

氮芥、斑蝥素

1 范围

本方法规定了测定化妆品中氮芥、斑蝥素的气相色谱-质谱测定法。

本方法适用于育发类化妆品中氮芥、斑蝥素含量的测定。

2 方法提要

以三氯甲烷提取育发类化妆品中的氮芥、斑蝥素等两种组分，用气相色谱-质谱联用仪测定。分别以氮芥、斑蝥素特征离子定性，以峰面积定量。本方法中氮芥的检出限为 0.03ng，定量下限为 0.10ng；若取 0.5g 样品，其方法检出限为 0.3 μ g/g，最低定量浓度为 1 μ g/g。斑蝥素的检出限为 0.05ng，定量下限为 0.15ng；若取 0.5g 样品，其方法检出浓度为 0.5 μ g/g，最低定量浓度为 1.5 μ g/g。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 氦气，纯度 \geq 99.999%。

3.2 三氯甲烷：分析纯。

3.3 饱和氯化钠水溶液：称取 40 g 氯化钠，置于 250 mL 磨口锥形瓶中，加入 100mL 水，超声 15 分钟，即得。

3.4 盐酸溶液（1mol/L）：取浓盐酸（ ρ_{20} =1.19g/mL）8.3mL，加水至100mL。

3.5 氢氧化钠溶液（1mol/L）：称取氢氧化钠4g，溶于水中，定容至100mL，混匀。

3.6 氮芥标准储备溶液[ρ （ $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ）=1mg/mL]：称取盐酸氮芥标准品[（ $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{Cl})_2 \cdot \text{HCl}$ ）0.0123g（精确到 0.00001g）至 10 mL 容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，摇匀。

3.7 斑蝥素标准储备溶液[ρ （ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ）=1mg/mL]：称取斑蝥素标准品 0.01g（精确到 0.00001g）于 10mL 容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，摇匀。

4 仪器和设备

4.1 气相色谱-质谱联用仪，配 EI 源。

4.2 分析天平。

4.3 涡旋混匀器。

4.4 离心机。

5 分析步骤

5.1 标准溶液制备

5.1.1 混合标准工作溶液[$\rho=100\mu\text{g}/\text{mL}$]：准确移取氮芥标准储备溶液（3.6），斑蝥素标准储备溶液（3.7）各 1.00 mL 至同一 10 mL 容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，摇匀。

5.1.2 标准系列溶液：分别准确移取混合标准工作溶液（5.1.1）0.05 mL，0.10 mL，0.25 mL，0.50 mL，1.00 mL 至 10 mL 容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，摇匀。

5.2 样品预处理

称取样品 0.5g（精确到 0.001 g）于 10 mL 离心管中，加饱和氯化钠水溶液 2.0 mL，涡旋 30s，用盐酸溶液（3.4）或氢氧化钠溶液（3.5）将样品溶液调至中性，精密加入三氯甲烷 5 mL，涡旋混匀 2 min，5000 rpm 离心 3 min，取下层有机相，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，滤液作为待测溶液，备用。

5.3 参考色谱-质谱条件

色谱柱：5%苯基-甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱（DB-5MS，30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ），或选用同等极性的弹性石英毛细管柱。

色谱柱温度：50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min，然后以每分钟 15 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 5 min，然后以每分钟 30 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min。

进样口温度：230 $^{\circ}\text{C}$ ；

色谱-质谱接口温度：230 $^{\circ}\text{C}$ ；

载气：氦气，纯度 $\geq 99.999\%$ （3.1），流速 1.0 mL/min；

电离方式：EI；

电离能量：70 eV；

测定方式：选择离子检测（SIM），氮芥定性离子（ m/z ）：106（100.0）、63（25.2）、120（4.8），定量离子（ m/z ）：106；斑蝥素定性离子（ m/z ）：128（100）、96（87.6）、70（20.6），定量离子（ m/z ）：128。

进样量：1 μL

进样方式：分流进样，分流比 10: 1；

溶剂延迟：5 min

5.4 测定

5.4.1 定性判定

用气相色谱-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 5.4 规定范围，则可以判定样品中存在氮芥或斑蝥素。

表 5.4 定性测定时离子相对丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (k)	k≥50%	50%>k≥20%	20%>k≥10%	k≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

5.4.2 定量

在“5.3”分析条件下，依次将系列浓度标准溶液分别进样，绘制峰面积-浓度校准曲线，其线性相关系数应大于 0.99。取“5.2”样品待测溶液进样，将氮芥或斑蝥素的色谱峰面积代入标准曲线，按“6”项下公式计算，得出样品中氮芥或斑蝥素的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m}$$

样品结果计算：

式中： ω ——样品中氮芥、斑蝥素的含量， $\mu\text{g/g}$ ；

m ——样品取样量， g ；

ρ ——代入校准曲线计算得到的样品待测液中斑蝥素或氮芥的质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V ——样品定容体积，本方法为 5mL。

在重复性条件下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 10%。

6.2 回收率和精密度

本方法对育发类化妆品中氮芥、斑蝥素加标回收率分别在 80.0%-120.0%之间，精密度分别在 10%之内。

7 图谱

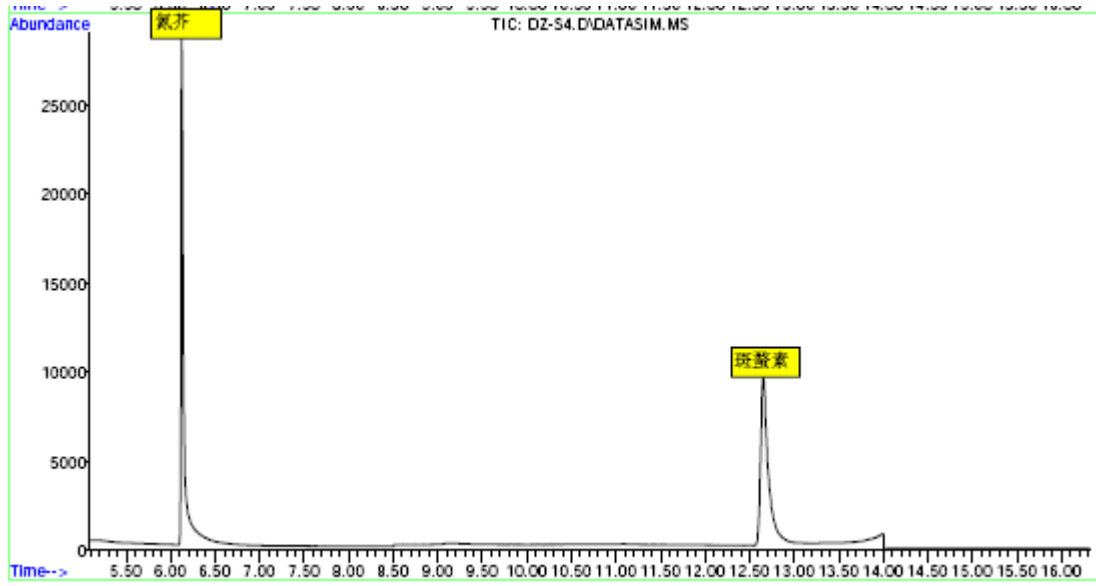


图 1 氮芥、斑蝥素的总离子流色谱图

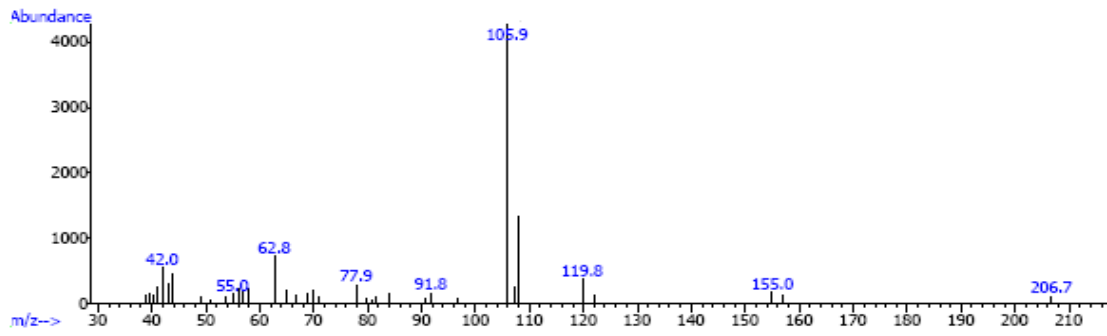


图 2 氮芥的质谱图

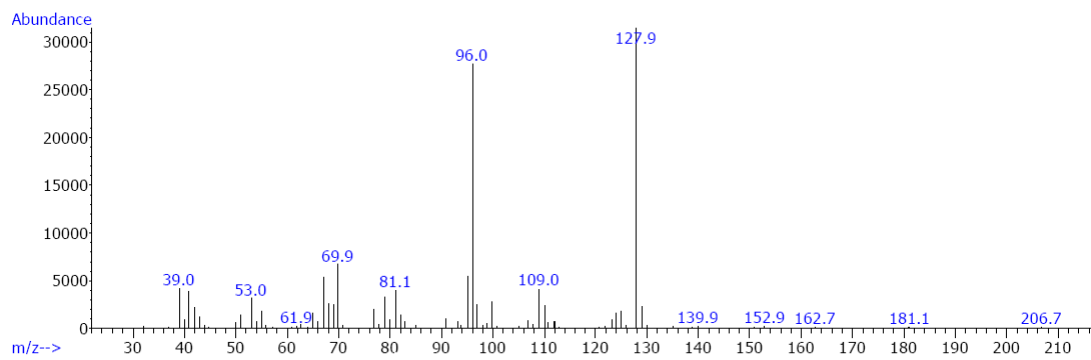


图 3 斑蝥素的质谱图

氮芥、斑蝥素检测方法修订说明

为进一步完善化妆品安全技术法规体系，中国食品药品检定研究院组织开展了“化妆品中氮芥、斑蝥素的检测方法”修订工作。现已对原方法进行了修订，完成了新方法建立和验证工作，就修订和起草工作情况说明如下：

1 修订和起草的必要性

氮芥是最早用于临床并取得突出疗效的抗肿瘤药物，是一种高度活跃的化合物，并且是一种强起疱剂和局部刺激剂，能刺激皮肤毛发的生长，但它是一种高毒性物质，若盐酸氮芥水溶液滴到皮肤上迅速透皮吸收，会引起大疱红肿疼痛甚至组织坏死溃疡，严重的可以通过呼吸道吸收引起气道水肿和肺水肿。我国对化妆品中的氮芥使用有严格限制，《化妆品卫生规范》2007 版规定氮芥为禁用物质，并且规定了氮芥检测方法。但该方法样品处理步骤比较繁琐，酸化除杂、碱性提取，再进行气相色谱测定，这些步骤可能对目标物的损耗大，造成结果不准确。斑蝥素外用对皮肤有止痒改善局部神经营养及刺激毛根、促进毛发生长作用，但是毒性较大，《化妆品卫生规范》（2007 年版）将斑蝥素作为限用物质仅可用于育(生)发剂中，在化妆品中最大允许使用浓度 1%，且在儿童产品中禁用，并收录了气相色谱测定方法。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）已将之列为禁用组分。但原有方法存在着很多缺点：两个组分分开测定，很不方便；三氯甲烷提取到的杂质较多，尤其是中药提取物中的生物碱成分多，严重干扰测定，常导致气相色谱法测定的干扰峰很多；对疑似阳性样缺乏确证手段。

针对原方法的缺点，本方法拟对上述两种物质的原方法进行改进，统一建立气相色谱-质谱法（GC/MS）作为氮芥、斑蝥素的定性（确证）方法和定量方法。

2 修订和起草依据及文献

- (1) 《化妆品卫生规范》（2007 年版）。
- (2) 《关于印发化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范的通知》（国食药监许[2010]455 号）
- (3) 孙艳平，李涛，宋辉，固相萃取-气相色谱法测定擦癣药水中斑蝥素的含量，《中药新药与临床药理》，2010 年 7 月第 21 卷第 4 期
- (4) 黄水兰，李超华，唐满姣，祛膜止血乳膏中斑蝥素的含量测定，《民营科技》，2012 年第 4 期

(5) 许勇, 苗水, 郑征伟等, GC-MS 法检测化妆品中禁用物质氮芥的含量, 中国卫生检验杂志, 2012 年 11 期

(6) 陆军, 庞燕军, 赵晓东等, 化妆品中氮芥测定方法的探讨, 香料香精化妆品, 2011 年第 2 期

(7) 张剑峰, 高建, 刘静晶等, 气相色谱法测定化妆品中氮芥, 中国卫生工程学, 2010 年第 1 期

3 起草原则

针对以上两种物质原方法存在的问题进行修订, 无需经酸化除杂、碱性提取再进行气相色谱测定等步骤, 而是直接在氯化钠饱和水溶液中采用三氯甲烷提取, 用气相色谱质谱法同时测定两种成分, 简便、准确。本检测方法兼具先进性和可行性, 方法的实用性更强, 尽量采用目前化妆品检测实验室普遍具备的分析技术, 并选择准确、可行、便于实际操作的分析条件, 保证检测方法的准确性和重现性。

4 起草过程

根据立项要求, 通过查阅国内外相关文献资料, 并在原有实验数据的基础上, 重点解决了对斑蝥素现有的《化妆品卫生规范》(2007 年版) 原方法复杂体系测定结果往往存在着准确性和重现性较差的问题; 氮芥提取方法繁琐及检测方法的准确性和重现性问题, 首先是改进提取方法, 参照文献^{[5][6]}, 使样品无需经酸化除杂、碱性提取再测定等步骤, 而直接在氯化钠饱和水溶液中采用三氯甲烷提取而进行测定, 简便、准确。新建立了 GC/MS 法作为定性(确证)方法和复杂体系中的定量方法, 保证检测方法的准确性和重现性。

通过各剂型检测和 3 家检验机构进行样品验证, 符合“化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范”, 最终形成了《化妆品中氮芥、斑蝥素检测方法》研究报告。

5 重点说明的问题

(1) 关于体例。本检测方法的体例主要参照《化妆品卫生规范》(2007 年版) 的卫生化学检验方法和中检院分发的“化妆品理化检验方法模板”的体例要求, 便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

(2) 关于检测方法的建立和验证。

《化妆品卫生规范》(2007 年版) 已分别收录了氮芥、斑蝥素的气相色谱检测方法, 但尚无氮芥、斑蝥素的气相色谱质谱检测方法。通过调整实验条件, 改进提取方法, 建立了

氮芥、斑蝥素的气相色谱质谱检测方法。本方法中氮芥的检出限为 0.03ng，定量下限为 0.10ng；若取 0.5g 样品，其方法检出限为 0.3μg/g，最低定量浓度为 1μg/g。高、中、低浓度的回收率均在 96-109%之间，精密度在 2%~5%之间，在 0.5895~11.79μg/mL 浓度范围内线性关系良好 ($r>0.999$)；斑蝥素的检出限为 0.1ng，定量下限为 0.3ng；若取 0.5g 样品，其方法检出限为 0.5μg/g，最低定量浓度为 1.5μg/g。高、中、低浓度的提取回收率均在 110-114%之间，精密度在 2%~3%之间，在 0.488~12.20μg/m 浓度范围内线性关系良好 ($r>0.99$)，

(3) 关于提取溶剂

本项目进行了溶剂替换试验，共试用了乙酸乙酯和环己烷，过程如下：

1) 用乙酸乙酯作溶剂按 2007 版卫生规范氮芥处理方法对盐酸氮芥对照品，加标样品进行了尝试实验，通过 GC-MS 分析结果不理想，首先不成线性，其次是回收率太低，故放弃了用乙酸乙酯作为提取溶剂的方法。

2) 用环己烷作溶剂，加 40%氨水 1mL，加 0.5g 氯化钠，最后加环己烷萃取（对照品的处理步骤与样品处理相同），进行了 GC-MS，虽线性 R 值大于 0.99，但加标回收不理想，在 70% 以下，故也放弃该法。

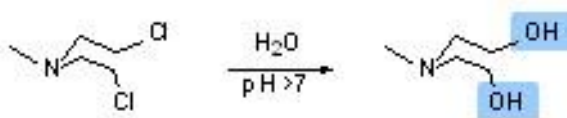
(4) 关于加入氯化钠

在样品的提取过程中，发现样品直接加入三氯甲烷提取后，乳化现象严重，使样品的提取效率降低，因此试验中选择加入氯化钠作为破乳剂，使回收率满足要求。

(5) 关于氮芥稳定性

原方法采用盐酸氮芥直接用水溶解配制。经试验，氮芥浓度不成线性（可能很快分解），回收率很低，这与文献^[4]的研究结果一致，故氮芥标准溶液最终以氯仿直接溶解。

另外，氮芥在 pH7 以上的水溶液将发生如下图所示水解反应而失活。该反应可逆，用盐酸控制好 pH (pH6-7) 能够将已分解的降解物以盐酸氮芥测定，达到真正控制氮芥的目的。



经上述试验和分析，最终选择了如正文的方法。

氮芥、斑蝥素检测方法的编制说明

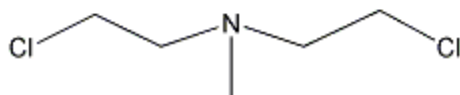
1 情况说明

为进一步完善化妆品安全技术法规体系，中国食品药品检定研究院组织开展了“化妆品中氮芥、斑蝥素的检测方法”修订工作。

2 研究背景

氮芥为双氯乙胺类烷化剂的代表，它是一高度活泼的化合物，常以盐酸氮芥的形式存在。盐酸氮芥极易溶于水和溶于三氯甲烷，有引湿性与腐蚀性，干燥结晶在40℃以下稳定，其水溶液极易水解，极不稳定。

据载，盐酸氮芥中文别名为安小辛，氮芥，恩比兴，肿瘤良，双氯乙基甲胺，恩比新，恩经兴，盐酸氮芥等；英文名称为mechlorethamine hydrochloride，英文别名为Chlormethine、Nitrogen mustard，Mustargen, Embichin, Chloromethamine, 2-Chloro-N-(2-chloroethyl)-N-methylethanamine；CAS号为55-86-7，EINECS号为200-120-5；分子式为C₅H₁₁Cl₂N，分子量为156.05。氮芥的结构式如下：

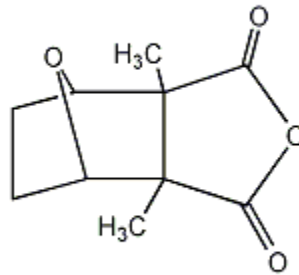


氮芥是最早用于临床并取得突出疗效的抗肿瘤药物，是一种高度活跃的化合物，在中性和弱碱性条件下，迅速与细胞中多种重要生物学成分发生烷化作用，影响细胞的分裂。氮芥属高毒类，是一种强起疱剂和局部刺激剂，能刺激皮肤毛发的生长。若盐酸氮芥水溶液滴到皮肤上迅速透皮吸收，会引起大疱红肿疼痛甚至组织坏死溃疡，严重的可以通过呼吸道吸收引起气道水肿和肺水肿。故我国化妆品卫生规范对育发类、防秃类、洗发类中的氮芥有严格限制，不得检出，并且规定了氮芥检测方法。

斑蝥素（cantharidin，CTD）存在于芫青科地胆属甲虫斑蝥（南方大斑蝥）*Mylabris phalerata* Pallas 或黄黑小斑蝥 *Mylabris cichorii* L. de 的全虫中，为一单萜过氧化物，斜方形白

色结晶。

据化工词典载,CTD 的中文别名为六氢-3 α ,7 α -二甲基-4,7-环氧异苯并呋喃-1,3-二酮;(3A α ,4 β ,7 β ,7A α)-六氢-3A,7A-二甲基-4,7-环氧异苯并呋喃-1,3-二酮;2,3-二甲基-7-氧杂-双环[2.2.1]庚烷-2,3-二羧酸酐;斑蝥酸酐;斑蝥酸酐;六氢-3 α ,7 α -二甲基-4,7-环氧异苯并呋喃-1,3-二酮;英文别名为 Dimethyl-3,6-epoxyperhydrophthalic anhydride; (1R,2S,3R,6S)-1,2-Dimethyl-3,6-epoxycyclohexane-1,2-dicarboxylic anhydride。结构式如下:



由于存在双酮结构,显示较强的脂溶性,在三氯甲烷、乙酸乙酯中的溶解性较大。

斑蝥素外用对皮肤有止痒改善局部神经营养及刺激毛根、促进毛发生长作用,但是毒性较大。微克量的斑蝥素就可使黏膜起水泡,在小白鼠腹膜内注射 LD₅₀ 为 1.0mg/Kg (Liand Y M.1992)。斑蝥素主要影响人、畜的胃肠、尿殖道、心脏和血管。实验表明,斑蝥素对多种实验动物肿瘤有一定抑制作用,尤其当腹水型肿瘤接种的瘤细胞数较少时,可见小鼠生存期延长。其作用机制可能是抑制蛋白质与核酸的合成。本品小剂量时对机体免疫功能无影响,较大剂量时则免疫功能下降,可作为皮肤发赤、发泡或生毛剂。临床用于治疗原发性肝癌、肺癌、食管癌、乳腺癌等,有一定近期疗效。不良反应为泌尿系统、胃肠系统的刺激症状,个别患者服用期间可出现阵发性心动过速、手指局部麻木感。停药后可减轻或消除。与化疗药物合并使用有预防白细胞下降作用。斑蝥素 30mg 可致人死亡。现已可用人工方法合成,用斑蝥素制备成的 N-羟基斑蝥胺(N-hydroxycantharidimide)试用于肝癌,有一定疗效。《化妆品卫生规范》(2007 版)规定,斑蝥素作为限用物质仅可用于育(生)发剂中,在化妆品中最大允许使用浓度 1%,且在儿童产品中禁用。化妆品标签上必须标印使用条件和注意事项:含斑蝥素;防止儿童抓拿;儿童勿用;避免接触眼睛。《化妆品安全技术规范》(2015 年版)已将之列为禁用组分。

育(生)发类化妆品一般有乳液、水剂、膏霜等类型。

3 研究现状

《化妆品卫生规范》（2007 版）规定了氮芥采用气相色谱法，但该方法样品处理步骤比较繁琐，酸化除杂、碱性提取再测定，这些步骤可能对目标物的损耗大，造成结果不准确；在复杂体系中，GC 测定的干扰峰很多；对疑似阳性样缺乏确证手段。国内类似文献较多，如陆军等^[6]直接采用三氯甲烷提取和溶解标准品，直接上气相色谱测定；许勇等^[5]采用环己烷直接提取，建立了 GC-MS 法进行测定。因此，本次修订参考上述文献进行了大量实验工作，优化了提取方法，并建立了 GC-MS 方法，作为氮芥的定性方法或定量方法。育(生)发类化妆品一般有乳液、水剂、膏霜等类型，针对这类复杂体系对疑似阳性样品缺乏确证手段等缺点，经过试验，本项目建立了 GC-MS 法作为定性（确证）和定量方法。

《化妆品卫生规范》（2007 版）规定了斑蝥素采用气相色谱法测定，但该方法存在着很多缺点，如三氯甲烷提取到的杂质较多，尤其是中药提取物中的生物碱成分多，严重干扰测定，导致 GC 测定的干扰峰很多；对疑似阳性样缺乏确证手段。国内类似文献较多，如孙艳平等^[3]采用固相萃取-气相色谱法测定擦癣药水中斑蝥素的含量，黄水兰等^[4]采用程序升温检测气相色谱测定祛膜止血乳膏中斑蝥素的含量，但都与《化妆品卫生规范》（2007 版）方法相似，存在着上述缺点。本实验针对育(生)发类化妆品多为乳液、水剂、膏霜的特点，及针对复杂体系缺乏有效的检测手段及原方法对疑似阳性样品缺乏确证手段等缺点，经过试验，建立了 GC-MS 法作为定性（确证）方法和定量方法。

4 项目完成情况

现已完成了新方法建立和验证工作，具体情况如下：

（1）在现有《化妆品卫生规范》（2007 版）氮芥、斑蝥素检测方法的基础上改进提取方法，采用直接在氯化钠饱和水溶液中采用三氯甲烷提取；新建立气相色谱-质谱法，以特征离子定性，以峰面积定量。本方法对氮芥的检出限为 0.03ng，定量下限为 0.10ng，若取 0.5g 样品，其方法检出限为 0.3 μ g/g，最低定量浓度为 1 μ g/g。斑蝥素的检出限为 0.1ng，定量下限为 0.3ng，若取 0.5g 样品，其方法检出浓度为 0.5 μ g/g，最低定量浓度为 1.5 μ g/g。高、中、低浓度的回收率都在 80-120%之间，满足分析检测要求。

（2）经 3 家检验机构验证，验证结果满足《化妆品及其原料中禁限用物质检测方法验证技术规范》相关要求。

现将方法修改前后进行比较如表 4.1。可见，经修改后，不仅前处理方法简单，两个组分可以同时测定，而且灵敏度也得以提高。

表 4.1 方法修改前后比较表

项目	旧方法		新方法	
	氮芥	斑蝥素	氮芥、斑蝥素	
预处理	酸性下除杂, 调中性后氯仿提取测定	直接氯仿提取测定	加盐, 调中性后氯仿提取测定	
测定方法	GC, 单点外标法	GC, 单点外标法	GC/MS, 标准曲线法	
检出限为	0.3ng	0.6ng	0.03ng	0.1ng
定量下限	1.0ng	2.0ng	0.10ng	0.3ng
方法检出限	0.3 μg/g	0.6 μg/g	0.3 μg/g	0.5 μg/g
最低定量浓度	1 μg/g	2 μg/g	1 μg/g	1.5 μg/g
取样量	5g	5g	0.5g	0.5g

5 方法研究

5.1 溶剂的选择

盐酸氮芥标准品易溶于水, 但文献表明氮芥易水解失活, 且在水中稳定性较差。试验中也曾尝试用环己烷作为标准品的溶解溶剂和前处理的提取溶剂, 但试验表明盐酸氮芥不能直接溶于环己烷, 如选择环己烷作为前处理的提取溶剂, 则还需另行选择其他溶剂做为标准品的溶解溶剂。经多次试验证实, 三氯甲烷有较好的溶解度和稳定性, 并且前处理较环己烷提取更加简化; 斑蝥素存在双酮结构, 有较强的脂溶性, 在三氯甲烷中有较好溶解性。因此选择三氯甲烷作为目标物的溶解溶剂和前处理的提取溶剂。

5.2 前处理过程中溶液 pH 的选择

考察样品溶液 pH 分别为 2、4、6 (未添加氢氧化钠或盐酸溶液调节的原样品溶液)、7、7.5、8、9、10 时, 本方法对样品中氮芥、斑蝥素提取效果的影响, 用提取回收率计算所得的结果来反映提取效果, 结果见表 5.2.1, 以 pH 值为横坐标, 提取回收率为纵坐标作图, 结果见图 5.2.1 和图 5.2.2。

表 5.2.1 溶液 pH 对氮芥、斑蝥素提取回收率的影响结果表

	氮芥				斑蝥			
	pH	加入量 μg	测得量 μg	回收率%	pH	加入量 μg	测得量 μg	回收率%
乳 剂	2	14.148	0.36	2.56	2	15.25	16.31	106.96
	4	14.148	16.09	113.70	4	15.25	16.63	109.07
	6	14.148	14.71	103.97	6	15.25	15.75	103.30
	7	14.148	14.16	100.06	7	15.25	16.90	110.82
	7.5	14.148	14.43	101.98	7.5	15.25	16.74	109.76

	8	14.148	12.50	88.32	8	15.25	15.76	103.31
	9	14.148	13.15	92.94	9	15.25	15.91	104.34
	10	14.148	12.97	91.70	10	15.25	15.99	104.86
水剂	2	14.148	0.36	2.56	2	15.25	16.53	108.40
	4	14.148	4.53	32.05	4	15.25	16.41	107.63
	6	14.148	13.75	97.21	6	15.25	15.89	104.18
	7	14.148	13.26	93.72	7	15.25	16.77	109.98
	7.5	14.148	13.75	97.20	7.5	15.25	17.20	112.78
	8	14.148	13.13	92.83	8	15.25	15.89	104.17
	9	14.148	11.91	84.15	9	15.25	15.78	103.45
	10	14.148	17.28	122.15	10	15.25	16.25	106.57
膏剂	2	14.148	0.36	2.56	2	15.25	16.63	109.07
	4	14.148	11.50	81.26	4	15.25	16.25	106.55
	6	14.148	13.79	97.48	6	15.25	15.65	102.64
	7	14.148	14.50	102.52	7	15.25	16.67	109.33
	7.5	14.148	8.32	58.82	7.5	15.25	16.77	109.99
	8	14.148	8.19	57.89	8	15.25	16.07	105.37
	9	14.148	7.57	53.50	9	15.25	16.44	107.81
	10	14.148	7.35	51.95	10	15.25	16.13	105.77

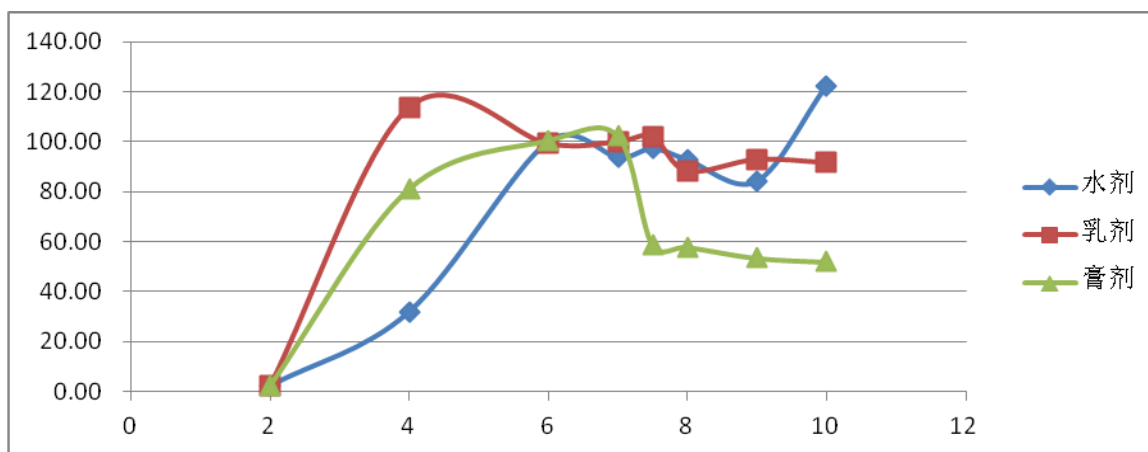


图 5.2.1 氮芥溶液 pH 对回收率的影响图

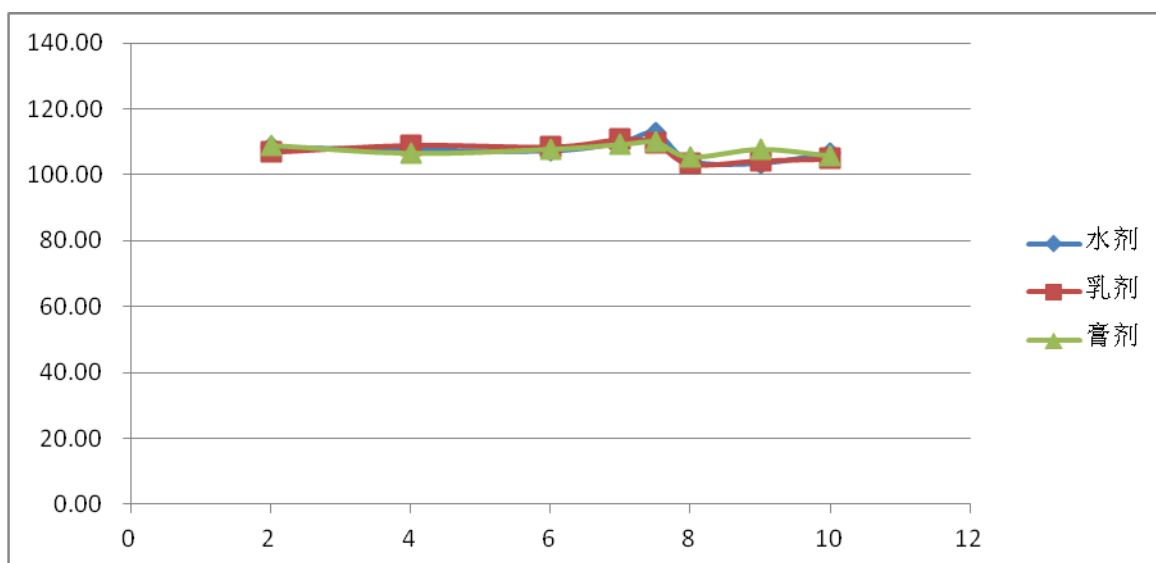


图 5.2.2 斑蝥素溶液 pH 对回收率的影响图

上图结果表明，不同 pH 对氮芥的提取影响较大，对斑蝥素提取影响忽略不计。根据以上溶液不同 pH 提取回收率的结果，确定方法中样品溶液的 pH 为 6~7。

5.3 考察样品含中药成分、去屑成分及洗发精类样品对提取方法的影响

取含中药成分的样品[含何首乌、女贞子、菟丝子、侧柏叶、苦参等，名称：XX 牌营养育发膏（7 号），批号：20140816]、含去屑成分洗发水[含吡硫翁锌、硫酸锌等成分,名称：XX 牌滋养防脱去屑洗发水（16 号），批号：20130528；含吡罗克酮乙醇胺盐成分，名称：酮康采乐（17 号），批号：FG236]及洗发精类样品[名称：XX 牌防脱洗发露（10 号），批号：20131102]，线性加标至与标曲同浓度，取精密加标至与标曲 S3 同浓度的样品计算提取回收率，其他步骤同标准正文。结果如下表所示：

表 5.3.1 不同样品氮芥加标线性浓度和定量离子色谱峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5
氮芥浓度 (μg/mL)	0.5895	1.179	2.9475	5.895	11.79
XX 牌营养育发膏	2265	6736	16794	35130	71869
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	3223	7395	16334	31738	65633
酮康采乐	2461	5883	13863	28665	60886
XX 牌防脱洗发露	3401	6750	17468	33805	66030

注：盐酸氮芥分子量 192.52，氮芥分子量 156.06

表 5.3.2 不同样品氮芥加标线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R
XX 牌营养育发膏	0.5895~11.79	$y = 4246.2x + 27.737$	0.9999
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	0.5895~11.79	$y = 5520x + 134.09$	0.9997
酮康采乐	0.5895~11.79	$y = 5194.2x - 919.5$	0.9995
XX 牌防脱洗发露	0.5895~11.79	$y = 5585.9x + 464.98$	0.9998

表 5.3.3 不同样品氮芥加标后氮芥的提取回收率

	加入量 μg	测得量	回收率%
XX 牌营养育发膏	14.148	13.491	95.41
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	14.148	13.134	92.82
酮康采乐	14.148	11.212	79.21
XX 牌防脱洗发露	14.148	14.015	99.13

表 5.3.4 不同样品斑蝥素加标线性浓度定量离子色谱峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5
斑蝥素浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.488	1.525	3.05	6.1	12.2
XX 牌营养育发膏	1955	6738	12766	26116	51768
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	1947	6104	11424	23118	46821
酮康采乐	1664	5577	10960	21689	46793
XX 牌防脱洗发露	2206	6792	13835	26616	53682

表 5.3.5 不同样品斑蝥素加标线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R
XX 牌营养育发膏	0.488~12.20	$y = 4246.2x + 27.737$	0.9999
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	0.488~12.20	$y = 3825.8x + 6.3078$	0.9999
酮康采乐	0.488~12.20	$y = 3841x - 610.73$	0.9993
XX 牌防脱洗发露	0.488~12.20	$y = 4383.3x + 144.8$	0.9999

表 5.3.6 不同样品斑蝥素加标后斑蝥素的提取回收率

	加入量 μg	测得量	回收率%
XX 牌营养育发膏	15.25	15.087	98.91
XX 牌滋养防脱去屑洗发水	15.25	13.420	88.02
酮康采乐	15.25	12.844	84.21
XX 牌防脱洗发露	15.25	16.414	107.60

结果表明在本方法条件下氮芥的检测响应值与样品中被测物质浓度在 0.5895~11.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性相关性良好($R \geq 0.99$), 提取回收率在 79.2%~99.1%之间; 斑蝥素的检测响应值与样品中被测物质浓度在 0.488~12.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性相关性良好($R \geq 0.99$), 提取回收率在 84.2%~107.6%之间。本方法适用于含中药成分样品、含去屑成分样品及洗

发精类样品。

5.4 各类样品基质干扰考察

分别选取各类样品共 20 批（见表 6.9），考察其样品基质对本方法目标物的干扰情况。结果表明，在目标物保留时间处，各样品基质对本方法目标物定性定量不存在显著干扰。本小节选取其中具有代表性的 4 批样品（即 5.3 节中的 4 批）给出基质对目标物无干扰图示（图 5.4.1-5.4.8）。

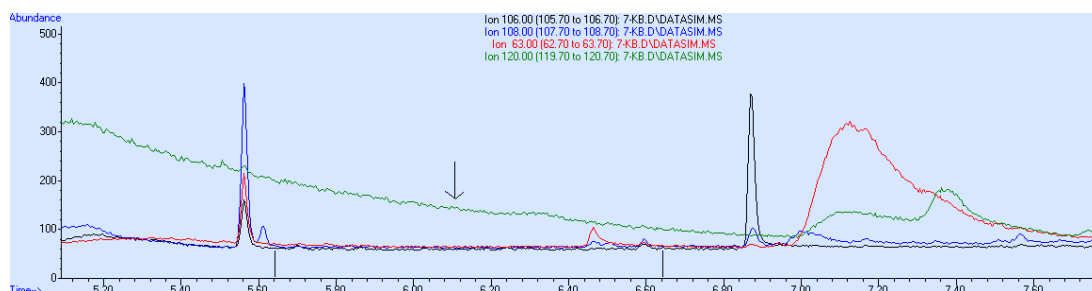


图 5.4.1 XX 牌营养育发膏（7 号）样品基质对氮芥无干扰图

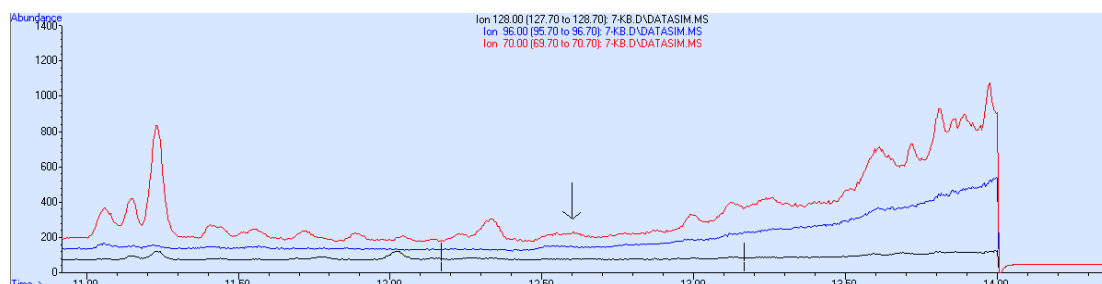


图 5.4.2 XX 牌营养育发膏（7 号）样品基质对斑蝥素无干扰图

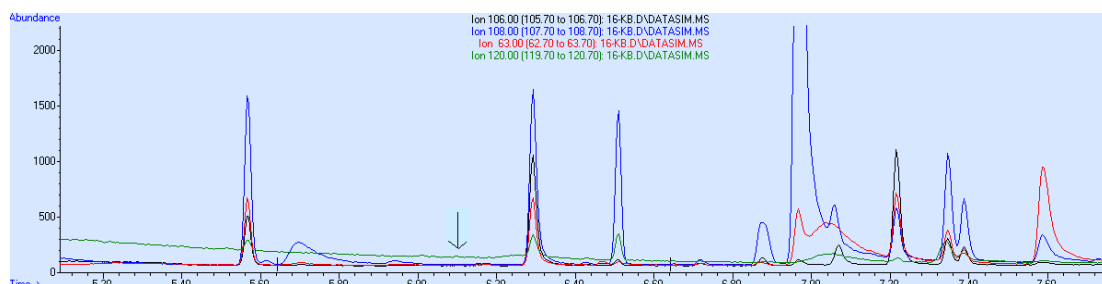


图 5.4.3 XX 牌滋养防脱去屑洗发水（16 号）样品基质对氮芥无干扰图

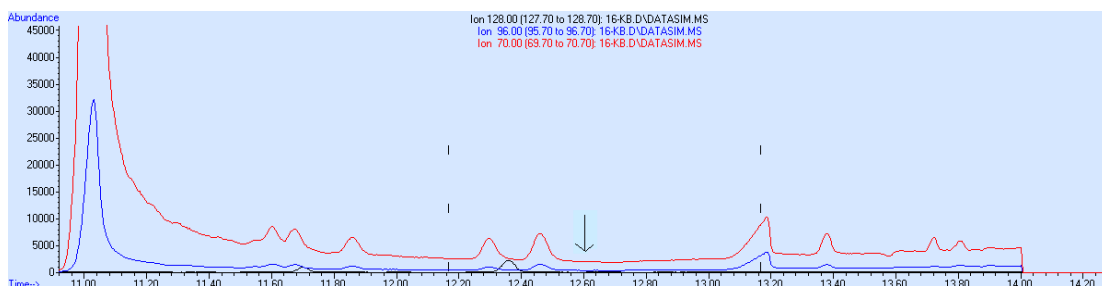


图 5.4.4 XX 牌滋养防脱去屑洗发水（16 号）样品基质对斑蝥素无干扰图

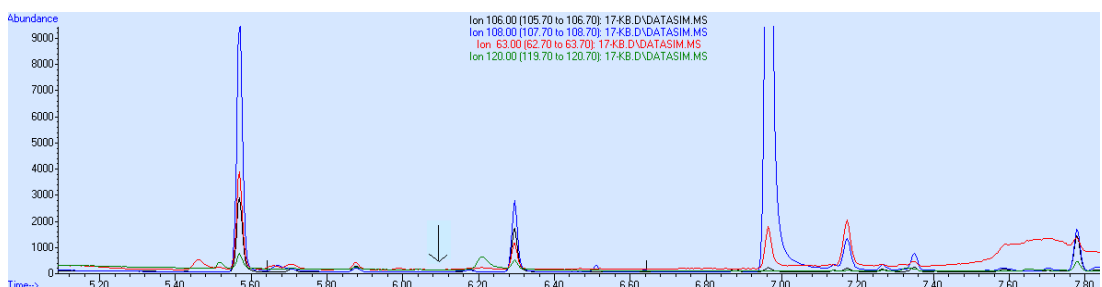


图 5.4.5 酮康采乐（17 号）样品基质对氮芥无干扰图

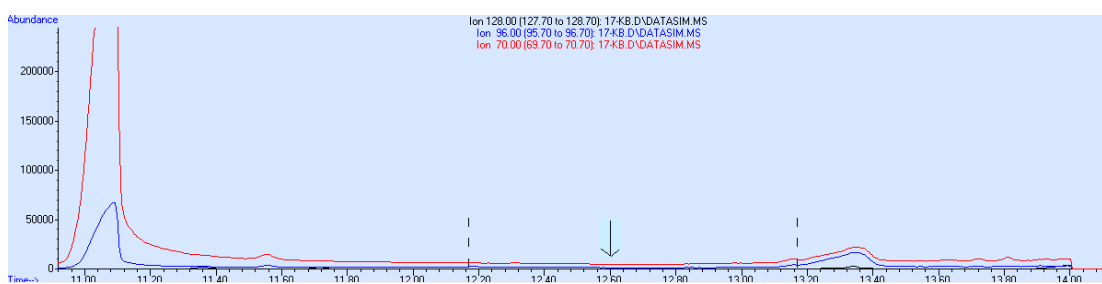


图 5.4.6 酮康采乐（17 号）样品基质对斑蝥素无干扰图

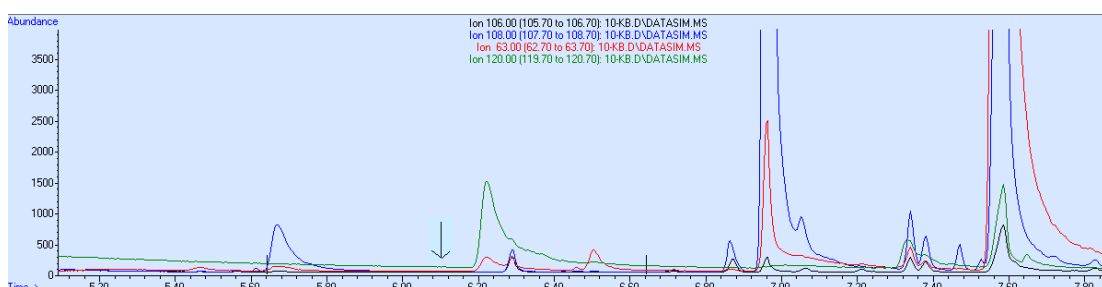


图 5.4.7 XX 牌防脱洗发露（10 号）样品基质对氮芥无干扰图

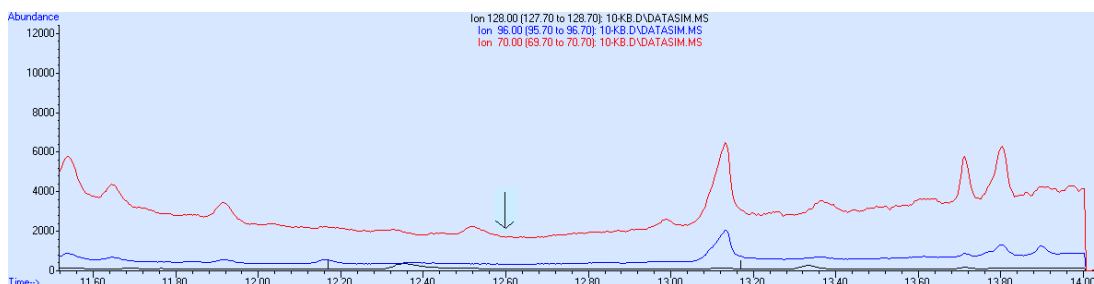


图 5.4.8 XX 牌防脱洗发露（10 号）样品基质对斑蝥素无干扰图

5.5 定量方式选择

原氮芥和斑蝥素的定量方法都采用单点外标法，操作起来不很方便，本项目考虑进行修订。实验中分别考察了乳剂、水剂和膏霜剂三种典型化妆品空白基质在低（S1）、中（S3）、高（S5）3 个标曲点浓度水平下，用单点法定量的被测物质的提取回收率，各平行测定 2 份，结果见表 5.5.1。结果表明，用单点法定量，氮芥的低、中、高浓度的提取回收率均在 91.8%~105.8%之间，斑蝥素的低、中、高浓度的提取回收率均在 108.9%~112.2%之间，与标准曲线法定量的回收率（参见 6.7-6.8）相当，两者可以互相替代。考虑到标准曲线法定量更简单直接，更方便适用于多批样品测定，因此选用标准曲线法作为本方法的定量方法。

表 5.5.1 三种剂型提取回收率

			加入量 μg	测得量	回收率%	均值	RSD%	
氮芥	乳剂	低浓度	1	2.9475	2.67	90.4	91.8	2.86
			2	2.9475	2.61	88.5		
		中浓度	1	14.148	13.46	95.1		
			2	14.148	13.42	94.9		
		高浓度	1	58.95	53.66	91.0		
			2	58.95	53.60	90.9		
	水剂	低浓度	1	2.9475	3.07	104.1	105.8	1.90
			2	2.9475	3.04	103.3		
		中浓度	1	14.148	15.32	108.3		
			2	14.148	15.19	107.4		
		高浓度	1	58.95	61.76	104.8		
			2	58.95	63.02	106.9		
膏剂	低浓度	1	2.9475	2.77	93.9	100.4	6.00	
		2	2.9475	2.76	93.6			
	中浓度	1	14.148	14.97	105.8			
		2	14.148	15.34	108.4			
	高浓度	1	58.95	58.94	100.0			
		2	58.95	59.43	100.8			
斑蝥素	乳剂	低浓度	1	2.44	2.68	110.0	108.9	1.51
			2	2.44	2.58	105.8		
		中浓度	1	15.25	16.82	110.3		
			2	15.25	16.66	109.2		

	高浓度	1	61	66.20	108.5					
		2	61	66.76	109.4					
	水剂	低浓度	1	2.44	2.71			111.0		
			2	2.44	2.74			112.4		
		中浓度	1	15.25	16.69			109.5	111.1	1.20
			2	15.25	17.13			112.3		
高浓度	1	61	66.84	109.6						
	2	61	68.26	111.9						
膏剂	低浓度	1	2.44	2.64	108.2					
		2	2.44	2.69	110.4					
	中浓度	1	15.25	17.22	112.9	112.2	2.24			
		2	15.25	17.20	112.8					
	高浓度	1	61	70.32	115.3					
		2	61	69.28	113.6					

6 实验室内部验证

通过上述研究建立了如正文的方法。根据《关于印发化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范的通知》（国食药监许[2010]455号）（以下简称《规范》），对所建立方法进行了实验室内部验证。

6.1 方法特异性

分别考察乳剂（12号某某牌固发去屑护发精华素）、水剂（13号某某牌浓发亮发精华液）、和膏剂（14号某某牌深层滋养育发发膜）三种典型剂型的化妆品样品和添加氮芥、斑蝥素后的色谱图。结果如图6.1-1至图6.1-6所示，表明三种典型剂型的化妆品基质中存在的物质对本方法目标检测物质（氮芥 6.1min，斑蝥素 12.6min 出峰）没有干扰。

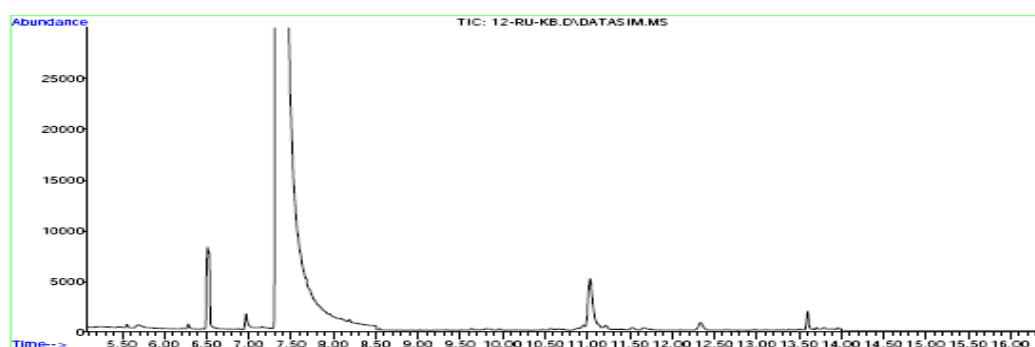


图 6.1.1 乳状（R）样品

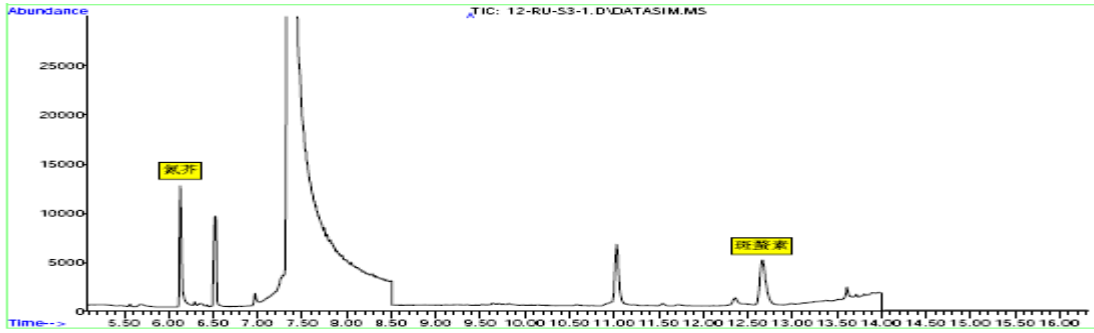


图 6.1.2 乳状 (R) 加标样品

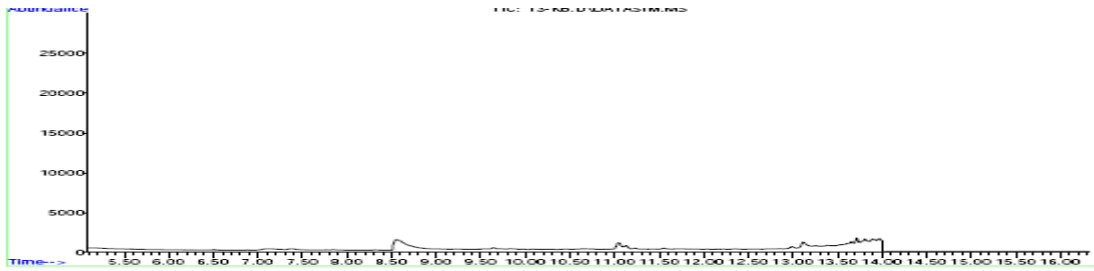


图 6.1.3 水状 (S) 样品

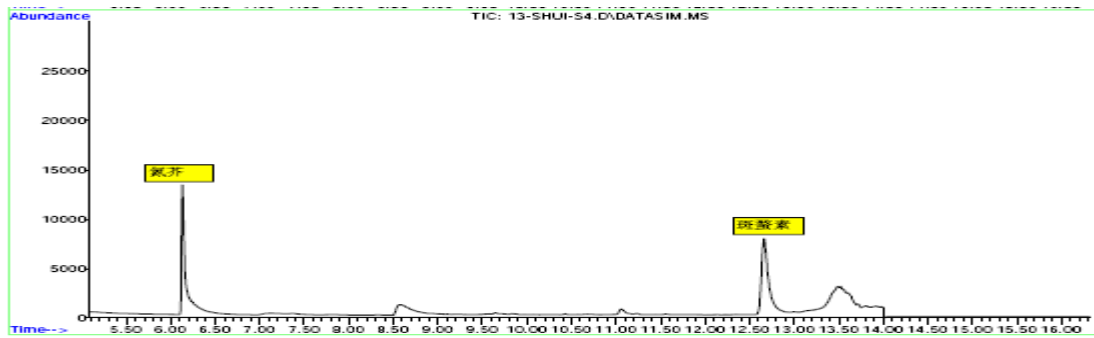


图 6.1.4 水状 (S) 加标样品

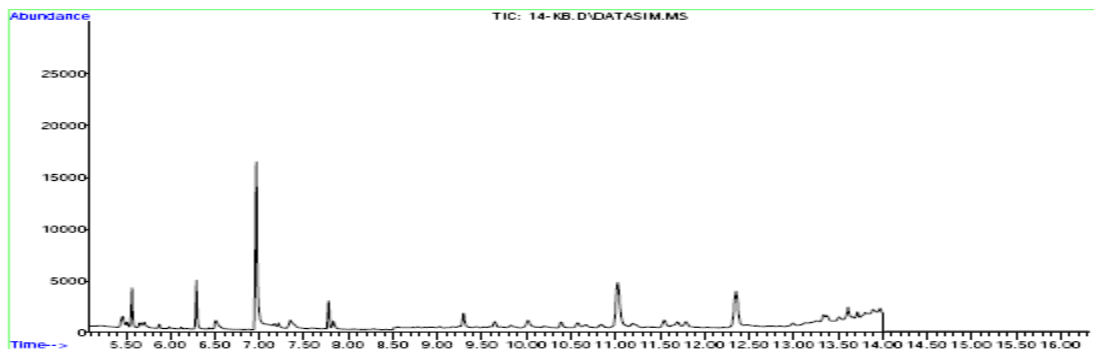


图 6.1.5 膏状 (G) 样品

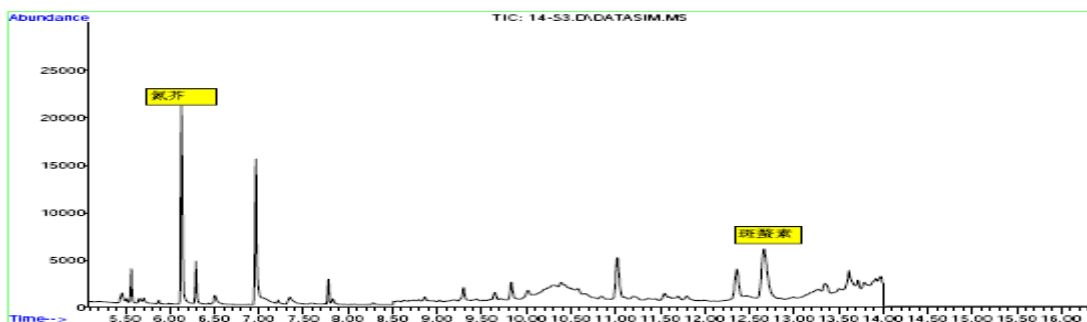


图 6.1.6 膏状 (G) 加标样品

6.2 线性及线性范围

在本方法条件下考察一定浓度范围内气相色谱质谱所测得的被测物质色谱峰面积对应浓度的线性相关性。分别称取盐酸氮芥对照品 0.01484g (来源 ALDRICH, 批号 02905CH, 含量 98%), 斑蝥素对照品 0.01237g(来源中检院, 批号 110783-201105, 含量 98.6%), 标准溶液照正文方法配制, 基质线性加标至与标曲同浓度, 其他步骤同样品处理。结果如表

6.2.1-6.2.4 所示。

结果表明在本方法条件下氮芥的检测响应值与样品中被测物质浓度在 0.5895~11.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性相关性良好($R\geq 0.99$), 斑蝥素的检测响应值与样品中被测物质浓度在 0.488~12.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性相关性良好($R\geq 0.99$)。本方法的线性相关性能够满足化妆品中被测物质测定的要求, 符合《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》要求。

表 6.2.1 氮芥标准溶液浓度、基质线性浓度和定量离子色谱峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5
氮芥浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	0.5895	1.179	2.9475	5.895	11.79
标准溶液	3374	7792	16989	37816	75289
乳剂	2744	4672	12743	26178	45908
水剂	2243	5364	11771	26201	48111
膏霜剂	3863	6933	17348	34274	70317

注: 盐酸氮芥分子量 192.52, 氮芥分子量 156.06

表 6.2.2 氮芥标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	线性方程	相关系数, R
标准溶液	0.5895~11.79	$y = 7380.2x - 1246.9$	0.9992
乳剂	0.5895~11.79	$y = 3901.1x + 971.49$	0.9972
水剂	0.5895~11.79	$y = 4107.3x + 336.3$	0.9986
膏霜剂	0.5895~11.79	$y = 5941.2x - 70.74$	0.9998

表 6.2.3 斑蝥素标准溶液浓度、基质线性浓度和定量离子色谱峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5
斑蝥素浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.488	1.525	3.05	6.1	12.2
标准溶液	2181	7086	14708	29244	59567
乳剂	1923	6177	12945	27390	48711
水剂	1849	6270	10682	21067	39299
膏霜剂	1949	6248	12417	24839	49572

注：S1、S2 为准确移取混合标准工作溶液 0.04mL、0.125mL 至 10mL 容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，摇匀而得。

表 6.2.4 斑蝥素标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R
标准溶液	0.488~12.20	$y = 4899.5x - 336.19$	0.9976
乳剂	0.488~12.20	$y = 4025x + 619.39$	0.9976
水剂	0.488~12.20	$y = 3167.1x + 1034.6$	0.9992
膏霜剂	0.488~12.20	$y = 4063.5x + 18.061$	1.0000

6.3 检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

将浓度为 $0.03\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液进样 $1.0\mu\text{L}$ ，测得氮芥的信噪比为 3.8，得到检出下限为 0.03ng ，将浓度为 $0.10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的被测物质标准溶液进样 $1.0\mu\text{L}$ ，测得氮芥的信噪比为 10.3，得到定量下限为 0.10ng 。本方法研究考察了乳剂、水剂、和膏霜剂三种典型化妆品剂型下被测物质的检出浓度和定量浓度。将浓度为 $0.50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液 $300\mu\text{L}$ 加入到 0.5g 基质中，按照样品处理方法操作，得到被测物质的检出浓度为 $0.3\mu\text{g}/\text{g}$ 。将浓度为 $0.50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液 1mL 加入到 0.5g 基质中，按照样品处理方法操作，得到被测物质的最低定量浓度为 $1\mu\text{g}/\text{g}$ 。

将浓度为 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液进样 $1.0\mu\text{L}$ ，测得斑蝥的信噪比为 3.9，得到检出下限为 0.05ng ，将浓度为 $0.15\mu\text{g}/\text{mL}$ 的被测物质标准溶液进样 $1.0\mu\text{L}$ ，测得氮芥的信噪比为 10.5，得到定量下限为 0.15ng 。本方法研究考察了乳剂、水剂、和膏霜剂三种典型化妆品剂型下被测物质的检出浓度和定量浓度。将浓度为 $3.34\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液 $75\mu\text{L}$ 加入到 0.5g 基质中，按照样品处理方法操作，得到被测物质的检出浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{g}$ 。将浓度为 $3.34\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液 $225\mu\text{L}$ 加入到 0.5g 基质中，按照样品处理方法操作，得到被测物质的最低定量浓度为

1.5 $\mu\text{g/g}$ 。

6.4 精密度

本方法研究考察了高、低标曲浓度共三种浓度下乳剂、水剂、膏霜剂三种体系下的日内精密度和日间精密度。

6.4.1 日内精密度

考察浓度为最低定量浓度，低浓度(标曲浓度 S1)，高浓度(标曲浓度 S5)下乳剂、水剂、膏霜剂 3 种体系下同一天内连续六次测定被测物质含量，结果见表 6.4.1.1-6.4.1.3。氮芥最低定量浓度相对标准偏差均小于 6%，低浓度相对标准偏差均小于 2%，高浓度相对标准偏差均小于 2%；斑蝥素最低定量浓度相对标准偏差均小于 3%，低浓度相对标准偏差均小于 3%，高浓度相对标准偏差均小于 2%，以上结果表明本方法的日内精密度良好。

表 6.4.1.1 三种剂型的最低定量浓度日内精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

	剂型	含量						均值	RSD%
		1	2	3	4	5	6		
氮芥	乳剂	0.286	0.275	0.277	0.275	0.270	0.274	0.276	0.501
	水剂	0.296	0.296	0.293	0.296	0.293	0.294	0.294	0.501
	膏剂	0.300	0.301	0.303	0.301	0.303	0.302	0.302	0.459
斑蝥素	乳剂	0.070	0.074	0.065	0.063	0.069	0.062	0.067	6.834
	水剂	0.226	0.226	0.227	0.234	0.228	0.227	0.228	1.293
	膏剂	0.173	0.171	0.173	0.175	0.170	0.170	0.172	1.272

表 6.4.1.2 三种剂型的低浓度日内精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

	剂型	含量						均值	RSD%
		1	2	3	4	5	6		
氮芥	乳剂	0.710	0.729	0.692	0.723	0.723	0.742	0.720	2.384
	水剂	0.781	0.781	0.769	0.791	0.788	0.784	0.782	0.996
	膏剂	0.975	0.985	0.965	0.969	0.972	0.979	0.974	0.722
斑蝥素	乳剂	0.557	0.551	0.545	0.556	0.569	0.595	0.562	3.195
	水剂	0.625	0.641	0.635	0.608	0.616	0.610	0.622	2.181
	膏剂	0.602	0.619	0.618	0.612	0.615	0.627	0.616	0.843

表 6.4.1.3 三种剂型的高浓度日内精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

	剂型	含量						均值	RSD%
		1	2	3	4	5	6		
氮芥	乳剂	22.070	21.715	21.991	22.593	22.487	22.233	22.181	1.470

	水剂	21.591	22.148	21.444	21.684	21.894	21.258	21.670	1.466
	膏剂	14.428	14.285	14.493	14.293	14.310	14.563	14.395	0.813
斑蝥素		1	2	3	4	5	6		
	乳剂	17.057	17.543	17.472	17.759	17.588	17.345	17.461	1.375
	水剂	21.971	23.022	22.313	22.531	22.988	22.112	22.490	1.612
	膏剂	17.235	17.239	17.334	17.158	17.177	17.704	17.308	1.158

6.4.2 日间精密度

考察最低定量浓度，低，高浓度下乳剂、水剂、膏霜剂等 3 种体系加标溶液在常温条件下每日连续进样 6 次取均值，连续三天测定被测物质含量，结果见表 6.4.2.1-6.4.2.3。斑蝥素的最低定量浓度相对标准偏差均小于 5%，低浓度相对标准偏差小于 6%，高浓度相对标准偏差小于 6%；氮芥的最低定量浓度相对标准偏差小于 15%，低浓度相对标准偏差小于 11%，高浓度相对标准偏差小于 14%，以上结果表明本方法的日间精密度良好，符合相关技术规范要求。

表 6.4.2.1 三种剂型的最低定量浓度日间精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
氮芥	1	0.286	0.256	0.262	0.296	0.240	0.244	0.300	0.291	0.277
	2	0.275	0.257	0.253	0.296	0.239	0.246	0.301	0.288	0.276
	3	0.277	0.253	0.263	0.293	0.241	0.242	0.303	0.282	0.276
	4	0.275	0.253	0.260	0.296	0.243	0.248	0.301	0.280	0.276
	5	0.270	0.252	0.261	0.293	0.242	0.249	0.303	0.274	0.276
	6	0.274	0.251	0.253	0.294	0.240	0.246	0.302	0.276	0.273
	平均值	0.276	0.254	0.259	0.294	0.241	0.246	0.302	0.282	0.276
	average	0.26			0.26			0.29		
RSD%	4.48			11.39			4.78			

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
斑蝥素	1	0.070	0.055	0.058	0.037	0.025	0.031	0.026	0.028	0.036
	2	0.074	0.075	0.067	0.038	0.026	0.030	0.023	0.029	0.020
	3	0.065	0.065	0.062	0.039	0.030	0.039	0.025	0.045	0.018
	4	0.063	0.063	0.068	0.047	0.017	0.035	0.027	0.032	0.033
	5	0.069	0.074	0.070	0.040	0.028	0.020	0.022	0.031	0.035
	6	0.062	0.079	0.064	0.038	0.020	0.017	0.022	0.025	0.040
	平均值	0.067	0.068	0.065	0.040	0.024	0.029	0.024	0.032	0.031
	average	0.07			0.03			0.03		
RSD%	2.85			26.10			13.87			

表 6.4.2.2 三种剂型的低浓度日间精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
氮芥	1	0.710	0.590	0.492	0.659	0.559	0.544	1.217	1.309	1.261
	2	0.729	0.569	0.542	0.659	0.584	0.521	1.233	1.256	1.224
	3	0.692	0.589	0.512	0.647	0.557	0.491	1.202	1.350	1.141
	4	0.723	0.588	0.505	0.670	0.563	0.495	1.209	1.375	1.170
	5	0.723	0.609	0.571	0.667	0.547	0.511	1.213	1.313	1.202
	6	0.742	0.597	0.596	0.663	0.566	0.514	1.223	1.444	1.197
	平均值	0.720	0.590	0.536	0.661	0.563	0.513	1.216	1.341	1.199
average		0.62			0.58			1.25		
RSD%		15.32			13.02			6.19		

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
斑蝥素	1	0.557	0.579	0.611	0.595	0.599	0.659	0.458	0.498	0.483
	2	0.551	0.582	0.645	0.607	0.606	0.633	0.476	0.492	0.469
	3	0.545	0.614	0.596	0.603	0.623	0.596	0.475	0.540	0.460
	4	0.556	0.611	0.615	0.582	0.592	0.611	0.468	0.540	0.459
	5	0.569	0.644	0.661	0.587	0.597	0.599	0.471	0.539	0.467
	6	0.595	0.631	0.664	0.583	0.604	0.601	0.484	0.576	0.465
	平均值	0.562	0.610	0.632	0.593	0.603	0.616	0.472	0.531	0.467
average		0.60			0.60			0.49		
RSD%		5.92			1.96			7.22		

表 6.4.2.3 三种剂型的高浓度日间精密度 ($\mu\text{g/ml}$)

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
氮芥	1	22.070	17.298	18.248	22.569	22.973	23.665	21.706	26.725	22.049
	2	21.715	18.612	18.647	23.155	23.501	23.560	21.488	25.768	20.113
	3	21.991	18.951	17.375	22.415	23.551	23.113	21.805	23.046	20.775
	4	22.593	16.787	16.482	22.668	23.887	23.141	21.501	22.357	20.514
	5	22.487	18.144	16.324	22.888	23.876	23.006	21.526	21.585	21.070
	6	22.233	18.454	17.043	22.219	23.369	23.746	21.911	21.958	20.462
	平均值	22.181	18.041	17.353	22.652	23.526	23.372	21.656	23.573	20.830
average		19.19			23.18			22.02		
RSD%		13.61			2.01			6.39		

		乳剂			水剂			膏剂		
		第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天	第一天	第二天	第三天
斑蝥素	1	17.057	15.753	18.114	17.391	17.155	17.915	17.250	20.542	17.424
	2	17.543	17.288	18.701	18.218	17.513	17.662	17.255	20.064	15.892
	3	17.472	17.497	17.466	17.660	17.217	17.469	17.350	18.305	16.522

4	17.759	15.457	16.447	17.832	17.777	17.564	17.173	17.630	16.358
5	17.588	16.760	16.309	18.191	17.717	17.236	17.192	17.115	16.741
6	17.345	17.138	17.379	17.503	17.291	17.940	17.724	17.263	16.268
平均值	17.461	16.649	17.403	17.799	17.445	17.631	17.324	18.487	16.534
average	17.17			17.62			17.45		
RSD%	2.64			1.01			5.63		

6.5 稳定性

6.5.1 日内稳定性

考察浓度为高浓度（标曲浓度 S5）、低浓度(标曲浓度 S1)共 2 种浓度下乳剂、水剂、膏霜剂 3 种体系下同一天内连续六次测定被测物质含量，结果见表 6.5.1.1、6.5.1.2。斑蝥素的低浓度（S1）的稳定性相对标准偏差均小于 4%，高浓度（S5）相对准偏差均小于 4%；氮芥的低浓度（S1）的稳定性相对标准偏差均小于 7%，高浓度（S5）相对准偏差均小于 4%。结果表明本方法的日内稳定性良好，显示氮芥、斑蝥素日内稳定。

表 6.5.1.1 三种剂型的低浓度日内稳定性

	剂型/ 时间 h	含量 (μg/ml)						均值	RSD%
		0	3	6	9	12	24		
氮芥	乳剂	0.861	0.776	0.784	0.789	0.702	0.725	0.773	7.208
	水剂	0.911	0.838	0.853	0.777	0.773	0.713	0.811	8.676
	膏剂	1.304	1.224	1.271	1.283	1.214	1.245	1.257	2.798
斑蝥素	乳剂	0.574	0.557	0.563	0.543	0.524	0.561	0.554	3.174
	水剂	0.608	0.584	0.582	0.570	0.578	0.577	0.583	2.251
	膏剂	0.525	0.472	0.488	0.488	0.459	0.455	0.481	5.323

表 6.5.1.2 三种剂型的高浓度日内稳定性

	剂型/ 时间 h	含量 (μg/ml)						均值	RSD%
		0	3	6	9	12	24		
氮芥	乳剂	24.584	23.701	24.531	23.873	23.031	22.753	23.745	3.171
	水剂	23.908	23.208	23.083	23.203	22.839	22.169	23.068	2.456
	膏剂	24.618	22.163	21.975	22.944	23.100	22.686	22.914	4.111
斑蝥素	乳剂	17.907	16.963	17.825	17.754	16.740	17.042	17.372	2.950
	水剂	18.260	16.748	17.452	17.735	17.472	17.254	17.487	2.870

6.5.2 日间稳定性

同日间精密度试验。

6.6 重复性

取乳剂、水剂、膏霜剂样品，精密称取 18 份（乳剂、水剂、膏霜剂各 6 份）0.5g 样品，精密加标至与标曲 S3 同浓度，其他步骤同样品处理。结果表 6.6，氮芥的重复性相对标准偏差均小 5%，斑蝥素的重复性相对标准偏差均小于 6%，结果表明本法重复性试验结果良好。

表 6.6 三种剂型的重复性

	含量 (μg/ml)						均值	RSD%	
	1	2	3	4	5	6			
	氮芥	乳剂	4.092	3.898	4.109	4.008			4.204
	水剂	3.890	3.577	3.733	3.963	3.616	3.798	3.763	4.016
	膏剂	5.261	5.423	5.224	5.643	5.830	5.414	5.466	4.243
	含量 (μg/ml)						均值	RSD%	
	1	2	3	4	5	6			
	斑蝥素	乳剂	3.877	3.838	4.003	3.839			3.968
	水剂	3.975	3.846	3.974	3.993	4.027	3.972	3.965	1.558
	膏剂	4.027	4.140	4.031	4.172	4.536	4.121	4.171	4.509

6.7 回收率

分别考察了乳剂、水剂和膏霜剂三种典型化妆品空白基质在低 (S1)、中 (S3)、高 (S5) 3 个标曲点浓度水平下被测物质的方法回收率和提取回收率，各平行测定 2 份，结果见表 6.7.1、6.7.2。结果表明，氮芥的低、中、高浓度的方法回收率均在 99%~111%之间，斑蝥素的低、中、高浓度的方法回收率均在 95%~101%之间。氮芥的低、中、高浓度的提取回收率均在 95%~109%之间，斑蝥素的低、中、高浓度的提取回收率均在 110%~114%之间，符合规定。

表 6.7.1 三种剂型方法回收率

			加入量 μg	测得量	回收率%	均值	RSD%	
			1	2	1			2
氮芥	乳剂	低浓度	1	2.948	2.77	93.86	99.6	7.0
			2	2.948	2.68	90.95		
		中浓度	1	14.15	15.09	106.64		
			2	14.15	15.42	108.98		
		高浓度	1	58.95	57.59	97.70		
			2	58.95	58.74	99.64		
	水剂	低浓度	1	2.948	3.98	134.88	111.0	16.3
			2	2.948	3.94	133.76		
		中浓度	1	14.15	13.92	98.39		
			2	14.15	14.08	99.50		
		高浓度	1	58.95	58.16	98.66		
			2	58.95	59.36	100.70		
膏剂	低浓度	1	2.948	2.79	94.81	99.5	4.06	
		2	2.948	2.79	94.56			
	中浓度	1	14.15	14.66	103.61			
		2	14.15	14.66	103.65			
	高浓度	1	58.95	59.24	100.49			
		2	58.95	59.24	100.49			

			2	58.95	58.82	99.78					
斑蝥素	乳剂	低浓度	1	2.44	2.21	90.60	95.5	6.1			
			2	2.44	2.10	85.92					
		中浓度	1	15.25	15.31	100.40					
			2	15.25	15.24	99.95					
		高浓度	1	61.00	59.74	97.94					
			2	61.00	59.99	98.34					
	水剂	低浓度	1	2.44	2.19	89.70	97.4	5.4			
			2	2.44	2.24	91.71					
		中浓度	1	15.25	15.23	99.87					
			2	15.25	15.61	102.37					
		高浓度	1	61.00	60.41	99.03					
			2	61.00	61.97	101.59					
		膏剂	低浓度	1	2.44	2.38			97.38	100.3	1.8
				2	2.44	2.51			103.02		
中浓度	1		15.25	15.26	100.04						
	2		15.25	15.35	100.62						
高浓度	1		61.00	60.97	99.96						
	2		61.00	61.37	100.60						

表 6.7.2 三种剂型提取回收率

			加入量 μg	测得量	回收率%	均值	RSD%	
氮芥	乳剂	低浓度	1	2.9475	2.97	100.60	95.9	3.64
			2	2.9475	2.92	99.06		
		中浓度	1	14.148	13.56	95.86		
			2	14.148	13.53	95.64		
		高浓度	1	58.95	54.32	92.15		
			2	58.95	54.26	92.05		
	水剂	低浓度	1	2.9475	3.29	111.45	108.7	1.95
			2	2.9475	3.27	110.83		
		中浓度	1	14.148	15.32	108.30		
			2	14.148	15.20	107.46		
		高浓度	1	58.95	62.40	105.85		
			2	58.95	63.65	107.97		
	膏剂	低浓度	1	2.9475	3.05	103.36	104.0	2.63
			2	2.9475	3.04	103.16		
		中浓度	1	14.148	14.99	105.98		
			2	14.148	15.34	108.42		
		高浓度	1	58.95	59.58	101.07		
			2	58.95	60.08	101.92		
斑蝥素	乳剂	低浓度	1	2.44	2.79	114.40	110.6	1.79
			2	2.44	2.70	110.55		
		中浓度	1	15.25	16.90	110.82		

	高浓度	2	15.25	16.74	109.76	112.8	2.46	
		1	61.00	66.31	108.71			
		2	61.00	66.87	109.63			
	水剂	低浓度	1	2.44	2.81			115.32
			2	2.44	2.85			116.61
		中浓度	1	15.25	16.77			109.98
2	15.25		17.20	112.78				
高浓度	1	61.00	66.95	109.76				
	2	61.00	68.37	112.08				
膏剂	低浓度	1	2.44	2.75	112.72	113.9	0.89	
		2	2.44	2.80	114.77			
	中浓度	1	15.25	17.29	113.40			
		2	15.25	17.27	113.26			
	高浓度	1	61.00	70.42	115.44			
		2	61.00	69.38	113.74			

6.8 最低定量浓度的方法回收率

分别考察了乳剂、水剂和膏霜剂三种典型化妆品空白基质最低定量浓度下的方法回收率, 结果见表 6.8。结果表明, 氮芥的回收率在 86%~111%之间, 斑蝥素的回收率在 83%~110%之间, 符合规定要求。

表 6.8 三种剂型最低定量浓度的方法回收率

		加入量 μg	测得量	回收率%	均值	RSD%	
氮芥	乳剂	1	0.5895	0.529	89.69	86.2	5.71
		2	0.5895	0.488	82.73		
	水剂	1	0.5895	0.635	107.73	107.9	0.27
		2	0.5895	0.638	108.15		
	膏剂	1	0.5895	0.653	110.75	110.4	0.46
		2	0.5895	0.649	110.03		
斑蝥素	乳剂	1	0.68625	0.588	85.72	85.1	1.06
		2	0.68628	0.580	84.45		
	水剂	1	0.68625	0.569	82.91	83.5	0.97
		2	0.68628	0.577	84.06		
	膏剂	1	0.68625	0.764	111.34	109.5	2.32
		2	0.68628	0.739	107.75		

6.9 实验样品检测分析

本项目检测了 20 批各剂型样品中的氮芥、斑蝥素, 结果见下表 6.9。为验证检验方法, 我们从中选取乳剂、水剂、膏霜剂各 1 批, 进行加标试验(名称分别为: 12 号 XX 牌固发去屑护发精华素, 批号 FL003H07;13 号 XX 牌浓发亮发精华液, 批号: ET131JA35; 14 号 XX 牌

深层滋养发膜，批号：2014A19335)，结果见表 6.2—6.8。试验结果表明，本方法样品前处理操作简便、回收率高、色谱峰重现性好、适合护发类化妆品中氮芥、斑蝥素含量的同时测定。

表 6.9 实验样品氮芥、斑蝥素检测结果

类型	编号	品名	氮芥	斑蝥素	批号	备注
乳剂	4	XX 牌防脱洗发液	未检出	未检出	20121108	
	9	XX 牌防脱洗发液	未检出	未检出	AL081GS02-赠品	
	10	XX 牌防脱洗发露	未检出	未检出	20131102	
	11	XX 牌防脱洗发露	未检出	未检出	EOXXR-2907	
	12	XX 牌固发去屑护发精华素	未检出	未检出	FL003H07	去屑成分
	16	XX 牌滋养防脱去屑洗发水	未检出	未检出	20130528	去屑成分
	17	酮康采乐	未检出	未检出	FG236	去屑成分
	18	XX 牌护发防脱洗发液	未检出	未检出	GF13B04	
	20	XX 牌固发去屑洗发露	未检出	未检出	(LB)81406253	
水剂	1	XX 牌毛囊滋养原液	未检出	未检出	BH39R22	
	5	XX 牌护发毛囊营养液	未检出	未检出	20150311	
	6	XX 牌护发精华露	未检出	未检出	20130131	
	13	XX 牌浓发亮发精华液	未检出	未检出	ET131JA35	
	19	XX 牌护发液	未检出	未检出	GE003B04	
	3	XX 牌乌密精华液	未检出	未检出	20131228	
膏剂	2	XX 牌乌发固发润发膏	未检出	未检出	DE005GS05	中药成分
	7	XX 牌营养护发膏	未检出	未检出	121216	中药成分
	8	XX 牌护发育发膏	未检出	未检出	AL081GS02	
	14	XX 牌深层滋养护发发膜	未检出	未检出	2014A19335	
	15	XX 牌营养护发膏	未检出	未检出	20140816	中药成分

备注：本方法中氮芥的检出限为 0.03ng，定量下限为 0.10ng；若取 0.5g 样品，其方法检出限为 0.3μg/g，最低定量浓度为 1μg/g；斑蝥素的检出限为 0.1ng，定量下限为 0.3ng。若取 0.5g 样品，其方法检出浓度为 0.5μg/g，最低定量浓度为 1.5μg/g。

7. 实验室间比对验证（外部实验室验证）

本方法在完成研究起草和实验室内验证工作后，分别委托三家（简称 C）进行外部实验室验证工作。

7.1 方法特异性

三家单位分别考察了乳剂、水剂和膏剂三种典型剂型的化妆品空白和添加氮芥、斑蝥素的色谱图和质谱图。结果表明三种典型剂型的化妆品基质中存在的物质对本方法目标检测物质没有干扰。

7.2 线性及线性范围

三家实验室分别考察了一定浓度范围内气相色谱-质谱测得的各被测物质定量离子峰面积对应浓度的线性相关性，结果见表 7.2.1-7.2.6。结果表明在本方法条件下氮芥、斑蝥素标准溶液和三种典型化妆品基质加标溶液的检测响应值在标曲浓度范围内线性相关性良好 ($R \geq 0.99$)。本方法的线性相关性能够满足化妆品中被测物质测定的要求，符合《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》要求。

表 7.2.1 A 实验室氮芥标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数, R
标准溶液	0.500~10.00	$y = 8969x + 76.26$	0.9995
乳剂	0.500~10.00	$y = 9103x + 176.8$	0.9996
水剂	0.500~10.00	$y = 8936x - 1287$	0.9992
膏霜剂	0.500~10.00	$y = 6831x + 294.1$	0.9994

表 7.2.2 B 实验室氮芥标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数, R^2
标准溶液	0.5048~10.10	$y = 6577.3x + 611.03$	0.9994
乳剂	0.5048~10.10	$y = 7737.0x - 133.9$	0.9995
水剂	0.5048~10.10	$y = 5965.7x + 94.9$	0.9992
膏霜剂	0.5048~10.10	$y = 8757.3x - 323.3$	0.9998

表 7.2.3 C 实验室氮芥标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数, R^2
标准溶液	0.548~16.435	$y = 424350x - 90318$	0.9995
乳剂	0.548~16.435	$y = 225227x + 69981$	0.9979

水剂	0.548~16.435	$y = 375240x + 16682$	0.9980
膏霜剂	0.548~16.435	$y = 330607x + 11948$	0.9992

表 7.2.4 A 实验室斑蝥素标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R^2
标准溶液	0.48~12.00	$y = 10080 + 799$	0.9997
乳剂	0.48~12.00	$y = 11120x - 444$	0.9999
水剂	0.48~12.00	$y = 9296x + 1346$	0.9997
膏霜剂	0.48~12.00	$y = 9429x + 1251$	0.9996

表 7.2.5 B 实验室斑蝥素标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R^2
标准溶液	0.4998~12.49	$y = 16437.7x - 9.12$	0.9998
乳剂	0.4998~12.49	$y = 15721.8x + 1650.7$	0.9988
水剂	0.4998~12.49	$y = 14160.8x + 1597.5$	0.9998
膏霜剂	0.4998~12.49	$y = 18061.4x + 1339.5$	0.9998

表 7.2.6 C 实验室斑蝥素标准溶液线性范围、基质线性范围和相关性

测定组分	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数, R^2
标准溶液	0.484~14.509	$y = 292218x - 2232.3$	0.9991
乳剂	0.484~14.509	$y = 125937x + 39367$	0.9972
水剂	0.484~14.509	$y = 341614x - 8775.1$	0.9982
膏霜剂	0.484~14.509	$y = 226765x + 27545$	0.9991

7.3 检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

三家实验室分别考察了本方法的检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度, 结果如表 7.3.1-7.3.2。结果表明, 三家实验室的检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度均能达到本方法规定的要求。

表 7.3.1 三家实验室氮芥检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

测定组分	检出限/ng	定量下限/ng	检出浓度/($\mu\text{g/g}$)	最低定量浓度/($\mu\text{g/g}$)
A 实验室	0.03	0.1	0.3	1
B 实验室	0.03	0.1	0.3	1
C 实验室	0.03	0.1	0.3	1

表 7.3.2 三家实验室斑蝥素检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

测定组分	检出限/ng	定量下限/ng	检出浓度/($\mu\text{g/g}$)	最低定量浓度/($\mu\text{g/g}$)
A 实验室	0.05	0.15	0.5	1.5
B 实验室	0.05	0.14	0.5	1.4
C 实验室	0.03	0.1	0.3	1

7.4 精密度

三家实验室分别考察了三种剂型最低定量浓度，低(标曲浓度 S1)，高(标曲浓度 S5)三种浓度供试品溶液的日内，日间精密度。日内精密度为同一天内连续六次测定被测物质含量，日间精密度为连续三天测定被测物质含量(每日连续进样 6 次取平均值)。结果见表 7.4.1-7.4.2，结果表明本方法的精密度良好。

表 7.4.1 三家实验室氮芥的最低定量浓度、低、高三种浓度的精密度(RSD/%)

	乳剂		水剂		膏剂	
	日内	日间	日内	日间	日内	日间
A 实验室	3.0-6.1	10.5-11.4	0.6-5.8	10.6-10.6	1.3-4.7	8.4-8.4
B 实验室	0.6-4.9	6.0-10.0	0.8-5.3	2.3-7.2	0.9-3.9	1.9-6.1
C 实验室	0.9-3.8	11.4-17.4	1.4-3.8	10.1-13.9	1.5-3.9	4.4-13.7

表 7.4.2 三家实验室斑蝥素的最低定量浓度、低、高三种浓度的精密度(RSD/%)

	乳剂		水剂		膏剂	
	日内	日间	日内	日间	日内	日间
A 实验室	0.8-6.3	9.8-10.0	0.7-5.7	7.1-7.2	1.0-2.4	9.9-10.8
B 实验室	0.7-5.2	5.8-11.3	1.0-5.6	5.9-10.1	0.8-2.2	2.1-2.4

C 实验室	3.0-5.5	12.6-14.5	2.6-4.5	8.6-17.6	2.4-5.3	8.8-14.4
-------	---------	-----------	---------	----------	---------	----------

7.5 重复性

三家实验室分别考察了取水剂、乳剂、膏霜剂样品，精密称取 18 份（水剂、乳剂、膏霜剂各 6 份）0.5g 样品，精密加标至与标曲 S3 同浓度，其他步骤同样品处理。结果如表 7.5.1-7.5.2，结果表明本法重复性试验结果良好。

表 7.5.1 三家实验室三种剂型氮芥的重复性 (RSD/%)

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	1.4	1.2	1.3
B 实验室	9.8	6.9	7.1
C 实验室	5.0	4.5	3.5

表 7.5.2 三家实验室三种剂型斑蝥素的重复性 (RSD/%)

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	1.5	0.5	0.5
B 实验室	9.1	5.2	6.3
C 实验室	2.6	2.8	5.1

7.6 稳定性

三家实验室考察了氮芥、斑蝥素在本方法条件下的稳定性。通过考察了乳剂、水剂和膏霜剂三种典型化妆品剂型高低两种浓度条件下的溶液在的稳定性，其结果参考 7.4，结果表明本方法中氮芥、斑蝥素的日内和日间稳定性良好。

7.7 回收率

三家实验室分别考察了分别考察了水剂、乳剂和膏霜剂三种典型化妆品空白基质在最低定量浓度，低、中、高浓度水平下被测物质的回收率，结果如下表 7.6.1-7.6.4。结果表明本法回收率基本符合要求。

表 7.6.1 三家实验室三种剂型氮芥提取回收率/%

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	84.4-88.0	83.0-101.2	103.5-106.8
B 实验室	93.5-112.1	87.4-92.4	97.7-114.0
C 实验室	84.5-99.5	83.9-100.5	85.3-100.2

表 7.6.2 三家实验室三种剂型氮芥方法回收率/%

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	90.3-113.2	102.2-114.8	100.5-109.4
B 实验室	95.9-102.5	97.2-115.3	85.6-96.2
C 实验室	90.6-107.3	92.9-109.0	90.7-109.8

表 7.6.3 三家实验室三种剂型斑蝥素提取回收率/%

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	70.5-107.0	97.8-100.7	95.5-99.1
B 实验室	100.3-117.5	88.5-108.1	103.5-112.3
C 实验室	85.3-107.9	89.7-97.8	88.7-106.7

注：A 实验室可能因操作的原因，乳剂低限的回收率稍偏低。

表 7.6.4 三家实验室三种剂型斑蝥素方法回收率/%

	乳剂	水剂	膏剂
A 实验室	96.2-108.1	93.8-108.7	92.1-109.5
B 实验室	99.6-113.6	96.3-108.9	86.9-112.4
C 实验室	93.5-109.2	96.8-108.4	90.7-107.0

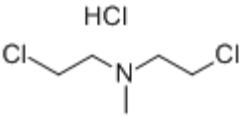
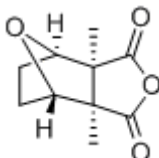
7.8 样品测定

三家实验室检测了各剂型样品中氮芥、斑蝥素的含有情况，均未发现阳性样品。为验证检验方法的效果，从中选取乳剂、水剂和膏霜剂各 1 批，进行加标试验，结果见 7.1-7.7。试验结果表明，本方法实验室间重现性良好，适合育发类化妆品中氮芥、斑蝥素含量的测定。

8 结论

经三家实验室验证，本方法符合《关于印发化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范的通知》（国食药监许[2010]455 号）验证技术规范要求，检测方法验证技术规范的主要技术指标均可以达到。

附表 氮芥、斑蝥素组分的基本信息

中文名称	氮芥	斑蝥素
英文名称	Chlormethine	Cantharidin
分子式	C ₅ H ₁₁ Cl ₂ N	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
分子量	156.05	196.2
CAS 号	51-75-2	56-25-7
中文化学名称	双(2-氯乙基)甲胺;N,N-二(2-氯乙基)甲胺	六氢-3a,7a-二甲基-4,7-环氧异苯并呋喃-1,3-二酮;(3A α ,4 β ,7 β ,7A α)-六氢-3A,7A-二甲基-4,7-环氧异苯并呋喃-1,3-二酮
英文化学名称	Bis-(2-chloroethyl)methylamine;chlormethine	4,7-Epoxyisobenzofuran-1,3-dione, hexahydro-3a,7a-dimethyl-, (3aR,4S,7R,7aS)-rel-(56-25-7)
结构式		

参考文献

- [1] 《化妆品卫生规范》(2007年版)。
- [2] 《关于印发化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范的通知》(国食药监许[2010]455号)
- [3] 许勇, 苗水, 郑征伟等, GC-MS 法检测化妆品中禁用物质氮芥的含量, 中国卫生检验杂志, 2012年11期
- [4] 陆军, 庞燕军, 赵晓东等, 化妆品中氮芥测定方法的探讨, 香料香精化妆品, 2011年第2期
- [5] 张剑峰, 高建, 刘静晶等, 气相色谱法测定化妆品中氮芥, 中国卫生工程学, 2010年第1期