

气相色谱-负化学源-三重四极杆质谱法测定 化妆品中的硝基麝香类化合物

王 征*

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心, 福建 福州 350002)

摘要:建立了一种用于不同化妆品中5种硝基麝香含量的气相色谱-负化学离子源三重四极杆质谱联用(GC-MS/MS)检测方法。采用丙酮/正己烷混合溶液超声提取化妆品中的硝基麝香,将提取液浓缩,以CNWBOND Si固相萃取柱净化。再由GC-MS/MS检测,氘代二甲苯麝香内标法定量。该方法对化妆品中5种硝基麝香的加标回收率为85.81%~103.77%,相对标准偏差(RSD)不大于5.32%,灵敏度高,定量限为50.0~500 ng/kg;选择性好,能有效消除复杂基体干扰。可作为常见化妆品中硝基麝香类化合物含量检测的确证方法。

关键词:气相色谱;负化学离子源三重四极杆质谱;硝基麝香;化妆品

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2012)11-1178-05

Determination of synthetic nitro-musks in cosmetics by gas chromatography coupled with negative chemical ionization-triple quadrupole mass spectrometry

WANG Zheng*

(Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, National Quality Supervision
and Testing Center for Processed Food, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A confirmatory method is presented for the determination of five nitro-musks (musk ambrette, musk xylene, musk moskene, musk tibeten and musk ketone) in different cosmetics by gas chromatography coupled with negative chemical ionization (NCI)-triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS). The samples were extracted under ultrasonication using a mixture of acetone and hexane. The extract was concentrated and then cleaned up by CNWBOND Si solid phase extraction cartridge. Five different instrument parameters such as the temperature programmed, ion source temperature, reagent gas pressure, collision energy, monitoring ion pairs were optimized for higher sensitivity. Then the analytes were qualitatively and quantitatively analyzed under the multiple reaction monitoring (MRM) mode after the chromatographic separation on an HP-5MS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), and employing d₁₅-musk xylene as internal standard. The mixed standards were spiked in the blank cosmetics samples (each nitro-musk was about 500 ng/kg), and the recoveries were in the range of 85.81%–103.77% with the relative standard deviations (RSDs) not more than 5.32%. The limits of quantification of the method were about 50.0–500 ng/kg. The method is accurate, rapid, sensitive and can be used in the inspection of the five nitro-musks in cosmetics.

Key words: gas chromatography (GC); negative chemical ionization-triple quadrupole mass spectrometry; nitro-musks; cosmetics

麝香作为化妆品中一种非常重要的原料,被广泛地用于香水、花露水、剃须水、膏霜等各类产品

中^[1]。但由于天然麝香的资源极其有限,从19世纪末Baur等首次合成硝基麝香后,合成麝香就逐渐成

* 通讯联系人:王 征,博士研究生,主要从事食品安全分析。Tel: (0591)83762000, E-mail: syymwan@sina.com.

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2011QK180, 2010QK025).

收稿日期:2012-07-02

为香精香料行业中天然麝香的廉价替代物。合成麝香可分为 3 大类: 硝基麝香、多环麝香和大环麝香^[2]。由于硝基麝香具有易于合成、价廉等特点, 目前被大量地使用于化妆品行业中。但是研究表明硝基麝香在食物链中具有生物富集作用, 易渗入人体细胞且具有疑似的致癌性, 所以美国及欧盟的许多国家已将其列为高关注物质^[3], 并禁止其用于化妆品及与皮肤接触的产品中, 我国 2007 年修订的《化妆品卫生规范》中也明确将硝基麝香列入禁限用物质表中^[4]。因此, 建立准确、快速、灵敏的化妆品中硝基麝香的分析方法十分必要。

目前, 对硝基麝香分析方法的研究主要集中于二甲苯麝香和酮麝香, 少量文献涉及葵子麝香^[5-8]。测定方法则多为薄层色谱法^[9]、气相色谱法^[8,10]和气相色谱-质谱法^[5,6,11-16]等, 尚未见到使用一种分析方法检测化妆品中所有禁限用硝基麝香的报道。本研究采用超声提取和固相萃取净化前处理技术, 以气相色谱-负化学离子源三重四极杆质谱(GC-NCI-MS/MS)进行分析; 由于 NCI 的选择性强, 检测灵敏度随待测分子电负性的增强显著提高, 而目标分析物硝基麝香均含有硝基苯结构, 电负性较强, 因此选择 NCI 作为离子源既有较好的选择性, 又有很高的灵敏度。三重四极杆质谱因采用多反应监测(MRM)模式可以很好地去掉复杂基质的背景干扰, 实现对目标物的定量分析。与目前普遍使用的单级质谱相比, 具有更强的抗基质干扰能力和定性定量准确性。因此该方法的定量限比现有大多数文献方法低^[5-16], 实现了对禁限用硝基麝香的准确测定, 并通过对市售几类化妆品样品中硝基麝香的检测论证了此方法的可行性。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

320MS 三重四极杆质谱仪, 配有化学源(美国 Varian 公司); DS-8510DTH 型超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司); 高速冷冻离心机(德国 Beckman 公司); CNWBOND Si 固相萃取柱(500 mg, 6 mL, 德国 CNW 公司); 滤膜(美国 Pall 公司)。

二甲苯麝香标准溶液(100 mg/L)、酮麝香标准品(纯度 > 99.7%)、葵子麝香标准品(纯度 > 99.5%)、伞花麝香标准溶液(10 mg/L)、西藏麝香标准溶液(10 mg/L)及内标 d₁₅-二甲苯麝香标准溶液(100 mg/L)均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。丙酮、正己烷、二氯甲烷(HPLC 级, 美国 Fisher 公司);

氦气、氙气(纯度 > 99.999%); 其他试剂均为分析纯。

化妆品样品为监督检查时在生产企业及市场上随机抽查的不同类型样品, 包括洗面奶、清洁霜、浴液、乳液、香水、粉饼、洗发液、护发素、润唇膏等化妆品共 33 件。

1.2 混合标准工作液的配制

标准储备液: 准确称取酮麝香及葵子麝香标准品各 5 mg, 分别用环己烷溶解并定容至 50 mL, 由此配制好质量浓度均为 100 mg/L 的标准储备液(冷藏保存)。

分别取酮麝香及葵子麝香储备液各 0.10 mL, 二甲苯麝香标准溶液 0.10 mL, 伞花麝香标准溶液及西藏麝香标准溶液 1.00 mL 用环己烷定容到 10 mL, 再逐级稀释成 5 种麝香质量浓度分别为 5、10、20、50、100 和 500 μg/L 的混合标准工作溶液, 其中 d₁₅-二甲苯麝香质量浓度均为 50 μg/L, 于 4 °C 下保存, 现用现配。

1.3 前处理步骤

准确称取化妆品试样 1.000 g 于 10 mL 具塞比色管中, 准确加入 50 μg/L d₁₅-二甲苯麝香内标溶液 0.1 mL, 以 1 mL 正己烷超声提取 1 min(输出功率 600 W), 再加入 9 mL 丙酮, 涡旋混匀, 超声提取 20 min(输出功率 600 W)后, 以 10 000 r/min 转速离心 5 min, 收集上清液于 10 mL 比色管中用氮气缓慢吹干, 再准确加入 2.0 mL 二氯甲烷溶解残渣, 用于固相萃取净化。固相萃取柱先用 5 mL 甲醇活化、5 mL 二氯甲烷平衡后, 再将样液过柱, 弃去直接流出液后用 2 mL 二氯甲烷洗脱。收集洗脱液, 用氮气缓慢吹干后, 准确加入 1.0 mL 正己烷溶解残渣, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 供 GC-NCI-MS/MS 测定。

1.4 色谱-质谱条件

HP-5MS 5% 苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度: 250 °C; 柱温: 程序升温, 初始温度 40 °C 保持 5 min, 以 40 °C/min 升至 205 °C, 再以 1 °C/min 升至 210 °C, 最后以 40 °C/min 升至 280 °C 保持 2 min; 传输线温度: 250 °C; 进样模式: 不分流进样; 进样量: 1 μL; 载气流速: 1.0 mL/min。NCI 电离源; 源温度 180 °C; 电子能量 70 eV; 碰撞气为氙气; 反应气为甲烷, 反应气压力 1.07 kPa; 溶剂延迟时间 7.5 min; 检测方式为 MRM 模式, 二甲苯麝香、酮麝香、葵子麝香、伞花麝香、西藏麝香及内标物的质谱分析参数见表 1。

表 1 5 种硝基麝香及内标 d₁₅-二甲苯麝香的质谱分析参数
Table 1 MS parameters for the five nitro-musks and d₁₅-musk xylene (internal standard)

Compound	Retention time/ min	Monitoring ion pair (<i>m/z</i>)	Collision energy/ eV	Quantitative ion pair (<i>m/z</i>)
Musk ambrette	8.22	253.4/150.4	26	253.4/150.4
		253.4/165.2	25	
d ₁₅ -Musk xylene	8.36	282.0/186.3	25	282.0/186.3
		282.0/234.0	18	
Musk xylene	8.51	267.0/147.0	20	267.0/147.0
		267.0/175.0	23	
Musk moskene	8.78	278.0/159.0	31	278.0/203.0
		278.0/203.0	18	
Musk tibeten	9.19	266.0/46.6	5	266.0/46.6
		266.0/236.2	4	
Musk ketone	9.47	264.0/206.0	15	264.0/206.0
		264.0/219.0	20	

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的选择

化妆品样品常用的提取方法为振荡提取、涡旋提取和超声提取等。硝基麝香难溶于水,在弱极性或中等极性的有机溶剂中有较好的溶解度。实验选取提取时间、提取溶剂种类、提取溶剂用量及提取方式 4 个因素,按照 1.3 节的方法处理不含硝基麝香的膏霜化妆品样品,进行 100 μg/kg 水平的添加回收试验。以 5 种硝基麝香的峰面积和为考察指标,用 L₉(3⁴)正交试验表安排试验,见表 2。通过正交试验得出这 4 个因素对提取效率的影响顺序为:提取溶剂种类 > 提取溶剂用量 > 提取时间 = 提取方式。虽然涡旋提取的提取率略高于超声提取,但是涡旋提取效率较低,不适合批量样品检测,因此选用了超声提取的方式。最优合成条件为:提取溶剂用量 10 mL、提取时间 20 min、提取溶剂为丙酮、提取方式为超声提取。另外,由于许多面霜、唇膏、香波类样品中含有较多的油脂及蜡等成分,加入少量正己烷可有效溶解样品基质,有利于样品的提取,所以选择在提取溶剂中加入 1 mL 正己烷。而对于基本不含油脂及蜡的爽肤水及香水类化妆品,可以不加

表 2 5 种硝基麝香提取条件优化的正交试验参数
Table 2 Orthogonal test parameters for optimization of the extraction of five nitro-musks

Level	Factors			
	Volume of extraction solvent/mL	Extraction time/min	Extraction solvent	Extraction mode
1	5	10	acetone	ultrasonic extraction
2	10	20	methanol	vortex extraction
3	20	30	methylene chloride	shake extraction

入正己烷,同时也可以不必过固相萃取柱净化,用丙酮稀释后直接进样测定。

2.2 固相萃取净化条件的优化

因为化妆品样品基体较为复杂,且 5 种硝基麝香中有 3 种为禁用物质,为达到高灵敏度,所以对样品的净化要求较为严格。如果提取液不进行净化,则有可能污染仪器,干扰待测化合物出峰,从而影响定性和定量分析结果。分别考察了 C₁₈ 柱(SupeL-clean LC-C₁₈)、亲水亲脂柱(Welchrom BRP)、石墨化炭黑与氨基混合柱(CNWBOND Carbon-GCB/PSA)和硅胶柱^[14](CNWBOND Si)对硝基麝香的净化效果,结果表明,硅胶柱的净化效果最优,回收率均超过 85%。采用硅胶柱为固相萃取柱,先用 5 mL 甲醇活化固定相,并除去固定相中的杂质,再用 5 mL 二氯甲烷平衡。取空白样品加入 3 组已知浓度的硝基麝香混合标准溶液及内标溶液,固相萃取的净化回收率试验结果见表 3。

表 3 空白样品中不同加标水平时的固相萃取净化回收率 (n=3)
Table 3 Clean-up recoveries of standards at different spiked levels by solid phase extraction (n=3) %

Compound	50 μg/kg	200 μg/kg	500 μg/kg
Musk ambrette	88.7	95.2	93.4
Musk xylene	85.8	89.5	88.9
Musk moskene	87.0	87.2	87.8
Musk tibeten	85.7	92.0	92.4
Musk ketone	86.2	90.4	92.3

2.3 色谱-质谱条件的优化

硝基麝香是一系列高度烷基取代的硝基苯类化合物,极性较小,因此应选用非极性或弱极性的色谱柱分析;另外化妆品配方中通常含有较多的非极性成分,如油脂、蜡、脂肪酸、醇、酯等。根据“相似相溶”原理,选用 HP-5MS 非极性毛细管气相色谱柱作为实验用色谱柱。

综合考虑目标组分的性质、适宜的柱流速、溶剂聚焦、整体分析时间等因素,实验比较了以下两个柱升温程序:a. 初始温度 60 °C 保持 5 min,以 10 °C/min 升至 200 °C,再以 5 °C/min 升至 210 °C,最后以 20 °C/min 升至 280 °C; b. 初始温度 40 °C 保持 5 min,以 40 °C/min 升至 205 °C,再以 1 °C/min 升至 210 °C,最后以 40 °C/min 升至 280 °C 保持 2 min;色谱图见图 1。实验结果表明,在两个升温程序下 5 种硝基麝香均得到了良好的分离,但峰形、峰高响应值及分析时间有较明显差异,条件 b 下峰形和峰高响应值均好于条件 a,且条件 b 下分析时间为条件 a 的一半。因此,选择条件 b 作为本实验的升温程序。

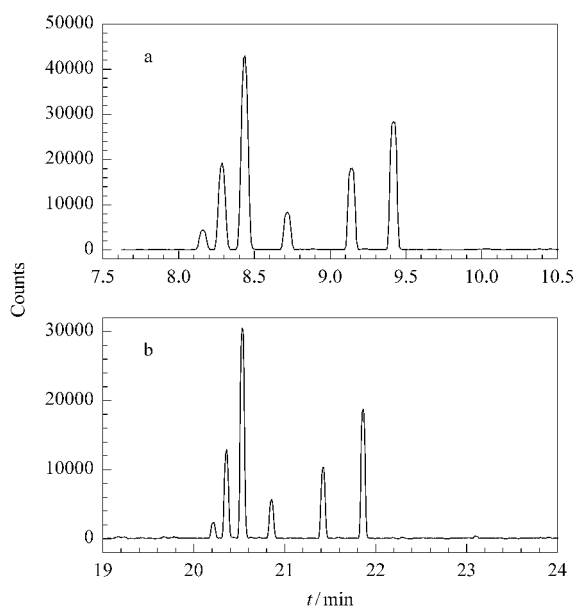


图 1 不同温度程序条件下 5 种硝基麝香及其氘代同位素内标的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of the five nitro-musks and d_{15} -musk xylene in different temperature programs

Temperature programs; a. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min) $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $200\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $280\text{ }^{\circ}\text{C}$; b. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min) $\xrightarrow{40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $205\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $\xrightarrow{1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $280\text{ }^{\circ}\text{C}$.

为了降低硝基麝香的定量限,需要优化离子源参数从而产生更好的电离效果。影响 NCI 的主要参数有源温度、灯丝发射电流强度及反应气压力等^[17]。通过考察一定浓度的各硝基麝香,使得基峰离子与特征碎片离子产生的离子对强度均达到最大,得出 1.4 节所述最佳参数。

硝基麝香在 NCI 电离方式下的质谱裂解方式不尽相同,二甲苯麝香、氘代二甲苯麝香及酮麝香易丢失一个亚硝基而得到丰度高于分子离子峰的基峰离子($[M-\text{NO}]^{-}$);葵子麝香易丢失一个甲基而得到丰度高于分子离子峰的基峰离子($[M-\text{CH}_3]^{-}$);伞花麝香和西藏麝香易得到一个电子生成带负电的分子离子峰($[M]^{-}$)。为获得更高的检测灵敏度,在选定的色谱条件下,首先通过全扫描方式做出各种硝基麝香的 GC-NCI-MS 质谱图,再选取各种硝基麝香的各基峰作为母离子。根据欧盟 2002/657/EC 指令^[18]规定,对于质谱确证方法必须达到 4 个确证点的要求,低分辨气相色谱-质谱联用仪应在确定母离子的基础上选择两个或两个以上的子离子。在确定各种麝香的母离子后,采用子离子扫描方式进行二级质谱分析,分别选取丰度较强的主要碎片离子作为定量离子,丰度次强的主要碎片离子作为辅助定性离子。对每一种选定的特征子离子,先在 5、10、15、20、25、

30、35、40 eV 能量下,初筛最优的碰撞能量,再在此能量点附近缩小能量间隔,优化选择最佳碰撞能量,以获得最佳的子离子响应值进行定性定量。对于 5 种标准品及内标物,其母离子、子离子及最佳碰撞能量见表 1,5 种硝基麝香及 d_{15} -二甲苯麝香同位素内标的 MRM 典型色谱图见图 2。

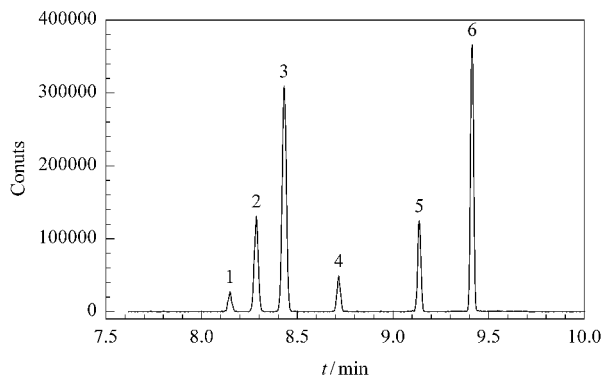


图 2 5 种硝基麝香及其氘代同位素内标的 MRM 典型色谱图

Fig. 2 MRM chromatogram of the five nitro-musks and d_{15} -musk xylene

Peak identifications; 1. musk ambrette; 2. d_{15} -musk xylene; 3. musk xylene; 4. musk moskene; 5. musk tibeten; 6. musk ketone.

2.4 方法的线性关系和定量限

以 d_{15} -二甲苯麝香为内标物,5 种硝基麝香以内标法定量以消除前处理操作过程中产生的误差。取 5 种硝基麝香的混合标准系列溶液,在本实验优化的操作条件下进行分析,以某种硝基麝香与内标物峰面积比(y)对目标物质量浓度(x)进行线性回归,平行测定 2 次,各组分在 $5\sim 500\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ 线性范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999。选取加标水平为 $1.00\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 的空白样品,按 1.3 节前处理后测定,根据其信噪比逐级稀释标准溶液,然后添加到空白样品中,再根据 10 倍信噪比确定定量限(LOQ),得到结果见表 4。从表 4 中可看出,定量限范围为 $50.0\sim 500\text{ ng}/\text{kg}$ 。

2.5 方法的准确度和精密度

取 1.0 g 空白样品,加入一定量的标准溶液,做 6

表 4 5 种硝基麝香的回归方程和定量限

Table 4 Regression equations and limits of quantification (LOQ) of the five nitro-musks

Compound	Regression equation	LOQ/(ng/kg)
Musk ambrette	$y=2.68\times 10^4x-7.88\times 10^5$	500
Musk xylene	$y=6.49\times 10^4x-1.38\times 10^5$	50.0
Musk moskene	$y=4.89\times 10^4x-1.35\times 10^6$	400
Musk tibeten	$y=4.22\times 10^4x-5.79\times 10^5$	100
Musk ketone	$y=2.19\times 10^4x-3.94\times 10^5$	50.0

y : the ratio of the peak area of the target compound to the peak area of the d_{15} -musk xylene; x : content of the target compound, $\mu\text{g}/\text{L}$. LOQ: $S/N=10$.

个平行样,同时做两个空白平行样,进行分析,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明,5种硝基麝香的平均回收率为85.81%~103.77%,RSD为0.75%~5.32%,可满足实验要求。空白样品加标500 ng/kg硝基麝香的提取液的色谱图与空白样品提取液的色谱图见图3。从图3中可以看出5种硝基麝香样品在500 ng/kg加标水平平均出峰明显,且空白提取液基本没有干扰。

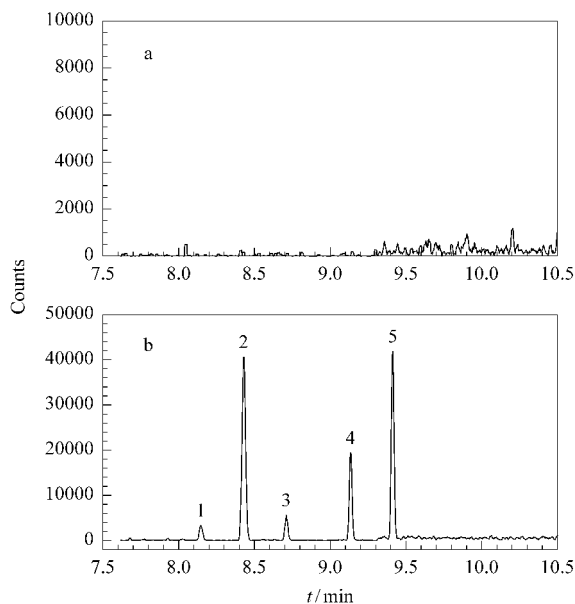


图3 (a)空白样品提取液及(b)500 ng/kg基质加标样品提取液的MRM色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of (a) a blank sample and (b) the sample spiked with 500 ng/kg standards

Peak identifications: 1. musk ambrette; 2. musk xylene; 3. musk moskene; 4. musk tibeten; 5. musk ketone.

2.6 实际样品分析

采用所建立的分析方法对生产企业及市场上随机抽查的不同类型洗面奶、清洁霜、浴液、乳液、香水、粉饼、洗发液、护发素、润唇膏等化妆品样品共33件进行分析测定。结果表明,有4件化妆品样品(其中香水2件,洗发液及护发素各1件)筛检出分别含有307、246、425及1 075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 二甲苯麝香、2件化妆品样品(其中香水1件,洗面奶1件)筛检出含有426、671 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 酮麝香。检出的6件化妆品中硝基麝香浓度均符合我国2007版《化妆品卫生规范》的要求。

3 结论

本实验采用固相萃取净化、GC-MS/MS法检测化妆品中硝基麝香的含量,操作简单,线性良好,检出

限低。可作为常见化妆品中硝基麝香类化合物含量检测的确证方法。在对市售化妆品中硝基麝香添加情况的调查中发现,78个抽检样品中有6个检出硝基麝香,说明目前我国化妆品行业中还存在使用硝基麝香替代天然麝香的现象。

参考文献:

- [1] Chemical Industry Press. Encyclopedia of Chinese Chemical Products. 3rd ed. Beijing: Chemical Industry Press (化学工业出版社. 中国化工产品大全. 3版. 北京:化学工业出版社), 2005
- [2] Zhou Q X, Wang M E, Fan F, et al. Acta Scientiae Circumstantiae (周启星, 王美娥, 范飞, 等. 环境科学学报), 2008, 28(1): 1
- [3] European Chemicals Agency. Support Document for Identification of 5-tert-Butyl-2,4,6-Trinitro-m-Xylene as a Substance of Very High Concern; European Chemicals Agency (2008-10-08) [2012-06-30]. <http://wenku.baidu.com/view/3c1f218371fe910ef12df87c.html>
- [4] Ministry of Health of the People's Republic of China. Hygienic Standard for Cosmetics. Beijing: [s. n.] (中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范. 北京: [出版者不详]), 2007: 3
- [5] Yang R. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (杨润. 中国卫生检验杂志), 2003, 13(4): 456
- [6] Ma Q, Bai H, Wang C, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (马强, 白桦, 王超, 等. 分析化学), 2009, 37(12): 1776
- [7] Roosen L, Covaci A, Neels H. Chemosphere, 2007, 69(10): 1540
- [8] Wang G N, Tang H, Chen D Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (王冠男, 汤桦, 陈大舟, 等. 色谱), 2012, 30(2): 135
- [9] Goh C L, Kwok S F. Contact Dermatitis, 1986, 14(1): 53
- [10] Polo M, Garcia-Jares C, Llompарт M, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 388(8): 1789
- [11] Mitjans D, Ventura F. Water Sci Technol, 2005, 52(10/11): 145
- [12] Yan J X, Li Q, Cui J J, et al. Journal of Shanghai Institute of Technology: Natural Science (阎俊秀, 李琼, 崔俊杰, 等. 上海应用技术学院学报: 自然科学版), 2011, 11(2): 103
- [13] Zeng X Y, Chen D H, Gui H Y, et al. The Administration and Technique of Environmental Monitoring (曾祥英, 陈多宏, 桂红艳, 等. 环境监测管理与技术), 2006, 18(3): 7
- [14] Peck A M, Linebaugh E K, Hornbuckle K. Environ Sci Technol, 2006, 40: 5629
- [15] Hu Z J, Shi Y L, Cai Y Q. Chinese Journal of Analytical Chemistry (胡正君, 史亚利, 蔡亚岐. 分析化学), 2010, 38: 885
- [16] Yu R P, Che J S, He E Q, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (虞锐鹏, 车金水, 何恩奇, 等. 分析化学), 2012, 40: 159
- [17] Budzikiewicz H. Mass Spectrom Rev, 1986, 5: 345
- [18] Official Journal of the European Communities. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. (2002-08-17) [2012-06-30]. <http://www.docin.com/p-238826229.html>