

蒲黄中1种新染色掺假色素的确认及9种橙黄色色素的检测方法研究[△]

耿 昭^{1,2*}, 张燕飞¹, 苟 琰², 周 娟², 郭 力¹, 吴 强²(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川省食品药品检验检测院, 成都 611731)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1225-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.20

摘 要 目的: 确认蒲黄中1种新染色掺假色素, 并建立同时检测9种橙黄色色素的方法。方法: 采用薄层色谱法(TLC)和液相色谱-质谱联用法对新染色掺假色素进行确认; 采用TLC和高效液相色谱法(HPLC)检测9种橙黄色色素: 色谱柱为Welch AQ-C₁₈, 流动相为乙腈-0.05 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为432 nm(柠檬黄、皂黄、金橙O、碱性橙II)和484 nm(日落黄、酸性橙I、金橙II、橙G、碱性橙21), 柱温为35 ℃, 进样量为10 μL。结果: 金胺O、柠檬黄和新染色掺假色素TLC图斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰; 新染色掺假色素为皂黄。柠檬黄、日落黄、橙G、酸性橙I、金橙II、金胺O、皂黄、碱性橙21和碱性橙II的TLC图斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰; 检测限分别为0.30、0.20、0.33、0.16、0.19、0.19、0.31、0.26、0.30 mg/kg。结论: 本研究所建方法可快速准确地对蒲黄中染色掺假色素和橙黄色色素进行定性检测。

关键词 蒲黄; 色素; 薄层色谱法; 液相色谱-质谱联用法; 高效液相色谱法

Identification of a New Adulterated Dye and Study on Detection Method for 9 Orange-yellow Dyes in Typhae Pollen

GENG Zhao^{1,2}, ZHANG Yanfei¹, GOU Yan², ZHOU Juan², GUO Li¹, WU Qiang²(1.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To identify a new adulterated dye, and to establish simultaneous detection method for 9 orange-yellow dyes in Typhae Pollen. **METHODS:** TLC and LC-MS were used for the identification of the new adulterated dye; TLC and HPLC method were used for determining 9 orange-yellow dyes. The determination was performed on Welch AQ-C₁₈ column with mobile phase consisting of acetonitrile-0.05 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength were set at 432 nm (lemon yellow, metanil yellow, gold orange O, basic orange II) and 484 nm (sun-set yellow, acid orange I, gold orange II, orange G, basic orange 21). The column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μL. **RESULTS:** TLC spots of auramine O, lemon yellow and new adulterated dye were clear and well separated without interference from negative control; new adulterated dye was identified as metanil yellow. TLC spots of lemon yellow, sunset yellow, orange G, acid orange I, gold orange II, auramine O, metanil yellow, basic orange 21 and basic orange II were clear and well separated without interference from negative control. The limits of detection were 0.30, 0.20, 0.33, 0.16, 0.19, 0.19, 0.31, 0.26, 0.30 mg/kg. **CONCLUSIONS:** The established method is able to detect adulterated dye and orange-yellow dye in Typhae Pollen rapidly and accurately.

KEYWORDS Typhae Pollen; Dye; TLC; LC-MS; HPLC

蒲黄为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L.、东方香蒲 *Typha orientalis Presl* 或同属植物的干燥花粉, 具有止血、化瘀、通淋的功效^[1]。近年来, 由于受到经济利益的驱使, 一些不法商贩将质量较差的蒲黄染色加工后以次充好高价出售, 还有用其植物非药用部位或淀粉甚至泥沙等染色后掺假的现象。患者如不慎使用了染色掺假的药材, 非但贻误病情无法达到预期治疗效果, 还会因染色掺假的物质造成不同程度的危害。尽管早

在2007年国家食品药品监督管理局已发布相关补充检验方法, 但染色蒲黄检出化工染料金胺O的现象仍时有报道^[2-4]。另外, 近年来还发现有使用柠檬黄进行染色的情况^[5]。对此, 本课题组从多地药材市场收集了26批蒲黄药材样品, 在对其进行检查过程中, 除了检出金胺O和柠檬黄外, 还发现1种未见报道的染色物质, 通过试验确定其为皂黄; 根据药材样品检出情况, 并考虑蒲黄的色泽和性质, 研究建立了蒲黄药材中柠檬黄、金胺O、皂黄、金橙II、日落黄、橙G、碱性橙II、碱性橙21、酸性橙I 9种已被检出或潜在可能用于染色的色素检测方法, 增加检测指标作为现有方法的有力补充, 以期加强对蒲

△ 基金项目: 国家科技重大专项课题(No.2014ZX09304307-002)

* 药师, 博士研究生。研究方向: 中药化学成分与中药药效物质基础。电话: 028-87877141。E-mail: gengzhao713@hotmail.com

黄药材的监督管理,从而保证大众用药安全。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪,包括DAD检测器(日本Shimadzu公司);1290-6540型液相色谱-质谱联用(LC-MS)仪(美国Agilent公司);KQ-1000E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz)。

1.2 试剂

柠檬黄对照品(批号:30117,纯度:90.0%)、金胺O对照品(批号:31203,纯度:90.0%)、皂黄对照品(批号:40728,纯度:99.0%)、日落黄对照品(批号:91229,纯度:90.0%)均购自德国Dr.Ehrenstorfer公司;橙G对照品(批号:130416,纯度:98.8%)、碱性橙II对照品(批号:131016,纯度:90.0%)、碱性橙21对照品(批号:150715,纯度:96.7%)、酸性橙I对照品(批号:130416,纯度:90.0%)均购自北京振翔科技有限公司;金橙II对照品(批号:111769-200701,供检测项使用)、蒲黄对照药材(批号:121225-201003)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈、乙酸铵为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

可疑蒲黄药材(26批)分别从安徽亳州、广西玉林、成都荷花池等中药材专业市场收集获得(见表1),经四川省食品药品检验检测院中药室黎跃成主任药师初步鉴别判断。

表1 蒲黄药材来源

Tab 1 The sources of Typhae Pollen

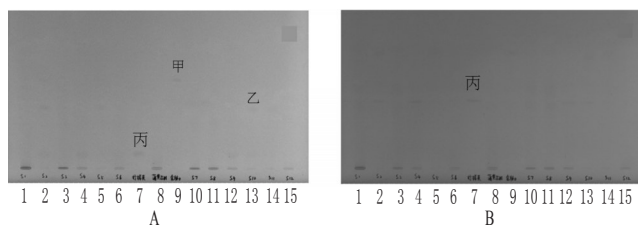
编号	收集/获得地点	编号	收集/获得地点	编号	收集/获得地点
1	广西玉林	10	成都荷花池	19	安徽亳州
2	成都荷花池	11	安徽亳州	20	安徽亳州
3	安徽亳州	12	安徽亳州	21	广西玉林
4	成都荷花池	13	安徽亳州	22	安徽亳州
5	广西玉林	14	成都荷花池	23	成都荷花池
6	安徽亳州	15	成都荷花池	24	成都荷花池
7	成都荷花池	16	成都荷花池	25	成都荷花池
8	广西玉林	17	广西玉林	26	成都荷花池
9	广西玉林	18	广西玉林		

2 染色色素的确认

2.1 薄层色谱(TLC)鉴别

取药材样品粉末2 g,加70%乙醇溶液10 mL,密塞,超声处理20 min,滤过,取滤液作为供试品溶液。取待测色素对照品适量,加70%乙醇溶液制成柠檬黄、金胺O质量浓度均为0.1 mg/mL的单一对照品溶液。取蒲黄对照药材粉末2 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-氨水(4:5:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,立即置日光下检视(见图1A)。结果表明,供试品色谱中,在与金胺O、柠

檬黄对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点(图1A中甲、丙),而对照药材(图1A中8)色谱相应的位置上,未显相同颜色的斑点,疑似检出金胺O和柠檬黄;同时在略低于金胺O斑点处可见另一橙黄色色素(图1A中乙)斑点,而对照药材(图中1A中8)色谱相应的位置上并未出现显相同颜色的斑点;此外,由于柠檬黄极性较大,采用上述展开剂导致其比较值较低(图1A中丙),为满足检视需要,参考相关文献^[6],以乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水(1:3:3:1:1, V/V/V/V/V)为展开剂对原薄层板进行二次展开,由于展开剂极性增大,此时斑点甲与斑点乙几乎重合不易分辨(见图1B)。通过两次TLC展开,初步判定所收集样品存在使用金胺O、柠檬黄和另一未知色素染色的情况,且样品中同时存在3种色素。



A.展开剂:二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-氨水;B.展开剂:乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水;1~6.供试品(编号:1~6);7.柠檬黄(图中丙);8.对照药材;9.金胺O(图中甲);10~15.供试品(编号:7~12)

A.agent: dichloromethane-ethyl acetate-methanol-ammonia; B.agent: ethyl acetate-*n*-butanol-ethanol-ammonia-water; 1-6.test samples (No. 1-6); 7.lemon yellow (C in figure); 8.reference substance; 9. auramine O (A in figure); 10-15. test samples (No. 7-12)

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

2.2 LC-MS确认

2.2.1 试验条件 (1)色谱条件。色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.05 mol/L 乙酸铵溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 95%B; 2~27 min, 95%→5%B);流速:0.4 mL/min;检测波长:432、483 nm;柱温:35 °C;进样量:2 μL。(2)质谱条件。离子源:电喷雾电离源(ESI);氮气流速:8 L/min;喷雾压力:55 psi;雾化气温度:350 °C;毛细管电压:4 000 V;碎裂电压:135 V;正离子检测;全扫描一级质谱(MS),质谱扫描范围 *m/z* 100~1 000。参比质量范围:*m/z* 121.050 9、922.009 8。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取待测色素对照品各适量,加70%乙醇溶液制成柠檬黄、金胺O、皂黄质量浓度均为10 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 橙黄色色素确认 取“2.2.2”项下混合对照品溶液、“2.1”项下供试品溶液各适量,按“2.2.1”项下试验条件进样测定(见图2)。结果表明,未知染色物质离子峰为354.094 0,软件给出匹配度最高的分子式为C₁₈H₁₅N₃O₃S,其主要二级碎片离子为*m/z* 169.089 5、156.996 0、109.029 0等,查阅Chemspider等数据库,推测其为皂黄,再经与皂黄对照品的保留时间、一级质谱图

和二级质谱图进行比对,确认为皂黄。其他染色样品色谱图中,检出与柠檬黄、金胺O对照品保留时间相同的色谱峰,同时采集其一级、二级质谱图,其色谱峰的一级、二级质谱图均与柠檬黄、金胺O对照品一致,其母离子分别为469.010 4和268.180 5,产生相应较高的碎片离子为451.000 1、200.000 7和252.149 1、147.091 0,可以确认其染有柠檬黄、金胺O。

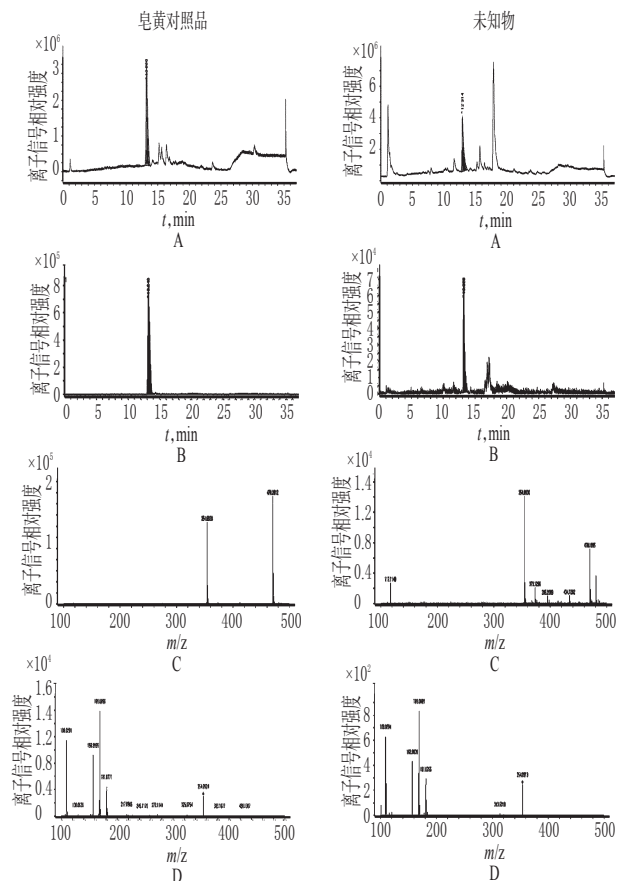


图2 未知物鉴定液相色谱-质谱联用图
A. TIC; B. EIC of parent ion; C. MS spectrum; D. MS/MS spectrum

图2 LC-MS chromatograms of the unknown compound

3 9种色素的检测

3.1 TLC鉴别

以“2.1”项下供试品溶液作为本试验供试品溶液。取待测色素对照品各适量,分别加70%乙醇溶液制成柠檬黄、金胺O、皂黄、日落黄、金橙II、橙G、碱性橙21、碱性橙II、酸性橙I质量浓度均为0.1 mg/mL的单一对照品溶液和混合对照品溶液。以70%乙醇溶液作阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述10种溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-氨水(4:5:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,立即置日光下检视。结果,金胺O、皂黄、碱性橙21、碱性橙II对照品色谱相应位置上阴性对照无干扰(见图3A)。再以乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水(1:3:3:1:1, V/V/V/V/V)为展开

剂,取出,晾干,立即置日光下检视(见图3B)。结果,柠檬黄、日落黄、金橙II、橙G、酸性橙I对照品色谱相应位置上阴性对照无干扰。两次展开中,供试品色谱在与柠檬黄、金胺O、皂黄对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。

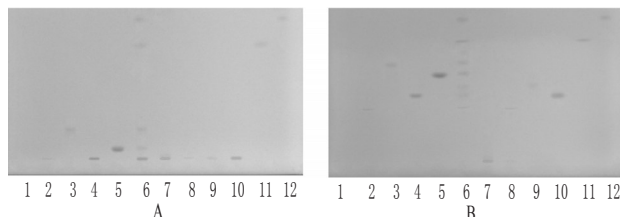


图3 薄层色谱图
A.展开剂:二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-氨水;B.展开剂:乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水;1.金胺O;2.柠檬黄;3.皂黄;4.日落黄;5.金橙II;6.混合对照品;7.阴性对照;8.供试品;9.酸性橙I;10.橙G;11.碱性橙21;12.碱性橙II

A. agent: dichloromethane-ethyl acetate-methanol-ammonia; B. agent: ethyl acetate-n-butanol-ethanol-ammonia-water; 1. auramine O; 2. lemon yellow; 3. metanil yellow; 4. sunset yellow; 5. gold orange II; 6. mixed control; 7. negative control; 8. sample; 9. acid orange I; 10. orange G; 11. basic orange 21 and basic orange II

图3 薄层色谱图

Fig 3 TLC chromatograms

3.2 9种色素含量测定

3.2.1 色谱条件 色谱柱: Welch AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05 mol/L 乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱(0~50 min, 100%→30% B); 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 432 nm(柠檬黄、皂黄、金橙O、碱性橙II)和484 nm(日落黄、酸性橙I、金橙II、橙G、碱性橙21); 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

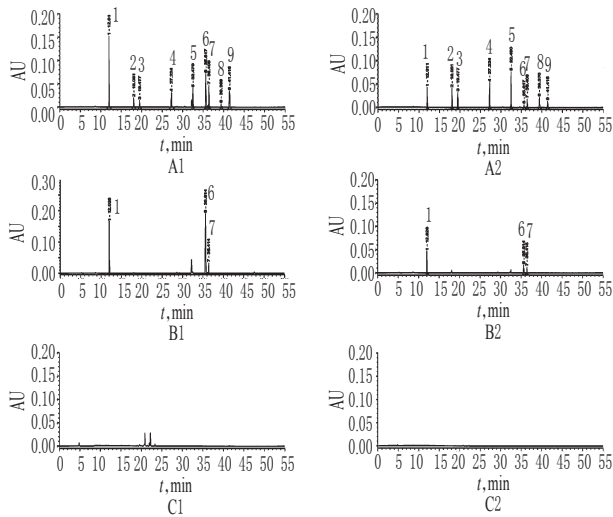
3.2.2 混合对照品溶液的制备 取待测色素对照品各适量,加70%乙醇溶液制成柠檬黄、金胺O、皂黄、日落黄、金橙II、橙G、碱性橙21、碱性橙II、酸性橙I质量浓度均为20 μg/mL的混合对照品溶液。

3.2.3 专属性质试验 精密吸取“3.2.2”项下混合对照品溶液、“2.1”项下供试品溶液、“3.1”项下阴性对照溶液各适量,按“3.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图4。结果,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱峰相应保留时间处有相应色谱峰,阴性对照溶液在此保留时间处无相应色谱峰,表明阴性对照对检测无干扰。

3.2.4 检测限考察 分别取待测色素对照品适量,加70%乙醇溶液,制成单一对照品溶液,倍比稀释,并按“3.2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,柠檬黄、日落黄、橙G、酸性橙I、金橙II、金胺O、皂黄、碱性橙21、碱性橙II的LOD分别为0.30、0.20、0.33、0.16、0.19、0.19、0.31、0.26、0.30 mg/kg。

3.3 检测结果

取26批药材样品各适量,分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“3.2.1”项下色谱条件进样检测。结果,11批药材样品(编号:1、2、3、5、6、7、8、10、11、12、15)检出金胺O,8批(编号:2、4、9、10、11、12、22、23)检出柠



A1.混合对照品(432 nm);B1.供试品(432 nm);C1.阴性对照(432 nm);A2.混合对照品(484 nm);B2.供试品(484 nm);C2.阴性对照(484 nm);1.柠檬黄;2.日落黄;3.橙G;4.酸性橙I;5.金橙II;6.金胺O;7.皂黄;8.碱性橙21;9.碱性橙II
A1. mixed control (432 nm); B1. test sample (432 nm); C1. negative control (432 nm); A2. mixed control (484 nm); B2. test sample (484 nm); C2. negative control (484 nm); 1. lemon yellow; 2. sunset yellow; 3. orange G; 4. acid orange I; 5. gold orange II; 6. auramine O; 7. metanil yellow; 8. basic orange 21; 9. basic orange II

图4 高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms

檬黄,6批(编号:2、5、6、10、11、12)检出皂黄;其中6批有皂黄检出的药材样品同时有金胺O、柠檬黄检出,其他色素未检出。检出阳性样品12批,总检出率为46%。

4 讨论

考虑到现有补充检验方法仅针对金胺O 1种色素进行检查,为扩大检查范围并提高结果准确性以应对日益复杂的染色掺假行为,除前述3种本次检出色素外,笔者增加目前已有相关补充检验方法及其他常见橙黄色系染色掺伪色素作为检测指标,包括日落黄、金橙II、橙G、碱性橙21、碱性橙II、酸性橙I,建立了蒲黄中9种常见橙黄色色素的TLC和HPLC的检测方法。

9种色素的TLC检测中,当供试品色谱中与对照品相应位置上出现相同颜色斑点时须用HPLC进行验证,且应比较相应色谱峰的紫外-可见吸收光谱。TLC中橙G和日落黄斑点比移值较为接近,在同一条件下不易辨识,而在HPLC条件下分离较好。

本试验中还考察了Welch AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、DIKMA Platisil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及Welch XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种色谱柱,9种色素在3种色谱柱上均分离良好,考虑到柠檬黄保留较弱需在高比例水相起始梯度洗脱,Welch AQ-C₁₈柱能与100%水流动相条件兼容,故优先使用Welch AQ-C₁₈柱。

皂黄化学名酸性间胺黄(Metanil yellow),主要用于肥皂的着色和羊毛、丝绸织物的染色和印花,也可用于染皮革、漆类及木制品及生物着色^[7]等;其与金胺O等同

属偶氮染料,其体内代谢物苯胺和萘胺分别被列为三级致癌物和一级致癌物^[8]。目前,其非法添加报道常见于食品安全问题,国家强制性标准中未规定其可作为食用色素使用,但有报道不法生产者将皂黄用于果汁饮料、豆制品、黄花鱼^[9]等,以改善产品色泽,而在中药材及饮片中鲜有报道,本文报道其用于蒲黄掺假染色,在其他中药材及饮片是否也有使用值得关注。考虑到蒲黄本身色泽和性质,本文中增加了几种常见色素,在其他药材和食品中多有报道,有助于加强对蒲黄药材的监管,以防患于未然。

笔者所收集的26批药材样品均为市场上较为廉价的蒲黄药材及饮片,染色现象在药材和饮片中均有发生,共检出染色药材样品12批,检出率较高,而染色样品情况与样品来源相关性较小,说明染色现象在各药材市场可能普遍存在。染色药材样品多为植物非药用部位或淀粉、泥沙等染色,在同时使用药典标准进行常规检验过程中发现多有灰分、酸不溶性灰分、浸出物和含量测定等检查项不符合规定的情况。

目前,中药材及饮片染色报道呈色素种类繁多、色素使用多样化、复杂化的趋势^[10],本文所检测的药材样品中同时存在柠檬黄、金胺O、皂黄3种色素调和染色的情况,可见现有补充检验方法难以满足日益复杂的染色样品检测需求。不断提升检验方法并打击非法染色行为任重而道远。

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,2015:353.
[2] 高珊,张婷婷,崔邵婧,等.市售蒲黄饮片的品质考察[J].中国药事,2014,28(3):292-295.
[3] 富小珺,张春梅.几种染色药材中化工染料金胺O的定性鉴别[J].中国医药指南,2013,11(21):107-108.
[4] 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(11):1742-1745.
[5] 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):69-71.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57.
[7] 金玉娥,孙丕,沈红,等.食品中违禁色素橙黄II和酸性间胺黄的HPLC测定研究[J].上海计量测试,2006,33(4):19-21.
[8] 薛虎寅,尹永梅,张太昌,等.偶氮类合成色素检测技术的研究进展[J].生物技术进展,2012,2(3):171-176.
[9] 张智慧,阎正,蔡立鹏,等.HPCE方法测定食品中皂黄色素[J].分析实验室,2009,28(S2):253-255.
[10] 肖凌,侯俊杰,徐箐,等.红花中一种新掺伪染料的确认及6种染色成分检测方法研究[J].药物分析杂志,2014,34(7):1231-1236.

(收稿日期:2016-07-23 修回日期:2016-09-30)

(编辑:张静)