

利用 HPLC 建立对比筛选法测定红花中色素金橙 II

金竹映, 陈旭*, 戴小峰, 罗声, 辛宇, 金颖

上海大学生命科学实验中心, 上海 200444

摘要: 利用高效液相色谱法, 分别检测并对比红花药材中羟基红花黄色素 A 和金橙 II 的浓度, 从而建立对比筛选红花样品中金橙 II 的方法。结果在 46 个红花样品中, 推测有 26 个可疑阳性样品; 而通过对比筛选法能将可疑阳性样品数减至 2 个。经 HPLC-MS 法确证了对比筛选法的结果。检测羟基红花黄色素 A (HSYA) 的色谱条件为: 甲醇-乙腈-0.01% 磷酸溶液 (体积比为 26: 2: 72) 为流动相。检测金橙 II 的色谱条件为: 乙腈-0.025 mol/L 溶液 (40: 60) 为流动相。此法相比于常规只检测红花中金橙 II 的方法, 筛选效率与精确度更高, 并且更经济、适应性更广。

关键词: 红花; HPLC; HPLC/MS; 羟基红花黄色素 A; 金橙 II; 对比筛选法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Establishment of HPLC Screening Method of Orange-II in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

JIN Zhu-yi, CHEN Xu*, DAI Xiao-feng, LUO Sheng, Xin Yu, JIN Ying

Experimental Center for Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Abstract: In this study, a HPLC method for contrastively screening of orange-II in safflower samples was established by comparing concentrations of HSYA and orange II. For hydroxysafflor yellow A (HYSYA) chromatographic testing condition, methanol-acetonitrile-0.01 mol/L phosphoric Acid (26: 2: 72) was used as mobile phase. For Orange II chromatographic testing condition, acetonitrile -0.025 mol/L monopotassium phosphate (40: 60) was used as mobile phase. After testing the concentration of orange-II of all 46 safflower samples, 26 were indicated as suspicious positive samples. However, the number of suspicious positive samples was reduced to 2 using contrast screening method. The screening results were ensured with LC/MS method. Hence, the results showed that the efficiency of contrast screening method was superior to conventional orange-II screening method.

Key words: safflower (*Carthamus tinctorius* L.); HPLC; HPLC/MS; hydroxysafflor yellow A; orange-II; contrast screening method

红花为菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 具有活血化瘀、止痛等功效^[1-3]。它对心血管系统有广泛而显著的作用, 其中查耳酮苷类化合物—羟基红花黄色素 A (HSYA) 为其活血化瘀作用的主要有效成分^[4]。由于红花具有确切的临床疗效, 因此已大量用于临床处方和中成药生产。由于红花价格相对较高, 其存在严重的掺伪现象^[5]。其中最常见的是金橙 II, 又名酸性橙 II、二号橙、桔黄橙或酸性金黄 II, 俗名金黄粉, 化学名为 2-萘酚偶氮对苯磺酸钠, 是一种化工染料, 主要用于皮革、

纺织物染色, 禁止作为食品添加剂使用。但其具有色泽鲜艳、着色稳定、价廉等特点, 一些不法商贩将其用于药材生产与加工, 严重危害了消费者健康。

目前有关红花的质量分析方法主要高效液相色谱法^[6-8]、高效液相-质谱联用法^[9]等。利用 HPLC 的方法仅检测红花中金橙 II 的含量会得出过多的可疑阳性样品, 削弱了检测的精确度, 而以往文献未见仅用常规 HPLC 法来提高红花中金橙 II 筛选精确度的报道。本实验期望通过同时测定 HSYA 和金橙 II 含量的对比筛选方法, 有效缩小可疑样品的范围, 提高试验的准确度。为了验证此对比筛选方法可靠性, 本实验利用高效液相-质谱联用法 (LC/MS) 进行验证, 查看两者结论的一致性。

收稿日期: 2013-01-28 接受日期: 2013-05-28

基金项目: 上海市科技发展基金项目 (10-E-37)

* 通讯作者 Tel: 86-21-66134592-205; E-mail: xuchen@staff.shu.edu.cn

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器 (SPD-M20A); Shimadzu LCMS-2020 液相色谱质谱联用仪。金橙 II 对照品 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 批号:91014); 羟基红花黄色素 A 对照品 (中国药品生物制品检验所, 批号:111637201106); 红花药材标准品 (中国药品生物制品检验所, 批号:120907-200609); 红花样品 (不同产地的红花, 共 46 种, 由上海华宇药业有限公司副主任药师张增良做生药学鉴定); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

2.1.1 羟基红花黄色素 A 液相色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.01% 磷酸溶液 (体积比为 26:2:72; 用磷酸调节至 pH 为 3.0); 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 403 nm; 进样量: 10 μL。

2.1.2 金橙 II 液相色谱条件^[10]

色谱柱: Inertsil ODS-SP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.025 mol/L-磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 并用磷酸调 pH 为 3.0) (40:60); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 484 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 LC/MS 条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (250 mm × 2.0 mm, 4.6 μm); 流动相: 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液 (30:70), 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 40 °C; 离子化模式为 ESI⁺; DL 温度: 250 °C; Heat Block 温度: 200 °C; 雾化气流速: 1.5 L/min; 干燥气流速: 20 L/min; 质谱扫描范围 m/z 为 300~400 amu; 采用 SIM 模式定量。

2.3 对照品溶液制备

2.3.1 羟基红花黄色素 A 对照品溶液制备

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品 0.4 mg, 用 25% 甲醇定容, 作为对照品储备溶液 (含羟基红花黄色素 A 的含量 0.2 mg/mL)。

2.3.2 金橙 II 对照品溶液制备

精密称取金橙 II 对照品 0.4 mg, 用 70% 乙醇稀释定容, 作为对照品储备溶液 (金橙 II 的含量为 0.2

mg/mL)。

2.4 样品溶液制备

2.4.1 羟基红花黄色素 A 样品溶液制备

精密称取红花药材粉末 (过 40 目筛) 0.2 g, 精密加入 25% 甲醇 25 mL 提取羟基红花黄色素 A, 超声处理 40 min, 取出, 冷却, 称重, 用 25% 甲醇补足重量后离心 (10000 g, 15 min), 冷藏保存。色谱分析时取 1 mL, 用 0.45 μm 的有机系微孔膜过滤后备用。

2.4.2 金橙 II 样品溶液制备

取红花药材粉末 (过 40 目筛) 0.4 g, 精密加入 70% 乙醇 4 mL 提取金橙 II, 超声处理 20 min, 取出, 冷却, 称重, 用 70% 乙醇补足重量后离心 (10000 g, 15 min), 冷藏保存。色谱分析时取 1 mL, 用 0.45 μm 的有机系微孔膜过滤后备用。

2.5 方法学考察

2.5.1 羟基红花黄色素 A 标准曲线制备

精密吸取羟基红花黄色素 A 对照品储备液 (0.2 mg/mL) 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。按“2.1.1”色谱条件测定, 以样品质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 X, 峰面积为纵坐标 Y 绘制标准曲线。计算回归方程为: $Y = 344 \times 10^7 X + 4.24 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 表明羟基红花黄色素 A 在 0.01~0.2 mg/mL 的浓度范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.5.1.1 进样精密度试验

精密吸取红花标准对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样量为 10 μL, 计算相对标准偏差 RSD 值为 0.31%。

2.5.1.2 重复性试验

取同一红花生药样品 6 份, 按“2.4.1”方法制备供试品溶液并测定含量。测得羟基红花黄色素 A 含量的 RSD 值为 1.49% ($n = 6$), 显示该方法重复性良好。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 3$)

Table 1 Recovery testing results ($n = 3$)

羟基红花黄色素 A 添加量 HSYA added amount (mg)	平均测定值 Average detected amount (mg)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
1.00	2.87	101.08	1.81
2.00	3.86	98.63	0.94
3.00	4.89	99.07	1.72

2.5.1.3 回收率试验

精密称取红花标准样品,按“2.4.1”方法制备该样品溶液。分别加入三份不同量的羟基红花黄色素 A 标准品,依次测定,计算回收率,见表 1。

2.5.2 金橙 II 标准曲线制备

取金橙 II 对照品溶液(0.2 mg/mL)适量配制成 0.02 mg/mL 溶液,分别精密吸取 1 mL 置于 1、5、25、100、500 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶液稀释至刻度,以及 0.2 mg/mL 对照品溶液,按“2.1.2”色谱条件测定,以样品质量浓度(mg/mL)为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y 绘制标准曲线。计算回归方程为: $Y = 3.11 \times 10^7 X + 3.92 \times 10^3$, $r = 0.9999$,表明金橙 II 在 $4.0 \times 10^{-5} \sim 0.2$ mg/mL 的浓度范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.6 样品检测

2.6.1 HPLC 方法测定

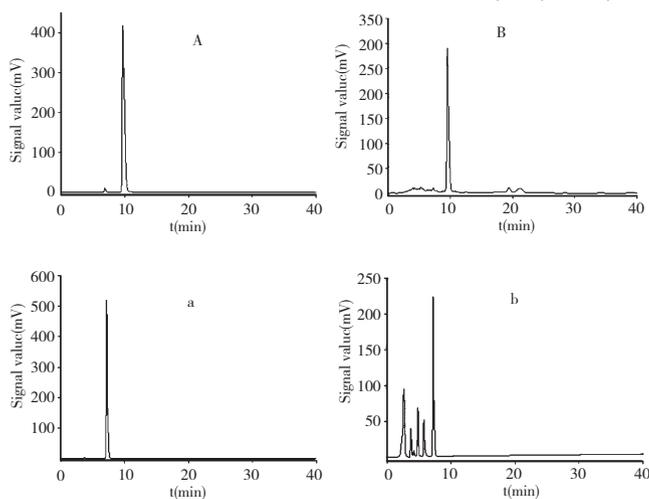


图 2 对照品溶液与部分红花样品色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of standards and safflower samples

A: 红花药材标准品色谱图; B: 46 号红花样品色谱图; a: 金橙 II 对照品色谱图; b: 16 号金橙 II 阳性样品色谱图

A: chromatogram of safflower standard control B: chromatogram of sample 46; a: chromatogram of Orange II standard control b: chromatogram of sample 16 with Orange II

2.6.2 对比法筛选添加金橙 II 假阳性样品

单独检测样品中金橙 II 含量出现了多达 26 个可疑阳性样品,为了缩小假阳性样品的范围,使检测更加经济高效,通过图 1 同时比对样品中羟基红花黄色素 A 和金橙 II 的含量,拟将金橙 II 与 HSYA 含量比值超过千分之二的样品,初步筛选为含非法添加色素金橙 II 的阳性样品,即 15、16 号样品。

2.6.3 质谱法验证对比筛选法得结果

取所有 46 个样品,每隔 10 个待测样品,以不同

将各样品的羟基红花黄色素 A 和金橙 II 的浓度绘制成联合曲线,以样品编号为横坐标,样品检测浓度(mg/mL)为纵坐标绘制曲线,见图 1。对照品溶液与部分样品的羟基红花黄色素 A 与金橙 II 的 HPLC 色谱图见图 2。

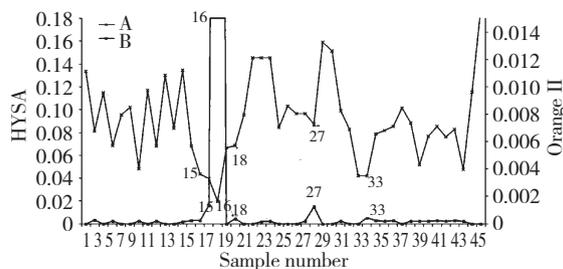


图 1 46 个样品羟基红花黄色素 A 与金橙 II 浓度曲线

Fig. 1 Concentration curves of HSYA and Orange-II of the 46 investigated samples

A: 羟基红花黄色素 A (HSYA); B: 金橙 II (Orange-II)

A: curve of hydroxysafflor yellow A (HSYA); B: curve of Orange-II

浓度梯度的金橙 II 标准品溶液以及红花药材标准品溶液作为对照,按照“2.2”的质谱条件,测定各个样品中金橙 II 的含量。对照品溶液和 15、16 号样品总离子流图见图 3。根据样品与标准对照品溶液的保留时间,以及核质比与文献报道金橙 II 分子的母离子质量数为 $328.9 m/z^{[11]}$ 一致,确定样品 15 和 16 中含有金橙 II,验证了对比筛选法的结果。

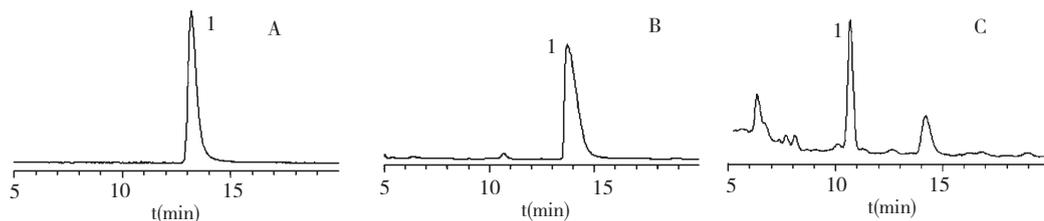


图3 金橙 II 照品溶液和 15、16 号样品总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of standard, sample 15 and sample 16

1: 金橙 II; A: 0.01 mol/L 金橙 II 标准溶液; B: 16 号红花样品; C: 15 号红花样品

1: Orange-II; A: 0.01 mol/L Orange II standard solution; B: safflower sample 16; C: safflower sample 15

3 讨论

3.1 HPLC 流动相的选择

根据《中国药典》2010 版, HPLC 检测羟基红花黄色素 A 的流动相为甲醇-乙腈-0.7% 磷酸溶液(体积比为 26: 2: 72), 其 pH 为 2 左右。为了能够改进羟基红花色素 A 的分离效果, 并且避免过低的 pH 值损坏色谱柱, 流动相选择为: 甲醇-乙腈-0.01% 磷酸溶液(体积比为 26: 2: 72), 以磷酸调 pH 为 3。

3.2 质谱流动相的选择

在质谱检测金橙 II 的液相条件选择中, 分别选用了乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵溶液(体积比为 30: 70)^[6]和乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液(体积比为 30: 70)的两种流动相, 质谱结果显示后者基线更稳定、峰型也较尖锐。

3.3 建立对比筛选法

本实验不同于现有文献中采用的单独测量金橙 II 的方法, 而是通过比较红花样品中羟基红花黄色素 A 和金橙 II 含量, 对比筛选出掺假金橙 II 的可疑阳性样品。利用 HPLC 法仅检测 46 个红花样品中金橙 II 的含量, 筛选出多达 26 个可疑阳性样品, 其假阳性样品的数量过多而导致结果不够精确。通过检出的非法添加剂与药品主要有效成分的含量比, 拟将比值大于千分之二之样品鉴定为阳性样品(见图 1)。通过实验证明: 对比筛选法可将原本的 26 个可疑阳性样品范围缩减到 2 个, 即 15、16 号样品。为验证对比筛选法的可行性和准确性, 通过液质联用技术对其所建立的方法进行佐证, 最后质谱实验结果显示, 所有 46 份红花样品中, 只有 15、16 号样品中添加了金橙 II。

3.4 筛选方法选择

除了对比筛选法, 还采用了文献报道的 HPLC-DAD(光谱匹配度)法^[12]。经光谱匹配, 16 号样品

与金橙 II 对照品, 在相同保留时间色谱峰的光谱匹配度为 0.99。另 45 个样品与对照品的光谱匹配度均小于 0.85, 据文献光谱匹配分析法判定这些样品中未添加金橙 II。通过分析发现, 当金橙 II 含量很低时, 其色谱峰的光谱扫描图发生扭曲和偏折, 影响与对照品的相似度匹配。其中, 液质联用法筛选出了含有金橙 II 的 15 号样品, 在光谱匹配筛选法中未检出。

4 总结

鉴于非法添加剂的目的在于冒充药品中的主要有效成分以降低成本。本研究基于这一事实建立对比筛选法, 来判定中药红花的优劣, 并通过质谱法佐证其正确性。通过本试验研究, 建立了利用常规的液相色谱仪来判定中草药红花优劣的对比筛选法, 该方法不仅适用于红花中金橙 II 的检测, 也能建立甄别其他药品优劣的对比筛选法。该方法经济高效且适用面更为广泛。

致谢:上海市食品药品监督管理局李耿老师提供红花原材料。

参考文献

- 1 Ministry of Public Health. Prescription Preparations of Chinese Medicinal of Drug Standards Issued. 1998.
- 2 Sha M(沙明), Zhang DF(张东方). DNA Quality evaluation of Chinese materia medica Sanguisorbae by DNA fingerprinting and HPLC fingerprinting. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37: 815-818.
- 3 Li SX(李顺旭), Li RD(李荣东). Content determination of crocus I and crocus II in *Crocus sativus* L. from various places in China by HPLC with gradient elution. *Cen South Pharm* (中南药学), 2010, 8: 886-889.