

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.023

超高效液相色谱-串联质谱法检测中药饮片8种黄色素类染色剂*

刘延忠¹, 刘东升^{2△}, 朱旭江², 姚世霞²

(1. 甘肃省医疗器械检验检测所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 建立同时测定中药饮片中8种黄色素类染色剂含量的超高效液相色谱-串联质谱法。方法 样品采用乙醇-水(7:3, V/V)超声提取。色谱柱为 Thermo Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 3.0 μm), 流动相为乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱), 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL; 电离方式为正离子电喷雾离子源(ESI⁺), 选择多反应监测模式进行定量分析。结果 8种黄色素类染色剂在各自线性范围内均与峰面积线性关系良好($r=0.9979\sim0.9995$); 平均回收率为 89.83%~99.52%, RSD 为 2.14%~3.67% ($n=6$)。结论 该方法简单快速、灵敏准确, 可用于中药饮片中黄色素类染色剂含量的检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 中药饮片; 黄色素; 快速筛查; 染色剂

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)17-0085-04

Determination of Eight Yellow Pigments Adulterated in Chinese Herbal Pieces by UPLC-MS/MS

LIU Yanzhong¹, LIU Dongsheng², ZHU Xujiang², YAO Shixia²

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou, Gansu, China 730070; 2. Gansu Institute of Medical Device Testing, Lanzhou, Gansu, China 730070)

Abstract: Objective To establish an ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of eight yellow pigments adulterated in Chinese herbal pieces. **Methods** The samples were extracted by ethanol-water (7:3, V/V) with ultrasonic. The chromatographic column was Thermo Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ column (100 mm ×

*基金项目: 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室项目[2020GSMPA-KL05]; 甘肃省食品药品青年科技创新项目[2018GSFDA037]。

第一作者: 刘延忠, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)544623019@qq.com。

△通信作者: 刘东升, 男, 硕士, 工程师, 研究方向为药物分析与质量标准, (电子信箱)1067664197@qq.com。

甲醇提取液蒸干, 加水溶解, 再用水饱和正丁醇提取, 蒸干, 甲醇溶解后进样分析。结果在三七皂苷 R₁ 峰处和人参皂苷 R_{b1} 峰处杂质峰均减少, 达到完全分离 ($R > 1.5$)。

HPLC 法和 UPLC 法同时测定颈舒颗粒的含量, 结果各成分测定值的 RSD 均小于 1.5%, 故可用 UPLC 法代替 HPLC 法测定颈舒颗粒中 4 种皂苷类成分的含量。

参考文献[1]中的方法, 人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 完全分离至少需要 70 min, 采用 UPLC 法在 10 min 内就可同时完全分离人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{e4} 4 种成分, 比原标准增加 2 个皂苷类成分的质量控制, 同时极大地缩短了分析时间, 减少了试药的用量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 中国医药科技出版社, 2015: 1568-1569.
- [2] 任 壮. 中药治疗颈椎病获得高质量证据[N]. 中国中医药报, 2018-06-21(006).
- [3] 杨 志, 林向全, 郑 忠. 颈舒颗粒治疗神经根型颈椎病 48 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(3): 58-60.
- [4] 傅煌黎. 推拿配合颈舒颗粒治疗颈椎病 60 例[J]. 中医外治杂志, 2013, 22(2): 20-21.
- [5] 吴立蓉, 王秀凤, 高卫东, 等. 超高效液相色谱法快速测定复方丹参片中皂苷类成分的含量[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(1): 32-35.

- [6] 李启艳, 王荣梅. 快速溶剂萃取-超高效液相色谱法测定稳心颗粒中皂苷类成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 528-531.
- [7] 吴志超, 孙 萍, 孔维忠, 等. UPLC 测定三七总皂苷微丸中 5 种皂苷类成分含量研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(5): 33-36.
- [8] 黄晓燕, 罗疆南, 罗 时, 等. UPLC 法测定心可宁胶囊中 4 种皂苷类成分的含量[J]. 海峡药学, 2019, 31(2): 77-79.
- [9] 艾 强, 雷 阳, 张原才, 等. UPLC 法测定三七总皂苷含量[J]. 现代农业科技, 2016(14): 274-275.
- [10] 屠颖晶. 不同提取方法对三七粉中人参皂苷 R_e 含量测定结果的影响[J]. 福建轻纺, 2020(3): 41-44.
- [11] 孙雨薇, 王珊珊, 徐 浩, 等. 不同方法对人参皂苷 R_e 提取效果的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(14): 301-304.
- [12] 周 晶, 乔 卫, 符敬伟, 等. 不同提取方法对西洋参皂苷含量的影响[J]. 天津医科大学学报, 2000, 6(1): 26-27.
- [13] 南敏伦, 司学玲, 赫玉芳, 等. 不同提取方法对西洋参中人参皂苷 R_{b1} 含量的影响[J]. 特产研究, 2004(3): 37-39.
- [14] 马珍琼, 普俊学, 屈云莲, 等. 三七总皂苷提取、分离纯化技术的研究进展[J]. 中国当代医药, 2016, 23(21): 19-22.
- [15] 刘 辰, 郑惠珍. 三七总皂苷的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(16): 71-74.
- [16] 苗 洋, 王 广, 李明天, 等. 三七总皂苷的提取及纯化[J]. 养殖技术顾问, 2011(12): 217.

(收稿日期: 2020-11-23; 修回日期: 2021-02-20)

2.1 mm, 3.0 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.02 mol/L ammonium acetate solution with gradient elution, the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, and the injection volume was 5 μL . The ionization mode was positive ion electrospray ionization source (ESI⁺), and multiple reaction monitoring mode (MRM) was selected for quantitative analysis. **Results** The eight yellow pigments showed a good linear relationship with peak area in their respective linear range ($r = 0.997\ 9 - 0.999\ 5$). The average recovery of eight yellow pigments was in the range of 89.83% - 99.52% with RSDs of 2.14% - 3.67% ($n = 6$). **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate, which can be used for the determination of yellow pigments adulterated in Chinese herbal pieces.

Key words: UPLC - MS/MS; Chinese herbal pieces; yellow pigments; rapid screening; staining agent

中药饮片作为中药提取物和中成药的基本原料,市场需求量大,染色剂染色伪制的常用中药饮片的外观性状接近正品,不易辨别,导致不法分子将假、劣药材染色后冒充正品^[1-2]。据报道,大部分黄色类染色剂不利于人体健康,如金胺 O、金橙 II 等黄色素类染色剂对人体可造成不同程度危害,故禁止用于中药饮片的染色。近年来,虽然药监部门加大了中药非法染色的打击力度,金胺 O 等染色剂的染色现象有所减少,但仍有不法商贩使用其他黄色素类染色剂进行非法染色。目前,国家药品监督管理局已颁布的中药饮片染色掺假物质补充检验多采用薄层色谱(TLC)法、高效液相色谱(HPLC)法对单个药材及饮片中的一种或几种色素进行检测^[3-4],品种覆盖面窄,检测方法灵敏度低,准确性差,易出现假阳性,不能有效控制中药饮片的质量。超高效液相色谱-串联质谱联用法(UPLC - MS/MS)广泛用于中药非法染色剂的检测^[5-14]。本研究中建立了同时测定蒲黄、黄芪、黄连、黄柏和延胡索等多种中药饮片中 8 种黄色素类染色剂含量的 UPLC - MS/MS 法,为中药饮片中黄色素类染色剂的检测提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LCMS - 8045 型超高效液相色谱 - 三重四极杆液质联用仪(日本岛津公司);ME204 型和 MS205DU 型分析天平(瑞士梅特勒 - 托利多公司,精度均为 0.01 mg);KQ - 500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);XK80 - A 型快速混匀器(江苏新康医疗器械有限公司);SHY - 2A 型多功能水浴恒温振荡器(金坛市大地自动化仪器厂);5430R 型离心机(德国艾本德公司);HGC - 24A 型氮气吹干仪(天津市高科技发展有限公司);Research plus 加样枪(德国艾本德公司,规格为 10, 100 μL);Xiboshi 一次性针式过滤器(美国戴安公司,规格为 0.22, 0.45 μm)。

1.2 试剂

柠檬黄对照品(批号为 30117,纯度为 90.0%);日落黄对照品(批号为 91001,纯度为 87.0%),金胺 O 对照品(批号为 00701,纯度为 79.0%),金橙 II 对照品(批号为 21116,纯度为 96.3%),碱性橙 22 对照品(批号为

6A16a050,纯度为 91.5%),均购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH;金橙 I 对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为 S11N8D48136,纯度 $\geq 98\%$);灿烂黄对照品(批号为 A2689A,纯度为 95%),皂黄对照品(批号为 D1714050,纯度为 98%),均购于上海 Aladdin 公司;乙腈、甲醇、乙酸铵、甲酸铵均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。药材样品信息见表 1。

表 1 药材样品信息

Tab. 1 Information of Chinese herbal pieces

药材名称	批号	生产厂家
黄芪	YPA7F0001, YPA7F0002, YPA7F0003, YPA7F0004, YPA7F0005, YPA7F0006	广州市药材公司
黄连	YPA7R0001, YPA7R0002, YPA7R0003, YPA7R0004, YPA7R0005, YPA7R0006	广州市药材公司
黄柏	YPA6R0001, YPA6R0002, YPA6R0003, YPA6R0004, YPA6R0005, YPA6R0006	广州市药材公司
延胡索	YPA4C0001, YPA4C0002, YPA4C0003, YPA4C0004, YPA4C0005, YPA4C0006	广州市药材公司
蒲黄	18041003 1701044	安国市广济堂药业有限责任公司 甘肃天力士中天药业有限责任公司

2 方法与结果

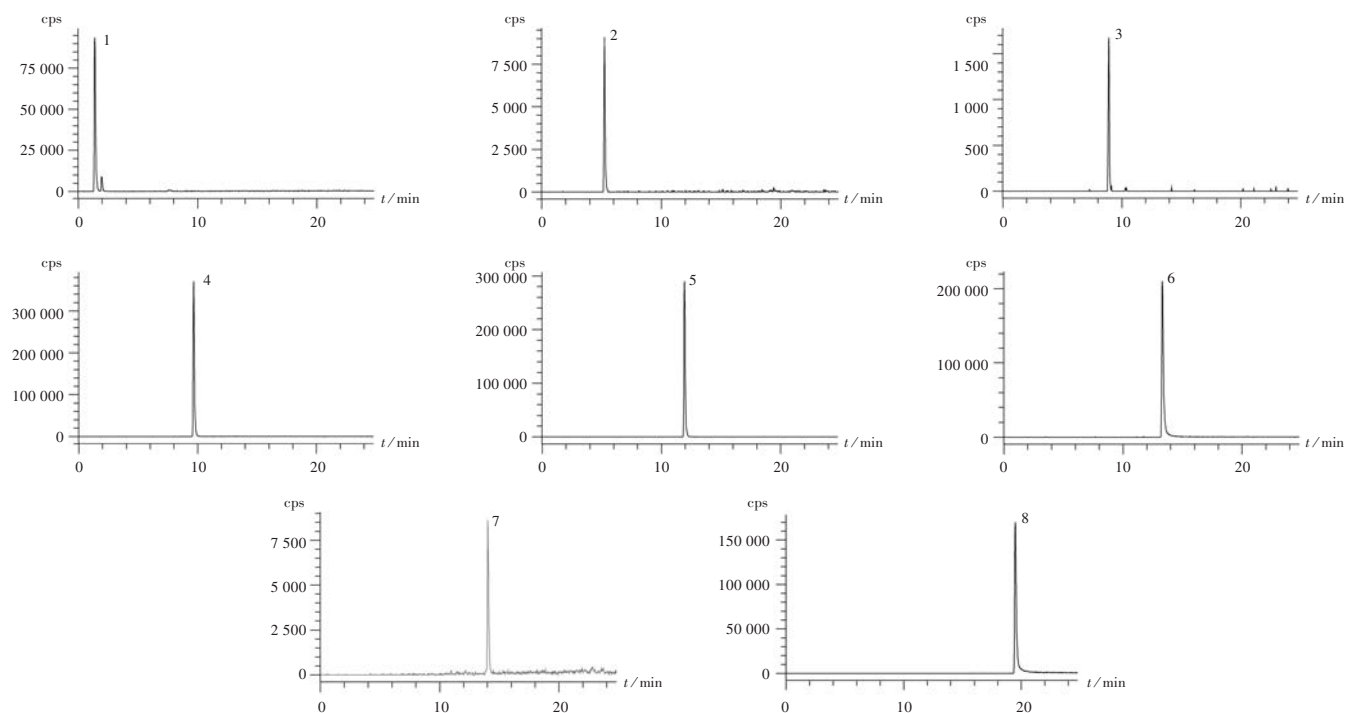
2.1 UPLC - MS/MS 条件

色谱条件:色谱柱为 Thermo AcclaimTM RSLC 120 C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.2 μm);流动相为乙腈(A) - 0.02 mol/L 乙酸铵溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 12 min 时 90% B $\rightarrow$ 55% B, 12 ~ 20 min 时 55% B $\rightarrow$ 30% B, 20 ~ 40 min, 时 30% B $\rightarrow$ 15% B);流速为 0.2 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 5 μL 。

质谱条件:电离方式为正离子电喷雾离子源(ESI⁺),反应监测模式(MRM);DL 管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;干燥气流速为 10 L/min;雾化气流速为 3.0 L/min;接口电压为 4.0 kV。总离子流图见图 1,各成分质谱信息见表 2。

2.2 溶液制备

分别取柠檬黄、日落黄、金橙 I、灿烂黄、金胺 O、金橙 II、皂黄和碱性橙 22 对照品各 10 mg,精密称定,加 70% 乙醇分别制成质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单标混合贮备液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。取上述单标混合贮备液各 1 ~ 3 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液。取样品适量,粉碎,取 2.0 g,精



1. 柠檬黄 2. 日落黄 3. 灿烂黄 4. 橙黄 I 5. 金橙 II 6. 金胺 O 7. 皂黄 8. 碱性橙 22

图 1 8 种黄色素类染色剂混合对照(中等线性浓度)的总离子流图

1. Lemon yellow 2. Sunset yellow 3. Brilliant yellow 4. Orange I 5. Golden orange II 6. Auramine O 7. Soap yellow 8. Alkaline orange 22

Fig. 1 Total ion flow diagram of mixed reference(medium linear concentration) of eight yellow pigments agents

表 2 8 种黄色素类染色剂质谱信息

Tab. 2 Mass spectrum information of eight yellow pigments

序号	成分	相对分子质量	时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	电离方式
1	柠檬黄(Tartrazine)	534.36	1.0~2.0	469.10	451.10/279.00	17/29	(+)
2	日落黄(Sunset Yellow FCF)	454.37	4.5~5.5	409.30	236.00/173.00	20/27	(+)
3	灿烂黄(Brilliant Yellow)	624.55	8.5~9.5	581.00	93.00/121.05	27/46	(+)
4	金橙 I(Orange I)	350.32	9.0~10.0	329.10	156.90/108.90	20/30	(+)
5	金橙 II(Orange II)	350.33	11.5~12.5	329.10	156.05/128.05	18/31	(+)
6	金胺 O(Auramine O)	303.83	13.0~14.0	268.20	147.10/252.15	28/34	(+)
7	皂黄(Metanyl yellow)	375.38	13.5~14.5	354.10	169.05/156.95	29/32	(+)
8	碱性橙 22(Basic Orange 22)	426.98	19.5~20.5	391.20	376.15/361.20	29/43	(+)

注: m/z 为质荷比。

Note: m/z = charge - to - mass ratio.

密称定,加70%乙醇20 mL,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)30 min,冷却至室温,用70%乙醇补足缺失的质量,摇匀,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察和检测限确定:分别精密吸取2.2项下稀释1倍后的单标混合贮备液,加70%乙醇,分别制成系列混合对照品溶液。注入超高效液相色谱-三重四级杆液质联用仪,按2.1项下色谱条件测定染色剂的峰面积积分值。以混合对照品溶液质量浓度为横坐标

(X , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到近原点的一条直线,计算回归方程和相关系数。结果见表3。可见,8种黄色素类染色剂质量浓度在0.2~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。方法的检测限为0.05~0.10 $\mu\text{g/g}$ 。详见表3。

表 3 8 种黄色素类染色剂回归方程、线性范围和检测限

Tab. 3 Regression equation, linear range and LOD of eight yellow pigments

成分	线性回归方程	相关系数(r)	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	检测限($\mu\text{g/g}$)
柠檬黄	$Y = 248.23X + 67.53$	0.9995	0.2~20.0	0.05
日落黄	$Y = 122.45X + 12.66$	0.9979	0.2~20.0	0.05
金橙 I	$Y = 73.18X + 7.53$	0.9992	0.2~20.0	0.05
灿烂黄	$Y = 81.59X + 28.56$	0.9991	0.2~20.0	0.05
金胺 O	$Y = 253.45X + 2.53$	0.9989	0.5~30.0	0.10
金橙 II	$Y = 54.53X + 2.43$	0.9990	0.2~20.0	0.05
皂黄	$Y = 73.12X + 52.86$	0.9985	0.2~20.0	0.05
碱性橙 22	$Y = 97.55X + 75.17$	0.9985	0.5~30.0	0.10

精密度和准确度试验:采用标准添加法,称取完全不含染色剂的空白样品6份,每份1.0 g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液各2 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。结果平均回收率为89.83%~99.52%, RSD 为2.14%~3.67%($n=6$)。详见表4。

表4 精密度和准确度试验结果($n=6$)

Tab. 4 Results of precision and accuracy tests($n=6$)

序号	成分	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)	序号	成分	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
1	柠檬黄	97.38	3.15	5	金橙Ⅱ	96.74	2.54
2	日落黄	89.83	2.67	6	金胺O	98.43	2.66
3	灿烂黄	99.52	2.78	7	皂黄	97.28	3.67
4	金橙Ⅰ	91.69	3.01	8	碱性橙22	98.34	2.14

2.4 样品中非法添加黄色素类染色剂检测

采用 UPLC-MS/MS 法,按 2.1 项下色谱条件对 26 批蒲黄(2 批)、黄芪、黄连、黄柏和延胡索(各 6 批)样品中非法添加黄色素类染色剂进行检测,结果样品均未检出黄色素类染色剂。

3 讨论

3.1 提取条件优化

曾考察不同提取溶液(甲醇、乙醇、70% 甲醇溶液、70% 乙醇溶液)对测定结果的影响,结果经 70% 乙醇溶液提取,供试品溶液进样后色谱峰峰形良好,且杂峰较少。综合考虑,以 70% 乙醇溶液为提取溶剂。考察不同提取方法(浸泡、超声、回流提取法)对测定结果的影响,结果超声提取法简便、快捷,且提取效率较高,故采用超声提取法。考察不同体积(10, 20, 30, 50 mL)的 70% 乙醇溶液和不同超声时间(15, 30, 45, 60 min)对测定结果的影响,最终选用 20 mL 70% 乙醇溶液超声处理 30 min。

3.2 质谱条件优化

根据 8 种染色剂分子的结构特征,分别在正离子和负离子模式下进行全扫描,结果在正离子模式下各染色剂的响应值均高于负离子模式下的响应值,故选用正离子模式;通过 UPLC 的自动进样器直接进样(不连接色谱柱),对毛细管电压、锥孔电压及质谱分辨率等条件进行优化,确定接口电压为 4.0 kV。在拟订质谱条件下,分别以分子离子为母离子,对其子离子进行全扫描,选取响应最高且干扰较小的子离子作为定量离子(MRM 模式),以响应值次之的作为定性离子,并对目标化合物二级质谱的碰撞能量等质谱分析参数进行优化。最终确定了质谱条件。

3.3 流动相优化

在质谱分析过程中,由于待测样品(阳性含染色剂)中含有偶氮键和季铵盐,故流动相中常加入一定浓度的甲酸和铵盐(甲酸铵或乙酸铵),有助于正离子的响应和峰形的改善。选择乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液、甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液、乙腈-0.02 mol/L 甲酸铵溶液和甲醇-0.02 mol/L 甲酸铵溶液 4 种流动相体系进行分析。结果显示,采用乙腈-乙酸铵体系进行梯度洗脱时,样品分离度和峰形均较好,且能进一步提高分析

样品的信噪比和灵敏度。

3.4 方法评价

本研究中建立了同时测定中药饮片可能添加的 8 种黄色素类染色剂的 UPLC-MS/MS 法,该方法稳定性好,可操作性强,准确度高,提高了工作效率,降低了检测成本。与 HPLC 法相比,进一步提高了方法的准确度和灵敏度,检测的色素种类较全面,有效地提高了检测速度,可为监测中药饮片非法染色提供参考。

参考文献

- [1] 刘静,戴忠,何轶,等. 中药中常见染色成分分析[J]. 中国药事,2017,31(4):364-373.
- [2] 马长宏,单作刚,齐家炜. 中药染色掺假的研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(2):153-154.
- [3] 钟名诚,饶伟文,刘剑云. 中药染色掺假检测方法的研究进展[J]. 海峡药学,2018,30(5):32-35.
- [4] 余坤子,陆以云,张南平,等. 中药材掺伪染色鉴别技术研究进展[J]. 中国药事,2017,31(11):1311-1316.
- [5] 张魁,胡青,孙健,等. UPLC/MS/MS 法定性定量测定中药材中 3 类 27 种合成色素[J]. 世界中医药,2019,14(4):822-827.
- [6] 朱日然,韩相宁,张亚楠,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定中药中 29 种合成着色剂[J]. 药物分析杂志,2018,38(6):1029-1035.
- [7] 苟瑛,耿昭,张燕飞,等. 液质联用法快速筛查中药材及饮片中常见染色掺假物质的方法研究及数据库建立[J]. 药物分析杂志,2017,37(3):461-470.
- [8] 何轶,雷银瓶,鲁静,等. HPLC-DAD-MS/MS 法结合谱库筛查 5 种中药中 21 种合成染料[J]. 中成药,2016,38(12):2631-2635.
- [9] 徐昱婷,张学博,苏静,等. 超高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定中药材(饮片)中非法添加 6 种水溶性红色素通用方法的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2016,18(5):911-918.
- [10] 陈林,温家欣,刘潇潇,等. HPLC 结合 LC-MS/MS 法快速检测穿山甲中掺加的 12 种黄色色素[J]. 中成药,2017,39(3):556-560.
- [11] 陈安珍,李新荣,孙磊,等. UPLC-MS/MS 法同时检测跌打丸中的 6 种非法染色物[J]. 药物分析杂志,2015,35(8):1453-1457.
- [12] 朱雪妍,谷立勃,何颂华. 高效液相色谱-串联质谱法测定葛根芩连片中染色剂金胺 O 的方法研究[J]. 中国药物警戒,2016,13(4):216-218.
- [13] 连云岚,杜娟,乔玉峰,等. 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[J]. 中草药,2016,47(18):3219-3223.
- [14] 胡青,林媛,张魁,等. 超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱法测定乌梅中 19 种深色染色色素[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(7):2663-2670.

(收稿日期:2020-11-25;修回日期:2021-02-02)