

超高效液相色谱三重四极杆质谱测定化妆品中的 10 种喹诺酮类抗生素禁用物质

LCMSMS-094

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定化妆品中诺氟沙星等 10 种喹诺酮类抗生素的方法。样品超声萃取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 外标法进行定量分析。10 种喹诺酮类抗生素在 0.5–200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，对 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.764–4.70% 和 0.042–0.940% 之间，仪器精密度良好；同时考察了化妆品空白基质加标结果，10 种喹诺酮类抗生素的回收率范围为 84.4%~115.2%，可以满足化妆品中 10 种喹诺酮类抗生素禁用物质的检测需求。

关键词：喹诺酮 化妆品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

依诺沙星、氟罗沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、莫西沙星等属于喹诺酮类人工合成抗菌药物，具有广谱性杀菌作用，是抗菌类药物。该类药物多具有广谱、高效、低毒等特点，因此应用较为广泛，但该类药物对人体中枢神经系统会造成不良反应，使用含该类药物的化妆品会刺激皮肤，引起皮肤过敏反应，严重的甚至导致全身过敏。

目前，化妆品已成为人民生活必不可少的消费品之一。与此同时，化妆品的安全性已日益成为广大消费者关注的问题。从 2013 年 7 月 11 日开始，欧洲经济区 (EEA) 市场中销售的化妆品必须符合新颁布的欧盟化妆品法规 (EC) No 1223/20092 的要求。我国《化妆品卫生规范》2007 年版中规定抗生素类为禁用物质，对

色谱检出阳性的样品必须要进行质谱确认。《化妆品中诺氟沙星等 10 种抗真菌类禁用物质的检测方法》(征求意见稿) 中对检出限做了规定，依诺沙星、氧氟沙星和诺氟沙星为 0.5 mg/kg，氟罗沙星、培氟沙星、环丙沙星、双氟沙星和莫西沙星为 0.2 mg/kg，沙拉沙星为 0.1 mg/kg，恩诺沙星为 0.05 mg/kg。

目前化妆品中喹诺酮类抗生素检测主要采用液相色谱法，但由于化妆品基质复杂，采用液相色谱法测定灵敏度低，而超高效液相色谱与串联质谱联用法具有选择性强、灵敏度高，能建立喹诺酮类药物非法添加的确证依据。使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了快速准确测定化妆品中 10 种喹诺酮类抗真菌禁用物质的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm I.D. \times 75 mm L., 2.2 μm
 流动相：A - 5mM 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸)；
 B - 乙腈 (含 0.1% 甲酸)
 流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	BConc.
1.0	Pumps	10%
3.5	Pumps	30%
4.0	Pumps	95%
4.5	Pumps	95%
4.6	Pumps	10%
7.0	Controller	Stop

质谱条件

离子化模式: ESI (+)
 离子喷雾电压: 4.5 kV
 雾化气: 氮气 3.0 L/min
 干燥气: 氮气 15 L/min
 碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C
 加热模块温度: 400°C
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 驻留时间: 20 ms
 延迟时间: 3 ms
 MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias(V)	CE(V)	Q ₃ Pre Bias(V)
依诺沙星	321.1	303.2*	-15	-19	-21
		204.2	-15	-40	-21
氟罗沙星	370.1	326.1*	-13	-19	-23
		269.1	-13	-26	-29
诺氟沙星	320.1	302.1*	-21	-20	-21
		276.1	-21	-17	-19
氧氟沙星	362.1	318.1*	-30	-19	-23
		261.1	-30	-26	-18
培氟沙星	334.1	290.1*	-27	-17	-20
		316.1	-27	-20	-22
环丙沙星	332.1	288.1*	-30	-17	-20
		314.1	-30	-21	-22
恩诺沙星	360.1	316.2*	-30	-19	-23
		342.1	-30	-20	-26
沙拉沙星	386.1	342.1*	-30	-19	-24
		368.1	-30	-21	-26
双氟沙星	400.1	356.1*	-30	-19	-25
		299.0	-30	-29	-30
莫西沙星	402.1	358.2*	-30	-20	-26
		384.1	-30	-22	-27

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

用乙腈配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液, 用乙腈和 0.1% 甲酸水 (1/9, v/v) 溶液稀释成浓度为 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 µg/L 标准工作液。

1.3.2 样品前处理

准确称取样品约 0.5 g, 置于 25 mL 比色管中, 加入 1 mL 饱和氯化钠溶液, 涡旋 30 s 后加入 0.1% 甲酸水溶液 20 mL, 涡旋 10 s 后, 加入乙腈 2.5 mL, 涡旋 30 s, 超声提取 30 min, 加入 0.1% 甲酸水溶液定容至刻度, 涡旋 1 min, 4500 rpm 离心 5 min, 取上清液经 0.45 µm 微孔滤膜过滤后, 滤液作为待测液备用。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

5.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

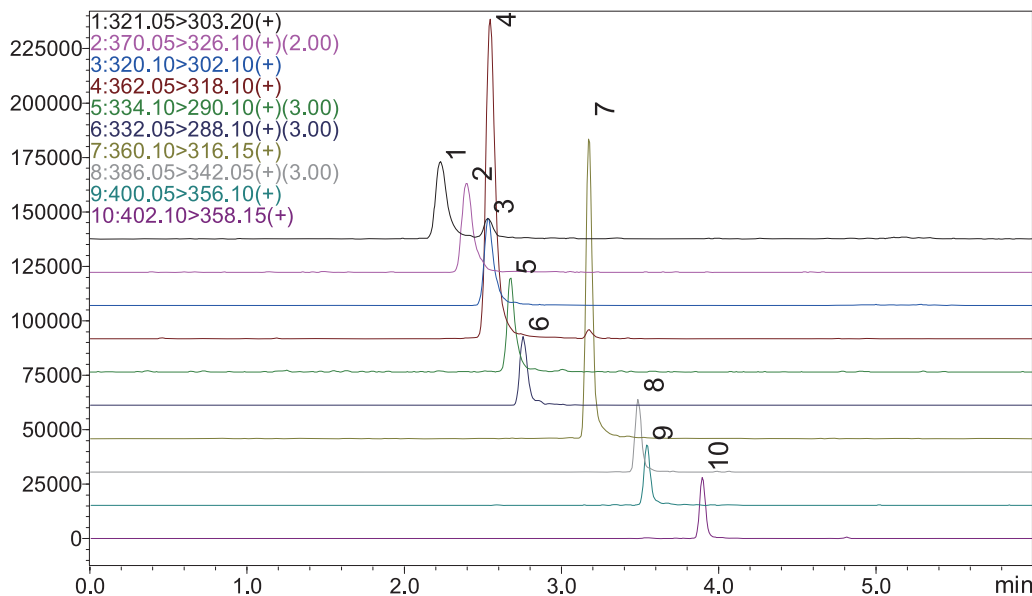
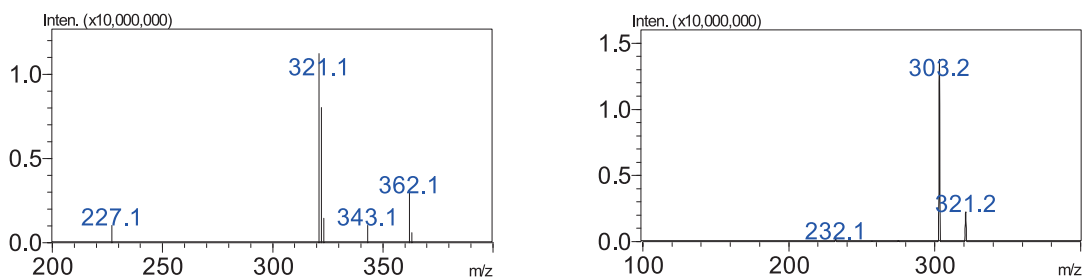


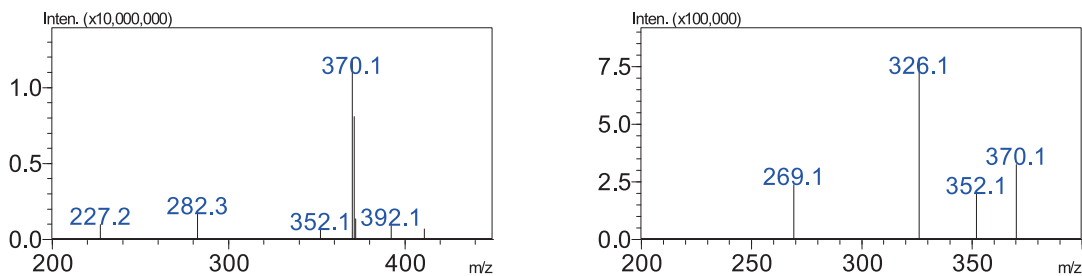
图 1 5.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

(1 依诺沙星; 2 氟罗沙星; 3 诺氟沙星; 4 氧氟沙星; 5 培氟沙星; 6 环丙沙星; 7 恩诺沙星; 8 沙拉沙星; 9 双氟沙星; 10 莫西沙星)

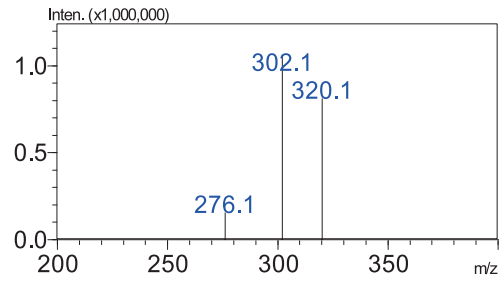
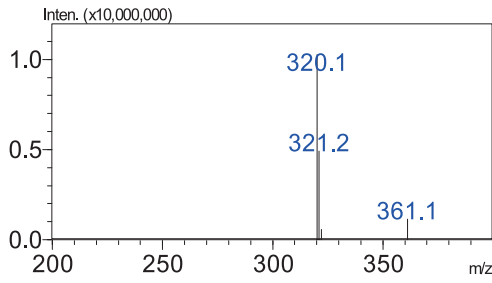
2.2 标准样品的扫描及产物离子扫描质谱图



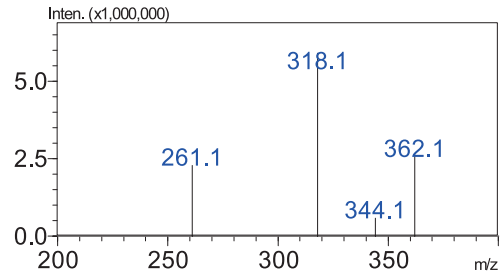
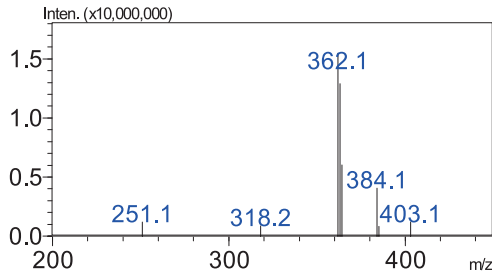
1 依诺沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-18V) (右图)



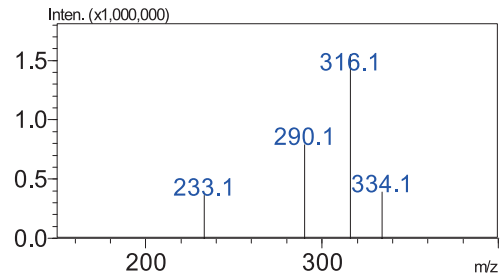
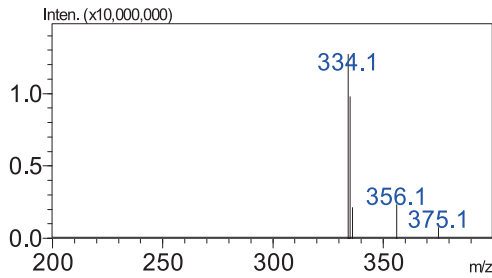
2 氟罗沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-20V) (右图)



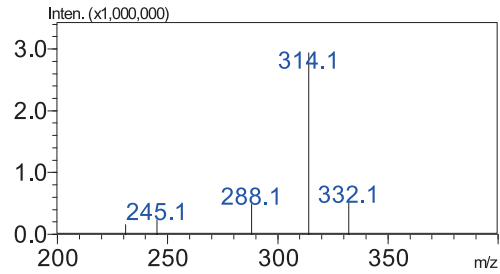
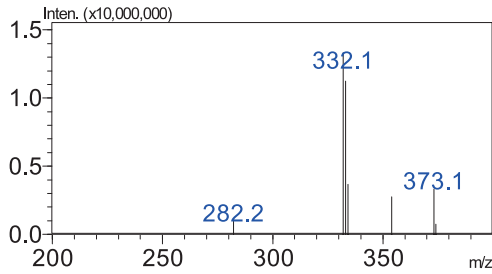
3 诺氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-15V) (右图)



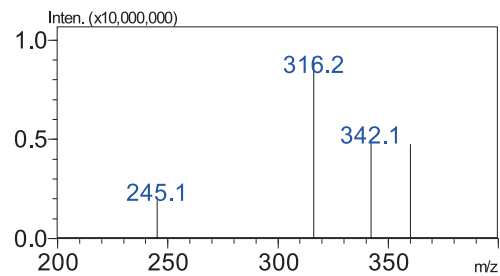
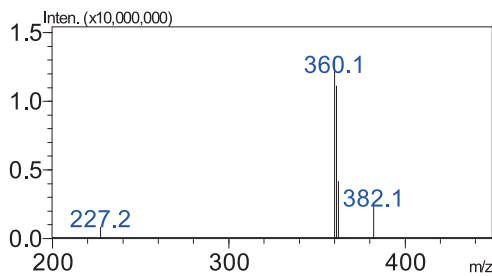
4 氧氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-20V) (右图)



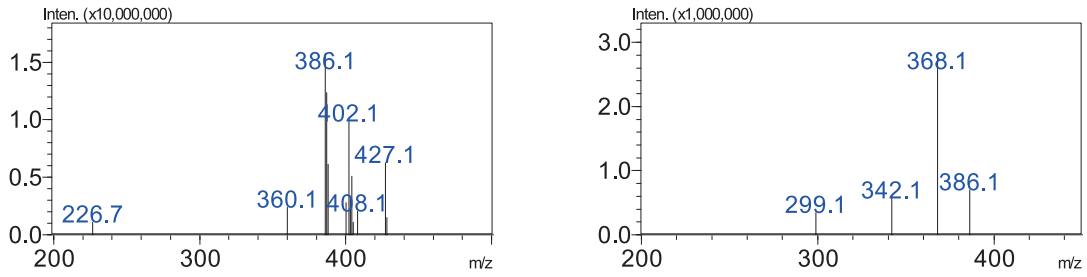
5 培氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-20V) (右图)



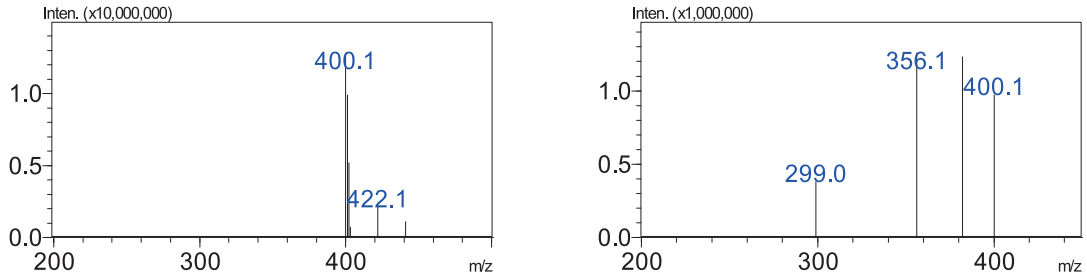
6 环丙沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-20V) (右图)



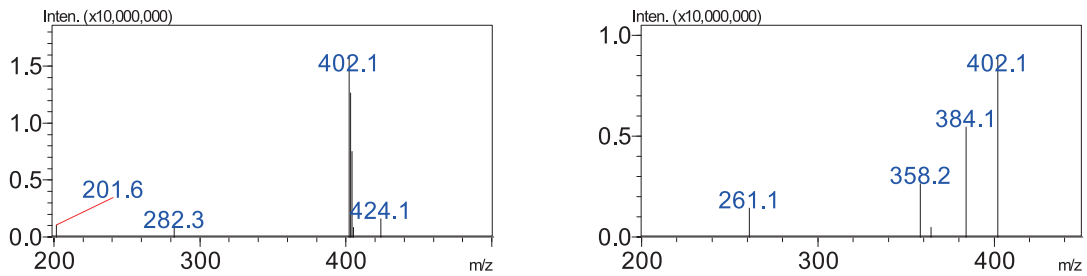
7 恩诺沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值-20V) (右图)



8 沙拉沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）



9 双氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）



10 莫西沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）

图 2 10 种喹诺酮类抗生素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.3 线性关系

将浓度为 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 3~12 所示。10 种喹诺酮类抗生素在一定浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

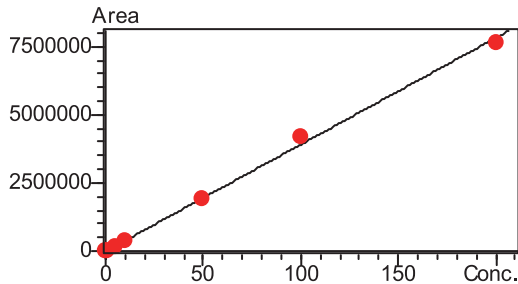


图 3 依诺沙星的标准工作曲线

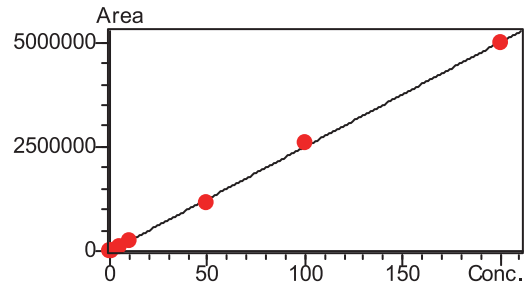


图 4 氟罗沙星的标准工作曲线

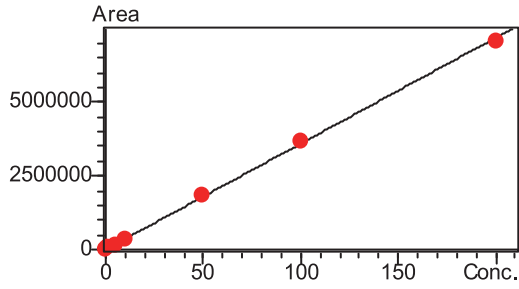


图 5 诺氟沙星的标准工作曲线

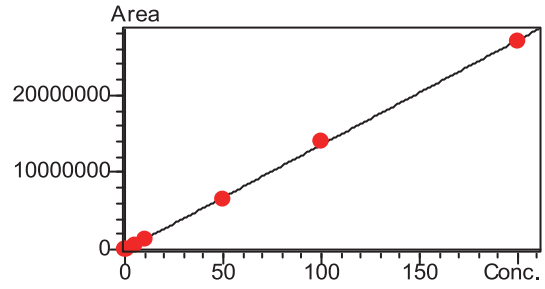


图 6 氧氟沙星的标准工作曲线

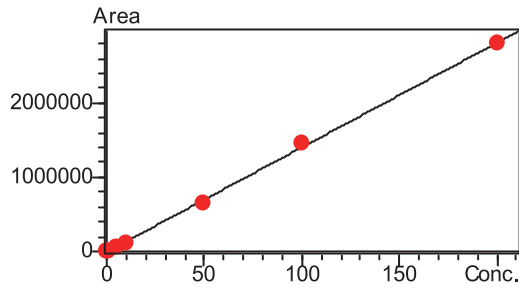


图 7 培氧沙星的标准工作曲线

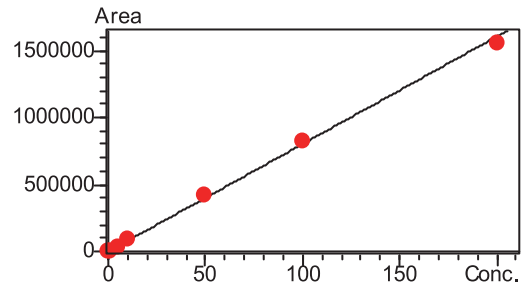


图 8 环丙沙星的标准工作曲线

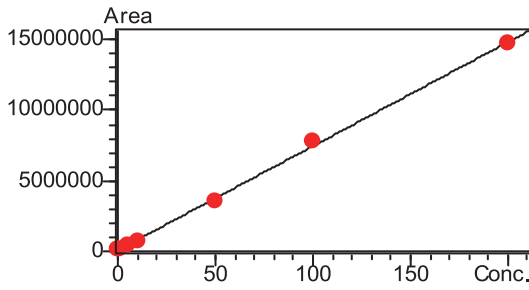


图 9 恩诺沙星的标准工作曲线

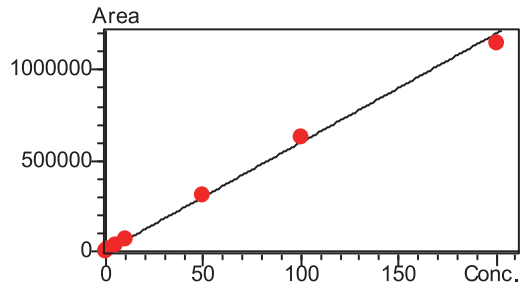


图 10 沙拉沙星的标准工作曲线

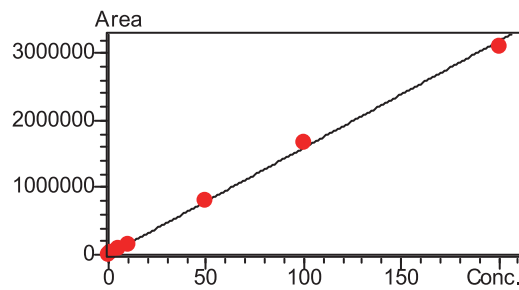


图 11 双氟沙星的标准工作曲线

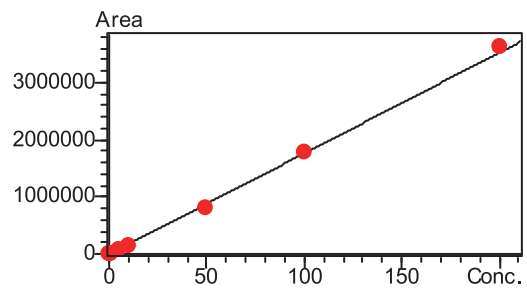


图 12 莫西沙星的标准工作曲线

表 3 10 种喹诺酮类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数	线性范围	检出限	定量限
			r	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)
1	依诺沙星	$Y = (39129.0)X + (-4527.11)$	0.9990	0.5-200	0.1	0.3
2	氟罗沙星	$Y = (25068.0)X + (-6750.71)$	0.9992	0.5-200	0.04	0.1
3	诺氟沙星	$Y = (35979.3)X + (2132.38)$	0.9998	0.5-200	0.02	0.1
4	氧氟沙星	$Y = (135788)X + (-17014.3)$	0.9997	0.5-200	0.02	0.07
5	培氟沙星	$Y = (14091.2)X + (-5810.89)$	0.9990	0.5-200	0.2	0.5
6	环丙沙星	$Y = (8037.05)X + (-1245.28)$	0.9993	0.5-200	0.07	0.2
7	恩诺沙星	$Y = (73845.8)X + (73939.9)$	0.9991	0.5-200	0.005	0.02
8	沙拉沙星	$Y = (6004.98)X + (1238.17)$	0.9987	0.5-200	0.02	0.06
9	双氟沙星	$Y = (15919.6)X + (675.165)$	0.9996	0.5-200	0.04	0.1
10	莫西沙星	$Y = (17632.9)X + (-4572.18)$	0.9986	0.5-200	0.1	0.4

2.4 精密度实验

对 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.764–4.70% 和 0.042–0.940% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (0.5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
依诺沙星	4.43	0.232	2.17	0.940	0.764	0.484
氟罗沙星	4.22	0.116	3.58	0.689	2.11	0.374
诺氟沙星	3.90	0.272	2.63	0.592	1.04	0.358
氧氟沙星	4.70	0.189	1.31	0.561	1.47	0.357
培氟沙星	3.23	0.274	4.22	0.411	1.91	0.327
环丙沙星	4.13	0.160	3.83	0.355	1.63	0.296
恩诺沙星	1.69	0.081	1.18	0.127	1.00	0.299
沙拉沙星	3.94	0.080	3.78	0.092	2.63	0.275
双氟沙星	4.66	0.042	2.87	0.092	2.47	0.299
莫西沙星	4.68	0.046	4.54	0.090	1.07	0.372

2.5 实际样品分析及回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测某国际品牌的化妆水，均未检测到这 10 种喹诺酮类抗生素。图 13 为某国际品牌化妆水的 MRM 色谱图。在此化妆水基质中添加浓度为 25 $\mu\text{g/kg}$ 的混合标准溶液，加标 MRM 色谱图如图 14 所示，加标回收率结果见表 5。

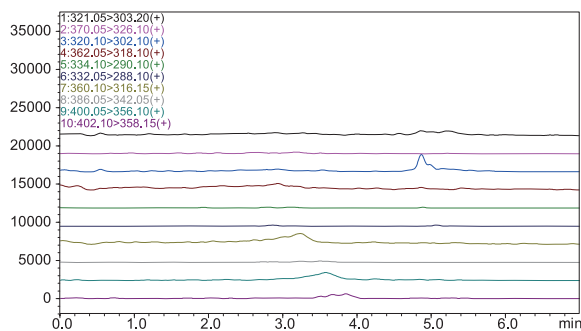


图 13 某国际品牌化妆水的 MRM 色谱图

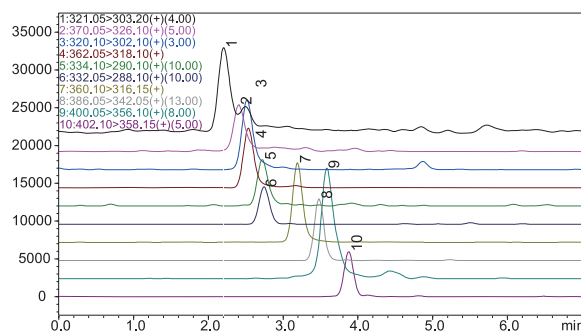


图 14 化妆水基质加标的 MRM 色谱图

表 5 化妆水中 10 种喹诺酮抗生素类物质检测与加标回收结果

编号	名称	检测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	理论浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	依诺沙星	N.D.	25	26.0	104.0
2	氟罗沙星	N.D.	25	26.7	106.8
3	诺氟沙星	N.D.	25	25.1	100.4
4	氧氟沙星	N.D.	25	27.7	110.6
5	培氟沙星	N.D.	25	27.7	110.6
6	环丙沙星	N.D.	25	23.9	95.6
7	恩诺沙星	N.D.	25	22.6	90.2
8	沙拉沙星	N.D.	25	25.8	103.2
9	双氟沙星	N.D.	25	24.1	96.2
10	莫西沙星	N.D.	25	27.6	110.2

注：N.D.表示未检出

结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定化妆品中 10 种喹诺酮类抗生素的分析方法。10 种喹诺酮类抗生素线性范围宽，在 0.5–200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数在 0.9986–0.9998 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.764–4.70% 和 0.042–0.940% 之间，仪器精密度良好，检出限范围为 0.3–8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。考察化妆水样品分析及加标实验，10 种喹诺酮类抗生素的回收率范围为 84.4–115.2%，可以满足化妆品中 10 种喹诺酮类抗生素的检测需求。