

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.020

气相色谱-质谱法检测化妆品中8种香豆素类化合物

郑抒, 谢静, 秦剑[△]

(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

摘要:目的 建立同时检测化妆品中六氢化香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、4,6-二甲基-8-特丁基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、5,7-二甲氧基香豆素、苯丙香豆素8种香豆素类化合物的气相色谱-质谱法。方法 采用二氯甲烷作为提取溶剂,超声处理;采用程序升温模式,经弱极性 Thermo TG-5SILMS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)分离,经电子轰击(EI)离子源电离,采用选择离子监测(SIM)扫描测定;外标法定量。结果 上述8种香豆素类化合物的质量浓度分别在2.0~102.0 mg/L、1.0~51.7 mg/L、1.1~56.5 mg/L、1.1~54.4 mg/L、0.4~20.0 mg/L、1.1~55.6 mg/L、1.1~53.3 mg/L、1.0~51.3 mg/L范围内与峰面积线性关系良好,相关系数均大于0.997 0($n=6$);7-羟基-6-甲氧基香豆素和苯丙香豆素的检测限分别为128 ng/g和177 ng/g,其余6种香豆素类化合物的检测限为6~41 ng/g。水剂类、乳液类和膏霜类3种基质的方法回收率为89.78%~116.64%($n=6$);8种香豆素类化合物在3种不同基质中含量的RSD在0.91%~5.68%范围内,均小于6%。结论 该方法简便、可靠,能满足化妆品中8种香豆素类化合物的检测要求。

关键词:香豆素类化合物;气相色谱-质谱法;化妆品

中图分类号:R979.9

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)17-0077-04

Determination of Eight Coumarins in Cosmetics by the GC-MS

ZHENG Shu, XIE Jing, QIN Jian

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the simultaneous determination of eight coumarins including hexahydrocoumarin, 7-methylcoumarin, 7-methoxycoumarin, 4,6-dimethyl-8-tert-butylcoumarin, scopoletin, 7-ethoxy-4-methylcoumarin, 5,7-dimethoxycoumarin and phenprocoumon in cosmetics. **Methods** The samples were dissolved in dichloromethane, and extracted by the ultrasound. The above eight coumarins were separated through a weak polar Thermo TG-5SILMS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with the mode of programmed temperature. The ionization mode was adopted with the electron-impact (EI) ion source, the selected ion monitoring (SIM) mode was adopted to determine, and the external standard method was adopted for quantitative analysis. **Results** The linear ranges of the above eight coumarins were 2.0-102.0 mg/L, 1.0-51.7 mg/L, 1.1-56.5 mg/L, 1.1-54.4 mg/L, 0.4-20.0 mg/L, 1.1-55.6 mg/L, 1.1-53.3 mg/L and 1.0-51.3 mg/L ($r>0.997 0, n=6$), respectively. The limit of detection (LOD) of scopoletin and phenprocoumon was 128 ng/g and 177 ng/g respectively, and that of the other six coumarins was in the range of 6-41 ng/g. The recovery rate of the three types of matrixes including liquid, emulsion and cream preparations was in the range of 89.78%-116.64% ($n=6$). The RSD of the content of eight coumarins in the above three different matrixes was in the range of 0.91%-5.68%, all lower than 6%. **Conclusion** The method is simple and reliable, which can meet the requirements for the determination of eight coumarins in cosmetics.

Key words: coumarins; GC-MS; cosmetics

香豆素是化学式以苯并- α -吡喃酮为母核的一类化合物的总称^[1],具有香甜气味,可作为沐浴露、香水、精油等化妆品的增香剂^[2],但大部分香豆素类化合物在化妆品中被禁用。合成香豆素类化合物对人体毒性大,会引发肝功能损伤^[3],且天然香豆素因其光敏作用^[4-6]易导致涂抹在皮肤上会引起皮肤红斑、色素沉着过度等皮肤损伤,甚至皮肤癌^[7]。不少国家都严格限制了该类化合物在化妆品中的添加和使用。德国联邦风险评估研究所明确要求,婴幼儿护理产品中不得添加香豆素类化合物^[8]。欧洲联盟发布的26种化妆品香料过敏原名单中也有香豆素^[9]。我国《化妆品安全技术规范(2015年版)》(以下简称《2015版规范》)明确规定,苯

丙香豆素、六氢化香豆素等香豆素类化合物为化妆品中禁用物质^[10]。针对香豆素类化合物的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法^[11-12]、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[13-15]、气相色谱法^[16]、气相色谱-质谱(GC-MS)法^[17]等。《2015版规范》仅收录了6-甲基香豆素、8-甲氧基补骨脂素、三甲沙林、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡内酯、补骨脂素、异补骨脂素、新补骨脂异黄酮和补骨脂二氢黄酮9种香豆素类化合物的HPLC法^[9]。相较于HPLC法和CC-MS/MS法,GC-MS法具有不使用有机流动相、定性定量准确、不易残留、试验方法易复制等优点,特别适合易挥发化合物的检测。但该方法在化妆品中香豆素类化合物的检测中应

第一作者:郑抒,女,硕士,工程师,研究方向为化妆品理化检验,(电子信箱)zhengshu@cqifdc.org.cn。

[△]通信作者:秦剑,男,大学本科,研究员,研究方向为化妆品检测,(电子信箱)qinjiancq@163.com。

用较少,涉及的检测方法有限,检测对象不够全面。刘思然等^[17]建立了GC-MS法测定27种香料,其中涉及的香豆素类化合物包括6-甲基香豆素和香豆素。漆爱明等^[18]优化了国标方法,并建立了同时测定化妆品中19种香料的GC-MS法,其中并未涉及香豆素类化合物。已报道的针对香豆素类化合物的定性或定量分析研究中,种类覆盖不完全,尤其是关于苯丙香豆素、六氢化香豆素的检测方法鲜有报道。本研究中选择《2015版规范》中明确规定禁用但无检测方法的4,6-二甲基-8-特丁基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、苯丙香豆素、7-甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、六氢化香豆素,以及植物提取物中常见的7-羟基-6-甲氧基香豆素(别名为东莨菪内酯)和5,7-二甲氧基香豆素^[1]为研究对象,建立了检测化妆品中上述8种香豆素类化合物的GC-MS法,为该物质的检测及其在化妆品中的风险评估提供技术支持。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TSQ 8000 Evo型三重四极杆气质联用仪,电子轰击离子源(美国赛默飞公司);MSA225S-1CE-DI型天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);XPE204型天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为万分之一);Multi Reax型恒温混匀器(德国 Heidolph 公司);KQ-800KDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为800 W,频率为40 kHz)。

1.2 试剂

苯丙香豆素标准品(phenprocoumon,纯度为96%,批号为4-RTW-119-6),六氢化香豆素标准品(hexahydrocoumarin,纯度为96%,批号为5-KHI-39-2),4,6-二甲基-8-特丁基香豆素标准品(4,6-dimethyl-8-tert-butylcoumarin,纯度为96%,批号为6-CWA-105-3),5,7-二甲氧基香豆素标准品(5,7-dimethoxycoumarin,纯度为98%,批号为2-HBS-28-1),均购于加拿大Toronto Research Chemicals公司;7-甲氧基香豆素标准品(7-methoxycoumarin,纯度为99%,批号为26723,美国AccuStandard公司);7-乙氧基-4-甲基香豆素标准品(7-ethoxy-4-methylcoumarin,纯度为98%,批号为10214970,美国Alfa Aesar公司);7-甲基香豆素标准品(7-methylcoumarin,纯度为99.8%,批号为A0013703,中国Bepure公司);7-羟基-6-甲氧基香豆素标准品(scopoletin,纯度为99.9%,批号为00019090-622,美国ChromaDex公司);甲醇(质谱纯,批号为CG2113850,美国Fisher公司);二氯甲烷(色谱纯,批号为29Y1902FK,美国ACS公司);纯化水(18.2 MΩ·cm,默克密理博纯水机)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 GC 条件

色谱柱:Thermo TG-5SILMS弱极性毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);载气:氮气;流速:1.0 mL/min;分流比:1:10;分流流量:10 mL/min;进样量:1 μL;进样口温度:250℃;程序升温:80℃、保持3 min,以8℃/min的速率升至240℃、保持5 min;运行时间:28 min。

2.1.2 MS 条件

离子化方式:电子轰击(EI)离子源;电子轰击源:70 eV;扫描方式:选择离子监测(SIM);离子源温度:280℃;传输线温度:280℃。各化合物的采集参数见表1。

表1 8种香豆素化合物的保留时间与特征离子

Tab. 1 Retention time and characteristic ions of the eight coumarins

化合物名称	保留时间(min)	定性离子(<i>m/z</i>)	定量离子(<i>m/z</i>)
六氢化香豆素	12.61	96,124,152	67
7-甲基香豆素	15.04	77,104,132	160
7-甲氧基香豆素	17.41	77,148,176	133
4,6-二甲基-8-特丁基香豆素	20.01	187,230	215
7-羟基-6-甲氧基香豆素	20.36	164,177	192
7-乙氧基-4-甲基香豆素	20.45	91,176,204	148
5,7-二甲氧基香豆素	20.67	135,163,206	178
苯丙香豆素	26.00	91,121,280	251

注:*m/z*为质荷比。

Note:*m/z* refers to the mass-to-charge ratio.

2.2 样品前处理

水剂类化妆品(含香水):取样品0.2 g,精密称定,置具塞比色管中,用二氯甲烷定容至10 mL,充分振荡均匀,超声,取上清液,经0.22 μm有机相滤膜滤过,进样分析。

乳液、膏霜类化妆品:取样品0.2 g,精密称定,置具塞比色管中,加入1.0 mL饱和氯化钠溶液,用二氯甲烷定容至10 mL,充分振荡均匀,超声,取上清液,经0.22 μm有机相滤膜滤过,进样分析。

2.3 标准品溶液配制

取六氢化香豆素和7-羟基-6-甲氧基香豆素标准品各适量,精密称定,溶于甲醇,配制质量浓度分别为200 mg/L和40 mg/L的标准品溶液;其余6种香豆素标准品同法配制为质量浓度为100 mg/L。取上述标准溶液适量,用二氯甲烷稀释,六氢化香豆素质量浓度为2.00,5.00,10.00,20.0,40.0,100.0 mg/L,7-羟基-6-甲氧基香豆素质量浓度为0.40,1.00,2.00,4.00,8.00,20.0 mg/L,其余6种香豆素质量浓度为1.00,2.50,5.00,10.0,20.00,50.0 mg/L的系列混合

表2 8种香豆素化合物的线性关系考察结果与检测限、定量限

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOD and LOQ of the eight coumarins

化合物名称	线性范围(mg/L)	回归方程	r	检测限(ng/g)	定量限(ng/g)
六氢化香豆素	2.0~102.0	$Y = 1.625E6X - 9.328E5$	0.999 6	41	137
7-甲基香豆素	1.0~51.7	$Y = 3.519E6X - 3.145E6$	0.999 8	7	22
7-甲氧基香豆素	1.1~56.5	$Y = 2.948E6X - 6.383E6$	0.999 6	11	35
4,6-二甲基-8-特丁基香豆素	1.1~54.4	$Y = 4.772E6X - 5.624E6$	0.999 8	6	20
7-羟基-6-甲氧基香豆素	0.4~20.0	$Y = 1.725E6X - 1.445E6$	0.997 1	128	427
7-乙氧基-4-甲基香豆素	1.1~55.6	$Y = 4.833E6X - 3.838E6$	0.999 6	19	65
5,7-二甲氧基香豆素	1.1~53.3	$Y = 2.713E6X - 1.935E6$	0.999 5	23	77
苯丙香豆素	1.0~51.3	$Y = 1.540E6X - 2.999E6$	0.999 1	177	590

表3 3种空白基质加样回收试验和精密度试验结果(% , n = 6)

Tab. 3 Results of the recovery test and the precision test of the three types of blank matrixes (% , n = 6)

化合物名称	基质类型	2.5 mg/L		5.0 mg/L		20.0 mg/L		化合物名称	基质类型	2.5 mg/L		5.0 mg/L		20.0 mg/L	
		回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD			回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
六氢化香豆素	水剂	89.78	1.60	108.51	1.99	105.02	2.22	7-羟基-6-甲氧基香豆素	水剂	106.44	1.19	110.92	1.80	105.03	0.90
	乳液	98.29	3.74	115.85	1.16	114.13	3.09		乳液	106.19	4.77	114.99	1.58	111.11	2.56
	膏霜	95.88	1.24	115.69	2.40	111.47	2.62		膏霜	113.07	2.53	112.04	3.00	113.26	2.56
7-甲基香豆素	水剂	108.11	0.91	101.02	2.12	106.86	1.76	7-乙氧基-4-甲基香豆素	水剂	92.69	1.38	100.39	2.89	99.84	2.00
	乳液	105.14	4.83	113.78	1.20	107.81	2.60		乳液	98.20	4.98	105.68	2.20	112.89	4.13
	膏霜	106.20	1.87	107.22	2.18	113.24	1.95		膏霜	97.48	2.12	115.31	3.33	108.92	2.37
7-甲氧基香豆素	水剂	109.43	1.02	104.03	2.26	100.18	2.05	5,7-二甲氧基香豆素	水剂	97.21	1.69	102.83	3.13	101.94	2.03
	乳液	104.57	5.47	113.01	1.54	109.45	3.44		乳液	98.51	4.13	106.82	2.22	115.41	4.33
	膏霜	102.88	2.39	106.67	2.56	114.10	1.71		膏霜	98.74	2.06	116.64	3.65	112.20	2.34
4,6-二甲基-8-特丁基香豆素	水剂	106.13	1.23	107.11	3.01	102.66	2.24	苯丙香豆素	水剂	111.32	4.61	111.89	2.30	108.25	2.87
	乳液	109.91	5.68	112.78	1.66	112.67	4.32		乳液	109.67	4.89	112.66	3.31	109.36	4.55
	膏霜	107.63	1.83	110.03	3.31	113.13	2.07		膏霜	114.89	3.97	112.37	5.02	112.79	1.70

标准品溶液。

2.4 方法学考察

线性关系考察与检测限、定量限确定:取2.3项下混合标准品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样分析。以8种香豆素类化合物的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、相应峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,详见表2。取样品0.2 g,精密称定,加二氯甲烷稀释至10 mL,以3倍信噪比计算检测限,以10倍信噪比计算定量限。结果见表2。

加样回收试验与精密度试验:在水剂、乳液和膏霜3种化妆品空白基质中,添加2.3项下混合标准品溶液,六氢化香豆素质量浓度分别为5.0、10.0、40.0 mg/L,7-羟基-6-甲氧基香豆素分别为1.0、2.0、8.0 mg/L,其余6种香豆素化合物分别为2.5、5.0、20.0 mg/L。同样品前处理方法进一步处理,按2.1项下色谱与质谱条件进样分析,各水平检测6份平行样品。结果见表3。3种化妆品空白基质在其余6种香豆素加标质量浓度为2.5 mg/L、六氢化香豆素为5.0 mg/L、7-羟基-6-甲氧基香豆素为1.0 mg/L的SIM图见图2。结果表明,8种香豆素类化合物在3种不同基质中含量的RSD在

0.91%~5.68%范围内,均小于6%,表明方法的精密度良好。回收率在89.78%~116.64%范围内,造成部分化合物回收率偏高的原因可能是由化妆品的基质效应导致,与化妆品基质复杂,各种物质的干扰较多,导致回收样品基线偏高,且回收率整体偏高趋势一致。

2.5 实际样品检测

香豆素类物质若添加进化妆品,会作为增香剂使用,且具有一定光敏特性,故选择香豆素类化合物使用可能性较大的香水类、沐浴洗发类非特殊护肤品样品各10份,防晒剂特殊类护肤品样品10份,依据本研究中的方法进行检测。结果显示,该30份样品中均未检出8种香豆素类化合物。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

考虑到8种香豆素类化合物都具有一定极性,强极性色谱柱稳定性不强,升温到一定程度时基线易漂移,影响检测结果,故未选择强极性色谱柱。本研究中比较了实验室常见的中极性(DB-624, 30 m×0.25 mm, 1.4 μm)和弱极性(TG-5SILMS, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm)色谱柱中各组分的分离情况。中极性色谱柱

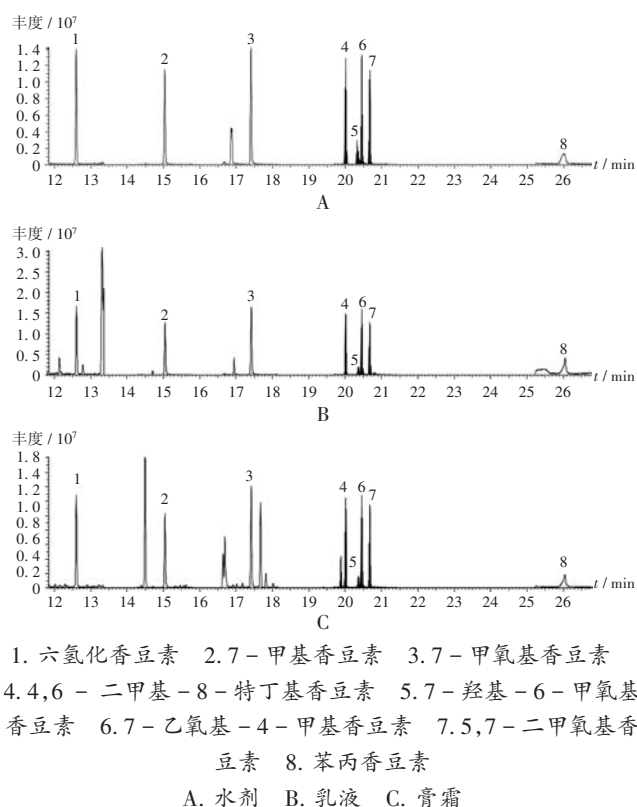


图2 3种空白基质在同一加标质量浓度的选择离子监测图

1. Hexahydrocoumarin 2. 7-Methylcoumarin 3. 7-Methoxycoumarin
4. 4,6-Dimethyl-8-tert-butylcoumarin 5. Scopoletin 6. 7-Ethoxy-4-methylcoumarin 7. 5,7-Dimethoxycoumarin 8. Phenprocoumon
A. Liquid preparation B. Emulsion preparation C. Cream preparation

Fig. 2 SIM diagrams of the three types of blank matrixes adding mixed standard solution with the same mass concentration

未检出苯丙香豆素,且7-乙氧基-4-甲基香豆素、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基-6-甲氧基香豆素3种化合物的出峰时间较晚,其中,7-羟基-6-甲氧基香豆素因出峰时间过长导致拖尾严重,影响检测限。弱极性色谱柱能同时检出这8种香豆素类物质,分离度理想,峰形尖锐对称。综合考虑化合物的总运行时间、分离度与峰形,最终选择弱极性色谱柱进行检测。

3.2 萃取溶剂选择

8种香豆素类化合物在甲醇中的溶解度均很好。但考虑到甲醇极性较大,使用甲醇作为萃取溶剂会对弱极性色谱柱造成很强的柱流失。同时,正己烷与甲醇不互溶,四氢呋喃对仪器有一定腐蚀性,丙酮为易制毒类试剂,故采用二氯甲烷作为萃取溶剂。标准曲线的配制由二氯甲烷稀释标准混合品溶液后得到。香豆素类化合物在各种剂型的化妆品中分布广泛,香水等液体类化妆品可直接用二氯甲烷分散并超声溶解;对于不易分散的乳霜等其他类化妆品,采用1.0 mL氯化钠饱和溶液破乳后,再加入二氯甲烷振荡,分散样品,超声提取。

3.3 方法评价

本研究中建立了同时测定化妆品中8种香豆素类

化合物的GC-MS法,对水剂类、乳液类、膏霜类3种不同基质的化妆品进行了相应前处理,且8种香豆素类物质得到满意分离,获得了各化合物的特征离子数据,方法定性定量准确、操作简便,精密度和回收率试验结果能满足检测要求,可为香豆素类化合物在化妆品中的风险监督提供技术支持。

参考文献

- [1] 周智明,李静,李海敏. 化妆品中植物香豆素的使用情况分析[J]. 广东化工,2020,47(15):83-85.
- [2] 熊友健,杨玉明,姜松,等. 呋喃香豆素类成分及其药理作用研究进展[J]. 中成药,2010,32(10):1764-1770.
- [3] 马强,白桦,王超,等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法快速筛查化妆品中18种香豆素类化合物[J]. 分析测试学报,2014,33(3):248-255.
- [4] FENTEM JH, HAMMOND AH, GARLE MJ, et al. Toxicity of coumarin and various methyl derivatives in cultures of rat hepatocytes and V79 cells[J]. Toxicology in Vitro,1992,6(1):21-25.
- [5] 梅家齐,杨得坡. 呋喃香豆素类光化学毒性及其脱敏柑橘精油的研制[J]. 香精香料化妆品,2010(5):55-58.
- [6] 马会娟,马强,李文涛,等. 化妆品中8种呋喃香豆素的高效液相色谱法检测及质谱确证[J]. 色谱,2013,31(5):416-422.
- [7] 汪洋,雷艳华,成秉辰,化妆品中香豆素化合物的概述[J]. 黑龙江医药,2013,26(6):981-983.
- [8] STIEFEL C, SCHUBERT T, MORLOCK GE. Bioprofiling of Cosmetics with Focus on Streamlined Coumarin Analysis[J]. ACS Omega,2017,2(8):5242-5250.
- [9] 刘思然,杨艳伟,朱英. 化妆品中26种致敏原香料标注情况调查[J]. 环境与健康杂志,2016,33(2):162-164.
- [10] 国家食品药品监督管理总局化妆品标准专家委员会. 化妆品安全技术规范[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:5-75.
- [11] 朱惠斌,王雪平. 高效液相色谱法测定日用香精中的10种香豆素及其衍生物含量[J]. 分析科学学报,2019,35(4):521-524.
- [12] 高瑞芳,李祥胜. 高效液相色谱法同时测定化妆品中香豆素等15种化合物[J]. 日用化学工业,2017,47(12):719-722.
- [13] 周智明,陈张好,李静,等. 化妆品中18种香豆素类物质的液相色谱检测和质谱确证[J]. 香精香料化妆品,2021(2):53-58.
- [14] 陈卫,张斌,陈丽波,等. 超高效液相色谱法测定化妆品中11种香豆素类化合物及质谱确证[J]. 日用化学工业,2020,50(11):804-808.
- [15] 孟宪双,马强,袁汉成,等. 化妆品中致敏原香豆素及其衍生物的高效液相色谱法测定及质谱确证[J]. 分析测试学报,2016,35(7):799-804.
- [16] 郑晨阳,顾华,余肖峰,等. 气相色谱法同时测定化妆品中7种香豆素类化合物[J]. 香精香料化妆品,2016(4):28-32.
- [17] 刘思然,朱英. 化妆品及香精中27种香料的气相色谱-质谱检测方法[J]. 色谱,2019,37(9):1026-1033.
- [18] 漆爱明,李彦君,谭杰. GC-MS法同时测定化妆品中19种香料[J]. 含量生物化工,2021,7(2):5-10.

(收稿日期:2021-12-14;修回日期:2022-02-18)