

UPLC 法同时测定西红花有效成分含量及鉴别非法染色^{*}

朱亚楠, 徐政, 李坤, 叶冠^{**}

(上海医药集团股份有限公司中央研究院, 上海 201203)

摘要 目的: 联合使用 UPLC 定时波长自动切换技术及梯度洗脱法, 快速测定西红花有效成分西红花苷 - I、西红花苷 - II 含量及鉴别柠檬黄、胭脂红、金胺 O 和新品红 4 个常见非法染色物。方法: 采用 UPLC 定时波长自动切换技术, 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈 - 0.05 mol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液 (含 0.05% 乙酸), 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C。结果: 西红花苷 - I、西红花苷 - II 和 4 个非法染色物可同时检出, 均达到基线分离; 西红花苷 - I、西红花苷 - II 均有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($r > 0.999\ 9$), 平均回收率 ($n=6$) 分别为 100.1%、101.6%, 12 批样品中西红花苷 - I、西红花苷 - II 的检测含量范围分别为 2.75%~9.92%、1.00%~4.28%; 柠檬黄、金胺 O、新品红、胭脂红的检测下限分别为 0.041、0.088、0.11、0.14 ng, 定量下限分别 0.17、0.23、0.32、0.42 ng。结论: 本方法简便快速, 准确灵敏, 重复性好, 能在短时间内较全面地评价西红花药材的质量, 有助于提高企业对原药材的检测效率。
关键词: 超高效液相色谱法; 西红花; 西红花苷 I; 西红花苷 II; 非法染色

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2020) 03-0483-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.03.12

Simultaneous determination of effective constituents and illegally added pigment in Croci Stigma by UPLC method^{*}

ZHU Ya-nan, XU Zheng, LI Kun, YE Guan^{**}

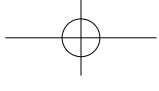
(Central Research Institute, Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To develop an UPLC method with wavelength switching and gradient elution for simultaneous determination of effective constituents (crocin- I and crocin- II) and four pigments (tartrazine, neucoccin, auramine O and new fuchsin) which were illegally added into Croci Stigma. **Methods:** An UPLC method was established with ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) and ultraviolet wavelength switching. The mobile phase was acetonitrile (A) and 0.05 mol · L⁻¹ ammonium acetate (0.05% acetic acid) (B) with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. And the column temperature was 35 °C. **Results:** Six components were separated and detected on the same chromatogram by changing the wavelength at different time periods. Crocin- I and crocin- II had wide linear range and good linear relationship ($r > 0.999\ 9$). The average recoveries ($n=6$) of crocin- I and crocin- II were 100.1% and 101.6%, respectively. The contents of crocin- I and

^{*} 上海市科学技术委员会课题 (15DZ1900100); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702300)

^{**} 通信作者 Tel: (021) 61871700-8088; E-mail: yeg@sphchina.com

第一作者 Tel: (021) 61871700-8236; E-mail: zhuyn@sphchina.com



crocin- II in 12 batches of samples were 2.75%–9.92% and 1.00%–4.28%, respectively. The LODs of tartrazine, auramine O, new fuchsin and neucoccin were 0.041, 0.088, 0.11 and 0.14 ng, and the LOQs were 0.17, 0.23, 0.32 and 0.42 ng, respectively. **Conclusion:** This method is rapid, accurate, sensitive with good reproducibility, which can evaluate the quality of Croci Stigma in short time to improve inspection efficiency.

Keywords: UPLC; Croci Stigma; crocin- I ; crocin- II ; illegally added pigment

西红花又称藏红花、番红花,为鸢尾科植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头^[1],具有活血化瘀,凉血解毒,解郁安神之功效。西红花由于特殊的用药部位使得其产量低,价格昂贵,市场上造假、掺假的情况十分严重,原料质量参差不齐,非法染色情况甚是严峻^[2-3]。在对市场造成冲击的同时,其中的一些偶氮类色素对人体也存在一定的健康危害^[4]。而原料的好坏直接决定了产品的品质,所以有必要对西红花进行全面的质控,有效成分含量测定和非法染色鉴别缺一不可。

西红花苷(crocins)是其主要活性成分,西红花药材的质量优劣与西红花苷含量密切相关^[5-7]。为了加强监管,国家食品药品监督管理局发布了药品补充检验方法和检验项目批准件2011001^[8],对金胺O、新品红、柠檬黄和胭脂红4个常见非法染色物进行检验。近年来,检测西红花药材质量及鉴别非法染色的文献报道也较多,但未见同时定量西红花苷-I、西红花苷-II和鉴别金胺O、新品红、柠檬黄和胭脂红4个常见染料的检测方法。2项检测工作分开进行,严重影响了工作效率,故有必要建立西红花高效、快速的整体表征和质量控制方法^[9]。

本法将《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版中有效成分的检测方法^[1]同药典补充方法^[8]中对柠檬黄、胭脂红、金胺O和新品红4个目前市场上常见非法色素的分析方法结合起来,联合使用UPLC定时波长自动切换技术及梯度洗脱法,快速测定西红花有效成分西红花苷-I、西红花苷-II含量及鉴别柠檬黄、胭脂红、金胺O和新品红4个常见非法染色物,方法方便快捷、准确度高,仪器设备要求低,大大提高工作效率的同时减少名贵药材的消耗及相关实验所带来的时间及经济成本,为企业产品的生产打下良好的基础。

1 仪器与材料

ACQUITY UPLC H-class system 超高效液相色谱

系统;KQ5200V型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Sartorius SQP电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);Milli-Q Reference超纯水机(默克密理博公司);Thermo Fisher Pico 17高速离心机(Thermo Fisher公司)。

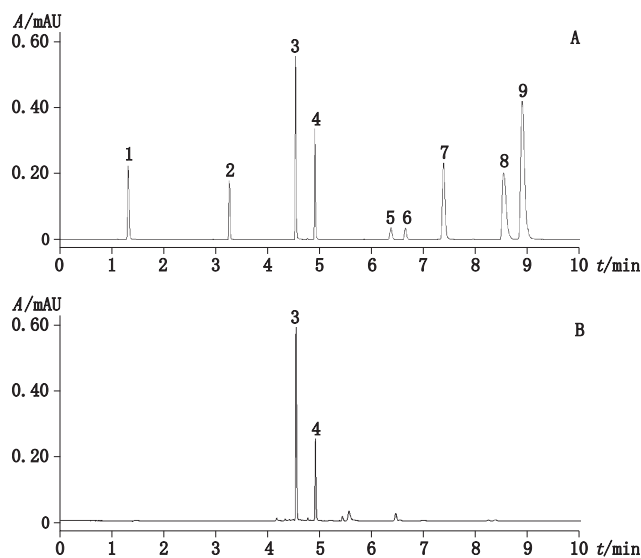
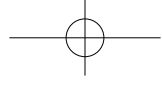
对照品西红花苷-I(批号111588-201704,含量 $\geq 88.4\%$)、西红花苷-II(批号111589-201705,含量 $\geq 92.2\%$)、柠檬黄(批号510004-201602,含量 $\geq 86.9\%$)、新品红(批号111955-201301,含量 $\geq 71.5\%$)、金胺O(批号111770-201603)、胭脂红(批号111771-201302)均购买于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯,乙酸为优级纯,乙酸铵、无水乙醇为分析纯,水为超纯水。

西红花样品购自于上海崇明岛、安徽亳州、浙江杭州、伊朗、青海西宁和西藏6个地区,共12批,样品信息见表1。经过上海医药集团股份有限公司中央研究院教授级工程师叶冠鉴定为鸢尾科植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头。

2 方法和结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8 μ m);柱温35 $^{\circ}$ C;流动相A为乙腈,流动相B为0.05 mol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵水溶液(含0.05%乙酸);梯度洗脱(0~3 min, 10%A $\rightarrow$ 37%A;3~9 min, 37%A;9~10 min, 37%A $\rightarrow$ 10%A);体积流量0.3 mL $\cdot$ min⁻¹;分段变波长测定:0~2.0 min在432 nm波长下检测柠檬黄,2.0~4.0 min在509 nm波长下检测胭脂红,4.0~5.3 min在440 nm波长下检测红花苷-I和红花苷-II,5.3~6.5 min在550 nm波长下检测新品红,6.5~7.0 min在432 nm波长下检测金胺O,7.0~8.0 min在550 nm波长下检测新品红,8.0~8.7 min在432 nm波长下检测金胺O,8.7~10.0 min在550 nm波长下检测新品红;进样量为1 μ L。色谱图见图1。理论塔板数按所测各成分色谱峰计均不低于10 000,分离度均不小于1.5。



1. 柠檬黄(tartrazine) 2. 胭脂红(neucocci) 3. 西红花苷-I(crocin-I) 4. 西红花苷-II(crocin-II) 5、7、9. 新品红(new fuchsin) 6、8. 金胺O(auramine O)

图1 混合对照品(A)与样品(B)HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别取对照品西红花苷-I、西红花苷-II、柠檬黄、金胺O、新品红和胭脂红适量,精密称定,置5 mL量瓶中,加入流动相A-B(10:90)配制成质量浓度分别为0.42、0.40、0.41、0.44、0.49、0.42 mg·mL⁻¹的对照品储备溶液。分别精密吸取上述对照品储备溶液各1 mL于10 mL量瓶中,加70%乙醇水溶液稀释定容,得1号混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取西红花药材粉末约40 mg,精密称定,置于100 mL棕色量瓶中,加入70%乙醇水溶液90 mL,冰浴超声(功率200 W,频率40 kHz)20 min后放至室温,再以初始流动相比比例A-B(10:90)定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 有效成分含量测定

2.4.1 线性关系

分别精密吸取“2.2”项中西红花苷-I和西红花苷-II各质量浓度储备溶液各0.5 mL于1 mL棕色量瓶中,得2号混合对照品溶液。再用70%乙醇水溶液稀释成10、20、50、100、200、500、1 000倍,得到系列混合对照品溶液,按“2.1”项下的色谱条件进样测定。以峰面积(Y),为纵坐标对照品质量浓度(X, mg·mL⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线。得西红花

苷-I和西红花苷-II回归方程:

$$Y=1.890 \times 10^7 X-3.240 \times 10^3 \quad r=0.9999$$

$$Y=2.610 \times 10^7 X-4.210 \times 10^3 \quad r=0.9999$$

西红花苷-I和西红花苷-II的线性范围分别为0.042~0.000 42 mg·mL⁻¹和0.040~0.000 40 mg·mL⁻¹。

2.4.2 精密度 取编号S9批次西红花样品,按“2.3”项中方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件检测,分别于1 d内连续进样6次和连续3 d内重复进样3次,每次进样1 μL,测定西红花苷-I、西红花苷-II的峰面积,计算日内及日间精密度。西红花苷-I、西红花苷-II峰的日内RSD分别为0.99%、0.43%,日间分别为1.1%、1.0%。精密度良好。

2.4.3 稳定性 取编号S9批次西红花样品,按“2.3”项中方法制备供试品溶液,分别于配制后在室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h,按“2.1”项色谱条件进样测定,得西红花苷-I、西红花苷-II峰面积的RSD分别为1.4%和1.2%,表明供试品溶液制备后24 h内稳定。

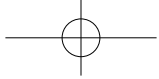
2.4.4 重复性 取编号S9批次西红花样品,按“2.3”项中方法平行制备供试品溶液6份,分别按“2.1”项中的色谱条件进样分析,结果西红花苷-I、西红花苷-II平均质量分数分别为7.62%和2.54%,RSD分别为1.3%和1.7%。

2.4.5 耐用性 通过改变柱温(32.5、35、37.5℃)和流动相pH(5.3、5.5、5.7),其余按照“2.1”项中的色谱条件进样分析。结果表明,色谱条件给微小改变,其分离效果未发生明显变化,各条件下西红花苷-I、西红花苷-II峰面积的RSD均<3%,该方法耐用性良好。

2.4.6 加样回收率 取已知含量的编号S9批次西红花粉末6份,每份约40 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,分别精密加入相当于样品成分量100%的各对照品溶液,按“2.3”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项中的色谱条件进样分析。结果西红花苷-I、西红花苷-II的平均回收率分别为100.1%、101.6%,RSD分别为2.0%、2.2%。

2.5 非法染色鉴别

将“2.2”项中柠檬黄、金胺O、新品红、胭脂红对照品储备溶液逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果当信噪比(S/N)=3时,柠檬黄、金胺O、新品红、胭脂红的检测下限分别为0.041、0.088、0.11、0.14 ng;当S/N=10时,定量下限分别0.17、0.23、0.32、



0.42 ng。

2.6 样品测定

取 12 批样品,按“2.3”项下供试品溶液的制备方法处理样品,按“2.1”项中的色谱条件进样分析,结果见表 1。

本品按《中国药典》西红花干燥品含西红花苷 - I ($C_{44}H_{64}O_{24}$) 和西红花苷 - II ($C_{38}H_{54}O_{19}$) 的总量

不得少于 10.0% 的要求^[1],对照实验中所测得样品结果发现,12 批样品中有 9 批符合要求,另 3 批有效成分含量明显偏低。通过对样品中可疑峰与 4 个色素对照品的紫外光谱图对照及峰纯度检测后发现 8、11、12 号样品存在染色现象,分别检出新品红、柠檬黄、金胺 O 和胭脂红,按照《中国药典》补充规定应不得检出非法染色物^[8]。

表 1 样品信息与测定结果

Tab. 1 Information and determination results of samples

编号 (No.)	来源 (source)	批号 (batch No.)	含量 (content) /%			色素 (pigments)
			西红花苷 - I (crocin- I)	西红花苷 - II (crocin- II)	总和 (total)	
S1	上海崇明岛 (Shanghai Chongming Island)	15081701	9.05	2.02	11.07	-
S2	上海崇明岛 (Shanghai Chongming Island)	16081201	9.26	1.50	10.76	-
S3	伊朗 (Iran)	20161001	8.45	2.49	10.94	-
S4	伊朗 (Iran)	KPZHH-15-06	9.68	2.98	12.66	-
S5	上海崇明岛 (Shanghai Chongming Island)	1703001	7.99	2.50	10.49	-
S6	青海西宁 (Qinghai Xining)	20161101	8.76	2.75	11.51	-
S7	浙江杭州 (Zhejiang Hangzhou)	170301	9.92	3.31	13.23	-
S8	伊朗 (Iran)	20170405	7.04	1.76	8.80	新品红 (new fuchsin)
S9	上海崇明岛 (Shanghai Chongming Island)	20170811	7.62	2.54	10.16	-
S10	上海崇明岛 (Shanghai Chongming Island)	600003439	9.81	4.28	14.08	-
S11	西藏 (Xizang)	20180512	2.75	1.00	3.74	柠檬黄 (tartrazine)
S12	安徽亳州 (Anhui Bozhou)	20180403	4.73	1.49	6.23	金胺 O、胭脂红 (auramine O, neucoccin)

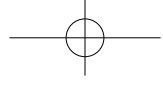
3 讨论

3.1 本法的优点

检测西红花药材质量及鉴别非法染色的法规及文献报道较多。西红花品质评价分析方面,JP17、BP 2015、EP 2014 及 ISO-3632 都采用紫外-可见分光光度法定量西红花总苷来评价西红花的质量^[10-13];2015 年版《中国药典》采用 HPLC 法检测西红花苷 I 和西红花苷 II 含量以评价西红花的质量^[1];也有文献报道采用近红外光谱及拉曼光谱技术均建立了较好的西红花苷定量模型^[14-17];非法染色鉴别方面,张彬彬等^[18]建立了一种薄层色谱-表面增强拉曼光谱法成功检测经金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红 4 种常见染料染色的西红花药材。付凌燕等^[19]采用液-质联用以及对照试剂对照的方法,对市场上西红花非法添加的色素鉴定为柠檬黄、胭脂红、金胺 O 和新品红,又建立薄层色谱和高效液相色谱法鉴别非法染色情况。但未见同时定量西红花苷 - I、西红花苷 - II 和检测金胺 O、新品红、柠檬黄

和胭脂红 4 种常见染料的检测方法。

本实验利用 UPLC 定时波长自动切换技术将西红花中的 2 个有效成分与 4 个常见非法染色物的特征峰同时体现在 1 张色谱图上,可更直观地判断样品中是否存在可疑色素及进行含量测定,避免了测定单个成分及逐步判断的烦琐步骤。本法研究所得柠檬黄、金胺 O、新品红、胭脂红的检测限分别为 0.041、0.088、0.11、0.14 ng,低于付凌燕等^[19]采用 LC-MS 联用技术研究所得 4 个染色物检测限分别为 2.5、0.5、0.5、7.5 μg ,表明本法所采用的 UPLC 技术在高分离度、高速度的同时,大大提高了灵敏度,且对仪器设备要求较低。另外,根据国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批准件 2011001 中规定西红花中不得检出柠檬黄、金胺 O、新品红、胭脂红,西红花一旦检出染色物,则视为不合格品,不能用于生产。此方法在企业质检部门的实际工作中可操作性强,能帮助企业在规定时间内较全面地评价西红花药材的质量,为企业原料质量控制提供参考。



3.2 溶剂的选择

实验过程中发现以 70% 乙醇水溶液配制的柠檬黄对照品溶液,在梯度洗脱中色谱峰出现分叉现象,原因推测为对照品溶液与流动相极性相差较大,改用流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(含 0.05% 乙酸)(10:90)作为溶剂,色谱峰正常。故选择流动相 A-B(10:90)作为溶剂。

3.3 色谱柱的选择

本文鉴定的 4 个染色物中,柠檬黄、胭脂红为偶氮磺酸盐类色素,极性和水溶性较强,反相色谱保留较弱;而金胺 O 和新品红为碱性芳基甲烷类染料,反相色谱保留较强,极性差别较大。为建立同时分离 4 个染色物的检测方法,先后试验筛选了 3 种色谱柱杂化颗粒(桥式乙基硅氧烷硅胶杂化颗粒、表面带电杂化颗粒、高强度硅胶颗粒),T3 柱具有平衡保留极性与非极性分析物的优势,通过对 3 种杂化颗粒柱的分离效果、耐用性等因素综合考虑,最后选择 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)色谱柱。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 版.一部[S]. 2015: 129
ChP2015. Vol I [S]. 2015: 129
- [2] SHAHID M, SHAHID-UL-ISLAM, MOHAMMAD F. Recent advancements in natural dye applications: a review[J]. J Clean Prod, 2013, 53(1): 310
- [3] 高丽,王旭,张景景,等. HPLC 法测定不同产地西红花中西红花苷-I 和红花苷-II 的含量[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9): 2274
GAO L, WANG X, ZHANG JJ, et al. Determination of crocin-I and crocin-II in *Crocus sativus* L. from various places by HPLC[J]. Clin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(9): 2274
- [4] 姚建标,金辉辉,何厚洪,等. 西红花特征图谱研究及真伪鉴别[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1378
YAO JB, JIN HH, HE HH, et al. Study on specific chromatograms of *Crocus sativus* and authenticity identification[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(9): 1378
- [5] RAHAIEE S, MOINI S, HASHEMI M, et al. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(4): 1881
- [6] 王平,童应鹏,陶露霞,等. 西红花的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(20): 3015
WANG P, TONG YP, TAO LX, et al. Research progress on chemical constituents of *Crocus sativus* and their pharmacological activities[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(20): 3015
- [7] 周桂芬,姚冲,钱晓东,等. 一测多评法结合面积归一化法测定西红花中西红花苷类成分[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1524
ZHOU GF, YAO C, QIAN XD, et al. Determination of crocins in Croci Stigma by quantitative analysis of multi-components with single marker and area normalization method[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(8): 1524
- [8] 2011001 国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批准件 西红花[S]. 2011
2011001Drug Added Inspection Method and Project Approval of State Food and Drug Administration *Crocus sativus* [S]. 2011
- [9] 周桂芬,留永咏,钱晓东,等. 基于中国药典与国际标准对西红花生产流通中质量评价方法的改良[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 835
ZHOU GF, LIU YY, QIAN XD, et al. Improvement of quality evaluation of Croci Stigma in the process of producing and distributing based on Chinese pharmacopoeia and ISO[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(5): 835
- [10] JP17[S]. 2016: 1963
- [11] BP 2015. Vol III [S]. 2015: 1440
- [12] EP 2014[S]. 2014: 1455
- [13] ISO-3632. Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1 (specification) and Part 2 (test methods) [S]. 2010. 12
- [14] ANASTASAKI E G, KANAKIS C D, PAPPAS C, et al. Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using raman spectroscopy and chemometrics[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10): 6011
- [15] ZALACAIN A, ORDOUDI SA, DÍAZ-PLAZA EM, et al. Near-infrared spectroscopy in saffron quality control: determination of chemical composition and geographical origin[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(24): 9337
- [16] 张聪,胡馨,张英华,等. 近红外光谱法测定西红花中西红花苷 I 含量的研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1559
ZHANG C, HU X, ZHANG YH, et al. Determination of crocin-I in *Crocus sativus* L. by near infrared spectroscopy[J]. Chin Tradit Pat Med, 2010, 32(9): 1559
- [17] 胡馨,张聪,张英华. 西红花中西红花苷 II 及总苷的近红外光谱研究[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 1
HU X, ZHANG C, ZHANG YH. Study crocin-II and total glucosidene in Croci Stigma by near infrared spectroscopy[J]. Mod Chin Med, 2012, 14(5): 1
- [18] 张彬彬,史毅,陈辉,等. 薄层色谱-表面增强拉曼光谱法快速检测染色掺伪的西红花[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(3): 215
ZHANG BB, SHI Y, CHEN H, et al. TLC-SERS for detection of the dyed Croci Stigma[J]. J Pharm Pract, 2017, 35(3): 215
- [19] 付凌燕,闵春艳,汪祺,等. 市售西红花药材掺伪染色检测方法的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 74
FU LY, MIN CY, WANG Q, et al. Experimental research on the detection methods of Croci Stigma adulteration on the markets[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(1): 74

(本文于 2019 年 12 月 30 日修改回)