LC-MS/MS 法测定化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素的含量作业指导书（SOP）

标准号：GB/T 37626-2019

参考标准

GB/T 37626-2019 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。

方法概述

2.1 方法编制说明

本方法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。本方法对化妆品中 9 种禁用青霉素类抗生素的含量进行检测。

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 9 种禁用青霉素类抗生素药物的含量筛查、定性和定量分析。

2.3 方法技术指标

本方法中 9 种禁用青霉素类抗生素药物的检出限和定量限详见表 5。

本方法标准溶液线性范围：10 ng/mL~250 ng/mL。

方法原理

本方法以乙腈为溶剂提取样品中抗生素药物成分，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及相对丰度比进行定性，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要求

4.1 基本设备

岛津 LCMS-8045，ESI 离子源；

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W；

离心机：BECKMAN COULTER AllegraTM 64R；

涡旋仪：Talboys；

移液枪：1000 μL，200 μL，20 μL；

超声波清洗器：深圳洁盟；

标准品、试剂、耗材

5.1 水：GB/T 6682 规定的一级水；

5.2 乙腈：色谱纯；

5.3 正己烷：色谱纯；

5.4 乙酸：优级纯；

5.5 氨水：分析纯；

5.6 乙腈溶液（5%）：准确称取 50 mL 乙腈至 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度；
5.7 乙腈提取液：准确量取 0.6 mL 氨水与 100 mL 乙腈充分混合；
5.8 乙腈饱和的正己烷溶液：取 100 mL 正己烷和 50 mL 乙腈于 250 mL 分液漏斗中，振摇 1 min，静置分层后，弃掉乙腈；
5.9 乙酸水溶液（0.1%）：准确量取 1 mL 乙酸至 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度；
5.10 乙酸乙腈溶液（0.1%）：准确量取 1 mL 乙酸至 1000 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度；
5.11 标准物质：购自岛津（上海）实验器材有限公司。各物质纯度不小于95%，9 种抗生素的中文名称、英文名称、CAS#、分子式、相对分子质量详见附表 2。

操作步骤

6.1 标准工作曲线的制作

6.1.1 标准储备液配制（1.0 mg/mL）

标准储备液的配制：分别精确称取 9 种抗生素组分标准品约 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，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 5% 乙腈水溶液进行稀释定容即得。

6.1.3 标准工作溶液的配制

将混合标准中间溶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。

No.	混合标准中间溶液加入量（μL）	5% 乙腈水溶液定容体积（mL）	最终浓度（ng/mL）	备注
1	10	10	10	标准工作溶液可存放于 4 °C冰箱中一个月。
2	20	10	20	
3	50	10	50	
4	100	10	100	
5	250	10	250	

6.2 仪器设备条件

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 °C

梯度洗脱程序：详见附表 3

质谱条件：

离子化模式：ESI (+) 模式扫描

加热模块温度：400 °C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：300 °C

干燥气：氮气 10.0 L/min

驻留时间：30 ms

加热气：干燥空气 10.0 L/min

MRM 参数：详见附表 4

DL 温度：250 °C

6.3 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。

6.4 计算和报告

6.4.1 定性分析

取供试品溶液与相应标准品溶液，在相同试验条件下测定，样品中如呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰，被测组分的特征离子峰保留时间与标准溶液对应的保留时间一致，且选择的定性离子的相对丰度比与相当浓度对照品溶液的定性离子的相对丰度比的最大偏差不超过附表 6 的规定范围，则可以判断样品中存在对应的抗生素类药物成分。

6.4.2 定量分析

取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：

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

w －化妆品中某抗生素类药物的质量分数，单位为 μg/g；

c －供试品溶液中某抗生素类药物的质量浓度，单位为 μg/mL；

V －样品定容体积，单位为 mL；

m －样品称样量，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 1　质量控制要求对照表

项目	浓度	判定准则	频率
标准曲线	10~250 ng/mL	R ⩾ 0.99	每批次

表 2　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	$C_{16}H_{19}N_3O_5S.3H_2O$	419.40
2	氨苄西林	Ampicillin Trihydrate	7177-48-2	$C_{16}H_{19}N_3O_4S.3H_2O$	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	Oxacillinsodiummonohydrate	7240-38-2	$C_{19}H_{18}N_3NaO_5S.H_2O$	441.43
7	氯唑西林	Cloxacillin sodium hydrate	7081-44-9	$C_{19}H_{19}ClN_3NaO_6S.H_2O$	475.87
8	萘夫西林	Nafcillin sodium hydrate	7177-50-6	$C_{21}H_{23}N_2NaO_6S.H_2O$	454.47
9	双氯西林	Dicloxacillin sodium hydrate	13412-64-1	$C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5.H_2O$	492.30

表 3　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	

表 4　9 种青霉素类抗生素药物的 MRM 参数表

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

表 5　检出限和定量限

序号	物质名称	方法检出限（μg/kg）	方法定量限（μg/kg）	仪器定量限（ng/mL）
1	阿莫西林	10	30	0.150
2	青霉素 G	10	30	0.420
3	氨苄西林	10	30	0.030
4	哌拉西林	10	30	0.420
5	青霉素 V	10	30	0.180
6	苯唑西林	10	30	0.150
7	氯唑西林	10	30	0.180
8	萘夫西林	10	30	0.300
9	双氯西林	10	30	0.120

表 6　定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度（k）	k ⩾ 50%	50% ＞ k ⩾ 20%	20% ＞ k ⩾ 10%	k ⩽ 10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%