

# LC-MS/MS 法测定化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素的含量

## LCMSMS-477

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪建立了化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素含量的测定方法。分别使用标准品及样品加标进行了方法的线性、回收率及精密度的考察。结果显示该方法在 10~250 ng/mL 浓度范围内建立标准曲线，线性相关系数均大于 0.999，线性良好；精密度考察中各物质保留时间 RSD 分布在 0.04%~0.44%，峰面积 RSD 分布在 0.92%~4.10%；其不同浓度的样品加标回收率分布在 70.21%~108.89% 之间；9 种青霉素类抗生物质灵敏度测试 LOD 在 0.01~0.14 ng/mL (0.04~0.56 ng/g)，LOQ 在 0.03~0.42 ng/mL (0.12~1.68 ng/g)，表明仪器灵敏度良好；该方法分析速度快，灵敏度高，准确度高适用于化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素的含量测定，也可为相关从业人员分析检测提供参考。

**关键词：** 三重四极杆液相色谱质谱联用仪 化妆品 9 种禁用青霉素类抗生素

青霉素类抗生素如阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林等药物均属于天然或人工合成的抗菌药物，具有抗菌和消炎的作用。目前我国已将此类药物纳入处方药管理中，并严格控制其使用量。我国《化妆品安全技术规范》（2015 年版）明确规定此类物质为化妆品禁用成分。不仅如此，欧盟等很多国家都在化妆品相关标准中对抗菌药物的添加有所限定。原因就是化妆品中如果存在抗生素药物，长期使用可能导致皮炎、细菌耐药性等诸多症状，而抗生素药物里面的青霉素类药物可能导致白细胞减少，抑制骨髓生成，造成肝肾功能损伤等危害。但是一些化妆品的不法商家为追求其使用效果和经济利益，不顾消费者的健康安全，在化妆品中违法添加这些药物，长期使用这样的化妆品将会给消费者的身心健康造成巨大损害。

此前，我国涉及化妆品中抗菌药物检测的国家标

准方法有：《化妆品安全技术规范》（2015 年版）2.1 氟康唑等 9 种组分、2.2 盐酸美满霉素等 7 种组分、2.3 依诺沙星等 10 种组分等，为了增大市场监管力度及范围，2019 年 6 月 4 日，由国家市场监督管理总局和中国国家标准化管理委员会共同发布了化妆品中 9 种青霉素类抗生素的检测方法，并规定了采用高效液相色谱 - 串联质谱法对化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素的含量进行测定。

本文采用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，参照国家市场监督管理总局和中国国家标准化管理委员会共同发布的《化妆品中阿莫西林等 9 种禁用青霉素类抗生素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素含量的检测方法。该方法快速、准确、灵敏度高，可以用于市售化妆品中青霉素类抗生素药物的筛查和准确测定。

表 1 9 种青霉素类抗生素药物的化合物信息

序号	中文名称	英文名称	CAS#	分子式	分子量
1	阿莫西林	Amoxicilin Trihydrate	61336-70-7	$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$	419.40
2	氨苄西林	Ampicillin Trihydrate	7177-48-2	$C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$	403.45
3	哌拉西林	Piperacillin	61477-96-1	$C_{23}H_{27}N_5O_7S$	517.55
4	青霉素 G	Penicillin G potassium salt	113-98-4	$C_{16}H_{17}N_2O_4SK$	372.48
5	青霉素 V	Penicillin V potassium salt	132-98-9	$C_{16}H_{17}N_2O_5SK$	388.48
6	苯唑西林	Oxacillin sodium monohydrate	7240-38-2	$C_{19}H_{18}N_3NaO_5S \cdot H_2O$	441.43
7	氯唑西林	Cloxacillin sodium hydrate	7081-44-9	$C_{19}H_{19}ClN_3NaO_6S \cdot H_2O$	475.87
8	萘夫西林	Nafcillin sodium hydrate	7177-50-6	$C_{21}H_{23}N_2NaO_6S \cdot H_2O$	454.47
9	双氯西林	Dicloxacillin sodium hydrate	13412-64-1	$C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5S \cdot H_2O$	492.30

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器配置

本实验使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：岛津 Shim-pack GIST 100 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm (P/N:227-30001-04)

流动相：A 相：0.1% 乙酸水溶液；B 相：0.1% 乙酸乙腈溶液

流速：0.3 mL/min

进样量：10 μL

柱温：30℃

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序详见表 2。

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	5
3.10	Pumps	Pump B Conc.	50
10.00	Pumps	Pump B Conc.	50
10.10	Pumps	Pump B Conc.	5
12.00	Controller	Stop	

## 质谱条件

离子化模式: ESI (+) 模式扫描

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

加热气: 干燥空气 10.0 L/min

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

驻留时间: 30 ms

MRM 参数: 详见表 3

表 3 9 种青霉素类抗生素药物的 MRM 参数信息

序号	物质名称	电离方式	保留时间 (min)	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 Pre (V)	CE (V)	Q3 Pre (V)
1	阿莫西林	+	2.14	365.85	114.10*	-18	-22	-22
				365.85	349.15	-18	-9	-25
2	青霉素 G	+	4.63	334.85	160.05*	-17	-12	-17
				334.85	176.10	-17	-11	-19
3	氨苄西林	+	4.65	350.00	106.00*	-11	-21	-19
				350.00	160.00	-14	-14	-14
4	哌拉西林	+	4.99	517.90	143.10*	-26	-21	-27
				517.90	160.05	-26	-13	-30
5	青霉素 V	+	5.54	351.00	160.00*	-14	-15	-27
				351.00	114.00	-26	-30	-10
6	苯唑西林	+	5.80	401.85	243.00*	-20	-13	-26
				401.85	160.05	-29	-13	-17
7	氯唑西林	+	6.20	435.80	277.00*	-22	-13	-30
				435.80	160.05	-22	-13	-29
8	萘夫西林	+	6.39	415.10	199.10*	-21	-13	-21
				415.10	171.05	-21	-37	-18
9	双氯西林	+	7.02	469.75	160.05*	-17	-14	-17
				469.75	310.95	-24	-15	-23

\* 为定量离子对信息

## 1.3 标准溶液制备

标准储备液的配制: 分别精确称取表 1 中各组分标准品约 10 mg 至 10 mL 容量瓶中, 加入 5% 乙腈水溶液溶解并定容至刻度, 得到 1.0 mg/mL 的各标准物储备液。分别取适量各标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用 5% 乙腈水溶液进行稀释定容, 得到 10 µg/mL 混合标准中间液; 再将混合标准中间液逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、250 ng/mL 的标准工作曲线, 待上机分析。

## 1.4 样品前处理

准确称取化妆品样品 0.5 g (精确至 0.1 mg), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入 15 mL 乙腈提取液, 涡旋 30 s, 分散均匀, 超声提取 10 min, 再以 8000 r/min 转速离心 5 min, 吸取上清液于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷溶液, 振荡 1 min 后弃去正己烷, 最后将提取液转移至鸡心瓶中, 氮吹浓缩至近干, 加入 2 mL 水溶解残渣, 混匀后经 0.22 µm 滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液备用。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 9 种标准物质的 MRM 色谱图

按照 1.3 配制的 50 ng/mL 标准溶液，上机分析，得到 9 种青霉素类抗生素药物的 MRM 色谱图，详见图 1。

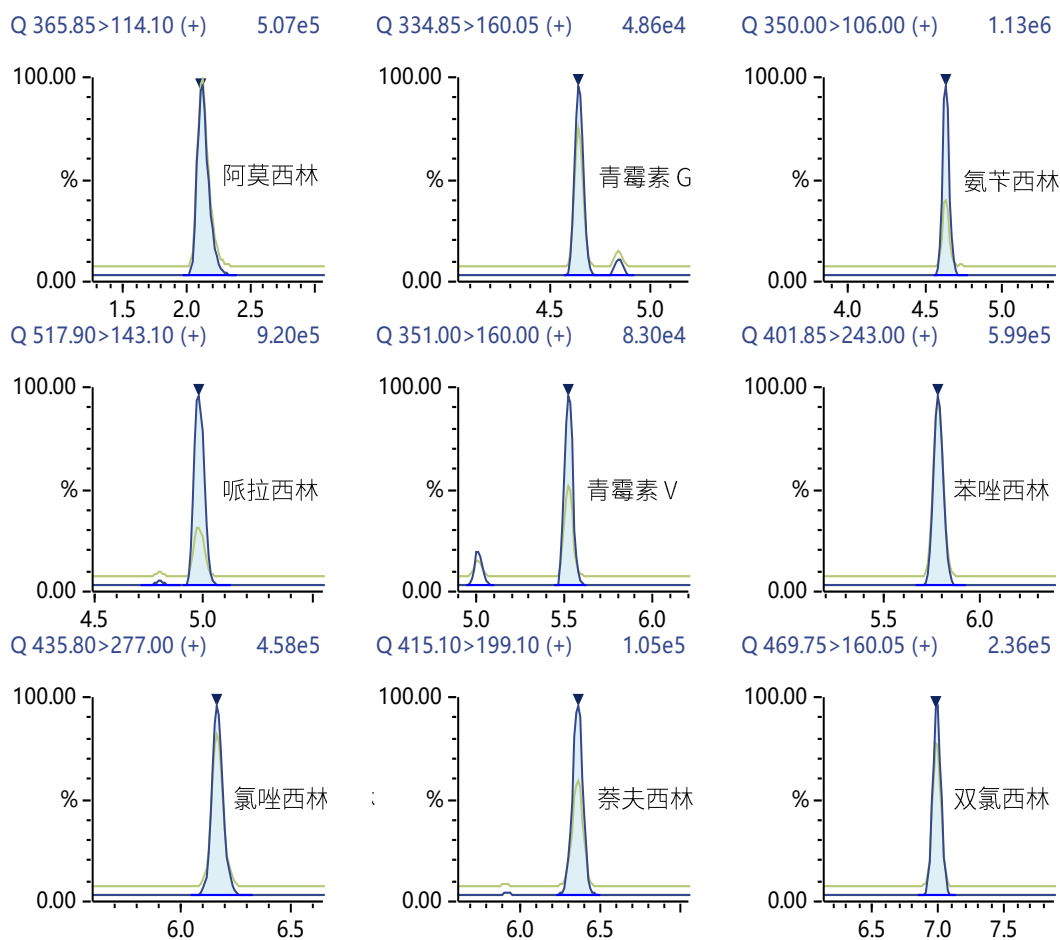


图 1 9 种青霉素类抗生素标准溶液的 MRM 色谱图 (50 ng/mL)

### 2.2 标准曲线线性范围

按照 1.3 方法配制标准系列溶液，上机分析得出各化合物的线性范围和线性关系，详见表 4。

表 4 9 种青霉素类抗生素药物的线性关系

序号	化合物	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	准确度 (%)
1	阿莫西林	$Y = (47757.1)X + (32543.7)$	10-250	0.9999	97.2~106.9
2	青霉素 G	$Y = (2578.95)X + (13199.2)$	10-250	0.9990	91.5~107.9
3	氨苄西林	$Y = (73901.3)X + (257158)$	10-250	0.9996	93.9~106.5
4	哌拉西林	$Y = (49397.8)X + (282341)$	10-250	0.9997	93.4~106.6
5	青霉素 V	$Y = (5468.04)X + (2360.71)$	10-250	0.9999	91.7~110.8
6	苯唑西林	$Y = (33781.1)X + (119153)$	10-250	0.9997	92.1~110.0
7	氯唑西林	$Y = (31539.4)X + (67731.1)$	10-250	0.9995	95.1~104.6
8	羧夫西林	$Y = (8036.79)X + (-6568.53)$	10-250	0.9999	97.9~102.5
9	双氯西林	$Y = (18227.4)X + (48273.0)$	10-250	0.9998	93.1~108.5

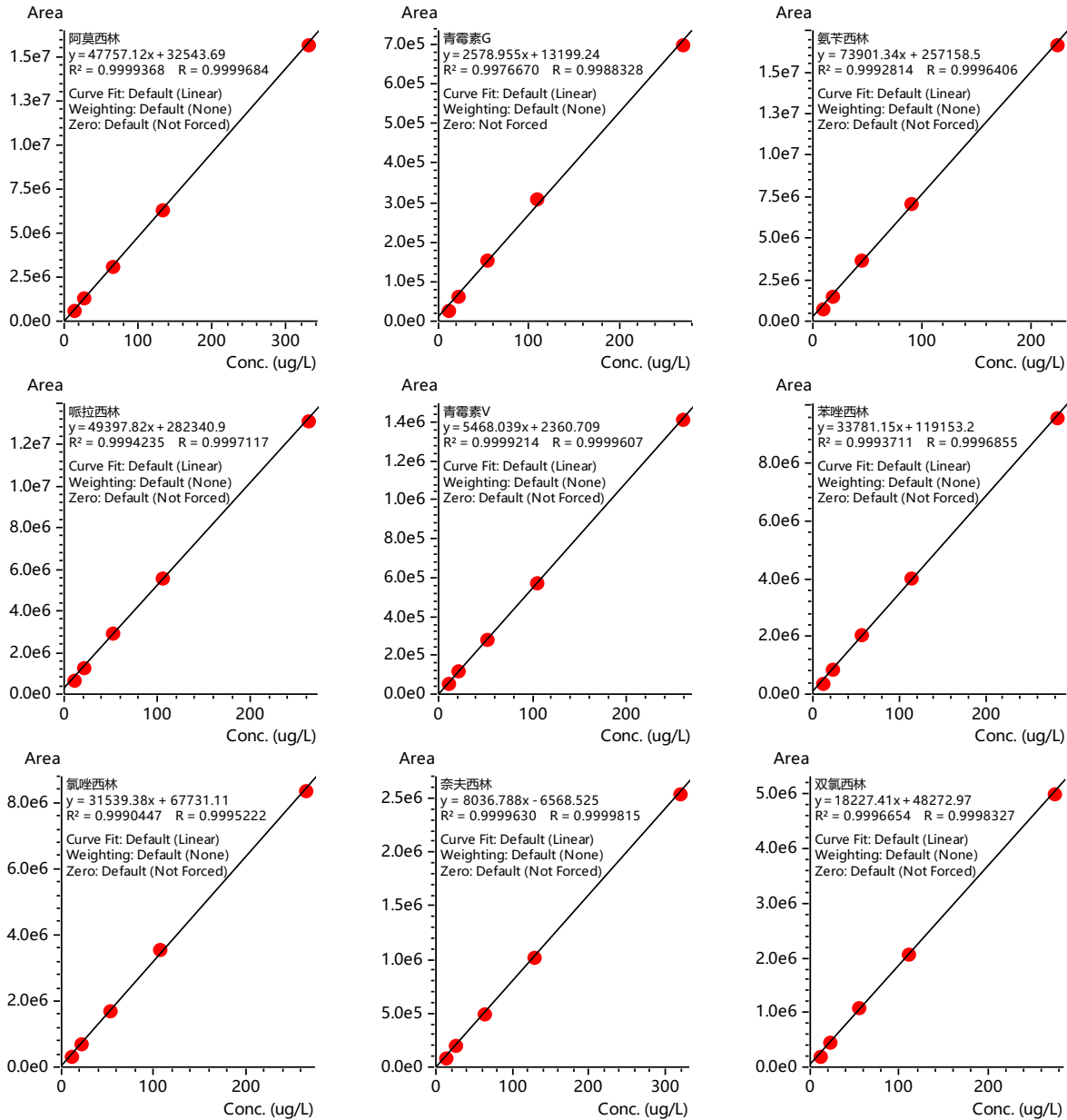


图 2 9 种青霉素类抗生素药物的校准曲线

### 2.3 精密度考察

分别取 10 ng/mL、50 ng/mL、250 ng/mL 的标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，平行测定 6 次计算保留时间 (RT) 和峰面积 (Area) 两者的 RSD%。结果显示各物质的保留时间 (RT) 的 RSD 在 0.04%~0.44%，峰面积 (Area) 的 RSD 在 0.92%~4.10%，实验结果表明精密度满足实验需求。具体结果详见表 5。

表 5 精密度考察结果 (n=6)

序号	物质名称	项目	RSD %		
			10 ng/mL	50 ng/mL	250 ng/mL
1	阿莫西林	RT	0.37	0.21	0.44
		Area	1.14	0.92	1.59
2	青霉素 G	RT	0.06	0.05	0.05
		Area	2.33	2.83	2.43
3	氨苄西林	RT	0.05	0.06	0.04
		Area	1.94	1.79	1.25
4	哌拉西林	RT	0.06	0.06	0.04
		Area	2.01	1.45	1.07
5	青霉素 V	RT	0.07	0.08	0.04
		Area	4.10	2.11	1.75
6	苯唑西林	RT	0.07	0.08	0.04
		Area	1.77	1.08	1.85
7	氯唑西林	RT	0.08	0.08	0.05
		Area	1.86	1.29	1.48
8	萘夫西林	RT	0.09	0.09	0.06
		Area	1.94	1.36	0.94
9	双氯西林	RT	0.08	0.10	0.06
		Area	1.67	1.43	1.72

#### 2.4 样品加标回收率考察

采用 1.4 方法测定市售某祛痘化妆品，未检出抗生素成分，并且在出峰区域无明显杂质干扰情况，样品色谱图见图 3；在该样品中分别精密加入混合标准品，加标量分别为 80 ng/g、200 ng/g 和 400 ng/g，制作三份加标回收样品，按 1.4 方法进行样品处理和测定，使用混合标准曲线进行回收率的计算，各化合物的回收率在 70.21%~108.89% 之间。具体结果详见表 6。

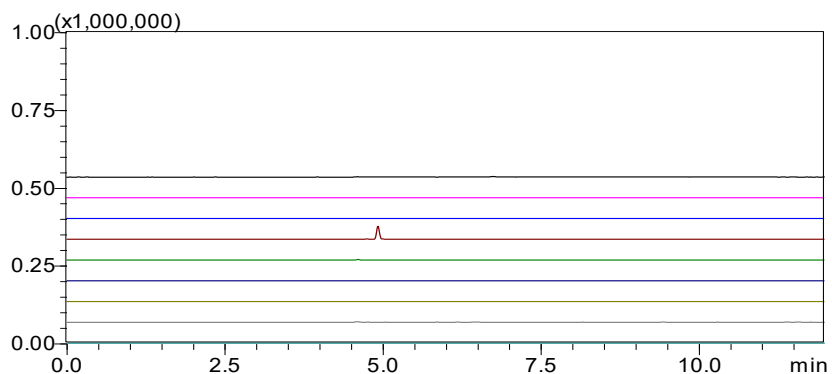
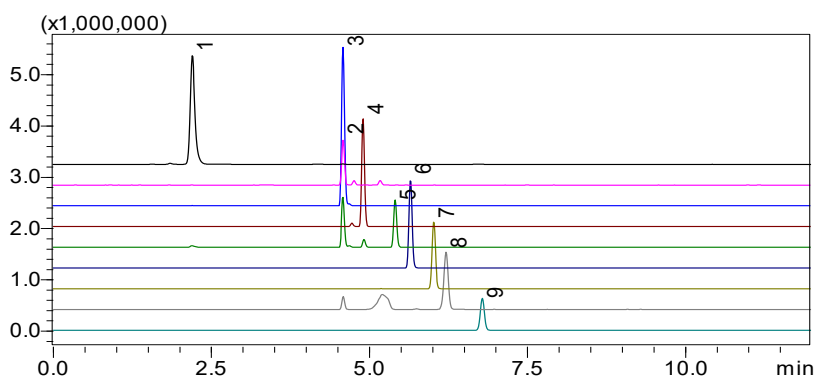


图 3 某化妆品提取液的 MRM 色谱图 (空白样品)



1: 阿莫西林; 2. 青霉素 G; 3. 氨苄西林; 4. 哌拉西林; 5. 青霉素 V;  
6. 苯唑西林; 7. 氯唑西林; 8. 萘夫西林; 9. 双氯西林。

图 4 某化妆品中加标量为 200 ng/g 的 MRM 色谱图 (加标样品)

表 6 样品加标回收率考察结果

序号	物质名称	样品含量平均值 (ng/g)	样品加标回收率 (%)		
			80 ng/g	200 ng/g	400 ng/g
1	阿莫西林	N.D.	87.74	92.24	89.31
2	青霉素 G	N.D.	87.27	105.86	108.89
3	氨苄西林	N.D.	85.17	102.13	108.01
4	哌拉西林	N.D.	82.47	92.76	94.21
5	青霉素 V	N.D.	74.48	71.36	70.21
6	苯唑西林	N.D.	71.09	78.40	78.85
7	氯唑西林	N.D.	73.34	79.99	81.14
8	萘夫西林	N.D.	80.82	84.85	83.53
9	双氯西林	N.D.	71.78	74.86	74.80

N.D. 表示未检出

## 2.5 检出限和定量限

在化妆品空白样中加入混标, 配成浓度为 10 ng/mL 的待测溶液, 考察仪器的灵敏度, 将处理好的样品按 1.2 中的分析条件进行测定。通过软件计算出方法的检出限和定量限, 具体数据详见表 7。在上述条件下, 9 种青霉素类抗生素物质的灵敏度 LOD 在 0.01~0.14 ng/mL (0.04~0.56 ng/g), LOQ 在 0.03~0.42 ng/mL (0.12~1.68 ng/g), 测试结果表明仪器灵敏度良好; 满足《化妆品中阿莫西林等 9 种禁用青霉素类抗生素的测定》的灵敏度 LOD=10 ng/g, LOQ=30 ng/g 的要求。

表 7 检出限和定量限

序号	物质名称	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	阿莫西林	0.050	0.150
2	青霉素 G	0.140	0.420
3	氨苄西林	0.010	0.030
4	哌拉西林	0.140	0.420
5	青霉素 V	0.060	0.180
6	苯唑西林	0.050	0.150
7	氯唑西林	0.060	0.180
8	萘夫西林	0.100	0.300
9	双氯西林	0.040	0.120

## ■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 液质联用系统，参照国家市场监督管理总局和中国国家标准化委员会共同发布的《化妆品中阿莫西林等 9 种禁用青霉素类抗生素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，有针对性的建立了化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素含量的检测方法。实验结果表明，9 种禁用青霉素类抗生素在 10-250 ng/mL 的范围内线性良好；精密度实验中，9 种禁用青霉素类抗生素保留时间的 RSD 分布在 0.04%~0.44%，峰面积的 RSD 分布在 0.92%~4.10%，仪器精密度良好；并且各物质加标回收率分布在 70.21%~108.89% 之间；9 种青霉素类抗生素物质的灵敏度 LOD 在 0.01~0.14 ng/mL (0.04~0.56 ng/g)，LOQ 在 0.03~0.42 ng/mL (0.12~1.68 ng/g)，测试结果表明仪器灵敏度良好；满足《化妆品中阿莫西林等 9 种禁用青霉素类抗生素的测定》的灵敏度 LOD=10 ng/g，LOQ=30 ng/g 的要求；岛津 LCMS-8045 液质联用仪具有分析速度快、稳定性好、结果准确度高等特点，满足《化妆品中阿莫西林等 9 种禁用青霉素类抗生素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》方法需求，也适用于多种相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

