

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化 通过 HPLC 测定防晒霜中的紫外线过 滤剂

作者

Monique Paré Speirs 博士
Wasatch Product
Development, LLC
427 W 11950 S, Draper, UT,
84020, USA

Limian Zhao
安捷伦科技有限公司

摘要

化学防晒霜配方中含有紫外线 (UV) 过滤化合物，可预防皮肤晒伤和 DNA 损伤。本应用简报开发并验证了一种对样品进行前处理，然后对防晒产品中的活性 UV 过滤剂成分进行定量分析的可靠方法。在进行 HPLC 分析前，采用有机萃取，然后通过膜过滤，从防晒乳液中提取活性成分。虽然参比标准分析物的保留时间重现性极佳 ($\%RSD \leq 0.11$)，但在色谱柱上连续进样防晒霜样品时，观察到严重的保留时间漂移、基线漂移和峰形不规则。使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 色谱柱解决了色谱问题，去除了提取样品中的基质脂质。结果实现了可接受的定量准确度和回收率水平 (95%–103.5%)，提高了连续进样 7 种非处方防晒产品中所有紫外线过滤剂保留时间的一致性。

前言

化学防晒产品中的活性成分是 FDA 批准的芳香族化合物，在紫外线范围内具有较高摩尔吸收率。这些紫外线过滤化合物与保湿剂、乳化剂和增稠剂结合在一起，可制得稳定配方，其中的活性成分可用于保护皮肤免受紫外线辐射。

需要进行定量分析测试，以确保非处方 (OTC) 防晒产品能提供广谱保护且满足美国联邦法规要求^[1]。防晒霜配方复杂基质和活性成分的紫外线吸收率使 HPLC 成为当前首选方法，以确保产品一致性和质量。但是，这些产品中存在的基质脂质会导致色谱重现性较差，从而造成色谱柱污染以及方法准确度和精密度不可靠。本应用简报讨论了一种简单的样品前处理技术，可在使用 Captiva EMR-Lipid 色谱柱分析防晒产品时提高色谱重现性并延长色谱柱寿命。

实验部分

试剂与标准品

HPLC 级水、HPLC 级异丙醇 (IPA) 和 5 种 FDA 批准的紫外线过滤剂（通常用于配制防晒霜^[2]）的 USP 参比标样购自 Sigma-Aldrich（表 1）。混合每种参比标样 10 mg，将其溶解在 IPA 中，使每种化合物的最终浓度达到 2 mg/mL，制得标准混合储备液。该储备液作为最高校准浓度水平（5 级），还配制了四个连续稀释

的储备液用作中间校准浓度，其中每种化合物浓度为 1 (4 级)、0.5 (3 级)、0.25 (2 级) 以及 0.125 mg/mL (1 级)。

消耗品

以下消耗品用于样品前处理：

- 15 mL 离心管 (Celltreat 部件号 229412)
- Agilent 6 mL Captiva EMR-Lipid 过滤柱 (部件号 5190-1004)
- 10 mL NORM-JECT Luer Slip 进样针 (Henke Sass Wolf 部件号 4100-000V0)
- 安捷伦接头：1、3、6 mL (部件号 12131001)
- 安捷伦优级 0.2 μ m 玻璃纤维/尼龙针头过滤器 (部件号 5190-5132)

- 安捷伦 2 mL 棕色螺口盖样品瓶 (部件号 5182-0716)
- 安捷伦螺口盖 PTFE/红色硅胶隔垫 (部件号 5190-7024)

从个人护理产品中提取和净化紫外线过滤剂

用分析天平将 100 mg 防晒霜或润唇膏直接称入 15 mL 离心管中。开始提取时，将 2 mL 热水 (85 至 95 °C) 加入试管中，将样品剧烈振摇并涡旋混合 2 分钟。将 10 mL IPA 等分试样加入试管中，再次涡旋混合 2 分钟，然后超声处理 10 分钟。为促进进一步溶剂化和分散，将样品以相同方式再次进行涡旋混合和超声处理。

表 1. 紫外线过滤剂参比标样的化学特性

紫外线过滤剂	结构
名称：奥克立林 分子式：C ₂₄ H ₂₇ NO ₂ 分子量 (g/mol)：361.48	
名称：奥西诺酯 分子式：C ₁₈ H ₂₆ O ₃ 分子量 (g/mol)：290.40	
名称：阿伏苯宗 分子式：C ₂₀ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol)：310.39	
名称：胡莫柳酯 分子式：C ₁₆ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol)：262.34	
名称：奥替柳酯 分子式：C ₁₅ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol)：250.33	

为促进液相和固相的分离，将样品在 2500 rpm 下离心 15 分钟。弃去沉淀块并将一半左右的上清液小心转移到 6 mL Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱中。将接头塞盖在过滤柱顶部，并用 10 mL Luer Slip 进样针对样品施加正压。样品混合物以每滴 3–5 秒的流速低压通过过滤柱。将洗脱液收集到洁净的 15 mL 锥形离心管中。在前半部分流过后，将其余样品转移到 EMR 过滤柱中。采用安捷伦优级 0.2 μm 玻璃纤维/尼龙针头过滤器过滤样品去除颗粒，直接加入至 2 mL 棕色玻璃样品瓶中。

仪器配置

本分析使用由 Agilent ChemStation 软件（版本 C.01.09）控制并配备四元泵、真空脱气机、自动进样器、色谱柱热交换器和二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统。使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (3.0 mm \times 50 mm, 2.7 μm) 和 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 保护柱 (2.1 mm \times 5 mm, 2.7 μm) 进行色谱分离。进样量为 1 μL ，进样之间用 IPA 清洗针头 3 次。用于分析物分离的等度流动相、流速和柱温箱为安捷伦专有。DAD 在 238 nm 波长下用于数据采集。分析停止时间为 11 分钟。每次样品分析后均运行不进样的空白，在该过程中，用 95% IPA 冲洗色谱柱，并在下一次进样前用流动相重新平衡。

结果与讨论

标准品的系统适用性

该方法对参比混标实现了出色的基线分离度，如图 1 所示。在 0.78 分钟处观察到的负峰是进样的假阳性结果。如先前的报道，在 1.92 分钟处观察到的峰是阿伏苯宗标准品中的杂质^[3]。在 4.92 至 9.87 分钟之间观察到的六个主要峰是按洗脱顺序鉴定的标准品分析物：

保留时间、峰宽（半峰高）、峰对称性、USP 拖尾因子和分离度值证实了参比混标中六种成分出色的基线分离度（表 2）。图 2 为混标的六次重复进样色谱图。该方法提供了出色的保留时间重现性，所有六个参比标样峰的 RSD% 介于 0.06–0.11，峰面积 RSD < 0.41%。

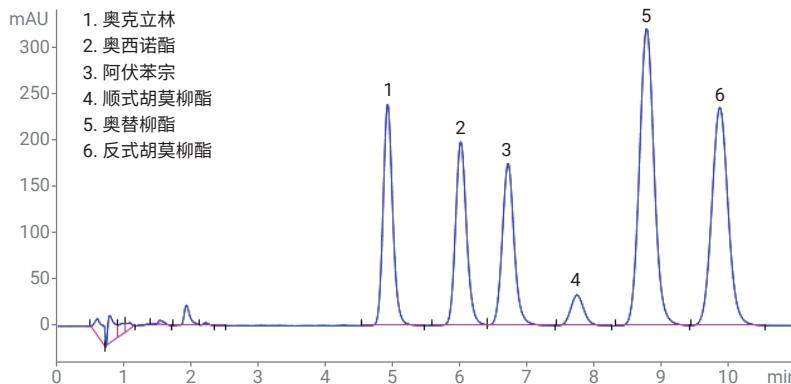


图 1. 参比混标中紫外线过滤剂的色谱洗脱曲线

表 2. 参比混标进样中六种分析物的保留时间（分钟）、峰宽（半峰高）、峰对称性、USP 拖尾因子和分离度值

峰编号	分析物名称	保留时间	半峰宽	对称性	USP 拖尾	分离度
1	奥克立林	4.922	0.150	0.85	1.158	无数据
2	奥西诺酯	6.011	0.174	0.85	1.154	3.97
3	阿伏苯宗	6.716	0.186	0.90	1.121	2.31
4	顺式胡莫柳酯	7.742	0.210	0.86	1.105	3.06
5	奥替柳酯	8.779	0.234	0.93	1.082	2.76
6	反式胡莫柳酯	9.870	0.260	0.94	1.074	2.61

线性

将峰面积相对参比混标相应浓度 (0.125–2 mg/mL) 作图, 可为每种过滤剂生成线性校准曲线。图 3 为五种紫外线过滤剂的线性曲线和相应相关系数 (R^2)。所有 5 条线性曲线的 R^2 值均 > 0.999 , 表明峰面积与每种参比标样浓度之间在校准范围内存在线性关系。

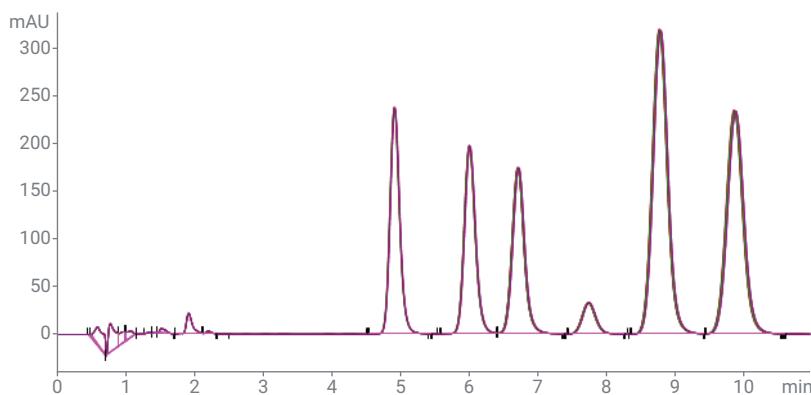


图 2. 参比混标的六次重复进样的叠加色谱图

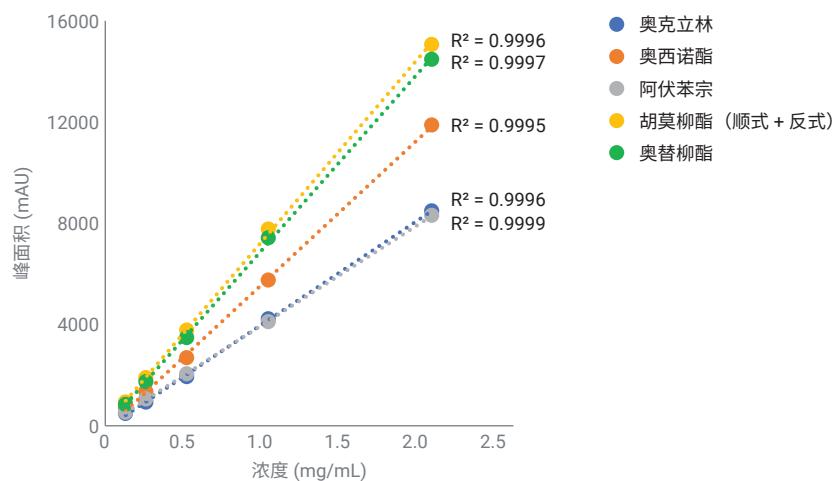


图 3. 紫外线过滤剂参比标样的校准曲线线性和相关系数

未经 Captiva EMR-Lipid 净化的 OTC 防晒产品样品色谱分析

从两种市售 OTC 防晒乳液（防晒霜 A 和 B）中提取活性成分，采用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙膜针头过滤器 (Sigma-Aldrich) 过滤，不经进一步净化即进样至色谱柱。图 4 和图 5 为防晒霜样品与参比混标的叠加色谱图。防晒霜 A 提取的样品中未经净化的序列显示了所有六个预期峰，保留时间分别与参比混标相同。但是，在系统不运行净化的情况下连续进样防晒霜 A 提取样品，色谱图开始表现出更明显的保留时间漂移（图 4），表明即使进样间的有机物相清洗浓度很高，也会累积色谱柱污染。

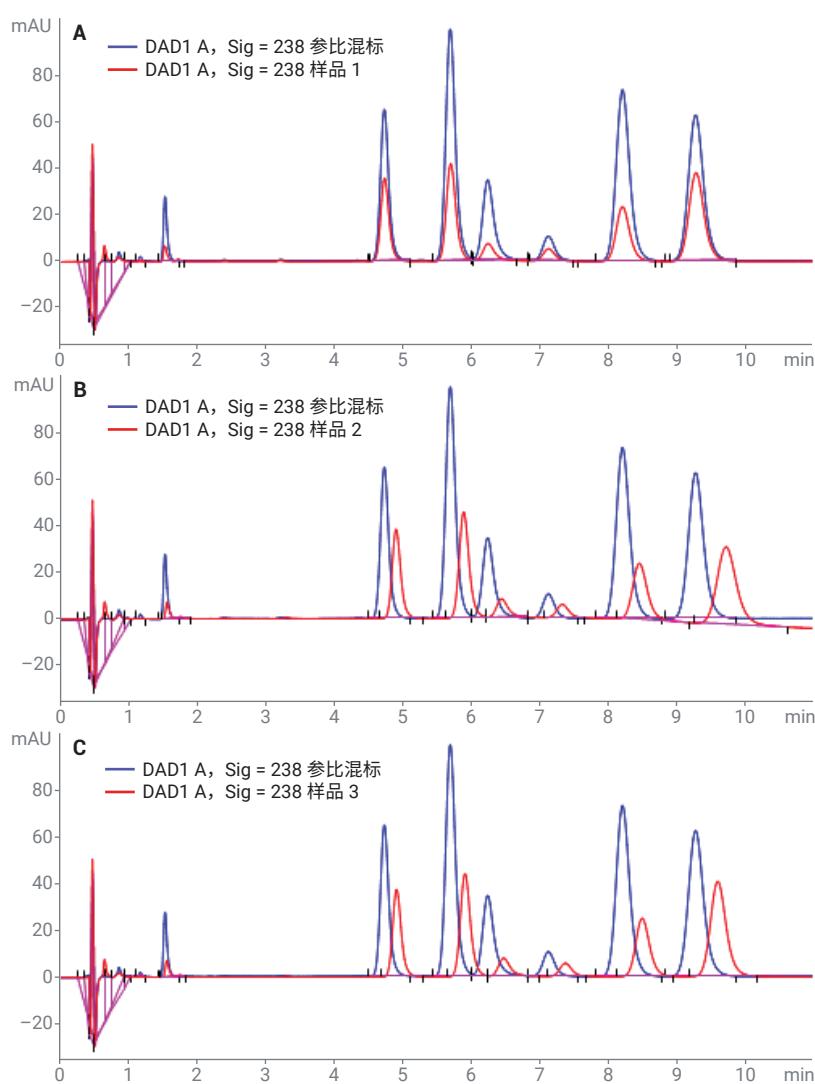


图 4. 连续进样三个防晒霜 A 提取的样品（不经净化）与参比混标的叠加色谱图

在三个未净化的防晒霜 B 提取样品中观察到了相同的问题，这些样品在防晒霜 A 样品后立即进样（图 5）。交换保护柱并反冲洗分析柱刚开始会略微校正保留时间漂移，但其他严重的色谱问题（包括峰形不规则和基线漂移）在随后每次进样混标时会变得更加明显（图 6）。仅进样 200 次后，色谱柱就无法再用。有趣的是，进样到色谱柱的大部分样品（97%）是纯标准品，表明仅是由于未净化基质样品的六次进样（图 4 和图 5）就完全损坏了分析柱。

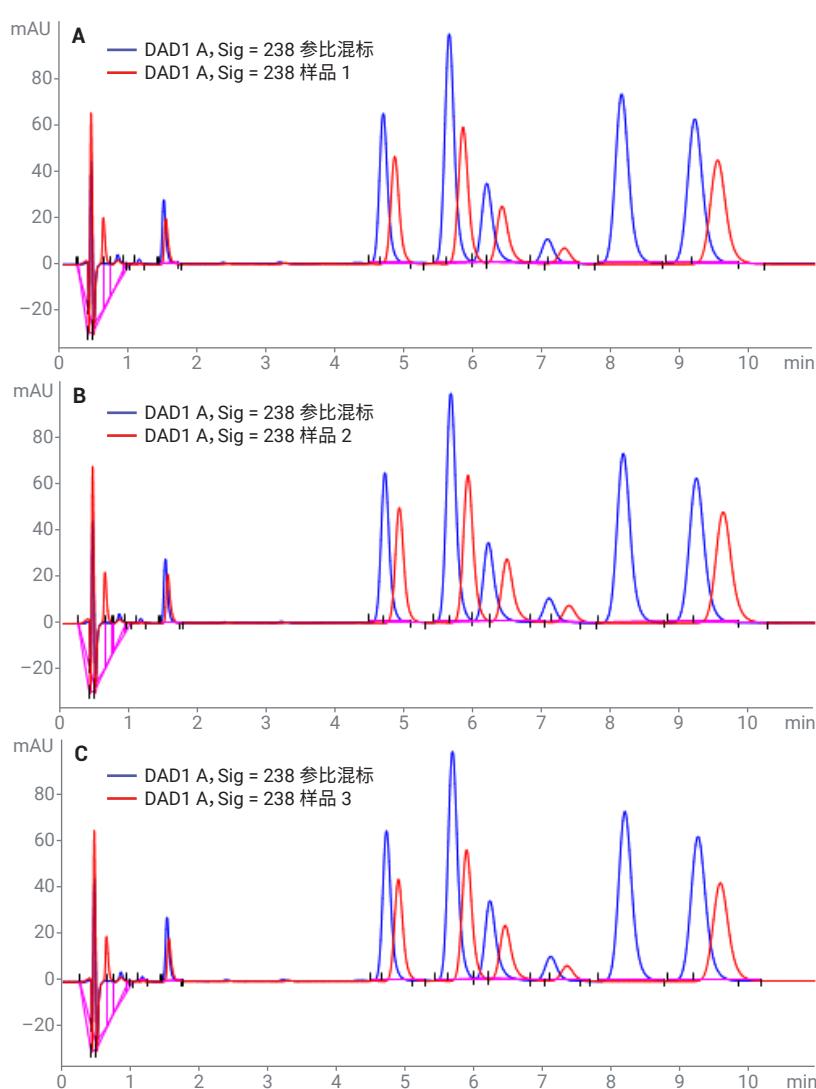


图 5. 连续进样三个防晒霜 B 提取的样品（不经净化）与参比混标的叠加色谱图

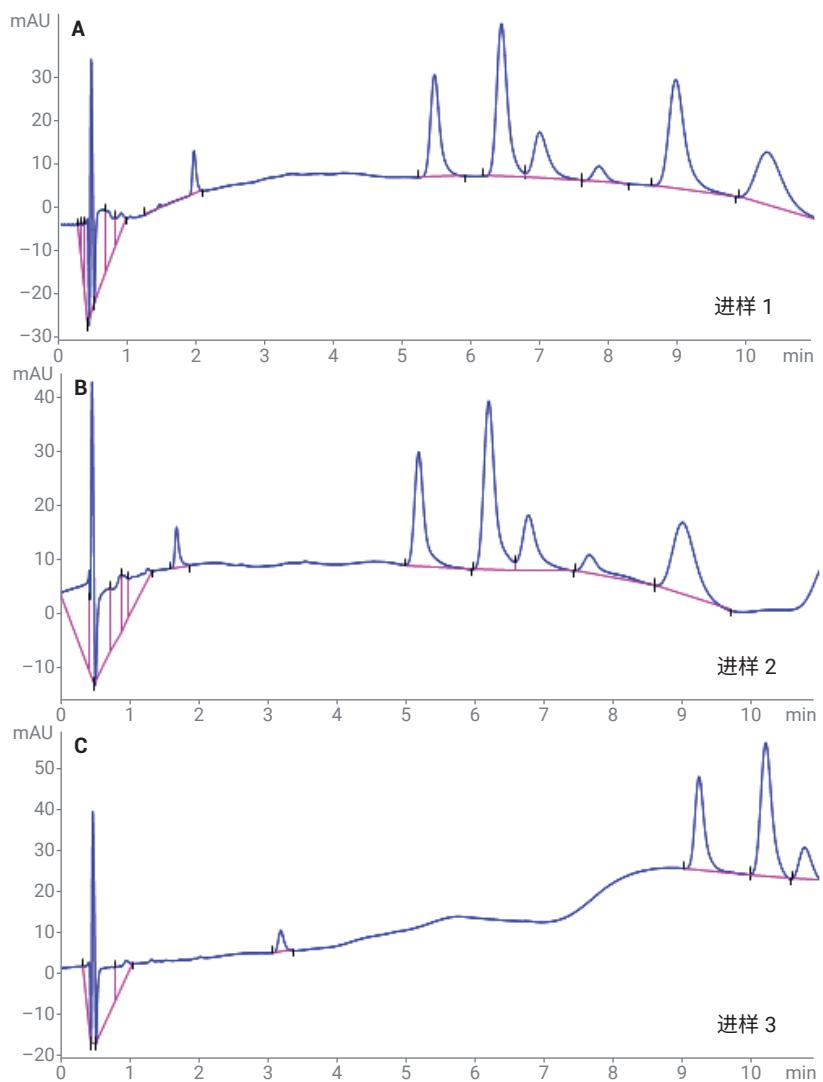


图 6. 六次防晒霜样品进样后连续进样参比标样

提取后采用 Captiva EMR-Lipid 净化对色谱分析的改进

为了解决由复杂样品基质导致的明显色谱性能下降，在提取样品后使用了 Captiva EMR-Lipid 净化。活性成分从六种市售 OTC 防晒乳液和 OTC 润唇膏中提取。每种产品的配方中含两种至五种活性紫外线过滤剂。Captiva EMR-Lipid 过滤柱用于进一步清洁样品粗提物，以去除基质脂质。安装新的分析柱和保护柱，每种产品均进行三次重复提取，并进行两次重复进样分析。图 7 显示了采用 Captiva EMR-Lipid 净化从每种产品（A 到 G）中提取样品的代表性色谱图。根据每种 OTC 配方中存在的活性成分，所有样品均得到了预期峰，保留时间与相应标准品和校准范围内的峰面积一致。在进样到色谱柱的七种不同产品样品的六次重复样品连续进样中，均未观察到保留时间漂移或其他色谱问题。

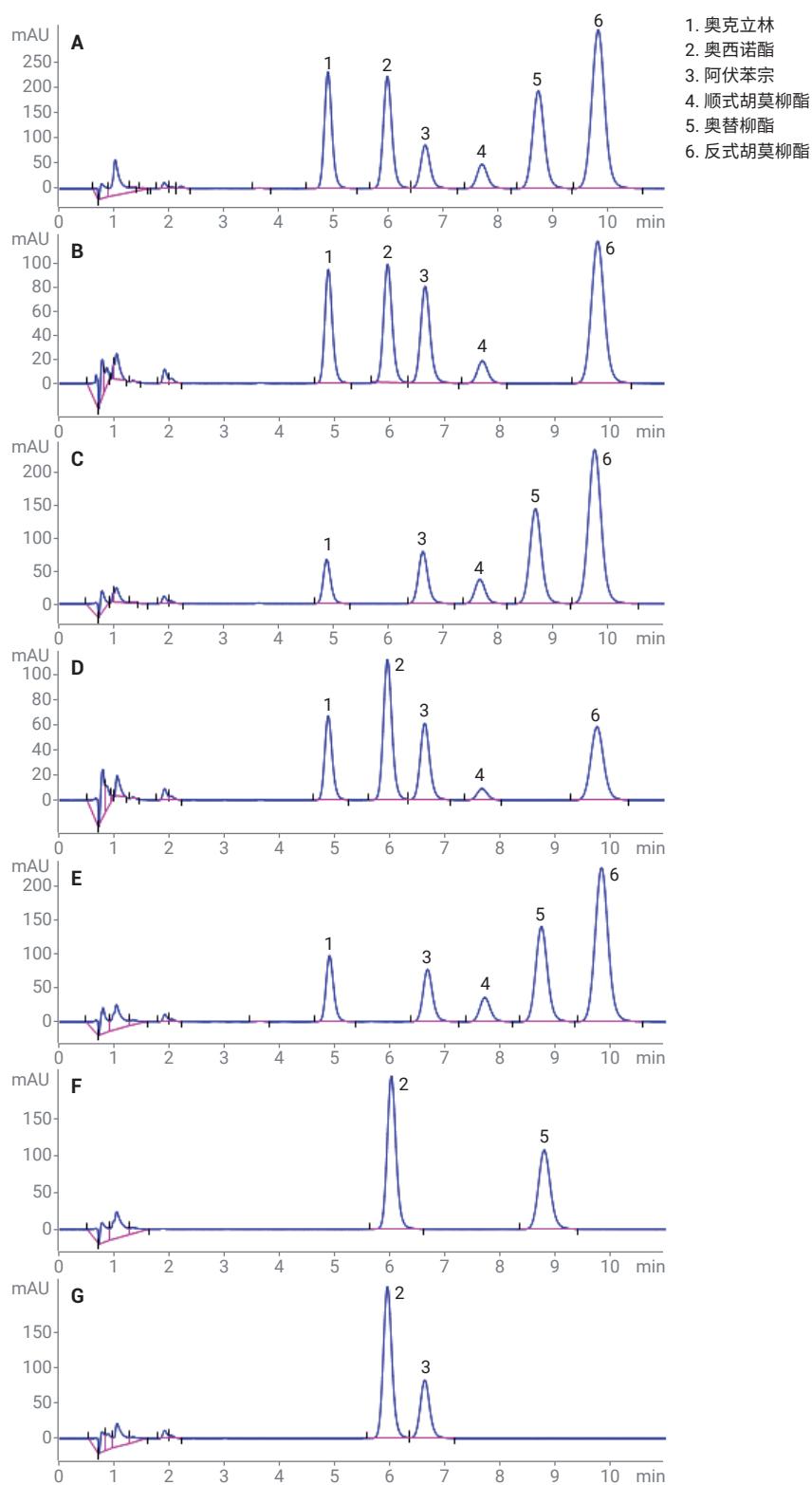


图 7. OTC 防晒乳液 (A、B、C、D、E、F) 和润唇膏 (G) 样品的六幅代表性叠加色谱图

表 3 列出 OTC 样品分析的定量结果。在所有 42 次样品进样中，活性紫外线过滤剂成分的回收率百分比为 95.0%–103.5%，回收率 RSD ≤ 2.19%。七种产品中每个紫外线过滤剂的平均回收率为 95.1%–101.1%。由于所有产品样品重复测定的定量结果均在可接受的置信度范围内（回收率 95%–105%），因此该分析方法符合所有测试产品准确度和回收率的可接受标准。同一根色谱柱用于执行 600 多次进样并测定 150 种 OTC 产品样品中紫外线过滤剂回收率的可接受水平，仍然保持了高质量色谱性能。

表 3. 从七种不同 OTC 产品样品中提取的紫外线过滤剂（经 Captiva EMR-Lipid 净化）的平均回收率（%）、标准偏差和 RSD%（每个产品 n = 6）

防晒乳液 A	奥克立林	奥西诺酯	阿伏苯宗	胡莫柳酯	奥替柳酯
平均回收率 (%)	98.67	97.63	100.22	98.92	97.63
标准偏差	2.16	1.94	2.20	2.12	1.97
% RSD	2.18	1.99	2.19	2.15	2.02
防晒乳液 B	奥克立林	奥西诺酯	阿伏苯宗	胡莫柳酯	
平均回收率 (%)	97.25	97.71	99.39	100.46	
标准偏差	1.58	1.47	1.48	1.62	
% RSD	1.63	1.50	1.49	1.62	
防晒乳液 C	奥克立林	阿伏苯宗	胡莫柳酯	奥替柳酯	
平均回收率 (%)	98.55	97.5	95.58	100.13	
标准偏差	0.60	0.62	0.58	0.49	
% RSD	0.60	0.64	0.61	0.49	
防晒乳液 D	奥克立林	奥西诺酯	阿伏苯宗	胡莫柳酯	
平均回收率 (%)	99.46	98.76	100.14	101.01	
标准偏差	0.72	1.26	1.35	1.48	
% RSD	0.73	1.28	1.34	1.46	
防晒乳液 E	奥克立林	阿伏苯宗	胡莫柳酯	奥替柳酯	
平均回收率 (%)	100.46	100.28	99.04	100.63	
标准偏差	1.52	1.82	1.17	0.95	
% RSD	1.51	1.81	1.19	0.94	
防晒乳液 F	奥西诺酯	奥替柳酯			
平均回收率 (%)	98.18	95.25			
标准偏差	0.26	0.20			
% RSD	0.26	0.21			
润唇膏	奥西诺酯	阿伏苯宗			
平均回收率 (%)	95.68	99.52			
标准偏差	0.70	0.71			
% RSD	0.73	0.72			

结论

本应用简报介绍了防晒产品的分析测试中基质效应对色谱分析的挑战。Agilent Captiva EMR-Lipid 净化可选择性地从六种不同防晒霜乳液和润唇膏的粗提物中去除基质脂质，同时不影响紫外线过滤剂的回收率。所有测试产品样品中活性成分的定量准确度和回收率均达到了可接受水平。在样品前处理过程中增加 Captiva EMR-Lipid 净化步骤，可在同一色谱柱上对多种防晒霜和润唇膏样品进行连续稳定的分析，使有效进样总次数增加了 200% 以上。此方法可用于提高化妆品研究、产品开发和质量控制中 OTC 测试的实验效率、数据重现性和性价比。

参考文献

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use—Small Entity Compliance Guide. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/labeling-and-effectiveness-testing-sunscreen-drug-products-over-counter-human-use-small-entity>. Retrieved September 22, **2019**
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun. <https://www.fda.gov/drugs/understanding-over-counter-medicines/sunscreen-how-help-protect-your-skin-sun#targetText=Sunscreens%20labeled%20%22%20water%20resistant%22%20are,directions%20on%20when%20to%20reapply>. Retrieved September 22, **2019**
3. Joseph, S.; Woodman, M. 应用配备 Agilent Poroshell 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪在 2 分钟内同时测定八种有机紫外线吸收剂，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-6861CHCN, **2010**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。