

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)。

6-姜酚(6-Gingerol)是姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的主要活性成分之一。姜酚具有强心、调节血管舒缩功能、抗血小板聚集、抗氧化、抗肿瘤、抑制病原微生物、抗炎、镇痛等药理作用^[1-2], 应用前景广泛。课题组前期研究结果显示^[3], 6-姜酚口服吸收迅速, 在肝脏中有较高的分布, 而血药浓度较低, 由此推测 6-姜酚主要的代谢场所可能为肝脏。目前, 肝微粒体体外孵育法是研究药物代谢的一种重要方法。虽然有文献报道^[4-5]用 HPLC 法测定 6-姜酚的含量, 但其中外标法居多。为了更加快速准确地测定生物基质样品中 6-姜酚的含量, 本文旨在改良 6-姜酚的 HPLC 测定方法, 以辣椒素为内标, 应用 HPLC 法测定大鼠肝微粒体中 6-姜酚的含量, 为研究 6-姜酚在肝脏中的药物代谢动力学提供依据。

1 仪器与试药

1.1 试药 6-姜酚(98.55 %, express technology Co. Ltd, 批号: MUST-11030401); 辣椒素(98 %, 成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-11011801); 甲醇为色谱纯(O & Putton Co.Ltd); 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters 515 高效液相色谱仪, 配 Waters 515 泵、Waters 2487 紫外检测器、Rheodyne 7725i 手动进样阀(20 μ L 定量环)、N3000 色谱工作站, 美国 Waters 公司; CR-22G 日立台式低温高速离心机; BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); CU410-86 型-80 $^{\circ}$ C 冰箱(New Brunswick Scientific, USA)。

1.3 动物 SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量(250 $\pm$ 20) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2008-0020, 实验前禁食不禁水 24 h。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液 精密称定 2 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得对照品溶液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用。

2.1.2 内标物溶液 精密称取辣椒素 4 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为内标液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.1.3 PBS 缓冲液的制备 称取磷酸二氢钾 0.2 g, 磷酸氢二钠 3.63 g, 氯化钠 8.0 g, 氯化钾 0.2 g, 加水至 1 L, 调节 pH 值至 7.4。

2.2 色谱条件 采用 KerosmasiL C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)色谱柱, 以甲醇-水(65:35)为流动相, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μ L, 检测温度为室温。

2.3 样品的制备与处理

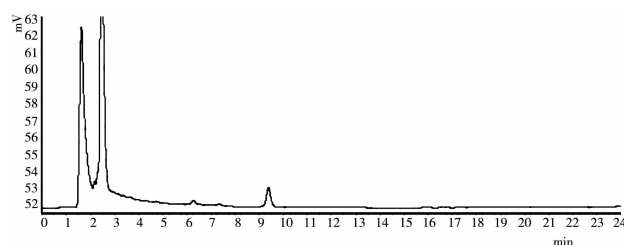
2.3.1 大鼠肝微粒体的制备 取 SD 大鼠, 乙醚麻醉后(以下均在冰浴上进行), 迅速打开腹腔, 用冰冷的 PBS 缓冲液经肝门静脉灌注肝脏, 同时下腔静脉剪开一小口, 释放灌注液, 当肝脏灌注至土黄色时, 剪下肝脏, 用滤纸吸干称重, 每克肝脏加入 4 mL 冰冷的 PBS 缓冲液, 在冰浴中匀浆制备肝匀浆液。肝匀浆液于 0 $^{\circ}$ C, 10000 g 离心 20 min, 取上清液加冰冷的 88 mmol $\cdot$ L⁻¹ CaCl₂ 溶液(每 mL 上清液加 0.1 mL), 混匀后冰浴 5 min, 再于 0 $^{\circ}$ C, 30000 g 离心 20 min, 弃去上清液, 沉淀用 1 mL 的 PBS-20 %甘油缓冲液反复吹打均匀, 分装, 于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。采用 Lowery 法^[6]测定肝微粒体蛋白浓度。

2.3.2 样品处理 取 2.3.1 项下制备的肝微粒液 10 μ L, 加入适量的 6-姜酚和 PBS 缓冲液至终体积为 200 μ L, 加 50 μ L 内标, 150 μ L 冰冷的乙腈涡旋混匀, 12000 g 离心 10 min, 取上清液 20 μ L 进样。

2.4 HPLC 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别取 6-姜酚对照品适量, 置于 37 $^{\circ}$ C 肝微粒液中, 涡旋混匀, 制成 6-姜酚终浓度为 1, 2, 4, 8, 10, 16, 32, 64, 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品肝微粒液, 按 2.3.2 项下方法操作, 进样 20 μ L, 记录色谱图; 以 6-姜酚浓度 C (μ g $\cdot$ mL⁻¹) 为横坐标, 6-姜酚与内标物的峰面积比值 Y 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y=0.122X-0.036(r=0.9995)$ 。结果表明, 在上述色谱条件下, 6-姜酚在 1~100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 浓度范围内与 Y 有良好的线性关系。

2.4.2 专属性试验 在上述的实验条件下, 6-姜酚和内标物色谱峰保留时间分别在 11.6 和 18.6 min, 6-姜酚与内标物峰形良好, 无杂质峰干扰, 结果见图 1。



A. 空白肝微粒体

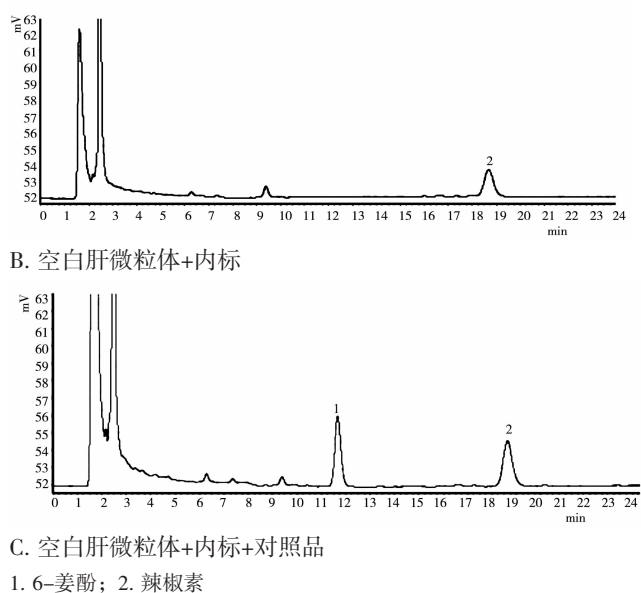


图1 HPLC法测定大鼠肝微粒体中6-姜酚色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of 6-gingerol in rat liver microsomes

2.4.3 回收率试验 取空白肝微粒，按照 2.4.1 项下的方法配制低、中、高 3 个浓度(1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对照品肝微粒体液(平行做 3 份)，按照 2.3.2 项下的方法处理，进样 20 μL ，记录图谱。将 6-姜酚峰面积与内标物面积比值代入标准曲线方程，计算 6-姜酚浓度，并与加入浓度比较，计算平均回收率分别为 103.5%，101.1%，100.6%，RSD 分别为 3.91%，5.76%，1.62% ($n=3$)。

2.4.4 精密度试验 取空白肝微粒，按照 2.4.1 项下的方法配制低、中、高 3 个浓度(1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对照品肝微粒体液，按照 2.3.2 项下的方法处理，进样 20 μL ，记录图谱，1 d 内连续测定 3 次，以 6-姜酚测得值与加入值的比值计算日内精密度；将以上 3 个浓度(1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对照品肝微粒液，连续测定 3 d，计算日间精密度，结果见表 1。

表 1 6-姜酚测定精密度考察($n=3$)

Table 1 Precision of 6-gingerol

理论值 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内		日间	
	测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
1	1.03±0.06	3.9	1.10±0.085	5.5
10	10.53±0.69	6.5	10.31±0.77	7.5
100	101.45±1.64	1.6	100.92±1.93	1.9

2.4.5 最低检测限与定量限 按信噪比 $S/N=3$ 计算，本法测定的最低检测浓度为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，定量限常用信噪比 $S/N=10$ 计算，其测定结果应具有一定准确度与精密度，本法测定的定量限为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，准确度与精密度 RSD 均小于 10%。

2.4.6 稳定性试验 制备 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 共 3 个

浓度的 6-姜酚肝微粒液，按照 2.3.2 项下的方法处理后，将样品放置在室温及 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内，于 12, 24, 48 h 分别进样分析。结果，RSD 均 < 8.0%，表明样品溶液在室温及 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 48 h 内稳定。

3 讨论

参考文献^[7]及 6-姜酚的理化性质，我们试用过香草醛做内标，但发现香草醛出峰时间太快(4 min 左右出峰)，容易被肝微粒的杂质峰干扰，若调整流动性比例使其出峰时间靠后，但 6-姜酚出峰时间变长。而辣椒素无论在出峰时间、峰形，还是分离度方面都比较好，因此，选择辣椒素作为内标。

研究比较了甲醇-水(75:35)、甲醇-水(70:30)、甲醇-水(65:35)3 种流动体系，结果 3 组分离效果均良好，但是，前两种体系在 6-姜酚出峰位置上有其他峰干扰，影响测定，而第 3 种没有这种现象，因此，选择甲醇-水(65:35)为流动相。

我们试用过相关文献报道^[8]的 N_2 吹干，流动性 75 μL 复溶的方法进行处理，但检测出来的结果不理想，而且，上清液为乙腈-水混合物，很难挥干溶剂，因此，本研究采用乙腈沉淀蛋白后，高速离心，取上清进样测定，结果表明回收率、精密度方面都符合分析要求，而且处理时间短，简单易行，可以避免处理过程中 6-姜酚的损失。

本研究通过对内标物、流动相、样品处理方法的筛选所建立的 6-姜酚在大鼠肝微粒体中的高效液相色谱测定法，其检测范围、回收率、精密度和稳定性基本符合生物样品分析的要求，可应用于 6-姜酚在大鼠肝微粒中的代谢研究，同时，也为 6-姜酚在其他生物基质样品的测定提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 蒋苏贞, 宓德卿, 王宁生. 姜酚心血管药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 219-221.
- [2] 黄雪松, 宴日安, 吴建中. 姜酚的生物活性述评[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2005, 26(3): 434-439.
- [3] Jiang SZ, Wang NS, Mi SQ. Plasmapharmacokinetics and tissue distribution of 6-gingerol in rats[J]. Biopharm Drug Dispos, 2008, 29(9): 529-537.
- [4] 张科卫, 吴皓, 崔小兵. HPLC 法测定小半夏汤中 6-姜酚和 6-姜醇[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1579-1581.
- [5] 蒋苏贞, 宓德卿, 王宁生. HPLC-UV 法测定大鼠血中 6-姜酚的浓度[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 171-173.
- [6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biolchem, 1951, 193: 265-275.
- [7] 陈燕, 蔡同一, 付力. 用改进的高效液相色谱法测定姜中姜辣素[J]. 食品科学, 2001, 22(4): 60-63.
- [8] Ding GH, Naora K, Hayashibara M, et al. Pharmacokinetics of [6]-gingerol after intravenous administration in rats[J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(6): 1612-1614.

(编辑: 宋威)