基于 HPLC-TOF-MS 和 HPLC-MS/MS 技术的产复康颗粒主要成分定性定量及药动学研究

王 静[1]，蒋慧宇[1]，邵姝鸣[2]，张 华[1]

1. 大连理工大学化工学院，辽宁 大连 116024
2. 上海益诺思生物技术有限公司，上海 201203

摘 要：目的 运用高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用（HPLC-TOF-MS）技术和高效液相色谱串联三重四级杆质谱（HPLC-MS/MS）法，对产复康颗粒化学成分进行快速鉴定及定量分析，并进行初步药动学研究。**方法** HPLC-TOF-MS 法采用 ZORBAX Eclipse Plus C_{18}（100 mm×3.0 mm，1.8 μm）色谱柱；流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水（B），梯度洗脱，体积流量 0.2 mL/min；质谱采用正、负离子扫描，扫描范围 *m/z* 100～2000。HPLC-MS/MS 法采用 Waters XBridge® BEH C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.5 μm）色谱柱；流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水（B），梯度洗脱，体积流量 0.4 mL/min；Scheduled MRM 正负离子切换监测模式定量分析。ig 给予 SD 大鼠产复康颗粒（0.5、5 g/kg），给药后于不同时间点颈静脉取血 0.2 mL，分离血浆，HPLC-MS/MS 法检测产复康颗粒入血成分及含量。**结果** HPLC-TOF-MS 法鉴定产复康颗粒中 24 种成分；建立的 HPLC-MS/MS 方法分离度良好，各方法学验证均符合要求，对 13 种主要成分进行定量分析，水苏碱、黄芪甲苷和益母草碱的含量较高，可能是其主要活性成分；药动学结果显示，仅在给药剂量 5 g/kg 时，血浆中可检测到水苏碱和益母草碱，水苏碱的消除较慢，益母草碱快速消除。**结论** 该方法简便、准确，重复性好，可用于产复康颗粒中多种成分的鉴定和含量的测定，为药材的质量控制、药动学研究提供了参考。

关键词：产复康颗粒；HPLC-TOF-MS；化学成分；HPLC-MS/MS；定量分析；药动学

中图分类号：R965.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376(2017)11 - 1559 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.007

Qualitative, quantitative and pharmacokinetic analysis of major constituents in Chanfukang granules by HPLC-TOF-MS and HPLC-MS/MS

WANG Jing[1], JIANG Hui-yu[1], SHAO Shu-ming[2], ZHANG Hua[1]

1. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China
2. Shanghai Innostar Bio-Tech Co.Ltd, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To establish qualitative and quantitative analysis methods for identification and determination of multi-constituent of Chanfukang granules (CFKG) using high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF-MS) and high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-MS/MS), and a preliminary pharmacokinetic study was carried out. **Methods** An Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} column (100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm) and a Waters XBridge® BEH C_{18} column (150 mm × 4.6 mm, 2.5 μm) were used with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as mobile phases by gradient elution. The compounds were detected by electrospray ion source in both positive and negative mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. SD rats were ig with CFKG (0.5, 5 g/kg). Blood samples of 0.2 mL were taken from jugular vein at different time points and plasma components and contents were determined by HPLC-MS/MS. **Results** Twenty-four constituents were identified by HPLC-TOF-MS qualitative analysis and thirteen constituents were quantitatively detected by HPLC-MS/MS. The established HPLC-MS/MS method had a good separation, and all the legal verification met the requirements. The content of stachydrine, Leonurine, and astragaloside IV were high, which may be the main active ingredient. The pharmacokinetic results showed that, only when the dose was 5 mg/kg, stachydrine and Leonurine can detected. Elimination of stachydrine was slow and elimination of Leonurine was fast. **Conclusion** A rapid and efficient method for studying the chemical constituents was established, which could provide reference for the quality control of Chanfukang granules.

Key words: Chanfukang granules; HPLC-TOF/MS; constituents; HPLC-MS/MS; quantitative analysis; pharmacokinetic

收稿日期：2017-08-01

作者简介：王 静（1977－），女，工程师，从事仪器分析，色谱分析、质谱分析技术及应用 E-mail: wangjing2009@dlut.edu.cn

产复康颗粒是由益母草、当归、人参、黄芪、何首乌、桃仁、蒲黄、熟地黄、香附（醋制）、昆布、白术、黑木耳 12 味中药材组成的复方制剂，具有补气养血、排瘀生新的功效[1]，临床上用于产后出血过多、气血俱亏、腰腿酸软、倦怠无力等症状的治疗[2-3]。临床研究表明，产复康颗粒对妇女产后、人工流产术后、子宫内膜切除术后的恢复和痛经等病症具有良好的疗效[4]。同时，也可联合缩宫素、阿司匹林等西药进行中西医结合治疗产后出血和痛经等疾病，联合治疗的效果明显优于西药单独治疗[5-6]。

尽管产复康颗粒在临床应用广泛，但是其产生药理活性的物质基础尚未完全明确，《中国药典》也仅规定了盐酸水苏碱的含量以控制药品质量，目前仅有采用 HPLC 方法测定产复康颗粒中盐酸水苏碱含量的研究[7]。作为中药复方，以单一指标控制质量显然不足以完全反应复方制剂的安全性和有效性，临床上就曾有产复康致严重腹泻的报道[8]。因此，本研究采用高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱（HPLC-TOF-MS）联用技术，快速鉴定产复康颗粒的化学成分；并建立高效液相色谱串联三重四级杆质谱（HPLC-MS/MS）法，对产复康颗粒中主要成分进行定量分析，并进行初步的药动学观察。基于产复康颗粒指标成分的快速定性定量分析，为产复康颗粒在临床的安全合理应用提供科学建议。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 6224 TOF LC/MS 系统，包括 1290 Infinity LC 系统和 G6224A TOF MS 系统（美国 Agilent 公司）；AB SCIEX QTRAP®4500 LC/MS 质谱系统（美国 AB 公司）；岛津 LC-20AD UFLC 系统德国艾尔玛 Elmasonic S60H 通用型超声波清洗仪（德国 Elma 公司）；MS105DU 型精密天平（瑞士 METTER TOLEDO 公司）。

1.2 药物及主要试剂

产复康颗粒，每袋装 5 g，无糖型，深圳三顺制药有限公司，共 3 批，批号分别为 170230、170220、170108。水苏碱（批号 160325）、益母草碱（批号 160115）、阿魏酸（批号 140425）、人参皂苷 Rg1（批号 17033104）、人参皂苷 Re（批号 17009109）、人参皂苷 Rb1（批号 17041004）、黄芪甲苷（批号 140522）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号 16061409）、大黄素（批号 140719）、大黄素甲醚（批号 141214）、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷（批号 16052509）、香蒲新苷（批号 16061604）、毛蕊花糖苷（批号 150415）对照品，纯度大于 99%，供含量测定用，均购自成都普菲德生物技术有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯（TEDIA®，Tedia Co.，Inc.，Fairfield，OH，USA）；甲酸为色谱纯（Anaqua Chemicals Supply，Houston，TX，USA）；去离子水由 Milli-Q 超纯水系统（美国密理博 Millipore 公司）获得；其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠，体质量 200～220 g，由大连医科大学 SPF 实验动物中心提供，实验动物生产许可证号 SCXK（辽）2013-0003。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取水苏碱、益母草碱、阿魏酸、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、香蒲新苷、毛蕊花糖苷标准品 1 mg 于 25 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度，制备质量浓度为 40 μg/mL 的储备液，保存于 4 ℃冰箱中。分别吸取各对照品储备液适量，制备混合对照品工作液，工作液质量浓度分别为水苏碱 10 μg/mL、益母草碱 2.0 μg/mL、阿魏酸 400 ng/mL、人参皂苷 Rg1 100 ng/mL、人参皂苷 Re 800 ng/mL、人参皂苷 Rb1 100 ng/mL、黄芪甲苷 10 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 100 ng/mL、大黄素 100 ng/mL、大黄素甲醚 40 ng/mL、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷 100 ng/mL、香蒲新苷 400 ng/mL、毛蕊花糖苷 100 ng/mL。

2.1.2 供试品溶液的制备 取产复康颗粒（批号 170230），研磨成粉，过 60 目筛网后，称取 200 mg 样品至 200 mL 量瓶中，加入甲醇至刻度，超声提取 30 min，冷却至室温，用甲醇补足至刻度，摇匀，取上清液 0.22 μm 滤膜过滤，滤液分析。

2.2 HPLC-TOF-MS 定性分析

2.2.1 液相和质谱条件 液相条件：色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C_{18}（100 mm×3.0 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈（A）- 0.1%甲酸水（B），梯度洗脱（0～25 min，5%～35%A；25～45 min，35%～100%A；45～50 min，100%A；50～55 min，100%～5%A；55～60 min，5%A）；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 20 μL。质谱条件：双喷雾离子源（Dual ESI），正/负离子扫描检测方式。毛细管电压（VCap）4 kV，碎裂电压（Fragmentor） 150 V；

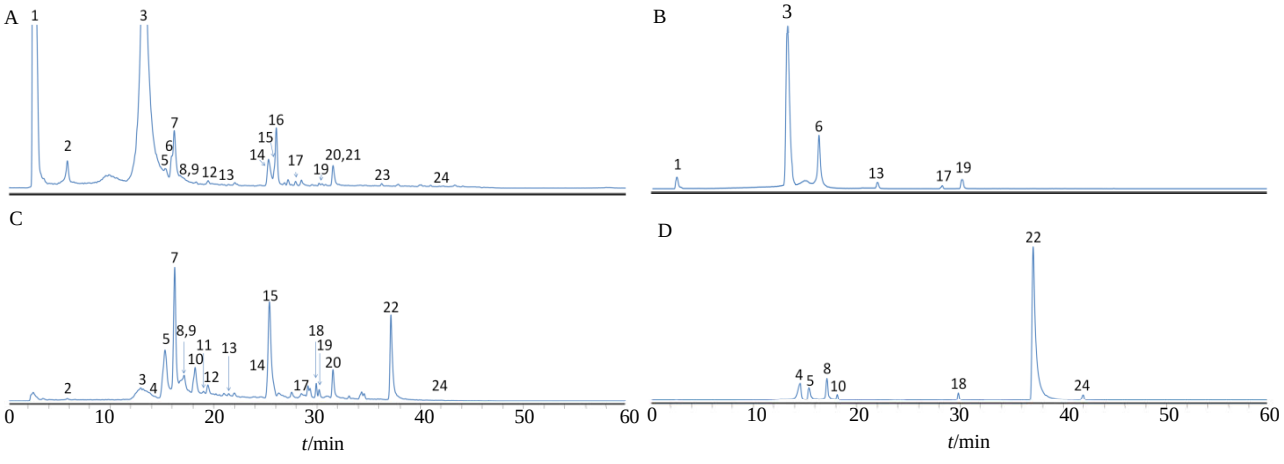
干燥气温度（Gas Temp）350 ℃，干燥气体积流量（Gas Flow）8 L/min，雾化气压力（Nebulizer）241 kPa。

2.2.2 产复康颗粒化学成分的鉴定 取“2.1.2”项下供试品溶液，HPLC-TOF-MS 分析得到总离子流图（图 1A）。根据总离子流图所得到的化合物精确分子质量信息，通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis（B.06.00）软件在 5×10^{-6} 的质量偏差范围内匹配分子式，与文献报道进行比对，对各化合物进行初步鉴定，共推测鉴别 24 种化合物，详细信息列于表 1 中。并利用已有的标准对照品，无偏差的鉴别出水苏碱、益母草碱、阿魏酸、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、香蒲新苷、毛蕊花糖苷等 13 种化学成分（图 1B）。

以正模式下的 6 号峰和负模式下的 22 号峰为例介绍鉴别过程。峰 6 和峰 22 在各自谱图上的保留时间（*t*）分别为 16.12 和 37.22 min，质核比（*m/z*）分别为 447.128 5 和 269.045 4。利用 Qualitative Analysis 软件，限定误差＜5×10^{-6}，匹配可能的分子式，并对比参考文献中的已知化合物的 *m/z*，确定分子式分别为 $C_{22}H_{22}O_{10}$ 和 $C_{15}H_{10}O_5$，加合峰分别为 $[M+H]^+$ 峰和 $[M-H]^-$ 峰，与理论精确分子质量（447.128 6 和 269.045 5）和同位素分布情况进行比对，吻合良好（图 2），推测峰 6 和峰 22 可能为毛蕊异黄酮苷和大黄素。最后，根据毛蕊异黄酮苷和大黄素的对照品的保留时间、精确分子量、同位素分布等信息，确定峰 6 和峰 22 分别为毛蕊异黄酮苷和大黄素。

2.3 HPLC-MS/MS 定量分析

2.3.1 液相和质谱条件 液相条件：采用 Waters XBridge® BEH C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.5 μm）色谱柱；流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水（B）；梯度洗脱（0～10 min，25%～35%A；10～15 min，35%～100%A；15～20 min，100%A；20～21 min，100%～25%A；21～25 min，25%A）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 10 μL。质谱条件：电喷雾离子源（ESI），正负离子切换扫描检测方式，动态多反应监测模式（Scheduled MRM）。离子化电压（IS）5.5 kV/－4.5 kV；温度为 500 ℃；喷雾气（GS1，N_2）压力为 345 kPa；辅助加热气（GS2，N_2）压力为 414 kPa；气帘气体（CUR）压力为 138 kPa；碰撞气（CAD）设置为 Medium；监测离子对及其他参数见表 2。二级质谱图见图 3。MRM 提取离子色谱图见图 4。



1-水苏碱 2-腺苷 3 益母草碱 4-阿魏酸 5-香蒲新苷 6-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 7-芦丁 8-异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷 9-异槲皮素 10-毛蕊花糖苷 11-杜鹃花酸 12-鼠李柠檬素-3-*O*-葡萄糖苷 13-人参皂苷 Rg1 14-汉黄芩素 15-大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷 16-益母草素 17-人参皂苷 Rb1 18-黄芪甲苷 19-人参皂苷 Re 20-芒柄花素 21-藻本内酯 22-大黄素 23-乙酰黄芪甙 I 24-大黄素甲醚

1-stachydrine 2-adenosine 3-Leonurine 4-ferulic acid 5-typhaneoside 6-calycosin glycoside 7-rutin 8-Isorhmnetin-3-*O*-neohesperidin 9-isoquercetin 10-verbascoside 11-azelaic acid 12-rhamnocitrin-3-*O*-glucoside 13-ginsenoside Rg1 14-wogonin emodin 15-Emodin-8-*O*- beta -*D*-glucoside 16-motherwort 17-ginsenoside Rb1 18-astragaloside 19-ginsenoside Re 20-formononetin 21-ligustilide 22-emodin 23-acetyl I astragaloside 24- physcion

图 1 供试品（A、C）、对照品（B、D）溶液的总离子流图

Fig. 1 HPLC-TOF-MS total ion chromatogram of sample (A, C) and standard solutions (B, D) in positive (A, B) and negative (C, D) ion mode

表 1 产复康颗粒中化学成分的鉴别分析

Table 1 Qualitative analysis of chemical constitutes in CFKG preparations

编号	化合物	分子式	准分子离子峰	理论值	测定值	误差/$\times10^{-6}$	*t*/min
1	水苏碱	$C_7H_{14}NO_2$	$[M+H]^+$	144.101 9	144.101 4	−3.47	2.386
2	腺苷	C_{10}	$[M+H]^+$	268.104 0	268.104 6	2.24	5.714
		$H_{13}O_4N_5$	$[M-H]^-$	266.089 5	266.089 2	−1.13	
3	益母草碱	$C_{14}H_{21}N_3O_5$	$[M+H]^+$	312.154 4	312.154 6	0.64	13.167
			$[M-H]^-$	310.140 8	310.141 3	1.61	
4	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 6	193.050 6	0.00	14.527
5	香蒲新苷	$C_{34}H_{42}O_{20}$	$[M+H]^+$	771.234 2	771.234 0	−0.26	15.344
			$[M-H]^-$	769.219 7	769.220 0	0.39	
6	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{10}$	$[M+H]^+$	447.128 6	447.128 5	−0.22	16.117
7	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	611.160 7	611.161 5	1.31	16.195
			$[M-H]^-$	609.146 1	609.146 6	0.82	
8	异鼠李素-3-O-新橙皮苷	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M+H]^+$	625.176 3	625.176 6	0.48	17.053
			$[M-H]^-$	623.161 8	623.162 4	0.96	
9	异槲皮素	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	465.102 8	465.102 7	−0.22	17.103
			$[M-H]^-$	463.088 2	463.088 7	1.08	
10	毛蕊花糖苷	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^-$	623.198 1	623.198 5	0.64	18.119
11	杜鹃花酸	$C_9H_{16}O_4$	$[M-H]^-$	189.097 6	189.097 7	0.53	18.952
12	鼠李柠檬素-3-*O*-葡萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{11}$	$[M+H]^+$	463.123 5	463.123 9	0.86	19.945
			$[M-H]^-$	461.108 9	461.108 4	−1.08	
13	人参皂苷 Rg1	$C_{42}H_{72}O_{14}$	$[M+Na]^+$	823.481 4	823.481 5	0.12	21.410
			$[M-H]^-$	799.484 9	799.483 8	−1.38	
14	汉黄芩素	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M+H]^+$	285.075 7	285.076 0	1.05	25.277
			$[M-H]^-$	283.061 2	283.061 2	0.00	
15	大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M+H]^+$	433.112 9	433.112 0	−2.08	25.418
			$[M-H]^-$	431.098 4	431.098 5	0.23	
16	益母草素	$C_{20}H_{30}O_3$	$[M+H]$	319.226 8	319.227 6	2.51	26.044
17	人参皂苷 Rb1	$C_{54}H_{92}O_{23}$	$[M+Na]^+$	1 131.592 2	1 131.591 5	−0.62	28.275
			$[M-H]^-$	1 107.590 7	1 107.590 8	0.09	
18	黄芪甲苷	$C_{41}H_{68}O_{14}$	$[M+HCOOH]^-$	829.459 1	829.458 7	−0.48	29.892
19	人参皂苷 Re	$C_{48}H_{82}O_{18}$	$[M+Na]^+$	969.539 3	969.539 2	−0.10	30.215
			$[M-H]^-$	945.542 8	945.543 0	0.21	
20	芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	269.080 8	269.081 0	0.74	31.593
			$[M-H]^-$	267.066 3	267.066 2	−0.37	
21	藁本内酯	$C_{12}H_{14}O_2$	$[M+H]$	191.106 7	191.106 5	−1.05	31.693
22	大黄素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.045 5	269.045 4	−0.37	37.22
23	乙酰黄芪甙 I	$C_{47}H_{74}O_{17}$	$[M+H]^+$	911.499 9	911.499 8	−0.11	37.942
24	大黄素甲醚	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M+H]^+$	287.075 7	287.076 0	1.05	42.073
			$[M-H]^-$	283.061 2	283.061 3	0.35	

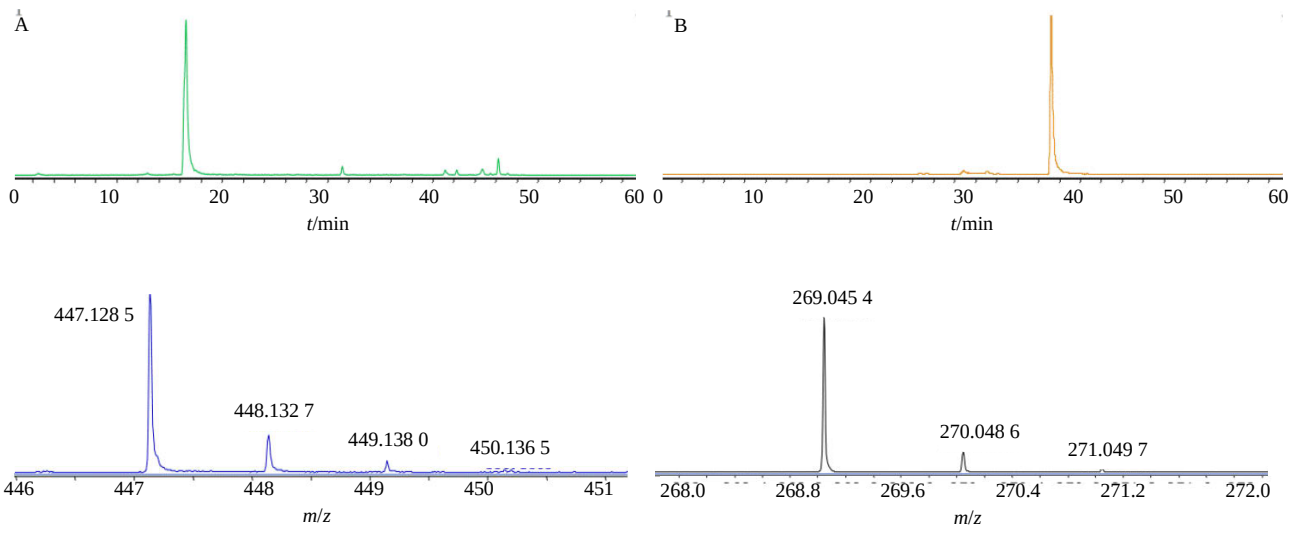


图 2　6（A）和 22（B）号化合物的提取离子色谱图和高分辨质谱图

Fig. 2　Extracted ion chromatograms (EIC) and accurate mass spectrograms of compound 6 (A) and 22 (B)

表 2　13 种分析物的 MRM 参数

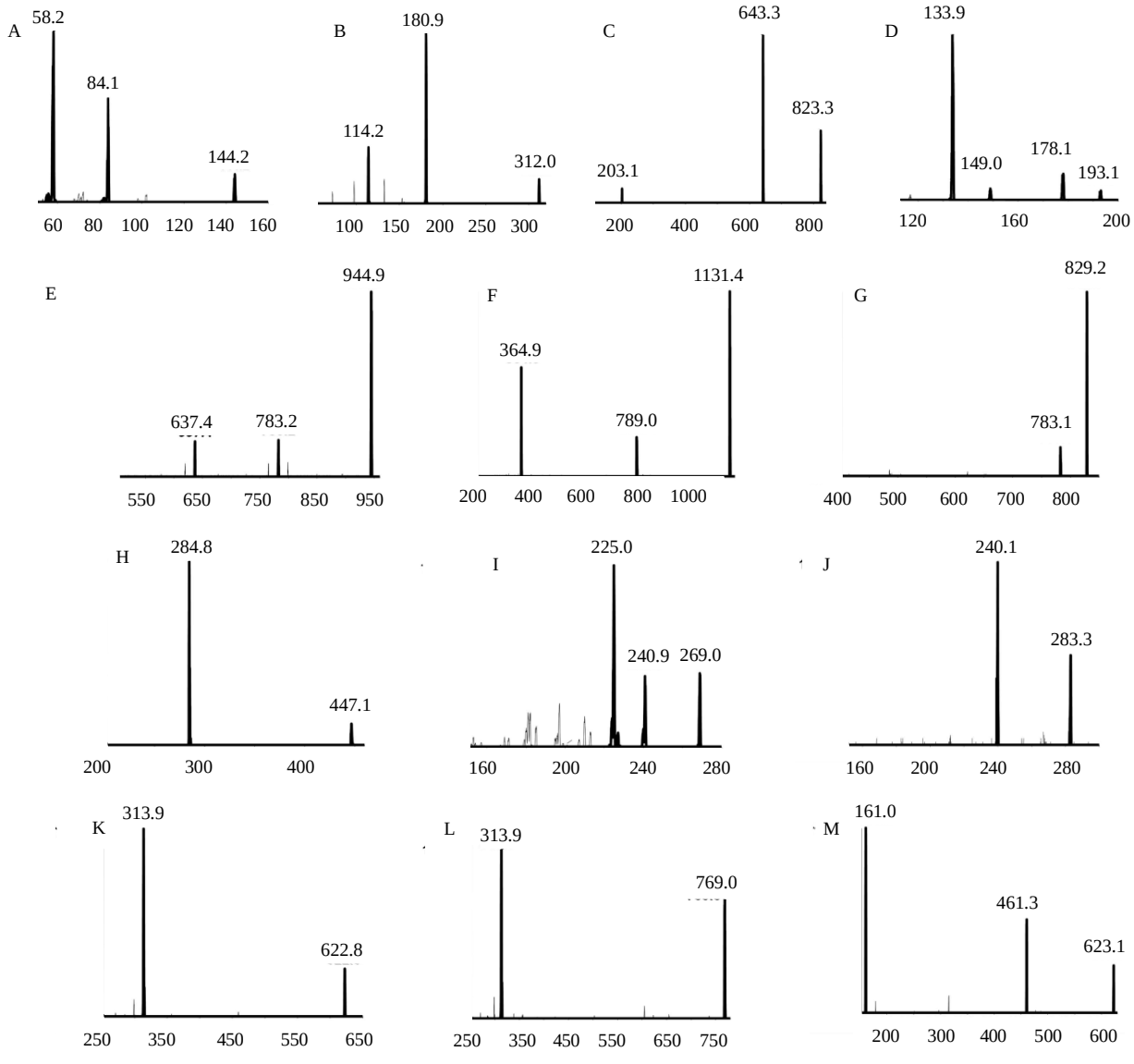
Table 2　Multiple reaction monitoring parameters for the 13 analytes

编号	化合物	Q1/Da	Q3/Da	解簇电压（DP）/V	入口电压（EP）/V	碰撞能量（CE）/V	碰撞室出口电压（CXP）/V
1	水苏碱	143.9	84.2	80	10	30	10
2	益母草碱	312.0	181.0	75	10	30	10
3	阿魏酸	193.0	134.0	−65	−10	−21	−13
4	人参皂苷 Rg1	823.5	643.1	180	10	52	10
5	人参皂苷 Re	969.8	789.1	180	10	57	23
6	人参皂苷 Rb1	1 131.7	364.9	200	10	76	13
7	黄芪甲苷	829.3	783.3	−120	−10	−36	−11
8	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447.0	284.9	80	10	24	10
9	大黄素	268.9	225.0	−100	−10	−38	−13
10	大黄素甲醚	283.0	240.0	−95	−10	−35	−13
11	异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷	623.2	314.0	−120	−10	−40	−13
12	香蒲新苷	769.1	313.9	−120	−10	−54	−13
13	毛蕊花糖苷	623.0	161.0	−135	−10	−40	−9

2.3.2　线性关系考察　将混合对照品溶液依次稀释 2、4、8、16、32、64 倍，共 7 个浓度，取各个浓度的混合对照品溶液各 10 μL 注入液质联用仪，测定峰面积。以峰面积为纵坐标、对照品质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，得到回归方程和相关系数。同法逐级稀释，分别以信噪比为 3 和 10 时的进样浓度确定为最低检测限和最低定量限，见表 3。

2.3.3　精密度试验　取同一份供试品溶液，按上述色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，计算峰面积的 RSD。结果显示，13 种分析物的 RSD 分为 0.28%～3.34%（表 4），表明仪器的精密度良好。

2.3.4　稳定性试验　取供试品溶液，分别在放置于 4 ℃冰箱中 0、2、4、8、12、24 h 后进样，记录峰面积，计算峰面积的 RSD。结果显示，13 种分析物的 RSD 为 0.73%～3.08%（表 4），表明在 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。



A-水苏碱　B-益母草碱　C-阿魏酸　D-人参皂苷 Rg1　E-人参皂苷 Re　F-人参皂苷 Rb1　G-黄芪甲苷　H-毛蕊异黄酮葡萄糖苷　I-大黄素　J-大黄素甲醚　K-异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷　L-香蒲新苷　M-毛蕊花糖苷

A-stachydrine　B-Leonurine　C-ferulic acid　D-ginsenoside Rg1　E-ginsenoside Re　F-ginsenoside Rb1　G-astragaloside　H-calycosin glycoside　I-Emodin　J- physcion　K-Isorhmnetin-3-*O*-neohesperidin　L-typhaneoside　M-verbascoside

图 3　13 种分析物的二级质谱图

Fig. 3　Product ion mass spectra of 13 analytes

2.3.5　重复性试验　取同一批次药材（批号 170230），精确称取 200 mg，共 6 份，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，准确吸取供试液 10 μL 进样，测定峰面积，计算含量。6 份样品中，13 种分析物的 RSD 分别为 0.73%～3.24%（表 4），表明重复性良好。

2.3.6　加样回收率试验　精密称取已知各成分含量的样品 200 mg，共 6 份，分别加入等量的对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下液相质谱条件进行测定，计算加样回收率。6 份样品中，13 种分析物的平均回收率是 96.3%～103.9%，RSD 为 0.56%～3.74%（表 4），表明该方法准确度良好。

2.3.7　样品测定　分别称取三批次样品各 200 mg，按“2.1.2”项下方法制备样品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件各测定 3 次，得相应色谱峰面积，代入回归方程，计算相应的 13 种成分质量分数，结果见表 5。

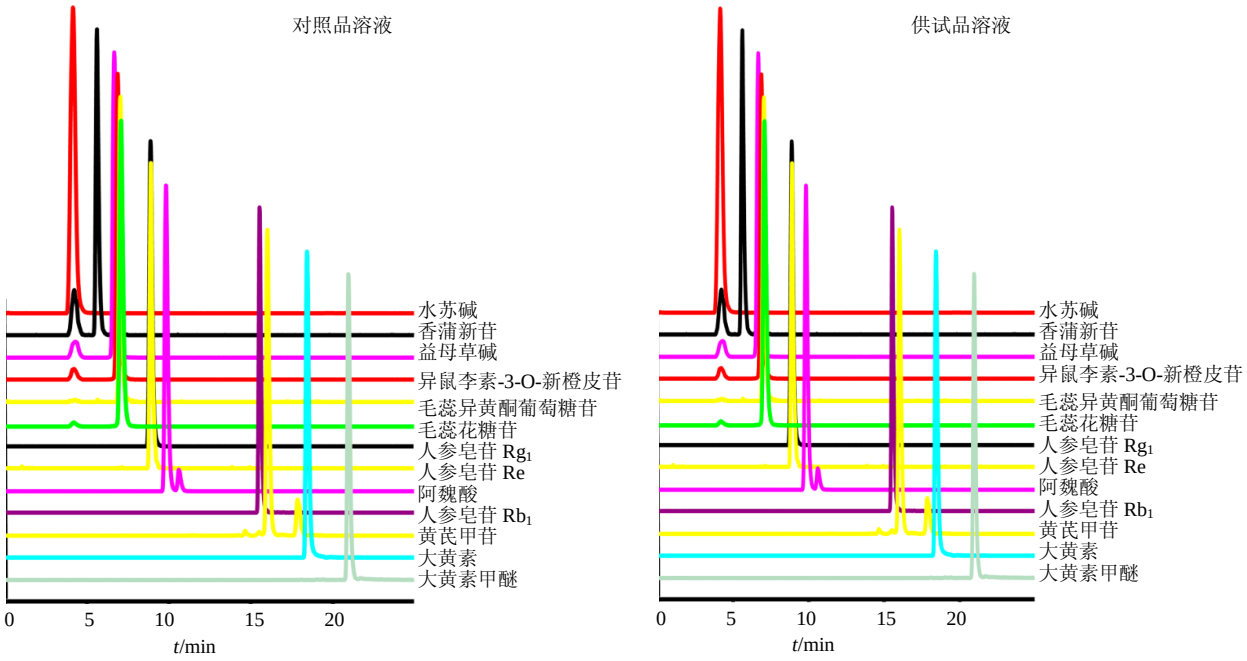


图 4　13 种分析物的 MRM 提取离子色谱图

Fig. 4　Representative MRM chromatograms for 13 analytes

表 3　13 种分析物的线性关系和范围

Table 3　Regression equations, linear ranges and LLOQs of 13 analyties.

编号	化合物	线性范围/(ng·mL^{-1})	回归方程	r	最低检测限/(ng·mL^{-1})	最低定量限/(ng·mL^{-1})	t/min
1	水苏碱	156～10 000	Y = 3 940X + 1 130 000	0.997 1	0.4	1	4.16
2	益母草碱	31.3～2 000	Y = 3 8600X + 1 754 000	0.997 6	0.4	1	6.65
3	阿魏酸	6.25～400	Y = 2 210X + 338	0.999 9	0.4	1	9.80
4	人参皂苷 Rg1	1.56～100	Y = 318X + 887.2	0.997 9	0.8	1.56	8.89
5	人参皂苷 Re	12.5～800	Y = 21.6X – 21	0.997 3	4.0	10	8.93
6	人参皂苷 Rb1	1.56～100	Y = 239X – 195	0.998 6	0.8	1.56	15.6
7	黄芪甲苷	156～10 000	Y = 286X + 4 260	0.998 3	2.0	10	16.0
8	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	1.56～100	Y = 19 500X – 4 890	0.997 7	0.2	0.5	7.11
9	大黄素	1.56～100	Y = 56 000X + 18 400	0.997 5	0.1	0.2	19.6
10	大黄素甲醚	0.625～40	Y = 6 420X + 4 040	0.998 3	0.2	0.5	21.5
11	异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷	1.56～100	Y = 5 940X – 3 090	0.997 1	0.4	1	6.89
12	香蒲新苷	6.25～400	Y = 157X – 146	0.999 8	3.1	6.25	5.73
13	毛蕊花糖苷	1.56～100	Y = 1 244X – 702	0.998 6	0.8	1.56	7.54

表 4　13 种分析物的精密度、稳定性、重复性和回收率

Table 4　Accuracy, reproducibility, stability, and recovery of 13 analytes

编号	化合物	精密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	回收率/%	回收率 RSD/%
1	水苏碱	1.58	1.92	2.86	102.8	2.62
2	益母草碱	1.09	2.04	1.22	103.9	2.94
3	阿魏酸	1.60	3.24	1.69	101.1	3.08
4	人参皂苷 Rg1	1.53	1.65	1.67	98.5	3.74
5	人参皂苷 Re	1.26	0.73	1.24	100.7	2.30
6	人参皂苷 Rb1	1.43	1.69	0.95	96.3	1.15
7	黄芪甲苷	1.60	1.20	0.73	98.5	0.56
8	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.28	1.51	1.01	101.7	1.68
9	大黄素	3.23	1.01	1.15	102.5	0.72
10	大黄素甲醚	3.34	2.64	2.55	103.3	2.29
11	异鼠李素-3-O-新橙皮苷	2.72	2.01	2.24	97.3	2.33
12	香蒲新苷	1.83	1.91	1.66	99.6	2.77
13	毛蕊花糖苷	1.53	2.80	3.08	103.8	3.74

表 5　三批样品中 13 种分析物的成分测定结果（$\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3）

Table 5　Content of 13 analytes in 3 batches of Chanfukang granules ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

编号	化合物	质量分数/（μg·g^{-1}）		
		170230 批次	170220 批次	170108 批次
1	水苏碱	1 780±25.1	2 120±28.3	1 612±42.1
2	益母草碱	453±19.9	348±16.1	253±19.1
3	阿魏酸	81.0±1.87	38.8±0.318	54.7±0.615
4	人参皂苷 Rg1	7.97±0.308	6.22±0.708	13.7±0.584
5	人参皂苷 Re	40.9±0.515	36.0±0.950	35.2±0.925
6	人参皂苷 Rb1	4.59±0.160	1.95±0.045 9	2.81±0.057 6
7	黄芪甲苷	4 793±35.2	2 610±39.4	3 580±44.1
8	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	62.0±0.850	44.7±0.529	29.2±0.651
9	大黄素	4.86±0.131	4.01±0.085 4	4.81±0.119
10	大黄素甲醚	5.04±0.108	2.96±0.055 1	4.06±0.073 7
11	异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷	3.80±0.087 9	4.60±0.044 4	5.52±0.063 2
12	香蒲新苷	57.6±1.56	34.2±0.410	63.1±0.764
13	毛蕊花糖苷	3.43±0.125	1.58±0.038 6	2.17±0.047 1

2.4　药动学研究

大鼠禁食过夜，不限饮水，实验前颈静脉埋管，ig 给予产复康颗粒（5 g/kg，混悬于 0.5% CMC-Na 溶液）。给药后 5、15、30、45、60、90、120、180、240、360、480、600、720 和 1 440 min 颈静脉取血 0.2 mL，并立即 3 500 r/min 离心 10 min，取血浆 50 μL，加入 100 μL 乙腈，涡漩 30 s 后离心（20 000× *g*，10 min），取上清液[9]，按“2.3.1”项下色谱条件测定，分析入血成分及含量。结果表明，产复康颗粒单次 ig 给予大鼠后，血浆中仅检测到水苏碱和益母草碱，两种成分的血药浓度随时间变化曲线如图 5 所示。水苏碱的消除较慢，口服 24 h 后，血浆中仍能检测到。而益母草碱则快速消除，口服 4 h 后，血浆中检测不到。两种成分的药动学参数见表 6。

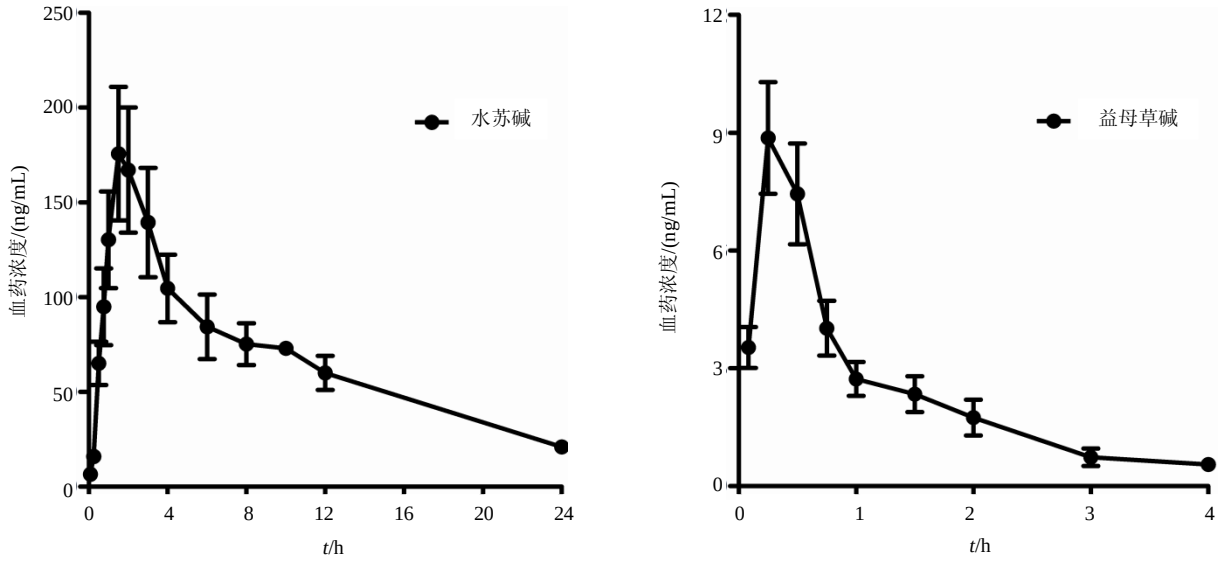


图 5　大鼠口服产复康颗粒后水苏碱和益母草碱的药时曲线（$\bar{x}$ ±*s*, *n* = 4）

Fig. 5　Mean plasma concentration–time profiles of stachydrine and Leonurine after oral coadministration in rats ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 4)

3　讨论

产复康颗粒不仅在临床上广泛应用于产后出血、痛经等妇科疾病的治疗，还用于奶牛产后气虚血瘀证的治疗，疗效确切，安全性较高，不良反应较少[4, 10]。作为妇科用药，涉及到妇女和婴儿的用药安全问题，产复康的安全性、有效性及质量控制

表 6 产复康颗粒中水苏碱和益母草碱的药动学参数（$\bar{x} \pm s$, $n = 4$）

Table 6 Pharmacokinetic parameters of stachydrine and leonurine in Chanfukang granules ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

参数	单位	水苏碱	益母草碱
AUC_{0-t}	$\mu g \cdot L^{-1} \cdot min$	97 044±21 609	580±171
$AUC_{0-\infty}$	$\mu g \cdot L^{-1} \cdot min$	107 338±21 089	642±201
MRT_{0-t}	min	546±39.8	69.9±8.84
$MRT_{0-\infty}$	min	736±79.5	92.3±15.1
$t_{1/2z}$	min	415±83.2	60.5±13.5
T_{max}	min	260±94.4	15.0±0.00
C_{max}	$\mu g \cdot L^{-1}$	185±54.9	8.86±2.37

受到广泛关注和研究[10-12]。《中国药典》规定，运用雷氏盐剩余比色法测定水苏碱的含量，产复康颗粒中水苏碱的含量不得少于 3.0 mg。然而，雷氏盐剩余比色法容易受到超声提取功率、活性炭脱色等因素的干扰[13]，而 HPLC 方法测定水苏碱需要特定的蒸发光检测器[7]，较为普遍的紫外检测器无法测定水苏碱。因此，本研究运用 HPLC-TOF-MS 和 HPLC-MS/MS 方法，对产复康颗粒中化学成分进行系统的定性定量研究。

3.1 提取方法的确定

产复康颗粒包含了益母草、当归、黄芪、人参等多种药材，参考《中国药典》的含量测定方法，选择甲醇、乙醇和水作为提取溶剂。在考察不同溶剂以及不同比例的提取率后，发现纯甲醇具有最高的提取率。同时，超声（功率 100 W，频率 40 kHz）辅助可以提高提取率。因此，确定提取方法为甲醇溶液超声提取 30 min。

3.2 色谱条件的选择

由于定性和定量分析中对液相分离度的要求不同，所以选择了不同的色谱条件分别进行定性和定量分析。在 HPLC-TOF-MS 分析中，为了实现不同组分的尽可能分离以鉴定出更多成分，采用了 ZORBAX Eclipse Plus C_{18}（100 mm×3.0 mm，1.8 μm）色谱柱进行色谱分离，分析时间为 60 min，具有较高的分离效率。在 HPLC-MS/MS 分析中，由于分析物具有不同的分子量和裂解规律，不需要完全的色谱分离即可在 MRM 模式下实现定量，因此选择了 Waters XBridge BEH C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.5 μm）色谱柱，在 25 min 内即可达到分离效果，提高定量测定效率。此外，考察了流动相的组成及比例，与甲醇相比，使用乙腈能显著改善分离效果。并且在水相中加入甲酸（0.1%）后的色谱峰型要优于加入乙酸铵（5 mmol/L），因此本实验选择了乙腈-0.1%甲酸水体系作为流动相。

3.3 质谱条件的选择

为了鉴定出更多成分，本文比较了正负离子的扫描结果，发现正负离子模式下均有较多的响应峰，为了便于化合物的鉴定，HPLC-TOF-MS 分析中，选择正负离子分别扫描模式进行分析，最终鉴定出 24 种化合物。在 HPLC-MS/MS 分析中，为了兼顾益母草中的水苏碱和益母草碱等正离子响应较好的化合物，以及阿魏酸和黄芪甲苷等负离子响应较好的化合物，提高定量分析的灵敏度，选择正负离子切换扫描的模式。选择 Scheduled MRM 监测模式定量分析 13 种分析物，以提高分析效率和灵敏度，实现了多种化合物的同时测定，不同化合物在各自的通道被检测，没有互相干扰。

3.4 测定结果分析

首先，运用建立的 HPLC-TOF-MS 方法，根据精确分子量和加合规律，比对相关文献，初步鉴定出 24 种化合物，其中 13 种经标准对照物质确定。该方法前处理简单，分析时间短，可重复性高，可作为产复康颗粒化学成分鉴定的初步方法，为产复康颗粒药效物质的明确和质量控制方法的深入研究奠定基础。

同时，采用所建立的 HPLC-MS/MS 方法对 3 批次产复康颗粒中 13 种成分进行准确定量分析。首先，根据《中国药典》的定量测定指标选择了测定指标。在组成产复康颗粒的 12 种中药材中，《中国药典》明确了益母草、当归、人参、黄芪、何首乌、桃仁、蒲黄、熟地黄等药材的指标成分。因此，本文选择水苏碱、益母草碱、阿魏酸、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、香蒲新苷、毛蕊花糖苷等 13 种成分分别作为上述药材的指标成分，进行多指标成分的含量测定。根据测定结果，这三批次药品中，产复康颗粒中水苏碱的量超过了 1.6 mg/g，高于《中国药典》规定的 3 mg/5 g 的标准。此外，产复康颗粒中黄芪甲苷和益母草碱的含量也较高。这三种成分可能是产复康颗粒发挥药理作用的主要活性成分，大量研究证明益母草碱和黄芪甲苷具有子宫和心血管保护活性[14-16]。需要注意的是，3 批样品中各成分的含

量存在一定差异。例如水苏碱、益母草碱和黄芪甲苷，最高量分别是最低量的 1.3 倍、1.8 倍和 1.8 倍，可能是不同批次药材在采摘、加工、炮制等过程中产生的。这也说明建立多指标成分同时测定的中药复方制剂质量控制方法的必要性。

3.5 药动学分析

目前，产复康颗粒的药代动力学研究尚未见诸报道。应用建立的 HPLC-MS/MS 方法，本研究首次对产复康颗粒的大鼠体内药动学进行了初步分析。在确认血浆成分对测定方法的专属性、精密度和线性没有影响后，对大鼠口服产复康颗粒后的血浆样品进行了定量测定。为了反映临床情况，首先确定给药剂量为 0.5 g/kg（临床剂量为一次 5 g，按照成人体质量 60 kg，人与大鼠剂量换算系数 6.3 计算得到）。但是在此剂量下，大鼠血浆中检测不到上述 13 种成分。当给药剂量提高到 5 g/kg 时，血浆中可检测到水苏碱和益母草碱，药时曲线如图 6 所示。中药是一个复杂体系，具有多靶点、多效应的特点，以指标成分的药动学可能无法准确的反映中药整体的药动学特点。单从药动学方面考虑，当给药剂量达到临床剂量 10 倍时，大鼠体内才检出 2 种指标成分。但是不能说明其他成分（药材）没有作用，他们可能通过影响水苏碱或益母草碱的吸收或消除发挥作用。当然，也不排除其他成分在血浆中不稳定，吸收后被快速代谢而无法检测到原型成分。因此，在未来的研究中，可以参考本研究的思路，以定性和定量相结合的方法考察产复康颗粒的药动学，真正揭示产复康的入血成分和药效物质。

本研究建立了 HPLC-TOF-MS 和 HPLC-MS/MS 方法，对产复康颗粒中化学成分和指标成分进行快速的定性定量研究，该方法简便、准确，重复性好，可作为产复康颗粒质量控制的参考方法；并初步进行药动学研究，为真正揭示产复康的药效物质提供参考。

参考文献

[1] 彭 维, 苏薇薇, 贾 强, 等. 产复康颗粒质量标准研究 [J]. 中药材, 2003, 26(3): 198-200.

[2] 张丽杰. 产复康颗粒治疗不完全药物流产 50 例疗效观察 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(6): 413.

[3] 吕小玲. 产复康颗粒联合缩宫素注射液治疗产后出血临床观察 [J]. 新中医, 2017, 49(4): 89-91.

[4] 张俊松, 祝承霞. 产复康冲剂的临床应用 [J]. 中成药, 1996, 18(2): 27-29.

[5] 马培芬, 范小兰, 米才毛. 产复康颗粒辅助早期妊娠药物流产 95 例临床观察 [J]. 青海医药杂志, 2013, 43(12): 14-15.

[6] 杨兰珍, 杨 艳. 产复康冲剂配合阿司匹林治疗痛经 75 例体会 [J]. 医学理论与实践, 2011, 24(1): 70-71.

[7] 戚建中. 产复康颗粒中盐酸水苏碱的 HPLC 分析 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 18-20.

[8] 周 萍, 何叶秋. 产复康致严重腹泻 1 例 [J]. 现代应用药学, 1994, (4): 55.

[9] Li B, Wu J, Li X. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of stachydrine and leonurine in rat plasma after oral administration of Herba Leonuri extract by LC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 76: 192-199.

[10] 郑 毅, 白明千. 中药制剂产复康的安全性研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2011, (10): 3.

[11] 彭 维, 苏薇薇, 贾 强, 等. 产复康颗粒质量标准研究 [J]. 中药材, 2003, 26(3): 198-200.

[12] 李家升, 吕 霖. 产复康无糖型颗粒质量标准的研究 [J]. 中药材, 2000, 23(11): 710-711.

[13] 肖巧清, 刘吉金. 产复康颗粒含量测定结果不稳定原因的分析与对策 [J]. 天津药学, 2001, 13(5): 57-58.

[14] Van Andel T, de Boer H J, Barnes J, et al. Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(2): 992-1000.

[15] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. J Tradit Chin Med, 2013 , 33(3): 413-416.

[16] Shang X, Pan H, Wang X, He H, Li M. Leonurusjaponicus Houtt: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(1): 14-32.