

高效液相色谱法同时测定化妆品中七种性激素

赵 珊, 吴大南, 王 鹏

(北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

摘要 :建立了化妆品中7种性激素(雌二醇、雌三醇、雌酮、睾酮、甲基睾酮、孕酮、己烯雌酚)同时测定的高效液相色谱法。先在试样中加入20 g/L氢氧化钠溶液与油脂进行皂化反应,然后用二氯甲烷-乙酸乙酯(体积比为40:1)混合液在酸性条件下(pH 3)萃取,选择XTerra™ RP₁₈色谱柱,以水-甲醇-乙腈(体积比为50:32:18)混合液为流动相,在波长230 nm处检测。7种性激素分离良好并排除了样品中杂质峰的干扰,低、高浓度平均回收率范围为75.6%~97.8%;相对标准偏差为1.9%~7.2%;检出限为3.7~12 ng。该方法可同时简便、准确地测定化妆品中的7种性激素。

关键词 :反相高效液相色谱法;性激素;化妆品

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2004)03-0267-03

Simultaneous Determination of Seven Sexual Hormones in Cosmetics by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

ZHAO Shan, WU Danan, WANG Peng

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract : An efficient method for analyzing seven sexual hormones in cosmetics, namely, estradiol, estradiol-17 β , estrone, testosterone, methyl-testosterone, progesterone and diethylstilbestrol by reversed-phase high performance liquid chromatography was developed. Samples were saponified with 20 g/L sodium hydroxide. The sexual hormones were then extracted with dichloromethane-acetic acetate (40:1, v/v) under acidic conditions (pH 3, adjusted with 1 mol/L HCl). An XTerra™ RP₁₈ column was employed and a mixture of water-methanol-acetonitrile (50:32:18, v/v) was used as mobile phase. The seven sexual hormones were detected at 230 nm. The average spiked recoveries for the seven sexual hormones ranged from 75.6% to 97.8% with relative standard deviations of 1.9% to 7.2%. The linear ranges of determination were from 5 to 50 mg/L with correlation coefficients of 0.9999, and the limits of detection were from 3.7 to 12 ng. The method is suitable to simultaneously assay the seven sexual hormones in cosmetics with simplicity and accuracy in a single injection.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography; sexual hormones; cosmetics

雌二醇、雌三醇、雌酮、睾酮、甲基睾酮、孕酮、己烯雌酚等性激素具有促进毛发生长、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产生副作用并有致癌危险^[1]。我国化妆品卫生规范规定:雌激素类、去甲肾上腺类、孕激素等激素为禁用物质。因此,化妆品中激素的检验对控制化妆品产品质量、保障人体健康具有重要的意义。性激素的检测方法主要有免疫法和色谱法,我国化妆品卫生规范规定采用高效液相色谱法(HPLC)测定这7种性激素^[2],作者未从国

外文献中检索到相关的报道。采用该规范方法测定时,需要直接用环己烷萃取样品,易导致样品乳化,萃取率低,且存在杂质干扰测定的问题。为解决上述问题,我们对样品处理方法及HPLC测定方法进行了研究,先在样品中加入20 g/L氢氧化钠溶液与油脂进行皂化反应,再用二氯甲烷-乙酸乙酯(体积比为40:1)混合液在酸性条件下萃取7种性激素;选择XTerra™ RP₁₈色谱柱,优化流动相水-甲醇-乙腈比例,使7种性激素在等度洗脱下达到完全分离,从而有效地排除了杂质干扰,建立起一种准确、可

靠、可应用于实际样品测定的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695-2996 型高效液相色谱仪(配有光电二极管阵列检测器)(美国 Waters 公司);Milli-Q2150 型超纯水器(美国 Millipore 公司);恒温水浴,控温范围 0~100 ℃。

雌二醇、雌三醇、雌酮、睾酮、甲基睾酮、孕酮、己烯雌酚购自 Sigma 公司;甲醇、乙腈为色谱纯试剂(Fisher 公司);二氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇均为分析纯试剂。

1.2 色谱条件

色谱柱:XTerra™RP₁₈柱(5 μm, 4.6 mm i. d. × 150 mm);流动相:水-甲醇-乙腈(体积比为 50:32:18);检测波长:230 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10.0 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 0.100 g,用少量无水乙醇溶解,移至 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,配制成质量浓度为 1.00 g/L 标准储备液。准确移取上述标准储备液各 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,配制成质量浓度为 0.100 g/L 的混合标准液。

1.4 样品制备

准确称取膏状、乳状、溶液状试样约 1.00 g 于 40 mL 小烧杯中,分 3 次加入 20 g/L 氢氧化钠溶液 15 mL,充分搅拌均匀,倾入分液漏斗中,加入 100 mL 饱和氯化钠溶液,用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH ≈ 3,以 30 mL 二氯甲烷-乙酸乙酯(体积比为 40:1)混合液分 3 次萃取,每次振摇 2 min,合并萃取液,加入无水硫酸钠脱水并在 50 ℃ 水浴上蒸馏除去有机溶剂。用无水乙醇溶解残留物,转移至 10 mL 具塞比色管中,用无水乙醇定容至刻度,混匀后,经 0.45 μm 滤膜过滤后进样分析。

2 结果与讨论

2.1 萃取剂的选择

文献[2,3]中采用环己烷作萃取剂,试样中的油脂、蜡脂和表面活性剂等组分亦被提取,造成乳化,影响两相分离,且 7 种激素中雌三醇的极性较强,环己烷作萃取剂萃取率仅为 12%。本研究采取在试样中加入氢氧化钠溶液,使其与油脂进行皂化反应,经酸化后,选择一定比例的二氯甲烷和乙酸乙酯做萃取剂,并对不同比例的二氯甲烷和乙酸乙酯

做萃取剂进行了筛选,结果表明:试样经皂化后萃取可减少乳化现象,当二氯甲烷和乙酸乙酯的体积比为 40:1 时,7 种性激素的萃取效果最好,萃取率为 84.6%~98.0%。

2.2 不同 pH 值对各种激素萃取率的影响

按照实验方法,试样中加入 15 mL 20 g/L 氢氧化钠溶液进行皂化反应,然后将溶液 pH 值分别调成中性(pH ≈ 7)、酸性(pH ≈ 3)、碱性(pH ≈ 13),用二氯甲烷-乙酸乙酯(40:1)萃取。结果表明:pH 值对雌三醇的影响较大,在碱性条件下,雌三醇萃取率仅为 0.6%;中性条件下,雌三醇萃取率为 63.8%;酸性条件下,萃取率为 84.9%。由于在酸性条件下雌三醇及其他 6 种激素萃取率均为最高,本文采用在酸性条件下萃取。

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 色谱柱的选择

文献[2,3]中报道:雌三醇在 C₁₈ 柱上的保留时间为 2~3 min。在实际样品测定时,雌三醇常常被干扰,因而不易准确定量。为了延长雌三醇的保留时间,我们选择 XTerra™RP₁₈ 柱与普通 C₁₈ 柱进行了比较,在相同流动相洗脱条件下,雌三醇在 XTerra™RP₁₈ 柱上保留时间比普通 C₁₈ 柱可延长约 2 min,有利于消除杂质峰的干扰。

2.3.2 流动相的选择

采用甲醇-水洗脱比乙腈-水洗脱有助于雌三醇在色谱柱上的保留,但仅用甲醇-水做流动相,甲基睾酮与雌二醇的色谱峰出现重叠;加入一定比例的乙腈,可使甲基睾酮与雌二醇的色谱峰分离;若加入一定量的四氢呋喃,也可以改善组分的分离,但是基线噪声明显增加,检测灵敏度降低。综合各种影响因素,对流动相比进行优化,常温下,当流动相为水-甲醇-乙腈(体积比为 50:32:18)时,7 种性激素组分达到基线分离并且排除了杂质峰的干扰。图 1

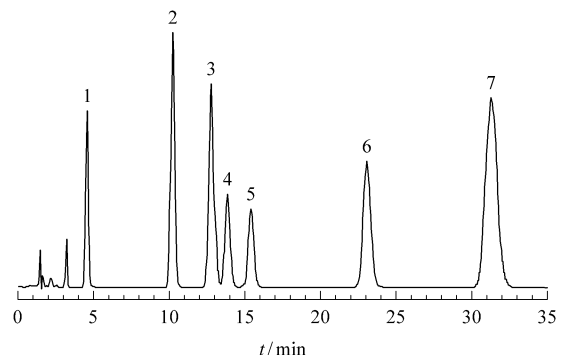


图 1 7 种性激素标准品混合物的色谱图

Fig.1 Chromatogram of a mixture of seven sexual hormone standards

1. estriol; 2. testosterone; 3. methyl-testosterone; 4. estradiol-17β; 5. estrone; 6. progesterone; 7. diethylstilbestrol.

是 7 种性激素的分离图谱。

2.3.3 检测波长的选择

从光电二极管阵列检测器所得到的 200 ~ 400 nm 这一范围内 7 种性激素的光谱图来看,睾酮、甲基睾酮、孕酮的吸收光谱相似,最大吸收峰在 245 nm 处;雌三醇、雌二醇、雌酮的吸收光谱相似,吸收峰在 210 和 279 nm 处;己烯雌酚的吸收峰在 227.5 nm 处。当 7 种性激素同时测定时,7 种激素较为灵敏的波长为 230 nm,因此选择 230 nm 作为 7 种性激素同时测定的波长。

2.4 线性关系及检出限

移取 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 激素混合标准液于 10 mL 比色管中,用无水乙醇稀释至 10 mL,配制成质量浓度为 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L 的混合标准溶液,以峰面积对质量浓度绘制工作曲线;按化妆品卫生规范对 HPLC 方法检出限的定义,以信噪比为 3 估算检出限^[2],其结果见表 1。

表 1 7 种性激素的工作曲线

Table 1 Calibration curve of seven sexual hormones

Component	Regression equation ¹⁾	r	LOD ²⁾ /ng
Estriol	$y = 8.65 \times 10^3 x + 4.28$	0.999 9	4.7
Testosterone	$y = 1.95 \times 10^4 x + 5.74 \times 10^3$	0.999 9	3.7
Methyl-testosterone	$y = 1.88 \times 10^4 x - 1.75 \times 10^3$	0.999 9	4.7
Estradiol-17 β	$y = 9.46 \times 10^3 x - 5.85 \times 10^3$	0.999 9	11
Estrone	$y = 8.76 \times 10^3 x - 1.40 \times 10^4$	0.999 9	12
Progesterone	$y = 1.86 \times 10^4 x - 1.40 \times 10^4$	0.999 9	7.3
Diethylstilbestrol	$y = 4.46 \times 10^4 x - 2.62 \times 10^5$	0.999 9	4.4

1) y : peak area; x : mass concentration, mg/L.

2) LOD: limit of detection.

2.5 回收率与精密度

称取美乳霜试样约 1.00 g,平行 7 份,分别加入低、高两种浓度标准混合溶液,充分混匀,按照本实验方法进行测定,7 种性激素的平均回收率为 75.6% ~ 97.8%,相对标准偏差为 1.9% ~ 7.2%,结果见表 2。

2.6 样品分析

按本方法测定去皱、生发、丰乳、瘦身类样品共 24 件,个别样品筛检出雌性激素孕激素,未发现干扰。样品分离色谱图如图 2 所示。

表 2 7 种性激素回收率及精密度测定结果 (n=7)

Table 2 Results of precision and recovery test for seven sexual hormone (n=7)

Component	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Estriol	5.0	3.78	75.6	3.7
	50	42.30	84.6	4.6
Restosterone	5.0	4.87	97.4	6.7
	50	47.78	95.6	2.2
Methyl-testosterone	5.0	4.88	97.6	3.0
	50	47.90	95.8	2.6
Estradiol-17 β	5.0	4.71	94.2	7.2
	50	47.28	94.6	1.9
Estrone	5.0	4.89	97.8	3.5
	50	48.47	96.9	2.0
Progesterone	5.0	4.70	94.0	3.8
	50	46.59	93.2	1.9
Diethylstilbestrol	5.0	4.30	86.0	3.2
	50	48.87	97.7	4.7

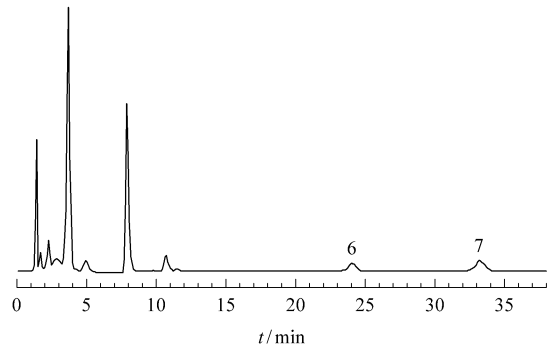


图 2 样品分离色谱图

Fig.2 The chromatogram of a sample
6. progesterone; 7. diethylstilbestrol.

参考文献:

- [1] Zheng Xingquan. Hygienic Testing for Cosmetics. Tianjin: Tianjin University Press (郑星泉. 化妆品卫生检验. 天津: 天津大学出版社), 1994. 219
- [2] Hygienic Standard for Cosmetics. Beijing: The Ministry of Health of P. R. China (化妆品卫生规范. 北京: 中华人民共和国卫生部), 2002. 197
- [3] Wang Jun, Hu Junming, Feng Chaohua. Journal of Hygiene Research (王 骏, 胡俊明, 冯朝华. 卫生研究), 1999, 28 (1): 35