doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.19.014

高效液相色谱法同时测定丹参药材和饮片中苋菜红、胭脂红、金胺 O 含量*

张　华，朱泽兵，马英杰，阳文武△

（重庆市万州食品药品检验所·三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室，重庆　404000）

摘要：目的　建立同时测定丹参药材和饮片中苋菜红、胭脂红、金胺 O 含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为中谱红 RD - C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇 - 0.05 mol / L 乙酸铵溶液（梯度洗脱），流速为 1.0 mL / min，柱温为 35 ℃，检测波长为 512 nm（苋菜红和胭脂红）、432 nm（金胺 O），进样量为 10 μL。**结果**　苋菜红、胭脂红、金胺 O 质量浓度均在 1 ~ 50 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好（$r \geq 0.999\ 3$，$n = 5$）；检测限分别为 0.10，0.10，0.03 mg / kg，定量限分别为 0.33，0.33，0.10 mg / kg；精密度和稳定性试验的 *RSD* 均小于 2.0%；平均加样回收率分别为 95.93%，94.70%，96.33%，*RSD* 分别为 1.03%，1.21%，1.17%（$n = 6$）。2 批丹参药材中检出金胺 O，含量分别为 0.16 mg / kg 和 0.21 mg / kg；21 批丹参饮片中均未检出上述 3 种色素，或检出量低于定量限。**结论**　该方法操作简便、灵敏度好、准确度高，可用于丹参药材和饮片中苋菜红、胭脂红、金胺 O 的含量测定。

关键词：高效液相色谱法；丹参；苋菜红；胭脂红；金胺 O；含量测定

中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）19 - 0071 - 04**

Simultaneous Determination of Amaranth, Carmine and Auramine O in Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Its Pieces by HPLC

ZHANG Hua, ZHU Zebing, MA Yingjie, YANG Wenwu

(Wanzhou Institute for Food and Drug Control · Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing, China　404000)

Abstract: Objective　To establish a high - performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of amaranth, carmine and auramine O in Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and its pieces. **Methods**　The chromatographic column was Zhongpu Hong RD - C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - 0.05 mol / L ammonium acetate solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 512 nm (amaranth, carmine) and 432 nm (auramine O), and the injection volume was 10 μL. **Results**　The linear range of amaranth, carmine and auramine O was 1 - 50 μg / mL ($r \geq 0.999\ 3$, $n = 5$). The limits of detection (LOD) of amaranth, carmine and auramine O were 0.10, 0.10 and 0.03 mg / kg respectively, and the limits of quantification (LOQ) of the above three pigments were 0.33, 0.33 and 0.10 mg / kg respectively. The *RSD*s of precision and stability tests were lower than 2.0%. The average recoveries of amaranth, carmine and auramine O were 95.93%, 94.70% and 96.33% with *RSD*s of 1.03%, 1.21% and 1.17% ($n = 6$). Auramine O was detected in the two batches of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, with the contents of 0.16 mg / kg and 0.21 mg / kg respectively. Amaranth, carmine and auramine O were not detected in the 21 batches of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma Pieces, or the LOD of the above three pigments were lower than their LOQ. **Conclusion**　The method is simple, sensitive and accurate, which can be used for the determination of amaranth, carmine and auramine O in Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and its pieces.

Key words: HPLC; Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; amaranth; carmine; auramine O; content determination

丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎，具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦功效，主治冠状动脉粥样硬化性心脏病、心绞痛、心烦不眠、月经不调、经闭痛经等症[1]。丹参药用历史悠久，用途广泛，为大宗常用中药，还是国家卫生健康委员会公布的“保健食品”品种。药理实验证明，丹参水溶性成分具有抗氧化、抗菌和治疗心脑血管疾病的功效，故丹参为预防和治疗心脑血管疾病的常用药[2-7]。苋菜红、胭脂红、金胺 O 均为人工合成色素，其色系与丹参颜色相近，极易用于丹参药材与饮片的染色。但这 3 种色素服用过量会危害人体健康。含有苋菜红的物品长期食用有致癌性，尤其对婴幼儿伤害极大；胭脂红毒理学实验显示其具有一定致癌和致突变作用；金胺 O 对皮肤黏膜有轻度刺激作用，可引起结膜炎、皮炎和上呼吸道刺激

*基金项目：重庆市药品监督管理局 2019 年药品补充检验方法项目[〔2022〕- 199]。

第一作者：张华，男，大学本科，副主任药师，研究方向为药品与食品质量控制，（电话）023 - 58557655（电子信箱）408744302@qq.com。

△通信作者：阳文武，男，硕士研究生，副主任中药师，研究方向为药品、食品质量控制与药用植物栽培，（电话）023 - 58152381（电子信箱）oyww2008@163.com。

症状，长期过量食用，将对人体肾脏、肝脏造成损害甚至致癌[8]。近年来，中药材中擅自添加色素及饮片染色问题依然严重[9]。《2019年全国中药材及饮片质量分析报告》指出，丹参、五味子、朱砂等部分市售品种存在染色现象[10]。目前，检测中药材或饮片中非法染色的研究较多[11-13]，但尚未见同时检测丹参中苋菜红、胭脂红、金胺O 3种常见合成色素方法的报道。为了提高丹参的质量和保障临床安全用药，本研究中建立了同时检测丹参药材和饮片中苋菜红、胭脂红、金胺O含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪（日本岛津公司），配有二极管阵列（SPD）检测器；KH-2000DB型超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司，功率为800 W，频率为40 kHz）；SQP型分析天平（德国Sartorius公司，精度为0.000 1 g）；SCI-20-D型超纯水机（重庆科润水处理设备有限公司）。

1.2 试药

甲醇（色谱纯，北京迪马科技有限公司）；乙酸铵（优级纯，天津光复科技发展有限公司）；苋菜红标准溶液（批号为19001），胭脂红标准溶液（批号为19001），金胺O标准溶液（批号为19002），均购自中国计量科学研究院标准物质研究与管理中心，质量浓度均为1 000 μg/mL；丹参药材（编号为1-2），产自四川和河南，经重庆市万州食品药品检验所张德伟副主任中药师鉴定均为正品；丹参饮片（编号为3-23），样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：中谱红RD-C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）-0.05 mol/L乙酸铵溶液（B），梯度洗脱（洗脱程序见表2）；流速：1.0 mL/min；柱温：35 ℃；检测波长：512 nm（苋菜红和胭脂红），432 nm（金胺O）；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

分别精密量取标准溶液各适量，配制成质量浓度分别为1，5，10，20，50 μg/mL的系列混合标准溶液。取样品1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇20 mL，称定质量，超声提取（功率为250 W，频率为40 kHz）30 min，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得供试品溶液。取混合标准溶液和供试品溶液各适量，置同一容量瓶中，混匀，即得加标供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：取2.2项下混合标准溶液、加标供试品溶液和供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，结果目标化合物分离度良好。色谱图见图1。

线性关系考察：取2.2项下混合标准溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，以峰面积（Y）为纵坐标、待测成分的质量浓度（X，μg/mL）为横坐标进行线性回归。结果见表3，表明苋菜红、胭脂红、金胺O的质量浓度在1~50 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定：取样品1 g，精密称定，置20 mL容量瓶中，加入较低质量浓度的混合标准溶液，加甲醇溶解并定容，按2.1项下色谱条件进样测定，分别以信噪比为3∶1和10∶1时的质量浓度确定检测限和定量限。结果见表3。

精密度试验：取2.2项下混合标准溶液（质量浓度为10 μg/mL），按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，结果见表3，表明仪器精密度良好。

稳定性试验：精密吸取同一加标供试品溶液，分别于0，4，8，12，16，20，24 h时按2.1项下色谱条件进样测

表1 丹参饮片样品信息

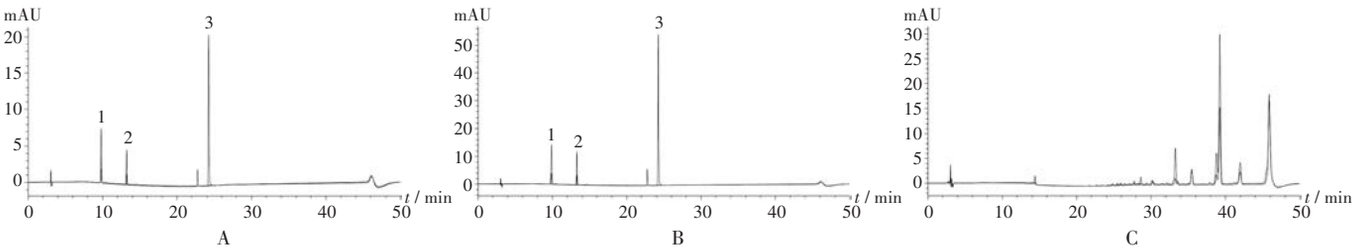
Tab. 1 Information of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma Pieces Samples

编号	生产厂家	批号
3	重庆万力药业有限公司	Y200401
4	四川滋宁中药饮片有限公司	20201001
5	重庆厚捷制药有限公司	Z21092402
6	重庆三峡云海药业股份有限公司	Y087210501
7	成都市祺隆中药饮片有限公司	210301
8	成都市祺隆中药饮片有限公司	200301-04
9	成都市祺隆中药饮片有限公司	191201-01
10	四川紫荆花药业有限公司	210601
11	湖南省弘华中药饮片有限公司	200801
12	云南白药集团中药资源有限公司	C20190402
13	四川弘升药业有限公司	190801
14	重庆天宝药业有限公司	200601
15	四川圣上大健康药业有限公司	200301
16	重庆金福道制药有限公司	200301
17	四川五芝中药饮片有限公司	200101
18	重庆康迪药业有限公司	190701
19	成都康美药业生产有限公司	191201331
20	太极集团四川绵阳制药有限公司	1905002
21	北京深港药业有限公司	2001006
22	上医正念堂（成都）医药科技有限公司	190601
23	安徽省泽华国药饮片有限公司	201001

表2 流动相梯度洗脱程序

Tab. 2 Program of gradient elution of mobile phase

时间（min）	流动相A（%）	流动相B（%）	时间（min）	流动相A（%）	流动相B（%）
0~12	10→45	90→55	20~40	70→80	30→20
12~20	45→70	55→30	40~46	80→10	20→90



1. 苋菜红 2. 胭脂红 3. 金胺O

A. 混合标准溶液 B. 加标供试品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Amaranth 2. Carmine 3. Auramine O

A. Mixed standard solution B. Test solution adding mixed standard solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

定，计算各化合物峰面积的*RSD*。结果见表3，表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

表3 方法学考察结果

Tab. 3 Results of the methodological investigation

化合物	回归方程	*r*	线性范围 (μg/mL)	检测限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)	*RSD*(%) 精密度试验	*RSD*(%) 稳定性试验
苋菜红	*Y*=9 013.2*X*+3 542.1	0.999 3	1~50	0.10	0.33	0.54	0.94
胭脂红	*Y*=17 674.6*X*+8 637.8	0.999 7	1~50	0.10	0.33	0.43	0.82
金胺O	*Y*=71 572.3*X*+21 156.4	1.000 0	1~50	0.03	0.10	0.31	1.01

加样回收试验：取样品6份，精密称定，分别精密加入适量混合标准溶液，依法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件分别进样测定，以加标前后所测定含量计算各色素的加样回收率。结果见表4，表明方法准确度良好。

2.4 样品检测

取丹参药材（编号为1－2）和饮片（编号为3－23），按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，结果仅编号为1和2的样品检出金胺O，含量分别为0.16 mg/kg和0.21 mg/kg，其余样品中均未检出或检出量低于定量限，未发现非法添加情况，但不排除存在其他安全隐患。

表4 加样回收试验结果（*n* = 6）

Tab. 4 Results of the recovery test (*n* = 6)

加入量(μg)	测得量(μg) 苋菜红	测得量(μg) 胭脂红	测得量(μg) 金胺O	回收率(%) 苋菜红	回收率(%) 胭脂红	回收率(%) 金胺O	$\bar{X}$(%) 苋菜红	$\bar{X}$(%) 胭脂红	$\bar{X}$(%) 金胺O	*RSD*(%) 苋菜红	*RSD*(%) 胭脂红	*RSD*(%) 金胺O
200.0	190.75	188.98	191.19	95.38	94.49	95.60						
200.0	190.34	187.22	190.88	95.17	93.61	95.44						
200.0	193.54	191.49	195.66	96.77	95.74	97.83	95.93	94.70	96.33	1.03	1.21	1.17
200.0	194.21	189.41	194.46	97.10	94.70	97.23						
200.0	192.98	192.57	190.08	96.49	96.28	95.04						
200.0	189.31	186.76	193.67	94.66	93.38	96.84						

3 讨论

3.1 色谱条件考察

通过单因素试验对色谱柱（中谱红RD－C_{18}柱、Diamonsil C_{18}柱、Sepax C_{18}柱和Inertsustain C_{18}柱），柱温（25，30，35 ℃），进样量（10，15，20 μL），流速（0.8，1.0，1.2 mL/min）及流动相系统（甲醇－0.05 mol/L乙酸铵溶液、乙腈－0.05 mol/L乙酸铵溶液、甲醇－0.025 mol/L磷酸二氢钾溶液和甲醇－水溶液）进行了考察。结果发现，当选择2.1项下色谱条件时各成分分离度良好，色谱峰峰形呈正态分布。同时，采用SPD检测器对各标准溶液于190～800 nm波长范围内扫描发现，苋菜红和胭脂红于512 nm波长附近有最大吸收；金胺O于432 nm波长附近有最大吸收，而于512 nm波长处吸收较弱。为保证各待测成分均能得到较好响应，且减少干扰峰，最终确定2.1项下色谱条件。

3.2 样品前处理优化

本研究中对不同提取溶剂（水、30%甲醇溶液、70%甲醇溶液、甲醇），浸泡时间（0，30，40，60 min），提取方法（超声提取和加热回流提取），超声提取时间（20，30，40 min）进行了考察，最终确定以甲醇超声处理30 min为样品提取条件。

3.3 方法评价

本方法操作简便快捷、适用范围广、专属性强、重复性好，可用于丹参药材和饮片中3种合成色素非法染色的快速筛查，有助于更好地控制丹参的质量，保障其临床安全用药。

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：