高效液相色谱-二极管阵列法测定保健酒中的萘普生

郭杰标[1]，蓝献泉[2]，肖仔君[1]，刘旺培[2]，严晓明[2]，何颖娟[1]
（1.韶关学院英东食品科学与工程学院，广东韶关 512005）（2.韶关市食品药品检验所，广东韶关 512026）

摘要： 近期不断发现抗炎药物被违法添加到抗风湿保健酒中增加治疗效果，这种现象对消费者健康构成威胁。萘普生是常用非甾体抗炎药物，本研究建立保健食品中违禁添加萘普生的液相检测方法。通过酸性条件氯仿和碱性水溶液两步液-液萃取，从保健酒中提取和净化萘普生。使用 Kromasil 100-5C_{18}（250×4.6 mm E74572）色谱柱，以甲醇-0.01M 磷酸缓冲液（pH 3.0）（75/25，*V/V*）流动相，流速为 1.0 mL/min 进行分离；检测波长为 231 nm。通过比对色谱峰保留值和加标实验，结合二极管阵列扫描图谱对可疑样品定性，并根据外标法峰面积定量检测萘普生含量。检品和基质成分基本实现了基线分离，最低检测限为 0.5 μg/mL，工作曲线的线性范围: 5~80 μg/mL (R^2=0.9993)，RSD 为 1.87% (n=6)，加标回收率 83.3~92.6%。方法准确、可靠，适用于检测保健品中违法添加的萘普生。

关键词： 功能食品；萘普生；违法添加；液-液萃取；色谱检测
文章篇号： 1673-9078(2014)8-238-241

Determination of Naproxen in Health Liquor Using HPLC-PAD

GUO Jie-biao[1], LAN Xian-quan[2], XIAO ZI-jun[1], LIU Wang-pei[2], YAN Xiao-ming[2], HE Ying-juan[1]
(1.Shaoguan College, Ying-dong College of Food Science and Engineering, Shaoguan, 512005, China)
(2.Shaoguan Institute for Food and Drug Control; Shaoguan 512026, China)

Abstract: Recently, undeclared anti-inflammatory drug were frequently exposed being adulterated into antirheumatic health liquors to promote therapeutic effect. This phenomenon poses a serious threat to public health. Naproxen is a common nonsteroidal anti-inflammatory drug. The aim of this study is to develop a liquid chromatographic method coupled with photodiode array detector for identification of illegal adulterated naproxen in healthy food. Two-step liquid-liquid extractions were employed to purify naproxen from samples using chloroform in acidic condition following aqueous solution in alkaline condition, respectively. Chromatographic separation was achieved on a Kromasil 100-5C_{18} column (250×4.6 mm E74572) with the mobile phase of methanol-10mM phosphate buffer (pH 4.0) (75/25, *V/V*), at a flow rate of 1.0 mL/min. The eluant was detected at 231nm. Retention time combined with standard addition result and PAD-scanning graph were applied to verify naproxen. Quantitation of naproxen was attempted by external standard method. The results showed as follows: the limit of quantitation was 0.5 μg /mL, the linear range was 5~80 μg/mL (R^2= 0.9993), RSD was 1.87% (n=6) and the recovery of naproxen from health liquor was ranging from 83.3~92.6%. The method is suitable in determination of naproxen as adulterants in health liquor due to its accuracy and reliability.

Key words: healthy foods; naproxen; illegal adulterant; liquid-liquid extraction; chromatographic detection

风湿性疾病是以关节、肌肉、软组织、神经等疼痛为主要症状，病程多呈慢性和反复发作。我国有通过“食疗”调理慢性疾病的传统，针对风湿性疾病的天然功能食品（以保健酒为主）近年来广受市场青睐。非甾体抗炎药物治疗风湿性疾病起效迅速且价格低廉，近期不断发现有不法厂家在保健酒中违法添加这类药物，以增强疗效牟取不正当利益[1~2]。在不知情前提下服用含非甾体抗炎药物的违法保健食品后，患者可能产生恶心、头痛、肝功能损伤或过敏性皮疹等不良反应[3,4]，严重的甚至导致过敏性休克和急性肾功能衰竭[5~6]。萘普生作为常用的非甾体抗炎药物，曾经被发现违法添加在抗风湿保健酒中[7~8]，必须加强对这类违法现象的监督抽查。

目前，检测违法添加非甾体抗炎药物的主要方法是薄层层析（TLC）检测[3,4]、高效液相色谱(HPLC)检测[5,6]、液相-质谱联用(LC-MS)检测[7]。其中，TLC 检测灵敏度和可靠性不足，LC-MS 方法虽然结果可靠程度高，但设备投入大、运行费用高，需要受过专门训练的技术人员进行操作，难以大规模展开应用。而 HPLC 的检测结果在复杂的基质环境之下，存在着大量的干扰峰，会影响结果的判断。本研究采用酸性条

收稿日期：2014-03-08
基金项目：广东省自然科学基金项目（S2011040001362）；韶关市科技计划项目（2013CX/K97）
作者简介：郭杰标(1971-)，博士，讲师，研究方向：食品安全检测
通讯作者：肖仔君(1973-)，副教授，博士，研究方向：食品安全检测

件氯仿和碱性水溶液两步液-液萃取，从保健酒中提取萘普生并尽可能去除基质成分。同时通过流动相的优化，提高萘普生的色谱分离保留值和理论塔板数，使检品和剩余的基质成分完全实现基线分离。根据色谱峰保留时间比对和加标试验，结合二极管阵列扫描图谱对可疑阳性样品充分确证，用外标法峰面积定量，建立在保健食品中检测萘普生的可靠方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪为岛津 LC-20A 仪(包括自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器)；XS105 型电子分析天平购自德国 Mettler 公司。

萘普生对照品购自中国药品生物制品检定所；超纯水由 Millipore Q 超纯水器制备；乙腈、甲醇为色谱纯，30 批风湿保健酒购自当地市场。其余所用试剂均为国产分析纯。

1.2 标准溶液的配制[8]

精确称取经 105 ℃干燥恒重的萘普生对照品 25 mg，置 25 mL 容量瓶中，加甲醇适量使之溶解，然后用甲醇稀释至刻度摇匀，作为 1.0 mg/mL 标准储备液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-5C18(250×4.6 mm, E74572)，流动相为 0.01 M 磷酸缓冲液(pH 3.0)-甲醇(25:75)；流速为 1.0 mL/min；检测波长为 231 nm。柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。

1.4 样品预处理[9]

取 2.0 mL 待测保健酒，在氮吹仪 80 ℃水浴吹干。用 5.0 mL 蒸馏水复溶，用稀盐酸调节 pH 至 2.0，加 5.0 mL 氯仿萃取酸化萘普生，加入硫酸钠破乳后收集有机相，在氮吹仪 65 ℃水浴吹干。

用 5.0 mL 0.01 M 碳酸氢钠溶解沉淀物，离心除去沉淀。用稀盐酸调节 pH 至 2.0，重复 1.4.1 步骤；用 10.0 mL 流动相溶解沉淀物，0.22 μm 膜过滤，待检。

2 结果与讨论

2.1 检验波长的选择[10]

取浓度为 20.0 μg/mL 的萘普生标准溶液，上样检测。唯一色谱峰的保留时间是 5.918 min，用二极管阵列检测器在 200~360 nm 波长范围扫描。结果如图 1 所示，萘普生在 200 nm 处有吸收峰，在 231 nm 有尖锐的吸收峰，。保健酒基质含有大量糖苷类、多酚类化合物，在 250~280 nm 的吸收较强。选 231 nm 作为检测波长，既能保证检测灵敏度，又具备较好的抗干扰能力。

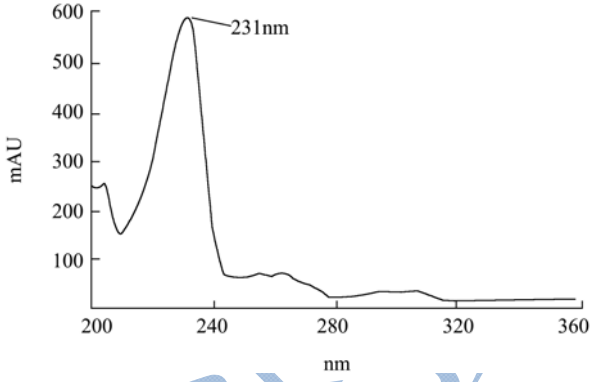


图 1 萘普生标准品色谱峰的二极管阵列扫描光谱图

Fig.1 PAD-scanning graph from peak of naproxen standard

2.2 流动相的选择

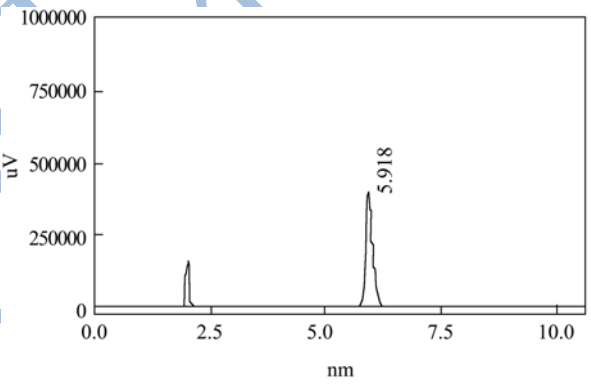


图 2 萘普生标准品溶液(20.0 μg/mL)色谱图

Fig.2 Chromatogram map of naproxen standard (20.0 μg/mL)

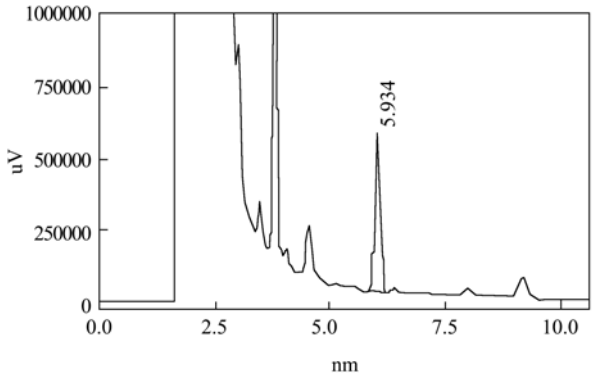


图 3 含萘普生的保健酒样品的色谱图

Fig.3 Chromatogram map of health liquor containing naproxen

在流动相中加入少量磷酸抑制萘普生的电离，减少检品极性，提高萘普生在反相柱中保留值和理论塔板数，同时减少了色谱峰的拖尾，使检品峰与干扰峰完全分离[12]。通过对流动相优化，组成为甲醇/0.01 mol/L 磷酸(pH 3.0) = 75/25 (*V*/*V*)的流动相。图 2 是使

用这种流动相检测20.0 μg/mL的萘普生标准溶液的色谱图，图3是含萘普生的保健酒样品的色谱图。萘普生的检测理论塔板数和分离度符合要求，检品和各种杂质的完全实现基线分离。

2.3 可疑样品确认

检测30批样品中有2批出现与萘普生标准品溶液主峰保留时间一致的色谱峰，初步认定这2批样品含有萘普生。参照鲁琳等[13]的方法，在阳性样品中添加萘普生，样品色谱图(以5#样品为例)如图4，结果样品检测峰与添加萘普生检测峰完全重叠，而且检品峰的峰高显著增加，由此证实检品与萘普生是同一物质。

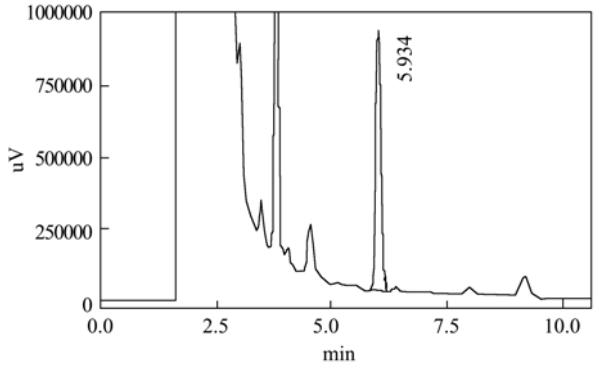


图4 含萘普生保健酒样品的加标色谱图

Fig.4 Chromatogram map of health liquor containing naproxen after adding standard

采用二极管阵列检测器对可疑检品进一步进行确证[12,13]。结果见图5(以5#样品为例)，阳性样品色谱峰的PAD扫描图谱，与萘普生完全的PAD扫描图谱完全一致（与图1比对），进一步证实检品色谱峰对应的物质是萘普生。

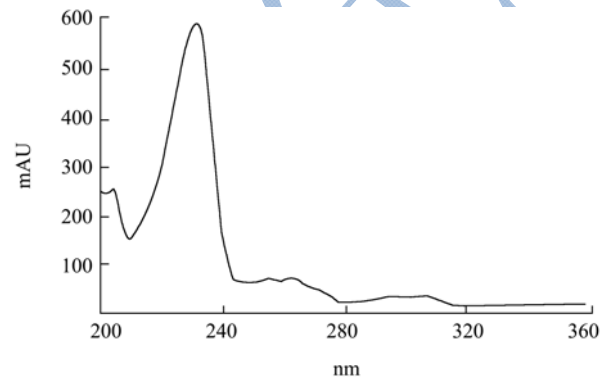


图5 可疑物质色谱峰二极管阵列扫描光谱图

Fig.5 PAD-scanning graph from peak of suspicious analyte

2.4 定量检测[13]

再分别取0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mL上述标准储备液于50 mL容量瓶中，用流动相稀释至刻度，使其成为浓度为5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μg/mL的标准溶液。各取10 μL进样检测，记录色谱图，测定峰面积。回归方程为：A=5832.225C+ 55.311 (R^2=0.9993)，表明萘普生在5.0~80 μg/mL浓度范围内定量线性关系良好。

依法检测样品溶液，将峰面积内插到标准曲线，计算出检品浓度乘以稀释倍数5，就是样品中的萘普生含量。

2.5 检测限测定[13]

取标准储备溶液稀释成适当浓度的溶液，依法检测，按3倍信号/噪音比计算，得到在此方法的实验条件下仪器检出限为0.5 μg/mL。保健酒中萘普生的添加量通常大于100 μg/mL，本方法的灵敏度足以满足检测要求。

2.6 稳定性试验

取浓度为20 μg/mL的标准品溶液室温放置0、2、4、8、12、24 h后依法测定，计算得RSD为1.36% (n=6)，表明液体样品在24 h内测定结果稳定。

2.7 精密度试验

取配制的样品溶液进样10 μg/mL依法检测，连续进样6次，测定峰面积，计算得RSD = 1.87% (n=6)。

2.8 回收率和精密度实验[13]

精密称取已测知含量的样品，分别置50 mL容量瓶中，各加入一定量的萘普生对照品标准储备溶液，其余步骤按1.4步骤进行预处理，并依法将处理好的每个样品连续分析6次，根据测定结果计算回收率。结果见表1。

表1 加标回收率及精密度实验结果

Table 1 Recoveries and precision accuracy of spiked samples

样品	本底值/(μg/mL)	加标值/(μg/mL)	检测值/(μg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
1	10.2	10.3	18.8	83.4	87.03	3.22
2	18.8	10.3	27.6	85.4		
3	27.4	10.3	36.8	91.3		
4	36.8	10.3	46.1	89.3		
5	46.1	10.3	54.8	84.5		
6	54.8	10.3	63.9	88.3		

2.9 样品检验结果

检验市售具有抗风湿作用的33种保健酒，检出含有萘普生的有1份 (含量为0.48mg/g)，阳性检出率为3.03%。与本课题组前期开发的免疫学方法[14]检测结

果相符。

3 结论

本研究根据相似相容原理，通过分别应用不同 pH 值得有机相和水相进行液-液萃取，在净化去除了大部分基质成分的同时，实现从保健品中充分抽提萘普生，样品检测色谱图的杂质峰已经很少，而加标回收率达到 83.3~92.6%。通过流动相的优化，提高萘普生色谱分离理论塔板数，实现检品和基质成分完全基线分离，并选取偏离基质吸收值的 231 nm 作为检测波长，降低基质成分的影响。根据色谱峰的保留时间比对和加标实验，结合二极管阵列检扫描图谱，实现对可疑样品进行充分确证。通过外标法定量, 最低检测限为 0.5 μg/mL，工作曲线的线性范围：5.0~80 μg/mL (R^2= 0.9993)，RSD 为 1.87% (n=6)。可见本方法灵敏、准确、可靠，适用于检测保健品中违法添加的萘普生。

参考文献

[1] 刘福艳,李军,谢元超,等.中成药中非法添加化学物质的现状与分析检测对策[J].中国药事,2008,22(12):1067-1069
LIU Fu-yan, LI Jun, XIE Yuan-chao, et al. Recent Advances and Analytic Technique on Determination of Chemical Drug Mixed Illegally in TCPM [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 22(12): 1067-1069

[2] 傅得兴, 封宇飞. 非甾体类抗炎药的安全性研究[J].中国全科医学,2008,11(2):136-139
FU De-xing, FENG Yu-fei. Research on Safety of nonsteroidal anti-inflammatory drug [J]. Chinese General Practice, 2008, 11(2): 136-139

[3] 王仕平,黄炳泉,刘卿,等.中成药中非法添加双氯芬酸钠与尼美舒利的快速检测[J].中国药品标准,2011,12(3):211-214
WANG Shi-ping, HUANG Bing-quan, LIU Qing, et al. Rapid Detection of Diclofenac Sodium and Nimesulide illegally mixed into Traditional Chinese medicine [J]. Drug Standards of China, 2011, 12(3): 211-214.

[4] 邓树勇,马启龙,丁燕,等.TLC 法快速筛选抗风湿类中成药中的化学药品[J].药物分析杂志,2009,29(10):1719-1721
DENG Shu-yong, MA Qi-long, DING Yan, et al. Rapid screening of TLC antirheumatic traditional Chinese medicines of add chemicals[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(10): 1719-1721

[5] 李存金,郭飞宇.HPLC 检测抗风湿类中成药中非法添加非甾体类化学物质[J].中成药,2010,32(12):2191-2194
LI Cun-jin, GUO Fei-yu. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in antirheumatic chinese traditional tatent medicines using HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2010, 32(12): 2191-2194

[6] 宁素云,郭兴杰,张虹,等.HPLC 法同时检测清热解毒类中成药中非法添加的 9 种化学药品[J].中国药事, 2009, 23(9): 907-910
NING Su-yun, GUO Xing-jie, ZHANG Hong, et al. Detection of 9 Illegal Components in Traditional Chinese Medicine for detoxification by HPLC [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2009, 23(9): 907-910

[7] 赵凤菊,来国防,孙刚,等.UPLC/MS/MS 法检测抗风湿类制剂中添加醋酸泼尼松、醋酸地塞米松、双氯芬酸钠和布洛芬[J].药物分析杂志,2010,30(6):1035-1037
ZHAO Feng-ju, LAI Guo-fang, SUN Gang, et al. Determination of prednisone acetate, dexamethasone acetate, diclofenac sodium and ibuprofen mixed in antirheumatic traditional Chinese medicine by UPLC/MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(6): 1035-1037

[8] Gowik P, Julicher B, Uhlig S. Multi-residue Method for Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Plasma Using High Performance Liquid Chromatography Photo Diodearray Detection: Method Description and Comprehensive in House Validation [J]. JChromatogr B, 1998, 716: 221-232

[9] Ashok K S, Ahmed N A, Tawfiq A A, et al. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 852 (2): 403-408

[10] Koichi S, Lee W L, Toyohide T, et al. Direct determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by column-switching LC-MS [J]. Journal of Separation Science, 2006, 29(18): 2725-2732

[11] Haque A, Stewart J T. Direct injection HPLC analysis of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on restricted access media columns [J]. Biomedical chromatography, 2004, 13: 51-56

[12] 王金生.HPLC- PDA 法检验保健食品中的盐酸西布曲明[J].中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 462, 507.
WANG Jin-sheng. Determination of sibutramine hydrochloride in health food by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(3): 462, 507

[13] 鲁琳,高燕红,李少霞,等.高效液相色谱-二极管阵列检测法测定保健食品中枸橼酸西地那非的研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(9):1052-1054
LU Lin, GAO Yan-hong, LI Shao-xia, et al. Determination of sildenafil citrate in health food by HPLC-PDA [J]. Chinese

Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(9): 1052-1054

[14] 郭杰标,肖仔君,郝卿辰,等.保健酒中萘普生免疫学检测方法的建立[J].现代食品科技,2013,29(7):1691-1695 GUO Jie-biao, XIAO Zi-jun, HAO Qing-chen, et al. Development of an immunoassay for detection of naproxen in health liquor [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1691-1695

现代食品科技