

脑得生片中非法染色剂柠檬黄的检测

逯雯洁, 乔亚玲, 海平

作者单位: 青海省药品检验检测院、青海省中藏药现代化研究重点实验室, 青海 西宁 810016

通信作者: 海平, 男, 研究员, 研究方向为药品质量控制, E-mail: 352786498@qq.com

基金项目: 青海省科技厅科研基础条件平台项目(2017-ZJ-Y40)

摘要:目的 建立脑得生片中非法染色剂柠檬黄的检测方法。方法 采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱柱为C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温30 ℃, 流速1.0 mL/min, 流动相为0.05 mol/L醋酸铵溶液-乙腈, 梯度洗脱, 检测波长432 nm。采用液相色谱质谱联用(LC-MS)对HPLC方法的专属性进行了验证。结果 在HPLC和LC-MS佐证结果一致情况下, 抽查的17批脑得生片样品中确证有3批样品含染色剂柠檬黄。结论 该方法快速、准确, 专属性好, 可作为脑得生片中非法添加染色剂柠檬黄的检测方法, 为脑得生片的质量控制提供方法。

关键词:酒石黄/分析; 色谱法, 高压液相; 质谱分析法; 脑得生片; 柠檬黄; 液相-质谱联用

Detection of illegally added lemon yellow in *Naodesheng* tablets

LU Wenjie, QIAO Yaling, HAI Ping

Author Affiliation: Qinghai Provincial Institute of Drug Control, Key Laboratory for the Study of the Modernization of Tibetan Medicine, Xining, Qinghai 810016, China

Abstract: **Objective** To establish a method for the detection of Lemon Yellow that is illegally added in *Naodesheng* Tablets. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted. C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Column temperature 30 ℃, mobile phase with 0.05 mol/L ammonium acetate and acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 432 nm. The method of LC-MS was used to verify the specificity of HPLC method. **Results** In the case of consistent results confirmed by HPLC and LC-MS, three out of seventeen batches of *Naodesheng* Tablets were proven to contain Lemon Yellow. **Conclusion** The method is rapid, accurate and with good specificity, and can be used as the detection method for *Naodesheng* Tablets' quality control

Key words: Tartrazine/analysis; Chromatography, high pressure liquid; Mass spectrometry; *Naodesheng* tablets; Lemon yellow; LC-MS

脑得生片是由三七、川芎、红花、葛根、山楂五味饮片组成的中药复方制剂, 具活血化瘀、通经活络之功效。用于淤血阻络导致的眩晕、中风, 肢体不用、言语不利及头晕目眩等症状; 脑动脉硬化、缺血性中风及脑出血后遗症见上述症候者。处方中红花药材被检出染色剂已有许多的报道^[1], 柠檬黄为其常用的染色剂之一。柠檬黄又名酒石黄、酸性淡黄、胨黄等。化学名称为1-(4-磺酸苯基)-4-(4-磺酸苯基偶氮)-5-吡唑啉酮-3-羧酸三钠盐, 为水溶性合成色素。由于部分企业红花原药材的采购、质量控制环节相对薄弱, 未对红花染色情况加以关注, 造成脑得生片中含有微量柠檬黄。本品为中药复方制剂, 其他药味对检测存在一定的干扰, 因此有必要对脑得生片中非法染色物检测方法进行系统的研究, 从而更好地控制药品内在质量。本研究自2017年10月至

2018年10月在查阅相关文献的基础上^[2-5], 建立了脑得生片中柠檬黄的高效液相色谱法全波长扫描紫外检测(HPLC-DAD)方法, 并采用液相-质谱联用(LC-MS)法对阳性结果加以确认, 为打击脑得生片中非法染色提供技术依据, 保证人民用药安全有效。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Sartorius BSA 224S-CW 电子天平(德国Sartorius公司)、KQ3200DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、Agilent 1260型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司)、Waters 2695型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 美国沃特世公司)AB SCIEX Triple Quad 5500 液质联用色谱仪(三重四级杆, 美国AB公司)。

1.2 试剂与药品 柠檬黄对照试剂(批号30117, 纯度90.0%购自德国Dr.公司); 乙腈、甲醇为色谱纯,

水为超纯水(Milli-Q),其他试剂均为分析纯。

脑得生片(A厂,批号160102;B厂,批号160701;C厂,批号20170101;D厂,批号160201;E厂,批号160301;F厂,批号20160403;G厂,批号170329;H厂,批号151101;I厂,批号20170301;J厂,批号20150201;K厂,批号20151001;L厂,批号160101;M厂,批号150202、150101、160101;N厂,批号160102;O厂,批号C1610012)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;流动相A为乙腈;流动相B为0.05 mol/L醋酸铵溶液;梯度洗脱(0~45 min, 5%A→45%A);DAD检测器,检测波长:432 nm;柱温30℃;流速1.0 mL/min;进样量10 μL。理论板数按柠檬黄峰计算应不低于3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照试剂溶液 称取柠檬黄对照试剂适量,加70%乙醇制成25 μg/mL的对照试剂溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取脑得生片20片,除去包衣,称定重量,研细,取约5 g,精密称定,精密加入70%乙醇10 mL,称定重量,超声处理20 min,放冷,再称定重量,用70%乙醇补足减失的重量,滤过,即得。

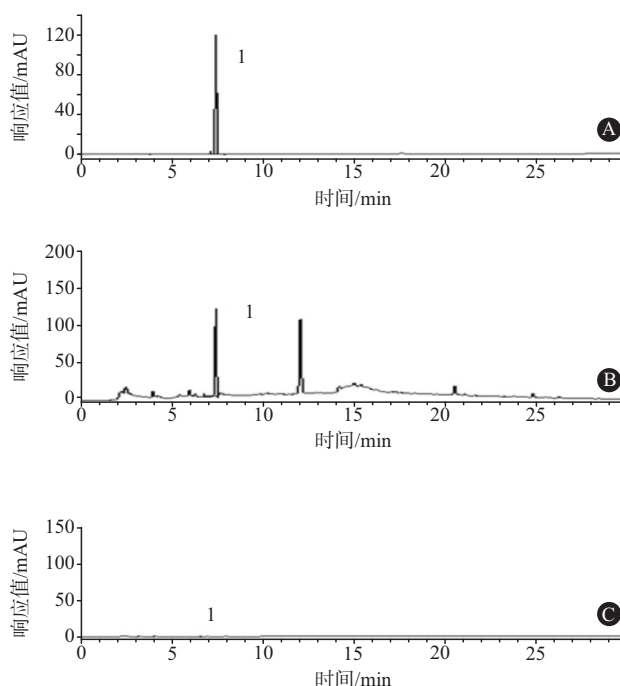
2.2.3 阴性对照溶液的制备 取检测未添加柠檬黄的红花和其他原料药材,按处方制得阴性样品。称取5 g,同供试品溶液制备法,制成阴性溶液。

2.3 专属性实验 精密吸取对照试剂溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪。结果阳性样品呈现与对照试剂保留时间相一致的色谱峰,阴性样品在同一保留时间无相应色谱峰出现,见图1。阳性样品中,与柠檬黄对照试剂保留时间相一致色谱峰的紫外吸收光谱与柠檬黄对照试剂一致,见图2。

2.3.1 质谱确认

2.3.1.1 质谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(1.8 μm, 50 mm×2.1 mm);流动相:乙腈(A)—0.02 mol/L醋酸铵溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 2%A~45%A);流速:0.3 mL/min;柱温:30℃。质谱检测参数:电喷雾负离子模式(ESI⁻),检测方式:一级质谱全扫描、多反应检测(MRM)方式;去簇电压100 V,入口电压10 V,碰撞能量16~31 V,源温度450℃,碰撞室出口电压3~12 V。

2.3.1.2 检测结果 柠檬黄属吡唑啉酮类合成色素,柠檬黄在环上有羧基,较小的碰撞能量就能脱羧释出CO₂,接着同时发生吡唑啉酮环的开裂(C-C键, N-C键)和N-C键环合,生成大量离子。



注:1为柠檬黄

图1 HPLC色谱图:A为对照试剂;B为阳性样品;C为阴性样品

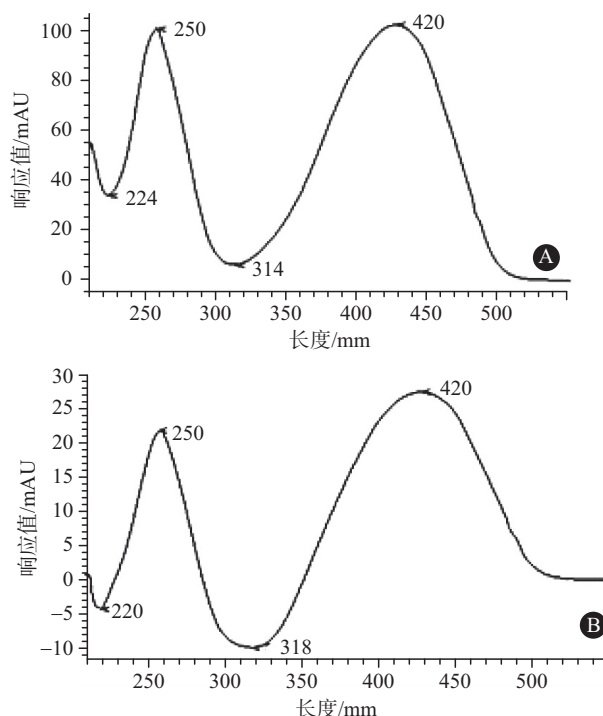


图2 光谱图:A为对照试剂,B为阳性样品

柠檬黄精确质量为533.950 4,在负离子模式丢失特点为-3Na+2H,形成m/z为467的分子离子峰。以467m/z为母离子进行二级质谱分析,选取丰度较强,干扰较小的两对子离子,进行多反应监测(MRM)模式检测。在柠檬黄染色样品色谱中,相应的色谱峰具有与柠檬黄相同的质谱特征。见图3、图4。

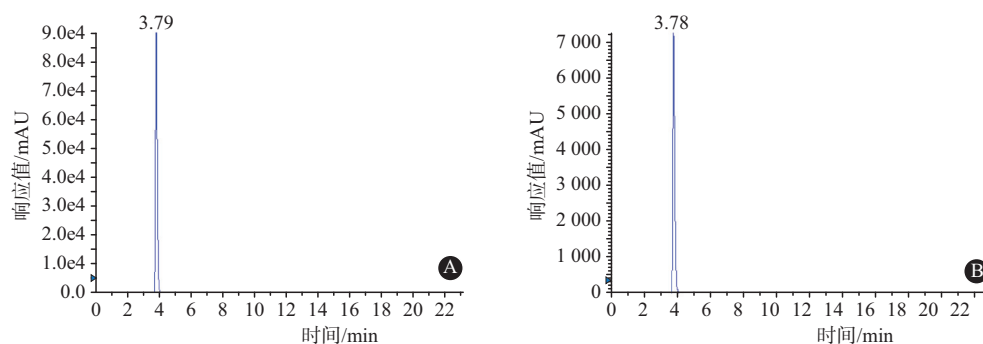


图3 柠檬黄对照试剂的选择离子色谱图:A为m/z 198.1,B为m/z 171.0

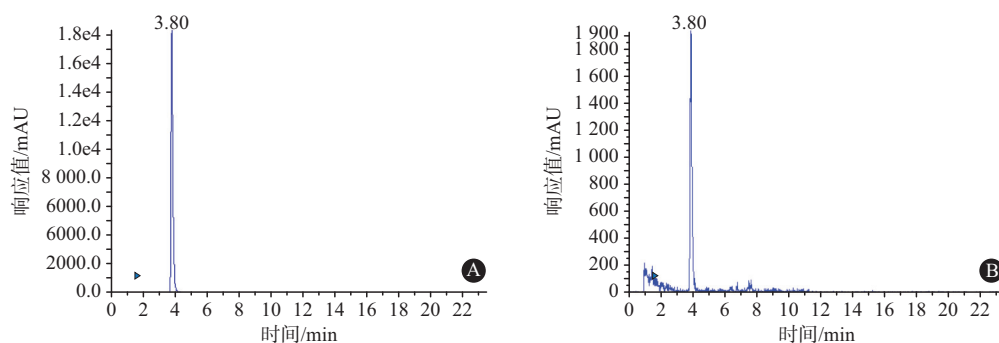


图4 阳性样品的选择离子色谱图:A为m/z 198.1,B为m/z 171.0

2.4 精密度 精密吸取柠檬黄对照试剂溶液(浓度约为25 $\mu\text{g/mL}$),连续进样5次,进样量10 μL ,测得柠檬黄保留时间及峰面积,保留时间RSD为0.20%,峰面积RSD为0.30%。结果表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温下放置,在0、1、2、4、6、12、24 h分别进样10 μL 进行分析,测定峰面积积分值,柠檬黄峰面积积分值的RSD为0.98%。结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取同一供试品溶液,精密称取6份,按上述方法制成供试品溶液,测定柠檬黄峰面积,结果柠檬黄色谱峰重现性良好,见图5。

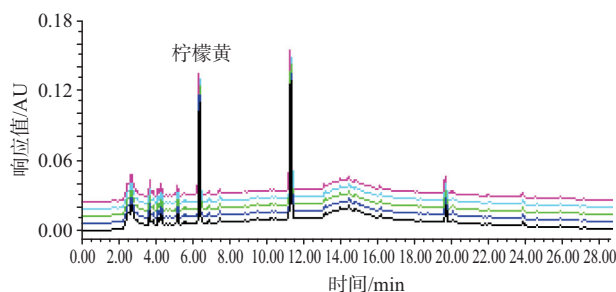


图5 脑得生片HPLC色谱图

2.7 不同仪器及色谱柱的考察 由于不同生产厂家的高效液相色谱仪和色谱柱存在性能上的差异,为考察方法的可行性及通用性,对样品还进行了以下耐用性试验,①采用不同厂家生产的色谱柱。②在不同的仪器上测定。结果表明耐用性较好。见

图6、图7,为用Waters 2695型高效液相色谱仪,Boston Boscherom ODS C_{18} (5 μm , 250 mm $\times$ 4.6mm)色谱柱所得色谱图。

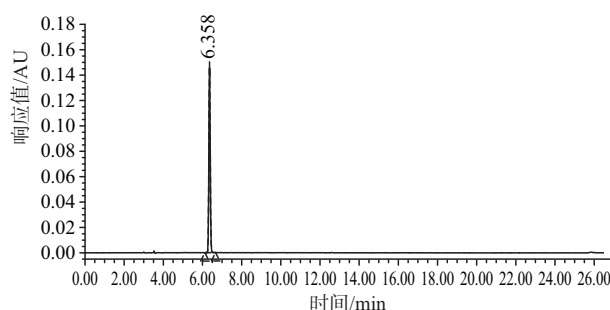


图6 对照试剂HPLC色谱图:Waters2695,Boston Boscherom ODS C_{18}

2.8 检测限 取柠檬黄对照试剂一定量配制一定浓度的对照溶液,按上述液相色谱条件,进样测定,以信噪比法($S/N=3$)测得柠檬黄的检出限为0.002 μg 。

2.9 样品测定 分别对上述15家企业17批脑得生片样品进行了检测,判定3个生产企业的3个批号脑得生片检出有掺伪染色现象:B厂,批号160701;H厂,批号151101;L厂,批号160101。染色物为柠檬黄,且符合上述方法中视为阳性检出的规定。

3 讨论

红花染色目的主要为,通过染色增重、掺伪;染色样品以次充好等。本研究重点考察项目红花药材为加水煎煮两次(共2.5 h)后取清膏入药。试验

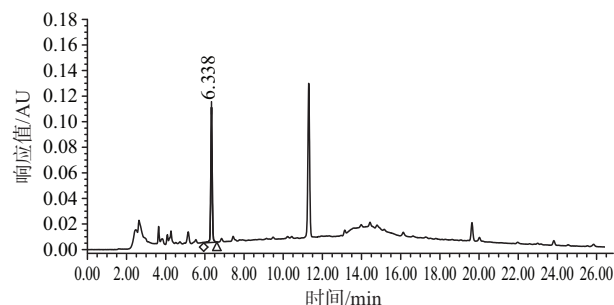


图7 脑得生片HPLC色谱图:Waters2695, Boston Boscherom ODS C₁₈

中模拟上述生产工艺制成柠檬黄阳性添加模拟制剂进行了研究,旨在考察染色剂的热稳定性、配伍稳定性等因素。结果表明:柠檬黄染色剂在生产工艺条件下稳定性良好。

柠檬黄作为一类常用染色剂,并非天然产物,非法染色系人为作假行为。采用本研究建立的方法,对脑得生片样品进行了筛查。阳性样品的检出,说明中成药还是存在一定的被化工染料污染情况。针对这种情况后续还需开展进一步的研究,以保证中成药的安全有效。

参考文献

- [1] 肖凌,侯俊杰,徐菁,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.
- [2] 余新启,何轶,鲁静,等.金胺O染色物在中成药中的检测方法研究[J].药物分析杂志,2014,34(1):130-135.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件2007009:红花[S].2007.
- [4] 国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件2013007:红花[S].2013.
- [5] 国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件2014016:红花[S].2014.
- [6] 李新荣,张春辉,单秀明,等.精制冠心病片中非法染色剂金橙Ⅱ的检测[J].中国药事,2016,30(6):588-592.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 李中华,刘薇,程显隆,等.我国中药红花的质量问题和监管策略[J].中国药事,2018,32(9):1217-1219.
- [10] 康家珍,罗兰,冀苏龙,等.基于液质联用技术的脑得生中红花成分分析[J].广东化工,2018,45(7):32-33.
- [11] 孙健,冯睿,胡青,等.聚酰胺固相萃取-HPLC法同时测定中药材中16种合成酸性色素[J].中成药,2015,37(5):1031-1036.
- [12] 刘艳,张勤,吕志刚,等.红花中非法添加色素的薄层色谱快速鉴别法[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(18):95-98.
- [13] 王卉,史亚军,邓辉,等.红花中羟基红花黄色素A的提取动力学研究[J].安徽医药,2015,19(10):1853-1856.
- [14] 金卓,丁晴.骨折挫伤胶囊中非法染色剂金橙Ⅱ的检测方法研究[J].海峡药学,2012,24(7):64-67.
- [15] 刘成伦,李小庆,王晶,等.偶氮类非食用色素的快速测定方法研究进展[J].食品科学,2009,30(5):273-276.
- [16] 卢士英,邹明强.食品中常见的非食用色素的危害与检测[J].中国仪器仪表,2009(8):45-50.

(收稿日期:2019-03-11,修回日期:2019-05-07)

◇ 编读往来 ◇

关于关键词标引的要求

关键词是为了文献标引工作从报告、论文中选取出来的用以表示全文主题内容信息款目的单词或术语。关键词包括叙词(主题词)和自由词两部分。主题词是专门为情报检索机构编制索引用的,它是从自然语言的主要词汇中选取后并加以规范化的词或词组;自由词是尚未规范化的词或词组。

GB/T 7713.3-2014规定,现代科技期刊都应在学术论文的摘要后面给出3~8个关键词(或叙词)。关键词的标引应按GB/T 3860—2009《文献主题标引规则》、CY/T 173—2019《学术出版规范关键词编写规则》的原则和方法,参照各种词表和工具书选取;请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中的医学主题词表(MeSH)内所列的词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。如果MeSH表中尚无相应的词,可选用直接相关的几个主题词进行组配;可根据树状结构表选用最直接的上位主题词;必要时可以将新学科、新技术中的重要术语以及文章题名的人名、地名作为关键词标出(自由词),并排列于最后;忌用泛指词。

关键词中的缩写应按MeSH表还原为全称;每个英文关键词第一个字母大写,各词汇之间用分号;中、英文关键词要相对应。

(郝希春)