

化妆品中8种大环内脂类抗生素的快速分析检测

Rapid Determination of 8 Macrolides Antibiotics in Cosmetics

孙小杰 (Xiaojie Sun)¹, 李立军 (Lijun Li)¹, 郭立海 (Lihai Guo)¹

¹ SCIEX亚太应用支持中心

Key Words : Macrolides; Cosmetics; LC-MS/MS; MRM; SPE; GB/T 35951-2018

前言

大环内酯类抗生素 (macrolides antibiotics, MA) 是一类分子结构中具有 12-16 个碳内酯环的抗菌药物的总称, 通过阻断 50S 核糖体中肽酰转移酶的活性来抑制细菌蛋白质合成, 属于快速抑菌剂。主要用于治疗需氧革兰阳性球菌和阴性球菌、某些厌氧菌以及军团菌、支原体、衣原体等感染。

由于化妆品对使用安全性要求更高, 不仅要求使用安全, 不能对施用部位产生明显的刺激和损伤, 更不能产生任何的抗药性, 故抗生素被现行的《化妆品卫生规范》规定为化妆品禁用物质。大环内脂类抗生素的添加不仅违反了相关法律法规的规定, 同时因抗生素滥用, 导致产生耐药性。对易过敏人群, 如果长期接触此类物质, 会有非常严重的危害。针对这些危害, 国家也制定了 GB/T 35951-2018 化妆品中 8 种大环内脂类抗生素的液质联用的测定。

大分子量极性分布宽化合物分析的挑战和难点

大环内脂类化合物是一类分子结构中具有 12-16 个碳内酯环化合物, 分子量相对比较大, 极性跨度比较大, 所以对整个液相



图1. SCIEX Triple Quad™ 4500 System。

分离提出了很高的要求, 尤其对部分化合物色谱峰型的改善难度很大。同时, 由于分子量比较大, 部分化合物电离效果不佳, 在保证分离分析效率的同时, 还需要考虑部分化合物的灵敏度需求。图 1 是 8 种大环内脂类抗生素的提取离子流图。

本实验的优势及特点

- 1、在 Phenomenex C18, 2.6 μm, 2.1 × 100 mm 色谱柱上, 所有化合物在8分钟之内都有良好的峰型和分离。
- 2、对于替米考星和泰乐菌素两种物质而言, 考虑到峰型的影响, 采用了1:1的甲醇和己腈作为洗脱相, 峰型前延减弱。
- 3、所有化合物在0.1 ng/mL-50 ng/mL均有良好的线性关系, 8种物质在0.2 ng/mL、5 ng/mL、以及20 ng/mL浓度添加水平下, 回收率都在82-93%范围内, 且在三个浓度下的方法重现新RSD%在2.1-3.8%范围内。
- 4、所有化合物的检出限均可达到1 ng/g, 可以轻松应对GB/T 35951-2018 对于方法检测灵敏度的要求。

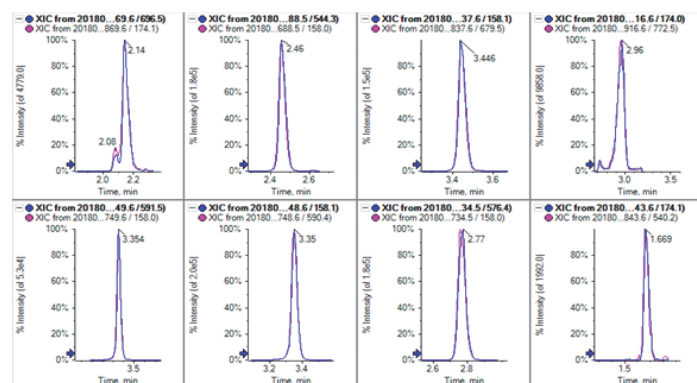


图1. 8种大环内脂类提取离子流图。

实验方法

样品前处理

提取部分

膏霜乳液类化妆品

称取试样约 0.2 g 于 15 mL 离心管中，加入 10 mL 甲醇，涡旋分散均匀后，超声提取 15 min，以 8000 r/min 离心 10 min，移取上清液 5 mL，加 15 mL 磷酸盐缓冲液混匀，待净化。

水剂类化妆品

称取试样 0.2 g 于 15 mL 离心管中，用磷酸盐缓冲液定容至 10 mL，混匀，以 8000 r/min 离心 5 min，移取上清液 5 mL，待净化。

净化

将 Cleanert PEP 固相萃取柱（60 mg/3 mL）依次使用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化，将试样提取液转移至固相萃取小柱中，用 5 mL 水和 5 mL 20% 甲醇水依次淋洗，弃去流出液，加压抽干，用 5 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液。在 40°C 水浴中用氮气吹至近干，加入 1 mL 20% 已腈水，涡旋 1 min 后，过微孔滤膜后液质联用待测。

液相分离条件以及质谱条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD

色谱柱：Phenomenex, C18 2.6 μm, 100 × 2.1 mm

流动相：A 0.1% 甲酸水；B 甲醇 / 已腈 = 1:1

流速：0.35 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL

运行时间：8 min

梯度洗脱条件详见 表 1

表 1. 液相分离梯度表。

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
0.5	65	35
5	10	90
6	5	95
6.1	75	25
8	75	25

质谱：SCIEX Triple Quad™ 4500 System

采集方式：Scheduled MRM™

液相条件优化

针对大环内脂类物质，兼顾灵敏度以及峰型的变化，本实验优化了甲酸的含量以及有机相的对比对实验结果的影响。

通过实际的实验对比，在使用甲酸水溶液的体系里，优化了甲酸的含量对实验结果的影响，在 0.01%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3% 甲酸的添加水平上，观察了峰型的变化以及灵敏度的变化，通过实验发现，甲酸不同的含量，对峰型的影响微乎其微，但是对灵敏度的影响确实比较明显，最终发现甲酸在 0.1% 的含量时，所有 8 种大环内脂类的化合物灵敏度均最佳。

部分大环内脂类峰型较差，实验发现，如果使用纯甲醇或者纯己腈时，替米考星和泰乐菌素的峰型较差，峰型前延比较严重，为为了改善峰型，优化了有机相的配比，通过对比分析，当有机相使用 1:1 的甲醇和己腈的混合溶液时，两种物质的峰型得到了很大的改善，峰型前延得到改善。表 1 中是实际运行的梯度分离条件。

表 2. 质谱部分离子源参数

Source Parameters	
Curtain Gas(CUR)	25psi
Collision Gas(CAD)	9psi
IonSpray Voltage(IS)	5500v
Temperature(TEM)	500°C
Ion Source Gas(GS1)	40psi
Ion Source Gas(GS2)	60psi

在选择色谱柱上，优化筛选过实验室常用的色谱柱，Phenomenex F5，Phenomenex C18，通过实验对比，发现 Phenomenex C18 具有更好的峰型。

质谱条件优化

本实验在 SCIEX Triple Quad™ 4500 系统上进行，选择了电喷雾电离源。每个化合物都严格根据欧盟的要求，选择两个子离子进行定量定性分析。每个化合物的优化参数详见表格 2。数据采集使用了 Analyst® 1.6.3 软件，数据处理以及定性分析使用 MultiQuant™ 3.0.2 软件。

表 3 中是每个化合物的 MRM 离子对信息。

表 3. List of analytes with MRM transitions.

Compound	MH+	Product ion(Q/C) ^a
螺旋霉素	843.6	174.1/540.2
阿奇霉素	749.6	591.5/158
替米考星	869.6	696.5/174.1
竹桃霉素	688.5	544.3/158
红霉素	734.5	576.4/158
泰乐菌素	916.6	174/772.5
克拉霉素	748.6	158/590.4
罗红霉素	837.6	158/679.5

Note: ^a (Quantitation Ion / Confirmation Ion)

结果与讨论

方法验证结果

重现性实验，通过在实际空白样品中添加 0.2 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL 的标准品，经上述前处理流程，针对每个浓度水平进行 6 次重复性实验，每种化合物的重现性 (RSD%) 都在 2.1 到 3.8% 范围内。

回收率实验，8 种化合物的平均回收率均在 85% 左右，详细结果见表 4。

表 4. Main analytical parameters^a.

Compound	Equation	R	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	RSD (%)	Rec (%)
螺旋霉素	y=1315.455x	0.99577	0.1	0.06	3.8	93
阿奇霉素	y=3.017e4x	0.99906	0.005	0.02	3.67	87.4
替米考星	y=3919.31x	0.99959	0.1	0.05	2.22	88.2
竹桃霉素	y=8.06e4x	0.99954	0.0045	0.015	2.08	82.0
红霉素	y=1.026e5x	0.9989	0.0036	0.009	1.9	87.6
泰乐菌素	y=7130.31x	0.999	0.1	0.068	2.1	90.1
克拉霉素	y=9.646e4x	0.99951	0.002	0.0071	2.89	85.3
罗红霉素	y=1.18e5x	0.99655	0.001	0.002	3.11	92.7

Note: ^a Calibration curve equations, regression coefficients (R), limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), repeatability of three different concentrations, and mean recovery of 3 (0.2, 5, 20 ng/ml) spike levels.

线性实验，在浓度 0.1-50 ng/mL 范围内进行实验，每种物质均有良好的线性关系，相关系数均在 0.996-0.999 范围内。所有化合物的最低检出限 LODs 都在 0.0011-0.1 ng/mL 范围内。最低检

出限均远远低于国标针对化妆品基质的限量要求。图 3 展示了 8 种大环内脂类的线性关系。

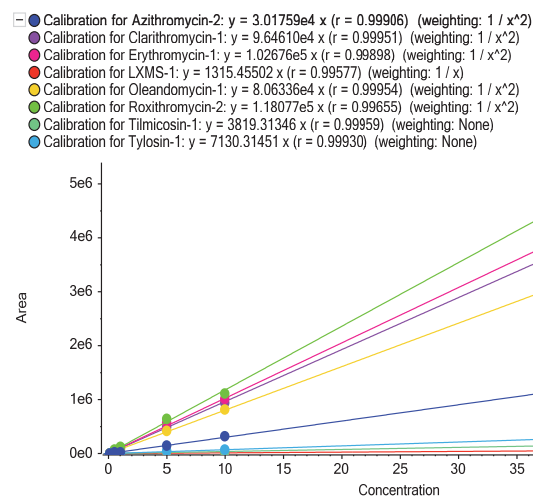


图 3. 8种大环内脂线性关系。

实际样品分析结果

本实验研究的样品信息详见表 5，所有样品均来源于市场超市。利用外标法以及标准曲线进行样品测定，二类样品（膏霜乳液类，水剂类）的测定结果详见表 6。

表 5. 部分实际样品信息。

样品类型		
膏霜乳液类	A 类（正规品牌）	5
	B 类（正规品牌）	5
	C 类（杂牌）	5
水剂类	D 类（正规品牌）	5

表 6. 实际样品的测定结果。

竹桃霉素	N/A	N/A	0.057	N/A
红霉素	N/A	N/A	N/A	N/A
泰乐菌素	N/A	N/A	0.08	N/A
克拉霉素	N/A	N/A	N/A	N/A
罗红霉素	N/A	N/A	N/A	N/A

Note: unit, ng/ml; N/A, not detected.

通过实际样品的测定，发现不管是膏霜乳液类或者是水剂类样品，正规品牌的化妆品，其大环内脂的含量远远小于国标限量的要求，都在未检出的水平上，但是对于市场上的杂牌化妆品，多多少少还有有一些检出，实际检测的结果表6中做了详细的展示。部分阳性样品的色谱图详见图4。

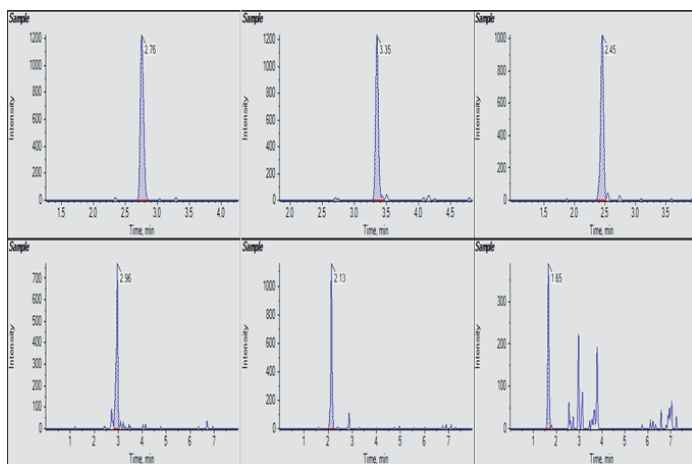


图 4. 部分杂牌化妆品中大环内脂类抗生素的测定结果色谱图。

总结

本文针对 2018 年 9 月 1 号实施的化妆品中 8 种大环内脂类抗生素的检测进行了详细的实验摸索和讨论，在 4500 系统上从方法的开发以及前处理的优化，前处理回收率满足分析方法学的要求，整套方法的检出限远低于国标的要求，达到了可以直接转移方法，快速进行前处理，数据处理，报告输出的流程化操作。

8 种大环内脂类抗生素，峰型良好，分析周期短，整体分析效率高，高度契合国标的要求，对化妆品的安全检测提供了强有力的保障。

参考文献

1. 化妆品中螺旋霉素等8种大环内脂类抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法，中华人民共和国国家标准，GB/T 35951-2018.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8832-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院

1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号

1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江西路15号

珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX