

荧光法测定化妆品中的芦荟苷

许国水 陈文枢

(应用化学系)

摘 要

目前,尚无测定含芦荟提取物的化妆品中的芦荟苷的适当方法.本文探讨了用荧光法测定化妆品中的芦荟苷,叙述测定的最佳条件、方法的回收率达95%,相对标准偏差为0.5%,线性范围为0.01—20ppm.

一、前 言

70年代以来^[1],世界化妆品市场年平均增长率为11%,超过化学工业生产的年增长速度.当前开发新化妆品的主要趋向是:低刺激、有疗效、面向天然.

百合科芦荟属植物芦荟Aloe vera L.,虽原产拉美、非洲,但传入我国已久.明朝刘文泰等纂的本草品汇精要和李时珍所著本草纲目,均有关于芦荟入药的记述;在民间也沿用芦荟的粘稠液汁代油泽发,近代已探明芦荟的药效成分为芦荟苷,并陆续发现新的微量的具特效的成分,如具治癌并能提高人体的抗癌免疫能力的芦荟素-A,及芦荟液汁中含有对人体皮肤抗炎症、抗过敏等独特药效的成分.因此国外不少化妆品厂家都把芦荟提取物引入新型化妆品的原料配伍中来.如American No.1 Shampoo products Ltd.的液体皂,菲律宾Henkel工业开发公司的芦荟护发素与芦荟洗发香波;日本Lion公司^[2]的护肤霜等都是含有芦荟提取物的新型化妆品,在国内市场上,近来也有国产芦荟洗发精等新产品出现.

发达国家政府所制法规中,化妆品类的法规要求甚严,对化妆品所含各组分均立有标准检验方法.由于化妆品成分复杂,现国内外用于药物中芦荟苷含量的分析方法文[3,4]均难适用,因而,本文主要介绍了国内首创的芦荟洗发精和芦荟护发素商品中芦荟苷含量的标准检验方法.

二、实验部分

1. 仪器与试剂

1) 仪器:紫外可见分光光度计,西德Jena等产;920-型荧光光度计,沪产.

2) 试剂:四硼酸钠、氢氧化钠、醋酸(36%)乙醇(95%)均A.R级、芦荟大黄素葡萄糖苷结晶(简称AEG)是本实验室从进口的库拉索芦荟提取物干块提取精制的结晶、芦荟

本文1987年6月8日收到.

洗发精(成品及半成品)及其各组分,半成品系指仅未加入芦荟提取物的芦荟洗发精,由福建南安洪濂第二化工厂提供、美国 No.1 香皂、菲律宾洗发精与护发素系进口商品。

2. 检验方法试探

1) 光谱性质: 分别把组成芦荟洗发精的各组分、芦荟洗发精及其半成品配制成适当浓度的溶液, 检验其对紫外可见光的吸收情况; 通过外加试剂进行对有关吸收峰的去留、增强削弱处理, 并在荧光光度计上检验其光谱特性。

2) 最佳检测条件的建立与验证: 从浓度、pH 值、反应物浓度、时间、温度等条件的变化, 探讨对荧光强度的影响因素与条件, 从回收率与相对标准偏差的结果检验最佳检测条件的可靠性。

三、结果与讨论

1. 光谱性质

1) 芦荟洗发精及其半成品的紫外可见吸收光谱性质如图 1, 比较图中曲线 a 与 b 便知芦荟洗发精半成品呈现 3 个吸收峰, 分别在波长约 280、450、630 nm 处。芦荟洗发精在波长约 300 nm 处有强吸收峰, 很可能与其它成分所呈现的吸收峰发生双向重迭, 说明芦荟提取物中某些成分对光有吸收。

2) 国产芦荟洗发精的着色剂为柠檬黄与亮靛兰, 它们的光谱性质如图 2。图中 a 为柠檬黄的紫外可见吸收光谱, 在波长约 280、450 nm 处呈现强吸收峰; b 为亮靛兰的紫外可见光谱, 仅在波长约 630 nm 处呈现吸收峰; c 为这二种着色剂混合时的水溶液对紫外可见光的吸收光谱, 它与图 1 中 a 芦荟洗发精半成品的谱图相似; d 为两种着色剂与碱共热后所呈现的光谱图, 比较谱线 c、d, 说明柠檬黄能被碱在加热下除去其吸收峰, 亮靛兰较稳定, 但吸收峰亦受削弱(低), 这现象与单一着色剂分别受碱作用结果吻合。

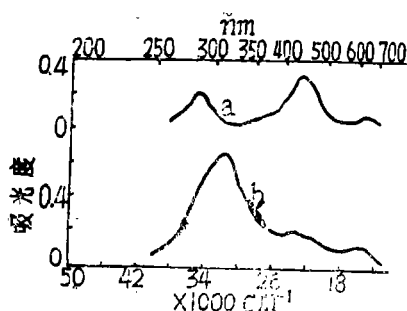


图 1 芦荟洗发精半成品 (a) 芦荟洗发精 (b) 的紫外可见吸收光谱

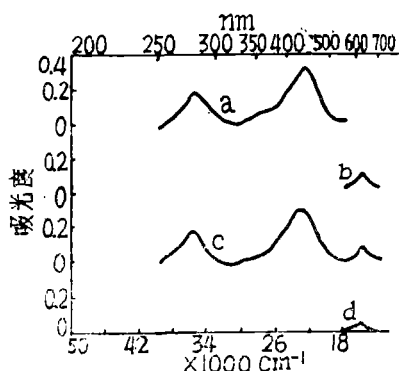


图 2 柠檬黄(a)亮靛兰(b)柠檬黄+亮靛兰(c)柠檬黄+亮靛兰+碱液(d)的紫外可见光谱

3) 图 3 为 AEG 结晶水溶液的紫外可见吸收光谱, 在紫外光部分呈现 4 个强吸收峰, 它们的位置分别在波长 230、245、255 与 305 nm 处, 在可见光部分仅在波长 400 nm 处有一较弱的吸收峰, 整个谱图性质符合羟基蒽醌衍生物对紫外可见光吸收的特性^[5]。

4) 图 4 为国产芦荟洗发精半成品、国产芦荟洗发精、AEG 的水溶液, 分别与碱共热后的紫外可见吸收光谱, 每种溶液的谱图都只呈现 1 个吸收峰, 分别出现在 630、310、305nm 处。最有趣的是 AEG 经碱处理后只留下位于波长 305nm 处的吸收峰。

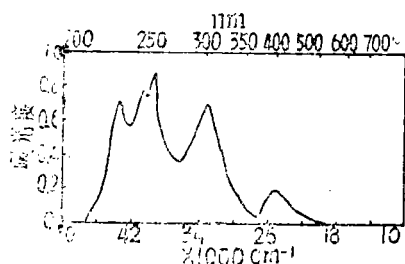


图 3 AEG 的紫外可见吸收光谱

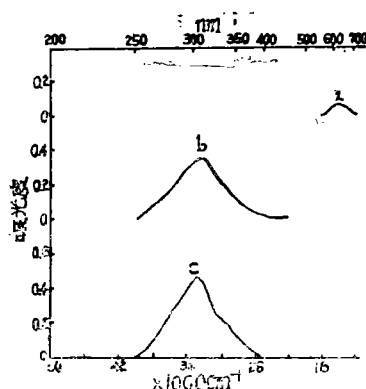


图 4 芦荟洗发精半成品(a)芦荟洗发精(b)AEG 溶液(c)分别与碱共热后的紫外可见吸收光谱

比较图 1—4, 可初步说明国产芦荟洗发精中有三种组成成分对光具吸收作用, 但受碱与加热后变化不一样, 其中柠檬黄的所有吸收峰消失, 亮兰吸收峰受削弱, AEG 仅留 1 个强吸收峰。这一位于波长 305nm 处的吸收峰不与任何其它吸收峰发生重叠, 我们要定量测定的正是产生这个吸收峰的物质。

5) 图 5 中 a_1 为国产芦荟洗发精经碱处理后, 以醋酸调至 pH 值为 7—8, 加四硼酸钠沸水浴后的紫外可见吸收光谱; a_2 为不加四硼酸钠外其它条件与 a_1 相同处理后所得的紫外可见光谱。比较 a_1 与 a_2 可说明四硼酸钠起反应后增强了吸光度, 但峰位不变。图中 b_1 — b_5 是以不同量的 AEG 与等量的四硼酸钠反应后的紫外可见吸收光谱, 它们的峰形和峰位都相似, 只有峰高呈有规律性地降低, 说明其线性关系很好。

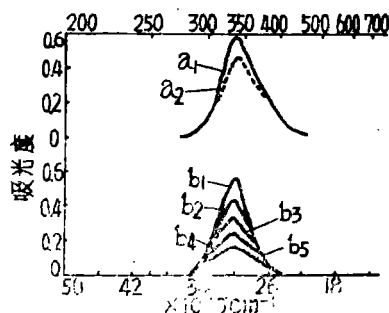


图 5 国产芦荟洗发精、AEG(不等量)与四硼酸钠反应后所产生的紫外可见吸收光谱

6) 图 6 为几种含有芦荟提取物的国内所产的化妆品, 以 5) 的处理方法处理后所呈现的光谱现象, 它们都仅保留 1 个位于波长 300nm 左右的相似吸收峰, 这一现象可认为芦荟提取物中含有结构上的类似性而引起同样的光谱性质。图 7 是几种已经证明的芦荟苷类的化学结构, 它们都属于以蒽醌为母核的羟基蒽醌

衍生物, 在其羟基蒽醌的母核上都有一颇相类似的邻-甲酰苯酚样结构 O=Cc1cc(O)ccc1, 因而在紫外可见吸收光谱图中都出现有峰形相似、峰位相近的吸收峰, 其波长约在 305nm 处。这一吸收峰表现稳定、吸光度较大, 不为其它吸收峰进行单向或双向所重叠, 为荧光法测定分析提供了极有利的因素。

7) 据B. Janiak等人^[6]对生药的研究, 发现芦荟素 (Aloin) 与四硼酸钠于水浴加热反应后, 能在波长460nm处发射黄绿色荧光, 在适当浓度下其性质稳定能在1h内遵从 Lambert Beer定律。

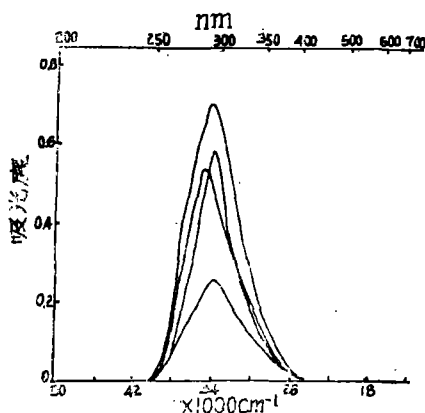


图6 几种含芦荟化妆品与四硼酸钠反应后的紫外可见吸收光谱

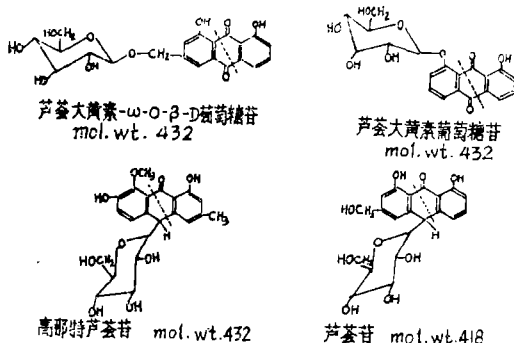


图7 几种芦荟苷的化学结构

8) 图8为AEG结晶与四硼酸钠反应后所产生的荧光性质。当AEG浓度高于20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 曲线斜率变号, 这是多数具荧光性物质所共有的现象, 即自熄灭与自吸收所产生的现象。在AEG浓度低于20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 荧光强度随浓度增大而呈线性增大, 虽AEG属羟基蒽醌葡萄糖苷, 但现象与B. Janiak等人所研究的Aloin (芦荟素) 所呈荧光现象相符。而图7所示4种芦荟素的分子量除芦荟苷略有差别外, 其它3种物质的分子量都相同, 因此采用AEG作为基准物所产生的相对误差并不大。

根据以上光谱性质的研究结果, 采用AEG结晶为基准物, 选择波长300nm作激发光, 在波长为460nm作发射光有可能对芦荟洗发精中的芦荟苷类进行荧光法定量检测。

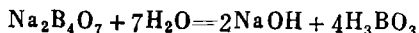
2. 最佳测定条件的探讨

1) 激发辐射与荧光发射波长区的选择: 虽然光谱性质探讨的结果认为激发辐射的波长区为300nm左右, 而实际只好依仪器的性能而定波长300—360nm为激发辐射的波长区, 荧光发射波长区则定在460—470nm区间内。

2) AEG与试样的浓度区间: 按图8说明AEG的浓度区间最好在0.1—15ppm之间, 因而试样稀释度也就可定。

3) 四硼酸钠的用量: 把AEG浓度固定为 $3.5 \times 10^{-5} \text{mol}$ ($\approx 15 \mu\text{g}/\text{ml}$), 使四硼酸钠与AEG的摩尔比为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0和8.0进行反应, 分别测得相对荧光强度如图9。结果表明当四硼酸钠与摩尔比 ≥ 4 时, 测得的荧光强度几乎不变。

4) 溶液pH的影响: 国产芦荟洗发精水溶液呈微酸性, pH值为5—6, 在不同pH值时与四硼酸钠反应所产生的相对荧光强度如图10。当溶液pH值 > 8 时, 反应后发射的相对荧光强度较强且稳定。由于四硼酸钠水溶液易产生水解即



致使溶液呈较强碱性,若非为排除其它干扰成分的需要、实际上无须先将溶液调为碱性。

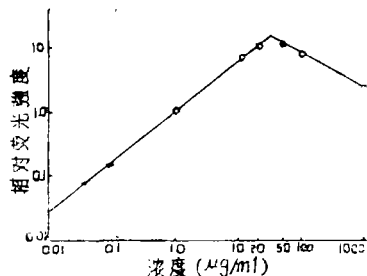


图8 AEG水溶液的荧光曲线

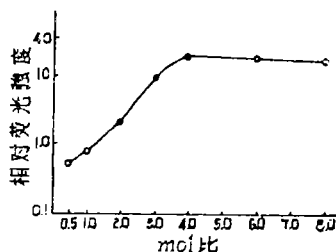


图9 四硼酸钠与AEG的摩尔比与相对荧光强度关系

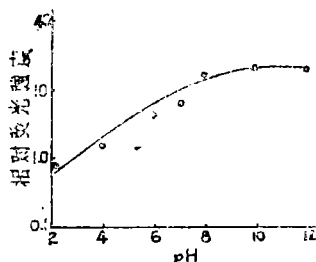


图10 溶液pH值与荧光强度关系

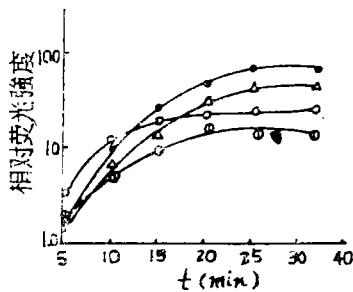


图11 反应时间与荧光强度关系
a为菲律宾洗发精; b为美国No.1香皂;
c为AEG; d为国产芦荟洗发精

5) 反应时间: AEG与四硼酸钠反应20—30min后,发射的荧光强度已达稳定状态。芦荟洗发精与四硼酸钠反应所需时间也同,但如果组分中的香料有干扰时,还须在加热下不时加入一定体积的乙醇,並不断搅拌以加速香精干扰成分的挥发。图11表明几种含芦荟化妆品与AEG分别和四硼酸钠反应所需的时间大约相差10 min,其中AEG达到稳定的荧光强度所需的反应时间较短,美国No.1香皂与菲律宾洗发精所需反应时间较长。

6) 测定时的温度与时间: 图12中a表明反应完成后,测定相对荧光强度时,溶液温度为15—25℃范围内发射的荧光强度变化不大。虽相对荧光强度随测量时溶液温度的上升而缓慢下降,但在(20—25℃)室温进行测定並不会严重影响其准确度。图中b表明反应后在1h以内测定其荧光强度都能达到一定准确度,但最好是40min以内完成测定。

7) 其它因素的影响: 芦荟洗发精中除成分复杂的芦荟提取物外,还有着色剂、香料、两性表面活性剂、烷醇酰胺、羊毛脂、防腐剂、无机盐等,在这十多种组分中,极难完全对测定不发生干扰,因而除加碱破坏柠檬黄色素、加乙醇帮助蒸发除去香料外,最好采用芦荟洗发精半成品作参比在同样条件下制备校正曲线图13为AEG荧光分析曲线。图中a为AEG水溶液的荧光分析曲线, b为加有与试样同量的芦荟洗发精半成品的AEG水溶液的荧光分析曲线。比较a、b两曲线可知其荧光强度均随AEG的浓度增大而增大,低浓度时较靠近,浓度 $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$ 时虽略有差别但影响不大。如需较精密测试时,可加以校准。

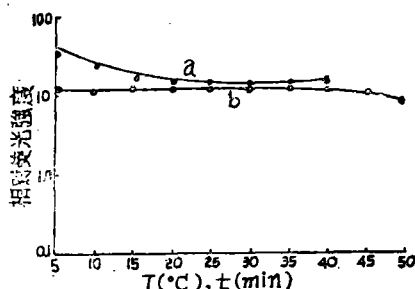


图12 测定时温度(a)放置时间(b)
与荧光强度的关系

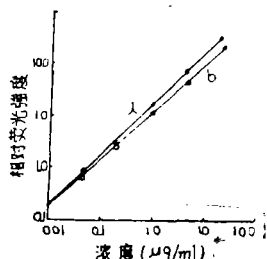


图 13 AEG 水溶液(a)添加芦荟洗发精半成品的
AEG水溶液(b)的荧光分析曲线

3. 方法的回收率

按节2所分析取得的最佳反应条件,为福建南安洪濑第二化工厂起草了芦荟洗发精与芦荟护发素中芦荟苷类含量的检测方法。据此检测对芦荟洗发精半成品加入AEG的回收率,结果如表1。在AEG含量为0.01—20 ppm范围内测量方法对AEG的回收率达94.9—95.5%,AEG含量在<0.01 ppm或>20 ppm时其相对标准偏差出现增大趋势。在0.1—10 ppm范围内相对标准偏差较小,其线性范围达3个数量级(10^3)的测量范围已能满足要求,何况芦荟提取物的每次内服用药允许量可达0.9—1.8 g^[7]。R. A. Paris^[8]等人分析了18种芦荟提取物,虽芦荟苷含量高低不同,但最高含量也已达22.5%,因此内服用药允许量相当于0.2—0.4 g的AEG结晶,而一般化妆品中所添加的芦荟提取物只含1%或更低,表1所得的分析方法的相对标准偏差已够符合化妆品的卫生要求。

表1 分析方法的回收率

AEG浓度理论值(ppm)	8次测量平均值(ppm)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
0.01	0.0095	94.9	0.7
0.1	0.0952	95.2	0.5
1.0	0.9551	95.5	0.5
10	9.493	95.0	0.5
20	19.10	95.2	0.5

4. 芦荟护发素中芦荟苷的荧光法测定实例

1) 方法提要: 试样经破乳后除去皂质的清液, 加四硼酸钠与连二亚硫酸钠、沸水浴30 min, 冷后, 乙酸酸化, 于荧光计上在360 nm的激发光照射下, 测量470 nm波长发射光的荧光强度。

2) 试剂: (1) 20% W/V 氯化钙溶液; (2) 四硼酸钠饱和溶液; (3) 连二亚硫酸钠; (4) 1:1 乙酸; (5) 6 N 氨水; (6) AEG 标准溶液: 称取 AEG 0.5000 g 于小烧杯中, 加 6 N 氨水 1—2 ml, 加水溶解, 移入 250 ml 的容量瓶中, 加水至刻度、摇匀、制成浓度为 2 mg/ml 的溶液; (7) 参比溶液: 称取芦荟护发素半成品 (仅未加入芦荟提取物的芦荟护发素) 25 g 于 100 ml 的烧杯中, 加氯化钙溶液 20 ml, 搅匀, 沸水浴 30 min, 冷至室温, 使清液滤入 100 ml 的容量瓶中, 用热水 40 ml 分四次洗涤杯中皂质物, 待冷过滤, 最后每次用 3—5 ml 冷水共三

次淋洗滤纸上的残留物,将前后集中的滤液加水至刻度摇匀。

3) 分析步骤: (1) 试样量: 称取 2.5000 g 试样 3 份; (2) 工作曲线的绘制: 分别移取 0.00、0.40、0.80、1.20、1.60、2.00 ml AEG 标准溶液于 100 ml 的烧杯中,各加 10 ml 参比溶液、10 ml 四硼酸钠饱和溶液、约 40 mg 连二亚硫酸钠,搅匀、沸水浴加热 30 min,待冷加乙酸 5 ml,移入 100 ml 容量瓶中,加水至刻度、摇匀,至 930 型荧光计上在 360 nm 波长的激发光照射下,测其 470 nm 波长的发射光的荧光强度,以 AEG 量为横坐标,相对荧光强度为纵坐标,绘制工作曲线; (3) 测定: 称取样品 2.5000 g 于 100 ml 的烧杯中,如制参比溶液处理方法除去皂质物后的滤液,加 10 ml 四硼酸钠饱和溶液、40 mg 的连二亚硫酸钠,搅匀,经沸水浴加热 30 min,待冷,加乙酸 5 ml,移入 100 ml 的容量瓶中,加水至刻度、摇匀,于 930 型荧光计上如绘制工作曲线条件测其荧光强度,然后从工作曲线上查出相应的芦荟苷含量。

4) 计算: 按 芦荟苷 (%) = $CV/W \times 100$ 的算式,计算芦荟护发素中含芦荟苷的百分含量。式中, C 为从工作曲线上查得的芦荟苷含量 (g/ml); V 为试液总体积 (ml); W 为试样量 (g)。

芦荟护发素中芦荟苷含量在 0.01—0.03 % 时,其分析结果的极差值应不大于 0.008 的允许差。

参 考 文 献

- [1] 化工部科技情报研究所,世界精细化工手册,化工部科技情报研究所出版,(1982),110.
- [2] C.A100,144838k.
- [3] 沙世炎编,中草药有效成分分析法(上册),人民卫生出版社,(1982),117—21.
- [4] A. O. A. C., *Official Methods of Analysis*, 10th Ed., (1965), 32, 2999, 12th Ed., (1975), 39071.
- [5] 北京医学院,北京中医学院主编,中草药成分化学,人民卫生出版社,(1980),230—2.
- [6] Janiak, B. and Boehment, *Arzneimittel Forsch*, 12 (1962), 431—5.
- [7] 上海中医学院方药教研组编,中药临床手册,上海人民出版社,(1977),49.
- [8] Paris, R. A. and Durand, M. Aloe assay, *Photometric Determination of Aloin*, *Ann. pharm*, 14 (1956), 755—61.

Fluorimetric Determination of Aloin in Cosmetics

Xu Guoshui Chen Wenshu

Abstract

This paper suggests to determine aloin in cosmetics, which contains aloe extracts, by fluorimetry.

It describes the optimum conditions in relation to the determination.

The method shows a recovery ratio of 95 percent, a relative standard deviation of 0.5 percent, and a linear range of 0.01—20 ppm.