

文章编号 :1001-5914(2009)05-0453-02

# 化妆品中 7 种常见抗生素的超高效液相色谱测定法

刘华良, 杨润, 李放, 马永建

**摘要** :目的 建立祛痘除螨类化妆品中 7 种常见抗生素(盐酸米诺环素、盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素及甲硝唑)同时测定的超高效液相色谱法。方法 样品中待测物采用甲醇与 1%甲酸水溶液等体积混合液超声提取,色谱柱采用 Waters UPLC BEH C<sub>18</sub>, 流动相 A(甲醇:乙腈体积比为 1:2)与 B(1%甲酸水溶液)梯度洗脱,流量为 0.2 ml/min,检测波长为 268 nm。结果 该方法各组分检出限为 0.3~0.5 ng,线性范围为 2~100 ng(1~50 mg/L),RSD≤4.8%,加标回收率为 82.5%~105.0%。结论 该方法快速、灵敏,能够满足检测祛痘除螨类化妆品中 7 种常见抗生素的需要。

**关键词** :化妆品;色谱法;液相;超高效液相色谱法;抗生素

中图分类号 :O657.7

文献标识码 :A

**Determination of Seven Antibiotics in Cosmetics by Ultra Performance Liquid Chromatography** LIU Hua-liang, YANG Run, LI Fang, et al. *Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China*

**Abstract** **Objective** To establish an ultra performance liquid chromatography method for the determination of 7 kinds of antibiotics (minocycline hydrochloride, ox tetracycline, tetracycline hydrochloride, chlortetracycline hydrochloride, doxycycline hydrochloride, chloramphenicol, metronidazole) in anti-acne cosmetics. **Methods** Seven kinds of antibiotics were separated on a Waters UPLC BEH C<sub>18</sub> column by gradient elution using A (methanol/acetonitrile = 1/2) and B(1% formic acid aqueous solution) as the mobile phase at a flow rate of 0.2 ml/min, with the detection wavelength of 268 nm. **Results** The detection limits were 0.3–0.5 ng, the calibration curves were linear in the range of 2–100 ng (1–50 mg/L), the precision was not more than 4.8% and the rate of recovery were 82.5%–105.6%. **Conclusion** The method established in the present paper is rapid, sensitive and suitable for the determination of 7 kinds of antibiotics in anti-acne cosmetics.

**Key words**: Cosmetics; Chromatography; gas; Ultra performance liquid chromatography; Antibiotics

抗生素属于处方药,我国《化妆品卫生规范》<sup>[1]</sup>(以下简称《规范》)规定此类物质为禁用成分,然而市场抽检往往会有检出<sup>[2-4]</sup>。国内对化妆品中 7 种常见抗生素(盐酸米诺环素、盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素及甲硝唑)的检测方法多采用高效液相色谱法(HPLC)<sup>[5-7]</sup>,2007 版《规范》也是采用 HPLC 法。超高效液相色谱(UPLC)是近 2 年来新发展的液相色谱技术,代表了液相色谱发展方向。本研究建立了 UPLC 法同时测定化妆品中 7 种常见抗生素的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

AcQuity UPLC(Waters 公司),盐酸四环素(97.5%)、盐酸金霉素(99.0%)、氯霉素(98.5%)及甲硝唑(99.4%)标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,盐酸米诺环素(85.1%)、盐酸土霉素(88.2%)、盐酸多西环素(86.0%)由中国药品生物制品检定所提供;甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯,超纯水由 Millipore 纯水机制备。

### 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相 A 为甲醇-乙腈(体积比为 1:2),流动相 B 为 1%甲酸水溶液,采用梯度洗脱,初始时流动相 A 体积分数为 10%,至 3.5 min 线性增长至 30%,然后保持 1.5 min,5.0 min 后恢复初始流动相,平衡 1.5 min 结束,流量为 0.2 ml/min,检测波长为 268 nm,进样量为 2 μl。

**1.2.2 标准溶液的配制** 单标储备溶液:准确称取各种标准物

质约 10 mg 分别至 10.0 ml 容量瓶中,用 1 ml 甲醇及 1 ml 1%甲酸水溶液溶解,甲醇定容至刻度,各单标浓度约为 1 mg/ml。校准曲线:根据所需标样浓度,移取适量各单标中间液于 10.0 ml 容量瓶中,流动相定容,标准系列为 1、2、5、10、50 mg/L,临用现配。以标准系列质量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制校准曲线。

**1.2.3 样品前处理** 提取方法借鉴《规范》<sup>[1]</sup>,但考虑到氯离子对仪器有一定的腐蚀性,用甲酸替代盐酸。即:称取化妆品样品 1.00 g 于 10 ml 具塞比色管中,加入甲醇和甲酸(1%)等体积混合溶液至刻度,摇匀,超声提取 20 min,必要时于离心机上以 1 610×g 离心 5 min,经 0.22 μm 滤膜过滤得到待测液,在设定色谱条件下上机分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相及洗脱条件的选择

流动相优化 流动相中的有机相选择借鉴了《规范》<sup>[1]</sup>。四环素类化合物属于两性化合物,从色谱理论上讲,流动相可以是酸性或碱性,但由于盐酸四环素和盐酸土霉素在碱性条件下易破坏失效<sup>[8]</sup>,所以选择酸性流动相。随着改变流动相中甲酸含量分别为 0.1%、0.2%、0.5%和 1.0%,发现甲硝唑的保留时间逐步变化,当甲酸含量为 1.0%时,保留时间逐步达到稳定,方法的重现性和耐用性最佳。由于 7 种化合物的极性差别大,所以宜采用梯度洗脱方式。另外,试验显示采用梯度洗脱比等度洗脱更能提高目标物质的检测灵敏度。图 1 为 7 种抗生素的标准色谱图,各化合物在 5 min 内得到分离,其保留时间见表 1。

### 2.2 方法的线性范围和检出限

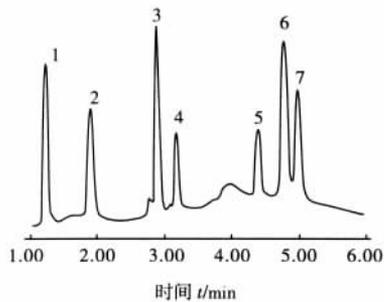
在设定色谱条件下,标准系列溶液的绝对质量与色谱峰面

基金项目 江苏省卫生厅预防医学基金资助项目(Y200709)

作者单位 江苏省疾病预防控制中心理化检测室(江苏 南京 210009)

作者简介 刘华良(1973-)男,博士,从事卫生检测研究。

积呈线性相关。检测下限以噪音的 3 倍计算。7 种抗生素的回归方程、相关系数、线性范围及仪器检出限见表 1。



1—甲硝唑;2—盐酸米诺环素;3—盐酸土霉素;4—盐酸四环素;  
5—盐酸金霉素;6—氯霉素;7—盐酸多西环素

图 1 抗生素混合标准溶液色谱图

表 1 7 种抗生素的 UPLC 测定法的保留时间、回归方程、  
相关系数、线性范围及方法检出限

抗生素	保留时间 (min)	回归方程	相关系数	线性范围 (mg/L)	检出限 (ng)
甲硝唑	1.21	$y=5\ 485x-2\ 092$	0.998 1	1~50	0.3
盐酸米诺环素	1.88	$y=8\ 540x-1\ 819$	0.999 3	1~50	0.3
盐酸土霉素	2.88	$y=7\ 510x-1\ 904$	0.999 3	1~50	0.3
盐酸四环素	3.17	$y=6\ 216x-684$	0.999 9	1~50	0.5
盐酸金霉素	4.39	$y=4\ 704x-905$	0.998 9	1~50	0.5
氯霉素	4.77	$y=7\ 270x-1\ 020$	0.999 1	1~50	0.3
盐酸多西环素	4.98	$y=6\ 183x-436$	0.999 6	1~50	0.3

### 2.3 准确度与精密度

向不含待测 7 种物质的祛痘除螨类样品中分别加入高低两种浓度的混合标准溶液,使加标量分别为 5 和 20 mg/kg,混匀过夜,依照前述样品处理方法提取测定,每个添加水平平行测定 6 份。7 种抗生素的平均回收率为 82.5%~105.0% RSD 为 0.4%~4.8%( $n=6$ )。7 种抗生素的精密度及准确度结果见表 2。

表 2 7 种抗生素的 UPLC 测定法的变异系数及

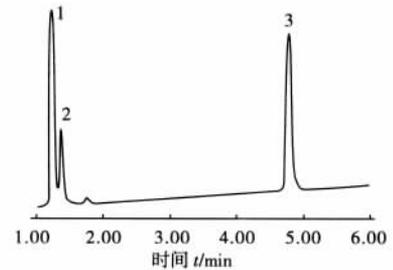
加标回收率测定结果 ( $n=6$ )

抗生素	RSD (%)	加标 5 mg/kg		加标 20 mg/kg	
		测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)
甲硝唑	4.8	5.28	105.0	20.1	100.3
盐酸米诺环素	0.4	4.63	92.5	18.3	91.5
盐酸土霉素	1.0	4.62	92.3	18.1	90.4
盐酸四环素	2.3	4.78	95.6	18.4	92.2
盐酸金霉素	2.9	4.86	97.1	19.2	95.8
氯霉素	4.5	4.13	82.5	16.9	84.5
盐酸多西环素	2.9	4.26	85.2	16.6	83.1

### 2.4 实际样品测定

对 11 份市售祛痘除螨类化妆品的分析表明,2 份检出氯霉素,检出质量分数分别为 0.37% 和 0.19%;1 份检出甲硝唑,质量分数为 1.02%。盐酸米诺环素、盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素未检出。图 2 为同时检出甲硝唑和氯霉素的

某阳性样品色谱图,峰 2 保留时间为 1.35 min,为杂质出峰,不影响对峰 1 甲硝唑的定性。



1—甲硝唑;2—杂质;3—氯霉素

图 2 某抗生素阳性样品色谱图

### 2.5 UPLC 与 HPLC 方法的比较

2.5.1 分析时间 《规范》中抗生素检测采用 HPLC 法,其分析时间为 16 min,而本研究建立的 UPLC 方法在 6.5 min 之内完成了分析测定,分析时间缩短到 40%。这对大批量的化妆品市场抽检有一定意义。

2.5.2 流动相溶剂消耗量 采用《规范》完成一次样品分析的流动相消耗量为 12.8 ml(流量为 0.8 ml/min),而 UPLC 的消耗量仅为 1.3 ml,是 HPLC 方法的 10%。可见,采用 UPLC 方法可以在很大程度上节省溶剂消耗,这既降低了分析成本,又减少了废液的排放,具有一定的环保意义。

2.5.3 仪器检出限 采用《规范》分析 7 种抗生素的检出限是 1~50 ng,王萍等<sup>[6]</sup>采用 HPLC 法对甲硝唑和氯霉素检出限分别为 65 ng 和 120 ng,武婷等<sup>[7]</sup>采用 HPLC 法对四环素类的检出限为 1~5 ng,而本研究建立的 UPLC 方法对 7 种抗生素检出限范围是 0.3~0.5 ng,低于 HPLC 法。

### 3 小结

本研究建立了化妆品中 7 种常见抗生素的 UPLC 检测方法,与已报道的 HPLC 方法比较,该方法检验速度更快,检出限更低,废液排放少,其他方法学参数都能达到要求。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部.化妆品卫生规范[S].2007.
- [2] 吴大南,郑和辉,杨丽华,等.祛痘除螨类化妆品中检出抗生素情况的调查[J].中国卫生检验杂志,2006,16(2):216-217.
- [3] 钟疑,罗晓燕,郭重山,等.化妆品中抗生素和防腐剂含量的研究[J].环境与健康杂志,2007,24(6):440-442.
- [4] 中华人民共和国卫生部.卫生部通报 9 省市功能化妆品抽检情况[J].中国化妆品,2006,9:12.
- [5] 杨艳伟,朱英,张卫强.化妆品中 7 种抗生素及地塞米松磷酸钠和水杨酸的高效液相色谱测定法[J].环境与健康杂志,2006,23(3):264-266.
- [6] 王萍,李洁,郑和辉.高效液相色谱法同时测定化妆品中的 7 种磺胺及甲硝唑和氯霉素[J].色谱,2007,25(5):743-746.
- [7] 武婷,王超,李楠.高效液相色谱法测定化妆品中九种禁用四环素类抗生素的方法研究[J].分析试验室,2007,26(8):52-54.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].2005 年版.北京:化学工业出版社,2005.

(收稿日期 2008-07-28 修回日期 2009-03-24)

(本文编辑 杜宇欣)