

· 中药工业 ·

牛黄清胃丸中化工染料检查及天然色素成分分析

刘静¹, 刘汇^{1,2}, 何轶¹, 戴忠^{1*}, 马双成^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 延边朝鲜族自治州食品药品检验所, 吉林 延吉 133002

[摘要] 目的: 建立牛黄清胃丸中化工染料检查方法并对其天然色素成分进行分析。方法: 采用 HPLC, Phenomenon Luna C₁₈ 色谱柱, 流动相为乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 醋酸铵(冰醋酸调 pH 4.5)梯度洗脱, 在 490 nm 检测波长对处方中黄芩、黄柏等药材可能存在的黄色系化工染料进行检查; 此外, 以 430 nm 为检测波长建立了本品天然色素成分指纹图谱。结果: 在 490 nm 检测波长下, 18 家企业生产的 49 批牛黄清胃丸样品中均未检出柠檬黄、日落黄、亮黄、金橙 II 和金胺 O 5 种黄色系化工染料。与此同时, 研究建立了本品中天然色素成分 HPLC 指纹图谱(430 nm), 采用 Chem pattern 软件分析表明, 样品与共有模式的相似度为 0.68~0.99; 确定 14 个共有峰并鉴定其中 9 个成分; 此外采用主成分分析阐明不同企业产品间差异较大的色素成分。结论: 所建立的方法准确、可靠、简便, 可用于牛黄清胃丸中化工染料检查及天然色素成分分析, 为本品质量控制提供了参考。

[关键词] 牛黄清胃丸; 化工染料; 天然色素; 高效液相色谱

[中图分类号] R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)01-0112-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190308003

Detection of Chemical Dyes and Analysis of Natural Pigment Constituents in Niu Huang Qingwei Pills

LIU Jing¹, LIU Hui^{1,2}, HE Yi¹, DAI Zhong^{1*}, MA Shuang-cheng^{1*}

1. National institutes for food and drug control, Beijing 100050, China;

2. Institute of Food and Drug, Yanbian Korean Autonomous Prefecture, Yanji 133002, China

[Abstract] **Objective:** To establish methods for detection of chemical dyes and analysis of natural pigment constituents in Niu Huang Qingwei Pills. **Methods:** HPLC method was applied on a Phenomenon Luna C₁₈ column with gradient Acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ ammonium acetate (pH 4.5 with glacial acetic acid) as eluent. Detection of possible yellow chemical dyes was under visible wavelength at 490 nm. Meanwhile, detection wavelength at 430 nm was selected for fingerprint establishment of natural pigment components. **Results:** Five kinds of chemical yellow dyes including lemon yellow, sunset yellow, brilliant yellow, golden orange II and auramine O were not detected in all the 49 batches of samples from 18 manufacturers. Additionally, HPLC fingerprint was established under 430 nm for analysis of natural pigment constituents. The result was then analyzed by ChemPattern software. It displayed that the similarities between samples and common pattern were in the range of 0.68-0.99. And 14 common peaks were determined and 9 were identified by comparing with reference standards. Also the principal component analysis demonstrated that the main difference between samples from different manufacturers. **Conclusion:** The established method was accurate and simple for chemical dye detection and natural pigment components analysis. It also provides scientific basis for its quality control.

[Keywords] Niu Huang Qingwei Pill; chemical dye; natural pigment; HPLC

牛黄清胃丸是由牛黄、大黄、黄芩、黄柏和番泻叶等 17 味药组成的中药复方制剂, 具有清胃泄火、润肠通便之功效。用于心胃火盛、头晕目眩、口舌生疮、牙龈肿痛、乳蛾咽痛、便秘尿赤^[1]。处

方中含有的黄芩、黄柏药材是市场上常见的染色中药, 其可能存在的合成染料主要有金胺 O, 但其他黄色系染料如柠檬黄、日落黄、亮黄、金橙 II 等也可能用于染色^[2-7]。中药安全问题一直备受关注, 从

* [通信作者] 戴忠, 研究员, 研究方向: 中药质量控制; E-mail: daizhong@nifdc.org.cn

马双成, 研究员, 研究方向: 中药质量与安全、中药化学; E-mail: masc@nifdc.org.cn

近年国家药品评价抽验质量分析情况来看,在经济利益的驱使下,中药染色掺伪现象时有发生^[2-3]。由于中药染色常采用化工染料,这些合成染料大都具有一定毒性,对人体健康存在严重安全隐患,有的甚至有致癌性,在食品领域被禁止使用或严格控制使用量^[8]。中药染色危害公众用药安全,欺骗消费者,是严重的违法行为。因此,国家药品监管部门高度重视,相继审核批准了多种中药中化工染料补充检验方法,主要有黄芩、蒲黄、红花等,有力地打击了中药使用合成染料染色的违法行为^[9]。因此,为更好地保障用药安全性。本研究首先研究建立了牛黄清胃丸中柠檬黄、日落黄、亮黄、金橙Ⅱ和金胺O的HPLC检查方法。同时,针对本品处方药味多,所含化学成分复杂多样,且处方中栀子、大黄等药材中含有一些天然色素成分的情况^[10-11],笔者进一步研究建立了这些天然色素成分指纹图谱,为更全面地评价本品质量提供了参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(配备DAD检测器);Mettler XS105DU 十万分之一天平、AE 3240 万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ-300DA 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,超声功率:300 W,频率:40 kHz);Milli Q 纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

金胺O、柠檬黄、日落黄、金橙Ⅱ对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111770-201603、510004-201602、510005-201602、111769-201302);亮黄(美国 Sigma-Aldrich 公司);黄芩苷、西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ、大黄酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚(中国食品药品检定研究院,批号分别为110715-201619、111588-201701、111589-201705、110757-201607、110713-2016113、110795-201710、110756-201512、110796-201621、110758-201616);乙腈、醋酸铵为色谱纯;冰醋酸为分析纯;水为超纯水。

牛黄清胃丸共49批,来源于18个生产企业,覆盖山西、辽宁、吉林等18个省区,分别为A企业(3批,样品编号1~3,批号分别为:A17033、A16239、A17046),B企业(2批,样品编号4~5,批号分别

为:17360701、17360401),C企业(3批,样品编号6~8,批号分别为:17013559、17013558、17013549),D企业(3批,样品编号9~11,批号分别为:17031009、111001、17041005),E企业(3批,样品编号12~14,批号分别为:1706153、1709126、1709130),F企业(3批,样品编号15~17,批号分别为:20161201、20170702、20170401),G企业(3批,样品编号18~20,批号分别为:170302、161205、170301),H企业(3批,样品编号21~23,批号分别为:1705021、1712033、1705026),I企业(3批,样品编号24~26,批号分别为:171002、170302、170301),J企业(3批,样品编号27~29,批号分别为:20170803、20170801、20170802),K企业(3批,样品编号30~32,批号分别为:111171212、11170329、11180208),L企业(3批,样品编号33~35,批号分别为:117002、117003、118001),M企业(3批,样品编号36~38,批号分别为:20151102、20170601、20170602),N企业(3批,样品编号39~41,批号分别为:170801、160703、170501),O企业(3批,样品编号42~44,批号分别为:170801、170301、170901),P企业(2批,样品编号45~46,批号分别为:20170901、20170201),Q企业(1批,样品编号47,批号:20170101),R企业(2批,样品编号48~49,批号分别为:20170701、20160602)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

取柠檬黄、日落黄、亮黄、金橙Ⅱ、金胺O对照品适量,用甲醇溶解,制成每1 mL中约含100 μg 的混合对照溶液,用0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

取大黄酸等9种对照品适量,用甲醇溶解,分别制成每1 mL中约含200 μg 的对照溶液,用0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 供试品溶液制备

取牛黄清胃丸2丸,加硅藻土6 g粉碎,研细,精密称取9 g,加甲醇溶液30 mL,超声处理30 min,放冷,取续滤液,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3 色谱条件

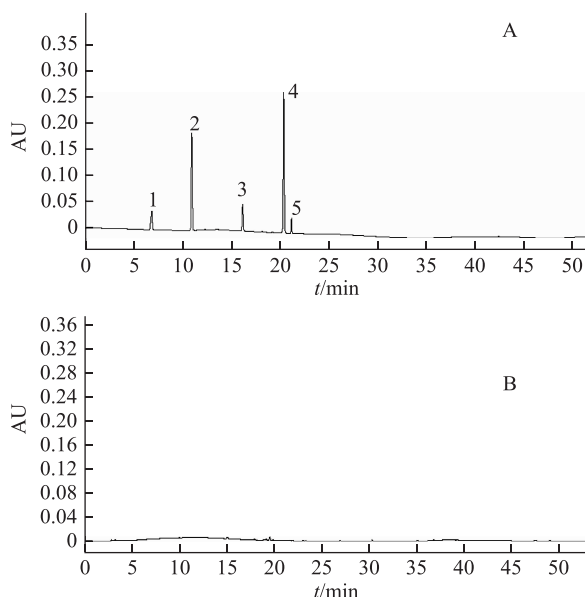
色谱柱:Phenomenon Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)柱;流动相:乙腈(A)和0.05 mol·L⁻¹醋酸铵(冰醋酸调pH 4.5)(B)梯度洗脱[梯度程序I

(化工染料检查): 0 ~ 30 min, 2% ~ 70% A; 30 ~ 40 min, 70% ~ 95% A; 40 ~ 50 min, 95% A; 梯度程序 II (天然色素成分分析): 0 ~ 35 min, 15% ~ 55% A; 35 ~ 45 min, 55% ~ 95% A; 45 ~ 50 min, 95% A]; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 40 ℃; 检测波长: 490 nm (I)、430 nm (II); 进样体积: 10 μL。

2.4 结果

2.4.1 HPLC 检查 5 种黄色系化工染料

2.4.1.1 样品检测 样品按 2.2 项下制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件梯度洗脱程序 I, 进样测定, 记录色谱图(图 1)。49 批牛黄清胃丸样品中均未检出与上述 5 种黄色系对照品保留时间一致的色谱峰。



注: A. 混合对照(1. 柠檬黄; 2. 日落黄; 3. 亮黄; 4. 金橙 II; 5. 金胺 O); B. 供试品。

图 1 混合对照品和供试品 HPLC 图(490 nm)

2.4.1.2 检出限 取不同浓度对照试剂溶液, 按 2.3 项下色谱条件梯度洗脱程序 I 进样。在 490 nm 检测波长下测定, 以信噪比 3:1 为检出限, 结果见表 1。

表 1 5 种化工染料对照试剂检测结果

染料	t_R /min	λ_{max} /nm	LOD/ng
柠檬黄	6.7	428	0.6
日落黄	10.8	486	0.3
亮黄	16.0	406	1.0
金橙 II	20.4	486	0.3
金胺 O	21.0	436	0.8

2.4.2 天然色素成分分析

2.4.2.1 方法学考察 精密度试验: 取同一供试品溶液(批号: A17033), 按 2.3 项下色谱条件 II 重复进样 6 次, 记录色谱图。以盐酸小檗碱为参照峰, 计算色谱图中特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.04% ~ 0.5%、0.3% ~ 2.9%, 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批次牛黄清胃丸(批号: A17033), 按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件 II 进样测定, 记录色谱图。以盐酸小檗碱为参照峰, 计算色谱图中特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.04% ~ 0.5%、0.3% ~ 2.9%, 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液(批号: A17033), 分别于 0、6、12、18、24 h 按 2.3 项下色谱条件 II 进样测定, 记录色谱图。以盐酸小檗碱为参照峰, 计算色谱图中特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.03% ~ 0.5%、0.4% ~ 3.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.2.2 共有模式的建立与分析 取 49 批牛黄清胃丸样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件梯度洗脱程序 II 进样测定, 记录色谱图, 见图 2。将结果导入 Chem Pattern 软件, 以所有变量作为共有峰筛选条件, 采用高斯曲线模拟的方法生成共有模式, 包括 14 个共有峰, 见图 3。经与对照品、对照药材比对, 鉴定其中 9 个共有峰并明确其主要药材来源, 见表 2。

2.4.2.3 统计学分析 相似度分析: 利用 Chem Pattern 软件, 以 HPLC (430 nm) 指纹图谱共有模式为参照图谱, 采用夹角余弦法计算各样品的相似度, 见图 4。所有 49 批样品与共有模式的相似度为 0.68 ~

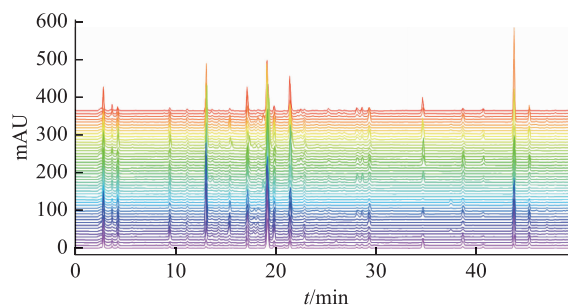
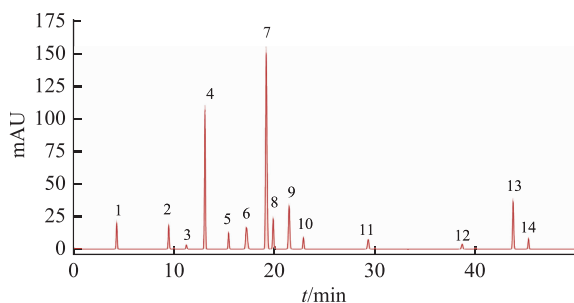


图 2 牛黄清胃丸样品天然色素 HPLC 指纹图谱(430 nm)

0.99, 其中C企业样品相似度高, 均一性好; 仅B企业样品相似度低于0.7, 分析发现其样品部分色谱峰含量较其他企业样品存在一定差异。



注: 3. 黄芩苷; 4. 西红花苷-I; 5. 西红花苷-II; 6. 大黄酸; 7. 盐酸小檗碱; 11. 芦荟大黄素; 12. 大黄素; 13. 大黄酚; 14. 大黄素甲醚。

图3 牛黄清胃丸天然色素指纹图谱共有模式(430 nm)

表2 牛黄清胃丸天然色素指纹图谱中共有峰的鉴定

色谱峰编号	成分	t_R/min	分子式	相对分子质量	主要来源
3	黄芩苷	11.20	$C_{21}H_{18}O_{11}$	446.36	黄芩
4	西红花苷-I	13.11	$C_{44}H_{64}O_{24}$	976.96	栀子
5	西红花苷-II	15.45	$C_{38}H_{54}O_{19}$	814.82	栀子
6	大黄酸	17.22	$C_{15}H_8O_6$	284.22	大黄
7	盐酸小檗碱	19.13	$C_{20}H_{18}ClNO_4$	371.81	黄柏
11	芦荟大黄素	29.32	$C_{15}H_{10}O_5$	270.24	大黄
12	大黄素	38.76	$C_{15}H_{10}O_5$	270.24	大黄
13	大黄酚	43.82	$C_{15}H_{10}O_4$	254.24	大黄
14	大黄素甲醚	45.35	$C_{16}H_{12}O_5$	284.26	大黄

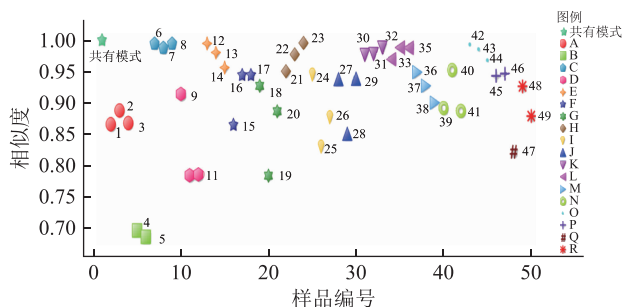
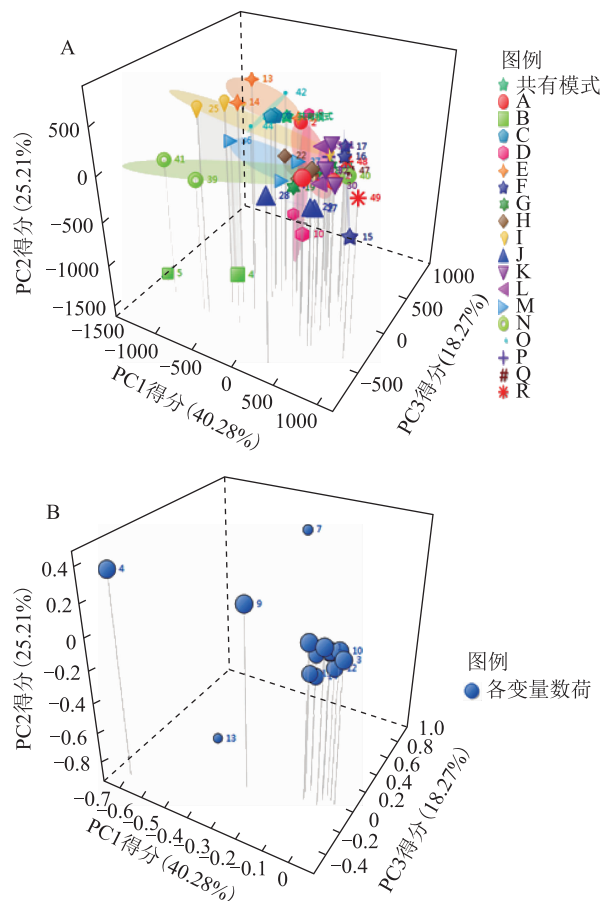


图4 牛黄清胃丸样品相似度

主成分分析: 主成分分析(PCA)是根据实际需要从中抽取几个来尽可能多地反映原来变量信息的一种多元统计分析方法。利用 Chem Pattern 软件将样品测定数据标准化后进行主成分分析, 见图5。第一主成分(PC1)的贡献率为40.28%, 第二主成分(PC2)的贡献率为25.21%, 第三主成分(PC3)的贡献率为18.27%, 累计达到83.76%, 说明其能较全面地反映样品间的差异。PCA散点图显示, 不

同企业生产样品基本可以各自聚为一类, 其中B企业样品明显偏离其他样品。主成分载荷图给出各色谱峰在主成分中所占的比例, 其中离 $X=0$ 轴距离越远的点对PC1的贡献越大, 如西红花苷I和大黄酚; 而离 $Y=0$ 轴距离越远的点对PC2的贡献越大, 如大黄酚和西红花苷I; 而离 $Z=0$ 轴距离越远的点对PC3的贡献越大, 如西红花苷I和盐酸小檗碱。以B和C企业为例, 两者样品主要沿PC2、PC3得到分离, 因对PC2、PC3贡献大的成分是其差异性成分; 因B位于 $PC2 < 0$, $PC3 < 0$ 的位置, C位于 $PC3 > 0$, $PC3 > 0$ 的位置, 所以与PC2负相关、与PC3正相关的成分大黄酚在B样品中含量较高; 与PC2、PC3均正相关的成分盐酸小檗碱在B样品中含量较低。



注: A. 得分图; B. 载荷图。

图5 牛黄清胃丸样品PCA分析结果

3 讨论

3.1 提取方法考察

采用超声提取方式, 分别考察不同提取溶剂(甲

醇、80%甲醇-水)、提取时间(超声30、45、60 min)等条件,结果发现,提取时间影响不大,甲醇提取样品中天然色素成分信息丰富,基线分离情况良好。

3.2 色素成分分析

实验过程中发现,尽管所有样品在490 nm下均未检出5种黄色系化工染料,但在430 nm波长下可见色谱峰信息丰富,因此研究建立了这些天然色素成分指纹图谱,并进一步分析鉴定其中9个主要共有峰,结果表明,这些成分主要来源于处方中大黄、番泻叶、黄柏、黄芩和栀子等5味药材。此外,通过Chem pattern软件分析,49批样品与共有模式的相似度为0.68~0.99,其中仅B企业样品相似度低于0.7,分析发现其样品部分色谱峰含量较其他企业样品存在一定差异;主成分分析能够明确不同企业产品中差异较大的成分,其在一定程度上也反映了不同企业相关药材的质量及投料情况。此外,个别企业样品批间存在一定差异,分析表明因部分色谱峰含量不同所致。

3.3 结论

所有样品均未检出柠檬黄、日落黄、亮黄、金橙Ⅱ和金胺O这5种黄色系化工染料。同时,研究建立的天然色素成分指纹图谱准确、可靠、简便,能够反映不同企业产品的质量,为更好地控制制剂质量提供了参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第一分册 牛黄清胃丸:WS3-B-0038-89[S]. 1989.
- [2] 戴忠,鲁静,朱炯,等. 关于中药国家评价性抽检的思考[J]. 中国药理学杂志,2015,50(2):93-98.
- [3] 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]. 中国药理学杂志,2015,50(4):277-283.
- [4] 何轶,雷银瓶,鲁静,等. HPLC-DAD-MS/MS法结合谱库筛查5种中药中21种合成染料[J]. 中成药,2016,38(12):2631-2635.
- [5] 胡青,孙健,于泓,等. 快速液相-四级杆串联高分辨飞行时间质谱定性测定中药中50种染色色素[J]. 中国药理学杂志,2016,51(15):1316-1323.
- [6] 朱雪妍,谷立勋,何颂华,等. 葛根芩连片中掺入染色剂的检测方法研究[J]. 药物分析杂志,2016,36(4):711-720.
- [7] 连云岚,杜娟,乔玉峰. HPLC-MS法检测少腹逐瘀丸及原料药材中非法添加的7种黄色素[J]. 中草药,2016,47(18):3219-3223.
- [8] 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):45-50.
- [9] 黄宝斌,许明哲,杨青云,等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析[J]. 药物分析杂志,2014,34(9):1701-1708.
- [10] 王玲. 中药大黄提取色素的抑菌作用研究[J]. 食品工业科技,2000,21(6):27-28.
- [11] 周庆新,白宗萍,陈芳甜,等. 栀子红色素理化特性表征及其稳定性研究[J]. 生物化工,2017,3(2):1-6.

(收稿日期:2019-03-08 编辑:王笑辉)

(上接第111页)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:743-746.
- [2] 刘玉玲,汪受传,李琳. 玉屏风颗粒在儿科疾病治疗中的应用进展[J]. 实用中医药杂志,2018,34(1):131.
- [3] 欧阳晓玫,何英梅,贺军权,等. 甘肃五大宗药材农残及重金属检测[J]. 中医学报,2005,33(5):22-24.
- [4] 张玉婷,郭永泽,刘磊,等. 中草药中农药残留限量标准国内外对比分析[J]. 世界标准信息,2008,431(5):22-25.
- [5] 李敏,刘渝,周睿,等. 国内外有关中药中重金属和砷盐的限量标准及分析[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2859-2860.
- [6] 卢进,申明亮. 中药材重金属含量与控制[J]. 中国中医药信息杂志,1995,2(10):10-12.

(收稿日期:2018-12-28 编辑:戴玮)