

LC-MS/MS 测定化妆品中对苯二胺等 32 种染发成分的作业指导书 (SOP)

标准号：《化妆品安全技术规范（2015 年版）》第四章 第 7.2 项

■ 参考标准

本方法参照“国家药监局 2021 年 第 17 号文件”的通告：《化妆品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》作为第四章 第 7.2 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《化妆品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》要求，本方法是定性确证方法，当化妆品中 32 种组分在同一色谱条件下未实现完全分离，如检出结果和化妆品标签成分不一致，需采用本法确证结果。32 种化合物参考附录 1。

2.2 方法使用范围

本方法适用于染发类化妆品中对苯二胺等 32 种组分定性分析。

2.3 方法技术指标

对于 32 种组分，上述标准规定的确证方法中，取样量为 0.5 g，稀释倍数为 10 mL 时，氢醌的检出浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ ，其余各组分的检出浓度为 0.5 $\mu\text{g/g}$ 。本方法的线性范围见附录 1。

■ 方法原理

称取 0.5 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。

本方法是以正离子模式、负离子模式分两次进样；相关 LCMSMS 色谱图参考附录 3。液相分析方法及其色谱图参考附录 4。

■ 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 μL ，200 μL ，20 μL ；

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）；

无水乙醇：色谱纯（默克）；

乙酸铵：质谱纯（Sigma）；

乙酸：质谱纯（Sigma）；

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 μm；
移液器：1 mL；

5.3 标准物质：纯度不小于 95%；

色谱柱：Shim-pack Scepter C18 2.1 mm I.D.× 100 mm L., 3 μm (P/N: 227-31014-05, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

■ 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 冰箱中避光保存一个月。

6.1.2 混合标准中间溶液配制 (10 mg/L)

10 mg/L 32 种化合物混合标液：用移液枪分别移取浓度 1000 mg/L 单标 (6.1.1) 100 μL 置于 10 mL 容量瓶中，然后用乙腈定容。于 10°C 冰箱中避光保存一周

6.1.3 标准工作溶液的配制

以乙腈:水 (1:1) 做溶剂，配制不同浓度的校准曲线溶液，浓度分别为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 mg/L (以 p- 苯二胺计)。采用从高浓度到低浓度逐级稀释，现用现配。

表 1 标准工作溶液的配制

标准工作溶液浓度 (mg/L)	加入的混合标准溶液浓度 (mg/L)	加入的混合标准溶液体积 (mL)	定容体积 (mL)
0.02	0.05	0.8	2
0.05	0.1	1.0	2
0.1	0.2	1.0	2
0.2	0.5	0.8	2
0.5	1.0	1.0	2
1.0	2.0	1.0	2
2.0	10.0	0.4	2

6.2 仪器设备条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Scepter C18 2.1 mm I.D.× 100 mm L., 3 μm

流动相：A 相 -5mmol/L 乙酸铵水溶液 (正离子模式)，5mmol/L 乙酸水溶液 (负离子模式)；

B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样体积：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，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	5
11.00	泵	B.Conc	20
16.00	泵	B.Conc	70
17.00	泵	B.Conc	95
19.00	泵	B.Conc	95
19.10	泵	B.Conc	5
23	控制器	Stop	

注：如需提高检测灵敏度，在满足分离条件的情况下，可将正离子模式改为乙酸水溶液作为流动相。

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：氩气
 MRM 参数：见附录 2

6.3 样品前处理

称取样品 0.5 g (精确到 0.001 g) 于 10 mL 具塞比色管中，加无水乙醇 + 水 (1+1) 的混合溶液至 10 mL 刻度，涡旋 1min，冰浴超声提取 15 min。如为浑浊溶液，可取适量离心 (5000 rpm) 5 min，取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，滤液作为待测溶液，并于 48 小时内完成检测。

6.4 加标试样

本方法称取染发剂样品 0.5 g，添加一定量的 32 种组分标准溶液，参考 6.3 前处理方法制备。

注：加标浓度必须该化合物的线性范围以内。

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

用液相色谱 - 三重四级杆串联质谱仪进行定性，如果样品中待测组分的色谱峰保留时间与浓度相近的标准工作溶液一致 (变化范围在 ±2.5% 之内)，并且在扣除背景后样品的质谱图中，所选择的监测离子均出现，且所选择的离子对相对丰度与标准工作溶液的离子对相对丰度相一致，相对丰度偏差符合表 3 要求，则可判断样品中存在该待测组分。

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	±20%	±25%	±30%	±50%

6.6.2 定量分析

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。

$$\omega = \frac{D \times \rho \times V}{m \times 10^6} \times 100$$

式中： ω ——化妆品中对苯二胺等 32 种组分的质量分数，%；

ρ ——从标准曲线上得到待测组分的质量浓度，mg/L；

V ——样品定容体积，mL；

m ——样品取样量，g；

D ——稀释倍数（不稀释则取 1）。

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

■ 质量控制

7.1 回收率、精密度和线性

本方法的基质加标回收率范围在 50.4%-110.1% 之间，相对标准偏差在 0.14 %-11.85%（n=3）；建立标准曲线，其相关系数在 0.9981~0.9999 之间，曲线各浓度点的准确度在 81.7%~112.7% 之间。

附录1 32种成分标准规定液相方法的检出浓度和定量限、本方法的线性范围

序号	中文名称	CAS号	标准的检出浓度 (μg/g)	本方法的线性范围 (mg/mL)
1	对苯二胺	106-50-3	0.5	0.05~1.0
2	对氨基苯酚	123-30-8	0.5	0.05~1.0
3	甲苯-2,5-二胺硫酸盐	615-50-9	0.5	0.05~0.5
4	间氨基苯酚	591-27-5	0.5	0.02~1.0
5	邻苯二胺	95-54-5	0.5	0.05~1.0
6	2-氯对苯二胺硫酸盐	61702-44-1	0.5	0.05~1.0
7	邻氨基苯酚	95-55-6	0.5	0.02~1.0
8	间苯二酚	108-46-3	0.5	0.1~1.0
9	2-硝基对苯二胺	5307-14-2	0.5	0.02~1.0
10	甲苯-3,4-二胺	496-72-0	0.5	0.1~1.0
11	4-氨基-2-羟基甲苯	2835-95-2	0.5	0.02~1.0
12	2-甲基间苯二酚	608-25-3	0.5	0.1~2.0
13	6-氨基间甲酚	2835-98-5	0.5	0.05~1.0
14	苯基甲基吡唑啉酮	89-25-8	0.5	0.05~1.0
15	N,N-二乙基甲苯-2,5-二胺盐酸盐	2051-79-8	0.5	0.1~1.0
16	4-氨基-3-硝基苯酚	610-81-1	0.5	0.05~2.0
17	间苯二胺	108-45-2	0.5	0.02~0.5
18	2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐	66422-95-5	0.5	0.02~0.2
19	氢醌	123-31-9	5	50~1000
20	4-氨基间甲酚	2835-99-6	0.5	0.02~1.0
21	2-氨基-3-羟基吡啶	16867-03-1	0.5	0.05~1.0
22	N,N-双(2-羟乙基)对苯二胺硫酸盐	54381-16-7	0.5	0.05~1.0
23	对甲基氨基苯酚硫酸盐	55-55-0	0.5	0.05~1.0
24	4-硝基邻苯二胺	99-56-9	0.5	0.1~1.0
25	2,6-二氨基吡啶	141-86-6	0.5	0.05~0.5
26	N,N-二乙基对苯二胺硫酸盐	6283-63-2	0.5	0.1~1.0
27	6-羟基吲哚	2380-86-1	0.5	0.1~1.0
28	4-氯间苯二酚	95-88-5	0.5	0.05~2.0
29	2,7-萘二酚	582-17-2	0.5	0.02~1.0
30	N-苯基对苯二胺	101-54-2	0.5	0.05~0.5
31	1,5-萘二酚	83-56-7	0.5	0.1~2.0
32	1-萘酚	90-15-3	0.5	0.05~1.0

附录2 32种化合物的MRM参数

No	中文名称	模式	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE (V)	Q3Pre Bias(V)
1	p- 苯二胺	+	109.10	65.10*	-12	-24	-25
				92.10	-12	-17	-18
2	p- 氨基苯酚	+	110.10	65.10*	-12	-22	-24
				93.05	-12	-18	-17
				39.10	-12	-31	-14
3	甲苯 -2,5- 二胺硫酸盐	+	123.10	108.10*	-13	-19	-19
				77.05	-13	-30	-13
4	m- 氨基苯酚	+	110.05	65.10*	-12	-23	-25
				93.10	-12	-18	-17
				39.10	-12	-33	-13
5	o- 苯二胺	+	109.10	92.05	-12	-18	-16
				39.10	-12	-37	-13
				65.10*	-12	-24	-24
6	2- 氯 -p- 苯二胺硫酸盐	+	143.00	108.10*	-15	-18	-18
				80.10	-16	-26	-14
7	o- 氨基苯酚	+	110.05	65.05*	-12	-24	-24
				92.10	-12	-17	-16
				39.10	-12	-35	-14
8	间苯二酚	+	109.05	65.10*	13	14	12
				41.05	13	22	16
9	2- 硝基 -p- 苯二胺	+	154.05	119.05*	-17	-16	-21
				136.10	-17	-13	-12
10	甲苯 -3,4- 二胺	+	123.05	77.10*	-13	-29	-28
				106.05	-13	-19	-19
11	4- 氨基 -2- 羟基甲苯	+	124.10	109.05*	-14	-21	-18
				77.05	-14	-26	-30
12	2- 甲基雷琐辛	-	123.05	55.00*	14	23	22
				79.00	14	14	14
13	6- 氨基 -m- 甲酚	+	124.10	77.10*	-14	-27	-29
				106.10	-14	-19	-18
14	苯基甲基吡唑啉酮	+	175.05	133.10*	-12	-17	-23
				65.05	-12	-30	-24
15	N,N- 二乙基甲苯 -2,5- 二胺 HCl	+	179.10	150.15*	-20	-16	-28
				135.10	-20	-26	-23
16	4- 氨基 -3- 硝基苯酚	-	153.05	123.00*	17	13	22
				122.00	18	18	23
				46.00	17	40	18

				92.10*	-12	-19	-16
17	m- 苯二胺	+	109.05	65.10	-12	-25	-25
				39.10	-12	-38	-14
18	2,4- 二氨基苯氧基乙醇 HCl	+	169.10	124.10*	-12	-17	-21
				108.10	-12	-21	-10
19	氢醌	-	109.00	108.00	13	10	13
				81.00	13	14	13
			108.00	108.00*	0	0	0
20	4- 氨基 -m- 甲酚	+	124.10	109.05*	-14	-21	-18
				77.10	-14	-25	-28
21	2- 氨基 -3- 羟基吡啶	+	111.05	94.05*	-12	-22	-16
				66.10	-12	-24	-25
22	N,N- 双 (2- 羟乙基)-p- 苯二胺硫酸盐	+	197.15	121.10*	-22	-26	-21
				152.10	-21	-16	-14
23	p- 甲基氨基苯酚硫酸盐	+	124.10	109.05*	-14	-18	-19
				80.05	-14	-32	-13
24	4- 硝基 -o- 苯二胺	+	154.05	107.10*	-11	-22	-18
				137.05	-17	-16	-23
25	2,6- 二氨基吡啶	+	110.05	66.10*	-12	-25	-26
				93.05	-12	-19	-17
26	N,N- 二乙基 -p- 苯二胺硫酸盐	+	165.10	121.10*	-18	-26	-20
				136.10	-12	-16	-22
27	6- 羟基吡啶	+	134.10	107.05*	-15	-22	-18
				77.10	-15	-32	-13
28	4- 氯雷琐辛	-	143.00	79.00*	16	17	17
				106.95	16	14	11
29	2,7- 萘二酚	-	159.05	130.10*	19	26	13
				102.05	19	28	18
30	N- 苯基 -p- 苯二胺	+	185.10	108.10*	-13	-23	-18
				80.10	-13	-51	-29
31	1,5- 萘二酚	-	159.05	115.05*	18	21	12
				131.10	18	23	23
32	1- 萘酚	-	143.05	115.00*	16	26	20
				41.05	17	30	17

* 定量离子对

附录 3 32 种化合物的 MRM 色谱图

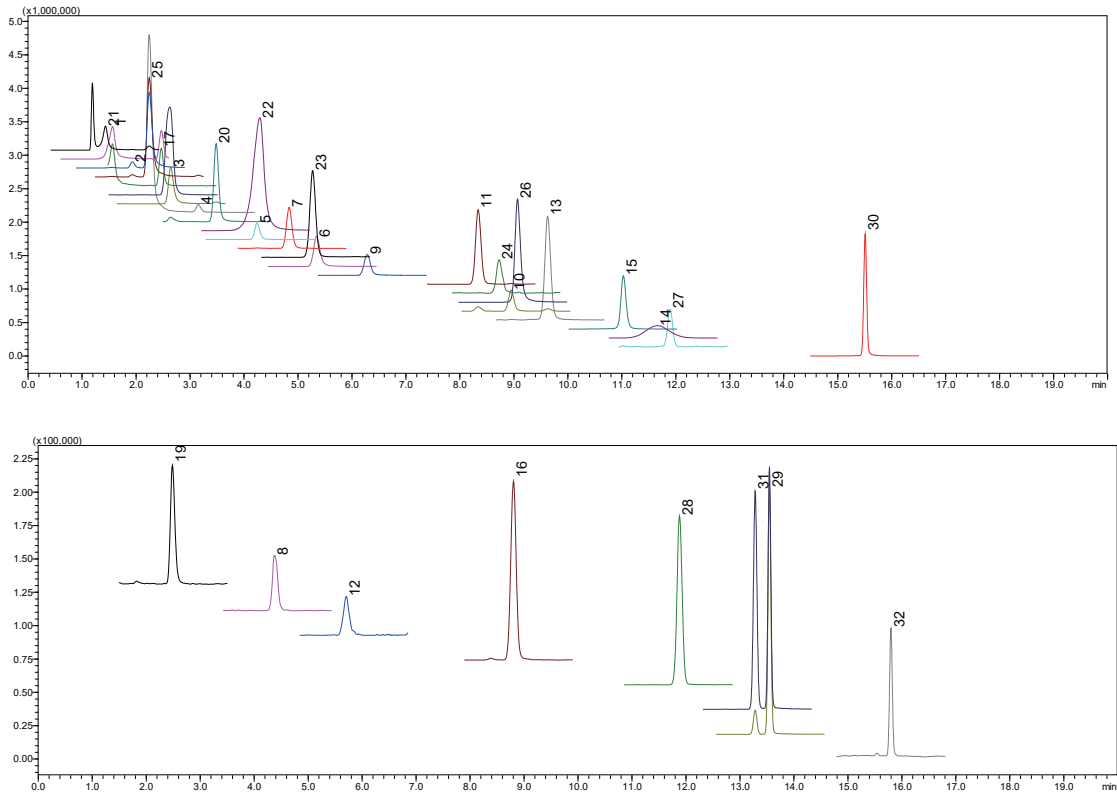


图 1 32 种染发组分标准溶液 MRM 色谱图 (0.02 mg/L, 峰 ID 号同表 2; 上图是正模式, 下图是负模式)

附录4 32种化合物的液相分析方法

参考标准规定，分两组测试：第一组为20种化合物组分，第二组为12种化合物

1 仪器条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 4.6 mm×250 mm，5μm

流动相（一组）：A相 - 20 mM 磷酸二氢钾 (PH7.5) B相 - 甲醇 C相 - 乙腈

流动相（二组）：A 20mM 磷酸二氢钾 (PH7.5) B 甲醇

流速：1 mL/min，柱温：25 度， 检测波长：280nm

进样体积：5 μL

洗脱程序：梯度洗脱，

第一组梯度程序

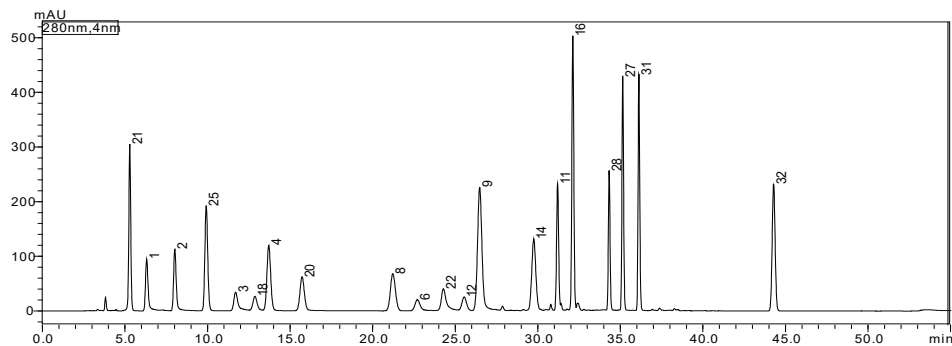
Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	96	2	2
15	96	2	2
22	90	5	5
35	50	10	40
50	50	10	40
50.1	96	2	2
55	96	2	2

第二组梯度程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	92	8
8	92	8
35	50	50
45	50	50
45.1	92	8
50	92	8

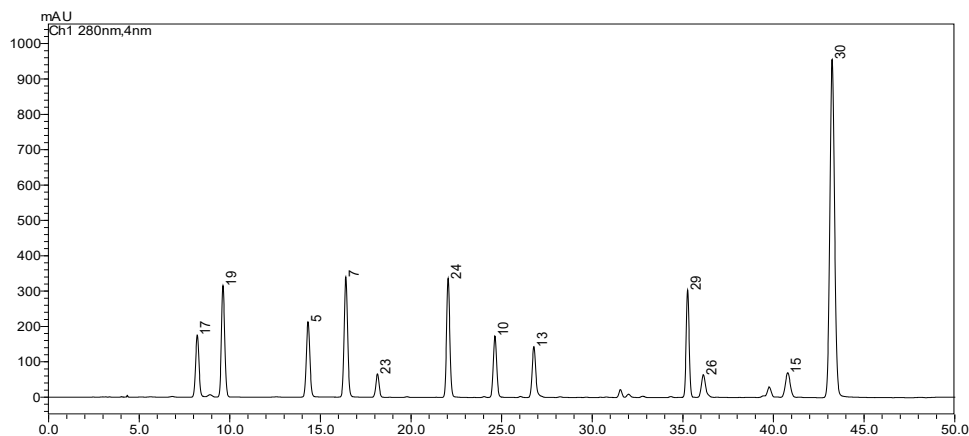
2 色谱图

第一组（20种）



21: 2-氨基-3-羟基吡啶; 1: p-苯二胺; 2: p-氨基苯酚; 25: 2,6-二氨基吡啶; 3: 甲苯-2,5-二胺硫酸盐;
 18: 2,4-二氨基苯氧基乙醇 HCl; 4: m-氨基苯酚; 20: 4-氨基-m-甲酚; 8: 间苯二酚; 6: 2-氯-p-苯二胺硫酸盐;
 22: N,N-双(2-羟乙基)-p-苯二胺硫酸盐; 12: 2-甲基雷琐辛; 9: 2-硝基-p-苯二胺; 14: 苯基甲基吡唑啉酮;
 11: 4-氨基-2-羟基甲苯; 16: 4-氨基-3-硝基苯酚 28: 4-氯雷琐辛; 27: 6-羟基吡啶; 31: 1,5-萘二酚; 32: 1-萘酚

第二组 (12 种)



- 17: m- 苯二胺; 19: 氢醌; 5: o- 苯二胺; 7: o- 氨基苯酚; 23: p- 甲基氨基苯酚硫酸盐;
24: 4- 硝基 -o- 苯二胺; 10: 甲苯 -3,4- 二胺; 13: 6- 氨基 -m- 甲酚; 29: 2,7- 萘二酚;
26: N,N- 二乙基 -p- 苯二胺硫酸盐;
15: N,N- 二乙基甲苯 -2,5- 二胺 HCl; 30: N- 苯基 -p- 苯二胺

岛津应用云

