

染色黄连中金胺 O 的检测方法研究

蒋 玲, 彭飞燕, 饶伟文, 肖 聪

广西桂林食品药品检验所, 广西 桂林 541002

摘 要: 目的 对市售黄连染色品中化工染料进行鉴定, 并研究其定量检测方法。方法 采用 TLC、HPLC-PAD、HPLC-MS 法, 对多批市售黄连样品进行定性、定量分析。结果 共检测 42 批市售品, 有 15 批检出金胺 O, 其质量分数在 0.26~1.65 mg/g。结论 黄连染色用化工染料为金胺 O, 本实验建立的检测方法, 可满足定性定量检测的要求。

关键词: 黄连; 金胺 O; TLC; HPLC-MS; HPLC-PAD

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)07-1344-04

Determination for auramine O in *Coptidis Rhizoma*

JIANG Ling, PENG Fei-yan, RAO Wei-wen, XIAO Cong

Guangxi Guilin Institute of Food and Drug Control, Guilin 541002, China

Key words: *Coptidis Rhizoma*; auramine O; TLC; HPLC-MS; HPLC-PAD

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎。用于湿热痞满, 呕吐吞酸, 泻痢, 黄疸, 高热神昏, 心火亢盛, 心烦不寐, 血热吐衄, 目赤, 牙痛, 消渴, 痈肿疔疮; 外治湿疹, 湿疮, 耳道流脓^[1]。收载于《中国药典》2010 年版。由于目前中药材、中药饮片的生产、经营秩序还较混乱, 掺杂使假现象偶有发现。经市场调查, 发现市售黄连片有染色掺假现象。本实验通过 TLC、HPLC-PDA、HPLC-MS 鉴定, 证实黄连染色用的化工染料主要为金胺 O (auramine O), 并建立了 HPLC 测定方法。

1 材料与仪器

1.1 材料

黄连对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号 120913-200407); 金胺 O 对照品, 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 批号 F20020818)。

黄连样品购自安徽亳州、四川荷花池、广西玉林和湖南廉桥药材市场, 并经笔者鉴定。

薄层色谱用硅胶 G 板 (青岛海洋化工厂分厂); 乙腈、乙酸铵为色谱纯, 其余乙醇、磷酸二氢钾等

试剂均为分析纯, 水为纯净水。

1.2 仪器

Waters 2695 高效液相分离系统-Quattro Micro 质谱联用仪; Waters 2998PAD 检测器。

2 方法与结果

2.1 TLC 法定性鉴别

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取金胺 O 适量, 加 70%乙醇制成 0.1 mg/mL 的溶液, 为对照品溶液 A (TLC 用)。取对照品溶液 A 适量, 加 70%乙醇制成 50 µg/mL 的溶液, 作为对照品溶液 B (HPLC 测定用)。

2.1.2 供试品溶液的制备 取供试品粉末 2 g, 加 70%乙醇 20 mL, 密塞, 超声处理 20 min, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液 A (TLC 用)。取供试品溶液 A, 0.45 µm 微孔滤膜滤过作为供试品溶液 B (HPLC 测定用)。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 取黄连对照药材适量, 按“2.1.2”项方法制备, 即得。

2.1.4 阳性样品溶液的制备 取黄连对照药材, 加入适量金胺 O 溶液, 搅拌均匀, 晾干。称取适量, 按“2.1.2”项方法制备, 即得。

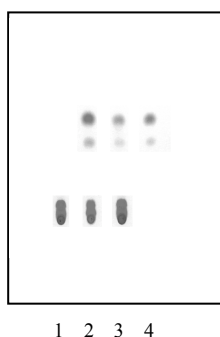
收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 科技部国家重大新药创制——创新药物研究开发技术平台建设课题 (2009ZX09308-006-4)

作者简介: 蒋 玲 (1959—), 女, 广西桂林人, 副主任中药师, 学士, 研究方向为中药质量控制。

Tel: (0773) 2852843-815 E-mail: jiangling3921@163.com

2.1.5 TLC 试验 取上述对照品溶液 A 及供试品溶液 A 各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-氨水 (4:5:1:1) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 立即在可见光下检视。结果在供试品色谱图中, 阳性样品在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点; 而阴性样品则无相同颜色的斑点, 见图 1。



1-阴性样品 2-黄连样品 3-阳性样品 4-金胺 O 对照品
1-negative sample 2-*Coptidis Rhizoma* sample
3-positive sample 4-auramine O reference substance

图 1 金胺 O 和黄连 TLC 图

Fig. 1 TLC chromatograms of auramine O and *Coptidis Rhizoma*

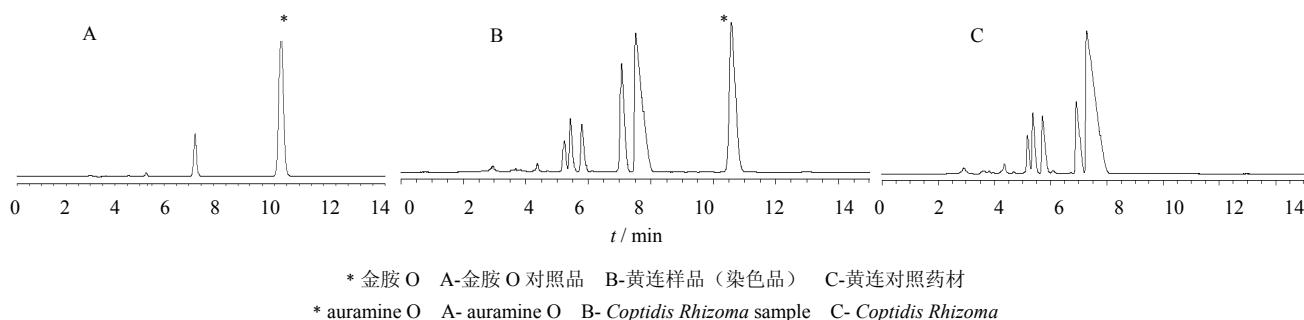


图 2 HPLC-PAD 色谱图

Fig. 2 HPLC-PAD chromatograms

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI) 正离子检测, 毛细管电压为 3.0 kV, 锥孔电压为 35 V, 脱溶剂气体体积流量 350 L/h, 锥孔气体体积流量 50 L/h, 源温度为 110 $^{\circ}$ C, 去溶剂气温度为 350 $^{\circ}$ C。扫描方式采用全扫描一级质谱、全扫描二级质谱 (MS/MS)。m/z 为 50~300。

2.3.3 结果 黄连样品 (染色品) 出现与金胺 O 对照品相同的选择离子流色谱峰, 且其分子离子峰 m/z 均为 268, 碎片离子峰 m/z 均为 147, 因此证实染色物为金胺 O, 见图 3。

2.2 HPLC-PAD法定性鉴别

2.2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈-0.025 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 并用磷酸调 pH 值为 3.0) (35:65) 为流动相; 检测波长 432 nm。理论塔板数按金胺 O 对照品色谱中的主峰计算应不低于 2 000, 金胺 O 主峰与相邻峰的分度度大于 1.5。

2.2.2 阴性样品溶液的制备 同“2.1.3”项。

2.2.3 样品测定 取供试品溶液 B 10 μ L, 对照品溶液 B 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

2.2.4 结果 HPLC 检测阳性样品具有与对照品保留时间相同的色谱峰, 比较色谱峰波长在 300~500 nm 的吸收光谱, 吸收光谱相同; 而阴性样品则无相对应的色谱峰, 见图 2。

2.3 染色黄连中金胺 O 的 HPLC-MS 定性

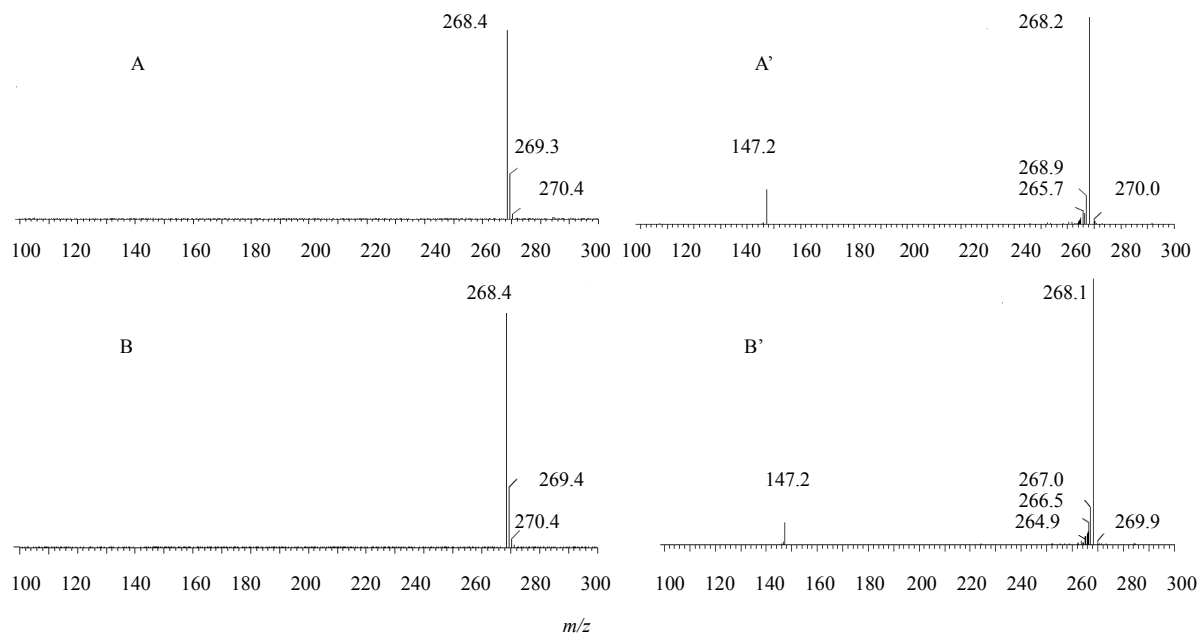
取上述用 TLC、HPLC 法检测呈阳性的黄连样品的供试品溶液 B 以及金胺 O 对照品溶液 B, 用 HPLC-MS 检测。

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Waters XTerra[®] MS C₁₈ (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵溶液 (27:73), 体积流量为 0.3 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 40 $^{\circ}$ C。

2.4 HPLC 定量方法的建立与验证

2.4.1 专属性试验 同“2.2”项。

2.4.2 标准曲线的绘制 精密称取金胺 O 对照品 10.34 mg 置 100 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别进样 0.5、1、2、5、10、15、20、25、30 μ L。以对照品进样量 (μ g) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 回归方程 $Y=6\,886\,716 X-238\,425$, $r=0.999\,9$, 结果表明, 金胺 O 在 0.051 7~3.102 0 μ g 内线性关系良好。



A-金胺 O 对照品一级质谱 A'-金胺 O 对照品二级质谱 B-黄连样品（染色品）一级质谱 B'-黄连样品（染色品）二级质谱
A-MS Chromatograms of auramine O A'-MS/MS chromatograms of auramine O B-MS Chromatograms of *Coptidis Rhizoma* sample (dyeing product) B'-MS/MS chromatograms of *Coptidis Rhizoma* sample (dyeing product)

图 3 HPLC-MS 一级质谱和二级质谱图
Fig. 3 HPLC-MS and MS/MS chromatograms

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液，在同一色谱条件下，间隔 3 h 进样，共 6 次，每次 10 μ L，以金胺 O 的主峰面积计算，RSD 为 1.0%。

2.4.4 重现性试验 对同一染色黄连样品平行取样 6 份，分别测定金胺 O 的量，RSD 为 1.75%。

2.4.5 回收率试验 取已知金胺 O 量的染色黄连样品 1.0 g，共 9 份，精密称定，分别加入适量的金胺 O 对照品溶液，按上述方法提取、测定，计算回收率，结果平均回收率为 98.25%，RSD 为 1.82%。

2.5 样品测定
取市场调查中收集的 42 批可疑染色黄连片样品，按上述方法测定，其中 15 批检出金胺 O。测定 10 批代表性样品，结果见表 1。

3 讨论
比较了用丙酮、水、70%乙醇、无水乙醇、醋酸乙酯等不同的提取溶剂制备供试品溶液，结果 70%乙醇提取率较高；在提取方法的选择上，回流、超声、振摇都能较好提出金胺 O，但以超声提取简

表 1 10 批市售黄连检测结果 (n=3)
Table 1 Determination of ten batches *Coptidis Rhizoma* (n=3)

样品编号	来源	规格	TLC	HPLC	金胺 O/(mg·g ⁻¹)
B-HL-1	安徽亳州药市	饮片	未检出	未检出	—
B-HL-2	安徽亳州药市	饮片	检出	检出	0.263 1
H-HL-1	四川荷花池药市	饮片	检出	检出	0.576 1
H-HL-2	四川荷花池药市	饮片	未检出	未检出	—
Y-HL-1	广西玉林药市	饮片	检出	检出	1.030 7
Y-HL-2	广西玉林药市	饮片	检出	检出	1.468 3
LQ-HL-1	湖南廉桥药市	饮片	检出	检出	1.401 8
LQ-HL-2	湖南廉桥药市	饮片	检出	检出	1.645 2
LQ-HL-3	湖南廉桥药市	饮片	检出	检出	1.279 4
LQ-HL-4	湖南廉桥药市	饮片	未检出	未检出	—

便迅速, 超声提取 20 min 即可提取完全。

本实验比较了多个系统的流动相, 结果发现采用乙腈-0.025 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, pH 值为 3.0) (35:65) 为流动相分离效果最佳。改变流动相比比例、体积流量、柱温, 在不同的仪器、色谱柱和不同的人员操作条件下, 检测结果基本一致。

金胺 O ($C_{17}H_{22}N_3Cl$), 又名碱性嫩黄、碱性荧光黄、金丝雀黄、盐酸氨基四甲基二氨基苯甲烷等, 是一种化工染料, 据报道属于接触性致癌物, 在国外早已列为禁用染料, 更不能用于食品着色^[2]。市售染色黄连片, 其染色的目的是将白色的无机矿物粉染黄后黏附于黄连片上掺伪增重, 通过测定这些染色黄连样品的总灰分, 高的可达 52.7%。将检出

金胺 O 的样品用水浸泡, 即有大量黄白色的粉末状杂质脱落沉淀下来。

市售黄连中用金胺 O 染色造假, 不但减少了黄连片的实际处方用量, 更重要的是其染料和无机增重物对人体的健康有较大的危害, 在药品监管工作中应对此类违法添加行为给予严厉的打击, 以保障公众用药安全。

致谢: 本所肖聪药师在 HPLC-MS 试验中提供的帮助。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 章 杰. 禁用染料和环保型染料 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.



《中国药材标准名录》已出版

科学出版社于 2011 年 4 月出版了由中国药品生物制品检定所林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》, 该书是在国家药品监督管理局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药品检验所积极配合下, 从 2004 年开始, 收集整理历版药典, 部颁标准、地方标准等大量资料, 历时 6 年, 进行了细致归纳整理, 编写了权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了 4 700 余种药材, 涉及 530 个科, 内容涵盖药材名、科名、拉丁科名、类别 (动物、植物或矿物) 原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等; 本书科学性强、编写简明、内容实用, 是企业、医院、中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价 298.00 元。

邮购联系人: 温晓萍 电话: 010-64034601 64019031 地址: 北京市东黄城根北街 16 号 (100717) 科学出版社温晓萍 (请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)

(本刊讯)