

使用一种稳定且灵敏的三重四极杆LC-MS/MS方法同时定量分析精油中的16种呋喃香豆素

Jun Xiang Lee, Wenlin Zhang

Waters Corporation

摘要

呋喃香豆素是一类多样化的天然产物，常见于各种植物和柑橘类水果中。呋喃香豆素与光毒性有关，由于柑橘类水果的油提取物常被用于化妆品和香水等消费品，因此需要关注安全性问题。本应用纪要展示了一种稳定且灵敏的UPLC-MS/MS定量方法，该方法使用Xevo™ TQ-XS分析精油中的呋喃香豆素，每份样品仅耗时15分钟。除6,7-二羟基香柠檬素(5–1000 ng/mL)外，该分析方法使所有呋喃香豆素在0.5–1000 ng/mL范围内表现出良好的线性， R^2 大于0.998且残留百分比小于22.5%。所有化合物的定量限(LOQ)都低至0.5 ng/mL，6,7-二羟基香柠檬素的LOQ为5 ng/mL。四对同分异构体在ACQUITY™ UPLC™ CSH™ 氟苯基色谱柱上实现了良好分离。基质效应研究表明，橙类精油基质（小于30%）中的呋喃香豆素没有明显的基质效应，并且溶剂校准曲线可用于定量分析各种精油样品中的呋喃香豆素。通过使用稀释法，目前建立的方法足以满足欧盟法规提出的1 mg/kg的规定限值。

优势

- 使用ACQUITY UPLC I-Class联用Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪或串联四极杆质谱仪，开发一种快速、稳定且灵敏的分析方法以准确定量精油样品中的16种呋喃香豆素
- 在ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱上轻松实现呋喃香豆素混合物中四对结构异构体的分离。这样能够对有相似MRM通道的每个异构体进行选择性和特异性鉴别与准确定量
- 在橙类精油基质中，低、中和高浓度水平呋喃香豆素(10, 100, and 1000 ng/mL)下都未观察到明显的基质效应。因此，溶剂校准曲线可用于定量精油样品中的呋喃香豆素，简化了准确定量分析所需的步骤

- 所开发的方法能够使15种呋喃香豆素的LOQ达到0.5 ng/mL，除了6,7-二羟基香柠檬素的LOQ为5 ng/mL。该LOQ低于欧盟法规(EC)第1223/2009号的规定限值1 mg/kg

简介

呋喃香豆素(furanocoumarins或furocoumarins)是一类在各种植物和柑橘类水果(例如,葡萄柚和柠檬)中发现的多样化天然产物¹。它的存在可能是一个问题,因为柑橘类水果的油提取物经常被用于消费品,例如化妆品、香水、防晒品、烫金产品和洗发水²。基于过往研究,由于呋喃香豆素的光毒性会影响药物代谢或者甚至导致急诊,存在着安全问题³。因此,有必要在各种潜在的来源中监测这些化合物。

呋喃香豆素在欧盟通过的关于化妆品的法规(EC)第1223/2009号中受到控制。附件II的条目358禁止直接添加呋喃香豆素,除了来自天然精油或提取物的成分。防晒品和烫金产品中呋喃香豆素总量的限值为1 mg/kg⁴。呋喃香豆素分析的一些常见分析方法包括高压液相色谱法(HPLC)联用分光光度(例如UV)⁵检测或质谱(MS)检测。虽然柑橘类精油中的呋喃香豆素浓度允许使用HPLC-UV和LC-MS进行直接分析,但考虑到在化妆品中的低浓度及化妆品的复杂性质,需要选择性和灵敏度更高的分析技术,例如串联四极杆LC-MS/MS。

2007年,国际日用香料协会(IFRA)提出了六种分析物(香柑内酯、香柠檬素、白当归脑、环氧香柑素、异茴芹内酯和氧化前胡素)作为呋喃香豆素家族的标志化合物。标志物的选择是基于它们在柑橘类精油中的总体出现率和浓度,其在柑橘类精油中的含量通常大于1000 ppm⁶。本应用纪要中,使用UPLC联用Xevo TQ-XS开发了一种快速且灵敏的方法来定量精油中的16种呋喃香豆素。

实验

材料与方法

校准曲线标样制备

16种呋喃香豆素的混标(Supelco, 93102)溶解于乙腈中,每种浓度为250 mg/kg,用于制备溶剂和基质匹配校准曲线。通过连续稀释至0.5、1、5、10、50、100、500和1000 ng/mL制备八个点的校准曲线,将乙腈用于溶剂校准曲线,空白橙类精油用于基质匹配校准。

精油样品的前处理

在LCMS进样前，使用乙腈对精油样品（葡萄柚）进行100倍稀释。

基质效应研究样品的前处理

使用乙腈将16种呋喃香豆素混标(Supelco, 93102)稀释至10、100和1000 ng/mL，并使用橙类精油空白基质(Supelco, PE05354)分别在溶剂和基质中创建加标样品。

色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱：	ACQUITY UPLC CSH氟苯基柱, 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m (P/N: 186005352)
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	1 μ L
流速：	0.4 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	%A	%B	曲线
初始	80	20	初始
1	80	20	6
10	20	80	6
11	5	95	6
13	5	95	6
13.1	80	20	6
15	80	20	6

质谱仪条件

质谱系统：	Xevo TQ-XS
电离模式：	ESI+
脱溶剂气温度：	400 °C
脱溶剂气流速(L/h)：	1000
锥孔气流速(L/h)：	150
离子源温度：	130 °C
毛细管电压：	1 kV

数据管理

色谱软件：MassLynx™ v4.2

质谱软件：Masslynx v4.2

定量软件：TargetLynx™

设置MRM通道

使用时间分段的MRM通道模式收集数据，每种呋喃香豆素包含两条通道。使用基于QuanOptimize功能的进样对化合物MRM通道以及它们各自的参数（例如，锥孔电压和碰撞能量）进行优化。表1中标记*的通道为定量通道。优化过程中，我们观察到白当归素的碎片离子(m/z 317)比母离子(m/z 335)的灵敏度更好，因此使用 m/z 317作为Q1中的母离子。

化合物名称	锥孔电压 (V)	MRM通道	碰撞能量 (V)	化合物名称	锥孔电压 (V)	MRM通道	碰撞能量 (V)
补骨脂素	22	187.1>131.0*	28	珊瑚菜素	34	301.3>233.2*	10
	22	187.1>143.0	16		34	301.3>218.2	28
花椒毒素	10	217.1>174.0*	22	氧化前胡素水合物	22	305.1>203.1*	22
	10	217.1>161.1	22		22	305.1>147.1	34
香柑内酯	10	217.1>202.1*	22	白当归素	30	317.2>233.3*	20
	10	217.1>174.0	28		30	317.2>175.1	30
异茴芹内酯	22	247.1>217.1*	28	白当归脑	30	317.3>233.2*	20
	22	247.1>232.1	16		30	317.3>218.3	30
欧前胡素	30	271.2>203.1*	16	8-香叶草氧基补骨脂素	16	339.1>203.1*	10
	30	271.2>147.1	34		16	339.1>137.2	10
异欧前胡素	30	271.2>203.0*	20	香柠檬素	16	339.3>203.1*	10
	30	271.2>147.2	30		30	339.3>81	20
独活素	22	287.1>203.1*	10	环氧香柑素	30	355.2>153.0*	10
	22	287.1>147.1	34		30	355.2>203.3	20
氧化前胡素	40	287.1>203.1*	16	6,7-二羟基香柠檬素	30	373>245*	30
	40	287.1>147.1	34		30	373>288.1	20

表1.16种呋喃香豆素的MRM通道。同分异构体对分别显示为橙色、蓝色、绿色和紫色。

结果与讨论

ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱的分离能力

十六种呋喃香豆素，包括四对同分异构体，于15分钟运行时间内都能在ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱上实现良好分离。有几对异构体的MRM通道相同，例如欧前胡素和异欧前胡素以及独活素和氧化前胡素。因此，这些峰的良好分离对于准确定量分析至关重要。使用100 ng/mL呋喃香豆素单标确认同分异构体对的保留时间。表2显示了四对同分异构体的化学结构及其各自的色谱图。1 mg/mL的呋喃香豆素混标的整体色谱图如图1所示。

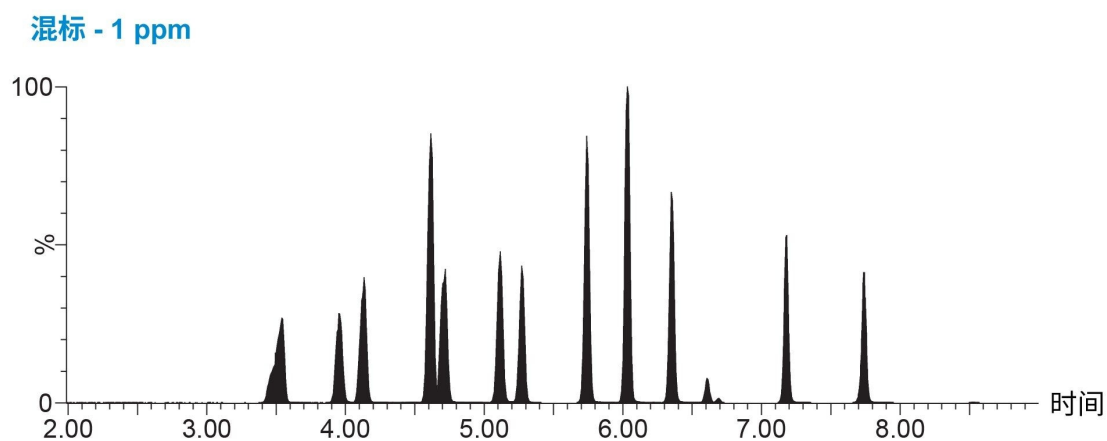


图1.16种呋喃香豆素混标的乙腈溶液(1 mg/mL)的UPLC-MS/MS色谱图

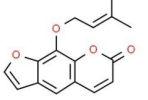
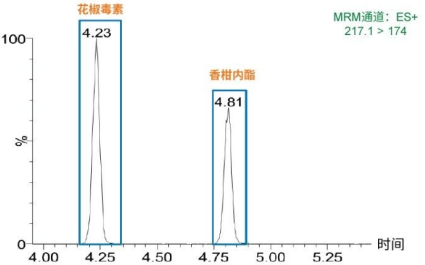
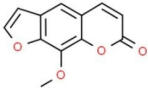
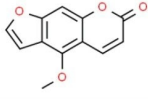
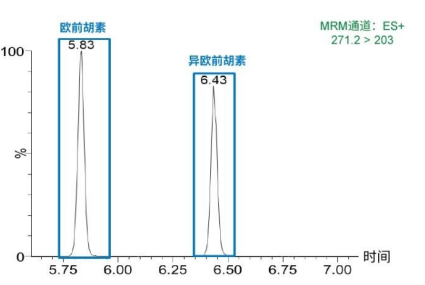
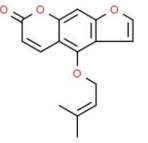
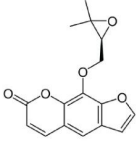
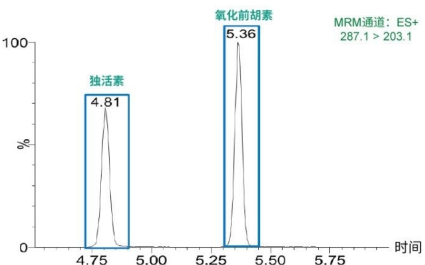
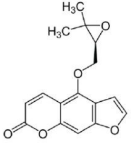
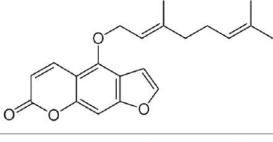
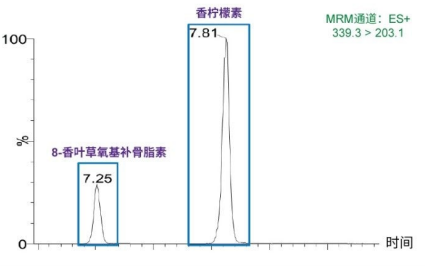
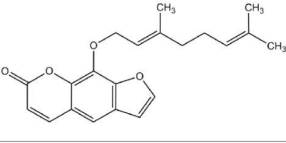
异构体	化合物名称	结构	色谱图
第1对	花椒毒素		
	香柑内酯		
第2对	欧前胡素		
	异欧前胡素		
第3对	独活素		
	氧化前胡素		
第4对	香柠檬素		
	8-香叶草氧基补骨脂素		

表2.在100 ng/mL时呋喃香豆素同分异构体的化学结构和定量MRM色谱图

仪器线性、准确度、精度和灵敏度

通过平均三条单独曲线的校准点得到表3中描述的外部校准曲线。所有呋喃香豆素的线性动态范围是0.5–1000 ng/mL（三个数量级），除了6,7-二羟基香柠檬素的线性范围为5–1000 ng/mL。所有分析物的线性回归 R^2 达到大

于0.998，残留百分比小于22.6%。一些呋喃香豆素校正曲线和残留物百分比的例子如图2所示。这表明Xevo TQ-XS联用ACQUITY I-Class对于呋喃香豆素的定量分析实现了优异的仪器线性和准确度。

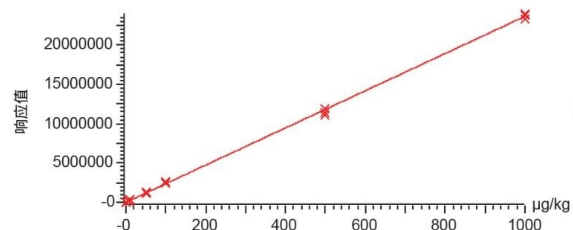
本研究还确立了LOQ，即能达到信噪比大于10的最低化合物浓度。除了6,7-二羟基香柠檬素，所有呋喃香豆素的LOQ都确定为0.5 ng/mL。6,7-二羟基香柠檬素的LOQ是10倍高，为5 ng/mL。在LOQ水平的色谱图如图3所示。

仪器精度测试通过在每个校正水平三次重复进样完成。最低校正水平的峰面积%RSD小于15%，表明LOQ水平时仪器精度良好。%RSD结果汇总如表3所示。

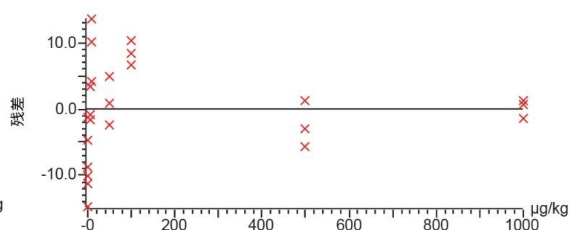
化合物名称	RT (min)	校正范围	R ²	残差 (%)	LOQ水平的S/N	LOQ水平的%RSD (n=3)
补骨脂素	4.10	0.5–1000 ng/mL	0.999	9.1	14	10.44
花椒毒素	4.27	0.5–1000 ng/mL	0.998	11.6	25	4.69
香柑内酯	4.83	0.5–1000 ng/mL	0.998	22.6	28	6.35
异茴芹内酯	4.74	0.5–1000 ng/mL	0.999	6.8	76	6.58
欧前胡素	5.85	0.5–1000 ng/mL	0.999	8.0	41	10.78
异欧前胡素	6.45	0.5–1000 ng/mL	0.999	6.1	53	5.49
独活素	4.83	0.5–1000 ng/mL	0.998	10.6	54	9.28
氧化前胡素	5.39	0.5–1000 ng/mL	0.999	7.6	21	14.64
珊瑚菜素	6.13	0.5–1000 ng/mL	0.999	5.5	190	11.42
氧化前胡素水合物	3.68	0.5–1000 ng/mL	0.999	9.9	35	6.72
白当归素	3.64	0.5–1000 ng/mL	0.998	2.6	16	5.80
白当归脑	5.23	0.5–1000 ng/mL	0.999	16.2	30	14.92
香叶草氧基补骨脂素	7.27	0.5–1000 ng/mL	0.999	1.7	75	5.64
香柠檬素	7.83	0.5–1000 ng/mL	0.999	8.1	259	3.08
环氧香柑素	6.71	0.5–1000 ng/mL	0.999	14.8	15	9.34
6,7-二羟基香柠檬素	6.15	5–1000 ng/mL	0.999	11.2	9	8.06

表3.关于呋喃香豆素的仪器线性、精度和灵敏度的详细信息。

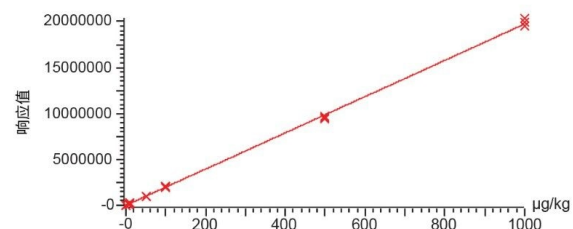
化合物名称: 异茴芹内酯
 相关系数: $r = 0.999465$, $r^2 = 0.998930$
 校正曲线: $23642.4 * x + 1386.64$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



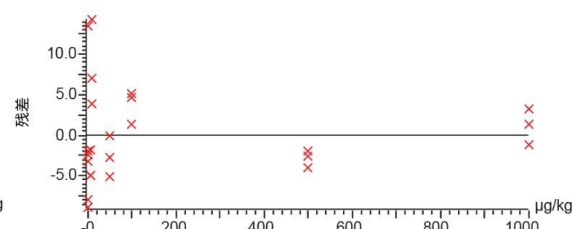
化合物名称: 异茴芹内酯
 相关系数: $r = 0.999465$, $r^2 = 0.998930$
 校正曲线: $23642.4 * x + 1386.64$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



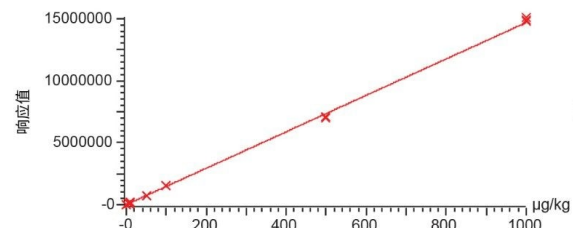
化合物名称: 欧前胡素
 相关系数: $r = 0.999632$, $r^2 = 0.999265$
 校正曲线: $19719.7 * x + 340.882$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



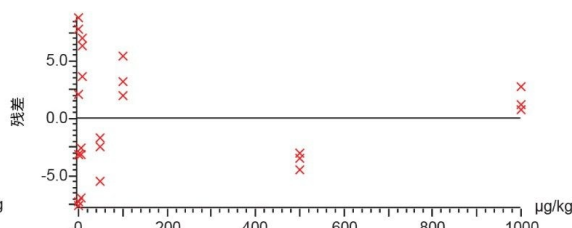
化合物名称: 欧前胡素
 相关系数: $r = 0.999632$, $r^2 = 0.999265$
 校正曲线: $19719.7 * x + 340.882$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



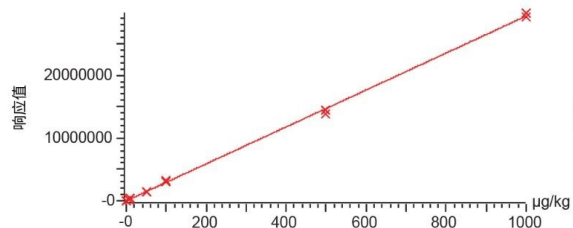
化合物名称: 香柠檬素
 相关系数: $r = 0.999613$, $r^2 = 0.999226$
 校正曲线: $14669.6 * x + 840.888$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: 香柠檬素
 相关系数: $r = 0.999613$, $r^2 = 0.999226$
 校正曲线: $14669.6 * x + 840.888$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: 珊瑚菜素
 相关系数: $r = 0.999501$, $r^2 = 0.999002$
 校正曲线: $29390.3 * x + 3371.14$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无



化合物名称: 珊瑚菜素
 相关系数: $r = 0.999501$, $r^2 = 0.999002$
 校正曲线: $29390.3 * x + 3371.14$
 响应类型: 外标法, 按峰面积计算
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x$, 轴转: 无

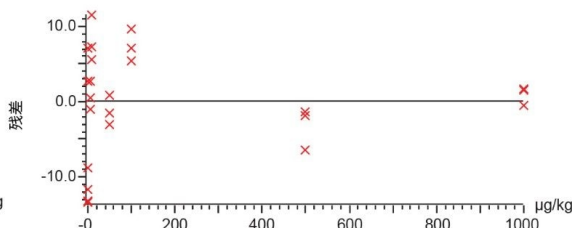


图2.Xevo TQ-XS联用ACQUITY I-Class采集的呋喃香豆素乙腈溶液的校正曲线示例。

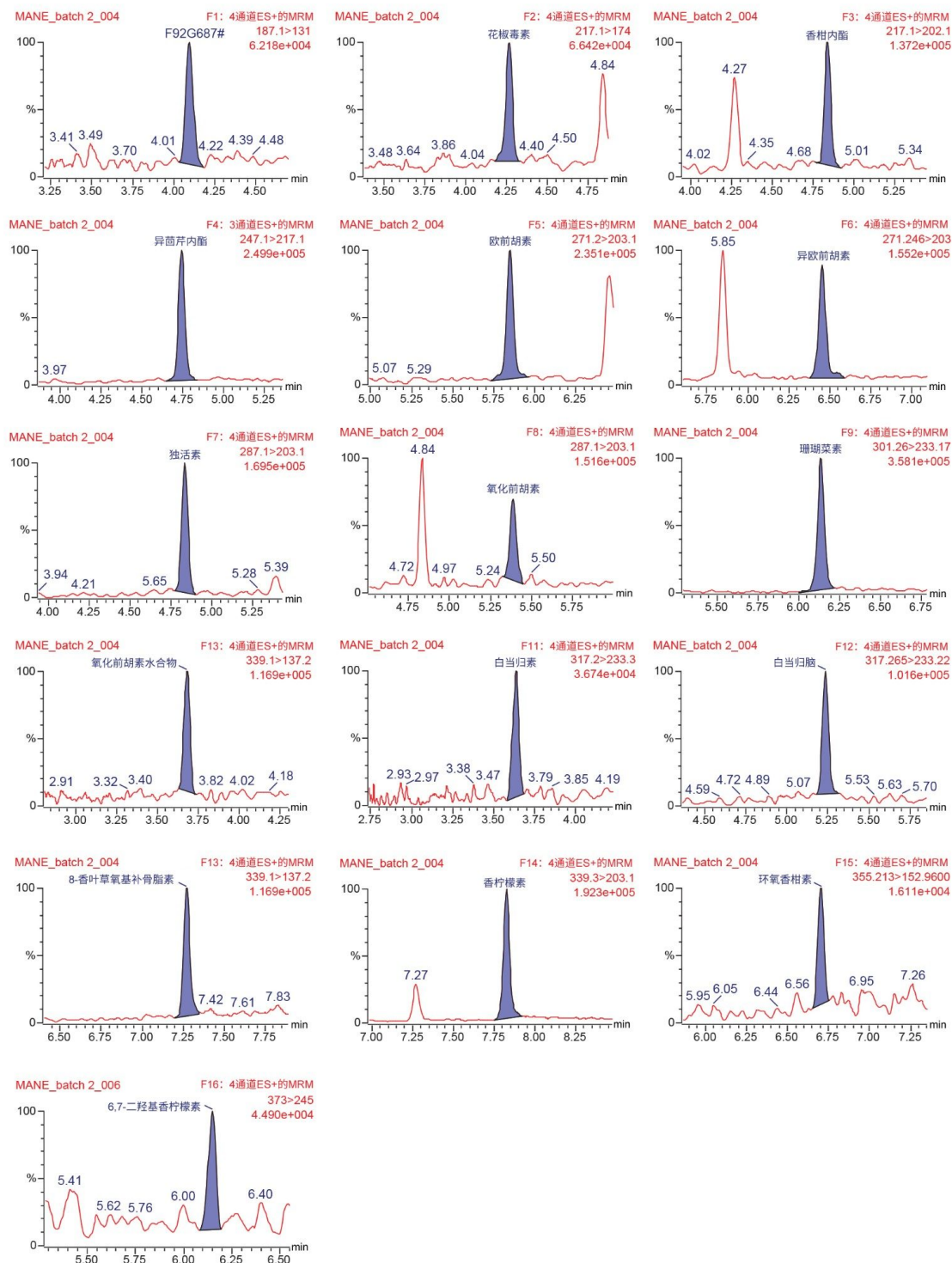


图3.在LOQ浓度时呋喃香豆素乙腈溶液的色谱图和S/N。

评估橙类精油对呋喃香豆素的基质效应

评估橙类精油对呋喃香豆素的基质效应，以确立是否应该使用溶剂或基质匹配校准曲线定量真实样品中的呋喃香豆素。根据空白橙类精油基质中加标的呋喃香豆素对比溶剂的峰面积以计算基质效应。分别加标至10 ng/mL、100 ng/mL和1000 ng/mL的呋喃香豆素代表真实精油样品中呋喃香豆素的低、中和高浓度水平。图4显示了溶剂和橙类精油基质中加标10 ng/mL时补骨脂素和6,7-二羟基香柠檬素的示例。表4汇总了橙类精油样品基质中呋喃香豆素的基质效应。

总之，在大多呋喃香豆素中可观察到轻微的基质增强，且在低浓度水平时基质效应更明显。因为大多分析物的基质增强小于130%，在三个不同浓度水平的呋喃香豆素中，基质效应并不明显。并且使用溶剂校准曲线应能够准确定量分析真实精油样品中的呋喃香豆素。

化合物名称	低浓度 (10 ng/mL)	中等浓度 (100 ng/mL)	高浓度 (1000 ng/mL)
补骨脂素	109.4	95.2	98.0
花椒毒素	161.1	119.3	106.4
香柑内酯	113.6	104.8	105.9
异茴芹内酯	135.9	127.6	111.6
欧前胡素	127.6	122.4	109.0
异欧前胡素	97.6	95.7	93.0
独活素	101.9	95.9	94.6
氧化前胡素	121.3	114.5	105.7
珊瑚菜素	150.8	142.0	125.1
氧化前胡素水合物	112.4	106.5	100.8
白当归素	121	113.6	109.1
白当归脑	137.8	127.3	109.3
香叶草氧基补骨脂素	124.7	110.9	104.9
香柠檬素	130.9	104.0	98.6
环氧香柑素	98.1	101.7	99.7
6,7-二羟基香柠檬素	134.9	113.1	109.5

表4.在橙类精油基质($n = 3$)中加标低、中和高浓度水平呋喃香豆素下的基质效应研究。基质效应大于130%以蓝色突出显示。

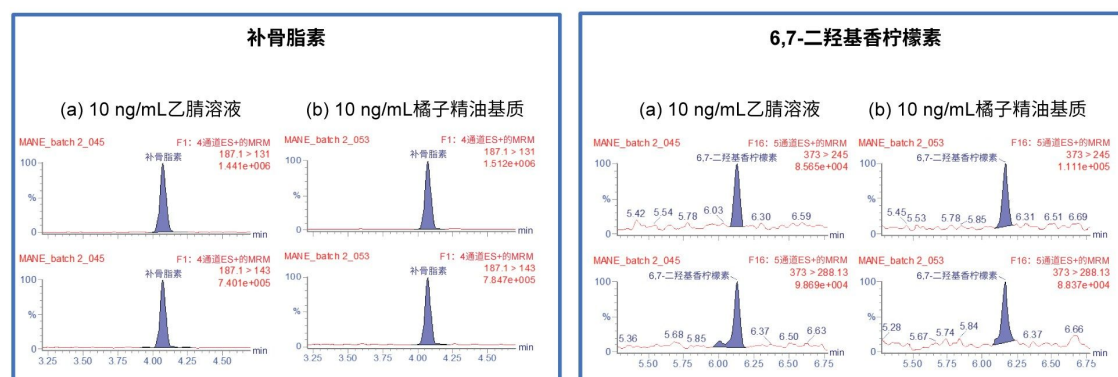


图4.(a)乙腈和(b)橙类精油基质中加标10 ng/mL时补骨脂素和6,7-二羟基香柠檬素的MRM色谱图。

精油样品中呋喃香豆素的定量分析

葡萄柚精油样品中的呋喃香豆素浓度差异很大，从0.09到196 mg/mL不等（见图5和表5）。Xevo TQ-XS宽广的线性动态范围（高达三个数量级）使分析人员能够准确定量样品中存在的不同数量级的分析物，从而简化样品前处理，缩减分析的时间和成本。

本研究建立了基质匹配校准和溶剂校准。使用乙腈将葡萄柚精油样品稀释100倍，分别对比溶剂和基质匹配校准曲线（见表5）对呋喃香豆素的实际浓度进行定量。溶剂和基质匹配校准曲线定量出实际浓度的差异百分比小于30%。结果与基质效应研究相符合，表明基质效应微小，以及溶剂标准品校准可用于定量精油样品中的呋喃香豆素。

化合物名称	实际浓度 (mg/mL)		高浓度 (1000 ng/mL)
	溶剂曲线	基质匹配曲线	
补骨脂素	0.13	0.09	30.8
花椒毒素	未检出	未检出	未检出
香柑内酯	8.2	7.6	7.3
异茴芹内酯	1.7	1.3	23.5
欧前胡素	3.9	3.3	15.4
异欧前胡素	5.2	5.5	5.8
独活素	14.6	15.1	7.1
氧化前胡素	99.1	92.2	7.0
珊瑚菜素	16.3	12.3	24.5
氧化前胡素水合物	7.3	7.0	4.1
白当归素	7.2	6.0	16.7
白当归脑	82.5	72.4	12.2
香叶草氧基补骨脂素	106.3	98.8	7.1
香柠檬素	197.5	196.0	0.8
环氧香柑素	未检出	未检出	未检出
6,7-二羟基香柠檬素	15.2	13.3	12.5

表5.葡萄柚精油样品中的呋喃香豆素浓度。

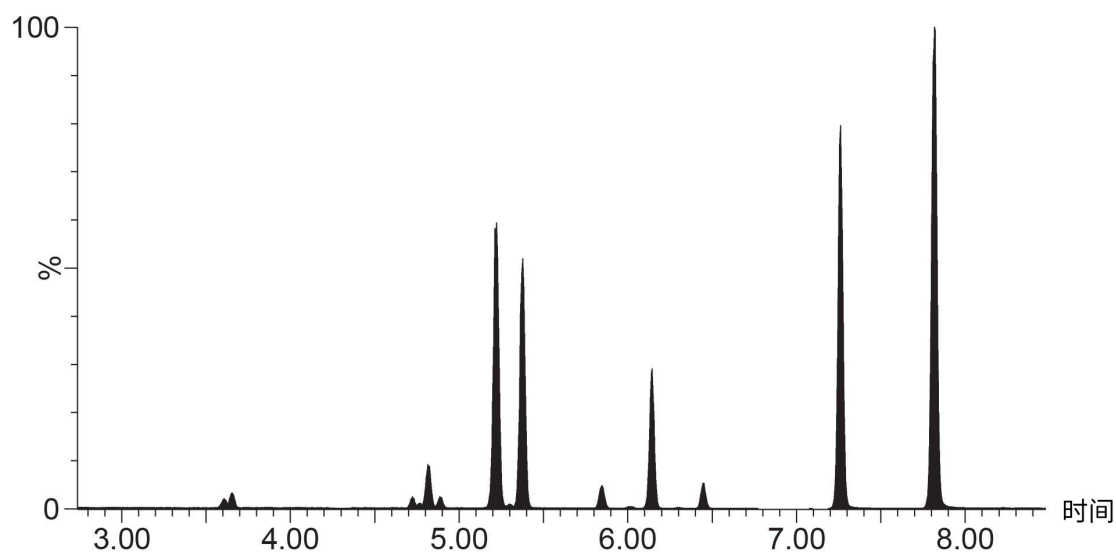


图5. 100倍稀释的葡萄柚精油样品中检测的呋喃香豆素色谱图。

结论

由于存在光毒性，准确定量消费品中的呋喃香豆素至关重要。在ACQUITY I-Class联用Xevo TQ-XS的系统上成功开发了快速筛选和定量16种呋喃香豆素的时间分段的MRM方法。使用ACQUITY UPLC CSH氟苯基色谱柱实现了四对呋喃香豆素同分异构体的良好分离，使每个异构体都能够准确定量。本研究为呋喃香豆素建立了优异的仪器准确度、精度和线性动态范围。该仪器还证明了使所有呋喃香豆素的LOQ达到0.5 ng/mL的能力，除了6,7-二羟基香柠檬素为5 ng/mL。

还使用简单的稀释法研究了橙类精油对呋喃香豆素的基质效应。在各种加标浓度的呋喃香豆素中可观察到轻微的基质增强（小于130%）。这表明基质效应不明显，并且使用溶剂和基质匹配校准曲线对精油样品进行定量分析得到证实。葡萄柚精油中的呋喃香豆素含量在0.09–196 mg/mL之间，使用溶剂和基质匹配校准曲线确定的实际浓度差异小于30%。

通过建立的方法，我们可以使用快速简便的样品前处理技术定量精油样品，同时满足欧盟法规(EC)第1223/2009号中提出的规定限值1 mg/kg。

参考资料

1. Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y., & Bourgaud, F. (2015). The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways. *PLOS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142757>.
2. Kreidl, M. et.al., Determination of Phytotoxic Furanocoumarins in Natural Cosmetics Using SPE With LC-MS. *Analytical Chimica Acta*, 2020, 1101, 211–221.
3. Christensen L.P., Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds). Polyphenols and Polyphenol-Derived Compounds and Contact Dermatitis, Polyphenols in Human Health and Disease. *Academic Press*, San Diego, 2014, pp 793–818.
4. Official *Journal of the European Union*, Regulation (EC) No 1223/2009 on Cosmetic Products, 30 Nov 2009.
5. Li, G.-J., Wu, H.-J., Wang, Y., Hung, W.-L., & Rouseff, R. L. (2019). Determination of Citrus Juice Coumarins, Furanocoumarins and Methoxylated Flavones Using Solid Phase Extraction and HPLC With Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Chemistry*, 271, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.130> <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.130>> .
6. International Fragrance Association, Brussels, Information Letter 799 Furocoumarins in Finished Cosmetic Products, 2008.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007739ZH, 2022年10月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)