

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定 洗发护发类化妆品中 6 种违禁药物

勾新磊¹, 刘伟丽^{1,2}, 张梅^{1,2}, 高峡^{1,2}, 赵新颖^{1,2}

(1. 北京市理化分析测试中心, 有机材料检测技术与质量评价北京市重点实验室 北京 100089;

2. 北京市食品安全分析测试工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法同时检测洗发护发类化妆品中 6 种违禁药物。样品经甲醇超声萃取, 用 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm)分离, 以甲醇和 0.1% 甲酸-水溶液为流动相梯度洗脱, 在电喷雾正离子模式下, 采用多反应监测(MRM)模式进行定性和定量分析。结果表明, 6 种药物在各自线性范围内的线性关系良好, 相关系数(R^2)均大于 0.997, 检出限为 0.9~13.3 μg/kg, 3 个加标水平下的回收率在 84.0%~94.7% 之间, RSD 在 1.3%~5.6% ($n=6$) 之间。该方法准确、简便, 可用于洗发护发类化妆品中违禁药物的快速检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS); 洗发护发类化妆品; 违禁药物

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2018)04-0485-07

doi: 10.7538/zpxb.2017.0116

Rapid Screening and Quantitative Detection of 6 Prohibited Drugs in Shampoo and Hair Growth Cosmetics by UPLC-MS/MS

GOU Xin-lei¹, LIU Wei-li^{1,2}, ZHANG Mei^{1,2}, GAO Xia^{1,2}, ZHAO Xin-ying^{1,2}

(1. Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing Technology & Quality Evaluation,
Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China;

2. Beijing Engineering Research Center of Food Safety Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: Baldness, alopecia and acne are common skin and hair diseases that may adversely influence the patient's social relationships. For reasons of safety and ease of use, cosmetic products are widely used to control these diseases. However, for the sake of profit and to enhance short-term efficacy, some manufacturers illegally add synthetic drugs to their cosmetic products. According to previous reports, minoxidil, flutamide, spironolactone, finasteride, dutasteride and ketoconazole are the most common topically

收稿日期: 2017-07-03; 修回日期: 2017-09-26

基金项目: 北京市自然科学基金-北京市科学技术研究院联合资助项目(L160005); 北京市科学技术研究院萌芽计划(2015-02);
北京市科学技术研究院创新团队项目(IG201605C1)资助

作者简介: 勾新磊(1983—), 男(汉族), 天津人, 助理研究员, 从事色谱-质谱分析研究。Email: 817411@163.com

通信作者: 赵新颖(1981—), 女(汉族), 北京人, 副研究员, 从事生物医药分析研究。E-mail: zhaoxinying_123@sina.com

网络出版时间: 2018-03-22; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180322.1136.002.html>

active anti-alopecia, anti-baldness, and anti-acne drugs. Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) is suitable for detecting these substances in an illegal product at lower concentrations, with a high degree of specificity, and obtaining additional information about the structure of the analytes. In this study, a method of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for rapid screening and quantification of six prohibited drugs in shampoo and hair growth cosmetics. The sample was ultrasonic extracted with methanol and separated on Waters Acquity UPLC BEH C18 column(100 mm×2.1 mm×1.7 μm). The electrospray ionization source in positive ion mode was used for analysing the six prohibited drugs in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results indicated that the standard curves were obtained with good correlation coefficients ($R^2 > 0.997$) in their concentration ranges. The limits of quantitation for six benzotriazole ultraviolet stabilizers were in the range of 0.9-13.3 μg/kg. The mean recoveries at three spiked levels were 84.0%-94.7% with the relative standard deviations of 1.3%-5.6%. Twenty kinds of shampoo and hair growth cosmetics were tested, where no prohibited drugs was found. This method is accurate, simple, rapid, which is suitable for rapid screening and detection of prohibited drugs in shampoo and hair growth cosmetics.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); shampoo and hair growth cosmetics; prohibited drugs

随着生活水平的不断提高,人们对美发有了更高要求,各种标识有去屑、防脱、生发等功效的洗发育发类化妆品日益繁多^[1]。然而,部分生产厂家利用洗发育发产品成分复杂、质量标准不完善等空缺,在产品中添加米诺地尔、螺内酯等临床药物,以增强抗脱发和去屑效果。米诺地尔、非那雄胺、酮康唑和螺内酯是一类应用广泛的育发、生发药物,在临床上已被证实具有抑制头皮毛囊变少,刺激毛根从而促进毛发生长,逆转脱发过程等作用。患者长期使用会对产品产生依赖,甚至出现刺激性皮炎、过敏、眩晕、肝功能下降、阳痿等症状^[2-3]。《化妆品安全技术规范》2015版^[4]规定:洗发育发产品中不得含有米诺地尔、酮康唑、螺内酯等物质。目前的检测研究主要关注米诺地尔、螺内酯和性激素等成分,而关于氟他胺、度他雄胺等新型药物的报道较少。因此,建立洗发育发类化妆品中非法添加违禁药物的检测方法具有重要意义。

洗发育发类化妆品中违禁药物的检测方法主要有薄层色谱法(TLC)^[5]、液相色谱法(LC)^[6-11]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[12-16]等。洗发育发类化妆品中植物提取物

成分日益增多,基质复杂多样,TLC法和LC法容易出现假阳性。而LC-MS/MS法具有灵敏度高、检出限低的特点,可以针对复杂基质进行多组分的定性和定量分析,广泛用于违禁药物的检测。

本研究拟建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法快速检测洗发育发类化妆品中6种违禁药物,希望为该类产品中违禁药物的检测及监控提供科学依据和技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Acquity超高效液相色谱仪,XEVO TQ串联质谱仪,Masslynx4.1工作站:美国Waters公司产品;KQ6000V超声波清洗器:昆山超声仪器有限公司产品;Milli-Q超纯水器:美国Millipore公司产品;CR22GⅢ离心机:日本日立公司产品。

1.2 材料与试剂

米诺地尔、酮康唑:纯度≥98%,上海安谱实验科技股份有限公司产品;非那雄胺、氟他胺:纯度≥98%,日本TCI公司产品;度他雄

胺:纯度 $\geq 99\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;螺内酯:纯度 $\geq 98\%$,阿达玛斯试剂有限公司产品;甲醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮:均为色谱纯,美国 Fisher 公司产品;实验用水:由

Milli-Q 净化系统制备;其他试剂均为分析纯;洗发护发样品:购自当地超市。

6 种药物的化学结构示于图 1。

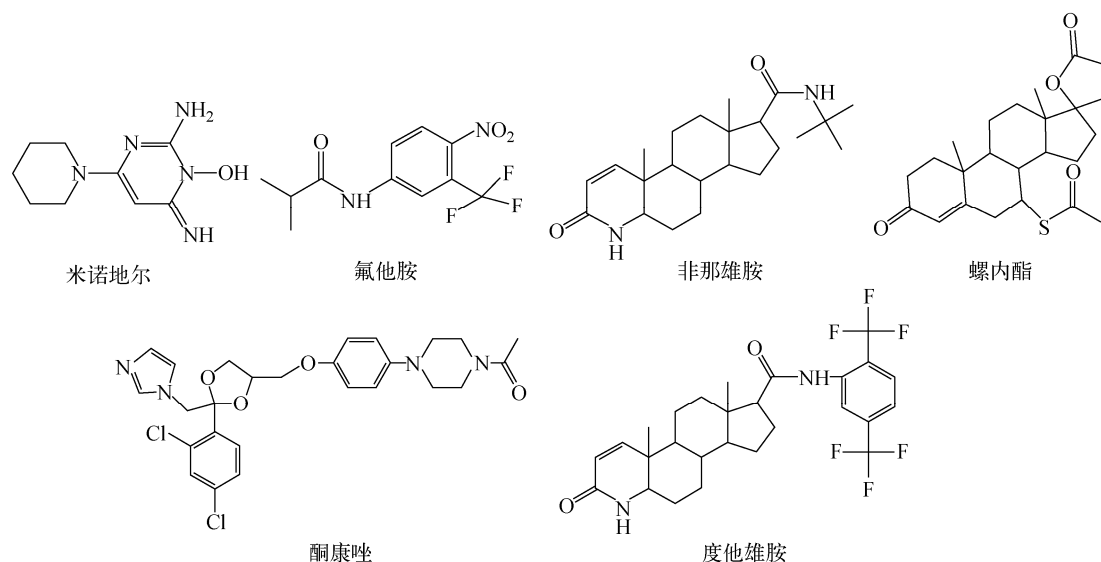


图 1 6 种药物的结构式

Fig. 1 Structural formulas of six drugs

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取适量的上述 6 种药物标准品,以甲醇溶解定容,制得浓度均为 1 000 mg/L 的储备液。分别准确移取各标准储备液于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制 10 mg/L 米诺地尔和氟他胺标准溶液,其他目标物浓度为 1 mg/L 的混合对照品储备液。所有标准溶液于 4 °C 保存。

1.4 样品处理

称取 1 g 样品(精确到 0.001 g)于 10 mL 具塞刻度离心管中,加入 8 mL 甲醇,涡旋 30 s,超声提取 20 min,放凉后加甲醇至刻度线,振荡、摇匀,以 6 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,待测。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C18 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.7 μm);流动相: A 为 0.1% 甲酸-水溶液, B 为甲醇;流速 0.2 mL/min;梯度洗脱程序: 0~6 min (10%~90% B), 6~8 min (90% B), 7~8.5 min (90%~10% B), 8.5~10 min (10% B);柱温

35 °C。

1.5.2 质谱条件 电喷雾正离子模式,多反应监测(MRM)模式;毛细管电压 3.0 kV;萃取电压 5.0 V;离子源温度 150 °C;脱溶剂气温度 350 °C;脱溶剂气流速 650 L/h;锥孔气流速 20 L/h;其他实验参数列于表 1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

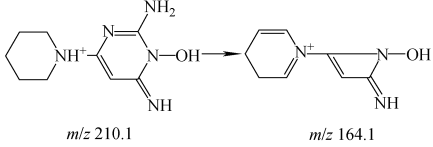
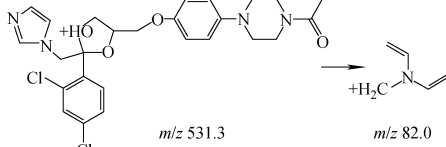
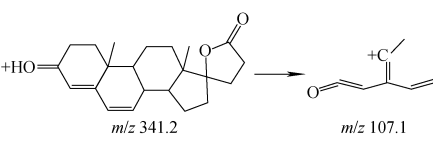
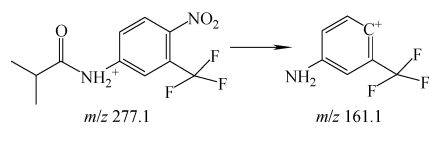
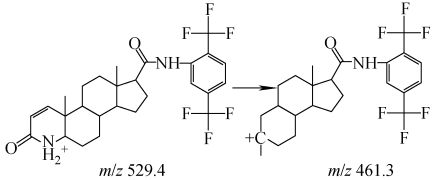
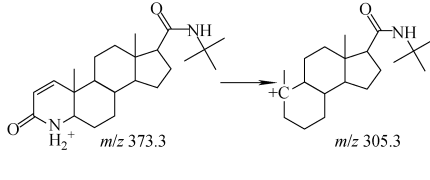
取 6 种药物的标准溶液,采用蠕动泵单独注入离子源,在正、负离子模式下全扫描,选择合适的电离方式和准分子离子峰。结果表明,在 ESI⁺ 模式下,螺内酯脱去乙酰基硫基后生成 m/z 341.2 离子,其丰度较高,故选择 m/z 341.2 作为母离子^[13]。其他 5 种药物均可获得较高丰度的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰。确定母离子后,采用子离子扫描方式进行二级质谱分析,对子离子进行筛选,以确定定量离子和定性离子。然后优化离子源温度、去溶剂气温度及流量、锥孔气流量,使待测物的离子化效率达到最佳。6 种药物定量离子的裂解途径列于表 2。

表 1 6 种药物的质谱条件
Table 1 MS/MS parameters for six drugs

化合物 Compounds	母离子 Parent ions (<i>m/z</i>)	子离子 Product ions (<i>m/z</i>)	锥孔电压 Cone voltages/V	碰撞能量 Collision voltages/eV
米诺地尔 Minoxidil	210.1	164.1*,193.1	20	24,25
酮康唑 Ketoconazole	531.3	82.0*,489.3	42	42,31
螺内酯 Spironolacton	341.2	107.1*,91.0	28	50,30
氟他胺 Flutamide	277.1	161.1*,231.1	22	25,20
度他雄胺 Dutasteride	529.4	461.3*,95.1	42	45,34
非那雄胺 Finasteride	373.3	305.3*,317.3	28	30,22

注：* 表示定量离子

表 2 6 种药物定量离子的裂解规律
Table 2 Fragmentation pathways of quantitative ions of six drugs

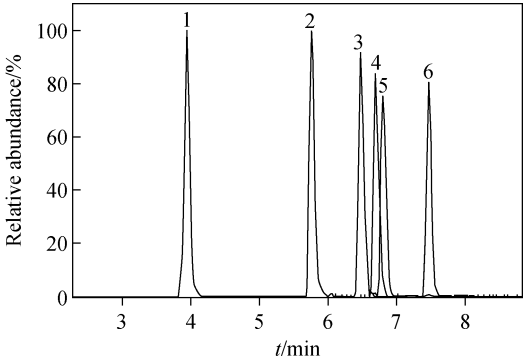
化合物 Compounds	裂解途径 Fragmentation pathways	化合物 Compounds	裂解途径 Fragmentation pathways
米诺地尔		酮康唑	
螺内酯		氟他胺	
度他雄胺		非那雄胺	

2.2 色谱条件的优化

实验考察了甲醇-水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相对目标化合物分离效果的影响。结果显示,以甲醇为有机相时,各待测物响应稳定,色谱峰形较好;而采用乙腈为有机相时,响应值明显降低。在流动相中加入甲酸,可提高目标化合物的离子化效率,获得更高的灵敏度。因此,实验选择甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相。6 种药物的叠加总离子流图示于图 2。

2.3 提取条件的优化

实验考察了乙酸乙酯、丙酮、乙腈、甲醇作为提取溶剂在定容体积 10 mL,超声 20 min



注:1. 米诺地尔;2. 酮康唑;3. 螺内酯;
4. 氟他胺;5. 度他雄胺;6. 非那雄胺

图 2 6 种药物叠加总离子流色谱图

Fig. 2 Combined total ion chromatogram of six drugs

时,对目标化合物的提取效果。在 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标水平下,不同提取剂的回收率示于图 3。可见,4 种提取剂对酮康唑、螺内酯、氟他胺、度他雄胺和非那雄胺均具有较好的提取效果,回

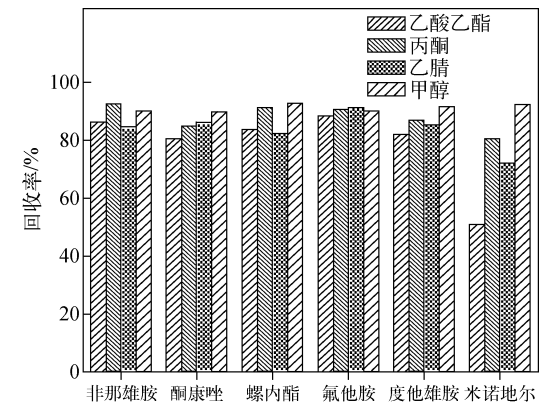


图 3 不同提取溶剂对 6 种药物回收率的影响
Fig. 3 Effect of different extraction solvents on recoveries of six drugs

收率均大于 80%。以甲醇作为提取剂时,米诺地尔的回收率明显大于其他 3 种溶剂;乙酸乙酯和丙酮对目标物中脂类、高级醇类等物质具有较好的溶解性,提取的杂质较多;而乙腈价格高、毒性大。因此,选择甲醇作为提取剂,6 种药物的回收率在 89.4%~92.5%之间。

进一步考察提取时间对提取效率的影响。结果表明,20 min 后,目标化合物的回收率提高不明显,所以确定超声提取时间为 20 min。

2.4 线性范围与检出限、定量限

以空白样品逐级稀释标准溶液,配制 6 种药物的系列混合标准工作液,其中氟他胺浓度为 5.0~1 000.0 $\mu\text{g}/\text{L}$,其他 5 种药物浓度为 0.5~100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。分别以各分析物的峰面积(y)对相应的浓度(x)做线性回归,得到线性回归方程和相关系数,以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)确定检出限(LOD)和定量限(LOQ),其结果列于表 3。

表 3 6 种药物的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of six drugs

化合物 Compounds	线性方程 Linear equations	相关系数 R^2	检出限 LODs/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 LOQs/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
米诺地尔	$y=669.5x-2.9$	0.997	1.0	3.0
酮康唑	$y=80.1x+662.7$	0.998	0.9	2.8
螺内酯	$y=595.4x+70.9$	0.998	1.2	3.5
氟他胺	$y=49.9x+16.6$	0.998	13.3	40.0
度他雄胺	$y=459.1x+88.8$	0.999	1.7	5.0
非那雄胺	$y=447.1x+136.3$	0.997	1.3	4.0

2.5 回收率和精密度

在空白样品中分别添加不同浓度的标准溶液,进行添加回收实验。氟他胺的 3 个加标水平分别为 50.0、500.0、1 000.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其他 5 种药物的加标水平为 5.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每个添加浓度平行测定 6 次,结果列于表 4。可见,不同浓度水平下,各待测物的平均回收率为 84.0%~94.7%,相对标准偏差为 1.3%~5.6%。

2.6 实际样品分析

利用本方法检测 20 个洗发护发化妆品样

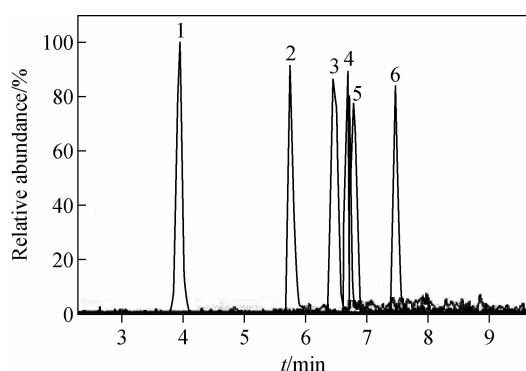
品。结果表明,样品中上述 6 种药物的含量均低于其检出限。空白样品在加标水平 2 下,测试液的叠加总离子流色谱图示于图 4。

3 结论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法快速测定洗发护发类化妆品中 6 种违禁药物。该方法操作简便、检出限低、准确度高,能够满足洗发护发类化妆品中 6 种药物的检测要求,可为违禁药物的检测及监控提供方法参考。

表 4 回收率和精密度检测结果
Table 4 Results of precisions and recoveries

化合物 Compounds	加标水平 1 Spiked level 1		加标水平 2 Spiked level 2		加标水平 3 Spiked level 3	
	回收率 Recoveries/%	RSDs/%	回收率 Recoveries/%	RSDs/%	回收率 Recoveries/%	RSDs/%
米诺地尔	86.5	2.6	89.5	2.8	92.5	2.5
酮康唑	85.3	3.6	92.1	2.0	93.4	2.0
螺内酯	84.3	3.2	90.4	1.8	94.7	1.9
氟他胺	86.2	5.6	88.0	3.0	92.0	2.7
度他雄胺	84.0	4.0	89.9	1.9	93.8	1.3
非那雄胺	86.1	3.9	91.5	3.5	92.1	2.0



注:1. 米诺地尔;2. 酮康唑;3. 螺内酯;
4. 氟他胺;5. 度他雄胺;6. 非那雄胺

图 4 空白样品在加标水平 2 下,
测试液的叠加总离子流色谱图

Fig. 4 Combined total ion chromatograms
of black sample at spiked level 2

参考文献:

- [1] 王坦,周紫燕. 防脱发领域研究进展[J]. 日用化学品科学,2013,36(9):27-31.
WANG Tan, ZHOU Ziyang. Research progress on anti-falling hair and hair growth[J]. Deterg Cosmet, 2013, 36(9): 27-31(in Chinese).
- [2] 陈声利,孙建方. 米诺地尔治疗脱发的药理与临床研究[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,2004,30(5):276-278.
CHEN Shengli, SUN Jianfang. Pharmacological and clinical studies of minoxidil in the treatment of alopecia[J]. Foreign Medical Sciences: Section of Dermatology and Venereology, 2004, 30(5): 276-278(in Chinese).
- [3] 韩勇,李琳,李英春. 促毛囊生长药物的研究进展[J]. 山东医药,2006,46(1):79-80.
HAN Yong, LI Lin, LI Yingchun. Advances in research of hair follicle growth promoting drugs [J]. Shandong Medical Journal, 2006, 46(1): 79-80(in Chinese).
- [4] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [5] 唐丽丽,谭小勇,陈华龙. 育发健康产品中米诺地尔的薄层色谱快筛方法研究[J]. 海峡药学,2016,28(9):77-78.
TANG Lili, TAN Xiaoyong, CHEN Hualong. Determination method of minoxidil in nurturing hair products by thin layer chromatography[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2016, 28(9): 77-78(in Chinese).
- [6] 龚越强,吕冠欣. HPLC 测定中草药育发类化妆品中非法添加的米诺地尔[J]. 食品与药品,2014,16(4):267-269.
GONG Yueqiang, LV Guanxin. Determination of illegally added minoxidil in herbal hair growth cosmetics by HPLC[J]. Food and Drug, 2014, 16(4): 267-269(in Chinese).
- [7] 张卫中,徐靖,汪欢晃,等. 超高效液相色谱法测定洗发类化妆品中 3 种去屑剂[J]. 理化检验:化学分册,2009,45(6):676-678.
ZHANG Weizhong, XU Jing, WANG Huanhuang, et al. UPLC determination of 3 anti-dandruff agents in shampoo cosmetics[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2009, 45(6): 676-678(in Chinese).
- [8] 吕冠欣,龚越强,左仕深,等. 快速筛查中草药育发类产品中非法添加米诺地尔的研究[J]. 今日药学,2014,24(10):708-711.

- LV Guanxin, GONG Yueqiang, ZUO Shishen, et al. A quick determination method of illegally added minoxidil in herbal hair growth cosmetics [J]. *Pharmacy Today*, 2014, 24(10): 708-711 (in Chinese).
- [9] 刘亚雄, 吴达萍, 孙婷婷. 高效液相色谱法检测防脱、育发类化妆品中的非那雄胺[J]. *日用化学工业*, 2014, 44(1): 54-56.
- LIU Yaxiong, WU Daping, SUN Tingting. Determination of finasteride in anticalvous hair cosmetics by high performance liquid chromatography[J]. *China Surfactant Detergent and Cosmetics*, 2014, 44(1): 54-56(in Chinese).
- [10] 熊小婷, 谭建华, 李慧勇, 等. 高效液相色谱/二极管阵列检测法快速测定育发类化妆品中8种违禁药物分析测试学报[J]. 2013, 32(4): 448-453.
- XIONG Xiaoting, TAN Jianhua, LI Huiyong, et al. Rapid determination of 8 prohibited drugs in hair growth cosmetics by HPLC/DAD[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2013, 32(4): 448-453(in Chinese).
- [11] 郭洁, 张华珺, 刘齐, 等. 高效液相色谱法同时测定洗发水中5种去屑剂[J]. *日用化学工业*, 2015, 45(12): 715-718.
- GUO Jie, ZHANG Huajun, LIU Qi, et al. Simultaneous determination of content of five kinds of antidandruff agent in shampoo by high performance liquid chromatography[J]. *China Surfactant Detergent and Cosmetics*, 2015, 45(12): 715-718(in Chinese).
- [12] 郑磊, 胡小键, 林少彬. 育发产品中斑蝥素和氮芥及米诺地尔的液相色谱-串联质谱测定法[J]. *环境与健康杂志*, 2016, 33(1): 66-68.
- ZHENG Lei, HU Xiaojian, LIN Shaobin. Determination of cantharidin, nitrogen mustard and minoxidil in nurturing hair products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Environment and Health*, 2016, 33(1): 66-68(in Chinese).
- [13] 赵佳丽, 欧贝丽, 周燕. 超高效液相色谱-质谱联用快速同时检测止痒类中药制剂中添加11种化学药物成分[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(12): 1 558-1 562.
- ZHAO Jiali, OU Beili, ZHOU Yan. Simultaneous determination of 11 chemicals added in itching agents traditional Chinese edicines by UPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2016, 33(12): 1 558-1 562(in Chinese).
- [14] 刘齐, 张华珺, 郭洁, 等. HPLC-MS/MS法同时测定育发液中9种禁限用物质[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(9): 1 660-1 666.
- LIU Qi, ZHANG Huajun, GUO Jie, et al. Simultaneous determination of 9 restricted substances in hair growth liquid by HPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(9): 1 660-1 666(in Chinese).
- [15] WU C S, JIN Y, ZHANG J L, et al. Simultaneous determination of seven prohibited substances in cosmetic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2013, 24(6): 509-511.
- [16] DE O D, PELLEGRINI M, PICHINI S, et al. High-performance liquid chromatography-diode array and electrospray mass spectrometry analysis of non-allowed substances in cosmetic products for preventing hair loss and other hormone dependent skin diseases[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(3): 641-648.
- [17] 刘萍, 王本杰, 魏春敏, 等. 人血浆中螺内酯及其代谢物坎利酮的LC-MS测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(11): 842-845.
- LIU Ping, WANG Benjie, WEI Chunmin, et al. Determination of spironolactone and its metabolite canrenone in human plasma by LC-MS[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2008, 39(11): 842-845(in Chinese).