



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I630387 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：106103831

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 06 日

(51)Int. Cl. : G01N30/02 (2006.01)

(30)優先權：2016/09/27 美國

62/400,120

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：馮嘉嫻 FENG, CHIA HSIEN (TW)；陳易青 CHEN, YI CHING (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

TW 201608010A

王聰，中國海洋大學研究生學位論文，發表日期：20110518。

Kamimori H et al., Anal Biochem. 1994 May 1;218(2):417-24.

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：11 共 33 頁

(54)名稱

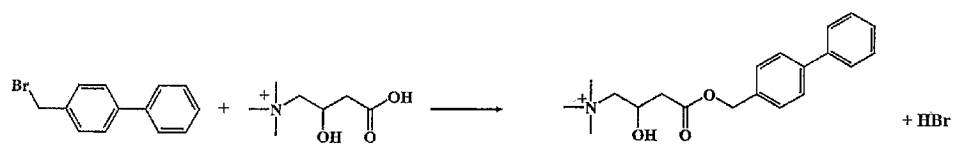
具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法、肉鹼缺乏症的診斷方法及用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組METHOD FOR DETECTING A QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND HAVING A γ -ACID GROUP, DIAGNOSIS OF CARNITINE DEFICIENCY AND KIT FOR DETECTING THE QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND HAVING THE γ -ACID GROUP

(57)摘要

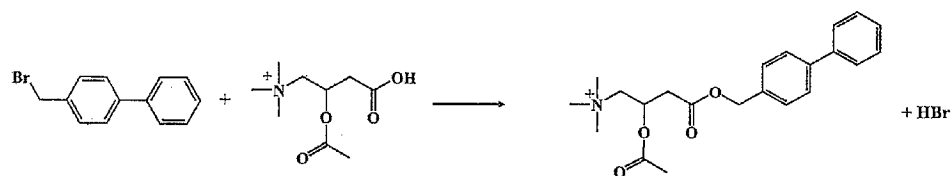
本發明提供一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，可以使一具 γ -羧酸基之四級銨化合物帶有螢光團者；一種肉鹼缺乏症的診斷方法，利用前述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法來檢測取自一疑似患者之樣品中的肉鹼含量，以評估該疑似患者是否罹患肉鹼缺乏症者；及一種用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，可以檢測一待測樣品中之具 γ -羧酸基之四級銨化合物濃度者。

The present invention provides a method for detecting a quaternary ammonium compound having a γ -acid group. The method allows the quaternary ammonium compound having a γ -acid group to carry a fluorophore. The present invention also provides a diagnosis of carnitine deficiency using said method to detect carnitine content in a sample taken from a suspected patient to assess whether the patient is suffering from carnitine deficiency; and a kit for detecting levels of the quaternary ammonium compound having the γ -acid group in a sample.

指定代表圖：

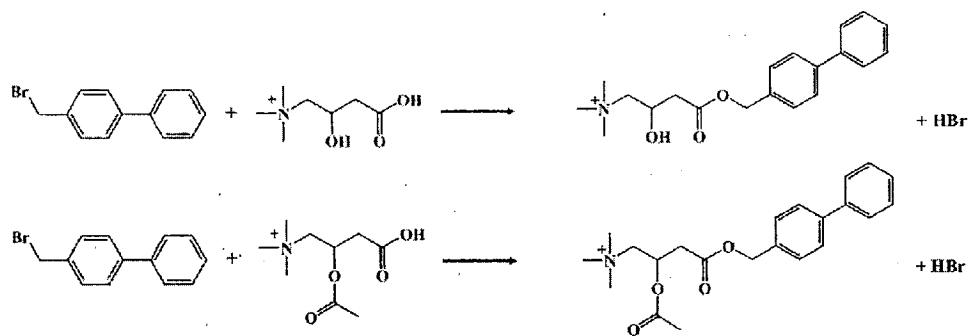


第 1a 圖



第 1b 圖

特徵化學式：



I630387

發明摘要

※ 申請案號：106103831

※ 申請日：106/02/06

※IPC 分類：G01N 30/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法、肉鹼缺乏症的診斷方法及用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組 / Method for Detecting a Quaternary Ammonium Compound Having a γ -acid Group, Diagnosis of Carnitine Deficiency and Kit for Detecting the Quaternary Ammonium Compound Having the γ -acid Group

【中文】

本發明提供一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，可以使一具 γ -羧酸基之四級銨化合物帶有螢光團者；一種肉鹼缺乏症的診斷方法，利用前述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法來檢測取自一疑似患者之樣品中的肉鹼含量，以評估該疑似患者是否罹患肉鹼缺乏症者；及一種用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，可以檢測一待測樣品中之具 γ -羧酸基之四級銨化合物濃度者。

【英文】

The present invention provides a method for detecting a quaternary ammonium compound having a γ -acid group. The method allows the quaternary ammonium compound having a γ -acid group to carry a fluorophore. The present invention also provides a diagnosis of carnitine deficiency using said method to detect carnitine content in a sample taken from a suspected patient to assess whether the patient is suffering from carnitine deficiency; and a kit for detecting levels of the quaternary ammonium compound having the γ -acid group in a sample.

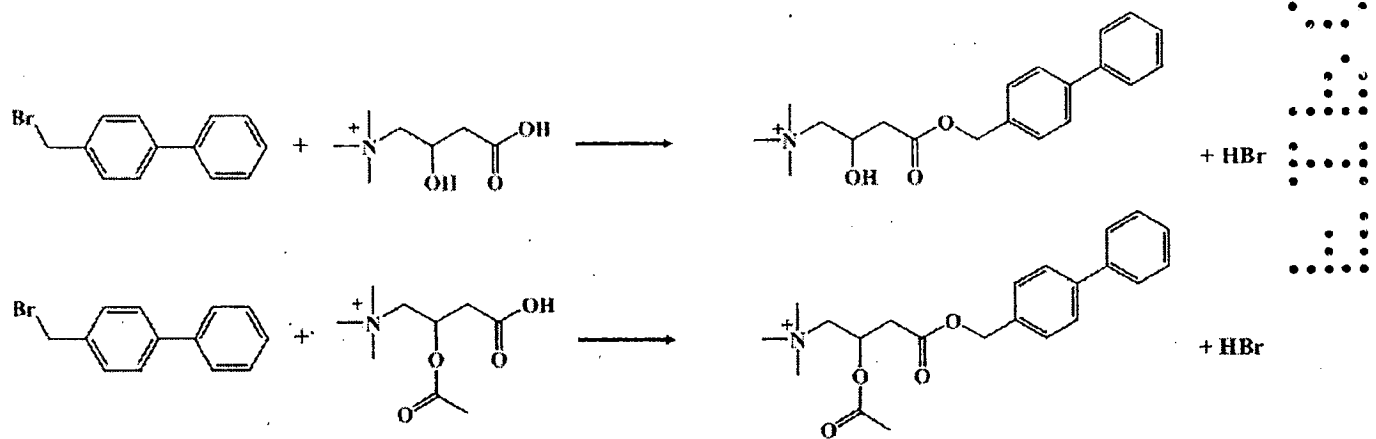
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



107年5月15日修正替換頁

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法、肉鹼缺乏症的診斷方法及用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組 / Method for Detecting a Quaternary Ammonium Compound Having a γ -acid Group, Diagnosis of Carnitine Deficiency and Kit for Detecting the Quaternary Ammonium Compound Having the γ -acid Group

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種檢測方法、利用該檢測方法之診斷方法及套組，特別關於一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法、一種肉鹼缺乏症的診斷方法及一種用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組。

【先前技術】

【0002】 具 γ -羧酸基之四級銨化合物（如，L-肉鹼、醯基肉鹼、乙醯肉鹼等）為對於人體而言係屬相當重要之分子，惟，此類化合物不僅分子量大，更由於其分子結構中同時具有羧酸基及四級銨基團，因此使該化合物具有高極性而難以萃取，且該具 γ -羧酸基之四級銨化合物缺乏螢光團（fluorophore）等發光基團，因而使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物不適用於習知檢測方法。

【發明內容】

【0003】 為解決上述問題，本發明提供一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，係可以使一具 γ -羧酸基之四級銨化合物帶有螢光團，而適用以螢光檢測法進行檢測者。

【0004】 本發明另提供一種肉鹼缺乏症的診斷方法，係利用前述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法來檢測取自一疑似患者體內之樣品的

107年5月15日修正替換頁

肉鹼類含量，以評估該疑似患者是否罹患肉鹼缺乏症者。

【0005】 本發明更提供一種用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，係可以檢測一待測樣品中是否包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物者。

【0006】 本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，係包含：提供一樣品，該樣品包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物；混合該樣品、具有一螢光團之一螢光化合物及一極性非質子溶劑，以形成一反應溶液；將該反應溶液置於 $80\sim 120^{\circ}\text{C}$ 下 $1\sim 15$ 分鐘，使該螢光化合物之螢光團與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行一 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液包含一衍生物，該衍生物為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的具 γ -羧酸基之四級銨化合物；於該衍生溶液中加入一萃取劑及一共溶劑，該萃取劑的極性較乙腈的極性高，使該萃取劑及該共溶劑共同形成一油包水之乳劑並分散於該衍生溶液中，以利用該萃取劑萃取該衍生溶液中的衍生物並獲得一待測溶液；及偵測該待測溶液中的衍生物，其中，該具有螢光團之螢光化合物為 4-溴甲基聯苯，該極性非質子溶劑為乙腈，該萃取劑為一醋酸銨水溶液，該共溶劑為甲苯；如此藉由該螢光化合物（4-溴甲基聯苯）及該極性非質子溶劑（乙腈）之添加，可以使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物與該螢光化合物（4-溴甲基聯苯）進行該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應，而使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物帶有該螢光團，不僅可以使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物適用於螢光檢測法，同時可以降低該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之極性，以利於後續之分離及分析。

【0007】 本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，該檢測方法另包含：於該反應溶液中加入一鹼劑，續使溶解有該鹼劑之反應溶液進行該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應，以獲得該衍生溶液；如此可以達成縮短該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應所需時間。

【0008】 本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，檢

107年5月15日修正替換頁

測方法另包含：選擇氫氧化鉀、碳酸鉀或碳酸氫鉀作為該鹼劑；如此可以對該 S_N2 親核取代反應提供合適的反應環境。

【0009】 本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，係以逆相層析法、螢光光譜法或質譜分析法偵測該待測溶液中的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的衍生物；如此可以使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物容易偵測。

【0010】 本發明之肉鹼缺乏症的診斷方法，係包含：自一疑似患者取得一樣品；以上述具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，於體外偵測該樣品中的肉鹼類化合物之含量，以獲得一偵測值；及比較該樣品的偵測值與一參考值；其中，該偵測值低於該參考值顯示該疑似患者罹患肉鹼缺乏症；如此利用上述具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法偵測由該疑似患者取得之樣品，能夠有效地分析該樣品中的肉鹼類含量，以有效地診斷該疑似患者是否罹患肉鹼缺乏症。

【0011】 本發明之肉鹼缺乏症的診斷方法，其中，偵測該樣品中的 L-肉鹼之含量，以獲得該偵測值，及偵測取自一健康個體之樣品中的 L-肉鹼之含量，以獲得該參考值。

【0012】 本發明之肉鹼缺乏症的診斷方法，其中，偵測該樣品中的 L-肉鹼之含量及乙醯肉鹼之含量，並計算該樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量之比值，以獲得該偵測值，及偵測取自一健康個體之樣品中的 L-肉鹼之含量及乙醯肉鹼之含量，並計算該健康個體之樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量之比值，以獲得該參考值。

【0013】 本發明之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，係包含：一具有螢光團之螢光化合物，該螢光化合物之螢光團用以與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行一 S_N2 親核取代反應以形成一衍生物；一極性非質子溶劑，用以加速該 S_N2 親核取代反應；一萃取劑，用以萃取

107年5月15日修正替換頁

該衍生物，該萃取劑的極性較該極性非質子溶劑的極性高；及一共溶劑，用以與該萃取劑共同形成一油包水之乳劑；其中，該具有螢光團之螢光化合物為 4-溴甲基聯苯，該極性非質子溶劑為乙腈，該萃取劑為一醋酸銨水溶液，該共溶劑為甲苯；如此確實能夠使包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物的樣品進行 S_N2 親核取代反應而生成該衍生物，以進一步利用逆相層析法、螢光光譜法或質譜分析法分析。

【0014】 本發明之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，其中，該套組另包含：一鹼劑，該鹼劑為可溶解於該極性非質子溶劑之鹼性化合物，且用以提供進行該 S_N2 親核取代反應的一鹼性環境；如此可以縮短該 S_N2 親核取代反應所需時間。

【0015】 本發明之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，其中，該鹼劑為氫氧化鉀、碳酸鉀或碳酸氫鉀；如此可以對該 S_N2 親核取代反應提供合適的反應環境。

【圖式簡單說明】

【0016】

第 1a 圖：係 4-溴甲基聯苯與肉鹼進行 S_N2 親核取代反應之反應式。

第 1b 圖：係 4-溴甲基聯苯與乙醯肉鹼進行 S_N2 親核取代反應之反應式。

第 2 圖：係第 A11~A16 及 A21~A26 組之峰面積比長條圖。

第 3 圖：係第 B11~B16 及 B21~B26 組之峰面積比長條圖。

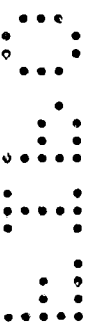
第 4 圖：係第 C10~C13 及 C20~C23 組之峰面積比長條圖。

第 5 圖：係第 C11 及 C21 組於 80°C 下加熱之峰面積比長條圖。

第 6 圖：係第 C11 及 C21 組於 90°C 下加熱之峰面積比長條圖。

第 7 圖：係第 C11 及 C21 組於 100°C 下加熱之峰面積比長條圖。

第 8 圖：係第 E11~E16 及 E21~E26 組之峰面積比長條圖。



107年5月15日修正替換頁

第 9 圖：係第 F11～F16 及 F21～F26 組之峰面積比長條圖。

第 10 圖：係第 G10～G14 及 G20～G24 組之峰面積比長條圖。

第 11 圖：係第 H10～H14 及 H20～H24 組之峰面積比長條圖。

【實施方式】

【0017】 為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【0018】 本發明所述之「具 γ -羧酸基之四級銨化合物」係指具有碳鏈之四級銨化合物中，於 γ 碳位具有一羧酸基（carboxylic acid group，即 $-C(=O)OH$ ）者，例如丁基甜菜鹼（butyrobetaine）、肉鹼（L-carnitine）、醯基肉鹼（acyl-L-carnitine species）、肉鹼酒石酸鹽（carnitine tartrate）、肉鹼延胡索酸鹽（carnitine fumarate）或肉鹼檸檬酸鹽（carnitine citrate）等，其中醯基肉鹼包含但不限於乙醯肉鹼（acetyl-L-carnitine）、丙醯肉鹼（propionyl-L-carnitine）、丁醯肉鹼（butyryl-L-carnitine）、異戊醯肉鹼（isovaleryl-L-carnitine）、己醯肉鹼（hexanoyl-L-carnitine）、辛醯肉鹼（octanoyl-L-carnitine）、癸醯肉鹼（decanoyl-L-carnitine）、月桂醯肉鹼（lauroyl-L-carnitine）、肉豆蔻醯肉鹼（myristoyl-L-carnitine）、棕櫚醯肉鹼（palmitoyl-L-carnitine）及硬脂醯肉鹼（stearoyl-L-carnitine）等，係為本發明所屬技術領域之通常知識者可以理解。

【0019】 本發明之一實施例的用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組係可以包含一具有螢光團（fluorophore）之螢光化合物（fluorescent compound）及一極性非質子溶劑（polar aprotic solvent），該套組係可以應用於檢測一樣品中是否含有具 γ -羧酸基之四級銨化合物。

【0020】 該樣品係可以選擇一藥物樣品、一化妝品樣品、一食品樣品、或來自一哺乳生物之生物樣品。詳言之，以該套組檢測該樣品前，可以根據樣品類型來進行合適之前處理，例如離心或乾燥等，係為本發明所

屬技術領域之通常知識者可以理解。

【0021】 更詳言之，係可以混合該樣品、該螢光化合物及該極性非質子溶劑，以形成一反應溶液，使該螢光化合物之螢光團與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行一 S_N2 親核取代反應 (S_N2 nucleophilic substitution reaction) 以形成一衍生物，該衍生物為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的具 γ -羧酸基之四級銨化合物（為便於後續說明，係將包含該衍生物之該反應溶液稱為一「衍生溶液」）。如此，即可以將該衍生溶液作為一待測溶液，並偵測該待測溶液中的衍生物，以得知該樣品中是否包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物。

【0022】 該螢光化合物包含該螢光團及一離去基 (leaving group)，該 S_N2 親核取代反應中，該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之羧酸基會於中性或鹼性環境下進行去質子化反應 (deprotonation)，攻擊該螢光化合物，使該離去基自該螢光化合物脫離，如此，該具 γ -羧酸基之四級銨化合物與該螢光化合物之螢光基團即可以共同形成該衍生物；舉例而言，該螢光化合物可以為 4-溴甲基聯苯 (4-bromomethylbiphenyl)、4-溴乙基聯苯 (4-bromoethylbiphenyl)、4-溴甲基-2'-氰基聯苯 (4-bromomethyl-2'-cyanobiphenyl)、(2-聯苯)重氮甲烷 ((2-biphenyl)diazomethane)、4-胺聯苯 (4-aminobiphenyl)、聯苯-4-基-氫氯酸肼 (biphenyl-4-yl-hydrazine hydrochloride)、4-苯酚 (4-phenylphenol) 或 4-聯苯三氟甲磺酸 (4-biphenyl trifluoromethanesulfonate)，惟不應以此為限。以 4-溴甲基聯苯作為該螢光化合物，且以肉鹼作為該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之情形，上述 S_N2 親核取代反應之反應式係如第 1a 圖所示；或者，以 4-溴甲基聯苯作為該螢光化合物，且以乙醯肉鹼作為該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之情形，上述 S_N2 親核取代反應之反應式係如第 1b 圖所示。

【0023】 該極性非質子溶劑係用以加速該 S_N2 親核取代反應；舉例而

107年5月15日修正替換頁

言，該極性非質子溶劑可以為乙腈。

【0024】 值得注意的是，於形成該反應溶液時，工者可以同時混合該樣品、該螢光化合物及該極性非質子溶劑；或者，工者另可以先將該樣品及該螢光化合物分別溶於該極性非質子溶劑之中，以形成一螢光化合物溶液及一樣品溶液，以便於進行溶液濃度及添加量之計算。例如，混合該樣品與該極性非質子溶劑以形成 2 μM 之該樣品溶液，混合該螢光化合物及該極性非質子溶劑以形成 2~35 mM 之該螢光化合物溶液，續以 20 μl 之該樣品溶液混合 5 μl 之該螢光化合物溶液以形成該反應溶液。

【0025】 此外，該套組可以進一步包含一鹼劑（base），該鹼劑可以促進該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之羧酸基的去質子化反應，並進一步促進該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應的進行。該鹼劑可以使用可溶解於該極性非質子溶劑之鹼性化合物，例如氫氧化鉀、碳酸鉀或碳酸氫鉀，較佳可以選擇氫氧化鉀作為該鹼劑；又，該鹼劑能夠以該極性非質子溶劑調製成一飽和鹼劑溶液，則可以提供合適之鹼性，以獲得最佳之反應效率。

【0026】 又，工者可以直接共同混合該鹼劑與該樣品、該螢光化合物及該極性非質子溶劑；或者，同上所述，工者亦可以先將該鹼劑溶解於適量之該極性非質子溶劑中以形成一鹼劑溶液，續與該樣品溶液及該螢光化合物溶液混合。例如，混合該樣品與該極性非質子溶劑以形成 2 μM 之該樣品溶液，混合該螢光化合物及該極性非質子溶劑以形成 2~35 mM 之該螢光化合物溶液，混合該鹼劑及該極性非質子溶劑以形成該飽和鹼劑溶液，續混合 20 μl 之該樣品溶液、5 μl 之該螢光化合物溶液與 2 μl 之該飽和鹼劑溶液以形成該反應溶液。

【0027】 進行該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應時，藉由額外提供熱量，可以加速反應之進行。於本實施例中，係將該反應溶液置於 80~120°C 下 1~15 分鐘，以獲得該衍生溶液。舉例而言，於 80°C 下加熱 9 分鐘，或於 90~100

107 年 5 月 15 日修正替換頁

℃下加熱 7 分鐘，均可以迅速完成上述 S_N2 親核取代反應。又，工者能夠依據所使用之容器的受熱狀況，調整加熱時間，以避免該極性非質子溶劑蒸發。

【0028】經由上述 S_N2 親核取代反應所獲得之衍生溶液係可以作為該待測溶液，該待測溶液係能夠以逆相層析法、螢光光譜法或質譜分析法進行檢測。舉例而言，該逆相層析法係可以藉由例如窄管式液相層析儀（narrow-bore liquid chromatography）或奈米化液相層析儀（nano liquid chromatography）等高壓液相層析系統來進行。詳而言之，以該逆相層析法檢測時，可以適當稀釋該待測溶液，或進行極性之調整，以及加入內標準品，再加入該窄管式逆相層析儀或該奈米化液相層析儀中。於本實施例中，係將該待測溶液加入甲醇，並加入 9-氨基吡啶（9-aminoacridine，作為內標準品）續抽取適量注入該窄管式液相層析儀內分析之。並且，為配合該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之極性，係選用一甲酸水溶液（含 0.2%之甲酸）搭配甲醇進行梯度沖提。

【0029】該質譜分析法係可以用一質荷比偵檢器進行，其偵測極限低且靈敏度高；或者，由於該具 γ -羧酸基之四級銨化合物已經藉由該 S_N2 親核取代反應而帶有螢光團，故可以利用該螢光光譜法，即以一螢光偵檢器偵測之。利用該螢光光譜法時，該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之最大激發波長係為 255 nm，而最大發射波長係為 317 nm。

【0030】此外，該套組可以進一步包含一萃取劑（extractant），該萃取劑的極性較該極性非質子溶劑的極性高，係可以用以萃取該衍生溶液中的衍生物，且萃取得到的萃取液亦可以作為該待測溶液，並依照需求選擇該逆相層析法、該螢光光譜法或該質譜分析法檢測該待測溶液中的該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的衍生物。

【0031】該萃取劑係可以選擇一去離子水或一鹽類水溶液，該鹽類水

107 年 5 月 15 日修正替換頁

溶液係可以選擇一醋酸銨水溶液、一氯化銨水溶液、一氯化鈉水溶液或一碳酸氫銨水溶液。該萃取劑為該鹽類水溶液時，可以藉由鹽類解離後之離子特性幫助該衍生物之萃取。該鹽類水溶液之濃度較佳為 1 M。又，當該樣品為一血漿樣品時，該萃取劑較佳為 1 M 之醋酸銨水溶液。

【0032】 又，該套組可以進一步包含一共溶劑 (co-solvent)，該共溶劑為低密度且和該萃取劑不互溶之有機溶劑，因此於混合該衍生溶液、該萃取劑及該共溶劑後，可以藉由震盪使該衍生溶液、該萃取劑與該共溶劑形成霧化的狀態 (cloudy)，詳而言之，該萃取劑與該共溶劑會共同形成一油包水之乳劑並以微小液滴 (droplet) 之形式分散於該衍生溶液中，以增加該萃取劑與該衍生溶液之接觸面積，藉此可提升利用該萃取劑萃取該衍生溶液中的衍生物之萃取效率。舉例而言，該共溶劑可以選擇為甲苯。

【0033】 此外，於萃取後，即可以分離取得該萃取液；舉例而言，可以利用離心使包含該衍生溶液、該萃取劑及該共溶劑之混合溶液分層，使萃取得到的萃取液分布於下層。

【0034】 此外，本實施例中，於混合該衍生溶液（包含作為該極性非質子溶劑之乙腈）、該萃取劑及該共溶劑時，乙腈係可以幫助該萃取劑分散於該衍生溶液中，藉此可以進一步提升萃取效率。

【0035】 由於該套組能夠使包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物的樣品進行該 S_N2 親核取代反應而生成該衍生物，使工者可以進一步利用該逆相層析法、該螢光光譜法或該質譜分析法分析，因此，該套組可以應用於一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，詳言之，該檢測方法包含提供該樣品；混合該樣品、該螢光化合物及該極性非質子溶劑，以形成該反應溶液；將該反應溶液置於 80~120°C 下 1~15 分鐘，使該螢光化合物之螢光團與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行該 S_N2 親核取代反應，以獲得該衍生溶液，該衍生溶液包含該衍生物；及將該衍生溶液作為該待

測溶液，偵測該待測溶液中的衍生物。

【0036】 此外，本發明之一實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，係可以於該衍生溶液中加入該萃取劑，以利用該萃取劑萃取該衍生溶液中的衍生物，以獲得該待測溶液。

【0037】 值得注意的是，藉由該套組可以用於檢測來自該哺乳生物之生物樣品，該套組及該檢測方法更可以應用於檢測一疑似患者體內的肉鹼類化合物之含量，藉此評估該疑似患者是否罹患肉鹼缺乏症。詳言之，首先自該疑似患者取得一樣品，並由一健康個體取得一健康個體之樣品，該二樣品係可以同為一全血樣品、一血清樣品、一血漿樣品或一尿液樣品，並於體外 (*in vitro*) 以上述具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法分別偵測該二樣品中的肉鹼類化合物之含量，以獲得一偵測值與一參考值，比較該偵測值與該參考值，若該偵測值低於該參考值，則顯示該疑似患者罹患肉鹼缺乏症。

【0038】 舉例而言，Inoue F 等人及 Peng M 等人發表健康成人的血漿中的 L-肉鹼含量約為 17.51~66.14 μM (J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999 Aug 6; 731(1): 83-8. ; J Chromatogr A. 2013 Dec 6; 1319: 97-106.)，因此前述偵測值可以為該疑似患者之 L-肉鹼含量值，且該參考值即可以為該健康個體之 L-肉鹼含量值，而當該偵測值為該疑似患者之血漿樣品中的 L-肉鹼含量值，則該參考值則可以為 66.14 μM ；又，Hothi DK 等人及 Flanagan JL 等人發表能夠以血漿樣品中的乙醯肉鹼/L-肉鹼的比值作為健康的指標，當乙醯肉鹼/L-肉鹼的比值高於 0.25 時即表示該個體罹患肉鹼缺乏症 (Nephrol Dial Transplant. 2006 Sep; 21(9): 2637-2641.)，因此前述偵測值亦可以為該疑似患者之血漿樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量的比值，且該參考值即可以為該健康個體之血漿樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量的比值，而當該偵測值為該疑似患者之血漿樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含

量的比值，則該參考值則可以為 0.25。

【0039】 為證實本發明確實可以使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之羧酸基接合該螢光化合物的螢光團，且可以萃取該具 γ -羧酸基之四級銨化合物，並分析該具 γ -羧酸基之四級銨化合物，遂進行下述實驗：

【0040】 (A) 螢光化合物濃度對 S_N2 親核取代反應之影響

【0041】 本實驗係以肉鹼（第 A11～A16 組）及乙醯肉鹼（第 A21～A26 組）作為該具 γ -羧酸基之四級銨化合物，以 4-溴甲基聯苯作為該螢光化合物，以配製該反應溶液。其中，各組別之肉鹼、乙醯肉鹼及 4-溴甲基聯苯濃度係如下第 1 表所示。

【0042】 第 1 表：第 A11～A16 組及 A21～A26 組之肉鹼、乙醯肉鹼及 4-溴甲基聯苯濃度

組別	肉鹼濃度 (μM)	4-溴甲基聯 苯濃度(mM)	組別	乙醯肉鹼濃 度 (μM)	4-溴甲基聯 苯濃度(mM)
第 A11 組	1.6	0.4	第 A21 組	1.6	0.4
第 A12 組	1.6	1	第 A22 組	1.6	1
第 A13 組	1.6	2	第 A23 組	1.6	2
第 A14 組	1.6	3	第 A24 組	1.6	3
第 A15 組	1.6	5	第 A25 組	1.6	5
第 A16 組	1.6	7	第 A26 組	1.6	7

【0043】 將上述第 A11～A16 及 A21～A26 組進行 S_N2 親核取代反應後，續加入甲苯及去離子水進行萃取，並於萃取得到的水相中加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比（peak area ratio），記錄如第 2 圖所示。

【0044】 由第 2 圖可知，各組皆能夠進行 S_N2 親核取代反應，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。此外，第 A11~A14 及第 A21~A24 組之中，隨著 4-溴甲基聯苯濃度上升，反應之效率亦隨之提高。而當 4-溴甲基聯苯之濃度達到 3 mM（第 A14、A24 組）以上時，則無法再提升反應之效率。因此，本實施例的該反應溶液中較佳係包含 3 mM 之該螢光化合物。

【0045】 （B）螢光化合物添加量對 S_N2 親核取代反應之影響

【0046】 本實驗同樣以肉鹼（第 B11~B16 組）及乙醯肉鹼（B21~B26 組）作為該具 γ-羧酸基之四級銨化合物，並預先以 2 μM 之濃度溶解於乙腈中，分別配製為含肉鹼、乙醯肉鹼之乙腈溶液。另取 4-溴甲基聯苯作為該螢光化合物，以 15 mM 之濃度溶於乙腈中，配製含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液。以如下第 2 表所示之含肉鹼、乙醯肉鹼之乙腈溶液及含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液添加量，分別配製第 B11~B16 組及第 B21~B26 組之該反應溶液。

【0047】 第 2 表：第 B11~B16 組及 B21~B26 組之含肉鹼、乙醯肉鹼之乙腈溶液及含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液添加量

組別	含肉鹼之乙腈溶液添加量（μl）	含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液添加量（μl）	組別	含乙醯肉鹼之乙腈溶液添加量（μl）	含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液添加量（μl）
第 B11 組	20	3	第 B21 組	20	3
第 B12 組	20	5	第 B22 組	20	5
第 B13 組	20	7	第 B23 組	20	7
第 B14 組	20	9	第 B24 組	20	9

107 年 5 月 15 日修正替換頁

第 B15 組	20	11	第 B25 組	20	11
第 B16 組	20	13	第 B26 組	20	13

【0048】 將上述第 B11～B16 及 B21～B26 組進行 S_N2 親核取代反應後，續加入甲苯及去離子水進行萃取，並於萃取得到的水相中加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 3 圖所示。

【0049】 由第 3 圖可知，各組皆能夠進行 S_N2 親核取代反應，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。其中，又以加入 5 μl 上述含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液（第 B12 及 B22 組），可以提供最佳之反應效率。推測係由於 5 μl 上述含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液即已提供足量之反應試劑，而隨含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液體積增加，整體反應系統之體積亦增大，而導致碰撞效率降低，使反應之效率下降。

【0050】 （C）該鹼劑種類對 S_N2 親核取代反應效率之影響

【0051】 取上述（B）實驗所述含肉鹼之乙腈溶液、含乙醯肉鹼之乙腈溶液及含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液，另取如下第 3 表所示之鹼劑配製含各鹼劑之飽和乙腈溶液。取 20 μl 上述含肉鹼之乙腈溶液混合 5 μl 上述含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液，另加入 2 μl 含各鹼劑之乙腈溶液作為第 C10～C13 組；及取 20 μl 上述含乙醯肉鹼之乙腈溶液混合 5 μl 上述含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液，加入 2 μl 含各鹼劑之乙腈溶液作為第 C20～C23 組，各組之鹼劑種類係如下第 3 表所示。

【0052】 第 3 表：第 C10～C13 及 C20～C23 組之鹼劑種類

組別	第 C10、C20 組	第 C11、C21 組	第 C12、C22 組	第 C13、C23 組
鹼劑種類	無	氫氧化鉀	碳酸鉀	碳酸氫鉀

107年5月15日修正替換頁

【0053】 將上述第 C10~C13 及 C20~C23 組進行 S_N2 親核取代反應後，續加入甲苯及去離子水進行萃取，並於萃取得到的水相中加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 4 圖所示。

【0054】 由第 4 圖可知，各組皆能夠進行 S_N2 親核取代反應，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。其中，又以第 C11 及 C21 組之反應效率最佳，顯示加入氫氧化鉀作為該鹼劑，可以提供適當之鹼性環境以輔助 S_N2 親核取代反應之進行，進而提供最佳之反應效率。

【0055】 (D) 加熱溫度及時間對 S_N2 親核取代反應效率之影響

【0056】 取上述混合含肉鹼之乙腈溶液、含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液及含氫氧化鉀之飽和乙腈溶液之第 C11 組（以下稱第 C11 組），及混合含乙醯肉鹼之乙腈溶液、含 4-溴甲基聯苯之乙腈溶液及含氫氧化鉀之飽和乙腈溶液之 C21 組（以下稱第 C21 組），分別以不同之加熱溫度及時間進行反應後，續加入甲苯及去離子水進行萃取，並於萃取得到的水相中加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 5~7 圖所示：於 80℃ 下加熱 3、5、7、9、11、13 分鐘，記錄為第 5 圖；於 90℃ 下加熱 3、5、7、9、11、13 分鐘，記錄為第 6 圖；及於 100℃ 下加熱 3、5、7、9、11、13 分鐘，記錄為第 7 圖。

【0057】 由第 5~7 圖可知，各組皆能夠進行 S_N2 親核取代反應，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。其中，於 80℃ 下，加熱 9 分鐘以上即能夠達到最佳反應效率；於 90~100℃ 下加熱 7 分鐘以上即能夠達到最佳反應效率。

【0058】 (E) 共溶劑體積對萃取之影響

107 年 5 月 15 日修正替換頁

【0059】 取上述第 C11、C21 組作為該反應溶液，以進行萃取。如上所述，第 C11、C21 組之體積皆為 27 μl 。第 C11 組包含帶有甲基聯苯基團之肉鹼，第 C21 組包含帶有甲基聯苯基團之乙醯肉鹼，以作為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的該具 γ -羧酸基之四級銨化合物。以甲苯作為該共溶劑，於 C11 組添加等量去離子水及不同體積之甲苯以作為第 E11～E16 組；另於第 C21 組添加等量去離子水及不同體積之甲苯以作為第 E21～E26 組，各組之去離子水及甲苯添加量係如下第 4 表所示。

【0060】 第 4 表：第 E11～E16 及 E21～E26 組之去離子水及甲苯添加量

組別	去離子水添加量 (μl)	甲苯添加量 (μl)	組別	去離子水添加量 (μl)	甲苯添加量 (μl)
第 E11 組	5	55	第 E21 組	5	55
第 E12 組	5	65	第 E22 組	5	65
第 E13 組	5	75	第 E23 組	5	75
第 E14 組	5	85	第 E24 組	5	85
第 E15 組	5	95	第 E25 組	5	95
第 E16 組	5	105	第 E26 組	5	105

【0061】 第 E11～E16 及 E21～E26 組分別震盪霧化後，續離心並抽取萃取得到的水相，加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 8 圖所示。

【0062】 由第 8 圖可知，各組皆能夠進行萃取，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。於第 E11～E14 及 E21～E24 組中，隨著甲苯體積上升，由於可以使萃取劑良好地分散於萃取系統中，而使萃取效率上升。

107年5月15日修正替換頁

惟，當甲苯體積大於 85 μl 後，則不再對萃取效率造成影響，故係以每 27 μl 之該反應溶液混合 5 μl 之水與 85 μl 之甲苯為最佳。

【0063】 (F) 萃取劑添加量對萃取之影響

【0064】 取上述第 C11、C21 組作為該反應溶液，以進行萃取。如上所述，第 C11、C21 組之體積皆為 27 μl 。第 C11 組包含帶有甲基聯苯基團之肉鹼，第 C21 組包含帶有甲基聯苯基團之乙醯肉鹼，以作為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的該具 γ -羧酸基之四級銨化合物。以甲苯作為該共溶劑，且以去離子水作為該萃取劑，於 C11 組添加等量甲苯及不同體積之去離子水以作為第 F11~F16 組；另於第 C21 組添加等量甲苯及不同體積之去離子水以作為第 F21~F26 組，各組之去離子水及甲苯添加量係如下第 5 表所示。

【0065】 第 5 表：第 F11~F16 及 F21~F26 組之去離子水及甲苯添加量

組別	去離子水添加量 (μl)	甲苯添加量 (μl)	組別	去離子水添加量 (μl)	甲苯添加量 (μl)
第 F11 組	5	85	第 F21 組	5	85
第 F12 組	7	85	第 F22 組	7	85
第 F13 組	9	85	第 F23 組	9	85
第 F14 組	11	85	第 F24 組	11	85
第 F15 組	13	85	第 F25 組	13	85
第 F16 組	15	85	第 F26 組	15	85

【0066】 第 F11~F16 及 F21~F26 組分別震盪霧化後，續離心並抽取萃取得到的水相，加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得

107 年 5 月 15 日修正替換頁

之峰面積比，記錄如第 9 圖所示。

【0067】 由第 9 圖可知，各組皆能夠進行萃取，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。當該萃取劑之添加量在 5~15 μl 時，皆能夠產生霧化現象；惟該萃取劑之添加量越小，能夠產生較高的濃縮效率，而使峰面積比上升。然而，當該萃取劑之添加量小於 5 μl 時，則會導致該水相難以抽取，故最佳係以每 27 μl 之該反應溶液混合 5 μl 之該萃取劑與 85 μl 之該共溶劑。

【0068】 (G) 該鹽類水溶液之種類對萃取之影響

【0069】 取上述第 C11、C21 組作為該反應溶液，以進行萃取。如上所述，第 C11、C21 組之體積皆為 27 μl 。第 C11 組包含帶有甲基聯苯基團之肉鹼，第 C21 組包含帶有甲基聯苯基團之乙醯肉鹼，以作為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的該具 γ -羧酸基之四級銨化合物。以甲苯作為該共溶劑，且以該鹽類水溶液作為該萃取劑，於 C11 組添加 85 μl 之甲苯及 1 M 鹽類水溶液 5 μl 以作為第 G10~G14 組；另於第 C21 組添加 85 μl 之甲苯及 1 M 鹽類水溶液 5 μl 以作為第 G20~G24 組，各組之鹽類種類係如下第 6 表所示。其中，第 G10 及 G20 組係以去離子水（無鹽類添加）取代該鹽類水溶液。

【0070】 第 6 表：第 G10~G14 及 G20~G24 組之鹽類種類

組別	G10、G20	G11、G21	G12、G22	G13、G23	G14、G24
鹽類種類	無	醋酸銨	氯化銨	氯化鈉	碳酸氫銨

【0071】 第 G10~G14 及 G20~G24 組分別震盪霧化後，續離心並抽取萃取得到的水相，加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 10 圖所示。

【0072】 由第 10 圖可知，各組皆能夠進行萃取，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。其中，又以第 G10、G20 組之去離子水（無鹽類添加）最佳，第 G11、G21 組之醋酸銨水溶液次之。

【0073】 （H）該鹽類水溶液之種類對血漿樣品萃取之影響

【0074】 取人類血漿樣品，加入蛋白質沉澱劑去除蛋白質後，溶於乙腈中並分別加入肉鹼（第 H10～H14 組）、乙醯肉鹼（第 H20～H24 組）及丁基甜菜鹼（第 H30～H34 組），以 4-溴甲基聯苯作為該螢光化合物進行 S_N2 親和取代反應。取等量經反應後之血漿樣品，分別加入等量之甲苯作為該共溶劑，以及等量、不同種類之 1 M 鹽類水溶液作為該萃取劑，各組之鹽類種類係如下第 7 表所示。

【0075】 第 7 表：第 H10～H14、H20～H24 及 H30～H34 組之鹽類種類

組別	H10、H20、H30	H11、H21、H31	H12、H22、H32	H13、H23、H33	H14、H24、H34
鹽類種類	無	醋酸銨	氯化銨	氯化鈉	碳酸氫銨

【0076】 第 H10～H14、H20～H24 及 H30～H34 組分別震盪霧化後，續離心並抽取萃取得到的水相，加入 9-氨基吡啶作為內標準品，以窄管式液相層析儀配合螢光偵檢器進行逆相層析，各組之峰面積相對標準品之峰面積計算所得之峰面積比，記錄如第 11 圖所示。

【0077】 由第 11 圖可知，各組皆能夠進行萃取，並能夠經該逆相層析法及該螢光光譜法偵測之。其中，對於血漿樣品而言，又以第 H11、H21、H31 組之醋酸銨水溶液最佳，第 H12、H22、H32 組之氯化銨水溶液次之。

【0078】 （I）以質譜分析法分析人類血漿樣品

【0079】 取 1 μl 血漿樣品，依據上述進行前處理、S_N2 親和取代反應及萃取，此處係以去離子水作為萃取劑。於萃取後，續進行逆相層析法，並以質譜分析法分析之，記錄如下第 8 表。

【0080】 第 8 表：血漿樣品分析結果

分析物	簡式 [M] ⁺	實際質量 (Da)	測得質量 (Da)	質量誤差 (ppm)	MS ² (m/z)
丁基甜菜鹼	C ₂₀ H ₂₆ NO ₂	312.1958	312.1955	-0.96	152, 167, 226
肉鹼	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	328.1907	328.1908	0.30	152, 167, 226, 310
乙醯肉鹼	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄	370.2012	370.2008	-1.08	152, 167, 226
丙醯肉鹼	C ₂₃ H ₃₀ NO ₄	384.2175	384.2165	-2.60	152, 167, 226, 366
丁醯肉鹼	C ₂₄ H ₃₂ NO ₄	398.2331	398.2325	-1.50	152, 167, 226, 380
異戊醯肉鹼	C ₂₅ H ₃₄ NO ₄	412.2487	412.2479	-1.94	152, 167, 226, 394
己醯肉鹼	C ₂₆ H ₃₆ NO ₄	426.2644	426.2638	-1.41	152, 167, 226, 408
辛醯肉鹼	C ₂₈ H ₄₀ NO ₄	454.2957	454.2954	-0.66	152, 167, 226, 436
癸醯肉鹼	C ₃₀ H ₄₄ NO ₄	482.3270	482.3265	-1.03	152, 167, 226, 464
月桂醯肉鹼	C ₃₂ H ₄₈ NO ₄	510.3583	510.3559	-4.70	152, 167, 226, 492
肉豆蔻醯肉鹼	C ₃₄ H ₅₂ NO ₄	538.3891	538.3884	-1.30	152, 167, 226, 520
棕櫚醯肉鹼	C ₃₆ H ₅₆ NO ₄	566.4204	566.4203	-0.18	152, 167, 226, 548
硬脂醯肉鹼	C ₃₈ H ₆₀ NO ₄	594.4517	594.4516	-0.17	152, 167, 226, 576

【0081】 由第 8 表可知，本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法確實能夠使用質譜分析法，並同時偵測到人體內多達 13 種肉鹼類化合物。

【0082】 (J) 市售錠劑之分析

【0083】 取包含肉鹼之錠劑粉碎成粉末後，將該粉末溶於乙腈中並經震盪、離心後取上清液，並依據上述進行 S_N2 親核取代反應及萃取後，以層析法偵測，將測得之肉鹼含量記錄於如下第 9 表。該錠劑係標示其每錠包含 1g 之肉鹼。

【0084】 第 9 表：包含肉鹼之錠劑分析結果

107年5月15日修正替換頁

錠劑編號	測得質量(mg)	RSD(%)	佔標示含量之百分比(%)
1	964.94	1.87	96.49
2	1002.33	3.95	100.23
3	1023.30	3.07	102.33
4	972.73	5.10	97.27
5	995.68	3.01	99.57

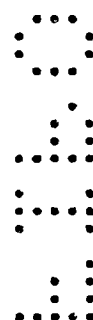
【0085】 由第 9 表可知，本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法確實能夠檢測錠劑中的肉鹼含量。此外，能夠根據本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法提供的分析結果，來判斷所分析之藥物樣品是否符合成分標示之規範，例如，美國藥典規範肉鹼錠劑的實際含量必須為標示含量的 90.0%~110.0%。

【0086】 (K) 市售針劑之分析

【0087】 取包含肉鹼之針劑，將該針劑與乙腈混合並經震盪、離心後取上清液，並依據上述進行 S_N2 親核取代反應及萃取後，以層析法偵測，將測得之肉鹼含量記錄於如下第 10 表。該針劑係標示其每 5 毫升包含 1g 之肉鹼。

【0088】 第 10 表：包含肉鹼之針劑分析結果

針劑編號	測得質量(mg/mL)	RSD(%)	佔標示含量之百分比(%)
1	204.15	3.91	102.08
2	208.75	2.24	104.38
3	202.56	5.43	101.28
4	203.48	2.40	101.74
5	202.21	5.09	101.11



【0089】 由第 10 表可知，本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法確實能夠檢測針劑中的肉鹼含量。同樣地，能夠根據本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法提供的分析結果，來判斷所分析之藥物樣品是否符成分標示之規範。例如，美國藥典規範肉鹼針劑的實際含量必須為標示含量的 90.0%~110.0%。

【0090】 (L) 市售食品及化妝品之分析

【0091】 取包含肉鹼類之食品（編號 A~D）及化妝品（編號 E~L），分別經過樣品前處理，並依據上述進行 S_N2 親核取代反應及萃取後，以層析法偵測，將測得之肉鹼類含量記錄於如下第 11 表。其中，編號 A 標示其肉鹼類含量為 500mg，編號 B 標示其肉鹼類含量為 250mg，編號 C 標示其肉鹼類含量為 20mg。

【0092】 第 11 表：包含肉鹼類之食品及化妝品分析結果

樣品編號	測得含量($\mu\text{g/g}$)		RSD(%)	佔標示含量之百分比(%)
	肉鹼	乙醯肉鹼		
A	441.55(mg/g)		7.87	88.3
B	246.94(mg/g)		2.91	98.9
C	87.72		1.93	109.7
D	0.66		1.53	
E	2885.25		6.68	
F	0.89		1.44	
G	330.61		3.23	
H	15280.90		1.13	
I	489.23		3.28	
J		492.84	3.56	

107年5月15日修正替換頁

K		480.89	0.52	
L		166.69	1.65	

【0093】 由第 11 表可知，本實施例的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法確實能夠檢測食品或化妝品等不同種類樣品中的肉鹼類含量，亦即，本發明具有「適用於類型之待測樣品」功效。

【0094】 依據上述實驗，可以證實本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，藉由螢光化合物及極性非質子溶劑之添加，確實可以使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物與該螢光化合物進行該 S_N2 親核取代反應，而使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物帶有該螢光團，達成「使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物適用於螢光光譜法」功效。同時，藉由使該具 γ -羧酸基之四級銨化合物接合該螢光化合物之螢光團，可以降低該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之極性，以利於後續之分離及分析，例如，利用逆相層析法分離該具 γ -羧酸基之四級銨化合物時，可以延長其於逆相層析儀之滯留時間，達成「提升分離效果」功效。

【0095】 本發明之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，另藉由萃取帶有螢光團之該具 γ -羧酸基之四級銨化合物，而能夠提升帶有螢光團之該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的濃度，進而達成「提升該具 γ -羧酸基之四級銨化合物之偵測靈敏度」功效。

【0096】 本發明之肉鹼缺乏症的診斷方法，利用上述具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法偵測由疑似患者取得之樣品，能夠有效地分析該樣品中的肉鹼類含量，達成「有效地診斷肉鹼缺乏症」功效。

【0097】 本發明之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，確實能夠使包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物的樣品進行 S_N2 親核取代反應而生成衍生物，且可針對該衍生物進一步利用一分析方法，例如逆相層析法、螢光光譜法或質譜分析法進行分析，達成「檢測樣品中是否包含具 γ -羧酸

107 年 5 月 15 日修正替換頁

基之四級銨化合物」功效。

【0098】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

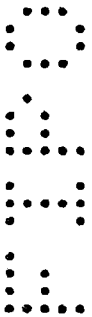
國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

(無)

【序列表】(請換頁單獨記載)



申請專利範圍

1. 一種具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，係包含：
提供一樣品，該樣品包含具 γ -羧酸基之四級銨化合物；
混合該樣品、具有一螢光團之一螢光化合物及一極性非質子溶劑，以形成一反應溶液；
將該反應溶液置於 $80\sim 120^{\circ}\text{C}$ 下 $1\sim 15$ 分鐘，使該螢光化合物之螢光團與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行一 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液包含一衍生物，該衍生物為羧酸基上置換有該螢光化合物之螢光團的具 γ -羧酸基之四級銨化合物；
於該衍生溶液中加入一萃取劑及一共溶劑，該萃取劑的極性較乙腈的極性高，使該萃取劑及該共溶劑共同形成一油包水之乳劑並分散於該衍生溶液中，以利用該萃取劑萃取該衍生溶液中的衍生物並獲得一待測溶液；及偵測該待測溶液中的衍生物；
其中，該具有螢光團之螢光化合物為 4-溴甲基聯苯，該極性非質子溶劑為乙腈，該萃取劑為一醋酸銨水溶液，該共溶劑為甲苯。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，該檢測方法另包含：於該反應溶液中加入一鹼劑，續使溶解有該鹼劑之反應溶液進行該 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核取代反應，以獲得該衍生溶液。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，該檢測方法另包含：選擇氫氧化鉀、碳酸鉀或碳酸氫鉀作為該鹼劑。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之具 γ -羧酸基之四級銨化合物的檢測方法，其中，係以逆相層析法、螢光光譜法或質譜分析法偵測該待測溶液中的具 γ -羧酸基之四級銨化合物的衍生物。
5. 一種肉鹼缺乏症的診斷方法，係包含：

107 年 5 月 15 日修正替換頁

自一疑似患者取得一樣品；

以如申請專利範圍第 1 項所述之檢測方法，於體外偵測該樣品中的肉鹼類化合物之含量，以獲得一偵測值；及

比較該樣品的偵測值與一參考值；

其中，該偵測值低於該參考值顯示該疑似患者罹患肉鹼缺乏症。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之肉鹼缺乏症的診斷方法，其中，偵測該樣品中的 L-肉鹼之含量，以獲得該偵測值，及偵測取自一健康個體之樣品中的 L-肉鹼之含量，以獲得該參考值。

7. 如申請專利範圍第 5 項所述之肉鹼缺乏症的診斷方法，其中，偵測該樣品中的 L-肉鹼之含量及乙醯肉鹼之含量，並計算該樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量之比值，以獲得該偵測值，及偵測取自一健康個體之樣品中的 L-肉鹼之含量及乙醯肉鹼之含量，並計算該健康個體之樣品中的 L-肉鹼含量/乙醯肉鹼含量之比值，以獲得該參考值。

8. 一種用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，係包含：

一具有螢光團之螢光化合物，該螢光化合物之螢光團用以與該具 γ -羧酸基之四級銨化合物的羧酸基進行一 S_N2 親核取代反應以形成一衍生物；

一極性非質子溶劑，用以加速該 S_N2 親核取代反應；

一萃取劑，用以萃取該衍生物，該萃取劑的極性較該極性非質子溶劑的極性高；及

一共溶劑，用以與該萃取劑共同形成一油包水之乳劑；

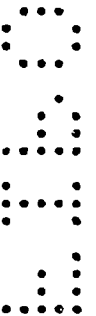
其中，該具有螢光團之螢光化合物為 4-溴甲基聯苯，該極性非質子溶劑為乙腈，該萃取劑為一醋酸銨水溶液，該共溶劑為甲苯。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，其中，該套組另包含：一鹼劑，該鹼劑為可溶解於該極性非質子溶劑之鹼性化合物，且用以提供進行該 S_N2 親核取代反應的一鹼性環

107 年 5 月 15 日修正替換頁

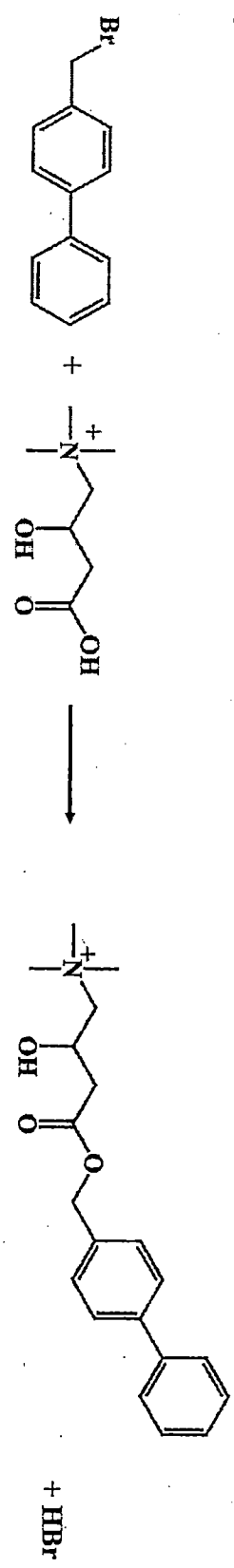
境。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之用以檢測具 γ -羧酸基之四級銨化合物的套組，其中，該鹼劑為氫氧化鉀、碳酸鉀或碳酸氫鉀。

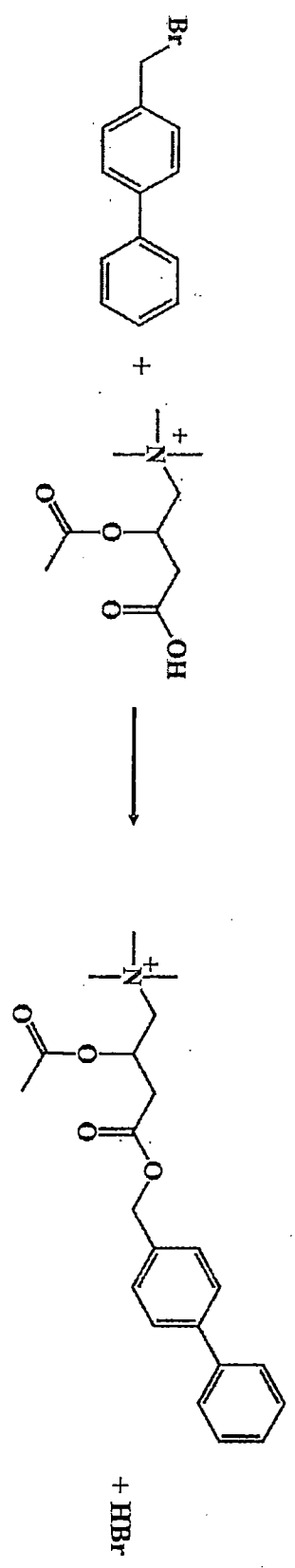


...

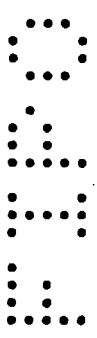
圖式

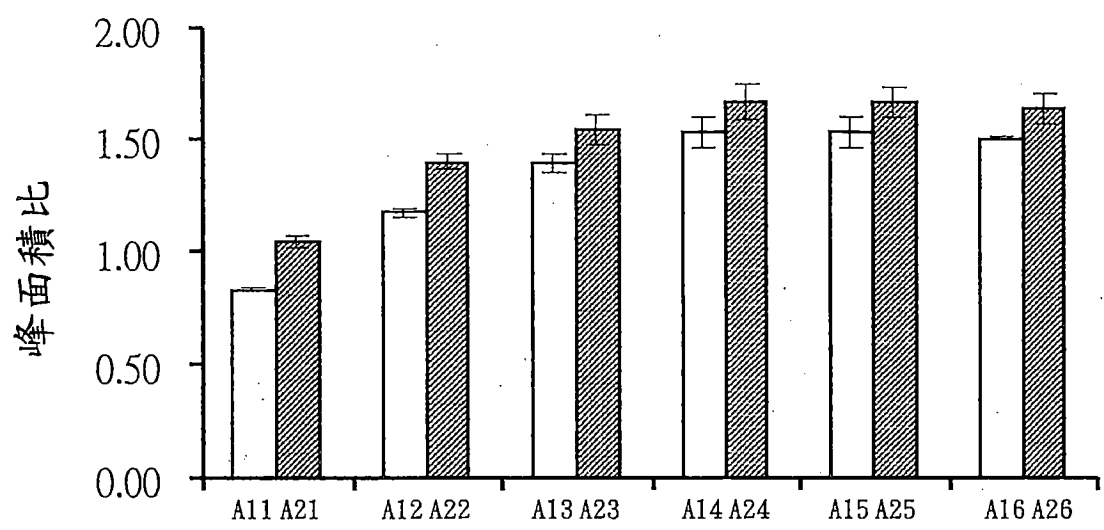


第 1a 圖

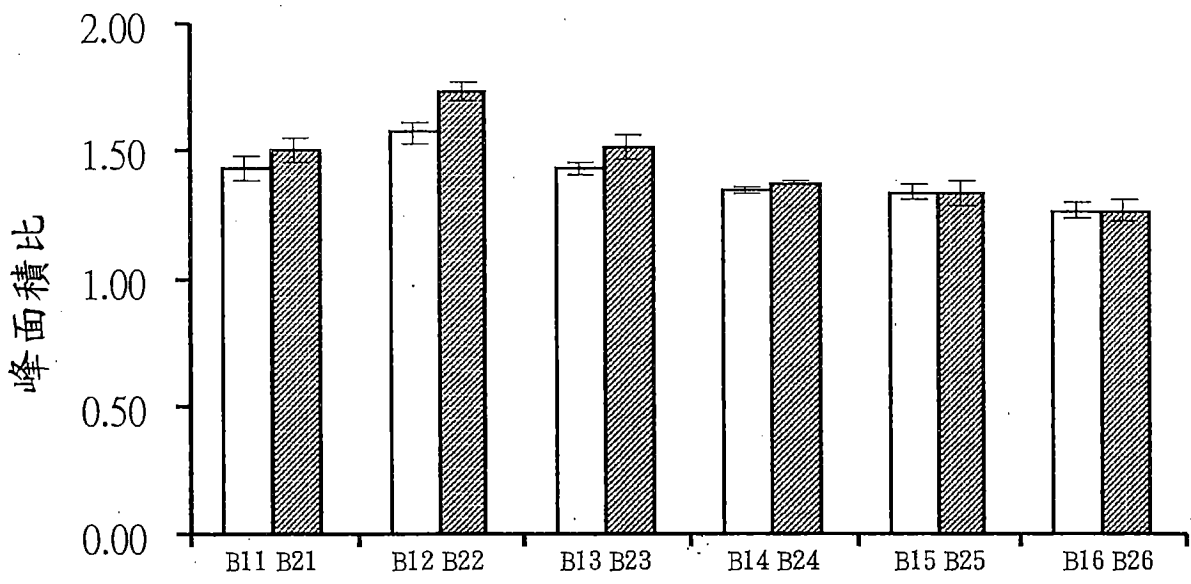


第 1b 圖

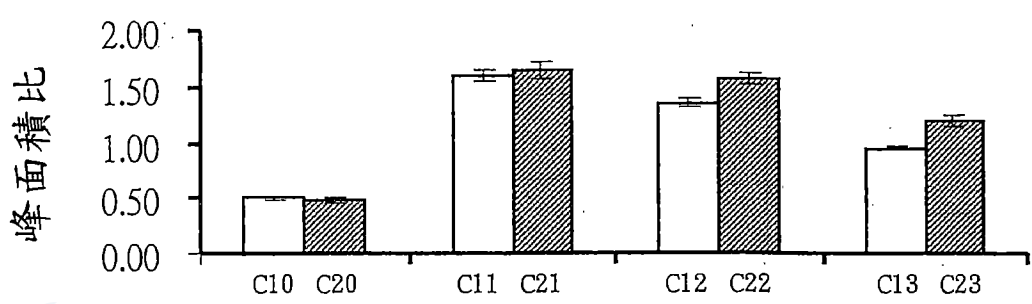




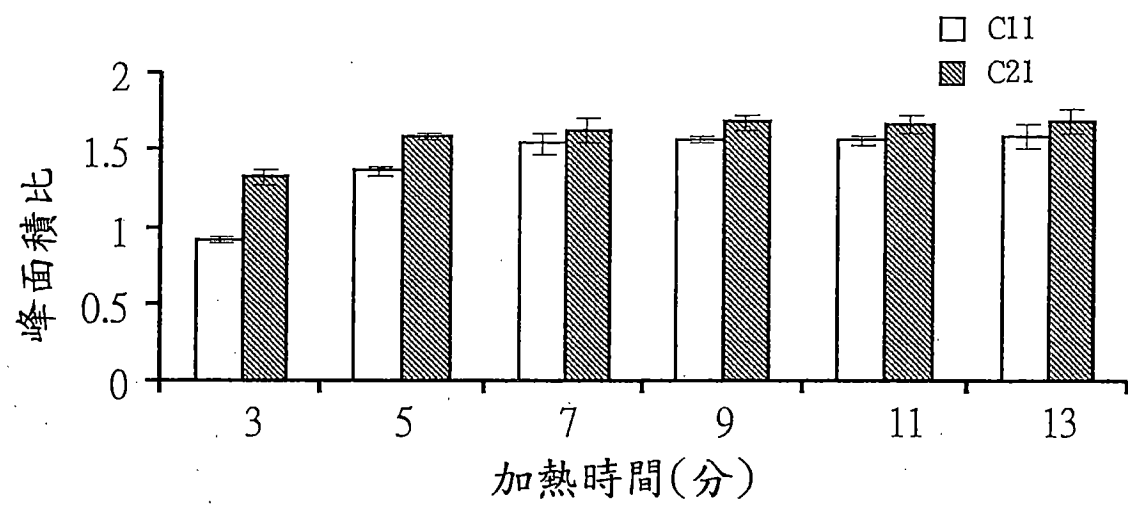
第 2 圖



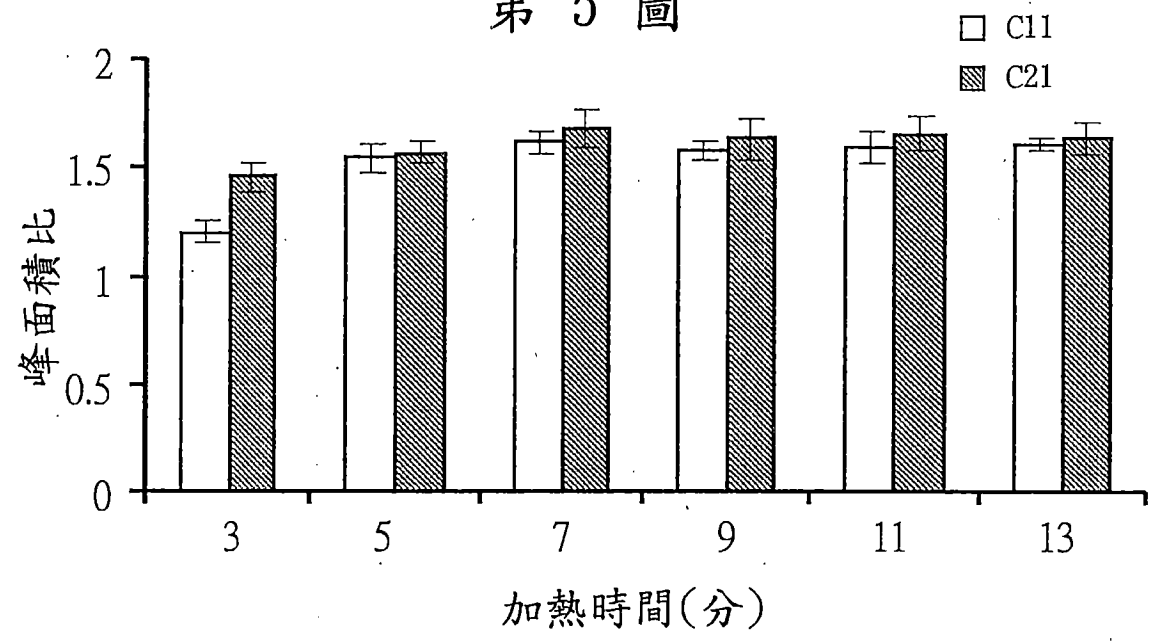
第 3 圖



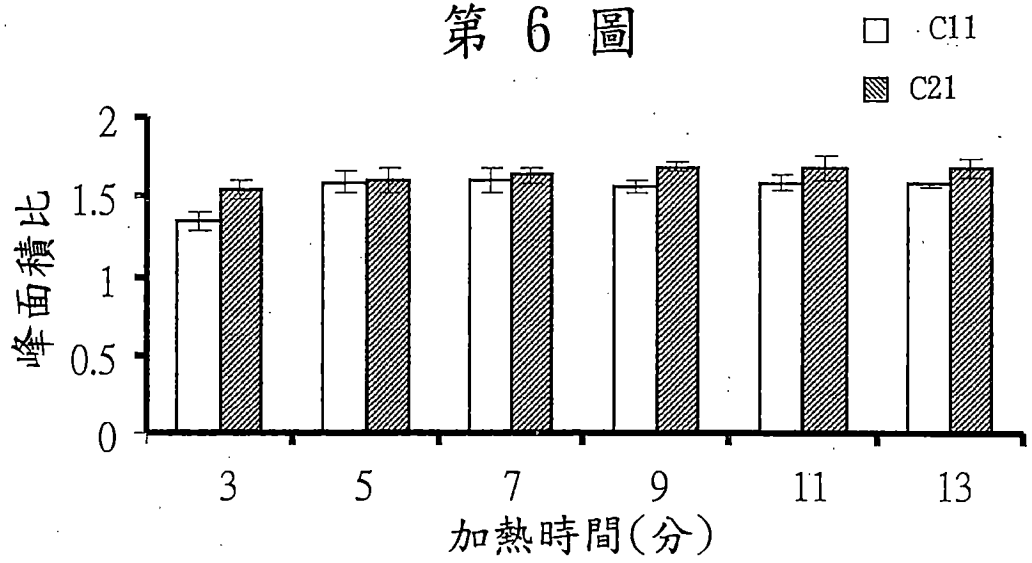
第 4 圖



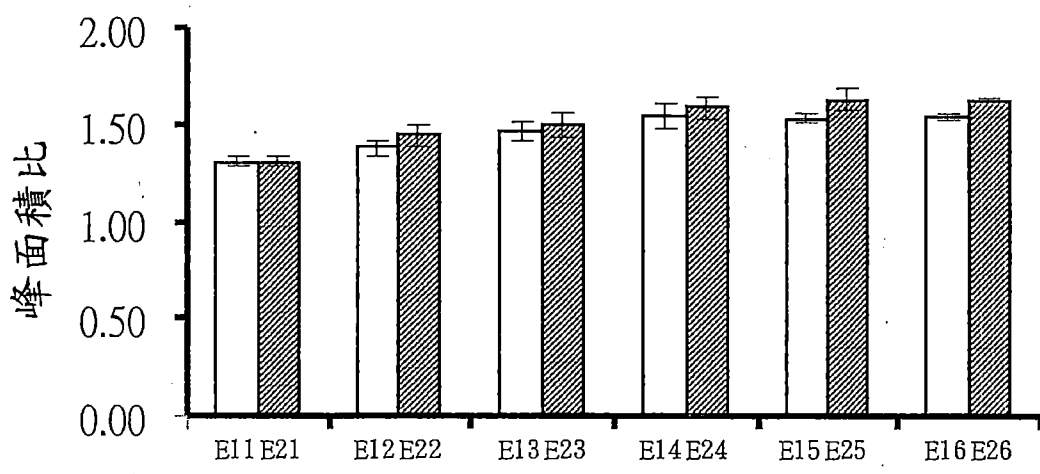
第 5 圖



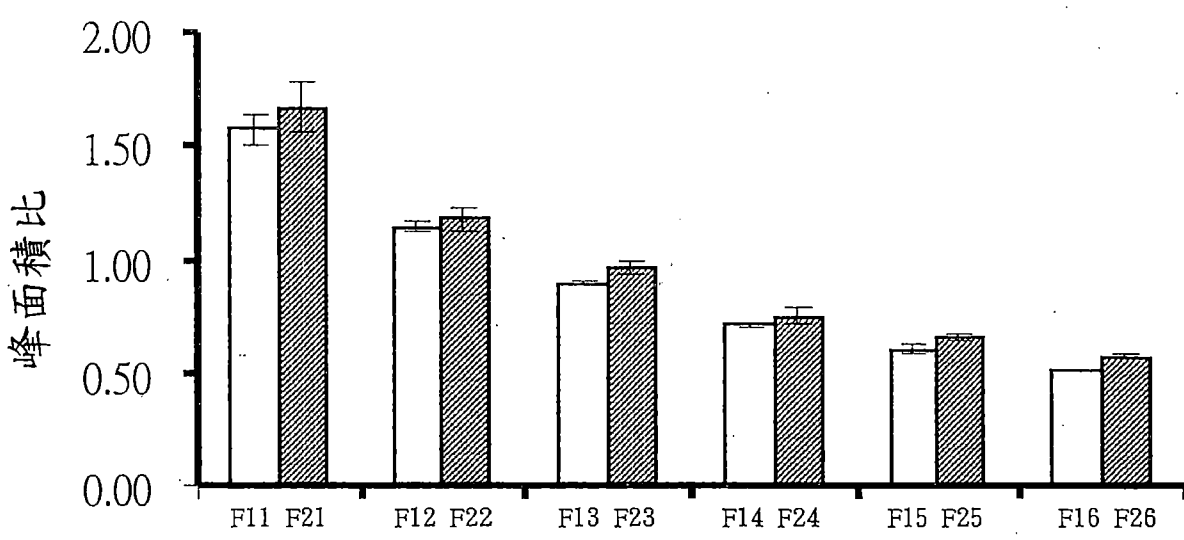
第 6 圖



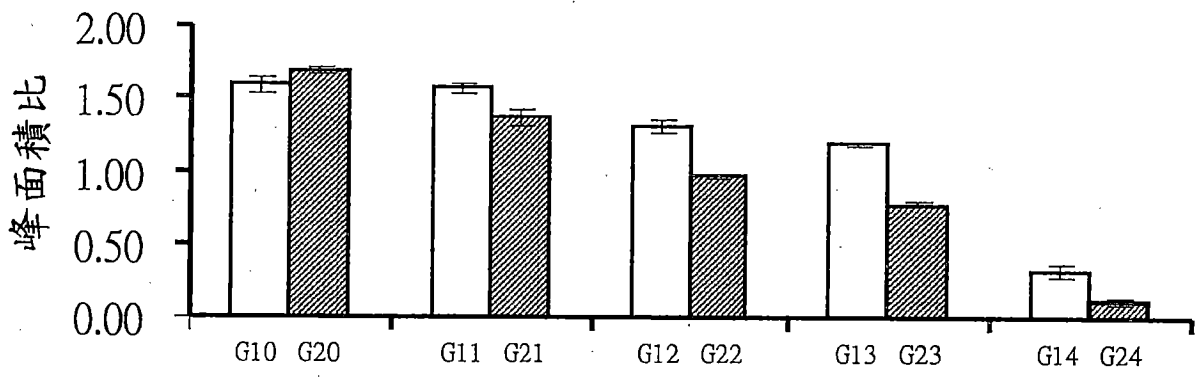
第 7 圖



第 8 圖

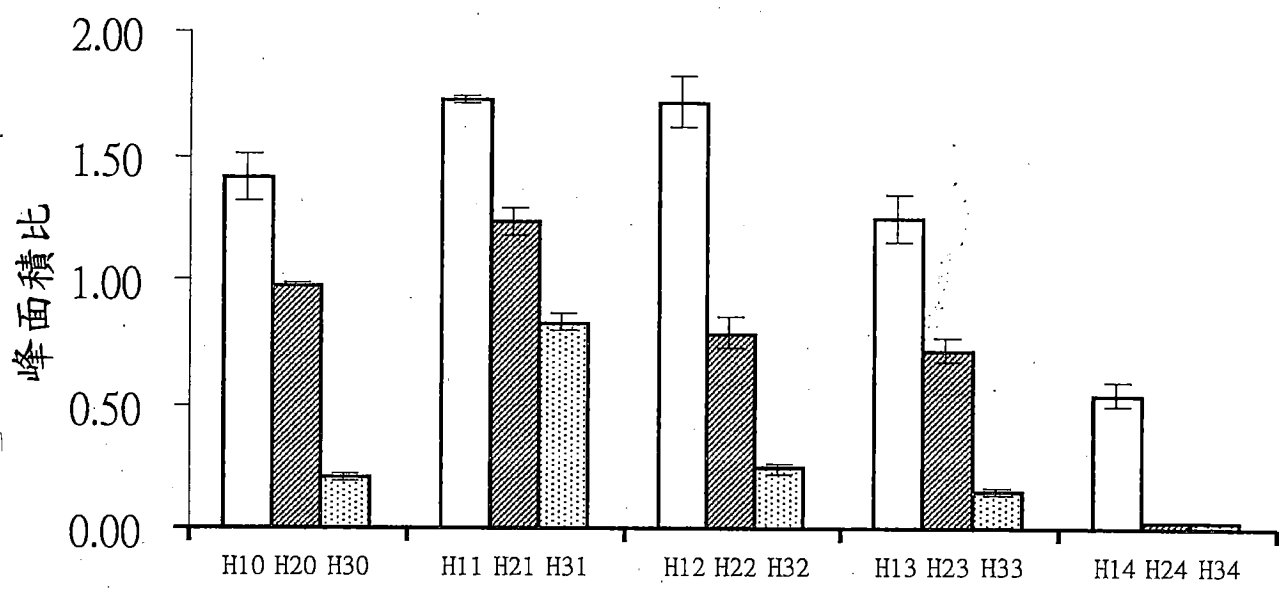


第 9 圖



第 10 圖

INNOVUE
新穎數位



第 11 圖