

以分散式液液微萃取技術結合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析毛地黃毒苷化合物

楊汶陵 劉建忠*

摘 要

本論文以分散式液液微萃取法，針對樣品溶液中毛地黃毒苷的藥物成份，進行萃取與預濃縮的前處理步驟，再配合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀，進行分析物的偵測。

將 1 mL 的四氫呋喃分散劑與 12 μ L 的氯仿萃取劑，分別注入 5 mL 的毛地黃毒苷標準溶液中，即呈現白色混濁狀，此時分析物通過分散劑被濃縮至萃取劑中，經過離心後，將離心管底部的沉澱液取出，並與 α -CHCA 基質溶液混合，再送入質譜儀做鑑定與分析。

由實驗結果得知，本論文所提出的分析方法，對於毛地黃毒苷的質譜訊號增強效果，最高約可達 1,200 倍以上，分析物在水溶液中的偵測極限為 2.2 nM、線性範圍為 0.05 ~ 1 μ M、相關係數(R^2) 值為 0.9998、相對標準偏差值均在 10% 以內。

此分析方法可成功地應用於尿液中毛地黃毒苷的檢驗，樣品溶液只需經過簡單的前處理步驟，即可進行分析物的偵測，具有快速、簡單、操作容易、高靈敏度和高選擇性等優點。

關鍵詞：分散式液液微萃取法、分散劑、萃取劑、基質輔助雷射脫附游離、飛行時間質譜儀。

* 通訊作者：407 台中市西屯區台中港路 3 段 181 號東海大學化學系

1. 前 言

毛地黃植物(foxglove plants)所提煉出的毛地黃毒苷(digitoxin)為類似於類固醇之物質，在臨床醫學的應用上，可作為治療因高血壓或動脈硬化所造成的充血型心臟衰竭(congestive heart failure, CHF)[1] 的強心劑。由於毛地黃毒苷對於心臟血管，有多重直接與間接的作用，同時具有治療與導致心律不整的結果，因此，需要密切監控病人體內藥物的濃度，以避免產生中毒的情形。適當的毛地黃毒苷治療劑量，在人體血液中的濃度範圍約為 10 ~ 20 ng/mL [2]，劑量超過 35 ng/mL 時，會引起多細胞及器官病變，對人體產生毒害，出現噁心、視力模糊、嗜睡等現象。由於此藥物的安全劑量範圍相當狹窄，用量太少可能會失去療效，用量太多可能會產生嚴重的毒害[2]，因此如何快速、準確、有效地監測病人體內毛地黃毒苷的濃度，是一個很重要的課題。

文獻中有關於毛地黃毒苷的檢測方法，報導並不多。Nore[3]曾使用放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)，測量生化樣品溶液中毛地黃毒苷的含量，其偵測極限(limit of detection, LOD)略小於 5 ng/mL、相對標準偏差值(relative standard deviation, RSD)介於 13.0%與 22.7%與之間；在 Pellati[4]的文獻報導中，以固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)管柱進行樣品的前處理，成功地分離出毛地黃毒苷的成份，再藉由高效能液相層析法(high-performance liquid chromatography, HPLC)偵測其濃度，所獲得的偵測極限為 1.59 $\mu\text{g/mL}$ ，相對標準偏差值為 1.0%，顯示具有良好的再現性，但此方法無法提出有力的定性證明，而且樣品的前處理步驟繁瑣、需要耗費大量的有機溶劑；Georgakopoulos[5]等人利用氣相層析質譜技術(GC/MS)，分析馬尿液中毛地黃毒苷的成份，獲得良好的回收率(90%)；Suzuki[6]等人也報導，以高效能液相層析串聯質譜儀(HPLC/MS/MS)，檢測人體血液與尿液樣本，具有極佳的靈敏度(偵測極限可達 0.1 ng/mL)與再現性(相對標準偏差值小於 12%)，但需進行耗時又繁瑣的萃取及層析過程。綜合上述文獻所提出的各種檢測技術，對於毛地黃毒苷藥物的分析，仍有許多值得改善之處。

本研究的主要目標是開發出一個快速、簡便的分析方法，以應用於毛地黃毒苷藥物的檢測。首先，利用分散式液液微萃取法(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)[7]進行樣品的前處理，達到簡單、快速、高濃縮效率等效果，再結合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)[8]，所具備的高靈敏性、高解析度、高專一性及不需經過耗時的層析分離步驟等優點，建立一套靈敏又快速的新分析技術。

2. 實驗設備與方法

2.1 樣品配製

秤取 10 mg 的 α -CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)固體，溶於 1 mL 的 0.1% TA 溶液中，製備成基質輔助雷射脫附游離法所使用的飽和基質溶液；以二次去離子水配製 10 mM 的 NaH_2PO_4 緩衝溶液，加入 NaOH 或 HCl，利用酸鹼度計調整溶液的 pH 值至 4、6、8 及 10；將 1.0 mM 的毛地黃毒苷水溶液，以 NaH_2PO_4 緩衝溶液稀釋，製備成 0.01 μM 、0.05 μM 、0.1 μM 、0.5 μM 及 1.0 μM 的待測標準溶液。本論文所使用的生化樣品為人體的尿液，由於樣品溶液的基質十分複雜，必須先以氫甲烷(acetonitrile)進行去蛋白的反應，再以 0.1%三氟醋酸(trifluoroacetic acid)溶液進行去鹽的反應，最後以 0.45 μm 的 Nylon 濾膜過濾沉澱物，即可完成尿液的前處理步驟，經過前處理後的樣品溶液，以分散式液液微萃取法達成濃縮分析物的效果，再結合 MALDI-TOF 質譜儀，進行毛地黃毒苷的鑑定分析。

2.2 分散式液液微萃取法

分散式液液微萃取法是利用三種不同的溶劑系統，進行分析物的萃取，具有操作簡單、快速、低流失、高回收率和高濃縮倍率等優點。在本論文中所採用的分散式液液微萃取法，實驗過程如下；首先，取 5 mL 的毛地黃毒苷標準溶液，置於 15 mL 的玻璃尖底離心管中，再注入 1 mL 的四氫呋喃(tetrahydrofuran)分散劑及 12 μL 的氯仿(chloroform)萃取劑，即形成白色膠束狀，以 3000 r.p.m.進行離心五分鐘，然後以 25 μL 的微量注射針，抽取離心管底部的沉澱液並與 α -CHCA 基質混合，取 1 μL 的混合溶液，點在樣品盤(target plate)上，待溶液乾燥後，即可直接送入 MALDI-TOF 質譜儀中，進行分析物的質譜檢測與圖譜收集。

2.3 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀

MALDI-TOF 質譜儀具有高樣品通量、高靈敏度、高解析度、高耐受性及不易受鹽類與緩衝溶液影響等優點，已被廣泛地應用於生物巨分子、高分子聚合物以及藥物等化合物的鑑定分析。過去的文獻[9-13]報導，對於毛地黃毒苷藥物的偵測，所使用的儀器與分析方法較為耗時。在本論文中，我們首先提出利用 MALDI-TOF 質譜儀進行化合物的偵測，其特點[8]包括：(1)操作簡易、快速且能同時進行多化合物的分析；(2)樣品製備容易、使用量少；(3)高靈敏度；(4)高質量範圍；(5)高通量、能點入數十至數百個樣品同步進行偵測。本論文所使用的 MALDI-TOF 質譜儀，為德國 Bruker 公司所生產的桌上型 MicroFlex 儀器，具備一波長為 337 nm 的 N_2 脈衝式雷射，有直線型與反

射型兩種飛行模式，所使用的偵測器為 microchannel plate detector (MCP)，並具有偵測正電荷離子與負電荷離子的功能。

3. 結果與討論

3.1 基質選擇與製備

以 MALDI-TOF 質譜儀進行化合物的分析時，使用合適的雷射脫附游離基質是十分重要的，良好的基質溶液需與樣品具有互溶性、均勻的結晶性及最佳的雷射吸收性質，這些因素對於分析物的離子化效率，具有相當大的影響，因此，在進行毛地黃毒苷的檢測之前，必須先選擇最適合的基質種類。

以常用的有機酸(SA、2,5-DHB、 α -CHCA)、奈米膠體溶液(奈米金、奈米銀、奈米銅、奈米白金)及石墨作為基質，比較在相同的雷射強度下，何種基質對分析物具有較好的游離效率，結果如圖 1 所示。由分析物的訊號強度或訊號雜訊比(signal-to-noise ratio, S/N)判斷，皆以圖 1a 的 α -CHCA 有機酸基質表現最佳，可明顯地偵測到毛地黃毒苷化合物(分子量 764.9 Da)與鈉離子、鉀離子相互結合後，所形成的 $[M+Na]^+$ (質荷比、 $m/z = 787.4$)及 $[M+K]^+$ ($m/z = 803.4$)訊號，因此，我們選擇以 α -CHCA 當作基質，進行本論文的相關研究。但是， α -CHCA 與分析物的混合溶液，經過乾燥以後，通常結晶性質較差，易有集中點(sweet spots)的情形產生，導致實驗的再現性變差。1999 年 Patrik[14]等人發表一種 seed-layer 的樣品配製方式，可提高基質與樣品的結晶均勻性，含內標物檢量線的相對標準偏差值，可降低至 3%以內。本實驗也利用 seed-layer 的方式配製待測樣品，將 1 μ L 的飽和 α -CHCA 溶液點在樣品盤，待其乾燥形成一層種晶層後，再將分析物與 α -CHCA 的混合溶液，點至種晶層上，使其形成均勻的結晶，然後送入 MALDI-TOF 質譜儀中進行偵測。

3.2 分散式液液微萃取法實驗條件最佳化

利用分散式液液微萃取法進行樣品的前處理，以達成最佳的分析物萃取與預濃縮效果時，主要的考慮因素[15-18]有萃取劑與分散劑的種類、溶劑之間的體積比及樣品溶液的 pH 值等。

萃取劑種類

在分散式液液微萃取法的實驗中，良好的萃取劑必須具備以下的條件：首先，密度必須大於樣品溶液與分散劑；其次，對於分析物的溶解度要優於分散劑；另外，須不易溶於樣品溶液但卻能與分散劑互溶；最後，不能干擾圖譜中分析物的訊號偵測。本實驗分別以二氯甲烷(dichloromethane, CH_2Cl_2 ；

密度為 1.32 g/mL)、氯仿(密度為 1.48 g/mL)、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4 ; 密度為 1.58 g/mL)[19]為萃取劑，進行毛地黃毒苷的萃取。結果發現以二氯甲烷作為萃取劑，樣品溶液經離心後並無任何沉澱液產生，完全不具濃縮分析物的效果；以四氯化碳與氯仿作為萃取劑，兩者皆有濃縮的效果，但氯仿的濃縮效率較高，因此，選擇以氯仿做為最佳的萃取劑。圖 2 為比較不同的萃取劑種類，對於分析物濃縮係數(enrichment factor)的影響，其中，氯仿的濃縮係數最高，可達近 800 倍的濃縮效果。

分散劑種類

分散劑在分散式液液微萃取法中，扮演著橋梁的角色，當包含著萃取劑的分散劑注入至樣品溶液時，由於萃取劑體積的擴張，萃取劑便會部份析出，形成膠束狀態，萃取出分析物。樣品溶液中分析物的萃取效果與濃縮倍率，會受到分散劑種類的影響，良好的分散劑必須能溶於萃取劑與樣品溶液中，分散劑的分配系數也要大於樣品溶液的分配系數。以五種較常使用的分散劑；丙酮(acetone)、甲醇(methanol)、乙醇(alcohol)、氯甲烷及四氫呋喃做一比較，發現以四氫呋喃作為分散劑時，所呈現的白色膠束最為明顯，具有最高的濃縮係數。

溶劑體積

以不同的萃取劑使用量(8 μL 、12 μL 、16 μL 、20 μL 及 24 μL)，探討萃取劑體積對於分析物濃縮效率的影響。當萃取劑低於 8 μL 時，沉澱相的體積相當少，造成抽取上的困難，不利於偵測；當萃取劑高於 16 μL 時，沉澱相的體積大量增加，濃縮效果變差；最佳的萃取劑為 12 μL ，所獲得的萃取效率最高，濃縮係數最大約為 1,150。

分散劑使用量的多寡也會影響分析物在樣品溶液中的濃縮效率。以不同體積的分散劑(0.5 mL、0.75 mL、1 mL、1.25 mL 及 1.5 mL)，分別進行分散式液液微萃取的實驗，當分散劑過少時(小於 1 mL)，所產生的白色膠束狀，無法均勻地分散在樣品溶液中，萃取效率不佳；當分散劑過多時(大於 1.5 mL)，沉澱相的體積減少，分析物的濃縮係數降低，萃取效率也不佳；當分散劑為 1 mL 或 1.25 mL 時，所獲得的濃縮係數最高(約等於 1,200)，萃取效率最好。圖 3 為分散劑的使用量與樣品回收率的關係，當體積為 1 mL 時，可達到最佳的樣品回收率(92%)。

樣品溶液 pH 值

調整樣品溶液 pH 值的目的是為了使分析物以中性的形式存在，使其從水相通過分散劑再轉移至萃取劑的含量增加，以提高萃取的效率。探討毛地黃毒苷溶液的 pH 值，對於濃縮係數的影響，實驗結果發現當 pH 值等

於 6 時，濃縮係數最高、萃取效果最佳。

表 1 列出分散式液液微萃取法，各項實驗變數及最佳操作條件。以最佳的實驗條件，分析含有毛地黃毒苷的標準溶液，顯示樣品溶液經過分散式液液微萃取後，訊號雜訊比的數值由 13 (圖 4A) 大大提升至 554 (圖 4B)，證明本論文所提出的分析方法，對於此一分析物具有極佳的萃取與濃縮效率。

3.3 標準溶液定量分析

分析物檢量線的製作是將濃度分別為 0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M 及 1.0 μ M 的毛地黃毒苷標準溶液，以最佳的分散式液液微萃取實驗條件，進行分析物的萃取與預濃縮，再結合 MALDI-TOF 質譜儀鑑定分析，每一個標準溶液均做 5 次的重複測量，所獲得的實驗數據，如圖 5 所示。由圖中可知，分析物的濃度與質譜偵測的訊號強度，具有良好的線性關係，相關係數 (correlation coefficient, R^2) 值為 0.9949。

分析物偵測極限的測量，則以訊號雜訊比為 3 時，所對應的濃度定義之。由實驗結果得知，本論文所提出的分析方法，對於毛地黃毒苷化合物的偵測極限為 2.2 nM (約等於 1.7 ng/mL)。

探討分析物的再現性，主要目的是要確認樣品盤上，同一個樣品點內 (shot-to-shot) 分析物結晶的均勻程度，以及不同樣品點之間 (sample-to-sample) 分析物的差異性，對實驗所造成的影響，結果發現所測得的相對標準偏差值皆在 10% 以內。

在正常人的尿液樣品中，添加入毛地黃毒苷藥物 (10^{-8} M)，以氟甲烷或 0.1% 三氟醋酸，進行去蛋白與去鹽類的前處理步驟，均可明顯地偵測到分析物與鈉離子相互結合後，所形成的 $[M+Na]^+$ ($m/z = 787.5$) 訊號 (圖 6)，代表此分析方法可成功地應用於含有複雜基質的真實尿液樣品溶液中，檢測微量的毛地黃毒苷成份。

4. 結論

本研究論文，以具有操作時間短、使用樣品量少及濃縮效率高等優點的分散式液液微萃取法，搭配高靈敏度、高樣品通量及樣品製備簡易等特性的 MALDI-TOF 質譜法，開發出一套靈敏且快速、有效的分析方法，應用於毛地黃毒苷化合物的偵測。

參考文獻

- [1] 楊寶峰、蘇定馮〔2004〕,“藥理學”,九州圖書文物有限公司.
- [2] 張婉雅、陳純誠〔2004〕,“基礎與臨床藥理學”,合記圖書.
- [3] Nore, A. K.; Stostein, L.; Larsen, A.; Amlie, J. P. (1980), “Digitalis Glycosides in Serum, Urine, and Cerebrospinal Fluid, Determined with a Commercial Radioimmunoassay”, *Clin. Chem.*, **26**, 321.
- [4] Pellati, F.; Bruni, R.; Bellardi, M. G.; Bertaccini, A. (2009), “Optimization and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Cardiac Glycosides in Digitalis Lanata”, *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 3260.
- [5] Kiouisi, P.; Angelis, Y. S.; Koupparis, M.; Kouretas, D.; Georgakopoulos, C. G. (2004), “Gas Chromatographic - Mass Spectrometric Cardiotonic Glycosides Detection in Equine Urine Doping Analysis”, *Chromatogr. Suppl.*, **59**, S105.
- [6] Guan, F.; Ishii, A.; Seno, H.; Suzuki, O. (1997), “Identification and Quantification of Cardiac Glycosides in Blood and Urine Samples by HPLC/MS/MS”, *Anal. Chem.*, **71**, 4034.
- [7] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M. M. (2006), “Determination of Organic Compounds in Water using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction”, *J. Chromatogr. A.*, **967**, 1.
- [8] 王銘達〔2008〕,“以銀奈米粒子當基質和濃縮探針搭配機質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法分析胺基配醣體類抗生素”,東海大學,碩士論文.
- [9] Fujii, Y.; Ikeda, Y.; Yamazaki, M. (1989), “High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Secondary Cardiac Glycosides in DIGITALIS PURPUREA Leaves”, *J. Chromatogr.*, **479**, 319.
- [10] Wiegrebe, H.; Wichtl, M. (1993), “High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Cardenolides in Digitalis Leaves after Solid-Phase Extraction”, *J. Chromatogr.*, **630**, 402.
- [11] Svec, F.; Tennikova, T. B. (1993), “High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes”, *J. Chromatogr.*, **646**, 279.
- [12] Graefe, K. A.; Tang, Z.; Karnes, H. T. (2000), “High-Performance Liquid Chromatography with On-line Post-Column Immunoreaction Detection of Digoxin and its Metabolites based on Fluorescence Energy Transfer in the Far-Red Spectral Region”, *J. Chromatogr. B.*, **745**, 305.
- [13] Jedlička, A.; Grafnetterová, T.; Miller, V. (2003), “HPLC Method with UV Detection for Evaluation of Digoxin Tablet Dissolution in Acidic Medium after Solid-Phase Extraction”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 109.

- [14] Önnarfjord, P.; Ekström, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J. (1999), "Homogeneous Sample Preparation for Automated High Throughput Analysis with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 315.
- [15] Xiong, C.; Ruan, J.; Cai, Y.; Tang, Y. (2009), "Extraction and Determination of Some Psychotropic Drugs in Urine Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 572.
- [16] Guo, J. H.; , Li, X. H; Cao, X. L.; Li, Y.(2009), "Determination of Triclosan, Triclocarban and Methyl-triclosan in Aqueous Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Rapid Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 3038.
- [17] Fu, L.; Liu, X.; Hu, J.; Wang, X. (2009), "Application of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Triazophos and Carbaryl Pesticides in Water and Fruit Juice Sample", *Anal. Chim. Acta* **632**, 289.
- [18] Melwanki, M. B.; Chen, W. S.; Bai, H. Y.; Lin, T. Y.; Fuh, M. R.(2009), "Determination of 7-aminoflunitrazepam in Urine by dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry", *Talanta* **78**, 618.
- [19] Francisco, P. P.; Isela, L.; Carlos, B. (2009), "Miniaturized Preconcentration Methods based on Liquid-Liquid Extraction and their Application in Inorganic Ultratrace Analysis and Speciation: A review", *Spectrochimica Acta Part B* **64**, 1.

表 1：分散式液液微萃取法的最佳實驗條件。

實驗變數	最佳條件
萃取劑	CHCl ₃
分散劑	THF
萃取劑體積	12 μL
分散劑體積	1 mL
pH 值	6
緩衝溶液	10 mM NaH ₂ PO ₄

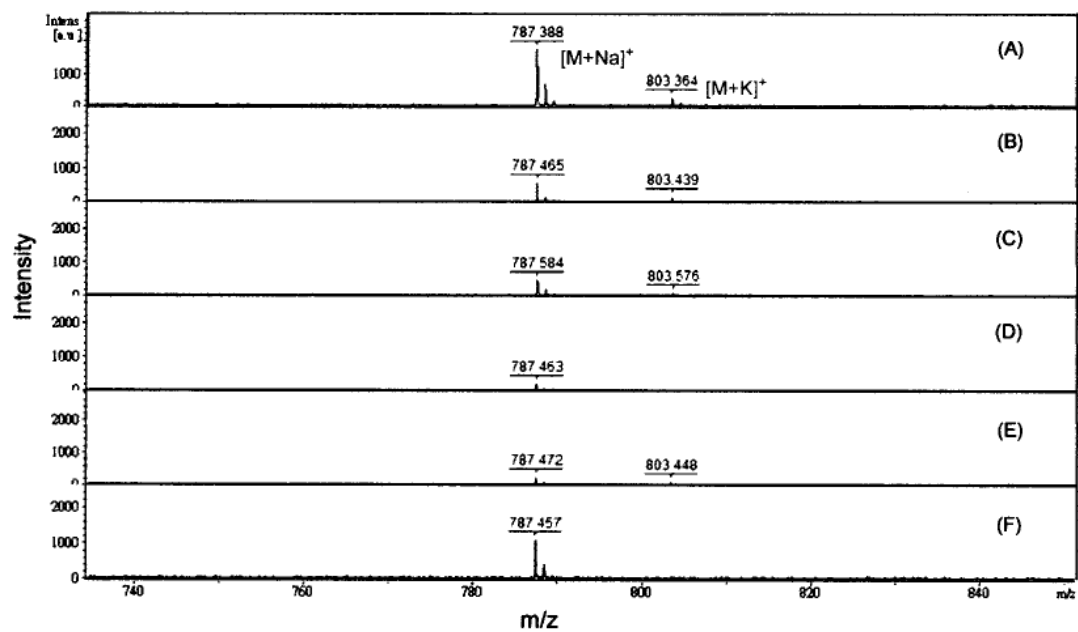


圖 1：以基質溶液(A) α -CHCA；(B)奈米膠體銀；(C)奈米膠體金；(D)奈米膠體銅；(E)奈米膠體鉑；(F)石墨所測得的毛地黃毒苷質譜圖。

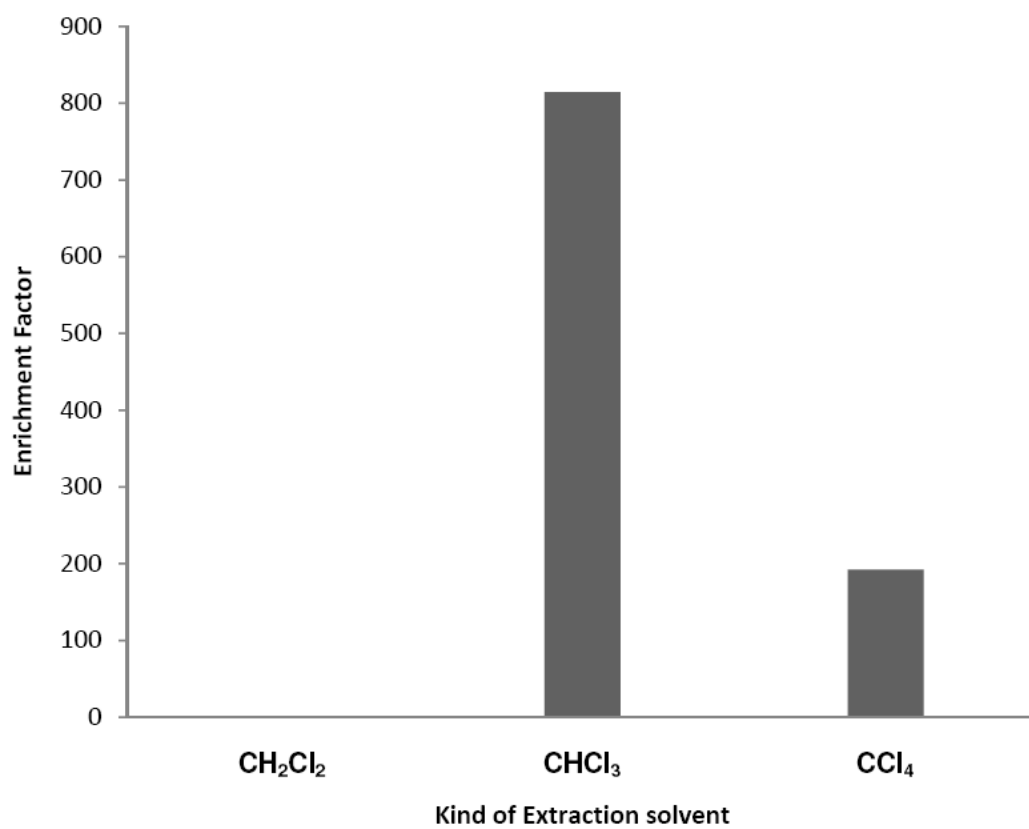


圖 2：萃取劑種類對於濃縮係數的影響。

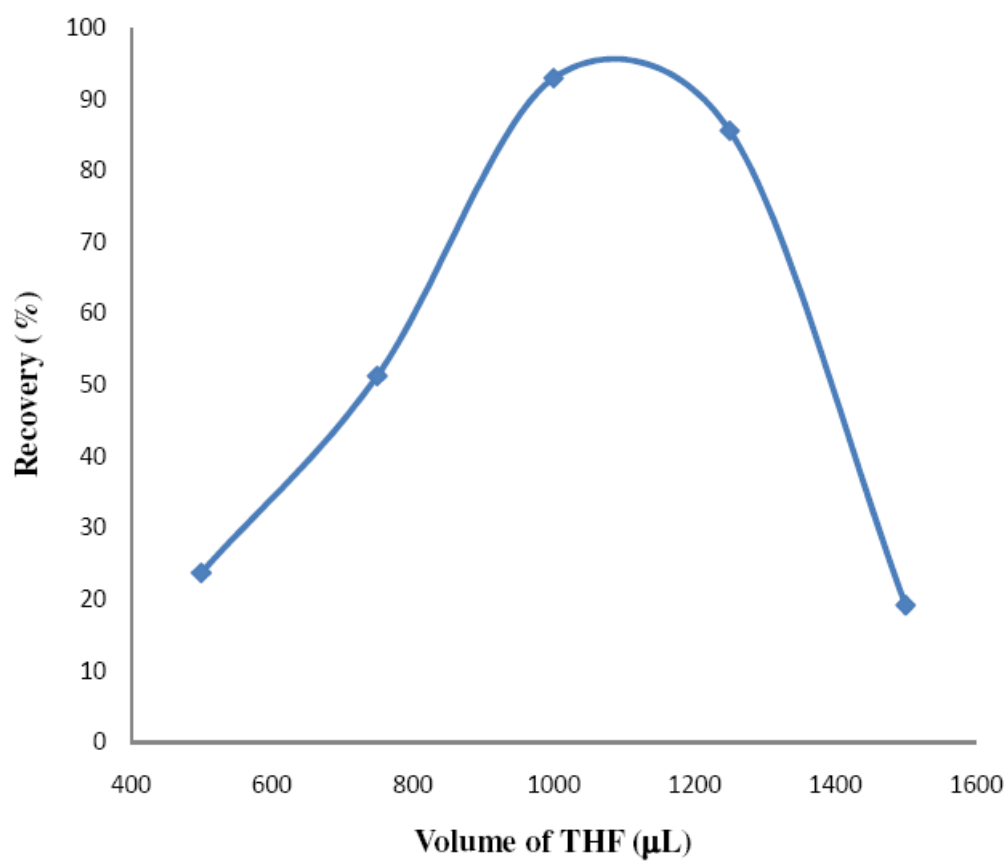


圖 3：分散劑體積對於樣品回收率的影響。

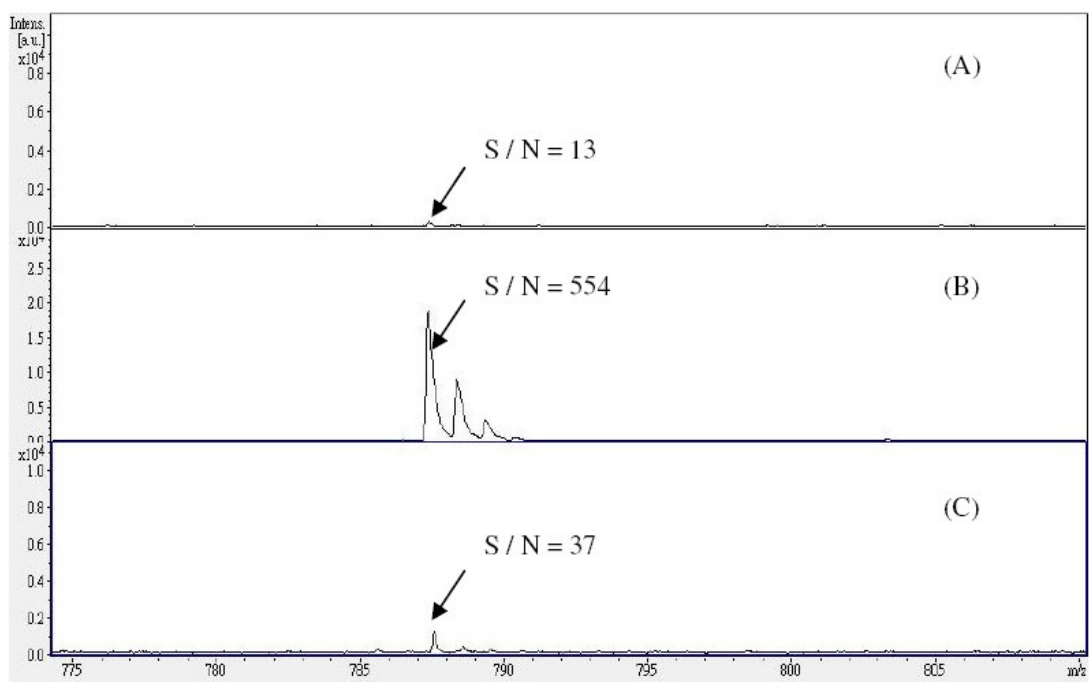


圖 4： 10^{-6} M 的毛地黃毒苷標準溶液(A)沒有經過；(B)經過；(C)稀釋 100 倍再經過分散式液液微萃取法，萃取分析物所測得的質譜圖。

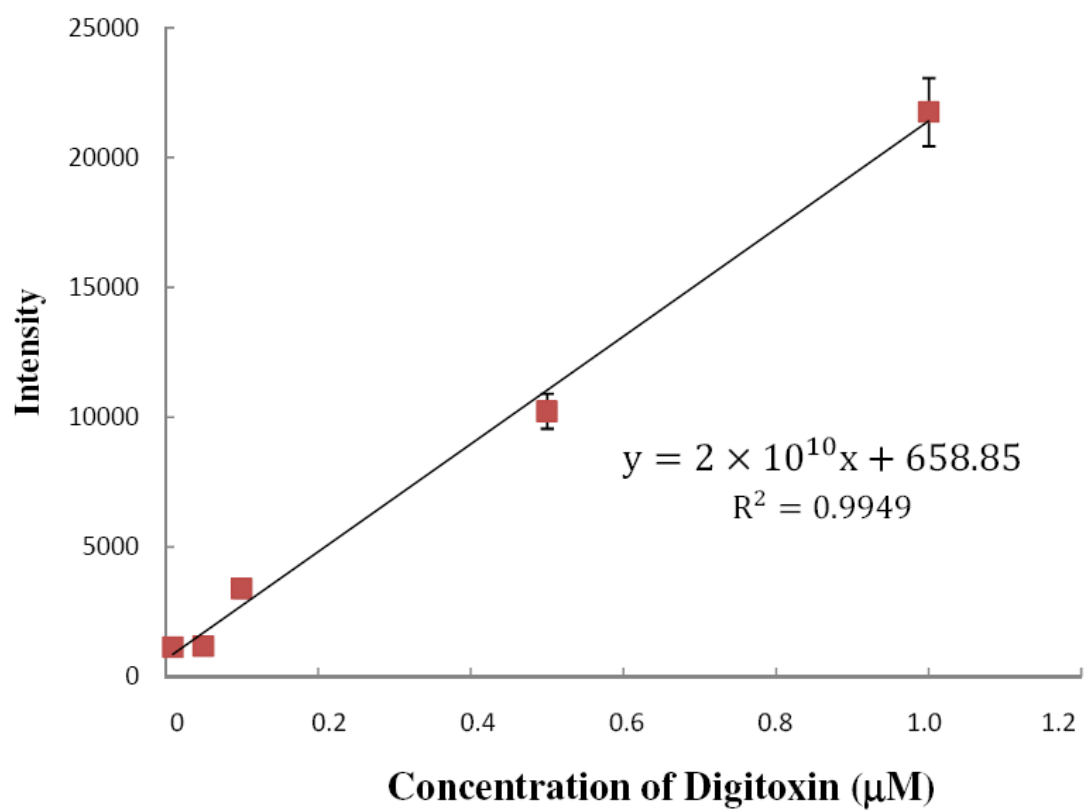


圖 5：毛地黃毒苷標準溶液的檢量線。

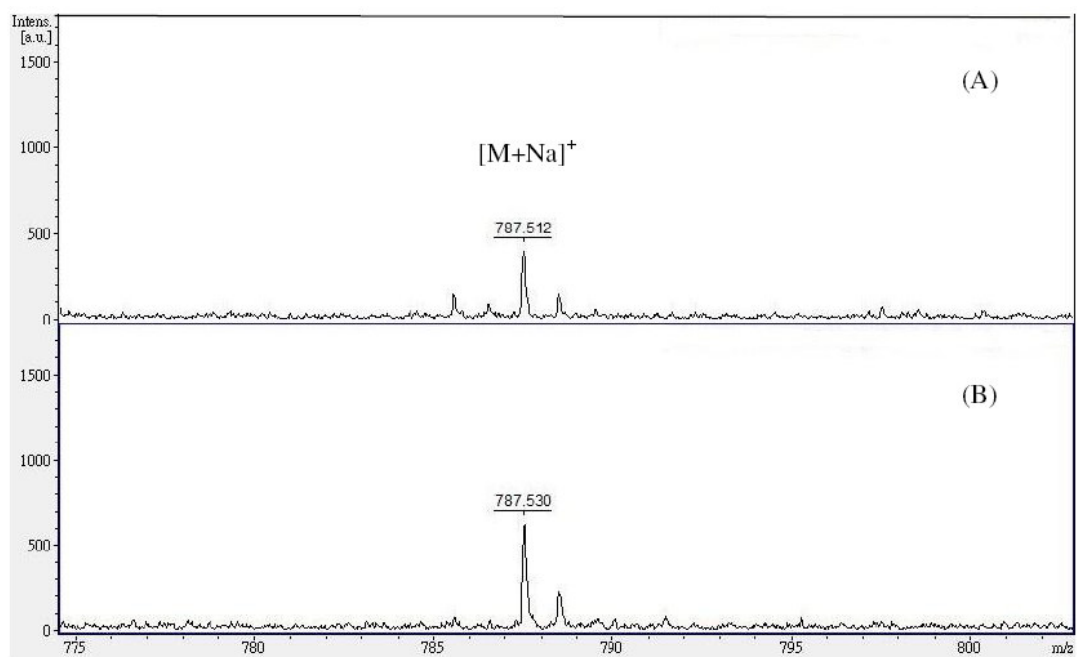


圖 6：以(A)氘甲烷；(B)0.1%三氟醋酸去除尿液基質干擾，所測得的毛地黃毒苷質譜圖。

Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Digitoxin by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

Wenn-Ling Yang Chien-Chung Liou*

Abstract

In this study, dispersive liquid-liquid microextraction method was employed for the extraction and preconcentration of digitoxin in an aqueous solution. The analyte was detected by the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

The appropriate mixture of 1 mL of dispersive solvent (tetrahydrofuran, THF) and 12 μL of extraction solvent (chloroform, CHCl_3) was injected into a standard solution of digitoxin. After centrifugation, the extraction solvent was deposited on the bottom of the conical tube. The sediment phase was transferred and mixed with α -CHCA matrix before analyzing by a mass spectrometer.

The results of our experimental data for the determination of digitoxin showed the signal enhancement factor of this analyte could be as high as 1,200 after dispersive liquid-liquid microextraction. The limit of detection of digitoxin was 2.2 nM, the linear dynamic range was from 0.05 μM to 1 μM with a correlation coefficient (R_2) of 0.9998, respectively and the relative standard deviation was within 10%.

The analytical method we proposed had also been successfully applied for the determination of digitoxin in biological fluids such as urine after simple pretreatment procedure. The advantages of this technique are fast, simple, easy sample preparation, high sensitivity and high selectivity.

Keyword: dispersive liquid-liquid microextraction method, dispersive solvent, extraction solvent, matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry