

三重四极杆质谱法测定化妆品中的 8 种糖皮质激素残留

LCMSMS-090

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泼尼松龙等 8 种糖皮质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，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。采用外标法进行定量分析，8 种糖皮质激素具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9997 以上。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，8 种糖皮质激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.038%~0.231% 和 0.80%~8.35% 之间，系统精密度良好，检出限范围为 0.01~0.08 $\mu\text{g/L}$ 。化妆品基质加标不同浓度标样，8 种糖皮质激素的回收率范围为 72.5%~106.5%，可以满足化妆品中糖皮质激素的检测需求。

关键词：糖皮质激素 化妆品 固相萃取 三重四极杆质谱

化妆品与人们的生活密切相关，已成为必不可少的消费品之一。与此同时，化妆品的安全性已经日益成为广大消费者关注的问题。研究表明，糖皮质激素可以抑制纤维细胞增生，减少 5-羟色胺形成，因而添加糖皮质激素的化妆品对皮肤具有一定的嫩白作用。短时间使用含有糖皮质激素的化妆品可使皮肤光滑细腻、红润白嫩。但长期使用易导致皮肤变薄、发红、发痒，另外通过皮肤吸收可引起全身副作用，导致面部皮肤损害、骨质疏松、肌肉萎缩、生长发育迟缓、免疫功能下降、诱发或加重感染和消化性溃疡、情绪异常、代谢紊乱等各种不良反应。一旦停用，皮肤就会发红、发痒，出现

红斑、丘疹、脱屑等。我国及欧盟化妆品新法规 (EC) No 1223/20092 中均明确规定，糖皮质激素、雌激素、雄激素、孕激素等激素为化妆品组分中禁用物质。岛津 LCMS-8040 三重四极杆质谱仪采用多反应监测模式，能有效地排除基质干扰，具有高的分离效率，能确证激素类禁用物质是否添加到化妆品中。

本文给出的超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用法是对《化妆品安全技术规范》和即将颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 中糖皮质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 2.0 mmI.D. \times 50 mmL., 1.6 μm
流动相：A - 0.1% 甲酸水，B - 甲醇，
A/B=45%/55% (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，正离子扫描
离子源接口电压：4.5 kV
喷雾针位置：0.5 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：30 ms
延迟时间：3 ms
MRM 参数：见表 2

表 1 梯度洗脱程序

| Time (min) | Module | Command | Value |
|------------|------------|--------------|-------|
| 3.0 | Pumps | Pump B Conc. | 80% |
| 3.1 | Pumps | Pump B Conc. | 55% |
| 6 | 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) |
|---------|-------|---------|-----------------------------|--------|-----------------------------|
| 泼尼松龙 | 361.2 | 343.15* | -18.0 | -11.0 | -24.0 |
| | 361.2 | 147.15 | -18.0 | -24.0 | -28.0 |
| 氢化可的松 | 363.2 | 121.20* | -18.0 | -25.0 | -22.0 |
| | 363.2 | 327.20 | -18.0 | -17.0 | -22.0 |
| 地塞米松 | 393.3 | 373.15* | -14.0 | -8.0 | -27.0 |
| | 393.3 | 355.20 | -14.0 | -13.0 | -25.0 |
| 醋酸泼尼松 | 401.3 | 295.05* | -15.0 | -20.0 | -20.0 |
| | 401.3 | 340.95 | -15.0 | -24.0 | -24.0 |
| 乙酸氟氢可的松 | 423.3 | 239.05* | -15.0 | -26.0 | -16.0 |
| | 423.3 | 181.25 | -15.0 | -28.0 | -12.0 |
| 醋酸可的松 | 403.3 | 163.30* | -15.0 | -30.0 | -30.0 |
| | 403.3 | 343.20 | -15.0 | -20.0 | -24.0 |
| 醋酸地塞米松 | 435.3 | 415.30* | -16.0 | -9.0 | -29.0 |
| | 435.3 | 397.15 | -16.0 | -11.0 | -28.0 |
| 丁酸氢化可的松 | 433.3 | 345.15* | -16.0 | -11.0 | -24.0 |
| | 433.3 | 297.20 | -16.0 | -18.0 | -20.0 |

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

用甲醇配制浓度为 10 mg/L 的上述 8 种糖皮质激素，将浓度为 10 mg/L 的 8 种糖皮质激素用纯水依次稀释至 1000 μg/L 的混合标样。将 1000 μg/L 的 8 种糖皮质激素混合标样，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)

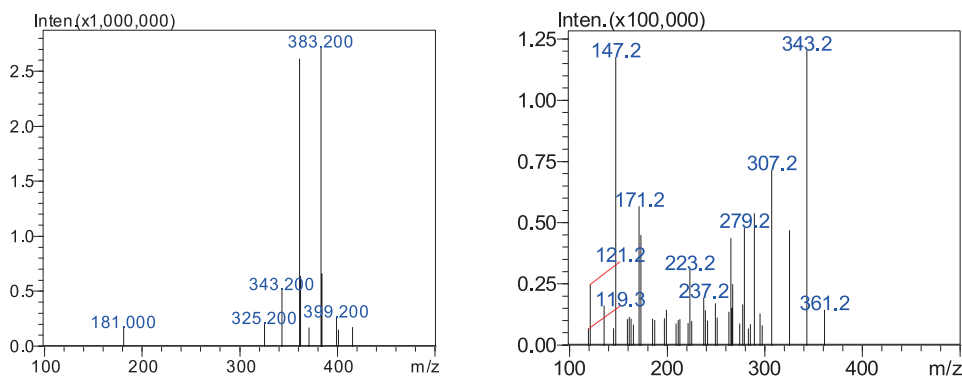
| 编号 | 名称 | 浓度 1 | 浓度 2 | 浓度 3 | 浓度 4 | 浓度 5 | 浓度 6 | 浓度 7 |
|----|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 泼尼松龙 | 0.5 | 1 | 2 | 5 | 10 | 25 | 50 |
| 2 | 氢化可的松 | 1 | 2 | 4 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| 3 | 地塞米松 | 1 | 2 | 4 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| 4 | 醋酸泼尼松 | 2 | 4 | 8 | 20 | 40 | 100 | 200 |
| 5 | 乙酸氟氢可的松 | 2 | 4 | 8 | 20 | 40 | 100 | 200 |
| 6 | 醋酸可的松 | 2 | 4 | 8 | 20 | 40 | 100 | 200 |
| 7 | 醋酸地塞米松 | 2 | 4 | 8 | 20 | 40 | 100 | 200 |
| 8 | 丁酸氢化可的松 | 1 | 2 | 4 | 10 | 20 | 50 | 100 |

1.3.2 样品前处理方法

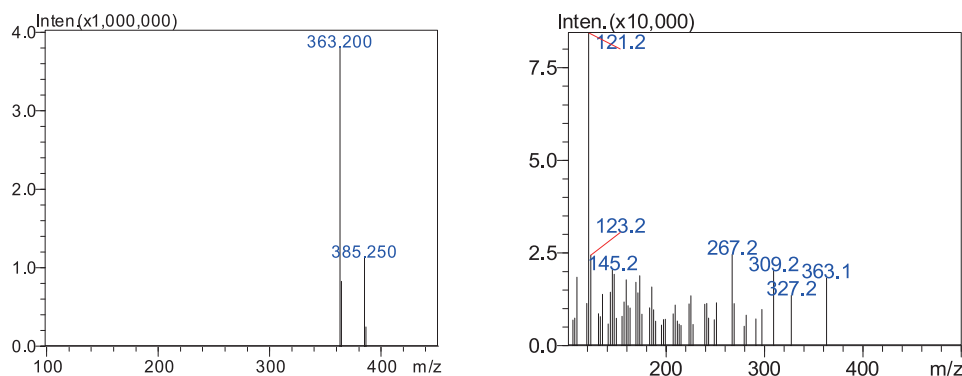
准确称取乳状样品约 1.0 g 于 100 mL 锥形瓶中，加入饱和氯化钠溶液 50 mL，稀硫酸 2 mL（稀硫酸由 2 mL 浓硫酸溶于 98 mL 水配制而成），振荡溶解后转移至 100 mL 分液漏斗中。用环己烷 30 mL 分三次萃取，必要时离心分离。合并环己烷并在 70°C 水浴上馏除，用 10 mL 乙腈溶解残渣并混匀，然后用 C18 固相萃取小柱进行吸附（小柱预先依次用 3 mL 甲醇和 5 mL 水活化），然后用乙腈和水（1:4, v/v）3 mL 淋洗，真空抽干。最后分别用 2.5 mL 乙腈和 2.5 mL 纯水分别洗脱，经 0.22 μm 滤膜过滤后取 10 μL 用于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

结果讨论

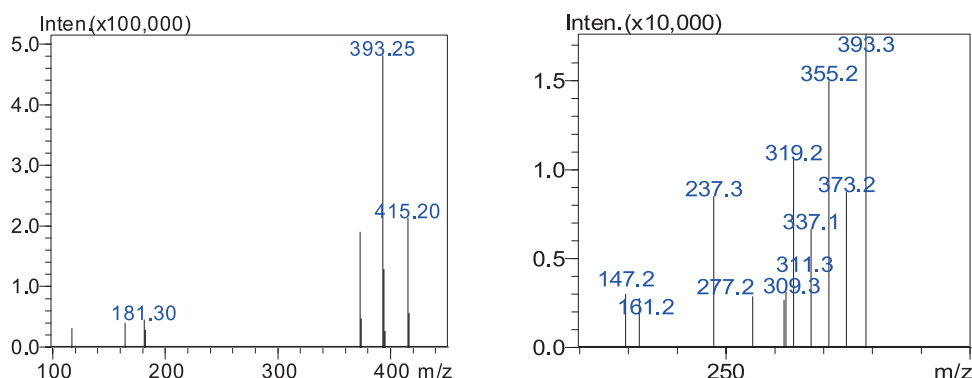
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



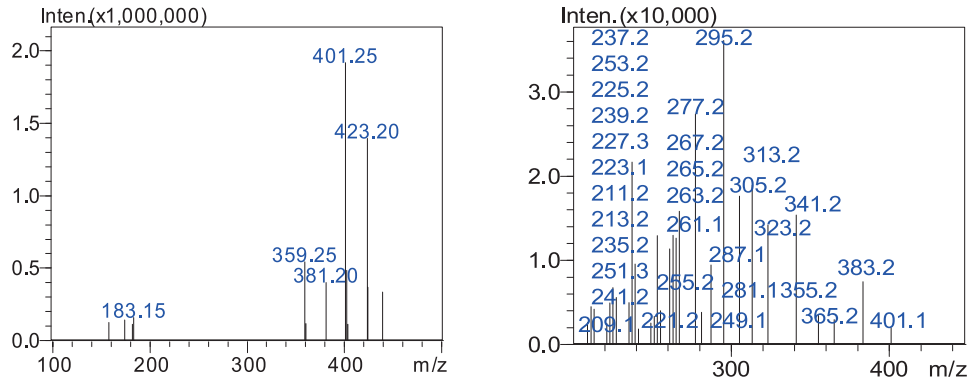
1. 泼尼松龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-17V）（右图）



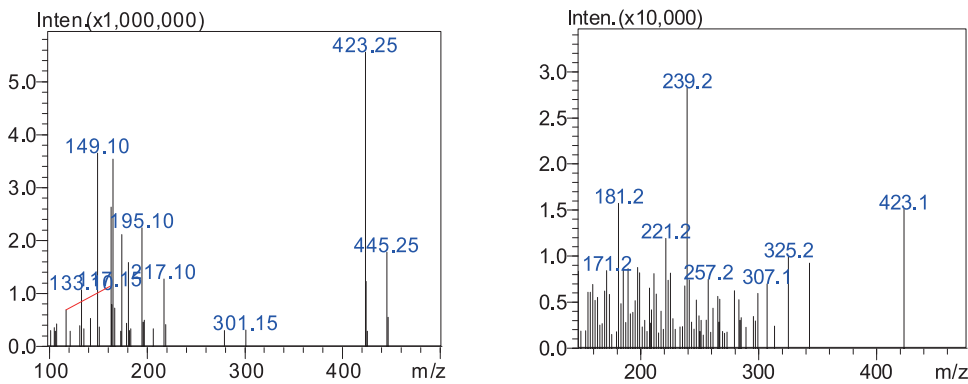
2. 氢化可的松的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



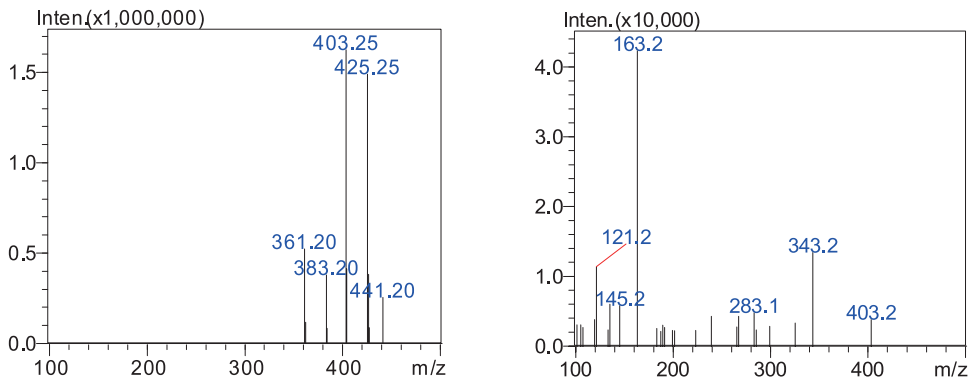
3. 地塞米松的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-15V）（右图）



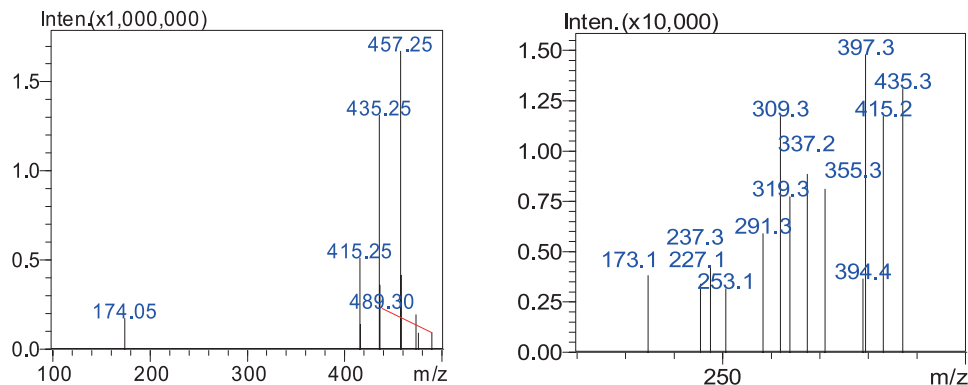
4. 醋酸泼尼松的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-20V) (右图)



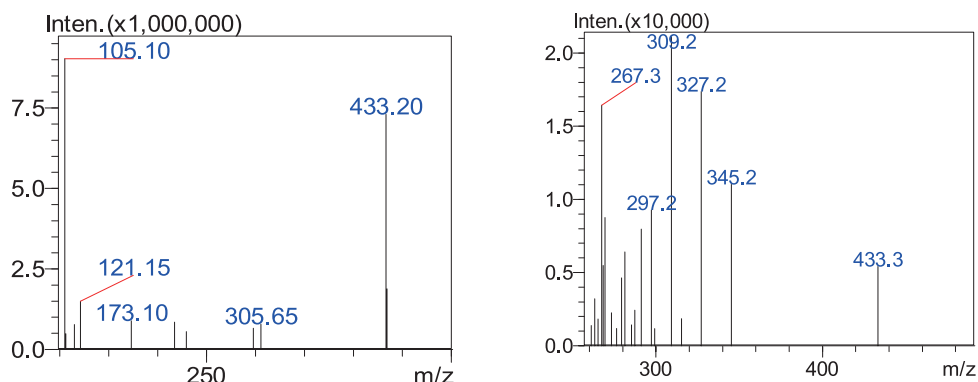
5. 乙酸氟氢可的松的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-30V) (右图)



6. 醋酸可的松的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-28V) (右图)



7. 醋酸地塞米松的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-14V) (右图)



8. 丁酸氢化可的松的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）

图1 8种糖皮质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。

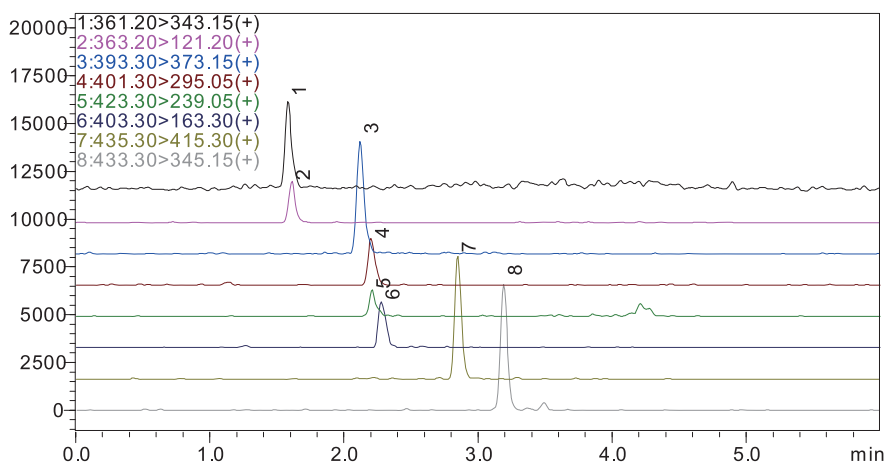
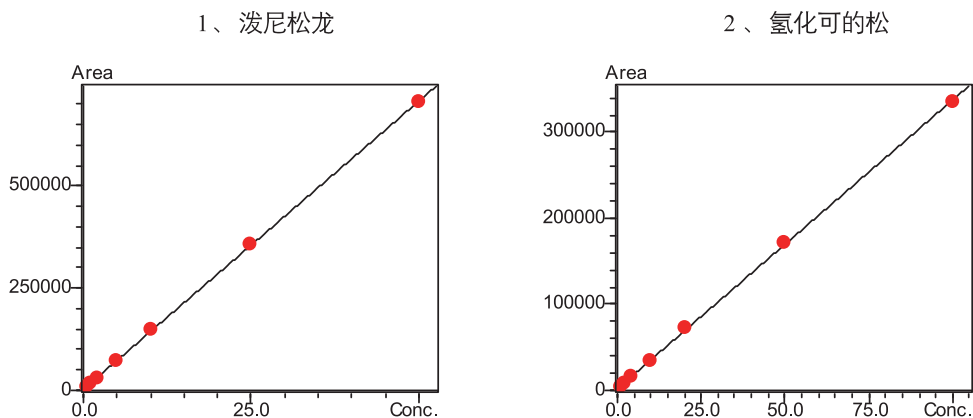


图2 混合标样的 MRM 色谱图

峰归属: 1、泼尼松龙 (1 μg/L); 2、氢化可的松 (2 μg/L); 3、地塞米松 (2 μg/L); 4、醋酸泼尼松 (4 μg/L); 5、乙酸氟氢可的松 (4 μg/L); 6、醋酸可的松 (4 μg/L); 7、醋酸地塞米松 (4 μg/L); 8、丁酸氢化可的松 (2 μg/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，8 种糖皮质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 0.9997~0.9999 之间，检出限和定量限见表 4。



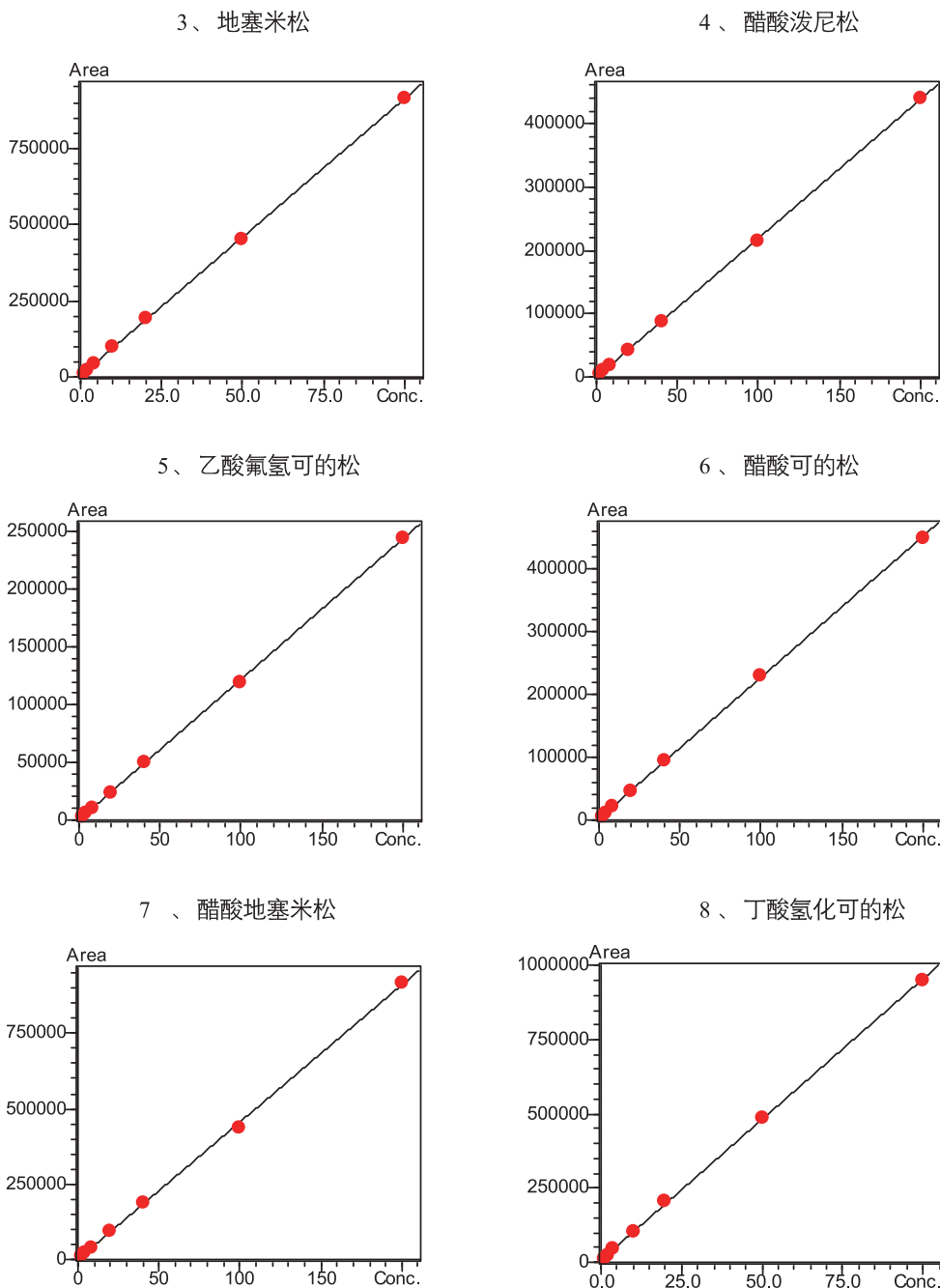


图3 8种糖皮质激素的标准工作曲线

表4 8种糖皮质激素的校准曲线参数

| 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 ($\mu\text{g/L}$) |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 泼尼松龙 | $Y = (14091.7)X + (3047.80)$ | 0.5-50 | 0.9999 | 0.06 | 0.20 |
| 氢化可的松 | $Y = (3355.25)X + (2114.46)$ | 1.0-100 | 0.9998 | 0.04 | 0.13 |
| 地塞米松 | $Y = (9077.02)X + (4723.96)$ | 1.0-100 | 0.9999 | 0.02 | 0.07 |
| 醋酸泼尼松 | $Y = (2189.74)X + (146.965)$ | 2.0-200 | 0.9999 | 0.08 | 0.27 |
| 乙酸氟氢可的松 | $Y = (1219.29)X + (88.6486)$ | 2.0-200 | 0.9999 | 0.06 | 0.20 |
| 醋酸可的松 | $Y = (2253.10)X + (2460.25)$ | 2.0-200 | 0.9999 | 0.07 | 0.23 |
| 醋酸地塞米松 | $Y = (4552.08)X + (760.466)$ | 2.0-200 | 0.9997 | 0.03 | 0.10 |
| 丁酸氢化可的松 | $Y = (9486.99)X + (7098.69)$ | 1.0-100 | 0.9999 | 0.01 | 0.04 |

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，8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0.038%~0.231%和0.80%~8.35%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 | 浓度 1 (RSD%) | | 浓度 2 (RSD%) | | 浓度 3 (RSD%) | |
|---------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 泼尼松龙 | 0.122 | 5.64 | 0.162 | 3.21 | 0.137 | 1.92 |
| 氢化可的松 | 0.153 | 5.90 | 0.130 | 2.33 | 0.134 | 0.96 |
| 地塞米松 | 0.115 | 3.03 | 0.115 | 2.41 | 0.123 | 0.80 |
| 醋酸泼尼松 | 0.170 | 8.35 | 0.077 | 3.07 | 0.137 | 2.41 |
| 乙酸氟氢可的松 | 0.194 | 7.23 | 0.093 | 5.17 | 0.145 | 1.80 |
| 醋酸可的松 | 0.231 | 6.67 | 0.090 | 4.55 | 0.176 | 1.52 |
| 醋酸地塞米松 | 0.117 | 5.91 | 0.038 | 4.04 | 0.106 | 1.08 |
| 丁酸氢化可的松 | 0.097 | 3.74 | 0.054 | 2.75 | 0.085 | 1.16 |

注：浓度 1 同表 3 浓度 1，浓度 2 同表 3 浓度 4，浓度 3 同表 3 浓度 7

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8种糖皮质激素标样的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。

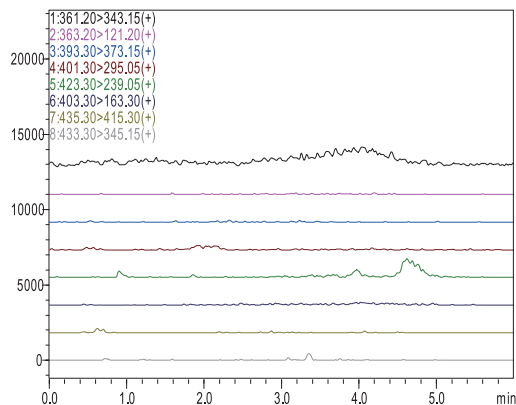


图4 空白化妆品基质的MRM色谱图

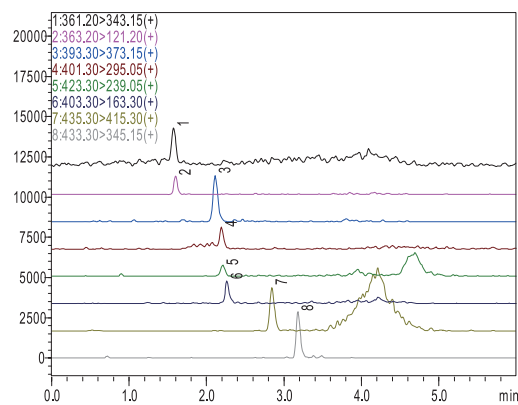


图5 化妆品基质加标的MRM色谱图

(浓度见表6加标浓度1，峰型归属见表6编号)

表6 化妆品中糖皮质激素检测与加标回收率结果

| 编号 | 名称 | 加标浓度1 | 实测浓度1 | 回收率1 | 加标浓度2 | 实测浓度2 | 回收率2 |
|----|---------|-----------------------------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| | | ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | (%) | ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | (%) |
| 1 | 泼尼松龙 | 0.5 | 0.46 | 92.6 | 5.0 | 4.78 | 95.6 |
| 2 | 氢化可的松 | 1.0 | 0.79 | 79.2 | 10 | 9.21 | 92.1 |
| 3 | 地塞米松 | 1.0 | 1.01 | 101.0 | 10 | 9.19 | 91.9 |
| 4 | 醋酸泼尼松 | 2.0 | 2.04 | 102.1 | 20 | 18.7 | 93.5 |
| 5 | 乙酸氟氢可的松 | 2.0 | 2.13 | 106.5 | 20 | 18.7 | 93.5 |
| 6 | 醋酸可的松 | 2.0 | 1.45 | 72.5 | 20 | 19.3 | 96.5 |
| 7 | 醋酸地塞米松 | 2.0 | 2.06 | 103.0 | 20 | 18.8 | 94.0 |
| 8 | 丁酸氢化可的松 | 1.0 | 1.05 | 105.0 | 10 | 8.03 | 80.3 |

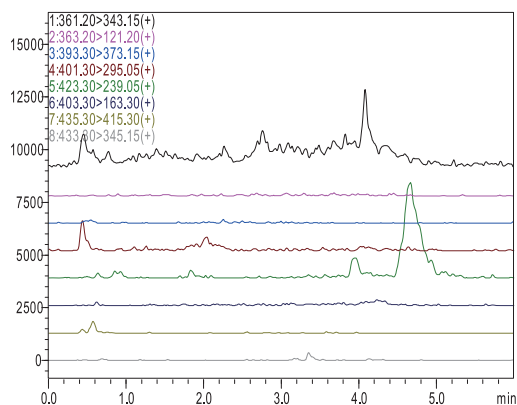


图 6 某国际品牌化妆品的 MRM 色谱图

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 3 种化妆品即 2 种面霜和 1 种洗面奶，均未检测到上述 8 种糖皮质激素。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 8 种糖皮质激素残留的分析方法。8 种糖皮质激素线性范围宽，相关系数在 0.9997~0.9999 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 0.038%~0.231% 和 0.80%~8.35% 之间，仪器精密度良好。化妆品基质加标两个不同浓度点，在定量限上均有很好的信号响应，回收率范围为 72.5%~106.5%。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糖皮质激素的检测需求。