

化妆品中双香豆素和环香豆素的高效液相色谱二极管阵列检测器测定

程 艳, 王 超, 薛一梅, 陈 伟, 王 星,
白 桦, 蔡天培, 胡孔新

(中国检验检疫科学研究院 工业品检验研究所, 北京 100025)

摘 要: 建立了用高效液相色谱 (HPLC) 二极管阵列检测器 (DAD) 测定化妆品中两种香豆素物质——双香豆素和环香豆素的方法。样品用乙腈 - 氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L) (体积比 9 : 1) 的提取溶液超声提取, 高效液相色谱 DAD 扫描检测, 并在 306 nm 波长进行分析。用保留时间结合二种香豆素的紫外光谱定性, 外标法定量, 并且采用液质联用 (LC - MS/MS) 确证。双香豆素的回收率为 96%~105%, 精密度 RSD 为 0.51%~2.08%, 定量下限为 1 ng; 环香豆素的回收率为 88%~104%, 精密度 RSD 为 0.51%~3.36%, 定量下限为 1 ng。
关键词: 高效液相色谱; 二极管阵列检测器; 液质联用; 双香豆素; 环香豆素; 化妆品

中图分类号: O657.72; Q949.752.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957 (2008) 02 - 0196 - 05

Determination of Dicumarol and Cyclocoumarol in Cosmetics by HPLC/DAD

CHENG Yan, WANG Chao, XUE Yimei, CHEN Wei, WANG Xing,

BAI Hua, CAI Tianpei, HU Kongxin

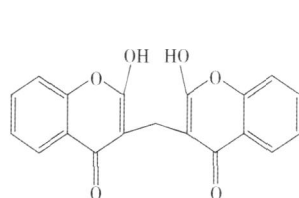
(Institute of Industrial Product Inspection, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: A method for simultaneous separation and determination of two coumarins, dicumarol and cyclocoumarol, in cosmetics by HPLC - diode-array detector (DAD) was developed. The cosmetics were extracted by ultrasonic with acetonitrile - NaOH solution (0.1 mol/L) (9 : 1, by volume). The filtrate was injected into RP - HPLC and detected at $\lambda = 306$ nm. Qualitative analysis of the coumarins was based on their retention times of the chromatogram and their ultraviolet spectra. Quantitative analysis used external standard methods. Furthermore, the results were affirmed by LC - MS/MS. The recoveries, relative standard deviations and limits of quantitation were 96% - 105%, 0.51% - 2.08%, 1 ng for dicumarol and 88% - 104%, 0.51% - 3.36%, 1 ng for cyclocoumarol, respectively.

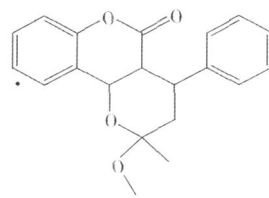
Key words: HPLC; DAD; LC - MS/MS; dicumarol; cyclocoumarol; cosmetics

香豆素是广泛存在于自然界中的内酯类化合物, 尤其在芸香科和伞形科植物中存在最多, 常用于日用香精中。在对人体具有抗高血压、抗凝血等药理作用的同时, 也具有一定的对生物体有害的生理毒性^[1-2]。

双香豆素 (dicumarol) 和环香豆素 (cyclocoumarol) 属香豆素类物质, 分子结构式分别如右图所示。它们具有草香味, 曾被广泛用作香料。但双香豆素和环香豆素具有光毒性, 易与紫外线产生作用而变质, 对肝脏有损害, 同时影响 MTT 代谢, 也影响生物体代谢^[3]。另外, 双香豆素还会影响生物体 NAD (P) H 脱氢酶, 从而影响细胞间信息传递^[4-5]。故近年来欧盟和我国都规定双香豆素和环香豆素为化妆品中禁用物质, 所以, 对双香豆素和环香豆素的检测是保障化妆品质量安全的重要措施。



双香豆素 ($C_{19}H_{12}O_6$, M_r 336.29)



环香豆素 ($C_{20}H_{18}O_4$, M_r 322.36)

收稿日期: 2006 - 12 - 27; 修回日期: 2007 - 03 - 05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500455)

第一作者: 程 艳 (1977 -), 女, 湖北仙桃人, 助理研究员, 博士, Tel: 010 - 85773355 - 2147, E - mail: yanzi77pku@yahoo.com.cn

国外的文献偏重于香豆素作为药物在生物体中的代谢机理和生理毒性研究, 对其检测方法研究较少。Maurel^[6]采用 GC-MS 方法, 测定了尿液中的 4 羟基香豆素及其代谢产物的含量, 其中包括环香豆素。而目前国内多数是植物 (绝大多数为中草药) 提取物中香豆素类物质的定性或定量分析研究。中国药典 (95 版)^[7]采用 HPLC 分离和检测, 操作较复杂, 且灵敏度不高。戴平^[8]采用紫外分光光度法测定了双香豆素片中双香豆素的含量, 操作简便, 但准确度低。乌云等^[9]采用溶剂萃取, 薄层色谱分离, 紫外吸收光谱定量, 测定了草木樨种籽中双香豆素的含量, 操作复杂, 灵敏度也不高。目前国内尚无同时分离和检测化妆品中双香豆素和环香豆素的报道。

本文建立了应用 HPLC/二极阵列检测器 (DAD) 进行化妆品中双香豆素和环香豆素检测的简便方法, 用保留时间结合紫外光谱图定性, 外标法定量, 并且采用液质联用 (LC-MS/MS) 确证, 避免了假阳性结果的发生, 方法准确、快速、简便, 检出限、回收率和精密度均符合要求, 可用于同时测定化妆品中的双香豆素和环香豆素。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 配自动进样器和 DAD 检测器; Waters 2695 Micromass Quattro micro™ AP 液质联用仪, 配自动进样器和工作站; KQ-600B 型超声波清洗仪; Beckman 高速冷冻离心机; 双香豆素 (Acros Organics 公司), 纯度 99%; 环香豆素 (Sigma-Aldrich 公司), 纯度 99%; 甲醇、乙腈 (Fisher 公司), 色谱纯; 二氯甲烷、氢氧化钠、乙酸、乙酸铵 (北京化学试剂公司), 优级纯; 实验用水为 Milli-Q I 级超纯水。

1.2 液相色谱条件

HPLC/DAD 条件: 伊利特 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.05 mol/L 乙酸铵水溶液 (含 0.25% 体积分数乙酸); 梯度条件: 0~2 min 时甲醇-乙腈-0.05 mol/L 乙酸铵水溶液体积比为 5:50:45, 2~3 min 线性变为 5:75:20, 3~10 min 保持 5:75:20, 10~12 min 线性变为 5:50:45, 12~15 min 保持 5:50:45; 流速 1.0 mL/min; 选择保存波长 190~400 nm 紫外光谱图。

1.3 液相色谱-质谱条件

LC 条件: Atlantis C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm i.d., 5 μm); 流动相: 水-甲醇; 梯度条件: 0~3 min 保持水与甲醇体积比为 2:8, 3~8 min 线性变化到 0:100, 8~15 min 保持 0:100; 流速 0.2 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。

双香豆素 MS 条件: 离子化方式 ESI(-); 毛细管电压 3.5 kV; 锥孔电压 13.0 V; Extractor 电压 2 V; RF Lens 电压 1.0 V; 离子源温度 100 °C; 脱溶剂气温度 300 °C; 数据采集方式: 二级离子监测 (MRM); 监测子离子及其碰撞能量: 335.2 > 116.7 (43 eV), 335.2 > 160.9 (13 eV)。

环香豆素 MS 条件: 离子化方式 ESI(+); 毛细管电压 3.0 kV; 锥孔电压 25.0 V; Extractor 电压 5 V; RF Lens 电压 1.0 V; 离子源温度 100 °C; 脱溶剂气温度 300 °C; 数据采集方式: 二级离子监测 (MRM); 监测子离子及其碰撞能量: 323.2 > 251.1 (20 eV), 323.2 > 172.9 (25 eV)。

1.4 标准溶液的配制

准确称取双香豆素和环香豆素各 0.010 0 g 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 待全部溶解后, 再加入少许乙腈, 超声溶解, 再加乙腈定容至 100 mL, 振荡均匀, 即得双香豆素和环香豆素质量浓度各为 100 mg/L 的混合标准储备液, 再逐级用乙腈溶液稀释至所需要的浓度。

1.5 样品前处理

称取化妆品试样 0.500 g, 精确到 1 mg, 加入体积比为 9:1 的乙腈-氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L) 提取, 超声振荡 20 min, 并用 1.0 mol/L 乙酸调节溶液 pH 值至中性, 定容至 25 mL, 混匀。取部分溶液放入离心管中, 在离心机上于 12 000 r/min 离心 10 min, 离心后的上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液待测定用。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

选用甲醇 - 水作为流动相，不出峰；选用水 - 乙腈或者水 - 乙腈 - 四氢呋喃作为流动相，双香豆素色谱峰较宽，不对称，且拖尾；选用甲醇 - 水 - 四氢呋喃，或者水 - 四氢呋喃作为流动相时，随着四氢呋喃比例增大峰形逐渐对称，但双香豆素出峰时间逐渐靠前，易与溶剂峰相混，不能同时满足出峰时间与峰形的要求。

在上述各流动相中分别加入 0.02、0.04、0.05 mol/L 的乙酸铵，环香豆素和双香豆素的色谱峰形都较好，加入少量乙酸调节 pH 值，能使峰形更加对称，但双香豆素和环香豆素两峰相隔太远。因此考虑采用梯度条件，同时为了减缓梯度条件下基线变化，加入少量甲醇，最终适宜的液相条件如“1.2 中所述，分离图谱见图 1。

2.2 检测波长的选择

采用 DAD 宽波段范围扫描，可在获取色谱分离图的同时在线监测物质的紫外光谱图。在较低紫外波段，背景对检测物质干扰严重；在 282 nm 处二者吸收值都较大，但色谱图不稳定，有时出现负峰；而在 306 nm 处检测峰形对称性较好，双香豆素与环香豆素响应值相近，无其它干扰，基线平稳。选定 306 nm 作为两种香豆素物质的检测波长。

2.3 样品提取溶剂的选择

由于环香豆素溶于有机溶剂，双香豆素溶于碱性水溶液，故考虑采用水 - 油复合提取溶剂。对比几种溶剂的提取效率，包括甲醇 - 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 (体积比 1 :1 和 2 :1)、乙腈、四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈 - 二氯甲烷混合溶剂 (体积比 10 :1, 10 :2, 10 :3 和 1 :1)，最终确定样品提取溶剂为乙腈 - 氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L) (体积比 9 :1)，提取后用 1.0 mol/L 乙酸调节溶液 pH 值至中性，提取结果符合要求。

2.4 定量标准曲线的绘制

以色谱峰的峰面积 (A) 为纵坐标，与其对应的质量浓度 (ρ, mg/L) 为横坐标作图，绘制标准工作曲线，并按信噪比为 10 求得定量下限。两种组分的线性范围、线性方程、相关系数及定量下限列于表 1。

表 1 双香豆素与环香豆素的校准曲线的线性范围、回归方程和定量下限

Table 1 Linear range, regression equation of the calibration curves and quantitation limit of dicoumarol and cyclocoumarol

Analyte	Linear range ρ/(mg · L ⁻¹)	Regression equation	Correlation coefficient r	Quantitation limit m/ng
Dicoumarol(双香豆素)	0.05~50	A = 31.42 ρ - 2.35	0.999 9	1
Cyclocoumarol(环香豆素)	0.05~50	A = 18.08 ρ + 3.46	0.999 9	1

2.5 精密度与回收率

选择经测定不含有这 2 种香豆素的不同剂型和用途的彩妆类样品 (固体粉状)、护肤类样品 (膏状)、洁肤类样品 (乳液状)、香水类样品 (液体状) 4 种空白样品，以样品中含量分别为 5.0、50.0、1 000 mg/kg 3 个添加浓度，按上述方法检测并进行 8 次平行实验，考察方法的回收率和精密度，结果见表 2。从表 2 中可看出，双香豆素的回收率为 96%~105%，相对标准偏差在 0.51%~2.08% 之间；环香豆素的回收率为 88%~104%，相对标准偏差在 0.51%~3.36% 之间。

表 2 双香豆素和环香豆素的添加回收率测定结果 (n = 8)

Table 2 The recovery tests for dicoumarol and cyclocoumarol (n = 8)

Sample	Added w _A /(mg · kg ⁻¹)	Dicoumarol(双香豆素)			Cyclocoumarol(环香豆素)		
		Found	Recovery	RSD	Found	Recovery	RSD
		w _F /(mg · kg ⁻¹)	R/%	s _r /%	w _F /(mg · kg ⁻¹)	R/%	s _r /%
Make-up (powder)	5.00	5.05	101	1.50	5.14	103	1.25
彩妆样品 (固体粉状)	50.0	50.5	101	0.91	50.7	101	0.51
	1 000	1 002	100	2.08	1 018	102	1.82

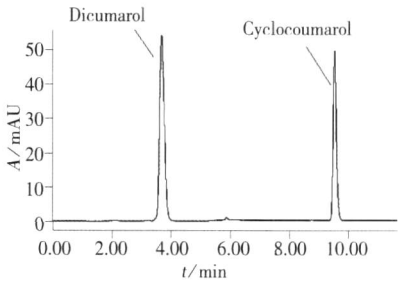


图 1 双香豆素和环香豆素标准物液相色谱分离图
Fig.1 Liquid chromatogram of dicoumarol and cyclocoumarol

(续表 2)

Sample	Added $w_A / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Dicumarol(双香豆素)			Cyclocoumarol(环香豆素)		
		Found	Recovery	RSD	Found	Recovery	RSD
		$w_F / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$	$w_F / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$
Skin care (cream)	5.00	5.16	103	1.32	4.96	99	2.00
护肤样品(膏状)	50.0	48.9	98	1.09	49.6	99	0.52
	1 000	978.4	98	0.85	997.6	100	0.99
Skin clean (lotion)	5.00	5.20	104	0.51	4.57	91	3.36
洁肤样品(乳液状)	50.0	50.1	100	0.93	50.2	100	1.26
	1 000	1 023	102	0.79	1 021	102	0.76
Perfume (liquid)	5.00	5.18	104	1.71	4.96	99	2.73
香水样品(液体状)	50.0	49.2	98	1.11	45.3	91	2.26
	1 000	978.4	98	0.85	981.9	98	1.08

2.6 LC - MS/MS确证

选择 LC - MS/MS进一步确认样品中的双香豆素和环香豆素。双香豆素和环香豆素标准总离子流和二级子离子质谱图见图 3。双香豆素的母离子 $C_{19}H_{11}O_6^-$ (m/z 335.2) 主要被打碎成 2 个子离子 $C_9H_5O_3^-$ (m/z 160.9)、 $C_8H_4O^-$ (m/z 116.7); 环香豆素的母离子 $C_{20}H_{19}O_4^+$ (m/z 323.2) 主要被打碎成 2 个子离子 $C_{16}H_{11}O_3^+$ (m/z 251.1)、 $C_{10}H_5O_3^+$ (m/z 172.9)。通过保留时间以及各子离子之间的丰度比值可以定性确定双香豆素和环香豆素是否存在, 排除假阳性结果的产生。同时, LC - MS/MS方法对于双香豆素和环香豆素的定量下限均能达到 1 ng。

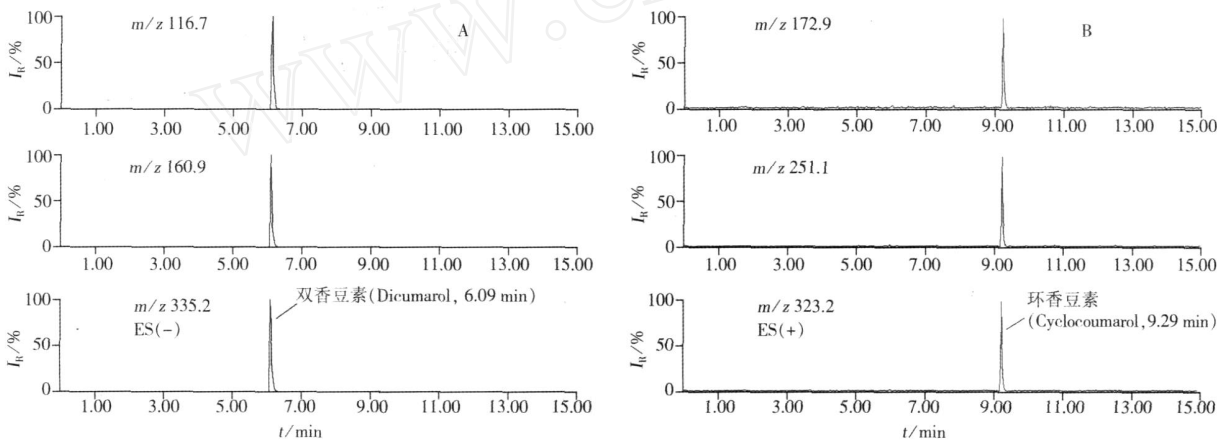


图 3 双香豆素 (A)和环香豆素 (B)标准物质的 LC - MS/MS总离子流图及二级子离子图
Fig. 3 Liquid chromatography - tandem mass spectrometric (LC - MS/MS) total ion and daughter ions chromatograms of dicumarol(A) and cyclocoumarol(B) standards

2.7 化妆品的测定

应用所建立的方法, 分别对不同品牌、不同产地、不同剂型 (粉末状、块状、膏状、霜状、乳液状、液体状)、不同用途的进出口化妆品中的双香豆素或环香豆素含量进行抽查检测, 其中彩妆样品 5 种, 护肤样品 4 种, 洁肤样品 2 种, 发用产品 2 种, 香水产品 7 种, 共 20 种不同产品。按照建立的测试方法进行检测, 测试结果经标准样品比对、DAD 验证和 LC - MS 确证, 表明抽查的 20 种进出口化妆品产品中没有检测到双香豆素或环香豆素。

参考文献:

[1] 宋继国, 宋化灿, 杨绮琴, 等. 香豆素及其衍生物在二甲基亚砷中的电还原性质 [J]. 分析测试学报, 2003, 22 (3): 48 - 50.
[2] 李洁, 李楠, 武婷, 等. 香豆素类物质的色谱检测进展 [J]. 生命科学仪器, 2005, 3(5): 34 - 38.
[3] COLLIER A C, PRITSOS C A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay[J]. Biochemical Pharmacology, 2003, 66(2): 281 - 287.
[4] ABDELMOHSEN K, STUHLMANN D, DAUBRAWA F, et al Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 434(2): 241 - 247.

(下转第 202 页)

发现随着 Cu^{2+} 浓度的增高, LDH 荧光强度逐渐降低, 并且符合荧光猝灭的 Stern - Volmer 公式。推测荧光猝灭的原因是由于金属离子与酶结合而生成不发荧光的基态络合物, 即以热的形式放出多余能量而产生无辐射跃迁。图 5 为 Cu^{2+} 对 LDH 荧光光谱的影响, $I_0/I_f = 0.944\ 85 + 43\ 001 \cdot C_{\text{Cu}^{2+}}$, $r = 0.999\ 1$, 据此可利用荧光光谱进行金属离子的定量分析。

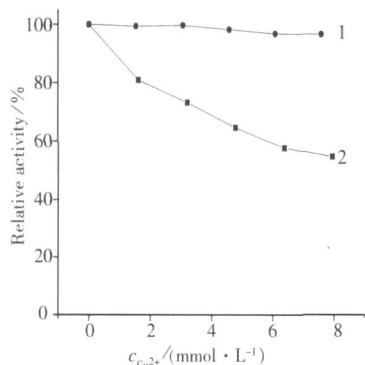


图 4 Cu^{2+} 对酶活力的影响和消除

Fig. 4 Effect of Cu^{2+} on the enzymatic activity and its elimination

(1) with 9.5 mmol/L EDTA;

(2) without EDTA

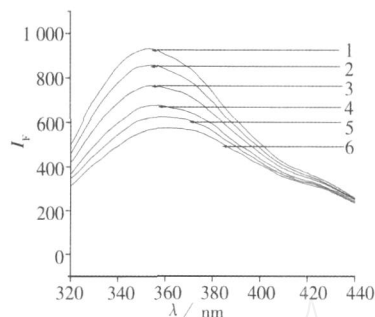


图 5 Cu^{2+} 对 LDH 荧光光谱的影响

Fig. 5 Effect of Cu^{2+} on the fluorescent spectra of lactate dehydrogenase (LDH)

$C_{\text{Cu}^{2+}} (\mu\text{mol/L})$: (1) 0; (2) 1.6;

(3) 3.2; (4) 4.8; (5) 6.4; (6) 7.9

参考文献:

- [1] ZABORSKA W, KRAJEWSKA B, LESZKO M, et al Inhibition of urease by Ni^{2+} ions analysis of reaction progress curves[J]. Journal of Molecular Catalysis B, 2001, 13: 103 - 108
- [2] ANTUNES F, MARINHO H S, PINTO R E, et al Diagnosis of enzyme inhibition based on the degree of inhibition[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1624: 11 - 20.
- [3] BAGIROVA N A, SHEKHOVTSOVA T N, HUYSTEE R B. Enzymatic determination of phenols using peanut peroxidase [J]. Talanta, 2001, 55: 1151 - 1164
- [4] MOUREAU F, WOUTERS J, KOENIG J J, et al A reversible monoamine oxidase inhibitor, Toloxatone: comparison of its physicochemical properties with those of other inhibitors including brofaromine, harmaline, R40519 and moclobemide [J]. Eur Med Chem, 1995, 30: 823 - 838
- [5] SOKD E, KMM R. Enzymatic method for the determination of tellurite ions[J]. Anal Chim Acta, 1994, 298: 381 - 386
- [6] MEYER-ALMES F J, AUER M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy: A new algorithm for the derivation of k_{cat}/K_m and K_i values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant[J]. Biochemistry, 2000, 39: 13261 - 13268
- [7] ANZENBACHEROVA E, ANZENBACHER P, MACEK K, et al Determination of enzyme (angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24: 1151 - 1156

(上接第 199 页)

- [5] KISHIT, TAKAHASHIT, MIZOBUCHIS, et al Effect of dicumarol, a Nad(P) h: quinone acceptor oxidoreductase 1 (DT - diaphorase) inhibitor on ubiquinone redox cycling in cultured rat hepatocytes[J]. Free radical research, 2002, 36 (4): 413 - 419.
- [6] MAURER H H, ARLT J W. Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography mass spectrometry after extractive methylation[J]. J Chromatogr. B, 1998, 714(2): 181 - 195
- [7] 卫生部药典委员会. 双香豆素及双香豆素片 [M]. 中国药典 (95 版). 北京: 化学工业出版社, 1995: 60 - 62
- [8] 戴平. 紫外分光光度法测定双香豆素片的含量 [J]. 华夏医学, 2000, 13(6): 800
- [9] 乌云, 韩雪松, 张建华, 等. 草木樨种籽中香豆素、双香豆素含量的分析 [J]. 中国草地, 1998, 1: 36 - 38