

高效液相色谱法同时测定化妆品中的七种香豆素类化合物

黄雄风 刘绿叶 金燕 许群
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

禹重科技® ÜZONGLAB

关键词

香豆素；化妆品；高效液相色谱法

引言

香豆素类化合物，是一类具有芳香气味的物质，广泛分布于植物。为增强香气，通常添加一定量的香豆素类香料于化妆品中¹。因此，香料的安全性将直接影响化妆品的安全性。有毒理实验发现，香豆素是大鼠的可疑致肿瘤物；此外，对人体肝脏有损伤²⁻³。由于香豆素类化合物具有相同的母体（其母体是由苯环和氧杂环组成的双环化合物，结构式见图1），因此危害性也较为相似。

香豆素类化合物在化妆品、食品、塑料等行业常被用作香料使用。鉴于香豆素类对人体健康的危害性，美国食品药品监督管理局（Food Drug Administration, FDA）早在1954年就禁止将香豆素用作食品添加剂⁴。欧盟早在2000年就提议在化妆品中禁用二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素和7-甲基香豆素，并于2009年在化妆品法规Regulation(EC) No 1223/2009中将双香豆素、环香豆素、醋硝香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、4-甲基-7-乙氧基香豆素纳入禁用物质列表；我国最早是在GB7916-1987《化妆品卫生标准》中规定6-甲基香豆素

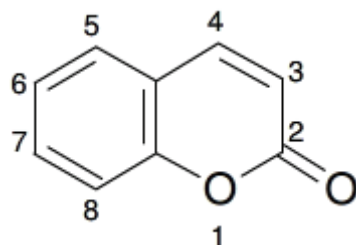


图1. 香豆素类化合物的母体



的最大允许浓度为0.003%，而《化妆品卫生规范》（2007版）中明确规定二氢香豆素、双香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、醋硝香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素为禁用物质⁵⁻⁸。

测定香豆素类化合物的方法有气相色谱法、高效液相色谱法、高效液相色谱法（HPLC）、液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）和气相色谱-质谱联用法（GC-MS）；其中，高效液相色谱法是较为简便的方法⁹⁻¹⁵。国内于2008年在标准SN/T 2104/2008《进出口化妆品中双香豆素和环香豆素的测定 液相色谱法》中采用高效液相色谱/紫外检测法对化妆品中的双香豆素和环香豆素进行了测定¹⁵。但是该标准只测定双香豆素和环香豆素，且流动相较为复杂。基于多种香豆素已被列入禁用或限用物质，本文拟通过高效液相色谱法建立一种同时测定化妆品中多种香豆素类化合物的简便方法。

仪器

Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000RS 四元系统, 包括:

- LPG-3400RS 四元分析泵 (具备溶剂脱气功能)
- WPS-3000RS 自动进样器 (配置 100 μ L 定量环)
- TCC-3000RS 柱温箱 (具备控温功能)
- DAD-3000RS (检测池体积 SST 2.5 μ L)

Thermo Scientific Chromeleon 色谱系统控制软件, 版本 6.80 或以上

试剂与标准品

去离子水, 18.2 M Ω -cm (Thermo Scientific GenPure Pro UV-TOC, P/N 50131948)

乙腈 (CH₃CN), HPLC 级 (Fisher Chemical, P/N AC610010040)

标准品

双香豆素 (CAS No.: 66-76-2)、环香豆素 (CAS No.: 518-20-7)、醋硝豆素 (CAS No.: 152-72-7)、香豆素 (CAS No.: 91-64-5)、7-甲氧基豆素 (CAS No.: 531-59-5)、6-甲氧基豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素 (CAS No.: 87-05-8) 购买于上海安谱科学仪器有限公司。

标准溶液的制备

标准储备液 1

分别准确称取 0.01 g 环香豆素、双香豆素、醋硝豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲氧基香豆素、甲基-7-乙氧基豆素七种香豆素标准品, 用二氯甲烷: 乙腈 (v:v 5: 95) 混合溶液定容至 10 mL, 得到浓度均为 1000 mg/L 的香豆素类化合物单标。各取 1 mL 上述浓度为 1000 mg/L 的单标于 10 mL 离心管, 用乙腈定容至 10 mL, 得到浓度为 100 mg/L 的标准储备液 1。

标准工作溶液

将标准储备液 1 用乙腈进行逐级稀释, 得到浓度为 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L 的标准溶液。

样品前处理

样品

分别称取两种不同的化妆品试样 0.1 g 至聚四氟乙烯容器中, 加入 3 mL 乙腈 /0.1 M 氢氧化钠混合溶液 (9:1,v/v), 在超声波清洗器中超声振荡 20 min 后, 加入 0.03 mL 浓度为 1.0 M 的乙酸溶液, 并用乙腈 /0.1 M 氢氧化钠混合溶液 (9:1,v/v) 定容至 5 mL, 混匀。取部分溶液放入离心管中, 在离心机上于 6000 r/min 离心 20 min, 离心后的上清液经 0.45 μ m 有机滤膜过滤, 滤液待测定用。

样品加标

称取其中的一种化妆品试样 0.1 g 至聚四氟乙烯容器中, 加入 0.5 mL 浓度为 10 mg/L 的混标, 按照样品前处理步骤与样品同步处理。

色谱条件

色谱柱: Acclaim 120, C18, 3 μ m (3.0 \times 150 mm) (P/N 063691)

流动相: 乙腈 / 水

进样体积: 1 μ L

流速: 0.425 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测: 紫外吸收波长, λ 306 nm

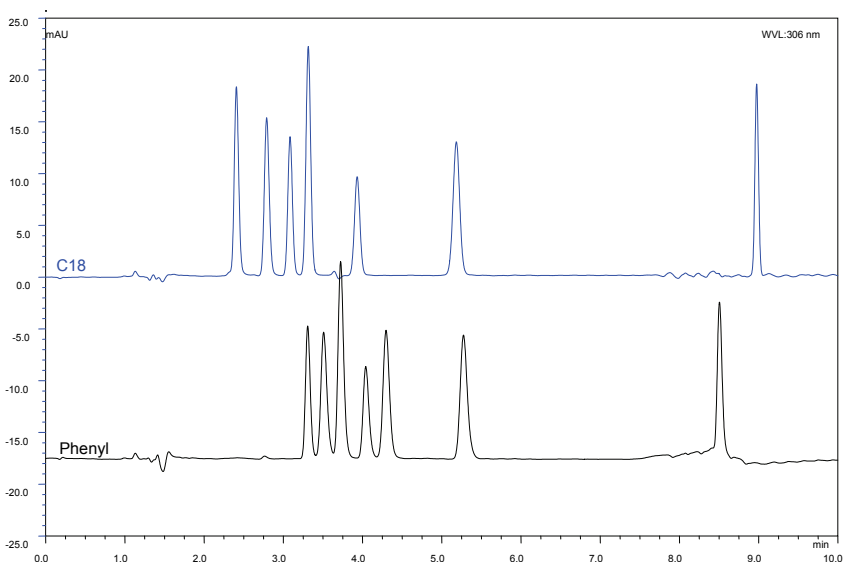


图 2. 7 种香豆素类化合物在同规格 C18 和 Phenyl 柱的分离对比图

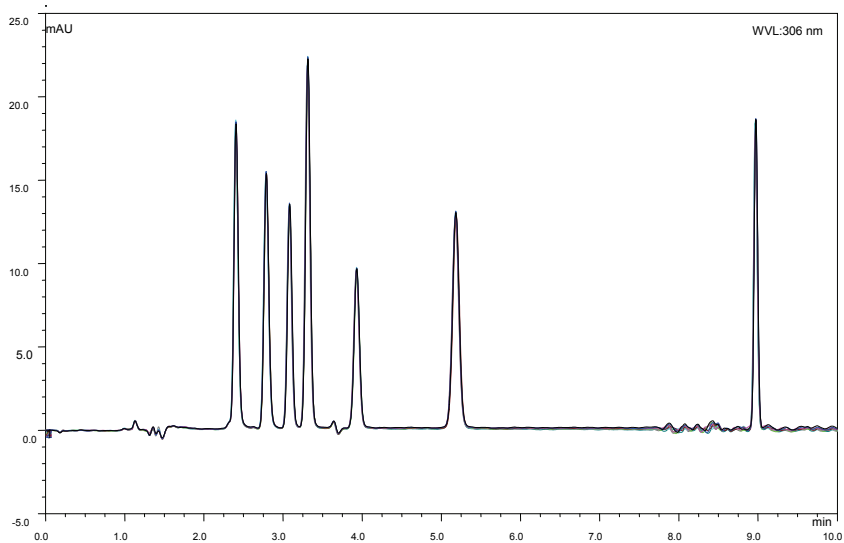


图 3. 香豆素混合标准品的重叠色谱图 (10 mg/L, n=8)

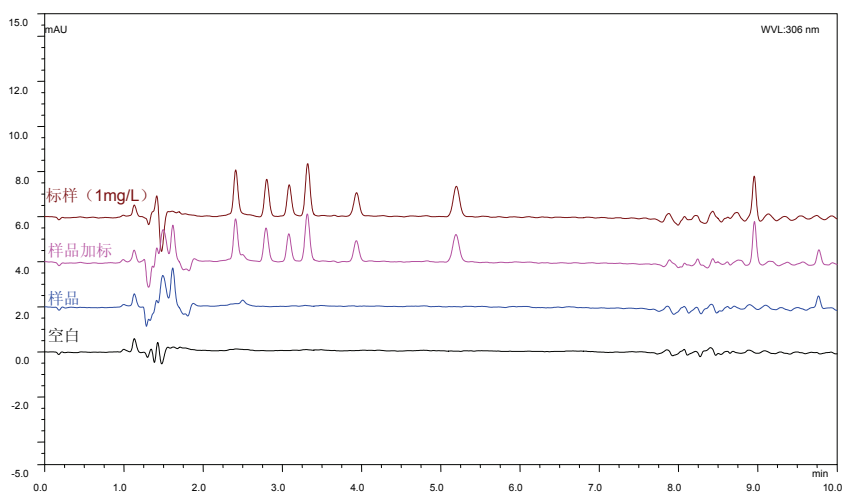


图 4. 空白、标样 (1 mg/L)、样品、样品加标 (加标浓度: 1 mg/L) 的色谱图

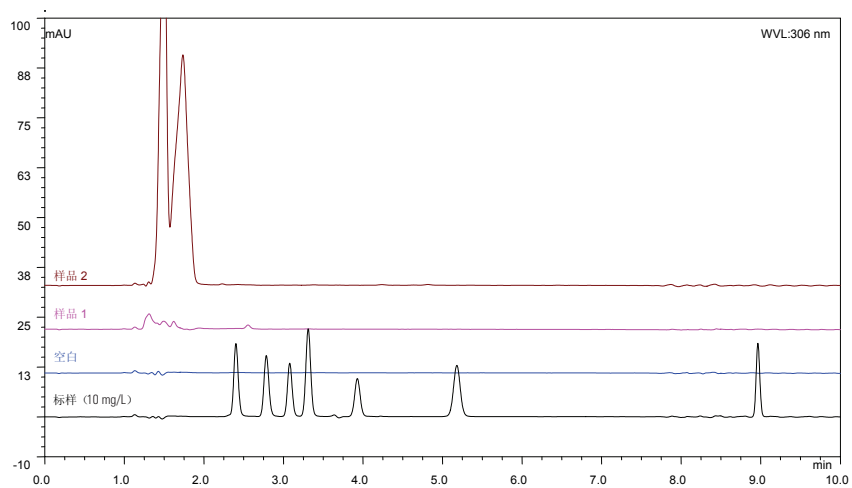


图 5. 空白、标样、样品的色谱图

表 1. 七种豆素的线性方程、重现性及检出限

化合物名称	线性方程 (R^2)	相对标准偏差 (保留时间)	相对标准偏差 (峰面积)	检出限 (3 倍 S/N)
环香豆素	$y = 0.0001x + 0.0007$ ($R^2=1$)	0.07 %	1.28 %	26 $\mu\text{g/L}$
双香豆素	$Y=0.0001c-0.014$ ($R^2=1$)	0.08%	1.16%	27 $\mu\text{g/L}$
香豆素	$y = 9E-05c + 0.0051$ ($R^2=1$)	0.09%	1.13 %	17 $\mu\text{g/L}$
7- 甲氧基香豆素	$y = 12401c - 133.9$ ($R^2=0.9998$)	0.09 %	1.30 %	37 $\mu\text{g/L}$
6- 甲基香豆素	$y = 0.0001x - 0.0045$ ($R^2=0.9999$)	0.08%	1.02 %	27 $\mu\text{g/L}$
4- 甲基 -7- 乙氧基豆素	$Y=0.0001c-0.0173$ ($R^2=1$)	0.06 %	1.19 %	28 $\mu\text{g/L}$

结果与讨论

色谱柱的选择

基于香豆素类化合物的化学性质, 本文在相同实验条件下比较了双香豆素、环香豆素在同种规格的 Phenyl 和 C18 分析柱的分离情况。由图 2 可知, 在该条件下, 香豆素类化合物在 C18 色谱柱的分离效果更好。

重现性、检出限和线性

为验证方法的重现性, 本文通过连续八次进样浓度为 10 mg/L 的混标, 得到各个香豆素类化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD), 保留时间和峰面积的 RSD 分别小于 0.1% 和 2%, 说明该方法具有良好的重现性; 香豆素、环香豆素等七种香豆素在 0.1 mg/L 至 50 mg/L 范围内具有良好的线性, 所有线性方程 R^2 都大于 0.999; 另外, 按照三倍信噪比可得到各个化合物的检出限, 具体结果见图 3 和表 1。

样品和样品加标的分析

为考察方法的可靠性, 本文对实际样品进行理论标样浓度为 1 mg/L 的加标, 环香豆素、双香豆素、香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、4-甲基-7-乙氧基豆素和醋硝豆素的回收率依次为: 80%、90%、89%、94%、84%、92% 和 89%, 说明该方法具有良好的可靠性, 见图 4。另外, 由图 5 可以看出, 七种香豆素类化合物在两种化妆品中均未检出, 符合《化妆品卫生规范》标准。

结论

在优化的实验条件下, 双香豆素、环香豆素等七种香豆素类化合物在 10 min 内可完成分析。实验结果表明, 该方法具有良好的线性、重现性和回收率, 为准确测定化妆品中的香豆素类化合物提供了技术支持。

参考文献

1. 李明阳. 化妆品化学 [M], 北京: 科学出版社, 2002.
2. 李洁, 王超, 武婷, 李楠. 高效液相色谱法测定化妆品中的三种香豆素, 日用化学工业, 2006, 36, 257-259.
3. Collier A C, Pritsos C A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MIT assay, Biochemical Pharmacology, 2003, 66:281-287.
4. U.S. Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations-Title 21-Food and Drug [EB/OL]. <http://www.fda.gov/>[2012-06-18].
5. SCCNFP/032/00, final. An initial list of perfumery materials which must not form part of fragrances compounds used in cosmetic products. The 12th Plenary meeting of SCCNFP, 3 May 2000[EB/OL]. http://ec.europa.eu/health/archive/ph-risk/.../out116_en.pdf[2012-06-20].
6. Consumers may take in large amounts of coumarin form cosmetics, too[EB/OL]. <http://www.brf.bund.de/cd/10569>. [2012-06-20].
7. 中华人民共和国卫生部, GB 7916-87 化妆品卫生标准 [S], 1987.
8. 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范 2007 版 [S], 2007.
9. 刘正聪, 陆舍铭, 王海利, 招云芳, 李中昌, 王迪, 缪明明. 超高效液相色谱法测定天然香料中的香豆素含量, 香精香料化妆品, 2009, 27-29.
10. 席海为, 马强, 王超, 白桦, 刘茜, 王焯. 高效液相色谱法对化妆品中的 17 种香豆素类化学成分的同时测定, 分析测试学报, 2010, 29, 1168-1172.
11. 程艳, 王超, 薛一梅, 陈伟, 王星, 白桦, 蔡天培,

- 胡孔新. 化妆品中双香豆素和环香豆素的高效液相色谱二极管阵列检测器测定, 分析测试学报, 2008, 196-202.
12. 赵晓亚, 林雁飞, 胡小钟, 王鹏, 付晓芳, 李晶. 气相色谱-质谱法同时测定化妆品中的5种香豆素类化合物, 分析试验室, 2010, 29, 76-79.
 13. 赵晓亚, 付晓芳, 王鹏, 李晶, 胡小钟. 高效液相色谱法测定化妆品中的香豆素类化合物, 分析科学学报, 2011, 27, 49-52.
 14. 韩熠, 张承明, 喻坤, 孟霞, 陈永宽, 缪明明. 食品及化妆品中香豆素和黄樟素类化合物分析方法研究进展, 香料香精化妆品, 2013, 1, 45-49.
 15. 中华人民共和国出入境检验检疫标准, SN/T 2104/2008 进出口化妆品中双香豆素和环香豆素的测定液相色谱法, 2008.

禹重科技® UZONGLAB

成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

上海市闵行区春申路2525号芭洛商务大楼

电话: 021-8039 4499 传真: 021-5433 0867

上海|北京|沈阳|太原|长沙|广州|成都|青岛|香港

全国销售和售后服务电话: 400-808-4598

邮编: 201104, China

邮箱: shanghai@uzong.cn

更多信息请访问: www.uzong.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC



了解我们



微信公众号