

气相色谱法测定斑贴膜片中香料混合物含量的研究

胡慧廉, 丁乃立, 施超欧(华东理工大学分析测试中心, 上海 200237)

摘要: 目的 建立毛细管气相色谱法测定用于检测 IV 型变态反应的斑贴膜片中 7 种香料混合物(香叶醇、羟基香茅醛、桂皮醛、丁香酚、戊基桂皮醛、桂皮醇、异丁香酚)含量的方法。方法 每片膜片用 1 mL 乙醇提取 30 min, 提取液直接注入气相色谱分析, 采用极性 PEG-20M 毛细管气相色谱柱分离, 外标法定量。结果 7 种香料组份的线性关系良好($r \geq 0.9995$); 精密度和稳定性试验 $RSD(n=8)$ 均 $< 2\%$; 加标回收率范围 $95.48\% \sim 107.52\%$, $RSD 0.31\% \sim 2.00\%$; 贴片香料含量均匀性试验 $RSD(n=8) < 5\%$; 定量限分别为 3.7, 4.3, 3.3, 3.5, 2.8, 2.3, 2.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 本方法样品前处理简单, 分析快速、准确和灵敏, 可满足斑贴膜片中香料混合物定量检测的需要。

关键词: 气相色谱法; 香料; 斑贴膜片; IV 型变态反应

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)03-0258-04

Determination of the Fragrance Mixtures in Patch Paster by Capillary Gas Chromatography

HU Huilian, DING Naili, SHI Chaoou(Analysis and Research Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of the mixtures of seven fragrance ingredients, including geraniol, hydroxy citronellal, cinnamaldehyde, eugenol, amylcinnamic aldehyde, cinnamyl alcohol and isoeugenol, in patch paster which can be used for testing type IV allergy by capillary gas chromatography. **METHODS** Each patch was extracted with 1 mL ethanol for 30 minutes. The extraction liquid was injected into GC for separation with a polar PEG-20M capillary column. The external standard method was used for quantitative analysis. **RESULTS** The standard curves were linear on a certain concentration with correlation coefficients larger than 0.999 5 for the seven target fragrances. The relative standard deviations ($n=8$) of precision and stability were less than 2%. The average recoveries for seven fragrances were between 95.48% and 107.52% with $RSD(n=3)$ in the range of 0.31%~2.00%. The relative standard deviations ($n=8$) of uniformity were less than 5%. The quantitative limits for seven fragrances were 3.7, 4.3, 3.3, 3.5, 2.8, 2.3, 2.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. **CONCLUSION** This method is simple, rapid, sensitive and accurate. It could meet the requirement for the quantitative analysis of fragrance ingredients in patch paster.

KEY WORDS: gas chromatography; fragrance mixtures; patch paster; type IV allergy

从天然植物中提取出的香料, 其独特的香气、很好的杀菌消毒和药用功能, 已广泛应用于药物、日用品和化妆品等领域^[1-2]。但来自植物的香料化学成份很复杂, 并非百分之百对人体安全^[3]。研究发现香料是导致接触性皮炎的主要原因^[4]。由于人们会接触到多种多样的香料, 因此选用一些测试用的香料来测试人们对香料的过敏程度, 就尤为必要。香料混合物斑贴膜片, 主药成份为香叶醇、羟基香茅醛、桂皮醛、丁香酚、戊基桂皮醛、桂皮醇和异丁香酚 7 种香料。该贴片主要用于 IV 型变态反应的检测^[5], 使用者将贴片贴于皮肤上, 若出现红肿, 瘙痒等症状则表明使用者对这些香料存在过敏。一般用于快速检测人们对各种化学物质的过敏程度。

建立快速、高效、成本低的检测香料混合物含

量的方法是满足市场上对该类斑贴膜片质量监控的要求。目前对香料的检测主要采用高效液相色谱法^[6]和气相色谱-质谱联用法^[7-8], 尚无通过气相色谱法快速测定有关斑贴膜片中香料混合物含量的研究报道。相比气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱法, 气相色谱法具有定量准确、成本低和对环境友好的优点。本文采用毛细管气相色谱法, 对斑贴膜片中 7 种香料混合物的含量分析进行了系统性的研究、确认, 所建方法简单、快速、重复性好、准确度高, 令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890 气相色谱仪(配 FID 检测器, 化学工作站); Agilent 7683 液体自动进样器(美国)。对照品: 香叶醇和丁香酚(中国药品生物制品检定

作者简介: 胡慧廉, 女, 硕士, 高级工程师 Tel: (021)64253223

E-mail: huhl@ecust.edu.cn

所, 纯度均 > 98%); 羟基香茅醛、戊基桂皮醛、桂皮醇和异丁香酚(美国 Accustandard 公司, 纯度均 > 99%); 桂皮醛(成都曼思特生物科技有限公司, 纯度 > 98%)。供试品: 含有 7 种香料混合物的斑贴膜片(批号: 20100501, 20100502, 20100503) 为厂家提供, 规格: 单片 0.9 cm × 0.9 cm。溶剂乙醇为分析纯;

1.2 色谱条件

PEG-20M 毛细管柱: 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, 柱温: 150 °C, 以 6 °C·min⁻¹ 的速度升至 240 °C; 气化室温度: 250 °C; 检测室(FID)温度: 250 °C; 载气: N₂; 柱前压: 4.44 psi (1 mL·min⁻¹); 分流比: 5:1; 进样量: 1 μL。

1.3 混合标准溶液的制备

根据成品浓度理论值要求的范围, 用乙醇配制对照品香叶醇、羟基香茅醛、桂皮醛、丁香酚、戊基桂皮醛、桂皮醇和异丁香酚混合标准储备液, 其质量浓度分别为 7.09, 5.4, 3.66, 3.49, 1.50, 5.4, 1.50 mg·mL⁻¹, 分别吸标准储备液 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mL 于 10 mL 量瓶中用乙醇稀释成系列标准溶液备用。

1.4 样品前处理

取单片 0.9 cm × 0.9 cm 的成品斑贴膜片, 加入 1 mL 乙醇密闭震荡提取 30 min, 取出提取液 1 μL, 进气相色谱检测。

2 结果与讨论

2.1 方法专属性研究

考虑到被测香料的 结构特性, 采用极性 PEG-20M 毛细管柱为分离柱。取单片空白膜片和成品膜片, 分别加入 1 mL 乙醇提取 30 min 后进样检测, 色谱图见图 1。结果表明, 在空白膜片上没有检测到和被测香料保留时间相近的杂质。可以认为贴片中的提取物完全为 7 种香料混合物。而极性 PEG-20M 毛细管柱对 7 种待测的香料混合物分离情况良好, 各组份相互间不干扰, 且 12 min 内完成整个分析, 快速简便。

2.2 供试品各香料成份提取效率研究

成品膜片加入乙醇分别提取 5, 10, 15, 30, 45, 60 min 后取样分析, 其对应的色谱响应值(面积)见图 2。从图 2 可以看到随着提取时间增长, 色谱响应值增大, 当提取时间超过 30 min 时, 其响应值基本不再增加, 故本实验选择 30 min 作为样品提取时间。

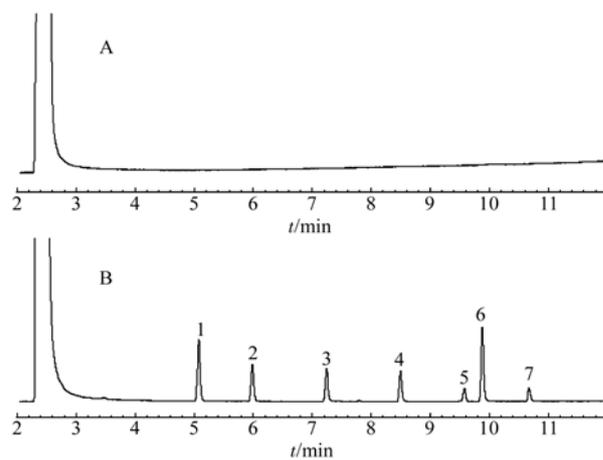


图 1 空白膜片(A)和成品膜片(B)的气相色谱图

1-香叶醇; 2-羟基香茅醛; 3-桂皮醛; 4-丁香酚; 5-戊基桂皮醛; 6-桂皮醇; 7-异丁香酚

Fig 1 GC chromatogram of blank paster(A) and drug-containing paster(B)

1-geraniol; 2-hydroxy citronellal; 3-cinnamaldehyde; 4-eugenol; 5-amylcinnamic aldehyde; 6-cinnamyl alcohol; 7-isoeugenol

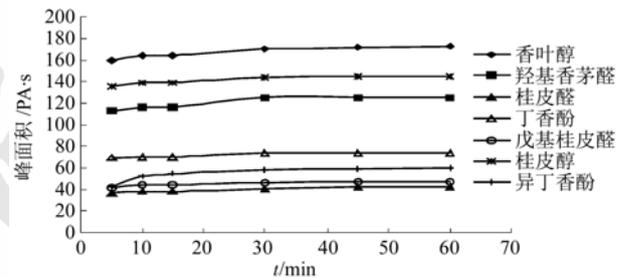


图 2 提取时间和峰面积的关系

Fig 2 The relationship between extraction time and peak areas

2.3 方法评价

2.3.1 线性关系及定量限测定 取 6 系列标准溶液分别装入液体自动进样器样品瓶中, 每瓶 1 mL, 取 1.0 μL 进样分析, 以溶液中各组份浓度(ρ)与其相对应的峰面积(Y)作线性回归以及香叶醇、羟基香茅醛、桂皮醛、丁香酚、戊基桂皮醛、桂皮醇、异丁香酚在信噪 S/N=10 时的定量限结果见表 1。

表 1 线性关系和定量限

Tab 1 Linear relationship and quantitative limits

香料	回归方程	r	线性范围/ mg·mL ⁻¹	定量限/ μg·mL ⁻¹
香叶醇	$Y=2496.7\rho+4.0244$	0.999 6	0.021~0.709	3.7
羟基香茅醛	$Y=1847.6\rho+3.3654$	0.999 7	0.016~0.540	4.3
桂皮醛	$Y=2665.5\rho+2.7291$	0.999 8	0.011~0.366	3.3
丁香酚	$Y=2345.5\rho-1.3412$	0.999 5	0.010~0.349	3.5
戊基桂皮醛	$Y=2513.6\rho+0.1558$	0.999 7	0.005~0.150	2.8
桂皮醇	$Y=3506.0\rho-7.7122$	0.999 6	0.016~0.540	2.3
异丁香酚	$Y=2542.9\rho-1.7088$	0.999 5	0.005~0.150	2.9

2.3.2 仪器精密度试验 取混合标准储备液稀释倍数为 100 的香料混合物标准溶液, 分别装入 8 个液体自动进样器样品瓶中, 每瓶 1.0 mL, 取 1 μ L 进样分析, 峰面积的相对标准偏差 RSD 见表 2。结果表明, 测量精密度良好。

表 2 精密度试验结果($n=8$)

Tab 2 The results of the precision test($n=8$)

香料名称	面积 RSD/%
香叶醇	0.48
羟基香茅醛	0.61
桂皮醛	1.31
丁香酚	0.75
戊基桂皮醛	1.56
桂皮醇	1.30
异丁香酚	1.79

2.3.3 回收率试验 取 9 片空白膜片分别精密添加高、中、低 3 个不同质量浓度(混合标准储备液稀释倍数分别为 50, 100, 200)的香料混合物标准溶液 1 mL, 提取 30 min, 分别进样, 每个浓度点溶液做平行 3 份, 计算加标回收率, 并用加标回收率试验($n=3$)来验证方法的精密度, 结果见表 3。结果表明, 回收率都在 95.48%~107.52%之间, RSD 在 0.31%~2.00%之间, 表明添加不同质量浓度的各香料回收率高, 具有较理想的重复性和准确度。

2.4 样品稳定性试验

取成品膜片 1 片, 加 1 mL 乙醇提取 30 min 后进样分析 4 次, 放置 1 d 后再进样 4 次, 8 次检测香料香叶醇、羟基香茅醛、桂皮醛、丁香酚、戊基桂皮醛、桂皮醇、异丁香酚含量的相对标准

表 4 3 批样品测定结果($n=8$)

Tab 4 Assay results of three batches of samples($n=8$)

香料组份	20100501		20100502		20100503	
	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{片}^{-1}$	RSD/%	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{片}^{-1}$	RSD/%	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{片}^{-1}$	RSD/%
香叶醇	0.084	3.98	0.079	4.02	0.086	3.90
羟基香茅醛	0.074	2.91	0.075	2.73	0.069	2.89
桂皮醛	0.020	4.04	0.022	3.97	0.024	3.94
丁香酚	0.039	4.20	0.035	4.25	0.034	4.03
戊基桂皮醛	0.022	4.45	0.019	4.73	0.023	4.68
桂皮醇	0.049	3.94	0.052	3.72	0.054	3.89
异丁香酚	0.019	4.67	0.017	4.56	0.016	4.91

3 讨论

本实验结果表明, 乙醇做提取剂, 提取完全, 操作简单; 采用极性 PEG-20M 毛细管色谱柱, 斑贴膜片上的主药成分 7 种香料的混合物能够得到

偏差在 0.47%~1.26%之间, 说明在 24 h 内提取液中的香料成分含量是稳定的。

表 3 回收试验结果($n=3$)

Tab 3 The results of recovery test($n=3$)

组份	本底量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	加标量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得值/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
香叶醇	0	0.035	0.037	103.51	1.03
		0.071	0.068	96.21	1.10
		0.142	0.140	98.95	0.81
羟基香茅醛	0	0.027	0.028	105.13	1.68
		0.054	0.052	95.79	0.61
		0.108	0.107	99.51	0.81
桂皮醛	0	0.018	0.019	102.55	1.62
		0.037	0.035	95.48	1.53
		0.073	0.073	99.86	0.93
丁香酚	0	0.017	0.019	106.04	2.00
		0.035	0.034	96.66	1.01
		0.070	0.070	99.67	0.62
戊基桂皮醛	0	0.008	0.008	107.52	1.28
		0.015	0.015	96.95	1.75
		0.030	0.030	100.51	0.31
桂皮醇	0	0.027	0.029	106.08	1.32
		0.054	0.053	99.01	1.37
		0.108	0.108	100.30	1.86
异丁香酚	0	0.008	0.008	102.85	1.05
		0.015	0.015	97.72	1.18
		0.030	0.030	99.76	0.52

2.5 样品测定

取样品 3 批(20100501, 20100502, 20100503), 每批取成品膜片 8 片, 分别加 1 mL 乙醇提取 30 min 后检测, 以峰面积外标法定量, 3 批样品每批 8 片贴片上各香料组份的平均含量及含量检测的相对标准偏差见表 4。结果表明, 各香料含量的相对标准偏差在 2.73%~4.91%之间, 说明各贴片上香料的涂层均匀性良好, 样品重复性较好。

很好的分离, 峰形良好, 分析时间短; 经方法学验证, 所建方法重复性好, 准确度高, 易于普及, 能够满足日常大批量样品分析的要求, 这对实际检测多种香料组分的混合物有着重要的参考价值。

REFERENCES

- [1] LI Y. Natural essential oils [J]. Tianjin Chemical Industry(天津化工), 2008, 22(6): 70-71.
- [2] LAPCZYNSKI A, BHATIA S P, FOXENBERG R J. Fragrance material review on geraniol [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(11): S160-S170.
- [3] BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, et al. Biological effects of essential oils [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(2): 446-475.
- [4] JOHANSEN J D, ANDERSEN T F, KJØLLER M, et al. Identification of risk products for fragrance contact allergy: A case-referent study based on patients' histories [J]. A J Contact Dermatitis, 1998, 9(2): 80-86.
- [5] POSADAS S J, PICHLE W J. Delayed drug hypersensitivity reactions – new concepts [J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(7): 989-999.
- [6] VILLA C, GAMBARO R, MARIANI E, et al. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(3): 755-762.
- [7] MASUCK I, HUTZLER C, LUCH A. Investigations on the emission of fragrance allergens from scented toys by means of headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(18): 3136-3143.
- [8] WANG C, WANG X, JI M Q. Determination of sixteen flavors in cosmetics by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Lab(分析实验室), 2006, 25(11): 118-122.

收稿日期: 2011-07-18