

【化学测定方法】

液相色谱 - 串联质谱法同时测定化妆品中的甲基异噻唑啉酮和甲基氯异噻唑啉酮

简龙海, 闻宏亮, 孙健, 王柯, 季申

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立超高效液相色谱 - 电喷雾离子化 - 三重四极杆串联质谱法(UPLC - ESI - MS/MS)同时测定化妆品中的甲基异噻唑啉酮(MIT)和甲基氯异噻唑啉酮(CIT)。方法: 样品以甲醇为溶剂, 涡旋混匀后超声提取, 12000 rpm、4℃离心 10 min, 上清液再经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 滤液经 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(10 cm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离后, 以正离子、多反应监测(MRM)模式进行定性定量分析。结果: MIT 和 CIT 的线性范围分别为 32.0 ng/ml ~ 800 ng/ml 和 47.6 ng/ml ~ 952 ng/ml, 相关系数均大于 0.995, 回收率均在 85% ~ 115% 之间, 精密度均小于 12%。结论: 该方法灵敏、专属、准确, 可用于化妆品中 MIT 和 CIT 的检测。

[关键词] 甲基异噻唑啉酮; 甲基氯异噻唑啉酮; LC - MS/MS; 化妆品; 防腐剂

[中图分类号] O657.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004 - 8685(2011)11 - 2652 - 03

Simultaneous determination of methylisothiazolinone and chloromethylisothiazolinone in cosmetics by LC - MS/MS

JIAN Long - hai, WEN Hong - liang, Sun Jian, WANG Ke, JI Shen

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a ultra performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometric method (UPLC - ESI - MS/MS) for the determination of methylisothiazolinone and chloromethylisothiazolinone in cosmetics. **Methods:** Cosmetic samples were extracted ultrasonically with methanol and the extracted solution was centrifugated (12000 rpm and 4℃, 10 min). The supernatant was filtered with 0.22 μm filter membrane and the filtrate was separated by ACQUITY UPLC BEH C18 column (10 cm × 2.1 mm, 1.7 μm). The analytes were detected by ESI - MS/MS in positive mode. **Results:** Calibration curves were linear in the range of 32.0 ng/ml ~ 800 ng/ml for methylisothiazolinone and 47.6 ng/ml ~ 952 ng/ml for chloromethylisothiazolinone, both with the correlation coefficient bigger than 0.995. The recoveries were both in the range of 85% ~ 115% with the precision (RSD) both less than 12%. **Conclusion:** The method is sensitive, specific and accuracy for the quantitative determination of methylisothiazolinone and chloromethylisothiazolinone in cosmetics.

[Key words] Methylisothiazolinone; Chloromethylisothiazolinone; LC - MS/MS; Cosmetics; Preservatives

甲基异噻唑啉酮(MIT)和甲基氯异噻唑啉酮(CIT)为化妆品中常用的广谱杀菌防腐剂,但人体皮肤接触高浓度的 MIT、CIT 可引起过敏性皮炎^[1]。因此有必要对化妆品中 MIT、CIT 的浓度进行严格控制。目前我国《化妆品卫生规范》(2007 年版)规定 MIT、CIT 为限用物质^[2],检测方法为 HPLC 法^[2],但该方法灵敏度低,且容易受到干扰,往往不能满足分析要求。文献关于化妆品中 MIT、CIT 的测定方法主要有 HPLC 法^[3-8]、GC 法^[9]等,但尚未见到关于化妆品中 MIT、CIT 的 LC - MS/MS 测定方法的报道。本文建立了 UPLC - ESI - MS/MS 法同时测定化妆品中 MIT、CIT 的含量,灵敏度高,专属性强,更能满足具复杂成分的化妆品的检测要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配备二元泵、柱温箱、自动进样器); API 4000 型串联四极杆质谱仪(美国 AB 公司);超声波清洗器[必能信超声(上海)有限公司];超纯水器(美国 Millipore 公司)。卡松(Kathon CG)标准溶液(SUPELCO 公司,批号 LB74430,含 MIT 0.40%,含 CIT 1.19%);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);实验用水为 Millipore 纯化水。

1.2 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(10 cm × 2.1 mm, 1.7 μm; 美国 Waters 公司)。流动相: 乙腈(A)与 0.1% 甲酸水溶液(B)。梯度洗脱程序: 0 min ~ 3 min, 10% A → 30% A; 3.0 min ~ 3.5 min, 30% A → 90% A; 3.5 min ~ 5.5 min, 90% A; 5.5 min ~ 6.5 min, 90% A → 10% A; 6.5 min ~

【作者简介】 简龙海(1978 -),男,硕士,主管药师,主要从事食品、药品检测工作。

10.0 min, 10% A。流速: 0.3 ml/min。进样体积: 3 μ l。

1.3 质谱条件

ESI 源, 正离子模式; 检测方式: MRM。碰撞气压力 (CAD): 3 psi; 气帘气压力 (CUR): 15 psi; 雾化气压力 (GS1): 50 psi; 去溶剂气压力 (GS2): 35 psi; 去溶剂温度 (TEM): 500 $^{\circ}$ C; 喷雾电压 (IS): 5500V; 去簇电压 (DP): 55 V; (射入电压) EP: 10 V; 碰撞室出口电压 (CXP): 12 V。MIT: m/z 116.0 \rightarrow 101.0 [定量离子, 碰撞能量 (CE): 30 V], m/z 116.0 \rightarrow 70.9 (CE: 24 V); CIT: m/z 150.0 \rightarrow 114.9 (定量离子, CE: 27 V), m/z 150.0 \rightarrow 86.9 (CE: 50 V)。离子对驻留时间 (Dwell): 50 ms。

1.4 标准储备溶液的制备

准确称取卡松标准溶液 200.00 mg 于含有 3 ml 甲醇的 10 ml 量瓶中, 用甲醇定容, 得 MIT 浓度为 80.0 μ g/ml、CIT 浓度为 238.0 μ g/ml 的混合标准储备溶液, 于 -18 $^{\circ}$ C 下保存。

1.5 样品前处理

称取 1.00 g 样品于 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 甲醇, 充分涡旋混匀, 超声 15 min 后, 于 12000 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 滤液供 UPLC-MS/MS 分析。

1.6 标准曲线的制备

取空白样品, 同“样品前处理”项下方法制备空白溶液。取标准储备溶液, 用空白溶液稀释, 制成分别含 MIT 3.20 ng/ml、16.0 ng/ml、32.0 ng/ml、80.0 ng/ml、160 ng/ml、320 ng/ml、800 ng/ml, 含 CIT 9.52 ng/ml、47.6 ng/ml、95.2 ng/ml、238 ng/ml、476 ng/ml、952 ng/ml、2380 ng/ml 的系列标准工作溶液, 分别进行 UPLC-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

取标准溶液, 分别以大气压化学离子化源 (APCI 源) 和 ESI 源考察 MIT 和 CIT 的响应, 结果两个待测物在两种源中均有较好的响应, 但以 APCI 源测定某些样品时, CIT 的峰形变胖或分叉; 以 ESI 源测定时则峰形良好。故选择 ESI 源进行分析。

取标准溶液以注射泵连续注射方式进行母离子扫描, 确定 m/z 116.0、 m/z 150.0 分别为 MIT 和 CMIT 的 $[M+H]^+$ 峰。以 $[M+H]^+$ 峰为母离子, 进行子离子扫描。选取响应高、干扰小的两个子离子, 以 MRM 方式对 CE、DP、气流压力等质谱参数进行优化。

2.2 色谱柱的选择

考察了 Waters 公司的 BEH C18 柱 (10 cm \times 2.1 mm, 1.7 μ m)、BEH HILIC 柱 (10 cm \times 2.1 mm, 1.7 μ m)、HSS T3 柱 (10 cm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 和 Agilent 公司的 SB-C18 柱 (10 cm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 对 MIT、CIT 的分离效果, 结果 HILIC 柱对两种化合物的保留效果均较差; CIT 在 HSS T3 柱上的峰形拖尾; BEH C18 柱与 SB-C18 柱的保留效果相类似, 峰形均较好 (色谱图见图 1)。

2.3 流动相的选择

分别以乙腈-10 mmol/L 甲酸铵溶液 (体积比为 6:4)、乙腈-0.1% 甲酸溶液 (体积比为 6:4) 为流动相进行等度洗脱测定, 结果: ①CIT 的峰形前延; ②含甲酸流动相的响应较高。故将等度洗脱改为梯度洗脱, 并分别以 0.02% 甲酸溶液、0.05% 甲酸溶液和 0.1% 甲酸溶液作为水相进行考察, 结果梯度洗脱的峰形对称, 柱效高; 甲酸浓度增大, 响应增强, 但甲酸浓度大

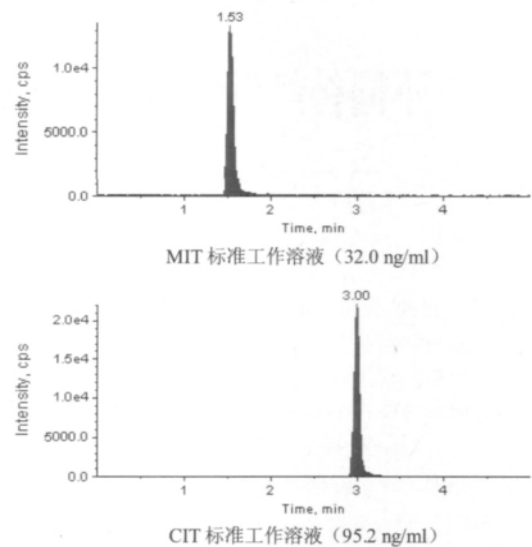


图 1 MIT 和 CIT 的 MRM (定量离子) 色谱图 (BEH C18 柱)

于等于 0.05% 时, 响应不再增强。故采用乙腈-0.1% 甲酸溶液作为流动相, 采用梯度洗脱进行测定。

2.4 提取溶剂的选择

MIT 与 CIT 均为极性化合物, 易溶于水、甲醇。对于化妆品中液体样品和膏、霜、露等半流体样品, 甲醇均能与之较好地混匀。文献采用的提取溶剂大多为甲醇。故最终选择甲醇作为提取溶剂。

2.5 线性范围和检出限 (LOD)

以浓度为横坐标, 待测物的峰面积为纵坐标, 以“1/X”为权重系数进行线性回归, 得回归方程: MIT $Y = 1990X - 13700$, $r = 0.9994$; CIT $Y = 1000X - 17400$, $r = 0.9993$ 。结果表明, MIT 和 CIT 分别在 32.0 ng/ml ~ 800 ng/ml、47.6 ng/ml ~ 952 ng/ml 范围内线性关系良好。在空白样品中添加不同量的 MIT 和 CIT, 按前处理方法处理后按浓度由高至低测定, 直至获得信噪比 (S/N) 约等于 3 的浓度, 以 S/N = 3 计算方法的 LOD, 结果 MIT 和 CIT 的 LOD 分别为 0.2 mg/kg、0.1 mg/kg。

2.6 回收率与精密度 (RSD) 试验

取 MIT 与 CIT 混合标准储备溶液, 用甲醇稀释至分别含 MIT 0.80 μ g/ml、含 CIT 2.380 μ g/ml 的混合标准溶液。取空白样品, 加入适量的 MIT 与 CIT 混合标准溶液, 制备 3 个浓度的加标样品, 一式 6 份, 按上述样品前处理方法处理后进行样分析。计算回收率和 RSD, 结果见表 1。

表 1 方法回收率与精密度试验结果 (n = 6)

化合物	加标浓度 (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	回收率 (%) ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)
MIT	20.0	18.3 ~ 22.2	101.2 \pm 9.8	9.7
	100	92.7 ~ 103.9	98.5 \pm 5.8	5.9
	700	667.1 ~ 706.5	98.6 \pm 3.3	3.3
CIT	59.5	52.9 ~ 64.8	99.4 \pm 10.5	10.6
	297.5	280.5 ~ 311.8	99.8 \pm 5.5	5.5
	856.8	844.8 ~ 900.8	102.2 \pm 3.6	3.5

(下转第 2667 页)

3 讨论

OSAHS 是引起高血压、冠心病、老年痴呆等心脑血管疾病的一种独立危险因素,而 DM 发病率也呈逐年上升趋势,这两种疾病均是引起劳动力丧失和致死的重要原因。近年 OSAHS 与胰岛素抵抗(IR)的关系逐渐受到重视,OSAHS 患者并发 DM 的关键在于 OSAHS 可诱发 IR,但其机制尚未阐明,OSAHS 所致的缺氧性损害、交感神经张力增高、脂质代谢紊乱、炎症因子水平增高等均可能参与其中^[3-5]。

leptin 是 ob 基因的表达产物,OSAHS 和 DM 患者的 leptin 水平均较高。有少数学者^[6]报道 OSAHS 与血浆 leptin 水平无相关关系,但国内外大部分研究均显示 OSAHS 患者的 AHI 与 leptin 呈正相关,提示 leptin 水平的升高可能与睡眠呼吸紊乱有关。大多数 OSAHS 患者同时存在 IR 和高 leptin 血症,而其 leptin 也随病情加重升高,OSAHS 患者 leptin 水平独立于年龄、肥胖外与空腹胰岛素水平、HOMA-IR 均呈正相关^[7]。因性别与 leptin 水平相关,而年龄与其不相关,因此我们全部选择了男性以排出性别因素的干扰。

既往只有少数短期(一周) nCPAP 治疗 OSAHS 合并 DM 的论著,但对此类患者长期治疗的疗效观察罕有报道。本研究显示,受试者在 6 个月 nCPAP 治疗前后尽管 BMI 无显著变化,但睡眠效率、AHI、LSaO₂ 等明显改善。nCPAP 目前在临床上已广泛应用于呼吸系统疾病和睡眠医学,特别是用于 OSAHS 治疗倍受重视。Ip 等^[8]曾报道单纯 OSAHS 患者通过 6 个月的 CPAP 治疗后,病情好转,升高的 leptin 明显下降。而本研究显示,合并 OSAHS 的 2 型 DM 患者在经 6 个月的 nCPAP 治疗后,HOMA-IR 指数明显下降,胰岛素的敏感性显著提高,FGB 和血清 leptin 水平明显降低,与文献结果比较一致。由此可见,原本由于夜间呼吸暂停或低通气所致的睡眠中断和间歇低氧会导致合并 OSAHS 的 2 型 DM 患者血糖出现波动,胰岛素敏感性降低,而在行 nCPAP 治疗后,中枢神经系统对低氧及高 CO₂ 的敏感性明显提高,神经系统的呼吸调节功能得到改善,也大大提高胰岛素敏感性。此外,本研究还显示,

通过 nCPAP 治疗可以有效的降低受试者的 HbA_{1c} 水平,糖化血红蛋白中的 HbA_{1c} 目前用于评价糖尿病控制程度的良好指标,所反映的是测定前 6~8 周的平均血糖水平。因此,我们推测 nCPAP 治疗能有效改善患者的血糖控制情况。

综上,我们发现 nCPAP 治疗可改善血氧饱和度和胰导素敏感性,使血糖得到纠正,血清 leptin 水平降低,病情缓解,此方法为合并 OSAHS 的 DM 患者的治疗提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Punjabi NM, Shahar E, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the sleep heart health study [J]. *Am J Epidemiol*, 2004, 160(6): 521-530.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸疾病学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(草案) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(4): 195-198.
- [3] 王红梅, 王林, 刘吉祥. 短期持续正压通气治疗对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征伴 2 型糖尿病患者胰岛素敏感性的影响 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(13): 597-599.
- [4] Levy P, Bonsignore MR, Eckel J. Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences [J]. *Eur Resp J*, 2009, 34(1): 243-260.
- [5] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome [J]. *Postgrad Med J*, 2009, 85(1010): 693-698.
- [6] Ahmet U, Ilcol YO, Nalci N, et al. Ghrelin, leptin, adiponectin, and resistin levels in sleep apnea syndrome: Role of obesity [J]. *Ann Thorac Med*, 2010, 5(3): 161-165.
- [7] Ip MS, Lam KS, Ho C, et al. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea [J]. *Chest J*, 2000, 118(3): 580-586.
- [8] Ip MS, Lam B, Ng MM, et al. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(5): 670-675.

(收稿日期: 2011-08-09)

(上接第 2653 页)

2.7 样品测定

采用建立的方法,对市售 62 批化妆品(15 批婴儿润肤露、10 批眼霜、25 批成人沐浴露、6 批防晒乳、6 批洁面乳)进行测定,结果 15 批成人沐浴露含 MIT 0.611 mg/kg~90.1 mg/kg,含 CIT 0.520 mg/kg~8.12 mg/kg,5 批婴儿润肤露含 MIT 0.682 mg/kg~3.32 mg/kg,含 CIT 0.531 mg/kg~6.40 mg/kg,其余样品未检出。

综上所述,本法专属性强,灵敏度高,可用于化妆品中 MIT 和 CIT 的测定。

[参考文献]

- [1] 郭庆梅. 异噻唑啉酮防腐剂——一种化妆品皮炎持续流行的病因 [J]. *国外医学(卫生学分册)*, 1990(3): 191-192.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 北京: 中国卫生出版社, 2007: 72, 234-236.

- [3] 董立军. 化妆品防腐剂凯松 CG 的高压液相色谱法测定 [J]. *精细化工*, 1990, 7(2): 70-72.
- [4] 胡俊明, 王骏. 反相离子对色谱法测定化妆品中溴硝丙醇等 11 种防腐剂 [J]. *色谱*, 1999, 17(5): 495-497.
- [5] 李洁, 赵金辉. 高效液相色谱法测定化妆品中凯松和布罗波尔 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2000, 10(5): 520-521.
- [6] 武婷, 王超, 王星, 等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中的 24 种防腐剂 [J]. *分析化学研究报告*, 2007, 35(10): 1439-1443.
- [7] 王超, 张青, 王星. 化妆品中甲基异噻唑啉酮及其氯代物的高效液相色谱测定法 [J]. *环境与健康杂志*, 2007, 24(6): 449-450.
- [8] 王萍, 李洁, 郑和辉. 超高效液相色谱法测定化妆品中 22 种防腐剂 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(6): 1291-1293.
- [9] 刘奋, 戴金晶, 梁伟, 等. 气相色谱法测定化妆品防腐剂凯松 [J]. *现代预防医学*, 2004, 31(6): 872-876.

(收稿日期: 2011-07-26)