

HPLC-MS/MS 法同时检测红花药材中 9 种非法染色物^A

李婷婷^{1*}, 李 良^{2#}, 刘 莉¹, 曾 桢¹, 孔卫东¹, 刘 芬³, 孙 茜⁴(1.成都市食品药品检验研究院, 成都 610045; 2.武警江西总队医院, 南昌 330006; 3.南昌大学药学院, 南昌 330031; 4.上海市宝山区仁和医院, 上海 200431)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3842-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.27

摘 要 目的:建立同时检测红花药材中 9 种非法染色物的方法。方法:采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)。色谱条件:色谱柱为 SB-C₁₈, 流动相为 10 mmol/L 甲酸铵-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。质谱条件:离子源为电喷雾离子源, 监测方式为负离子多离子反应监测, 离子喷雾电压为 3 500 V, 干燥气温度为 350 ℃, 干燥气流速为 10 L/min, 碰撞气为高纯氮气, 扫描范围为 m/z 50~1 000。结果:丽春红、酸性红 73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙 II、日落黄、赤藓红和金橙 G 检测质量浓度线性范围分别为 5.313 5~531.35 ng/mL($r=0.987\ 0$)、1.312 0~1 312.00 ng/mL($r=0.994\ 8$)、124.480 0~2 824.00 ng/mL($r=0.983\ 2$)、6.300 0~630.00 ng/mL($r=0.964\ 8$)、1.035 8~517.92 ng/mL($r=0.996\ 4$)、0.552 0~1 104.00 ng/mL($r=0.909\ 0$)、5.046 3~2 018.52 ng/mL($r=0.996\ 2$)、5.046 3~2 018.52 ng/mL($r=0.997\ 6$)、1.079 5~2 159.00 ng/mL($r=0.990\ 0$); 定量限分别为 10.418 7、1.131 0、68.401 0、13.695 7、1.670 7、0.238 0、3.973 3、1.064 7、1.285 0 ng/kg, 检测限分别为 3.125 6、0.339 3、20.520 3、4.108 7、0.501 2、0.071 4、1.192 0、0.319 4、0.385 5 ng/kg; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<3.0%; 回收率为 91.2%~99.1% (RSD 为 0.7%~2.2%, $n=6$)。结论:该方法专属性强、灵敏度高、简便快捷, 适用于红花药材中 9 种非法染色物的同时检测。

关键词 高效液相色谱-串联质谱法; 红花; 丽春红; 酸性红 73; 柠檬黄; 偶氮玉红; 诱惑红; 金橙 II; 日落黄; 赤藓红; 金橙 G

Simultaneous Determination of 9 Illegal Dyes in *Carthamus tinctorius* by HPLC-MS/MS

LI Tingting¹, LI Liang², LIU Li¹, ZENG Zhen¹, KONG Weidong¹, LIU Fen³, SUN Qian⁴(1.Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China; 2.Armed Police Jiangxi Corps Hospital, Nanchang 330006, China; 3.College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 4.Renhe Hospital of Shanghai Baoshan District, Shanghai 200431, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 9 illegal dyes in *Carthamus tinctorius*. METHODS: HPLC-MS/MS was adopted. The determination was performed on SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of 10 mmol/L ammonium formate-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. Mass spectrometry condition: electrospray ion source, negative ion multi-ion reaction monitoring mode, ion spray voltage of 3 500 V, drying gas temperature of 350 ℃, drying gas flow rate of 10 L/min, colliding gas of high pure nitrogen gas, scanning range of m/z 50~1 000. RESULTS: The linear ranges of ponceau, acid red 73, lemon yellow, azorubin, allura red, gold orange II, sunset yellow, pyrosine and golden orange G were 5.313 5~531.35 ng/mL($r=0.987\ 0$), 1.312 0~1 312.00 ng/mL($r=0.994\ 8$), 124.480 0~2 824.00 ng/mL($r=0.983\ 2$), 6.300 0~630.00 ng/mL($r=0.964\ 8$), 1.035 8~517.92 ng/mL($r=0.996\ 4$), 0.552 0~1 104.00 ng/mL($r=0.909\ 0$), 5.046 3~2 018.52 ng/mL($r=0.996\ 2$), 5.046 3~2 018.52 ng/mL($r=0.997\ 6$), 1.079 5~

1430-1432.

[6] 李强,杜思逸,张忠亮,等.中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J].中草药,2013,44(22):3095-3104.

[7] 周玉新.中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2002:5-8.

[8] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药

房,2011,22(19):1819-1822.

[9] 国家林业局,国家卫生部,国家工商总局,等.关于加强赛加羚羊、穿山甲、稀有蛇类资源保护和规范其产品入药管理的通知[J].中国现代中药,2008,10(5):3-4.

[10] 何锦钧,李子鸿,李怀国,等.醋淬穿山甲的炮制工艺研究[J].中国处方药,2006,5(4):64-65.

[11] 吴芝园.四种穿山甲属动物类药材的生药鉴别研究[D].南京:南京中医药大学,2015:58.

^A 基金项目:江西省卫生计生委中医药科研课题(No.2015A069)
* 主管药师。研究方向:药物含量测定与质量标准。电话:028-85362592
通信作者:主管药师,硕士。研究方向:药物质量标准。E-mail: 278623586@qq.com

2 159.00 ng/mL($r=0.990\ 0$), respectively. The limits of quantitation were 10.418 7, 1.131 0, 68.401 0, 13.695 7, 1.670 7, 0.238 0, 3.973 3, 1.064 7, 1.285 0 ng/kg. The limits of detection were 3.125 6, 0.339 3, 20.520 3, 4.108 7, 0.501 2, 0.071 4, 1.192 0, 0.319 4, 0.385 5 ng/kg, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0%. The recoveries were 91.2% -99.1% (RSD=0.7% -2.2% , $n=6$). CONCLUSIONS: The established method is specific, sensitive, simple and rapid, and can be used for the detection of 9 illegal dyes in *C. tinctorius*.

KEYWORDS HPLC-MS/MS; *Carthamus tinctorius*; Ponceau; Acid red 73; Lemon yellow; Azorubin; Allura red; Gold orange II ; Sunset yellow; Pyrosine; Golden orange G

红花来源于菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.的干燥不带子房的管状花^[1],表面红色或红黄色,主产河南、湖南、四川、新疆等地;具有活血通径、散瘀止痛之功效,临床常用于经闭、痛经、恶露不行、症瘕痞块、跌打损伤的治疗。近年来,由于红花药材应用广泛,来源有限,而存在造假、掺假的情况,严重影响药材质量,损害消费者健康^[2-3]。

本试验采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS),参考相关文献^[4-10],对从中药材市场、医院、药店等流通环节收集的红花药材进行了掺伪染色检测方法的研究,以期为进一步完善红花药材掺伪染色检测方法、加强红花药材的监督管理、提高红花饮片质量、打击相关非法掺伪掺假行为提供可行手段。

1 材料

1.1 仪器

1290 型 G6460C MS/MS 三重四级杆 HPLC-MS 仪(美国 Agilent 公司);AE-240 型电子分析天平、AEG-220 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);SK1200B 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

丽春红对照品(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司,批号:91117,纯度:81.0%);酸性红 73 对照品(批号:111955-200701,纯度:99.0%)、柠檬黄对照品(批号:510004-201401,纯度:95.9%)、偶氮玉红对照品(批号:520054-201401,纯度:99.9%)、诱惑红对照品(批号:510003-201401,纯度:91.0%)、金橙 II 对照品(批号:111769-201302,纯度:98.2%)、日落黄对照品(批号:510005-201401,纯度:89.0%)、赤藓红对照品(批号:111772-201202,纯度:97.5%)均购自中国食品药品检定研究院;金橙 G 对照品(美国 Acros 公司,批号:A0338124,纯度:85.0%);甲酸铵、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

红花药材(批号:20150007、20150009、20150010、20150019、20150020、20150022、20150024、20150029、20150039、20150043、20150045、20150047、20150069、20150070、20150071、20150072、20150085)来自中药材市场、医院、药店等流通环节,经成都市食品药品检验研究院孔卫东主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:SB-C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:10 mmol/L 甲酸铵(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:0.2 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	A, %	B, %
0	95	5
1.00	95	5
1.25	85	15
3.50	75	25
7.50	70	30
11.0	5	95

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;监测方式:负离子多离子反应监测;离子喷雾电压:3 500 V;干燥气温度:350 ℃;干燥气流速:10 L/min;碰撞气:高纯氮气;扫描范围: m/z 50~1 000。质谱参数见表 2;提取离子流见图 1。

表 2 质谱参数

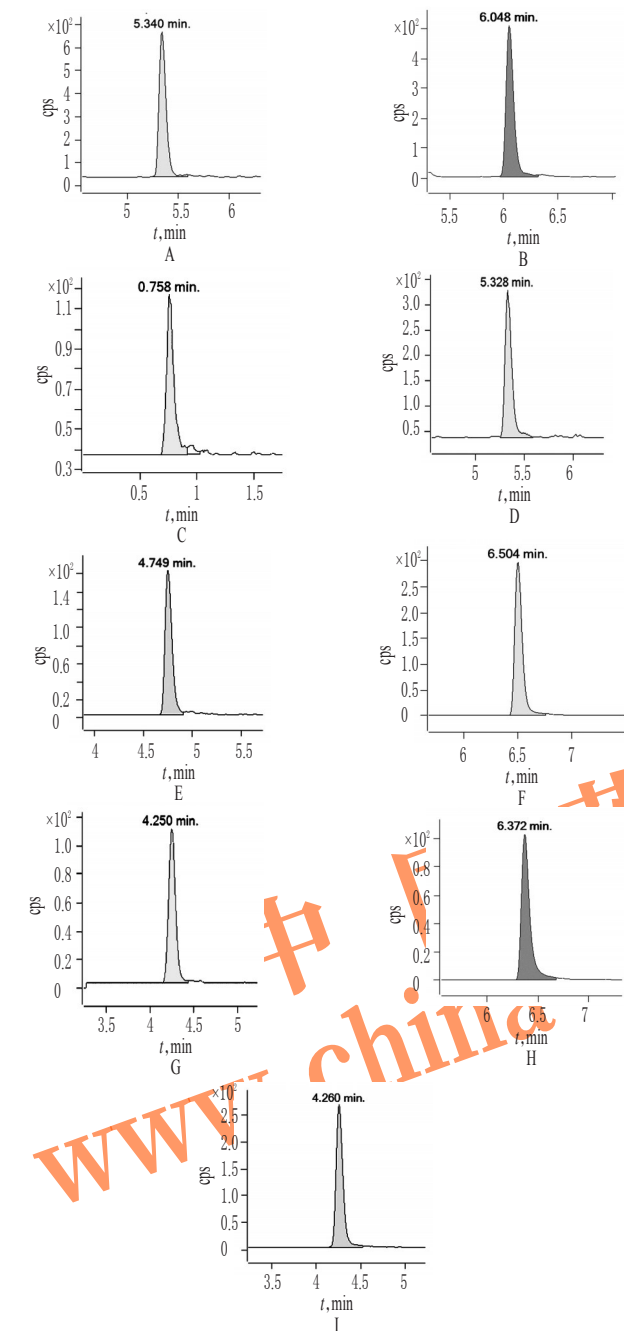
Tab 2 Parameters of mass spectrometry

化学物质	母离子	碎片离子	裂解电压,eV	碰撞能量,eV	保留时间,min
丽春红	435.1	194.0	198	46	35
		355.1		22	35
酸性红 73	511.1	302.0	124	19	30
		222.1		47	30
柠檬黄	467.1	198.0	260	18	80
		79.9		66	80
偶氮玉红	457.1	377.0	176	19	35
		170.0		47	35
诱惑红	450.9	207.0	188	33	35
		371.0		22	35
金橙 II	327.1	171.1	154	22	30
		156.0		34	30
日落黄	407	326.9	180	22	35
		206.8		30	35
赤藓红	834.8	662.8	210	37	30
		537.0		37	30
金橙 G	407.1	302.0	119	14	35
		222.0		38	35

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各待测成分对照品约 5 mg,分别置于 100 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液溶解并定容,制成单一对照品溶液;精密量取上述单一对照品溶液各 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液定

容,摇匀,即得。



A. 丽春红; B. 酸性红 73; C. 柠檬黄; D. 偶氮玉红; E. 诱惑红; F. 金橙 II; G. 日落黄; H. 赤藓红; I. 金橙 G;
A. ponceau; B. acid red 73; C. lemon yellow; D. azo red; E. temptation red; F. gold orange II; G. sunset yellow; H. red moss; I. golden orange G;

图1 提取离子流图

Fig 1 Extraction ion chromatograms

2.2.2 供试品溶液 取样品 0.2 g, 精密称定, 加 70% 乙醇溶液 20 mL, 称定质量, 超声 (功率: 250 W, 频率: 59 kHz) 处理 20 min, 放冷, 再次称定质量, 用 70% 乙醇溶液补足减失的质量, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品溶液适量, 加

70% 乙醇溶液制成丽春红、酸性红 73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙 II、日落黄、赤藓红和金橙 G 质量浓度均为 0.5、1.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、250.00、500.00 ng/mL 的系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各 10 μL, 按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度 (x, μg/mL) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程与线性范围, 详见表 3。

表3 回归方程、线性范围与定量限、检测限

Tab 3 Regression equation, linear range and the limits of quantitation and detection

待测成分	回归方程	线性范围, ng/mL	r	定量限, ng/kg	检测限, ng/kg
丽春红	y=12.76x+68.13	5.313 5~531.35	0.987 0	10.418 7	3.125 6
酸性红 73	y=88.50x+554.74	1.312 0~1 312.00	0.994 8	1.131 0	0.339 3
柠檬黄	y=1.11x+10.17	124.480 0~2 824.00	0.983 2	68.401 0	20.520 3
偶氮玉红	y=4.569 3x+36.97	6.300 0~630.00	0.964 8	13.695 7	4.108 7
诱惑红	y=27.22x+220.88	1.035 8~517.92	0.996 4	1.670 7	0.501 2
金橙 II	y=450.41x+4 019.47	0.552 0~1 104.00	0.909 0	0.238 0	0.071 4
日落黄	y=25.47x+141.30	5.046 3~2 018.52	0.996 2	3.973 3	1.192 0
赤藓红	y=258.46x+888.68	5.046 3~2 018.52	0.997 6	1.064 7	0.319 4
金橙 G	y=63.14x+253.58	1.079 5~2 159.00	0.990 0	1.285 0	0.385 5

2.4 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 并按“2.1”项下试验条件进样测定, 当信噪比为 10:1 时, 得定量限; 当信噪比为 3:1 时, 得检测限, 详见表 3。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 丽春红、酸性红 73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙 II、日落黄、赤藓红和金橙 G 峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.1%、2.4%、1.3%、1.8%、1.6%、1.2%、1.5%、1.2% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液 (批号: 20150019) 适量, 分别于室温下放置 0、3、6、12、18、24 h 时按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果, 丽春红、酸性红 73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙 II、日落黄、赤藓红和金橙 G 峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.0%、1.5%、1.3%、1.2%、1.4%、1.3%、1.1%、1.2% (n=6), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品 (批号: 20150019) 适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果, 丽春红、酸性红 73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙 II、日落黄、赤藓红和金橙 G 峰面积的 RSD 分别为 2.2%、1.1%、1.5%、1.3%、1.2%、1.8%、0.9%、1.2%、1.1% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

取已知含量样品(批号:20150019)适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表4。

表4 回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	加入量,ng	平均测得量,ng	回收率范围,%	平均回收率,%	RSD,%
丽春红	500.0	472.5	93.0~96.7	94.5	1.5
酸性红73	500.0	491.0	97.4~99.1	98.2	0.7
柠檬黄	500.0	465.5	91.4~96.8	93.1	2.2
偶氮玉红	500.0	463.0	91.2~94.9	92.6	1.6
诱惑红	500.0	486.0	96.1~98.4	97.2	0.9
金橙Ⅱ	500.0	481.5	94.6~98.0	96.3	1.2
日落黄	500.0	477.0	93.7~96.7	95.4	1.1
赤藓红	500.0	476.0	94.3~96.1	95.2	0.7
金橙G	500.0	485.5	96.5~98.4	97.1	1.2

2.9 样品中染色物的检测

取17批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表5(表中“ND”为未检测出)。

表5 样品检测结果(n=3)

Tab 5 Results of samples test(n=3)

样品批号	丽春红	酸性红73	柠檬黄	偶氮玉红	诱惑红	金橙Ⅱ	日落黄	赤藓红	金橙G
20150007	ND	ND	ND	ND	ND	296.16	ND	ND	ND
20150009	ND	364.21	412.61	15.48	ND	ND	130.14	ND	ND
20150010	ND	ND	4 888.89	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20150019	ND	353.76	1 298.05	2.64	ND	ND	805.38	ND	ND
20150020	ND	617.01	3 328.56	ND	ND	ND	1 880.94	ND	ND
20150022	ND	ND	339.92	ND	ND	ND	399.76	ND	ND
20150024	ND	ND	1 303.56	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20150029	ND	ND	2 129.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20150039	ND	ND	ND	ND	ND	1.69	ND	ND	ND
20150043	ND	298.09	1 117.04	ND	ND	ND	383.61	ND	ND
20150045	ND	ND	6 850.71	ND	ND	ND	143.14	ND	ND
20150047	ND	565.07	1 093.23	30.07	ND	ND	ND	ND	ND
20150069	ND	ND	1 119.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20150070	ND	150.16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20150071	ND	342.64	5 679.67	ND	ND	ND	1 202.14	ND	ND
20150072	ND	364.19	13 339.29	ND	ND	ND	2 527.40	ND	ND
20150085	ND	ND	3 306.99	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3 讨论

本研究测定的9种目标物均为红花药材中常用的染色剂,根据其性质和分子结果,可知在负离子扫描模式下灵敏度最高。选择电喷雾离子源为电离模式,对质谱条件进行优化,确定分子离子峰,在此基础上,选择出峰

度最大的2个子离子作为定量和定性离子,确定最佳碰撞能量,以获得最大灵敏度。

根据本试验结果,目前红花药材中确实存在非法染色问题。本次检出2种以上染料染色的红花药材有9批,可见红花药材染色问题相当突出,且染料种类繁多,呈现多样化、复杂化趋势。

综上所述,本研究确立了红花药材中丽春红、酸性红73、柠檬黄、偶氮玉红、诱惑红、金橙Ⅱ、日落黄、赤藓红和金橙G的检测方法。结果表明,17批次药材样品中存在不同程度金橙Ⅱ、酸性红73、柠檬黄、偶氮玉红、日落黄5种非法染色物。该研究本方法专属性强、灵敏度高、简便快捷,适用于红花药材中9种非法染色物的同时检测。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:151.

[2] 闵春艳,付凌燕,汪祺,等.红花药材掺伪染色检测方法的实验研究[J].中国药事,2011,25(8):772-775.

[3] 杨建龙,曲艳丽,徐彤彤,等.HPLC-MS/MS法测定风湿关节炎片中松香酸的含量[J].中国药房,2015,26(25):4299-4301.

[4] 肖海龙,屠海云,王红青,等.反相高效液相色谱法快速测定食品中18种水溶性合成着色剂[J].中国卫生检验杂志,2011,21(2):264-266.

[5] 田华,贾继民,阿布力米提·伊力.红花等3种中药中砷、汞、铅含量的分析研究[J].中国卫生检验杂志,2012,22(8):1746-1747.

[6] 国家食品药品监管总局.食品安全国家标准:食品添加剂:酸性红(偶氮玉红)[S].GB 28309-2012.

[7] 栾洁,倪艳娜,丁晴.红花饮片染色掺伪品的检测方法探讨[J].安徽医药,2012,16(7):917-919.

[8] 胡晓炜.超高效液相色谱法检测西红花中非法添加的染料金橙Ⅱ[J].中国药业,2011,20(14):40-41.

[9] 蒋磊,孟祥松,姬凤娟.HPLC-DAD法检测女宝胶囊中的微量金橙Ⅱ[J].安徽医药,2011,15(4):437-439.

[10] 张晓霞,娜仁.红花药材质量分析[J].中国药事,2012,26(4):392-394.

(收稿日期:2016-10-04 修回日期:2017-03-13)
(编辑:张 静)