



中华人民共和国国家标准

GB/T 35951—2018

化妆品中螺旋霉素等 8 种大环内酯类 抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of eight macrolide antibiotics such as
spiramycin in cosmetics—LC-MS/MS

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)归口。

本标准起草单位：苏州世谱检测技术有限公司、广东华鑫检测技术有限公司、江苏隆力奇生物科技股份有限公司、上海市日用化学工业研究所、完美(中国)有限公司、欧诗漫生物股份有限公司、苏州质量检测科学研究院、河北省食品检验研究院、江苏省食品药品监督检验研究院、江苏省产品质量监督检验研究院、苏州大学、苏州赛分科技有限公司。

本标准主要起草人：车文军、杨洋、沈敏、代丹、周建青、张丽华、李晓敏、陆小宇、杨安全、范素芳、方萍、袁利文、刘园、李海、廖华勇、康薇、王小丹、张征、张岩、武中平、卢剑、李建祥、黄学英。



引 言

本标准的被测物质是我国《化妆品安全技术规范(2015 年版)》规定的禁用物质。

禁用物质是指不能作为化妆品生产原料即组分添加到化妆品中的物质。《化妆品安全技术规范(2015 年版)》规定:若技术上无法避免禁用物质作为杂质带入化妆品时,应进行安全性风险评估,确保在正常、合理及可预见的使用条件下不得对人体健康产生危害。

目前我国尚未规定这些物质的限量值,本标准的制定,仅对化妆品中测定这些物质提供检测方法。

化妆品中螺旋霉素等 8 种大环内酯类 抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素含量的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定方法的试验方法、结果计算、回收率与精密度、允许差等内容。

本标准适用于膏霜乳液、水剂类化妆品中螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素含量的测定。

本标准方法检出限与定量限参见附录 A 中的表 A.1。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 试验方法

3.1 原理

样品经提取液超声提取、离心后,经固相萃取小柱净化,用液相色谱-串联质谱法测定和确证,外标法定量。

3.2 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 3.2.1 甲醇:色谱纯。
- 3.2.2 乙腈:色谱纯。
- 3.2.3 甲酸:色谱纯。
- 3.2.4 正己烷:色谱纯。
- 3.2.5 氢氧化钠。
- 3.2.6 磷酸二氢钠。
- 3.2.7 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4.0 g 氢氧化钠,并用水稀释至 1 L。
- 3.2.8 甲醇水溶液(3+7):量取 30 mL 甲醇(3.2.1)与 70 mL 水混合。
- 3.2.9 乙腈水溶液(2+8):量取 20 mL 乙腈(3.2.2)与 80 mL 水混合。
- 3.2.10 磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L):溶解 12.2 g 磷酸二氢钠于 950 mL 水中,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0,最后用水稀释至 1 L。
- 3.2.11 8 种大环内酯抗生素标准样品/物质:纯度均不小于 96%。螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素的药物名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子

质量及结构式参见附录 B 中的表 B.1。

3.2.12 标准储备溶液：准确称取适量各标准物质(3.2.11)分别置于 50 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成浓度为 500 mg/L 的储备液，冷藏避光保存，有效期为一个月。

3.2.13 混合标准储备溶液：分别准确移取阿奇霉素、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素标准储备溶液(3.2.12)0.2 mL 和螺旋霉素、替米考星标准储备溶液(3.2.12)6.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成阿奇霉素、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素浓度为 1 mg/L，螺旋霉素、替米考星浓度为 30 mg/L 的混合标准储备溶液，临用前现配。

3.2.14 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者：200 mg, 3 mL。使用前依次用 5 mL 甲醇, 5 mL 水活化。

3.2.15 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相。

3.3 仪器和设备

3.3.1 液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)：配有电喷雾离子源(ESI)。

3.3.2 电子天平：感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。

3.3.3 离心机：转速不低于 6 000 r/min。

3.3.4 超声波清洗机。

3.3.5 固相萃取装置。

3.3.6 氮气吹干仪。

3.3.7 涡旋混合器。

3.3.8 具塞塑料离心管：15 mL。

3.4 试样制备

3.4.1 提取

3.4.1.1 膏霜乳液类化妆品(水包油)

称取试样约 0.2 g (精确至 0.000 1 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中，准确加入 10 mL 甲醇(3.2.1)，涡旋分散均匀后，超声提取 15 min，以 6 000 r/min 离心 10 min，移取 5.0 mL 上清液，加 15 mL 磷酸盐缓冲溶液(3.2.10)混匀后，待净化。

3.4.1.2 膏霜乳液类化妆品(油包水)

称取试样约 0.2 g (精确至 0.000 1 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中，加入 2 mL 正己烷(3.2.4)，分散均匀后，准确加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(3.2.10)，超声提取 15 min，以 6 000 r/min 离心 10 min，弃去上层正己烷后，移取 5.0 mL 下层清液，加 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(3.2.10)混匀后，待净化。

3.4.1.3 水剂类化妆品

称取试样约 0.2 g (精确至 0.000 1 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中，用磷酸盐缓冲溶液(3.2.10)定容至 10 mL，混匀，以 6 000 r/min 离心 5 min，移取 5.0 mL 上清液，待净化。

3.4.2 净化

将试样提取液转移至固相萃取小柱(3.2.14)中，依次用 5 mL 水, 5 mL 甲醇水溶液(3.2.8)淋洗，弃去流出液，减压抽干后，用 5 mL 甲醇(3.2.1)洗脱，收集洗脱液。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹至近干，加入 1.0 mL 乙腈水溶液(3.2.9)，在涡旋混合器上混合 1 min 后，过微孔滤膜(3.2.15)后滤液待测。

3.5 液相色谱-串联质谱测定

3.5.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱： C_{18} 柱，100 mm×2.1 mm(i.d.)，5 μ m，或相当者；
- b) 流动相：A：乙腈，B：0.2%甲酸溶液，梯度洗脱，梯度洗脱条件见表 1；
- c) 柱温：30 $^{\circ}$ C；
- d) 进样量：10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序表

时间/min	A	B	流速/(mL/min)
0.0	10%	90%	0.30
2.0	20%	80%	0.30
4.0	30%	70%	0.30
7.0	40%	60%	0.30
10.1	95%	5%	0.30
11.0	10%	90%	0.30
18.0	10%	90%	0.30

3.5.2 串联质谱参考条件

串联质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式；
- b) 喷雾电压：3.0 kV；
- c) 雾化温度：300 $^{\circ}$ C；
- d) 毛细管温度：350 $^{\circ}$ C；
- e) 鞘气压力：50 Arb(1 Arb=1 psi)；
- f) 辅助气压力：20 Arb(1 Arb=0.3 L/min)；
- g) 碰撞气、鞘气和辅助气：氩气(99.999%)；
- h) 扫描模式：多反应监测(MRM)模式，8 种大环内酯类抗生素的质谱参数见表 2。

表 2 质谱参数

序号 No.	药物名称 Drugs	母离子 Parent ion m/z	子离子 Daughter ion m/z	碰撞能 Collision energy eV	透镜电压 Tube Lens V
1	螺旋霉素 Spiramycin	843.3	174.0* 142.1	32 31	105
2	阿奇霉素 Azithromycin	749.0	591.2 158.0*	46 31	103
3	替米考星 Tilicosin	869.1	174.1 98.2*	47 43	124

表 2（续）

序号 No.	药物名称 Drugs	母离子 Parent ion <i>m/z</i>	子离子 Daughter ion <i>m/z</i>	碰撞能 Collision energy eV	透镜电压 Tube Lens V
4	竹桃霉素 Oleandomycin	688.3	158.0* 544.2	25 16	84
5	红霉素 Erythromycin	734.0	576.2 158.0*	31 20	84
6	泰乐菌素 Tylosin	916.0	173.9 155.9*	35 38	111
7	克拉霉素 Clarithramycin	748.0	590.22 158.0*	27 18	84
8	罗红霉素 Roxithromycin	837.2	679.2 158.0*	28 22	79
* 定量离子(Quantitative ion)。					

3.5.3 混合标准工作溶液的制备

用乙腈水溶液(3.2.9)将混合标准储备溶液(3.2.13)逐级稀释得到阿奇霉素、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素浓度为 5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 及螺旋霉素、替米考星浓度为 150 μg/L、300 μg/L、750 μg/L、1 500 μg/L、3 000 μg/L 的系列混合标准工作溶液,浓度由低到高进行检测,以定量离子峰面积对质量浓度作图,做出标准曲线回归方程。

3.5.4 测定步骤

样品待测液中各组分的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样测定。

3.5.5 定性判定

在相同条件测定样品溶液和标准溶液,如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准溶液中的某种组分峰的保留时间一致(变化范围在±2.5%),并且所选择的两对子离子的质荷比一致,样品溶液中定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液中定性离子的相对丰度进行比较时,相对偏差不超过表 3规定的范围,则可判断样品中存在该组分。

8 种大环内酯类抗生素标准物质选择离子质量色谱图参见附录 C 中的图 C.1。

表 3 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

3.6 空白试验

除不加试样外,均按上述测定条件和步骤进行。

4 结果计算

结果按式(1)计算,计算结果保留至小数点后两位。

$$X_i = \frac{C_i \times V \times K}{m}$$

.....(1)

式中：

X_i ——样品中待测组分含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$)；

C_i ——由标准曲线得出的测试液中某种组分的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)；

V ——定容体积,单位为毫升(mL)；

K ——稀释倍数；

m ——样品质量,单位为克(g)。

5 回收率与精密度

阿奇霉素、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克拉霉素、罗红霉素在添加浓度 $5\ \mu\text{g/L} \sim 25\ \mu\text{g/L}$ 范围内及螺旋霉素、替米考星在添加浓度为 $150\ \mu\text{g/L} \sim 750\ \mu\text{g/L}$ 范围内,回收率在 $85\% \sim 110\%$ 之间,相对标准偏差小于 10% 。

6 允许差

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10% 。

附 录 A
(资料性附录)

8 种大环内酯类抗生素测定方法检出限与定量限

8 种大环内酯类抗生素测定方法检出限与定量限参见表 A.1。

表 A.1 8 种大环内酯类抗生素测定方法检出限与定量限

化合物	检出限/($\mu\text{g/g}$)	定量限/($\mu\text{g/g}$)
螺旋霉素	0.75	2.5
阿奇霉素	0.08	0.30
替米考星	0.75	2.5
竹桃霉素	0.01	0.04
红霉素	0.01	0.04
泰乐菌素	0.08	0.30
克拉霉素	0.08	0.30
罗红霉素	0.08	0.30
注：检出限与定量限以取样量 0.2 g,定容体积 1 mL,进样量 10 μL 计。		

附 录 B
(资料性附录)

8 种大环内酯类抗生素的药物名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量及结构式

8 种大环内酯类抗生素的药物名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量及结构式参见表 B.1。

表 B.1 8 种大环内酯类抗生素的药物名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量及结构式

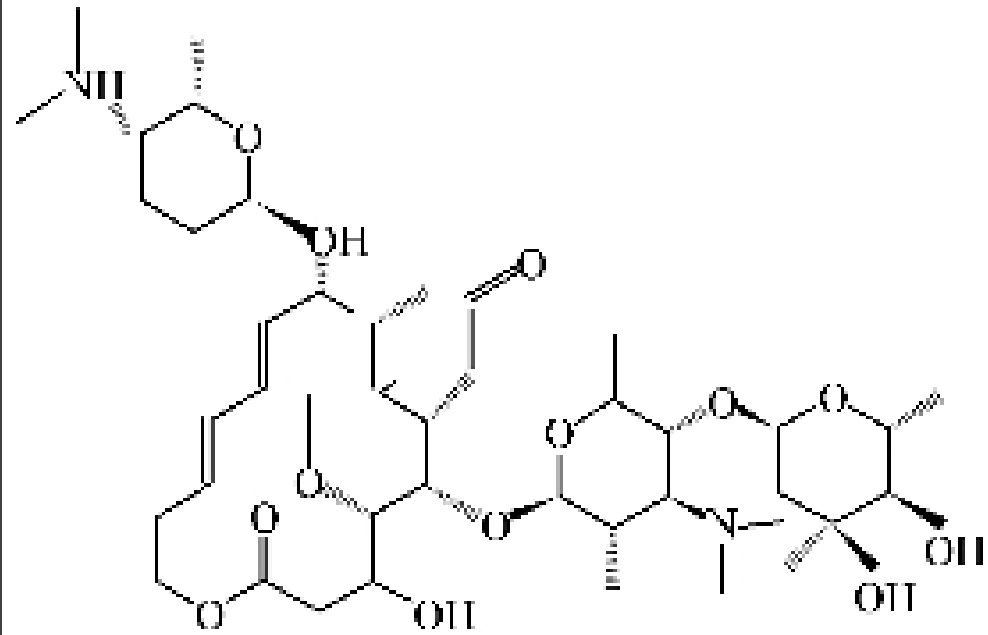
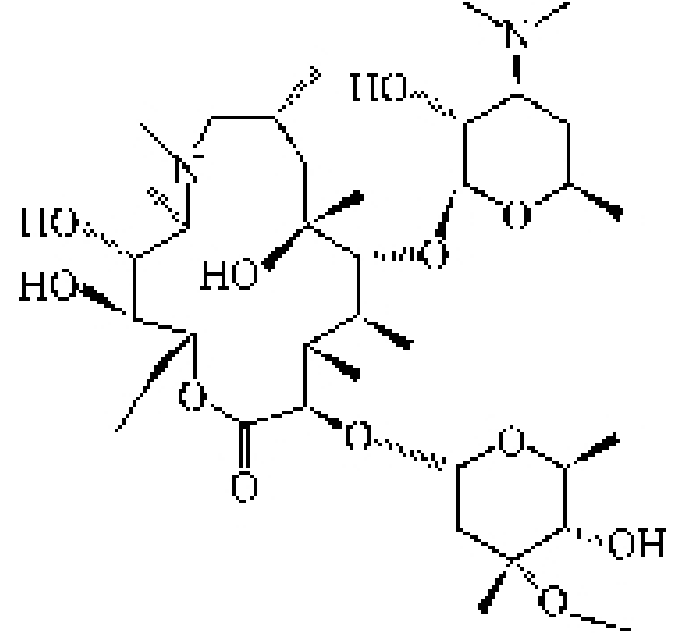
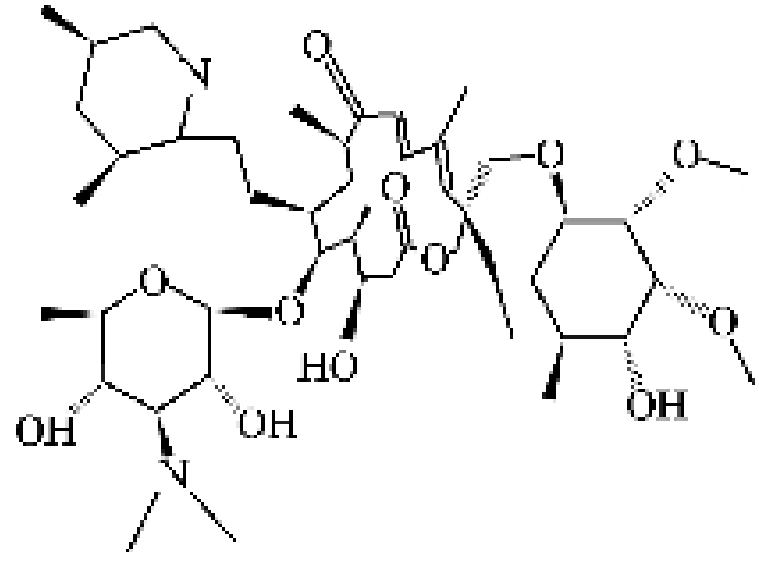
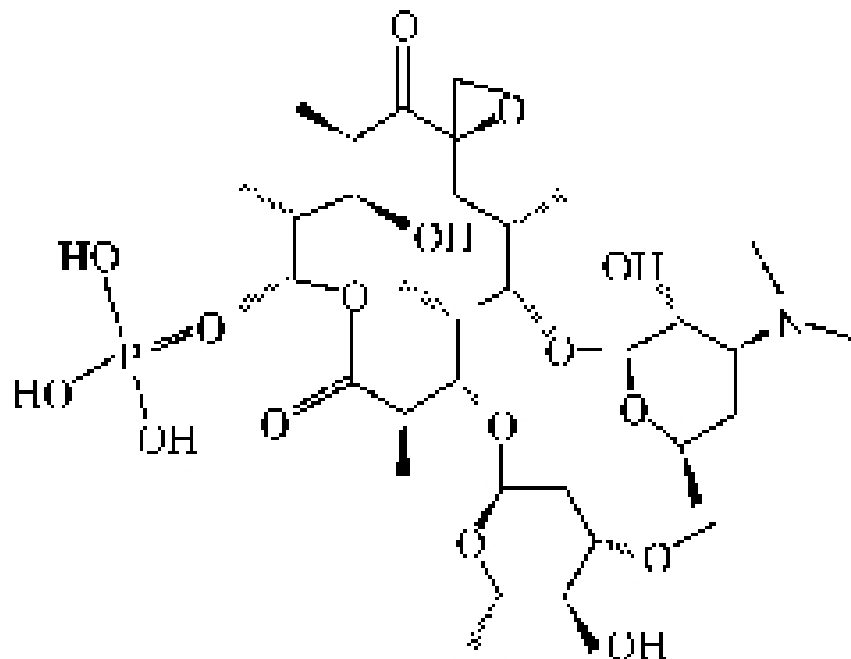
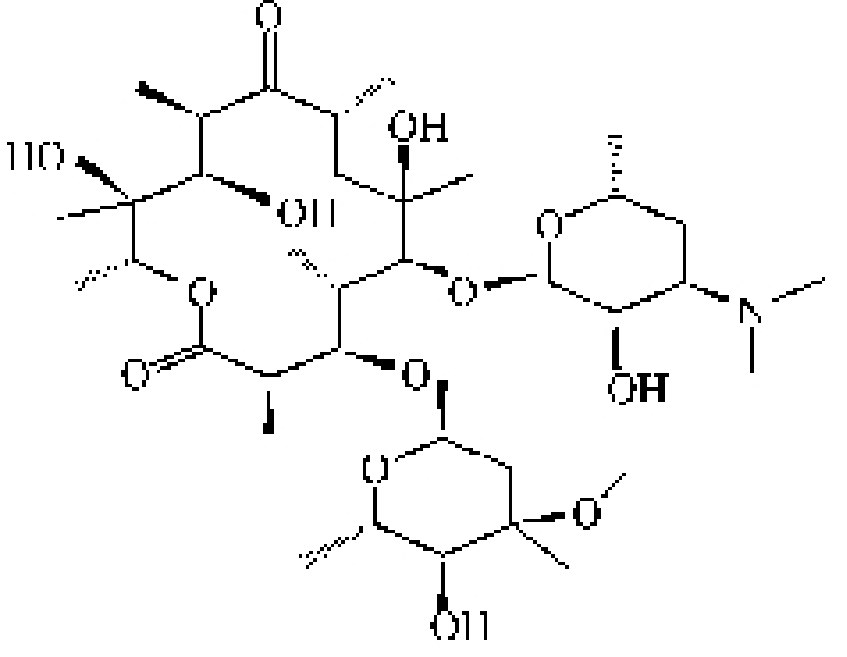
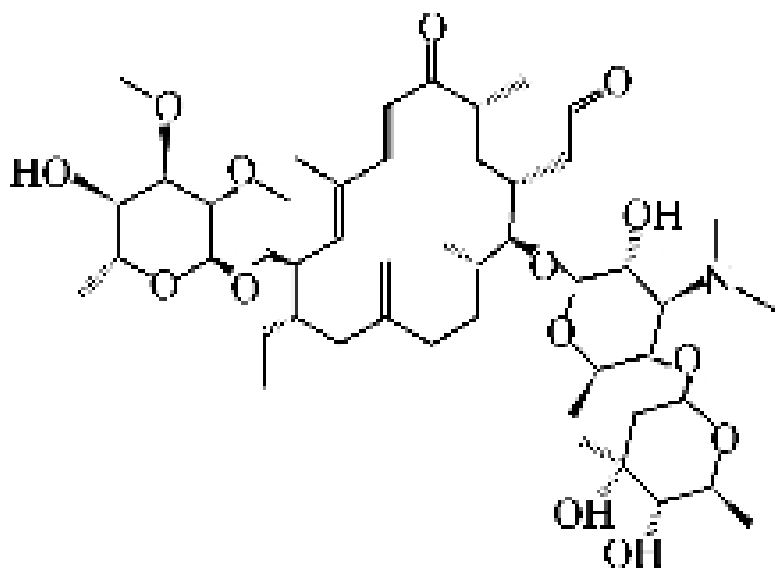
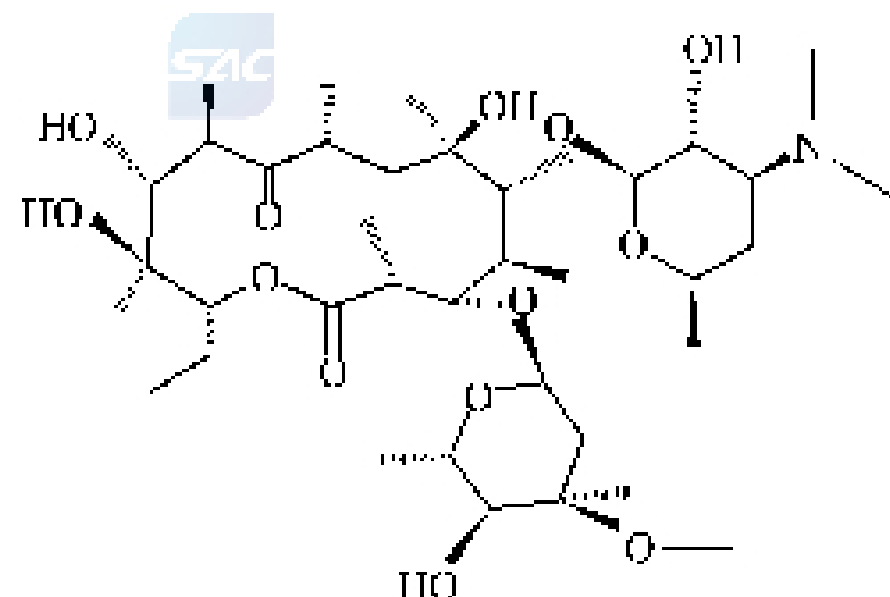
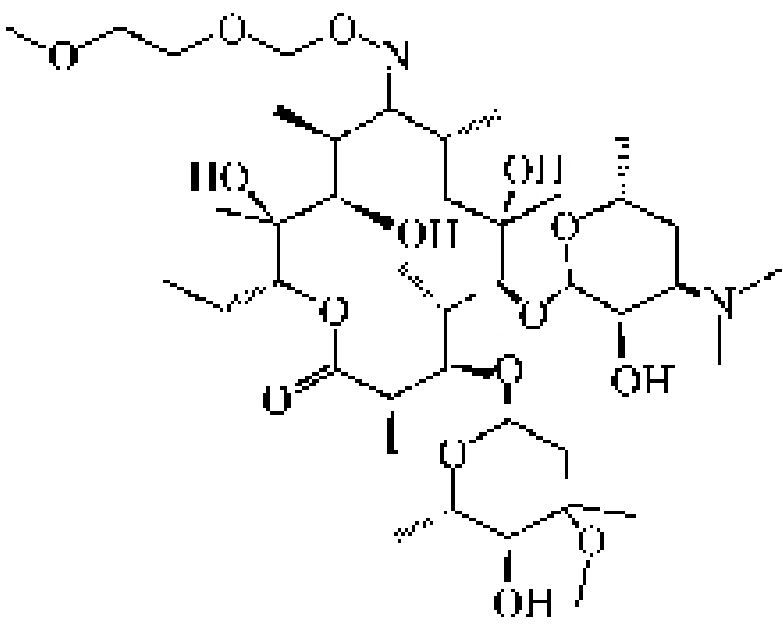
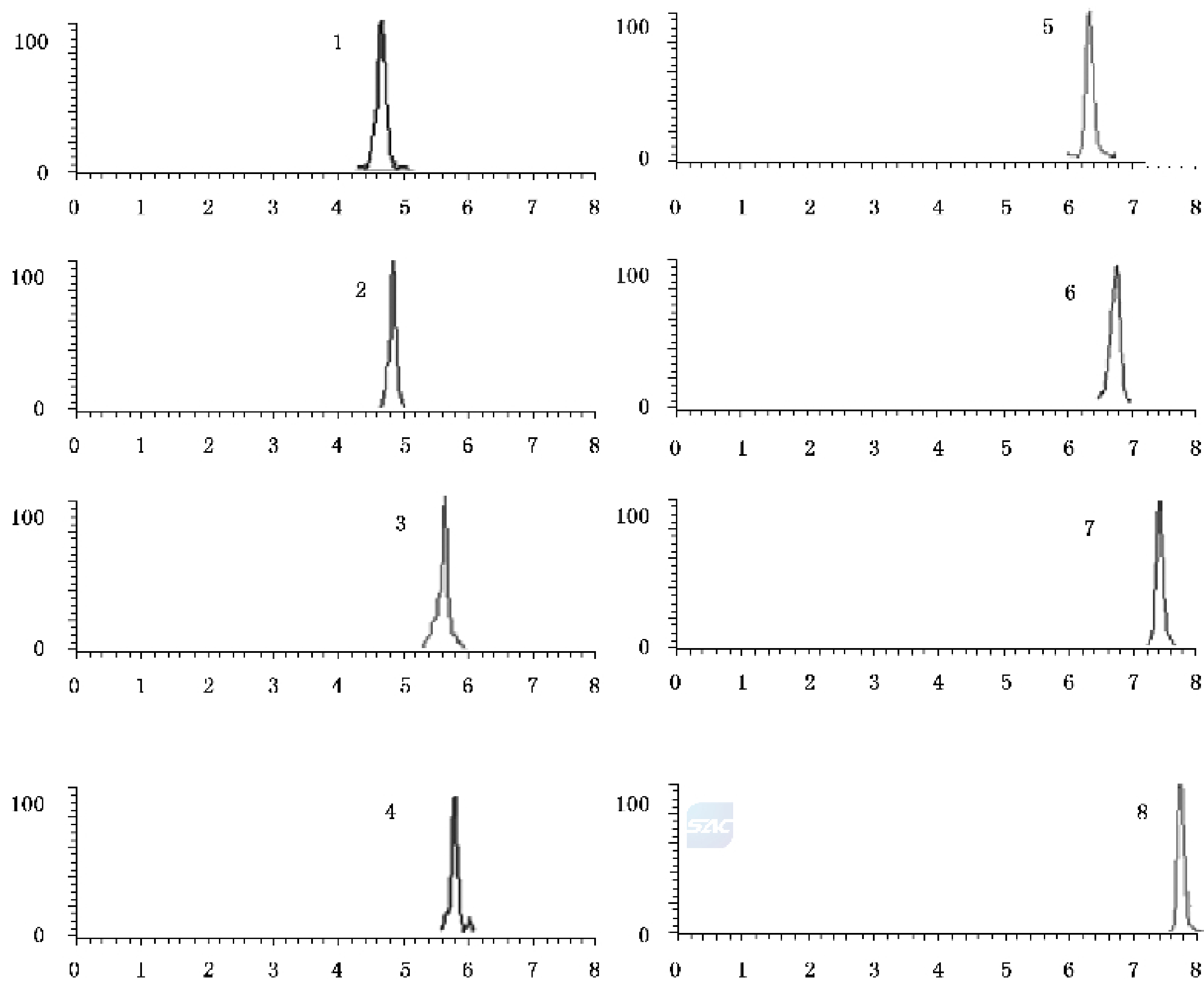
序号	药物名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子质量	结构式
1	螺旋霉素	Spiramycin	8025-81-8	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	843.05	
2	阿奇霉素	Azithromycin	83905-01-5	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	748.98	
3	替米考星	Tilicosin	108050-54-0	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	869.13	
4	竹桃霉素	Oleandomycin	7060-74-4	$C_{35}H_{64}NO_{16}P$	785.85	

表 B.1 (续)

序号	药物名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子质量	结构式
5	红霉素	Erythromycin	114-07-8	$C_{27}H_{47}NO_{13}$	733.93	
6	泰乐菌素	Tylosin	1401-69-0	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916.10	
7	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	747.95	
8	罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	837.05	

附录 C
(资料性附录)
标准物质选择离子质量色谱图

8 种大环内酯类抗生素标准物质选择离子质量色谱图参见图 C.1。



- 说明：
- 1——螺旋霉素；
 - 2——阿奇霉素；
 - 3——替米考星；
 - 4——竹桃霉素；
 - 5——红霉素；
 - 6——泰乐菌素；
 - 7——克拉霉素；
 - 8——罗红霉素。

图 C.1 8 种大环内酯类抗生素标准物质选择离子质量色谱图