

三重四极杆质谱测定化妆品中 7 种抗真菌类禁用物质

LCMSMS-088

摘要: 本文建立了岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定去屑洗护类化妆品中 7 种抗真菌类禁用物质的分析方法。洗护类化妆品基质经超声提取后, 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, 用多反应监测串级质谱进行定性分析。配制基质标准工作溶液, 采用外标法建立定量方法, 灰黄霉素和氟康唑在 5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好; 克霉唑、益康唑、咪康唑和联苯苄唑在 0.1 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好; 酮康唑在 1 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数在 0.9976~0.9998 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 种抗真菌类物质的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.035%~2.25% 和 1.06%~4.37% 之间, 系统精密度良好, 检出限范围为 0.001 ~0.05 mg/kg。同时考察去屑洗发水样品分析及加标实验, 7 种抗真菌类物质的回收率范围为 74.2%~110%, 可以满足洗护类化妆品中 7 种抗真菌类禁用物质的检测需求。

关键词: 灰黄霉素 抗真菌 化妆品 三重四极杆质谱

灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、益康唑、咪康唑、氟康唑、联苯苄唑均为广谱抗真菌药物, 对皮肤癣、念珠菌及隐球菌均具有抑制和杀菌作用, 可以缓解由花斑癣、脂溢性皮炎和头皮糠疹(头皮屑)引起的脱屑与瘙痒, 具有去屑止痒的效果, 因此这类抗真菌药物有可能被添加至宣称具有去屑功能的洗护类发用化妆品中, 给人民健康带来潜在的危害。

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。我国《化妆品卫生规范》2007 年版中规定酮康唑和抗生素类为禁用物质, 对色谱检出阳性的样品必须要进行质谱确认。《化妆品

中抗真菌类禁用物质的检测方法》(征求意见稿) 中对检出限做了规定, 氟康唑、克霉唑、益康唑和咪康唑为 0.1 mg/kg, 酮康唑为 0.5 mg/kg, 联苯苄唑为 0.02 mg/kg, 灰黄霉素为 0.2 mg/kg。岛津 LCMS-8040 三重四极杆质谱仪采用多反应监测模式, 能同时检测 7 种有类似抗真菌作用的禁用物质, 并且能确证 7 种禁用物质是否添加到化妆品中。

本文使用 LCMSMS-8040, 参考欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 和《化妆品中抗真菌类禁用物质的检测方法》(征求意见稿), 建立了去屑类化妆品中 7 种抗真菌类药物的分析方法, 此方法简单、快速和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

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-30AC 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-ODSIII 2.1 mmL.

D. \times 50 mmL., 1.6 μm

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

流动相: A - 0.1% 甲酸水; B - 0.1% 甲酸乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度 20%, 梯度洗脱见表 1,

表 1 梯度洗脱程序

Time (min)	B.Con.
0.50	20
1.00	40
3.00	60
3.50	90
4.00	90
4.01	20
5.00	Stop

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

喷雾针位置: 0 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°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

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)
灰黄霉素	353.1	165.0*	-24	-19	-14
		215.0	-24	-22	-17
酮康唑	531.2	489.0*	-40	-31	-17
		255.1	-40	-39	-26
克霉唑	277.0	165.1*	-30	-25	-17
		241.0	-30	-27	-25
益康唑	381.0	125.0*	-30	-30	-12
		193.1	-30	-19	-13
咪康唑	417.0	159.0*	-30	-38	-29
		161.0	-30	-35	-30
氟康唑	307.1	238.0*	-20	-16	-16
		220.0	-20	-17	-15
联苯苄唑	311.1	243.0*	-30	-20	-30
		165.0	-30	-44	-30

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 样品前处理方法

参考《化妆品中抗真菌类禁用物质的检测方法》(征求意见稿)中前处理方法: 准确称取样品 0.5 g, 置于 25 mL 比色管中, 加入饱和氯化钠溶液 1 mL, 涡旋 30 s, 加入乙腈 1 mL, 涡旋 30 s, 加入乙腈 20 mL, 涡旋 30 s, 超声提取 30 min, 涡旋 30 s, 加入乙腈定容至刻度, 4500 rpm 离心 5 min, 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后。

1.3.2 标准溶液配制

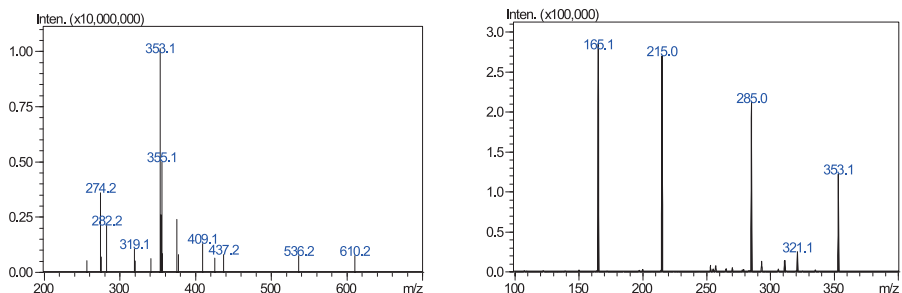
准确称取空白样品 0.5 g, 置于 25 mL 比色管中, 分别加入系列浓度标准工作溶液, 按照“1.3.1 样品处理”步骤进行前处理, 即得不同浓度点的基质标准工作液用于建立标准曲线(见表 3)。

表 3 混合标准工作液中各标准物质的浓度 (μg/L)

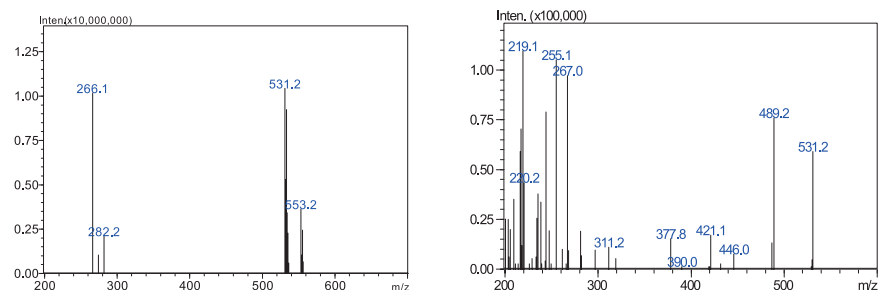
编号	名称	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5	浓度6	浓度7
1	灰黄霉素	1	5	10	50	100	200	500
2	酮康唑	1	5	10	50	100	200	500
3	克霉唑	0.1	0.5	1	5	10	20	50
4	益康唑	0.1	0.5	1	5	10	20	50
5	咪康唑	0.1	0.5	1	5	10	20	50
6	氟康唑	1	5	10	50	100	200	500
7	联苯苄唑	0.1	0.5	1	5	10	20	50

结果讨论

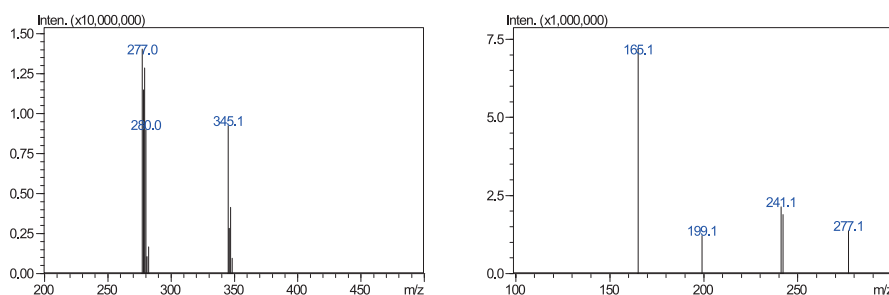
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



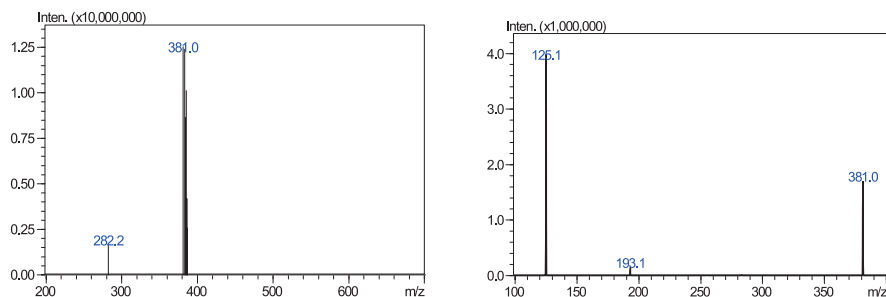
1. 灰黄霉素的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-20V) (右图)



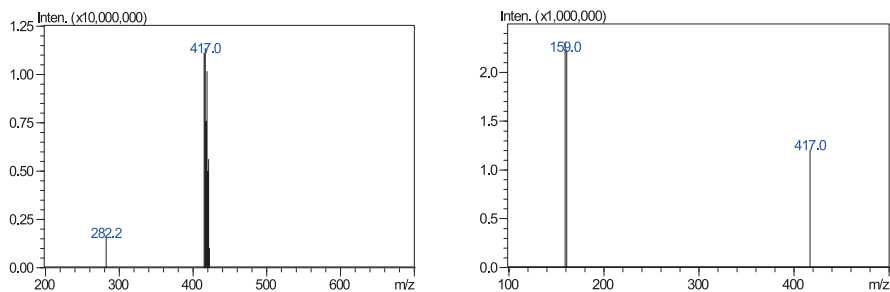
2. 酮康唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-40V) (右图)



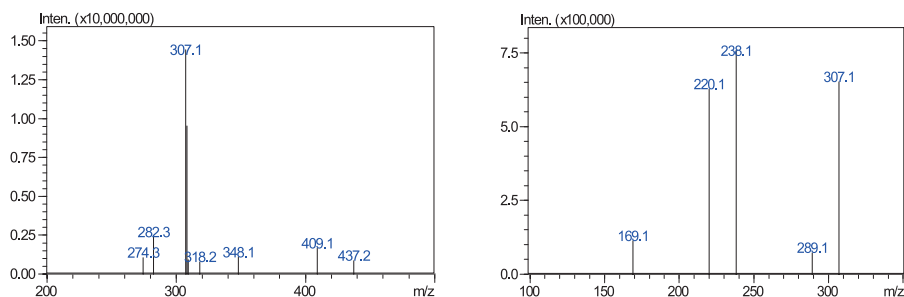
3. 克霉唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-20V) (右图)



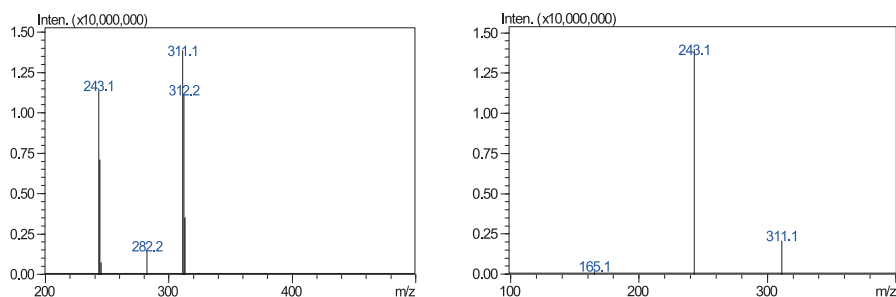
4. 益康唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-22V) (右图)



5.咪康唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



6.氟康唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-15V）（右图）



7.联苯苄唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-9V）（右图）

图 1 7 种抗真菌类禁用物质的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 空白基质标准溶液的 MRM 色谱图

空白基质标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示。

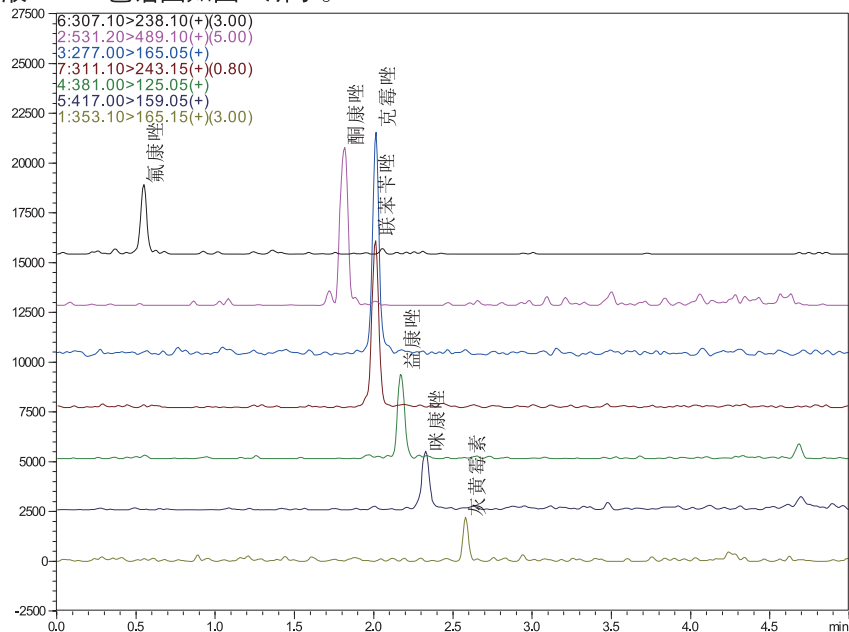


图 2 基质标准溶液的 MRM 色谱图（灰黄霉素、酮康唑、氟康唑浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ ，其余浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ ）

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，采用外标法建立校准曲线，如图 3 所示，7 种抗真菌类禁用物质在各自的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均在 0.9976~0.9998 之间，仪器自动计算的方法检出限和定量限见表 4。

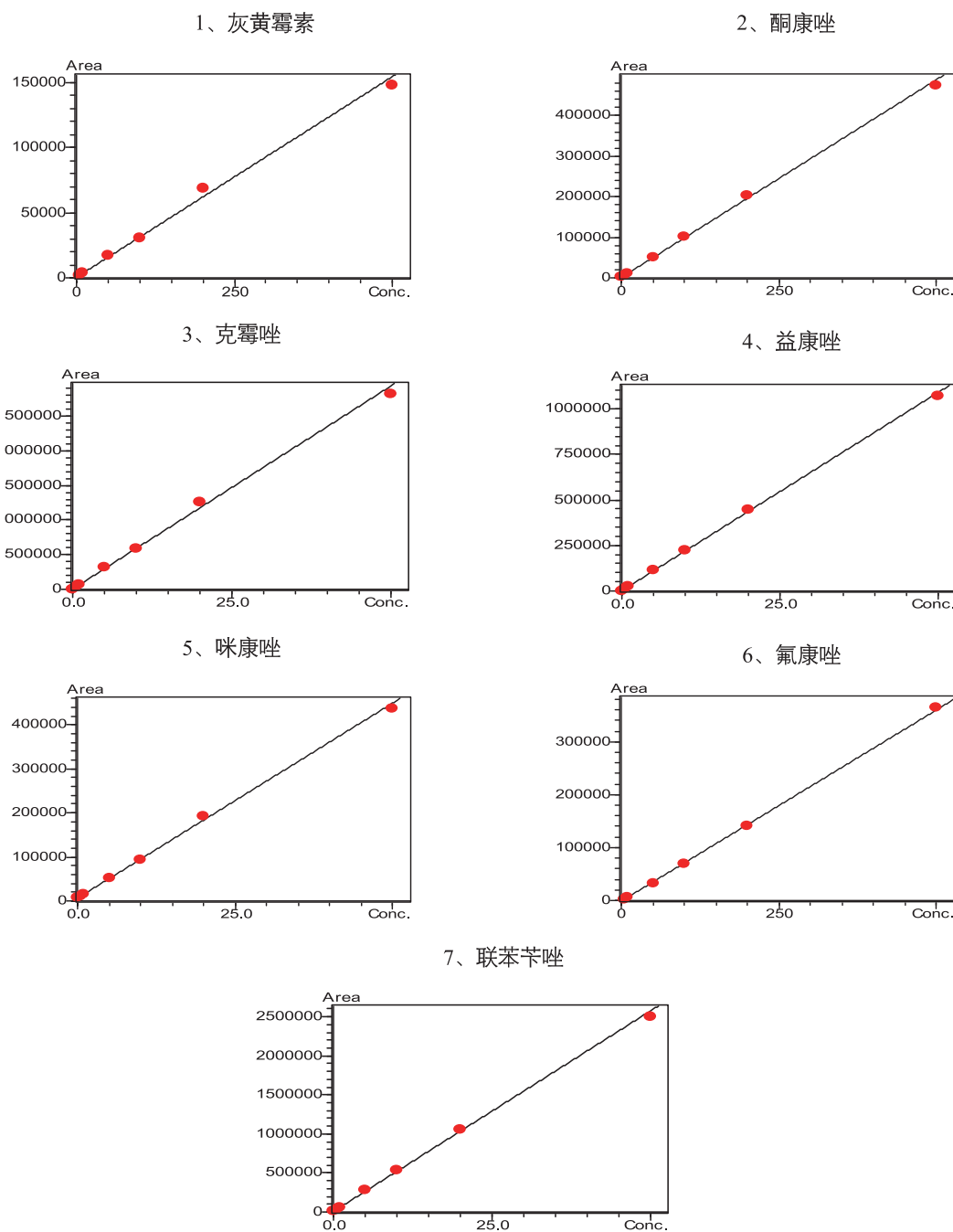


图 3 7 种抗真菌类禁用物质的标准工作曲线

表 4 7 种抗真菌类禁用物质的基质校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (R)	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
1	灰黄霉素	$Y = (307.585)X + (393.059)$	5-500	0.9976	0.05	0.2
2	酮康唑	$Y = (975.811)X + (782.440)$	1-500	0.9994	0.01	0.03
3	克霉唑	$Y = (58491.0)X + (3168.10)$	0.1-50	0.9987	0.002	0.005
4	益康唑	$Y = (21733.3)X + (1241.05)$	0.1-50	0.9998	0.001	0.004
5	咪康唑	$Y = (8868.63)X + (6257.75)$	0.1-50	0.9993	0.001	0.003
6	氟康唑	$Y = (721.989)X + (-1090.20)$	5-500	0.9997	0.02	0.07
7	联苯苄唑	$Y = (51250.7)X + (7416.34)$	0.1-50	0.9995	0.001	0.002

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 0.035%~2.25% 和 1.06%~4.37% 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% (浓度级别 2)		RSD% (浓度级别 4)		RSD% (浓度级别 7)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
灰黄霉素	0.212	3.16	0.071	4.62	0.035	3.52
酮康唑	0.872	2.07	0.117	4.03	0.077	1.34
克霉唑	0.478	1.79	0.058	2.4	0.057	1.53
益康唑	0.213	3.44	0.071	3.53	0.05	1.63
咪康唑	0.204	4.37	0.069	2.81	0.056	1.51
氟康唑	2.25	3.94	1.46	2.83	1.68	2.34
联苯苄唑	0.097	1.82	0.06	2.81	0.049	1.06

2.5 实际样品分析及回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测某国际品牌的去屑洗发水，均未检测到这 7 种抗真菌类禁用物质。图 4 为某国际品牌化妆品的 MRM 色谱图。在此去屑洗发水基质中添加灰黄霉素、酮康唑、氟康唑浓度为 0.5 mg/kg 以及克霉唑、益康唑、咪康唑、联苯苄唑浓度为 0.05 mg/kg 的混合标准溶液，加标 MRM 色谱图如图 5 所示，加标回收率结果见表 6。

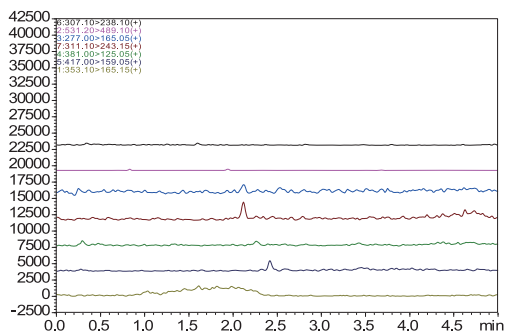


图 4 某国际品牌去屑洗发水的 MRM 色谱图

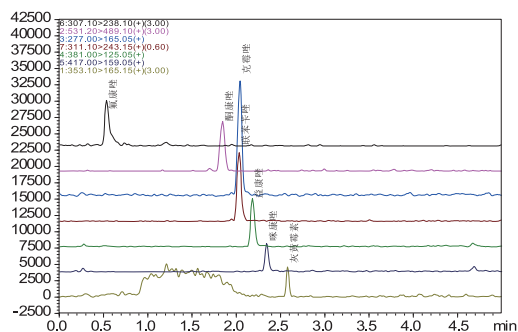


图 5 去屑洗发水基质加标的 MRM 色谱图

表 6 去屑洗发水中抗真菌类物质检测与加标回收结果

编号	名称	检测浓度 (mg/kg)	理论浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	回收率 (%)
1	灰黄霉素	N.D.	0.5	0.492	98.4
2	酮康唑	N.D.	0.5	0.465	92.9
3	克霉唑	N.D.	0.05	0.0489	97.8
4	益康唑	N.D.	0.05	0.0521	104
5	咪康唑	N.D.	0.05	0.0371	74.2
6	氟康唑	N.D.	0.5	0.548	109.6
7	联苯苄唑	N.D.	0.05	0.055	110

注：N.D.表示未检出

结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定化妆品中 7 种抗真菌类药物的分析方法。7 种抗真菌类药物线性范围宽，灰黄霉素和氟康唑在 5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好；克霉唑、益康唑、咪康唑和联苯苄唑在 0.1 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好；酮康唑在 1 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数在 0.9976~0.9998 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 0.035%~2.25% 和 1.06%~4.37% 之间，仪器精密度良好，检出限范围为 0.001 ~0.05 mg/kg。考察去屑洗发水样品分析及加标实验，7 种抗真菌类物质的回收率范围为 74.2%~110%，可以满足洗护类化妆品中 7 种抗真菌类禁用物质的检测需求。