

# 高效液相色谱二极管阵列检测法测定化妆品中的性激素含量

LC-098

**摘要:** 本文使用岛津高效液相色谱仪,建立了化妆品中性激素含量测定的方法。本方法采用 C18 色谱柱,水/甲醇=30/70 (v/v) 为流动相进行梯度洗脱,二极管阵列检测器检测。性激素在 0.025~25  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内具有良好的线性,相关系数均在 0.9999 以上。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.78% 和 5.27% 以下,表明仪器精密度良好,仪器检出限在 0.85~9.1  $\mu\text{g/L}$  之间。实际样品添加不同浓度,回收率为 71.1%~103.8%,结果表明方法准确可靠。

**关键词:** 化妆品 性激素 高效液相色谱 二极管阵列检测器

性激素添加到化妆品中具有促进毛发生长、丰乳、美白、除皱和增加皮肤弹性等作用,由于具有特殊的美容功效,性激素常常被一些化妆品生产商添加到各类功能性化妆品中,研究表明长期使用添加性激素的化妆品会产生副作用甚至有致癌的危险,给广大消费者健康带来损害。我国《化妆品安全技术规范》规定性激素为化妆品的禁用物质,从 2013 年 7 月 11 日开始,欧洲经济

区 (EEA) 市场中销售的化妆品必须符合新颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 的要求。

本文提出高效液相色谱二极管阵列检测法是对《化妆品安全技术规范》和新颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 中性激素检测方法的补充和应对,本方法操作简单、灵敏度高。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A,包括 CBM-20A 系统控制器,LC-20AD $\times$ 2 高精度溶液输送泵,DGU-20A5 在线脱气机,SIL-20AC 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱,SPD-M20A 二极管阵列检测器。

### 1.2 分析条件

色谱柱 :Shimadzu VP-ODS 4.6 mmI.D.  $\times$  150 mmL., 5  $\mu\text{m}$

流动相 :A - 水, B - 甲醇, A/B=30/70 (v/v)

流速 :1.0 mL/min

洗脱方式 :梯度洗脱 (见表 1)

柱温 :40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长 :190~370 nm

进样量 :10  $\mu\text{L}$

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.0	Pumps	Pump B Conc.	70%
6.1	Pumps	Pump B Conc.	90%
10.0	Pumps	Pump B Conc.	90%
10.1	Pumps	Pump B Conc.	70%
14.0	Controller	Stop	

### 1.3 样品处理

#### 1.3.1 性激素标准溶液的配制

标准工作溶液配制：用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用甲醇和水溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液，各标准物质的具体浓度见表 2。

表 2. 混合标准工作液中各标准物质的浓度(μg/mL)

名称	检测波长(nm)	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5
己烯雌酚	204	0.25	0.50	2.5	5.0	25.0
雌酮	204	0.25	0.50	2.5	5.0	25.0
雌三醇	204	0.025	0.05	0.25	0.5	2.5
睾酮	245	0.25	0.50	2.5	5.0	25.0
甲睾酮	245	0.25	0.50	2.5	5.0	25.0
孕酮	245	0.25	0.50 </td <td>2.5</td> <td>5.0</td> <td>25.0</td>	2.5	5.0	25.0

#### 1.3.2 试样的制备

准确称取化妆品液体样品 1.0 g 于 10 mL 具塞比色管中，在水浴上馏除乙醇等挥发性有机溶剂，用甲醇稀释到 10 mL，超声提取 30 min，静置，以 10000 r/min 速度离心 5 min，取上清液经 0.45 μm 有机系滤膜过滤，滤液直接过滤到液相专用样品瓶中用于分析。

## 结果与讨论

### 2.1 标准谱图

性激素不同采集波长下标准溶液色谱图如图 1 和图 2 所示。

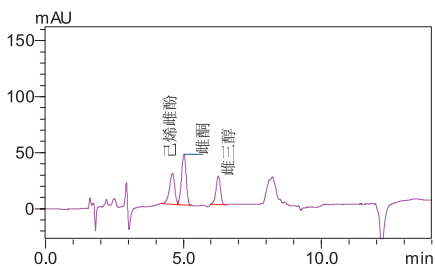


图 1. 3 种激素在 204 nm 采集波长下标准溶液的色谱图(己烯雌酚和雌酮：2.5 μg/mL；雌三醇：0.25 μg/mL)

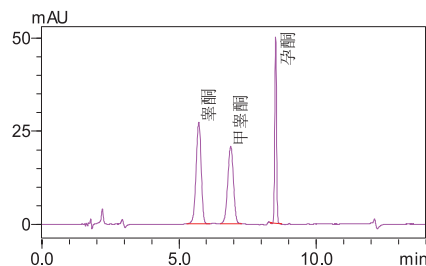
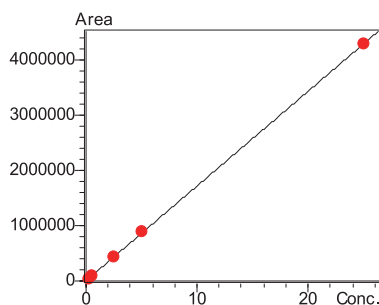


图 2. 3 种激素在 245 nm 采集波长下标准溶液的色谱图(己烯雌酚、雌酮和雌三醇均为 2.5 μg/mL)

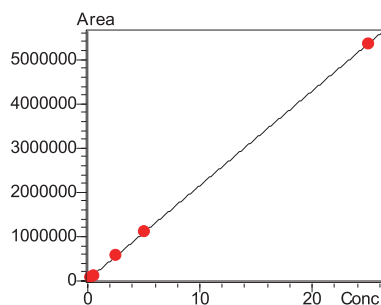
### 2.2 线性关系

由图 3 可以看出在 0.025~25 μg/mL 的浓度范围内，6 种激素的线性相关性良好，相关系数均在 0.9999 以上（见表 3）。

1、己烯雌酚



2、雌酮



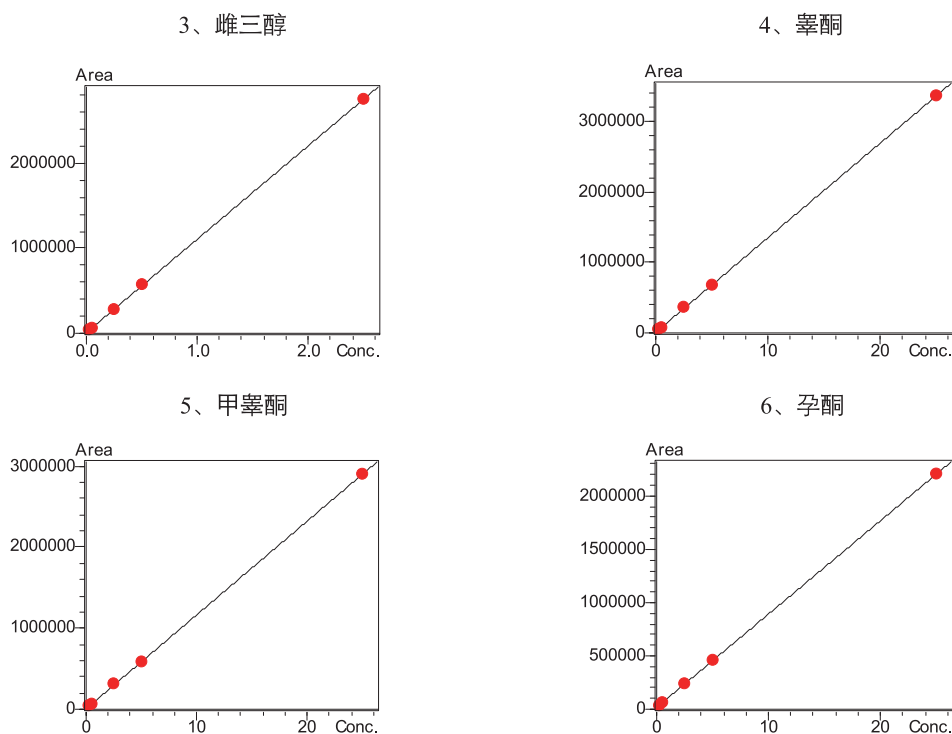


图 3.性激素的校准曲线

表 3. 性激素的线性方程和检出限

名称	线性范围	相关系数(R)	检出限(μg/L)	定量限(μg/L)
己烯雌酚	$Y = (171638)X + (3565.74)$	0.9999	9.1	30.4
雌酮	$Y = (213206)X + (24078.5)$	0.9999	5.6	18.7
雌三醇	$Y = (1097741)X + (8313.43)$	0.9999	0.85	2.85
睾酮	$Y = (134361)X + (8768.28)$	0.9999	3.5	11.5
甲睾酮	$Y = (115788)X + (6474.50)$	0.9999	4.6	15.1
孕酮	$Y = (87549.7)X + (17131.3)$	0.9999	1.7	5.5

### 2.3 精密度实验

对不同浓度的混合标准工作液连续测定 6 次，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：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.026%~ 0.78 % 和 0.26%~5.27% 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)

样品名称	RSD%(浓度1)		RSD%(浓度3)		RSD%(浓度5)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
己烯雌酚	0.043	2.62	0.12	2.14	0.041	1.26
雌酮	0.090	4.17	0.11	0.97	0.036	0.29
睾酮	0.39	0.85	0.73	0.37	0.58	0.30
甲睾酮	0.43	1.61	0.78	0.74	0.61	0.61
孕酮	0.09	5.27	0.22	0.67	0.20	0.28
雌三醇	0.037	2.88	0.10	2.78	0.026	0.26

## 2.4 基质加标实验

按照 1.3.2 所述步骤处理空白化妆品，图 4 和图 5 分别在 204 nm 和 245 nm 采集波长条件下基质加标扣除基质空白的样品色谱图，由图可知，化妆品基质并未干扰到目标物的定量。化妆品中添加不同浓度标样计算回收率结果见表 5。

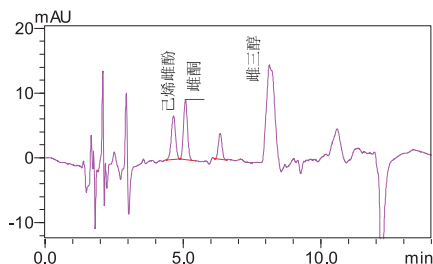


图4. 204 nm下加标3种激素的色谱图(己烯雌酚和雌酮: 0.5 mg/kg; 雌三醇: 0.05 mg/kg)

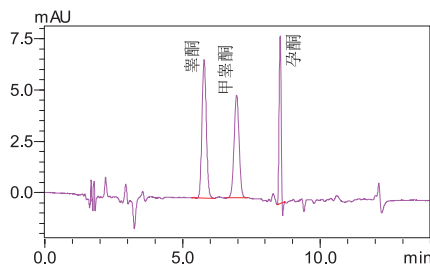


图5. 采集波长245 nm下加标3种激素0.5 mg/kg的色谱图

表 5. 加标样品回收率 (n=3)

编号	名称	加标含量 1 (mg/kg)	回收率 1 (%)	加标含量 2 (mg/kg)	回收率 2 (%)	检出限 (mg/kg)
1	己烯雌酚	0.5	82.3	2.5	103.8	0.05
2	雌酮	0.5	77.1	2.5	102.5	0.03
3	雌三醇	0.05	71.1	0.25	102.4	0.008
4	睾酮	0.5	97.6	2.5	93.4	0.004
5	甲睾酮	0.5	97.9	2.5	93.0	0.005
6	孕酮	0.5	89.0	2.5	90.4	0.003

## 2.5 实际样品分析

按照上述所建立的分析方法，将该方法应用于实际某国际品牌化妆品的检测，检测其中一份化妆品基质含有孕酮（浓度为 0.081 mg/kg），色谱图如图 6 所示。

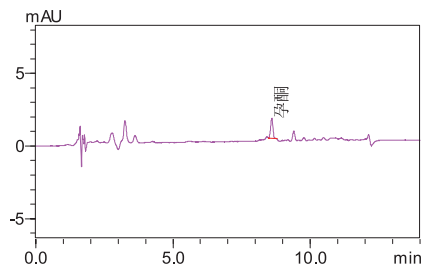


图 6. 检测某国际品牌化妆品的色谱图

## ■ 结论

本实验中使用岛津高效液相色谱仪 (LC-20A)，建立了化妆品中激素含量测定的方法。性激素在 0.025~25 μg/mL 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9999 以上，方法检出限在 0.003~0.05 mg/kg 之间，空白基质样品添加不同浓度，回收率为 71.1%~103.8%，结果表明方法准确可靠。实际样品分析结果检测到其中一份化妆品含有孕酮 (含量为 0.081 mg/kg)。

附录：性激素的中英文名称、分子式、相对分子质量及 CAS 登陆号

中文名称	英文名称	分子式	相对分子质量	CAS号
己烯雌酚	Diethylstilbestrol	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	268.35	6898-97-1
雌酮	Estrone	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270.37	53-16-7
雌三醇	Estriol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	288.38	50-27-1
睾酮	Testosterone	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288.42	58-22-0
甲睾酮	17-Methyltestosterone	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302.45	58-18-4
孕酮	Progesterone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314.46	57-83-0