中图分类号：R955　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)21－0071－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.21.017

液体伤口敷料中非法添加维生素检测方法研究*

李　煜，陈　超△，王　丹

（浙江省食品药品检验研究院·浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室，浙江 杭州　310052）

摘要：目的　建立定性定量检测液体伤口敷料中非法添加烟酰胺和维生素 B_6 的高效液相色谱法和液相色谱－质谱法。**方法**　定量方法中，色谱柱为 Waters Sunfire C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为 0.1% 庚烷磺酸钠溶液（用甲酸调 pH 至 2.5）－甲醇（梯度洗脱），检测波长为 261 nm（烟酰胺）和 290 nm（维生素 B_6），经外标法定量。定性方法中，色谱柱为 Waters Acquity HSS T3 C_{18} 柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为 0.1% 甲酸水溶液－甲醇（95∶5，*V*/*V*），电喷雾离子化检测，正离子下多反应监测（MRM）模式。**结果**　定量方法中，烟酰胺的质量浓度在 0.01～200 μg/mL 范围内、维生素 B_6 的质量浓度在 0.05～100 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好（r = 1.000 0，n = 5）；检测限分别为 0.023，0.010 μg/mL，定量限分别为 0.081，0.042 μg/mL；平均加样回收率分别为 98.47%～100.63% 和 99.06%～101.13%，*RSD* 分别为 0.23%～1.52% 和 0.14%～3.36%。2 批样品中，烟酰胺的含量为 0.30%～0.31%，维生素 B_6 的含量为 0.048%～0.050%。定性方法中，烟酰胺和维生素 B_6 的检测限分别为 0.5，0.1 ng/mL。**结论**　该方法快速简便、灵敏度高，可用于液体伤口敷料中非法添加烟酰胺和维生素 B_6 的定性和定量检测。

关键词：液体伤口敷料；烟酰胺；维生素 B_6；非法添加；定性检测；定量检测

Detection Methods for Illegal Addition of Vitamin in Liquid Wound Dressing

LI Yu, CHEN Chao, WANG Dan

(Zhejiang Institute for Food and Drug Control · Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Provincial, Hangzhou, Zhejiang, China　310052)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography and liquid chromatography－mass spectrometry method for the qualitative and quantitative detection of illegal addition of nicotinamide and vitamin B_6 in liquid wound dressing. **Methods**　In the quantitative method, the chromatographic column was Waters Sunfire C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% sodium heptanesulfonate solution (adjusted to pH 2.5 with formic acid)－methanol (gradient elution), the detection wavelength was set at 261 nm for nicotinamide and 290 nm for vitamin B_6, and the quantification was determined by the external standard method. In the qualitative method, the chromatographic column was Waters Acquisition HSS T3 C_{18} column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution－methanol (95∶5, *V*/*V*), and electrospray ionization detection was adopted with multi－reaction monitoring (MRM) mode under positive ions. **Results**　In the quantitative method, the linear ranges of nicotinamide and vitamin B_6 were 0.01－200 μg/mL and 0.05－100 μg/mL (r = 1.000 0, n = 5), respectively; the limits of detection (LOD) were 0.023 μg/mL and 0.010 μg/mL, respectively, and the limits of quantification (LOQ) were 0.081 μg/mL and 0.042 μg/mL, respectively; the average recoveries of nicotinamide and vitamin B_6 were in the

*基金项目：浙江省基础公益研究计划项目[LTGC23H300002]。

第一作者：李煜，女，博士，主任药师，研究方向为药品质量标准，（电子信箱）yuli113@126.com。

△通信作者：陈超，男，大学本科，高级工程师，研究方向为药品质量标准，（电子信箱）chenchao@zjyj.org.cn。

联质谱法同时测定蜂蜜中 9 种新烟碱类杀虫剂残留[J]. 分析科学学报，2015，31(2)：203－207.

[15] 赵　静，高　进，吴宇宽. 高效液相色谱－加热电喷雾串联三重四级杆质谱法测定蔬菜中 18 种常用农药残留[J]. 分析科学学报，2011，27(6)：759－763.

[16] 许秀莹，施海燕，王鸣华. 气相色谱－质谱联用测定大米中 6 种烟碱类农药残留[J]. 质谱学报，2012，33(2)：99－103.

[17] 邱琦珍，潘兴鲁，吴小虎，等. 超高效液相色谱串联质谱法测定豇豆中新烟碱类农药残留[J]. 植物保护，2024，50(3)：247－252.

[18] 赵　飞，张　武，张毓秀，等. 高效液相色谱－串联质谱法检测柑橘中 4 种新烟碱类农药的残留量[J]. 农药科学与管理，2023，44(11)：45－51.

[19] 平　华，赵天宇，马智宏，等. 分散固相萃取－超高效液相色谱－串联质谱法同时测定土壤中新烟碱类农药及其代谢物的残留量[J]. 理化检验：化学分册，2023，59(11)：1276－1283.

[20] 黄　彪，刘文静，傅建炜，等. QuEChERS 前处理法－超高效液相色谱串联质谱法同时测定茶油中 7 种烟碱类农药残留[J]. 农产品质量与安全，2019(1)：45－48.

[21] 汪弘康，高猛峰，沈斯文，等. 分散固相萃取净化－超高效液相色谱－串联质谱法同时测定水果中 7 种链格孢霉毒素的含量[J]. 食品安全质量检测学报，2024，15(10)：22－30.

（收稿日期：2024－04－23；修回日期：2024－05－18）

ranges of 98.47% - 100.63% and 99.06% - 101.13%, with *RSD*s of 0.23% - 1.52% and 0.14% - 3.36%, respectively. The contents of nicotinamide and vitamin B_6 in the two batches of samples were in the ranges of 0.30% - 0.31% and 0.048% - 0.050%. In the qualitative method, the limits of detection of nicotinamide and vitamin B_6 were 0.5 ng / mL and 0.1 ng / mL, respectively. **Conclusion** This method is fast, simple, and highly sensitive, which can be used for qualitative and quantitative detection of illegal addition of nicotinamide and vitamin B_6 in liquid wound dressing.

Key words: liquid wound dressing; niacinamide; vitamin B_6; illegal addition; qualitative detection; quantitative detection

液体伤口敷料是一种创面敷料，属第二类医疗器械产品中的注输、护理和防护器械，通常为溶液或软膏。液体伤口敷料通过在创面表面形成保护层起物理屏障作用，用于小创口、擦伤、切割伤等非慢性创面及周围皮肤的护理[1]。我院药品检查中发现，2批液体伤口敷料中有烟酰胺和维生素B_6检出。烟酰胺是烟酸的酰胺化合物，作为辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ的组成部分参与各种细胞的代谢，作为天然抗氧化剂清除自由基，提高免疫性[2-4]。维生素B_6是维持动物机体正常代谢所必需的低分子有机化合物，作为辅酶催化150多种酶，调节蛋白质、碳水化合物、脂质、血红素和重要生物活性代谢物的代谢和合成[5-6]。按相关法规，液体伤口敷料所含成分应不具有药理学作用，且不可被人体吸收。但目前尚无用于液体伤口敷料中维生素的检测方法，亟须建立补充检测方法。本研究中建立了测定烟酰胺和维生素B_6含量[7-8]的高效液相色谱（HPLC）法和液相色谱-质谱（LC-MS）法，以控制该类药物的质量，完善其质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪，Agilent 1290-G6490 QQQ型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪，均购自美国Agilent公司；P300H型超声波清洗器（德国Elma公司，功率为1 580 W，频率为60 kHz）；XPE205型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司，精度为0.000 01 g）。

1.2 试药

甲醇、甲酸（色谱纯，美国Merck公司）；庚烷磺酸钠（色谱纯，山东禹王实业有限公司化工分公司）；水为超纯水；烟酰胺对照品（批号为100115-202005，含量为99.9%），维生素B_6对照品（批号为100116-201906，含量为99.9%），均购自中国食品药品检定研究院；MF型液体伤口敷料（A公司，批号分别为R2071，R2021，规格为每支5 mL）。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定含量

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Waters Sunfire C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：A为0.1%庚烷磺酸钠溶液（用甲酸调pH至2.5），B为甲醇，梯度洗脱（0～10 min时85%A，10～17 min时85%A → 65%A，17～30 min时65%A，30～30.5 min时65%A → 85%A，30.5～38 min时85%A）；流速：1.0 mL / min；检测波长：261 nm（烟酰胺），290 nm（维生素B_6）；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.1.2 溶液制备

分别取烟酰胺对照品和维生素B_6对照品各10 mg，精密称定，分别置10 mL容量瓶中，加70%甲醇溶解并定容，摇匀，作为对照品贮备液。分别取对照品贮备液各2.0 mL，置20 mL容量瓶中，加70%甲醇定容，作为混合对照品溶液。取对照品贮备液各适量，分别用70%甲醇稀释，制成烟酰胺质量浓度分别为0.1，0.5，1，50，200 μg / mL的系列标准溶液，以及维生素B_6质量浓度分别为0.05，0.25，0.75，25，100 μg / mL的系列标准溶液。取样品0.5 g，置20 mL容量瓶中，加15 mL 70%甲醇超声（频率为37 kHz）15 min，冷却至室温，用70%甲醇定容，即得供试品溶液。取氯化钠0.5 g、透明质酸0.05 g，作为空白基质，加水100 mL使溶解，即得空白基质溶液。

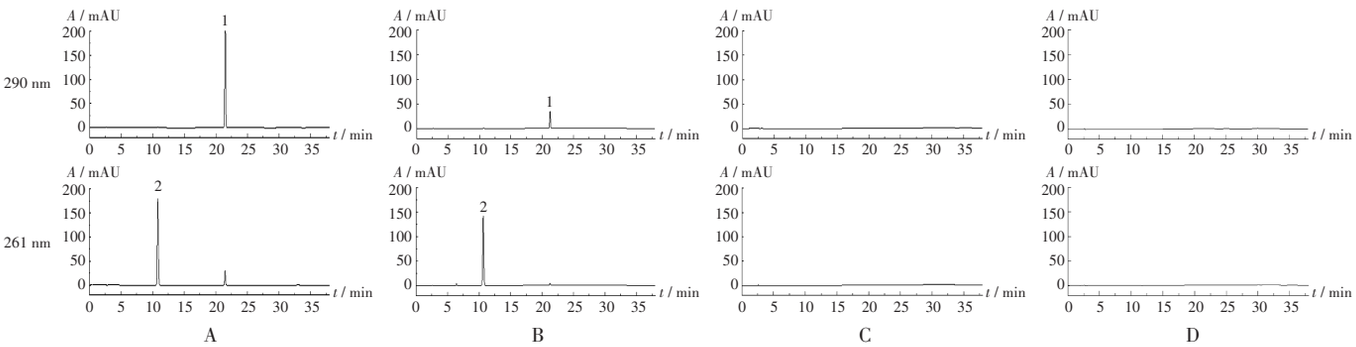
2.1.3 方法学考察

专属性试验：取2.1.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白基质溶液、空白溶剂（70%甲醇溶液）各适量，按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中，在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现，且阴性对照无干扰，表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察：精密量取2.1.2项下烟酰胺和维生素B_6系列标准溶液各适量，按2.1.1项下色谱条件进样测定，以质量浓度（X，μg / mL）为横坐标、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归。结果见表1，表明烟酰胺的质量浓度在0.1～200 μg / mL范围内、维生素B_6的质量浓度在0.05～100 μg / mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定：取空白基质0.5 g，加入2.1.2项下混合对照品溶液适量，按2.1.1项下色谱条件进样，分别以所测目标物峰面积信噪比（S / N）为3倍和10倍时的质量浓度为检测限和定量限。结果见表1。

加样回收试验与精密度试验：取样品0.25 g（批号



1. 维生素 B_6　2. 烟酰胺

A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液（批号为 R2071）　C. 空白基质溶液　D. 空白溶剂（70% 甲醇溶液）

图 1　高效液相色谱图

1. Vitamin B_6　2. Niacinamide

A. Mixed reference solution　B. Test solution (batch number: R2071)　C. Blank matrix solution　D. Blank solvent (70% methanol solution)

Fig. 1　HPLC chromatograms

表 1　线性关系考察和检测限与定量限确定结果

Tab. 1　Results of the linear relation test, LOD and LOQ

化合物	回归方程	r	线性范围 (μg/mL)	检测限		定量限	
				μg/mL	μg/g	μg/mL	μg/g
烟酰胺	$Y=21X-0.0514$	1.000 0	0.1～200	0.023	0.94	0.081	3.2
维生素 B_6	$Y=23X-0.1436$	1.000 0	0.05～100	0.010	0.40	0.042	1.7

为 R2071），精密称定，分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液；取空白基质 0.5 g，精密称定，加入 2 倍定量限浓度混合对照品溶液，平行 6 份。取上述样品，按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并代入标准曲线计算回收率和相对标准偏差（*RSD*）。结果见表 2，表明方法准确度和仪器精密度良好。

表 2　加样回收试验结果

Tab. 2　Results of the recovery test

浓度	烟酰胺			维生素 B_6		
	加入量 (mg)	平均回收率(%)	*RSD* (%)	加入量 (mg)	平均回收率(%)	*RSD* (%)
低质量浓度（$n=3$）	0.791 2	99.72	0.35	0.083 8	101.13	0.59
中质量浓度（$n=3$）	0.989 0	100.63	0.23	0.104 7	101.08	0.68
高质量浓度（$n=3$）	1.186 8	100.63	0.27	0.125 7	99.06	0.14
2 倍定量限浓度（$n=6$）	0.003 96	98.47	1.52	0.002 09	99.75	3.36

耐用性试验：精密量取 2.1.2 项下混合对照品溶液适量，调整缓冲液 pH 值为 2.3，2.7，流速为 0.8，1.2 mL/min，柱温为 25，35 ℃，色谱柱为 Agilent Extend C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）和 Welch Ultimate AQ－C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果烟酰胺和维生素 B_6 在不同色谱条件下均分离良好，表明方法耐用性良好。

2.1.4　样品含量测定

取 2 批样品（批号分别为 R2071，R2021），按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 3。

表 3　样品含量测定结果（%）

Tab. 3　Results of the content determination of nicotinamide and vitamin B_6 in samples (%)

批号	烟酰胺		维生素 B_6	
	含量	*RSD*	含量	*RSD*
R2071	0.31	0.03	0.050	0.61
R2021	0.30	0.01	0.048	0.75

2.2　LC－MS 法定性分析

2.2.1　试验条件

色谱条件：色谱柱为 Waters Acquity HSS T3 C_{18} 柱（100 mm × 2.1 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液－甲醇（95∶5，*V*/*V*），运行 7 min；流速为 0.1 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量为 1 μL。

质谱条件：电喷雾离子化（ESI）检测，正离子监测模式；气体为氮气，温度为 230 ℃，流速为 14 L/min；喷雾器压力为 20 psi，鞘气温度为 350 ℃，流速为 8 L/min；毛细管电压为 4 000 V；数据采集模式为多反应监测（MRM）模式。烟酰胺和维生素 B_6 的质谱参数见表 4。

表 4　质谱参数

Tab. 4　MS parameters

化合物	母离子（*m*/*z*）	碎片离子（*m*/*z*）	碰撞能量（V）
烟酰胺	122.9	79.9*，77.8	20
维生素 B_6	170.0	152.0*，134.1	10

注：*为定量离子对，*m* / *z* 为质荷比。

Note: * refers to the quantitative ion pairs, and *m* / *z* refers to the mass to charge ratio.

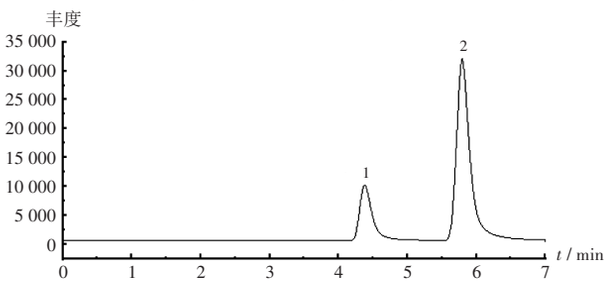
2.2.2　溶液制备

分别取烟酰胺和维生素 B_6 对照品贮备液各 1.0 mL，置 100 mL 容量瓶中，加水定容，取上述溶液 1.0 mL，置 200 mL 容量瓶中，加水定容，即得对照品溶液。

取2.1.2项下供试品溶液1.0 mL，置100 mL容量瓶中，加水定容，取上述溶液2.0 mL，置20 mL容量瓶中，加水定容，即得供试品溶液。

2.2.3 检测限测定

取空白基质0.5 g，加对照品溶液适量，按2.2.1项下试验条件进样测定，总离子流图见图2。分别以所测目标物峰S/N为3倍时的质量浓度作为检测限。结果烟酰胺的检测限为0.5 ng/mL(19.8 μg/kg)，维生素B_6的检测限为0.1 ng/mL(5.2 μg/kg)。



1. 烟酰胺 2. 维生素B_6

图2 液相色谱-质谱总离子流图

1. Niacinamide 2. Vitamin B_6

Fig. 2 LC-MS TIC chromatograms

2.2.4 结果判定

若采用HPLC法检出疑似阳性结果，可采用LC-MS法对样品进行确证。在相同试验条件下，若样品中检出色谱峰的保留时间与对照品溶液中对应成分一致，所选择监测离子对的相对丰度比与相当质量浓度对照品溶液的离子对相对丰度比的偏差不超过表5规定范围，则可判断样品中存在对应的待测成分。

表5 不同相对离子丰度(K)对应的最大允许偏差

Tab. 5 Maximum allowable deviation corresponding to different relative ion abundances (K)

K	$K>50\%$	$20\%<K\leqslant50\%$	$10\%<K\leqslant20\%$	$K\leqslant10\%$
偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

3 讨论

本研究中参考《保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定》(GB/T 5009.197—2003)[9]、《牙膏中维生素B_2、维生素B_3和维生素B_6的测定 高效液相色谱法》(GB/T 36921—2018)[10]及文献[11-16]，建立了同时测定烟酰胺和维生素B_6的HPLC法，并建立了鉴别烟酰胺和维生素B_6的LC-MS法，可为医疗器械中非法添加的成分提供有效的检测方法。由于烟酰胺和维生素B_6的最大吸收波长相差较大，故采用双波长测定，若检出相应色谱峰，则采用LC-MS法进行确证。

HPLC法中，为有效分离烟酰胺和维生素B_6，选择梯度洗脱法；为避免溶剂效应，采用不同溶剂。LC-MS法中，为有效提取离子，监测模式采用MRM模式。方法学考察结果显示，本研究中建立的方法快速简便、灵敏度高，可用于液体伤口敷料中非法添加烟酰胺和维生素B_6的定性和定量检测。

参考文献

[1] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于调整《医疗器械分类目录》部分内容的公告(2022年第25号)[A/OL]. (2022-03-24)[2023-10-11]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ylqxggtg/20220324153614110.htmL.

[2] 李钟玉，李临生. 烟酸、烟酰胺的研究进展[J]. 化工时刊，2003，17(2)：6-9.

[3] YANG SJ, CHOI JM, KIM L, et al. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAS-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014, 25(1): 66-72.

[4] TAN CL, CHIN T, TAN CYR, et al. Nicotinamide metabolism modulates the proliferation/differentiation balance and senescence of human primary keratinocytes [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2019, 138(8): 1638-1647.

[5] BIRD RP. The emerging role of viamin B_6 in inflammaion and carcinogenesis[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2018, 83: 151-194.

[6] MOLINA A, OKA T, MUNOZ SM, et al. Vitamin B_6 suppresses growth and exprssion of albumin gene in a human hepatoma cell line HepG2[J]. Nutrition Cancer, 1997, 28(2): 206-211.

[7] 吴海霞. 高效液相色谱法测定乳饮料中烟酸、烟酰胺含量[J]. 中国食品工业，2022(19)：90-93.

[8] 李 妲，李 玲，吴 琦，等. 高效液相色谱-质谱法同时测定复合维生素B片中的5种成分含量[J]. 中国药业，2022，31(9)：87-90.

[9] GB/T 36921—2018，牙膏中维生素B_2、维生素B_3和维生素B_6的测定 高效液相色谱法[S].

[10] GB/T 29664—2013，化妆品中维生素B_3(烟酸、烟酰胺)的测定 高效液相色谱法和高效液相色谱串联质谱法[S].

[11] 丁立新，张羽男，高金波，等. 复合维生素B片中4种维生素含量的紫外褶合光谱法测定[J]. 中国医药工业杂志，2005，36(3)：163-164.

[12] 郭亚东. 超临界流体色谱同时测定维生素B_2，B_3和烟酰胺[J]. 色谱，2003，21(6)：603-605.

[13] 庄向平，唐炜虹. 高效液相色谱法测定蚕蛹冻干粉中维生素B_2，D_3含量[J]. 宁波高等专科学校学报，2001，13(B03)：98-100.

[14] 周新星，张玲玲，周晓莹，等. 保健食品中B族维生素的快速分析方法研究[J]. 食品安全导刊，2023(30)：97-100.

[15] 杨玉平，谢柏艳. 液质联用法同时测定保健食品中维生素B_1、维生素B_6、烟酸、烟酰胺和咖啡因的含量[J]. 湖北农业科学，2023，62(9)：124-129.

[16] 王天歌，刘轩彤，段 瑞，等. 化妆品中常见维生素的功效及检测方法概述[J]. 品牌与标准化，2024(1)：46-50.

(收稿日期：2023-10-25；修回日期：2024-05-10)