

附件 2

化妆品中抗感染类药物的检测方法 Determination of Anti-infective Drug in Cosmetics

1 范围

本方法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。

本方法适用于膏霜类、乳液类、水剂类等化妆品中 36 种抗感染类药物的检测。

本方法所包含的 36 种抗感染类药物名称、CAS 号及化学结构式见附表 1。

2 方法提要

本方法以乙腈为溶剂提取样品中抗感染类药物成分，用高效液相色谱仪分离，质谱检测器检测，对样品中的 36 种抗感染类药物进行初筛。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。

本方法中 36 种抗感染类药物的检出限、定量下限及取样量为 0.2g 时最低检出浓度和定量浓度见附表 2。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 甲醇，色谱纯；

3.2 乙腈，色谱纯；

3.3 甲酸，色谱纯；

3.4 氯化钠。

3.5 饱和氯化钠溶液：称取 40g 氯化钠，置于 250mL 磨口锥形瓶中，加入 100mL 水，超声 15 分钟，即得。

3.6 含 0.5%甲酸的乙腈溶液：量取 200mL 乙腈于 500mL 容量瓶中，加入 2.5mL 甲酸，用乙腈稀释并定容至刻度，摇匀。

3.7 5mmol 乙酸铵缓冲溶液 (pH4.0)：称取 0.3854g 乙酸铵于 1000mL 容量瓶中，加水 980mL 溶解后，用甲酸调节 pH 至 4.0，加水定容至刻度，混匀，过 0.22 μ m 微孔滤膜。

3.8 氯霉素标准储备溶液 [ρ (氯霉素) = 1.0mg/mL]：精确称取 10mg (精确至 0.01mg) 的氯霉素对照品，置 10mL 棕色容量瓶中，加入甲醇 (3.1) 充分溶解后，用甲醇 (3.1) 定容至刻度，摇匀。该储备液质量浓度为 1.0mg/mL。置于-18 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存。

3.9 其他组分标准储备溶液 [ρ (待测组分) = 0.1mg/mL]：分别精确称取附表 1 中除氯霉素外其他待测组分对照品各 10 mg (精确至 0.01mg) 置于 100mL 棕色容量瓶中，加甲醇 (3.1) 使溶解 (对于溶解性差的物质可加入少量甲酸或水促进溶解)，并用甲醇 (3.1) 定容至刻度，摇匀，即得质量浓度为 0.1mg/mL 的标准储备溶液。置于-18 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存。

3.10 混合标准储备液：分别精确移取各待测组分标准储备溶液 (3.8 和 3.9) 1.0mL 于 100mL 容量瓶中，用甲醇 (3.1) 稀释并定容至刻度，作为混合标准储备液。置于-18 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存。

4 仪器

4.1 高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪。

4.2 分析天平：感量 0.0001g 和 0.00001g。

4.3 超声波清洗仪。

4.4 冷冻离心机。

4.5 涡旋混合仪。

5 测定步骤

5.1 筛查用混合标准溶液的制备

分别取混合标准储备液（3.10）适量，用初始流动相进行稀释，配制成氯霉素浓度为 200ng/mL，其他组分浓度为 20ng/mL 的筛查用混合标准溶液。

5.2 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 5 份于 15mL 离心管中（0.2g/份），分别加入标准品储备溶液适量，按照样品处理操作步骤处理，配制成氯霉素浓度为 200、400、600、800、1000ng/mL，其他组分浓度为 20、40、60、80、100ng/mL 的系列溶液（浓度范围可根据实际情况进行调整）。

5.3 样品处理

准确称取化妆品样品（实际样品或空白样品）0.2g（精确到 0.0001g），置于 15mL 离心管中，准确加入 3mL 饱和氯化钠溶液（3.5），涡旋 30s，分散均匀，加入含 0.5%甲酸的乙腈溶液（3.6）5mL，涡旋 30s，超声提取 30min，涡旋混合摇匀，以 8000r/min 转速 0℃冷冻离心 5min，吸取上清液于 10mL 容量瓶中，加水定容至 10mL，混匀，经 0.22μm 滤膜过滤后，滤液作为供试品溶液备用。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 色谱条件

色谱柱：C₁₈ 柱（100mm×2.1mm，1.7μm）或等效色谱柱；

流动相：溶液 A：5mmol 乙酸胺缓冲溶液 pH4.0 (3.7)，溶液 B：乙腈（含 0.1%甲酸），梯度洗脱程序见表 1；

表 1 流动相的梯度洗脱程序

时间 (min)	溶液 A (%)	溶液 B (%)
0	98	2
14	1	99
17	1	99
17.1	98	2
20	98	2

流速：0.3mL/min；

柱温：40℃；

进样量：5μL。

5.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI 源）；

监测模式：正离子、负离子多离子反应监测模式，监测离子对及相关参数设定见附表 3（可根据仪器情况调整）；

0–2min：不进入质谱仪分析， 2–20min：进入质谱仪分析。

5.5 定性判定

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应不超过表 2 的规定，则可以判定样品中存在对应的抗感染类药物成分。

表 2 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%

5.6 定量测定

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。取供试品溶液测定,将对应的定量离子色谱峰面积代入线性回归方程,按“计算”项下公式,计算样品中各组分的含量。

6 计算

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D}{m}$$

式中: ω ——化妆品中的抗感染类药物禁用物质质量分数, $\mu\text{g/g}$;

ρ ——供试品溶液中抗感染类药物禁用物质的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

V ——样品定容体积, mL;

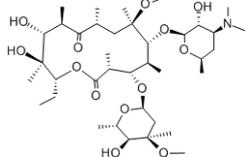
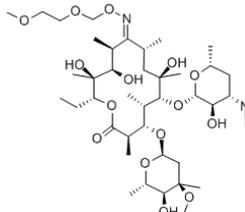
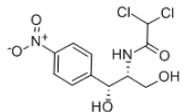
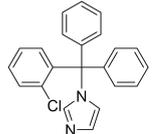
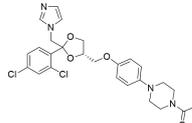
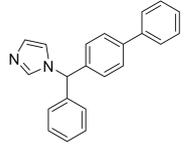
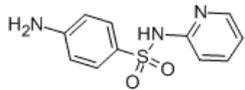
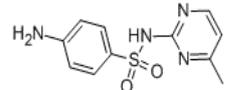
m ——样品取样量, g;

D ——稀释倍数(不稀释则为 1)。

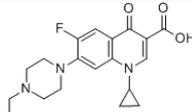
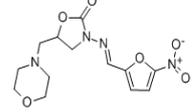
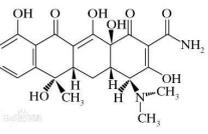
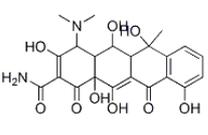
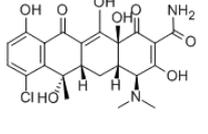
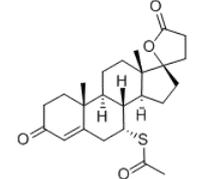
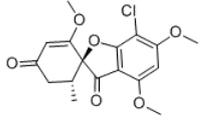
相同条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附表 1 36 种抗感染药物的 CAS 编号、分子式、分子量和结构式

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	结构式
1	甲硝唑	Metronidazole	443-48-1	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171.16	
2	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361.37	
3	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.34	
4	克林霉素	Clindamycin	18323-44-9	C ₁₈ H ₃₃ ClN ₂ O ₅ S	425.0	
5	克林霉素磷酸酯	Clindamycin phosphate	24729-96-2	C ₁₈ H ₃₄ ClN ₂ O ₈ P S	504.97	
6	林可霉素	Lincomycin	154-21-2	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	406.5	
7	多西环素	Doxycycline	564-25-0	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	
8	米诺环素	Minocycline	10118-90-8	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₇	457.5	
9	阿奇霉素	Azithromycin	83905-01-5	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748.98	

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	结构式
10	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747.95	
11	罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837.05	
12	氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	C ₁₁ H ₁₂ C ₂ N ₂ O ₅	323.1	
13	克霉唑	Clotrimazole	23593-75-1	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂	344.84	
14	酮康唑	Ketoconazole	65277-42-1	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	531.43	
15	氟康唑	Fluconazole	86386-73-4	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306.27	
16	联苯苄唑	Bifonazole	60628-96-8	C ₂₂ H ₁₈ N ₂	310.39	
17	磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249.29	
18	磺胺甲噁啶	Sulfamerazine	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	264.3	

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	结构式
19	磺胺甲二唑	Sulfamethizole	144-82-1	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	270.33	
20	磺胺甲氧嘧啶	Sulfamethoxypyridazine	80-35-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280.3	
21	磺胺氯吡啶	Sulfachloropyridazine	80-32-0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	284.72	
22	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.28	
23	依诺沙星	Enoxacin	74011-58-8	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	320.32	
24	沙拉沙星	Sarafloxacin	98105-99-8	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	385.36	
25	培氟沙星	Pefloxacin	70458-92-3	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	333.36	
26	氟罗沙星	Fleroxacin	79660-72-3	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	369.34	
27	双氟沙星	Difloxacin	98106-17-3	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	399.39	
28	莫西沙星	Moxifloxacin	151096-09-2	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₄	401.43	
29	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33	

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	结构式
30	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359.4	
31	呋喃它酮	Furaltadone	139-91-3	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₆	324.29	
32	四环素	Tetracycline	60-54-8	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	
33	土霉素	Oxytetracyclin	79-57-2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460.4	
34	金霉素	Aureomycin	57-62-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478.9	
35	螺内酯	Spirolactone	52-01-7	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	416.57	
36	灰黄霉素	Griseofulvin	126-07-8	C ₁₇ H ₁₇ ClO ₆	352.77	

注：附表 1 参考部分药物临床使用情况排序

附表2 36种抗感染药物的检出限与定量下限

序号	化合物	检出限 (ng)	定量下限 (ng)	最低检出浓度 ($\mu\text{g/g}$)	定量浓度 ($\mu\text{g/g}$)
1	甲硝唑	0.025	0.075	0.25	0.75
2	磺胺吡啶	0.025	0.075	0.25	0.75
3	磺胺甲噁唑	0.025	0.075	0.25	0.75
4	磺胺甲二唑	0.025	0.075	0.25	0.75
5	磺胺甲氧唑	0.025	0.075	0.25	0.75
6	磺胺氯哒嗪	0.025	0.075	0.25	0.75
7	磺胺甲噁唑	0.025	0.075	0.25	0.75
8	依诺沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
9	沙拉沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
10	培氟沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
11	氧氟沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
12	氟罗沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
13	双氟沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
14	莫西沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
15	诺氟沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
16	环丙沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
17	恩诺沙星	0.025	0.075	0.25	0.75
18	呋喃它酮	0.025	0.075	0.25	0.75
19	林可霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
20	克林霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
21	克林霉素磷酸酯	0.025	0.075	0.25	0.75
22	四环素	0.025	0.075	0.25	0.75
23	多西环素	0.025	0.075	0.25	0.75
24	米诺环素	0.025	0.075	0.25	0.75
25	土霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
26	金霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
27	阿奇霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
28	克拉霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
29	罗红霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
30	氯霉素	0.1	0.3	1	3
31	螺内酯	0.025	0.075	0.25	0.75
32	灰黄霉素	0.025	0.075	0.25	0.75
33	克霉唑	0.025	0.075	0.25	0.75
34	酮康唑	0.025	0.075	0.25	0.75
35	氟康唑	0.025	0.075	0.25	0.75
36	联苯苄唑	0.025	0.075	0.25	0.75

注：附表2参考各组分色谱图出峰顺序排序

附表3 36种抗感染药物的监测离子对相关参数设定表

序号	物质名称	电离方式	母离子(m/z)	Frag. (V)	子离子(m/z)	CE (V)
1	甲硝唑	ESI+	172.0	22	82.0*	18
			172.0	22	128.0	22
2	磺胺吡啶	ESI+	250.0	10	156.0*	16
			250.0	10	92.0	26
3	磺胺甲噁唑	ESI+	265.0	22	156.0*	15
			265.0	22	92.0	18
4	磺胺甲二唑	ESI+	271.1	30	156.0*	15
			271.1	30	92.0	25
5	磺胺甲氧嗪	ESI+	281.1	35	156.0*	25
			281.1	35	92.0	25
6	磺胺氯哒嗪	ESI+	285.0	20	155.9*	15
			285.0	20	92.0	28
7	磺胺甲噁唑	ESI+	254.1	22	156.0*	18
			254.1	22	107.9	18
8	依诺沙星	ESI+	321.1	40	232.0*	30
			321.1	40	303.1	35
9	沙拉沙星	ESI+	386.2	6	299.1*	28
			386.2	6	342.1	18
10	培氟沙星	ESI+	334.2	13	233.1*	20
			334.2	13	290.1	16
11	氧氟沙星	ESI+	362.2	30	261.1*	28
			362.2	30	318.2	18
12	氟罗沙星	ESI+	370.2	29	269.1*	28
			370.2	30	326.0	20
13	双氟沙星	ESI+	400.2	38	299.1*	22
			400.2	38	356.0	20
14	莫西沙星	ESI+	402.2	6	261.1*	24
			402.2	6	364.5	28
15	诺氟沙星	ESI+	320.1	40	233.1*	25
			320.1	40	276.1	20
16	环丙沙星	ESI+	332.2	42	231.0*	22
			332.2	42	288.1	18
17	恩诺沙星	ESI+	360.2	29	245.1*	20
			360.2	29	342.2	20
18	呋喃它酮	ESI+	325.0	28	100.0*	15
			325.0	28	281.0	12
19	林可霉素	ESI+	407.2	40	359.4*	20

序号	物质名称	电离方式	母离子 (m/z)	Frag. (V)	子离子 (m/z)	CE (V)
			407.2	40	126.1	25
20	克林霉素	ESI ⁺	425.2	20	377.2*	18
			425.2	20	126.2	25
21	克林霉素磷酸酯	ESI ⁺	505.2	30	126.1*	30
			505.2	30	457.2	30
22	四环素	ESI ⁺	445.1	30	410.2*	18
			445.1	30	427.3	14
23	多西环素	ESI ⁺	445.2	6	428.2*	20
			445.2	6	154.0	28
24	米诺环素	ESI ⁺	458.2	8	441.3*	18
			458.2	8	283.1	30
25	土霉素	ESI ⁺	461.2	4	426.1*	18
			461.2	4	444.2	18
26	金霉素	ESI ⁺	479.1	25	444.1*	20
			479.1	25	462.2	16
27	阿奇霉素	ESI ⁺	749.6	55	591.5*	30
			749.6	55	116.1	30
28	克拉霉素	ESI ⁺	748.6	35	158.1*	30
			748.6	35	590.6	20
29	罗红霉素	ESI ⁺	837.6	22	158.1*	31
			837.6	22	679.6	36
30	氯霉素	ESI ⁻	321.1	25	152.0*	15
			321.1	25	257.2	10
31	螺内酯	ESI ⁺	341.1	20	107.0*	35
			341.1	20	165.0	65
32	灰黄霉素	ESI ⁺	353.2	6	165.0*	20
			353.2	6	215.0	20
33	克霉唑	ESI ⁺	277.1	4	165.1*	24
			277.1	4	241.0	20
34	酮康唑	ESI ⁺	531.2	26	244.0*	30
			531.2	26	489.3	28
35	氟康唑	ESI ⁺	307.1	2	238.1*	15
			307.1	2	220.0	16
36	联苯苄唑	ESI ⁺	311.2	20	243.1*	15
			311.2	20	165.0	10

注：附表 3 参考各组分色谱图出峰顺序排序；*：定量离子对

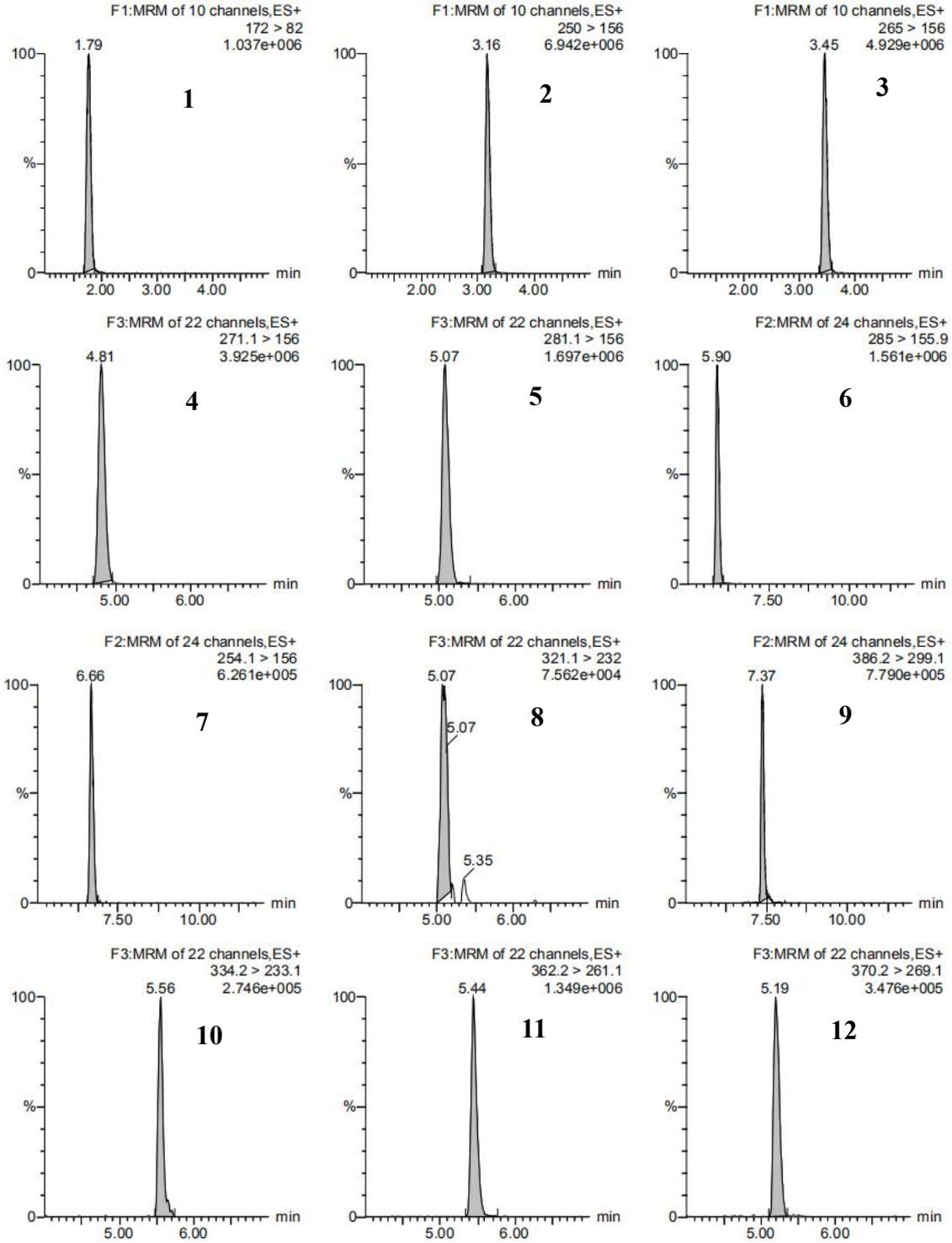


图 1 36 中抗感染药物 HPLC-MS/MS 色谱图

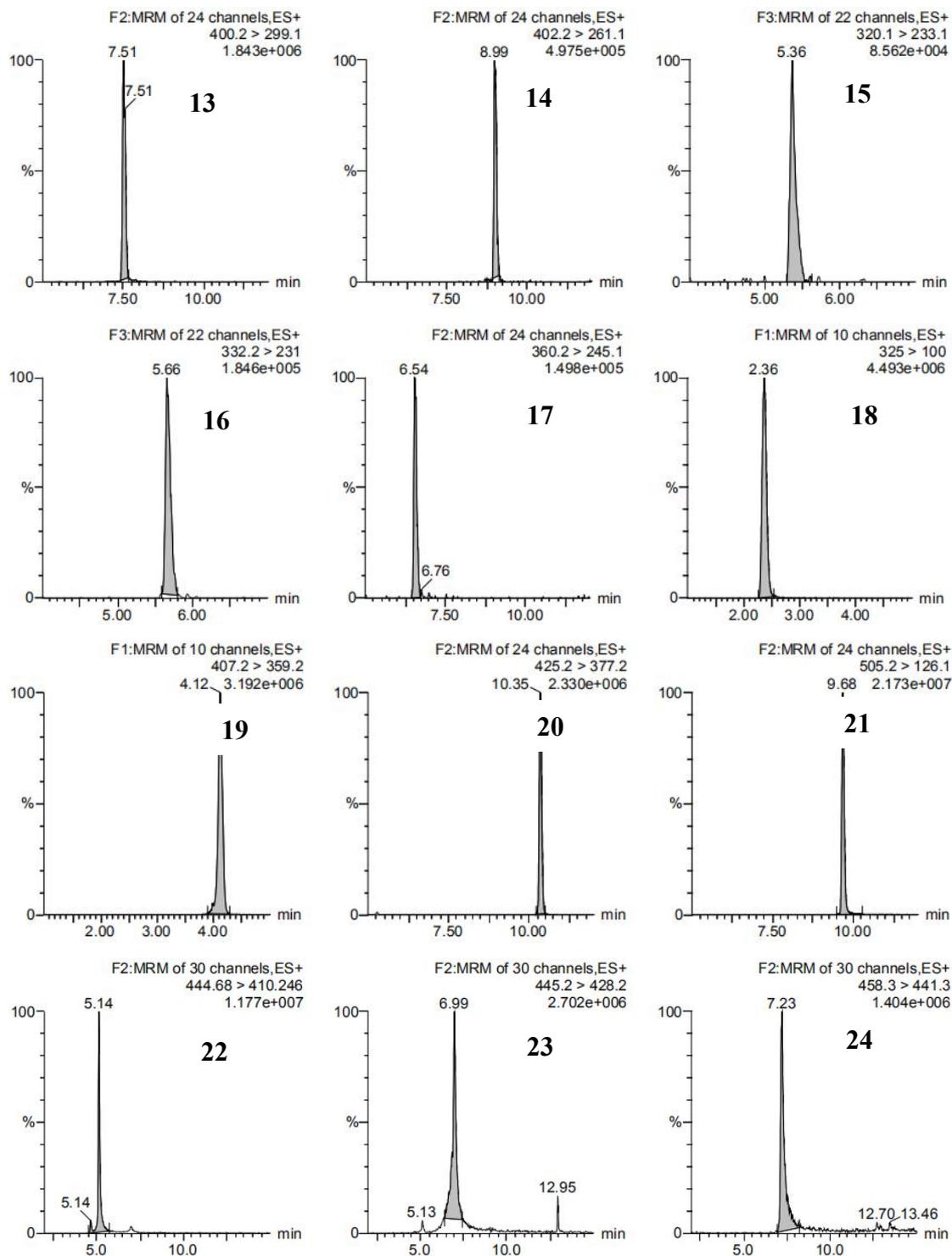


图 1 36 中抗感染药物 HPLC-MS/MS 色谱图 (续)

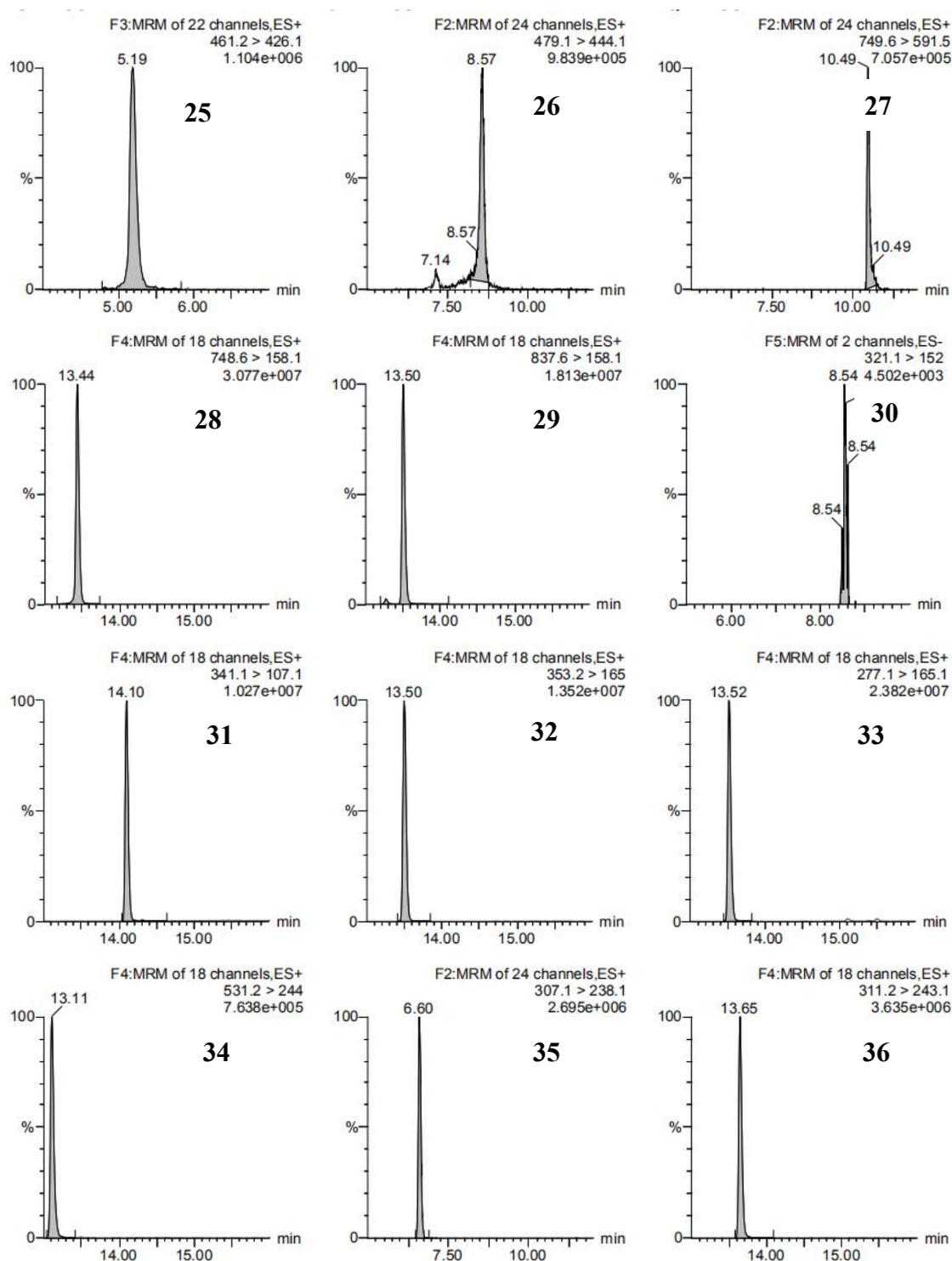


图 1 36 中抗感染药物 HPLC-MS/MS 色谱图 (续)

图中 1-36 号组分为：甲硝唑、磺胺吡啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲二唑、磺胺甲氧唑、磺胺氯噻唑、磺胺甲噁唑、依诺沙星、沙拉沙星、培氟沙星、氧氟沙星、氟罗沙星、双氟沙星、莫西沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、呋喃它酮、林可霉素、克林霉素、克林霉素磷酸酯、四环素、多西环素、米诺环素、土霉素、金霉素、阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素、氯霉素、螺内酯、灰黄霉素、克霉唑、酮康唑、氟康唑、联苯苄唑 (参考各组分出峰顺序)。