

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0074-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.017



## 高效液相色谱法同时测定八味石灰华丸中 2 种成分含量\*

蔡缘缘<sup>1,2,3</sup>, 谢和兵<sup>1,2,3,4</sup>, 尼玛次仁<sup>4</sup>, 白玛旦增<sup>4</sup>, 袁志兵<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133;  
3. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000)

**摘要:**目的 建立同时测定八味石灰华丸中鞣花酸(EA)、羟基红花黄色素 A(HYSA)含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 - 甲醇(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 253 nm(EA)、403 nm(HYSA), 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 EA、HYSA 质量浓度分别在 0.73~14.52 μg/mL 及 3.97~79.45 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.999\ 8, 1.000\ 0, n=7$ ); 检测限分别为 0.29 μg/mL 及 1.59 μg/mL, 定量限分别为 0.58 μg/mL 及 3.18 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 103.36% 及 102.57%, RSD 分别为 3.00% 及 2.75% ( $n=6$ )。结论 该方法操作简便、结果准确, 可用于同时测定八味石灰华丸中 EA、HYSA 的含量。

**关键词:** 藏药; 八味石灰华丸; 鞣花酸; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱法; 含量测定

### Simultaneous Determination of Two Components in Bawei Shihuihua Pills by HPLC

CAI Yuanyuan<sup>1,2,3</sup>, XIE Hebing<sup>1,2,3,4</sup>, NIMA Ciren<sup>4</sup>, BAIMA Danzeng<sup>4</sup>, YUAN Zhibing<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226133; 4. Tibet Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd., Shigatse, Xizang, China 857000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of ellagic acid (EA) and hydroxysafflor yellow A (HYSA) in Bawei Shihuihua Pills. **Methods** The chromatographic column was the ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution - methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 253 nm (EA) and 403 nm (HYSA), the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of EA and HYSA were 0.73 - 14.52 μg/mL, 3.97 - 79.45 μg/mL ( $r = 0.999\ 8, 1.000\ 0, n = 7$ ) respectively. The limits of detection of EA and HYSA were 0.29 μg/mL, 1.59 μg/mL, the limits of quantification were 0.58 μg/mL, 3.18 μg/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of EA and HYSA were 103.36%, 102.57% with RSDs of 3.00%, 2.75% ( $n = 6$ ) respectively. **Conclusion** This method is easy and accurate, which can be used to simultaneously determine the contents of EA and HYSA in Bawei Shihuihua Pills.

**Key words:** Tibetan medicine; Bawei Shihuihua Pills; ellagic acid; hydroxysafflor yellow A; HPLC; content determination

八味石灰华丸始载于《四部医典》(1987年版), 是西藏神猴药业有限责任公司的全国独家产品(国药准字 Z20083038)。其由绿绒蒿、肉桂、红花、石灰华、甘肃棘豆膏、葶苈、丁香、石榴子组方, 有利尿消肿功效, 临床用于治疗肺水肿、肝水肿、肾水肿等原因引起的水肿, 尤其对肾损伤引起的水肿疗效较好。本品现行的药品标准(原国家食品药品监督管理局标准 YBZ01032008)中仅有定性检查, 其质量稳定性和临床疗效无法得到保障。为提高制剂的质量标准, 本研究中参考 2020 年版《中国药典

(三部)》<sup>[1]</sup>的含量测定法与文献[2-5], 采用高效液相色谱(HPLC)法测定八味石灰华丸中主要指标性成分鞣花酸(EA)、羟基红花黄色素 A(HYSA)<sup>[6-7]</sup>的含量, 为该制剂的质量控制提供依据。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配有光电二极管阵列检测器); UV-1900i 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司); UC-250 DE 型超声清

\* 基金项目: 国家自然科学基金[81470247]; 西藏自治区日喀则市区域科技协同创新专项[QYXTZX-RKZ2022-07]。

第一作者: 蔡缘缘, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理学, (电子信箱) caiyuanyuan202208@163.com。

△ 通信作者: 袁志兵, 男, 博士研究生, 副教授, 研究方向为中药药理学, (电子信箱) zhibinyuan@sina.com。

洗仪(上海精其仪器有限公司);HTY-800g型切药机(永康市红太阳机电有限公司);XSR205DU/AC型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg), Synergy-UV型纯水仪(美国Merck Millipore公司)。

## 1.2 试药

八味石灰华丸(批号分别为20220701、20220901、20221201、20230601),均由西藏神猴药业有限责任公司提供;EA对照品(批号为111959-201903,含量88.8%),HYSA对照品(批号为111637-202111,含量96.8%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,磷酸为优纯级,水为纯化水。药材饮片石灰华(批号为20200301)、红花(批号为20200401)、丁香(批号为20200301)、葶苈(批号为20200301)、绿绒蒿(批号为202000201)、石榴子(批号为20230619)、肉桂(批号为20200301)、甘肃棘豆(批号为20230504),均由西藏神猴药业有限责任公司提供,经江苏神猴医药研究有限公司谢和兵副主任药师鉴定为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~11 min时25%B→40%B,11~20 min时40%B→48%B,20~26 min时48%B→61%B,26~28 min时61%B→25%B,28~30 min时25%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:253 nm(EA)、403 nm(HYSA);柱温:35℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

取EA对照品0.01022 g,精密称定,置50 mL棕色容量瓶,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为0.182 mg/mL的EA对照品贮备液。取HYSA对照品0.01026 g,精密称定,置20 mL棕色容量瓶,加70%甲醇-0.1%磷酸水溶液溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为0.497 mg/mL的HYSA对照品贮备液。分别精密吸取4,8 mL,置同一50 mL棕色容量瓶,加0.1%磷酸水溶液-70%甲醇定容,摇匀,即得EA、HYSA质量浓度分别为0.015 mg/mL、0.079 mg/mL的混合对照品溶液。取样品适量,研磨成细粉,取0.5 g,精密称定,置150 mL锥形瓶,加70%甲醇溶液50 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理60 min,放冷,加70%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按八味石灰华丸处方及工艺制备缺石榴子、红花的阴性样品,按供试品溶液制备方法分别制备相应阴性对照品溶液。不加样品,按供试品溶液制备方法制备空白溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且空白与阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL,分别置10 mL容量瓶,用0.1%磷酸水溶液-70%甲醇定容,制得系列混合对照品溶液。各取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,以待测成分的质量浓度( $X, \mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。得EA回归方程为 $Y_1 = 93.217X_1 + 14.236$  ( $r = 0.9998, n = 7$ ),HYSA为 $Y_2 = 28.575X_2 + 3.196$  ( $r = 1.0000, n = 7$ )。结果表明,EA、HYSA质量浓度分别在0.73~14.52 μg/mL及3.97~79.45 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比为3:1及10:1时待测成分的质量浓度为检测限和定量限。结果EA、HYSA检测限分别为0.29 μg/mL及1.59 μg/mL,定量限分别为0.58 μg/mL及3.18 μg/mL。

精密度试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果EA、HYSA峰面积的RSD分别为1.48%及1.71% ( $n = 6$ ),表明方法精密度良好。

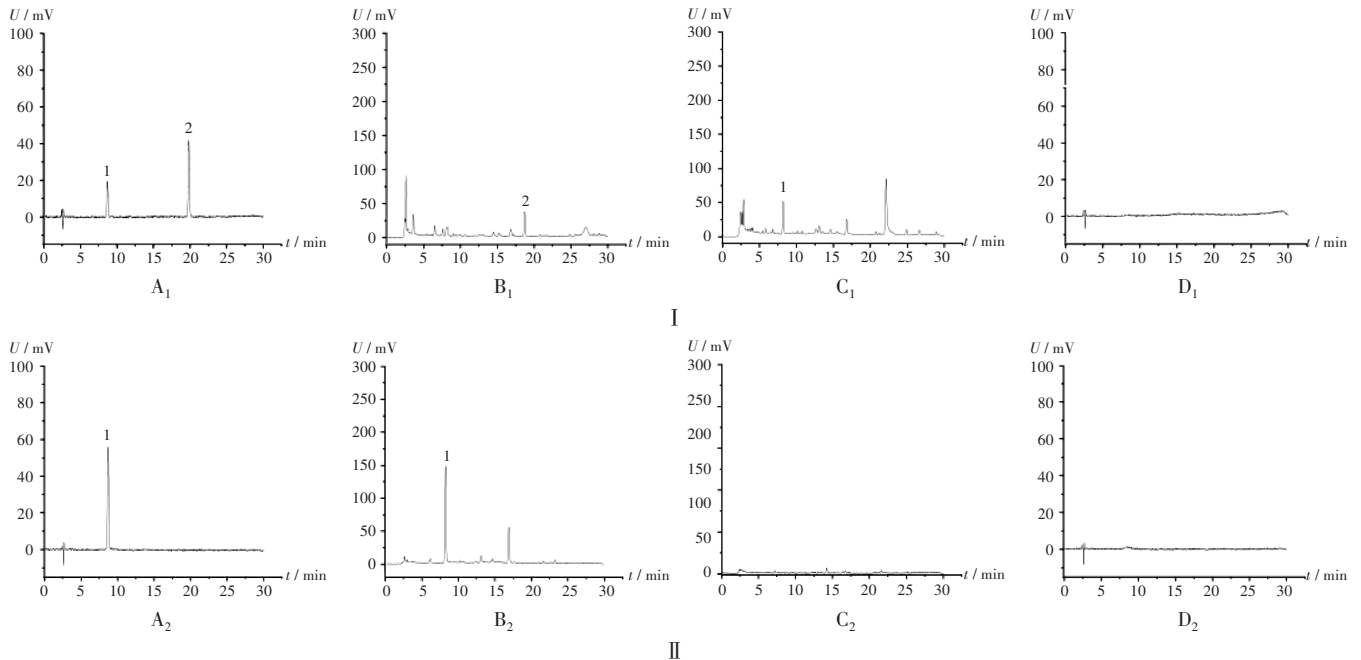
稳定性试验:取供试品溶液(批号为20220701)适量,分别于室温放置0,4,8,12,24,36 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果EA、HYSA峰面积的RSD分别为1.30%及0.90% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在室温放置36 h内基本稳定。

重复性试验:平行称取6份样品(批号为20220701),按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样,记录峰面积并计算含量。结果EA、HYSA的含量分别为0.28 mg/g及1.14 mg/g, RSD分别为1.97%及1.30% ( $n = 6$ ),表明方法重复性较好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号20220701)适量,共6份,各0.5 g,分别加入混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

### 2.4 样品含量测定

取样品(批号为20220901、20221201、20230601)适量,平行3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果EA、HYSA含量分别为0.28,0.17,0.23 mg/g及1.29,



1. HYSA 2. EA  
A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>. 混合对照品溶液 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>. 供试品溶液 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>. 阴性对照品溶液(分别缺石榴子、红花) D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>. 空白溶液  
I. 253 nm II. 403 nm

图1 高效液相色谱图

1. HYSA 2. EA

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>. Mixed reference solution B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>. Test solution C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>. Negative reference solution (lacking Punicae Granati Semen and Carthami Flos, respectively) D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>. Blank solution  
I. 253 nm II. 403 nm

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of the recovery test (n=6)

样品含量		加入量		测得量		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
EA	HYSA	EA	HYSA	EA	HYSA	EA	HYSA	EA	HYSA	EA	HYSA
0.141	0.572	0.109	0.596	0.256	1.194	105.50	104.36				
0.140	0.566	0.109	0.596	0.247	1.145	98.17	97.15				
0.141	0.573	0.109	0.596	0.257	1.196	106.42	104.53				
0.140	0.569	0.109	0.596	0.255	1.176	105.50	101.85	103.36	102.57	3.00	2.75
0.140	0.569	0.109	0.596	0.251	1.187	101.83	103.69				
0.140	0.569	0.109	0.596	0.252	1.188	102.75	103.86				

1. 43及1.30 mg/g, RSD分别为24.30%及5.83%(n=3)。

### 3 讨论

#### 3.1 指标性成分选择

EA是石榴子的主要有效成分<sup>[8]</sup>,属没食子酸的衍生物<sup>[9]</sup>,具有抗炎、抗氧化、降糖、保肝、保护心肌和调节免疫等药理作用<sup>[10-11]</sup>;HYSA是红花的主要有效成分,属单查尔酮苷类结构的化合物<sup>[12-13]</sup>,具有改善肾功能、抗心肌缺血等多种药理作用<sup>[14-15]</sup>。现代药理学研究表明,EA、HYSA在治疗肾损伤方面均具有保护作用<sup>[16-17]</sup>,而八味石灰华丸临床针对肾损伤引起的水肿具有较好的疗效。故选择EA、HYSA作为指标性成分。

#### 3.2 色谱条件选择

预试验中发现,EA在253 nm波长处有较强吸收, HYSA吸收较弱,且供试品溶液HPLC图谱中HYSA峰与相邻峰分离度过小;HYSA在403 nm波长处有较强吸收,而EA无吸收。尝试用253 nm单一波长测定供试品中的EA、HYSA含量,结果发现,HYSA的色谱峰峰面积较小,且受到严重干扰;通过调节流动相、色谱柱等色谱条件,均不能达到良好分离效果。故选择HPLC双波长法,在253 nm、403 nm波长处分别测定EA、HYSA的含量。预试验中结合文献<sup>[18-20]</sup>,比较了四氢呋喃、甲醇、乙腈有机相及水、磷酸水溶液(0.05%, 0.1%, 0.15%),甲酸水溶液(0.05%, 0.1%, 0.15%)水相对色谱峰的影响。结果发现,室温(25℃)条件下乙腈、四氢呋喃作为有机相时,EA色谱峰拖尾严重,甲醇作为有机相时EA色谱峰形较好;室温条件下水、甲酸水溶液作为水相时EA色谱峰分离度欠佳,磷酸水溶液作为水相时EA色谱峰分离度显著增加,且体积分数为0.1%时最佳,故选择0.1%磷酸水溶液-甲醇为流动相。还考察了不同柱温(25℃、30℃、35℃)对色谱峰的影响,结果发现,柱温升高,HYSA和EA色谱峰分离度显著提

高,当柱温达到35℃,色谱峰分离良好(分离度均大于1.5),故柱温选择35℃。

### 3.3 溶液制备

EA对照品难溶于水,微溶于醇,溶于碱、吡啶<sup>[21]</sup>,但其溶液不稳定,光照及溶液pH均会大幅影响EA的稳定性<sup>[22]</sup>。预试验中参考2020年版《中国药典(一部)》石榴皮药材含量测定方法,配置每1 mL含20 μg的EA的甲醇溶液并室温放置12 h,即有沉淀析出,溶液变浑浊,与EA在溶液状态下不稳定析出有关。而在避光的偏酸性条件下,溶液稳定性显著提高。因此,本研究中选择在避光条件下,先用甲醇溶解EA,置棕色容量瓶中,再用0.1%磷酸水溶液-70%甲醇稀释并定容,避光冷藏保存。

预试验中通过单因素试验分析了提取溶剂、提取方式、提取时间、料液比对供试品溶液中指标成分EA、HYSA含量的影响。结果表明,甲醇提取液中2个指标性成分的含量均显著高于乙醇提取液;且当甲醇体积分数为20%,40%,50%,70%时,供试品溶液中EA、HYSA含量显著增加,当甲醇体积分数为70%,80%,90%时,2种成分含量变化不显著,故选择70%甲醇。加热回流与超声提取法(功率250 W,频率40 kHz)所制备的供试品溶液中2种指标性成分含量无显著差异,故选择更简便的超声提取法。超声提取5,10,20,30,60 min时,供试品溶液中2种指标性成分含量均显著增加且与提取时间呈正相关,但超声60,120 min时含量相当,故选择超声60 min。料液比为1:25(*m/V*,下同)、1:50、1:100时供试品溶液中2种成分含量均显著增加且与该比例呈正相关,但料液比1:100、1:200时含量相当,故选择料液比1:100。

### 3.4 方法评价

本研究中建立了同时测定八味石灰华丸中EA和HYSA含量的HPLC法,相较于2种成分单独的液相分析,该法可有效减少仪器的进样次数,且重复性、精确性好,样品处理方法稳定可行,可用于制剂的质量评价及质量标准提升提供依据,也为药材、中成药中EA、HYSA的检测提供参考。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:456.  
[2] 张文莉,张俊仪,张龙开,等. 高效液相色谱法测定余甘子提取物中没食子酸与鞣花酸含量[J]. 中国药业,2019,28(2): 26-29.  
[3] 才让草,潘遐,李魁,等. 藏药石榴莲花散中鞣花酸和胡椒碱含量测定方法研究[J]. 中国药事,2020,34(2):215-221.  
[4] 何元. HPLC-PDA同时测定石榴健胃片中4种活性成分

的含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(12):2209-2214.  
[5] 任荣军,湛建峰,陈虹球,等. 高效液相色谱法同时测定艾绒中4种成分[J]. 中国药业,2023,32(24):103-106.  
[6] 胡小祥,何艳. 高效液相色谱法同时测定骨折挫伤胶囊中羟基红花黄色素A和大黄素含量[J]. 中国药业,2020,29(1): 54-56.  
[7] 杜克群,成颜芬,李敏敏,等. 基于特征图谱与5种成分含量的经典名方桃红四物汤量值传递分析[J]. 中草药,2022, 53(22):7058-7069.  
[8] 马梅芳,张丹丹,张波. 石榴籽化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品,2020,22(5):434-437.  
[9] 何宇鸿,梁敏桐,刘璐群,等. 鞣花酸药理作用综述[J]. 化学工程与装备,2022(3):216-217.  
[10] RiOS JL, GINER RM, MARIN M, et al. A Pharmacological Update of Ellagic Acid [J]. *Planta Medica*, 2018, 84(15): 1068-1093.  
[11] 陈玫伶,勾玲,卢海啸. 鞣花酸药理作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2023,25(1):196-202.  
[12] 唐红,鲁道旺,杨詹詹,等. 羟基红花黄色素A的药理学研究进展[J]. 广州化工,2017,45(14):20-22.  
[13] ZHANG XL, SHEN DY, FENG YT, et al. Pharmacological Actions, Molecular Mechanisms, Pharmacokinetic Progressions, and Clinical Applications of Hydroxysafflor Yellow A in Antidiabetic Research [J]. *Journal of Immunology Research*, 2021,2021:4560012.  
[14] ZHAO F, WANG P, JIAO YY, et al. Hydroxysafflor Yellow A: A Systematical Review on Botanical Resources, Physicochemical Properties, Drug Delivery System, Pharmacokinetics, and Pharmacological Effects [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020,11:579332.  
[15] 牛芬溪,刘悦,刘雅楠,等. 羟基红花黄色素A的药理作用及研究进展[J]. 中国药理学杂志,2021,56(17):1372-1377.  
[16] 孙慧,付千,戴晨曦,等. 鞣花酸对马兜铃酸I诱导小鼠急性肾损伤的保护作用[J]. 食品科学,2022,43(5):84-90.  
[17] BAI J, ZHAO JJ, CUI DX, et al. Protective effect of hydroxysafflor yellow A against acute kidney injury via the TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. *Sci Rep*,2018,8(1):9173.  
[18] 李菲. 基于高效液相色谱指纹图谱及多指标成分分析的化学计量学评价活血消痛酊质量[J]. 中国药业,2023, 32(15):79-84.  
[19] 刘婷婷,杨玲霞,罗宇,等. 藏药六味大托叶云实散质量标准研究[J]. 中国药业,2021,30(11):50-52.  
[20] 张留超,刘勇华. 鞣花酸磷脂复合物的制备及其口服生物利用度研究[J]. 中成药,2021,43(7):1685-1690.  
[21] 施洋,孙芸,谢莉,等. 石榴皮中活性成分鞣花酸的平衡溶解度与油水分配系数的测定[J]. 新疆医科大学学报, 2016,39(2):145-148.  
[22] 骆菊文,蒋新元,徐佳敏,等. 鞣花酸的稳定性及其保护研究[J]. 日用化学工业,2020,50(8):547-552.

(收稿日期:2023-12-20;修回日期:2024-09-19)