

國立臺灣大學醫學院毒理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Toxicology

College of Medicine

National Taiwan University

Master's Thesis



利用液相層析串聯式質譜儀搭配人類肝臟微粒體鑑定

依托咪酯和其一次代謝產物之二次質譜

Identify the Phase I metabolites of Etomidate Using LC-

MS/MS and Human Liver Microsomes

綦品婕

Pin-Chieh Chi

指導教授：陳珮珊 博士，陳惠文 博士

Advisors: Pai-Shan Chen, Ph.D., Huei-Wen Chen, Ph.D.

中華民國 114 年 6 月

June 2025

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書



MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

利用液相層析串聯式質譜儀搭配人類肝臟微粒體鑑定依托咪酯和其一次代謝產

物之二次質譜

(論文中文題目) (Chinese title of Master's Thesis)

Identify the Phase I metabolites of Etomidate Using LC-MS/MS and Human Liver
Microsomes

(論文英文題目) (English title of Master's Thesis)

本論文係 蔡品婕 (姓名) R07447008 (學號) 在國立臺灣大學 毒理學 (系/所/學位學程) 完成之碩士學位論文，於民國 114 年 07 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Graduate Institute of Toxicology on 30 (date) 07 (month) 2025 (year) have examined a Master's Thesis entitled above presented by Pin-Chieh Chi (name) R07447008 (student ID) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

陳明

廖寶琦

(指導教授 Advisor)

陳惠文

華國春

(指導教授 Advisor)

系(所、學位學程)主管 Director:

華國春

謝誌



終於來到撰寫謝誌的時刻，回顧我的碩士生涯，想放棄的念頭未曾間斷，但我最終明白「放棄其實需要更大的勇氣」。既然這是自己選擇的路，又不願半途而廢，那縱使跪著，也要將它完成。感謝去年出現這項新興濫用藥物「喪屍煙彈」重新點燃我心中那一片荒蕪，讓我看見一點點希望的火苗，復學這一年以來，我也慢慢找回那隨著時間流逝的初衷…

感謝我的指導教授陳珮珊老師，從未放棄我这資質平庸又胡攪蠻纏的學生，除了在研究上循循善誘，一步步引導我思考之外，還給予我很多的時間與自由去探索自己真正想要的人生。也感謝我的指導教授陳惠文老師，像一個慈祥的爸爸，話雖不多但永遠默默給予我鼓勵與支持。

感謝華國泰教授、廖寶琦教授百忙之中撥冗擔任我的口試委員，悉心與我討論、指出我論文的不足之處以及對於實驗方法的建議，使我跳脫平常一貫的思維模式，從不同的角度切入探討問題，讓研究更加完整。

感謝毒理所姚琬琳助教，在我休學以及復學期間給予我很多的提點與協助，是個溫暖又不可或缺的存在。

感謝 R540 的快樂小夥伴們：永誠、欣宜、品儒、士勛、易蓁、哲安、勛誠，因為有你們的陪伴，才能讓我在這復學後的一年裡，無數個下班後繼續做實驗的深夜也有人陪伴，實驗室裡經常有弟弟妹妹們的歡笑聲讓我感覺從不孤單。

感謝台大癌醫檢醫部的好同事們，讓我在畢業前夕可以多安排休假，心無旁騖的撰寫論文、準備口試。感謝男友以及昔日的實驗室夥伴晶霓，在我口試前夕焦頭爛額的日子裡，提供我源源不絕的情緒價值還有暖心的陪伴。

所幸一路上受到各種的幫助，這篇論文的每一個字都是有你們的力量才能誕生。期許未來的自己能充分利用這段時間所學習到的精神，成為更好的人。

中文摘要



依托咪酯 (Etomidate) 原為臨床所使用的麻醉劑，近年來因為「喪屍煙彈」這種與電子煙併用的濫用形式在臺灣迅速蔓延。然而，目前臨床和法醫毒理學對於其代謝機制和特定生物標誌的理解仍不夠完整。

為了更深入了解依托咪酯在體內的變化，本研利用液相層析串聯式質譜儀 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)，並搭配人類肝臟微粒體 (Human Liver Microsomes, HLMs) 體外代謝模型，來模擬依托咪酯在人體肝臟中的第一級代謝，相較於目前已發表的文獻僅探討 0 至 2 小時的代謝時間，本研究在 0 到 168 小時之間，總共取了 9 個時間點，以更全面了解代謝物隨時間變化的趨勢，本研究首先使用全掃描(Full Scan)與選擇離子掃描 (Selected ion monitoring)模式比對實驗組與對照組之圖譜，結合第一級代謝反應可能之反應途徑找出潛在的代謝物，再利用產物離子掃描模式(Product ion mode)分析其二次質譜之圖譜，並解析其可能之碎裂機制。

本研究主要發現六條主要的第一階段代謝途徑，這些代謝產物及其對應的質荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) 如下：

N-去烷基化 (N-dealkylation, E1, m/z 141)、苯乙基去氫化 (phenylethyl dehydrogenation, E2, m/z 243)、芳環羥基化 (aromatic hydroxylation, E3, m/z 261)、乙氧基羥基化 (ethoxy hydroxylation, E4, m/z 261)、雙羥基化 (dihydroxylation, E5, m/z 277)、O-去烷基化生成依托咪酯酸 (O-dealkylation to form etomidate acid, E6, m/z 217)，從時間曲線上來看，依托咪酯酸在反應進行到第 4 小時的時候，濃度就已經超越了原型藥物，並在 24 小時達到高峰，證實了依托咪酯酸是監測依托咪酯濫用的潛在關鍵生物標誌。

綜上，本研究為臨床和法醫毒理學監測依托咪酯濫用提供更詳細的一級代謝路徑及質譜分析資訊，有助於未來更有效地應對「喪屍煙彈」這類新興毒品濫用的防治與規範。

關鍵字：依托咪酯、液相層析串聯式質譜儀、人類肝臟微粒體、第一級代謝反應、二次質譜

Abstract



Etomidate, originally developed as a non-barbiturate anesthetic for endotracheal intubation, has recently become widely abused in Taiwan through a new form of drug delivery known as “zombie vape,” where etomidate is illicitly mixed with electronic cigarette liquids. Despite its increasing prevalence as a substance of abuse, knowledge regarding its metabolic mechanisms and specific biomarkers remains limited in both clinical and forensic toxicology fields. To better understand the biotransformation of etomidate, this study employed liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in combination with an *in vitro* metabolic model using human liver microsomes (HLMs) to simulate phase I hepatic metabolism. Unlike previous studies that primarily focused on short incubation times ranging from 0 to 2 hours, this investigation extended the analysis to 168 hours, collecting samples at nine distinct time points to capture a more comprehensive view of time-dependent metabolite formation. Metabolite screening was initially conducted using full scan and selected ion monitoring (SIM) modes to compare chromatographic patterns between experimental and control groups. Potential metabolites were predicted based on plausible phase I reactions and subsequently confirmed using product ion mode to obtain MS/MS spectra and elucidate characteristic fragmentation pathways. This study identified six major phase I metabolic pathways of etomidate, corresponding to N-dealkylation (E1, *m/z* 141), phenylethyl dehydrogenation (E2, *m/z* 243), aromatic hydroxylation (E3, *m/z* 261), ethoxy hydroxylation (E4, *m/z* 261), dihydroxylation (E5, *m/z* 277), and O-dealkylation leading to the formation of etomidate acid (E6, *m/z* 217). Time-course analysis demonstrated that etomidate acid exceeded the concentration of the parent compound by the fourth hour and reached its

peak at 24 hours, supporting its role as a potential biomarker for detecting etomidate use and abuse. In conclusion, this study offers a more detailed and extended characterization of etomidate's phase I metabolism and its associated mass spectrometric signatures, providing valuable insight for clinical and forensic toxicology. The findings contribute to more effective monitoring and regulation strategies in response to the growing abuse of new psychoactive substances such as zombie vape.

Keywords: Etomidate, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), human liver microsomes (HLMs), phase I metabolism, MS/MS spectra

目次



國立臺灣大學碩士學位論文口試委員會審定書.....	i
謝誌.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	v
目次.....	vii
圖次.....	ix
表次.....	xi
第一章 緒論.....	1
1.1 依托咪酯 (Etomidate) 臨床用途	1
1.2 依托咪酯 (Etomidate) 全球濫用情形	2
1.3 依托咪酯 (Etomidate) 台灣濫用情形	3
1.4 藥物代謝反應與體外代謝模型	4
1.4.1 藥物代謝反應	4
1.4.2 體外代謝模型之選擇	5
1.5 依托咪酯的代謝	9
1.6 依托咪酯的現行檢測方法	16
1.6.1 尿液／血清用免疫層析試紙	16
1.6.2 電子煙油「滴劑快篩」——臺灣本土版本	16
1.6.3 液相層析-串聯質譜 (LC-MS/MS)	16
1.6.4 氣相層析-質譜 (GC-MS)	17
1.6.5 高解析質譜 (HRMS)	18
1.7 液相層析串聯式質譜儀原理	19
1.7.1 液相層析串聯式質譜儀之組成	19
1.7.2 串聯式質譜常見掃描模式	20
1.8 研究目的	23
第二章 實驗材料及分析方法.....	24

2.1 實驗材料.....	24
2.2 樣品製備.....	25
2.2.1 第一級代謝反應(Phase I reaction).....	25
2.2.2 依托咪酯質譜參數最佳化(Infusion).....	25
2.2.3 未知的代謝物鑑定與代謝時間軸建立.....	26
2.3 實驗儀器與設定.....	27
2.3.1 液相層析質譜儀.....	27
第三章 結果與討論.....	28
3.1 依托咪酯質譜參數最佳化(Infusion)結果.....	28
3.2 依托咪酯代謝時間趨勢.....	30
3.3 以選擇性離子監測(SIM)模式尋找各潛在代謝物之母離子(Precursor ion).....	32
3.4 以產物離子掃描模式 (product ion mode) 鑑定各代謝物之二次質譜.....	42
第四章 結論.....	72
第五章 未來展望.....	73
參考文獻.....	75

圖次



圖 1. 依托咪酯與美托咪酯的結構式與分子量，摘自參考文獻[11].....	10
圖 2. 依托咪酯的產物離子質譜圖及裂解途徑，摘自參考文獻[40]	10
圖 3. 依據羥基化(A)與去烷基化(B)代謝途徑，預測依托咪酯可能生成之碎片離子，摘自參考文獻[40]	11
圖 4. 依托咪酯代謝路徑預測，摘自參考文獻[40]	14
圖 5. 液相層析串聯式質譜儀組成示意圖，摘自參考文獻[49]	21
圖 6. 串聯式質譜的四種掃描模式示意圖，摘自參考文獻[50]	21
圖 7. 層析圖 (a) 10 ng/mL 依托咪酯 (滯留時間: 8.19 min; 紅線: m/z 245→141, 綠線: m/z 245→95, 藍線: m/z 245→105) 及 (b)第一級主要代謝物 (滯留時間: 3.83 min; 紅線: m/z 217→113, 綠線: m/z 217→105, 藍線: m/z 217→95).....	29
圖 8. 依托咪酯及其代謝物隨時間變化趨勢 (a)多重反應監測模式(MRM)下依托咪酯及依托咪酯酸隨時間變化趨勢 (b)子離子掃描模式(product ion scan)下各代謝物隨時間變化趨勢	31
圖 9. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E1 (m/z 141)	36
圖 10. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E2 (m/z 243)	36
圖 11. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E3、E4 (m/z 261)	37
圖 12. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E5 (m/z 277)	37
圖 13. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E6 (m/z 217)	38
圖 14. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E7 (m/z 421)	38
圖 15. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E8 (m/z 317)	39
圖 16. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E9 (m/z 157)	39
圖 17. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E10 (m/z 113)	40
圖 18. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E11 (m/z 393)	40
圖 19. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E12、E13 (m/z 437)	41
圖 20. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E14 (m/z 127)	41
圖 21. (a)-(i)為 E1 (m/z 141) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	46
圖 22. E1 (m/z 141) 在 RT 3.1 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	47
圖 23. 根據 E1 (m/z 141) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	47
圖 24. (a)-(i)為 E2 (m/z 243) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	50
圖 25. E2 (m/z 243) 在 RT 8.9 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	51
圖 26. 根據 E2 (m/z 243) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	51
圖 27. (a)-(i)為 E3、E4 (m/z 261) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	54
圖 28. E3、E4 (m/z 261) 在 RT 8.4 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	55
圖 29. 根據 E3 (m/z 261) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	55

圖 30. (a)-(i)為 E5 (m/z 277) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	58
圖 31. E5 (m/z 277) 在 RT 7.8 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	59
圖 32. 根據 E5 (m/z 277) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	59
圖 33. (a)-(i)為 E6 (m/z 217) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	62
圖 34. E6 (m/z 217) 在 RT 3.8 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	63
圖 35. 根據 E6 (m/z 217)的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	63
圖 36. (a)-(i)為 E9 (m/z 157) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	66
圖 37. E9 (m/z 157) 在 RT 0.9 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)	67
圖 38. 根據 E9 (m/z 157) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式	67
圖 39. (a)-(i)為 E10 (m/z 113) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖	70
圖 40. E10 (m/z 113) 在 RT 3.7 min 的二次質譜圖 (CE 20 V).....	71
圖 41. 根據 E10 (m/z 113) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式.....	71

表次

表 1. 常見第一級(Phase I)代謝反應	7
表 2. 常見第二級(Phase II)代謝反應	8
表 3. 14 種依托咪酯潛在代謝物	12
表 4. 層析條件與梯度	27
表 5. 依托咪酯質譜參數最佳化結果	28
表 6. 14 項依托咪酯潛在代謝產物之代謝數據整理與分析	35

第一章 緒論



1.1 依托咪酯 (Etomidate) 臨床用途

依托咪酯 (Etomidate) 為一種非巴比妥類鎮靜劑，已廣泛用於催眠性鎮靜與臨床麻醉[1, 2]。1960 年代由 Janssen 研發，1972 年於歐洲上市、1983 年獲美國 FDA 核准，2025 年仍列入 WHO Model List of Essential Medicines，顯示其基礎地位穩固。在臨床上用途主要有以下四項：一、全身麻醉導入 (Induction of General Anesthesia)，標準劑量 0.2–0.3 mg / kg 靜脈注射，可在 30–60 秒內造成失去意識，作用約 3–5 分鐘，由於其短效且對心血管抑制小之特性，適用於心臟疾病或失血的病人[3]。二、短程手術或處置的鎮靜、維持麻醉，常與鴉片類或笑氣併用，應用於脫臼復位、心臟去顫、電痙攣治療、內視鏡與心導管室等時間 ≤ 10 分鐘的處置，有起效快、甦醒快，不良循環反應少且單次給藥對腎上腺影響有限。三、快速序列氣管插管 (Rapid Sequence Intubation, RSI)，由於其保持血壓與心輸出量的「血流動力學穩定」特性，成功插管率高，於 1980 年代起被急診與院前醫療採納為首選誘導劑之一，特別適用於低血壓、失血或休克病人[4]。四、加護病房短期鎮靜，相較於丙泊酚 (propofol)，對血壓影響較小，故可於機械通氣或重症影像檢查前給予單次或間歇靜脈推注(bolus)，以減少血壓波動；惟長時間持續輸注易造成腎上腺抑制，現今多限制在短時使用[5, 6]。依托咪酯原本是為「靜脈麻醉導入」而設計，憑藉快速起效與優異的血流動力學穩定性，很快延伸到短程鎮靜與緊急插管等場景。雖然後續發現腎上腺抑制副作用，使其持續輸注用途受限，但在一次性麻醉導入及血流動力學不穩定 (hemodynamically unstable) 病人插管時，仍被廣泛使用[3]。



1.2 依托咪酯 (Etomidate) 全球濫用情形

1972–1980 年代依托咪酯於歐洲上市後迅速成為麻醉導入首選，當時尚無「娛樂性濫用」紀錄[7]。1990 年代起國外文獻偶有醫師、護理師將依托咪酯與肌肉鬆弛劑並用自殺或自我鎮靜的案例，揭露醫院藥櫃外流風險。1994 年報告中，護理人員以「vecuronium + 依托咪酯 + 酒精」自殺，驗得血中依托咪酯濃度 0.041 $\mu\text{g/mL}$ [8]，2000–2010 年代關注焦點仍以麻醉醫護人員「職業接觸→成癮」為主[9]；泛指「非鴉片類麻醉藥濫用」的回顧指出，依托咪酯與酮胺、丙泊酚成為麻醉專業人員的高風險藥物之一。2010–2020 年間，零星自殺與自用個案持續，但始終局限於醫療圈[10]。

在南韓，由於丙泊酚(propofol)被列為精神管制藥物並受到嚴格規範，替代藥物需求大增，致使依托咪酯濫用事件頻傳。因此，亟需建立能有效監測依托咪酯的分析方法。自 2011 年丙泊酚被列管後，2012 年的取締行動即發現部分製藥公司員工非法將丙泊酚流入首爾江南地區醫院與診所，並由醫師與藝人施用或注射[11]。依托咪酯呈白色液體，外觀與丙泊酚相似且作用相近，因而被用作丙泊酚替代品，多起走私案例亦已被報導[12]。

自 2020 年起，依托咪酯逐漸由醫用挪用到暗網販售，中國於該年 7 月列管合成大麻素後，不法分子尋找新「無列管鎮靜劑」，鎖定脂溶性高、易溶於電子煙油基底溶劑(丙二醇/植物甘油)的依托咪酯[13]。中國媒體調查揭露，地下買家以每 500 g 依托咪酯粉末自製「上頭電子煙」，並在社群暗語中販售。2022 年起中國多省在交通事故與酒吧中首度驗出依托咪酯，出現「吸兩口就秒睡」的口碑傳播。2023 年 10 月中國將依托咪酯正式列入第二類精神藥品；同時公安部發布「清源斷流—2023」專案，點名依托咪酯為重點新興毒品。2023 年底，香港急診部門也通報首宗「Space Oil」個案，受害者多為 15–20 歲青少年[14]。2024 年，依托咪酯開始在亞太區域迅速擴散，使亞太正式成為濫用熱

區；美國費城醫院也發布健康警訊，表示街頭樣本同時檢出依托咪酯(etomidate) + 吩坦尼(fentanyl) + 美得定(medetomidine)，並出現首宗致死過量。2024 年 11 月，台灣海巡緝獲 135 kg 依托咪酯原粉，可調製 135 萬支「喪屍煙彈」；同月刑法由三級升列二級毒品，該案為台灣史上最大宗依托咪酯案件，黑市價值估逾新台幣 27 億元[15]。2025 年 3 月，聯合國毒品及犯罪辦公室(UNODC)發布全球預警，強調短短三年，已有 30 餘國在毒品樣本或中毒個案中驗出依托咪酯及七種結構類似物[16]；特別點名東亞、東南亞為熱區，並首次確認紐西蘭的電子煙也驗出依托咪酯，宣告依托咪酯已列入全球新興精神活性物質(NPS)監測清單[15]。

1.3 依托咪酯 (Etomidate) 台灣濫用情形

依托咪酯為短效型靜脈全身麻醉劑，臨床常用於緊急插管與小型程序鎮靜；然而，根據過往文獻顯示，其長期或高劑量使用可能造成中樞神經系統損傷及腎上腺抑制。2023 年起，台灣陸續出現以電子菸載具吸食依托咪酯的「喪屍煙彈 (zombie vape)」現象，標榜「比大麻安全」，因此成為新興濫用問題。

托咪酯施用者吸食後無法自我控制，造成多起車禍意外。2024 年 7 月，新北市三重區一名員警遭受依托咪酯影響之駕駛撞擊身亡，引發社會關注；同年 9 月，海巡署在苗栗外海攔截兩名嫌犯，查扣 7.46 kg 依托咪酯，足以製造約 8.5 萬支煙彈。2024 年刑事局毒品查緝中心統計，依托咪酯僅占全國毒品案件約 5%，但受高調媒體報導影響，民眾往往高估其流行程度。進一步追查顯示，台灣並無藥廠生產依托咪酯，境內檢出之來源多自東南亞走私，亦有來自中國之嫌疑；近兩起重大走私案皆與海上運輸路線有關，排除國內製造之可能。

關於台灣依托咪酯的檢出趨勢，2024 年 1–10 月衛福部「濫用藥物檢驗通

報系統」在非尿液檢體（電子煙油、粉末、錠劑等）中已檢出 2905 件，對比 2023 年全年的 22 件暴增 132 倍。2024 年 10 月，檢警於基隆港攔截 135 kg 依托咪酯原粉（純度 99 %），市值約 27 億元，可製 135 萬支煙彈，為台灣史上最大宗依托咪酯走私案[15]；若原料未被攔查，就會一路往下進入分裝，1 公斤依托咪酯可製作約 1 萬顆煙彈。劑型與販售以 PG/VG (丙二醇/植物甘油) 電子煙油為主，行銷名稱「喪屍煙彈／Zombie Vape」。此外，依托咪酯使用族群年齡快速下探，部分國中生願付 NT\$2500/支購買，校園有家長通報「一口暈」電子煙。

基於以上，我國政府單位史無前例加快「依托咪酯」納管程序，2024 年 8 月公告列管三級毒品，同年 11 月，行政院長卓榮泰宣布將其公告列為二級毒品 [17]，期盼藉由法律公權力增強檢警查緝及壓制力。

1.4 藥物代謝反應與體外代謝模型

1.4.1 藥物代謝反應

藥物在在人體內代謝反應可分為 **第一級（Phase I）代謝反應** 與 **第二級（Phase II）代謝反應**。

第一級代謝反應的核心為增加反應位點，提供可結合的官能基，包含羥基化（hydroxylation）、去烷基化（dealkylation）、去胺化（deamination）、氧化（oxidation）、還原（reduction）和水解（hydrolysis）等反應。這些反應主要是透過肝臟酵素作用進行，例如細胞色素 P450（cytochrome P450, CYPs）、含黃素腺嘌呤二核苷酸單加氧酶（FAD-containing mono-oxygenases, FMOs）及單胺氧化酶（monoamine oxidases, MAOs）。

第二級代謝反應則藉由在這些官能基上接合高極性基團，使親水性顯著提

高以利排泄，包含葡萄糖醛酸化 (glucuronidation)、硫酸化 (sulfation)、甲基化 (methylation)、乙醯化 (acetylation)，以及與胺基酸 (如甘胺酸、麩胺酸和牛磺酸) 或麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 進行結合反應。這些反應主要由結合型酵素催化，例如 UDP-葡萄糖醛酸轉移酶 (UDP-glucuronyltransferase, UGT)、硫酸轉移酶 (sulfotransferase, SULT)、麩胱甘肽轉移酶 (glutathione S-transferase, GST)、N-乙醯基轉移酶 (N-acetyl transferase, NAT) 和甲基轉移酶 (methyl transferase)。這些酵素將其受質與藥物的有機基團結合，以提高藥物的親水性，降低藥物的分佈體積 (volume of distribution, Vd)，從而同時達到解毒並促進藥物排出體外之目的[18]。表 1 以及表 2 列舉了常見的第一級及第二級代謝反應。

1.4.2 體外代謝模型之選擇

肝臟在各類內生性與外源性化合物的代謝與處置中扮演核心角色[19]。鑑於肝臟代謝與處置對藥物療效與毒性具有決定性影響，前臨床階段的藥物評估常採用體外肝模型[20]。目前已建立多種體外模型以研究肝臟藥物生物轉化 (biotransformation)，例如人類肝微粒體 (human liver microsomes, HLMS)、肝細胞質 (cytosol)、肝 S9 分液 (S9 fractions) 以及肝細胞 (hepatocytes) [21, 22]。其中，以人類肝微粒體 (HLM) 和人類肝臟 S9 分液 (HLS9) 最為常用 [23]，可以作為初步篩選的方法，獲得藥物初步代謝資訊，並預測藥物在人體內的代謝情形[24]。S9 是透過將肝臟組織均質化 (homogenization) 後，經 9000 g、20 分鐘離心後所得之上清液，內含微粒體與細胞質；再以 100000 g 超高速離心約 1 小時，可將其中的沉澱部分分離為 HLM。HLM 富含內質網及其他胞器，這些膜上集中分布了多種藥物代謝酶 (DMEs) 與轉運蛋白[21, 25]。

人類肝微粒體 (Human liver microsomes, HLMs) 富含 CYP450、FMO 及部分微粒體 UGT；Phase I 酵素濃度通常為 S9 的 1.5 – 2 倍，S9 因同時含微粒體與細胞質酵素，故 Phase I 酵素因「稀釋效應」濃度較低。HLM 主要用於進行藥物的第一級代謝反應，需加入輔酶（如 NADP）啟動代謝作用。此外也能用於研究第二級代謝反應之中的葡萄糖醛酸結合反應，此時則須加入輔酶 UDPGA 以催化反應進行[26]。針對氧化、去烷基化、去氫化等第一步反應，HLM 可提供更強的反應速率與訊號，使代謝物訊號易於偵測與結構解析。S9 會迅速將初級代謝物再共軛，造成原型 Phase I 代謝物訊號弱化甚至消失，降低 LC-MS/MS 鑑定靈敏度。有鑑於此，本研究因針對 Phase I 代謝物進行二次質譜之解析，故選用 HLM 作為體外代謝模型。

人類肝細胞質 (Human liver cytosol) 富含多種參與第二級代謝 (phase II metabolism) 的酵素，包括硫酸轉移酶 (sulfotransferases, SULTs)、麩胱甘肽轉移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 及 N-乙醯基轉移酶 (N-acetyltransferases, NATs) [23]。為了有效地評估這些第二級代謝反應，實驗中需分別添加各酵素作用所需之輔酶或共因子，例如：針對 SULT，需額外添加輔酶 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸鹽 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)；對於 GST，則需添加麩胱甘肽 (glutathione, GSH)；而 NAT 的代謝反應則需同時添加乙醯輔酶 A (acetyl CoA)、二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 及乙醯輔酶 A 再生系統 (acetyl CoA regenerating system)，以維持代謝反應順利進行。



表 1. 常見第一級(Phase I)代謝反應

代謝階段	主要反應類型	化學本質	常見酵素	生成物特徵	範例
Phase I (功能化反應)	氧化 (Oxidation)	引入/暴露 -OH、-	CYP450、	輕度增加水溶	羥基化 (+16 Da)• <i>N</i> -/ <i>O</i> -去烷基化
		NH ₂ 、=O 等極性	FMO、ADH、	性；有時活性	(-14/-28 Da) (etomidate →
		官能基	MAO	上升	etomidate-acid)
	還原 (Reduction)	加氫或去氧	CYP450、Azo/硝	常發生於缺氧	硝基 → 胺基
			基還原酶	組織	酮 → 醇
	水解 (Hydrolysis)	酯/醯胺鍵開裂	胃腸道、血漿及	產生游離酸或	酯 → 醇 + 酸
			肝臟酯酶	醇	

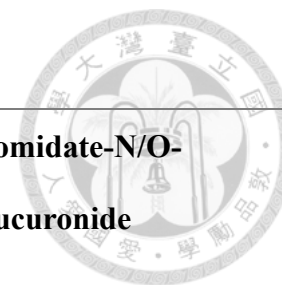


表 2. 常見第二級(Phase II)代謝反應

Phase II (結合反應)	葡萄糖醛酸化 (Glucuronidation)	加入 glucuronic acid (+ 176 Da)	UGT 家族	增加極性、 易於腎臟排除	etomidate-N/O-glucuronide
	硫酸化 (Sulfation)	加入 SO_3^- (+ 80 Da)	SULT	多發生於酚類、胺類	Dopamine-O-sulfate
	麩胱甘肽化 (GSH Conjugation)	加入 GSH (+ 305 Da)	GST	解毒親電性中間體	NAPQI-GSH (乙酰胺酚)
	乙醯化 (Acetylation)	加入 COCH_3 (+ 42 Da)	NAT	使活性下降	Isoniazid-acetyl
	甲基化 (Methylation)	加入 CH_3 (+ 14 Da)	COMT、TPMT	調整活性或終止活性	etomidate-O-methyl (E14)
	胺基酸/脂肪酸結合	甘胺酸、牛磺酸、脂肪酸	AA-NAT, Acyl-CoA transferase	增加極性或導向膽汁	苯甲酸-甘胺酸 (馬尿酸)



1.5 依托咪酯的代謝

由於依托咪酯臨床應用範圍廣、庫存量、合成成本低及精神活性強，濫用問題越發嚴重。過量使用依托咪酯可能導致認知功能障礙、腦損傷、呼吸抑制等嚴重健康後果[27]。為因應此一濫用現象，各國紛紛實施相關管制政策。然而，受龐大經濟利益驅動，犯罪集團開始對依托咪酯結構進行改造，在保留精神活性的同時，規避現有檢測技術與法規打擊。由於結構與精神活性極為相似，美托咪酯 (metomidate) 遂開始流入濫用市場。再加上網路交易興起等外在因素，依托咪酯的非法濫用更趨頻繁且隱蔽。圖 1 顯示美托咪酯與依托咪酯的具體結構。已有研究報導以液相層析-多反應監測質譜 (LC-MRM-MS/MS) 對依托咪酯及美托咪酯進行檢測[27, 28]，然而，這兩種藥物在人體內代謝速度極快，常使檢體中難以檢出原型藥物，為偵查與檢驗帶來挑戰[29]。因此，分析代謝物成為當前最受關注且有效的研究方向之一。在法醫科學研究中，代謝物常用作生物標誌，可監測藥物濫用、判定服用時間並延長檢測窗口[30]。此外，由於依托咪酯與美托咪酯的化學結構極為相似，比較兩者的代謝譜不僅可為研究結構類似物的代謝提供依據，也為「設計藥物 (Designer drugs)」之代謝研究帶來重要思路。

近年來，採用液相層析-高解析質譜 (LC-HRMS) 之藥物代謝研究備受關注[30-32]。就代謝模型而言，人類體內 (in vivo) 樣本雖為最可靠的研究材料，但此類藥物對受試者可能造成健康風險，致使相關試驗難以通過倫理審查[33]。因此，利用替代模型進行代謝模擬成為更可行的途徑；常用模型包含：混合型人肝微粒體 (mixed HLMS)、人類肝臟 S9 分液(S9 fraction)以及不同受精時間之斑馬魚[34-37]。這些模型廣泛應用於代謝譜研究、代謝模擬與分析[38]。HLMS 與 S9 fraction 屬體外 (in vitro) 模型，兩者酵素系統濃度不盡相同，可能無法完整重現體內代謝歷程；而不同受精時間之斑馬魚則為體內模

型，其基因與人類同源度逾 71 % [39]，故常用於代謝模型探討。

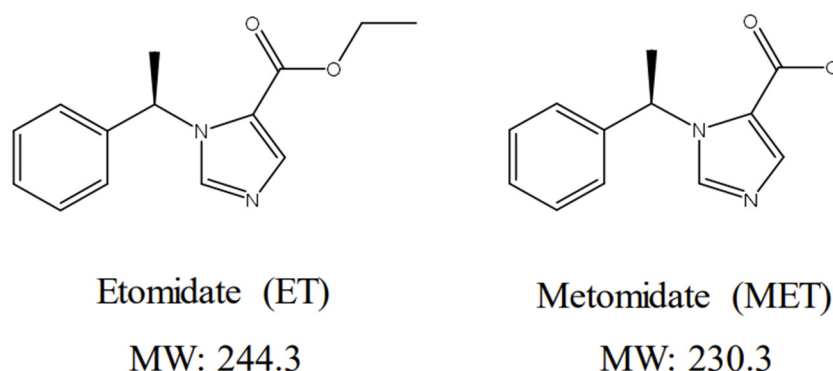


圖 1. 依托咪酯與美托咪酯的結構式與分子量，摘自參考文獻[11]

依托咪酯在正離子模式呈現一組 $[M+H]^+$ 分子離子， $m/z = 245.1$ （組成式 $C_{14}H_{17}N_2O_2$ ）。其產物離子質譜中可觀察到四個主要碎片離子： $m/z = 141$ （ $C_6H_9N_2O_2$ ）、**105**（ C_8H_9 ）、**113**（ $C_4H_5N_2O_2$ ）、**95**（ $C_4H_3N_2O$ ），其化學結構與裂解途徑如圖 2 所示：首先，imidazole 鏈上的 C-N 共價鍵斷裂產生 m/z 141 與 105 兩個特徵離子；其後， m/z 141 再喪失一個乙基，生成 m/z 113 的離子。至於 m/z 95，則源自 m/z 113 發生 C-O 單鍵斷裂並伴隨重排所形成的 onium 離子。

綜合而言， m/z 141、105 與 113 這三組關鍵碎片的結構變化，對於後續預測與解析依托咪酯的代謝譜具有決定性意義。

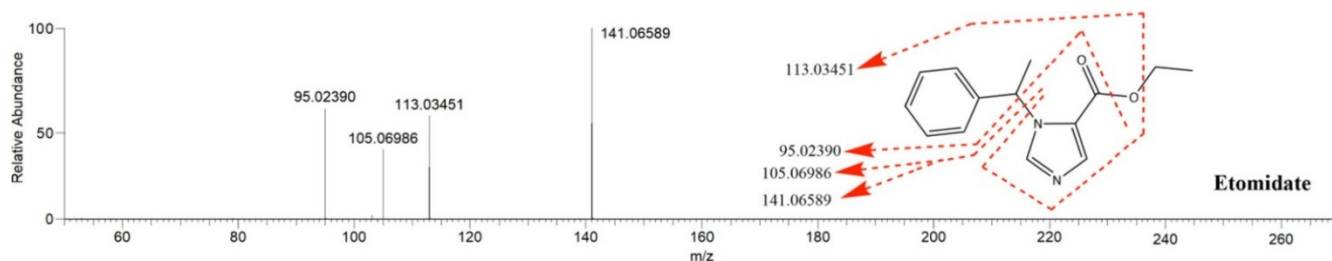


圖 2. 依托咪酯的產物離子質譜圖及裂解途徑，摘自參考文獻[40]

依托咪酯易於苯環 (benzene ring) 與咪唑環 (imidazole ring) 上產生羥基化反應 (hydroxylation)，此外，O-去烷基化 (O-dealkylation) 與 N-去烷基化 (N-dealkylation) 也是常見的代謝途徑[37, 38]。在羥基化的代謝途徑中， $[M+H]^+$ 離子的 m/z 值增加 16 Da，被視為預測羥基化的重要指標 (如圖 3 所示)。在酯鏈的 O-去烷基化代謝途徑方面，依托咪酯會觀察到 28 Da 的中性損失 (neutral loss)，至於 N-去烷基化的代謝途徑，可觀察到其 $[M+H]^+$ 離子的 m/z 值相較於原型藥物明顯降低。因此，當進行依托咪酯代謝物的化學結構鑑定時，著重於與 m/z 141 ($C_6H_9N_2O_2$)、105 (C_8H_9) 和 113 ($C_4H_5N_2O_2$) 相關的中性損失或質量差異。圖 3 展示了 O-去烷基化與 N-去烷基化所產生的潛在碎片離子。

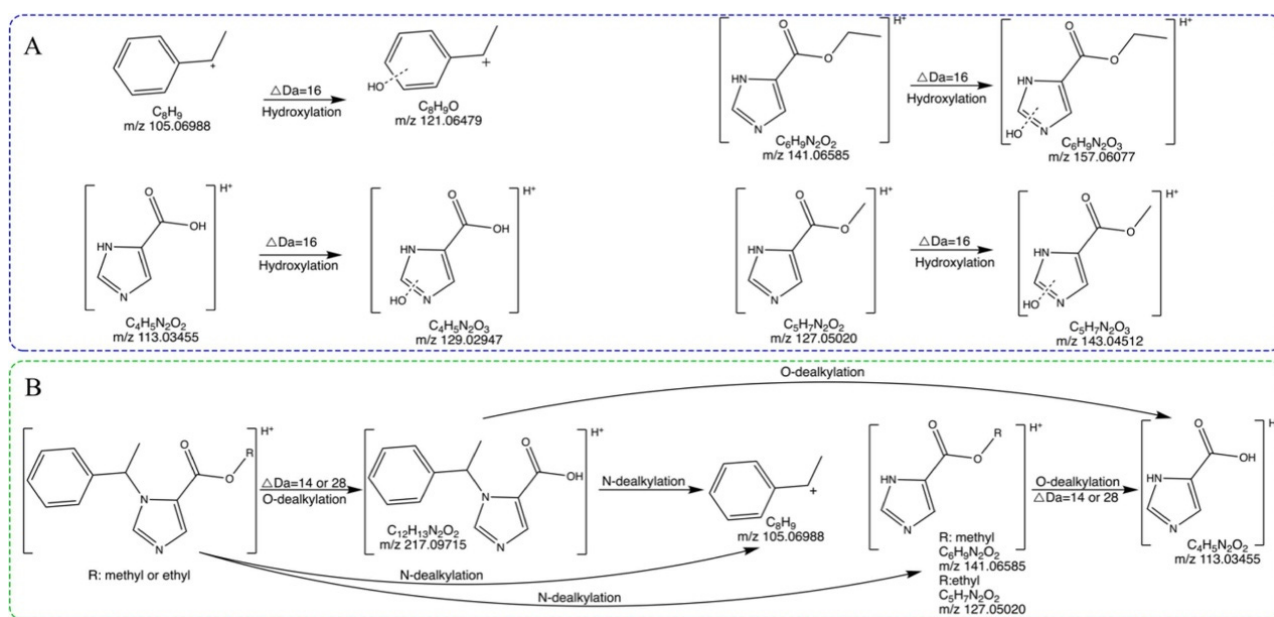


圖 3. 依據羥基化(A)與去烷基化(B)代謝途徑，預測依托咪酯可能生成之碎片離子，摘自參考文獻[40]

Zhong 等人的研究[40]利用三種代謝模型（HLMs、S9 fraction、斑馬魚），鑑定出共 14 種依托咪酯代謝物，其中 phase I 代謝物 8 種 (E1~6、E9、E10)、phase II 代謝物 6 種 (E7、E8、E11~14)（表 3；完整代謝途徑見圖 4）。

表 3. 14 種依托咪酯潛在代謝物[40]

代謝物	[M + H] ⁺ (m/z, 組成式)	關鍵碎片
E1	141.06563 (C ₆ H ₉ N ₂ O ₂ , -0.224)	113.03422、95.02372 表示 N- 去烷基化；95 來自去乙氧基
E2	243.11137 (C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂ , -0.092)	無 105.06988 而出現 103.05375，證實苯乙基去氫化
E3	261.12408 (C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₃ , 0.711)	157.06053、121.06443 證明單 羥基化（苯環）
E4	261.12982 (C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₃ , 0.583)	139.05003 顯示羥基位於與咪唑 相連之乙氧基
E5	277.11828 (C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄ , 0.634)	分子量 +32 Da，屬二羥基化； 119.04900 指苯環與乙基各添一 羥基
E6	217.08760 (C ₁₃ H ₁₃ NO ₂ , -0.166)	質量 -28 Da，為 O-去烷基化 (依托咪酯酸)；105.06950、 95.06037 特徵

代謝物	[M + H] ⁺ (m/z)	來源與結合型式	關鍵碎片
E7	421.15939 (C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₈ , 0.191)	原型藥 N-葡萄糖醛酸化	141.06554
E8	317.09671 (C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₈ , -0.009)	E1 N-葡萄糖醛酸化	113.03424 、 95.02377
E9	157.06077 (C ₆ H ₉ N ₂ O ₃ , 0.309)	E1 單羥基化 (酯鍵)	139.04994
E10	113.03410 (C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ , -0.454)	E1 O-去乙基化	95.02355
E11	393.12924 (C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₈ , -0.637)	E6 N-葡萄糖醛酸化	289.06659 、 105.06962
E12	437.15460 (C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₉ , -0.486)	E3 O-葡萄糖醛酸化	333.09174 、 105.06963 、 139.05002
E13	437.15460 (同上)	E4 N-葡萄糖醛酸化	297.09625 、 141.06555 、 113.03429
E14	127.04985 (C ₅ H ₆ N ₂ O ₂ , -0.354)	E10 O-甲基化 (+14 Da)	113.03406 、 95.02357

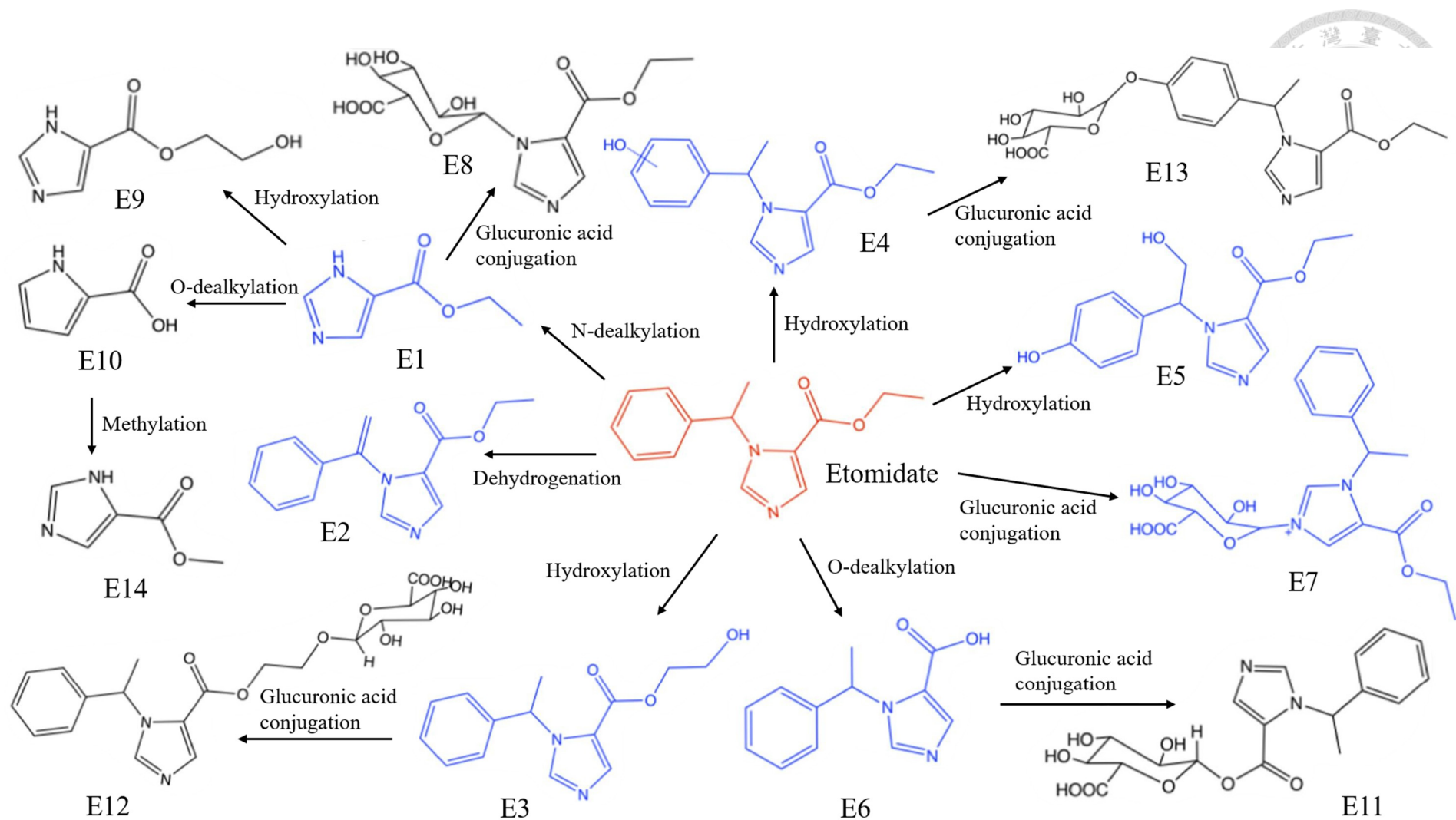


圖 4. 依托咪酯代謝路徑預測，摘自參考文獻[40]



1. N-去烷基化 (E1) 產生典型 m/z 141→113→95 序列，為後續 Phase II 代謝 (E8、E9、E10、E14) 的前驅物。
2. 苯乙基去氫化 (E2) 以 103.05375 取代 105.06988 作為判別特徵。
3. 羥基化：單羥基化 (+16 Da；E3/E4) 及二羥基化 (+32 Da；E5) 可藉 157.06053、121.06443、119.04900 等離子定位。
4. O-去烷基化 (E6) -28 Da，並在 m/z 105、95 處保留特徵峰，確認為 依托咪酯酸 (etomidate acid)。
5. 葡萄糖醛酸化 主要為 N-或 O-結合，觀測特徵為母體碎片 +176 Da；E12/E13 顯示同分異構之 N-/O-結合差異。
6. O-甲基化 (E14) 為 E10 再代謝產物，+14 Da 並保留 113→95 序列。

綜上所述，該研究首次系統性預測依托咪酯在多元生物／體外模型中的完整代謝譜，並透過高解析質譜鎖定關鍵離子（141／113／95 Da 等）以協助後續藥物動力學分析與法醫毒理學鑑定。



1.6 依托咪酯的現行檢測方法

近兩年由於喪屍煙彈氾濫，警政與臨床端對現場篩檢依托咪酯的需求急遽攀升，促使多款免疫層析式快速檢測試劑（Lateral-Flow Rapid Test Kits）及電子煙油專用「滴劑快篩」相繼問世，以下將分別介紹其優點及實際應用上的困境。

1.6.1 尿液／血清用免疫層析試紙

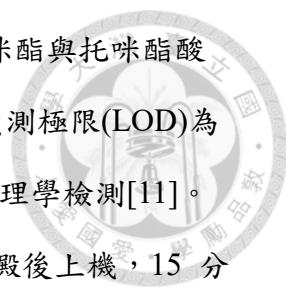
臨床常用的一次性尿液或血清試紙，係利用單株抗體與膠體金或螢光微球反應，優點為 10 至 15 分鐘即可進行結果判讀，非常適合急診室與路邊攔檢等需即時排除大量陰性樣本的場域[41]。然而，其限制為目前多以免或小鼠來源抗體製成，對 imidazole 類結構相近物（如美托咪酯）具交叉反應，且對樣本基質（高色素尿、含酒精電子煙液）干擾敏感，易出現偽陽性或偽陰性。法醫研究所正在評估以人源化抗體降低雜訊之第二代試紙。

1.6.2 電子煙油「滴劑快篩」——臺灣本土版本

若要篩查電子煙油，警政署與國家衛生研究院合作開發的滴劑快篩可在油質介質中直接顯色，整體流程約 5 分鐘。然而，所有快篩試劑的靈敏度都受限於較高的閾值（一般須達數百 ng/mL 才會呈現陽性），且抗體對結構相近的美托咪酯或其他 imidazole 類化合物仍有顯著交叉反應，易受樣本中香料、色素與尼古丁干擾而產生偽陽或偽陰性；因此，快篩只能作為預篩，陽性結果必須後送質譜實驗室確證[17]。

1.6.3 液相層析-串聯質譜（LC-MS/MS）

LC-MS/MS 是現行法醫與臨床的標準方法，普遍可在 10 分鐘內同時分離



定量依托咪酯，2019 年 Jung 等人率先在尿液中同步定量依托咪酯與托咪酯酸(etomidate-acid)，只需簡易蛋白沉澱，6.5 分鐘內完成分離，偵測極限(LOD)為 0.2 ng/mL，線性範圍至 1 μ g/mL，可直接應用於臨床及法醫毒理學檢測[11]。2021 年 Yum 等人將分析對象擴至血液，採乙腈一次蛋白質沉澱後上機，15 分鐘內完成定量，濃度範圍 1–500 ng/mL，並證實可同時偵測結構相近的美托咪酯，符合急診與司法毒物的時效需求[42]。2023 年 Han 等人使用 UPLC-MS/MS 於 6 分鐘內同時定量血液中依托咪酯與依托咪酯酸，LOD 0.05 ng/mL；其操作流程僅需簡易固相萃取，強調可支援第一線偵辦依托咪酯濫用案件[43]。2024 年 He 等人提出「一步前處理 + LC-MS/MS」尿液檢測策略，對依托咪酯與依托咪酯酸的定量精密度 < 6%，整體分析時間縮至 4 分鐘，且作者特別評估高糖、高鹽與多種藥物共存情境，顯示方法具高耐受性，適用於大量篩檢[27]。2025 年 Qian 等人開發的 3.8 分鐘 UPLC-MS/MS 方法，可在單一分析中分離定量依托咪酯及三種 imidazole 類類似物，最低偵測 0.1 ng/mL，並成功應用於電子煙油與血液樣本，顯示對「喪屍煙彈」案件具高度實用性[44]。LC-MS/MS 的弱點在於上機前處理較為繁複（固相萃取、蛋白沉澱等約需 30–45 分鐘）、設備與人員成本高，且難以在現場部署。

1.6.4 氣相層析-質譜 (GC-MS)

2000 年 Deng 等人利用傳統 GC-MS（電子撞擊模式）測定血漿中依托咪酯，並提出衍生化與離子片段機制，可作為低解析 GC-MS 辨識依托咪酯及其去酯水解產物的參考[45]。GC-MS 優勢為多數毒物實驗室已有儀器與其資料庫，成本較低；惟依托咪酯需要先用 BSTFA 衍生化才能進入管柱分析，操作時間長且酸性代謝物不易檢出，對快速確認案件樣本的靈敏度與效率均不如 LC-MS/MS。

1.6.5 高解析質譜 (HRMS)



若研究目的是研究未知代謝物或監測結構類似物，則需高解析質譜 (HRMS)。Quadrupole-Orbitrap 或 TOF 系統在 m/z 50–1000 的全掃描中可一次捕捉十餘種已知和未知代謝物，並能事後回溯分析新的「新興精神活性物質」訊號；最新研究便利用高解析質譜評估斑馬魚 (in vivo)、人類肝微粒體 HLMs (in vitro) 與人類尿液、毛髮樣本中依托咪酯及三種結構類似物 (metomidate、propoxate、isopropoxate) 的代謝概況，推測出 11 種依托咪酯代謝物，為法醫毒理的濫用監測提供碎片庫[46]。然而高解析質譜儀價格昂貴、資料處理複雜，若要定量仍需搭配 LC-MS/MS 校正，因此多在研究或高階法醫中心使用。



1.7 液相層析串聯式質譜儀原理

1.7.1 液相層析串聯式質譜儀之組成

液相層析質譜儀 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS)，目前應用性非常廣泛。層析部分主要利用液態動相 (mobile phase) 負載分析物進入分析管柱，再與靜相 (stationary phase) 產生不同的極性作用力達到分離效果。影響 LC 分析效能的主要因素有三：(1) 分析管柱 (analytical column) 通常選擇 C18 或 C8 之靜相材質進行分析，或依實驗樣品各別特性選擇其他特殊靜相，如 C30、phenyl 及 C4 等。(2) 液相層析流速 (LC flow-rate) 對結果影響也很大，流速的選擇通常配合分析管柱內徑。(3) 移動相及添加劑 (additive) 的選擇，對儀器的使用及壽命亦有非常之影響。

質譜部分最常使用的離子源為電噴灑游離 (electrospray ionization, ESI)，主要是將液態分析物轉成氣態帶電分子，再利用質量分析器分析荷質比 (m/z) 以了解分析物的分子量。最常見的質量分析器為四極柱質量分析器 (Quadrupole Analyzer) --- 由四個平行電極棒組成，上面加以 DC 及高頻率交流電，藉由調整 AC 的參數讓不同 m/z 的離子通過四極柱達到質量分析的功能，若將兩段四極柱質量分析器 Q1 & Q3 連結[47]，即為串聯式質譜儀 (見圖 5)，並且在中間有誘導碰撞解離區 Q2 (collision induced dissociation, CID) 能將分析物在此給予惰性氣體 (如氮氣、氬氣)，提供裂解能量並再利用第二段質譜儀掃描，所以能進一步得到分析物的特徵子離子 (product ion) 圖譜[48]。



1.7.2 串聯式質譜常見掃描模式

以三重四極桿為例，依 MS1（第一質量分析器）、CID（碰撞誘導解離）與 MS2（第二質量分析器）的工作方式，可區分四種掃描策略（詳見圖 6）

(a) 子離子掃描（Product-ion scan）：

MS1 固定單一母離子，經 CID 後 MS2 全掃描所有碎片；可用於確定分子碎裂圖譜、鑑定結構或選擇最具專一性的離子對。

(b) 母離子掃描（Precursor-ion scan）：

MS2 固定於特定產物離子，MS1 連續掃描；凡能產生該特定碎片的前驅離子皆被檢出。此模式常搜尋帶有共同特徵碎片（如磷脂類 m/z 184.1）的化合物族。

(c) 中性丟失掃描（Neutral-loss scan）：

MS1 與 MS2 同步掃描，但保持一固定的質量差 Δm （代表共同的中性分子損失），當母離子在 CID 後損失指定「中性碎片」時才被記錄。適合偵測在裂解時共同脫去 SO_3 、 H_2O 等中性基團的分子。

(d) 多重離子監測/多重反應監測（Multiple-ion monitoring；即 SRM/MRM）：

MS1、MS2 分別鎖定一對母/子離子對（可設定多組），只量測目標離子對，訊噪比（signal-to-noise ratio, S/N）與靈敏度最高，為臨床與法醫定量的標準模式。

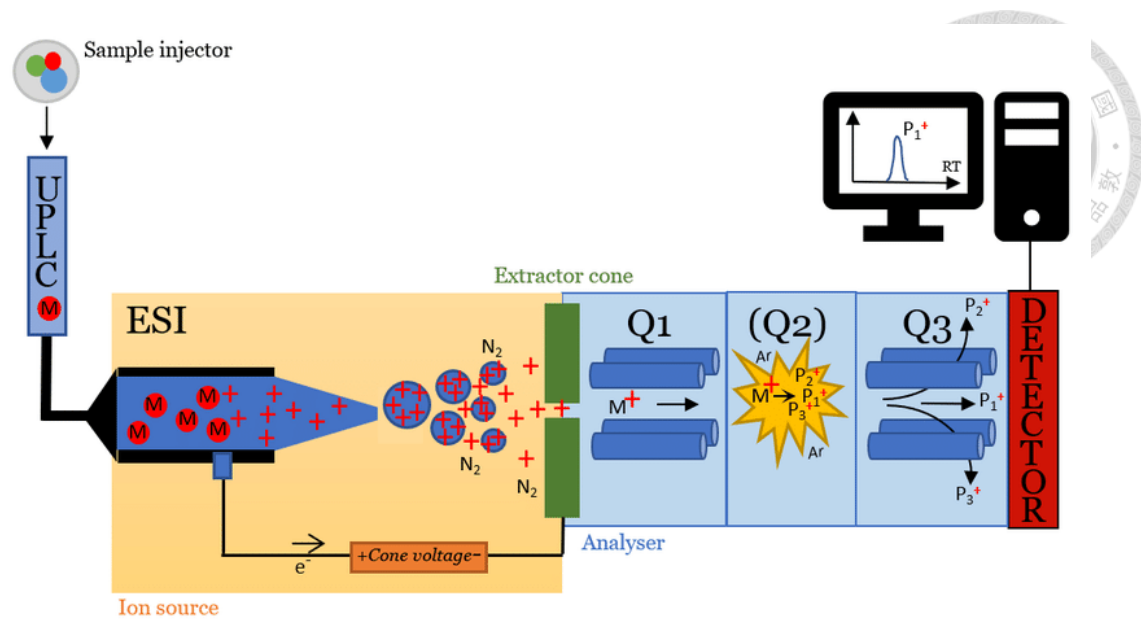


圖 5. 液相層析串聯式質譜儀組成示意圖，摘自參考文獻[49]

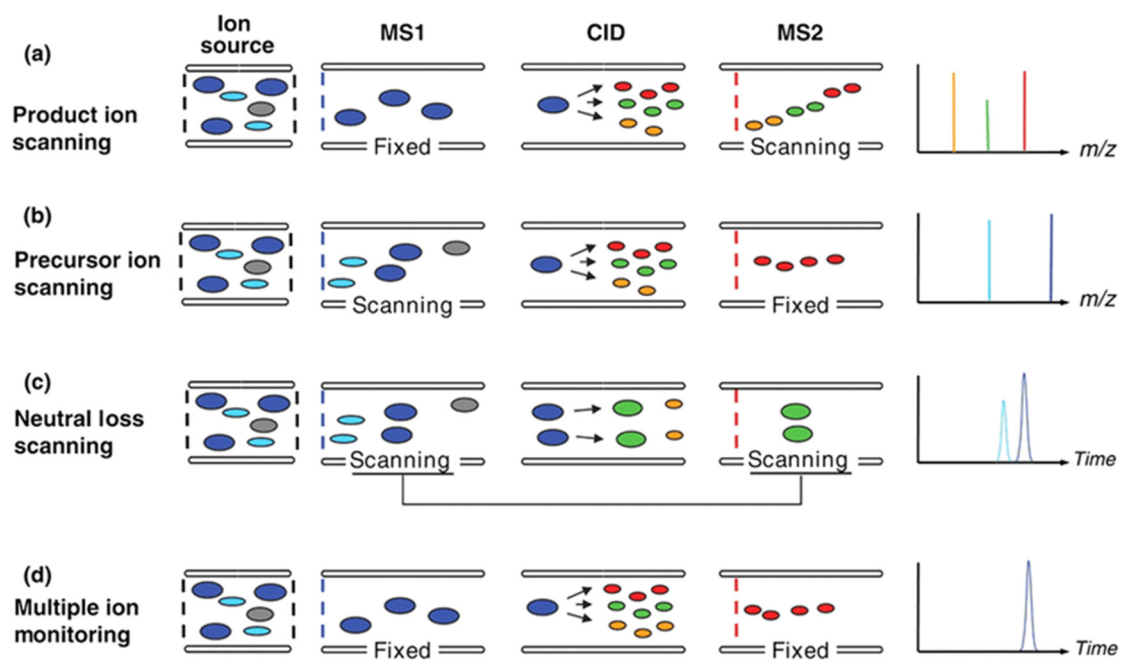
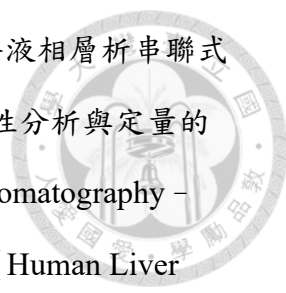


圖 6. 串聯式質譜的四種掃描模式示意圖，摘自參考文獻[50]



因電噴灑游離 (Electrospray Ionization, ESI) 的發展，使得液相層析串聯式質譜儀 (LC-MS/MS) 成為廣泛用於藥物代謝產物的鑑定、特性分析與定量的重要儀器[51]。本研究採用液相層析串聯式質譜儀 (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 結合人類肝臟微粒體 (Human Liver Microsomes, HLMs) 體外代謝模型，以模擬依托咪酯在人體肝臟中的第一級代謝過程。在體外代謝實驗部份，相較於既有文獻僅探討 0 至 2 小時的代謝情形[40, 46]，本研究將取樣時間延長至 0 至 168 小時，共設置 9 個時間點，以更全面地掌握代謝物隨時間變化的趨勢。在分析流程部份，首先透過全掃描模式 (Full Scan) 與選擇離子監測模式 (Selected Ion Monitoring, SIM) 比較實驗組與對照組之質譜圖譜，並結合已知的第一級代謝反應途徑推測潛在的代謝產物。隨後，利用產物離子掃描模式 (Product Ion Mode) 獲取目標代謝物的二次質譜圖譜，進一步解析其可能的碎裂途徑與結構特徵，藉此完成對代謝產物的鑑定與結構推測。此方法結合了 SIM 模式在目標母離子篩選上的高靈敏度與 Product Ion Mode 在結構解析上的選擇性，可在無高解析質譜儀的條件下，於複雜的生物基質中有效完成藥物代謝產物的篩選、鑑定與結構推測，並具備流程簡便、可重複性高及成本效益佳的優勢。

1.8 研究目的

原先在臨床用於鎮靜麻醉的依托咪酯(Etomidate)，在台灣的濫用情況日益受到重視。然而，目前對於依托咪酯的代謝產物研究仍相當有限[40, 46]，本研究首次運用液相層析串聯式質譜儀(LC-MS/MS)搭配人類肝微粒體(HLMs)體外代謝模型，全面鑑定依托咪酯第一級(Phase I)代謝產物，並挑選適合用於監測依托咪酯使用的特異性生物標誌。

本研究具體目標包含：

- (1) 以體外實驗方式生合成依托咪酯的第一級代謝產物。
- (2) 使用三重四極桿質譜儀 (triple quadrupole MS) 鑑定其第一級代謝產物，並評估代謝產物之代謝趨勢。
- (3) 找出除原型藥物以外適合作為監測依托咪酯濫用的特異性生物標誌。
- (4) 用產物離子掃描模式 (Product ion scan) 分析代謝產物二次質譜之圖譜，並解析其可能之碎裂機制。

第二章 實驗材料及分析方法



2.1 實驗材料

本研究所使用之藥品及溶劑，液相層析-質譜級 (LC-MS grade) 甲醇 (MeOH) 係購置於 DUKSAN PURE CHEMICALS (Ansan, Korea)、乙腈 (A) 係購置於 J. T. Baker® Chemical (Corporate Pkwy, PA, USA)。甲酸 (formic acid)、甲酸銨 (Ammonium formate)、0.5M 磷酸緩衝溶液 (2.5495g 磷酸鈉 + 3.5495g 磷酸二鈉溶於 50 mL 去離子水) 係購置於 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。超純水系統採用 MilliQ® Integral Water Purification (Darmstadt, Germany)。

本研究所使用之分析級標準品，依托咪酯 (Etomidate) 係購置於 Cerilliant (Austin, TX, USA)。人類肝微粒體 (HLM) 購自 Corning® Gentest™ (Corning, NY, USA)。NADPH Regenerating System Solution A (26 mM NADP⁺、66 mM 葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 與 66 mM 氯化鎂 (MgCl₂)，以去離子水配製) 以及 NADPH Regenerating System Solution B (40 U mL⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸去氫酶 (G-6-PDH)，溶於 5 mM 檸檬酸鈉緩衝液) 皆購自 Corning® Gentest™ (Corning, NY, USA)。



2.2 樣品製備

2.2.1 第一級代謝反應(Phase I reaction)

本研究之反應流程經由原廠建議進行調整。用以分析第一級代謝物之孵育反應於 37 °C 下進行，條件為混合 1 mg/mL 的人類肝微粒體 50 μ L、NADPH 再生系統 B 液 10 μ L，以及 0.5 M 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.4) 200 μ L，並以蒸餾水補足至總體積 1 mL。濃度為 1 mg/mL 的 依托咪酯(Etomidate) 先溶於 50% 甲醇中。經由 MiVac 濃縮儀 (GeneVac，英國) 乾燥去除有機溶劑後，將依托咪酯直接加入反應混合液中，最終濃度為 500 μ M。

反應透過加入 NADPH 再生系統 A 液 50 μ L 啟動，並於 37 °C、150 rpm 下使用 Orbital shaker incubator (S300S 型號，FIRSTEK，台灣台北) 進行振盪孵育，收取反應 0, 1, 4, 8, 12, 24, 72, 144, 168 小時的產物，共 9 個時間點且三重複。反應終止方式為加入三倍體積之冰冷乙腈，並置於 -20 °C 冷藏至少 30 分鐘以充分沉澱蛋白質。之後以 15000 $\times$ g、4 °C 離心 30 分鐘以去除沉澱之蛋白質。收集上清液後，儲存於 -20 °C 直至分析使用。

陰性對照組之製備與上述流程相同，但不加入依托咪酯或是人類肝微粒體。

2.2.2 依托咪酯質譜參數最佳化(Infusion)

以 50 % 甲醇 將注射系統清洗後，配置 100 ng/mL、含 0.1 % 甲酸的依托咪酯並上機；系統連線時在 Hardware Configuration 選 Mass only 並啟動 profile。接著進行 Q1 掃描尋找前驅離子 (預設 DP 50、EP 10)，待 TIC 平穩後擷取資料。鎖定前驅離子後，以 Edit Ramp 調整 DP (由大至小縮範圍) 找出訊號最強值，再固定 DP 掃描 EP 以尋優。完成 Q1 最佳化後切換

Product Ion (MS^2) 模式，逐步提高 CE 以偵測產物離子，記錄具代表性的 Q3。隨即在 MRM 模式下固定 DP/EP，掃描 CE 取得各轉換對的最佳碰撞能；再以 Edit Ramp 優化 CXP，確定產物離子離開碰撞池時的最佳能量。最後，把所有參數 (Q1、DP、EP、Q3、CE、CXP) 填入 MRM 表格進行一次總確認，存檔後停止注射，並以 50 % MeOH 徹底清洗系統，使儀器回到待機狀態。整體流程即可完成 Infusion 條件的快速優化與方法建立。

2.2.3 未知的代謝物鑑定與代謝時間軸建立

取各 400 μ L 之 8 小時一級代謝產物以及其兩組陰性對照組，使用迴旋濃縮儀抽乾，再以 200 μ L 10% 甲醇回溶後進質譜分析，以 Q1 scan 以及 Q1 SIM Mode 針對可能之一級代謝物進行掃描，候選代謝物再進一步使用 product ion mode 在 CE 5, 10, 15, 20, 50, 80 下分析其子離子，並找出各代謝物隨時間變化之趨勢。



2.3 實驗儀器與設定

2.3.1 液相層析質譜儀

本研究採用 SCIEX 之 Triple Quad™ 4000 三重四極桿質譜儀，串聯 Waters ACQUITY 液相層析系統，以分析依托咪酯及其代謝物。離子化採 Turbo V 電噴灑源，操作條件為 curtain gas 10 psi、nebulizer gas 25 psi、heating gas 25 psi，噴灑電壓 4.5 kV，源溫 500 °C。層析管柱使用 Thermo Hypersil GOLD™ (50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)。每次進樣體積為 15 μL，流動相 A (水相) 為 5mM 甲酸胺溶於 10% 甲醇，流動相 B (有機相) 為 5mM 甲酸胺溶於 90% 甲醇，梯度條件詳列於表 4。訊號擷取與資料處理皆使用 SCIEX Analyst® 1.6.2 軟體，定量分析亦適用於同一軟體。

表 4. 層析條件與梯度

層析總時長(min)	流速(μL/min)	流動相 A(%)	流動相 B(%)
0	200	100	0
10	200	0	100
13	200	0	100
13.5	200	100	0
18	200	100	0

第三章 結果與討論



3.1 依托咪酯質譜參數最佳化(Infusion)結果

為了優化質譜儀的分析參數，將依托咪酯和其第一級代謝產物的濃度分別配製成 100 ng/mL (溶於 50% 甲醇)，接著透過注射器將分析物直接注入質譜儀進行分析。依托咪酯和其第一級代謝產物的多重反應監測模式(MRM)離子對(Transitions)以及各參數設定，詳見表 5，層析圖與滯留時間詳見圖 7。

表 5. 依托咪酯質譜參數最佳化結果

化合物 (正電模式)	滯留時間 (min)	離子對	DP	EP	CE	CXP
依托咪酯	8.19	245→141	38	5	14	7
		245→95	38	5	33	4
		245→105	38	5	29	5
依托咪酯代謝物	3.83	217→113	33	4	13	11
		217→105	33	4	30	20
		217→95	33	4	28	9

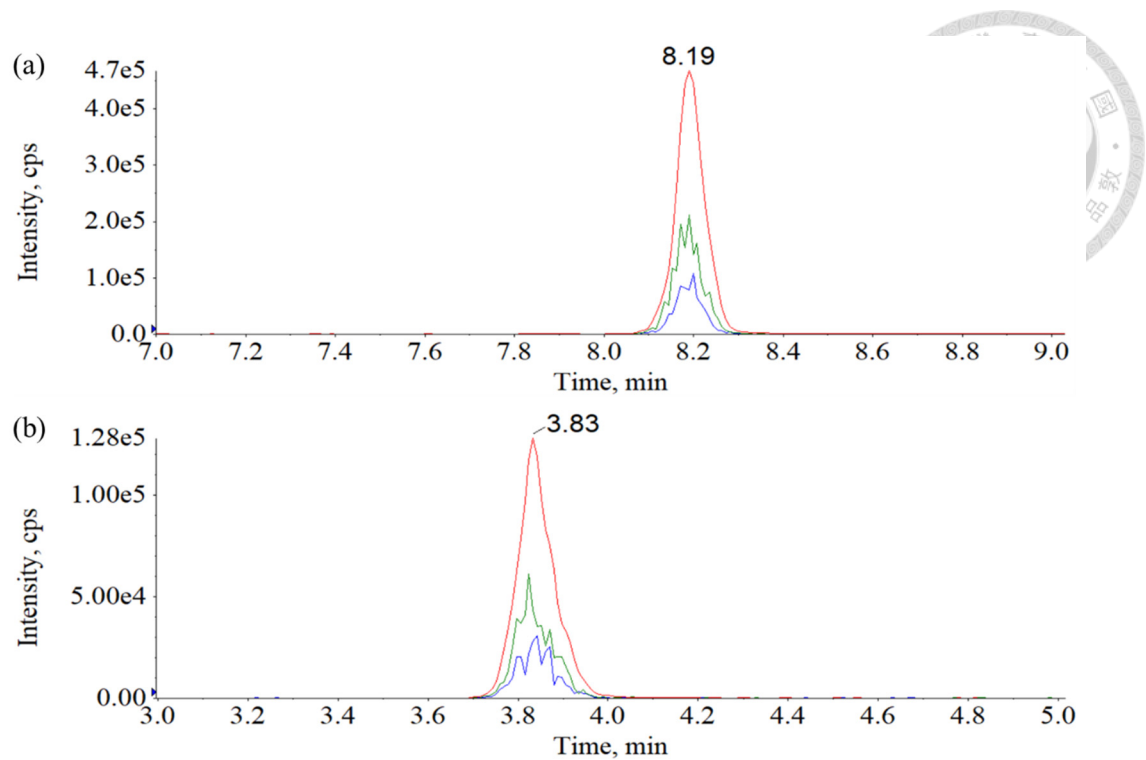


圖 7. 層析圖 (a) 10 ng/mL 依托咪酯 (滯留時間: 8.19 min; 紅線: m/z 245→141, 綠線: m/z 245→95, 藍線: m/z 245→105) 及 (b) 第一級主要代謝物 (滯留時間: 3.83 min; 紅線: m/z 217→113, 綠線: m/z 217→105, 藍線: m/z 217→95)



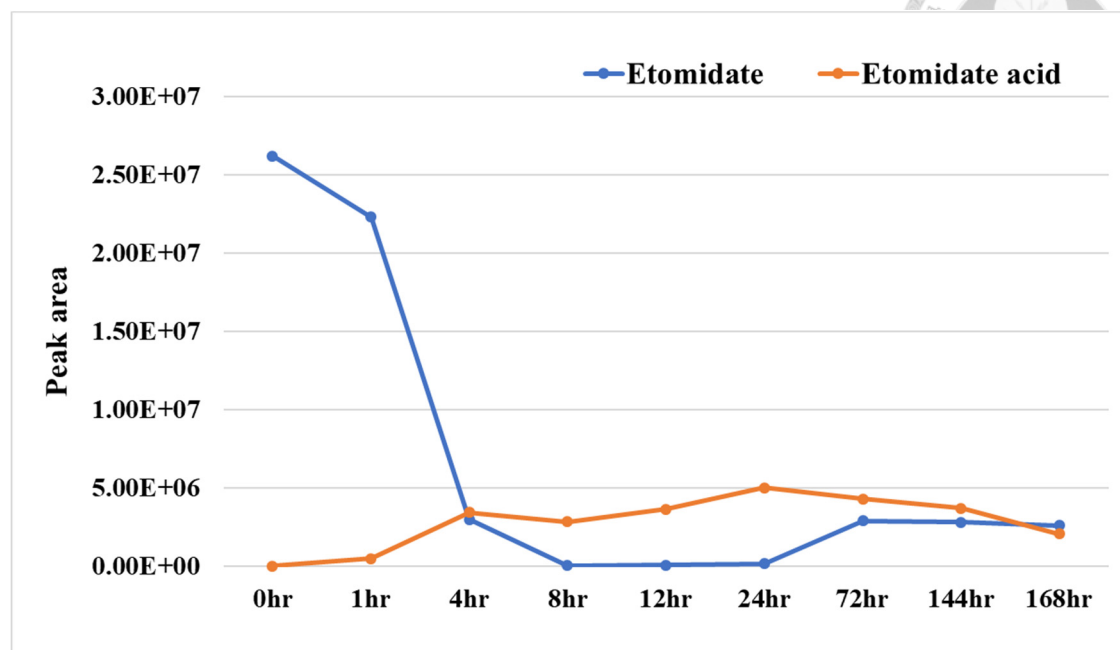
3.2 依托咪酯代謝時間趨勢

依托咪酯與其代謝物於不同時間點(0 小時至 168 小時)的訊號強度(peak area)變化，詳見圖 8。

由圖 8 (a)可得知依托咪酯酸於反應 4 小時後訊號強度開始較依托咪酯大，且於 24 小時訊號強度達到最大值。由此推測，依托咪酯酸可作為依托咪酯暴露 4 小時後的監測指標。此外，由此圖的結果也可推測依托咪酯半衰期大約落在反應 1-4 小時之間，與 Forman 等人於 2011 年報導的終末半衰期 2-5 小時[3]，以及 Valk 等人於 2021 年回顧指出在健康受試者中的終末半衰期為 2.9- 5.5 小時[52]相符。

由圖 8 (b)可得知在所有潛在代謝物中，E6 (即依托咪酯酸)暴露 1 小時即可偵測，4 小時躍升至約 2.4×10^8 ，12 小時達最高峰 ($\approx 3.0 \times 10^8$)，之後雖稍有波動，但至 168 小時仍保持最高訊號。其快速生成並長時間維持，顯示 E6 為依托咪酯最主要且最穩定的 Phase I 代謝物，可作為後續體內動態追蹤與濫用監測的首選生物標誌。

(a)



(b)

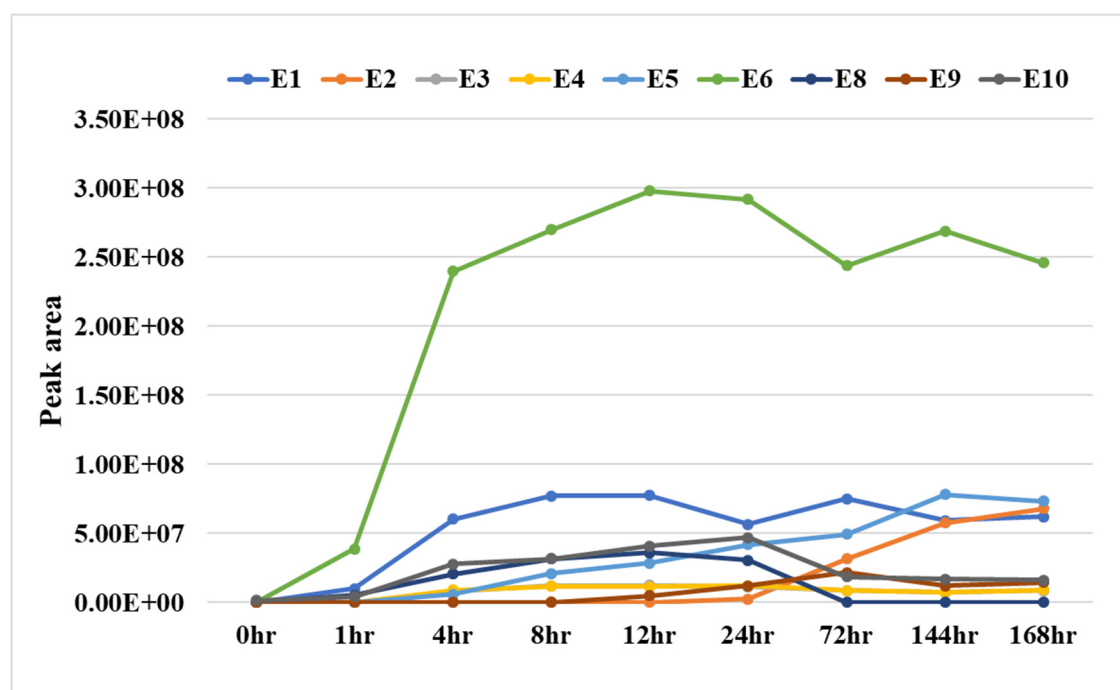


圖 8. 依托咪酯及其代謝物隨時間變化趨勢 (a)多重反應監測模式(MRM)下依托咪酯及依托咪酯酸隨時間變化趨勢 (b)子離子掃描模式(product ion scan)下各代謝物隨時間變化趨勢

3.3 以選擇性離子監測(SIM)模式尋找各潛在代謝物之母離子(Precursor ion)

由於選擇離子監測模式 (Selected Ion Monitoring, SIM mode) 僅針對特定 m/z 進行監測，有效排除非目標背景雜訊，顯著提升目標物的偵測選擇性與靈敏度，適用於低濃度代謝物的定性與半定量分析。14 項依托咪酯潛在代謝產物之代謝數據整理與分析統整於表 6。

圖 9 至圖 20 為以 SIM mode 偵測依托咪酯潛在代謝物 E1 至 E14 之母離子所得之層析圖，藍線皆為實驗組，即依托咪酯與 HLM 反應 8 小時的產物，紅線皆為陰性對照組 (negative control)，即未添加依托咪酯之樣品，僅添加 HLM。

圖 9 中，藍線於滯留時間約 3.28 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E1 (m/z 141) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E1 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 10 中，藍線在滯留時間約 8.97 分鐘處出現明顯且對稱的訊號峰，推測 E2 (m/z 243) 代謝物的生成。相對地，紅線在相同滯留時間未觀察到明顯峰值，進一步確認該訊號為代謝反應所特有。

圖 11 中，E3 與 E4 皆為單羥基化代謝物，其結構差異可能導致滯留時間略有重疊。藍線在滯留時間約 9.05 分鐘觀察到明顯訊號峰，推測 E3 與 E4 (m/z 261) 代謝產物的生成，而紅線在相同滯留時間無明顯訊號，確認該 m/z 261 訊號為代謝反應所特有，並非源自背景雜訊。

圖 12 中，藍線於滯留時間約 7.76 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E5 (m/z 277) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E5 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 13 中，藍線於滯留時間約 3.82 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E6 (m/z 217) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E6 為代

謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 14 中，藍線於滯留時間約 10.73 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E7 (m/z 421) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E7 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 15 中，藍線於滯留時間約 9.90 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E8 (m/z 317) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間處訊號顯著較小，確認 E8 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 16 中，藍線於滯留時間約 2.83 與 6.56 分鐘處皆出現明顯訊號峰，推測 E9 (m/z 157) 代謝物的生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E9 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 17 中，藍線於滯留時間約 3.81 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E10 (m/z 113) 生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E10 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。E10 為咪唑環裂解後之氧化產物，其生成代表依托咪酯可能經由深度代謝途徑產生小分子極性代謝物。

圖 18 中，藍線於滯留時間約 11.09 分鐘處出現明顯且尖銳的訊號峰，推測 E11 (m/z 393) 生成。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E11 為代謝反應特有產物，非由背景雜訊所致。

圖 19 中，藍線於滯留時間約 9.11、9.33 及 9.66 分鐘處皆出現明顯訊號峰，推測分別為 E12 與 E13 (m/z 437) 之代謝產物。紅線在相同滯留時間無顯著訊號，確認 E12 與 E13 為代謝反應所特有產物，非由背景雜訊所致。

值得注意的是，E7、E8 以及 E11~13 為葡萄糖醛酸共軛 (glucuronide conjugate) 的代謝物，屬於 Phase II 產物，顯示即使在 HLM 中仍可產生有限程度之葡萄糖醛酸化反應。然而，雖 HLM 中 UGTs 存在，但若未額外添加 UDP-glucuronic acid (UDPGA) 這類輔酶，反應效率會偏低。因此，在 HLM 中偵測到 E7、E8 以及 E11~13 訊號，可能也是由於反應時間足夠長或是分析靈敏度高

(如 SIM 模式)使其可偵測到低量產物。

圖 20 中，藍線與紅線在整體層析圖中無顯著差異，顯示在本實驗中，於 SIM 模式下並未觀察到 E14 (m/z 127) 之明顯訊號，顯示 E14 未於本實驗條件下產生或其濃度低於偵測極限。E14 推測為 E10 經甲基化形成之 phase II 代謝產物，可能因 HLM 中缺乏足夠的甲基轉移酶活性，或缺乏輔酶 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 而未生成。後續研究可考慮添加 SAM 輔酶或改用含甲基轉移酶的系統進行確認。





表 6. 14 項依托咪酯潛在代謝產物之代謝數據整理與分析

代謝物	代謝路徑	滯留時間(min)	化學式	[M+H] ⁺ 離子
E1	N-去烷基化	3.28	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂	141
E2	去氫化	8.97	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	243
E3	羥基化	9.05	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₃	261
E4	羥基化	9.05	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	261
E5	羥基化	7.76	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	277
E6	O-去烷基化	3.82	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂	217
E7	N-葡萄糖醛酸化	-	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₈	421
E8	N-去烷基化、 N-葡萄糖醛酸化	-	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₈	317
E9	N-去烷基化、 羥基化	0.90	C ₆ H ₈ N ₂ O ₃	157
E10	N-去烷基化、 O-去烷基化	3.81	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	113
E11	O-去烷基化、 O-葡萄糖醛酸化	-	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₈	393
E12	羥基化、 O-葡萄糖醛酸化	-	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₉	437
E13	羥基化、 O-葡萄糖醛酸化	-	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₉	437
E14	去烷基化、 甲基化	-	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	127

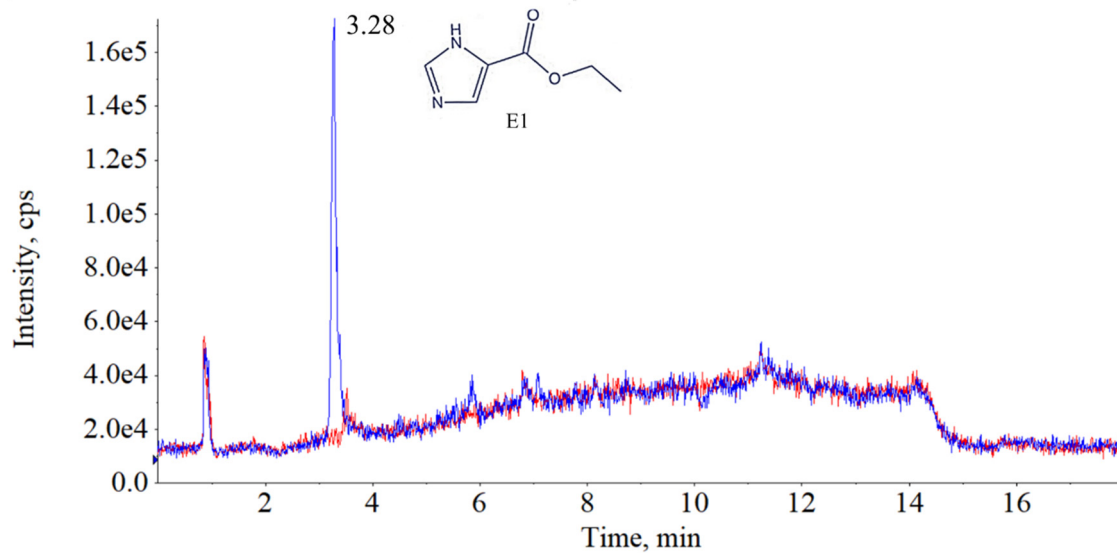


圖 9. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E1 (m/z 141)

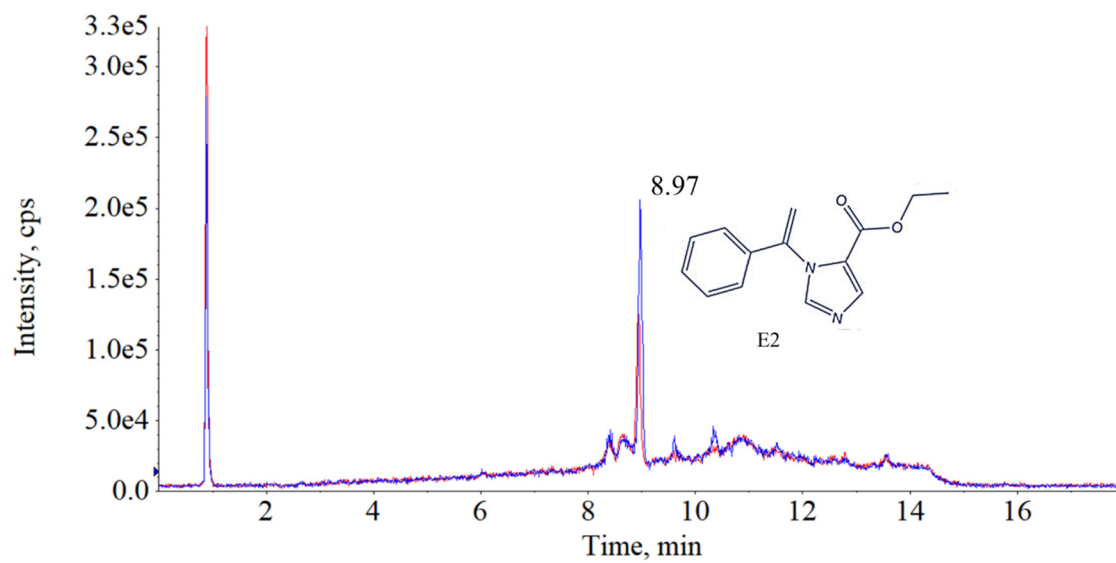


圖 10. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E2 (m/z 243)

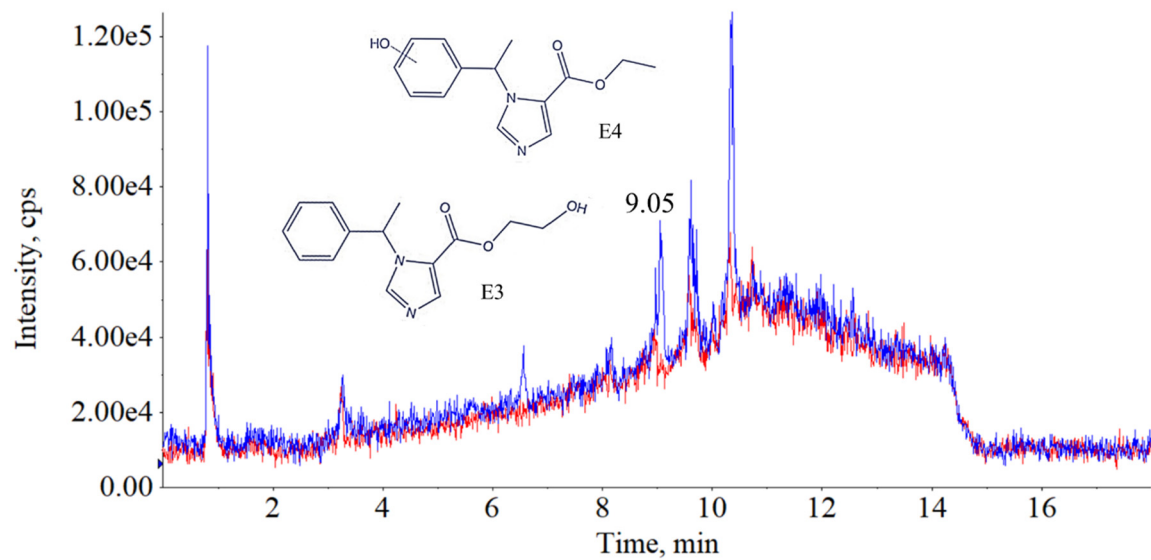


圖 11. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E3、E4 (m/z 261)

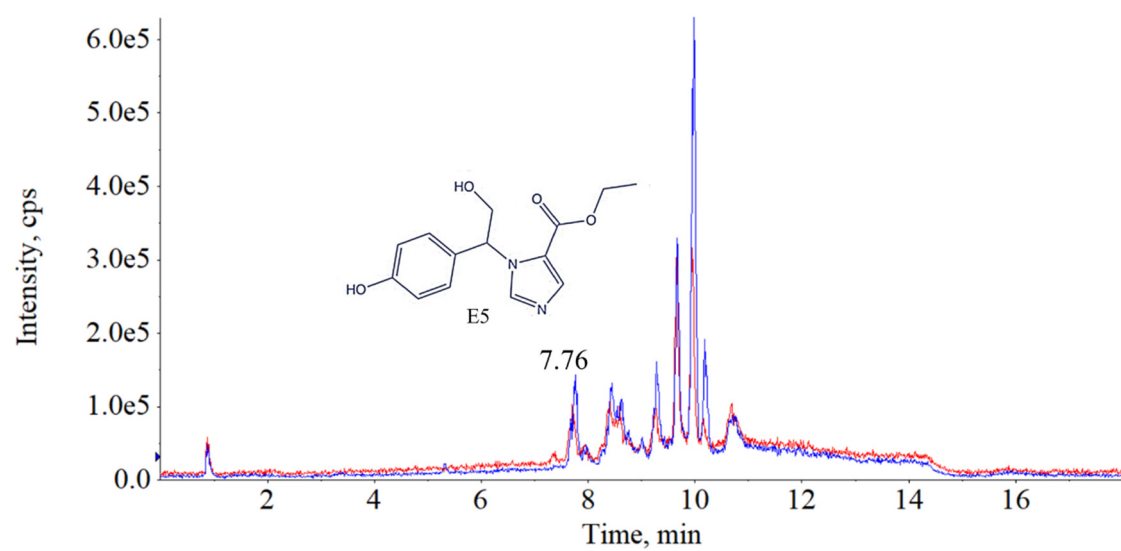


圖 12. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E5 (m/z 277)

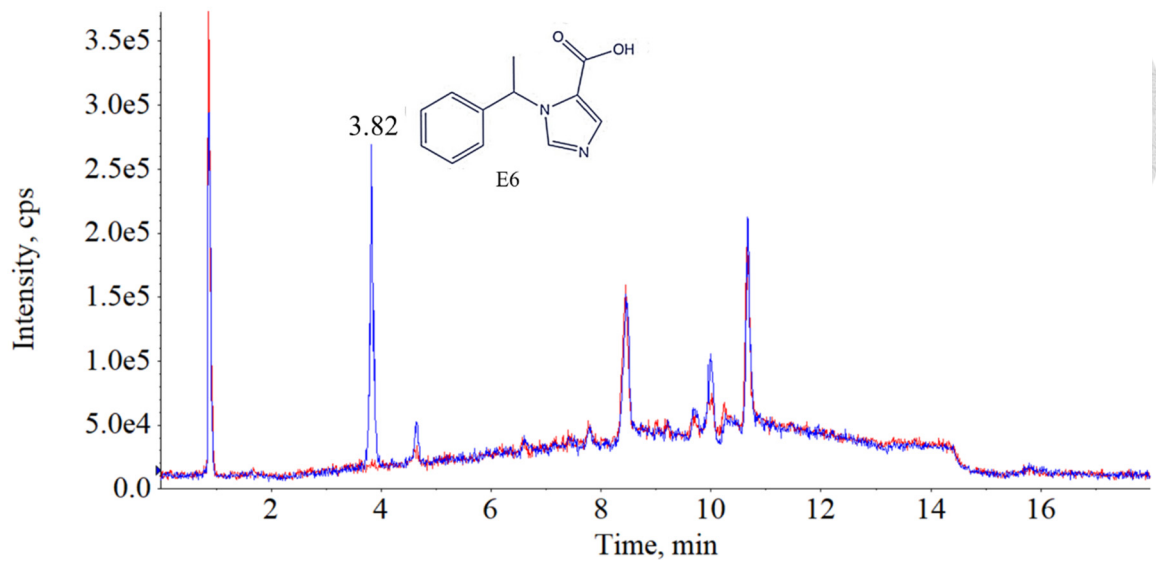


圖 13. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E6 (m/z 217)

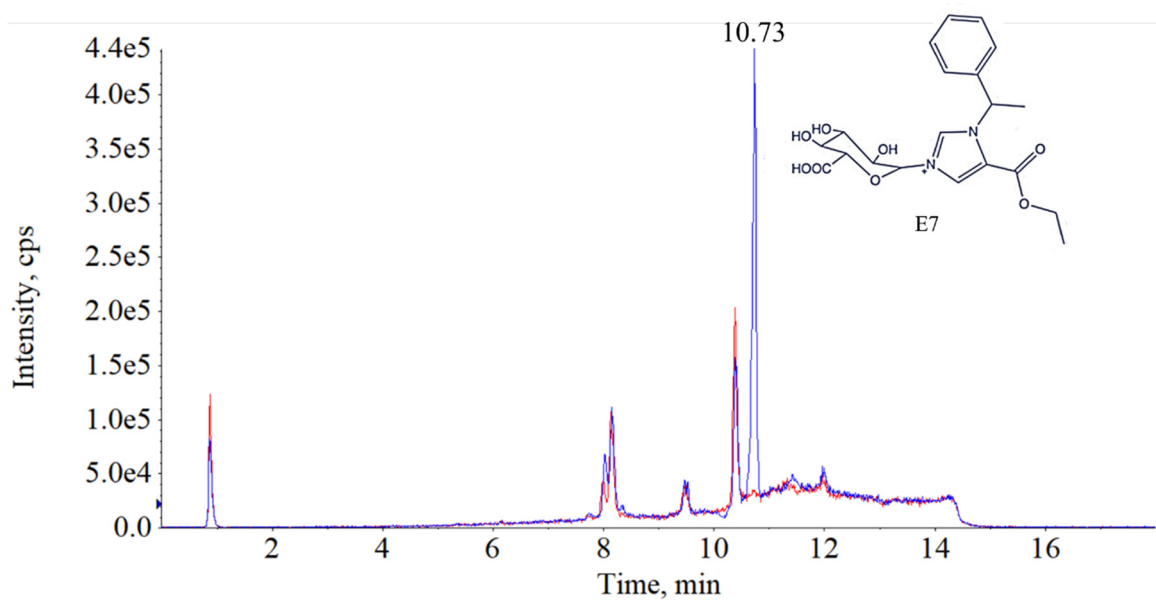


圖 14. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E7 (m/z 421)

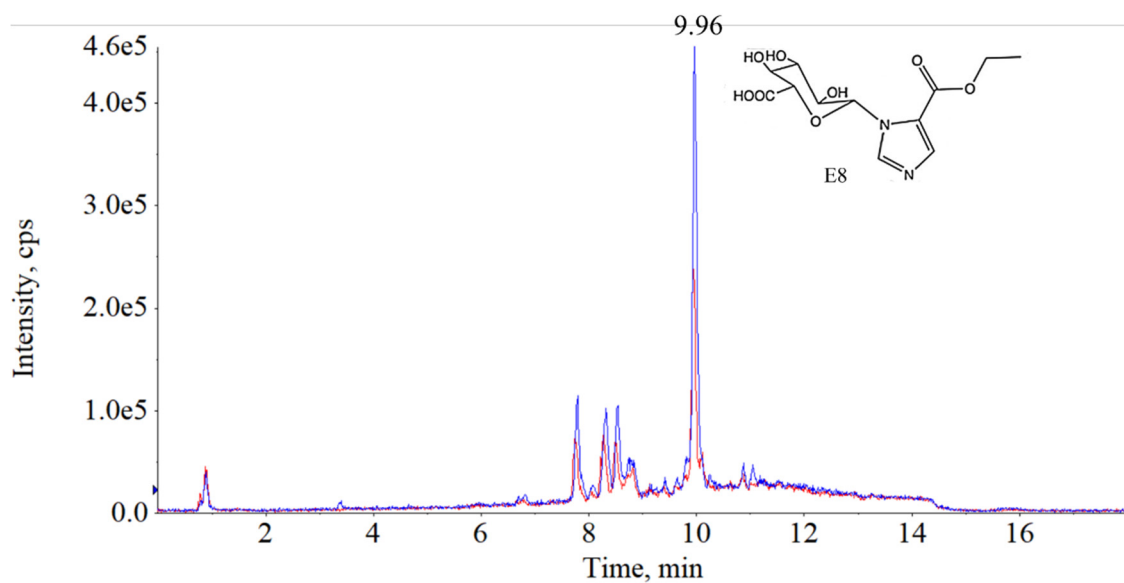


圖 15. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E8 (m/z 317)

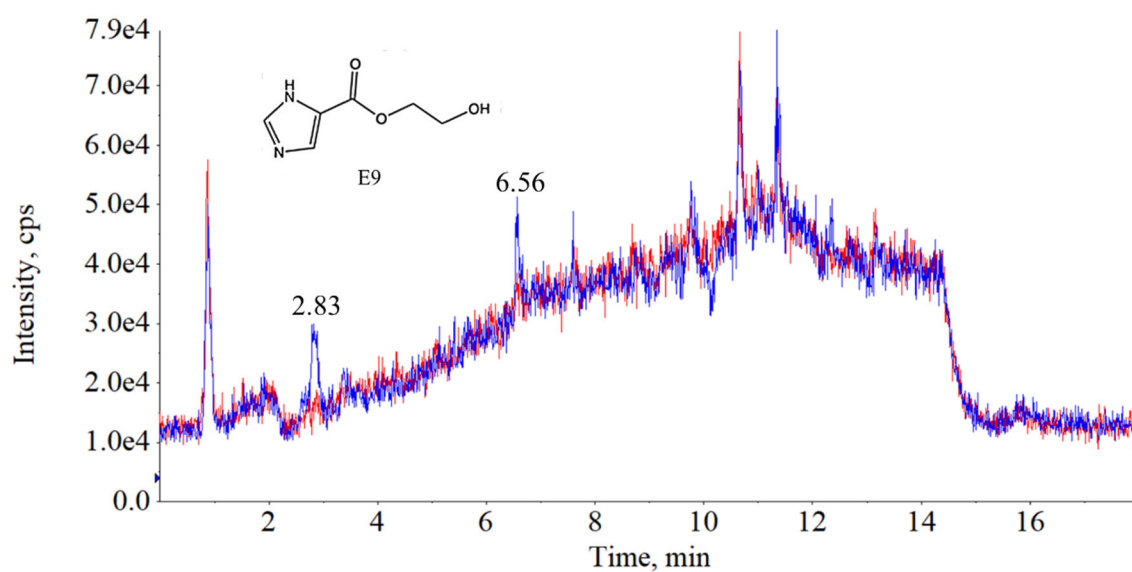


圖 16. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E9 (m/z 157)

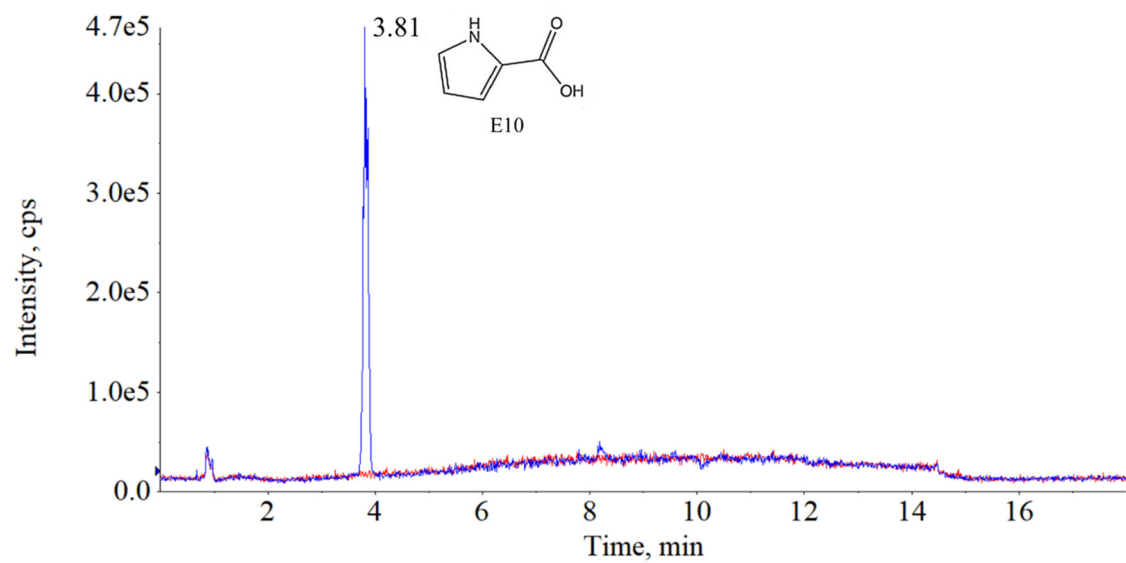


圖 17. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E10 (m/z 113)

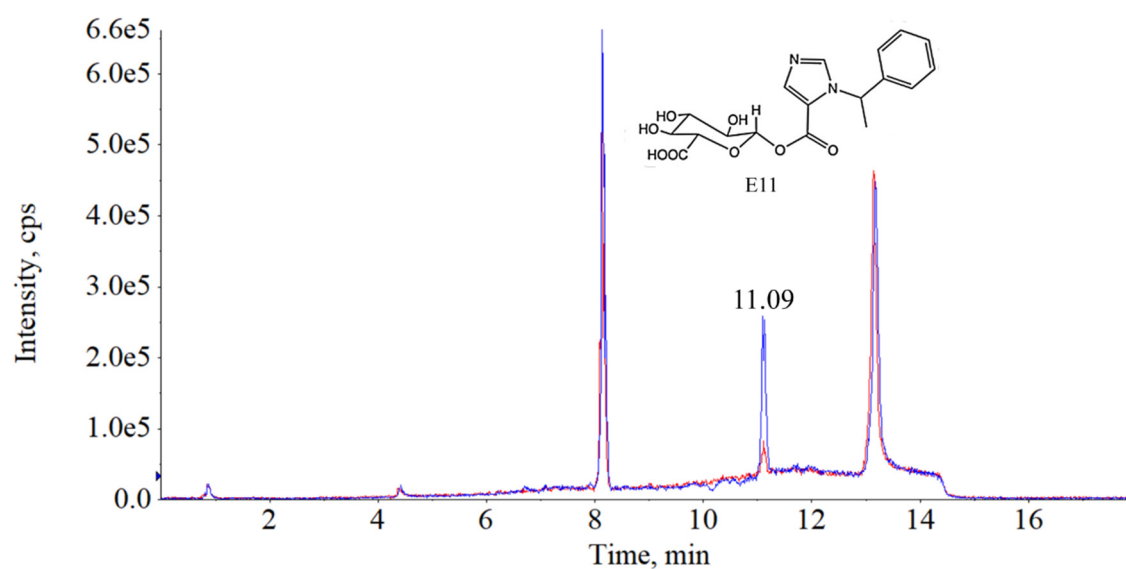


圖 18. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E11 (m/z 393)

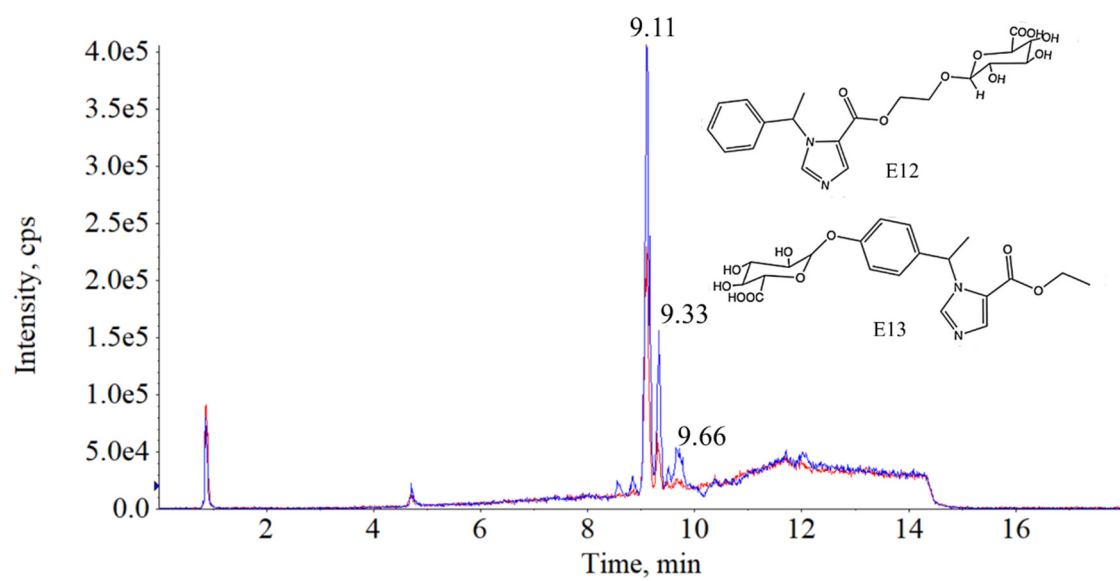


圖 19. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E12、E13 (m/z 437)

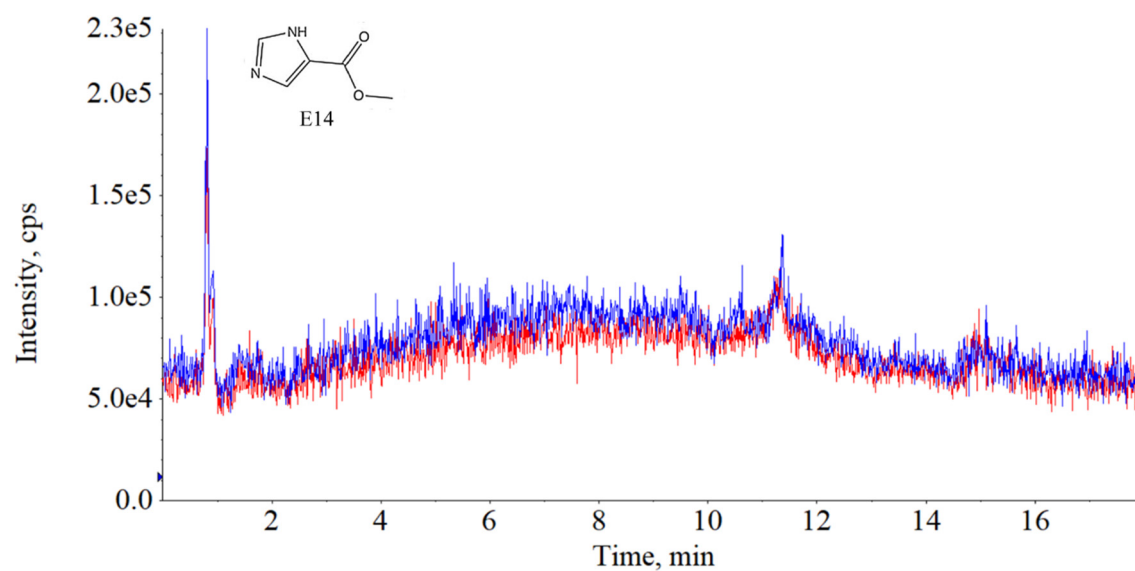


圖 20. 選擇性離子監測 (SIM) 模式下 E14 (m/z 127)

3.4 以產物離子掃描模式 (product ion mode) 鑑定各代謝物之二次質譜

為確認 Q1 SIM 模式下所觀察到的 m/z 訊號確實為依托咪酯之代謝產物，本研究進一步採用產物離子掃描模式 (product ion mode) 進行分析。透過選定 SIM 模式下所偵測之前驅離子 (precursor ion) 進行碰撞誘導解離 (collision-induced dissociation, CID)，獲得其特徵性片段離子圖譜。經由 MS/MS 資料比對碎裂離子組成與結構特徵，成功驗證各代謝產物之化學結構，進一步提高定性結果之正確性與可信度。此方式對於代謝物鑑定尤為關鍵，特別是在無標準品輔助之情況下，可提供結構推測與生物轉化機制之有力佐證。

本研究監測體外代謝模型中 14 項依托咪酯的潛在代謝物，包括 8 個 phase I 代謝產物及 6 個 phase II 代謝產物 (如表 6 所示)。各代謝產物的產物離子質譜圖及片段裂解途徑詳見圖 21 至圖 41，14 項代謝產物之代謝途徑詳見圖 4。

代謝產物 E1 的 $[M+H]^+$ 離子 m/z 為 141 ($C_6H_9N_2O_2$)，可推測原型藥發生 N-去烷基化。其碎片離子 m/z 113 ($C_4H_5N_2O_2$) 來自乙基基團的消除；碎片離子 m/z 95 ($C_4H_3N_2O$) 則由乙氧基 (ethoxy) 脫離所形成 (圖 23)。

代謝產物 E2 的 $[M+H]^+$ 離子 m/z 為 243 ($C_{14}H_{14}N_2O_2$)，顯示發生脫氫 (dehydrogenation) 反應。由於未觀察到 m/z 105，推測脫氫發生在苯乙基 (phenethyl) 基團上，該現象亦可透過其他主要片段離子 m/z 225、179 及 95 ($C_4H_3N_2O$) 進一步確認 (圖 26)。

代謝產物 E3 及 E4 在 Zhong 等人的研究[40]中，於全掃描模式下皆觀察到 $[M+H]^+$ 離子約為 m/z 261 ($C_{14}H_{17}N_2O_3$ ，261.12408 與 261.12982， Δ ppm 分別為

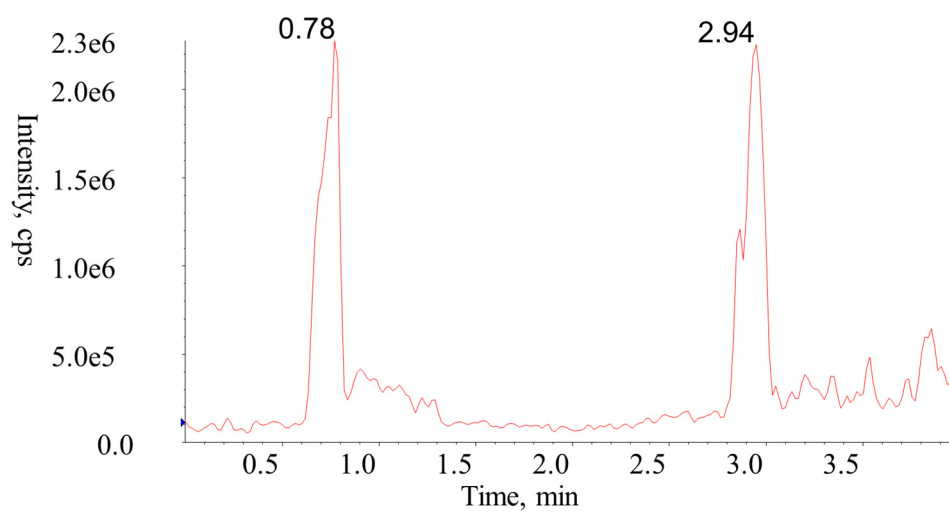
0.711 及 0.583)，表明發生了單羥基化 (monohydroxylation)。產物離子譜中觀察到 m/z 157 ($C_6H_9N_2O_3$) 與 121 (C_8H_9O) 之片段離子。與原型藥所得的兩個片段離子 m/z 141 及 105 相比，增加的 16 Da 顯示苯環與咪唑環各別發生羥基化反應。E3 的羥基化位置可依據片段離子 m/z 113 ($C_6H_7N_2O_2$) 與 95 ($C_4H_3N_2O$) 來判斷；E4 則因觀察到片段離子 m/z 139 ($C_6H_7N_2O_2$)，證實羥基化發生在咪唑環上連接的乙氧基 (ethoxy) 處。

代謝產物 E5 的 $[M+H]^+$ 離子 m/z 為 277 ($C_{14}H_{16}N_2O_4$)，較原型藥增加 32 Da，推測發生了雙羥基化 (dihydroxylation)。E5 裂解過程中產生片段離子 m/z 259，表明兩個羥基皆位於苯環上 (圖 32)。另外兩個片段離子 m/z 135、及 121 的出現，也支持羥基化反應皆發生在苯環上。

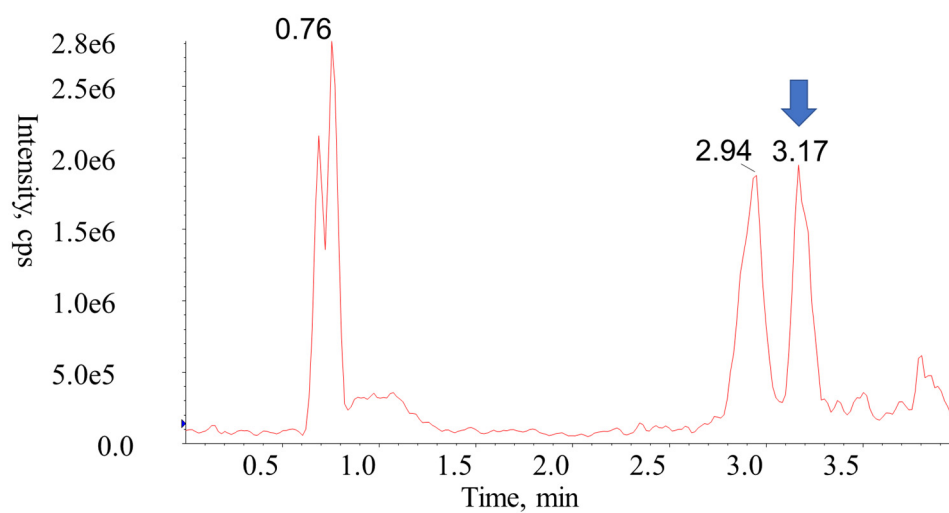
代謝產物 E6 的 $[M+H]^+$ 離子 m/z 為 217 ($C_{13}H_{13}NO_2$)，較原型藥降低 28 Da (圖 35)，顯示發生了 O-去烷基化 (去乙基化) 反應。此代謝產物未出現 m/z 141 ($C_6H_9N_2O_2$) 片段，且出現 113 ($C_4H_5N_2O_2$)、 m/z 105 (C_8H_9) 與 95 ($C_4H_3N_2O$) 表明依托咪酯酸 (etomidate acid) 的形成是由於酯鏈部分發生了 28 Da 的中性損失所致。

E9 與 E10 分別呈現 $[M+H]^+$ 離子於 m/z 157 ($C_6H_9N_2O_3$) 與 m/z 113 ($C_4H_4N_2O_2$)，對應於 E1 之單一羥基化 (monohydroxylation) 及 O-去乙基化 (O-deethylation) 代謝產物。E9 之產物離子圖中可觀察到 m/z 139 ($C_6H_7N_2O_2$) 之片段，推測其羥基化反應發生於酯鏈部位 (圖 38)。同樣的，E10 中出現 m/z 95 ($C_4H_3N_2O$) 之特徵片段，支持其代謝途徑為 O-去乙基化反應 (圖 41)。

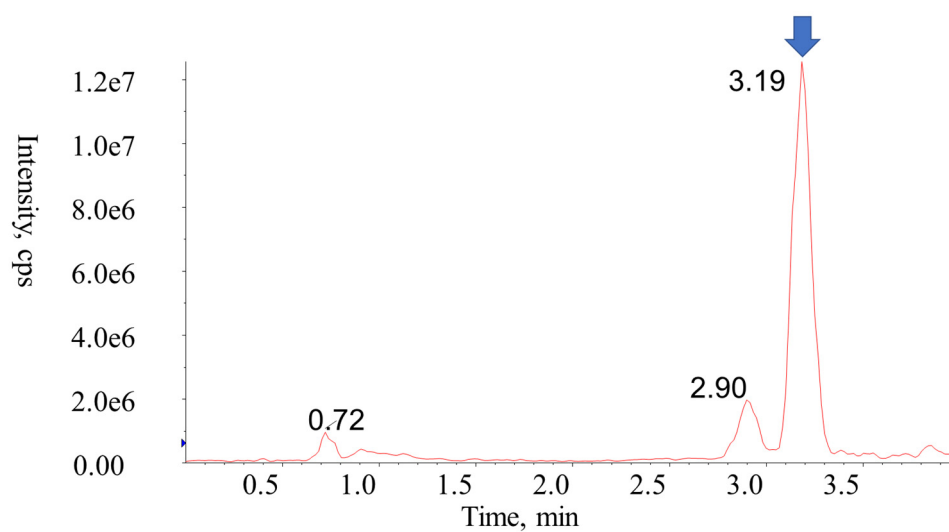
(a) m/z 141 (0hr)



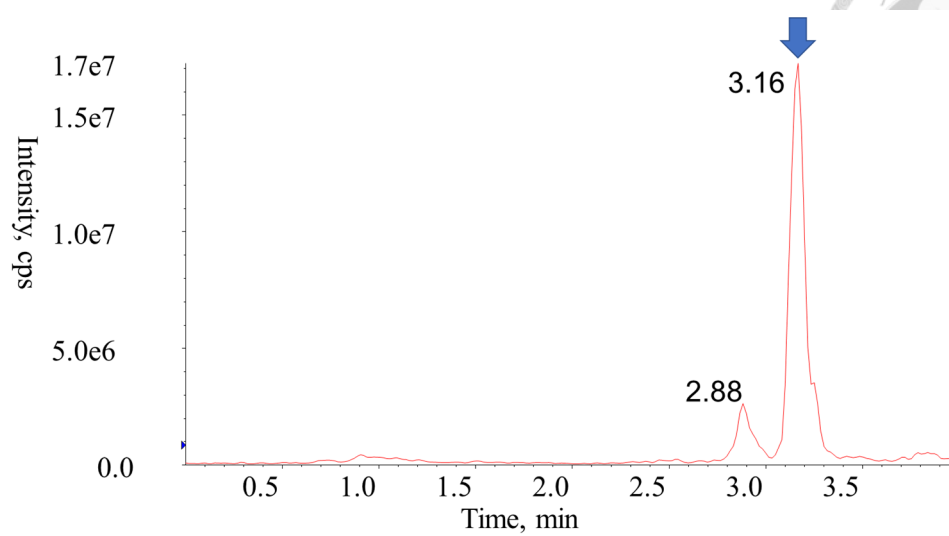
(b) m/z 141 (1hr)



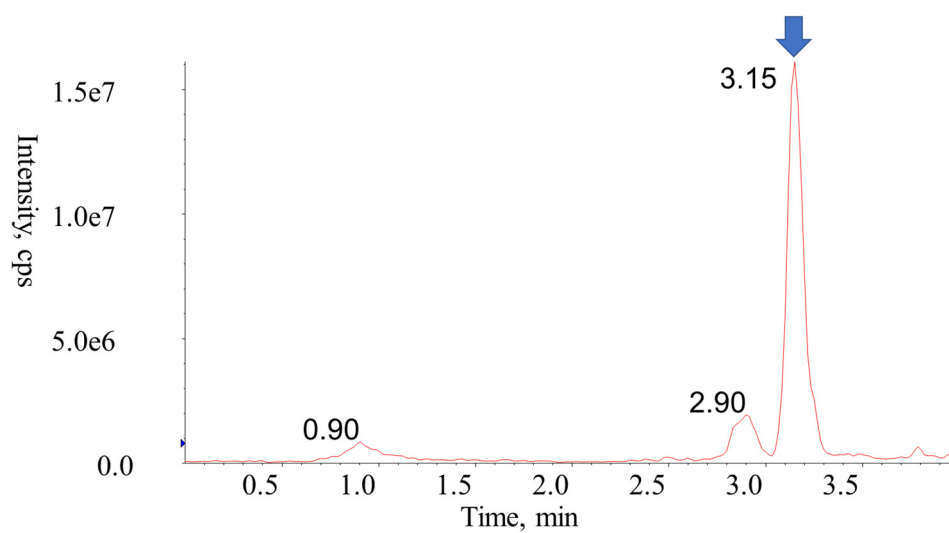
(c) m/z 141 (4hr)



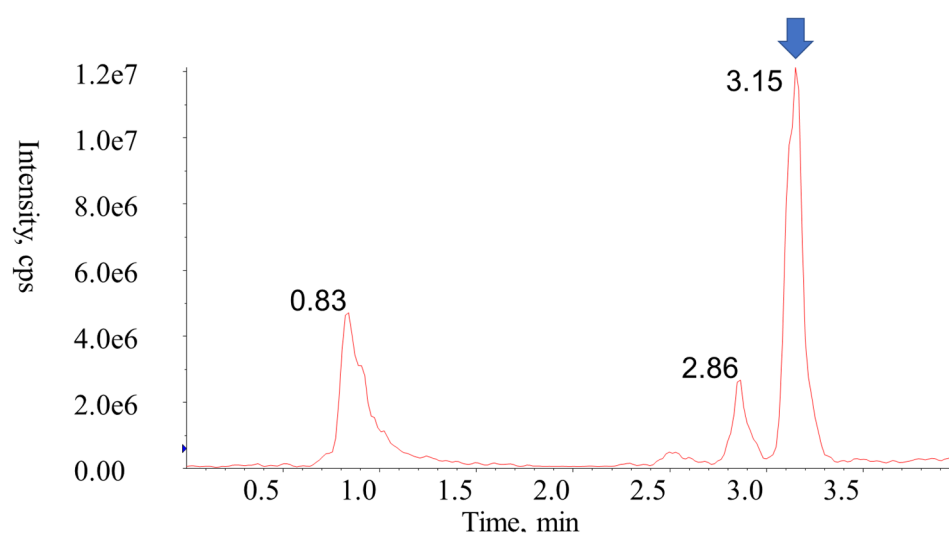
(d) m/z 141 (8hr)



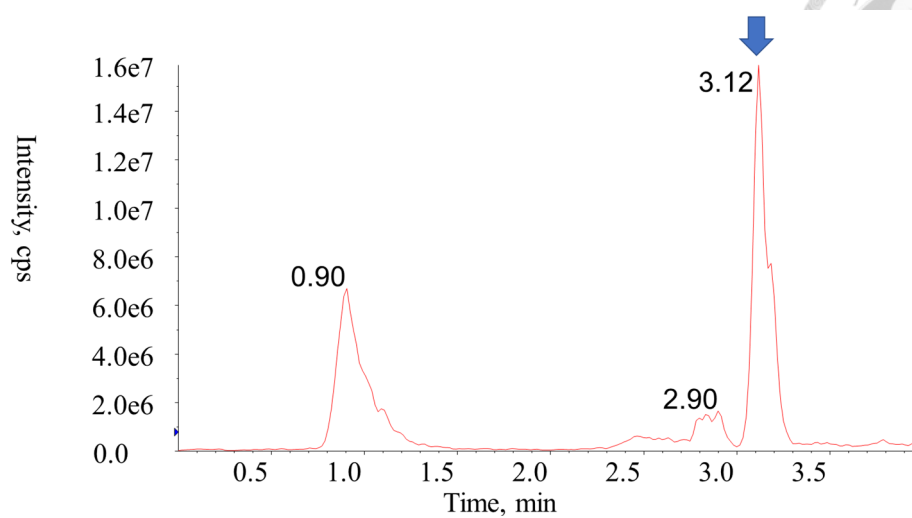
(e) m/z 141 (12hr)



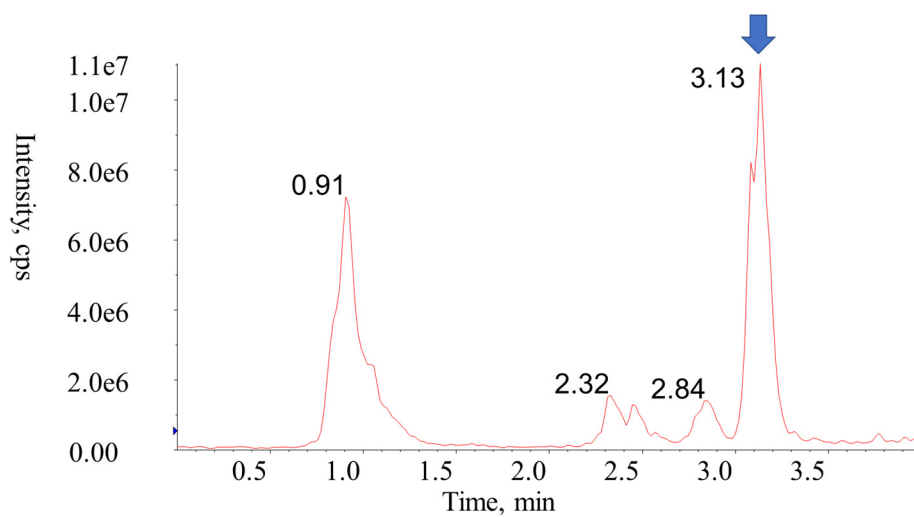
(f) m/z 141 (24hr)



(g) m/z 141 (72hr)



(h) m/z 141 (144hr)



(i) m/z 141 (168hr)

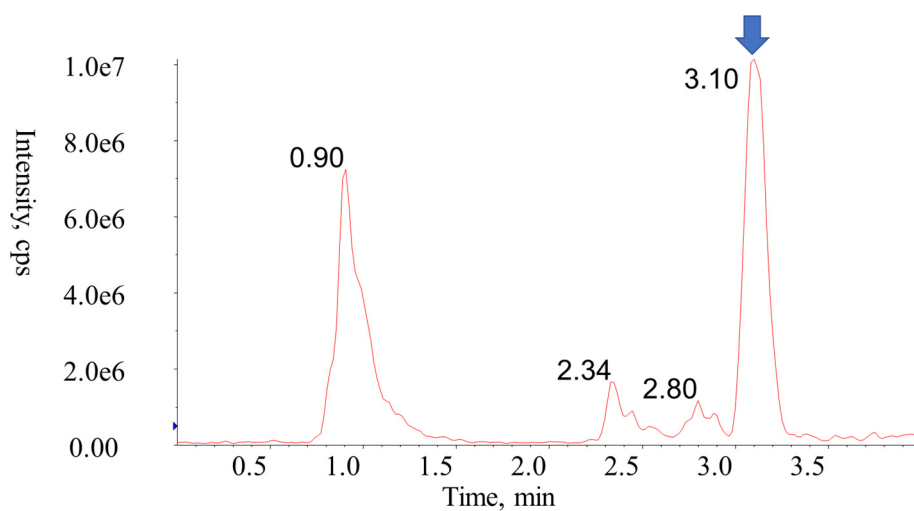


圖 21. (a)-(i)為 E1 (m/z 141) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

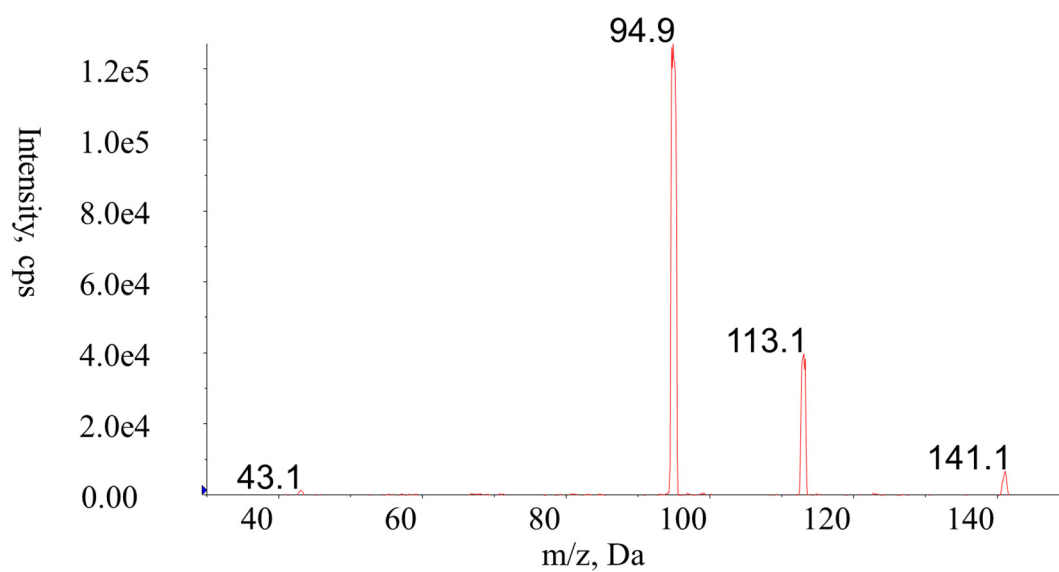


圖 22. E1 (m/z 141) 在 RT 3.1 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

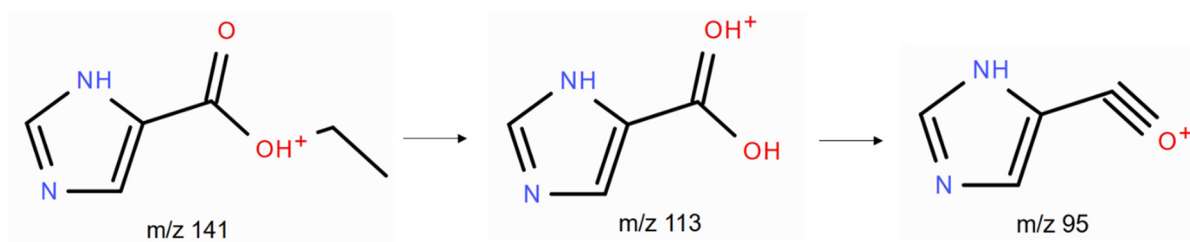
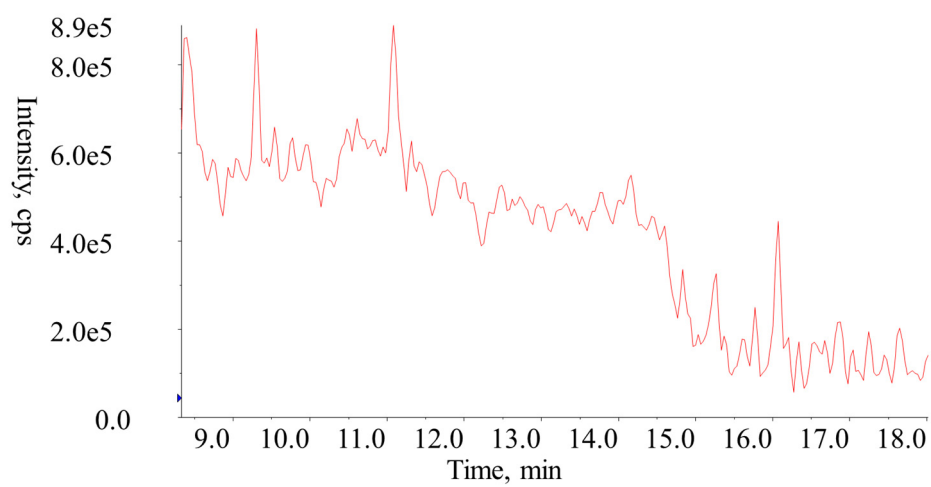


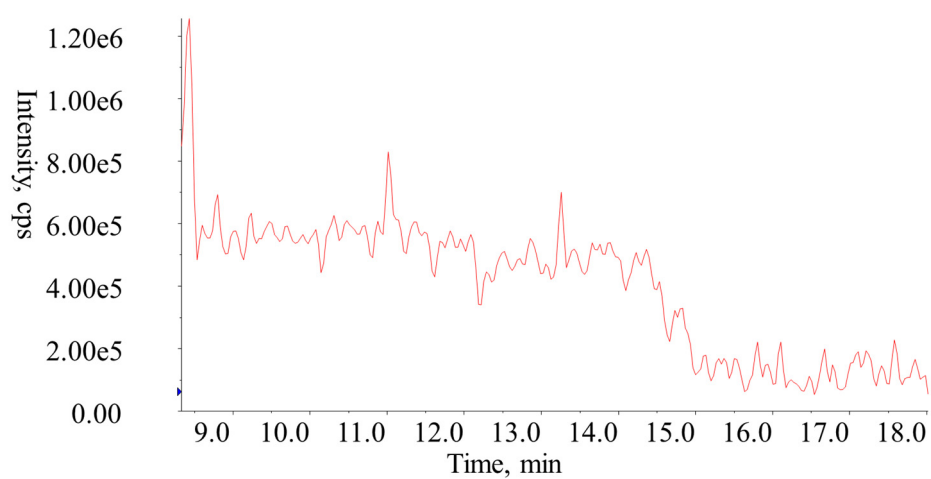
圖 23. 根據 E1 (m/z 141) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式



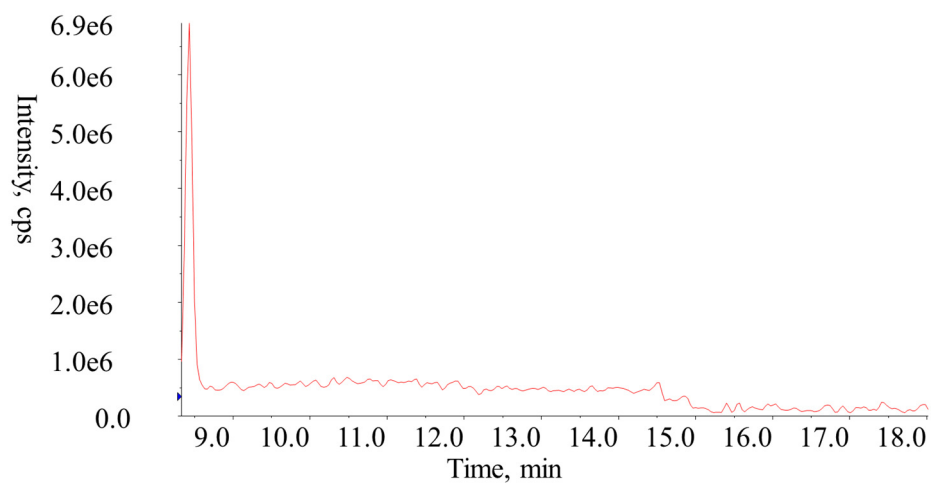
(a) m/z 243 (0hr)



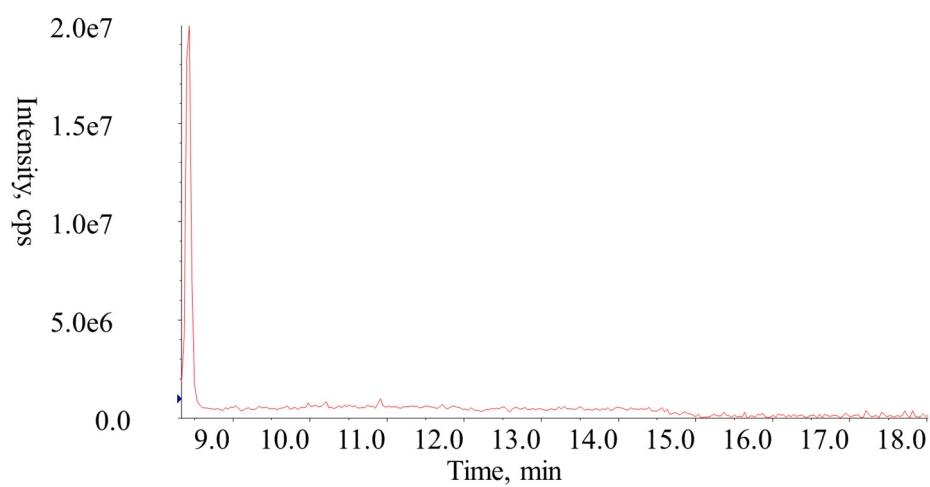
(b) m/z 243 (1hr)



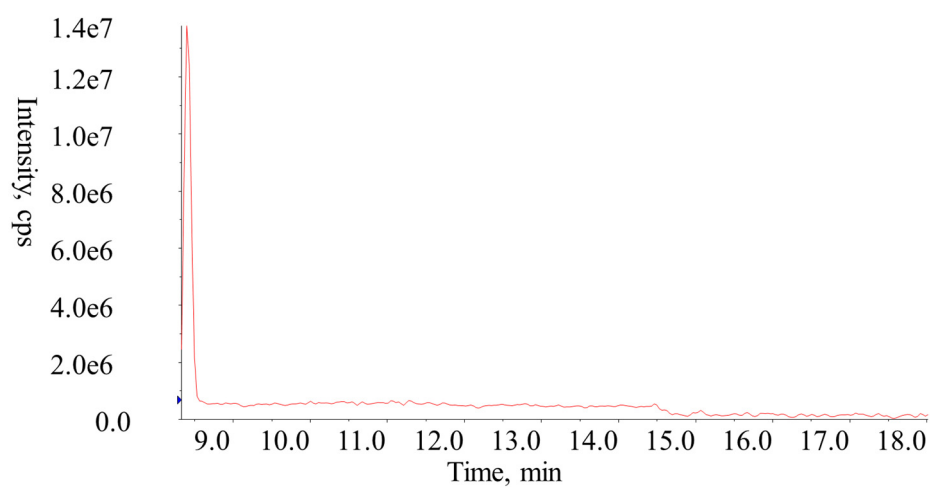
(c) m/z 243 (4hr)



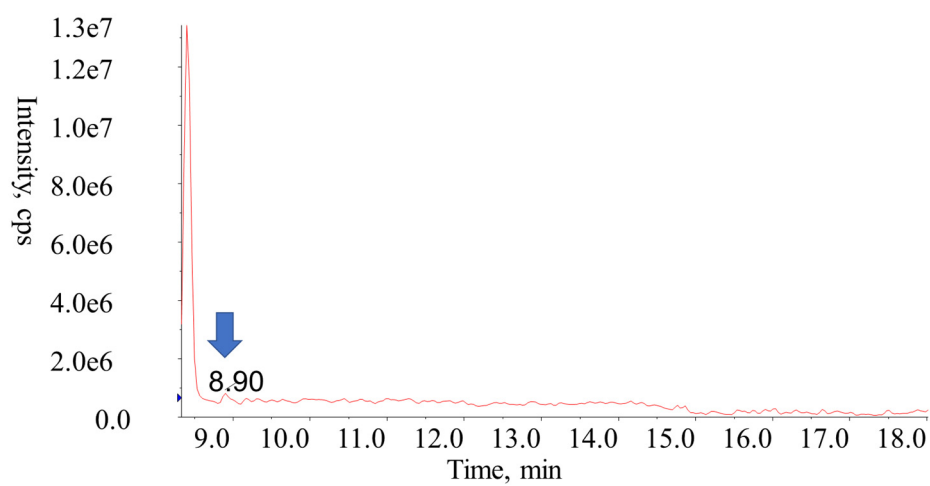
(d) m/z 243 (8hr)



(e) m/z 243 (12hr)

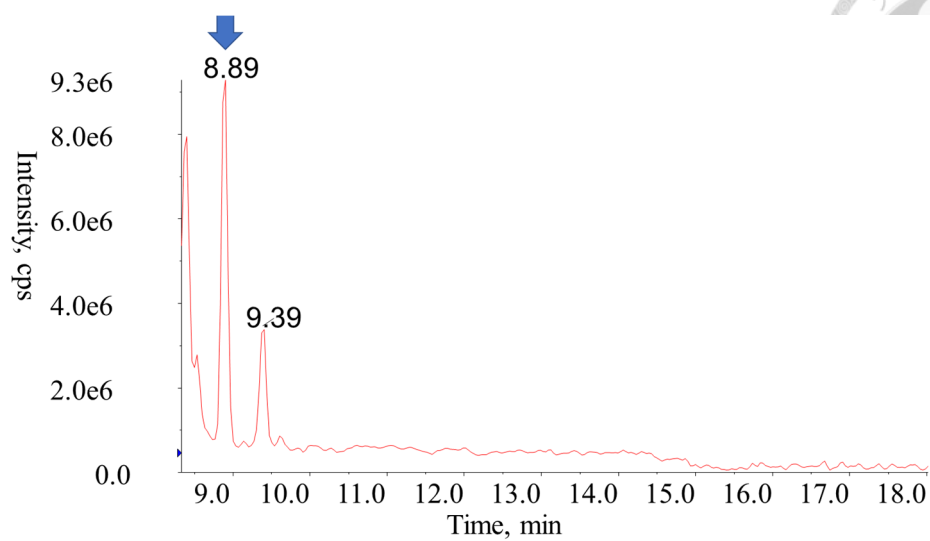


(f) m/z 243 (24hr)

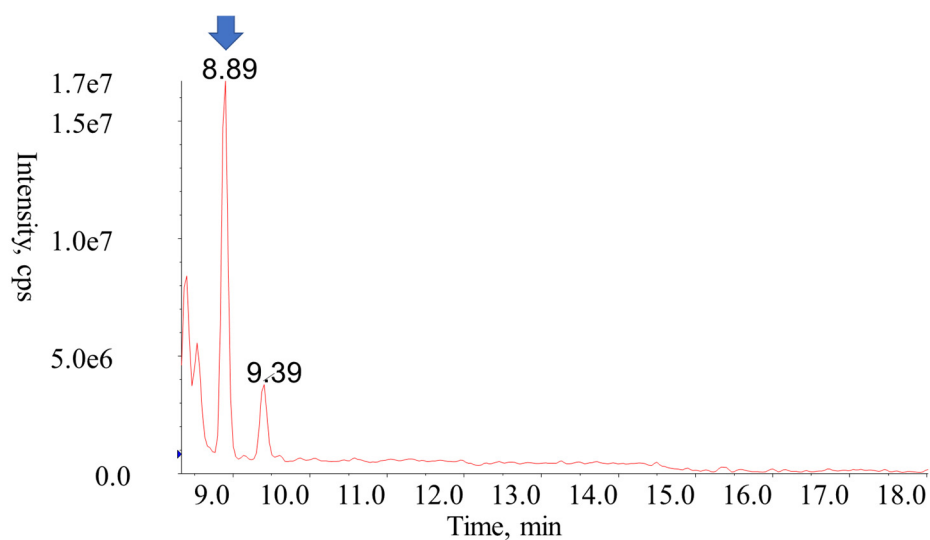




(g) m/z 243 (72hr)



(h) m/z 243 (144hr)



(i) m/z 243 (168hr)

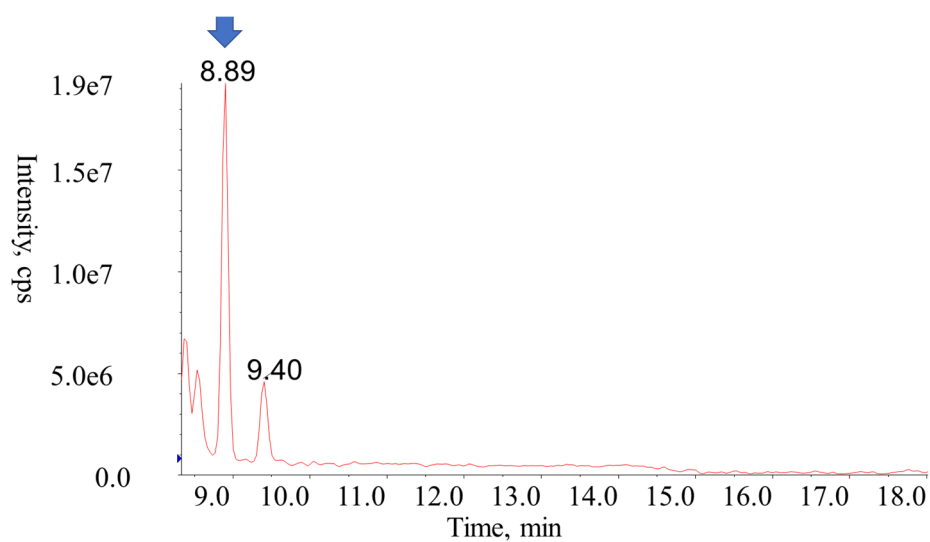


圖 24. (a)-(i) 為 E2 (m/z 243) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

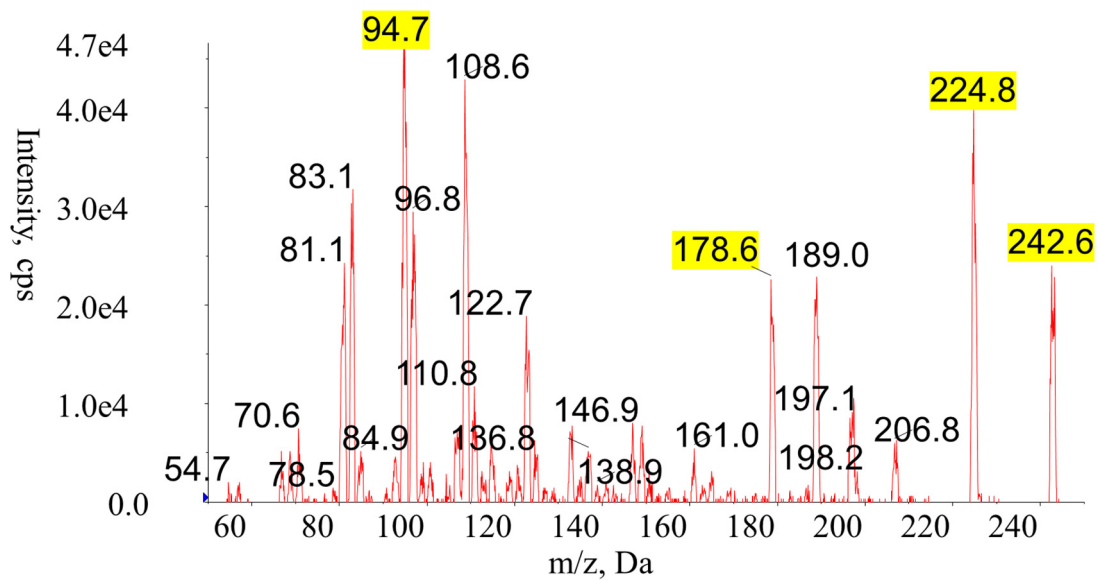


圖 25. E2 (m/z 243) 在 RT 8.9 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

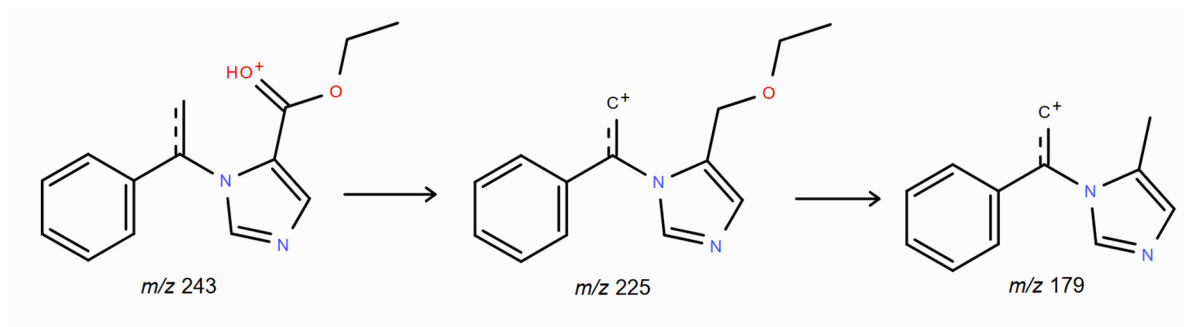
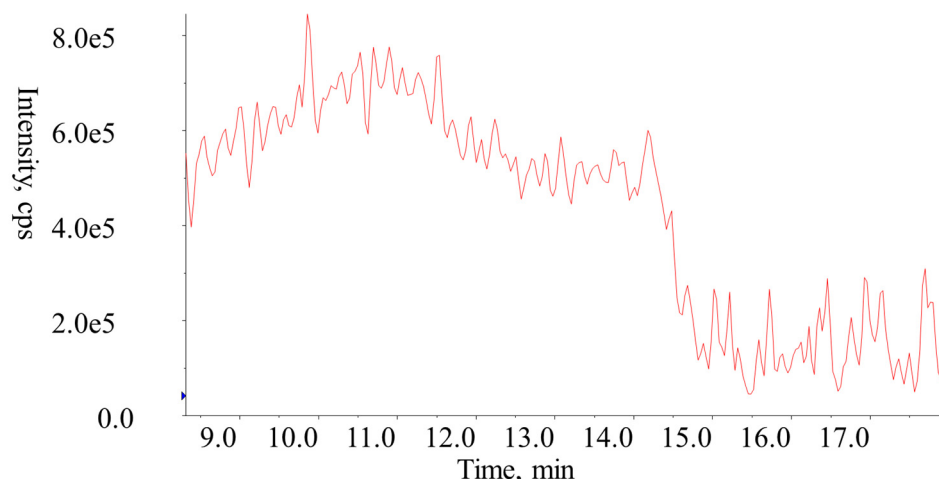
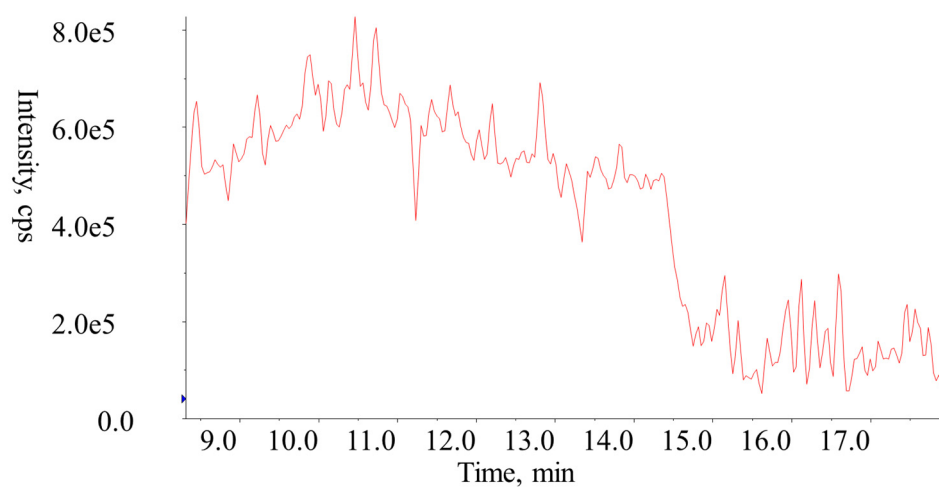


圖 26. 根據 E2 (m/z 243) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式

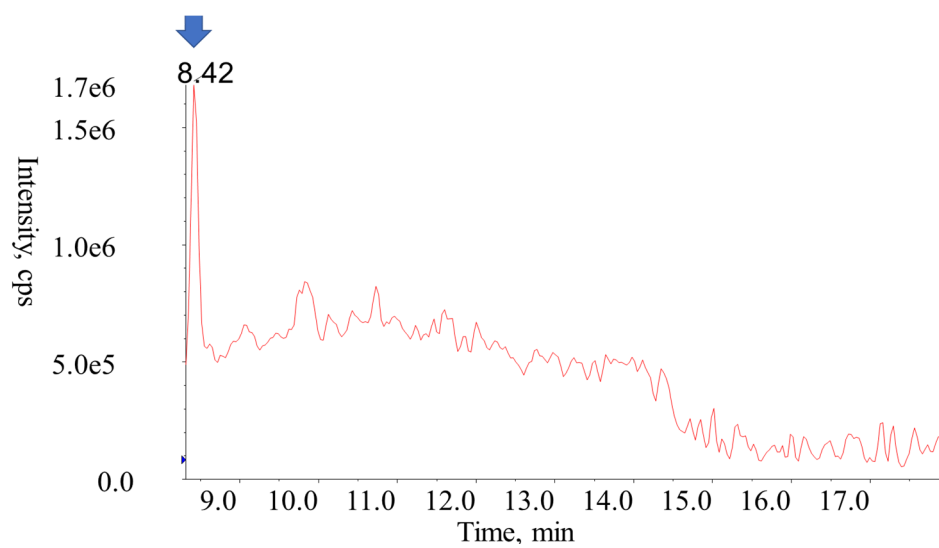
(a) m/z 261 (0hr)



(b) m/z 261 (1hr)

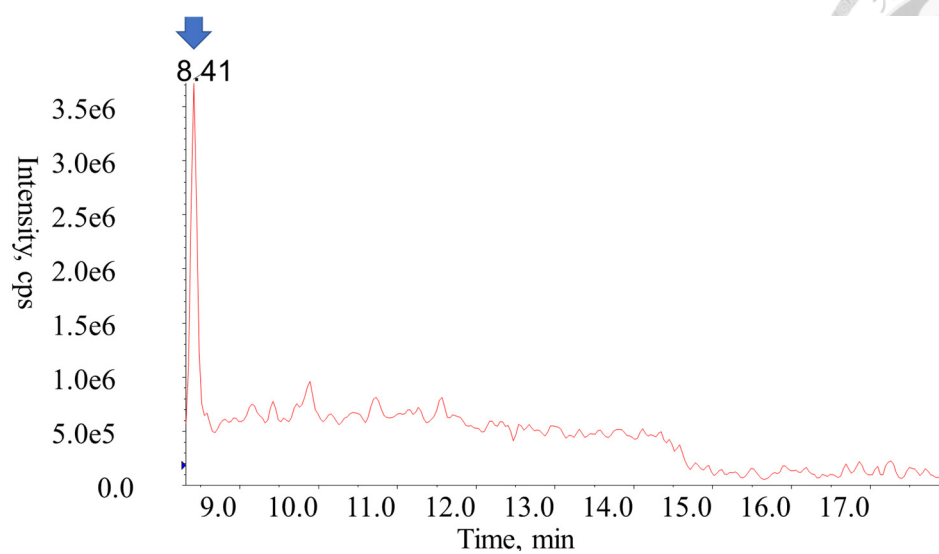


(c) m/z 261 (4hr)

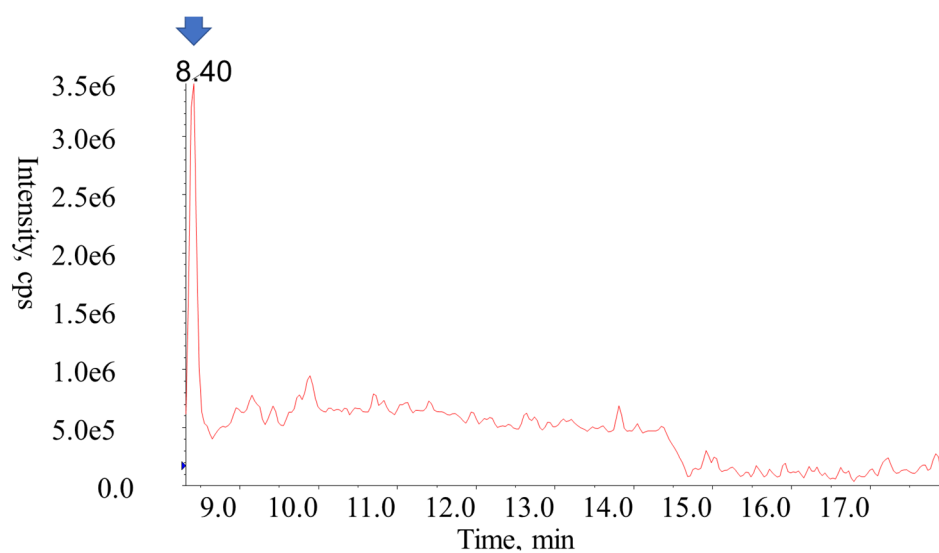




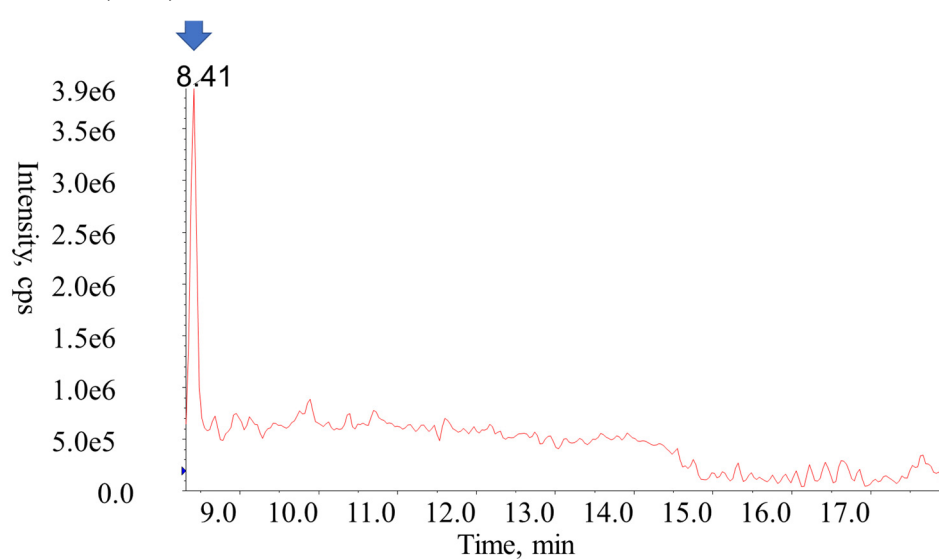
(d) m/z 261 (8hr)



(e) m/z 261 (12hr)

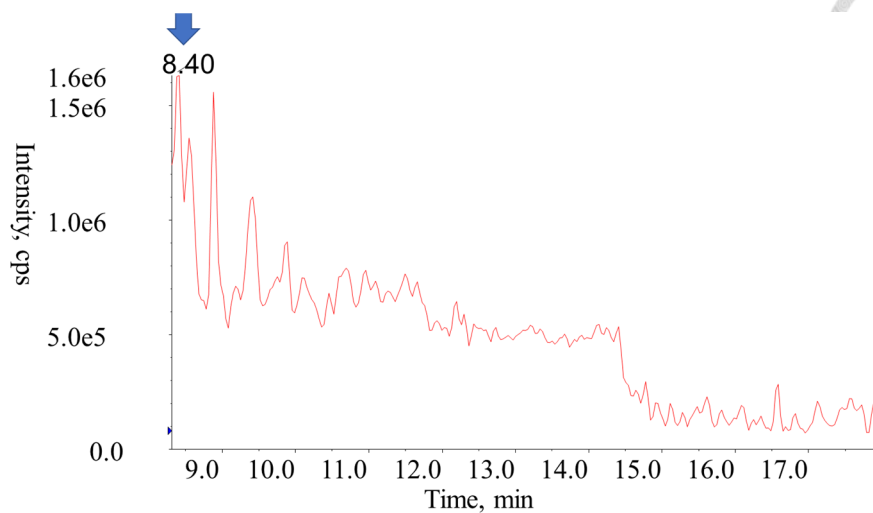


(f) m/z 261 (24hr)

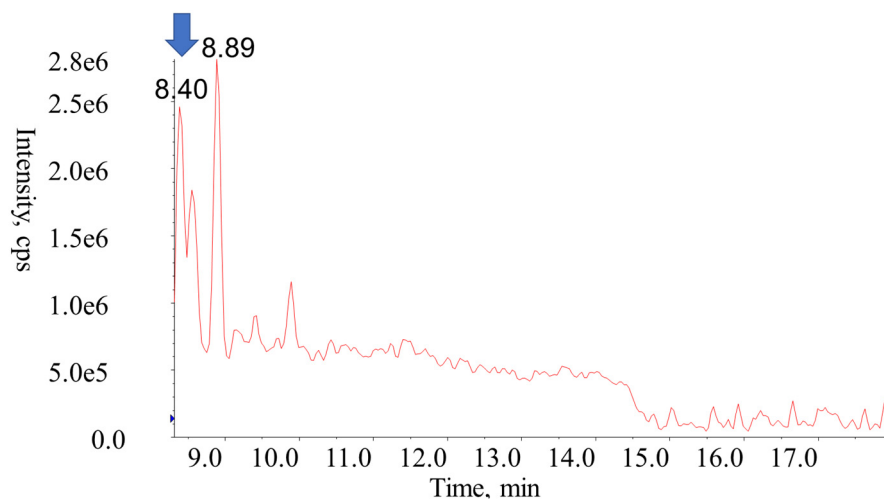




(g) m/z 261 (72hr)



(h) m/z 261 (144hr)



(i) m/z 261 (168hr)

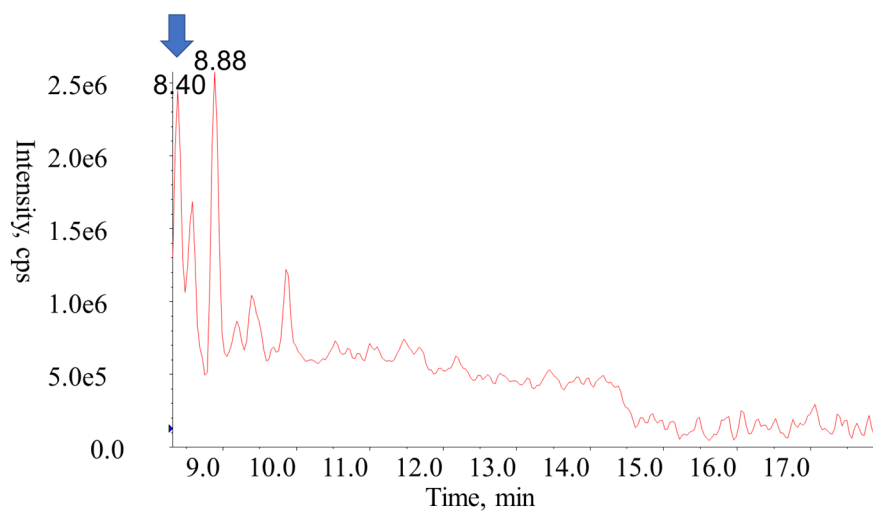


圖 27. (a)-(i) 為 E3、E4 (m/z 261) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

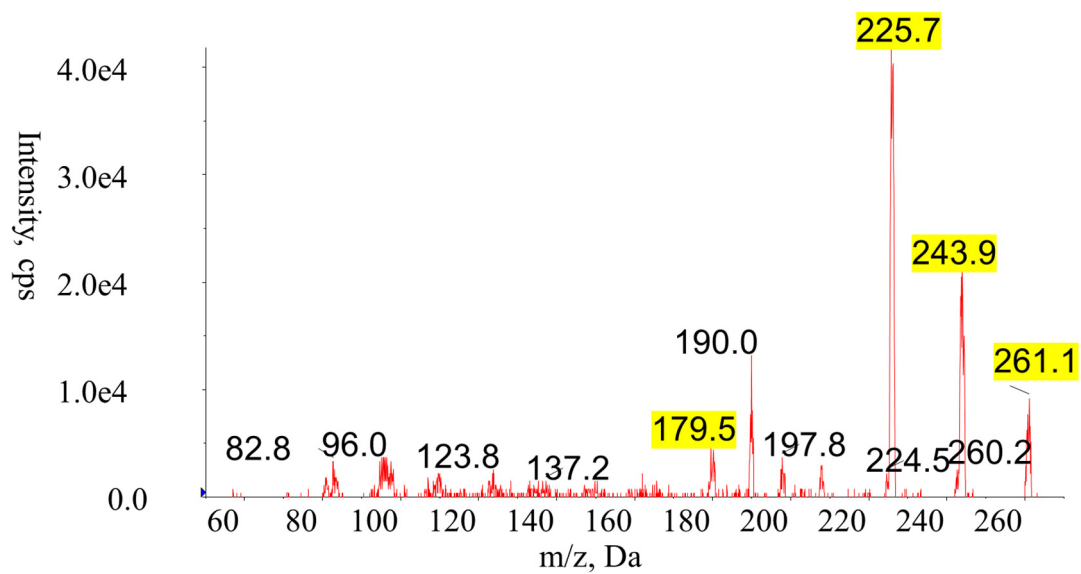


圖 28. E3、E4 (m/z 261) 在 RT 8.4 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

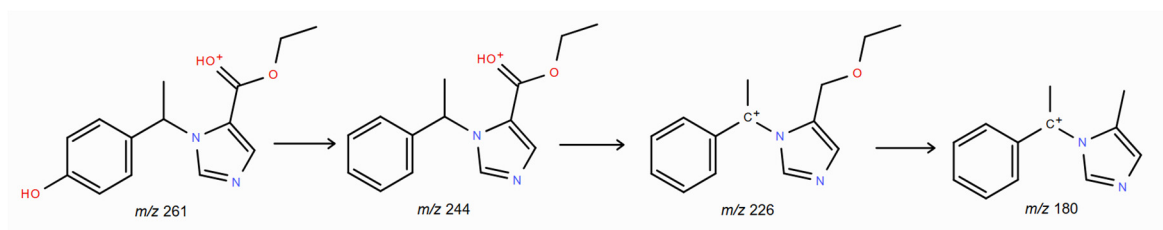
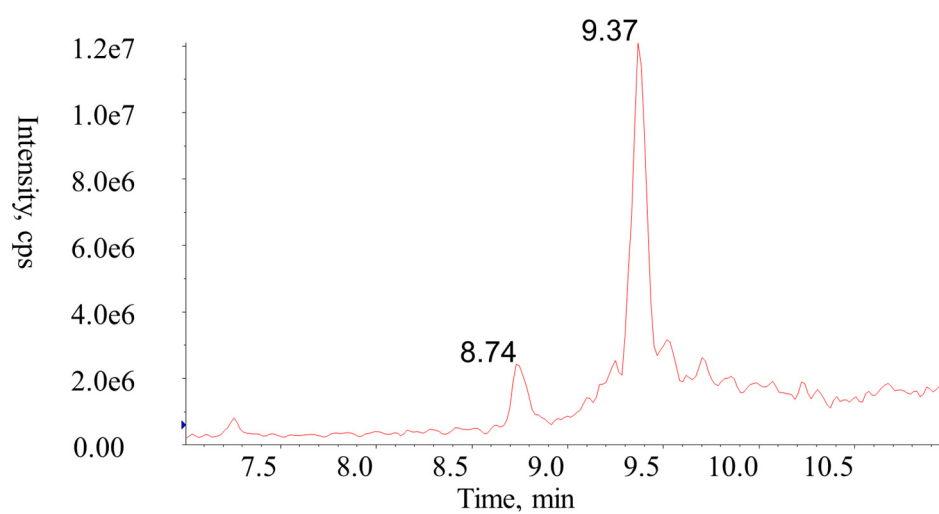
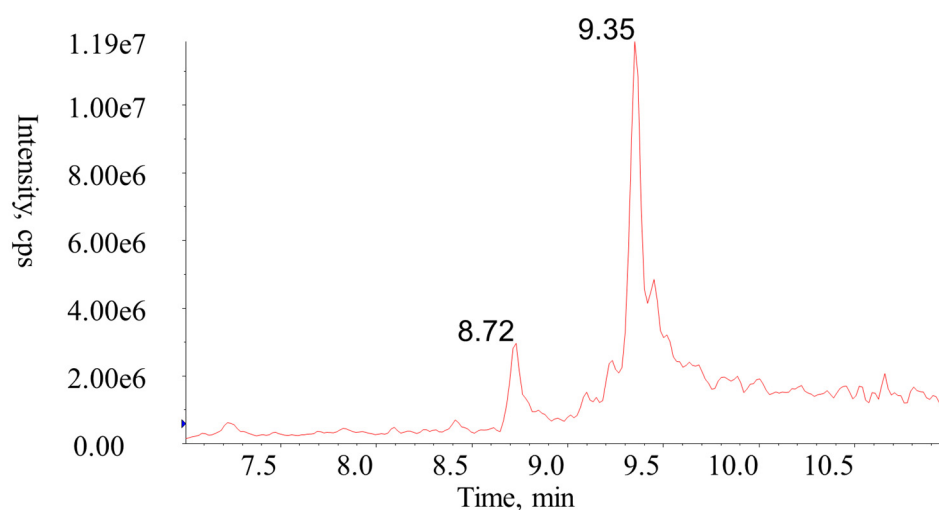


圖 29. 根據 E3 (m/z 261) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式

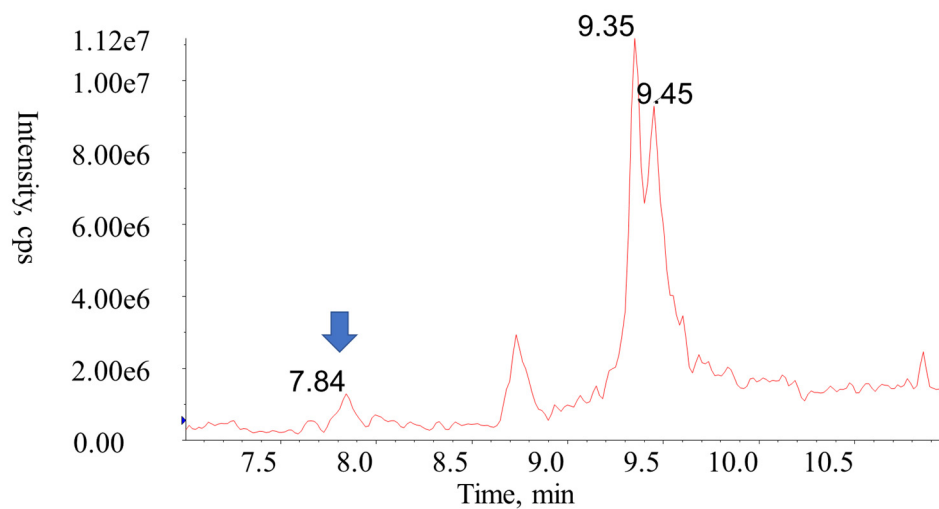
(a) m/z 277 (0hr)



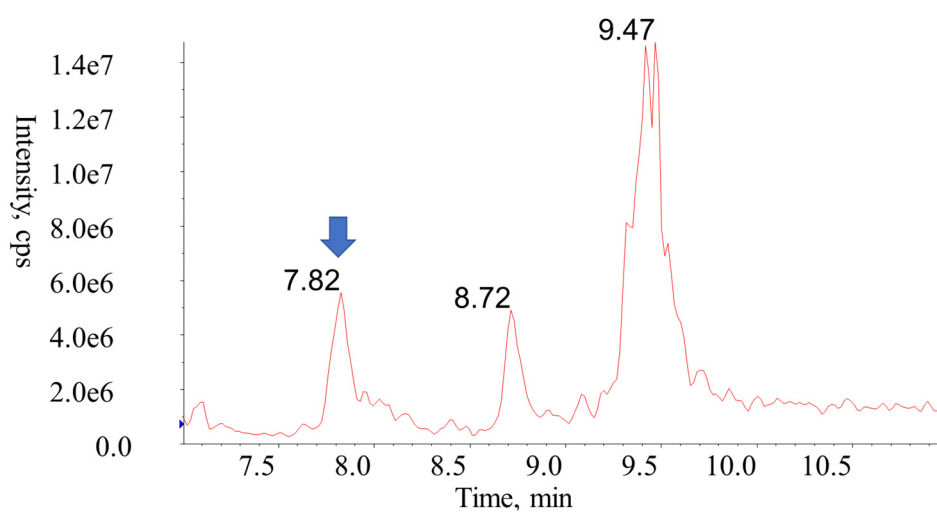
(b) m/z 277 (1hr)



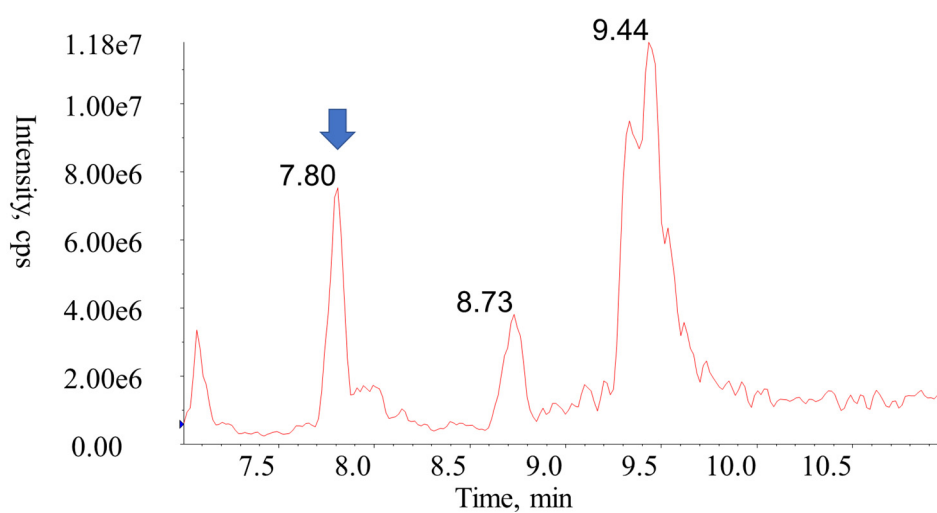
(c) m/z 277 (4hr)



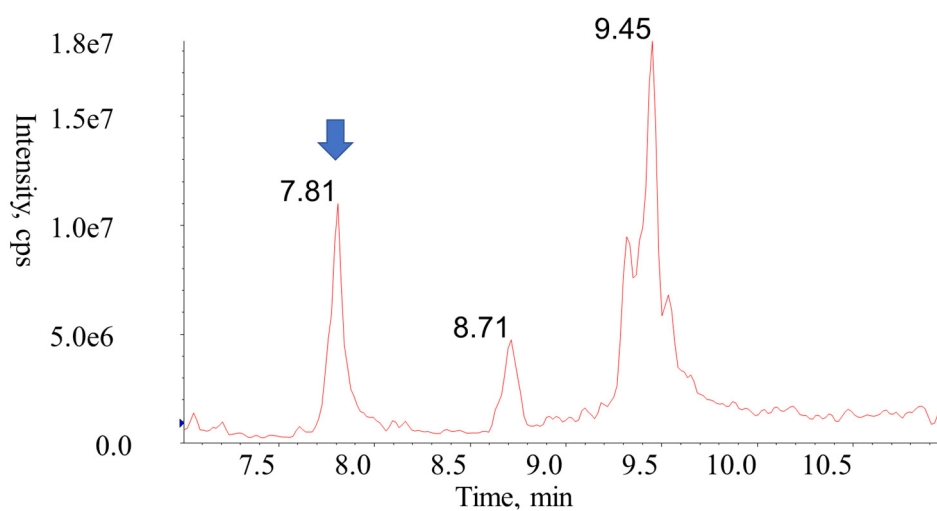
(d) m/z 277 (8hr)



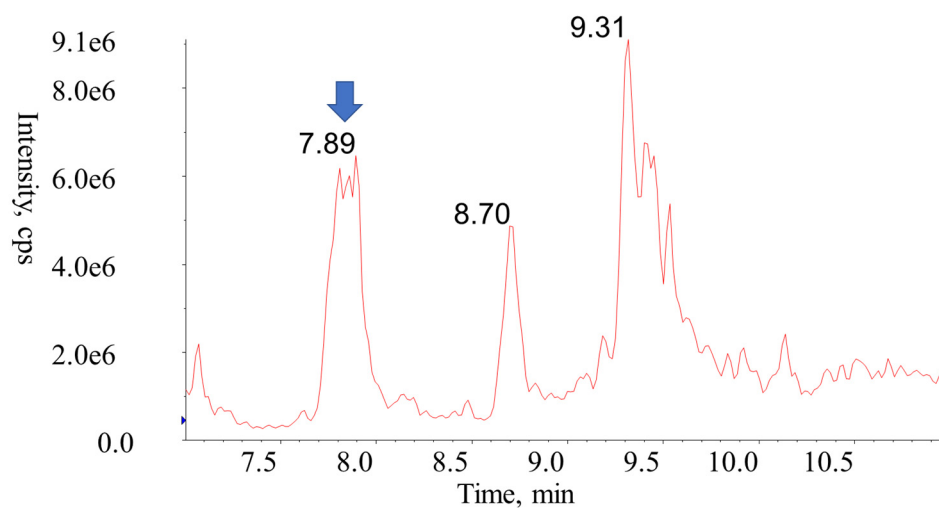
(e) m/z 277 (12hr)



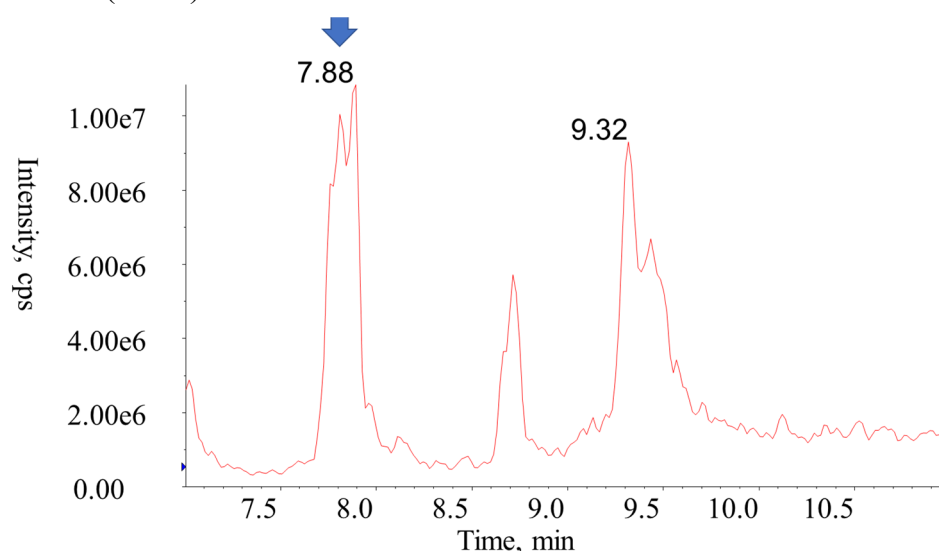
(f) m/z 277 (24hr)



(g) m/z 277 (72hr)



(h) m/z 277 (144hr)



(i) m/z 277 (168hr)

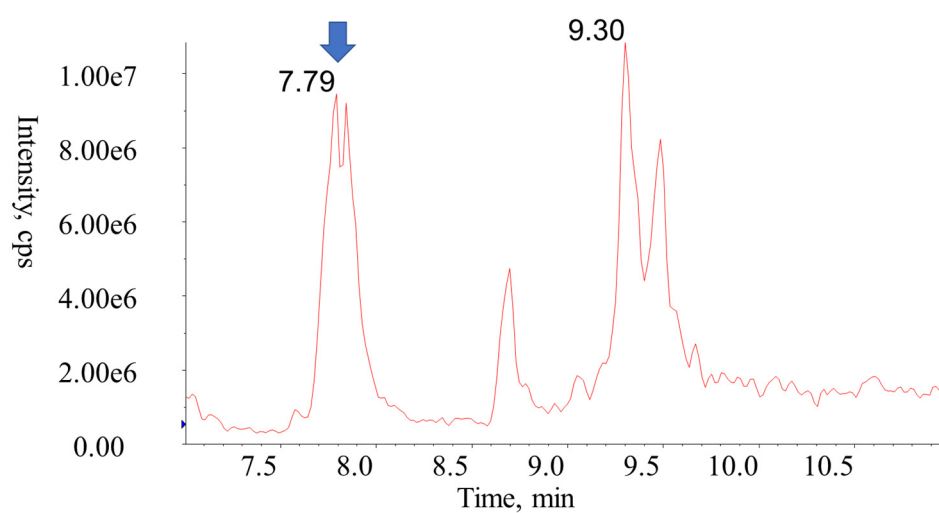


圖 30. (a)-(i)為 E5 (m/z 277) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

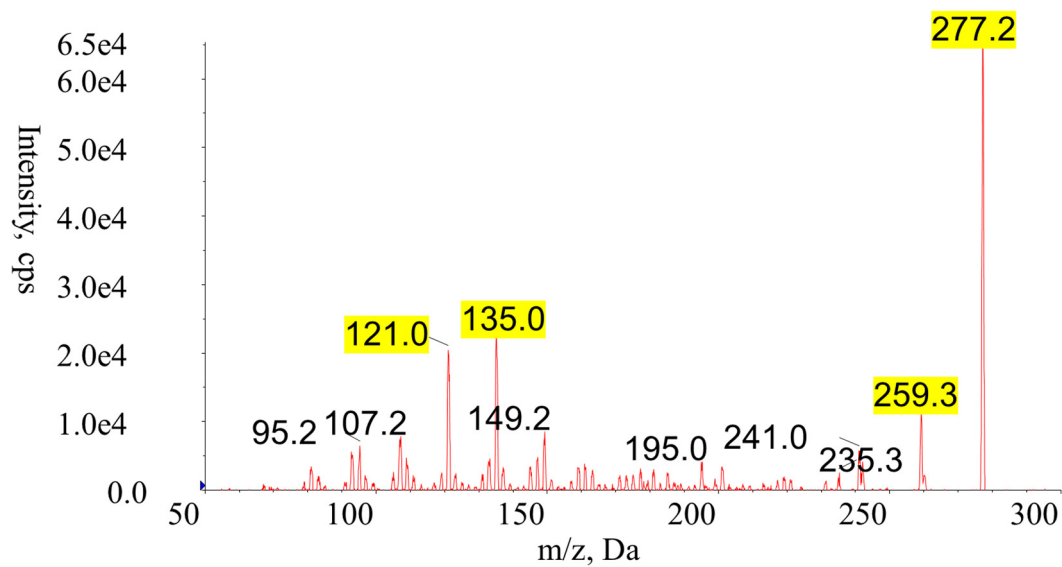


圖 31. E5 (m/z 277) 在 RT 7.8 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

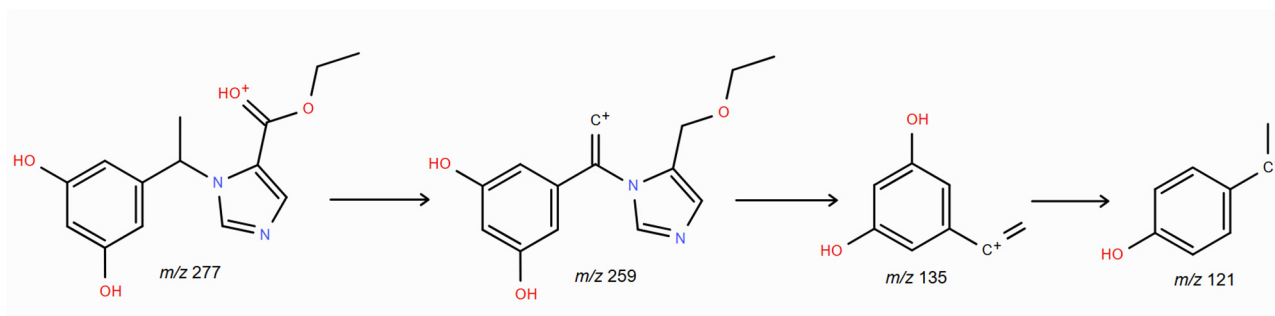
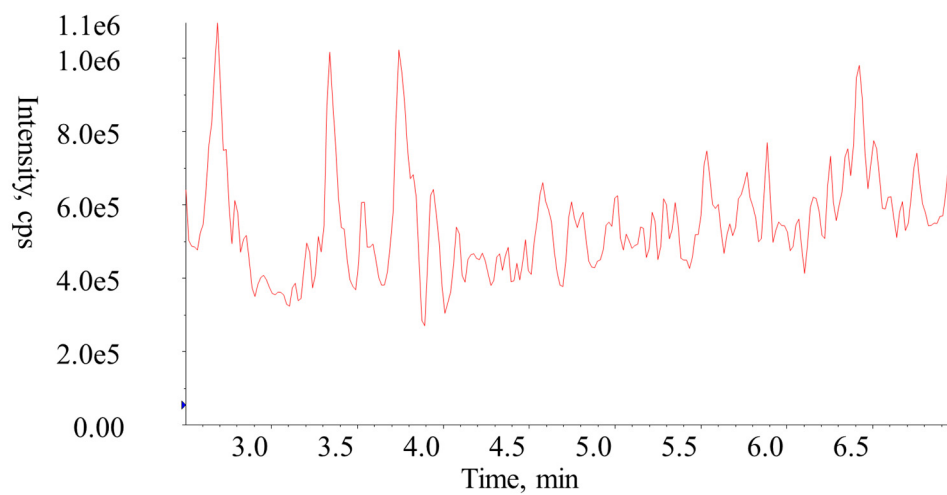
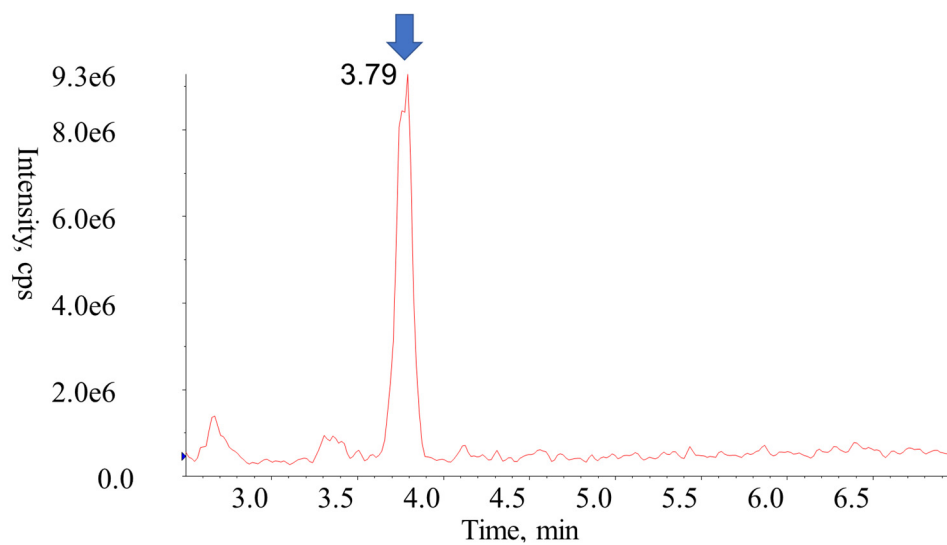


圖 32. 根據 E5 (m/z 277) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式

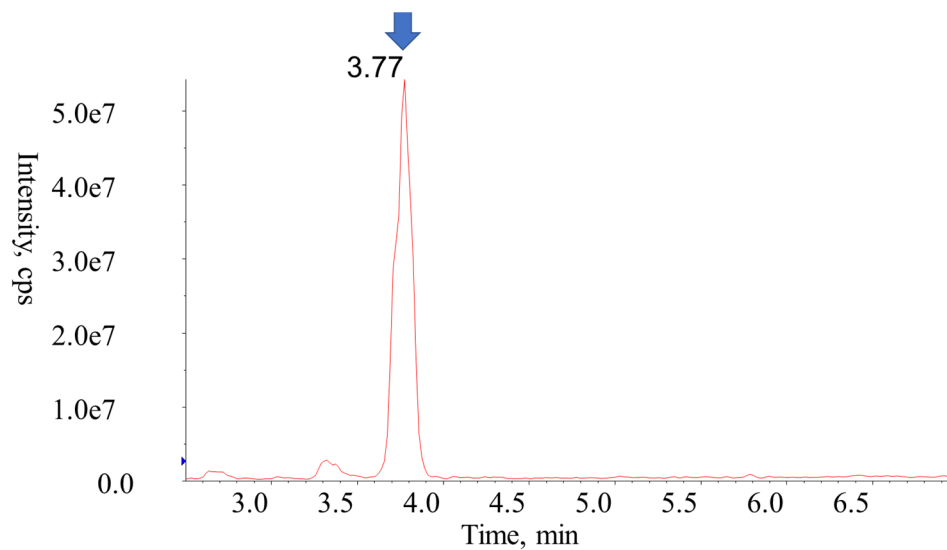
(a) m/z 217 (0hr)



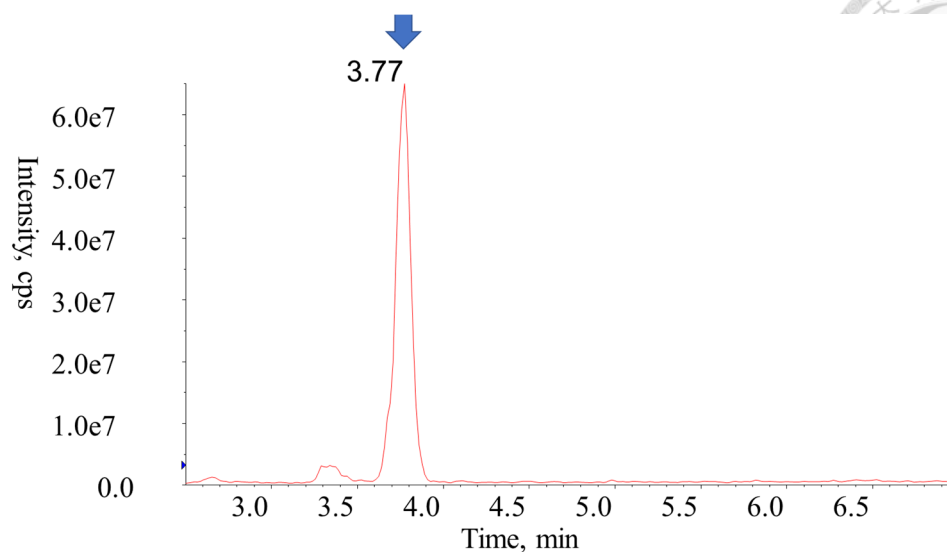
(b) m/z 217 (1hr)



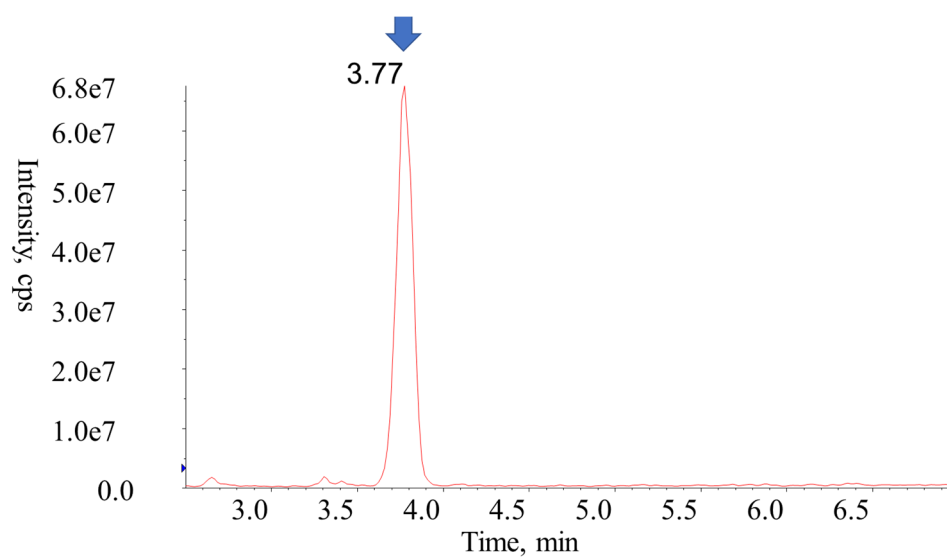
(c) m/z 217 (4hr)



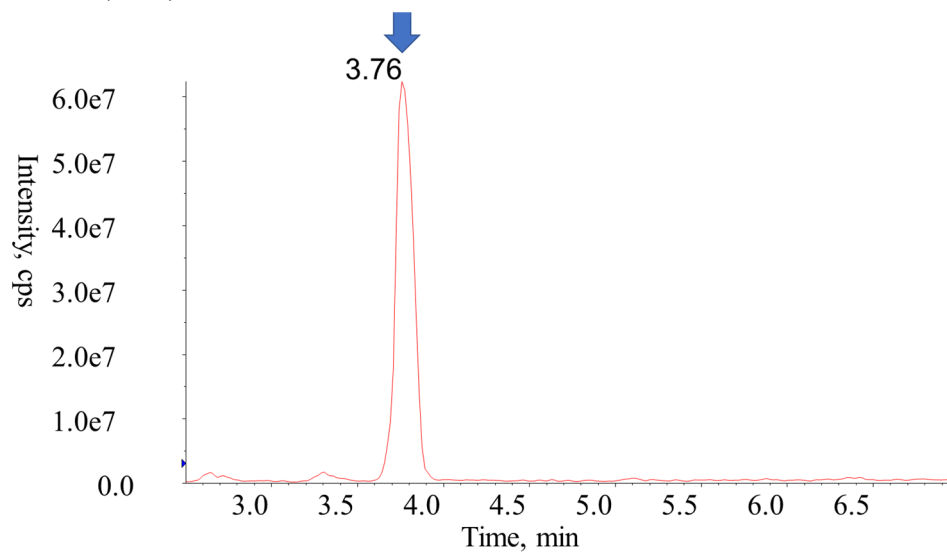
(d) m/z 217 (8hr)



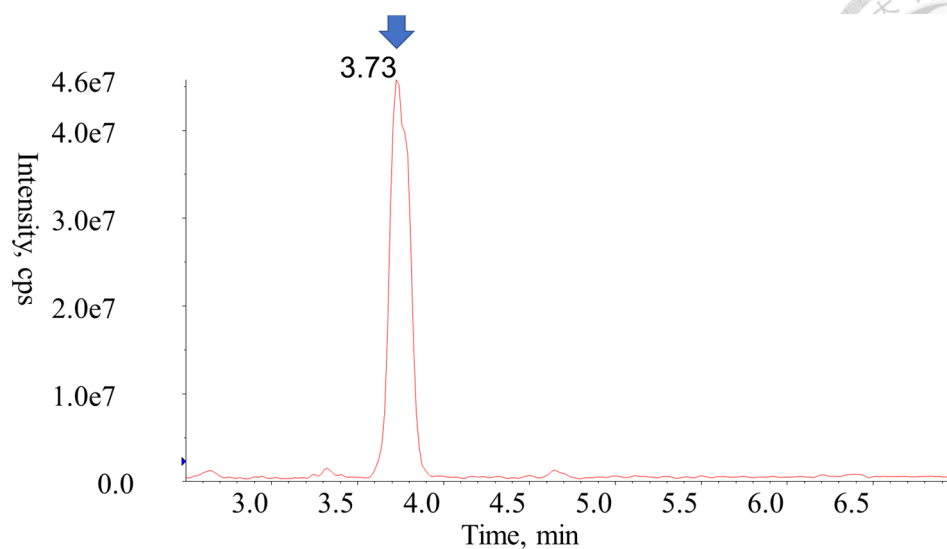
(e) m/z 217 (12hr)



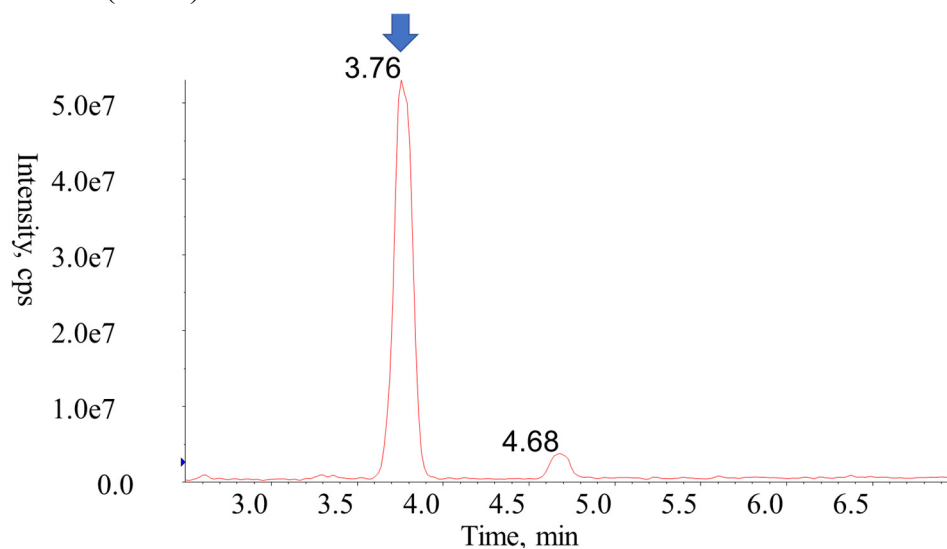
(f) m/z 217 (24hr)



(g) m/z 217 (72hr)



(h) m/z 217 (144hr)



(i) m/z 217 (168hr)

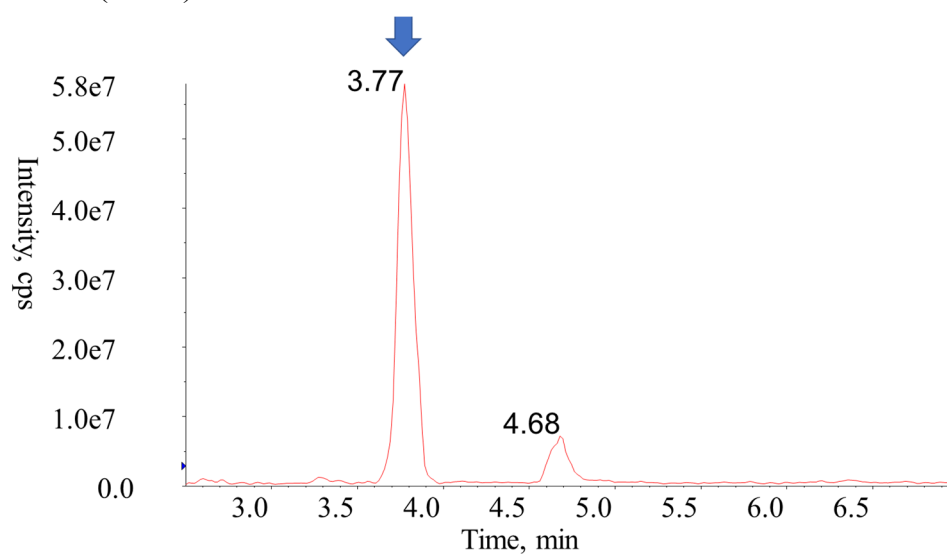


圖 33. (a)-(i)為 E6 (m/z 217) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

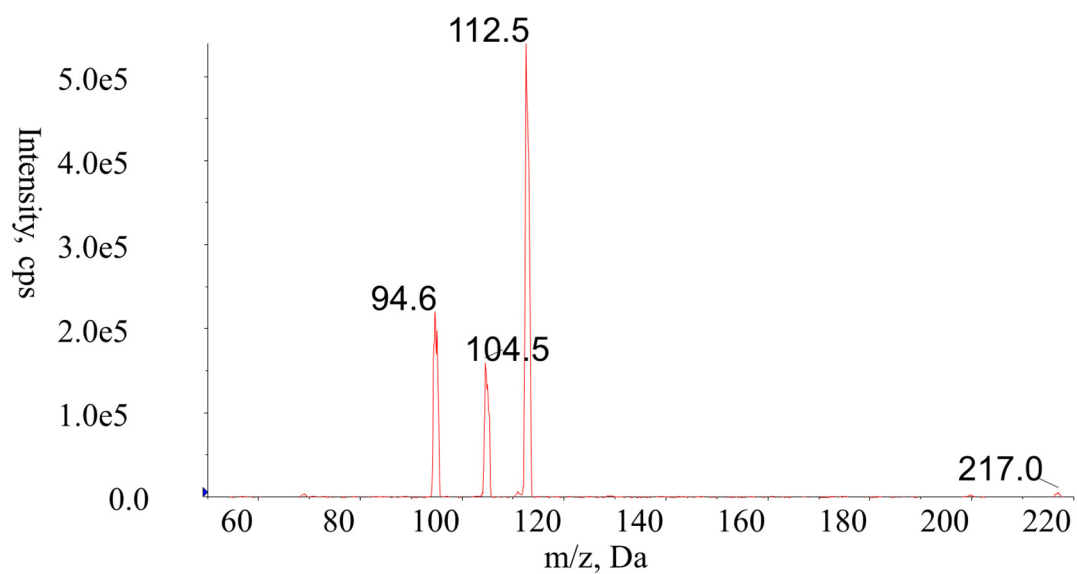


圖 34. E6 (m/z 217) 在 RT 3.8 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

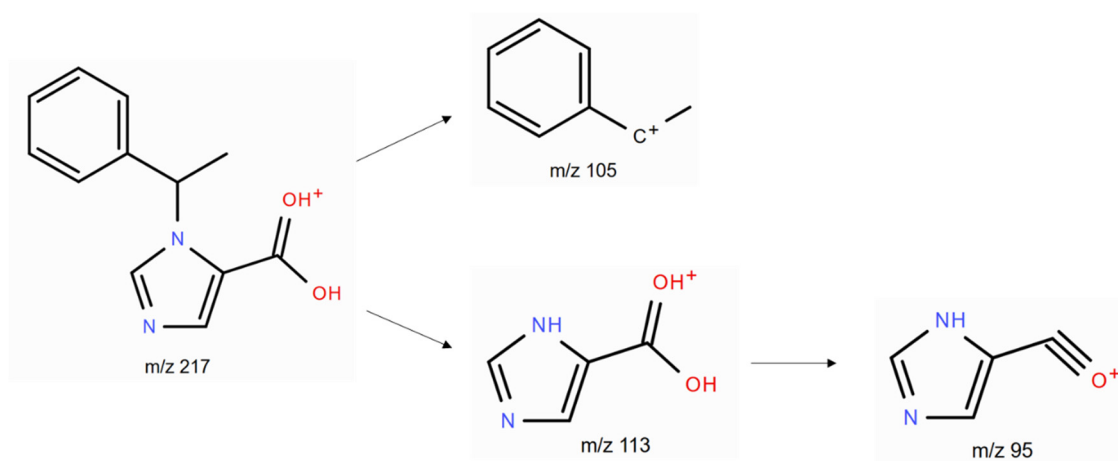
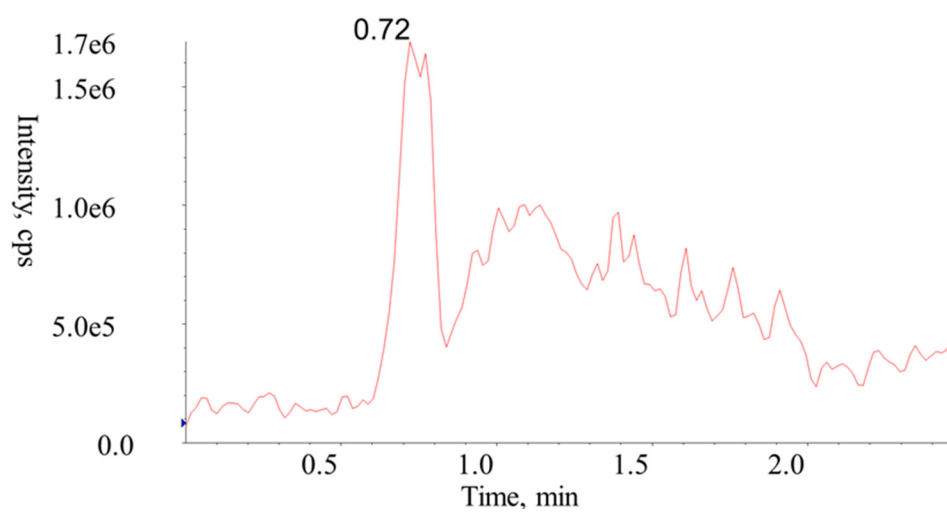


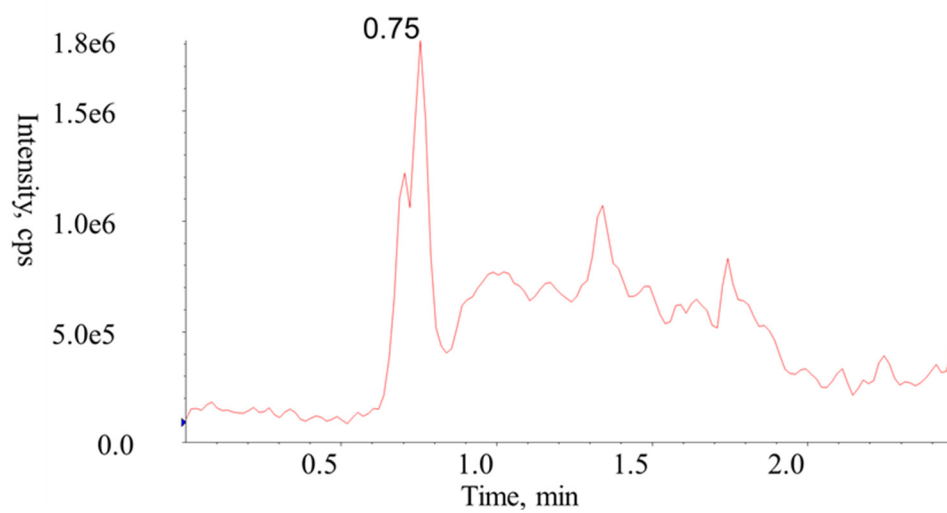
圖 35. 根據 E6 (m/z 217)的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式



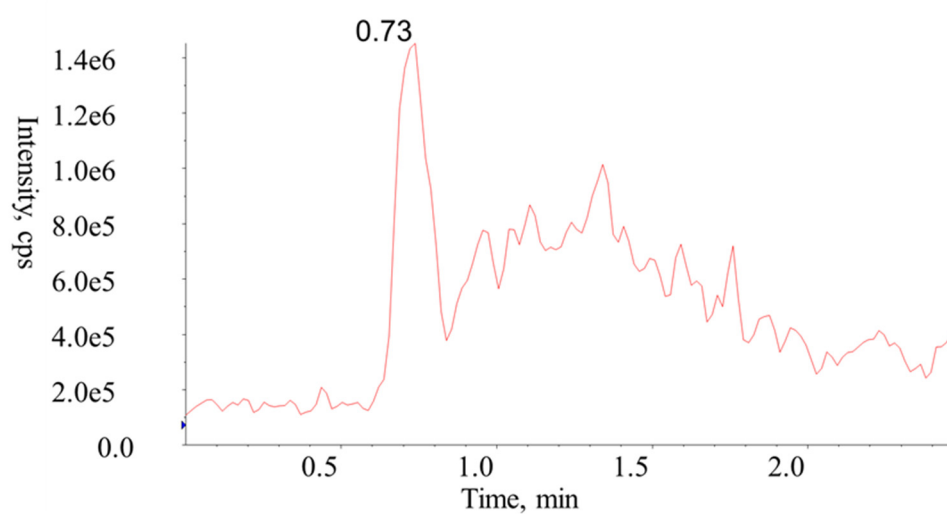
(a) m/z 157 (0hr)



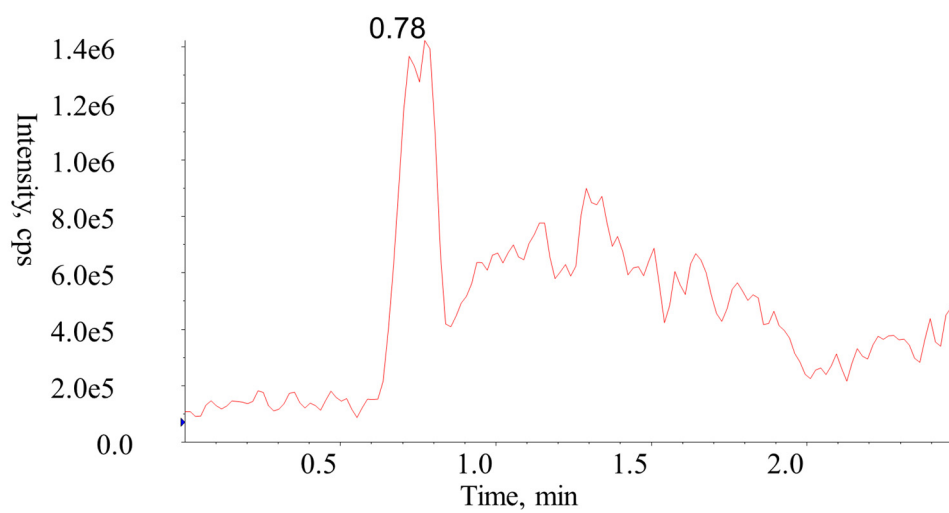
(b) m/z 157 (1hr)



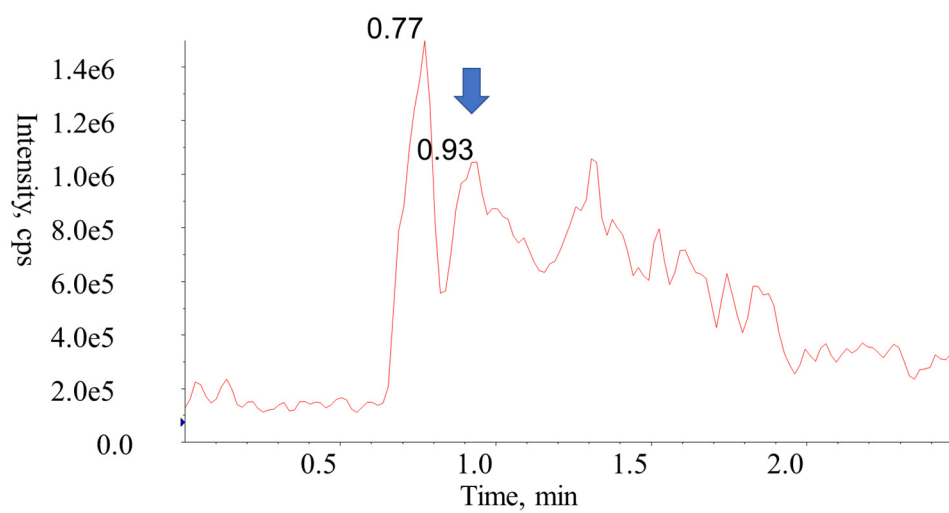
(c) m/z 157 (4hr)



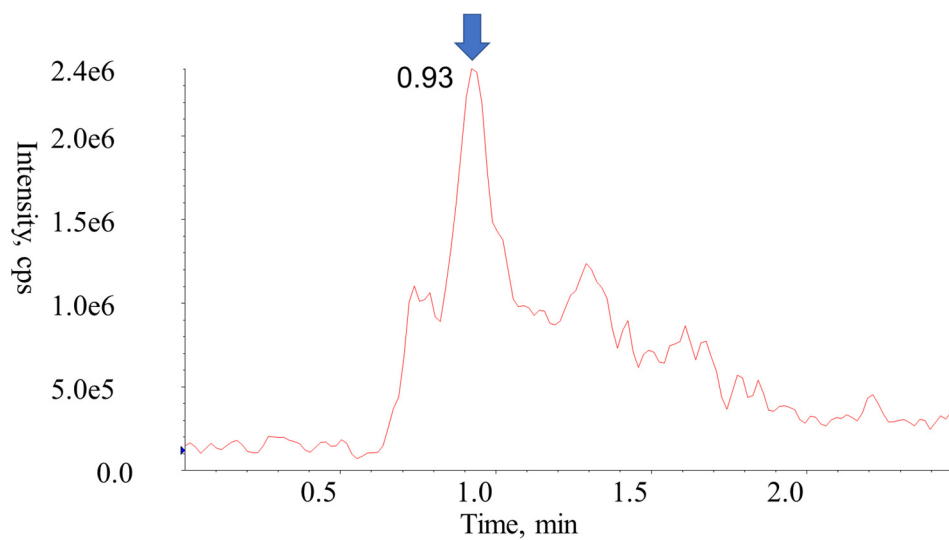
(d) m/z 157 (8hr)



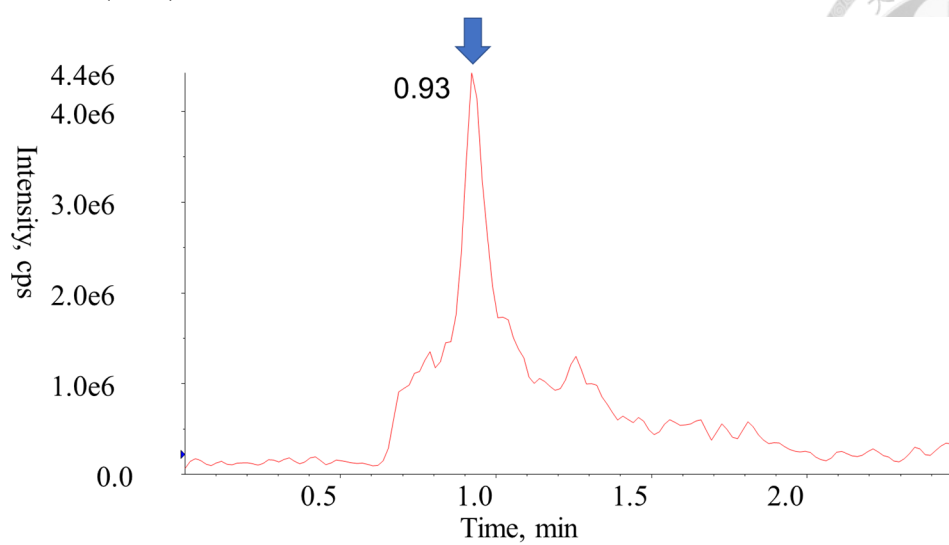
(e) m/z 157 (12hr)



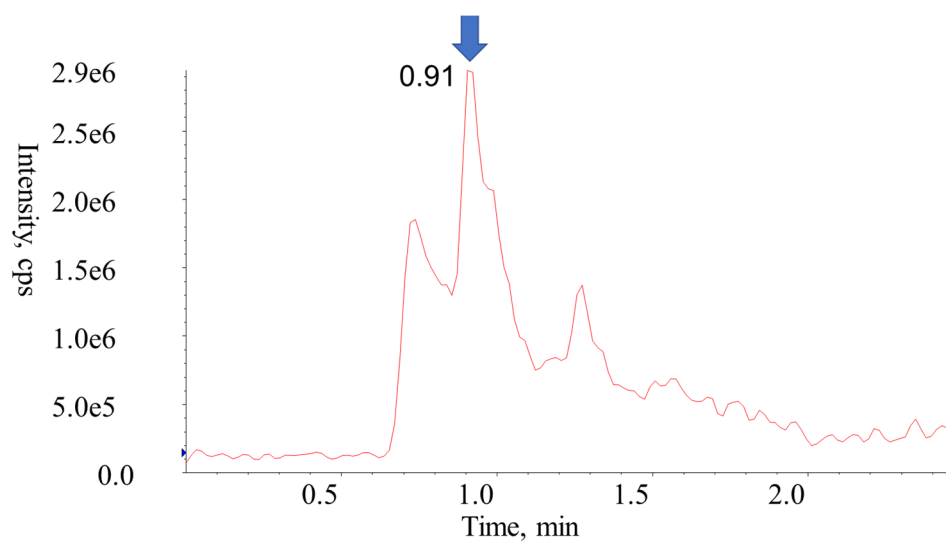
(f) m/z 157 (24hr)



(g) m/z 157 (72hr)



(h) m/z 157 (144hr)



(i) m/z 157 (168hr)

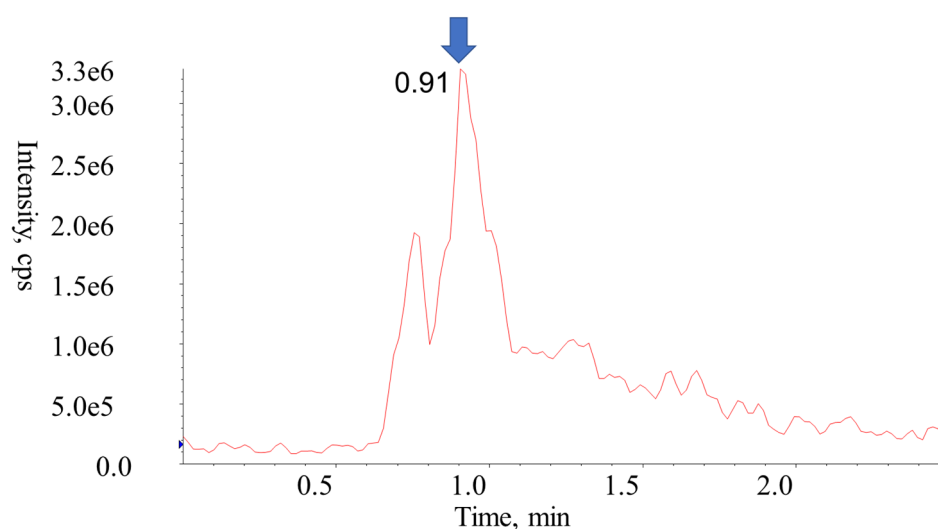


圖 36. (a)-(i)為 E9 (m/z 157) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

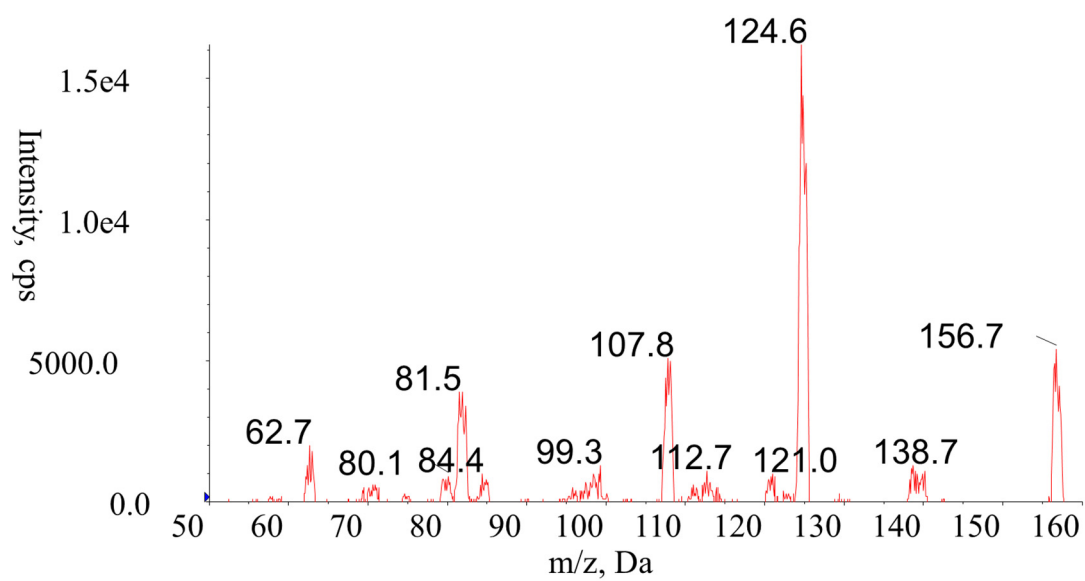


圖 37. E9 (m/z 157) 在 RT 0.9 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

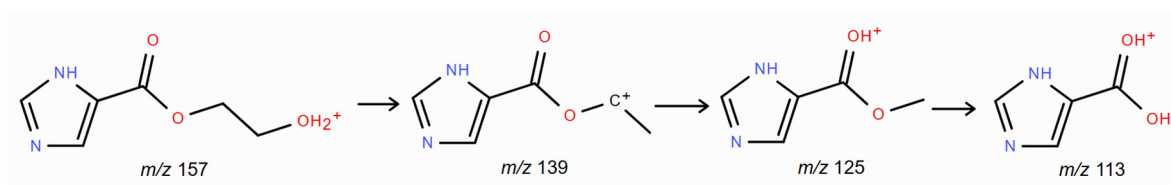
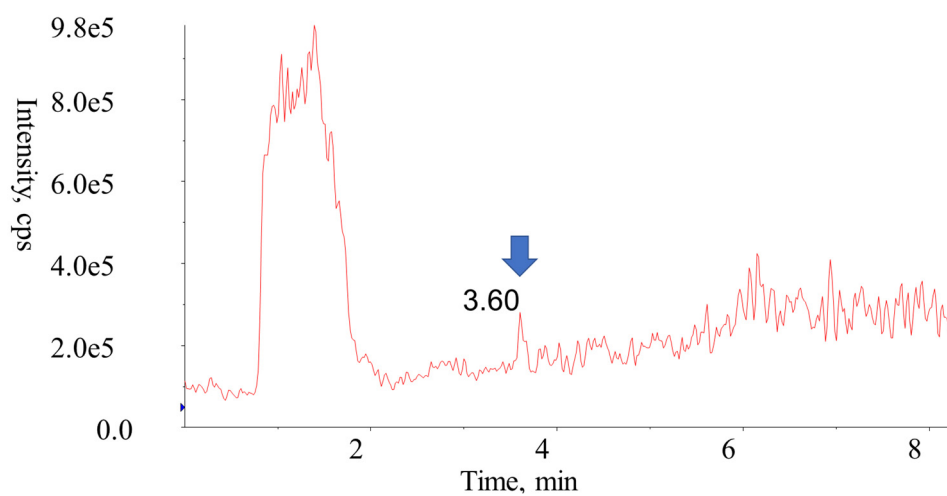
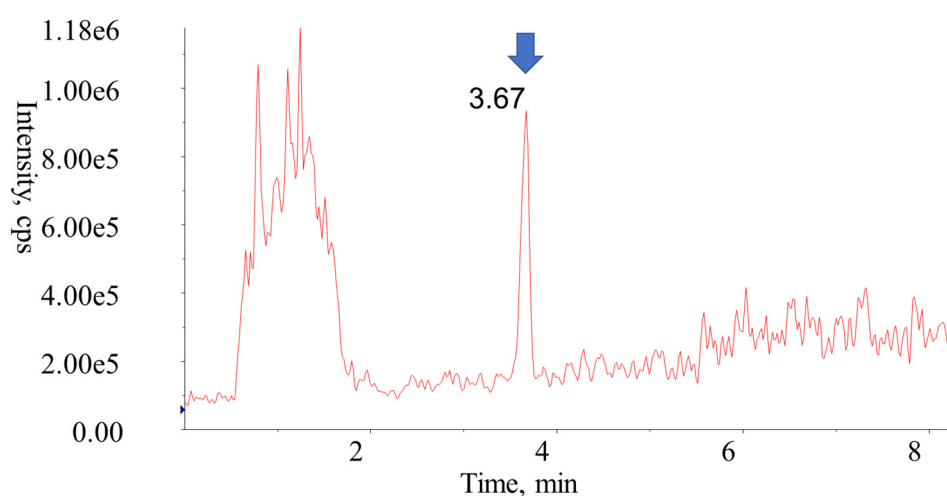


圖 38. 根據 E9 (m/z 157) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式

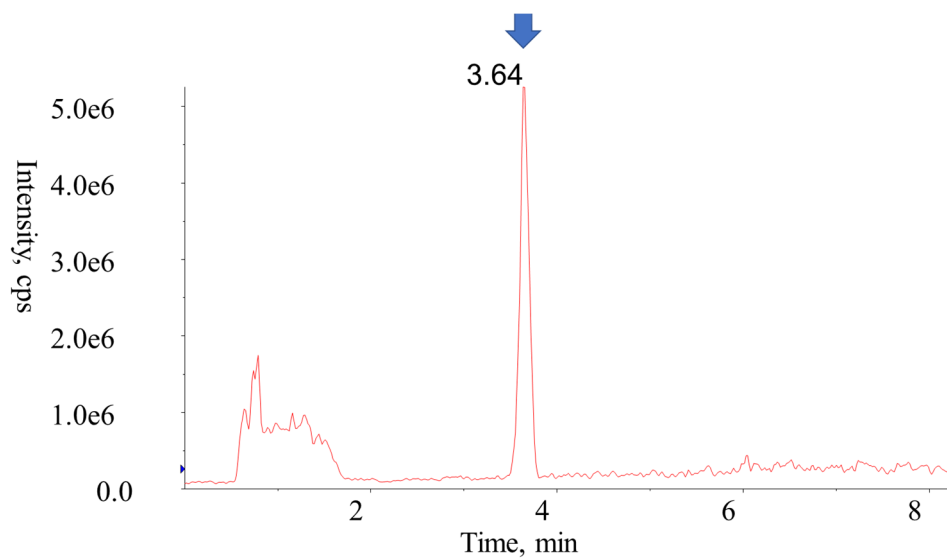
(a) m/z 113 (0hr)



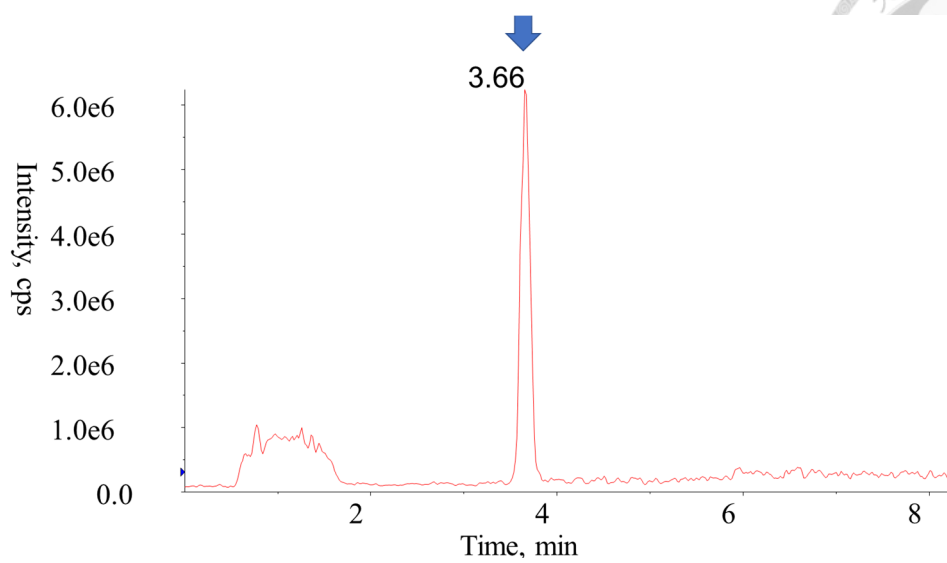
(b) m/z 113 (1hr)



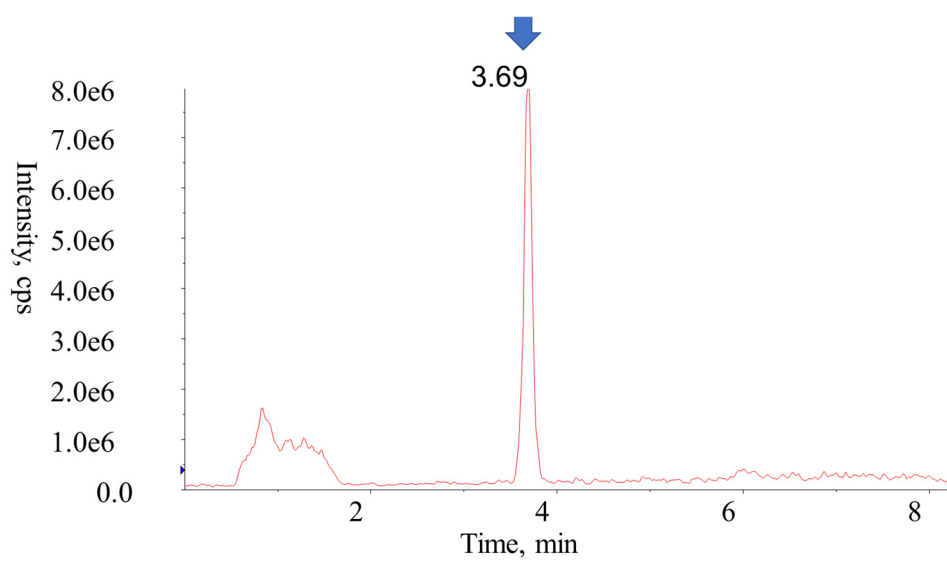
(c) m/z 113 (4hr)



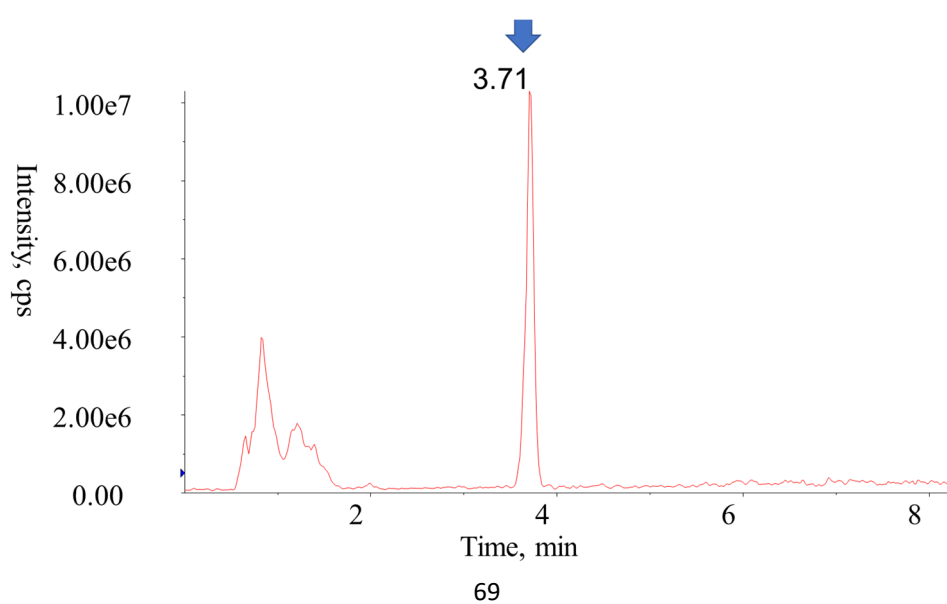
(d) m/z 113 (8hr)



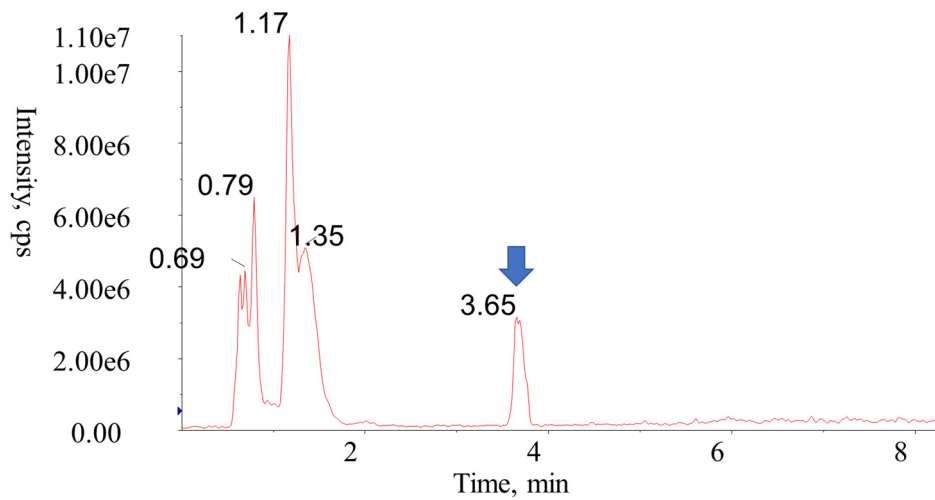
(e) m/z 113 (12hr)



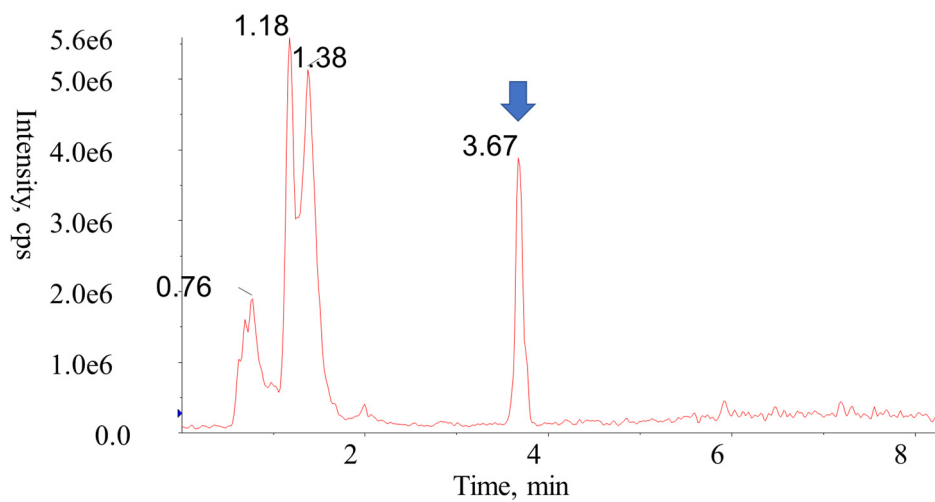
(f) m/z 113 (24hr)



(g) m/z 113 (72hr)



(h) m/z 113 (144hr)



(i) m/z 113 (168hr)

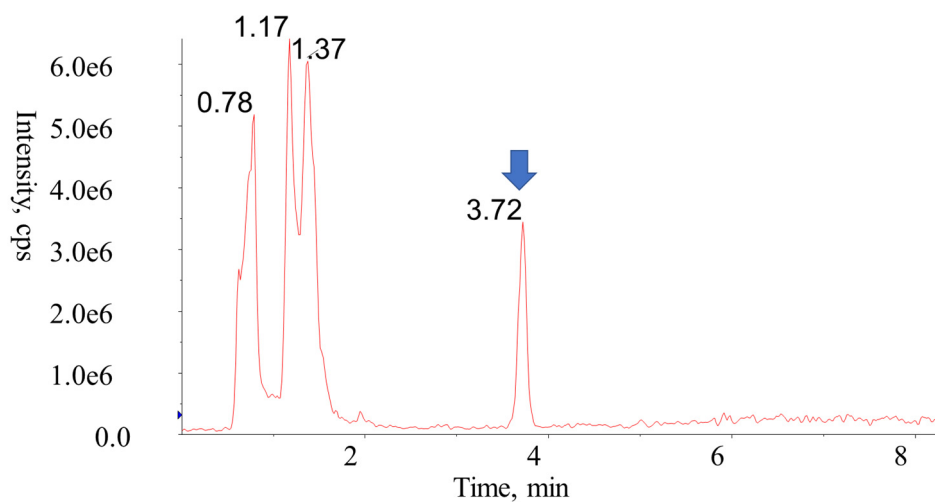


圖 39. (a)-(i)為 E10 (m/z 113) 於 phase I 反應 0 至 168 小時的層析圖

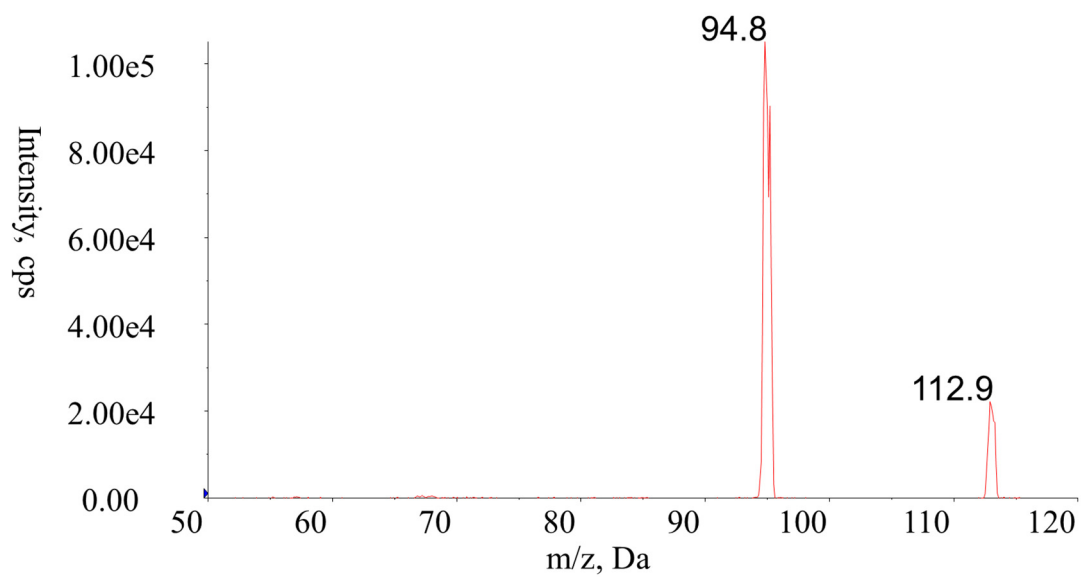


圖 40. E10 (m/z 113) 在 RT 3.7 min 的二次質譜圖 (CE 20 V)

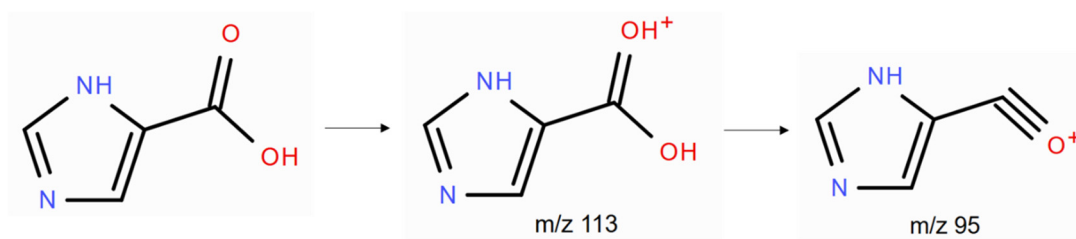


圖 41. 根據 E10 (m/z 113) 的二次質譜圖 (CE 20 V) 所預測的碎裂模式

第四章 結論



本研究首度以人類肝臟微粒體 (HLMs) 延長反應時間至 168 小時，系統分析依托咪酯在體外 Phase I 代謝之完整時間軌跡，並結合 LC-MS/MS 鑑定六條主要代謝途徑／產物：N-去烷基化 (E1)、苯乙基去氫化 (E2)、芳環羥基化 (E3)、乙氧基羥基化 (E4)、雙羥基化 (E5)、以及 O-去烷基化(E6)。時間曲線顯示依托咪酯酸 (E6) 於第 4 小時訊號大小超越原型藥、24 小時達最大值，證實其可作為為監測依托咪酯使用或濫用的生物標誌。

綜合結果可得三大結論：

(1)方法學突破

以 HLMs 結合 LC-MS/MS 所建立的策略，可在無標準品的情況下，有效率地鎖定並驗證未知代謝物，並於 9 個時間點描繪濃度動態，相較於既有僅觀察 HLMs 反應 0 至 2 小時的研究，延伸幅度顯著。

(2)代謝譜新見解

六條 Phase I 路徑中，以 N-去烷基化與 O-去烷基化最為活躍，前者衍生的 m/z 141 $\rightarrow$ 113 $\rightarrow$ 95 片段序列為判讀 Phase II 產物的關鍵特徵；後者生成的依托咪酯酸則可直接用於法醫與臨床檢測。

(3)技術限制與改進方向

Phase II 代謝物在 Q1 SIM 模式下可檢出，但 MS/MS 二次質譜之訊號不足，主因為 precursor DP/EP 未最佳化及輔酶供給不足，後續需對 Phase II 參數進行系統性優化，或在反應中外加 UDPGA 等輔因子以提高 Phase II 反應活性。

第五章 未來展望



在本研究中，為確認 Q1 SIM 模式下所偵測之 m/z 訊號是否確實對應於依托咪酯的代謝產物，本研究進一步採用產物離子掃描模式 (product ion mode) 進行分析。透過選擇 SIM 模式下之母離子 (precursor ion)，並施以碰撞誘導解離 (collision-induced dissociation, CID)，取得其對應的特徵性二次質譜圖。藉由 MS/MS 資料中各碎裂離子的組成與結構特徵進行比對，可有效驗證代謝產物之化學結構，進而提升定性分析的準確性與可信度。此策略特別適用於缺乏標準品的情況，提供代謝產物結構鑑定與推測其生物轉化機制的重要依據。

然而，儘管於 Q1 SIM 模式下可清楚觀察到 phase II 代謝物的訊號，但在進一步的 MS/MS 分析階段卻未能獲得足夠的碎片離子訊號。造成此現象的原因，可能是由於我們在進行此研究時，尚未針對這些 phase II 代謝物之前驅離子 (precursor ions) 的質譜參數 (例如去團簇電位 Declustering Potential, DP 及進樣電位 Entrance Potential, EP) 進行最佳化，因此在進入 MS/MS 碰撞誘導解離 (collision-induced dissociation, CID) 過程時，導致訊號明顯損失。

未來改善這個問題的解決方案有三個方向可考慮：首先，透過對 phase II 代謝物之 precursor ions 進行系統性的參數最佳化，特別是針對 DP 與 EP 進行調整，以獲得更穩定且更強的訊號強度；其次，可透過提高待測物的濃度或進樣量 (例如透過樣品的濃縮步驟) 以提升訊號強度；最後，亦可在進行代謝反應時添加 UDP 醣醛酸 (UDP-glucuronic acid) 等 phase II 反應的輔酶或共因子，以活化 phase II 代謝反應，促進 phase II 代謝物的形成，進而增加後續 MS/MS 分析中的訊號強度與檢測靈敏度。

此外，本研究利用原型藥物的碎裂途徑 (fragmentation pathway) 作為推測代謝產物碎裂模式的參考，透過三重四極桿質譜儀的產物離子掃描模式 (product ion mode) 獲取相關訊號。然而，若目標代謝產物因結構修飾而引入新的碎裂途徑，或發生分子內重排 (intramolecular rearrangement)，可能會產生與原型藥物顯著不同的產物離子分佈，導致部分代謝產物無法僅依 product ion mode 準確鑑別。因此，未來可引入高解析質譜儀 (HRMS) 以獲取精確質量 (accurate mass) 與同位素分佈資訊，從而推導化學分子式並提升結構判定的準確度。首先進行全質譜掃描 (Full MS scan)，依據推測的化學式搜尋對應的高精確前驅離子質量，並在二次質譜 (MS/MS scan) 中獲得碎片離子的精確質量與碎裂模式。當計算所得質量誤差 (mass error) 小於 ± 5 ppm 時，即可為所提出之分子式提供有力的證據。最終，我們可將三重四極桿質譜儀與 HRMS 的鑑定結果進行交叉比對與整合，藉此完成對代謝產物的準確鑑定與結構推測。

參考文獻



1. Millischer, V., et al., *Comparison of etomidate and methohexital as anesthetic agents for continuation and maintenance electroconvulsive therapy: A retrospective analysis of seizure quality and safety*. J Affect Disord, 2023. **330**: p. 33-39.
2. Chung, M., et al., *Use of etomidate in patients with heart failure undergoing noncardiac surgery*. Br J Anaesth, 2020. **125**(6): p. 943-952.
3. Forman, S.A., *Clinical and molecular pharmacology of etomidate*. Anesthesiology, 2011. **114**(3): p. 695-707.
4. Deitch, S., et al., *The use of etomidate for prehospital rapid-sequence intubation*. Prehosp Emerg Care, 2003. **7**(3): p. 380-3.
5. Flynn, G. and Y. Shehabi, *Pro/con debate: Is etomidate safe in hemodynamically unstable critically ill patients?* Crit Care, 2012. **16**(4): p. 227.
6. Erdoes, G., R.M. Basciani, and B. Eberle, *Etomidate--a review of robust evidence for its use in various clinical scenarios*. Acta Anaesthesiol Scand, 2014. **58**(4): p. 380-9.
7. Kulstad, E.B., et al., *Etomidate as an induction agent in septic patients: red flags or false alarms?* West J Emerg Med, 2010. **11**(2): p. 161-72.
8. Detweiler, C. and N. Mambo, *Suicide with Vecuronium and Etomidate: A Case Report and Review of the Literature*. Academic Forensic Pathology, 2014. **4**: p. 244-250.
9. Molina, D.K., V.M. Hargrove, and R.G. Rodriguez, *Distribution of etomidate in a fatal intoxication*. J Anal Toxicol, 2008. **32**(8): p. 715-8.
10. Deng, L., et al., *Non-Opioid Anesthetics Addiction: A Review of Current Situation and Mechanism*. Brain Sci, 2023. **13**(9).
11. Jung, Y.K., et al., *Simultaneous Determination of Etomidate and Its Major Metabolite, Etomidate Acid, in Urine Using Dilute and Shoot Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Molecules, 2019. **24**(24).
12. Han, C., et al., *Changes in psychiatric disorder incidence patterns during the COVID-19 pandemic in Korea: a study using the nationwide universal health insurance data*. BMC Psychiatry, 2024. **24**(1): p. 889.
13. Li, M., B. Lin, and B. Zhu, *Rapid Screening of Etomidate and Its Analogs in Seized e-Liquids Using Thermal Desorption Electrospray Ionization Coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry*. Toxics, 2024. **12**(12).

14. *Spread of 'space oil drug' (etomidate) abuse in Hong Kong and consequent emergency department presentations.* HKMJ, 2025.
15. CNA. *Police bust 135kg shipment of Cat. 2 narcotic etomidate.* 2024 [cited 2024 Nov 29]; Available from: <https://www.taipeitimes.com/News/taiwan/archives/2024/11/29/2003827683>.
16. UNODC. *Increasing detections of etomidate and analogues on illicit drug markets is becoming a global concern.* 2025 [cited 2025 07.13]; Available from: <https://www.unodc.org/LSS/Announcement/Details/8774c132-4b30-477c-9ceb-46ce384223fd>.
17. 迎戰「喪屍煙彈」：依托咪酯毒駕頻傳，鑑驗人員破解化學密碼的突破與挑戰 - 報導者 The Reporter. 2024; Available from: <https://www.twreporter.org/a/etomidate-drugtesting>.
18. Prakash, C., C.L. Shaffer, and A. Nedderman, *Analytical strategies for identifying drug metabolites.* Mass Spectrom Rev, 2007. **26**(3): p. 340-69.
19. Meyer, U.A., *Overview of enzymes of drug metabolism.* J Pharmacokinet Biopharm, 1996. **24**(5): p. 449-59.
20. Iwatsubo, T., et al., *Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data.* Pharmacol Ther, 1997. **73**(2): p. 147-71.
21. Ekins, S., et al., *Present and future in vitro approaches for drug metabolism.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(1): p. 313-24.
22. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons.* Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
23. Asha, S. and M. Vidyavathi, *Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review.* Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**(6): p. 1699-722.
24. Li, A.P., *Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties.* Drug Discov Today Technol, 2005. **2**(2): p. 179-85.
25. Fujiki, Y., et al., *Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum.* J Cell Biol, 1982. **93**(1): p. 97-102.
26. Jia, L. and X. Liu, *The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments.* Curr Drug Metab, 2007. **8**(8): p. 822-9.
27. He, T.-F., et al., *A highly efficient liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) assay for etomidate and etomidate acid in urine, liver and kidney.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2024. **125**: p. 107490.
28. Atucha, E., et al., *Structure–activity relationship of etomidate derivatives at*

- the GABAA receptor: Comparison with binding to 11 β -hydroxylase.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**(15): p. 4284-4287.
29. Massano, M., et al., *Metabolic profile of N-ethylhexedrone, N-ethylpentedrone, and 4-chloromethcathinone in urine samples by UHPLC-QTOF-HRMS.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2024. **241**: p. 115994.
30. Qin, S., et al., *Mass spectrometric characterization and identification of new methcathinone metabolites in human blood (plasma), urine and hair by liquid chromatography-high field quadrupole exactive orbitrap mass spectrometer.* Microchemical Journal, 2020. **159**: p. 105423.
31. Nykodemová, J., et al. *2C-B-Fly-NBOMe Metabolites in Rat Urine, Human Liver Microsomes and C. elegans: Confirmation with Synthesized Analytical Standards.* Metabolites, 2021. **11**, DOI: 10.3390/metabo11110775.
32. de Araujo, A.L.D., et al., *Is zebrafish (Danio rerio) water tank model applicable for the assessment of glucocorticoids metabolism? The budesonide assessment.* Journal of Chromatography B, 2021. **1179**: p. 122826.
33. Alipour, M., et al., *Histopathological study on neuroapoptotic alterations induced by etomidate in rat hippocampus.* Acta Histochemica, 2021. **123**(3): p. 151693.
34. Gawlik, M. and R. Skibiński, *Identification of new metabolites of vardenafil with the use of HLM and photochemical methods by LC-ESI-HRMS combined with multivariate chemometric analysis.* International Journal of Mass Spectrometry, 2018. **433**: p. 55-60.
35. Peeters, L., et al., *A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions.* Chemo-Biological Interactions, 2020. **328**: p. 109192.
36. Lee, H.-K., et al., *PI60 - In vitro metabolism of endosulfan sulfate in human liver microsomes, S9 fractions and hepatocytes.* Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2020. **35**(1, Supplement): p. S71-S72.
37. Murari, M., et al., *Study of metabolism and potential toxicity of nine synthetic opioid analogs using the zebrafish larvae model.* Drug Testing and Analysis, 2024. **16**(6): p. 629-637.
38. Zhao, W., et al., *The uses of zebrafish (Danio rerio) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024. **272**: p. 116023.
39. Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.* Nature, 2013. **496**(7446): p. 498-503.
40. Zhong, S., et al., *Identification and characterization of etomidate and metomidate metabolites in zebrafish, HLMs and S9 fraction by quadrupole-*

- orbitrap LC-MS/MS for drug control*. Journal of Chromatography B, 2025. **1250**: p. 124374.
41. *Etomidate Rapid Test Kit*. 2025; Available from: https://www.bio-equip.cn/enshow1equip.asp?equipid=144301&utm_source=chatgpt.com.
 42. Yum, H., et al., *Fast and reliable analysis of veterinary metomidate and etomidate in human blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in a postmortem case*. J Forensic Sci, 2021. **66**(6): p. 2532-2538.
 43. Han, X., et al., *UPLC-MS/MS Method for Detection of Etomidate and Its Metabolite Etomidate Acid Quantity in Blood*. Fa Yi Xue Za Zhi, 2023. **39**(6): p. 564-570.
 44. Qian, X., et al., *Rapid qualitative and quantitative analysis of etomidate and its structural analogs in blood by UPLC-MS/MS and application in six forensic cases*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2025. **264**: p. 116962.
 45. Deng, X.-s. and V.J. Simpson, *Gas chromatographic–mass spectrometric determination of etomidate in mouse brain*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2000. **43**(1): p. 73-77.
 46. Tang, Y., et al., *Metabolic Profile of Etomidate and Its Three Analogs in Zebrafish, Human Liver Microsomes, Human Urine and Hair Samples Using UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS*. Drug Testing and Analysis, 2025. **n/a**(n/a).
 47. Yost, R.A. and C.G. Enke, *Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation*. Anal Chem, 1979. **51**(12): p. 1251-64.
 48. Cooks, R.G., *Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary*. Journal of Mass Spectrometry, 1995. **30**(9): p. 1215-1221.
 49. Zimdahl Kahlin, A., *Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism*. 2020.
 50. Jjunju, F., *Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends*. 2015.
 51. Liu, X. and L. Jia, *The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies*. Curr Drug Metab, 2007. **8**(8): p. 815-21.
 52. Valk, B.I. and M. Struys, *Etomidate and its Analogs: A Review of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Clin Pharmacokinet, 2021. **60**(10):

p. 1253-1269.

