

- Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3):969–982.
- [10] Scott KL, Kabbarah O, Liang MC, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer[J]. Nature, 2009, 459(7250):1085–1090.
- [11] Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, et al. GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding[J]. Cell, 2009, 139(2):337–351.
- [12] Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer[J]. Cell, 2017, 168(4):644–656.
- [13] Farber-Katz SE, Dippold HC, Buschman MD, et al. DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3[J]. Cell, 2014, 156(3):413–427.
- [14] Ognibene M, Podestà M, Garaventa A, et al. Role of GOLPH3 and TPX2 in neuroblastoma DNA damage response and cell resistance to chemotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19):4764.
- [15] Liu L, Doray B, Kornfeld S. Recycling of Golgi glycosyltransferases requires direct binding to coatomer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(36):8984–8989.
- [16] Tang S, Pan H, Wei W, et al. GOLPH3: a novel biomarker that correlates with poor survival and resistance to chemotherapy in breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(62):105155–105169.
- [17] Guo YT, Qiu CZ, Huang ZX, et al. Correlational research of Golgi phosphorylation protein 3 expression in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(48):13473–13479.
- [18] Scheie D, Kufaisi HHA, Broholm H, et al. Biomarkers in tumors of the central nervous system—a review[J]. APMIS, 2019, 127(5):265–287.
- [19] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer[J]. Oncology, 2005, 69(Suppl 3):4–10.
- [20] Kerbel RS. Tumor angiogenesis[J]. N Engl J Med, 2008, 358(19):2039–2049.
- [21] Farhat FS, Tfayli A, Fakhruddin N, et al. Expression, prognostic and predictive impact of VEGF and bFGF in non-small cell lung cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 84(2):149–160.
- [22] Koutras A, Kotoula V, Fountzilias G. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer[J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(1):79–94.
- [23] Costache MI, Ioana M, Iordache S, et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature[J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(3):199–208.
- [24] 苏乃伟,冯旭,覃家锦. VEGF及nm23在广西地区食管癌中的表达及其相关性研究[J]. 中国临床新医学, 2011, 4(10):916–919.
- [25] Peng J, Fang Y, Tao Y, et al. Mechanisms of GOLPH3 associated with the progression of gastric cancer: a preliminary study[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e107362.
- [收稿日期 2021-07-04][本文编辑 韦所苏 韦颖]

本文引用格式

臧志意,魏小东. GOLPH3与VEGF在肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(9):915–920.

论著

HPLC法同时测定痔瘘洗液中大黄素和大黄酚的含量

蒙丽斌, 潘洪平

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院药学部(蒙丽斌), 编辑部(潘洪平)

作者简介: 蒙丽斌(1971-), 女, 大学本科, 理学学士, 主管药师, 研究方向: 医院药学。E-mail: 25469230@qq.com

通信作者: 潘洪平(1968-), 男, 医学博士, 主任药师, 研究方向: 临床药学和编辑学。E-mail: php88@126.com

【摘要】目的 建立高效液相色谱(HPLC)同时测定痔瘘洗液中大黄素和大黄酚含量的方法, 为该制剂的质量评价提供依据。**方法** 采用HPLC法同时测定痔瘘洗液中大黄素和大黄酚的含量, 色谱柱: Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液(体积比为80:20); 流速为0.8 ml/min, 检测波长为254 nm, 柱温为25℃; 进样量10 μl。**结果** 大黄素、大黄酚的进样量分别在1.90~6.00 μg/ml($n=5$, $R=0.999$)和4.00~18.51 μg/ml($n=5$, $R=0.999$)范围内与各自的峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为98.80%、102.50%, 相对标准偏差(RSD)分别为0.19%($n=6$)、0.02%($n=6$)。**结论** 该法具有操作简单、准确、回收率好、精密度和重复性高、分析快速等优点, 可作为痔瘘洗液的质量控制方法。

【关键词】 高效液相色谱; 痔瘘洗液; 大黄素; 大黄酚; 同时测定

【中图分类号】 R 284.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2021)09-0920-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.09.17

Simultaneous determination of emodin and chrysophanol in Hemorrhoids Fistula Lotion by HPLC method

MENG Li-bin, PAN Hong-ping. Department of Pharmacy, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for the simultaneous determination of emodin and chrysophanol in Hemorrhoids Fistula Lotion by high-performance liquid chromatography (HPLC) and to provide the basis for the quality evaluation of the preparation. **Methods** The contents of emodin and chrysophanol in Hemorrhoids Fistula Lotion were simultaneously determined by HPLC. A chromatographic column of Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. Methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution (80:20, V/V) was used as mobile phase at a flow rate of 0.8 ml/min, and the detection wavelength was set at 254 nm. The column temperature was 25 °C and the injection volume was 10 μl. **Results** There was a good linear relationship between emodin injection volume and its peak area in a range of 1.90 ~ 6.00 μg/ml ($n=5$, $R=0.999$), and there was a good linear relationship between chrysophanol injection volume and its peak area in a range of 4.00 ~ 18.51 μg/ml ($n=5$, $R=0.999$), with the average recovery rates of emodin and chrysophanol being 98.80% and 102.50%, respectively, and the relative standard deviations (RSD) of emodin and chrysophanol being 0.19% ($n=6$) and 0.02% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method has the advantages of simple operation, accuracy, good recovery rate, high precision and good repeatability, and rapid analysis. It can be used for the quality control method of Hemorrhoids Fistula Lotion.

[Key words] High-performance liquid chromatography (HPLC); Hemorrhoids Fistula Lotion; Emodin; Chrysophanol; Simultaneous determination

痔瘕洗液由红花、山银花、大黄、桃仁、花椒、当归、苦参、虎杖、黄柏、地榆炭、白芷和芒硝 (配比为 2:3:3:1.5:1.5:2:3:3:3:3:1.5) 共十二味中药经加工制成^[1], 处方中的大黄具有利湿退黄、泻热通便、解毒消痈之功, 为峻猛之品当为君药, 与臣药黄柏、山银花、苦参、地榆炭、白芷 (辅助君药大黄加强清热解毒、活血止痛、收敛生肌之功), 佐药红花、桃仁、花椒、当归、虎杖 (协助君、臣药以加强治疗作用), 使药芒硝 (引经调和药), 共奏清热解毒、活血止痛、收敛生肌之功效。药理研究表明, 痔瘕洗液对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、甲型链球菌、乙型链球菌等细菌均有抑制作用^[2]。本品临床主要用于痔疮术后坐浴^[3]、痔瘕病^[4]和肛门水肿^[5]等治疗。由于大黄素和大黄酚为痔瘕洗液的重要抗菌活性成分, 因此, 测定大黄素和大黄酚的含量对痔瘕洗液的质量控制显得尤为重要。根据大黄素和大黄酚的分子结构特点, 本研究采用高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 法同时测定痔瘕洗液中大黄素和大黄酚的含量, 为建立该制剂的质量控制方法和质量评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); CP225D 型电子天平 (德国赛多利斯公司); AW-120 型电子天平 (西班牙 COBOS 公司)。大黄素、大黄酚对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110756-200110、110796-200615。规格: 大黄素含量为 98.7%, 20 mg/支; 大黄酚含量为 99.2%,

20 mg/支)。痔瘕洗液 (上海凯宝药业股份有限公司, 批号: 20101214、20100711、20100121, 均在药品有效期内完成试验)。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。柱温 25 °C。进样量: 供试品、对照品各 10 μl。流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (80:20, V/V)。检测波长选择 254 nm。流速为 0.8 ml/min。

1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取大黄素、大黄酚对照品适量, 加入无水乙醇-乙酸乙酯 (2:1) 混合溶液制成每 1 ml 含大黄素 10 μg、大黄酚 25 μg 的混合对照品溶液, 作为对照品储备液。

1.2.2.2 供试品溶液的配制 精密量取供试品 30 ml, 加盐酸 3 ml, 加热回流 30 min, 立即冷却, 用三氯甲烷提取 3 次, 每次 30 ml 合并三氯甲烷液, 蒸干, 残渣用甲醇使溶解, 转移至 10 ml 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 制得供试品溶液。该法制备的供试品溶液所得的峰形、出峰时间及分离都可达到较好效果。

1.2.2.3 阴性样品溶液配制 取不含大黄的阴性样品, 采用供试品溶液制备方法 (“1.2.2.2”项下) 制备阴性样品溶液, 进样分析。

1.2.2.4 线性关系考察 分别取 “1.2.2.1” 项下的大黄素和大黄酚对照品溶液, 加甲醇制成每 1 μl

含大黄素 0.16 μg、大黄酚 0.79 μg 的混合对照品溶液,作为系列浓度的对照品溶液。依次自动进样 5、10、15、20、25 μl,记录色谱图。以对照品进样量 X(μg)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归分析。

1.2.2.5 精密度考察 分别精密吸取“1.2.2.1”项下的大黄素和大黄酚混合对照品溶液 10 μl,在相同的色谱条件下连续进样 6 次,分别测定峰面积的积分值。分别计算大黄素、大黄酚峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)。

1.2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,于室温下 0、2、4、6、8、12、24 h 分别按上述色谱条件测定,分别测定大黄素、大黄酚的峰面积积分值,分别计算大黄素、大黄酚峰面积的 RSD。

1.2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号:20100711)共 6 份,按供试品溶液制备方法平行制备溶液并测

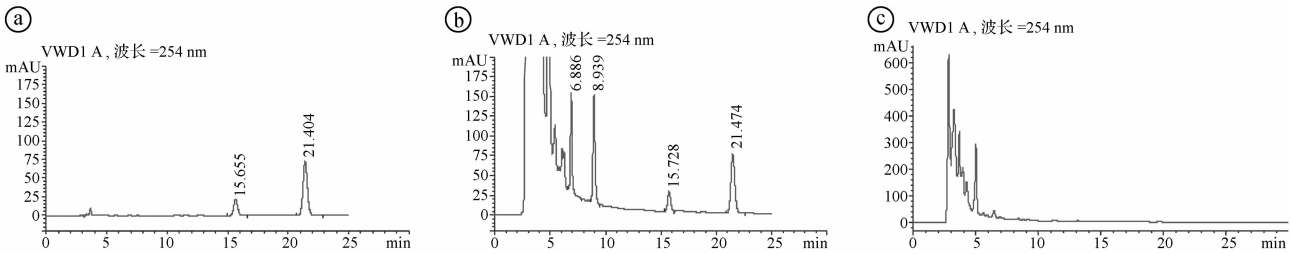
定大黄素、大黄酚的平均含量及其相应的 RSD。

1.2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:20100711)10 ml,分别精密加入一定量的大黄素、大黄酚对照品,按“1.2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项下的色谱条件测定,计算加样回收率。

1.2.2.9 样品含量测定 取 3 批痔瘕洗液样品,按“1.2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项下的色谱条件测定,计算样品的大黄素、大黄酚含量。

2 结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验结果 结果表明,大黄素和大黄酚,及其与杂质峰分离良好,分离度>1.5,所得峰形尖,对称,重复性好,无拖尾现象,理论塔板数符合要求,说明色谱柱柱效高,同时无阴性干扰,出峰时间亦达到满意的效果。结果提示色谱条件选择恰当,系统适用性试验良好。见图 1。



①对照品; ②供试品; ③阴性样品(15.728-大黄素;21.171-大黄酚)

图 1 高效液相色谱图

2.2 线性关系考察结果 以对照品进样量 X(μg)(为横坐标),对峰面积 Y(为纵坐标)进行线性回归分析,结果表明,各组分在表 1 浓度范围内的线性关系良好。见表 1。

表 1 大黄素和大黄酚的线性与范围

化合物	线性范围(μg/ml)	回归方程	R
大黄素	1.90~6.00	Y=5.7769X-1.5935(n=5)	0.999
大黄酚	4.00~18.51	Y=7.2059X-0.9980(n=5)	0.999

2.3 精密度考察结果 大黄素、大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.35%、0.12%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验结果 室温下 0~24 h 内,大黄素、大黄酚的 RSD 分别为 1.52%、0.44%(n=6),表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5 重复性试验结果 同一批样品的大黄素、大黄酚的平均含量分别为 4.83 μg/ml、9.29 μg/ml,RSD 分别为 0.84%、0.61%(n=6),表明分析方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验结果 已知含量的样品的加样回收率试验结果提示,大黄素、大黄酚的平均回收率分别为 98.80%、102.50%,RSD 分别为 0.19%、0.02%。见表 2。

表 2 加样回收率试验测定结果

组分名称	取样量(ml)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
大黄素	15.00	3.0	1.53	3.03	98.00	98.80	0.19
	15.00	3.0	1.53	3.04	98.70		
	15.00	3.0	1.53	3.05	99.30		
	15.00	3.0	1.53	3.07	100.00		
	15.00	3.0	1.53	3.03	98.00		
	15.00	3.0	1.53	3.05	99.30		
大黄酚	15.00	6.22	3.08	6.27	103.60	102.50	0.02
	15.00	6.22	3.08	6.21	101.60		
	15.00	6.22	3.08	6.21	101.60		
	15.00	6.22	3.08	6.22	101.90		
	15.00	6.22	3.08	6.36	106.50		
	15.00	6.22	3.08	6.19	100.00		

2.7 样品含量测定结果 3 批痔瘕洗液样品的大黄素、大黄酚含量测定结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($n=3$)

批 号	20101214	20100711	20100121	RSD(%)
大黄素($\mu\text{g/ml}$)	1.80	1.87	1.67	5.70
大黄酚($\mu\text{g/ml}$)	8.39	8.25	8.53	1.67

3 讨论

3.1 大黄素与 大黄酚具有相似的分子结构,两者极性相近,传统的化学分析方法可将 大黄素与 大黄酚混合物(如总蒽醌)的乙醚液,依次用碳酸钠、氢氧化钠水溶液萃取,分别得到 大黄素、大黄酚;或利用聚酰胺柱层析法,以稀醇至高浓度醇洗脱,依次得到 大黄素、大黄酚。但这些方法具有步骤繁琐、操作复杂、准确度差、回收率低、精密度和重复性不高、分析结果慢等缺点,均不适宜作为制剂的质量控制方法。HPLC 法以液体为流动相,将不同极性的混合物溶于溶剂中,通过高压输液系统,泵入装有固定相的色谱柱中,在柱内各成分被分离后,进入检测器进行检测。HPLC 法具有高压、高速(分析速度快)、高效(分离效能高)、高灵敏度、操作简便、重现性好和应用范围广等特点。已有一些文献报道通过 HPLC 法同时测定 大黄素、大黄酚等成分的含量,对口服中成药^[6-7]、外用中成药^[8-11]、中药材^[12-13]甚至一些民族药^[14]进行有效质量控制。由于 大黄是痔瘕洗液的重要药味,而 大黄素和 大黄酚则是 大黄的主要有效成分。目前已见一些关于痔瘕洗液质量标准研究的报道:杨家福等^[15]采用薄层色谱法鉴别痔瘕洗液中的 大黄、黄柏;陈展^[16]采用加速试验和长期试验方法,考察痔瘕洗液在不同试验条件下样品的性状、鉴别、含量及微生物的变化,并对痔瘕洗液进行了质量稳定性考察,以评价该药品质量;陈展和凌晓云^[17]还建立了痔瘕洗液微生物限度检查方法;陈展和吴晓燕^[18]采用 HPLC 法对山银花中的绿原酸进行了含量测定以建立痔瘕洗液的质量控制方法。本研究采用 HPLC 法同时测定痔瘕洗液中主要抗菌活性成分 大黄素和 大黄酚的含量,具备一定的难度和较好的药理针对性,其方法及实验过程可重复性较好,进一步拓宽痔瘕洗液的质量标准研究,为建立该制剂精准的质量控制方法和提高质量评价标准提供依据,具备一定的创新性和指导意义。

3.2 从本研究结果概括出以下几点体会。(1) 大黄素、大黄酚提取条件的确定。在对痔瘕洗液中 大黄

素和 大黄酚进行提取的预实验中,曾试用 5%~30% 盐酸进行酸化处理,结果表明利用 10% 盐酸酸化后提取效果最佳。在对加热回流时间(5~60 min)进行考察时确定加热回流 30 min 为最佳时间。在对甲醇、乙醇、三氯甲烷等溶剂进行考察时,确定三氯甲烷提取 3 次较为完全且易于挥发蒸干溶剂。(2) 大黄素、大黄酚检测波长的确定。根据 大黄素和 大黄酚均具有共轭双键结构的特点,以及凡具有芳香环或共轭双键结构的有机化合物在特定吸收波长处所测得的吸收度可用于药品的鉴别、纯度检查及含量测定的原理^[19],各取 大黄素、大黄酚对照品的甲醇溶液,经可见紫外分光光度计,在 220~470 nm 波长的范围内进行扫描,结果 大黄素和 大黄酚的最大吸收波长分别是 253.9 nm 和 255.1 nm。借鉴其他含 大黄成分的中成药进行 大黄素和 大黄酚含量同时测定以监控产品质量的方法^[20],以及笔者对含 大黄成分的中成药痔瘕洗液样品的实际测定结果,本研究确定 大黄素、大黄酚同时测定的检测波长为 254 nm。(3) 流动相和柱温的确定。一般用于分离 大黄素和 大黄酚的流动相主要有 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(70:30)、甲醇-0.1% 磷酸水溶液(85:15)和 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(80:20)。对以上的流动相,采用柱温 25℃,流速 0.8 ml/min,逐一系统进行试验,结果发现 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(80:20)为流动相时,对痔瘕洗液中 大黄素、大黄酚及其相邻峰分离良好,分离度>1.5,同时所得到的峰形尖,对称,重复性好,不拖尾,理论塔板数符合要求,柱效高,同时无阴性干扰,出峰时间亦达到满意的效果。(4) 进样量的考察。分别对进样量为 5 μl 、10 μl 、20 μl 的对照品和样品进行考察,结果发现,在峰的响应值满足的前提下,综合考虑峰形、峰高、RSD 值、杂质干扰和色谱柱寿命等情况,决定 10 μl 为较为理想的进样量。(5) 色谱条件的确定。通过优选,本研究确定 HPLC 法同时测定痔瘕洗液中 大黄素和 大黄酚含量的色谱条件:柱温 25℃,流速 0.8 ml/min,流动相为 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(80:20)。

总之,利用上述色谱条件以 HPLC 法同时测定痔瘕洗液中的 大黄素、大黄酚含量时, 大黄素、大黄酚与其他干扰成分得到较好的分离。该法具有操作简单、准确、回收率好、精密度和重复性高、分析快速等优点,可用来连续测定痔瘕洗液中的 大黄素、大黄酚含量,同时该色谱条件下阴性样品溶液不产生干扰,提示该方法适合作为痔瘕洗液的质量控制方法。

参考文献

- [1] 陈 展,杨家福,吴晓燕,等.痔瘕洗液的工艺选择[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(2):103-104.
- [2] 张晓岚.痔瘕洗液体外抑菌作用[J].遵义医学院学报,2010,33(2):137,139.
- [3] 郑 莉,杨家福,苏 虹.坐浴对痔瘕术创面愈合作用的研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(13):145-146.
- [4] 匡菊香,杨 艳,叶 凤,等.痔瘕洗液的制备及临床应用[J].遵义医学院学报,2003,26(5):476-477.
- [5] 周 辉.痔瘕洗液治疗肛门水肿[J].四川中医,2006,24(8):82.
- [6] 张 宪,李 岳.高效液相色谱法同时测定麻仁丸中大黄素、大黄酚、大黄酸及厚朴酚含量[J].国际中医中药杂志,2019,41(10):1107-1110.
- [7] 杨佩磊,蔡咏梅.HPLC法同时测定厚朴排气合剂中和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的含量[J].药物分析杂志,2017,37(5):922-926.
- [8] 张佳军,张 燕,朱 峰,等.HPLC法同时测定三黄消肿软膏中大黄素和大黄酚的含量[J].海峡药学,2019,31(4):71-73.
- [9] 李子君,牟晓莹.HPLC法同时测定肿痛外擦酊中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].海峡药学,2017,29(9):46-48.
- [10] 谭本仁,郑锦坤,徐晓梅,等.高效液相色谱法同时测定痔清舒洗剂中大黄素和大黄酚含量[J].中国药业,2016,25(17):74-77.
- [11] 王艳坤,赵 萍,高 建,等.HPLC法同时测定烧伤膏中没食子酸、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚[J].中成药,2014,36(5):1095-1097.
- [12] 何盛江,聂 阳,陈 刚,等.HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中国药房,2016,27(33):4719-4721.
- [13] 彭贵龙,周光明,杨远高,等.高效液相色谱同时测定何首乌中大黄酸、大黄素和大黄酚的含量[J].四川大学学报(自然科学版),2014,51(2):349-353.
- [14] 文 花,刘 燕,董 武,等.HPLC法同时测定蒙药给喜古讷-6中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中国民族医药杂志,2019,25(8):41-43.
- [15] 杨家福,陈 展,吴晓燕,等.痔瘕洗液质量标准研究[J].中国中医药信息杂志,2013,20(8):64-66.
- [16] 陈 展.痔瘕洗液质量稳定性试验研究[J].亚太传统医药,2014,10(6):13-14.
- [17] 陈 展,凌晓云.痔瘕洗液微生物限度检查方法的建立[J].安徽医药,2014,18(6):1047-1050.
- [18] 陈 展,吴晓燕.痔瘕洗液质量控制方法研究[J].中医药导报,2014,20(3):69-71.
- [19] 周曙光,潘洪平.高效液相色谱法测定妇科千金胶囊中芒柄花素含量的价值[J].中国临床新医学,2017,10(11):1059-1061.
- [20] 张 浩,付 彬.HPLC法测定金花消痤胶囊中大黄素和大黄酚的含量[J].西北药学杂志,2011,26(2):102-103.

[收稿日期 2021-04-09][本文编辑 韦所苏 韦 颖]

本文引用格式

蒙丽斌,潘洪平.HPLC法同时测定痔瘕洗液中大黄素和大黄酚的含量[J].中国临床新医学,2021,14(9):920-924.