【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I628435
【45】公告日： 中華民國 107 (2018) 年 07 月 01 日
【51】Int. Cl.：　*G01N33/50　(2006.01)*　*G01N33/68　(2006.01)*
發明　全 10 頁

【54】名　稱：穀胱甘肽的檢測方法及其套組
METHOD FOR DETECTING GLUTATHIONE AND KIT THEREOF

【21】申請案號：106122222　【22】申請日： 中華民國 106 (2017) 年 07 月 03 日
【30】優 先 權： 2017/02/17　美國　62/460,452

【72】發 明 人： 馮嘉嫻 (TW) FENG, CHIA HSIEN；陳貞文 (TW) CHEN, CHEN WEN
【71】申 請 人： 高雄醫學大學　KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY
高雄市三民區十全一路 100 號
【74】代 理 人： 黃耀霆

【56】參考文獻：
CN　101329345A　　CN　103512855A
WO　2009/018112A2

審查人員：林佳慧

【57】申請專利範圍

1. 一種穀胱甘肽的檢測方法，係包含：提供一待測樣品，該待測樣品含有穀胱甘肽；以 9-溴甲基丫啶作為一衍生試劑，混合該待測樣品、該衍生試劑及一衍生溶媒以得一待反應混合液，以使該衍生試劑與該待測樣品所含有之穀胱甘肽進行一衍生反應而得一衍生溶液，該衍生溶液含有一穀胱甘肽衍生物，該穀胱甘肽衍生物為硫醇基上置換有一標記之穀胱甘肽，該衍生溶媒為可溶解該衍生試劑及穀胱甘肽之一溶媒；於該衍生溶液中加入一移除干擾溶媒以移除該衍生溶液中多餘的衍生試劑，經由震盪及離心以獲得一水層溶液，該移除干擾溶媒為與該待反應混合液不互溶之一溶媒，該移除干擾溶媒之 Log P 值介於 0.5~2.0 之間；及以該水層溶液作為一待測溶液，以紫外光光譜法、螢光光譜法、液相層析法或質譜分析法偵測該待測溶液中的穀胱甘肽衍生物，以獲得一穀胱甘肽強度值。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇丙酮、乙腈或二甲基亞碸作為該衍生溶媒。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，混合該待測樣品、該衍生試劑、該衍生溶媒及一鹼催化劑以得該待反應混合液，以使該衍生試劑與該待測樣品所含有之穀胱甘肽進行該衍生反應。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇丙酮、乙腈或二甲基亞碸作為該衍生溶媒，且選擇氫氧化鈉、氫氧化鉀、碳酸氫鈉或碳酸氫鉀作為該鹼催化劑。
5. 如申請專利範圍第 1~4 項中任一項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇乙酸乙酯、乙酸正丙酯或乙酸叔丁酯作為該移除干擾溶媒。
6. 如申請專利範圍第 1~4 項中任一項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，以一陽離子界面活性劑作為一萃取試劑，萃取該水層溶液中的穀胱甘肽衍生物並獲得一萃取液，續將該萃取液作為該待測溶液，以獲得該穀胱甘肽強度值。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇乙酸乙酯、乙酸正丙酯或乙酸叔丁酯作為該移除干擾溶媒，且選擇三辛基甲基氯化銨、四庚基溴化銨或四辛基溴化銨作為該萃取試劑。

8. 如申請專利範圍第 1~4 項中任一項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，混合一血液樣品及一蛋白質沉澱劑，使該血液樣品中的蛋白質形成一蛋白質沉澱物，藉由離心去除該蛋白質沉澱物以獲得一上清液，該上清液即為該待測樣品。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇丙酮或乙腈作為該蛋白質沉澱劑。
10. 如申請專利範圍第 1~4 項中任一項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，混合一血液樣品及一還原試劑，使該還原試劑打斷該血液樣品中的穀胱甘肽的雙硫鍵結，再加入一蛋白質沉澱劑，使該血液樣品中的蛋白質形成一蛋白質沉澱物，藉由離心去除該蛋白質沉澱物以獲得一上清液，該上清液即為該待測樣品。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之穀胱甘肽的檢測方法，其中，選擇二硫蘇糖醇作為該還原試劑，且選擇丙酮或乙腈作為該蛋白質沉澱劑。
12. 一種穀胱甘肽的檢測套組，用以檢測一待測樣品是否包含穀胱甘肽，該穀胱甘肽的檢測套組係包含：一衍生試劑，該衍生試劑為 9-溴甲基丫啶，且用以與該待測樣品中的穀胱甘肽進行一衍生反應以形成一穀胱甘肽衍生物，該穀胱甘肽衍生物為硫醇基上置換有一標記之穀胱甘肽；一衍生溶媒，用以與該待測樣品及該衍生試劑共同形成一待反應混合液，該衍生溶媒為可溶解該衍生試劑及穀胱甘肽之一溶媒；及一移除干擾溶媒，該移除干擾溶媒為與該待反應混合液不互溶之一溶媒，該移除干擾溶媒之 Log P 值介於 0.5~2.0 之間。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該衍生溶媒為丙酮、乙腈或二甲基亞碸。
14. 如申請專利範圍第 12 或 13 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該檢測套組另包含：一鹼催化劑，該鹼催化劑為可溶解於該衍生溶媒之鹼性化合物，且用以提供進行該衍生反應的一鹼性環境。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該鹼催化劑為氫氧化鈉、氫氧化鉀、碳酸氫鈉或碳酸氫鉀。
16. 如申請專利範圍第 12 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該移除干擾溶媒為乙酸乙酯、乙酸正丙酯或乙酸叔丁酯。
17. 如申請專利範圍第 12 或 16 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該檢測套組另包含：一萃取溶劑，該萃取溶劑為碳數 25~32 的一陽離子界面活性劑，且用以萃取該穀胱甘肽衍生物。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述之穀胱甘肽的檢測套組，其中，該萃取試劑為三辛基甲基氯化銨、四庚基溴化銨或四辛基溴化銨。

圖式簡單說明

第 1a 圖：還原型穀胱甘肽(reduced glutathione)的化學結構式。

第 1b 圖：氧化型穀胱甘肽(oxidized glutathione)的化學結構式。

第 2 圖：本發明第一實施例之穀胱甘肽的檢測方法之流程圖。

第 3 圖：還原型穀胱甘肽與 9-溴甲基丫啶之衍生反應的化學方程式。

第 4 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之流程圖。

第 5 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同種類的衍生試劑之測試結果長條圖。

第 6a 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同種類的鹼催化劑之測試結果長條圖。

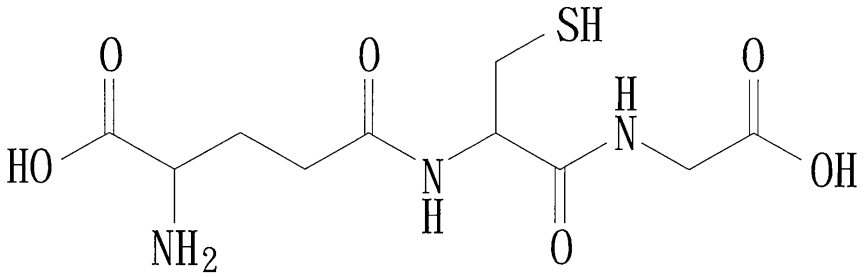
第 6b 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同濃度的氫氧化鈉水溶液(鹼催化劑)之測試結果長條圖。

第 7 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同種類的移除干擾溶媒之測試結果長條圖。

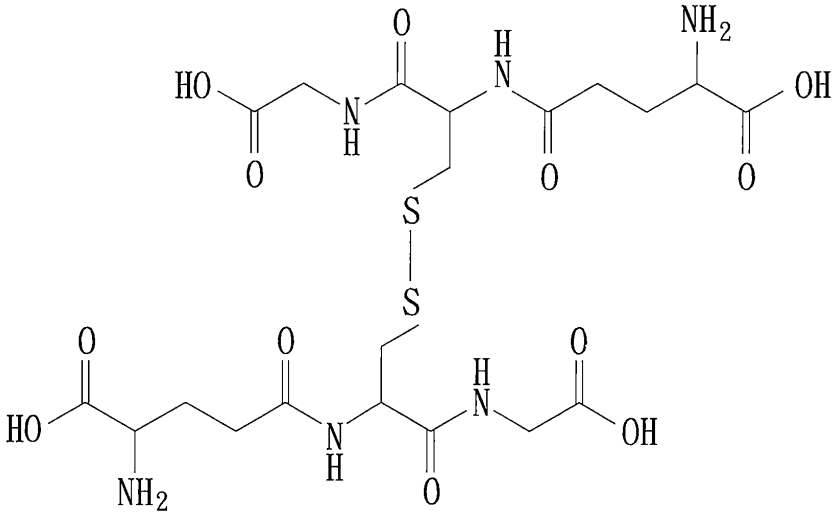
第 8 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同種類的萃取溶劑之測試結果長條圖。

第 9 圖：本發明第一實施例之穀胱甘肽的檢測方法與第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之比較結果，其中，波峰 1 所示為穀胱甘肽、波峰 2 所示為衍生試劑之水解產物，且波峰 3 所示為衍生試劑。

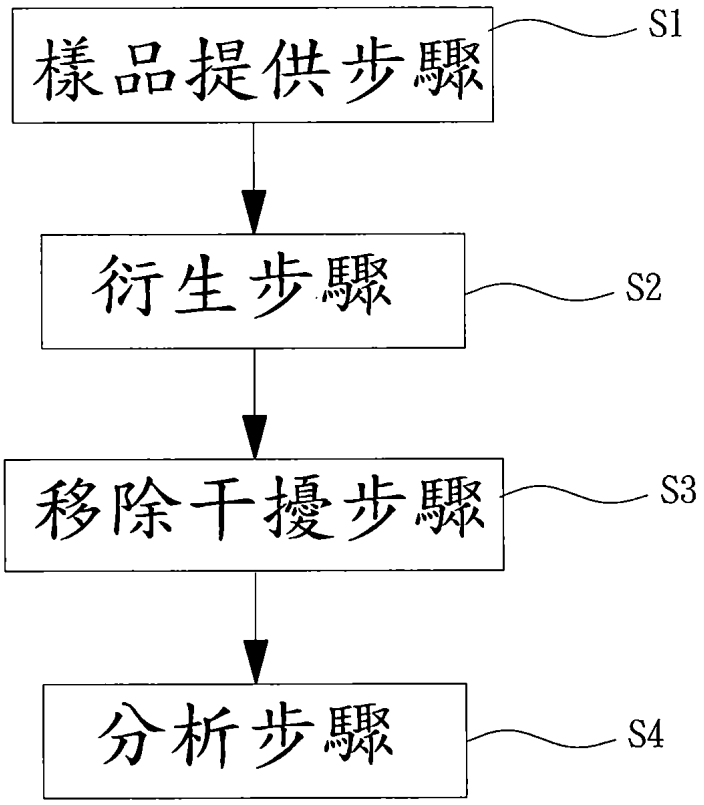
第 10 圖：本發明第二實施例之穀胱甘肽的檢測方法之不同種類的還原試劑之測試結果長條圖。



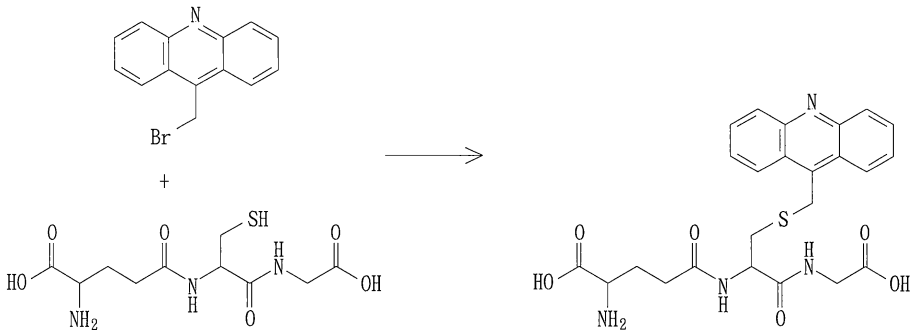
第 1a 圖



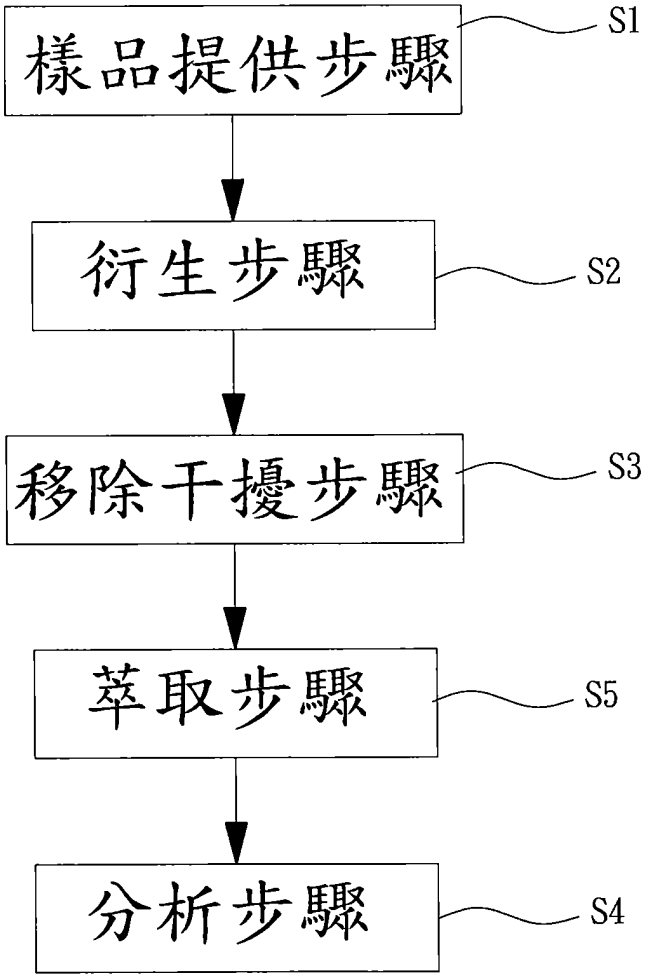
第 1b 圖



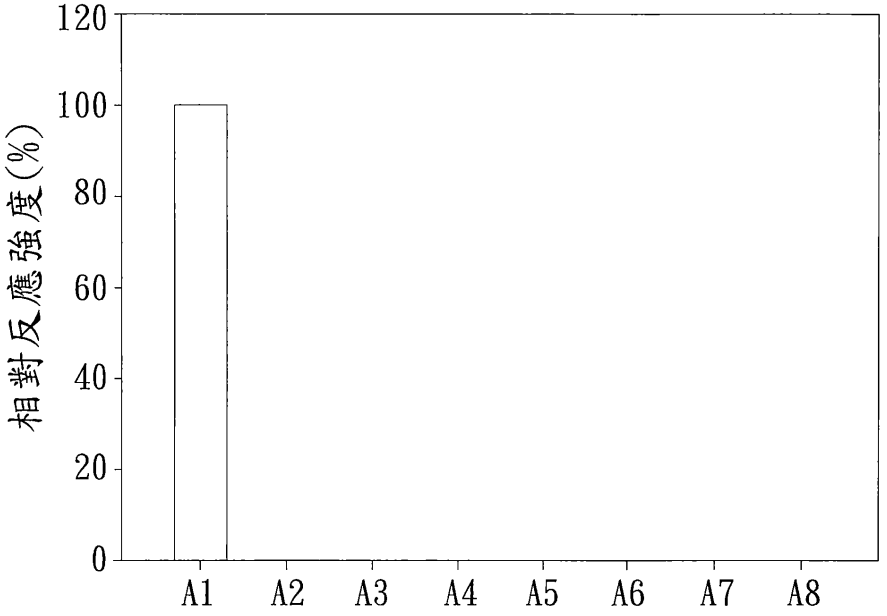
第 2 圖



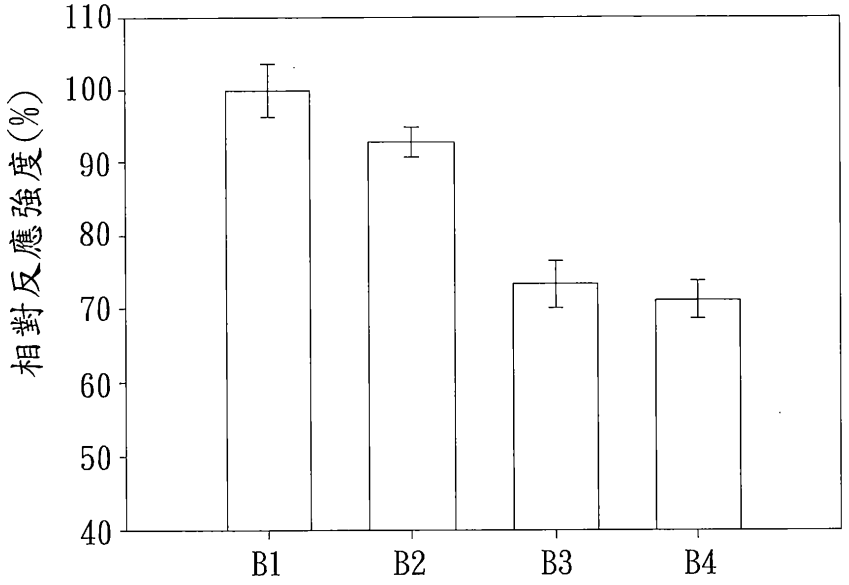
第 3 圖



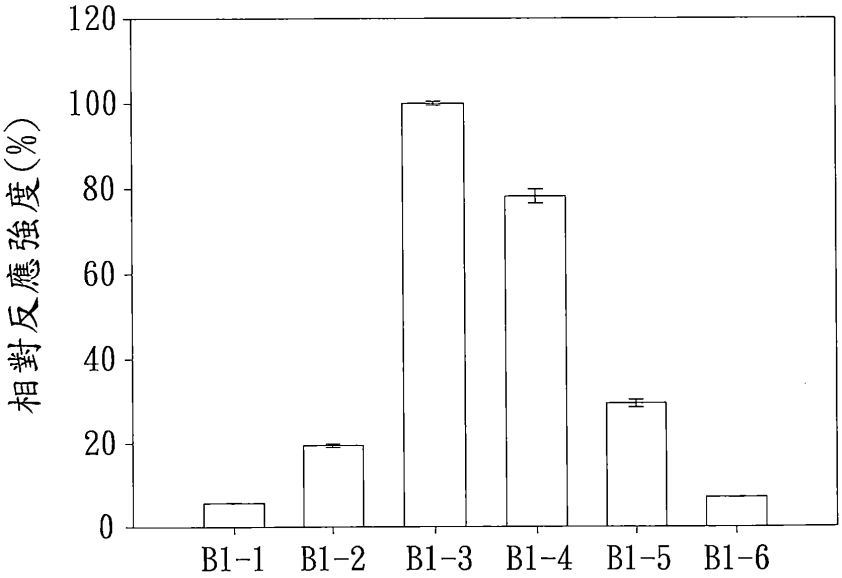
第 4 圖


120
100
80
60
40
20
0
相對反應強度(%)
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8

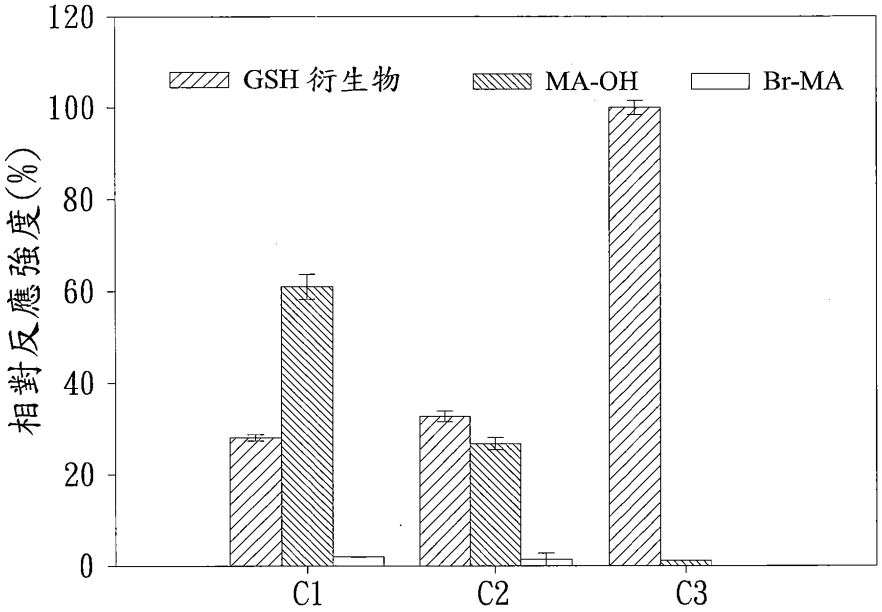
第 5 圖


110
100
90
80
70
60
50
40
相對反應強度(%)
B1
B2
B3
B4

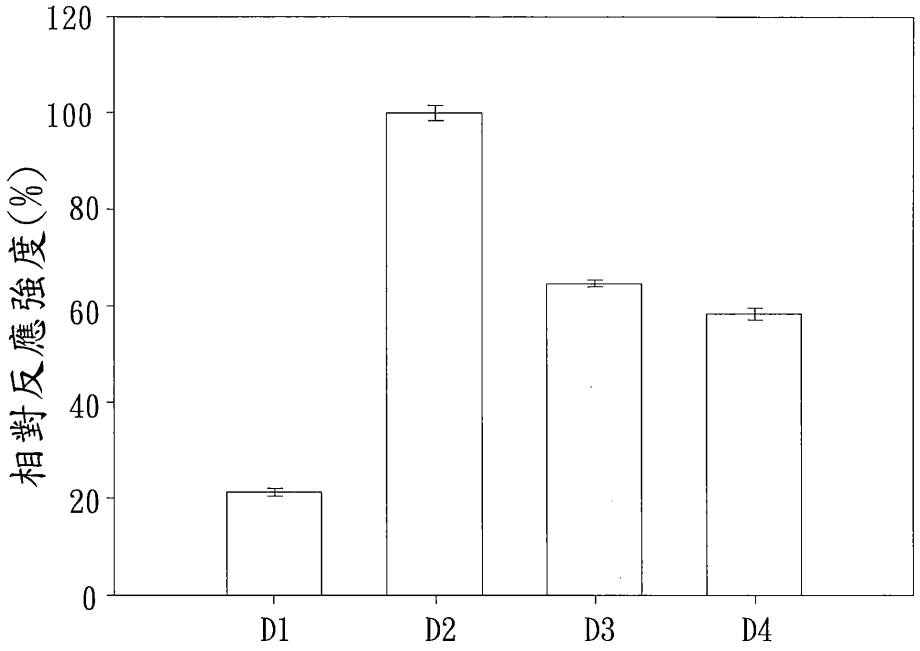
第 6a 圖


120
100
80
60
40
20
0
相對反應強度(%)
B1-1
B1-2
B1-3
B1-4
B1-5
B1-6

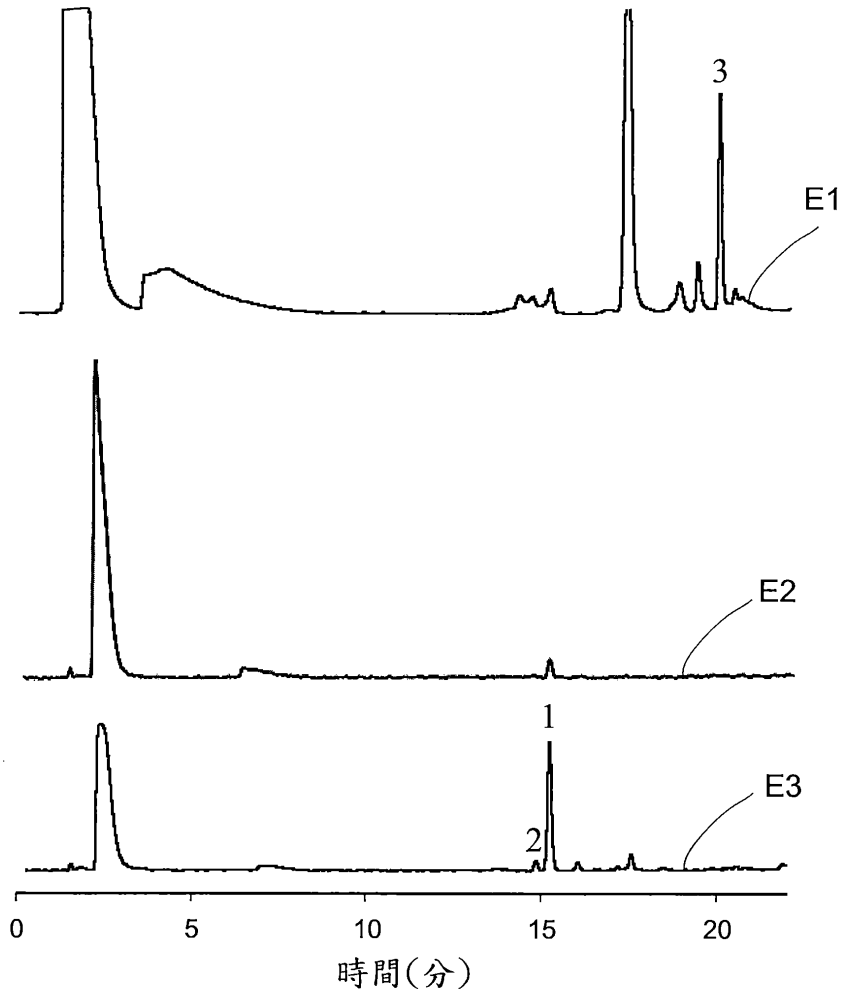
第 6b 圖


120
100
80
60
40
20
0
相對反應強度(%)
GSH 衍生物
MA-OH
Br-MA
C1
C2
C3

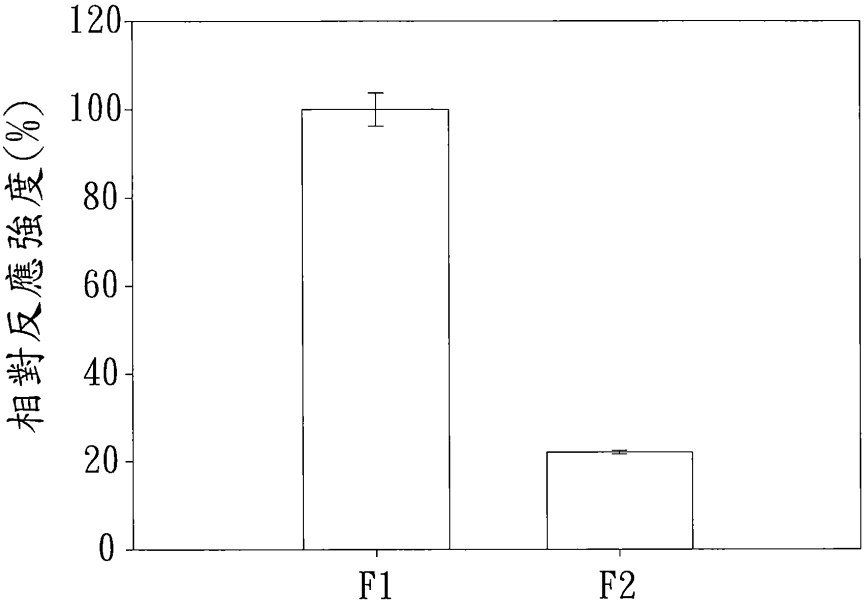
第 7 圖



第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖