附件6

化妆品中地氯雷他定等15种物质的检测方法

1 范围

本方法规定了采用高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中地氯雷他定（CAS No：100643-71-8）、氯苯那敏（CAS No：132-22-9）、阿司咪唑（CAS No：68844-77-9）、曲吡那敏（CAS No：91-81-6）、溴苯那敏（CAS No：86-22-6）、苯海拉明（CAS No：58-73-1）、异丙嗪（CAS No：60-87-7）、羟嗪（CAS No：68-88-2）、奋乃静（CAS No：58-39-9）、西替利嗪（CAS No：83881-51-0）、氟奋乃静（CAS No：69-23-8）、氯丙嗪（CAS No：50-53-3）、氯雷他定（CAS No：79794-75-5）、特非那定（CAS No：50679-08-8）、赛庚啶（CAS No：129-03-3）等15种抗组胺类物含量的方法。

本方法适用于膏霜、乳液、水剂和啫喱等类型化妆品中地氯雷他定、氯苯那敏、阿司咪唑、曲吡那敏、溴苯那敏、苯海拉明、异丙嗪、羟嗪、奋乃静、西替利嗪、氟奋乃静、氯丙嗪、氯雷他定、特非那定、赛庚啶含量的测定。

2 方法提要

以甲醇为溶剂提取化妆品中抗组胺类物质，用高效液相色谱仪分离，质谱检测器检测，采用保留时间和特征离子对丰度比定性，以待测物质相对应离子峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

本方法对15种抗组胺类物质的检出限均为1 ng/mL，定量下限均为2 ng/mL，如以取样0.2 g计，检出浓度均为250 ng/g，定量下限浓度均为500 ng/g。

3 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为一级实验用水。

3.1 甲醇，色谱纯。

3.2 甲酸，色谱纯。

3.3 甲酸铵，色谱纯。

3.4 甲酸铵-甲酸水溶液：称取甲酸铵（3.3）6.3 g，加1 mL甲酸（3.2），加水1000 mL溶解，用0.22 µm滤膜过滤。

3.5 标准品，参考附录A。

3.6标准储备溶液（ρ=1 g/L）：分别准确称取15种抗组胺标准品各10 mg（必要时需折算），精确到0.0001 g，置于10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1）溶解并定容。

3.7 混合标准储备溶液（ρ=2.5 mg/L）：准确移取各标准储备液25 µL至10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1）溶解并定容。

4 仪器和设备

4.1高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪。

4.2 超声波清洗器。

4.3 0.22 µm滤膜。

4.4 离心机，10000 r/min。

4.5 涡旋振荡器。

4.6 天平，感量0.0001 g。

4.7 天平，感量0.001 g。

注：由于部分吩噻嗪类抗组胺物质在个别高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪上有吸附现象，这可能与其中的金属管道种类和仪器清洗有关，因此在实验时应确认仪器没有影响实验结果的吸附存在。

5 分析步骤

5.1 标准溶液：用甲醇（3.1）稀释混合标准储备溶液，精密配制得浓度为2、5、10、20、50 ng /mL的系列浓度标准溶液。标准溶液现用现配。

5.2 样品预处理

准确称取样品0.2 g，精确至0.001g，置于具塞比色管中，加入甲醇（3.1）40 mL，涡旋振荡30 s，使试样与提取溶剂充分混匀，超声提取20 min（工作频率20～43KHz，200 W），用甲醇（3.1）定容至50mL，摇匀，必要时以10000 r/min离心5 min。取上清液经0.22 μm滤膜过滤，滤液作为试样溶液备用。必要时用适量甲醇（3.1）稀释滤液备用。

5.3色谱-质谱参考条件

5.3.1 色谱条件

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱 (3.0 μm, 3.0×150mm)。

流动相：溶液A：甲酸铵-甲酸水溶液（3.4），溶液B：甲醇（3.1），梯度程序见表1：

表1 流动相比例

|  |  |
| --- | --- |
| 时间 | 流动相组成 |
| 0 min | A+B =50+50 |
| 4 min | A+B =50+50 |
| 6 min | A+B =35+65 |
| 14 min | A+B =0+100 |
| 16 min | A+B =0+100 |
| 16.1 min | A+B =50+50 |
| 20 min | A+B =50+50 |

流速：0.4 mL/min；

柱温：35 ℃；

进样量：2 μL；

样品盘温度：4 ℃；

5.3.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI源）；

监测模式：正离子多离子反应监测模式； 监测离子对及相关电压参数设定见表2；

雾化气流速：3 L/min；

干燥气流速：15 L/min；

脱溶剂管温度：250 ℃；

离子源加热温度：400 ℃；

碰撞气：Ar，230 kPa；

离子化电压：4500 V

表2质谱监测离子对及相关电压参数设定表

| 编号 | 物质名称 | 母离子（m/z） | 子离子（m/z） | CE（V） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 地氯雷他定 | 311.1 | 259.1\* | 22 |
|  |  |  | 294.1 | 18 |
| 2 | 氯苯那敏 | 275.1 | 230.1\* | 15 |
|  |  |  | 167.1 | 42 |
| 3 | 阿司咪唑 | 459.3 | 135.1\* | 38 |
|  |  |  | 218.1 | 26 |
| 4 | 曲吡那敏 | 256.2 | 211.1\* | 14 |
|  |  |  | 91.1 | 35 |
| 5 | 溴苯那敏 | 319.1 | 273.9\* | 18 |
|  |  |  | 167.0 | 43 |
| 6 | 苯海拉明 | 256.2 | 167.1\* | 13 |
|  |  |  | 165.0 | 45 |
| 7 | 异丙嗪 | 285.1 | 86.2\* | 20 |
|  |  |  | 198.0 | 22 |
| 8 | 羟嗪 | 375.2 | 201.0\* | 20 |
|  |  |  | 166.1 | 39 |
| 9 | 奋乃静 | 404.2 | 171.1\* | 24 |
|  |  |  | 143.2 | 29 |
| 10 | 西替利嗪 | 389.1 | 201.0\* | 20 |
|  |  |  | 166.1 | 41 |
| 11 | 氟奋乃静 | 438.2 | 143.1\* | 31 |
|  |  |  | 171.1 | 25 |
| 12 | 氯丙嗪 | 319.1 | 86.2\* | 21 |
|  |  |  | 58.0 | 41 |
| 13 | 氯雷他定 | 383.1 | 337.0\* | 22 |
|  |  |  | 267.0 | 36 |
| 14 | 特非那定 | 472.3 | 436.3\* | 26 |
|  |  |  | 454.3 | 20 |
| 15 | 赛庚啶 | 288.2 | 96.2\* | 27 |
|  |  |  | 191.0 | 27 |

\*：定量离子对。

5.4 定性判定

用高效液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定。在相同试验条件下，样品中应呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰，被测物质的特征离子峰保留时间与标准溶液对应的保留时间一致，且样品所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的监测离子对相对丰度比的偏差不超过表3规定范围，则可以判定样品中存在对应的禁用物质。

表3 定性判定时离子相对丰度的最大允许偏差

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 离子相对丰度（k） | k≥50% | 50 %> k ≥ 20 % | 20 %> k ≥ 10 % | k≤ 10 % |
| 允许的最大偏差 | ±20% | ±25% | ±30% | ±50% |

5.5 定量测定

在参考分析条件下，依次将标准溶液分别进样，记录各次特征离子色谱峰面积并绘制峰面积（A）-浓度（C）标准曲线并计算线性回归方程，其线性相关系数应不小于0.99。取试样溶液进样，将对应特征离子色谱峰面积代入回归方程，按“取试计算”项下公式，计算样品中各物质的含量。

5.6 平行实验

按以上步骤操作，对同一样品独立进行测定获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的15 %。

6分析结果的表述

6.1计算



式中： *ω*——样品中抗组胺类物质的含量，ng/g；

 *ρ*——试样溶液中抗组胺类物质的浓度，ng/mL；

 *V*——样品定容体积，mL；

 *m*——样品取样量，g。

 *D*——稀释倍数（如未稀释则为1）。

6.2 回收率和精密度

多家实验室验证在定量下限浓度附近回收率为76.7%—148.6 %，相对标准偏差小于10.2 %；其他浓度回收率为75.7%—119.4 %，相对标准偏差小于9.8 %。

附录A

表A 标准品信息表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 标准品 | 分子量 | 纯度要求 | CAS No | 分子式 | 折算系数 |
| 1 | 地氯雷他定 | 310.83 | ≥98% | 100643-71-8 | C19H19ClN2 | 1.00 |
| 2 | 马来酸氯苯那敏 | 390.87 | ≥98% | 113-92-8 | C16H19ClN2·C4H4O4 | 1.43 |
| 3 | 阿司咪唑 | 458.58 | ≥98% | 68844-77-9 | C28H31FN4O | 1.00 |
| 4 | 盐酸曲吡那敏 | 291.82 | ≥98% | 154-69-8 | C16H21N3·HCl | 1.14 |
| 5 | 马来酸溴苯那敏 | 435.3 | ≥98% | 980-71-2 | C16H19BrN2·C4H4O4 | 1.37 |
| 6 | 盐酸苯海拉明 | 291.82 | ≥98% | 247-24-0 | C17H21NO·HCl | 1.14 |
| 7 | 盐酸异丙嗪 | 320.89 | ≥98% | 58-33-3 | C17H20N2S·HCl | 1.13 |
| 8 | 盐酸羟嗪 | 447.83 | ≥95% | 2192-20-3 | C21H27ClN2O2·2HCl | 1.20 |
| 9 | 奋乃静 | 403.97 | ≥98% | 58-39-9 | C21H26ClN3OS | 1.00 |
| 10 | 盐酸西替利嗪 | 461.82 | ≥98% | 83881-52-1 | C21H25ClN2O3·2HCl | 1.19 |
| 11 | 盐酸氟奋乃静 | 510.44 | ≥98% | 146-56-5 | C22H26F3N3OS·2HCl | 1.17 |
| 12 | 盐酸氯丙嗪 | 355.33 | ≥98% | 69-09-0 | C17H19ClN2S·HCl | 1.12 |
| 13 | 氯雷他定 | 382.89 | ≥98% | 79794-75-5 | C22H23ClN2O2 | 1.00 |
| 14 | 特非那定 | 471.7 | ≥98% | 50679-08-8 | C32H41NO2 | 1.00 |
| 15 | 盐酸赛庚啶 | 350.88 | ≥95% | 41354-29-4 | C21H21N·HCl·1.5H2O | 1.22 |

注：标准品与目标物质不同时需进行必要的折算。

附录B

图B 标准品标准溶液HPLC-MS/MS参考色谱图