

基于 UPLC-Q-TOF-MSⁿ 的化妆品中 40 种性激素非法添加分析及筛查数据库的建立

程巧鸳¹, 施诗², 周明昊¹, 吴鸳鸯¹ (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立基于 UPLC-Q-TOF-MSⁿ 的化妆品中 40 种性激素非法添加分析及筛查数据库。方法 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 正离子模式以 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 负离子模式以水-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C; 采用电喷雾电离源(ESI), 采集模式为 Scan MS 及 Targeted MS/MS, 将 40 种性激素的精确质量数、保留时间、二级质谱图导入 PCDL 软件建立筛查数据库。结果 采用所建立的数据库方法快速筛查 100 批化妆品, 1 批育发类产品检出少量黄体酮。结论 本研究所建立的 40 种性激素分析方法和筛查数据库具有简便、快速、灵敏和准确的特点, 适合化妆品中非法添加性激素的高通量筛查和准确性。

关键词: 化妆品; 非法添加; 性激素; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 筛查数据库

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)05-0614-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.05.007

引用本文: 程巧鸳, 施诗, 周明昊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MSⁿ 的化妆品中 40 种性激素非法添加分析及筛查数据库的建立[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 614-621.

Establishment of an Analysis Method and Screening Database for Illegal Addition of 40 Sex Hormones in Cosmetics Based on UPLC-Q-TOF-MSⁿ

CHENG Qiaoyuan¹, SHI Shi², ZHOU Minghao¹, WU Yuanyang¹ (1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an analysis method and screening database based on UPLC-Q-TOF-MSⁿ for illegal addition of 40 sex hormones in cosmetics. **METHODS** The gradient elution was carried out on Agilent SB-C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 0.1% formic acid water and acetonitrile were used as mobile phase in positive ion mode, water and acetonitrile were used as mobile phase in negative ion mode, the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C. MS detection was carried out by electrospray ionization(ESI) mass spectrometer in Scan MS and Targeted MS/MS mode. The accurate mass, retention time and MS/MS mass spectrum of 40 sex hormones were imported into PCDL software to establish a rapid screening database. **RESULTS** The established method and database was used to screen 100 batches of cosmetics, and one batch of hair-growing product was detected with a small amount of progesterone. **CONCLUSION** The established analysis method and screening database including 40 sex hormones is fast, sensitive and accurate, which is suitable for high-throughput screening and accurate qualitative analysis of sex hormones adulterants in cosmetics.

KEYWORDS: cosmetics; illegal addition; sex hormones; UPLC-Q-TOF-MSⁿ; screening database

随着人们生活水平的不断提高, 人们对化妆品的需求不断增加。2019 年中国化妆品交易额达 2 992 亿元人民币^[1], 化妆品市场的快速发展引起了人们对化妆品质量及安全的广泛关注。据国家药品监督管理局公告显示, 非法添加激素仍是化妆品不合格的主要因素, 其中性激素由于具有较强的生理活性, 如促进毛发生长、丰乳、美白、抗皱抗衰老、增加皮肤弹性和促进第二性征等作用, 常常被一些不法厂商添加到化妆品中以增强其宣称的功效^[2]。然而, 长期使用含有性激素的化

妆品会导致皮肤性激素沉积、皮肤萎缩变薄、干扰内分泌等不良反应, 甚至会引发细胞癌、乳腺癌、卵巢癌等危险^[3-4]。中国《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[5]和欧盟化妆品法规[Regulation(EC) No 1223/2009]^[6]均明确规定雌激素、雄激素和孕激素为化妆品禁用药物, 因此建立化妆品中非法添加性激素的快速、准确、高通量的筛查方法, 对保障消费者的安全具有重要意义。

目前, 国内外文献报道的化妆品中性激素检测方法主要包括 HPLC^[7-13]、GC-MS^[14]和 LC-MS^[15-22]。

基金项目: 浙江省药品监管系统科技计划项目(2021036)

作者简介: 程巧鸳, 女, 博士, 副主任中药师 E-mail: chengqiaoyuan@zjyj.org.cn

HPLC 根据保留时间和光谱图定性,易受样品复杂基质的干扰。GC-MS 往往需要对样品进行衍生化处理,前处理较复杂。低分辨 LC-MS 在化合物定性准确度方面尚有欠缺,容易产生假阳性的结果。近年来,高分辨质谱如飞行时间质谱(TOF)^[23]和静电场轨道阱质谱(Orbitrap)^[24],因其强大的定性能力,开始在化妆品禁用物质筛查等领域得到了一定应用。本研究采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MSⁿ)建立 40 种性激素的精确质量数、保留时间、碎片离子、同位素丰度比的筛查数据库,并对 100 批化妆品进行筛查确证。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 高效液相色谱仪; Agilent 6550 Q-TOF 飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司), MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00, PCDL Manager B.08.00; Elmasonic P300H 超声波清洗器(德国埃尔玛公司); Genpure uv/uf 超纯水机(美国赛默飞世尔科技公司); XPE 205 分析天平(瑞士梅特勒公司)。

1.2 试剂

氧甲氢龙(纯度: 98%; 批号: DST190503-318)、诺龙(纯度: 98%; 批号: DST190605-055)、宝丹酮(纯度: 98%; 批号: DST190601-180)、睾酮(纯度: 98%; 批号: DST190115-125)、去氢甲睾酮(纯度: 98%; 批号: DST190602-184)、甲睾酮(纯度: 98%; 批号: DST190225-107)、黄体酮(纯度: 98%; 批号: DST190603-169)、安宫黄体酮(纯度: 98%; 批号: DST190603-052)、醋酸氯睾酮(纯度: 98%; 批号: DST190602-152)、己酸孕酮(纯度: 98%; 批号: DST191112-175)、苯丙酸诺龙(纯度: 98%; 批号: DST190415-127)、雌三醇(纯度: 98%; 批号: DST190604-153)、雌二醇(纯度: 98%; 批号: DST190601-155)、17 α -乙炔基雌二醇(纯度: 98%; 批号: DST190604-303)、雌酚酮(纯度: 98%; 批号: DST190604-156)、己烯雌酚(纯度: 98%; 批号: DST180411-251)、己烷雌酚(纯度: 98%; 批号: DST190502-151)均购于成都德思特生物技术有限公司; 群勃龙(纯度: 99.7%; 批号: 174947)、21-羟基黄体酮(纯度: 99.8%; 批号: G687081)、雄烯二酮(纯度: 99.3%; 批号: G158946)、氯司替勃(纯度: 99.5%; 批号: G165939)、雄诺龙(纯度: 99.1%; 批号: G174851)、醋酸美仑孕酮(纯度: 97.7%; 批号: G728710)、丙酸诺龙(纯度: 98.6%;

批号: G755138)、戊酸雌二醇(纯度: 99.3%; 批号: 50903)均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 表睾酮(纯度: 97%; 批号: 5-MGG-47-1)、甲炔诺酮(纯度: 98%; 批号: 4-ARP-62-1)、醋酸环丙氯地孕酮(纯度: 98%; 批号: 26-GHZ-54-1)、醋酸氯地孕酮(纯度: 97%; 批号: 17-SSR-74-1)购于加拿大 TRC 公司; 诺美孕酮(纯度: 99.7%; 批号: 1431743-AS)、醋酸双烯雌酚(纯度: 99.6%; 批号: 0644030-AS)、17- α -雌二醇(纯度: 98.6%; 批号: 2002998-AS)、双烯雌酚(纯度: 96.6%; 批号: 0850961-AS)均购自美国 CFW Labs 公司; 氟甲睾酮(纯度: 98%; 批号: 371039)、肾上腺甾酮(纯度: 98%; 批号: B4O8B-RA)、美雄诺龙(纯度: 99%; 批号: 368155)、尼尔雌醇(纯度: 99%; 批号: 310482)、炔雌醇环戊醚(纯度: 97%; 批号: A7P6J-BF)、羟甲雄酮(纯度: 98%; 批号: 413088)、雌三醇-D2(纯度: 98.9%; 批号: M-415)均购自上海安谱实验科技股份有限公司。

乙腈(色谱纯, 默克公司), 乙酸铵、甲酸(色谱纯, Sigma 公司), *N*-丙基乙二胺吸附剂(PSA)(Agela Technologies 公司, 批号: D19-00015)、十八烷基键合硅胶吸附剂(C₁₈)(Agela Technologies 公司, 批号: BD0006-CP1004), 无水硫酸镁(国药集团化学试剂有限公司)。纯水由 Genpure uv/uf 超纯水机制备。100 批宣称具有育发防脱、抗皱/抗衰老、健美、美乳、美白、脱毛功效的化妆品购于浙江省内各经营单位。

2 方法与结果

2.1 液相色谱和质谱条件

采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m), 正离子模式下, 以 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(0~7 min, 40%B; 7~11 min, 40% $\rightarrow$ 90%B; 11~14 min, 90%B; 14~14.1 min, 90% $\rightarrow$ 40%B; 14.1~17 min, 40%B); 负离子模式下, 以水(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(0~6 min, 40% $\rightarrow$ 80%B; 6~9 min, 80%B; 9~9.1 min, 80% $\rightarrow$ 40%B; 9.1~12 min, 40%B); 流速 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C。30 种性激素在正离子流动相下提取离子流图见图 1, 10 种性激素在负离子流动相下提取离子流图见图 2。

离子源: 采用双喷射离子源 Dual AJS ESI, 其中雌激素除醋酸双烯雌酚、炔雌醇环戊醚、尼尔雌醇采用 ESI⁺外其余均采用 ESI⁻模式扫描, 雄激素和孕激素均采用 ESI⁺模式扫描; 雾化气压力 35 psi;

干燥气温度 200 ℃, 干燥气流速 14 L·min⁻¹; 鞘气温度 350 ℃, 鞘气流速 11 L·min⁻¹; 采集模式为 Scan MS 及 Targeted MS/MS: 一级质谱扫描范围 m/z 100~1 000; 二级质谱扫描范围 m/z 50~1 000; 碰撞池 CID, 碰撞能 10, 20, 40 eV; 正离子模式下参比离子: 121.050 9, 922.009 8 m/z ; 负离子模式下参比离子: 112.985 6, 1 033.988 1 m/z 。

2.2 数据库建立

2.2.1 对照品溶液的制备 取上述 40 种性激素对照品适量, 精密称定, 用甲醇配制成约 1.0 mg·mL⁻¹ 的单标储备溶液, -18 ℃ 冰箱中保存备用。精密吸取各单标储备溶液适量混合, 加甲醇配制成 20.0 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, -18 ℃ 冰箱保存, 使用前取出, 待溶液恢复到室温后使用。

2.2.2 测定法 将上述 40 种性激素混合对照品溶液, 按“2.1”项下液相色谱和质谱条件, 在正负离子模式下分别进行试验。在一级全扫描模式下, 优化毛细管电压、鞘气温度、流速等质谱参数, 得到每种对照品母离子的精确质量数和保留时间值; 之后在 Targeted MS/MS 模式下对每种对照品进行二级质谱分析, 同时采集每个对照品在 CID 碰撞模式下, 碰撞能(CE)为 10, 20, 40 eV 的二级碎片离子质谱图, 计算各化合物的检出限, 结果为 0.05~1.5 mg·kg⁻¹。

2.2.3 数据库建立 运用与 MassHunter 软件联合使用的 PCDL 软件, 将 40 种性激素对照品的名称、分子式、CAS 号、保留时间、二级质谱图等内容传输到数据库中, 见表 1。



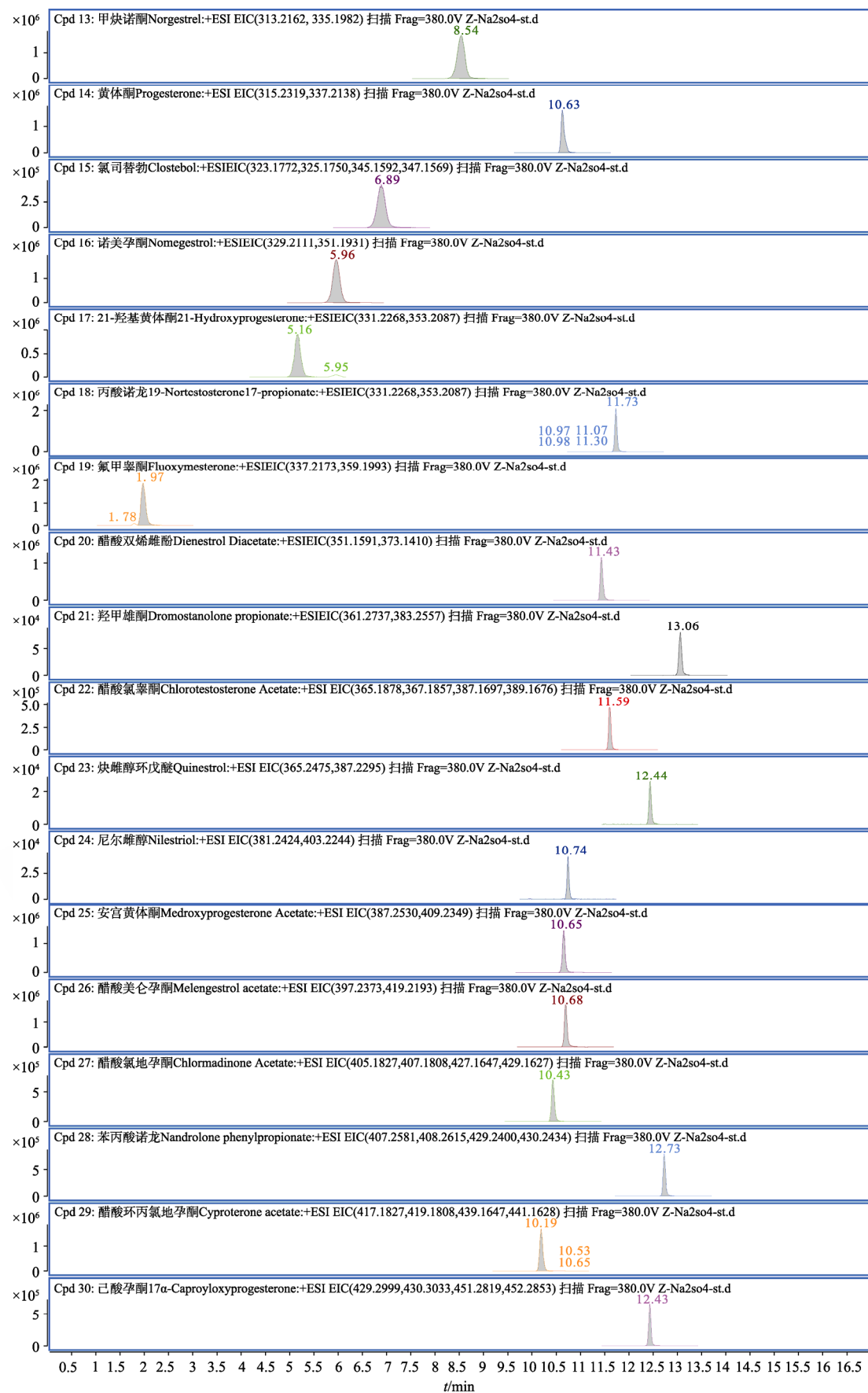


图1 30种性激素提取离子流图(正离子模式)

Fig. 1 Extraction ion chromatogram of 30 sex hormones(positive ion mode)

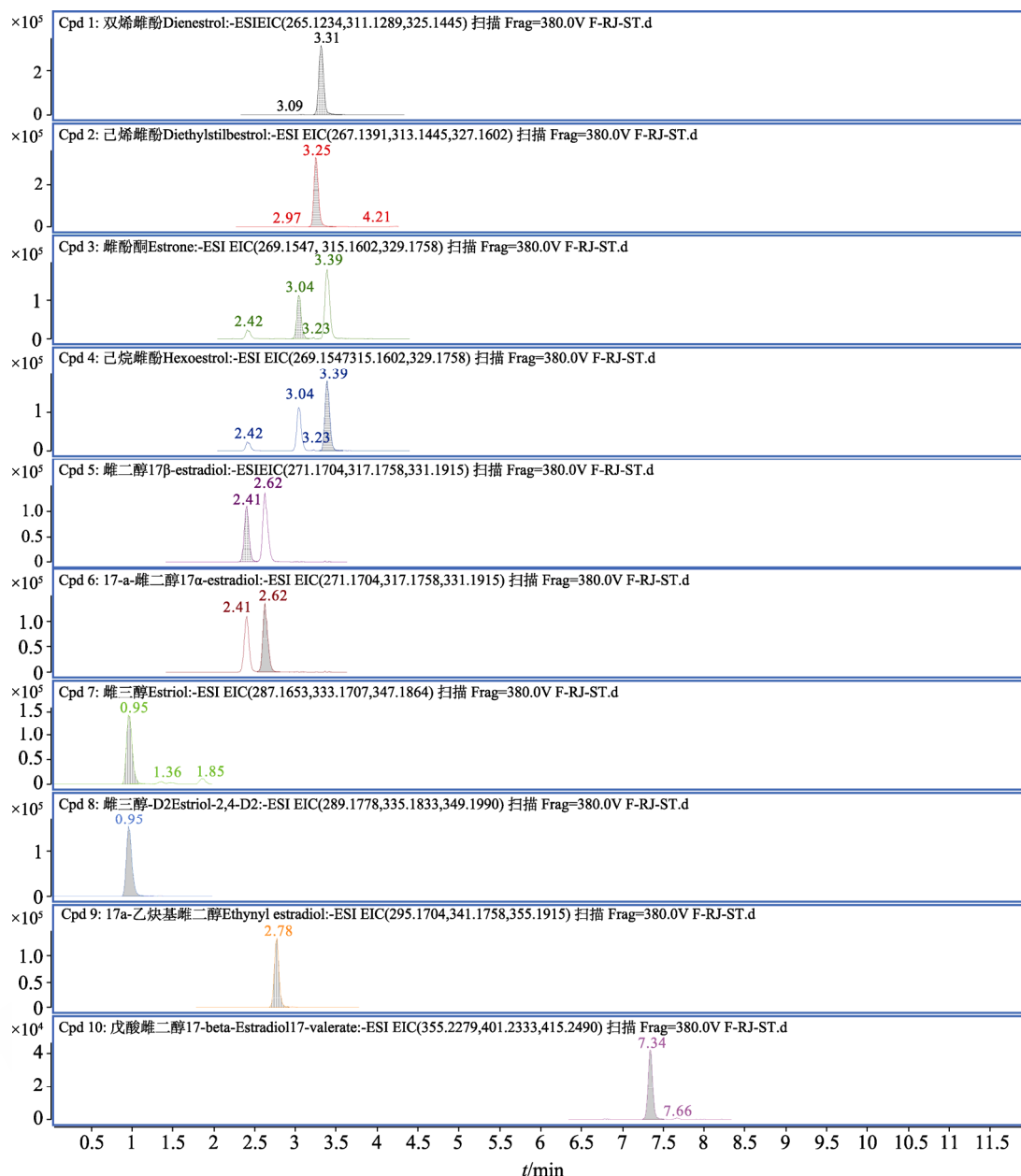


图 2 10 种性激素提取离子流图(负离子模式)

Fig. 2 Extraction ion chromatogram of 10 sex hormones(negative ion mode)

2.3 样品测定

2.3.1 供试品溶液的制备 液态水基类样品：称取样品 0.5 g(精确到 0.001 g)，置于 50 mL 聚四氟乙烯具盖离心管中，精确加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 1 min，使充分分散均匀，超声提取 20 min，摇匀，经 0.22 μ m 滤膜过滤，取滤液待测。

膏霜乳液类基类样品：称取样品 0.5 g(精确到 0.001 g)，置 50 mL 聚四氟乙烯具盖离心管中，精确加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 1 min，使充分分散均匀，超声处理 20 min，放冷至室温，加入 6 g 无水 MgSO_4 ，迅速振摇，涡旋振荡 1 min，置于冰水

浴中降温，以 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，移取上清液 2 mL 至加有 25 mg PSA 和 25 mg C_{18} 离心管中，涡旋混合 1 min，以 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min，移取上清液，经 0.22 μ m 滤膜过滤，取滤液待测。

2.3.2 测定法 吸取上述供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件和质谱条件，进样分析，得到样品的色谱和质谱图。

2.3.3 结果分析 样品先经一级全扫，获得的一级质谱图经过 MassHunter Workstations Software Qualitative Analysis Version B.07.00 软件的“Findby Formula-Options”功能与数据库中信息母离子

表 1 40 种性激素对照品 CAS 号、分子式、精确分子量、离子化方式、保留时间及碎片离子

Tab. 1 CAS number, molecular formula, precise molecular weight, ionization mode, retention time and fragment ion of 40 sex hormones

化合物	CAS 号	分子式	精确分子量	离子化方式	保留时间/min	碎片离子
氟甲睾酮	76-43-7	C ₂₀ H ₂₉ FO ₃	337.217 3	ESI+	1.97	131.084 8, 181.101 1, 223.146 7, 241.157 6, 281.188 2, 299.198 9, 317.209 9
肾上腺甾酮	382-45-6	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	301.179 8	ESI+	2.35	91.054 1, 121.064 5, 135.079 1, 161.095 6, 225.126 2, 257.152 3, 283.168 7
群勃龙	10161-33-8	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	271.169 3	ESI+	2.87	67.052 7, 107.047 8, 121.064 4, 133.064 2, 189.126 2, 199.110 8, 227.142 0, 253.157 7
氧甲氢龙	53-39-4	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	307.226 8	ESI+	3.31	81.069 0, 95.084 5, 121.100 1, 149.131 5, 229.192 9, 253.193 5, 271.203 2, 289.213 6
诺龙	434-22-0	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	275.200 6	ESI+	3.42	83.048 1, 109.063 7, 145.100 4, 163.110 2, 185.131 8, 199.147 1, 239.177 5, 257.188 2
宝丹酮	846-48-0	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	287.200 6	ESI+	3.45	121.064 4, 135.116 0, 147.080 0, 173.095 6, 187.109 5, 213.128 5, 269.189 3
睾酮	58-22-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	289.216 2	ESI+	4.49	97.063 8, 109.063 6, 123.079 5, 161.131 2, 161.131 2, 189.161 5, 213.162 6, 253.192 7, 271.202 7
去氢甲睾酮	72-63-9	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	301.216 2	ESI+	4.79	95.084 7, 121.063 8, 149.131 5, 173.094 7, 283.203 0
21-羟基黄体酮	64-85-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	331.226 8	ESI+	5.15	97.064 1, 109.064 1, 123.079 7, 159.116 3, 295.205 8
表睾酮	481-30-1	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	289.216 2	ESI+	5.56	97.064 1, 109.064 0, 123.079 7, 145.100 8, 175.147 3, 213.162 4, 253.193 6, 271.204 2
雄烯二酮	63-05-8	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	287.200 6	ESI+	5.76	97.064 1, 109.063 9, 123.079 5, 159.116 3, 173.131 4, 211.146 8, 229.157 8, 269.189 0
诺美孕酮	58691-88-6	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329.211 1	ESI+	5.95	83.048 2, 111.079 9, 173.096 3, 253.159 0, 269.189 8, 293.190 5, 311.200 5
甲睾酮	58-18-4	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.231 9	ESI+	6.25	97.064 0, 109.063 8, 159.116 2, 177.162 8, 189.162 8, 227.178 1, 245.188 4, 267.209 0, 285.219 5
氯司替勃	1093-58-9	C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂	323.177 2	ESI+	6.88	81.069 2, 93.069 4, 131.025 8, 143.026 1, 163.148 2, 175.148 3, 251.179 8, 269.190 6, 305.167 2
雄诺龙	521-18-6	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	291.231 9	ESI+	6.99	81.069 5, 99.079 7, 119.085 2, 135.116 7, 145.101 0, 159.117 2, 173.132 9, 201.164 3, 215.180 0, 255.211 3, 273.221 5
甲炔诺酮	6533-00-2	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	313.216 2	ESI+	8.51	83.048 4, 109.064 4, 133.101 0, 159.117 3, 185.132 7, 245.190 2, 295.206 1
美雄诺龙	521-11-9	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	305.247 5	ESI+	9.08	81.069 2, 99.079 8, 121.101 2, 135.116 8, 159.116 8, 173.133 3, 213.164 1, 229.195 9, 229.226 7, 269.226 7, 287.237 6
醋酸环丙氯地孕酮	427-51-0	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄	417.182 7	ESI+	10.18	133.100 3, 147.115 8, 219.057 4, 263.140 7, 279.172 6, 321.183 2, 357.159 4
醋酸氯地孕酮	302-22-7	C ₂₃ H ₂₉ ClO ₄	405.182 7	ESI+	10.42	81.069 2, 133.100 7, 249.162 4, 267.173 1, 309.183 4, 345.159 9
黄体酮	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315.231 4	ESI+	10.62	97.064 0, 109.063 8, 123.079 8, 239.178 5, 255.210 1, 279.210 4, 297.220 9
安宫黄体酮	71-58-9	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	387.252 9	ESI+	10.64	97.063 8, 123.079 7, 175.148 2, 267.210 2, 285.221 0, 309.221 1, 327.231 4
醋酸美仑孕酮	2919-66-6	C ₂₅ H ₃₂ O ₄	397.237 3	ESI+	10.69	97.064 0, 119.084 7, 145.100 7, 187.111 6, 221.132 2, 237.162 9, 261.163 1, 279.173 7, 295.204 2, 337.215 2
尼尔雌醇	39791-20-3	C ₂₅ H ₃₂ O ₃	381.242 4	ESI+	10.73	57.069 2, 102.126 9, 107.965 9, 195.124 1, 251.044 9, 313.184 2
醋酸双烯雌酚	84-19-5	C ₂₂ H ₂₂ O ₄	351.159 1	ESI+	11.42	107.048 7, 121.064 5, 158.072 2, 173.095 9, 237.090 5, 267.137 5, 279.100 9, 309.147 8
醋酸氯睾酮	855-19-6	C ₂₁ H ₂₉ ClO ₃	365.187 8	ESI+	11.58	131.025 2, 143.025 0, 175.147 8, 213.161 1, 251.178 6, 269.188 4, 287.154 4, 305.164 4, 323.175 8
丙酸诺龙	7207-92-3	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	331.226 8	ESI+	11.73	57.032 5, 109.063 6, 145.100 3, 163.110 4, 239.178 1, 257.188 6, 275.199 2
己酸孕酮	630-56-8	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	429.299 9	ESI+	12.42	71.085 5, 97.064 8, 145.101 4, 175.148 5, 205.159 2, 231.174 8, 271.206 2, 295.205 4, 313.216 6
炔雌醇环戊醚	152-43-2	C ₂₅ H ₃₂ O ₂	365.247 5	ESI+	12.43	60.043 3, 107.048 8, 133.065 0, 159.116 1, 285.898 7, 326.965 6
苯丙酸诺龙	62-90-8	C ₂₇ H ₃₄ O ₃	407.259 1	ESI+	12.72	105.069 9, 109.065 4, 239.177 3, 257.190 5
羟甲雄酮	521-12-0	C ₂₃ H ₃₆ O ₃	361.273 7	ESI+	13.05	57.033 1, 145.101 7, 173.132 5, 199.148 9, 215.179 6, 261.042 8, 269.226 2, 287.236 9, 323.224 9
雌三醇-D2	53866-32-3	C ₁₈ H ₂₂ D ₂ O ₃	289.177 8	ESI-	0.96	57.974 8, 94.925 1, 116.926 9, 173.094 0, 257.938 8
雌三醇	50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	287.165 3	ESI-	0.99	57.975 3, 100.931 7, 135.971 2, 152.991 6, 171.081 1, 269.151 3
雌二醇	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	271.170 4	ESI-	2.41	61.987 2, 116.928 0, 145.066 8, 158.072 8, 183.081 7, 239.144 6, 253.157 9
17 α -雌二醇	57-91-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	271.170 4	ESI-	2.62	61.9871, 116.927 9, 145.065 9, 158.073 6, 183.081 7, 239.144 6, 253.160 4
17 α -乙炔基雌二醇	57-63-6	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	295.170 4	ESI-	2.77	92.927 5, 112.984 9, 145.065 7, 159.081 4, 171.081 6, 269.155 5
雌酮	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	269.154 7	ESI-	3.04	80.980 5, 145.065 9, 159.811 0, 213.127 7, 253.123 7
己烯雌酚	56-53-1	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	267.139 1	ESI-	3.25	93.034 4, 130.042 2, 195.082 0, 209.060 7, 222.068 7, 237.092 2, 251.107 7
双烯雌酚	84-17-3	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	265.123 4	ESI-	3.31	68.995 2, 93.034 4, 112.985 1, 130.943 8, 170.947 6, 249.092 5
己烷雌酚	84-16-2	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	269.154 7	ESI-	3.39	80.980 3, 119.050 0, 134.073 2, 174.968 2
戊酸雌二醇	979-32-8	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	355.227 9	ESI-	7.34	101.060 8, 145.065 5, 238.135 9, 253.160 2, 296.862 6, 318.844 1

的精确质量数和保留时间进行比对, 软件自动筛选出疑似添加的性激素组分, 然后对该样品中的疑似目标物在 Targeted MS/MS 模式下进行二级质谱检测分析, 将所得到的二级碎片离子质谱图与已建立数据库的二级碎片离子质谱图进行比对。

结果显示, 一批育发液样品检出黄体酮, 提取离子流图及二级质谱图见图 3~4。

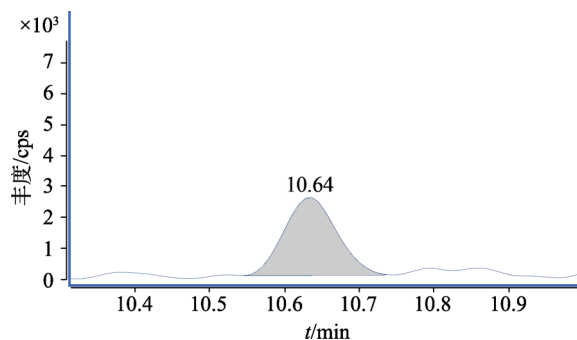


图 3 阳性样品中黄体酮的提取离子流图

Fig. 3 Extraction ion chromatogram of progesterone in positive sample

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

一般在正离子模式下加入适量的甲酸或乙酸有利于提高分析物的离子化强度和改善性激素类药物的峰形, 本实验先考察了纯水和 0.1% 甲酸水溶液作为流动相时分析物的响应。结果大部分分析物以 0.1% 甲酸水溶液作为流动相时, 质谱响应较好。继而考察不同浓度的甲酸水溶液(0.05%, 0.1%, 0.2%), 发现大部分分析物在这 3 种甲酸水溶液中响应差别不大, 且宝丹酮和雄烯二酮、睾酮和表睾酮、丙酸诺龙和 21-羟基黄体酮这 3 组同分异构体得到较好的分离, 故而选择 0.1% 甲酸水溶液作为流动相。

在负离子模式下, 考察了纯水和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

乙酸铵溶液作为流动相时对分析物响应和分离的影响。结果发现以 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液作为流动相时同分异构体雌二醇和 17- α -雌二醇(m/z 271.170 4)、雌酚酮和己烷雌酚(m/z 269.154 7)、雌三醇及 17 α -乙炔基雌二醇的响应和分离均不如纯水, 因此选择纯水作为负离子的流动相。

3.2 质谱条件的优化

根据相关文献报道^[25], 雌激素类(除醋酸双烯雌酚、炔雌醇环戊醚、尼尔雌醇外)化合物因含有酚羟基而适合在 ESI 源的负离子模式下离子化, 产生的母离子为[M-H]⁻准分子离子峰。雄激素和孕激素适合在 ESI 源的正离子模式下形成[M+H]⁺准分子离子峰, 在相应的离子化模式下, 分别将 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 40 种性激素对照品溶液进行质谱参数的优化。第一步: 在一级质谱全扫描模式(Scan MS)下, 采集 40 种目标化合物的母离子信息, 确定每种化合物的母离子, 优化毛细管电压、干燥气温度和干燥气流速等质谱参数, 以获得目标物的准分子离子峰和保留时间; 然后在 Targeted MS/MS 模式下, 碰撞池 CID 模式下, 对准分子离子在 3 个碰撞能(10, 20, 40 eV)下同时扫描, 得到 3 个碰撞能下的二级质谱图, 10 eV 的碰撞能量较低, 确保母离子信息; 20 eV 和 40 eV 的碰撞能量较高, 保证获取丰富的碎片离子信息; 最终将得到的信息导入 PCDL 软件中, 建立 40 种性激素的高分辨筛查数据库。

3.3 样品测定

采用本研究所建立的方法对市售 100 批宣称具有育发防脱、抗皱/抗衰老、健美、美乳、美白、脱毛功效的化妆品进行了高通量筛查, 一批育发液样品检出黄体酮。该产品主要以植物为原料, 检出的黄体酮是原料带入或人为少量添加有待进

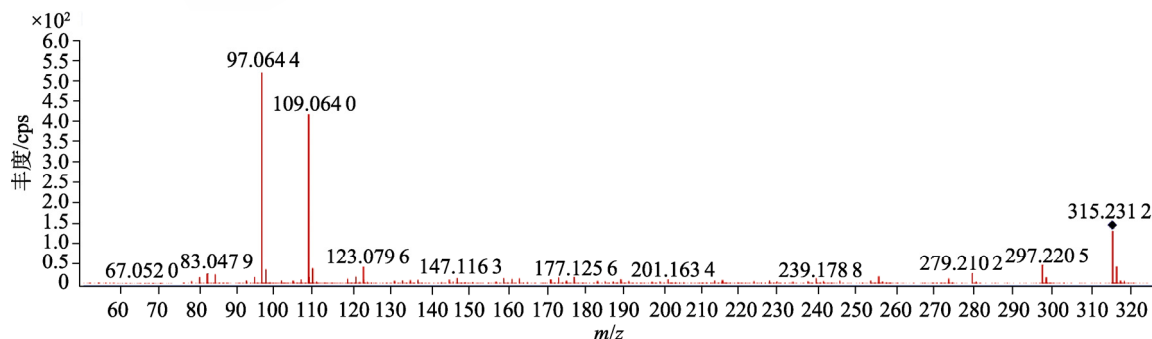


图 4 阳性样品中黄体酮的二级质谱图

Fig. 4 Mass spectrum of progesterone in positive sample

一步确认。《化妆品安全技术规范》2015 年版^[5]禁用组分检验方法“2.4 雌三醇等 7 种组分”和“2.5 米诺地尔等 7 种组分”均收载有黄体酮的测定方法,分别为液相色谱和液相色谱-质联用法,检出限分别为 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。由于现行标准存在一定缺陷,企业在研发生产类似产品时需对黄体酮的测定方法进行综合评判。

3.4 小结

本研究所建立的基于 UPLC-Q-TOF-MSⁿ 的化妆品中 40 种性激素的分析方法及筛查数据库,具有简便、快速、灵敏、筛查范围广、确证信息可靠等特点,可在无对照品的条件下实现对化妆品中非法添加性激素组分进行高通量筛查,还可根据精确质量数和质谱二级特征碎片推测未知衍生物分子式及结构,该数据库的建立可为化妆品的科学监管提供方法参考。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国国家统计局. 2019 社会消费品零售总额增长 8.0%^[EB/OL]. (2020 年 1 月 17 日). <http://www.stats.gov.cn/>.
- [2] TU D Z, WU H L, LI Y N, et al. Measuring estriol and estrone simultaneously in liquid cosmetic samples using second-order calibration coupled with excitation-emission matrix fluorescence based on region selection^[J]. *Anal Methods*, 2012, 4(1): 222-229.
- [3] ZHANG Q Y, LUO H T. Research progress on analytical techniques for hormone illegally added in cosmetics^[J]. *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2018, 45(12): 155-156.
- [4] 齐尚忠. 化妆品中激素和抗生素的检测方法研究进展^[J]. *中国洗涤用品工业*, 2014(6): 74-77.
- [5] 化妆品安全技术规范^[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [6] Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products^[S]. The European Parliament and of the Council, 2009.
- [7] WANG X F, ZENG W F, WANG J, et al. Simultaneous determination of seven sexual hormones in essential oil by high performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors^[J]. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2009, 27(3): 328-332.
- [8] ZHAO S, WU D N, WANG P. Simultaneous determination of seven sexual hormones in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography^[J]. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2004, 22(3): 267-269.
- [9] MA Q, WANG C, WANG X, et al. Simultaneous determination of 15 hormones in cosmetics using ultra performance liquid chromatography^[J]. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2007, 25(4): 541-545.
- [10] XIONG X T, TAN J H, LI H Y, et al. Rapid determination of 8 prohibited drugs in hair growth cosmetics by HPLC/DAD^[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2013, 32(4): 448-453.
- [11] 李显庆, 王玲玲. 化妆品中 7 种性激素高效液相色谱法同时测定^[J]. *中国公共卫生*, 2014, 30(3): 359-360.
- [12] CHENG J, YU P P, GU H, et al. Simultaneous determination of eight sexual hormones in cosmetics by high performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors^[J]. *Chin J Anal Lab*(分析实验室), 2016, 35(1): 112-116.
- [13] PANG D B, XU L, JI S F, et al. Study on quick determination of six kinds of sex hormones in cosmetics by ultra performance convergence chromatography^[J]. *Flavour Fragr Cosmet*(香料香精化妆品), 2017(3): 29-32.
- [14] WU W Q, SHEN C Y, YANG Y L, et al. Determination of sex hormones in liquid cosmetics by gas chromatography-mass spectrometry^[J]. *J Labour Med*(环境与职业医学), 2004, 21(4): 307-309.
- [15] DE ORSI 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]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 641-648.
- [16] HUANG B F, YE L, HAN J L, et al. Simultaneous determination of 25 sex hormones in Cosmeceutical by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution^[J]. *Chin J Heal Lab Technol*(中国卫生检验杂志), 2011, 21(5): 1048-1053.
- [17] 刘齐. 高效液相色谱—质谱联用法同时测定育发液中 9 种禁用物质的研究^[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [18] ZHOU Z M, LUO Z Y. LC-MS/MS determination of 15 sex hormones in cosmetics^[J]. *Phys Test Chem Anal: Part B: Chem Anal*(理化检验: 化学分册), 2018, 54(2): 161-166.
- [19] WANG Y F, LIU Z B, XIONG Z Q, et al. Monitoring on thirteen kinds of sexual hormones illegally added in skin care cosmetics by QuEChERS-UPLC-MS/MS^[J]. *Chin J Ration Drug Use*(中国合理用药探索), 2017, 14(3): 33-41.
- [20] LIN Z H, ZHAO Y, XING Y N, et al. Simultaneous determination of 21 sexual hormones in cosmetics by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry^[J]. *Chin J Anal Lab*(分析实验室), 2017, 36(4): 441-447.
- [21] RU G, WANG K, CHEN D D, et al. Simultaneous determination of thirteen sex hormones in cosmetics by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry^[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2018, 37(4): 464-470.
- [22] YUE L, LI X J. Simultaneous determination of five banned sex hormones in cosmetics with UPLC-MS/MS^[J]. *China Surfactant Deterg Cosmet*(日用化学工业), 2017, 47(8): 476-480.
- [23] ZHANG X L, DING J, WANG J L. Determination of 7 sex hormones add to cosmetics by UPLC-QTOF-MS^[J]. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2015, 27(10): 36-39.
- [24] MENG X S, BAI H, GUO T, et al. Broad screening of illicit ingredients in cosmetics using ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry with customized accurate-mass database and mass spectral library^[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1528: 61-74.
- [25] LUO H T, HUANG X L, WU H Q, et al. Simultaneous determination of 30 hormones and chloramphenicols residues in fish using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry^[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2011, 30(12): 1329-1337.

收稿日期: 2020-12-24
(本文责编: 曹粤锋)