

液相色谱 – 串联质谱法测定化妆品中多种激素

武中平, 卢 剑, 高 巍, 俞幼芬

(国家化妆品质量监督检验中心, 江苏 南京 210029)

摘要: 采用液相色谱 – 串联质谱法测定化妆品中糖皮质激素、雌激素、雄激素、孕激素等激素的含量。不同形态的化妆品样品以甲醇为提取剂进行超声提取, 样品提取液离心后得到上清液经 HLB 固相萃取小柱净化, 用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB – C₁₈ 柱 (1.8 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm), 乙腈 – 水作为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 2.0 μ L, 糖皮质激素、雄激素、孕激素采用正离子扫描模式, 雌激素采用负离子扫描模式, 多反应监测测定。化妆品样品平均加标回收率为 72.31% ~ 97.89%, 相对标准偏差为 2.24% ~ 11.34%, 方法检出限为 0.002 mg/kg ~ 0.8 mg/kg

关键词: 化妆品; 激素; 测定; 液相色谱 – 串联质谱法

中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001 – 1803(2010)02 – 0153 – 04

Determination of various hormones in cosmetics by liquid chromatography together with mass spectrometry

WU Zhong-ping LU Jian GAO Wei YU You-fen

(National Suspecting and Testing Center for Cosmetics Nanjing Jiangsu 210029 China)

Abstract Content of various kinds of hormones including glucocorticoids, oestrogens, androgens and progestogen in cosmetics were determined by liquid chromatography together with mass spectrometry. Various cosmetics samples were extracted by methyl alcohol under help of ultrasonic wave. The extracts were centrifuged, and the upper clear solutions were purified by HLB SPE columns and separated with Agilent ZORBAX Eclipse XDB – C₁₈ column (1.8 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm), using a mobile phase consist of acetonitrile – water and gradient eluted at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C and the injection volume was 2.0 μ L. Glucocorticoids, androgens and progestogen were analyzed in the positive ion scanning mode, while oestrogens were analyzed in the negative ion scanning mode. The detections were made with MRM mode. The average recoveries achieve between 72.31% and 97.89%, and the relative standard deviations (RSD) achieve between 2.24% and 11.34%. The detection limits of this method achieves 0.002 mg/kg ~ 0.8 mg/kg.

Key words cosmetics, hormones, determination, liquid chromatography together with mass spectrometry

化妆品与人们的生活密切相关, 近几年随着我国人民生活水平的提高, 化妆品已成为必不可少的消费品之一。与此同时, 化妆品的安全性已经日益成为广大消费者关注的问题。化妆品中所添加的某些化学物质对人体健康具有潜在的危害。

短时间使用含有糖皮质激素的化妆品可使皮肤光滑细腻、红润白嫩。但长期使用易导致皮肤变薄、发红、发痒, 另外通过皮肤吸收可引起全身副作用, 导致面部皮肤损害、骨质疏松、肌肉萎缩、生长发育迟缓、免

疫功能下降、诱发或加重感染和消化性溃疡、情绪异常、代谢紊乱等各种不良反应。一旦停用, 皮肤就会发红、发痒, 出现红斑、丘疹、脱屑等。由于性激素的重要生理功能, 化妆品中添加性激素能够在短时间内促进毛发生长, 防止皮肤老化, 除皱、增加皮肤弹性或治疗粉刺等。但长久使用会导致色素沉积、产生黑斑、皮肤萎缩变薄, 甚至具有致癌性。

我国《化妆品卫生规范》和欧盟化妆品规程 (Directive 76/768/EEC) 中均明确规定, 不得使用含

收稿日期: 2009 – 09 – 16 修回日期: 2009 – 12 – 21

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助项目 (2007QK131); 江苏省质量技术监督局资助项目 (KJ083102)

作者简介: 武中平 (1974 –), 男, 湖南人, 工程师, 硕士, 电话: (025) 86536608

有雌激素、雄激素、孕激素和糖皮质激素的物质作为化妆品原料。因此,检测各种化妆品中是否含有雌激素、雄激素、孕激素和糖皮质激素,对于控制化妆品的产品质量,确保化妆品的使用安全,保障人民身体健康具有重要的意义。

通过对样品前处理技术、色谱和质谱操作条件等方面进行研究,建立了一种可测定化妆品中多种激素(包括雌激素、雄激素、孕激素和糖皮质激素)含量的液相色谱-串联质谱法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200/6410液相色谱-串联质谱仪,美国 Agilent公司; N- EVAP12氮吹仪,美国 Organomation Associates公司; Waters Oasis HLB固相萃取小柱,美国 Waters公司; SB- 800DT超声波清洗机,宁波新芝生物科技有限公司; XHC旋涡混合器,江苏省金坛市医疗仪器厂; Avanti J- E高速离心机,美国贝克曼库有限公司; Supelco cm- 12固相萃取装置,美国 Supelco公司。

乙腈、甲醇,均为色谱纯;电阻率为 $18.2\text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$ 超纯水;曲安奈德,质量分数 $\geq 97.0\%$;地塞米松、雌二醇,质量分数 $\geq 97.5\%$;泼尼松、醋酸泼尼松龙、丙酸倍氯米松、睾丸酮、醋酸可的松、甲基睾丸酮、醋酸地塞米松、雌酮、己烯雌酚、丙酸氯倍他索、雌三醇、醋酸氢化可的松,质量分数 $\geq 99.0\%$;氢化可的松、泼尼松龙、倍他米松、孕酮,质量分数 $\geq 99.5\%$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

使用前分别准确称取适量激素标准品,用乙腈分别配制成质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。根据需要再用乙腈逐级稀释成不同质量浓度的系列混合标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理

准确称取化妆品试样 0.5 g (准确至 0.02 g) 于 50.0 mL 聚四氟乙烯离心管中,移入 20.0 mL 甲醇^[1-3],超声提取 20.0 min 以 $14\,000\text{ r/min}$ 离心 10.0 min 准确移取上清液 10.0 mL 于刻度试管中,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹至近干,加入 $\varphi(\text{CH}_3\text{OH})=20\%$ 水溶液,定容至 2.0 mL ,在旋涡混合器上混合 2.0 min 待净化。

用 5.0 mL 甲醇活化 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱^[2-3]后,再用 5.0 mL 水平衡,当溶剂液面到达小

柱吸附层表面时,将待净化液加入固相萃取小柱,先用 4.0 mL 水淋洗,再用 6.0 mL 甲醇洗脱,使液滴逐滴流下。收集洗脱液,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹至近干,加入乙腈,定容至 2.0 mL 。在旋涡混合器上混合 2.0 min 过 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,待测。

1.2.3 色谱操作条件

液相色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB- C₁₈ ($50\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$);流动相: 乙腈-水,梯度洗脱;流速: 0.3 mL/min ;柱温: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量: $2.0\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.2.4 质谱条件

电喷雾离子源;毛细管电压 4.0 kV ;喷雾器压力 $2.8959\times 10^5\text{ Pa}$ 干燥器流速 10 L/min 干燥器温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$;多反应监测(MRM)模式。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理

化妆品样品含有一定的油脂、蜡质,在用溶剂对残留于这些样品中的激素进行提取时不可避免地会将油脂、蜡质等物质也提取出来,从而对检验结果造成干扰,并影响分析仪器的性能、寿命。作者通过实验发现,乙腈和甲醇均可作为化妆品样品激素残留测定的提取溶剂,但乙腈和甲醇相比,价格贵一些,且浓缩时间长,并且由于其极性较强,对化妆品中其他极性物质也有较强的提取能力,从而增加了后面净化过程的难度。故采用甲醇做提取剂对化妆品中多种激素残留进行提取,得甲醇提取液。用 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱对提取液进行净化,结果表明,该净化技术能很好地除去样品中油脂、蜡质以及一些极性物质对检验仪器、分析结果的干扰、影响。

2.2 流动相及洗脱条件的优选

在色谱柱上,分别考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈- 10 mmol/L 乙酸铵水溶液、甲醇- 10 mmol/L 乙酸铵水溶液等流动相体系对多种激素的分离效果,结果表明,采用乙腈-水流动相体系梯度洗脱有利于多种激素的分离。为了改善泼尼松龙、泼尼松和氢化可的松的分离,同时使雌三醇的保留时间适当延长,乙腈起始比例不能太高,经过实验,最终确定了如下梯度洗脱条件: $0\sim 10.0\text{ min}$ 乙腈体积分数(下同)由 18% 线性增加到 38% ; $10.0\text{ min}\sim 12.0\text{ min}$ 乙腈由 38% 线性增加到 48% ; $12.0\text{ min}\sim 14.0\text{ min}$ 乙腈由 48% 线性增加到 68% ; $14.0\text{ min}\sim 16.0\text{ min}$ 乙腈由 68% 线性增加到 95% ,保持 1.0 min ; $17.0\text{ min}\sim 17.5\text{ min}$ 乙腈由 95% 线性降低到 18% ,保持 2.5 min 。

2 3 质谱条件的选择

ESI+ 和 ESI- 作为离子化模式进行质谱条件的优化。
分析条件参数见表 1。

根据待检激素化合物的化学电离性质, 分别选用

表 1 多种激素的质谱分析参数

Tab 1 Analysis results of 19 kinds of hormones by liquid chromatography together with mass spectrometry

序号	激素名称	t(保留) /min	监测离子对	碎裂电压 /V	碰撞能量 /eV	离子化方式
1	雌三醇	4.109	287.3>171.1	160	38	ESI-
			287.3>159.2	160	45	
2	泼尼松龙	6.550	361.1>343.0	130	3	ESI+
			361.1>147.2	130	25	
3	泼尼松	6.585	359.0>341.3	140	3	ESI+
			359.0>147.0	140	35	
4	氢化可的松	6.719	363.1>327.3	140	8	ESI+
			363.1>121.0	140	30	
5	倍他米松	8.949	393.0>373.0	140	3	ESI+
			393.0>355.0	140	5	
6	地塞米松	9.127	393.3>373.3	120	5	ESI+
			393.3>355.0	120	10	
7	曲安奈德	10.108	435.3>397.1	100	18	ESI+
			435.3>213.3	100	30	
8	醋酸泼尼松龙	10.739	403.3>385.4	120	10	ESI+
			403.3>289.3	120	10	
9	醋酸氢化可的松	10.993	405.3>327.2	80	10	ESI+
			405.3>309.1	80	12	
10	雌二醇	11.663	271.4>183.0	160	38	ESI-
			271.4>145.0	160	52	
11	醋酸可的松	11.904	403.2>343.2	120	20	ESI+
			403.2>163.0	120	30	
12	睾丸酮	12.012	289.0>108.7	110	20	ESI+
			289.0>96.8	110	25	
13	甲基睾丸酮	13.197	303.1>285.1	120	15	ESI+
			303.1>97.0	120	30	
14	醋酸地塞米松	13.391	435.3>291.1	100	18	ESI+
			435.3>147.1	100	28	
15	雌酮	13.409	269.3>183.0	160	25	ESI-
			269.3>145.3	160	35	
16	己烯雌酚	14.825	267.3>251.1	140	22	ESI-
			267.3>237.1	140	26	
17	孕酮	16.484	315.4>297.2	120	10	ESI+
			315.4>109.1	120	30	
18	丙酸氯倍他索	16.529	467.3>355.1	120	18	ESI+
			467.3>146.9	120	32	
19	丙酸倍氯米松	17.158	522.1>504.0	120	10	ESI+
			522.1>320.0	120	10	

在正离子和负离子模式下分别进行全扫描以选择适当的电离方式和分子离子峰。实验结果表明, 糖皮质激素、雄激素和孕激素在离子源 ESI+ 电离方式下, 可获得较高丰度的 $[M+H]^+$ 母离子, 雌激素在离子源 ESI- 电离方式下, 可获得较高丰度的 $[M-H]^{-[3-4]}$ 。在确定各激素的母离子后, 采用子离子扫描方式对子

离子进行了优化选择, 确定了定量离子和辅助定性离子。通过优化毛细管电压、去溶剂气温度、去溶剂气流量、碰撞气压力、碎裂电压、碰撞能量及质谱分辨率等质谱参数, 使得待检激素的分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度达到最大。多种激素的总离子流图见图 1。

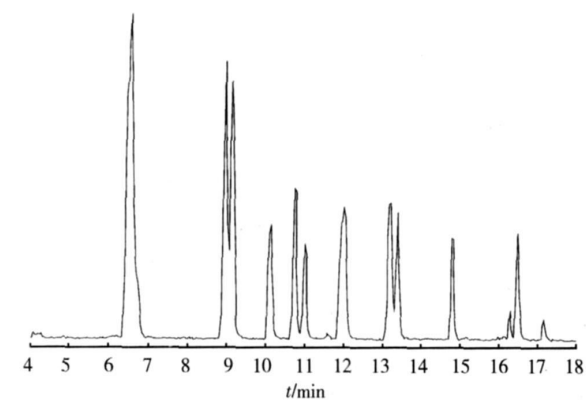


图 1 多种激素的总离子流图
Fig 1 TIC of various hormones

2 4 线性方程和方法检出限以及方法的精密度和回收率

用配制好的标准溶液 (0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L) 按照 1.2.2 条件进行测定, 用质量浓度 - 峰面积计算其线性方程和相关系数, 以 3 倍信噪比确定各激素的检出限。数据见表 2。对空白化妆品添加不同浓度标准溶液进行添加回收率和精密度实验。添加 3 个水平, 每个添加水平重复 6 次, 分别计算平均添加回收率和相对标准偏差。其数据也列于表 2。

表 2 线性方程、检出限、平均添加回收率和相对标准偏差
Tab 2 Regression equation, R^2 , limit of detection, recovery and RSD

序号	名称	线性方程	R^2	LOD /mg·kg ⁻¹	平均加标 回收率 /%	RSD /%
1	雌三醇	$y = 2167.3x - 103.86$	0.9947	0.8	77.22	9.34
2	泼尼松龙	$y = 43314x + 4919.2$	0.9842	0.002	76.65	4.43
3	泼尼松	$y = 10738x + 1247.1$	0.9936	0.008	76.65	3.02
4	氢化可的松	$y = 7482.9x + 833.24$	0.9953	0.01	94.14	3.96
5	倍他米松	$y = 15331x + 2211.3$	0.9937	0.005	72.31	3.59
6	地塞米松	$y = 16352x + 2041.3$	0.9931	0.005	79.39	3.98
7	曲安奈德	$y = 8883.6x + 1986.6$	0.9943	0.005	89.58	4.92
8	醋酸泼尼松龙	$y = 12262x + 1905.3$	0.9921	0.005	80.48	2.66
9	醋酸氢化可的松	$y = 11183x + 631.13$	0.9916	0.01	93.53	3.36
10	雌二醇	$y = 610.60x + 16.418$	0.9979	0.3	86.38	11.34
11	醋酸可的松	$y = 8098.8x + 318.26$	0.9968	0.015	81.06	3.17
12	睾酮	$y = 8077.9x + 2469.7$	0.9919	0.04	89.60	4.32
13	甲基睾酮	$y = 15764x + 2190.1$	0.9987	0.04	77.73	2.57
14	醋酸地塞米松	$y = 5504.8x + 615.85$	0.9908	0.012	73.01	2.43
15	雌酮	$y = 6200.0x - 348.97$	0.9951	0.32	94.95	4.74
16	己烯雌酚	$y = 10869x - 296.23$	0.9998	0.008	97.89	2.24
17	孕酮	$y = 7577.4x + 653.67$	0.9949	0.007	90.91	7.00
18	丙酸氯倍他索	$y = 1239.0x + 442.60$	0.9947	0.14	76.56	10.11
19	丙酸倍氯米松	$y = 1441.1x + 116.49$	0.9951	0.11	79.95	10.15

3 结语

建立的对化妆品中雌激素、雄激素、孕激素和糖皮质激素等残留量的液相色谱 - 串联质谱测定方法, 前处理简单, 操作方便, 线性范围较宽, 检出限低 (0.002 mg/kg~ 0.8 mg/kg), 精密度和准确度好 (加标平均回收率为 72.31% ~ 97.89%, 相对标准偏差为 2.24% ~ 11.34%), 符合实验室对化学污染物残留测定方法的要求, 可应用于化妆品样品中上述激素残留量的测定。

参考文献:

[1] 马强, 王超, 王星, 等. 超高效液相色谱法同时测定化妆品中的 15 种激素 [J]. 色谱, 2007, 25(4): 541 - 545
[2] 王超, 马强, 王星. 反相高效液相色谱法同时测定化妆品中 16 种激素 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 654 - 655
[3] 王超, 马强, 王星, 等. 液相色谱 - 串联质谱法同时测定化妆品中的 16 种激素 [J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1257 - 1262
[4] 陈慧华, 应永飞, 吴平谷, 等. 液相色谱 - 串联质谱同时测定动物组织中 22 种同化激素 [J]. 分析化学, 2009, 37(2): 181 - 186