

## · 论 著 ·

## UHILIC-MS/MS 法同时测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中 5 种维生素的含量

任强强<sup>1</sup>, 赵优琴<sup>1</sup>, 许文<sup>1</sup>, 黄鸣清<sup>1</sup>, 叶水国<sup>2</sup>, 石贞香<sup>2</sup> (1 福建中医药大学药学院, 福建省中药学重点实验室, 福建福州 350122; 2. 国药控股星鲨制药(厦门)有限公司, 福建 厦门 361028)

**[摘要]** **目的** 建立一种超高效亲水作用色谱串联三重四极杆质谱法(UHILIC-MS/MS), 同时测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙的含量。**方法** 采用超高效液相色谱仪, Waters ACQUITY BEH-HILIC Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以 90% 乙腈(含 0.5% 甲酸)-10 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5% 甲酸)为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 0.30 ml/min; 在电喷雾(ESI)正离子模式下, 用多反应监测(MRM)模式进行含量测定。**结果** 在 5 min 内, 样品中 5 种维生素分别在各自考察的浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数(*r*)均大于 0.998 4; 整体加样回收率在 93.27%~100.39% 之间, RSD 为 1.41%~4.96%; 10 批样品中维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺、泛酸钙的含量测定结果分别为 32.40~38.91、7.002~8.462、9.677~11.17、33.64~39.58、3.276~3.771 mg/250 g。**结论** 本研究建立的 UHILIC-MS/MS 方法可快速实现对复方三维右旋泛酸钙糖浆中 5 种维生素类成分定性鉴定或定量检测, 为复方三维右旋泛酸钙糖浆的开发利用和质量评价提供了可靠的技术检测方法。

**[关键词]** 复方三维右旋泛酸钙糖浆; 超亲水作用色谱-串联质谱; 维生素 B<sub>1</sub>; 维生素 B<sub>2</sub>; 维生素 B<sub>6</sub>; 烟酰胺; 泛酸钙; 含量测定

**[中图分类号]** R917

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2018)06-0512-07

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.008

## Simultaneous determination of 5 B-vitamins in compound trivitamin and calcium pantothenate syrup by UHILIC-MS/MS

REN Qiangqiang<sup>1</sup>, ZHAO Youqin<sup>1</sup>, XU Wen<sup>1</sup>, HUANG Mingqing<sup>1</sup>, YE Shuiguang<sup>2</sup>, SHI Zhenxiang<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Fuzhou 350122, China; 2. Sinopharm Xingsha Pharmaceuticals (Xiamen) Co., Ltd., Xiamen 361028, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a ultra hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (UHILIC-MS/MS) for the simultaneous determination of 5 B-vitamins including thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinamide and calcium pantothenate in Compound Trivitamin and Calcium Pantothenate Syrup. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Waters ACQUITY UHILIC BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column with the mobile phase consisting of 10 mmol/L ammonium formate water and 90% acetonitrile both containing 0.5% formic acid water in a gradient elution at a flow rate of 0.30 ml/min. An electrospray positive ion multiple reaction monitoring (MRM) was used as a detector. **Results** Five B-vitamins in the sample achieved excellent linearity calibration curves over the concentration range tested (*r*>0.998 4) within 5 min. The overall average recovery rates were in the range of 93.27%-100.39% with RSD of 1.41%-4.96%. The contents of thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinamide and calcium pantothenate in ten samples were 32.40-38.91, 7.002-8.462, 9.677-11.17, 33.64-39.58, 3.276-3.771 mg/250 g, respectively. **Conclusion** The UHILIC-MS/MS method established in this study could quickly achieve qualitative identification or quantitative detection of five B-vitamins components in Compound Trivitamin and Calcium Pantothenate Syrup, which provided a reliable technical detection method for the development, utilization and quality evaluation of Compound Trivitamin and Calcium Pantothenate Syrup.

**[Key words]** Compound Trivitamin and Calcium Pantothenate Syrup; ultra hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; thiamine; riboflavin; pyridoxine; nicotinamide; calcium pantothenate; content determination

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81673561);福建省教育厅杰出青年人才项目

**[作者简介]** 任强强, 硕士研究生. 研究方向: 中药药效物质基础及其作用机制研究., Tel: 18305983297; Email: rqq2017fzy@163.com

**[通讯作者]** 黄鸣清, 博士, 副教授, 硕士生导师. 研究方向: 中药新药研发、中药药效物质基础及其作用机制研究, Tel: (0591) 22861135, Email: hmq1115@126.com

复方三维右旋泛酸钙糖浆,原名维他肥儿膏或维力膏,收载于化学药品地标升国标第十册药品标准。其主要成分包括维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺、泛酸钙 5 种 B 族维生素和十味中药(党参、焦白术、茯苓、炒薏苡仁、芡实、山药、山楂、焦麦芽、莲子、炒扁豆),其组分为每 250 g 含维生素 B<sub>1</sub> 36 mg、维生素 B<sub>2</sub> 7.25 mg、维生素 B<sub>6</sub> 10.75 mg、烟酰胺 36 mg 和泛酸钙 3.6 mg,其中维生素 B<sub>1</sub> 和烟酰胺的含量范围应为制剂标示量的 90%~110%,维生素 B<sub>2</sub> 和维生素 B<sub>6</sub> 的含量范围应为制剂标示量的 90%~120%,是一种以中药为主的健脾胃中西复方制剂。其主治功能为“补中益气,健脾止泻,消食导滞”,用于小儿脾胃虚弱、消化不良、体倦神疲及小儿病后调理的滋补营养剂<sup>[1]</sup>。

目前,关于复方三维右旋泛酸钙糖浆中维生素的测定已有文献报道<sup>[2,3]</sup>,但文献中只对其中一种或两种维生素进行含量测定,难以全面反映复方三维右旋泛酸钙糖浆中 B 族维生素的质量。而对于其他文献中,常利用高效液相色谱(HPLC)法测定 B 族维生素的含量<sup>[4-6]</sup>,如梯度洗脱反相高效液相色谱(RP-HPLC)法<sup>[2,3,7]</sup>、定量核磁共振法<sup>[8]</sup>以及高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术<sup>[9,10]</sup>测定其成分的报道。但是 HPLC 进行多成分维生素的检测方法耗时较长(10~40 min),而且由于维生素类成分极性很大,在普通 C<sub>18</sub> 反相色谱柱上保留较差,这些方法在测定时操作色谱条件一般较为复杂,需要添加十二烷基硫酸钠等调节剂以改善色谱行为,且本研究存在中药复方的复杂性和干扰性因素。

随着现代分析技术的发展,超高效亲水作用色谱(ultra hydrophilic interaction chromatography, UHILIC)应运而生,本实验选用的色谱柱与传统反相色谱柱相比,其填料使用化学稳定耐受的、三键键合的酰胺基(amide)键合相,主要针对在普通反相色谱柱中保留弱或者不保留的极性物质,并且可以缓解在反相色谱柱中流动相中高水相引起的反压高及质谱信号低等问题。其分离机制为酰胺基与待测物质之间亲水作用的分配机理(当流动相进入色谱柱时,固定相表面会选择性吸附流动相中的水,在表面形成动态的“富水层”,溶质通过在“富水层”与流动相中的分配作用<sup>[11]</sup>),从而获得更好的色谱分离,特别适合于类似维生素这种强极性物质的色谱保留;同时在亚 2 微米的工艺下,改善了亲水作用色谱的待测物的涡流扩散和传质阻抗,与普通色谱柱相比,表现更好的峰形和灵敏度。

在本研究中,将酰胺键合相色谱柱应用于维生

素成分的分析,色谱分离模式的流动相采用的是高比例有机相/低比例水相,这样的结合有利于提高电喷雾离子化质谱(mass spectrometry, MS)的灵敏度,进一步提高了分析专属性、灵敏度及缩短分析时间,同时可解决中药复方样品存在的复杂性和干扰性因素。目前,利用超高效亲水作用色谱串联三重四极杆质谱法(UHILIC-MS/MS)检测多种维生素成分的方法鲜有报道,因此,采用 UHILIC-MS/MS 同时测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中 5 种维生素含量,弥补目前针对复方三维右旋泛酸钙中 5 种维生素同时测定方法的空白,同时也为其他复方或者含复杂基质的样品中维生素的检测提供另外一种技术手段,报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Xevo TQ-S 三重四极杆质谱(美国 Waters 公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500E 台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-1 恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

### 1.2 试剂

乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司),其余试剂均为分析纯;对照品维生素 B<sub>1</sub>(批号:100390-201505,含量为 97.0%)、维生素 B<sub>2</sub>(批号:100369-201504,含量为 98.2%)、维生素 B<sub>6</sub>(批号:100116-201404,含量为 100%)、烟酰胺(批号:100115-201604,含量为 99.9%)和泛酸钙(批号:100370-201402,含量为 97.5%)均购于中国食品药品检定研究院;10 个批次复方三维右旋泛酸钙糖浆均来自于国药控股星鲨制药(厦门)有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱-质谱(LC-MS)条件

#### 2.1.1 色谱条件

采用 Waters ACQUITY UHILIC BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱;含 0.5% 甲酸的 90% 乙腈溶液为流动相(A),含 0.5% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵水溶液为流动相(B),梯度洗脱(0~1.0 min, 92% A→92% A; 1.0~2.0 min, 92% A→50% A; 2.0~3.0 min, 50% A; 3.0~3.1 min, 50% A→92% A; 3.1~5.0 min, 92% A),流速 0.3 ml/min,柱温为 45 °C,进样量 2 μl。标准品、样品及内标的色谱图见图 1。

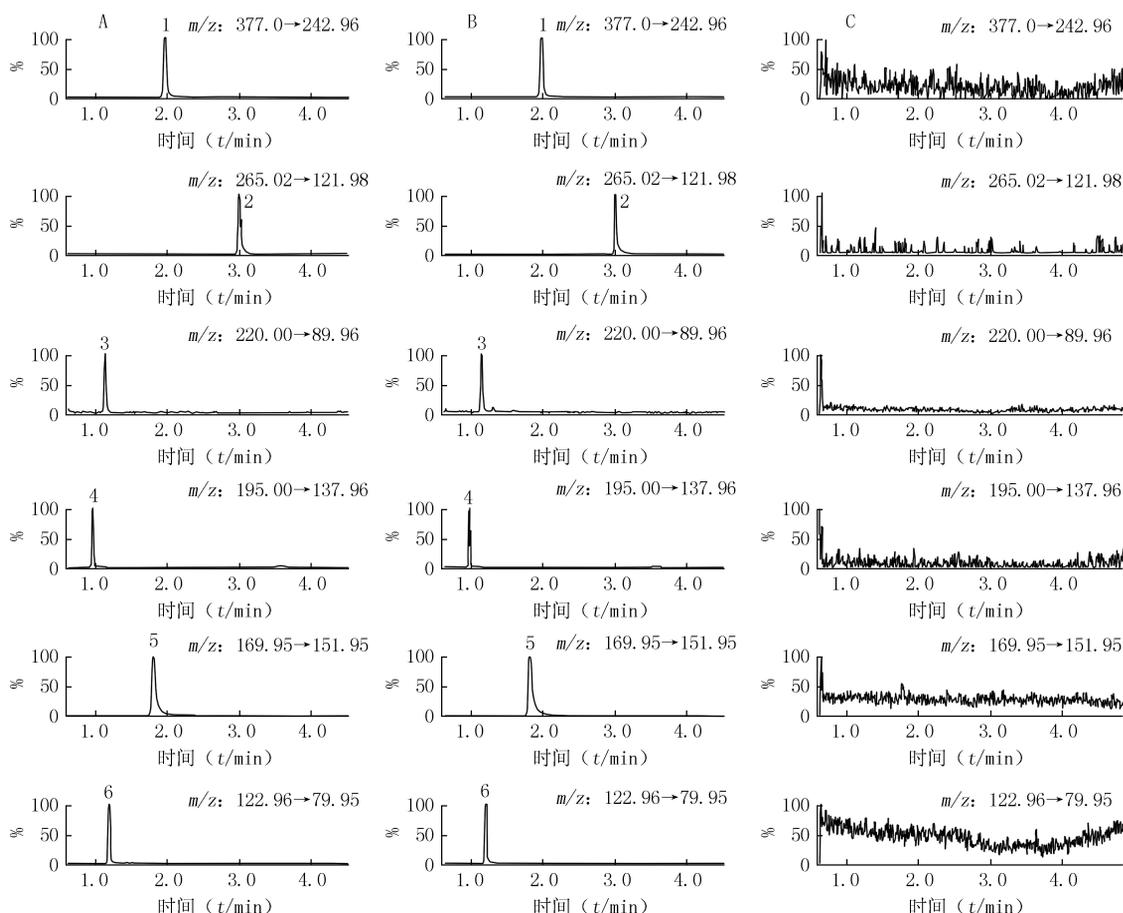


图1 对照品(A)、复方三维右旋泛酸钙糖浆样品(B)、空白溶剂(C)的离子流色谱图

1. 维生素 B<sub>2</sub>; 2. 维生素 B<sub>1</sub>; 3. 泛酸钙; 4. 内标咖啡因; 5. 维生素 B<sub>6</sub>; 6. 烟酰胺

### 2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI)正离子模式,多反应监测(MRM);毛细管电压:3.5 KV;脱溶剂氮气流速:800 L/h;脱溶剂温度:500 °C;锥孔 N<sub>2</sub> 气流:

50 L/h;离子源温度:150 °C;二级锥孔萃取电压:3.00 V;停留时间:5 ms;氩气作为碰撞气体;氮气为载气。各成分的质谱参数见表1,待测维生素及内标的二级质谱图及裂解过程见图2。

表1 各种成分的质谱分析参数

成分	分子式	保留时间 (t <sub>R</sub> /min)	母离子 (m/z)	定量子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	离子模式
维生素 B <sub>1</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	2.94	265.02	121.98	40	20	正离子
维生素 B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1.76	377	242.96	45	25	正离子
维生素 B <sub>6</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	1.69	169.95	151.95	40	12	正离子
烟酰胺	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	1.17	122.96	79.95	35	18	正离子
泛酸钙	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	1.10	220	89.96	40	12	正离子
咖啡因	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0.96	195	137.96	40	18	正离子

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品溶液及内标溶液的制备

分别精密称取维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙的对照品适量,单独以流动相溶液[含 0.5% 甲酸的 90% 乙腈溶液-含 0.5% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的水溶液(=92% :8%)]溶解并

定容于棕色量瓶中,制成质量浓度分别为 2.602、0.076、2.364、2.078、2.12 mg/ml 的对照品母液。分别精密量取适量各对照品母液置于 10 ml 棕色量瓶中,用流动相溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 52.04、15.20、18.912、41.56、6.36 μg/ml 的混合对照品储备溶液。然后用流动相

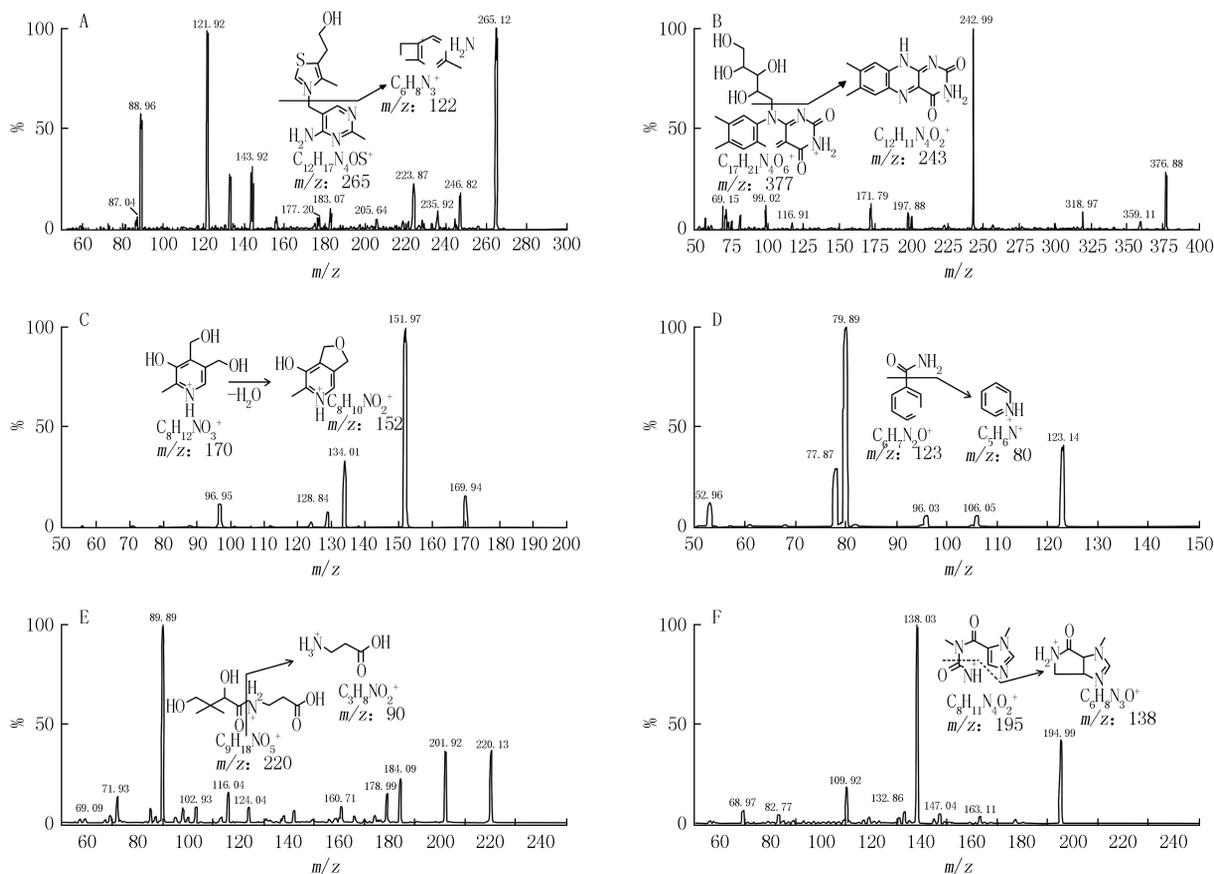


图2 维生素和内标的二级质谱图及裂解过程

A. 维生素 B<sub>1</sub>; B. 维生素 B<sub>2</sub>; C. 维生素 B<sub>6</sub>; D. 烟酰胺; E. 泛酸钙; F. 内标咖啡因

溶液稀释分别得到混合对照品溶液,再用内标咖啡因溶液稀释 100 倍,其中维生素 B<sub>1</sub> 的线性浓度(浓度 1~浓度 5)为 520.4、416.32、260.2、156.12 和 78.06 ng/ml;维生素 B<sub>2</sub> 的线性浓度为 152、121.6、76、45.6 和 22.8 ng/ml;维生素 B<sub>6</sub> 的线性浓度为 189.12、151.296、94.56、56.736 和 28.368 ng/ml;烟酰胺的线性浓度为 415.6、332.48、207.8、124.68 和 62.34 ng/ml;泛酸钙的线性浓度为 63.6、50.88、31.8、19.08 和 9.54 ng/ml。另精密称取咖啡因对照品 10.4 mg,加入甲醇定容于 50 ml 量瓶,制得浓度为 208 μg/ml 的内标母液,取一定体积的内标母液于 100 ml 棕色量瓶中,用流动相稀释定容成浓度为 52 ng/ml 的内标溶液,以供 UHILIC-MS/MS 分析。

### 2.2.2 供试品溶液的制备

取待测复方三维右旋泛酸钙糖浆样品 5 g,置 50 ml 棕色锥形瓶中,加 30% 甲醇水 20 ml,超声(功率 250 W,频率 80 kHz)提取 30 min,定容于 25 ml 棕色容量瓶,过滤,取续滤液。取样品滤液,按样品溶液:内标溶液=1:99(10 μl:990 μl)加入内标溶液,摇匀,0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 线性关系考察及检测限、定量限测定

按照“2.2.1”项方法制备混合对照品储备溶液,用流动相溶液及浓度为 52 ng/ml 的内标溶液,采用倍数稀释法,分别稀释,制得 5 个不同浓度梯度的系列标准溶液,按“2.1”项下 LC-MS 条件进行分析,得各成分的峰面积。以质量浓度(X)为横坐标,各成分峰面积与内标物峰面积比值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程、相关系数及线性范围见表 2。分别以信噪比 S/N=10 和 S/N=3 时各个对照品溶液的质量浓度作为检测限和定量限,结果见表 2。

### 2.3.2 精密度试验

取线性浓度 4 浓度水平的对照品混合溶液(维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙浓度分别为: 156.12、45.6、56.736、124.68 和 19.08 ng/ml),按“2.1”项下测定峰面积,1 d 内连续进样 6 次测定日内精密度,连续测定 3 d,每天进样 3 针测定日间精密度,分别计算各对照品与内标物的峰面积比值及比值的 RSD,结果维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙的日内精密度

表2 各成分的回归方程、相关系数和线性范围、检测限和定量限

成分	回归方程	r	线性范围 (ng/ml)	LOD/ (ng/ml)	LOQ/ (ng/ml)
维生素 B <sub>1</sub>	y=0.038 1x-0.386 3	0.999 7	78.1~520.4	2.28	4.55
维生素 B <sub>2</sub>	y=0.005 6x-0.014 2	0.999 2	22.8~152.0	0.67	1.33
维生素 B <sub>6</sub>	y=0.207 7x+0.767 3	0.999 7	28.3~189.1	0.83	1.65
烟酰胺	y=0.030 6x+0.298 6	0.999 3	62.3~415.6	1.82	3.64
泛酸钙	y=0.007 5x-0.003 4	0.998 4	9.5~63.6	0.28	0.56

RSD 分别为 2.54%、3.32%、2.22%、1.81% 和 1.86%，日间精密度 RSD 分别为 3.28%、2.07%、2.38%、2.05% 和 2.21%，表明仪器精密度良好。

### 2.3.3 稳定性试验

将样品(批号 20970104)的供试品溶液在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后按照“2.1”项下 LC-MS 条件进样分别测定,根据标准曲线计算各成分的浓度及其 RSD,结果维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙 RSD 分别为 2.06%、3.78%、2.69%、2.42% 和 2.29%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.3.4 重复性试验

取同一批复方三维右旋泛酸钙糖浆(批号 20970104),按“2.2.2”项供试品溶液的制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.1”项下 LC-MS 条件进样分别测定,分别计算样品中各成分平均含量及其 RSD,结果维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺和泛酸钙平均含量分别为 134.27、30.20、43.83、143.84、13.38 μg/g, RSD 分别为 3.45%、3.83%、4.70%、4.54% 和 2.03%，表明该方法的重复性良好。

### 2.3.5 加样回收率考察

精密称取已知含量的复方三维右旋泛酸钙糖浆(批号 20970104)3 份,每份 2.5 g,分别置于 50 ml 棕色容量瓶中,按照表 3 分别精密加入低、中、高各对照品储备溶液适量,并用流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液按照“2.1”项下 LC-MS 条件进样分别测定,计算维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、烟酰胺、泛酸钙的平均回收率,结果见表 3。

### 2.3.6 样品含量测定

取 10 批复方三维右旋泛酸钙糖浆各 3 瓶,按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下 LC-MS 条件进样分析测定,按内标法计算得到 10 批样品中 5 个被测成分的含量,结果见表 4。

表3 加样回收率测定结果(n=3)

成分	原含量 (μg)	添加量 (μg)	测得量 (μg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
维生素 B <sub>1</sub>	335.67	156.12	488.52±6.69	97.90	4.37
		312.24	649.09±15.04	99.87	4.82
		624.48	956.33±28.23	99.85	4.53
维生素 B <sub>2</sub>	75.49	30.40	104.20±0.62	94.45	2.17
		60.80	136.06±2.00	99.04	3.32
		121.60	195.61±5.20	99.32	4.30
维生素 B <sub>6</sub>	109.57	47.28	155.13±0.89	96.37	1.96
		94.56	204.13±3.62	99.45	3.85
		189.12	297.91±7.29	100.09	3.85
烟酰胺	359.61	155.85	509.69±2.11	96.30	1.41
		311.70	673.44±15.49	100.14	4.96
		623.40	982.31±27.49	100.39	4.39
泛酸钙	33.45	15.90	48.28±0.37	93.27	2.52
		31.80	64.19±1.21	96.17	3.96
		63.60	94.83±2.47	96.96	4.01

表4 复方三维右旋泛酸钙糖浆  
5种成分的含量(mg/250g, n=3)

批号	维生 素 B <sub>1</sub>	维生 素 B <sub>2</sub>	维生 素 B <sub>6</sub>	烟酰胺	泛酸钙
20961001	33.51	7.481	10.60	38.70	3.771
20960603	32.40	8.332	10.87	39.58	3.377
20960901	33.37	8.029	11.07	38.78	3.361
20960902	33.33	7.002	9.68	33.94	3.495
20960903	35.39	7.645	10.45	36.14	3.412
20970102	38.68	8.462	11.17	38.69	3.321
20970103	37.84	7.377	10.11	35.13	3.335
20970104	38.91	7.932	10.70	36.85	3.415
20970201	37.84	8.113	10.97	38.57	3.428
20970202	34.25	7.276	9.87	33.64	3.276
均值	35.55	7.765	10.55	37.00	3.419
RSD(%)	7.08	6.21	4.88	5.90	4.040

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的优化

根据化合物的理化性质和色谱行为,采用了 4 种高效色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Waters ACQUITY

UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Waters ACQUITY UHILIC BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 进行分析,以比较色谱峰形、分离度和基质效应。结果显示 C<sub>18</sub> 色谱柱的保留情况较差,出峰时间过于靠前,在中药基质下,受到中药复方极性成分的基质效应的影响,导致其 5 种维生素的基质效应均达到 110% 以上,使测定结果偏差很大,且待测成分峰形不佳,而采用 Waters ACQUITY UHILIC BEH Amide 色谱柱分离效果较好,并且受中药基质干扰的基质效应在 95%~105% 之间,对检测的成分干扰较小,且待测成分峰形良好,无开叉现象,可实现 5 种维生素的同时测定。

另外,对于流动相的筛选,首先比较了甲醇-酸水和乙腈-酸水两种有机相体系,结果表明乙腈体系优于甲醇体系,然后进一步考察乙腈有机相体系下的不同酸水的影响,包括 0.1% 甲酸水、0.5% 甲酸水、0.1% 醋酸水、0.5% 醋酸水和 10 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5% 甲酸)。结果表明 10 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5% 甲酸)最佳,最后经过优选确定采用 90% 乙腈(含 0.5% 甲酸)-10 mmol/L 甲酸铵水(含 0.5% 甲酸)系统,各成分的分离效果最优。

### 3.2 供试品溶液制备方法的优化

通过比较温浸、回流、超声和振摇提取法,结果显示振摇和超声提取率较高,采用温浸和回流均对待测 B 族维生素成分有一定程度的破坏,而振摇提取需要特殊的振摇设备和振摇容器,因此采用超声提取法的操作更为简便且提取效果较好。在此基础上,考察不同提取时间 10、20、30、40、50、60 min,结果显示提取时间为 30 min 时,5 种待测成分的提取率达到峰值;然后进一步比较了不同提取溶剂即纯水、10%、20%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 甲醇及纯甲醇,测定结果显示以 30% 甲醇水为提取溶剂时,5 种维生素的提取率较高;最后考察了提取料液比 1:0.5、1:1、1:2、1:4、1:10、1:25、1:50,结果表明采用 1:4 的料液比提取效果最佳。

### 3.3 质谱方法的优化

为了提高质谱检测灵敏度,本实验对各个维生素的质谱多反应监测(MRM)进行优化考察,首先,维生素 B<sub>1</sub> 母离子为 265.02,经过四极杆碰撞室裂解,其质谱裂解可以产生 88.95、121.98、143.95 3 个子离子,其中 121.98 为[C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>峰,在子离子中丰度最高,因此作为定量离子,而 88.95、143.95 作为定性离子。维生素 B<sub>2</sub> 母离子为 377,

经过裂解,其质谱裂解可以产生 171.98、197.95、242.96 3 个子离子,其中 242.96 为[C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>峰,在子离子中丰度最高,因此作为定量离子,而 171.98、197.95 作为定性离子。维生素 B<sub>6</sub> 母离子为 169.95,经过裂解,其质谱裂解可以产生 96.95、133.95、151.95 3 个子离子,其中 151.95 为[C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>峰,在子离子中丰度最高,因此作为定量离子,而 96.95、133.95 作为定性离子。烟酰胺母离子为 122.96,其质谱裂解可产生 53、79.95、95.95 3 个子离子,其中 79.95 为[C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N]<sup>+</sup>峰,在子离子中丰度最高,因此作为定量离子,而 53、95.95 作为定性离子。泛酸钙母离子为 220,其质谱裂解可产生 89.96、184、202 3 个子离子,其中 89.96 为[C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>峰,在子离子中丰度最高,因此作为定量离子,184、202 作为定性离子。

### 3.4 含量测定结果分析

通过含量测定,复方三维右旋泛酸钙糖浆中维生素 B<sub>1</sub> 的含量范围为 32.40~38.91 mg/250 g,维生素 B<sub>2</sub> 的含量范围为 7.002~8.462 mg/250 g,维生素 B<sub>6</sub> 的含量范围为 9.677~11.17 mg/250 g,烟酰胺的含量范围为 33.64~39.58 mg/250 g,泛酸钙的含量范围为 3.276~3.771 mg/250 g。经统计,10 个批次复方三维右旋泛酸钙糖浆中 5 种维生素含量的平均值分别为 35.55、7.765、10.55、37.00、3.419 mg/250 g, RSD 分别为 7.08%、6.21%、4.88%、5.90%、4.04%,其含量波动小于 10%,所测维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub> 和烟酰胺的含量均在制剂标示量范围之内。由于文献报道显示,温度对制剂中维生素 B<sub>1</sub> 的稳定性影响显著<sup>[12]</sup>,pH 值的降低有利于提高其稳定性,遇光或者铜、铁、锰等金属离子均能加速氧化<sup>[13]</sup>。维生素 B<sub>2</sub> 在碱性溶液中或受光影响极易变质,但在一定温度下对热较稳定,氧化剂对维生素 B<sub>2</sub> 稳定性有较大影响,还原剂未见明显影响<sup>[14]</sup>。维生素 B<sub>6</sub> 水溶液可被空气氧化变色,pH 值高时氧化加快,在酸性溶液中较稳定,120 °C 加热 30 min 亦不分解<sup>[13]</sup>。烟酰胺结构比较稳定,不会轻易被酸碱以及水分等破坏,但贮存时间对其含量具有极显著的影响<sup>[15]</sup>。因此提示样品生产过程中或者存放过程中应该尽量减少维生素的破坏,以提高样品的均匀性。

综上所述,本研究通过 UHILIC-MS/MS 法快速定性鉴定和定量检测复方三维右旋泛酸钙糖浆中 5 种维生素类成分,为复方三维右旋泛酸钙糖浆的开发利用和质量评价提供了可靠的实验依据。检测

## 【参考文献】

- [1] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 中国人民解放军医疗机构制剂规范(2002年版)增补本[M]. 北京:人民军医出版社, 2007:35.
- [2] 全国法制计量管理技术委员会. 测量不确定度评定与表示(JJF1059.1-2012)[S]. 北京:中国计量出版社, 2013.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. 测量不确定度要求的实施指南(CNAS-GL05;2011)[S]. 北京:中国计量出版社, 2011.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南(CNAS-GL06;2006)[S]. 北京:中国计量出版社, 2006.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. 常用玻璃量器检定规程(JJG196-2006)[S]. 北京:中国计量出版社, 2006.
- [6] 盖静, 王俊丽, 安宝文, 等. HPLC-DAD法测定复方樟脑搽剂中樟脑和苯酚的含量[J]. 西北国防医学杂志, 2015, 36(2): 87-89.
- [7] 陆松伟, 宋洪杰, 陈方剑. HPLC法同时测定复方樟脑搽剂中苯酚和樟脑含量[J]. 药实践杂志, 2011, 29(5):347-349.
- [8] 盖静, 盖丽, 张焯. 变换波长法测定复方樟脑搽剂中樟脑和苯酚的含量[J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(2):42-44.
- [9] 凌云, 杨杨, 傅秋生, 等. 复方樟脑搽剂中三组分的含量测定[J]. 解放军药学报, 2014, 30(5):431-434.
- [10] 谷娜, 郭胜才. 高效液相色谱法测定复方樟脑搽剂中苯酚的含量[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(4):316-317.
- [11] 王俊丽, 李加恒, 盖静. 毛细管气相色谱法同时测定复方樟脑搽剂中樟脑、薄荷脑含量[J]. 西北国防医学杂志, 2016, 37(3):164-165.
- [12] 高梅, 张耀, 贾茹. 顶空气相色谱法测定咳速停糖浆中薄荷脑的不确定度[J]. 广东化工, 2015, 42(7):155-171.
- [13] 黄诗前. 顶空气相色谱法测定十滴水中的乙醇量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(5):466-448.
- [14] 李燕, 吴皓东, 郝宇薇, 等. GC法测定唇香草挥发油中薄荷酮的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(9):1136-1141.
- [15] 姚鑫, 程宗琦, 姜玮, 等. 气相色谱法测定复方薄荷脑滴鼻液中樟脑与薄荷脑的含量[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(5): 594-596.
- [16] 吴查青, 王发英, 关晓娟. 顶空气相色谱法测定厚朴中 $\beta$ -桉油醇含量的方法研究[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(9):29-33.

[收稿日期] 2018-01-19 [修回日期] 2018-09-14  
[本文编辑] 陈盛新

(上接第517页)

过程中无需使用十二烷基硫酸钠等离子对试剂, 分析时间仅5 min, 溶剂消耗小, 同时抗干扰能力强, 解决了中药复方样品存在下对维生素检测的干扰。本研究弥补了目前针对复方三维右旋泛酸钙中5种维生素同时测定方法的空白, 同时也可为其他复方或者含复杂基质的样品中维生素的检测提供一种新的解决方案。

## 【参考文献】

- [1] 国家药品监督管理局. 国家药品标准(试行)[S]. WS-10001-(HD-0950)-2002.
- [2] 翁水旺, 高祖钦. RP-HPLC法测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中烟酰胺的含量[J]. 药进展, 2006, 30(10):457-460.
- [3] 翁水旺. RP-HPLC法测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中维生素B<sub>1</sub>和维生素B<sub>6</sub>的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(6): 645-647.
- [4] 陈华龙, 刘旺培. HPLC法测定复合维生素B片中维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、烟酰胺的含量及含量均匀度[J]. 海峡药学, 2016, 28(2):63-65.
- [5] 陈彩云, 魏鲜娥, 蔡伟江, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中泛酸、烟酰胺、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5):1866-1871.
- [6] 李彩霞, 苏智阳, 袁文杰. HPLC法测定维生素B族片中3种组分的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(6):54-57.
- [7] 解瑞辉. HPLC与UV法测定维生素B<sub>1</sub>注射液中维生素B<sub>1</sub>含量的比较[J]. 海峡药学, 2017, 29(8):47-49.
- [8] 郭强胜, 刘明珂, 禹珊, 等. 定量核磁共振法同时测定复合维生素B片中B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、烟酰胺和泛酸钙[J]. 波谱学杂志, 2016, 33(3):442-451.
- [9] 刘俊杰, 耿春梅, 郭曦, 等. 人血清水溶性维生素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>和B<sub>9</sub>高效液相色谱串联质谱联用技术测定方法的建立和验证[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(7):617-620.
- [10] 梁瑞强, 王聪, 曹进, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中10种水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3):966-974.
- [11] 金小青, 姚立新, 薛昆鹏. 亲水作用色谱的发展概述[J]. 化工管理, 2014(27):70-71.
- [12] 仇岐枢, 冯建新. 复合维生素B溶液处方的改进及稳定性考察[J]. 中国医院药学杂志, 1997, 17(3):126-127.
- [13] 宋永美, 吴玉林. 复合维生素B溶液的化学稳定性分析[J]. 数理医药学杂志, 2005, 18(4):364-366.
- [14] 李嘉霖, 高宗华. 维生素B<sub>2</sub>片中维生素B<sub>2</sub>的测定及稳定性[J]. 光谱实验室, 2012, 29(4):2576-2578.
- [15] 孙美玲. 贮存时间、湿度、铜源和添加剂来源对预混料中B族维生素稳定性的影响[D]. 沈阳农业大学, 2016.

[收稿日期] 2018-05-11 [修回日期] 2018-10-09  
[本文编辑] 陈盛新