

此本实验中基质效应的存在不影响分析方法的重现性和准确性。

比格犬静注知母皂苷 B-II 后, $t_{1/2}$ 和 MRT_{0-4} 分别为 7.81, 2.89 h, 我们前期的实验结果显示 SD 大鼠静注知母皂苷 B-II 后, $t_{1/2}$ 和 MRT_{0-4} 分别为 1.63, 0.71 h^[10], 与 SD 大鼠相比, 比格犬给药后二者均显著延长, 表明知母皂苷 B-II 静注给药后在比格犬体内代谢更慢, 驻留时间更长, 并且知母皂苷 B-II 口服给药后情况与之类似^[10-11]。以上结果表明知母皂苷 B-II 在不同种属动物间代谢情况可能存在较大差异。知母皂苷 B-II 在比格犬体内的口服生物利用度仅为 0.72 %, 比 SD 大鼠的 1.1 % 更低^[10], 表明知母皂苷 B-II 在两种动物体内的口服吸收均较差, 其原因可能与首过效应、胃肠道降解及难以透过小肠黏膜层等有关, 将在后续实验中作进一步的研究。

本文根据新药非临床药代动力学研究的有关原则^[12], 在前期选用啮齿类动物 SD 大鼠的基础上, 再选用另一种非啮齿类动物比格犬作为实验对象, 对知母皂苷 B-II 的药代动力学规律进行了临床前研究, 结果表明其在两种动物体内的口服生物利用度均较低, 因此, 在选择新药剂型和给药方式时应充分考虑此特点。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 197-198.
- [2] 蔡飞, 王维泓, 高守红, 等. 知母皂苷及其苷元的药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5): 331-335.
- [3] 邓云, 马百平, 从玉文, 等. 知母皂苷 B II 对 A β 25-35 诱导的原代大鼠神经细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 244-247.
- [4] Lu WQ, Qiu Y, Li TJ, et al. Timosaponin B-II inhibits pro-inflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(9): 1301-1308.
- [5] Zhang J, Meng Z, Zhang M, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from Anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood[J]. Clin Chim Acta, 1999, 289(1-2): 79-88.
- [6] 原源. 知母防治缺血性脑中风的物质基础及品质评价[D]. 上海: 第二军医大学, 2005: 51-107.
- [7] Li TJ, Qiu Y, Yang PY, et al. Timosaponin B-II improves memory and learning dysfunction induced by cerebral ischemia in rats[J]. Neurosci Lett, 2007, 421(2): 147-151.
- [8] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.
- [9] Kite GC, Porter EA, Simmonds MS. Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1148(2): 177-183.
- [10] Cai F, Sun L, Gao S, et al. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of timosaponin B-II in blood plasma and a study of the pharmacokinetics of saponin in the rat[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(5): 1411-1416.
- [11] 王莉, 贾彦波, 陈方, 等. HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中的知母皂苷 B-II[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8): 1064-1068.
- [12] 《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》课题研究组. 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [EB]. <http://www.sda.gov.cn/gsz05106/15.pdf>.

(编辑: 梁进权)

LC-MS 法测定离体大鼠肝灌流模型中知母皂苷 B2 的含量及药动学研究

尤 杰^{1, 2}, 赫 蕾², 陈明苍², 季宇彬¹, 潘国宇²(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150076; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立简单、快速的测定 K-H 缓冲液中知母皂苷 B2 含量的 LC-MS 方法, 检验特定剂量知母皂苷 B2 在大鼠离体肝灌流模型中的肝脏提取率。**方法** 将 SD 大鼠离体肝灌流给予知母皂苷 B2, 取出不同时间点肝灌流液, LC-MS 法测定肝灌流液中知母皂苷 B2 的浓度。色谱条件: ACE C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1 μ m), 流动相为乙腈-0.05 % 甲酸水溶液 (V/V), 采用梯度洗脱。**结果** 知母皂苷 B2 在 0.125 ~ 2 μ g/mL 范围

收稿日期: 2012-10-17

作者简介: 尤杰, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与药物代谢动力学。Email: staffyujay@hotmail.com。通讯作者: 潘国宇, 研究员, 研究方向: 药物安全评价与药物代谢动力学。Email: gypan@cdser.simm.ac.cn。

基金项目: 国家科技重大专项《重大新药创制》课题(2012ZX09301001-001)。

内线性良好($r^2=0.999$), 日间和日内变异系数(RSD) < 10 %, 基质效应 RSD < 15 %, 符合生物样品分析的方法学要求。**结论** 该方法准确、灵敏、快速、高效, 适用于知母皂苷 B2 在离体灌流液中的定量分析。获得了 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 的知母皂苷 B2 样品大鼠离体肝灌流状态下的肝提取率和肝清除率曲线。

关键词: 知母皂苷 B2; 液质联用; 方法学; 基质效应; 肝灌流

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.019

Determination of Timosaponin B2 in K-H Buffer by LC-MS and Pharmacokinetics of Timosaponin B2 in Isolated Perfused Rat Liver Model

YOU Jie^{1,2}, HE Lei², CHEN Mingcang², JI Yubin¹, PAN Guoyu² (1. Research Center for Life Science and Environmental Science, Harbin Commercial University, Harbin 150076 Heilongjiang, China; 2. Shanghai Medicine Institute, China Academy of Science, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To develop a LC-MS method to determine timosaponin B2 in K-H buffer quickly and effectively, and by using this method to study the metabolism of timosaponin B2 in isolated perfused rat liver model.

Methods The isolated SD rat liver was perfused with K-H buffer containing timosaponin B2, and then the perfusate was taken out at different time for the determination of timosaponin B2 concentration by LC-MS method. The chromatographic condition was as follows: ACE C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1 μm), mobile phase consisting of acetonitrile-0.05 % formic acid (V/V), gradient elution. **Results** The linear ranges of timosaponin B2 was 0.125~2 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0.999$). The intra-day and inter-day coefficient of differentiation was less than 10%, and the coefficient of differentiation for matrix effect was less than 15 %, which fit the standard. **Conclusion** The method is effective, rapid and accurate for the determination of timosaponin B2 in K-H buffer, and the hepatic extraction rate and a liver clearance curve of timosaponin B2 at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ have been got in isolated perfused rat liver.

Keywords: Timosaponin B2; LC-MS; Methodology; Matrix effect; Liver perfusion

知母为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)的根茎, 味苦, 性寒, 归肺、胃、肾经。具有清热泻火、滋阴润燥、止渴除烦等功效^[1], 其主要成分知母皂苷一直是国内外的研究热点^[2]。知母皂苷 B2 作为知母皂苷中的一个标志性成分, 具有抗衰老、抗炎、抗氧化等药理作用^[3]。但关于知母皂苷 B2 的药动学研究却鲜有报道。本实验探索并建立了针对高浓度盐溶液中知母皂苷 B2 的萃取和灵敏、高效、简单的 LC-MS 检测方法, 为在离体组织学水平上研究知母皂苷 B2 的药动学行为提供了很好的检测方法。

1 材料

1.1 药品与试剂 知母皂苷 B2 (HPLC 纯度 > 90 %, 本实验室自制, 经 NMR-MS 检测确证其结构); 地塞米松(分析纯, 上海国药试剂公司); 牛磺酸(分析纯,

上海国药试剂公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Merk 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Merk 公司); 正丁醇(分析纯, 上海国药试剂公司); K-H 缓冲液(本实验室自制, 根据 sigma 公司 K-H 缓冲液的配方改良)。

1.2 动物 SD 大鼠, SPF 级, 体质量(220±20)g, 由上海斯莱克实验动物公司提供, 饲养于中国科学院上海药物研究所 SPF 级动物房, 动物合格证号: 2012-06-PGY-03。

1.3 仪器 LC-MS8030 液相-质谱仪, 日本岛津; Centrifuge 5418 离心机, 美国 Eppendorf 公司; Vortex-5 震荡仪(江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SPD121P 真空离心机(美国 Thermo 公司); BT100-2J 恒流蠕动泵(Longerpump 公司); XMTP-8222 恒温水浴锅(上海精宏仪器有限公司); XS 105 型十万分之一天平(美国 METTLER TOLEDO 公司); KQ5200 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);

Heal force 超纯水机。

2 方法

2.1 色谱条件 ACE C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1 μm); 流动相为乙腈-0.05 %甲酸水溶液(V/V); 采用梯度洗脱, 0 min 时采用乙腈:0.05 %甲酸水溶液 1:9, 至 4 min 时将乙腈比例升至 45 %, 再至 6 min 时将乙腈比例降回 10 %, 样品检测时间设定为 10 min。流速为 0.2 mL/min, 进样体积 10 μL, 柱温 40 ℃。

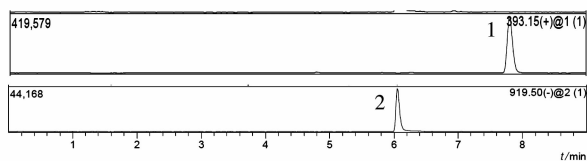
2.2 质谱条件 检测方法: 采用正离子检测内标物地塞米松, 负离子检测知母皂苷 B2。扫描方法: 选择离子扫描(SIM), 质荷比(m/z)地塞米松为 393.15; 知母皂苷 B2 为 919.50; 雾化器流速 3.0 L/min, 干燥器流速为 15.0 L/min, DL 管温度 250 ℃, 加热块温度 400 ℃, 接口电压 4500 V, 检测电压 1720 V。

2.3 样品预处理 精密吸取样品溶液 10 μL, 分别加入 80 μL 的 K-H 缓冲液和 0.1 μg/mL 地塞米松甲醇 10 μL 溶液中。另取 100 μL K-H 缓冲液作为标准品 0 点。分别向上述标准品管中精密加入正丁醇 1 mL, 涡流混合 3 min 后置振荡仪振荡 20 min, 确保样品被充分萃取。8000 r/min 离心 10 min, 取正丁醇层 800 μL, 于真空离心机中减压挥干, 分别加入 0.5 %甲酸水溶液 100 μL 复溶, 18000 r/min 离心 10 min, 取上清 80 μL 进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准样品制备 分别精密称取知母皂苷 B2 标准品 200, 100, 50, 2.5, 1.25 μg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 使其终浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25 μg。按照上述样品预处理方法处理并进样。

2.4.2 专属性试验 分别进样处理后的空白 K-H 缓冲液样品、知母皂苷 B2 对照品, 进样后对比可见知母皂苷 B2 和内标化合物在出峰位置处无其他物质干扰, 且检测响应高。内标地塞米松出峰时间为 7.776 min; 知母皂苷 B2 出峰时间为 6.054 min, 结果见图 1。



1. 地塞米松; 2. 知母皂苷 B2

图1 知母皂苷 B2 的质谱响应时间

Figure 1 The response of LC-MS method for timosaponin B2

2.4.3 标准曲线 以标准品峰面积比(样品/内标物)为纵坐标, 样品质量浓度 (μg/L)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.1894X + 0.0031$, $R^2 = 0.999$ 。表明知母皂苷 B2 在 0.125~2 μg/L 线性关系良好, 信噪比(S/N)>10。

2.4.4 精密度试验 精密吸取 3 个不同浓度标准样品溶液 5 μL, 按照上述色谱和质谱条件进样检测, 各重复 6 次, 计算得知母皂苷 B2 的日内精密度; 将上述样本分别放置 12, 24, 48, 72 h 后按同等质谱条件进样 6 次, 计算得知母皂苷 B2 的日间精密度, 结果见表 1。上述色谱和质谱条件下所检测的知母皂苷 B2 精密度良好, 知母皂苷 B2 在 72 h 后依然保持稳定。

表 1 不同浓度知母皂苷 B2 的精密度测定结果

Table 1 Precision of timosaponin B2 at different concentrations

加入量 /μg·mL ⁻¹	日内精密度(n=6)		日间精密度	
	平均值/μg·mL ⁻¹	RSD/%	平均值/μg·mL ⁻¹	RSD/%
0.25	0.243	4.95	0.223	8.24
0.50	0.489	2.40	0.474	3.84
1.00	0.988	0.86	0.954	3.51

2.4.5 重复性试验 分别精密称取同等质量的知母皂苷 B2 样品, 按供试品制备方法平行制备成 6 份待测品溶液, 分别进样 5 μL, 按上述色谱和质谱条件检测。计算得知母皂苷 B2 含量的 RSD 为 2.57 %, 表明本方法重现性良好。

2.4.6 提取回收率试验 将知母皂苷 B2 标准品按上述供试品配制方法, 分别配制成 0.25, 0.5, 1 μg/mL 浓度的供试品溶液, 每个浓度平行配制 6 份样品。另外, 以复溶溶液为溶剂, 分别配制上述 3 个浓度标准品, 各取 5 μL 进样。将样品与标准品结果对比计算样品提取回收率, 结果见表 2。

表 2 知母皂苷 B2 回收率(n=6)

Table 2 The extraction recovery of timosaponin B2

样品量/μg·mL ⁻¹	实测量/μg·mL ⁻¹	平均回收率/%	RSD/%
1.00	82.4	78.9	4.95
0.50	78.8		
0.25	75.6		

2.4.7 基质效应检测^[4] 以流动相为溶剂分别配制含知母皂苷 B2 标准品 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μg/mL 的系列浓度供试品, 供试品系列重复 5 次, 各取 5 μL 进样。另采用不同时间配制的空白 K-H 缓冲液, 按照上述样品预处理方法处理至减压挥干, 分别加入与供试品系列浓度一致的标准品, 同样重复 5 次, 各进

样 5 μL 。检测结果可得供试品标准曲线 5 组，方法处理组标准曲线 5 组，通过比较计算得出其基质效应为 11.17 %，结果见表 3。计算结果 < 15 %，说明本方法中的基质效应可忽略^[5]。

表 3 K-H 缓冲液中知母皂苷 B2 的基质效应
Table 3 Matrix effect of K-H buffer for timosaponin B2

标准曲线组号	标准品斜率	样品斜率	ME/%
1	4.0680	3.7175	11.17
2	4.0560	3.7170	
3	4.2761	3.5910	
4	4.0887	3.6081	
5	4.1461	3.6926	

2.5 大鼠离体肝灌流试验

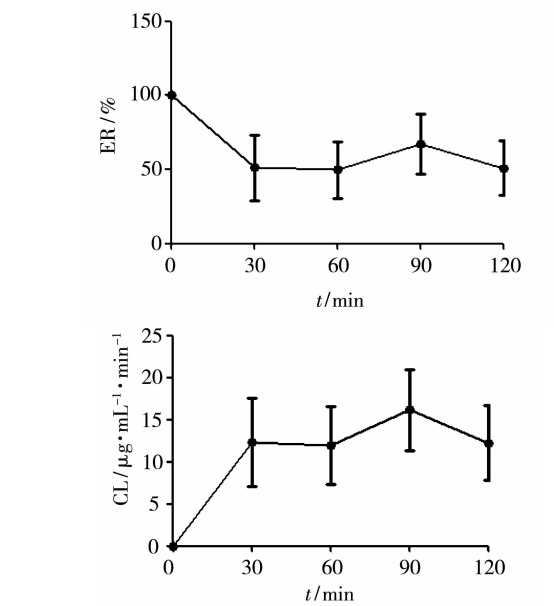
2.5.1 K-H 缓冲液的制备 根据 sigma 公司配方改良后自制^[6]。贮备液 A：精密称取 0.141 g MgSO_4 ，0.16 g KH_2PO_4 ，0.35 g KCl ，6.9 g NaCl 和 2.1 g NaHCO_3 置于 100 mL 容量瓶中，蒸馏水定容至刻度；贮备液 B：精密称取 2 g D-Glu 置于 100 mL 容量瓶中，蒸馏水定容至刻度；贮备液 C：精密称取 0.373 g CaCl_2 置于 100 mL 容量瓶中，蒸馏水定容至刻度；以上贮备液均置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存。临用前取 A、B、C 贮备液各 100 mL 混匀，定容至 1000 mL。

2.5.2 知母皂苷灌流液的制备 精密吸取 160 $\mu\text{g/mL}$ 的知母皂苷 B2 标准品水溶液 10 mL，置于 2 L 棕色容量瓶中，同时，加入牛磺酸 34 mg，采用上述 K-H 缓冲液定容至刻度，使灌流液中的知母皂苷 B2 终浓度为 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 离体肝灌流模型的建立^[7] 取成年 SD 大鼠，体重 250~300 g 之间。随机分为 2 组，即实验组和重复组，每组 4 只。实验前禁食 12 h，不禁水。20 %乌拉坦麻醉后，将大鼠固定于操作台上，酒精消毒腹部。于大鼠下腹部做 V 字形切口充分暴露肝脏、十二指肠、肝门静脉、下腔静脉、胆管等器官。由下腔静脉注入 100 U 肝素进行抗凝血处理。采用内径 28 μm 的 PE 管对胆管插管，引流胆汁。采用去针头的静脉滞留针对大鼠肝门静脉进行插管，剪开下腔静脉并灌入 0 $^{\circ}\text{C}$ 空白 K-H 缓冲液，流速 15 mL/min (7.5 r/min)，待肝脏冲洗干净后小心分离肝脏至承托盘上。更换 37 $^{\circ}\text{C}$ 氧饱和空白 K-H 缓冲液平衡 20 min 后，更换含药 K-H 缓冲液进行灌流，分别于 30，60，90，120 min 采集出肝灌流液样品，样品取出后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。灌流期间观察胆管插管胆汁流出情况，确保肝脏活性。

2.7 测定结果 通过对出肝灌流液样品的测定，计算获得了 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 知母皂苷 B2 对离体大鼠肝脏灌流

给药的肝脏提取率 (ER)^[8] 和药物肝脏清除率 (CL) 随时间变化曲线，结果见图 2。



注： $\text{ER} = \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times 100\%$ ； $\text{CL} = \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}{F}$
图2 知母皂苷 B2 离体肝灌流中的肝脏提取率和肝药物清除率
Figure 2 ER and CL in IPRL for timosaponin B2 (n=4)

3 讨论

本实验比较了乙酸乙酯、正丁醇和正己烷-二氯甲烷-异丙醇 (2 : 1 : 1) 液，3 种提取溶剂，质谱结果显示正丁醇提取效果最佳。比较了不同体积正丁醇的提取效果，发现其提取量与正丁醇加入的体积成正比，因此，选择 10 倍量正丁醇进行知母皂苷 B2 灌流液的提取。

为了了解酸碱度对于复溶后知母皂苷 B2 检测响应的影 响，本实验选择了 0.5 % 甲酸水溶液，蒸馏水，0.5 % 氨水 (25 %) 水溶液分别作为复溶溶剂进行质谱测定，结果显示 0.5 % 甲酸水溶液复溶的知母皂苷 B2 检测响应最好，标准曲线线性最佳。

流动相优先选用等度洗脱，该方法检测时间短，但本实验发现乙腈-水 (1 : 9) 等度洗脱使样品峰形差，响应低。即使调节相比比例，峰形和响应值效果仍然不理想。采用本梯度法洗脱出峰时间较短，峰型标准，响应值高。

由上述大鼠离体肝灌流提取率结果曲线可见，知母皂苷 B2 在大鼠肝脏中的摄取和代谢需经过一定的时间才能达到稳态平衡，稳态可能源自于肝细胞上用于转运知母皂苷 B2 的转运载体达到饱和，并且肝脏对于知母皂苷 B2 的代谢也达到饱和，两者形成了一个动态平衡，平衡后的肝脏提取率约为 50 %。肝灌流 1.5 h 后，知母皂苷 B2 的肝提取率出现一定的波动，这可能与实验用肝脏离体时间过长，肝细胞活力

下降有关。肝脏清除率是反应肝脏对于药物清除能力的一个重要参数。由上图可知, 当门静脉中的知母皂苷 B2 浓度在 $1.6 \mu\text{g/mL}$, 药液流速在 15 mL/min 时, 大鼠肝脏对于知母皂苷 B2 的清除率基本稳定在 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 左右, 这可能提示了大鼠肝脏对于知母皂苷 B2 的最大清除率。

参考文献:

- [1] 徐爱娟, 韩丽萍, 蒋琳兰. 知母的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(4): 624-628.
- [2] 王迪, 姜艳艳, 石任兵. 中药知母质量控制方法研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(4): 263-265.
- [3] 尤杰, 孙兆林, 季宇彬, 等. 知母皂苷 AⅢ 药理活性及机制研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(3): 11-12.
- [4] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱中的基质效应[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753-756.
- [5] 丁黎. 药物色谱分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 357-358.
- [6] Frazier MJ. Biological based kinetic model for chemical kinetics in the isolated perfused rat liver system: Basic recirculation model for water-soluble/lipid-insoluble chemicals[J]. Toxicol Methods, 1998, 32(8): 257-284.
- [7] Brouwer KL. Hepatic distribution and clearance of antisense oligonucleotides in the isolated perfused rat liver[J]. Pharm Res, 1997, 14(2): 516-521.
- [8] Brouwer KL, Vore M. The effect of hypoxia and pregnancy on antipyrine metabolism in isolated perfused rat liver[J]. Pharmacol Exp Ther, 1985, 234: 584-589.

(编辑: 宋威)

HPLC 法测定 6-姜酚在大鼠肝微粒体中的含量

向云亚, 蒋苏贞, 黄兆胜(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立一种准确检测大鼠肝微粒中 6-姜酚(6-gingerol)含量的方法。**方法** 以辣椒素为内标物, 采用 Kromasil-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 以甲醇-水(65:35)为流动相, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL , 检测温度为室温。**结果** 6-姜酚浓度在 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与 6-姜酚和内标物峰面积之比值有良好的线性关系($r=0.9995$); 最低检测限与定量限分别为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 低、中、高浓度的平均回收率分别为 103.5%, 101.1%, 100.6%, 日内 RSD 分别为 3.9%, 6.5%, 1.6%, 日间 RSD 分别为 5.5%, 7.5%, 1.9%。**结论** 本方法操作简单, 快速灵敏, 可用于肝微粒中 6-姜酚含量的测定。

关键词: HPLC; 6-姜酚; 辣椒素; 肝微粒体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.020

Determination of 6-Gingerol in Rat Liver Microsomes by HPLC

XIANG Yunya, JIANG Suzhen, HUANG Zhaosheng (School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective** To develop a HPLC method for the determination of 6-gingerol in rat liver microsomes. **Methods** Kromasil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was adopted at room temperature. HPLC method was established by using capsaicin as internal standard. The mobile phase consisted of methanol-water (65:35) at a flow of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The UV detection wave length was set at 280 nm, and the injection volume was 20 μL . **Results** The linear range of 6-gingerol was $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9995$), the limit of detection was $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the limit of quantitation was $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The average recovery rates of 6-gingerol at low, medium and high concentrations were 103.5%, 101.1% and 100.6%, the intra-day RSD was 3.9%, 6.5% and 1.6%, and the inter-day RSD was 5.5%, 7.5% and 1.9%, respectively. **Conclusion** The method is simple, convenient, sensitive for the determination of 6-gingerol in liver microsomes.

Keywords: HPLC; 6-Gingerol; Capsaicin; Liver microsomes

收稿日期: 2012-10-19

作者简介: 向云亚, 男, 博士研究生, 主要从事中药安全性与有效性的评价研究。Email: xiangyunya@163.com。通讯作者: 蒋苏贞, 博士, 副教授, 主要从事中药安全性及有效性的评价研究。Email: jsu8815@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(10451040701006098); 广州中医药大学创新基金课题(K0090086)。