

高效液相色谱法测定化妆品中 11a-孕酮和 11a-孕酮醋酸盐

王丁林*, 顾宇翔

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: 目的 建立凝胶渗透色谱净化液相色谱法检测 11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐二种激素的分析方法, 为市场监管和企业质量控制提供技术支撑。**方法** 样品经乙酸乙酯提取, 使用乙酸乙酯: 正己烷=1:1 作为淋洗液, 经凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)净化, 收集 12~20 min 淋洗液, 淋洗液经旋转蒸发旋得到待测净化液。采用乙腈: 水=45:55 作为流动相、C18(250×4.6 mm)色谱柱进行分离、二级管阵列检测器对最大吸收波长为 245 nm 的 11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐两种激素进行同时测定。**结果** 该方法线性相关系数在 0.995 以上, 三种代表性化妆品加标回收率分别为 90.0%~102.6%、85.1~102.7%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.7%~2.5%、0.1%~8.7%, 方法检出限分别为 0.3 mg/kg、0.6 mg/kg, 定量限分别为 1.0 mg/kg、2.0 mg/kg。**结论** 该方法操作简单、定性可靠、定量准确, 可用于化妆品中禁用激素 11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 11a-孕酮; 11a-孕酮醋酸盐; 化妆品

Determination of 11a-progesterone and 11a-progesterone acetate in cosmetics by high performance liquid chromatography method

WANG Ding-Lin*, GU Yu-Xiang

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To study the detection method of 11a-progesterone and 11a-progesterone acetate by gel permeation chromatography and liquid chromatography, and to provide technical support for market supervision and enterprise quality control. **Methods** Samples are extracted by ethyl acetate; use 1:1 ethyl acetate: hexane as eluent; purify by gel permeation chromatography (GPC) method; collect the eluent for 12~20 min; obtain the purified solution from eluent by rotary evaporation; wait for the determination of liquid chromatography. Use 45:55 acetonitrile: water as mobile phase; use C18 (250×4.6 mm) chromatographic column for separation; use photo diode array detector for the determination of 11a-progesterone and 11a-progesterone acetate at 245 nm. **Results** The linear correlation coefficient of this method is above 0.995, the recovery rate is 90.0%~102.6% and 85.1~102.7%, the relative standard deviation (RSD) is 0.7%~2.5% and 0.1%~8.7%, the limit of detection is 0.3 mg/kg and 0.6 mg/kg, and the limit of quantification is 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg. **Conclusion** The method is simple, reliable and accurate, and can be used for the determination of 11a-progesterone acetate and 11a-progesterone acetate in cosmetics.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; 11a-progesterone; 11a-progesterone acetate; cosmetics

*通信作者: 王丁林, 硕士, 高级工程师, 主要从事食品、化妆品检测技术及标准化研究。E-mail: wangdl@sqi.org.cn

*Corresponding author: WANG Ding-Lin, Master, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: wangdl@sqi.org.cn

0 引言

化妆品中含有的某些特殊成分如雌性激素类物质,长期使用可能会出现女性月经不调、皮肤暗沉、情绪不稳定等不良反应^[1]。化妆品作为与人体健康密切相关的产品,其安全性受到消费者、生产企业和政府监管部门的高度重视,为此,欧盟、美国、日本等发达国家政府都颁布了各自的化妆品管理法规,我国也颁布了相应的管理法规^[2]。欧盟化妆品法规以及我国国家食品药品监督管理总局在2015年颁布的《化妆品安全技术规范》把孕激素类和具有雄激素效应的物质列入化妆品禁用组分列表,其相应的激素检测方法只有雌三醇、雌酮、己烯雌酚、雌二醇、睾酮、甲基睾酮、黄体酮7个组分,其他孕激素类和具有雄激素效应的物质目前尚无相应的检测方法。据文献报道化妆品中禁用激素的测定方法有薄层色谱法^[3-4]、气相色谱-质谱联用法^[2-5]、液相色谱法^[6-8]、液相色谱-串联质谱法^[9-18]等,只有液质联用法涉及11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐,其他方法未涉及到。因此本研究对此二种激素开展凝胶渗透色谱净化液相色谱法检测的研究,能进一步完善化妆品中禁用激素的检测方法,对于我国化妆品中激素的市场监管与企业质量控制以及保护广大消费者的健康与安全具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

高效液相色谱仪带二极管阵列检测器(美国 WATERS, 2695-2998),全自动凝胶净化系统(德国 LCTECH, FREE STYLE),大容量离心机(德国 Eppendorf, Centrifuge 5804),旋转蒸发器(德国 Heidolph, ML/HB/G3),固相萃取仪(SUPELCO VISIPREP DL-24),程序干浴氮吹仪(冠森生物科技(上海)有限公司 KS-PBC-B2),旋涡振荡器(美国 Scientific Industries VORTEX-2),超纯水器(美国 Millipore Advantage A10)。

标准品:11a-孕酮购自 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度>97.5%;11a-孕酮醋酸盐均购自 TCI 公司,纯度>98.0%。

乙腈、乙酸乙酯、环己烷、甲醇均为色谱纯试剂,50 mmol/L 磷酸溶液,30%甲醇淋洗液。

1.2 实验方法

称取1.0 g样品,加5 mL 50 mol/L 磷酸溶液,加20 mL 乙酸乙酯,充分混匀。然后以8000 r/min离心5 min,取出上层乙酸乙酯,再重复提取2次,合并上层乙酸乙酯并旋转蒸发至干。在鸡心瓶中加入10 mL 乙酸乙酯-环己烷

(V/V=1:1)溶解。

1.3 凝胶渗透色谱(GPC)净化

淋洗液:乙酸乙酯-环己烷=1:1;流速:5 mL/min;淋洗程序:12 min前弃去,12~20 min收集,20~30 min进行清洗。

收集到的淋洗液经旋转蒸发至近干,用2 mL 30%的甲醇溶液溶解备用。

1.4 色谱参数

采用C18(250×4.6 mm)色谱柱,柱温25°C,流速1.0 mL/min,进样量为10 μL,流动相为乙腈:水=45:55

2 结果与分析

2.1 净化

凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)可以有效去除样品中的大分子物质和小分子杂质,在样品中加入100 μg二种激素标样,按照上述条件进行GPC淋洗,淋洗液经浓缩用流动相定容测定结果见图1。

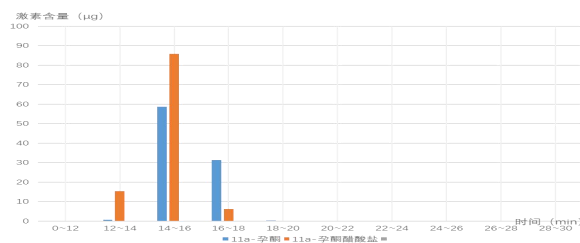


图1 GPC净化分段收集液中二种激素含量结果
Fig.1 Results of two hormone contents in GPC purified segment collection solution

从图1中数据可以看出,11a-孕酮分段收集时间在12~20 min;11a-孕酮醋酸盐分段收集时间在12~18 min。因此二个组分的收集时间确定为12~20 min。

2.2 仪器参数条件的优化

2.2.1 检测波长的选择

对二种被测组分在190~400 nm的范围内进行扫描,得到二组分的紫外吸收光谱图,见图2。11a-孕酮的最大紫外特征吸收波长为244.0 nm,11a-孕酮醋酸盐的最大紫外特征吸收波长为242.8 nm。从二极管阵列检测器从190-400 nm扫描的结果看,11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐在245 nm附近有一个最大紫外吸收波长。因此可选择245 nm作为11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐检测时的波长。

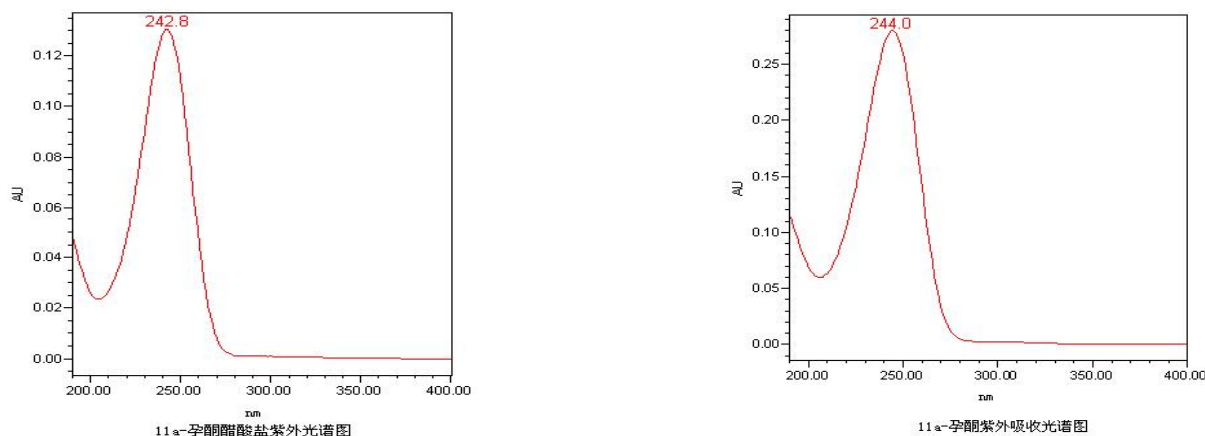


图 2 二种激素的紫外吸收光谱图

Fig.2 UV-absorption spectra of two hormones

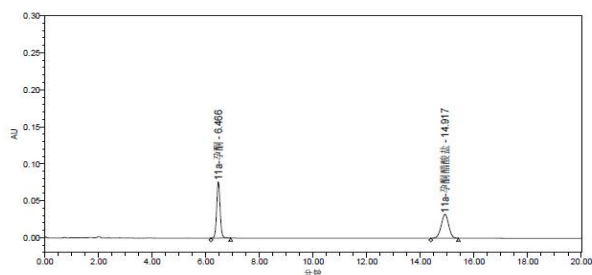


图 3 11 α -孕酮和 11 α -孕酮醋酸盐标样的色谱图(245 nm)

Fig.3 Chromatogram of 11 α -progesterone and 11 α -progesterone acetate reference (245 nm)

2.2.2 流动相的选择

分别选择了甲醇、水为流动相, 乙腈、水为流动相进

行试验, 实验结果表明当流动相为甲醇、水为流动相, 作为检测 11 α -孕酮、11 α -孕酮醋酸盐基线影响不大, 而对 17 α -羟基孕烯醇酮的基线影响较大。选择了乙腈、水为流动相作为二种激素检测的流动相并对流动相比列进行研究。乙腈: 水=45:55 的流动相可在 20 min 内将二种激素有效分离。用标样进行试验得到的色谱图见图 3。

2.3 标准曲线及检出限

取适量的混合标准溶液于 10 mL 容量瓶中分别配置成浓度为 0、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液, 用甲醇定容。各取 10 μL 分别按上述色谱条件进行测定, 分别得到二种激素组分的质量浓度 x ($\mu\text{g/mL}$) 与峰面积 y 之间的标准工作曲线, 根据检出限的定义, 以信噪比 $S/N=3$ 为样品的检出限, $S/N=10$ 为样品的定量限, 结果见表 1。

表 1 化妆品二种激素的标准曲线及检出限

Table 1 Standard curves and LOD of sexual hormones in cosmetics

激素名称	标准工作曲线	相关系数(r)	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
11 α -孕酮	$y = 30802x + 1715$	0.9999	0.3	1.0
11 α -孕酮醋酸盐	$y = 27854x + 5090$	0.9999	0.6	2.0

2.4 加标回收率

取膏霜、润肤乳液、化妆水三个空白样品, 分别在其中添加 5.0 mg/kg、25.0 mg/kg 和 100.0 mg/kg 的激素。每个浓度各制备六个平行样品, 用前面方法中的预处理方法

进行预处理, 在高效液相色谱仪上进样, 测得加入的各激素的含量。三种代表性化妆品中 11 α -孕酮和 11 α -孕酮醋酸盐的加标回收率分别为 90.0 ~ 102.6%、85.1 ~ 102.7%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.7 ~ 2.5%、0.1 ~ 8.7%, 详见表 2。

表 2 化妆品中二种激素的回收率

Table 2 Recoveries of hormones in cosmetics

激素名称	添加量(mg/kg)	膏霜		润肤乳液		化妆水	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
11 α -孕酮	5.0	100.9	1.1	100.3	0.8	100.3	2.5

	25.0	102.6	1.6	92.5	0.7	96.4	0.8
	100.0	100.3	0.7	102.5	1.7	90.0	0.9
	5.0	98.3	1.9	85.2	7.8	85.1	8.7
11a-孕酮醋酸盐	25.0	101.6	0.1	102.0	1.8	97.6	1.2
	100.0	99.6	0.6	102.7	1.4	89.3	1.0

3 讨论与结论

本研究建立了化妆品中 11a-孕酮、11a-孕酮醋酸盐二种激素的高效液相色谱法测定其含量的检测方法。实验中采用乙酸乙酯作为提取溶剂,采用凝胶渗透色谱(GPC)对其进行净化处理,并对净化后的溶液进行浓缩,方法的回收率高、提高了目标化合物的检出限;净化浓缩后提取液采用 C18 反相色谱柱分离,以乙腈-水(45:55)作为流动相,245 nm 特征紫外吸收波长作为定量检测波长,在较短的时间内成功分离并测定了二种激素的含量。本方法快速、分离度高,不存在样品基质干扰和溶剂干扰,样品回收率高,线性范围为 0~100 mg/L,最低检出限分别为 0.3 mg/kg、0.6 mg/kg,定量检出限分别为 1.0 mg/kg、1.0 mg/kg,一般激素在化妆品中添加量较高时才具有一定的效果,虽然本法检出限比液质联用法高,但不会影响违法添加化妆品中二种激素含量的检测。

参考文献

- [1] 李朝晖, 陈玉清, 贾雨祥, 等. 化妆品激素成分检验技术探析. 质量与市场[J]. 2022, 增刊, 61-63.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 《化妆品安全技术规范》[M]. 2015 年 11 月.
- [3] LUIGI GAGLIARDI A, DANIELA DE O, *et al.* Development of a tandem thin-layer chromatography high performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 457: 187-198.
- [4] 王敏荣, 单琴. 薄层层析法检测化妆品中部分雌性激素 [J]. *中国公共卫生*, 1997, 13(12): 749-750.
- [5] 吴维群, 沈朝焯等. 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.
- [6] 王小芳, 曾文芳, 王菁, 任韧. 高效液相色谱-二极管阵列荧光检测器串联法同时测定精油中的七种性激素[J]. *色谱* 2009, 27(3): 328-332.
- [7] 黄百芬, 李晓萍, 等. 高效液相色谱法同时测定化妆精油中的七种性激素[J]. *浙江科技学报*, 2003, 15 SO (11): 84-86.
- [8] WEN Y, WANG Y, ZHOU BS, *et al.* Determination of Sexual Hormones in Liquid Cosmetics by Polymer Monolith Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(5): 681-684.
- [9] 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.
- [10] KUSHNIR MM, ROCKWOOD AL, ROBERTS WL, *et al.* Development and Performance Evaluation of a Tandem Mass Spectrometry Assay for 4 Adrenal Steroids [J]. *Clinical Chemistry*, 2006, 52(8): 1559-1567.
- [11] 吴西梅, 朱杰民. 化妆品中雄激素的高效液相色谱-质谱鉴定[J]. *环境与健康杂志*, 2005, 22(6): 473-47.
- [12] 吴鸳鸯, 王任, 陈岑. QuEChERS 结合液质联用法同时测定化妆品中 6 种孕激素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(13), 1554-1557.
- [13] 陈溪, 张晓林, 刘莹, 等. 液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 22 种激素 [J]. *理化检验 - 化学分册*, 2013, 49(4), 468-472,476.
- [15] 崔晗, 深葆真, 陈溪. 凝胶渗透色谱-液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中 15 种糖皮质激素和性激素[J]. *日用化学工业*, 2014, 44(5), 295-298.
- [16] 陈蓉, 汪鑫. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定膏霜类化妆品中的 17 种激素[J]. *中国药师*, 2019, 22(5), 936-938.
- [17] 高瑞芳, 李翔, 赵倩茹, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定化妆品中 29 种雌性激素[J]. *香精香料化妆品*, 2022, 4,49-53,70.
- [18] 丁宁, 董亚蕾, 张秋. UHPLC-MS_MS 法同时测定祛痘类化妆品中 63 种激素类药物[J]. *日用化学品科学*, 2022, 45(8), 11-16,39.

(责任编辑: 吴华)

作者简介



王丁林, 硕士, 高级工程师, 主要从事食品、化妆品检测技术及标准化研究。
E-mail: wangdl@sqi.org.cn