化妆品中糖皮质类激素的快速测定

谭建华，熊小婷，赵田甜，贾芳，王继才，席绍峰，李慧勇，吴玉鎏
（广州市质量监督检测研究院，广东广州 510110）

摘要：建立了一种简单、快速测定化妆品中三十种糖皮质类激素的分析方法。采用饱和氯化钠溶液-乙腈-正己烷三相溶剂直接提取并净化样品，亚铁氰化钾-醋酸锌溶液沉淀乳化基质后，用超高效液相色谱进行测定。另外，本文对不同的提取溶剂和提取方法的提取效果等做了系统的比较，优化了实验条件，方法的回收率为 89.8%~105.2%，相对标准偏差为 5.0%~10.3%，方法定量限为 2.0 mg/kg。

关键词：超高效液相色谱法（UPLC）；糖皮质类激素；快速测定
文章篇号：1673-9078(2012)2-226-228

Rapid Determination of Glucocorticosteroids in Cosmetics

TAN Jian-hua, XIONG Xiao-ting, ZHAO Tian-tian, JIA Fang
WANG Ji-cai, XI Shao-feng, LI Hui-yong, WU Yu-luan
(Guangzhou Products Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: A simple and rapid method was developed for determination of 30 specified glucocorticosteroids. Sample was extracted and purified by three phases solvent system comprised of saturated aqueous sodium chloride solution, acetonitrile and hexane. After emulsified matrix was precipitated by potassium ferrocyanide and zinc acetate solution, 30 specified glucocorticosteroids were determined by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). In addition, extraction conditions were further optimized by systematically reseaching on effects of different extracting solvents and methods. With this method, the average recoveries for glucocorticosteroids ranged from 89.8 % to 105.2 %; The relative standard deviations were between 5.0 % and 10.3 %; And the method quntification limit was 2.0 mg/kg.

Key words: ultra performance liquid chromatography (UPLC); glucocorticosteroids; rapid determination

糖皮质类激素属甾体类化合物，具有强大的抗炎作用，对许多皮肤性炎症和过敏症非常有效，在临床上应用广泛。但是，长期大量使用会导致皮质功能亢进综合征、诱发或加重感染等不良后果。部分化妆品企业盲目追求产品的有效性，于化妆品产品中添加糖皮质类激素药物，消费者使用了添加糖皮质激素药物的化妆品后，短时间内会使皮肤有所改善，而且在临床上不会有任何明显的异常反应，而长期使用该类化妆品会导致糖皮质激素依赖性皮炎、接触性皮炎或化妆品皮肤病，甚至毁容。《化妆品卫生规范》（2007 年版）明确将糖皮质类激素列为化妆品中禁用物质。因此，检测各种化妆品中是否含糖皮质激素，对于控制化妆品的产品质量，保障人民身体健康具有重要的意义。

近年来，化妆品中糖皮质类激素的检测较受关注，

收稿日期：2011-12-03
基金项目：广东省质监局科技项目（2009ZZ05）
作者简介：谭建华（1982-），男，硕士，主要研究方向为有害物质检测方法的研发
通讯作者：李慧勇（1974-），男，博士

国内外均有文献报道。采用的方法包括高效液相色谱法[1~3]，液相色谱-质谱联用法[4~7]等。吴大南等[1]采用高效液相色谱法检测化妆品中 6 种糖皮质激素；GB/T 24800.2-2009《化妆品中四十一种糖皮质激素的测定 液相色谱串联质谱法和薄层层析法》[6]中建立了较为系统地固相萃取-液质联用及薄层色谱法测定化妆品中糖皮质激素的方法等。本文采用简单的液液萃取法，结合超高效液相色谱，建立了一种化妆品中 30 种糖皮质类激素的快速测定的方法，方法简单、快速、准确，并成功地用于实际化妆品样品的测定。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

超高效液相色谱仪，Acquity UPLC，美国 Waters 公司；超纯水系统，milli-Q，美国 millipore 公司；BEH C_{18} 色谱柱（2.1×150 mm，1.7 μm）、HSS T3（1.0×50 mm，1.8 μm）；冷冻离心机，Allegra 64R，Beckman。

糖皮质类激素标准物质：倍他米松、可的松醋酸酯、地塞米松、泼尼松龙、氟替卡松丙酸酯、甲基泼尼松龙、氢化可的松醋酸酯、氟轻松醋酸酯、曲安奈德（Dr 标准品）；可的松、倍氯米松、地夫可特（TRC 标准品）、氟氢缩松、氢化可的松戊酸酯、氟米龙醋酸酯、氟米龙、二氟拉松双醋酸酯、甲基泼尼松龙醋酸酯、地塞米松醋酸酯、曲安西龙双醋酸酯、倍他米松戊酸酯、泼尼卡酯、哈西奈德、阿氯米松双丙酸酯、安西奈德（USP 标准品）、曲安奈德醋酸酯、氢化可的松丁酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、泼尼松醋酸酯（中国药品生物制品检定所标准品）。

甲醇、乙腈、（HPLC 级，Merk 公司）；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

1.2 标准溶液的配置

分别准确称量三十种糖皮质类激素各 10 mg（精确至 0.1 mg）于 10 mL 棕色容量瓶中，加甲醇溶解并定容，分别配成 1 g/L 的标准储备液。将标准储备液以乙腈水溶液（*V/V*=1:1）配制成混合标准溶液再将其稀释成系列混合标准工作溶液，4 ℃避光保存。

1.3 样品前处理

准确称取 0.5~1.0 g（精确至 0.001 g）样品，置于 10 mL 比色管中，按一定顺序[a]准确加入乙腈、饱和氯化钠溶液和正己烷各 3 mL，再于均质器上充分均质，冷冻离心，用针抽取中间层澄清液，转移至 10 mL 离心管中。再加 3 mL 乙腈于原比色管中，重复以上步骤。将两次提取的澄清液合并，加入 10%亚铁氰化钾溶液（*V/V*）0.2 mL，再加入 20%醋酸锌溶液（*V/V*）0.2 mL，用水稀释至 10 mL，混匀，离心，取上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤，供 UPLC 测定。

[a] 注：乙腈、饱和氯化钠溶液和正己烷的加入顺序可根据实际样品的特点进行调整。对于水基为主的样品、水包油类样品等可先加入饱和氯化钠溶液分散均匀。而对于蜡质含量较高的样品、油包水类样品和等可先加入正己烷分散均匀。

1.4 仪器分析条件

UPLC 条件 色谱柱：BEH C_{18}（2.1×150 mm，1.7 μm）；柱温：40 ℃；进样体积：5 μL；流速：0.3 mL/min；流动相条件见表 1。光电二极管阵列检测器（PDA）。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	流动相 A(水)	流动相 B(乙腈)
0	63	37
4.5	63	37
10	45	55
13	45	55
13.1	63	37
14.0	63	37

2 结果与讨论

2.1 提取方法的选择

表 2 不同溶剂体系对化妆品中三十种糖皮质类激素加标提取效果的比较

Table 2 Extraction efficiency of the 30 glucocorticosteroids in cosmetics by different solvents

化合物	溶剂体系（回收率/%）				
	甲醇	乙腈	甲醇水溶液/(V/V=1:1)	丙酮	饱和氯化钠水溶液+乙腈+正己烷
泼尼松龙	94.5	95.4	96.2	95.6	90.2
可的松	98.6	95.8	94.5	98.5	94.5
甲基泼尼松龙	100.5	99.8	95.8	96.9	92.5
倍他米松	101.6	98.9	94.7	96.5	94.3
地塞米松	99.5	96.8	98.5	99.0	92.8
倍氯米松	99.6	95.8	95.2	97.1	91.2
曲安奈德	99.3	95.8	94.6	96.7	94.6
曲安西龙双醋酸酯	96.8	96.7	93.9	97.8	94.2
氟氢缩松	95.8	96.7	95.9	102.5	92.6
氟米龙	95.8	96.2	99.4	100.2	93.5
氢化可的松醋酸酯	94.5	95.6	99.2	97.3	94.8
地夫可特	93.8	98.4	94.8	99.7	92.9
泼尼松醋酸酯	95.6	98.4	96.2	99.9	93.8
可的松醋酸酯	95.1	94.3	97.9	99.6	93.5
甲基泼尼松龙醋酸酯	94.6	95.7	99.2	100.8	105.2
氢化可的松丁酸酯	94.8	96.7	94.5	98.2	92.3
地塞米松醋酸酯	98.7	96.8	99.1	97.5	94.8
氟米龙醋酸酯	96.8	98.5	97.2	98.8	92.3
氢化可的松戊酸酯	95.5	94.8	95.8	95.6	93.7
曲安奈德醋酸酯	96.3	98.2	97.1	105.2	96.8
氟轻松醋酸酯	101.6	98.6	97.9	103.6	93.8
二氟拉松双醋酸酯	96.9	99.2	97.8	99.3	92.8
倍他米松戊酸酯	99.3	98.2	97.6	104.5	93.0
泼尼卡酯	94.6	95.8	94.9	94.8	95.6
哈西奈德	98.6	95.9	96.7	99.1	90.9
阿氯米松双丙酸酯	99.8	99.1	96.9	95.7	92.3
安西奈德	98.6	96.1	99.8	97.9	91.9
氯倍他索丙酸酯	93.9	95.9	92.8	95.9	91.0
氟替卡松丙酸酯	93.0	94.8	93.7	95.6	90.8

现代食品科技

倍他米松双丙酸酯	94.6	95.8	92.9	98.6	89.8

化妆品种类繁多，基质及结构形态差异巨大，特别是不同化妆所添加的不同表面活性剂体系给糖皮质类激素的提取和纯化造成较大困难。本试验中采用了甲醇、乙腈、甲醇水溶液（*V*/*V*=1:1）、丙酮等提取溶剂，系统地比较了以上不同溶剂对化妆品中糖皮质类激素的提取效率（见表 2）。

结果显示，以上溶剂体系对所选 30 种糖皮质类激素均具有较好的提取效果，提取回收率均在 90%以上。但是，通过进一步的试验发现，由于几种溶剂的化学性质方面的差异，导致对于样品中杂质的溶解能力不同，特别是在分析基质复杂的膏状化妆品时存在明显差异。丙酮对于化妆品中常用基质如油脂类、蜡类以及组成这些成分的高级脂肪酸、高级醇类物质有很强的溶解能力，因此，采用丙酮提取化妆品中糖皮质类激素，将会在提取液中带入过多的杂质，对色谱柱及仪器造成损害。

另外，考虑到通过三相溶剂体系（饱和氯化钠水溶液+乙腈+正己烷）在有效提取化妆品中糖皮质类激素的同时，能去除样品基质中极性强的杂质（溶于水相）及非极性和部分弱极性的杂质（溶于正己烷相），达到较好的快速提取与净化。相比较而言，采用甲醇、甲醇水溶液为提取溶剂无法同时达到提取与净化的目的。因此本试验选用三相溶剂体系为提取和净化溶剂。

本试验中，在将提取后的乙腈氮吹浓缩后，可看到仍然有许多杂质析出，加水稀释后，提取液呈均匀乳化状，采用高速离心、过滤，去除效果不明显。经分析，这些杂质可能为一些表面活性剂或高分子聚合物，如月桂酸（酯）、硬脂酸（酯）等等。我们尝试采用固相萃取方法（包括正相硅胶柱、反相 C_{18} 柱、亲水亲酯柱 HLB）对提取液进行净化，但由于杂质极性与 30 种糖皮质类激素的极性范围相近，无法得到理想的分离净化。参考 GB/T 24800.2-2009[6]中的方法，我们采用亚铁氰化钾-醋酸锌溶液沉淀乳化基质，取得了较为满意的效果。

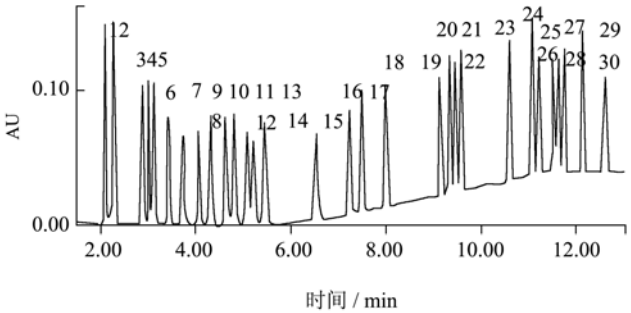


图1 三十种糖皮质激素标样色谱图

Fig.1 HPLC chromatography of 30 glucocorticosteroids standards

注：1: 泼尼松龙；2: 可的松；3: 甲基泼尼松龙；4: 倍他米松；5: 地塞米松；6: 倍氯米松；7: 曲安奈德；8: 曲安西龙双醋酸酯；9: 氟氢缩松；10: 氟米龙；11 氢化可的松醋酸酯；12: 地夫可特；13: 泼尼松醋酸酯；14: 可的松醋酸酯；15: 甲基泼尼松龙醋酸酯；16: 氢化可的松丁酸酯；17: 地塞米松醋酸酯；18: 氟米龙醋酸酯；19: 氢化可的松戊酸酯；20: 曲安奈德醋酸酯；21: 氟轻松醋酸酯；22: 二氟拉松双醋酸酯；23: 倍他米松戊酸酯；24: 泼尼卡酯；25: 哈西奈德；26: 阿氯米松双丙酸酯；27: 安西奈德；28: 氯倍他索丙酸酯；29: 氟替卡松丙酸酯；30: 倍他米松双丙酸酯。

2.2 色谱柱和流动相的选择

本文分别采用 BEH C_{18} 色谱柱（2.1×150 mm，1.7 μm）和 HSS T3（1.0×50 mm，1.8 μm）进行了分离试验，发现 BEH C_{18} 对 30 种糖皮质类激素的分离效果优于 HSS T3。

糖皮质激素的基本化学结构为氢化可的松结构，在此结构基础上，进行 C1-C2 位脱氢、C6-a 位甲基化、C9-a 位氟化、C11 位羟基化等修饰。从结构上可看出，所选 30 种糖皮质类激素为近中性化合物，调节流动相 pH 对色谱的保留特性无明显影响。因此，我们主要考察了不同洗脱能力组成的甲醇-乙腈-水体系（甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水）对目标化合物分离的影响。结果显示，有机相为乙腈时，与水相采用梯度洗脱，对 30 种糖皮质类激素具有较好的选择性，分离效果理想。

2.3 线性与检测限量

分别配制浓度为 0.2~25.0 mg/kg 的标准溶液，在本方法所确定的试验条件下，对 30 种糖皮质类激素进行测定，根据其色谱峰面积积分值和相应的浓度响应关系，求得线性回归方程，具有良好的线性关系 R^2 均在 0.999 以上。本文采用加标样品基质中标样相对应的响应与背景噪音的比值（S/N=10）来确定方法定量限，30 种糖皮质类激素的方法定量限均为 2.0 mg/kg。

2.4 回收率和精密度

选用空白化妆品为加标基质，分别添加 5.0 mg/kg、20.0 mg/kg 两个浓度水平的糖皮质类激素标准物质，按照本方法进行回收测定，每水平平行三份，计算其回收率和精密度。方法的回收率 89.8%~105.2%，相对标准偏差为 5.0%~10.3%。

2.5 实际样品的测定

采用本法对购自广东地区的共 50 份化妆品，包括标称有祛痘、抗敏、美白、祛斑等功效的产品，

进行了以上糖皮质类激素含量的检测。在上述实验条件下进行分析，2 种祛痘类膏霜化妆品和 1 种美白化妆品中检出有地塞米松、倍他米松和氯倍他索丙酸酯，含量在 5~200 mg/kg 之间。

3 结论

本文采用简单的饱和氯化钠溶液-乙腈-正己烷三相溶剂直接提取并净化样品，亚铁氰化钾-醋酸锌溶液沉淀乳化基质，成功建立了化妆品中糖皮质类激素的超高效液相色谱测定方法，方法简单、快速、准确，可用于化妆品中三十种糖皮质类激素的测定。

参考文献

[1] 吴大南,郑和辉,李洁.高效液相色谱法检测化妆品中 6 种糖皮质激素[J].中国卫生检验杂志,2006,16(3):309-310

[2] 赵晓亚,林雁飞,胡小钟,等.反相高效液相色谱法同时测定化妆品中 9 种糖皮质激素[J].分析试验室,2009,28(2):111-115

[3] 武中平,高巍,耿宁,等.高效液相色谱-二极管阵列检测器法同时测定化妆品中 19 种激素残留量[J].香料香精化妆品,2009,12(6):25-28

[4] 贾薇,韩彦华,于晓英.液相色谱-串联质谱法同时检测化妆品中 7 种激素[J].质谱学报,2007,11:27-28

[5] 王传现,刘罡一,倪昕路,等.高效液相色谱-串联质谱法检测化妆品中糖皮质激素类违禁药物[J].分析仪器,2008,6:23-28

[6] GB/T 24800.2-2009《化妆品中四十一种糖皮质激素的测定 液相色谱串联质谱法和薄层层析法》

[7] Luigi G, Daniela D O, Maria R D G, et al.“ Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products” [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 457: 187-198

现代食品科技