

化妆品中糖皮质激素类非法添加物的 LC-MS/MS 分析

田媛¹, 冯舒丹^{1,2}, 黄美花¹, 张尊建^{1*}¹中国药科大学分析测试中心, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009;²南京市食品药品监督管理局, 南京 210007)

摘要 建立化妆品中醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松和醋酸地塞米松等非法添加物的 LC-MS/MS 同时测定方法。化妆品经酸化甲醇(冰醋酸调 pH 为 4.0)超声提取, 正己烷除脂净化, HPLC-MS/MS 分析, 流动相为甲醇-0.1% 甲酸(60:40), 色谱柱为岛津 Shim-pack VP-ODS C₁₈(150 mm × 2.0 mm, 5 μm)。方法学试验表明: 本方法可作为化妆品中非法添加糖皮质激素的常规分析方法。

关键词 化妆品; 糖皮质激素; LC-MS/MS

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)01-0053-05

LC-MS/MS determination of glucocorticoids illegally added into cosmetics

TIAN Yuan¹, FENG Shu-dan^{1,2}, HUANG Mei-hua¹, ZHANG Zun-jian^{1*}

¹Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Nanjing Food and Drug Administration, Nanjing 210007, China

Abstract An analytical method for the simultaneous determination of cortisone acetate, prednisone, hydrocortisone, triamcinolone, dexamethasone and dexamethasone acetate in cosmetics using LC-MS/MS was developed. Cosmetic samples were extracted by acidified methanol and analyzed by LC-MS/MS using an electrospray source. The separation was carried out on a Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈(150 mm × 2.0 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid solution (60:40). The established method is suitable for routine monitoring and determination of glucocorticoids added in cosmetics illegally.

Key words cosmetics; glucocorticoids; LC-MS/MS

糖皮质激素具有调节糖、脂肪和蛋白质生物合成和代谢的作用。临床上糖皮质激素作为抗感染药物, 可抑制纤维细胞增生, 减少 5-羟色胺形成, 因而对皮肤有一定的嫩白作用。但其并无抗菌作用, 且能抑制机体的免疫功能, 长期使用含糖皮质激素的化妆品会对人体产生以下不良反应: 向心性肥胖、高血压、月经紊乱、诱发或加重肾脏感染性疾病、引起低钾性肾病与多囊性肾病, 更有甚者会引起全身病变如柯兴氏综合征、激素性糖尿病, 有些并发症可以直接威胁到病人生命。因此我国《化妆品卫生规范》(2007 版) 和欧盟化妆品规程 (Directive 76/768/EEC) 均明确规定此类物质为禁用成分^[1-2]。但至今为止, 我国并未有针对化妆品

中糖皮质激素的国家标准检测方法, 这给化妆品的质量监督管理工作带来了很大不便, 并将最终影响消费者的利益与身心健康。因此, 尽快建立化妆品中非法添加糖皮质激素的检测方法尤为重要, 也是保证化妆品行业健康发展的需要。

目前, 国内外关于化妆品中糖皮质激素的分析偶见报道, 以灵敏度较低、专属性不强的 LC-UV 法^[1-2]为主要分析手段。有文献报道以串联质谱为检测器, 但所采用的固相萃取处理样品和梯度程序洗脱待测物不仅耗时且重现性差, 限制了其推广^[3]。本研究首次建立了化妆品中醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松和醋酸地塞米松等 6 种抗感染效果好, 价格低廉, 最常被非法

添加的糖皮质激素的 LC-MS/MS 同时测定方法,并采用欧盟推荐的 4 Ips (identification points, 识别点) 方法,同时完成定性和定量。所建立的方法灵敏度高,准确度好,回收率稳定,可作为化妆品中非法添加糖皮质激素的常规分析方法。

1 材料

1.1 试剂

对照品:醋酸可的松(纯度 99.1%,批号 0504050)、醋酸地塞米松(纯度 99.2%,批号 0504070)均购自中国药品生物制品检定所;泼尼松(纯度 99.7%,批号 0604010)、泼尼松龙(纯度 99.3%,批号 0607080)、曲安西龙(纯度 99.5%,批号 0702110)、地塞米松(纯度 99.1%,批号 0601030)均购自天津天药药业股份有限公司;地西洋(纯度 99.8%,江苏省药品检验所,批号 0501020)。

甲醇(色谱纯,德国 VWR 公司);正己烷(色谱纯,加拿大 Hexanes 公司);其余试剂均为市售分析纯。

标准贮备液:精密称取上述各对照品适量,以甲醇溶解,定量配制成 1.0 mg/mL 标准贮备液,临用前以相应溶剂稀释至合适浓度的标准工作液。

1.2 仪器

FinniganTM TSQ Quantum Discovery MAX 液质联用系统,含 FinniganTM Surveyor 液相色谱仪, FinniganTM Surveyor 自动进样器, FinniganTM TSQ Quantum 三重四极杆质谱仪和应用软件 Xcalibur 2.0 (美国 Thermo Electron 公司);Rotavapor R-200 旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司)。

2 方法

2.1 样品处理方法

取化妆品 1.0 g (膏状、乳状、溶液状),置 10 mL 具塞离心管中,精密加入地西洋内标溶液(1 μ g/mL) 10 μ L, 甲醇 5.0 mL (醋酸调 pH 为 4.0),超声 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,转移至 25 mL 分液漏斗中,加正己烷 5 mL,

充分振荡,静置 5 min,弃去上层正己烷,转移下层甲醇至 50 mL 圆底烧瓶中,于 40 $^{\circ}$ C 水浴中旋转蒸发浓缩至干,以流动相 500 μ L 溶解,转移至 1.5 mL 离心管中,14 000 r/min 离心 8 min,取上清液供 HPLC-MS/MS 分析。

2.2 LC-MS/MS 测定条件

色谱柱:岛津 Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm \times 2.0 mm, 5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流动相:甲醇-0.1% 甲酸(60:40);流速:0.2 mL/min;进样量:10 μ L。ESI-MS/MS 选择性反应正离子检测,测定化合物一个母离子的两个子离子响应之和,检测离子和各子离子碰撞能量见表 1。主要 ESI-MS/MS 工作参数:喷雾电压:+4 500V,毛细管加热温度:350 $^{\circ}$ C,鞘气(氮气)压力:5.425 \times 10⁶ Pa,辅助气(氮气)压力:8.75 \times 10⁵ Pa, Source CID 碰撞能量:10V, CID 碰撞气压力(氩气):0.2 Pa。

Table 1 Conditions for the ESI-MS/MS determination of six glucocorticoids

Drugs	Precursor ion/ (<i>m/z</i>)	Product ion/ (<i>m/z</i>)	Collisional energy/ V
Cortisone acetate	403.2	343.2	22
		163.0	39
Prednisone	359.2	147.3	40
		171.1	39
Hydroprednisone	361.2	171.1	12
		147.1	18
Triamcinolone	395.2	225.1	12
		357.2	16
Dexamethasone	393.3	147.0	35
		237.0	38
Dexamethasone acetate	435.2	415.2	11
		397.2	21

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 方法专属性 上述色谱条件下测得空白化妆品、空白化妆品添加 6 种糖皮质激素和内标的典型色谱如图 1、2 所示。由图可见,空白化妆品基质不干扰色谱分析。测得醋酸可的松、曲安西龙、泼尼松、泼尼松龙和地塞米松的最低定量限(LOQ)为 0.1 ng/g,醋酸地塞米松的 LOQ 为 1 ng/g。

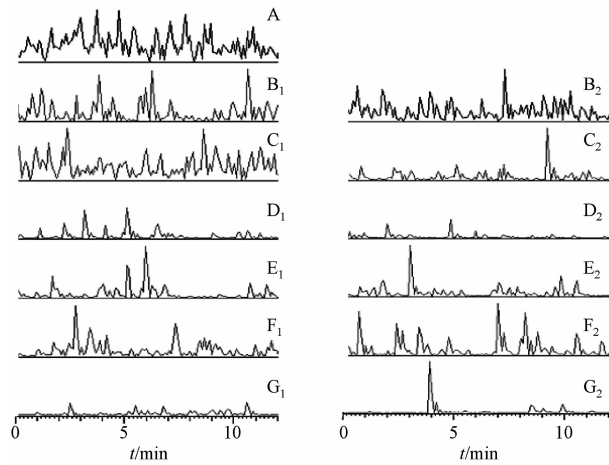


Figure 1 Representative selective reaction monitoring (SRM) chromatograms for a drug free cosmetic sample

A: Diazepam (IS) (285.1 → 195.0); B: Prednisone (B₁: 359.2 → 147.3; B₂: 359.2 → 171.1); C: Hydroprednisone (C₁: 361.2 → 171.1; C₂: 361.2 → 147.1); D: Dexamethasone (D₁: 393.3 → 147.0; D₂: 393.3 → 237.0); E: Triamcinolone (E₁: 395.2 → 225.1; E₂: 395.2 → 357.2); F: Cortisone acetate (F₁: 403.2 → 343.2; F₂: 403.2 → 163.0); G: Dexamethasone acetate (G₁: 435.2 → 415.2; G₂: 435.2 → 397.2)

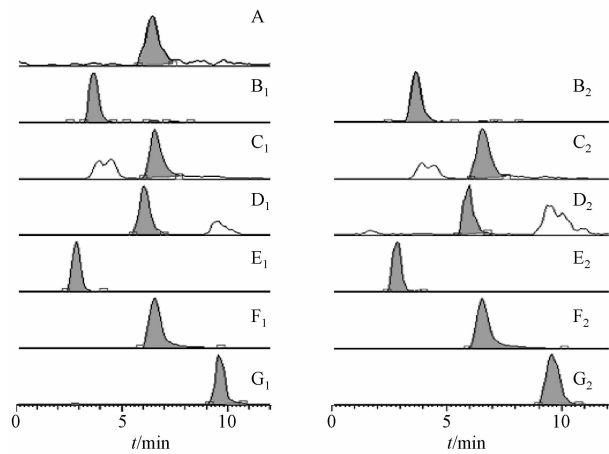


Figure 2 Representative SRM chromatograms for a drug-free cosmetic spiked with six glucocorticoids and the IS (diazepam)

A: Diazepam (IS, $t_R = 6.5$ min); B: Prednisone (B₁, B₂, $t_R = 3.6$ min); C: Hydroprednisone (C₁, C₂, $t_R = 6.6$ min); D: Dexamethasone (D₁, D₂, $t_R = 6.1$ min); E: Triamcinolone (E₁, E₂, $t_R = 2.9$ min); F: Cortisone acetate (F₁, F₂, $t_R = 6.5$ min); G: Dexamethasone acetate (G₁, G₂, $t_R = 9.6$ min)

3.1.2 标准曲线 分别精密吸取醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松和醋酸地塞米松标准工作液适量,置10 mL具塞离心管中,吹干,加空白化妆品1.0 g,配制成醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松浓度为0.1,0.2,0.5,1,2,5,10,20,50 ng/g,醋酸地塞米松浓度为1,2,5,10,20,50,100,200,500 ng/g的样本,按

“2.1”项下操作,并进行色谱分析,分别记录6种化合物色谱峰面积(A_s)与内标色谱峰面积(A_r)。重复测定5次。以平均峰面积比($R(R = A_s/A_r)$)对浓度(c , ng/g)进行线性回归($w = 1/c^2$),回归方程见表2。醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松浓度在0.1~50 ng/g范围内,醋酸地塞米松浓度在1~500 ng/g范围内质谱响应线性关系良好。

Table 2 Regression equations of six glucocorticosteroids in cosmetic samples ($n = 5$)

Drug	Regression equation	r
Cortisone acetate	$R = 0.9814 \times c - 1.317 \times 10^{-3}$	0.9978
Prednisone	$R = 0.5672 \times c - 2.828 \times 10^{-3}$	0.9971
Hydroprednisone	$R = 0.3542 \times c + 69.635 \times 10^{-3}$	0.9975
Triamcinolone	$R = 0.1760 \times c - 6.399 \times 10^{-3}$	0.9981
Dexamethasone	$R = 0.1440 \times c - 1.574 \times 10^{-3}$	0.9981
Dexamethasone acetate	$R = 0.0262 \times c + 2.196 \times 10^{-2}$	0.9901

3.1.3 回收率 按标准曲线测定方法配制含醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松浓度为0.2,2,20 ng/g,醋酸地塞米松为2,20,200 ng/g 3种浓度水平的化妆品样本各5份,按“2.1”项下处理方法操作,在萃取后的甲醇中精密加入1 μ g/mL内标溶液10 μ L,40 $^{\circ}$ C水浴中旋转蒸发浓缩至干,残留物以流动相500 μ L溶解,高速离心,转移上清液进行色谱分析,分别计算各化合物与内标色谱峰面积比($A_{s,i-r}$)。另取空白化妆品样品1.0 g,按“2.1”项下处理方法操作,在萃取后的甲醇中精密加入前一步骤等量样品和内标标准液,40 $^{\circ}$ C水浴中旋转蒸发浓缩至干,残留物以流动相500 μ L涡旋溶解,高速离心,转移上清液进行色谱分析,分别计算各化合物与内标的色谱峰面积比($A_{s,i-r}$)。计算化妆品样品处理方法的回收率(%),即 $A_{s,i-r}/A_{r,i-r} \times 100$,结果见表3,高中低3种浓度水平样品的平均回收率均大于60%且稳定。

3.1.4 精密度 按标准曲线测定方法配制含醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松浓度0.2,2,20 ng/g,醋酸地塞米松2,20,200 ng/g 3种浓度水平的化妆品样本,按“2.1”项下处理方法同样操作。在一个分析批内测定5次,计算批内精密度;在不同天连续制备并测定3个分析批次,计算批间精密度。结果表明方法精密度良好,RSD在3.42%~13.44%之间。

3.1.5 稳定性 按标准曲线测定方法配制含醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松浓度为 0.2, 2, 20 ng/g, 醋酸地塞米松为 2, 20, 200 ng/g 3 种浓度水平的化妆品样本各 2 份, 其中 1 份按“2.1”项下处理方法同样操作并立即分析, 记录

各化合物及内标色谱峰面积。另 1 份室温放置 24 h 后再进行处理并分析, 记录各化合物及内标色谱峰面积。结果表明, 样品测定的准确度在 92.10% ~ 110.85% 之间。说明样品在室温下放置 24 h 内稳定。

Table 3 Recoveries of six glucocorticoids from cosmetic samples ($n = 5$)

Drug	Low concentration		Middle concentration		High concentration	
	Average/%	RSD/%	Average/%	RSD/%	Average/%	RSD/%
Cortisone acetate	65.01	6.38	63.02	6.47	66.80	7.07
Prednisone	61.73	7.45	63.57	7.42	65.69	5.82
Hydrocortisone	68.27	7.48	63.86	4.59	61.71	6.47
Triamcinolone	63.82	9.55	66.99	7.69	68.52	7.76
Dexamethasone	63.65	7.97	61.64	8.42	62.41	8.26
Dexamethasone acetate	65.50	8.56	62.41	5.22	66.52	3.67

Low, middle and high concentration levels for cortisone acetate, prednisone, hydrocortisone, triamcinolone and dexamethasone were 0.2, 2, 20 ng/g respectively; low, middle and high concentration level for dexamethasone acetate was 2, 20, 200 ng/g respectively

3.1.6 基质效应 取 6 份不同来源空白化妆品混匀, 按“2.1”项下处理方法操作, 溶样后精密加入标准贮备液适量, 使醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松的最终浓度分别为 0.2, 2, 20 ng/g, 醋酸地塞米松最终浓度为 2, 20, 200 ng/g, 平行 5 份, 进行色谱分析, 记录各色谱峰面积, 记为 A; 另制备相同浓度水平的各标准对照液, 平行 5 份, 进行色谱分析, 记录各色谱峰面积, 记为 B。内标地西洋 (10 ng/g) 同法考察。以 A/B 计算基质效应表征 (ME), 结果 (表 4) 表明, 各组分及内标的 ME 在 90% ~ 110% 之间, 证明在所建立的分析条件下基质效应影响可以忽略。

3.2 方法应用 应用所建立的方法随机抽检了市售的美白祛斑或除螨祛痘的化妆品共 45 种, 其中进口化妆品 21 种 (膏状 5 种, 乳状 7 种, 溶液状 9 种), 国产 24 种 (膏状 7 种, 乳状 7 种, 溶液状 10 种)。检测结果如下: 1 种国产化妆品含地塞米松, 含量为 24.16 ng/g; 另有 1 种国产化妆品含醋酸地塞米松, 含量为 31.34 ng/g, 其他化妆品均未检出以上 6 种糖皮质激素, 检出率为 4.44%。

Table 4 Average matrix effects (%) of six glucocorticoids in cosmetic samples ($n = 5$)

Drug	Low concentration	Middle concentration	High concentration
Cortisone acetate	95.81	101.15	90.11
Prednisone	102.27	99.70	108.68
Hydrocortisone	98.89	101.24	104.79
Triamcinolone	104.78	102.14	107.41
Dexamethasone	103.00	99.85	103.18
Dexamethasone acetate	102.50	101.63	100.61
Diazepam (IS)	-	95.36	-

4 讨论

4.1 串联质谱用于同时定性定量分析

LC-MS/MS 分析中化合物在最佳碰撞能量下的多个丰度较强离子的峰面积比非常稳定, 且其比值 SPAR (standard peak area ratio) 只与化合物结构有关, 与色谱条件及所处基质背景无关^[4]。本试验通过比较待测样品的 PAR (peak area ratio) 与标准添加样品的 SPAR 对待测样品进行定性, 并将两个子离子响应的峰面积之和作为定量依据, 首次建立了化妆品中糖皮质激素的 LC-MS/MS 同时定性定量分析方法。表 5 给出了 6 种糖皮质激素的 SPAR。

4.2 样品前处理方法优化

化妆品是由各种不同原料经合理调配加工而成的混合物。在其配方中占比较大的成分包括油脂 (橄榄油、水貂油等)、蜡类 (棕榈蜡、羊毛酯等)、烃类 (凡士林等) 以及粉质原料等。另外, 对化妆品成形、稳定或赋予色、香及其他特性起作用的辅助原料还包括香精香料、着色剂、防腐剂、抗氧化剂等。由于化妆品含有如此之多的成分, 因此样品的前处理就显得尤为重要。

6 种糖皮质激素均为相同的甾体结构, 极性较小, 脂溶性好, 能溶解于多种有机溶剂中。实验比较了甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷-乙酸乙酯 (20:80)、乙醚等 5 种萃取试剂的提取效率, 结果表明甲醇的提取效率最高。考虑到 6 种糖皮质激素的分子中都有羟基和活性氢, 呈一定酸性, 根据

相似相溶的原理,酸化有机溶剂可增加其溶解度,提高提取效率。实验比较了以冰醋酸调节甲醇 pH 为 2.0,3.0,4.0,5.0 时的提取效率,结果表明,当 pH 为 4.0 时提取效率最高且稳定。实验还比较了

涡旋混匀 3 min 和超声 10 min 两种不同的处理方式,结果表明后者的提取效率明显高于前者。最终确定了 5.0 mL 甲醇超声 10 min 提取、正己烷除脂的样品前处理方法。

Table 5 Standard peak area ratio (SPAR) of six glucocorticoids

Drug	n	Low concentration		Middle concentration		High concentration		Average	RSD/%
		Average	RSD/%	Average	RSD/%	Average	RSD/%		
Cortisone acetate	5 ^a	1.55	12.75	1.50	5.83	1.58	6.26	1.53	7.40
	15 ^b	1.53	9.76	1.51	6.47	1.54	5.77		
Prednisone	5 ^a	0.51	9.98	0.57	9.20	0.54	8.07	0.53	9.91
	15 ^b	0.52	12.45	0.54	9.90	0.52	6.99		
Hydroprednisone	5 ^a	2.83	11.72	2.84	6.59	2.94	5.16	2.94	7.14
	15 ^b	2.88	10.20	2.95	5.83	2.99	4.25		
Triamcinolone	5 ^a	1.56	8.77	1.53	5.94	1.55	5.77	1.53	7.43
	15 ^b	1.51	10.26	1.55	6.04	1.54	5.48		
Dexamethasone	5 ^a	2.99	9.82	2.84	7.93	2.85	7.15	2.93	8.57
	15 ^b	2.89	10.77	2.92	5.40	2.97	9.04		
Dexamethasone acetate	5 ^a	0.21	10.28	0.21	7.36	0.19	7.94	0.20	9.06
	15 ^b	0.20	10.52	0.19	8.75	0.20	7.21		

^aIntra-batch; ^bInter-batch

5 结 论

本文首次建立了化妆品中醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、曲安西龙、地塞米松、醋酸地塞米松等 6 种糖皮质激素的 LC-MS/MS 同时测定方法。6 种糖皮质激素在相应浓度范围内,色谱响应线性关系良好 ($r > 0.99$);高、中、低浓度水平样品回收率均大于 60% 且稳定;批内、批间变异均小于 15%;标准液和样品中待测化合物的二级质谱碎片相对丰度比的平均值相对偏差小于 10%,说明本方法可用于化妆品中糖皮质激素类非法添加物的同时定性鉴别和定量分析。

参 考 文 献

- [1] 吴大南 (Wu DN), 郑和辉 (Zheng HH), 王 萍 (Wang P), 等. 超高效液相色谱法测定化妆品中 8 种糖皮质激素 [J]. 中国卫生检验杂志 (*Chin J Health Lab Technol*), 2008, **18**(2): 197 - 198.
- [2] 赵晓亚 (Zhao XY), 林雁飞 (Lin YF), 胡小钟 (Hu XZ), 等. 反相高效液相色谱法同时测定化妆品中的 9 种糖皮质激素 [J]. 分析实验室 (*Chin J Anal Lab*), 2009, **28**(2): 111 - 115.
- [3] 王传现 (Wang CX), 刘罡一 (Liu GY), 倪昕路 (Ni XL), 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测化妆品中糖皮质激素类违禁药 [J]. 分析仪器 (*Anal Instrum*), 2008(6): 23 - 28.
- [4] 罗国安 (Luo GA), 梁琼麟 (Liang QL), 王义明 (Wang YM), 等. 电喷雾质谱新方法及在生命分析化学中的应用 [J]. 现代仪器 (*Mod Instrum*), 2005, **11**(1): 5 - 8.