附件6

化妆品中灰黄霉素等9种抗真菌类

禁用物质的检测方法

**1 适用范围**

本方法规定了采用液相色谱-串联质谱法测定化妆品中9种禁用物质：灰黄霉素（CAS号：126-07-8）、酮康唑（CAS号：65277-42-1）、克霉唑（CAS号：23593-75-1）、益康唑（CAS号：27220-47-9）、咪康唑（CAS号：22916-47-8）、氟康唑（CAS号：86386-73-4）、联苯苄唑（CAS号：60628-96-8）、环吡酮胺（CAS号：41621-49-2）、萘替芬（CAS号：65472-88-0）的检测方法。

本方法适用于化妆品中禁用物质：灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、益康唑、咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、环吡酮胺、萘替芬含量的测定。

**2 方法提要**

样品经过提取后（其中环吡酮胺的测定需要进行硫酸二甲酯衍生化处理），用液相色谱-串联质谱法测定，以多反应离子监测模式进行监测，采用特征离子丰度比进行定性，待测化合物峰面积定量，以标准曲线法计算含量。本方法的检出限、定量限和取样品0.5 g时的检出浓度、定量浓度见表1.

**表1　9种违禁成分的检出限和检出浓度**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 检出限（ng/mL） | 定量限（ng/mL） | 检出浓度(μg/g) | 定量浓度(μg/g) |
| 氟康唑 | 2.0 | 20 | 0.25 | 1.0 |
| 酮康唑 | 10 | 50 | 0.50 | 2.5 |
| 萘替芬 | 0.40 | 2.0 | 0.02 | 0.10 |
| 联苯苄唑 | 0.40 | 2.0 | 0.02 | 0.10 |
| 克霉唑 | 2.0 | 4.0 | 0.15 | 0.25 |
| 益康唑 | 2.0 | 20 | 0.15 | 1.0 |
| 咪康唑 | 2.0 | 4.0 | 0.15 | 0.25 |
| 灰黄霉素 | 4.0 | 10 | 0.25 | 0.50 |
| 环吡酮胺 | 2.0 | 10 | 0.15 | 0.50 |

**3 试剂和材料**

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为去离子水。

3.1 乙腈，色谱纯。

3.2 硫酸二甲酯，分析纯。

3.3 三乙胺，分析纯。

3.4 乙酸，色谱纯。

3.5 氯化钠，分析纯。

3.6 氢氧化钠，分析纯。

3.7 灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、益康唑、咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、环吡酮胺、萘替芬对照品（纯度大于97 %）。

3.8 饱和氯化钠溶液，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。

3.9 0.3 mmol/L 氢氧化钠溶液，称取 1.2 g 氢氧化钠，置于250 mL烧杯中，加入100 mL水，用玻璃棒搅拌至溶解，即得。

3.10 混合标准储备溶液[ρ（待测成分）= 1 mg/mL]：精密称取灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、益康唑、咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、环吡酮胺、萘替芬对照品（3.7）10 mg（精确至0. 1 mg）置于同一10 mL量瓶中，加乙腈（3.1）使溶解并定容至刻度，摇匀，即得质量浓度为1 mg/mL的混合标准储备溶液。

3.11 系列浓度标准工作溶液：用乙腈（3.1）稀释混合标准储备溶液，精密配制得质量浓度为10、25、50、100、300、500 μg /mL的系列浓度标准溶液。

**4 仪器**

4.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪。

4.2 分析天平：感量0.0001 g。

4.3 分析天平：感量0.00001 g。

4.4 超声波清洗仪。

4.5 离心机。

4.6 涡旋混合仪。

**5 测定步骤**

5.1未衍生化样品处理（用于测定除环吡酮胺外的8种禁用物质）

准确称取样品约0.5 g（精确至1 mg），置于25 mL比色管中，加入饱和氯化钠溶液（3.8）1mL，涡旋30s，加入乙腈（3.1）1mL，涡旋30s，加入乙腈（3.1）20 mL，涡旋30 s，超声提取30 min，涡旋30 s，加入乙腈（3.1）定容至刻度，4500 rpm离心5 min，取上清液经0.45 μm微孔滤膜过滤后，滤液作为未衍生化待测备用溶液，用于测定除环吡酮胺外的8种禁用物质。

5.2 衍生化样品处理（仅用于测定环吡酮胺）

精密吸取上述未衍生化待测备用溶液1 mL于玻璃试管中，加入0.3 mmol/L 氢氧化钠溶液（3.9）0.5 mL，而后加入50 μL 硫酸二甲酯（3.2），涡旋30 s，置于37 ℃水浴 15 min，最后加入50 μL三乙胺（3.3），涡旋30 s后，经0.45 μm微孔滤膜过滤，滤液作为衍生化待测备用溶液，仅用于测定环吡酮胺。

5.3 未衍生化系列浓度基质标准工作溶液制备

准确称取空白样品约0.5 g（精确至1 mg），置于25 mL比色管中，分别加入系列浓度标准工作溶液（3.11）50 μL，按照“5.1 样品处理”步骤进行前处理，即得质量浓度为1、2.5、5、10、30、50 μg /g的系列浓度基质标准曲线工作溶液，用于测定除环吡酮胺外的8种禁用物质（基质标准曲线采用的空白样品的性状应与待测化妆品基本一致）。

5.4衍生化系列浓度基质标准工作溶液制备

精密吸取上述未衍生化系列浓度基质标准工作溶液1 mL于玻璃试管中，加入0.3 mmol/L 氢氧化钠溶液（3.9）0.5 mL，而后加入50 μL 硫酸二甲酯，涡旋30 s，置于37 ℃水浴 15 min，最后加入50 μL三乙胺，涡旋30 s后，经0.45 μm微孔滤膜过滤后，即得质量浓度为1、2.5、5、10、30、50 μg /g的衍生化系列浓度基质标准曲线工作溶液，仅用于测定环吡酮胺。

5.5 液相色谱-三重四极杆质谱联用分析条件

5.5.1 色谱条件

色谱柱： 辛烷基硅烷键合硅胶色谱柱 (2.1×100mm, 3.5 μm)。

流动相：溶液A： 0.1%乙酸，溶液B：乙腈（含0.1%乙酸），梯度程序见表2；

**表2　流动相的梯度程序**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间（min） | 溶液A（%） | 溶液B（%） |
| 0 | 85 | 15 |
| 1 | 85 | 15 |
| 2 | 55 | 45 |
| 4 | 40 | 60 |
| 4.8 | 20 | 80 |
| 5 | 85 | 15 |
| 9 | 85 | 15 |

流速：0.4 mL/min；柱温：30 ℃；进样量：2 μL。

5.5.2 质谱参考条件

离子源： 电喷雾离子源（ESI源）；

监测模式： 正离子监测模式； 监测离子对及相关电压参数设定见表3

喷雾压力： 40 psi；

干燥气流速： 10 L/min；

干燥气温度： 350 ℃；

毛细管电压： 4000 V；

0 ~ 1.5min：不进入质谱仪分析, 1.5 ~ 9 min：进入质谱仪分析。

**表3　三重四极杆离子对及相关电压参数设定表**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 物质名称 | 母离子（m/z） | Frag.(V) | 子离子（m/z） | CE（V） |
| 1 | 灰黄霉素 | 353.0 | 130 | 165.0\* | 20 |
| 130 | 215.0 | 20 |
| 2 | 酮康唑 | 531.0 | 130 | 489.0\* | 50 |
| 130 | 255.0 | 40 |
| 3 | 克霉唑 | 277.0 | 110 | 165.0\* | 20 |
| 110 | 241.0 | 20 |
| 4 | 益康唑 | 381.0 | 130 | 125.0\* | 40 |
| 130 | 193.0 | 20 |
| 5 | 咪康唑 | 417.0 | 130 | 159.0\* | 40 |
| 130 | 161.0 | 30 |
| 6 | 氟康唑 | 307.0 | 130 | 238.0\* | 15 |
| 130 | 220.0 | 15 |
| 7 | 联苯苄唑 | 311.0 | 90 | 243.0\* | 35 |
| 90 | 165.0 | 10 |
| 8 | 环吡酮胺 | 222.2 | 110 | 136.1\* | 25 |
| 110 | 162.2 | 30 |
| 9 | 萘替芬 | 288.0 | 110 | 117.0\* | 25 |
| 110 | 141.0 | 15 |

\*：定量离子对。

5.6 定性判定

用液相色谱-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，被测禁用物质的质量色谱峰保留时间与标准溶液中对应物质的质量色谱峰保留时间一致；样品色谱图中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离子对相对丰度比的偏差不超过表4规定范围，则可以判断样品中存在对应的禁用物质。

**表4　定性确证时相对离子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% |

5.7 定量测定

5.7.1 未衍生化样品定量测定

在“5.5”项液相色谱-三重四极杆质谱联用分析条件下，用未衍生化系列浓度基质标准工作溶液（5.3）分别进样，以禁用物质的系列浓度为横坐标，禁用物质的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立基质标准曲线，其线性相关系数应大于0.99。取“5.1”项下处理得到的待测溶液进样，禁用物质的峰面积代入基质标准曲线，计算禁用物质的质量浓度，按“6”项下公式，计算样品中除环吡酮胺外8种禁用物质的质量分数。

5.7.2 衍生化样品定量测定

在“5.5”项液相色谱-三重四极杆质谱联用分析条件下，用衍生化系列浓度基质标准工作溶液（5.4）分别进样，以禁用物质的系列浓度为横坐标，禁用物质的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立基质标准曲线，其线性相关系数应大于0.99。取“5.2”项下处理得到的待测溶液进样，禁用物质的峰面积代入基质标准曲线，计算禁用物质的质量浓度，按“6”项下公式，计算样品中环吡酮胺的质量分数。

5.8 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 计算**

*w* = Df*ρ*

 式中：w—— 化妆品中禁用物质的质量分数，μg /g；

f —— 样品称量重量校正系数，0.5g/*m*（m —样品称量重量）；

ρ—— 代入回归方程计算得到的待测样液中禁用物质的质量浓度，μg/g；

D —— 稀释倍数（不稀释则为1）。

**7 回收率和精密度**

多家实验室验证低浓度的平均方法回收率为84.7%~113.5%，相对标准偏差小于14.9 %，中、高浓度的平均方法回收率为84.8%~115.1%，相对标准偏差小于13.0 %。

**8 色谱图**



**图1 未经过衍生化处理的混合对照品溶液的HPLC-MS/MS色谱图**

色谱峰：1．氟康唑；2．酮康唑；3．萘替芬； 4．联苯苄唑；5．克霉唑；6．益康唑；

7．灰黄霉素； 8．咪康唑。



**图2 衍生化后混合对照品溶液的HPLC-MS/MS色谱图**

色谱峰： 9．环吡酮胺。