

【化学测定方法】

HPLC - PDA 法检测蒲黄和黄连中十种非法添加色素

郑娟, 邹耀华

(杭州市药品检验所, 杭州 310017)

摘要 目的:建立 HPLC - PDA 法测定蒲黄和黄连中非法添加色素金橙 G、日落黄、金橙 I、亮黄、甲基橙、金橙 II、金橙 IV、金莲橙 G、金胺 O、二甲基黄的方法。方法:样品用 70% 乙醇溶液提取,以甲醇 - 0.05 mol/L 醋酸铵溶液梯度洗脱,二极管阵列检测器检测。结果:该方法检出限为 0.026 mg/kg ~ 0.950 mg/kg,2 档添加回收率为 81.5% ~ 104.7%;市售蒲黄和黄连中多批次检出金胺 O。结论:本实验采用 HPLC - PDA 法同时检测蒲黄和黄连等黄色类中药材(饮片)中十种常用的非法添加色素,方法简单、准确、快速,可以为制药企业或药品监督管理部门控制蒲黄和黄连的质量提供一定的参考。

关键词 高效液相色谱; 二极管阵列检测器; 蒲黄; 黄连; 色素

中图分类号 O657.7⁺2

文献标识码 A

文章编号 1004 - 8685(2011)05 - 1078 - 03

Determination of ten colouring agent in pollen typhae and pollen typhae with HPLC - PDA

ZHENG Juan, ZOU Yao - hua

(Hangzhou Institute for Drug Control, Hangzhou 310017, China)

[Abstract] **Objective:** A method for rapid determination of ten colouring agent in Pollen Typhae and Pollen Typhae (included Orange G, Sunset Yellow, Orange I, brilliant yellow, Methyl Orange, Orange II, Orange IV, Tropaeolin G, Auramine O, Dimethyl Yellow) was developed. **Methods:** The sample was extracted by 70% ethanol, gradient elution with methanol and 0.05 mol/L ammonium acetate and then detected by Photo - Diode Array Detector. **Results:** The limits of quantitation (LOQs) of the method were 0.026 mg/kg ~ 0.950 mg/kg, and fortified recovery of reference substance solutions at two levels were 81.5% ~ 104.7%, the RSDs were below 2.0% (n=3). Ten reference substance solutions were separated well in fifty minutes. Auramine O was detected in multi - batch of Pollen Typhae and Pollen Typhae. **Conclusion:** This method is simple, rapid, and reproducible, and it can be used as a low - cost, convenient method for measuring colouring agent in Saffron and Safflower, and it can provide reference or help for relative company and State food and drug administration.

[Key words] High Performance Liquid Chromatography; Photo - Diode Array Detector; Pollen Typhae; Pollen Typhae; Colouring agent

蒲黄和黄连都为常用中药材,在现代中医学上使用较为广泛,仅被《中国药典》2010 年版一部收载的中成药中就有 100 多个品种的处方中含有这两味中药材^[1]。由于近年自然灾害造成中药材减产以及部分不法商贩的炒作,这两味中药材(饮片)价格逐年上涨。由于受到利益的驱动,一些中药材生产商将质量差的蒲黄和黄连经工业染料染色美化后,冒充优质饮片,或将其掺入质量好的饮片中,以高价出售。如蒲黄中经常发现用淀粉、非药用部位或直接用地沙染色后掺入其中以次充好的现象,这样的中药材(饮片)不仅达不到治疗效果,并有可能给百姓的用药带来安全隐患,因为有些工业染料对人体的肝肾有毒副作用,甚至有致畸、致癌、致突变的作用^[2,3]。目前黄色和橙色类着色剂占有比重较大^[4],关于合成色素的检测方法在食品中报道较多^[5-7],中药材(饮片)非法添加色素的检测方法报道仅见红色类着色剂^[8]。2007 年及 2010 年国家食品药品监督管理局依次发布了蒲黄和黄连中不得检出金胺 O 的补充检验通知,但是这远远不足以控制中药

材(饮片)的染色情况,因此本实验建立了 HPLC - PDA 法同时测定常用的十种黄色和橙色类合成色素,确保中药材(饮片)质量,切实维护百姓的用药安全。

1 仪器与试剂

1.1 仪器及主要设备

SHIMADZU LC - 20A 高效液相色谱仪(带 PDA 检测器); Inertsil ODS - SP 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm); USC - 502 超声萃取仪(上海波龙电子有限公司); XS105 电子天平(瑞士 METTLER)。

1.2 试剂与对照品

乙醇(杭州化学试剂有限公司)为分析纯;醋酸铵(国药集团化学试剂有限公司);水(杭州娃哈哈集团)为纯净水;色谱甲醇(Merck);对照试剂:金橙 G(上海迈坤化工有限公司, 20100712)、日落黄[国家标准物质中心, GW(E) 100004A], 0.5 mg/ml]、金橙 I(上海迈坤化工有限公司, 20100706)、亮黄(上海迈坤化工有限公司, 20100706)、甲基橙(中国公司合营新中化学厂, 1 - 56 - 10 - 14)、金橙 II(上海迈坤化工有限公司, 20070520)、金橙 IV(上海迈坤化工有限公司, 20100706)、金莲橙 G(上海迈坤化工有限公司, 20100706)、金胺 O(SIG-

基金项目 杭州市科技发展计划项目(20090833B31)

作者简介 郑娟(1984 -),女,本科,中药师,主要从事食品药品检测。

MA,073K3402)、二甲基黄(崇明县裕安裕西试剂厂,HGB 3085-59)

1.3 实验样品

蒲黄、黄连市场采购,主要购自安徽亳州市场及杭州市场,经杭州市药品检验所中药室主任殷红妹副主任中药师鉴定蒲黄为植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L. 或东方香蒲 *Typha orientalis* Presl、的干燥花粉,黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎。

2 方法和结果

2.1 液相参数 色谱柱

Inertsil ODS-3(5 μm,4.6 mm×250 mm);流动相: A 为 0.05 mol/L 醋酸铵溶液, B 为甲醇,梯度洗脱,0 min~10 min, A 90%→55%, B 10%→45%, 10 min~40 min, A 55%→20%, B 45%→80%, 40 min~50 min, A 20%→10%, B 80%→90%, 50 min~60 min, A 10%, B 90%;平衡时间: 10 min;流速: 1.0 ml/min;柱温 30℃;检测波长: 432 nm;紫外扫描范围: 200 nm~600 nm;进样量: 10 μl;理论板数按金橙 G 计应不低于 5000。

2.2 对照品混合溶液的制备

①精密量取日落黄对照品溶液 10 ml 置 50 ml 量瓶中,加 70% 的乙醇溶解并定容至刻度,摇匀;②精密称取金橙 G 19.80 mg、金橙 I 17.23 mg、亮黄 19.60 mg、甲基橙 10.10 mg、金橙 II 22.95 mg、金橙 IV 9.71 mg、金莲橙 G 33.00 mg、金胺 O 9.50 mg 及二甲基黄 6.47 mg 置同一 100 ml 量瓶中,加 70% 的乙醇溶解并定容至刻度,摇匀。精密量取对照品溶液①7 ml、②10 ml 置同一 50 ml 量瓶中,加 70% 的乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取供试品粗粉约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇溶液 20 ml,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 KHz) 20 min,放冷至室温,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取对照品混合溶液 0.5 ml、1 ml、2 ml、5 ml、10 ml、20 ml 分别置 25 ml 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取 10 μl 注入液相色谱仪,按“2.1”色谱条件测定,以各对照试剂的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,分别绘制标准曲线,各对照试剂线性范围、相关系数和方法检出限(以 10 倍仪器噪声所对应待测物的浓度作为方法检出限)见表 1。

2.5 仪器精密度实验

精密吸取对照品混合溶液 5 μl,按“2.1”色谱条件测定,连续进样 6 次,结果 10 个对照试剂的峰面积 RSD 均小于 2.0%(n=6),表明分析仪器具有良好的精密度,对照试剂 HPLC 图见图 1。

2.6 稳定性实验

精密吸取同一对照试剂溶液 5 μl,分别于 2 h、4 h、8 h、12 h、16 h、24 h 注入液相色谱仪,依法测定峰面积值,结果 10 个对照试剂的峰面积 RSD 均小于 2.0%,说明对照试剂在 24 h 内稳定。

2.7 方法的精密度和加样回收实验

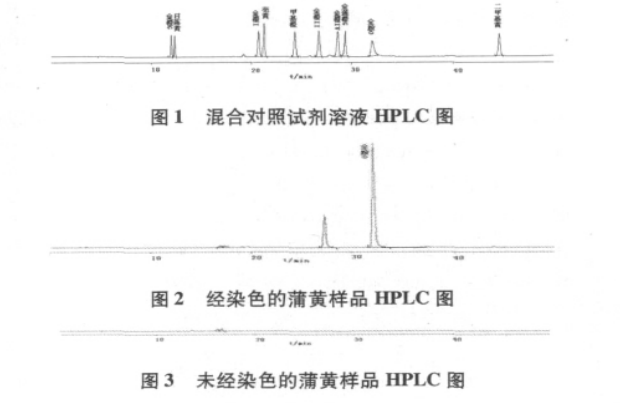
以未添加色素的蒲黄样品为本底,分别加入对照试剂混合溶液 0.5 ml 和 5 ml 两个添加浓度,每个添加浓度重复试验 3 次,按“2.3”处理,结果见表 1。

表 1 各对照试剂线性相关性、线性范围、回收率及方法最低检出限

对照试剂名称	线性范围 (mg/L)	线性相关系数	方法检出限 (LOQs) (mg/g)	回收率±RSD(%)	
				0.5 ml	5 ml
金橙 G	1.98~79.2	1.0000	0.079	81.5±0.5	98.2±1.7
日落黄	0.700~28.0	1.0000	0.028	89.5±0.2	99.0±1.3
金橙 I	1.72~68.9	1.0000	0.069	97.5±1.3	94.1±2.0
亮黄	1.96~78.4	1.0000	0.078	87.1±1.5	93.9±1.9
甲基橙	1.01~40.4	1.0000	0.040	95.3±0.6	102.4±1.2
金橙 II	2.30~91.8	0.9999	0.092	95.1±0.8	98.7±1.1
金橙 IV	0.971~38.8	1.0000	0.039	99.1±0.9	93.6±1.4
金莲橙 G	3.30~132	0.9998	0.132	94.2±0.6	96.4±0.2
金胺 O	0.950~38.0	1.0000	0.038	80.7±0.7	104.7±1.4
二甲基黄	0.647~25.9	0.9999	0.026	94.8±0.8	100.1±0.3

2.8 供试品的测定

取蒲黄样品(12 批次)和黄连样品(8 批次),按“2.3”处理后按“2.1”色谱条件测定,结果蒲黄中有 4 批次检出金胺 O,黄连有 4 批次检出金胺 O,含量在 0.150 mg/g~2.28 mg/g。染色及未染色的蒲黄样品 HPLC 图分别见图 2 和图 3。



3 讨论

本实验所检测的十种色素均为水溶性或醇溶性色素,且染色剂都染色在饮片的表面,因此选择 70% 乙醇溶液作为提取液,超声处理 20 民,方法操作简单,回收率高,适合蒲黄和黄连中非法添加色素的定性定量检测。另外本实验所检测的 10 种色素均为黄色或橙色类染色剂,其紫外最大吸收均在 380 nm~490 nm 左右,根据各对照试剂在液相上的响应值,选择 432 nm 作为检测波长。关于流动相的选择,由于梯度洗脱过程中甲醇比例较大,曾选择极性大洗脱能力较强的乙腈做流动相,但是梯度洗脱过程中,随着乙腈比例的增加,醋酸铵容易析出,堵塞管路,且乙腈比例增大,对液相的单向阀也不利,而甲醇的比例增加到 90% 醋酸铵也未析出,且各个对照试剂之间的分离与及各峰的对称性都很好,因此本实验选择甲醇和 0.05 mol/L 的醋酸铵溶液作为流动相。

从检验结果来看,蒲黄和黄连的染色主要以金胺 O 为主,金胺 O 是一种工业染料,对人体有致癌作用。国家食品药品(下转第 1082 页)

和血清中。编码 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶的基因突变会导致 H 抗原形成缺陷,但是突变后引起 mRNA 转录活性下降还是酶的生物活性下降尚不明确,因此需要对 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶基因进行体外表达研究,测定突变后 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶活性,以进一步明确 H 抗原形成缺陷的机制。

$\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶催化供给底物 GDP-岩藻糖上的岩藻糖基团转移到受体底物的半乳糖残基上形成 H 抗原,其催化反应过程为 GDP-岩藻糖和 I 抗原决定簇(Gal β -R)反应生成 H 物质和 GDP。因 H 抗原的前体物 Gal β -R 在体外难以合成,现一般以 Gal β -R 的类似物 β -苯酰半乳糖苷为受体底物。早期体外测定 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶活性主要采用同位素标记的方法,活性反应结束后通过色谱或层析方法分离反应产物再进行放射性测定^[5,7],该方法相对比较繁琐且放射性标记物存在污染,目前仅国外少量实验室使用。本实验我们根据其催化反应原理,采用反相高效液相色谱法测定 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶活性。反相液相色谱法具有快速、高效和操作方便的优点,通过调整分离条件可以将相差不大的糖类分子、核酸分子等各种大分子物质分离开。实验中我们以 GDP-岩藻糖作为供体底物, β -苯酰半乳糖苷作为受体底物进行催化反应。由于反应中产物的生成量相对较低,而底物 GDP-岩藻糖相对不稳定,因此以底物 β -苯酰半乳糖苷的减少来计算 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶活性。实验结果显示建立的方法具有高灵敏度和重复性,可以有效测定 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶活性。

本实验采用高效液相色谱对 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶催化反应后的混合物进行了分离分析,通过调整流动相的比例、流动相 pH 值、流速和柱温可以将底物 β -苯酰半乳糖苷很好的从反应混合物中分离出来,而且用时较短,整个分离只需要 3 min~4 min。实验中通过调整流动相 KH_2PO_4 的浓度,发现随着盐浓度增加,不仅保留时间延长而且对色谱柱影响较大,因此不宜选用高浓度的盐溶液。分析流速对样品分离的影响,发现 1 ml/min 的流速下具有较好的分离度,随着流速增加相应的保留时间缩短,虽然峰型较好但是分离度较低;相反流速降低,则整个出峰时间延长峰宽增加,因此综合考虑分离度与峰型选择 1 ml/min 的流速。与同位素标记的方法比较,本

方法操作简单快速,反应后样品处理过程方便,避免了复杂的层析分离过程和同位素标记的污染,而且测定结果准确和稳定,更适合于常规检测,但本方法需要配置有高效液相色谱设备。目前该方法已成功应用于 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶基因体外表达的研究,这将为阐明 H 抗原形成缺陷的机制和 $\alpha-1,2$ 岩藻糖基转移酶功能关系的研究提供帮助。

参考文献

- [1] Larsen RD, Ernst LK, Nair RP, *et al.* Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17): 6674-6678.
- [2] Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, *et al.* Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 5843-5847.
- [3] Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, *et al.* Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2) fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating non-sense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4640-4649.
- [4] Rouquier S, Lowe JB, Kelly RJ, *et al.* Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2) fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4632-4639.
- [5] Chester MA, Yates AD and Watkins WM. Phenyl P-D-Galactopyranoside as an Acceptor Substrate for the Blood-Group H Gene-Associated Guanosine Diphosphate L-Fucose: P-D-Galactosyl a-2-L-Fucosyltransferase [J]. *Eur J Biochem*, 1976, 69(2): 583-592.
- [6] Bhende YM, Deshpande CK, Bhatia HM, *et al.* A "new" blood group character related to the ABO system [J]. *Lancet*, 1952, 1(6714): 903-904.
- [7] Iwamori M and Domino SE. Tissue-specific loss of fucosylated glycolipids in mice with targeted deletion of $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase genes [J]. *Biochem J*, 2004, 380(Pt 1): 75-81.

(收稿日期: 2010-12-27)

(上接第 1079 页)

监督管理局已发布的检验补充批准件中明确规定蒲黄和黄连中不得检出金胺 O,不法商贩为了以次充好,必然会使用新的染色剂,只有多种色素同时测定才能更好更有效的控制中药材(饮片)的质量,才能减少或杜绝染色问题,才能还市场一个正常的秩序。

目前消费者购买饮片以为颜色鲜艳者质量为佳,所以才会出现如此严重的染色现象,目前市场上黄色或橙黄色类中药材(饮片)种类较多,如黄芩、黄柏、延胡索等,因此该方法可以推广到表面为黄色或橙黄色类中药材(饮片)的非法染色检测中去。

参考文献

- [1] 中国药典.一部 [S]. 2010.
- [2] 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.

- [3] 王建伟,梁焱琼.食品中对位红等禁用染料检测方法的研究及最新进展 [J]. *食品安全导刊*, 2009, 7: 40-41.
- [4] 凌关庭.食品添加剂手册 [M]. 第 2 版.北京:化学工业出版社, 1997: 541-546.
- [5] 刁晓霞.高效液相色谱法测定乳制品中的合成色素 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(4): 769-770.
- [6] 赵珊,张晶,杨奕,等.超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法检测果汁和葡萄酒中的 27 种工业染料 [J]. *色谱*, 2010, 28(4): 356-362.
- [7] 倪睿,杨龙彪,刘兰侠.固相萃取-高效液相色谱法测定饮料中 8 种色素 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(5): 991-992.
- [8] 邹耀华,殷红妹,郭怡飏,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.

(收稿日期: 2011-02-22)