

# 基于 TDESI-MS/MS 法快速检测 “焦糖色”非法染色中药

李运<sup>1,2</sup>, 代伟<sup>3</sup>, 高鹏<sup>1,2</sup>, 邵长春<sup>1,2</sup>, 王月玲<sup>1,2</sup>, 张虹艳<sup>1,2</sup>, 赵磊<sup>4,5\*</sup>

(1. 兰州市食品药品检验检测研究院, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃省种植中药材外源性污染物监测工程研究中心, 甘肃 兰州 730000;

3. 甘肃省妇幼保健院, 甘肃 兰州 730050; 4. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117;

5. 四平市食品药品检验所, 吉林 四平 136000)

[摘要] 目的: 采用热解吸电喷雾离子源质谱 (thermal desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry, TDESI-MS/MS) 技术, 建立中药中“焦糖色”非法染色的快速检测方法。方法: 采用 TDESI-MS/MS 技术, 以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇 (1:1, v/v) 为电喷雾溶液, 设定电喷雾溶液流速  $140 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 热脱附温度  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ , 正离子电喷雾离子化 (ESI<sup>+</sup>); 干燥气温度  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 干燥气流速  $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 雾化器压力 5psi; 毛细管电压 4 000 V。采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 以“焦糖色”生产中的副产物 4-甲基咪唑为检测指标。样品经水提取, 直接进样, 与对照品的响应进行比较分析, 确定是否存在“焦糖色”非法染色。结果: 分别对 19 批次市售丁香、6 批防风样品进行快速筛查, 发现 2 批次丁香样品中检出 4-甲基咪唑, 存在“焦糖色”非法染色。结论: 本方法操作简单、快速、灵敏, 可用于中药中“焦糖色”非法染色的筛查。

[关键词] 热解吸电喷雾离子源质谱技术; 中药; 焦糖色; 4-甲基咪唑

[中图分类号] R284.1 [文献标志码] B [文章编号] 2095-3593(2022)02-0131-05

## Rapid Detection of Chinese Herbal Medicine Dyed by Caramel Color Based on TDESI-MS/MS

LI Yun<sup>1,2</sup>, DAI Wei<sup>3</sup>, GAO Peng<sup>1,2</sup>, SHAO Chang-chun<sup>1,2</sup>, WANG Yue-ling<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Hong-yan<sup>1,2</sup>, ZHAO Lei<sup>4,5\*</sup>

(1. Lanzhou Institutes for Food and Drug Control, Gansu Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Engineering Research Center for Monitoring Exogenous Harmful Residues in Traditional Chinese Medicines, Gansu Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Maternity and Childcare Hospital, Gansu Lanzhou 730050, China;

4. Changchun University of traditional Chinese Medicine School of Medicine, Jilin Changchun 130117, China;

5. Siping Institute for Food and Drug Control, Jilin Siping 136000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a fast detecting method for caramel color illegally added into traditional Chinese medicinal materials by thermal desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry (TDESI-MS/MS). **Methods:** The analysis was performed on TDESI-MS/MS, which was used to electrospray solution with 0.1% formic acid aqueous solution-methanol (1:1, v/v). The electrospray solution flow rate of  $140 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ , and the thermal desorption temperature was  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ . ESI<sup>+</sup>, set the dry gas temperature of  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  and the flow rate of dry gas was  $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ . The atomizer pressure of 5psi and the capillary voltage of 4 000 V. The detection was carried out by TDESI-MS/MS in the multiple-reaction monitoring (MRM) mode, it was used 4- methylimidazole as the detection index which was a by-product in caramel color production. The samples were extracted by water, directly injected. The judgement of whether dye was added or not was made by compared with the response of the standard substance. **Results:** To rapid screening of 19 batches of Caryophylli Flos and 6 batches of Saposhnikoviae Radix samples on the market, 4-methylimidazole was discovered in 2 batches of Caryophylli Flos samples, and illegal caramel staining was identified. **Conclusion:** This method was simple, rapid and sensitive, which could be used to screen for

[基金项目] 甘肃省药品科研项目(2020GSMPA034)

[作者简介] 李运,男,高级工程师,研究方向:中药质量控制研究。E-mail:lyun04@163.com

\*[通讯作者] 赵磊,男,副主任药师,研究方向:中药质量控制研究。E-mail:zhaolei0433@sina.com

illegal caramel staining in traditional Chinese medicine.

[Key Words] TDESI-MS/MS; Traditional Chinese medicine materials; Caramel color; 4-Methylimidazole

中药是我国传统医药学中重要的组成部分,为中华民族的防病治病、医疗保健做出了重要贡献。近年来,随着国家对中医药重视度的提高以及人们对中医药认可度的增加,中药材、中药饮片需求量逐年上升。然而,利用化工染料等色素对中药材、中药饮片进行染色增重、染色掺伪的现象屡见不鲜。2013年,在原国家食品药品监督管理总局召开的“两打两建”专项行动中,组织开展了中药饮片违法染色问题专项抽验,在抽取的397批样品中,检验证实涉及红花、延胡索、西红花的22批次样品存在染色问题。为有效控制中药非法染色,国家药品监督管理局陆续发布了涉及蒲黄、黄芩、红花、黄柏等药材的20余项补充检验方法,为净化市场发挥了重要作用。尚有新的染色问题和现象出现,如丁香<sup>[1]</sup>、防风等中药材、中药饮片中发现“焦糖色”染色问题。

本研究采用TDESI-MS/MS技术,建立了一种中药材及中药饮片中焦糖色非法染色的快速检测方法,以焦糖色生产中的副产物4-甲基咪唑(4-methylimidazole, 4-MEI)为检测指标,所建立的方法可在30s内对4-MEI进行高灵敏度的快速筛查,为有效遏制掺假、掺杂等行为,提高中药材及饮片的质量,保证人民群众用药安全,提供技术支撑。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

安捷伦 Ultivo 三重四极杆质谱仪,配备有热解析-电喷雾离子源(山东国投鸿基检测技术股份有限公司),金属取样探针(材质为镍铬合金,线径0.6 mm,环直径2 mm),梅特勒 MS105DU 电子天平,密理博 Milli-Q 超纯水系统。

### 1.2 试剂

对照品4-甲基咪唑(批号:190150-201501,纯度:98.7%)、丁香对照药材(121039-201906)、防风对照药材(120947-201810)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,甲酸、无水乙醇等均为分析纯。

实验用样品来源于中药材专业市场,共收集丁香样品19份,经兰州大学药学院杨永建教授鉴定为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thun. 的干燥花蕾。防风样品6份,经兰州大学药学院杨永建教授鉴定为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. 的干燥根。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品和供试品溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液制备** 4-甲基咪唑标准储备溶液( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ):精密称取10.13 mg 4-甲基咪唑,用甲醇溶解后定容至10 mL容量瓶中,置于 $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。4-甲基咪唑标准稀释溶液( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ):精密吸取100  $\mu\text{L}$  4-甲基咪唑标准储备溶液,用甲醇定容至100 mL容量瓶,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

**2.1.2 供试品溶液制备** 分别取粉碎成细粉的待测样品1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入水10.00 mL,密塞,超声(功率300 W,频率40 kHz)提取20 min,摇匀,离心,取上清液滤过,即得。

### 2.2 TD-ESI 离子源条件

采用金属探针取样方式,用移液器准确移取3  $\mu\text{L}$ 待测样品溶液加至金属采样针前端取样环处,然后将采样针垂直插入热脱附管内。在设定热解析温度下,对采样针表面的待测物进行解吸附,解吸后的气态待测物分子经载气收束并吹送至电喷雾区域。TD-ESI配有外置推拉式蠕动注射泵,推动泵内溶剂进入离子源,通过电喷雾促进待测物离子化,最终进入质谱仪进行检测分析<sup>[2]</sup>。

离子源条件:电喷雾溶液流速 $140 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ ,热脱附温度 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,电喷雾溶液为0.1%甲酸水溶液-甲醇(1:1, v/v)。

### 2.3 质谱条件

正离子电喷雾离子化( $\text{ESI}^+$ );干燥气温度: $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;干燥气流速: $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ;雾化器压力:5 psi;毛细管电压:4 000 V。MRM模式,4-甲基咪唑准分子离子  $m/z$  83.1;碎片离子分别为  $m/z$  56.2 (CE: 30eV),  $m/z$  42.1 (CE: 30eV);碎裂电压:30 eV。

### 2.4 实验条件优化

**2.4.1 热脱附温度** 取“2.1.1”项下对照品储备液,用甲醇稀释,配制成 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的4-MEI对照品溶液,精密移取3  $\mu\text{L}$ ,分别调节热脱附温度为 $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $270 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,各温度下分别连续进样3针。结果综合考虑不同热脱附温度下总离子流图及定性离子MRM响应峰形和峰面积的差异, $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时灵敏度相对较佳,故确定 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 为热脱附温度,见图1。

**2.4.2 电喷雾溶液流速** 电喷雾溶液的流速对于待测化合物的电离产生一定影响,取“2.4.1”项下

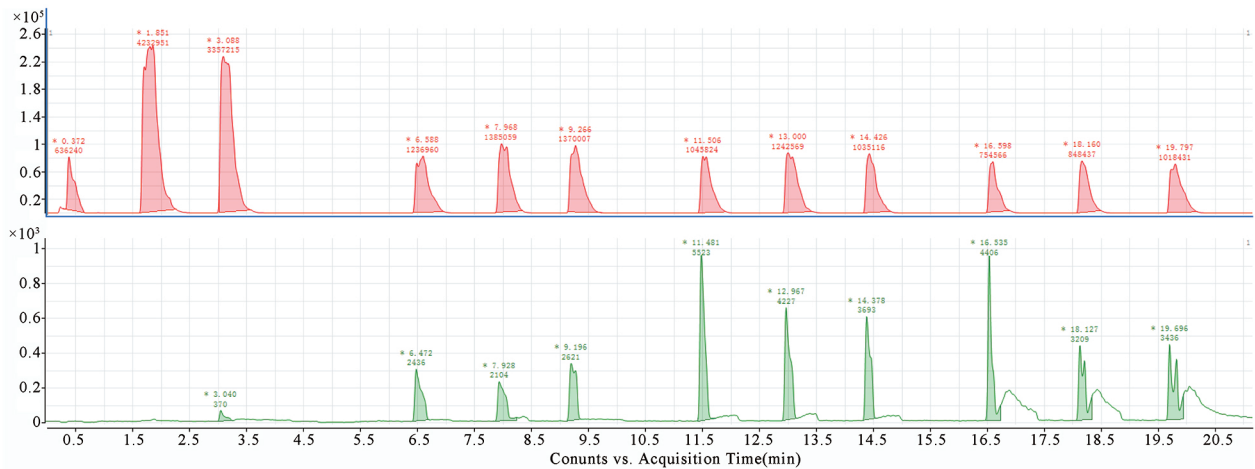


图1 不同热脱附温度对4-MEI响应值的影响

100 ng · mL<sup>-1</sup>的4-MEI对照品溶液,精密移取3 μL,分别调节电喷雾溶液速度为100、140、180、220 μL · h<sup>-1</sup>,各流速下分别连续进样3针。结果综合考虑不同电喷雾溶液流速下总离子流图及定

性离子MRM响应峰形和峰面积的大小,流速为140 μL · h<sup>-1</sup>时相对较佳,故确定140 μL · h<sup>-1</sup>为电喷雾溶液流速,如图2所示。

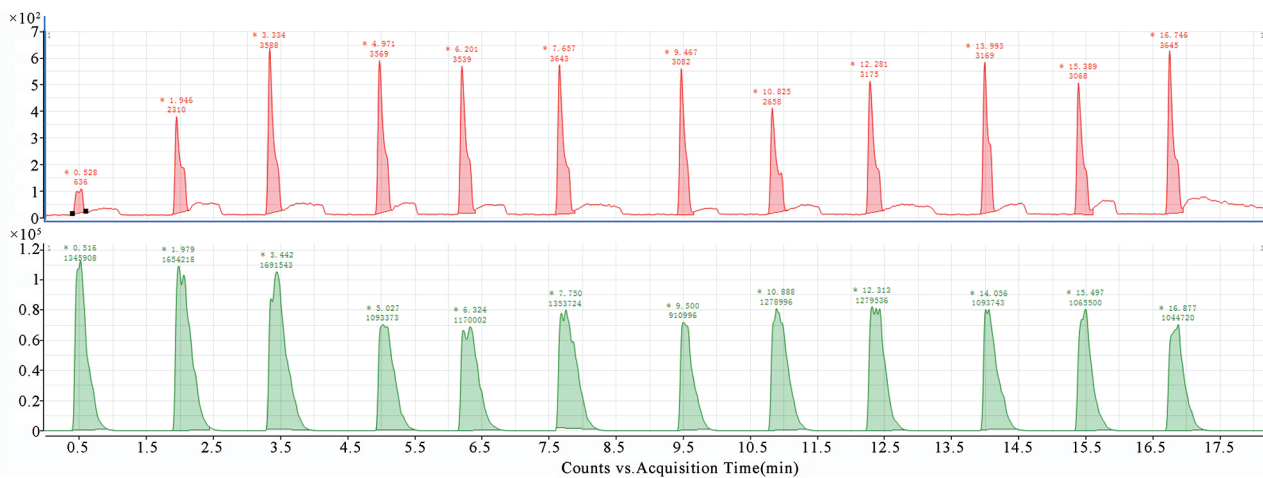


图2 不同电喷雾溶液流速对4-MEI响应值的影响

**2.4.3 电喷雾溶液组成** 分别对比水-甲醇(1:1, V/V)、0.1%甲酸水溶液-甲醇(1:1, V/V)、0.1%甲酸水溶液(含5 mmol · L<sup>-1</sup>乙酸铵)-甲醇(1:1, V/V) 3种电喷雾溶液对4-MEI检测效果的影响,发现0.1%甲酸水溶液-乙腈(1:1, V/V)作为电喷雾溶液时,4-MEI响应强度最高,峰形最佳,故选择0.1%甲酸水溶液-乙腈(1:1, V/V)作为电喷雾溶液。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 基质干扰考察** 分别取丁香、防风对照药材适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,用探针取样,按“2.2”、“2.3”项下方法采集信号,将已采样的探针插入加热管中进行热解吸,进而通过离子源电离后进入质谱检测器,考察空白样品对检测

信号的干扰。结果提示空白样品中均未检出4-MEI信号,表明空白基质对检测不存在干扰,该方法专属性较强。

**2.5.2 检出限** 取“2.1”项下对照品储备液适量,进行逐级稀释,按“2.2”、“2.3”项下方法进行检测,以目标化合物 S/N = 3 时的浓度作为其检测限;4-MEI的检测限为:1.0 ng · mL<sup>-1</sup>。

**2.5.3 重复性** 精密称取同一“焦糖色”染色阳性药材样品6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别精密移取3 μL至采样环,在每个采样点连续进样3次,按“2.2”、“2.3”项下方法进行检测,4-MEI信号均可稳定显示,表明该方法重复性良好,见图3。

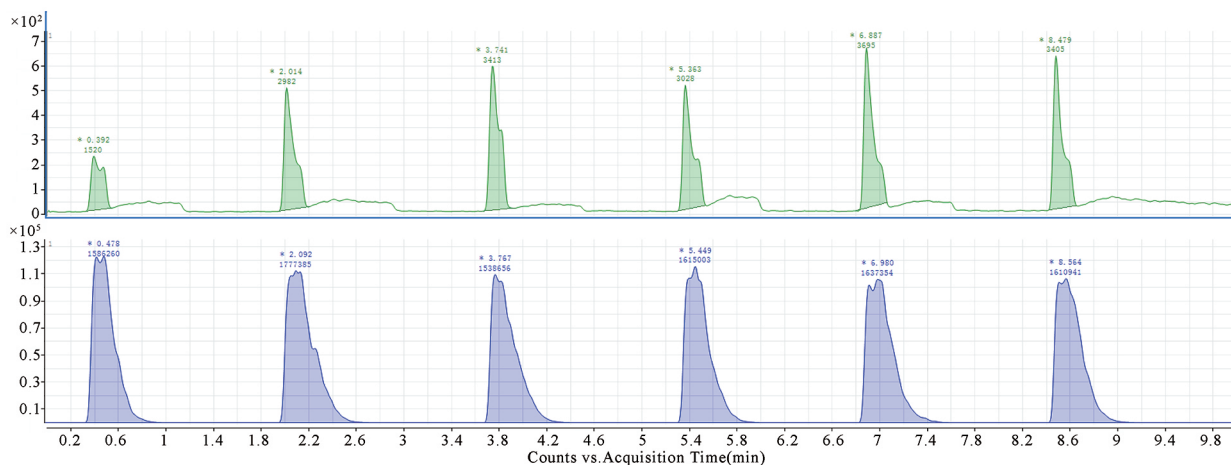


图3 重复性实验结果

**2.5.4 稳定性** 取上述重复性考察用同一供试品溶液,分别于室温下放置 0、4、8、12、24 h,按“2.2”、“2.3”项下方法,在每个采样点连续进样 3 次,按上述质谱条件进行质谱检测,4-MEI 信号均可稳定显示,表明该方法稳定性良好。

### 2.6 样品测定

分别对 19 批丁香和 6 批防风药材进行分析。将“2.1”项下方法制备供试品溶液经热解析电喷雾处理后进样检测,根据 MRM 结果,结合所监测离子对的特征以及离子丰度比与标准物质的离子丰度比的一致情况,发现有 2 批丁香样品中检出 4-MEI,提示该样品中存在“焦糖色”染色。将阳性样品参照《中国药典》焦糖项下检查项 4-甲基咪唑方法检测<sup>[3]</sup>,检出 4-MEI,结果一致。

## 3 讨论

“焦糖色”是我国允许在食品及药用辅料中使用的着色剂,依据焦糖生产中所用催化剂的不同可分为普通焦糖、苛性亚硫酸盐法焦糖、氨法焦糖、亚硫酸铵法焦糖<sup>[4,5]</sup>。其生产中,受加热的影响,还原糖、氨基酸或蛋白质发生美拉德反应和焦糖化反应等系列化学反应,除产生“焦糖色”外,尚可产生小分子杂环类化合物,如 4-甲基咪唑等<sup>[6]</sup>。研究表明,4-MEI 为神经毒素,具有强烈的致惊厥作用,且有致癌风险<sup>[7]</sup>。作为药用辅料、食品添加剂使用,我国国家标准中规定吸光度为 0.10 时 4-MEI 的限量不得超过 0.02%<sup>[3,5]</sup>。欧盟食品安全委员会规定亚硫酸铵法生产的“焦糖色”素中 4-MEI 每日最大摄入量不超过 200 mg · (kg · d)<sup>-1</sup><sup>[6]</sup>。

目前,对于 4-MEI 的检测,主要集中于高效液相色谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱法<sup>[9]</sup>、高效液相色谱-串联质谱

法<sup>[6,10-12]</sup>和气相色谱-质谱联用法<sup>[13]</sup>等。上述方法多存在样品前处理较为复杂,操作繁琐,单个样品测试时间长,无法实现现场快速检测实时出具检测结果。TDESI-MS/MS 是一种相对较新的质谱技术,迄今只有有限的应用,主要用于有毒物质<sup>[14-16]</sup>、非法着色剂<sup>[17]</sup>、疾病相关生物标记物<sup>[18]</sup>等的快速筛查、识别等方面,具有一定的优势。

对“焦糖色”检出为阳性的丁香样品,进一步的研究发现,该样品中混有一定比例的花梗,非药用部位也超过标准规定。提示非药用部位超标的丁香样品,可能存在“焦糖色”非法染色的风险。本实验建立了一种基于热解析-电喷雾离子源质谱技术的中药材中“焦糖色”非法染色的快速筛查方法。以“焦糖色”生产过程中副产物 4-甲基咪唑为检测标志物,采用 MRM 模式进行检测,无需复杂的样品前处理,只需用金属采样探针采集待测物后直接上机,可对中药材中的 4-甲基咪唑进行准确的定性分析,整个检测过程实现了原位检测。该方法具有操作简单,快速,重复性好,准确度高,易于推广的优点,为中药材“焦糖色”染色的检测提供了有效的方法补充,为有效遏制掺假、掺杂等行为,提高中药材及饮片的质量,保证人民群众用药安全提供技术支撑。

### 参考文献

- [1] 周志强,万林春,许妍,等.丁香掺杂染色问题及检测方法研究[J].中国药事,2018,32(10):1336-1341.
- [2] 张虹艳,石晓峰,邱国玉,等.热解吸-电喷雾离子源-三重四极杆质谱法快速筛查火锅底料和肉汤中非法添加罂粟壳[J].色谱,2022,38(7):861-867.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2020 年版(四部)[S].北京:科技医药出版社,2020:777-778.
- [4] 黄强,罗发兴,扶雄.焦糖色素及其研究进展[J].中国食品添加剂,

- 2004, 3: 43-46.
- [ 5 ] 食品安全国家标准 食品添加剂 焦糖色[S]. GB1886.64-2015
- [ 6 ] 翟纹静,金尉,徐振东. 焦糖色素中 4-甲基咪唑的液质联用检测方法的研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 141-144.
- [ 7 ] Baan R, Grosse Y, Lauby-Sesretan B, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields[J]. The Lancet Oncology, 2011, 12(7): 624-626.
- [ 8 ] Lee KG, Jang H, Shibamoto T. Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in caramel model systems: A role of sulphite[J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1165-1168.
- [ 9 ] 郭小莉,陈敏,胡锦荣,等. 气相色谱法测定酱油中的 4-甲基咪唑[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 125-127.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] 李建平,渠志华,王辰,等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定啤酒中 4-甲基咪唑的含量 [J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(5): 610-613.
- [ 12 ] Lojková L, Klejdus B, Moravcová J, et al. Supercritical fluid extraction (SFE) of 4(5)-methylimidazole (4-MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4)-tetrahydroxybutyl-imidazole (THI) from ground-coffee with high-performance liquid Chromatographic electrospray mass spectrometric quantification (HPLC/ESI-MS) [J]. Food Addit Contam, 2006, 23(10): 963-973.
- [ 13 ] Casal S, Fernandes JO, Oliveira MB, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric quantification of 4-(5-)-methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction [J]. J of Chromatography A, 2002, 976(1-2): 285-91.
- [ 14 ] Su H, Liu KT, Chen BH, et al. Rapid identification of herbal toxins using electrospray laser desorption ionization mass spectrometry for emergency care [J]. J of Food and Drug Analysis, 2019, 27: 415-427.
- [ 15 ] Lee CW, Su H, Lee RH, et al. Point-of-care identification of organophosphates in gastric juice by ambient mass spectrometry in emergency settings [J]. Clinica Chimica Acta, 2018, 485: 288-297.
- [ 16 ] Su H, Lin YP, Yang SC, et al. Rapid detection of non-volatile household pesticides in drained gastric juice by ambient mass spectrometry for emergency management [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1066: 69-78.
- [ 17 ] Chao YY, Chen YL, Chen WC, et al. Rapid detection of illegal colorants on traditional Chinese pastries through mass spectrometry with an interchangeable thermal desorption electrospray ionization source [J]. Food Chemistry, 2018, 252: 189-197.
- [ 18 ] Huang TL, Lo LH, Shiea J, et al. Rapid and simple analysis of disease-associated biomarkers of Taiwanese patients with schizophrenia using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry [J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 473: 75-81.

(收稿日期:2021-12-15)

· 警戒与通报 ·

## 欧盟审查特利加压素可能增加肝肾综合征患者呼吸障碍的风险

欧盟药品管理局(EMA)开始对含有特利加压素的药物进行审查。在部分欧盟国家这些药物被批准用于治疗晚期肝病患者的肾脏问题(肝肾综合征, HRS)、口腔和胃之间的静脉曲张出血(食道)、以及与外科手术相关的某种方式的出血。

出于对一项大型临床试验结果安全性的担忧,EMA 安全委员会(PRAC)开始了这项审查。该临床试验涉及的 HRS 患者肾功能迅速下降。结果表明,接受特利加压素治疗的患者在首次给药后 90 天内出现和死于呼吸障碍的发生率高于安慰剂组。呼吸障碍如呼吸衰竭(严重呼吸困难),是该药物的已知风险。然而在该研究中呼吸衰竭的发生率(10%)高于产品信息中报告的发生率,在该产品信息中呼吸衰竭被列为不常见(即影响接近 1% 的患者)。

出于这些担忧,丹麦药品管理局要求对特利加压素药物用于 HRS 治疗的安全性与获益进行审查。目前,这项审查不包括使用特利加压素治疗出血,因为没有涉及该用法的新安全性信息。虽然审查仍在进行中,特利加压素可以继续用于这些适应证以及 HRS 的治疗。

特利加压素是一种血管加压素类似物。特利加压素的主要作用是收缩内脏血管平滑肌,减少内脏血流量,从而减少门静脉血流、降低门静脉压。在 HRS 患者中,由于肝脏损伤,肝脏血压升高导致血管扩张,进而导致肾脏供血不足。特利加压素通过收缩供应腹部器官的血管,帮助恢复流向肾脏的血液,从而改善肾脏功能。