



中华人民共和国国家标准

GB/T 24800.1—2009

化妆品中九种四环素类抗生素的测定 高效液相色谱法

Determination of 9 tetracyclines in cosmetics by
high performance liquid chromatography method

2009-11-30 发布

2010-05-01 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

本标准的附录 A 为资料性附录。

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。

本标准负责起草单位：中国检验检疫科学研究院、上海市日用化学工业研究所、上海香料研究所。

本标准主要起草人：武婷、王超、马强、张庆、席广成、肖海清、李琼、崔俭杰。



引 言

本标准中的被测物质是我国《化妆品卫生规范》规定的禁用物质,不得作为化妆品生产原料即组分添加到化妆品中。如果技术上无法避免禁用物质作为杂质带入化妆品时,则化妆品成品应符合《化妆品卫生规范》对化妆品的一般要求,即在正常及合理的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。

化妆品中九种四环素类抗生素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中九种四环素类抗生素的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于皮肤护理类化妆品中九种四环素类抗生素的测定。

本标准二甲胺四环素的检出限为 25 mg/kg, 土霉素、四环素、去甲基金霉素的检出限为 10 mg/kg, 金霉素、美他环素、多西环素的检出限为 5 mg/kg, 差向脱水四环素和脱水四环素的检出限为 2.5 mg/kg。

二甲胺四环素的定量限为 50 mg/kg, 土霉素、四环素、去甲基金霉素的定量限为 25 mg/kg, 金霉素、美他环素、多西环素的定量限为 10 mg/kg, 差向脱水四环素和脱水四环素的定量限为 5 mg/kg。

2 原理

以甲醇为溶剂, 超声提取、离心, 0.45 μm 的有机滤膜过滤, 溶液注入配有二极管阵列检测器 (DAD) 的液相色谱仪检测, 外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外, 试剂均为分析纯。

3.1 甲醇: 色谱纯。

3.2 乙腈: 色谱纯。

3.3 九种四环素, 纯度不小于 97.0%; 土霉素, 纯度不小于 97.9%; 金霉素, 纯度不小于 99.0%; 多西环素, 纯度不小于 96.5%; 美他环素, 纯度不小于 99.6%; 去甲基金霉素, 纯度不小于 99.0%; 二甲胺四环素, 纯度不小于 99.0%; 脱水四环素, 纯度不小于 90.0%; 差向脱水四环素, 纯度不小于 90.0%。

3.4 九种四环素类抗生素标准储备液: 准确称取各类四环素(3.3)0.1 g, 精确到 0.000 1 g, 分别置于 50 mL 烧杯中, 加适量甲醇溶解, 溶液定量移入 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 混匀, 即得浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液。

九种四环素类抗生素混合标准储备液: 分别移取上述标准储备液(3.4)各 10 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得浓度为 100 mg/L 的标准混合储备液。

3.5 九种四环素类抗生素标准工作溶液: 用甲醇将上述混合标准储备液(3.5)分别配成一系列浓度为 1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L 的标准工作溶液, 冰箱冷藏保存, 可使用一周。

3.6 0.01 mol/L 草酸溶液: 称取草酸($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)1.26 g, 精确至 0.001 g, 于 50 mL 烧杯中, 加水溶解后, 移入 1 000 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀, 即得 0.01 mol/L 的草酸溶液。

4 仪器

4.1 液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器。

4.2 微量进样器, 10 μL 。

4.3 超声波清洗器。

4.4 离心机, 大于 5 000 r/min。

4.5 溶剂过滤器和 0.45 μm 有机过滤膜。

4.6 具塞比色管,10 mL。

5 测定步骤

5.1 样品处理

称取化妆品试样约 0.2 g,精确到 0.001 g,于 10 mL 具塞比色管中,加入约 8 mL 甲醇,在超声波清洗器中超声振荡 30 min,冷却至室温后,加甲醇定容至刻度。取部分溶液放入离心管中,在离心机上于 5 000 r/min 离心 20 min,离心后的上清液经 0.45 μ m 有机滤膜过滤,滤液供测定用。

5.2 测定

5.2.1 色谱条件

5.2.1.1 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm(内径),5 μ m,或相当者)。

5.2.1.2 流动相:A:甲醇与乙腈的混合溶液(1+3,V/V),B:0.01 mol/L 的草酸溶液(3.7),梯度洗脱条件见表 1。

表 1 方法的梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0	22	78
3	42	58
6	42	58
12	60	40

5.2.1.3 流速:1.0 mL/ min。

5.2.1.4 检测波长:程序可变波长:0~4.00 min 为 350 nm,4.01 min~12.00 min 为 270 nm。

5.2.1.5 柱温:25 $^{\circ}$ C。

5.2.1.6 进样量:10 μ L。

5.2.2 标准工作曲线绘制

分别移取一系列浓度为 1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L 的标准工作溶液,按色谱条件(5.2.1)进行测定,记录色谱峰面积,以色谱峰的峰面积为纵坐标,对应的溶液浓度为横坐标作图,绘制标准工作曲线。

九种四环素的标准液相色谱图参见附录 A 的图 A.1。

5.2.3 试样测定

用微量注射器吸取试样溶液(5.1)注入液相色谱仪,按色谱条件(5.2.1)进行测定,记录色谱峰的保留时间和峰面积,由色谱峰的峰面积可从标准曲线上求出相应的浓度。样品溶液中的被测物响应值均应在仪器测定的线性范围之内。含量高的试样可取适量试样溶液用流动相稀释后进行测定。

5.2.4 定性确认

液相色谱仪对样品进行定性测定,进行样品测定时,如果检出四环素类抗生素的色谱峰的保留时间与标准品相一致,并且在扣除背景后的样品色谱图中,该物质的紫外吸收图谱与标准品的紫外吸收图谱相一致,则可初步确认样品中存在被测四环素类抗生素。必要时,阳性样品需用其他方法进行确认试验。

5.3 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

5.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

6 结果计算

结果按式(1)计算(计算结果应扣除空白值):

$$X_i = \frac{c_i \cdot V}{m}$$

.....(1)

式中：

X_i ——样品中被测四环素的质量浓度，单位为毫克每千克(mg/kg)；

c_i ——标准曲线查得被测四环素的浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

V ——样品稀释后的总体积，单位为毫升(mL)；

m ——样品质量，单位为克(g)。

7 方法检出限与定量限

二甲胺四环素的检出限为 25 mg/kg，土霉素、四环素、去甲基金霉素的检出限为 10 mg/kg，金霉素、美他环素、多西环素的检出限为 5 mg/kg，差向脱水四环素和脱水四环素的检出限为 2.5 mg/kg。

二甲胺四环素的定量限为 50 mg/kg，土霉素、四环素、去甲基金霉素的定量限为 25 mg/kg，金霉素、美他环素、多西环素的定量限为 10 mg/kg，差向脱水四环素和脱水四环素的定量限为 5 mg/kg。

8 回收率与精密度

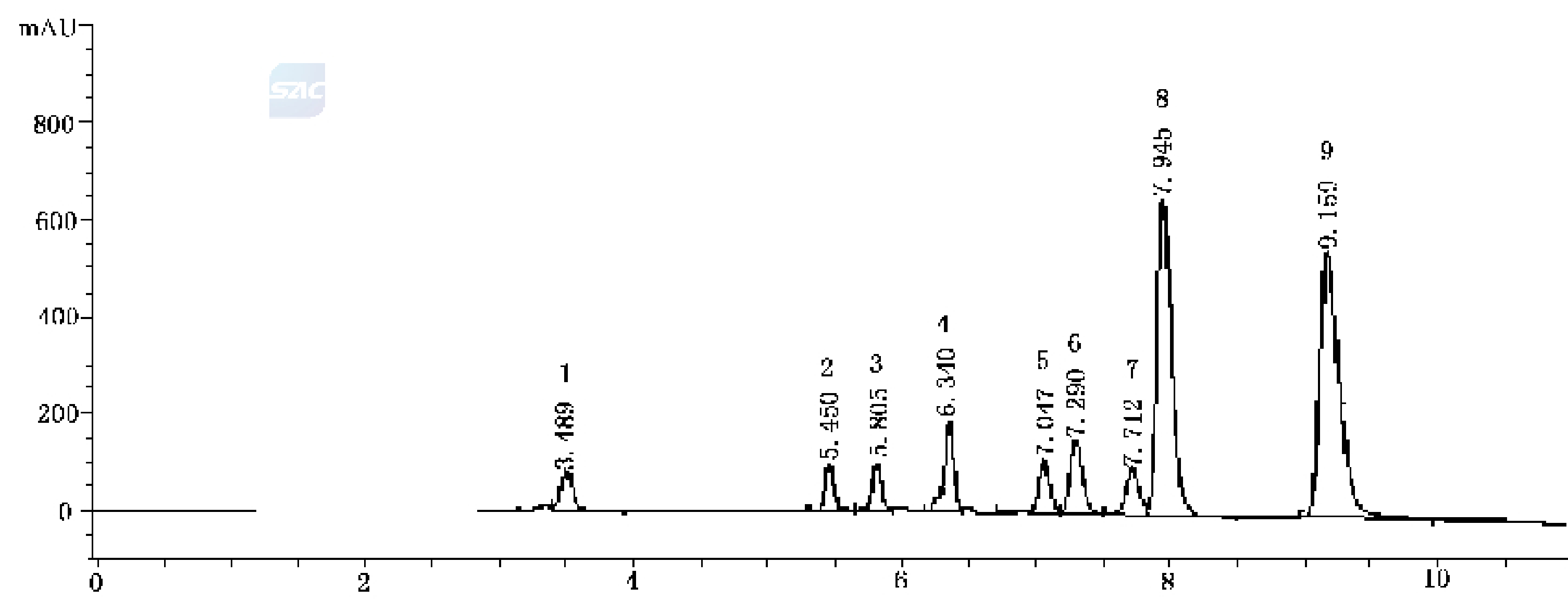
在添加浓度 5 mg/kg～500 mg/kg 浓度范围内，回收率在 85％～110％之间，相对标准偏差小于 10％。

9 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应超过算术平均值的 10％。



附 录 A
(资料性附录)
标准物质的液相色谱图



- 1——二甲胺四环素(3.489 min)；
- 2——土霉素(5.450 min)；
- 3——四环素(5.805 min)；
- 4——去甲基金霉素(6.340 min)；
- 5——金霉素(7.047 min)；
- 6——美他环素(7.290 min)；
- 7——多西环素(7.712 min)；
- 8——差向脱水四环素(7.945 min)；
- 9——脱水四环素(9.159 min)。

图 A.1 九种四环素的标准液相色谱图