

建立液相质谱联用法测定生姜提取液中米诺地尔、度他雄胺与非那雄胺的含量方法

黄锦波¹, 罗杰鸿²

(1. 詹姆斯(广州)实验技术有限公司, 广东 广州 510000; 2. 广东安纳检测技术有限公司, 广东 广州 510000)

摘要: 建立液相串联质谱法测定生姜提取液中米诺地尔, 度他雄胺与非那雄胺含量的方法。样品经过乙腈溶解, 超声 15 min, 再经过 Oasis HLB 固相萃取柱净化, 最终以甲醇洗脱并定容于 10 ml 容量瓶。采用电喷雾离子源, 全扫描模式, 取适量样品上机测试。选择 Extend-C18 为分离柱, 90% 甲醇-0.1% 甲酸水为流动相。结果米诺地尔, 度他雄胺与非那雄胺的检出浓度分别为 0.020mg/kg, 0.019mg/kg, 0.022 mg/kg, 线性良好, R^2 均大于 0.995。以空白样品为基质, 回收率在 89.0%-99.8% 之间, 相对标准偏差在 0.5-4.1% 之间。

关键词: 液相串联质谱法; 生姜提取液; 米诺地尔; 度他雄胺; 非那雄胺

Determination of three prohibited hormones in hair cosmetics by LC-MS

Huang Jin-bo¹, Luo Jie-hong²

(1. Jims (Guangzhou) Experimental Technology Co., Ltd.; 2. Guangdong Anna Testing Technology Co., Ltd., Guangzhou 510000)

Abstract: Objective to establish a liquid phase tandem mass spectrometry method for the determination of minoxidil, dutasteride and finasteride in ginger extract. Methods The samples were dissolved in acetonitrile, sonicated for 15min, and then purified by Oasis HLB column. Finally, the samples were eluted with methanol and fixed in a 10 ml volume-volume flask. Using electrospray ion source, full scan mode, take appropriate samples on the machine test. Extend-c18 was selected as the separation column, and 90% methanol-0.1% formic acid water was used as the mobile phase. Results The detectable concentrations of minoxidil, dutasteride and finasteride were 0.020mg/kg, 0.019mg/kg and 0.022mg/kg, respectively, with good linearity and R^2 greater than 0.995. Using blank sample as substrate, the recoveries were 89.0%-99.8% and the relative standard deviations were 0.5-4.1%. Conclusion This method can accurately analyze the contents of three prohibited hormones in ginger extract.

Key words: LC-MSMS; ginger extract; Minoxidil; Dutasteride; finasteride

生姜提取液可通过刺激头皮血液,使得毛囊活跃,有助于毛发生长,减少脱发断发^[1],往往被用作生发原料。米诺地尔或雄胺激素类激素可被用于治疗脱发症状,但根据《化妆品安全技术规范》(2015年版)中规定,米诺地尔或雄胺激素类激素禁止添加到日化用品中,若长期使用含有这三种激素的日化用品,很有可能导致头屑增多、皮肤瘙痒、脱发加剧等^[2],因此需建立相关的检测方法,以监测相关的产品。

目前,检测米诺地尔,非那雄胺与度他雄胺的主要方法为液相色谱仪^[3-4]、液相质谱联用法^[5-6]。液相色谱仪在检测的过程中对分离条件要求高,不同基质的样品有可能需要开发不同的分离方法,同时容易出现假阳性。液相色谱-串联质谱法,能同时检测几十种激素^[7],这有利于缩短分析时间,有利于辨别假阳性,因此,在实际工作中,首选液相串联质谱测定激素。

目前质谱法测定米诺地尔与非那雄胺的检测方法相对较多^[8-9],但是检测度他雄胺的检测方法较少,因此本实验通过优化前处理条件,色谱条件与质谱条件,建立了液相质谱联用测定生姜提取液中米诺地尔、度他雄胺与非那雄胺含量的方法。

1 试验

1.1 仪器和试剂

赛默飞液相色谱质谱联用仪 TSQ Quantum Ultra&Access MAX, 詹姆斯 ZY-1001 超声波清洗器、TDL-5A 台式离心机。

米诺地尔标准品(纯度为 99.5%)、非那雄胺标准品(纯度为 99.7%)、度他雄胺标准品(纯度为 99.9%)(均购于上海安谱实验科技有限公司)。

样品:市售

试剂:甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯,三氯甲烷为分析纯。

耗材: Oasis HLB 固相萃取小柱, Aisimo WAX 固相萃取小柱。

1.2 溶液配制

1) 种激素的混合对照品储备液

分别称取米诺地尔、非那雄胺、度他雄胺对照品适量,用甲醇溶解并稀释成各组分质量浓度分别约为 10 μ g/ml 的混合对照品储备液。

2) 种激素的系列混合标准工作溶液

精密 3 种激素的混合对照品储备液 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1ml，分别置于 6 只 10ml 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至标线，配制成各组分质量浓度均分别为 10、20、40、20、40、60、80、100 μ g/l 的系列混合标准工作溶液。

1.3 仪器工作条件

1) 色谱条件 色谱柱：Extend-C18 色谱柱（100 mm \times 0.46 cm \times 0.25 μ m），柱温：35 $^{\circ}$ C；进样体积 5 μ l；流速为 0.2 ml/min。流动相 A 为甲醇，流动相 B 为 0.1 % 甲酸水，等度洗脱，A:B=90 %:10 %。

2) 质谱条件 电喷雾离子源（ESI $^{+}$ ），全扫描模式（scan），碰撞气为氩气，雾化气为氮气，雾化室温度：350 $^{\circ}$ C，接口温度为 250 $^{\circ}$ C，接口电压为 3.5 kV，其余质谱参数见表 1。

表 1 质谱参数

化合物	质荷比 m/z			碰撞电压/V
	分子量	M+H $^{+}$	M+Na $^{+}$	
米诺地尔	209.2	210.2	/	25
非那雄胺	372.5	373.4	395.3	30
度他雄胺	528.5	529.3	551.3	22

1.4 试验方法

准确称取均匀的样品 0.5 g 于 10 ml 离心管中，加入 3 ml 乙腈进行提取，振荡 1 min，超声 10 min 后，于 5000 r/min 的离心机上进行离心，有机相经 Oasis HLB 固相萃取小柱（提前分别以 5 ml 甲醇，10 ml 水活化）净化，待样品液体流尽后，以甲醇进行自然流下洗脱，最终以甲醇定容于 10 ml 容量瓶中，供试品经过有机滤膜过滤后，上机待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在优化的色谱条件下，3 种激素的混合标准溶液的色谱图见图 1

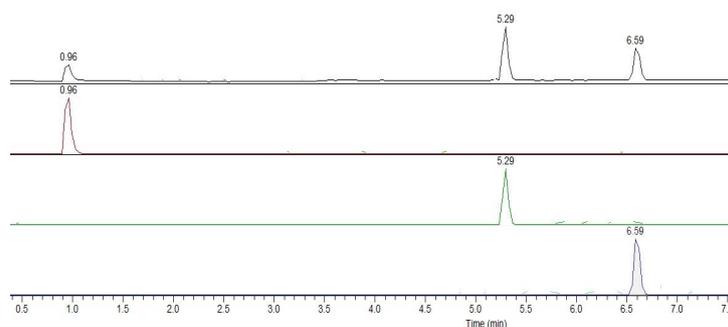


图 1-1 3 种激素的总离子色谱图

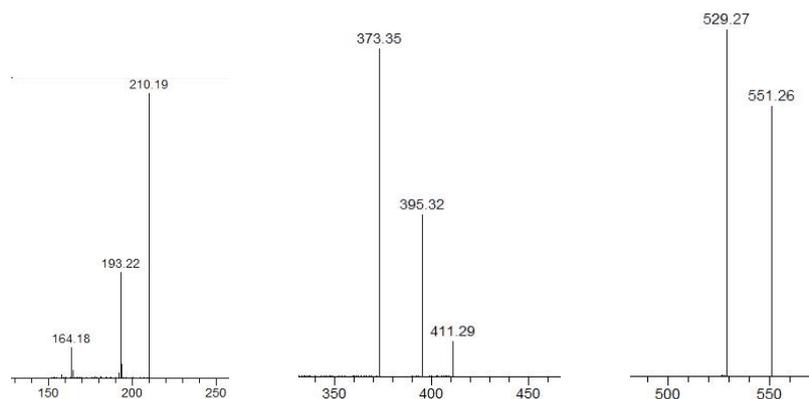


图 1-2 米诺地尔，非那雄胺与度他雄胺（从左到右）标准溶液的总离子色谱图与相关离子柱状图

2.2 仪器条件的优化

2.2.1 流动相的选择

本试验以常见的甲醇-0.1%甲酸水作为流动相，分别设置 10% 甲醇-0.1% 甲酸水，30% 甲醇-0.1% 甲酸水、50% 甲醇-0.1% 甲酸水、70% 甲醇-0.1% 甲酸水，90% 甲醇-0.1% 甲酸水进行测试，查看各个目标峰的响应值（响应值以同浓度下的峰面积大小判断）。结果发现，流动相的变化，对度他雄胺的响应值无明显影响，但有机相的占比越高，米诺地尔与非那雄胺的响应值越高，因此本试验的流动相采用 90% 的甲醇-0.1% 甲酸水。

2.2.2 质谱条件的优化

以 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合标准溶液以注射进样的方式进行全扫描分析，通过优化雾化室温度、碰撞能量、毛细管电压等参数，得到 3 种激素的最优分析条件。结果表明，这三种激素在正模式下响应更高。米诺地尔、非那雄胺、度他雄胺的最佳碰撞电压分别为 25V、30 V、22 V。M+H⁺分别为 210.3、373.4、529.3、551.3。

2.3 样品前处理条件的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

本试验以甲醇、乙醇、乙腈与三氯甲烷作为提取剂，分别考察不同提取剂对目标物的回收率影响。结果表明，这甲醇与乙醇对米诺地尔的回收率较低，而三氯甲烷对非那雄胺与度他雄胺的回收率相对偏高，而乙腈作为提取剂时，三个目标物的回收率均较好（如表 2 所示），因此本实验选择的样品提取剂为乙腈。

表 2 考察不同溶剂作为提取剂的回收率结果

化合物	米诺地尔加标量为 0.10 μg 、非那雄胺加标量为 0.10 μg 、与度他雄胺加标量为 0.11 μg			
	甲醇	乙醇	乙腈	三氯甲烷
米诺地尔	85.4 %	84.4 %	90.5 %	109.4 %

非那雄胺	92.5 %	91.4 %	92.5 %	105.4 %
度他雄胺	90.9 %	93.4 %	95.9 %	110.4 %

2.3.2 超声时间的确定

本实验设计超声 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 与 30 min 进行对比实验, 以一定浓度的质控样作为提取样品, 参考 1.3 的方法进行前处理, 以回收率的高低作为判断的标准。结果发现, 米诺地尔在超声 10 min 内, 回收率呈上升阶段, 而 10min 到 15 min 内无明显的变化, 大于 15 min 后, 有往下的趋势, 而非那雄胺与度他雄胺在超声 15 min 内, 呈上升的阶段, 而大于 15 min 后, 并无明显的变化。因此本试验, 采用超声提取时间为 15 min。具体如图 4-图 6 所示。

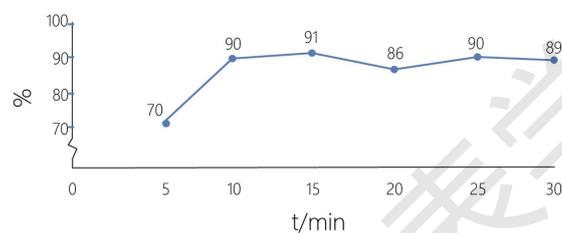


图 4 米诺地尔的超声提取时间与回收率的趋势图

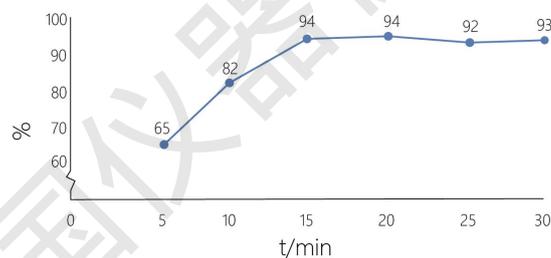


图 5 非那雄胺的超声提取时间与回收率的趋势图

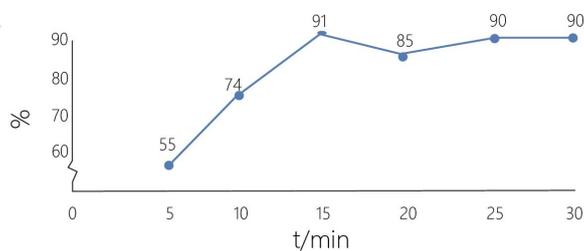


图 6 度他雄胺 超声提取时间与回收率的趋势图

2.3.3 净化条件的选择

本试验考察两种固相萃取柱对质控样中的目标物的净化能力, 分别为 Oasis HLB 固相萃取柱与 Aisimo WAX 固相萃取柱, 结果发现采用 Aisimo WAX 固相萃取小柱进行净化时, 三

种目标物的回收率范围在 58.4 %至 75.9 %之间，而采用 Oasis HLB 固相萃取柱时，回收率的范围在 89.1 %到 96.4 %之间，因此本实验选用 Oasis HLB 固相萃取柱作为净化柱。

2.4 标准曲线与检出浓度

配制 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 的混合标准溶液系列，按优化后的色谱条件对其进行测定，以目标物的配置浓度为横坐标，峰面积为纵坐标。线性范围，回归方程与相关系数详见表 3。

检出限以 3 倍信噪比 (3 S/N) 时所对应的浓度计算。

表 3 3 种激素标准曲线考察结果

峰号	目标物	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	线性回归方程	相关系数	检出限 (mg/kg)
1	米诺地尔	10.05-100.5	$Y = 53460X - 329$	0.9998	0.020
2	非那雄胺	9.77-97.7	$Y = 99878X - 1472$	0.9999	0.019
3	度他雄胺	10.99-109.9	$Y = 43944X - 3072$	0.9994	0.022

2.6 回收试验与精密度

以不含的生姜提取液作为空白基质，分别对其添加低、中、高三个水平的混合标准溶液，每个水平测试 6 次，回收率和测定值的相对标准偏差(RSD)见表 4。

表 4 精密度和回收率实验结果 (n=6)

化合物	加标量 0.02 μg		加标量 0.04 μg		加标量 0.2 μg	
	回收率%	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
米诺地尔	92.8%	4.1	92.7	3.6	99.8	1.3
非那雄胺	89.0%	3.4	95.0	2.5	97.9	0.5
度他雄胺	90.4%	3.9	93.5	3.1	98.8	2.6

3 总结

本实验通过优化样品前处理与色谱仪器条件，探索出适合液相质谱法测定生姜提取液中 3 种激素含量的检测方法，本实验方法具有较高的准确度和精密度，能准确的检测生姜提取液中米诺地尔，非那雄胺与度他雄胺含量。

参考文献:

- [1] 高合意,黄健聪. 复配植物防脱生发原料的制备与功效评价研究[J].日用化学工业. 2018,48(09):521-526
- [2] 张朝辉. 非那雄胺与米诺地尔治疗男性雄激素性秃发疗效分析[J]. 临床研究,2017,03(25):39-42.
- [3] 高媛. HPLC 法测定米诺地尔洗剂含量及温度对含量影响的考察[J]. 中国药师,2018,07:1284-1286.
- [4] 刘亚雄. 高效液相色谱法检测防脱、育发类化妆品中的非那雄胺[J]. 日用化学工业,2014,01:54-56.
- [5] 赵薇. 超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿化妆品中米诺地尔等 7 种成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 09: 2765-2770.
- [6] 许文佳. HPLC-MS/MS 法同时测定生姜提取液中的 13 种违禁成分[J]. 药物分析杂志,2019,08:1483-1488.
- [7] 郑磊. 育发产品中斑蝥素和氮芥及米诺地尔的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 环境与健康杂志,2016,01: 66-68.
- [8] 吴川彦. HPLC-Q-TOF-MS 法对米诺地尔及凝胶有关物质的分: 中国药师,2017,12:2267-2272.
- [9] 龚越强. HPLC 测定中草药育发类化妆品中非法添加的米诺地尔[J]. 食品与药品,2014,04:267-269.