

UPLC-PDA 法同时测定滋水清肝饮中 10 种成分的含量

侯梦卉， 楚欣莹， 王舒心， 张清钥， 王磊， 马静*

(天津中医药大学第一附属医院，国家中医针灸临床医学研究中心，天津 300381)

摘要：目的 建立 UPLC-PDA 法同时测定滋水清肝饮中没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、马钱苷、丹皮酚的含量。方法 分析采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×100 mm, 1.8 μm)，流动相 0.2% 甲酸-甲醇，梯度洗脱；体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 254 nm。结果 10 种成分在各自范围线性关系良好 ($R^2 \geq 0.9999$)，平均加样回收率 91.57% ~ 105.1%，RSD 0.9% ~ 2.8%。结论 该方法专属性强，灵敏度高，可为滋水清肝饮的质量评价及临床应用提供参考。

关键词：滋水清肝饮；化学成分；含量测定；UPLC-PDA

中图分类号：R927.2

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2025)11-3566-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.005

Simultaneous content determination of ten constituents in Zishui Qinggan Drink

HOU Meng-hui, CHU Xin-ying, WANG Shu-xin, ZHANG Qing-yue, WANG Lei, MA Jing*

(First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China)

KEY WORDS: Zishui Qinggan Drink; chemical constituents; content determination; UPLC-PDA

滋水清肝饮出自《医宗己任编》，为清代名医高鼓峰临床验方，方中滋肾养阴制约肝火妄动之源，水至则风熄；清泻肝热为肾阴焦灼之困釜底抽薪，火泻则水生，后世医家将其应用于肾虚肝郁所致绝经综合征、卵巢功能衰退等症^[1-3]，可调控 ERK/CREB/BDNF 等通路来改善性腺轴紊乱，抑制细胞焦亡^[4-5]，并通过 PI3K-Akt 信号通路等途径发挥抗抑郁、抗氧化等作用^[6-7]，但目前对该方的质量评价研究鲜见报道。本实验根据相关文献、前期研究结合 2020 年版《中国药典》，发现滋水清肝饮中酒萸肉、栀子所含的没食子酸和栀子苷有抗细胞凋亡、抑制肿瘤增殖等作用^[8-11]，熟地黄、牡丹皮主要成分 5-羟甲基糠醛、京尼平龙胆双糖苷和莫诺苷具有抗炎、抗氧化、抗凝活性^[12-16]，酒萸肉所含的马钱苷可促细胞再生^[17]，白芍所含的芍药苷可改善卵巢功能^[18]，牡丹皮所含的丹皮酚和氧化芍药苷有抗焦虑抑郁作用^[19-21]，协同发挥全方滋肾清肝功效，并采用 UPLC-PDA 法同时测

定上述 10 种成分的含量，以期实现该方质量评价，对后续相关医疗机构制剂研发具有重要意义。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY H Class Plus 型超高效液相色谱仪（美国沃特世科技公司）；Centrifuge 5424 R 型台式离心机（德国艾本德股份公司）；ME204 型电子天平（万分之一）、MS105DU 型电子天平（十万分之一）（瑞士梅特勒-托利多公司）；UPR-I I-15TNZP 型超纯水仪（四川优普超纯科技有限公司）；SB25-12DTN 型超声波清洗机（宁波新芝生物科技有限公司）；Votex-5 型涡旋振荡器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

1.2 药材与药物 牡丹皮（批号 23070413）、白芍（批号 23050301）、北柴胡（批号 230501）、山药（批号 230404）、酒萸肉（批号 2208084）、熟地黄（批号 2303084）、泽泻（批号 23032536）、当归（批号 230601）、茯苓（批号 230405009）、栀子（批号 230401CP0419）、炒酸枣仁（批号

收稿日期：2025-04-17

基金项目：现代中医药海河实验室科技项目（24HHZYSS00014）

作者简介：侯梦卉（1993—），女，博士生，研究方向为中医妇科学。E-mail: houmenghui0205@163.com。

*通信作者：马静（1979—），女，博士，主任医师，博士生导师，研究方向为中医妇科学。E-mail: majing2609@163.com

230405) 均由天津中医药大学第一附属医院提供, 经专家鉴定为正品。滋水清肝饮共3批, 分别来自北京盛世龙药业有限公司、津药达仁堂集团股份有

限公司、河北美威药业股份有限公司, 所含饮片信息见表1。

表1 滋水清肝饮中饮片信息

Tab. 1 Information of decoction pieces in Zishui Qinggan Drink

饮片	批次1		批次2		批次3	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号
牡丹皮	安徽	2310073	安徽	9240405301	安徽	230501
白芍	安徽	2309124	安徽	9231203303	安徽	240403
北柴胡	河北	2404115	山西	9240400801	陕西	240202
山药	河南	2311193	河北	240300101	河北	231202
酒萸肉	河南	231101CP0039	河南	230601CP0039	浙江	240101
熟地黄	河南	2310137	山西	230402101	河南	240302
泽泻	福建	2312232	四川	240300801	四川	240401
当归	甘肃	2212114	甘肃	9240302001	甘肃	240304
茯苓	安徽	2312157	云南	230305801	安徽	240102
梔子	江西	2312186	江西	230501002	江西	240101
炒酸枣仁	河北	2110104	山东	230902801	河北	240101

1.3 试剂 没食子酸(C17D10C105977)、5-羟甲基糠醛(H12M9Z61023)、去乙酰车叶草酸甲酯(Z1708X45939)、氧化芍药苷(A18IB212939)、莫诺昔(M14IB209606)、京尼平龙胆双糖苷(N17IB232628)、梔子苷(S17O11Y127293)、芍药苷(M28GB143089)、马钱苷(M25IB210623)、丹皮酚(N22HB201956)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度≥98%。甲醇(色谱纯)购自美国Sigma-Aldrich公司; 甲醇(质谱纯)购自美国赛默飞世尔科技公司; 甲酸(质谱纯)购自美国ACS恩科化学公司; 二甲基亚砜(DMSO, 分析纯)购自天津市大茂化学试剂厂; 超纯水为实验室自制。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 精密称取10种对照品, 除了没食子酸用水溶解外, 其他成分用甲醇溶解(部分先用DMSO助溶), 制成质量浓度分别为没食子酸1.98 mg/mL、5-羟甲基糠醛3.04 mg/mL、去乙酰车叶草酸甲酯1.004 mg/mL、氧化芍药苷1.018 mg/mL、莫诺昔3.03 mg/mL、京尼平龙胆双糖苷2.045 mg/mL、梔子苷6.035 mg/mL、芍药苷7.02 mg/mL、马钱苷1.514 mg/mL、丹皮酚3.985 mg/mL的贮备液, 分别精密移取400、500、500、200、400、450、500、500、400、400 μL, 置于5 mL量瓶中, 加水定容至刻度, 制成质量浓度分别为158.4、304、100.4、40.72、242.4、184.05、603.5、702、121.12、318.8 μg/mL的溶液, 即得, 50%甲醇逐级稀释2、4、8、16、32倍。

另外, 分别吸取上述贮备液400、500、500、200、400、450、500、450、400、400 μL, 转移至25 mL量瓶中, 50%甲醇定容, 用于加样回收率试验。

2.2 供试品溶液制备 取熟地黄、山药、酒萸肉、茯苓、泽泻、牡丹皮、梔子、当归、白芍、酸枣仁各10 g, 柴胡6 g, 加6倍量水回流提取2次, 每次1.5 h, 合并滤液, 精密移取3 mL, 置于10 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度, 混匀, 静置, 14 000 r/min离心15 min, 取上清液, 即得。

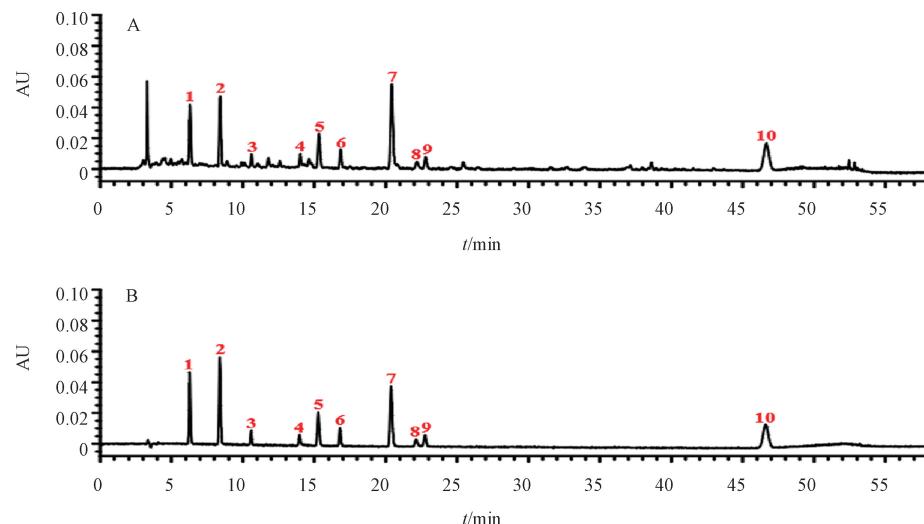
2.3 阴性样品溶液制备 按照处方比例和制备工艺, 分别制成缺牡丹皮、酒萸肉和白芍, 缺酒萸肉和熟地黄, 缺梔子, 缺牡丹皮, 缺酒萸肉, 缺牡丹皮和白芍的阴性样品, 按“2.2”项下方法制备, 即得。

2.4 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相0.2%甲酸(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~7 min, 10%~21% B; 7~13 min, 21%~27% B; 13~28 min, 27%~37% B; 28~37 min, 37%~46% B; 37~43 min, 46%~49% B; 43~49 min, 49%~95% B; 49~58 min, 95% B); 体积流量0.3 mL/min; 柱温40 °C; 检测波长254 nm; 进样量2 μL

3 结果

3.1 专属性试验 取对照品、供试品溶液适量, 在“2.4”项色谱条件下进样测定, 发现各成分保留时间一致, 见图1。

取阴性样品溶液适量, 在“2.4”项色谱条件下进样测定, 发现阴性无干扰, 见图2。

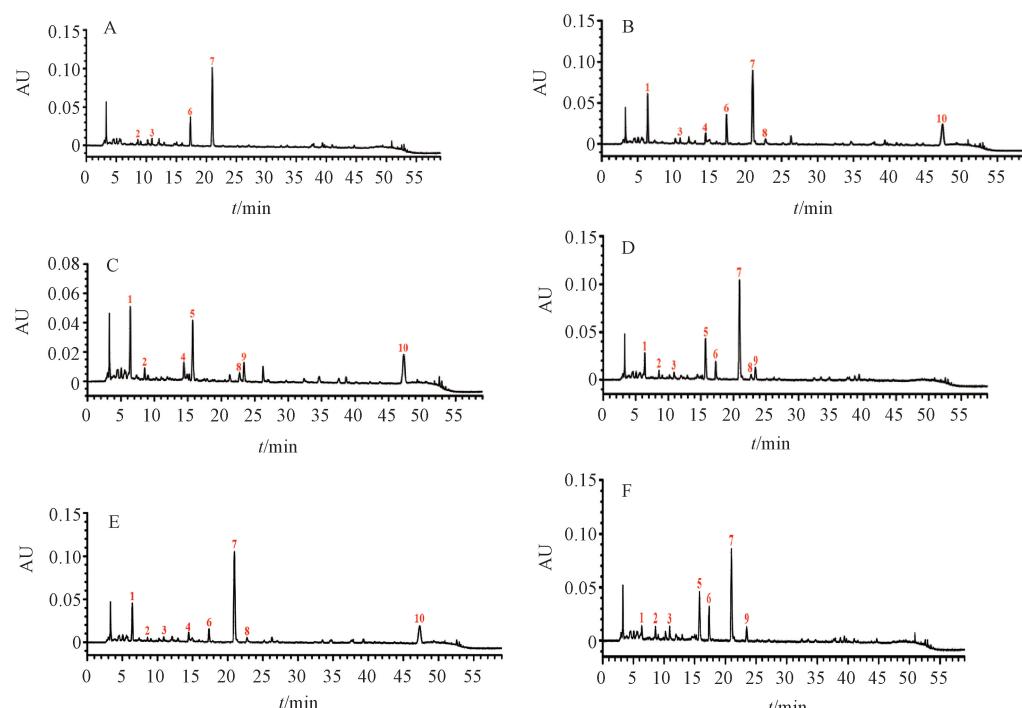


注: A 为供试品, B 为对照品。

1. 没食子酸 2. 5-羟甲基糠醛 3. 去乙酰车叶草酸甲酯 4. 氧化芍药苷 5. 莫诺昔 6. 京尼平龙胆双糖苷 7. 桔子苷
 8. 芍药苷 9. 马钱子 10. 丹皮酚
 1. gallic acid 2. 5-hydroxymethylfurfural 3. deacetylasperulosidic acid methyl ester 4. oxypaeoniflorin
 5. monoside 6. geniposide gentiobioside 7. gardenoside 8. paeoniflorin 9. loganin 10. paeonol

图1 各成分 UPLC-PDA 色谱图 (I)

Fig. 1 UPLC-PDA chromatograms of various constituents (I)



注: A~F 分别为缺牡丹皮、酒萸肉和白芍, 缺酒萸肉和熟地黄, 缺桔子, 缺牡丹皮, 缺酒萸肉, 缺牡丹皮和白芍的阴性样品。

1. 没食子酸 2. 5-羟甲基糠醛 3. 去乙酰车叶草酸甲酯 4. 氧化芍药苷 5. 莫诺昔 6. 京尼平龙胆双糖苷 7. 桔子苷 8. 芍药苷
 9. 马钱子 10. 丹皮酚
 1. gallic acid 2. 5-hydroxymethylfurfural 3. deacetylasperulosidic acid methyl ester 4. oxypaeoniflorin 5. monoside 6. geniposide gentiobioside
 7. gardenoside 8. paeoniflorin 9. loganin 10. paeonol

图2 各成分 UPLC-PDA 色谱图 (II)

Fig. 2 UPLC-PDA chromatograms of various constituents (II)

3.2 方法学考察

3.2.1 线性关系考察 取“2.1”项下对照品溶液适量，在“2.4”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标

(Y) 进行回归，并且分别以信噪比（S/N）3:1、10:1为检测限、定量限，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
没食子酸	$Y=15.369.275.77X+3.297.975.12$	0.999 9	4.950~158.4	2.475	4.950
5-羟甲基糠醛	$Y=11.186.157.45X+13.457.711.44$	0.999 9	9.500~304.0	4.750	9.500
去乙酰车叶草酸甲酯	$Y=4.837.493.13X+951.335.82$	0.999 9	3.138~100.4	1.569	3.138
氧化芍药苷	$Y=9.239.101.15X-174.273.63$	0.999 9	1.273~40.72	0.636 3	1.273
莫诺苷	$Y=6.893.620.58X+362.069.65$	0.999 9	7.575~242.4	3.788	7.575
京尼平龙胆双糖苷	$Y=4.035.454.32X+460.072.14$	0.999 9	5.752~184.1	2.876	5.752
栀子苷	$Y=5.532.500.08X+4.182.900.50$	0.999 9	18.86~603.5	9.430	18.86
芍药苷	$Y=588.134.46X+113.569.65$	0.999 8	21.94~702.0	10.97	21.94
马钱苷	$Y=5.042.907.00X+1.050.768.66$	0.999 9	3.785~121.1	1.893	3.785
丹皮酚	$Y=9.921.934.44X+738.728.86$	1.000 0	9.963~318.8	4.981	9.963

3.2.2 精密度试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于同一天、连续3 d在“2.4”项色谱条件下各进样测定6次，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、马钱苷、丹皮酚日内峰面积RSD分别为0.4%、0.4%、0.9%、0.7%、1.6%、0.2%、0.5%、1.3%、0.5%、0.4%，日间峰面积RSD分别为0.1%、0.1%、0.8%、0.3%、0.9%、0.4%、0.2%、0.4%、0.3%、0.2%，表明仪器精密度良好。

3.2.3 重复性试验 按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、马钱苷、丹皮酚含量RSD分别为2.5%、2.0%、0.4%、0.5%、1.5%、0.3%、1.2%、0.9%、0.2%、0.2%，表明该方法重复性良好。

3.2.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液，10℃下于0、2、4、8、10、12 h在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、马钱苷、丹皮酚峰面积RSD分别为0.8%、0.9%、0.6%、1.1%、1.2%、0.2%、0.6%、1.1%、0.4%、1.0%，表明溶液在12 h内稳定性良好。

3.2.5 加样回收率试验 精密移取本品1.5 mL，加入2.5 mL对照品溶液，按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下

进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、马钱苷、丹皮酚平均加样回收率分别为98.5%、104.2%、105.1%、102.0%、91.57%、93.68%、103.3%、98.79%、97.91%、96.4%，RSD分别为2.7%、1.7%、1.9%、2.2%、0.9%、2.1%、1.1%、2.8%、1.8%、1.0%。

3.3 样品含量测定 取3批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表3。

表3 各成分含量测定结果 (mg/mL, n=3)

Tab. 3 Results for content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

成分	批次1	批次2	批次3
没食子酸	0.073	0.070	0.064
5-羟甲基糠醛	0.012	0.015	0.012
去乙酰车叶草酸甲酯	0.018	0.035	0.011
氧化芍药苷	0.017	0.017	0.010
莫诺苷	0.170	0.167	0.175
京尼平龙胆双糖苷	0.094	0.155	0.094
栀子苷	0.552	0.426	0.515
芍药苷	0.375	0.378	0.350
马钱苷	0.068	0.069	0.066
丹皮酚	0.109	0.134	0.099

4 讨论

本实验首先考察了不同色谱柱 [HSS T3柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm)、COSMOSIL PBr柱(2.1 mm×100 mm)]出峰数量、分离度、峰形，最终确定为Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱。再

考察了不同流动相(0.1%甲酸-甲醇、0.1%甲酸-乙腈),发现以0.1%甲酸-甲醇洗脱时各成分色谱峰分离度、峰形良好。然后,分别考察了0.1%甲酸-甲醇、0.2%甲酸-甲醇,从峰形、分离度方面考虑,最终确定为0.2%甲酸-甲醇。最后,考察了不同柱温,发现在40℃下各成分色谱峰出峰数目多,分离度理想。

5 结论

本实验建立UPLC-PDA法同时测定滋水清肝饮中没食子酸、5-羟甲基糠醛、去乙酰车叶草酸甲酯、氧化芍药苷、莫诺昔、京尼平龙胆双糖昔、栀子昔、芍药昔、马钱昔、丹皮酚的含量,发现该方法操作性强,精准度高,可为该方质量控制及临床应用提供参考。

参考文献:

- [1] 李燕,郑树霞,胡佩玲.滋水清肝饮的临床应用进展[J].四川中医,2022,40(7):213-217.
- [2] 王一茗,温永天,卫裕晨,等.基于调中复衡理论运用滋水清肝饮治疗脾胃病[J].中医杂志,2023,64(15):1534-1537.
- [3] 李燕,郑树霞,胡佩玲.滋水清肝饮治疗绝经综合征失眠及焦虑抑郁疗效观察[J].时珍国医国药,2022,33(12):2960-2962.
- [4] 曹珊珊,史磊磊,张雨涵,等.滋水清肝饮对慢性束缚应激抑郁小鼠皮层ERK/CREB/BDNF通路及肠道菌群的影响[J].中草药,2024,55(2):489-498.
- [5] 张雨涵,曹珊珊,史磊磊,等.基于JAK2/ERK1/2/STAT3信号通路探讨滋水清肝饮对皮质酮代替饮水抑郁模型小鼠干预作用[J].中药药理与临床,2024,40(9):42-48.
- [6] 杨峰,朱雯,张雯,等.滋水清肝饮通过抑制细胞焦亡减轻抑郁模型大鼠海马区炎症[J].安徽中医药大学学报,2023,42(2):85-90.
- [7] 王宇.滋水清肝饮治疗绝经综合征的临床观察及网络药理学研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2021.
- [8] 史海燕,郗艳丽.没食子酸生物活性研究进展[J].吉林医药学院学报,2020,41(2):146-149.
- [9] 陈榕,何梓炫,颜烨,等.栀子及其主要成分的药理及毒性作用研究进展[J].中草药,2023,54(18):6092-6105.
- [10] 闫焕杰,孙岩,叶东霞.没食子酸对人骨肉瘤HOS细胞增殖、迁移和侵袭能力及上皮-间充质转化的影响[J].中国医药科学,2024,14(15):20-23.
- [11] 郑时旭,陈丽,丁雅容,等.没食子酸激活Nrf-2信号通路降低高糖诱导NIH-3T3细胞氧化应激与炎症反应[J].中药药理与临床,2024,40(2):78-84.
- [12] 段红允.氧化芍药苷联合运动对抑郁症大鼠的抗抑郁作用及其机制[J].分子植物育种,2023,21(18):6178-6184.
- [13] 张紫凝,左芦根,胡建国.莫诺昔药理学作用和机制的研究进展[J].蚌埠医学院学报,2023,48(1):135-138.
- [14] 邓小兰,那丽莎,于雪,等.莫诺昔调控糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经氧化应激损伤的机制[J].中国当代医药,2024,31(18):4-8.
- [15] 姜哲轶,吴婷月,沈传斌,等.5-羟甲基糠醛的药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2022,39(1):92-95.
- [16] 赫伟,周成蕾.HPLC法测定滇产白花蛇舌草及伪品中去乙酰车叶草酸甲酯的研究[J].中国民族民间医药,2023,32(24):33-36.
- [17] 熊阳昆,龚名洋,罗颖熙,等.马钱昔调控AMPK信号通路改善果糖饮食小鼠肝脏脂代谢紊乱的作用机制[J].中草药,2024,55(21):7325-7334.
- [18] 张利.白芍的药理作用及现代研究进展[J].中医临床研究,2014,6(29):25-26.
- [19] 张长龙,马明钰,李阳,等.丹皮酚和芦丁对经前烦躁障碍症肝气逆证大鼠行为、卵巢激素和神经递质的影响[J].山东中医药大学学报,2022,46(4):508-515.
- [20] 段红允.氧化芍药苷联合运动对抑郁症大鼠的抗抑郁作用及其机制[J].分子植物育种,2023,21(18):6178-6184.
- [21] 金朝,郑大华,何昊奇,等.氧化芍药苷在正常与抑郁大鼠体内代谢产物的比较研究[J].中草药,2024,55(9):2887-2895.