



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103210308 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201180054812. 9

(22) 申请日 2011. 11. 15

(30) 优先权数据

2010-256187 2010. 11. 16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 05. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/076248 2011. 11. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/067090 JA 2012. 05. 24

(73) 专利权人 米诺发源制药株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 铃木加代子 铃木恒阳 冢原路子

春田裕子 八田明 浜田雄二

井上秀雄

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 吴孟秋

(51) Int. Cl.

G01N 30/88 (2006. 01)

G01N 27/62 (2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

CN 101897680 A, 2010. 12. 01,

CN 101216465 A, 2008. 07. 09,

CN 101532994 A, 2009. 09. 16,

US 2005/0148088 A1, 2005. 07. 07,

JP 特開昭 52-51995 A, 1977. 04. 26,

JP 特開昭 50-92796 A, 1975. 07. 24,

W.-J. Zhao PhD et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics. 《Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics》. 2008, 第 33 卷 (第 3 期),

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法の一部改正について. 《食安発 0802 第 2 号》. 2010,

Li Ding et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS. 《Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis》. 2006, 第 40 卷 (第 3 期), 田娟 等. HPLC-MS-MS 测定人血浆中的甘草次酸及生物利用度. 《中南药学》. 2007, 第 5 卷 (第 5 期),

Zhongping John Lin et al. Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in radix Glycyrrhizae, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS. 《Journal of Chromatography B》. 2005, 第 814 卷 (第 2 期),

瀬戸隆子 等. 一般用医薬品の鎮咳去痰薬に含有される生薬の確認試験. 《東京健安研セ年報》. 2004, 第 55 卷 (续)

审查员 陈群霞

权利要求书1页 说明书16页 附图4页

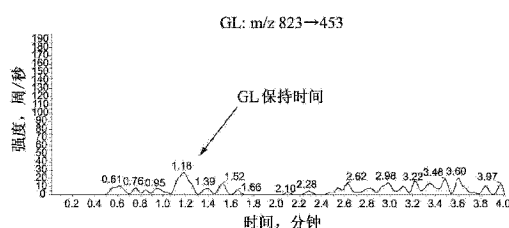
(54) 发明名称

源自生药的成分的定量方法

(57) 摘要

源自生药的成分的高灵敏度定量方法包括：提取工序，通过将碱或醇中混合有生物样品的混合物注入具有反相分配功能及阴离子交换功能的固相中后，用清洗液至少对所述固相清洗一次，之后利用酸性醇从所述固相中洗脱，从而制备含有源自生药的成分的提取物；以及定量工序，通过质谱法对经由所述提取工序提取的提取物中的选

自由甘草甜素、甘草次酸、甘草甜素及甘草次酸的代谢物、甘草甜素及甘草次酸的类似物、甘草中含有的皂苷成分以及它们药学上可接受的盐组成的组中的至少一种进行检测，并定量。



[ 转续页 ]

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 30/06* (2006. 01)

*G01N 30/72* (2006. 01)

(56) 对比文件

赵文静 等 . 高效液相色谱—质谱法测定人

血浆中甘草次酸浓度及人体药代动力学研究.《山东大学学报(医学版)》. 2008, 第46卷(第11期),

田莉 等 . 生物样品中甘草酸及其代谢产物检测方法的研究进展.《药物分析杂志》. 2009, 第29卷(第2期),

1. 一种源自生药的成分的定量方法,其特征在于,具有:

提取工序,通过将碱或醇中混合有生物样品的混合物注入具有反相分配功能及阴离子交换功能的固相中后,用清洗液对所述固相清洗,之后利用酸性醇从所述固相中洗脱,从而制备含有源自生药的成分的提取物;以及

定量工序,通过质谱分析法对经由所述提取工序提取的提取物中的选自由甘草甜素、甘草次酸、甘草甜素的代谢物、甘草次酸的代谢物、甘草甜素的类似物、甘草次酸的类似物、甘草中含有的皂苷成分,以及它们的药学上可接受的盐组成的组中的至少一种进行检测,并定量,

在所述提取工序中,通过用碱和醇和水的混合液进行清洗后,再用醇、醇和水的混合液、或者乙腈进行清洗,以进行固相的清洗。

2. 根据权利要求1所述的源自生药的成分的定量方法,其特征在于,

所述碱和醇和水的混合液是将按体积计0.5%~28%的氨水和甲醇以99:1~1:3混合后形成的混合液。

3. 根据权利要求1或2所述的源自生药的成分的定量方法,其特征在于,

所述生物样品是血液、血浆或者组织提取物。

## 源自生药的成分的定量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于对生物样品中的甘草甜素及其代谢物等高灵敏度地进行定量的方法。

[0002] 本申请基于并要求于 2010 年 11 月 16 日提交的日本专利申请 2010-256187 号的优先权,并将其全部内容结合于此,作为参考。

### 背景技术

[0003] 甘草甜素(以下简称 GL)及其盐是具有抗过敏作用、抗炎症作用、以及免疫调剂作用、肝细胞损害抑制作用、肝细胞繁殖促进作用、病毒繁殖抑制作用/灭活作用等多种多样生理活性的甘草根提取成分。在日本,自古以来被用作中药等的临床药物,现在被广泛用于治疗慢性肝脏疾病、湿疹/皮炎、婴儿苔癣、圆形脱毛症(円形脱毛症)、各种过敏、炎症等。并且,作为除医药品之外的用途,由于 GL 具有耐盐(塩なれ)效果并具有甜味效果,因此作为甜味剂多用于腌菜和调料等众多食品。

[0004] 根据非临床试验的结果认为,GL 具有容易积聚在肝脏且迅速被排泄至胆汁中的特性,并一边进行代谢以及肠肝循环一边被排出。特别是口服给药中,作为配糖体(配糖体)的水溶性极性物质的 GL 显示低吸收性,同时由于被肠道细菌代谢和首过效应,在末梢血液中的浓度极低。因此,为了测定 GL 的血液中的动态,迄今为止已经尝试过各种各样的方法,但是难以检测服用含 GL 的制剂、掺合甘草的中药制剂时血液中的 GL,长期以来也不清楚其动态。

[0005] 例如,存在以下测定方法:对采自口服 GL 后的健康者的血浆,进行甲醇处理除去蛋白质后,通过酶免疫法(EIA)测定该血浆中的 GL 的量的方法;以及利用采用了十八烷基化学结合型(ODS)柱等具有反相分配功能的柱的高速液相色谱法(HPLC)的测定方法(例如非专利文献 1~4)。但是,这些测定方法中,定量临界值最多为 0.1  $\mu$ g/mL 左右,即使能够检测出作为主代谢物的甘草次酸(以下简称为 GA),也无法检测出 GL。因此,根据从尿中检测的示例,间接证明了 GL 的血液中的转移(参照非专利文献 4)。于是,对含 GL 的制剂的药效,以可定量的 GA 代替 GL 作为评价指标。

[0006] 在先技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献 1:石渡(イシワタ),其他 7 名,《生化及药剂学期刊》(バイオロジカル・アンド・ファーマシユーティカル・ブリテン(Biological and Pharmaceutical Bulletin)),2000 年第 23 卷第 8 号第 904~905 页。

[0009] 非专利文献 2:德·格鲁特(De Groot),其他 1 名,《色谱法杂志》(ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー(Journal of Chromatography)),1988 年第 456 卷第 71~81 页。

[0010] 非专利文献 3:中田(ナカタ),其他 3 名,《和汉药学会志》(和漢医薬学会誌),1986 年第 3 卷第 3 号第 278~279 页。

[0011] 非专利文献 4:山村(ヤマムラ),其他 7 名,《美国药学杂志》(ジャーナル・オ

ブ・ファーマシューティカル・サイエンス (Journal of Pharmaceutical Sciences)), 1992 年第 81 卷第 10 号第 1042 ~ 1046 页。

## 发明内容

[0012] 发明要解决的技术问题

[0013] 作为活性主体的原形药物 GL 的药代动力学, 在根据有效性、安全性判断为恰当使用后, 是有用的。为此, 希望不以 GA 为评价对象, 而能够对血浆等生物样品中的 GL 量进行定量。

[0014] 鉴于上述技术问题, 本发明的目的在于提供用于检测血浆等生物样品中的 GL 并进行定量的方法。

[0015] 解决技术问题的技术方案

[0016] 为解决上述技术问题, 本申请各发明人进行了深入研究, 结果发现, 首先, 利用采用了具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相的固相提取法从生物样品中提取出含有 GL 的成分后, 通过质谱法分析提取物中的 GL, 能够检测并定量生物样品中的 GL, 至此完成本发明。

[0017] 即, 本发明提供以下内容:

[0018] (1) 一种源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 其特征在于, 具有: 提取工序, 通过将碱或醇中混合有生物样品的混合物注入具有反相分配功能及阴离子交换功能的固相中后, 用清洗液对上述固相清洗至少一次, 之后利用酸性醇从上述固相中洗脱, 从而制备含有源自生药的成分的提取物; 以及定量工序, 通过质谱法对经由上述提取工序提取的提取物中的选自由甘草甜素、甘草次酸、甘草甜素及甘草次酸的代谢物、甘草甜素及甘草次酸的类似物、甘草中含有的皂苷成分以及它们药学上可接受的盐组成的组中的至少一种进行检测, 并定量, 其中, 上述清洗液是选自由水、碱、醇及乙腈组成的组中的一种或两种以上的混合液。

[0019] (2) 上述 (1) 所记载的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 其特征在于, 在上述提取工序中, 通过用碱和醇和水的混合液清洗后, 再用醇、醇和水的混合液、或者乙腈进行清洗, 以进行固相的清洗。

[0020] (3) 上述 (2) 所记载的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 其特征在于, 上述碱和醇和水的混合液是将按体积计 0.5% ~ 28% 的氨水和甲醇以 99 : 1 ~ 1 : 3 混合后形成的混合液。

[0021] (4) 上述 (1) ~ (3) 中任一项所记载的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 其特征在于, 上述生物样品是血液、血浆或者组织提取物。

[0022] 发明效果

[0023] 根据本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 能够检测含量非常少的生物样品中的 GL, 并进行定量。因此, 通过利用本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 能够对从摄取含有 GL 的制剂或饮食的人身上采取的生物样品中的 GL 进行定量, 并能够高精度地解析药代动力学。

## 附图说明

[0024] 图 1A 是表示实施例 6 中空白血浆样品中的 GL 的色谱图。

[0025] 图 1B 是表示实施例 6 中空白血浆样品中的 GA 的色谱图。

[0026] 图 1C 是表示实施例 6 中空白血浆样品中的内部标准 (IS) 的色谱图。

[0027] 图 2A 是表示实施例 6 中,添加有标准溶液 (G) 的血浆样品 (血浆中的 GL 添加量: 0.5ng/mL) 中的 GL 的色谱图。

[0028] 图 2B 是表示实施例 6 中,添加有标准溶液 (G) 的血浆样品 (血浆中的 GA 添加量: 2ng/mL) 中的 GA 的色谱图。

[0029] 图 2C 是表示实施例 6 中,添加有标准溶液 (G) 的血浆样品中的 IS 的色谱图。

[0030] 图 3 是表示实施例 7 中 GL 的平均血药浓度变化的图。

[0031] 图 4 是表示实施例 7 中 GA 的平均血药浓度变化的图。

### 具体实施方式

[0032] 本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的特征在于,通过采用了具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相的固相提取法提取出生物样品中的 GL 之后,通过质谱法对得到的提取物中的 GL 含量进行定量。通过利用质谱法代替现有的 HPLC 法等进行定量,能够提高 GL 的检测灵敏度。并且,不利用采用现有的 ODS 柱这种仅具有反相分配功能的固相的固相提取法,而是利用具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相进行制备,由此能够从供质谱分析的提取物中除去更多的异物,从而能够大幅地提高质谱分析的灵敏度。

[0033] 具体而言,本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的特征在于,包括:提取工序,通过将碱或醇中混合有生物样品的混合物注入具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相后,用清洗液清洗上述固相一次或两次以上,之后利用酸性醇从上述固相中洗脱,从而制备含有源自生药的成分的提取物;以及定量工序,通过质谱法对经由上述提取工序提取的提取物中的 GL、GA、GL 及 GA 的代谢物、GL 及 GA 的类似物、甘草中含有的皂苷成分以及选自由上述物质的药理学上可接受的盐构成的组中的至少一种进行检测,并定量,上述清洗液是选自由水、碱、醇以及乙腈构成的组中的一种或两种以上的混合液。

[0034] 优选上述提取工序中制备含有至少两种源自生药的成分的提取物,优选上述定量工序中在一次测定(检测模式除外)中对至少两种成分进行检测、定量。

[0035] 根据本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法定量的源自生药的成分是选自由 GL、GA、GL 及 GA 的代谢物、GL 及 GA 的类似物、甘草中含有的皂苷成分以及上述物质的药理学上可接受的盐构成的组(以下有时称为“GL 等”)中的至少一种。

[0036] 作为 GL 及 GA 的代谢物,例如可以列举出:3-单葡萄糖醛酸甘草次酸(20 $\beta$ -羧基-11-氧代-30-正齐墩果-12-烯-3 $\beta$ -基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸)、30-单葡萄糖醛酸甘草次酸(3 $\beta$ -羟基-11-氧代齐墩果-12-烯-30-酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸)、3-氧代-GA(3,11-二氧代齐墩果-12-烯-30-酸)、3 $\alpha$ -GA(3 $\alpha$ -羟基-11-氧代齐墩果-12-烯-30-酸)、3位的结合硫酸盐(3 $\beta$ -羟基磺酰氧基-11-氧代齐墩果-12-烯-30-酸)、3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -二羟基-11-氧代齐墩果-12-烯-30-酸以及 3 $\beta$ ,24-二羟基-11-氧代齐墩果-12-烯-30-酸等。

[0037] 另外,作为 GL 及 GA 的类似物,例如可以列举出:20 $\alpha$ -羧基-11-氧代-29-正

齐墩果-12-烯-3 $\beta$ -基( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基熊果酸)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸、20 $\beta$ -羧基-24-羟基-11-氧代-30-正齐墩果-12-烯-3 $\beta$ -基( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基熊果酸)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸、18 $\alpha$ -GL(20 $\beta$ -羧基-11-氧代-(18 $\alpha$ H)-30-正齐墩果-12-烯-3 $\beta$ -基( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基熊果酸)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸)、18 $\alpha$ -GA(3 $\beta$ -羟基-11-氧代-(18 $\alpha$ H)-齐墩果-12-烯-30-酸)等。

[0038] 另外,作为甘草中含有的皂苷成分,例如可以列举出:甘草皂苷 C1(20 $\beta$ -羧基-11-氧代-30-正齐墩果-12-烯-3 $\beta$ -基( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基熊果酸)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖醛酸)等。

[0039] 本发明中采用的 GL 等的药学上可接受的盐只要是在生物体内具有与 GL 等相同的药理效果的盐,则并未特别限定。具体而言,可以列举出例如铵盐、钠盐、钾盐等。

[0040] 本发明中,可以对 GL 等当中的一种进行定量,也可以在一次操作中对 GL 等中的两种以上进行定量。本发明中特别优选同时对 GL 和 GA 进行定量。

[0041] 提供给本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的生物样品,以从生物体采取的试料为好,优选为从人体、或者小鼠、大鼠等动物身上采取的试料。另外,可以是血液、血浆、血清、尿、腹水、胸水、关节液、骨髓液、胆汁等,也可以是从肝脏、或胰腺、肾脏等组织采取的组织块等的提取物(组织提取物)。组织块等的提取物可以利用常规方法通过均质化而制备。本发明中,优选为血液、血浆、尿或组织提取物,更优选为血浆。

[0042] 以下,按照每个工序对本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法进行说明。

[0043] 作为提取工序,首先制备在碱或醇中混合生物样品后得到的混合物。作为生物样品中添加的碱,只要是能够使得到的混合物的 pH 为碱性的物质,则并未特别限定,例如可以列举出氨、氨水、氢氧化钠溶液、碳酸氢钠溶液等。另外,作为醇,优选碳数为 1~6 的低级醇,可以列举出甲醇、乙醇、异丙醇等。也可以是在用水稀释的醇溶液。本发明中,作为生物样品中添加的碱或醇,优选为氨、氨水、甲醇、或甲醇水溶液,更优选为氨或氨水。

[0044] 生物样品中添加的氨水的浓度并未特别限定,可以考虑生物样品的种类、其后使用的固相的种类、得到的混合物的氨浓度等之后,进行适当的调整。本发明中,生物样品中添加的氨或氨水的浓度,优选为使得到的混合物的氨浓度按体积计达到 0.01%~30% 的浓度,更优选为使其达到 0.05%~25% 的浓度,进一步优选为使其达到 0.05%~20% 的浓度。

[0045] 其次,将得到的混合物注入具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相中,使该混合物中的 GL 等吸附在固相上。作为具有反相分配功能以及阴离子交换功能的固相,例如可以列举出反相分配-阴离子交换混合模式固相萃取柱、Oasis MAX(沃特世公司制)等。

[0046] 用清洗液清洗吸附有 GL 等的固相一次或两次以上,除去非特异性结合的成分。清洗液是选自由水、碱、醇以及乙腈构成的组中的一种或两种以上的混合液。作为清洗液使用的碱或醇,可以列举出与生物样品中添加的碱或醇相同的物质。另外,固相的清洗,可以用相同的清洗液进行两次以上,也可以用不同的清洗液依次清洗。

[0047] 本发明中,固相的清洗优选为通过利用碱和醇和水的混合液、碱和水的混合液、或者水清洗之后,再利用醇、醇和水的混合液、或者乙腈清洗而进行,更优选为通过利用碱和醇和水的混合液清洗之后,再利用醇、醇和水的混合液、或者乙腈清洗而进行。作为碱和醇和水的混合液,优选为氨和醇和水的混合液,更优选为氨和甲醇和水的混合液。

[0048] 氨和甲醇和水的混合液中的各成分的组成比,只要是能够保持使 GL 等吸附于固相的状态的组成比,则并未特别限定。例如,优选为混合液中的甲醇浓度按体积计为 1%~75%、氨浓度为 0.1%~21%,更优选为甲醇浓度为 25%~75%、氨浓度为 0.1%~21%。这种组成比的混合液例如可以通过使按体积计为 0.5%~28%氨水和甲醇以 99 : 1~1 : 3 的比例混合而制备。

[0049] 利用碱和醇和水的混合液进行第一次清洗之后,作为第二次清洗使用的清洗液,优选使用醇,更优选使用甲醇或乙醇,进一步优选使用甲醇。

[0050] 之后,通过利用酸性醇从上述固相中洗脱,从而制备含有源自生药的成分的提取物。作为酸性化溶剂可以列举出甲酸醇、盐酸、三氟乙酸等。本发明中优选为甲酸醇。作为用作洗脱液的甲酸醇,优选为甲酸和碳数为 1~6 的低级醇的酯,更优选为甲酸甲醇或甲酸乙醇,进一步优选为甲酸甲酯。另外,为了以后的质谱分析,将得到的洗脱物蒸发干燥。

[0051] 其次,作为定量工序,通过质谱法对经由提取工序提取的提取物中的 GL 等进行检测并定量。作为质谱法,优选为通过 LC-MS(液相色谱/质谱)法或者 LC-MS/MS(液相色谱/串联质谱)法进行。具体而言,将蒸发干燥后的洗脱物溶解于 LC 的流动相之后,进行 LC,再进行 MS。LC-MS 以及 LC-MS/MS 可以通过使用由 HPLC 和质谱仪组合成的装置而进行。

[0052] 如专利文献 1~4 所记载,优选使用 ODS 柱等具有反相分配功能的柱进行 LC。另外,MS 可以利用常规方法进行。例如通过 ESI(电喷雾电离)法或 APCI(大气压化学电离)法将试料离子化之后,通过磁偏转型、四级杆型、飞行时间型等质谱装置分离检测各离子。

[0053] 通过利用 LC-MS 法进行质谱分析,例如能够使血液、血浆、或血清中的 GL 等的定量极限改善至 20ng/mL 左右。同样,通过利用 LC-MS/MS 法进行质谱分析,能够使血液等中的 GL 等的定量极限提高至 10ng/mL 以下,例如 0.5ng/mL 左右。

[0054] 市售试剂的大量口服给药(GL 为 1600mg)中的血浆中 GL 浓度约为 500ng/mL 左右的情况已经被报道(《环境卫生展望》102(9),65-68,1994(Environmental Health Perspectives,102(9),65-68,1994))。基于该见解进行的比例计算的结果,当以治疗肝病为目的时,计算出与临床常用量即给药量 75mg 相当的推测血液中浓度为大约 23ng/mL。即,通过本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,能够对利用现有方法不可能检测出的血液中的 GL 进行定量。特别是,口服摄取 GL 制剂等后的血液中的 GL 浓度,个体差别大,利用定量极限不够的测定法,出现血液检体无法检测出 GL 的情况、以及无法测定长时间的药物动态、测定精度和测定结果可靠性不够的情况,但通过本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,特别是通过利用 LC-MS/MS 法进行质谱分析,能够得到可靠性更高的测定结果。

[0055] 实施例

[0056] 接着,列举实施例进一步对本发明进行详细说明,但本发明并不仅限于以下实施例。

[0057] 实施例 1

[0058] 通过 LC-MS 法进行质谱分析从而进行本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法时,对血浆中的 GL 以及 GA 的定量临界值进行测定,并制作成标准曲线。

[0059] 标准溶液的制备

[0060] 首先,准确称量 GL(常盘植物化学研究所制)10.0mg,溶解于甲醇后,准确地制成

100mL,从而制备成 100  $\mu$ g/mL 的 GL 标准原液。同样,准确称量 GA(阿尔佩斯药品工业株式会社制)10.0mg,溶解于甲醇后,准确地制成 100mL,从而制备成 100  $\mu$ g/mL 的 GA 标准原液。

[0061] 其次,分别准确地取 GL 标准原液 2mL 以及 GA 标准原液 8mL,利用甲醇准确制成 50mL,从而制备成 GL 浓度为 4000ng/mL、GA 浓度为 16000ng/mL 的标准溶液 (A)。用甲醇依次稀释该标准溶液 A,制备成表 1 所记载的标准溶液 (B) ~ (F)。分别制备标准原液以及标准溶液之后进行冷藏保存 ( $5 \pm 4^{\circ}\text{C}$ )。制备器具使用的是玻璃器皿。

[0062] 表 1

[0063]

|    | 标准溶液     |      |      |      |      |     |
|----|----------|------|------|------|------|-----|
|    | 单位:ng/mL |      |      |      |      |     |
|    | A        | B    | C    | D    | E    | F   |
| GL | 4000     | 2000 | 1500 | 1000 | 500  | 200 |
| GA | 16000    | 8000 | 6000 | 4000 | 2000 | 800 |

[0064] 血浆样品的制备

[0065] 将在人类血浆 0.5mL 中添加标准溶液 (A) 50  $\mu$ L 并充分混合后的血浆作为血浆样品。对于标准溶液 (B) ~ (F) 也分别进行同样的操作,制备成血浆样品。在这些血浆样品中进一步添加内部标准液 (IS) 50  $\mu$ L。本实施例中,使用  $\alpha$ -Hederin 作为内部标准物质。另外,制备成在人类血浆 0.5mL 中添加甲醇 100  $\mu$ L 后的血浆作为空白血浆样品。

[0066] 提取工序

[0067] 在各血浆样品中添加按体积计 0.56% 氨水 1mL 并充分混合后 (混合物中的氨浓度:0.37%),将得到的混合物全部注入 (用于) Oasis MAX (沃特世公司制) (以下简化为“MAX”)。对于该 MAX,在注入血浆样品之前,预先通过注入按体积计 2% 的甲酸 / 甲醇溶液后,再注入水,从而进行预处理。

[0068] 注入血浆样品后,用按体积计 0.56% 氨水 / 甲醇溶液 (体积比 1 : 1 的混合液) 清洗该 MAX 后,用甲醇再次进行清洗。

[0069] 之后,注入按体积计 2% 甲酸 / 甲醇溶液,使吸附于该 MAX 的 GL 等洗脱。在  $40^{\circ}\text{C}$  加温下、氮气中使洗脱液 (提取物) 蒸发干燥。

[0070] 定量工序

[0071] 使蒸发干燥后的提取物溶解于以下流动相 A 液 / B 液 (体积比 1 : 1 的混合液) 250  $\mu$ L 中。其中 20  $\mu$ L 注入分析柱,在如下所示条件下进行 LC。

[0072] 装置:Alliance HT 2695 (沃特世公司制)

[0073] 分析柱:CAPCELL PAK C18 (UG120、5  $\mu$ m、1.5mm $\times$ 150mm、资生堂公司制)

[0074] 流动相:A 液,按体积计 0.1% 甲酸;B 液,按体积计 0.1% 甲酸乙腈;线性梯度 (表 2)

[0075] 流速:0.30mL/min

[0076] 柱温: $40^{\circ}\text{C}$

[0077] 试料注入量:20  $\mu$ L

[0078] 表 2

[0079]

| 时间(分钟) | 流动相A(%) | 流动相B(%) |
|--------|---------|---------|
| 0.00   | 60      | 40      |
| 2.00   | 10      | 90      |
| 4.00   | 10      | 90      |
| 4.01   | 60      | 40      |
| 14.00  | 60      | 40      |

- [0080] 其次,在如下所示条件下,对通过 LC 得到的包含 GL 等的分馏进行 MS。
- [0081] 装置:ZQ2000(沃特世公司制)
- [0082] 离子化法:ESI(Turbo Spray:电喷雾离子源)
- [0083] 检测法:GL(负、正离子检测),GA/IS(正离子检测),MRM(多反应监测)
- [0084] 毛细管电压:2.5kV
- [0085] 提取器电压:2V
- [0086] RF 透镜电压:0.2V
- [0087] 源温:110℃
- [0088] 脱溶剂温度:350℃
- [0089] 脱溶剂气体流量:350L/hr
- [0090] 锥孔气体流量:50L/hr
- [0091] 表 3
- [0092]

| 物质名 | 离子检测 | 质量(m/z) | 锥孔电压(V) |
|-----|------|---------|---------|
| GL  | 负    | 821     | 60      |
|     | 正    | 823     | 30      |
| GA  | 正    | 471     | 60      |
| IS  | 正    | 751     | 30      |

[0093] 其结果,LC-MS 的测定结果随着血浆样品中的 GL 或 GA 浓度而增大,基于血浆样品中的 GL 或 GA 浓度和 LC-MS 的测定结果得到的标准曲线显示线性。即,由上述结果可知,血浆等生物样品中的 GL 的浓度为 20ng/mL ~ 400ng/mL、GA 的浓度为 80ng/mL ~ 1600ng/mL,通过利用 LC-MS 的本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,可以高精度地定量生物样品中的 GL 等。

[0094] 特异性、线性、日内再现性的研究

[0095] 进而,对特异性、线性、以及日内再现性进行研究。其结果,利用 LC-MS 的本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,分别在 20ng/mL ~ 400ng/mL 以及 80ng/mL ~ 1600ng/mL 的范围内显示良好的线性(标准曲线的相关系数为 0.9979)和再现性。并且,如表 4 所示,日内再现性的结果为,GL 的负离子模式(GL-)的真实度为 -1.2% ~ +0.6%,精度为 5.2% ~ 6.0%,正离子模式(GL+)的真实度为 -5.9% ~ +5.9%,精度为 3.3% ~ 7.7%;GA 的真实度为 -7.0% ~ +7.2%,精度为 3.0% ~ 7.7%。由以上结果确定,GL 以及 GA 的定量极限浓度分别为 20ng/mL、80ng/mL。

[0096] 表 4

[0097]

| GL              |             |              |             |              | GA              |             |              |
|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|--------------|
| GL-             |             |              | GL+         |              |                 |             |              |
| 添加浓度<br>(ng/mL) | 精度<br>(%CV) | 真实度<br>(%RE) | 精度<br>(%CV) | 真实度<br>(%RE) | 添加浓度<br>(ng/mL) | 精度<br>(%CV) | 真实度<br>(%RE) |
| 20              | 5.7         | 0.6          | 3.3         | 5.9          | 80              | 7.7         | -1.8         |
| 100             | 6.0         | -1.2         | 7.7         | 0.5          | 400             | 3.0         | 7.2          |
| 400             | 5.2         | -0.9         | 6.1         | -5.9         | 1600            | 4.7         | -7.0         |

[0098] 实施例 2

[0099] 对混合到生物样品中的碱或醇的种类对于本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的定量灵敏度的影响进行了研究。

[0100] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS50  $\mu$  L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0101] 具体而言,除了制备将表 5 中记载的溶液 1mL 添加至血浆样品再注入 MAX 的混合物之外,进行与实施例 1 相同的操作,对 GL 以及 GA 进行定量。

[0102] 将血浆样品中混合的溶液为按体积计 0.56% 氨水时的定量结果分别设定为回收率 100%, 计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 (相对值)。计算结果示于表 5。此外,表 5 中的氨水后面括号内的数值表示添加该氨水后得到的混合物中的氨浓度 (体积百分比)。

[0103] 表 5

[0104]

|                 | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|-----------------|-----------|---------|--------|--------|
|                 | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 水               | 67.6      | 62.9    | 73.4   | 72.4   |
| 0.14% 氨水(0.09%) | 94.7      | 102.5   | 76.3   | 82.5   |
| 0.56% 氨水(0.37%) | 100.0     | 100.0   | 100.0  | 100.0  |
| 2.8% 氨水(1.86%)  | 102.4     | 110.6   | 103.2  | 110.6  |
| 5.6% 氨水(3.72%)  | 94.7      | 103.6   | 101.1  | 113.6  |
| 28% 氨水(18.6%)   | 87.2      | 102.8   | 99.8   | 103.3  |
| 0.0025M 氢氧化钠水溶液 | 73.7      | 86.1    | 74.0   | 69.1   |
| 0.1% 碳酸氢钠水溶液    | 80.5      | 75.0    | 93.2   | 81.9   |
| 甲醇              | 93.1      | 88.5    | 96.5   | 94.7   |
| 乙醇              | 77.9      | 76.6    | 77.1   | 53.7   |
| 2% 磷酸           | 0.0       | 0.0     | 5.9    | 0.0    |
| 2% 高氯酸          | 0.0       | 0.0     | 3.7    | 0.0    |

[0105] 其结果,使用碱和醇时比使用水时的回收率良好。相反,当添加磷酸和高氯酸等酸性溶液时,未能检测出 GL,也几乎未能回收 GA。另外,醇中,与乙醇相比,使用甲醇时,GL 和 GA 中的任一方的回收率都良好。碱中,与使用氢氧化钠水溶液和碳酸氢钠溶液时相比,使用氨水时回收率良好。但是,几乎未观察到因氨水的浓度而产生不同。

[0106] 实施例 3

[0107] 对固相的清洗液的种类对于本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的定量灵敏度的影响进行了研究。

[0108] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS50  $\mu$  L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0109] 具体而言,除了用表 6 中记载的溶液清洗注入血浆样品后的 MAX,之后再用甲醇清洗之外,进行与实施例 1 相同的操作,对 GL 以及 GA 进行定量。

[0110] 将当注入血浆样品后的 MAX 的清洗液按体积计为 0.56% 氨水 / 甲醇溶液 ( 体积比 1 : 1 的混合液 ) 时的定量结果分别设定为回收率 100%, 计算出各血浆样品的 GL、GA、以及 IS 的回收率 ( 相对值 )。计算结果示于表 6。此外, 表 6 中溶液名后面括号内的比率表示各溶液的混合比。

[0111] 表 6

[0112]

|                         | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|-------------------------|-----------|---------|--------|--------|
|                         | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 水                       | 94.8      | 101.3   | 92.0   | 98.3   |
| 0.56% 氨水                | 92.3      | 89.8    | 93.5   | 99.8   |
| 1.4% 氨水                 | 96.3      | 90.6    | 106.9  | 103.5  |
| 0.56% 氨水/甲醇(1:1)        | 100.0     | 100.0   | 100.0  | 100.0  |
| 2.8% 氨水/甲醇(1:1)         | 83.0      | 81.2    | 121.2  | 101.8  |
| 5.6% 氨水/甲醇(1:1)         | 104.1     | 116.0   | 119.9  | 112.9  |
| 28% 氨水/甲醇(1:1)          | 103.0     | 99.3    | 111.8  | 94.9   |
| 0.56% 氨水/甲醇(3:1)        | 108.1     | 117.7   | 93.7   | 98.6   |
| 0.56% 氨水/甲醇(1:3)        | 95.9      | 110.5   | 107.4  | 102.7  |
| 0.0025M 氢氧化钠水溶液/甲醇(1:1) | 101.4     | 94.2    | 78.8   | 94.8   |

[0113] 其结果, 只有用 0.0025M 氢氧化钠水溶液 / 甲醇溶液 ( 体积比 1 : 1 的混合液 ) 清洗时, GA 的回收率略低, 而用水、氨水、氨水和甲醇的混合液中的任一种作为清洗液时, GL、GA 以及 IS 的回收率都良好。

[0114] 实施例 4

[0115] 对固相的清洗液的种类对于本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的定量灵敏度的影响进行了研究。

[0116] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS50  $\mu$  L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0117] 具体而言, 除了用按体积计为 0.56% 氨水 / 甲醇溶液 ( 体积比 1 : 1 的混合液 ) 清洗注入血浆样品后的 MAX, 之后用乙醇、甲醇、按体积计 50% 甲醇水溶液或者乙腈再次清洗之外, 进行与实施例 1 相同的操作, 对 GL 以及 GA 进行定量。

[0118] 将第二次的清洗液为甲醇时的定量结果设定为回收率 100%, 计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 ( 相对值 )。计算结果示于表 7。其结果, 无论用哪一种溶液清洗, GL 的回收率都在 80% 以上, 为良好。并且, GA 的回收率除了按体积计为 50% 的甲醇水溶液的情况以外都在 80% 以上, 为良好。特别是, 甲醇的情况中回收率最好。

[0119] 表 7

[0120]

|        | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|--------|-----------|---------|--------|--------|
|        | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 甲醇     | 100.0     | 100.0   | 100.0  | 100.0  |
| 乙醇     | 94.7      | 93.5    | 83.0   | 92.7   |
| 50% 甲醇 | 92.7      | 87.8    | 70.3   | 82.3   |
| 乙腈     | 85.2      | 83.3    | 81.4   | 85.6   |

[0121] 实施例 5

[0122] 对来自固相的洗脱液的种类对于本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法的定量灵敏度的影响进行了研究。

[0123] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS50  $\mu$  L 并充分

混合后的产物作为血浆样品。

[0124] 具体而言,除了用表 8 中记载的溶液从 MAX 进行洗脱之外,进行与实施例 1 相同的操作,对 GL 以及 GA 进行定量。

[0125] 表 8

[0126]

|      | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|------|-----------|---------|--------|--------|
|      | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 甲酸甲醇 | 100.0     | 100.0   | 100.0  | 100.0  |
| 甲酸乙醇 | 82.2      | 87.7    | 77.9   | 88.5   |
| 甲酸乙腈 | 0.0       | 0.0     | 94.8   | 102.4  |
| 磷酸甲醇 | 0.0       | 0.0     | 0.0    | 0.0    |

[0127] 将洗脱液为甲酸甲醇时的定量结果设定为回收率 100%,计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 (相对值)。计算结果示于表 8。其结果,甲酸甲醇的情况中回收率最高。另外,使用甲酸乙醇时虽然比不上甲酸甲醇,但也能够良好地回收 GL 和 GA。与此相对,洗脱液为甲酸乙腈和磷酸甲醇时,未能检测出 GL。

[0128] 比较例 1

[0129] 使用仅仅具有反相分配功能的固相代替 MAX,对血浆中的 GL 以及 GA 进行定量。

[0130] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$ L 以及 IS 50  $\mu$ L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0131] 具体而言,除了使用作为 ODS 柱的 Sep-Pak (3cc、60mg、30  $\mu$ m、沃特世公司制) 代替 MAX;先用甲醇、再用水对该柱进行状态调节;以及,分别使用按体积计为 0.56% 的氨水或 0.1N 盐酸作为用于制备注入柱中的混合物的溶液 (稀释液),使用水或乙腈 / 水 (体积比 = 1 : 3、含有 1M 四丁基溴化铵) 作为固相的清洗液,使用按体积计为 2% 的甲酸甲醇、按体积计为 2% 的甲酸乙腈 / 水 (体积比 = 1 : 1) 或按体积计为 2% 的甲酸甲醇 / 水 (体积比 = 1 : 1) 作为来自固相的洗脱液之外,进行与实施例 1 相同的操作。

[0132] 将实施例 2 中与血浆样品混合的溶液为按体积计 0.56% 的氨水时的定量结果分别设定为回收率 100%,计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 (相对值)。计算结果示于表 9。此外,表 9 中“1-1”为按体积计 0.56% 的氨水、“1-2”为 0.1N 盐酸、“2-1”为水、“2-2”为乙腈 / 水 (体积比 = 1 : 3、含有 1M 四丁基溴化铵)、“3-1”为按体积计 2% 的甲酸甲醇、“3-2”为按体积计 2% 的甲酸乙腈 / 水 (体积比 = 1 : 1)、“3-3”为按体积计 2% 的甲酸甲醇 / 水 (体积比 = 1 : 1)。

[0133] 表 9

[0134]

| 稀释液 | 清洗液 | 洗脱液 | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|-----|-----|-----|-----------|---------|--------|--------|
|     |     |     | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 1-1 | 2-1 | 3-1 | 38.4      | 0.0     | 38.4   | 60.8   |
| 1-2 | 2-1 | 3-1 | 50.2      | 0.0     | 31.5   | 91.5   |
| 1-1 | 2-2 | 3-1 | 0.0       | 0.0     | 0.0    | 0.0    |
| 1-1 | 2-1 | 3-2 | 0.0       | 0.0     | 13.8   | 41.6   |
| 1-1 | 2-1 | 3-3 | 17.8      | 0.0     | 7.8    | 73.1   |

[0135] 其结果可知,即使是稀释液等的组合中回收率最良好的情况,GL 的回收率也最多为 50% 左右,与使用 MAX 的情况相比,GL 等的检测灵敏度差得多。

[0136] 比较例 2

[0137] 使用具有反相分配功能和极性相互作用功能的固相来代替 MAX,对血浆中的 GL 以

及 GA 进行定量。

[0138] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS 50  $\mu$  L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0139] 具体而言,除了使用作为多孔聚合物的 Oasis HLB (3cc、60mg、30  $\mu$  m、沃特世公司制) 代替 MAX;先用甲醇、再用水对该柱进行预处理,并且,分别使用按体积计 0.56% 的氨水或 0.1N 盐酸作为用于制备注入柱中的混合物的溶液 (稀释液),使用按体积计 5% 的甲醇水溶液作为固相的清洗液,并使用甲醇作为来自固相的洗脱液之外,进行与实施例 1 相同的操作。

[0140] 将实施例 2 中与血浆样品混合的溶液为按体积计 0.56% 的氨水时的定量结果分别设定为回收率 100%,计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 (相对值)。计算结果示于表 10。

[0141] 表 10

[0142]

| 稀释液      | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|----------|-----------|---------|--------|--------|
|          | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 0.56% 氨水 | 51.2      | 58.0    | 37.9   | 103.2  |
| 0.1N 盐酸  | 0.0       | 0.0     | 39.1   | 94.3   |

[0143] 其结果,使用 0.1N 盐酸作为稀释液时,未能检测出 GL, GA 的回收率也非常低。另一方面可知,即使使用按体积计为 0.56% 的氨水时, GL 的回收率也最多为 55% 左右,与使用 MAX 的情况相比, GL 等的检测灵敏度差得多。

[0144] 比较例 3

[0145] 使用具有反相分配功能和阳离子交换功能的固相代替 MAX,对血浆中的 GL 以及 GA 进行定量。

[0146] 将在人类血浆 0.5mL 中添加实施例 1 的标准溶液 (E) 50  $\mu$  L 以及 IS 50  $\mu$  L 并充分混合后的产物作为血浆样品。

[0147] 具体而言,除了使用 Oasis MCX (3cc、60mg、30  $\mu$  m、沃特世公司制) 代替 MAX、先用甲醇、再用水对该柱进行预处理、以及分别使用 0.1N 盐酸作为用于制备注入柱中的混合物的溶液 (稀释液),使用 0.1N 盐酸作为固相的清洗液,并使用按体积计为 2% 的氨水 / 甲醇溶液作为来自固相的洗脱液之外,进行与实施例 1 相同的操作。

[0148] 表 11

[0149]

|     | 回收率 (相对值) |         |        |        |
|-----|-----------|---------|--------|--------|
|     | GL- (%)   | GL+ (%) | GA (%) | IS (%) |
| 1   | 40.0      | 40.5    | 40.7   | 56.4   |
| 2   | 33.9      | 37.7    | 38.9   | 56.7   |
| 3   | 42.3      | 39.8    | 42.1   | 60.0   |
| 4   | 38.6      | 46.5    | 41.6   | 61.1   |
| 5   | 32.9      | 39.2    | 41.1   | 55.8   |
| 平均值 | 37.6      | 40.7    | 40.9   | 58.0   |

[0150] 将实施例 2 中与血浆样品混合的溶液为 0.56 体积 % 氨水时的定量结果分别设定为回收率 100%,计算出各血浆样品的 GL、GA 以及 IS 的回收率 (相对值)。独立进行 5 次的计算结果以及平均值示于表 11。

[0151] 其结果可知, GL 和 GA 中的任一种的回收率都未达到 50%, 与使用 MAX 的情况相

比, GL 等的检测灵敏度差得多。

[0152] 实施例 6

[0153] 通过 LC-MS/MS 法进行质谱分析从而进行本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法时, 对血浆中的 GL 以及 GA 的定量临界值进行测定, 并制作成标准曲线。并且同时检验该方法的准确度和可靠性。

[0154] 标准溶液的制备

[0155] 进行与实施例 1 相同的操作, 通过甲醇稀释实施例 1 中使用的标准原液, 制备成表 12 中记载的标准溶液 (B) ~ (G)。

[0156] 表 12

[0157]

|    |      | 标准溶液 |     | 单位: ng/mL |    |    |
|----|------|------|-----|-----------|----|----|
|    | B    | O    | D   | E         | F  | G  |
| GL | 2000 | 500  | 200 | 50        | 20 | 5  |
| GA | 8000 | 2000 | 800 | 200       | 80 | 20 |

[0158] 血浆样品的制备以及提取工序

[0159] 进行与实施例 1 相同的操作, 制备添加有标准溶液 (B) ~ (G) 的人类血浆样品和空白血浆样品, 将这些血浆样品分别注入 MAX 中、使 GL 等吸附、用按体积计为 0.56% 的氨水 / 甲醇溶液以及甲醇清洗之后, 用按体积计为 2% 的甲酸 / 甲醇溶液洗脱, 再蒸发干燥。

[0160] 定量工序

[0161] 使蒸发干燥后的提取物溶解于以下流动相 A 液 / B 液 ( 体积比 1 : 1 的混合液 ) 250  $\mu$  L 中。其中, 将 1  $\mu$  L 注入分析柱中, 在如下所示条件下进行 LC-MS/MS。

[0162] LC-MS/MS 系统 : API4000 系统 ( 应用生物系统公司制 )

[0163] LC

[0164] 装置 : LC-20A ( 岛津制作所制 )

[0165] 分析柱 : Inertsil ODS-3 ( 2.1mm  $\times$  150mm、粒径 5  $\mu$  m、GL 科技公司制 )

[0166] 流速 : 0.50mL/min

[0167] 柱温 : 40 $^{\circ}$ C

[0168] 自动进样器温度 : 5 $^{\circ}$ C

[0169] 试料注入量 : 1  $\mu$  L

[0170] 流动相 : A 液, 按体积计为 0.1% 的甲酸 ; B 液, 按体积计为 0.1% 的甲酸乙腈 ; 线性梯度 ( 表 13 )

[0171] 表 13

[0172]

| 时间 (分) | 流动相A (%) | 流动相B (%) |
|--------|----------|----------|
| 0.00   | 40       | 60       |
| 2.00   | 10       | 90       |
| 4.00   | 10       | 90       |
| 4.01   | 40       | 60       |
| 6.00   | 40       | 60       |

[0173] MS/MS

[0174] 装置 : API4000 ( 应用生物系统公司 )

- [0175] 离子化法:ESI(Turbo Spray:电喷雾离子源)
- [0176] 检测法:正离子检测、MRM(Multiple reaction monitoring:多反应监测)
- [0177] 离子喷射电压:5500V(正)
- [0178] 离子源温度:400℃
- [0179] 气帘气体:10(氮气)
- [0180] 离子源气体1:70(氮气)
- [0181] 离子源气体2:50(氮气)
- [0182] 碰撞气体:8(氮气)
- [0183] 表 14
- [0184]

| 监测离子及其他设定 |               |               |           |           |            |            |
|-----------|---------------|---------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 物质名       | Q1质量<br>(m/z) | Q3质量<br>(m/z) | DP<br>(V) | EP<br>(V) | CE<br>(eV) | CXP<br>(V) |
| GL        | 823           | 453           | 126       | 10        | 35         | 14         |
| GA        | 471           | 149           | 116       | 10        | 57         | 10         |
| IS        | 751           | 455           | 71        | 10        | 25         | 12         |

[0185] 图 1A ~图 1C 中示出空白血浆样品的色谱。分别地,图 1A 示出 GL 的峰的位置 (GL 的保持时间 ;m/z823 → 453),图 1B 示出 GA 的峰的位置 (GA 的保持时间 ;m/z471 → 149),图 1C 示出 IS 的峰的位置 (IS 的保持时间 ;m/z751 → 455)。另外,图 2A ~图 2C 中示出添加有标准溶液 (G) 的血浆样品 (血浆中的 GL 浓度 :0.5ng/mL, GA 浓度 :2ng/mL) 的色谱。分别地,图 2A 示出 GL 的峰 (图中用箭头示出),图 2B 示出 GA 的峰 (图中用箭头示出),图 2C 示出 IS 的峰 (图中用箭头示出)。GL、GA、IS 的保持时间分别为大约 1.2 分钟、3.1 分钟、1.4 分钟,空白血浆样品的色谱上未出现妨碍定量的峰,GL、GA、IS 的峰形状良好。

[0186] 定量结果示于表 15。另外,实际的添加浓度和测定值 (表中的定量值) 的相对误差也同样示于表 15。其结果,GL 和 GA 这两者的相对误差都在 15% 以内。即,根据这些结果可以确定,血浆等生物样品中的 GL 浓度为 0.5ng/mL ~ 200ng/mL、GA 浓度为 2ng/mL ~ 800ng/mL 时,通过利用了 LC-MS/MS 的本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,能够高精度地定量生物样品中的 GL 等。

[0187] 表 15

[0188]

| GL              |                |             | GA              |                |             |
|-----------------|----------------|-------------|-----------------|----------------|-------------|
| 添加浓度<br>(ng/mL) | 定量值<br>(ng/mL) | 相对误差<br>(%) | 添加浓度<br>(ng/mL) | 定量值<br>(ng/mL) | 相对误差<br>(%) |
| 0.5             | 0.545          | +9.0        | 2               | 1.831          | -8.5        |
| 2               | 1.992          | -0.4        | 8               | 8.235          | +2.9        |
| 5               | 4.815          | -1.7        | 20              | 20.796         | +4.0        |
| 20              | 18.315         | -8.4        | 80              | 77.434         | -3.2        |
| 50              | 50.504         | +1.0        | 200             | 212.042        | +6.0        |
| 200             | 201.230        | +0.6        | 800             | 789.661        | -1.3        |

[0189] 特异性、线性、日内、日间再现性的研究

[0190] 进而,根据美国食品药品监督管理局 (FDA) 的分析方法验证指南 (《行业指南,生物分析方法验证》,美国健康与人类服务部食品药品监督管理局,2001 年 5 月 (“Guidance for

Industry, Bioanalytical Method Validation”, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001)), 对特异性、线性、日内、日间再现性进行了研究。并且, 也进行了稳定性评价试验 (室温下 4 小时以及  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻保存 3 个月时的生物样品中保存稳定性、冻融稳定性、测量实际试样的稳定性、标准溶液稳定性)。研究结果示于表 16。其结果, 利用 LC-MS/MS 的本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法, 分别在  $0.5\text{ng/mL} \sim 200\text{ng/mL}$  以及  $2\text{ng/mL} \sim 800\text{ng/mL}$  的范围内显示良好的线性和再现性。日内再现性的结果为, GL 的真实度为  $-12.8\% \sim +4.8\%$ , 精度为  $4.0\% \sim 9.5\%$ , GA 的真实度为  $-13.4\% \sim +4.4\%$ , 精度为  $2.2\% \sim 9.0\%$ 。另一方面, 日间再现性中, GL 的真实度为  $-9.4\% \sim +2.0\%$ , 精度为  $2.1\% \sim 5.5\%$ , GA 的真实度为  $-10.9\% \sim +8.1\%$ , 精度为  $1.3\% \sim 9.1\%$ 。根据再现性的结果确定, GL 以及 GA 的定量极限浓度分别为  $0.5\text{ng/mL}$ 、 $2\text{ng/mL}$ 。

[0191] 另外, 所有稳定性评价试验 (生物样品中保存稳定性、冻融稳定性、测量实际试样的稳定性、标准溶液稳定性) 中, 与初始值比较都在  $\pm 15\%$  以内, 很稳定。由以上结果确定, 根据美国食品药品监督管理局的分析方法验证指南, 本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法是确保了可靠性的定量方法。

[0192] 表 16

[0193]

| GL              |                |             |              | GA              |                |             |              |
|-----------------|----------------|-------------|--------------|-----------------|----------------|-------------|--------------|
| 添加浓度<br>(ng/mL) | 定量值<br>(ng/mL) | 精度<br>(%CV) | 真实度<br>(%RE) | 添加浓度<br>(ng/mL) | 定量值<br>(ng/mL) | 精度<br>(%CV) | 真实度<br>(%RE) |
| 日内再现性           |                |             |              | 日内再现性           |                |             |              |
| 0.5             | 0.436          | 8.0         | -12.8        | 2               | 1.733          | 9.0         | -13.4        |
| 1               | 0.938          | 9.5         | -6.2         | 4               | 3.700          | 6.6         | -7.5         |
| 10              | 10.295         | 4.0         | +3.0         | 40              | 41.779         | 4.4         | +4.4         |
| 160             | 167.721        | 4.4         | +4.8         | 640             | 614.662        | 2.2         | -3.9         |
| 日间再现性           |                |             |              | 日间再现性           |                |             |              |
| 0.5             | 0.453          | 5.1         | -9.4         | 2               | 1.783          | 9.1         | -10.9        |
| 1               | 0.954          | 2.1         | -4.6         | 4               | 3.853          | 6.6         | -3.7         |
| 10              | 10.197         | 3.9         | +2.0         | 40              | 43.249         | 3.0         | +8.1         |
| 160             | 160.408        | 5.5         | +0.3         | 640             | 622.379        | 1.3         | -2.8         |

[0194] 实施例 7

[0195] 对口服给药含 GL 的制剂后的血浆中的 GL 进行了检测, 并测定了药物动态。

[0196] 本实施例是根据基于赫尔辛基宣言的道德准则、药事法第 14 条第 3 款、第 80 条的 2 以及《关于药品临床试验的实施基准 (GCP) 的省令》(平成 9 年厚生省令第 28 号) 进行的。具体而言, 根据申请人的委托, 在第三方委员会承认之后, 在试验负责医师的管理下, 由 EPS 株式会社以及医疗法人社团育生会山口医院进行含 GL 的制剂的口服给药以及血浆样品的采取。另外, 根据相同申请人的委托, 由株式会社日本医学临床检查研究所环保事业部 (现在的医药化妆品分析事业部) 对得到的血浆样品中的 GL 以及 GA 进行测定。

[0197] 另外, 受试者是对试验目的、试验内容、隐私保护等进行了充分了解后, 签署了同意参加试验的书面材料的 6 名健康日本男性 (年龄: 20 岁以上 35 岁以下, 事前检查时 BMI: 18.5 以上 25.0 以下) 为对象。

[0198] 使用掺合有甘草甜素-铵、甘氨酸、DL-蛋氨酸的糖衣片“复方甘草甜素片 (グ

リチロン配合錠) (注册商标)”作为含 GL 的制剂。根据临床常规剂量,和足量水一起单次口服 3 片复方甘草甜素苷片。服药以及采血时间等试验日程示于表 17。在 30 分钟以内通过离心分离处理 (4℃、3000rpm、10 分钟),回收 1mL 以上得到的血液作为血浆,在 -20℃ 以下冷冻保存直至测定浓度时。

[0199] 表 17

[0200]

| 日程  | 时间    | 经过时间   | 条件  | 采血 | 所见/检查<br>安全性的确定 |
|-----|-------|--------|-----|----|-----------------|
| 前一天 | 18:00 | -15hr  | 住院  |    |                 |
|     | 19:00 | -14hr  | 用餐  |    |                 |
| 第1天 | 7:00~ | -2hr~  |     | ●  | ●               |
|     | 9:00  | 0hr    |     |    |                 |
|     | 9:00  | 0hr    | 服药  |    |                 |
|     | 9:15  | 0.25hr |     | ●  |                 |
|     | 9:30  | 0.5hr  |     | ●  |                 |
|     | 9:45  | 0.75hr |     | ●  |                 |
|     | 10:00 | 1hr    |     | ●  |                 |
|     | 11:00 | 2hr    |     | ●  |                 |
|     | 13:00 | 4hr    | 用餐※ | ●  |                 |
|     | 15:00 | 6hr    |     | ●  |                 |
|     | 17:00 | 8hr    |     | ●  |                 |
|     | 19:00 | 10hr   | 用餐※ | ●  |                 |
|     | 21:00 | 12hr   |     | ●  |                 |
| 第2天 | 3:00  | 18hr   |     | ●  |                 |
|     | 9:00  | 24hr   | 用餐※ | ●  |                 |
|     | 13:00 | 28hr   | 用餐  |    |                 |
|     | 19:00 | 34hr   | 用餐  |    |                 |
|     | 21:00 | 36hr   |     | ●  |                 |
| 第3天 | 9:00  | 48hr   | 出院  | ●  | ●               |

[0201] ※ 采血后用餐。

[0202] 在采集的血浆样品 0.5mL 中添加按体积计 0.56% 的氨水 1mL 并充分混合后,进行与实施例 1 相同的操作,将得到的混合物注入 MAX、使 GL 等吸附、用按体积计为 0.56% 的氨水 / 甲醇溶液以及甲醇清洗之后,用按体积计为 2% 的甲酸 / 甲醇溶液洗脱,再蒸发干燥。

[0203] 然后,进行与实施例 6 相同的操作,对蒸发干燥后的提取物进行 LC-MS/MS,测定各血浆样品中的 GL 浓度以及 GA 浓度。图 3 是表示 GL 的平均血药浓度变迁的图,图 4 是表示 GA 的平均血药浓度变迁的图。并且,图 3 以及图 4 示出 6 个检体的平均值以及标准偏差。其结果确定,根据本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,不仅是一直以来作为代替指标的主代谢物的 GA,还能够直接测定作为原形药物的 GL 本身的血浆中的浓度。即,根据本发明,血浆中 GL 的微量检测首次获得成功,并搞清楚了长期以来不清楚的 GL 的血液中动态。

[0204] 药代动力学解析

[0205] 根据 GL 以及 GA 的测定数据,计算出最大血药浓度 (Cmax)、达峰时间 (Tmax)。另外,通过梯形法计算出到给药后 48 小时为止的药物浓度 - 时间曲线下面积 (AUC<sub>0→48h</sub>),通过最小二乘法根据消除相计算出消除速率常数 (ke1) 以及消除半衰期 (t<sub>1/2</sub>)。另外,还

计算出给药后无限长时间为止的药物浓度-时间曲线下面积 (AUTO  $\rightarrow \infty$ ) 以及体内滞留时间 (MRT)。

[0206] 其结果,本实施例中, GL 的 C<sub>max</sub> 大约在 10ng/mL ~ 40ng/mL 的范围,作为平均值为 24.8ng/mL。这与上述基于市售试剂的大量口服给药例的预测值 (约 23ng/mL) 大致相等,从而示出 GL 剂量与药物浓度的相关性。另外, T<sub>max</sub> 平均为 4.5 小时,对这之前 (1 ~ 2 小时) 或者这之后 (12 小时) 等显示多个浓度峰的受试者也进行了观察。后者的浓度峰是在用餐后出现的,因此也暗示了摄取食物对 GL 的吸收或肠肝循环造成影响的可能性。

[0207] 另一方面,确定到作为 GL 的主代谢物的 GA 在血浆中被证实为只滞后了 4 小时, 6 小时之后检测出 GL 的约 10 倍的药物浓度 (以摩尔换算约 20 倍)。在体外,在最佳条件下使用人肝脏微粒体培养 GL 的结果,迅速转化为中间代谢物的 3- 单葡萄糖醛酸甘草次酸 (3-monoglucuronyl-glychrretinic acid),而只生成少量 GA (《生化药理学》(Biochemical Pharmacology) 42 (6/7) 1025-1029, 1991)。另外,在无菌大鼠中,口服给药 GL 的结果,在血浆以及粪便中未确定 GA,因此可以认为在生物体内的 GA 生成由肠道细菌担任主导作用 (引用:《药学药理学杂志》(J. Pharm. Pharmacol) 46, 135-137, 1994)。因而,推测吸收滞后是到与肠道菌群接触为止的时间,还可以认为用餐条件 (或者禁食条件) 是影响 药物在消化道内的移动、肠道菌群的代谢能力、消化道吸收,影响 GA 暴露量的因素。对每个受试者观察吸收后的 GA 动态,确定了以下趋势:原形药物浓度高的受试者中代谢物出现弱,相反,原形药物浓度低的受试者中代谢物出现强。由此启示如下的可能性:与 GA 同时作为原形药物的 GL 的消化道吸收也与肠道菌群的代谢能力相关联,这表现为个体差异 (数据未发布)。

[0208] 工业实用性

[0209] 根据本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法,能够对摄取临床剂量的含 GL 的制剂或饮食后血液中的 GL 进行定量,因此本发明的源自生药的成分的高灵敏度定量方法可以主要用于药品 / 生药的恰当使用、安全性评价、药代动力学解析、新 GL 制剂开发等。

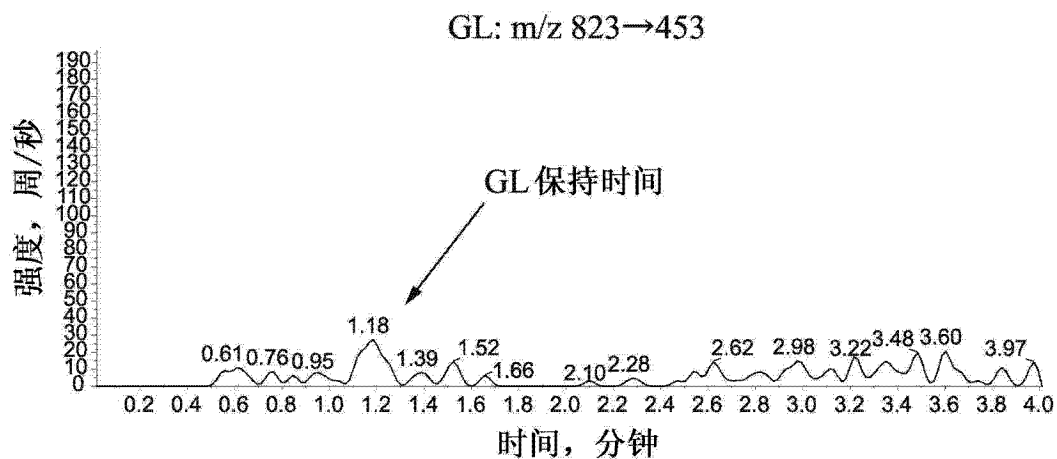


图 1A

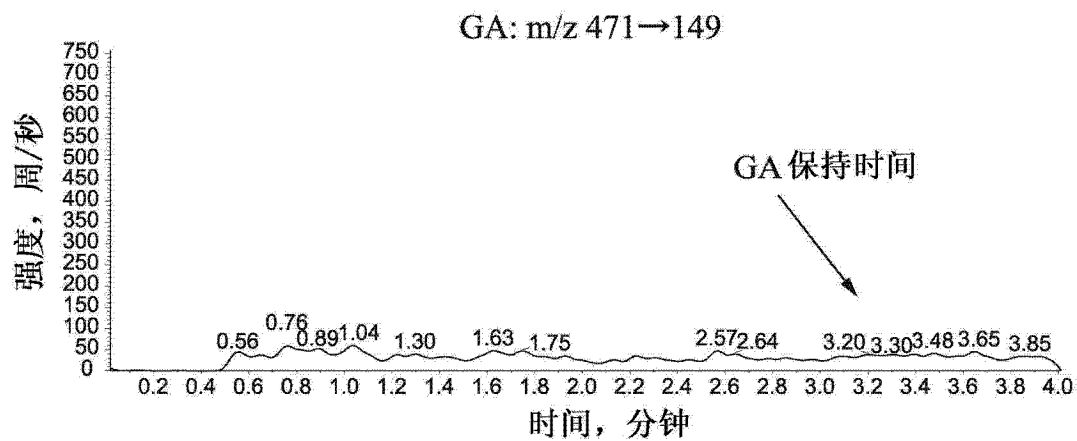


图 1B

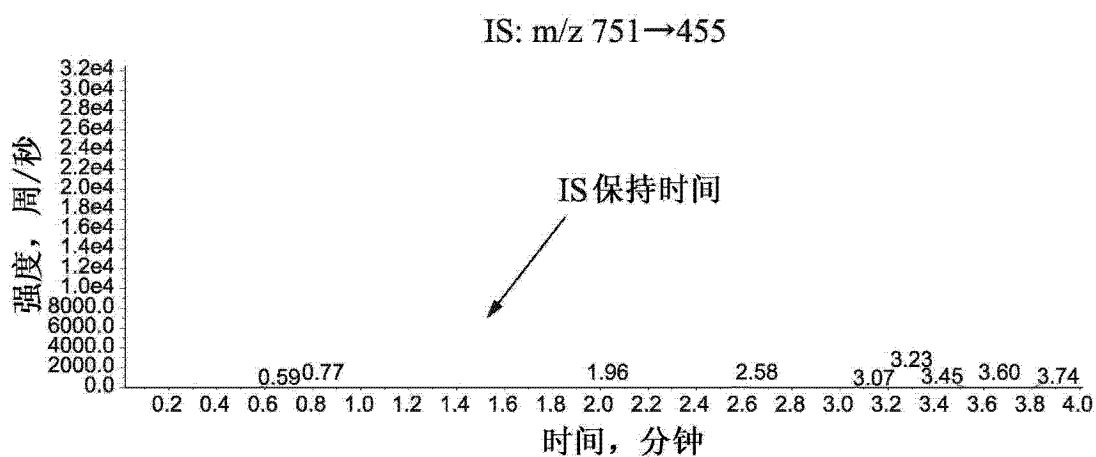


图 1C

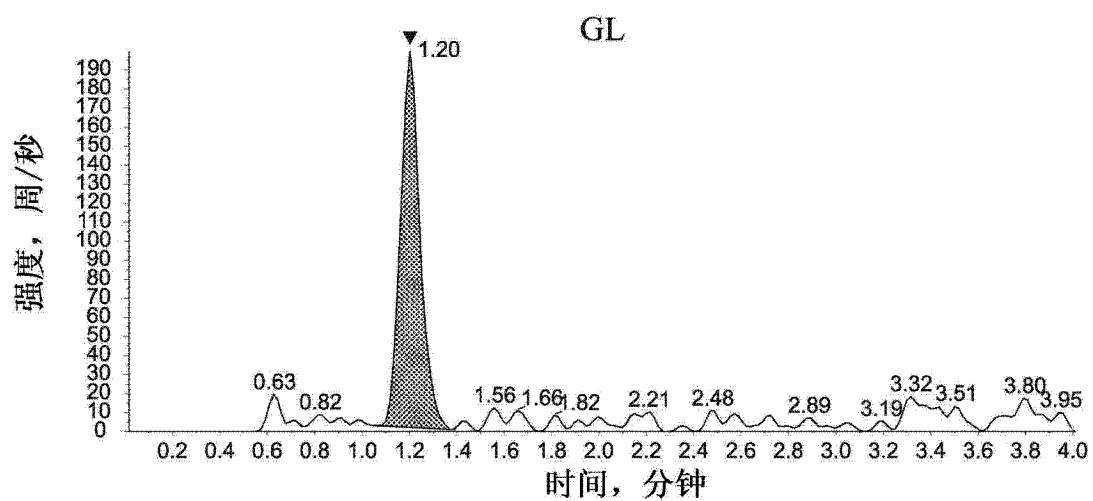


图 2A

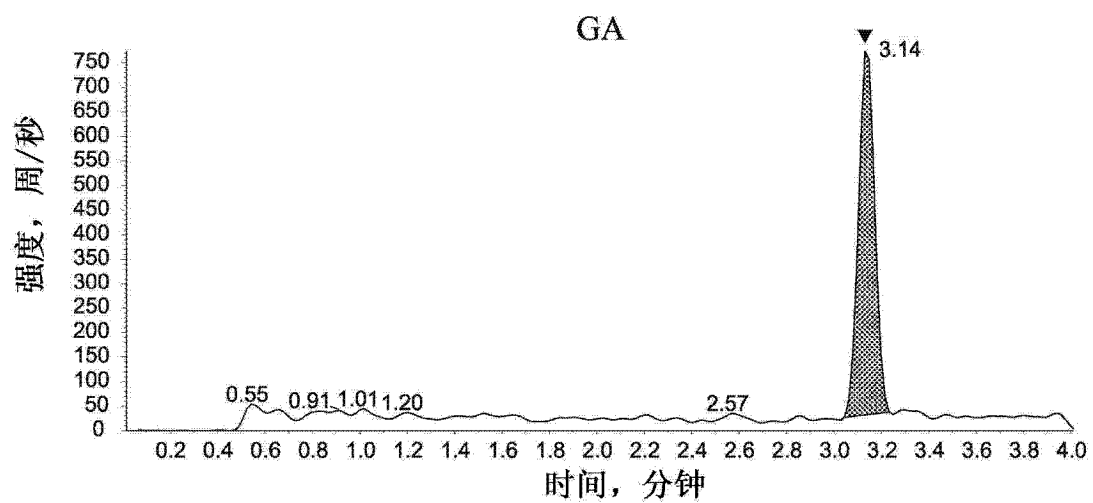


图 2B

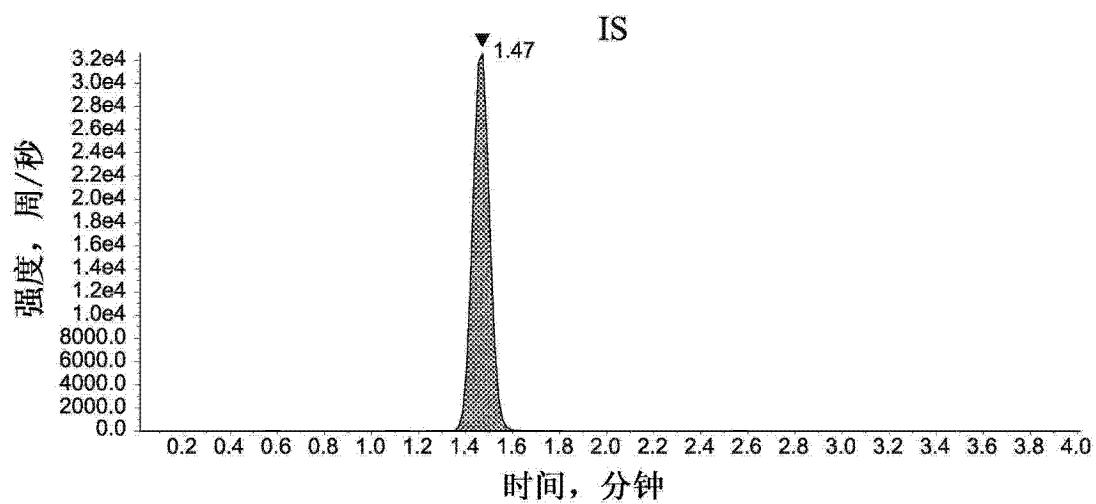


图 2C

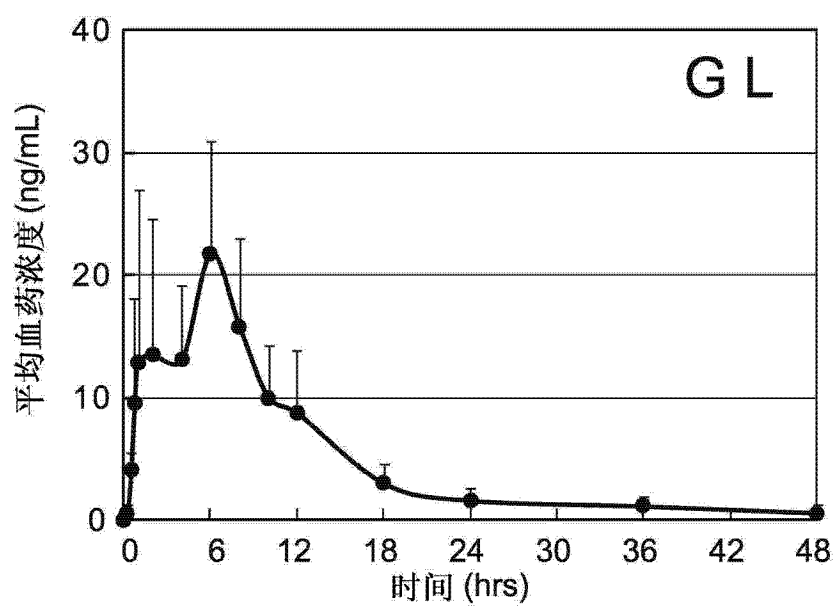


图 3

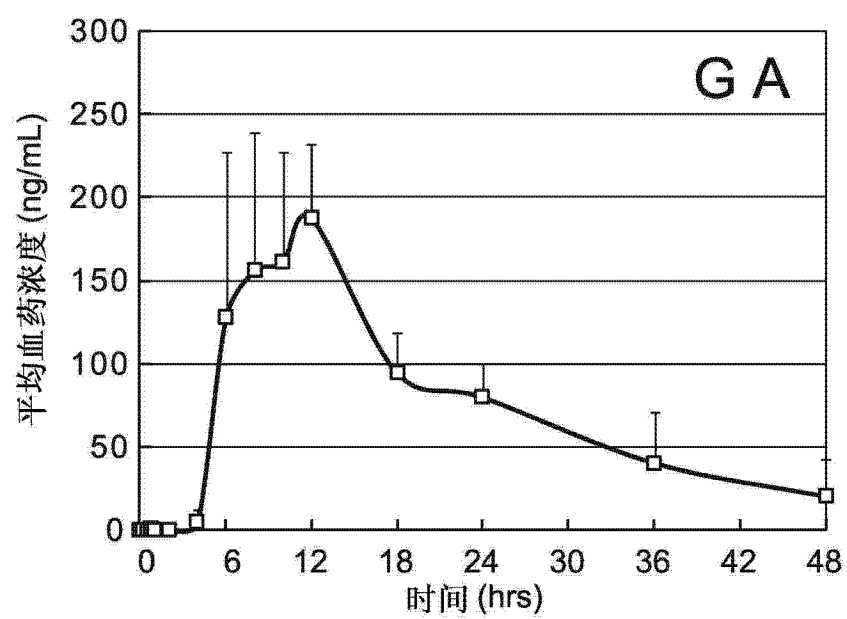


图 4