

# 黄柏违规使用金胺 O 染色剂的定性测定

## LCMSMS-511

**摘要：**本文采用岛津 LC-20ADXR 高效液相色谱系统、LCMS-8040 高效液相色谱串联质谱系统，建立了黄柏中金胺 O 的定性方法。妇科止带片、绿袍散经 70% 乙醇提取，Shim-pack GIST C18 色谱柱分离，PDA 检测，未检出金胺 O；绿袍散、妇科止带片加标样品在 RT=16.2 min 和 23.4 min 检出色谱峰（435 nm），经与金胺 O 光谱图比较，初步识别为金胺 O。采用 LCMS-8040 对目标峰进行分析，SCAN+ 触发产物离子模式扫描，目标峰与金胺 O 针素一级、二级质谱图相似度极高，推测目标峰为金胺 O。本文建立了基于液相色谱、UV 光谱以及串联质谱的绿袍散、妇科止带片中染色黄柏的的鉴别方法，该方法选择性强，灵敏度高，有效保障了临床用药安全。

**关键词：**LC-20ADXR LCMS-8040 黄柏 金胺 O 妇科止带片 绿袍散

金胺 O，也称碱性嫩黄 O，是一种合成染色剂，主要用于蚕丝、棉、腈纶、羊毛等的染色。金胺 O 曾发现被用于劣质黄柏、蒲黄、延胡索等中药材、中药饮片的非法染色。金胺 O 对人体具有一定毒性作用，被列为非食用物质，在中药材、中药饮片和中成药中均不得检出。

国家药监局此前发布了《绿袍散中金胺 O 检查项补充检验方法 (BJY 201922)》、《妇科止带片中金胺 O 检查项补充检验方法 (BJY 201902)》等多项公告，

对涉及黄柏药材的中成药，规定了金胺 O 染色剂的定性测定方法。采用液相色谱法，以保留时间、PDA 光谱图信息对金胺 O 进行定性识别。

本文参考以上两项补充检验方法，基于液相色谱 - 二极管阵列检测器 - 三重四极杆质谱，建立了妇科止带片、绿袍散违规使用染色黄柏的定性测定方法。该方法综合考虑色谱分离、UV 光谱以及质谱定性要素，选择性强，灵敏度高，供相关行业参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8040 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用系统，配备 PDA 检测器。具体配置如下

输液泵 :LC-20ADXR×2

系统控制器 :CBM-20A

自动进样器 :SIL-20AC

三重四极杆质谱仪 :LCMS-8040

柱温箱 :CTO-20AC

色谱工作站 :LabSolutions Ver. 5.98

在线脱气机 :DGU-20A<sub>5R</sub>

二极管阵列检测器 :SPD-M20A

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱（250 mm× 4.6 mm I.D.，5 μm）岛津（上海）实验器材有限公司，P/N 227-30017-08

流动相：A-0.02mol/L 乙酸铵水溶液；B- 甲醇

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL

波长：435 nm

洗脱方式绿袍散：梯度洗脱，梯度见表 1，初始 10%；

妇科止带片片：等度洗脱，B 相浓度为 30%

分流比：柱后三通分流，约 30% 进质谱

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	20
20.00	Pumps	Pump B Conc.	70
22.00	Pumps	Pump B Conc.	10
30.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源参数

离子源: ESI<sup>+</sup>

加热模块温度: 400 °C

雾化气流速: 3.0 L/min

干燥气流速: 15.0 L/min

DL 温度: 250 °C

扫描模式: MS SCAN/ 触发产物离子扫描

MS 参数: 扫描范围 m/z100-350, 触发产物离子, 优选离子 m/z 268.2, CE=-25 V

1.3 对照品溶液配制

精密称取金胺 O 标准品 2.0 mg, 用 1.0 mL 乙醇溶解, 并稀释至 2 μg/mL 工作液, 待测。

1.4 供试品制备

取绿袍散内容物 1.0 g, 加甲醇 50 ml, 超声处理 20 分钟, 放冷, 滤过, 取续滤液, 即得;

取妇科止带片 (包衣片除去包衣) 适量, 研细, 取 2.5 g, 加入 70% 乙醇 10 ml, 密塞, 超声处理 30 分钟, 放冷, 滤过, 取续滤液, 即得。

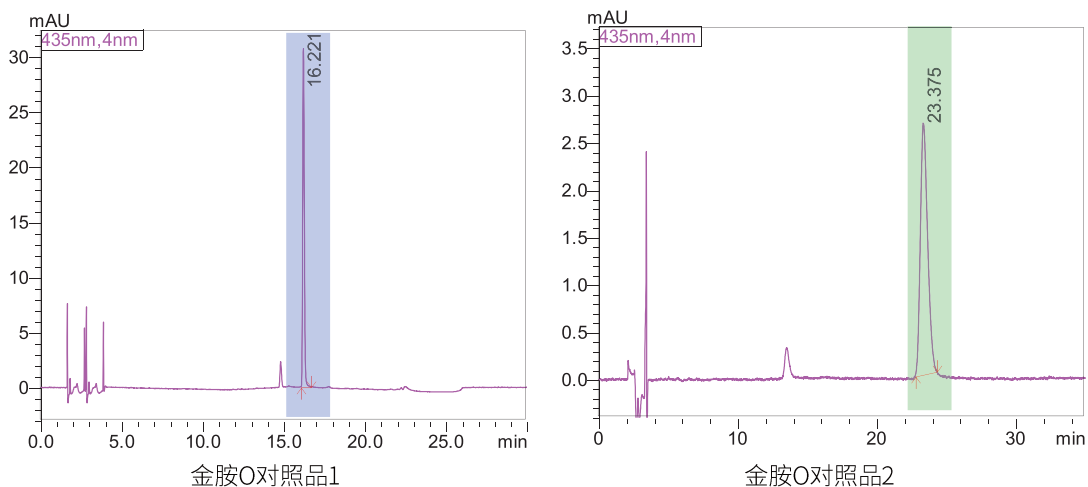
1.5 结果判断

供试品色谱中, 应不得出现与对照品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, 则采用二级管阵列检测器比较相应色谱峰的紫外 - 可见吸收光谱 (220 ~ 700 nm), 吸收光谱应不相同。必要时采用高效液相色谱 - 质谱联用方法确证。(源自《绿袍散中金胺 O 检查项补充检验方法 (BJY 201922)》, 国家药品监督管理局, 2019 年 11 月)。

■ 结果与讨论

2.1 色谱图

金胺 O 对照品分别按照梯度和等度条件分析, 金胺 O 保留时间分别为 RT=16.2 min 和 23.4 min, 理论塔板数 103893、8703, 均大于 2000, 系统适应性通过。对照品、供试品、供试品加标进行分析, 如下图 1, 供试品中未检出金胺 O, 而供试品加标样品可检出金胺 O, 初步判定绿袍散、妇科止带片中无金胺 O, 结果符合预期。



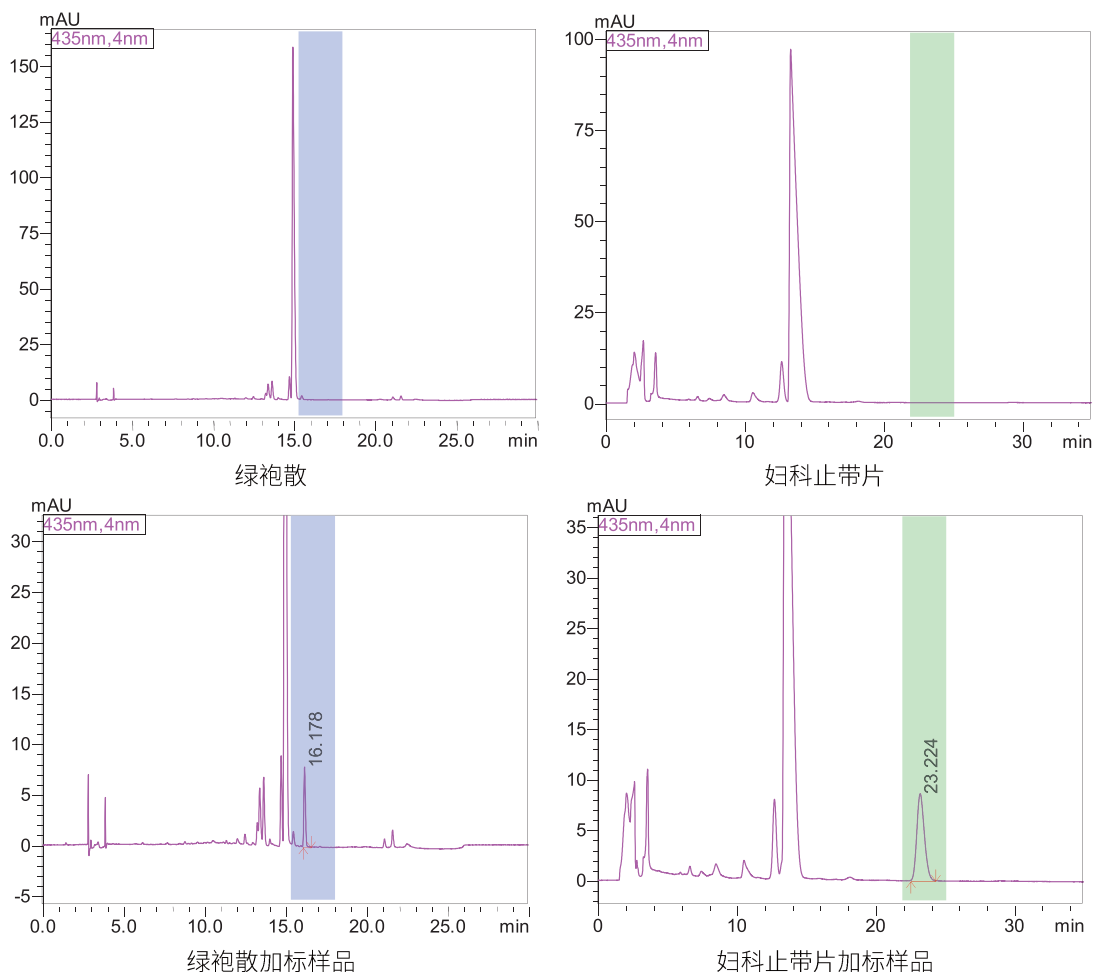


图 1 对照品、供试品、供试品加标色谱图

## 2.2 检出限及定量限

对浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$  的金胺 O 溶液进样分析，由信噪比计算其检出限及定量限 (LOD,  $S/N=3$ ; LOQ,  $S/N=10$ )，结果如表 1 所示。

表 1 金胺 O 针素的检出限和定量限

名称	基质	检出限 ( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/mL}$ )
金胺 O	绿袍散	0.007	0.024
金胺 O	妇科止带片	0.059	0.20

## 2.3 光谱图相似度判别

供试品加标样品中金胺 O 与对照品的保留时间一致，保留时间  $RSD < 2\%$ 。对照品、供试品加标样品对应色谱峰的光谱图见图 2，其光谱相似度为分别为 97.3%、98.3% (图 3)，光谱相似度高，推测为金胺 O。

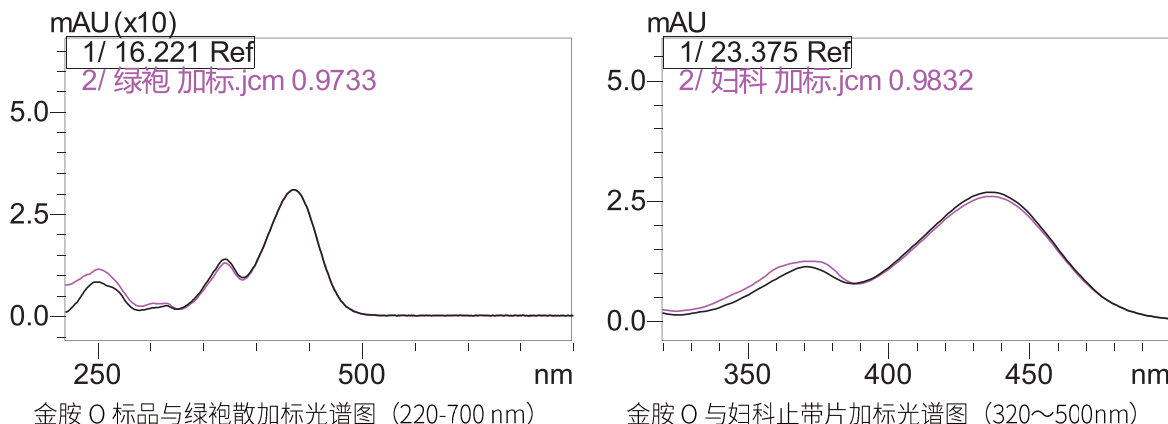


图 2 供试品、供试品加标样品光谱图

ID#	显示	对象	对象参数	比例	缩放倍率	$\lambda_{max}$	$\lambda_{min}$	相似度	Ch#
1	<input checked="" type="checkbox"/>	时间	16.22097	正常化	1.00	436/202/371/250/315	194/388/325/290/220	Ref	1
2	<input checked="" type="checkbox"/>	光谱	绿袍 加标.jcm	正常化	3.91	436/203/371/252/314	193/388/222/291/327	0.9733	

ID#	显示	对象	对象参数	比例	缩放倍率	$\lambda_{max}$	$\lambda_{min}$	相似度	Ch#
1	<input checked="" type="checkbox"/>	时间	23.37477	设置	1.00	437/204/371/250	193/387/220/292/326	Ref	1
2	<input checked="" type="checkbox"/>	光谱	妇科 加标.jcm	设置	0.30	436/204/372/250	195/389/221/288/325	0.9832	

图 3 光谱相似度对比结果

#### 2.4 液相色谱质谱联用方法确证结果

为了进一步进行定性确认，使用 LCMS-8040 对加标样品中目标色谱峰进行分析。在使用液质联用分析时，需进行柱后分流进样，以保证质谱的离子化效率。对照品中金胺 O 质谱图如下图 4，观测到正离子模式  $[M+H]^+$  峰， $m/z$  268.20，对前体离子进行碰撞，碰撞能  $CE=25$  V，二级质谱图登录 MSn 库。绿袍散加标样品在  $RT=16.19$  min 色谱峰检出色谱峰，一级质谱图基峰为  $m/z$  268.20，二级质谱图进行谱库检索，与金胺 O 相似度 100 分（满分 100），主要碎片离子  $m/z$  252.00、 $m/z$  147.15、 $m/z$  122.10、 $m/z$  107.20 均与金胺 O 碎片离子一致，如图 5 所示；妇科止带片加标，二级质谱图匹配得分 99 分。以上结果表明，三重四极杆质谱用于金胺 O 定性选择性强，重现性好。

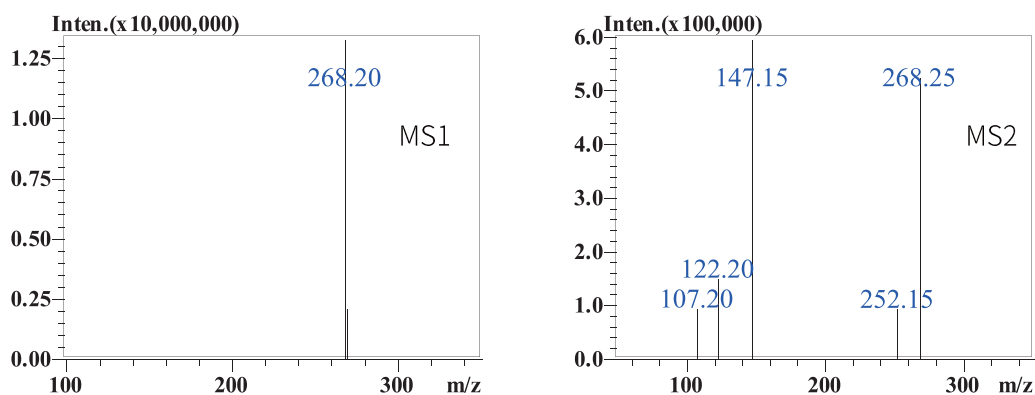


图 4 对照品中金胺 O 一级质谱图 (MS1)、二级质谱图 (MS2)



图5 加标样品二级质谱图谱库检索结果

## ■ 结论

本文采用岛津 LC-PDA-MS/MS 高效液相色谱串联质谱系统，建立了含黄柏中药材中违规使用金胺 O 染色的定性确认方法。该方法基于色谱保留时间、UV 光谱以及一级、二级质谱图定性，选择性强，准确度高，供相关行业参考。

岛津应用云

