

# 超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱法测定 乌梅中 19 种深色染色色素

胡青<sup>1</sup>, 林媛<sup>2</sup>, 张甦<sup>1</sup>, 郑希望<sup>2</sup>, 崔亚君<sup>2</sup>, 季申<sup>1\*</sup>

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱法建立乌梅中蓝色、绿色、黑色等多种色素检测方法。**方法** 药材经甲醇-0.1%甲酸水(V:V=3:2)超声提取3次, 提取液合并, 分别经弱阴离子 WAX 固相萃取柱和弱阳离子 WCX 固相萃取柱净化得到水溶性酸性色素待测溶液和水溶性碱性色素待测溶液, 最后采用超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱仪分析测定。**结果** 19种色素的加标回收率 62.3%~128.2%, 方法检测限为 0.5~345.5 μg/kg。将本方法用于实际样品分析, 检出部分乌梅有非法染色。**结论** 此方法灵敏、快速, 可用于测定乌梅非法染色。

**关键词:** 乌梅; 深色色素; 染色; 超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱法

## Detection of 19 dark pigments illegally added in *Mumu Fructus* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HU Qing<sup>1</sup>, LIN Yuan<sup>2</sup>, ZHANG Su<sup>1</sup>, ZHENG Xi-Wang<sup>2</sup>, CUI Ya-Jun<sup>2</sup>, JI Shen<sup>1\*</sup>

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for detection of 19 dark pigments illegally added in *Mumu Fructus* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with methanol-0.1% formic acid solution (V:V=3:2) by ultrasonic 3 times, cleaned up with WAX and WCX columns to obtain acidic and alkaline pigments tested solution, respectively. Finally, the analytes were detected by UHPLC-MS/MS. **Results** Recoveries of 19 kinds of dark pigments in *Mumu Fructus* were 62.3%~128.2%, and the limits of detection were 0.5~345.5 μg/kg. This method could be applied to sample analysis, and the results found some partial illegally added pigments in *Mumu Fructus*. **Conclusion** The established method is fast and sensitive, which can meet the determination requirements of dark pigments illegally added in *Mumu Fructus*.

**KEY WORDS:** *Mumu Fructus*; dark pigment; dye; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(14DZ2294000)

**Fund:** Supported by Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (14DZ2294000)

\*通讯作者: 季申, 主任药师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。E-mail: jishen2013@163.com

\*Corresponding author: JI Shen, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500 Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: jishen2013@163.com

## 1 引言

常用色素一般分为天然色素和人工合成色素。天然色素来自天然, 主要由植物组织中提取, 也包括一些来自动物、矿物、微生物的色素。人工合成色素是指用人工化学合成方法所制得的有机色素, 几乎所有的合成色素都不能向人体提供营养物质, 甚至某些合成色素会危害人体健康。

食品中对色素的使用种类和用量有严格规定。同样的, 虽然中药中不允许使用任何色素染色, 但近年来, 中药非法染色层出不穷<sup>[1-3]</sup>。中药基质特殊, 其染色具有不确定性。因此, 需要建立广谱筛查方法, 快速发现非法染色行为。国家颁布了系列补充检验方法作为药材中染色检测方法, 对净化市场发挥了一定的作用。但这些标准针对某种药材规定只能检测 1~5 种色素, 色素品种局限, 容易发生漏检。乌梅作为药食两用药材, 由于颜色较深, 其色素检测标准规定测定苋菜红、亮蓝、日落黄 3 种色素<sup>[4]</sup>。文献报道中对红、黄色素检测方法相对较多<sup>[5-8]</sup>, 但未见对蓝色、绿色、黑色等深色色素的检测方法报道。

因此, 本研究收集了市面上常见的深色色素, 根据性质分为酸性色素、碱性色素, 采用适宜溶剂提取, 分别经阴离子或阳离子交换固相萃取柱净化, 通过超高效液相色谱分离, 用三重串联四级杆质谱仪以多反应监测(MRM)模式对待测色素特定的离子对通道进行测定。该方法能够快速、准确地检测乌梅中染色的深色色素, 对其他药材深色色素染色筛查具有借鉴作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与耗材

#### 2.1.1 前处理试剂

乙腈、甲酸均为色谱纯试剂(德国 Merck 公司); 甲醇、氨水均为分析纯试剂(上海凌峰化学试剂有限公司)。

#### 2.1.2 质谱试剂

乙腈为质谱级试剂(德国 Merck 公司); 甲酸为色谱纯试剂(德国 Merck 公司); 甲酸铵为分析纯(瑞士 Fluka 公司)。

#### 2.1.3 色谱柱及固相萃取柱

ACQUITY UPLC®HSS T3 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm); Waters ACQUITY Guard Filter 在线过滤器(0.2 μm); Waters ACQUITY UPLC HSS T3 预柱(1.8 μm); 聚酰胺((PA) 固相萃取柱; oasis®WAX 6cc WAX 固相萃取柱; oasis®WCX 6cc WCX 固相萃取柱。

#### 2.1.4 色素品种及分组

根据色素的溶解性和酸碱性, 将蓝、绿、黑 3 类色素共 21 种分为水溶性酸性色素 X 组和水溶性碱性色素 J 组, 具体分类如下:

X 组包括: 酸性墨水蓝(B4)、羊毛绿(G2)、酸性绿 25(G3)、酸性黑 1(H1)、亮蓝 G(B1)、专利蓝 V(B2)、亮蓝(B6)、溶剂绿 7(G5)、溴百里酚蓝(B8)、靛蓝磺酸钠(B7)、茜素绿(G7)、基尼绿 B(G8)、固绿 FCF(G9)、酸性绿 SF(G10)、食品黑 1(H2)。

J 组: 碱性蓝 9(B9)、天青 A(B10)、孔雀石绿(G1)、隐形孔雀石绿(G6)。

本实验所用对照品信息详见表 1。

表 1 19 种色素对照品信息  
Table 1 Reference substance information of 19 pigments

序号	自编号	中文名	英文名	批号	化学式	厂家	纯度
1	G1	孔雀石绿	malachite Green	20501	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub>	Dr.E	96.9%
2	B4	酸性墨水蓝	methyl Blue	SLBB4827V	C <sub>37</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	Sigma	60.0%
3	G2	羊毛绿	green S	00624	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	Dr.E	96.0%
4	G3	酸性绿 25	acid Green 25	13227JOV	C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	Sigma	75.0%
5	H1	酸性黑 1	naphthol Blue Black	MKKB0226V	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	Sigma	无
6	B1	亮蓝 G	brilliant Blue G	SLBB221V	C <sub>47</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	Sigma	无
7	B2	专利蓝 V	patent Blue V	00728	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Dr.E	88.5%
8	B6	亮蓝	brilliant Blue FCF	40710	C <sub>37</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	Dr.E	98.0%
9	G5	溶剂绿 7	pyranine	GJ01-HBKA	C <sub>16</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	东京化成	85.0%
10	B8	溴百里酚蓝	bromothymol Blue	MKBR4619V	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> B <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	Sigma-Aldrich	95%
11	B7	靛蓝磺酸钠	indigotine	BCBD1142V	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ·2Na	Fluka	98%
12	B9	碱性蓝 9	methylene Blue	426046	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> SCl	Polyscience	无
13	G7	茜素绿	acid green 9	KNCQG-DC	C <sub>37</sub> H <sub>34</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na	东京化成	无

续表 1

序号	自编号	中文名	英文名	批号	化学式	厂家	纯度
14	G8	基尼绿 B	guinea Green B	04423HNV	C <sub>37</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na	Aldrich	50%
15	G9	固绿 FCF	food green 3	BCBD0137V	C <sub>37</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub> ·2Na	Fluka	98%
16	G10	酸性绿 SF	light Green SF	451782	C <sub>37</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> ·2Na	Polyscience	无
17	H2	食品黑 1	brilliant black PN	BCBN2507V	C <sub>28</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> ·4Na	Fluka	96%
18	G6	隐色孔雀石绿	leucomalachite green	1405114V	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub>	Fluka	98%
19	B10	天青 A	azure A	609044	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> S	Polyscience	无

## 2.2 样 品

选取可能会用蓝、绿、黑等深色色素染色的乌梅作为基质研究对象, 经鉴定为正品。具体信息如表 2 所示。

表 2 样品基本信息  
Table 2 Information of samples

样品	来源	批号
乌梅	上海	/
制乌梅	上海	131119
制乌梅	上海	13072202
乌梅	上海	130716
乌梅	安徽	/

## 2.3 仪 器

Agilent 1290 Infinity 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 6495 三重四级杆质谱仪, 双电喷雾离子源(美国 Agilent 公司); Millipore Milli-Q Gradient A10 纯水仪(美国 Millipore 公司); Sartorius CP225D 分析天平(德国 Sartorius 公司); BRANSON B9500S-DTH 超声仪(必能信上海超声仪器有限公司); eppendorf centrifuge 5810R 离心机(德国 eppendorf 公司); HWS-28 双列八孔恒温水浴(上海慧泰仪器制造有限公司); IKA HS 260 恒温摇床(艾卡广州仪器设备有限公司)。

## 2.4 对照品溶液的制备

根据上述色素分类, X 组、J 组分别取对照品 10 mg, 精密称定(精确至 0.1 mg), 用水溶解, 定容至 20 mL 配制为对照品储备液, 保存于 4 °C, 使用前放置恢复室温。按照需要进一步配制混合标准溶液。

## 2.5 供试品溶液的制备

精密称取药材粉末 1 g, 加甲醇-0.1%甲酸水(V:V=3:2)

20、10、10 mL 振摇提取 3 次, 每次 30 min, 合并提取液并用提取溶剂定容至 50 mL。

精密量取提取液 10 mL, 置 WAX 固相萃取小柱上(预先用甲醇活化), 依次用 8 mL 甲醇、4 mL 纯水除杂, 洗脱液弃去, 用氨水-甲醇-水(V:V:V=10:80:10) 8 mL 快速洗脱, 收集洗脱液, 用甲酸调节 pH 值近中性, 用纯水定容至 10 mL, 摇匀, 14000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为酸性色素待测溶液。

另精密量取提取液 10 mL, 置 WCX 固相萃取小柱上(预先用甲醇活化), 用 5%氨水溶液除杂, 洗脱液弃去, 用甲酸-甲醇-水(V:V:V=2:90:8) 8 mL 快速洗脱, 收集洗脱液, 加氨试液调节 pH 值近中性, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 14000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为碱性色素待测溶液。

## 2.6 色谱条件

流动相梯度洗脱条件见表 3(酸性组: A: 10 mmol/L 乙酸铵溶液, B: 乙腈; 碱性组: A: 10 mmol/L 乙酸铵溶液+0.1%甲酸溶液, B: 乙腈)。流速: 0.550 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 1 μL。各色素的提取离子流(EIC)叠加图见图 1、图 2。

表 3 流动相梯度洗脱条件  
Table 3 Gradient elution of liquid chromatography

时间(min)	酸性色素		时间(min)	碱性色素	
	A%	B%		A%	B%
0	95	5	0	50	50
7	60	40	5	30	70
10	20	80	8	5	95
12	5	95	10	5	95
20	5	95	11	95	5
21	95	5	12	95	5
23	95	5	13	50	50

## 2.7 串联质谱条件

扫描范围:  $m/z$  100~1000; 离子源参数: 雾化气 ( $N_2$ ): 20 psi; 干燥气( $N_2$ ): 流速 14 L/min, 温度 200 °C; 鞘气( $N_2$ ): 流速 11 L/min, 温度 350 °C; 毛细管电压

3.5 kV; 去极化电压: 1.5 kV, 离子漏斗参数高压 RF: 150 V, 离子漏斗参数低压 RF: 60 V。酸性色素采集模式: 负离子扫描模式; 碱性色素采集模式: 正离子扫描模式(表 4、5)。

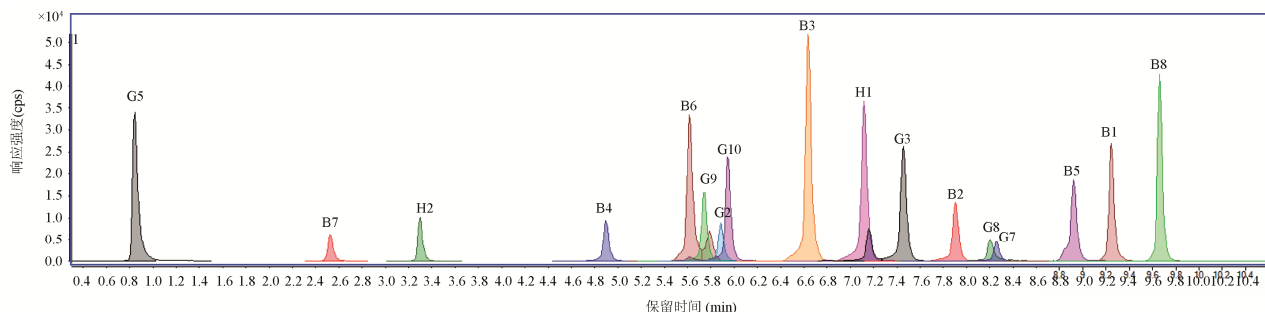


图1 酸性色素标准色谱图(负离子扫描模式)

Fig. 1 Chromatogram of acidic pigments (ESI<sup>-</sup>)

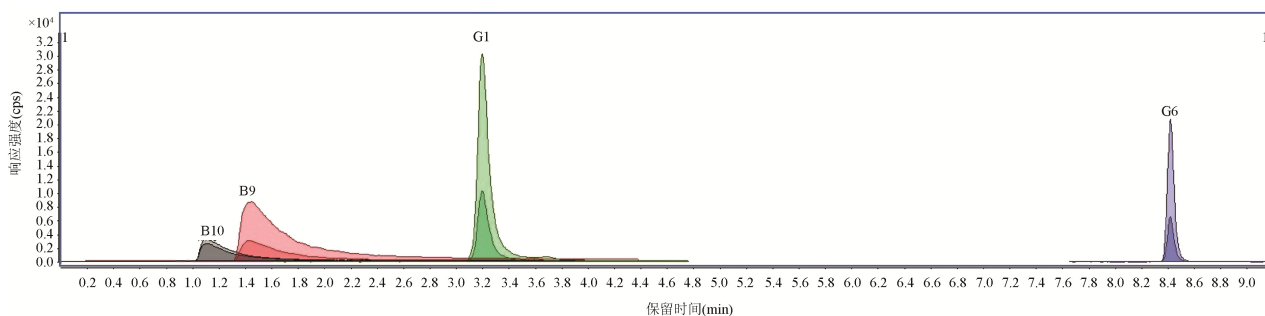


图2 碱性色素标准色谱图(阳离子扫描模式)

Fig. 2 Chromatogram of alkaline pigments (ESI<sup>+</sup>)

表4 酸性色素主要参考质谱参数

Table 4 Parameters for the analysis of acidic pigments

编号	保留时间(RT, min)	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	碰撞能量(eV)	子离子( $m/z$ )	碰撞能量(eV)
G5	0.9	228.0[M+H] <sup>2+</sup>	188.1	14	295.9	22
H1	7.1	285.0[M+H] <sup>2+</sup>	163.9	14	238.9	14
B6	5.6	747.0	683.1	34	/	/
B4	4.9	376.6[M+H] <sup>2+</sup>	336.4	20	502.9	40
G9	5.7	381.0[M+H] <sup>2+</sup>	170.0	34	497.3	22
B1	9.3	414.6[M+H] <sup>2+</sup>	169.9	40	644.2	20
B7	2.5	421.0	340.9	34	260.9	46
H2	3.3	518.4[M+H] <sup>2+</sup>	388.2	20	777.5	20
G2	5.9	553.0	511.1	34	523.1	46
B2	7.9	559.0	479.2	38	435.3	54
G3	7.5	577.1	479.1	38	392.1	42
B8	9.7	621.0	542.1	30	463.3	42
G8	8.2	667.0	587.2	38	497.3	42
G7	8.3	701.0	621.1	34	531.1	46
G10	6.0	747.0	341.1	14	683.2	42

### 3 结 果

#### 3.1 线性关系的考察

取对照品储备液逐级稀释测定, 以对照品峰面积与相应的浓度进行线性回归分析, 回归方程、相关系数及线性范围结果, 见表 6。

#### 3.2 回收率和重复性试验

取乌梅样品粗粉约 1 g, 精密称定, 一式 12 份, 以 3 份为 1 组(其中中等浓度为 6 份作为重复性试验), 按低、中、高 3 种浓度水平分别精密加入加样回收率用混合对照品溶液(加入提取溶剂时应扣除已加入的对照品混标溶液体积), 依法制备供试品溶液并测定含量, 计算回收率, 以中等浓度加样回收率计算重复性, 结果见表 7。

表 5 碱性色素主要参考质谱参数  
Table 5 Parameters for the analysis of alkaline pigments

编号	保留时间(RT, min)	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	碰撞能量(ev)	子离子( $m/z$ )	碰撞能量(ev)
B10	1.1	256.1	214.1	38	241.1	30
G1	3.2	329.2	313.2	46	165.0	74
G6	8.4	331.0	239.0	42	223.0	58
B9	1.5	284.1	268.0	46	252.0	66

表 6 线性方程及相关系数  
Table 6 Regress equations and correlation coefficients

色素品种	线性范围( $\mu\text{g/mL}$ )	回归方程	相关系数( $r$ )
G5	50~1000	$Y=214425.484089X-3753.759085$	0.9985
H1	50~1000	$Y=212685.543964X-302.857449$	0.9999
B6	50~5000	$Y=76610.627488X-2161.025386$	0.9999
B4	50~1000	$Y=2.749775X-85.483769$	0.9922
G9	50~5000	$Y=41335.850693X-862.118642$	0.9999
B1	50~1000	$Y=87.985046X-760.403969$	0.9999
B7	50~1000	$Y=12730.036993X+289.815307$	0.9985
H2	500~5000	$Y=4.661650X-2724.106755$	0.9964
G2	50~5000	$Y=23795.479836X-547.217145$	0.9999
B2	50~5000	$Y=90422.704800X-3262.536087$	0.9998
G3	50~5000	$Y=66453.076887X-665.601914$	0.9999
B8	50~5000	$Y=375629.356684X-69844.836841$	0.9957
G8	50~5000	$Y=24031.146107X+569.041018$	0.9997
G7	50~5000	$Y=21053.202348X-816.903949$	0.9998
G10	50~5000	$Y=63603.508123X+604.697071$	0.9997
B10	8~1000	$Y=46049.751064X-1321904.180081$	0.9981
G10	8~5000	$Y=7134.152920X-44648.565407$	0.9999
G1	1.6~1000	$Y=91759.172253X-1022981.896076$	0.9994
B9	1.6~1000	$Y=148549.522504X-3066961.176182$	0.9981

表 7 加样回收率及重复性  
Table 7 Recoveries and repeatability

色素品种	低浓度 mg/kg	回收率/%(n=3)	中浓度 mg/kg	回收率/%(n=3)	高浓度 mg/kg	回收率/%(n=3)	重复 RSD/%(n=6)
G5	5	97.1	10	93.2	15	104.2	6.0
B7	15	89.2	30	82.3	45	92.0	3.2
H2	25	72.5	50	68.5	75	81.0	3.5
B4	25	100.1	50	94.1	75	128.2	8.2
B6	10	65.3	20	87.1	30	85.0	5.7
G10	10	66.0	20	94.5	30	80.0	6.6
G9	5	84.2	10	83.2	15	91.0	1.7
G2	10	66.0	20	68.6	30	77.5	5.2
H1	5	80.3	10	81.2	15	89.3	4.0
G3	10	74.4	20	70.7	30	83.2	3.7
B2	5	65.2	10	71.5	15	79.1	5.4
G8	5	62.3	10	71.5	15	74.2	4.2
G7	5	63.3	10	62.3	15	72.3	8.6
B1	5	71.2	10	75.5	15	84.2	2.0
B8	5	65.6	10	72.5	15	86.1	2.7
B10	5	98.2	10	94.4	15	93.5	1.1
B9	5	92.2	10	88.6	15	89.2	1.3
G1	5	104.5	10	98.2	15	99.1	0.8
G10	5	98.5	10	94.3	15	89.1	4.3

续表 8

### 3.3 方法检测限

以加样回收率实验低浓度水平的供试品溶液, 进样测定信噪比, 分别以  $S/N$  为 3 时计算仪器检测限、方法检测限, 结果如表 8 所示。

### 3.4 样品测定结果

对从市场收集的乌梅, 按照 2.3 和 2.4 的方法, 提取、测定, 结果部分样品检出亮蓝、亮蓝 G(表 9)。

表 8 检测限  
Table 8 The limits of detection

色素品种	仪器检测限/pg	方法检测限( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
G5	0.4	19.3
H1	0.3	13.7
B6	1.3	66.7
B4	0.5	23.0
G9	2.4	119.0

色素品种	仪器检测限/pg	方法检测限( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
B1	0.5	22.8
B7	0.9	46.7
H2	4.7	236.8
G2	0.01	0.5
B2	1.5	76.5
G3	2.6	132.2
B8	0.2	8.3
G8	2.2	109.1
G7	0.1	5.5
G10	6.9	345.5
B10	0.2	7.5
G1	0.05	2.7
G10	0.1	4.0
B9	0.5	23.5

表 9 样品测定结果  
Table 9 Detection results of samples

药材	来源	批号	结果(mg/kg)
乌梅	上海	/	亮蓝 G(6.66)
制乌梅	上海	131119	未检出
制乌梅	上海	13072202	未检出
乌梅	上海	130716	未检出
乌梅	安徽	/	亮蓝(5.21)

## 4 讨 论

### 4.1 供试品溶液提取方法研究

色素种类繁多, 不同类型色素的理化性质有所差异, 特别是同时提取多种染色色素, 需要考察兼顾性好的提取方法。本研究制备了模拟染色样品, 用以考察优化最佳提取方法。

对提取方式、提取溶剂、提取时间和提取次数等影响因素进行考察, 选取最佳条件。通过考察振摇、超声、回流、索氏提取共 4 种提取方式, 实验结果发现, 4 种提取方式结果相差不大, 回流、索氏提取没有明显优势, 且高温易破坏色素的结构, 考虑实验成本, 操作简便等, 最终采用振摇作为提取方式。

文献中对于水溶性色素提取溶剂的报道一般以甲醇-0.1%甲酸水溶液, 经考察确定最佳比例提取溶剂为甲醇-0.1%甲酸水(V:V=3:2)。

分别考察振摇时间为 15、30、45 min 的实验结果, 结果显示 30 min 已达到最大提取效率。分别考察提取 2、3、4 次的实验结果, 结果显示提取 3 次与提取 4 次测得色素峰面积基本一致, 提示提取 3 次已基本提取完全。

### 4.2 供试品溶液净化方法研究

食品中色素测定标准采用的是水提取, 聚酰胺固相分散净化法, 该方法适用于食品基质<sup>[9]</sup>。为有效去除复杂中药基质干扰, 进一步富集待测色素, 本研究考察了聚酰胺固相萃取柱, 虽然有较好的通用性, 但对于含酸性、碱性成分较多的药材除杂效果有待提高, 故基于色素在溶液中电离呈离子状态, 进一步考察了阴离子交换、阳离子交换固相萃取柱以及对应的最佳净化方法。

在填料规格、洗脱溶液比例和洗脱溶剂体积等优化过程中, 肉眼直接观察柱子的颜色及洗脱液的颜色深浅进行比较, 选取最佳条件。

根据酸性色素可与弱阴离子交换柱(WAX)吸附洗脱原理, 考察最佳洗脱溶剂。分别用不同体积比的氨水-甲醇水溶液(5:80:15、10:30:60、10:40:50、10:50:40、10:60:30、10:70:20、10:80:10、10:90、15:80:5、1:80:19)洗脱。结果表明, 用氨水-甲醇水溶液(V:V:V=10:80:10)洗脱的小柱相

对其他比例的洗脱剂洗脱较干净, 故本实验选用 WAX 柱及氨水-甲醇水溶液(V:V:V=10:80:10)作洗脱剂。

根据碱性色素可与弱阳离子交换柱(WCX)吸附洗脱原理, 考察了最佳洗脱溶剂。分别用不同体积比的甲醇-甲酸水溶液(30:2:68、40:2:58、50:2:48、60:2:38、70:2:28、80:2:18、90:2:8、90:1:9、90:0.1:9.9、90:4:6)洗脱。结果表明, 用甲醇-甲酸水溶液(V:V:V=90:2:8)洗脱的小柱相对其他比例的洗脱剂洗脱较干净, 故本实验选用 WCX 柱及甲醇-甲酸水溶液(V:V:V=90:2:8)作洗脱剂。

### 4.3 色谱条件优化

经过对流动相梯度洗脱程序调整, 使多种色素达到分离。碱性色素组 B9、B10 色谱峰拖尾严重, 考虑到这 2 种化合物的性质, 需在流动相为强酸或强碱流动相条件下才能出比较好的峰形, 但极端流动相条件对大多色素不适用, 并会损伤色谱柱, 因此, 考虑到大多色素的兼顾性, 采用 2.4 流动相条件。

### 4.4 质谱条件优化

在全扫描模式下进样, 确定各色素母离子和响应最好的子离子及其碰撞能量。以响应最好的子离子作为定量离子, 响应略弱的作为定性离子。G5、H1、B3、B4 等色素易出现多电荷离子, 所以, 选择响应稳定的双电荷离子作为母离子。

### 4.5 2 种未成功纳入方法的色素

除上述 19 种色素, 还对反应艳蓝 19、酸性深蓝 113 色素也进行了研究, 但经方法学考察, 反应艳蓝 19 和酸性深蓝 113 在阴离子 WAX 柱上均发生死吸附导致回收率均较差, 故最终只将本研究中 19 色素纳入该检测方法。

## 5 结 论

本方法有效发现乌梅存在规避标准检测色素品种非法染色的情况, 弥补了检验标准的局限性。为快速有效发现非法染色行为, 高通量色素检测方法的研究开发已成为趋势, 课题组已开发多种色素的薄层、液相、液质联用检测方法<sup>[16-18]</sup>, 部分方法收载于《中国药典》2015 年版色素测定法指导原则<sup>[19]</sup>, 为打击非法染色行为提供了急需的技术支持。

### 参考文献

- [1] 蒋玲, 饶伟文, 彭飞燕, 等. 几种中药饮片的非法添加现象研究 [J]. 首都医药, 2011, 18(20): 46.
- [2] Jiang L, Rao WW, Peng FY, et al. Studies on illegally addition in decoction pieces [J]. Cap Food Med, 2011, 18(20): 46.
- [2] 魏锋, 刘薇, 严华, 等. 我国中药材及饮片的质量情况及有关问题分析 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 277-283.
- Wei F, Liu W, Yan H, et al. National wide quality surveillance and analysis

- of Chinese material medical and decoction pieces [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(4): 277–283.
- [3] 胡浩彬. 当前中药材和中药饮片三大制假方法分析[J]. *药学与临床研究*, 2012, 20(3): 261–263
- Hu HB. Three concocting behavior of Chinese material medical and decoction pieces [J]. *Pharm Clin Res*, 2012, 20 (3): 261–263.
- [4] 2009001 国家药品补充检验方法和检验项目批准件[S].  
2009001 State supplemental testing method for drug [S].
- [5] 李启艳, 朱日然, 孙萍, 等. HPLC-DAD 法检测染红中药中 20 种非法添加色素[J]. *医学导报*, 2015, 34(5): 655–657.
- Li QY, Zhu RR, Sun P, *et al.* Simultaneous determination of 20 pigments in illegally dyed Chinese herbs by HPLC-DAD [J]. *Herald Med*, 2015, 34(5): 655–657.
- [6] 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): 2724–2728.
- Zou YH, Yin HM, Guo YB, *et al.* Determination of eleven colouring agent in Saffron and Safflower with HPLC-PDA [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(11): 2724–2728.
- [7] 郑娟, 邹耀华. HPLC-PDA 法检测蒲黄和黄连中十种非法添加色素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(5): 1078–1082.
- Zheng J, Zou YH. Determination of ten colouring agent in pollen typhae and pollen typhae with HPLC-PDA [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(5): 1078–1082.
- [8] 汪建君, 陈惠玲. HPLC-PDA 法检测正天丸和正天胶囊中 6 种非法添加色素[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(1): 51–53.
- Wang JJ, Chen HL. Determination of six pigments illegally added in zhengtian pill and zhengtian capsule by HPLC-PDA [J]. *Drug Eval Res*, 2013, 36(1): 51–53.
- [9] GB/T 5009.35-2003 食品中合成着色剂的测定[S].  
GB/T 5009.35-2003 Determination of synthetic color in foods [S].
- [10] He GG, Wei JG, Yong GZ. Rapid method for quantification of seven synthetic pigments in colored Chinese steamed buns using UPLC-MS/MS without SPE [J]. *Anal Sci*, 2015, 31(3): 205–210.
- [11] Ping Q, Zi HL, Gui YC. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 181(15): 101–110.
- [12] Feng F, Zhao YS, Wei Y, *et al.* Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(20): 1813–1818.
- [13] 郭新东, 洗燕萍, 罗海英, 等. 凝胶净化/超高效液相色谱串联质谱法测定调味酱中 32 种工业染料[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(6): 658–663.
- Guo XD, Xian YP, Luo HY, *et al.* Determination of 32 industrial dyes in seasoning paste by gel permeation chromatography and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2012, 31(6): 658–663.
- [14] 赵延胜, 杨敏莉, 张峰, 等. 四极杆-飞行时间质谱法筛查奶酪中 29 种禁用和限用合成色素[J]. *色谱*, 2011, 29(7): 631–636.
- Zhao YS, Yang ML, Zhang F, *et al.* Screening method for 29 forbidden or limited synthetic pigments in cheese by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(7): 631–636.
- [15] 王萍亚, 周勇, 戴意飞, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速筛查水产品中 28 种酸性合成色素[J]. *色谱*, 2015, 33(8): 822–829.
- Wang PY, Zhou Y, Dai YF, *et al.* Rapid screening of 28 acidic artificial dyes in fishery products by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(8): 822–829.
- [16] 胡青, 孙健, 张魁, 等. 中药中 48 种非法染色色素的 TLC 法检测[J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46(7): 695–700.
- Hu Q, Sun J, Zhang S, *et al.* Simultaneous detection of 48 banned pigments in traditional Chinese medicine by TLC [J]. *Chin J Pharm*, 2015, 46(7): 695–700.
- [17] 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.
- Sun J, Feng R, Hu Q, *et al.* Simultaneous detection of sixteen synthetic acid pigments in medicinal Chinese herbs by polyamide SPE-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, 37(5): 1031–1036.
- [18] 方琳. 中药中染色色素通用检测方法的研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2014.
- Fang L. Simultaneous detection of banned dyes in traditional Chinese medicine [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [19] 中国药典 2015 年版四部[S].  
Chinese Pharmacopoeia 2015 IV [S].

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



胡青, 副主任药师, 主要研究方向为中药质量控制和安全性检测技术研究。  
E-mail: huqingyjs@163.com



季申, 主任药师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。  
E-mail: jishen2013@163.com