

四、利用陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法 分析古柯鹼及鴉片類藥物

人類很早就嘗試借助各種物質來治療疾病或改變自己的情緒及思維，例如使用酒精類的飲料來幫助社交娛樂，並且藉由一些天然植物，如罌粟、大麻、古柯葉等具有特殊止痛、鎮定或興奮的功效來做為醫療用途或達到自我陶醉的境界，而不當的使用藥物傷害個人健康或社會安全的濫用行為一直是世界各國最為頭痛的問題，一旦藥物濫用者成癮之後，無法支付所需要購買毒品的龐大費用，衍生出來的犯罪行為如偷竊、搶劫等，對個人及國家社會均造成嚴重的傷害。

在國內，自民國七十九年以後藥物濫用的問題日趨嚴重，其中以甲基安非他命(methamphetamine) 和鴉片類藥物為大宗。以下將利用陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法分析經常被濫用的中樞神經興奮劑古柯鹼(cocaine) 及鴉片類藥物包括嗎啡(morphine)、海洛因(heroin)、6-乙酰嗎啡(6-acetylmorphine) 和可待因(codeine)。

在一般濫用藥物檢測中，氣相層析質譜儀法(GC-MS) 為相關檢驗機構所認可的方法，但在古柯鹼及鴉片類藥物的檢測上，氣相層析質譜儀法在操作上必須經由衍生反應，藉以提高此類藥物在質譜的易讀性，因此增加了檢驗所需花費的時間，且質譜儀的造價昂貴，因此就有研究者相繼地發展出免疫分析法(immunoassay)[54]，液相層析方法(liquid chromatography)[55-57]，在不需經過衍生的步驟即可分析，但其均無法達到 GC/MS[58] 在偵測上的選擇性(selectivity) 及靈敏度(sensitivity)，因此我們選擇了毛細管電泳分析技術結合 UV 偵測器，同樣地在不需衍生的步驟下，利用線上濃縮的技術改善偵測的靈敏度。

4.1 古柯鹼(Cocaine)

古柯鹼是由古柯葉所提煉出來，早年在南美安斯地帶的印地安原住民已有在宗教儀式中燃燒或咀嚼古柯葉之風俗習慣，當時藉咀嚼古柯葉可以消除飢餓和疲勞，而在醫療方面古柯鹼則被發現可作為麻醉劑之用途。古柯鹼在 1855 年由古柯葉所提煉出後，於 1880 年代被引進美國，在 1980

年代在美國被廣泛的濫用，隨後更蔓延至歐洲、印度等地[32]。

古柯鹼為古柯葉中重要的生物鹼，其結構如 Figure 4-1 所示，又名為 benzoylmethylecgonine。古柯鹼為一種局部麻醉劑，屬間接作用之擬交感神經藥物，不會直接作用於接受器上，但可藉由調控神經細胞的鈉離子通道因而阻斷神經傳導達到麻醉之目的[49]。

古柯鹼在國內被列為第一級管制藥品，俗稱為可卡因、可可精或 Crack，過量的使用古柯鹼會導致不正常的中樞神經興奮作用，使用者會迅速地變得興奮、不想休息、多話、憂鬱、迷惑及敏感，成癮者則會有體重下降、心跳增加、併發憂鬱、幻想等精神狀態之特徵。使用者通常以鼻吸入或將藥物加熱後吸入其煙霧方式使用，亦有皮膚、肌肉或靜脈注射方式，古柯鹼經吸煙方式使用後可迅速地通過血腦障壁(blood-brain barrier)，增加其藥理作用的危害，此在美國已造成嚴重之濫用問題。

4.2 嗎啡(Morphine)

嗎啡起名於Morpheus，為「夢之神」之意，1806年由德國化學家 Serturmer 首先自鴉片中抽提出來，也是第一種被純化的生物鹼。1820年由德國 Merck 藥廠正式生產製造。直到 1853 年才發現皮下注射的方法，正由於皮下注射之吸收快速，因此中毒成癮性的速度很快，而逐漸由歐洲蔓延開來[32]。

嗎啡為鴉片(Opium)中最主要的生物鹼，外觀為白色粉末或白色針狀結晶之中樞神經抑制劑，活性型的嗎啡為左旋性之天然生物鹼具有鎮痛作用其結構如 Figure 4-1 所示，右旋性之嗎啡則不具有鎮痛作用。醫藥上所使用為其鹽酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽和酒石酸鹽，目前較普遍使用者為鹽酸鹽及硫酸鹽。嗎啡為癌症末期患者最常用的止痛劑之一，以注射方式進入人體，則約 90% 的嗎啡會在 24 小時內自尿液中排泄出；但若嗎啡以口服進入人體時，則僅 60% 會在 24 小時內自尿液中排泄出，因此一般以注射方式進入人體[50]。

4.3 海洛因(Heroin)

海洛因之化學名為二乙醯嗎啡(diacetylmorphine) ，由無水醋酸酐與嗎啡加熱反應而得，在嗎啡的兩個羥基(hydroxyl group) 上以乙醯基(acetyl group) 取代，其結構如 Figure 4-1 所示，脂溶性因乙醯基的取代而大大增加，因此更易通過血腦障壁造成中樞神經系統的傷害。

海洛因是 1874 年由德國化學家首先合成的藥物；1898 年由德國 Bayer 藥廠生產製造。當初由嗎啡合成的原因是預期藉由合成新的藥物以抑制嗎啡的濫用情形，但結果發現新的藥物鎮痛效果為嗎啡的4~8倍，成癮性卻是嗎啡的 8 倍，因此造成美國地區的廣泛濫用，1924 年美國單單一個紐約市就有 75% 的犯罪是因為吸食海洛因所引起[51,52]，可見其對美國社會之重大影響。而世界各國也同樣對海洛因加以管制，如 1945 年日本禁止醫療使用以及 1953 年英國也將其從藥典中刪除[53]。至於我國也在 90 年代流行起海洛因，在國內緝獲的毒品數量中，海洛因僅次於甲基安非他命為第二大濫用藥物，因此被列為第一級管制藥品。

4.4 6-乙醯嗎啡(6-Acetylmorphine)

6-乙醯嗎啡為海洛因的代謝物，但在體內會很快的分解成為嗎啡，其結構如 Figure 4-1 所示。由於 6-乙醯嗎啡為吸食海洛因的獨特代謝物，因此在尿液檢體中若檢出 6-乙醯嗎啡成分，則可確定其為海洛因的吸食者[52]。

4.5 可待因(Codeine)

可待因又名甲基嗎啡，化學名 $5\alpha, 6\alpha, -7,8\text{-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphine-6-ol}$ ，佔鴉片成分的 0.7~2.5%，其結構如 Figure 4-1 所示。1832 年由法國化學家從鴉片中分離出來，大部分是使用在止痛或止咳等方面，通常以硫酸鹽及磷酸鹽的型態存在，其為鎮咳糖漿中常見的成分。因其具有成癮性 現今已有多數國家將其列為管制藥品。我國將可待因及其製劑依其含量分別歸列在不同等級的管制藥品中，每 100 毫升(或100公克) 5.0 公克以上者為第二級管制藥品；每 100 毫升(或100公克) 1.0 公克以上者為第三級管制藥品；可待因內服液（含糖漿劑）含量每 100 毫升未滿 1.0 公克之醫師處方用藥為第四級管制藥品。可待因經口服

吸收良好，但對鴉片受體的親合力很低，經肝臟代謝後會去甲基而產生嗎啡，因此也具有止痛的作用，但止痛的效果較差，且成癮性也相對較低，因此主要為醫療上鎮咳之用藥。

以上所提及的鴉片類藥物主要對大腦皮質、下視丘及 Medullary centers 的抑制作用而造成鎮靜與止痛效果。鴉片類藥物與鴉片接受器結合會產生不同的作用，主要有抑制神經元活性止痛的作用及產生鎮靜效果並伴有欣快感，因此易被有心者濫用，使用劑量過高時會產生呼吸抑制導致死亡。再者，濫用者常因共用針頭而感染愛滋病、病毒性肝炎等疾病，對個人與社會都造成嚴重的危害[32]。

4.6 線上濃縮方法

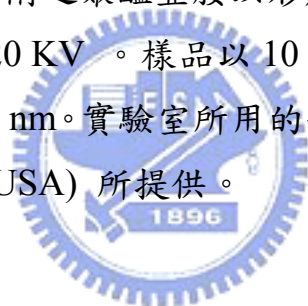
由 Figure 2-12 的整理中發現，帶電荷的分析物隨著與界面活性劑親合的強度增加，也可應用於複合兩種線上濃縮的模式 (ex. CSEI-sweeping-MEKC, ASEI-sweeping-MEKC, LVSS-sweeping-MEKC)，藉著兩種線上濃縮技術的結合，在濃縮倍率方面，可以比單一線上濃縮技術增加 10~100 倍，因此在古柯鹼及鴉片類藥物的分析上，藉由分析物在低 pH 值下三級銨的結構會被質子化而帶正電之性質，在線上濃縮方法的開發上，本實驗選擇以陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮模式 (CSEI-sweeping-MEKC) 來進行分析。

在陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮模式的操作步驟上，首先將高導電度緩衝溶液 (high-conductivity buffer solution, HCB) 充滿毛細管管柱，後再導入一小段純水，接著以正向電壓電動方式注入配製在低導電度基質之陽離子分析物，此時分析物在外加電場驅使下，由低導電度基質快速通過純水區域之高電場區，至高導電度緩衝溶液 (低電場區) 時速度隨即減慢，因此分析物會聚集或堆積在純水區域與高導電度緩衝溶液的交界處，形成第一次濃縮。隨即轉換電極方向將毛細管兩端置於含有陰離子界面活性劑 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 之背景緩衝溶液，此時陽離子分析物會因靜電吸引往負極 (入口端) 方向移動，而負電微胞會往正極 (出口端) 方向移動，當分析物與微胞接觸後受微胞影響也會以較慢的速度往正極 (出口端) 方向移動，因此形成二次濃縮的步驟，最後以 MEKC 機制進行分

離。當中為了避免負電微胞導入毛細管時被電滲流推出，因此先前使用高導電度緩衝溶液必須配置在低 pH 值下，已達到抑制電滲流之目的。

4.7 儀器裝置

使用貝克曼公司(Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA) 所製造之毛細管電泳儀， P/ACE MDQ 系列進行實驗。紫外光-可見光二極體陣列(UV-VIS diode array) 作為偵測器。儀器與分析數據由 Beckman Cotlter MDQ 32 Karat software 控制與處理；以內徑 50 μm ，外徑 360 μm ，總長 60 cm(至偵測窗口為 50 cm) 之二氧化矽毛細管(fused-silica capillary, polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ, USA) 作為分離管柱，毛細管外層塗附之聚醯亞胺 polyimide(PI) 以火焰灼燒 0.5 cm，再以乙醇溶劑輕微擦拭灼燒處，去除塗附之聚醯亞胺以形成偵測窗口。管柱溫度控制在 25°C 下。分離電壓為 -20 KV。樣品以 10 KV 電壓注入導入毛細管中。偵測器吸收波長設於 240 nm。實驗室所用的去離子水係由 Milli-Q 水系統 (Millipore, Bedford, MA, USA) 所提供。



4.8 試藥

所有試藥均屬分析等級。磷酸氫二鈉(disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)、氫氧化鈉(sodium hydroxide) 皆購自Fluka公司，十二烷基磺酸鈉(Sodium dodecyl sulfate, SDS) 購自Sigma(St. Louis, MO, USA)。檸檬酸(citric acid)、甲醇(methanol)、乙腈(acetonitrile)皆購自Merck公司，嗎啡(Morphine, catalog no. M-005; 1 mg/mL methanol; MP)、海洛因(Heroin, catalog no. H-038; 1 mg/mL acetonitrile; HR)、可待因(Codeine, catalog no. C-006; 1 mg/mL acetonitrile; CD)、乙醯嗎啡(6-Acetylmorphine, catalog no. A-009; 1 mg/mL acetonitrile; AM)、古柯鹼(Cocaine, catalog no. C-008; 1 mg/mL acetonitrile; CC) 皆購自 Radian International 公司，其結構詳見 Figure 4-1。

4.9 固相萃取

使用 Supelco 公司(Bellefonte, PA, U.S.A) 所生產之 12 port Vacuum Manifold 固相萃取裝置，搭配 EYELA 公司(Tokyo, Japan) 所生產之 A-3S 型水噴射幫浦。固相萃取管為 Oasis[®] HLB solid phase extraction cartridges (3cc/60mg) 購自 Waters 公司(Waters, Milford, MA, USA)，實驗所使用之電導度計為 TOA 公司(Tokyo, Japan) 所生產的 CM-40S 型儀器。

4.10 實驗方法

4.10.1 新毛細管的調態(Condition)

本實驗所使用的毛細管內徑為 50 μm ，外徑為 360 μm ，管柱長 60 cm，有效長度為 50 cm，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 0.2 cm，再以乙醇擦拭作為偵測窗口，裝置於 MDQ 卡夾中。新的毛細管柱在使用前依序先以甲醇沖洗 10 分鐘，接著以去離子水沖洗 2 分鐘，去除管壁油污。為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化並穩定，再以 1.0 N 之氫氧化鈉水溶液活化沖洗毛細管內壁之矽醇基 20 分鐘，接著以去離子水沖洗 2 分鐘，然後以高濃度、低 pH 值 (100 mM, pH 2.2) 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液沖洗 10 分鐘後備用。

4.10.2 實驗前、後毛細管的處理

每次實驗進行前先使用 100 mM, pH 2.2 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液沖洗 3 分鐘，以有效抑制毛細管管柱內壁矽醇基之解離，再以含有有機修飾劑之高導電度緩衝溶液(HCB) 沖洗 3 分鐘，即可導入樣品溶液進行樣品分析實驗。完成電泳分離後，由於背景緩衝溶液含有高濃度的界面活性劑，處理不慎容易發生阻塞毛細管的情況。因此每次完成電泳分離後應立即以甲醇、去離子水沖洗毛細管各沖洗 5 分鐘；另外，每日實驗結束保存管柱前必須再沖洗甲醇溶劑 20 分鐘及去離子水 20 分鐘，以徹底清除緩衝


溶液中之界面活性劑，延長分離管柱使用壽命。

4.10.3 古柯鹼及鴉片類藥物標準溶液之配製

嗎啡(Morphine)、海洛因(Heroin)、可待因(Codeine)、乙醯嗎啡(6-Acetylmorphine)與古柯鹼(Cocaine)標準品為各自配置於甲醇或乙腈的溶液，各為 1000 ppm 的標準母液存放在冰箱中-10°C 保存，由於實驗為線上濃縮實驗，因此不需要高濃度的標準母液，前述母液需再以去離子水為溶劑混合稀釋至 5 ppm，分析時再依所需要以緩衝溶液稀釋至適當的濃度。

4.10.4 不同濃縮分離條件之測試

4.10.4.1 緩衝溶液不同 pH 值之影響



本實驗為了使分析物分子之性質更易於與界面活性劑微胞親合，因此討論緩衝溶液 pH 值變化之影響，固定高導電度緩衝溶液濃度及乙腈含量(100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液；15% v/v)，背景緩衝溶液濃度(50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液)及 SDS 150 mM 的含量，改變兩者的 pH 值由 pH 2.2 至 pH 5.0，討論緩衝溶液 pH 值對電滲流的速度與分析物帶電性的影響。其餘分離條件，樣品注入電壓 10 KV；300 sec，分析物濃度為 500 ppb；稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2)；分離電壓 -20 KV。

4.10.4.2 背景緩衝溶液含量不同濃度 SDS 之影響

藉由增加背景緩衝溶液 SDS 含量以了解帶負電荷微胞數目對濃縮效果之影響，因此固定高導電度緩衝溶液之條件(100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液；15% v/v；pH 4.0)及背景緩衝溶液濃度(50 mM 檸檬酸/磷酸

氫二鈉緩衝溶液；pH 4.0) ，改變背景緩衝溶液 SDS 的含量由 50 mM 至 150 mM ，其餘分離條件，樣品注入電壓 10 KV ; 300 sec ，分析物濃度為 500 ppb ；稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2) ；分離電壓 -20 KV 。

4.10.4.3 高導電度緩衝溶液含量不同乙腈之影響

藉由有機溶劑的添加改變分析物在微胞相與溶液相的分配情況，由不含乙腈之緩衝溶液至高導電度緩衝溶液內含有乙腈 20% ，探討乙腈對整體的遷移速度與分離效率之影響。其餘分離條件，高導電度緩衝溶液濃度為 100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) ，背景緩衝溶液為 50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液含量 150 mM SDS ，樣品注入電壓 10 KV ; 300 sec ，分析物濃度為 500 ppb ；稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2) ；分離電壓 -20 KV 。

4.10.4.4 背景緩衝溶液不同離子濃度之影響

藉由調整背景緩衝溶液之離子濃度，改變電滲流的遷移速度，可以用來幫助減小電滲流，因此背景緩衝溶液之離子濃度由 10 mM 至 100 mM ，以了解背景緩衝溶液對整體遷移速度與濃縮效率之影響。其餘分離條件，高導電度緩衝溶液濃度為 100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含量 10% 乙腈，背景緩衝溶液(pH 4.0)含量 150 mM SDS ，樣品注入電壓 10 KV ; 300 sec ，分析物濃度為 500 ppb ；稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2)；分離電壓 -20 KV 。

4.10.4.5 樣品注射時間

固定樣品注入電壓 10 KV ，延長樣品注射時間可以直接增加樣品導入毛細管的量，分析物濃度為 50 ppb ，注射時間由 300 sec 至 900 sec ，

探討增加樣品注射時間對濃縮效率之影響。分離條件為高導電度緩衝溶液 100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含量 10% 乙腈，背景緩衝溶液(50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液；pH 4.0) 含量 150 mM SDS，稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2)；分離電壓 -20 KV。

4.10.4.6 再現性分析及定量校正曲線

取混合五種標準品之原液 5 ppm 以 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液稀釋成 50 ppb、250 ppb、500 ppb、750 ppb、1000 ppb 等五種濃度進行電泳分離實驗，樣品注入條件為 10 KV, 600 sec，以前述測試所獲得之最佳濃縮分離條件進行毛細管電泳分析五次。古柯鹼及鴉片類藥物之五種分析物以其波峰面積對濃度作圖，製備標準校正曲線。另針對分析物之遷移時間及波峰積分面積進行再現性比較分析，個別計算相對標準偏差值 (RSD, %)。



4.10.5 粉末之偵測

三種不同嫌疑粉末由憲兵司令部刑事鑑識中心所提供。將取得之粉末狀樣品，各取 1.5 mg 加入 1 mL 甲醇進行超音震盪 30 分鐘後，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取其上層溶液用 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液 (pH 2.2) 稀釋 1000 倍之後進入毛細管電泳分析。

4.10.6 尿液樣品之固相萃取步驟

取空白尿液樣品 2 mL 加入 200 μ L 5 ppm 混合的標準品及 1 mL 10mM 的磷酸緩衝溶液 (調整 pH 值約至8)，首先利用 2 mL 甲醇和 2 mL 10mM 的磷酸緩衝溶液(pH 8.0) 來沖洗平衡全新的固相萃取管，做完上述步驟後，接續著加入配置好的 3 mL 尿液樣品以小於 1 mL/min 的流速通

過萃取管，之後再用 2 mL 含 10% 甲醇之去離子水溶液，以流速大於 2 mL/min 沖洗萃取管，等萃取管內溶液完全被吹乾後，以 3 mL 甲醇沖提，最後沖提液在 40°C 下以氮氣吹乾，乾燥後的物質再以 2 mL 離子水回溶，此時必須調整溶液之電導度，若其電導度大於 55.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 則需再添加去離子水，調整溶液之電導度約為 55.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，方能進入毛細管電泳分離。

4.10.6.1 固相萃取之回收率(Recovery, RE)

固相萃取的回收率為了減低尿液樣品的基質干擾利用 2 mL 空白尿液樣品中只加入 1 mL 10mM 的磷酸緩衝溶液(pH 8.0) 同前述之固相萃取步驟，沖提液在氮氣吹乾後，加入 200 μL 5 ppm 混合的標準品以離子水回溶至 2 mL(Post-extracted spiked sample)，進入毛細管電泳分離，與空白尿液樣品在萃取前加入 200 μL 5 ppm 混合的標準品(Extracted sample) 之分析結果比較，計算其波峰面積百分比，運算公式如式 4-2 所示。最後以重複五次分析結果之平均值和 1.96 倍的標準偏差值(SD)，做為 95% 的可信賴區間。

4.11 結果與討論

4.11.1 緩衝溶液不同 pH 值之影響

由 4.6.1 節得知，緩衝溶液 pH 值除了可以改變分析物帶電的性質，還可以藉由 pH 值改變電滲流的移動速度，在此毛細管未經過界面活性劑的修飾管壁，隨著 pH 值的增加表面解離的矽醇基越多，電滲流的遷移速度越快，分析物是經由電動注入導入毛細管，電動注入的進樣量 Q 可以由以下式求出[9]:

$$Q = (\mu_{ep} + \mu_{eof})V\pi r^2 Ct / L \quad (6-1)$$

其中 μ_{ep} 為分析物的電泳遷移率， μ_{eof} 為電滲流遷移率， V 為外加電壓，

r 為毛細管內半徑， C 為分析物的濃度， t 為進樣量時間， L 為毛細管總長度。

在式 6-1 所表示的公式中得知電滲流越快進樣量越多，由 Figure 4-2 也可看出隨著 pH 值的增高分析物的訊號越趨於明顯，此外，pH 值的增加使質子化的能力減弱，促使古柯鹼及鴉片類分析物帶電性減弱，而增加了分析物與負電微胞(SDS)的作用力，進而提昇濃縮的效果，至 pH 5.0 時波峰有變寬的現象產生，因此選擇 pH 4.0 的緩衝溶液為最佳分離條件。

4.11.2 背景緩衝溶液含量不同濃度 SDS 之影響

由 4.6.3 節得知，界面活性劑濃度增加致使分析物的容量係數(capacity, k) 增加，藉此可提高濃縮效率。本實驗藉由負電微胞(SDS)作二次的濃縮，當負電微胞遷移速度比電滲流的速度快時，分析物需與負電微胞結合一起向出口端移動，由 Figure 4-3 可以看出 SDS 濃度由 50 mM 至 150 mM，分析物因需藉著負電微胞向前移動，分析物的容量係數越大，與負電微胞作用力越強，分析物移動時間就越短。在濃縮效率方面也可以由 Figure 4-3 看出 SDS 濃度增加，分析物的 k 值亦隨之增加，而有較佳的濃縮效率，但當 SDS 濃度大於 150 mM 時，其會嚴重吸附在毛細管管壁，破壞了毛細管原有的分離狀態，因此選擇 SDS 濃度為 150 mM 為最佳分離條件。

4.11.3 高導電度緩衝溶液含量不同乙腈之影響

由 Figure 4-4 可以發現在不含有機修飾劑之緩衝溶液中，古柯鹼(cocaine, peak1) 與海洛因(heroin, peak2) 無法單由界面活性劑分離，必須添加有機溶劑修飾分析物在微胞相與溶液相的分配情況，以改善分離的效率，經由不同有機溶劑比較之後，選擇添加乙腈來幫助分離。

由 Figure 4-4 所示，添加 10% 含量的乙腈已可完全分離，隨著添加

乙腈的量增加，相對地降低溶液相的極性，分析物的容量係數(k)減小，濃縮的效率有下降的驅勢，考慮濃縮的效果選擇了 10% 含量的乙腈為最佳分離條件。

4.11.4 背景緩衝溶液不同離子濃度之影響

由 4.6.4 節得知，提高緩衝溶液離子強度時，會造成毛細管壁電雙層被壓縮，使毛細管中的 Zeta 電位降低，因而減低電滲流的速度。在此由於電滲流往負極(入口端)與微胞移動方向相反，當電滲流減慢時，微胞進入毛細管的速度增快，分析物與微胞接觸後遷移至偵測器的時間就越快。此外，因實驗使用負電微胞(SDS)，緩衝溶液離子濃度因此影響其所感受電場強大小，背景緩衝溶液(含微胞)與高導電度緩衝溶液(不含微胞)的離子強度差異就會產生如 2.1 節所提到的電分散作用(electrophoretic dispersion)，當背景緩衝溶液比高導電度緩衝溶液的離子強度低時，因為電場強度關係，負電微胞會聚集於兩溶液界面，形成較高濃度的微胞區帶，因此增大與分析物親合的容量係數，藉此增加濃縮效率。

由 Figure 6-4 所示，背景緩衝溶液離子強度由 10 mM 至 100 mM 進行討論，可以觀察出當背景緩衝溶液比高導電度緩衝溶液的離子強度低(10 mM, 25 mM, 50 mM) 時，其分析物移動時間，比當背景緩衝溶液等於高導電度緩衝溶液的離子強度時來的快，推測此乃是負電微胞(SDS) 聚集於兩溶液的界面，而使分析物往出口端移動速度變快，因此在負電微胞聚集效應與離子強度效應之間負電微胞聚集較為明顯，推測可能原因為，在操作步驟中首先使用低 pH 值的緩衝溶液抑制電滲流的速度，所以在此增加離子強度而造成電滲流速度降低的效應相對地就變得不明顯，故在比較其濃縮效率之後，選擇了 50 mM 的背景緩衝溶液為最佳的條件。

4.11.5 樣品注射時間

在此藉由增加樣品電動注入的時間來增加進樣量，由 Figure 4-6 所

示，注射時間由 300 sec 至 900 sec。此外，除了藉提高樣品注射時間來增加濃縮效率外，還需考慮到分析物在此模式下的濃縮極限，在進樣量到達濃縮極限後，增加進樣量並不會增加濃縮效率，反之會使波峰變寬，由 Figure 4-6 可看出注射時間至 900 sec 時波峰明顯變寬，且長時間的電動注入使得焦爾熱的現象影響增大，peak 1(cocaine)波峰因注射時間的增加與背景峰重疊在一起，因此考慮濃縮效果之後，選擇了注射時間 600 sec 為最佳的條件。

4.11.6 樣品濃縮效果及放大倍率

由 Figure 4-7 (C) 所示，在 CSEI-sweep-MEKC 所探討的最佳分離條件(高導電度緩衝溶液：100 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含量 10% 乙腈；背景緩衝溶液：50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含 150 mM SDS，稀釋樣品溶液為 1 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 2.2)；樣品注入電壓 10 KV，分析物濃度為 50 ppb，注射時間 600 sec，分離電壓 -20 KV) 下，與注入傳統 MEKC (Figure 4-7(A) 200 ppm, 壓力注入 0.5psi, 3.0 sec, 分離條件：50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含 150 mM SDS，分離電壓 -20 KV) 及 sweep-MEKC 模式 (Figure 4-7(B) 1 ppm, 壓力注入 0.5psi, 300 sec, 分離條件：50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 含量 150 mM SDS，稀釋樣品溶液為 50 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液(pH 4.0) 不含 SDS，分離電壓 -20 KV) 比較，由圖譜可以看出 CSEI-sweep-MEKC 模式有效地濃縮低濃度(50 ppb) 的分析物，由波峰高度訊號值比較堆積效率 SE_{height} (見式 4-1)，經計算後由 Table 4-2 可看出分析物在 CSEI-sweep-MEKC 模式放大效果與傳統 MEKC 比較堆積效率均在 2200 倍以上，與 sweep-MEKC 比較均在 42 倍以上。

4.11.7 再現性分析及定量校正曲線

為確定本實驗經由陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法分析古

柯鹼及鴉片類藥物是否有再現性，在最佳分離條件下，重複五次實驗，針對分析物的遷移時間與積分面積作觀察，如 Table 4-1 所示，五種分析物的遷移時間相對標準偏差(RSD, %) 均小於 0.48% ；積分面積相對標準偏差(RSD, %) 均小於 4.78% ，由此可知本實驗不論在遷移時間或積分面積再現性均良好。

將古柯鹼及鴉片類藥物五種分析物以適當緩衝溶液稀釋配置成不同濃度後，以最佳分離條件來製作定量校正曲線，結果三種分析物之定量校正曲線線性方程式如Table 4-1 所示，線性相關係數(r^2) 均介於0.9927~0.9967 之間，顯示線性關係良好。使用上述實驗的最佳分離濃縮條件方法偵測極限(S/N=3) 為0.13 ppb ~ 0.43 ppb 之間。

4.11.8 粉末之偵測

由 Figure 4-8 所示，標準品、混合粉末與標準品及三種不同嫌疑粉末偵測之分析圖譜，分離條件為上述所探討之最佳條件。由遷移時間作為比較依據，可以看出嫌疑粉末 I (如 Figure 4-8 (B)) 可能為嗎啡之成分，嫌疑粉末 II (如 Figure 4-8 (C)) 可能為海洛因之成分，嫌疑粉末 III (如 Figure 4-8 (D)) 可能為古柯鹼之成分，由 Figure 4-9 比較各嫌疑粉末與嗎啡、海洛因和古柯鹼之吸收光譜圖，發現其波型均與標準品相似，因此進一步地混合三種粉末與古柯鹼、海洛因與嗎啡標準品做比較(如 Figure 4-8 (E)) ，可由成長之波峰及遷移時間判定三種嫌疑粉末 I 、 II 、 III 分別為含有嗎啡、海洛因及古柯鹼成份之藥錠。經計算三種嫌疑粉末所含嗎啡、海洛因及古柯鹼之濃度除以粉末之取樣濃度，得知在此嫌疑粉末 I 、 II 、 III 內嗎啡、海洛因及古柯鹼的含量分別為 5.2% 、 3.3% 、 15.4% 。

4.11.9 尿液樣品之偵測與回收率

尿液樣品方面，使用空白的尿液添加入古柯鹼及鴉片類藥物五種分析物來進行偵測，偵測條件為上述所探討之最佳條件。由 Figure 4-10 可以看出在未經由固相萃取純化之尿液樣品(以去離子水稀釋 50 倍，電導度~

55.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$) 其基質干擾會覆蓋住分析物的訊號，因此本實驗必須經由固相萃取之前處理去除基質干擾，才能順利地看到分析物的訊號，如 Figure 4-10 所示，重複五次相同的萃取步驟(見 6.4.6 節)，對古柯鹼及鴉片類藥物五種分析物進行偵測，其平均回收率均可達到 70% 以上。

4.12 結論

本實驗使用陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法 (CSEI-sweeping-MEKC)，對古柯鹼及鴉片類藥物進行線上濃縮研究。其特徵在於利用電動注入使陽離子分析物在純水區帶與緩衝溶液產生電場強的差異，而造成堆積，此外，利用酸性緩衝溶液抑制電滲流的產生，促使微胞的遷移速度大於電滲流，將分析物堆積在樣品與含微胞緩衝溶液交界處，形成樣品區帶再次堆積並進行分離，此方法結合兩種濃縮技術，使偵測極限降低 2200~3200 倍。

利用最佳分離條件，高導電度緩衝溶液為 pH 4.0, 100 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，樣品以 1 mM, pH 2.2 檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液稀釋，10 KV 電壓注入 600 sec，背景緩衝溶液為 pH 4.0、50 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，含有 150 mM SDS 於緩衝溶液中，再施加分離電壓 -20 KV，進行濃縮分離，偵測極限(LOD) 可達到 0.13 ppb ~ 0.43 ppb 之間。此條件下進行嫌疑藥物的分析，可依據遷移時間與標準品的添加有效地辨別不同濫用藥物之成分。在尿液樣品方面，藉由固相萃取的前處理步驟及調整樣品溶液之電導度，也可以清楚地在尿液基質中看到古柯鹼及鴉片類藥物五種分析物的訊號。

Table 4-1 Stacking efficiency in term of peak height.

Compound	SE _{height} ^a	SE _{height} ^b
cocaine	2400	46
heroin	2200	50
6-acetylmorphine	3100	46
codeine	3000	43
morphine	3200	47

^a peak height(CSEI-sweep-MEKC)/ peak height(normal MEKC)×dilution factor

^b peak height(CSEI-sweep-MEKC)/ peak height(sweep-MEKC) × dilution factor



Table 4-2 Regression equations, coefficients of variation (r^2), limits of quantitation (LOQ), limits of detection (LOD), migration times, and values of RSD for cocaine and opiates during separation using CSEI-sweeping-MEKC technique.

	cocaine	heroin	6-acetylmorphine	codeine	morphine
Regression equation	$y = 363.78 x + 704.08$	$y = 85.345 x + 4102.3$	$y = 169.72 x + 6927.4$	$y = 206.61 x + 11247$	$y = 289.8 x + 120.08$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9969$	$r^2 = 0.9961$	$r^2 = 0.9946$	$r^2 = 0.9927$	$r^2 = 0.9937$
LOQ (S/N = 10, ppb)	0.45	1.36	1.43	1.25	1.05
LOD (S/N = 3, ppb)	0.13	0.40	0.43	0.37	0.31
Migration time (min)	6.95	7.07	7.79	8.13	9.33
RSD (%; n = 5)					
I . Migration time (min)	0.32	0.30	0.34	0.37	0.48
II . Peak area	2.31	3.26	2.55	4.78	3.02

Table 4-3 Identified compound and purity of three suspect powders

No.	Identified compound	Purity
I	morphine	5.2%
II	heroin	3.3%
III	cocaine	15.4%

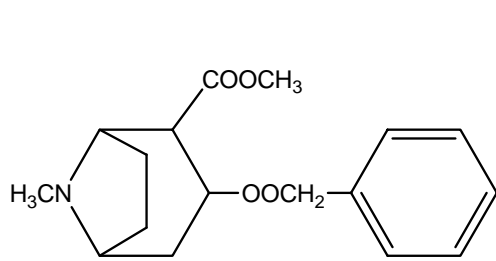


Table 4-4 Recoveries for cocaine (CC), heroin (HR), 6-acetylmorphine (AM), codeine(CD), morphine (MP).

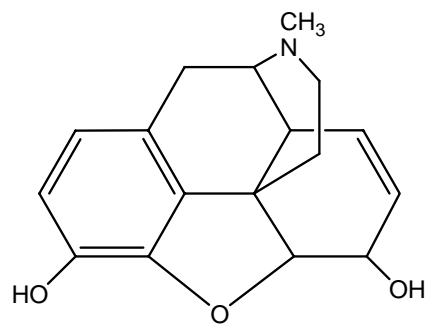
	Recovery					AVE	$\pm 1.96 \times SD$
CC	82.6%	88.4%	90.5%	83.0%	78.3%	84.6	$\pm 9.54\%$
HR	67.9%	75.6%	69.6%	73.1%	76.6%	72.5	$\pm 7.38\%$
AM	72.7%	70.0%	67.7%	78.9%	68.2%	71.5	$\pm 8.99\%$
CD	72.3%	69.6%	77.0%	68.8%	72.4%	72.0	$\pm 6.35\%$
MP	78.6%	72.3%	75.9%	77.0%	76.6%	76.0	$\pm 4.57\%$

$\pm 1.96 \times SD$ (95% confident level)

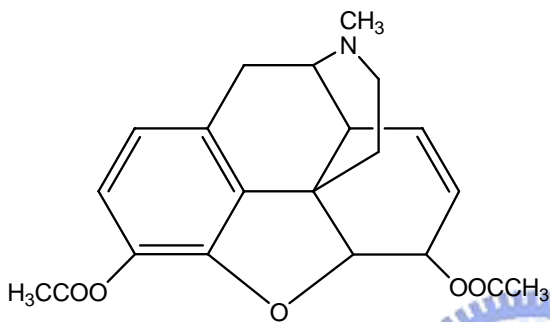




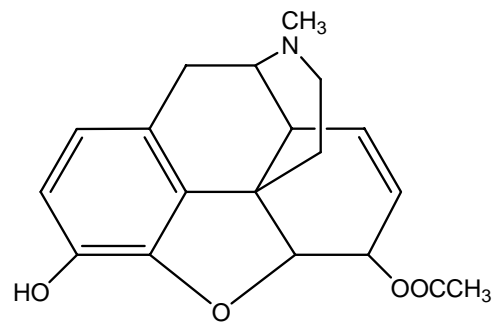
Cocaine (CC)



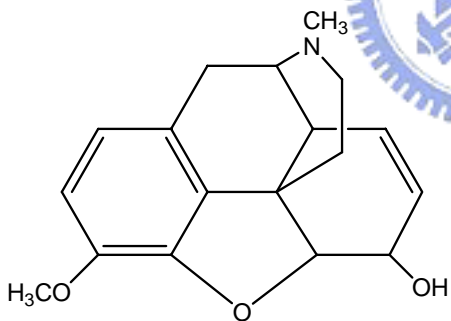
Morphine (MP)



Heroin (HR)



6-Acetylmorphine (AM)



Codeine (CD)

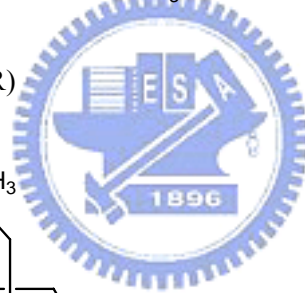


Figure 4-1 The structure of cocaine and opiates.

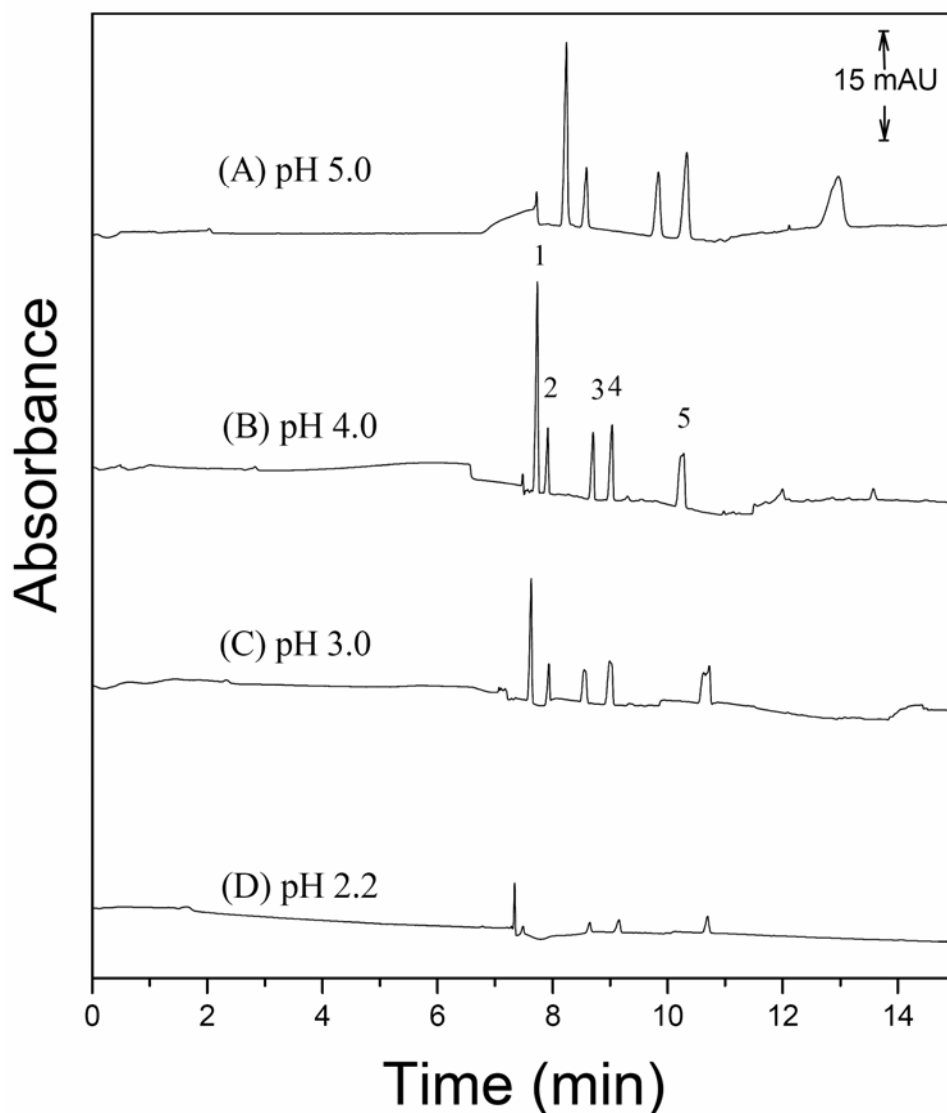


Figure 4-2 Effect that the pH of the buffer solution has on CE separation. (A) pH 5.0; (B) pH 4.0; (C) pH 3.0; (D) pH 2.2. Conditions: HCB: 100 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer, 15% acetonitrile; BGS: 150 mM SDS, 50 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer ; sample solution: 1 mM, pH 2.2 citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer; electrokinetic injection 10 kV, 300 s; separation voltage: -20 kV; Analytes (500 ppb): peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP).

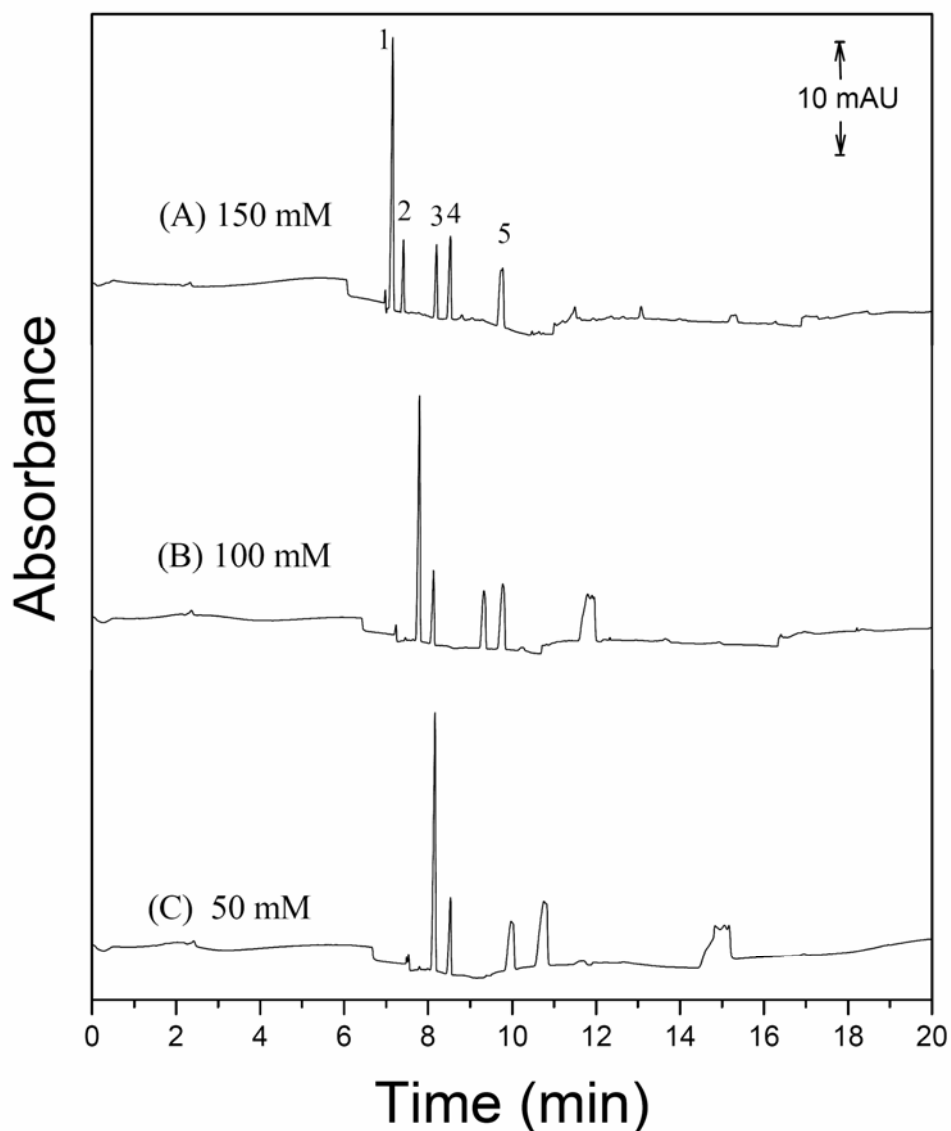


Figure 4-3 Effect that SDS concentration in background buffer solution. (A) 50 mM; (B) 100 mM; (C) 150 mM. Other than the buffer solution having pH 4.0, the separation conditions were the same as those described in Figure 4-2. Analytes (500 ppb): peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP).

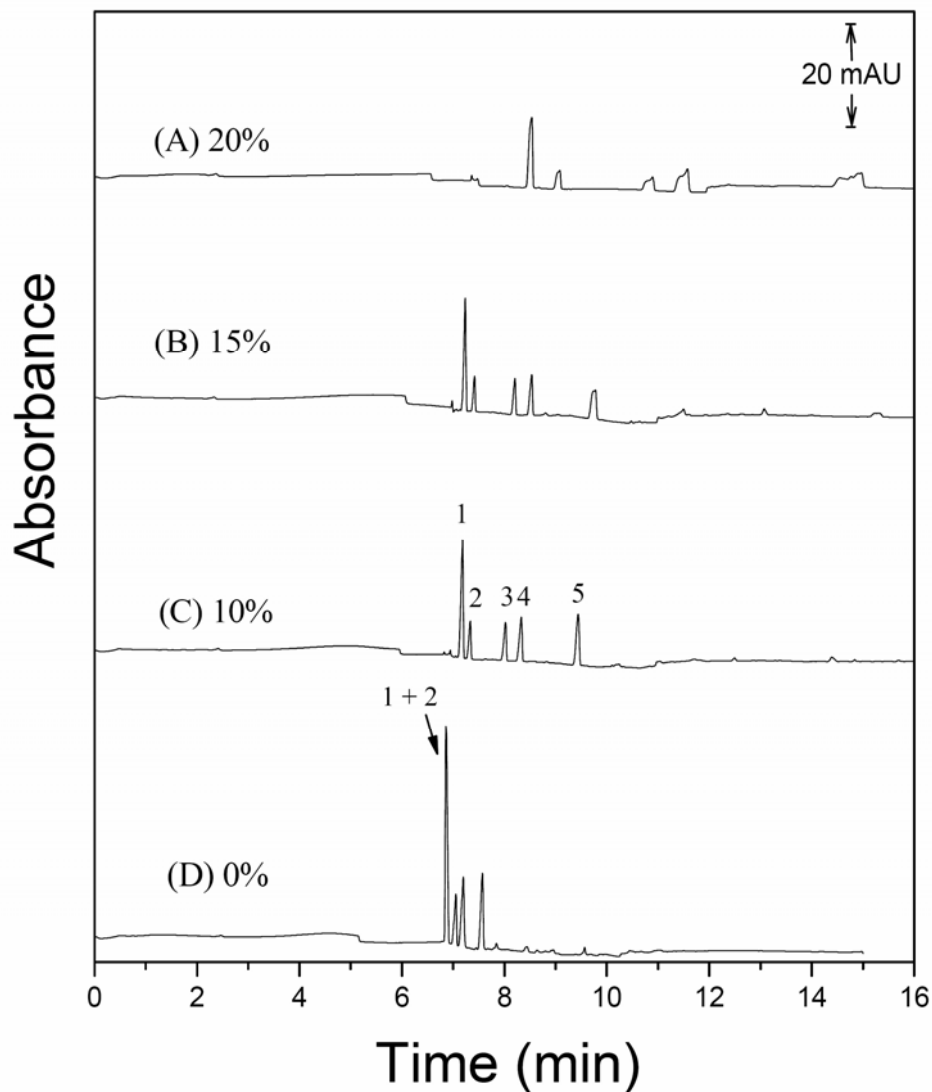


Figure 4-4 Effect that the percentage of acetonitrile (v/v) in the high-conductivity buffer solution. (A) 0%; (B) 10%; (C) 15%; (D) 20%. Other than the buffer solution having pH 4.0, the separation conditions were the same as those described in Figure 4-2. Analysts (500 ppb): peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP).

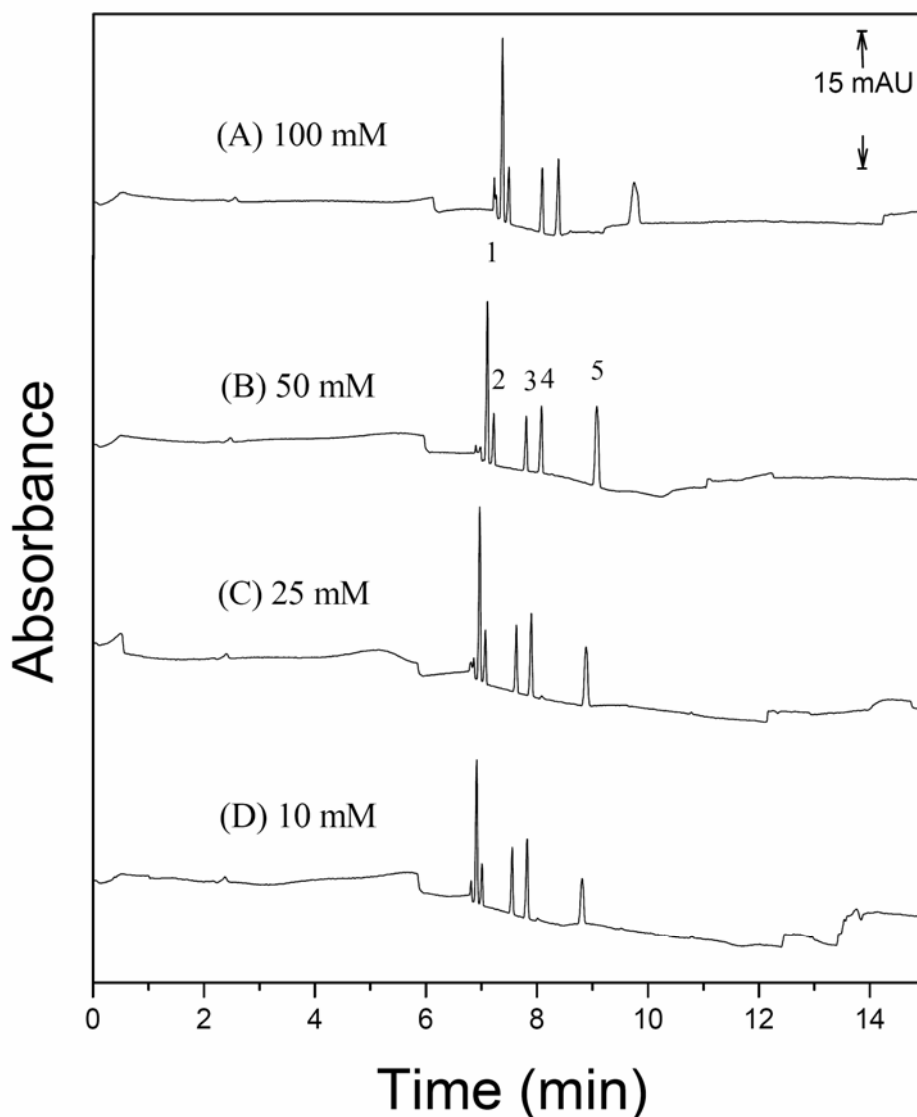


Figure 4-5 Effect that ion strength of background buffer solution. (A) 10 mM; (B) 25 mM; (C) 50 mM; (D) 100 mM. Other than the buffer solution having pH 4.0, the percentage of acetonitrile (v/v) being 10%, the separation conditions were the same as those described in Figure 4-2. Analytes (500 ppb): peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP).

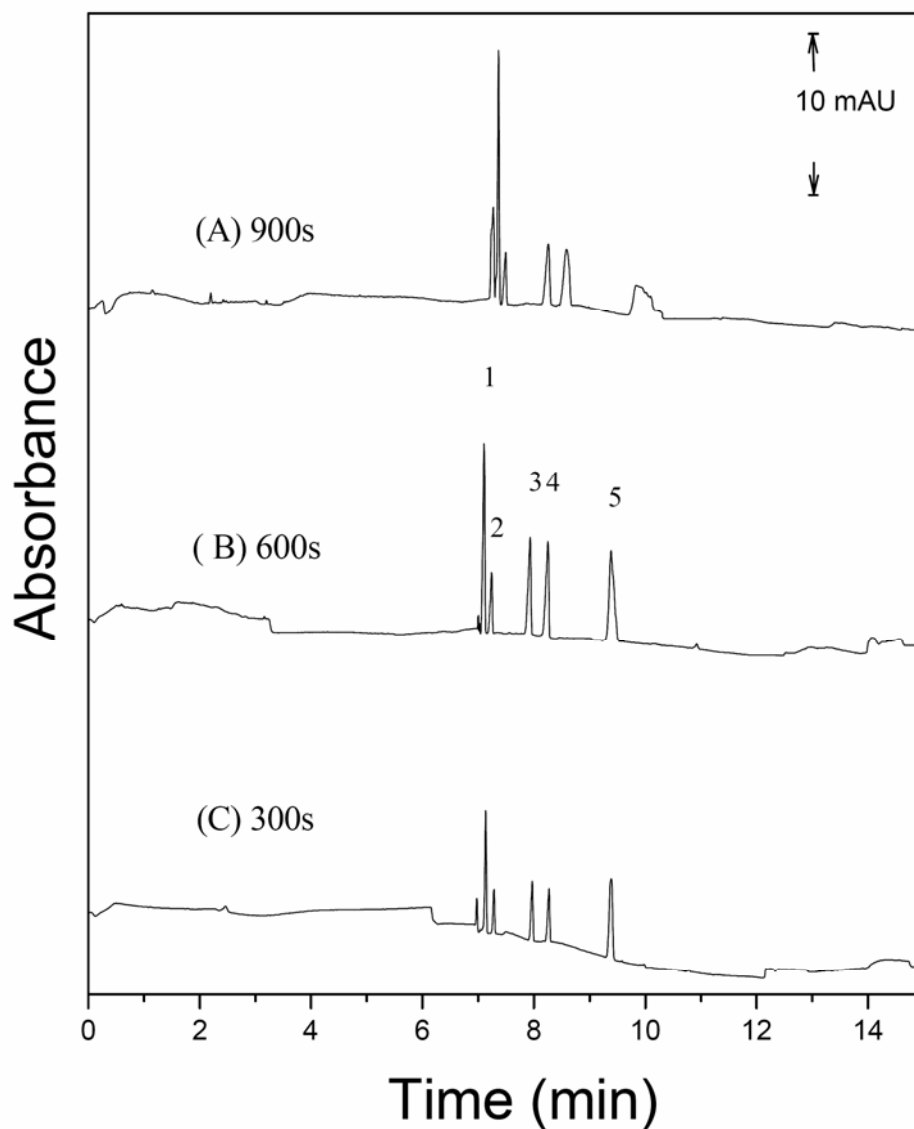


Figure 4-6 Effect that the injection time. (A) 300 sec; (B) 600 sec; (C) 900 sec. Other than the buffer solution having pH 4.0, the percentage of acetonitrile (v/v) being 10%, the separation conditions were the same as those described in Figure 4-2. Analytes (50 ppb): peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP).

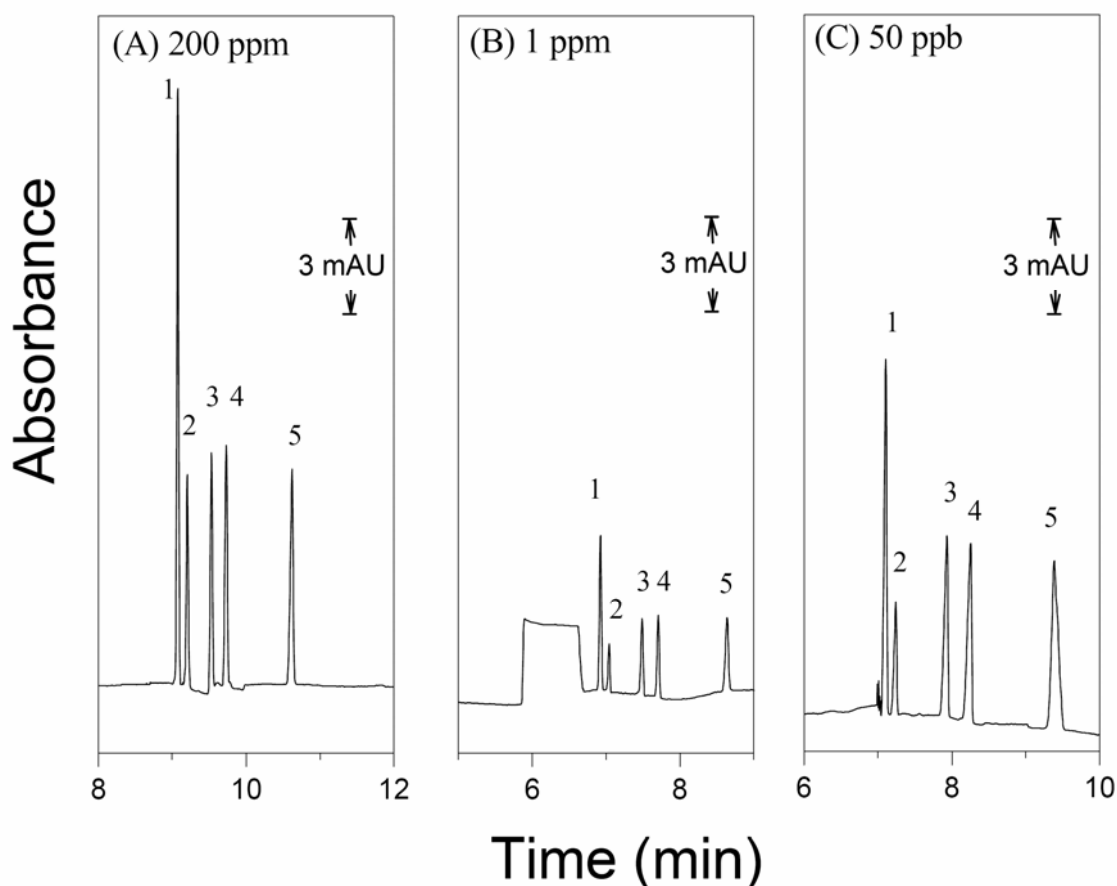


Figure 4-7 A comparison between the CSEI-sweeping-MEKC, sweeping-MEKC method and normal MEKC. (A) normal MEKC. Sample concentrations: 200 ppm; hydrodynamic injection: 3.0 s. The separation condition: 150 mM SDS, 50 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer, 15% acetonitrile; separation voltage: -20 kV (B) Sweeping-MEKC. Sample concentrations: 1 ppm; hydrodynamic injection: 300 s. Sample matrix: 50 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer. The separation conditions were the same as normal MEKC. (C) CSEI-sweeping-MEKC. Sample concentrations: 50 ppb; electrokinetic injection 10 kV, 600 s. The separation conditions were the same as those described in Figure 4-6. Analytes: peak 1, CC; peak 2, HR; peak 3, AM; peak 4, CD; peak 5, MP.

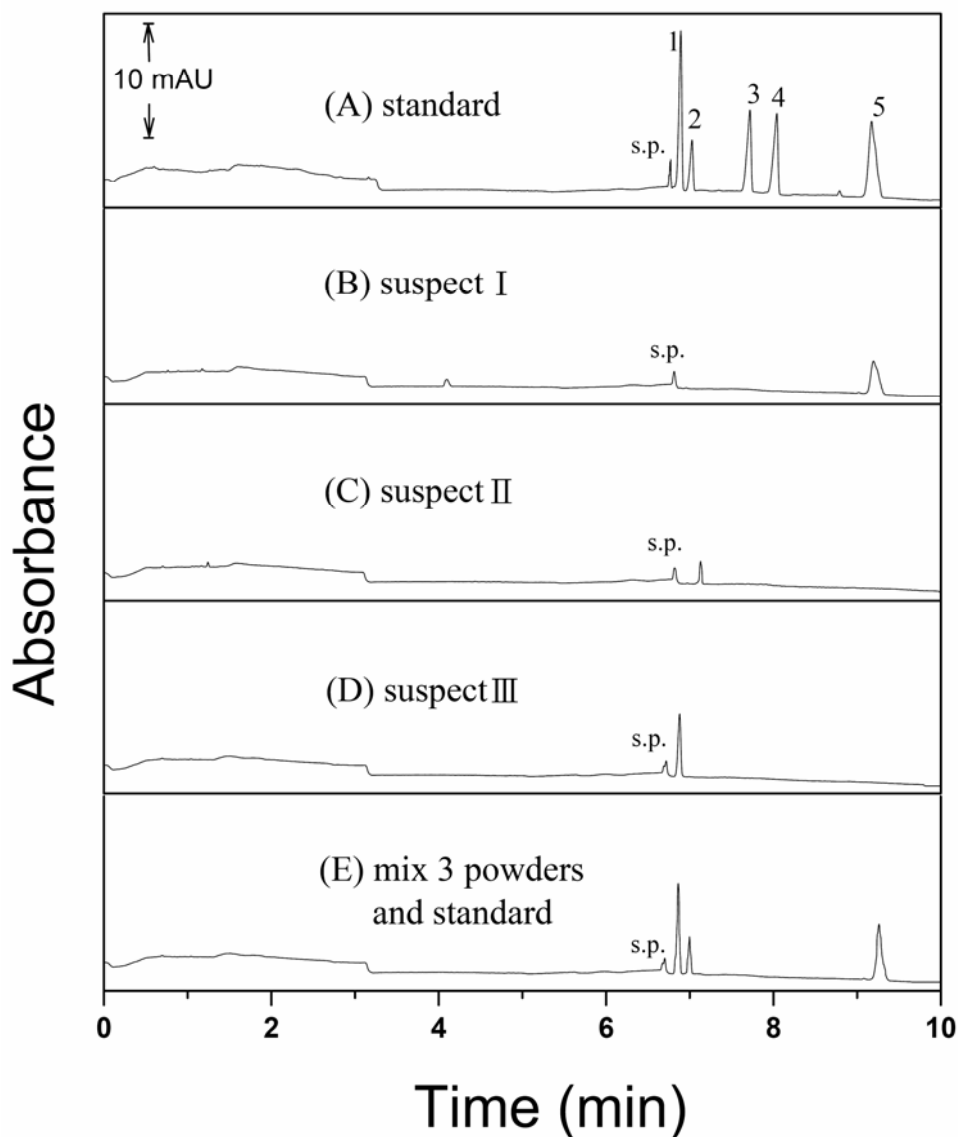


Figure 4-8 CSEI-sweeping-MEKC electropherogram of (A) standard sample (B) suspect I , (C)suspect II , (D) suspect III, (E) mix (B)(C)(D) powders and spike cocaine, heroin, morphine. Analytes: peak 1, cocaine (CC); peak 2, heroin (HR); peak 3, 6-acetylmorphine (AM); peak 4, codeine (CD); peak 5, morphine (MP); s.p., system peak.

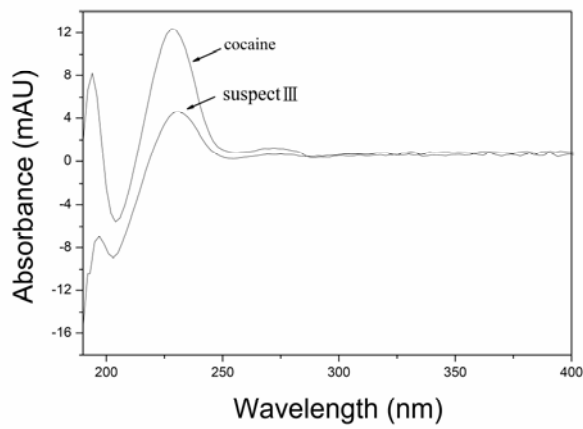
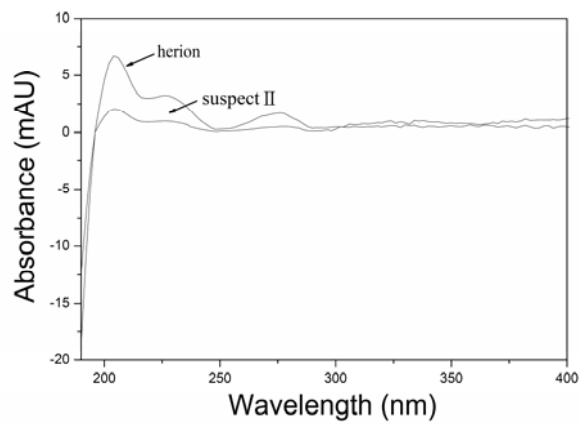
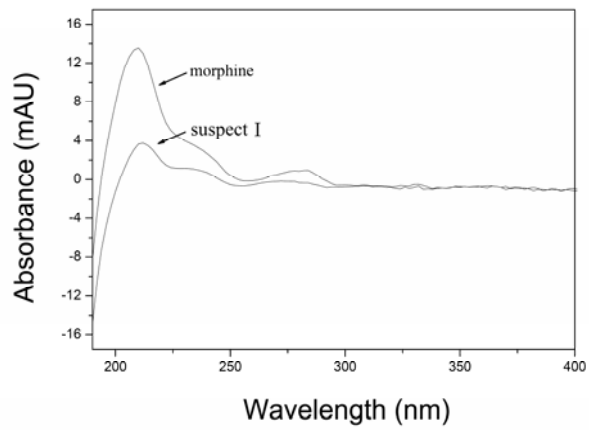


Figure 4-9 On-line UV spectram of morphine, heroin, cocaine and three suspect's powders.

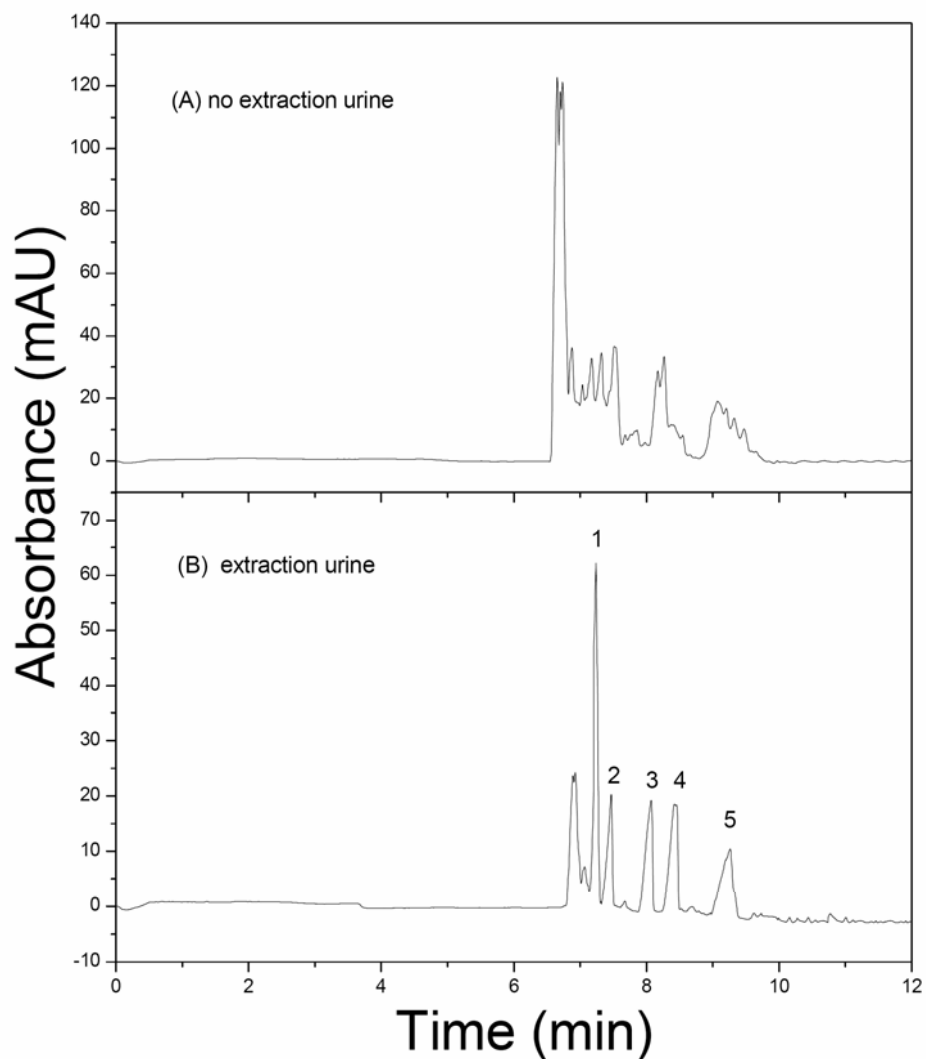


Figure 4-10 CSEI-sweeping-MEKC electropherogram of (A) no extraction urine (1/50 urine, conductivity $\sim 55.6 \mu\text{S}/\text{cm}$), (B) solid-phase extraction urine (spike standard cocaine (peak 1); heroin (peak 2); 6-acetylmorphine (peak 3); codeine (peak 4); morphine (peak 5)).

五、參考資料

1. N. David, High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction, Hewlett Packard Company, 1992
2. Jandik P, Bonn G, Capillary electrophoresis of small molecules and ions, VCH, 1993.
3. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open tubular capillary. *Anal. Chem.* 56 (1984) 111.
4. R. Kuhn, S.Hoffstetter-Kuhn, Capillary Electrophoresis:Principles and Practice, Springer Verlag, 1993.
5. Baker, Dale R., Capillary electrophoresis, John & Wiley & Sons, Inc, 1995.
6. F.E.P Mikkers, F.M. Everaerts and Th.P.E.M. Verheggen, High-Performance Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11.
7. R. L. Chien, D. S. Burgi, Electroosmotic properties and peak broadening in field-amplified capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1354.
8. R. L. Chien, D. S. Burgi, Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2042.
9. R. L. Chien, D. S. Burgi, Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* 202 (1992) 306.
10. D. M. Osbourm, D. J. Weiss, C. E. Lunte, On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
11. A. B. Wey, W. Thormann, Head-column field-amplified sample stacking in presence of siphoning: Application to capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry of opioids in urine. *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 507.
12. A. Alnajjar, B. McCord, Determination of heroin metabolites in human

- urine using capillary zone electrophoresis with β -cyclodextrin and UV detection. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 33 (2003) 463.
13. C. H. Lin, T. Kaneta, On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. *Electrophoresis* 25 (2004) 4058.
 14. H. Y. Huang, C. W. Chiu, S. L. Sue, C. F. Cheng, Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 29.
 15. Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, Large-volume sample stacking for analysis of ethylenediaminetetraacetic acid by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23 (2002) 2880.
 16. Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, Large-volume sample stacking combined with separation by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for analysis of isoxazolylpenicillins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
 17. C. Tu, L. Zhu, C. H. Ang, H. K. Lee, Effect of NaOH on large-volume sample stacking of haloacetic acids in capillary zone electrophoresis with a low-pH buffer. *Electrophoresis* 24 (2003) 2188.
 18. C. Neusus, M. Pelzing, M. Macht, A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis -tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 23 (2002) 3149.
 19. Joselito P. Quirino, S. Terabe, Exceeding 5000-Fold Concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Science*, 282 (1998) 465.
 20. R. B. Taylor, R. G. Reid, A. S. Low, Analysis of proguanil and its metabolites by application of the sweeping technique in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 201.
 21. A. Gavenda, J. Sevcik, J. Psotova, Petr. Bednar, Determination of anthracycline antibiotics doxorubicin and daunorubicin by capillary

- electrophoresis with UV absorption detection. *Electrophoresis* 22 (2001) 2782.
22. C. Fang, J. T. Liu, C. H. Lin, On-line identification of lysergic acid diethylamide (LSD) in tablets using a combination of a sweeping technique and micellar electrokinetic chromatography/77 K fluorescence spectroscopy. *Electrophoresis* 24 (2003) 1025.
23. C.-E. Lin, Yu-C. Liu, T.-Y. Yang, Ta-Z. Wang, C.-C. Yang, On-line concentration of *s*-triazine herbicides in micellar electrokinetic chromatography using a cationic surfactant. *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 239.
24. M. J. Markuszewski, P. B. McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in *Bacillus subtilis* cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 293.
25. M. N. Monton, J. P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, Separation and on-line preconcentration by sweeping of charged analytes in electrokinetic chromatography with nonionic micelles. *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 99.
26. Joselito P. Quirino, S. Terabe, Sweeping of Analyte Zones in Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.* 71 (1999) 1638.
27. J. P. Quirino, S. Terabe, Approaching a Million-Fold Sensitivity Increase in Capillary Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection: Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping. *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023.
28. L. Zhu, C. Tu, H. K. Lee, On-Line Concentration of Acidic Compounds by Anion-Selective Exhaustive Injection-Sweeping -Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.* 74 (2002) 5820.
29. J.-B. Kim, Y. Okamoto, S. Terabe, On-line sample preconcentration of cationic analytes by dynamic pH junction in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 251.

30. P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, S. Terabe, On-Line Focusing of Flavin Derivatives Using Dynamic pH Junction-Sweeping Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 74 (2002) 3736.
31. 黃萌祺，「利用毛細管電泳線上濃縮法分析防腐劑與酚酸」，國立交通大學，應用化學研究所碩士論文，民國九十三年
32. 李志恒，2003物質濫用，行政院衛生署管制藥品管理局，2003
33. Randall C. Baselt, Robert H. Cravey, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 4th edition, Chemocal Toxicology Institute Foster City, CA, 1995
34. M.A. Mattila, and H.M. Larni, Flunitrazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs.* (1980) 353.
35. F. Yongqiu, A study on the determination of flunitrazepam in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Med. Soc.* 44 (1997) 23.
36. W. Huang, D. E. Moody, Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood. *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 333.
37. J. Rohrich, K. Schmidt, H. Bratzke, Application of the novel immunoassay TRIAGE to a rapid detection of antemortem drug abuse. *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 407.
38. M. Manchon, M. F. Verdier, P. Pallud, A. Vialle, F. Beseme, J. Bienvenu, Evaluation of EMIT-TOX Enzyme Immunoassay for the analysis of benzodiazepines in serum: usefulness and limitations in an emergency laboratory. *J. Anal. Toxicol.* 9 (1985) 209.
39. S. J. Salamone, S. Hanasoge, Flunitrazepam excretion patterns using the Abuscreen On-Trak and On-Line immunoassays: comparison with GC-MS. *J. Anal Toxicol* 21 (1997) 341
40. F. Guan, H. Seno, A. Ishii, K. Watanabe, T. Kumazawa, Solid-phase microextraction and GC-ECD of benzophenones for detection of benzodiazepines in urine. *J. Anal Toxicol.* 23 (1999) 54.

41. Stephane Pirnay , Ivan Ricordel , Danielle Libong , Stephane Bouchonnet, Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 235
42. Negrusz A, Moore C, Deitermann D, Lewis D, Kaleciak K, Kronstrand R, Feeley B, RS. Niedbala, Highly sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening and NCI-GC-MS confirmation of flunitrazepam and its major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair. *J Anal Toxicol.* 23 (1999) 429.
43. H. Nguyen, D. R. Nau, Solid-phase microextraction and GC-ECD of benzophenones for detection of benzodiazepines in urine. *J Anal Toxicol.* 24 (2000) 37.
44. V. Cirimele, P. Kintz, C. Staub, P. Mangin, Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NCI. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 189.
45. V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI. *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 596.
46. M. Rittner, F. Pragst, W-R. Bork, J. Neumann Screening, Method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 115.
47. M. Kollroser, C. Schober, Simultaneous analysis of flunitrazepam and its major metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm Biomed Anal.* 28 (2002) 1173.
48. X. Cahours, S. Cherkaoui, G. Rozing, J-L. Veuthey, Microemulsion electrokinetic chromatography versus capillary electrochromatography-UV-mass spectrometry for the analysis of flunitrazepam and its major metabolites. *Electrophoresis* 23 (2002) 2320.
49. Brody TM, Larner J, Minneman KP. Human pharmacology, molecular to

clinical, C.V. Mosby, 2000.

50. R. Wasels, F. Belleville, Gas chromatographic-mass spectrometric procedures used for the identification and determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine. *J. Chromatogr. A* 674(1994) 225.
51. M. J. Ellenhorn, D. G. Barceloux, Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, Elsevier, 1988
52. R. C. Baselt, R. H. Cravey, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Chemical Toxicology Institute, 1995
53. 行政院衛生署編，「藥物濫用防制-宣導教育手冊」，民國86年6月
54. M. Bogusz, R. Aderjan, G. Schmitt, E. Nadler, B. Neureither, The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and EMIT-dau immunoassays--a comparative study. *Forensic Sci Int.* 48 (1990) 27.
55. A. W. E. Wright, M. T. Smith, Improved One-Step Solid-Phase Extraction Method for Morphine, Morphine-3-Glucuronide, and Morphine-6-Glucuronide From Plasma and Quantitation Using High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. *The Drug Monit.* 20 (1998) 215.
56. Huwyler J, Rufer S, Kuster E, Drewe J, Rapid and highly automated determination of morphine and morphine glucuronides in plasma by on-line solid-phase extraction and column liquid chromatography. *J Chromatogr. B* 674(1995) 57.
57. Sukbuntherng J, Walters A, Chow HH, Mayersohn M, Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci.* 84 (1995) 799.
58. Kintz P, Mangin P, Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int.* 73 (1995) 93.