



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209910 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480027413. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

G01N 33/493(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 1/40(2006. 01)

61/785, 159 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/050273 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/139025 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 百奥马克科技有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚

(72) 发明人 鲁文·戈登 布莱恩·郑

纳斯德·卜克思 布拉姆·拉姆贾汪

阿夫塔卜·艾哈迈德

弗雷泽·艾伦·霍夫

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限

公司 31220

代理人 郑立 刘万磊

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

尿样中乙酰金刚烷胺的检测和定量

(57) 摘要

一种定量尿样中乙酰金刚烷胺的方法, 该方法包括使用固相萃取从尿样中洗脱乙酰金刚烷胺以及使用拉曼光谱定量从尿样中洗脱的乙酰金刚烷胺。

1. 一种定量尿样中乙酰金刚烷胺的方法,所述方法包括:
使用固相萃取从尿样中洗脱乙酰金刚烷胺;以及
使用拉曼光谱定量从尿样中洗脱的乙酰金刚烷胺。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述固相萃取包括用甲醇洗脱乙酰金刚烷胺。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,使用拉曼光谱定量从尿样中洗脱的乙酰金刚烷胺,包括基于底物的、表面增强拉曼光谱的使用。
4. 如权利要求 1 所述的方法的应用,所述应用基于尿样中乙酰金刚烷胺的定量对患者进行病理状态的筛选。
5. 如权利要求 1 所述的方法的应用,所述应用基于尿样中乙酰金刚烷胺的定量对患者进行癌症的筛选。

尿样中乙酰金刚烷胺的检测和定量

背景技术

技术领域

[0001] 本发明涉及生物标记的检测和定量,尤其涉及尿样中乙酰金刚烷胺的检测和定量。

[0002] 相关技术说明

[0003] 液相色谱质谱已被成功用于检测和定量生物样品,诸如尿中极其低含量的乙酰金刚烷胺。如于 2004 年 11 月 4 日授权给 Sitar 等人的美国专利号 6,811,967 中所公开的,这可促进处于早期的癌症的诊断,因为对包括金刚烷胺的亚精胺/精胺 N¹-乙酰转移酶(SSAT)的乙酰化形式的定量可用于检测包括癌症的各种病理状态,其全部公开内容通过引用并入本发明。然而,利用液相色谱质谱检测和定量乙酰金刚烷胺是相对耗时和高成本的。因此,需要一种高效且成本节约的方法来检测和定量乙酰金刚烷胺,从而允许快速经济的测试。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种改进的检测和定量尿样中乙酰金刚烷胺的方法。

[0005] 相应地,提供了一种定量尿样中乙酰金刚烷胺的方法。该方法包括使用固相萃取从尿样中洗脱乙酰金刚烷胺,并使用拉曼光谱定量从尿样中洗脱的乙酰金刚烷胺。

[0006] 固相萃取可包括用甲醇洗脱乙酰金刚烷胺。使用拉曼光谱定量从尿样中洗脱的乙酰金刚烷胺可包括基于底物的、表面增强拉曼光谱的使用。

[0007] 此处公开的方法基于尿样中乙酰金刚烷胺的定量,可用于对患者进行病理状态的筛选。此处公开的方法基于尿样中乙酰金刚烷胺的定量,还可用于对患者进行癌症的筛选。

[0008] 此处公开的方法可用于在低成本下检测和定量乙酰金刚烷胺。

附图说明

[0009] 通过以下给出的具体实施方式的描述,仅以实施例的方式,并参照附图,本发明将更容易理解,其中:

[0010] 图 1 显示了包被在表面增强拉曼散射(SERS)底物上的甲醇液滴中的乙酰金刚烷胺露天蒸发和缓慢蒸发的结果;

[0011] 图 2 显示了使用 SERS 底物的乙酰金刚烷胺的定量;

[0012] 图 3 显示了甲醇中不同浓度的乙酰金刚烷胺的拉曼光谱;以及

[0013] 图 4 显示了基于图 3 中的拉曼光谱的校准曲线。

具体实施方式

[0014] 此处公开的是使用拉曼光谱来鉴定和定量尿样中的乙酰金刚烷胺,一种亚精胺/精胺 N¹乙酰转移酶(SSAT)代谢的产物。尿液是许多盐、极性代谢物和多种非极性类固醇

的浓缩溶液。在尿样中,预期的乙酰金刚烷胺的浓度比金刚烷胺的浓度小约 1000 倍。金刚烷胺和乙酰金刚烷胺的区别是基于在大约 1600cm^{-1} 波数处羧基的振动谱带。金刚烷胺和乙酰金刚烷胺的光谱之间还有一些其他的差别,但是,这一个拉曼谱带是特别关注的,因为它仅出现在乙酰金刚烷胺光谱中。

[0015] 制备尿样,并用固相萃取 (SPE) 分离尿样中的不同成分。相应地,尿样使用固相萃取进行预处理,用以在使用拉曼光谱鉴定和定量存在于尿样中的乙酰金刚烷胺之前去除杂质。

[0016] 尿样

[0017] 包括以下尿液成分 NaCl 8.00g/L、KCl 1.64g/L、 K_2SO_4 2.63g/L、尿素 13.40g/L 以及肌酸酐 1.50g/L 的人工尿液被用于制备具有皮质酮 16.7mM、金刚烷胺 3.3mM 和乙酰金刚烷胺 3.3uM 的尿样。

[0018] 固相萃取 (SPE) :

[0019] 尿样利用固相萃取进行处理以去除盐和极性杂质,提高乙酰金刚烷胺对金刚烷胺的比例,并最小化来自非极性类固醇的污染。以下方案能够实现上述三个目标,其使用菲罗门公司 (Phenomenex Inc.) 的 Strata X、聚合物反相 (Polymeric Reversed Phase),菲罗门公司 (Phenomenex Inc.) 位于加利福尼亚 90501-1403,托伦斯,马德里大街 411 号。

[0020] (1) 准备 :2mL MeOH、2mL 去离子 H_2O 、2mL 50mM pH 7.0 的磷酸缓冲液。

[0021] (2) 上样 :将 2mL 的尿样和 2mL 的 50mM pH 7.0 的磷酸缓冲液混合,并上样到 SPE 柱上。

[0022] (3) 洗涤 1 :2mL 去离子 H_2O , 2x 1.5mL 50mM pH 7.0 的磷酸缓冲液 (盐和极性代谢物 and 此部分一起洗脱)。

[0023] (4) 洗涤 2 :2x 2mL 40% 溶于水中的甲醇 (金刚烷胺 and 此部分一起洗脱,而乙酰金刚烷胺和极性较小的类固醇皮质酮被保留)。

[0024] (5) 洗涤 3 :2mL 100% 的甲醇 (乙酰金刚烷胺 and 此部分一起洗脱,而皮质酮被保留)。

[0025] (6) 通穿过柱子的冲洗空气数分钟以使柱子干燥。

[0026] (7) 洗脱液 :2mL 乙酸乙酯 (皮质酮被洗脱)。

[0027] 在表面增强拉曼散射 (SERS) 底物上包被乙酰金刚烷胺 :

[0028] 甲醇中的乙酰金刚烷胺,从上述 SPE 的洗涤 3 中获得,被滴加包被在 SERS 底物上用于拉曼测量。在本实施例中,SERS 底物是来自雷尼绍公司 (Renishaw Inc.) 的 Klarite® SERS 底物,雷尼绍公司 (Renishaw Inc.) 位于伊利诺斯州 60192,霍夫曼伊斯塔特,垂林姆大道 (Trillium Boulevard)。乙酰金刚烷胺对 SERS 底物的均匀包被有助于可靠的定量。观察到甲醇的缓慢蒸发能改进乙酰金刚烷胺对底物的包被。图 1 显示了露天蒸发和缓慢蒸发的结果,其中缓慢蒸发中气流是受限制的。可以看出,缓慢蒸发产生了均匀的包被。

[0029] 拉曼测量

[0030] 在本实施例中,30uL 甲醇中的乙酰金刚烷胺被滴加包被在 SERS 底物上,并允许缓慢干燥。收集 170 个网格点的拉曼图,每个网格点处积分 1 秒钟。这 170 个光谱中,只有那些显示出拉曼峰的被保留,其余的被忽略。图 2 显示了基于 1600cm^{-1} 谱带的定量。达到了要求的分辨率和 1ng/mL 的检测限,并且具有足够的信噪比。然而,本领域技术人员可知,可

以使用若干不同的峰来建立校准曲线,因为不同的峰会产生斜率稍有不同的校准曲线。

[0031] 使用拉曼数据和分析建立校准曲线

[0032] 图 3 显示了以下浓度的甲醇中的乙酰金刚烷胺的拉曼测量:1ng/mL、5g/mL、10ng/mL、25ng/mL 和 50ng/mL,这些浓度使用标准化学操作,将乙酰金刚烷胺溶解在甲醇中制备。每个浓度选取拉曼光谱中的五个峰,也就是,738cm⁻¹、776.8cm⁻¹、1198cm⁻¹、1210cm⁻¹和 1436cm⁻¹。

[0033] 每个峰被分隔为峰面积和相邻面积。在每个峰面积和相邻面积选取 10 个点。这些点被积分,且峰面积的数量总和减去相邻面积的数量总和被用于获得每个峰的强度。然后可以通过对五个峰积分获得每个浓度下的拉曼强度,如下所示。

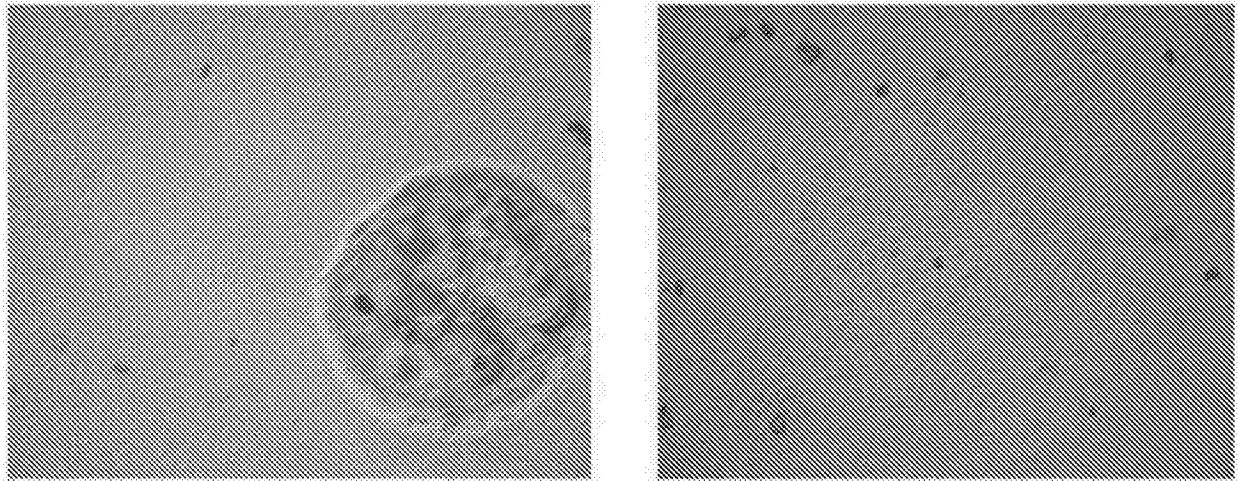
$$[0034] \sum_{n=5} \left(\sum_{n_peak=10} I_{peak} - \sum_{n_adjacent=10} I_{adjacent} \right)$$

[0035] 其中, I_{peak} 是峰面积中的强度,以及 I_{adjacent} 是相邻面积中的强度。之后,对每个浓度的强度的和进行绘图,建立如图 4 所示的校准曲线,图 4 也显示了对分析的再验证。该校准曲线可被用于在尿样中检测和定量乙酰金刚烷胺。

[0036] 结论

[0037] 结果表明乙酰金刚烷胺能使用固相萃取从尿样中分离。之后能用拉曼光谱来同时检测和定量尿样中的乙酰金刚烷胺,并具有 1ng/mL 的灵敏度,从而对患者进行病理状态,比如癌症的筛选。

[0038] 本领域技术人员可知,上述提供的许多细节仅仅是作为实施例,并无意限制本发明的保护范围,本发明的保护范围是根据权利要求得出的。



露天蒸发

缓慢蒸发

图 1. 缓慢蒸发改进包被并因此得到可靠的定量。

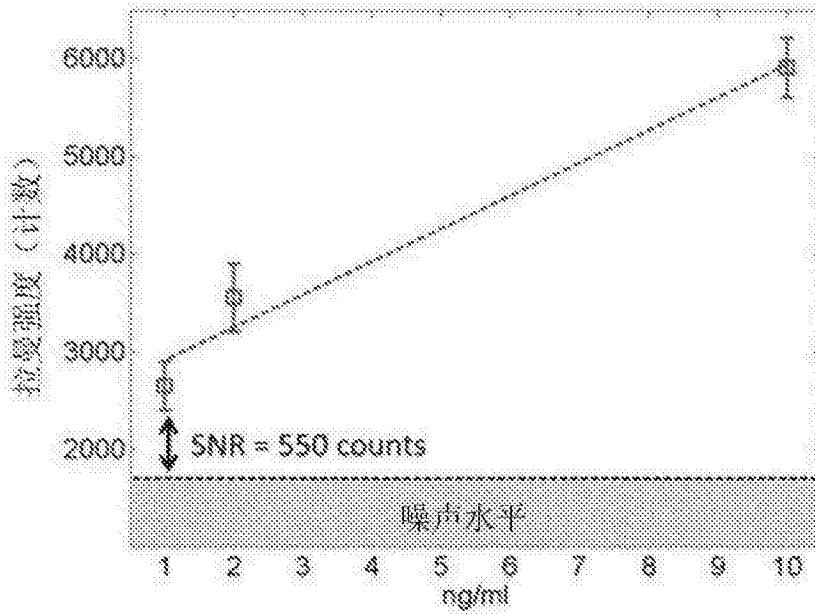


图2. 使用Klarite® 底物定量乙酰金刚烷胺。达到了要求的1ng/mL灵敏度。

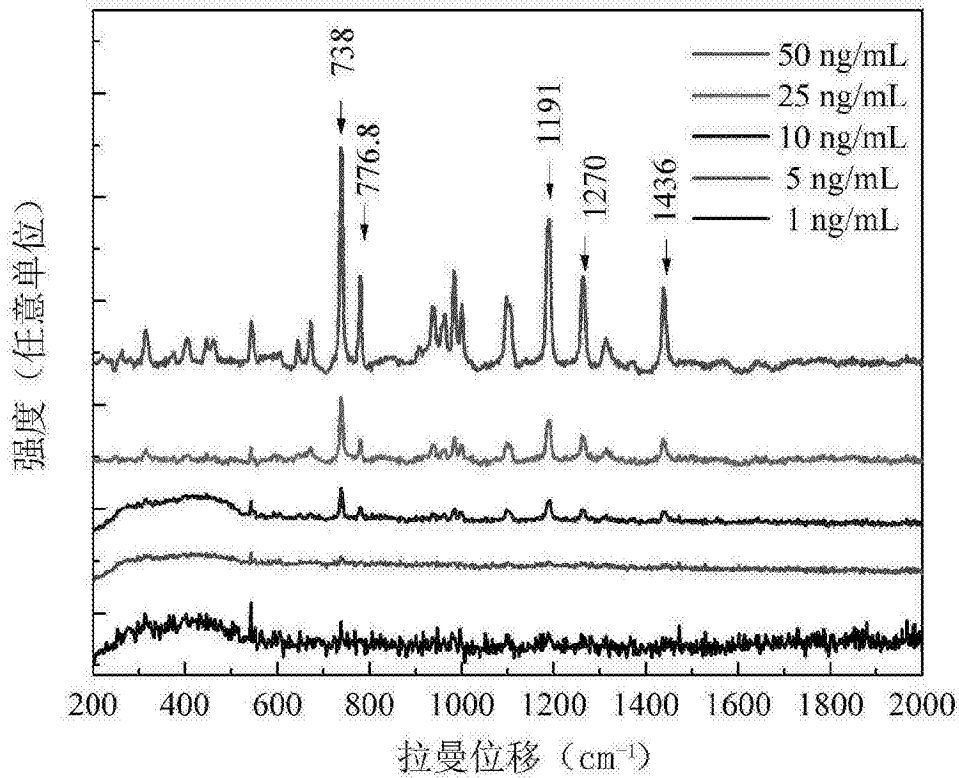


图3. 不同浓度的甲醇中的乙酰金刚烷胺的拉曼光谱，使用甲醇蒸发并使用Klarite®底物。

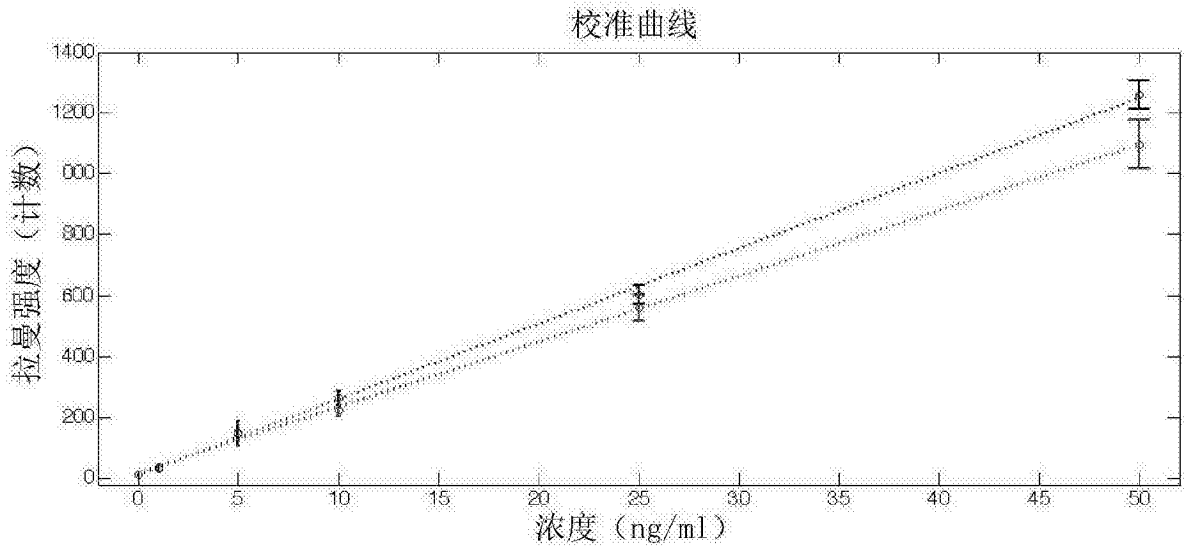


图 4. 校准曲线,其中位于下方的线是原始数据,位于上方的线是再验证。