

基于UPLC-Q TOF-MS^E技术的藤黄健骨丸指纹图谱建立 及共有峰鉴定

谢东¹ 胡健楠¹ 李念¹ 杨桔² 黄青² 皮子凤^{1*}
郑飞¹ 戴雨霖¹ 越皓^{1*}

¹(长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

²(长春人民药业集团有限公司, 长春 130033)

摘要 建立藤黄健骨丸高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,完善产品质量标准。采用 Waters Symmetry C18 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)色谱柱;流速为0.4 mL/min;进样量为2 μL;紫外检测波长为260 nm;在柱温30℃下以0.1%甲酸水(A)和0.1%甲酸乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版本)”建立藤黄健骨丸指纹图谱,并分析相似度。采用液质联用技术(UPLC-Q TOF-MS^E),根据化合物串联质谱信息结合对照品进行了共有峰结构鉴定。共确定了10批藤黄健骨丸指纹图谱中20个共有峰,相似度均在0.95以上。基于对照品和串联质谱信息指认了共有峰中13种成分的结构,并进行了峰归属。对10批藤黄健骨丸指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行了计算,结果显示各批次样品共有峰的相对保留时间和相对峰面积均比较稳定,表明它们所对应的各成分含量较为均一。采用该指纹图谱对中间体进行了相似度评价,发现中间体与成品相关性良好。该方法精密度、重复性和稳定性好,不仅可用于藤黄健骨丸成品的质量控制,还可对中间体进行检测,用于生产过程的控制。

关键词 藤黄健骨丸;高效液相色谱;指纹图谱;液质联用

中图分类号:O656

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2024)03-0437-08

藤黄健骨丸是著名中医学家刘柏龄教授凭借大量的临床实践归纳总结出的中药方剂,该方是由熟地黄、鹿衔草、肉苁蓉、鸡血藤、骨碎补(烫)、淫羊藿和炒莱菔子7味中药为原料,经粉碎、提取后以炼蜜为粘合剂制成的纯中药浓缩蜜丸制剂^[1]。方中7味药,6味入肾经,以补肾治本,治骨治标,标本兼治,现已广泛应用于临床^[2-3]。研究表明,该方对骨关节炎、骨质疏松等骨病具有良好的治疗效果^[4-5]。然而,目前对藤黄健骨丸的质量标准研究报道较少,赵勇等^[6]采用薄层色谱法对方中熟地黄和淫羊藿药材进行了鉴别,利用高效液相色谱(HPLC)技术检测了骨碎补中柚皮苷以及淫羊藿中淫羊藿苷的含量,以提高其质量标准。此外多数相关研究也仅是对方中单个或几个化学成分建立含量测定方法,但检测指标偏少,均难以反映药品的整体质量^[7-10]。基于此,本研究采用HPLC法建立藤黄健骨丸的指纹图谱,结合液质联用技术对其共有峰的结构进行鉴定,并对其相似度进行评价,考察中间体和成品间的相关性,以期对藤黄健骨丸的质量控制提供理论研究基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

U3000型高效液相色谱仪(HPLC,美国Thermo公司);Acquity型超高效液相色谱(UPLC,美国Waters公司);Q-TOF SYNAPT型高分辨质谱仪(HRMS,美国Waters公司);ME204/02型电子天平(上海METTLER TOLED公司);KS-2200DE型超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司)。

藤黄健骨丸10批中间体(组方中药按制剂工艺制成的混合粉末)批号分别为:22039、22040、22041、22042、23003、23004、23005、23006、23007和23008,及其对应的10批成品(组方中药按制剂工艺制成的

2023-11-10 收稿;2024-03-01 接受

吉林省科技发展计划项目(No. 20210401064YY)资助

*E-mail:178521212@qq.com; yuehao@ccucm.edu.cn

浓缩蜜丸)批号分别为:20221005、20221101、20221102、20221103、20230301、20230302、20230303、20230401、20230402和20230403,均来源于长春人民药业集团有限公司,药材产地来源分别为:地黄(河南家种);鹿衔草(内蒙野生);骨碎补(湖北、重庆、贵州野生);肉苁蓉(新疆家种);淫羊藿(甘肃野生);鸡血藤(云南野生);莱菔子(甘肃野生)。对照品松果菊苷(批号:N25GB168967)、淫羊藿苷(批号:T11A11B111118)、柚皮苷(批号:H24N9Z75896)、毛蕊花糖苷(批号:N19GB168679)、淫羊藿次苷Ⅱ(批号:A20GB158231)均购自于上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于等于98%。甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);乙腈(色谱纯,美国Sigma公司);甲酸(色谱纯,上海Aladdin公司);Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 对照品溶液的制备

精密称定淫羊藿苷、松果菊苷、淫羊藿次苷Ⅱ、柚皮苷和毛蕊花糖苷对照品各1.0 mg,加甲醇分别配置成浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液。

1.3 供试品溶液的制备

精密称定藤黄健骨丸成品5 g和中间体2.5 g,分别置于50 mL锥形瓶中,再精密量取甲醇25 mL加入使溶解,称定质量1,在功率为100 W,频率为40 kHz的条件下超声处理1 h,放冷,称定质量2,用甲醇补足2次称定的质量损失,摇匀,滤过,即得供试样品^[11]。

1.4 阴性样品溶液的制备

按照处方工艺制备藤黄健骨丸中7味药材相应的阴性样品,再分别按1.3节方法制备,即得。

1.5 色谱条件

采用Waters Symmetry C18(150 mm×2.1 mm,3.5 μm)色谱柱;在柱温30 °C下以0.1%甲酸水(A)和0.1%甲酸乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min,5%~10% B;10~15 min,10%~15% B;15~30 min,15%~25% B;30~42 min,25%~55% B;42~52 min,55%~80% B;52~57 min,80%~5% B;57~62 min,5% B);流速为0.4 mL/min;进样量为2 μL;紫外检测波长为260 nm。

1.6 质谱条件

以ESI为离子源,在MS^E全扫描模式下对正/负离子进行分析;扫描时间为1.5 s;扫描范围 m/z 50~2000;离子源温度正离子模式下为120 °C,负离子模式下为110 °C;脱溶剂气温度400 °C;锥孔气和脱溶剂气的流速为50和800 L/h;锥孔电压为40 V;毛细管电压正离子模式设置为3.0 kV,负离子模式设置为2.5 kV;碰撞能量为25~45 V;采用甲酸钠对质谱仪进行校正,使用亮氨酸脑啡肽(正离子模式下 m/z 556.2771,负离子模式下 m/z 554.2615)对质量数进行实时校正^[12]。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

通过查阅文献[13-17]确定各对照品常见紫外检测波长,松果菊苷、毛蕊花糖苷的检测波长分别为330和334 nm,淫羊藿苷的检测波长为270 nm,柚皮苷的检测波长为283 nm,淫羊藿次苷Ⅱ的检测波长为265 nm。结合文献[13-17]并考察藤黄健骨丸紫外检测波长,结果在260 nm波长下指纹图谱中各共有峰吸收较好,信号较强,故选择其为最适检测波长。

2.2 藤黄健骨丸指纹图谱的建立

2.2.1 仪器精密度试验

取藤黄健骨丸(成品)样品连续进样测定6次,以5号色谱峰(松果菊苷)作为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间^[18]。结果见辅助材料表S1和S2,各共有峰的相对峰面积的RSD值均小于1.86%,相对保留时间的RSD值均小于1.52%,表明该仪器精密度良好,满足分析质量要求。

2.2.2 重复性试验

取6份藤黄健骨丸(成品)样品依次进样测定,以5号色谱峰(松果菊苷)为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间^[18]。结果见辅助材料表S3和S4,各共有峰的相对峰面积的RSD值均小于1.32%,相对保留时间的RSD值均小于1.05%,表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性实验

取藤黄健骨丸(成品)样品在 0、2、4、8、12、16、20 和 24 h 分别进样测定,以 5 号色谱峰(松果菊苷)为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间^[18]。结果见辅助材料表 S5 和 S6,各共有峰的相对峰面积的 RSD 值均小于 1.41%,相对保留时间的 RSD 值均小于 1.22%,说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 指纹图谱的建立及共有峰指认

取 10 批藤黄健骨丸(成品)样品,依次进样测定并记录色谱图,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)”对供试品溶液的色谱图(X1-X10)进行分析,选择 X1 作为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设置为 0.1,再进行多点校正以及 Mark 峰的匹配,最终获得 10 批成品的指纹图谱(图 1),并自动生成对照指纹图谱 R(图 2A 谱线 a)^[19]。因 5 号峰峰面积大,分离度好,保留时间及峰面积稳定,因此以 5 号峰为参照峰,共标定出 20 个共有峰,共有峰面积占总峰面积 90% 以上。

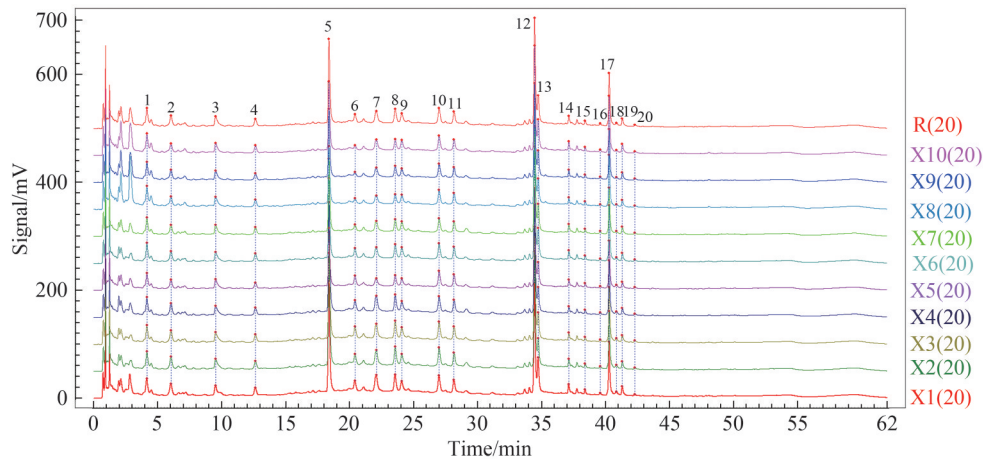


图 1 10 批藤黄健骨丸指纹图谱
Fig. 1 Fingerprints of 10 batches of Tenghuang Jiangu Wan

对共有峰进行结构鉴定,共指认了 13 种成分。通过对比指纹图谱(图 2 谱线 a)与对照品保留时间(图 2 谱线 b-f)指认出其中 5 个峰:峰 5 为松果菊苷;峰 7 为毛蕊花糖苷;峰 8 为柚皮苷;峰 12 为淫羊藿苷;峰 19 为淫羊藿次苷 II。通过串联质谱共有峰分析指认出另外 8 种:峰 1 为 3,5-二甲氧基-4-羟基苯基 β -D-葡萄糖苷;峰 2 为新北美圣草苷;峰 3 为双藜苷 A;峰 9 为柚皮素;峰 10 为 3,6-二芥子酰基蔗糖;

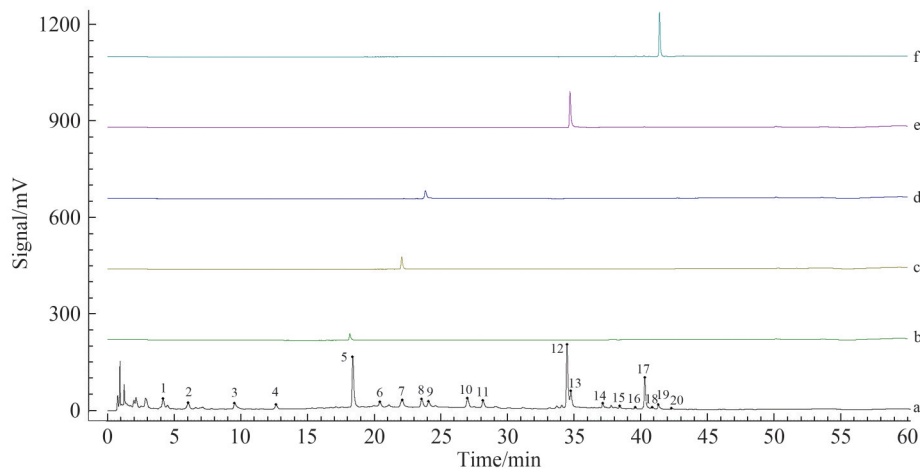


图 2 对照指纹图谱(a)和对照品 HPLC 色谱图(b. 松果菊苷; c. 毛蕊花糖苷; d. 柚皮苷; e. 淫羊藿苷; f. 淫羊藿次苷 II)
Fig. 2 Reference fingerprints (a) and HPLC chromatograms of reference standards (b. Echinacoside; c. Acteoside; d. Naringin; e. Icaritin; f. Icariside II)

峰 11 为朝藿定 B; 峰 13 为鼠李糖基淫羊藿次苷 II; 峰 17 为淫羊藿次苷 I。这些化合物的串联质谱信息如表 1 所示, 以峰 19 的质谱裂解途径为例, 简要说明它们的质谱指认过程。峰 19 在负离子模式下观察到准分子离子峰 m/z 513. 1760, 其主要发生糖基和常见中性小分子的裂解, 碎片离子集中在 m/z 367. 1164、352. 0912 和 324. 0966 处。 m/z 367. 1164 的离子对应 $[M-H-Rha]^-$, 是由一分子鼠李糖基的丢失产生。 m/z 352. 0912 和 m/z 324. 0966 的离子为中性分子的丢失, 分别对应 $[M-H-Rha-CH_3]^-$ 和 $[M-H-Rha-CH_3-CO]^-$ 。通过在质谱中与对照品的保留时间及裂解途径进行比对, 峰 19 被鉴定为淫羊藿次苷 II, 其可能的裂解途径如图 3 所示。

表 1 13 种共有峰的质谱鉴定

Table 1 Identification of 13 common peaks by mass spectrometry

Peaks (No.)	Retention time/min	Selected ion	Observed (m/z)	Mass error/ ($mg \cdot L^{-1}$)	Major product ions (m/z)	Compound	Attribution
1	4. 13	$[M-H]^-$	331. 103 8	1. 0	179. 056 0	Koaburaside	a
2	5. 95	$[M-H]^-$	595. 166 5	-0. 7	459. 113 7, 235. 024 5	Neeriocitrin	b
3	9. 12	$[M+H]^+$	825. 278 9	-2. 8	663. 229 9, 517. 170 4, 355. 118 0	Diphyllaside A	c
5	18. 37	$[M-H]^-$	785. 250 6	-0. 4	623. 218 8, 461. 166 0, 179. 034 7	Echinacoside	d
7	22. 14	$[M-H]^-$	623. 197 6	-0. 9	461. 164 9, 315. 104 8, 179. 035 5	Acteoside	d, e
8	23. 61	$[M-H]^-$	579. 171 2	-1. 2	271. 060 7, 151. 003 3	Naringin	b
9	24. 14	$[M+H]^+$	273. 075 9	0. 6	153. 018 1, 119. 049 2	Naringenin	b
10	27. 06	$[M-H]^-$	753. 224 8	0. 2	223. 060 4, 205. 050 3, 190. 026 6	3,6-Disinapoyl sucrose	f
11	28. 23	$[M+HCOO]^-$	853. 276 7	-0. 6	645. 218 2, 366. 110 4, 351. 087 0	Epimedin B	c
12	34. 51	$[M+HCOO]^-$	721. 234 3	-0. 8	513. 175 9, 367. 117 5, 351. 086 6	Icariin	c
13	34. 81	$[M-H]^-$	659. 233 5	-1. 6	367. 116 5, 351. 086 9, 323. 092 0	2-O-Rhamnosylcariside II	c
17	40. 36	$[M-H]^-$	529. 170 6	-1. 8	367. 117 7, 352. 092 9	Icariside I	c
19	41. 39	$[M-H]^-$	513. 176 0	-1. 2	367. 116 4, 352. 091 2, 324. 096 6	Icariside II	c

Note: a. *Spatholobus*; b. *Rhizoma Drynariae*; c. *Epimedium brevicornum*; d. *Desertliving Cistanche*; e. *Radix Rehmanniae Praeparata*; f. Radish Seed.

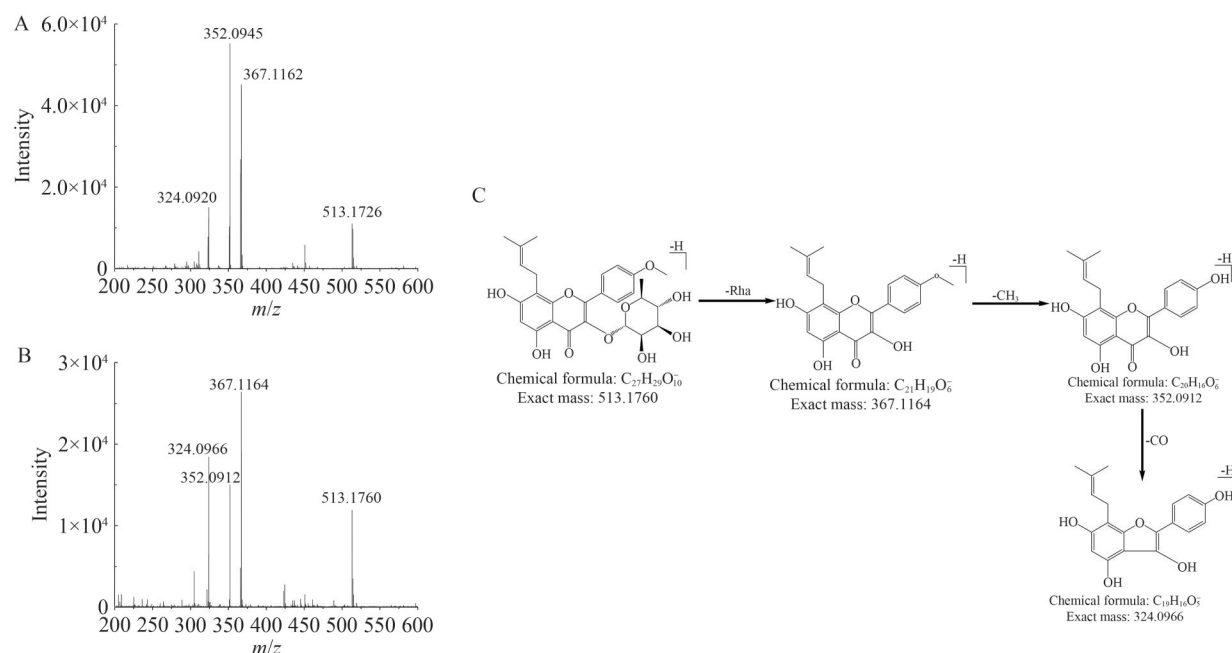


图 3 对照品(A)和样品中(B)淫羊藿次苷 II 的二级质谱图及其可能的裂解途径(C)

Fig. 3 MS/MS spectrum of icariside II in reference standard (A) and sample (B), and its possible cleavage pathway (C)

2.3 共有峰归属

对制备的藤黄健骨丸 7 味药材阴性样品溶液进样测定并记录色谱图, 利用“中药色谱指纹图谱相似

度评价系统(2012 版本)”对色谱图进行分析,结果见图 4。比对共有峰发现峰 1 来源于药材鸡血藤 G,峰 2、8 和 9 来源于药材骨碎补 D,峰 3、6、11、12、13、14、15、16、17 和 19 来源于药材淫羊藿 F,峰 4、20 来源于药材熟地黄 B,峰 5、7 来源于药材肉苁蓉 E,峰 10 来源于药材莱菔子 H,峰 18 来源于药材鹿衔草 C。

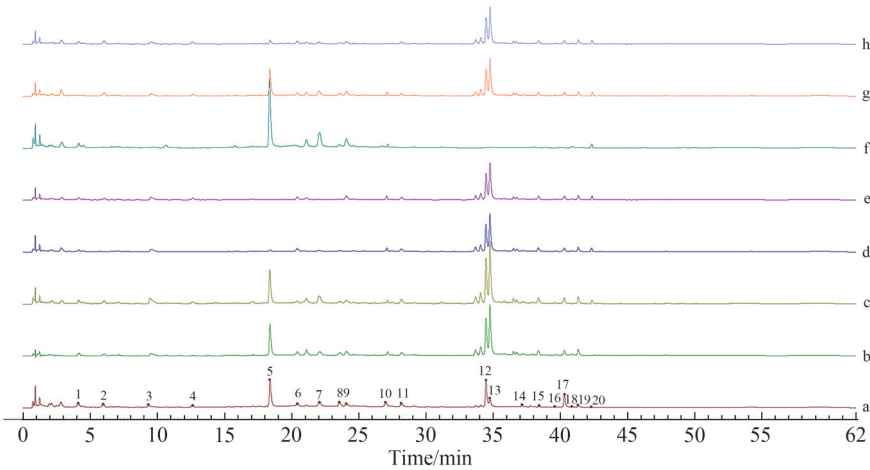


图 4 指纹图谱阴性对照

Fig. 4 Negative controls of fingerprints

Note: a. The test solution; b. Negative sample solution of Radix Rehmanniae Praeparata; c. Negative sample solution of Pyrola; d. Negative sample solution of Rhizoma Drynariae; e. Negative sample solution of Desertliving Cistanche; f. Negative sample solution of Epimedium brevicornum; g. Negative sample solution of Spatholobus; h. Negative sample solution of Radish Seed

2.4 共有峰相对保留时间和相对峰面积计算

设置参照峰(5号色谱峰)的保留时间和峰面积为 1.00,分别计算 10 批藤黄健骨丸指纹图谱中其他 19 个共有峰相对参照峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见辅助材料表 S7 和 S8。表中结果可以看出,10 批藤黄健骨丸指纹图谱中各共有峰相对保留时间的 RSD 值均不超过 0.33%,相对峰面积的 RSD 值均小于 4.62%,表明各批次样品的共有峰出峰时间和峰面积均比较稳定,提示它们所代表的各成分含量差异较小,样品质量稳定、可靠。

2.5 指纹图谱相似度评价

取藤黄健骨丸 10 批中间体和 10 批成品的供试品溶液进行色谱分析并记录色谱图,导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)”选择 X1 作为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设置为 0.1,再进行多点校正以及 Mark 峰的匹配,建立 10 批成品的指纹图谱,并自动生成对照指纹图谱 R。再以生成的对照指纹图谱 R 为参照图谱,对 10 批中间体色谱图同法建立中间体-成品指纹图谱。分别计算它们的相似度,结果见表 2 和 3。10 批藤黄健骨丸(成品)的指纹图谱相似度均在 0.95 以上,表明各批样品之

表 2 10 批成品指纹图谱相似度计算结果

Table 2 Fingerprint similarity calculation results of 10 batches finished products

Batch No.	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	R
X1	1.000	0.998	0.997	0.998	0.959	0.982	0.980	0.959	0.979	0.967	0.991
X2	0.998	1.000	1.000	0.999	0.968	0.987	0.986	0.966	0.984	0.973	0.995
X3	0.997	1.000	1.000	0.999	0.970	0.987	0.987	0.967	0.984	0.973	0.995
X4	0.998	0.999	0.999	1.000	0.964	0.984	0.983	0.962	0.980	0.969	0.992
X5	0.959	0.968	0.970	0.964	1.000	0.994	0.994	0.996	0.993	0.994	0.988
X6	0.982	0.987	0.987	0.984	0.994	1.000	0.999	0.992	0.998	0.995	0.998
X7	0.980	0.986	0.987	0.983	0.994	0.999	1.000	0.992	0.997	0.995	0.997
X8	0.959	0.966	0.967	0.962	0.996	0.992	0.992	1.000	0.996	0.998	0.987
X9	0.979	0.984	0.984	0.980	0.993	0.998	0.997	0.996	1.000	0.998	0.997
X10	0.967	0.973	0.973	0.969	0.994	0.995	0.995	0.998	0.998	1.000	0.991
R	0.991	0.995	0.995	0.992	0.988	0.998	0.997	0.987	0.997	0.991	1.000

间质量均一、稳定,制剂工艺稳定。中间体-成品指纹图谱的相似度在0.954~1.000范围内,说明藤黄健骨丸由中间体加密制备成品丸剂的工艺过程中,化学成分的损失较少,主要成分均在中间体及成品中体现,表明中间体与成品间相关性较好,该制剂工艺稳定。

表3 中间体-成品指纹图谱相似度计算结果

Table 3 Calculated similarity results of intermediate-control fingerprint

Batch No.	R	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
R	1.000	0.975	0.981	0.985	0.981	0.995	0.998	0.998	0.995	0.998	0.997
Z1	0.975	1.000	0.995	0.997	0.997	0.956	0.981	0.974	0.954	0.980	0.968
Z2	0.981	0.995	1.000	0.999	0.999	0.967	0.988	0.983	0.961	0.984	0.971
Z3	0.985	0.997	0.999	1.000	0.999	0.972	0.990	0.986	0.967	0.987	0.976
Z4	0.981	0.997	0.999	0.999	1.000	0.965	0.987	0.981	0.961	0.984	0.972
Z5	0.995	0.956	0.967	0.972	0.965	1.000	0.993	0.994	0.995	0.990	0.991
Z6	0.998	0.981	0.988	0.990	0.987	0.993	1.000	0.997	0.991	0.997	0.993
Z7	0.998	0.974	0.983	0.986	0.981	0.994	0.997	1.000	0.991	0.995	0.993
Z8	0.995	0.954	0.961	0.967	0.961	0.995	0.991	0.991	1.000	0.994	0.997
Z9	0.998	0.980	0.984	0.987	0.984	0.990	0.997	0.995	0.994	1.000	0.998
Z10	0.997	0.968	0.971	0.976	0.972	0.991	0.993	0.993	0.997	0.998	1.000

3 结论

建立了藤黄健骨丸的HPLC指纹图谱,确定了20个共有峰,并参照阴性样品对峰进行了归属。通过对照品保留时间结合串联质谱分析对13种成分(3,5-二甲氧基-4-羟基苯基 β -D-葡萄糖苷、新北美圣草苷、双藜苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、柚皮苷、柚皮素、3,6-二芥子酰基蔗糖、朝藜定B、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、淫羊藿次苷I和淫羊藿次苷II)的色谱峰进行了指认,并推断了淫羊藿次苷II的质谱裂解途径。计算了10批藤黄健骨丸指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各批次样品共有峰相对保留时间和相对峰面积的差值均较小,所对应的各成分含量保持稳定。对建立的指纹图谱进行了相似度评价,发现10批成品的相似度较好,均在0.95以上,表明该制剂质量稳定,所建立的指纹图谱能对其质量进行整体控制,且藤黄健骨丸中间体与成品之间也具有良好的相关性。综上,本研究建立的指纹图谱可对藤黄健骨丸的内在质量进行整体性评价,为其质量标准提升提供科学依据。

辅助材料(Supporting Information)[指纹图谱相关数据表格]可以从本刊网站(<http://yyhx.ciac.jl.cn/>)下载。

参 考 文 献

- [1] 张文静,王雨辰,段瑶,等. 藤黄健骨丸调控BMP-2/Smad信号通路治疗绝经后骨质疏松症[J]. 吉林中医药, 2023, 43(12): 1459-1464.
ZHANG W J, WANG Y C, DUAN Y, et al. Effect of Tenghuang Jiangu Wan in the treatment of postmenopausal osteoporosis model rats by regulating BMP-2/Smad signaling pathway[J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2023, 43(12): 1459-1464.
- [2] 刘爱国,樊芹英,郑浩,等. 藤黄健骨胶囊联合经皮椎体成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折疗效分析[J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(6): 1132-1135.
LIU A G, FAN Q Y, ZHENG H, et al. Therapeutic effect of Tenghuang Jiangu capsule combined with percutaneous vertebroplasty on osteoporotic vertebral compression fracture[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(6): 1132-1135.
- [3] 司文腾,陈宾,周宇. 藤黄健骨胶囊联合玻璃酸钠治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 525-528.
SI W T, CHEN B, ZHOU Y. Clinical study on Tenghuang Jiangu capsules combined with sodium hyaluronate in treatment of knee osteoarthritis[J]. Drugs Clinic, 2020, 35(3): 525-528.
- [4] 杨文博,乔莉,刘红喜,等. 藤黄健骨胶囊在骨质疏松性椎体压缩骨折经皮椎体成形术中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(10): 215-218.

- YANG W B, QIAO L, LIU H X, et al. Application of Tenghuang Jiangu capsules combined with PVP for osteoporotic vertebral compression fracture[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(10): 215-218.
- [5] 符仲秋, 王维学, 丰景斌. 藤黄健骨胶囊对大鼠膝关节炎的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(15): 1996-1998.
- FU Z Q, WANG W X, FENG J B. Effect of Tenghuang Jiangu capsules on knee osteoarthritis in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(15): 1996-1998.
- [6] 赵勇, 王艳, 郑金凤, 等. 藤黄健骨丸质量标准研究[J]. 中国药师, 2013, 16(1): 76-80.
- ZHAO Y, WANG Y, ZHENG J F, et al. Study on the quality standard for Tenghuang Jiangu pills[J]. Chin Pharm, 2013, 16(1): 76-80.
- [7] 赵子剑. HPLC测定藤黄健骨胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 光明中医, 2009, 24(4): 646-647.
- ZHAO Z J. Determination of icariin in Tenghuang Jiangu capsules by HPLC[J]. Guangming Tradit Chin Med, 2009, 24(4): 646-647.
- [8] 于曼娜, 张青. 高效液相色谱法测定藤黄健骨胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 98-100.
- YU M N, ZHANG Q. Determination of icariin in Tenghuang Jiangu capsules by high performance liquid chromatography[J]. Strait Pharm, 2006, 18(4): 98-100.
- [9] 陈毅鹏, 陈志桃. 高效液相色谱法测定藤黄健骨颗粒中淫羊藿苷的含量[J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 47-48.
- CHEN Y P, CHEN Z T. Determination of icariin in Tenghuang Jiangu granules by HPLC[J]. Strait Pharm, 2009, 21(10): 47-48.
- [10] 于文静, 侯放, 王焕群. 高效液相色谱法测定藤黄健骨丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药品标准, 2009, 10(3): 210-212.
- YU W J, HOU F, WANG H Q. Determination of icariin in Tenghuang Jiangu pills by HPLC[J]. Drug Standards China, 2009, 10(3): 210-212.
- [11] 赵昱玮, 南敏伦, 司英奇, 等. 高效液相色谱—测多评法同时检测藤黄健骨丸中7种成分含量[J]. 中国医药导报, 2022, 19(33): 33-36.
- ZHAO Y W, NAN M L, SI Y Q, et al. Simultaneous determination of 7 components in Tenghuang Jiangu pills by high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single-marker[J]. Chin Med Her, 2022, 19(33): 33-36.
- [12] 曹辉, 周霖, 孙志, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS结合整合网络药理学的藤黄健骨胶囊化学成分识别及作用机制初步研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2408-2417.
- CAO H, ZHOU L, SUN Z, et al. Chemical composition identification and mechanism study of Tenghuang Jiangu capsule based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and network pharmacology[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(9): 2408-2417.
- [13] 李静, 张青, 肖春霞, 等. HPLC波长切换法同时测定排毒养颜胶囊中10种成分[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4824-4830.
- LI J, ZHANG Q, XIAO C X, et al. Simultaneous determination of 10 components in Paidu Yangyan capsules by HPLC wavelength change method[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(20): 4824-4830.
- [14] 陈肖家, 张庆文, 季晖, 等. 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 625-630.
- CHEN X J, ZHANG Q W, JI H, et al. Comparison of UV spectrophotometry and HPLC on quantitative determination of total flavonoids of Herba Epimedii[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(5): 625-630.
- [15] 丁桂兰, 薛亚光, 邢春来, 等. HPLC测定橘红丸中柚皮苷、橙皮苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(9): 21-24.
- DING G L, XUE Y G, XING C L, et al. Determination of narigin and hesperidin in Juhong pills by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(9): 21-24.
- [16] 周菲, 林美斯, 王琳, 等. 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3824-3832.
- ZHOU F, LIN M S, WANG L, et al. Preparation and process quality control of substance benchmarks of classical famous prescription of Baihe Dihuang Decoction[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2019, 50(16): 3824-3832.
- [17] 李钦青, 柴金苗, 贺文彬, 等. 高效液相色谱法同时测定复方藜枝颗粒中淫羊藿苷、宝藜苷 I、甘草苷和甘草酸铵的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(6): 714-717.
- LI Q Q, CHAI J M, HE W B, et al. Simultaneous determination of icariin, baohuoside I, liquiritin and ammonium glycyrrhizinate in Fufang Huo Zhi granule by HPLC[J]. Tradit Chin Drug Res Clinic Pharm, 2020, 31(6): 714-717.
- [18] 葛楠, 李志能, 闫广利, 等. 经典名方固阴煎基准样品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7730-7739.

GE N, LI Z N, YAN G L, et al. HPLC fingerprinting study of classical formula Guyin Decoction[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2022, 53(24): 7730-7739.

[19] 孙庆妹, 王琼晓, 尤金玲, 等. 基于HPLC指纹图谱和多成分定量的玄参质量评价研究[J]. 中草药, 2023, 54(20): 6827-6835.

SUN Q M, WANG Q X, YOU J L, et al. Quality evaluation of Scrophularia ningpoensis based on HPLC fingerprint and multi-component content determination[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2023, 54(20): 6827-6835.

Fingerprint Construction and Identification of Common Peaks for Tenghuang Jiangu Wan Based on UPLC-Q TOF-MS^E

XIE Dong¹, HU Jian-Nan¹, LI Nian¹, YANG Ju², HUANG Qing², PI Zi-Feng^{1*}, ZHENG Fei¹,
DAI Yu-Lin¹, YUE Hao^{1*}

¹(Jilin Ginseng Acadmg, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

²(Changchun People Pharmaceutical Group Co., Ltd., Changchun 130033, China)

Abstract To establish the high performance liquid chromatographic (HPLC) fingerprint of Tenghuang Jiangu Wan (THJGW) and improve its quality standard, a Waters Symmetry C18 column (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm) was used and a gradient elution with 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) was performed as the mobile phase. The flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 30 °C, the injection volume was 2 μL and the detection wavelength was 260 nm. The fingerprint of THJGW was established and analyzed for its similarity by using the “Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 version)”. The identification of common peaks was characterized by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q TOF-MS^E) combining with reference standards. The relative retention times and relative peak areas of common peaks in the fingerprints of 10 batches of Tenghuang Jiangu Wan were calculated. A total of 20 common peaks were determined in the fingerprints of 10 batches from THJGW, and the similarities were all above 0.95. Based on the information of reference standards and tandem mass spectrometry, the structures of 13 components in the common peaks were identified. And then, the corresponding Chinese medicines for each peak were attributed. The relative retention times and relative peak areas of common peaks in all batches of samples were relatively stable, corresponding to a constant content of ingredients. The similarity of the intermediates was evaluated using this fingerprint and showed a good correlation between intermediates and finished products. This method is precise, reproducible and stabilized. It can be used not only for quality control of the finished product of THJGW, but also for the detection of the intermediates.

Keywords Tenghuang Jiangu Wan; High performance liquid chromatographic; Fingerprint; Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry

Received 2023-11-10; Accepted 2024-03-01

Supported by Science and Technology Development Project of Jilin Province(No. 20210401064YY)