

化妆品中 21 种磺胺类药物的高效液相色谱检测及质谱确证

马 强, 王 超, 王 星, 白 桦, 崔艳妮, 武 婷, 何瑞云, 王彦斌

(中国检验检疫科学研究院工业品检验研究所, 北京 100123)

磺胺类药物是具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 用于预防和治疗细菌感染性疾病, 具有抗病原体范围广、化学性质稳定、使用方便、易于生产等特点, 它通过干扰细菌的叶酸代谢而抑制细菌的生长繁殖。临床研究表明, 磺胺类药物具有一定的祛痘、抗粉刺、除螨等功效。但由于磺胺类药物在体内的作用时间和代谢时间较长, 通过任何途径摄入的磺胺都有可能蓄积在人体中, 进而对人体机能产生危害, 并导致病原体产生抗药性^[1-2]。我国《化妆品卫生标准》^[3]、《化妆品卫生规范》^[4]、欧盟化妆品规程^[5]、日本药事法^[6]中均明确规定, 磺胺类药物为化妆品组中禁用物质。

关于磺胺类药物检测的研究报道主要集中在食品样品^[7-8]、生物样品^[9-11]、环境样品^[12-13]等方面, 涉及的方法包括光谱法^[14-15]、薄层色谱法 (TLC)^[7]、高效液相色谱法 (HPLC)^[9,12]、高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS)^[8,13]、气相色谱-质谱法 (GC-MS)^[10]、超临界流体色谱法 (SFC)^[11]等。化妆品中磺胺类药物的检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[16-17]、超高效液相色谱法 (UPLC)^[18]等。本文建立了同时测定化妆品中 21 种磺胺类药物的 HPLC 及质谱确证方法, 方法准确、简便、快速, 可应用于化妆品的实际检验工作。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); Quattro micro API 三重四极杆质谱仪 (美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司); KQ-600B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MS2 型旋涡振荡器 (德国 IKA 公司); CR 21G 型高速冷冻离心机 (日本 Hitachi 公司)。甲醇为色谱纯试剂 (美国 Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯 (北京化工厂)。

磺胺胍、磺胺、磺胺醋酰、磺胺二甲异噁啉、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基噁啉、磺胺二甲噁啉、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺甲氧哒嗪、琥珀酰磺胺噻唑、磺胺氯哒嗪、磺胺甲基异噁啉、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲异噁啉、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺硝苯胍自 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度均不小于 97%。

1.2 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱, 0 ~ 7 min, 8%A ~ 16%A; 7 ~ 3 min, 16%A ~ 22%A; 13 ~ 18 min, 16%A ~ 22%A; 18 ~ 27 min, 25%A; 27 ~ 29 min, 25%A ~ 55%A; 29 ~ 40 min, 55%A ~ 95%A; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 32 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 268 nm。以色谱峰的保留时间定性, 并以紫外吸收光谱图辅助定性; 以外标法峰面积定量。21 种磺胺的色谱分离图见图 1。

1.3 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测; 毛细管电压: 3.5 kV; 萃取电压: 1.0 V; 射频透镜电压: 0.0 V; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C; 去溶剂气流速 500 L/h; 锥孔气流速 50 L/h; 光电倍增器电压 650 V; 碰撞气体为氩气, 碰撞气压 0.32 Pa。监测离子对、锥孔电压和碰撞能速等参数见表 1。

基金项目: 国家标准委员会计划资助项目 (20072832 - T - 607); 国家质量监督检验检疫总局科技计划资助项目 (2007 IK085)

第一作者: 马 强 (1979 -), 男, 助理研究生, Tel: 010 - 85773355 - 2254, E-mail: maqiang 1129@yahoo.com.cn

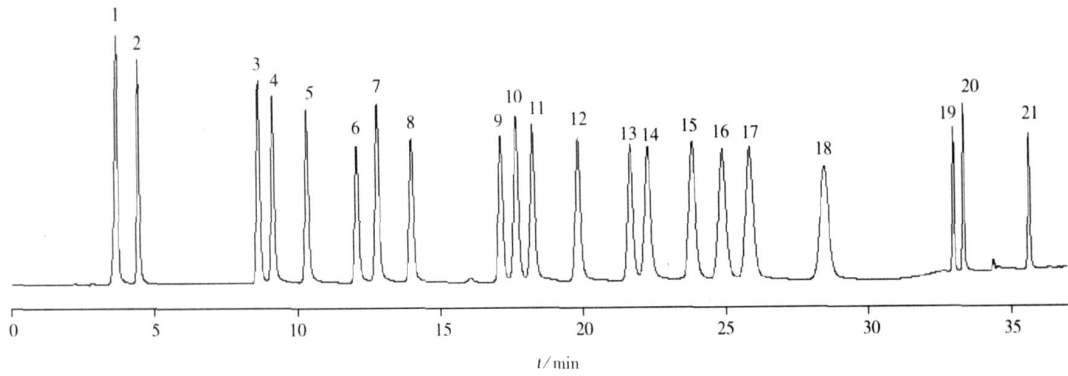


图 1 21 种磺胺标准品混合物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a mixture of 21 sulfonamide standards

1. sulfaguanidine; 2. sulfanilamide; 3. sulfacetamide; 4. sulfisomidine; 5. sulfadiazine; 6. sulfathiazole; 7. sulfapyridine;
8. sulfamerazine; 9. sulfamoxole; 10. sulfamethazine; 11. sulfamethizole; 12. sulfamethoxypyridazine; 13. succinylsulfathiazole;
14. sulfachloropyridazine; 15. sulfamethoxazole; 16. sulfamonomethoxine; 17. sulfadoxine; 18. sulfisoxazole; 19. sulfadimethoxine;
20. sulfaquinoxaline; 21. sulfanitran

表 1 21 种磺胺的质谱分析参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for 21 sulfonamides

Sulfonamide	Monitoring ion pairs m/z	Cone voltage U/V	Collision energy E/eV	Relative intensity	Tolerance /%
Sulfaguanidine	216/157	22	15	100	± 20
	216/109		23	52	
Sulfanilamide	173/156	15	7	100	± 20
	173/91		18	51	
Sulfacetamide	215/156	15	10	100	± 25
	215/92		22	49	
Sulfisomidine	279/124	30	20	100	± 25
	279/186		17	33	
Sulfadiazine	251/156	25	15	100	± 20
	251/108		23	61	
Sulfathiazole	256/156	25	15	100	± 25
	256/108		23	49	
Sulfapyridine	250/156	27	15	100	± 25
	250/184		17	31	
Sulfamerazine	265/156	27	17	100	± 20
	265/172		15	51	
Sulfamoxole	268/156	26	17	100	± 25
	268/113		17	49	
Sulfamethazine	279/186	25	18	100	± 20
	279/156		18	72	
Sulfamethizole	271/156	23	15	100	± 25
	271/108		23	46	
Sulfamethoxypyridazine	281/156	27	17	100	± 20
	281/108		27	57	
Succinylsulfathiazole	356/256	32	17	100	± 25
	356/156		23	46	
Sulfachloropyridazine	285/156	25	15	100	± 25
	285/108		25	45	
Sulfamethoxazole	254/156	25	17	100	± 20
	254/108		22	78	
Sulfamonomethoxine	281/156	28	17	100	± 30
	281/215		15	16	
Sulfadoxine	311/156	30	18	100	± 25
	311/108		30	41	
Sulfisoxazole	268/156	23	13	100	± 20
	268/113		15	82	

(续表 1)

Sulfonamide	Monitoring ion pairs m/z	Cone	Collision	Relative intensity	Tolerance / %
		voltage U/V	energy E/eV		
Sulfadimethoxine	311/156	35	20	100	± 25
	311/108		27		
Sulfaquinoxaline	301/156	25	15	100	± 20
	301/108		25		
Sulfanitran	336/156	25	13	100	± 25
	336/294		10		

1.4 标准溶液的配制

准确称取 21 种磺胺标准品各 100 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇 - 水 (体积比 50 : 50) 混合液溶解并定容, 其中磺胺喹噁啉加入数滴氢氧化钠溶液使之溶解, 配制成质量浓度各为 1 000 mg/L 的标准储备液。将标准储备液配制成混合标准后再将其稀释成 21 种磺胺标准品的质量浓度均分别为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg/L 的系列混合标准溶液。

1.5 样品的制备

1.5.1 膏霜、水剂、散粉、香波类样品的制备 称取化妆品试样 1.0 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 准确加入 5 mL 甲醇和 5 mL 水, 在超声波清洗器中超声提取 20 min, 以 15 000 r/min 高速离心提取液 15 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 必要时可添加适量氯化钠电解质, 利用盐析效应促进过滤, 滤液供高效液相色谱测定。

1.5.2 唇膏类样品的制备 称取化妆品试样 1.0 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 准确加入 2 mL 四氢呋喃, 在超声波清洗器中超声提取 10 min, 再加入 8 mL 水, 超声提取 10 min, 以 15 000 r/min 高速离心提取液 15 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤液供高效液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 样品提取方法的选择

针对膏霜、水剂、散粉、香波、唇膏等不同基质的化妆品样品, 分别建立适宜的样品提取方法。为减少操作步骤及获得尽可能高的提取效率, 采用超声提取方式对样品进行提取。分别考察了不同提取溶剂和提取时间等条件下的提取效率, 确定了不同样品类型的提取方法。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱的选择 分别考察了不同品牌的 C_{18} 柱、 C_8 柱、苯基柱等具有不同选择性固定相的色谱柱对于 21 种磺胺类药物的分离效果, 结果表明, 磺胺在不同固定相的色谱柱上表现出分离选择性的差异, 最终采用 Waters Symmetry C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 色谱柱获得了最为理想的分离效果。

2.2.2 流动相及洗脱条件的选择 分别采用不同比例的甲醇 - 水、乙腈 - 水等混合溶剂体系进行一系列预试验, 结果表明, 由于磺胺类药物具有弱碱性, 其中性流动相体系中的色谱峰形不够理想。本研究考察了在流动相中添加甲酸、乙酸、三氟乙酸后对磺胺色谱分离效果的影响, 结果表明, 以甲醇 - 0.1% 甲酸水溶液作为流动相系统获得了理想的色谱峰形和分离效果。进一步考察了在甲醇 - 水体系中添加不同比例的甲酸对于磺胺类药物的分离效果, 甲酸添加量在 0.1% ~ 0.5% 变化, 实验结果表明, 0.1% 甲酸为最佳添加量。由于 21 种磺胺的极性差异较大, 因此选择采用梯度洗脱方式, 经过多次试验, 确定了优化的梯度洗脱条件 (见 “1.2”)。

2.2.3 柱温的选择 色谱柱的柱温对于磺胺的保留值和选择性具有一定影响。本实验研究了 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 柱温范围的分离情况。实验结果表明, 当柱温为 32 $^{\circ}\text{C}$ 时, 磺胺色谱峰之间实现了理想的分离。

2.3 线性关系及检出限

将一系列不同质量浓度的混合标准溶液依次进样, 以峰面积对质量浓度绘制工作曲线, 各磺胺成分均在 1 ~ 800 ng 进样范围内与其各自对应的峰面积呈线性关系, 相关系数均大于 0.999; 21 种磺胺的检出限 ($S/N = 3$) 为 0.2 ~ 0.4 mg/kg。

2.4 回收率与精密度实验

选择经测定不含有磺胺的膏霜、水剂、散粉、香波、唇膏等不同类型的化妆品试样分别进行实验,称取化妆品试样 1.0 g, 分别加入高、中、低 3 种浓度的混合标准溶液, 充分混匀, 按照本实验方法进行测定, 每种类型样品的每个添加水平平行测定 6 份, 21 种磺胺的平均回收率为 89%~109%, 相对标准偏差为 0.7%~6.6%。

2.5 样品分析

应用本方法对洗面奶、清洁霜、浴液、化妆水、粉饼、洗发液、护发素、润唇膏等不同类型的进口化妆品样品(原产国包括法国、意大利、美国、日本、韩国等)共 40 件和国产化妆品共 10 件进行了分析测定, 均未检出磺胺类药物。

参考文献:

- [1] 庞国芳. 农药兽药残留现代分析技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 366-367.
- [2] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 228-229.
- [3] GB 7916-87.
- [4] 卫生部. 化妆品卫生规范 [S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2007.
- [5] Council Directive of 27 July 1976 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products (76/768/EEC).
- [6] The Pharmaceutical Affairs Law. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan
- [7] UNRUH J, P D TROW SKIE, SCHWARTZ D P, et al Solid-phase extraction of sulfamethazine in milk with quantitation at low ppb levels using thin-layer chromatography[J]. J Chromatogr, 1990, 519(1): 179-187.
- [8] THOMPSON T S, NOOT D K Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2005, 551(1/2): 168-176
- [9] HELA W, BRANDTNER M, W DEK R, et al Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC - DAD for detection[J]. Food Chem, 2003, 83(4): 601-608
- [10] CANNAVAN A, HEWITT SA, BLANCHFLOWER W J, et al Gas chromatographic - mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative[J]. Analyst, 1996, 121: 1457-1461.
- [11] RAMSEY E D, PERKINS J R, GAMES D E Analysis of drug residues in tissue by combined supercritical - fluid extraction - supercritical - fluid chromatography - mass spectrometry - mass spectrometry[J]. J Chromatogr. A, 1991, 464: 353-364
- [12] L N C Y, HUANG S D. Application of liquid - liquid - liquid microextraction and high-performance liquid - chromatography for the determination of sulfonamides in water[J]. Anal Chim Acta, 2008, 612(1): 37-43.
- [13] BALAKRISHNAN V K, TERRY K A, TOPIO J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods[J]. J Chromatogr. A, 2006, 1131(1/2): 1-10.
- [14] NI Y N, Q I Z B, KOKOT S Simultaneous ultraviolet - spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches[J]. Chemom Intell Lab Syst, 2006, 82: 241-247.
- [15] SCHWARTZ D P, LIGHTFIELD A R. Practical screening procedures for sulfamethazine and N4-acetylsulfamethazine in milk at low parts - per - billion levels[J]. J AOAC Int, 1995, 78(4): 967-970.
- [16] 王萍, 李洁, 郑和辉. [J]. 色谱, 2007, 25(5): 743-746
- [17] 杨艳伟, 朱英. [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1343-1344.
- [18] 郑和辉, 王萍, 李洁. [J]. 色谱, 2007, 25(2): 238-240

Determination of 21 Sulfonamides in Cosmetics by HPLC and Verified by HPLC - MS

MA Qiang, WANG Chao, WANG Xing, BAI Hua, CUI Yan-ni, WU Ting,
HE Rui-yun, WANG Yan-bin

(Institute of Industrial Product Inspection, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: An analytical method based on reversed-phase liquid chromatography has been developed for the simultaneous determination of 21 sulfonamides in cosmetics. Various cosmetic samples, including creams, lotions, powders, shampoos and lipsticks, were extracted under ultrasonication, and then separated on a Waters Symmetry C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) by gradient elution with methanol and 0.1% formic acid

(下转第 218 页)

3 结 论

实验利用高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱分析方法同时测定动物组织中 3 种四环素类抗生素残留量, 回收率、精密度和检出限均达到了比较满意的结果, 满足痕量检测的要求, 同时该方法可以应用于海产品、畜禽肉类和内脏等食品中痕量四环素类抗生素残留的检测。

参考文献:

- [1] 张宏伟, 王喆, 刘伟. 动物性食品中兽药和饲料添加剂残留及其对人体的危害 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(4): 1 - 3.
- [2] CHERLET M, SCHELKENS M, CROUBELS S, et al Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2003, 492(1/2): 199 - 213.
- [3] KAMEL A M, FOUADA H G, BROWN P R, et al Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2002, 13(4): 543 - 557.

Simultaneous Determination of Tetracycline Antibiotics Residues in Animal Tissue by HPLC - ESIMS/MS

WANG Tan¹, CHEN Da-zhou², TANG Hua², ZHANG Jing-hua¹, ZHOU Xiao-jing¹, ZHAO Xin-ying¹

(1. Beijing Center of Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China; 2. Chemical Metrology & Analytical Science Division of the National Institute of Metrology P. R. China, Beijing 100013, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline in animal tissue was successfully established by HPLC - ESIMS/MS. The tetracycline antibiotics in animal tissue were extracted by liquid - solid extraction and cleaned up by SPE. The mass spectrometer was operated in the positive-ion mode using selected reaction monitoring (SRM). The results showed that three tetracycline antibiotics were well separated under the optimal conditions. The detection limits of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline were 0.16 ng/g, 0.1 ng/g and 0.1 ng/g, respectively. The spiked recoveries were range of 84% - 94% and the relative standard deviations were 2.4% - 2.9%.

Key words: tetracycline antibiotics; HPLC - ESIMS/MS; animal tissue; determination

(上接第 214 页)

in water as the mobile phase. In the range of 1 - 800 ng, the calibration curves of 21 hormones showed good linearity with the correlation coefficients more than 0.999. The positive results were identified and verified by HPLC - MS/MS. The mean recoveries at the three spiked levels of various cosmetic samples were 89% - 109% with the relative standard deviations of 0.7% - 6.6%.

Key words: sulfonamides; cosmetics; high performance liquid chromatography; mass spectrometry