

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 化妆品中的3种磺脲类物质

周莉莉*, 王艳丽, 杨颖, 薛霞, 杨昊, 刘桂亮,
郑红, 张艳侠, 卢兰香

(山东省产品质量监督检验研究院 国家加工食品质量监督检验中心(山东), 山东 济南 250103)

摘要:建立了同时测定化妆品中3种磺脲类物质(氨磺丁脲、氯磺丙脲及甲苯磺丁脲)的超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。霜剂、水剂、膏剂等不同类型的化妆品样品通过酸化甲醇提取, 提取液经离心过滤后用水稀释, 超高效液相色谱分离, 串联质谱检测, 外标法定量, 5 min内即可完成3种化合物的分离分析。3种磺脲类化合物在0.001~0.1 mg/L范围内呈良好线性, 其相关系数均大于0.999, 定量下限均为0.08 mg/kg。在低、中、高3个加标水平下的平均回收率为80.9%~117.0%, 相对标准偏差为3.6%~9.7%。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 化妆品; 氨磺丁脲; 氯磺丙脲; 甲苯磺丁脲

中图分类号: O657.63; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2013)09-1086-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.09.010

Simultaneous Determination of 3 Sulfonylureas in Cosmetics by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

ZHOU Li-li*, WANG Yan-li, YANG Ying, XUE Xia, YANG Hao, LIU Gui-liang, ZHENG Hong,
ZHANG Yan-xia, LU Lan-xiang

(National Center for Quality Supervision and Inspection of Processed Food(Shandong), Shandong Supervision and Inspection Institute for Product Quality, Jinan 250103, China)

Abstract: A comprehensive ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric (UPLC - MS/MS) method was developed for the determination of 3 sulfonylureas (carbutamide, chlorpropamide and tolbutamide) in cosmetics. Various cosmetic samples, including cream, aqua and ointment, were extracted with acidified methanol and then diluted with water. The extract was separated with reversed-phase UPLC using a binary eluent under isocratic conditions, and determined by MS/MS under the negative electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring. The result indicated that a good separation of three compounds was obtained in 5 min. The calibration curves for 3 sulfonylureas were linear in the range of 0.001 - 0.1 mg/L with correlation coefficients more than 0.999. The limits of quantitation (LOQs) for 3 sulfonylureas were all 0.08 mg/kg. The mean recoveries at three spiked levels ranged from 80.9% to 117.0% with relative standard deviations ($n = 6$) of 3.6% - 9.7%. Under the optimal conditions, The method has good simplicity, sensitivity and stability, and is suitable for the rapid determination of 3 sulfonylureas in cosmetics.

Key words: ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry; cosmetics; carbutamide; chlorpropamide; tolbutamide

化妆品作为日常用品, 因适用范围广、长时间驻留人体等问题, 其安全性备受关注。磺脲类药物具有 $R_1-SO_2NHCONH-R_2$ 基本结构, 医学上常用作降血糖药物。氯磺丙脲、甲苯磺丁脲和氨磺丁脲为第一代磺脲类代表性药物, 有较高的血浆蛋白结合率, 对脂肪细胞和脂肪细胞因子均有良好作用。

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-05-14

基金项目: 国家标准委员会计划项目(20101090-T-607); 国家质检总局科技计划项目(2009QK246)

* 通讯作者: 周莉莉, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品化妆品相关研究与检测分析, Tel: 0531-89701895, E-mail: sdqizhoulili@126.com

有临床实验研究表明, 部分磺脲类药物可使患者体重出现减轻, 而且体重指数越大, 体重下降幅度就越大。磺脲类药物还会引起消化道反应以及皮肤过敏反应等, 严重者会造成造血系统受抑制, 白细胞减少^[1-2]。

氨磺丁脲、氯磺丙脲和甲苯磺丁脲是我国《化妆品卫生标准》^[3]、《化妆品卫生规范》^[4]、欧盟化妆品规程(Council Directive 76/768/EEC)^[5]、美国食品药品监督管理局颁布的化妆品手册(Cosmetic Handbook)^[6]和东盟化妆品法规^[7]中均明确规定的禁用物质, 不得作为化妆品组分添加。目前关于磺脲类化合物检测方法的研究报道主要涉及口服药物及制剂, 采用的方法为液相色谱法^[8-10]及液相色谱-质谱法^[11-12], 尚无相关化妆品检测方法标准及测定报道。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术, 通过优化前处理方法和色谱-质谱条件, 建立了化妆品中氨磺丁脲、氯磺丙脲和甲苯磺丁脲3种违禁添加药物的定性与定量分析方法。

1 实验部分

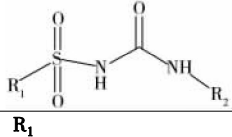
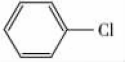
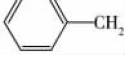
1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC-Quattro Premier XETM 质谱联用仪, 配有电喷雾离子源及 Masslynx 4.1 数据处理系统(美国 Waters 公司); Sigma 3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 电子天平(瑞士 Sartorius 公司); SIR 漩涡混合器(德国 IKA 公司)。

氨磺丁脲、氯磺丙脲及甲苯磺丁脲标准品购于 Sigma-Aldrich 公司, 相应标准品化学结构图、CAS 号、分子式和分子量等信息见表 1; 甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司); 其余试剂均为分析纯(北京化工厂); 水为超纯水(18.2 MΩ·cm); 0.22 μm 有机滤膜。

表 1 3 种磺脲类物质的化学结构示意图、CAS 号、分子式和分子量

Table 1 Chemical structure sketch maps, CAS No., formulas and relative molecular mass of 3 sulfonylureas

Compound	Structure	CAS No.	Formula	M_w	
Carbutamide (氨磺丁脲)		(CH ₂) ₃ CH ₃	339-43-5	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	271.34
Chlorpropamide (氯磺丙脲)		(CH ₂) ₂ CH ₃	94-20-2	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	276.73
Tolbutamide (甲苯磺丁脲)		(CH ₂) ₃ CH ₃	64-77-7	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	270.35

1.2 样品前处理

称取 1.0 g 试样(精确至 0.01 g), 置于 25 mL 比色管中, 加入 15 mL 1% 甲酸甲醇溶液旋涡 1 min, 超声提取 15 min 后冷却至室温, 用 1% 甲酸甲醇溶液定容至刻度, 转移至离心管中, 以不低于 3 000 r/min 离心 10 min。若样液较混浊, 可将离心管放入冰箱中 0 °C 以下冷冻 1 h。移取上清液 1.0 mL, 加入 1.5 mL 水, 混合均匀后经微孔滤膜过滤, 上机测定。

1.3 色谱与质谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm i. d., 1.7 μm); 流动相为甲醇-0.2% 甲酸水溶液(40:60, 体积比); 流速 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL。

电喷雾离子源(ESI): 正离子模式; 毛细管电压: 3.5 kV; 萃取电压: 3.0 V; 离子源温度: 110 °C; 脱溶剂气温度: 450 °C; 脱溶剂气流速 600 L/h; 锥孔反吹气流速 50 L/h; 碰撞室压力: 3.0 × 10⁻³ mbar; 多离子反应监测(MRM), 各物质优化采集参数见表 1。采用溶剂延迟技术, 运行开始时,

色谱柱流出液经六通切换阀切换至废液中直至 0.5 min, 质谱从 0.5 min 开始采集数据至 4.5 min, 同时六通切换阀又将柱流出液切换至废液中。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件

3 种磺脲类化合物(氯磺丙脲、甲苯磺丁脲和氨磺丁脲)均具有弱酸性、脂溶性, 在提取样品时, 加入酸化甲醇可使样品中磺脲类成为游离态, 增加其在甲醇中的溶解度。同时由于化妆品中含有较多蛋白质^[13], 甲醇作为提取液主要成分可以促使蛋白质变性而明显减少其在提取液中的存在, 减少基质对磺脲类测定的影响, 保护色谱柱。

2.1.1 提取溶液酸浓度的确定 在同一样品(经测定不含氯磺丙脲、甲苯磺丁脲和氨磺丁脲 3 种物质)中添加适量待测物混合标样, 混合后用氮气缓慢吹干。以甲酸含量分别为 0、0.5%、1%、2%、4% 的甲酸甲醇溶液作为提取液, 考察了不同酸浓度提取液对样品的提取效率。结果显示, 酸性甲醇对待测物的提取效果比甲醇好, 其中以 1% 甲酸甲醇作为提取剂时, 3 种待测物的提取效率最高。

2.1.2 净化条件 考虑到化妆品样品基质的复杂性, 实验选择具有代表性的霜剂、水剂和膏剂化妆品-保湿霜 1(略稀)、保湿霜 2(粘稠)、爽肤水、嫩肤水、中成药屑克洗发膏作为样品基质, 分别加入 1% 甲酸甲醇溶液超声提取后, 选用 2 种 SPE 小柱(Oasis[®] HLB 亲水亲酯平衡反相固相萃取柱、强阴离子交换 MAX 反相固相萃取柱), 通过加标回收实验考察相应 SPE 小柱的净化效果, 实验结果表明, 过柱后回收率无明显提高, 色谱峰形及色谱峰信噪比也无明显改善, 过柱效果不明显。此外, 黏稠保湿霜等化妆品样品经酸性甲醇后溶液较混浊, 若将该类提取液置于冰箱中 0 °C 以下冷冻 1 h 后, 可得到较好的过膜效果。因此净化实验采用未过柱方式, 并将提取液置于冰箱中冷冻 1 h。

2.2 色谱条件的优化

由于 3 种待测物的醇溶性较好, 在 C₁₈ 色谱柱上保留行为合适。为此, 实验选择 Waters BEH C₁₈ 柱(粒径 1.7 μm, 50 mm × 2.1 mm, i. d.) 为色谱分离柱, 比较了甲醇-水(40 : 60)、甲醇-10 mmol/L 醋酸铵溶液(40 : 60)、甲醇-0.2% 甲酸水溶液(40 : 60) 和乙腈-水(30 : 70)、乙腈-10 mmol/L 醋酸铵溶液(30 : 70)、乙腈-0.2% 甲酸溶液(30 : 70) 6 种流动相体系的分离效果, 实验发现, 在 C₁₈ 键合固定相上分离试样中的磺脲类化合物时, 选择甲醇-0.2% 甲酸水(40 : 60) 体系为流动相, 可获得适中保留时间、良好峰形及高质谱响应。

2.3 质谱条件的优化

在正离子检测模式下进行一级质谱分析, 得到待测物的准分子离子峰, 对毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气流量等参数进行优化, 使样液中待测物的离子化效率达到最佳。然后对准分子离子峰进行子离子扫描, 得到碎片离子信息, 对碰撞能量等参数进行优化, 使准分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度达到最大。优化后 3 种磺脲待测物的色谱保留时间、一级质谱的锥孔电压和二级质谱的碰撞能量参数见表 2。此外, 将色谱峰按出峰时间进行分时采集, 可最大程度增加对提取离子的扫描时间, 增强方法灵敏度和重现性。3 种磺脲待测物的 MRM 谱图如图 1 所示。

表 2 3 种磺脲类物质的检测参数
Table 2 UPLC-MS/MS detection data for 3 sulfonylureas

Compound	Retention time (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	Daughter ions (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Carbutamide	1.20	272.1	155.9, 74.2*	25	18, 12
Chlorpropamide	2.66	277.1	192.0, 174.9*	20	12, 20
Tolbutamide	3.66	271.1	154.8, 74.3*	25	18, 12

* quantitation ion

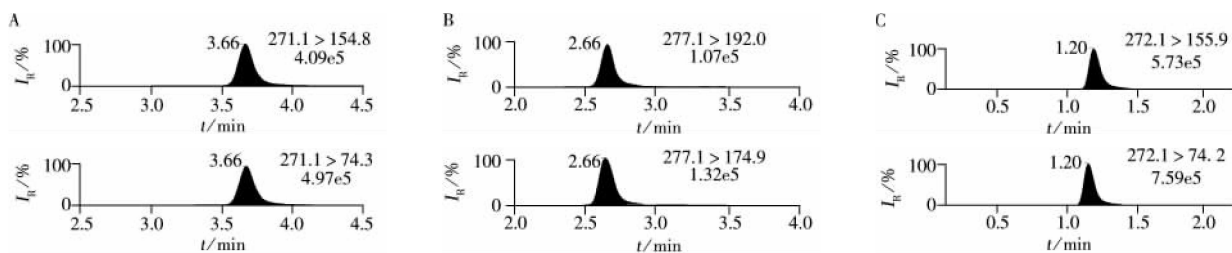


图1 基质匹配加标3种磺脲类物质的多反应监测质量色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of a blank sample spiked with 3 sulfonylureas

A. tolbutamide; B. chlorpropamide; C. carbutamide

2.4 基质效应的消除

为了最大限度消除基质效应干扰, 本实验采用基质匹配法定量。以空白化妆品样品的提取液作为标准溶液的稀释溶液, 可使标准溶液和样品溶液具有相同的离子化环境, 从而消除基质效应。

2.5 方法的线性范围及定量下限

在本方法所确定的色谱和质谱条件下, 对一系列质量浓度的3种磺脲类待测物混合标液按浓度从低到高进行分析, 3种待测物的线性范围、回归方程及相关系数见表3。结果显示, 3种待测物在0.001~0.1 mg/L范围内呈良好线性, 其相关系数均大于0.999。按10倍信噪比计算得出3种磺脲类化合物在化妆品中的定量下限均为0.08 mg/kg。

表3 3种磺脲类物质的线性范围、线性方程、相关系数及定量下限

Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients(r) and LOQs of 3 sulfonylureas

Compound	Linear range $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Linear equation	r	LOQ $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
Carbutamide	0.001~0.1	$Y = 806.6X - 80.80$	0.9997	0.08
Chlorpropamide	0.001~0.1	$Y = 492.0X - 34.75$	0.9998	0.08
Tolbutamide	0.001~0.1	$Y = 959.4X - 473.7$	0.9996	0.08

2.6 回收率与精密度

分别在空白保湿霜1(略稀)、保湿霜2(粘稠)、嫩肤水、中成药屑克洗发膏4个样品中依次添加低、中、高3个水平的3种磺脲类待测物混合标准溶液, 每个水平取6个平行样, 按本方法进行提取处理并分析测定, 计算添加回收率和精密度, 结果见表4。3种磺脲类物质的平均回收率在80.9%~117.0%之间, 相对标准偏差在3.6%~9.7%之间, 数据表明本方法可满足检测要求。

表4 化妆品中3种磺脲的加标回收率及相对标准偏差($n=6$)Table 4 Spiked recoveries and RSDs for 3 sulfonylureas in cosmetic samples($n=6$)

Compound	Added $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Toner(嫩肤水)		Shampoo(洗发膏)		Essence(保湿霜1)		Serum(保湿霜2)	
		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Carbutamide	0.08	83.1~98.3	7.1	93.7~99.4	5.3	95.1~102.4	4.8	90.4~98.6	3.7
	0.40	85.9~97.1	6.0	83.6~94.9	5.0	86.7~98.2	4.7	87.2~95.8	4.6
	0.80	83.0~96.2	4.7	87.1~94.3	3.8	82.3~97.1	6.2	82.7~96.4	5.8
Chlorpropamide	0.08	89.1~96.3	5.0	91.4~97.2	4.7	93.3~98.1	3.6	88.0~94.3	5.3
	0.40	90.2~95.1	4.3	88.3~94.8	4.5	91.7~99.4	4.2	89.5~93.7	5.0
	0.80	89.9~94.6	4.0	82.4~104.3	9.7	86.8~98.3	3.9	84.1~103.2	8.2
Tolbutamide	0.08	84.6~100.2	7.8	100.1~117.0	8.6	90.6~97.3	6.1	87.2~92.1	4.4
	0.40	80.9~96.4	6.5	87.1~97.8	5.0	86.9~95.7	7.3	82.3~103.2	9.5
	0.80	86.1~98.9	4.8	85.2~98.8	6.2	89.5~95.2	6.0	84.4~97.7	6.2

2.7 实际样品测定

在优化条件下, 应用本方法对清洁类、护理类、修饰类等不同类型的洗面奶、清洁霜、保湿霜、乳液、嫩肤水、护发素、洗发膏润唇膏等化妆品样品进行检测, 均未检出上述3种磺脲类物质。

3 结 论

本研究建立了化妆品中氨磺丁脲、氯磺丙脲和甲苯磺丁脲3种违禁添加物质的UPLC-MS/MS分析方法,该方法重现性良好、操作简便快速、结果准确。运用本方法对化妆品进行检测分析,能够为化妆品的质量控制和安全评价提供科学依据。

参考文献:

- [1] Xu S Y. *Modern Applied Clinical Pharmacology*. Beijing: People's Medical Publishing House(徐叔云. 现代实用临床药理学. 北京: 人民卫生出版社), 1996: 816.
- [2] Wang J H, Xu Z. *J. Qiqihar Univ. Med.* (王建华, 徐喆. 齐齐哈尔医学院学报), 2011, 32(4): 590-591.
- [3] GB 7916-87, Hygienic Standard for Cosmetics. National Standards of the People's Republic of China(GB 7916-87, 化妆品卫生标准. 中华人民共和国国家标准).
- [4] Ministry of Health of the People's Republic of China. Hygienic Standard for Cosmetics(中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范), 2007.
- [5] The Cosmetics Directive of the Council European Communities, Dir. 76/768/EEC, March, 2000.
- [6] Cosmetic Handbook. U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA/IAS, 1992, <http://www.fda.gov>.
- [7] Agreement on the ASEAN Harmonized Cosmetic Regulatory Scheme, <http://www.aseansec.org>.
- [8] Wang R, Chen K. *Chin. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, 9(11): 1226-1228.
- [9] Liu Q Z, Li H Y, Hang T J. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (刘起中, 李惠义, 杭太俊. 中国现代应用药学杂志), 2008, 25(1): 61-63.
- [10] Adilieti, Xie S Y, Chen Y, Li W X, Xiang Z M. *Chin. Arch. Tradit. Chin. Med.* (阿迪列提, 谢淑英, 陈勇, 李文霞, 向智敏. 中华中医药学刊), 2007, 25(6): 1268-1269.
- [11] Guo J F, Chen X Y, Zhong D F. *J. Instrum. Anal.* (郭继芬, 陈笑艳, 钟大放. 分析测试学报), 2000, 19(6): 5-8.
- [12] Pan W, Zheng S L, Mao X Q, Yu L J, Dong G B. *Chin. J. Pharm. Anal.* (潘炜, 郑顺利, 毛希琴, 于利军, 董广彬. 药物分析杂志), 2009, 29(4): 569-574.
- [13] Liang M Z. *Guangdong Chem. Ind.* (梁楣珍. 广东化工), 2009, 36(12): 104-105.

非晶合金原子结构研究取得进展

近日,上海交通大学材料科学与工程学院陈明伟教授领衔的国际研究团队在非晶合金原子结构的研究方面取得突破性进展,首次在实验上表征了非晶中重要结构单元二十面体团簇的原子空间构型,并证明二十面体原子团簇的几何不稳定性是非晶形成的结构起源。

专家认为,该研究是非晶结构研究上取得的又一重大进展,将推动对非晶中很多基本科学难题,如玻璃转变问题、非晶形变机制等的研究,为探索新型非晶材料提供指南。相关研究成果日前在线发表于《科学》杂志。

非晶态材料是一类远离平衡态、结构无序的刚性固体物质,具有许多特异物理、化学性质,并在工业界及日常生活中得到了广泛的应用。尽管对非晶材料的使用已有相当长的历史,但人类对其结构和性能的认识并不十分清楚,仍有大量长期悬而未决的基本科学问题。造成这一现状的根本原因在于无法对非晶结构进行有效的实验表征。非晶结构表征成为制约非晶物理和材料发展的瓶颈。

据悉,该项研究得到了国家自然科学基金的资助。

(信息来源:《中国科学报》)