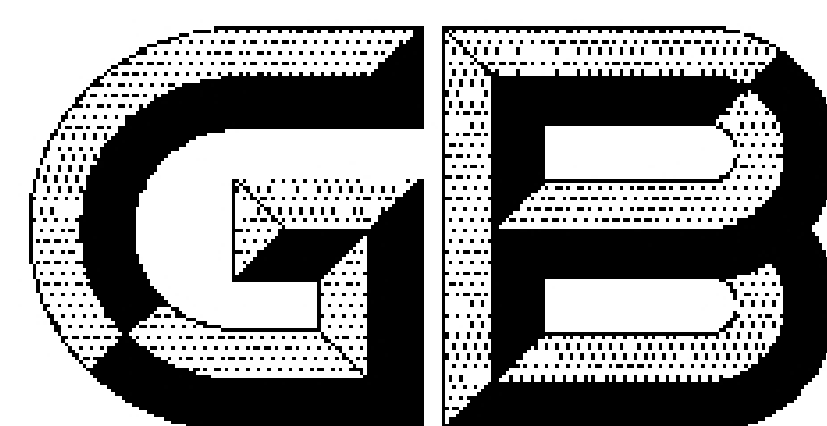




# 中华人民共和国国家标准

GB/T 34918—2017

## 化妆品中七种性激素的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 7 sexual hormones in cosmetics—  
Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2017-11-01 发布

2018-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会



# 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会(SAC/TC 374)提出并归口。

本标准起草单位：深圳市计量质量检测研究院、中检华纳(北京)质量技术中心有限公司、中检联盟(北京)质检技术研究院有限公司、国家日用小商品质量监督检验中心、深圳市容大生物技术有限公司、深圳市金因生物技术有限公司、浙江艳庄化妆品有限公司、无限极(中国)有限公司、完美(中国)有限公司、上海相宜本草化妆品股份有限公司、广东丹姿集团有限公司、广州市巧美化妆品有限公司、广东芭薇生物科技股份有限公司、纳爱斯集团有限公司、义乌市产品(商品)质量监督检验研究院。

本标准主要起草人：赵彦、林志惠、幸苑娜、冯岸红、陈茜、许鸿辉、杨平顺、葛峰、孙红梅、刘德海、姚松君、李晓敏、袁利文、吕智、毛勇进、张健、刘瑞学、段建军、韦顺文。





# 化妆品中七种性激素的测定

## 超高效液相色谱-串联质谱法

**警示——**使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准的使用可能涉及到某些有危险的材料、设备和操作,本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

### 1 范围

本标准规定了超高效液相色谱-串联质谱法测定水状、乳状、膏状、面膜、粉状等化妆品中七种性激素(雌三醇、雌二醇、雌酮、己烯雌酚、睾酮、甲基睾酮、黄体酮)的原理、试剂、仪器设备、样品处理、测定、试验数据处理和实验报告等。

本标准适用于水状、乳状、膏状、面膜、粉状等化妆品中七种性激素的检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 原理

用甲醇+乙腈(1+1,体积比)混合溶剂漩涡提取化妆品中的性激素,离心过滤后,加入氢氧化钠溶液进行皂化反应,调节 pH 至 6.5~7.5,经固相萃取小柱净化,用反相超高效液相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

### 4 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

- 4.1 GB/T 6682 规定的一级水。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 乙酸铵。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 浓盐酸。
- 4.7 甲醇+乙腈(1+1,体积比):分别量取 500 mL 甲醇(4.2)和 500 mL 乙腈(4.3)充分混匀后制得。
- 4.8 乙酸铵溶液(0.5 mmol/L):称取 38.5 mg 乙酸铵(4.4),用水(4.1)溶解定容至 1 L。
- 4.9 氢氧化钠溶液(20 g/L):称取 20.0 g 氢氧化钠(4.5),用水(4.1)溶解定容至 1 L。
- 4.10 盐酸溶液(10 mol/L):量取 833 mL 的浓盐酸(4.6),用水(4.1)溶解定容至 1 L。
- 4.11 盐酸溶液(1 mol/L):量取 100 mL 的 10 mol/L 盐酸溶液(4.10),用水(4.1)溶解定容至 1 L。



- 4.12 盐酸溶液(0.1 mol/L):量取 100 mL 的 1 mol/L 盐酸溶液(4.11),用水(4.1)溶解定容至 1 L。
- 4.13 10%乙腈水溶液(体积比):量取 100 mL 乙腈(4.3)和 900 mL 水(4.1)充分混匀后制得。
- 4.14 纤维素滤纸。
- 4.15 pH 试纸:范围 5.5~9.0。
- 4.16 HLB 固相萃取小柱或相当者:150 mg。
- 4.17 样品过滤器:有机膜,孔径 0.22  $\mu\text{m}$ 。
- 4.18 标准品和同位素内标:雌三醇、雌二醇、雌酮、己烯雌酚、睾酮、甲基睾酮、黄体酮为标准品,雌三醇 D2、甲基睾酮 D3 为同位素内标,纯度不小于 99.0%。7 种标准品和 2 种同位素内标的英文名称、CAS 登录号、分子式、化学结构图参见附录 A。
- 4.19 内标储备液(100  $\mu\text{g/mL}$ ):准确称取同位素内标(4.18)各 10.0 mg,用甲醇(4.2)分别溶解定容至 100.0 mL,于 $(-4\pm 1)^\circ\text{C}$ 下密封保存,可在一年内稳定。
- 4.20 标准储备液(1  $\text{mg/mL}$ ):准确称取标准品(4.18)各 10.0 mg,用甲醇(4.2)分别溶解定容至 10.0 mL,于 $(-4\pm 1)^\circ\text{C}$ 下密封保存,可在一年内稳定。
- 4.21 混合内标使用液(1  $\mu\text{g/mL}$ ):准确量取内标储备液(4.19)各 1.00 mL,用甲醇(4.2)定容于 100.0 mL,于 $(-4\pm 1)^\circ\text{C}$ 下密封保存。
- 4.22 标准混合工作溶液:根据需要,用甲醇稀释,将各标准储备液(4.20)配制成 0.025  $\mu\text{g/mL}$ 、0.050  $\mu\text{g/mL}$ 、0.20  $\mu\text{g/mL}$ 、0.40  $\mu\text{g/mL}$ 、0.80  $\mu\text{g/mL}$  系列浓度的标准曲线溶液后,各取 1.00 mL 置于进样瓶中,并加入 50  $\mu\text{L}$  混合内标使用液(4.21),制得标准混合工作溶液,标准混合工作溶液中各浓度梯度含各同位素内标 0.05  $\mu\text{g}$ 。

## 5 仪器设备

- 5.1 超高效液相色谱-串联质谱联用仪(配 ESI 源)。
- 5.2 分析天平:精度 0.1 mg。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 离心机:转速 10 000 r/min;容量 10 mL,50 mL。
- 5.5 固相萃取装置。

## 6 样品准备

### 6.1 提取

称取 0.2 g 样品(精确至 0.001 g)于 15 mL 具塞离心管中,准确加入 2 mL 甲醇+乙腈(1+1,体积比)(4.7),涡旋震荡使样品溶液达到均质状态,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上层清液至另一 50 mL 具塞离心管中,下层样品用 2 mL 甲醇+乙腈(1+1,体积比)(4.7)重复提取一次,合并两次提取液后,加入 35 mL 氢氧化钠溶液(20 g/L)(4.9),混匀,10 000 r/min 离心 10 min 后,经纤维素滤纸(4.14)过滤后,分别加入 10 mol/L 盐酸溶液(4.10)、1 mol/L 盐酸溶液(4.11)和 0.1 mol/L 盐酸溶液(4.12),调节清液 pH 值至 6.5~7.5 之间,待固相萃取小柱净化。

### 6.2 净化

HLB 固相萃取小柱(4.16)接上固相萃取装置(5.5),小柱分别用 5 mL 甲醇(4.2)、10 mL 水(4.1)进行活化。将待净化的样品溶液倒入小柱中,待样品溶液完全流出后,加入 10 mL 10%乙腈水溶液(4.13)清洗小柱,弃去全部淋出液。在负压下,减压抽干 1 min,最后用 5 mL 甲醇(4.2)洗脱,收集样品洗脱液于 15 mL 离心管中,转移样品洗脱液至 5 mL 具塞比色管,用甲醇(4.2)定容至刻度液。经样品



过滤器(4.17)过滤后,取 1.00 mL 的样品溶液置于进样瓶中,并加入 50  $\mu$ L 混合内标使用液(4.21),待仪器测定。

7 测定

7.1 液相色谱/串联质谱参考条件

使用的仪器不同,最佳分析条件也可能不同,因此不可能给出仪器分析的通用色谱和质谱条件参数。设定的参数应保证被测组分得到有效分离和测定,下面给出的色谱和质谱条件参数经证明是可行的。

- a) 色谱柱:C<sub>8</sub> 柱,100 mm $\times$ 2.1 mm(内径),1.8  $\mu$ m,或相当者;
- b) 柱温:35  $^{\circ}$ C;
- c) 液相色谱流动相及参考分离条件见表 1;
- d) 进样体积:5  $\mu$ L;
- e) 电离方式:电喷雾电离,雌三醇、雌二醇、雌酮、己烯雌酚采用 ESI(−),睾酮、甲基睾酮、黄体酮采用 ESI(+);
- f) 正负离子喷雾电压:4.0 kV;
- g) 雾化气:氮气,40 psi;
- h) 干燥气:氮气,流速:10 L/min,温度:300  $^{\circ}$ C;
- i) 碰撞气:氦气;
- j) 检测方式:多反应监测(MRM);
- k) 7 种性激素药物和 2 种同位素内标的质谱测定参数见表 2。

表 1 液相色谱流动相及参考分离条件

| 时间<br>min | 流速<br>mL/min | 流动相 A<br>(水,0.5 mmol/L 乙酸铵) | 流动相 B<br>[甲醇+乙腈(1+1,体积比)] |
|-----------|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| 0         | 0.3          | 40                          | 60                        |
| 4.5       | 0.3          | 5                           | 95                        |
| 7.0       | 0.3          | 5                           | 95                        |
| 8.0       | 0.3          | 40                          | 60                        |
| 10.0      | 0.3          | 40                          | 60                        |

表 2 7 种性激素药物和 2 种同位素内标的质谱测定参数

| 序号 | 药物名称 | 出峰时间<br>min | 电离方式   | 定性离子对( $m/z$ )<br>(母离子/子离子) | 定量离子对( $m/z$ )<br>(母离子/子离子) | 碰撞能量<br>eV | 碎裂电压<br>V  |
|----|------|-------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|------------|------------|
| 1  | 雌三醇  | 1.82        | ESI(−) | 287.1/257.2<br>287.1/171.0  | 287.1/171.0                 | 13<br>35   | 160<br>160 |
| 2  | 雌二醇  | 3.07        | ESI(−) | 271.1/183.0<br>271.1/145.1  | 271.1/183.0                 | 35<br>35   | 160<br>160 |
| 3  | 雌酮   | 3.26        | ESI(−) | 269.1/159.0<br>269.1/145.1  | 269.1/145.1                 | 40<br>35   | 190<br>190 |



表 2 (续)

| 序号 | 药物名称    | 出峰时间<br>min | 电离方式   | 定性离子对( <i>m/z</i> )<br>(母离子/子离子) | 定量离子对( <i>m/z</i> )<br>(母离子/子离子) | 碰撞能量<br>eV | 碎裂电压<br>V  |
|----|---------|-------------|--------|----------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 4  | 己烯雌酚    | 3.53        | ESI(－) | 267.1/251.1<br>267.1/236.9       | 267.1/251.1                      | 20<br>23   | 170<br>170 |
| 5  | 睾酮      | 3.33        | ESI(＋) | 289.2/109.1<br>289.2/97.0        | 289.2/97.0                       | 26<br>25   | 150<br>150 |
| 6  | 甲基睾酮    | 3.53        | ESI(＋) | 303.5/108.9<br>303.5/97.1        | 303.5/97.1                       | 30<br>28   | 150<br>150 |
| 7  | 黄体酮     | 4.07        | ESI(＋) | 315.5/109.0<br>315.5/97.1        | 315.5/109.0                      | 28<br>25   | 150<br>150 |
| 8  | 雌三醇 D2  | 1.82        | ESI(－) | 289.1/172.7                      | 289.1/172.7                      | 35         | 150        |
| 9  | 甲基睾酮 D3 | 3.53        | ESI(＋) | 306.2/96.9                       | 306.2/96.9                       | 25         | 130        |

7.2 定性分析

在相同仪器分析条件下测定标准溶液和样品溶液，若样品溶液中检出的色谱峰保留时间与标准溶液中的某种组分峰的保留时间一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现，且所选择的定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液的定性离子的相对丰度进行比较时，偏差不超过规定允许范围(见表 3)，则可判定样品中存在该组分。

表 3 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

| 相对离子丰度/%  | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
|-----------|-----|--------|--------|-----|
| 允许的相对偏差/% | ±20 | ±25    | ±30    | ±50 |

7.3 定量分析

本标准采用内标法定量。

每次测定前配制标准浓度系列(4.22)，按浓度由小到大依次测定，记录定量选择离子积分峰面积，以目标物与内标物质的浓度比为横坐标，目标物与内标物质的峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线并计算回归方程，其线性相关系数应大于 0.99。标准品及同位素内标的超高效液相色谱-串联质谱多反应监测(MRM)色谱图参见附录 B。

单个物质的方法定量下限均为 0.625 mg/kg。

8 试验数据处理

在相同仪器分析条件下测定样品溶液，选择目标离子进行定量，并根据标准曲线以内标法定量，按式(1)计算含量。



$$X_i = \frac{c_i \times V \times b}{m}$$

.....( 1 )



式中：

- $X_i$  ——样品中某种组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；
- $c_i$  ——由标准曲线得出待测样品溶液中某种组分的浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ )；
- $V$  ——定容体积,单位为毫升(mL)；
- $b$  ——稀释倍数；
- $m$  ——样品质量,单位为克(g)。

测定结果以各性激素的含量分别表示,取两次平行测定结果的算术平均值,保留三位有效数字。

9 允许差

在重复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%。

10 试验报告

试验报告至少应给出以下内容：

- a) 试样描述；
- b) 使用的标准(包括发布或出版年号)；
- c) 试验结果；
- d) 与规定的分析步骤的差异；
- e) 在试验中观察到的异常现象；
- f) 试验日期。





附 录 A  
(资料性附录)

7 种性激素的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、化学结构图及对应同位素内标

7 种性激素的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、化学结构图及对应同位素内标见表 A.1。

表 A.1 7 种性激素的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、化学结构图及对应同位素内标

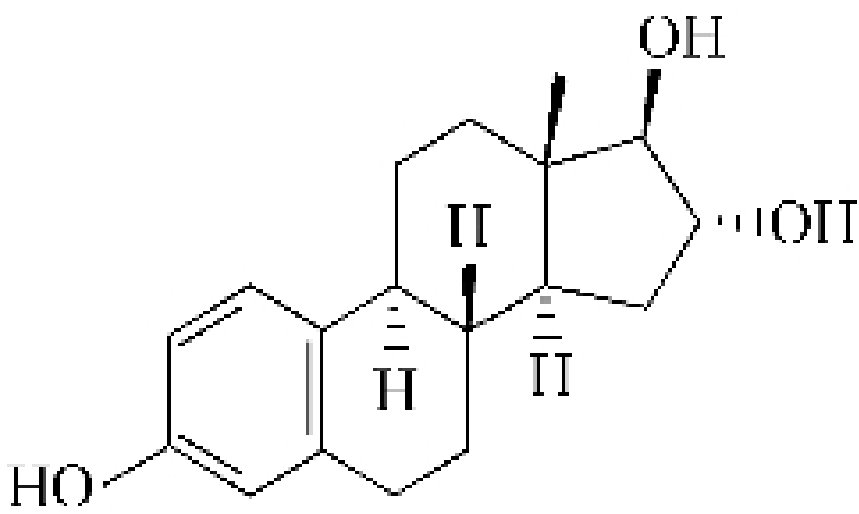
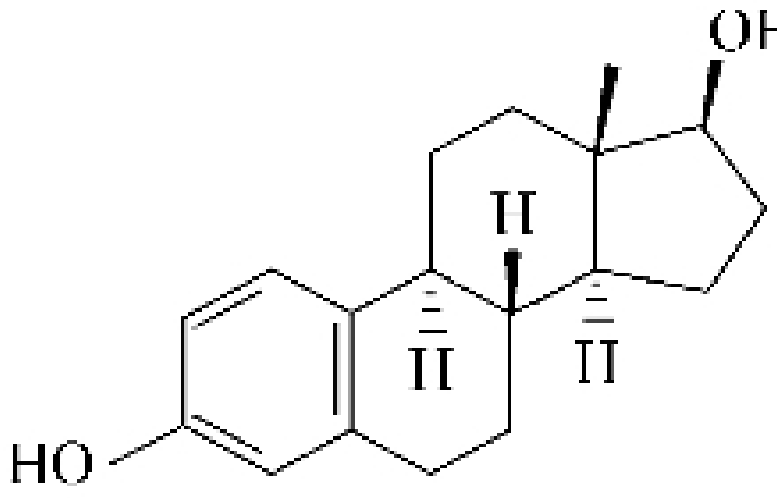
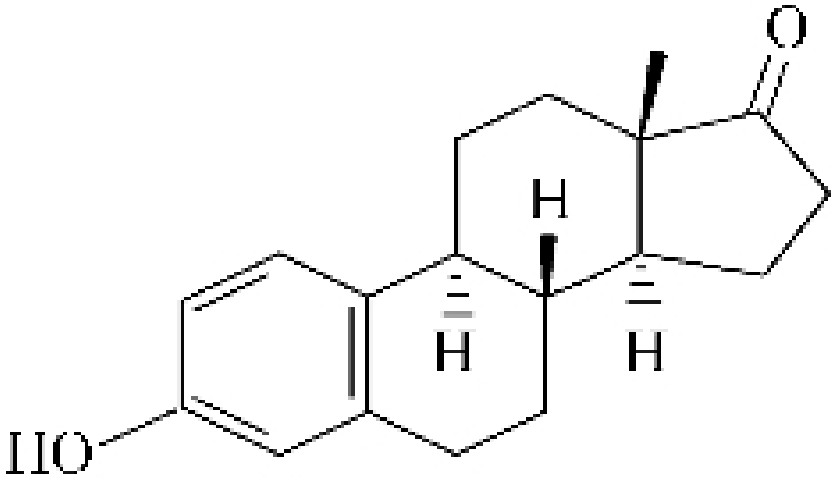
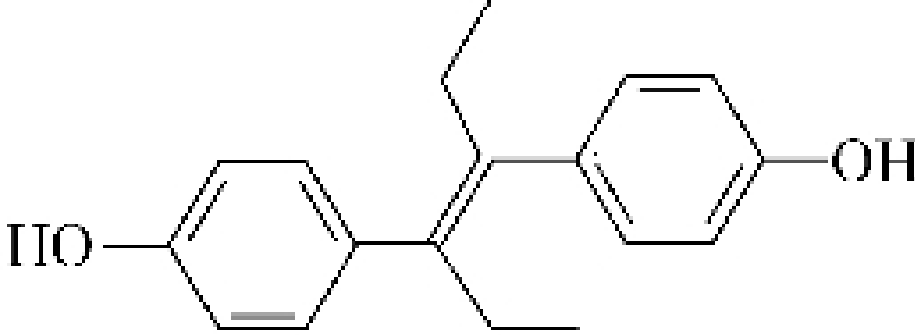
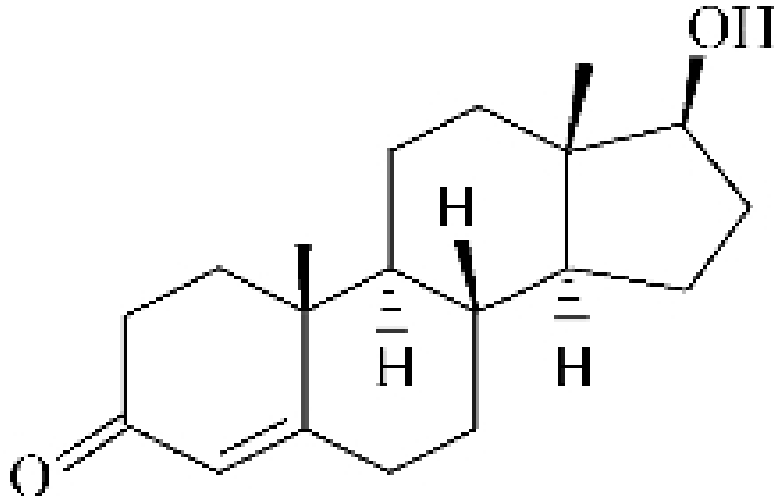
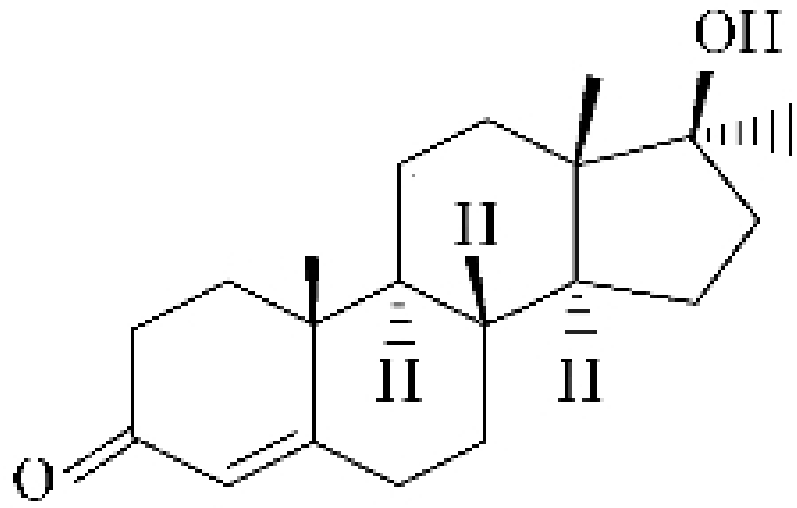
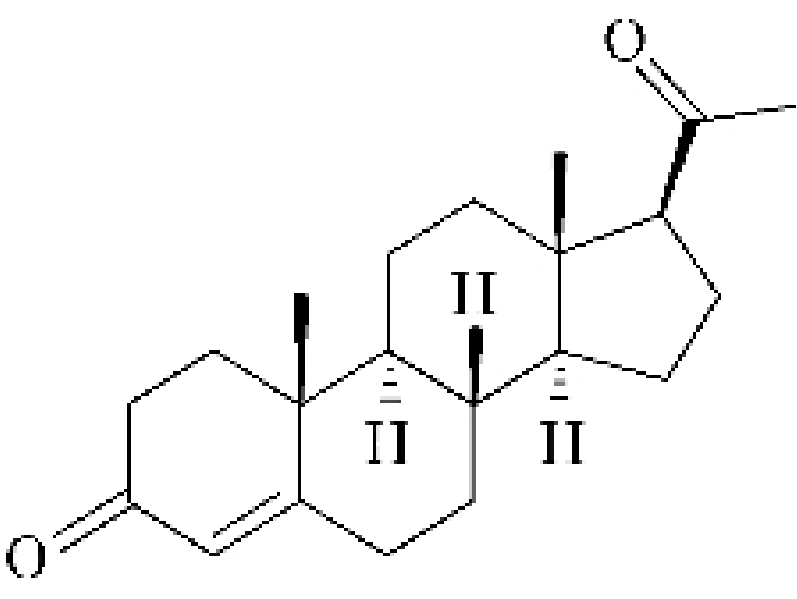
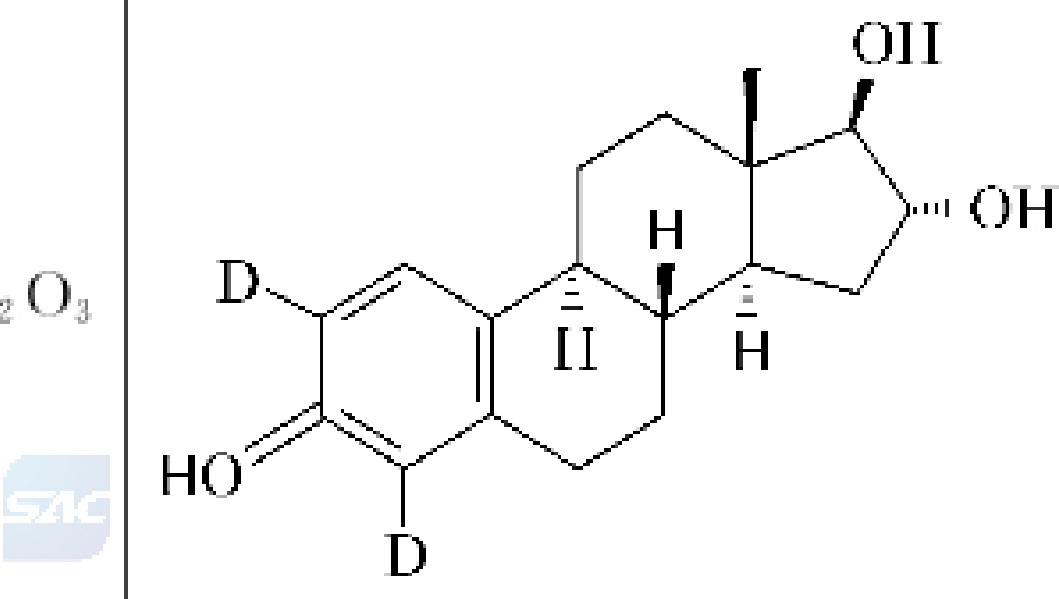
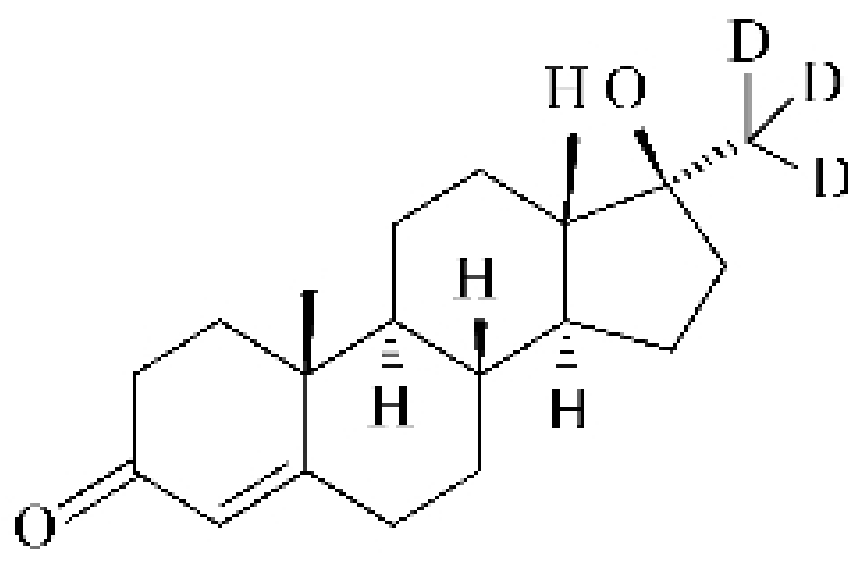
| 序号 | 中文名称 | 英文名称               | CAS 登录号   | 分子式                                                                                                        | 化学结构图                                                                                 | 对应同位素内标 |
|----|------|--------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1  | 雌三醇  | Estriol            | 50-27-1   | <br>$C_{18}H_{24}O_3$ |   | 雌三醇 D2  |
| 2  | 雌二醇  | Estradiol          | 50-28-2   | $C_{18}H_{24}O_2$                                                                                          |  | 雌三醇 D2  |
| 3  | 雌酮   | Estrone            | 53-16-7   | $C_{18}H_{22}O_2$                                                                                          |  | 雌三醇 D2  |
| 4  | 己烯雌酚 | Diethylstilbestrol | 6898-97-1 | $C_{18}H_{20}O_2$                                                                                          |  | 雌三醇 D2  |
| 5  | 睾酮   | Testosterone       | 58-22-0   | $C_{19}H_{28}O_2$                                                                                          |  | 甲基睾酮 D3 |



表 A.1（续）

| 序号 | 中文名称    | 英文名称                  | CAS 登录号    | 分子式                  | 化学结构图                                                                                 | 对应同位素内标 |
|----|---------|-----------------------|------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 6  | 甲基睾酮    | Methyltestosterone    | 58-18-4    | $C_{20}H_{30}O_2$    |    | 甲基睾酮 D3 |
| 7  | 黄体酮     | Progesterone          | 57-83-0    | $C_{21}H_{30}O_2$    |   | 甲基睾酮 D3 |
| 8  | 雌三醇 D2  | Estriol-D2            | 53866-32-3 | $C_{18}H_{22}D_2O_3$ |  | —       |
| 9  | 甲基睾酮 D3 | Methyltestosterone-D3 | 96425-03-5 | $C_{20}H_{27}D_3O_2$ |  | —       |



附 录 B  
(资料性附录)

7 种性激素标准品及 2 种同位素内标的提取离子色谱图

图 B.1 为 7 种性激素标准品及 2 种同位素内标物的提取离子色谱图。

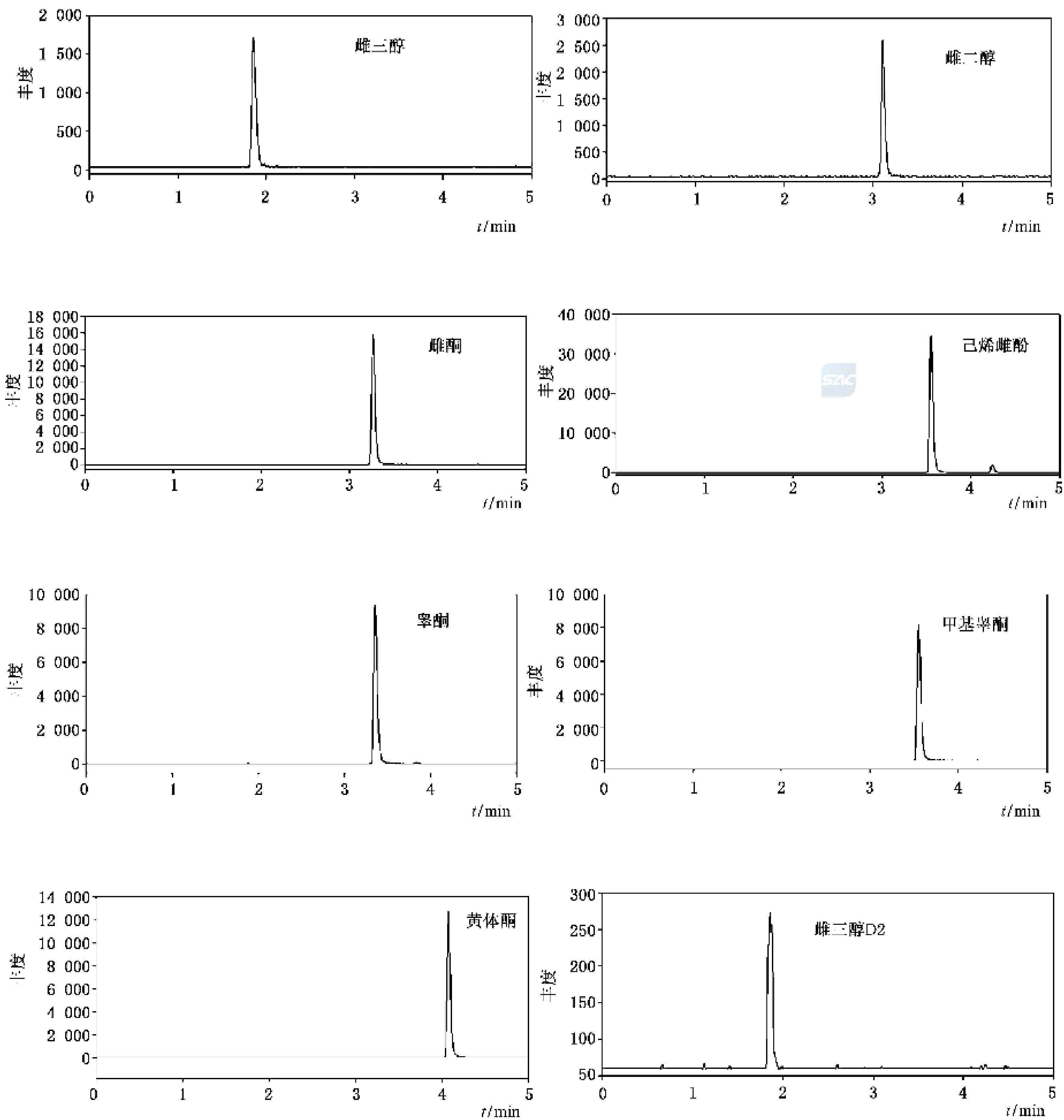


图 B.1 7 种性激素标准品及 2 种同位素内标的提取离子色谱图



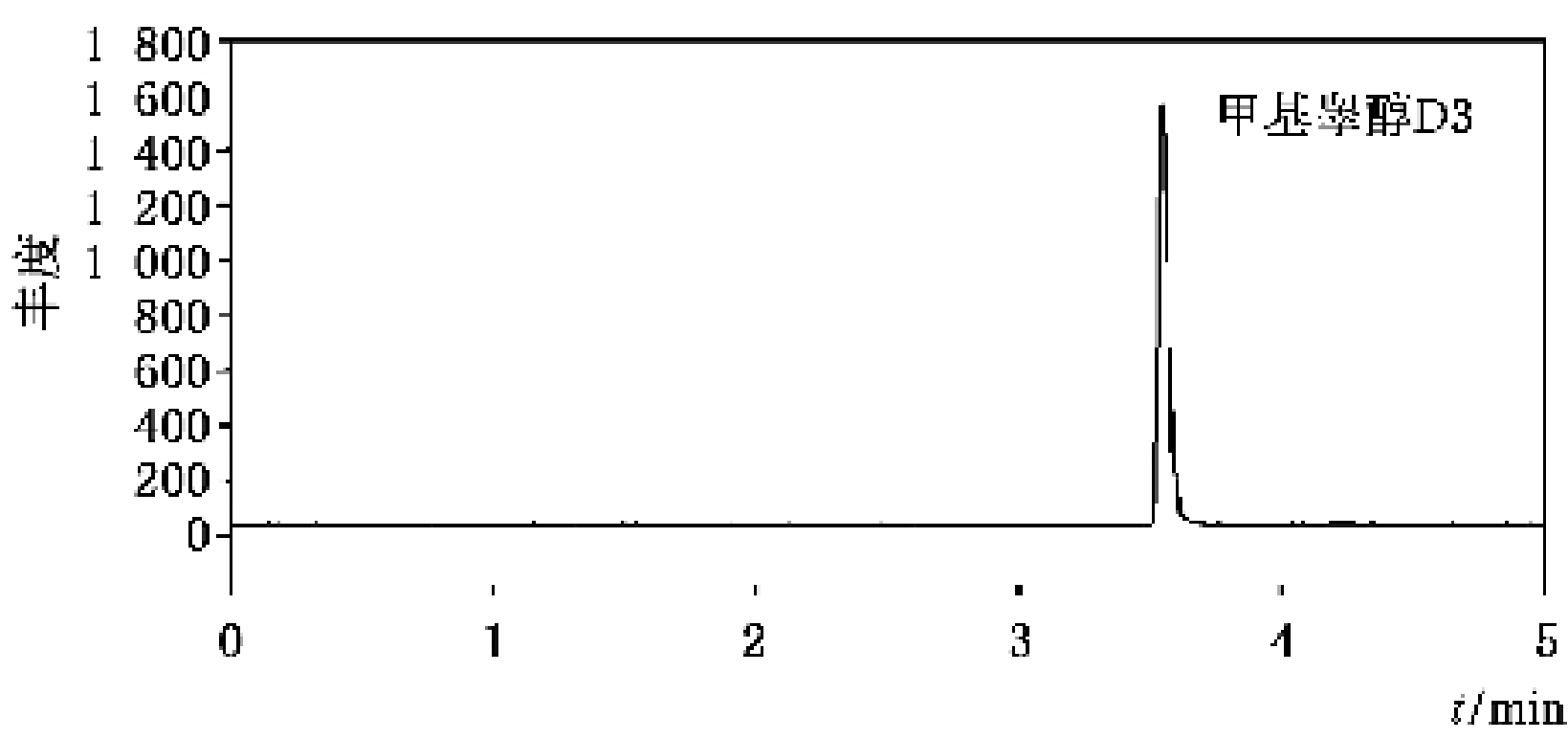


图 B.1 (续)