

三重四极杆质谱法测定化妆品中的 7 种性激素残留

LCMSMS-087

摘要：本文建立了一种使用固相萃取与岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用方法测定化妆品中孕酮、睾酮、甲基睾酮、雌三醇、雌二醇、雌酮和己烯雌酚 7 种性激素残留的分析方法。化妆品基质经提取、除脂、固相萃取等样品前处理后，以乙腈和水作为流动相，超高效液相色谱 LC-30A 进行梯度洗脱分离，用多反应监测串联质谱进行定性分析。采用外标法建立定量方法，7 种性激素具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9984~0.9997 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验，7 种性激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.022%~0.332% 和 3.30%~8.15% 之间，系统精密度良好，检出限范围为 0.06~0.67 $\mu\text{g/L}$ 。化妆品基质加标 5 $\mu\text{g/kg}$ ，7 种性激素的回收率范围为 72.4%~102%，可以满足化妆品中 7 种性激素的检测需求。

关键词：性激素 化妆品 固相萃取 三重四极杆质谱

性激素添加到化妆品中具有促进毛发生长、丰乳、美白、除皱和增加皮肤弹性等作用，由于具有特殊的美容功效，性激素常常被一些化妆品生产商添加到各类功能性化妆品中，研究表明长期使用添加性激素的化妆品会产生副作用甚至有致癌的危险，给广大消费者健康带来损害。我国《化妆品卫生规范》规定性激素为化妆品的禁用物质，对色谱检出阳性的样品必须要进行质谱确认，涉及的激素种类包括雌酮、雌二醇、雌三醇、己烯雌酚、睾酮、甲基睾酮和孕酮 7 种，但是《化妆品卫生规范》并未对三重四极杆检测方法做出限量检出

要求，岛津 LCMS-8040 三重四极杆质谱仪采用多反应监测模式，能有效的排除基质干扰，具有高的分离效率，能准确实现定量分析。目前三重四极杆质谱仪已经成为分析测定激素的首选方法。从 2013 年 7 月 11 日开始，欧洲经济区 (EEA) 市场中销售的化妆品必须符合新颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 的要求。

本文提出超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用法是对 2007 版《化妆品卫生规范》和新颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 中性激素检测方法的补充和应对。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.1 mmI.D. \times 50 mmL., 1.6 μm

流动相：A - 纯水，B - 乙腈，A/B=75%/25% (V/V)

洗脱方式：梯度洗脱见表 1

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正负离子同时扫描

离子源接口电压：4.5 kV

喷雾针位置：0.3 mm

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：50 ms

延迟时间：1 ms

MRM 参数：见表 2

表 1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
7.0	Pumps	Pump B Conc.	60%
7.1	Pumps	Pump B Conc.	25%
10	Controller	Stop	

表 2 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
孕酮	315.2	109.00*	-21.0	-25.0	-23.0
	315.2	97.20	-21.0	-29.0	-19.0
睾酮	289.2	109.00*	-20.0	-25.0	-11.0
	289.2	97.15	-20.0	-25.0	-19.0
甲基睾酮	303.2	97.25*	-20.0	-25.0	-18.0
	303.2	108.85	-20.0	-32.0	-23.0
雌三醇	287.2	171.30*	21.0	39.0	27.0
	287.2	145.20	21.0	45.0	25.0
雌酮	269.2	145.10*	19.0	38.0	24.0
	269.2	159.00	19.0	36.0	29.0
雌二醇	271.2	145.35*	20.0	41.0	26.0
	271.2	183.15	20.0	33.0	18.0
己烯雌酚	267.2	251.25*	19.0	26.0	26.0
	267.2	237.25	19.0	29.0	25.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

用乙腈配制浓度为 10 mg/L 的上述 7 种性激素，将浓度为 10 mg/L 的 7 种性激素用乙腈依次稀释至 1000 µg/L 的混合标样。将 1000 µg/L 的 7 种激素混合标样，用水逐级稀释成不同浓度点的标准工作液用于建立标准曲线（见表 3）。

表 3 混合标准工作液中各标准物质的浓度(µg/L)

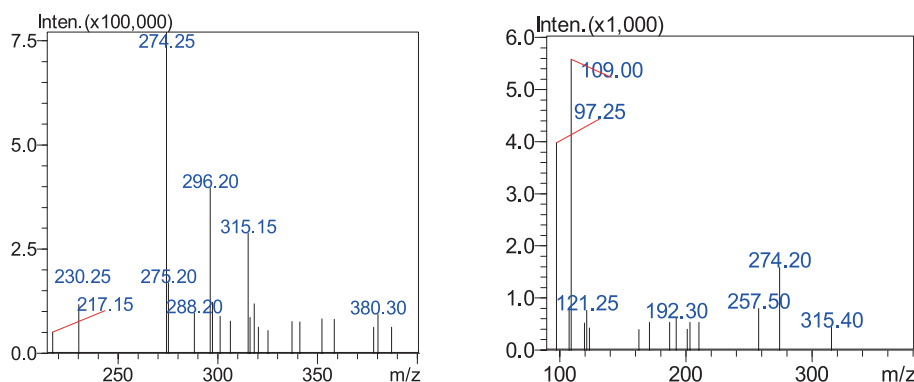
编号	名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
1	孕酮	2	10	20	50	100	200
2	睾酮	5	10	20	50	100	200
3	甲基睾酮	2	5	10	20	50	100
4	雌三醇	2	5	10	20	50	100
5	雌二醇	5	10	20	50	100	200
6	雌酮	2	5	10	20	50	100
7	己烯雌酚	1	5	10	20	50	100

1.3.2 样品前处理方法

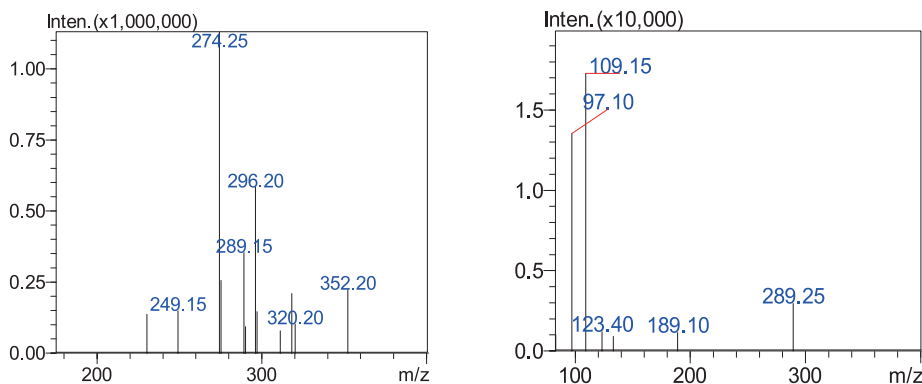
准确称取乳状样品约 1.0 g 于 100 mL 锥形瓶中，加入饱和氯化钠溶液 50 mL，稀硫酸 2 mL（稀硫酸由 2 mL 浓硫酸溶于 98 mL 水配制而成），振荡溶解后转移至 100 mL 分液漏斗中。用环己烷 30 mL 分三次萃取，必要时离心分离。合并环己烷并在 70°C 水浴上馏除，用 10 mL 乙腈溶解残渣并混匀，然后用 C18 固相萃取小柱进行吸附（小柱预先依次用 3 mL 甲醇和 5 mL 水活化），然后用乙腈和水（1:4, v/v）3 mL 淋洗，真空抽干。最后分别用 2.5 mL 乙腈和 2.5 mL 纯水分别洗脱，经 0.22 μm 滤膜过滤后取 10 μL 用于液质联用仪分析。

结果讨论

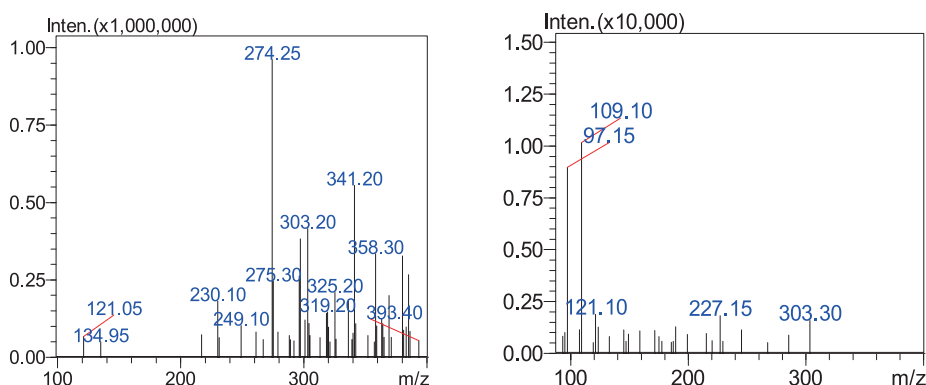
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



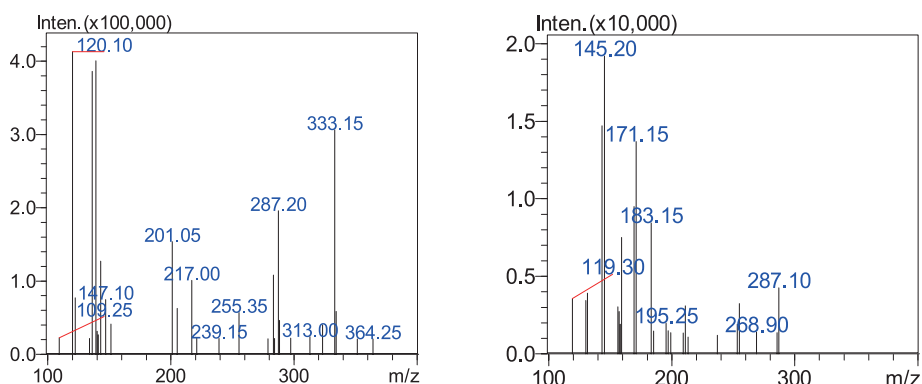
1. 孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



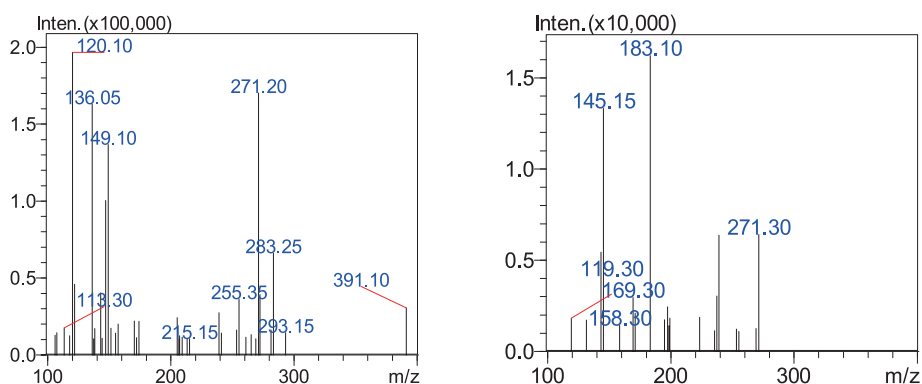
2. 睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



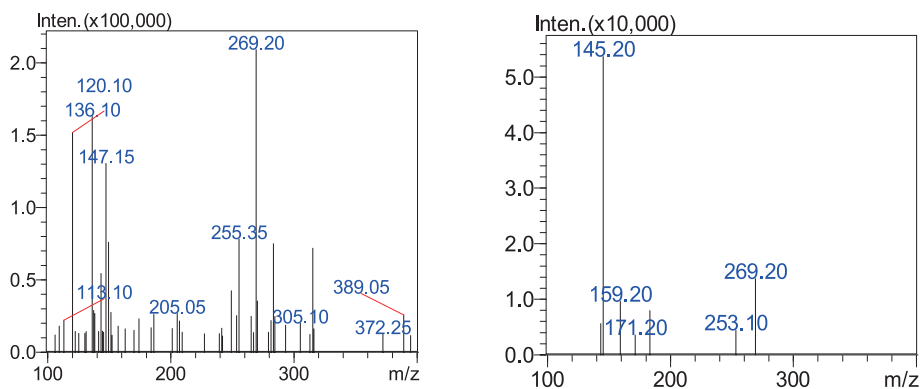
3. 甲基睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



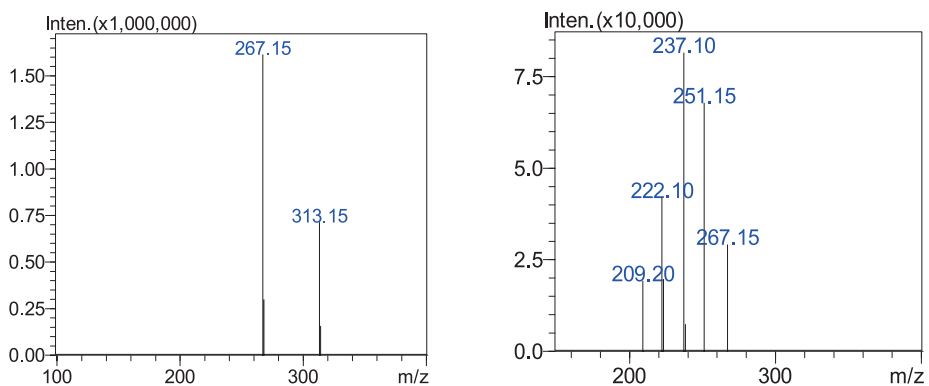
4. 雌三醇的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 45V) (右图)



5. 雌二醇的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 43V) (右图)



6. 雌酮的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 37V) (右图)



7. 7-烯雌酚的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 29V) (右图)

图 1 7 种性激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

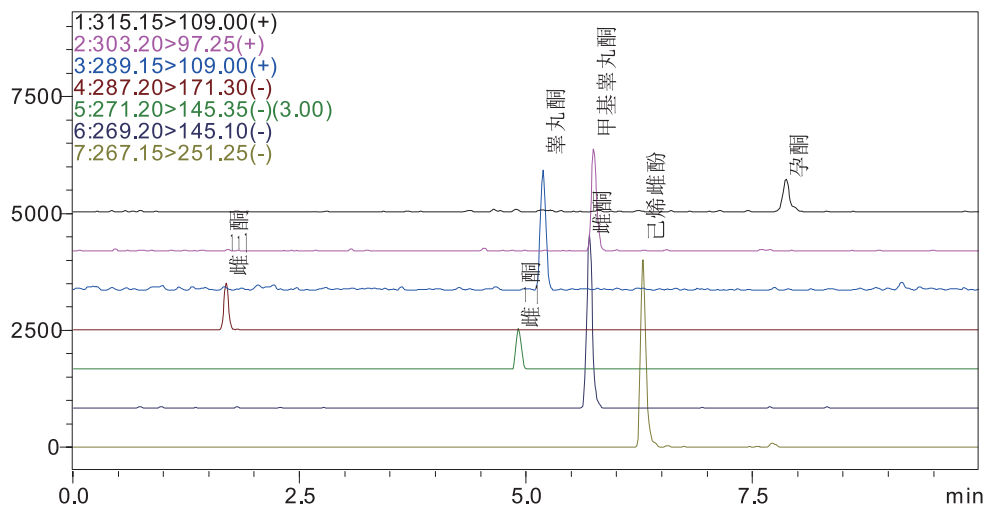
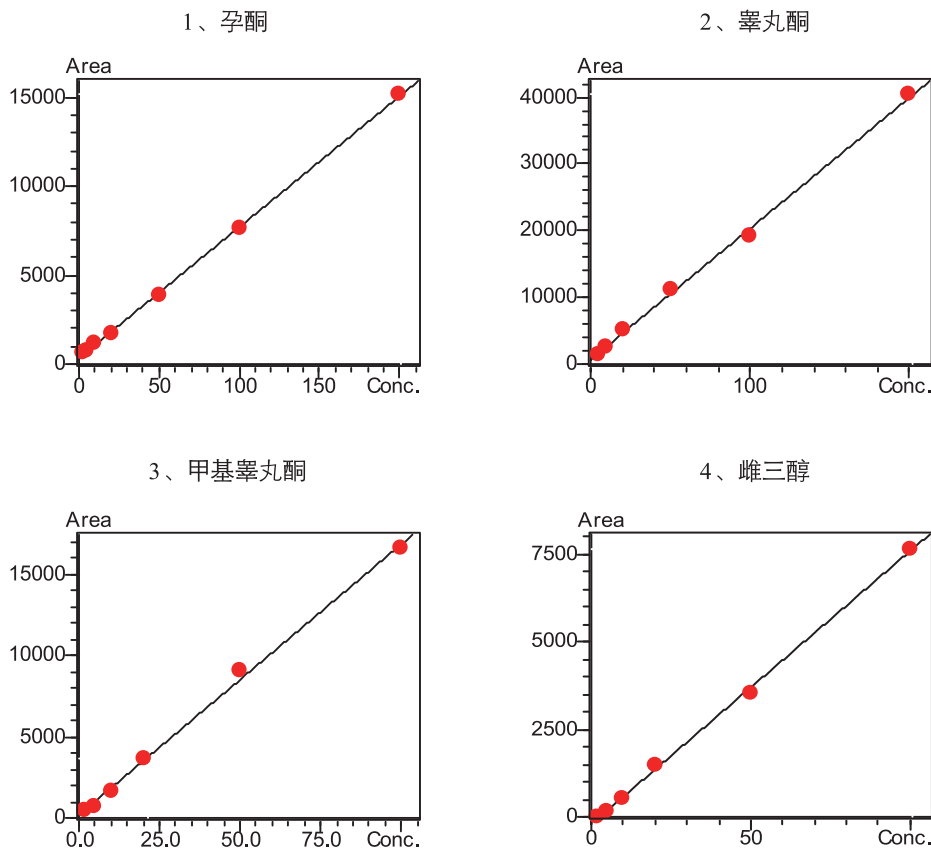


图 2 混合标样浓度级别 4 的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，按照表 3 线性浓度点，采用六点外标法建立校准曲线，如图 3 所示，7 种性激素在各自的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均在 0.9984~0.9997 之间，检出限和定量限见表 4。



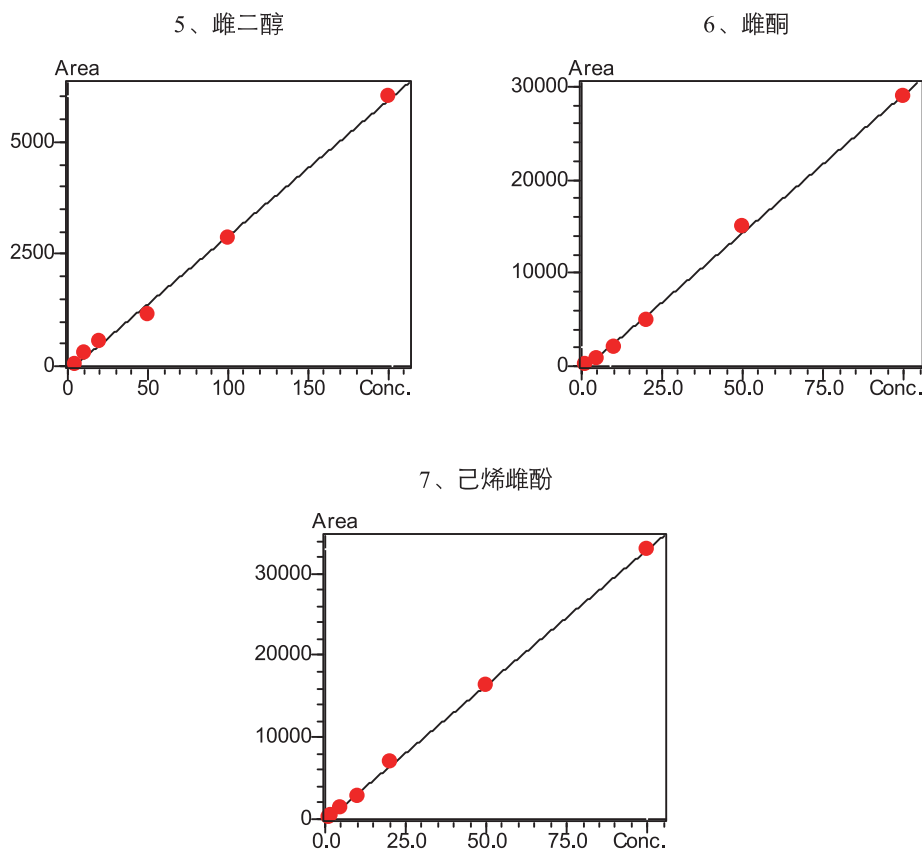


图3 7种性激素的标准工作曲线

表4 7种性激素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (R)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	孕酮	$Y = (73.6035)X + (348.970)$	2-200	0.9997	0.36	1.2
2	睾丸酮	$Y = (196.188)X + (706.045)$	5-200	0.9991	0.67	2.3
3	甲基睾丸酮	$Y = (166.644)X + (186.635)$	2-100	0.9988	0.61	2.0
4	雌三醇	$Y = (78.0267)X + (-204.544)$	2-100	0.9994	0.38	1.3
5	雌二醇	$Y = (30.2885)X + (-129.761)$	5-200	0.9984	0.44	1.5
6	雌酮	$Y = (296.704)X + (-542.676)$	1-100	0.9991	0.09	0.3
7	己烯雌酚	$Y = (331.120)X + (-182.078)$	1-100	0.9997	0.06	0.2

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表5），平行测定6次，7种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.022%~0.332%和3.30%~8.15%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%(5 µg/L)		RSD%(20 µg/L)		RSD%(50 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
孕酮	0.120	5.67	0.057	5.72	0.047	3.85
睾酮	0.121	7.42	0.038	5.82	0.044	3.46
雌二醇	0.135	7.54	0.156	7.28	0.071	5.86
甲基睾酮	0.109	8.15	0.098	7.45	0.059	3.85
雌三醇	0.332	6.14	0.206	5.83	0.187	4.98
雌酮	0.168	7.05	0.059	5.83	0.058	3.47
己烯雌酚	0.086	6.83	0.022	3.95	0.105	3.30

2.5 基质加标实验

图 4 为化妆品基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图。往空白化妆品基质中添加 7 种浓度为 5 µg/kg 性激素标样, 加标 MRM 色谱图如图 5 所示, 从图 5 中可以看到, 基质加标样品在定量限上均有很好的响应, 化妆品基质中 7 种激素检测与加标回收率结果见表 6。

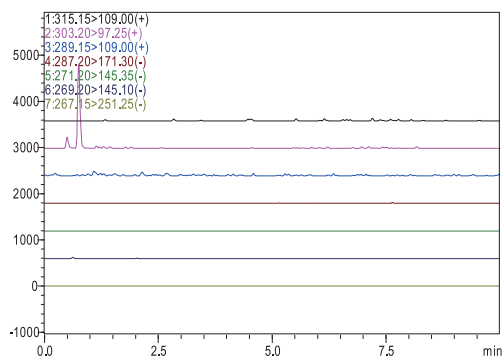


图 4 空白化妆品基质的 MRM 色谱图

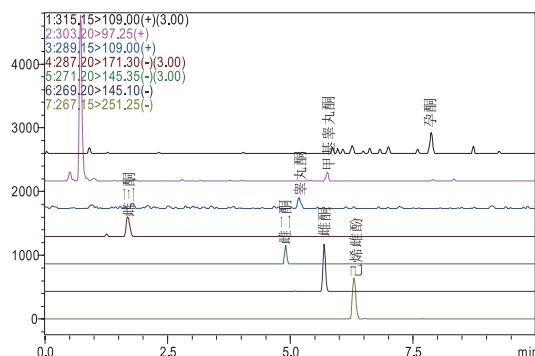


图 5 化妆品基质加标 5µg/kg 的 MRM 色谱图

表 6 化妆品中激素检测与加标回收率结果

名称	检测浓度 (µg/kg)	实测浓度 (µg/kg)	回收率 (%)
孕酮	N.D.	4.96	99.2
睾酮	N.D.	4.47	89.4
甲基睾酮	N.D.	5.10	102
雌三醇	N.D.	4.09	81.8
雌二醇	N.D.	4.19	83.7
雌酮	N.D.	4.77	95.3
己烯雌酚	N.D.	3.62	72.4

注: N.D.表示未检出

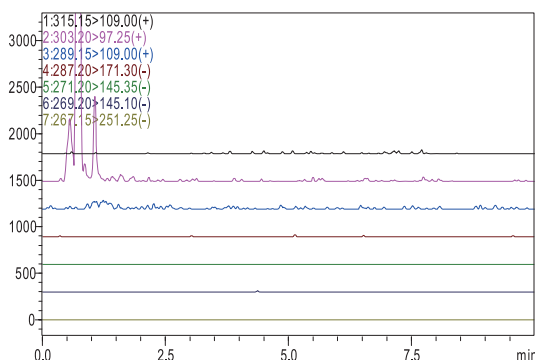


图 6 某国际品牌化妆品的 MRM 色谱图

2.6 实际样品分析

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测某国际品牌的 2 种化妆品，均未检测到这 7 种性激素。图 6 为某国际品牌化妆品的 MRM 色谱图。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 和固相萃取联用测定化妆品中 7 种性激素残留的分析方法。7 种性激素线性范围宽，相关系数在 0.9984~0.9997 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.022%~0.332% 和 3.30%~8.15% 之间，仪器精密度良好。化妆品基质加标 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，在定量限上均有很好的信号响应，无明显基质干扰，其回收率范围为 72.4%~102%。实验结果表明该方法灵敏度高，岛津超高效液相色谱串联三重四极杆质谱联用仪可以满足化妆品中性激素的检测需求。