

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.06.023

染色沉香中 10 种非法染色剂检查方法的建立*

周 谧¹, 龚旭东¹, 徐丹洋¹, 王素素¹, 吴慧峰^{2,Δ}

(1. 江苏省南通市食品药品监督检验中心, 江苏 南通 226006; 2. 南通三越中药饮片有限公司, 江苏 南通 226300)

摘要:目的 建立染色沉香中非法染色剂橙黄 G、橙黄 I、甲基橙、甲基黄、碱性橙 21、金胺 O、亮黄、柠檬黄、日落黄、皂黄的检查方法。方法 采用薄层色谱(TLC)法对 46 批样品中上述 10 种非法染色剂进行筛查;采用超高效液相色谱-二极管阵列检测器(UPLC-DAD)法进行验证,色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为甲醇-0.2 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱),检测波长为 420 nm;采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法进行确认,离子源为电喷雾离子源,正负离子扫描模式。结果 筛查出 5 批疑似检出柠檬黄、日落黄的样品;样品中被检成分与对照品保留时间一致,且图谱也一致;样品中相关物质的离子峰及碎片特征与 2 种对照品一致。结论 所建立的方法可用于沉香中这 10 种非法染色剂的检查。

关键词:沉香;柠檬黄;日落黄;薄层色谱法;超高效液相色谱法;高效液相色谱串联质谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)06-0091-04

Establishment of Inspection Method for Ten Illegal Dyes in the Dyed Aquilariae Lignum Resinatum

ZHOU Mi¹, GONG Xudong¹, XU Danyang¹, WANG Susu¹, WU Huifeng²

(1. Nantong Food and Drug Control Center, Nantong, Jiangsu, China 226006; 2. Nantong Sanyue Prepared Slices of Chinese Crude Drugs Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226300)

Abstract: Objective To establish a method for the inspection of illegal dyes (orange G, orange I, methyl orange, methyl yellow, basic orange 21, auramine O, brilliant yellow, lemon yellow, sunset yellow and metanil yellow) in the dyed Aquilariae Lignum Resinatum. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to screen the above 10 illegal dyes in 46 batches of samples. Ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector (UPLC-DAD) method was used for verification, and the chromatographic column was Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was methanol-0.2 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution), and the detection wavelength was 420 nm. High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was used to confirm. Electrospray ion (ESI) was adopted as the ion source with positive and negative ion scanning mode. **Results** Five batches of suspected lemon yellow and sunset yellow samples were screened. The retention time and the UV spectra of the tested components in the test solution were consistent with those of the reference solution. The characteristics of related material ion peaks and fragments of the the test solution were consistent with those of two kinds of reference solution. **Conclusion** The established method can be used for the inspection of these ten illegal dyes in the dyed Aquilariae Lignum Resinatum.

Key words: Aquilariae Lignum Resinatum; lemon yellow; sunset yellow; TLC; UPLC; HPLC-MS/MS

沉香为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材,具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘功效,为治疗气逆喘息、呕吐、呃逆、心腹疼痛的要

药^[1]。白木香是我国生产中药沉香的唯一植物资源,为我国特有的珍贵药用植物,由于自然灾害和人为破坏,野生资源在不断减少,被列入国家二级保护野生植物。

*基金项目:江苏省南通市科技项目[YYZ17091]。

第一作者:周谧,女,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为中药鉴定及质量监管,(电子信箱)656074350@qq.com。

Δ通信作者:吴慧峰,女,大学本科,主管中药师,研究方向为中药鉴定及炮制工艺,(电子信箱)1549496589@qq.com。

- 阳离子的含量[J]. 药学与临床研究,2021,29(2):101-105.
- [13] 王 森,靳贵英,王彩媚. 离子色谱-积分脉冲安培检测法测定 β-环糊精中的有关物质[J]. 中国药业,2017,26(4):27-31.
- [14] 栗 贵,刘雁鸣,龙海燕,等. 离子色谱法测定药用辅料硬脂酸镁中氯离子和硫酸根离子及不同级别产品含量比较[J]. 药物分析杂志,2016,36(12):2251-2256.
- [15] 栗 贵,刘雁鸣,龙海燕,等. 离子色谱法测定木糖醇中氯离子、硫酸根离子和磷酸根离子及不同级别产品质量状况的评价[J]. 中南药学,2019,17(1):102-104.
- [16] 范卫平. 离子色谱法同时测定那屈肝素钙中氯离子和硫酸根离子的含量[J]. 中国无机分析化学,2021,11(2):15-20.
- [17] 张 泰,王岩艳. 药用辅料影响诊疗安全研究进展[J]. 中国药物警戒,2021,18(5):492-494.
- [18] 赵丽华,应育洁. 药用辅料不良反应概述[J]. 中国当代医药,2020,27(17):25-28.
- [19] 潘 波,顾小焱,刘征宙. 药用辅料的管理及其研究新进展[J]. 化学试剂,2021,43(1):55-62.

(收稿日期:2021-06-16;修回日期:2021-08-21)

沉香不仅是中医临床常用名贵药材,还是保健品、高级香料、化妆品等的原料,由于需求量大,资源紧张,导致市场中沉香药材价格迅速上涨,质量混乱,以假乱真的现象较严重。沉香表面应为黑褐色树脂与黄白色的木部相间,以往存在用松香浸泡不含或含较少树脂的白木香使其醇溶性浸出物达标的情况,随着标准的不断完善,该类现象明显减少^[2]。但近来在日常抽检过程中发现,部分沉香药材样品表面与合格品比较颜色偏黄,怀疑存在将劣质饮片通过工业染色剂染色后冒充或掺入优质饮片的情况^[3-7]。为此,本研究中采用薄层色谱(TLC)法、超高效液相色谱-二极管阵列检测器(UPLC-DAD)法依次检查,开展了沉香药材中10种非法染色剂检查方法的研究,并采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法对检出成分进行确认^[5,8-9]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

H-Class型超高效液相色谱仪(美国Waters公司);Thermo LCQ Fleet型质谱仪(美国Thermo Fisher公司,离子阱质谱仪);CPA225D型电子分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为十万分之一);KQ-500DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

橙黄G对照品(阿拉丁试剂<上海>有限公司,批号为C1608071);橙黄I对照品(批号为RH100041),甲基橙对照品(批号为C00001424),皂黄对照品(批号为C00001408),均购自罗恩科技<北京>有限公司;甲基黄对照品(批号为J6180005),碱性橙21对照品(批号为2168K050),亮黄对照品(批号为B0410005),均购自上海安谱科学仪器有限公司;金胺O对照品(批号为111770-201603),柠檬黄对照品(批号为510004-201401,含量91.0%),日落黄对照品(批号为510005-201602,含量86.9%),沉香对照药材(批号为121222-201203),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(德国Merck公司);沉香样品共46批,为日常抽检或市场购买;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。色素信息见表1。

2 方法与结果

2.1 TLC法鉴别

鉴别:取药材样品粉末2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%乙醇20mL,超声(功率500W,频率40kHz,下同)处理20min,取出,放冷,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。量取10种色素对照品各适量,加70%乙醇制成每1mL各约含0.1mg的混合对照品溶液I。取对照药材,加70%乙醇20mL,超声处理20min,取出,放冷,滤过,取续滤液,即得阴性对照品溶液。精密

表1 色素信息

Tab. 1 The information of illegal dyes

色素	化学式	相对分子质量	CAS号
橙黄G	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	452.37	1936-15-8
橙黄I	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$	350.32	523-44-4
甲基橙	$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$	327.32	547-58-0
甲基黄	$C_{14}H_{15}N_3$	225.30	60-11-7
碱性橙21	$C_{22}H_{23}ClN_2$	350.88	3056-93-7
金胺O	$C_{17}H_{21}N_3 \cdot HCl$	303.83	2465-27-2
亮黄	$C_{26}H_{18}N_4Na_2O_8S_2$	624.55	3051-11-4
柠檬黄	$C_{16}H_{12}N_4O_9S_2 \cdot 3Na$	534.36	1934-21-0
日落黄	$C_{16}H_{10}N_2O_7S_2 \cdot 2Na$	451.97	2783-94-0
皂黄	$C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$	375.38	587-98-4

吸取上述3种溶液各10μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水(6:2:4:0.5,V/V/V/V)为一次展开剂,正丁醇-丙酮-乙酸乙酯-水-氨水(6:6:2:2:0.5,V/V/V/V/V)为二次展开剂,展开,取出,晾干,日光下检视(温度12℃,相对湿度45%)^[10-11]。46批供试品溶液色谱中,有5批疑似检出柠檬黄和日落黄,阴性对照无干扰。详见图1。

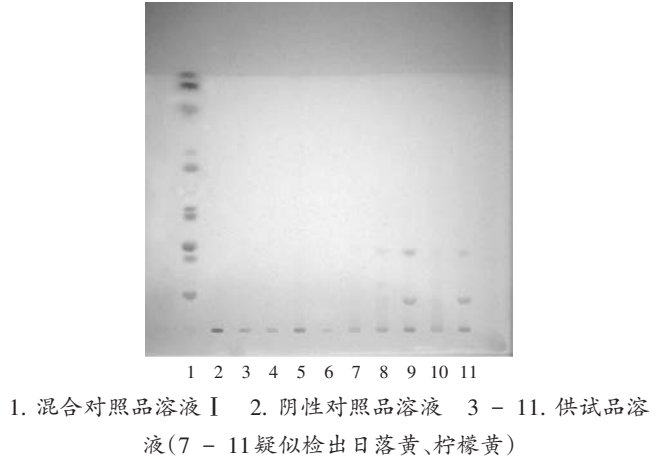


图1 薄层色谱图

1. Mixed reference solution I 2. Negative reference solution
3 - 11. Test solution (sunset yellow and lemon yellow are suspected in Test solution 7 - 11)

Fig. 1 TLC chromatograms

检测限考察:量取10种色素对照品各适量,加70%乙醇制成每1mL中各约含0.01mg的混合对照品溶液II。同法试验,以清晰可辨斑点的质量浓度作为检测限。结果橙黄G、橙黄I、甲基橙、甲基黄、碱性橙21、金胺O、亮黄、柠檬黄、日落黄、皂黄的检测限分别为0.013, 0.016, 0.010, 0.011, 0.010, 0.010, 0.010, 0.010, 0.009, 0.011mg/g。

2.2 UPLC-DAD法验证

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC®BEH C₁₈柱(100mm×

2. 1 mm, 1.7 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.2 mol/L 乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min时 10%A→17%A, 2~3 min时 17%A→20%A, 3~6 min时 20%A→40%A, 6~16 min时 40%A→45%A, 16~20 min时 45%A→46%A, 20~22 min时 46%A→70%A, 22~23 min时 70%A→100%A); 流速: 0.2 mL/min; 检测波长: 420 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 溶液制备

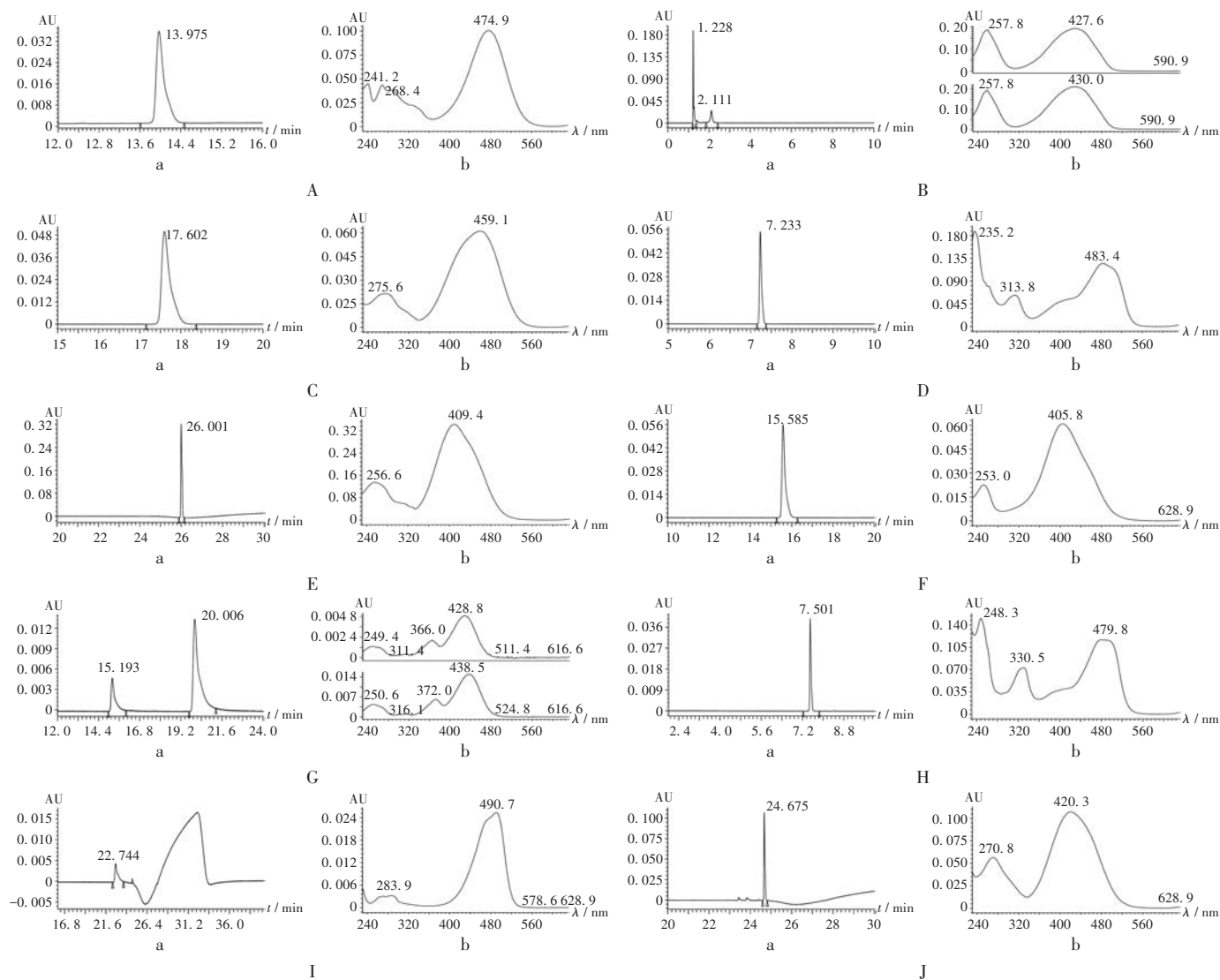
量取10种色素对照品各适量, 加70%乙醇制成每1 mL中各约含0.04 mg的混合对照品溶液Ⅲ。

2.2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验: 取混合对照品溶液Ⅲ、2.1项下疑似含染色剂的供试品溶液、2.1项下阴性对

照品溶液各适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果理论板数按柠檬黄峰计不低于3 000^[12-14], 阴性对照在与10种色素对照品相同保留时间处无干扰峰, 表明专属性良好。扫描230~630 nm波长范围的紫外-可见吸收光谱, 并进行峰纯度检查, 结果峰纯度均符合要求。详见图2(因篇幅所限, 仅以对照品为例)。

检测限考察: 取混合对照品溶液Ⅱ, 倍比稀释, 并按2.2.1项下色谱条件进样测定, 以信噪比为3:1时的质量浓度为检测限。结果橙黄G、橙黄I、甲基橙、甲基黄、碱性橙21、金胺O、亮黄、柠檬黄、日落黄、皂黄的检测限分别为0.39, 0.32, 0.31, 0.22, 0.31, 0.50, 0.29, 0.39, 0.35, 0.34 $\mu\text{g/g}$ 。



a. 超高效液相色谱图 b. 紫外-可见分光光谱图

A. 橙黄I B. 柠檬黄 C. 甲基橙 D. 日落黄 E. 甲基黄 F. 亮黄 G. 金胺O H. 橙黄G I. 碱性橙21 J. 皂黄

图2 超高效液相色谱-二极管阵列检测器图谱

a. HPLC-DAD chromatograms b. UV spectrograms

A. Orange I B. Lemon yellow C. Methyl orange D. Sunset yellow E. Methyl yellow F. Brilliant yellow G. Auramine O

H. Orange G I. Basic orange 21 J. Metanil yellow

Fig. 2 UPLC-DAD chromatograms

2.2.4 样品检测

取混合对照品溶液Ⅲ,46批样品的供试品溶液及2.1项下阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果在46批样品中,有5批疑似检出柠檬黄和日落黄,且与相应对照品的紫外-可见分光光谱图完全一致。

2.3 HPLC-MS/MS 确认

2.3.1 试验条件

色谱条件:同2.2.1项。质谱条件:离子源温度为350℃,毛细管温度为350℃,源电压为4000V,鞘气流速为35arb,辅助气流速为10arb,离子源为电喷雾离子源;扫描模式为正负离子,同时进行一级质谱全扫描、二级质谱全扫描,扫描范围 m/z 50~600^[13-15]。质谱离子信息见表2。

表2 质谱离子信息

Tab.2 The information of mass spectrum ion

化合物	离子化方式	母离子	子离子	碰撞电压(eV)
橙黄G	负离子	407	302	30
橙黄I	负离子	327	171,247	30
甲基橙	正离子	306	121,357	35
甲基黄	正离子	226	120,148	35
碱性橙21	正离子	315	300	30
金胺O	正离子	269	147	35
亮黄	正离子	579	301	35
柠檬黄	负离子	407	77,121	30
日落黄	负离子	407	327	30
皂黄	负离子	352	156,260	30

2.3.2 样品检测

取混合对照品溶液Ⅲ,46批样品的供试品溶液及2.1项下阴性对照品溶液,按2.3.1项下试验条件进样测定。在疑似染色供试品溶液色谱中,与柠檬黄、日落黄对照品相应色谱峰呈相同的质谱特征。结果显示,46批样品中有5批检出柠檬黄和日落黄。

3 讨论

参照蒲黄中金胺O检查的补充检验方法(批准件编号为2007007)、红花中多种色素检查的补充检验方法(批准件编号为2013006,2014016),用70%乙醇对药材样品进行直接提取,方法简便快捷。

预试验中采用了不同展开系统,二氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水(6:2:4:0.5,V/V/V/V)和正丁醇-丙酮-乙酸乙酯-水-氨水(6:6:2:2:0.5,V/V/V/V/V)进行比较,多种色素的分离效果欠佳,尝试前一种系统为一次展开剂,后一种系统为二

次展开剂,所得薄层色谱斑点清晰,分离度佳。对温度和相对湿度等影响因素进行了考察,结果温度和相对湿度对薄层色谱鉴别结果无明显影响。

本研究中46批沉香药材样品有5批检出柠檬黄和日落黄。当前市场沉香染色情况较严重,检出的柠檬黄和日落黄这2种染色剂均未见报道。两者均为合成染色剂,由苯环和偶氮基团等物质缩合而成,在一定条件下可分解产生20多种具有致癌性的芳香胺类物质,会导致基因变异,进而导致病变和诱发各类恶性肿瘤等^[16]。

综上所述,本研究中所建立的方法可用于沉香中这10种非法染色剂的检查。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:192-193.
- [2] 苟琰,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.
- [3] 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.
- [4] 蒋玲,饶伟文. 中药染色掺假的研究进展[J]. 首都医药,2011,15(16):16-18.
- [5] 姜国萍,孙萍,朱日然. 染色中药添加色素的检测技术研究进展[J]. 时珍国医国药,2015,26(3):694-696.
- [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(1):1742-1745.
- [7] 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.
- [8] 董媛,林春燕,张赞华,等. 染色蒲黄中柠檬黄、日落黄检查方法的建立[J]. 药物分析杂志,2017,37(4):670-676.
- [9] 翟清,杨志伟,石鑫磊,等. 染色蒲黄中柠檬黄的检测方法研究[J]. 中国医药科学,2015,5(19):69-74.
- [10] 胡青,孙健,张魁,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.
- [11] 杨蝉. 中药及胶囊中九种合成色素的检测方法研究[D]. 贵阳:贵阳中医学院,2014.
- [12] 胡青,孙健,于泓,等. 快速液相-四级杆串联高分辨飞行时间质谱定性测定中药中50种染色色素[J]. 中国药理学杂志,2016,51(15):1316-1323.
- [13] 罗轶,丘明明,何颂华,等. 蛤蚧定喘丸中十种非法染色物的检测[J]. 中国医药导报,2007,14(15):139-143.
- [14] 朱雪妍,谷立勃,何颂华,等. 葛根芩连片中掺入染色剂的检测方法研究[J]. 药物分析杂志,2016,36(4):711-720.
- [15] 项婧. 液相色谱-质谱法测定食品中多种合成色素和染料及相应质谱库的建立[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.
- [16] YAMJALA K, NAINAR MS, RAMISSETTI NR. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry - A review [J]. Food Chem, 2016, 192:813-824.

(收稿日期:2021-05-21;修回日期:2021-08-01)

本栏目由

重庆药友制药有限责任公司

协办

进行比较,多种色素的分离效果欠佳,尝试前一种系统为一次展开剂,后一种系统为二