

吴启鑫,赵小亮,焦玥,等. 小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法建立与药代动力学特征研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1304-1313.

Wu QX, Zhao XL, Jiao Y, et al. Establishment of HPLC-MS/MS quantitative analysis method and pharmacokinetic characteristics of Flavokawain B of plasma in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1304-1313.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.008

小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法建立与药代动力学特征研究

吴启鑫^{1#},赵小亮^{1#},焦玥¹,罗明珠¹,王怡婷¹,李晶哲¹,
王靖怡¹,马琰岩¹,李涛^{1,2*},刘长振^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心,北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室,北京 100700;2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 建立小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的高效液相色谱-质谱联用 (HPLC/MS-MS) 定量分析方法,并研究其在小鼠体内的药代动力学特征。**方法** KM 小鼠采用尾静脉注射 (20 mg/kg)、腹腔注射 (20、40 和 60 mg/kg) 和灌胃 (200、400 和 600 mg/kg) 给药后,在 0、5、30 min 及 1、2、4、6、8、12、16 和 24 h 眼底静脉丛取血,分离血浆样品,HPLC-MS/MS 分析样品中黄卡瓦胡椒素 B 的浓度,计算药代动力学参数,并评价不同途径给药下黄卡瓦胡椒素 B 的生物利用度。**结果** 在 0.2 ~ 800.0 ng/mL 浓度范围内,黄卡瓦胡椒素 B 线性关系良好 ($r = 0.9995$),定量下限为 0.2 ng/mL,准确度在 -8.50% ~ 12.50%,精密度在 1.73% ~ 12.03%,且无明显基质效应 (88.68% ~ 102.04%),确证该方法适用于小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的定量分析。药代动力学结果显示,黄卡瓦胡椒素 B 腹腔注射和灌胃给药后在体内吸收迅速,血药浓度在给药 0.083 h 即为峰值,在腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg 和灌胃 200 ~ 600 mg/kg 给药范围内呈现良好的线性药代动力学过程。黄卡瓦胡椒素 B 的绝对生物利用度腹腔注射给药为 53.29%,灌胃给药为 1.38%。**结论** 本研究建立的 HPLC-MS/MS 定量分析方法,操作简便、准确、灵敏度高,成功应用于小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的药代动力学特征研究。

【关键词】 黄卡瓦胡椒素 B;药代动力学;生物利用度;HPLC-MS/MS

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1304-10

Establishment of HPLC-MS/MS quantitative analysis method and pharmacokinetic characteristics of Flavokawain B of plasma in mice

WU Qixin^{1#}, ZHAO Xiaoliang^{1#}, JIAO Yue¹, LUO Mingzhu¹, WANG Yiting¹,
LI Jingzhe¹, WANG Jingyi¹, MA Yanyan¹, LI Tao^{1,2*}, LIU Changzhen^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of TCM Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700)

Corresponding author: LIU Changzhen. E-mail:lcz0220@163.com; LI Tao. E-mail:hndxlitao@163.com

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目资助 (CI2021A05021), 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金资助 (JBGS2021004, ZZ2018009), 北京市自然科学基金资助项目 (7212187)。

Funded by CACMS Innovation Fund (CI2021A05021), the Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes (JBGS2021004, ZZ2018009), Beijing Municipal Natural Science Foundation (7212187).

【作者简介】 吴启鑫 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药活性物质的筛选及分析。Email: pharmacy_wu@163.com;
赵小亮 (1982—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 中药药代动力学。Email: 13215372@qq.com。
#共同第一作者

【通信作者】 刘长振 (1974—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 中药活性物质的筛选及分析。Email: lcz0220@163.com;
李涛 (1987—), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向: 中药药效物质基础、药代动力学及代谢流分析。Email: hndxlitao@163.com。
* 共同通信作者

[Abstract] Objective To create a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the quantitative analysis of Flavokawain B in plasma, and to investigate its pharmacokinetic characteristics in mice. **Methods** Flavokawain B was administered to KM mice via intravenous injection (20 mg/kg), intraperitoneal injection (20, 40, and 60 mg/kg), and intragastric (200, 400, and 600 mg/kg) routes. Blood was drawn from the venous plexus of the eye fundus at 0, 5, 30 min and 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, and 24 h and then the plasma was separated. Flavokawain B levels in the plasma samples were analyzed by HPLC-MS/MS, and its pharmacokinetic parameters and bioavailability following the different routes of administration were calculated. **Results** Flavokawain B showed a good linear relationship in plasma ($r = 0.9995$), with a low limit of quantification of 0.2 ng/mL, accuracy $-8.50\% \sim 12.50\%$, precision $1.73\% \sim 12.03\%$, and no obvious matrix effect ($88.68\% \sim 102.04\%$). HPLC-MS/MS was verified as a suitable method for the quantitative evaluation of Flavokawain B in mice plasma. Flavokawain B showed rapid absorption *in vivo*, with a peak of plasma concentrations at 0.083 h after intraperitoneal or intragastric administration. Flavokawain B showed good linear pharmacokinetics following intraperitoneal injection of 20 ~ 60 mg/kg and intragastric administration of 200 ~ 600 mg/kg. The absolute bioavailability of Flavokawain B was 53.29% following intraperitoneal injection and 1.38% following intragastric administration. **Conclusions** The current quantitative HPLC-MS/MS technique provides a straightforward, precise, and sensitive method for investigating the pharmacokinetics of Flavokawain B in mice.

[Keywords] Flavokawain B; pharmacokinetics; bioavailability; HPLC-MS/MS

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卡瓦胡椒 (*Piper methysticum*) 是一种原产于南太平洋地区的药食同源植物,属胡椒科,入药部位主要为根及根茎。在当地,卡瓦胡椒作为一种失眠、焦虑和更年期症状的自然疗法,现临床多用于镇静催眠、抗痉挛、局部麻醉、抗真菌等方面^[1-2]。近年,其相关制剂已作为非处方药或食品添加剂进入欧美国家,我国亦有相关报道^[2]。黄卡瓦胡椒素 B (Flavokawain B, FKB) 是从卡瓦胡椒中分离出来的一种天然甲氧基化查耳酮,具有抗炎^[3-4]、抗癌^[5-6]、镇痛^[7]、抗血管生成^[8-9]和免疫调节等多种治疗作用。FKB 在治疗恶性肿瘤方面表现出色,尤其是胃癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌,其开发前景令人瞩目,引起了全球的广泛关注^[5,10-14]。另外,FKB 有潜在的肝毒性报道^[9,15]。但截至目前,对 FKB 的体内过程了解尚不充分,为阐明 FKB 的药代动力学特征,本研究利用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 建立血药浓度定量分析方法,并进一步比较了静脉给药、腹腔注射和灌胃给药后血浆中 FKB 的药代动力学特征和生物利用度数据,这将为 FKB 药理机制、安全性研究和进一步开发提供方法和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

168 只 SPF 级雄性 KM 小鼠,7 ~ 8 周龄,体重 (31.0 ± 1.5) g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。在昼夜交替照明、恒温(23 ~ 25℃)、恒湿(49% ~ 51%)环境中喂养 3 d,适应饲养环境,自由饮食饮水。实验前禁食 12 ~ 16 h,自由饮水。所有动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所【SYXK(京)2021-0017】,实验均经过中国中医科学院医学实验中心伦理委员会批准(ERCCACMS21-2106-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

木犀草素(批号:RDD-00702005014)、黄卡瓦胡椒素 B(批号:RDD-H-02802301004)购于成都瑞芬思德丹生物科技有限公司,纯度均大于 98%;二甲亚砜(Sigma 公司,批号:103209528),羧甲基纤维素钠(国药集团,批号:20120330),Tween80(MCE 公司,批号:HYS000006634),PEG-300(MCE 公司,批号:HYW000084018);甲醇、乙腈(LC/MS 级,北京迪马公司),甲酸(LC/MS 级,美国 Sigma 公司),甲酸铵(LC/MS 级,美国 Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。

Targin VX-Ⅲ多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);Milli-Q Integral 5 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Rotanta 460R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司)。HPLC-MS/MS 系统(美国 AB Sciex 公司),包括 ExionLC-20AC 高效液相色谱仪、Ion Drive™ Turbo V 离子源、Sciex6500+ 三重四极杆检测器、Analyst 1.7 数据采集系统和 MutiQuant 3.0.3 数据处理系统等。

1.2 方法

1.2.1 药品配制

(1)尾静脉注射组和腹腔注射组:称取适量的 FKB,加入所需药液体积的 4%二甲基亚砜,充分振荡使药物完全溶解,再加入所需药液体积的 40% PEG-300 和 5% Tween80,最后加入剩余体积的生理盐水,振荡并超声处理 60 s,配制成 4 mg/mL、8 mg/mL、12 mg/mL 的 FKB 溶液。

(2)灌胃组:称取适量的 FKB,加入 4%二甲基亚砜和 5% Tween80,混合后溶于 0.5%羧甲基纤维素钠,振荡并超处理声 60 s,最终配制成 40 mg/mL、80 mg/mL、120 mg/mL 的 FKB 溶液。

1.2.2 动物实验

7 周龄雄性 KM 小鼠,随机分成 7 个组:(1)尾静脉注射组(*i.v.* 20 mg/kg)、(2)低剂量腹腔注射组(*i.p.* 20 mg/kg)、(3)中剂量腹腔注射组(*i.p.* 40 mg/kg)、(4)高剂量腹腔注射组(*i.p.* 60 mg/kg)、(5)低剂量灌胃组(*i.g.* 200 mg/kg)、(6)中剂量灌胃组(*i.g.* 400 mg/kg)、(7)高剂量灌胃组(*i.g.* 600 mg/kg),每个组由 24 只小鼠组成 11 个取血时间点(每只小鼠 3 个取血时间点),每个时间点平行 6 只小鼠。实验于小鼠给药后 0、5、30 min 及 1、2、4、6、8、12、16、24 h,于眼底静脉丛取血 100 μ L,迅速装入 EDTA·Na₂抗凝管中,在 4℃ 4362 r/min 条件下离心 15 min,弃沉淀,取上层血浆装于新 Ep 管中,-80℃ 保存备用。

1.2.3 样品溶液配制

(1)对照品溶液配制:精密称取 FKB 对照品约 10 mg,倒入 5 mL 容量瓶中,加入甲醇,超声 5 min 助溶,将溶液稀释至刻度,摇匀即得。所配制贮备液浓度为 2 mg/mL,逐级稀释后得到 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、61.5、125.0、250.0、500.0、1000.0、2000.0 和 4000.0 ng/mL 浓度的对照品系列溶液,置于-80℃ 保存备用。

(2)内标溶液配制:精密称取木犀草素对照品约 10 mg,倒入 5 mL 容量瓶中,后加入甲醇,超声 5 min 助溶,将溶液稀释至刻度,摇匀即得内标母液,-80℃ 冰箱中备用。临用前用甲醇将内标母液稀释成 10 μ g/mL 的内标溶液。

(3)质量控制(QC)样品的配制:取低、中、高 3 个浓度的对照品溶液,加入一定量的空白血浆充分混合,摇匀即得低浓度质控(LQC,0.5 ng/mL)、中浓度质控(MQC,20 ng/mL)和高浓度质控(HQC,

600 ng/mL)样品,置于-80℃ 条件下保存备用。

1.2.4 血浆样品的处理

血浆样品在室温下融化后,充分混匀,精密量取 50 μ L,置于 0.6 mL 干净离心管中,精密加入 10 μ L 内标溶液和 140 μ L 乙腈,6000 r/min 涡旋混合 5 min,4℃ 13 795 r/min 离心 10 min,取上清液,4℃ 13 795 r/min 再次离心 10 min,取上清待测。

1.2.5 HPLC-MS/MS 条件

(1)色谱条件:色谱柱为 XSelect[®] HSS T3 色谱柱(2.5 μ m,2.1 $\times$ 50 mm,美国 Waters 公司);流动相为 A(水,含 0.1%甲酸):B(乙腈-异丙醇[50:50]),梯度洗脱程序如下:0 ~ 4.0 min,20% ~ 100% B;4.0 ~ 6.0 min,100% B ~ 100% B;6.0 ~ 6.1 min,100% B ~ 20% B;6.1 ~ 8.0 min,20% B ~ 20% B。柱温为 35℃;样品室温度为 4℃;流速为 0.3 mL/min;进样量为 2 μ L。

(2)质谱条件:电喷雾离子源(ESI),气帘气(N₂)为 40 psi,碰撞气(N₂)为 9 psi,喷雾电压为 +5500 V,雾化温度为 550℃,雾化气(GS1,N₂)和辅助气(GS2,N₂)均为 55 psi。实验采用多反应监测(MRM)模式正离子扫描,FKB 和内标木犀草素离子对及相应的去簇电压、碰撞能量、保留时间等质谱参数见表 1。

1.2.6 方法学的建立与验证

(1)选择性:随机取 6 只小鼠空白血浆,除不加内标(等体积纯水替代)外,按“1.2.4”项下方法操作,进行 HPLC-MS/MS 分析,并记录相应的色谱图。通过色谱图比较定量限(limit of quantification,LOQ)样品、小鼠空白血浆样品和小鼠给药后血浆样品,考察该方法的选择性。

(2)线性范围及定量限:取 FKB 对照品系列溶液,分别随机加入小鼠空白血浆,得到 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.1、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 和 800.0 ng/mL 的模拟生物样品,同样按“1.2.4”项下方法操作,进行 HPLC-MS/MS 分析。横坐标 X 为血浆样品中待测物的浓度,纵坐标 Y 为待测物与内标的峰面积比值,1/X 为权重系数,回归分析采用加权最小二乘法,最终得到各成分的标准曲线和线性范围。各成分的 LOQ 经信噪比 S/N = 10 计算,并以 LOQ 作为标准曲线的最低浓度点。

(3)基质效应与提取回收率:取 QC 和 LOQ 样品,每一浓度配制 6 份,按“1.2.4”项下方法操作,进样分析得到 FKB 与内标的色谱峰面积比值 A;取

用纯水配制以上等浓度的样品,进样分析得到 FKB 与内标的色谱峰面积比值 B;另随机取空白血浆,按“1.2.4”项下方法操作,上述相应等浓度的对照品和内标溶液分别加入于经提取的上清液中,进样分析后可得 FKB 与内标的色谱峰面积比值 C。A 与 B 的比值即基质效应,A 与 C 的比值即提取回收率。

(4)准确度与精密度:LOQ 样品和 QC 样品 1 d 之内测定 6 次,且连续 3 d 检测,计算日内、日间精密度及准确度。

(5)残留:取定量上限样品,按“1.2.4”项下方法操作,然后进样空白样品;该循环连续操作 3 次,之后统一分析各待测物的残留。

(6)稀释可靠性:配制 6 份模拟生物样品,约 10 倍 QC 样品浓度(6000 ng/mL),稀释到 600 ng/mL(使用空白血浆稀释),如“1.2.4”的步骤操作,进样以分析,并计算稀释后样品的准确度及精密度。

(7)稳定性:配制 3 份相同浓度的 QC 样本,按“1.2.4”步骤操作,考察室温稳定性是通过室温放置 0.5 h 和 2 h;考察后期稳定性是通过 4℃ 条件下放置 12 h 和 24 h;考察冻融稳定性是通过-80℃ 冻存,室温融化,重复 3 次;考察长期稳定性是通过-80℃ 冻存 1 个月。

取 QC 样品,每一浓度配制 3 份,并按“1.2.4”项下方法操作,在 4℃ 放置 12 h 和 24 h,考察后期稳定性;在室温下放置 0.5 h 和 2 h,考察室温稳定性;经历 3 次冻融(-80℃ 冻存,室温融化),考察冻融稳

定性;在-80℃ 条件下冷冻 1 个月,考察长期稳定性。

1.3 统计学分析

本实验使用 MutiQuant(版本:3.0.3,美国 AB Sciex 公司)处理数据,Origin Pro 2016(版本:b9.3.226,美国 OriginLab 公司)和 ChemBioDraw Ultra(版本:14.0,美国 PerkinElmer 公司)绘图 DAS 软件(版本:3.0,上海博佳医药)的非房室模型计算药代参数。最大血药浓度(C_{max})和达峰时间(T_{max})均为实测值,采用梯形法计算时间浓度曲线下面积(AUC),使用 AUC_{0-t} 和相应给药剂量进行多剂量线性关系分析。

2 结果

2.1 质谱分析

选择低分子质量模式下进行 FKB 的质谱分析,结果正离子模式监测优于负离子模式,在正离子模式下 FKB 主要生成 $[M+H]^+$ 峰。对 $[M+H]^+$ 峰的主要碎片离子进行扫描分析,结果见图 1。

选择丰度最高且稳定性好的离子对(285.1/181.1)作为定量离子对用于 FKB 的定量分析,另外选择一对丰度高且稳定性好的离子对(285.1/131.1)作为定性离子对用于 FKB 的确认。

由于 FKB 尚无商业化的稳定同位素标记物可供使用,本实验选择的内标是黄酮类化合物木犀草素,在正离子模式下对木犀草素进行离子扫描和离子对优化,结果见图 1。在 MRM 模式下,FKB 和内

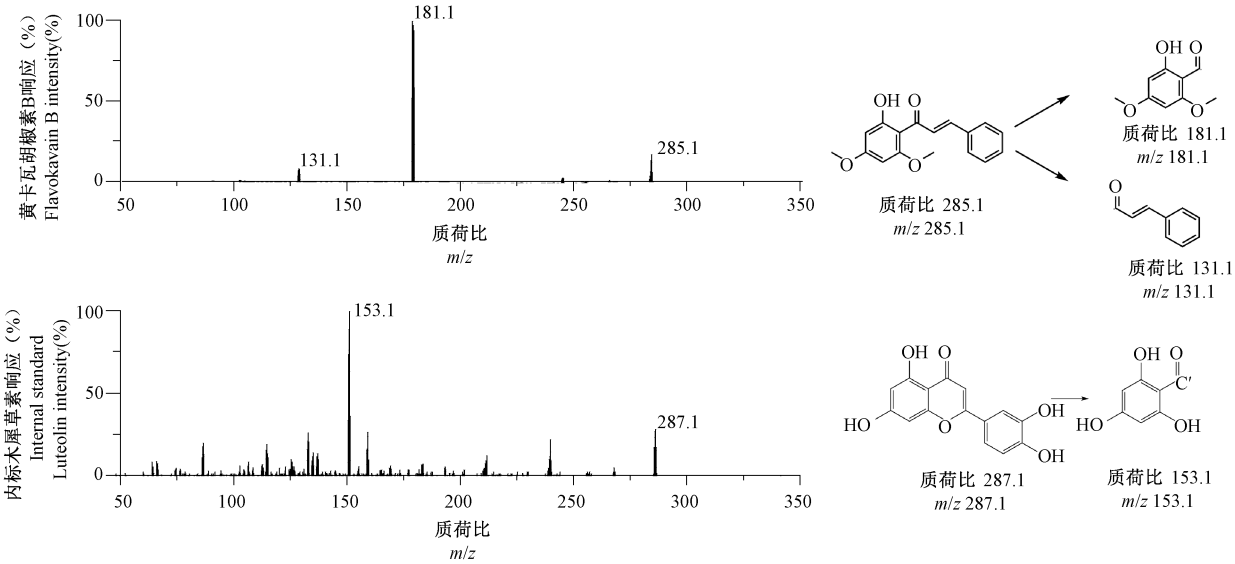


图 1 质谱碎片及可能的裂解过程

Figure 1 Product ion spectra and chemical structures with the fragmentation pattern

标本犀草素的各离子对的保留时间、碰撞能量和去簇电压等液相-质谱参数结果见表 1。

2.2 方法学考察

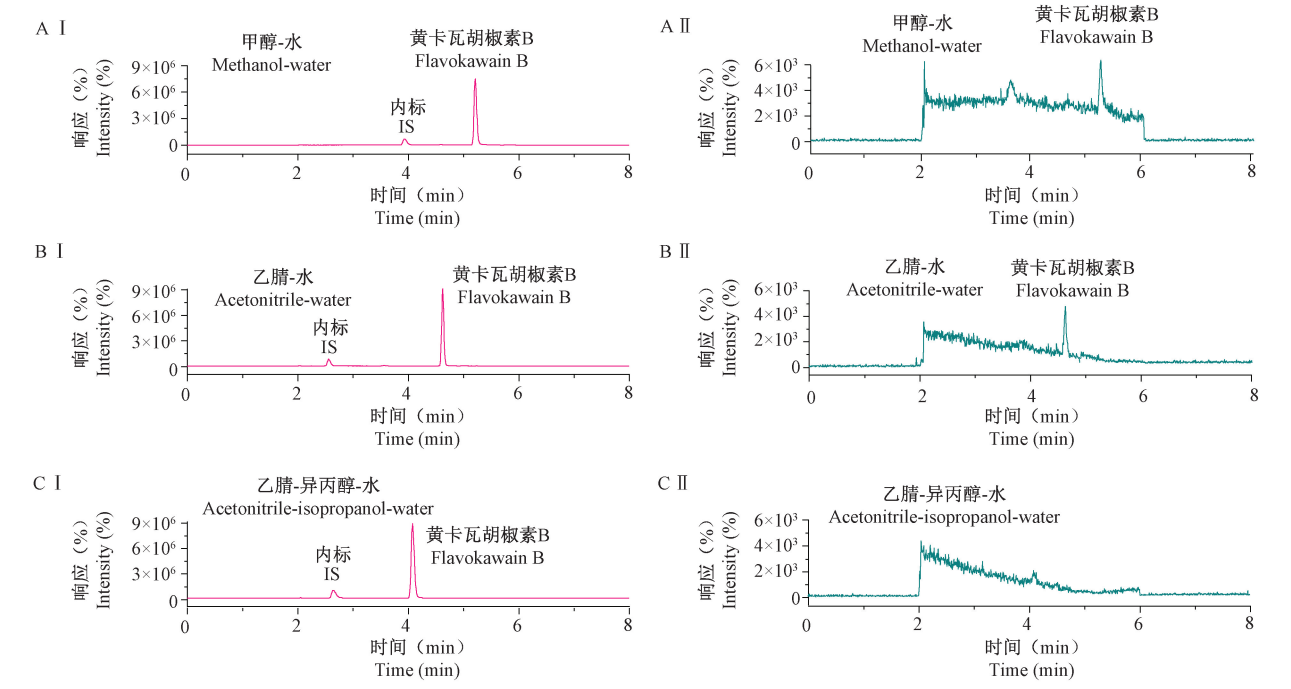
2.2.1 残留效应

使用含高浓度 FKB 的模拟生物样品 (800 ng/mL) 及内标, 考察 XSelect® HSS T3、XSelect® HSS

PFP 等不同色谱柱的残留, 结果 XSelect® HSS T3 色谱柱残留最少; 考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-异丙醇-水等不同洗脱体系下系统的残留, 结果乙腈-异丙醇-水洗脱条件下残留最少, 结果见图 2。因此使用 XSelect® HSS T3 色谱柱以乙腈-异丙醇-水为洗脱相来进行方法学的验证。

表 1 黄卡瓦胡椒素 B 和内标本犀草素优化后的液相质谱质谱参数

Table 1 Optimized liquid chromatography-mass spectrometry parameters of Flavokawain B and internal standard luteolin					
分析物 Analyte	离子对 Ion pair	驻留时间 (ms) Dwell time (ms)	去簇电压 (V) De-clustering voltage (V)	碰撞能量 (eV) Collision energy (eV)	保留时间 (min) Retention time (min)
黄卡瓦胡椒素 B Flavokawain B	285. 1/181. 1	100	105	27	4. 06
木犀草素 (内标) Luteolin (Internal standard)	287. 1/153. 1	100	150	44	2. 65



注: A I, A II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在甲醇-水洗脱体系下残留的离子流图; B I, B II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在乙腈-水洗脱体系下残留的离子流图; C I, C II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在乙腈-异丙醇-水洗脱体系下残留的离子流图。

图 2 不同洗脱体系下的残留色谱图

Note. A I, A II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in methanol-water elution system. B I, B II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in acetonitrile-water elution system. C I, C II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in acetonitrile isopropanol water elution system.

Figure 2 Carry-over results under different elution systems

2.2.2 提取溶剂选择

将含 FKB 的模拟生物样品 (100 ng/mL) 按“1.2.4”项下方法操作, 考察 FKB 和内标本犀草素在 3 倍甲醇和 3 倍乙腈提取条件下的提取率。提取率结果表明 3 倍乙腈 (FKB 为 97.08% ± 6.60%、IS 为 92.12% ± 4.24%) 稍优于 3 倍甲醇 (FKB 为

84.70% ± 1.89%、IS 为 96.83% ± 4.50%), 因此采用 3 倍乙腈作为提取溶剂进行后续方法学验证。

2.3 方法学确证

2.3.1 方法的选择性

如图 3 所示, 待测成分峰形和分离效果较好, FKB 出峰时间约为 4.06 min, 内标出峰时间约为

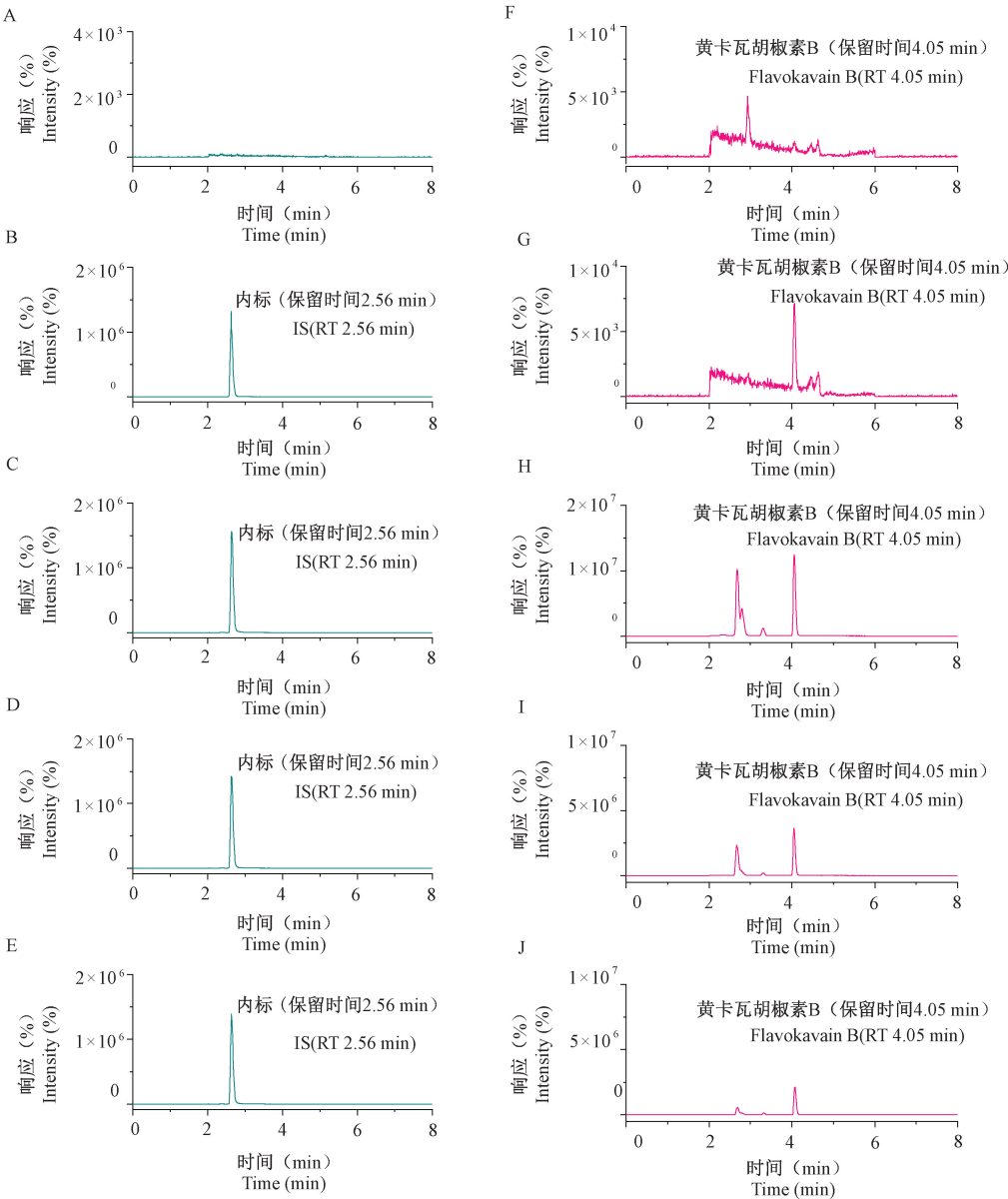
2. 65 min,小鼠血浆和脑组织中的内源性物质、代谢产物等基本不干扰以上成分的检出。

2. 3. 2 线性范围及定量限

血浆中 FKB 典型的标准曲线回归方程为 $Y = 0.010X + 0.0033$, 相关系数 r 为 0.9995, 在 0.2 ~ 800 ng/mL 范围内线性关系良好, 经信噪比 $S/N = 10$ 计算的 LOQ 为 0.2 ng/mL。

2. 3. 3 基质效应与提取回收率

LOQ 样品及各浓度 QC 样品的基质效应为 88.68% ~ 102.04%, 提取回收率在 95.42% ~



注:A,F:空白血浆样品提取离子流图;B,G:空白血浆样品加入内标(IS,木犀草素)和FKB(LOQ浓度,0.2 ng/mL)的提取离子流图;C,H:小鼠尾静脉注射给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图;D,I:小鼠腹腔注射给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图;E,J:小鼠灌胃给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图。

图3 血浆中黄卡瓦胡椒素B和内标的MRM色谱图

Note. A, F. Extracted ion chromatogram of blank plasma sample. B, G. Blank plasma samples spiked with internal standard (IS, luteolin) and Flavokawain B (LOQ concentration, 0.2 ng/mL). C, H. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intravenous injection in mice. D, I. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intraperitoneal injection in mice. E, J. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intragastric administration in mice.

Figure 3 Multiple reactions monitoring chromatogram of Flavokawain B and internal standard in plasma

101.55%,表明样品提取和分析方法良好。

2.3.4 准确度与精密度

结果显示, LOQ 相对误差在 $-4.45\% \sim 12.50\%$,各浓度 QC 样品相对误差在 $-8.50\% \sim 9.70\%$;日内和日间精密度 LOQ 样品的 RSD 在 13.00% 以内,各浓度 QC 样品的 RSD 在 10.00% 以内,表明分析方法准确、稳定可行。

2.3.5 残留与稀释效应

进样高浓度 QC 样品后,空白样品的残留均低于内标响应的 0.03% ,低于 LOQ 样品的 11.03% ;稀释后样品准确度为 $2.43\% \sim 8.62\%$,精密密度为 2.48% ,表明分析方法的残留及稀释可靠性良好。

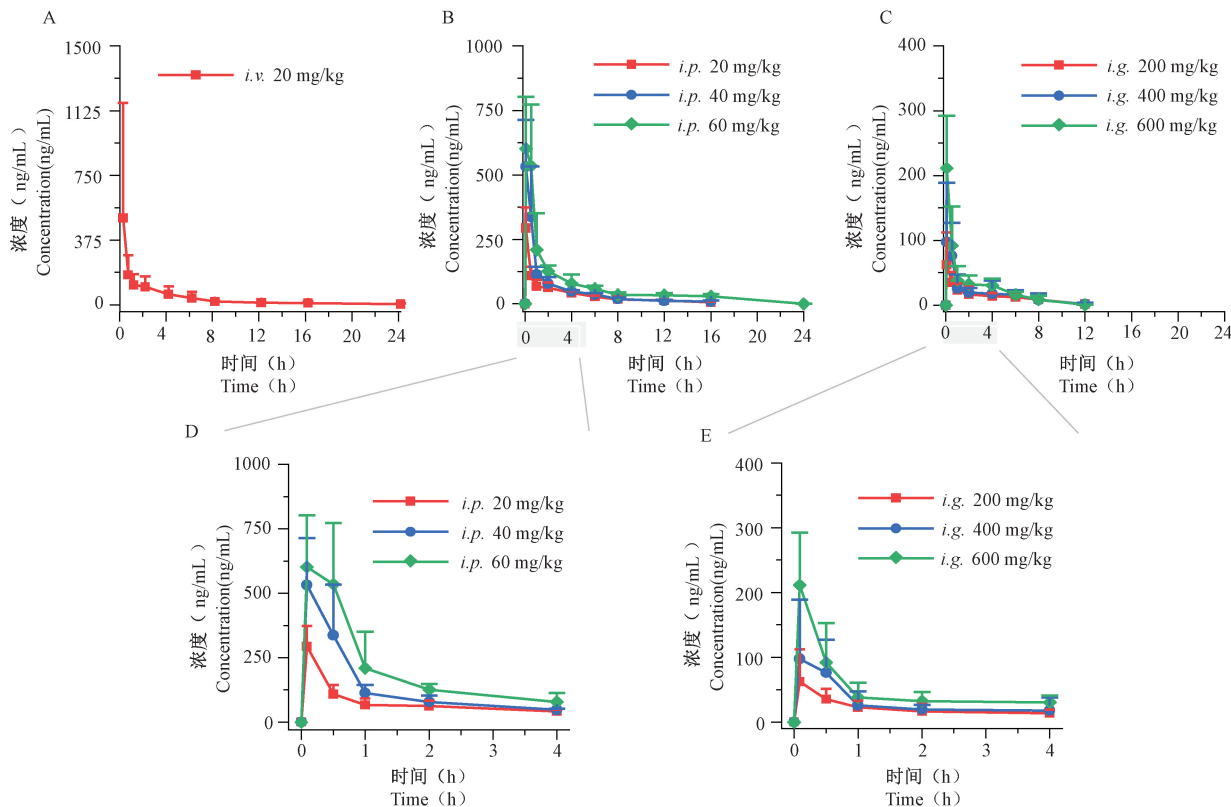
2.3.6 稳定性

测定低、中、高浓度 QC 样品在不同处理条件的

稳定性,实验结果表明 FKB 在室温放置 2 h(回收率: $92.89\% \sim 109.20\%$),经过 3 次冻融(回收率: $95.69\% \sim 103.98\%$), -80°C 条件下储存 1 个月(回收率: $90.86\% \sim 103.46\%$),及处理后的样品在进样室内放置 24 h(回收率: $109.04\% \sim 111.70\%$),稳定性基本良好。

2.4 药代动力学结果

小鼠在静脉(20 mg/kg)、腹腔注射(20 、 40 和 60 mg/kg)和灌胃(200 、 400 和 600 mg/kg)给药后未发现明显不良反应,FKB 的平均药时浓度曲线见图 4,计算的主要药代动力学参数见表 2。FKB 在小鼠体内吸收速度很快,各给药组在第 1 个采血时间点 0.083 h 即为峰值;体内滞留时间 MRT_{0-t} 较短,为 $2.78 \sim 4.51\text{ h}$;表观分布容积较大,均高于 243.63 L/kg 。与尾静脉注射和腹腔注射给药(半衰期:



注:A:小鼠尾静脉注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;B:小鼠腹腔注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;C:小鼠灌胃给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;D:小鼠腹腔注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 在 $0 \sim 4\text{ h}$ 的平均药时浓度曲线局部放大图;E:小鼠灌胃给药后黄卡瓦胡椒素 B 在 $0 \sim 4\text{ h}$ 的平均药时浓度曲线局部放大图。

图 4 小鼠给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intravenous injection in mice. B. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intraperitoneal injection in mice. C. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intragastric administration in mice. D. Partially enlarged plot of the mean concentration-time curve of Flavokawain B from $0 \sim 4\text{ h}$ after intraperitoneal injection in mice; E. Partially enlarged view of the mean concentration-time curve of Flavokawain B in mice after intragastric administration from $0 \sim 4\text{ h}$.

Figure 4 Mean concentration-time curve of Flavokawain B in mice after administration($\bar{x} \pm s, n = 6$)

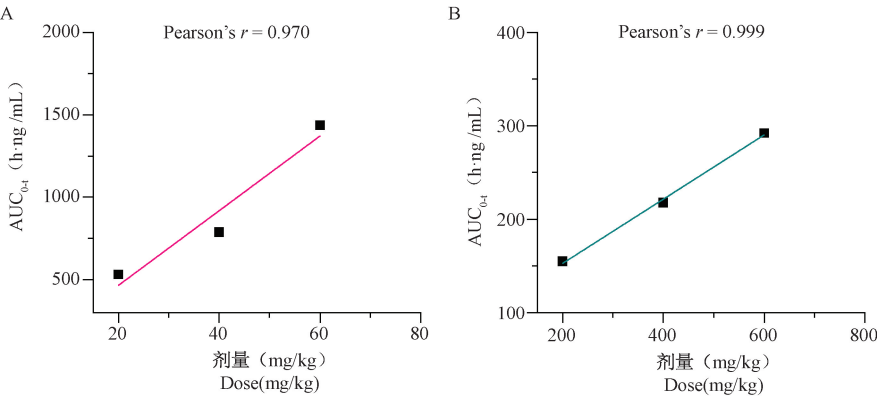
表 2 小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃黄卡瓦胡椒素 B 后血浆中药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of plasma Flavokawain B in mice after intravenous injection, intraperitoneal injection, and intragastric administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数 Parameter	<i>i.v.</i> 20 (g/kg)	<i>i.p.</i> 20 (mg/kg)	<i>i.p.</i> 40 (mg/kg)	<i>i.p.</i> 60 (mg/kg)	<i>i.g.</i> 200 (mg/kg)	<i>i.g.</i> 400 (mg/kg)	<i>i.g.</i> 600 (mg/kg)
AUC ₀₋₄ (h·ng/mL)	852.940	529.320	786.960	1436.280	154.490	217.640	292.130
AUC _{0-∞} (h·ng/mL)	898.820	578.840	898.560	1437.080	158.310	341.190	299.710
MRT ₀₋₄ (h)	4.510	4.220	3.270	5.090	3.730	3.580	2.780
MRT _{0-∞} (h)	6.060	5.830	6.350	5.100	3.990	11.250	3.090
t _{1/2α} (h)	7.600	4.890	8.330	2.040	1.810	8.840	2.180
T _{max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
V _z /F (L/kg)	244.060	243.630	534.920	122.950	329.080	1495.880	630.400
CL _z /F L/(h·kg)	22.250	34.550	44.520	41.750	126.340	117.240	200.200
C _{5 min} or C _{max} (ng/mL)	503.860	294.160	532.460	602.390	62.290	97.510	211.440
F (%)	—	62.060	46.130	56.130	1.810	1.280	1.140

4.89 ~ 9.70 h;清除率:22.25 ~ 44.23 L/(h·kg) 相比,FKB 灌胃给药体内半衰期(1.71 ~ 2.78 h)明显减小;清除率(1263.38 ~ 2001.95 L/(h·kg))明显加快。与静脉给药相比,腹腔注射 FKB 的绝对生物利用度为 46.31% ~ 62.06%,灌胃 FKB 的绝对生物

利用度仅为 1.14% ~ 1.81%。腹腔注射和灌胃给药 FKB 多剂量线性关系分析结果见图 5,可知小鼠在腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg 及灌胃 200 ~ 600 mg/kg 给药剂量范围内,药代动力学过程呈明显的线性关系(Pearson's $r > 0.97$)。



注:A:小鼠腹腔注射给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC₀₋₄与给药剂量间的线性关系;B:小鼠灌胃给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC₀₋₄与给药剂量间的线性关系。

图 5 小鼠给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC₀₋₄与给药剂量间的线性关系($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. The linear relationship between AUC₀₋₄ and dosage of Flavokawain B in plasma after intraperitoneal injection in mice. B. The linear relationship between AUC₀₋₄ and dosage of Flavokawain B in plasma after intragastric administration in mice.

Figure 5 Linear relationship between AUC₀₋₄ and the dosage of Flavokawain B in the plasma of mice after administration($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

关于卡瓦胡椒相关制剂中 FKB 的含量测定方法有多种,如 HPLC-紫外光谱法、高效薄层色谱法、核磁共振波谱法和 HPLC-MS 法等^[16-19],但 FKB 在生物样品中检测方法的报道相对较少。Kanumuri 等^[17]报道了健康志愿者血浆中 FKB 的超高效液相(UHPLC)-MS 方法,Yang 等^[20]报道了大鼠血浆中 FKB 的 UHPLC-MS 方法,以上检测方法的血浆样品

来源分别为人和大鼠,定量限分别为 0.25 ng/mL 和 0.53 ng/mL,在小鼠血浆中 FKB 的检测方法尚未见报道。为深入了解 FKB 在小鼠体内的药代动力学特征,本研究利用 HPLC-MS/MS 建立灵敏、准确度高的血药浓度分析方法,并进一步探讨该方法在小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃给药不同剂量后血药浓度分析的适用性,这将为后期 FKB 在小鼠体内药理机制和安全性研究提供依据。在前期实验中,发现 FKB 容易在色谱柱残留,因此优化了不同色谱

柱和不同洗脱条件的残留,提高了 FKB 的检测准确度,同时还考察了样品的稀释效应,控制定量上限,达到进一步减少 FKB 残留的目的。并且,通过色谱柱等液相条件和质谱参数的优化,本方法检测 FKB 的 LOQ 低至 0.20 ng/mL,和上述方法相比有一定的提高。本文建立的 FKB 的 HPLC-MS/MS 分析方法,经验证符合中国药典《生物样品分析方法指导原则》的要求^[21],可同时满足小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃给药不同剂量 FKB 后血浆中药物浓度的样品检测(0.34 ~ 1814.32 ng/mL),并完整绘制了各给药途径血浆中 FKB 的药时曲线,成功用于 FKB 的药代动力学特征及生物利用度研究。

文献报道 FKB 小鼠灌胃剂量为 500 mg/kg^[22],在此基础上依据初步的急性毒性结果对剂量进行了探索,FKB 的最终剂量范围设计为腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg、灌胃 200 ~ 600 mg/kg,尾静脉注射为 20 mg/kg。在整个实验过程中小鼠状态良好,未发现明显不良反应。

小鼠灌胃和腹腔注射后,FKB 吸收速度很快,血药浓度在给药后第一个采血时间点 5 min 即为峰值,通过 PubChem 网站查询 FKB 的油水分分配系数 LogP 为 3.8,说明 FKB 的脂溶性高、渗透性高,这可能是其体内迅速吸收的重要原因。FKB 表观分布容积(高于 243.63 L/kg)远大于小鼠的体液体积(0.73 L/kg)^[23],说明 FKB 在小鼠体内的分布极为广泛。FKB 灌胃给药的绝对生物利用度极差(1.38%),这与灌胃给药的体内消除半衰期较短及清除率较快有关。文献报道查尔酮等黄酮类成分代谢稳定性差,口服后以原型形式吸收入血少,并且药物极易受胃酸、消化酶和肠道菌群的影响^[24-25],亦能导致进入体循环的药量相对变少,这提示在后期 FKB 的相关制剂开发过程中对生物利用度需要特别关注。另外,在 FKB 质谱检测的 285.1/181.1 离子对通道上约 2.69 min 处有一色谱峰(图 3H ~ 3J),并随 FKB 的浓度变化而呈规律性变化,推断可能是 FKB II 相代谢物,如 FKB 的葡萄糖醛酸苷等进一步电离而形成的。关于 FKB 体内主要代谢物及相关活性的研究,课题组未来将进一步探索。FKB 腹腔注射给药的绝对生物利用度为 53.29%,相比灌胃给药有很大提升,并且在 20 ~ 60 mg/kg 给药剂量范围内呈现线性的药代动力学过程,这为使用腹腔给药进行 FKB 相关药理机制的探索提供了依据。

在研究中,发现受试药物 FKB 溶解度低(0.012 g/L, 25℃),几乎不溶于水,因而使用 5% Tween80 和 4% DMSO 辅料助溶。虽然 Tween80 和 DMSO 是科研常用的助溶剂,但我国近年临床研究发现,不少品种中药注射剂出现的严重不良反应均与使用了 Tween80 相关^[26-27]。此外,高剂量的 DMSO 静脉注射可能也会带来副作用^[28]。因此,本研究中静脉注射方式给药在助溶剂用量上存在一定的不足之处。在未来研究中,将尝试通过化学修饰等手段增加 FKB 溶解度或减少药物起效浓度等方式来减少助溶剂的用量,进而再次开展其药代动力学相关研究。总之,本研究建立的 HPLC/MS-MS 测定小鼠血浆中 FKB 的方法简便、准确、灵敏度高,适用于 FKB 在小鼠血浆中药代动力学特征和生物利用度研究,研究结果为 FKB 相关制剂的进一步研究开发提供了新方法和数据参考。

参 考 文 献(References)

- [1] 韦琨, 窦德强, 裴玉萍, 等. 胡椒的化学成分、药理作用及与卡瓦胡椒的对比 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 328-333.
Wei K, Dou DQ, Pei YP, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of pepper and comparison with kava pepper [J]. Chin J Chin Mater Med, 2002, 27(5): 328-333.
- [2] 王厄舟, 潘胜利, 张淑芳. 卡瓦胡椒化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 855-858.
Wang EZ, Pan SL, Zhang SF. Advances in chemical and pharmacological studies on kava *Piper methysticum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2001, 32(9): 855-858.
- [3] Lin CT, Senthil Kumar KJ, Tseng YH, et al. Anti-inflammatory activity of Flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(14): 6060-6065.
- [4] Yiannis C, Huang K, Tran AN, et al. Protective effect of kava constituents in an *in vitro* model of oral mucositis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(7): 1801-1811.
- [5] Abu N, Mohamed NE, Yeap SK, et al. *In vivo* antitumor and antimetastatic effects of Flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 1401-1417.
- [6] Celentano A, Tran A, Testa C, et al. The protective effects of Kava (*Piper methysticum*) constituents in cancers: a systematic review [J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(7): 510-529.
- [7] Mohamad AS, Akhtar MN, Zakaria ZA, et al. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, Flavokawain B on chemical and thermal models of nociception in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 647(1-3): 103-109.
- [8] Rossette MC, Moraes DC, Sacramento EK, et al. The *in vitro* and *in vivo* antiangiogenic effects of Flavokawain B [J]. Phytother Res, 2017, 31(10): 1607-1613.

- [9] Abu N, Mohameda NE, Tangarajoo N, et al. *In vitro* toxicity and *in vivo* immunomodulatory effects of Flavokawain A and flavokawain B in balb/C mice [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10 (7): 1199–1202.
- [10] Hua R, Pei Y, Gu H, et al. Antitumor effects of Flavokawain B flavonoid in gemcitabine resistant lung cancer cells are mediated via mitochondrial-mediated apoptosis, ROS production, cell migration and cell invasion inhibition and blocking of PI3K/AKT Signaling pathway [J]. J BUON, 2021, 26(2): 645.
- [11] Palko-Łabuz A, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T, et al. Cyclization of flavokawain B reduces its activity against human colon cancer cells [J]. Hum Exp Toxicol, 2020, 39(3): 262–275.
- [12] Hseu YC, Lin RW, Shen YC, et al. Flavokawain B and doxorubicin work synergistically to impede the propagation of gastric cancer cells via ROS-mediated apoptosis and autophagy pathways [J]. Cancers, 2020, 12(9): 2475.
- [13] Li X, Pham V, Tippin M, et al. Flavokawain B targets protein neddylation for enhancing the anti-prostate cancer effect of Bortezomib via Skp2 degradation [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 25.
- [14] Zhu Y, Fan W, Wang Y, et al. Flavokawain B weakens gastric cancer progression via the TGF- β 1/SMAD4 pathway and attenuates M2 macrophage polarization [J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 4903333.
- [15] Jhoo JW, Freeman JP, Heinze TM, et al. *In vitro* cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*) [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 3157–3162.
- [16] Zenger K, Agnolet S, Schneider B, et al. Biotransformation of Flavokawains A, B, and C, chalcones from kava (*Piper methysticum*), by human liver microsomes [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(28): 6376–6385.
- [17] Kanumuri SRR, Mamallapalli J, Nelson R, et al. Clinical pharmacokinetics of kavalactones after oral dosing of standardized kava extract in healthy volunteers [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297: 115514.
- [18] Meissner O, Häberlein H. HPLC analysis of Flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* forst [J]. J Chromatogr B, 2005, 826(1–2): 46–49.
- [19] Dharmaratne HR, Dhammika Nanayakkara NP, Khan IA. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ^{13}C NMR spectroscopic analyses [J]. Phytochemistry, 2002, 59(4): 429–433.
- [20] Yang X, Zan T, Yan H, et al. UPLC-MS/MS determination of flavokawain B, a novel anti-tumor chemotherapeutic agent in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study in rats [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(2): e4391.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part IV [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press; 2020.
- [22] Narayanapillai SC, Leitzman P, O'Sullivan MG, et al. Flavokawains A and B in kava, not dihydromethysticin, potentiate acetaminophen-induced hepatotoxicity in C57BL/6 mice [J]. Chem Res Toxicol, 2014, 27(10): 1871–1876.
- [23] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. Pharm Res, 1993, 10(7): 1093–1095.
- [24] Wang X, Chen B, Xu D, et al. Molecular mechanism and pharmacokinetics of flavonoids in the treatment of resistant EGF receptor-mutated non-small-cell lung cancer: a narrative review [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(6): 1388–1406.
- [25] Rudrapal M, Khan J, Dukhyil AAB, et al. Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics [J]. Molecules, 2021, 26(23): 7177.
- [26] 邱玲, 段为钢. 注射用聚山梨酯 80 的安全性分析 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(6): 90–95.
- Qiu L, Duan WG. Analysis on the safety of the excipient polysorbate 80 for injection [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(6): 90–95.
- [27] 张伟, 殷华, 李月, 等. 中药注射剂中增溶性辅料聚山梨酯 80 的安全性问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (20): 160–165.
- Zhang Y, Yin H, Li Y, et al. Analysis on safety of polysorbate 80 as a solubilizing excipient in traditional Chinese medicine injections [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25 (20): 160–165.
- [28] 贾国荣, 谢波. 二甲基砒临床应用的国内研究现状 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1284–1286.
- Jia GR, Xie B. Research status of safety of clinical application of dimethyl sulfoxide at home and abroad [J]. Int J Lab Med, 2010, 31(11): 1284–1286.

[收稿日期] 2023-03-03