**风湿定胶囊人工色素检查项的检验方法**

**【检查】柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝** 照高效液相色谱法(中国药典2020年版四部通则0512)试验。

**色谱条件与系统适应性试验** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以甲醇为流动相A，0.02mol/L乙酸铵溶液为流动相B，按下表进行梯度洗脱，检测波长为380nm，理论塔板数按日落黄峰计应不低于3000。

液相色谱梯度洗脱条件

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间（分钟） | 甲醇（%） | 0.02mol/L乙酸铵溶液（%） |
| 0～10 | 5→20 | 95→80 |
| 10～18 | 20→80 | 80→20 |
| 18～25 | 80 | 20 |

**对照品溶液的制备** 取柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝对照品适量，精密称定，加水制成每ml各含柠檬黄10μg，苋菜红25μg，胭脂红20μg，日落黄100μg，亮蓝50μg的混合对照品溶液，即得。

**供试品溶液的制备** 取本品内容物，研细，取约1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入提取液100ml，超声处理40分钟，6000rpm下离心5分钟，精密量取上清液50ml，于80℃水浴浓缩至约15ml，再加入3mL甲酸混匀，得待净化液。待净化液加在聚酰胺小柱（1000mg，容量为6ml，依次用甲醇、水、pH=6的水各5mL洗脱）上，依次用pH=4的水10mL，甲醇-甲酸（6:4）20mL，水10mL洗脱，弃去。用无水乙醇-氨水-水（7:2:1）溶液15mL洗脱，收集洗脱液，于80℃水浴蒸干，残渣用水定容至5mL，滤过，取续滤液，即得。

（上述所需溶液的配制：

柠檬酸溶液：称取20g柠檬酸，加水至100mL，溶解混匀。

pH=6的水：水加柠檬酸溶液调节至pH值到6。

pH=4的水：水加柠檬酸溶液调节至pH值到4。

提取液：取乙醇-乙腈（2:1）140ml，加水60ml，氨水2ml，混匀。）

**测定法** 分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各10μl，注入液相色谱仪，记录色谱图。

**结果判断** 供试品色谱中，应不得出现与柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝对照品溶液色谱峰保留时间相同的色谱峰。若出现保留时间相同的色谱峰，采用二极管阵列检测器比较相应色谱峰在190～800nm波长范围的紫外-可见吸收光谱，吸收光谱应不相同。

**备注：**必要时，可采用高效液相色谱-质谱联用方法验证。建议采用电喷雾正离子模式（ESI+）或负离子模式（ESI-）和甲醇-2mmol/L乙酸铵溶液流动相系统。