

# LC-30A 测定祛痘除螨类化妆品中甲硝唑与 6 种抗生素类药物

LC-090

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定祛痘除螨类化妆品中甲硝唑与 6 种抗生素药物的方法。前处理简单, 并借助超高效液相色谱 LC-30A 在 7 min 内实现快速分离, 因此可以快速、准确地测定甲硝唑、美满霉素、土霉素、四环素、金霉素、多西环素和氯霉素等 7 种物质。这 7 种物质的线性良好, 相关系数均大于 0.9999; 不同浓度的精密度实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.04 ~ 0.61% 和 0.39 ~ 3.85% 之间, 仪器精密度良好; 7 种物质的方法检出限在 0.15 ~ 0.49 mg/kg 之间, 定量限在 0.47 ~ 1.57 mg/kg 之间; 样品加标回收率在 70.1 ~ 110.0% 之间。

**关键词:** 甲硝唑 抗生素 化妆品 超高效液相色谱仪

四环素类抗生素是由链霉菌产生的一类广谱抗生素, 主要有四环素、金霉素、土霉素和强力霉素等。自 1948 年从金色链丝菌的培养液中分离出金霉素用于治疗斑疹、原发性异型肺炎、泌尿道感染等疾病以来, 四环素类抗生素已发展了多个品种。此外还有甲硝唑与氯霉素都是具有杀菌、抑菌的功效, 有人将其添加在消炎杀菌类(祛痘)化妆品中, 但我国《化妆品卫生规范》(2007 年版) 与欧盟化妆品规程 (Council Directive 76/768/EEC) 明确规定了这些物质在化妆品中为禁用物质。

我国《化妆品卫生规范》(2002 年版) 只是明确了四环素类抗生素为禁用物质, 并未有标准测试方法。因此有不同的测试方法如: 采用微生物法、酶联免疫法、薄层色谱法、液相色谱法和液质联用法等。目前, 我国

《化妆品卫生规范》(2007 年版) 已于 2007 年 8 月 1 日正式执行, 并首次提出了化妆品中五种四环素类抗生素(美满霉素、土霉素、四环素、金霉素和多西环素) 及甲硝唑、氯霉素的标准检测方法, 其中规定了土霉素、四环素、金霉素、多西环素和氯霉素的检出浓度为 1.0 mg/kg (美满霉素和甲硝唑为 50 mg/kg); 以及最低定量浓度为 3.3 mg/kg (美满霉素和甲硝唑为 150 mg/kg)。

因此, 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, 参考《化妆品卫生规范》(2007 年版) 的标准方法, 建立了祛痘除螨类化妆品中甲硝唑与 6 种抗生素药物的分析方法, 此方法简单、快速和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 四元梯度系统。具体配置为 LC-30AD 输液泵, 四元梯度比例阀, 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, LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: GL Inertsil ODS-3 2.0 mm I.D. × 50 mm L.,

2 μm

流动相: A - 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 2.5);

B - 乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 5 μL

柱温: 35°C

PDA 检测范围: 190~800 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.90	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	25
5.00	Pumps	Pump B Conc.	25
5.01	Pumps	Pump B Conc.	10
9.00	Controller	Stop	

### 1.3 样品制备

标准物质：共 7 种，分别为甲硝唑、美满霉素、土霉素、四环素、金霉素、多西环素和氯霉素。

标准溶液配制：用甲醇配制 1000 mg/L 7 种混合标准溶液。

用甲醇：0.1 mol/L 盐酸溶液（1:9,v/v）的溶剂将 1000 mg/L 混标稀释成 0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 和 50 mg/L 不同浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：参考 2007 版《化妆品卫生规范》

称取 1.0 g 试样（精确至 0.01 g）至 10 mL 离心管中，加入 10 mL 甲醇：0.1 mol/L 盐酸溶液（1:1），室温超声 30 min，离心，取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，用液相分析。

## 结果讨论

### 2.1 标准样品的色谱图

混合标准样品的色谱如图 1 所示，各物质的定量波长分别为：氯霉素为 268 nm、其他均为 350 nm。

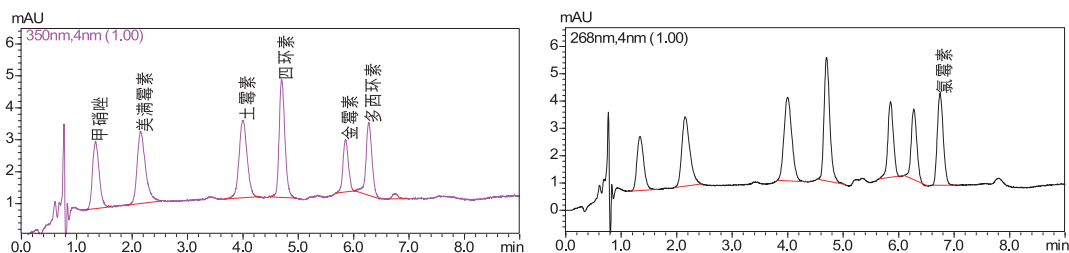


图 1 1 mg/L 混合标准样品的色谱图

### 2.2 线性关系

将浓度为 0.2, 0.5, 1, 5, 10 和 50 mg/L 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 1~ 8 所示线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 2。

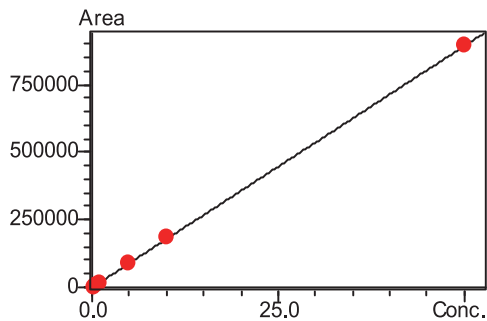


图 2 甲硝唑的标准工作曲线

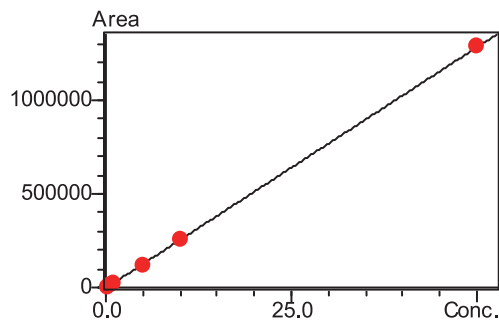


图 3 美满霉素的标准工作曲线

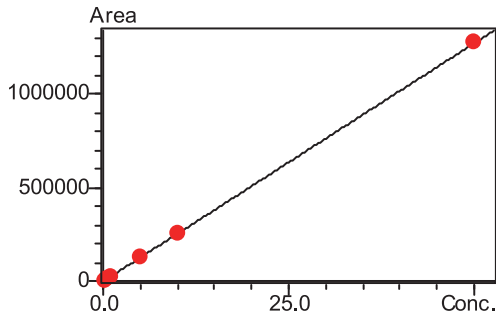


图 4 土霉素的校准工作曲线

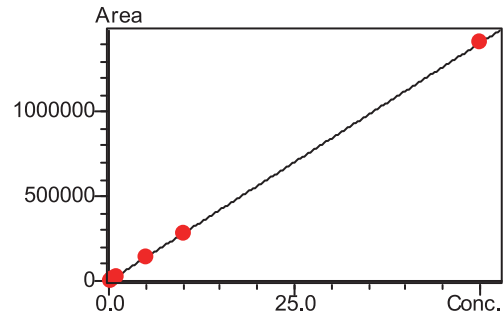


图5 四环素的校准工作曲线

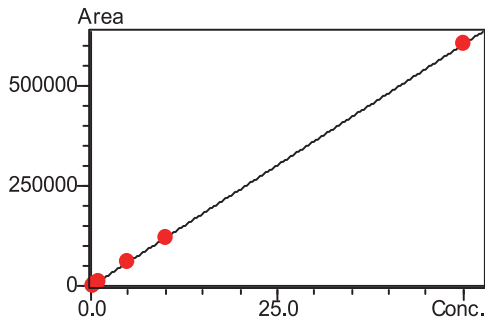


图 6 金霉素的校准工作曲线

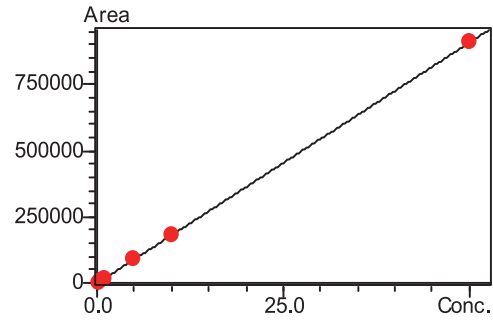


图 7 多西环素的校准工作曲线

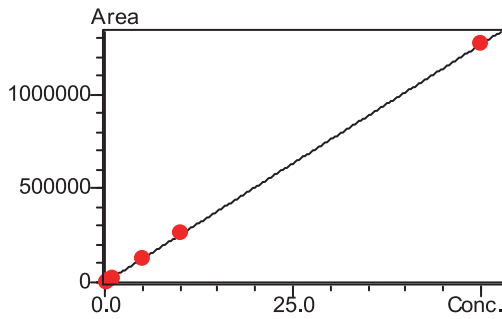


图 8 氯霉素的校准工作曲线

表 2 7 种物质的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 R
1	甲硝唑	$Y = (17868.9)X + (-180.973)$	0.9999
2	美满霉素	$Y = (25754.6)X + (-2744.15)$	0.9999
3	土霉素	$Y = (25535.4)X + (-2090.57)$	0.9999
4	四环素	$Y = (28170.9)X + (-740.647)$	0.9999
5	金霉素	$Y = (12051.3)X + (-566.352)$	0.9999
6	多西环素	$Y = (18194.5)X + (-1567.66)$	0.9999
7	氯霉素	$Y = (25377.0)X + (449.982)$	0.9999

### 2.3 方法的检出限和定量限

按照 1.3 中样品制备方法，在样品中添加 2.0 mg/kg 混合标样。按 1.2 中的分析条件进行测定，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 MDL = 3.14 × S，定量限 LOQ = 4 × MDL。测定结果如表 3 所示：

表 3 7 种物质的检出限和定量限

No.	名称	浓度(mg/kg)	标准偏差(S)	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
1	甲硝唑	2.0	0.08	0.24	0.76
2	美满霉素	2.0	0.08	0.25	0.79
3	土霉素	2.0	0.06	0.18	0.58
4	四环素	2.0	0.05	0.15	0.47
5	金霉素	2.0	0.16	0.49	1.57
6	多西环素	2.0	0.10	0.32	1.03
7	氯霉素	2.0	0.08	0.24	0.76

### 2.4 精密度实验

配制如表 4 浓度的混合标液，平行进样 6 次。7 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04 ~ 0.61% 和 0.39 ~ 3.85% 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)

No.	名称	RSD%(0.2 mg/L)		RSD%(1 mg/L)		RSD%(10 mg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	甲硝唑	0.36	2.46	0.19	0.57	0.35	1.03
2	美满霉素	0.26	2.46	0.19	1.08	0.61	0.39
3	土霉素	0.30	2.49	0.19	1.08	0.27	1.03
4	四环素	0.12	1.05	0.11	1.25	0.11	0.46
5	金霉素	0.19	3.85	0.05	0.74	0.07	2.02
6	多西环素	0.21	3.11	0.06	0.68	0.08	0.95
7	氯霉素	0.13	2.84	0.04	1.03	0.06	1.11

### 2.5 基质加标实验

按照 1.3 中样品制备方法，在样品中添加混合标样，加标含量如表 5，各平行 4 次。测试结果显示：扣除面霜样品空白后，其样品加标回收率在 70.1 ~ 110.0% 之间；具体结果如表 5。面霜样品的色谱图如图 9 所示，面霜的加标样品色谱图如图 10 所示。

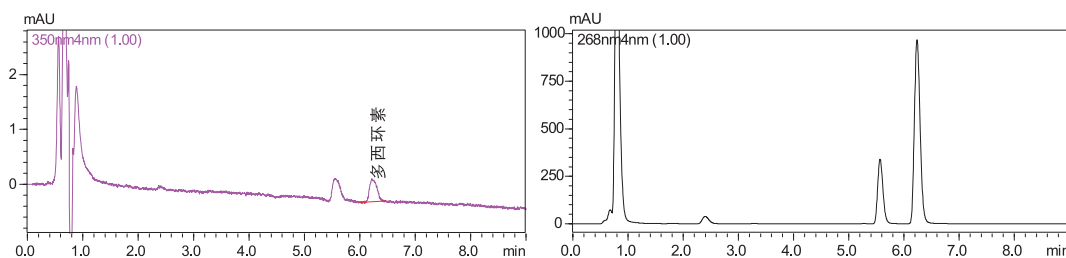


图 9 面霜样品的色谱图

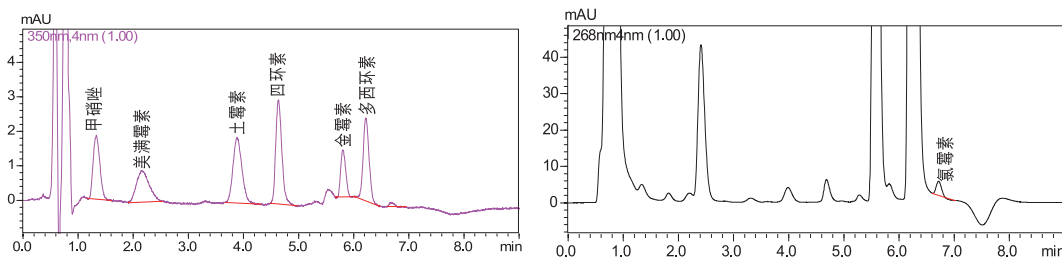


图 10 10 mg/kg 样品基质加标样色谱图

表 5 加标样的回收率结果 (n=4)

No.	样品名称	样品浓度 (mg/kg)	回收率 (%)			RSD%		
			2 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	2 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg
1	甲硝唑	N.D	83.5	93.5	88.6	2.05	1.96	0.56
2	美满霉素	N.D	72.5	70.1	75.3	3.51	0.94	0.70
3	土霉素	N.D	86.0	88.2	85.3	2.89	2.72	0.76
4	四环素	N.D	97.5	93.7	98.6	1.83	1.68	0.68
5	金霉素	N.D	87.0	87.0	81.7	2.98	0.24	0.85
6	多西环素	3.39	110.0	92.4	95.0	2.48	2.82	0.97
7	氯霉素	N.D	86.5	86.2	87.6	3.70	3.62	0.62

## 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定祛痘除螨类化妆品中甲硝唑与 6 种抗生素类药物。甲硝唑、美满霉素、土霉素、四环素、金霉素、多西环素和氯霉素这 7 种物质的线性良好，相关系数均大于 0.9999。7 种物质的方法检出限在 0.15 ~ 0.49 mg/kg 间，定量限在 0.47 ~ 1.57 mg/kg 间；基质加标回收率在 70.1 ~ 110.0% 之间。此法的方法检出限均低于《化妆品卫生规范》（2007 年版）规定的检出浓度为 1.0 mg/kg（美满霉素和甲硝唑为 50 mg/kg）。

此方法前处理简单，分析快速和灵敏度高，可作为测得祛痘除螨类化妆品中甲硝唑与抗生素类药物的日常检测方法。