

HPLC 结合 LC-MS/MS 法快速检测穿山甲中掺加的 12 种黄色色素

陈 林¹, 温家欣², 刘潇潇², 雷 肖^{2*}, 张 荣^{1*}

(1. 广东药科大学, 广东广州 510006; 2. 广东省药品检验所, 广东广州 510180)

摘要: 目的 通过 HPLC 结合 LC-MS/MS 法快速检测穿山甲 *Manis Squama* 中掺加的 12 种黄色色素 (柠檬黄、日落黄、酸性橙 10、栀子黄、碱性嫩黄 O、碱性橙 21、碱性橙 2、酸性橙 2、皂黄、碱性橙 22、酸性嫩黄 G、奶油黄)。方法 穿山甲 70% 甲醇提取液的 HPLC 分析采用 Agilent Poroshell 120 EC C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm, 亚 3 μm 核壳填料); 以甲醇-乙酸铵为流动相, 梯度洗脱; 柱温 40 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 450 nm。再通过 LC-MS/MS 法进行验证。结果 各色素在各自范围内均呈良好的线性关系 ($r \geq 0.999$)，平均加样回收率 76.9% ~ 103.7%，RSD 2.0% ~ 9.5%。60 批样品中有 1 批掺加了栀子黄。结论 该方法准确灵敏, 可用于快速检测穿山甲中掺加的黄色色素。

关键词: 穿山甲; 黄色色素; HPLC; LC-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0556-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.024

Rapid determination of twelve yellow pigments adulterated in *Manis Squama* by HPLC combined with LC-MS/MS

CHEN Lin¹, WEN Jia-xin², LIU Xiao-xiao², LEI Yi^{2*}, ZHANG Rong^{1*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

KEY WORDS: *Manis Squama*; yellow pigments; HPLC; LC-MS/MS

穿山甲 *Manis Squama* 在我国被列为二级重点保护野生动物, 通常取其鳞片经炮制加工成炮山甲和醋山甲饮片, 具有活血通络、下乳消肿的功效, 疗效确切^[1]。但其物种稀少, 并且难以进行人工饲养, 故价格昂贵。

药材色泽是判定其质量的重要指标之一, 近年来在经济利益的诱惑下, 不法分子将质量差的药材通过非法染色美化后冒充优质品出售, 如在西红花、蒲黄、黄芩等中药材中经常发现非法添加日落黄、金胺 O、酸性橙 II 等色素^[2-4]。穿山甲经炮制加工后, 优质的饮片呈黄色或金黄色, 色泽鲜艳, 目前其质量控制主要为真伪鉴别与有效成分分析^[5-6], 尚无关于非法染色的研究, 故亟需建立穿山甲中非法添加色素的检测方法。

文献 [2-4] 报道的对中药材非法添加色素的检测方法主要是 HPLC 法, 常采用粒径为 5 μm 的色谱柱, 无法在短时间内实现多种成分同时快速分析。根据色谱速率理论, 减小填料粒径是提高柱效最有效的方法, 如亚 2 μm 色谱柱, 但随着填料粒径减小, 柱压显著增高, 需要专门设备 (如 UPLC) 才能使用。随着色谱填料技术日新月异的发展, 以高柱效和低柱压为出发点, 核-壳填料技术将一层多孔外壳熔融到实心硅胶核, 形成核壳颗粒填料, 减小了纵向扩散路径与传质阻抗, 使色谱峰展宽减小, 柱效显著增加, 尤其是亚 3 μm 色谱柱, 不仅具有与多孔亚 2 μm 色谱柱相当的分离性能, 并且其柱压仅相当于后者的一半, 可广泛应用于 HPLC 系统, 成为近年来高通量液相色谱分析方

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2013B090200059); 广州市健康产品非法添加化学成分快速检测技术重点实验室项目 (2013)

作者简介: 陈 林 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为食品药品分析。E-mail: 1185315333@qq.com

* 通信作者: 雷 肖 (1977—), 男, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为食品药品分析。E-mail: Leiy04@qq.com

张 荣 (1978—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为物理药学。E-mail: zhangr-zju@hotmail.com

法的研究热点^[7-9]。因此,本实验选择在中药材中常检出的4种黄色合成色素(柠檬黄、日落黄、酸性橙Ⅱ、碱性嫩黄O)及其他易滥用的8种黄色色素作为研究对象,采用亚3 μm核壳填料色谱柱建立穿山甲中各非法添加色素同时快速检测的HPLC方法,并结合LC-MS法,对阳性样品作进一步定性确证。

1 方法

1.1 仪器与试剂 API 5500 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Waters2695 HPLC 色谱仪, 配置 PDA 检测器(美国 Waters 公司); CP225D 十万分之一电子天平、PB-10 PH 计(德国 Sartorius 公司); Millipore Milli Q 纯水机等。柠檬黄(批号 14001)、日落黄(批号 14001)、栀子苷(批号 15592)购自中国计量科学研究院; 碱性嫩黄 O(批号 31203)、酸性橙 2(批号 21116)购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 藏花素(批号 P29S6F3857)、酸性嫩黄 G(批号 YY15098)、酸性橙 10(批号 S19088)、奶油黄(批号 C15140)、皂黄(批号 AA17527)购自上海源叶生物科技有限公司; 碱性橙 21(批号 M307K050)、碱性橙 22(批号 0020G056)、碱性橙 2(批号 CDAF-80028)购自上海安谱科学仪器有限公司。甲醇、乙酸铵均为色谱纯; 冰醋酸为分析纯; 水为超纯水。60 批穿山甲来自 2015 年国家中药材及饮片专项任务, 经广东省药品检验所林锦峰副主任中药师鉴定为鲮鲤科动物穿山甲的干燥鳞甲。

1.2 对照品溶液制备 精密称取各色素对照品 10 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 配制成 500 μg/mL 各成分贮备液。临用时量取适量, 用初始比例流动相配制成 50、10、5、1.5、0.25、0.1 μg/mL 对照品溶液。

1.3 供试品溶液制备 样品经碾碎后, 精密称取 1.0 g, 置于 50 mL 带盖聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 70% 甲醇, 称定质量, 超声(480 W、40 kHz)提取 15 min, 冷却至室温, 加水补足减失的质量, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0.5 mL, 加入 1 mL 水溶液, 混合均匀, 0.45 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤, 滤液进 HPLC 检测。检出阳性成分的供试品溶液用水溶液稀释至与对照品溶液相当, 过 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜, 滤液进 LC-MS/MS 检测。

1.4 HPLC 条件 Agilent Poroshell 120 EC C₁₈ 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 柱温 40 °C; 体

积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长 450 nm; 流动相甲醇(A)-20 mmol/L 乙酸铵(B, 冰醋酸调 pH 至 5.3), 梯度洗脱(0~3 min, 10%~38% A; 3~6 min, 38%~62% A; 6~9 min, 62%~76% A; 9~10 min, 75%~90% A; 10~12 min, 90% A; 12~13 min, 90%~10% A; 13~16 min, 10% A)。

1.5 LC-MS/MS 条件 Agilent Poroshell 120 EC C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm); 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 5 μL; 流动相甲醇(A)-5 mmol/L 乙酸铵(B), 梯度洗脱(0~3 min, 10%~38% A; 3~6 min, 38%~62% A; 6~9 min, 62%~76% A; 9~10 min, 75%~90% A; 10~12 min, 90% A; 12~13 min, 90%~10% A; 13~16 min, 10% A); 电喷雾离子源(ESI⁻)负离子模式; 检测方式 MS² 全扫描, 扫描范围 m/z 50~1 000; 气帘气 275.8 kPa; 碰撞气 62.0 kPa; 离子喷射电压 -4 500 V; 离子温度 500 °C; 离子气 1:55、2:55。参数见表 1。

表 1 LC-MS/MS 参数

Tab. 1 LC-MS/MS parameters

化合物	定性离子对(Q ₁ /Q ₃) m/z	锥孔电压/V	碰撞能/V
藏花素	975.4/327.3	-90	-15、-45

2 结果

2.1 效能分析 在相同流动相体系下, 选择分离性能优异的 ACE C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)作为传统 5 μm 色谱柱代表, 考察 5 μm、亚 3 μm 色谱柱对 12 种色素的分离情况, 色谱图见图 1。由图可知, 5 μm 色谱柱 ACE C₁₈ 完成各成分分离需要 40 min, 并且酸性橙 2 与皂黄未能完全分离; 亚 3 μm 色谱柱 Agilent Poroshell 120 EC C₁₈(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) 分离性能更优异, 只需 16 min 即可实现所有成分分离, 分离度均大于 1.5, 节省了约 60% 的分析时间和溶剂。

2.2 线性关系考察 取系列对照品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样。以溶液质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 结果见表 2, 可知各色素在各自范围内线性关系均良好。

2.3 检出限和定量限 取标准曲线最低质量浓度点溶液, 用初始比例流动相稀释, 根据对照品溶液 S/N = 3 计算检出限, S/N = 10 计算定量限, 结果见表 2。

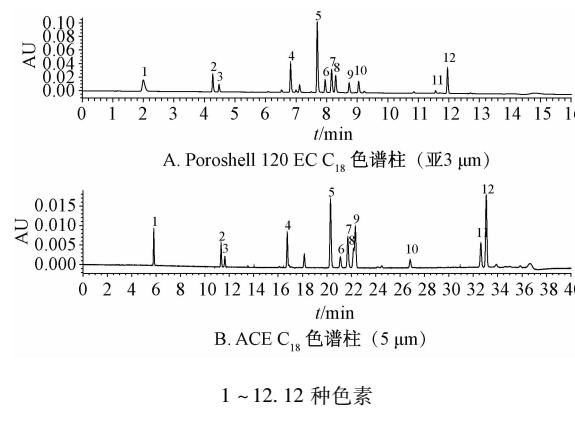


图1 对照品溶液 (1.5 μg/mL) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance solution (1.5 μg/mL)

表2 12种色素线性关系

Tab. 2 Linear relationships of twelve pigments

色素	线性方程	r	检出限/ (μg·g ⁻¹)	定量限/ (μg·g ⁻¹)
柠檬黄	$Y = 47\ 007X - 2\ 803$	0.999 1	1.0	3.0
日落黄	$Y = 31\ 988X - 1\ 301$	0.999 2	0.6	1.8
酸性橙 10	$Y = 14\ 549X - 455$	0.999 3	1.0	3.0
栀子黄	$Y = 70\ 685X - 4\ 291$	0.999 3	0.6	1.8
碱性嫩黄 O	$Y = 178\ 211X - 7\ 007$	0.999 1	0.5	1.5
碱性橙 21	$Y = 30\ 188X - 2\ 253$	0.999 1	0.6	1.8
碱性橙 2	$Y = 39\ 379X - 3\ 453$	0.999 2	0.6	1.8
酸性橙 2	$Y = 45\ 295X - 3\ 603$	0.999 2	0.6	1.8
皂黄	$Y = 26\ 340X - 1\ 267$	0.999 1	0.7	2.3
碱性橙 22	$Y = 33\ 897X - 1\ 026$	0.999 0	0.8	2.5
酸性嫩黄 G	$Y = 15\ 298X - 781$	0.999 2	1.0	3.0
奶油黄	$Y = 31\ 953X + 161$	0.999 9	0.9	3.0

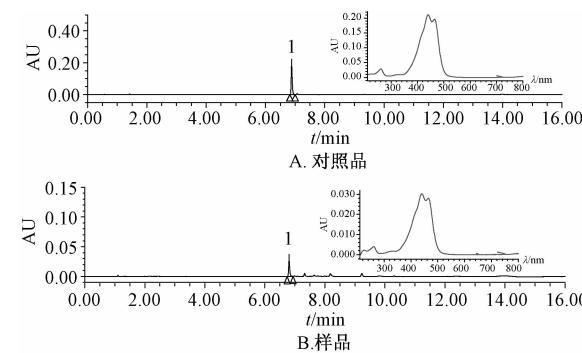
2.4 加样回收率试验 取阴性样品约1 g, 加入对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法处理, 制成低(0.3 μg/mL)、中(1.7 μg/mL)、高(6.7 μg/mL)3个质量浓度水平, 每个水平5份, 在“2.4”项色谱条件下进样。结果, 12种色素的平均加样回收率76.9%~103.7%, RSD 2.0%~9.5%。

2.5 精密度试验 取1.5 μg/mL对照品溶液, 连续进样6次, 测得各色素峰面积RSD 0.2%~1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 HPLC法检测 在“2.4”项色谱条件下对60批样品进行初步检测, 发现有1批可能掺杂了色素, 其紫外可见吸收光谱图与文献[10-12]报道的栀子黄色素极为相似。具体见图2。

同时, 在240 nm波长下检测出栀子苷(图3)。文献[13-15]报道, 栀子黄色素是一种从栀子果实中提取的天然色素, 藏花素是其主要成分,

因栀子苷会影响栀子黄色素的显色效果, 故在色素提取过程中需进行纯化精制, 以除掉该成分。由此推测, 不法分子为了节约成本, 可能采用栀子进行非法染色。



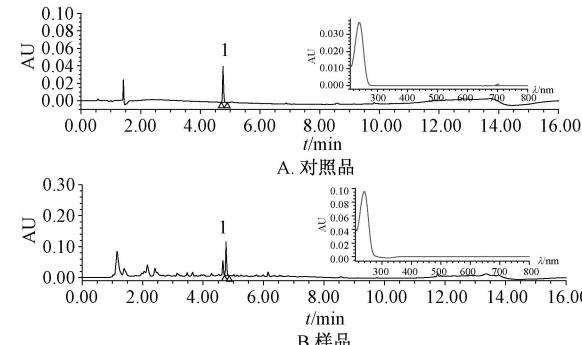
注: 外面大图是液相色谱图, 里面小图是紫外可见吸收 (UV-Vis) 光谱图

1. 栀子黄

1. crocin

图2 栀子黄液相色谱图与紫外可见吸收 (UV-Vis) 光谱图

Fig. 2 LC chromatograms and UV-Vis spectra of crocin



注: 外面大图是液相色谱图, 里面小图是紫外可见吸收 (UV-Vis) 光谱图

1. 栀子苷

1. gardenoside

图3 栀子苷液相色谱图与紫外可见吸收 (UV-Vis) 光谱图

Fig. 3 LC chromatograms and UV-Vis spectra of gardenoside

2.7 LC-MS/MS法验证 穿山甲成分复杂, 故需结合LC-MS/MS法对检测结果进行验证。本实验采用定性能力更强的离子全扫描二级质谱模式进行检测, 因受样品中目标成分浓度及基质的影响, 难以采用全谱进行定性评价, 故在相同分析条件下, 通过样品与对照品比较, 寻找是否具有相同特征碎片离子峰的方式。

栀子黄质谱裂解途径主要是糖苷键断裂与CO₂

分子丢失^[16-17]，具体见图4。由图可知，在ESI⁻模式下，出现准分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 975，随

后脱去2个糖苷键，得到碎片离子 m/z 651、327；再脱去2个羰基，得到碎片离子 m/z 283、239。

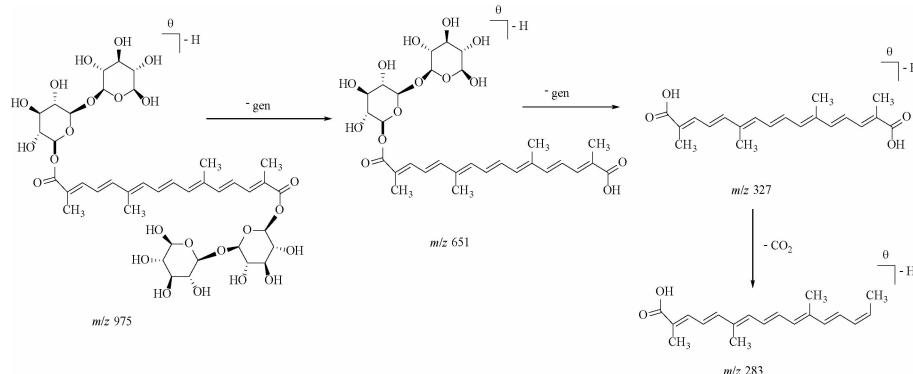


图4 桔子黄裂解途径
Fig. 4 Fragmentation pathway of crocin

在“2.5”项质谱条件下，对桔子黄对照品及可疑阳性样品进行分析，结果见图5和图6。由图6可知，阳性样品二级质谱图中均出现与桔子黄 (m/z 975、651、327、283) 裂解途径相符的特征离子碎片峰。同时，样品与对照品的二级质谱图检测结果一致，故确认该掺加色素为桔子黄。

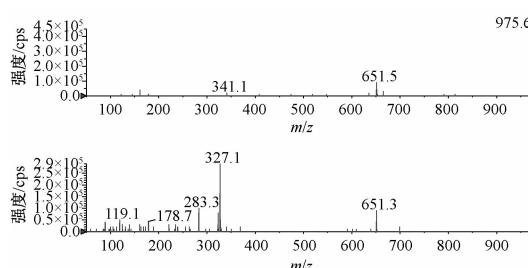


图5 桔子黄二级质谱图

Fig. 5 MS² spectra of crocin

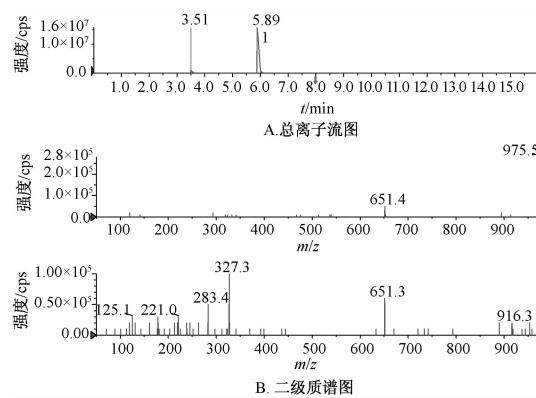


图6 阳性样品总离子流图 (TIC) 及二级质谱图
Fig. 6 TIC and MS² spectra of positive sample

3 讨论

3.1 流动相选择 为兼顾HPLC法条件便于转移至LC-MS/MS法，本实验选择合成色素分析效果优异、易挥发的甲醇-乙酸铵体系作为流动相，发现碱性橙2与酸性橙2的分离度受流动相pH影响较大，为实现两者完全分离，再采用冰醋酸调节pH。分别考察了乙酸铵pH在4.5~6.5之间的分离情况，发现pH5.3时，各成分得到较好分离，而且与杂质成分的分离度也均满足HPLC分析要求。

3.2 检测波长选择 采用PDA检测器，在200~800 nm范围内进行扫描，发现250 nm附近各成分均有吸收，但穿山甲基质复杂，在紫外光吸收区域易受基质干扰，不仅影响目标成分与杂质的分离，同时降低了分析灵敏度；当波长大于400 nm时，杂质吸收减弱，对待测目标成分干扰较小。因此，根据各成分紫外-可见光谱吸收特征，并综合考虑分析方法的灵敏度需求，本实验最终选择450 nm作为检测波长。

3.3 提取条件优化 文献[18]报道，对中药材非法添加色素的检测主要是采用70%乙醇、70%甲醇^[19]、无水乙醇^[20]等溶剂超声提取。本实验发现，以70%乙醇或无水乙醇提取时，柠檬黄与桔子黄的回收率均低于50%；以70%甲醇提取时，各成分回收率稳定，均能达到76%以上。

3.4 加样回收率试验中部分色素 RSD 偏大的原因 通过外观检查发现，穿山甲染色不均匀，这可能是导致加样回收率不稳定的主要原因，导致部分色素 RSD 达到了8.5%以上。

4 结论

本实验采用亚3 μm 核壳填料色谱柱，建立了穿山甲中掺加12种黄色色素的检测方法，与传统5 μm 色谱柱相比，节约了近60% 的分析时间与溶剂。采用上述方法对60批样品进行分析时，发现有1批掺加了栀子黄，表明中药材非法染色存在“钻标避检”（钻研标准漏洞，避开法定标准检验）的趋势，需要相关部门引起重视。

参考文献：

- [1] 刘灿黄, 张 继, 康 帅, 等. 中国穿山甲、非洲树穿山甲及伪品的鉴别研究[J]. 中药材, 2014, 37(7): 1178-1182.
- [2] 李启艳, 朱日然, 孙 萍, 等. HPLC-DAD 法检测染红中药材中20种非法添加色素[J]. 医药导报, 2015, 34(5): 655-657.
- [3] 孙 健, 冯 睿, 胡 青, 等. 聚酰胺固相萃取-HPLC-DAD 法同时检测中药材中16种合成酸性色素[J]. 中成药, 2015, 37(5): 1031-1036.
- [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] 程金友, 石俊英, 吕鹏月. 穿山甲及其混淆品鉴别与质量研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(10): 758-759.
- [6] 贾 静, 张红印, 陈 俊, 等. 名贵动物药材穿山甲的DNA条形码分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2212-2215.
- [7] Vaast A, Broeckhoven K, Dolman S, et al. Comparison of the gradient kinetic performance of silica monolithic capillary columns with columns packed with 3 μm porous and 2.7 μm fused-core silica particles [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 270-275.
- [8] Zacharis C K, Kika F S, Tzanavars P D, et al. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of five banned fat-soluble colorants in spices using a narrow-bore monolithic column[J]. *Talanta*, 2011, 84(2): 480-486.
- [9] Hsieh Y, Duncan C J, Brisson J M. Fused-core silica column high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of rimonabant in mouse plasma[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(15): 5668-5673.
- [10] 丁 艳, 孙益民, 马芝森, 等. 高效液相色谱法测定食品中的栀子黄的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 199-202.
- [11] 周伟娥, 凌 云, 张 元, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中栀子黄色素含量[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 187-192.
- [12] 陈 阳, 张 浩, 蔡 乐, 等. 栀子黄 $A_{238\text{nm}}/A_{440\text{nm}}$ 值与西红花苷和栀子苷相关性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 77-80.
- [13] 高彦祥, 李媛媛. 栀子黄色素提取与精制研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(3): 14-17.
- [14] 李永利, 张 殇, 翟志雷. 高效液相色谱法测定食品中栀子黄[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 72-74.
- [15] 张 莹, 夏 炎, 陈 莹, 等. 栀子黄色素标准品藏红花素的制备[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 100-103.
- [16] 高凤阳, 高晓燕, 张加余, 等. HPLC-DAD-MS/MS 对栀子中色素成分的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(5): 343-348.
- [17] Thang Q, Francois C, Edward F, et al. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1455-1461.
- [18] 邹耀华, 殷红妹, 郭怡庭, 等. HPLC-PDA 法检测西红花和红花中十一种非法添加色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 2724-2725.
- [19] 郑 娟, 邹耀华. HPLC-DAD 法检测蒲黄和黄莲中十中非法添加色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1078-1079.
- [20] 翟海云, 刘振平, 余 晓, 等. 高效液相色谱法测定中药中的五种黄色工业染料[J]. 化学研究与应用, 2014, 26(1): 135-139.