

化粧品中aminoether型之antihistamine成分以LC/MS/MS分析之檢驗方法建立

許閻顯 黃守潔 陳玉盆 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究利用超高效液相層析串聯式質譜儀(UPLC/MS/MS)，建立一簡便快速的分析方法，可同步分析化粧品中bromodiphenhydramine、carbinoxamine、clemastine、diphenhydramine、diphenylpyraline、doxylamine等6種常見Aminoether型antihistamine成分。檢體以甲醇溶解後，經ACQUITY UPLC HSS T3層析管柱(2.1×100 mm, 1.8 μm)，採用0.1%甲酸溶液及甲醇/乙腈(75:25, v/v)溶液為移動相作梯度沖提，並以多重反應監測模式(MRM)偵測，6種成分之標準曲線線性範圍為0.25-10 ng/mL，線性回歸係數 r^2 皆為0.995以上。同日內及異日間之相對標準偏差均小於11.8%，添加回收試驗之回收率介於90.9-113.9%，相對標準偏差皆小於13.1%，定量極限皆可達0.5 mg/g。應用本研究所建立之方法檢測市售頭部用化粧品共25件，結果均符合相關規定。

關鍵詞：化粧品、抗組織胺、超高效液相層析串聯質譜儀

前言

組織胺(histamine)為人體內化學傳導物質，廣泛存在於組織中，影響訊息的傳遞及細胞反應，如過敏、發炎、睡眠、賀爾蒙分泌及體溫調節等功能，因此會引起癢、打噴嚏、流鼻水及局部紅腫等現象⁽¹⁾，對於發生上述症狀時，經常會使用抗組織胺藥物來減緩症狀所產生之不適感。

抗組織胺藥物為組織胺受體拮抗劑(histamine antagonist)，可與組織胺對組織胺受體(histamine receptor)產生競爭作用，減少組織胺與受體結合，或是抑制組胺酸脫羧酶(histidine decarboxylase)的活性，減少組胺酸(histidine)轉變成組織胺，進而達到減緩不適症狀之產生。目前抗組織胺藥物依結合受體類型分為四類，分別為H1、H2、H3及H4，而大

部分與過敏反應相關的是第1型受體，其主要分布於呼吸道、消化系統、血管平滑肌及大腦，而第一代抗組織胺藥物大都為H1受體藥物⁽²⁾，藥物類型依化學結構差異主要分為六大類，分別為乙醚胺類(Aminoethers)、乙二胺類(Ethylene diamines)、哌嗪類(Piperazines)、丙胺類(Propyl amines)、吩噻嗪類(Phenothiazine)及二苯環庚烯/庚烷類(Dibenzocycloheptene/heptane)⁽³⁾，而依據現行化粧品管理規定⁽⁴⁾，化粧品中Aminoether型以外者不得使用，頭部以外之部位不得使用，限量為0.01%，且歸類為含藥化粧品管理，依化粧品衛生管理條例⁽⁵⁾規定，應向衛生福利部食品藥物管理署申請查驗登記，經核准並發給許可證後，才可製造或輸入販售，經查目前含該類成分之化粧品許可證共有33張。為確保民眾健康，本研究擬利用超高效液相層析(ultra performance liquid

chromatography, UPLC) 搭配串聯式質譜儀 (mass/mass)，建立快速簡便之檢測方法，可同時分析化粧品中6種Aminoether型抗組織胺成分：bromodiphenhydramine、carbinoxamine、clemastine、diphenhydramine、diphenpyraline 及 doxylamine，所建立之方法將公開供各界參考。

材料與方法

一、材料

(一) 檢體來源

本研究檢測用檢體為自行價購之化粧品檢體，共計25件。

(二) 試藥

bromodiphenhydramine、carbinoxamine、clemastine、diphenhydramine、diphenpyraline 及 doxylamine 對照用標準品皆為 USP 級標準品；甲醇及乙腈採用液相層析級；甲酸購自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, Missouri, USA)；濾膜 (0.22 μm ，Nylone 材質) 購自 Merck 公司 (Frankfurter Straße, Darmstadt, Germany)。

二、儀器及設備

液相層析系統含自動進樣裝置、線上除氣裝置、四動相混合幫浦與 10 L 樣品圈 (sample loop) (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) 搭配串聯式質譜系統，搭配電灑游離法 (electrospray ionization, ESI)。所使用霧化氣體 (sheath gas) 及去溶劑氣體 (desolvation gas) 皆為氮氣；碰撞室 (collision chamber) 內所使用之碰撞氣體 (collision gas) 為氬氣。層析管柱 (ACQUITY UPLC HSS T3, I.D. 2.1 \times 100 mm, 1.8 μm , Waters Corp.)。超純水系統 (Milli-Q, Billerica, Massachusetts, USA)。

三、標準品原液之配製

分別取 6 種抗組織胺對照用標準品約 50 mg，精確稱定，分別以 50% 甲醇溶液溶解並定

容至 50 mL，作為標準原液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，4 $^{\circ}\text{C}$ 儲藏。

四、檢液之配製

取經均質之檢體約 1.0 g，精確稱定，加入甲醇 10 mL，經超音波振盪 30 分鐘後，以甲醇定容至 20 mL，再精確量取 0.2 mL 置於容量瓶中，以 50% 甲醇溶液定容至 20 mL，再以 0.22 μm Nylone 濾膜過濾後，供做檢液。

五、液相層析串聯質譜條件

(一) 液相層析儀

層析管柱：ACQUITY UPLC HSS T3，2.1 \times 100 mm，1.8 mm

移動相：A 液為 0.1% 甲酸溶液；

B 液為 甲醇/乙腈 (75: 25, v/v) 溶液，移動相梯度如表一

層析管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$

流速：0.25 mL/min

注入量：2.5 mL

(二) 串聯質譜儀 (離子源採電灑法離子化，偵測正/負離子)

毛細管電壓：3.98 kV

離子源溫度：150 $^{\circ}\text{C}$

溶媒揮散溫度：500 $^{\circ}\text{C}$

偵測模式：多重反應偵測

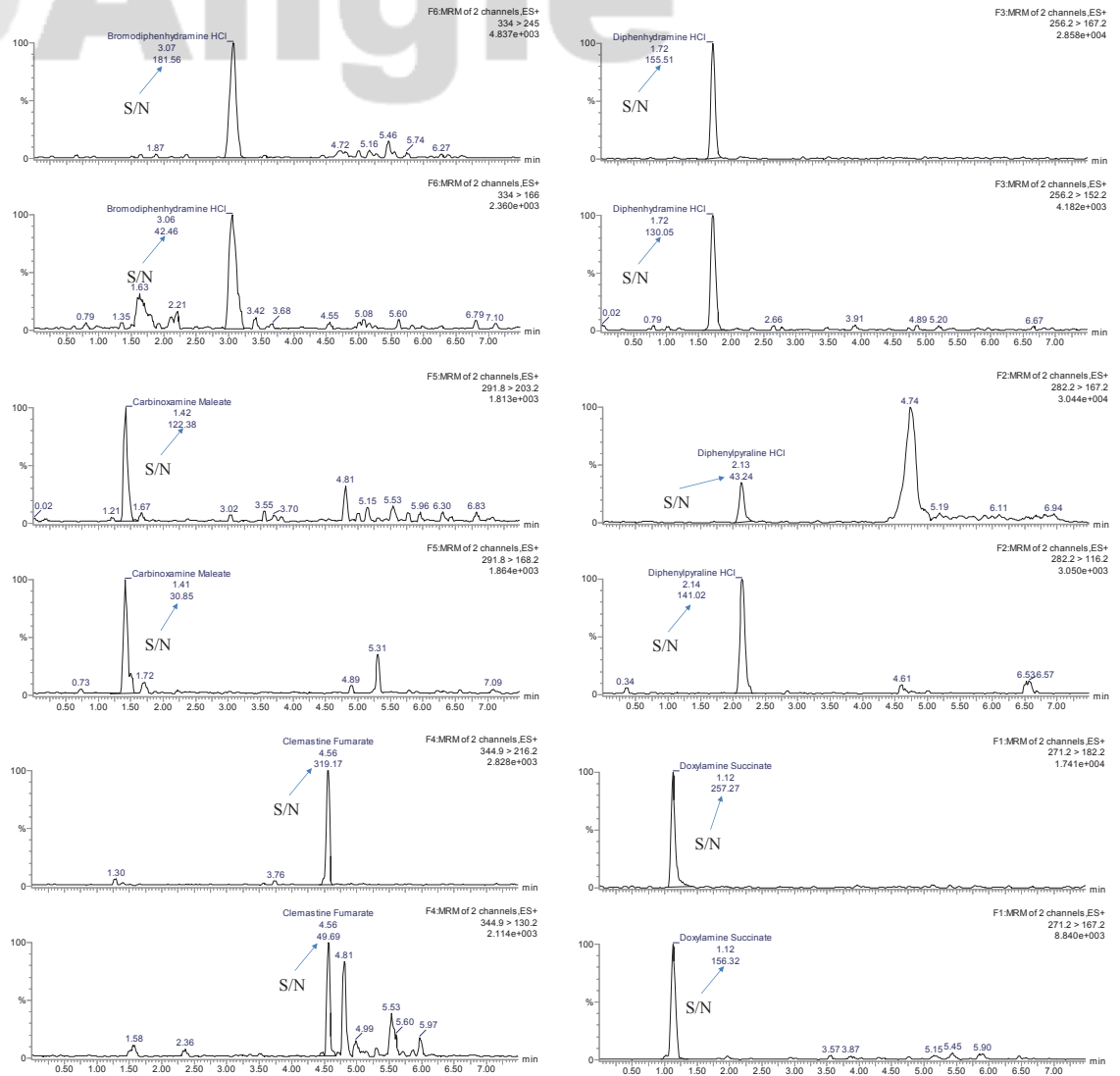
六、標準曲線製作

精確量取 6 種抗組織胺混和標準溶液，濃度範圍為 0.25-10 ng/mL，經濾膜過濾後進行分析，以波峰面積對濃度作圖，製作標準曲線。

表一、梯度沖提 (gradient) 條件

時間	移動相溶液 A (%)	移動相溶液 B (%)
0 \rightarrow 3	45 \rightarrow 45	55 \rightarrow 55
3 \rightarrow 3.5	45 \rightarrow 5	55 \rightarrow 95
3.5 \rightarrow 5	5 \rightarrow 5	95 \rightarrow 95
5 \rightarrow 6	5 \rightarrow 45	95 \rightarrow 55
6 \rightarrow 7.5	45 \rightarrow 45	55 \rightarrow 55

化粧品中aminoether型之antihistamine成分以LC/MS/MS分析之檢驗方法建立



圖一、化粧品中6種抗組織胺成分以LC/MS/MS分析之MRM圖譜

七、重複性分析

(一)同日間(intraday)

配製5種濃度的標準溶液，於同一日內連續分析3次，計算相對標準偏差(RSD%)， $n=3$ 。

(二)異日間(interday)

配製5種濃度的標準溶液，於不同3日分析，每一濃度重複亦分析3次，計算相對標準偏差(RSD%)， $n=9$ 。

八、添加回收試驗

取空白檢體約1.0 g，添加3種不同濃度抗組織胺標準品，重複分析3次，求其濃度，計算其回收率(recovery)。

九、基質效應評估

於空白樣品中添加5種不同濃度抗組織胺標準品製作基質匹配檢量線，取基質匹配檢量線斜率扣除標準曲線斜率後再與標準曲線斜率

表二、多重反應監測(MRM)條件

分析物	離子化模式	離子對	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Bromodiphenhydramine	ESI ⁺	334 > 245 ^a	30	12
		334 > 166		33
Carbinoxamine maleate	ESI ⁺	291.8 > 203.2 ^a	24	15
		291.8 > 168.2		33
Clemastine fumarate	ESI ⁺	344.9 > 216.2 ^a	20	15
		344.9 > 130.2		15
Diphenhydramine HCl	ESI ⁺	256.2 > 167.2 ^a	22	12
		256.2 > 152.2		35
Diphenylpyraline HCl	ESI ⁺	282.2 > 167.2 ^a	20	16
		282.2 > 116.2		32
Doxylamine succinate	ESI ⁺	271.2 > 167.2 ^a	30	32
		271.2 > 182.2		16

a. 定量離子對

相除並以百分比表示。

十、定量極限評估

取經均質之空白檢體，加入適量標準溶液分別分析，每一添加量進行3重複試驗，就所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，以定性離子訊噪比大於3且定量離子訊噪比大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限(limit of quantification, LOQ)。

結果與討論

一、LC/MS/MS最適分析條件

本研究分別針對ACQUITY UPLC BEH C18、CSH Fluoro-Phenyl、CORTECS C18⁺及ACQUITY UPLC HSS T3等4種層析管柱進行評估，結果以ACQUITY UPLC HSS T3 (I.D. 2.1 × 100 mm, 1.8 μm)有較好的分析效果。移動相選擇則參考Gergov等人研究⁽⁶⁾，移動相A採用0.1%甲酸溶液，移動相B為乙腈，進行梯度沖提，結果發現有溶劑效應(solvent effect)，當移動相B調整為甲醇/乙腈(75: 25, v/v)溶液時則明顯改善溶劑效應，梯度條件如表一，流速

為0.3 mL/min，可於7分鐘內完成分析。利用正/負離子電灑法多重反應偵測，6種抗組織胺成分選定之母離子皆為[M+H]⁺，由母離子所形成的碎片中，挑選具分子特異性之子離子做為MRM定性離子，以訊號較強之子離子做為定量離子，所得最佳化參數值如表二所示。

二、方法確效試驗

Bromodiphenhydramine、clemastine、diphenhydramine及diphenpyraline之標準溶液線性範圍為0.25-5 ng/mL，carbinoxamine及doxylamine之標準溶液線性範圍則為0.5-10 ng/mL，分別配製5種不同濃度之標準溶液，於同日內及異日間分析，其結果如表三，同日內及異日間試驗之相對標準偏差分別介於0.88-7.36%及0.19-8.69%之間，顯示出本研究方法具有良好之再現性。取經均質之空白檢體，添加6種待測物混合標準溶液，使其最終濃度介於0.5-5 mg/g，所得之添加回收率如表四所示，其回收率介於90.9-113.8%，相對標準偏差(RSD)均小於13.1%。分別製作標準曲線及基質匹配檢量線，以斜

化粧品中aminoether型之antihistamine成分以LC/MS/MS分析之檢驗方法建立

表三、6種抗組織胺成分同日(intar-day)及異日(inter-day)間重複性分析結果

Compound	Concentration (ng/mL)					RSD (%)	
	1	2	3	4	5	Intraday	Interday
Bromodiphenhydramine	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	2.36-6.09	0.51-7.49
Carbinoxamine	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	1.17-6.31	0.51-6.54
Clemastine	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	0.88-4.90	1.33-7.61
Diphenhydramine	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	1.87-7.36	0.20-8.69
Diphenylpyraline	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	1.37-6.96	0.19-8.01
Doxylamine	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	0.91-5.17	0.34-7.30

表四、6種抗組織胺成分添加回收結果

Compound	Spiked level (ng/g)	Recovery ^a (%)	RSD (%)
Bromodiphenhydramine	0.5	96.62	8.87
	1.0	108.72	12.49
	2.0	101.43	6.90
Carbinoxamine	1.0	95.83	9.16
	2.0	96.99	13.12
	5.0	94.08	5.63
Clemastine	0.5	102.18	11.35
	1.0	99.27	7.61
	2.0	105.93	8.65
Diphenhydramine	0.5	96.64	5.18
	1.0	97.41	5.25
	2.0	90.91	2.64
Diphenylpyraline	0.5	98.96	8.31
	1.0	103.45	7.82
	2.0	98.15	4.38
Doxylamine	1.0	97.82	7.43
	2.0	102.29	0.87
	5.0	113.85	1.95

a. n=3

率評估基質效應，6種抗組織胺之基質評估效應皆介於 $\pm 11\%$ (表五)，顯示基質效應不明顯。由以上結果得知，本分析方法具有良好之回收率。以定性離子訊噪比大於3且定量離子大於10之最低濃度為檢驗方法之定量極限，bromodiphenhydramine、clemastine、diphenhydramine及diphenpyraline均為0.5 mg/g，carbinoxamine及doxylamine均為1.0

mg/g。

三、市售產品之檢驗

應用本研究所建立之方法檢驗市售頭部類化粧品共25件，結果1件養髮液及1件洗髮精標示許可證字號，均檢出diphenhydramine 0.01%，與原查驗登記相符，其餘23件則均未檢出，與規定相符。

表五、基質效應之評估

分析物	基質匹配檢量線		標準曲線		基質效應評估
	斜率 (a)	截距 (b)	斜率 (A)	截距 (B)	$\frac{a \times A}{A} \times 100\%$
Bromodiphenhydramine	2504.049	85.488	2711.578	104.961	-7.65%
Carbinoxamine	1712.243	-197.330	1869.501	-31.183	-8.41%
Clemastine	6839.831	-216.649	7055.813	228.111	-3.06%
Diphenhydramine	3747.583	-219.230	3389.499	130.195	10.56%
Diphenylpyraline	307.435	0.741	333.347	-2.618	-7.77%
Doxylamine	779.883	-101.269	816.815	40.941	-4.52%

本研究透過超高效液相層析串聯質譜之優勢，可準確鑑別及定量，方法之流程簡單，回收率及再現性皆均符合歐盟2002/657/EC⁽⁷⁾要求。本檢驗方法將公開供各界作為檢驗化粧品中6種抗組織胺成分之參考。

參考文獻

1. Wikipedia. 2015. Histamine. [http://en.wikipedia.org/wiki/Histamine].
2. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S. and *et al.* 2011. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475(7354): 65-70.
3. DeRuiter, J. 2001. Principles of Drug Action 2. [http://www.auburn.edu/~deruija/hist_antihis.pdf].
4. 行政院衛生署食品藥物管理局。2010。化粧品衛生管理條例暨相關法規彙編。158頁。[http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=191299.07.01]。
5. 衛生福利部。2002。化粧品衛生管理條例。91.06.12總統華總一義字第09100119210號令。
6. Gergov, M., Robson, J. N., Ojanpera, I. and *et al.* 2001. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by chromatography ionspray tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 121(1-2): 108-115.
7. Commission of the European (EU). 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the analytical methods and the interpretation of results. 2002/657/EC, OJ L221/8.

Determination of Antihistamines in Cosmetics by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

KUO-HSIEN HSU, SHOU-CHIEH HAUNG, YU-PEN CHEN,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

In this study, a simple and rapid UPLC/MS/MS method was set up for the quantification of 6 antihistamines, namely bromodiphenhydramine, carbinoxamine, clemastine, diphenhydramine, diphenylpyraline and doxylamine, in cosmetics. The samples were dissolved in methanol and analyzed using an Acquity UPLC HSS T3 (I.D. 2.1 mm x 10 cm, 1.8 mm) column with 0.1% formic acid and methanol/acetonitrile (75: 25, v/v) solution as eluents under a gradient program. The linear concentrations of 6 standard solutions were in the range of 0.25-10 ng/mL with r^2 values greater than 0.995. The average recoveries of 6 compounds spiked into the samples were 90.9-113.8% and the relative standard deviations of average recoveries were less than 13.1%. The limits of quantification were 0.5 mg/g for bromodiphenhydramine, clemastine, diphenhydramine and diphenylpyraline and 1 mg/g for carbinoxamine and doxylamine. The test results showed that all of the 25 commercial cosmetics products were compliant with the regulations.

Key words: cosmetics, antihistamine, UPLC/MS/MS