



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106443019 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610797768.5

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 广东省药品检验所

地址 510180 广东省广州市越秀区惠福西路进步里2号

(72)发明人 方继辉 汪瑾彦 李杨杰

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

代理人 胡辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/559(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种用于快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法。利用磷酸缓冲液作为样品稀释液,用于快速检测化妆品的糖皮质激素。每500ml样品稀释液中含有下列组分:2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.4g  $\text{NaCl}$ , 余量水。利用本发明的样品稀释液可以很好的将化妆品(包括水剂、乳剂、膏霜剂化妆品)中各种糖皮质激素和化妆品中的其他成分较好地分开,稀释后得到的待检测样品溶液可以用市面上常用的地塞米松检测卡进行检测。本发明样品稀释液和方法可以很好的检测至少11种糖皮质激素化合物,其中水系化妆品方法检出限为 $1 \mu\text{g/g}$ ,乳、膏霜系化妆品方法检出限为 $2 \mu\text{g/g}$ 。

1. 磷酸盐缓冲液在快速检测化妆品的糖皮质激素中作为样品稀释液的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠的缓冲液,其浓度分别为0.01-0.03M、0.003-0.005M和0.06-0.1M,pH为7-9。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠的缓冲液,其浓度分别为0.01-0.02M、0.003-0.0045M和0.06-0.096M,pH为7-8。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:磷酸盐缓冲液的加入量为每0.5-1g待测化妆品样品,加入磷酸盐缓冲液至10mL。
5. 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的样品稀释液,其特征在于:每500ml样品稀释液中含有下列组分:2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.4gNaCl,余量水。
6. 根据权利要求5所述的样品稀释液,其特征在于:该样品稀释液的pH值为7.4。
7. 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的试剂盒,其特征在于:包含地塞米松检测卡和权利要求5-6任一项所述的样品稀释液。
8. 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的方法,其特征在于,包括下列步骤:
  - 1) 样品预处理:取0.5-1g样品,加入样品稀释液至10mL,振荡混合,得到待测样品溶液;其中样品稀释液如权利要求5-6任一项所述;
  - 2) 吸取待检样品溶液,滴加3-5滴于地塞米松检测卡的加样孔中,5-10分钟后读取结果。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:如果检测卡T线不显色则判定样品中含有糖皮质激素,如果检测卡T线显色则判定样品中不含有糖皮质激素。
10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:糖皮质激素包括氢化可的松、倍他米松、地塞米松、醋酸地塞米松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、醋酸泼尼松和/或泼尼松。

## 一种用于快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化妆品分析领域,具体涉及一种用于快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法。

### 背景技术

[0002] 糖皮质激素是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素,主要为皮质醇(cortisol),具有调节糖、脂肪、和蛋白质的生物合成和代谢的作用,还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒、抗休克作用。

[0003] 短时间使用含有糖皮质激素的化妆品可使皮肤光滑细腻、红润白嫩,有着较好的美容效果。因此常被一些不良化妆品生产商非法添加到名目繁多的各类化妆品中,给消费者带来严重的健康损害。如果长期使用含有这类物质的化妆品,皮肤就会对激素产生依赖,而且很难摆脱。长期使用后则会发生皮肤变薄、毛细血管扩张、毛囊萎缩,一旦停用,皮肤就会发红、发痒,出现红斑、丘疹、脱屑等,还会引起骨质疏松、肌肉萎缩、生长发育迟缓、诱发或加重感染和消化性溃疡、情绪异常、代谢紊乱等各种不良反应。因此,我国《化妆品安全技术规范》(2015版)规定此类物质为禁用成分。

[0004] 目前,化妆品中糖皮质激素检测通常使用液相色谱质谱联用进行分析,操作繁琐、检验时间长,不适用于监督部门、检测机构、各类机构现场快速检测的要求。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

磷酸盐缓冲液在快速检测化妆品的糖皮质激素中作为样品稀释液的应用。

[0007] 优选的,磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠的缓冲液,其浓度分别为0.01-0.03M、0.003-0.005M和0.06-0.1M,pH为7-9。

[0008] 优选的,磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠的缓冲液,其浓度分别为0.01-0.02M、0.003-0.0045M和0.06-0.096M,pH为7-8。

[0009] 优选的,磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠的缓冲液,其浓度分别为0.016M、0.0038M和0.082M,pH为7.4。

[0010] 优选的,磷酸盐缓冲液的加入量为每0.5-1g待测化妆品样品,加入磷酸盐缓冲液至10mL。

[0011] 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的样品稀释液,每500ml样品稀释液中含有下列组分:2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.4g $\text{NaCl}$ ,余量水。

[0012] 优选的,该样品稀释液的pH值为7.4。

[0013] 由于该样品稀释液为缓冲溶液,接近浓度或相似配方的溶液其pH值仍可达到7.4,这些接近浓度或相似配方的溶液均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

[0014] 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的试剂盒,包含地塞米松检测卡和上述任

一项所述的样品稀释液。

[0015] 一种用于快速检测化妆品中糖皮质激素的方法,包括下列步骤:

1) 样品预处理:取0.5-1g样品,加入样品稀释液至10mL,振荡混合,得到待检测样品溶液;其中样品稀释液如上述任一项所述。

[0016] 2) 吸取待检样品溶液,滴加3-5滴于地塞米松检测卡的加样孔中,5-10分钟后读取结果。

[0017] 优选的,如果检测卡T线不显色则判定样品中含有糖皮质激素,如果检测卡T线显色则判定样品中不含有糖皮质激素。

[0018] 优选的,糖皮质激素包括氢化可的松、倍他米松、地塞米松、醋酸地塞米松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、醋酸泼尼松和泼尼松。

[0019] 本发明的胶体金试纸条应用竞争抑制免疫层析的原理,样本中的待测物在流动的过程中与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合,抑制了抗体和NC膜检测线(T)上待测物-蛋白偶联物的结合。当样品目标物经样品缓冲液提取稀释溶解,溶液滴入样品孔后,样品溶液中的糖皮质激素与金标抗体相结合,进而封闭金标抗体上糖皮质激素的抗原结合点,阻止金标抗体与纤维素膜上糖皮质激素偶联物结合,使之显色较弱,甚至不显色;反之,如样品溶液中没有糖皮质激素,则不能阻止金标抗体与纤维素膜上的糖皮质激素偶联物结合,从而显色较强。

[0020] 因为待测物为化妆品,它有水剂、乳剂、膏霜剂之分,其基质各不相同,所以非法添加的糖皮质激素存在于化妆品复杂组分中。目前市售的各种糖皮质激素检测卡及其试剂盒大多没有配套稀释液,少数有配套稀释液,但是稀释液的量较少,如40片试纸配备50mL稀释液;加上市售的各种检测卡往往只是针对其中一种糖皮质激素(比如地塞米松)进行检测,所以无法满足市场上化妆品中非法添加的各种糖皮质激素的检测。

[0021] 本发明的有益效果是:

利用本发明的样品稀释液可以很好的把化妆品(包括水剂、乳剂、膏霜剂化妆品)中各种糖皮质激素从化妆品中提取出来,稀释后得到的待检测样品溶液可以用市面上常用的地塞米松检测卡进行检测。

[0022] 本发明样品稀释液和提取方法可以很好的检测下述糖皮质激素化合物种类包括:氢化可的松、倍他米松、地塞米松、醋酸地塞米松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、醋酸泼尼松、泼尼松。其中水系化妆品方法检出限为1 $\mu$ g/g,乳、膏霜系化妆品方法检出限为2 $\mu$ g/g。

[0023] 通过本发明方法的处理,将一种糖皮质激素检测卡同时检测化妆品中多种糖皮质激素,覆盖种类多,灵敏度高,准确度高,操作简单、检测时间短,不需要专门设备,适合现场操作,适用于监督部门、检测机构、各类机构现场快速检测的要求。

## 附图说明

[0024] 图1是用于糖皮质激素检测的检测卡操作示意图;

图2是用于糖皮质激素检测的检测卡结果判断图;

图3是该快速检测化妆品中多种糖皮质激素的方法所涵盖的11种化合物及其阳性示图,图中浓度为加在检测卡上的样液浓度;

图4为检测结果；

图5为检测结果。

### 具体实施方式

[0025] 本发明的胶体金试纸条应用竞争抑制免疫层析的原理，样本中的待测物在流动的过程中与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合，抑制了抗体和NC膜检测线(T)上待测物—蛋白偶联物的结合。当样品目标物经样品缓冲液提取稀释溶解，溶液滴入样品孔后，样品溶液中的糖皮质激素与金标抗体相结合，进而封闭金标抗体上糖皮质激素的抗原结合点，阻止金标抗体与纤维素膜上糖皮质激素偶联物结合，使之显色较弱，甚至不显色；反之，如样品溶液中没有糖皮质激素，则不能阻止金标抗体与纤维素膜上的糖皮质激素偶联物结合，从而显色较强(见图1)。

[0026] 本发明所使用的胶体金试纸条购自相关耗材供应公司，一般无配套的稀释液或配少量的稀释液。

[0027] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明，但并不局限于此。

#### [0028] 实施例1

用于快速检测化妆品中糖皮质激素的方法，包括如下步骤：

##### 1. 配制样品稀释液

称取2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.4g  $\text{NaCl}$ 于500mL烧杯中，加水定容至500mL刻度，充分溶解摇匀，即得pH值为7.4的样品稀释液。

[0029] 由于该样品稀释液为缓冲溶液，熟悉本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下配制出接近浓度或相似配方的溶液，这些接近浓度或相似配方的溶液均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

##### [0030] 2. 样品预处理：

水剂化妆品：取1g样品加入10mL样品提取管中，用样品缓冲稀释液定容至刻度，充分振摇混匀后作为待检样品溶液。

[0031] 乳、膏霜剂化状品：取0.5g样品加入10mL样品提取管中，用样品缓冲稀释液定容至刻度，充分振摇混匀后作为待检样品溶液。

##### [0032] 3. 检测方法：

拆开包装袋，取出地塞米松检测卡；用滴管吸取待检样品溶液，垂直滴加3-5滴于加样孔中。加样后开始计时，5分钟后即可读取结果；若检测线与控制线显色深浅对比不明显，可在10分钟后，再进行结果判读。

##### [0033] 4. 结果判断：

阴性(-)：T线有显色，表示样品中糖皮质激素浓度低于检出限或不含糖皮质激素。

[0034] 阳性(+)：T线无显色，则表示样品中糖皮质激素浓度高于检出限。

[0035] 无效：未出现质控C线，表明操作过程不正确或检测卡已失效。可参照图2进行结果判定。

[0036] 如果结果显示阳性，需要在实验室采用国家相关法定方法进一步进行实验分析以确证。

#### [0037] 实施例2

利用实施例1的方法检测下述11种化合物种类包括：氢化可的松、倍他米松、地塞米松、醋酸地塞米松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、醋酸泼尼松、泼尼松。

[0038] 准确称取各标准物质各5.0mg,用乙醇溶解定容至5mL,得1mg/mL单标储备液,然后用乙醇逐级稀释至10 $\mu$ g/mL,得标准工作溶液。

[0039] 糖皮质激素标准溶液的配制:将标准工作溶液用样品缓冲稀释液逐级稀释至0.1 $\mu$ g/mL,待测。

[0040] 检测步骤同实施例1。其结果表明,该11种化合物均可检出,其阳性图见图3。

[0041] 实施例3

利用实施例1的方法进行空白样品加标试验。分别称取乳、膏霜空白样品0.5g,取水系空白样品1mL于样品提取管中,各平行取11份,分别加入上述实施例2的11种单标溶液,得到包含上述11种糖皮质激素的乳、膏霜样品。

[0042] 用样品缓冲稀释液稀释定容至10mL,使其浓度为0.1 $\mu$ g/mL待测。检测步骤同实施例1。其结果表明,该11种化合物加标于空白样品中,与均可检出阳性,水系化妆品方法检出限为1 $\mu$ g/g,乳、膏霜系化妆品方法检出限为2 $\mu$ g/g。

[0043] 实施例4

利用实施例1的方法对已知阳性的样品(见表1)进行试验。结果图4。

[0044] 表1阳性样品试验结果

编号	样品	浓度	快速检测结果
8723	某牌医肤膏	地塞米松 5.32mg/kg	阳性
10931	某牌精华霜	地塞米松 19.40mg/kg、 地塞米松醋酸酯 1.03mg/kg	阳性
11387	某牌修复霜	地塞米松 10.10mg/kg	阳性

图4结果表明均可检出阳性,和表1的结果一致。

[0045] 实施例5

共收集50批样品(13批水系化妆品,37批乳、膏霜剂化妆品)对本发明进行验证,同时与确证方法的结果进行比较,确证采用国家标准《GB/T 24800.2-2009化妆品中四十一一种糖皮质激素的测定液相色谱串联质谱法和薄层层析法》中的液质联用法,结果见表2。

[0046] 表2筛查结果和最终确证结果

快筛结果	确证		合计
	添加	未添加	
阳性 (8)	7	1	8
阴性 (42)	0	42	42
合计	7	43	50

表2结果显示:除1批样品检出假阳性外,其余均与确证结果一致,方法的准确率为98%,灵敏度为100%,特异度为97.7%,漏检为率0。

[0047] 对比例1

利用实施例1的方法检测雌激素,2 $\mu$ g/mL的雌激素标准溶液的试验结果见图5。由图5可知,T线有显色,呈阴性。可见具有类似甾体类结构的化合物如雌激素,不会对本方法造成干扰。本方法对糖皮质激素类化合物特异性良好。

[0048] 对比例2

利用市售地塞米松检测卡以及产品配套的缓冲液(40片检测卡配一瓶50mL的缓冲液)进行对比实验。

[0049] 按照产品说明书的指导进行稀释和检测,结果能检测11种糖皮质激素的一种或几种。

[0050] 按照本发明实施例1的样品预处理步骤开始进行试验,能检测11种糖皮质激素的一种或几种,但无法检测本发明所述的全部11种化合物。

[0051] 由于此产品配套的缓冲溶液是每40片检测卡配一瓶50mL的缓冲液,因此缓冲液的量远不能满足检测的需求,而本方法中的稀释液一次可制备500mL,且制备方法便捷快速,满足各类机构现场快速检测的要求。

[0052] 此外,如果根据每40片检测卡配一瓶50mL缓冲液的比例,即处理1份样品仅用约1.2mL缓冲液,如果按照本方法的方法,将取样量减少(水系0.1g,乳系0.05g),再加1mL缓冲液稀释。由于糖皮质激素在化妆品中属于非法添加成分,考虑样品的均匀性,取样量过少可能造成阳性样品漏筛。而本发明方法的取样量可保证化妆品中非法添加糖皮质激素的漏检率良好。

[0053] 对比例3

利用水替代本发明的样品稀释液进行实验,其他步骤同实施例1。结果能检测11种糖皮质激素的一种或几种,但无法检测本发明所述的全部11种化合物。

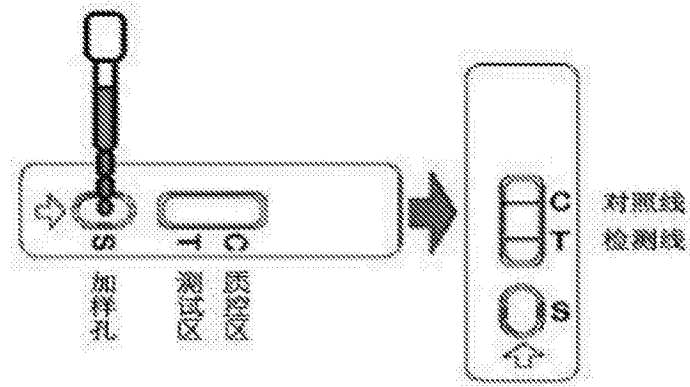


图1

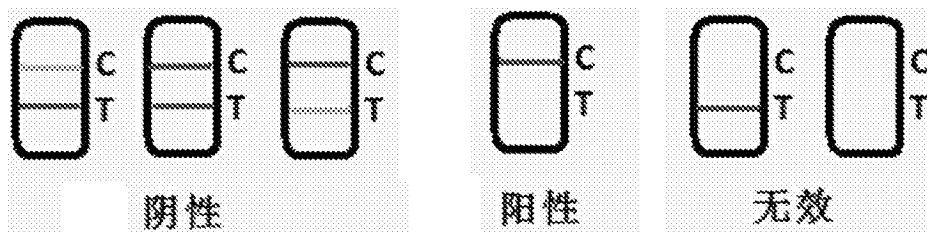


图2



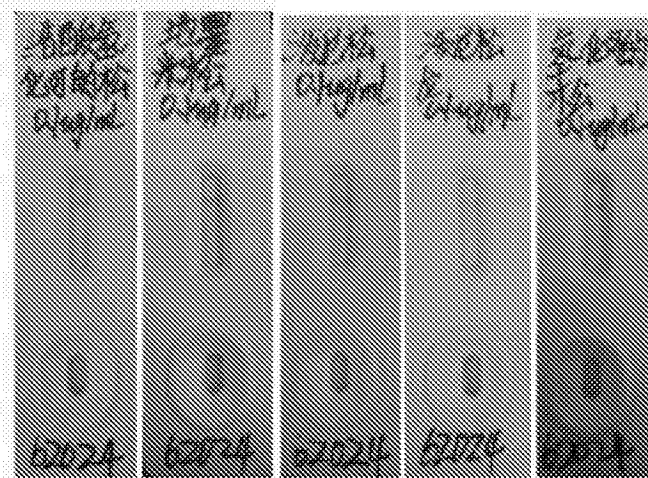
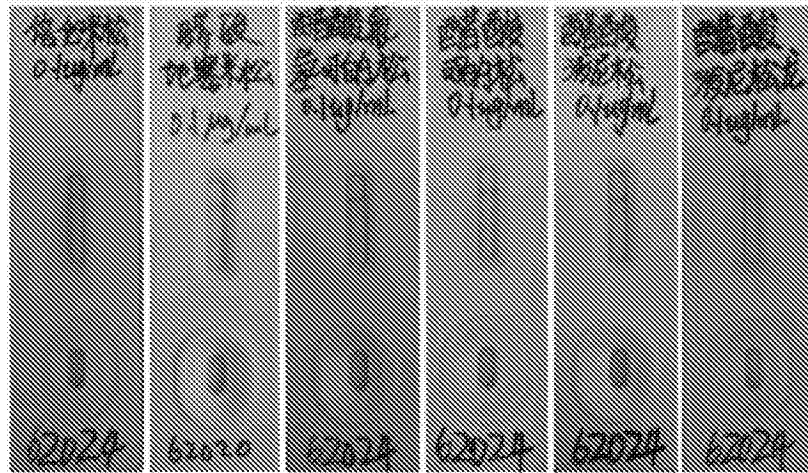


图3

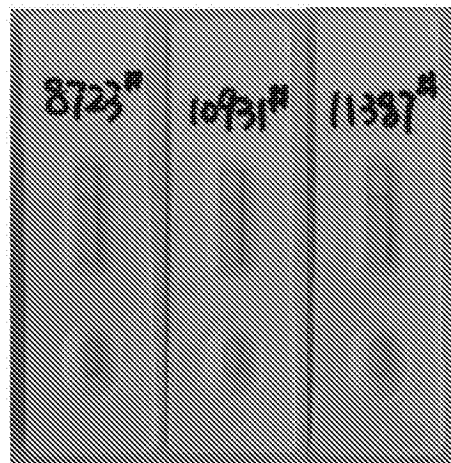


图4



图5