

固相萃取 - 微乳液相色谱法对化妆品中 8 种激素的同时测定

李 宁¹, 侯璇珠¹, 王锦旋¹, 王铁杰², 李玉兰², 李 军²

(1 广东药学院 药科学院, 广东 广州 510006; 2 深圳市药品检验所, 广东 深圳 518029)

摘要: 建立了固相萃取 - 微乳液相色谱同时测定化妆品中糖皮质激素、雌激素、雄激素、孕激素等 8 种激素药物的新方法。化妆品样品用甲醇超声提取, 经 Cleanert ODS-SPE 固相萃取柱纯化后, 以 Venusil ASB C₈(T) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 30 nm) 为色谱柱, 3.0% 十二烷基硫酸钠 (SDS) - 6.0% 正丁醇 - 0.8% 正辛烷 - 89.6% 水为流动相, 检测波长为 240 nm。结果表明, 8 种激素在 15 min 内达到基线分离, 线性范围为 0.5~30 mg/L, 相关系数 r 均大于 0.999 5。在低、中、高 3 种加标水平下, 8 种激素的平均回收率为 82%~109%; 相对标准偏差为 1.5%~5.4%; 检出限为 0.04~0.07 ng。

关键词: 微乳液相色谱; 固相萃取; 激素类药物; 化妆品

中图分类号: O657.72 R977.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)02-0115-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.02.003

Simultaneous Determination of 8 Hormones in Cosmetics by Solid Phase Extraction with Microemulsion Liquid Chromatography

LIN Ning¹, HOU Xuan-zhu¹, WANG Jin-xuan¹, WANG Tie-jie², LI Yu-lan², LI Jun²

(1. College of Pharmacy, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China

2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518029, China)

Abstract A new analytical method based on solid phase extraction coupled with microemulsion liquid chromatography has been developed for the simultaneous determination of 8 hormones in cosmetics samples. The samples were extracted with methanol under ultrasonication, and then cleaned up by a Cleanert ODS solid phase extraction cartridge. 8 hormones were separated within 15 min on a Venusil ASB C₈(T) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 30 nm) column by the mobile phase consisted of microemulsion 3.0% sodium dodecylsulfate (SDS) - 6.0% *n*-butanol - 0.8% *n*-octane - 89.6% water, and detected at 240 nm. The calibration curves of 8 hormones were linear in the range of 0.5-30 mg/L with correlation coefficients more than 0.999 5. The average spiked recoveries for 8 hormones ranged from 82% to 109% with relative standard deviations of 1.5% - 5.4%, and the limits of detection were in the range of 0.04-0.07 ng.

Key words microemulsion liquid chromatography (MELC); solid phase extraction (SPE); hormone; cosmetic

激素是临床常用的一类药物, 其中糖皮质激素对皮肤病有良好的消炎作用, 可抑制纤维细胞增生, 减少 5-羟色胺形成。因而在短时间使用对皮肤具有一定的嫩白作用^[1], 长期使用则会发生皮肤变薄、毛细血管扩张、毛囊萎缩, 一旦停用, 皮肤就会发红、发痒, 出现红斑、丘疹、脱屑等。性激素(包括雌激素、雄激素、孕激素)主要具有控制附性器官和第二性征的作用, 对体内糖、脂肪、蛋白质、盐等的代谢有不同程度的影响。当该类激素直接作用于皮肤时, 能促进毛发生长、防止皮肤老化, 具有除皱、增加皮肤弹性等作用, 但长期使用会有副作用且有致癌的危险^[1]。因此我国《化妆品卫生规范》^[2]、《化妆品卫生标准》^[3]中均明确规定糖皮质激素、雌激素、雄激素、孕激素等为化妆品中的禁用物质。

化妆品中激素的检测方法通常有高效液相色谱法^[4-6]、超高效液相色谱法^[7]、液相色谱-质谱联

用法^[8]等。微乳液相色谱 (MELC) 是在胶束液相色谱 (Micellar liquid chromatography, MLC) 基础上发展起来的一种新的液相色谱技术。在 MELC 分离过程中, 溶质的保留由其在固定相、微乳分散相和水相之间的分配平衡决定, 尤其是微乳分散相 (油相) 对亲脂性化合物洗脱能力更强, 使其色谱分离具有新的机理, 同时其可控参数较多, 容易改善溶质的保留行为, 提高分离度。微乳流动相含水约 90%, 减少了污染, 降低了分析成本, 并缩短了分析时间, 被誉为绿色色谱。近年来微乳液相色谱技术已用于多组分的分离^[9-11], 药物及其杂质的分离检测^[12-14], 及生物样品的检测^[15]。

本文在前人工作^[16]的基础上, 采用固相萃取 (SPE) - 微乳液相色谱技术, 选取具有代表性的糖皮质激素 (曲安西龙、泼尼松龙、醋酸地塞米松、醋酸氟轻松、左炔诺孕酮)、雌激素 (己烯雌酚)、雄激素 (丙酸睾酮)、孕激素 (黄体酮) 8 种激素药物作为检测药品, 通过优化色谱条件, 在 15 min 内完成了多组分激素的快速检测。该方法简便、快速、准确、绿色环保、灵敏度高, 可用于化妆品、保健品及药品中多组分激素的常规检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: LC-10ATVP 泵、SPD-10AVP 紫外检测器 (日本 Shimadzu 公司); HW-2000 色谱工作站 (南京千谱软件有限公司); QT-330 柱温箱 (天津旗美科技有限公司); Cleanert ODS-SPE 固相萃取柱 (1 000 mg/6 mL, Agela 公司); 超声波清洗器 (天津恒奥超声波清洗机); TDL80-2B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); RE-52A 旋转蒸发仪 (巩义市予华仪器有限责任公司); AUV 220D 十万分之一天平 (日本 Shimadzu 公司); PURELAB 超纯水器 (英国 Elga 公司)。

曲安西龙、泼尼松龙、醋酸地塞米松、醋酸氟轻松、左炔诺孕酮、己烯雌酚、黄体酮及丙酸睾酮 (购于中国药品生物制品检定所, 含量测定用); 甲醇、乙腈 (Dikma 公司) 均为色谱纯, 水为超纯水; 十二烷基硫酸钠 (SDS) (Sigma 试剂, 纯度 99.9%), 聚氧乙烯月桂醇 (Brij35) (Amresco 试剂, 纯度 99.9%); 正丁醇、正辛烷、正辛醇及其它试剂均为分析纯。

1.2 微乳溶液的制备

微乳成分: 将表面活性剂、油相、助表面活性剂及水按顺序混合, 其质量分数分别为 3.0% SDS、6.0% 正丁醇、0.8% 正辛烷、89.0% 水。超声 30 min, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 即得透明稳定的微乳溶液, 待用。

1.3 标准溶液的配制

分别精密称取 8 种激素标准品各 2.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用微乳溶液超声溶解定容, 即得质量浓度为 50 mg/L 的标准储备液。分别移取 0.1、0.5、1、2、3、4、6 mL 上述储备液于一系列 10 mL 量瓶中, 用微乳溶液定容至刻度, 配成一系列不同质量浓度的混合标准溶液。

1.4 样品预处理

称取化妆品试样 0.500 g 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 超声提取 20 min, 置冰箱中冷冻 2 h, 取出后立即转移至离心管中, 于 3 000 r/min 转速下离心 20 min 后, 取上清液, 在 70 °C 水浴下浓缩至近干, 再在微弱的氮气流下缓慢吹干。加入 2 mL 30% 甲醇水溶液溶解残渣, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。滤液经 SPE 柱纯化 (使用前用 10 mL 甲醇活化、10 mL 水平衡)。将滤液过柱后, 先用 6 mL 10% 甲醇水溶液淋洗, 弃去流出液; 再用 6 mL 80% 甲醇水溶液洗脱, 收集洗脱液。整个过程中控制洗脱流速为 1.0 mL/min。将收集的洗脱液在微弱的氮气流下缓慢吹干, 然后精密量取 1 mL 微乳溶液至全溶, 待用。

1.5 色谱条件

色谱柱: Venusil ASB C₈ (T) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 30 nm); 流动相: 3.0% SDS - 6.0% 正丁醇 - 0.8% 正辛烷 - 89.0% 水; 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 240 nm; 进样量: 20 μL。以色谱峰的保留时间定性, 外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 样品提取条件的优化

考察了不同提取溶液(甲醇、无水乙醇、正丁醇)的提取效果。结果表明,以甲醇为提取溶剂时,浸出杂质少且易排除基质干扰,获得较高的回收率。此外,还考察了不同提取时间(10、20、30 min)对样品萃取效率的影响。结果表明,超声提取 20、30 min 时,样品提取回收率较高且无明显差别,因此确定超声提取时间为 20 min。

2.2 固相萃取条件的优化

考察了甲醇体积分数分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 时的洗脱效果。结果表明,以 10% 甲醇溶液作为淋洗液时,8 种激素仍被保留在固相萃取柱上,故选用 10% 甲醇溶液作为淋洗液以净化固相萃取柱,除去样品基质中杂质的干扰。80% 甲醇溶液可将 8 种激素完全洗脱,同时又不会将强保留的杂质洗脱,故选用 80% 甲醇溶液作为洗脱液。

以曲安西龙和丙酸睾酮为考察对象,研究了固相萃取过程中洗脱液用量(4、5、6、7、8 mL)和流速(0.5、1.0、1.5 mL/min)对分离效果的影响。结果表明,回收率随着洗脱液体积的增加而增加,当体积大于 6 mL 时,洗脱液体积变化对样品回收率的影响不明显;样品过 SPE 柱的流速不能太快,否则会因未达到分配平衡,而导致干扰物未被柱填料完全吸附,故应适当降低洗脱液流速,以减少测定时其他物质对待测组分的干扰,并改善整体分离效果。考虑到样品处理时间和回收率,实验确定洗脱流速为 1.0 mL/min,洗脱液体积为 6 mL。

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 色谱柱的选择 研究了固定相孔径对激素类药物分离的影响,实验表明,孔径为 30 nm 的色谱柱分离选择性好,柱效较高。在此基础上,分别考察了 Venusil ASB C₁₈(T)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 30 nm)和 Venusil ASB C₈(T)(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 30 nm)色谱柱对 8 种激素类药物的分离效果。结果表明,选择以 C₈ 键合硅胶作为固定相的 Venusil ASB C₈(T) 色谱柱,不仅能保证分离度,还能缩短分析时间。

2.3.2 不同表面活性剂的选择 考察了 SDS、Brij35 表面活性剂对 8 种甾体激素成分的分离效果,结果表明,在流动相中加入 SDS 可使 8 种药物在较短时间内达到基线分离,而加入 Brij35 样品的分析时间较长,且醋酸地塞米松和己烯雌酚的分离度差。故本文选择 SDS 作为表面活性剂。

2.3.3 正丁醇用量的选择 助表面活性剂一般采用体积分数为 6.0%~16.5% 的正丁醇,其体积分数小于 6.0% 则不能形成微乳,而大于 9% 时对分离影响很小,只能降低保留时间^[16]。本文考察了微乳中正丁醇体积分数分别为 6.0%、7.0%、8.0%、9.0% 时对 8 种甾体激素成分分离效果的影响,结果发现 6.0% 正丁醇可使 8 种化合物达到基线分离。所以微乳溶液选择 6.0% (体积分数) 正丁醇。

2.3.4 不同油相的选择 考察了不同油相(正辛烷、正辛醇)中 8 种甾体激素成分的分离效果。结果表明,以正辛烷为油相的微乳溶液,对泼尼松龙和丙酸睾酮洗脱能力较正辛醇低,能增加曲安西龙和泼尼松龙、黄体酮和丙酸睾酮的分离度,使 8 种甾体激素药物的分离选择性较好。故选择正辛烷为该体系的油相。

2.3.5 pH 的选择 考察了不同 pH 微乳体系(pH 2.0、3.0、4.0、5.0)及缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾)对分离的影响。结果显示,随着微乳体系 pH 值的减小,各药物的保留因子略有增大,但对改善 8 种甾体激素药物的分离效果没有显著差异。这是由于甾体激素属于中性化合物,流动相的 pH 对其保留影响较小。而缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾)的微乳体系对化合物的保留也没有影响。考虑到色谱柱的耐受性,故选择不加酸和缓冲盐的微乳体系。

图 1 为 8 种激素标准品混合物在优化色谱条件下的色谱图,在 15 min 内 8 种化合物完全分离。

2.4 反相液相分离模式的比较

研究了同时测定化妆品中 8 种激素的 RPLC 方法,以甲醇-水(65:35)为流动相,其分析时间为 23 min,完成一次样品分析有机溶剂(甲醇)的消耗量约 12 mL;而本文建立的 MELC 方法在 15 min 内完成对各类激素的分析,且流动相中仅有极少量有机溶剂,完成 1 次样品分析的消耗量约 1.2 mL。由

此可见, 采用 MELC 方法可减少检测时间, 降低有机溶剂的消耗, 降低成本, 绿色环保。

2.5 线性关系及检出限

将质量浓度分别为 0.5、2.5、5、10、15、20、30 mg/L 的混合标准溶液依次进样分析, 以峰面积 y 对质量浓度 x (mg/L) 做标准方程, 结果见表 1。结果表明, 8 种激素药物分别在 0.5~30 mg/L 范围内呈线性, 相关系数 r 不小于 0.999 5, 检出限 ($SN = 3$) 为 0.04~0.07 ng

表 1 8 种激素的保留时间、线性方程、相关系数与检出限

Table 1 Retention times, linear equations, correlation coefficients (r) and limits of detection (LODs) of 8 hormones ($n = 3$)

No.	Compound	Retention time t/m in	Linear equation	r	LOD m/ng
1	Triamcinolone (曲安西龙)	3.648	$y = 22\ 813x + 7\ 899.1$	0.999 6	0.07
2	Prednisolone (泼尼松龙)	4.038	$y = 34\ 872x + 14\ 355$	0.999 6	0.04
3	Dexamethasone 17-acetate (醋酸地塞米松)	4.995	$y = 28\ 018x + 2\ 428.9$	0.999 8	0.06
4	Fluocinonide (醋酸氟轻松)	6.075	$y = 21\ 724x + 10\ 129$	0.999 5	0.06
5	Levonorgestrel (左炔诺孕酮)	7.305	$y = 34\ 783x + 4\ 600.7$	0.999 6	0.05
6	Diethylstilbestrol (己烯雌酚)	8.876	$y = 39\ 003x + 19\ 305$	0.999 6	0.04
7	Progesterone (黄体酮)	10.375	$y = 35\ 375x + 6\ 796$	0.999 6	0.05
8	Testosterone propionate (丙酸睾酮)	13.905	$y = 39\ 732x + 14\ 756$	0.999 5	0.04

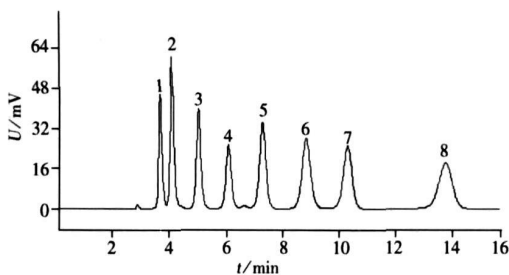


图 1 8 种激素标准品混合物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 8 hormones mixture standards experimental condition: microemulsion: 3.0% SDS-0.8% *n*-octane-6.0% *n*-butanol; Venusil ASB C₈(T) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 30 m); temperature 35 °C; flow rate 0.8 mL · min⁻¹; detection wavelength 240 nm; the peak numbers of 1-8 are the same as those described in table 1

2.6 方法的回收率与精密度

采用经测定不含有激素的化妆品样品约 0.500 g 进行加标回收率和精密度实验。分别加入低、中、高 (2、20、40 mg/kg) 3 种水平的标准混合溶液, 充分混合, 按实验方法进行提取、纯化和测定。每个加标水平平行测定 6 次。8 种甾体激素的平均加标回收率为 82%~109%, 相对标准偏差为 1.5%~5.4%, 结果见表 2。

表 2 8 种激素的加标回收率与相对标准偏差

Table 2 Recoveries and RSDs of 8 hormones ($n = 6$)

Compound	Added 2 mg · kg ⁻¹		Added 20 mg · kg ⁻¹		Added 40 mg · kg ⁻¹	
	Average recovery	RSD	Average recovery	RSD	Average recovery	RSD
	$\bar{R}/\%$	$s_r/\%$	$\bar{R}/\%$	$s_r/\%$	$\bar{R}/\%$	$s_r/\%$
Triamcinolone	90	3.8	92	4.0	92	4.3
Prednisolone	87	4.2	88	4.3	88	4.9
Dexamethasone 17-acetate	90	5.1	90	4.2	90	4.5
Fluocinonide	103	1.9	102	1.6	102	2.1
Levonorgestrel	82	5.4	84	4.0	95	3.7
Diethylstilbestrol	83	4.8	84	4.2	85	3.6
Progesterone	98	2.3	97	3.4	98	1.5
Testosterone propionate	109	3.8	107	2.2	107	2.8

2.7 样品分析

应用本方法对多种不同类别以及不同形态的化妆品共 25 件进行了 8 种激素类药物的测定。结果表明, 1 件化妆品中检出含有醋酸地塞米松, 含量为 7.8 mg/kg (见图 2)。

3 结论

建立了一种新的分离模式 MELC 对 8 种激素类药物进行分析, 通过对表面活性剂类

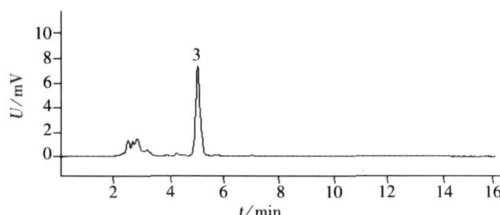


图 2 实际样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of cosmetic sample 3 dexamethasone 17-acetate, experimental conditions were the same as those in Fig. 1

型、不同键合色谱柱、不同油相以及正丁醇用量等因素的考察, 得到最佳色谱条件, 并进行了方法学考察, 结合固相萃取对化妆品试样进行检测。结果表明本方法快速、准确, 可用于外用药品及化妆品中激素添加剂的检测。

参考文献:

- [1] 郑星泉, 周淑玉, 周世伟. 化妆品卫生检验手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003 118-294
- [2] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范 [M]. 北京: 中国卫生出版社, 2007 11-34
- [3] GB7916-87 中华人民共和国化妆品卫生标准 [S].
- [4] 王超, 马强, 王星. 反相高效液相色谱法同时测定化妆品中的 16 种激素 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 654-655.
- [5] 赵珊, 吴大南, 王鹏. 高效液相色谱法同时测定化妆品中七种性激素 [J]. 色谱, 2004, 22(3): 267-269.
- [6] 王丽芳, 李琼, 姜佩华, 等. 高效液相色谱法同时测定化妆品中的 5 种性激素 [J]. 精细化工, 2008, 25(5): 279-281.
- [7] 王超, 马强, 王星, 等. 超高效液相色谱法同时测定化妆品中的 15 种激素 [J]. 色谱, 2007, 25(4): 541-545.
- [8] 王超, 马强, 王星, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中的 16 种激素 [J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1257-1262.
- [9] MARSH A, CLARK B, ALTRIA K. Oil-in-water microemulsion high performance liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals [J]. Chromatographia 2004, 59(9/10): 531-542.
- [10] MARSH A, CLARK B, ALTRIA K. Oil-in-water microemulsion LC determination of pharmaceuticals using gradient elution [J]. Chromatographia 2005, 61(11/12): 539-547.
- [11] 李宁, 黄光亮, 李玉兰, 等. 微乳液相色谱法同时测定山楂叶提取物中 4 种黄酮成分 [J]. 分析化学, 2009, 37(12): 1791-1794.
- [12] EAMON M, SHEILA D, JOE P, et al. Application of MELC and MEEKC for the analysis of paracetamol and related impurities in suppositories [J]. Chromatographia 2008, 68: 49-56.
- [13] MALENOVIC A, IVANOVIC D, MEDENICA M, et al. Influence of structural and interfacial properties of microemulsion eluent on chromatographic separation of simvastatin and its impurities [J]. J Chromatogr A, 2006, 1131(1/2): 67-73.
- [14] 贺帅, 张忠义, 张守尧. 鼻可灵喷雾剂中地塞米松磷酸钠、氧氟沙星及盐酸麻黄碱含量的微乳液相色谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 654-656.
- [15] JANCIC B, IVANOVIC D, MEDENICA M, et al. Development of liquid chromatographic method for losinopril determination in human plasma using microemulsion as eluent [J]. J Chromatogr A, 2005, 1088(1/2): 187-193.
- [16] 李宁, 侯璇珠, 杨雯, 等. 水包油型微乳液相色谱分离激素类药物的影响因素 [J]. 色谱, 2009, 27(3): 323-327.

(上接第 114 页)

- [13] YU Huazhong, ROWE A W, WAUGH D M. Templated electrochemical deposition of zirconia thin films on "recordable CDs" [J]. Anal Chem, 2002, 74(22): 5742-5747.
- [14] WANG Shuqing, YN Yin ei, LN Xiang qn. Cooperative effect of Pt nanoparticles and Fe(III) in the electrocatalytic oxidation of nitrite [J]. Electrochem Commun, 2004, 6(3): 259-262.
- [15] NISHIMURA K, OHNISHI R, KUNIMATSU K, et al. Surface species produced on Pt electrodes during HCHO oxidation in sulfuric acid solution as studied by infrared reflection-absorption spectroscopy (RRAS) and differential electrochemical mass spectroscopy (DEMS) [J]. J Electroanal Chem, 1989, 258(1): 219-225.
- [16] 杨宏洲, 邓友全. Au/PANI/GC 电极的制备及对甲醛的电催化氧化研究 [J]. 化学学报, 2002, 60(4): 569-573.