

高效液相色谱法同时检测化妆品中 7 种性激素的条件选择及简化前处理

袁金华, 黄薇, 查河霞, 宋黎军

摘要: [目的] 简化预处理步骤, 提高化妆品中 7 种性激素检测的准确度、精密度。[方法] 利用乙醇溶解超声分散离心过滤, 选择合适的色谱条件, 实现 7 种性激素的完全分离和同时检测。[结果] 实验中的预处理步骤能满足测定需要, 确定检测波长为 230nm, 选择流动相乙腈: 水 (40: 60, 体积比), 保留时间 < 30min, 7 种性激素组分完全基线分离, 能避开杂质峰的干扰。7 种性激素的工作曲线在 0.1~50.0 mg/L 的范围内呈良好的线性关系, 回归方程的相关系数 > 0.999。回收率为 84%~104%, 相对标准偏差为 1.9%~8.3%, 最低检出限 0.01~0.06 mg/L。[结论] 按照本实验预处理方法进行测定, 可实现 7 种性激素组分完全基线分离和同时测定。准确度、精密度和检出限均满足实验测定要求。

关键词: 性激素; 化妆品; 高效液相色谱法; 前处理

Simplified Pretreatment and Simultaneous Determination of Seven Sex Hormones in Cosmetics via High Performance Liquid Chromatography YUAN Jin-hua, HUANG Wei, ZHA He-xia, SONG Li-jun (Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

Abstract: [Objective] To develop a simplified pretreatment method for simultaneous concentration determination of seven hormones in cosmetics via high performance liquid chromatography (HPLC). [Methods] After a simplified pretreatment of the samples, the proper HPLC conditions were optimized. [Results] This simplified pretreatment was good enough for the measurement. An XTerra TMRP18 column was employed and a mixture of acetonitrile: aqueous (40: 60) was used as mobile phase. The measuring wavelength was 230 nm. The proper HPLC conditions were investigated for the determination of seven hormones in the linear range 0.1-50.0 mg/L (correlation coefficients greater than 0.999, and the recoveries for the seven sex hormones ranged from 84%-104% with relative standard deviations of 1.9%-8.3%. The lowest detection limits were 0.01-0.06 mg/L. [Conclusion] The method is suitable for simultaneous determination of the seven sex hormones in cosmetics with simplicity and accuracy.

Key Words: sex hormones; cosmetics; high-performance liquid chromatography; pretreatment

性激素 (sex hormone) 俗名荷尔蒙, 包括己烯雌酚、甲基睾丸酮、睾丸酮、 β -雌二醇、雌三醇、雌酮和孕酮等物质。近年来, 含性激素的化妆品不断被开发使用。研究表明: 性激素影响人体糖、脂肪、蛋白质和盐等物质的代谢^[1]; 直接作用于皮肤, 有促进毛发生长、丰乳、防止皮肤老化、除皱、增加皮肤弹性等作用。但长期使用添加性激素的化妆品会对人体产生有害作用并有致癌危险。如雌性激素化妆品已有报道致细胞癌、子宫内膜癌、乳腺癌^[2]、睾丸癌^[3]和儿童性早熟等^[4]。1987 年, 我国制订了《化妆品卫生标准》GB 7916—1987^[5], 即现行《化妆品卫生规范》(2007)^[6]的最早版本, 均明确规定: 性激素为禁用物质。因此, 开展化妆品中性激素的检测, 对控制化妆品质量、加强卫生监督和保障人体健康有重要意义。性激素的检测方法主要有免疫法^[7-9]和色谱法^[10-12]。我国《化妆品卫生规范》规定采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定 7 种性激素^[5], 此

法前处理操作繁杂; 用环己烷萃取样品, 萃取率低; 且存在杂质干扰问题; 按规范的色谱条件, 也无法分离 β -雌二醇和己烯雌酚^[13]。目前, 国内已有报道着重于样品的预处理方法和色谱条件选择^[14-15], 烦琐的预处理过程导致回收率偏低。国外有研究用 HPLC 和气质联用法分别检测性激素^[16-17], 但没有涉及化妆品样品处理方面的研究报道。本实验拟选用无水乙醇溶解样品, 经过超声分散和过滤后直接进样, 简化预处理步骤; 并选择最佳色谱柱条件, 实现 7 种性激素的良好分离和同时检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 2695 (配有 2996 光电二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司); Milli2Q2150 型超纯水器 (美国 Millipore 公司); 超声仪 (UP500H, 南京熊猫); 离心机 (TDL-40B, 上海 Anke 公司); 0.45 μ m 微孔滤膜 (上海新亚净化器件厂) 及配套注射器 (上海注射器厂)。

β -雌二醇、雌三醇、雌酮、睾丸酮、甲基睾丸酮、孕酮、己烯雌酚 (美国 Sigma 公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水乙醇 (分析纯, 南京化学试剂厂)。

[基金项目] 南京市医学重点科技发展项目 (编号: ZKX06030); 江苏省预防医学科研课题 (编号: Y2006026)

[作者简介] 袁金华 (1970-), 女, 博士, 副主任技师; 研究方向: 理化检验; E-mail: njedckitty@163.com

[作者单位] 南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210003

1.2 色谱条件

色谱柱: Waters XTerra TMRP18 柱 (3.5 μm , ϕ 4.6 mm $\times$ 150 mm); 流动相: 乙腈: 水 (体积比为 40: 60); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5.0~20.0 μL 。采用色谱峰的保留时间和紫外吸收光谱图定性, 外标法峰面积定量。

1.3 标准液的配制

分别准确称取 7 种性激素标准品各 0.10 g, 用少量甲醇 (乙醇) 溶解, 分别 (一起) 移至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 (乙醇) 稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1.00 g/L 单 (混) 标准储备液。准确移取上述各标准储备液各 10.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 (乙醇) 稀释至刻度, 配制成质量浓度为 100 mg/L 的单 (混) 标准使用液。

1.4 样品处理

分别准确称取膏状、乳膏状、凝胶状和水状化妆品试样约 1.00 g 于各支 10 mL 具塞比色管中, 敞口放置 12 h 以挥发水及有机溶剂。再用无水乙醇溶解, 超声混匀 15 min 后, 定容至刻度后, 再以 4 000 r/min 速度离心 10 min (离心半径约 7 cm), 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

2 结果

2.1 预处理过程的简化

本实验选取甲醇和乙醇两种常用溶剂分别处理化妆品样品, 并用对应的甲醇和乙醇两种标准系列进行测定。测定结果表明: 用甲醇和乙醇两种系列预处理样品, 从溶解能力及分离方面看, 二者并无明显区别, 样品未出现类似环己烷^[6, 14]的乳化现象, 均可以通过离心分层; 用对应的标准系列回归测定, 仅仅是色谱图中乙醇的溶剂峰略高于甲醇, 但性激素的测定对结果没有影响。鉴于绿色化学理念, 本实验选择无水乙醇体系进行预处理和相关测定条件的选择。

超声可以促进样品在乙醇中溶解和分散, 提高效率, 时间以 15 min 为宜。离心机限于机器性能, 取最大转速 4 000 r/min, 选择时间 10 min, 离心半径约 7 cm, 已能满足实验需要。原则上转速越大越利于离心分离。

本实验只选取了水剂、凝胶、膏剂和乳膏剂 4 种类型化妆品, 采用上述简单预处理方法均可以实现离心分离。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱的选择 与文献^[14]类似, 本实验选择 XTerra TMRP18 柱进行测定。比起普通的 C18 柱, 可适用较宽的 pH 值范围。本实验中柱粒径为 3.5 μm 。

2.2.2 检测波长的选择 在流动相 (乙腈: 水体积比为 40: 60) 等相同条件下, 7 种性激素在光电二极管阵列检测器得到 210~395 nm 范围内的光谱图, 如图 1 所示。图 1 根据 7 种性激素保留时间值从小到大分成 7 个峰, 横坐标表示波长 (nm), 纵坐标为吸光度, 即光密度 (D)。图中各峰左边数值表示对应的保留时间, 单位为 min。雌三醇 (峰 1)、 β -雌二醇 (峰 4) 和雌酮 (峰 5) 的吸收光谱相似, 吸收峰在 210 nm 和 279 nm 处; 睾酮 (峰 2)、甲基睾酮 (峰 3) 和孕酮 (峰 6) 的吸收光谱相似, 最大吸收峰在 245 nm 处; 己烯雌酚 (峰 7) 的吸收峰在 227 nm 和 240 nm 处。

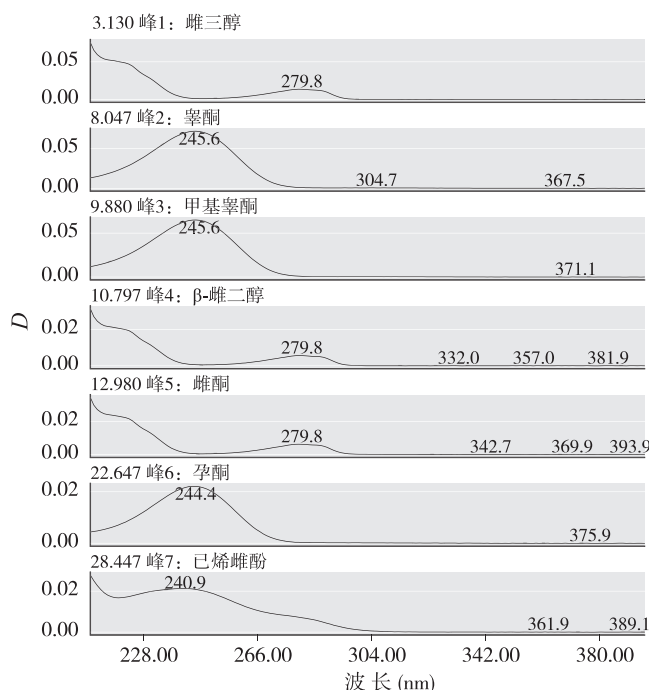


图 1 7 种性激素的紫外光谱图

7 种性激素结构图 (图 2) 显示, 孕酮、睾酮、甲基睾酮具有相同的显色基团; β -雌二醇、雌酮和雌三醇也同时具有酚基团; 己烯雌酚独具二酚结构。性激素的结构特点决定了其相应的紫外性质。

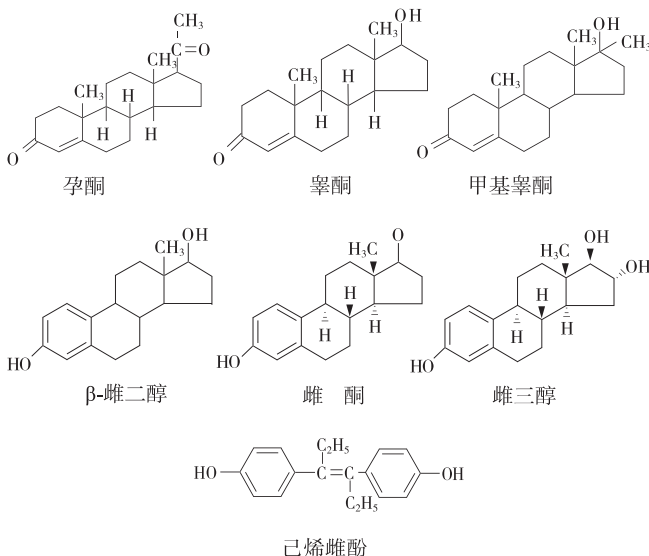


图 2 7 种性激素的结构示意图

综合 7 种性激素的紫外吸收特点, 在流动相乙腈: 水为 40: 60 条件下, 本实验分别测试了 215、220、230 nm 3 种波长, 均可以实现 7 种性激素的良好分离检测。鉴于 215、220 nm 波长范围内, 干扰因素较多, 因此选择 230 nm 作为 7 种性激素同时测定的波长。在此波长下, 等量的性激素吸收强弱顺序为: 睾酮 > 甲基睾酮 > 雌三醇 > 己烯雌酚 > 孕酮 > 雌酮 > β -雌二醇。

2.2.3 流动相的选择 采用甲醇-水体系和甲醇-乙腈-水体系做流动相, 柱压会高达 20.7 MPa 以上。选择乙腈-水体系做流动相, 可大大降低柱压。这是由乙腈的黏度小于甲醇所致。

综合各种影响因素,对流动相配比进行优化,常温下,乙腈:水=50:50时,保留时间短,但孕酮与己烯雌酚、甲基睾酮与β-雌二醇均无法分离。当选择乙腈:水=40:60时,保留时间<30 min,即可得到最佳分离效果,7种性激素组分达到基线分离并且可排除杂质峰的干扰。利用7种性激素单标分别定性,得到在本实验条件下的保留时间顺序。图3是7种性激素的分离图谱。

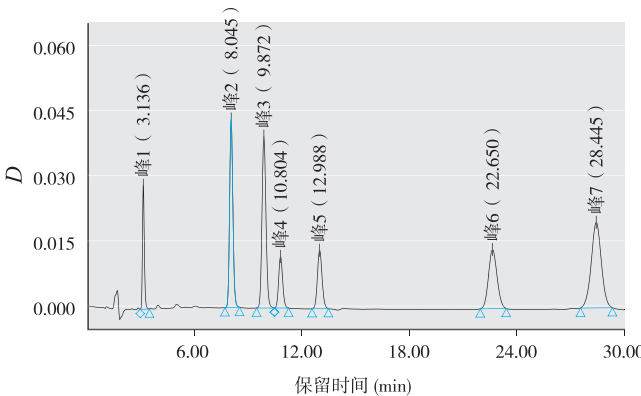


图3 7种性激素标准品混合物的色谱图

2.3 线性关系及检出限

以100 mg/L的混合标准使用液为母液,移取0.01、0.05、0.50、5.00 mL 激素混合标准液10 mL 于比色管中,用无水乙醇分别稀释至10 mL,配制成质量浓度为0.1、0.5、5.0、50.0 mg/L的混合标准溶液。进样前分别配制目标浓度为0.10、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00、25.00、50.00 mg/L的标准系列,分别取样10 μL进样。以峰面积对质量浓度绘制工作曲线,结果如表1所示:在0.1~50.0 mg/L范围内呈良好线性关系,回归方程相关系数均大于0.9990。

表1 7种性激素的工作曲线

性激素名称	回归方程	r
雌三醇	$\hat{y} = -27982 + 80285 x$	0.9996
睾酮	$\hat{y} = -85709 + 22544 x$	0.9996
甲基睾酮	$\hat{y} = -88831 + 247478 x$	0.9997
β-雌二醇	$\hat{y} = -32158 + 71012 x$	0.9997
雌酮	$\hat{y} = -34779 + 93782 x$	0.9997
孕酮	$\hat{y} = -76215 + 190519 x$	0.9994
己烯雌酚	$\hat{y} = -394551 + 347360 x$	0.9994

[注]y: 峰面积; x: 质量浓度, mg/L。

按《化妆品卫生规范》对HPLC方法检出限的定义^[5],以信噪比为3倍估算7种性激素的最低检出限范围为:睾酮和甲基睾酮0.01~0.06 mg/L,雌三醇0.02 mg/L,β-雌二醇0.04 mg/L,雌酮和孕酮0.05 mg/L,己烯雌酚0.06 mg/L。

2.4 精密度与回收率

称取凝胶剂、乳剂、膏剂类化妆品试样各约0.10 g,平行7份,1份空白本底,另6份分别加入10.00 mg/L和50.00 mg/L混合标准溶液各0.10 mL,充分混匀,放置过夜使与样品充分平衡。按照本实验方法进行预处理并测定,表2列出了不同化妆品类别添加同一浓度的精密度和回收率结果。7种性激素的相

对标准偏差为1.9%~8.3%。回收率为84%~104%。

表2 不同类别样品中7种性激素的精密度和回收率

名称	添加值 (mg/L)	样品类别	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
雌三醇	0.50	膏剂	0.49 ± 0.02	4.1	98
		凝胶类	0.46 ± 0.01	2.2	92
		乳霜剂	0.48 ± 0.01	2.1	96
睾酮	0.50	膏剂	0.49 ± 0.01	2.0	98
		凝胶类	0.46 ± 0.01	2.2	92
		乳霜剂	0.47 ± 0.02	4.8	94
甲基睾酮	0.50	膏剂	0.48 ± 0.01	2.1	96
		凝胶类	0.46 ± 0.01	2.2	92
		乳霜剂	0.49 ± 0.02	4.1	98
β-雌二醇	0.50	膏剂	0.51 ± 0.02	3.9	102
		凝胶类	0.46 ± 0.02	4.3	92
		乳霜剂	0.45 ± 0.03	6.7	90
雌酮	0.50	膏剂	0.52 ± 0.02	3.8	104
		凝胶类	0.43 ± 0.02	4.6	86
		乳霜剂	0.46 ± 0.03	6.5	92
孕酮	0.50	膏剂	0.49 ± 0.02	4.1	98
		凝胶类	0.46 ± 0.02	4.3	92
		乳霜剂	0.52 ± 0.01	1.9	104
己烯雌酚	0.50	膏剂	0.48 ± 0.04	8.3	96
		凝胶类	0.42 ± 0.02	4.8	84
		乳霜剂	0.44 ± 0.03	6.8	88

在同一样品中,分别添加2种不同浓度标准性激素,按本实验方法进行预处理和HPLC测定,加标回收率如表3所示。低浓度0.10 mg/L的添加结果,7种性激素的平均回收率为90%;0.50 mg/L标准添加的回收率为96%~104%,测定结果的准确度和精密度均符合国家标准要求^[6, 18]。

表3 不同浓度7种性激素的回收率

激素名称	添加值 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)
雌三醇	0.10	0.09	90
	0.50	0.50	100
睾酮	0.10	0.09	90
	0.50	0.49	98
甲基睾酮	0.10	0.09	90
	0.50	0.48	96
β-雌二醇	0.10	0.09	90
	0.50	0.51	102
雌酮	0.10	0.09	90
	0.50	0.52	104
孕酮	0.10	0.09	90
	0.50	0.49	98
己烯雌酚	0.10	0.09	90
	0.50	0.48	96

2.5 实际样品分析

按本实验方法市场上某些水剂、凝胶剂、乳剂、膏剂类产品进行了测定,没有发现化妆品有性激素的阳性样品。

(下转第514页)

究[J]. 农药科学与管理, 2006, 27(1): 7-9.

[2] 农业部环境质量监督检验测试中心(天津), 农业部环境保护科研监测所. NY/T 761—2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留检测方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

[3] ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, STAJHBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the

determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412-431.

[4] 李本昌. 农药残留量实用检测方法手册[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.

[5] 杨建湘, 黄超群, 熊莉莉. 烯酰吗啉原药的高效液相色谱分析[J]. 精细化工中间体, 2003, 33(4): 50-51.

(收稿日期: 2009-06-15)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

(上接第 511 页)

3 讨论

样品预处理简化后, 会有杂质在色谱柱保留。但由于保留时间不干扰 7 种性激素的测定, 因而本实验中才无须进行分离。化妆品取样量也大大减少, 节省了预处理的试剂和时间。这种简化预处理步骤大大提高了测定的准确度(84%~104%)、精密度(1.9%~8.3%), 可得到最低 0.01~0.06 mg/L 的检出限。

实验的简单预处理步骤能满足某些化妆品样品的测定需要, 在检测波长 230 nm, 乙腈: 水 = 40: 60 流动相条件下, 30 min 内即可实现 7 种性激素组分完全的基线分离, 且避开了杂质峰的干扰。其他共存物不干扰性激素的分离和测定。但育发类等基体复杂的化妆品不适于本法测定, 需要进一步实验探索, 另作讨论。

本研究结果适用于水剂、凝胶剂、乳剂、膏剂类样品的 7 种性激素的同时检测, 可以在化妆品检测分析机构推广应用, 评价化妆品的质量卫生, 保证人民群众的健康安全, 为相关检测标准的制定提供了科学依据。

参考文献:

[1] McEWEN B, AKAMA K, ALVES S, et al. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7093-7100.

[2] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 935-936.

[3] WARING RH, HARRIS RM. Endocrine disrupters: A human risk? [J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 244(112): 2-9.

[4] MASSART F, PARRINO R, SEPPIA P, et al. How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty? [J]. Minerva Pediatr, 2006, 58(3): 247-554.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB 7916—1987 化妆品卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.

[6] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[M]. 北京: 人民卫生

出版社, 2007: 220-227.

[7] 刘以训. 一种快速、可靠的性甾体激素放射免疫测定法[J]. 动物学杂志, 1982, 17(3): 42-46.

[8] 虞小芳, 翁萌炜. 保健品和化妆品中雌二醇免疫法测定溶剂的选择[J]. 浙江预防医学, 2005, 17(8): 78-79.

[9] ANDRÉ C, JACQUOT Y, TRUONG TT, et al. Analysis of the progesterone displacement of its human serum albumin binding site by beta-estradiol using biochromatographic approaches effect of two salt modifiers[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 796(2): 267-81.

[10] 黄百芬, 李晓萍, 任一平, 等. 高效液相色谱法同时测定化妆精油中的七种性激素[J]. 浙江科技学院学报, 2003, 15(增刊): 84-85.

[11] 胡伟, 黄荣斌, 陈小君, 等. 用气相色谱考察雌二醇的衍生化方法[J]. 分析测试技术与仪器, 2001, 7(1): 41-44.

[12] 吴维群, 沈朝辉, 杨玉林, 等. GC-MS 联用技术检测水性化妆品中性激素成分的方法研究[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(4): 307-309.

[13] 朱杰民, 吴西梅, 杜达安, 等. 用高效液相色谱法测定化妆品中性激素的探讨[J]. 华南预防医学, 2004, 30(4): 60-61.

[14] 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.

[15] 王骏, 胡俊明, 冯朝华. 反相高效液相色谱法测定化妆品中性激素[J]. 卫生研究, 1999, 28(1): 35-36.

[16] HONOUR JW. High-performance liquid chromatography for hormone assay[J]. Methods Mol Biol, 2006, 324: 25-52.

[17] HONOUR JW. Gas chromatography-mass spectrometry[J]. Methods Mol Biol, 2006, 324: 53-74.

[18] 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: 114-118.

(收稿日期: 2009-04-20)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)