

# UPLC/MS/MS 法定性定量测定中药材中 3 类 27 种合成色素

张 甦 胡 青 孙 健 冯 睿 于 泓 季 申

(上海市食品药品检验所, 上海, 201203)

**摘要** 目的: 采用液相-固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱联用技术对 27 种色素建立了准确、灵敏的分析方法。方法: 针对脂溶性、酸性和碱性 3 类色素分别采用不同的制备方法、色谱条件和电喷雾极性, 采用 4 种不同药用部位的代表性药材进行了方法学考察。结果: 表明方法线性关系良好( $r \geq 0.997$ ); 脂溶性和碱性色素的检测限为 0.03 ~ 3.87 ng/g, 酸性色素为 0.003 ~ 1.94  $\mu\text{g/g}$ ; 准确度和精密度分别为 70% ~ 105% 和 0.9% ~ 6.8%; 应用于 25 个品种 80 批样品的筛查。结论: 所建方法可靠、高效、准确, 适用于中药材复杂基质中不同种类色素的测定。

**关键词** 27 种; 合成色素; 脂溶性; 酸性; 碱性; 定性定量; 中药材; UPLC/MS/MS

## Qualitative and Quantitative Determination of 27 Synthetic Dyes of 3 Species in Herbs by UPLC/MS/MS

Zhang Su<sup>1,2</sup>, Hu Qing<sup>1</sup>, Sun Jian<sup>1</sup>, Feng Rui<sup>1</sup>, Yu Hong<sup>1</sup>, Ji Shen<sup>1</sup>

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract Objective:** To develop a sensitive and accurate method combining liquid and solid phase extraction with ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to analyze 27 dyes. **Methods:** Different preparations, chromatography conditions and polarity of ESI were applied for 3 categories of lipophilic, acidic and basic dyes respectively. Four species of herbs representing different parts of plant were selected for methodology observation. **Results:** The linear correlation coefficient was good ( $r \geq 0.997$ ). The LODs of oil soluble and basic dyes were 0.03 ~ 3.87 ng/g and acid dyes were 0.003 ~ 1.94  $\mu\text{g/g}$  respectively. The accuracies and precisions were 70% ~ 105% and 0.9% ~ 6.8% respectively. **Conclusion:** After detecting 80 samples of 25 species herbs, this method proved to be reliable, efficient and accurate in the detection of different kinds of dyes in the complex matrix of herbs.

**Key Words** 27 kinds; Artificial dyes; Lipophilic, Acidity; Basicity; Qualitative and quantitative determination; Herbs; UPLC/MS/MS

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.007

中药主要为天然产物, 随着社会发展, 人们对身体健康愈加重视, 市场对中药的需求不断增加, 价格也水涨船高。由于当前中药生产、经营秩序尚未完全规范, 社会诚信体系缺失, 监管无法涉及所有环节, 中药染色、以劣充好等违法违规行为仍屡禁不止<sup>[1-3]</sup>。这些违法行为严重危害人民身体健康和生命安全、影响中医中药的声誉和中医药事业的健康发展。特别是合成色素的添加, 其特征的偶氮基团(-N=N-)结构, 易被肠道菌群还原形成芳香胺类化合物<sup>[4]</sup>, 可引起神经毒性<sup>[5]</sup>、基因毒性<sup>[6]</sup>以及致癌性<sup>[7]</sup>。

目前, 合成色素的分析方法包括薄层色谱法(TLC)<sup>[8]</sup>、毛细管电泳法(CE)<sup>[9]</sup>、离子色谱法<sup>[10]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[11-12]</sup>、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[13-14]</sup>、液相色谱-四极杆飞行时间质谱法<sup>[15-16]</sup>等。本实验室已建立了快速检测的薄层色

谱法, 粗略定量和定性的高效液相色谱法<sup>[17]</sup>以及用于定性的UHPLC-Q-TOF法<sup>[18]</sup>。这些方法可在不同水平的实验室用于不同处理过程的色素测定。本文重点阐述利用UPLC/MS/MS对色素同时进行定量和定性分析。对3组色素的流动相和质谱条件进行优化, 为体现不同基质的复杂性, 选用4种不同药用部位的代表性药材进行了方法学考察。应用该方法对25个品种80批样品进行了测定, 结果表明该方法灵敏、准确, 适用于中药材基质中染色色素的测定。

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术(UPLC/MS/MS), 在正、负离子2种采集模式下, 对复杂中药基质中的目标化合物进行了鉴定。Waters ACQUITY UPLC I-Class (Milford, Massachusetts, USA)由二元泵(BSM)、进样器(SM-FTN)和柱温箱(CM-A)组成, 配有AB Sciex API 4000 MS/MS系统

基金项目: 中国药典 2015 年版标准提高方法研究项目(中药中常用色素检测方法的研究); 上海市科委技术服务平台(18DZ2292200)

作者简介: 张甦(1980.04—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 中药安全性, E-mail: zhangsu09y@163.com

通信作者: 季申(1963.08—), 女, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究, E-mail: jishen2013@163.com

( Framingham, Massachusetts, USA ), 采用 Analyst 1.6.1 软件进行数据采集和处理。

1.2 试剂 根据溶解性和酸碱性将色素对照试剂分为3组。见表2。对照试剂的生产厂家包括 Sigma-Aldrich ( St. Louis, MO, USA ), Dr. Ehrenstorfer GmbH ( Augsburg, German ), Fluca ( Buchs, Switzerland ) and 和 NIFDC ( 中国国家食品药品监督管理局, 北京)。在标签或分析证书上显示对照试剂纯度均超过80%。提取用甲酸、氨水、乙腈、甲醇为分析级试剂, 购自国药控股化学试剂有限公司(上海)。质谱流动相包括甲酸铵, 甲酸和乙腈是 LC/MS 级, 购自默克公司( KGaA, Darmstadt, Germany )。

1.3 分析样品 选取了25种不同颜色的中药材作为样本, 包括花、茎、根和果实等植物的典型部位。均为市售, 包括山茱萸, 黄连, 丹参, 槐米, 大黄, 制何首乌, 乌梅, 酸枣仁, 醋延胡索, 关黄柏, 鸡血藤, 片姜黄, 黄芩, 茜草, 苏木, 五味子, 生蒲黄, 红花, 番泻叶, 枸杞子, 花椒, 青黛, 人工牛黄, 松花粉, 月季花, 南五味子。上述前4种中药材分别作为果实、根、茎、花的代表进行方法学验证。以上均由上海华宇中药材有限公司(中国上海)提供。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱采用 Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> column ( 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm, Agilent, Palo Alto, CA, USA )。柱温: 40 °C。正离子扫描模式下, 流动相为 0.1% 甲酸/20 mmol/L 乙酸铵溶液(A)-乙腈(B); 负离子扫描模式下, 流动相为 2 mmol/L 乙酸铵溶液(A)溶液-乙腈(B), 梯度洗脱程序见表1。流速: 0.4 mL/min, 进样体积: 1 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

脂溶性色素		碱性色素		酸性色素	
时间(min)	B(%)	时间(min)	B(%)	时间(min)	B(%)
0	40	0	40	0	5
2	50	5	60	2	5
5	98	8	95	2.5	15
15	98	12	95	7	25
15.5	40	13	40	15	30
20	40	18	40	22	95
				25	95
				26	5
				32	5

2.2 质谱条件 采用 MRM 监测脂溶性色素和水溶性碱性色素洗脱液电离后的阳离子, 水溶性酸性色素的电离后产生的阴离子。Q1 和 Q3 质量分析器的质量选择以单位分辨率为基准。设定一个子离子用

于定量, 另一个用于定性。采用氮气作为离子源气体1、离子源气体2、气帘气、碰撞气, 流速分别控制在 65、60、30、6 psi。电喷雾电压正离子模式为 5 500 V, 负离子模式为 -4 500 V。离子源温度: 600 °C。利用 27 种色素的对照试剂溶液采用流注分析法(FIA)分别对去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和代表性子离子进行优化, 其优化值见表2。

2.3 供试品溶液 根据色素的基本结构, 对不同色素采用不同的提取和制备方法, 以确保色素的纯化效率。

脂溶性色素: 取药材粗粉 1 g, 加乙腈 25 mL, 超声处理 30 min, 离心, 取上清液作为供试品溶液。

水溶性碱性色素: 取药材粗粉 1 g, 加 0.1% 甲酸甲醇溶液 25 mL, 超声处理 30 min, 离心, 取上清液 5 mL, 快速通过聚酰胺小柱(1 g, 内径为 1 cm, 依次用甲醇 3 mL 和 0.1% 甲酸溶液 3 mL 预洗), 流速约每分钟 5 mL/min, 用 60% (v/v) 甲醇/水溶液(含 0.1% 甲酸) 5.0 mL 以低于 5.0 mL/min 的流速洗脱。洗脱液离心并用 0.22 μm 滤膜过滤, 作为供试品溶液。

水溶性酸性色素: 除提取液(60% (v/v) 甲醇/0.1% 甲酸)为溶剂外, 处理过程与碱性色素提取相同。洗脱溶液更改为 8 mL 甲醇-氨水-水(v/v, 7:2:1)。洗脱液加入 2 mL 的 25% 甲酸溶液震荡, 离心过滤通过 0.22 μm 滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.4 对照试剂溶液 合成色素分成 3 组(O, B 和 A), 配制浓度约为 500 μg/mL 的对照试剂储备液。脂溶性组用乙腈溶解, 其他 2 个水溶性组分别用水溶解。储备液均保存于 -4 °C, 根据需要稀释至不同浓度。

2.5 色素的选择和分组 食品中允许适当使用色素, 因此色素的限制重点在禁用的种类和过量使用。但中药材中的色素情况却不同。滥用色素的目的是冒充正品或以次充好, 导致中药材伪品质量差, 影响药效, 甚至对人体有害。因此中药材中不允许添加色素。

本研究主要针对合成色素, 包括报告公布的中药材中已检出色素(金胺 O, 亮蓝等), 在食品基质中报道过的禁用色素(苏丹系列和罗丹明 B 等), 以及在食品中应用的普通色素(苋菜红, 柠檬黄等)。选取了覆盖不同色系和不同性质色素, 以扩大方法的适用范围。由于所选色素性质不同, 我们将其分为脂溶性、水溶性碱性和水溶性酸性 3 类。为了最大限度地提高提取和纯化效率, 对 3 组色素采用不同的前处理方案。

表 2 27 种色素对照试剂分组、代号、名称、分子式、CAS 号、C. I. 号、优化参数及碎片离子

组别	色素代号	色素名称	分子式	CAS 号	C. I. 号	对照品溯源	保留时间 (min)	定量离子对	定量离子对	去簇电压 (V)	碰撞电压 (V)	
oil-soluble dyes	O1	Disperse red 9 分散红 9	$C_{15}H_{11}NO_2$	82-38-2	60505	Sigma	5.34	238.2→223.1	238.2→223.1 238.2→165.1	100	33 38.5	
	O2	Sudan Red G 苏丹红 G	$C_{17}H_{14}N_2O_2$	1229-55-6	12150	Dr. E	6.15	279.1→123.1	279.1→123.1 279.1→108.1	46	23 47	
	O3	Sudan I 苏丹红 I	$C_{16}H_{12}N_2O$	842-07-9	12055	Sigma	6.29	249.1→93.0	249.1→93.0 249.1→156.1	46	33 21	
	O4	808 Scarlet 808 猩红	$C_{23}H_{17}N_3O_2$	6410-26-0	12300	NIFDC	7.08	368.2→275.1	368.2→275.1 368.2→219.1	113	25 47	
	O5	Sudan II 苏丹红 II	$C_{18}H_{16}N_2O$	3118-97-6	12140	Sigma	7.24	277.1→121.1	277.1→121.1 277.1→106.1	46	25 55	
	O6	Sudan III 苏丹红 III	$C_{22}H_{16}N_4O$	85-86-9	26100	Sigma	8.01	353.1→197.1	353.1→197.1 353.1→128.1	71	27 51	
	O7	Sudan IV 苏丹红 IV	$C_{24}H_{20}N_4O$	85-83-6	26105	Sigma	9.94	381.1→224.1	381.1→224.1 381.1→225.1	71	31 25	
water-soluble basic dyes	B1	Auramine O 金胺 O	$C_{17}H_{22}ClN_3$	2465-27-2	41000	Sigma	2.21	267.9→147.1	267.9→147.1 267.9→252.2	90	39.5 44.5	
	B2	New Fuchsin 新品红	$C_{22}H_{23}N_3HCl$	3248-91-7	42520	Sigma	2.28	330→223.3	330.0→223.3 330.0→300.3	120	46 52	
	B3	Rhodamine B 罗丹明 B	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	81-88-9	45170	Sigma	5.01	443.2→399.2	443.2→399.2 443.2→355.2	106	49 69	
	B4	Malachite Green 孔雀石绿	$C_{23}H_{25}N_2$	569-64-2	42000	Dr. E	3.97	329.3→313.2	329.3→313.2 329.3→208.0	101	53 46	
	A1	Tartrazine 柠檬黄	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	1934-21-0	19140	Sigma	1.89	232.8→211.0	232.8→211.0 232.8→197.8	-45	-10.5 -20	
	A2	Acid Red 27 苋菜红	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	915-67-3	16185	Sigma	3.35	268.0→228.1	268.0→228.1 268.0→220.8	-95	-21 -26	
	A3	Acid Red 18 酸性红 18	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	2611-82-7	16255	Dr. E	3.93	268.0→301.7	268.0→301.7 268.0→206.0	-60	-17.5 -18.5	
	A4	Sunset Yellow 日落黄	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	2783-94-0	15985	Sigma	4.24	203.1→170.9	203.1→170.9 203.1→206.9	-65	-19 -20	
	A5	Orange G 酸性橙 10	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	1936-15-8	16230	Sigma	4.61	203.0→150.4	203.0→150.4 203.0→189.1	-62	-12 -8	
	A6	Allura Red AC 诱惑红	$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$	25956-17-6	16035	Sigma	4.85	225.0→207.0	225.0→207.0 225.0→199.8	-75	-22 -23	
	A7	Green S 羊毛绿	$C_{27}H_{25}N_2NaO_7S_2$	3087-16-9	44090	Dr. E	8.06	553.2→510.9	553.2→510.9 553.2→496.1	-126	-40 -51	
	A8	Eosin 曙红	$C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$	17372-87-1	45380	Sigma	8.17	647.0→520.8	647.0→520.8 647.0→522.7	-105	-38 -40	
	water-soluble acid dyes	A9	Brilliant Yellow 亮黄	$C_{26}H_{18}N_4Na_2O_8S_2$	3051/11/4	24890	Sigma	8.21	289.0→236.0	289.0→236.0 289.0→249.0	-100	-20 -21.5
		A10	Brilliant Blue 亮蓝	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	3844-45-9	42090	Sigma	8.41	373.3→169.9	373.3→169.9 373.3→333.2	-86	-45 -24.5
		A11	Orange I 金橙 I	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$	523-44-4	14600	Sigma	8.75	327.1→170.8	327.1→170.8 327.1→247.0	-83	-30.5 -30.5
		A12	Acid Red 73 酸性红 73	$C_{22}H_{14}N_4Na_2O_7S_2$	5413-75-2	27290	NIFDC	11.28	255.2→150.5	255.2→150.5 255.2→240.8	-65	-17 -11
A13		Erythrosin B 赤藓红	$C_{20}H_6I_4Na_2O_5$	16423-68-0	45430	Sigma	11.31	834.8→536.8	834.8→536.8 834.8→662.8	-110	-51.5 -51.5	
A14		Naphthol Blue Black 酸性黑 I	$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$	1064-48-8	20470	Sigma	12.19	285.4→164.0	285.4→164.0 285.4→218.6	-75	-23.5 -18	
A15		Orange II 金橙 II	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$	633-96-5	15510	fluca	13.64	326.7→170.8	326.7→170.8 326.7→155.7	-85	-35 -45.5	
A16		Brilliant Blue G 亮蓝 G	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	6104-58-1	42655	Sigma	18.64	830.4→170.0	830.4→170.0 830.4→644.1	-160	-94 -64.5	

2.6 色素的提取 由于色素的溶解性和酸碱性的存在差异,因此选用不同的溶剂提取色素。对脂溶性色素通过比较环己烷和乙腈的影响,最终选择乙腈作为提取溶剂。对于水溶性色素,含 0.1% 甲酸的

甲醇溶液有助于提取。对于酸性色素,考察了不同比例的甲醇-0.1% 甲酸溶液。最终,60% (v/v) 甲醇/水溶液(含 0.1% 甲酸)效果最好。具体内容已在我们的之前的研究中有讨论<sup>[17-18]</sup>。



图1 27种色素的UPLC-ESI-MS/MS图谱

作为中药材的草本植物通常是干燥的,这与食品基质有很大不同。一旦药材被染色,带有静电荷的分子会强烈吸附在药材纤维上,使得提取非常困难。为了最大限度地提取色素而非提取中药材中的

成分,与振摇、索氏提取和加热回流进行比较后,选择超声处理方式。

2.7 色素的纯化 由于中药材中色素检测方法报道很少,参考食品中色素的不同纯化方法。在多数情况下,制备方法会根据目标色素的性质进行调整,如氧化铝、大孔树脂、HLB<sup>[14]</sup>、聚酰胺<sup>[11]</sup>、离子交换SPE<sup>[15,20-21]</sup>。其中,由于酰胺基与色素的偶氮结构之间存在氢键相互作用,聚酰胺对碱性色素和酸性色素的净化均有良好的作用。

本文采用商品化的聚酰胺固相萃取小柱,简化操作步骤,提高结果重复性。对碱性色素和酸性色素洗脱液 pH 值进行考察。通过对填料规格、洗脱溶液比例和洗脱溶剂体积进行优化,最终测定条件如 2.3 所述。

2.8 流动相优化 由于脂溶性色素中偶氮键的存在以及碱性色素中季铵盐的存在,含 0.1% 甲酸的流动相可增强正离子的响应,同时加入乙酸铵后峰形得到改善。流动相不仅在分离方面表现良好,而且对这些化合物的响应也表现良好。但酸性色素不是这样。由于酸性色素含有硫酸根,缓冲盐浓度越高,对峰响应的抑制作用越大。当乙酸铵浓度降低到 2 mmol/L 时,响应增加了约 50 倍,并且对分离效果和峰形没有干扰。见图 1。

2.9 母离子和子离子的选择 所有质谱参数均利用色素对照试剂溶液流注法进行优化。我们选择一个响应强的子离子作为 MRM 模式的定量离子,另一个作为定性离子。但对于某些酸性色素(亮蓝色

和亮黄色),由于含有对称结构和硫酸根导致<sup>[M-H]</sup>2-稳定存在,而不是[M-H]<sup>-</sup>。所以我们选择<sup>[M-H]</sup>2-作为母离子,及其子离子作为配对离子。

## 2.10 方法验证

以丹参、山茱萸、槐米、黄连分别代表的果、根、茎、花不同药用部位进行方法学研究。

2.10.1 线性关系 线性关系中脂溶性和碱性色素对照试剂浓度分别为 0.05、0.1、1、10、50 ng/mL,酸性色素浓度分别为 0.005、0.01、0.1、1 和 5 μg/mL。以各色素的峰面积对浓度进行线性回归,并通过计算相关系数,对线性回归方程进行评价。各相关系数均大于 0.997,说明该方法线性关系良好。结果见表 3。

2.10.2 检测限 分别在 4 个样品中加入线性标准中最低浓度的对照试剂溶液测定检测限。以各色素 3 倍的信噪比(S/N)作为检测限(LOD),脂溶性和碱性色素检测限范围分别为 0.03 ~ 3.87 ng/g 和 0.003 ~ 1.94 μg/g。由此明显可以看出负模式的响应比正模式低 10 ~ 100 倍。结果见表 3。

2.10.3 稳定性 通过对同一批山茱萸样品在 24 h 内每隔 4 h 测定一次,进行稳定性分析。采用相对标准偏差(%RSD)作为稳定性指标。不同时间色素的峰面积经比较差异较小,在 1.2% ~ 4.9% 之间,说明样品在测定条件下是稳定的。见表 3。

2.10.4 准确度和精密度 通过测定加入 4 种药材中的对照试剂含量考察方法准确度。添加 3 个浓度水平的对照试剂计算平均回收率。结果表明分析方

表 3 27 种色素的线性、检测限和稳定性

色素名称	线性范围 (ng)	脂溶性和碱性色素				稳定性 RSD(%)	色素名称	线性范围 (ng)	酸性色素				稳定性 RSD(%)		
		r	检测限(ng/g)						r	检测限(μg/g)					
			I	II	III	IV			I	II	III	IV			
分散红 9	0.05 ~ 50	0.999 9	0.12	0.21	0.05	0.20	4.7	柠檬黄	100 ~ 5 000	0.991 1	0.06	0.22	0.19	0.47	3.0
苏丹红 G	0.05 ~ 50	0.998 5	0.05	0.18	0.06	0.03	4.7	苋菜红	100 ~ 5 000	0.999 4	0.08	0.49	1.15	1.82	3.8
苏丹红 G	0.05 ~ 50	1.000 0	0.69	0.65	0.29	0.46	4.4	酸性红 18	100 ~ 5 000	0.999 6	0.25	0.16	0.35	1.94	3.7
808 猩红	0.05 ~ 50	1.000 0	0.08	0.06	0.06	0.06	1.4	日落黄	5 ~ 5 000	0.999 4	0.17	0.19	0.17	0.35	4.3
苏丹红 II	0.05 ~ 50	0.997 4	0.10	0.06	0.32	0.52	1.7	酸性橙 10	5 ~ 5 000	0.999 6	0.01	0.01	0.02	0.04	2.0
苏丹红 III	0.05 ~ 50	0.999 5	0.61	0.96	0.55	0.57	1.9	诱惑红	5 ~ 5 000	0.999 0	0.06	0.09	0.08	0.12	4.9
苏丹红 IV	0.05 ~ 50	0.998 9	0.20	0.37	0.27	0.53	2.1	羊毛绿	5 ~ 5 000	0.999 6	0.02	0.02	0.04	0.09	3.1
金胺 O	0.05 ~ 50	0.998 9	0.32	1.92	0.30	1.15	1.2	曙红	5 ~ 5 000	0.999 8	0.04	0.01	0.03	0.22	3.3
新品红	0.05 ~ 50	0.999 9	0.15	1.04	0.57	0.60	1.3	亮黄	5 ~ 5 000	0.999 7	0.17	0.12	0.04	0.24	1.2
罗丹明 B	0.05 ~ 50	0.999 8	0.07	0.47	0.09	0.19	2.2	亮蓝	5 ~ 5 000	0.998 0	0.20	0.01	0.01	0.01	4.3
孔雀石绿	0.05 ~ 50	1.000 0	0.30	3.87	0.20	0.73	2.4	金橙 I	5 ~ 5 000	0.998 8	0.82	0.07	0.01	0.07	2.0
								酸性红 73	5 ~ 5 000	0.999 9	0.04	0.01	0.01	0.04	4.4
								赤藓红	5 ~ 5 000	0.999 9	0.09	0.02	0.05	0.10	4.7
								酸性黑 I	5 ~ 5 000	0.999 9	0.04	0.04	0.19	0.90	2.1
								金橙 II	5 ~ 5 000	0.999 9	0.22	0.01	0.03	0.07	4.1
								亮蓝 G	100 ~ 5 000	0.999 5	0.01	0.01	0.04	0.003	4.1

法准确度较好,回收率在 70.0% ~ 105% 之间(表 4)。日落黄和羊毛绿结果均不佳,尤其是在槐花中。按照该方法对同一样品重复进样 6 次验证方法精密度。

表 4 4 种中药材的回收率和精密度结果

色素代号	色素名称	平均回收率(%)				精密度(RSD,%)			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
O1	分散红 9	86.1	83.4	89.6	84.9	2.1	3.2	1.2	2.8
O2	苏丹红 G	86.7	83.4	86.9	81.8	1.2	1.8	2.1	2.8
O3	苏丹红 G	90.9	81.1	90.8	85.8	1.8	2.0	2.7	2.8
O4	808 猩红	94.0	81.2	83.8	82.4	1.2	2.0	3.0	1.2
O5	苏丹红 II	97.3	69.7	73.0	69.9	0.9	2.8	3.5	3.2
O6	苏丹红 III	91.5	78.4	74.6	78.5	1.2	3.4	4.3	4.7
O7	苏丹红 IV	90.1	88.1	81.3	82.1	3.3	2.9	2.2	4.0
B1	金胺 O	83.9	101.4	91.9	92.0	2.2	1.1	2.5	2.1
B2	新品红	102.0	102.4	95.3	90.5	2.2	1.4	2.0	1.7
B4	罗丹明 B	79.3	82.8	87.0	89.8	2.9	2.3	2.2	1.0
B3	孔雀石绿	85.0	97.0	94.8	92.9	1.4	1.2	2.0	1.2
A1	柠檬黄	73.1	69.4	74.7	70.5	5.0	4.5	4.0	6.8
A2	苋菜红	92.5	88.0	97.2	87.0	4.8	2.8	1.5	1.3
A3	酸性红 18	90.6	84.6	78.2	83.8	2.1	1.7	4.5	3.1
A4	日落黄	71.4	72.9	57.2	74.6	3.1	3.3	3.2	3.0
A5	酸性橙 10	96.8	104.9	95.2	92.6	2.6	3.0	3.9	1.0
A6	诱惑红	90.9	75.3	85.4	90.2	2.3	2.8	3.9	2.5
A7	羊毛绿	68.5	66.9	49.1	75.6	5.0	2.8	6.5	3.4
A8	曙红	108.2	95.2	90.5	85.6	2.5	2.4	3.1	1.6
A9	亮黄	101.6	91.9	84.9	67.1	2.1	3.8	3.1	3.5
A10	亮蓝	92.5	95.1	84.0	92.9	1.1	2.8	5.9	2.1
A11	金橙 I	91.5	101.0	94.3	88.4	1.7	1.3	2.9	4.2
A12	酸性红 73	104.3	99.2	98.0	91.8	1.9	2.8	1.8	1.2
A13	赤藓红	100.0	105.3	93.3	85.1	1.5	1.6	1.2	3.3
A14	酸性黑 I	110.2	90.4	97.1	66.1	1.6	3.6	3.2	4.2
A15	金橙 II	101.1	104.4	98.9	93.2	3.2	1.3	3.2	1.4
A16	亮蓝 G	85.1	97.8	91.1	78.2	1.2	1.4	2.7	4.1

表 5 样品分析结果

药材名称	阳性/总样品量	检出色素
生蒲黄	1/4	金胺 O
大黄	1/3	金胺 O
延胡索	2/9	金胺 O
何首乌	1/5	亮蓝 G
丹参	1/3	金橙 II
乌梅	1/3	亮蓝 G
红花	4/5	金橙 II, 酸性红 73, 酸性红 18, 金胺 O
另 18 种药材	0/48	-

2.11 应用 从市场中随机购买 25 个品种 80 批中药材。其中,11 个样品中检出非法添加色素,检出率高达 13.8%。金胺 O 是一种高频检出色素,常见于大黄、大黄、红花等黄色和红色中药材。金橙 II 和酸性红 18 或 73 是另外 2 种常用色素,常见于丹参、红花等红色中药材。在一批红花样品中同时检出了 4 种色素。亮蓝 FCF 和 G 是在制何首乌、乌梅

等黑色中药材中首次报道发现的色素。根据表 5 所示的结果,中药材中染色色素应引起更多关注。

### 3 总结

通过聚酰胺固相萃取柱纯化和 UPLC-MS/MS 相结合建立了中药材中的 27 种色素准确、灵敏的筛查方法。本方法结果可靠,重现性好,检测限符合要求,分析时间短,可用于颜料类的常规分析。与食品基质不同的,中药材自身干燥,成分复杂,给方法的建立造成一定困难。本方法首次应用于中药材中的非法添加色素,结果应引起更广泛的重视。未来的研究将报道进一步改进后的制备方法和检测技术。

### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 总局关于中药材及饮片专项抽检结果的通告(2017 年第 5 号)[EB/OL]. 2017-01-12(2017-03-22) http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1872/168503.html.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 总局关于 54 批中药饮片不合格的通告(2017 年第 21 号)[EB/OL]. 2017-02-09(2017-03-22) http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1872/169415.html.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 总局关于 23 批次中药饮片不合格的通告(2017 年第 33 号)[EB/OL]. 2017-02-23(2017-03-22) http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1872/169865.html.
- [4] Rafii F, Hall JD, Cerniglia CE. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract[J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35 :897-901.
- [5] Nagaraja TN, Desiraju T. Effects of chronic consumption of metanil yellow by developing and adult rats on brain regional levels of norepinephrine, dopamine and serotonin, on acetylcholine esterase activity and on operant conditioning[J]. Food and Chemical Toxicology, 1993, 31:41-44.
- [6] Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, Christodoulou P, Kareli D, Polilou S. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48 :2934-2944.
- [7] Golka K, Kopps S, Myslak ZW. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability [J]. Toxicology Letters, 2004, 151:203-210.
- [8] Gerasimov AV. Use of computers for processing thin-layer chromatograms based on an example of red food dyes[J]. Vopr Pitan, 2000, 69 (1-2):63-65.
- [9] Markéta R, Petr T, Patrik V, Pavel K, Jan P. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1141 :206-211.
- [10] Chen QC, Mou SF, Hou XP, Riviello JM, Ni ZM. Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography [J]. Journal of Chromatography A. 1998, 827: 73-81.
- [11] 刘敏, 李小林, 别玮, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定调味品中 15 种工业合成染料 [J]. 色谱, 2011, 29(2):162-167.

用水超声溶解后,加入等体积预冷的 20% 三氯乙酸低温沉淀蛋白,用预冷丙酮洗涤沉淀,从而获得蛋白提取物,酶解后进样分析,发现质谱响应明显提高。

参考文献

[1] Wu HZ, Ren CY, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from Colla Corii Asini [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 182 (8) :129-136.

[2] Liu M, Tan H, Zhang X, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang ejiao jiang on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152 (3) :575-584.

[3] 王璐, 李祥雯, 侯燕. 蔗糖铁注射液与复方阿胶浆用于产后贫血治疗的大样本随机对照研究 [J]. *河北医药*, 2017, 39 (2) :242-246.

[4] Li Y, He H, Yang L, et al. Therapeutic effect of Colla corii asini on improving anemia and hemoglobin compositions in pregnant women with thalassemia [J]. *Int J Hematol*, 2016, 104 (5) :559-565.

[5] 张路, 朱海芳, 陈慧慧, 等. 复方阿胶浆对小鼠抗疲劳能力的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (19) :254-257.

[6] Shen LJ, Chen HL, Zhu QF, et al. Identification of bioactive ingredients with immuno-enhancement and anti-oxidative effects from Fufang-Ejiao-Syrup by LC-MS<sup>n</sup> combined with bioassays [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117 (1) :363-371.

[7] 山东东阿阿胶有限公司企业标准(Q/DT 0001S-2018) [S], 2018.

[8] 山东省食品药品监督管理局. 关于进一步加强阿胶糕类食品生产许可工作有关问题的通知 [Z]. 2014.

[9] 颜琳琪, 谢升谷, 李樱红, 等. 阿胶类保健食品中阿胶真实含量调查 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23 (15) :3122-3123.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:189.

[11] 国家食品药品监督管理总局药品补充检验方法和检验项目批准件(2012001) [Z]. 2013.

[12] 杭宝建, 田晨颖, 陈晓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定阿胶中马、牛、羊、猪、骆驼、鹿皮源成分 [J]. *色谱*, 2018, 4 (36) :408-412.

[13] Xue L, Feng S, Gong L, et al. Species-specific identification of collagen components in CollaCoriiAsini using a nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry proteomics approach [J]. *Inter J Nanom*, 2017, 12:4443-4454.

[14] 巩丽萍, 杭宝建, 迟连利, 等. 马皮特征肽的发现及其在阿胶中马皮源成分检测中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38 (2) :364-369.

[15] 巩丽萍, 石峰, 李雪, 等. 一种羊特征性多肽及其应用: 中国, CN106093244A [P]. 2016-11-09.

[16] 杭宝建, 邢晨, 由鹏飞, 等. 一种猪源性特征肽及其在猪皮和阿胶定性检测中的应用流程: 中国, CN106589114A [P]. 2017-04-26.

[17] Cheng X L, Wei F, Xiao X Y, et al. Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62 (2) :191-195.

[18] 龙国友, 李明华, 刘薇, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测阿胶补血颗粒中的阿胶 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36 (5) :826-829.

[19] 陈佳, 称显隆, 魏锋, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测复方阿胶浆中阿胶 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35 (2) :328-332.

[20] 董洪霜, 张静娴, 胡青, 等. 胶类中药质量控制研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49 (13) :3166-3173.

(2019-03-10 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 827 页)

[12] Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. *Talanta*, 2008, 74 (5) :1408-1413.

[13] 林维宣, 孙兴权, 赵雪蓉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测化妆品中 6 种禁用着色剂 [J]. *色谱*, 2012, 30 (5) :527-532.

[14] Feng F, Zhao Y, Yong W, Sun L, Jiang G, Chu X. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879 (20) :1813-1818.

[15] 张东雷, 汪丽娜, 陈小珍, 等. 超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱法测定肉制品中 10 种碱性染料 [J]. *色谱*, 2012, 30 (8) :770-776.

[16] 赵延胜, 杨敏莉, 张峰, 等. 液相色谱/四极杆-飞行时间质谱法筛查奶酪中 29 种禁用和限量合成色素 [J]. *色谱*, 2011, 29 (7) :631-636.

[17] Jian S, Rui F, Qing H, Hong Y, Su Z, Lin F, et al. Simultaneous de-

termination of sixteen synthetic acid pigments in medicinal Chinese herbs by polyamide SPE-HPLC [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2015, 37 :1031-1036.

[18] Hu Q, Sun J, Yu H, Zhang S, Feng R, Ji S. Qualitative analysis of 50 pigments in dyed herb by UHPLC/QTOF [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2016, 51 (15) :1316-1323.

[19] Li XQ, Zhang QH, Ma K, Li HM, Guo Z. Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 182 :316-326.

[20] 冯月超, 贾丽, 何亚荟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定粮食及肉制品中的 24 种工业染料 [J]. *色谱*, 2013, 31 (10) :1021-1027.

[21] 尹峰, 丁召伟, 杨志坚. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测香料中罗丹明 B [J]. *色谱*, 2012, 30 (7) :672-676.

(2019-03-10 收稿 责任编辑:徐颖)