

· 论 著 ·

高效液相色谱测定化妆品中羟苯基丙酰胺苯甲酸含量及质谱确证

陈云霞¹ 郑君¹ 苏宁¹ 王聪² 毛淋² 刘梦琳³

1. 中国检验检疫科学研究院 北京 100176; 2. 中检科(北京)化妆品技术有限公司 北京 100176;
3. 日照海关 山东 日照 276800

摘要: 目的 建立了化妆品中羟苯基丙酰胺苯甲酸(二氢燕麦生物碱 D) 含量的高效液相色谱测定方法及质谱确证方法。方法 水剂类、膏霜类化妆品用甲醇超声提取, 提取液经 Agilent Eclipse XDB - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离后, 用二极管阵列检测器在 220 nm 下检测, 外标法定量。结果 二氢燕麦生物碱 D 的线性范围为 0.5 μg/ml ~ 50 μg/ml, 相关系数为 0.999 8, 方法检出限为 0.8 μg/g (S/N = 3), 定量限为 2.5 μg/g (S/N = 10)。在 3 个加标水平下, 方法平均回收率为 90.0% ~ 102.5%, 相对标准偏差为 1.52% ~ 3.59%。检出羟苯基丙酰胺苯甲酸的样品可用液相色谱 - 质谱联用的方法确证。结论 该分析方法简便灵敏、准确、快速, 适用于化妆品样本中羟苯基丙酰胺苯甲酸含量的测定。
关键词: 化妆品; 羟苯基丙酰胺苯甲酸; 高效液相色谱; 液相色谱 - 质谱联用

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8685(2021)05 - 0529 - 04

Determination of hydroxyphenylpropanamide benzoic acid in cosmetics by high performance liquid chromatography and confirmed by mass spectrometry

CHEN Yun-xia*, ZHENG Jun, SU Ning, WANG Cong, MAO Lin, LIU Meng-lin

* Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

Abstract: Objective The high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatograph - mass spectrometer (LC - MS/MS) methods were developed for the determination of hydroxyphenylpropanamide benzoic acid in cosmetics samples.

Methods Water and cream cosmetics were extracted with ultrasonic methanol. After separation on an Agilent Eclipse XDB - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the extracted solution was detected by a diode array detector at 220 nm and quantified by external standard method. **Results** The linear range of dihydroat alkaloid D was within 0.5 μg/ml - 50 μg/ml, the correlation coefficient (*r*) was 0.999 8, the limit of detection was 0.8 μg/g (S/N = 3), and the limit of quantification was 2.5 μg/g (S/N = 10). The average recoveries of the method were within 90.0% - 102.5% with relative standard deviations (RSDs) of 1.52% - 3.59% at three spiked levels. The samples of hydroxyphenylpropanamide benzoic acid can be confirmed by liquid chromatography - mass spectrometry. **Conclusion** The method is accurate, simple, rapid and suitable for the determination of hydroxyphenylpropanamide benzoic acid in cosmetics samples.

Key Words: Cosmetics; Hydroxyphenylpropanamide benzoic acid; High performance liquid chromatography; Liquid chromatograph - mass spectrometer

燕麦不但含有配备合理、利用率高的蛋白质,而且含可溶性膳食纤维和多种不饱和脂肪、维生素及矿物质等,因此长期以来一直被认为是一种营养丰富且具保健作用的食物原料。近年来,许多研究证实,燕麦是天然抗氧化剂的重要来源之一^[1]。燕麦中含有多种生物活性成分,如 β - 葡聚糖、生育酚、生育三烯

酚和燕麦生物碱等,其抗氧化活性已成为西方发达国家研究的热点之一^[2-3]。生物碱是一类含氮有机化合物,多数为含氮杂环结构,生物活性显著,燕麦生物碱是一类独特的天然含氮酚酸类衍生物,具有抗氧化、抗炎、抗增殖等生物活性^[4-6],因此,天然的燕麦生物碱也会被添加到化妆品中,起到抗氧化抗炎的功效。研究表明,燕麦中燕麦生物碱含量较低,为 2 mg/kg ~ 300 mg/kg,其中燕麦生物碱 A、B 和 C 含量相对较高,但由于天然燕麦生物碱提取过程复杂,且容易造成原料和溶剂的浪费,有些企业用人工合成的化学物质冒充天然燕麦生物碱提取物而加入到化妆品中,如二氢

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项(2019J-K041)

作者简介: 陈云霞(1987 -),女,硕士,高级工程师,主要从事化妆品安全性及功效性检测技术研究。

通讯作者: 苏宁, E-mail: sun@caiq.org.cn

燕麦生物碱 D(羟苯基丙酰胺苯甲酸)是根据天然燕麦生物碱人工合成的物质,结构类似药物曲尼司特,具有快速抗炎止痒、抗敏抗刺激、抗组胺、抗纤维化和抑制红斑等功效。相比于天然燕麦生物碱,这类人工合成的化学物质也在一定程度上增加了消费者使用的风险,因此对该物质建立相应的检测方法尤为重要。

目前,对于生物碱含量的测定主要在中草药材^[7-10]、农产品^[11]及食品等领域,对于生物碱含量的检测主流方法为液相色谱法,如马悦等^[12]和史煜华等^[13]通过液相色谱法分别对防己和风湿骨痛片中相应的药物生物碱含量进行测定;周亚楠等^[14]采用 UPLC 法同时测定药品中黄连生物碱的含量;王文文等^[15]通过超高压液相色谱-串联质谱法分析药材中的生物碱。而化妆品中二氢燕麦生物碱 D 的含量测定还未见报道。本研究建立了测定化妆品中人工合成二氢燕麦生物碱 D 高效液相色谱分析及质谱确证方法,弥补该物质在化妆品领域的检测空白,对于化妆品中该合成化妆品原料含量检测具有重要意义,同时也为天然燕麦提取物与人工合成原料的鉴别提供重要的技术支持。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1260 型高效液相色谱仪配有 DAD 检测器(美国 Agilent 公司);AB QTRAP®

5500 液相色谱质谱联用仪(美国 SCIEX 公司);MX-S 涡旋振荡器(美国 SCIOLOGEX);CR-22N 高速冷冻离心机(日本日立公司)。羟苯基丙酰胺苯甲酸(98%,批号:10300152);甲醇(色谱纯,批号:A452-4);乙腈(色谱纯,批号:932537);甲酸(色谱纯,批号:A118P-500);其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 高效液相色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇:0.04% 四丁基氢氧化铵水溶液=50:50(V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 °C;检测波长:220 nm。

1.2.2 液相色谱-串联三重四级杆质谱确证条件 液相色谱条件:色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(10 cm×4.6 mm,3.5 μm);流动相 A:0.1% 甲酸水溶液,流动相 B:乙腈。流动相 A:B=98:2(V/V);流速:0.6 ml/min;柱温:30 °C;进样量:2 μl。离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子监测;检测方式:多反应监测(MRM);离子源参数:气帘气:30.0 psi;碰撞气:7 psi;离子喷雾电压:5 500 V;离子源温度:600 °C;雾化气:55 psi;辅助气:60 psi;羟苯基丙酰胺苯甲酸的质谱参数见表 1。

表 1 羟苯基丙酰胺苯甲酸的质谱分析参数

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间(ms)	去簇电压(V)	碰撞电压(V)	碰撞室出口电压(V)
羟苯基丙酰胺苯甲酸	284.0	136.1	100	16	22	15
		240.1 ^a	100	15	34	15

注:a 为定量离子。

1.2.3 标准溶液的配制 准确称取羟苯基丙酰胺苯甲酸标准物质 10 mg(精确至 0.1 mg),置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 1 000 μg/ml 的标准储备液。将标准储备溶液稀释成质量浓度分别为 0.5 μg/ml、1.0 μg/ml、5.0 μg/ml、10.0 μg/ml、20.0 μg/ml、50.0 μg/ml 的系列混合标准溶液。

1.2.4 样品前处理 称取 1.0 g(精确到 0.001 g)样品(水、乳、霜)于 10 ml 比色管中,加入甲醇并定容至刻度,涡旋振荡使样品分散,在超声中提取 20 min,转移至离心管 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤,滤液作为待测液,供液相色谱仪测定。

2 结 果

2.1 前处理与试验条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择 分别用 C₁₈、C₈、氨基柱、苯基

柱在液相色谱条件下对羟苯基丙酰胺苯甲酸进行分析,发现在 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱对羟苯基丙酰胺苯甲酸的分析保留时间,峰型都较好,因此选择 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)作为分析色谱柱。

2.1.2 流动相条件的选择 分别用甲醇、甲醇和水、乙腈、乙腈和水作为流动相分析羟苯基丙酰胺苯甲酸,但是均出现了目标峰拖尾的情况,根据羟苯基丙酰胺苯甲酸为碱性,在 1 L 水相中添加 1 ml 40% 的四丁基氢氧化铵溶液,发现羟苯基丙酰胺苯甲酸峰型对称,因此选择甲醇:0.04% 四丁基氢氧化铵水溶液=50:50(V/V)作为流动相。按上述最优色谱条件,得到羟苯基丙酰胺苯甲酸标准溶液的高效液相色谱图见图 1。对于阳性样品,按 1.2.2 确证条件,得到标准溶液的 LC-MS/MS 谱图见图 2。

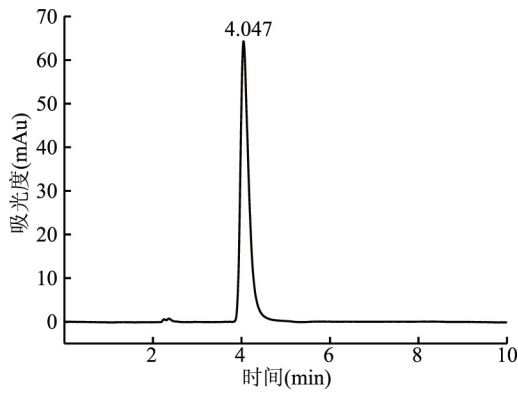


图1 羟苯基丙酰胺苯甲酸标准溶液的高效液相色谱图

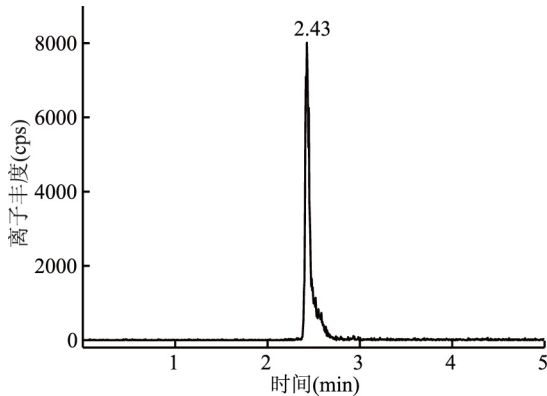


图2 羟苯基丙酰胺苯甲酸标准溶液的LC-MS/MS谱图

2.1.3 提取溶剂的选择 本实验考察了羟苯基丙酰胺苯甲酸在乙腈、甲醇、水、甲醇和水(1:1, V/V)提取溶剂的提取效果。羟苯基丙酰胺苯甲酸在甲醇和乙腈中提取效果最好。综合考虑毒性和普适性,本研究选择甲醇为最佳提取溶剂。

2.1.4 提取时间的选择 在空白化妆品样品中添加羟苯基丙酰胺苯甲酸标准溶液,混合均匀后,用甲醇提取,在超声中分别提取5 min、10 min、15 min、20 min、30 min、40 min,结果表明,随提取时间的增加,提取效率先增加,当超声提取超过20 min后提取效率基本保持不变,因此确定超声提取时间为20 min。

2.2 方法学考察

2.2.1 方法的线性关系和定量限 将羟苯基丙酰胺苯甲酸标准储备溶液逐级稀释得到的浓度为0.50 μg/ml、1.00 μg/ml、5.00 μg/ml、10.0 μg/ml、20.0 μg/ml、50.0 μg/ml的标准工作溶液,按1.2的测定条件浓度由低到高依次进样分析,以各羟苯基丙酰胺苯甲酸的峰面积(y轴)对相应的浓度(x轴)绘制标准曲线,得到线性回归方程 $y = 56.45x + 23.90$,相关系数为0.9998,线性范围为0.5 μg/ml ~ 50 μg/ml,方法检出限(S/N=3)为0.8 μg/g,定量限(S/N=10)为2.5 μg/g。

2.2.2 方法的回收率和精密度 以经过测定不含有羟苯基丙酰胺苯甲酸的空白样品为基质,分别进行空白样品添加回收率和精密度的测定。在2.5 μg/g、5.0 μg/g、25.0 μg/g 3个加标水平下,每个水平平行测定6次,羟苯基丙酰胺苯甲酸的回收率为90.0% ~ 102.5%,相对标准偏差(RSD)为1.52% ~ 3.59%(表2)。本方法在1 d内不同时间和不同日期(5 d内)测得的日内精密度和日间精密度分别为1.0%和2.5%。

表2 羟苯基丙酰胺苯甲酸的加标回收率及RSD(n=6)

化合物	添加水平 (μg/g)	水剂		乳液		膏霜	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
羟苯基丙酰胺苯甲酸	2.5	92.5	2.10	94.5	3.05	90.0	3.59
	5.0	96.3	1.52	99.6	2.94	92.4	3.10
	25.0	98.1	2.83	102.5	1.86	100.3	2.78

2.3 质谱确证 阳性样品需用液相色谱-串联质谱进行确认试验,按照1.2.2项条件进行测定,如果样品溶液中羟苯基丙酰胺苯甲酸色谱峰的保留时间与标准工作溶液一致(变化在±2.5%),样品中羟苯基丙酰胺苯甲酸的母离子和子离子都能和标准溶液中羟苯基丙酰胺苯甲酸的母离子和子离子对应,则可判断样品中在相应保留时间内检出的物质为羟苯基丙酰胺苯甲酸。

2.4 实际样品的测定 应用本方法对市场上购买的化妆水、乳液和膏霜等不同种类的化妆品样品共10份,进行上述物质检测,其中一款样品检出二氢燕

麦生物碱D,含量为5.46%。液相色谱谱图见图3。

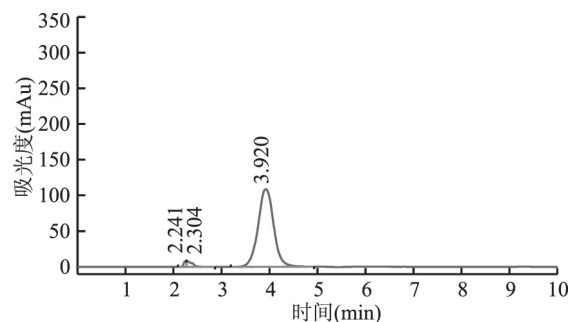


图3 样品检出羟苯基丙酰胺苯甲酸的高效液相色谱图

(下转第535页)

上的菌落形态差异较大^[11],可以进一步通过菌落形态进行鉴定。由于生孢梭菌一般不产生肉毒毒素,可以通过激光辅助解析/飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)鉴别基因型相似但表型有差异的菌株,比如肉毒梭菌和生孢梭菌^[11,12]提供较高的参考价值。

16S rRNA 基因序列系统进化树是基于 16S rRNA 序列的高度保守性对菌株进行种属鉴定和分类,是研究细菌种属之间亲缘关系及进化关系的标准,聚类在同一分支的菌株可鉴定为同一种属^[13]。16S rRNA 分类鉴定在菌株属水平内,近缘的属水平间以及科水平内系统进化关系的研究具有一定价值,能够快速高效的为菌株的范围提供依据,结合生理生化实验结果,更全面地进行菌株的分离鉴定^[14,15]。我国目前并没有乳粉中厌氧芽孢杆菌的限量标准及检出方法,为了确保乳粉的质量安全问题,建议严格控制原料乳和乳粉加工过程中的微生物污染水平,并建立健全厌氧芽孢杆菌的标准鉴定方法,为乳粉的质量安全提供保障。

参考文献

- [1] 董银苹,徐进,王伟,等.浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽孢杆菌的分离及鉴定[J].中国食品卫生杂志,2015,27(5):494-498.
- [2] 董银苹,韩春卉,江涛,等.生孢梭菌代谢产物对 ICR 小鼠的毒性研究[J].中国食品卫生杂志,2014,26(5):414-417.
- [3] 张亚红.蜡芽芽孢杆菌在婴幼儿乳粉储存期及复水后消长规律的研究[D].南京:南京农业大学,2015.
- [4] 陈会君.奶粉中肉毒梭菌的检测[D].北京:北京化工大学,

2017.

- [5] Sadiq FA.奶粉中需氧型芽孢菌的生物多样性、腐败性和存活方式研究[D].杭州:浙江大学,2017.
- [6] 郑艺.婴儿配方奶粉中污染微生物的检测、评价及溯源研究[D].包头:内蒙古农业大学,2017.
- [7] 王鸣秋,杨硕,刘艳,等.16S rRNA 在婴幼儿配方乳粉微生物鉴定中的应用[J].公共卫生与预防医学,2014,25(2):61-64.
- [8] 李明振,廖学文,屈汶辉,等.一株抑菌型地衣芽孢杆菌的快速分离与鉴定及其对 4 株耐药致病菌的抑制作用[J].南京农业大学学报,2017,40(2):325-331.
- [9] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by Clostridium sporogenes in various animals and cultured cells[J]. J Med Microbiol, 1997, 46(4): 270-275.
- [10] Yuan DD, Liu GC, Ren DY, et al. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China [J]. Food Control, 2012, 25(2): 752-757.
- [11] 吴玲玲,李艳芬,闫江舟,等.食物中毒样品中 A(B)型肉毒梭菌的分离鉴定[J].现代预防医学,2018,45(1):40-46.
- [12] 李颖,董银苹,张迪,等.一起丁酸梭菌致新生儿坏死性小肠结肠炎暴发事件的实验室诊断与溯源[J].中华预防医学杂志,2018,52(2):129-133.
- [13] 汪皓秋,俞骅,郑伟,等.二代测序技术在一起食源性疾病事件病原鉴定中的初步应用[J].中华预防医学杂志,2018,52(6):647-652.
- [14] 杨洁,张文亮,邹建军,等.新疆传统酸奶中乳酸菌的筛选鉴定及菌相分析[J].食品工业科技,2015,36(1):324-333.
- [15] 王红,黄彦,周艳,等.广西市售婴儿食品中克罗诺菌分离株基因特征及进化分类鉴定[J].中国食品卫生杂志,2016,28(1):6-10.

收稿日期:2019-12-23

(上接第 531 页)

3 结论

本文建立了化妆品样本中人工合成的二氢燕麦生物碱 D 的液相色谱分析方法及液相色谱-质谱确证方法,该方法具有操作简便、回收率高、精密度好等特点,满足化妆品样本中人工合成二氢钠燕麦生物碱 D 含量测定的需求,为化妆品样本中化合物的检验鉴定提供了较为实用有效的分析方法。

参考文献

- [1] Pererson, DM, Qureshi AA. Genotype and environment effects on tococls of barley and oats[J]. Cereal Chem, 1993, 70: 157-162.
- [2] Yang J, Ou B, Wise ML, et al. In vitro total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides[J]. Food Chem, 2014, 160: 228-345.
- [3] Wu YJ, Yuan JL, Chen HB. Progress on structure and function of avenanthramides[J]. Sci Techno Food Ind, 2018, 39(15): 328-332.
- [4] Maliarova M, Mrazova V, Havrlentova M, et al. Optimization of parameters for extraction of avenanthramides from oat (Avenasativa L.) grain using response surface methodology(RSM) [J]. J Brazil Chem Soc, 2015, 26(11): 2369-2378.
- [5] Ishihara A, Kojima K, Fujita T, et al. New series of avenanthramides in oat seed [J]. Biosci Biotechno Viochem, 2014, 78

(12): 1975-1983.

- [6] 任祎,马挺军,崔林.燕麦生物碱及其潜在的保健作用[J].中国粮油学报,2012,27(1):124-128.
- [7] 赵小梅,杨志军,袁文珺,等.蒙药紫花高乌头 HPLC 指纹图谱及生物碱含量测定[J].中国新药杂志,2019,28(22):2776-2782.
- [8] 杨海宁,文瑾,孙筱林,等.高效液相色谱法测定生附子中 3 种双酯型生物碱含量[J].医药导报,2019,38(11):1459-1462.
- [9] 刘明珠,李清,卢永昌.红花绿绒蒿中总生物碱的含量测定[J].青海农林科技,2019(3):10-14.
- [10] Li DL, Li CR, Li P. Simultaneous determination of seven isosteroidal alkaloids in fritillaria wabuensis by HPLC-ELSD method [J]. Chin Pharm J, 2019, 54(12): 1012-1017.
- [12] Ma Y, Li K, Cui N, et al. Simultaneous determination of 3 alkaloids in Stephania tetrandrae radix by RP-HPLC [J]. Chem Eng, 2019, 281(2): 24-26.
- [13] Shi YH, Huang WK, Huang QW, et al. Content determination of six alkaloids in fengshigutong tablet by SPE-HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2018, 35(12): 1797-1800.
- [14] Zhou YN, Bai J, Yuan H, Liu YL. Simultaneous determination of 5 coptis alkaloid in lianshen tonglin tablets by UPLC [J]. Chin Pharm, 2017, 28(33): 4725-4727.
- [15] Wang WW, Yang F, Yang Z, et al. Determination of 5 alkaloids in fritillaria by ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Instrumental Anal, 2019, 38(4): 461-465.

收稿日期:2019-12-27