中图分类号：R927.2；R979.9　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)11－0078－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.11.016

高效液相色谱法同时测定保泰松片中4种色素含量*

孙　婷[1]，闫　凯[1]，赵　冬[1]，王　柳[1]，朱嘉亮[2△]

（1. 河北省药品医疗器械检验研究院，河北 石家庄　050200；　2. 中国食品药品检定研究院，北京　102629）

摘要：目的　建立同时测定保泰松片中4种人工合成色素胭脂红、柠檬黄、苋菜红、诱惑红铝色淀含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为Waters Symmetry Shield C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为甲醇－0.02 mol/L乙酸铵溶液(梯度洗脱)，流速为1.0 mL/min，检测波长为254 nm，柱温为35 ℃，进样量为10 μL。**结果**　胭脂红、柠檬黄、苋菜红、诱惑红铝色淀的质量浓度均在0.05～2.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geqslant 0.9996$，$n=7$)；检测限均为0.02 μg/mL，定量限均为0.05 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于1.5%；平均加样回收率分别为98.67%，97.96%，99.65%，99.72%，*RSD*分别为1.09%，2.32%，1.50%，2.14%($n=6$)。8批样品测得的色素成分均与标示色素成分一致，含量为3.77～40.56 mg/kg。**结论**　所建立的方法结果准确、专属性强、灵敏度高，可用于糖衣片剂中多种人工合成色素含量的同时测定。

关键词：高效液相色谱法；保泰松片；人工合成色素；含量测定

Simultaneous Determination of Four Pigments in Phenylbutazone Tablets by HPLC

SUN Ting[1], YAN Kai[1], ZHAO Dong[1], WANG Liu[1], ZHU Jialiang[2]

(1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang, Hebei, China　050200;　2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China　102629)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of four artificially synthetic pigments (carmine red, lemon yellow, amaranth red, and temptations red aluminum lake) in Phenylbutazone Tablets. **Methods**　The chromatographic column was Waters Symmetry Shield C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－0.02 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The linear range of carmine red, lemon yellow, amaranth red, and temptations red aluminum lake was 0.05－2.00 μg/mL ($r \geqslant 0.9996$, $n=7$). The limit of detection was 0.02 μg/mL, and the limit of quantification was 0.05 μg/mL. The *RSD*s of the precision, stability, and repeatability test results were all lower than 1.5%. The average recoveries of carmine red, lemon yellow, amaranth red, and temptations red aluminum lake were 98.67%, 97.96%, 99.65%, and 99.72%, with *RSD*s of 1.09%, 2.32%, 1.50%, and 2.14% ($n=6$), respectively. The pigment components detected in eight batches of samples were consistent with the labeled pigment components, with a content of 3.77－40.56 mg/kg. **Conclusion**　The established method has high accuracy, strong specificity, and high sensitivity, which can be used for the simultaneous determination of various artificially synthetic pigments in Phenylbutazone Tablets.

Key words: HPLC; Phenylbutazone Tablets; artificially synthetic pigments; content determination

食用色素分为天然色素和人工合成色素。天然色素主要来自动植物，提取成本较高[1]；人工合成色素因其价格低廉、颜色鲜艳且稳定性强，常被用作食品、保健食品和药品添加剂，但其多以苯、甲苯、萘等化工产品为原料，经磺化、硝化、偶氮化等反应合成[2]，进入人体后会随食物和药物被人体吸收，部分人工合成色素易诱发中毒、泄泻，甚至有致畸、致癌、致突变的风险。大部分具有一定毒性的人工合成色素已停用[3]，但有因违规使用或过量使用食用色素导致的食品安全问题陆续曝光[4]。如何严格控制食用色素的质量是提升其使用安全性的关键。目前检测色素的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法[5]、分光光度法[6]、电化学法[7]和液相色谱－串联质谱法[8－9]，基于Bismuthiol－Ⅰ的新型、快速和选择性的电化学传感器[10]、石墨/氮化碳/聚乳酸复合材料3D打印电极[11]、基于石墨烯修饰碳膜和植物合成的氧化钴纳米粒子的伏安传感器[12]等新技术也相继有报道。HPLC法因其分析速度快、分离效能高、灵敏度高、应用范围广，目前仍为食用色素的主要检测方法[13]。食用色素的人工合成色素在药品中主要用于片剂包衣和明胶空心胶囊。赵霞等[14]已采用HPLC法对明

*基金项目：河北省2021年度医学科学研究课题计划[20210108]。

第一作者：孙婷，女，硕士，正高级工程师，研究方向为药品检验、质量标准、仿制药一致性评价、生物样本检测，(电子信箱)122547652@qq.com。

△通信作者：朱嘉亮，女，硕士，副主任药师，研究方向为国家药品抽检及法规，(电子信箱)zhujl@nifdc.org.cn。

胶空心胶囊人工合成色素进行了测定。但目前对药品片剂包衣中人工合成色素的测定尚未见报道。保泰松片为糖衣片剂，不良反应发生率较高[15-17]，且其含量测定方法易受包衣颜色干扰[18-19]，其包衣添加色素分别为胭脂红、柠檬黄、苋菜红、诱惑红铝色淀。人工合成色素在食品中的使用量具有严格的卫生学标准限制[14]，但在药物制剂包衣中无相关要求。本研究中参考《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2024)[20]和2020年版《中国药典(四部)》附录9303 色素测定法指导原则[21]，采用聚酰胺吸附法对样品进行前处理，建立了同时测定保泰松片中人工合成色素含量的HPLC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Shimadzu公司)；XS105DU型电子天平(精度为0.01 mg)，XPR26/A型电子天平(精度为0.005 mg)，S220型酸度计(相对pH精度为±0.002)，均购自瑞士Mettler Toledo公司；HWS-24型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司，消耗功率为1 000 W，恒温波动温度为±0.5 ℃)；SHB-Ⅲ型真空泵(上海振捷实验设备有限公司，功率为180 W)；Milli-Q型超纯水制备系统(美国Millipore公司)。

1.2 试药

保泰松片样品(8批，编号为S1-S8，规格为每片0.1 g)信息见表1；柠檬黄对照品(批号为C17138000，含量为90.0%)，苋菜红对照品(批号为C17048000，含量为87.0%)，胭脂红对照品(批号为C10148500，含量为81.0%)，诱惑红铝色淀对照品(批号为C16284000，含量为70.0%)，均购自德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司；甲醇为色谱纯，柠檬酸、乙醇、氨水、乙酸、盐酸、聚酰胺均为分析纯，水为超纯水。

表1 保泰松片样品信息

Tab. 1 Information of Phenylbutazone Tablets samples

编号	生产企业	批号
S1	上海现代哈森(商丘)药业有限公司	16052621
S2	特一药业集团股份有限公司	20150903
S3	西南药业股份有限公司	160202
S4	常州康普药业有限公司	1606007
S5	甘肃兰药药业有限公司	20160803
S6	开封制药(集团)有限公司	15080201
S7	西安利君制药有限责任公司	1508434-3
S8	山西太原药业有限公司	160601

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters Symmetry Shield C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇(A)-0.02 mol/L乙酸铵溶液(B)，梯度洗脱(0~3 min时5%A→35%A，3~10 min时35%A→100%A，10~21 min时100%A→5%A)；流速：1.0 mL/min；检测波长：254 nm；柱温：35 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液：分别取柠檬黄、诱惑红铝色淀、苋菜红、胭脂红对照品各适量，精密称定，加水制成质量浓度分别为4.00 μg/mL的单一对照品溶液。取上述4种单一对照品各适量，精密称定，加水制成质量浓度为4.00 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液：取样品(编号S1-S8)10片，用纯化水50 mL分次将糖衣洗出溶解，作为样品溶液。取样品溶液(添加诱惑红铝色淀色素的样品需在样品溶液中加入1 mol/L盐酸溶液)，加柠檬酸调pH至6，加热至60 ℃，取1 g聚酰胺粉，加少许水调成粥状，倒入样品溶液中，搅拌片刻，以G3垂融漏斗抽滤，用60 ℃水(pH 4)洗涤3~5次，再用水洗至中性，用乙醇-氨水-水混合溶液解吸3~5次至色素完全解吸，收集解吸液，加乙酸中和，蒸发至近干，加水溶解并定容至5 mL，经0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

内芯供试品溶液：取去除色素包衣后的10片样品(编号为S1)内芯，研细，取粉末2 g，精密称定，置50 mL容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，即得。

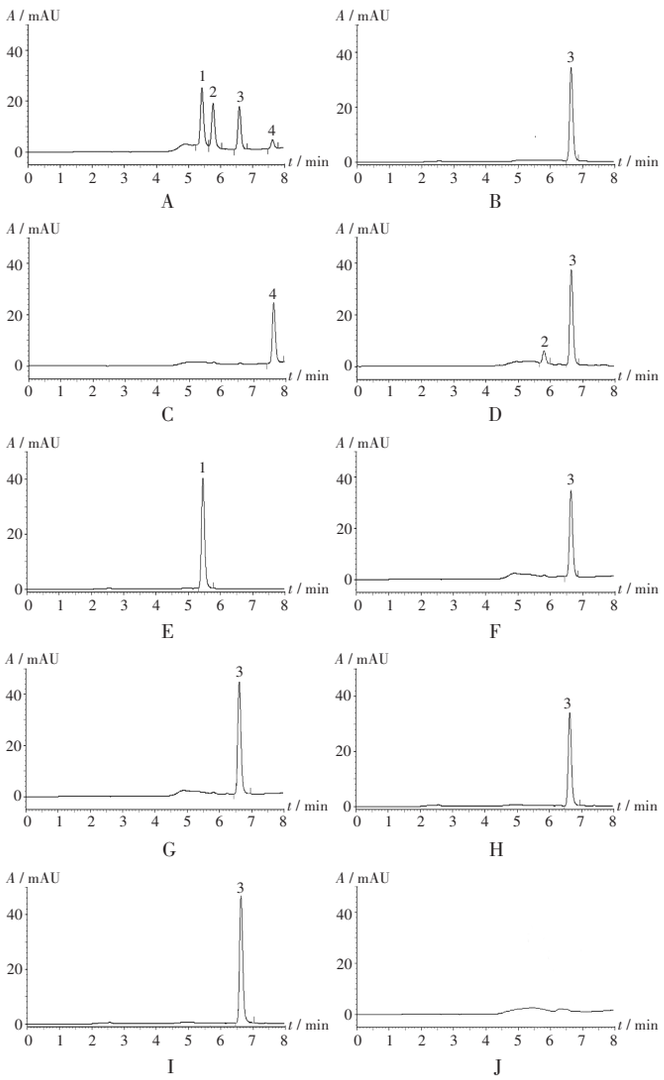
阴性对照品溶液：取纯化水50 mL，自“加柠檬酸调pH至6”起，按供试品溶液制备方法制备，即得。

2.3 方法学考察

专属性试验：分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定。结果混合对照品溶液色谱中，4种人工合成色素的分离度良好，且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察：精密量取2.2项下柠檬黄、诱惑红铝色淀、苋菜红、胭脂红混合对照品溶液适量，加水逐级稀释成质量浓度分别为0.05，0.10，0.30，0.50，1.00，1.50，2.00 μg/mL的系列线性关系考察溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，以质量浓度(X，μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归，得柠檬黄、诱惑红铝色淀、胭脂红、苋菜红回归方程分别为$Y_{柠}=29\,431.78\,X_{柠}-137.040\,7$($r=0.999\,8$，$n=7$)，$Y_{诱}=25\,628.94\,X_{诱}-130.935\,3$($r=0.999\,6$，$n=7$)，$Y_{胭}=23\,100.24\,X_{胭}-219.078\,3$($r=0.999\,7$，$n=7$)，$Y_{苋}=28\,996.13\,X_{苋}-60.955\,14$($r=0.999\,6$，$n=7$)。结果表明，4种人工合成色素的质量浓度均在0.05~2.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察：取2.2项下混合对照品溶液适量，加水逐级稀释成质量浓度分别为2.00，1.00，0.20，0.05 μg/mL的系列混合对照品溶液，按2.1项下



1. 柠檬黄 2. 苋菜红 3. 胭脂红 4. 诱惑红铝色淀
A. 混合对照品溶液 B - I. 供试品溶液(编号 S1 - S8)
J. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Lemon yellow 2. Amaranth red 3. Carmine red 4. Temptations red aluminum lake
A. Mixed reference solution B - I. Test solution (numbers S1 - S8)
J. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3和10时的质量浓度分别作为检测限和定量限。结果4种人工合成色素的检测限均为0.02 μg/mL,定量限均为0.05 μg/mL。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果混合对照品溶液中4种人工合成色素峰面积的RSD均小于0.53%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1 - S8)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于配制后0,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果4种人工合成色素峰面积的RSD均小于1.36%($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号为S1 - S8)适量,平行6份,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,记录峰面积,并计算含量。结果4种人工合成色素含量的RSD均小于1.00%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取2.2项下内芯供试品溶液适量,分别加入2.2项下混合对照品溶液,制成4种人工合成色素质量浓度约为0.40,0.50,0.60 μg/mL的供试品溶液,每个质量浓度平行2份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算各成分的加样回收率。结果见表2。

耐用性试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,分别考察不同流速(±0.1 mL/min)、不同柱温(±5 ℃)、不同型号色谱柱[Agilent Zorbax SB C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),Waters XBridge C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),Welch Xtimate C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm)]对测定结果的影响。结果显示,所有改变条件的混合对照品溶液中系统适用性均符合要求,表明方法的耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取8批样品(编号S1 - S8)各适量,分别按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,记录峰面积,按外标法计算样品含量。结果8批样品中均检出已标注人工合成色素。详见表3。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

加入量(μg/mL)				测得量(μg/mL)				回收率(%)				$\bar{X}$(%)				RSD(%)			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0.61	0.60	0.59	0.62	0.60	0.59	0.58	0.61	98.36	98.33	98.31	98.39								
0.61	0.60	0.59	0.62	0.59	0.60	0.58	0.62	96.72	100.00	98.31	100.00								
0.51	0.50	0.49	0.52	0.50	0.49	0.49	0.52	98.04	98.00	100.00	100.00								
0.51	0.50	0.49	0.52	0.52	0.51	0.48	0.53	101.96	102.00	97.96	101.92	97.96	99.72	98.67	99.65	2.32	2.14	1.09	1.50
0.41	0.40	0.39	0.42	0.40	0.39	0.38	0.42	97.56	97.50	97.44	100.00								
0.41	0.40	0.39	0.42	0.39	0.41	0.39	0.41	95.12	102.50	100.00	97.62								

注:A为柠檬黄,B为诱惑红铝色淀,C为胭脂红,D为苋菜红。

Note: A refers to lemon yellow, B refers to temptations red aluminum lake, C refers to carmine red, and D refers to amaranth red.

表 3 样品中 4 种人工合成色素含量测定结果（mg / kg，n = 2）

Tab. 3 Results of the content determination of four artificially synthetic pigments in samples (mg / kg, n = 2)

编号	标注色素	测得色素	测得含量	编号	标注色素	测得色素	测得含量
S1	胭脂红	胭脂红	34.18	S4	柠檬黄	柠檬黄	40.56
S2	诱惑红铝色淀	诱惑红铝色淀	21.42	S5	胭脂红	胭脂红	35.61
				S6	胭脂红	胭脂红	40.33
S3	苋菜红（食用级）	苋菜红（食用级）	3.77	S7	胭脂红	胭脂红	31.22
				S8	胭脂红	胭脂红	40.49
	胭脂红	胭脂红	36.02				

3 讨论

3.1 色谱条件选择

流动相曾考察乙腈 - 0.02 mol / L 乙酸铵溶液、甲醇 - 0.05 mol / L 乙酸铵溶液和甲醇 - 0.02 mol / L 乙酸铵溶液，结果 0.02 mol / L 乙酸铵溶液作为流动相时的基线较平稳，峰形及分离度均较好，故以此溶剂作为流动相。曾考察等度洗脱和梯度洗脱 2 种方式，结果梯度洗脱出峰时间较快，且分离度和理论板数符合要求，故选择梯度洗脱方式。采用二极管阵列检测器（DAD）于 250 ~ 400 nm 波长范围内对 4 种色素成分进行扫描，结果 4 种成分均于 254 nm 波长处响应较好，故选择 254 nm 作为检测波长。

3.2 是否存在添加色素与标示色素不符现象

8 批样品中，测得添加色素成分均与标示色素成分相符，不存在非法添加现象。其中有 6 批样品的添加色素为胭脂红，含量为 31.22 ~ 40.49 mg / kg，1 批样品的添加色素为诱惑红铝色淀，1 批样品的添加色素为柠檬黄，1 批样品添加了苋菜红（食用级）和胭脂红 2 种色素，也是唯一 1 批样品的添加色素中标注了级别，并使用了食用级色素。

3.3 是否存在添加色素的必要性

保泰松片常用于治疗强直性脊柱炎，经查询国家药品监督管理局网站，目前国内仍有 70 个批准文号，具有一定的市场占有量。其包衣中添加色素对现行质量标准中含量测定方法具有一定干扰，因其市场价格较低，部分企业仍采用传统包糖衣工艺，若包糖衣工艺的温度控制不稳定，糖衣表面会出现黑麻点等现象。查阅文献[22 - 24]，以上添加水溶性色素的热稳定差异较大，且胭脂红在人体摄入后会产生具有强烈致癌性的物质。由于添加色素对保泰松片未体现出明显优势，故保泰松片添加色素是否存在必要性值得进一步探讨。

3.4 包衣中添加色素限度的规范性

本研究中参考食品添加剂的使用标准和限度，拟订各种色素的含量范围为柠檬黄 0.04 ~ 0.50 g / kg，苋菜红 0.025 ~ 1.00 g / kg，胭脂红 0.01 ~ 0.50 g / kg，诱惑红铝色淀 0.019 ~ 0.10 g / kg。由表 3 可见，8 批样品中人工合成色素柠檬黄、胭脂红、苋菜红和诱惑红铝色淀的检出量为 3.77 ~ 40.56 mg / kg，差异约为 10 倍。人工合成色素具有一定毒性，如小鼠经口苋菜红的半数致死量为 10 g / kg，药品中人工合成色素限度无明确规定，企业对包衣添加色素级别的控制意识也较淡薄，药品中添加色素含量也较混乱，其具有潜在风险，使用缺乏规范性，生产时应科学、规范、合理使用人工合成色素。

3.5 方法评价

本研究中建立的方法结果准确、灵敏度较高，适用于糖衣片剂中多种人工合成色素含量的同时测定。

参考文献

[1] 李巧玲，田 晶. 食用合成色素的安全性评价及对策[J]. 食品工业，2017，38(11)：268 - 271.
[2] FENG JH, Cerniglia CE, CHEN HZ. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota[J]. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 2012, 4(2): 568 - 586.
[3] 朱海英. 食品安全法背景下食用合成色素的问题及对策研究[D]. 武汉：武汉工业学院，2012.
[4] 张明慧，周有祥，刘 姣，等. 食用色素标准物质的研究进展[J]. 中国食品添加剂，2023，34(11)：220 - 228.
[5] 郭晓雷，刘 涛，林兆盛，等. 高效液相色谱法测定市售茶叶中 8 种人工合成色素及风险分析[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(23)：8874 - 8879.
[6] WU H, GAO NN, ZHANG LZ, et al. Automated Magnetic Solid - Phase Extraction for Synthetic Food Colorant Determination[J]. Food Analytical Methods, 2015, 9(3): 614 - 623.
[7] DARABI R, SHABANI - NOOSHABADI M, KARIMI - MALEH H, et al. The potential of electrochemistry for one - pot and sensitive analysis of patent blue V, tartrazine, acid violet 7 and ponceau 4R in foodstuffs using IL / Cu - BTC MOF modified sensor[J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130811.
[8] 刘益锋，李 蓉，张朋杰，等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定焙烤食品中 9 种水溶性添加剂的研究[J]. 中国食品添加剂，2019，30(2)：137 - 141.
[9] 胡文彦，刘新梅，刘其南，等. 超声辅助提取 - 液相色谱 - 串联质谱法同时测定马卡龙中人工合成色素与天然色素[J]. 食品安全质量检测学报，2019，10(9)：2678 - 2683.
[10] CALAM TT. A new, fast and selective electrochemical sensor based on Bismuthiol - I for the voltammetric detection of tartrazine, a synthetic food dye, in soft drinks[J]. Microchemical Journal, 2024, 197: 109907.
[11] LUCAS V, LUANA M, SUELLEN FL, et al. 3D - printed electrodes using graphite / carbon nitride / polylactic acid composite material: A greener platform for detection of amaranth dye in food samples[J]. Food Chemistry, 2024, 442: 138497.
[12] BUHARINOVA MA, KHAMZINA EI, KOLOTYGINA VY, et al. A Voltammetric Sensor Based on Carbon Veil Modified with Graphene and Phytosynthesized Cobalt Oxide Nanoparticles for the Determination of Food Dyes Tartrazine (E102) and Allura Red(E129)[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2023,