



(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 I751875 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：109147116

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 31 日

(51)Int. Cl. : G01N33/02 (2006.01)

C07D311/06 (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：馮嘉嫻 FENG, CHIA-HSIEN (TW)；蔡宜君 TSAI, YI-CHUN (TW)；陳奎蓉 CHEN, KUI-RONG (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

CN 105866316A

CN 106610410A

CN 107782834A

CN 109541058A

Lee, B., Scopelliti, R., & Severin, K. " A molecular probe for the optical detection of biogenic amines. Chemical Communications", Chem. Commun., 47(34), 2011, 9639-9641。

Danchuk, A. I., Komova, N. S., Mobarez, S. N., Doronin, S. Y., Burmistrova, N. A., Markin, A. V., & Duerkop, A. "Optical sensors for determination of biogenic amines in food", Analytical and Bioanalytical Chemistry., May 8 (2020) ; 412(17): 4023-4036。

審查人員：謝敏哲

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：18 共 53 頁

(54)名稱

生物胺的檢測方法及檢測套組

(57)摘要

一種生物胺的檢測方法，用以解決生物胺不適用習知檢測方法的問題。該生物胺的檢測方法：提供一待測樣品，該待測樣品含有生物胺；以香豆素-3-羧酸作為一衍生試劑，混合該待測樣品、該衍生試劑、一偶聯試劑及一鹼性工作液以得一待反應混合液，使該衍生試劑與該待測樣品中的生物胺於該偶聯試劑輔助下進行一醞胺化反應，獲得溶於一衍生溶液中之一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；及以該衍生溶液作為一待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，以獲得一生物胺強度值。本發明另關於一種生物胺的檢測套組。

A method for detecting biogenic amine is used to solve the problem that the conventional method is not suitable for detecting biogenic amine. The method for detecting biogenic amine includes providing a sample with biogenic amine. The sample, a derivatization reagent (coumarin-3-carboxylic acid, C-3-CA), a coupling reagent and an alkaline working solution are mixed to form a mixture, while an amidation reaction between the biogenic amines in the sample and the derivatization reagent in the presence of the coupling reagent, forming a derivative of biogenic amine. The derivative of biogenic amine in a derivatization solution is then detected to obtain a value of biogenic amine. A kit for detecting biogenic amine is also disclosed.

指定代表圖：



I751875

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 生物胺的檢測方法及檢測套組

【英文發明名稱】 Method and Kit for Detecting Biogenic Amine

## 【中文】

一種生物胺的檢測方法，用以解決生物胺不適用習知檢測方法的問題。該生物胺的檢測方法：提供一待測樣品，該待測樣品含有生物胺；以香豆素-3-羧酸作為一衍生試劑，混合該待測樣品、該衍生試劑、一偶聯試劑及一鹼性工作液以得一待反應混合液，使該衍生試劑與該待測樣品中的生物胺於該偶聯試劑輔助下進行一醯胺化反應，獲得溶於一衍生溶液中的一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；及以該衍生溶液作為一待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，以獲得一生物胺強度值。本發明另關於一種生物胺的檢測套組。

## 【英文】

A method for detecting biogenic amine is used to solve the problem that the conventional method is not suitable for detecting biogenic amine. The method for detecting biogenic amine includes providing a sample with biogenic amine. The sample, a derivatization reagent (coumarin-3-carboxylic acid, C-3-CA), a coupling reagent and an alkaline working solution are mixed to form a mixture, while an amidation reaction between the biogenic amines in the sample and the derivatization reagent in the presence of the coupling reagent, forming a derivative of biogenic amine. The derivative of biogenic amine in a derivatization solution is then detected to obtain a value of biogenic amine. A kit for detecting biogenic amine is also disclosed.

【指定代表圖】 第 1 圖

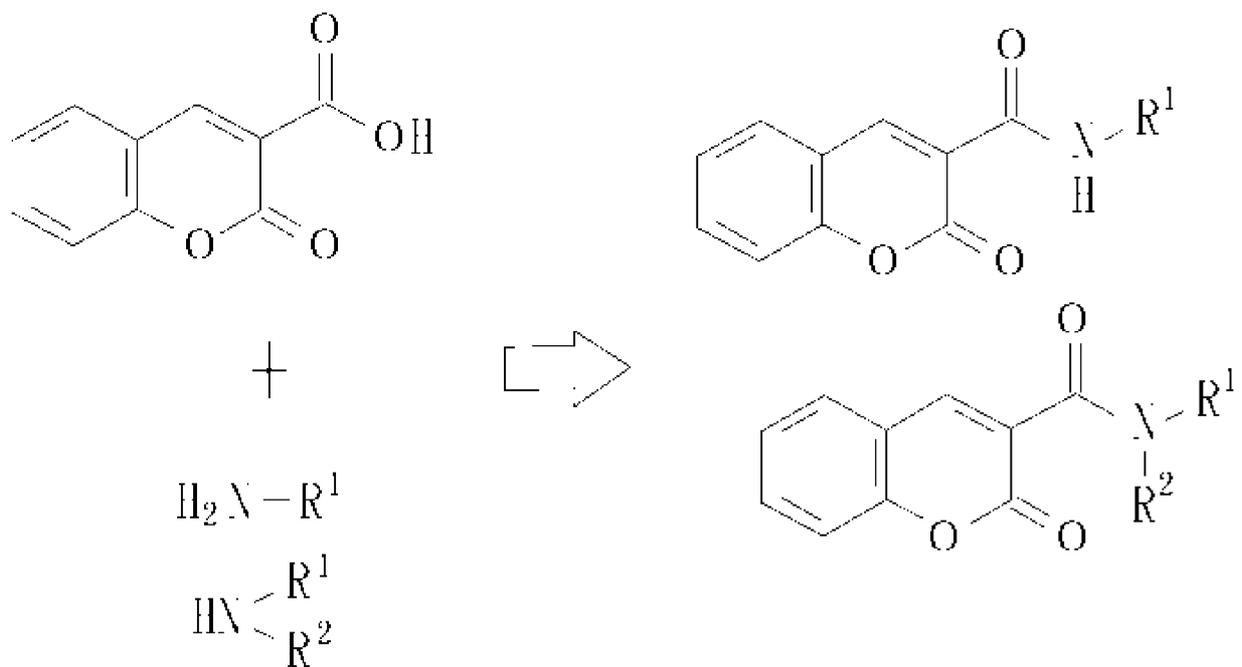
【代表圖之符號簡單說明】

S1: 樣品提供步驟

S2: 衍生步驟

S3: 偵測步驟

【特徵化學式】



## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 生物胺的檢測方法及檢測套組

【英文發明名稱】 Method and Kit for Detecting Biogenic Amine

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種檢測方法，尤其是一種生物胺的檢測方法；本發明另關於用於實施該生物胺的檢測方法的檢測套組。

### 【先前技術】

【0002】 生物胺 (biogenic amine) 為具有一或多個胺基 (amine group) 的生物物質 (biogenic substance)，其為鹼性的含氮化合物 (basic nitrogenous compound)，主要藉由胺基酸的脫羧作用 (decarboxylation) 或藉由醛類、酮類的胺化作用 (amination) 及轉氨作用 (transamination) 而形成。

【0003】 人體內含有多種不同的內源性生物胺 (endogenous biogenic amine)，其可以產生自不同的組織，如腎上腺素 (epinephrine)、去甲腎上腺素 (norepinephrine)、多巴胺 (dopamine)、血清素 (serotonin)、5-羥基吲哚乙酸 (5-hydroxyindole-3-acetic acid，簡稱 5-HIAA)、變腎上腺素 (metanphrine)、去甲變腎上腺素 (normetanephine) 及 3-甲氧基酪胺 (3-methoxytyramine，簡稱 3-MT) 等。前述內源性生物胺在體內含量的多寡，可能有助於疾病的診斷；舉例而言，血漿或尿液中游離的變腎上腺素可以用於嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma) 的診斷；富含血小板的血漿中的色胺酸 (tryptophan)、5-羥基色胺酸 (5-hydroxytryptophan，簡稱 5-HTP)、血清素及 5-羥基吲哚乙酸可以用於神經內分泌腫瘤 (neuroendocrine tumor，簡稱 NET) 的診斷；腦脊髓液或尿液中的兒茶酚胺 (catechloamine)、血清素及 5-

經基吡啶乙酸則可以用於神經母細胞瘤（neuroblastoma）的診斷。

**【0004】** 此外，生物胺存在於多種食品中（特別是乳酪、葡萄酒、啤酒、米酒、肉類等發酵食品中），食物中的生物胺的累積通常是細菌來源的酵素對游離胺基酸的脫羧作用而產生，因此生物胺被認定是可以用於判斷食品新鮮度的指標，且生物胺對人體亦具有潛在毒性，因而世界各國多有針對食品中的生物胺的含量制定出限量標準。舉例而言，美國規定水產品中的組織胺含量不得超過 50 mg/kg，歐盟則規定食品中組織胺含量不得超過 100 mg/kg，酪胺含量不得超過 100~800 mg/kg；歐洲部分國家亦針對葡萄酒中的生物胺含量制定建議上限含量。

**【0005】** 然而，由於大多數的生物胺為高極性物質，且不具有特異的紫外光發光團，亦缺乏螢光特性，使生物胺不適用習知檢測方法。有鑑於此，仍有必要提升一種生物胺的檢測方法及檢測套組。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 為解決上述問題，本發明的目的是提供一種生物胺的檢測方法，係可以有效檢測一待測樣品中的生物胺者。

**【0007】** 本發明的次一目的是提供一種生物胺的檢測方法，係可以縮短檢測的時程者。

**【0008】** 本發明的又一目的是提供一種生物胺的檢測套組，係用於檢測該待測樣品中是否包含生物胺者。

**【0009】** 本發明的生物胺的檢測方法，可以包含：提供一待測樣品，該待測樣品含有生物胺；以香豆素-3-羧酸作為一衍生試劑，混合該待測樣品、該衍生試劑、一偶聯試劑及一鹼性工作液以得一待反應混合液，使該衍生試劑與該待測樣品中的生物胺於該偶聯試劑輔助下進行一醯胺化反應，獲得溶

於一衍生溶液中之一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；及以該衍生溶液作為一待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，以獲得一生物胺強度值。

**【0010】** 據此，藉由使該待測樣品中的生物胺的胺基與香豆素-3-羧酸的羧基，在該偶聯試劑的輔助下進行該醯胺化反應，進而可以獲得胺基上置換有標記的生物胺衍生物，該生物胺衍生物能夠經由各種習知方法偵測其存在（例如，以液相層析法分離後，利用紫外光光譜法、螢光光譜法、或質譜分析法進行偵測），因此本發明的生物胺的檢測方法具有良好的靈敏度、精密度及準確度，能夠降低該待測樣品的使用量，為本發明之功效。

**【0011】** 本發明的生物胺的檢測方法，其中，該偶聯試劑可以為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎘六氟磷酸鹽、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；如此，使該偶聯試劑可以輔助該待測樣品中的生物胺的胺基與香豆素-3-羧酸的羧基之間形成該醯胺鍵，以促進該醯胺化反應的進行。

**【0012】** 本發明的生物胺的檢測方法，其中，該鹼性工作液為一有機鹼化合物溶於一工作溶媒所形成，該有機鹼化合物可以為 4-二甲胺基吡啶、N-甲基嗎啉、咪唑、或三乙胺，且該工作溶媒可以為乙腈；如此，使該有機鹼化合物可以使香豆素-3-羧酸的羧基轉化為羧酸根陰離子，以利該偶聯試劑輔助該醯胺化反應的進行。

**【0013】** 本發明的生物胺的檢測方法，其中，該待反應混合液另包含一萃取溶媒及一鹽溶液，且在該醯胺化反應後，使該衍生溶液分層形成一上層溶液及一下層固化物，續以該上層溶液作為該待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，該萃取溶媒可以為乙腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯或二氯甲

110年11月11日修正替換頁

烷，且該鹽溶液可以為一磷酸氫二鈉水溶液；如此，該萃取溶媒及該鹽溶液可以共同作用以去除該衍生溶液中過量添加的衍生試劑（香豆素-3-羧酸）或該偶聯試劑，並去除該醯胺化反應所產生的副產物，進而富集該生物胺衍生物，而能夠使該生物胺衍生物更容易被偵測得到該生物胺強度值。

【0014】基於相同的技術概念下，本發明的生物胺的檢測套組，可以包含：一衍生試劑，該衍生試劑為香豆素-3-羧酸，且用於與該待測樣品中的生物胺進行一醯胺化反應以形成一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；一偶聯試劑，用於促進該醯胺化反應的進行；及一鹼性工作液，用於與該待測樣品、該偶聯試劑及該衍生試劑共同形成一待反應混合液，該鹼性工作液包含可溶解該衍生試劑、該偶聯試劑及生物胺之一工作溶媒。

【0015】據此，該檢測套組係能夠應用於實施前述之生物胺的檢測方法，有效地與生物胺共同形成安定性良好的生物胺衍生物，工者因而可以因應需求選用各種習知方法來偵測該生物胺衍生物（例如，以液相層析法分離後，利用紫外光光譜法、螢光光譜法、或質譜分析法進行偵測），為本發明之功效。

【0016】本發明的生物胺的檢測套組，其中，該偶聯試劑可以為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；如此，使該偶聯試劑可以輔助該待測樣品中的生物胺的胺基與香豆素-3-羧酸的羧基之間形成該醯胺鍵，以促進該醯胺化反應的進行。

【0017】本發明的生物胺的檢測套組，其中，該鹼性工作液為一有機鹼化合物溶於該工作溶媒所形成，且用於活化該衍生試劑的羧基，該有機鹼化

合物可以為 4-二甲胺基吡啶、N-甲基嗎啉、咪唑、或三乙胺，且該工作溶媒可以為乙腈；如此，使該有機鹼化合物可以使香豆素-3-羧酸的羧基轉化為羧酸根陰離子，以利該偶聯試劑輔助該醯胺化反應的進行。

【0018】 本發明的生物胺的檢測套組，另包含：一萃取溶媒，為一非質子性溶劑，且用於溶解該生物胺衍生物；及一鹽溶液，與該萃取溶媒不互溶，且用於形成鹽析效應，該萃取溶媒可以為乙腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯或二氯甲烷，且該鹽溶液可以為一磷酸氫二鈉水溶液；如此，該萃取溶媒及該鹽溶液可以共同作用以去除該衍生溶液中過量添加的衍生試劑(香豆素-3-羧酸)或該偶聯試劑，並去除該醯胺化反應所產生的副產物，進而富集該生物胺衍生物，而能夠使該生物胺衍生物更容易被偵測得到該生物胺強度值。

#### 【圖式簡單說明】

##### 【0019】

- 〔第 1 圖〕 本發明之第一實施例的生物胺的檢測方法的流程圖。
- 〔第 2 圖〕 生物胺與香豆素-3-羧酸之衍生反應的化學方程式。
- 〔第 3 圖〕 本發明之第二實施例的生物胺的檢測方法的流程圖。
- 〔第 4 圖〕 試驗 (B) 中，第 B1~B4 組待測溶液的生物胺強度值長條圖。
- 〔第 5 圖〕 試驗 (C) 中，第 C1~C3 組待測溶液的生物胺強度值長條圖。
- 〔第 6 圖〕 試驗 (D) 中，第 D1~D4 組待測溶液的生物胺強度值長條圖。
- 〔第 7 圖〕 試驗 (E) 中，第 E1~E2 組待測溶液的毛細管液相層析圖，其中，波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。
- 〔第 8 圖〕 試驗 (F) 中，第 F0~F2 組待測溶液的毛細管液相層析圖，其中，波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、

精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

〔第 9a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G1 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 9b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G1 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 10a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G2 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 10b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G2 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 11a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G3 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 11b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G3 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 12a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G4 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 12b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G4 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 13a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G5 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 13b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G5 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 14a 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G6 組待測溶液的先驅離子光譜圖。

〔第 14b 圖〕 試驗 (G) 中, 第 G6 組待測溶液的碎片離子光譜圖。

〔第 15a 圖〕 試驗 (H) 中, 各生物胺標準品同批次的檢量線分析結果。

〔第 15b 圖〕 試驗 (H) 中, 各生物胺標準品異批次的檢量線分析結果。

〔第 16a 圖〕 試驗 (I) 中, 第 I1-1 組醬油樣品的毛細管液相層析圖, 其中, 波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

〔第 16b 圖〕 試驗 (I) 中, 第 I2-1 組魚露樣品的毛細管液相層析圖, 其中, 波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

〔第 16c 圖〕 試驗 (I) 中, 第 I3-1 組黑麥汁樣品的毛細管液相層析圖, 其中, 波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

〔第 17 圖〕 試驗 (J) 中，味噌樣品的毛細管液相層析圖，其中，波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

〔第 18 圖〕 試驗 (K) 中，血漿樣品的毛細管液相層析圖，其中，波峰 1~6 分別為組織胺衍生物、腐胺衍生物、亞精胺衍生物、屍胺衍生物、精胺衍生物及酪胺衍生物所形成的波峰。

### 【實施方式】

【0020】 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：

【0021】 請參照第 1 圖所示，本發明之第一實施例的生物胺的檢測方法可以包含：一樣品提供步驟 S1、一衍生步驟 S2 及一分析步驟 S3。

【0022】 詳而言之，該樣品提供步驟 S1 中，係提供含生物胺的一待測樣品。舉例而言，該待測樣品可以來自一食品樣品或來自一生物樣品（例如一血液樣品、一尿液樣品或一腦脊髓液樣品）。當該待測樣品為來自液態的該食物樣品時，該待測樣品可以直接進行該衍生步驟 S2，而當該待測樣品為來自固態的該食物樣品時，則可以將該食物樣品加入水中，超音波震盪以使該食物樣品中的生物胺溶於水中，在離心（14,800 rpm、1 分鐘）之後取得一上清液，續以該上清液作為該衍生步驟 S2 的待測樣品。

【0023】 值得注意的是，由於該生物樣品的成分複雜，於進行該衍生步驟 S2 之前，必須先移除該生物樣品中的蛋白質，進而可以避免蛋白質對後續衍生步驟 S2 造成干擾，而影響一醯胺化反應（amidation reaction）的效益；舉例而言，工者可以先混合該生物樣品及一蛋白質沉澱劑（protein precipitant），該蛋白質沉澱劑可以為丙酮（acetone）或乙腈（acetonitrile，

簡稱 ACN)，使該血液樣品中的蛋白質形成一蛋白質沉澱物，並藉由離心（14,800 rpm、1 分鐘）去除該蛋白質沉澱物以獲得一上清液，該上清液即可以作為後續之衍生步驟 S2 所使用之待測樣品。

【0024】該衍生步驟 S2 中，工者係能夠以香豆素-3-羧酸（coumarin-3-carboxylic acid，簡稱 C-3-CA）作為一衍生試劑（derivatization reagent），將該衍生試劑溶於一鹼性工作液中（alkaline working solution），並於其中加入該待測樣品，即可以配製獲得一待反應混合液，如此，使該衍生試劑與該待測樣品中的生物胺進行如第 2 圖所示的該醯胺化反應，使一醯胺鍵（amide bond）形成該衍生試劑的一羧基（carboxyl group，即-COOH）與該待測樣品中的生物胺的一胺基（amino group，即-NH<sub>2</sub>）之間，以獲得一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺。舉例而言，該待反應混合液中，該衍生試劑（香豆素-3-羧酸，C-3-CA）的濃度可以為 25~100 mM；於本實施例中，該衍生試劑的濃度為 75 mM。

【0025】該鹼性工作液可以為一有機鹼化合物（organic base）溶於一工作溶媒（working solvent）所形成，該有機鹼化合物可以使該衍生試劑的羧基轉化為羧酸根陰離子（carboxylate anion，即-COO<sup>-</sup>），以利該偶聯試劑輔助該醯胺化反應的進行。舉例而言，該工作溶媒可以為乙腈、丙酮、二甲基亞砜（dimethyl sulfoxide，簡稱 DMSO）或碳酸二甲酯（dimethyl carbonate，簡稱 DMC），該有機鹼化合物可以為 4-二甲胺基吡啶（4-dimethylaminopyridine，簡稱 DMAP）、N-甲基嗎啉（N-Methylmorpholine，簡稱 NMM）、咪唑（imidazole）或三乙胺（triethylamine，簡稱 TEA），且該待反應混合液中，該有機鹼化合物的濃度可以為 50~180 mM；於本實施例中，該工作溶媒為乙腈，該有機鹼化合物為 4-二甲胺基吡啶（DMAP），且該有機鹼化合物的濃度為 140 mM。

【0026】由於該羧基與該胺基之間的醯胺鍵形成緩慢，工者可以於配製該待反應混合液時，同時加入一偶聯試劑（coupling reagent），以輔助該醯胺化反應的進行。舉例而言，該偶聯試劑可以為能夠形成活性酯類介導偶聯反應（activated ester-mediated coupling reaction）的(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽（(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate，簡稱 COMU）、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯（O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate，簡稱 TBTU）或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯六氟磷酸酯（1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate，簡稱 HATU），且該待反應混合液中，該偶聯試劑的濃度可以為 50~150 mM；於本實施例中，該偶聯試劑為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽（COMU），且該偶聯試劑的濃度為 125 mM。

【0027】為了加速該醯胺化反應反應的進行，工者可以對該待反應混合液施予一能量。舉例而言，工者係可以於 30~70°C 的乾浴（dry bath）中加熱該待反應混合液 1~20 分鐘，以促進該生物胺衍生物的形成；於本實施例中，係於 30°C 的乾浴中加熱 3 分鐘。

【0028】接著，於該分析步驟 S3 中，工者可以將該衍生溶液作為一待測溶液，利用各種習知方法來偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，以獲得一生物胺強度值，並以該生物胺強度值來評估該待測樣品中是否包含生物胺，甚或是該待測樣品中的生物胺之含量多寡。舉例而言，工者能夠以液相層析法分離後，利用紫外光光譜法、螢光光譜法或質譜分析法來偵測該待測溶液中的生物胺衍生物；例如係以結合紫外光偵測之毛細管高效液相層析法

(capillary high performance liquid chromatography combined with UV detector, 簡稱 CapLC-UV) 進行偵測, 或者以奈米化液相層析法串聯質譜分析法 (nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, 簡稱 nano LC-MS/MS) 進行偵測。

【0029】此外, 請參照第 3 圖所示, 由於在進行該分析步驟 S3 時, 該待測溶液 (該衍生溶液) 中可能含有過量添加的衍生試劑 (香豆素-3-羧酸) 或該偶聯試劑, 且該醯胺化反應亦可能產生副產物 (byproduct), 於本發明之第二實施例的生物胺的檢測方法可以包含: 該樣品提供步驟 S1、一衍生萃取步驟 S2' 及該分析步驟 S3。

【0030】該衍生萃取步驟 S2' 中, 除了該待測樣品、該衍生試劑、該鹼性工作液及該偶合試劑之外, 該待反應混合液還可以包含一萃取溶媒 (extraction solvent) 及一鹽溶液 (salt solution), 該萃取溶媒為可以溶解該生物胺衍生物的一非質子性溶劑 (aprotic solvent), 其可以輔助該衍生反應的進行而形成該生物胺衍生物, 並可以自該待測樣品中萃取生物胺衍生物; 該鹽溶液為與該萃取溶媒不互溶的一溶液, 其可以形成鹽析 (salting-out) 效應, 使過量的衍生試劑、副產物等可以與溶有該生物胺衍生物的萃取溶媒分層。舉例而言, 該萃取溶媒可以為乙腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯 (ethyl acetate, 簡稱 EA) 或二氯甲烷 (dichloromethane, 簡稱 DCM), 且該鹽溶液可以為包含磷酸氫二鈉 (disodium hydrogen phosphate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 的溶液, 且該待反應混合液中, 該鹽溶液的濃度可以為 100~1000 mM; 於本實施例中, 該萃取溶媒為碳酸二甲酯, 該鹽溶液為濃度為 1000 mM 的磷酸氫二鈉水溶液。

【0031】在混合該待測樣品、該衍生試劑、該鹼性工作液、該偶合試劑、該萃取溶媒及該鹽溶液, 以獲得該待反應混合液之後, 工者並可以在對該待反應混合液施予該能量之後, 使該鹽溶液產生相變化 (phase change), 自液

相 (liquid phase) 轉變為固相 (solid phase) 而形成一下層固化物 (solidified product)，因而更容易與溶有該生物胺衍生物的萃取溶媒分離。舉例而言，工者係可以於 30~70°C 的乾浴中加熱該待反應混合液 1~20 分鐘之後，將該待反應混合液進行冰浴 (ice bath)，接著取上層溶液作為該待測溶液，進行該分析步驟 S3。

【0032】 依據前述，基於相同的技術概念下，本發明之一實施例的生物胺的檢測套組可以包含：該衍生試劑、該偶聯試劑及該鹼性工作液，該衍生試劑為香豆素-3-羧酸，且用以與生物胺進行該醯胺化反應而能夠共同形成該生物胺衍生物，該偶聯試劑用於促進該醯胺化反應的進行，例如可以為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯，該鹼性工作液為該有機鹼化合物溶於該工作溶媒所形成，該有機鹼化合物用於使該衍生試劑的羧基轉化為羧酸根陰離子，以利該偶聯試劑輔助該醯胺化反應的進行，該工作溶媒則為可以溶解該衍生試劑、該偶聯試劑、生物胺及該有機鹼化合物的乙腈。

【0033】 該生物胺的檢測套組還可以包含：該萃取溶媒及該鹽溶液，該萃取溶媒為可以溶解該生物胺衍生物的一非質子性溶劑 (aprotic solvent)，其可以輔助該衍生反應的進行而形成該生物胺衍生物，並可以自該待測樣品中萃取生物胺衍生物；該鹽溶液為與該萃取溶媒不互溶的一溶液，其可以形成鹽析 (salting-out) 效應，使過量的衍生試劑、副產物等可以與溶有該生物胺衍生物的萃取溶媒分層。舉例而言，該萃取溶媒可以為乙腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯或二氯甲烷；該鹽溶液可以為磷酸氫二鈉水溶液。

【0034】 為證實該生物胺的檢測方法係能夠用於檢測該待測樣品中的生物胺的含量，遂進行以下試驗：

【0035】 生物胺標準品溶液的配製：分別將組織胺（histamine，簡稱 His）、腐胺（putrescine，簡稱 Put）、亞精胺（spermidine，簡稱 Spd）、屍胺（cadaverine dihydrochloride，簡稱 Cad）、精胺（spermine，簡稱 Spm）及酪胺（tyramine，簡稱 Tyr）等生物胺溶解於水中，形成濃度為 400  $\mu$ M 的生物胺標準品溶液。

【0036】 衍生試劑溶液的配製：分別將 4-二甲胺基吡啶（DMAP）、N-甲基嗎啉（NMM）、咪唑（imidazole）及三乙胺（TEA）等有機鹼化合物溶解於該工作溶媒（乙腈）中，形成濃度為 140 mM 的鹼性工作液，續將該衍生試劑（香豆素-3-羧酸，C-3-CA）溶於前述的鹼性工作液中，形成濃度為 75 mM 的衍生試劑溶液。

【0037】 偶聯試劑溶液的配製：分別將(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽（COMU）、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯（TBTU）及 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯六氟磷酸酯（HATU）等偶聯試劑溶於該工作溶媒（乙腈）中，形成濃度為 125 mM 的偶聯試劑溶液。

【0038】 鹽溶液的配製：將磷酸氫二鈉（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）溶解於水中，形成濃度為 1 M 的鹽溶液。

【0039】 （A）衍生試劑的選擇

【0040】 請參照第 1 表所示，本試驗係選用香豆素-3-羧酸（C-3-CA，第 A1 組）、色酮 2-甲酸（chromone-2-carboxylic acid，第 A2 組）、甲芬那酸（mefenamic acid，第 A3 組）、三級桂皮酸（*tert*-cinnamic acid，第 A4 組）、3-吲哚丙烯酸（3-indoleacrylic acid，第 A5 組）、啶酮酸（nalidixic acid，第 A6 組）及 1-萘甲酸（1-naphthoic acid，第 A7 組）等作為各組的衍生試劑，將各組衍生試劑溶於該鹼性工作液（DMAP）中，形成濃度為 75 mM 的衍生

試劑溶液，取該衍生試劑溶液（75  $\mu\text{L}$ ），混合該偶聯試劑溶液（COMU，75  $\mu\text{L}$ ）及生物胺標準品溶液（100  $\mu\text{L}$ ），再加入該萃取溶媒（DMC，100  $\mu\text{L}$ ）及該鹽溶液（ $\text{Na}_2\text{HPO}_{4(\text{aq})}$ ，400  $\mu\text{L}$ ），震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為該待測溶液，以薄層層析法（thin layer chromatography，簡稱 TLC）觀察各組於 302 nm 的紫外光波長下是否能夠觀察到該生物胺衍生物的生成，接著以 ImageJ 軟體進行定量以獲得該生物胺強度值。

【0041】 第 1 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	衍生試劑 (溶於鹼性工 作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液
A1	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基 吡啶)	(1-氰基-2-乙氧 基-2-氧代亞乙 基胺基氧基)二 甲基氨基嗎啉 代碳鎊六氟磷 酸鹽 (COMU)	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水 溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_{4(\text{aq})}$ )
A2	色酮 2-甲酸 (4-二甲胺基 吡啶)			
A3	甲芬那酸 (4-二甲胺基 吡啶)			
A4	三級桂皮酸 (4-二甲胺基 吡啶)			

A5	3-吲哚丙烯酸 (4-二甲胺基 吡啶)			
A6	啶酮酸 (4-二甲胺基 吡啶)			
A7	1-萘甲酸 (4-二甲胺基 吡啶)			

【0042】請參照第 2 表所示，針對進行測試的 6 種生物胺，僅有第 A1 組的香豆素-3-羧酸 (C-3-CA) 均可以成功地形成該生物胺衍生物，第 A3 組的甲芬那酸 (mefenamic acid) 只能夠成功地形成組織胺 (His)、亞精胺 (Spd)、精胺 (Spm) 及酪胺 (Tyr) 的衍生物，而第 A2 組的色酮 2-甲酸 (chromone-2-carboxylic acid)、第 A4 組的三級桂皮酸 (tert-cinnamic acid)、第 A5 組的 3-吲哚丙烯酸 (3-indoleacrylic acid)、第 A6 組的啶酮酸 (nalidixic acid) 及第 A7 組的 1-萘甲酸 (1-naphthoic acid) 均無法形成該生物胺衍生物。

【0043】第 2 表、本試驗各組待測溶液的生物胺強度值

組別	衍生試劑	強度 (波峰面積)					
		組織胺 (His)	腐胺 (Put)	亞精胺 (Spd)	屍胺 (Cad)	精胺 (Spm)	酪胺 (Tyr)
A1	香豆素-3-羧酸	804.39	1895.01	1228.39	866.49	559.50	487.35
A2	色酮 2-甲	—	—	—	—	—	—

	酸						
A3	甲芬那酸	64.43	0	114.14	0	125.44	117.34
A4	三級桂皮酸	—	—	—	—	—	—
A5	3-吡啶丙烯酸	—	—	—	—	—	—
A6	吡啶酮酸	—	—	—	—	—	—
A7	1-萘甲酸	—	—	—	—	—	—

**【0044】** (B) 有機鹼化合物的選擇

**【0045】** 請參照第 3 表所示，本試驗係選用 4-二甲胺基吡啶 (DMAP，第 B1 組)、N-甲基嗎啉 (NMM，第 B2 組)、咪唑 (imidazole，第 B3 組)、或三乙胺 (TEA，第 B4 組) 等有機鹼化合物，溶於該工作溶媒 (乙腈) 中而形成濃度為 140 mM 的鹼性工作液之後，再將該衍生試劑 (香豆素-3-羧酸，C-3-CA) 溶於各組的鹼性工作液而形成該衍生試劑溶液，取該衍生試劑溶液 (75  $\mu$ L)，混合該偶聯試劑溶液 (COMU，75  $\mu$ L) 及生物胺標準品溶液 (100  $\mu$ L)，再加入該萃取溶媒 (DMC，100  $\mu$ L) 及該鹽溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，400  $\mu$ L)，震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為該待測溶液，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行定量以獲得該生物胺強度值。

**【0046】** 第 3 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	衍生試劑 (溶於鹼性工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液

B1	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基吡啶)	(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽 (COMU)	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_{4(\text{aq})}$ )
B2	香豆素-3-羧酸 (N-甲基嗎啉)			
B3	香豆素-3-羧酸 (咪唑)			
B4	香豆素-3-羧酸 (三乙胺)			

【0047】毛細管液相層析法所使用的固定相 (stationary phase) 為 C18 管柱 (Waters XBridge BEH C18 XP, 2.1 mm×100 mm; 2.5 μm), 移動相 (mobile phase) 包含溶媒 A (solvent A, 0.1%甲酸水溶液) 及溶媒 B (solvent B, 乙腈), 以如第 4 表所示的條件進行梯度沖提 (gradient elution), 偵測波長為 294 nm, 流速為 180 μL/min。

【0048】第 4 表、毛細管液相層析法所使用的梯度沖提的條件

時間 (min)	溶媒 A	溶媒 B
0	95	5
3	95	5
4	40	60
13	40	60
14	0	100
20	0	100

【0049】請參照第 4 圖所示，無論是第 B1 組的 4-二甲胺基吡啶 (DMAP)、第 B2 組的 N-甲基嗎啉 (NMM)、第 B3 組的咪唑 (imidazole) 或第 B4 組的三乙胺 (TEA，第 B4 組) 均可以成功地形成該生物胺衍生物，其中以第 B1 組的 4-二甲胺基吡啶 (DMAP) 的效果為佳。

【0050】 (C) 偶聯試劑的選擇

【0051】請參照第 5 表所示，本試驗係選用(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽 (COMU，第 C1 組)、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU，第 C2 組) 或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯六氟磷酸酯 (HATU，第 C3 組) 等偶聯試劑形成濃度為 125 mM 的偶聯試劑溶液，取該衍生試劑溶液 (香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu$ L)，混合前述各組的偶聯試劑溶液 (75  $\mu$ L) 及生物胺標準品溶液 (100  $\mu$ L)，再加入該萃取溶媒 (DMC，100  $\mu$ L) 及該鹽溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，400  $\mu$ L)，震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為該待測溶液，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行定量以獲得該生物胺強度值。

【0052】第 5 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	衍生試劑 (溶於鹼性工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液
C1	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基吡啶)	(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水 溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ )

		甲基氨基嗎啉 代碳鎊六氟磷 酸鹽 (COMU)		)
C2		O-苯並三氮唑- N,N,N',N'-四 甲基脲四氟硼 酸酯 (TBTU)		
C3		2-(7-氧化苯並 三氮唑)- N,N,N',N'-四 甲基脲六氟磷 酸酯六氟磷酸 酯 (HATU)		

【0053】請參照第 5 圖所示，無論是第 C1 組的(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎊六氟磷酸鹽 (COMU)、第 C2 組的 O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU) 或第 C3 組的 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯六氟磷酸酯 (HATU) 均可以成功地形成該生物胺衍生物，其中以第 C1 組的(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎊六氟磷酸鹽 (COMU) 的效果為佳。

【0054】(D) 萃取溶媒的選擇

【0055】請參照第 6 表所示，本試驗係選用乙腈 (ACN, 第 D1 組)、碳酸二甲酯 (DMC, 第 D2 組)、乙酸乙酯 (EA, 第 D3 組) 或二氯甲烷 (DCM,

第 D4 組) 等作為該萃取溶媒，取該衍生試劑溶液 (香豆素-3-羧酸, C-3-CA, 溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中, 75  $\mu$ L), 混合該偶聯試劑溶液 (COMU, 75  $\mu$ L) 及生物胺標準品溶液 (100  $\mu$ L), 再加入前述各組的萃取溶媒 (100  $\mu$ L) 及該鹽溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 400  $\mu$ L), 震盪 15 秒之後, 以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘, 接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘, 再進行冰浴, 取上層溶液作為該待測溶液, 以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行定量以獲得該生物胺強度值。

【0056】 第 6 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	衍生試劑 (溶於鹼性工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液
D1	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基吡啶)	(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎊六氟磷酸鹽 (COMU)	乙腈 (ACN)	磷酸氫二鈉水溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_{4(\text{aq})}$ )
D2			碳酸二甲酯 (DMC)	
D3			乙酸乙酯 (EA)	
D4			二氯甲烷 (DCM)	

【0057】 請參照第 6 圖所示, 無論是第 D1 組的乙腈 (ACN)、第 D2 組的碳酸二甲酯 (DMC)、第 D3 組的乙酸乙酯 (EA) 或第 D4 組的二氯甲烷 (DCM) 均可以成功地形成該生物胺衍生物, 其中以第 D2 組的碳酸二甲酯 (DMC) 的效果為佳。

【0058】 (E) 鹽溶液的選擇

【0059】請參照第 7 表所示，本試驗係選用磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，第 E1 組) 或硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，第 E2 組) 等鹽類溶於水以形成濃度為 1000 mM 的鹽溶液，取該衍生試劑溶液 (香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu\text{L}$ )，混合該偶聯試劑溶液 (COMU，75  $\mu\text{L}$ ) 及生物胺標準品溶液 (100  $\mu\text{L}$ )，再加入該萃取溶媒 (碳酸二甲酯，100  $\mu\text{L}$ ) 及前述各組的鹽溶液 (400  $\mu\text{L}$ )，震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為該待測溶液，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行分析。

【0060】第 7 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	衍生試劑 (溶於鹼性工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液
E1	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基 吡啶)	(1-氰基-2-乙氧 基-2-氧代亞乙 基胺基氧基)二 甲基氨基嗎啉 代碳鎊六氟磷 酸鹽 (COMU)	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水 溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_{4(\text{aq})}$ )
E2				硫酸鈉水溶液 ( $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ )

【0061】請參照第 7 圖所示，第 E1 組的磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 可以分別形成組織胺 (His)、腐胺 (Put)、亞精胺 (Spd)、屍胺 (Cad)、精胺 (Spm) 及酪胺 (Tyr) 等生物胺的衍生物，其波峰位置如 1~6 所示；而第 E2 組的硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 則在第 12~14 分鐘的滯留時間有干擾，因而無法有效

分離各生物胺的衍生物。

**【0062】** (F) 第一實施例與第二實施例的比較

**【0063】** 請參照第 8 表所示，本試驗將該衍生試劑溶液（香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu$ L），混合該偶聯試劑溶液（COMU，75  $\mu$ L）及水（100  $\mu$ L），再加入該萃取溶媒（碳酸二甲酯，100  $\mu$ L）及該鹽溶液（磷酸氫二鈉，400  $\mu$ L），震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為第 F0 組的待測溶液，以毛細管液相層析法（CapLC）進行分析。

**【0064】** 將該衍生試劑溶液（香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu$ L），混合該偶聯試劑溶液（COMU，75  $\mu$ L）及生物胺標準品溶液（100  $\mu$ L），再加入該萃取溶媒（碳酸二甲酯，100  $\mu$ L）及該鹽溶液（磷酸氫二鈉，400  $\mu$ L），震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再進行冰浴，取上層溶液作為第 F1 組的待測溶液，以毛細管液相層析法（CapLC）進行分析。

**【0065】** 以及將該衍生試劑溶液（香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu$ L），混合該偶聯試劑溶液（COMU，75  $\mu$ L）及生物胺標準品溶液（100  $\mu$ L），震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘後作為第 F2 組的待測溶液，以毛細管液相層析法（CapLC）進行分析。

**【0066】** 第 8 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	待測樣品	衍生試劑 (溶於鹼性 工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液

110年11月11日修正替換頁

F0	水	香豆素-3-羧酸 (4-二甲胺基吡啶)	(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ )
F1	生物胺標準品		氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎊六氟磷酸鹽 (COMU)	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉水溶液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ )
F2				—	—

【0067】請參照第 8 圖所示，與未加入該萃取溶媒及該鹽溶液的第 F2 組（即，第一實施例的生物胺的檢測方法）相比，加入該萃取溶媒及該鹽溶液的第 F1 組（即，第二實施例的生物胺的檢測方法）可以較為清晰地分離組織胺（His）、腐胺（Put）、亞精胺（Spd）、屍胺（Cad）、精胺（Spm）及酪胺（Tyr）等生物胺的衍生物，其波峰位置如 1~6 所示。

【0068】（G）生物胺衍生物的質譜鑑定

【0069】請參照第 9 表所示，本試驗係將組織胺（His，第 G1 組）、腐胺（Put，第 G2 組）、亞精胺（Spd，第 G3 組）、屍胺（Cad，第 G4 組）、精胺（Spm，第 G5 組）或酪胺（Tyr，第 G6 組）等生物胺溶於水以形成濃度為 400  $\mu\text{M}$  的生物胺標準品溶液，將該衍生試劑溶液（香豆素-3-羧酸，C-3-CA，溶於包含 4-二甲胺基吡啶的鹼性工作液中，75  $\mu\text{L}$ ），混合該偶聯試劑溶液（COMU，75  $\mu\text{L}$ ）及生物胺標準品溶液（100  $\mu\text{L}$ ），再加入該萃取溶媒（碳酸二甲酯，100  $\mu\text{L}$ ）及該鹽溶液（磷酸氫二鈉，400  $\mu\text{L}$ ），震盪 15 秒之後，以 14,800 rpm 的轉速離心 2 分鐘，接著於 30°C 的乾浴中反應 3 分鐘，再

進行冰浴，取上層溶液作為該待測溶液，以奈米化液相層析法串聯質譜分析法（nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry，簡稱 nano LC-MS/MS）進行偵測。

**【0070】** 第 9 表、本試驗各組待反應混合液的配方

組別	待測樣品	衍生試劑 (溶於鹼性 工作液)	偶聯試劑	萃取溶媒	鹽溶液
G1	組織胺 (His)	香豆素-3-羧 酸 (4-二甲胺 基吡啶)	(1-氰基-2-乙 氧基-2-氧代 亞乙基胺基 氧基)二甲基 氨基嗎啉代 碳鎊六氟磷 酸鹽 (COMU)	碳酸二甲酯 (DMC)	磷酸氫二鈉 水溶液 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4(aq)</sub> )
G2	腐胺 (Put)				
G3	亞精胺 (Spd)				
G4	屍胺 (Cad)				
G5	精胺 (Spm)				
G6	酪胺 (Tyr)				

**【0071】** 奈米化液相層析法串聯質譜分析法所使用的固定相 (stationary phase) 為 C18 管柱 (Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 75 mm × 50 mm ; 1.7 μm)，移動相 (mobile phase) 包含溶媒 A (solvent A, 0.1% 甲酸水溶液) 及溶媒 B (solvent B, 0.1% 甲酸乙腈溶液)，以如第 10 表所示的條件進行梯度沖提 (gradient elution)，流速為 300 nL/min。

**【0072】** 第 10 表、奈米化液相層析法串聯質譜分析法的梯度沖提條件

時間 (min)	溶媒 A	溶媒 B
0	99	1
1	88	12
5	0	100
45	0	100

【0073】如第 9a、9b 圖所示的組織胺衍生物的先驅離子光譜圖 (precursor ion spectrum) 及碎片離子光譜圖 (fragment ion spectrum) 所示，以 MS-1 掃描所得的該組織胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 284.1033，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的組織胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 95 及 266。

【0074】如第 10a、10b 圖所示的腐胺衍生物的先驅離子光譜圖及碎片離子光譜圖所示，以 MS-1 掃描所得的該腐胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 433.1400，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的腐胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 173、244 及 415。

【0075】如第 11a、11b 圖所示的亞精胺衍生物的先驅離子光譜圖及碎片離子光譜圖所示，以 MS-1 掃描所得的該亞精胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 662.2159，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的亞精胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 230、244 及 472。

【0076】如第 12a、12b 圖所示的屍胺衍生物的先驅離子光譜圖及碎片離子光譜圖所示，以 MS-1 掃描所得的該屍胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 447.1559，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的亞精胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 201、258 及 429。

【0077】如第 13a、13b 圖所示的精胺衍生物的先驅離子光譜圖及碎片

離子光譜圖所示，以 MS-1 掃描所得的該精胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 891.2883，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的精胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 473 及 701。

【0078】如第 14a、14b 圖所示的酪胺衍生物的先驅離子光譜圖及碎片離子光譜圖所示，以 MS-1 掃描所得的該酪胺衍生物的波峰 ( $[M+H]^+$ ) 的質荷比 ( $m/z$ ) 為 482.1237，且以 MRM 模式進行 MS2 掃描所得的酪胺衍生物的碎片離子的波峰的質荷比 ( $m/z$ ) 為 173、292 及 464。

【0079】(H) 分析確效 (validation)

【0080】本試驗係以濃度介於 3~400  $\mu\text{M}$  的生物胺標準品進行測試，在經該衍生萃取步驟 S2' 之後，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行分析，以該生物胺衍生物的濃度作為 X 軸，並以該生物胺衍生物與內部標準品 (internal control) 的波峰面積比 (peak area ratio) 作為 Y 軸，經線性回歸 (linear regression) 分析獲得檢量線 (calibration curve) 的公式及決定係數 (coefficient of determination, 簡稱  $r^2$ )。

【0081】第 11 表、本試驗各生物胺標準品同批次的檢量線分析結果

生物胺標準品	線性關係 ( $\mu\text{M}$ )	檢量線公式 ( $n=6$ )	決定係數
組織胺 (His)	3~400	$y = 0.0010x + 0.0458$	0.992
腐胺 (Put)	3~400	$y = 0.0024x + 0.1102$	0.995

亞精胺 (Spd)	3~400	$y = 0.0027x + 0.1138$	0.997
屍胺 (Cad)	3~400	$y = 0.0035x + 0.1493$	0.997
精胺 (Spm)	5~400	$y = 0.0047x + 0.0965$	0.995
酪胺 (Tyr)	3~400	$y = 0.0025x + 0.1406$	0.994

【0082】 第 12 表、本試驗各生物胺標準品異批次的檢量線分析結果

生物胺標準品	線性關係 ( $\mu\text{M}$ )	檢量線公式 ( $n=6$ )	決定係數
組織胺 (His)	3~400	$y = 0.0011x + 0.0104$	0.992
腐胺 (Put)	3~400	$y = 0.0023x + 0.0322$	0.992

亞精胺 (Spd)	3~400	$y = 0.0026x + 0.0286$	0.996
屍胺 (Cad)	3~400	$y = 0.0034x + 0.0301$	0.995
精胺 (Spm)	5~400	$y = 0.0047x + 0.0512$	0.993
酪胺 (Tyr)	3~400	$y = 0.0024x + 0.0557$	0.996

【0083】如第 15a、15b 及第 11、12 表所示，無論是在同批次內 (intrabatch assay) 或異批次間 (interbatch assay) 的分析，該生物胺的檢測方法在 3~400  $\mu\text{M}$  的濃度範圍中，其濃度與波峰面積具有良好的線性關係。

【0084】接著，以低濃度 (10  $\mu\text{M}$ )、中濃度 (150  $\mu\text{M}$ ) 及高濃度 (350  $\mu\text{M}$ ) 的生物胺標準品，進行同批次內及異批次間的精密度 (precision) 及準確度 (accuracy) 的分析。

【0085】第 13 表、本試驗各生物胺標準品的精密度及準確度的測試結果

生物胺標準品	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	同批次內 (n=6)		異批次間 (n=6)	
		相對標準偏差 (RSD, %)	相對誤差 (RE, %)	相對標準偏差 (RSD, %)	相對誤差 (RE, %)

		%)		%)	
組織胺 (His)	10	3.75	-2.80	5.20	2.05
	150	2.99	2.10	2.54	0.07
	350	5.31	2.15	1.64	0.68
腐胺 (Put)	10	2.76	4.04	5.27	1.50
	150	0.89	2.68	1.82	1.24
	350	1.09	-0.22	2.63	0.64
亞精胺 (Spd)	10	1.69	2.19	0.87	2.41
	150	1.75	3.30	4.11	2.12
	350	1.03	1.04	8.35	0.66
屍胺 (Cad)	10	1.61	1.34	2.41	0.41
	150	0.84	2.21	2.12	2.82
	350	0.60	1.94	0.66	-0.69
精胺 (Spm)	10	1.67	-4.50	7.87	-3.69
	150	1.32	2.92	6.34	-0.90
	350	0.45	0.89	5.35	-2.59
酪胺 (Tyr)	10	4.31	-4.38	7.64	4.39
	150	4.73	2.43	4.35	2.62
	350	5.24	2.38	1.10	-0.19

【0086】如第 13 表所示，無論是在同批次內或異批次間的分析，相對標準偏差 (relative standard deviation, 簡稱 RSD) 及相對誤差 (relative error, 簡稱 RE) 均小於 10%，顯示該生物胺的檢測方法具有良好的準確度及精密度。

## 【0087】 (I) 液態的食物樣品的分析結果

【0088】 本試驗係選用醬油樣品（第 I1-1~I1-10 組）、魚露樣品（第 I2-1~I2-6 組）或黑麥汁樣品（第 I3-1~I3-9 組）進行測試，在經該衍生萃取步驟 S2' 之後，以毛細管液相層析法（CapLC）進行分析。

## 【0089】 第 14 表、10 種市售醬油的生物胺含量分析結果

組別	含量 (µg/g) [ 相對標準偏差 (%) ] (n=3)					
	組織胺 (His)	腐胺 (Put)	亞精胺 (Spd)	屍胺 (Cad)	精胺 (Spm)	酪胺 (Tyr)
I1-1	368.78 [ 4.95 ]	494.80 [ 3.74 ]	62.11 [ 3.07 ]	519.04 [ 5.06 ]	75.80 [ 2.30 ]	794.01 [ 0.92 ]
I1-2	99.21 [ 4.84 ]	20.21 [ 4.80 ]	43.99 [ 2.12 ]	56.37 [ 3.40 ]	N.D.	89.60 [ 3.65 ]
I1-3	75.07 [ 5.55 ]	147.67 [ 4.07 ]	94.82 [ 3.91 ]	113.94 [ 5.97 ]	<LOQ	385.70 [ 0.34 ]
I1-4	232.38 [ 4.10 ]	307.50 [ 4.49 ]	73.99 [ 2.94 ]	64.93 [ 5.52 ]	<LOQ	199.58 [ 6.37 ]
I1-5	34.28 [ 0.11 ]	25.21 [ 0.49 ]	63.52 [ 1.21 ]	64.87 [ 2.39 ]	<LOQ	124.59 [ 0.91 ]
I1-6	149.76 [ 2.79 ]	126.36 [ 0.71 ]	51.28 [ 2.50 ]	172.55 [ 1.98 ]	<LOQ	343.52 [ 4.67 ]
I1-7	204.37 [ 2.24 ]	321.30 [ 3.13 ]	64.33 [ 1.36 ]	135.24 [ 3.29 ]	<LOQ	756.00 [ 3.71 ]
I1-8	92.28	41.48	56.11	174.72	<LOQ	74.48

110年11月11日修正替換頁

	{ 1.90 }	{ 3.65 }	{ 2.25 }	{ 5.39 }		{ 4.50 }
I1-9	255.91 { 2.11 }	118.12 { 4.72 }	41.63 { 9.22 }	73.76 { 5.51 }	N.D.	495.70 { 7.91 }
I1-10	68.10 { 1.59 }	55.98 { 1.32 }	112.57 { 3.48 }	237.56 { 1.50 }	42.14 { 1.34 }	235.14 { 2.36 }

【0090】第 15 表、9 種市售魚露的生物胺含量分析結果

組別	含量 (µg/g) { 相對標準偏差 (%) } (n=3)					
	組織胺 (His)	腐胺 (Put)	亞精胺 (Spd)	屍胺 (Cad)	精胺 (Spm)	酪胺 (Tyr)
I2-1	95.02 { 6.67 }	172.22 { 2.90 }	41.59 { 3.37 }	455.02 { 2.30 }	19.09 { 9.34 }	198.41 { 4.75 }
I2-2	48.07 { 2.49 }	39.60 { 6.69 }	25.12 { 5.32 }	121.40 { 2.69 }	N.D.	61.69 { 3.39 }
I2-3	247.34 { 3.07 }	284.94 { 4.23 }	138.69 { 6.72 }	759.10 { 4.75 }	249.63 { 3.70 }	426.22 { 7.48 }
I2-4	237.43 { 4.54 }	176.30 { 7.00 }	175.39 { 4.89 }	512.25 { 3.32 }	117.29 { 2.20 }	391.44 { 4.24 }
I2-5	129.26 { 3.29 }	121.77 { 4.77 }	128.21 { 0.77 }	360.74 { 2.54 }	99.55 { 2.01 }	326.24 { 3.25 }
I2-6	95.33 { 1.31 }	89.92 { 0.93 }	91.11 { 3.11 }	273.79 { 2.08 }	58.35 { 1.41 }	120.50 { 3.43 }
I2-7	76.68 { 1.64 }	64.12 { 1.51 }	72.14 { 2.12 }	141.80 { 2.17 }	<LOQ	70.55 { 2.36 }

110年11月11日修正替換頁

I2-8	119.65 〔 1.16 〕	101.68 〔 0.92 〕	40.60 〔 0.60 〕	308.27 〔 2.08 〕	42.34 〔 1.87 〕	134.92 〔 6.10 〕
I2-9	131.45 〔 1.84 〕	127.91 〔 2.46 〕	38.86 〔 5.80 〕	403.04 〔 2.97 〕	59.66 〔 3.89 〕	145.62 〔 3.62 〕

【0091】第 16 表、9 種市售黑麥汁的生物胺含量分析結果

組別	含量 (µg/g) 〔 相對標準偏差 (%) 〕 (n=3)					
	組織胺 (His)	腐胺 (Put)	亞精胺 (Spd)	屍胺 (Cad)	精胺 (Spm)	酪胺 (Tyr)
I3-1	2.47 〔 7.89 〕	39.48 〔 3.97 〕	2.58 〔 5.53 〕	40.58 〔 7.33 〕	3.63 〔 2.40 〕	31.40 〔 3.70 〕
I3-2	3.12 〔 5.99 〕	3.33 〔 3.31 〕	2.94 〔 4.82 〕	3.89 〔 3.93 〕	2.28 〔 2.37 〕	2.37 〔 7.73 〕
I3-3	N.D.	6.36 〔 0.53 〕	27.39 〔 0.71 〕	4.83 〔 1.26 〕	<LOQ	3.52 〔 0.48 〕
I3-4	N.D.	41.86 〔 2.82 〕	2.54 〔 4.41 〕	41.04 〔 4.35 〕	<LOQ	15.75 〔 5.31 〕
I3-5	N.D.	4.20 〔 5.30 〕	2.70 〔 5.15 〕	4.28 〔 2.66 〕	<LOQ	2.15 〔 2.84 〕
I3-6	1.40 〔 3.96 〕	2.85 〔 0.92 〕	2.42 〔 3.74 〕	2.29 〔 1.33 〕	<LOQ	1.94 〔 5.82 〕
I3-7	3.07 〔 1.31 〕	3.18 〔 0.84 〕	3.59 〔 2.12 〕	2.69 〔 0.95 〕	2.48 〔 1.95 〕	3.65 〔 0.44 〕
I3-8	1.00	0.90	1.79	1.43	<LOQ	2.68

110年11月11日修正替換頁

	{ 1.20 }	{ 5.90 }	{ 8.63 }	{ 8.96 }		{ 6.59 }
I3-9	1.31 { 6.41 }	0.65 { 4.05 }	2.17 { 5.15 }	1.45 { 7.27 }	N.D.	<LOQ

【0092】 如第 14~16 表及第 16a~16c 圖所示，無論是市售醬油、市售魚露或市售黑麥汁，以該生物胺的檢測方法均可以檢測到生物胺的存在。

【0093】 (J) 固態的食物樣品的分析結果

【0094】 本試驗係選用味增樣品進行測試，將該味增樣品溶於水，以超音波震盪 15 分鐘之後，於 14,800 rpm 的轉速下離心 5 分鐘，取上清液在經該衍生萃取步驟 S2' 之後，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行分析，其結果如第 17 圖所示，以該生物胺的檢測方法可以檢測到生物胺的存在。

【0095】 (K) 生物樣品的分析結果

【0096】 本試驗係選用血漿樣品進行測試，將該血漿樣品混合乙睛後，於 14,800 rpm 的轉速下離心 5 分鐘，取上清液在經該衍生萃取步驟 S2' 之後，以毛細管液相層析法 (CapLC) 進行分析，其結果如第 18 圖所示，以該生物胺的檢測方法亦可以檢測到生物胺的存在。

【0097】 綜上所述，藉由使該待測樣品中的生物胺的胺基與香豆素-3-羧酸的羧基，在該偶聯試劑的輔助下進行該醯胺化反應，進而可以獲得胺基上置換有標記的生物胺衍生物，該生物胺衍生物能夠經由各種習知方法偵測其存在（例如，以液相層析法分離後，利用紫外光光譜法、螢光光譜法、或質譜分析法進行偵測），因此本發明的生物胺的檢測方法具有良好的靈敏度、精密度及準確度，能夠降低該待測樣品的使用量，為本發明之功效。

【0098】 再且，該檢測套組係能夠應用於實施前述之生物胺的檢測方法，有效地與生物胺共同形成安定性良好的生物胺衍生物，工者因而可以因

應需求選用各種習知方法來偵測該生物胺衍生物（例如，以液相層析法分離後，利用紫外光光譜法、螢光光譜法、或質譜分析法進行偵測），為本發明之功效。

【0099】 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】

#### 【0100】

〔本發明〕

S1:樣品提供步驟

S2:衍生步驟

S2':衍生萃取步驟

S3:偵測步驟

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種生物胺的檢測方法，包含：

提供一待測樣品，該待測樣品含有生物胺；

以香豆素-3-羧酸作為一衍生試劑，混合該待測樣品、該衍生試劑、一偶聯試劑及一鹼性工作液以得一待反應混合液，使該衍生試劑與該待測樣品中的生物胺於該偶聯試劑輔助下進行一醯胺化反應，獲得溶於一衍生溶液中的一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；及

以該衍生溶液作為一待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物，以獲得一生物胺強度值。

【請求項 2】 如請求項 1 之生物胺的檢測方法，其中，該偶聯試劑為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯。

【請求項 3】 如請求項 1 之生物胺的檢測方法，其中，該鹼性工作液為一有機鹼化合物溶於一工作溶媒所形成。

【請求項 4】 如請求項 3 之生物胺的檢測方法，其中，該有機鹼化合物為 4-二甲胺基吡啶、N-甲基嗎啉、咪唑、或三乙胺。

【請求項 5】 如請求項 3 之生物胺的檢測方法，其中，該工作溶媒為乙腈。

【請求項 6】 如請求項 1 之生物胺的檢測方法，其中，該待反應混合液另包含一萃取溶媒及一鹽溶液，且在該醯胺化反應後，使該衍生溶液分層形成一上層溶液及一下層固化物，續以該上層溶液作為該待測溶液，偵測該待測溶液中的生物胺衍生物。

【請求項 7】 如請求項 6 之生物胺的檢測方法，其中，該萃取溶媒為乙腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯或二氯甲烷。

【請求項 8】 如請求項 6 之生物胺的檢測方法，其中，該鹽溶液為磷酸氫二鈉。

【請求項 9】 一種生物胺的檢測套組，包含：

一衍生試劑，該衍生試劑為香豆素-3-羧酸，且用於與該待測樣品中的生物胺進行一醯胺化反應以形成一生物胺衍生物，該生物胺衍生物為胺基上置換有一標記的生物胺；

一偶聯試劑，用於促進該醯胺化反應的進行；及

一鹼性工作液，用於與該待測樣品、該偶聯試劑及該衍生試劑共同形成一待反應混合液，該鹼性工作液包含可溶解該衍生試劑、該偶聯試劑及生物胺之一工作溶媒。

【請求項 10】 如請求項 9 之生物胺的檢測套組，其中，該偶聯試劑為(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亞乙基胺基氧基)二甲基氨基嗎啉代碳鎗六氟磷酸鹽、O-苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯或 2-(7-氧化苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯。

【請求項 11】 如請求項 9 之生物胺的檢測套組，其中，該鹼性工作液為一有機鹼化合物溶於該工作溶媒所形成，且用於活化該衍生試劑的羧基。

【請求項 12】 如請求項 11 之生物胺的檢測套組，其中，該有機鹼化合物為 4-二甲胺基吡啶、N-甲基嗎啉、咪唑或三乙胺。

【請求項 13】 如請求項 11 之生物胺的檢測套組，其中，該工作溶媒為乙腈。

【請求項 14】 如請求項 9 之生物胺的檢測套組，另包含：

一萃取溶媒，為一非質子性溶劑，且用於溶解該生物胺衍生物；及

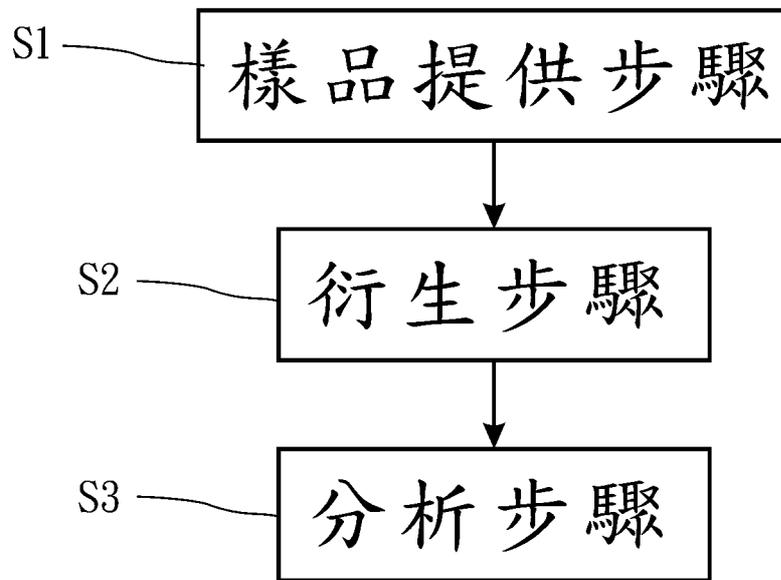
一鹽溶液，與該萃取溶媒不互溶，且用於形成鹽析效應。

【請求項 15】 如請求項 14 之生物胺的檢測套組，其中，該萃取溶媒為乙

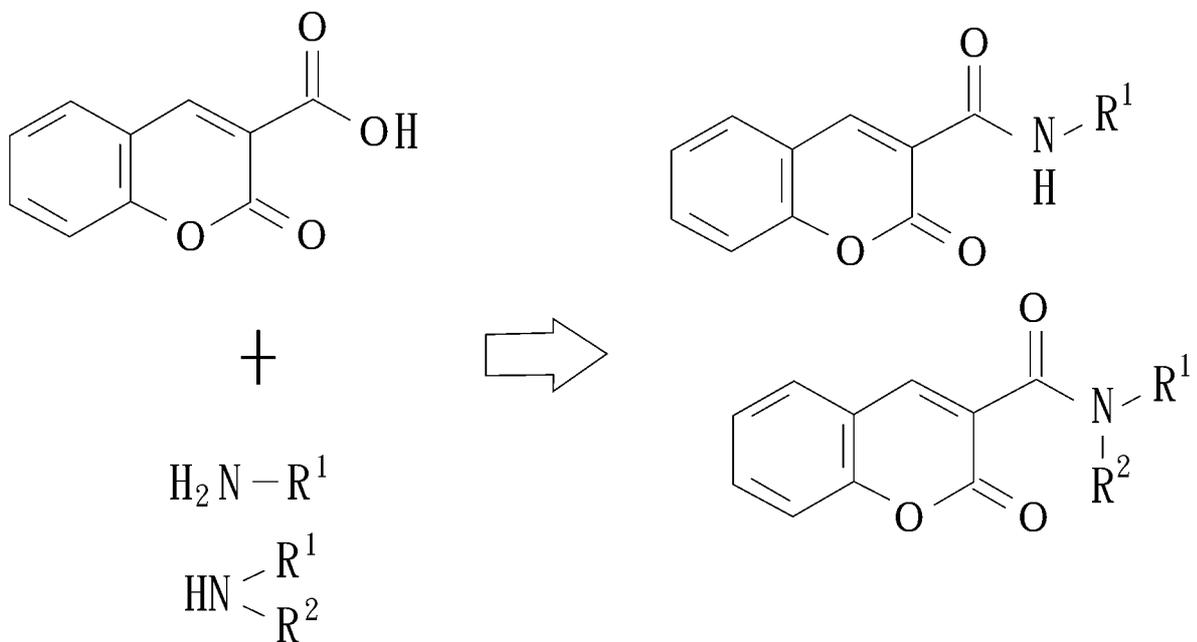
腈、碳酸二甲酯、乙酸乙酯或二氯甲烷。

【請求項 16】如請求項 14 之生物胺的檢測套組，其中，該鹽溶液為磷酸氫二鈉。

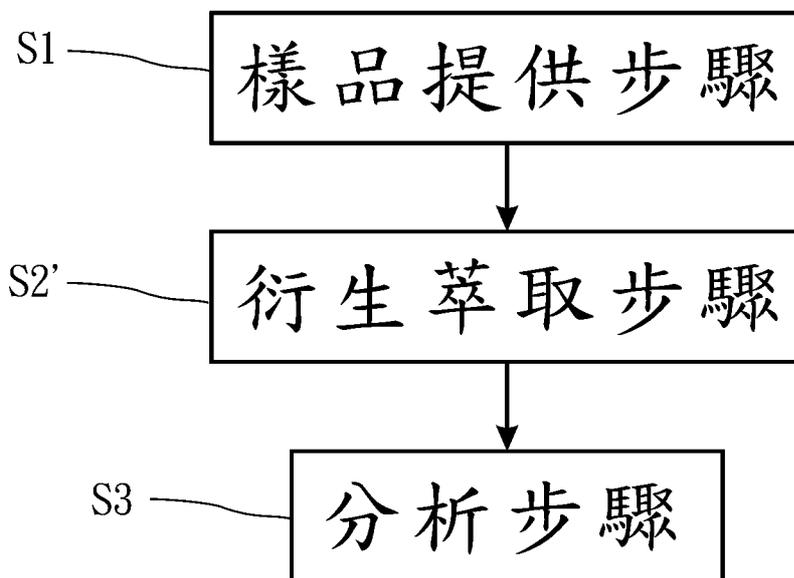
## 【發明圖式】



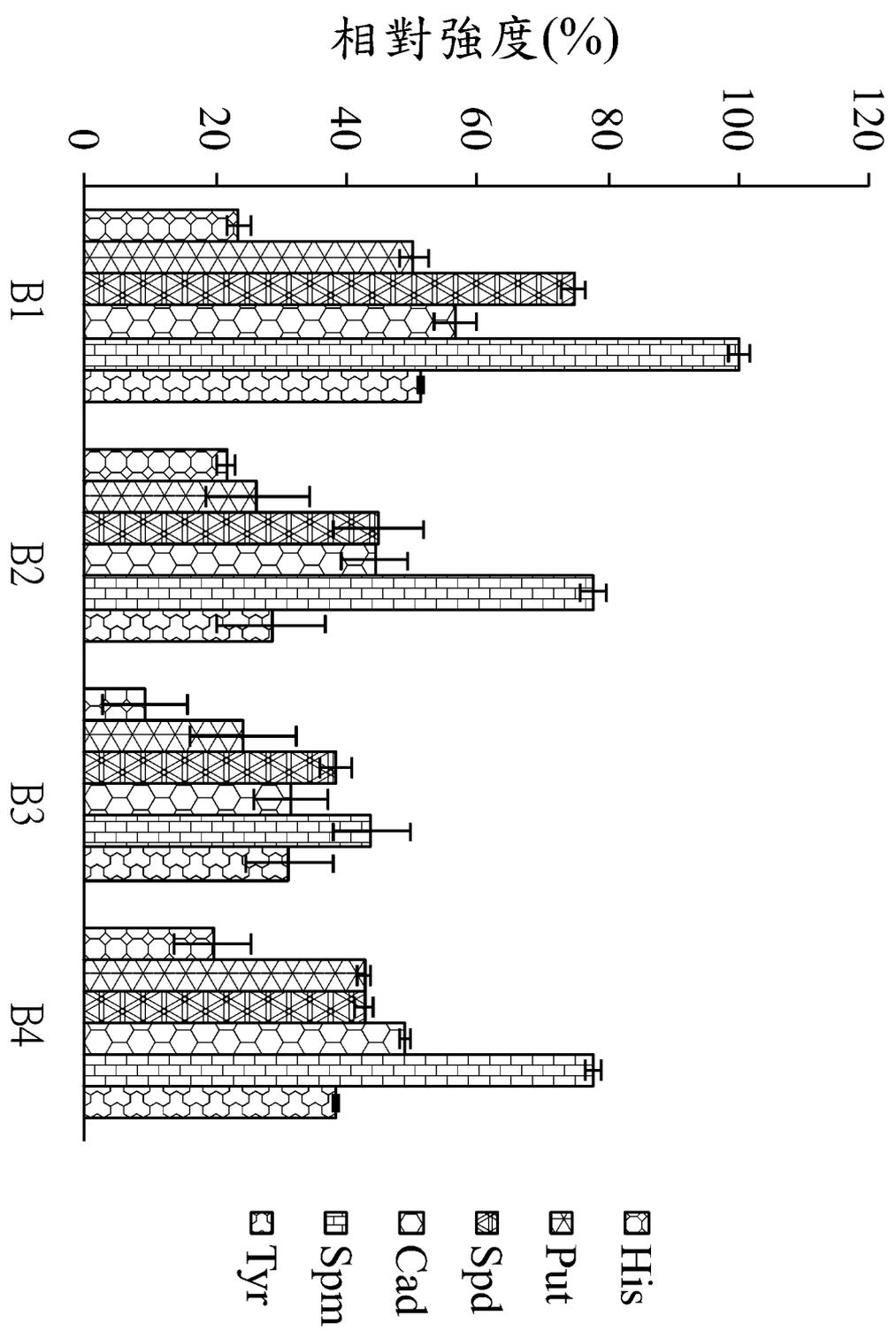
【第 1 圖】



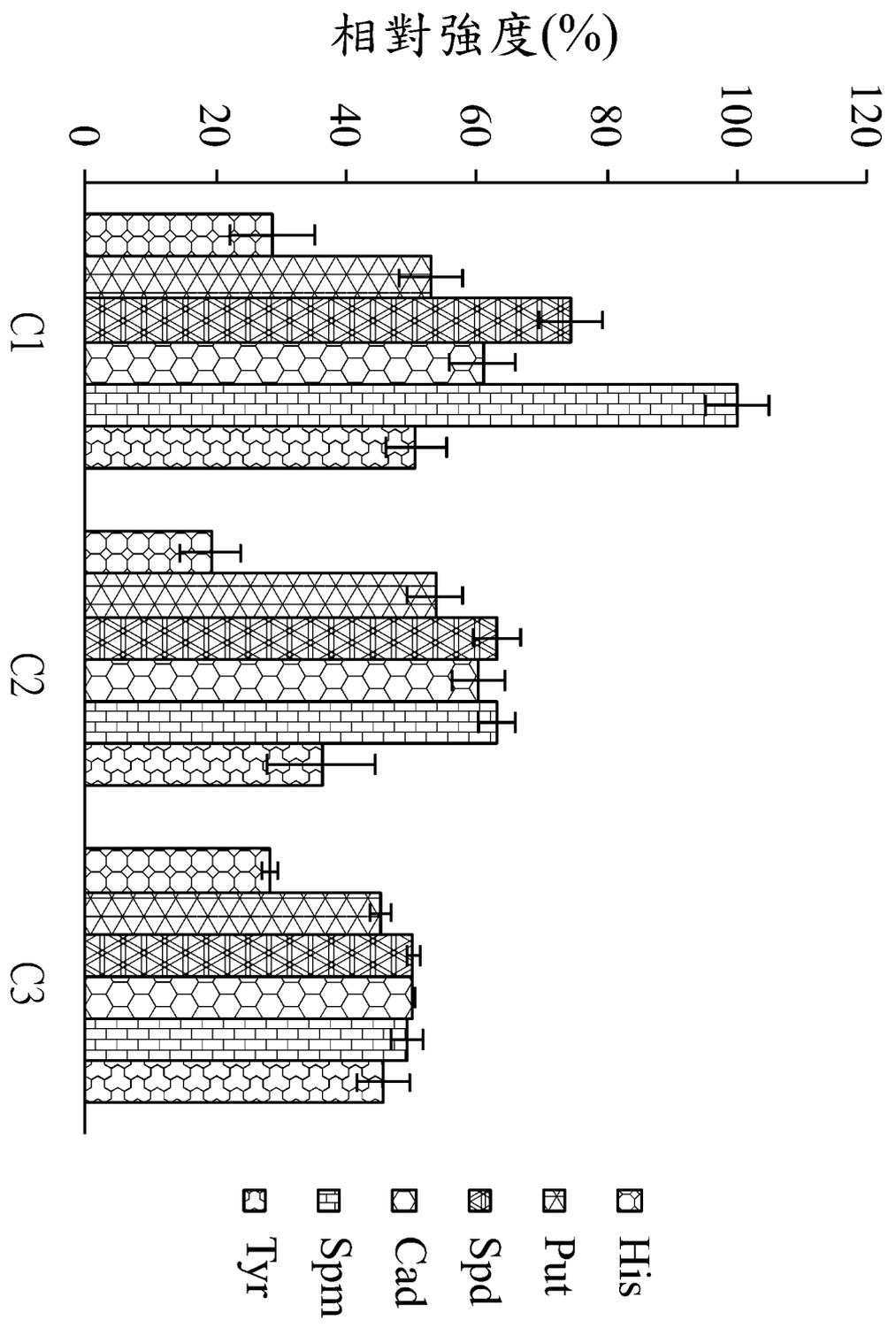
【第 2 圖】



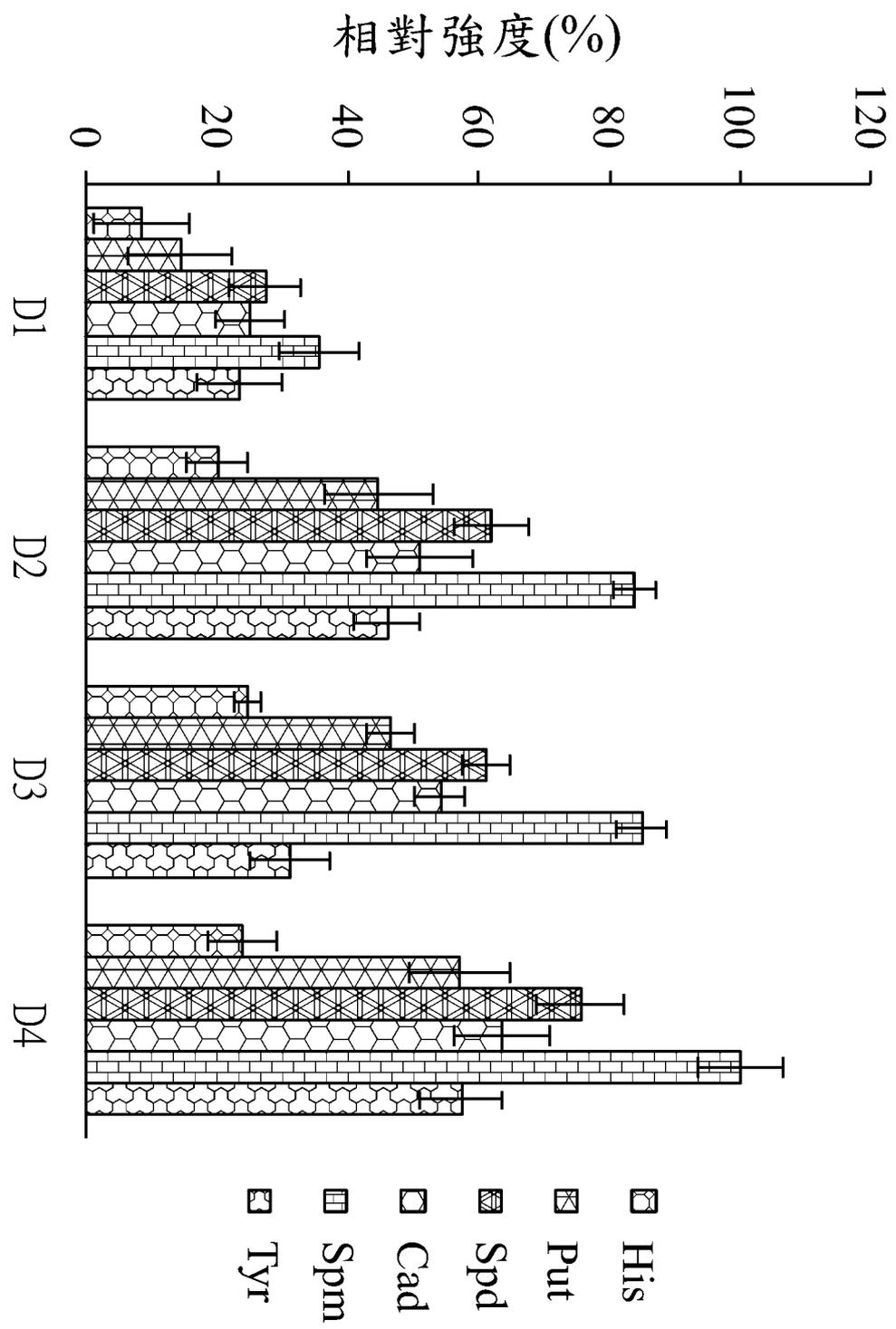
【第 3 圖】



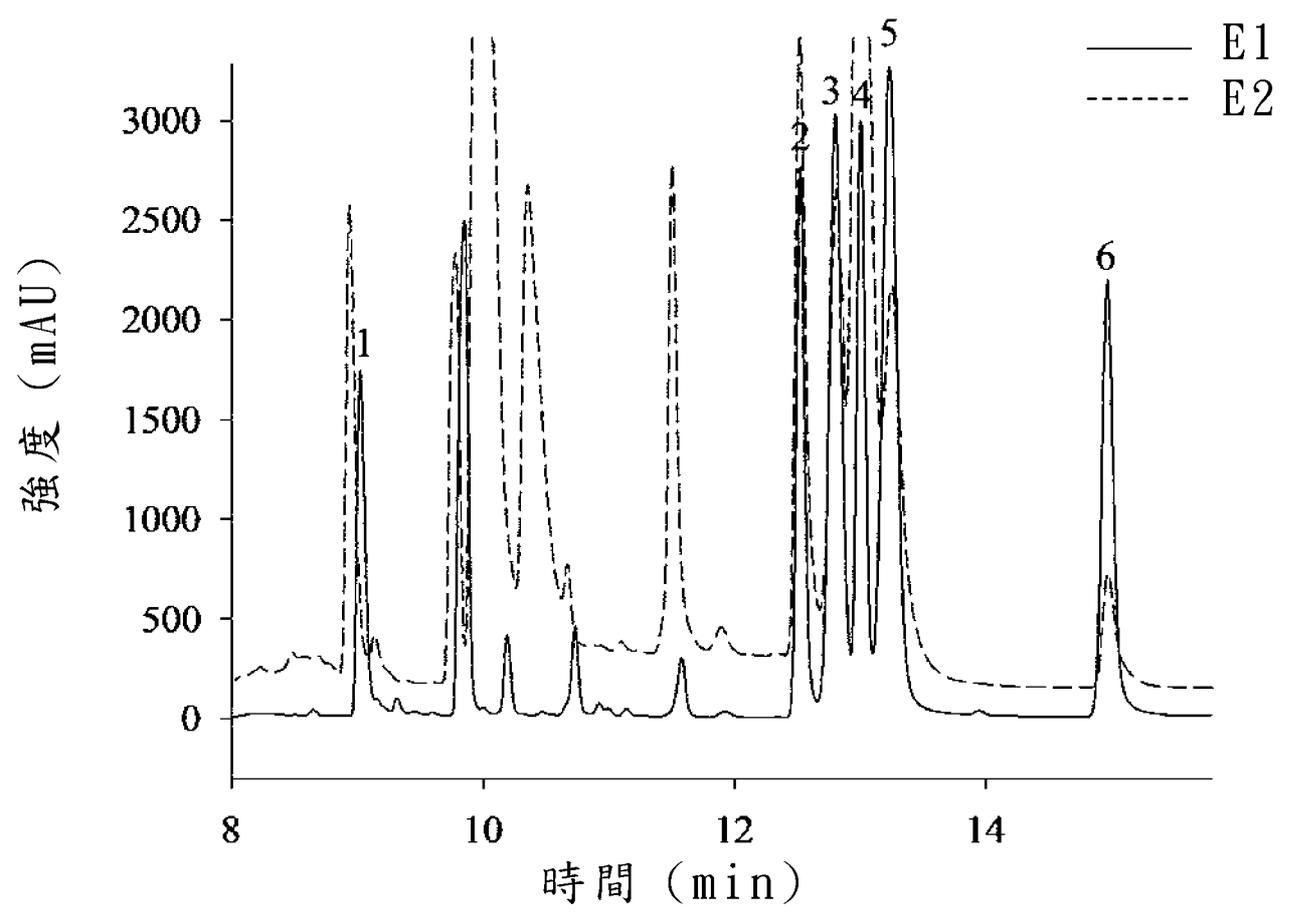
【第 4 圖】



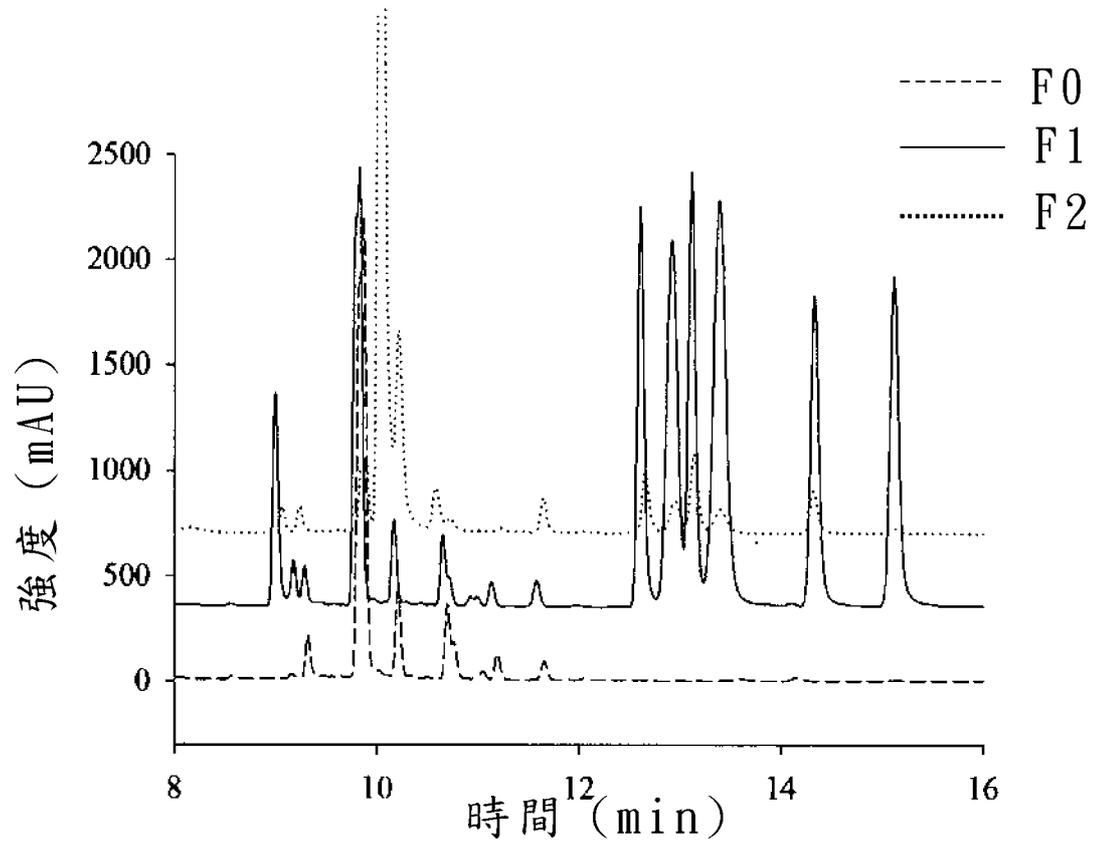
【第 5 圖】



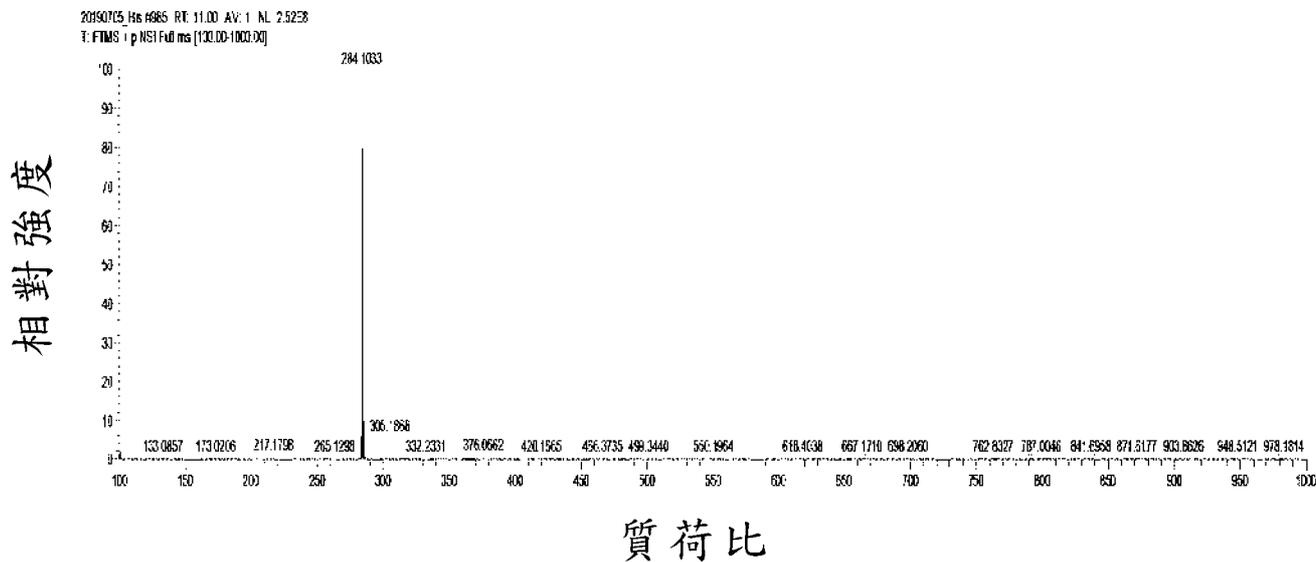
【第 6 圖】



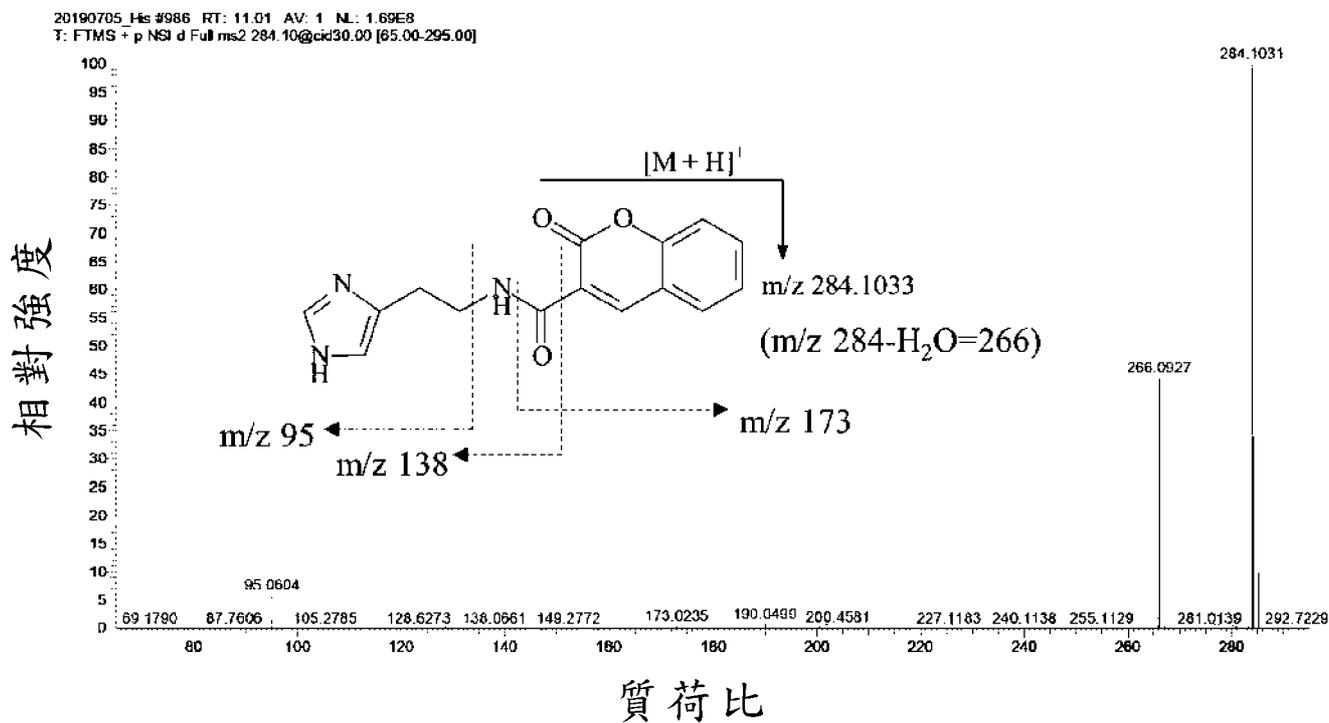
【第 7 圖】



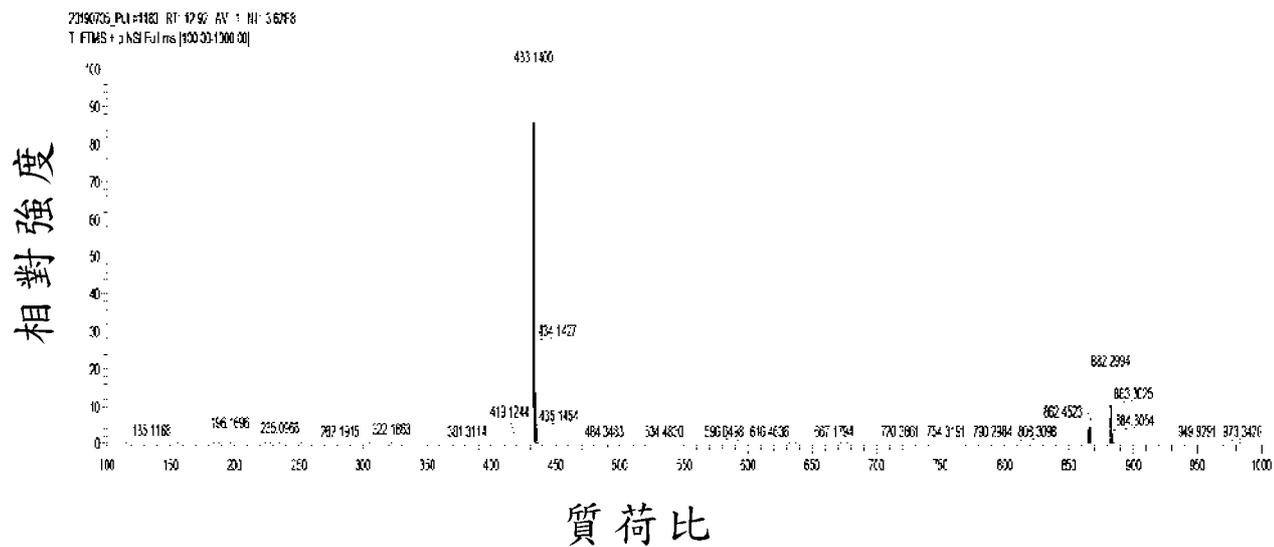
【第 8 圖】



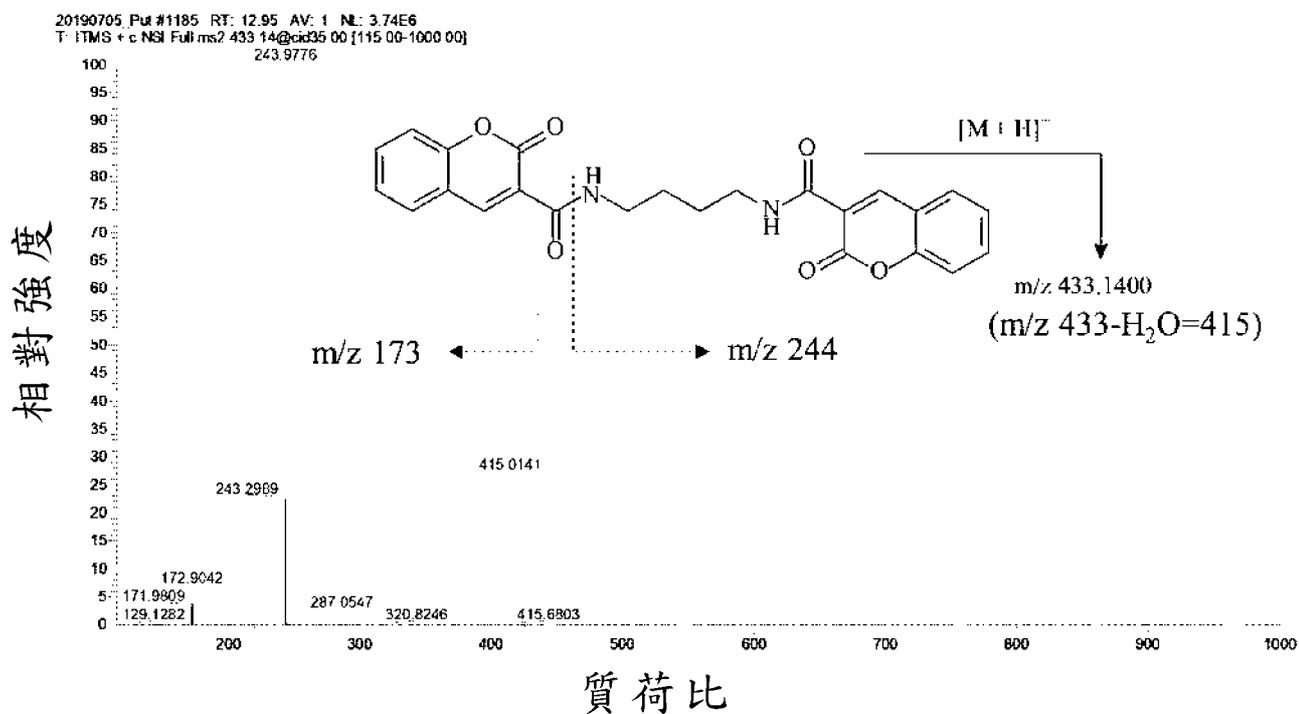
【第 9a 圖】



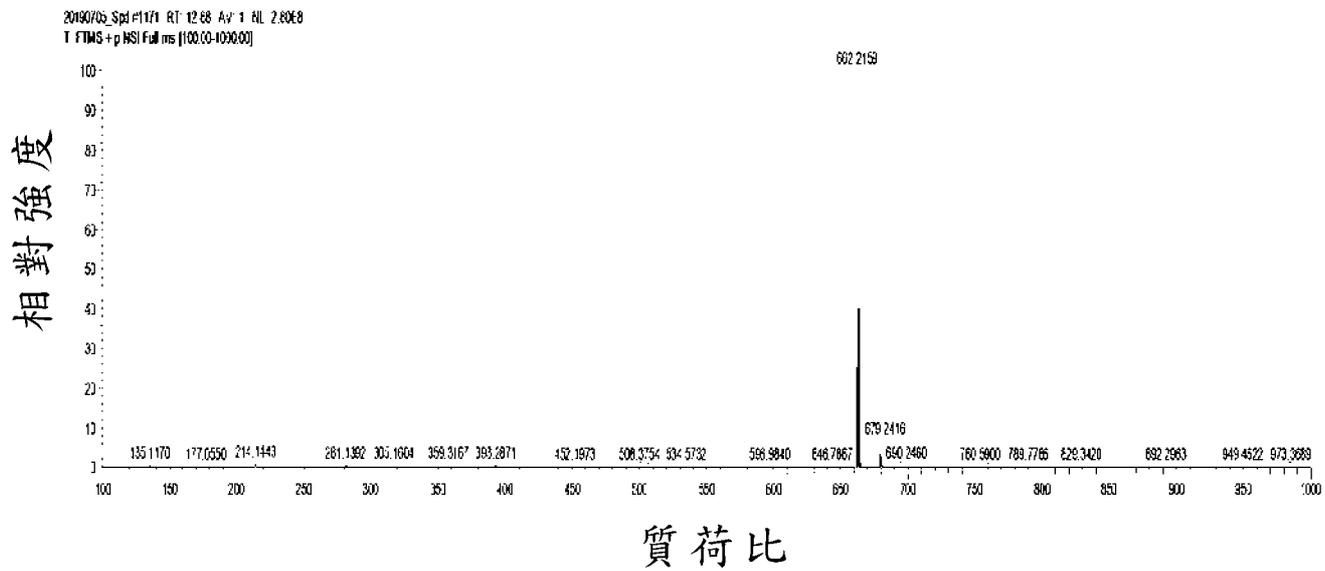
【第 9b 圖】



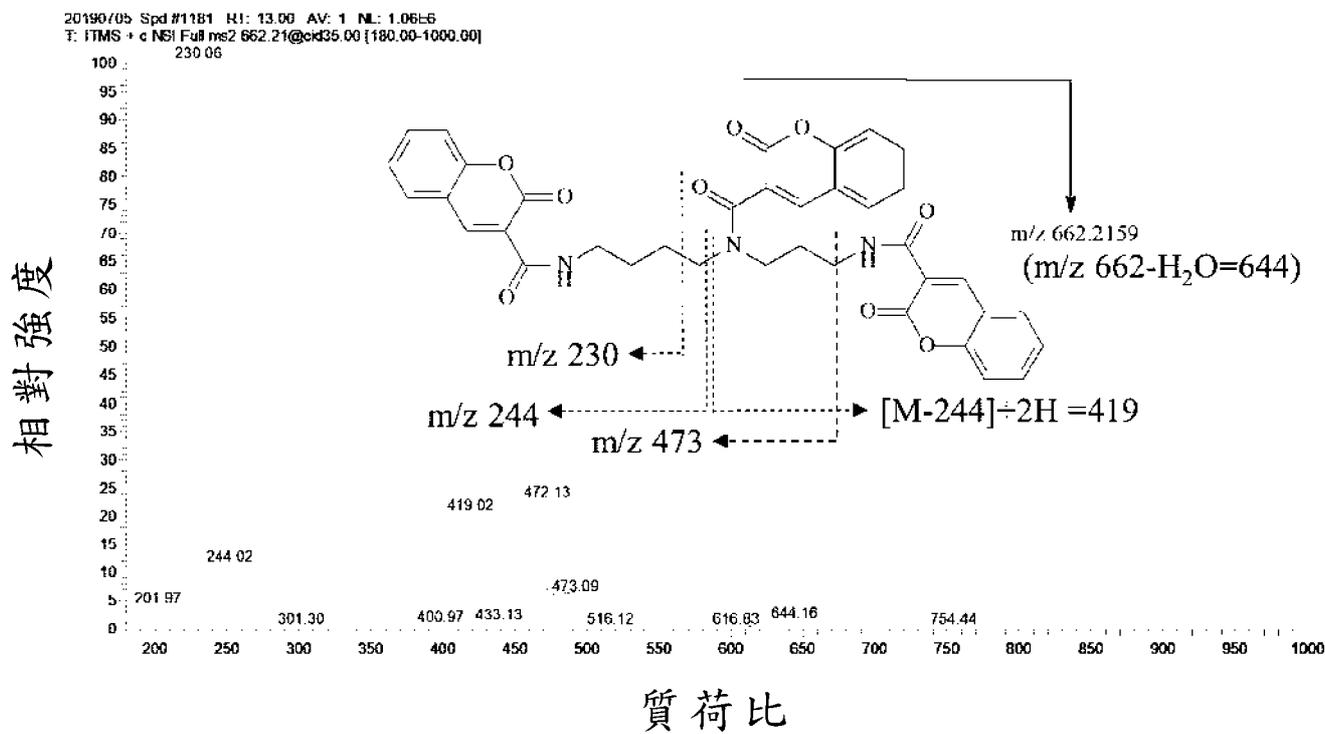
【第 10a 圖】



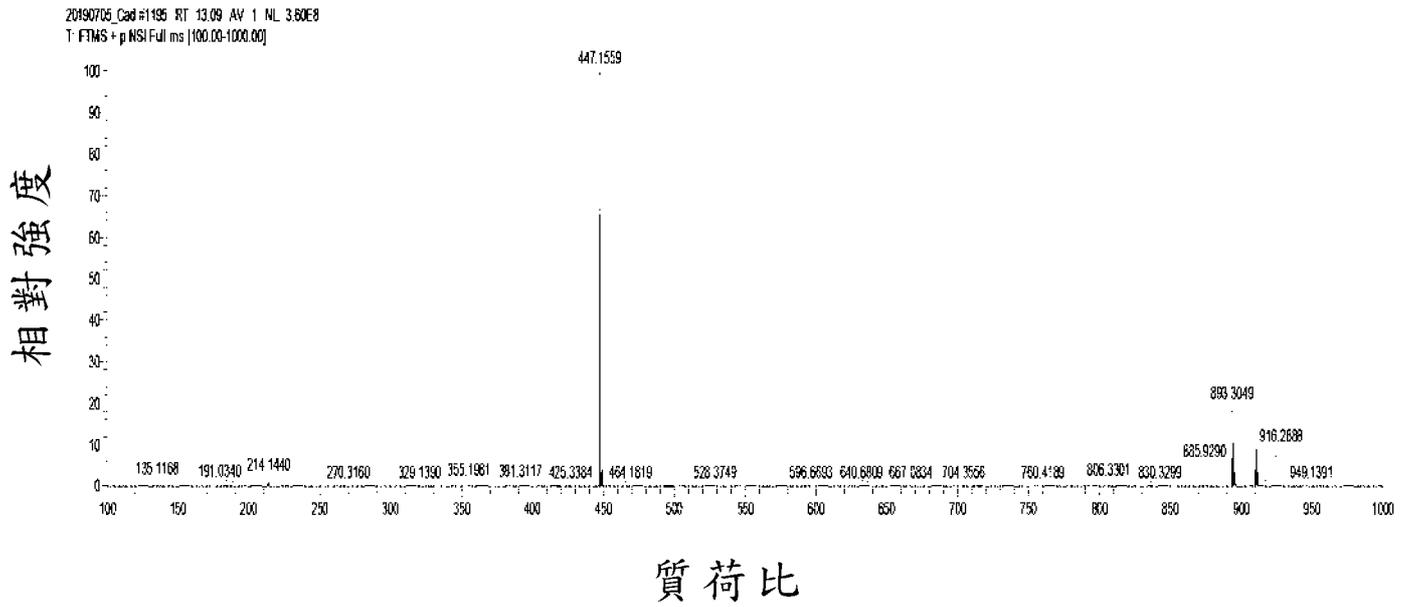
【第 10b 圖】



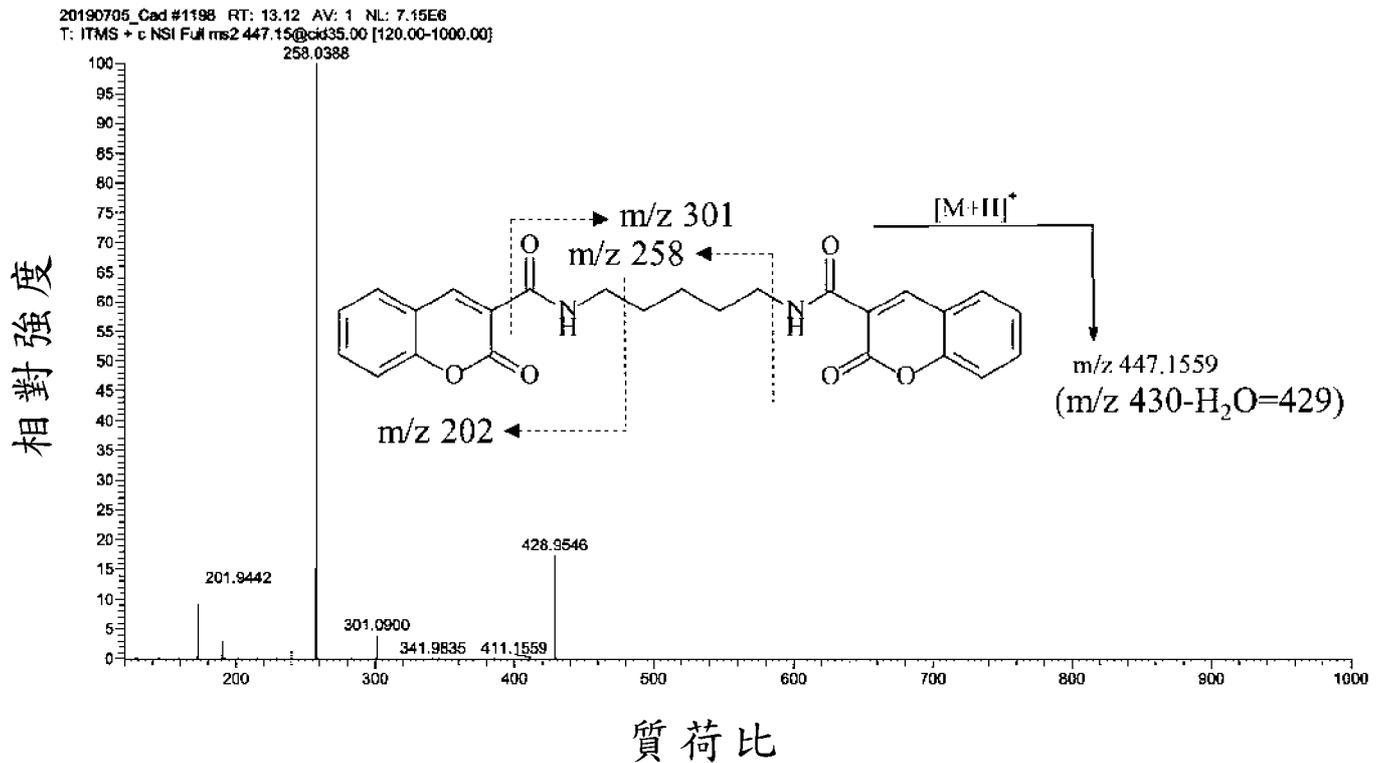
【第 11a 圖】



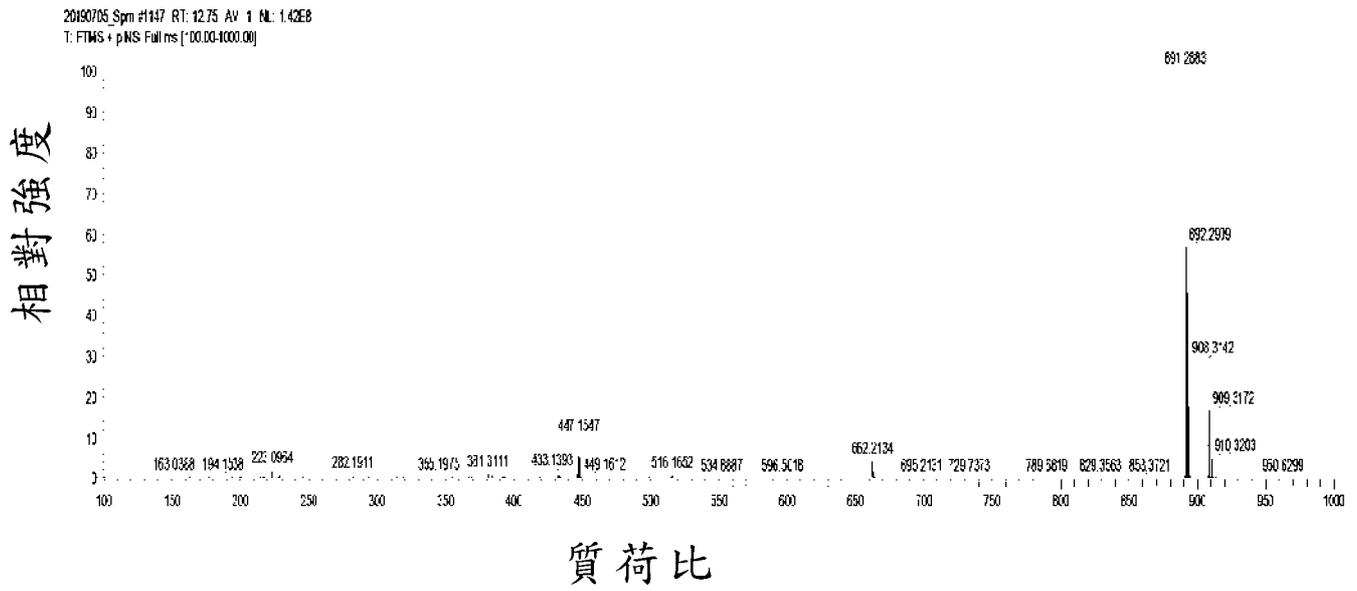
【第 11b 圖】



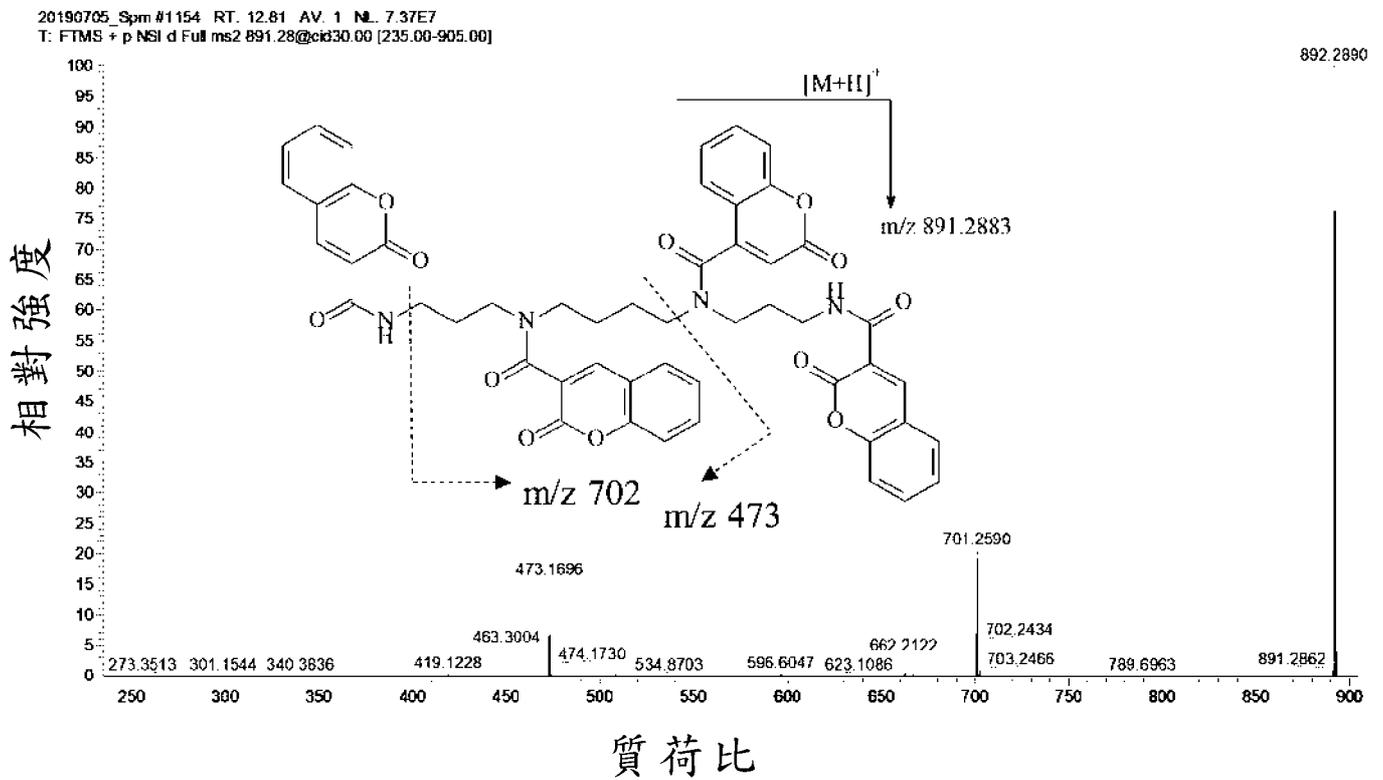
【第 12a 圖】

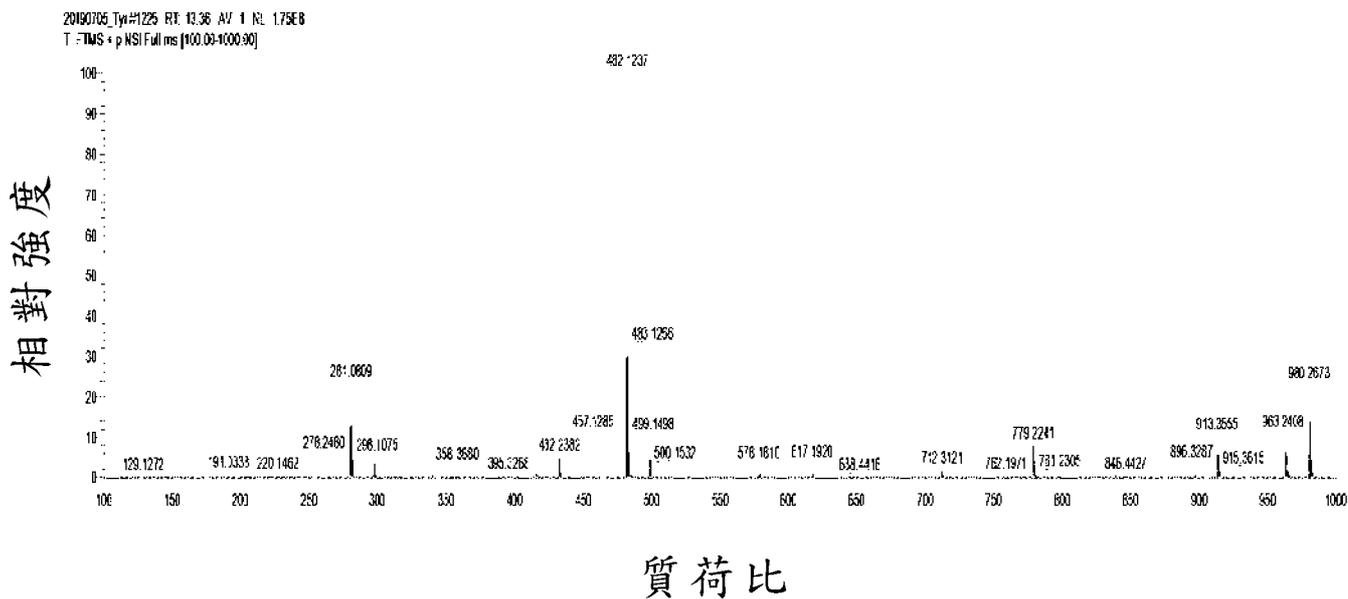


【第 12b 圖】

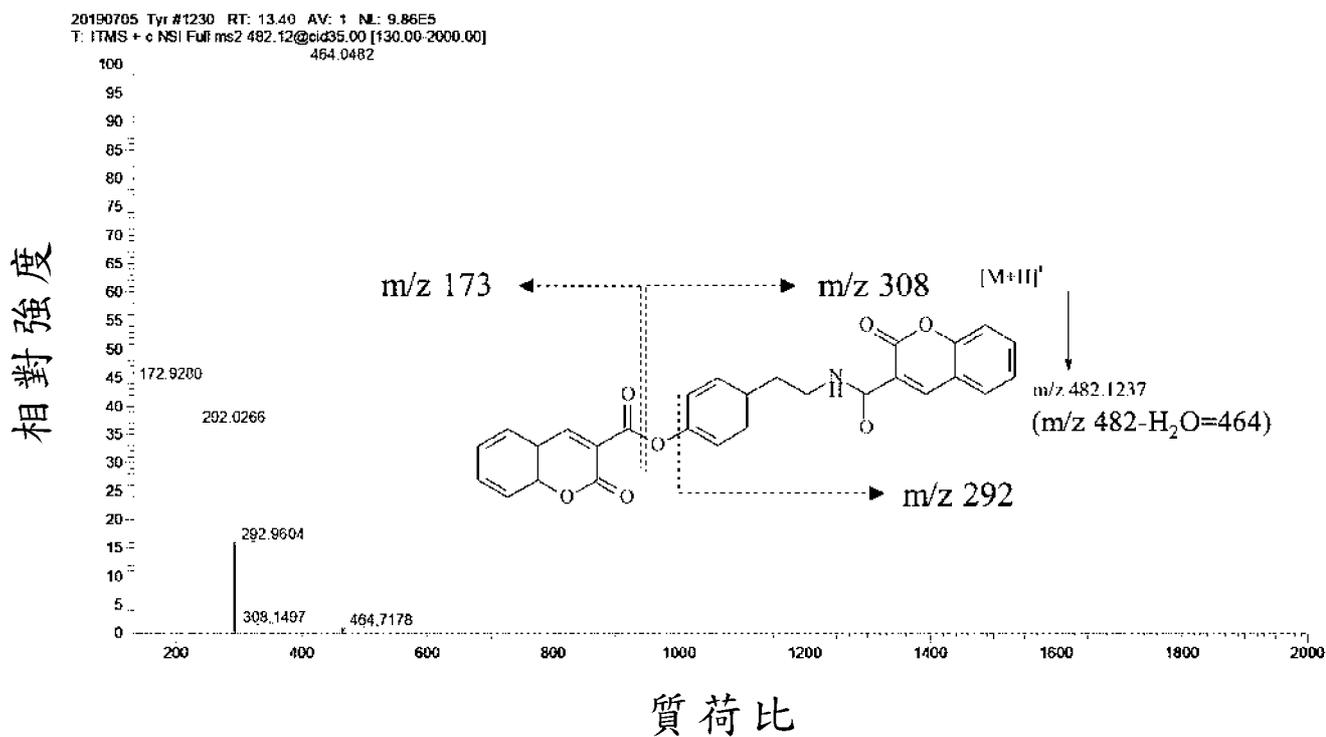


【第 13a 圖】

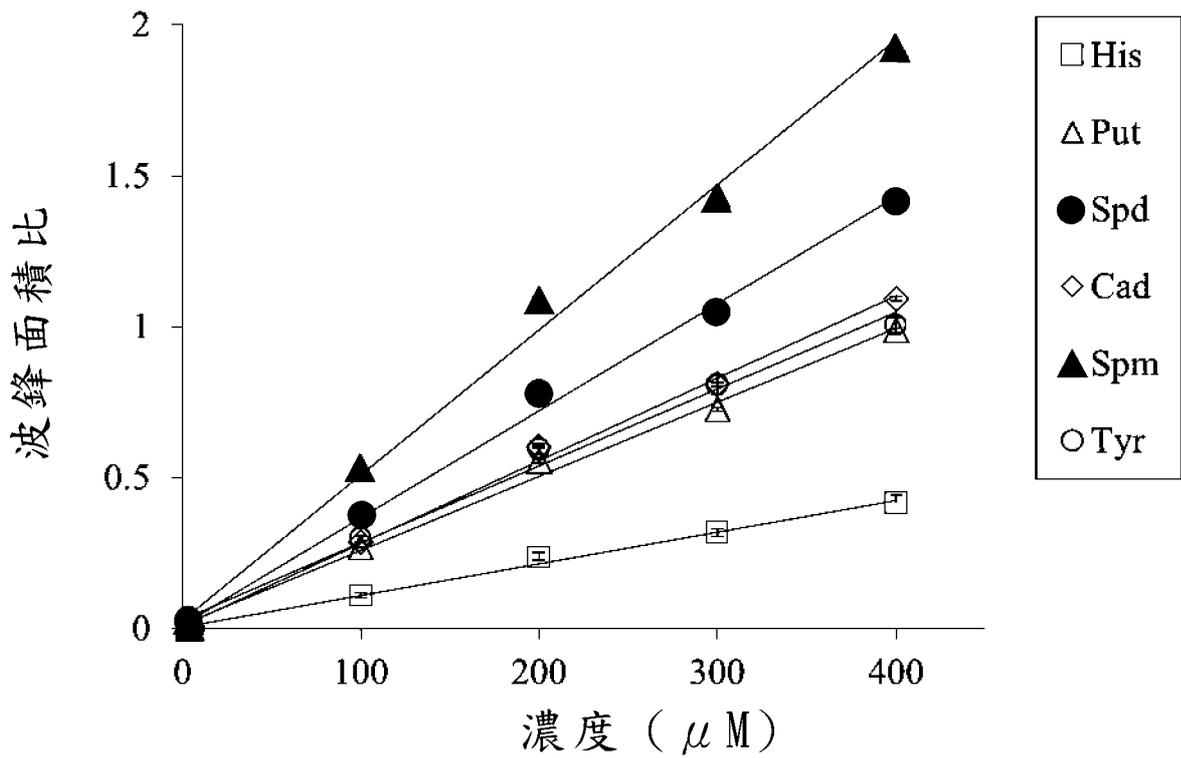




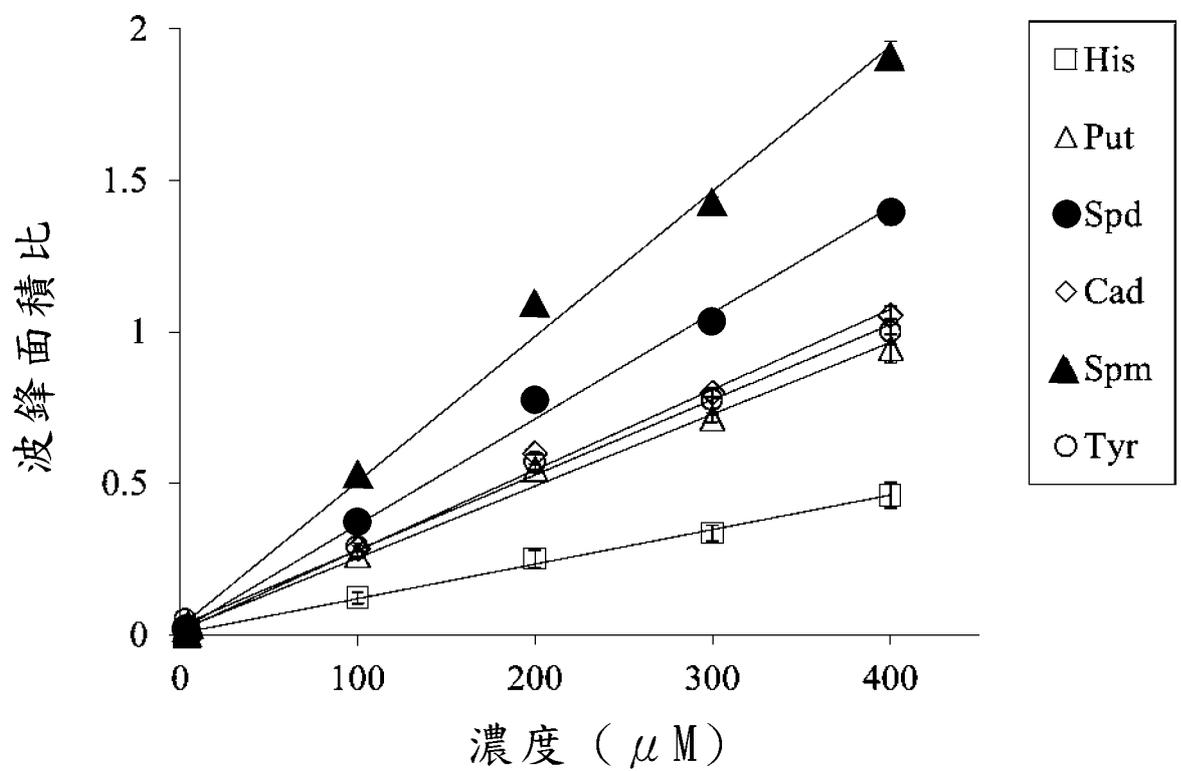
【第 14a 圖】



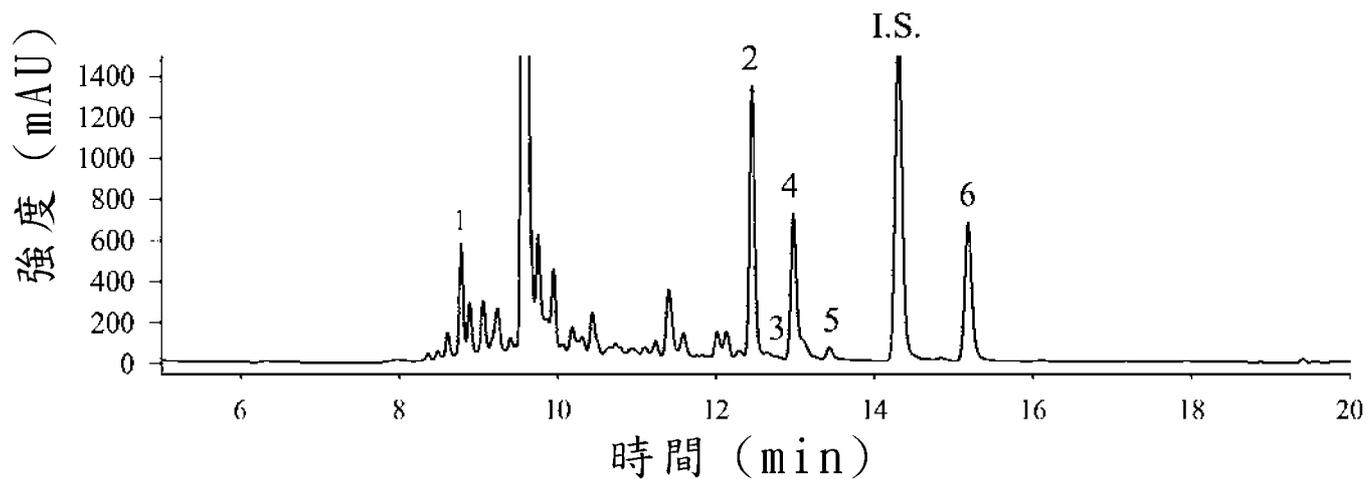
【第 14b 圖】



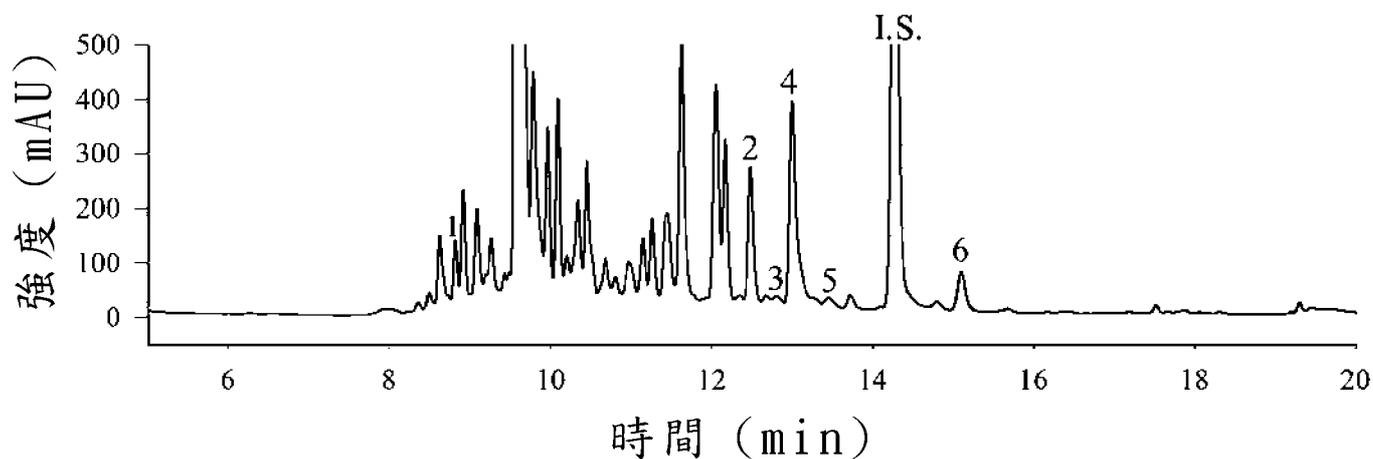
【第 15a 圖】



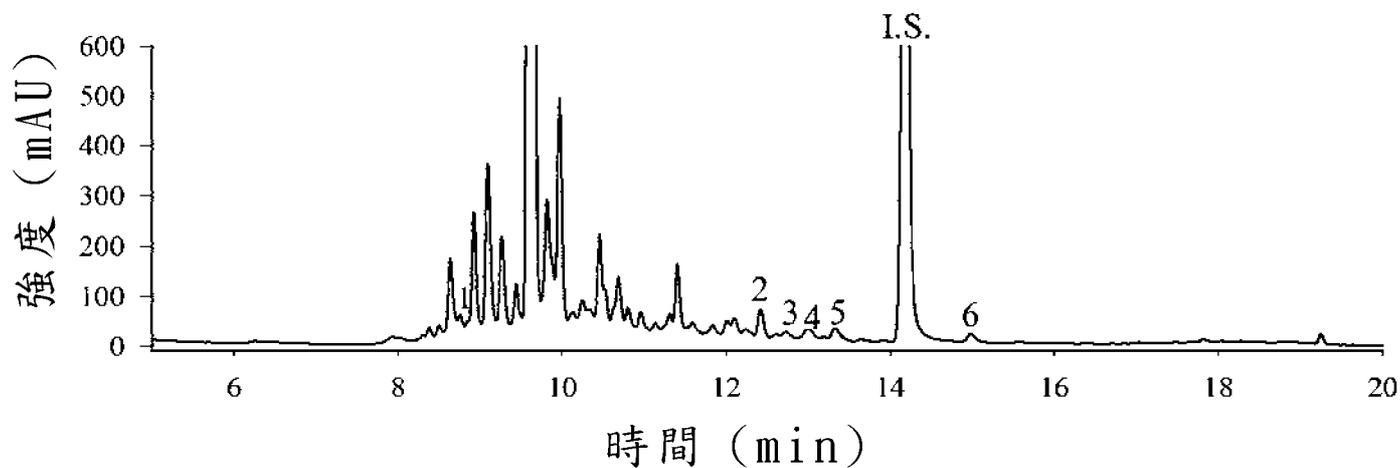
【第 15b 圖】



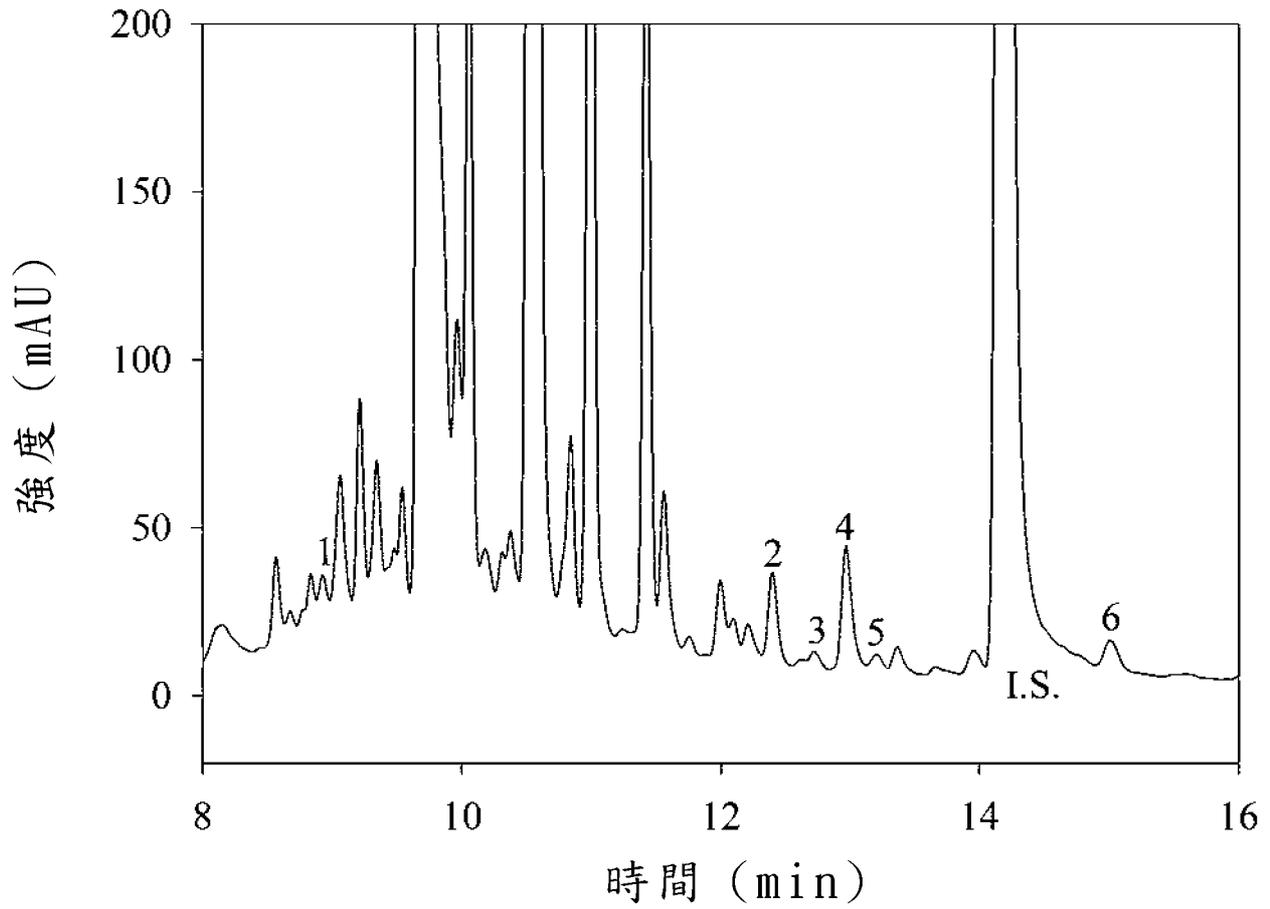
【第 16a 圖】



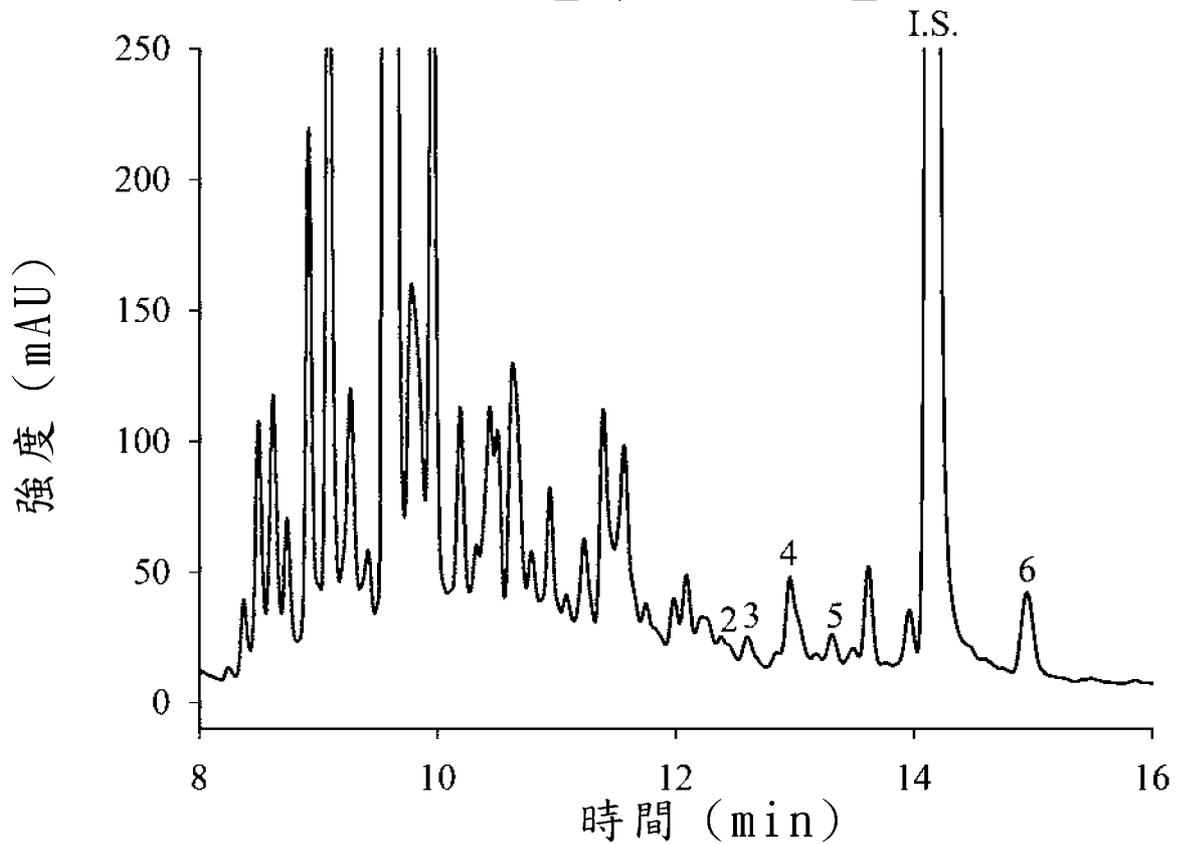
【第 16b 圖】



【第 16c 圖】



【第 17 圖】



【第 18 圖】