

HPLC-MS 法检测少腹逐瘀丸及原料药材中非法添加的 7 种黄色素

连云岚¹, 杜娟¹, 乔玉峰²

1. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

2. 山西振东制药股份有限公司, 山西 长治 047100

摘要: **目的** 建立一种用于快速检测中药中非法添加的 7 种黄色素(柠檬黄、日落黄、灿烂黄、金橙 II、金胺 O、碱性橙 21、碱性橙)的 HPLC-MS 方法。**方法** 样品采用 70%乙醇溶液超声提取,以反相 C₁₈ 为色谱柱分离,以乙腈-0.05 mol/L 醋酸铵水溶液为流动相梯度洗脱, HPLC 以二极管阵列检测器在 432 nm 处检测,质谱检测器选择 ESI 离子源、正离子扫描检测。**结果** 在上述色谱及质谱条件下,7 种常用黄色素分离度、专属性及耐用性良好,精密度 RSD 在 0.4%~1.8%;色素溶液在 24 h 内稳定, RSD<1.9%;准确度试验回收率在 95.1%~102.9%;检出限(LOD)在 2~31 μg/kg;重复性 RSD 在 0.3%~1.4%。3 批次市售中药中均检出金胺 O。**结论** 方法简便、快速、重复性好、灵敏度高,可用于检测易染色中药中非法添加的 7 种黄色素,为有关企业或食品药品监督管理部门控制中药质量提供一定的参考。

关键词: 中药;非法染色;HPLC-MS;蒲黄;延胡索;柠檬黄;日落黄;灿烂黄;金橙 II;金胺 O;碱性橙 21;碱性橙
中图分类号: R286.02; R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)18-3219-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.014

Determination of seven yellow pigments illegally added into Chinese materia medica by HPLC-MS

LIAN Yun-lan¹, DU Juan¹, QIAO Yu-feng²

1. Shanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

2. Shanxi Zhendong Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 047100, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid method for the simultaneous determination of seven yellow pigments (tartrazine, sunset yellow, brilliant yellow, orange II, auramine O, astrazon orange G, and basic orange) which were illegally added into Chinese materia medica (CMM). **Methods** The sample was extracted with ultrasonic by 70% ethanol, separated on a reversed phase C₁₈ chromatographic column by gradient elution using a mobile phase made up of acetonitrile and 0.05 mol/L ammonium acetate solution, and then detected by diode array detector in the wavelength of 432 nm and mass spectrometry detector with ESI⁺ ion source. **Results** Under the condition of the above chromatography and mass spectrometry, the separating degree, specificity, and durability of the seven yellow pigments were good. RSD of precision was between 0.4%—1.8%. Above pigment solution was stable in 24 h and RSD < 1.9%. The recovery rates of accuracy were between 95.1%—102.9%. The limits of detection (LODs) were in the range of 2—31 μg/kg, and the RSD of repeatability was in the range of 0.3%—1.4%. Auramine O was detected in three batches of CMM for sale. **Conclusion** This method is simple, rapid, reproducible and has high sensitivity, which can be used for the determination of seven yellow pigments illegally added into dyed CMM, and it can provide the reference or help for relative company and State Food and Drug Administration in controlling the quality of CMM.

Key words: Chinese materia medica; illegal dyeing; HPLC-MS; *Typhae Pollen*; *Corydalis Rhizoma*; tartrazine; sunset yellow; brilliant yellow; orange II; auramine O; astrazon orange 21; basic orange

近年来,中药材及饮片染色问题比较严重^[1-3]。其中,蒲黄、栀子、黄柏、延胡索、石斛、黄连、黄芩、红花、丹参等中药易被黄色染料染色。迄今为止,

已报道有检测方法的黄色染料有 20 多种,包括金橙 II (酸性橙 II、橙黄 II、酸性艳橙、金黄粉)^[4-11]、金橙 I^[8-11]、金橙 IV^[9-11]、金胺 O (碱性嫩黄、碱性

收稿日期: 2016-03-31

作者简介: 连云岚 (1972—), 女, 副主任药师, 研究方向为中药分析。Tel: (0351)2028643 E-mail: lianyunlan2006@163.com

荧光黄、金丝雀黄)^[4,6-9,11]、橙黄 G (金橙 G、橙黄 G、耐光橙 G、酸性耐光桔黄)^[4,9-11]、碱性橙 II (王金黄、块黄)^[4,10]、碱性橙 21^[8,10]、碱性橙 22^[8,10]、皂黄 (间苯胺黄 AT、酸性黄 R、胺基苯磺酸黄、金莲橙 G)^[4,9,11]、柠檬黄^[5-8]、日落黄^[5-9,11]、冻黄 (直接冻黄 G、直接黄 12)^[6]、络黄^[6]、亮黄 (纸黄 3G、灿烂黄、直接黄 4)^[8-9,11]、酸性橙 10^[8]、酸性橙 17^[8]、苏丹黄^[8]、苏丹橙 G^[8]、色酚黄 S^[8]、姜黄^[3]、甲基橙^[9-11]以及二甲基黄^[9,11]等。因这些染料有的对皮肤黏膜有轻微的刺激,可引起结膜炎、皮炎和上呼吸道感染等症状;有的会引起中毒反应,属于接触性致癌物;有的为可疑致癌物,对肾脏有毒性等,对人体均可造成不同程度的危害^[9],故禁止用于中药材或饮片的染色。

目前国家食品药品监督管理局虽批准了蒲黄及延胡索的补充检验方法 (编号分别为 2007007、2010006)^[12-13],但仅针对这 2 种药材中金胺 O 和金橙 II 非法染色进行筛查。另外,检测中药材或饮片非法染色的文献报道较多,大多用 TLC 和 HPLC 法^[4-6,8,10-11],未见同时检测金胺 O、金橙 II、碱性橙 21、碱性橙、柠檬黄、日落黄和亮黄 7 种常见染料的检测方法,也未见这 7 种色素的 HPLC-MS 确认方法的报道。本实验以少腹逐瘀丸 [由当归、蒲黄、延胡索 (醋制) 等 10 味药组成] 为研究对象,建立了用 HPLC 法的初筛方法和 HPLC-MS 法的确认方法,用于检测中药中非法添加的 7 种黄色染料,为监管部门的监管提供技术支撑。

1 仪器与材料

Agilent1260 液相色谱仪,美国 Agilent 公司; Waters Acquity UPLC 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; TSQ QUANTUM ACCESS MAX 高效液相色谱-质谱联用仪,美国 Thermo fisher 公司。

对照品金胺 O (批号 201302,供检查用)、金橙 II (批号 200701,供检查用)、日落黄 (批号 201301,供检查用) 均购自中国食品药品检定研究院;碱性橙 21 (批号 MKBP1548V,质量分数 95%) 购自天津希恩思生化科技有限公司;碱性橙 (柯衣定 R,批号 BCBD5284V,质量分数 90%) 购自天津化学有限公司;柠檬黄 (批号 GBW(E)10001a-13001,0.5 mg/mL) 购自中国计量科学研究院;灿烂黄 (批号 A2689A,质量分数 95%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯,水为超纯水。

实验样品少腹逐瘀丸均取自国内 10 个省 (市、自治区),样品来源于国家计划抽验品种,共 21 批次,涉及 6 家生产企业,其中最多的为内蒙古自治区 12 批次,吉林 5 批次,天津 4 批次;4 份蒲黄、4 份延胡索药材均由相应生产企业提供;蒲黄及延胡索经山西省食品药品检验所中药室崔宇宏教授鉴定为《中国药典》2015 年版收载的品种,即蒲黄为香蒲科香蒲属植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L. 的干燥花粉;延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

十八烷基硅烷键合硅胶柱, DAD 检测器,检测波长 432 nm。以乙腈-0.05 mol/L 乙酸铵水溶液,流动相系统梯度洗脱: 0~12 min, 10%~45% 乙腈; 12~20 min, 45%~70% 乙腈; 20~40 min, 70%~80% 乙腈; 40~41 min, 80%~10% 乙腈; 41~46 min, 10% 乙腈; 进样量 20 μ L; 体积流量 1 mL/min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取日落黄、金橙 II、金胺 O、柠檬黄、灿烂黄、碱性橙 21、碱性橙共 7 种对照品适量 (约 10 mg),精密称定,加乙醇制成含 10 μ g/mL 的混合对照品溶液。HPLC-MS 法所用对照品溶液加 70% 乙醇稀释 10 倍。

2.2.2 供试品溶液的制备 取供试品 5 g,加 70% 乙醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,取续滤液,即得。

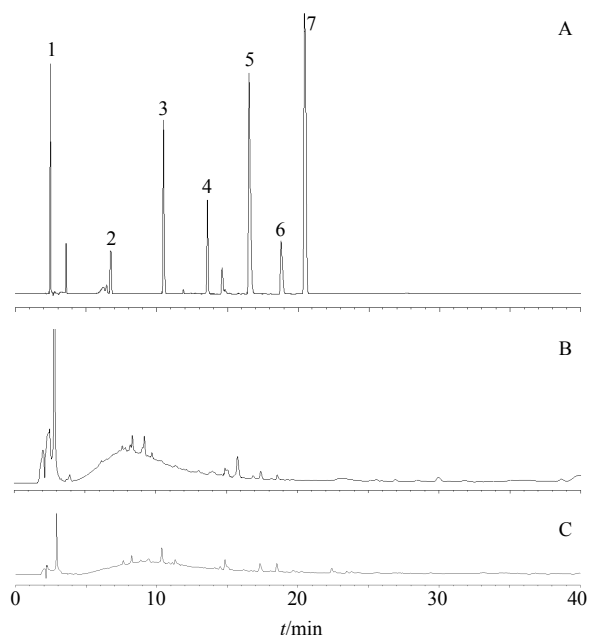
2.2.3 阴性样品溶液的制备 取少腹逐瘀丸处方中除去蒲黄与延胡索的空白样品及处方中全部药味,按其处方比例、工艺同供试品溶液的制备方法制备去蒲黄、延胡索及处方中全部药味但色素未检出阳性的 2 种阴性供试品溶液。

2.3 专属性考察

取“2.2.1”项对照品溶液和“2.2.3”项下阴性样品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明,在日落黄与碱性橙 21 对照品保留时间处有色谱峰出现,见图 1;但与相应对照品光谱图不一致,见图 2;2 种阴性供试品溶液均无干扰,专属性良好。

2.4 重复性试验

精密称取未检出 7 种黄色素的阴性样品,共 6 份,分别精密加入对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法进行提取制成质量浓度均为 10 μ g/mL 的溶



1-柠檬黄 2-日落黄 3-灿烂黄 4-金橙 II 5-金胺 O 6-碱性橙 21-碱性橙
7-碱性橙
1-tartrazine 2-sunset yellow 3-brilliant yellow 4-orange II
5-auramine O 6-astrazon orange 21 7-basic orange

图 1 7 种黄色素对照品 (A) 及缺蒲黄与延胡索阴性样品 (B) 和处方中全部药味但色素未检出阳性的阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC for seven kinds of yellow pigments (A) and negative sample without *Typhae Pollen* and *Corydalis Rhizoma* (B), and negative sample of pigments not checked out (C)

液, 作为供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算各成分的保留时间及其 RSD。结果柠檬黄、日落黄、灿烂黄、金橙 II、金胺 O、碱性橙 21、碱性橙的平均保留时间分别为 2.5、6.7、10.5、13.6、16.5、18.8、20.5 min (图 1), RSD 分别为 0.3%、0.4%、0.6%、1.1%、1.2%、1.4%、0.8%。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液 (均为 100 $\mu\text{g/mL}$) 在拟定的液相条件下连续测定 6 次, 根据峰面积测定仪器精密度, 结果显示柠檬黄、日落黄、灿烂黄、金橙 II、金胺 O、碱性橙 21、碱性橙的 RSD 分别为 0.8%、1.6%、1.2%、1.8%、0.4%、1.1%、0.9%。

2.6 稳定性试验

精密称取未检出 7 种黄色素的阴性样品, 分别精密加入对照品溶液适量, 按“2.2.2”项下方法进行提取制成质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样测定,

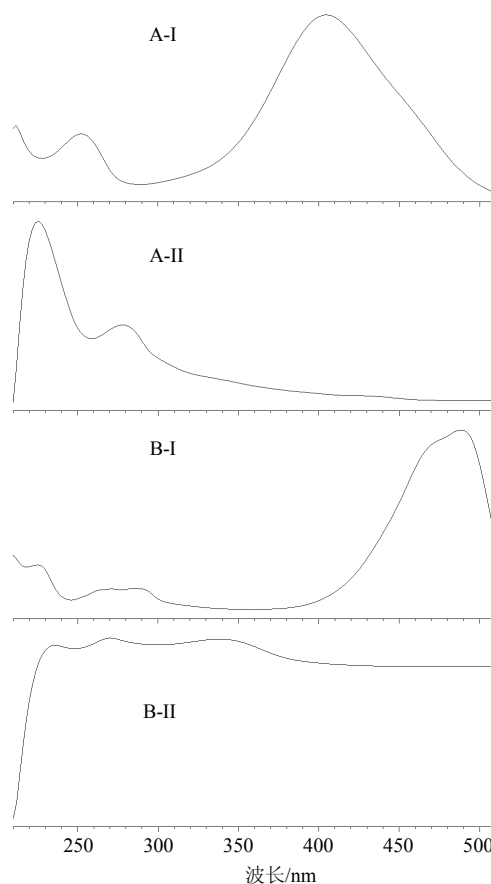


图 2 日落黄 (A) 和碱性橙 21 (B) 对照品 (I) 以及样品中与对照品相同保留时间处色谱峰 (II) 的光谱图

Fig. 2 Spectrac of reference substance (I) and chromatographic peaks with same retention time (II) of sunset yellow (A) and astrazon orange 21 (B)

根据峰面积计算 RSD, 结果显示柠檬黄、日落黄、灿烂黄、金橙 II、金胺 O、碱性橙 21、碱性橙的 RSD 分别为 1.3%、0.6%、1.4%、0.9%、1.2%、1.6%、1.9%。

2.7 加样回收率试验

精密吸取混合对照品溶液适量, 加入到未检出染色的阴性样品中, 按“2.2”项方法分别制备不同质量浓度的供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.8 耐用性试验

使用不同液相色谱仪及不同色谱柱进行考察, Agilent 1260 液相色谱仪与岛津 Intersil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, Waters Acquity UPLC 高效液相色谱仪和 Waters Acquity UPLC C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 两者色谱图均具有良好的分离度, 说明本方法耐用性良好。

2.9 检测限 (LOD) 试验

以不同质量浓度的对照品溶液加入到未检出染

表 1 7 种黄色素平均回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Average recovery rates of seven kinds of yellow pigments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	回收率/%		
	1.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	2.4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
柠檬黄	95.1 $\pm$ 3.5	96.9 $\pm$ 4.4	102.9 $\pm$ 3.4
金胺 O	96.6 $\pm$ 4.2	98.1 $\pm$ 3.5	99.8 $\pm$ 1.3
日落黄	99.6 $\pm$ 2.8	100.2 $\pm$ 1.5	98.8 $\pm$ 2.8
金橙 II	97.4 $\pm$ 5.6	96.8 $\pm$ 2.9	97.4 $\pm$ 3.6
碱性橙 21	98.0 $\pm$ 3.3	97.2 $\pm$ 3.7	100.8 $\pm$ 2.9
灿烂黄	96.3 $\pm$ 4.1	95.4 $\pm$ 2.7	97.7 $\pm$ 3.2
碱性橙	101.6 $\pm$ 4.3	100.7 $\pm$ 4.6	98.2 $\pm$ 2.8

表 2 7 种黄色素的质谱采集参数

Table 2 LC-MS/MS parameters for seven kinds of yellow pigments

序号	色素	分子式	相对分子质量	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/eV
1	柠檬黄	$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}_3$	534.36	469	200	15
2	金胺 O	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$	303.84	268	147	30
3	日落黄	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$	452.36	409	236	20
4	金橙 II	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	350.32	327	156	30
5	碱性橙 21	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2$	350.88	314	299	30
6	灿烂黄	$\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$	624.55	571	346	15
7	碱性橙	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4$	226.28	213	121	15

2.11 药材样品测定

根据上述方法对企业提供的 4 份蒲黄药材、4 份延胡索药材进行测定。8 份药材中, 只有 1 批次蒲黄检出金胺 O, 并进行了质谱确认, 色谱图及质谱图见图 3。其余色素均未检出。

2.12 少腹逐瘀丸样品测定

按照上述方法对国家评价性抽检抽取的 21 批次少腹逐瘀丸样品进行检验, 结果发现未检出金胺 O 的有 18 批次, 占 85.7%; 检出金胺 O 的有 3 批次, 占 14.3%, 涉及 3 个企业。检出金胺 O 的样品均通过 HPLC-MS 方法进行了确认。其余色素均未检出。

3 讨论

中药及保健食品中的非法添加问题已引起学者及监管机构的密切关注^[14-19]。目前国家食品药品监督管理局虽批准了蒲黄及延胡索非法染色的补充检验方法(编号分别为 2007007、2010006)^[12-13], 但仅针对这 2 种药材分别检测金胺 O 和金橙 II 的非法染色, 没有其他黄色类染料的检测标准, 虽然本次

色的阴性样品中, 按“2.2.2”项下方法制备, 以信噪比 3:1 时计算各色素成分的检测限, 结果柠檬黄、金胺 O、日落黄、金橙 II、碱性橙 21、灿烂黄、碱性橙的 LOD 分别为 2、11、31、28、14、15、11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果表明, 7 种成分的 LOD 均在 0.04 mg/kg 以下, 表明方法具有较高的灵敏度, 完全能满足非法添加的检测要求。

2.10 HPLC-MS 法色谱条件

Waters 十八烷基硅烷键合硅胶柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相同“2.1”项, 柱体积流量 0.2 mL/min, 电喷雾离子源, 质谱检测器, ESI⁺扫描, 扫描范围 m/z : 105~1 000, 进样量 1 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。各成分监测离子见表 2。

实验未发现其他黄色类染料添加, 但不排除存在隐患。经方法学研究发现, 7 种染料或色素的 HPLC 检测方法及 HPLC-MS 确认方法专属性及耐用性等都较好, 操作简便、适用范围广、灵敏度高, 适合用于中药及中药制剂中黄色染料或色素非法染色的检测。

流动相曾考察甲醇-水、甲醇-乙酸铵水溶液以及乙腈-乙酸铵水溶液, 结果发现乙腈-乙酸铵水溶液洗脱, 各成分分离以及峰形较好, 故选择此流动相。在测定波长选择上, 由于各色素的最大吸收波长不同, 但均在 350~480 nm 有较大的吸收, 故选择 432 nm 进行监测, 对于供试品中的共有峰可以用 DAD 光谱图进行比对。

提取色素的方法有聚酰胺吸附法、液液萃取法、固相萃取法, 超声提取法等。考虑到前几种方法较繁琐、溶剂消耗大, 不利于用于快速检测, 故选择超声提取法。曾比较了乙醇、甲醇、水 3 种提取溶剂及其不同比例的溶液提取效率, 结果表明 70%乙醇提取 30 min, 提取效率最高, 且色谱图中杂峰少,

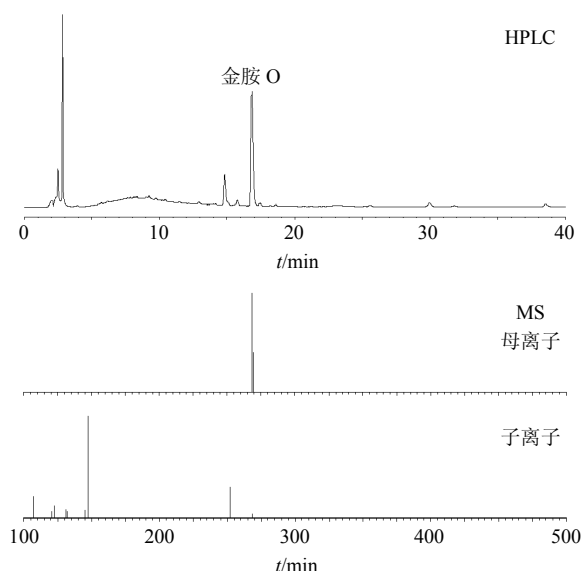


图 3 样品 (批号 120114) 中金胺 O 的色谱及质谱图
Fig. 3 HPLC and LC-MS/MS of auramine O in samples

峰形较好, 故选择 70%乙醇提取。

亮黄仅见文献有 TLC 鉴别及 HPLC 法检测^[4], 未见液质联用方法检测的报道。另外, 碱性橙检测未见文献报道。本实验提供了此 2 种色素的检测供参考。建议今后关注食品用合成色素的使用及检测, 尤其是价格低廉的水溶性色素, 易被用于中药的非法染色, 需进一步研究和建立更多成分的检测方法。

参考文献

- [1] 益磊, 孟祥松, 周志美, 等. 染色增重中药材及饮片科学监管技术方法探究 [J]. 中国药事, 2014, 28(3): 288-291.
- [2] 蒋玲, 饶伟文. 中药染色掺假的研究进展 [J]. 首都医药, 2011, 18(16): 16-18.
- [3] 胡浩彬. 当前中药材和中药饮片三大制假方法分析 [J]. 药学与临床研究, 2012, 20(3): 261-263.
- [4] 翟海云, 刘振平, 余晓, 等. 高效液相色谱法测定中药中的五种禁用黄色工业染料 [J]. 化学研究与应用, 2014, 26(1): 135-139.
- [5] 肖凌, 侯俊杰, 徐箐, 等. 红花中一种新掺伪染料的确证及 6 种染色成分检测方法研究 [J]. 药物分析

杂志, 2014, 34(7): 1231-1236.

- [6] 饶伟文, 蒋玲, 赵纯玉, 等. 几种染色掺假中药的化工染料鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1742-1745.
- [7] 黄宝斌, 许明哲, 杨青云, 等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1701-1708.
- [8] 胡青, 孙健, 张甦, 等. 中药中 48 种非法染色色素的 TLC 法检测 [J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(7): 695-700.
- [9] 符江, 荆文光, 章军, 等. 中药中非法添加问题研究现状与分析 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 437-442.
- [10] 李启艳, 朱日然, 孙萍, 等. HPLC-DAD 法检测染红中药中 20 种非法添加色素 [J]. 医药导报, 2015, 34(5): 655-657.
- [11] 郑娟, 邹耀华. HPLC-PDA 法检测蒲黄和黄连中十种非法添加色素 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1078-1079.
- [12] 国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批准件 蒲黄 [S]. 2007007.
- [13] 国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批准件 延胡索 [S]. 2010006.
- [14] 朱健, 裘一婧, 沈国芳. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健品中 13 种非法添加化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.
- [15] 励炯, 沈国芳, 朱建, 等. UPLC-MS/MS 法测定抗风湿中成药中非法添加 8 种抗风湿性化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2647-2651.
- [16] 裴月梅. HPLC 法测定清脑降压片中非法添加的氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3414-3417.
- [17] 丁宝月, 屠婕红, 薛磊冰, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定降压类中成药及保健食品中非法添加 34 种化学药的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 688-696.
- [18] 蒋丽萍, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的 9 种壮阳类化学药物 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2238-2245.
- [19] 黄越燕, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定中药及保健食品中非法添加 17 种抗炎镇痛类化学药的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 246-254.