

LC-MS/MS 法测定化妆品中己脒定二（羟乙基磺酸）盐等 8 种防腐剂

LCMSMS-614

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定化妆品中 8 种防腐剂的方法。化妆品样品采用甲醇提取，LC-MS/MS 分析。8 种防腐剂采用两个液相条件分析，每个条件 7 min 内完成测定。8 种防腐剂在指定的浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.05~0.5 ng/mL。加标回收和精密度实验测试表明，方法准确度高，重复性好。该方法快速、有效，可应对化妆品中防腐剂的风险监测需求。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 化妆品 防腐剂

化妆品防腐剂是指以抑制微生物在化妆品中的生长和繁殖为目的而在化妆品中加入的物质。常见的化妆品中防腐剂有羟苯酯类、苯氧乙醇类、咪唑烷基脲类、甲基异噻唑啉酮（卡松）、苯甲醇类、1,2- 二醇类和布罗波尔等。由于化妆品的保质期通常较长，许多化妆品离不开防腐剂，特别是液态水基类化妆品。然而，一些不法厂家肆意过量地添加化妆品，可能给使用者带来安全隐患，如卡松可能对皮肤产生刺激作用，羟苯酯类可能会影响激素的分泌、布罗波尔类可能会导致致癌物质亚硝胺的产生。

《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中列出了化妆品中 51 种准用防腐剂，并规定了每一种防腐剂的最大使用限量和使用范围，因此需要开发合适的检测

方法进行化妆品中防腐剂的准确定量。另外，部分化妆品中实际防腐剂成分和外包装上标识成分不一致，这可能暗示着该化妆品生产过程中存在违规操作的可能，因此，准确的防腐剂定性确证方法也必不可少。

化妆品中防腐剂的检测方法包括 LC 法、GC 法、LC-MS/MS 法和 GCMS 法等。2021 年 3 月国家药品监督管理局发布《化妆品中防腐剂检验方法》（2021 年第 17 号通告），其中包括了《化妆品安全技术规范》中 51 种准用防腐剂的检测方法。

本文参照该通告中 4.3 和 4.5 的方法，建立了 LC-MS/MS 法测定化妆品中 8 种防腐剂的方法。该方法快速、准确，可以很好地应对化妆品中防腐剂的快速筛查、定性确证和定量分析。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	对应（2021 年第 17 号公告）方法
1	己脒定二（羟乙基磺酸）盐	Hexamidinediisethionate	659-40-5	C ₂₂ H ₃₂ N ₄ O ₆ S	606.71	4.3
2	氯己定	Chlorhexidine	55-56-1	C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀	505.45	4.3
3	十二烷基三甲基溴化铵	N,N,N-trimethyl-1-dodecanaminium bromide	1119-94-4	C ₁₅ H ₃₄ N•Br	308.34	4.3
4	十二烷基二甲基苄基氯化铵	Benzalkoniumchloride	139-07-1	C ₂₁ H ₃₈ N•Cl	339.99	4.3
5	苜索氯铵	Benzethonium chloride	121-54-0	C ₂₇ H ₄₂ ClNO ₂	448.08	4.3
6	十四烷基二甲基苄基氯化铵	Tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride	139-08-2	C ₂₃ H ₄₂ N•Cl	368.04	4.3
7	十六烷基二甲基苄基氯化铵	Benzylhexadecyldimethyl ammonium chloride	122-18-9	C ₂₅ H ₄₆ N•Cl	396.09	4.3
8	海克替啶	Hexetidine	141-94-6	C ₂₁ H ₄₅ N ₃	339.60	4.5

1.2 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A
 脱气机：DGU-20A₅
 输液泵：LC-30AD×2
 自动进样器：SIL-30AC
 柱温箱：CTO-20A
 质谱检测器：LCMS-8050
 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

1.3 分析条件

液相条件 1（适用于己脒定二（羟乙基磺酸）盐、氯己定的测试）：

色谱柱：Shim-pack GIST C18（50 mm x 2.1 mmI.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 mM 乙酸铵水溶液（含 0.1% 甲酸）；B 相 - 甲醇

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，洗脱程序见表 2

流速：0.3 mL/min
 进样量：1 μL

柱温：40°C

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	15
3.00	泵	B.Conc	90
4.50	泵	B.Conc	90
4.60	泵	B.Conc	15
7.00	Controller	Stop	

液相条件 2（适用于十二烷基三甲基溴化铵等 6 种化合物的测试）：

色谱柱：Shim-pack GIST C18（50 mm x 2.1 mmI.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 mM 乙酸铵水溶液（含 0.1% 甲酸）；B 相 - 甲醇

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 65%，洗脱程序见表 3

流速：0.3 mL/min
 进样量：1 μL

柱温：40°C

表 3 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	泵	B.Conc	65
3.00	泵	B.Conc	95
4.50	泵	B.Conc	95
4.60	泵	B.Conc	65
7.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8050
 接口温度：300°C
 离子化模式：ESI⁺
 DL 温度：250°C
 离子源接口电压：4.0 kV
 加热模块温度：400°C

雾化气：氮气 3.0 L/min
 干燥气：氮气 10.0 L/min
 碰撞气：氩气
 MRM 参数：见表 4

扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：50 ms
 延迟时间：3 ms

表 4 MRM 优化参数

No.	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	己脒定二 (羟乙基磺酸) 盐	355.20	120.20*	-18	-40	-11
			137.20	-25	-32	-23
2	氯己定	505.10	336.40*	-36	-21	-14
			170.10	-36	-34	-16
3	十二烷基三甲基溴化铵	228.30	60.20*	-17	-26	-22
			57.20	-16	-25	-22
4	十二烷基二甲基苄基氯化铵	304.20	91.00*	-22	-35	-21
			212.20	-11	-21	-22
5	苄索氯铵	412.40	320.00*	-15	-27	-14
			91.10	-15	-45	-14
6	十四烷基二甲基苄基氯化铵	332.00	91.10*	-23	-45	-20
			240.20	-24	-23	-25
7	十六烷基二甲基苄基氯化铵	360.00	91.00*	-24	-40	-22
			58.10	-26	-30	-22
8	海克替啶	341.30	156.10*	-24	-20	-26
			168.30	-17	-23	-16

注：* 表示定量离子

1.4 标准品的配制

8 种防腐剂储备溶液来源于客户，溶剂为甲醇。

混合标准中间液：准确移取适量储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 2500 ng/mL 的混合标准中间溶液。

标准曲线配制：以 50% 甲醇水为溶剂，将混合标准中间液逐级稀释至浓度为 1、2、20、5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准点，上机分析。

1.5 样品前处理方法

准确称取样品 1.0 g，置于具塞比色管中，加入 8 mL 甲醇，涡旋混匀，超声提取 20 min，用甲醇定容至 10 mL，摇匀。取上清液 5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。样液以 10000 r/min 的转速离心 5 min，经 0.22 μm 滤膜过滤后，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 8 种防腐剂色谱图

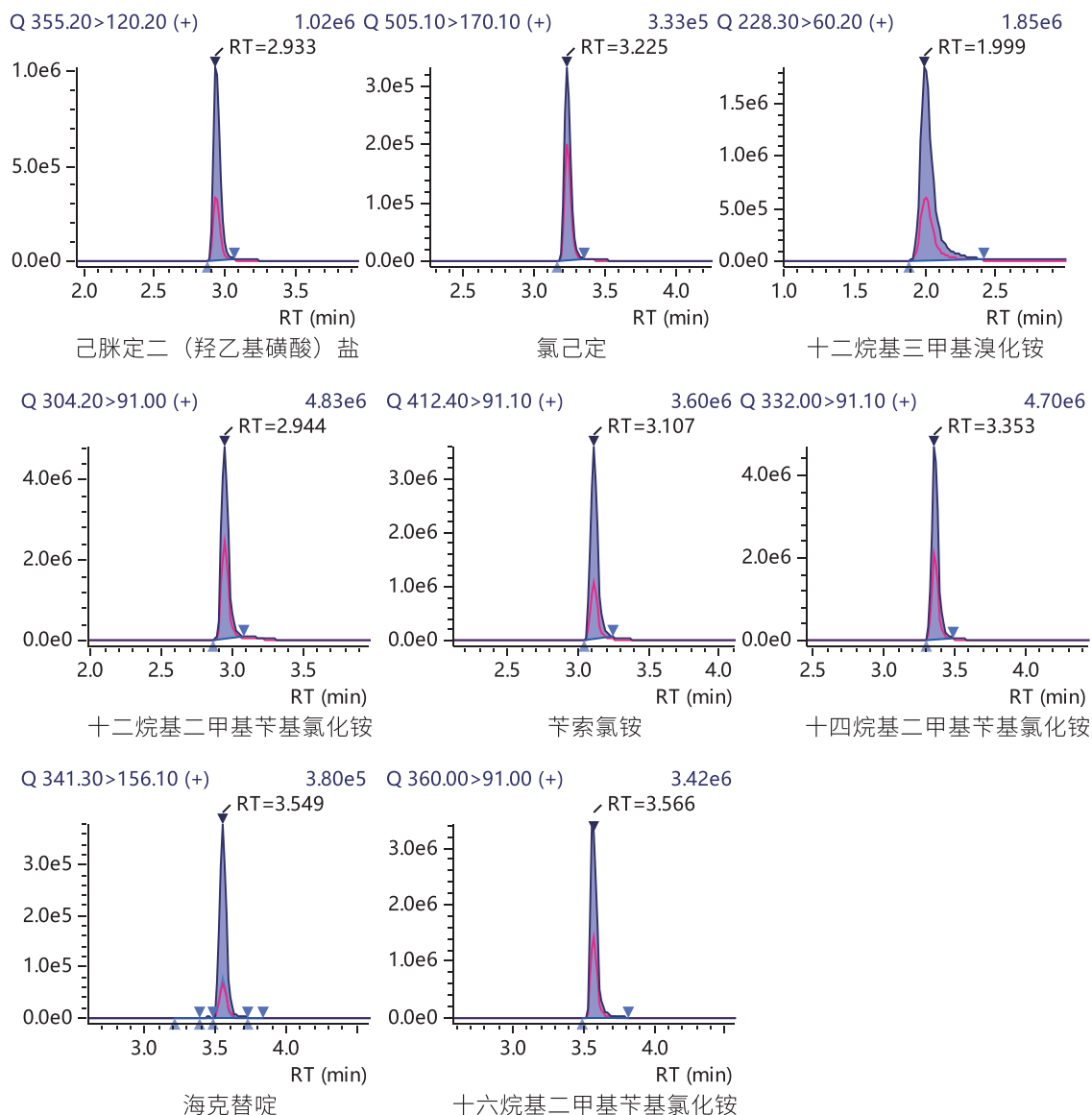


图 1 8 种防腐剂 MRM 色谱图 (100 ng/mL)

2.2 线性范围

按照 1.4 项下配制方法，配制标准曲线。以化合物浓度 X 为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，8 种防腐剂在指定浓度内线性良好，相关系数均大于 0.995。以标准曲线浓度最低点使用 3 倍信噪比的方式计算检出限，8 种防腐剂的检出限为 0.05~0.5 ng/mL。

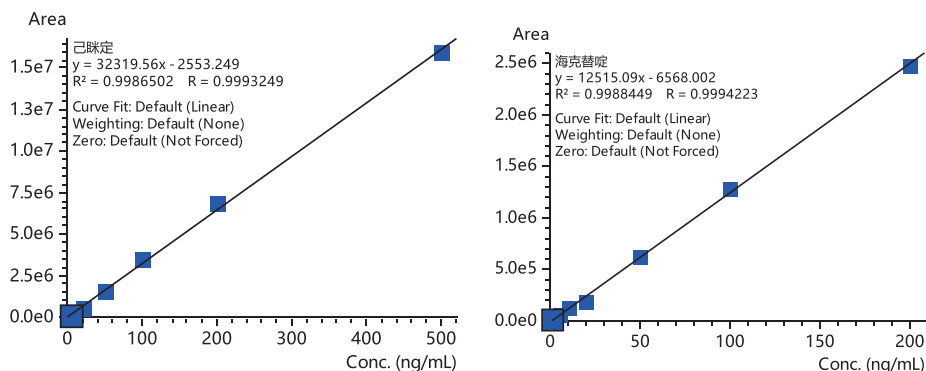


图 2 防腐剂标准曲线 (部分)

表 5 8 种防腐剂标准曲线参数

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	加权系数	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
1	己脒定二(羟乙基磺酸)盐	1~200	0.9985	1/C	91~108	0.05
2	氯己定	1~200	0.9989	1/C	90~105	0.05
3	十二烷基三甲基溴化铵	1~200	0.9966	1/C	92~105	0.5
4	十二烷基二甲基苄基氯化铵	1~200	0.9958	1/C	90~108	0.5
5	苄索氯铵	1~200	0.9983	1/C	93~111	0.2
6	十四烷基二甲基苄基氯化铵	1~200	0.9969	1/C	90~111	0.2
7	十六烷基二甲基苄基氯化铵	1~200	0.9973	1/C	91~107	0.2
8	海克替啶	1~200	0.9994	无	93~109	0.5

2.3 重复性

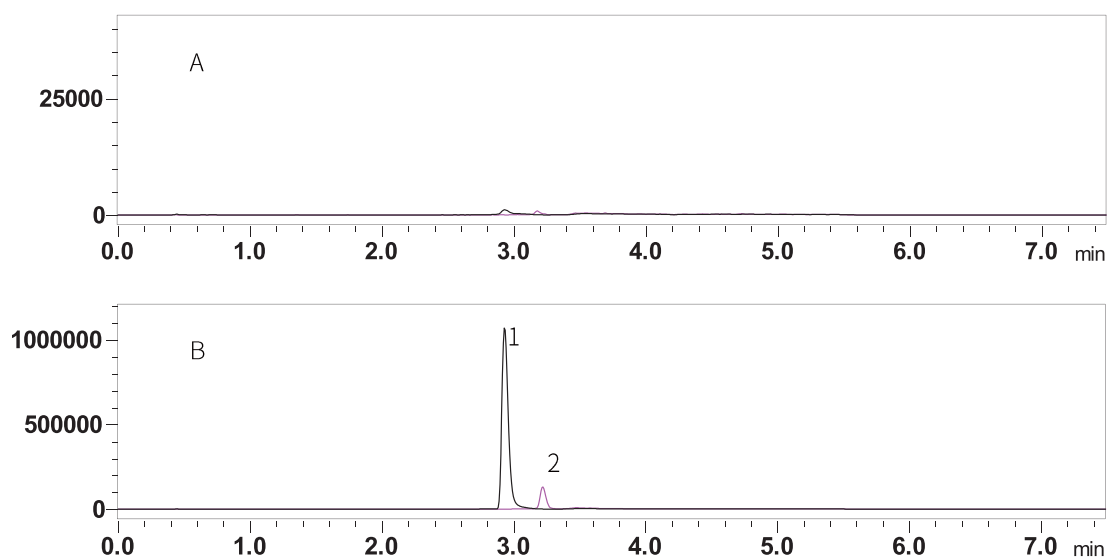
对 100 ng/mL 混合标准溶液连续分析 6 次, 计算重复性。结果见表 6。8 种化合物的保留时间 RSD 为 0.05~0.07%, 峰面积 RSD 为 0.98%~3.64%, 重复性良好。

表 6 8 种防腐剂重复性结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %	No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %
1	己脒定二(羟乙基磺酸)盐	0.07	1.49	5	苄索氯铵	0.05	2.23
2	氯己定	0.06	2.91	6	十四烷基二甲基苄基氯化铵	0.06	0.98
3	十二烷基三甲基溴化铵	0.06	1.56	7	十六烷基二甲基苄基氯化铵	0.05	3.64
4	十二烷基二甲基苄基氯化铵	0.06	2.20	8	海克替啶	0.06	2.10

2.4 方法准确性和精密度

取某品牌柔肤水, 按照 1.5 前处理方式进行处理, 样品中未检出方法中的防腐剂。向样品中添加浓度为 0.5、5.0 mg/kg 2 个水平的加标量, 每个水平重复 3 次, 进行加标回收率和精密度试验。表 7 为实验结果, 8 种化合物的平均回收率为 81.2%~105.9%, 相对标准偏差为 1.48%~9.25%。



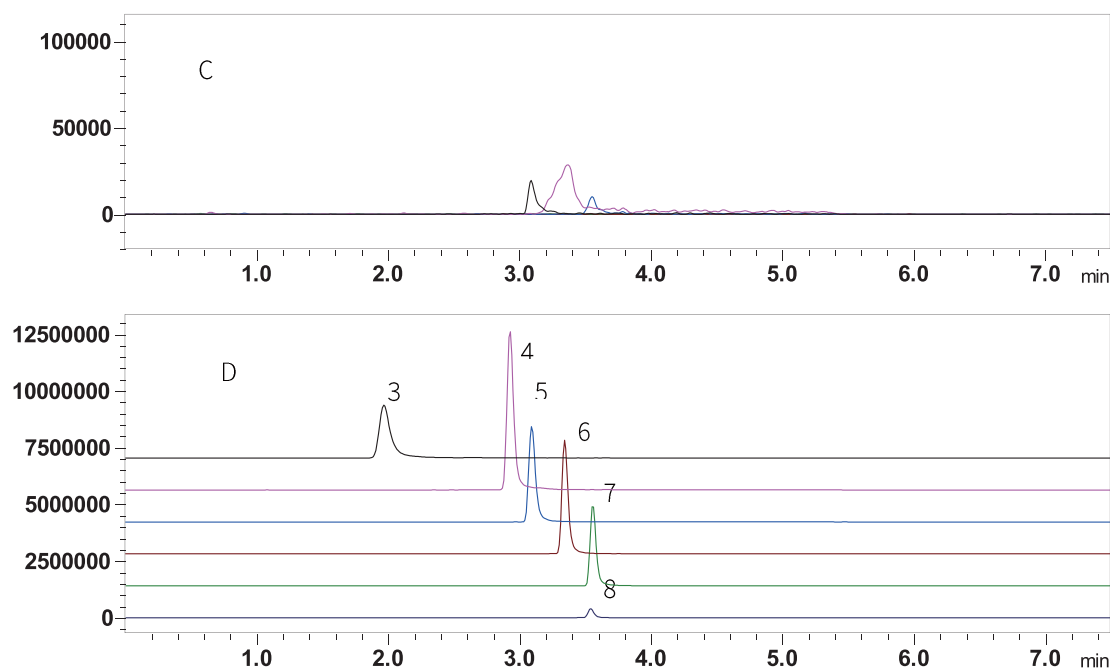


图3 样品和加标溶液 TIC 图 (化合物 1~8 编号同表 3)

A、某柔肤水产品 TIC 图 (液相条件 1)；B、某柔肤水产品加标溶液 TIC 图 (液相条件 1)；
C、某柔肤水产品 TIC 图 (液相条件 2)；D、某柔肤水产品加标溶液 TIC 图 (液相条件 2)；

表 7 8 种防腐剂加标回收和精密度结果 (n=3)

No.	化合物	样品浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
1	己脒定二 (羟乙基磺酸) 盐	N.D.	0.5	82.5	2.19
			5	105.9	1.48
2	氯己定	N.D.	0.5	81.2	2.85
			5	99.1	1.59
3	十二烷基三甲基溴化铵	N.D.	0.5	99.9	5.27
			5	101.9	4.80
4	十二烷基二甲基苄基氯化铵	N.D.	0.5	98.9	6.74
			5	96.6	5.39
5	苜索氯铵	N.D.	0.5	92.0	9.03
			5	93.7	1.76
6	十四烷基二甲基苄基氯化铵	N.D.	0.5	81.7	5.41
			5	82.4	5.59
7	十六烷基二甲基苄基氯化铵	N.D.	0.5	83.5	4.25
			5	82.8	7.73
8	海克替啶	N.D.	0.5	83.1	9.25
			5	83.5	4.38

注：N.D. 表示未检出。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定化妆品中 8 种防腐剂含量的方法。方法参照国家药品监督管理局发布《化妆品中防腐剂检验方法》（2021 年第 17 号通告）中的方法，其中 8 个化合物包括了公告中《4.3 己脒定二（羟乙基磺酸）盐等 7 种组分检验方法》LCMSMS 确证部分的 7 个化合物、以及《4.5 海克替啶检验方法》中 LC-MS/MS 确证部分的化合物。该方法分为两个液相条件进行，分别在 7 min 内完成测定。方法采用外标法定量，各化合物在 1~200 ng/mL 浓度范围内相关系数均大于 0.995，检出限为 0.05~0.5 ng/mL。样品采用甲醇提取后上机分析。加标结果显示防腐剂化合物在 0.5、5.0 mg/kg 2 个浓度水平下，平均回收率为 81.2%~105.9%，相对标准偏差为 1.48%~9.25%。本文所建立的方法快速、有效，可应对化妆品中常见防腐剂的日常监测和阳性确证工作。

岛津应用云

