

高效液相色谱法同时测定化妆精油中的七种性激素

黄百芬¹,李晓萍²,任一平¹,沈向红¹

(1. 浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310009 2. 浙江树人大学,浙江 杭州)

摘要:建立了用高效液相色谱法同时测定化妆品中七种性激素的有效方法。试样经脱脂、提取、清洗、浓缩后,采用 ODS-C₁₈ 色谱柱,乙腈与水为流动相,进行梯度洗脱,应用二极管阵列检测器、荧光检测器的串联技术对样品中的七种性激素进行测定和鉴定,获得了良好的效果。七种性激素最低检出浓度为 5 μg/g,变异系数在 3.4% 以下,样品加标回收率在 83% 以上,标准曲线在 5~150 μg/mL 的线性范围内,相关系数均大于 0.999。

关键词:高效液相色谱法;化妆品;性激素

中图分类号:O658

文献标识号:A

文章编号:1671-8798(2003)S0-0084-03

化妆品中添加激素能促进毛发生长,防止皮肤老化,有除皱,增加皮肤弹性等作用。但长久使用含激素的化妆品有致癌性。国际癌症研究中心(IARC)已证明己烯雌酚能引起细胞癌,子宫内膜癌,乳腺癌,卵巢癌。性激素指雄激素、雌激素及孕激素三类。化妆品卫生标准规定此三类激素为禁用物质。因此,化妆品中激素的检测对化妆品产品质量的提高,保障人民身体健康具有非常重要的意义。

随着人民生活水平的提高,品种繁多的化妆品出现在化妆品柜台上,给化妆品中激素的检测提出了更高的要求。激素的化学测定方法有经典的比色法,薄层色谱法,高效液相色谱法。随着分析技术的提高和分析仪器的发展,高效液相色谱法已成为目前应用最广泛的测定激素的方法。高效液相色谱法灵敏、快速、分辨率高、重复性好。

本文将试样用乙腈提取,经正己烷脱脂,提取液中乙腈用氮吹仪吹干后,用 8% 的碳酸氢钠水溶液溶解,再用乙醚反萃取,蒸干乙醚,用流动相定容,采用 ODS-C₁₈ 色谱柱进行分离,应用二极管阵列检测器、荧光检测器的串联技术对样品中的七种性激素进行测定和鉴定,获得了良好的效果。前处理方法操作步骤较多,但能去除大量的干扰成分,灵敏度高,重现性好,有较理想的回收率。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国贝克曼高效液相色谱仪,带 168 二极管阵列检测器、岛津 RF-10AXL 荧光光度检测器、旋转蒸发器、固相萃取装置、氮气吹干仪、KQ3200E 医用超声波清洗器。甲醇(HPLC 级);乙腈(HPLC 级);乙醚、正己烷、乙酸乙酯均为 AR 级,用前需重蒸;超纯水;碳酸氢钠(AR 级);七种激素标样为雌三醇,雌二醇,甲基睾丸酮,雌酮,己烯雌酚,睾丸酮,黄体酮,均从中国生物制品鉴定所购得。

1.2 色谱条件:

色谱柱:ODS 柱(Inertisl ODS-C₁₈柱 3μm,250 mm×4.6 mm);流动相:乙腈-水梯度淋洗;流速:0.75 mL/min;紫外检测器的检测波长 230 nm;荧光检测器:激发波长 280 nm,发射波长 310 nm;运行时间为 65 min。

收稿日期:2003-10-10

作者简介:黄百芬(1965—),女,工程师,浙江余姚人,主要从事食品及药物分析方法的研究。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取 50 mg 左右的激素标准品,用甲醇溶解并定容至 100 mL,配制成浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。再逐级稀释成 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液浓度系列。

1.4 样品处理

萃取:称取样品约 2 g 于 10 mL 具塞刻度管中,加入 5 mL 乙腈涡流混合 1 min,用 15 mL 正己烷分 3 次脱脂,合并的己烷相再用 6 mL 乙腈分 3 次萃取,合并所有乙腈提取液于 10 mL 刻度试管中,用氮吹仪吹干。

反萃取:加入 5 mL 的 8% 碳酸氢钠水溶液,再用 15 mL 乙醚分 3 次提取下层清液,合并乙醚相并用氮气吹干,流动相定容至 10 mL,过滤,待 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相的摸索

选用乙腈和水做变梯度试验,按图 1 中三种梯度方式进行标样分离。标样按梯度 1 进行分离,甲睾与雌酮完全重叠;按梯度 2,甲睾与雌酮仍完全重叠;按梯度 3,甲睾与雌酮已能完全分开。

2.2 检测手段的选择

因各种激素的结构不同,对紫外光的吸收也不同,由扫描结果知,雌激素的紫外最佳吸收波长为 204 nm,雄激素的紫外最佳吸收波长为 242 nm,可利用二极管阵列检测器跟踪扫描来进行定性。雌激素中雌三醇、雌二醇有很强的自然荧光,雌酮有较弱荧光,激发波长为 280 nm,发射波长为 310 nm,孕激素、雄激素无荧光。由于荧光检测器具有更高的灵敏度和选择性,雌三醇、雌二醇的定量以

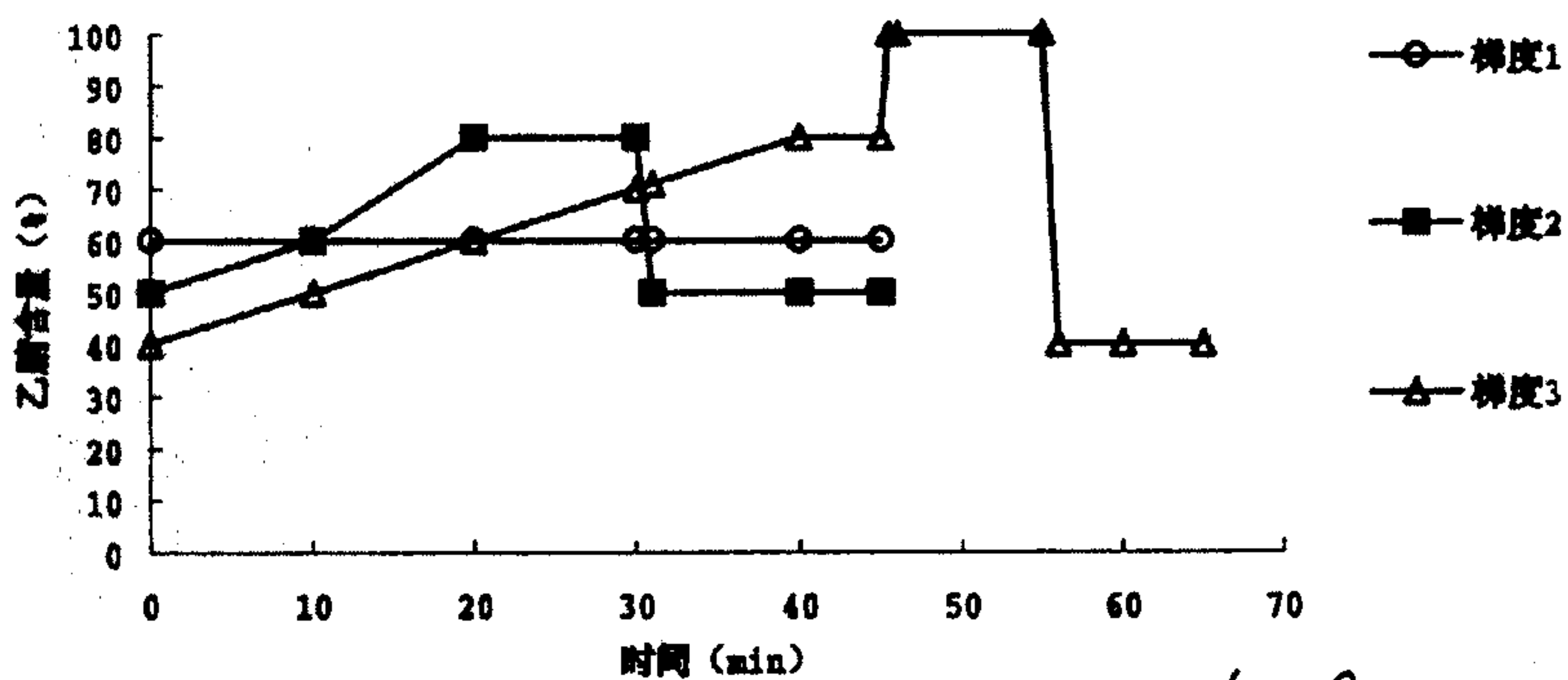


图 1 梯度曲线图

荧光为首选,同时可根据同一组分浓度的荧光、紫外的吸收峰面积的比值对被测组分的定性提供进一步的参考,以减少单纯以二极管阵列扫描进行定性所产生的假阳性现象。在本实验条件下,荧光、紫外的吸收峰面积的比值见表 1。

表 1 荧光/紫外面积比

名 称	雌三醇	雌二醇	雌 酮	己烯雌酚	黄体酮	甲 睾	睾 丸 酮
荧光峰面积	287.0	461.0	14.0	/	/	/	/
紫外峰面积	9.7	17.7	40.0	19.0	54.7	43.2	45.3
荧光/紫外面积比	29.6	26.0	0.35	/	/	/	/

2.4 样品的测定结果和回收率

选用莎拉娜收腹霜,加入一定量的 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混标混匀后作为阳性样品,称取 2 g,依次加入 0.5 mL, 1.5 mL 储备标准溶液,按 1.4 方法处理,定容至 10 mL,每份重复两次,取平均值所得结果表明,七种性激素除黄体酮(83.5%)以外,回收率在 90.96 ~ 106.8 之间。

2.5 线性试验

将标准储备液逐级稀释成下列浓度的混标溶液,依次进样,进样量为 20 μL ,结果见表 2。由表 2 可见,标准曲线在 5 ~ 150 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内线性良好。

表 2 线性测定结果

名 称	浓度 1 $\mu\text{g/mL}$	浓度 2 $\mu\text{g/mL}$	浓度 3 $\mu\text{g/mL}$	浓度 4 $\mu\text{g/mL}$	浓度 5 $\mu\text{g/mL}$	浓度 6 $\mu\text{g/mL}$	回归方程	相关系数
雌三醇	5.28	10.55	21.10	42.20	63.30	84.40	$y = 4.0077x + 0.2050$	$R = 0.9999$
雌二醇	7.78	15.55	31.10	62.20	93.30	124.40	$y = 2.2472x + 0.1195$	$R = 0.9999$
甲 睾	5.16	10.31	20.62	41.24	61.86	82.48	$y = 1.0277x - 0.6758$	$R = 0.9999$
雌 酮	6.08	12.17	24.34	48.68	73.02	97.36	$y = 2.1686x - 1.0454$	$R = 0.9999$
己烯雌酚	9.20	18.40	36.80	73.60	110.40	147.20	$y = 0.7139x + 0.2471$	$R = 1$
黄体酮	5.98	11.97	23.94	47.88	71.82	95.76	$y = 0.9374x + 0.03604$	$R = 0.9999$
睾丸酮	5.97	11.94	23.88	47.76	71.64	95.52	$y = 0.9021x - 0.02419$	$R = 0.9999$

2.6 方法精密度

选用丰胸化妆精油 1.00 g, 加入一定量的 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混标混匀后作为阳性样品, 称取 6 份, 每份 1.00 g, 按 1.4 操作, 处理后依次进样。由所得结果可知, RSD 在 2.07 ~ 6.90% 之间。

2.7 实样色谱图

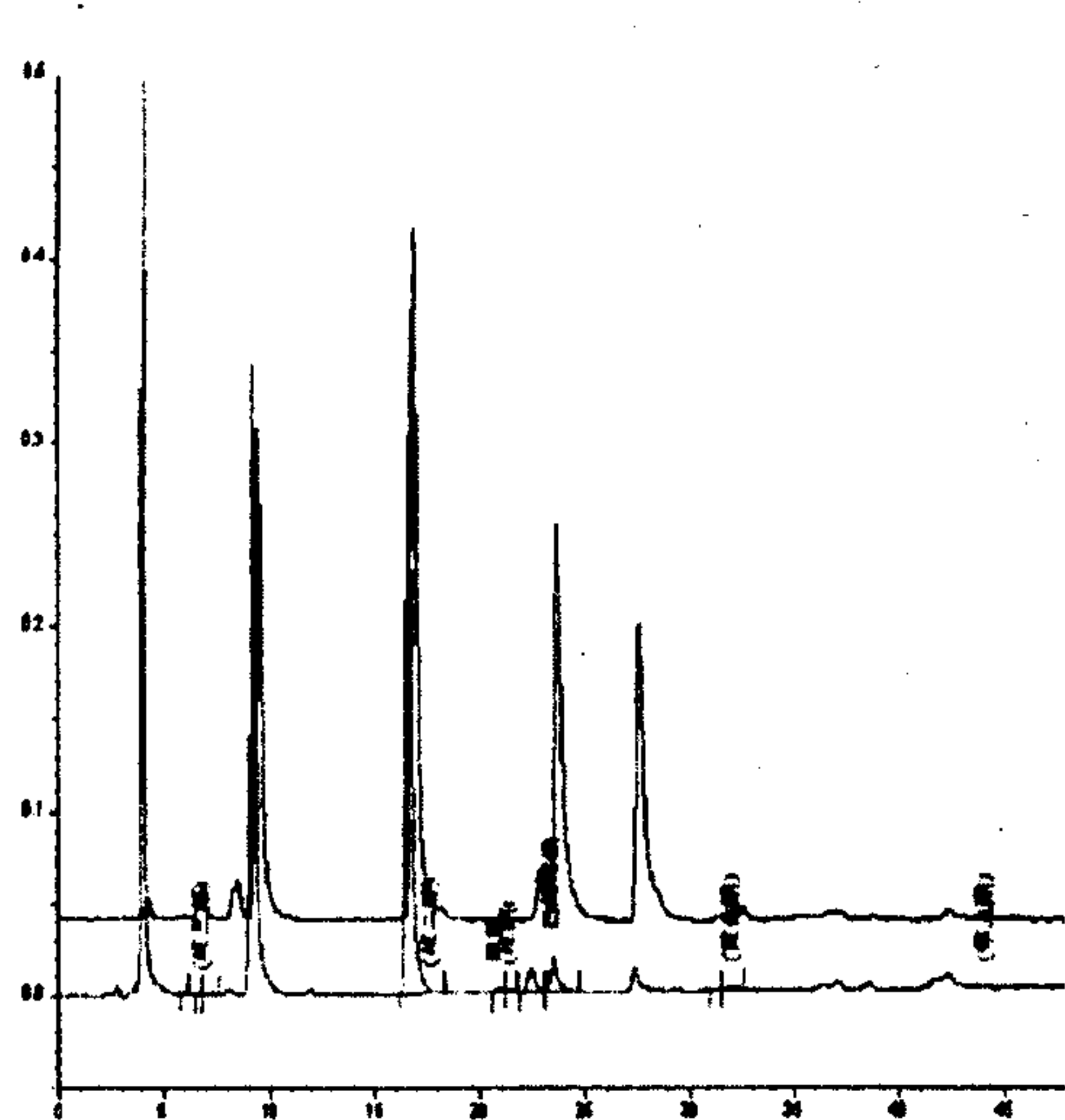


图 2 瘦腿霜色谱图

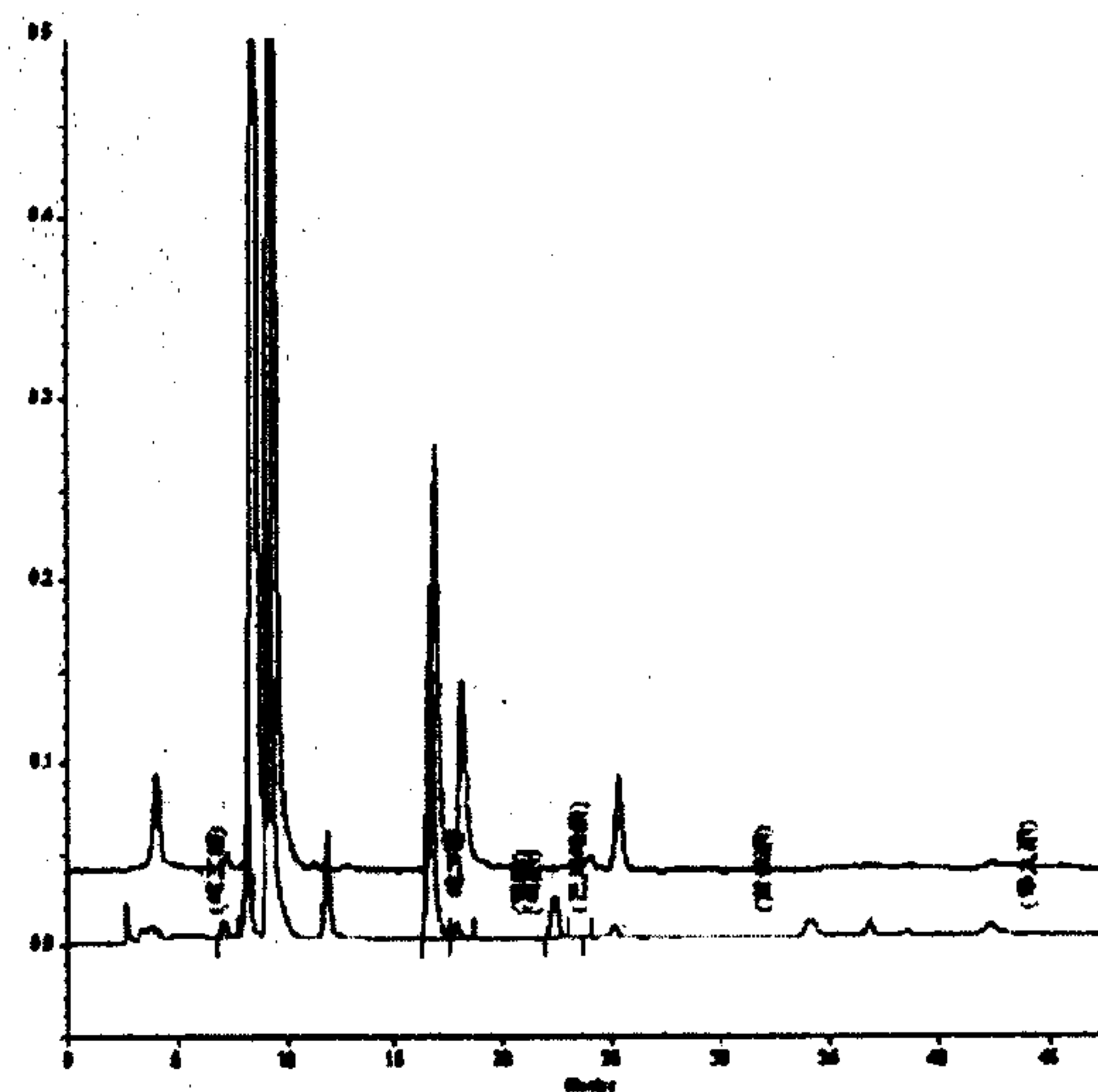


图 3 健胸霜色谱图

2.8 最低检出限

根据信噪比 3:1 时的浓度为最低检出浓度, 将混合标准溶液稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 总 结

利用高效液相色谱法能够准确分离测定化妆品中的性激素, 而且利用本方法具有较高的回收率, 重现性好, 灵敏度高, 能够排除干扰峰的影响, 但是由于目前市场上化妆品种类繁多, 干扰成分复杂, 因此, 样品的预处理方法的使用范围有限, 需要针对不同的样品来摸索前处理方法, 以求得到最佳方案。

参考文献:

- [1] 仇文升, 李安良主编, 《药物化学》[M]. 北京: 高等教育出版社出版, 2000.
- [2] 中华人民共和国卫生部卫生法制与监督司, 化妆品卫生规范[Z]. 2002.
- [3] 李美发. 医用高效液相色谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.

(下转第 99 页)