

# LC-MS/MS 法测定化妆品中他克莫司和吡美莫司

## LCMSMS-904

**摘要：** 本文参照国家药监局化妆品补充检验规定《化妆品中他克莫司和吡美莫司的测定》（BJH202301），建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定化妆品中他克莫司和吡美莫司的方法。结果表明，在线性范围内，线性相关系数  $r > 0.999$ ，线性良好。基质混合标准溶液重复性保留时间 RSD% 为 0.04~0.26%，峰面积 RSD% 为 0.49%~3.27%。加标回收率为 95.6%~115.5%。该方法快速、稳定、准确，可应对化妆品中他克莫司和吡美莫司快速定量分析。

**关键词：** 三重四极杆液质联用仪 化妆品 他克莫司 吡美莫司

### 技术特点：

- ❖ 本方法可以实现化妆品中他克莫司和吡美莫司的快速测定。
- ❖ 本方法实际测得检出限和定量限均优于标准要求。

他克莫司是从链霉菌属中分离出的发酵产物，是一种大环内酯类抗生素，为一种强力的新型免疫抑制剂。吡美莫司是亲脂性抗炎性的子囊霉素巨内酰胺的衍生物，可细胞选择性地抑制前炎症细胞因子的产生和释放。他克莫司和吡美莫司，作为皮肤用处方药，必须遵医嘱使用。然而，部分不法企业将其非法添加至化妆品中，给消费者的健康安全带来严重隐患。

2023 年 7 月，国家药监局发布 2023 年第 89 号公告《化妆品中他克莫司和吡美莫司的测定》化妆品补

充检验方法，该方法填补了化妆品中他克莫司和吡美莫司测定检验方法的空白，为政府监管部门打击化妆品中非法添加他克莫司和吡美莫司的行为提供有力技术支撑。

本文参照国家药监局发布的方法，建立了 LC-MS/MS 法测定化妆品中他克莫司和吡美莫司。该方法、准确，能够应对化妆品中他克莫司和吡美莫司的快速筛查和准确定量。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本文使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A <sub>5R</sub>
输液泵：	LC-30AD × 2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-30A	质谱检测器：	LCMS-8050
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.123		

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：	Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.8 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03)		
流动相：	A 相 -0.1% 乙酸 -5 mmol/L 乙酸铵水溶液; B 相 -0.1% 乙酸 -5 mmol/L 乙酸铵甲醇		
流速：	0.3 mL/min	进样量：	2 μL
柱温：	45°C		
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，洗脱程序见表 1		

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
0.50	泵	B.Conc	30
3.00	泵	B.Conc	70
8.00	泵	B.Conc	98
11.00	泵	B.Conc	98
11.30	泵	B.Conc	30
15.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子源 : ESI (+)	加热块温度 : 400°C
雾化气流速 : 3.0 L/min	D L 温度 : 200°C
加热气流速 : 10.0 L/min	接口温度 : 300°C
干燥气流速 : 10.0 L/min	接口电压 : 2 kV
MRM 参数 : 见表 2	扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

表 2 化合物信息及 MRM 优化参数

No.	化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	他克莫司	104987-11-3	821.60	768.60*	-30	-22	-22
				576.40	-30	-23	-22
2	吡美莫司	137071-32-0	827.60	774.60*	-22	-23	-22
				564.40	-30	-26	-20

注: \* 表示定量离子

1.3 混合标准溶液的配制

称取他克莫司、吡美莫司标准品各 10 mg (精确到 0.00001 g), 置 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀, 即得 (1000 µg/mL)。逐级用甲醇稀释, 得到 1 µg/mL 的混合标准溶液。

1.4 供试品溶液的制备

称取样品约 0.2 g (精确到 0.0001 g) 于 10 mL 具塞比色管中, 加入 8 mL 甲醇, 涡旋振荡 30 s 至样品与提取溶剂混合均匀。超声提取 15 min, 静置至室温, 然后用甲醇定容至刻度, 摇匀, 以 4000 r/min 离心 5 min, 上清液经 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 化合物 MRM 色谱图

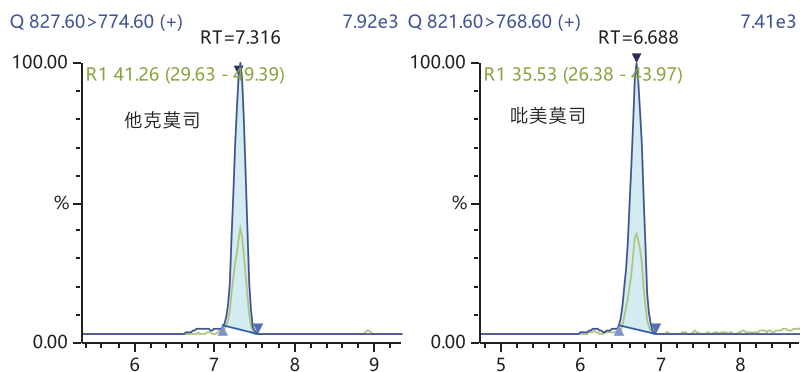


图 1 5 ng/mL 他克莫司和吡美莫司 MRM 色谱图

## 2.2 线性范围

取 1.3 中的混合标准溶液，用 1.4 制备得到的空白基质提取液依次配制成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、20、50 ng/mL 的基质混合标准系列溶液，上机测试。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析。结果表明，他克莫司和吡美莫司在线性范围内相关系数大于 0.999，线性良好。

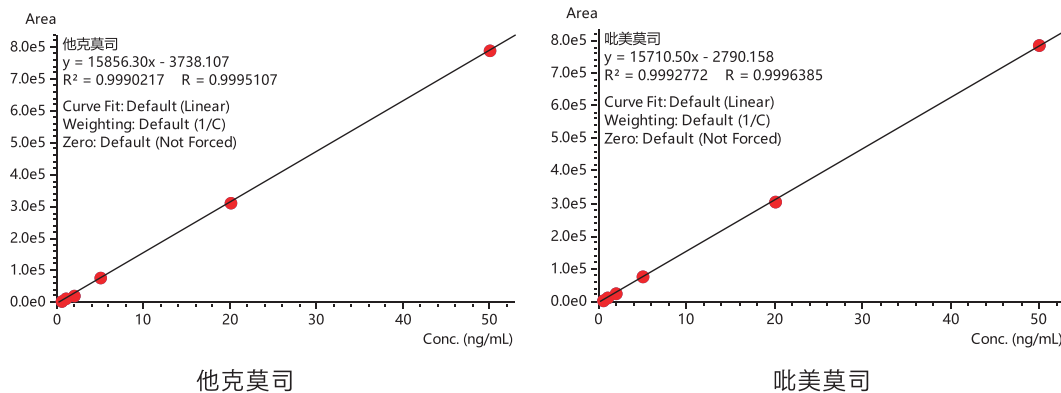


图 2 他克莫司和吡美莫司校准曲线

表 3 他克莫司和吡美莫司校准曲线参数

No.	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (r)	准确度 (%)
1	他克莫司	0.5-50	0.9995	84.0-115.6
2	吡美莫司	0.5-50	0.9996	87.3-114.3

## 2.3 检出限及定量限

取线性最低点基质混合标准溶液 (0.5 ng/mL)，进行上机分析。通过 LabSolutions 软件计算检出限及定量限。结果表明，他克莫司的检出限为 0.46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 1.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；吡美莫司的检出限为 1.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 3.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，优于标准要求，结果见表 4。

表 4 他克莫司和吡美莫司检出限及定量限

No.	化合物名称	实际测定		标准要求	
		检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	他克莫司	0.46	1.53	10	25
2	吡美莫司	1.06	3.53	10	25

## 2.4 重复性考察

取 0.5、5.0、20 ng/mL 基质混合标准溶液，按照 1.2 分析条件进行上机分析，连续进样 6 针，计算重复性。结果表明，基质混合标准溶液重复性保留时间 RSD% 为 0.04~0.26%，峰面积 RSD% 为 0.49%~3.27%，方法重复性良好，仪器精密度良好。结果见表 5。

表 5 他克莫司和吡美莫司重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	0.5 ng/mL		5.0 ng/mL		20 ng/mL	
		保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	他克莫司	0.26	3.27	0.07	1.98	0.04	0.49
2	吡美莫司	0.08	2.92	0.04	2.25	0.04	1.02

### 2.5 加标回收率试验

取某品牌样品适量, 按照 1.3 前处理方式制备样品, 样品中未检出他克莫司和吡美莫司。按照 1.3 前处理方式制备加标样品, 配制成三个水平浓度加标样品溶液, 平行测定 3 次, 进行加标回收率试验 (见图 3)。结果表明, 他克莫司的平均回收率为 96.8%~115.5%, 相对标准偏差为 1.11~3.70%; 吡美莫司的平均回收率为 95.6%~111.3%, 相对标准偏差为 1.01~3.46%, 结果见表 6。

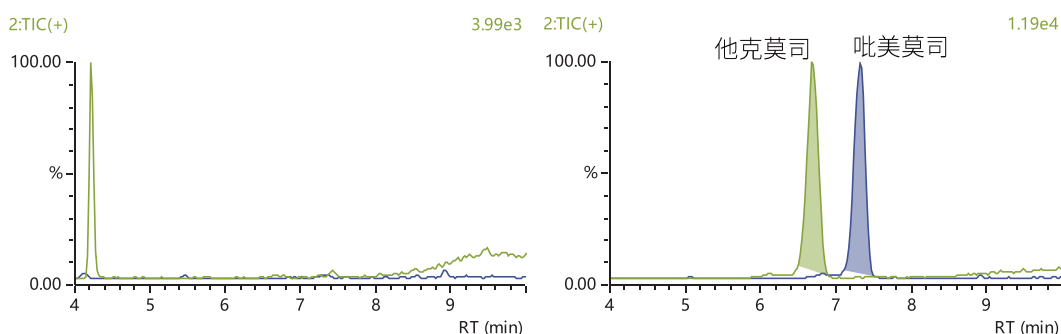


图 3 加标回收样品 TIC 图 (左图: 样品, 右图: 0.25 mg/kg 加标样品)

表 6 加标回收和精密度结果 (n=3)

No.	化合物名称	样品浓度 (mg/kg)	0.025 mg/kg		0.25 mg/kg		1.0 mg/kg	
			回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	他克莫司	N.D.	115.5	3.70	108.7	1.11	95.8	1.60
2	吡美莫司	N.D.	111.3	3.46	109.6	1.52	95.6	1.01

注: N.D. 表示未检出。

## 结论

本文使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪, 参照国家药监局化妆品补充检验规定《化妆品中他克莫司和吡美莫司的测定》(BJH202301), 建立了化妆品中他克莫司和吡美莫司的检测方法。本方法灵敏度高、重复性好, 能够应对化妆品中他克莫司和吡美莫司的日常监测工作。

岛津应用云

