

doi:10.3969/j.issn.1008-6145.2023.03.008

# 高效液相色谱-荧光检测法测定化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩

陈桂琴, 张小媚

(广东省药品检验所国家药监局化妆品风险评估重点实验室, 广州 510663)

**摘要** 采用高效液相色谱-荧光检测法测定化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩。样品经甲醇超声提取20 min,以 $C_{18}$ 色谱柱进行分离,以乙腈-水(体积比为85:15)为流动相进行洗脱,用荧光检测器测定,色谱峰面积外标法定量。 $\alpha$ -三联噻吩的质量浓度在5~200 ng/mL范围内与色谱峰面积具有良好的线性关系,相关系数( $r$ )为0.999 9,方法的检出限为10 ng/g。以霜类、乳液类、水剂类及液态油基类4种空白基质进行加标回收试验,在3种不同加标水平下,回收率为94.6%~98.6%,测定结果的相对标准偏差为0.6%~2.2%( $n=6$ )。该方法样品处理简便、快捷,分析灵敏度高,可用于化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的检测。

**关键词** 高效液相色谱法; 荧光检测器; 化妆品;  $\alpha$ -三联噻吩

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1008-6145(2023)03-0034-05

## Determination of $\alpha$ -terthiophene in cosmetics by HPLC with fluorescence detector

CHEN Guiqin, ZHANG Xiaomei

(Guangdong Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Safety Risk Assessment of Cosmetics, Guangzhou 510663, China)

**Abstract**  $\alpha$ -Terthiophene in cosmetics was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector. The samples were extracted with methanol for 20 min, separated with  $C_{18}$  chromatography column, eluted with acetonitrile water (85 : 15) as mobile phase, determined with fluorescence detector, and quantified with external standard method of chromatographic peak area. The mass concentration of  $\alpha$ -terthiophene had a good linearity with the chromatographic peak area in the range of 5-200 ng/mL, the correlation coefficient was 0.999 9, and the detection limit of the method was 10 ng/g. Four blank samples of frost, lotion, water agent and liquid oil were used as the matrix for the recovery test. Under three different addition levels, the recoveries were 94.6%-98.6%, and the relative standard deviations of determination results were 0.6%-2.2%( $n=6$ ). The results show that the method is simple, rapid, sensitive, which can be used for the determination of  $\alpha$ -terthiophene in cosmetics.

**Keywords** HPLC; fluorescence detector; cosmetics;  $\alpha$ -terthiophene

$\alpha$ -三联噻吩(又称为 $\alpha$ -T)是一种光敏化合物,广泛存在于菊科植物中,尤其万寿菊属中<sup>[1-2]</sup>,它对蚊幼虫、蝇幼虫和其它的昆虫具有强烈的光活化毒杀作用,作为新型植物杀虫剂在农业广泛应用<sup>[3-5]</sup>。万寿菊、小万寿菊及孔雀草是常见的几种万寿菊属植物,这几种植物的相关提取物作为化妆品原料列于《国际化妆品原料标准中文名称目录》<sup>[6]</sup>,包含万寿菊花提取物、万寿菊花油、小万寿菊花油、孔雀草花/叶/茎提取物等,这几种原料常作为香精成分,广泛地运用于香水及其它化妆品中。

因为万寿菊、小万寿菊及孔雀草植物中含有 $\alpha$ -三联噻吩,其相关提取物/油作为化妆品原料可能产生光毒性的安全问题,欧盟消费者安全科学委员会(SCCS)及其前身欧盟消费者科学委员会(SCCP)对其进行了一系列安全性评估。早在2005年,欧盟消费品科学委员会(SCCP)发布评估意见SCCP/0869/05提出,万寿菊提取物/油具有光毒性,由于没有得到证实的安全使用限值,建议化妆品中不要使用万寿菊、小万寿菊、孔雀草提取物/油。2018年,根据SCCS的评估意见,欧盟委员会公布了欧盟化妆品法规2018/978号修订案<sup>[7]</sup>,将

**基金项目** 广东省药品监督管理局科技创新项目(2022TDZ10)

**通信作者** 陈桂琴, 硕士, 主要从事化妆品检测技术研究工作

**收稿日期** 2023-02-10

**引用格式** 陈桂琴, 张小媚. 高效液相色谱-荧光检测法测定化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩[J]. 化学分析计量, 2023, 32(3): 34.

CHEN Guiqin, ZHANG Xiaomei. Determination of  $\alpha$ -terthiophene in cosmetics by HPLC with fluorescence detector[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2023, 32(3): 34.

万寿菊花提取物和花油列入化妆品法规禁用物质清单;将小万寿菊和孔雀草花提取物/花油列入化妆品法规禁用物质清单中,设置这两种原料在驻留类和冲洗类化妆品中的质量分数分别不超过0.01%和0.1%,并设定了其原料中 $\alpha$ -三联噻吩的质量分数不大于0.35%等限制使用条件。

在我国,孔雀草提取物和油等相关原料未收录在《已使用化妆品原料名称目录(2015版)》<sup>[8]</sup>中,而万寿菊花提取物和小万寿菊花油列于目录中。2021年,参考欧盟化妆品评估和法规调整情况,我国将万寿菊花提取物、万寿菊花油纳入禁用组分表。目前,新发布的《已使用化妆品原料名称目录(2021版)》仍然将小万寿菊花油列于其中,但并未对其在化妆品中使用限制条件做出规定。据文献报道,鲤肠、深裂刺头菊等植物中存在含量较高的 $\alpha$ -三联噻吩<sup>[9]</sup>,而这些植物的相关部位的提取物,如鳢肠提取物、鳢肠叶粉、鳢肠叶提取物、鳢肠提取物等也收纳在《已使用化妆品原料名称目录(2021版)》中,这些原料在化妆品中使用存在一定的安全风险。

通过文献调研,我国目前尚无化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩法定测定方法和限值标准,化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的检测方法鲜有文献报道。为了更好的服务监管,保障消费者的健康,有必要建立化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的检测方法。部分文献报道了植物中 $\alpha$ -三联噻吩的含量检测方法,包括荧光分光光度法<sup>[10]</sup>、气相色谱法<sup>[11]</sup>、高效液相色谱法<sup>[12-13]</sup>、高效液相色谱-质谱联用法<sup>[14]</sup>等。《中华人民共和国药典(2020年版)》一部收载了禹州漏芦中 $\alpha$ -三联噻吩含量的测定方法<sup>[15]</sup>,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.1%乙酸溶液为流动相,使用紫外检测器检测 $\alpha$ -三联噻吩含量。 $\alpha$ -三联噻吩本身具有荧光特性,在一定波长的光照下可以发出黄绿色荧光。 $\alpha$ -三联噻吩在植物中含量较低,一般植物提取物添加到化妆品含量也很低,所以对 $\alpha$ -三联噻吩检测方法要求灵敏度高,能够检测化妆品中痕量水平的 $\alpha$ -三联噻吩。

笔者采用超声萃取-高效液相色谱法测定化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩,用荧光检测器测定,该方法样品处理简单、快速,测定结果准确、可靠。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱仪:SHIMADZU LC-20AT型,配荧光检测器、二极管阵列检测器,日本岛津仪器有

限公司。

超声波清洗器:S300H型,德国Elma公司。

超纯水发生器:Milli Q Reference型,美国密理博公司。

电子天平:XS205DU型,感量为0.01 mg,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司。

$\alpha$ -三联噻吩对照品:质量分数为99.0%,源叶生物科技有限公司。

乙腈、甲醇:均为色谱纯,霍尼韦尔贸易(上海)有限公司。

正己烷、丙酮、冰乙酸:均为分析纯,广州化学试剂厂。

化妆品样品:万寿菊精油小滚珠18号、野生埃及万寿菊单方精油、万寿菊祛痘凝胶,市售。

### 1.2 标准溶液的配制

准确称取 $\alpha$ -三联噻吩对照品10 mg(精确至0.01 mg),置于20 mL棕色容量瓶中,用少量丙酮溶解,甲醇定容至标线,摇匀,配制成 $\alpha$ -三联噻吩标准储备溶液。

用甲醇将 $\alpha$ -三联噻吩标准储备溶液逐级稀释成质量浓度分别为5、10、20、50、100、200 ng/mL的 $\alpha$ -三联噻吩系列标准工作溶液。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Titank C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m,美国菲罗门公司);流动相:乙腈-水(85:15,体积比,下同),流量为1.0 mL/min;荧光检测波长:激发波长为352 nm,发射波长为428 nm;柱温:30 °C;进样体积:5  $\mu$ L。

### 1.4 样品处理

称取化妆品样品0.5 g(精确到0.1 mg),置于10 mL具塞比色管中,加入3 mL甲醇,涡旋30 s,使样品分散均匀,用甲醇定容至标线,超声提取20 min,静置至室温,用0.22  $\mu$ m尼龙66滤膜过滤后,滤液作为样品溶液备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

#### 2.1.1 检测器的选择

《中华人民共和国药典(2020年版)》一部收载了禹州漏芦中 $\alpha$ -三联噻吩含量的测定方法<sup>[9]</sup>,使用紫外检测器,检测波长为352 nm。 $\alpha$ -三联噻吩具有荧光特性,在一定波长的光照下可发出黄绿色荧光。王玉健等<sup>[5]</sup>利用荧光分光光度法测定 $\alpha$ -三联噻吩,最大激发波长为352 nm,最大荧光发射波长为428

nm。本实验采用高效液相色谱法,配置荧光检测器及二极管阵列检测器,在同等色谱条件下测定 $\alpha$ -三联噻吩,其中荧光检测器设置激发波长352 nm,发射波长428 nm,二极管阵列检测器设置检测波长为352 nm。结果表明,使用荧光检测器获取的 $\alpha$ -三联噻吩方法检出限为0.5 ng/mL,使用二极管阵列检测器获取的方法检出限为100 ng/mL,可见荧光法检出限更低,灵敏度高,可用于检测样品中的痕量 $\alpha$ -三联噻吩。由于荧光检测法同时设定了特征的激发波长和发射波长,能够有效排除其它物质的干扰,选择性好,准确度高。综上所述,本实验选择荧光检测器作为检测器。

### 2.1.2 流动相选择

参考文献[9-10,14-15],分别选择甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%乙酸溶液、甲醇-0.1%乙酸溶液4种流动相,考察其对色谱分离的影响。结果表明,4种流动相下的色谱峰形均良好。本实验选择乙腈-水作为流动相,目标物峰形良好,基线平稳,拖尾因子较小,且保留时间适中。

### 2.1.3 色谱柱及柱温的选择

为了考察不同色谱柱的 $\alpha$ -三联噻吩出峰情况,分别选取了Phenomenex Titank C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、CAPCELL PAK C<sub>18</sub> UG120柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)三种型号色谱柱对 $\alpha$ -三联噻吩标准储备溶液和样品溶液进行测定。结果表明,Phenomenex Titank C<sub>18</sub>柱的色谱峰形对称、尖锐,保留时间适中,因此选择该型号色谱柱。

分别考察25、30、35、40  $^{\circ}$ C柱温条件下 $\alpha$ -三联噻吩的色谱行为,结果表明:当柱温升高时, $\alpha$ -三联噻吩保留时间逐渐前移,其它无显著变化。为了保护色谱柱和方便温度控制,选择实验柱温为30  $^{\circ}$ C。

图1为优化色谱条件后的 $\alpha$ -三联噻吩标准溶液色谱图。

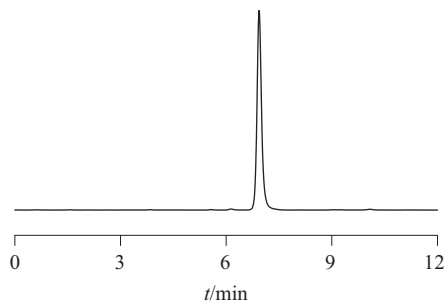


图1  $\alpha$ -三联噻吩标准溶液色谱图

### 2.2 样品提取溶剂的选择

$\alpha$ -三联噻吩不溶于水,可溶于甲醇、丙酮等溶剂。分别选择甲醇、丙酮、甲醇-丙酮(体积比为4:1)混合溶液作为提取溶剂进行试验,结果表明用丙酮处理液态油基基质、乳剂基质、霜剂基质得到的样品溶液比较澄清,用甲醇处理得到的样品溶液比较浑浊。通过比较空白基质加标回收率,发现几种提取溶液的回收率在90%~100%之间,提取效果均能满足分析要求。考虑到丙酮挥发性较强,最终选择甲醇作为提取溶剂。

### 2.3 线性方程、检出限和定量限

取 $\alpha$ -三联噻吩系列标准工作溶液,按1.3色谱条件进行测定并记录色谱图。以 $\alpha$ -三联噻吩的质量浓度( $X$ , ng/mL)为横坐标、色谱峰面积( $Y$ )为纵坐标,进行线性回归,绘制标准曲线,计算线性方程和相关系数。结果表明, $\alpha$ -三联噻吩在质量浓度为5~200 ng/mL范围内与色谱峰面积线性关系良好,线性方程为 $Y=1\ 760.932\ 6X-2\ 112.912\ 5$ ,相关系数( $r$ )为0.999 9。

取空白液态油基类样品0.5 g,加入10 ng/mL的 $\alpha$ -三联噻吩标准工作溶液1 mL,涡旋混匀后,制得质量浓度为20 ng/g的加标样品,然后按样品处理方法进行处理,测定信噪比,若信噪比大于3,则适当减少对对照品溶液的加入量,重新测定,直至获得信噪比约为3的样品溶液。以信噪比为3时的质量浓度作为方法检出限,得到方法的检出限为10 ng/g;同样操作,以10倍信噪比计算得方法的定量下限为30 ng/g。

### 2.4 加标回收与精密度试验

分别取膏霜类、乳液类、水剂类及液态油基类空白基质样品各0.5 g,分别精密加入混合标准工作溶液适量,使添加水平分别为0.2、1.0、3.0  $\mu$ g/g,每个水平制备6份样品,按照本法进行样品处理和测定,计算回收率,结果见表1,空白样品和加标样品色谱图分别见图2~图9。由表1数据可知,5种不同基质空白化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的平均加标回收率为94.3%~98.6%,相对标准偏差为0.6%~2.2%,表明本法精密度、准确度均较高。

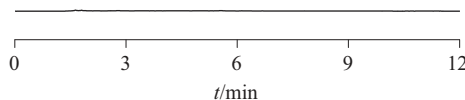


图2 水基空白样品基质色谱图

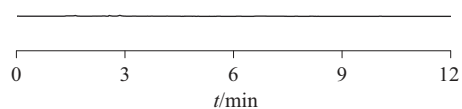


图3 乳液空白样品基质色谱图

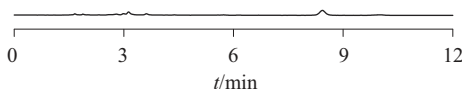


图4 膏霜空白样品基质色谱图

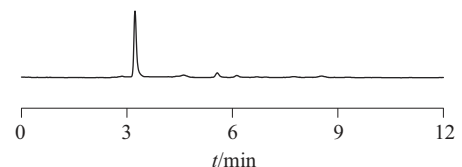


图5 液态油空白样品基质色谱图

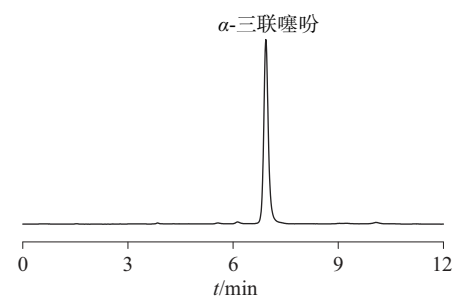


图6 水基加标样品色谱图

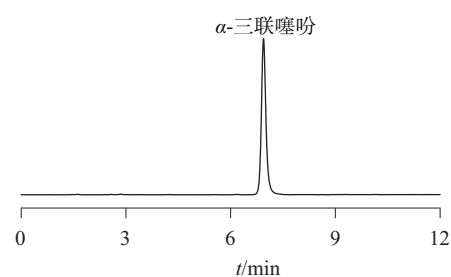


图7 乳液加标样品色谱图

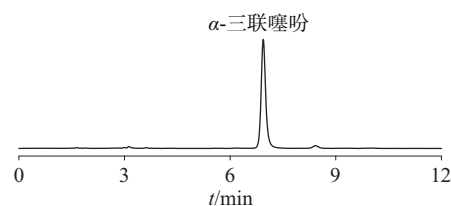


图8 膏霜加标样品色谱图

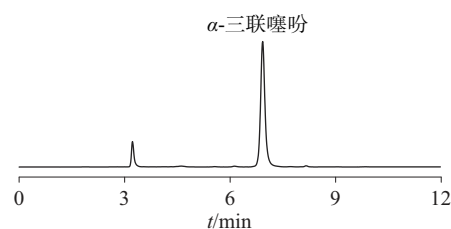


图9 液态油基加标样品色谱图

表1 空白样品加标回收试验结果

基质	$\alpha$ -三联噻吩质量分数/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			平均回收率/%	RSD/%
	添加量	测定值	平均值		
膏霜	0.2	0.210, 0.209, 0.207, 0.210, 0.207, 0.208	0.208	98.6	0.8
	1.0	1.046, 1.056, 1.036, 1.025, 1.035, 1.039	1.040	98.4	1.0
	3.0	3.027, 2.955, 3.024, 2.957, 3.054, 2.982	3.000	94.7	1.4
乳液	0.2	0.203, 0.202, 0.207, 0.206, 0.210, 0.208	0.206	97.2	1.4
	1.0	1.016, 1.008, 1.017, 1.002, 1.014, 1.012	1.012	95.8	0.6
	3.0	3.198, 3.104, 3.064, 3.131, 3.077, 3.149	3.120	98.5	1.6
水剂	0.2	0.209, 0.201, 0.199, 0.201, 0.201, 0.195	0.201	95.1	2.2
	1.0	0.999, 1.013, 1.004, 1.010, 1.013, 1.001	1.007	95.3	1.0
	3.0	3.031, 2.979, 2.959, 2.952, 2.989, 3.015	2.988	94.3	1.0
液态油基	0.2	0.197, 0.197, 0.201, 0.200, 0.203, 0.203	0.200	94.7	1.4
	1.0	1.030, 1.024, 1.015, 1.023, 1.011, 1.044	1.025	97.0	1.0
	3.0	2.964, 2.974, 3.049, 3.034, 3.041, 2.996	3.010	95.0	1.2

## 2.5 稳定性试验

在不同时间点分别检测不同浓度的空白基质样品加标溶液,计算测定值的相对标准偏差,评估 $\alpha$ -三联噻吩的稳定性。连续三天分别检测常温下放置的 $\alpha$ -三联噻吩浓度水平为5、50 ng/mL的空白基质样品加标溶液,计算色谱峰面积的相对标准偏差,结果见表2。由表2数据可知, $\alpha$ -三联噻吩在三天内是稳定的。

表2 稳定性试验结果(n=3)

$\alpha$ -三联噻吩质量浓度/( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	色谱峰面积测定值			RSD/%
	第1天	第2天	第3天	
5	8 892	8 821	8 769	0.7
50	86 263	85 108	84 509	1.0

## 3 结语

利用高效液相色谱-荧光检测法检测化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的含量,以甲醇为提取溶剂,乙腈-水作



为流动相, $\alpha$ -三联噻吩质量浓度与色谱峰面积线性关系良好。该方法样品处理简便、快捷,分析灵敏度高,测定结果准确、可靠,可用于化妆品中 $\alpha$ -三联噻吩的检测。

#### 参考文献

- [1] 王玉健,胡林,徐汉虹. $\alpha$ -三联噻吩的 $\beta$ -环糊精包结物荧光检测方法[J].农药,2014,43(9): 406.
- [2] 吕邵娃,管计苹,谭美徽,等.万寿菊的显微鉴别及5个主要成分的含量测定[J].中国医药导报,2020(2): 17.
- [3] 徐汉虹,鞠荣.植物源光活化毒素的研究与新农药开发[J].华南农业大学学报(自然科学版),2003,24(4): 100.
- [4] 乐海洋,赵善欢.万寿菊提取物对白纹伊蚊幼虫的光活化活性及有效成分研究[J].华南农业大学学报,1998,19(2): 8.
- [5] 万树青,杨淑娟. $\alpha$ -三噻吩光活化抑制植物生长活性及作用靶标[J].植物保护学报,2006,33(2): 183.
- [6] 国家药品监督管理局.关于印发国际化妆品原料标准中文名称目录(2010年版)的通知(国食药监许[2010]479号)[EB/OL].(2010-12-14)[2023-01-16].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjzhzp/20101214120001653.html>.
- [7] 沈耐涛,袁欢,林庆斌,等.全球主要生产国家和地区化妆品法规中植物类原料的相关规定[J].中国中药杂志,2019,44(24): 5488.
- [8] 国家药品监督管理局.国家药监局关于发布《已使用化妆品原料目录(2021年版)》的公告(2021年第62号)[EB/OL].(2021-04-27)[2023-01-16].<https://www.nmpa.gov.cn/zhuantihzhpch2021/hzhp2021fgwj/20210430162707173.html>.
- [9] 王新国,徐汉虹,刘新清,等.四种菊科植物 $\alpha$ -三噻吩的含量测定及杀虫活性研究[J].华南农业大学学报,2001,22(3): 26.
- [10] 王玉健,胡林,徐汉虹.植物中 $\alpha$ -三联噻吩的荧光分光光度法检测[J].华南农业大学学报,2005,26(1): 73.
- [11] 李喜凤,胡利欣,胡春月,等.GC法测定禹州漏芦中 $\alpha$ -三联噻吩含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14): 114.
- [12] 李喜凤,余云辉,胡春月,等.HPLC测定不同产地禹州漏芦中 $\alpha$ -三联噻吩含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6): 60.
- [13] 孔燕凌.HPLC同时测定墨旱莲正丁醇有效部位含量分析[J].实验与检验医学,2017,35(4): 475.
- [14] 沈慧芳,张燕红,兰仁华. $\alpha$ -三噻吩与麻保沙星的HPLC/MS分析[J].华南理工大学学报(自然科学版),2001,29(11): 47.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(三部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015.