

LC-MS/MS 测定化妆品中 63 种激素作业指导书 (SOP)

标准号：《化妆品安全技术规范（2015 年版）》第四章 第 2.34 项

■ 参考标准

本方法参照“国家药监局 2019 年 第 66 号文件”的通告：《化妆品中激素类成分的检测方法》作为第四章 第 2.34 项纳入《化妆品安全技术规范（2015 年版）》。

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

根据“国家药监局 2019 年 第 66 号文件”的通告中《化妆品中激素类成分的检测方法》要求，本方法对化妆品中 63 种激素类化合物含量进行检测，具体化合物参考附录 1。

2.2 方法使用范围

本方法适用于膏霜乳液类、液态水基类、液态油基类、凝胶类、面膜类等化妆品中 63 种激素类成分的定性与定量。

2.3 方法技术指标

对于 63 种激素化合物，上述标准规定的定量下限以及取样量为 0.2 g 时的检出浓度；本方法的线性范围见附录 1。

■ 方法原理

称取 0.2 g 样品，经乙腈超声提取、离心、过滤、上机分析。本方法使用 LC-MS/MS 检测，采用基质匹配曲线，外标法定量分析。

■ 仪器设备及辅助设备要求

4.1 基本设备

岛津 LCMS-8045，ESI 离子源；

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W；

离心机：Eppendorf Centrifuge 5810R

涡旋仪：IKA；

移液枪：1000 μ L，200 μ L，20 μ L；

超声波清洗器：深圳洁盟；

■ 试剂、耗材、标准品

5.1 试剂

水：GB/T 6682 规定的一级水；

乙腈：色谱纯（默克）；

正己烷：色谱纯（默克）；

5.2 耗材

离心管：50 mL、15 mL；

容量瓶：100、10 mL；

微孔过滤膜：疏水性滤膜，0.22 μ m；

注射器：1 mL；

5.3 标准物质：纯度不小于 95%；

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线的制作

6.1.1 单标储备液配制 (1000 mg/L)

分别称取单个激素标准品 10 mg (精确到 0.00001 g) 置于 10 mL 容量瓶中, 加乙腈使溶解并定容至刻度, 即得浓度为 1000 mg/L 单标储备液。于 -20°C 冰箱中保存。

6.1.2 混合标准中间溶液配制 (10 mg/L)

10 mg/L 63 种化合物混合标液: 用移液枪分别移去取浓度 1000 mg/L 单标 (6.1.1) 100 μ L 置于 10 mL 容量瓶中, 然后用乙腈定容。于 -20°C 冰箱中保存。

6.1.3 基质标准工作溶液的制备

选取空白乳液样本, 经过 6.3 样品前处理制备出空白样品溶液, 以此空白样本溶液做溶剂, 配制不同浓度的标准工作溶液, 浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、60.0 和 100.0 μ g/L (参考表 1), 用于建立基质匹配曲线 (具体化合物的线性范围如表 1 所示)。基质标准工作溶液是采用从高浓度到低浓度逐级稀释, 现用现配。

表 1 标准曲线的配置

基质标准工作溶液浓度 (g/L)	加入的混合标液溶液浓度 (g/L)	加入的混合标液体积 (L)	基质空白溶液的定容体积 (mL)
0.1	0.2	1000	2
0.2	0.5	800	2
0.5	1	1000	2
1.0	2	1000	2
2.0	5	800	2
5.0	10	1000	2
10.0	20	1000	2
20.0	60	667	2
60.0	100	1200	2
100.0	10000	20	2

6.1.4 质控标准储备溶液: 称取曲安奈德、卤美他松、哈西奈德、地塞米松、地塞米松醋酸酯、氟氢缩松、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、环索奈德、雌二醇、己烯雌酚标准品各约 10 mg (精确到 0.00001 g) 置于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈 (3.1) 溶解并定容至刻度, 作为质控标准储备液。置 -20°C 保存。对于质谱响应较弱的成分, 实验室可自行增加该成分作为质控标准物质, 以提高筛查准确性。

6.1.5 质控标准混合溶液: 分别量取质控标准储备溶液适量, 用 50% 乙腈溶液, 配制成浓度在定量下限附近的溶液。置 4°C 保存。

6.2 仪器设备条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack Velox C18 2.1 mm I.D. \times 100 mm L., 2.7 μ m

流动相: A 相 - 水; B 相 - 乙腈

流速: 0.45 mL/min

柱温: 40°C

进样体积: 5 μ L

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 25%, 时间程序见表 2。

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	泵	B.Conc	25
9.50	泵	B.Conc	38
10.50	泵	B.Conc	38
14.50	泵	B.Conc	60
15.00	泵	B.Conc	95
16.00	泵	B.Conc	95
16.10	泵	B.Conc	25
18.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI (+) 雾化气流速: 3.0 L/min
 加热气流速: 10.0 L/min 干燥气流速: 10.0 L/min
 接口温度: 300°C 加热模块温度: 400°C
 DL 温度: 250°C 碰撞气: 氦气
 MRM 参数: 见附录 2

6.3 样品前处理

6.3.1 膏霜乳液类、液态水基类、凝胶类、面膜类样品

称取样品 0.2 g (精确到 0.001g), 置于 10 mL 具塞塑料离心管中, 加入 2 mL 乙腈, 在涡旋混合仪上振荡 30s 至试样与提取溶剂混合均匀, 然后加入 8 mL 乙腈, 超声提取 20 min, 静置至室温, 以 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 mL 置于 10 mL 离心管, 再用 6 mL 水稀释, 然后经 0.22 μm 滤膜过滤至 1.5 mL 样品瓶, 备用。

6.3.2 液态油基类

称取样品 0.2 g (精确至 0.001g), 置于离心管中, 加入 2 mL 正己烷, 在涡旋混合仪上分散, 然后加入 70% 乙腈 3 mL, 涡旋振荡 2 min, 4000 r/min 离心 10 min, 吸取下层溶液至 10 mL 比色管中, 上层正己烷层用 70% 乙腈水 3 mL, 自“涡旋振荡 2 min, …”起, 重复上述步骤一次, 合并两次溶液, 加 50% 乙腈水定容至刻度, 滤过 (必要时用适量 50% 乙腈水溶液稀释, 稀释液经 0.22 μm 滤膜过滤), 滤液作为待测溶液。

6.4 加标试样

称取乳液样品 0.2 g, 添加 63 种激素标准溶液, 加标浓度在 0.015 μg/g-9 μg/g (加标浓度必须该化合物的线性范围以内), 以下参考 6.3 前处理方法。

6.5 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析, 若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围, 则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.6 计算和报告

6.6.1 定性分析

取供试品溶液与相应标准品溶液, 在相同试验条件下测定, 样品中如呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰, 被测组分的特征离子峰保留时间与标准溶液对应的保留时间一致, 且选择的定性离子的相对丰度比与相当浓度对照品溶液的定性离子的相对丰度比的最大偏差满不超过表 3 的规定, 则可以判断样品中存在对应的激素药物成分。

注: 如使用质控标准混合溶液, 应满足以下质控条件: ①各成分均检出相应的特征离子对, ②特征离子对信噪比 SN ≥ 7, ③保留时间相对偏差在 ±3% 内。当样品中检出疑似阳性成分时, 应随行相应的标准溶液进行确证。

表 3 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)	$k \geq 50\%$	$50\% > k \geq 20\%$	$20\% > k \geq 10\%$	$k \leq 10\%$
允许的最大偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

6.6.2 定量分析

取标准工作溶液依次测定，以待测组分的系列浓度为横坐标，待测组分的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立标准曲线，其线性相关系数应不小于 0.99。取供试品溶液进样，将对应的定量离子色谱峰面积代入公式计算样品中各组分的含量。

液相色谱—质谱测定结果可由计算机按照外标法自动计算，也可按照下式计算：

$$w = \frac{c \times V \times D}{m}$$

w — 化妆品中某激素类药物的质量分数，单位为 $\mu\text{g/g}$ ；

c — 供试品溶液中某激素类药物的质量浓度，单位为 $\mu\text{g/mL}$ ；

V — 样品定容体积，单位为 mL；

m — 样品称样量，单位为 g；

D — 稀释倍数（不稀释则为 1）

注：相同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 15%。

■ 质量控制

7.1 回收率和精密度

多家实验室验证定量下限浓度回收率为 72.7 ~ 122.1%，相对标准偏差小于 15% (n=6)，其他浓度回收率为 80.7 ~ 119.6%，相对标准偏差小于 11% (n=6)。

附录 1 63 种激素类成分标准规定的检出浓度和定量限、本方法的线性范围

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	标准的检出浓度 (µg/g)	标准的定量限 (ng/mL)	本方法的线性范围 (ng/mL)
1	曲安西龙	Triamcinolone	124-94-7	0.03	2	0.5~100
2	泼尼松龙	Prednisolone	50-24-8	0.03	2	0.2~20
3	泼尼松	Prednisone	53-03-2	0.03	2	0.2~20
4	异氟泼尼松	9-fluoroprednisolone	338-95-4	0.03	2	0.5~20
5	氢化可的松	Hydrocortisone	50-23-7	0.03	2	0.1~20
6	可的松	Cortisone	53-06-5	0.03	2	0.2~20
7	甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	83-43-2	0.03	2	0.1~20
8	倍他米松	Betamethasone	378-44-9	0.03	2	0.2~20
9	地塞米松	Dexamethasone	50-02-2	0.03	2	0.1~20
10	氟米松	Flumethasone	2135-17-3	0.03	2	0.1~20
11	倍氯米松	Beclomethasone	4419-39-0	0.03	2	2~100
12	曲安奈德	Triamcinolone acetonide	76-25-5	0.03	2	0.2~20
13	地索奈德	Desonide	638-94-8	0.03	2	0.1~20
14	氟尼缩松	Flunisolide	77326-96-6	0.03	2	0.1~20
15	氟轻松	Fluocinolone acetonide	67-73-2	0.03	2	0.1~20
16	曲安西龙双醋酸酯	Triamcinolone diacetate	67-78-7	0.03	2	0.1~20
17	氟氢缩松	Fludrocortide	1524-88-5	0.1	6	0.5~20
18	泼尼松龙醋酸酯	Prednisolone 21-acetate	52-21-1	0.03	2	0.5~20
19	氟米龙	Fluoromethalone	426-13-1	0.03	2	0.5~20
20	氢化可的松醋酸酯	Hydrocortisone 21-acetate	50-03-3	0.03	2	0.5~20
21	氟氢可的松醋酸酯	Fludrocortisone 21-acetate	514-36-3	0.03	2	0.5~20
22	地夫可特	Deflazacort	14484-47-0	0.03	2	0.1~20
23	泼尼松醋酸酯	Prednisone 21-acetate	125-10-0	0.03	2	0.2~20
24	可的松醋酸酯	Cortisone 21-acetate	50-04-4	0.03	2	0.2~20
25	卤美他松	Halometasone	50629-82-8	0.1	6	1~20
26	甲基泼尼松龙醋酸酯	Methylprednisolone 21-acetate	53-36-1	0.03	2	0.2~20
27	倍他米松醋酸酯	Betamethasone 21-acetate	987-24-6	0.03	2	0.5~60
28	睾酮	Testosterone	58-22-0	0.03	2	0.2~20
29	地塞米松醋酸酯	Dexamethasone 21-acetate	1177-87-3	0.03	2	0.5~20
30	布地奈德	Budesonide	51333-22-3	0.03	2	0.2~20
31	氢化可的松丁酸酯	Hydrocortisone 17-butyrate	13609-67-1	0.03	2	0.2~10
32	孕三烯酮	Gestrinone	16320-04-0	0.03	2	0.1~20
33	氟米龙醋酸酯	Fluorometholone 17-acetate	3801-06-7	0.03	2	0.1~10
34	甲基睾丸酮	Methyltestosterone	58-18-4	0.03	2	0.1~10
35	氢化可的松戊酸酯	Hydrocortisone 17-valerate	57524-89-7	0.03	2	0.2~20
36	曲安奈德醋酸酯	Triamcinolone acetonide acetate	3870-07-3	0.03	2	0.1~10
37	二氟拉松双醋酸酯	Diflorasone diacetate	33564-31-7	0.03	2	0.1~10
38	氟轻松醋酸酯	Fluocinonide	356-12-7	0.03	2	0.1~10

39	炔诺孕酮	Norgestrel	6533-00-2	0.03	2	0.2~20
40	倍他米松戊酸酯	Betamethasone 17-valerate	2152-44-5	0.03	2	0.1~10
41	哈西奈德	Halcinonide	3093-35-4	0.1	6	0.5~20
42	泼尼卡酯	Prednicarbate	73771-04-7	0.03	2	0.1~20
43	氯替泼诺	Loteprednol etabonate	82034-46-6	0.03	2	0.1~10
44	阿氯米松双丙酸酯	Alclomethasone dipropionate	66734-13-2	0.03	2	0.2~10
45	安西奈德	Amcinonide	51022-69-6	0.03	2	0.5~10
46	卤倍他索丙酸酯	Halobetasol Propionate	66852-54-8	0.03	2	0.2~10
47	氯倍他索丙酸酯	Clobetasol 17-propionate	25122-46-7	0.03	2	0.1~5
48	氟替卡松丙酸酯	Fluticasone propionate	80474-14-2	0.03	2	0.2~10
49	莫米他松糠酸酯	Mometasone furoate	83919-23-7	0.03	2	0.2~10
50	醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	595-33-5	0.03	2	0.1~10
51	醋酸氯地孕酮	Chlormadinone acetate	302-22-7	0.03	2	0.1~10
52	倍他米松双丙酸酯	Betamethasone dipropionate	5593-20-4	0.03	2	0.2~10
53	黄体酮	Progesterone	57-83-0	0.03	2	0.2~10
54	醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9	0.03	2	0.1~10
55	倍氯米松双丙酸酯	Beclmetasone dipropionate	5534-09-8	0.03	2	0.2~10
56	双氟可龙戊酸酯	Diflucortolone valerate	59198-70-8	0.03	2	0.2~10
57	氯倍他松丁酸酯	Clobetasone 17-butyrate	25122-57-0	0.03	2	0.5~20
58	己酸羟孕酮	Hydroxyprogesterone caproate	630-56-8	0.03	2	0.2~20
59	环索奈德	Ciclesonide	126544-47-6	0.03	2	1~100
60	雌三醇	Estriol	50-27-1	0.1	6	1~60
61	雌二醇	Estradiol	50-28-2	0.1	6	2~100
62	雌酮	Estrone	53-16-7	0.1	6	0.5~60
63	己烯雌酚	Diethylstilbestrol	56-53-1	0.03	2	0.5~20

附录 2 63 种化合物的 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE (V)	Q3Pre Bias(V)
1	曲安西龙	Triamcinolone	395.15	357.20*	-21	-14	-16
				225.15	-21	-20	-23
2	泼尼松龙	Prednisolone	361.15	343.25*	-19	-12	-15
				147.15	-19	-24	-13
3	泼尼松	Prednisone	359.20	341.20*	-19	-12	-15
				147.20	-19	-24	-14
4	异氟泼尼松	9-fluoroprednisolone	379.20	359.25*	-20	-9	-24
				341.20	-20	-12	-23
5	氢化可的松	Hydrocortisone	363.20	121.20*	-18	-24	-22
				105.15	-13	-46	-18
6	可的松	Cortisone	361.15	163.25*	-19	-23	-15
				121.20	-19	-30	-11
7	甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	375.20	357.25*	-20	-11	-23
				161.20	-20	-20	-15
8	倍他米松	Betamethasone	393.20	355.25*	-27	-13	-23
				147.15	-14	-26	-25
				373.20	-20	-9	-12
9	地塞米松	Dexamethasone	393.20	355.25*	-20	-13	-16
				147.15	-14	-10	-25
				373.25	-19	-25	-27
10	氟米松	Flumethasone	411.15	253.20*	-22	-17	-26
				121.15	-22	-35	-21
11	倍氯米松	Beclomethasone	409.15	391.20*	-22	-12	-18
				279.20	-22	-19	-12
				147.20	-22	-29	-26
12	曲安奈德	Triamcinolone acetonide	435.15	415.25*	-23	-11	-19
				339.20	-23	-15	-15
				397.25	-23	-16	-18
13	地索奈德	Desonide	417.20	399.30*	-22	-13	-18
				225.15	-22	-25	-22
				323.25	-22	-14	-22
14	氟尼缩松	Flunisolide	435.15	321.20*	-16	-14	-20
				397.20	-30	-11	-18
				339.20	-30	-14	-15
15	氟轻松	Fluocinolone acetonide	453.15	121.20*	-23	-34	-21
				337.20	-23	-15	-15
16	曲安西龙双醋酸酯	Triamcinolone diacetate	479.15	441.15*	-25	-12	-21
				321.20	-25	-17	-14
17	氟氢缩松	Fludrocortide	437.20	361.20*	-23	-19	-16
				285.15	-23	-25	-12

				147.20*	-21	-25	-28
18	泼尼松龙醋酸酯	Prednisolone 21-acetate	403.20	307.20	-21	-14	-13
				385.25	-22	-11	-17
19	氟米龙	Fluorometholone	377.20	279.30*	-12	-17	-18
				321.30	-12	-14	-14
20	氢化可的松醋酸酯	Hydrocortisone 21-acetate	405.20	309.25*	-12	-18	-19
				121.15	-23	-28	-11
21	氟氢可的松醋酸酯	Fludrocortisone 21-acetate	423.20	239.30*	-23	-25	-10
				121.10	-23	-33	-17
22	地夫可特	Deflazacort	442.20	142.20*	-24	-35	-13
				124.10	-24	-47	-11
23	泼尼松醋酸酯	Prednisone 21-acetate	401.15	295.20*	-21	-16	-13
				147.15	-21	-14	-20
24	可的松醋酸酯	Cortisone 21-acetate	403.20	163.20*	-21	-26	-15
				343.20	-21	-20	-23
25	卤美他松	Halometasone	445.10	155.10*	-23	-32	-25
				287.15	-23	-15	-18
26	甲基泼尼松龙醋酸酯	Methylprednisolone 21-acetate	417.20	399.25*	-22	-11	-18
				253.30	-22	-22	-26
				309.20*	-23	-14	-13
27	倍他米松醋酸酯	Betamethasone 21-acetate	435.20	337.20	-23	-14	-13
				415.25	-23	-9	-19
28	睾酮	Testosterone	289.15	97.00*	-14	-23	-17
				109.05	-14	-24	-17
				309.25*	-13	-14	-14
29	地塞米松醋酸酯	Dexamethasone 21-acetate	435.20	337.25	-23	-13	-15
				415.25	-13	-10	-19
30	布地奈德	Budesonide	431.20	413.25*	-23	-12	-19
				147.20	-23	-30	-14
31	氢化可的松丁酸酯	Hydrocortisone 17-butyrate	433.20	345.25*	-23	-13	-22
				121.15	-13	-28	-11
32	孕三烯酮	Gestrinone	309.10	241.20*	-16	-23	-25
				199.15	-16	-33	-19
33	氟米龙醋酸酯	Fluorometholone 17-acetate	419.20	279.25*	-22	-16	-18
				321.25	-22	-14	-14
34	甲基睾丸酮	Methyltestosterone	303.20	109.10*	-16	-27	-17
				97.10	-16	-26	-16
35	氢化可的松戊酸酯	Hydrocortisone 17-valerate	447.25	345.30*	-14	-13	-15
				121.20	-24	-25	-11
				339.15*	-26	-16	-15
36	曲安奈德醋酸酯	Triamcinolone acetonide acetate	477.20	321.20	-25	-19	-10
				457.20	-15	-10	-21

37	二氟拉松双醋酸酯	Diflorasone diacetate	495.15	317.15* 279.20	-26 -26	-14 -16	-14 -12
38	氟轻松醋酸酯	Fluocinonide	495.15	337.15* 121.15	-26 -26	-18 -41	-15 -11
39	炔诺孕酮	Norgestrel	313.20	109.15* 245.25	-16 -17	-27 -18	-10 -15
40	倍他米松戊酸酯	Betamethasone 17-valerate	477.20	355.20* 279.20	-25 -25	-12 -18	-16 -18
41	哈西奈德	Halcinonide	455.15	105.20* 121.20	-24 -24	-53 -45	-21 -19
42	泼尼卡酯	Prednicarbate	489.30	381.20* 115.10	-26 -26	-12 -15	-17 -19
43	氯替泼诺	Loteprednol etabonate	467.15	265.25* 359.20	-24 -24	-21 -13	-17 -16
44	阿氯米松双丙酸酯	Alclometasone dipropionate	521.20	301.20* 279.20	-28 -28	-21 -19	-19 -10
45	安西奈德	Amcinonide	503.20	339.15* 321.20	-26 -26	-17 -20	-15 -14
46	卤倍他索丙酸酯	Halobetasol Propionate	485.15	391.05* 353.15	-25 -25	-13 -16	-18 -16
47	氯倍他索丙酸酯	Clobetasol 17-propionate	467.15	373.20* 355.25	-25 -24	-12 -15	-17 -16
48	氟替卡松丙酸酯	Fluticasone propionate	501.15	313.25* 293.20	-26 -26	-15 -18	-20 -30
49	莫米他松糠酸酯	Mometasone furoate	521.10	503.15* 263.25	-28 -28	-13 -25	-24 -27
50	醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	385.25	325.25* 267.25	-20 -20	-15 -18	-14 -17
51	醋酸氯地孕酮	Chlormadinone acetate	405.15	309.20* 267.20	-21 -21	-17 -22	-19 -16
52	倍他米松双丙酸酯	Betamethasone dipropionate	505.20	319.20* 411.25 279.20	-26 -26 -26	-16 -12 -19	-20 -19 -18
53	黄体酮	Progesterone	315.25	97.15* 109.15	-17 -17	-23 -26	-17 -10
54	醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone 17-acetate	387.20	327.25* 123.15	-20 -20	-15 -29	-14 -11
55	倍氯米松双丙酸酯	Beclmetasone dipropionate	521.20	503.20* 319.20	-28 -28	-13 -17	-24 -14
56	双氟可龙戊酸酯	Diflucortolone valerate	479.25	375.25* 439.25	-25 -25	-14 -13	-17 -20

57	氯倍他松丁酸酯	Clobetasone 17-butyrate	479.20	343.15*	-15	-17	-23
				279.15	-15	-18	-18
58	己酸羟孕酮	Hydroxyprogesterone caproate	429.25	313.30*	-22	-15	-21
				271.25	-22	-21	-17
59	环索奈德	Ciclesonide	541.30	523.30*	-28	-13	-24
				323.20	-28	-18	-14
60	雌二醇	Estriol	271.25	183.10*	13	39	19
				145.15	13	38	29
61	雌三醇	Estradiol	287.20	143.10*	14	54	14
				171.20	13	37	17
62	雌酮	Estrone	269.25	145.10*	13	36	27
				183.20	13	35	12
63	己烯雌酚	Diethylstilbestrol	267.20	251.15*	13	24	17
				222.10	13	34	23

岛津应用云

