

LC-MS/MS 法测定化妆品中普鲁卡因胺等 7 种组分作业指导书 (SOP)

标准：《化妆品安全技术规范（2015 年版）》第四章 第 2.23 项

■ 参考标准

本方法参照《化妆品安全技术规范（2015 年版）》第四章 第 2.23 项 普鲁卡因胺等 7 种组分中的方法进行检测。

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

普鲁卡因胺、利多卡因等药物为临床上治疗心律失常的药物，也可用作局部麻醉药。该药物如果添加于化妆品中，可能会给人带来肌肉松弛等护肤的愉悦感。然而，过量使用这些药物可能导致胸痛、头晕、出现幻觉等症状，且人体本身会产生该类药物的耐药性。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）规定，普鲁卡因胺等 7 种局部麻醉药为化妆品中的禁用组分。

普鲁卡因胺等 7 种局部麻醉药可以采用 LC 法或 LCMSMS 法进行检测。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）第四章 2.23 列出了《普鲁卡因胺等 7 种组分》的检测方法，该方法以 LC 法定量，LCMSMS 进行辅助定性确证。

本 SOP 建立了 LCMS-8050 测定化妆品中普鲁卡因胺等 7 种成分的检测方法。该方法快速、准确，可有效应对化妆品中普鲁卡因胺等 7 种局麻药的风险监测工作。

2.2 方法使用范围

本方法适合于液态水基类、液态油基类、膏霜乳液类、凝胶类等化妆品中普鲁卡因胺等 7 种组分的筛查、定性和定量。

本方法所指的 7 种禁用组分包括普鲁卡因胺、普鲁卡因、氯普鲁卡因、苯佐卡因、利多卡因、丁卡因、辛可卡因。

2.3 方法技术指标

本方法中 7 种普鲁卡因胺的线性范围、及仪器检出限见表 6。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中给出普鲁卡因胺等 7 种化合物液相方法的检出限为 8~10 ng，相当于 1.6~2 μg/mL。

■ 方法原理

本方法以乙腈为溶剂提取样品中 7 种普鲁卡因胺类药物，用岛津 LCMSMS 仪器进行初筛。筛查结果呈阳性的样品，以相应的标准品为对照，根据保留时间和特征离子对的相对丰度比定性，定量离子对峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

■ 仪器设备及辅助设备要求

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8050，ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W；

离心机：BECKMAN COULTER Allegra™ 64R；

涡旋仪：Talboys；

移液枪：1000 μL，200 μL，20 μL

超声波清洗器

■ 标准品、试剂、耗材

7 种普鲁卡因胺标准品：本实验标准品主要从当地检测单位获得，实验人员可自行询问标准品公司进行标准品的购买；

乙腈、甲醇、甲酸：色谱级；

无水硫酸镁、PSA 粉末、PCX 固相萃取小柱购自上海安谱公司；

5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液 (pH 4.0)：称取 0.3854 g 乙酸铵于 1000 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜；超声脱气后使用。

■ 操作步骤

6.1 标准溶液配制

6.1.1 标准储备液配制

各组分标准储备溶液 (250 mg/L)：准确称取待测组分对照品 2.5 mg 置于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，即得 250 mg/L 各标准储备溶液，置于 -18°C 冰箱中贮存。

6.1.2 混合标准中间溶液配制 (2.5 μg/mL)

用移液枪准确吸取各标准储备液 0.1 mL 转移到 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 2.5 μg/mL 的混标中间液。

6.1.3 标准曲线的制备

用移液枪准确吸取混标中间液 (2.5 μg/mL) 1 mL 至 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 250 ng/mL 的标准曲线使用液。以水为溶剂，将该标准曲线使用液逐级稀释至浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50 ng/mL 的标准曲线工作溶液，配制表格如表 1 所示，上机分析。

表 1 标准曲线的配制

标准曲线溶液浓度 (ng/mL)	加入的混合标准溶液浓度 (ng/mL)	混合标准溶液加入量 (μL)	溶剂取用量 (μL)
0.5	20	25	975
1	20	50	950
2	20	100	900
5	250	20	980
10	250	40	960
20	250	80	920
50	250	200	800

6.2 仪器条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN:227-30001-02)

流动相：A 相 -5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液 (含 0.1% 甲酸)；B 相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min	加热气：干燥空气 10.0 L/min
柱温：40°C	DL 温度：250°C
梯度洗脱程序：见表 2	加热模块温度：400°C
进样量：1 μL	接口温度：300°C
质谱条件：离子化模式：ESI+	驻留时间：30 ms
接口电压：4 kV	干燥气：氮气 10.0 L/min
雾化气：氮气 3.0 L/min	MRM 参数：见附表 5

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.70	泵	B.Conc	10
2.00	泵	B.Conc	60
4.00	泵	B.Conc	90
5.00	泵	B.Conc	90
5.10	泵	B.Conc	10
7.00	Controller	Stop	

6.3 样品前处理

液态水基类：准确称取 0.5 g 均质样品，加入 10 mL 乙腈，涡旋混匀后超声 20 min。加入 4.0 g 无水硫酸镁和 2.0 g 氯化钠，涡旋后，4000 rpm 离心 5 min，取上清液于离心管中。用 10 mL 乙腈重复提取一次，合并上层有机相。

从合并的有机相中取 2 mL，加入 0.25 g 无水硫酸镁和 0.4 g PSA 粉末，涡旋后以 4000 rpm 离心 2 min。取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液混匀，过 0.22 μm 滤膜后，上机分析。

膏霜乳液类：称取 0.5 g 样品于 15 mL 离心管中，加入 8 mL 1% 三氯乙酸，2 mL 乙腈，涡旋 1 min，5000 r/min 离心 5 min，上清液待固相萃取小柱净化。

PCX 固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、5 mL 1% 三氯乙酸进行活化。将待净化的样品液流经小柱后，用 3 mL 1% 甲酸甲醇溶液淋洗小柱，弃去淋洗液，再用 10 mL 的 5% 氨水甲醇洗脱，收集洗脱液，氮气吹干，用甲醇定容至 10 mL。取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液混匀，过 0.22 μm 滤膜后，上机分析。

6.4 加标试样

称取 0.5 g 化妆品试样于 15 mL 离心管中，加入 2.5 μg/mL 混合标准中间液 200 μL，加标浓度为 1 mg/kg（相当于上机浓度为 50 ng/mL），涡旋混合均匀，以下同样品前处理方法。

6.5 测定

按照 5.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 1.0 μL，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

进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子对均出现，且离子丰度比与标准样品的离子丰度比满足下方表格中允许偏差要求的，则可判断样品中存在该禁用物质。

离子对相对比例 (和基峰比 %)	相对离子强度最大允许偏差
> 50%	±20%
> 20% ~ 50%	±25%
> 10% ~ 20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.6.2 定量分析

取标准曲线溶液依次测定,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 — 化妆品中的禁用物质质量分数,单位为 $\mu\text{g/g}$;

c — 供试品溶液中禁用物质的质量浓度,单位为 ng/mL ;

V — 样品定容体积,单位为 mL ;

m — 样品取样量,单位为 g ;

D — 稀释倍数

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

表 3 质量控制要求对照表

项目	浓度	判定准则	频率
标准曲线	0.5~50 $\mu\text{g/L}$	$R \geq 0.99$	每批次
空白基质加标	1 mg/kg	回收率 80%-110%	每批次

表 4 化合物信息

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量
1	普鲁卡因胺	Procainamide	614-39-1	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$	271.79
2	普鲁卡因	Procaine	59-46-1	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	236.31
3	氯普鲁卡因	Chloroprocaine	3858-89-7	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$	307.21
4	苯佐卡因	Benzocaine	94-09-7	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	165.19
5	利多卡因	Lidocaine	137-58-6	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$	234.34
6	丁卡因	Tetracaine	94-24-6	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$	264.36
7	辛可卡因	Cinchocaine	85-79-0	$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$	343.46

表 5 7 种普鲁卡因胺 MRM 参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
普鲁卡因胺	235.90	163.25*	-12	-17	-18
		120.20	-12	-28	-24
普鲁卡因	236.90	100.25*	-18	-16	-20
		120.20	-12	-27	-23
氯普鲁卡因	270.85	100.25*	-10	-16	-20
		154.10	-10	-28	-29
苯佐卡因	166.05	138.10*	-11	-13	-29
		94.15	-11	-18	-19
利多卡因	234.95	86.25*	-13	-21	-19
		58.05	-10	-36	-23
丁卡因	265.25	176.25*	-11	-18	-19
		72.20	-12	-24	-28
辛可卡因	344.30	271.25*	-13	-22	-24
		116.15	-12	-53	-22

表 6 7 种普鲁卡因胺的线性范围和检出限

化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	加权系数	准确度 (%)	仪器检出限 (ng/mL)
普鲁卡因胺	0.5~50	0.9998	无	95~106	0.03
普鲁卡因	0.5~50	0.9999	1/C	98~103	0.05
氯普鲁卡因	0.5~50	0.9976	1/C	98~108	0.05
苯佐卡因	0.5~50	0.9995	1/C	95~106	0.2
利多卡因	0.5~50	0.9996	无	93~107	0.005
丁卡因	0.5~50	0.9958	1/C	85~104	0.01
辛可卡因	0.5~50	0.9971	1/C	87~106	0.005

岛津应用云

