

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 100-5C₁₈ (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

文章编号: 1673-9078(2014)8-238-241

Determination of Naproxen in Health Liquor Using HPLC-PAD

GUO Jie-biao¹, LAN Xian-quan², XIAO Zi-jun¹, LIU Wang-pei², YAN Xiao-ming², HE Ying-juan¹

(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 100-5C₁₈ 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

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

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

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 °C 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 °C,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 °C 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 °C 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。

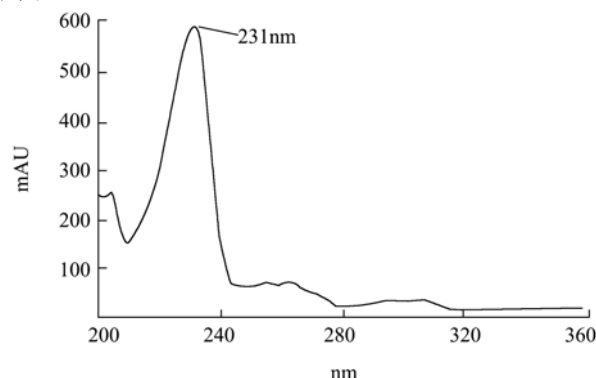


图1 萘普生标准品色谱峰的二极管阵列扫描光谱图

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

2.2 流动相的选择

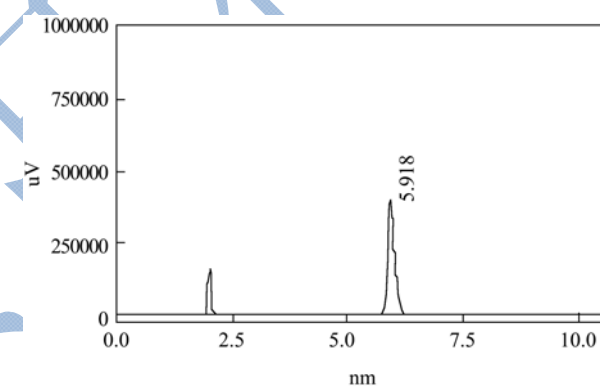


图2 萘普生标准品溶液(20.0 μg/mL)色谱图

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

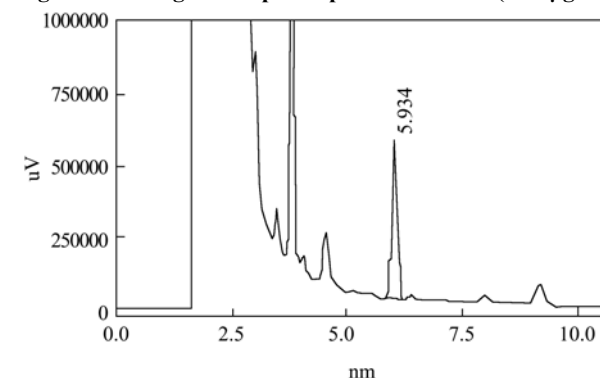


图3 含萘普生的保健酒样品的色谱图

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。

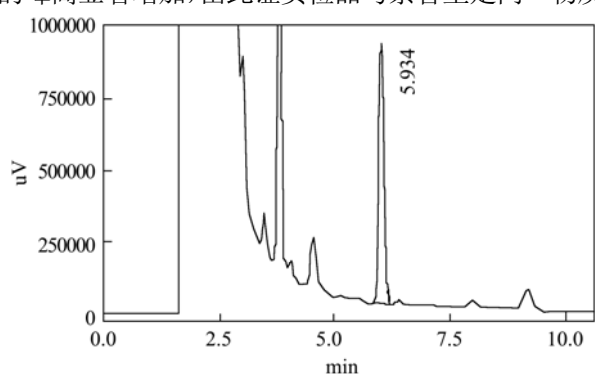


图 4 含萘普生保健酒样品的加标色谱图

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。

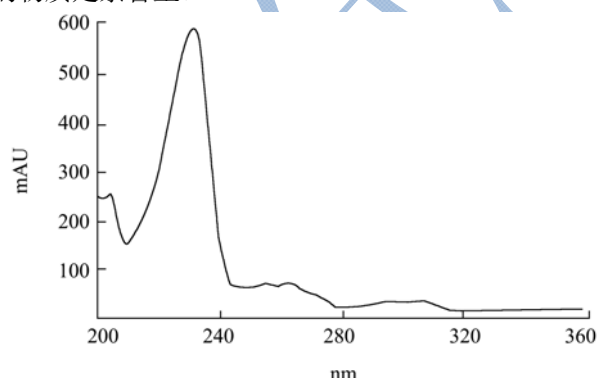


图 5 可疑物质色谱峰二极管阵列扫描光谱图

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 $\mu\text{g/mL}$,工作曲线的线性范围: 5.0~80 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9993$), 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