

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.08.016

海金沙中非法添加柠檬黄的快速鉴别研究

王康, 郭舟, 张勤[△], 陈建玲, 吴竞

(湖北省襄阳市公共检验检测中心, 湖北 襄阳 441004)

摘要:目的 建立快速鉴别海金沙中非法添加柠檬黄的方法。方法 采用水试法进行柠檬黄初筛;采用薄层色谱法对柠檬黄进行定性鉴别;采用高效液相色谱法进行验证试验,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 432 nm,柱温为 35℃,进样量为 10 μL。结果 药材样品 5、样品 6 溶液呈现与柠檬黄对照品溶液类似且显著的黄色;其薄层色谱图在与柠檬黄对照品色谱图相应位置上显相同的黄色斑点;与柠檬黄对照品的高效液相色谱图保留时间及相应紫外-可见吸收光谱图完全相同,阴性对照无干扰。结论 建立的水试法、薄层色谱法和高效液相色谱法,操作简单、快速、准确,适用于快速筛查海金沙中非法添加的柠檬黄,建议申报为海金沙中柠檬黄检查的补充检验方法。

关键词:海金沙;柠檬黄;非法添加;水试法;薄层色谱法;高效液相色谱法;快速鉴别

中图分类号:R932;R284.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)08-0055-03

Rapid Identification of Lemon Yellow Illegally Added in *Lygodii Spora*

WANG Kang, GUO Zhou, ZHANG Qin, CHEN Jianling, WU Jing

(Xiangyang Public Inspection and Testing Center, Xiangyang, Hubei, China 441004)

Abstract: Objective To establish a rapid method for the identification of lemon yellow illegally added in *Lygodii Spora*. **Methods** Aqueous solution test was used for lemon yellow preliminary screening. The thin-layer chromatography(TLC) was used for qualitative identification of lemon yellow, and high-performance liquid chromatography(HPLC) was used for the validation test, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L ammonium acetate solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 432 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The test solution of sample V and VI showed similar and significant yellow color to the control solution of lemon yellow, the TLC chromatograms showed the same yellow spots on the corresponding position of the reference solution of lemon yellow. The retention time of HPLC chromatograms and the corresponding spectrograms of the test solution of sample V and VI were the same as those of the reference solution of lemon yellow, and the negative control had no interference. **Conclusion** The established aqueous solution test, TLC method and HPLC method are simple, rapid and accurate, which are suitable for rapid screening of lemon yellow illegally added in *Lygodii Spora*. It is recommended to apply for the supplementary inspection method of lemon yellow in *Lygodii Spora*.

Key words: *Lygodii Spora*; lemon yellow; illegal addition; aqueous solution test; TLC; HPLC; rapid identification

海金沙为海金沙科植物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. 的干燥成熟孢子,有清利湿热、通淋止痛功效,主要用于热淋、膏淋、血淋、石淋、尿道涩痛等的治疗^[1]。海金沙由于药用部位的特殊性,采收难,产量低,市场需求较大,导致其价格不断上涨,由于利润的驱使和市场监管不到位等原因,市场上部分海金沙药材长期存在杂质过多、掺泥沙或其他物质增重等质量问题^[2-3]。近年来,全国中药材及饮片质量分析报告和湖北省药品质量公告中,不合格批次较多的中药材、饮片中屡屡出现海金沙,不合格项目主要为性状、显微鉴别和总灰分^[4-6]。2019年5月至2020年6月,湖北省襄阳市药品监督抽检过程中对部分海金沙药材样品进行薄层色谱鉴别时,发现其甲醇溶液呈显著黄色,疑似非法添加了水溶性色素柠檬黄。由于2015年版《中国药典(一部)》海金沙项

下无色素检查项,相关的补充检验方法也处于空白状态;同时,海金沙中非法添加柠檬黄色素也未见类似报道。本研究中采用水试法进行初筛、薄层色谱鉴别检查是否非法添加柠檬黄,并采用高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法进行验证。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪,包括SPD-M20A型二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);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);XS205型电子天平(精度为0.01 mg)、AL204型电子天平(精度为0.1 mg),均购自瑞士梅特勒-托利多公司;HU-6150B型超声波清洗器(天津恒高电气科技有限公司)。

第一作者:王康,女,大学本科,药师,研究方向为中药鉴定与中药检验,(电子信箱)253530468@qq.com。

[△]通信作者:张勤,女,大学本科,主任药师,研究方向为中药鉴定与中药检验,(电子信箱)710083016@qq.com。

1.2 试药

柠檬黄对照品(中国食品药品检定研究院,批号为510004-202003,含量为93.4%);硅胶G板(青岛海洋化工有限公司);海金沙药材9批(来源见表1);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

表1 海金沙药材来源

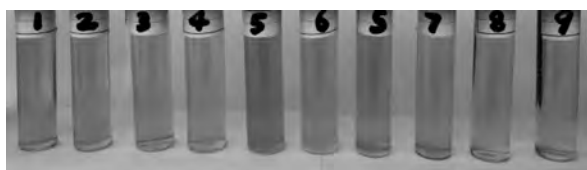
Tab.1 Source of *Lygodii Spora*

编号	批号	生产单位	供样单位
1	180101	安徽药知源中药饮片有限公司	襄阳康锦综合门诊部有限公司
2	160401	安徽孟氏中药饮片有限公司	襄阳市襄州区古驿镇中心卫生院
3	180401	亳州市圣海中药饮片有限公司	枣阳市太平镇中心卫生院
4	D7100301	黄冈金贵中药产业发展有限公司	襄阳市第五人民医院
5	191001	安徽药知源中药饮片有限公司	襄阳普爱大药房鱼梁洲店
6	150501	湖北神龙本草中药饮片有限公司	谷城县中医院
7	170801	湖北强康中药饮片有限公司	谷城县第二人民医院
8	810100	湖北辰美中药有限公司	国药控股襄阳有限公司
9	190428	亳州市永刚饮片厂有限公司	天济大药房连锁有限公司十六分店

2 方法与结果

2.1 水试法初筛

取药材样品1~9号各5g,分别置50mL烧杯中,加水40mL,搅拌5min,静置10min,滤过,取续滤液,得供试品溶液。另取柠檬黄对照品适量,同法制备对照品溶液。上述溶液各取20mL,置25mL纳氏比色管中,同置白色背景前,在自然光下平视观察,结果药材样品5、样品6供试品溶液呈现与对照品溶液类似且显著的黄色,初步判断可能非法添加了色素柠檬黄。详见图1。



1-9. 供试品溶液 S. 对照品溶液

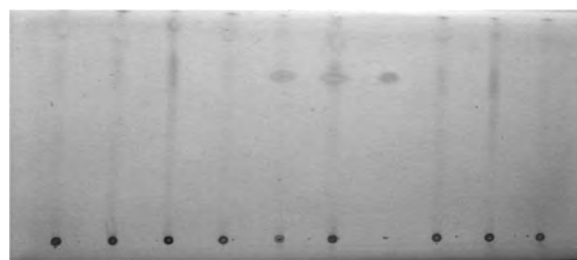
图1 水试法比色图

1-9. Test solution S. Reference solution

Fig.1 Colorimetric picture of aqueous solution test

2.2 薄层色谱法检查

取药材样品1~9号各5g,分别加70%乙醇40mL,超声(150W,40kHz,下同)处理20min,离心,取上清液,得供试品溶液。另取柠檬黄对照品适量,加70%乙醇,制成质量浓度为0.1mg/mL的对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502“薄层色谱法”试验,吸取各供试品溶液和对照品溶液各10μL,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,V/V/V/V/V)为展开剂,二次展开,取出,晾干,在可见光下检视。结果见图2。药材样品5、样品6供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同的黄色斑点,故判断药材中非法添加



1-9. 供试品溶液 S. 对照品溶液

图2 薄层色谱图

1-9. Test solution S. Reference solution

Fig.2 TLC chromatograms

了色素柠檬黄。

2.3 验证试验

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈(A)-0.05mol/L乙酸铵溶液(B),梯度洗脱(0~30min时5%A→45%A,30~40min时45%A→5%A,40~45min时5%A);流速:1.0mL/min;检测波长:432nm;柱温:35℃;进样量:10μL。

2.3.2 溶液制备

取柠檬黄对照品适量,加70%乙醇制成每1mL约含10μg的对照品溶液。取高度怀疑非法添加了柠檬黄的药材样品5、6各5g,分别加70%乙醇40mL,超声处理20min,离心,取上清液,得供试品溶液。取确定未添加柠檬黄的样品,同法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 测定法

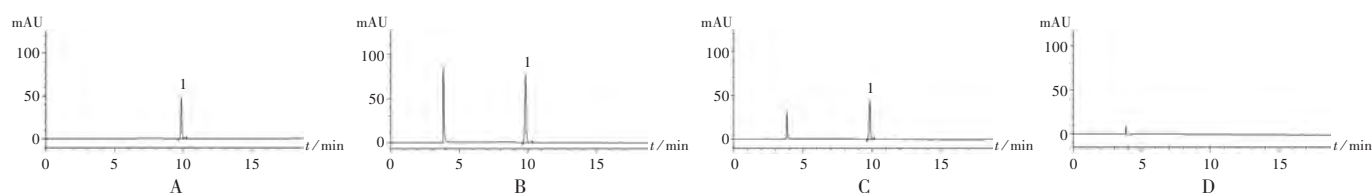
分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶液色谱中,应不得出现与对照品溶液色谱相同保留时间处的色谱峰;若出现,则采用紫外-可见分光光度法比较色谱峰在190~760nm波长范围内光谱的吸光度,吸光度应不相同。

2.3.4 结果判定

依法测定,结果见图3和图4。样品5、样品6供试品溶液色谱中,均与对照品溶液相应色谱保留时间完全相同,相应的光谱图也完全相同,而阴性对照品溶液则无相应色谱峰。结果确证样品5、样品6均添加了色素柠檬黄。

3 讨论

2018年8月,全国范围内开展中药饮片质量集中整治后,中药饮片的质量有很大改善,但仍存在极少部分中药材染色现象^[5-6]。文献报道发现有染色问题的中药品种涉及延胡索^[7]、蒲黄^[8-9]、黄连^[8,10]、西红花^[11]、红花^[12]、丹参^[13]、黄芩^[14]等,主要采用薄层色谱法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法对药材中的人工合成色素进行定性及定量检测^[15-16]。



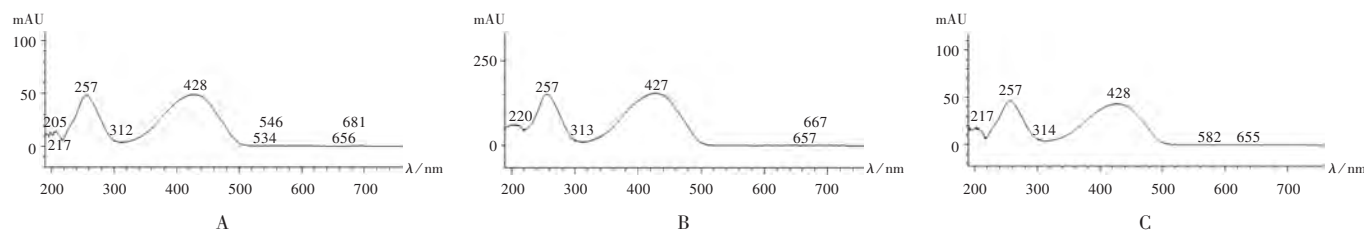
1. 柠檬黄
A. 对照品溶液 B. 药材样品 5 供试品溶液 C. 药材样品 6 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液

图 3 高效液相色谱图

1. lemon yellow

A. Reference solution B. Test solution of sample V C. Test solution of sample VI D. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms



A. 对照品溶液 B. 药材样品 5 供试品溶液 C. 药材样品 6 供试品溶液

图 4 紫外-可见吸收光谱图

A. Reference solution B. Test solution of sample V C. Test solution of sample VI

Fig. 4 UV-Vis absorption spectrograms

本研究中对海金沙采用水试法进行色素检查初筛,该经验鉴别法具有操作简单、快速、结果易判断的特点,对于判断海金沙是否非法添加水溶性色素柠檬黄有很好的参考价值,可在药品监督检验中更高效地发挥快速初筛作用。初筛阳性样品需通过薄层色谱法进行进一步检查,其操作简单,试验成本低,但同时检测多种色素时分离度较差,易出现假阳性干扰,且灵敏度较低,不能作为确证方法。高效液相色谱法可利用色谱峰的保留时间和紫外-可见吸收光谱图进行定性判断,具有专属性强、灵敏度高、分离度好的特点,可用于柠檬黄的定性确证和定量分析。

经国家药品监督管理局批准的补充检验方法是非法添加色素监督检验的重要依据,是中药材染色问题监管的重要科学手段。各级食品药品检验机构在最近 10 年的监督抽检中,通过应用经批准的补充检验方法,检出大批量的掺假染色中药材,有力打击了中药材非法添加的违法行为。鉴于海金沙尚无相关色素非法添加的检验方法,本研究中建立的海金沙中柠檬黄的快速检测方法,操作简单、快速、准确,可用于申报海金沙中柠檬黄检查的补充检验方法。

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: 中国医药科技出版社, 2015: 302-303.
- [2] 符江, 荆文光, 章军, 等. 中药中非法添加问题研究现状与分析[J]. 中草药, 2014, 45(3): 437-442.
- [3] 魏锋, 刘薇, 严华, 等. 我国中药材及饮片的质量情况及有关问题分析[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(4): 277-283.

- [4] 张萍, 李明华, 石岩, 等. 2017 年全国中药材及饮片质量概况[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4198-4202.
- [5] 吴颖, 季宝轶. 2018 年全国中药饮片抽检情况分析及其治理对策[J]. 江苏卫生事业管理, 2020, 31(4): 464-467.
- [6] 张萍, 李宁新, 李明华, 等. 2019 年全国中药材及饮片质量分析报告[J]. 中国现代中药, 2020, 22(5): 663-671.
- [7] 肖聪, 饶伟文, 钟名诚. 染色延胡索中金胺 O 的检测方法研究[J]. 中国药师, 2010, 13(9): 1235-1238.
- [8] 郑娟, 周耀华. HPLC-PDA 法检测蒲黄和黄连中十种非法添加色素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1078-1080.
- [9] 董媛, 林春燕, 张赞华, 等. 染色蒲黄中柠檬黄、酸性黄 36 检查方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 670-676.
- [10] 蒋玲, 彭飞燕, 饶伟文, 等. 染色黄连中金胺 O 的检测方法研究[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1344-1347.
- [11] 付凌燕, 闵春艳, 汪祺, 等. 市售西红花药材掺伪染色检测方法的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 74-77.
- [12] 刘艳, 张勤, 吕志刚, 等. 红花中非法添加色素的薄层色谱快速鉴别法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 95-98.
- [13] 于亚男, 胡立立, 安宇. 丹参中非法添加 9 种黄色合成色素薄层色谱鉴别[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(15): 15-17.
- [14] 莫连峰, 饶伟文, 赵纯玉. 高效液相色谱法测定染色黄芩中金胺的含量[J]. 中国药业, 2007, 16(15): 29-30.
- [15] 姜国萍, 孙萍, 朱日然. 染色中药添加色素的检测技术研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 694-696.
- [16] 耿昭, 苟琰, 周娟, 等. 中药材饮片及中成药中染色色素检测现状和通用检测方法的建立[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1418-1424.

(收稿日期: 2020-08-07)