



(21)申請案號：099143391

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl. : **B01D15/08 (2006.01)**(71)申請人：金穎生物科技股份有限公司 (中華民國) GENEFERM BIOTECHNOLOGY CO., LTD.
(TW)

臺南市新營區新工路 33 號

梁士賢 (香港地區) LEUNG, SZE YIN (HK)

香港

邱欣 (中國大陸) DI, XIN (CN)

中國大陸

(72)發明人：梁士賢 LEUNG, SZE YIN (HK)；邱欣 DI, XIN (CN)；劉永利 LIU, YONG LI
(CN)；劉興超 LIU, XING CHAO (CN)；申文晉 SHEN, WEN JIN (CN)

(74)代理人：陳金鈴

(56)參考文獻：

TW 515888

US 2010/0051801A1

US 2010/0210865A1

審查人員：林偉

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：6 共 21 頁

(54)名稱

檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法

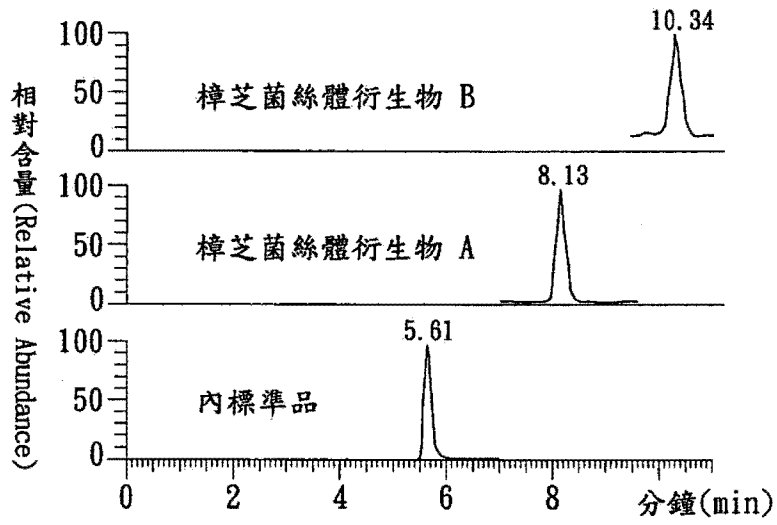
METHOD FOR INSPECTING CONCENTRATION VARIATION OF ANTRODIA CAMPHORATA IN ORGANISM

(57)摘要

本發明係有關於一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其主要係將已含有樟芝萃取物目標成分及內標準品之大鼠血漿樣品吸取入試管，並加入乙酸乙酯混合，以離心出上層有機相，隨之將上層有機相移到一乾淨的試管，再加入移動相混合，復將上述溶液注入液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕系統進行分析，藉此，以準確測得樟芝萃取物灌胃於大鼠體內後目標成分濃度變化，進而依此準確測得之數據，以擬定新藥設計，優化給藥方案及改進劑型，俾獲得高效、速效或緩釋、低副作用之所需劑量。

The invention relates to a method for inspecting concentration variation of Antrodia camphorata in an organism. Primarily, a target composition and an internal standard of a plasma sample of big rats contained with Antrodia camphorata extracts are drawn into a test tube. Then the plasma sample is put into the test tube and ethyl acetate is added to mix therewith for separating upper organic phase. Continuously, the upper organic phase is moved into a clear test tube. Furthermore, a mobile phase is added to the mixture. The above-mentioned solution is injected into Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) system to process an analysis. Accordingly, concentration variation of the target composition after Antrodia camphorata extracts are filled into the stomach of big rats can be accurately measured. Moreover, according to the accurately measured data, people can design new drug formulations, optimize dosage regimens and

improve preparation formulations. Thereby the required dosage with functions of high effect, rapid effect, slow release and low side effect can be available.



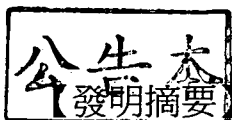
第五圖



申請日: 991210

IPC分類:

B01D 15/08(2006.01)



【中文發明名稱】 檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR INSPECTING CONCENTRATION VARIATION OF ANTRODIA CAMPHORATA IN ORGANISM

【中文】

本發明係有關於一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其主要係將已含有樟芝萃取物目標成分及內標準品之大鼠血漿樣品吸取入試管，並加入乙酸乙酯混合，以離心出上層有機相，隨之將上層有機相移到一乾淨的試管，再加入移動相混合，復將上述溶液注入液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕系統進行分析，藉此，以準確測得樟芝萃取物灌胃於大鼠體內後目標成分濃度變化，進而依此準確測得之數據，以擬定新藥設計，優化給藥方案及改進劑型，俾獲得高效、速效或緩釋、低副作用之所需劑量。

【英文】

The invention relates to a method for inspecting concentration variation of Antrodia camphorata in an organism. Primarily, a target composition and an internal standard of a plasma sample of big rats contained with Antrodia camphorata extracts are drawn into a test tube. Then the plasma sample is put into the test tube and ethyl acetate is added to mix therewith for separating upper organic phase. Continuously, the upper organic phase is moved into a clear test tube. Furthermore, a mobile phase is added to the mixture. The above-mentioned solution is injected into Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) system to process an analysis. Accordingly, concentration variation of the target composition after Antrodia camphorata extracts are filled into the stomach of big rats can be accurately measured. Moreover, according to the accurately measured data, people can

design new drug formulations, optimize dosage regimens and improve preparation formulations. Thereby the required dosage with functions of high effect, rapid effect, slow release and low side effect can be available.

【指定代表圖】 第(五)圖

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】**【中文發明名稱】** 檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法**【英文發明名稱】** METHOD FOR INSPECTING CONCENTRATION VARIATION OF
ANTRODIA CAMPHORATA IN ORGANISM**【技術領域】****【0001】** 本發明係有關於一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，尤指一種可以準確測知樟芝於生物體內濃度變化的檢測方法。**【先前技術】****【0002】** 按，藥物動力學是研究藥物在動物體內的含量隨時間變化規律的科學，藥物動力學可以幫助實驗者探討藥物在動物體內的動態變化，包括藥物在機體內的吸收、分布、代謝及排泄等過程，這些因素共同決定了最理想的服藥方法，包括藥量與用藥間隔等。某些藥物的安全範圍較小，過量容易中毒，不足量則無法發揮療效，必須嚴格控制藥物在血中或體內的份量，甚至要定期抽血測量藥物在血中濃度，例如：強心劑、抗癲痛藥、抗心律不整藥與胺基配糖體類抗生素等，因此，藥物動力學的運用係決定藥物是否能成功發揮治療效果的關鍵。

樟芝係多孔菌科的珍貴藥用真菌，廣泛用於民間療法，如：治療食物或藥物中毒、高血壓、皮膚瘙癢和肝臟疾病。如：台灣公告第I318877號之「具護肝、抗發炎及抗腫瘤活性之牛樟芝〔ANTORODIA CAMPHORATA〕菌絲體及其混合物與化合物」，即是由樟芝提煉出具有護肝、抗腫瘤、抗發炎的活性萃取物，另台灣公

告第I296929號之「用以預防及治療B型肝炎、酒精性肝損傷及四氯化碳肝損傷之樟芝製劑」，則係將樟芝之菌絲體，運用於作為預防及治療B型肝炎、酒精性肝損傷及四氯化碳肝損傷之製劑。另研究報告更指出樟芝的酒精提取物具有抗氧化和免疫調節的活性成分，該活性成分係包含總酚、三萜類化合物、碳水化合物和腺苷等。

迄今為止，已由樟芝菌絲體的油脂提取物中分離出馬來醯亞胺〔maleimide〕和順丁烯二酸酐〔maleic〕及無水衍生物〔antrocinnamons〕A、B、C、D及樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕A、B、C、D、E等，在這些成分之中樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕B和樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕C表現出顯著的腫瘤細胞毒殺作用，特別是小鼠肺癌〔LLC〕的腫瘤細胞，不同的樟芝提取物其生物活性已被廣泛研究，但是對於樟芝萃取成分在生物體內的含量隨時間變化情形之藥物動力學研究卻很少被揭露，因此，業界至今仍無法有效掌握服用樟芝之最佳劑量。

緣是，本發明人有鑑於現今對服用樟芝之最佳劑量難以確實掌握之缺失，乃藉其多年於相關領域的製造及設計經驗和知識的輔佐，並經多方巧思，而研擬出本發明之檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法。

【發明內容】

【0003】 本發明係有關於一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其主要目的係為了提供一種可以準確測知樟芝於生物體內濃度變化的檢測方法。

為了達到上述實施目的，本發明人乃研擬如下檢測樟芝於生

物體內濃度變化之方法，其主要係使用乙酸乙酯以液-液萃取的方式將兩個目標成分和內標準品一起從生物體血漿中萃取出來，即吸取血漿樣品放入試管中，並加入內標準品，而後將該血漿樣品混合物以渦旋混合，繼之，加入乙酸乙酯，在往復震盪器震盪，並離心出上層有機相，隨之，將上層有機相移到一個乾淨的試管，以氮氣流蒸發至乾燥，續將蒸乾後的殘留物加入移動相以渦旋混合，復將上述溶液注入液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕系統進行分析。

藉此，以準確測得樟芝萃取物灌胃於生物體內後兩個目標成分濃度變化，進而依此準確測得之數據，以擬定新藥設計，優化給藥方案及改進劑型，俾獲得高效、速效或緩釋、低副作用之所需劑量。

【圖式簡單說明】

【0004】 第一圖：本發明之樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕B的產物離子質譜圖

第二圖：本發明之樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕C的產物離子質譜圖

第三圖：本發明之空白血漿之標準參考物質〔SRM〕層析圖

第四圖：本發明之血漿加上樟芝菌絲體衍生物B、樟芝菌絲體衍生物C和內標準品之標準參考物質〔SRM〕層析圖

第五圖：本發明之生物體灌胃樟芝萃取物的血漿樣品之標準參考物質〔SRM〕層析圖

第六圖：本發明之生物體灌胃樟芝萃取物後血漿中樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C平均濃度對應時間曲線

【實施方式】

【0005】 而為令本發明之技術手段及其所能達成之效果，能夠有更完整且清楚的揭露，茲詳細說明如下，請一併參閱揭露之圖式及圖號：

首先，請參閱第一圖所示，為本發明之檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其實施步驟係包含如下：

A. 實驗材料之備置

a. 備置目標成分及內標準品：該目標成分係分別為樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕B和樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕C，另該內標準品則為苯甲二氮焯〔Diazepam〕，在紫外光譜、質譜、核磁共振和高效液相層析的分析下，分離的二個目標成分樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C的純度大於96%，另內標準品苯甲二氮焯的純度大於99%；

b. 備置實驗設備：使用島津〔Shimadzu〕高效液相色譜系統（係配有LC-10ADvp幫浦、島津SIL-HTA的自動進樣器），以及三段四極質譜儀〔Therm Finnigan TSQ Quantum Uitra〕（係配備大氣壓化學游離源界面、Xcalibur1.4數據系統和LCquan2.0定量軟件），另液相層析使用安捷倫〔Agilent〕XDB-C₈之液相層析管柱與C18的保護管柱〔8毫米x4毫米，5微米〕，溫度為20℃，流動相由乙腈和水組成〔70:30，V/V：體積百分濃度〕，流速0.5毫升/分鐘〔mL/min〕，另以大氣壓力化學游離法〔APCI〕於正離子模式下進行，尖端放電電流定於4微安培〔 μ A〕，毛細管溫度維持在270℃和汽化溫度在450℃，霧化和脫溶劑使用35氣密度〔Arb〕氮氣作為鞘氣和使用5氣密度輔助氣

體，碰撞誘導解離〔CID〕的方式採用1.0毫托〔mTorr〕氬氣作為碰撞氣體，定量是用前趨物-產物之電子轉移的選擇性反應監測〔SRM〕，樟芝菌絲體衍生物B在質量/電荷〔m/z〕314→246，樟芝菌絲體衍生物C在質量/電荷〔m/z〕330→262和內標準品在質量/電荷〔m/z〕285→193，樟芝菌絲體衍生物B、樟芝菌絲體衍生物C和內標準品的碰撞能量分別是被15、15和37電子伏特。

c. 備置查核樣品〔QC〕和校正標準品：該查核樣品〔QC〕係將混合原液含95.2微克/毫升〔 $\mu\text{g/mL}$ 〕的樟芝菌絲體衍生物B和113.2微克/毫升的樟芝菌絲體衍生物C溶於甲醇之中，以甲醇連續稀釋混合原液，另實驗中使用的內標準品作業濃度為25.0奈克/毫升〔 ng/mL 〕之標準溶液，將苯甲二氮焯溶於甲醇的原液稀釋而成，繪製標準曲線之標準品則以甲醇溶液稀釋原液，又吸取50微升〔 μL 〕適當作業濃度的標準溶液加入100微升〔 μL 〕的血漿中，可得樟芝菌絲體衍生物B濃度：47.6、95.2、142.8、238.0、476.0、952.0、2380、4760奈克/毫升〔 ng/mL 〕，樟芝菌絲體衍生物C濃度：56.6、113.2、169.8、283.0、566.0、1132、2380、5660奈克/毫升，另查核樣品濃度，樟芝菌絲體衍生物B為119.0、952.0、3380 μL ，樟芝菌絲體衍生物C為141.5、1132.0、4528奈克/毫升。

d. 備置實驗生物體：本發明係以六隻體重範圍於220~205克的Sprague-Dawley大鼠，並使其禁食12小時。

B. 由生物體內萃取出成分物

使每隻大鼠灌胃樟芝菌絲體的乙酸乙酯萃取物，懸浮於

含有0.5%的羧甲基纖維素鈉的水溶液中，給藥劑量為9.096克/公斤，相當於22.8毫克/公斤的樟芝菌絲體衍生物B和50.2毫克/公斤的樟芝菌絲體衍生物C，再由大鼠眼睛脈絡膜靜脈取得500微升〔 μL 〕的血液樣本，收集在裝有肝素的微量離心管〔eppendorf〕，取樣時間分別為：給藥前〔0分鐘〕，以及給藥後5，15，30，60，120，180，240，360，480，600和1440分鐘，取得肝素化血漿立即以每分鐘4000轉的轉速離心10分鐘後，將取得血漿儲存在 -70°C ，等待分析，藥物動力學參數之計算使用DAS 2.0軟件；

C. 樣品分析

吸取100微升〔 μL 〕的血漿樣品到10毫升〔mL〕玻璃試管中並混入50微升作業濃度的內標準品，再將該混合物以震盪混合1分鐘，隨之加入2毫升的乙酸乙酯為分離液，在往復震盪器震盪10分鐘，接著以每分鐘4000轉的轉速離心10分鐘，以分離出上層有機相，隨之，將該上層有機相移到一個乾淨的試管，再以 45°C 的氮氣流蒸發至乾燥，蒸乾後的殘留物加入50微升的移動相中渦旋混合30秒後，將20微升的上述溶液注入液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕系統進行分析；

於實驗中樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C會強烈地滯留於C18高效液相層析管柱，為了減少它們的滯留時間，選擇使用安捷倫〔Agilent〕XDB-C₈管柱〔4.6mm150mm，5米〕進行液相層析，嘗試不同移動相，係分別由甲醇—水或乙腈—水組成，結果顯示乙腈相較於甲醇，可提供了更高質量的質譜信號和更低的背景干擾，於加入酸性修飾物於流動相，在大氣壓力化學游離

法〔APCI〕條件下，對於解離效果無顯著影響，最後，選擇由乙腈—水〔70:30，V/V：體積百分濃度〕組成的移動相，可以達到對稱的峰形和較短的層析分析時間，同時也能降低基質影響的效應，在液相層析質譜儀〔MS/MS〕檢測樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C的條件最佳化方面，使用注射器泵將每一個分析物標準溶液注入移動相，請參閱第一、二圖所示，為樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C的產物離子質譜；

又請參閱第三～五圖所示，顯示典型的選擇性反應監測器色譜，樣品分別為：空白的血漿【如第三圖】及血漿加上47.6奈克/毫升的樟芝菌絲體衍生物B及56.6奈克/毫升的樟芝菌絲體衍生物C和25.0奈克/毫升內標準品【如第四圖】，以及採集大鼠灌胃樟芝萃取物4小時後的血漿樣品【如第五圖】，在內標準品及分析樣本的分析時間內，無內源性物質干擾物，標準曲線於下述範圍內呈良好的線性，樟芝菌絲體衍生物B：47.6-4760奈克/毫升和樟芝菌絲體衍生物C：56.6-5660奈克/毫升，低定量極限〔LLOQs〕的濃度樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C分別為47.6和56.6奈克/毫升，請參閱表一所示，顯示出分析查核樣品〔QC〕中樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C其精密度和準確性，當日測試和異日間測試，精密度低於5.3%，準確度〔RE〕低於2.7%，樟芝菌絲體衍生物B平均回收率為：78.8±3.7%，69.4±10.3%和76.1±12.3%，antrodin C平均回收率為73.9±10.0%，74.9±7.2%和78.3±11.6%，平均內標準品回收率為75.8±3.0%，就基質的影響方面，所有的計算值分別為85%和115%，這表明一起洗出的基質成分很少或沒有影響分析物或內

標準品的離子化，穩定性的研究表明，樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C在血漿中，室溫25°C，2小時〔相對溼度RE<3.0%〕，-70°C保存15天〔相對溼度RE<3.1%〕，以及3次凍融循環〔相對溼度RE<4.0%〕的操作條件下，可保持穩定的狀態，另兩個分析樣本也被證明在25°C下持續24小時〔RE<4.2%〕依舊維持穩定；

【0006】 表一

【0007】

Compound	Added(ng/mL)	Found(ng/mL)	Intra-day RSD(%)	Inter-day RSD(%)	Relative error(%)
Antrodin B	47.6	46.7	1.9	2.5	1.9
	119.0	119.5	3.1	5.3	0.4
	952.0	956.3	2.4	3.6	0.5
	3808.0	3836.3	3.0	4.2	0.7
Antrodin C	56.6	55.1	1.2	2.7	2.7
	141.2	141.9	3.0	1.2	0.5
	1132.0	1119.6	3.1	4.3	1.1
	4528.0	4598.6	3.0	3.5	1.6

【0008】

D. 方法確效

校正曲線持續做三天，每日每個濃度水準兩個重複數，確認了方法的線性。準確度和精密度則以分析查核樣品〔QC〕進行評估，在三個濃度水平，六個重複數，執行三天，提取回收率的評估，在三個濃度水平及內標準品在同一濃度水平的條件下，比較六個血漿樣品萃取前後的吸收峰面積，基質的影響以比較六個血漿樣品萃取後的吸收峰面積，在三種濃度和背景乾淨的標準品在相同的三個濃度下進行評估，樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C在大鼠血漿中的穩定性，則透過已儲存並進行過的條件，測定其最高級及最低濃度值。

E. 分析結果：六隻大鼠灌胃樟芝萃取物後的藥物動力學研

究，劑量：9.096克/公斤，相當於樟芝菌絲體衍生物B：22.8毫克/公斤，樟芝菌絲體衍生物C：50.2毫克/公斤，請參閱第六圖所示，為樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C在血漿中的平均濃度-時間曲線，這兩個分析物在血漿中的濃度-時間曲線具有相同的趨勢，兩個分析物的濃度-時間曲線皆符合二室體模式，樟芝菌絲體衍生物B的最大濃度值〔 C_{max} 〕為 1277 ± 944 奈克/毫升、最大濃度時間點〔 T_{max} 〕為 35.0 ± 12.2 分鐘、濃度曲線下面積〔 AUC 〕 $_{0-t}$ 為 $326,981 \pm 166,403$ 奈克.分鐘/毫升〔ng min/mL〕和半衰期〔 $t_{1/2}$ 〕為 263.7 ± 123.1 分鐘，另樟芝菌絲體衍生物C的最大濃度值〔 C_{max} 〕為 2425 ± 1688 奈克/毫升、最大濃度時間點〔 T_{max} 〕為 27.5 ± 6.1 分鐘、濃度曲線下面積〔 AUC 〕 $_{0-t}$ 為 $432 \pm 136,971$ 奈克.分鐘/毫升〔ng min/mL〕及半衰期〔 $t_{1/2}$ 〕為 251.4 ± 168.0 分鐘。

由上述實施方式可知，本發明係以液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕方法測定在生物體〔大鼠〕血漿中的樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C，該方法靈敏性和專一度皆高，並已成功應用於生物體〔大鼠〕灌胃樟芝萃取物後，在其體中的樟芝菌絲體衍生物B和樟芝菌絲體衍生物C之藥物動力學研究，據此，俾藉由準確測得樟芝萃取物於生物體內中濃度變化，以進一步擬定新藥設計，進而優化給藥方案及改進劑型，達到獲得高效、速效或緩釋、低副作用之所需劑量的實質效益者。

綜上所述，本發明實施例確能達到所預期之使用功效，又其所揭露之具體構造，不僅未曾見諸於同類產品中，亦未曾公開於申請前，誠已完全符合專利法之規定與要求，爰依法提出發明專

利之申請，懇請惠予審查，並賜准專利，則實感德便。

【符號說明】

【0009】 無

【主張利用生物材料】

【0010】

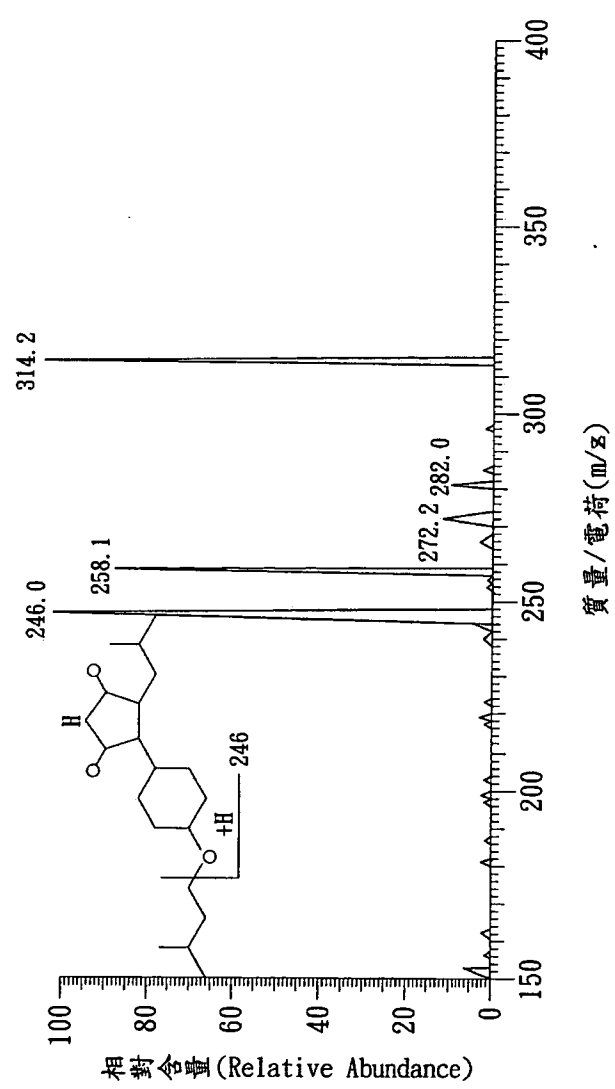
【發明申請專利範圍】

- 【第1項】** 一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其主要係將樟芝萃取物目標成分與苯甲二氮焯〔Diazepam〕內標準品一起從生物體血漿中萃取出來，再將吸取的血漿樣品放入液相層析管柱之試管，並加入分離液混合，以離心出上層有機相，隨之將上層有機相移到一乾淨的試管，再加入移動相混合，而該移動相係包含乙腈—水，且該乙腈含量為體積百分濃度70%，而該水含量為體積百分濃度30%，復將上述溶液注入液相層析串聯質譜〔LC-MS/MS〕系統進行分析，並於大氣壓力化學游離法〔APCI〕於正離子條件下，以前趨物-產物之電子轉移的選擇性反應監測〔SRM〕定量該樟芝萃取物目標成分；其中該大氣壓力化學游離法係以碰撞誘導解離〔CID〕的方式採用1.0毫托〔mTorr〕氬氣作為碰撞氣體，且該樟芝萃取物目標成分質量/電荷〔m/z〕值介於330~246之間。
- 【第2項】** 如申請專利範圍第1項所述檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法係使用乙酸乙酯以液-液萃取的方式將目標成分和內標準品從生物體血漿中萃取出來。
- 【第3項】** 如申請專利範圍第1項所述檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該分離液係為乙酸乙酯。
- 【第4項】** 如申請專利範圍第1項所述檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該上層有機相係於試管中以氮氣流蒸發至乾燥後再與移動相混合。

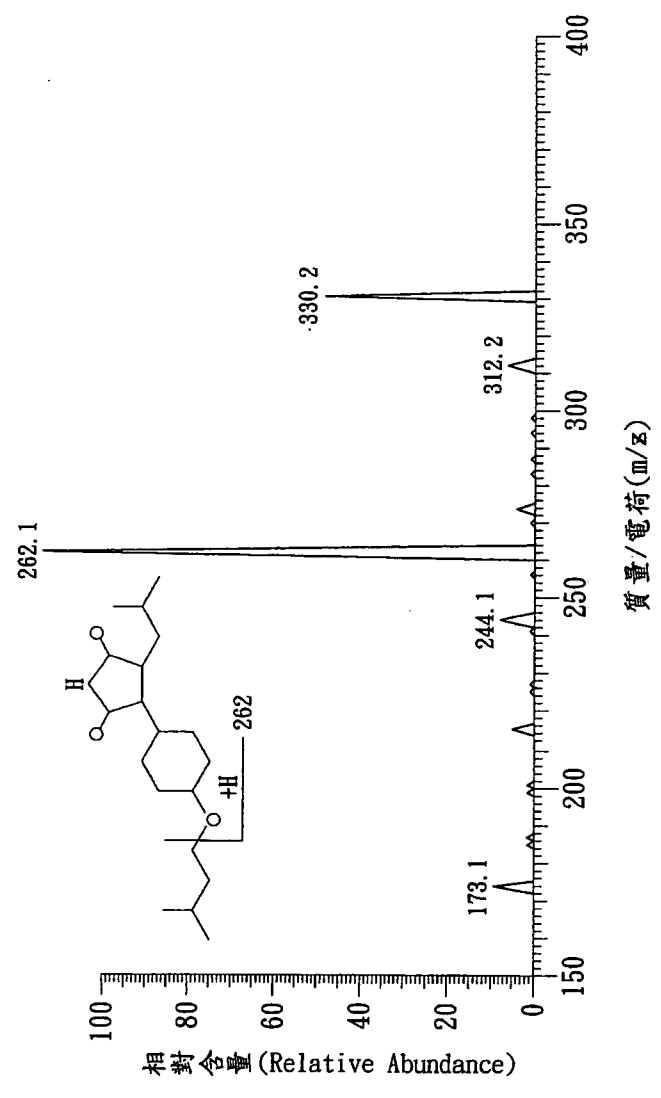
- 【第5項】 如申請專利範圍第1項所述檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該上層有機相係與移動相以渦旋混合。
- 【第6項】 如申請專利範圍第1項所述檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該樟芝萃取物目標成分係包含樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕B和樟芝菌絲體衍生物〔antrodin〕C。
- 【第7項】 如申請專利範圍第1項所述一種檢測樟芝於生物體內濃度變化之方法，其中，該試管係為安捷倫〔Agilent〕XDB-C₈之液相層析管柱。

圖式

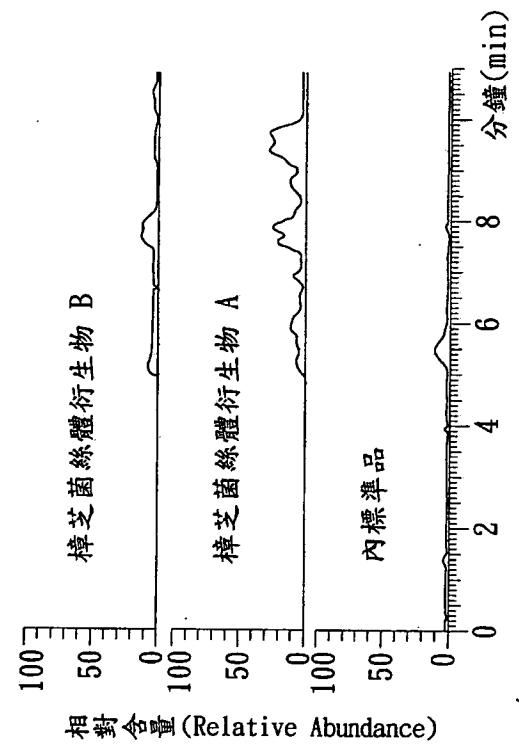
【發明圖式】



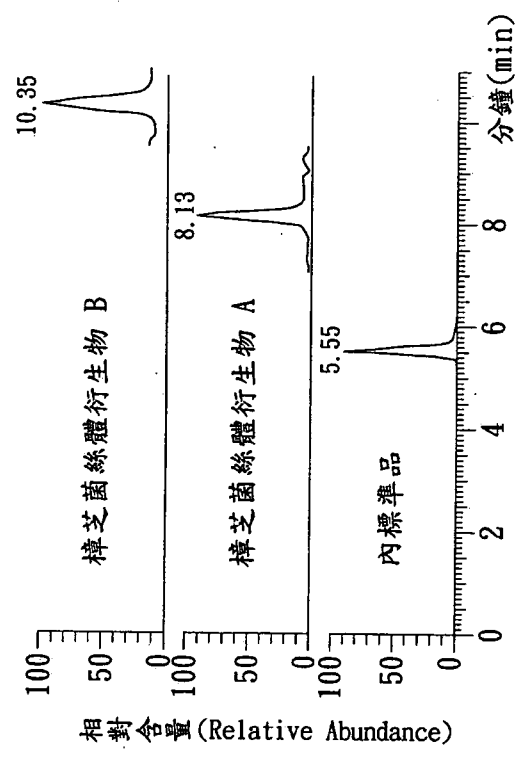
第一圖



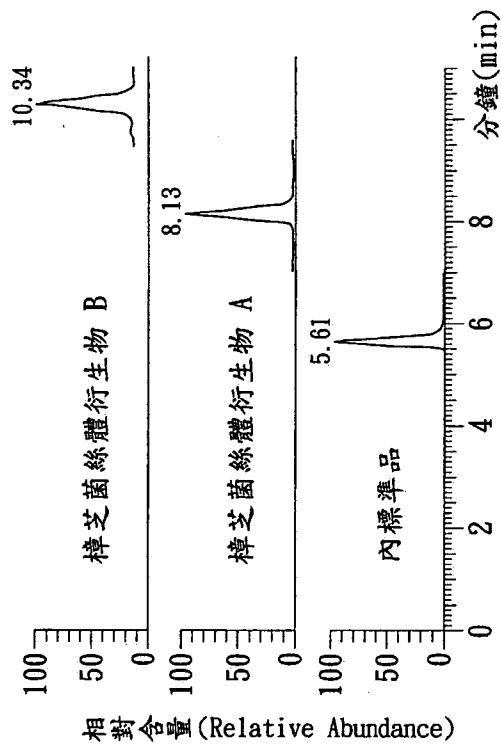
第二圖



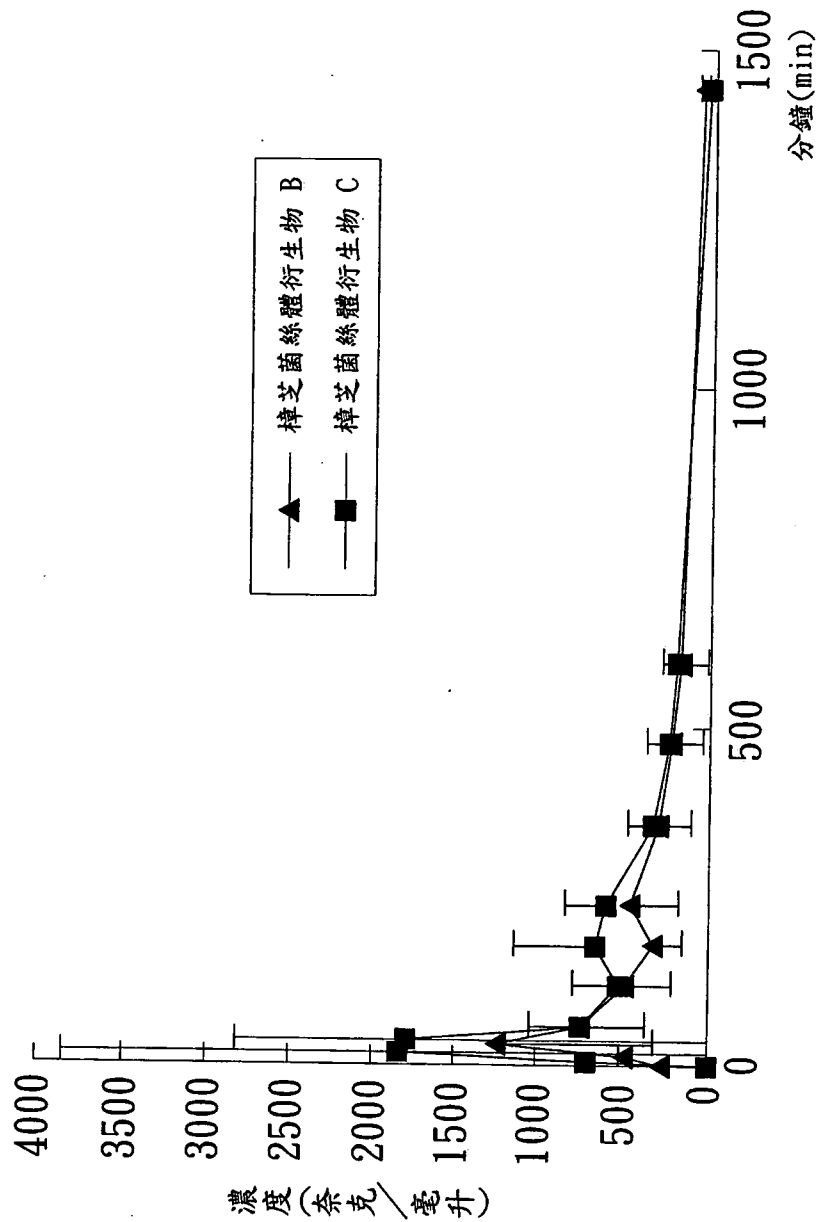
第三圖



第四圖



第五圖



第六圖