



(21)申請案號：103144827 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 22 日

(51)Int. Cl. : G01N33/15 (2006.01) G01N27/64 (2006.01)

C07D207/408(2006.01) C07D219/02 (2006.01)

(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：呂濟宇 LU, CHI YU (TW)；吳盈蓉 WU, YING JUNG (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

Bhatt M et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Jun 1;878(19):1605-10. Epub 2010 Mar 19.

Wu CY et al., J Chromatogr A. 2014 Dec 29;1374:14-22. [Epub 2014 Nov 26].

Fukushima T et al., J Pharm Biomed Anal. 2003 Jan 15;30(6):1655-87.

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：10 共 24 頁

(54)名稱

乙琥胺檢測方法

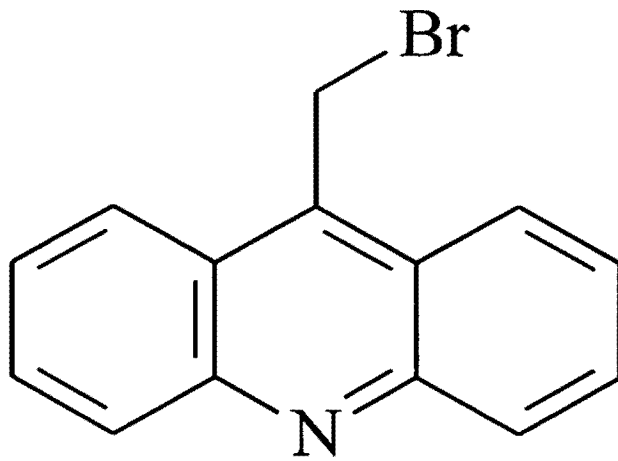
A METHOD FOR DETECTING ETHOSUXIMIDE

(57)摘要

一種乙琥胺檢測方法，係適用於少量之待測樣品，其包含：提供一待測樣品；以 9-溴甲基啉作為一衍生試劑，將該衍生試劑加入該待測樣品，以獲得一待反應液，並對該待反應液施予一能量，使該衍生試劑與該待測樣品所含有之乙琥胺進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之乙琥胺；及使該衍生溶液與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該接合該標記之乙琥胺，使該接合該標記之乙琥胺形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一乙琥胺強度值。

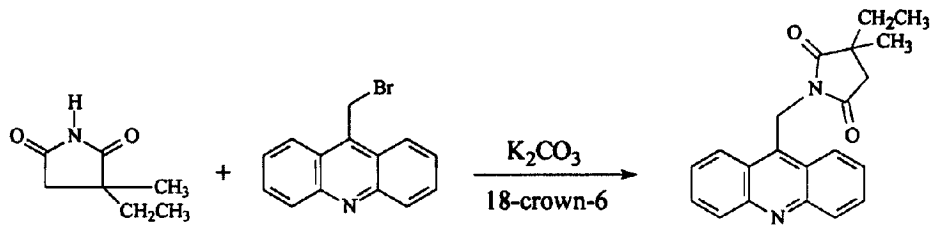
A method for detecting ethosuximide suitable for small amount of sample is disclosed. The method includes the following steps. A sample including ethosuximide is provided. Energy is applied to a reacting solution containing the sample and 9-(bromomethyl)acridine as a derivatization agent, permitting a derivatization reaction occur between the sample and the derivatization agent to obtain a derivatization solution with a tagged ethosuximide. The derivatization solution and a matrix are co-crystallized, the co-crystallized mixture is fired by a laser beam to form a vaporized ion, and the vaporized ion is analyzed to obtain a value of ethosuximide.

指定代表圖：



第 3 圖

特徵化學式：



發明摘要

※ 申請案號：103144827

※ 申請日：103.12.22

※ IPC 分類：

G01N33/15 (2006.01)

G01N27/64 (2006.01)

C07D207/408 (2006.01)

C07D219/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

乙琥胺檢測方法 / A method for detecting ethosuximide

【中文】

一種乙琥胺檢測方法，係適用於少量之待測樣品，其包含：提供一待測樣品；以 9-溴甲基啶作為一衍生試劑，將該衍生試劑加入該待測樣品，以獲得一待反應液，並對該待反應液施予一能量，使該衍生試劑與該待測樣品所含有之乙琥胺進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之乙琥胺；及使該衍生溶液與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該接合該標記之乙琥胺，使該接合該標記之乙琥胺形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一乙琥胺強度值。

【英文】

A method for detecting ethosuximide suitable for small amount of sample is disclosed. The method includes the following steps. A sample including ethosuximide is provided. Energy is applied to a reacting solution containing the sample and 9-(bromomethyl)acridine as a derivatization agent, permitting a derivatization reaction occur between the sample and the derivatization agent to obtain a derivatization solution with a tagged ethosuximide. The derivatization solution and a matrix are co-crystallized, the co-crystallized mixture is fired by a laser beam to form a vaporized ion, and the vaporized ion is analyzed to obtain a value of ethosuximide.

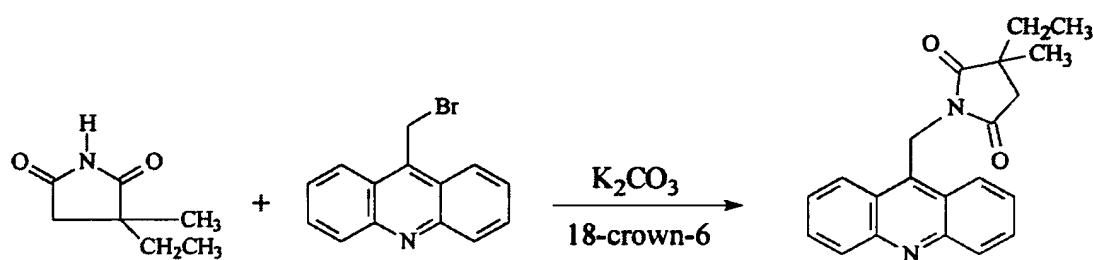
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 3 ）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】：



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)

乙琥胺檢測方法 / A method for detecting ethosuximide

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種檢測方法，特別是一種檢測乙琥胺含量之乙琥胺檢測方法。

【先前技術】

【0002】 請參照第 1 圖所示，乙琥胺 (ethosuximide, 3-ethyl-3-methylpyrrolidine-2,5-dione, 簡稱 ETH) 為一種常用之抗癲癇症 (epilepsy) 藥物，除了於藥廠需要依據規定進行製劑含量檢測外，其於臨床上亦需要進行血液中濃度之監控，以確保血液中濃度可以達到治療效果，亦避免誘發毒性或其他副作用之產生。

【0003】 習知乙琥胺檢測方法係先將一待測樣品經由液相萃取法 (liquid-liquid extract) 或固相萃取法 (solid phase extraction) 進行萃取，續經由高壓液相層析儀 (high-pressure liquid chromatography, 簡稱 HPLC) 進行分析。

【0004】 然而，習知乙琥胺檢測方法中，受限於液相萃取法及固相萃取法需先將待測樣品進行分離、萃取，因此需要大量的待測樣品 (25~250 μL)，不適用於檢測較為難以取得之待測樣品。

【0005】 並且，習知乙琥胺檢測方法中所使用之高壓液相層析儀，不僅分析的時間較長，在每個樣品分析之後，又需要額外的時間沖洗層析管柱，並且需待該層析管柱回復平衡狀態後，才可以進行下一個待測樣品之分析，相當耗費時間，因此不適用於大規模之待測樣品篩檢。

【0006】 再者，習知乙琥胺檢測方法中，高壓液相層析儀係需要以大

量之有機溶媒沖洗層析管柱，因此，分析過程中係會產生大量有機廢液，會對環境造成危害。

【發明內容】

【0007】 本發明係提供一種乙琥胺檢測方法，係具有較高之精密度，可以減低待測樣品之使用量者。

【0008】 本發明另提供一種乙琥胺檢測方法，係可以大幅縮短檢測時間，以利於大規模之待測樣品篩檢者。

【0009】 本發明更提供一種乙琥胺檢測方法，係可以減少排出有機廢液，以避免造成環境污染者。

【0010】 為達到前述發明目的，本發明所運用之技術手段及藉由該技術手段所能達到之功效包含有：

【0011】 一種乙琥胺檢測方法，係包含：提供一待測樣品；以 9-溴甲基啶作為一衍生試劑，將該衍生試劑加入該待測樣品，以獲得一待反應液，並對該待反應液施予一能量，使該衍生試劑與該待測樣品所含有之乙琥胺進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之乙琥胺；及使該衍生溶液與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該接合該標記之乙琥胺，使該接合該標記之乙琥胺形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一乙琥胺強度值。

【0012】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，係以微波方式對該待反應液施予該能量，使該衍生反應得以進行。

【0013】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，係以微波方式對該待反應液施予 12 kW/h 之能量，使該衍生反應得以進行。

【0014】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，係以 400 W 之功率微波該待反應液 2 分鐘，使該衍生反應得以進行。

【0015】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該待反應液另包含一碳酸

鉀之飽和水溶液。

【0016】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該待反應液另包含 18-冠-6，以螯合該待反應液中之鉀離子。

【0017】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該基質係包含 α -氰基-4-羥基桂皮酸及二羥基苯甲酸。

【0018】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該基質係包含以重量比計為 2 : 5 之 α -氰基-4-羥基桂皮酸及二羥基苯甲酸。

【0019】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該待測樣品係由一包含以下步驟之方法獲得：將一製劑樣品溶於一乙腈水溶液（50%（V/V）），以獲得該待測樣品。

【0020】 本發明之乙琥胺檢測方法，其中，該待測樣品係由一包含以下步驟之方法獲得：混合一血清樣品中及甲苯，以獲得一血清-甲苯混合液；將該血清-甲苯混合液進行離心，以獲得一上清液；將該上清液進行乾燥，續回溶於一乙腈水溶液（50%（V/V）），以獲得該待測樣品。

【0021】 本發明之乙琥胺檢測方法，經由該化學衍生步驟中，該衍生試劑 9-溴甲基啶與乙琥胺進行衍生反應，提升乙琥胺被辨識之辨識效率及專一性，因而僅以少量之待測樣品，即可以精確地被檢測，適用於難以取得、或較為高價之待測樣品，為本發明之功效。

【0022】 本發明之乙琥胺檢測方法，經由該分析步驟，係可以使該接合該標記之乙琥胺形成該氣相離子，並且根據質荷比分析器偵測該氣相離子之質荷比，進而計算出該待測樣品中是否含有乙琥胺，可以大幅減少檢測及分析之時間，達到快速待測樣品篩檢之功效。

【0023】 本發明之乙琥胺檢測方法，僅於該前處理步驟及該萃取步驟使用少量之有機溶媒，可以減少檢測過程中產生之大量有機廢液，進而達到減少環境污染之功效。

【圖式簡單說明】

【0024】

第 1 圖：係乙琥胺之化學結構式。

第 2 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法的流程圖。

第 3 圖：係衍生試劑 9-溴甲基啉的化學結構式。

第 4 圖：係乙琥胺及 9-溴甲基啉進行衍生反應之反應化學式。

第 5 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之不同衍生試劑測試長條圖。

第 6A 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之不同加熱條件測試長條圖。

第 6B 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之不同微波功率測試長條圖。

第 6C 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之不同微波時間測試長條圖。

第 7 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之不同基質測試圖譜。

第 8 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之混合基質測試圖譜。

第 9 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之血清樣品測試圖譜。

第 10 圖：係本實施例乙琥胺檢測方法之血清樣品檢量線測試圖譜。

【實施方式】

【0025】 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：

【0026】 請參照第 2 圖所示，係本發明乙琥胺檢測方法之一實施例的流程圖，係包含：一樣品提供步驟 S1，係提供一待測樣品，一衍生步驟 S2，係使該待測樣品所含有之乙琥胺與一衍生試劑進行一衍生反應，使該待測樣品所含有之乙琥胺接合一標記；及一分析步驟 S3，係分析該接合該標記之乙琥胺，以獲得一乙琥胺強度值。

【0027】 詳而言之，本實施例中，該乙琥胺檢測方法係可以用以分析一製劑樣品或一血清樣品，故於該樣品提供步驟 S1 中，該待測樣品係可以藉由將該製劑樣品溶於一乙腈水溶液（50%（V/V）），即，等體積之乙腈及

純水的混合溶液) 所獲得；又或者，亦可以藉由取 10 μL 之該血清樣品混合 40 μL 之甲苯 (toluene)，獲得一血清-甲苯混合液後，以 13,000 rpm 之轉速離心 10 分鐘，以獲得一上清液 (30 μL)，續真空乾燥該上清液 10 分鐘，並回溶於該乙腈水溶液 (50% (V/V))，以獲得該待測樣品。

【0028】 該化學衍生步驟 S2 中，係將 9-溴甲基啉 (9-(bromomethyl) acridine，簡稱 BrMA，如第 3 圖所示) 作為該衍生試劑，該衍生試劑係溶於乙腈 (acetonitrile，簡稱 ACN)。係可以將該衍生試劑加入該待測樣品，以獲得一待反應液；又，該待反應液另可以包含一碳酸鉀之飽和水溶液 (K_2CO_3 (sat.1)，pH 13)，以促進溶解於該乙腈水溶液中之乙琥胺進行解離；再者，該待反應液更可以包含 18-冠-6 (18-crown-6，1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane)，用以螯合該碳酸鉀之飽和水溶液解離產生之鉀離子，以避免鉀離子對於後續分析步驟之干擾。

【0029】 為驅使該衍生反應之進行，係可以對該待反應液施予一能量，例如係可以利用微波方式施予 12 kW/h 之能量，使該衍生反應得以進行，於本實施例中，係使用功率為 400 W 之微波爐，對該待反應液微波 2 分鐘，即可以使乙琥胺及 9-溴甲基啉進行如第 4 圖所示之衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之乙琥胺。

【0030】 該分析步驟 S3 中，係可以選擇以基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜儀 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer，簡稱 MALDI-TOF MS) 進行分析，但不以此為限。詳而言之，該衍生溶液係可以置於該基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜儀之一樣品托盤 (target plate)，覆蓋上一基質 (matrix)，使該基質與該衍生溶液形成一結晶狀固態物，該基質係可以吸收波長為 330~360 nm 之雷射光束。於本實施例中，該基質係包含 α -氰基-4-羥基桂皮酸 (α -cyanol-4-hydroxycinnamic acid，簡稱 CHCA) 及二羥基苯甲酸

(2,5-dihydroxybenzoic acid, 簡稱 2,5-DHB), 詳言之, 係等體積混合濃度分別為 10 mg/mL 及 25 mg/mL 之 CHCA 及 2,5-DHB 後, 取 0.5 μ L 備用。

【0031】 接著, 以波長為 330~360 nm 之一雷射光束照射該結晶狀固態物, 使該結晶狀固態物可以被激發, 以形成一氣相離子, 該氣相離子經由電場加速後, 可以進入一質荷比分析器, 以偵測該氣相離子之質荷比 (mass-to-charge ratio, 簡稱 m/z), 以獲得該待測樣品之乙琥胺強度值; 該質荷比分析器係可以選自飛行式時間質荷比分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer)、四極棒質荷比分析器 (quadrupole analyzer)、離子阱質荷比分析器 (ion trap analyzer, 簡稱 IT analyzer) 及傅立葉轉換質荷比分析器 (Fourier transform-ion cyclotron resonance, 簡稱 FT-ICR)。於本較佳實施例中, 該質荷比分析器係選擇為飛行式時間質荷比分析器 (time-of-flight analyzer, 簡稱 TOF analyzer), 其分析速度快, 結合基質輔助雷射脫附游離法, 係可以有效節省樣品分析之時間。

【0032】 值得注意的是, MALDI-TOF MS 於偵測小分子物質時, 由於背景雜訊較高, 因此多不適用於偵測小分子物質, 本實施例乙琥胺檢測方法則係藉由該化學衍生步驟 S2 大幅放大乙琥胺之訊號, 同時避開造成干擾之背景雜訊, 而使 MALDI-TOF MS 得以應用於其中。

【0033】 較佳地, 更可以於該化學衍生步驟 S2 中, 於上清液中添加一內部標準品 (internal standard), 該內部標準品係可以選擇為乙琥胺同位素, 於本實施例中, 係 d3-乙琥胺, 該內部標準品同樣經由該衍生反應, 與該基質形成該結晶狀固態物, 並且被雷射光束激發形成該氣相離子。根據質荷比分析器分析該內部標準品之乙琥胺強度值, 與該待測樣品所得之乙琥胺強度值相比, 將數值帶入乙琥胺之檢量線, 即可以計算出該待測樣品中的乙琥胺的含量。

【0034】 為證實本實施例之乙琥胺檢測方法係能夠用以檢測待測樣

品中所含之乙琥胺含量，遂配製濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之乙琥胺（購自 Sigma）作為標準品（溶解於該乙腈水溶液 50% (V/V)），及配製濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之乙琥胺同位素（即 d3-乙琥胺，購自 Toronto Research Chemicals Inc.）作為內部標準品（溶解於該乙腈水溶液 50% (V/V)）；續混合體積各為 2 μL 之乙琥胺、乙琥胺同位素、該碳酸鉀之飽和水溶液、18-冠-6（濃度為 10 mM）及該衍生試劑 9-溴甲基啉（濃度為 0.25 mM），以微波方式進行加熱（功率為 400 W、微波時間為 2 分鐘），促進該衍生反應之進行，續將 0.5 μL 之衍生溶液點於該樣品托盤後，以 0.5 μL 之該基質（包含 CHCA 及 2,5-DHB）覆蓋於其上，係以 MALDI-TOF MS 進行分析，以獲得該乙琥胺強度值。

【0035】 (A) 衍生試劑之選擇

【0036】 本試驗各組之衍生試劑（濃度皆為 1 mM）係分別選用 9-溴甲基啉（9-(bromomethyl)acridine，簡稱 BrMA，第 A1 組）、2-溴甲基-6-甲基吡啉（2-(bromomethyl)-6-methylpyridine，簡稱 BrMMP，第 A2 組）、8-溴甲基喹啉（8-(bromomethyl)quinoline，簡稱 BrMQ，第 A3 組），及 4-溴甲基-6,7-二甲氧基香豆素（4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin，簡稱 BrDMC，第 A4 組），其係同屬於含溴化合物，且其吸收波長皆為 350 nm，其餘試驗條件均如上所述。

【0037】 請參照第 5 圖所示，第 A2~A4 組之衍生試劑幾乎無法測得乙琥胺強度值，係由於其衍生試劑之碳-溴鍵長小於碳-碳鍵長，因而形成立體空間障礙影響該衍生反應之進行。故，本試驗證實以 9-溴甲基啉確實可以作為該衍生試劑，以應用於本實施例之乙琥胺檢測方法。

【0038】 (B) 加熱條件之選擇

【0039】 本試驗係選用以微波方式（400 W，2 min）（第 B1-1 組）及以乾浴方式（50 $^{\circ}\text{C}$ ，30 min）（第 B1-2 組）對該反應液施予該能量，以驅使該衍生反應之進行，其餘試驗條件均如上所述。其結果如第 6A 圖所示，

以微波方式進行加熱，可以使該衍生反應所產生之水分子發生震盪，進而使水分子之間相互碰撞、摩擦並且於一有限範圍之區域產生熱能，因而可以驅使該衍生反應有效率之進行，因而使該乙琥胺強度值得以提升。

【0040】 續針對前述之微波方式之條件進行進一步之測試。本試驗中，係分別選用 100 W (第 B2-1 組)、200 W (第 B2-2 組)、400 W (第 B2-3 組)、600 W (第 B2-4 組)、800 W (第 B2-5 組)，及 1000 W (第 B2-6 組) 之功率，分別對該待反應液微波 2 分鐘，其結果如第 6B 圖所示，以 400 W 之功率對該待反應液微波 2 分鐘之第 B2-3 組具有較佳之乙琥胺強度值。

【0041】 另針對微波時間進行測試，係分別以 400 W 之功率，分別對各組之待反應液微波 1 分鐘 (第 B3-1 組)、2 分鐘 (第 B3-2 組)、4 分鐘 (第 B3-3 組)、6 分鐘 (第 B3-4 組)、8 分鐘 (第 B3-5 組)，及 10 分鐘 (第 B3-6 組)，結果如第 6C 圖所示，以 400 W 之功率對該待反應液微波 2 分鐘之第 B3-2 組仍具有較佳之乙琥胺強度值。

【0042】 (C) 基質之選擇

【0043】 本試驗係以 α - 氰基 -4- 羥基 桂皮酸 (α -cyanol-4-hydroxy- cinnamic acid，簡稱 CHCA，第 C1-1 組)、二羥基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid，簡稱 2,5-DHB，第 C1-2 組)、3,5-二甲氧基-4-羥基桂皮酸基桂皮酸 (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid，又稱為 sinapinic acid，簡稱 SA，第 C1-3 組)、4-氫硫基苯酸 (4-mercaptobenzoic acid，簡稱 MBA，第 C1-4 組)、2-巯基并噻唑 (2-mercaptobenzothiazole，簡稱 MBT，第 C1-5 組)、及 7-巯基 -4- 甲基 香豆素 (7-mercapto-4-methyl- coumarin，簡稱 MMC，第 C1-6 組) 作為基質，各組基質之濃度均為 10 mg/mL，其結果如第 7 圖所示，第 C1-1 組之 CHCA 雖然具有較佳之乙琥胺強度值，惟其於質荷比為 336.15 處具有過多之干擾

訊號，因而不適合應用於本實施例之乙琥胺檢測方法，而其餘各組之 2,5-DHB、SA、MBA、MBT、MMC 之乙琥胺強度值不佳，亦不適合應用於本實施例之乙琥胺檢測方法。

【0044】 續混合不同重量比之 CHCA 及 2,5-DHB，以作為該基質，其結果如第 8 圖所示，以重量比計為 2：5 之 CHCA 及 2,5-DHB 可以提升乙琥胺強度值，確實適用於本實施例之乙琥胺檢測方法。

【0045】 依據上述試驗結果，證實本實施例之乙琥胺檢測方法，係以 9-溴甲基啶作為該衍生試劑、以微波方式進行加熱（功率為 400 W、微波時間為 2 分鐘），並混合 CHCA 及 2,5-DHB 作為該基質，而可以獲得較佳乙琥胺強度值。

【0046】 (D) 標準品之檢量線

【0047】 分別以濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ ，及 1 $\mu\text{g/mL}$ 之乙琥胺標準品依本實施例之乙琥胺檢測方法測得其乙琥胺強度值，依據各濃度之波峰面積及濃度，經線性回歸計算獲得標準品之檢量線的線性回歸方程式為 $y=(9.8751\pm 0.2303)x+(0.0008\pm 0.0047)$ （相關係數 $r=0.9988$ 、決定係數 $R^2=0.9978$ 、相對標準偏差 $RSD<10\%$ ），證實於濃度介於 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內之待測樣品之線性良好。

【0048】 (E) 市售製劑樣品之測試結果

【0049】 為證實本實施例之乙琥胺檢測方法適用於市售乙琥胺製劑，遂以標示含量為 250 mg 之市售製劑樣品（硬膠囊，第 E01~E10 組）進行測試。係優先取得該硬膠囊中之液體，以該乙腈水溶液（50 wt%）稀釋為 200 $\mu\text{g/mL}$ 後備用。

【0050】 續以本實施例乙琥胺檢測方法量測上述濃度為 200 $\mu\text{g/mL}$ 之待測樣品之乙琥胺強度值，以前述標準品之檢量線回推其濃度，並回推該市售製劑樣品之含量是否符合標示含量 250 mg，其結果如第 1 表所示，各

組硬膠囊之含量平均值皆落於 250 mg±10%內，且相對標準偏差 RSD、相對誤差 RE 皆 < 10%，證實本實施例乙琥胺檢測方法適用於市售乙琥胺製劑。

【0051】 第 1 表、本試驗市售製劑樣品之含量

| 組別 | 平均值 (µg/mL) | 相對標準偏差(%) | 相對誤差 (%) |
|-----|--------------|-----------|----------|
| E01 | 232.62±8.31 | 3.57 | -6.95 |
| E02 | 225.60±0.66 | 0.29 | -9.76 |
| E03 | 246.95±5.07 | 2.05 | -1.22 |
| E04 | 250.87±3.97 | 1.58 | +0.35 |
| E05 | 257.61±6.51 | 2.53 | +3.04 |
| E06 | 254.45±5.52 | 2.17 | +1.78 |
| E07 | 247.47±6.51 | 2.63 | -1.01 |
| E08 | 269.06±13.25 | 4.92 | +7.62 |
| E09 | 271.16±13.80 | 5.09 | +8.46 |
| E10 | 250.97±2.57 | 1.02 | +0.39 |

【0052】 (F) 血清樣品之測試結果

【0053】 為證實本實施例之乙琥胺檢測方法適用於血清樣品，係取得一人類血清，取 9 µL 之人類血清混合 1 µL 之乙琥胺（濃度為 5 mg/mL），以獲得一血清樣品（第 F2 組），另以未混合乙琥胺之人類血清作為控制組（第 F1 組），取 10 µL 之該血清樣品混合 40 µL 之甲苯，以 13,000 rpm 之轉速離心 10 分鐘，以獲得該上清液，續將該上清液進行乾燥後，以 10 µL 之該乙腈水溶液（50% (V/V)）回溶後備用，以本實施例乙琥胺檢測方法分析其乙琥胺強度值，其結果分別如第 9 (a) 圖及第 9 (b) 圖所示，本實施例之乙琥胺檢測方法確實適用於血清樣品。

【0054】 (G) 血清樣本之檢量線

【0055】 續配製含有濃度為 5 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 及 500 $\mu\text{g/mL}$ 之乙琥胺的血清樣品，依上述方法測得其乙琥胺強度值，如第 10 (a) ~ 10 (f) 圖所示，依據各濃度之波峰面積及濃度，經線性回歸計算獲得血清樣品之檢量線的線性回歸方程式為 $y=(2.1906\pm 0.1082)x+(0.0196\pm 0.0073)$ (相關係數 $r=0.9975$ 、決定係數 $R^2=0.9950$ 、相對標準偏差 $RSD<10\%$)，證實該血清樣品於濃度介於 1~500 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內之待測樣品之線性良好。

【0056】 綜合上述，本發明之乙琥胺檢測方法，經由該化學衍生步驟中，該衍生試劑 9-溴甲基啶與乙琥胺進行衍生反應，提升乙琥胺被辨識之辨識效率及專一性，因而僅以少量之待測樣品，即可以精確地被檢測，適用於難以取得、或較為高價之待測樣品，為本發明之功效。

【0057】 再者，本發明之乙琥胺檢測方法，經由該分析步驟，係可以使該接合該標記之乙琥胺形成該氣相離子，並且根據質荷比分析器偵測該氣相離子之質荷比，進而計算出該待測樣品中是否含有乙琥胺，可以大幅減少檢測及分析之時間，達到快速待測樣品篩檢之功效。

【0058】 並且，本發明之乙琥胺檢測方法，僅於該前處理步驟及該萃取步驟使用少量之有機溶媒，可以減少檢測過程中產生之大量有機廢液，進而達到減少環境污染之功效。

【0059】 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】**【0060】**

S1 樣本提供步驟

S2 化學衍生步驟

S3 分析步驟

【生物材料寄存】

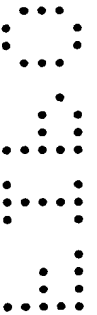
國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

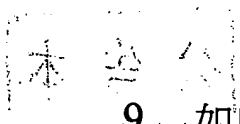
(無)

【序列表】(請換頁單獨記載)

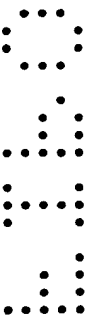


申請專利範圍

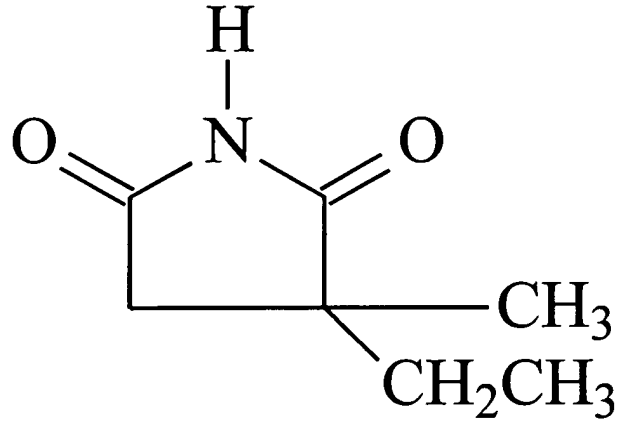
1. 一種乙琥胺檢測方法，係包含：
提供一待測樣品；
以 9-溴甲基啶作為一衍生試劑，將該衍生試劑加入該待測樣品，以獲得一待反應液，並對該待反應液施予一能量，使該衍生試劑與該待測樣品所含有之乙琥胺進行一衍生反應，以獲得一衍生溶液，該衍生溶液係含有接合一標記之乙琥胺；及
使該衍生溶液與一基質形成一結晶狀固態物，以一雷射光束離子化該接合該標記之乙琥胺，使該接合該標記之乙琥胺形成一氣相離子，並以一質荷比分析器檢測該氣相離子，以獲得一乙琥胺強度值。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，係以微波方式對該待反應液施予該能量，使該衍生反應得以進行。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，係以微波方式對該待反應液施予 12 kW/h 之能量，使該衍生反應得以進行。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，係以 400 W 之功率微波該待反應液 2 分鐘，使該衍生反應得以進行。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該待反應液另包含一碳酸鉀之飽和水溶液。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該待反應液另包含 18-冠-6，以螯合該待反應液中之鉀離子。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該基質係包含 α -氰基-4-羥基桂皮酸及二羥基苯甲酸。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該基質係包含以重量比計為 2:5 之 α -氰基-4-羥基桂皮酸及二羥基苯甲酸。



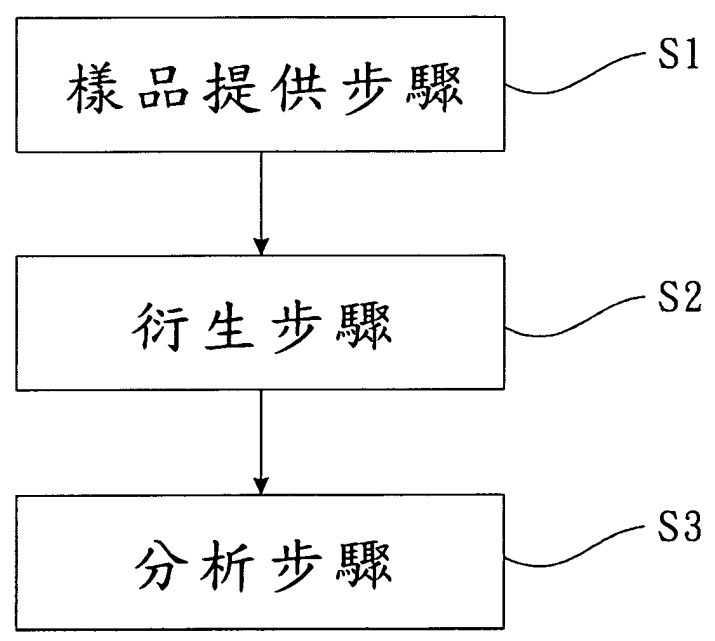
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該待測樣品係由一包含以下步驟之方法獲得：將一製劑樣品溶於一乙腈水溶液（50%（V/V）），以獲得該待測樣品。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之乙琥胺檢測方法，其中，該待測樣品係由一包含以下步驟之方法獲得：
混合一血清樣品中及甲苯，以獲得一血清-甲苯混合液；
將該血清-甲苯混合液進行離心，以獲得一上清液；
將該上清液進行乾燥，續回溶於一乙腈水溶液（50%（V/V）），以獲得該待測樣品。



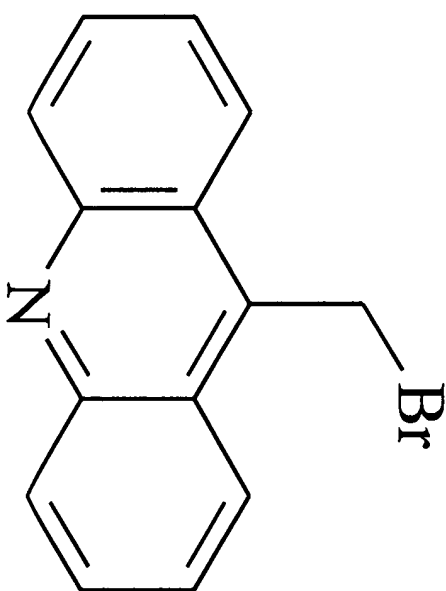
圖式



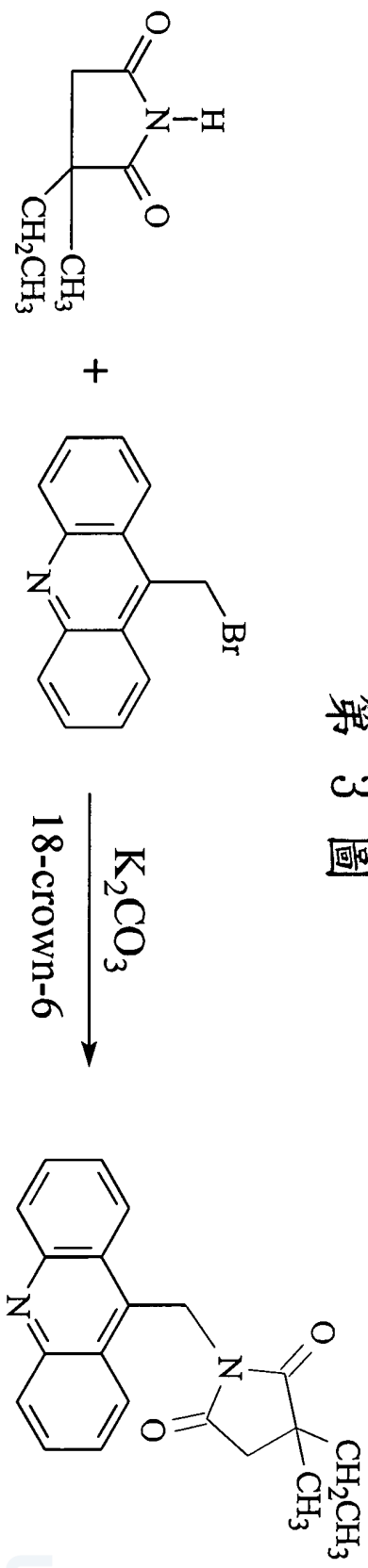
第 1 圖



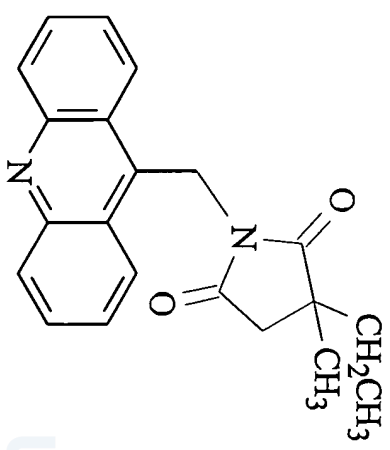
第 2 圖

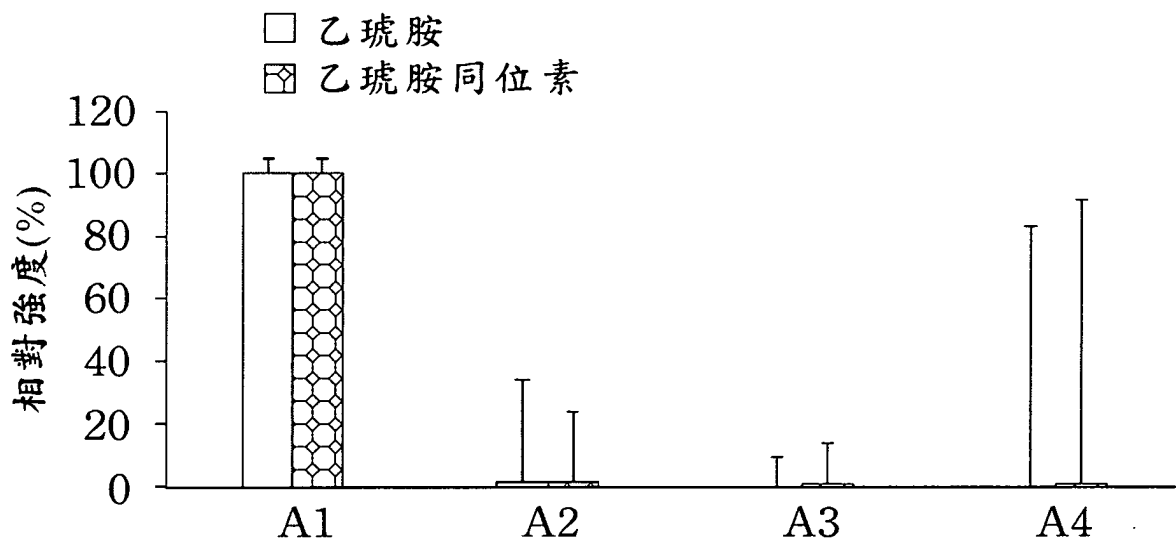


第 3 圖

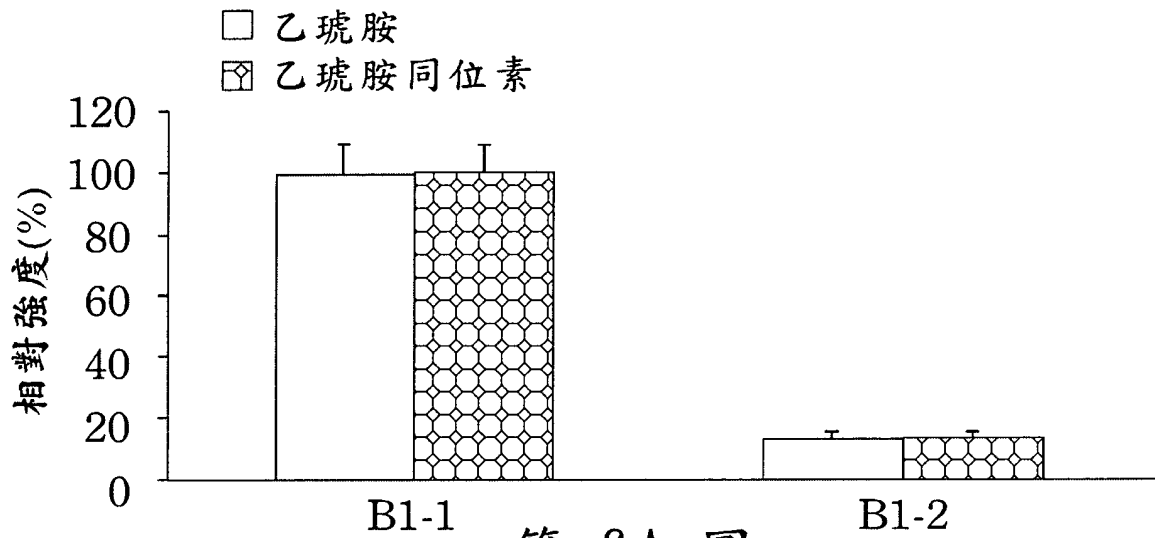


第 4 圖

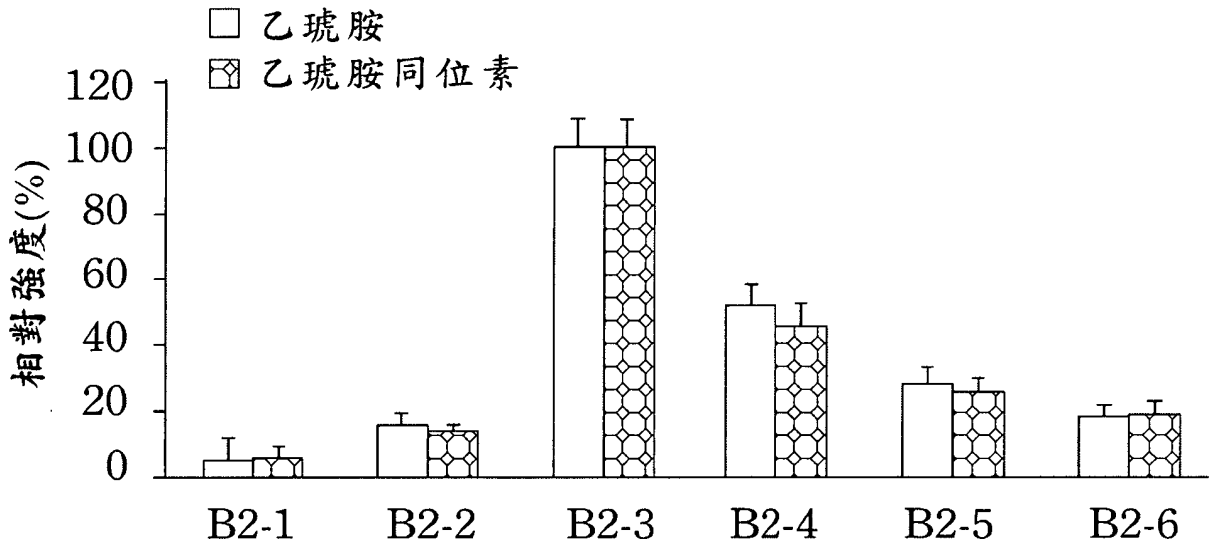




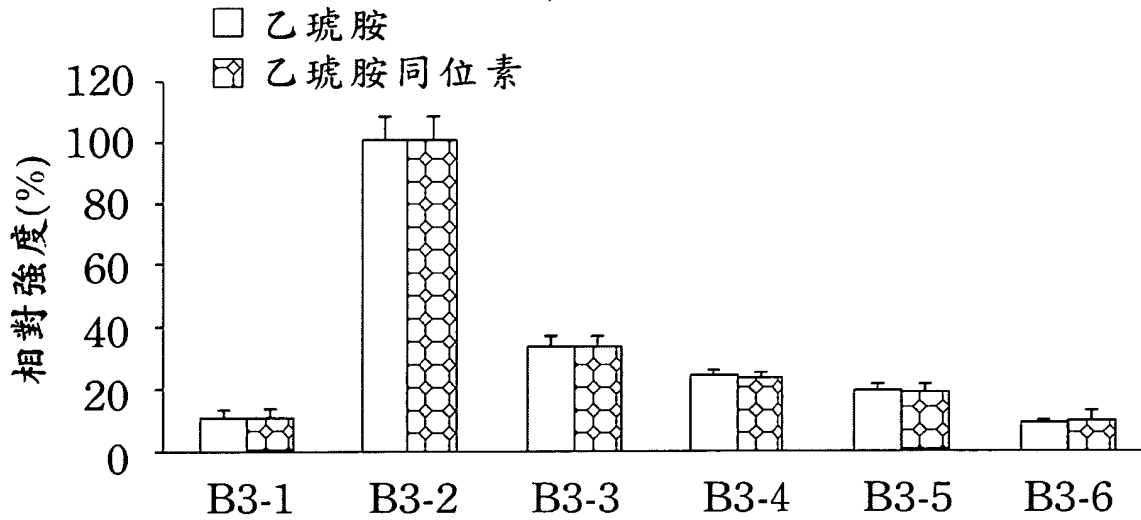
第 5 圖



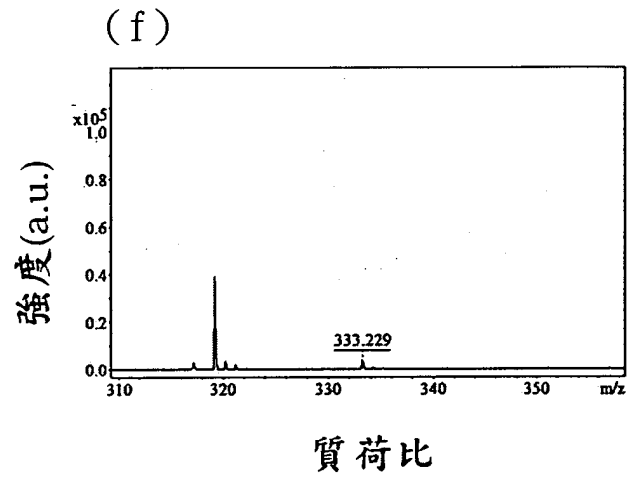
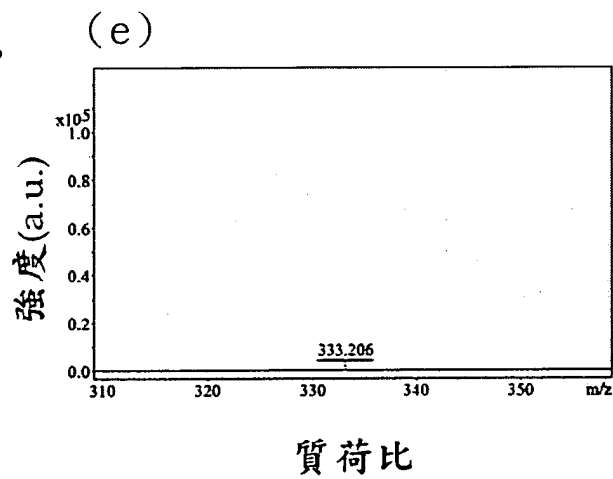
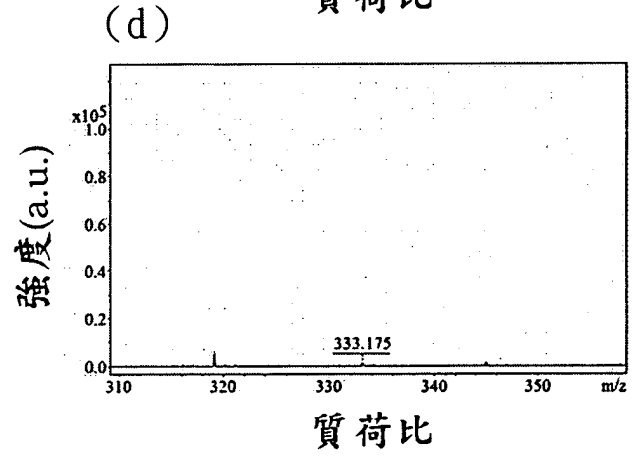
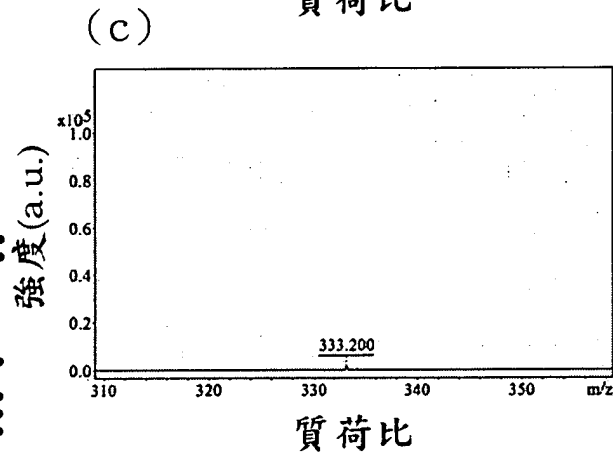
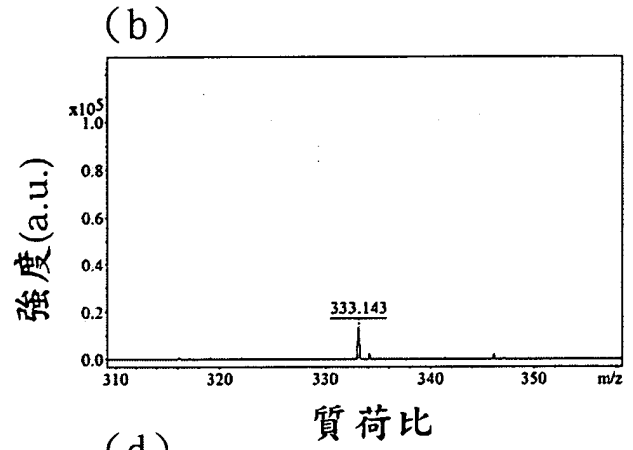
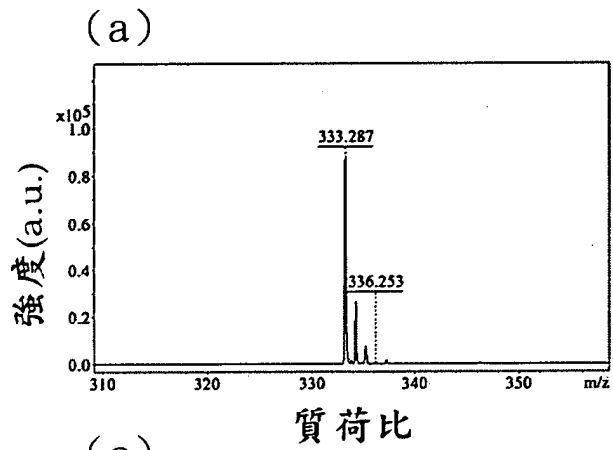
第 6A 圖



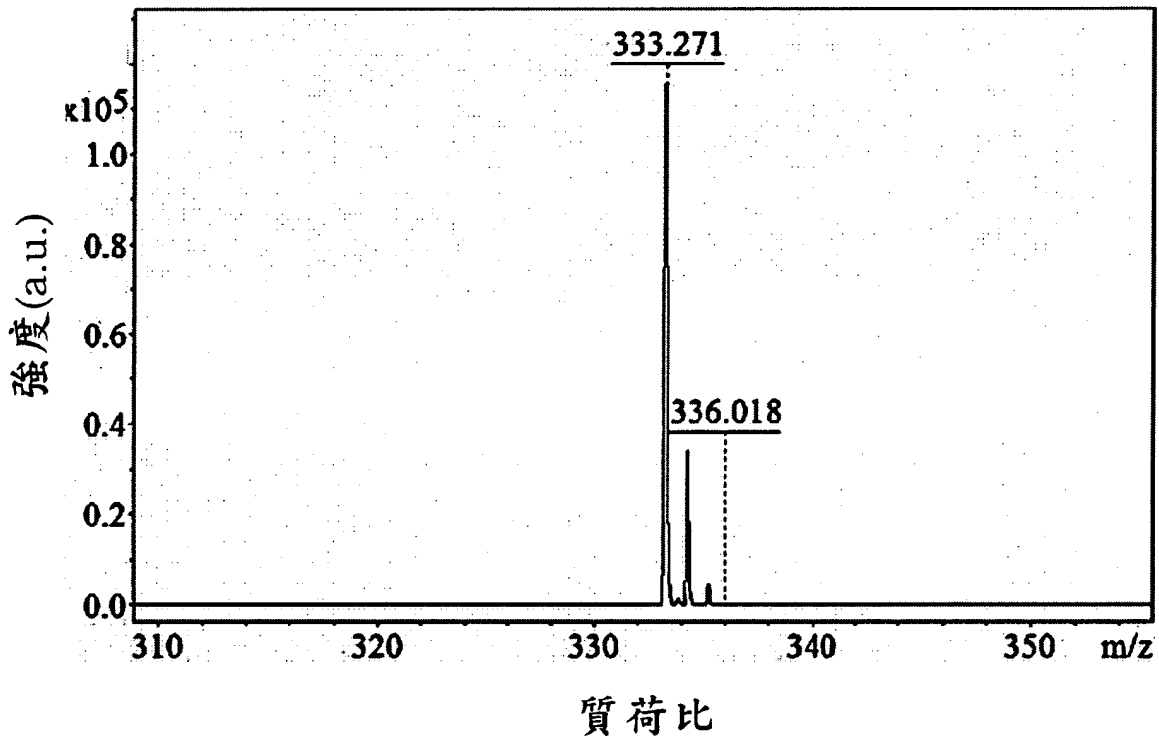
第 6B 圖



第 6C 圖

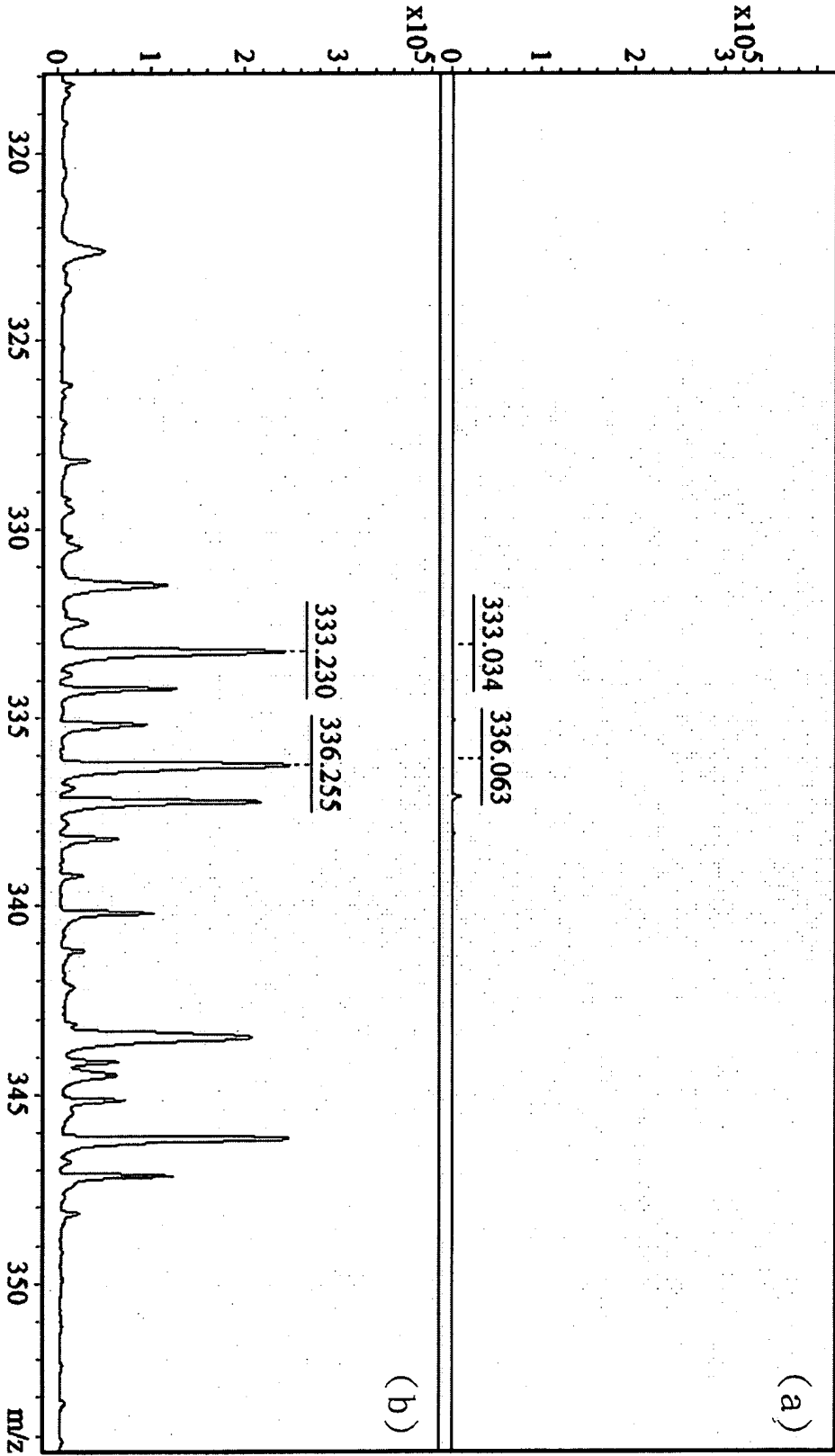


第 7 圖



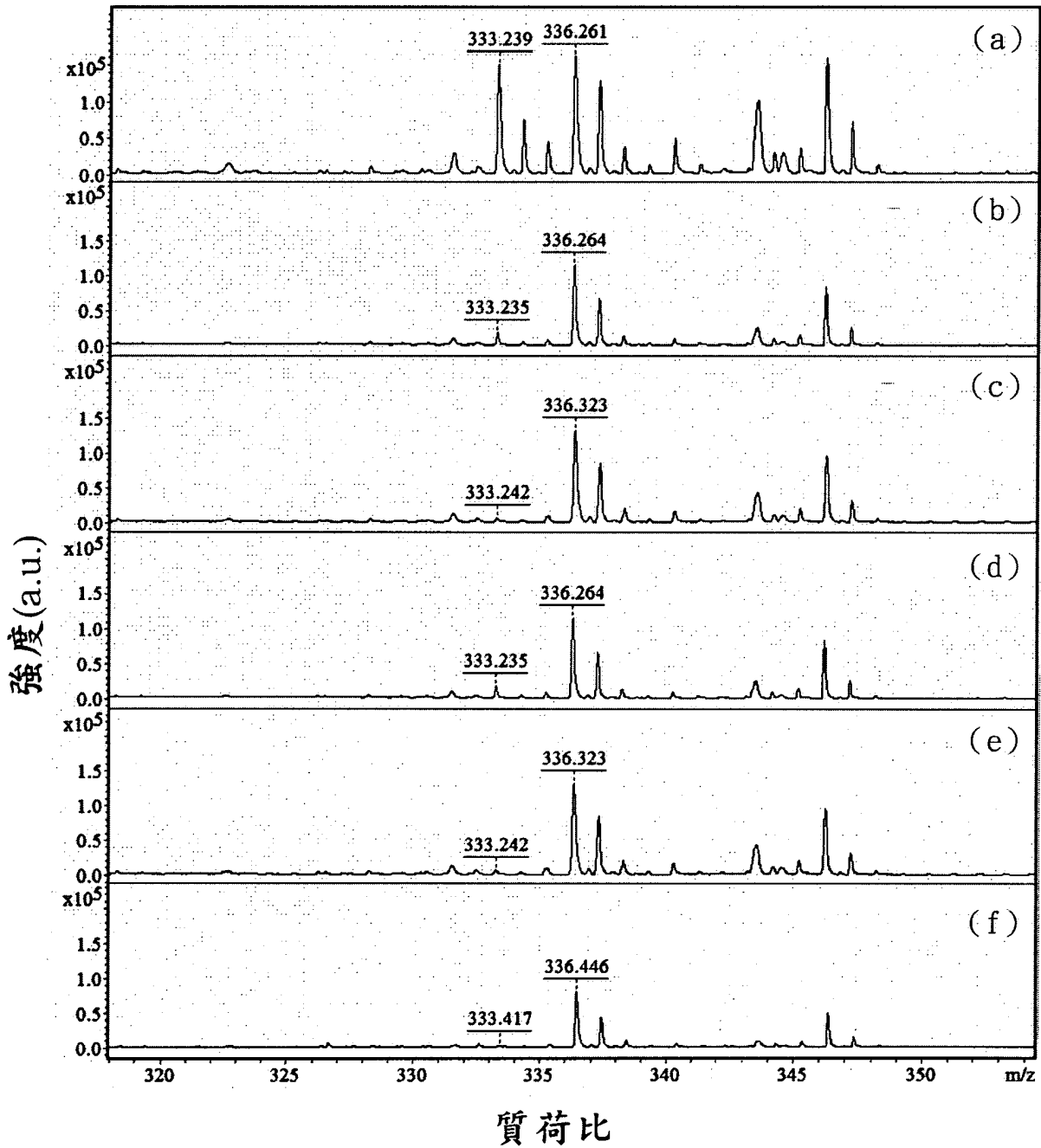
第 8 圖

強度(a.u.)



質荷比

第 9 圖



第 10 圖