LC-MS/MS 定量分析药用明胶空心胶囊中合成色素的含量

赵海云，李玉杰，张冬梅，杨娜，凌霄 *

（山东省食品药品检验研究院，济南 250101）

摘要　目的：建立药用明胶空心胶囊样品中 22 种合成色素的超高效液相色谱 / 三重四极杆质谱定量分析方法。**方法：**样品经 60 ℃水、乙醇 – 水（7∶3）及乙腈浸泡超声提取，提取液采用聚酰胺粉吸附，固相萃取柱净化，分别以无水乙醇 – 水（3∶7）、无水乙醇 –2% 氨水 – 水（7∶2∶1）、乙腈解吸附，洗至聚酰胺粉无色；收集解吸液，旋蒸浓缩，加 50% 乙腈定容，经 0.22 μm 滤膜过滤，进样分析。**结果：**10 种限用色素线性浓度范围为 5~500 mg·L^{-1}，12 种禁用色素的线性浓度范围为 0.002~12.5 mg·L^{-1}；22 种合成色素均得到有效提取，加标提取回收率为 72.1%~100.3%，检出限为 0.5~284 μg·L^{-1}；146 批次样品中，GB2760–2014 规定允许作为食品添加剂使用的 11 种合成色素中，共检出 8 种，分别为柠檬黄、亮蓝、胭脂红、赤藓红、苋菜红、诱惑红、日落黄、喹啉黄，其中柠檬黄与亮蓝使用频率较高；禁用的合成色素中，15 批次样品检出坚牢绿。**结论：**该方法对药用明胶空心胶囊中合成色素的定量分析有良好的适用性。采用建立方法，对多家企业产品进行测定，发现合成色素存在滥用现象，鉴于合成色素的危害性，其在制药工业中的使用品种、使用限量和安全性评价以及标签标示管理等方面应引起重视。

关键词：药用辅料；明胶空心胶囊；色素定量；柠檬黄；亮蓝；胭脂红；赤藓红；苋菜红；诱惑红；日落黄；喹啉黄；

中图分类号：R 917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0254–1793（2017）07–1329–09

doi：10.16155/j.0254–1793.2017.07.26

Quantitative determination for 22 synthetic pigments in medical gelatin capsule shells by liquid chromatography–MS/MS

ZHAO Hai–yun, LI Yu–jie, ZHANG Dong–mei, YANG Na, LING Xiao *

（Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101）

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis method for 22 synthetic pigments by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Method:** The sample was soaked and extracted by 60 ℃ water、ethanol–water（7∶3）and acetonitrile. After extraction, the solution was absorbed by polyamide powder, then purified by solid phase chromatography, desorbed by absolute alcohol–water（3∶7）、absolute alcohol–2% ammonia solution–water（7∶2∶1）and acetonitrile until the polyamide powder became colorless. The collected solution was concentrated by rotary evaporation, diluted by 50% acetonitrile and filtrated by 0. 22 μm filter membrane, then quantified by UPLC–MS/MS. **Results:** The results showed that for the 10 limited synthetic pigments, the linearity range was 5–500 mg·L^{-1};

* 通信作者　Tel:（0531）81216551; Email: Xiaol6551@126.com
第一作者　Tel:（0531）81216550; Email: helen8204@126.com

For the 12 forbidden synthetic pigments, the linearity range was 0.002–12.5 mg·L^{-1}; 22 synthetic pigments were all extracted effectively. The spiked recoveries ranged from 72.1%–100.3%, and the detection limits ranged from 0.5–284 μg·L^{-1}. In 146 batches of samples, 8 of 11 kinds of synthetic pigment permitted to be used as food additives by GB 2760–2014 were detected. They are citric yellow, bright blue, carmine, erythrosine, amaranth, temptation red, sunset yellow and quinoline yellow, respectively. Among these pigments, lemon yellow and light blue are used much more frequently. Fast green, a forbidden pigment was found in 15 batches. **Conclusion:** The method is suitable for quantitative determination for 22 synthetic pigments in medical gelatin capsule shells. Samples from different manufacturers were tested by established methods and abuse of synthetic pigments was found. In view of the dangers of synthetic pigment in pharmaceutical industry, we should pay more attention to the varieties、the limit、safety evaluation and label management of these products.

Keyword: pharmaceutic excipient; synthetic pigments assay; medical gelatin capsule shells; citric yellow; bright blue; carmine; erythrosine; amaranth; temptation red; sunset yellow; quinoline yellow; UPLC–MS/MS

合成色素即人工合成的色素虽具有诸如色泽鲜艳,着色力强等诸多优点,但其毒性及致癌性,长久以来饱受安全性争议。特别是偶氮化合物类合成色素的致癌作用,在国际癌症研究机构(IARC)公布的化学物质对人体致癌性综合评价报告中,苋菜红、酸性红、日落黄均被列为三级致癌物。目前我国食品添加剂使用标准中允许使用的偶氮类色素有日落黄、柠檬黄、胭脂红、苋菜红、酸性红、诱惑红、新红、喹啉黄,非偶氮类色素有赤藓红、亮蓝、靛蓝。

我国食品安全国家标准 GB 2760–2014 规定了允许作为食品添加剂使用的 11 种食用合成色素的使用原则、使用范围及最大使用量。但合成色素作为药用,却未有明确的标准规定,中国药典 2015 年版既没有对明胶空心胶囊的色素检查项,也没有对允许使用的合成食用色素的种类和最大使用量做出规定。这就造成空心胶囊中食用合成色素的添加种类与添加量既无标准可循,又无明确管理办法,存在监管漏洞。

本文以药用明胶空心胶囊为研究对象,采用超高效液相色谱/三重四极杆质谱建立了 22 种合成色素的定量分析方法。

1 仪器与材料

仪器:LC–MS/MS8050 超高效液相色谱–三重四极杆串联质谱(岛津公司)

色谱柱:Hypersil GOLD 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(150 mm×3.5 mm 2.1 μm;Thermo 公司)

IKA RV10 旋转蒸发仪 TC–502 恒温水浴固相萃取仪(Agilent 公司)0.22 μm 为微孔滤膜(waters 公司) Millipore 超纯水机等

试剂:乙酸铵、乙腈(色谱纯德国 merck 公司),无水乙醇、甲醇(天津康科德试剂有限公司),200 目聚酰胺粉(国药集团公司)等

色素对照品:柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、新红、酸性红 73、诱惑红、赤藓红、亮蓝、靛蓝均购自中国食品药品检定研究院;专利蓝、坚牢绿、孔雀石绿、喹啉黄、罗丹明 B、碱性紫、金胺 0、金橙Ⅱ、苏丹红Ⅰ、苏丹红Ⅱ、苏丹红Ⅲ、苏丹红Ⅳ均购自德国 Dr.Ehrenstorfer。

146 批次药用明胶空心胶囊产品,均来自山东省药品安全质量风险监测抽样,分别抽自 21 家胶囊生产企业。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

参照 GB/T 5009.35–2003 食品中合成着色剂的测定中样品前处理方法[1]。因所选色素极性跨度较大,故提取过程中增加水与乙腈的提取,同时将 G3 垂熔漏斗纯化改为固相萃取柱纯化,减少解吸液的使用。称取胶囊 1.0 g,置 50 mL 离心管中,加 60 ℃水 10 mL, 超 声(500 W,40 kHz)10 min,3 000 r·min^{-1} 离心 5 min,取上清液置蒸发皿中,按上述方法重复提取 3 次,再以 60 ℃无水乙醇–水(7∶3)与乙腈同法依次提取。水提取物无需纯化,移至蒸发皿,置水浴锅上蒸发至近干,待用。取有机相提取液合并上清液,置 60 ℃水浴上蒸至近干,加入 2 g 聚酰胺粉,使色素完全吸附,将聚酰胺粉上固相萃取小柱,分别以乙醇–水(30∶70)、无水乙醇–2% 氨水–水(7∶2∶1)、乙腈为解吸液各 10 mL,重复提取 3 次,依

次提取，洗至聚酰胺粉无色；收集解吸液，旋蒸浓缩，合并水提取物，加 50% 乙腈定容至 10 mL 量瓶中，经 0.22 μm 滤膜过滤，进样分析；根据需要，对含色素浓度超出线性范围批次，进行 25 倍、50 倍稀释。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取或量取胭脂红、苋菜红、日落黄、赤藓红、诱惑红、柠檬黄、新红、靛蓝、亮蓝、喹啉黄、酸性红 73、坚牢绿、孔雀石绿、专利蓝、罗丹明、碱性紫、金胺 0、金橙Ⅱ、苏丹Ⅰ、苏丹Ⅱ、苏丹Ⅲ、苏丹Ⅳ各色素对照品适量，加 50% 乙腈溶解并稀释配制至适宜浓度，作为对照品储备液。综合考虑食品中限用色素的允许添加限度与质谱响应值，最终确定标准品溶液中 10 种限用色素浓度为 5~500 $mg\cdot L^{-1}$，12 种禁用色素的浓度为 0.002~12.5 $mg\cdot L^{-1}$。

2.3 液相色谱 – 质谱条件

液相色谱条件：流动相 A：10mMol 乙酸铵 +0.1% 甲酸流动相 B：乙腈，梯度洗脱（见表 1）；检测波长：254 nm、500 nm；柱温：35 ℃进样量：1 μL；质谱条件：电喷雾离子源（ESI）雾化气流速：3.0 $L\cdot min^{-1}$；加热气流速：10.0 $L\cdot min^{-1}$；干燥气流速：10.0 $L\cdot min^{-1}$；接口温度：300 ℃；脱溶剂管温度：200 ℃；加热器温度：300 ℃；扫描方式：多反应检测模式（MRM）分段扫描。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure

时间（time）/min	流动相 A（mobile phase A）/%	流动相 B（mobile phase B）/%
0	90	10
3	85	15
15	70	30
25	20	80
25.1	5	95
32	5	95
32.1	90	10
40	90	10

2.4 质谱条件优化

首先运行单个对照品的全扫描，确定特征母离子与离子模式；再通过 MRM 自动优化，选定各色素的两组子离子（1 组作为定量离子，1 组作为定性离子）及碰撞电压，22 种合成色素基本信息及质谱条件见表 2。

表 2 种合成色素基本信息及质谱条件

Tab. 2 The basic information of 22 synthetic pigments and mass conditions

色素名称（name of pigments）	分子式（molecular formula）	理论相对分子量（theoretical relative molecular weight）	离子模式（ion mode）	母离子（parent ion）	子离子（daughter ion）	碰撞电压（collision voltage）/kV	CAS No.
柠檬黄（tartrazine）	$C_{16}H_{12}N_4O_9S_2$	468.00	ESI^-	467.00	198.10* 423.20	19.0	1934-21-0
新红（new red）	$C_{18}H_{15}N_3O_{11}S_3$	544.99	ESI^-	271.65	172.0* 185.0	16.0	220658-76-4
苋菜红（amaranth）	$C_{20}H_{14}N_2O_{10}S_3$	537.98	ESI^-	268.10	206.05* 228.10	19.0	915-67-3
胭脂红（carmine）	$C_{20}H_{14}N_2O_{10}S_{33}$	537.98	ESI^-	268.15	206.05* 222.10	14.0	2611-82-7
诱惑红（allura red）	$C_{18}H_{16}N_2O_8S_2$	452.03	ESI^-	225.15	207.05* 214.00	16.0	25956-17-6
日落黄（sunset yellow）	$C_{16}H_{12}N_2O_7S_2$	408.01	ESI^-	203.10	171.05* 142.10	30.0	2783-94-0
赤藓红（erythrosine）	$C_{20}H_8I_4O_5$	835.66	ESI^-	834.65	662.70* 536.85	36.0	568-63-8

表 2(续)

色素名称(name of pigments)	分子式(molecular formula)	理论相对分子量(theoretical relative molecular weight)	离子模式(ion mode)	母离子(parent ion)	子离子(daughter ion)	碰撞电压(collision voltage)/kV	CAS No.
酸性红 73(carmosine 73)	$C_{22}H_{14}N_4Na_2O_7S_2$	556.48	ESI^-	511.00	302.10* 222.10	24.0	5413-75-2
亮蓝(brilliant blue)	$C_{37}H_{36}N_2O_9S_3$	748.16	ESI^-	747.15	170.15* 561.05	55.0	3844-45-9
靛蓝(indigo)	$C_{16}H_{10}N_2O_8S_2$	421.99	ESI^+	263.10	77.0* 235.10	-15.0	860-22-0
喹啉黄(quinoline yellow)	$C_{18}H_{11}NO_8S_2$	432.99	ESI^-	352.10	288.20* 244.20	30.0	8004-92-0
坚牢绿(fast green)	$C_{37}H_{36}N_2O_{10}S_3$	764.15	ESI^+	765.20	306.05* 473.95	-45.0	2353-45-9
孔雀石绿(malachite green oxalate)	$C_{23}H_{25}ClN_2$	364.92	ESI^+	329.20	313.15* 208.10	-45.0	510-13-4
金胺 O(auramine)	$C_{17}H_{21}N_3 \cdot HCl$	303.84	ESI^+	268.15	147.05* 122.05	-30.0	2465-27-2
金橙Ⅱ(orange Ⅱ)	$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$	350.32	ESI^-	327.10	171.15* 156.10	26.0	633-96-5
罗丹明 B(rhodamine B)	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	479.01	ESI^+	443.20	399.20* 413.20	-45.0	81-88-9
碱性紫(methyl violet)	$C_{25}H_{30}ClN_3$	407.98	ESI^+	372.00	356.30* 340.10	-38.0	548-62-9
专利蓝(patent blue)	$C_{27}H_{32}N_2O_7S_2$	560.17	ESI^-	559.10	435.00* 479.25	44.0	3536-49-0
苏丹红Ⅰ(sudan red Ⅰ)	$C_{16}H_{12}N_2O$	248.10	ESI^+	249.20	93.05* 156.05	-30.0	842-07-9
苏丹红Ⅱ(sudan red Ⅱ)	$C_{18}H_{16}N_2O$	276.13	ESI^+	277.20	121.05* 156.00	-35.0	3118-97-6
苏丹红Ⅲ(Sudan red Ⅲ)	$C_{22}H_{16}N_4O$	352.13	ESI^+	353.25	77.05* 156.05	-27.0	85-86-9
苏丹红Ⅳ(sudan red Ⅳ)	$C_{24}H_{20}N_4O$	380.16	ESI^+	381.25	106.10* 225.15	-34.0	85-83-6

*定量离子(quantitative ion)

2.5 对照品溶液的液相色谱图与 MRM 色谱图

因所选色素颜色、结构差异较大,故紫外最大吸收波长跨度较大,紫外检测波长较难选定。以 254 nm 波长处吸收作为对照品溶液的液相色谱图见图 1,MRM 色谱图见图 2.

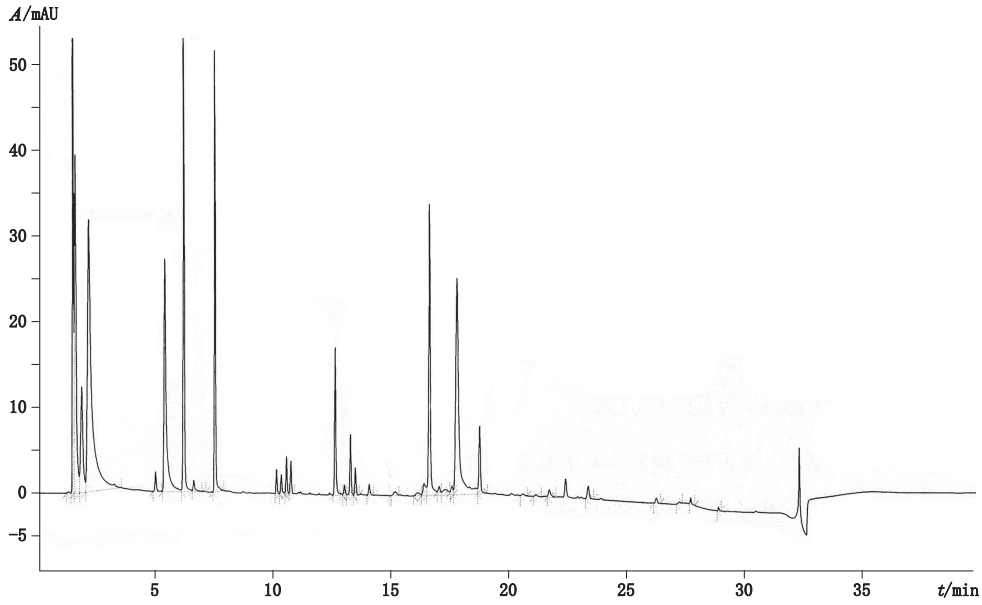
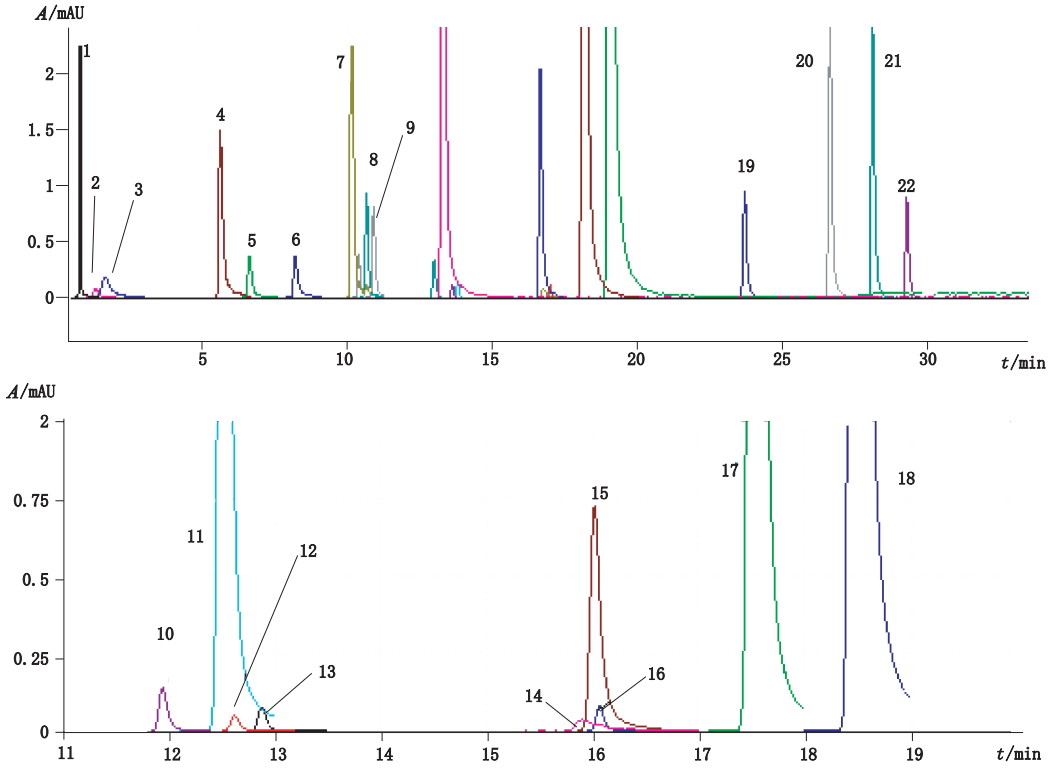


图 1　对照品溶液的液相色谱图

Fig. 1　The chromatogram of standard solution



（11 min~20 min 局部放大图）

1. 柠檬黄（tartrazine） 2. 新红（new red） 3. 苋菜红（amaranth ） 4. 胭脂红（carmine） 5. 日落黄（sunset yellow） 6. 诱惑红（allura red） 7. 坚牢绿（fast green） 8. 亮蓝（brilliant blue） 9：喹啉黄（quinoline yellow） 10. 酸性红（carmosine 73）73 11. 金胺 O（auramine ） 12. 金橙Ⅱ（orange Ⅱ） 13. 专利蓝（patent blue） 14：靛蓝（indigo） 15. 孔雀石绿（malachite green oxalate） 16. 赤藓红（erythrosine ） 17. 罗丹明 B（rhodamine B） 18. 碱性紫（methyl violet） 19. 苏丹红Ⅰ（sudan red Ⅰ） 20. 苏丹红Ⅱ（sudan red Ⅱ） 21. 苏丹红Ⅲ（sudan red Ⅲ） 22. 苏丹红Ⅳ（sudan red Ⅳ）

图 2　对照品溶液的 MRM 色谱图

Fig. 2　The MRM spectrogram of standard solution

2.6 滤膜吸附试验

为避免滤膜吸附，致使测定结果偏低，采用标准品溶液分别经直接进样与经滤膜过滤后进样；测定各合成色素响应值的变化。比较了津腾 0.22 μm 有机滤膜与 waters Acrodisc syringe 0.22 μm 滤膜的吸附性。经验证，2 种滤膜对赤藓红、碱性紫、苏丹Ⅰ~Ⅳ等色素均有不同程度吸附，但 waters Acrodisc syringe 0.22 μm 滤膜明显优于津腾 0.22 μm 有机滤膜。采用 waters Acrodisc syringe 0.22 μm 滤膜，除赤藓红回收率为 92.1%，碱性紫、苏丹Ⅰ~Ⅳ为 77%~85%，其它各合成色素的回收率均在 95%~101% 之间。

2.7 方法的精密度、线性、检出限与定量限

取同一对照品溶液连续进样 6 次，22 种色素峰面积的相对标准偏差为 0.1%~4.8%。取对照品储备液，加 50% 的乙腈稀释配制成 10%~200% 的标准品溶液，按上述条件分析，以定量离子对峰面积与相应浓度进行线性回归，得到回归方程，线性关系均良好。取对照品溶液，加 50% 的乙腈逐步稀释至适宜浓度，根据其计算所得信噪比，以 3 倍与 10 倍信噪比（S/N）对应浓度，计算检出限与定量限，测定结果详见表 3。

表 3 各合成色素精密度、线性与检出限

Tab. 3 The precision, linerity and detection limit of synthetic pigments

色素名称（name of pigments）	精密度（precision），RSD/%	线性范围（linearity range）/（$mg \cdot L^{-1}$）	线性方程（linear equation）	回归系数（regression coefficient）R^2	检出限（limit of detection）/（$\mu g \cdot L^{-1}$）	定量限（limit of quantitation）/（$\mu g \cdot L^{-1}$）
柠檬黄（tartrazine）	1.5	10~155	$Y=540.7X-4.054\times10^3$	0.996	43.0	142.0
新红（new red）	3.6	1~25	$Y=2.557\times10^3X+1.235\times10^4$	0.993	92.3	304.0
苋菜红（amaranth）	4.8	5.0~101	$Y=5.501\times10^3X+1.633\times10^3$	0.997	96.0	288.0
胭脂红（carmine）	4.6	2.5~492	$Y=3.214\times10^3X+1.163\times10^4$	0.997	62.3	206.0
日落黄（sunset yellow）	0.5	20~384	$Y=2.149\times10^3X+1.150\times10^5$	0.997	46.2	152.0
喹啉黄（quinoline yellow）	0.2	1.0~2.0	$Y=1.036\times10^4X-484.2$	0.999	17.7	58.1
亮蓝（brilliant blue）	0.2	1.0~153	$Y=1.268\times10^4X+1.650\times10^4$	0.996	20.1	60.0
靛蓝（iIndigo）	0.4	0.4~11.94	$Y=1.631\times10^4X-6.386\times10^3$	0.990	28.4	63.8
酸性红 73（carmosine 73）	0.2	1.0~199	$Y=7.365\times10^4X-5.050\times10^3$	0.999	3.7	12.2
诱惑红（allura red）	0.4	2.5~49	$Y=3.303\times10^3X+1.626\times10^4$	0.991	33.9	112.0
赤藓红（erythrosine）	0.1	2.5~500	$Y=2.227\times10^4X-3.397\times10^3$	0.998	23.7	78.4
金橙Ⅱ（orange Ⅱ）	0.2	0.1~1	$Y=1.723\times10^4X-309.1$	0.999	6.2	18.2
金胺 O（auramine）	0.1	0.002~0.069	$Y=2.738\times10^7X-1.101\times10^4$	0.999	0.2	0.5
专利蓝（patent blue）	0.1	0.5~12.5	$Y=6.177\times10^4X+6.453\times10^3$	0.996	4.5	14.8
坚牢绿（fast green）	0.2	0.049~0.778	$Y=4.265\times10^4X-553.9$	0.998	9.6	31.7
孔雀石绿（malachite green oxalate）	0.1	0.002~0.08	$Y=4.716\times10^6X+1.599\times10^3$	0.998	1.0	3.0
罗丹明 B（rhodamine B）	0.1	0.002~0.08	$Y=5.355\times10^7X+1.163\times10^3$	0.999	0.5	1.5
碱性紫（methyl violet）	0.2	0.02~0.816	$Y=1.017\times10^7X-2.462\times10^3$	0.997	0.5	1.5
苏丹红Ⅰ（sudan red Ⅰ）	0.2	0.004~0.07	$Y=2.553\times10^7X+1.858\times10^3$	0.999	1.4	4.6
苏丹红Ⅱ（sudan red Ⅱ）	0.2	0.004~0.07	$Y=4.712\times10^7X+5.428\times10^3$	0.999	1.2	3.8
苏丹红Ⅲ（sudan red Ⅲ）	0.1	0.004~0.07	$Y=6.994\times10^6+5.087\times10^3$	1.000	1.2	3.8
苏丹红Ⅳ（sudan red Ⅳ）	0.1	0.004~0.07	$Y=3.266\times10^6X+2.270\times10^3$	0.999	1.4	4.9

2.8 方法的准确度

2.8.1 提取溶剂与提取时间的验证 称取未加任何色素的透明胶囊 1.0 g,置 50 mL 离心管中,加入标准品溶液 1 mL,分别考察提取液用了(分别加入提取液 60 ℃水、60 ℃无水乙醇 – 水(7∶3)与乙腈各 5、10、15 mL 依次提取 3 次;)、考察超声时间(超声 5、10、15 min)与解吸液用量(各 5、10、15 mL),考察方法的提取效率。经考察,提取液 / 解吸液每次用量为 5 mL 时,提取 / 解吸不完全,仍有部分色素不能完全提取;提取液 / 解吸液每次用量为 10 mL 时,色素提取 / 解吸完全,胶囊 / 聚酰胺粉颜色基本呈无色;提取液每次用量为 15 mL 时,色素提取完全,溶剂量使用大,导致后续蒸干所需时间延长;超声时间过短,仍有部分色素积聚在离心管底部,不能完全提取;超声 10 min 与超声 15 min,提取效果均较理想。根据考察结果确定提取方法为:"称取供试品 1.0 g,置 50 mL 离心管中,加 60 ℃水 10 mL,超 声(500 W,40 kHZ)10 min,3 000 r·min^{-1} 离心 5 min,取上清液置蒸发皿中,按上述方法重复提取 3 次,再以 60 ℃无水乙醇 – 水(7∶3)与乙腈同法依次提取。水提取物无需纯化,移至蒸发皿,置水浴锅上蒸发至近干,待用。取有机相提取液合并上清液,置 60 ℃水浴上蒸至近干,加入 2 g 聚酰胺粉,使色素完全吸附,将聚酰胺粉上固相萃取小柱,分别以乙醇 – 水(30∶70)、无水乙醇 –2% 氨水 – 水(7∶2∶1)、乙腈为解吸液各 10 mL,重复提取 3 次,依次提取,洗至聚酰胺粉无色;收集解吸液,旋蒸浓缩,合并水提取物,加 50% 乙腈定容至 10 mL 量瓶中,经 0.22 μm 滤膜过滤,进样分析"。

2.8.2 方法回收率 称取未加任何色素的透明胶囊 1.0 g,置 50 mL 离心管中,分别加入对照品溶液 0.8、1 与 1.2 mL,按照上述方法进行处理后,每个浓度平行 3 份样品测定加标回收率和 RSD。除苏丹Ⅰ ~ Ⅳ回收率在 72.1%~75.2% 外,其他各色素加标回收率在 75.9%~100.3%,RSD 在 1.4%~5.3%,测定结果详见表 4。

表 4 22 种合成色素加标回收率及 RSD

Tab. 4 The recoveries and RSD of 22 synthetic pigments

色素名称(name of pigments)	对照品浓度(standard concentration)/(mg·L^{-1})	80%		100%		120%	
		回收率(recovery)/%	RSD/%	回收率(recovery)/%	RSD/%	回收率(recovery)/%	RSD/%
柠檬黄(tartrazine)	50	84.4	4.5	83.2	3.9	85.1	4.1
新红(new red)	10	79..2	5.0	79.7	4.5	82.5	4.3
苋菜红(amaranth)	50	76.3	5.2	78.4	5.1	75.9	4.7
胭脂红(carmine)	25	77.1	5.0	78.8	4.6	79.7	4.1
日落黄(sunset yellow)	25	89.3	3.4	89.9	3.2	90.8	2.7
喹啉黄(quinoline yellow)	5	94.8	2.7	93.3	2.1	94.2	2.3
亮蓝(brilliant blue)	10	88.3	2.9	89.7	1.9	90.9	2.2
靛蓝(indigo)	10	78.0	5.2	78.9	4.8	79.5	4.1
酸性红 73(carmosine 73)	10	91.2	2.6	92.7	2.3	94.3	2.6
诱惑红(allura red)	25	94.3	3.0	95.6	2.4	96.7	2.9
赤藓红(erythrosine)	25	84.2	4.4	86.5	4.8	84.1	5.3
金橙Ⅱ(orange Ⅱ)	5	99.2	1.4	96.7	2.1	97.5	2.9
金胺 O(auramine)	0.25	97.2	2.0	96.1	3.2	95.6	2.6
专利蓝(patent blue)	2.5	90.2	2.6	94.2	2.5	93.1	2.7
坚牢绿(fast green)	2.5	88.5	3.5	89.3	2.9	92.0	3.4
孔雀石绿(malachite green oxalate)	0.25	94.6	2.0	99.8	3.7	97.5	2.9
罗丹明 B(rhodamine B)	0.25	96.7	3.0	100.3	3.2	97.5	2.9
碱性紫(methyl violet)	2.5	80.9	5.1	79.7	4.1	84.0	4.7
苏丹红Ⅰ(sudan red Ⅰ)	0.5	72.1	4.3	74.3	4.6	75.0	4.3
苏丹红Ⅱ(sudan red Ⅱ)	0.5	73.6	4.5	75.1	3.4	74.9	5.0
苏丹红Ⅲ(sudan red Ⅲ)	0.5	73.1	3.9	74.8	4.8	75.2	4.2
苏丹红Ⅳ(sudan red Ⅳ)	0.5	72.9	4.0	73.9	4.3	74.6	4.3

2.9 样品测试结果计算

使用建立的方法对抽验的146批次明胶空心胶囊进行测定,采用各色素线性方程计算样品中色素浓度,采用下式计算胶囊中色素含量:

色素($g \cdot kg^{-1}$)$=C \times V/W$

其中 C:线性方程计算所得色素浓度 V:供试品稀释体积 W:供试品称样量

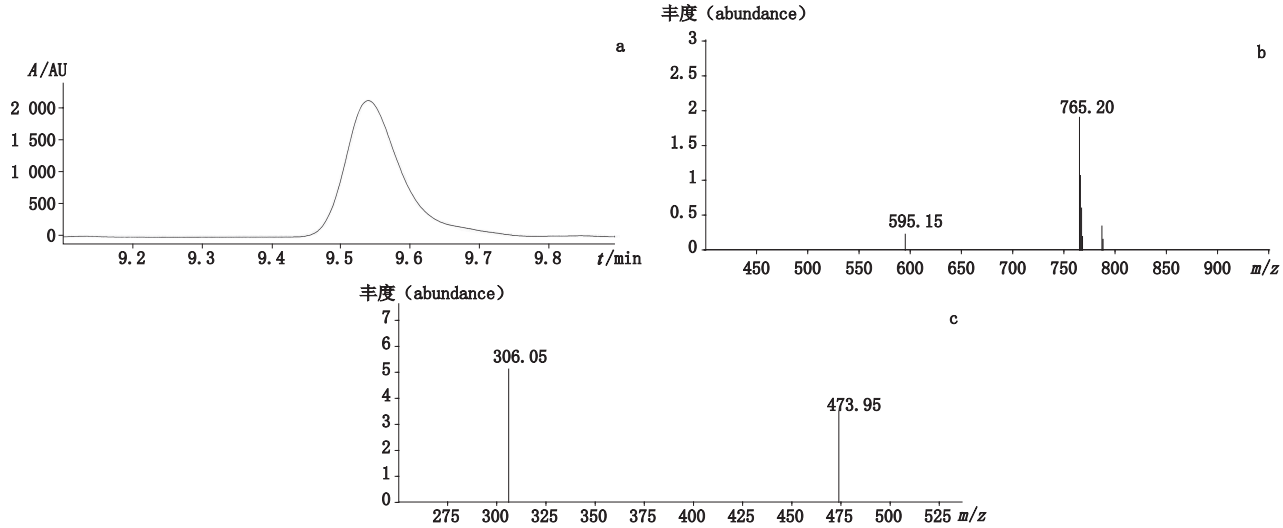
2.10 结果分析

GB 2760–2014规定允许作为食品添加剂使用的11种合成色素中,共检出8种,分别为柠檬黄、亮蓝、胭脂红、赤藓红、苋菜红、诱惑红、日落黄、喹啉黄,其中柠檬黄与亮蓝使用频率较高;禁用的合成色素中,15批次样品检出坚牢绿。其中柠檬黄、亮蓝、胭脂红、赤藓红、日落黄GB 2760–2014规定允许作为食品添加剂使用量最大为0.5 $g \cdot kg^{-1}$;苋菜红、诱惑红允许使用的最大量为0.3 $g \cdot kg^{-1}$,多批次产品检出上述色素超限数倍使用。虽多种色素存在超出食品限度添加使用的情况,但根据各色素的ADI值与用药要求,正常食用胶囊剂药物,尚无安全风险。坚牢绿属禁用合成色素,15批次样品添加量在0.000 4~0.029 $g \cdot kg^{-1}$之间,详见表5,定性质谱图见图3。

表5 146批次样品合成色素添加使用情况

Tab. 5 The analysis result of the addition of synthetic pigments in 146 batches of samples

色素名称(name of pigments)	检出批次(detectable batch)	使用频率(using frequency)/%	添加量范围(additive amount range)/($g \cdot kg^{-1}$)	GB 2760–2014允许添加量(additive amount permitted by GB 2760–2014)/($g \cdot kg^{-1}$)	ADI/($mg \cdot kg^{-1}$)
柠檬黄(tartrazine)	74	51	0.028~1.554	0.05~0.5	0~7.5
亮蓝(brilliant blue)	107	73	0.01~4.969	0.01~0.5	0~12.5
胭脂红(carmine)	26	18	0.012~4.091	0.05~0.5	0~4
苋菜红(amaranth)	21	14	0.032~3.989	0.025~0.3	0~0.5
赤藓红(erythrosine)	7	5	0.016~2.873	0.015~0.05	0~0.1
诱惑红(allura red)	2	1	0.2~1.466	0.025~0.3	0~7
日落黄(sunset yellow)	12	8	0.004~1.559	0.025~0.6	0~25
喹啉黄(quinoline yellow)	2	1	0.001 2~0.001 8	0.1	0~10
坚牢绿(fast green)	15	10	0.000 4~0.029	—	—



a.MRM b.一级(primary) c.二级质谱图(secondary)

图3 检出样品中坚牢绿定性质谱图

Fig. 3 The qualitative Mass spectrogram obtained from sample

3 结论

建立了明胶空心胶囊中22种合成色素的液相色谱–三重四极杆质谱定量分析方法。样品采用水、无水乙醇–水、乙腈分次提取,对极性跨度较大的

22 种合成色素,均可实现有效提取。采用三重四极杆定量分析,10 种限用色素线性浓度范围为 5~500 mg·L^{-1},12 种禁用色素的线性浓度范围为 0.002~12.5 mg·L^{-1};22 种合成色素均得到有效提取,加标提取回收率为 72.1%~100.3%,检出限为 0.5~284 μg·L^{-1}。该方法对药用明胶空心胶囊中合成色素的定量分析有良好的适用性。对 146 批次明胶空心胶囊的分析结果令人担忧。多家胶囊生产企业多批次样品添加色素总量大于 1.0 g·kg^{-1},合成色素滥用充斥着整个胶囊生产企业。明胶空心胶囊作为药用辅料也允许加入着色剂,但目前未有药用级着色剂的品种、限量要求和相关法定的检测标准。鉴于合成色素的危害性,其在制药工业中的使用品种、使用限量和安全性评价以及标签标示管理等方面应引起重视。

参考文献

[1] GB 2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standards Standards for uses of food additive[S].

[2] SUN HW, WANG FCh, AI LF. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tanem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A. 2007. 1164: 120

[3] 黎永乐,郑彦婕,熊岑等. 液相色谱/线性离子肼-静电场轨道高分辨质谱法快速筛查葡萄酒中的合成色素[J]. 色谱, 2013, 31(8): 729
LI YL, ZHENYJ, XIONG C, *et al*. Fast screening of the artificial dyes in wine by liquid chromatography/hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(8): 729

[4] 赵廷胜,杨敏莉,张峰等. 液相色谱/四级杆-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
ZHAO ST, 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

[5] 赵霞,关皓月,栾琳等. HPLC 法测定明胶空心胶囊中的人工合成色素[J]. 中国药事, 2012, 26(8): 879
ZHAO X, GUAN HY, LUAN L, *et al*. Determination for synthetic food colors in vacant capsules by HPLC[J]. Chin Pharm Aff, 2012, 26(8): 879

[6] CHEN DM, LI XQ, TAO YF, *et al*. Development of a liquid chromatography-tandemmass spectrometry with ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of sudan dyes and their metabolites in the edible tissues and eggs of food-producing animals[J]. J Chromatogr B, 2013, 939: 45

[7] FENG F, ZHAO YSH, YONG W, *et al*. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Chromatogr B, 2011, 879: 1813

[8] 钱疆,杨方,陈驰等. 超高效液相色谱飞行时间质谱测定食品中 36 种合成色素[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 215
QIAN J, YANG F, CHEN C, *et al*. Determination of 36 artificial pigments in foods by ultro high performance liquid chromatography and time-of-fight mass spectrometry[J]. Food Sci, 2013, 34(6): 215

[9] 李帮锐,冯加力,潘振球,等. 高效液相色谱-质谱/质谱测定饮料中人工合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(64): 579
LI BR, FENG JL, PAN ZQ, *et al*. Determination of synthetical pigments in drinks by high performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry[J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(64): 579

[10] 杨熙,吴惠勤,黄芳,等. 高效液相色谱-串联质谱同时测定粉条中 6 种人工合成色素[J]. 分析实验室, 2015, 34(6): 672
YANG X, WU HQ, HUANG F, *et al*. Determination of 6 kinds of synthetic pigments in vermicelli by high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(6): 672

[11] LI J, DING XM, LIU DD, *et al*. Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography- tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2013, 942: 46

[12] LIU RY, HEI WJ, HE PL, *et al*. Simultaneous determination of fifteen illegal dyes in animal feeds and poultry products by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879: 2416

[13] 吕东明,丁云连,詹晟等. 超高效液相色谱/四极杆-飞行时间质谱法检测 22 种禁用和限用合成色素[J]. 现代仪器与医疗, 2013, 19(2): 52
LV DM, DING YL, ZHAN Sh, *et al*. Determination of 22synthetic colors in beverage by ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-fight mass spectrometry[J]. Mod Instrum Med Treat, 2013, 19(2): 52

[14] 杨婵. 中药及胶囊中九种合成色素的检测方法研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2009
YANG C. Studies on the Test Method of Nine Kinds of Synthetic Pigments in Traditional Chinese Medicine and Capsule [D]. Guiyang: South China University of Technology, 2009

[15] 戚平. 食品和环境水中合成色素的高通量筛查及快速检测技术研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014
QIN P. High-throughput Screening and Fast Analytical Technology of Synthetic Colors in Foods and Environment Water [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014

[16] 黄方取,曹丽军,严继东. 高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定葡萄酒中合成色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3038
HUANG FQ, CAO LJ, YAN JD. Determination of sythetical pigments in port wine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Chin J Health lab Tec, 2013, 23(15): 3038

(本文于 2016 年 5 月 12 日收到)