

LC-MS/MS 法测定化妆品中 36 种抗感染类药物作业指导书 (SOP)

标准：《化妆品安全技术规范（2015 年版）》第四章 第 2.35 项

■ 参考标准

本方法参照“国家药监局 2019 年 第 66 号文件”的通告：《化妆品中抗感染类药物的检测方法》作为第四章 第 2.35 项纳入《化妆品安全技术规范（2015 年版）》，本文参考通告中的方法进行检测。

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

2019 年 9 月 27 日，国家药监局发布通告，将《化妆品中抗感染类药物的检测方法》纳入《化妆品安全技术规范（2015 年版）》中，规定了采用高效液相色谱 - 串联质谱法测定化妆品中 36 种抗感染类药物含量的方法。方法覆盖了《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中 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，使得化妆品中抗感染类药物的检测更加准确、高效。

2.2 方法使用范围

本方法适合于液态水基类、膏霜乳液类等化妆品中 36 种抗感染类药物的筛查、定性和定量。

2.3 方法技术指标

本方法中 36 种抗感染类药物的线性范围、及检出限见表 6。

■ 方法原理

本方法以乙腈为溶剂提取样品中抗感染类药物成分，用岛津 LC-MS/MS 仪器进行初筛。筛查结果呈阳性的样品，以相应的标准品为对照，根据保留时间和特征离子对的相对丰度比定性，定量离子对峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8050，ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W

离心机：BECKMAN COULTER Allegra™ 64R

涡旋仪：Talboys

移液枪：1000 μ L，200 μ L，20 μ L

超声波清洗器

■ 标准品、试剂、耗材

36 种抗感染类药物标准品：本实验标准品主要从当地检测单位获得，实验人员可自行询问标准品公司进行标准品的购买；

乙腈、甲醇、甲酸：色谱级；

饱和氯化钠溶液：称取 40 g 氯化钠，置于 250 mL 磨口锥形瓶中，加入 100 mL 水，超声 15 min，即得。
 0.5% 甲酸乙腈溶液：量取 200 mL 乙腈于 500 mL 容量瓶中，加入 2.5 mL 甲酸，用乙腈稀释定容至刻度，摇匀。
 5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液 (pH4.0)：称取 0.3854 g 乙酸铵于 1000 mL 容量瓶中，加水 980 mL 溶解后，用甲酸调节 pH 至 4.0，加水定容至刻度，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜。

■ 操作步骤

6.1 标准溶液配制

6.1.1 标准储备液配制

各组分标准储备溶液 (1 mg/mL)：准确称取待测组对照品 10 mg 置于 10 mL 棕色容量瓶中，加乙腈溶解（部分溶解性差的物质应加入少量甲酸或水促进溶解），再用甲醇定容至刻度，摇匀，即得 1 mg/mL 各标准储备溶液，置于 -18°C 冰箱中贮存。

6.1.2 混合标准中间溶液配制 (10 μg/mL)

用移液枪准确吸取各标准储备液 0.1 mL 转移到 10 mL 容量瓶中，用 50% 乙腈水定容。即得。

6.1.3 基质标准工作溶液的制备

取与待测化妆品配方相同或相近的基质空白样品，按 5.3 样品前处理实验，得到基质提取液。用移液枪准确吸取混合标准中间溶液 (10 μg/mL) 1 mL 至 10 mL 容量瓶中，用基质提取液定容，得到 1 μg/mL 基质匹配标准溶液。继续以基质提取液为溶剂，将该基质匹配标准溶液逐级稀释至浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100、200 ng/mL 的基质匹配标准工作溶液，配制表格如表 1 所示，上机分析。

表 1 标准曲线的配制

基质标准工作溶液浓度 (μg/L)	加入的混合标准溶液浓度 (μg/L)	混合标准溶液加入量 (μL)	空白基质溶液取用量 (μL)
0.5	10	50	950
1	10	100	900
2	100	20	980
5	100	50	950
10	100	100	900
20	1000	20	980
50	1000	50	950
100	1000	100	900
200	1000	200	800

6.2 仪器条件

色谱柱：Shim-pack GIST 2.0mm I.D.*100mm L., 2 μm

流动相：A 相 -5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液 (pH 4.0)；B 相 - 乙腈 (含 0.1% 甲酸)

流速：0.3 mL/min

加热气：干燥空气 10.0 L/min

柱温：40°C

DL 温度：250°C

梯度洗脱程序：见表 2

加热模块温度：400°C

进样量：2 μL

接口温度：300°C

质谱条件：离子化模式：ESI，正负离子同时扫描

驻留时间：5ms

接口电压：4 kV (+)；-3 kV (-)

干燥气：氮气 10.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

MRM 参数：见附表 5

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	10
8.00	Pumps	Pump B Conc.	23
10	Pumps	Pump B Conc.	23
12	Pumps	Pump B Conc.	90
13.5	Pumps	Pump B Conc.	90
13.6	Pumps	Pump B Conc.	10
16.00	Controller	Stop	

6.3 样品前处理

准确称取化妆品样品 0.2 g，置于 15 mL 离心管中，准确加入 3 mL 饱和氯化钠溶液，涡旋 30 s，分散均匀，加入含 0.5% 甲酸的乙腈溶液 5 mL，涡旋 30 s，超声提取 30 min，涡旋混合摇匀，以 8000 r/min 转速 0°C 冷冻离心 5 min，吸取上清液于 10 mL 容量瓶中，加水定容至 10 mL，混匀，经 0.22 μm 滤膜过滤后，滤液作为供试品溶液备用。

6.4 加标试样

称取 0.2 g 化妆品试样于 15 mL 离心管中，加入 10 μg/mL 抗感染类药物混标 200 μL，加标浓度为 2.5 mg/kg（相当于上机浓度为 200 ng/mL），涡旋混合均匀，以下同样品前处理方法。

6.5 测定

按照 5.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 2.0 μL，若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.6 计算和报告

6.6.1 定性分析

进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子对均出现，且离子丰度比与标准样品的离子丰度比满足下方表格中允许偏差要求的，则可判断样品中存在该农药。

离子对相对比例（和基峰比 %）	相对离子强度最大允许偏差
> 50%	±20%
> 20%~50%	±25%
> 10%~ 20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.6.2 定量分析

取基质标准工作溶液依次测定，以待测组分的系列浓度为横坐标，待测组分的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立基质标准曲线，其线性相关系数应不小于 0.99。取供试品溶液进样，将对应的定量离子色谱峰面积代入公式计算样品中各组分的含量。

液相色谱—质谱测定结果可由计算机按照外标法自动计算，也可按照下式计算：

$$w = \frac{c \times V \times D}{m}$$

- w — 化妆品中的抗感染类药物禁用物质质量分数，单位为 $\mu\text{g/g}$ ；
 c — 供试品溶液中抗感染类药物禁用物质的质量浓度，单位为 $\mu\text{g/mL}$ ；
 V — 样品定容体积，单位为 mL；
 m — 样品取样量，单位为 g；
 D — 稀释倍数（不稀释则为 1）
 注：相同条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

■ 质量控制

表 3 质量控制要求对照表

项目	浓度	判定准则	频率
标准曲线	0.5~200 $\mu\text{g/L}$	$R \geq 0.99$	每批次
空白基质加标	0.02-0.05mg/kg	回收率 85%-115%	每批次

表 4 化合物信息

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子量
1	甲硝唑	Metronidazole	443-48-1	171.2
2	林可霉素	Lincomycin	154-21-2	406.5
3	磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	249.3
4	呋喃它酮	Furaltadone	139-91-3	324.3
5	依诺沙星	Enoxacin	74011-58-8	320.3
6	磺胺甲噁唑	Sulfamerazine	127-79-7	264.3
7	土霉素	Oxytetracyclin	79-57-2	460.4
8	氟罗沙星	Fleroxacin	79660-72-3	369.3
9	磺胺甲二唑	Sulfamethizole	144-82-1	270.3
10	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	319.3
11	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	361.4
12	磺胺甲氧嗪	Sulfamethoxy pyridazine	80-35-3	280.3
13	培氟沙星	Pefloxacin	70458-92-3	333.4
14	四环素	Tetracycline	60-54-8	444.4
15	多西环素	Doxycycline	564-25-0	444.4
16	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	331.3
17	氟康唑	Fluconazole	86386-73-4	306.3
18	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	359.4
19	米诺环素	Minocycline	10118-90-8	457.5
20	磺胺氯吡嗪	Sulfachloropyridazine	80-32-0	284.7
21	沙拉沙星	Sarafloxacin	98105-99-8	385.4
22	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	253.3
23	双氟沙星	Difloxacin	98106-17-3	399.4
24	金霉素	Aureomycin	57-62-5	478.9

25	克林霉素磷酸酯	Clindamycin phosphate	24729-96-2	505.0
26	莫西沙星	Moxifloxacin	151096-09-2	401.4
27	氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	323.1
28	阿奇霉素	Azithromycin	83905-01-5	749.0
29	克林霉素	Clindamycin	18323-44-9	425
30	酮康唑	Ketoconazole	65277-42-1	531.4
31	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	748
32	罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	837.1
33	联苯苄唑	Bifonazole	60628-96-8	310.4
34	灰黄霉素	Griseofulvin	126-07-8	352.8
35	克霉唑	Clotrimazole	23593-75-1	344.8
36	螺内酯	Spironolactone	1952-1-7	416.6

表 5 36 种抗感染类药物的定量离子对和参考离子对

序号	物质名称	电离方式	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	Q1 Pre (V)	CE (V)	Q3 Pre (V)
1	甲硝唑	ESI ⁺	2.58	172.0	82.0*	-11	-24	-15
				172.0	128.0	-11	-14	-14
2	林可霉素	ESI ⁺	4.50	407.2	359.4	-20	-20	-20
				407.2	126.1*	-20	-30	-20
3	磺胺吡啶	ESI ⁺	5.30	250.0	156.0*	-12	-15	-17
				250.0	92.0	-12	-27	-17
4	呋喃它酮	ESI ⁺	5.50	325.0	100.0	-12	-15	-17
				325.0	281.0*	-12	-12	-20
5	磺胺甲噁啉	ESI ⁺	5.89	265.0	156.0	-10	-17	-17
				265.0	92.0*	-10	-29	-18
6	依诺沙星	ESI ⁺	7.65	321.1	232.0	-16	-35	-26
				321.1	303.1*	-11	-22	-22
7	土霉素	ESI ⁺	7.68	461.2	426.1*	-13	-19	-22
				461.2	444.2	-10	-17	-22
8	氟罗沙星	ESI ⁺	7.95	370.2	269.1	-11	-27	-19
				370.2	326.0*	-11	-20	-23
9	磺胺甲二唑	ESI ⁺	7.95	271.1	156.0*	-10	-14	-17
				271.1	92.0	-10	-27	-17
10	诺氟沙星	ESI ⁺	8.18	320.1	233.1	-16	-24	-17
				320.1	276.1*	-12	-18	-20
11	氧氟沙星	ESI ⁺	8.21	362.2	261.1	-10	-28	-19
				362.2	318.2*	-10	-20	-23

12	磺胺甲氧唑	ESI ⁺	8.36	281.1	156.0*	-10	-17	-16
				281.1	92.0	-10	-28	-18
13	培氟沙星	ESI ⁺	8.43	334.2	233.1	-12	-26	-17
				334.2	290.1*	-12	-19	-21
14	四环素	ESI ⁺	8.49	445.1	410.2*	-12	-20	-21
				445.1	427.3	-10	-13	-16
15	多西环素	ESI ⁺	8.49	445.2	428.2	-12	-17	-22
				445.2	154.0*	-12	-26	-16
16	环丙沙星	ESI ⁺	8.56	332.2	231.0*	-12	-36	-16
				332.2	288.1	-10	-18	-21
17	氟康唑	ESI ⁺	9.51	307.1	238.1*	-11	-16	-17
				307.1	220.0	-11	-18	-15
18	恩诺沙星	ESI ⁺	9.55	360.2	245.1	-10	-27	-17
				360.2	342.2*	-10	-22	-25
19	米诺环素	ESI ⁺	9.56	458.2	441.3*	-10	-19	-17
				458.2	283.1	-10	-30	-20
20	磺胺氯哒唑	ESI ⁺	9.75	285.0	156.0*	-11	-15	-17
				285.0	92.0	-11	-29	-18
21	沙拉沙星	ESI ⁺	10.51	386.2	299.1*	-11	-29	-22
				386.2	342.1	-11	-20	-17
22	磺胺甲噁唑	ESI ⁺	10.63	254.1	156.0*	-13	-15	-17
				254.1	107.9	-10	-23	-20
23	双氟沙星	ESI ⁺	19.73	400.2	299.1*	-11	-29	-21
				400.2	356.0	-11	-21	-26
24	金霉素	ESI ⁺	11.34	479.1	444.1*	-13	-20	-23
				479.1	462.2	-13	-16	-23
25	克林霉素磷酸酯	ESI ⁺	11.55	505.2	126.1*	-20	-32	-24
				505.2	457.2	-26	-21	-17
26	莫西沙星	ESI ⁺	11.77	402.2	261.1*	-11	-25	-19
				402.2	364.5	-11	-27	-27
27	氟霉素	ESI ⁺	12.44	321.1	152.0*	12	17	14
				321.1	257.2	12	12	17
28	阿奇霉素	ESI ⁺	12.63	749.6	591.5*	-20	-30	-22
				749.6	116.1	-22	-47	-23
29	克林霉素	ESI ⁺	12.70	425.2	377.2	-12	-20	-14
				425.2	126.2*	-12	-27	-26
30	酮康唑	ESI ⁺	13.50	531.2	244.0	-20	-34	-18
				531.2	489.3*	-20	-31	-18

31	克拉霉素	ESI ⁺	13.56	748.6	158.1*	-22	-28	-17
				748.6	590.6	-20	-20	-22
32	罗红霉素	ESI ⁺	13.57	837.6	158.1*	-20	-34	-17
				837.6	679.6	-20	-23	-26
33	联苯苄唑	ESI ⁺	13.82	311.2	243.1*	-12	-16	-12
				311.2	165.0	-12	-34	-18
34	灰黄霉素	ESI ⁺	13.87	353.2	165.0*	-11	-21	-18
				353.2	215.0	-10	-21	-15
35	克霉唑	ESI ⁺	13.96	277.1	165.1*	-20	-30	-20
				277.1	241.0	-10	-28	-17
36	螺内酯	ESI ⁺	14.15	341.1	107.0*	-12	-29	-11
				341.1	165.0	-17	-55	-17

表 6 36 种抗感染类药物的线性范围和检出限

编号	化合物	线性范围 (ng/mL)	检出限 ng
1	甲硝唑	0.5-200	0.025
2	林可霉素	0.5-50	0.025
3	磺胺吡啶	0.5-200	0.025
4	呋喃它酮	5-200	0.025
5	依诺沙星	0.5-200	0.025
6	磺胺甲噁啉	0.5-200	0.025
7	诺氟沙星	2-200	0.025
8	土霉素	5-200	0.025
9	氧氟沙星	0.5-200	0.025
10	氟罗沙星	0.5-200	0.025
11	多西环素	5-200	0.025
12	培氟沙星	0.5-200	0.025
13	环丙沙星	0.5-200	0.025
14	四环素	2-200	0.025
15	恩诺沙星	1-200	0.025
16	磺胺甲二唑	0.5-200	0.025
17	磺胺甲氧嗪	1-200	0.025
18	氟康唑	0.5-200	0.025
19	沙拉沙星	2-200	0.025
20	米诺环素	5-200	0.025
21	双氟沙星	1-200	0.025
22	克林霉素磷酸酯	2-200	0.025
23	莫西沙星	2-200	0.025

24	阿奇霉素	0.5-200	0.025
25	磺胺氯哒嗪	1-200	0.025
26	金霉素	1-200	0.025
27	克林霉素	0.5-200	0.025
28	磺胺甲噁唑	0.5-200	0.025
29	氯霉素	2-100	0.1
30	酮康唑	0.5-200	0.025
31	克拉霉素	0.5-200	0.025
32	罗红霉素	0.5-200	0.025
33	灰黄霉素	0.5-200	0.025
34	克霉唑	0.5-200	0.025
35	联苯苄唑	0.5-200	0.025
36	螺内酯	2-200	0.025

岛津应用云

