

心可宁胶囊中违法染色成分酸性红 73 检测方法的研究

胡亮^{1,2}, 罗时^{1,2}, 李瑞莲^{1,2}, 罗疆南^{1,2*}

(1. 湖南省药品检验研究院湖南药用辅料检验检测中心, 长沙 410001; 2. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 长沙 410001)

摘要 目的: 确认心可宁胶囊中违法染色的色素或染料成分, 建立相应的染色成分分析方法。方法: 采用高效液相色谱 (HPLC) 法对心可宁胶囊进行筛查, 并采用 HPLC-MS/MS 二级质谱对阳性样品进行确认。质谱采用电喷雾负离子扫描 (ESI⁻), 多反应监测模式 (MRM), 选择质荷比 m/z 255.0 $\rightarrow$ 150.5 和 m/z 255.0 $\rightarrow$ 241.0 作为检测离子对, 记录相应色谱图。在此基础上, 采用 HPLC 法对阳性样品中的酸性红 73 进行含量测定。色谱条件: 采用 Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈 -0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵溶液 (24:76) 为流动相, 流速为 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 509 nm。结果: 采用 HPLC 法对 213 批心可宁胶囊进行筛查, 并采用 HPLC-MS/MS 对可疑样品进行确认, 有 24 批样品可检出酸性红 73; 酸性红 73 进样量在 0.001 203~1.203 μ g 的范围内乌峰面积有良好的线性关系。24 批阳性样品中酸性红 73 的含量范围为 6.25~87.6 μ g $\cdot$ g⁻¹。结论: 本方法准确可靠, 可作为心可宁胶囊中酸性红 73 染色物的检测方法。
关键词: 心可宁胶囊; 酸性红 73; 化工染料; 高效液相色谱法; 液相色谱-质谱联用法; 安全监测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 08-1489-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.08.19

Research on the detection methods of illegal dyeing ingredient acid red 73 in the Xinkening capsules

HU Liang^{1,2}, LUO Shi^{1,2}, LI Rui-lian^{1,2}, LUO Jiang-nan^{1,2*}

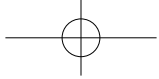
(1. Hunan Institute for Drug Control, Hunan Pharmaceutical Excipients Testing and Inspection Center, Changsha 410001, China;

2. Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha 410001, China)

Abstract Objective: The purpose of the research is to establish an analysis method for identification of the pigments or dyes in Xin Kening capsules. **Methods:** An HPLC was used as the screening method of acid red 73. The positive results of screening were confirmed by HPLC-MS/MS with ESI⁻ ion source. The ion at m/z 255.0 $\rightarrow$ 150.5 and m/z 255.0 $\rightarrow$ 241.0 was selected for MS/MS analysis and the corresponding chromatogram was recorded. Based on those results, an HPLC method was developed for the qualification of acid red 73 in positive samples. An Hypersil ODS C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column was adopted, the mixture of acetonitrile and 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ ammonium acetate (24:76) was used as the mobile phase, the flow rate was 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, and the detection wavelength was set at 509 nm. **Results:** The HPLC method was used for the screening of 213 batches of Xin Kening

* 通信作者 Tel: (0731) 82275853; E-mail: huliang0813@163.com

第一作者 Tel: (0731) 82275853; E-mail: 530289007@qq.com



capsules. The suspected samples were confirmed by HPLC-MS/MS. Acid red 73 was detected from 213 batches of samples. Acid red 73 had considerable linear relationship in the range of 0.001 203–1.203 μg . The content of acid red 73 in 24 batches of positive samples ranged from 6.25 to 87.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This method is accurate and reliable, and can be used as the detection method for acid red 73 in Xin Kening capsules.

Keywords: Xin Kening capsules; acid red 73; chemical dye; HPLC; HPLC-MS/MS; safety monitoring

心可宁胶囊处方由丹参、三七、红花、蟾酥、水牛角浓缩粉、牛黄、人参须、冰片八味中药组成,其中丹参水煮提取,其余三七、红花等七味均为生粉入药,具有活血散瘀、开窍止痛功能,用于冠心病、心绞痛、胸闷等症^[1-3]。据文献报道,近年来红花药材存在用酸性红 73 等染色现象^[4-7],致使红花原药材中非法添加的酸性红 73 等色素被带入到成药中,给患者带来安全隐患。酸性红 73 又名酸性大红 GR,为黄光红色粉末,溶于水呈红色溶液,能溶于酒精和溶纤维素,在工业上主要用于羊毛、丝织物及纸张、皮革的染色,还可用于塑料、电化铝、水泥的着色^[8-10]。

目前心可宁胶囊中酸性红 73 检测方法未见报道,与中药材及其饮片相比,中成药多为复方制剂,其中可能存在酸性红 73 的含量较低,其他药味干扰较大,因此,有必要针对心可宁胶囊中的酸性红 73 检测方法进行系统研究,以更好地控制药品质量,保障人民用药安全。本文采用 HPLC-DAD 法对处方中含有红花、丹参等可能使用酸性红 73 染色的中成药进行筛查,并采用 HPLC-MS/MS 法对阳性结果进行确认。对收集的 213 批样品进行检查研究,其中 24 批检测出酸性红 73,在此基础上本文还建立了阳性样品中酸性红 73 的 HPLC 含量检测方法,为打击中成药中非法染色提供了技术手段。

1 仪器与试药

DIONEX Ultimate 3000-TSQ ENDURA 液质联用色谱仪(赛默飞世尔科技公司);Waters 2695 液相色谱仪;2998 二级管阵列检测器(沃特世科技有限公司),METTLER AE240 型电子天平(梅特勒-托利多,万分之一);XSE205DU 型电子天平(梅特勒-托利多,十万分之一);超声波清洗仪 KQ500DE (500 W, 40 kHz)。酸性红 73 对照品(批号:111773-201602)由中国食品药品检定研究院提供,乙腈为色谱纯(Fisher Chemical 公司),乙酸铵(国药集团化学试剂有限公司)等其他试剂均为分析纯。样品来源为国家食品药品监督管理局心可宁胶囊品种抽验

工作抽验样品及企业提供的部分样品。

2 方法与结果

2.1 HPLC 筛查

2.1.1 对照品溶液的制备

取酸性红 73 对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 中含 20 μg 的溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.2 供试品溶液制备

取胶囊内容物约 4 g,置具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 20 mL,密塞,超声处理(功率 500 W, 40 kHz) 20 min,放冷,摇匀滤过,取续滤液,即得。

未检出酸性红 73 的样品照本项下方法制备,即得阴性样品溶液。

2.1.3 色谱条件与系统适用性试验

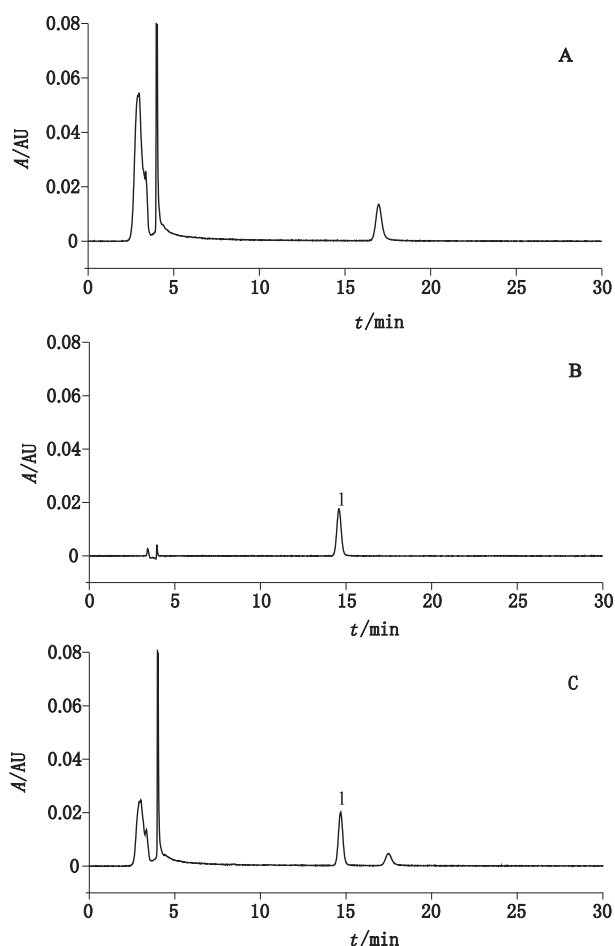
采用 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈-0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液(24:76);DAD 检测器,流速:0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:509 nm。理论塔板数按酸性红 73 峰计算应不低于 3 000。

取“2.1”项下方法制备的心可宁胶囊阴性样品溶液、酸性红 73 对照品溶液和心可宁胶囊阳性样品溶液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。结果见图 1。

2.1.4 专属性试验

2.1.4.1 HPLC-DAD 法 取“2.1.2”项下心可宁胶囊阳性样品溶液与“2.2.1”项下酸性红 73 对照品溶液进行 HPLC-DAD 法检测,采用二极管阵列检测器比较相应色谱峰在 200~600 nm 波长范围的紫外-可见吸收光谱,其 DAD 检测紫外-可见吸收光谱图基本一致(见图 2)。

2.1.4.2 HPLC-MS/MS 法 色谱柱:Shim-pack GIST C_{18} (2.1 $\times$ 100 mm, 2 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈(A)-10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵(B)溶液梯度洗脱(0~1.2 min, 20%A; 1.2~8 min, 20% $\rightarrow$ 90%A);流速 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱采集参数:电喷雾负离子扫描(ESI⁻),毛细管电压



1. 酸性红 73 (acid red 73)

图 1 心可宁胶囊阴性样品 (A)、酸性红 73 对照 (B)、心可宁胶囊阳性样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample of Xin Kening capsules (A), acid red 73 reagent reference (B), positive sample of Xin Kening capsules (C)

2.0 kV, 鞘气流速 $20 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流速 $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 脱溶剂温度 350°C , 离子传输管温度 350°C , 采用多反应监测 (MRM), 选择质荷比 m/z $255.0 \rightarrow 150.5$ 和 m/z $255.0 \rightarrow 241.0$ 为检测离子对, 碰撞能量为 10.25 V 。二级质谱图见图 3。

2.1.5 筛查结果

在本次筛查的 213 批次样品中, 共有 24 批心可宁胶囊样品检出与酸性红 73 对照色谱保留时间相同的色谱峰, 且该峰在 $200\sim 600 \text{ nm}$ 波长范围的 UV-Vis 吸收光谱与对照品一致。主要涉及 2 家企业生产的样品, 其中 1 家企业抽样 80 批, 有 18 批检出酸性红 73, 检出率为 22.5%, 含量范围为 $6.25\sim 10.99 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 另 1 家企业抽样 7 批, 有 6 批检出酸性红 73, 检出率为 85.7%, 含量范围为 $78.99\sim 87.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

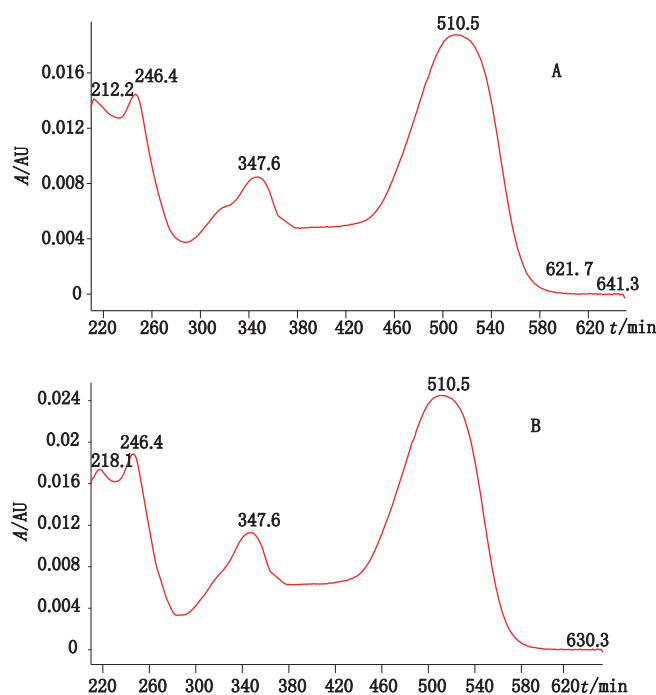


图 2 酸性红 73 对照品 (A)、心可宁胶囊阳性样品 (B) 的紫外-可见吸收光谱图

Fig. 2 UV-vis spectra of acid red 73 reference substance (A), positive sample of Xin Kening capsules (B)

2.1.6 阳性样品确认

24 批阳性样品均采用 HPLC-MS/MS 进行确认, 出现与酸性红 73 对照色谱保留时间相同的色谱峰, 且相应的提取离子流色谱图与对照品一致。

2.2 HPLC 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取酸性红 73 对照品 12.03 mg , 置 100 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液① ($120.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 精密量取对照品溶液① 5.1 mL , 分别置 25 、 100 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液② ($24.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、③ ($1.203 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.2 供试品溶液的制备

取本品内容物约 4 g , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 20 mL , 密塞, 称定, 超声处理 (500 W , 40 kHz) 20 min , 放冷, 称定, 用 70% 甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.3 色谱条件

同“2.1.3”项。

2.2.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液③ ($1.203 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 、 $5 \mu\text{L}$, 对照品溶液② ($24.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 、 10 、 $15 \mu\text{L}$, 对照

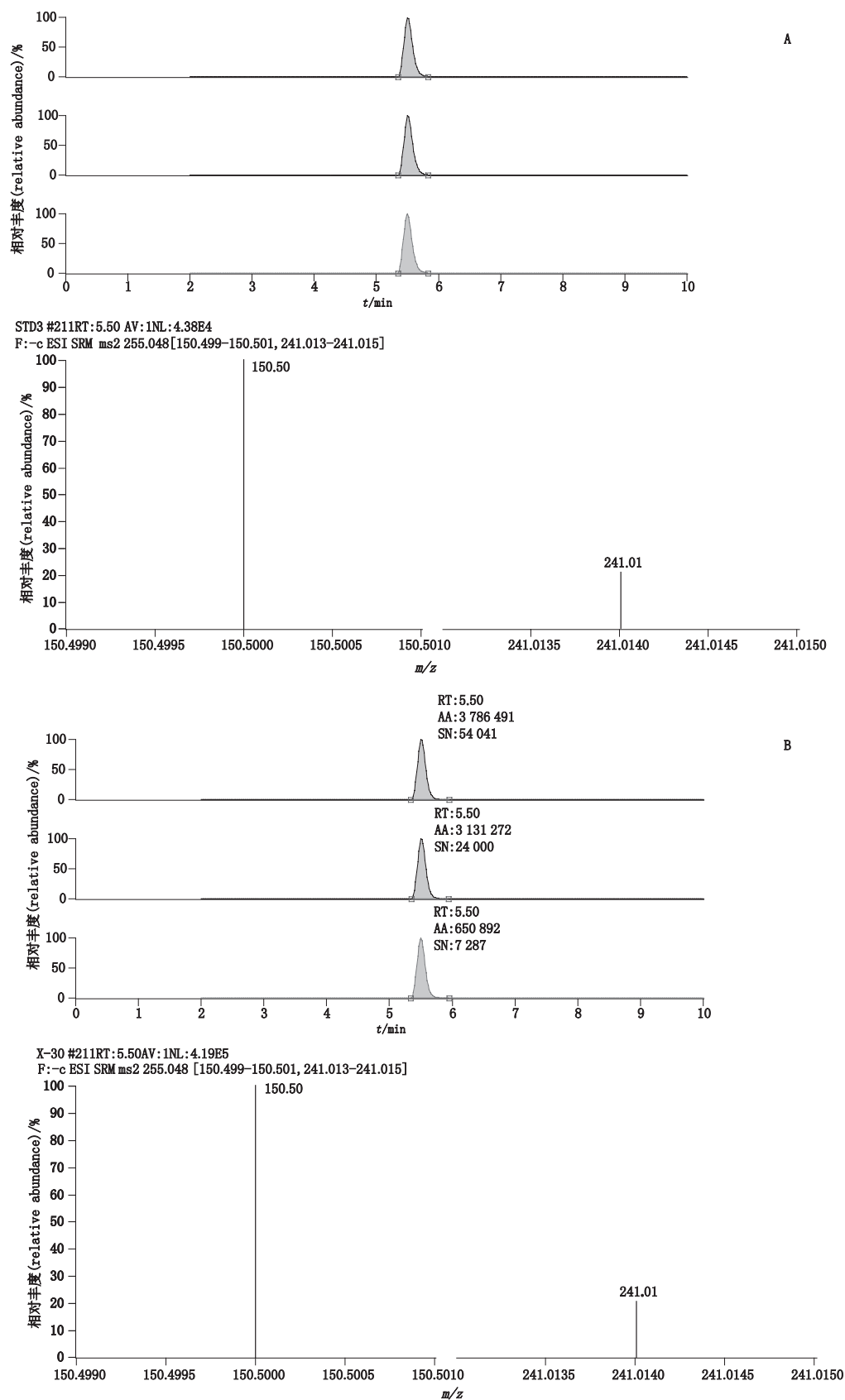
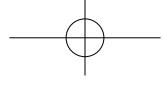


图3 酸性红73对照品溶液(A)、心可宁胶囊阳性样品溶液(B)的二级质谱图

Fig. 3 Mass spectra of acid red 73 reference reagent (A) and positive sample of Xin Kening capsules (B)



品溶液①(120.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5、10 μL 注入液相色谱仪,测定,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,进样量(X , μg) 为横坐标,绘制标准曲线,得其回归方程:

$$Y = 3.000 \times 10^6 X - 9.056 \times 10^3 \quad r^2 = 0.9999$$

结果表明,酸性红 73 对照品进样量在 0.001 203~1.203 μg 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液②(24.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),连续进样 6 次,每次 10 μL ,分别记录峰面积,计算 RSD 为 0.56%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验

取心可宁胶囊(批号 6E01),分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液各 6 份,进样 10 μL 进行分析,心可宁胶囊中酸性红 73 含量平均值为 74.13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.1%。表明该法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验

取“2.2.6”项下心可宁胶囊同一份供试品溶液,室温下放置,在 0、6、12、18、24 h 分别进样 10 μL 进行分析,分别记录峰面积,计算 RSD 为 1.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验

取已测定含量的样品(批号 6E01,含酸性红 73 74.13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 2 g,共 6 份,分别精密称定,置已精密加入对照品溶液①(120.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL 蒸干后的具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,密塞,称定量,超声处理 20 min,放冷,称定,用 70% 甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,即得。在上述液相色谱条件下进样分析,按外标法计算加样回收率,6 批样品平均回收率为 103.0%, RSD 为 0.96%。表明该法加样回收率较好。

2.2.9 检测下限和定量下限

取“2.2.1”项下酸性红 73 对照品溶液,用 70% 甲醇进行逐步稀释,以信噪比 3:1 的浓度作为仪器检测下限,信噪比 10:1 的浓度为仪器定量下限,测定其检测下限和定量下限分别为 1.48 ng 和 7.29 ng。

2.2.10 样品测定

取心可宁胶囊阳性样品,照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL 进行测定,用外标法计算含量,结果 24 批阳性样品中酸性红 73 含量最高为 87.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,最低为 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

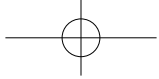
本文参考文献[11-12],采用超声提取对样品进

行了测定。文献报道的酸性红 73 等色素的 HPLC 条件主要有乙腈-磷酸缓冲盐溶液^[13-14]和乙腈-醋酸铵溶液^[11, 15-16]等。考虑到目前建立的方法同时使用 HPLC 法对酸性红 73 色素进行筛查和含量测定,采用 HPLC-MS/MS 对阳性样品进行确认,本文最终选择了乙腈-醋酸铵溶液系统。

与高效液相色谱法相比, TLC 法具有简便快速等优点,本实验对采用 TLC 法对心可宁胶囊中酸性红 73 筛查也进行了考察。结果表明,供试品溶液较粘稠,酸性红 73 含量低的样品斑点不可见,加大点样量后,斑点拖尾严重,容易产生误判;尝试过柱处理和更换展开系统及提取溶剂,结果均不理想。薄层色谱法中酸性红 73 的检测下限约为 40 ng,与 HPLC 法检出限 1.48 ng 相差较大。同时由于心可宁胶囊为复方制剂,其他药味的存在降低了可能存在的化工染料的浓度,也给测定带来很大的干扰。因此心可宁胶囊中酸性红 73 色素的测定还是以 HPLC 法为首选方法。采用建立的方法对 213 批心可宁胶囊样品进行了筛查,该方法快速简便,可用于心可宁胶囊中酸性红 73 的检测。实验结果表明,213 批次样品中共筛查出 24 批阳性样品,中成药中存在化工染料染色的情况依然严峻,所以对中药材及饮片的非法染色情况应引起高度重视,加强监管力度。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂第 9 册[S]. Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, PR China. The Preparation of Traditional Chinese Drug, Vol 9
- [2] 梁秀坤,贾善学,李漫漫. 心可宁胶囊质量评价分析[J]. 中国药事, 2015, 29(8): 850
LIANG XK, JIA SX, LI MM. Quality evaluation and analysis of Xin Kening capsules[J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(8): 850
- [3] 廖婉,傅超美,贾东艳,等. 心可宁胶囊质量标准研究[J]. 成都医学院学报, 2008, 3(1): 31
LIAO W, FU CM, JIA DY, et al. Quality standard for Xinkening capsule[J]. J Chengdu Med Coll, 2008, 3(1): 31
- [4] 饶伟文,蒋玲,赵纯玉. 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
RAO WW, JIANG L, ZHAO CY. Identification of chemical industry dyes in adulteration of Chinese medicinal materials[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(11): 1742
- [5] 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
- [6] 胡佳, 郭琳, 何涛. 27 批红花柠檬黄、酸性红 73、胭脂红染色及掺伪的检测[J]. 光明中医, 2016, 31(11): 1561
HU J, GUO L, HE T. Detection of tartrazine, Acid Red 73 and carmine in 27 patch of Safflower[J]. Chin J Guangming Chin Med, 2016, 31(11): 1561
- [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, (215): 1078
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
- [8] 杨新玮, 罗钰言, 何岩彬, 等. 化工产品手册—染料[M]. 第四版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 219
YANG XW, LUO YY, HE YB, *et al.* Handbook of Chemical Industry Products—Dye[M]. 4th Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 219
- [9] 章杰. 禁用染料和环保型染料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
ZHANG J. Prohibited dyes and Green dye[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002
- [10] 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
LU SY, ZOU MQ. The hazards of frequent inedible colorants used in foods and their detection methods[J]. Chin Instrum, 2009(8): 45
- [11] 刘兴鹏, 申瑾, 周兰, 等. HPLC-PDA 内标法检测康尔心胶囊十二种非法添加色素[J]. 中国药事, 2015, 29(12): 1315
LIU XP, SHEN C, ZHOU L, *et al.* HPLC-PDA internal standard method to detect twelve illegal pigments in Kangerxin capsules[J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(12): 1315
- [12] 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
- [13] 赵纯玉, 饶伟文, 莫连峰. 蒲黄中金胺 O 的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(12): 1956
ZHAO CY, RAO WW, MO LF. HPLC determination of auramine O added in Pollen Tyhpae[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(12): 1956
- [14] 肖凌, 侯俊杰, 聂晶, 等. 元胡止痛系列制剂中金胺 O 的检测[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2008
XIAO L, HOU JJ, NIE J, *et al.* Detection of auramine O in Yuanhu Zhitong preparations[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(11): 2008
- [15] 闵春艳, 付凌燕, 汪祺, 等. 红花药材掺伪染色检测方法的实验研究[J]. 中国药事, 2011, 25(8): 772
MIN CY, FU LY, WANG Q, *et al.* Experimental research of Carthami Flos adulteration[J]. Chin Pharm Aff, 2011, 25(8): 772
- [16] 余新启, 何轶, 鲁静, 等. 金胺 O 染色物在中成药中的检测方法研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 130
YU XQ, HE Y, LU J, *et al.* Study on detection methods for auramine O in Chinese patent medicines[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(1): 130

(本文于 2018 年 11 月 23 日收到)