

Nexera LC-40 双进样液相分析系统 应用文集



前言

现代高效液相色谱具有工作自动化、高通量、高灵敏度等特点，越来越多的应用于食品、化药、中药、化妆品等行业的多成分多指标分析；但在实际样品分析中，也面临着一些挑战；比如在功能性食品研究中，对活性成分（氨基酸、有机酸、脂质、糖等）综合分析是必要的，而不是简单地关注一个化合物组；中药中活性成分（黄酮类、糖苷类等）综合功效研究，就需制定多物质质控指标；化妆品中同类物质（染发剂、防腐剂、着色剂等）也倾向形成多物质同时筛查分析，还有化药行业中主成分含量与有关物质同时分析等需求；这些活性成分或者同种类物质组分，其化合物极性差别都较大，色谱行为表现各异，都对现有的常规液相色谱提出更高要求。

作为全球知名的分析仪器综合生产厂商，岛津已经进入中国市场超过 30 年。公司一直以提供“科学解决方案”为使命，秉承“以科学技术为社会做贡献”的宗旨，不断引领突破性创新，满足各检测行业的技术需求。自 1969 年推出第一台 GPC 色谱分析仪以来，岛津相继推出了 LC-20A、LC-30A、i-Series、LC-40 等多款仪器类型，仪器的改进升级使得色谱数据质量不断提高，并对各个行业领域的液相色谱分析带来更有价值的影响。经过近半个世纪的 LC 技术经验沉淀，全新的 Nexera LC-40 系列液相色谱仪与人工智能和物联网结合，将在智能化、高效化和自动化领域引领全新的行业标准。而基于 Nexera LC-40 系列液相色谱仪搭建而成的双进样液相分析系统，不仅仅具备 LC-40 系列液相的工作自动化、高通量、高灵敏度、极低残留、分析速度快、良好的重复性和线性等特点，而且借助独特双进样口式自动进样器，平行双流路设计，可实现同时取样，同时运行两个分析流路，大大提高了分析效率和仪器投资利用率；此外，平行双流路的设计可以实现多元系统配置、多检测器类型的自由组合，为满足化学性质差异较大的多组分化合物同时分析提供助力。

Nexera LC-40 双进样液相分析系统具备卓越的仪器性能，岛津中国分析中心现已利用此款液相色谱仪进行了化妆品、医药和食品行业领域的特色应用数据开发，形成《Nexera LC-40 双进样液相分析系统应用文集》。本应用文集以化妆品行业行业应用为主，同时涵盖了中药配方颗粒、化药、食品等行业应用，收录了 12 篇应用报告，供相关行业从业人员参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 Nexera LC-40 双进样液相分析系统简介	1
1.1 背景	1
1.2 仪器介绍	2
仪器配置	2
软件设置	3
1.3 仪器特点	5
1.4 应用领域	7
第 2 章 双进样液相分析系统应用方案	8
2.1 化妆品行业的应用	8
化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的测定	9
化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的测定	16
化妆品中甲基异噻唑啉酮等 23 个组分和吡硫鎓锌等 18 个组分测定	22
化妆品中 CI 10020 等 11 种原料和 CI 11920 等 13 种原料的测定	30
化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的测定	37
2.2 中药配方颗粒中的应用	42
四季青配方颗粒指标成分含量的测定	43
巴戟天配方颗粒特征图谱分析	48
2.3 化药行业的应用	53
药品纯度试验与定量试验的同时分析	54
阿托伐他汀钙含量及其有关物质的同时测定	58
2.4 食品行业的应用	64
食品中 7 种有机酸含量的测定	65
发酵过程中有机酸和糖类物质含量的同时监测	71
鱼肉中与 ATP 有关的物质、组胺和氨基酸的分析	78
附录 检测项目和双进样系统仪器配置一览表	86

第 1 章 Nexera LC-40 双进样液相分析系统简介

1.1 背景

我们熟知的传统液相色谱仪（HPLC）基本构成是系统控制器、输液泵（二元或四元）、脱气机、自动进样器（单进样口）、柱温箱、检测器等组件组成；基本原理是通过输液泵将储液瓶中流动相带入色谱系统，一个被测样品经自动进样器注入，并随流动相通过色谱柱，色谱柱分离后进入检测器检测，检测信号由数据处理设备采集与处理，并记录色谱图；由此可知传统 HPLC 系统通常只有一个流路系统，一次分析一个样品。传统 HPLC 系统经过半个世纪的发展，已经广泛应用于医药、食品、化妆品、饲料、生物药、金属铸造、纺织、造纸等很多行业；但根据其硬件设计及其原理，面对日益增加的多样品、多组分的应用分析需求，传统 HPLC 系统（单流路涉及）的工作效率问题就会凸显出来。比如在化妆品、食品、化药、中药等行业常常使用液相色谱法来对样品进行多成分多指标分析，像功能食品中氨基酸、有机酸、脂质、糖等活性成分，中药中活性成分黄酮类、糖苷类等成分，但是这些活性成分的化合物极性差别都较大，色谱行为表现各异，无法合并为一个液相方法来测试，现普遍采用建立多个液相分析方法，分开测试；若使用传统 HPLC（单流路设计）分析，需对同一样品多次分析，分析时间长，影响分析效率；还有化妆品中染发剂、着色剂等化合物测试，对样品保存时间有要求（24 小时或 48 小时），因为这些目标物物质易发生降解，分析时间过长定量结果准确性也会受到影响。

为解决这些实际样品在传统 HPLC 在检测中遇到的瓶颈，岛津推出了 Nexera LC-40 双进样液相分析系统，该系统是基于 Nexera LC-40 高效液相色谱仪搭建的双进样液相系统，具有两套独立的液相流路，可以同时运行两个液相方法；可应对多组分化合物同时分析、多项目同时开展的需求。此外，Nexera LC-40 液相色谱仪是岛津新一代液相色谱系统，可将人工智能整合到仪器设备中，可以实现自动检测仪器故障、自动分析等功能，同时通过物联网（IoT）与仪器设备进行网络化集成，将实验室管理变的更加直观、更加简单；人工智能和物联网完美结合，使 Nexera LC-40 系列的双进样液相分析系统具备智能化、高效化和自动化等优势。

1.2 仪器介绍

Nexera LC-40 双进样液相分析系统是基于 Nexera LC-40 系列液相色谱，通过独特的自动进样器双进样口设计，可实现取样后分别注入两个独立流路中，同时运行两个分析过程，大大提高了分析效率和仪器投资利用率。

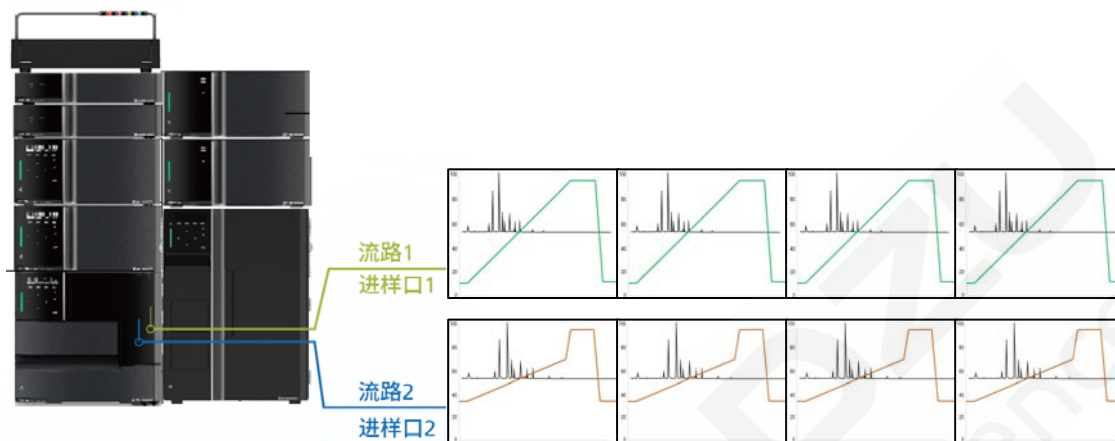


图 1 Nexera LC-40 双进样液相分析系统

仪器配置

双进样系统的工作模式相当于两套独立的液相色谱仪，但是硬件配置相比两套液相，节省一台 CBM-40、一台 SIL-40C XR、一台 CTO-40C；以及一套 Labsolutions 软件。该系统可实现一机多用，既可以作为双进样系统运行，又可以选择常规液相系统来使用，无须改动硬件管路。

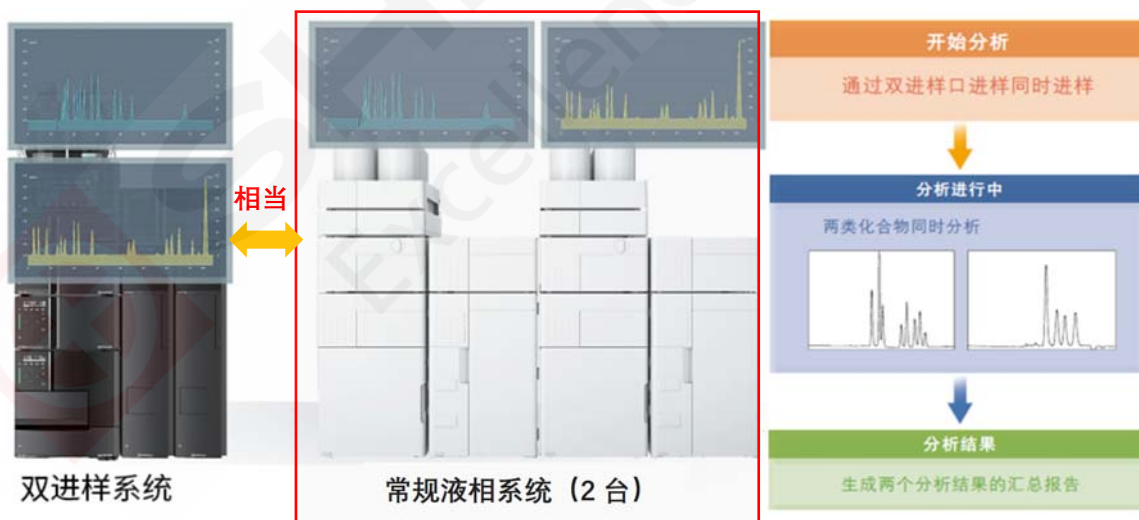
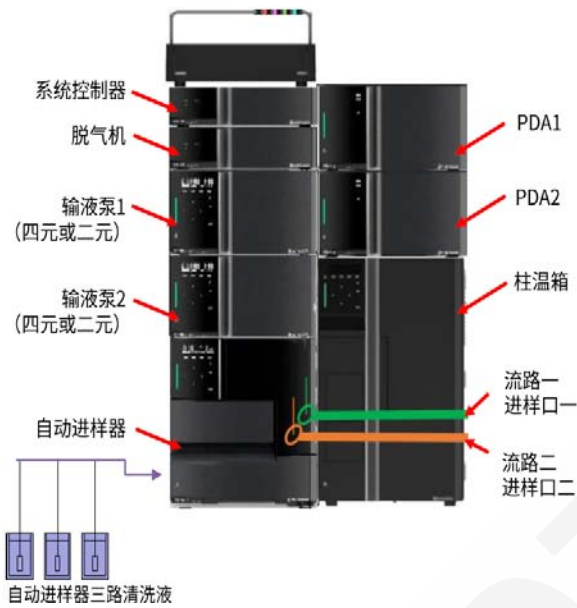
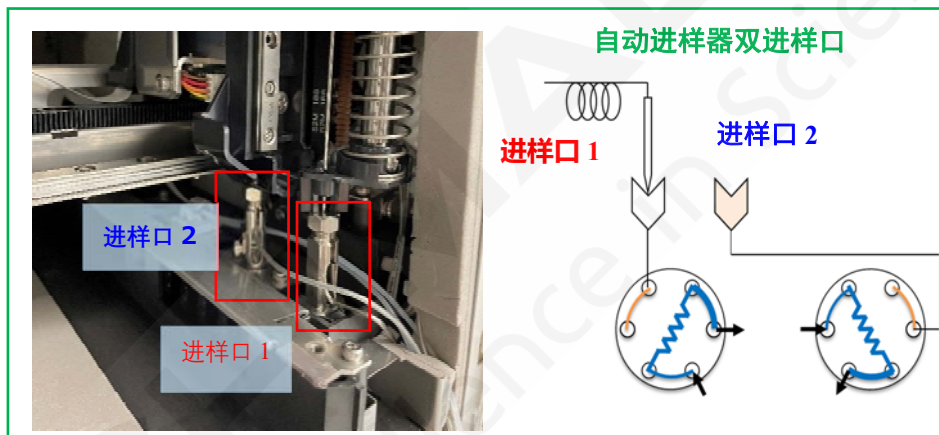


图 2 Nexera LC-40 双进样液相分析系统的工作原理图

- ◆ 具体的仪器硬件配置如下：



- ◆ SIL-40 自动进样器采用双进样口设计，可以同时进样分析。



软件设置

该系统只需使用一个 Labsolutions 软件即可进行两条流路的方法编辑以及数据采集。

1> 两个流路的梯度程序设定

流路 1 是四元系统，运行第一组方法；流路 2 是二元系统，运行第二组方法。





图 3 双进样液相色谱的梯度设置界面

2> 自动进样器的双进口与批处理表设置

分析	样品瓶号	样品瓶架	进样体积	样品瓶号 (端口)	样品瓶架	进样体积	样品名	样品ID	样品类型	方法文件	数据文件
1	20	1		1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
2	20	1		1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
3	1	1		19	1	5	G1+G2	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
4	1	1		10	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
5	1	1		2	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
6	1	1		2	1	1	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
7	1	1		19	1	5	G1+G2	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
8	1	1		19	1	5	G1+G2	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
9	1	1		2	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
10	1	1		2	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
11	1	1		2	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)
12	1	1		2	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	S11-碳氢化合物自VLC方法-3.1cm	(自动命名文件)

图 4 双进样液相色谱工作站中自动进样器与批处理的设置

1.3 仪器特点

特点一：倍速高通、效率提升

平行双流路、双进样口设计，相当于两台独立液相系统同时运行，大大提升分析效率。



备注：案例引用岛津应用报告《化妆品中32种染发剂》中数据

特点二：一机多用、自由切换

- ✚ 两个独立液相流路，既可以同时使用，也可以单独使用；
- ✚ 可自由选择四元或二元系统 比如：四元系统+二元系统、双四元系统、双二元系统；
- ✚ 可自由搭配检测器，比如：PDA+PDA、PDA+UV、PDA+ELSD 等搭配；



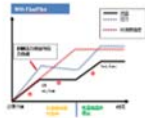
特点三：智能主控、精灵守护

基于 Nexera LC-40 系列液相优异的硬件性能；各大精灵守护，智能解析复杂液相数据。

- ✚ LC-40 系列输液泵具有超高的流速精密度，
- ✚ SIL-40 自动进样器能够实现超低的交叉污染，
- ✚ SPD-M40A 检测器使用了三重控温技术，使得仪器具有出色的稳定性。



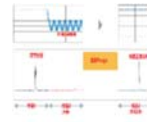
流动相精灵



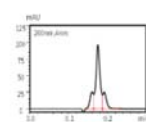
流速控制精灵



诊断精灵



修复精灵



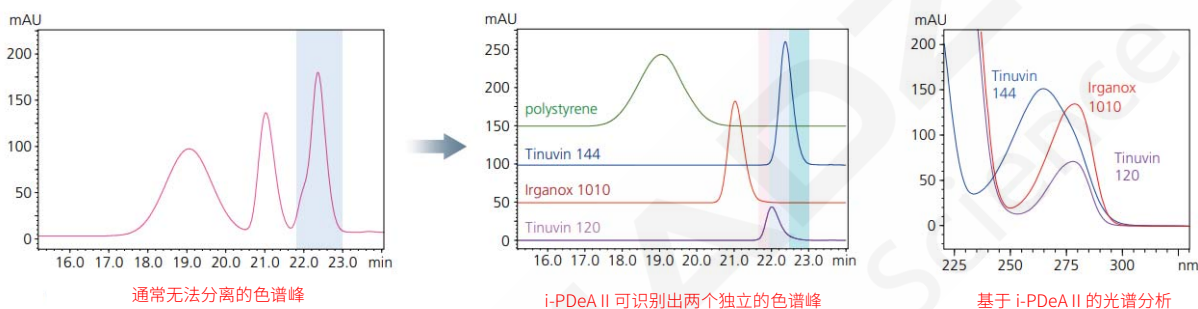
谱峰解析精灵

特点四：支持智能分析功能



i-PDeA II 智能峰解卷积功能

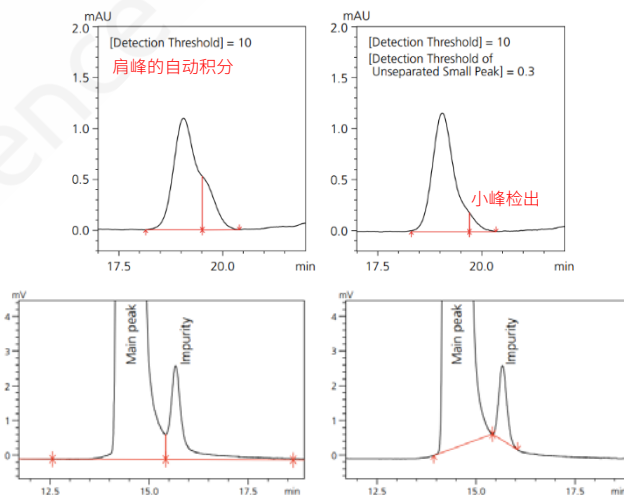
智能峰解卷积功能“i-PDeA II”，不仅能对色谱柱未完全分离的峰进行定性定量，还可用于对象峰的纯度。通过简单地设定 Labsolutions 中的时间和波长参数来实现色谱峰分离。



i-PeakFinder 智能峰积分功能

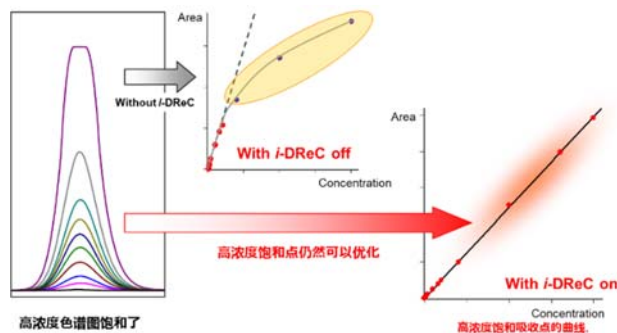
在噪音较高的色谱图中，i-PeakFinder 也可以自动识别色谱峰，并考虑基线漂移等因素获得的更高积分精度。通过调整 i-PeakFinder 的参数，例如峰值检测阈值等，则可检出更低强度的色谱峰。

共流出的分割通过手动设置共流出峰的基线是非常耗时的，并且不同的习惯或要求可能会得到不同的结果，通过调整 i-PeakFinder 的参数，可在不同情况下获得结果一致的基线。



i-DReC 智能动态量程扩展功能

i-DReC 是一种可以显著地扩展线性范围的新分析方法，其可以在不稀释高浓度化合物的情况进行分析，并确保正确的校准曲线。



1.4 应用领域

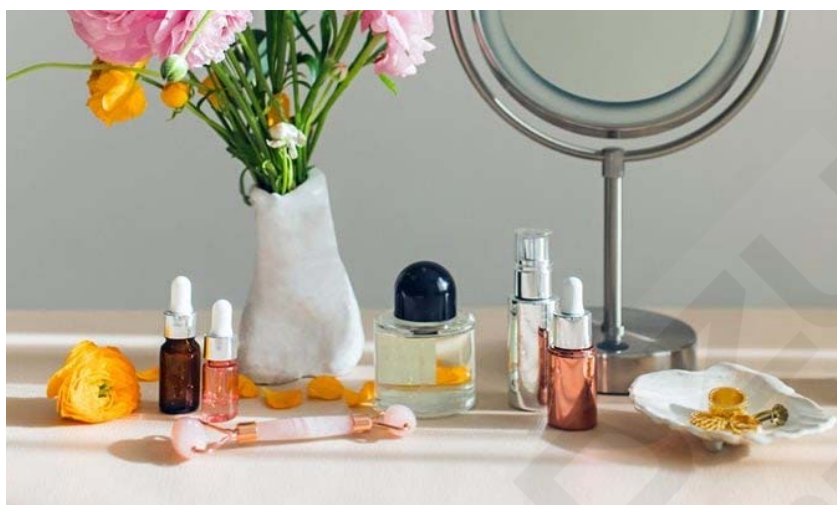
基于 Nexera LC-40 系列液相色谱系统搭建的双进样液相分析系统，具有双进样口设计、平行双流路、输液泵与检测器的自由搭配等优势，有效提升分析效率，节省时间。可应用于以下领域：

- ◇ **化妆品分析：**分析化妆品中染发剂、防晒剂等限用、准用成分，或化妆品原料具有美白功效的成分。该类组分分析参考法规规定需分两组测试，该仪器可实现两组同时分析。
- ◇ **中药配方颗粒分析：**分析中药配方颗粒中的指标成分、特征谱图等；该类样品分析化合物极性差别较大，使用该系统，可以采用双色谱柱、双检测器同时分析。
- ◇ **化药分析：**分析原料药中主成分纯度、有关物质含量等；该类样品浓度差异较大，借助该系统可以实现不同浓度、不同进样体积的同时分析。
- ◇ **食品分析：**分析食品中营养成分、食品工业发酵产物的检测等；食品分析涉及化合物极性大、多组分分析等情景，可借助该系统双流路、双检测器等优势，实现同时分析。

除了应用于以上领域，对于法规规定需进行分组测试和目标化合物差异较大的多组分分析等应用场景，双进样液相分析系统均有一定优势。

第 2 章 双进样液相分析系统应用方案

2.1 化妆品行业的应用



化妆品是指以涂擦、喷洒或者其他类似的方法，散布于人体表面任何部位（皮肤、毛发、指甲、口唇等），以达到清洁、护肤、美容和修饰目的的日用化学工业产品。随着人们生活水平的提高，化妆品正变得越来越普及，而国家对化妆品准入门槛的逐渐提高。近年来，国家药监局不断推出新的法规与标准，来完善化妆品检验检测体系。其中《化妆品安全技术规范》作为行业检测标准是化妆品监管体系的重要组成部分。而在目前实施的《化妆品安全技术规范》(2015 年)中，涉及液相检测项目占总项目的 50%以上；因此高效液相色谱仪是该行业主要检测仪器。岛津新推出 LC-40 双进样液相分析系统具有两个独立流路，既可以作为单独一套常规液相用，又可以当两套液相使用，平行运行两个项目；最突出的特点是不改变法规规定液相方法的同时，节省近一半的分析时间，提高分析效率；对于易降解的目标化合物，减少分析时间可以有效地减少样品的降解。比如：巯基乙酸等 8 种组分要求 24 小时完成检测。因此，对于易降解且分析时间较长的样品分析，尤其是同一个检测项目需要使用两个方法和两个进样口的情况下，该系统具有突出的优势，适用于化妆品的检测分析。本章介绍了双进样液相分析系统在化妆品检测分析中的应用，供化妆品行业从业人员参考。

《化妆品安全技术规范》中规定部分项目（适用于该系统）

No.	《规范》项目	LC 法	处理后样品存储
1	对苯二胺等 32 种原料	LC+PDA: 分两组、不同流动相、不同梯度	48 小时内
2	3-亚苄基樟脑等 22 种原料	LC+PDA: 分两组、不同流动相、不同梯度	--
3	抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料	LC+PDA: 分两组、不同流动相、不同梯度	--
4	巯基乙酸等 8 种原料	LC+PDA: 分两组、相同流动相、不同梯度	24 小时内
5	2-氨基-4-羟乙氨基茴香醚硫酸盐等 15 种	LC+PDA: 分两组、相同流动相、不同梯度	48 小时内
6	甲基异噻唑啉酮等 23 个组分 吡硫鎓锌等 18 个组分	LC+PDA: 两个项目，同类组分可以同时做	--
7	CI 10020 等 11 种原料、CI 11920 等 13 种原料	LC+PDA: 两个项目，同类组分可以同时做	6 小时内

化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定对苯二胺等 32 种染发剂含量的方法。32 种染发剂组分 10-400 m/L 浓度范围内, 其相关系数大于 0.999, 各浓度点的回读准确度在 91.0%~113.6%之间, 线性相关性良好。稳定性考察中, 32 种组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.012~0.17%和 0.039~2.88%之间, 仪器精密度良好; 并对实际样品进行分析。双进样液相分析系统可以实现一次进样同时分析两组样品, 分析快速, 能满足国家药监局(2021 年第 17 号) 通告发布的《化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的检测方法》中液相方法的检测需求。

关键词: 双进样液相分析系统 染发剂 对苯二胺

技术特点:

- ❖ 双流路设计可同时分析两组样品, 满足标准规定, 节省时间, 减少样品降解。
- ❖ 双流路各自独立运行, 可应对不同液相系统(四元系统+二元系统) 配置分析需求。

染发剂是给头发染色的一种化妆品, 普遍含有对苯二胺类物质, 这是染发剂中必须用到的一种着色剂。这类化合物是《化妆品安全技术规范(2015年版)》中规定准用组分, 同时还有些物质如氢醌, 是规定不允许添加的, 属于染发剂的禁用物质。因此在染发剂等化妆品的相关管理中, 需要有合适的检测方法来进行监控。

2021 年 3 月 2 日, 国家药监局发布通告(2021 年 第 17 号), 公布了最新修订的《化妆

品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》, 此次修订, 增加了一种液相色谱法和液质确证方法, 并将检测方法纳入《化妆品安全技术规范(2015 年版)》。

本文参考《化妆品中对苯二胺等32种染发剂的检测方法》中“参考色谱条件2”; 采用岛津双进样液相分析系统建立测定化妆品中32种染发组分的液相分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 LC-40 双进样液相分析系统, 具体配置为:

输 液 泵	: LC-40B XR (流路 2)	系统控制器	: CBM-40A
	LC-40D XR (LPGE) (流路 1)		
脱 气 机	: DGU-405×2	检 测 器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.97
柱 温 箱	: CTO-40C		

1.2 双进样系统的应用优势

1> 工作效率提升。在本案例中, 根据标准规定 32 种染发剂的测定, 需两针进样来完成两组化合物的测试, 第一组 55 min+第二组 50 min, 两针供需 105min; 采用该系统后, 两针进样同时进行, 总用时 55 min; 耗时降低一倍, 可有效提升工作效率。

2> 多样化系统配置: 本案例中, 第一组采用 3 路流动相分析, 硬件配置是四元液相系统; 第二组

采用 2 路流动相分析，硬件配置可选二元液相系统；而双进样系统两条色谱流路配置可选择四元+二元系统的配置。

3> 有效减少样品降解。染发剂样品易降解，标准规定样品处理后，需 48 小时内完成测试，分析时间的减半，有效减少样品降解。

因此，对易降解、分析时间长的样品分析，尤其是同一个检测项目需要两个方法两针进样的使用场景，该系统优势突出。

1.3 分析条件

流路 1: (第一组 (G1) 测定 20 种染发剂的色谱条件)

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μ m),
(P/N:227-30017-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流 动 相 : A 20mM 磷酸氢二钾 (pH7.5) B 甲醇 C 乙腈

流 速 : 1 mL/min 柱 温 : 25°C

进 样 体 积 : 5 μ L 波 长 : 280 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱，时间程序见表1。

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	97	1	2
15	97	1	2
22	90	5	5
35	50	10	40
50	50	10	40
50.1	97	1	2
55	97	1	2

流路 2: (第二组 (G2) 测试 12 种染发剂的色谱条件)

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μ m),
(P/N:227-30017-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流 动 相 : A 20mM 磷酸氢二钾 (pH7.5) B 甲醇

流 速 : 1 mL/min 柱 温 : 25°C

进 样 体 积 : 5 μ L 波 长 : 280 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱，时间程序见表2。

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	92	8
8	92	8
35	50	50
45	50	50
45.1	92	8
55	92	8

1.4 混合标准溶液配置

标准储备溶液：准确称取各染料对照品 0.1g（精确到 0.0001g），分别置 10 mL 容量瓶中，以 2 g/L 亚硫酸氢钠水溶液和无水乙醇（1+1）的混合溶液溶解并定容至 10 mL，制成浓度约为 10 g/L 的各染料标准储备溶液。

标准工作溶液：取标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中，使用无水乙醇稀释，配制成浓度为 10、25、50、100、250 和 400 mg/L 的标准工作溶液。现用现配。

1.5 样品前处理方法

准确称取样品 0.5 g（精确到 0.0001g）于 10 mL 具塞比色管中，加无水乙醇/水(1:1)的混合溶液至 10 mL，涡旋 1min，冰浴超声提取 15 min。如为浑浊溶液，可取适量离心（5000 rpm）5 min，取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液作为待测溶液，并于 48 小时内完成检测。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

混合标准溶液 500 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图图 1-2 所示。

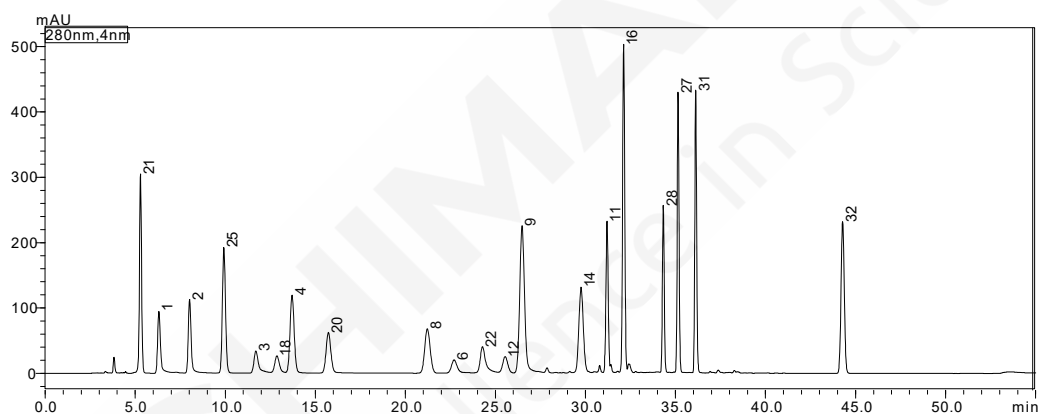


图 1 标准品溶液色谱图（400 $\mu\text{g/mL}$ ，第一组）

(21: 2-氨基-3-羟基吡啶; 1: p-苯二胺; 2: p-氨基苯酚; 25: 2,6-二氨基吡啶; 3: 甲苯-2,5-二胺硫酸盐; 18: 2,4-二氨基苯氧基乙醇 HCl; 4: m-氨基苯酚; 20: 4-氨基-m-甲酚; 8: 间苯二酚; 6: 2-氯-p-苯二胺硫酸盐; 22: N,N-双(2-羟乙基)-p-苯二胺硫酸盐; 12: 2-甲基雷琐辛; 9: 2-硝基-p-苯二胺; 14: 苯基甲基吡唑啉酮; 11: 4-氨基-2-羟基甲苯; 16: 4-氨基-3-硝基苯酚 28: 4-氯雷琐辛; 27: 6-羟基吡啶; 31: 1,5-萘二酚; 32: 1-萘酚)

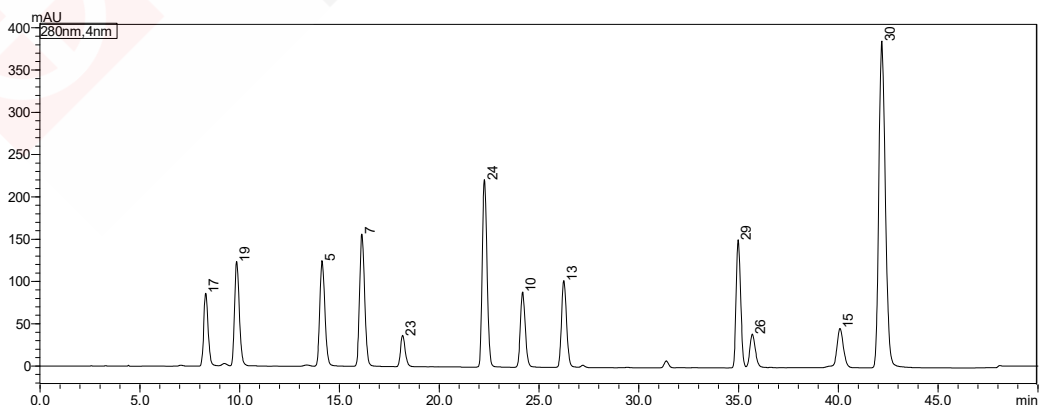


图 2 标准品溶液色谱图（400 $\mu\text{g/mL}$ ，第二组）

(17: m-苯二胺; 19: 氢醌; 5: o-苯二胺; 7: o-氨基苯酚; 23: p-甲基氨基苯酚硫酸盐; 24: 4-硝基-o-苯二胺; 10: 甲苯-3,4-二胺; 13: 6-氨基-m-甲酚; 29: 2,7-萘二酚; 26: N,N-二乙基-p-苯二胺硫酸盐; 15: N,N-二乙基甲苯-2,5-二胺 HCl; 30: N-苯基-p-苯二胺)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，部分化合物结果如图6所示。在10~400 mg/L浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数>0.999，具体结果见表3。

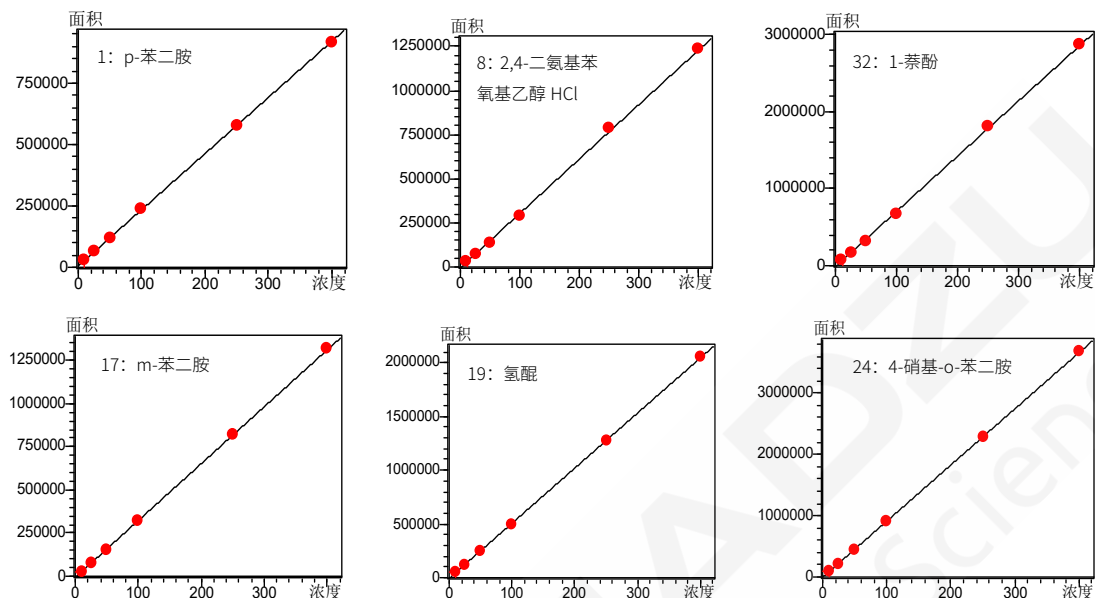


图3 部分化合物的校准曲线

表3 校准曲线参数

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 r	准确度(%)	检出限($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	<i>p</i> -苯二胺	$Y = (2286.21)X + (6257.97)$	0.9998	97.1~103.3	23.2
2	<i>p</i> -氨基苯酚	$Y = (3008.03)X + (-9180.41)$	0.9992	91.2~111.4	19.8
3	甲苯-2,5-二胺硫酸盐	$Y = (1464.55)X + (8844.79)$	0.9998	93.5~104.7	30.4
4	<i>m</i> -氨基苯酚	$Y = (5393.70)X + (-9234.72)$	0.9996	93.8~107.0	12.6
5	<i>o</i> -苯二胺	$Y = (5568.37)X + (-5105.54)$	0.9999	98.6~103.1	4.4
6	2-氯- <i>p</i> -苯二胺硫酸盐	$Y = (1072.01)X + (5984.37)$	0.9998	95.5~106.0	43
7	<i>o</i> -氨基苯酚	$Y = (6858.88)X + (-7767.02)$	0.9999	98.7~103.1	3.6
8	间苯二酚	$Y = (3081.84)X + (-4109.06)$	0.9993	91.0~109.4	26.4
9	2-硝基- <i>p</i> -苯二胺	$Y = (9240.64)X + (-13747.0)$	0.9990	93.0~108.3	7.6
10	甲苯-3,4-二胺	$Y = (3842.33)X + (-4183.93)$	0.9999	98.2~103.0	6.6
11	4-氨基-2-羟基甲苯	$Y = (4493.80)X + (-1063.18)$	0.9998	95.4~103.2	6.2
12	2-甲基雷琐辛	$Y = (764.315)X + (-1047.33)$	0.9996	94.6~107.3	85.8
13	6-氨基- <i>m</i> -甲酚	$Y = (4537.99)X + (-4619.14)$	0.9999	98.6~102.9	5.6
14	苯基甲基吡唑啉酮	$Y = (5598.30)X + (-9670.34)$	0.9998	94.7~105.2	11.4
15	N,N-二乙基甲苯-2,5-二胺 HCl	$Y = (2625.35)X + (-10114.5)$	0.9995	93.2~111.4	15.8
16	4-氨基-3-硝基苯酚	$Y = (8519.87)X + (-10445.9)$	0.9996	93.4~107.4	3.4
17	<i>m</i> -苯二胺	$Y = (3294.13)X + (-6766.67)$	0.9998	97.2~105.8	7.6
18	2,4-二氨基苯氧基乙醇 HCl	$Y = (3004.17)X + (-12197.9)$	0.9995	91.8~109.6	40.4
19	氢醌	$Y = (5127.96)X + (-6359.88)$	0.9999	98.5~103.3	4.8
20	4-氨基- <i>m</i> -甲酚	$Y = (3012.78)X + (-4161.02)$	0.9998	95.0~104.4	24.4
21	2-氨基-3-羟基吡啶	$Y = (4067.63)X + (-17881.2)$	0.9995	92.8~113.6	12.6
22	N,N-双(2-羟乙基)- <i>p</i> -苯二胺硫酸盐	$Y = (1791.25)X + (-3055.88)$	0.9998	94.5~103.9	43.2

23	<i>p</i> -甲基氨基苯酚硫酸盐	$Y = (1513.74)X + (1315.50)$	0.9997	92.3~104.9	12.4
24	4-硝基- <i>o</i> -苯二胺	$Y = (9171.01)X + (-6435.17)$	0.9999	98.9~102.1	2.6
25	2,6-二氨基吡啶	$Y = (5649.45)X + (-14363.1)$	0.9995	92.7~108.8	10.2
26	N,N-二乙基- <i>p</i> -苯二胺硫酸盐	$Y = (1923.78)X + (-3246.33)$	0.9999	98.5~104.5	15.8
27	6-羟基吲哚	$Y = (6735.51)X + (-4262.91)$	0.9997	94.5~105.5	3.4
28	4-氯雷琐辛	$Y = (4426.69)X + (-5052.74)$	0.9996	93.7~107.1	5.6
29	2,7-萘二酚	$Y = (5992.52)X + (-1310.92)$	0.9999	99.3~100.7	3.4
30	N-苯基- <i>p</i> -苯二胺	$Y = (21936.2)X + (-15984.6)$	0.9999	99.3~102.0	1.4
31	1,5-萘二酚	$Y = (7911.10)X + (-8755.74)$	0.9996	94.0~106.8	3.2
32	1-萘酚	$Y = (7170.95)X + (-10225.3)$	0.9995	93.7~107.5	6.4

2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.012~0.42%和 0.039~3.99% 之间，仪器精密度良好。

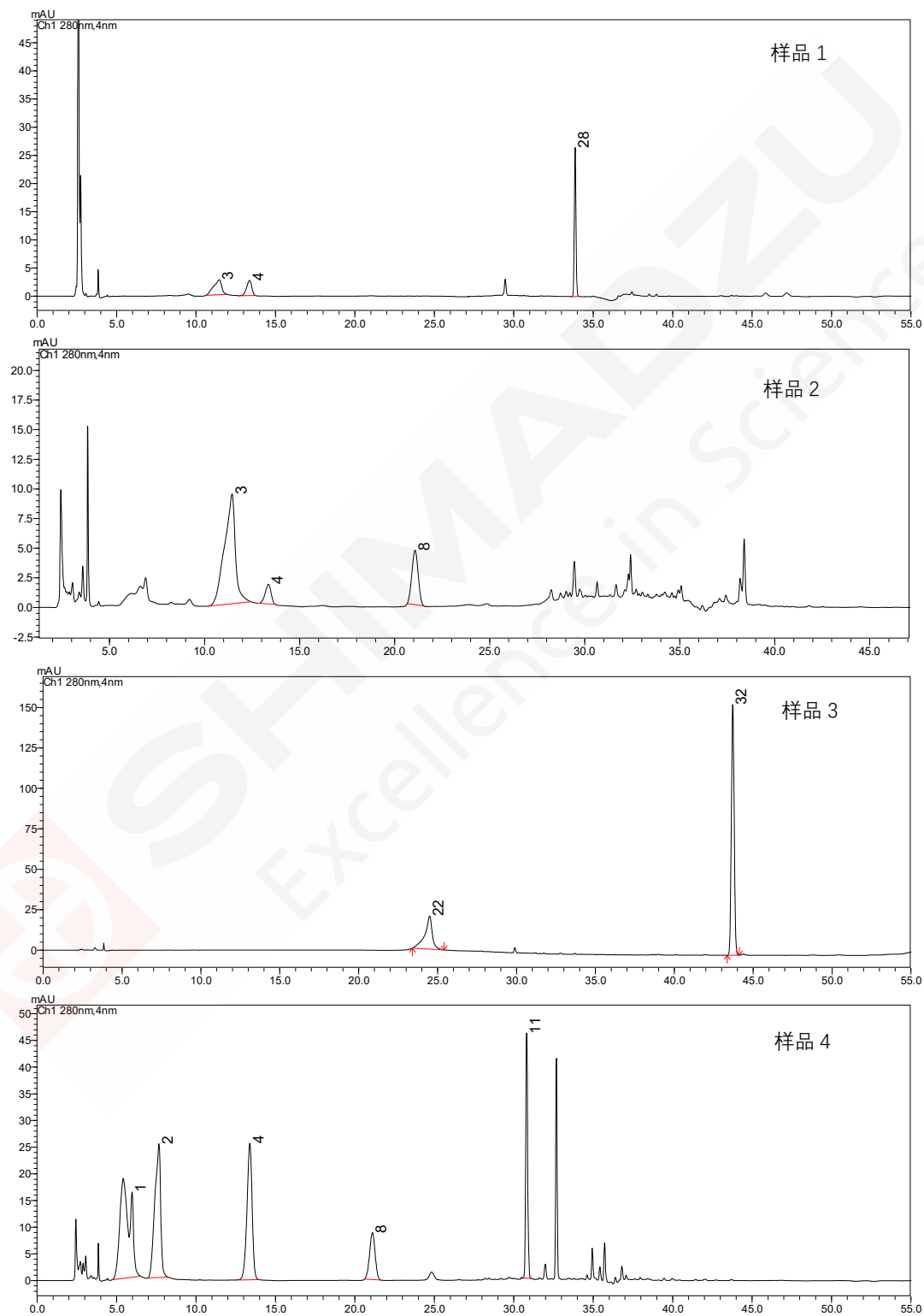
表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	名称	RSD% (10 mg/L)		RSD% (50 mg/L)		RSD% (250 mg/L)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	<i>p</i> -苯二胺	0.019	0.132	0.054	0.130	0.076	0.227
2	<i>p</i> -氨基苯酚	0.065	0.318	0.025	0.119	0.072	0.189
3	甲苯-2,5-二胺硫酸盐	0.088	1.194	0.049	0.326	0.067	0.231
4	<i>m</i> -氨基苯酚	0.074	0.757	0.024	0.669	0.039	0.653
5	<i>o</i> -苯二胺	0.106	0.904	0.153	0.319	0.151	0.415
6	2-氯- <i>p</i> -苯二胺硫酸盐	0.091	0.471	0.026	0.379	0.052	0.284
7	<i>o</i> -氨基苯酚	0.087	0.588	0.137	0.314	0.155	0.510
8	间苯二酚	0.087	0.615	0.032	0.370	0.043	0.241
9	2-硝基- <i>p</i> -苯二胺	0.050	0.295	0.017	0.066	0.037	0.223
10	甲苯-3,4-二胺	0.044	1.405	0.053	0.284	0.025	0.309
11	4-氨基-2-羟基甲苯	0.012	0.298	0.009	0.166	0.023	0.637
12	2-甲基雷琐辛	0.060	1.008	0.020	0.514	0.036	0.226
13	6-氨基- <i>m</i> -甲酚	0.045	1.307	0.038	0.206	0.020	0.355
14	苯基甲基吡啶啉酮	0.024	1.077	0.020	0.261	0.021	0.262
15	N,N-二乙基甲苯-2,5-二胺 HCl	0.167	2.879	0.021	0.774	0.056	0.362
16	4-氨基-3-硝基苯酚	0.011	0.039	0.008	0.100	0.022	0.394
17	<i>m</i> -苯二胺	0.326	0.894	0.422	0.154	0.367	0.300
18	2,4-二氨基苯氧基乙醇 HCl	0.118	2.329	0.057	1.274	0.104	3.994
19	氢醌	0.172	0.753	0.162	0.308	0.178	0.439
20	4-氨基- <i>m</i> -甲酚	0.136	0.473	0.032	0.101	0.061	0.318
21	2-氨基-3-羟基吡啶	0.052	0.596	0.072	0.405	0.068	0.488
22	N,N-双(2-羟乙基)- <i>p</i> -苯二胺 硫酸盐	0.089	1.119	0.024	0.338	0.060	0.826
23	<i>p</i> -甲基氨基苯酚硫酸盐	0.080	2.254	0.116	0.684	0.134	0.395
24	4-硝基- <i>o</i> -苯二胺	0.046	0.702	0.067	0.262	0.044	0.297
25	2,6-二氨基吡啶	0.065	0.137	0.033	0.073	0.053	0.347
26	N,N-二乙基- <i>p</i> -苯二胺硫酸盐	0.154	2.031	0.019	0.685	0.029	0.296
27	6-羟基吲哚	0.012	0.064	0.008	0.070	0.022	0.168
28	4-氯雷琐辛	0.013	0.123	0.011	0.117	0.021	0.291
29	2,7-萘二酚	0.030	0.817	0.018	0.283	0.029	0.284

30	N-苯基- <i>p</i> -苯二胺	0.035	0.935	0.024	0.369	0.081	0.309
31	1,5-萘二酚	0.013	0.032	0.009	0.088	0.022	0.307
32	1-萘酚	0.019	0.132	0.012	0.228	0.024	0.187

2.4 样品测试

取 5 个染发剂样品，分别准确称量 0.5 g，参考 1.4 的样品前处理方法，制备上机。具体测试结果如下表 5。其样品色谱图如图 4。



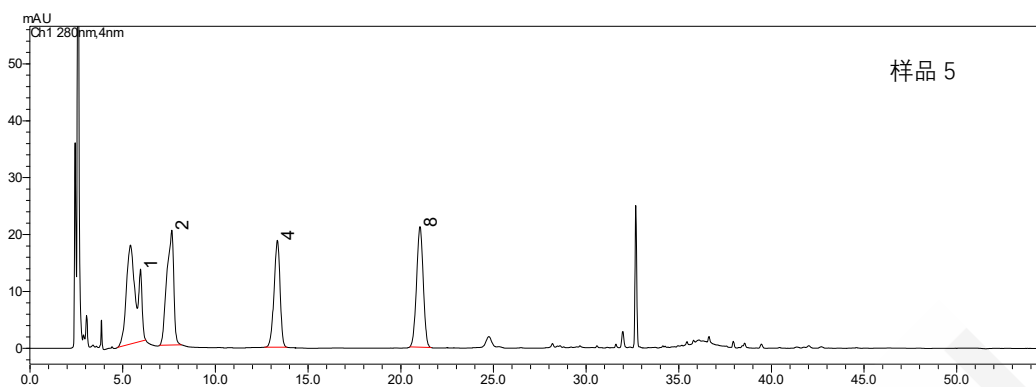


图 4 样品色谱图

表 5 样品测试结果

No.	化合物	样品浓度 (%)				
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
1	p-苯二胺				0.72%	0.60%
2	p-氨基苯酚				0.43%	0.35%
3	甲苯-2,5-二胺硫酸盐	0.12%	0.49%			
4	m-氨基苯酚	0.03%	0.02%		0.22%	0.16%
8	间苯二酚		0.07%		0.14%	0.34%
11	4-氨基-2-羟基甲苯				0.17%	
22	N,N-双(2-羟乙基)-p-苯二胺硫酸盐			0.75%		
28	4-氯雷琐辛	0.09%				
32	1-萘酚			0.54%		

4. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立快速测定对苯二胺等 32 种染发剂含量的方法，并考察了线性、重复性、实际样品测试等，可以满足国家药监局（2021 年 第 17 号）通告发布的《化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的检测方法》的检测需求。双进样液相分析系统可以实现一次进样同时分析两组样品，分析耗时降低一倍，防止样品降解的可能，可供相关行业参考。

化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料含量的方法。11 种组分 1.0-10.0mg/L 范围内, 其相关系数大于 0.997, 各浓度点的回读准确度在 92.4%~107.7%之间, 线性相关性良好。稳定性考察中, 11 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.010~0.107%和 0.077~3.137%之间, 仪器精密度良好。双进样液相分析系统具有双进样口、独立双流路, 可实现同时分析两组样品, 满足国家药监局 2023 年第 41 号通告中公布《化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法》需求。

关键词: 双进样; 液相色谱仪; 抗坏血酸磷酸酯镁

技术特点:

- ❖ 平行双流路是独立运行, 可实现梯度、等度同时分析, 互不影响。
- ❖ 自动进样器是双进样口设计, 可满足不同体积进样方式。

抗坏血酸磷酸酯镁为水溶性维生素C的衍生物, 作为化妆品原料之一, 在化妆品中广泛使用。抗坏血酸磷酸酯镁是一种酪氨酸酶抑制剂, 对黑色素中间体起还原作用, 可阻碍从酪氨酸/多巴色素互变酶至黑色素中个点上的氧化链反应, 具祛斑美白作用。进入人体后可消除氧自由基, 还可促进真皮胶原蛋白生成, 从而达到去皱、抗衰老作用。抗坏血酸磷酸酯镁已经成为美白淡

斑化妆品中常用的添加剂。为加强化妆品的监督管理, 我国《化妆品安全技术规范》对化妆品用抗坏血酸磷酸酯镁等原料的品种、使用范围和限制条件都做出了明确的规定。

本文参考国家药监局公布的《化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法》, 采用岛津双进样液相分析系统建立测定化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料含量的液相分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统, 具体配置如下

输 液 泵	: LC-40D XR (LPGE) (流路 1)	系统控制器	: CBM-40A
	LC-40B XR (流路 2)		
脱 气 机	: DGU-405×2	检 测 器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.117
柱 温 箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

流路 1: 第一组, 抗坏血酸磷酸酯镁等 10 种

色谱柱:	Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm), (P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)		
流动相:	A-0.02mol/L 磷酸二氢钾溶液 B-甲醇		
流速:	1.0mL/min	柱 温:	25°C
进样体积:	10μL	洗脱方式:	梯度洗脱 (见表1)

波长：烟酰胺为230nm、抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、曲酸、3-邻-乙基抗坏血酸、甲氧基水杨酸钾、鞣花酸为250 nm、阿魏酸、4-丁基间苯二酚、苯乙基间苯二酚为280 nm

表1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
3	95	5
8	60	40
14	40	60
18	30	70
25	95	5
30	95	5

流路2：第二组，凝血酸

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),
(P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相：A-0.05mol/LKH₂PO₄-0.2%H₃PO₄溶液 B-甲醇

流速：1.0mL/min 柱温：30°C

波长：210nm 进样体积：20μL

洗脱方式：等度洗脱，运行15 min。

1.3 混合标准溶液配置

标准工作溶液：量取已配好的混合标准储备溶液 1mL，鞣花酸标准溶液 2.5mL，至于 10mL 容量瓶中，用纯水稀释至刻度，配制成浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 和 50.0 μg/mL 的标准工作溶液。

1.4 样品前处理方法

第一组：称取样品 0.5g (精确到 0.0001g) 于 15mL 具塞比色管中，加甲醇-水 (1+1) 溶液至约 9mL，涡旋分散，超声提取 20min，冷却至室温，转移到 10mL 容量瓶中，加 5%甲醇定容至刻度，混匀后转移至离心管中，以 12000r/min 的转速离心 15min，取上清液经 0.22μm 滤膜过滤，滤液作为待测溶液。

第二组：称取样品 0.5g (精确到 0.0001g) 于 15mL 具塞比色管中，加 5%甲醇溶液至约 9mL，涡旋分散，超声提取 10min，冷却至室温，转移到 10mL 容量瓶中，加 5%甲醇定容至刻度，混匀后转移至离心管中，以 12000r/min 的转速离心 10min，取上清液经 0.22μm 滤膜过滤，滤液作为待测溶液。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

混合标准溶液10 μg/mL的色谱图如图1-2所示，化合物编号同表3

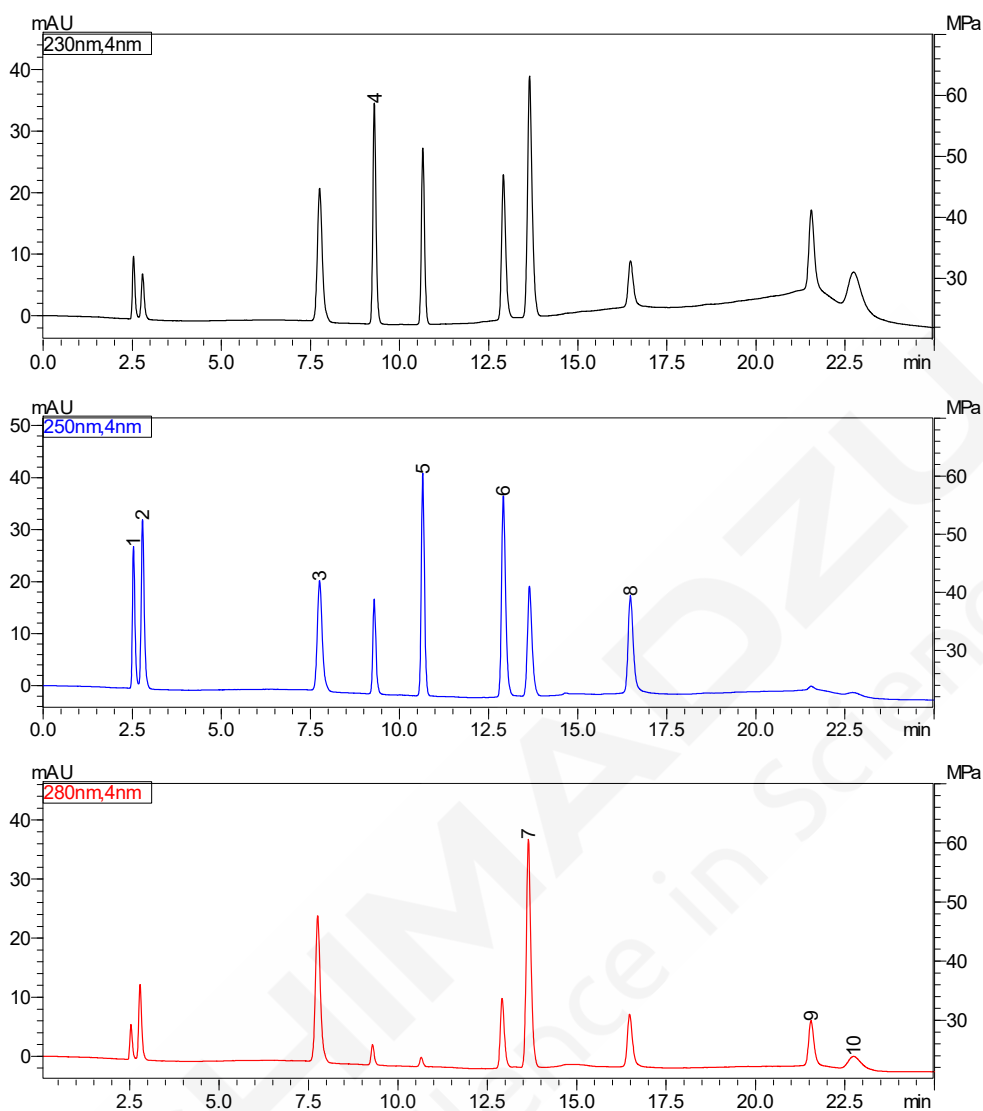


图 1 10µg/mL 标准品溶液色谱图 (流路 1)

(第一组, 1.抗坏血酸磷酸酯镁、2.抗坏血酸葡萄糖苷、3.曲酸、4.烟酰胺、5.3-邻-乙基抗坏血酸、6.甲氧基水杨酸钾、7.阿魏酸
8.鞣花酸、9.4-丁基间苯二酚、10.苯乙基间苯二酚)

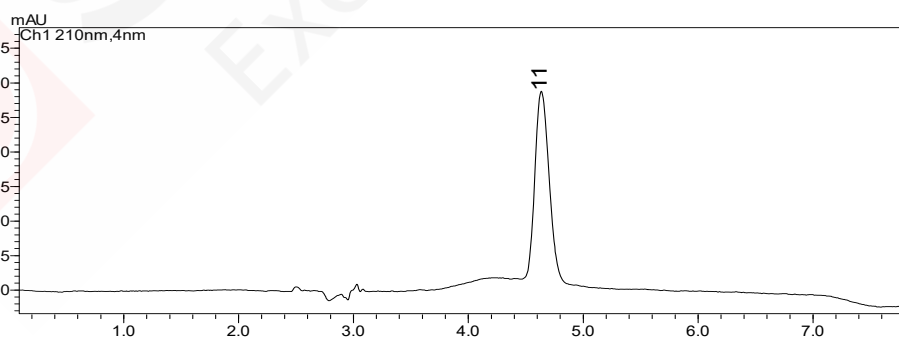


图 2 50µg/mL 标准品溶液色谱图 (流路 2) (第二组: 11.凝血酸)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液,按1.3中的分析条件进行测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,采用外标法建立校准曲线,部分化合物结果如图3所示。在1.0~10.0mg/L浓度范围内,具有较好的线性关系,线性相关系数 >0.997 ,具体结果见表2。

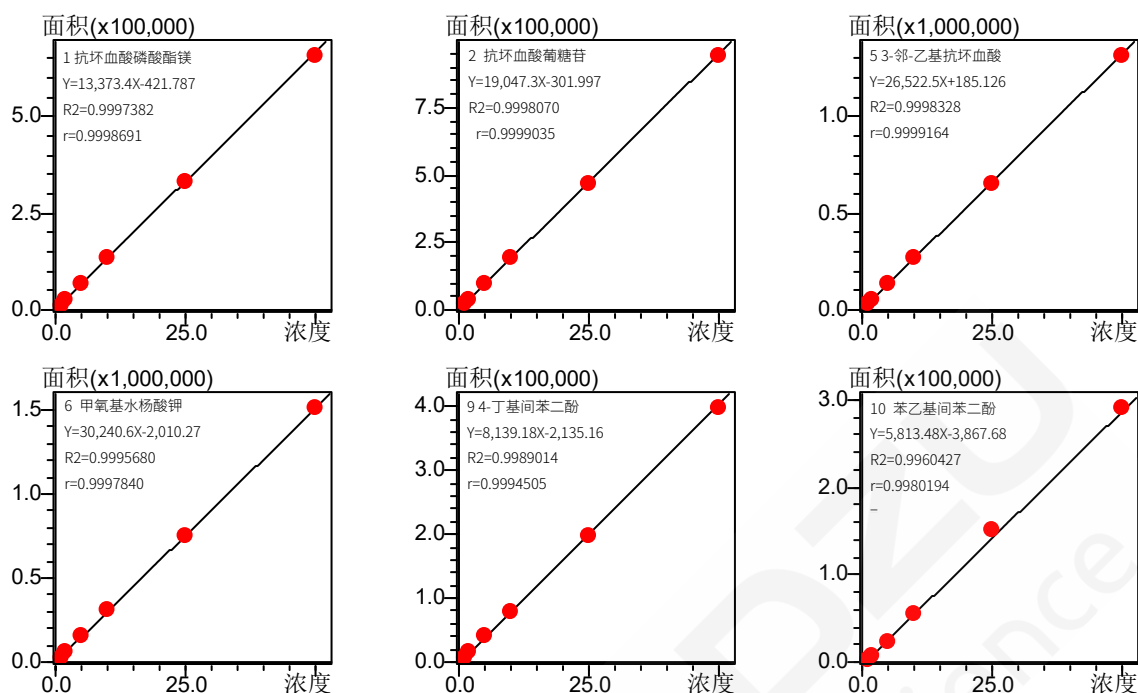


图3 部分化合物的校准曲线

表2 校准曲线参数

No.	化合物名称	CAS 号	线性范围 (mg/L)	相关系数 r	准确度(%)	检出限(μg/g)
1	抗坏血酸磷酸酯镁	113170-55-1	1.0~10.0	0.9998	98.6~101.6	0.05
2	抗坏血酸葡萄糖苷	129499-78-1	1.0~10.0	0.9999	98.7~101.7	0.04
3	曲酸	501-30-4	1.0~10.0	0.9997	97.8~102.5	0.06
4	烟酰胺	98-92-0	1.0~10.0	0.9999	98.8~101.2	0.04
5	3-邻-乙基抗坏血酸	86404-04-8	1.0~10.0	0.9999	98.7~101.5	0.03
6	甲氧基水杨酸钾	152312-71-5	1.0~10.0	0.9997	96.8~101.3	0.03
7	阿魏酸	1135-24-6	1.0~10.0	0.9998	97.7~101.5	0.03
8	鞣花酸	476-66-4	1.0~10.0	0.9980	92.4~107.7	0.08
9	4-丁基间苯二酚	18979-61-8	1.0~10.0	0.9994	97.7~103.8	0.14
10	苯乙基间苯二酚	85-27-8	1.0~10.0	0.9980	93.2~105.9	0.50
11	凝血酸	701-54-2	1.0~10.0	0.9999	93.9~104.1	1.06

2.3 精密度实验

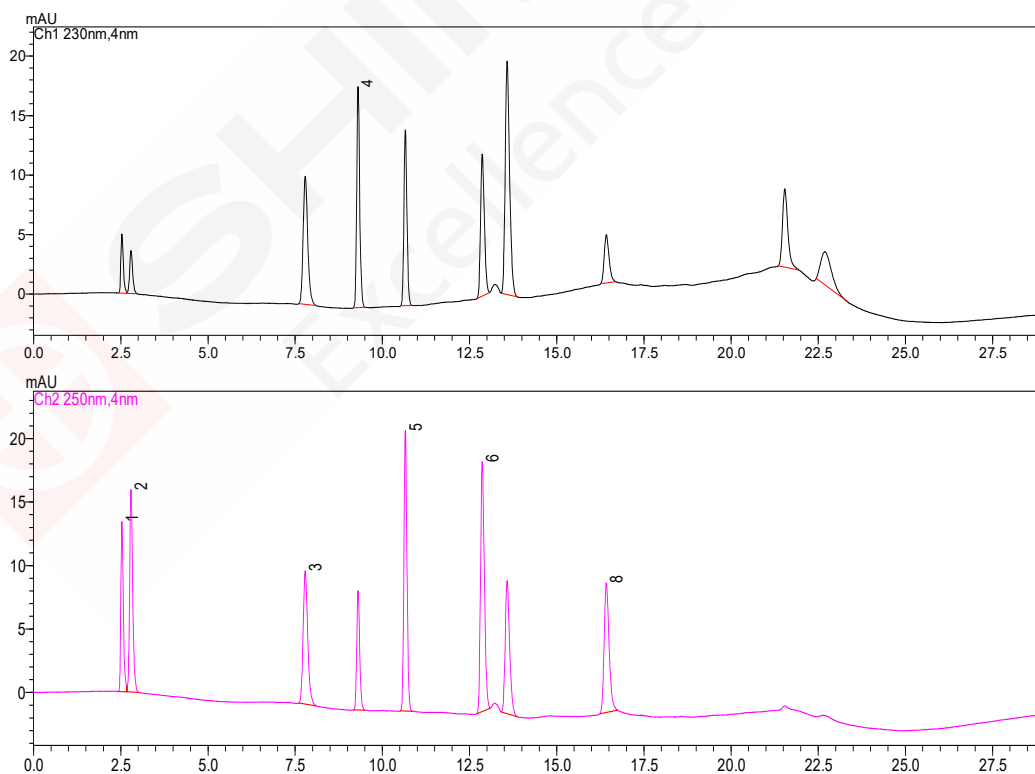
不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.010~0.107%和 0.077~3.137%之间，仪器精密度良好。如表 3 所示

表 3 保留时间和峰面积重复性及回收率测试结果

No.	化合物名称	RSD% (5 μ g/mL)		RSD% (25 μ g/mL)		加标浓度 (50 μ g/g)		加标浓度 (100 μ g/g)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	检测值 (μ g/g)	回收率 (%)	检测值 (μ g/g)	回收率 (%)
1	抗坏血酸磷酸酯镁	0.025	0.846	0.027	0.085	49.04	98.0	107.4	107.4
2	抗坏血酸葡萄糖苷	0.021	0.223	0.036	0.095	54.25	108.5	110.84	110.8
3	曲酸	0.023	1.314	0.010	0.161	52.65	105.3	109.52	109.5
4	烟酰胺	0.026	0.145	0.023	0.077	43.34	86.6	93.32	93.3
5	3-邻-乙基抗坏血酸	0.024	0.133	0.024	0.096	50.65	101.3	109.44	109.4
6	甲氧基水杨酸钾	0.022	0.218	0.026	0.077	51.05	102.1	108.04	108.0
7	阿魏酸	0.020	0.237	0.022	0.098	55.64	111.2	110.32	110.3
8	鞣花酸	0.018	3.137	0.018	1.481	45.34	90.6	86.40	86.4
9	4-丁基间苯二酚	0.017	0.882	0.016	0.296	44.45	88.9	98.20	98.2
10	苯乙基间苯二酚	0.063	2.195	0.035	0.596	56.65	111.3	110.64	110.6
11	凝血酸	0.085	1.039	0.053	0.155	49.05	98.0	99.32	99.3

2.4 加标回收率测试

取化妆品样品（本底样品经测试未检出抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种化合物）加入一定浓度的标液（加标浓度如表 3 所示），按照 1.5 中样品制备方法，每个浓度平行制备 3 份样品。加标回收率测试结果显示：抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种化合物的样品加标回收率在 86.6%~111.3%之间，满足标准测试要求，样品加标色谱图见图 4、图 5，结果如表 3。



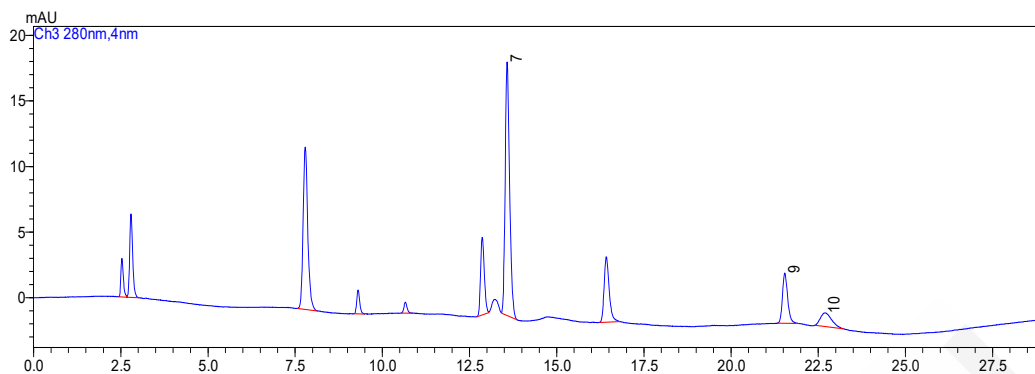


图4 样品加标色谱图 (100 $\mu\text{g/g}$)

(第一组, 1.抗坏血酸磷酸酯镁、2.抗坏血酸葡萄糖苷、3.曲酸、4.烟酰胺、5.3-邻-乙基抗坏血酸、6.甲氧基水杨酸钾、7.阿魏酸 8.鞣花酸、9.4-丁基间苯二酚、10.苯乙基间苯二酚)

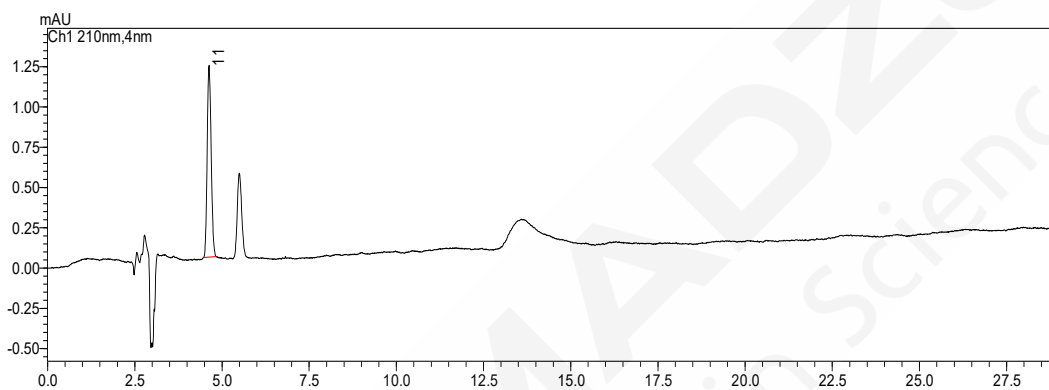


图5 样品加标色谱图 (100 $\mu\text{g/g}$) (第二组: 11.凝血酸)

3. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立快速测定抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料含量的方法，并考察了线性、重复性、加标回收率，可以满足国家药监局发布的检测方法《化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法》的检测需求。双进样液相分析系统可实现同时分析两组样品，并且两组方法互不干扰；在不改变法规方法同时提升分析效率，可供相关行业参考。

化妆品中甲基异噻唑啉酮等 23 个组分和吡硫鎓锌等 18 个组分的测定

摘要: 本文使用岛津 LC-40 双进样液相分析系统建立了同时分析甲基异噻唑啉酮等 23 个组分和吡硫鎓锌等 18 个组分两个项目方法。41 种组分在各自的浓度范围内,其相关系数大于 0.999,各浓度点的回读准确度在 87.9%~112.7%之间,线性相关性良好。稳定性考察中,41 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.011~0.165%和 0.133~1.36%之间,仪器精密度良好;加标回收结果显示,41 种防腐剂的加标回收结果为 91.8%~104.2%,RSD 为 0.31%~3.62%,并对实际样品进行分析。该系统可以实现一次同时分析两组样品,分析快速,能满足《化妆品安全技术规范》(2022 年)征求意见稿,“4 防腐剂检验方法”中 4.1 和 4.2 章节项目同时检测的需求。

关键词: LC-40双进样液相分析系统 防腐剂 化妆品

技术特点:

- ❖ 平行双流路各自独立运行,一次同时分析两个不同项目,无干扰。
- ❖ 该系统符合《化妆品安全技术规范》中防腐剂检测 4.1 和 4.2 章节的液相方法标准规定。

化妆品防腐剂是指以抑制微生物在化妆品中的生长和繁殖为目的而在化妆品中加入的物质。常见的化妆品中防腐剂有羟苯酯类、苯氧乙醇类、咪唑烷基脲类、甲基异噻唑啉酮(卡松)、苯甲醇类、1,2-二元醇类和布罗波尔等。由于化妆品的保质期通常较长,许多化妆品离不开防腐剂,特别是液态水基类化妆品。如果过量添加防腐剂,可能给使用者带来安全隐患。

2021 年 3 月国家药品监督管理局发布《化妆品中防腐剂检验方法》(2021 年第 17 号通告),

将 51 种准用防腐剂的检测方法,纳入《化妆品安全技术规范》。在《化妆品安全技术规范》(2022 年)征求意见稿中,防腐剂检测方法分 4.1~4.7 七个章节,其中,4.1 是“甲基异噻唑啉酮等 23 个组分”、4.2 是“吡硫鎓锌等 18 个组分”,包含 41 种常检的防腐剂。

本文参考《化妆品中防腐剂检验方法》中 4.1 和 4.2 方法;采用 LC-40 双进样液相分析系统建立了同时分析这两个项目液相方法,供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统,具体配置如下:

输 液 泵 : LC-40D XR (LPGE) (流路 1)	系统控制器 : CBM-40A
LC-40B XR (流路 2)	
脱 气 机 : DGU-405×2	检 测 器 : SPD-M40×2
自动进样器 : SIL-40C XR	色谱工作站 : LabSolutions Ver. 5.117
柱 温 箱 : CTO-40C	

1.2 分析条件

流路 1: 测定甲基异噻唑啉酮等 23 个组分

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),
(P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流 动 相 : A 0.12%磷酸水溶液 B 乙腈

流速: 1 mL/min 柱温: 30°C
进样体积: 10 µL 波长: 230、254、280 nm
洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表1。

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	90	10
5	90	10
29	50	50
45	65	35
54	40	60
57	5	95
60	90	10

流路 2: 测试吡硫鎓锌等 18 个组分

色谱柱: CAPCELL PAK C18 CR(150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm)
流动相: A 磷酸二氢钠缓冲溶液 (pH=3.8) B 甲醇
流速: 0.8 mL/min 柱温: 30°C
进样体积: 10 µL 波长: 230、280 nm
洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表2。

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	85	15
10	70	30
15	55	45
32	30	70
47	15	85
54	15	85
55	85	15

1.3 混合标准溶液配制

化妆品中 23 种防腐剂: 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-08584;

化妆品中 18 种防腐剂: 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-08620;

标准工作溶液: 取混合标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中, 使用甲醇稀释, 配制成系列浓度的标准工作溶液。现用现配。

1.4 样品前处理方法

参考《化妆品安全技术规范》(2022 年) 征求意见稿中, 4 防腐剂检测方法 4.1 和 4.2 液相方法部分。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

两组混合标液的色谱图如图1和图2:

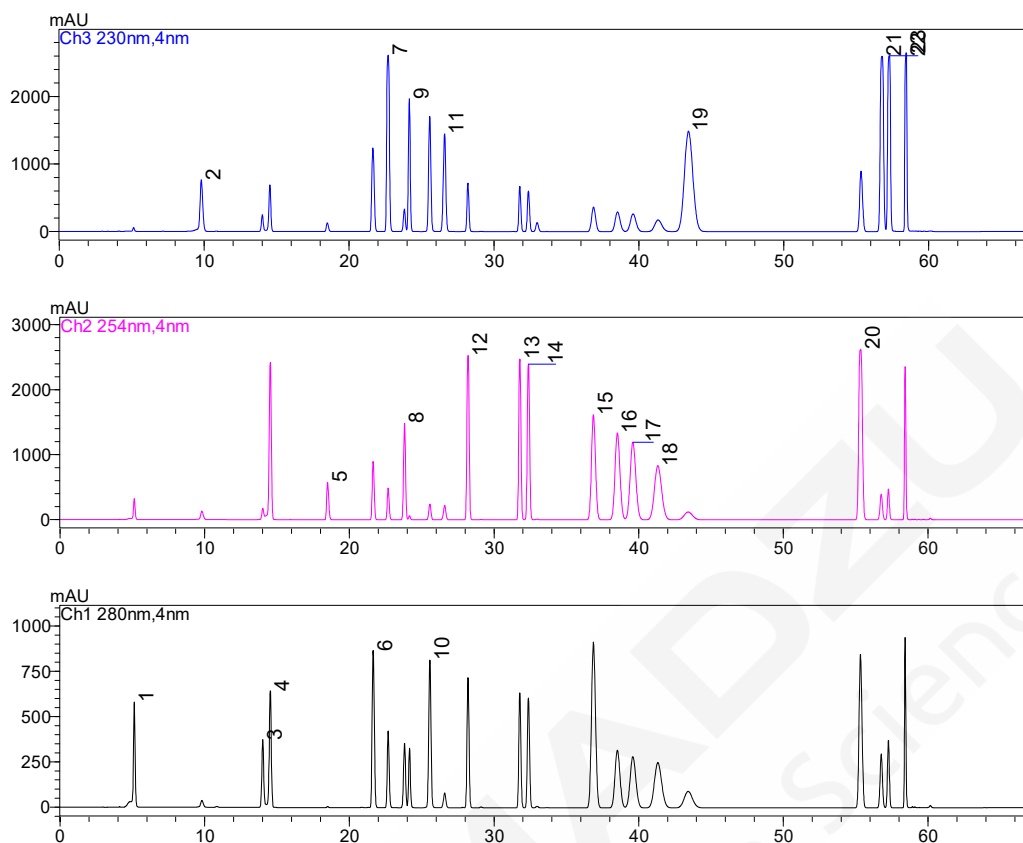


图 1 23 种组分标准溶液色谱图 (括号内为组分浓度, 单位: $\mu\text{g/mL}$)

1: 甲基异噻唑啉酮 (120); 2: 2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇 (3000); 3: 4-羟基苯甲酸 (400); 4: 甲基氯异噻唑啉酮 (120); 5: 苯甲醇 (6000); 6: 苯氧乙醇 (6000); 7: 苯甲酸 (1000); 8: 4-羟基苯甲酸甲酯 (200); 9: 氯苯甘醚 (600); 10: 脱氢乙酸 (600); 11: 5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷 (5000); 12: 4-羟基苯甲酸乙酯 (500); 13: 4-羟基苯甲酸异丙酯 (500); 14: 4-羟基苯甲酸丙酯 (500); 15: 4-羟基苯甲酸苯酯 (600); 16: 4-羟基苯甲酸异丁酯 (600); 17: 4-羟基苯甲酸丁酯 (600); 18: 4-羟基苯甲酸苄酯 (600); 19: 苯甲酸乙酯 (1200); 20: 4-羟基苯甲酸戊酯 (1200); 21: 苯甲酸异丙酯 (1200); 22: 苯甲酸丙酯 (1200); 23: 苯甲酸苯基酯 (1200)

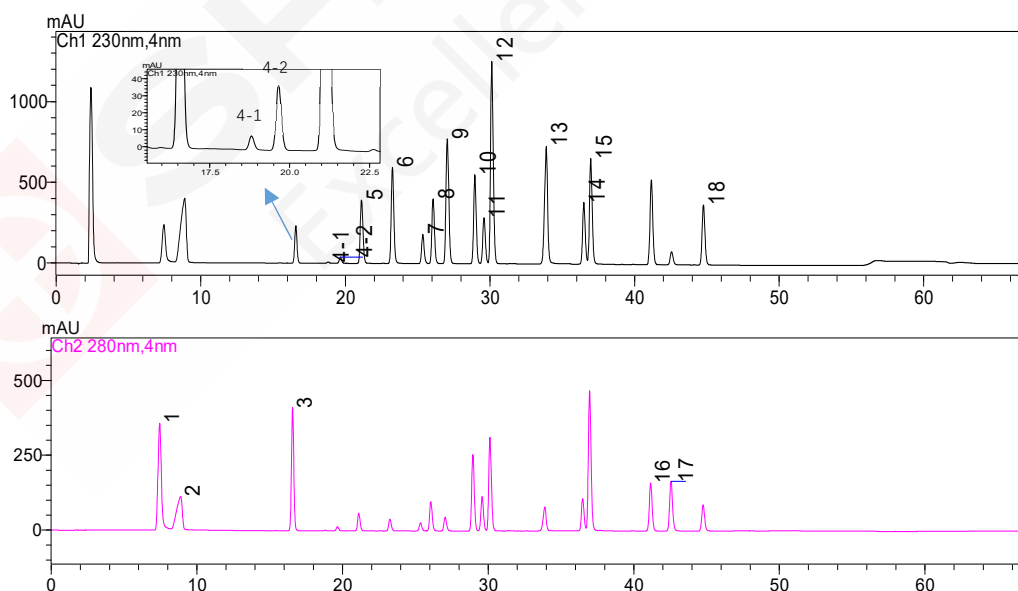


图 2 18 种组分标准溶液色谱图 (括号内为组分浓度, 单位: $\mu\text{g/mL}$)

1: 吡硫鎓锌 (200), 2: 水杨酸 (600), 3: 山梨酸 (120), 4-1: 苯氧丙醇, 4-2: 苯氧异丙醇 (120), 5: 2,6-二氯苯甲醇 (1200), 6: 苯甲酸甲酯 (240), 7: 碘丙炔醇丁基氨甲酸酯 (3600), 8: 对氯间甲酚 (300), 9: 2,4-二氯苯甲醇 (1200), 10: 邻苯基苯酚 (360), 11: 邻伞花烃-5-醇 (360), 12: 氯二甲酚 (1200), 13: 氯咪巴唑 (1200), 14: 苄氯酚 (360), 15: 吡罗克酮乙醇胺盐 (1200), 16: 三氯卡班 (120), 17: 三氯生 (360), 18: 溴氯芬 (360)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按1.3中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，部分化合物结果如图5所示。在各自的浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 >0.999 ，具体结果见表3。

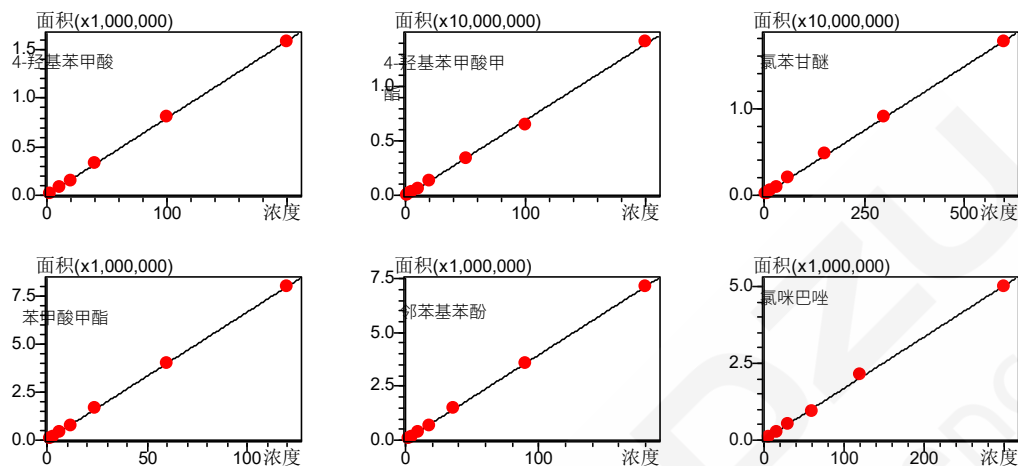


图3 部分化合物的校准曲线

表3 校准曲线参数

方法	No.	化合物名称	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r	准确度(%)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)
	1	甲基异噻唑啉酮	0.05~200	0.9998	97.1~105.0	0.02
	2	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	1~3000	0.9997	92.5~104.7	0.5
	3	4-羟基苯甲酸	0.2~200	0.9990	91.8~109.3	0.07
	4	甲基氯异噻唑啉酮	0.06~200	0.9996	91.3~105.3	0.02
	5	苯甲醇	3~6000	0.9998	94.5~108.9	1
	6	苯氧乙醇	2~4000	0.9993	90.1~105.3	0.7
	7	苯甲酸	0.5~1000	0.9996	91.9~104.2	0.17
	8	4-羟基苯甲酸甲酯	0.1~500	0.9998	90.8~108.1	0.04
	9	氯苯甘醚	0.3~600	0.9998	88.4~106.0	0.1
	10	脱氢乙酸	0.3~600	0.9994	94.6~109.0	0.1
	11	5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷	2.5~5000	0.9997	96.1~112.7	0.8
4.1	12	4-羟基苯甲酸乙酯	0.25~500	0.9995	93.7~105.9	0.08
	13	4-羟基苯甲酸异丙酯	0.25~500	0.9999	92.3~104.7	0.08
	14	4-羟基苯甲酸丙酯	0.25~500	0.9999	87.9~104.5	0.08
	15	4-羟基苯甲酸苯酯	0.3~500	0.9992	93.6~110.8	0.1
	16	4-羟基苯甲酸异丁酯	0.3~500	0.9990	93.8~113.6	0.1
	17	4-羟基苯甲酸丁酯	0.3~500	0.9991	93.7~111.2	0.1
	18	4-羟基苯甲酸苄酯	0.3~500	0.9991	91.8~109.6	0.1
	19	苯甲酸乙酯	2~1200	0.9993	94.7~103.6	0.2
	20	4-羟基苯甲酸戊酯	0.6~500	0.9997	89.9~105.2	0.2
	21	苯甲酸异丙酯	0.7~500	0.9996	91.3~105.8	0.2
	22	苯甲酸丙酯	0.7~500	0.9995	90.3~104.8	0.2
	23	苯甲酸苯基酯	0.8~500	0.9993	92.3~104.9	0.27
4.2	1	吡硫鎓锌	2~200	0.9994	91.9~107.1	0.6
	2	水杨酸	1~600	0.9995	92.3~110.2	0.3

3	山梨酸	0.2~120	0.9993	90.6~105.6	0.06
4	苯氧异丙醇	0.2~120	0.9993	92.5~106.3	0.06
5	2,6-二氯苯甲醇	2~500	0.9991	92.4~108.2	0.6
6	苯甲酸甲酯	0.4~200	0.9995	91.3~108.2	0.12
7	碘丙炔醇丁基氨基甲酸酯	6~3000	0.9998	91.7~105.3	1.8
8	对氯间甲酚	0.5~50	0.9999	91.5~105.8	0.15
9	2,4-二氯苯甲醇	2~300	0.9992	93.2~108.2	0.6
10	邻苯基苯酚	0.6~200	0.9995	90.9~105.2	0.18
11	邻伞花烃-5-醇	0.6~200	0.9998	89~106.2	0.18
12	氯二甲酚	2~600	0.9998	90.9~107.1	0.6
13	氯咪巴唑	2~600	0.9994	89.5~106.3	0.6
14	苄氯酚	0.6~200	0.9998	91.2~102.1	0.18
15	吡罗克酮乙醇胺盐	2~600	0.9998	90.8~102.7	0.6
16	三氯卡班	0.2~120	0.9996	91.3~104.8	0.06
17	三氯生	0.6~360	0.9999	91.2~105.3	0.18
18	溴氯芬	0.6~200	0.9998	91.0~105.6	0.18

2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.011~0.165%和 0.133~1.36% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

方法	No.	名称	RSD% (标曲最低点浓度)		RSD% (标曲中点浓度)	
			R.T.	Area	R.T.	Area
	1	甲基异噻唑啉酮	0.119	0.345	0.165	0.637
	2	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	0.163	0.318	0.143	0.228
	3	4-羟基苯甲酸	0.147	0.646	0.138	0.357
	4	甲基氯异噻唑啉酮	0.084	0.675	0.123	0.201
	5	苯甲醇	0.106	0.652	0.095	0.319
	6	苯氧乙醇	0.096	0.327	0.026	0.189
	7	苯甲酸	0.083	0.382	0.080	0.177
	8	4-羟基苯甲酸甲酯	0.082	0.312	0.059	0.173
	9	氯苯甘醚	0.054	0.192	0.057	0.194
	10	脱氢乙酸	0.043	0.502	0.047	0.249
	11	5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷	0.016	0.235	0.035	0.133
4.1	12	4-羟基苯甲酸乙酯	0.054	0.283	0.033	0.176
	13	4-羟基苯甲酸异丙酯	0.045	0.307	0.028	0.196
	14	4-羟基苯甲酸丙酯	0.047	0.694	0.030	0.183
	15	4-羟基苯甲酸苯酯	0.067	0.391	0.058	0.150
	16	4-羟基苯甲酸异丁酯	0.021	0.234	0.069	0.149
	17	4-羟基苯甲酸丁酯	0.126	0.693	0.079	0.178
	18	4-羟基苯甲酸苄酯	0.101	0.569	0.104	0.297
	19	苯甲酸乙酯	0.082	0.591	0.098	0.308
	20	4-羟基苯甲酸戊酯	0.056	0.571	0.039	0.187
	21	苯甲酸异丙酯	0.056	0.496	0.026	0.175
	22	苯甲酸丙酯	0.059	0.332	0.020	0.165
	23	苯甲酸苯基酯	0.085	0.254	0.011	0.106
4.2	1	吡硫鎓锌	0.146	0.603	0.067	0.362
	2	水杨酸	0.067	1.156	0.031	0.962

3	山梨酸	0.252	1.035	0.043	0.439
4	苯氧异丙醇	0.082	1.364	0.060	1.121
5	2,6-二氯苯甲醇	0.033	0.872	0.062	0.388
6	苯甲酸甲酯	0.031	0.865	0.054	0.346
7	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	0.034	0.925	0.039	0.317
8	对氯间甲酚	0.025	0.432	0.040	0.688
9	2,4-二氯苯甲醇	0.073	0.274	0.036	0.328
10	邻苯基苯酚	0.054	0.164	0.032	0.512
11	邻伞花烃-5-醇	0.024	0.631	0.014	0.364
12	氯二甲酚	0.081	0.692	0.020	0.268
13	氯咪巴唑	0.063	0.592	0.013	0.156
14	苯氯酚	0.038	0.381	0.023	0.246
15	吡罗克酮乙醇胺盐	0.062	0.390	0.015	0.306
16	三氯卡班	0.049	0.475	0.019	0.284
17	三氯生	0.046	0.590	0.021	0.385
18	溴氯芬	0.052	0.719	0.023	0.451

2.4 加标回收实验

取某护肤水样品，按照 1.5 前处理方式处理样品后上机。样品仅检出 1203 mg/g 4-羟基苯甲酸甲酯。向样品中分别添加标准储备液 20 μ L 和 200 μ L，对应的上机浓度分别为标准曲线第二点和第五点，进行加标回收测试。结果表明，41 种防腐剂的加标回收结果为 91.8%~104.2%，RSD 为 0.31%~3.62%。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=3)

方法	No.	名称	样品含量 mg/kg	加标浓度 1		加标浓度 2	
				回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
	1	甲基异噻唑啉酮	N.D.	104.2	1.41	103.2	1.67
	2	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	N.D.	102.3	0.89	98.7	1.12
	3	4-羟基苯甲酸	N.D.	92.6	0.96	91.8	1.34
	4	甲基氯异噻唑啉酮	N.D.	101.3	1.48	104.2	1.11
	5	苯甲醇	N.D.	100.2	0.98	103.6	0.86
	6	苯氧乙醇	N.D.	102.7	0.54	98.7	0.67
	7	苯甲酸	N.D.	101.2	0.32	99.4	0.77
	8	4-羟基苯甲酸甲酯	1203	93.4	1.31	95.4	2.17
	9	氯苯甘醚	N.D.	103.6	1.19	100.6	0.91
	10	脱氢乙酸	N.D.	101.0	2.15	102.3	1.14
	11	5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷	N.D.	98.4	0.95	99.3	1.13
4.1	12	4-羟基苯甲酸乙酯	N.D.	95.6	0.83	99.7	1.76
	13	4-羟基苯甲酸异丙酯	N.D.	95.4	1.37	98.2	1.96
	14	4-羟基苯甲酸丙酯	N.D.	97.4	0.96	93.0	1.83
	15	4-羟基苯甲酸苯酯	N.D.	96.7	1.93	98.5	1.50
	16	4-羟基苯甲酸异丁酯	N.D.	102.1	2.34	99.6	1.49
	17	4-羟基苯甲酸丁酯	N.D.	102.6	0.96	97.0	1.78
	18	4-羟基苯甲酸苄酯	N.D.	101.0	1.56	104.0	1.97
	19	苯甲酸乙酯	N.D.	98.2	1.59	98.0	0.31
	20	4-羟基苯甲酸戊酯	N.D.	96.5	1.57	103.9	1.87
	21	苯甲酸异丙酯	N.D.	96.5	1.96	96.2	1.75
	22	苯甲酸丙酯	N.D.	95.0	1.32	102.0	1.65
	23	苯甲酸苯基酯	N.D.	98.5	2.54	101.1	1.06
4.2	1	吡硫鎓锌	N.D.	104.6	3.06	104.7	3.62
	2	水杨酸	N.D.	96.7	1.15	101.3	0.96

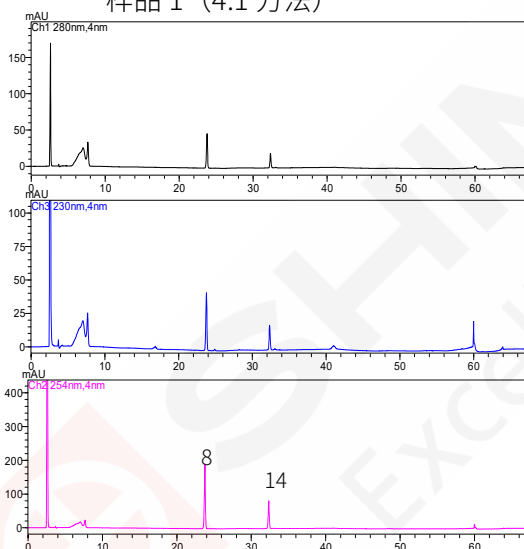
3	山梨酸	N.D.	95.2	1.03	103.4	1.39
4	苯氧异丙醇	N.D.	98.2	1.36	96.0	1.12
5	2,6-二氯苯甲醇	N.D.	103.3	0.87	102.6	1.38
6	苯甲酸甲酯	N.D.	103.1	0.86	95.4	1.34
7	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	N.D.	97.4	0.92	103.9	1.37
8	对氯间甲酚	N.D.	95.2	1.43	104.0	1.68
9	2,4-二氯苯甲醇	N.D.	97.3	1.27	96.3	1.32
10	邻苯基苯酚	N.D.	101.5	1.64	103.2	1.52
11	邻伞花烃-5-醇	N.D.	102.4	1.36	101.4	1.64
12	氯二甲酚	N.D.	98.1	2.68	102.0	1.68
13	氯咪巴唑	N.D.	96.3	2.59	97.3	1.56
14	苜氯酚	N.D.	98.3	1.83	102.3	2.46
15	吡罗克酮乙醇胺盐	N.D.	96.2	1.39	101.5	1.36
16	三氯卡班	N.D.	99.4	1.45	101.9	2.48
17	三氯生	N.D.	96.4	1.59	101.2	1.38
18	溴氯芬	N.D.	95.2	1.79	102.3	1.45

注释：N.D. 为未检出

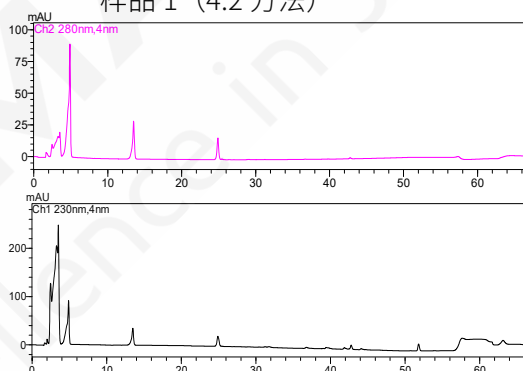
2.5 样品测试

取 2 个化妆品样品，分别准确称量 1.0 g，参考 1.5 的样品前处理方法，制备上机。具体测试结果如下表 6。其样品色谱图如图 4。

样品 1 (4.1 方法)



样品 1 (4.2 方法)



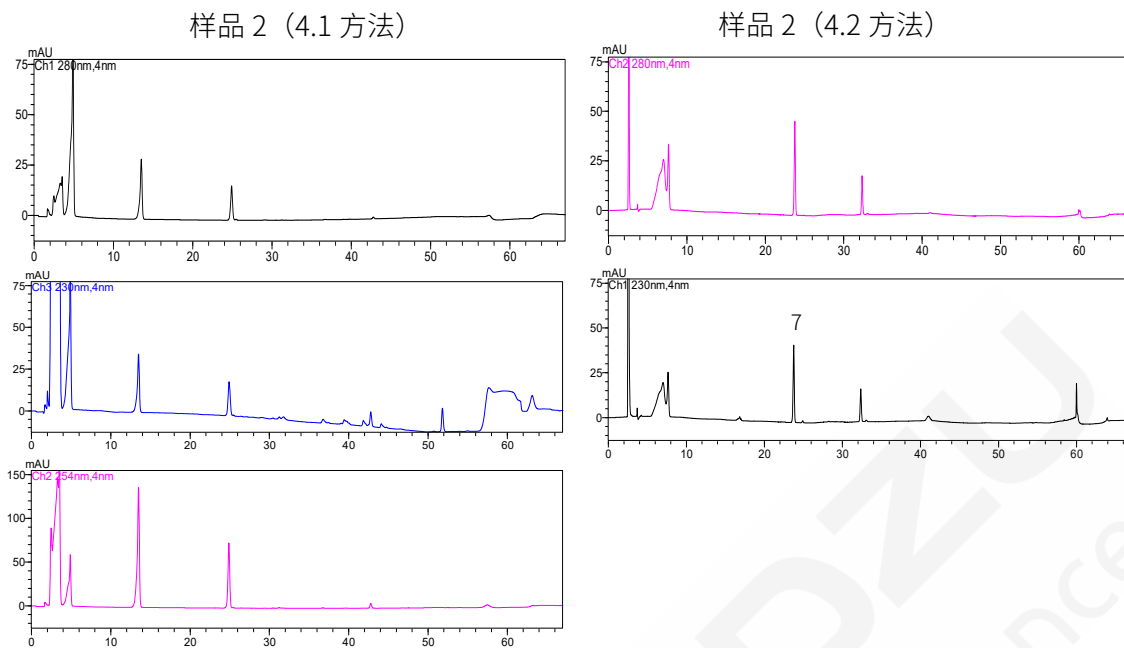


图 4 样品色谱图

表 6 样品测试结果

色谱峰编号	化合物	样品浓度, %	
		样品 1	样品 2
4.1 方法 No.8	4-羟基苯甲酸甲酯	0.034	N.D.
4.1 方法 No.14	4-羟基苯甲酸丙酯	0.021	N.D.
4.2 方法 No.7	碘丙炔醇丁基甲酸酯	N.D.	0.008

注: N.D. 为未检出

4. 结论

本文使用岛津 LC-40 双进样液相分析系统建立同时分析甲基异噻唑啉酮等 23 个组分和吡硫鎓锌等 18 个组分两个项目方法; 并考察了线性、重复性、实际样品测试等, 可以满足《化妆品安全技术规范》(2022 年) 征求意见稿, “4 防腐剂检验方法” 中 4.1 和 4.2 章节液相方法分析要求。LC-40 双进样液相分析系统可以实现一次同时分析两组样品, 且项目不干扰; 在不改变法规方法同时, 实现分析时间节省一半, 提高了工作效率, 可供相关行业参考。

化妆品中 CI 10020 等 11 种原料和 CI 11920 等 13 种原料的测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定化妆品中 CI 10020 等 11 种原料和 CI 11920 等 13 种原料含量的方法。24 种着色剂组分 1.0-10.0 mg/L 浓度范围内,其相关系数大于 0.997,各浓度点的回读准确度在 93.5%~108.9%之间,线性相关性良好。稳定性考察中,24 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.016~0.107%和 0.335~1.215%之间,仪器精密度良好。双进样液相分析系统可以实现一次进样同时分析两组样品,既不改变法规方法又可实现分析快速,满足国家药检局(2023 年第 41 号)通告中《化妆品中 CI 10020 等 11 种原料的检测方法》和《化妆品中 CI 11920 等 13 种原料的检测方法》的检测需求。

关键词: 双进样液相分析系统 化妆品 禁用着色剂

技术特点:

- ❖ 不改变现有法规方法条件,一次分析同时做两个项目,节省分析时间,减少样品降解。
- ❖ 针对两个项目(相同流动相,不同梯度),该系统可以共用流动相,提高工作效率。

着色剂(也称色素)作为化妆品原料之一,在化妆品中广泛使用。着色剂按照性能和着色方式可分为染料和颜料两大类,染料又分为天然染料和合成染料,颜料则分为无机颜料和有机颜料。按照来源方式,可分为天然着色剂和合成着色剂两大类。其中天然染料和无机颜料一般属于天然着色剂,合成着色剂则包括合成染料及有机颜料。大多数的合成着色剂多来自煤焦油产物,往往会对人体造成不同程度的危害,例如,导致生育能力下降、畸胎,甚至诱发癌症,一些合成色

素可引起光敏反应。为安全起见,我国《化妆品安全技术规范》对化妆品用着色剂的品种、使用范围和限制条件都做出了明确的规定。

本文参考国家药检局(2023 年第 41 号)公布的《化妆品中 CI 10020 等 11 种原料的检测方法》和《化妆品中 CI 11920 等 13 种原料的检测方法》,采用岛津双进样液相分析系统建立测定化妆品中 CI 10020 等 11 种原料和 CI 11920 等 13 种原料含量的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统,具体配置如下:

输 液 泵	: LC-40D XR (LPGE) (流路 1)	系统控制器	: CBM-40A
	LC-40B XR (流路 2)		
脱 气 机	: DGU-405×2	检 测 器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.117
柱 温 箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

流路 1 和流路 2 的液相条件

色 谱 柱： Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μ m),
(P/N:227-30017-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流 动 相： A -0.02mol/L 乙酸铵溶液 B -乙腈

流 速： 0.8 mL/min 柱 温： 35°C

波 长： 250 nm、500 nm、620 nm 进 样 体 积： 5 μ L

洗 脱 方 式： 梯度洗脱，两组的梯度程序分别如下图。

表 1 流路 1 (第一组: 11 种) 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	98	2
5	98	2
7	90	10
11	80	20
32	50	50
34	10	90
35	98	2
45	98	2

表 2 流路 2 (第二组: 13 种) 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	80	20
7	60	40
18	55	45
28	0	100
38	0	100
39	80	20
45	80	20

1.3 混合标准溶液配置

标准工作溶液: 取浓度为 1.0 g/L 的各染料标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中, 用纯水稀释, 配制成浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 μ g/mL 的标准工作溶液。

1.4 样品前处理方法

称取样品 0.2 g (精确到 0.0001g) 于 10 mL 具塞比色管中, 加 0.02 mol/L 乙酸铵溶液适量, 涡旋分散, 超声提取 10 min, 必要时可用甲酸或氨水调节 pH 值, 使 pH 值范围在 5.5~7.0 之间, 用 0.02 mol/L 乙酸铵溶液定容至刻度。如为浑浊溶液, 可取适量离心 (5000 rpm) 5 min, 取上清液经 0.45 μ m 亲水微孔聚四氟乙烯 (PTFE) 滤膜过滤, 滤液作为待测溶液, 并于 6 小时内完成检测。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

混合标准溶液10 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图如图1-2所示，着色剂编号同表3

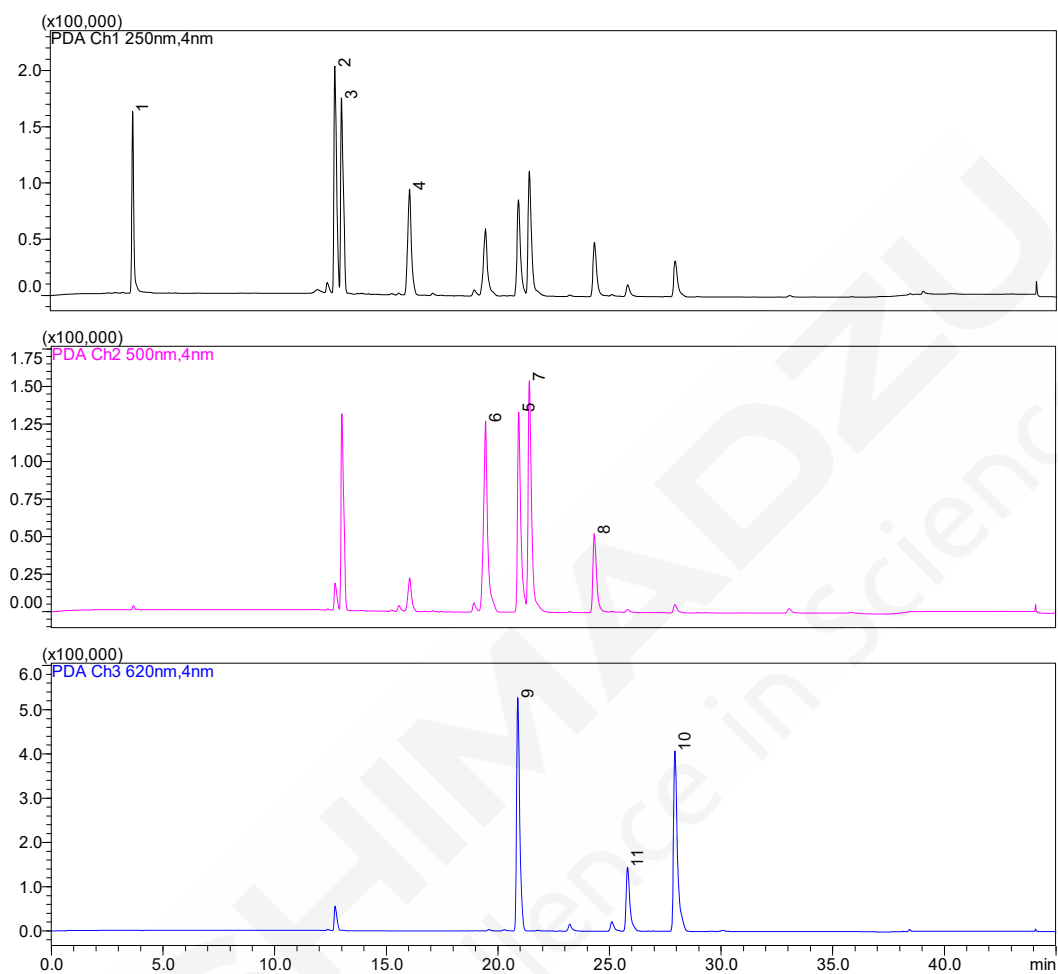
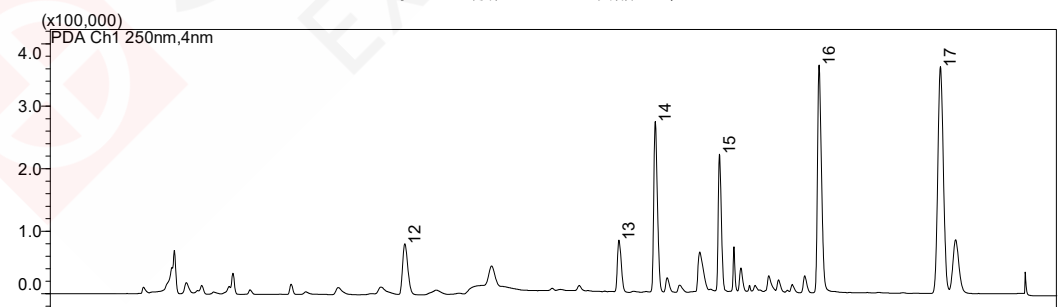


图 1 10 $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液色谱图 (流路 1)

(第一组, 1.溶剂绿 7、2.酸性绿 1、3.食品红 14、4.食品红 1、5.酸性黄 73、6.酸性橙 6、7.酸性红 87、8.食品红 9、9.食品绿 3、10.酸性蓝 1、11.食品蓝 5)



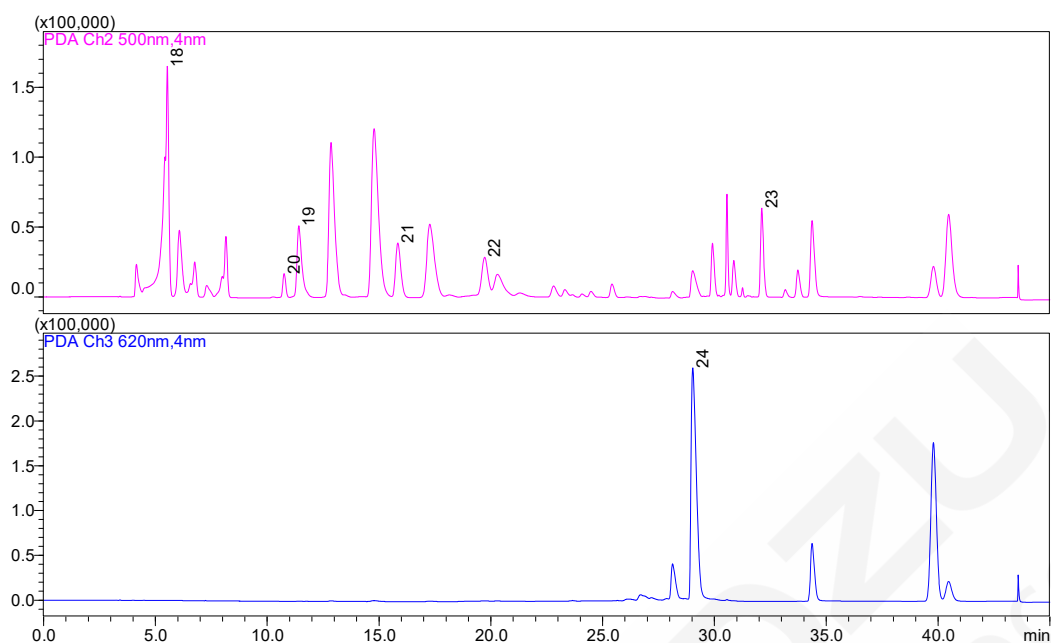


图 2 10 µg/mL 标准品溶液色谱图 (流路 2)

(第二组: 12. 颜料红 83、13. 颜料红 63、14. 酸性紫 9、15. 颜料红 64、16. 食品橙 3、17. 溶剂红 3、18. 酸性橙 11、19. 颜料红 4、20. 碱性蓝 26、21. 碱性紫 14、22. 溶剂黄 33、23. 溶剂紫 13、24. 溶剂绿 3)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按1.3中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，部分化合物结果如图4所示。在1.0~10.0 mg/L浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 >0.997 ，具体结果见表3。

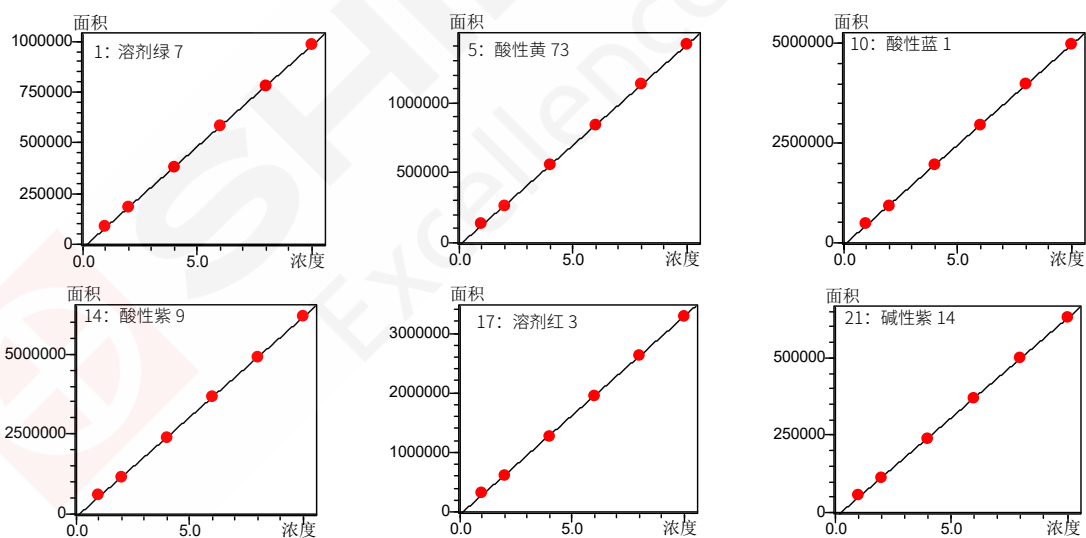


图 3 部分化合物的校准曲线

2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.016~0.107%和 0.335~1.215%之间，仪器精密度良好。

2.4 加标回收率测试

取化妆品样品（本底样品经测试未检出 24 种着色剂）加入一定浓度的着色剂标液（加标浓度如表 3 所示），按照 1.5 中样品制备方法，每个浓度平行制备 3 份样品。加标回收率测试结果显示：24 种着色剂的样品加标回收率在 85.2%~109.2%之间，满足标准测试要求，结果如表 3。

3. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立快速测定溶剂绿 7 等 24 种禁用着色剂含量的方法，并考察了线性、重复性、加标回收率，可以满足国家药监局发布的《化妆品中 CI 10020 等 11 种原料的检测方法》和《化妆品中 CI 11920 等 13 种原料的检测方法》的检测需求。双进样液相分析系统可以实现一次分析同时测试两组样品，不改变法规方法、分析耗时降低一倍，可供相关行业参考。

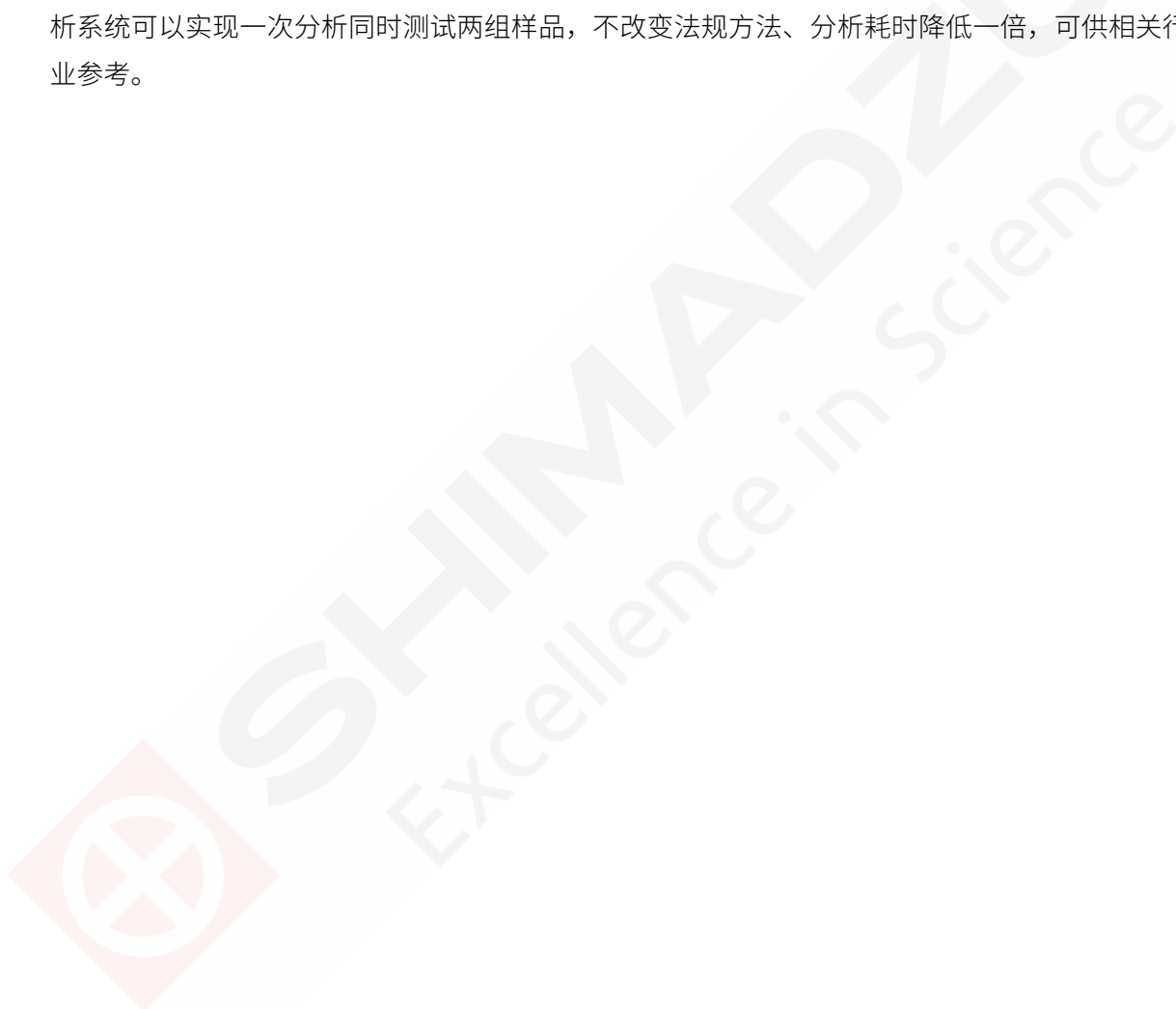


表 3 校准曲线参数、保留时间和峰面积重复性及回收率测试结果

No.	索引号	化合物名称	相关系数 r	准确度(%)	检出限 ($\mu\text{g/g}$)	RSD% (2 $\mu\text{g/mL}$)		RSD% (6 $\mu\text{g/mL}$)		加标浓度 (50 $\mu\text{g/g}$)		加标浓度 (200 $\mu\text{g/g}$)	
						R.T.	Area	R.T.	Area	检测值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	检测值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
1	CI 59040	溶剂绿 7	0.9995	98.6~105.2	2.1	0.086	0.457	0.079	0.542	43.2	86.4	176.2	88.1
2	CI 10020	酸性绿 1	0.9998	97.5~104.8	1.4	0.034	0.447	0.064	0.833	46.4	92.8	187	93.5
3	CI 45430	食品红 14	0.9992	93.5~104.7	1.2	0.036	0.412	0.058	0.335	42.8	85.6	174.2	87.1
4	CI 14700	食品红 1	0.9997	96.5~105.7	3.2	0.028	0.466	0.079	0.527	47.6	95.2	194.2	97.1
5	CI 45350	酸性黄 73	0.9996	98.2~102.5	2.3	0.027	0.452	0.064	0.613	44.3	88.6	179	89.5
6	CI 14270	酸性橙 6	0.9991	96.5~105.3	1.1	0.054	0.441	0.038	0.484	48.9	97.8	191.2	95.6
7	CI 45380	酸性红 87	0.9989	98.7~103.1	2.4	0.022	0.459	0.056	0.461	46.5	93	192.6	96.3
8	CI 16185	食品红 9	0.9992	96.5~104.8	0.7	0.016	0.508	0.049	0.592	51.2	102.4	197.4	98.7
9	CI 42053	食品绿 3	0.9993	95.2~103.6	1.1	0.026	0.454	0.081	0.533	43.7	87.4	178.8	89.4
10	CI 42045	酸性蓝 1	0.9997	97.4~105.3	2.3	0.076	0.453	0.062	0.688	53.2	106.4	206.6	103.3
11	CI 42051	食品蓝 5	0.9994	96.4~104.2	1.2	0.097	0.457	0.058	0.625	44.3	88.6	183.4	91.7
12	CI 58000	颜料红 83	0.9999	96.6~106.1	2.6	0.075	0.537	0.063	0.497	46.5	93	190.2	95.1
13	CI 15880	颜料红 63	0.9998	97.6~104.9	2.1	0.064	0.628	0.051	0.814	48.3	96.6	196.4	98.2
14	CI 45190	酸性紫 9	0.9999	98.4~108.3	3.5	0.045	0.577	0.068	0.766	54.6	109.2	210.6	105.3

15	CI 15800	颜料红 64	0.9992	94.1~103.8	1.2	0.079	0.679	0.094	0.692	44.2	88.4	187.2	93.6
16	CI 11920	食品橙 3	0.9998	97.3~107.5	1.0	0.061	0.759	0.075	0.773	49.2	98.4	190.2	95.1
17	CI 12010	溶剂红 3	0.9999	96.7~103.2	2.3	0.073	0.494	0.082	0.588	48.6	97.2	187.6	93.8
18	CI 45370	酸性橙 11	0.9979	95.8~105.3	1.3	0.107	0.641	0.093	0.696	52.4	104.8	217.8	108.9
19	CI 12085	颜料红 4	0.9999	97.5~106.3	0.8	0.082	0.825	0.066	0.831	53.2	106.4	198.8	99.4
20	CI 44045	碱性蓝 26	0.9985	93.6~108.9	0.5	0.094	0.766	0.081	0.779	51	102	208.4	104.2
21	CI 42510	碱性紫 14	0.9998	94.3~107.6	1.5	0.058	0.527	0.070	0.628	45.1	90.2	178.4	89.2
22	CI 47000	溶剂黄 33	0.9990	95.7~102.8	0.9	0.066	1.215	0.041	1.036	42.6	85.2	178.8	89.4
23	CI 60725	溶剂紫 13	0.9998	97.1~102.5	1.4	0.073	0.744	0.063	0.782	53.3	106.6	202.6	101.3
24	CI 61565	溶剂绿 3	0.9996	94.6~105.1	0.7	0.068	0.639	0.055	0.694	45.8	91.6	191.6	95.8

化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的检测方法。巯基乙酸等 8 种原料 1.0-100.0mg/L 浓度范围内,其相关系数大于 0.997,各浓度点的回读准确度在 87.8%~109.5%之间,线性相关性良好。稳定性考察中,8 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.004~0.191%和 0.074~2.845%之间,仪器精密度良好。双进样液相分析系统可以实现一次进样同时分析两组样品,既不改变法规方法又可实现分析快速,满足国家药监局公布的《化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的检测方法》中液相方法的检测需求。

关键词: 双进样液相分析系统; 巯基乙酸

技术特点:

- ❖ 同一项目中两组方法(相同流动相,不同梯度),该系统可共用流动相,提高工作效率。
- ❖ 不改变现有法规方法条件,同时分析两组样品,节省时间,减少样品降解。

巯基乙酸酯类是一种常用于化妆品中的化学成分,其主要作用是起到抗氧化和保湿作用,它们通常被用于防止自由基损伤和减少细纹和皱纹。而对于头发而言,巯基乙酸的氧化作用会致使头发表层的鳞片遭到破坏,使头发内部结构处于无保护状态,导致头发内部的水分和营养成分流失,从而使头发的角蛋白发生病变,使头发发黄、发脆,没有弹性,烫发后,头发与衣服上会留有一股难以洗掉的异臭味,这也与巯基乙酸类物质有很大的关系。巯基乙酸与巯基乙酸盐不仅有刺激性、过敏性,还可能破坏人体的造血功

能,甚至诱发淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、白血病等,添加了这类物质的烫发剂,其安全性一直是公众比较关注的问题。为安全起见,我国《化妆品安全技术规范》对化妆品用烫发剂中巯基乙酸类原料类型、使用范围和限制条件都做出了明确的规定。

参考 8 月 22 日国家药监局发布通告(2023 年第 41 号)中《化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的检测方法》-液相法,采用岛津双进样液相分析系统建立测定化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统,具体配置如下:

输液泵	: LC-40D XR (LPGE) (流路 1)	系统控制器	: CBM-40A
	LC-40B XR (流路 2)		
脱气机	: DGU-405×2	检测器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.117
柱温箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

流路 1 和流路 2 的液相条件

色谱柱	: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm), (P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)
流动相	: A-磷酸溶液(0.05%) B-含0.05%磷酸的乙腈溶液

流 速 : 1.0 mL/min
波 长 : 210 nm
洗脱方式: 梯度洗脱, 两组的梯度程序分别如下图。

柱 温 : 30 °C
进 样 体 积: 20 μL

表 1 流路 1 (第一组: 6 种) 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	96	4
10.0	96	4
20.0	93	7
20.1	75	25
40.0	10	90
40.1	0	100
50.0	0	100
50.1	96	4
55.0	96	4

表 2 流路 2 (第二组: 2 种) 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	50	50
35	20	80
40.0	20	80
40.1	50	50
45.0	50	50

1.3 混合标准溶液配置

第一组标准工作溶液【巯基乙酸、甘油巯基乙酸、巯基乙酸甲酯、亚二巯基二乙酸、巯基乙酸乙酯、巯基乙酸异丙酯】: 取浓度为 1.0 g/L 的各原料标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈磷酸溶液 (1+9) 稀释, 配制成浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 的标准工作溶液。

第二组标准工作溶液【巯基乙酸丁酯、巯基乙酸异辛酯】: 取浓度为 1.0 g/L 的各原料标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈磷酸溶液 (8+2) 稀释, 配制成浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 的标准工作溶液。

1.4 样品前处理方法

第一组: 称取样品 0.25g (精确到 0.0001g) 于 25 mL 具塞比色管中, 加乙腈磷酸溶液 (1+9) 20 mL, 涡旋分散, 超声提取 15 min, 再用乙腈磷酸溶液 (1+9) 定容至刻度, 摇匀, 以 10000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为待测溶液。

第二组: 称取样品 0.25g (精确到 0.0001g) 于 25 mL 具塞比色管中, 加乙腈磷酸溶液 (1+9) 20 mL, 涡旋分散, 超声提取 15 min, 再用乙腈磷酸溶液 (8+2) 定容至刻度, 摇匀, 以 10000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为待测溶液。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

混合标准溶液20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的色谱图如图1-2所示，原料编号同表3

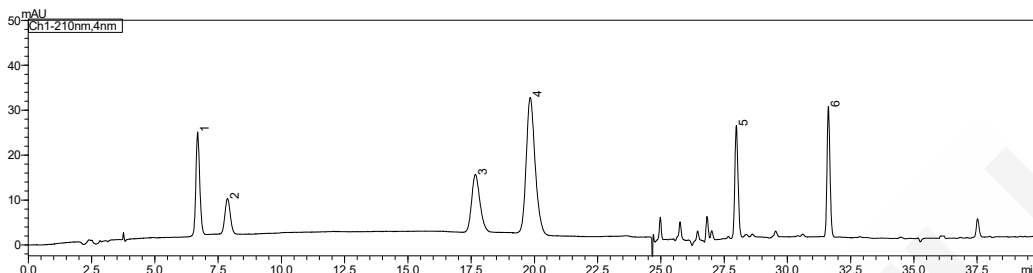


图 1 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品溶液色谱图 (流路 1)

(第一组, 1.巯基乙酸、2.甘油巯基乙酸酯、3.巯基乙酸甲酯、4.亚二巯基二乙酸、5.巯基乙酸乙酯、6.巯基乙酸异丙酯)

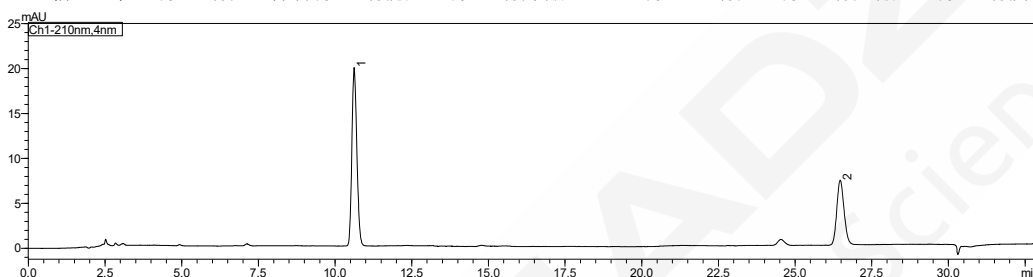


图 2 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品溶液色谱图 (流路 2)

(第二组: 1.巯基乙酸丁酯、2.巯基乙酸异辛酯)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按1.3中的分析条件进行测定，结果显示在1.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 >0.997 ，具体结果见表3。

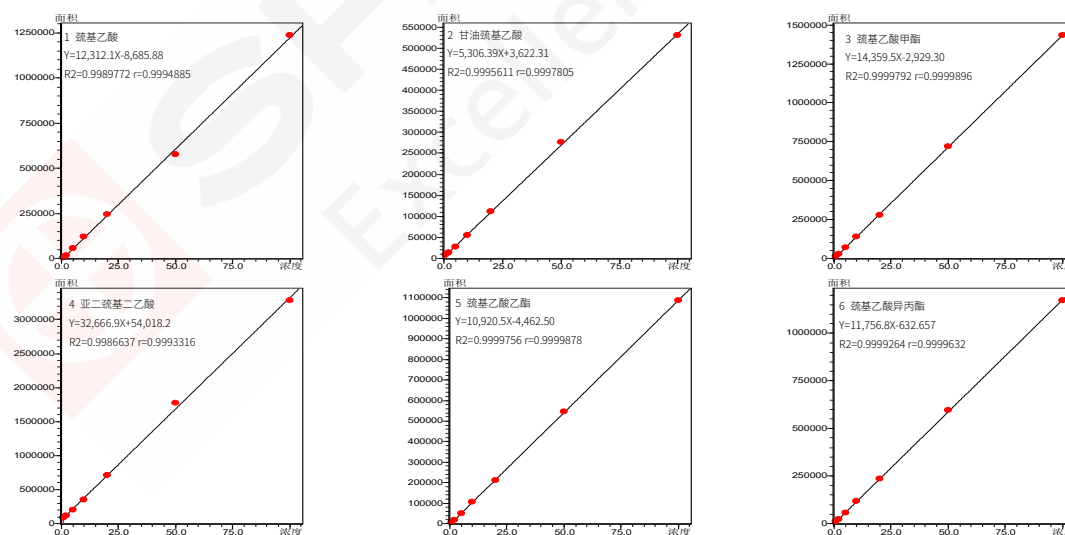


图 3 部分化合物的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	化合物名称	CAS 号	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 r	准确度(%)	检出限($\mu\text{g}/\text{g}$)
1	巯基乙酸	68-11-1	1.0~100.0	0.9994	95.0~108.1	0.11
2	甘油巯基乙酸酯	30618-84-9	1.0~100.0	0.9997	87.8~103.1	0.29
3	巯基乙酸甲酯	2365-48-2	1.0~100.0	0.9999	98.2~109.1	0.33
4	亚二巯基二乙酸	505-73-7	1.0~100.0	0.9993	89.5~105.5	0.09
5	巯基乙酸乙酯	623-51-8	1.0~100.0	0.9999	98.7~106.0	0.09
6	巯基乙酸异丙酯	7383-61-1	1.0~100.0	0.9999	93.0~101.4	0.08
7	巯基乙酸丁酯	10047-28-6	1.0~100.0	0.9999	97.9~109.5	0.44
8	巯基乙酸异辛酯	7659-86-1	1.0~100.0	0.9999	99.2~104.2	1.09

2.3 精密度实验

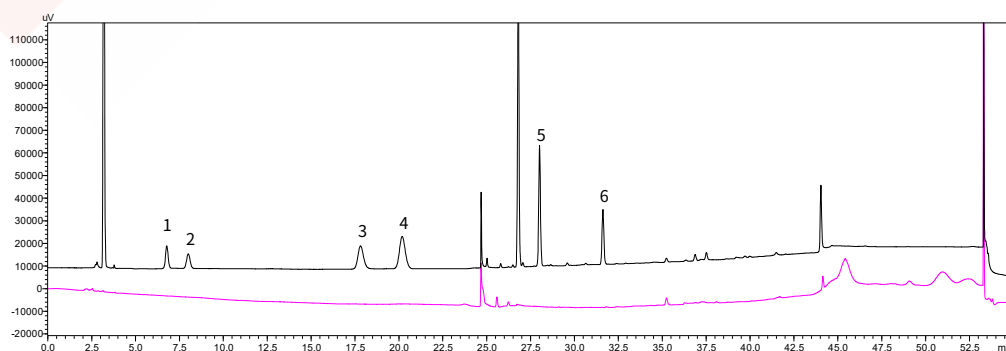
不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次, 用于考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.004~0.191%和 0.074~2.845%之间, 仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性、回收率测试结果

No.	化合物名称	RSD% (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		RSD% (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		加标浓度 (1000 $\mu\text{g}/\text{g}$)		加标浓度 (2000 $\mu\text{g}/\text{g}$)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	检测值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	回收率 (%)	检测值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	回收率 (%)
1	巯基乙酸	0.008	0.242	0.014	0.169	1065.1	106.5	1855.8	92.8
2	甘油巯基乙酸酯	0.018	0.299	0.016	0.211	996.5	99.6	2064.6	103.2
3	巯基乙酸甲酯	0.011	0.761	0.010	0.308	951.9	95.2	1943.0	97.2
4	亚二巯基二乙酸	0.020	0.577	0.026	0.289	1024.6	102.5	2023.5	101.1
5	巯基乙酸乙酯	0.008	0.526	0.004	0.225	1027.8	102.8	1984.6	99.2
6	巯基乙酸异丙酯	0.008	0.695	0.004	0.253	989.8	98.9	1976.3	98.8
7	巯基乙酸丁酯	0.098	0.074	0.191	0.820	974.0	97.4	1973.3	98.7
8	巯基乙酸异辛酯	0.058	0.929	0.143	2.845	1019.7	101.9	2045.9	102.3

2.4 加标回收率测试

取化妆品样品, 未检出 8 种巯基乙酸原料, 以此作为空白样品进行加标测试, 加入一定浓度的巯基乙酸标液 (加标浓度如表 3 所示), 按照 1.5 中样品制备方法, 每个浓度平行制备 2 份样品。加标回收率测试结果显示: 8 种巯基乙酸的样品加标回收率在 92.8%~106.5%之间, 满足标准测试要求, 样品加标回收色谱图如图 4、5 所示, 结果如表 4。

图 4 加标回收色谱图 (加标浓度: 1000 $\mu\text{g}/\text{g}$; 黑色: 加标样品; 红色: 空白样品)

(第一组, 1.巯基乙酸、2.甘油巯基乙酸酯、3.巯基乙酸甲酯、4.亚二巯基二乙酸、5.巯基乙酸乙酯、6.巯基乙酸异丙酯)

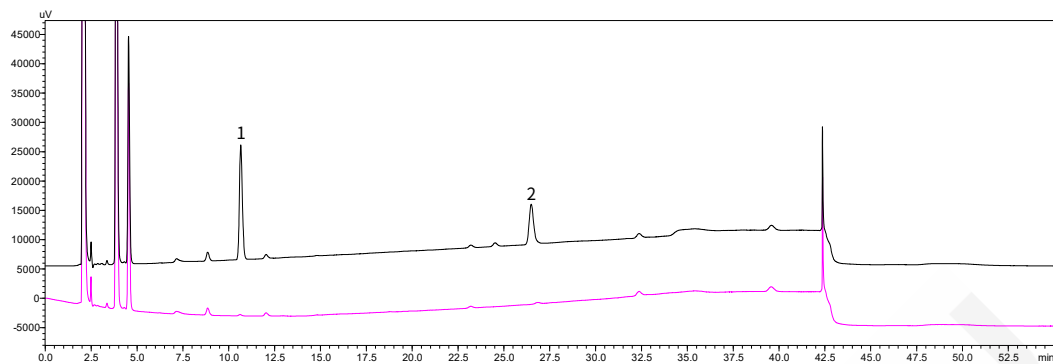


图5 加标回收色谱图 (加标浓度: 1000 $\mu\text{g/g}$; 黑色: 加标样品; 红色: 空白样品)

(第二组: 1.巯基乙酸丁酯、2.巯基乙酸异辛酯)

3. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立快速测定化妆品中巯基乙酸等 8 种原料含量的方法, 并考察了线性、重复性、加标回收率, 可以满足国家药监局发布的检测方法《化妆品中巯基乙酸等 8 种原料的检测方法》的检测需求。双进样液相分析系统可以实现一次进样同时分析两组样品, 不改变法规方法、分析耗时降低一倍, 可供相关行业参考。

2.2 中药配方颗粒中的应用



中药配方颗粒由单味中药饮片经水提、分离、浓缩、干燥、制粒而成的颗粒，在中医药理论指导下，按照中医临床处方调配后，供患者冲服使用。临床使用的中药配方颗粒品种大约 870 个，应用形式为散包调配和调配机调配。面对日益增多的品种与市场规模，国家在 2021 年出台了相关政策与法规对该行业进行监管；其中《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》就规范中药配方颗粒国家药品标准和省级药品监管部门标准制定的技术要求。目前，国家药典委员会已公示的 248 个中药配方颗粒品种的药品标准对应特征图谱分析条件、系统配置、特征图谱及分析结果；根据标准规定 HPLC 或 UHPLC 是主要检测仪器。

在中药特征图谱的鉴定和有效成分的分析测定过程中，由于中药成分复杂，目标化合物化学性质差异往往较大，常用的中药材中有效成分包括酚类物质（有紫外响应，用 PDA 检测），多糖类物质（无紫外响应，用 ELSD 检测），若使用液相色谱仪进行测试时，经常需要结合使用高选择性、高灵敏度的特异性检测器和通用型检测器，或者多类型色谱柱，共同对中药成分特征图谱和有效成分进行分析。如：四季青配方颗粒两种特征性指标成分中，长梗冬青苷无紫外响应，需使用 ELSD 检测器进行测定，原儿茶酸则可以使用紫外检测器进行分析。

因此，岛津双进样液相分析系统基于 Nexera LC-40XR 快速液相色谱仪（系统耐压 70 MPa）搭建，具有两个独立流路，可同时运行两组样品分析。由于两个流路是独立运行，可以实现输液泵（二元或四元）和检测器（PDA 或 ELSD）的配置多样化。满足中药特征图谱鉴定和有效成分测定使用场景。本章重点介绍岛津双进样液相分析系统在中药配方颗粒检测分析方面的性能优势和特点，为中药行业的研究和质量控制提供了有力支持，供中药行业从业人员参考。

四季青配方颗粒指标成分含量的测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了四季青配方颗粒中 2 种指标成分的含量测定方法。该方法可同时使用 ELSD 检测器和 PDA 检测器, 分别测定长梗冬青苷和原儿茶酸含量。长梗冬青苷在 5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 其相关系数为 0.9996; 原儿茶酸 1-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 其相关系数为 0.9990, 两种物质线性相关性良好。稳定性考察中, 2 种指标成分的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07~0.10%和 0.24~2.00%之间, 表明仪器精密度良好。双进样液相分析系统具有双流路可分别连接 PDA 与 ELSD 检测器, 进而同时分析两种不同类型的化合物, 从而实现四季青配方颗粒中长梗冬青苷和原儿茶酸两种指标成分的同时分析。

关键词: 双进样液相分析系统 四季青配方颗粒 长梗冬青苷 原儿茶酸

技术特点:

- ❖ 该系统具有双进样口, 双流路, 可同时使用两种检测器分析不同物质
- ❖ 可高效应对四季青配方颗粒中两种指标性成分的同时检测

四季青为冬青科植物, 具有清热解毒, 消肿祛瘀的功效, 可用于肺热咳嗽, 咽喉肿痛, 痢疾, 胁痛, 热淋; 外治烧烫伤, 皮肤溃疡。中药配方颗粒是中药汤剂的现代化产品, 制备成中药配方颗粒相比传统中药饮片, 可以免去临用前煎煮的麻烦, 大大节省时间精力。

《中国药典》2020 年版 I 部四季青的含量测定项下, 采用 HPLC-ELSD 检测长梗冬青苷。除此之外, 四季青中的原儿茶酸可起到抑菌、抗

病毒的作用, 是四季青中另一种指标成分。四季青中原儿茶酸的测定可采用 HPLC-PDA 法。

然而, 对于四季青中的两种指标性成分的检测, 需要使用两台液相色谱仪分别搭配两个检测器, 方法较为费时。岛津 LC-40 双进样液相分析系统, 可在一套系统上搭配两个检测器, 同时完成四季青中原儿茶酸和长梗冬青苷两类指标性成分的检测。方法省时省力, 可高效应对四季青配方颗粒的指标测试。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统, 具体配置如下:

输液泵	: LC-40D XR (LPGE)、LC-40B XR	系统控制器	: CBM-40A
脱气机	: DGU-405×2	检测器	: ELSD-LT III、SPD-M40
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.97
柱温箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

流路 1 (用于测定长梗冬青苷)

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),
(P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相: A-10%异丙醇水溶液; B-10%异丙醇甲醇溶液

流速: 1.0 mL/min 柱温: 50°C

进样体积: 10 μL 洗脱方式: 梯度洗脱, 见表1。

ELSD 条件

增益: Wide

漂移管温度: 40 °C

过滤器: 3s

表 1 流路 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	70	30
10	65	35
12	57	43
30	57	43
40	43	57
41	70	30
47	70	30

流路 2 (用于测定原儿茶酸)

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),
(P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相: A-0.1%磷酸水溶液; B-乙腈

流速: 1.0 mL/min

柱温: 50 °C

波长: 254 nm

进样体积: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 见表2。

表 2 流路 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	93	7
15	93	7
16	10	90
26	10	90
27	93	7
47	93	7

1.4 标准溶液配置

长梗冬青苷对照品溶液: 取长梗冬青苷对照品适量, 精密称定, 加 80%甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液, 即得。

原儿茶酸对照品溶液: 取原儿茶酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液, 即得。

1.5 样品前处理方法

长梗冬青苷供试品溶液: 取本品约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80%甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 80%甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

原儿茶酸供试品溶液: 取本品约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇溶液 20 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 放冷, 再称定重量, 用甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

长梗冬青苷标准溶液50 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图如图1所示,原儿茶酸标准溶液100 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图如图3所示。

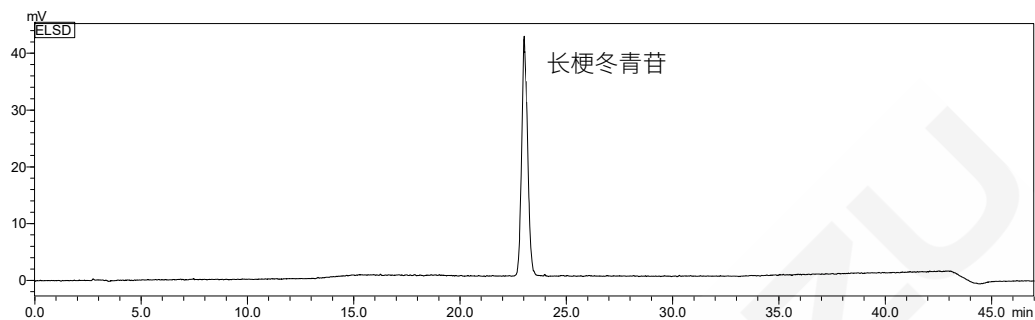


图 1 50 $\mu\text{g/mL}$ 长梗冬青苷标准品溶液色谱图 (流路 1)

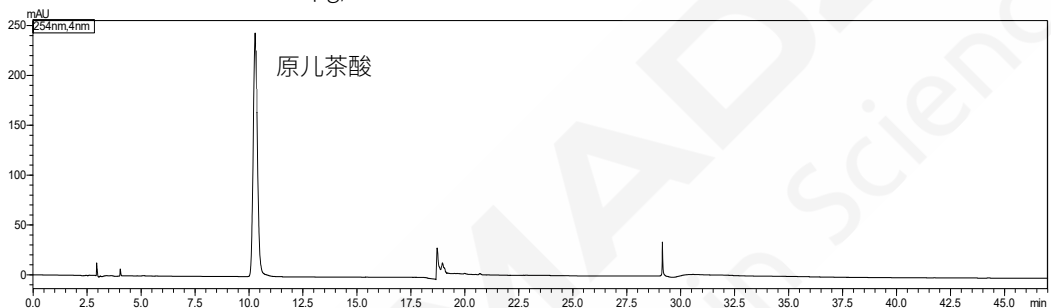


图 2 100 $\mu\text{g/mL}$ 原儿茶酸标准品溶液色谱图 (流路 2)

2.2 线性范围

按1.3中的对照品溶液制备方式,分别用80%甲醇和甲醇配制成浓度为5~500 $\mu\text{g/mL}$ 的长梗冬青苷和浓度为1~400 $\mu\text{g/mL}$ 的原儿茶酸标准工作溶液,按照1.2中的分析条件进行测定。结果表明,长梗冬青苷和原儿茶酸线性良好,线性相关系数均大于0.999,具体结果见表3。

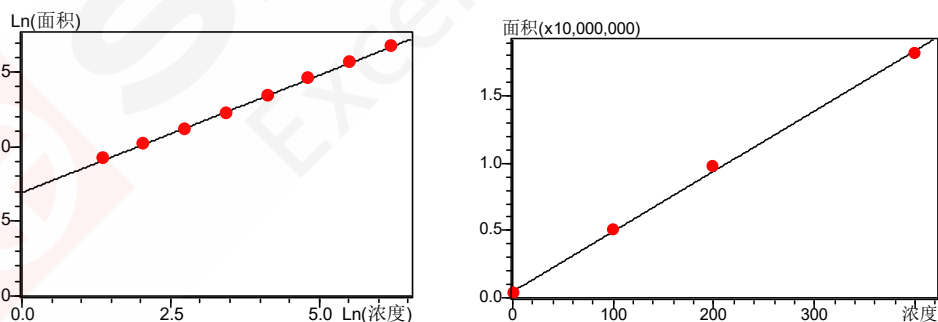


图 3 长梗冬青苷和原儿茶酸校准曲线

表 3 标准曲线结果

序号	化合物名称	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 (r)	检测限 LOD ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
1	长梗冬青苷	5~500	0.9996	2	5
2	原儿茶酸	1-400	0.9990	0.1	0.4

2.3 精密度实验

取供试品溶液，按照 1.2 分析条件连续进样 6 次，考察仪器精密度。结果如表 4，长梗冬青苷保留时间 RSD 为 0.07%，峰面积 RSD 为 2.00%，原儿茶酸保留时间 RSD 为 0.10%，峰面积 RSD 为 0.24%，表明仪器精密度良好。

表 4 精密度试验结果 (n=6)

序号	化合物名称	RSD (%)	
		保留时间(min)	峰面积
1	长梗冬青苷	0.07	2.00
2	原儿茶酸	0.10	0.24

2.4 样品测定

取 3 批四季青配方颗粒样品，按 1.4 制得供试品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，含量测定结果见表 5。3 批四季青配方颗粒样品长梗冬青苷含量为 1.14~1.46%，原儿茶酸含量为 2.16~2.40%。

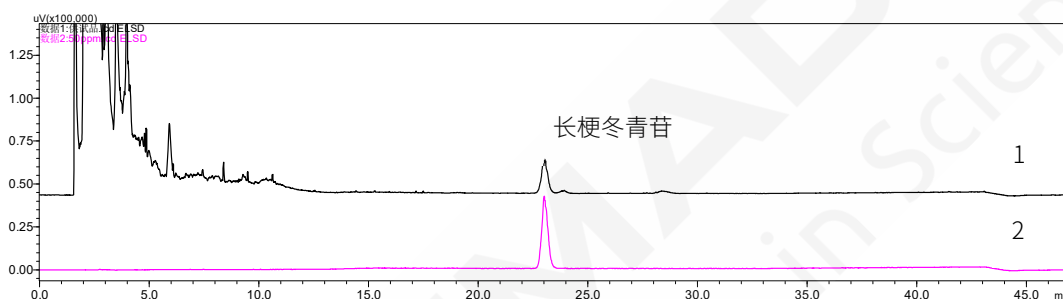


图 4. 长梗冬青苷色谱图 (流路 1: 1、四季青供试品溶液; 2、长梗冬青苷 50 µg/mL 对照品溶液)

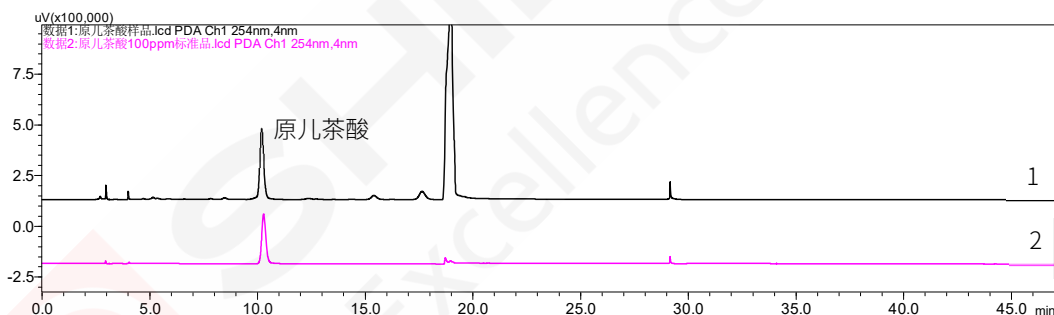


图 5. 原儿茶酸色谱图 (流路 2: 1、四季青供试品溶液; 2、原儿茶酸 100 µg/mL 对照品溶液)

表 5 供试品溶液测试结果

序号	化合物名称	样品 1	样品 2	样品 3
		含量 (%)	含量 (%)	含量 (%)
1	长梗冬青苷	1.14	1.46	1.25
		1.17	1.44	1.27
2	原儿茶酸	2.40	2.28	2.16
		2.38	2.28	2.16

2.5 加标回收测试

取同一批号、同一浓度的 9 份样品，分别精密加入混合对照品溶液，配制成相当于供试品 50% 含量、100% 含量、200% 含量的加样回收溶液，按 1.4 中供试品溶液的制备进行样品前处理，使用随行样品含量计算回收率，回收率测定结果见表 6。长梗冬青苷回收率为 101.8~108.1%，原儿茶酸回

收率为 103.7~106.2%。

表 6 回收率测定结果 (n=3)

序号	化合物名称	50%含量		100%含量		200%含量	
		回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
1	长梗冬青苷	108.1	2.13	104.7	2.73	101.8	3.03
2	原儿茶酸	103.7	0.53	104.1	0.21	106.2	0.27

3. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立了四季青配方颗粒 2 种指标成分的含量测定方法, 该方法可同时利用 ELSD 测定长梗冬青苷和 PDA 检测器测定原儿茶酸含量。考察了线性、重复性、加标回收率, 可以有效应对四季青中药配方颗粒中长梗冬青苷和原儿茶酸两种指标性成分的同时检测。

巴戟天配方颗粒特征图谱分析

摘要: 本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了巴戟天配方颗粒特征图谱的分析方法。该方法使用蒸发光散射检测器和紫外检测器同时测定巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类、寡糖类特征图谱。结果表明,巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类、寡糖类特征图谱分析结果符合标准规定。精密度试验中,环烯醚萜及蒽醌类各特征峰保留时间 RSD% 为 0.02~1.01%;寡糖类特征图谱各特征峰保留时间 RSD% 为 0.47~0.64%,仪器精密度良好。该方法省时、快速、稳定,可应对巴戟天配方颗粒特征谱图的分析。

关键词: 双进样液相分析系统 巴戟天配方颗粒 特征图谱

技术特点:

- ❖ 该系统具有独立双流路,可同时并列PDA和ELSD两个检测器,实现不同性质物质分析。
- ❖ 一次同时分析巴戟天中糖类和苷类两类物质的特征谱图,节省分析时间。

巴戟天为茜草科植物,其具有补肾阳,强筋骨,祛风湿的功效。中药配方颗粒是中药汤剂的现代化产品。将其制备成中药配方颗粒相比传统中药饮片,可以免去临用前煎煮的麻烦,大大节省时间精力,中药配方颗粒这一新兴中药服药方式的质量标准进行全国规范的统一,对中药市场的长远发展具有深远意义。

国家药品监督管理局国家药品标准 YBZ-PFKL-2021001《巴戟天配方颗粒》中,使用 PDA

检测器测定环烯醚萜及蒽醌类特征图谱,ELSD检测器测定寡糖类特征图谱。该标准需要使用两套液相色谱仪分别搭配两个检测器进行检测,较为费时。岛津 LC-40 双进样液相色谱仪,可在一套系统上搭配两个检测器,同时完成巴戟天配方颗粒中环烯醚萜及蒽醌类特征图谱和寡糖类特征图谱的检测。该方法省时省力,可高效应对《巴戟天配方颗粒》国家药品标准的特征图谱分析。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统,具体配置如下:

输液泵	: LC-40B XR×2	系统控制器	: CBM-40
脱气机	: DGU-405×2	检测器	: SPD-40、ELSD-LT III
自动进样器	: SIL-40C XR	柱温箱	: CTO-40C
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.128		

1.2 分析条件

流路 1: 环烯醚萜及蒽醌类特征图谱分析条件

色谱柱	: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm)		
流动相	: A 相-0.2%磷酸水溶液; B 相-甲醇		
流速	: 0.3 mL/min	柱温	: 30°C
波长	: 235nm、280nm	进样体积	: 1 μL
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为1%, 洗脱程序见表1。		

表 1. 流路 1 梯度洗脱程序

时间(min)	单元	处理命令	值
8.00	泵	B.Conc	1
10.00	泵	B.Conc	7
15.00	泵	B.Conc	10
20.00	泵	B.Conc	48
30.00	泵	B.Conc	75
35.00	泵	B.Conc	90
35.10	泵	B.Conc	1
45.00	控制器	Stop	

流路 2: 寡糖类特征图谱分析条件

色 谱 柱 : ShimNex HE Amide (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01243-29)

流 动 相 : A 相-水; B 相-乙腈

流 速 : 1.0 mL/min 柱 温 : 30 $^{\circ}$ C

进 样 体 积 : 10 μ L

E L S D 条 件 : 增益 Wide, 漂移管温度 40 $^{\circ}$ C, 雾化器压力 350 kPa

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 78%, 洗脱程序见表 2。

表 2. 流路 2 梯度洗脱程序

时间(min)	单元	处理命令	值
5.00	泵	B.Conc	78
20.00	泵	B.Conc	60
24.00	泵	B.Conc	60
26.00	泵	B.Conc	78
45.00	控制器	Stop	

1.3 对照品溶液配制

对照品溶液配制参照国家药品监督管理局发布的《巴戟天配方颗粒》国家药品标准配制。

环烯醚萜及蒽醌类对照品溶液配制: 取水晶兰苷、去乙酰车叶草苷酸、甲基异茜草素-1-甲醚对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成 75 μ g/mL 的水晶兰苷、100 μ g/mL 的去乙酰车叶草苷酸、100 μ g/mL 的甲基异茜草素-1-甲醚混合对照品溶液, 即得。

寡糖类对照品溶液配制: 分别取蔗糖、1-蔗糖三糖、耐斯糖、巴戟天寡糖 5 聚糖对照品适量, 精密称定, 加 80% 乙腈制成 500 μ g/mL 的混合对照品溶液, 即得。

1.4 供试品前处理方法

供试品溶液配制参照国家药品监督管理局发布的《巴戟天配方颗粒》国家药品标准配制。

环烯醚萜及蒽醌类供试品溶液配制: 取本品适量, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 60 min, 放冷, 再称定重量, 用 30% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

寡糖类供试品溶液配制: 取本品适量, 研细, 取约 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇

15 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 放冷, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2. 结果与讨论

2.1 特征图谱分析

取1.3和1.4中的对照品溶液和供试品溶液, 按1.2分析条件进行分析, 色谱图如图1~2所示, 结果见表3~4。结果表明, 巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类、寡糖类特征图谱分析结果符合标准规定。

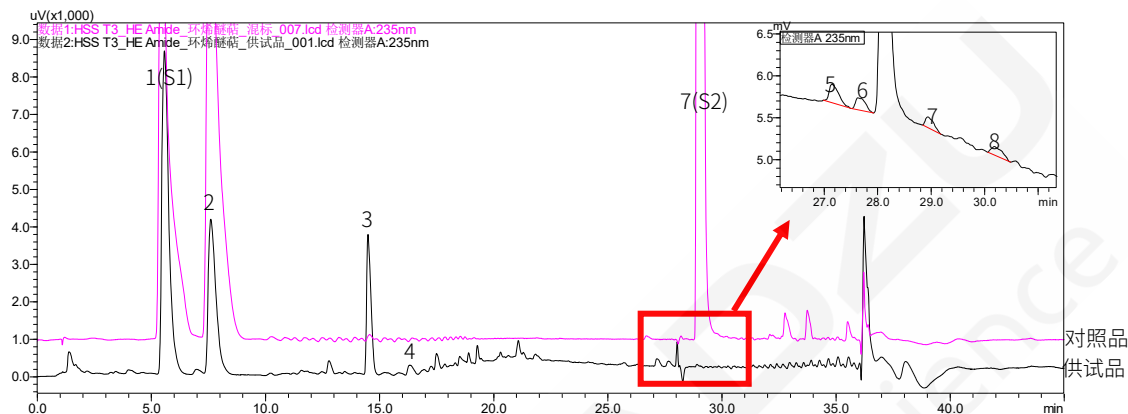


图 1. 巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类特征色谱图

(峰 1(S1): 水晶兰苷; 峰 2: 去乙酰车叶草苷酸; 峰 7(S2): 甲基异茜草素-1-甲醚)

表 3. 巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类供试品溶液特征图谱结果

特征峰 No.	保留时间(min)	相对保留时间 (实际测定)	相对保留时间 (标准规定)
1(S1)	5.618	-	-
2	7.617	1.356	1.42 (1.278~1.562)
3	14.532	2.587	2.82 (2.538~3.102)
4	16.315	2.904	2.96 (2.664~3.256)
5	27.227	0.941	0.94 (0.846~1.034)
6	27.821	0.961	0.95 (0.855~1.045)
7(S2)	28.939	-	-
8	30.252	1.045	1.04 (0.936~1.144)

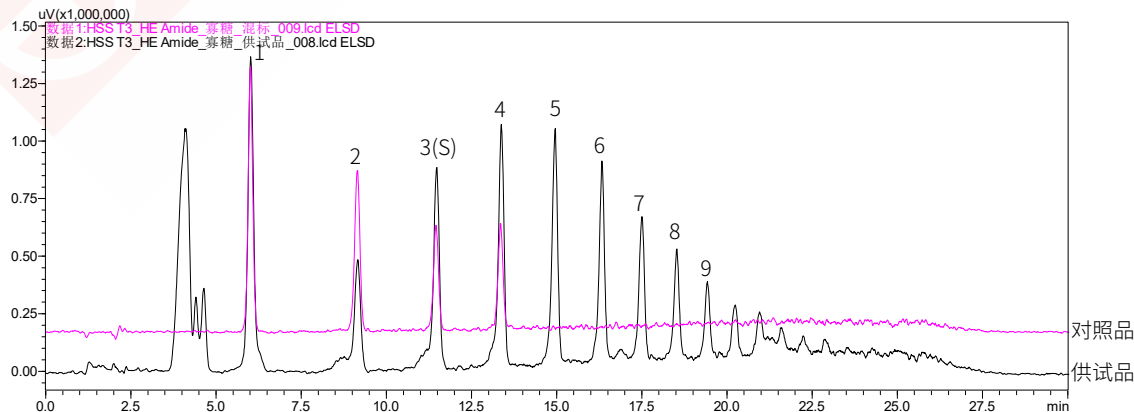


图 2. 巴戟天配方颗粒寡糖类特征色谱图

(峰 1: 蔗糖; 峰 2: 1-蔗果三糖; 峰 3(S): 耐斯糖; 峰 4: 巴戟天寡 5 聚糖)

表 4. 巴戟天配方颗粒寡糖类供试品溶液特征图谱结果

特征峰 No.	保留时间(min)	相对保留时间 (实际测定)	相对保留时间 (标准规定)
1	6.105	0.524	0.54 (0.513~0.567)
2	9.298	0.798	0.77 (0.731~0.808)
3(S)	11.644	-	-
4	13.563	1.165	1.19 (1.130~1.249)
5	15.147	1.301	1.34 (1.206~1.474)
6	16.542	1.421	1.47 (1.323~1.617)
7	17.723	1.522	1.58 (1.422~1.738)
8	18.757	1.611	1.68 (1.512~1.848)
9	19.672	1.689	1.76 (1.584~1.936)

2.2 精密度

取 1.4 制得的供试品溶液，按 1.2 中的分析条件，重复进样 6 次，计算重复性。结果表明，环烯醚萜及蒽醌类特征图谱中的 8 个特征峰保留时间 RSD% 为 0.02~1.01%；寡糖类特征图谱中的 9 个特征峰保留时间 RSD% 为 0.47~0.64%，仪器精密度良好。

表 5 精密度试验结果 (n=6)

类型	特征峰 No.	保留时间 (RSD%)	类型	特征峰 No.	保留时间 (RSD%)
环烯醚萜 及蒽醌类	1(S1)	1.01	寡糖类	1	0.63
	2	0.52		2	0.64
	3	0.12		3(S)	0.61
	4	0.11		4	0.58
	5	0.03		5	0.53
	6	0.04		6	0.51
	7(S2)	0.02		7	0.48
	8	0.09		8	0.47
				9	0.47

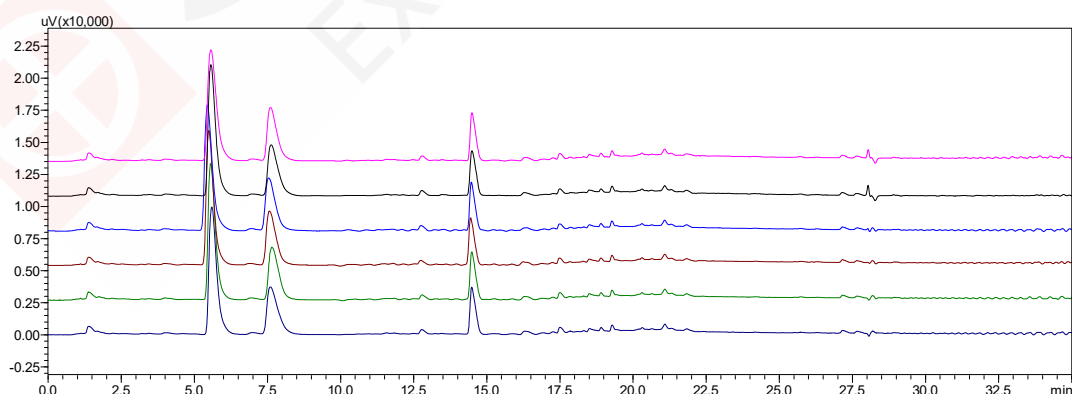


图 3. 巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类特征图谱连续 6 针色谱图

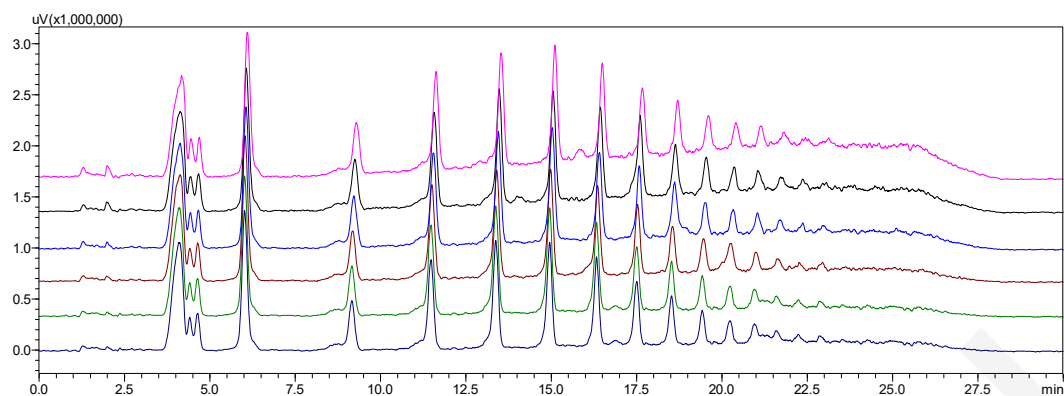


图 4. 巴戟天配方颗粒寡糖类特征图谱连续 6 针色谱图

3. 结论

本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了巴戟天配方颗粒特征图谱分析方法，该方法可使用蒸发光散射检测器和紫外检测器同时测定巴戟天配方颗粒环烯醚萜及蒽醌类、寡糖类的特征图谱。该方法不改变法规方法、分析耗时降低一倍，可以满足《巴戟天配方颗粒》国家药品标准的检测需求，对研究中药配方颗粒多种组分具有积极意义。

2.3 化药行业的应用



化学药物是从自然界的矿物、动植物中提取出来的有效成分，或者是通过化学合成或生物合制得的药物。这些药物具有明确的结构，可以用于预防、治疗和诊断疾病，或者用于调节人体功能、提高生活质量和保持身体健康的特殊化学品。为了确保药品的质量，保障药物上市后人们的使用安全，药物必须进行质量检测分析；从药品研发阶段成分分析、合成工艺优化，生产过程中主成分分析、杂质检测、有害物质研究；后期药品在人体内代谢产物分析等等，各个环节都涉及仪器分析。

美国药典（United States Pharmacopeia; USP）、日本药典（Japanese Pharmacopoeia; JP）以及《中国药典》等规定了各种项目的分析需要进行纯度试验和定量试验等，以确保药品的质量，而这些项目分析根据法规高效液相色谱法占有主流地位。即使是使用高效液相色谱法，但很多时候，根据分析目的不同，通常需要使用不同色谱条件进行多个项目测试，这就涉及多个 HPLC 条件分别进行分析。比如主成分含量高、有关物质含量低，无法实现一针进样分析，通常是需分两次进样（不同进样体积和进样浓度）分析测定；岛津双进样液相分析系统的自动进样器是双进样口设计，可以同时触发两个独立流路的运行；从而实现一套液相系统，同时完成主成分纯度、有关物质含量的测试分析，提升了分析效率。对于药典规定的类似测试项目，该系统的优势非常明显。本章主要介绍岛津双进样液相分析系统同时进行化药中主成分分析、有关物质分析方面的应用案例，充分展示了该仪器的性能优势和特点，供化药行业从业人员参考。

药品纯度试验与定量试验的同时分析

摘要: 本文使用 Nexera LC-40 双进样液相分析系统同时进行布洛芬的纯度试验及定量试验，在加速的分析条件下，获得了良好的分离和重现性结果，同时也可以显著减少分析工作所需的时间。本文列举的相关分析示例说明 Nexera 双进样系统可应用于药品、食品和环境等领域中 HPLC 分析多种目标组分的情况，可提高常规分析工作的效率。

关键词: 双进样液相分析系统；布洛芬；丙戊酮；纯度试验

技术特点:

- ❖ 双进样系统可同时进行化药的纯度实验和定量实验，提高分析工作的效率。
- ❖ 在USP<621>中规定的允许范围内改变分析条件，缩短分析时间，满足标准规定。

美国药典 (United States Pharmacopeia; USP) 和日本药典 (Japanese Pharmacopoeia; JP) 等规定了各种项目的分析需要进行纯度试验和定量试验等，以确保药品的质量。即使规定使用HPLC进行分析，但在很多时候，其中收录的分析条件因分析目的不同而进行多项试验，并要使用多个HPLC条件分别进行分析。

在本文中，关于“USP43-NF38”中收录的布洛芬的纯度试验（类似物质）和定量试验的分析方法，分析条件变化及其允许范围见USP General Chapter <621> Chromatography (在本文中称为USP <621>)，分析速度根据其作了提升。此外，将介绍使用Nexera双进样系统在两种快速分析条件下同时进行分析的示例。

1. 实验部分

1.1 系统配置

Nexera 双进样系统有两个独立的流路，分别进样，并同时在不同的条件下对两个系统进行分析。本实验采用流路①进行布洛芬的纯度试验，采用流路②进行定量试验。

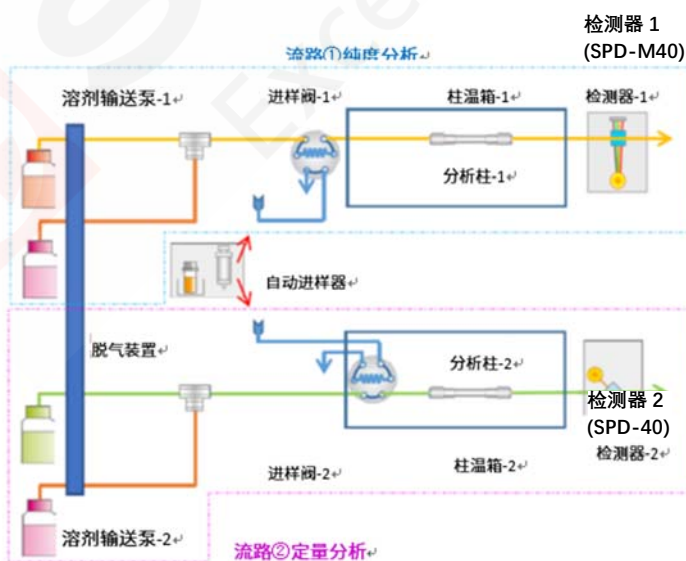


图 1 Nexera 双进样系统的流路图



图 2 Nexera 双进样系统（外观）

1.2 分析条件

流路 1: (第一组 布洛芬纯度实验)

色 谱 柱 : Shim-pack VeloxTMC18 (150 mm × 3 mm I.D., 2.7 μm)
流 动 相 : A: 10 mmol/L 磷酸水溶液(pH 2.5) B: 乙腈 A/B = 33:67
流 动 相 流 速 : 1.8 mL/min 柱 温 : 35°C
采 集 波 长 : 214 nm (SPD-M40) 进 样 体 积 : 1 μL

流路 2: (第二组 布洛芬定量实验)

色 谱 柱 : Shim-packTM GIST C18-HP (75 mm × 3 mm I.D., 3 μm)
流 动 相 : A: 1 %w/v 氯乙酸水溶液 (用氢氧化铵调至 pH 3.0) B: 乙腈 A/B = 1:1
流 动 相 流 速 : 1.0 mL/min 柱 温 : 35°C
采 集 波 长 : SPD-40, 254 nm 进 样 体 积 : 1 μL

1.3 样品前处理

“USP43-NF38”中载的布洛芬纯度试验定量试验的分析方法。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图及其系统适用性考察

2.1.1 布洛芬纯度试验分析条件与结果

使用流路①实施了“USP43-NF38”中载的布洛芬纯度试验。在 USP<621>规定的允许范围内改变分析条件后缩短了分析时间。对含有布洛芬和苯戊酮(内标物质)的样品进行系统适用性分析,其色谱图如图 3,系统适用性试验结果如表 1 所示。经证实,在 USP<621>允许的改变范围内,提高了布洛芬纯度试验分析效率,满足系统适用性试验分离的相关要求。

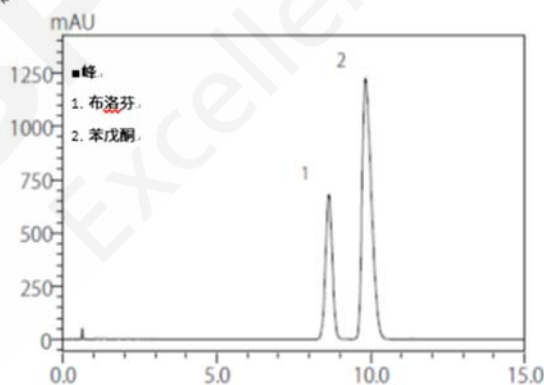


图 3 纯度试验系统适用性样品色谱

表 1 纯度试验的系统适用性项结果

系统适用性项目	标准	结果
相对保留时间	苯戊酮 (当布洛芬保留时间为1.0时)	0.8
分辨率	苯戊酮和布洛芬	≥2.0

2.1.2 布洛芬定量试验分析条件与结果

使用流路②实施了“USP43-NF38”中收录的布洛芬定量试验。在 USP<621>规定的允许改变范围内改变分析条件，缩短了分析时间。对含有布洛芬及其分解物、4-异丁基苯乙酮（USP 专论中表示为 Ibuprofen Related Compound C）和苯戊酮（内标物质）的样品进行分析，其色谱图如图 4，系统适用性试验结果如表 2 所示。经证实，定量试验的分析按照 USP<621>提高了分析速度，满足系统适用性试验分离相关要求。

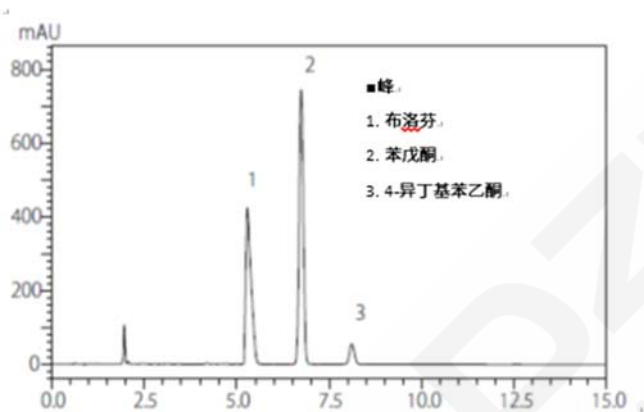


图 4 定量试验系统适用性样品色谱图

表 2 定量试验的系统适用性项结果

系统适用性项目		标准	结果
相对保留时间	苯戊酮（当布洛芬保留时间为1.0时）	1.4	1.3
	4-异丁基苯乙酮（当苯戊酮保留时间为1.0时）	1.2	1.2
分辨率	布洛芬和苯戊酮	≥2.5	5.8
	苯戊酮和4-异丁基苯乙酮	≥2.5	5.8
对称因子	布洛芬	≤2.5	2.0
	苯戊酮	≤2.5	1.0
	苯戊酮和4-异丁基苯乙酮	≤2.5	1.0

2.2 纯度实验与定量实验的重复性

使用 Nexera 双进样系统同时进行了 6 次连续分析。图 5 所示为纯度试验的色谱图，表 3 所示为保留时间和峰面积的相对标准偏差。图 6 所示为定量试验的色谱图，表 4 所示为关于系统适用性的保留时间和峰面积的相对标准偏差。纯度和定量实验结果均满足系统适用性标准，重复性良好。

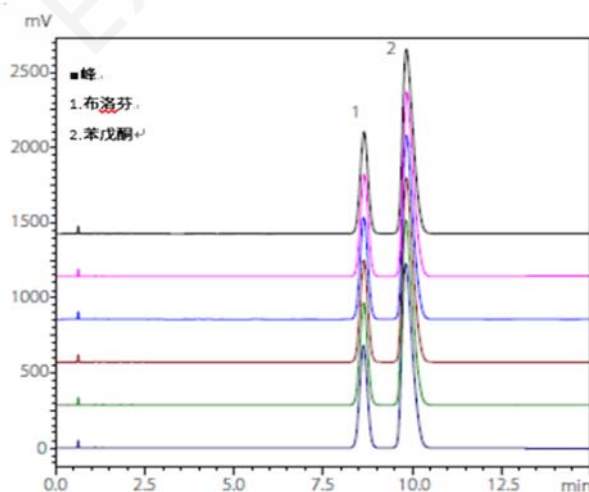


图 5 同时分析时的色谱图（纯度试验）

表 3 同时分析时的重现性 (纯度试验)

项目		相对标准偏差(%) n=6
布洛芬	保留时间	0.10
	峰面积	0.18
苯戊酮	保留时间	0.08
	峰面积	0.18

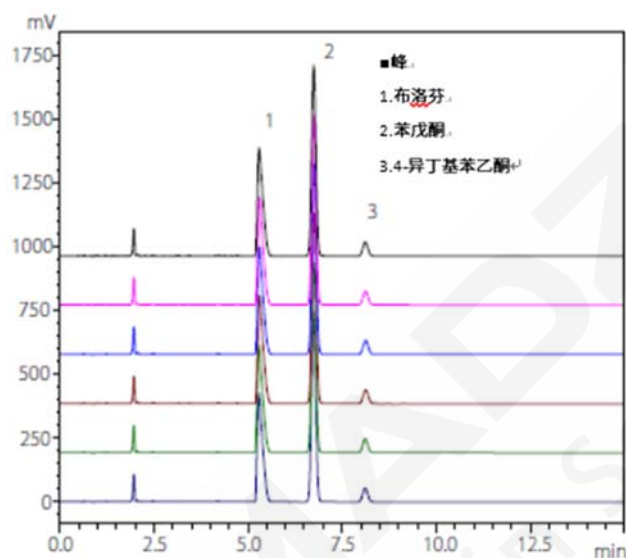


图 6 同时分析时的色谱图 (定量试验)

表 4 同时分析时的重现性 (定量试验)

系统适用性项目		相对标准偏差(%) n=6	
		标准	结果
布洛芬	保留时间	≤2.0	0.09
	峰面积	≤2.0	0.05
苯戊酮	保留时间	≤2.0	0.07
	峰面积	≤2.0	0.07
4-异丁基苯乙酮	保留时间	≤2.0	0.07
	峰面积	≤2.0	0.07

2. 结论

对于“USP43-NF38”中收载的布洛芬纯度试验(类似物质)和定量试验的两种分析方法,根据USP<621>改变分析条件,可在满足各系统适用性的情况下进行快速分析。此外,使用Nexera双进样系统同时进行布洛芬的纯度试验及定量试验,在较短的分析条件下,获得了良好的分离和重现性结果,同时也可以显著减少分析工作所需的时间。

Nexera™双进样系统可应用于食品和环境等领域,通过HPLC同时分析多种目标组分从而可提高常规分析工作的效率。

阿托伐他汀钙含量及其有关物质的同时测定

摘要: 本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定阿托伐他汀钙含量及其有关物质的方法。主成分阿托伐他汀钙在 100-2000mg/L 浓度范围内、7 种有关物质组分在 2.0-100 mg/L 浓度范围内, 其线性相关系数均大于 0.999, 精确度在 92.6%~114.0%之间, 线性良好; 稳定性考察中, 8 种组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.68~2.56 %和 0.46~2.81 %之间, 仪器精密度良好; 对方法的回收率进行考察, 结果显示 8 种化合物的样品加标回收率在 83.4%~106.2%之间, 满足标准测试要求。双进样液相分析系统可实现阿伐他汀钙含量和有关物质同时分析, 分析快速, 耗时短。

关键词: 双进样液相分析系统 阿托伐他汀 有关物质

技术特点:

- ❖ 该系统平行双流路设计可实现主成分与有关物质同时分析, 节省分析时间。
- ❖ 阿托伐他汀钙含量及其有关物质测试结果, 均满足药典规定。

心血管疾病是危害人类健康 (特别是中老年人) 最常见、最严重的疾病之一, 血脂异常是动脉粥样硬化、冠心病以及其他心脑血管疾病的重要因素。阿托伐他汀钙属 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 本身无活性, 口服吸收后的水解产物在体内竞争性抑制胆固醇合成过程中的限速酶羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶, 使胆固醇的合成减少, 也使

低密度脂蛋白受体合成增加, 中度降低血清三酰甘油水平和增高血高密度脂蛋白水平。

本文参考 2020 版二部国家药典中, 国家药典委员会发布《阿托伐他汀钙》, 采用岛津双进样液相分析系统建立同时分析阿托伐他汀钙含量及有关物质的液相方法。

1. 实验部分

1.1 仪器: 岛津双进样液相分析系统, 具体配置如下:

输 液 泵	: LC-40D XR (LPGE) (流路 1)	系统控制器	: CBM-40A
	LC-40B XR (流路 2)		
脱 气 机	: DGU-405×2	检 测 器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.117
柱 温 箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

流路 1: 第一组 7 种杂质

色 谱 柱	: Shim-pack GIST C18-AQ (4.6mm × 250mm L(HSS), 5.0 μm), (P/N:227-30742-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)		
流 动 相	: A 相-1.54g/L 醋酸铵溶液 (冰醋酸调节 pH 值至 4.4) : 乙腈 (70; 30); B 相-乙腈		
流 速	: 0.8 mL/min	柱 温	: 35°C
进 样 体 积	: 10 μL	波 长	: 244 nm

洗脱方式： 梯度洗脱，B相初始浓度为16%，时间程序见表1。

表1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
15	Pump	B.Conc	16
50	Pump	B.Conc	16
52	Pump	B.Conc	80
70	Pump	B.Conc	80
70.1	Pump	B.Conc	16
75	Control	Stop	

流路2：第二组 主成分-阿托伐他汀钙

色谱柱： Shim-pack GIST C18 (4.6mm × 250mm L(HSS), 5.0 μm), (P/N:227-30017-08, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相： A相-1.54 g/L 醋酸铵溶液(冰醋酸调节 pH 值至4.4) :乙腈 (70:30);
B相-乙腈

流速： 0.8 mL/min 柱温： 35°C

进样体积： 10 μL 波长： 244 nm

洗脱方式： 梯度洗脱，B相初始浓度为14%，时间程序见表2。

表2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	B(%)
15	Pump	B.Conc	14
40	Pump	B.Conc	20
42	Pump	B.Conc	80
60	Pump	B.Conc	80
60.1	Pump	B.Conc	14
65	Control	Stop	

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备：

第一组：参照 2020 版国家药典项下有关物质测定法，取阿托伐他汀钙与杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII 对照品各约 10 mg，置 50mL 量瓶中，使用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，摇匀，作为储备液；用二甲基甲酰胺作为稀释剂分别稀释成 2、5、10、20、50、100 mg/L 的标准工作溶液。

第二组：精密称取阿托伐他汀钙主成分，用二甲基甲酰胺分别稀释成 50、100、200、500、1000、2000 mg/L 的标准工作溶液。

样品前处理：

第一组：参照 2020 版国家药典项下有关物质测定法，取供试品适量，研细，取细粉适量，加适量二甲基甲酰胺，超声约 5 分钟使阿托伐他汀钙溶解，并稀释成每 1 mL 中约含阿托伐他汀 2.5 mg 的溶液，滤过，取续滤液。(临用新制)。

第二组：参照 2020 版国家药典项下有关物质测定法，取供试品适量，研细，取细粉适量，加适

量二甲基甲酰胺，超声约 5 分钟使阿托伐他汀钙溶解，并稀释成每 1 ml 中约含阿托伐他汀 0.1 mg 的溶液，滤过，取续滤液。（临用新制）。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

两个流路的色谱图如下所示

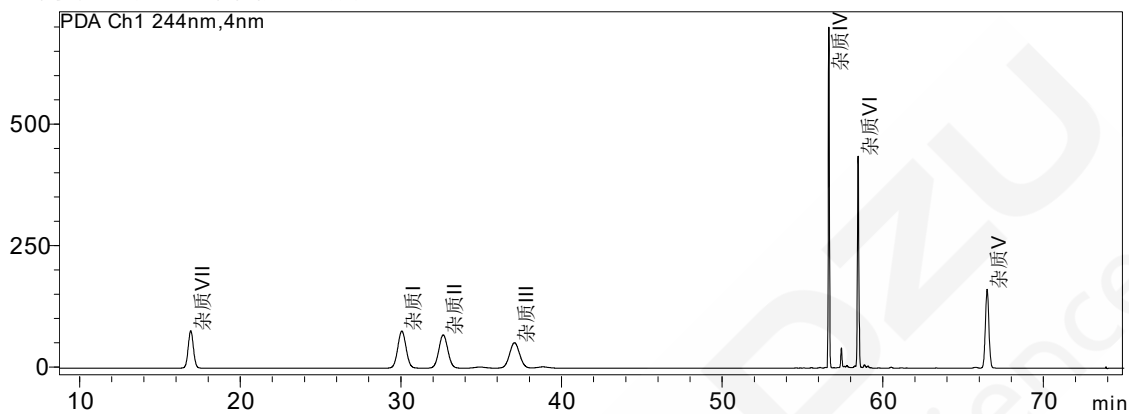


图 1 标准品溶液色谱图（100 mg/L，第一组）

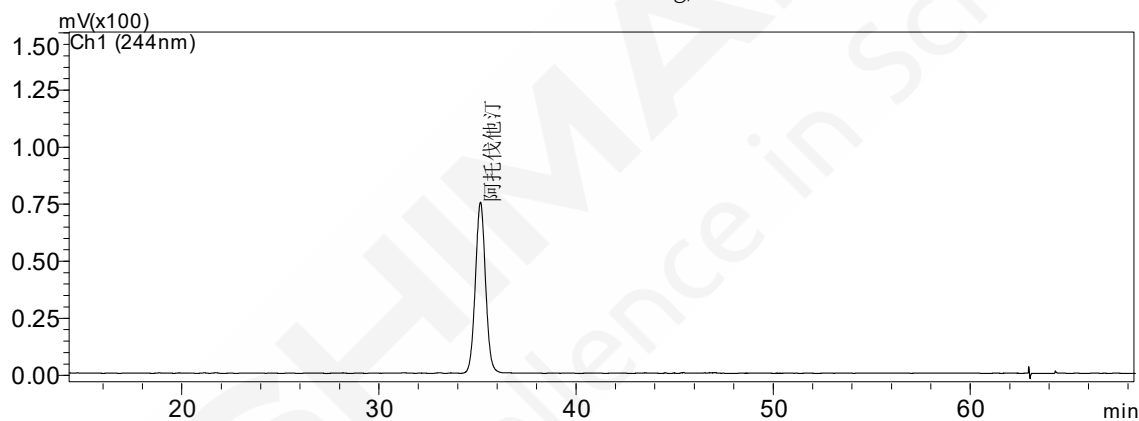
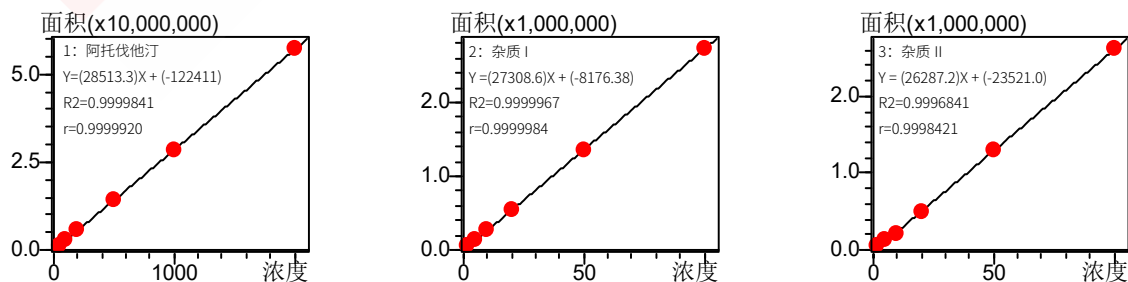


图 2 标准品溶液色谱图（100 mg/L，第二组）

2.2 校准曲线

将不同浓度的标准品溶液，按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，结果如图5所示。7种杂质在2.0~100.0 mg/L，主成分在100~2000 mg/L 浓度范围内，具有良好的线性关系，线性相关系数均大于0.999，准确度在92.6~115.9，具体结果见表3。



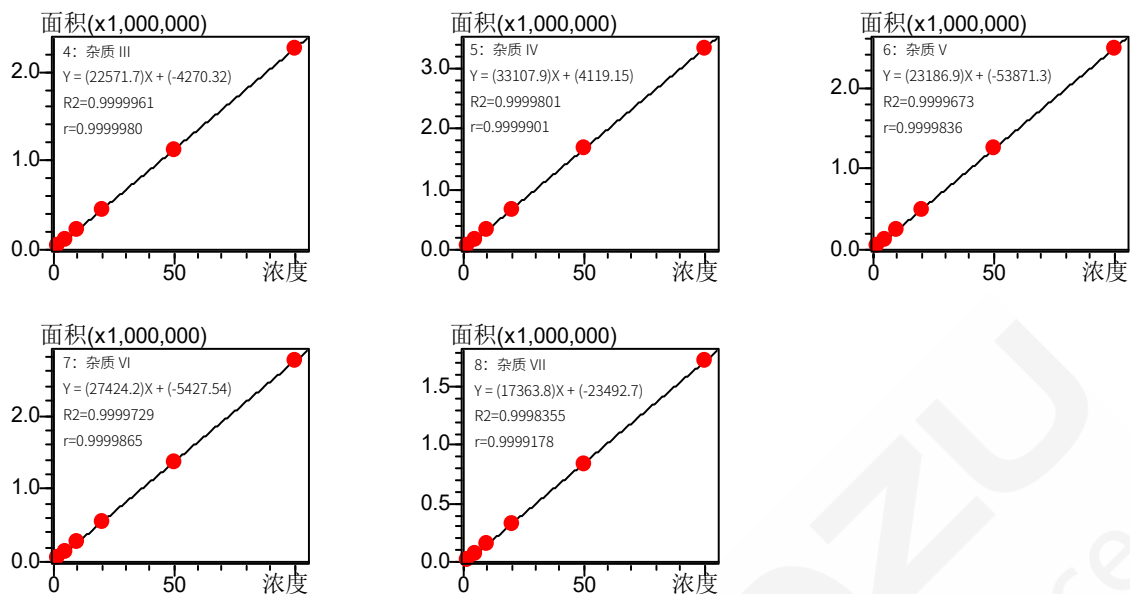


图 3 8 个化合物的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	化合物	保留时间	线性范围	相关系数r	准确度(%)
1	阿托伐他汀	35.079	50-2000	0.9999	99.3~100.9
2	杂质I	30.119	2-100	0.9999	99.0~102.1
3	杂质II	32.650	2-100	0.9998	95.3~115.9
4	杂质III	37.040	2-100	0.9999	98.1~100.5
5	杂质IV	56.679	2-100	0.9999	93.6~101.0
6	杂质杂质V	66.521	2-100	0.9999	92.6~101.0
7	杂质VI	58.443	2-100	0.9999	98.8~114.0
8	杂质VII	16.958	2-100	0.9999	97.7~112.0

2.3 精密度实验

取不同浓度的标准品溶液(第一组 5 mg/L、第二组 100 mg/L)连续进样 6 次,用于考察仪器的精密度,保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.68~2.56 %和 0.46~2.81 %之间,仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	名称	RSD%	
		R.T.	Area
1	阿托伐他汀	0.68	0.46
2	杂质I	1.23	1.39
3	杂质II	1.34	1.41
4	杂质III	1.75	1.51
5	杂质IV	1.43	1.59
6	杂质V	1.63	1.61
7	杂质VI	2.56	2.81
8	杂质VII	1.54	1.30

2.4 实际样本测试

取已知实际样本适量，两套流路分别加入一定浓度的杂质及阿托伐他汀标液，杂质流路 1 样本浓度为 2500 mg/L、阿托伐他汀流路 2 样本浓度为 100 mg/L，按照 1.3 中样品制备方法。据中国药典规定限度，供试品溶液的色谱图中如有杂质峰，杂质 I 和杂质 II 峰面积分别不得大于对照溶液主峰面积的 3 倍 (0.3%)，杂质 III 和杂质 VI 峰面积分别不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍 (0.15%)，杂质 IV、杂质 V 和杂质 VII 峰面积分别不得大于对照溶液的主峰面积 (0.1%)，其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积 (0.1%)，各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 10 倍 (1.0%)，小于灵敏度溶液主峰面积的色谱峰忽略不计。依照计算，杂质流路 1 中所测试实际样本峰面积小于线性检测限 (2 mg/L) 峰面积则记为 N.D；阿托伐他汀流路 2 测定阿托伐他汀含量，测定结果如下表。

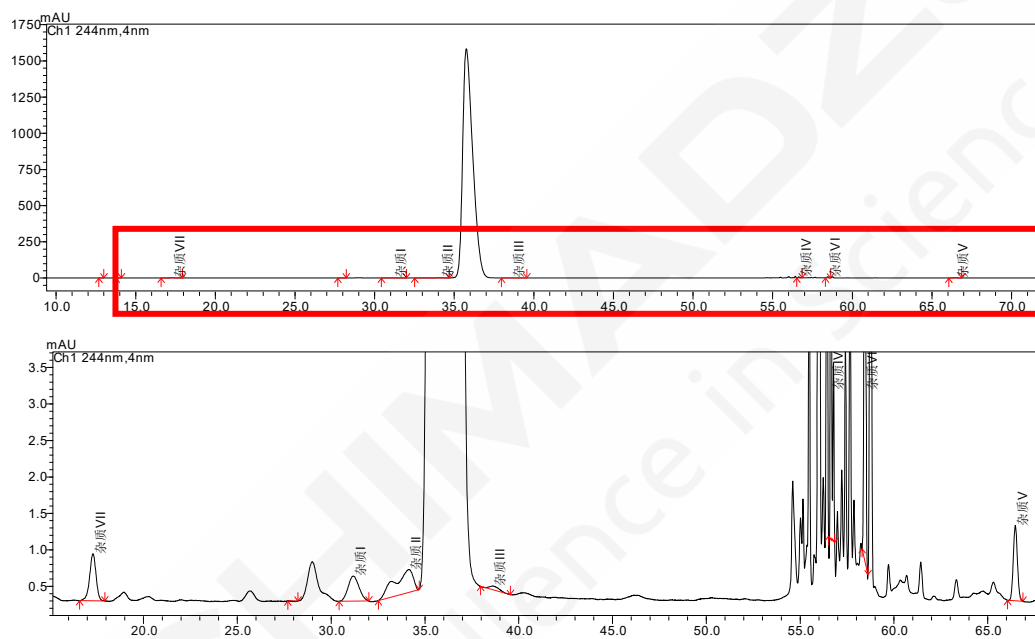


图 4 实际样本杂质测定-流路 1

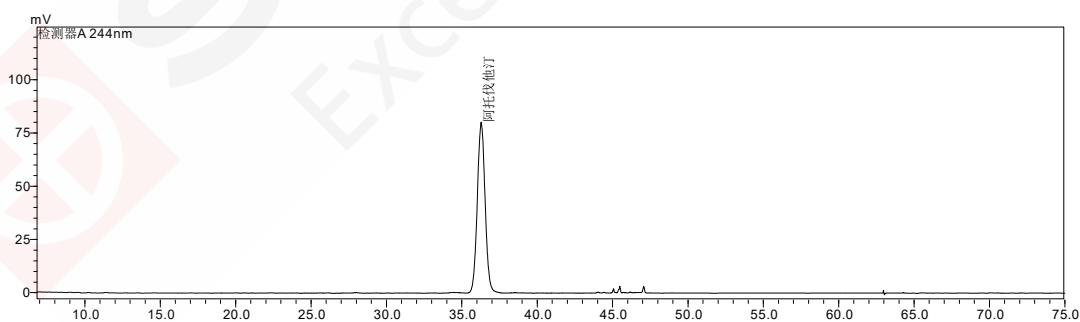


图 5 实际样本含量测定-流路 2

表 5 实际样本结果

No.	化合物名称	检测限 峰面积	实际样本 峰面积	检出结果 (mg/L)
1	阿托伐他汀	1,315,937	2,875,994	105.158
2	杂质 I	47,577	13,953	N.D.
3	杂质 II	47,964	21,954	N.D.
4	杂质 III	40,863	1,764	N.D.
5	杂质 IV	66,115	41,454	N.D.
6	杂质 V	44,013	15,844	N.D.
7	杂质 VI	57,108	52,758	N.D.
8	杂质 VII	25,355	15,356	N.D.

2.5 加标回收率测试

取已知含量的供试品适量，两套流路分别加入一定浓度的杂质及阿托伐他汀标液，杂质流路 1 加标浓度为 5ppm、阿托伐他汀流路 2 加标浓度为 100ppm，按照 1.3 中样品制备方法，加标回收率测试结果显示：8 种化合物的样品加标回收率在 83.4%~106.2%之间，满足标准测试要求。

表 6 加标回收率结果

NO.	化合物	加标浓度 (ug/mL)	检测值 (ug/mL)	回收率 (%)
1	阿托伐他汀	100	94.36	94.4
2	杂质I	5	5.19	103.8
3	杂质II	5	4.61	92.2
4	杂质III	5	4.69	93.8
5	杂质IV	5	5.31	106.2
6	杂质V	5	4.17	83.4
7	杂质VI	5	4.23	84.6
8	杂质VII	5	4.85	97.0

4. 结论

本文使用岛津双进样液相分析系统建立了快速测定阿托伐他汀钙的有关物质及含量的方法，并考察了线性、重复性、加标回收率测试等，均可以满足国家药典委员会颁布的（2020 版 二部）发布的《阿托伐他汀钙》的检测需求。双进样液相分析系统的使用可以实现阿伐他汀钙主成分含量和有关物质同时分析，节省分析时间，可供相关行业参考

2.4 食品行业的应用



食品，指各种供人食用或者饮用的成品和原料以及按照传统既是食品又是药品的物品，但是不包括以治疗为目的的物品。随着社会的发展和水平的提高，中国农业进入了满足营业健康需求的新阶段，食品加工行业的发展也进入高质量发展阶段，呈现出具有营养功能性的食品需求增加迅速、食品领域科技传销受到重视等特征，人们更加关注营养与健康。食品中的营养成分主要是包括蛋白质、脂类、碳水还和我、矿物质、维生素、水和膳食纤维。对营养物质检测，国家食品药品监督管理局（FDA）具有相关规定，比如食品中有机酸类、维生素类等，这些营养成分含量较高，法规多使用高效液相色谱法分析。

在功能性食品研究中，对活性成分的综合分析是必要的。这些情况需要同时分析许多类型的化合物（氨基酸、有机酸、脂质、糖等），而不是简单地关注一个化合物组；而这些物质的极性、化学性质差异较大，需采用不同的液相分析条件。比如：1> 食品中多种有机酸的测试，由于己二酸与其他化合物在保留特性方面的差异，需要使用两套不同的液相方法进行分析，因此标准中规定了两个不同的分析方法；2> 对鱼肉等生鲜类食品进行新鲜度和变质程度分析时，需要对 ATP、组胺和氨基酸等化学性质不同的一组化合物进行分析测定，综合测试结果对目标参数进行评估，ATP 相关化合物具有紫外吸收，而目标组胺和氨基酸通过衍生后具有荧光活性，因此为了完成目标参数评估需要使用不同类型的检测器完成目标化合物的测定；3> 在食品工业发酵过程中，对不同化学性质发酵产物的检测也需要使用不同的液相方法，不同的检测器进行监测。因此，针对食品分析中这些情况，需要使用不同的液相条件、不同色谱柱以及不同检测组合进行分析，使用双进样液相分析系统，可以灵活搭配不同液相条件和检测器，对目标参数进行同步测试，从而将时间减少一半，有效提高工作效率。这个系统可以在不改变常规液相分析条件的情况下，有效地应对检测规范要求。这意味着，即使是易降解或需要长时间分析的样品，特别是需要使用两种方法和两个进样针的检测项目，该系统也能够表现出卓越的优势，能够完全满足食品安全检测分析的需求。本章重点介绍了岛津双进样液相分析系统在食品安全检测方面性能优势和特点，供行业从业人员参考。

食品中 7 种有机酸含量的测定

摘要：本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了快速测定食品中有机酸等 7 种原料的检测方法。7 种有机酸在各自线性浓度范围内，相关系数均大于 0.997，各浓度点的回读准确度在 89.1%~114.7%之间，线性相关性良好。稳定性考察中，7 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.016~0.195%和 0.071~2.700%之间，仪器精密度良好。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，既不改变法规方法又可实现分析快速，满足食品安全国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》的检测需求。

关键词：双进样液相色谱仪；有机酸

技术特点：

❖ 针对标准要求的两针进样方法，双进样系统可通过一次分析实现

❖ 应对GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》

世界上使用的酸味剂约有 20 余种，每年需求量增长率为 3-5%。食品酸味剂分为有机酸味剂和无机酸味剂，常见的酸味剂一般是有机酸，如柠檬酸、苹果酸、酒石酸等均广泛应用于食品加工。在食品加工、贮存及品质管理等方面被认为是最重要的成分，测定食品中的酸度具有非常重要意义，有机

酸影响食品的色、香、味及稳定性，另外，食品中有机酸含量高，则其 pH 值低，而 pH 值对食品稳定性有一定影响，pH 值是果蔬罐头杀菌条件的主要依据。本文参考食品安全国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》，采用岛津双进样液相色谱仪建立了食品中 7 种有机酸的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津双进样液相色谱仪，具体配置为：

输 液 泵	: LC-40B XR、 LC-40D XR (LPGE)	系统控制器	: CBM-40
脱 气 机	: DGU-405×2	检 测 器	: SPD-M40×2
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114
柱 温 箱	: CTO-40C		

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱	: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm 5 μm), P/N:227-30017-08; Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm x 4.6 mm 5 μm), P/N:227-30742-08 (岛津 (上海) 实验器材有限公司)		
流 动 相	: A-磷酸溶液 (0.1%) B-甲醇		
流 速	: 1.0 mL/min	柱 温	: 40 °C

波 长 : 210 nm

进样体积 : 20 μ L

洗脱方式 : 梯度洗脱, 两组的梯度程序分别如下图。

分组:

第一组 (G1), 测定酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸、富马酸梯度条件

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	97.5	2.5
10.0	97.5	2.5
10.1	0	100
15.0	0	100
15.1	97.5	2.5
22.0	97.5	2.5

第二组 (G2), 测定己二酸梯度条件

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	75	25
10.0	75	25
10.1	0	100
15.0	0	100
15.1	75	25
22.0	75	25

1.3 混合标准溶液配置

I 组标准工作溶液【乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、丁二酸、富马酸】: 分别称取酒石酸 1.25 g、苹果酸 2.5 g、柠檬酸 2.5 g、丁二酸 6.25 g (精确至 0.01 g) 和富马酸 2.5 mg (精确至 0.01 mg) 于 50 mL 小烧杯中, 加水溶解, 用水转移到 50 mL 容量瓶中, 定容, 混匀, 于 4°C 保存, 其中酒石酸质量浓度为 25000 μ g/mL、苹果酸 50000 μ g/mL、乳酸 50000 μ g/mL、柠檬酸 50000 μ g/mL、丁二酸 125000 μ g/mL 和富马酸 50 μ g/mL。分别吸取混合标准储备液 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用 0.1% 磷酸水溶液定容至刻度, 摇匀, 于 4°C 保存。

II 组标准工作溶液【己二酸】: 准确称取按其纯度折算为 100% 质量的己二酸 12.5 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 于 4°C 保存。分别吸取 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用 0.1% 磷酸水溶液定容至刻度, 混匀, 备用。

1.4 样品前处理方法

果茶: 称取 5 g (精确至 0.01 g) 均匀试样 (若试样中含有二氧化碳应先加热除去), 加入 25 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 经 0.45 μ m 水相滤膜过滤, 注入高效液相色谱仪分析。

果冻: 称取 10 g (精确至 0.01 g) 均匀试样, 放入 50 mL 塑料离心管中, 像其中加入 20 mL 水后在 15000 r/min 的转速下提取 2 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上层提取液至 50 mL 容量瓶中, 残留物再用 20 mL 水重复提取一次, 合并提取液于同一容量瓶中, 并用水定容至刻度, 经 0.45 μ m

水相滤膜过滤，注入高效液相色谱仪分析。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

7种有机酸混合标准溶液色谱图如图1-2所示，各目标化合物编号同表3

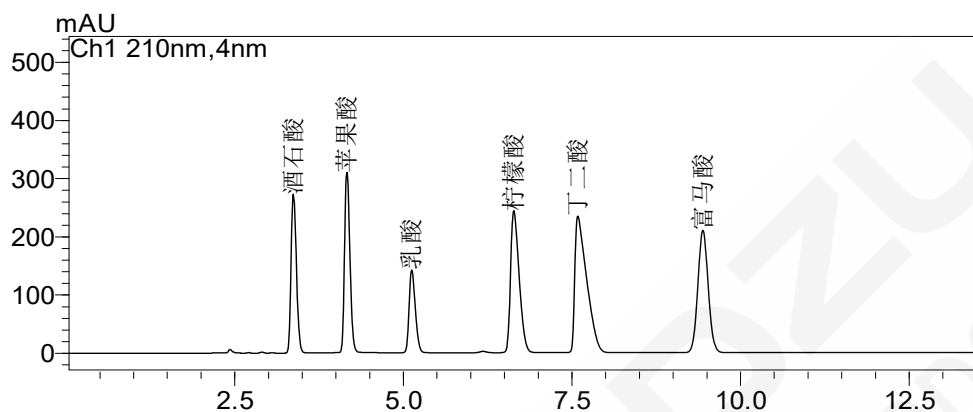


图1 标准品溶液色谱图 (流路1)

(酒石酸 1000 mg/L、苹果酸 2000 mg/L、乳酸 2000 mg/L、柠檬酸 2000 mg/L、丁二酸 5000 mg/L、富马酸 2 mg/L)

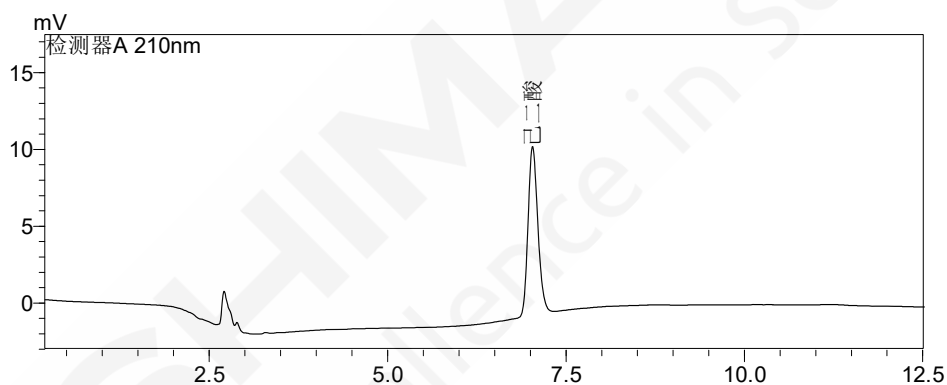


图2 己二酸的标准品溶液色谱图 (200 mg/L) (流路2)

2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按1.3中的分析条件进行测定，结果显示浓度范围内，酒石酸(500-10000 $\mu\text{g/mL}$)、苹果酸(1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、乳酸(1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、柠檬酸(1000-20000 $\mu\text{g/mL}$)、丁二酸(2500-50000 $\mu\text{g/mL}$)、富马酸(1-20 $\mu\text{g/mL}$)、己二酸(10-200 $\mu\text{g/mL}$)具有较好的线性关系，线性相关系数 >0.997 ，各浓度点的回读准确度在89.1%~114.7%之间，具体结果见表3。

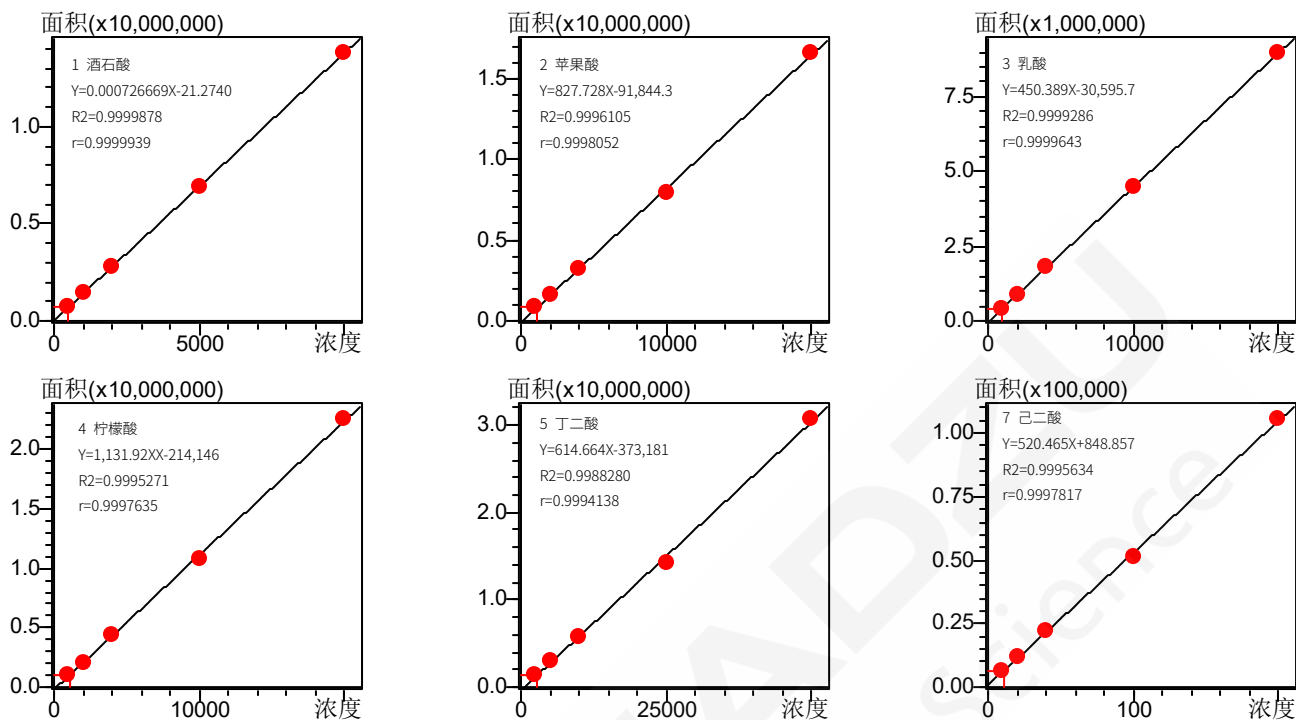


图3 部分化合物的校准曲线

2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样6次，用于考察仪器的精密度，浓度点信息、保留时间和峰面积的重复性结果如表3所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.016~0.195%和0.071~2.700%之间，仪器精密度良好。

2.4 加标回收率测试

取某果汁样品如上方法进行测试，样品中检出苹果酸和柠檬酸。以该样品进行加标回收率实验，加入一定浓度的有机酸标液，按照1.5中样品制备方法，每个浓度平行制备2份样品。加标回收率测试结果显示：7种有机酸的样品加标回收率在86.8%~107.6%之间，满足标准测试要求，样品加标回收色谱图如图4、5所示，加标浓度和结果如表3。

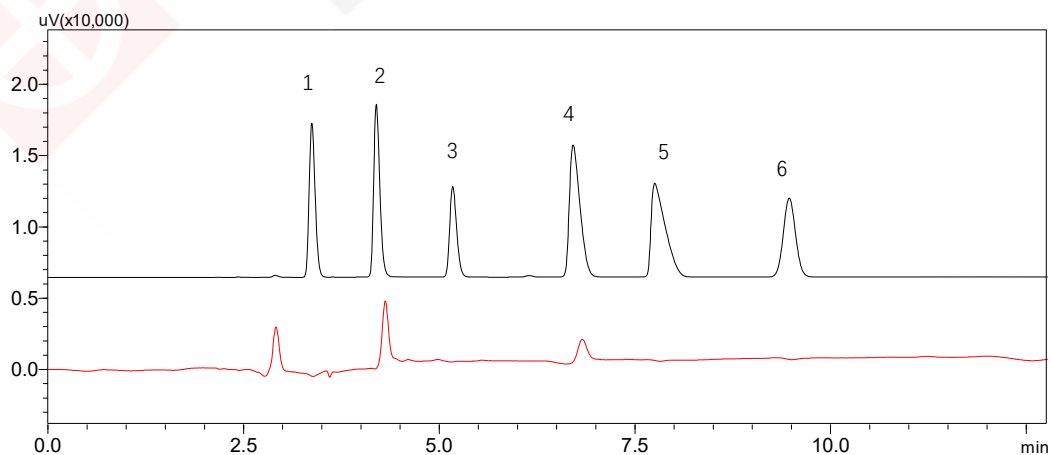


图4 加标回收色谱图 (黑色: 加标样品; 红色: 空白样品)

(第一组, 1.酒石酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、2.苹果酸 1000 $\mu\text{g/g}$ 、3.乳酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、4.柠檬酸 500 $\mu\text{g/g}$ 、5.丁二酸 2500 $\mu\text{g/g}$ 、6.富马酸 2.5 $\mu\text{g/g}$)

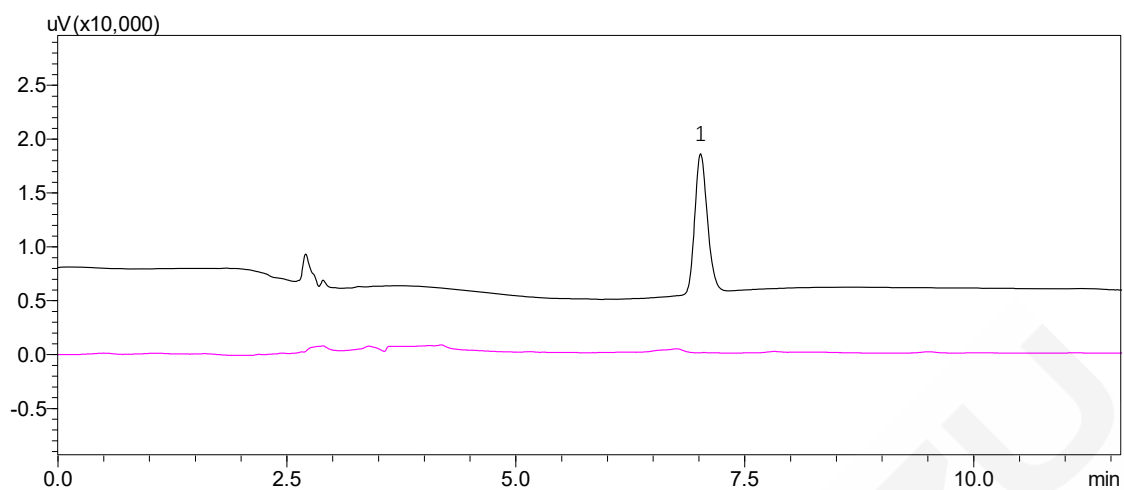


图5 加标回收色谱图（黑色：加标样品；红色：空白样品）

（第二组：1.己二酸 50 $\mu\text{g/g}$ ）

3. 结论

本文使用岛津双进样液相色谱仪建立快速测定食品中有机酸7种原料含量的方法，并考察了线性、重复性、加标回收率，可以满足食品安全国家标准GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，不改变法规方法、分析耗时降低一倍，可供相关行业参考。

表 3 校准曲线参数、保留时间和峰面积重复性及回收率测试结果

No.	化合物名称	CAS	相关系数 r	准确度(%)	检出限 (mg/kg)	RSD% ①			RSD% ②			空白样品测试结果 (μg/g)	加标浓度①			加标浓度②		
						浓度 (μg/ml)	R.T.	Area	浓度 (μg/ml)	R.T.	Area		加标值 (μg/g)	检测值 (μg/g)	回收率 (%)	加标值 (μg/g)	检测值 (μg/g)	回收率 (%)
1	酒石酸	87-69-4	0.9999	97.3~100.7	74.85	1000	0.057	0.290	5000	0.096	0.318	N.D.	500	518.5	103.7	1000	1052	105.2
2	苹果酸	6915-15-7	0.9998	97.3~108.6	149.70	2000	0.018	0.153	10000	0.040	0.440	314.7	1000	1286.7	97.2	2000	2241	96.3
3	乳酸	50-21-5	0.9999	89.1~102.3	109.45	2000	0.041	0.190	10000	0.016	0.228	N.D.	500	512.5	102.5	1000	1054	105.4
4	柠檬酸	77-92-9	0.9997	97.2~114.7	69.65	2000	0.079	0.105	10000	0.195	0.175	173.4	500	711.3	107.6	1000	1189	101.6
5	丁二酸	110-17-8	0.9993	95.4~114.4	169.15	5000	0.082	0.084	25000	0.055	0.111	N.D.	2500	2210	88.4	5000	4565	91.3
6	富马酸	110-17-8	0.9994	95.3~113.2	0.79	2	0.204	0.071	10	0.351	0.103	N.D.	2.5	2.17	86.8	5.0	4.41	88.2
7	己二酸	124-04-9	0.9997	97.1~104.2	23.40	10	0.046	0.814	50	0.132	2.700	N.D.	50	51.45	102.9	100	104.7	104.7

N.D. 未检出

发酵过程中有机酸和糖类物质含量的同时监测

摘要：本文使用岛津 Nexera LC-40 双进样液相分析系统建立了同时分析发酵过程中有机酸和糖类物质含量的方法，该系统可以评估酸奶发酵过程中的有机酸、糖含量的时间进程变化，对发酵进展情况进行了监测，实现快速同时对多种化合物进行分析功能。

关键词：双进样液相分析系统 有机酸 糖类

技术特点：

- ❖ 单流路可自定义改造，流路一采用柱后缓冲电导法，可进行甲酸、醋酸测定；
- ❖ 实现有机酸和糖类物质同时分析，展示发酵过程中多种不同类别化合物监测。

微生物分解各种物质并产出有用的物质，这个过程称为发酵。近年来，除了食品以外，发酵也被广泛运用于工业领域。为理清发酵过程并优化其条件，对有机酸、糖、氨基酸等多种化合物进行了测定，展开了多方面分析。使用HPLC

法时，由于不同的化合物所适用的分离模式以及检测方法各不相同，因此需要分别单独分析。本文介绍了一种使用双进样系统监测发酵过程的分析方法，在同一个系统中同时执行两种类型化合物的分析。

1. 实验部分

1.1 系统配置

利用 Nexera 的自动进样器 SIL-40 系列的可定制双进样功能，对独立的两条流路分别进样，同时进行不同条件的两个系统的分析，最终生成一个数据文件，汇总成一个报告展示结果。

图 1 所示为双进样系统流程图。第一条流路使用了离子排阻色谱柱、柱后缓冲电导法、电导检测器对有机酸进行分析；第二条流路使用配体交换色谱柱、示差折光检测器对糖类进行分析。由于有机酸和糖类分析时柱温条件不同，因此分别使用两台 CTO-40S 柱温箱来控制温度。

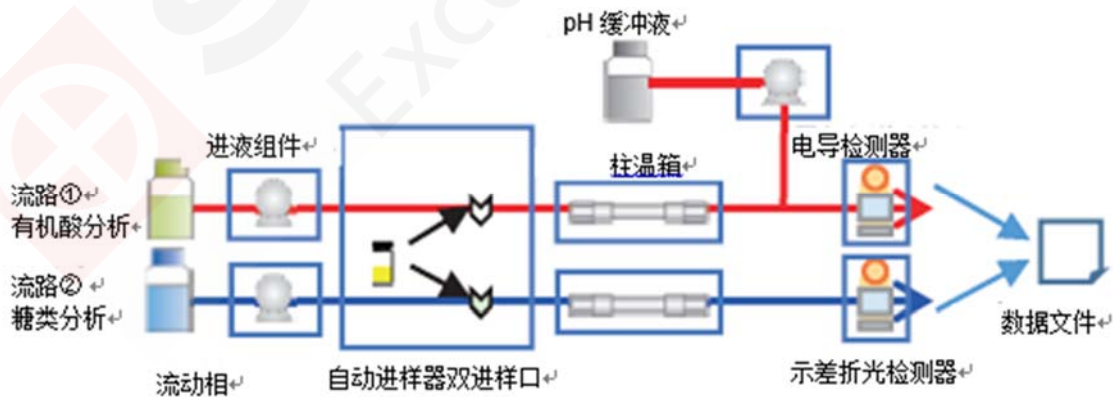


图 1 双进样系统流程图

1.2 分析条件

流路 1: (第一组 测定有机酸：柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、醋酸)

色 谱 柱 : Shim-pack™ Fast-OA (100 mm L.×7.8 mm I.D., 5 μm)

保护柱：Shim-pack Fast-OA (G) (10 mm L.×4.0 mm I.D., 12 μm)
流动相：5.0 mmol/L p-甲苯磺酸水溶液
pH 缓冲液：5.0 mmol/L p-甲苯磺+20 mmol/L Bis-Tris+0.1 mmol/L EDTA 混合水溶液
流动相流速：0.8 mL/min 柱温：40 °C
pH 缓冲液流速：0.8 mL/min 进样体积：10 μL
检测器：电导检测器

流路 2：(第二组 测试糖类：乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖)

色谱柱：Shim-pack SCR-101C (300 mm L.×7.9 mm I.D., 10 μm)
保护柱：Shim-pack 保护柱 SCR (C) (50 mm L.×4 mm I.D., 10 μm)
流动相：水
流动相流速：1.0 mL/min 柱温：80 °C
检测器：示差折光检测器 进样体积：10 μL

1.3、样品的前处理

在牛奶中加入酸奶，放入酸奶制造机中，在40°C温度下进行发酵，每隔一定时间取样。前处理方法如下：

- (1) 称1 g酸奶，加入5 mmol/L p-甲苯磺酸水溶液4 mL和1 mL氯仿；
- (2) 振荡1分钟，在10000 rpm速度下进行离心；
- (3) 取上清液，用0.45 μm微孔滤膜过滤；
- (4) 滤液用纯水稀释10倍，制成分析试样。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

有关使用 Shim-pack Fast-OA 与柱后缓冲电导法的分析详情，请参考技术报告《使用 Shim-packFast-OA 与 pH 缓冲电导检测法对有机酸快速分析 (C190-0489)》。

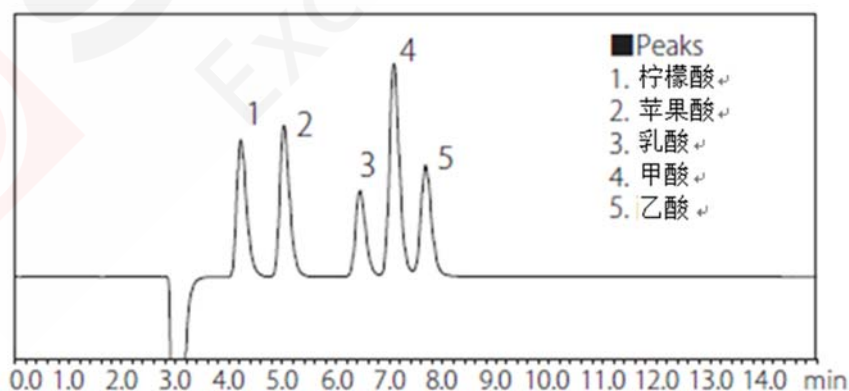


图 2 100 mg/L 有机酸混合标准溶液的色谱图 (流路 1)

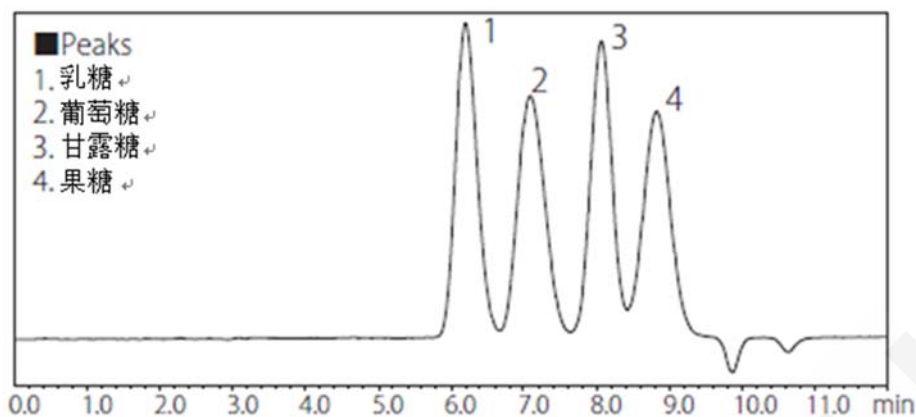


图3 糖混合标准溶液的色谱图 (流路 2)

2.2 重复性

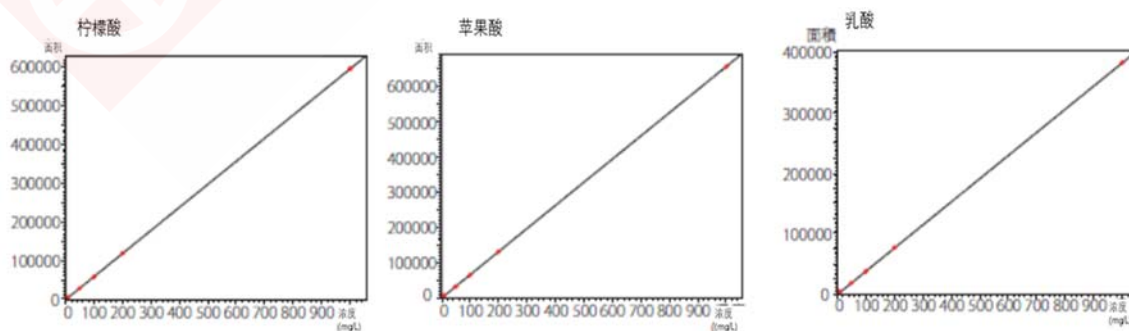
表 1 分别显示了有机酸混合标准溶液 (各 200 mg/L) 以及糖混合溶液标准溶液 (各 1000 mg/L) 连续 6 次分析的保留时间和峰面积 RSD%结果。所有成分的保留时间、峰面积 RSD%相对标准偏差结果均小于 1%。

表1 有机酸和糖类重复性结果 (n=6)

NO.	化合物名称	保留时间平均 (min)	保留时间 %RSD	峰面积 %RSD
1	柠檬酸	4.21	0.023	0.25
2	苹果酸	5.02	0.020	0.07
3	乳酸	6.44	0.018	0.39
4	甲酸	7.08	0.015	0.34
5	乙酸	7.67	0.013	0.53
6	乳糖	6.20	0.01	0.08
7	葡萄糖	7.10	0.055	0.09
8	甘露糖	8.07	0.010	0.13
9	果糖	8.83	0.008	0.11

2.3 校准曲线

图 4 所示为有机酸的标准曲线，表 2 为标准曲线的线性范围范围与相关系数；有机酸的 5 个化合物及糖类的 4 个化合物相关系数均为 $R^2=0.9998$ 以上，线性良好。



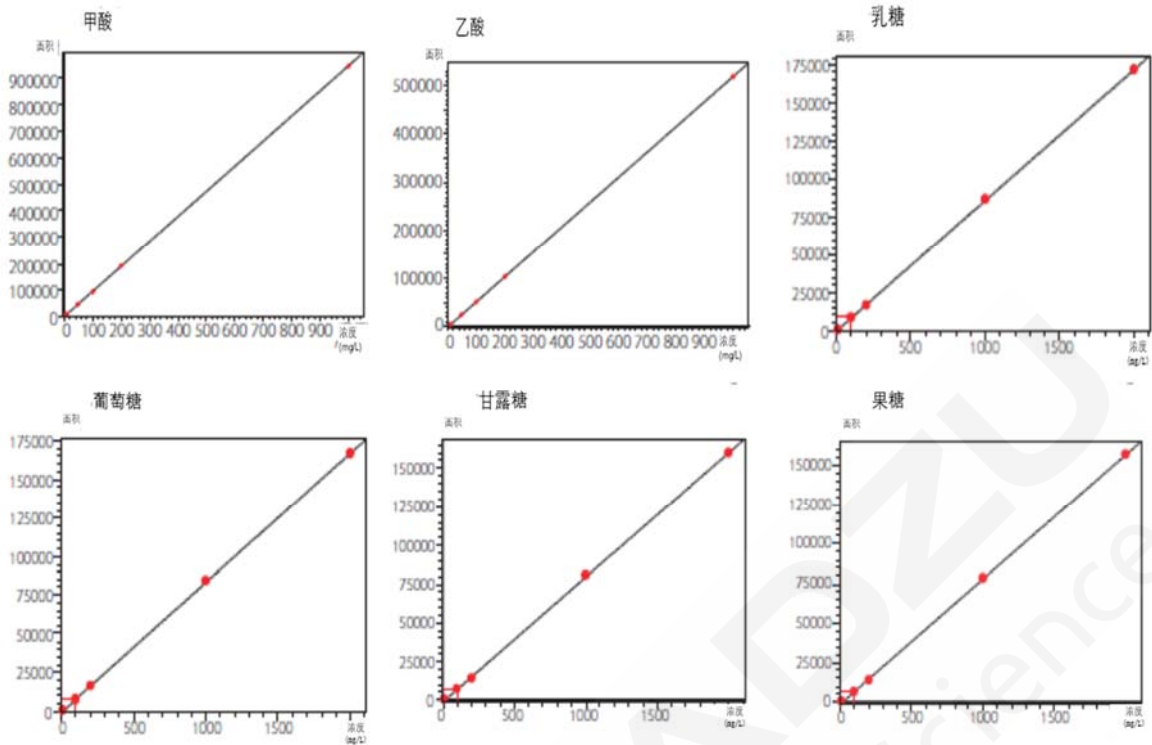


图4 有机酸的标准曲线

表2 有机酸的线性范围与相关系数 (R²)

No.	化合物名称	线性范围 (mg/L)	R ²
1	柠檬酸	10-1000	0.9999
2	苹果酸	10-1000	0.9999
3	乳酸	10-1000	0.9999
4	甲酸	10-1000	0.9999
5	乙酸	10-1000	0.9999
6	乳糖	10-2000	0.9999
7	葡萄糖	10-2000	0.9999
8	甘露糖	10-2000	0.9998
9	果糖	10-2000	0.9998

2.4 残留量评估

对有机酸（柠檬酸、乳酸）、糖（乳糖）的残留量进行了评估。清洗自动进样器时，在清洗液中加入水，将进样针内外壁清洗干净。图5所示为有机酸的残留量评估结果，图6为糖类的残留量评估结果。结果表明，柠檬酸残留量为0.0055%、乳酸为0.0069%、乳糖为0.0098%，残留量小，不会对定量产生影响。

黑线: 100 g/L 柠檬酸、乳酸混合标准水溶液
 红线: 空白溶液

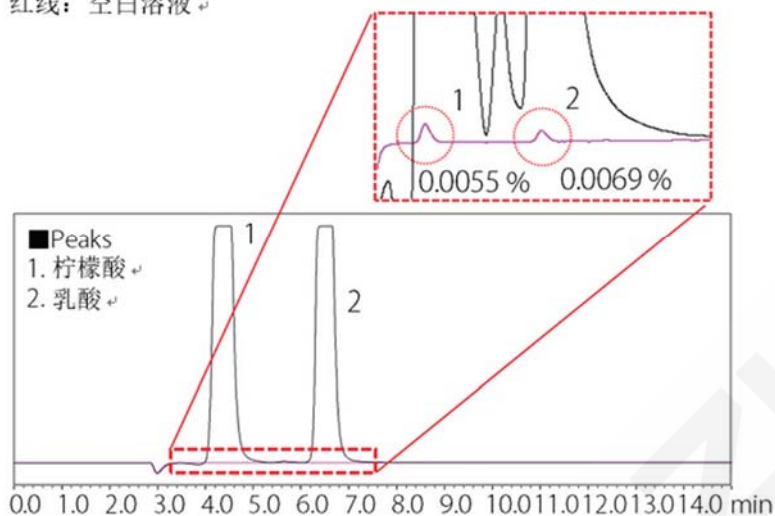


图5 柠檬酸、乳酸的残留量评估

黑线: 20 g/L乳糖水溶液
 红线: 空白溶液

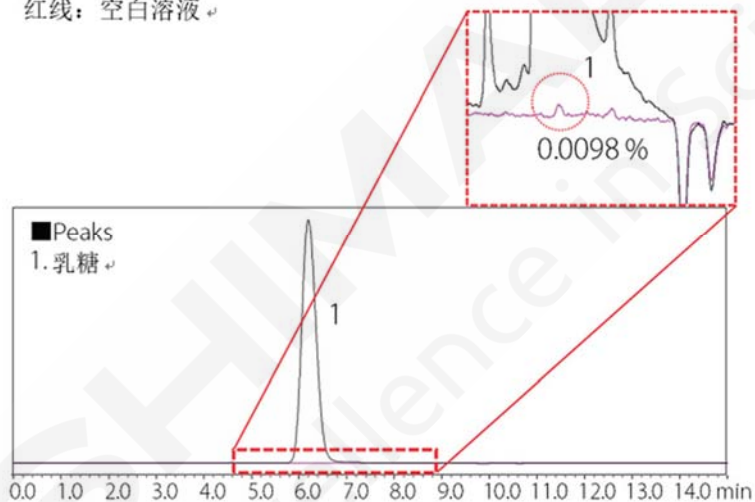


图6 乳糖的残留量评估

2.5 酸奶的分析

对经过一定时间后 (0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5小时) 的试样进行分析。图7所示为发酵3.5小时后样品有机酸分析色谱图如图8, 糖类色谱图如图9, 结果表明, 柠檬酸、乳酸及乳糖有检出。

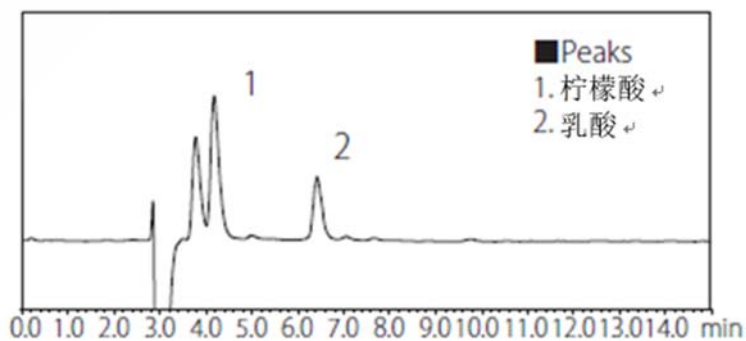


图7 发酵3.5小时的酸奶中有机酸色谱图

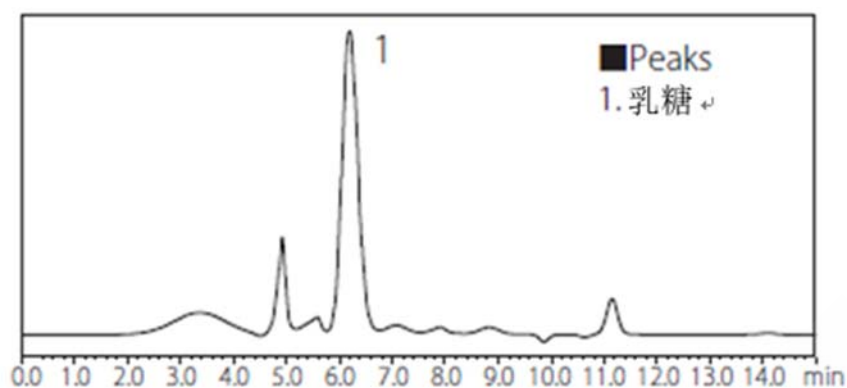


图8 发酵3.5小时的酸奶中糖类色谱图

2.6 酸奶回收率实验

取发酵3.5小时的样品加入有机酸、糖类，进行回收率试验。在预处理操作(1)中，称1g酸奶，加入5mmol/L p-甲苯磺酸水溶液2.6mL、400mg/L有机酸混合水溶液0.7mL、2000mg/L糖混合水溶液0.7mL、氯仿1mL。添加标准液的色谱图如图9、图10，表5为有机酸和糖类的回收率结果，有机酸和糖类的回收率达到94.6-101.8%，结果良好。

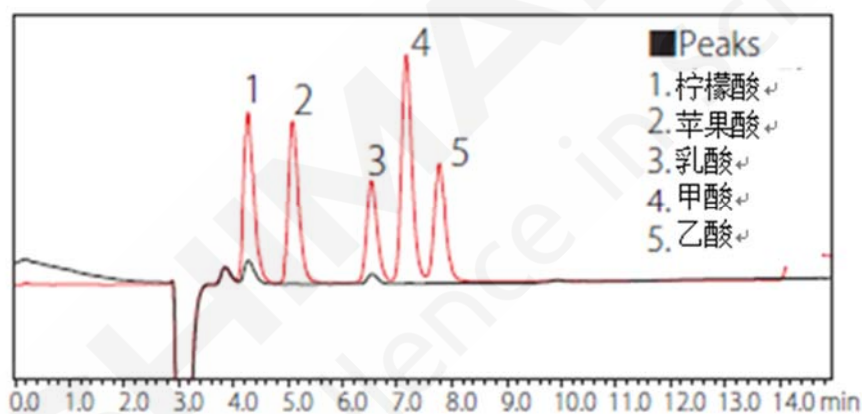


图9 有机酸的色谱图 (红: 添加标准液、黑: 未添加标准液)

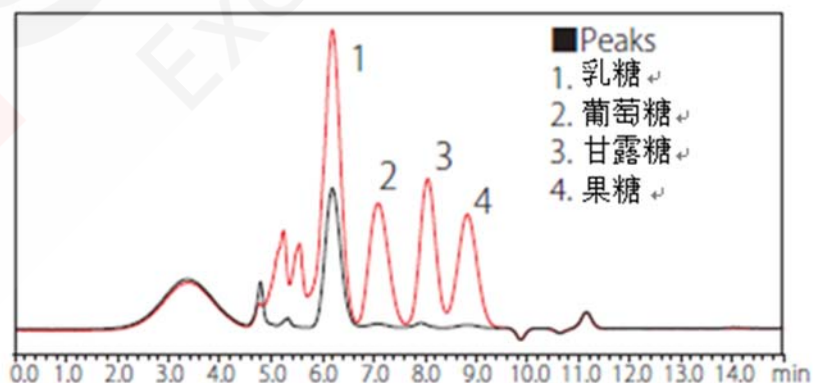


图10 糖类的色谱图 (红: 添加标准液、黑: 未添加标准液)

表 3 回收率结果

No.	化合物名称	样品浓度 (mg/L)	加标浓度 (mg/L)	加标测定浓度 (mg/L)	回收率 (%)
1	柠檬酸	10.0	56.0	65.9	99.8
2	苹果酸	未检测出	56.0	57.0	101.8
3	乳酸	8.4	56.0	61.4	94.6
4	甲酸	未检测出	56.0	56.4	100.6
5	乙酸	未检测出	56.0	56.1	100.3
6	乳糖	257.1	280.0	544.0	102.4
7	葡萄糖	未检测出	280.0	282.4	100.9
8	甘露糖	未检测出	280.0	301.5	107.7
9	果糖	未检测出	280.0	298.6	106.6

2.7 酸奶发酵时间进程变化实验

对经过一定时间 (0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5 小时) 后的样品进行分析, 确认了有机酸、糖类含量的时间进程变化。图 11 所示为不同发酵时间下有机酸含量的变化, 图 12 为糖类含量的变化。从结果可以发现, 随着发酵的进程, 乳糖发生分解, 生成乳酸。这里显示的浓度换算为酸奶原液的浓度。

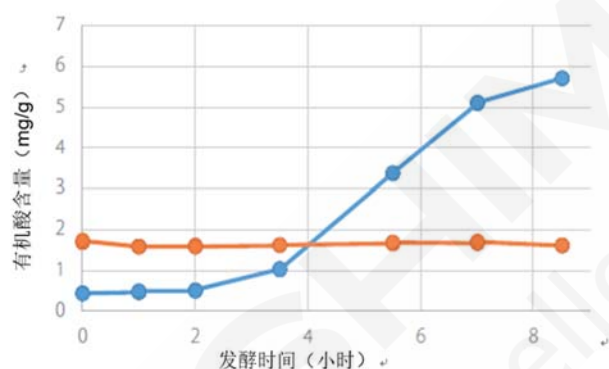


图 11 酸奶中有机酸的含量 (蓝: 乳酸、橙: 柠檬酸)

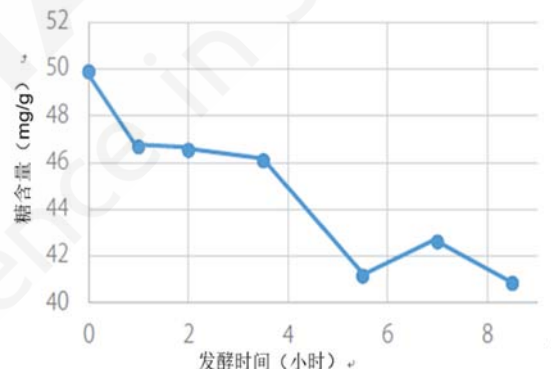


图 12 酸奶中糖类的含量

3 结论

使用 Nexera 系列双进样系统, 可以同时进行有机酸和糖类的分析。

使用该系统, 可以评估酸奶发酵过程中的有机酸、糖含量的时间进程变化, 对发酵进展情况进行分析。双进样系统可实现快速同时对多种化合物进行分析。

鱼肉中与 ATP 有关的物质、组胺和氨基酸的分析

摘要: 本文使用岛津 Nexera LC-40 双进样液相分析系统建立了同时分析鱼肉中与 ATP 有关的物质、组胺和氨基酸含量的方法，通过 K 值计算可同时分析鱼肉新鲜度和变质状态，快速获得结果，从而可以多角度地评估鱼肉样品。

关键词: 双进样液相分析系统 ATP 组胺 氨基酸

技术特点:

- ❖ 双流路设计可同时分析ATP有关的物质、组胺和氨基酸含量。
- ❖ 双进样系统同时分析鱼肉新鲜度和变质状态，多角度评估鱼肉样品。

众所周知，鱼贝类的肌肉与畜产动物相比，组织较为柔软、水分较多，因此容易变质。正确判定这些鱼贝类的新鲜度，对保证食品的安全非常重要。目前广泛使用的一种方法是利用与动物肌肉能源ATP（腺苷三磷酸）有关物质的变化作为肌肉新鲜度的指标，此外，在对鱼肉新鲜度进行数值评估时经常使用K值。另一方面，近年来，有报道称作为非挥发性变质胺的组胺会引起的食物中毒，导致过敏病症。金枪鱼等红肉鱼变质后，会累积高浓度的组胺（氨基酸之一的组氨酸的代谢物）。组胺具有热稳定性，在烹饪过程中不能去除，因此一旦产生，就无法预防食物中毒。因此，以国际食品标准委员会（Codex）和欧洲为首的各国制定了组胺的限值标准。

L536号应用介绍了一个测定鱼肉K值并针

对新鲜度随时间的变化创建多数据报告的例子。在此，我们介绍一个使用Nexera双进样系统同时分析作为新鲜度指标的K值、作为变质状态指标的组胺的例子。此外，在本文的分析条件下，还可以同时分析鱼肉中所含的、以鲜味为人们所知的营养成分-氨基酸和核酸。通常，在分析与ATP相关的物质和氨基酸（包括组胺）时，两者所用的分析条件（例如流动相，分析色谱柱和检测器）是不同的，因此，需要使用2台HPLC分别进行分析，或者使用1台HPLC实施2次分析。但是，对于随时间变化的样品（例如新鲜度或变质状态），应尽快获得结果。

本文分别使用光电二极管阵列（PDA）检测器（SPD-M40）和荧光检测器（RF-20AXS）检测ATP相关物质和包括组胺在内的氨基酸。

1. 实验部分

1.1 系统介绍

使用 Nexera 双进样系统，可以通过将样品注入两个独立的流路同时分析。此外，由于将获得的两个分析数据存储在一个数据文件中，因此对同一样品的综合分析和数据管理非常容易（图 1）。

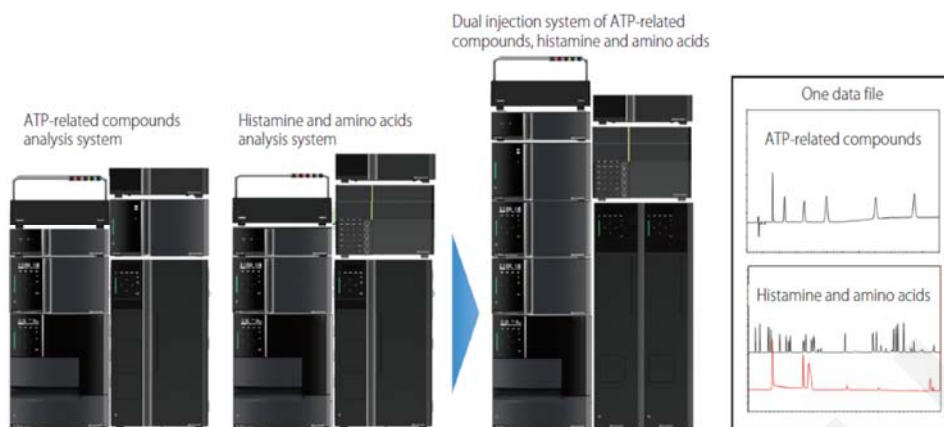


图1 单个系统（左）和双进样系统（右）

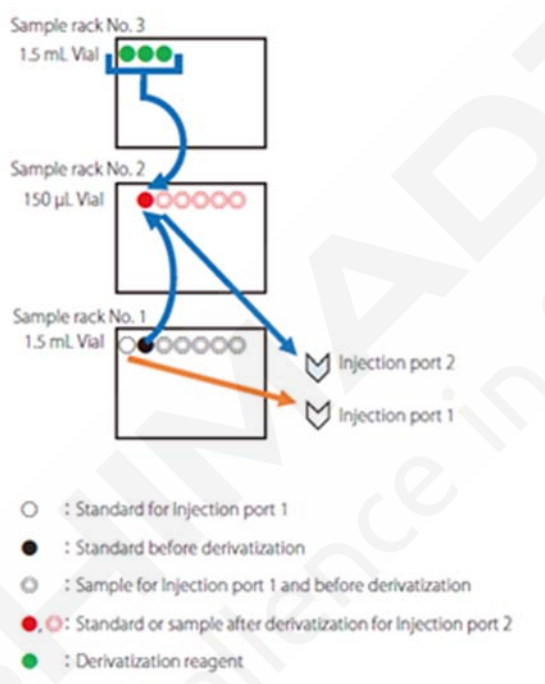


图2 双进样液相色谱工作站中自动进样器与批处理的设置

1.2 分析条件

流路1: 第一组 测定6种ATP-related

色谱柱: Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm)

流动相: A 水/乙腈=100/1 (v/v) 含0.15 mol/L 磷酸, 0.225 mol/L 三乙胺

B 水/乙腈=80/20 (v/v) 含0.15 mol/L 磷酸, 0.225 mol/L 三乙胺

流速: 0.8 mL/min 柱温: 30°C

进样体积: 10 μL 波长: 260 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表1。

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
4	100	0
11.50	88	12
11.51	0	100
18.50	0	100
18.51	100	0
32	100	0

流路 2: 第二组 测试 25 种组胺与氨基酸

色谱柱: Shim-pack Velox C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.7 μ m)

流动相: A 20mM 磷酸二氢钾 (pH6.5) B 乙腈/甲醇/水=45/40/15(v/v/v)

流速: 0.8 mL/min 柱温: 35°C

进样体积: 1 μ L 波长: Ex:350 nm,Em:450 nm(Ch1)
Ex:266 nm,Em:305 nm(Ch2)

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表2。

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
8	87	13
15	75	25
21.50	48	52
21.51	0	100
27.50	0	100
27.51	95	5
32	95	5

1.3 预处理方法以及 HPLC 分析条件

标准工作溶液: 见表 5。

使用金枪鱼作为样品。用高氯酸萃取后除去蛋白质, 然后进行中和, 用 HPLC 进行分析^[1] (图 3)。分析条件如 1.3 所示。ATP 相关物质, 组胺和 24 种氨基酸通常通过梯度洗脱来分离, 将在多样品分析中反复获得稳定结果的条件作为梯度洗脱的条件。组胺和氨基酸的分析, 需要使用邻苯二甲醛 (OPA) 和 9-芴基甲基氯甲酸酯 (FMOC) 进行荧光衍生, 自动进样器即可自动进行柱前荧光衍生 (表 3 和 4)。这样就无需进行复杂的手动预处理 (例如丹磺酰氯衍生化), 并保证了从衍生化到开始分析的时间保持恒定。

此外, 在本文中, 使用了低吸附玻璃瓶 TORAST™-H GlassVial。该样品瓶有两个产品系列: 1.5 mL 和小容量的 150 μ L。衍生化试剂和衍生化前的样品使用 1.5 mL 小瓶, 样品和衍生化试剂反应的小瓶, 使用在少量的情况下也易于混合的 150 μ L 小瓶。图 3 显示了自动进样器的样品设置。Nexera 的自动进样器 SIL-40 系列可以设置三个样品架, 因此如图 3 所示, 通过为每种用途设置不同样品瓶, 可以防止样品设置错误。

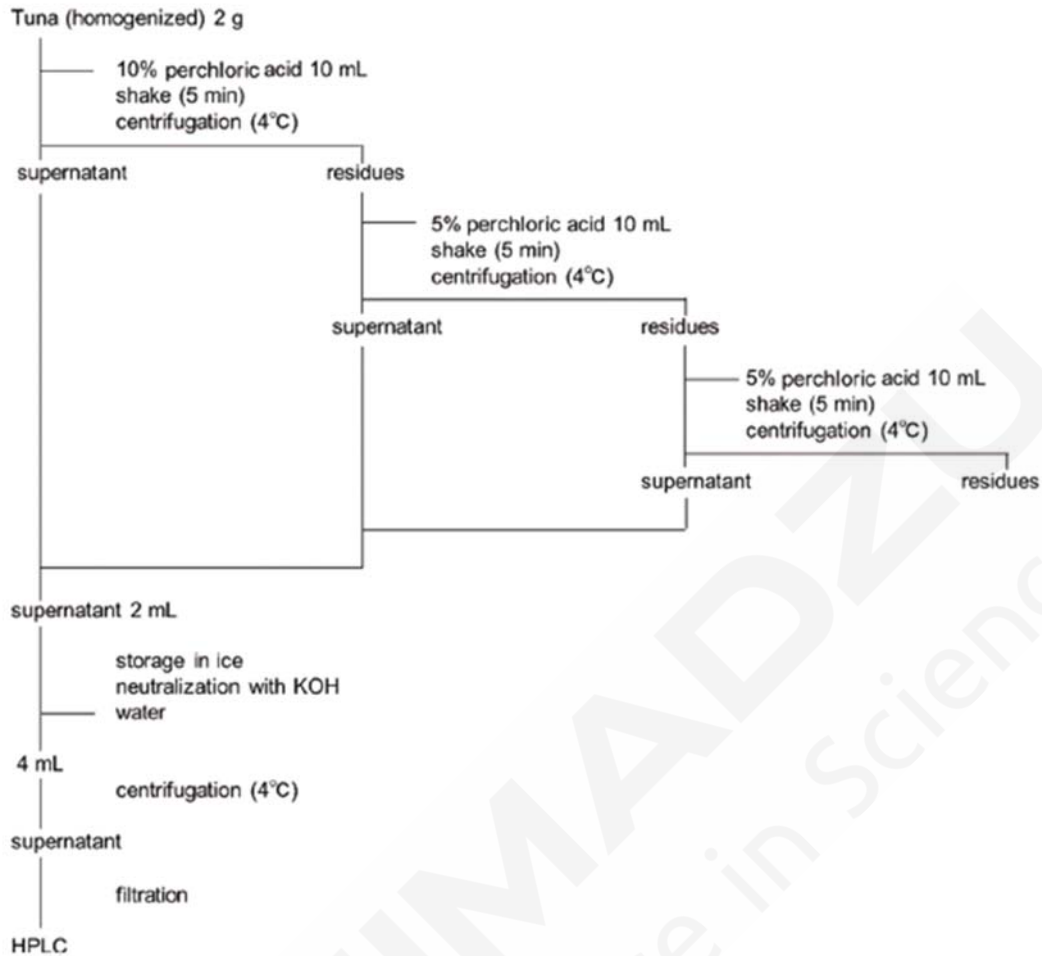


图 3 预处理方案

表 3 柱前自动衍生流程

①	MPA*2 solution 20 ul
②	OPA reagent 20 ul
③	Sample 10 ul
④	Mix
⑤	FMOc reagent 5.0 ul
⑥	Mix
⑦	Injection

表 4 衍生物试剂的制备

- | | |
|---|--|
| ① | 巯基丙酸溶液 将 10 ul 3-巯基丙酸加入 10 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液中) |
| ② | OPA 试剂 将 0.3 mL 乙醇加入 10 mg 的 0-邻苯二甲醛中并完全溶解, 然后加入 0.7 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液和 4 mL 超纯水。) |
| ③ | FMOc 试剂 将 10 mg 9-苄基甲基氯甲酸酯溶于 50 mL 乙腈中 |

2. 结果与讨论

2.1 预处理萃取溶剂和添加回收率的确认

此前已经报道过用高氯酸提取 ATP 相关物质的预处理方法, 我们讨论了是否可以同样地提取组

胺和氨基酸。作为实验空白，分别添加 1 μ mol 组胺和组氨酸，以水和高氯酸进行萃取，两者均能获得稳定的萃取效率(表 5)。

使用金枪鱼，根据“食品中农药残留等相关试验方法的稳定性评价指南”，同时进行 6 个添加回收试验。添加组胺使浓度达到国际食品标准委员会 (Codex) 的标准浓度 (10mg /100g)，静置 30 分钟后，同时处理 6 个样品。添加回收试验结果如表 6 所示。准确性 (回收率的平均值) 和精密度的结果都很好。

表 5 萃取溶剂不同时组胺和组氨酸的萃取效率

N	Extraction efficiency (%)			
	Histamine		Histidine	
	Water	Perchloric acid	Water	Perchloric acid
1	84.0	97.7	93.8	92.5
2	100.8	95.7	102.1	93.0

表 6 组胺的添加回收试验 (N=6)

N	Recovery rates (%)
1	96.8
2	98.3
3	99.8
4	99.8
5	101.0
6	103.0
Average (%RSD)	99.8 (2.14%)

2.2 校准曲线

针对31种目标成分创建校准曲线，所有成分的相关系数均在R²=0.999以上，线性良好。各成分的校准曲线浓度范围和相关系数，具体结果见表7。

表 7 校准曲线参数

No.	化合物名称	校准曲线范围 (u mol/L)	相关系数 R ²
1	<i>Hx</i>	1-300	0.99982
2	<i>IMP</i>	1-300	0.99983
3	<i>HxR</i>	1-300	0.99984
4	<i>AMP</i>	1-300	0.99987
5	<i>ADP</i>	1-200	0.99998
6	<i>ATP</i>	1-200	0.99944
7	Aspartic acid	0.25-50	0.99994
8	Glutamic acid	0.25-50	0.99995
9	Asparagine	0.25-50	0.99995
10	Serine	0.25-50	0.99995
11	Glutamin	0.25-50	0.99995
12	Glycine	0.25-100	0.99996
13	Histidine	0.25-100	0.99968

14	Threonine	0.25-50	0.99994
15	β -Alanine	0.25-50	0.99991
16	Arginine	0.25-50	0.99994
17	Alanine	0.25-100	0.99994
18	Taurine	0.25-100	0.99995
19	Anserine	0.25-100	0.99997
20	Carnosine	0.25-100	0.99995
21	Tyrosine	0.25-50	0.99995
22	Valine	0.25-50	0.99995
23	Methionine	0.25-50	0.99996
24	Histamine	0.25-50	0.99999
25	Cystine	0.25-25	0.99953
26	Tryptophan	0.25-50	0.99993
27	Phenylalanine	0.25-50	0.99995
28	Isoleucine	0.25-50	0.99995
29	Leucine	0.25-50	0.99996
30	Lysine	0.25-100	0.99995
31	Proline	1-25	0.99953

*Hx: Hypoxanthine

HxR: Inosine

IMP: Inosine 5' -monophosphate

AMP: Adenosine 5' -monophosphate

ADP: Adenosine 5' -diphosphate

ATP: Adenosine 5' -triphosphate

2.3 鱼肉中的 ATP 相关物质、组胺和氨基酸的同时分析以及 k 值、组胺浓度测定

使用生黄鳍金枪鱼，在购买后立即预处理，与改变储存温度一天后预处理进行比较分析，确认 K 值和组胺浓度。储存温度为冷藏保存（4°C）和室温（25°C）。购买一天后（存储在 4°C 下）进行预处理与购买后立即预处理相比较，K 值略有增加（+1.4%），并且观察到新鲜度随时间发生了变化。此外，比较储存温度时，K 值在 25°C 时明显增加（+25.1%），并且新鲜度下降，但是没有生成组胺。同样，确认了购买后冷藏储存 6 天的鲜长鳍金枪鱼的 K 值和组胺浓度。结果显示 K 值增加到 70.4%，达到所谓的变质区域，并且检测到低于 Codex 标准值的组胺。浓度为 2.1 mg/100 g。图 4 为标准品和金枪鱼中目标成分的色谱图，表 8 显示了经过不同天数、不同储存温度下的金枪鱼 K 值和组胺浓度。此外，还可以从许多氨基酸中分离并检测出组胺，也可同时分析鱼肉中常见的组氨酸、丙氨酸、牛磺酸、鹅肌肽、肌肽和赖氨酸等成分。表 9 显示了黄鳍金枪鱼中常见的核酸与氨基酸的浓度。

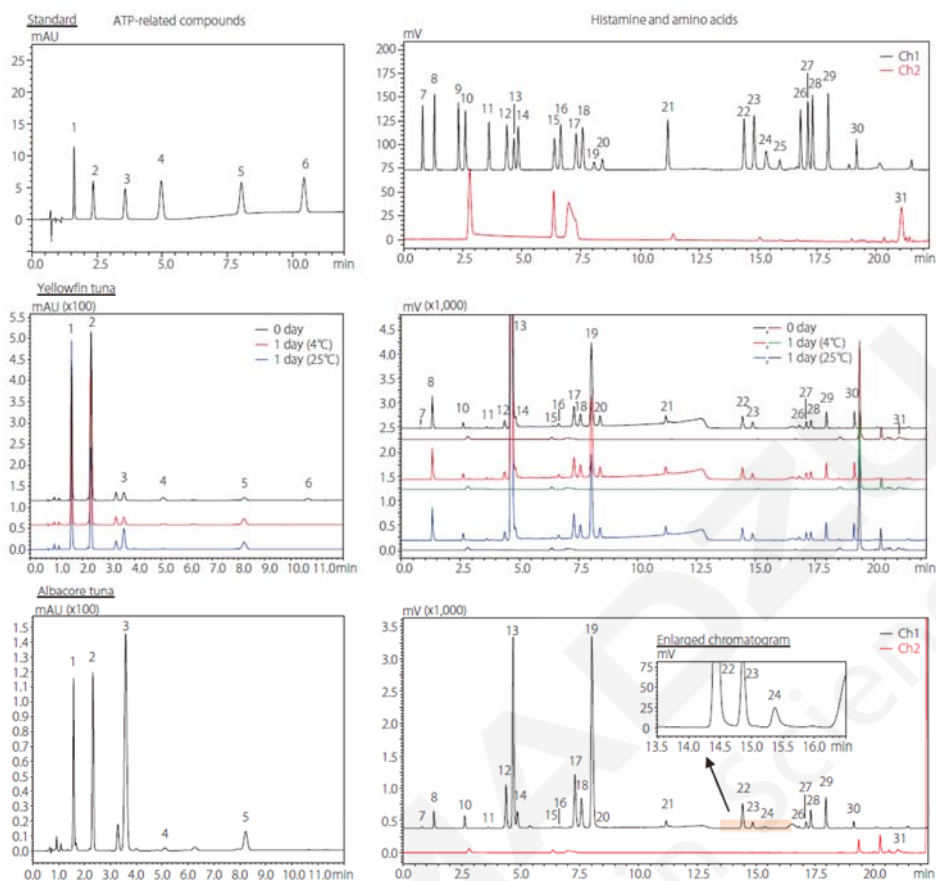


图4 标准品和金枪鱼（黄鳍、长鳍）目标成分色谱图（序号见表5）

表8 经过天数、储存温度下的金枪鱼k值和组胺浓度

	天数	温度°C	K 值*3 (%)	组胺浓度 (mg/100g)
黄鳍	0	4	36.1	N.D
	1	4	38.7	N.D
		25	61.2	N.D
长鳍	6	4	70.4	2.1

*3: k 值的定义公式 $formula = (Hx+HxR) / (Hx+HxR+IMP+AMP+ADP+ATP) * 100$

表9 黄鳍金枪鱼中的核酸和氨基酸的浓度

No.	化合物名称	黄鳍金枪鱼 (0天) (umol/L) *4
2	IMP	278.9
8	Glutamic acid	46.6
13	Histidine	(2416.0)
17	Alanine	55.7
18	Taurine	27.8
19	Anserine	(1062.5)
20	Carnosine	82.0
22	Valine	23.6
29	Leucine	20.4
30	Lysine	50.7

*4: 括号中的值超出量化范围

3. 结论

使用 Nexera 双进样系统，测量金枪鱼的新鲜度和由于组胺引起的变质状况。ATP 相关物质和组胺可以通过相同的预处理进行萃取。换言之，可以通过相同预处理程序获得待测样品。

K 值显示出随储存天数和温度变化的变化，表明温度越高，新鲜度越低。此外，在 K 值显示变质的样品中也检测到了组胺。组胺可以从氨基酸中分离检测，并且该系统可以同时分析鱼肉中所含的氨基酸。

使用 Nexera 双进样系统可同时分析鱼肉新鲜度和变质状态，快速获得结果，从而可以多角度地评估鱼肉样品。



附录 检测项目和双进样系统仪器配置一览表

序号	检测领域	检测项目	仪器配置	参考标准	页码
1	化妆品	对苯二胺等 32 种组分	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》7.2	P9
		抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》8.1	P16
		甲基异噻唑啉酮等 23 个 和吡硫鎇锌等 18 个组分	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》4.1+4.2	P22
		CI 10020 等 11 种和 CI 11920 等 13 种原料	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》6.3+6.4	P30
		巯基乙酸等 8 种原料	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》3.9	P37
2	中药配方 颗粒	四季青	二元+四元系统 SPD-M40+ELSD-LT III	/	P43
		巴戟天	二元+四元系统 SPD-M40+ELSD-LT III	国家药监局发布《巴戟 天配方颗粒》	P48
3	化药	布洛芬	二元+二元系统 SPD-M40+ SPD-40	美国药典 USP43-NF38	P54
		阿托伐他汀钙	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	2020 版二部国家药典 《阿伐他汀钙》	P58
4	食品	7 种有机酸	二元+四元系统 SPD-M40+ SPD-M40	GB 5009.157-2016	P65
		有机酸、糖类	二元+二元系统 CDD+RID	/	P71
		与 ATP 有关的物质、组 胺和氨基酸	二元+二元系统 SPD-M40+RF-20AXS	/	P78

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本公司在此对中国地图标注信息的行为仅限于表明本公司在中国各地分支机构区域分布状况, 不作为任何测绘、绘制或其他用途。

本产品资料所宣传的内容, 以本版本为准, 资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知。

印刷日期: 2024

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOWLOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。