

高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中的 欧前胡素和异欧前胡素

陈捷^{1*}, 徐娟¹, 熊莉华²

(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623;

2. 广州市中小学卫生保健所, 广东 广州 510180)

摘要 建立了化妆品中欧前胡素和异欧前胡素的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定与确证方法。样品经甲醇提取,以 C_{18} 柱为分离柱,10 mmol/L 乙酸铵/甲醇溶液-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(80:20, v/v)为流动相分离,采用电喷雾串联四极杆质谱进行检测。欧前胡素和异欧前胡素在 0.25 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 内线性良好(相关系数大于 0.999),方法定量限(LOQ)为 0.50 mg/kg。在 0.50 ~ 10.0 mg/kg 内,欧前胡素和异欧前胡素的回收率范围分别为 82.2% ~ 105% 和 80.0% ~ 103%,相对标准偏差分别为 2.7% ~ 4.9% 和 1.8% ~ 4.6%。该方法能够满足化妆品中欧前胡素和异欧前胡素检测的需要。

关键词 高效液相色谱-串联质谱 欧前胡素 异欧前胡素 化妆品

中图分类号 O658

文献标识码 A

文章编号 1000-8713(2011)05-0454-04

Determination of imperatorin and isoimperatorin in cosmetics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Jie^{1*}, XU Juan¹, XIONG Lihua²

(1. Technology Center of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;

2. Health Center of Guangzhou Primary and Middle Schools, Guangzhou 510180, China)

Abstract: A novel method for the simultaneous determination of imperatorin and isoimperatorin in cosmetics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed. The imperatorin and isoimperatorin were extracted by methanol. The analytes were separated on a C_{18} column using 10 mmol/L ammonium acetate/methanol-5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (80:20, v/v) as mobile phase, and then detected by HPLC-MS/MS using multiple reaction monitoring (MRM) mode. The good linearities ($r > 0.999$) were achieved for the target compounds over the range of 0.25 – 20 $\mu\text{g/L}$. The limits of quantification (LOQs) were 0.5 mg/kg. The recoveries for the imperatorin and isoimperatorin varied from 82.2% to 105% and 80.0% to 103% with the relative standard deviations ranging from 2.7% to 4.9% and 1.8% to 4.6% respectively in the range of 0.50 – 10.0 mg/kg. The method can meet the requirements for the simultaneous determination of imperatorin and isoimperatorin in cosmetics.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); imperatorin; isoimperatorin; cosmetics

欧前胡素(imperatorin)和异欧前胡素(isoimperatorin)是中药白芷中的有效活性成分,具有镇静、解痉、平喘、消炎、抗菌作用,此外异欧前胡素还

有抗癌作用,可用于治疗白癜风和银屑病,也广泛应用于抗过敏、抗炎、镇痛以及抗心脑血管疾病的药物中^[1]。欧前胡素和异欧前胡素是一种光毒活性物

* 通讯联系人 陈捷,高级工程师. Tel: (020)38290339, E-mail: cjciq@yahoo.com.cn.

基金项目 检验检疫行业标准制定计划(No. 2009B093).

收稿日期 2010-12-27

质,当其通过皮肤进入体内后,一旦受到日光或紫外线照射,则可使受照射处皮肤发生光毒性或光敏性皮炎,使受照射部位红肿,色素增加,表皮增厚等,因而在《化妆品卫生规范》(2007 年版)中将欧前胡素和异欧前胡素列为禁用物质。随着社会的发展,化妆品的安全性问题越来越引起人们的重视,一些特殊用途的化妆品为了追求美白或祛痘功效而非法添加白芷,但白芷中含有的欧前胡素和异欧前胡素因其毒性而对使用者的健康产生巨大的威胁。为了维护广大消费者的利益,非常有必要建立一个化妆品中欧前胡素和异欧前胡素的测定方法,为进出口化妆品的安全评价提供科学依据。

目前国内外报道对白芷中欧前胡素和异欧前胡素的测定方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[2-7]、高效毛细管电泳法^[8]、薄层色谱扫描法^[9]、气相色谱-质谱法^[10,11] 以及毛细管电色谱法^[12],化妆品中的欧前胡素和异欧前胡素的检测在国内仍未见报道。本文采用快速、稳定的样品提取技术处理样品,建立了化妆品中欧前胡素和异欧前胡素的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

日本岛津公司液相色谱 (UFLC LC20A) ;美国 AB Sciex 公司三重串联四极杆质谱联用仪 (API Qtrap 4000),配有电喷雾离子源 (ESI) ;水浴超声波发生装置 (德国,SW30H) ;低温离心机 (德国 Sigma 3-16PK) ;高速离心机 (德国 Sigma 1-14) ;涡旋振荡器 (德国 IKA MS3 basic,) ;电子天平 (德国 Sartorius,精确至 0.001 g)。

欧前胡素和异欧前胡素标准品购自 Sigma 公司,纯度均为 98%。用甲醇分别配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,在 -18℃ 避光保存。甲醇,色谱纯。乙酸铵,分析纯。实验用化妆品 :润肤霜 (法国 Labroatoires Ingrid Millet),精华露 (宝洁公司),洁面乳 (宝洁公司),爽肤水 (瑞士都尔化妆品公司),面膜 (瑞士科丽妍公司)。

1.2 提取与净化

称取试样 1 g (精确至 0.001 g) 置于 50 mL 离心管中,加入 10.0 mL 甲醇,涡旋振荡 2 min,45℃ 水浴超声 30 min,于 -5℃ 下 4 500 r/min 离心 10 min,吸取上清液于具塞离心管中。

将上清液置于 -18℃ 下冷冻 2 h 后,在冷冻状态下快速吸取 1.0 mL 冷冻清液置于刻度试管中,

用甲醇-水 (80:20, v/v) 定容到 2.0 mL,摇匀。稀释液在 12 000 r/min 下离心 5 min,上清液过 0.2 μm 滤膜,收集滤液于具塞试管中,再吸取滤液 100 μL,用甲醇-水 (80:20, v/v) 定容到 10.0 mL,供 HPLC-MS/MS 测定。

1.3 测定

1.3.1 色谱条件

色谱柱 :Waters SunFire™ C₁₈ 柱 (3.5 μm, 10 cm × 2.1 mm)。流动相 :10 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液-5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (80:20, v/v)。流速 :0.25 mL/min。柱温 40℃。进样量 :10 μL。

1.3.2 质谱条件

离子源为 ESI,正离子扫描,多反应监测 (MRM),雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气。各种气体压力如下 :气帘气 (CUR) 206.85 kPa (30 psi),雾化气 (GS1) 344.75 kPa (50 psi),辅助加热气 (GS2) 413.70 kPa (60 psi),碰撞气 (CAD) Medium。电喷雾电压 (IS) 5 000 V,离子源温度 (TEM) 500℃,采集时间 100 ms,去簇电压 (DP) 40 V,碰撞室入口电压 (EP) 10 V,碰撞室出口电压 (CXP) 4 V。欧前胡素和异欧前胡素的定性离子对、定量离子对、碰撞能量 (CE) 见表 1。

表 1 欧前胡素和异欧前胡素的多反应监测条件
Table 1 HPLC-MS/MS MRM conditions for
imperatorin and isoimperatorin

Compound	t _R /min	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE/V
Imperatorin	2.2	271.2	203.1 *	17
			147.1	43
Isoimperatorin	2.9	271.1	203.1 *	17
			147.1	43

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

欧前胡素和异欧前胡素属呋喃香豆素类化合物,极性较小,在反相色谱柱上的保留性质较好。以甲醇-水 (80:20, v/v) 为流动相,比较了几种如 SunFire™ C₁₈, Discovery, Supelco 和 Synergi Fusion-RP80A 等 C₁₈ 反相色谱柱的分离效果。不同厂商的 C₁₈ 柱因为碳含量、残余硅醇基封尾情况的差异,色谱峰形也不完全相同。实验表明,SunFire™ C₁₈ 反相色谱柱更适合于欧前胡素和异欧前胡素的分离。

虽然欧前胡素和异欧前胡素极性较小,但还是具有一定的极性,在 C₁₈ 柱上峰形比较宽;当水的比例增大时,流动相的极性随之增强,欧前胡素和异欧前胡素的峰形会变得更宽,灵敏度明显下降。通过

实验,选择了有机相/水相比比例为 8:2 作为流动相,流速为 0.25 mL/min 在此条件下,欧前胡素和异欧前胡素在 C_{18} 柱上的保留时间约为 2 min,峰形较窄。在流动相优化过程中,比较了甲醇-水、乙腈-水,以及它们与乙酸铵的复配溶液,结果表明,用 10 mmol/L 乙酸铵/甲醇溶液-5 mmol/L 乙酸铵溶液 (80:20, v/v) 做流动相时,有利于欧前胡素和异欧前胡素的电离,响应值较高,且达到基线分离。

2.2 MS/MS 特征诊断离子的选择

分别以正电离模式的 $[M+H]^+$ 和负电离模式的 $[M-H]^-$ 对欧前胡素和异欧前胡素进行 Q1 分子离子全扫描,结果表明,欧前胡素和异欧前胡素在正电离模式下有很高的响应(见图 1)。

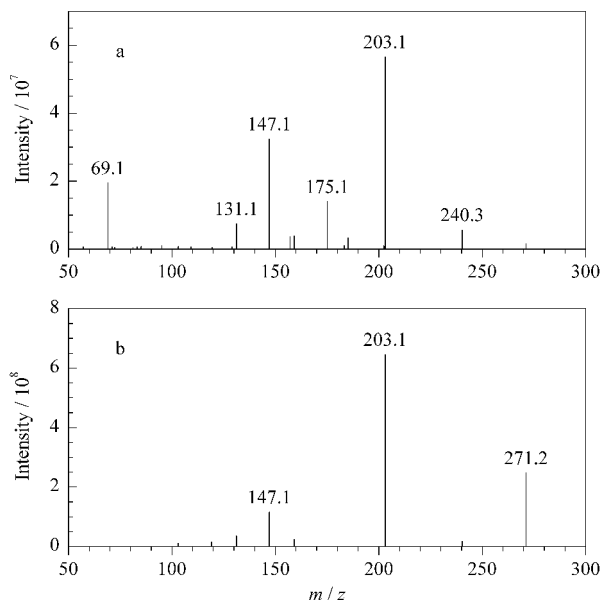


图 1 (a) 欧前胡素的准分子离子 $[M+H]^+$ 及 (b) 异欧前胡素的准分子离子 $[M+H]^+$ 的子离子全扫描质谱图

Fig. 1 Full scan product ion spectra of (a) imperatorin parent ion $[M+H]^+$ and (b) isoimperatorin parent ion $[M+H]^+$

根据图 1 确定了欧前胡素和异欧前胡素在多反应监测模式下信号采集的特征离子对,并对与化合物相关的有关参数进行了优化,见表 1,两种化合物的 HPLC-MS/MS 多反应监测色谱图见图 2。

2.3 样品前处理

具有美白或去痘功效的化妆品主要可分为膏状、乳霜和水剂等 3 大类,膏状和乳霜类化妆品中含油脂较多,实验过程中发现,化妆品中的油脂对仪器污染严重,检测灵敏度下降很快,且基质效应也很严重,因此在样品前处理过程中应尽可能除去。根据欧前胡素和异欧前胡素易溶于氯仿,可溶于苯、乙醇、乙醚,溶于热水,不溶于冷水,脂溶性较高,极性

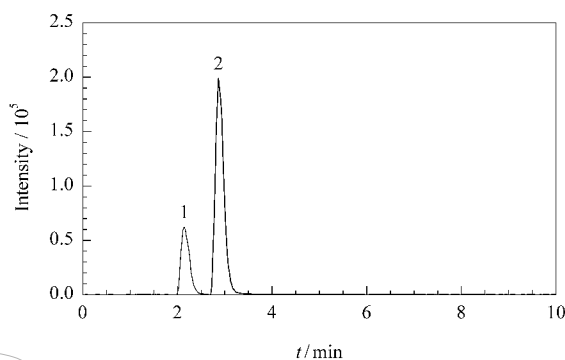


图 2 欧前胡素和异欧前胡素的 HPLC-MS/MS 多反应监测色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of imperatorin and isoimperatorin

Peaks: 1. imperatorin; 2. isoimperatorin.

较小等物理性质,选择了甲醇为萃取溶剂进行提取。涡旋振荡,45 ℃ 水浴超声 30 min,使欧前胡素和异欧前胡素被甲醇充分提取。在 -5 ℃ 下离心,弃去沉淀,之后,上清液放入 -18 ℃ 冷冻 2 h,使油脂及一些杂质析出,得到初步净化的甲醇提取液。

由于流动相为甲醇-水系统,化妆品的甲醇提取液遇到水相后,一些在水中溶解度低的物质会析出,造成色谱柱堵塞,所以采用流动相将甲醇提取液先稀释 2 倍(由于溶液极性的改变,会有一些杂质析出),然后在 12 000 r/min 离心 5 min,过 0.2 μm 滤膜,得到进一步净化的样液,再将该净化样液用流动相稀释 100 倍,得到待测样品溶液。实验中分两步稀释的目的不同,前者是进一步消除杂质,后者主要是消除样品的基质效应。

2.4 定性测定

将标准溶液及样品溶液进行测定,如果样品溶液在与标准溶液相同的保留时间有峰出现,则对其进行确证分析。若被测物的质量色谱峰保留时间与标准物质相一致,并且在扣除背景后的样品谱图中,所选择的离子均出现;Q1/Q3 特征离子对的信噪比不小于 3;同时所选择离子的相对丰度与相近浓度标准物质相关离子的相对丰度一致,被确证的样品可判定为阳性检出。

2.5 线性关系和定量限(LOQ)

配制系列混合标准溶液,在前述 HPLC-MS/MS 方法的 MRM 监测模式下进行分析,以组分的峰面积(Y)对其质量浓度(X, μg/L)作图,得到欧前胡素的线性方程为 $Y = 6.6 \times 10^4 X + 168$, $r = 0.9999$,异欧前胡素的线性方程为 $Y = 2.15 \times 10^5 X + 124$, $r = 1.0000$,欧前胡素和异欧前胡素在 0.25 ~ 20 μg/L 内均呈良好的线性关系。当样品溶液中目标

组分被检出且浓度超出此线性范围时,需要适当稀释至此线性范围内。根据线性关系、仪器灵敏度和回收率数据确定欧前胡素和异欧前胡素的定量限(LOQ,信噪比(S/N) ≥ 10)均为 0.5 mg/kg。

2.6 方法的回收率和精密度

分别对润肤霜、精华露、洁面乳、爽肤水、面膜样品做添加回收试验,欧前胡素和异欧前胡素的添加

水平分别为 0.500, 1.00 和 10.0 mg/kg。每个添加水平做 6 个平行样,按照前述方法进行测定,实验结果见表 2。本方法在 3 个添加水平下,欧前胡素和异欧前胡素的平均回收率范围分别为 82.2% ~ 105% 和 80.0% ~ 103%,相对标准偏差(RSD)分别为 2.7% ~ 4.9% 和 1.8% ~ 4.6%;表明本方法满足化妆品中欧前胡素和异欧前胡素的测定要求。

表 2 空白基质中两种被测物的回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Spiked recoveries and RSDs (precisions) for two analytes in different matrices ($n=6$)

Sample	Spiked/ (mg/kg)	Imperatorin				Isoimperatorin			
		Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %	Range of recovery/%	Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %	Range of recovery/%
Cream	0.500	0.450	89.9	2.7	86.6 ~ 93.6	0.421	84.2	3.7	80.0 ~ 89.0
	1.00	0.928	92.8	4.0	89.8 ~ 99.1	0.936	93.6	2.3	91.4 ~ 97.6
	10.0	9.634	96.3	3.2	92.5 ~ 101	9.627	96.3	3.6	92.6 ~ 102
Mask	0.500	0.489	97.8	4.7	91.2 ~ 104	0.449	89.8	1.8	87.8 ~ 91.8
	1.00	0.992	99.2	4.2	92.0 ~ 104	0.911	91.1	4.4	87.3 ~ 96.1
	10.0	9.891	98.9	4.2	94.7 ~ 105	9.640	96.4	4.3	91.7 ~ 102
Cleanser	0.500	0.441	88.3	4.4	82.2 ~ 93.2	0.452	90.4	4.6	85.0 ~ 95.6
	1.00	0.874	87.4	4.1	84.1 ~ 93.1	0.953	95.3	3.1	91.0 ~ 98.0
	10.0	9.536	95.4	3.3	90.7 ~ 99.6	9.592	95.9	3.1	91.5 ~ 99.2
Toner	0.500	0.483	96.5	4.6	91.0 ~ 104	0.437	87.3	4.0	84.2 ~ 91.8
	1.00	0.951	95.1	3.8	91.0 ~ 100	0.848	84.8	1.8	83.3 ~ 86.7
	10.0	9.741	97.4	4.9	90.1 ~ 104	9.579	95.8	3.6	90.1 ~ 99.9
Essence	0.500	0.454	90.7	4.3	86.0 ~ 97.4	0.475	95.1	2.5	91.4 ~ 98.4
	1.00	0.878	87.8	4.5	83.1 ~ 94.3	0.993	99.3	3.4	94.7 ~ 103
	10.0	9.533	95.3	4.3	90.7 ~ 101	9.430	94.3	3.7	90.4 ~ 99.1

2.7 方法的应用

应用本方法对计划监控化妆品中的润肤霜、精华露、洁面乳、爽肤水、面膜等样品进行测定,结果在所检样品中均未检出欧前胡素和异欧前胡素。

3 结语

本研究建立了化妆品中欧前胡素和异欧前胡素的 HPLC-MS/MS 测定方法,该法重现性良好,操作简便、结果准确。运用本方法对化妆品进行检测,能够为进出口化妆品的安全评价提供科学的依据。

参考文献:

[1] Jiang G H, Zhang L M, Ma Y Y, et al. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (蒋桂华, 张绿明, 马逾英, 等. 时珍国医国药), 2008, 19(11):2718

[2] Suo J L, Shen F, Qiao T. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine (索建兰, 沈峰, 乔婷. 陕西中医), 2010, 31(1):93

[3] Zheng C Y, Xia Y J, Xu C Q. West China Journal of Pharmaceutical (郑翠英, 夏艳姣, 徐超群. 华西药理学杂志), 2008, 23(6):683

[4] Hu H J, Lou Z H, Lü G Y, et al. Journal of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine (胡华杰, 楼招欢, 吕圭源, 等. 浙江中医药大学学报), 2010, 34(3):418

[5] Jia M R, Wang M Y, Jin Q M, et al. West China Journal of Pharmaceutical (贾敏如, 王梦月, 金曲嫫, 等. 华西药理学杂志), 2003, 18(5):361

[6] Liu R M, Li A F, Sun A L. J Chromatogr A, 2004, 1052(1/2):223

[7] Li H B, Lai J P, Jiang Y, et al. J Chromatogr A, 2002, 943(2):235

[8] Wang K T, Liu H T, Chen X G, et al. Talanta, 2001, 54(4):753

[9] Zhang L Y, Ren Y C, Zhong Z Q, et al. Information on Traditional Chinese Medicine (张丽英, 任艳春, 仲昭庆, 等. 中医药信息), 2002, 19(4):24

[10] Li L, Li Z L, He Y X, et al. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (李玲, 李祖伦, 何宇新, 等. 时珍国医国药), 2009, 20(2):306

[11] Liu H M, Zhang M X. China Journal of Chinese Materia Medica (刘红梅, 张明贤. 中国中药杂志), 2004, 29(3):241

[12] Wang J J, Chen Z, Wu Y T, et al. Chinese Journal of Chromatography (王佳静, 陈昭, 吴玉田, 等. 色谱), 2010, 28(3):240