

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 ℃; 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 ($r>0.999\ 5$), 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。若生艾灸火则易伤人肌脉”, 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, 以期对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 0.000 1 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 ℃; 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 ℃；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 ℃；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

表 2 2 种色素线性关系

色素	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检出限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
金胺 O	<i>Y</i> =45 127 <i>X</i> -783.31	0.999 9	1.0~100	0.1	0.3
酸性黄 36	<i>Y</i> =26 550 <i>X</i> -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

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 3 2 种色素加样回收率试验结果（*n*=9）

色素	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收率/	RSD/%
	μg	μg	%	%	
金胺 O	507.5	472.0	93.01	94.80	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		
	506	485.1	95.87	96.20	0.26
酸性黄 36	506	484.7	95.79		
	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	96.52	
	1 396	1 347.4	96.52		
	1 396	1 340.3	96.01	96.01	

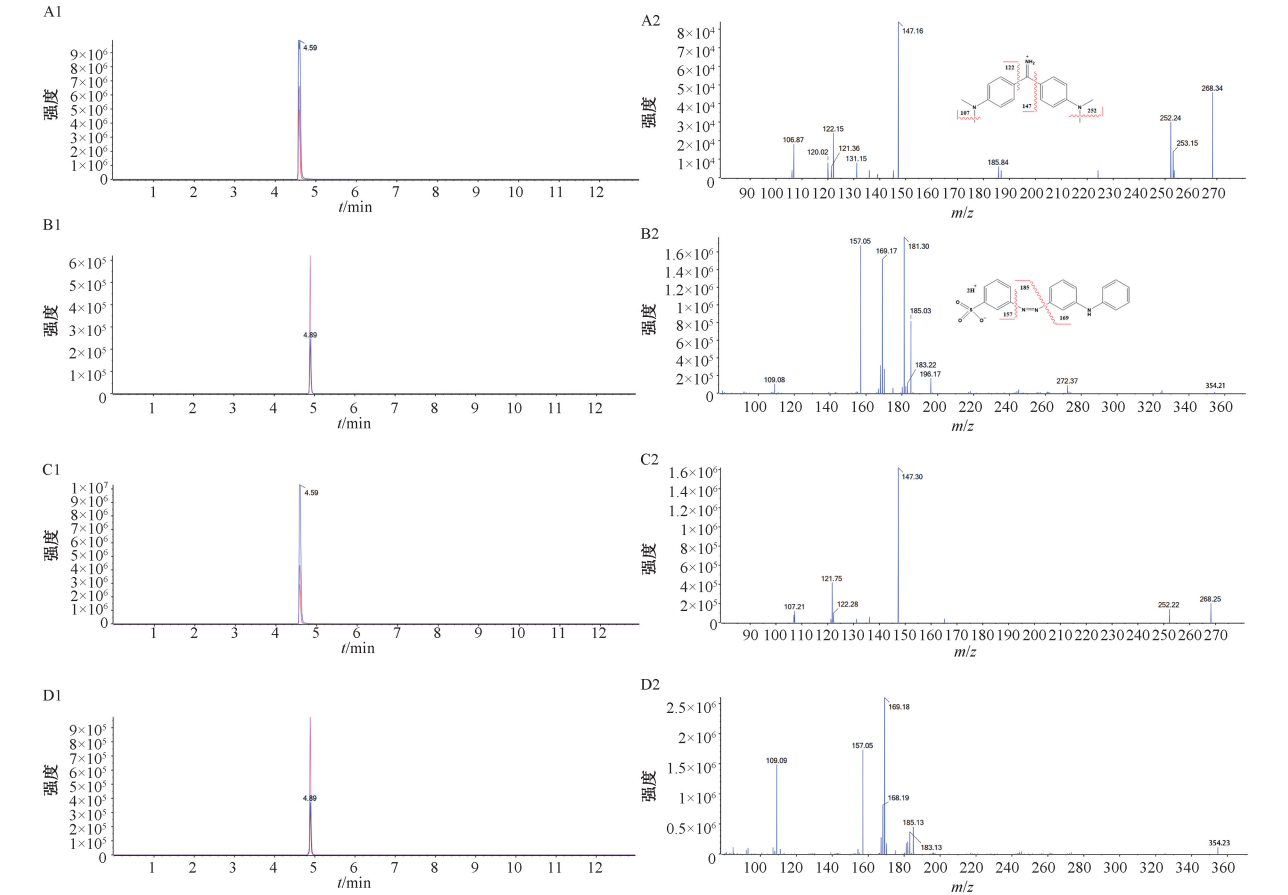
表 4 阳性样品检测结果

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	纯艾条条	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, 朱海嫒, 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. 礞石滚痰丸中金胺 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. 不同纯度艾绒艾柱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. 不同叶绒比艾绒氮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] BJJY201803, 蒲黄药材及饮片中心柠檬黄、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.