

## 丁香掺杂染色问题及检测方法研究

周志强, 万林春\*, 许妍, 洪挺, 赵雯, 袁铭铭, 罗跃华\* (江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

**摘要** 目的: 4-甲基咪唑为焦糖色素制备过程中的一副产物, 通过建立4-甲基咪唑的快速检测方法, 控制丁香中花梗染焦糖色素后掺入样品。方法: 采用高效液相色谱-质谱联用法, 色谱柱为Phenomenex Luna C18 (2 mm×150 mm, 3 μm), 以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30 ℃; 质谱使用电喷雾离子源, 正离子模式下检测。结果: 4-甲基咪唑在9.28~371.11 ng·mL<sup>-1</sup>浓度范围内呈良好的线性关系 ( $r=0.9994$ ), 平均回收率96.91%, RSD=1.0%; 160批次丁香中33批次检出4-甲基咪唑, 表明上述样品涉嫌染色。结论: 本方法快速、简便、准确, 专属性强, 灵敏度高, 可作为丁香中4-甲基咪唑的定性定量检测方法, 为控制丁香质量提供参考。

**关键词:** 丁香; 掺杂染色; 焦糖色素; 4-甲基咪唑; 液质联用

中图分类号: R28; R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)10-1336-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.10.005

### On the Problem of Adulteration Dyeing in Flos Caryophylli and its Detection Method

Zhou Zhiqiang, Wan Linchun\*, Xu Yan, Hong Ting, Zhao Wen, Yuan Mingming, Luo Yuehua\* (Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

**Abstract Objective:** To establish a rapid detection method of 4-methylimidazole which is a by-product in the preparation of caramel to control the adulteration of pedicel of Flos Caryophylli dyed with caramel. **Methods:** HPLC-MS was used, and the column was Phenomenex Luna C18 (2 mm×150 mm, 3 μm) gradiently eluted with methanol-0.1% formic acid solution as the mobile phase at the flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was 30 ℃. Positive electrospray ionization was used for mass spectrometer. **Results:** 4-methylimidazole showed a good linear relationship ( $r=0.9994$ ) in the range of 9.28~371.11 ng·mL<sup>-1</sup>, the average recovery rate was 96.91%, RSD=1.0%. 4-methylimidazole was detected in 33 batches among 160 batches of Flos Caryophylli, indicating that these batches were suspected of being dyed. **Conclusion:** The method is fast, simple, accurate, highly specific and sensitive, which can be used as a qualitative and quantitative detection method for 4-methylimidazole in Flos Caryophylli and can provide useful information for the quality control of Flos Caryophylli.

**Keywords:** Flos Caryophylli; adulteration dyeing; caramel; 4-methylimidazole; HPLC-MS

作者简介: 周志强, 初级药师; 研究方向: 中药质量评价研究; E-mail: 648767060@qq.com

通信作者: 万林春, 副主任中药师; 研究方向: 中药质量评价研究; Tel: (0791) 88158716; E-mail: 425217982@qq.com

罗跃华, 主任中药师; 研究方向: 中药质量评价研究; Tel: (0791) 88158689; E-mail: emailuo@sohu.com

丁香为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 的干燥花蕾, 当花蕾由绿转红时采摘<sup>[1]</sup>。丁香亦名公丁香、丁子香、鸡舌香, 为常用中药。目前, 市场上丁香主要产于印度尼西亚、马达加斯加等地, 为进口药材。我国广东、广西、海南等地曾有栽培。丁香入药历史悠久, 是我国传统进口“南药”之一。丁香具有温中降逆, 补肾助阳的功效。用于脾胃虚寒, 呃逆呕吐, 食少吐泻, 心腹冷痛, 肾虚阳痿<sup>[2]</sup>。丁香的主要成分丁香酚具有抑菌、麻醉、解热、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[3-4]</sup>。丁香除作为药用外, 还是食品中常用的调味料之一, 安全无毒, 对食品中的腐败菌有良好的抑制和杀灭效果, 在食品中的应用也越来越广泛<sup>[5-6]</sup>。

丁香收载于《中国药典》2015年版一部, 为本单位2017年国家评价性抽验品种。研究中发现不法分子为获取利润, 将丁香花梗采用焦糖色素进行染色后混入样品中。由于中药材市场经营比较混乱, 药材和饮片掺杂染色的现象比较常见<sup>[7-9]</sup>, 但关于丁香掺杂染色的情况未见报道。丁香表面颜色为棕褐色或褐黄色, 其未被染色的杂质颜色为浅棕色, 两种颜色相差较大, 极易区分。而染色后的花梗颜色与丁香颜色相似, 消费者难以区分。而现标准虽有杂质检查项目, 但缺少适宜指标用于控制杂质质量及反映非法染色状况。

焦糖色素又名焦糖色, 是一种浓黑褐色粘稠物质, 属于食品添加剂的范畴<sup>[10]</sup>。如可乐类饮料独特的棕褐色、酱油中的色泽便是来自焦糖色素。考虑到焦糖色素为一复杂混合物, 难以采用标准物质对其进行定性。在以亚硫酸铵为原料生产焦糖色素时, 会产生副产物含氮杂环咪唑类化合物4-甲基咪唑等。在大剂量情况下能导致动物长肿瘤, 有可能给人体带来致癌风险<sup>[11-12]</sup>。4-甲基咪唑不是丁香

固有的化学成分, 但由于人为掺入染有焦糖色素的杂质后, 焦糖色素生产中的副产物4-甲基咪唑便引入样品中, 严重影响丁香使用安全<sup>[13-14]</sup>。为此, 对丁香中的4-甲基咪唑进行研究。本文系采用质谱作为检测器, 采用多反应监测扫描方式, 提高了分析灵敏度, 建立了液质联用的检测方法来确定杂质是否有被染色情况, 以有效遏制掺假、造假的行为, 提高丁香饮片的质量, 保证人民群众的用药安全和有效。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 快速液相色谱仪-API4000串联质谱仪(配ESI源, G1312B二元高压泵, G1367D自动进样器, G1315C检测器, G1379B真空在线脱气机, G1316B柱温箱), Sartorius BT 25S、BSA124S-CW电子天平(德国Sartorius公司), KQ-500E型超声波仪(40 kHz, 500 W, 昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

4-甲基咪唑(中国食品药品检定研究院, 批号: 190150-201501)。甲醇(美国Sigma公司)为色谱纯, 甲酸(美国Fluka公司)为色谱纯; 水为Milli-Q制备的超纯水, 其余试剂均为分析纯, 丁香饮片样品为2017年中药饮片专项抽验工作抽样, 共160批。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C-18 (2 mm × 150 mm, 3 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.1%甲酸水溶液(B), 按照表1梯度洗脱; 流速: 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

表1 流动相梯度洗脱表

时间/min	V(流动相A)/%	V(流动相B)/%
0	2	98
3	2	98
4	100	0
6	100	0
6.5	2	98
11	2	98

## 2.2 质谱条件

电喷雾电离离子源 (ESI), 正离子模式检测, 电喷雾电压为5500 v; 干燥气温度500 °C,

气帘气: 20 psi; 碰撞气: 6 psi; 其他质谱参数见表2。

表2 对照品质谱检测参数

对照品	Q1	Q3	DP (v)	CE (v)
4-甲基咪唑	83.0	56.2	40	24
	83.0	42.2	40	36

## 2.3 对照品溶液的制备

精密称取4-甲基咪唑对照品9.40 mg, 置50 mL量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 作为对照品母液。精密量取上述对照品母液0.5 mL, 置10 mL量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取上述对照品储备液0.1 mL, 置10 mL量瓶中, 加丁香基质溶液 (取未染色的丁香杂质1.0 g, 研成粉末, 置具塞锥形瓶中, 加入水10 mL, 密塞, 超声处理20 min, 摇匀, 离心, 滤过, 取续滤液即得) 至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

## 2.4 供试品溶液的制备

取丁香1.0 g, 研成粉末, 置具塞锥形瓶中, 精

密加入水10 mL, 密塞, 超声处理20 min, 摇匀, 离心, 滤过, 即得。

## 2.5 阴性样品溶液的制备

取未染色的丁香样品, 按“2.4”节供试品溶液制备方法, 制成阴性样品溶液。

## 2.6 测定方法

取对照品溶液, 进样5 μL, 注入液质联用仪, 记录所得质谱MRM色谱图 (见图1)。

取供试品溶液, 进样5 μL, 注入液质联用仪, 记录所得质谱MRM色谱图 (见图2)。

取阴性样品溶液, 进样5 μL, 注入液质联用仪, 记录所得质谱MRM色谱图 (见图3)。

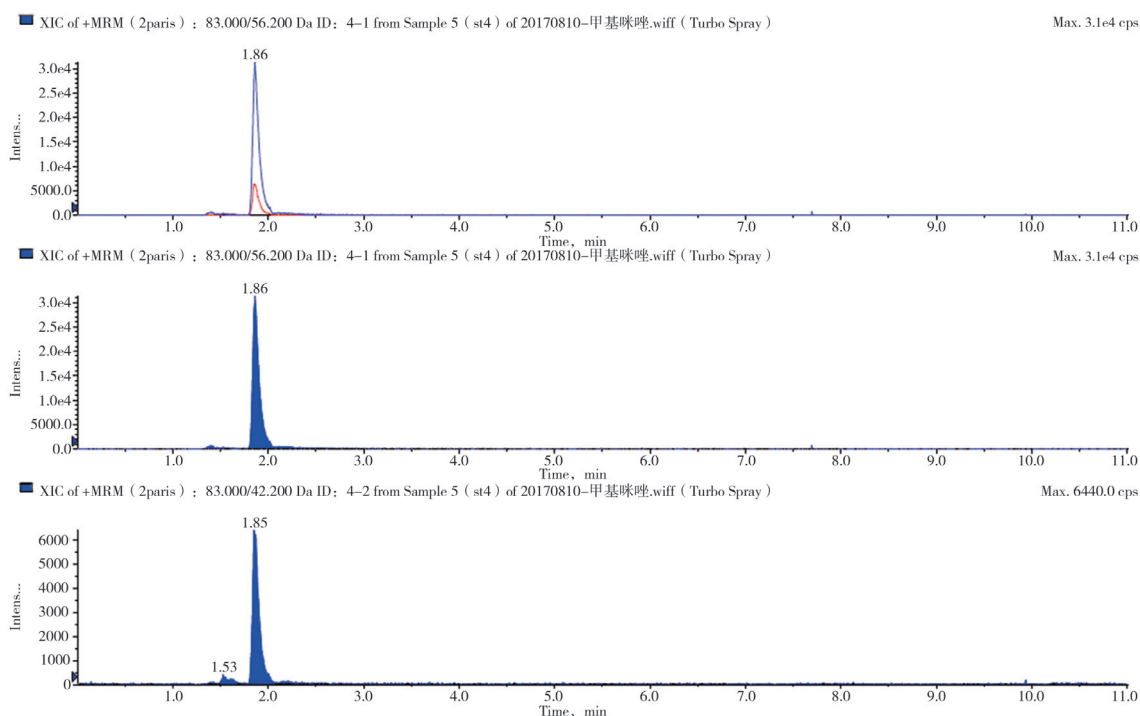


图1 对照品溶液 MRM 色谱图

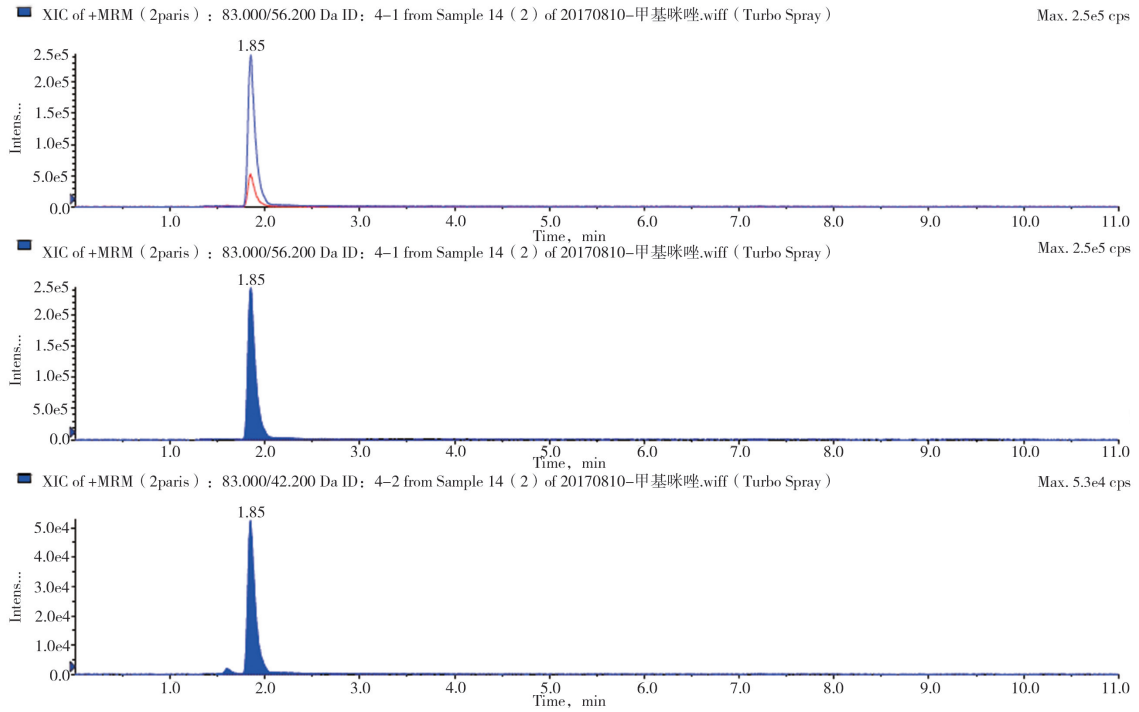


图 2 供试品溶液 MRM 色谱图

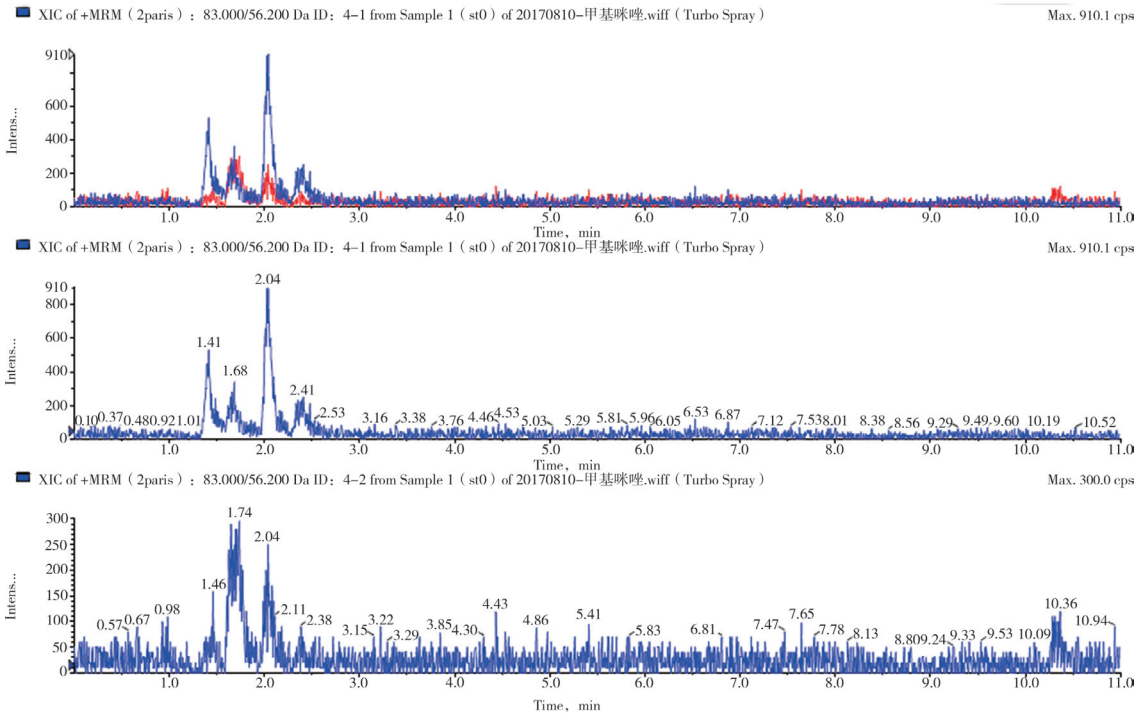


图 3 阴性样品溶液 MRM 色谱图

## 2.7 方法学研究

按照欧盟委员会指令96/23/EC对定性分析的要求,选取1个母离子及其2个子离子或2个母离子及其各1个子离子,并依据子离子相对丰度比即离子比(定性离子/定量离子)和化合物的保留时间来定性<sup>[15]</sup>。因此,本方法以 $m/z$  83.0为母离子,对母离子进行轰击以获得二次碎裂产生的子离子,选择丰度较高、干扰较小的离子对 $m/z$  83.0>56.2, 83.0>42.2作为定性离子对,选择离子丰度最高的离子对 $m/z$  83.0>56.2作为定量离子对。

### 2.7.1 线性关系考察

取4-甲基咪唑对照品储备液稀释成系列对照品溶液(浓度为10、25、50、100、200、400  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),进样测定。以浓度为横坐标,定量离子对的峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程:

$$Y=1531.7X+6115.7, r=0.9994$$

表明4-甲基咪唑在9.28~371.11  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

### 2.7.2 精密度试验

取对照品溶液连续进样6次,测定峰面积,结果4-甲基咪唑色谱峰峰面积RSD为0.6%,表明仪器精密度良好。

### 2.7.3 稳定性试验

取阳性供试品溶液一份,分别于0、2、4、8、12、24 h进样,测定峰面积,结果4-甲基咪唑色谱峰峰面积RSD为1.8%。表明供试品溶液中4-甲基咪唑在24 h内稳定。

### 2.7.4 重复性试验

取同一批号阳性检出(批号:160901)供试品,按“2.4”节供试品溶液制备方法平行制备6份供试品溶液,测定峰面积,结果4-甲基咪唑含量的RSD为1.2%。表明该方法重复性良好。

### 2.7.5 检测限和定量限

取4-甲基咪唑对照品溶液逐级稀释后进样测试,以信噪比3:1的溶液浓度来确定检测限(LOD)为26  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;以信噪比10:1的溶液浓度来确定定量限(LOQ)为87  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

### 2.7.6 回收率试验

精密称取已知含量(4-甲基咪唑含量为0.67  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )的供试品6份,每份约0.5 g,分别精密加入4-甲基咪唑对照品储备液(9.28  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

40  $\mu\text{L}$ ,依法测定,计算回收率,测得4-甲基咪唑的平均回收率为96.91%,RSD=1.0%,表明方法准确度良好。

### 2.7.7 样品测定

采用上述方法对本次所收集160批次的丁香饮片进行测定,结果发现31家企业生产的33批次样品检出4-甲基咪唑(含量在0.03~8.71  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),提示这些企业涉嫌非法添加焦糖色素,存在质量风险。在另外未检出4-甲基咪唑的127批次样品中随机选取15批次,对挑出来的杂质和去除杂质后的纯丁香分别进行检测,结果均未检出4-甲基咪唑,表明丁香及杂质本身不含4-甲基咪唑。另外,对上述检出4-甲基咪唑的33批次样品,再对其去除杂质后的纯丁香进行了测定,结果显示有9批次检出4-甲基咪唑,说明染色杂质中的焦糖色素会迁移到纯丁香中。

## 3 讨论

1) 丁香混入染色的非药用部位(花梗),即使净制后,采用本方法仍有可能检出4-甲基咪唑,表明此方法具有较强的灵敏度;另外,本方法采用纯水超声处理样品,提取方式简便快捷,所测结果重复性好,准确度高,适用于丁香杂质中4-甲基咪唑的定性确证及定量分析。

2) 4-甲基咪唑的化学结构中含有氨基,在ESI源电离下容易获得 $\text{H}^+$ ,形成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,故本试验选择ESI源正离子模式检测。另外,在ESI<sup>+</sup>模式下,往往会在流动相中加入可以提供 $\text{H}^+$ 的甲酸或乙酸等,以提高目标化合物的离子化效率,故本试验中水相为0.1%甲酸水溶液。由于4-甲基咪唑的极性大、分子量小,与固定相C18之间的相互作用力较差,故采用甲醇作为有机相,甲醇-0.1%甲酸水溶液(2:98)作为初始比例洗脱,以延长4-甲基咪唑的保留时间。

3) 药典标准中有丁香杂质控制项目,利用杂质检查虽然可以对丁香的质量进行一定控制,但是无法反映其是否存在染色、掺杂增重等违法情况,给消费者带来一定的潜在风险。通过液质联用方法对杂质中4-甲基咪唑进行测定,可以快速判定丁香是否被掺杂染色,也为国家市场监管提供技术支持,规范药材和饮片市场,以确保药材和饮片的安全性和有效性。

## 参考文献:

- [1] 中国药典:一部[S]. 2015: 4.
- [2] 肖培根. 新编中药志第二卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 6761.
- [3] 朱金段, 袁德俊, 林新颖. 丁香的药理研究现状及临床应用[J]. 药物研究, 2013, 21(1): 32-35.
- [4] 屠寒. 丁香药理作用研究进展[J]. 综述与专论, 2015, 10(5): 59-62.
- [5] 张珂, 李华, 陆启玉. 丁香的药理学特性及其在食品中的应用研究进展 [J]. 河南工业大学学报, 2015, 36(6): 125-129.
- [6] 屠寒, 江汉美, 卢金清, 等. 丁香药理作用研究进展 [J]. 香料香精化妆品, 2015, (5): 59-62.
- [7] 饶伟文, 蒋玲, 赵纯玉, 等. 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): 1742-1745.
- [8] 赵丽佳, 饶伟文, 吴萌. 染色红花中酸性橙II测定法的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1794-1796.
- [9] 苏晶, 程显隆, 鲁静, 等. 伪品血竭中染色剂苏丹红IV的检测[J]. 中国药事, 2008, 22(4): 318-320.
- [10] 王树清, 高崇, 朱石生, 等. 高色率焦糖色素的合成新工艺 [J]. 中国调味品, 2005, (3): 50-53.
- [11] Yuan J H, Burka L T. Toxicokinetics of 4-methylimidazole in the Male F344 Rat[J]. Xenobiotica, 1995, 25(8): 885-894.
- [12] Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, et al. Carcinogenicity of Radiofrequency Electromagnetic Fields [J]. The Lancet Oncology, 2011, 12(7): 624-626.
- [13] 张璐, 孔祥虹, 何强, 等. UPLC-MS-MS检测饮料中的4-甲基咪唑及其同分异构体2-甲基咪唑[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 244-248.
- [14] 林晓珊, 杭义萍, 吴惠勤, 等. 气相色谱-串联质谱技术在调味品有害物质分析中的应用研究[D]. 分析实验室, 2011, 30(11): 85-88.
- [15] European Communities. Commission Decision of 12 August 2002: Implementing Council Directive 96 /23 /EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results[J]. Off J Eur Comm, 2002, 45: L221 / 8-36.

(收稿日期 2018年7月13日 编辑 郑丽娥)