

HPLC-DAD 法结合 LC-MS/MS 法检测艾绒和艾条中非法添加的色素

陈林，赵培敬*，李中娥，宋颖
(南阳市产品质量检验检测中心，河南南阳 473061)

摘要：目的 通过 HPLC-DAD 法结合 LC-MS/MS 法检测艾绒和艾条中非法添加的金胺 O 和酸性黄 36。方法 HPLC-DAD 分析采用 Welch Materials Eclipse XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) (35 : 65)；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；检测波长 425 nm；采用 LC-MS/MS 法对所检出的阳性样品进行验证。结果 金胺 O 和酸性黄 36 在各自范围内线性关系良好 ($r > 0.9995$)，平均加样回收率分别为 94.8%、96.2%，RSD 分别为 1.1%、0.26%。67 批样品中有 7 批存在非法染色嫌疑，阳性检出率为 10.4%。结论 该方法准确灵敏，可用于艾绒和艾条中非法添加色素的检测，并为相关国家标准的提高提供参考。

关键词：艾绒；艾条；金胺 O；酸性黄 36；HPLC-DAD；LC-MS/MS

中图分类号：R284.1

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2024)07-2461-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.055

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶，具有温经止血、散寒止痛之功效^[1]，为民间常用中药，以其为原料制成的艾绒作为中医临床灸材，是重要的应用方面^[2-4]。随着国家对“治未病”理念的重视及中医养生推动力度的不断加大，艾绒常用于日常养生保健。

《本草纲目》记载：“凡用艾叶需用陈久者，治令细软，谓之熟艾。若生艾灸则易伤人血脉”，新艾绒带明显暗绿色，而陈艾绒颜色发土黄或金黄色，纯度越高越黄^[5-6]，故色泽被认为是判定艾绒品质的重要指标，而这也为不法分子掺假染色“指明”了方向。目前，《灸用艾绒》^[7]和《清艾条》^[8]2 个国家标准只通过显微特征鉴别真伪，而课题组前期在日常检验中发现艾绒和清艾条部分样品色泽异常，参考中药材中常见非法添加色素的相关报道^[9-12]，采用 HPLC-DAD 法结合 LC-MS/MS 法鉴定出 2 种非法添加色素，即金胺 O 和酸性黄 36。

鉴于现行国家标准^[7-8]无法判断艾绒、艾条中是否存在非法染色行为，且当前关于艾绒、艾条的研究大多集中在质量分级方面^[13-16]，未见检测非法添加色素的报道。为有效打击掺假染色行为，保障市场上艾绒、艾条产品的质量安全，本实验建立两者非法添加色素的分析方法，以期为相关国家标准的提高提供参考。

1 材料

AB Sciex 4500 液质联用仪（美国 AB Sciex 公司）；LC-20AT 高效液相色谱仪，配置 DAD 检测器（日本岛津公司）；XS205DU 电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；Milli Q 纯水仪（美国 Millipore 公司）。

金胺 O（批号 111770-201603，纯度 99.9%）、酸性黄

36（批号 112015-201801，纯度 99.8%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。67 批样品均来源于 2022 年艾产品风险监控抽检，经南阳市产品质量检验检测中心赵培敬副主任药师鉴定为正品。乙腈为色谱纯，购自美国 Tedia 公司；甲醇、磷酸、甲酸、磷酸二氢钠、乙酸铵均为分析纯，购自天津科密欧化学试剂有限公司；水为超纯水。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品 10 mg，置于 20 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度为 500 μg/mL 的贮备液，量取适量，甲醇逐级稀释成 100、50、25、5.0、1.0 μg/mL 溶液，即得。

2.2 供试品溶液制备 样品混匀后精密称取 0.5 g（精确至 0.0001 g），置于 50 mL 具塞三角烧瓶中，精密加入甲醇 20 mL，称定质量，超声提取 30 min，冷却至室温，甲醇补足减失的质量，0.45 μm 微孔滤膜过滤，供 HPLC 仪检测。检出阳性成分的样品溶液用甲醇稀释至与对照品质量浓度相当，0.22 μm 微孔滤膜过滤，供 LC-MS/MS 仪检测。

2.3 HPLC-DAD 条件 Welch Materials Eclipse XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸) (35 : 65)；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；检测波长 425 nm；进样量 10 μL；扫描波长 200~800 nm。

2.4 LC-MS/MS 条件 Waters acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)；流动相乙腈 (A) -0.01 mol/L 乙酸铵 (B，含 0.1% 甲酸)，梯度洗脱 (0~6 min, 10%~70% A；6~6.5 min, 70%~95% A；6.5~11 min,

收稿日期：2023-06-15

基金项目：河南省市场监督管理局科技计划项目（2022sj106, 2023sj19）

作者简介：陈林，女，硕士，主管药师，研究方向为食品药品质量分析。E-mail: 1185315333@qq.com

* 通信作者：赵培敬，男，副主任中药师，研究方向为食品药品质量分析。E-mail: peijingzhao@126.com

95%~95% A; 11~11.1 min, 95%~10% A; 11.1~13 min, 10% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL; 电喷雾离子源 (ESI⁺); 正离子扫描; MS₂ 全扫描; 扫描范围 80~700 amu; 气帘气 40 psi (1 psi=6.895 kPa); 碰撞气 9 psi; 离子喷射电压 5 500 V; 离子温度 500 °C; 离子气 1:50、2:50。其他参数见表 1。

表 1 金胺 O、酸性黄 36 质谱参数

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	DP/V	CE/V
金胺 O	268	252, 147, 122	60	47
酸性黄 36	354	185, 169, 157	150	40

3 结果

3.1 流动相选择 异泽兰黄素是艾叶中重要的黄酮类标志成分, 可作为艾绒、艾条质量控制的重要指标, 对于该成分的分析常用流动相为乙腈-0.2% 磷酸、乙腈-磷酸二氢钠缓冲液 (pH3.0)^[17-18], 同时参考色素检测常用流动相系统乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸)^[19] 和乙腈-0.1% 甲酸^[20], 发现在 HPLC-DAD 分析中各成分均能得到有效分离, 且峰形符合要求。考虑到磷酸与磷酸盐难挥发, 故在 LC-MS 分析中只考察了乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) 和乙腈-0.1% 甲酸 2 种流动相, 发现各色素质谱信号响应均较好, 但酸性黄 36 在乙腈-0.1% 甲酸流动相系统中峰形拖尾。综合质谱信号响应和色谱峰形, 最终选择乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) 作流动相。

3.2 检测波长选择 采用 DAD 检测器扫描供试品溶液在

200~800 nm 波长范围内的 3D 图, 发现大于 400 nm 时艾绒、艾条中固有成分几乎没有吸收, 对 2 种色素的检测干扰最小。另外, 金胺 O 在 435 nm 波长附近有最大吸收, 酸性黄 36 在 417 nm 波长附近有最大吸收, 最终选择 425 nm 作为检测波长。

3.3 提取条件优化 为提高目标成分的提取率, 同时防止提取过多的杂质而对色谱柱和仪器造成污染, 分别考察了甲醇、70% 甲醇和 50% 甲醇对目标成分和杂质的提取率。通过计算 254、350 nm 波长处杂质峰面积的总和来考察杂质提出率, 在 425 nm 波长处考察目标成分提取率, 发现经 50%、70% 甲醇提取的杂质峰面积总和相当, 但甲醇作为提取溶剂时杂质峰面积总和只有其他 2 种溶剂的一半, 而目标成分平均加样回收率依次为甲醇>70% 甲醇>50% 甲醇, 综合杂质提出率和目标成分回收率, 故选择甲醇作为提取溶剂。

3.4 HPLC-DAD 方法学考察

3.4.1 专属性试验 取艾绒、艾条阴性样品若干批, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密加入对照品溶液适量, 在“2.3”项色谱条件下进样测定。结果, 样品中固有成分对目标色素成分检测均无干扰。

3.4.2 线性关系考察 取“2.1”项下系列质量浓度对照品溶液适量, 在“2.3”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 并以 S/N=3 为检出限, S/N=10 为定量限, 结果见表 2, 可知 2 种色素在各自范围内线性关系良好。

表 2 2 种色素线性关系

色素	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检出限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
金胺 O	$Y=45.127X-783.31$	0.999 9	1.0~100	0.1	0.3
酸性黄 36	$Y=26.550X-4.446.7$	0.999 8	1.0~100	0.3	1.0

3.4.3 加样回收率试验 取阴性样品约 0.5 g, 加入对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 制成低 (25 μg/mL)、中 (50 μg/mL)、高 (70 μg/mL) 3 个质量浓度, 各重复 3 次, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 结果见表 3。

3.4.4 精密度试验 取“2.1”项下质量浓度为 50 μg/mL 的对照品溶液适量, 在“2.3”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得金胺 O、酸性黄 36 峰面积 RSD 分别为 0.07%、0.12%, 保留时间 RSD 分别为 0.49%、0.33%, 表明仪器精密度良好。

3.5 HPLC-DAD 检测 从生产 (30 批)、线下流通 (14 批)、线上流通 (23 批) 3 个环节抽检样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 通过与对照品色谱峰保留时间和紫外-可见吸收光谱比较, 初步筛选出阳性样品 7 批, 见表 4。此外, 还发现多批线上流通环节样品的显微特征异常与灰分测定值不合格, 说明当前线上流通环节的艾绒、艾条存在着严重的掺假现象, 亟需加强监管。

3.6 LC-MS/MS 验证 艾绒、艾条基质成分复杂, 难以采用全谱进行定性评价, 因此本研究在相同分析条件下与对

表 3 2 种色素加样回收率试验结果 (n=9)

色素	加入量/ μg		测得量/ μg		回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
	507.5	472.0	507.5	475.4			
金胺 O	507.5	472.0	93.01	94.80	93.68	93.68	1.1
	507.5	475.4	93.68				
	507.5	478.4	94.26				
	1 012	963.2	95.18				
	1 012	960.2	94.88				
	1 012	970.4	95.89				
	1 388	1 334.6	96.15				
	1 388	1 322.2	95.26				
	1 388	1 315.7	94.79				
	1 396	485.1	95.87	96.20	95.79	95.79	0.26
酸性黄 36	506	484.7	96.20				
	506	487.2	96.29				
	1 004	967.7	96.38				
	1 004	965.9	96.21				
	1 004	967.0	96.31				
	1 396	1 343.1	96.21				
	1 396	1 347.4	96.52				
	1 396	1 340.3	96.01				

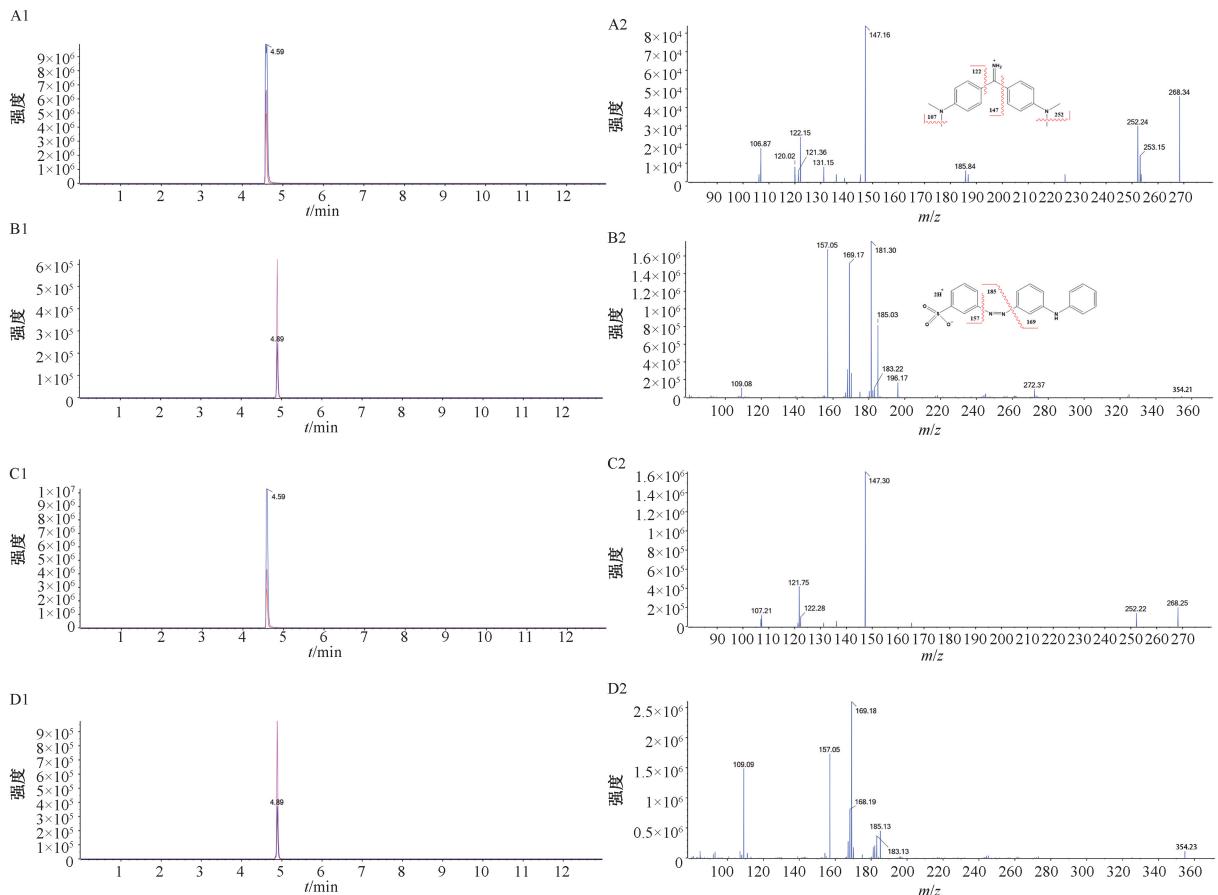
表4 阳性样品检测结果

序号	样品	来源	含量	
			金胺O/(mg·kg ⁻¹)	酸性黄36/(mg·kg ⁻¹)
1	金黄艾绒(30:1)	线上流通	14	137
2	野生金艾绒(30:1)	线上流通	—	608
3	十年陈艾绒(10:1)	线上流通	6 299	—
4	五年陈艾绒(10:1)	线上流通	660	—
5	五年陈艾绒(35:1)	线上流通	—	1 073
6	纯艾条	线上流通	33	—
7	纯艾灸条	线上流通	1 628	—

注: —表示未检出。

照品溶液比较, 以是否具有相同特征碎片离子峰的方式进行验证, 结果见图1。由此可知, 在ESI⁺模式下金胺O准分子离子 $[M-Cl]^{+}$ 峰为 m/z 268, 其二级质谱全扫描特征离子峰为 m/z 252、147、122、107 (图1A2); 酸性黄36准分子离子 $[M-Na+2H]^{+}$ 峰为 m/z 354, 其二级质谱全扫描特征离子峰为 m/z 185、169、157 (图1B2); 在阳性样品1提取离子流图 (图1C1) 中, 出现与金胺O (图1A1) 一致

的峰, 其二级质谱图 (图1C2) 中碎片离子峰 m/z 252、147、122、107 均与金胺O (图1A2) 一致, 确认非法添加了金胺O; 阳性样品2提取离子流图 (图1D1) 中出现与酸性黄36 (图1B1) 一致的峰, 其二级质谱图 (图1D2) 中碎片离子峰 m/z 185、169、157 也均与酸性黄36 (图1B2) 一致, 确认非法添加了酸性黄36。



注: A~D 分别为金胺O、酸性黄36、阳性样品1、阳性样品2; 1为提取离子流图, 2为二级质谱图。

图1 对照品及阳性样品的提取离子流图和二级质谱图

4 结论

本实验采用HPLC-DAD法结合LC-MS/MS法首次建立艾绒、艾条中金胺O、酸性黄36这2种色素的检测手段, 并应用于67批样品, 发现有7批存在非法添加现象, 且均

来自线上流通环节, 表明相关产品存在违规染色、钻标避检的现象, 需引起重视。今后, 课题组将继续研究上述色素的快检方法, 以期为相关部门现场检验提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 91.
- [2] 刘春, 吴中朝. 浅论艾灸十大温效及临床应用 [J]. 中医杂志, 2013, 54(10): 893-895.
- [3] 洪宗国. 中医灸法选择艾叶作为灸材的机理研究 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2015, 34(1): 47-51.
- [4] 黄显章, 张元, 王旭, 等. 基于实验室制绒工艺比较不同产地艾叶出绒率 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 40-45.
- [5] 梅全喜. 艾叶的研究与应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 187.
- [6] 武娟, 毛梦然, 蒲锐, 等. 艾灸疗法与艾绒 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(11): 102-104.
- [7] GB/T40976-2021, 灸用艾绒 [S].
- [8] GB/T40975-2021, 清艾条 [S].
- [9] 陈林, 温家欣, 刘潇潇, 等. HPLC 结合 LC-MS/MS 法快速检测穿山甲中掺加的 12 种黄色色素 [J]. 中成药, 2017, 39(3): 556-560.
- [10] 莫显超, 朱海瑛, 马婵娟. 绿袍散及原料药中 5 种非法添加黄色染色剂的检测 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(10): 1363-1368.
- [11] 连云岚, 杜娟, 乔玉峰. HPLC-MS 法检测少腹逐瘀丸及原料药材中非法添加的 7 种黄色素 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3219-3223.
- [12] 吴嫣艳, 于倩茜. 磷石滚痰丸中金胺 O 与金橙 II 的检测方法 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1232-1235.
- [13] 武娟, 万定荣, 赵百孝, 等. 艾绒的质量评价标准及其商品分级研究 [J]. 中国药业, 2019, 28(24): 4-7.
- [14] 张觉予, 陈犹得, 冼建春, 等. 不同纯度艾绒艾炷灸温度时间变化的研究 [J]. 中国针灸, 2015, 35(9): 909-912.
- [15] 彭政, 杨雅雯, 徐扬, 等. 不同叶绒比艾绒氯含量比较及其在艾绒等级鉴定上的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4051-4056.
- [16] 孙昱, 李计萍, 吴静义, 等. 清艾条质量研究的若干思考 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(9): 1044-1049.
- [17] 曹利, 卢金清, 叶欣, 等. HPLC 法同时测定不同品牌艾条及艾柱中山奈酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素的含量 [J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1393-1395; 1400.
- [18] 王哲, 李晓华, 李波, 等. 不同产地艾叶中异泽兰黄素和棕矢车菊素含量的比较 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(34): 30-33.
- [19] BZY201803, 蒲黄药材及饮片中柠檬黄、酸性黄 36 和金胺 O 检查项补充检验方法 [S].
- [20] 钱晓燕, 刘海山, 朱晓雨, 等. 固相萃取/超高效液相色谱串联质谱法测定化妆品中 12 种合成着色剂 [J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 527-532.