

红花中非法添加色素的薄层色谱快速鉴别法

刘艳*, 张勤, 吕志刚, 范可青

(襄阳市食品药品检验所, 湖北 襄阳 441021)

[摘要] **目的:**针对各省药品质量公告中红花中非法添加色素的报道,按现行国家补充检验批件仅能检出色素金橙Ⅱ,现建立快速薄层色谱方法,以补充检验红花药材中可能含有的除金橙Ⅱ外其他类非法添加的色素。**方法:**采用薄层色谱法,硅胶 G 为固定相,70% 乙醇为溶剂,乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水(1:3:3:1:1)为展开剂,在可见光下检视筛查;采用高效液相色谱法(HPLC),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-0.05 mol·L⁻¹醋酸铵(52:48)为流动相,柱温35℃,检测波长508 nm,用紫外检测器和二极管阵列检测器进行两次检测,通过与对照试剂色谱峰比进一步加以确证。**结果:**在薄层色谱和 HPLC 佐证结果一致情况下,抽查的9批红花药材中确证有两批药材含食品禁用色素酸性红73。**结论:**该薄层方法简单、快速、重复性好,成本低,适用于药品检测车的快速筛查红花中非法添加色素,补充了红花国家标准中的相关规定,对进一步加大对中药材、中药饮片市场的监管,对开展染色掺假中药专项整治具有较强的实用性。

[关键词] 红花; 非法添加色素; 薄层色谱鉴别; 酸性红73; 药品检测车

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0095-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180095

Rapid TLC Identification Method of Illegally Added Pignent in Carthami Flos

LIU Yan*, ZHANG Qin, LU Zhi-gang, FAN Ke-qing

(Xiangyang Institute for Food and Drug Control, Xiangyang 441021, China)

[Abstract] **Objective:** This article was aimed to establish a rapid identification method for the detection of illegally added pigments in Carthami Flos besides golden orange pigment Ⅱ in the case of that only golden orange pigment Ⅱ can be detected according to the current national inspection approval of to supplement the inspection of illegally added pigment in Carthami Flos besides golden orange pigment Ⅱ. **Method:** In TLC method, silicagelG was used as stationary phase, 70% ethanol was used as solvent, and ethylacetate-butanol-ethanol-ammonia-water (1:3:3:1:1) was used as developing solvent, and the result was detected under visible light. The positive samples were further proved by HPLC method. In HPLC method, octadecylsilane bonded silica was used as a filler, methanol-0.05 mol·L⁻¹ ammonium acetate (52:48) was used as mobile phase. The column temperature was 35℃, the detection wavelength was 508 nm, by tested twice with ultraviolet detector and photodiode array detector. Then the result was compared with the peak of the control reagents for further confirmation. **Result:** The results of two positive samples by TLC were consistent with those by HPLC. Two out of nine groups of Carthami Flos samples were proven to contain the forbidden food pigment acid red 73. **Conclusion:** The method is suitable for rapid screening of illegally added pigment in Carthami Flos. The established TLC method is simple, rapid, reproducible, cost-effective, to supplement the relevant provisions of national standards, and to play a significant role in the management of medicine timber and Chinese Herbal Medicine.

[Key words] Carthami Flos; illegal add pigment; TLC; acid red 73; drug testing vehicles

目前世界上共有13种红花,我国仅有1种,主产于新疆、河南、湖南、云南、浙江等地。红花具有活

血通经、散瘀止痛的功效,是活血化瘀方剂的良药,不仅对妇科疾病有较好的疗效还在临床广泛用于心脑血管等疾病;由于它含有红花油、红花蛋白和红花黄色素,可以降低胆固醇,防治动脉硬化及机体脂质代谢紊乱^[1],对人类保健的独特作用已日益受到广泛的关注,在我国被卫生部批准为药食同源中药。红花中含有色素、黄酮类化合物、酚酸、脂肪酸、挥发油、多炔及其他成分,色素主要指红花黄色素和红色素,其中黄色素含量约为 4%~10%,红色素约为 0.2%~0.5%^[2-4]。红花色素成分主要是红花黄色素 A (saffor yellow A)、羟基红花黄色素 A (carthosafflor yellow A) 和红花红色素 (carthmin)^[5]。近几年来不法经销商为牟取利润在红花中非法添加色素达到以次充优的目的。多个省市药品质量公告^[6-8]中屡屡出现红花中非法添加色素的报道,可见该品种中非法添加色素在我国内地医药市场有泛滥之势。根据湖北省食品药品监督管理局《关于 2011 年抽验计划》的精神,2012 年 3~9 月我市药品检测车共抽验 9 批红花,按 2010 年版《中国药典》一部^[9]及国家食品药品监督管理局《药品检验补充检验方法和检验项目批准件》(批准件编号 2007009)^[10]检验,发现 1 批检出非法添加色素金橙 II,另有 3 批的薄层色谱出现了非红花的红色斑点。针对上述情况,我们努力寻求一种能用于药品检测车快速鉴定红花非法添加(除金橙 II 以外色素)的方法。经查阅资料及观察样品溶液的颜色,我们初步判断有的红花样品中可能含有胭脂红、赤藓红、酸性红 73 等色素。而红花的成分中并不含上述 3 种色素。本文建立薄层色谱鉴别的方法以鉴别红花中是否添加了上述 3 种色素。

1 材料

1.1 仪器 ZY-600U 型薄层色谱自动成像分析系统(北京先驱威锋技术开发公司),LC-20A 高效液相色谱仪(包括 SPD-M20A 二极管阵列检测器,日本岛津公司)。

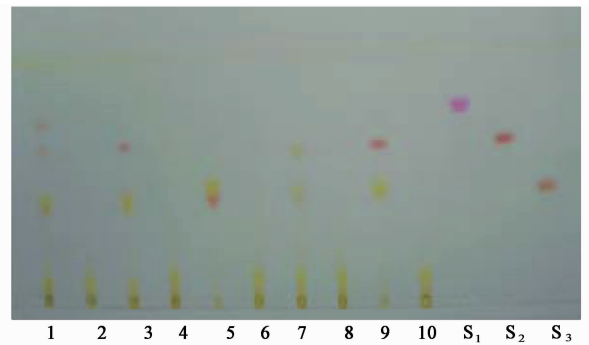
1.2 试药 红花对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 110717-200204),胭脂红(批号 111771-200701)、赤藓红(批号 111772-200701)、酸性红 73(批号 111773-200701)对照试剂,均购自中国食品药品检定研究院,硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱法^[11] 取本品 2 g(不粉碎),加 70% 乙醇 5 mL,超声提取 20 min,静置,取上清液作

为供试品溶液。另取胭脂红、赤藓红和酸性红 73 对照试剂适量,分别加 70% 乙醇溶解并制成每 1 mL 含 0.1 mg 的对照试剂溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液和对照试剂溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-氨水-水(1:3:3:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在可见光下检视。供试品色谱中,在与对照试剂色谱相应的位置上,不得显相同颜色的斑点。若出现相同颜色的斑点,则用高效液相色谱法验证。

2.1.1 初筛 取样品 1~9 及对照药材、对照试剂,分别按上述方法试验,结果见图 1。



1~9. 样品;10. 红花对照药材;S₁. 赤藓红对照试剂;
S₂. 酸性红 73 对照试剂;S₃. 胭脂红对照试剂

图 1 初筛薄层色谱

由图 1 可见,样品 1,3,9 色谱中,在与酸性红 73 对照试剂色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

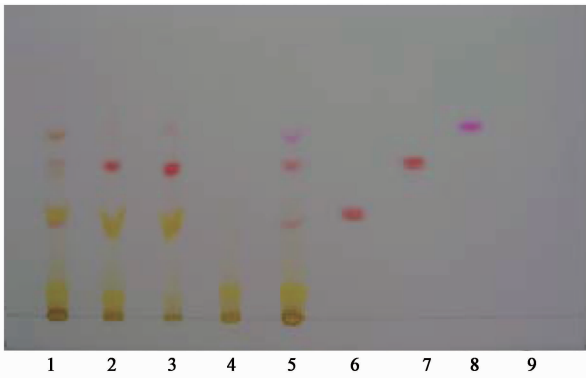
2.1.2 复筛 取样品 1,3,9,红花对照药材及 3 种对照试剂,分别按上述方法试验,结果可见,样品 1,3,9 色谱中,在与酸性红 73 对照试剂色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

再取样品 1,3,9,红花对照药材、加入 3 种对照试剂的红花对照药材、3 种对照试剂及空白试剂,分别按上述相同方法试验,结果见图 2。

在排除空白试剂及对照药材的干扰后,样品 1,3,9 色谱中,在与酸性红 73 对照试剂色谱相应的位置上,仍然显相同颜色的斑点但样品 1 斑点的颜色要淡一些,即样品 1,3,9 疑似添加了酸性红 73,旋即用 HPLC 进行验证。

2.2 HPLC 验证 照高效液相色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI D)测定^[11]。

2.2.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇-0.05 mol·L⁻¹醋酸铵(52:48),柱温 35 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 508 nm,理



1. 样品 1;2. 样品 3;3. 样品 9;4. 红花对照药材;
5. 加入三种对照试剂后的红花对照药材;6. 胭脂红对照试剂;
7. 酸性红 73 对照试剂;8. 赤藓红对照试剂;9. 70% 乙醇空白试剂

图 2 加入对照试剂后的复筛 TLC

论板数按酸性红 73 峰计算不低于 2 000。

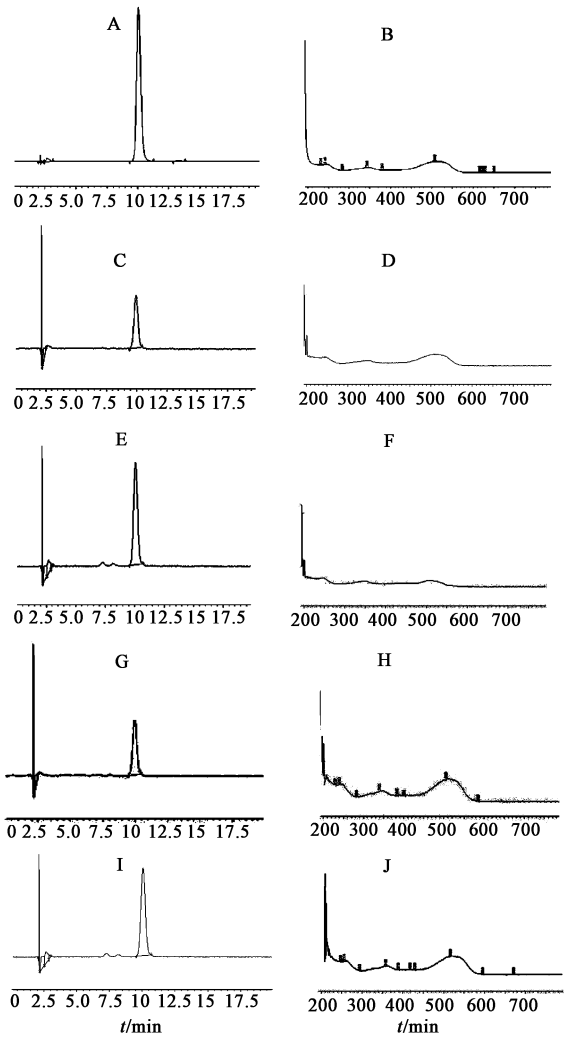
2.2.2 酸性红 73 对照试剂溶液的制备 取酸性红 73 对照试剂适量,精密称定,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含 74.4 μg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取上述疑似含有酸性红 73 的 3 个红花样品各 2 g(不粉碎),分别加入 70% 乙醇 15 mL,超声处理 10 min,取上清液作为供试品溶液。取供试品溶液、酸性红 73 对照试剂溶液各 15 μL ,按上述薄层色谱方法展开、取出、晾干(二次展开);分别刮取薄层板上与酸性红 73 对照试剂的斑点在同一水平位置的 3 个样品的斑点及对照试剂的斑点,置离心管中,加入 70% 乙醇 2 mL,密塞,超声处理 5 min,离心(1 200 转)3 min;取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得供试品溶液和对照试剂(TCL 上刮取)溶液。

2.2.4 测定法 分别精密吸取两种对照试剂溶液和上述供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得。

供试品色谱中,应不得出现与对照试剂色谱保留时间相同的色谱峰。若出现保留时间相同的色谱峰,则采用二极管阵列检测器比较相应色谱峰在 210 ~ 550 nm 波长范围的紫外-可见吸收光谱,吸收光谱应不相同。

2.2.5 结果判断 从以上 HPLC 色谱、UV 光谱(图 4)中可见,样品 3 及样品 9 与酸性红 73 对照试剂的 HPLC 色谱图、UV 光谱保留时间一致,可证明样品 3 和样品 9 确实添加了色素酸性红 73;而样品 1 仅 HPLC 色谱与酸性红 73 对照试剂保留时间一致,样品 1 的 UV 光谱未积出数据峰,则不能佐证其添加了酸性红 73 色素的结论。



A. 酸性红 73 对照试剂 HPLC 色谱;B. 酸性红 73 对照试剂 UV 光谱;C. 酸性红 73 对照试剂(TCL 上刮取)HPLC 色谱;D. 酸性红 73 对照试剂(TCL 上刮取)UV 光谱;E. 样品 1 色谱;F. 样品 1 光谱;G. 样品 3 色谱;H. 样品 3 光谱;I. 样品 9 色谱;J. 样品 9 光谱

图 4 红花及对照试剂 HPLC 色谱及 UV 光谱

3 讨论

有报道称,红花伪品常用金橙 II 染色;进一步实验显示,还使用了色素酸性红 73 和胭脂红。酸性红 73,又名酸性大红 GR,为黄光红色粉末,是食品禁用色素,常用于毛丝织物的染色,也用作纸张和皮革的染色,还可用于塑料、香料和水泥的着色及其制造墨水,为可疑致癌物质^[12];金橙 II 又名酸性橙 7、酸性橙 II、酸性金黄 II、酸性艳橙 GR,俗称金黄粉,是一种非生物合成着色剂,含有强致癌物,被禁止作为食品添加剂使用^[13]。根据本文的薄层色谱方法,我们对抽验的 9 批红花进行了薄层色谱鉴别,并对 3 个疑似含有酸性红 73 的样品用 HPLC 佐证,结果编号

为 3,9 的两个样品均检出酸性红 73,从技术上佐证了其非法添加色素的定论(表 1)。而编号为 1 的样品在上述 3 个薄层色谱图中其疑似斑点均显较淡的颜色、色谱峰的出峰时间与酸性红 73 尽管一致但因含量低其光谱图未积出数据峰就不能确定该疑似斑点就是酸性红 73。从上述 3 个薄层色谱图中还可看出样品 1,3,5,7,9 的色谱图中还有类红色斑点及酸性红 73 下方的黄色斑点(红花对照药材则无)具

体添加的是什么色素还在进一步研究之中。本文的色谱检测证明,对于这些染色红花中检出一定量的金橙 II 和酸性红 73,毒理学实验显示它们具有一定的致癌和致突变作用,如果患者长期使用含有这些含有染料的红花,易引起短暂性或持久性的病理状态,甚至危及生命。该方法操作简便、快速、专属性强,为药品检测车快速鉴别红花是否非法添加色素增添了一种新方法。

表 1 9 批红花的检验

No.	批号	供样单位	生产单位	检验结果	备注
1	无	保康县歇马中心卫生院	亳州市中药饮片厂	不符合规定	性状、显微鉴别、HPLC 合格,薄层色谱金橙 II 检查不合格(按照本文方法检验,检出疑似酸性红 73)
2	2011-05-16	湖北人福中通医药有限公司	新疆	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
3	20100527	襄樊同和大药房连锁有限公司老车站店	西藏	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格(按照本文方法检验,检出疑似酸性红 73)
4	110601	襄樊九州通医药有限公司	湖北金贵中药饮片有限公司	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
5	无	谷城县石花中心卫生院	安徽协和成药业饮片有限公司	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
6	0110516	襄阳市中医医院	新疆	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
7	110420	襄樊天济大药房连锁有限责任公司	安徽海鑫中药饮片有限公司	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
8	110401	襄樊金统一医药连锁有限公司金统一药房中心店	新疆	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格
9	100801	谷城县冷集中心卫生院	新疆	符合规定	性状、薄层色谱金橙 II 检查合格(按照本文方法检验,检出疑似酸性红 73)

[参考文献]

[1] 张国霞,王维波,陈德道,等.红花中羟基红花黄色素 A 的加速稳定性研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(15):86.

[2] 马自超,寺原典彦.红花色素成分的研究[J].中国食品添加剂,2008,2:16.

[3] WEICA. Isolation, purification, and structure identification of bioactive components from Flos carthami [D]. 无锡:Jiang Nan University,2006.

[4] KOICHI, CHIHIRON, YASUOMIM. Separation of major safflowers from carthamus yellow using high-speed countercurrent chromatography [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol,2008,31:1047.

[5] 孙阳,杨婧,张琪琪,等.红花多糖对肝癌细胞增殖阻滞的机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(13):156.

[6] 北京市药品监督管理局.第四季度北京市药品质量

公告[N].2010.

[7] 湖北省食品药品监督管理局.第四季度湖北省药品质量公告[N].2011.

[8] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省药品质量公告[N].2011:1.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:141.

[10] 国家食品药品监督管理局.《药品检验补充检验方法和检验项目批准件》(批准件编号:2007009).

[11] 国家食品药品监督管理局.《药品检验补充检验方法和检验项目批准件》(批准件编号:2007014).

[12] 栾洁,倪艳娜,丁晴.红花饮片染色掺伪品的检测方法探讨[J].安徽医药,2012,16(7):917.

[13] 潘昌华,刘劭钢,龚小娟.“金黄粉”的化学结构测定[J].中华预防医学杂志,2003,37(1):49.

[责任编辑 顾雪竹]