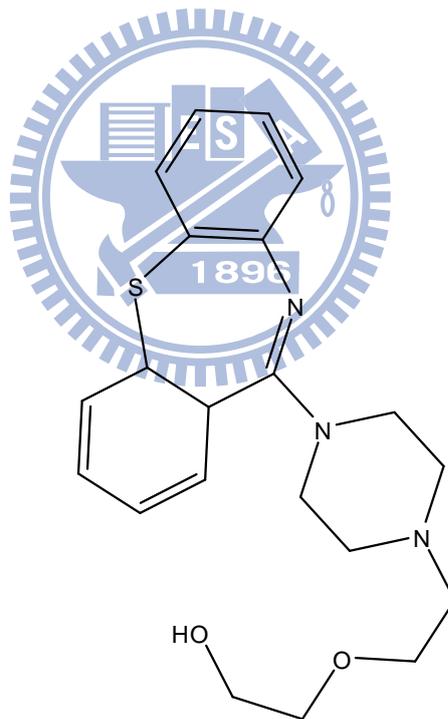


圖 3-3 Quetiapine 結構式

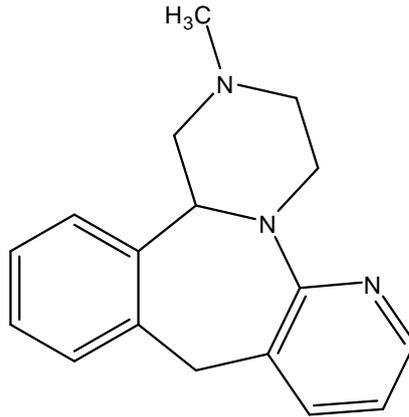


圖 3-4 Mirtazapine (內標準品) 結構式

3.7 萃取方法

血漿 (含抗凝劑) 注入層析系統前需先做前處理。前處理方式是取 150 μl 血漿加上 250 μl 之甲醇，以超音波震盪 15 分鐘。再以 14000 rpm 離心 7 分鐘，取出 200 μl 上清液加入內標準品溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mirtazapine 甲醇溶液) 2 μl ，混合均勻。



四、結果與討論

Olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之結構皆為多環化合物，具疏水性鍵結，故選擇使用 C18 之分析管柱，使分析物與管柱中之固定相作用，產生滯留性，再以移動相沖提。因 olanzapine 之 pKa 為 7.4；quetiapine 之解離常數為 6.8 和 3.3；ARP 則為 7.6，移動相 A 之 pH 值為 4.0。此時三個分析物皆為解離狀態，若是以等位沖提 (isocratic elution)，會使層析峰型擴散。故我們使用梯度沖提 (gradient elution) 方式改善此情形。梯度沖提可使樣品帶被壓縮，明顯改善層析峰板型。並且梯度沖提方式，因移動相極性的改變，具不同極性的分析物與移動相作用力會不同，所以干擾物與分析物在相同滯留時間出現的狀況可減少許多，可避免干擾的情形發生。而移動相中加入三乙胺，可減少拖尾的情形產生。移動相請參考表 3-1 之梯度沖提，流速為 0.3 ml/min，初始比例為水相 (移動相 A) 與有機相 (移動相 B) 比例為 85：15，再提高有機相進行沖提，olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之滯留時間分別為約為 4 分鐘、7 分鐘與 8 分鐘，而內標準品滯留時間為 6 分鐘，分離情形良好，梯度沖提 9 至 15 分鐘時為 100% 的乙腈，主要目的為清洗分析管柱、進樣器與質譜離子源的部分，15 至 17 分鐘切換比例至初始狀態，17 至 22 分鐘則為重新平衡分析管柱。

4.1 游離源最佳化

我們使用電噴灑游離源作為質譜串聯液相層析儀的介面，而游離源的參數設定將會決定分析物的訊號大小。電噴灑游離源主要的作用是将經過液相層析儀幫浦送出的移動相轉化為氣態，並且使欲檢測的分析物帶上電荷，若是液滴無法完全去溶劑化，將使偵測訊號不明顯。

實驗中，olanzapine、aripiprazole 與 quetiapine 配製濃度為 100 ng/ml，以六相閥直接進樣至質譜中。進樣體積為 20 μ l。進樣時不經過分析管柱，

移動相組成為 20 mM 乙酸銨並加入 0.15 % 三乙胺，再以乙酸調整至 pH 4.0 與乙腈以 50/50 (v/v) 比例混合。液相層析儀流速設定為 0.3 ml/min。

以上述條件探討分析物在質譜電噴灑游離源介面下最佳化的條件，每一參數皆注射三次，求取面積平均值，以最佳之實驗結果做為分析條件。探討項目為乾燥氣體流量、霧化壓力、毛細管電壓與毛細管溫度。

4.1.1 乾燥氣體流量

移動相通過電噴灑口處所產生的微小液滴，必須藉由乾燥氣體將液滴去溶劑化 (desolvation)，才會形成氣態離子。在實驗中改變氣體流量由 4 l/min ~ 12 l/min。由圖 4-2 中可明顯看出乾燥氣體流量在 4 l/min 時，olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 的訊號相對較小，原因應為乾燥氣體流量不足，導致在電噴灑口處的液滴無法完全乾燥形成氣態離子。在提高流速後訊號明顯上升，而乾燥氣體流量提高至 10 l/min 與 12 l/min 時，訊號則不再上升，並且 olanzapine 訊號會下降，我們選擇 8 l/min 作為乾燥氣體的流量，此時 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 皆達訊號最大值。

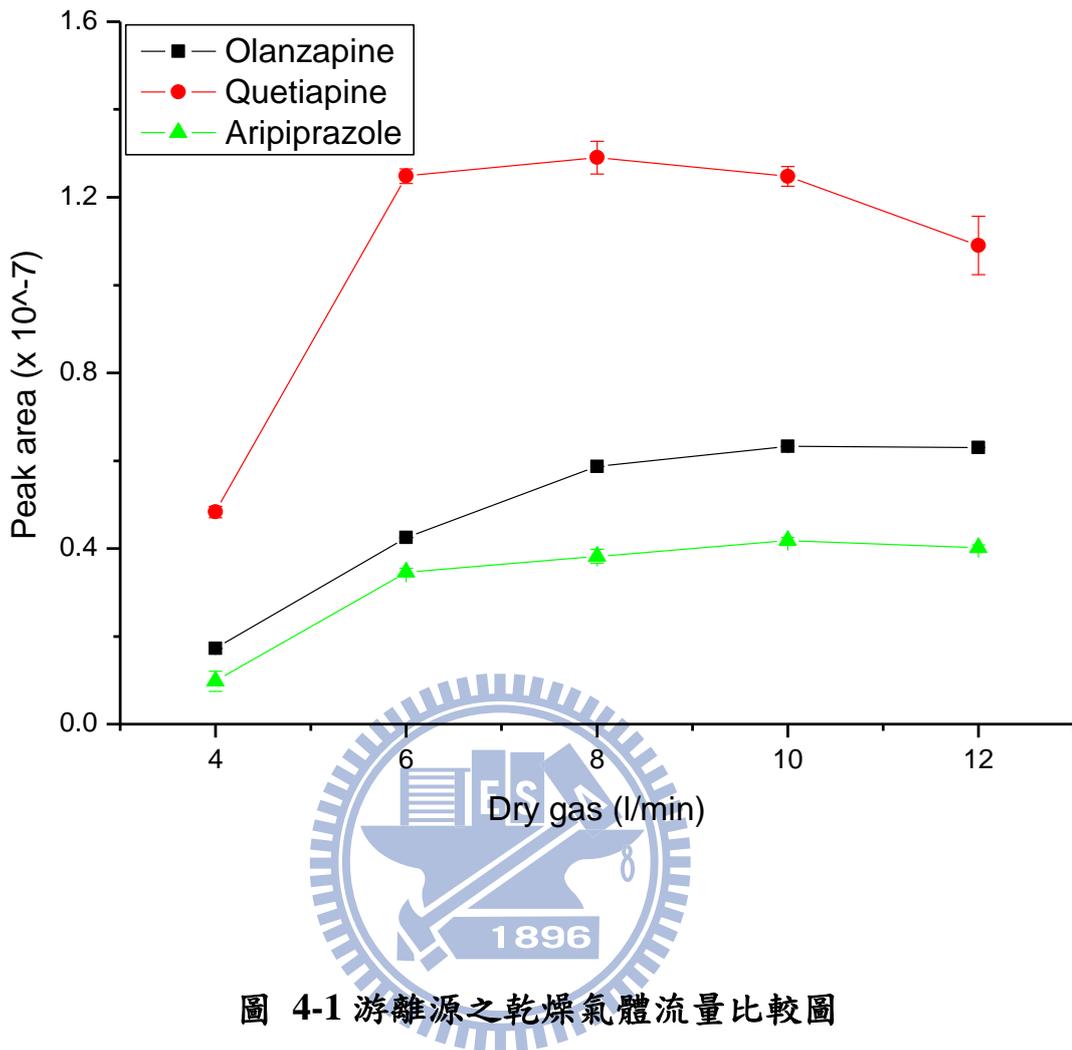


圖 4-1 游離源之乾燥氣體流量比較圖

4.1.2 霧化壓力之測試

移動相在通過電噴灑口處，會有霧化氣體輔助液滴的形成，並且穩定的噴灑液滴。一般霧化氣體為氮氣，而霧化氣體的壓力對游離的效果有所不同。若是霧化的壓力太小，所形成的液滴可能太大，造成游離效果不佳。實驗中，測試霧化壓力由 40 psi ~ 80 psi。

由圖 4-2 可看出霧化壓力對 olanzapine 與 aripiprazole 的訊號並沒有明顯的影響，但對 quetiapine 影響很大。當霧化壓力越大時，quetiapine 訊號越弱。推測應為 quetiapine 游離效果佳，結構上易接上質子，形成 M + H

的模式，使其在霧化壓力增加時，被氣體吹散，因而使訊號削弱。我們選擇 40 psi 作為電噴灑霧化之壓力。

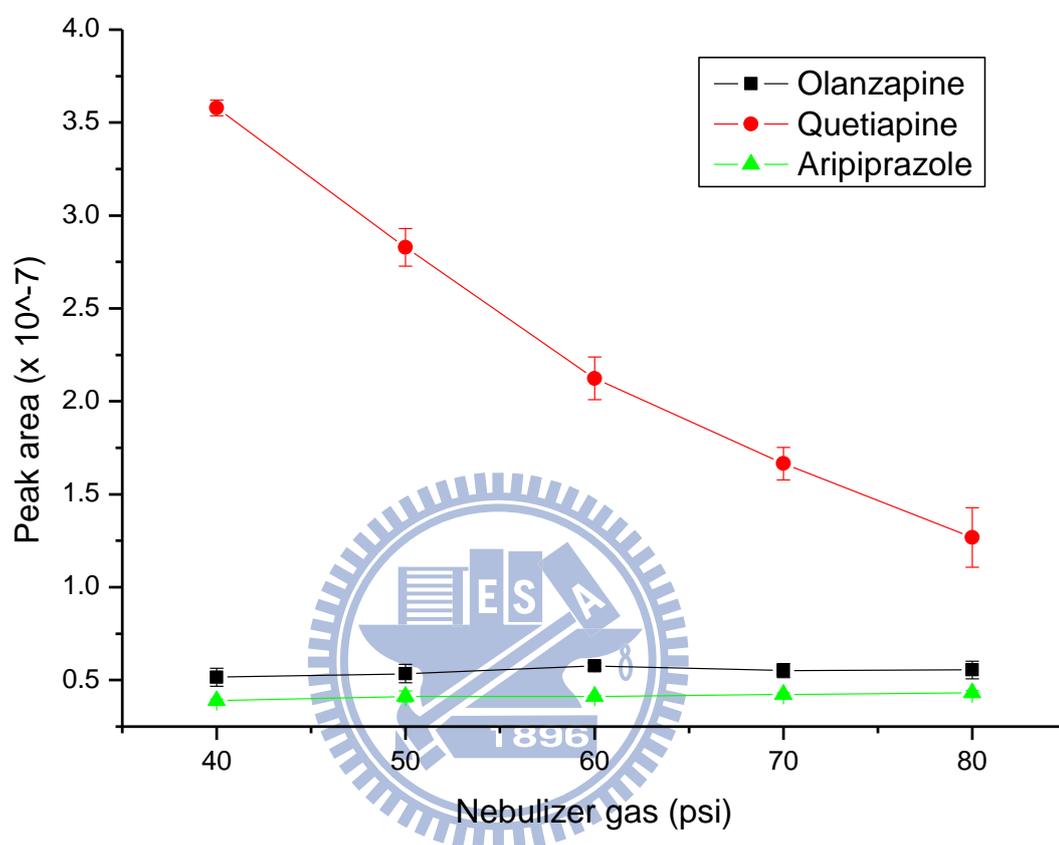


圖 4-2 游離源霧化壓力比較圖

4.1.3 毛細管電壓

毛細管電壓可決定電場，若是電壓過大會產生電弧，造成不穩定的現象。實驗中，測試毛細管電壓由 1000 V ~ 3000 V。實驗結果如圖 4-3，olanzapine 與 quetiapine 在電壓值為 1500 V 時，訊號較明顯，電壓值提高至 2000 V 以上後訊號開始下降，但 aripiprazole 之訊號在 2000 V 時訊號明顯

上升。考量到三分析物個別之訊號強度，折衷考量下我們選擇訊號最佳的 2000 V 為毛細管電壓。

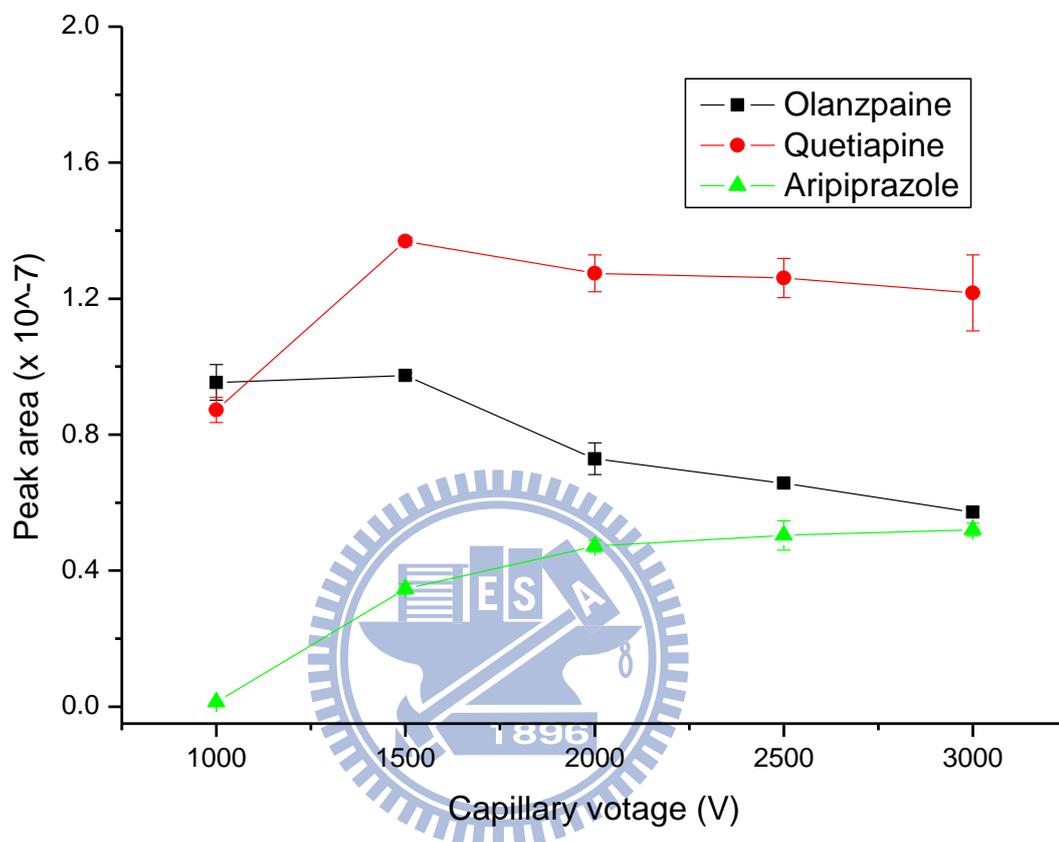


圖 4-3 游離源之毛細管電壓比較圖

4.1.4 毛細管溫度

毛細管溫度可幫助溶劑的去除以提高霧化效果，也可去除掉熱不穩定的雜質，但必須注意分析物的熱穩定性，以避免分析物降解的情形產生。實驗中，測試毛細管溫度由 250 °C ~ 350 °C。測試結果如圖 4-4，毛細管溫度對三個分析物的訊號皆無明顯差異，即使溫度提高至 350°C 時，訊號仍穩定，所以我們選擇 350 °C 作為毛細管溫度，以提高偵測時之雜訊比。

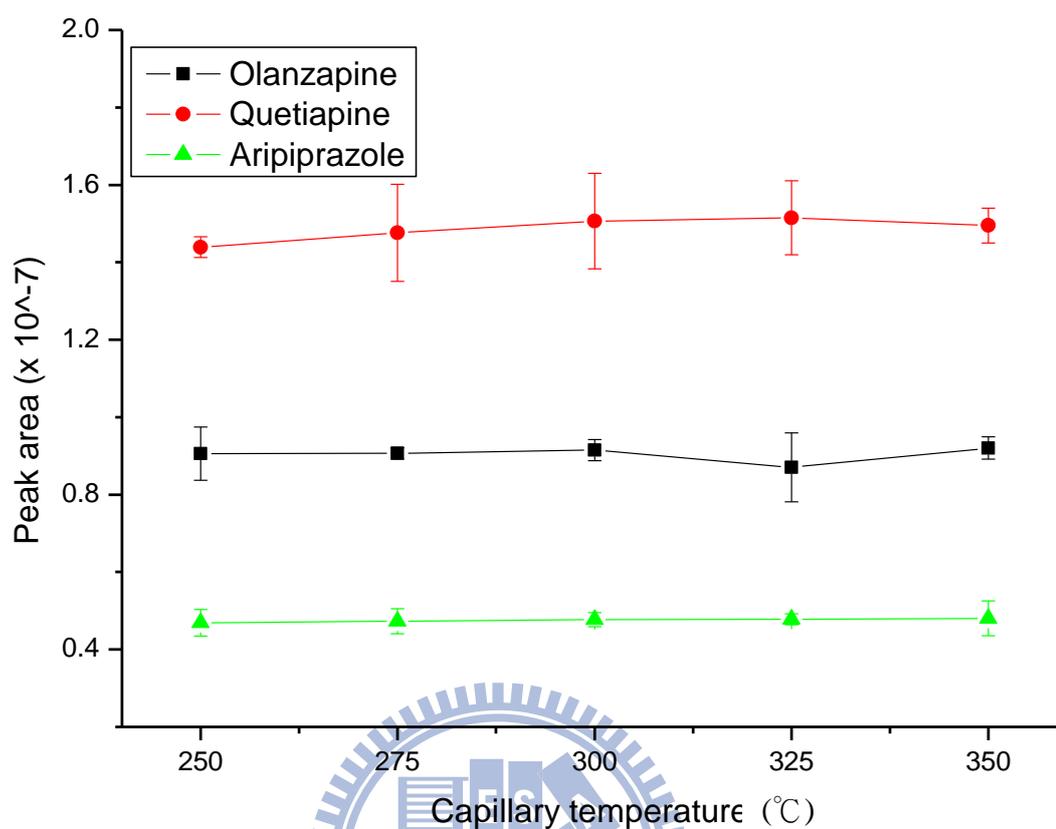


圖 4-4 游離源之毛細管溫度比較圖

經上述游離源最佳化後之參數，注入標準品溶液 (olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之濃度分別為 200、200 與 400 ng/ml) 之層析圖如圖 4-5，可以看到三個分析物與內標準品之解析度與層析峰型皆良好，即以此作為 LC-ESI-MS 中之游離源參數。

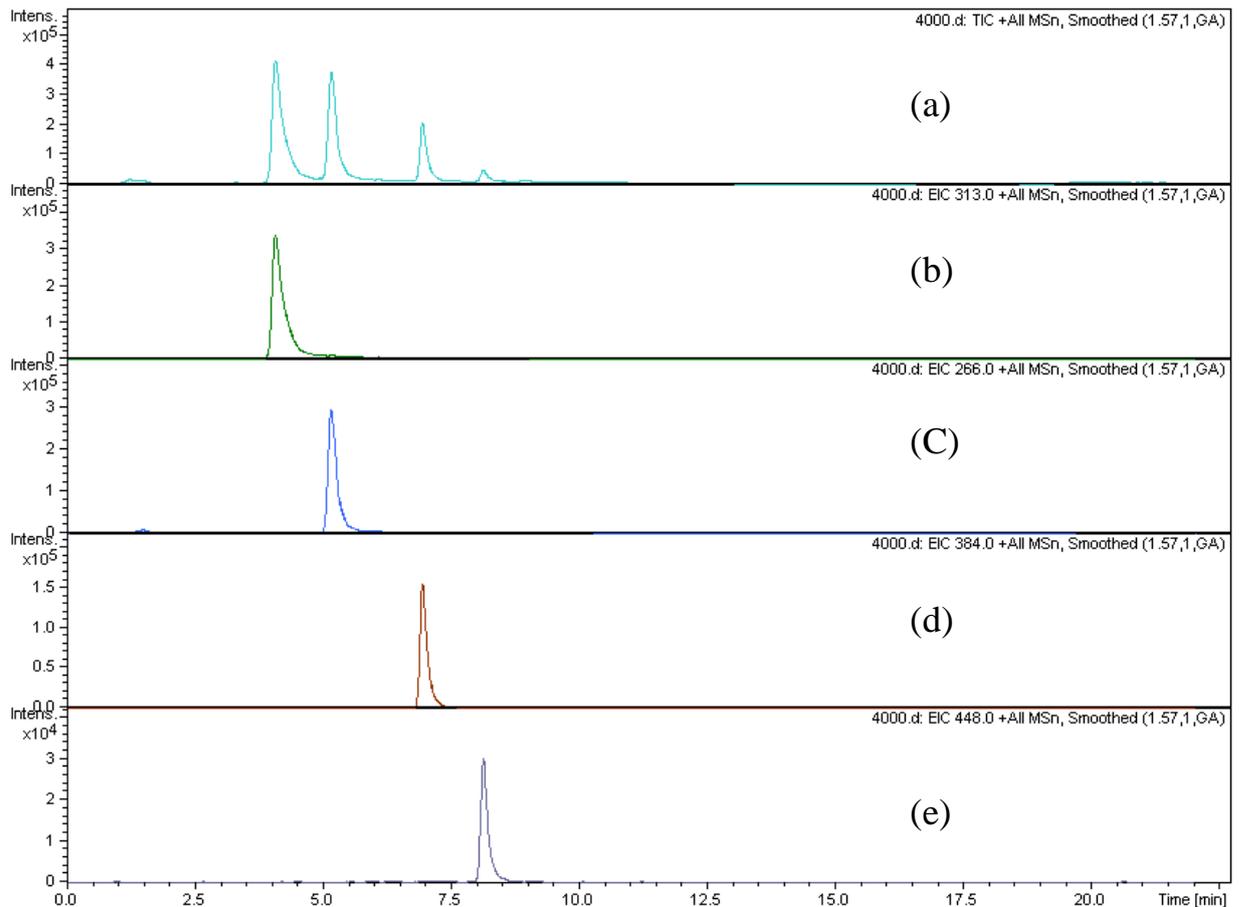


圖 4-5 標準品檢量線層析圖

Olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 濃度為 200 ，200 與 400 ng/ml 。
 (a) TIC 圖， (b) EIC : 313 ，olanzapine 層析圖， (c) EIC : 266 ，internal standard 層析圖， (d) EIC : 384 圖，quetiapine 層析圖， (e) EIC : 448 圖，aripiprazole 層析圖

4.2 萃取條件測試

我們將以簡易操作的蛋白質沉澱方式進行萃取，但考慮到分析條件是使用液相層析串聯質譜儀，加入重金屬或是鹽類會影響質譜並造成傷害，所以我們選擇易於揮發的有機溶劑作為萃取溶劑的種類，萃取的測試條件

分別為：不同溶劑種類、不同離心時間與不同溶劑強度，萃取條件測試步驟如圖 4-6。

標準品溶液濃度為 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 1000 ng/ml，取出 200 μ l 加上 2 μ l 內標準品。樣品配製方式如圖 4-6。每一條件重複配至三次。取出 96 μ l 的人類血漿加上 4 μ l 的 100 μ g/ml olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 標準品溶液，混合均勻，再加入 300 μ l 的萃取溶劑 (olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之最終濃度為 1000 ng/ml)，混合均勻後，以超音波震盪 15 分鐘，再以 14000 rpm 離心，取出上清液 200 μ l 加上 2 μ l 內標準品，混合均勻。

在層析圖中，將標準品溶液與萃取後之樣品溶液中之 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 面積與分別與內標準品面積相除，求得比值，計算回收率，以最佳回收率之實驗條件做為實驗之參數。



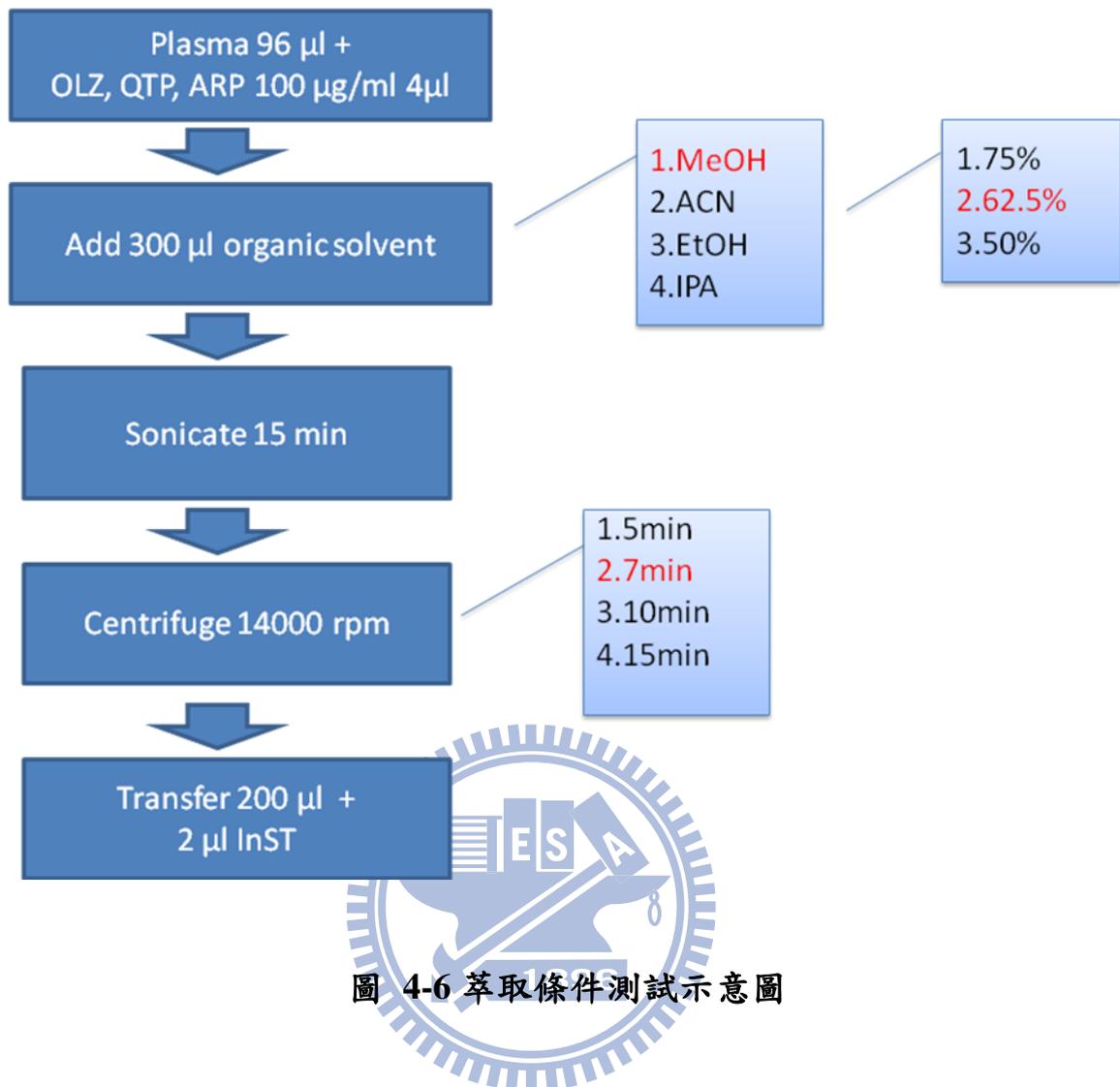


圖 4-6 萃取條件測試示意圖

4.2.1 不同溶劑測試

水溶性有機溶劑會使蛋白質變性造成溶解度下降而沉澱。這是因為有機溶劑之介電常數較低，會使蛋白質間正負電荷結合力增加，形成厭水性膠體，相對會使水與蛋白質的作用力變差，即發生沉澱。加入有機溶劑使蛋白質發生沉澱作用，離心後，可達到分離的效果，並且由於 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 可溶於有機溶劑中，可達到萃取的作用。我們使用下面幾種不同溶劑進行實驗，分別是甲醇 (methanol)、乙腈 (acetonitrile)、乙醇 (ethanol)與異丙醇 (2-propanol)。

回收率結果如圖 4-7 所示，四種有機溶劑的回收率差異不大，都相當良好。但由於除甲醇外之有機溶劑，因其極性較低，與動相初始比例之極性差異過大，導致分析物層析峰型變差，極性越低峰型越差，如圖 4-8 所示。因此我們選擇以甲醇作為有機溶劑。

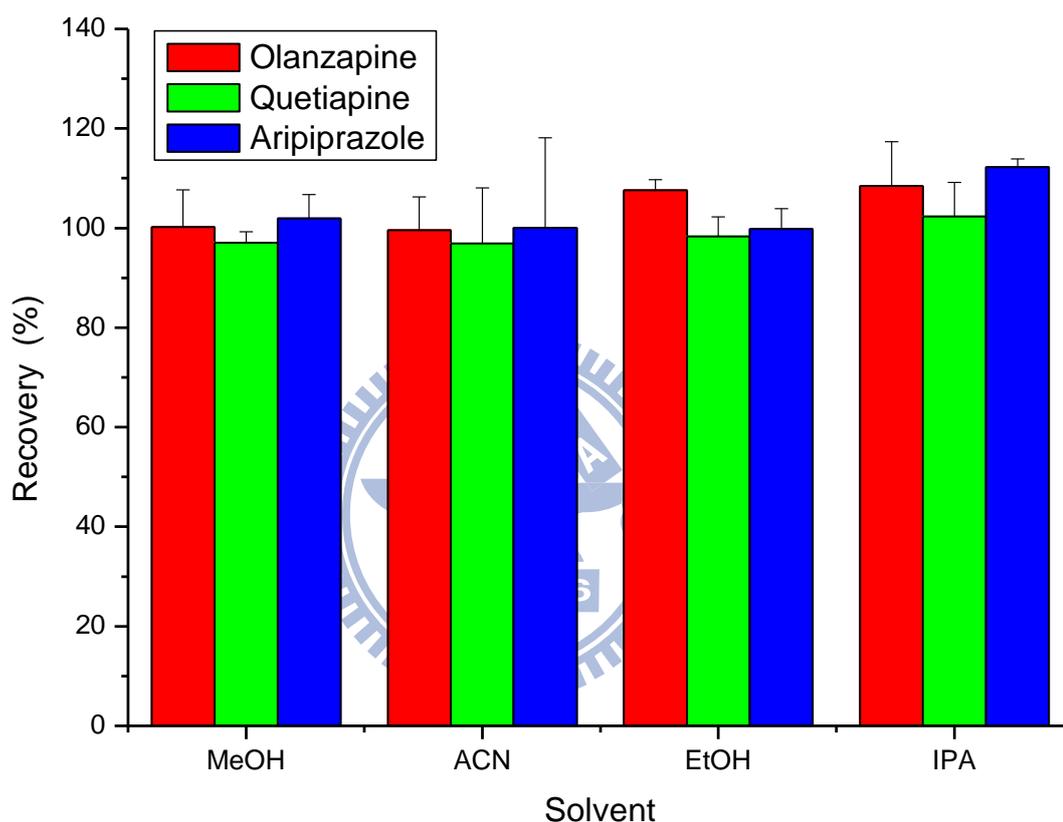


圖 4-7 分別以甲醇、乙腈、乙醇與異丙醇作為萃取溶劑之回收率

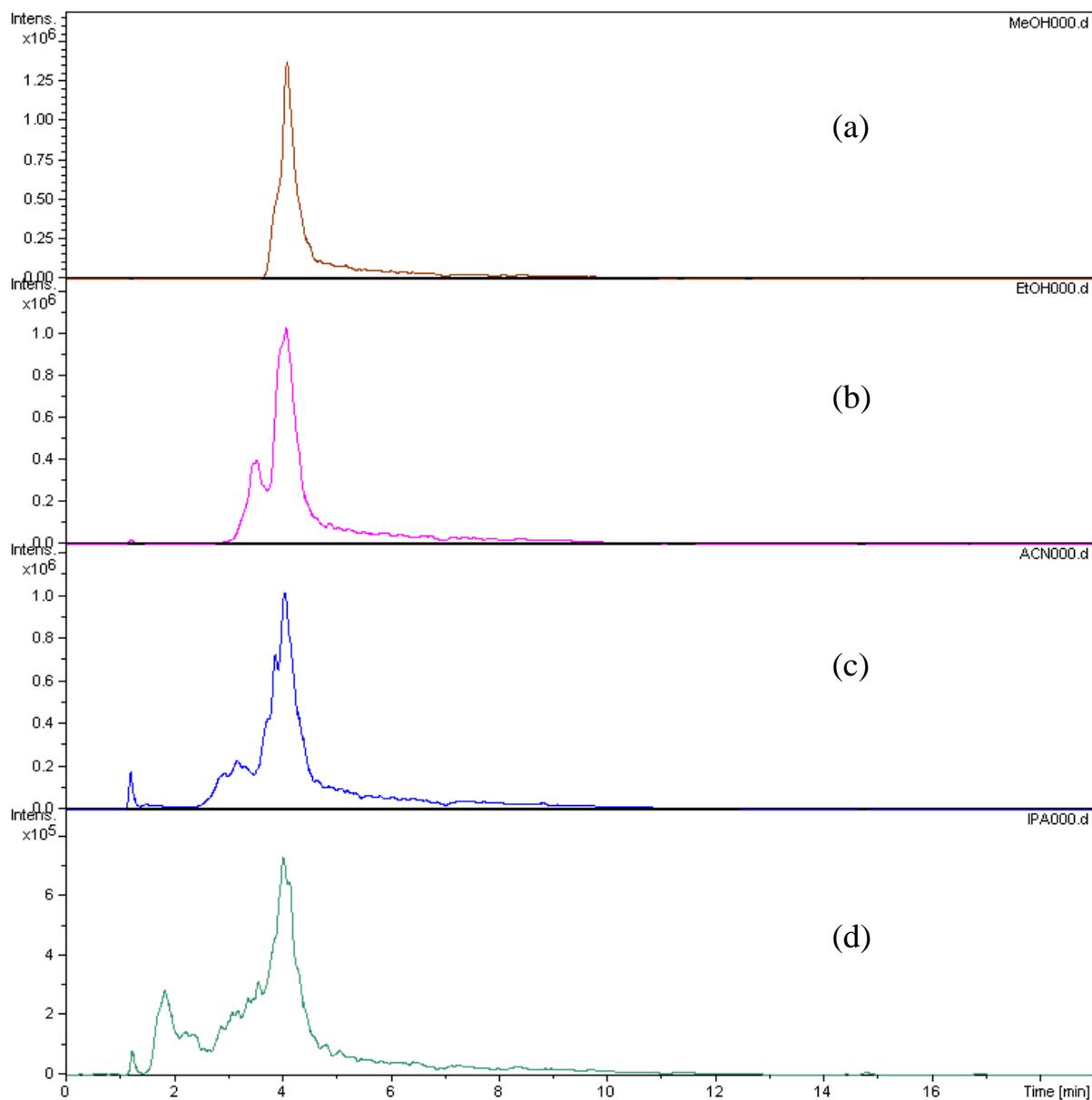


圖 4-8 不同溶劑萃取之層析圖

EIC : 313，分別以 (A) 甲醇、(B) 乙醇 (C) 乙腈、與 (D) 異丙醇 萃取

4.2.2 不同溶劑比例

使用甲醇作為蛋白質沉澱法的溶劑，改變甲醇的強度測試回收率，選擇使用最少量的有機溶劑即能達到最好回收率的條件作為蛋白質沉澱法之溶劑比例。此選擇之原因在於真實樣品萃取時便能使用最少量的有機溶

劑，不但能減少稀釋倍數也可減少有機溶劑的使用量，分別以 75、62.5 與 50% (v/v)的甲醇萃取。

結果如圖 4-9，olanzapine 與 quetiapine 在 50% (v/v) 以上的有機溶劑之萃取結果良好，唯 aripiprazole 之回收率過高且再現性不佳。推測應為有機溶劑不足，無法確實使血液中之蛋白質變性，因而導致基質干擾。我們選擇 62.5% (v/v) 的甲醇做為萃取溶劑的強度，以減少稀釋倍率。

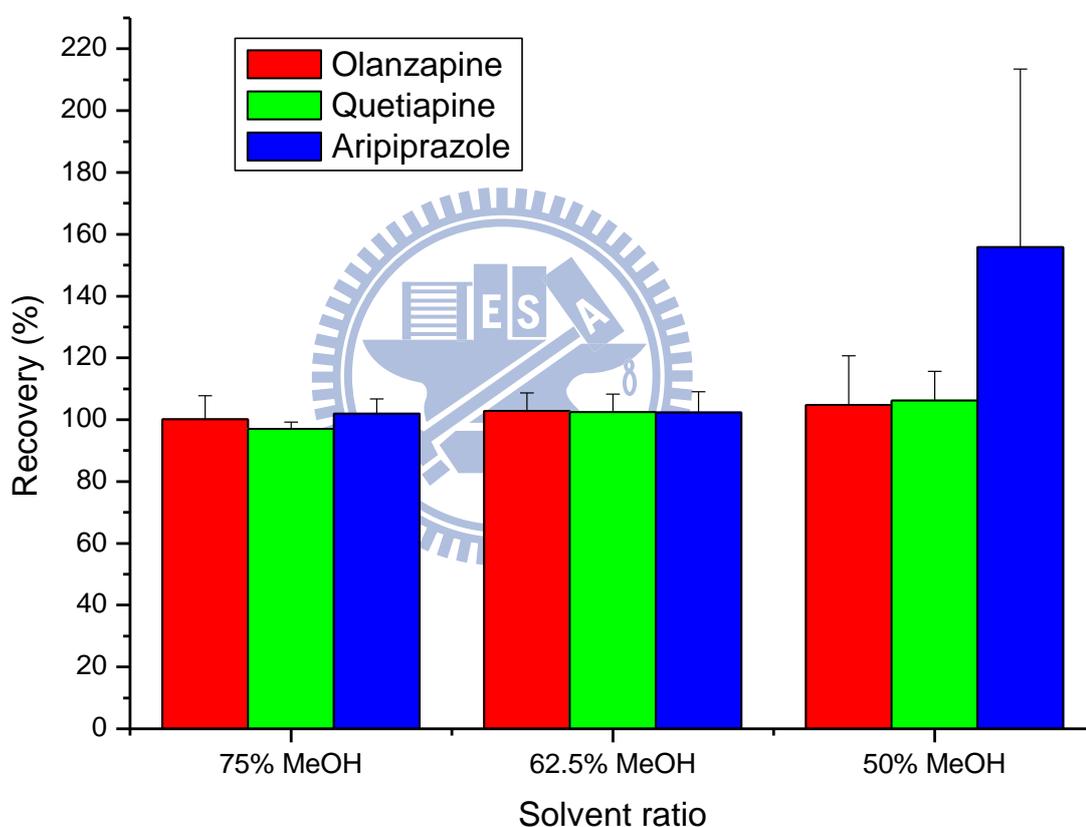


圖 4-9 分別以 75、62.5 與 50% (v/v) 的甲醇作為萃取溶劑之回收率

4.2.3 不同離心時間測試

加入有機溶劑後會造成蛋白質變性而沉澱，離心可達到分離蛋白質的效果以避免對系統造成傷害或是基質干擾影響偵測極限。以 62.5% (v/v) 的甲醇做為萃取條件，測試不同離心時間，結果如圖 4-9 所示，三個分析物在轉速 14000 rpm 離心 7 分鐘與 10 分鐘，回收率都相當良好，而在離心 15 分鐘下的回收率有些微偏低，可能為在離心過程產熱，因而導致分析物有降解的情形產生。由於 5 分鐘的離心時間之回收率 RSD 較離心 7 分鐘大，顯示懸浮未去除盡之蛋白質造成偵測上之干擾，所以我們選擇 7 分鐘做為離心時間。

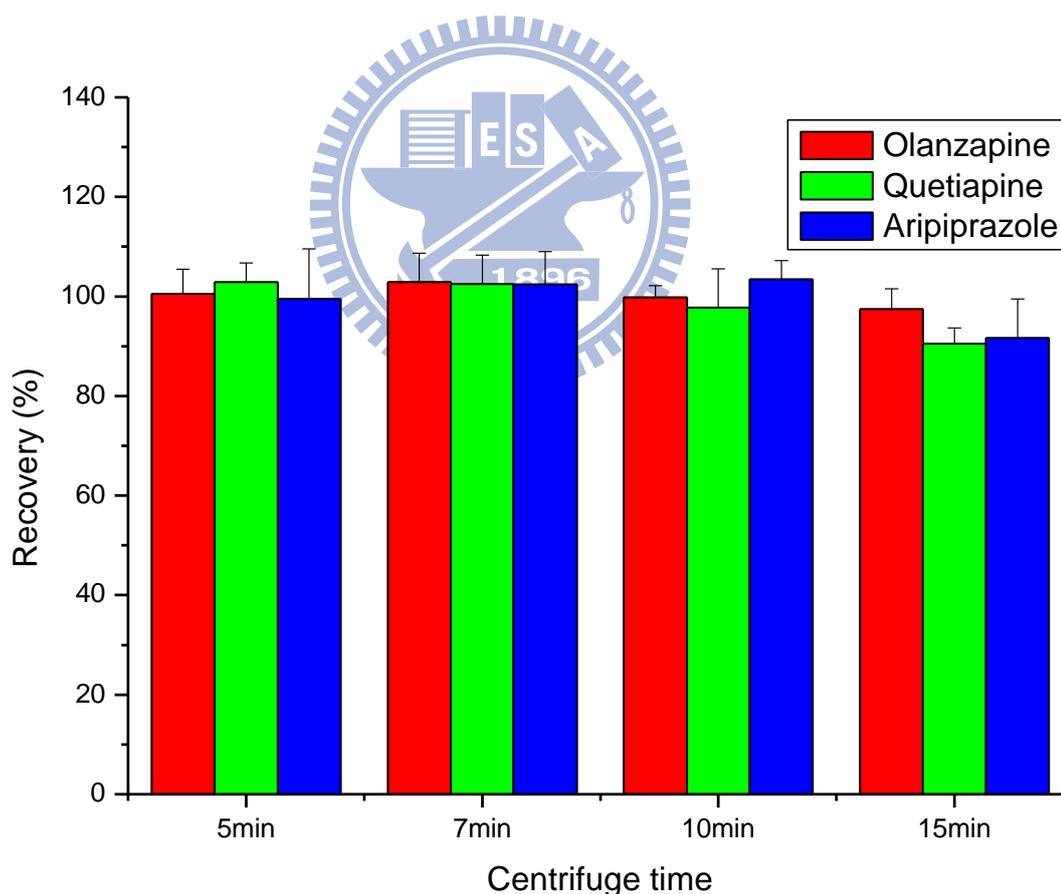


圖 4-10 分別以 5、7、10 與 15 分鐘作為離心時間之回收率

4.2.4 定量校正曲線與再現性結果

表 4-1 列出 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 之檢量線相關係數與偵測極限之結果，也列出滯留時間與面積比值之再現性。校正曲線濃度範圍在 1 至 100 ng/ml 與 100 至 2000 ng/ml， r^2 為 0.9961 與 0.9987，表示有良好的線性關係。Olanzapine 之檢量線圖如圖 4-11 與 4-12；quetiapine 之檢量線圖如圖 4-13 與 4-14；aripiprazole 之檢量線圖如 4-15。而計算得到偵測極限約為 0.3 ng/ml。也針對分析物的滯留時間與再現性作探討，在最佳化的條件下重複三次實驗，求取 RSD。滯留時間 RSD 小於 1.62%，面積比值 RSD 小於 8.0%，顯示此偵測方法具有良好的再現性。

表 4-1 檢量線、相關係數、最低偵測極限與再現性

Compound	Therapeutic range (ng/ml)	Linear range (ng/ml)	Linear equations	(r^2)	LOD (ng/ml) ^a	RSD ^b
Olanzapine	20-80	2.5 - 100	$y = 0.0168x + 0.0434$	0.9965	0.94	8.60
		100 - 800	$y = 0.0083x + 0.9513$	0.9956		
Quetiapine	70-170	2.5 - 100	$y = 0.0044x + 0.0228$	0.9926	0.95	7.69
		100 - 800	$y = 0.0025x + 0.2497$	0.9951		
Aripiprazole	50-350	25 - 1600	$y = 0.0004x + 0.0048$	0.9959	1.35	2.58

^aS/N=3, n=3

^bsample concentration: olanzapine 2.5 ng/ml ; quetiapine 2.5 ng/ml ; aripiprazole 25 ng/ml.

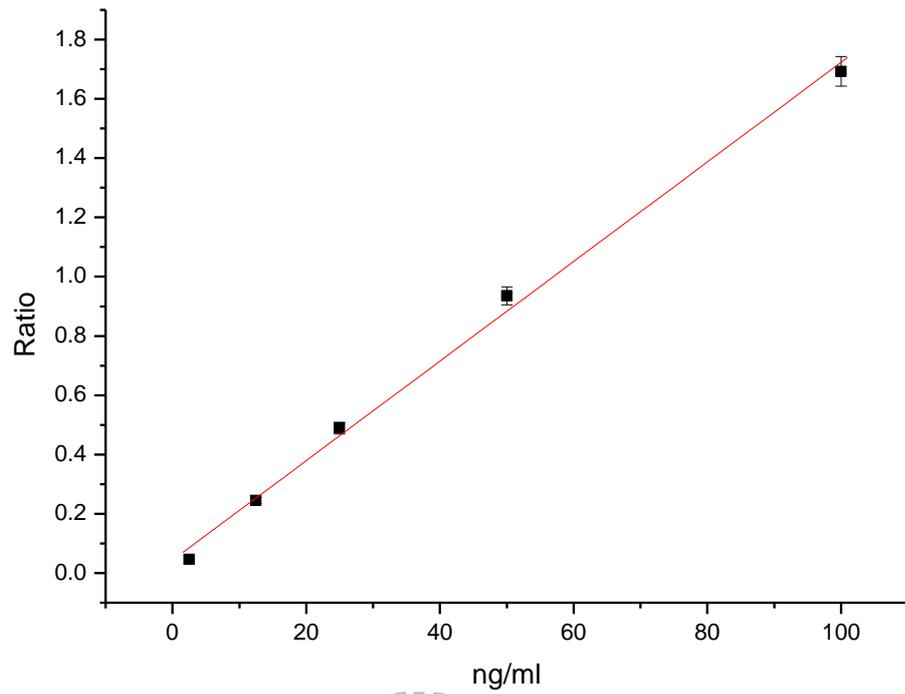


圖 4-11 Olanzapine 2.5 至 100 ng/ml 之檢量線

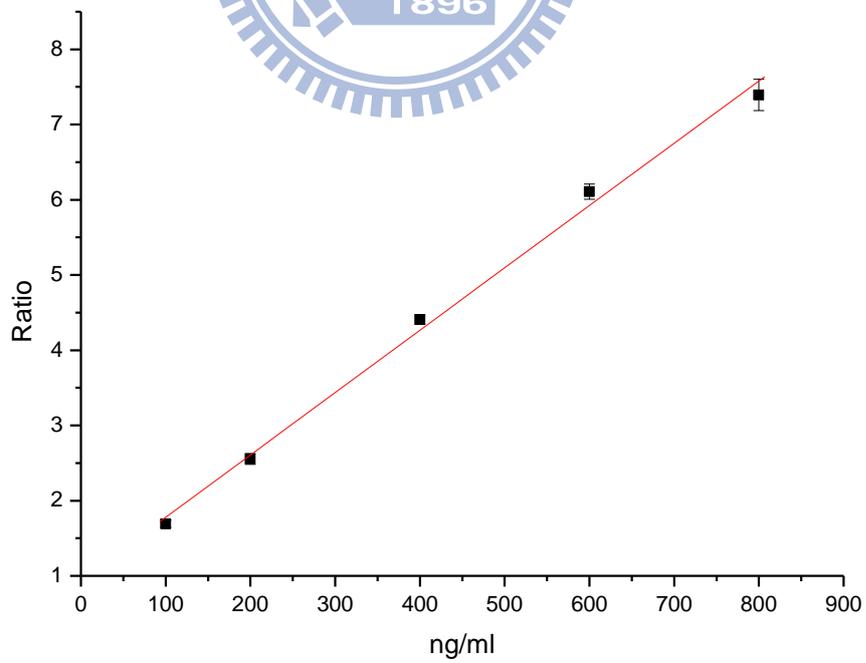


圖 4-12 Olanzapine 100 至 800 ng/ml 之檢量線

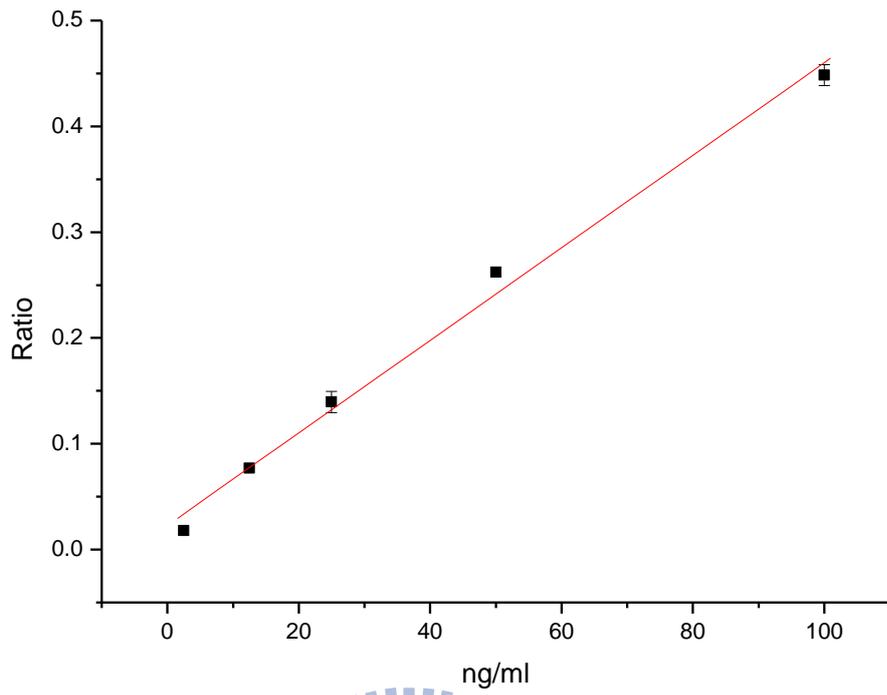


圖 4-13 Quetiapine 2.5 至 100 ng/ml 之檢量線

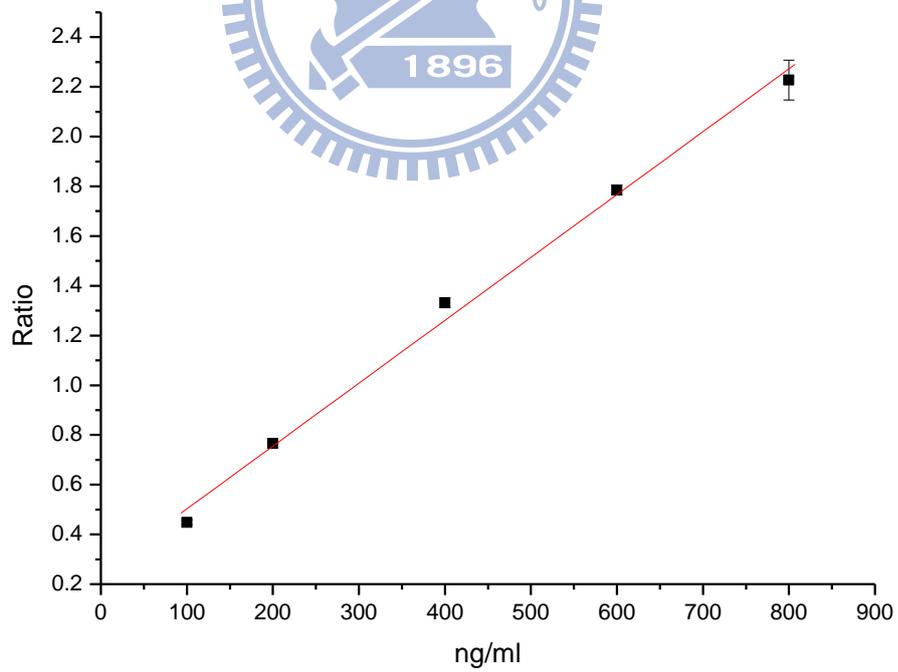


圖 4-14 Quetiapine 100 至 800 ng/ml 之檢量線

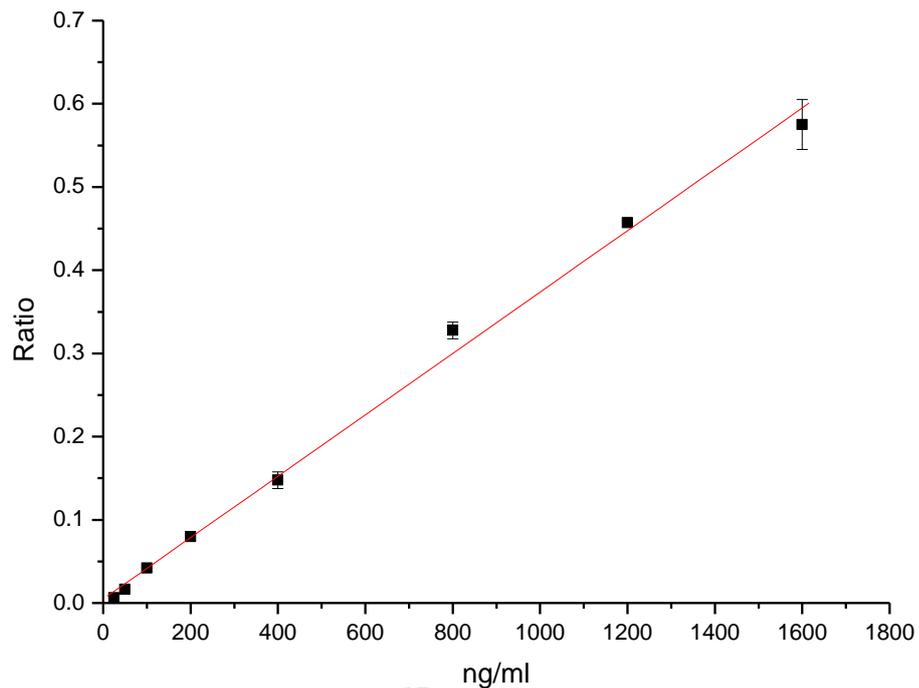


圖 4-15 Aripiprazole 25 至 1600 ng/ml 之檢量線

4.3 同日與異日間之回收率與再現性

表 4-2 與 4-3 列出同日間與異日間之標準樣品添加於真實樣品，濃度分別為 1、10 與 1000 ng/ml 之回收率與再現性。同日間之回收率介於 104.18% 至 108.89%，RSD 介於 3.39% 至 4.30% 之間；異日間之回收率介於 104.02% 至 108.39% 之間，RSD 介於 2.67% 至 7.76% 之間。

表 4-2 同日間標準品添加於真實樣品之回收率與再現性

Compound	Conc. (ng/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
Olanzapine	10	101.25	6.44
	150	101.10	2.65
	300	99.95	4.92
Quetiapine	10	100.08	7.75
	150	96.96	3.58
	300	101.77	3.23
Aripiprazole	40	95.03	4.49
	600	94.73	3.79
	1200	94.07	0.81

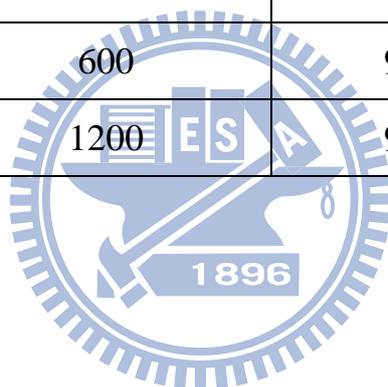
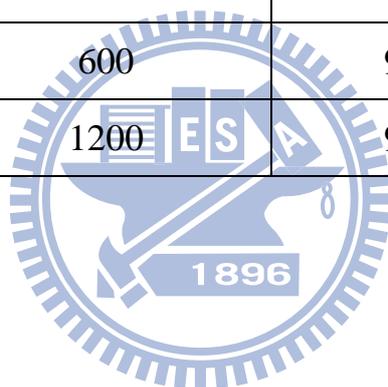


表 4-3 異日間標準添加於真實樣品之回收率與再現性

Compound	Conc. (ng/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
Olanzapine	10	96.87	5.79
	150	103.20	6.14
	300	101.18	6.42
Quetiapine	10	101.43	6.96
	150	101.44	6.88
	300	103.66	5.46
Aripiprazole	40	91.09	3.00
	600	95.36	3.44
	1200	97.45	2.76



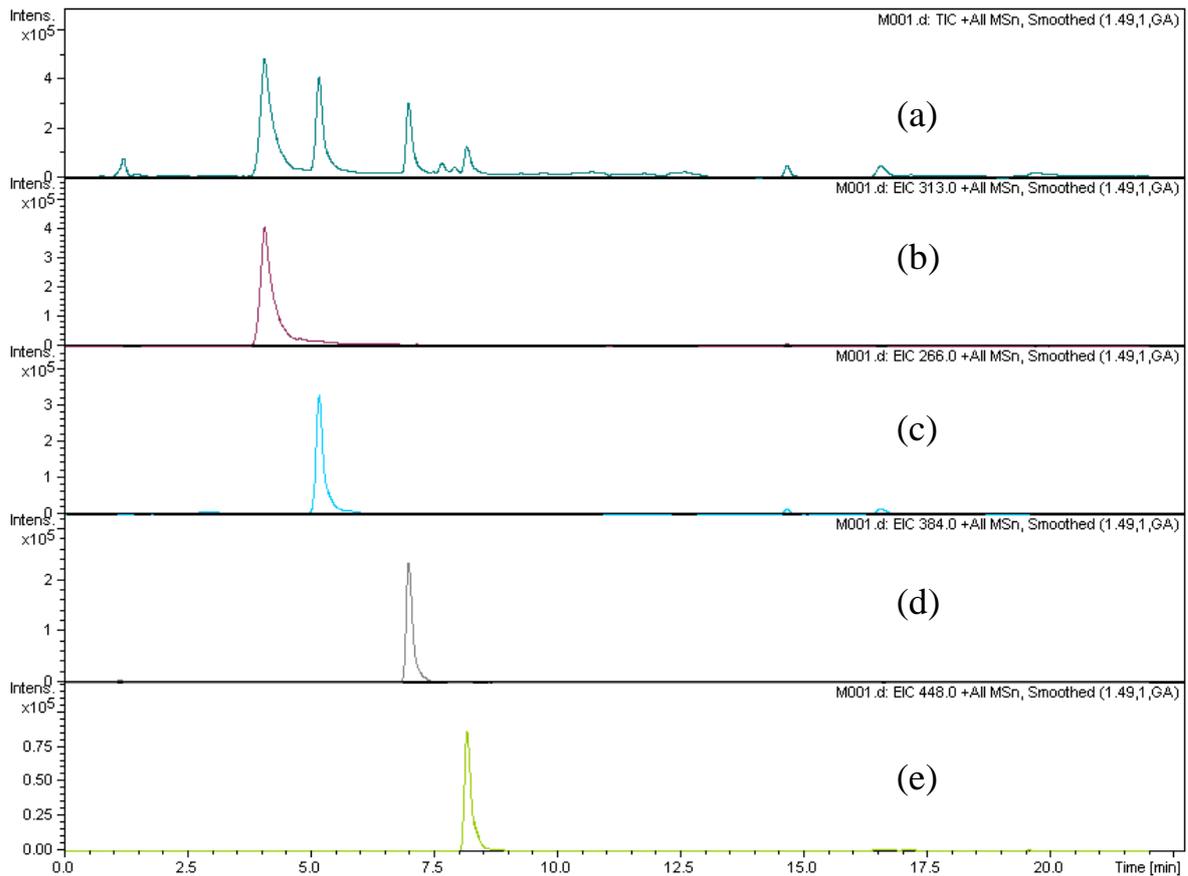


圖 4-16 標準品添加於真實樣品之層析圖

Olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 濃度分別為 150、150 與 600 ng/ml。 (a) TIC 圖， (b) EIC：313，olanzapine 層析圖， (c) EIC：266，internal standard 層析圖， (d) EIC：384 圖，quetiapine 層析圖， (e) EIC：448 圖，aripiprazole 層析圖

4.4 不同實驗室差異

以本篇論文之操作方式 (NCTU) 以及第三公正單位 (世宸生物科技，ROSETTA Phamamate Co., Ltd.)，雙方一同檢測相同含有 olanzapine 未知濃度之血漿樣品。每一樣品分別以不同方式進行樣品前處理後，重複注射三次，探討兩實驗室之實驗結果。表 4-4 為檢測結果，表中可以看出雙方在

不同樣品前處理與不同儀器、設備與實驗條件下所得之數據相當接近，且均具有優異之精確度。此實驗證實本研究所提出之分析方法相比於一般實驗室採用之標準分析方法在準確度與精密度上均有不錯的表現。同時尚具有成本低廉、操作簡便、分析迅速等優點，足以應用於此類精神疾病藥物的分析與定量。

表 4-4 不同實驗室檢測未知濃度之血漿樣品結果

	Spiked (ng/ml)	This work		ROSETTA	
		Found (ng/ml)	Recovery (%)	Found (ng/ml)	Recovery (%)
Sample 1	26.67	24.73	92.75 ± 8.6	25.91	97.15 ± 1.7
Sample 2	66.67	55.03	82.54 ± 2.1	66.42	99.63 ± 3.6

五、結論

本實驗使用液相層析儀串聯質譜儀，以蛋白質沉澱作為萃取條件，偵測血漿中的 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole。首先測試質譜儀的最佳化條件，以移動相不經分析管柱，探討分析物於電噴灑游離源之游離效率以及電噴灑穩定性的影響，乾燥氣體流量、霧化壓力與毛細管電壓會影響噴灑液滴的形成與去溶劑化是否完全。實驗中毛細管溫度在 275 至 350°C 之間差異不大，選擇最高之毛細管溫度以減少基質之干擾。以上述最佳化之條件為參數，測試不同的萃取條件之回收率。測試項目分別為：不同溶劑、不同離心時間與不同有機溶劑強度。我們發現甲醇的萃取效率最佳，可能與分析物極性較高有關係；而離心時間會影響是否確實將變性的蛋白質沉澱分離，未完全分離會導致基質的干擾，使回收率過高；使用的有機溶劑強度若低於 62.5% 回收率也會過高，猜測是因為無法將蛋白質完全變性，而無法確實分離所導致。

以 20 mM ammonium acetate，0.15% (v/v) triethylamine，pH 4.0 與乙腈為移動相以梯度沖提，分析管柱為 Zorbax Eclipse XBD C18，2.1 × 150 mm，5 μm，Guard column 為 Security Guard Cartridge，流速為 0.3 ml/min，進樣體積為 20 μl，此方法於 10 分鐘前即可分離完成。質譜儀設定參數為乾燥氣體流量 8 L/min，霧化壓力 40 psi，毛細管電壓 2000 V、毛細管溫度 350°C。

Olanzapine 校正曲線濃度範圍在 2.5 至 100 ng/ml 之間與 100 至 800 ng/ml 之間，相關係數(r^2) 分別為 0.9965 與 0.9956，最低偵測極限為 0.94 ng/ml。以標準品添加於真實樣品，同日間之回收率介於 99.95% 至 101.25% 之間，異日間之回收率介於 96.87% 至 103.20% 之間，RSD 皆小於 6.44%。

Quetiapine 校正曲線濃度範圍在 2.5 至 100 ng/ml 之間與 100 至 800 ng/ml 之間，相關係數 (r^2) 分別為 0.9926 與 0.9951，最低偵測極限為 0.95 ng/ml，以標準品添加於真實樣品，同日間之回收率介於 96.96% 至 101.77% 之間，異日間之回收率介於 101.43% 至 103.66% 之間，RSD 皆小於 7.75%。

Aripiprazole 校正曲線濃度範圍在 50 至 350 ng/ml 之間，相關係數 (r^2) 為 0.9959，最低偵測極限為 1.35 ng/ml，以標準品添加於真實樣品，同日間之回收率介於 94.07% 至 95.03% 之間，異日間之回收率介於 91.09% 至 97.45% 之間，RSD 皆小於 4.49%。上述數據皆顯示以此方法檢測血漿中之 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 具有良好之回收率與再現性。

與過去文獻比較可得，利用 62.5% 之甲醇萃取人類血漿中之 olanzapine、quetiapine 與 aripiprazole 具有操作簡單、快速、不受基質干擾與良好再現性及回收率等優點。



六、參考文獻

- (1) Douglas, A. S.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of Instrumental Analysis*. 5 ed.; Harcourt Colleague Publisher: Belmont, 1997.
- (2) Douglas, A. S.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Fundamentals of Analysis Chemistry*. eighth ed.; Thomson Publisher,: Arlington, 2004.
- (3) Willoughby, R.; Sheehan, E.; Mitrovich, S., *A Global View of LC/MS*. second ed.; Global View Publishing: 2002.
- (4) 呂路線; 石玉中; 邱亞峰, *精神分裂癥的診斷與護理*. 中原農民出版社: 鄭州, 2005.
- (5) 瞿發林, *精神疾病現代藥物治療手冊*. 1 ed.; 第二軍醫大學出版社: 2005.
- (6) Berna, A.; Ackermann, B.; Ruterbories, K.; Glass, S., "Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J. Chromatogr. B* **2002**, 767, 163-168.
- (7) Shimokawa, Y.; Akiyama, H.; Kashiyama, E.; Koga, T.; Miyamoto, G., "High performance liquid chromatographic methods for the determination of aripiprazole with ultraviolet detection in rat plasma and brain: Application to the pharmacokinetic study" *J. Chromatogr. B* **2005**, 821, 8-14.
- (8) Kollroser, M.; Schober, C., "Direct-injection high performance liquid chromatography ion trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 1266-1272.
- (9) Raggi, M. A.; Casamenti, G.; Mandrioli, R.; Izzo, G.; Kenndler, E., "Quantitation of olanzapine in tablets by HPLC, CZE, derivative spectrometry and linear voltammetry" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 23, 973-981.
- (10) Davis, P. C.; Wong, J.; Gefvert, O., "Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 20, 271-282.
- (11) Zhou, Z. L.; Li, X.; Li, K. Y.; Me, Z. H.; Cheng, Z. E.; Peng, W. X.; Wang, F.; Zhu, R. H.; Li, H. D., "Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry" *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, 802, 257-262.
- (12) Bellomarino, S. A.; Brown, A. J.; Conlan, X. A.; Barnett, N. W., "Preliminary evaluation of monolithic column high-performance liquid

- chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection for the determination of quetiapine in human body fluids" *Talanta* **2009**, *77*, 1873-1876.
- (13) Saar, E.; Gerostamoulos, D.; Drummer, O. H.; Beyer, J., "Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS" *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 915-925.
- (14) Basavaiah, K.; Rajendraprasad, N.; Vinay, K. B., "Microtitrimetric determination of a drug content of pharmaceuticals containing olanzapine in aqueous medium" *CI&CEQ* **2009**, *15*, 77-81.
- (15) Hilaert, S.; Snoeck, L.; Van den Bossche, W., "Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the simultaneous analysis of four atypical antipsychotics" *J. Chromatogr.* **2004**, *1033*, 357-362.
- (16) Musenga, A.; Saracino, M. A.; Spinelli, D.; Rizzato, E.; Boncompagni, G.; Kenndler, E.; Raggi, M. A., "Analysis of the recent antipsychotic aripiprazole in human plasma by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with diode array detection" *Anal. Chim. Acta* **2008**, *612*, 204-211.
- (17) Hwang, P. L.; Wei, S. Y.; Yeh, H. H.; Ko, J. Y.; Chang, C. C.; Chen, S. H., "Simultaneous determination of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in plasma by capillary electrophoresis combining on-column field-amplified sample injection and application in schizophrenia" *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2778-2786.
- (18) Saracino, M. A.; Mercolini, L.; Flotta, G.; Albers, L. J.; Merli, R.; Raggi, M. A., "Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. B* **2006**, *843*, 227-233.
- (19) Morgan, P. E.; Manwaring, V.; Flanagan, R. J., "HPLC of basic drugs using non-aqueous ionic eluents: evaluation of a 3 μ m strong cation-exchange material" *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 318-323.
- (20) Bao, J. Q.; Potts, B. D., "Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection" *J. Chromatogr. B* **2001**, *752*, 61-67.
- (21) Chiu, J. A.; Franklin, R. B., "Analysis and pharmacokinetics of olanzapine (LY170053) and two metabolites in rat plasma using reversed-phase HPLC with electrochemical detection" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 609-615.
- (22) Sabbioni, C.; Saracino, M. A.; Mandrioli, R.; Albers, L.; Boncompagni, G.; Raggi, M. A., "Rapid analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in human plasma using high-performance liquid chromatography with coulometric detection" *Anal. Chim. Acta* **2004**, *516*, 111-117.
- (23) Raggi, M. A.; Mandrioli, R.; Sabbioni, C.; Ghedini, N.; Fanali, S.; Volterra, V., "Determination of olanzapine and desmethylolanzapine in the plasma of

- schizophrenic patients by means of an improved HPLC method with amperometric detection" *Chromatographia* **2001**, *54*, 203-207.
- (24) Berna, M.; Shugert, R.; Mullen, J., "Determination of olanzapine in human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry" *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1003-1008.
- (25) Bogusz, M. J.; Kruger, K. D.; Maier, R. D.; Erkwow, R.; Tuchtenhagen, F., "Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry" *J. Chromatogr. B* **1999**, *732*, 257-269.
- (26) Gervasini, G.; Vizcaino, S.; Herraiz, A. G.; Benitez, J.; Carrillo, J. A., "Applicability of an assay for routine monitoring of highly variable concentrations of olanzapine based on HPLC with mass spectrometric detection" *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 2088-2091.
- (27) Nirogi, R. V. S.; Kandikere, V. N.; Shukla, M.; Mudigonda, K.; Maurya, S.; Boosi, R.; Yeffamilli, A., "Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 935-942.
- (28) Choong, E.; Rudaz, S.; Kottelat, A.; Guillarme, D.; Veuthey, J. L.; Eap, C. B., "Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 1000-1008.
- (29) Kirchherr, H.; Kuhn-Velten, W. N., "Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach" *J. Chromatogr. B* **2006**, *843*, 100-113.
- (30) Barrett, B.; Holcapek, M.; Huclova, J.; Borek-Dohalsky, V.; Fejt, P.; Memec, B.; Jelinek, I., "Validated HPLC-MS/MS method for determination of quetiapine in human plasma" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 498-505.
- (31) Zuo, X. C.; Wang, F.; Xu, P.; Zhu, R. H.; Li, H. D., "LC-ESI-MS for rapid and sensitive determination of aripiprazole in human plasma" *Chromatographia* **2006**, *64*, 387-391.
- (32) Bogusz, M. J., "Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity" *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 3-19.
- (33) Limited, E. L. a. C., 金菩薩膜衣錠 仿單.
- (34) de la Torre, C. S.; Martinez, M. A.; Almarza, E., "Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures" *Forensic Sci. Int.* **2005**, *155*, 193-204.
- (35) Saracino, M. A.; Gandolfi, O.; Dall'Olio, R.; Albers, L.; Kenndler, E.;

- Raggi, M. A., "Determination of Olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure" *J. Chromatogr.* **2006**, *1122*, 21-27.
- (36) Zhang, G.; Terry, A. V.; Bartlett, M. G., "Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection" *J. Chromatogr. B* **2007**, *856*, 20-28.
- (37) Limited, A. U., 思樂康膜衣錠 仿單.
- (38) Mandrioli, R.; Fanali, S.; Ferranti, A.; Raggi, M. A., "HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 969-977.
- (39) Hasselstrom, J.; Linnet, K., "Fully automated on-line quantification of quetiapine in human serum by solid phase extraction and liquid chromatography" *J. Chromatogr. B* **2003**, *798*, 9-16.
- (40) Otsuka Pharmaceutical Co., L. T. I. F., 大塚安立復® 錠 仿單.
- (41) Lancelin, F.; Kayssa, D.; Tabaouti, K.; Linda, K.; Sophie, B. A.; Paubel, P.; Piketty, M. L., "Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma" *J. Chromatogr. B* **2008**, *867*, 15-19.

