

UPLC-MS/MS 法测定不同产地何首乌中 6 种水溶性维生素含量

周利¹ 郭兰萍¹ 高峰² 李佳兴¹ 余意³ 马方励³ 杨健¹

(1 道地药材国家重点实验室培育基地/中国中医科学院中药资源中心,北京,100700; 2 中国中医科学院西苑医院,北京,100091; 3 无限极(中国)有限公司,广州,510663)

摘要 目的:建立超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱联用技术(UPLC-MS/MS)测定何首乌中水溶性维生素类成分的分析方法。方法:将粉碎后的何首乌样品用超纯水超声提取后,经 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离并在动态多反应监测模式(MRM)下检测,得到相应的提取离子流图,以峰面积进行定量。结果:何首乌中 6 个水溶性维生素的含量差别较大,其中 VB₄ 为何首乌中维生素的主要来源,在 6 个维生素类化合物中的含量最高,达到 85.89 μg/g; VB₆ 平均含量最低,仅为 0.68 μg/g。其余 4 种维生素类成分 VB₂、VB₅、NA 和 NAM 的平均含量均相对较低。结论:该法简单快速,结果准确、可靠,重复性好,为何首乌中水溶性维生素类成分的深入研究以及何首乌保健产品的开发提供了参考依据。

关键词 何首乌;水溶性维生素;超高效液相-串联三重四极杆质谱联用;含量分析

Determination of 6 Water-Soluble Vitamins in Polygoni Multiflori Radix from Different Habitants by UPLC-MS/MS

Zhou Li¹, Guo Lanping¹, Gao Feng², Li Jiaxing¹, Yu Yi³, Ma Fangli³, Yang Jian¹

(1 State Key Laboratory of Dao-di Herbs breeding base, National Resources Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2 Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 3 Infinitus(China) Company Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract Objective: To establish an Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass/Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) method to determine the contents of water-soluble vitamins in Polygoni Multiflori Radix from different habitants. **Methods:** The pulverized Polygoni Multiflori Radix sample was ultrasonically extracted with ultrapure water, separated by an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) and detected under dynamic multiple reaction monitoring mode (MRM) to obtain the corresponding extracted ions Flow chart, and quantified by peak area. **Results:** The contents of 6 water-soluble vitamins in Polygoni Multiflori Radix had great differences. Among them, the content of VB₄ was the highest which was 85.89 μg/g; and the content of VB₆ was the lowest which was only 0.68 μg/g. The average content of the other 4 vitamins, VB₂, VB₅, NA and NAM, was relatively low. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. It provides a reference for the follow-up research of water-soluble vitamins and health food development of Polygoni Multiflori Radix.

Key Words Polygoni multiflora Radix; Water-soluble vitamins; UPLC-MS/MS; Content analysis

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.008

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,味苦、甘、涩,性微温,归肝、心和肾经^[1],是一种常用补益中药,最早载于《日华子本草》,曰:“其药本草无名,因何首乌见藤夜交,便即采食有功,因以采人为名耳”^[2]。何首乌另有地精、仙药、首乌等别名,生用可解毒、消痈、润肠通便,制用能补肝肾、强筋骨、益精血、乌须发,历来被古今医家、食疗养生家所推崇,在医疗、保健、化工等领域占有重要地位^[3-4]。目前何首乌生品及炮制

品均已纳入我国保健食品原料名录。

维生素又名维他命,是维持人体正常功能不可缺少的营养物质,也是保持机体健康不可缺少的活性物质。研究表明,维生素缺乏将会导致包括皮炎、脱屑、口腔溃疡、坏血病、儿童佝偻病等在内的一系列症状及疾病,同时,维生素对一些疾病也有一定的治疗作用,如研究表明,叶酸、维生素能够降低脑梗死患者血中 HCY 的水平,降低患者死亡率^[5];维生素 C 可作为电子供体在细胞中产生过氧化氢杀伤肿

基金项目:财政部中央本级专项(2060302);国家自然科学基金青年基金项目(81603241);国家重点研发计划项目(2017YFC1700701)

作者简介:周利(1992.10—),女,硕士,研究实习员,研究方向:中药材质量分析与评价,E-mail:zhouli3131@163.com

通信作者:杨健(1981.07—),男,博士,副研究员,研究方向:中药资源,E-mail:yangchem2012@163.com

瘤细胞,在肿瘤治疗中具有广阔前景^[6-7]。作为一种重要的功能因子,维生素是各类食品,医疗、保健品原料的重要检测指标;而其在何首乌中的含量却鲜有报道。本研究以超高效液相色谱三重四级杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立了同时测定何首乌中 6 种水溶性维生素成分维生素 B₂(VB₂)、维生素 B₄(VB₄)、维生素 B₅(VB₅)、维生素 B₆(VB₆)、烟酸(NA)和烟酰胺(NAM)的方法,并以不同产地来源的 15 批何首乌样品为研究对象,对其所含的该类成分的含量水平进行了分析及评价,以期为何首乌的深入研究及保健产品开发提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 ACQUITY UPLC™ 系统(Waters 公司,美国,型号:I-Class),API 四级杆-线性离子阱质谱仪(ABSCIEX 公司,配有离子喷雾接口,美国,型号:6500),电子天平(梅特勒-托利多有限公司,瑞士,型号:NewClassic MF),超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号 SB800DTD),Eppendorf 离心机(Eppendorf 公司,德国,型号:5810R)。

1.2 试剂 色谱级甲醇和乙腈(Fisher Scientific 公司,美国,I1014107923、JB081430);乙酸铵(LC/MS 分析用,Fisher Scientific 公司,美国,批号 A639-500);水为自制超纯水,来至赛默飞超纯水系统(电阻率为 18.2 MΩ/cm,美国,型号 GenPure)。对照品:维生素类化合物对照品共 6 个,分别为:维生素 B₂(VB₂,批号 B21290)、维生素 B₄(VB₄,批号 18108459072)、维生素 B₅(VB₅,批号 B21291)、维生素 B₆(VB₆,批号 B21292)、烟酸(NA,批号 BCBH1877V)、烟酰胺(NAM,批号 J16N8R47789)。其中维生素 B₂、烟酸、烟酰胺和维生素 B₅ 购买于北京北京融诚鑫德科技发展有限公司;维生素 B₄ 和维生素 B₆ 购买于上海士峰生物科技有限公司。以上对照品纯度均大于 98%。

1.3 分析样品 本研究所用何首乌采自四川、广东、云南等何首乌主产区,经中国中医科学院中药资源中心金艳鉴定为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,采集具体信息见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);流动相 A:10 mmol/L 乙酸铵,流动相 B:乙腈,流速:0.5 mL/min;进样量:1 μL,柱温:40 ℃,梯度洗脱:0~1.5 min,流动相 A 95%→95%;1.5~4 min,流动相 A 95%→45%;4~4.5 min 流动相 A 45%→95%;4.5~6 min,流动相

A 95%→95%。

2.2 质谱条件 离子源:Turbo V;电离模式:ESI+;气帘气(CUR)体积流量:30 L/min;喷雾电压(IS):5500 V;雾化气(GS1)体积流量:50 L/min;加热辅助气(GS2)体积流量:50 L/min;采集方式:MRM;离子化温度(TEMP):550 ℃。优化的条件参数见表 2。

表 1 何首乌样品来源信息

样品编号	产地	采收时间(年.月)
1	甘肃陇南武都	2016.10
2	广东德庆	2016.12
3	广东高州	2016.10
4	贵州凯里	2016.12
5	安徽亳州	2016.10
6	湖北荆门	2016.10
7	重庆	2016.11
8	云南红河	2016.12
9	广西玉林	2016.10
10	四川南充	2016.11
11	四川达州	2016.11
12	四川宜宾	2016.11
13	四川遂宁	2016.11
14	四川攀枝花	2016.11
15	四川西昌	2016.11

表 2 6 个维生素成分的质谱优化条件

维生素	R t(min)	MRM 参数			
		MRM 离子对 (m/z)	去簇电压 (DP/V)	碰撞能量 (CE/eV)	射出电压 (CXP/V)
烟酸	0.58	124.2/79.9	60	29	14
维生素 B ₅	0.60	220.0/90.0	57.4	20	11
维生素 B ₄	0.70	136.1/119.0	106	31	15
维生素 B ₆	0.73	170.0/152.1	48	19	14
烟酰胺	0.87	123.2/80.0	66	27	9
维生素 B ₂	2.87	377.2/243.1	136	33	8

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取维生素类标准品适量,制备成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,其中维生素 B₂ 用 10% 的氨水为溶剂配成单一成分对照品储备液,其他维生素用 10 mmol/L 乙酸铵:甲醇(9:1)的溶液为溶剂分别配成单一成分对照品储备液。分别精密吸取各标准储备液适量,分组配制成适量浓度的各混合标准品溶液,其中维生素 B₂ 为第 1 组,维生素 B₄、维生素 B₅ 和烟酸为第 2 组,维生素 B₆ 和烟酰胺为第 3 组。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末 50 mg,置于离心管中,精密加入超纯水 1.5 mL,称定重量,超声提取 30 min(功率:250 W,频率:40 kHz),再称定重量,用超纯水补足减少的质量,12 000 r/min 离心 10 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤

过,取续滤液作为供试品溶液。放置于 4 ℃ 冰箱供 UPLC-MS/MS 分析用。

2.5 线性关系考察 取上述 3 组混合对照品溶液,逐级稀释为 7 个不同质量浓度的标曲混标溶液,采用 2.2 和 2.3 项下条件进行测定,以色谱峰面积 Y 为纵坐标,进样浓度 X(μg/mL) 为横坐标得到回归方程、线性范围与相关系数,结果见表 3。结果表明,6 种目标成分在各自的浓度范围内线性良好。

表 3 标准曲线的线性范围、回归方程和相关系数			
名称	线性范围 (μg/mL)	标准曲线	R ²
维生素 B ₂	0.01 ~ 1.00	Y = 8.95 × 10 ⁵ X - 7.91 × 103	0.999 6
维生素 B ₄	0.10 ~ 8.00	Y = 4.76 × 10 ⁶ X + 4.26 × 106	0.992 1
维生素 B ₅	0.01 ~ 1.00	Y = 3.06 × 10 ⁶ X + 8.46 × 103	0.999 0
烟酸	0.01 ~ 0.50	Y = 5.69 × 10 ⁶ X + 5.63 × 104	0.992 0
烟酰胺	0.01 ~ 0.80	Y = 4.16 × 10 ⁶ X + 8.15 × 104	0.999 3
维生素 B ₆	0.01 ~ 0.50	Y = 1.24 × 10 ⁸ X + 5.64 × 103	1.000 0

2.6 中间精密度实验 精密吸取同一混合对照品溶液,连续重复进样 6 次,测得各目标化合物峰面积的 RSD 范围为 0.54% ~ 2.67%,证明仪器精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性实验 取同一份供试品溶液,分别于 0、1、2、3、6 h 进样,以测定化合物稳定性。结果显示,各维生素类化合物在 6 h 内测定值的 RSD 在 2.32% ~ 3.87% 之间,证明化合物稳定性良好,满足分析需要。

2.8 重复性实验 取同一份何首乌样品,精密称定 6 份,按本研究所述提取方法提取完成并过滤测定。结果显示,各目标化合物测定值的 RSD 在 1.78% ~ 4.37% 之间,证明方法重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取何首乌样品 5 份,向其

中加入一定质量浓度的对照品溶液。按照 2.4 项方法处理后进样分析,以计算所得的实际值与加入量的比值即为回收率。6 个维生素的平均加样回收率:维生素 B₂ 为 95.3%,维生素 B₄ 为 102.9%,维生素 B₅ 为 96.2%,烟酸为 104.3%,烟酰胺为 95.8%,维生素 B₆ 为 105.6%,其 RSD 均小于 6.0%。

2.11 样品的测定结果 取各产地何首乌供试品溶液,按照优化后的色谱及质谱条件进行测定,测定结果根据标准曲线回归方程及实际称样量进行计算,进而得到样品中各化合物的含量。见表 4。

3 讨论

不同产地何首乌维生素的总含量在 52.97 ~ 186.50 μg/g 之间,平均含量为 108.13 μg/g。其中 VB₄ 为何首乌中维生素的主要来源,在 6 个水溶性维生素中的含量最高,平均值达到 85.89 μg/g;VB₆ 平均含量最低,仅为 0.68 μg/g。其余 4 种维生素类化合物在何首乌中的含量均分布在 0 ~ 10 μg/g 之间,VB₂、NAM、VB₅ 和 NA 的平均含量依此为 8.41 μg/g、6.67 μg/g、3.25 μg/g 和 3.23 μg/g。

不同产地来源的样品中,以广西玉林何首乌中维生素总量最高,达到 186.50 μg/g,其次是广东高州产何首乌,其维生素总含量为 177.79 μg/g;此外,分别来自四川达州、四川宜宾、四川遂宁和贵州凯里的样品中维生素类成分总含量均达到 100 μg/g 以上,分别为 157.62 μg/g、122.29 μg/g 和 127.29 μg/g。其余产地药材中维生素总量均低于 100 μg/g,最低的为安徽亳州产样品,仅为 52.97 μg/g,为广西玉林何首乌总维生素含量的 28.40%。

表 4 不同产地何首乌中维生素的含量分析结果(n=3,μg/g)							
编号	VB ₂	VB ₄	VB ₅	NA	VB ₆	NAM	总维生素
1	1.41 ± 0.07	68.27 ± 1.62	2.92 ± 0.23	1.41 ± 0.12	0.52 ± 0.02	4.86 ± 0.10	79.38
2	4.03 ± 0.38	80.45 ± 3.19	2.88 ± 0.04	2.53 ± 0.19	0.63 ± 0.02	4.67 ± 0.22	95.20
3	7.26 ± 0.24	155.48 ± 0.36	2.80 ± 0.63	4.02 ± 0.10	0.56 ± 0.01	7.68 ± 0.39	177.79
4	5.55 ± 0.16	86.57 ± 4.89	2.81 ± 0.20	2.40 ± 0.11	0.90 ± 0.07	9.58 ± 0.55	107.80
5	15.54 ± 0.15	19.94 ± 1.93	8.49 ± 0.15	3.70 ± 0.15	1.74 ± 0.27	3.56 ± 0.38	52.97
6	23.36 ± 1.17	55.16 ± 1.47	2.35 ± 0.06	7.76 ± 0.19	0.82 ± 0.02	4.19 ± 0.03	93.64
7	5.73 ± 0.15	37.63 ± 0.79	5.01 ± 0.36	2.90 ± 0.04	0.37 ± 0.01	2.59 ± 0.09	54.22
8	5.09 ± 0.02	59.21 ± 2.02	3.32 ± 0.13	3.91 ± 0.15	0.88 ± 0.02	13.44 ± 0.08	85.86
9	14.46 ± 0.42	159.67 ± 1.20	1.95 ± 0.06	3.22 ± 0.03	0.91 ± 0.04	6.29 ± 0.08	186.50
10	8.33 ± 0.23	75.78 ± 0.30	4.73 ± 0.66	3.11 ± 0.07	0.90 ± 0.06	6.08 ± 0.24	98.93
11	9.03 ± 0.34	134.19 ± 0.18	1.77 ± 0.06	1.91 ± 0.15	0.12 ± 0.01	10.58 ± 0.09	157.62
12	4.94 ± 0.12	105.15 ± 0.45	1.73 ± 0.01	2.30 ± 0.11	0.41 ± 0.03	7.78 ± 0.37	122.29
13	4.17 ± 0.22	109.12 ± 1.76	1.80 ± 0.09	1.99 ± 0.08	0.39 ± 0.01	9.82 ± 0.15	127.29
14	2.19 ± 0.12	81.87 ± 0.94	3.05 ± 0.21	2.89 ± 0.13	0.36 ± 0.01	3.70 ± 0.12	94.06
15	15.08 ± 0.60	59.90 ± 0.40	3.20 ± 0.05	4.45 ± 0.13	0.67 ± 0.02	5.17 ± 0.45	88.46
平均含量	8.41	85.89	3.25	3.23	0.68	6.67	108.13

本研究还同时检测了何首乌中的 VB_1 、 VC 、 VB_7 和 VB_8 4 种成分,但此 4 种成分在何首乌药材中均未检出。研究利用 UPLC-MS/MS 法测定了不同产地何首乌药材中 6 种水溶性维生素成分的含量。该法简单快速,结果准确、可靠,重复性好,为何首乌后续的相关研究提供了参考依据。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. 2015 ed. Part 1. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [2] Jian C. Functional Components and Health Function of Polygonum Multiflorum Thunb[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2009, 5(4): 41-42, 45.
- [3] Cui H R, Bai Z F, Song H B, et al. Investigation of potential toxic factors for fleece-flower root; from perspective of processing methods evolution[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(2): 333-339.

- [4] CAI W J, WU Z H. The efficacy and clinical application of radix polygoni multiflora[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2016(3): 139-140.
- [5] ZHOU N Q, HUANG J Y. The Relationship between Homocysteine Level and Severity of Cerebral Infarction and the Effect of Folic Acid and B Vitamins[J]. For all Health, 2013, 11(15): 108-109.
- [6] Jing X J, Ji-Hui D U, Ke-Jian H E. Research Progress on Role of Vitamin C in Tumor Therapy[J]. Medical Recapitulate, 2010, 16(4): 554-557.
- [7] Zhang L, Zhang T, Tan N, et al. Combined Application of Vitamin C and Arsenic Trioxide in Inhibiting Bladder Cancer Cell Lines T-24 in vitro[J]. Cancer Research on Prevention & Treatment, 2017, 44(2): 103-107.

(2019-10-15 收稿 责任编辑:王明)

关于开展“首荟通便胶囊、鼻渊通窍颗粒、脉络舒通丸”征文的通知

首荟通便胶囊,商品名:顺益舒®,鲁南厚普制药有限公司生产,由何首乌、芦荟、决明子、阿胶、枸杞、人参、白术、枳实八味药材组方而成。适应症:功能性便秘(气阴两虚兼毒邪内蕴证),症见便秘、腹胀、口燥咽干、神疲乏力、五心烦热、舌质红嫩或淡、苔薄白或白腻、脉沉细或滑数者。在临床应用可达到泻浊通便,养阴益气,国家专利组方,精选地道药材,临床治愈率高,润肠通便,排毒养颜,减肥降脂,可全面改善肠道功能,安全性高。

鼻渊通窍颗粒,山东新时代药业有限公司生产,组方在宋代严用和“苍耳子散”基础上,结合现代临床疾病特点,化裁而来的经验方,配伍严谨,标本同治,见效快,疗效确切,可以迅速改善鼻塞,减少鼻腔分泌物,清除鼻甲肿胀,改善或恢复功能,缓解头痛、头昏等症状,对细菌感染和病毒感染均有效,适用人群广泛:儿童、成人、老人均可使用,纯中药颗粒制剂,服用方便,副作用少。由辛夷、苍耳子(炒)、麻黄、白芷、薄荷等 14 味中药组方而成,适应症:用于急鼻渊(急性鼻窦炎)属外邪犯肺证,症见:前额或颧骨部压痛,鼻塞时作,流涕黏白或黏黄,或头痛,或发热,苔薄黄或白,脉浮。

脉络舒通丸,商品名:通力达®,鲁南厚普制药有限公司生产,是国医大师唐祖宣的临床经验方,由二妙散、四妙勇安汤,止痉散等五个方剂融合而成,方药组成:黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、甘草、水蛭、蜈蚣、全蝎。具有一定的抗炎、抗凝溶栓、消肿止痛的作用,临床用于防治浅静脉炎和深静脉血栓形成,可以与抗凝药联合,不增加出血风险。

为了进一步总结和评估首荟通便胶囊、鼻渊通窍颗粒、脉络舒通丸在中国人群中的临床疗效,交流临床应用经验,

更好地提高疾病的临床治疗水平,《世界中医药》杂志编辑部与鲁南制药集团有限公司自 2019 年 1 月 1 日起联合举办“助力中药科研,”有奖征文活动。具体要求如下:

1. 征文内容及要求

内容:(1)基础研究。(2)临床疗效分析和临床应用经验总结。

要求:(1)凡未在公开期刊上发表的论文均可投稿;(2)应征论文写作规范请参照《世界中医药》杂志稿约的要求;(3)本次征文只接受 E-MAIL 方式投稿,电子版本请使用 Word 排版,E-MAIL 地址:lnzyzw@163.com(投稿后请注意确认)。(4)来稿请注明支持文章的基金项目名称及编号、作者姓名、性别、出生年月、单位、学历、职称、研究方向、通讯地址、联系电话和电子邮箱。

2. 评选及奖励办法:《世界中医药》编辑部将邀请国内知名专家及相关专业编委组成评审委员会,对所有征文进行评审。本次征文活动设特等奖 1 名,奖励科研基金 20000 元;一等奖 3 名,奖励科研基金 10000 元;二等奖 5 名,奖励科研基金 5000 元;三等奖论文 10 篇,奖励科研基金 2000 元;参与奖 300 名,获精美礼品 1 份。对获奖论文只奖励第一作者。优秀论文将择优发表,获奖优秀文章将推荐到各级期刊发表。凡符合论文要求的所有优秀论文均收入产品论文汇编。

3. 征文截止日期:2019 年 12 月 30 日。

4. 联系方式:邮编:276000;地址:山东省临沂市红旗路 209 号鲁南制药集团医学部;电话:15266651969(微信同号),联系人:医学部孙成磊;邮箱:lnzyzw@163.com,邮件主题请注明“鲁南制药有奖征文+姓名+医院+科室”。

《世界中医药》杂志社