

高效液相色谱-串联质谱法测定睫毛增长液 化妆品中的比马前列素

潘晨, 许勇, 韩晶, 彭兴盛, 郑荣*

(上海市食品药品检验所, 国家药监局化妆品监测评价重点实验室, 上海 201203)

摘要: 建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定睫毛增长液化妆品中比马前列素含量的分析方法。样品经50% (体积分数) 甲醇溶液提取, Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm)分离, 以5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液(含0.02% 甲酸)-乙腈(体积比55:45)为流动相等度洗脱, 流速0.3 mL · min⁻¹, 采用电喷雾正离子源(ESI⁺), 多反应监测(MRM)扫描方式检测, 外标法定量。结果表明, 比马前列素在0.5~100 ng · mL⁻¹质量浓度范围内线性良好, 相关系数(*r*²)为0.998 2, 在低、中、高3个加标水平下的平均回收率分别为98.6%、101%和99.2%, 相对标准偏差(RSD)分别为2.4%、2.1%、1.2%, 检出限(LOD, *S/N*=3)为0.015 μg · g⁻¹, 定量下限(LOQ, *S/N*=10)为0.05 μg · g⁻¹。该方法快速简便、灵敏度高, 适用于市售睫毛增长液化妆品中比马前列素的快速准确检测。

关键词: 比马前列素; 睫毛增长; 化妆品; 高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)

中图分类号: 0657.72; 0657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)07-0917-05

Determination of Bimatoprost in Eyelash Enhancing Cosmetics Serums by High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

PAN Chen, XU Yong, HAN Jing, PENG Xing-sheng, ZHENG Rong*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, National Medical Products Administration Key Laboratory for Monitoring and Evaluation of Cosmetics, Shanghai 201203, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (HPLC – MS/MS) method was established for the determination of bimatoprost in eyelash enhancing cosmetics serums. The samples were extracted with 50% (by volume) methanol, then separated on an Agilent Poroshell 120 EC – C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) column by isocratic elution, with 5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate containing 0.02% formic acid – acetonitrile (55 : 45) as mobile phases at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. The analyte was detected by HPLC – MS/MS with electrospray ionization source in positive ion mode (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM), and quantified by external standard method. Results showed that there existed a good linear relationship for bimatoprost in the range of 0.50 – 100 ng · mL⁻¹ with a correlation coefficient (*r*²) of 0.998 2. The limit of detection (LOD, *S/N* = 3) and limit of quantitation (LOQ, *S/N* = 10) were 0.015 and 0.05 μg · g⁻¹, respectively. The recoveries at low, medium and high spiked levels were 98.6%, 101% and 99.2%, with relative standard deviations (RSDs) of 2.4%, 2.1% and 1.2%, respectively. The method is simple, rapid and high sensitive, and is suitable for the rapid determination of bimatoprost in eyelash enhancing cosmetics serums.

Key words: bimatoprost; eyelash enhancing; cosmetics; high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS)

比马前列素(Bimatoprost)属于前列腺素类似物(结构式见图1), 是用于治疗青光眼和高眼压的降眼压处方药比马前列素液滴眼液(商品名Lumigan)的有效成分^[1-2], 由美国Allergan公司研制, 该公司先后获准上市了0.03%和0.01%的比马前列素液滴眼液。临床试验发现, 比马前列素具有引起睫毛增

收稿日期: 2020-03-23; 修回日期: 2020-05-05

基金项目: 上海市药品监督管理局重大资助项目(ZD202003)

* 通讯作者: 郑荣, 硕士, 主任药师, 研究方向: 食品化妆品监督检验和检测技术, E-mail: zhengrongsifdc@163.com

长的副作用^[3]。于是, Allergan 公司于 2008 年底推出用于治疗睫毛稀少症(Eyelash hypotrichosis)^[4]的 Latisse(含 0.03% 比马前列素眼科溶液), 该药是首个也是唯一一个获得 FDA 许可用于睫毛增长、增粗、增黑的药物, 归入处方药物管理。目前, Allergan 公司拥有比马前列素药物用于刺激睫毛生长的全球独家专利。但比马前列素除了会刺激睫毛生长外, 还会对眼部产生副作用, 如刺激皮肤内黑色素细胞的生长, 眼周黑色素沉积, 眼睑发痒发肿, 眼睛疼痛、结膜充血等, 长期过量使用会造成视神经损伤, 导致视力下降甚至失明^[5-7]。

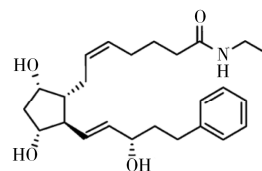


图 1 比马前列素的分子结构式
Fig. 1 Molecular structure of bimatoprost

近年来, 某些化妆品厂商为提高市场竞争力, 利用比马前列素刺激睫毛生长的副作用, 在睫毛增长液类化妆品中违规添加该成分, 使得消费者在获得睫毛增长效果的同时也饱受其带来的如眼睛刺激、瘙痒、黑眼圈、结膜充血等伤害。目前, 我国《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[8]的禁限用组分列表中未提及比马前列素, 国外如欧盟化妆品法规(EC)NO 1223/2009^[9]附件 II(禁用物质)和附件 III(限用物质)中也未作相关规定。但比马前列素作为药理活性成分, 附带可预见性的危害, 不应添加在化妆品中。值得注意的是, 欧盟已重视并在近几年多次通报并召回含比马前列素的睫毛增长液, 其中也有来自中国的产品, 然而我国对于睫毛增长液化妆品中比马前列素的监管目前仍是空白。因此, 为规范化妆品市场秩序, 确保化妆品质量安全, 保障消费者使用安全, 建立睫毛增长液化妆品中比马前列素含量的检测方法已迫在眉睫。

目前, 比马前列素的报道主要集中于药品、生物制品等领域, 分析方法主要为高效液相色谱法^[10-12]和液相色谱-质谱联用法^[13-14]。化妆品中比马前列素的检测方法仅有几篇外文文献报道, 如 Johansson 等^[15]曾报道了利用液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-QTOF-MS)和核磁共振(NMR)技术对非药用产品中未知活性成分的通用筛查方法, 其中包含睫毛增长液中前列腺素类似物的筛查, 但未作定量分析; Wittenberg 等^[16]采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定化妆品中的前列腺素类似物, 基于 QuEChERS 液-液萃取法处理样品, 并采用氘代内标定量, 该方法前处理程序相对繁琐, 氘代内标成本高, 也较难获得。为尽快监测国内化妆品市场中比马前列素的使用情况, 本文通过简单、快速的溶剂提取, 建立了一种科学、高效的睫毛生长液中比马前列素的 HPLC-MS/MS 测定方法, 填补了我国化妆品中比马前列素测定的空白, 为加快化妆品行业的质量监管和补充完善相关检验方法提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290 UPLC/6495 MS/MS 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司); Sartorius CP224S 和 225D-1CN 电子天平(德国赛多利斯公司); 5800 型超声仪(美国 Branson 公司); MS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); 5810R 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司); Milli-Q Reference A+ 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

比马前列素标准品(纯度 99%, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国默克公司); 甲酸、乙酸铵(色谱纯, 德国 Sigma 公司)。

1.2 标准溶液配制

标准中间溶液: 精密称取比马前列素标准品 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 摇匀, 配成质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 于 $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。精密吸取上述标准储备液 1 mL, 用甲醇稀释定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 配成质量浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准中间溶液。

标准工作溶液: 精密吸取适量标准中间溶液, 用 50% (体积分数) 甲醇溶液稀释制得质量浓度分别为 0.5、1、5、10、20、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准工作溶液。

1.3 样品前处理

精确称取试样 0.2 g(准确至 0.001 g)至 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 20 mL 50% 甲醇溶液涡旋 3 min, 充分混匀, 以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液适量经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 待测, 同步进行空白试验。

1.4 色谱-质谱条件

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC - C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm × 2.7 μm); 流动相: 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵(含 0.02% 甲酸)(A) - 乙腈(B)(体积比 55 : 45), 等度洗脱; 柱温 30 °C; 流速 0.3 mL · min⁻¹; 进样量 5 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子电离模式(ESI⁺); 毛细管电压: 3 500 V; 干燥气温度: 250 °C; 干燥气流速: 14 L · min⁻¹; 雾化器压力: 1.378 bar; 鞘气温度: 250 °C; 鞘气流速: 11 L · min⁻¹; 裂解电压: 380 V; 检测方式: 多反应监测(MRM)模式。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱条件优化

考察了水-乙腈、乙酸铵-乙腈、甲酸/乙酸铵-乙腈 3 种流动相体系对比马前列素的色谱行为和离子化程度的影响。结果显示, 以水-乙腈为流动相时待测物峰形有拖尾现象, 在加入 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵后得以改善。另外, 向流动相中添加一定量甲酸可提高比马前列素的离子化效率, 因此实验考察了水相中添加不同体积分数(0.01%、0.02%、0.05%、0.1%) 甲酸对测定的影响。结果显示, 甲酸含量为 0.02% 时待测物的响应最高。通过优化, 最终确定采用含 0.02% 甲酸的 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液-乙腈(体积比 55 : 45) 为流动相等度洗脱, 此时比马前列素可在 5 min 内获得良好的峰形和响应, 其总离子流图见图 2。

2.2 质谱条件优化

以 1.0 μg · mL⁻¹ 比马前列素标准溶液进行质谱条件优化, 在正模式下全扫描。结果显示, [M + H]⁺ 峰响应非常低, [M + Na]⁺ 丰度最高, 为抑制加钠峰的出现尝试向流动相中添加一定量乙酸铵, 但并无明显改善^[16]。文献报道对比 APCI 源和 ESI 源测定马前列素的结果, 发现 APCI 源虽可在一定程度上减少 [M + Na]⁺, 但整体灵敏度比 ESI 低^[16]。由于 [M + Na]⁺ 峰容易受分析环境影响而不稳定, 在定量分析时应尽量避免使用。另外, 进行全扫描时还发现存在丰度较高的 [M + H - H₂O]⁺、[M + H - 2H₂O]⁺、[M + H - 3H₂O]⁺ 峰, 这可能是

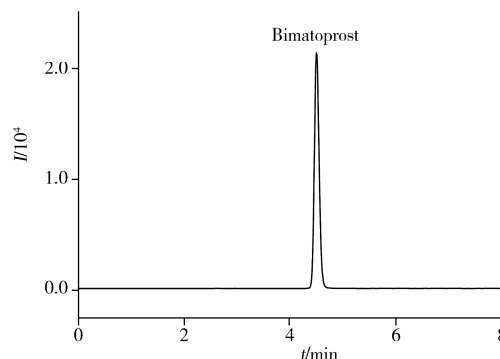


图2 比马前列素标准溶液的总离子流图(50 ng · mL⁻¹)
Fig.2 Total ion chromatogram of bimatoprost(50 ng · mL⁻¹)

因为比马前列素为多羟基化合物, 电离时容易脱水得到系列 [M + H - nH₂O]⁺ 峰, 因此最终采用响应高且稳定的 [M + H - H₂O]⁺ (*m/z* 398.2) 为母离子, 再利用二级质谱扫描确定其子离子, 选择响应好且稳定的 2 个子离子 (*m/z* 362.2、317.1) 组建 MRM 离子对, 并优化确定其它质谱参数(表 1)。

表1 比马前列素的质谱参数
Table 1 MS parameters of bimatoprost

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Bimatoprost	4.6	398.2	362.2*, 317.1	380, 380	8, 16

* quantitative ion

2.3 前处理条件优化

比马前列素在甲醇、乙腈等有机溶剂中均具有较好的溶解度, 考虑到乙腈毒性大且成本高, 故选择甲醇为的提取剂。由于市售睫毛增长液为水溶液状态, 加入溶剂涡旋即可充分混匀, 为简化操作步骤, 比较了不同甲醇含量(100%、80%、50%、30%) 超声(10 min)和涡旋(3 min)的提取效率。结果显示, 以 100% 甲醇提取时比马前列素的峰形前展, 其余 3 种比例甲醇提取后的峰形对称, 回收率均高于 90%, 且以 50% 甲醇的提取效率最高, 故选择 50% 甲醇为提取溶剂。通过实验比较显示, 超声 10 min 和涡旋 3 min 的提取效率无明显差异, 为节约时间成本, 故选择涡旋 3 min 进行提取。而对一些不

能很好分散或溶解的样品, 可进行超声处理。

由于化妆品基质中含有大量表面活性剂和脂溶性物质, 实验考察了 Captiva EMR - Lip 脂质净化柱对样品的净化效果。结果发现, 在空白基质样品中添加 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 比马前列素, 经 Captiva EMR - Lip 脂质净化柱重力自洗脱后的回收率低于 50%, 表明 Captiva EMR - Lip 净化柱不适用于目标物净化, 故前处理过程不采用脂质净化柱净化。

2.4 基质效应的考察

基质效应会影响方法的准确度和精密度, 通常采用提取后添加法评价^[17-18], 同时考虑到基质效应的增强或抑制程度一般随分析物浓度的不同而发生改变, 因此本研究采用基质匹配标准曲线的斜率与溶剂配制标准曲线的斜率之比来考察基质效应, 若比值小于 1, 则为基质抑制效应, 反之为基质增强效应。结果发现, 3 个样品组(质量浓度均为 0.5 、 1.0 、 5.0 、 10 、 20 、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的斜率比值为 0.92 、 0.94 、 0.92 , 表明该方法存在一定程度的基质抑制效应, 采用基质匹配标准曲线定量可较好地消除基质效应的影响, 提高结果准确性。

2.5 线性关系、检出限及定量下限

选用不含比马前列素的空白样品, 按照“1.3”方法进行样品前处理, 取滤液作为稀释液, 配制比马前列素质量浓度分别为 0.5 、 1.0 、 5.0 、 10 、 20 、 50 、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液, 分别进样 $5 \mu\text{L}$, 以比马前列素的定量离子对峰面积为纵坐标(y), 对应质量浓度为横坐标(x , $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行线性回归。结果显示, 比马前列素在 $0.5 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内线性良好, 线性方程为 $y = 1706.4x - 7.5596$, 相关系数(r^2)为 0.9982 。以 3 倍信噪比($S/N=3$)和 $S/N=10$ 计算得检出限(LOD)和定量下限(LOQ)分别为 0.015 、 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 可满足分析要求。

2.6 回收率与相对标准偏差

取空白样品 0.2 g , 分别加入一定量比马前列素标准溶液, 配成低($0.05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、中($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)和高($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)3 个水平的加标溶液, 在优化条件下, 每个浓度平行测定 6 次, 计算回收率和相对标准偏差(RSD)。结果显示, 3 个加标浓度下比马前列素的平均回收率分别为 98.6% 、 101% 、 99.2% , RSD($n=6$)分别为 2.4% 、 2.1% 、 1.2% , 表明该方法的准确度和精密度良好, 可满足检测要求。

2.7 实际样品检测

在优化条件下, 应用本方法对 10 批市售睫毛增长液化妆品进行测定, 其中 3 批次样品中检出比马前列素, 含量为 $205.6 \sim 282.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 其中含量为 $282.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的阳性样品总离子流图见图 3。由此可见, 目前睫毛增长液化妆品中违规添加比马前列素成分的现象较为严重, 监管部门应当尽快引起重视。

3 结 论

本文建立了高效液相色谱 - 串联质谱法测定睫毛增长液化妆品中比马前列素含量的分析方法, 该方法简单快速、灵敏度高、操作性强, 满足睫毛增长液化妆品中比马前列素的定性和定量分析要求, 可为后期开展风险监测及有效监管化妆品的非法添加提供技术支持。

参考文献:

- [1] Dong Z. *Chin. J. New Drugs* (董智. 中国新药杂志), **2002**, 2(11): 172 - 174.
- [2] Easthope S E, Perry C M. *Drugs Aging*, **2002**, 19(3): 231 - 248.
- [3] Tosti A, Pazzaglia M, Voudouris S, Tosti G. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2004**, 6(51): S149 - S150.
- [4] Woodson S A. *Nurs. Womens Health*, **2009**, 3(13): 243 - 248.
- [5] Inoue K, Shikawa M, Higa R, Sugahara M, Soga T, Wakakura M, Tomita G. *Eye*, **2012**, 11(26): 1465 - 1472.

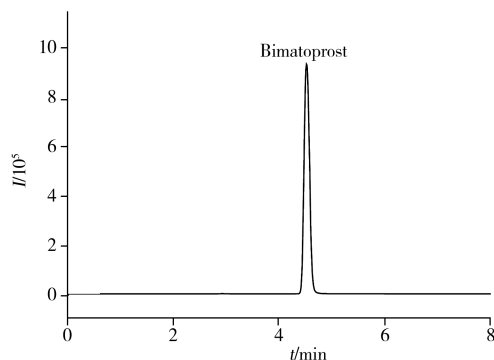


图 3 典型阳性样品的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of a typical sample

- [6] Holló G. *Expert Opin. Drug Saf.*, **2007**, 1(6): 45–52.
- [7] Alagöz G, Bayer A, Boran C, Serin D, Kükner A. *Ophthalmologica*, **2008**, 222: 161–167.
- [8] Safety and Technical Standards for Cosmetics(2015). China Food and Drug Administration(化妆品安全技术规范(2015年版). 国家食品药品监督管理总局), **2015**.
- [9] Regulation(EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council, **2009**.
- [10] Kumar S S, Natraj K, Khan A, Kumar B K, Rao J V. *J. Pharm. Res.*, **2011**, 4(10): 3733–3734.
- [11] Zezula M, Ruszczak M, Maruszak W, Zagrodzka J, Chodynski M, Dams I. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 174: 348–359.
- [12] Johnson T V, Gupta P K, Vudathala D K, Blair I A, Tanna A P. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **2011**, 1(27): 51–59.
- [13] Cantor L B, Hoop J, Wudunn D, Yung C W, Catoira Y, Valluri S, Cortes A, Acheampong A, Woodward D F, Wheeler L A. *Br. J. Ophthalmol.*, **2007**, 5(91): 629–632.
- [14] Maxey K M, Johnson J L, Brecque J L. *Surv. Ophthalmol.*, **2001**, 1(47): S34–S40.
- [15] Johansson M, Fransson D, Rundlöf T, Huynh N H, Arvidsson T J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 100: 215–229.
- [16] Wittenberg J B, Zhou W L, Wang P G, Krynskiy A J. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1359: 140–146.
- [17] Xiong S, Liu C Y, Wang Z J, Li H, Ren X D, Wang L, Tian F L, Zhao H B. *J. Instrum. Anal.* (熊爽, 刘成雁, 王志嘉, 李红, 任雪冬, 王璐, 田福林, 赵海波. 分析测试学报), **2017**, 36(8): 980–985.
- [18] Xiang P, Shen M, Zhuo X Y. *J. Instrum. Anal.* (向平, 沈敏, 卓先义. 分析测试学报), **2009**, 28(6): 753–756.

(责任编辑: 周启动)

2019 年度《分析测试学报》优秀论文获奖名单

本刊 2018 年开展的优秀论文评选活动受到了广泛关注, 并得到了读者和作者朋友的热烈欢迎。为鼓励学者积极展示优秀科研成果, 撰写更多更好的论文, 突显高质量论文对我国分析测试行业的引领和促进作用, 同时加强学术交流, 激发科研人员的创新热情, 本刊继续开展了 2019 年度优秀论文评选活动。

本次评选基于 CNKI 提供的即年被引频次、总被引频次、被核心期刊引用次数及下载量等数据, 并结合学术先进性、领域研究热点、成果应用前景、发表时间等综合指标, 从 2018 年(2018.1.1~2018.12.31) 出刊的 241 篇论文中评选出 10 篇《分析测试学报》2019 年度优秀论文(获奖名单见附表)。获奖的 10 篇论文将获颁荣誉证书和奖金(1 000 元/篇)。

热烈祝贺获奖作者, 并欢迎广大读者朋友积极投稿!

《分析测试学报》编辑部

附表: 2019 年度《分析测试学报》优秀论文获奖名单
(以发表先后排序)

序号	论文题名	论文作者	发表时间
1	3 种人工结香方法所得沉香挥发性成分的 SPME/GC-MS 分析	张静斐, 吴惠勤*, 黄晓兰, 林晓珊, 马艳芳, 侯思润	2018 年 1 期
2	质谱在高通量快速检测技术中的应用研究进展	胡明珠, 孟宪双, 王春, 王长海, 牛增元, 白桦, 马强*	2018 年 2 期
3	基于不同电化学探针检测乳腺癌基因片段电化学传感器的研究	贺彩梅, 胡晓琴, 刘舒萍, 李晓霞*	2018 年 3 期
4	Orbitrap 高分辨质谱法高通量筛查生化药品、中成药与保健品中非法添加的 13 种消化类化学药物	郭常川, 孙华, 石峰*, 邢晟, 张迅杰, 李可, 贺美莲, 姜玮*	2018 年 3 期
5	多壁碳纳米管分散固相萃取结合在线 GPC/GC-MS/MS 技术同时检测茶叶中 40 种有机磷农药	朱炳祺, 金绍强, 田春霞, 胡帆, 徐潇颖, 罗金文*	2018 年 4 期
6	基于光谱比值分析的无标样近红外模型传递方法	倪力军, 肖丽霞, 张立国*, 栾绍嵘	2018 年 5 期
7	金属有机骨架材料-核酸适配体荧光法检测沙门氏菌	蒋晓华*, 丁文捷, 栾崇林, 代建国	2018 年 5 期
8	数字微流控技术及其在生物分析中的应用	阮庆宇, 邹芬香, 王杨, 林晓焱, 张明霞, 周雷激, 杨朝男, 朱志*	2018 年 10 期
9	表面增强拉曼光谱技术在食品安全检测中的应用研究进展	邹婷婷, 徐振林, 杨金易, 王弘, 孙远明, 沈玉栋*	2018 年 10 期
10	超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱法同时测定不同贮藏条件下红参中 17 种人参皂苷类成分	石婧婧, 陈舒好, 邹立思, 刘训红*, 唐仁茂, 马继梅, 严颖, 赵慧	2018 年 11 期