

# 超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱质谱 对化妆品中抗生素类成分的快速筛查和确证

王凤美<sup>1</sup>, 牛增元<sup>1\*</sup>, 罗忻<sup>1</sup>, 李兆永<sup>2</sup>, 叶曦雯<sup>1</sup>, 张鸿伟<sup>1</sup>, 何京澄<sup>1</sup>

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002;  
2. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生态研究中心, 青岛 266061)

**摘要:** **目的** 建立化妆品中抗生素快速筛查和确证的超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry)。**方法** 采用超声波辅助提取化妆品中的抗生素类化合物, 提取液经 ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以水(含 5 mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸)-乙腈为流动相, 梯度洗脱分离。静电场轨道阱一级全扫描得到的准分子离子的精确质量数用于快速筛选分析, 保留时间和离子阱的二级质谱数据用于进一步定性确证。**结果** 36 种抗生素的精确质量相对偏差小于  $5 \times 10^{-6}$  (5 ppm), 线性相关系数  $r^2$  大于 0.994, 方法检出限(limit of detection)均  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 方法的加标回收率为 54.15%~117.55%, 相对标准偏差(relative standard deviation)为 1.19%~13.25%。**结论** 应用该方法对不同剂型的 50 余种化妆品实际样品筛查的分析结果良好, 说明该方法是化妆品中抗生素类成分快速筛查和确证的有效方法。

**关键词:** 抗生素; 化妆品; 超高效液相色谱法; 线性离子阱/静电场轨道阱组合质谱法

## Screening and confirmation of antibiotics in cosmetics by high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry

WANG Feng-Mei<sup>1</sup>, NIU Zeng-Yuan<sup>1\*</sup>, LUO Xin<sup>1</sup>, LI Zhao-Yong<sup>2</sup>, YE Xi-Wen<sup>1</sup>, ZHANG Hong-Wei<sup>1</sup>, HE Jing-Cheng<sup>1</sup>

(1. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Research Center for Marine Ecology, the First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

**ABSTRACT: Objective** To screen and confirm common antibiotics in cosmetics by ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-LTQ/orbitrap MS). **Methods** Cosmetic samples were extracted with methanol, the elutes were separated on a Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) using gradient elution with aqueous containing 5 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid/acetonitrile. The accurate mass of quasi-molecular ion were acquired by full scanning of electrostatic field orbitrap, the rapid screening were carried out by the accurate mass of quasi-molecular ion. The confirmatory analysis for target compounds was

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK224)、质检公益行业科研专项(201510036-01)

**Fund:** Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2011IK224) and Scientific Research Projects by Quality Inspection Service Industry (201510036-01)

\*通讯作者: 牛增元, 男, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zyniuqd@163.com

\*Corresponding author: NIU Zeng-Yuan, Professor, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District Qingdao 266002, China. E-mail: zyniuqd@163.com

performed with the retention time and qualitative fragments obtained by data dependent scan mode. **Results** Under the optimal conditions, 36 antibiotics were routinely detected with mass accuracy error below  $5 \times 10^{-6}$  (5 ppm), and they all showed a good linearity in their respective linear ranges with correlation coefficients all higher than 0.99. The limit of detection (LOD) for all of 36 determined compounds were  $\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , the recoveries were in the range of 54.15%-117.55% with the relative standard deviations (RSDs) between 1.19%~13.25%. **Conclusion** The developed method was applied to screen the antibiotics in 50 kinds of cosmetic samples which demonstrated that the method was a useful tool for the rapid screening and qualitative identification of antibiotics in cosmetics.

**KEY WORDS:** antibiotic; cosmetic; ultra high performance liquid chromatography; linear ion trap/orbitrap mass spectrometry

## 1 引言

抗生素类物质属于处方药,化妆品中添加的抗生素包括硝基咪唑类、磺胺素、喹诺酮类等。这些药物的添加使化妆品具有一定的祛痘、抗粉刺、除鳞等功效,但长期使用会使消费者对抗生素产生耐药性,从而对以后医疗抗生素的治疗效果产生影响<sup>[1]</sup>。欧盟新法规《No 1223/2009》<sup>[2]</sup>和我国《化妆品卫生规范》<sup>[3]</sup>均明文规定抗生素类药物为禁用物质。化妆品市场广阔,违规添加各类抗生素的现象屡有发生,因此,快速筛查化妆品中是否添加抗生素并快速锁定目标物,对消费者健康和化妆品市场监管具有重要的意义。

化妆品中抗生素的分析方法主要有高效液相色谱法<sup>[4-7]</sup>、液相色谱-串联质谱法<sup>[8-10]</sup>等。高效液相色谱法无法很好地解决杂质干扰和吸光度差异的问题,液相色谱-质谱法因其选择性好、灵敏度高的特点成为近年来抗生素分析的主流方法,刘华良等<sup>[9]</sup>采用超高效液相色谱串联质谱法,实现了化妆品中常见抗生素和甲硝唑的同时测定;马强等<sup>[10]</sup>应用液相色谱-质谱联用技术建立了化妆品中 22 种磺胺类药物的测定方法;但都是采用低分辨质谱用于抗生素的分析,低分辨质谱对没有标准品的未知化合物的筛选鉴别有一定的局限性。由于化妆品的种类繁多,基质复杂,需要采用具有更高灵敏度和更强抗基质干扰、更先进的快速筛查方法。线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱(linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry)兼有离子阱和高分辨质谱平行检测的能力,离子阱的多级质谱可得到结构碎片,高分辨质谱可得到精确质量数,弥补了以上方法的不足,适用于复杂基质中化合物的快速分析。本课题组在前

期研究<sup>[11]</sup>中采用超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱(ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry)实现了纺织品中致癌染料的筛查和确证, Hurtaud-Pessel 等<sup>[12]</sup>采用液相色谱与 orbitrap 高分辨质谱联用技术建立了肌肉组织中多种抗生素的快速筛查方法;而液相色谱-高分辨质谱联用技术用于快速筛选化妆品中抗生素的研究尚未见报道,本研究采用 LTQ-Orbitrap XL 组合式高分辨质谱仪建立化妆品中抗生素的快速筛选方法,为保障化妆品安全,规范化妆品行业秩序提供技术支持。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器与试剂

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Thermo Scientific LTQ-Orbitrap XL 组合式高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); Himac CR22GII 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); MS1 Minishaker 旋涡混合器(德国 IKA 公司); FA1104 型电子天平(上海精天电子仪器厂); KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q(18.2 MΩ cm)超纯水处理系统(美国 Millipore 公司); 氮吹浓缩仪(美国 Caliper 公司)。

甲酸(色谱纯, Fluka 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck 公司); 乙酸铵(色谱纯, Mallinckrodt Bake 公司)。磺胺嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、甲氧苄胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺醋酰、磺胺吡啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲异恶唑、磺胺甲氧哒嗪、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲基异恶唑、磺胺喹恶林、磺胺苯吡唑、磺胺甲噻二唑购于美国 Sigma Aldrich 公司,纯度均 99%;环

丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、丹诺沙星、沙拉沙星、洛美沙星、氟甲喹、吡哌酸、依诺沙星、双氟沙星、麻保沙星、西诺沙星、恶喹酸、二甲硝咪唑、二甲硝咪唑代谢物、甲硝唑、甲硝唑代谢物、洛硝唑啉购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度均 99%。

## 2.2 对照品溶液的配制

分别准确称取适量抗生素标准品, 用甲醇分别配制成有效浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液, 置于  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。临用时, 根据需要逐级稀释成不同质量浓度的系列混合标准工作液。

## 2.3 样品溶液的制备

准确称取 1.0 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 加 10 mL 甲醇, 涡旋混匀, 超声提取 15min, 冷却至室温, 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入正己烷 10 mL, 涡旋震荡 1 min, 10000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层(膏霜类再次用 10 mL 正己烷脱脂, 离心), 下层甲醇提取液吹干后, 1 mL 乙腈-水(含 5 mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸)(1:9)溶解定容, 上机测定。

## 2.4 色谱-质谱条件

### 2.4.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司); 流速: 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相 A 为水(含 5 mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸), B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 梯度洗脱程序: 0~5 min, 20%~30% B; 5~8 min, 30%~60% B。

### 2.4.2 质谱条件

质量分析器: FT orbitrap; 可加热的电喷雾离子源(heated electrospray ion source, HESI); 离子化方式: HESI<sup>+</sup>; 毛细管温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ ; 喷雾电压: 3.0 kV; 管状透镜电压: 80 V; 鞘气压力:  $2.067\times 10^5$  Pa; 辅助气流量: 3.3 L/min; 正离子模式全扫描; 质量范围( $m/z$ ): 50~500。采用平行模式扫描: 静电场轨道阱的高分辨扫描(分辨率  $R=30000$ ), 对全扫描中响应最强的离子做线性离子阱 CID 碰撞扫描; 归一化能量: 35%。36 种抗生素 UPLC-LTQ/Orbitrap MS 分析参数见表 1。

表 1 36 种抗生素的分析参数  
Table 1 Analysis parameters of the 36 kinds of antibiotics

No.	Compounds	Retention time/min	Ion formation	Theoretical ( $m/z$ )	Measured ( $m/z$ )	Mass accuracy error/ $10^{-6}$ (ppm)
1	Sulfadiazine	1.75	[M+H] <sup>+</sup>	251.05972	251.05951	-0.84
2	Sulfadoxine	3.65	[M+H] <sup>+</sup>	311.08085	311.08131	1.48
3	Sulfadimethoxine	5.45	[M+H] <sup>+</sup>	311.08085	311.08130	1.45
4	Trimethoprim	1.88	[M+H] <sup>+</sup>	291.14517	291.14501	-0.55
5	Sulfamethazine	2.45	[M+H] <sup>+</sup>	279.09102	279.09078	-0.86
6	Sulfacetamide	1.64	[M+H] <sup>+</sup>	215.04849	215.04799	-2.33
7	Sulfapyridine	1.93	[M+H] <sup>+</sup>	250.06447	250.06508	2.44
8	Sulfathiazole	1.80	[M+H] <sup>+</sup>	256.02089	256.02164	2.93
9	Sulfamerazine	2.09	[M+H] <sup>+</sup>	265.07537	265.07601	2.41
10	Sulfisoxazole	4.31	[M+H] <sup>+</sup>	268.07540	268.07574	1.27
11	Sulfamethoxypyridazine	2.53	[M+H] <sup>+</sup>	281.07029	281.06959	-2.49
12	Sulfamonomethoxine	3.05	[M+H] <sup>+</sup>	281.07029	281.07075	1.64
13	Sulfaclorpyridazine	3.37	[M+H] <sup>+</sup>	285.02075	285.02043	-1.12
14	Sulfamethoxazole	3.91	[M+H] <sup>+</sup>	254.05939	254.05853	-3.39
15	Sulfaquinoxaline	5.54	[M+H] <sup>+</sup>	301.07537	301.07509	-0.93
16	Sulfaphenazole	5.77	[M+H] <sup>+</sup>	315.09102	315.09061	-1.30
17	Sulfamethizole	2.46	[M+H] <sup>+</sup>	271.03179	271.03171	-0.30

续表 1

No.	Compounds	Retention time/min	Ion formation	Theoretical ( <i>m/z</i> )	Measured ( <i>m/z</i> )	Mass accuracy error/10 <sup>-6</sup> (ppm)
18	Ciprofloxacin	1.90	[M+H] <sup>+</sup>	332.14050	332.14072	0.66
19	Levofloxacin	1.82	[M+H] <sup>+</sup>	362.15106	362.15073	-0.91
20	Norfloxacin	1.77	[M+H] <sup>+</sup>	320.14050	320.14084	1.06
21	Enrofloxacin	2.25	[M+H] <sup>+</sup>	360.17180	360.17206	0.72
22	Danofloxacin	2.01	[M+H] <sup>+</sup>	358.15615	358.15619	0.11
23	Sarafloxacin	2.95	[M+H] <sup>+</sup>	386.13107	386.13104	-0.08
24	Lomefloxacin	2.08	[M+H] <sup>+</sup>	352.14672	352.14697	-0.71
25	Flumequine	7.24	[M+H] <sup>+</sup>	262.08740	262.08719	-0.80
26	Pipemidilic acid	1.44	[M+H] <sup>+</sup>	304.14042	304.14096	1.78
27	Enoxacin	1.65	[M+H] <sup>+</sup>	321.13575	321.13608	1.03
28	Difloxacin	3.11	[M+H] <sup>+</sup>	400.14672	400.14679	0.17
29	Marbofloxacin	1.72	[M+H] <sup>+</sup>	363.14631	363.14645	0.39
30	Cinoxacin	3.57	[M+H] <sup>+</sup>	263.06625	263.06619	-0.23
31	Oxolinic acid	4.48	[M+H] <sup>+</sup>	262.07100	262.07077	-0.88
32	Unizole	2.01	[M+H] <sup>+</sup>	142.06110	142.06081	-2.04
33	Ronidazole	1.70	[M+H] <sup>+</sup>	201.06183	201.06134	-2.44
34	Metronidazole	1.52	[M+H] <sup>+</sup>	172.07167	172.07145	-1.28
35	Hydroxymetronidazole	1.33	[M+H] <sup>+</sup>	188.06658	188.06613	-2.39
36	2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole	1.54	[M+H] <sup>+</sup>	158.05602	158.05594	-0.51

### 3 结果与讨论

#### 3.1 样品的提取

由于化妆品种类较多,且每一类化妆品的基质和性状都比较复杂,因此对不同剂型的化妆品样品处理也应有不同的方法,本研究重点选择乳剂类样品、水剂类样品和油剂类样品作为研究对象,进行了前处理方法的分析讨论。实验综合考查了不同提取溶剂(甲醇、乙腈、乙酸乙酯、50%甲醇水、50%乙腈水、丙酮)和不同超声时间(5、10、15、20、25 min)下的提取效果。结果表明,以甲醇为提取溶剂、超声提取15 min时的提取效果最好,待测成分提取完全。如果样品属于“油包水”类型,为破乳需要添加适量的四氢呋喃,以提高目标化合物的回收率。本实验方法具有操作简便、快速、提取率高等优点,能满足化妆品

中抗生素类物质快速筛选分析的检测要求。

#### 3.2 色谱/质谱条件的优化

反相色谱分离常用的流动相组成一般为:甲醇-水和乙腈-水,如果采用正离子模式采集,流动相中一般加入0.1%甲酸,可增加离子化效率,添加一定浓度的乙酸铵会改善分离度并提高质谱响应值。乙酸铵浓度的选择较为常用的是5或10 mmol/L,原则上满足要求的情况下,浓度越低越好,浓度太高,乙酸盐易在色谱系统结晶,造成色谱柱寿命的缩短及色谱系统的磨损。在反相色谱系统中,有机相乙腈的洗脱能力比甲醇更强,一般情况下峰形更为尖锐。根据实验室多年的食品中兽药残留检测经验,以及相关的文献报道,以上化合物的检测正离子采集模式下均可采用乙腈-0.1%甲酸作为流动相系统,在水相中加入乙酸铵,可以得到更好的峰形。本实验采用乙腈

-5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)作为流动相系统, 36 种抗生素类化合物均得到良好的峰形和灵敏度。

本研究采用 ESI<sup>+</sup>对 36 种化合物进行了检测, 结果发现, 所考查的 36 种抗生素类化合物均产生 [M+H]<sup>+</sup>准分子离子峰。因此, 本研究采用正离子模式

全扫描检测筛选化妆品中的 36 种抗生素, 以保证各化合物均能达到最佳灵敏度。在最佳质谱条件下, 各化合物准分子离子的精确质量数测定的相对偏差均小于  $5 \times 10^{-6}$ 。36 种抗生素提取离子色谱图见图 1(化合物筛选的离子提取窗口宽度为  $5 \times 10^{-6}$ (5 ppm))。

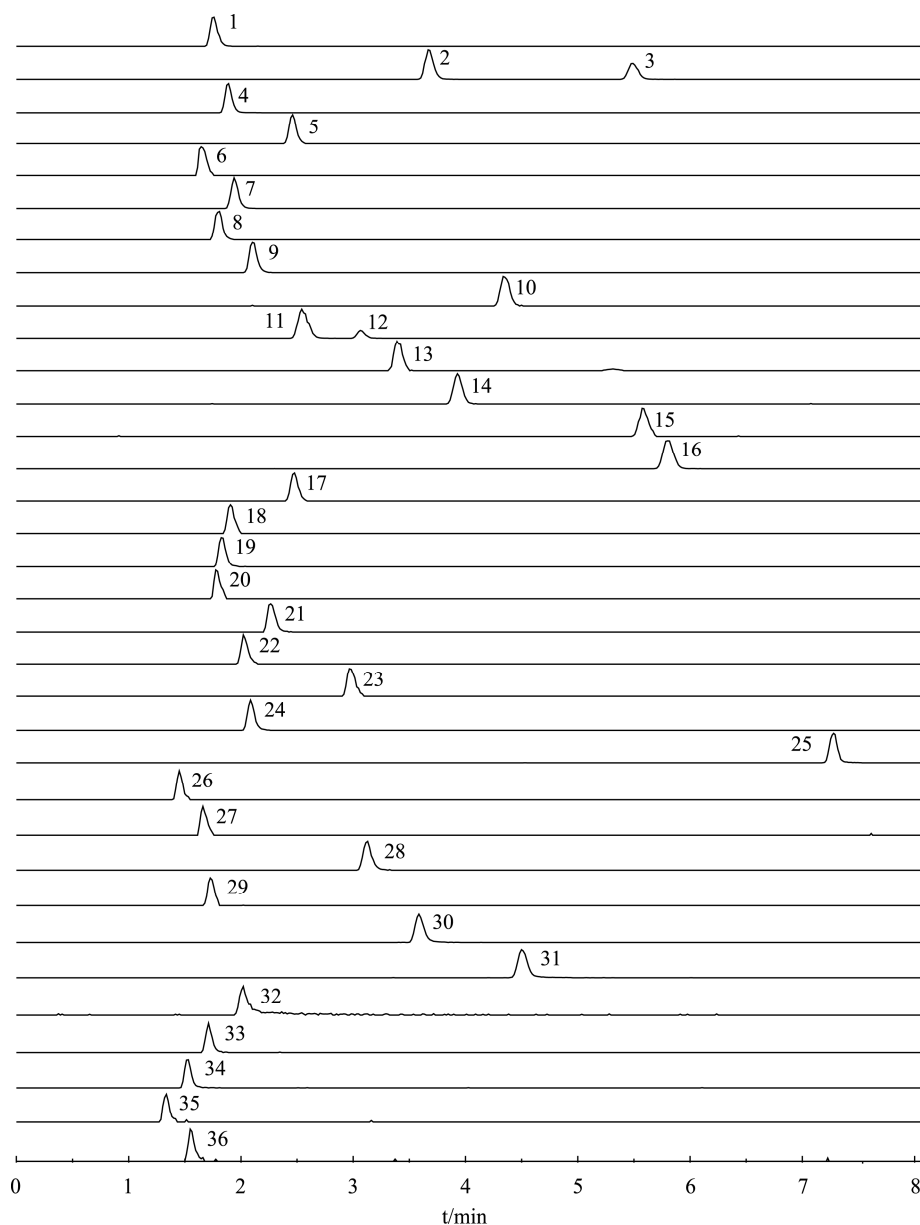


图 1 36 种抗生素化合物提取离子色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of the 36 kinds of antibiotics

(1: Sulfadiazine; 2 : Sulfadoxine; 3: Sulfadimethoxine; 4: Trimethoprim; 5: Sulfamethazine; 6: Sulfacetamide; 7: Sulfapyridine; 8 : Sulfathiazole; 9: Sulfamerazine; 10: Sulfisoxazole; 11: Sulfamethoxy pyridazine; 12: Sulfamonomethoxine; 13: Sulfaclopyridazine; 14: Sulfamethoxazole; 15: Sulfaquinoxaline; 16 : Sulfaphenazole; 17: Sulfamethizole; 18: Ciprofloxacin; 19 : Levofloxacin; 20 : Norfloxacin; 21 : Enrofloxacin; 22 : Danofloxacin; 23: Sarafloxacin; 24 : Lomefloxacin; 25 : Flumequine; 26: Pipemidic acid; 27: Enoxacin; 28 : Difloxacin; 29: Marbofloxacin; 30 : Cinoxacin; 31: Oxolinic acid; 32: Unizole; 33: Ronidazole; 34 : Metronidazole; 35: Hydroxymetronidazole; 36: 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole)

### 3.3 碰撞模式的选择

碰撞电压是串联质谱中影响碎片离子强度的重要参数,对检测灵敏度和特征离子碎片信息的丰度有直接影响。当碰撞电压较低时,目标碎片离子峰强度较弱,灵敏度相对较差;当碰撞电压超过一定强度,会产生过多的碎片离子而影响目标碎片离子的甄别。

LTQ-Orbitrap XL 线性离子阱/静电场轨道阱组合式质谱仪可以提供碰撞诱导解离 (collision-induced dissociation, CID) 和高能碰撞诱导解离 (high collision dissociation, HCD) 两种碰撞裂解模式。本实验分别采集了 36 种抗生素在归一化碰撞能量为 35% 时的 CID 和 HCD 高分辨质谱谱图 (表 2)。

表 2 36 种抗生素在 CID 和 HCD 裂解模式下产生的碎片离子比较  
Table 2 Comparison of products of the 36 kinds of antibiotics in CID and HCD modes

No.	Compounds	Parent Ion	Product ion/ ( <i>m/z</i> ) (relative abundance/%)	
			CID	HCD
1	Sulfadiazine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01125(100)	156.01122(100);251.05965(30)
2	Sulfadoxine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01143(100);108.04427(21);311.08111(20)	156.01158(100);108.04435(85);92.04909(51)
3	Sulfadimethoxine	[M+H] <sup>+</sup>	245.10368(100);156.07683(90);218.02338(56);311.08129(41)	156.07689(100);108.04436(55);92.04907(31)
4	Trimethoprim	[M+H] <sup>+</sup>	230.11622(100);123.06636(46)	291.14506(100)
5	Sulfamethazine	[M+H] <sup>+</sup>	186.03306(100);279.09093(24)	279.09092(100);186.03306(90);204.04362(83);156.01130(81);124.08669(80);108.04413(34);92.04917(21)
6	Sulfacetamide	[M+H] <sup>+</sup>	156.01087(100)	156.01089(100);108.04395(46);92.04904(28)
7	Sulfapyridine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01175(100);184.08741(77)	156.01176(100);184.08742(50);250.06521(48);108.04449(45);92.04904(27)
8	Sulfathiazole	[M+H] <sup>+</sup>	156.01179(100)	156.01175(100);108.04449(48);92.04904(34)
9	Sulfamerazine	[M+H] <sup>+</sup>	172.01791(100);156.01172(72);265.07604(35)	156.01172(100);108.04451(54);172.01793(43);92.04946(36);265.07604(34)
10	Sulfisoxazole	[M+H] <sup>+</sup>	156.01176(100)	156.01178(100);108.04404(63);92.04904(42)
11	Sulfamethoxypyridazine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01097(100);126.06578(25)	156.01104(100);126.06583(42);108.04410(35);281.06983(23);92.04907(21)
12	Sulfamonomethoxine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01153(100);215.09309(91)	156.01153(100);108.04433(70);126.06622(54);92.04936(44);215.09309(30)
13	Sulfaclorpyridazine	[M+H] <sup>+</sup>	156.01125(100);188.01273(26)	156.01124(100);108.04414(39);92.04918(25)
14	Sulfamethoxazole	[M+H] <sup>+</sup>	156.01090(100)	156.01083(100);108.04394(35);92.04904(20)
15	Sulfaquinoxaline	[M+H] <sup>+</sup>	156.01131(100);208.01760(45)	156.01131(100);108.04419(38);92.04923(25);301.07541(22)
16	Sulfaphenazole	[M+H] <sup>+</sup>	222.03307(100);315.09081(35)	315.09071(100)
17	Sulfamethizole	[M+H] <sup>+</sup>	156.01121(100)	156.01122(100);108.04412(41);92.04916(26)
18	Ciprofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	288.15045(100);314.12982(82)	332.14053(100);288.15051(95);314.12994(68);245.10829(20)
19	Levofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	318.16089(100)	318.16095(100);362.15094(38)
20	Norfloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	302.12970(100);276.15024(93)	320.14053(100);276.15033(73);302.12985(70)

续表 2

No.	Compounds	Parent Ion	Product ion/ ( <i>m/z</i> ) (relative abundance/%)	
			CID	HCD
21	Enrofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	316.18198(100); 342.16132(50)	316.18207(100);360.17200(65);342.14167(37)
22	Danofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	340.14545(100); 314.16632(56)	358.15607(100);340.14557(55);314.16638(32)
23	Sarafloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	342.14108(100); 368.12024(70)	342.14130(100);386.13080(80);368.12051(71);299.09888(41)
24	Lomefloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	308.15695(100); 334.13638(30)	308.15701(100);352.14697(86);265.11441(76);334.13644(35)
25	Flumequine	[M+H] <sup>+</sup>	244.07660(100)	244.07658(100);262.08722(77)
26	Pipemidilic acid	[M+H] <sup>+</sup>	286.12964(100); 217.10851(44)	304.14020(100);217.10829(46);286.12936(44)
27	Enoxacin	[M+H] <sup>+</sup>	303.12497(100); 257.13925(35);277.14563(21)	321.13602(100);303.12534(74);277.14594(28);234.10376(23)
28	Difloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	356.15671(100); 382.13559(54)	356.15686(100);400.14606(58);382.13568(46);299.09915(26)
29	Marbofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	320.10422(100); 345.13593(37)	320.10428(100);363.16433(95);345.13599(89);277.06183(28)
30	Cinoxacin	[M+H] <sup>+</sup>	245.05528(100); 263.06573(36)	263.06583(100);245.05537(42)
31	Oxolinic acid	[M+H] <sup>+</sup>	244.06001(100)	244.05998(100);262.07062(72)
32	Unizole	[M+H] <sup>+</sup>	142.06079(100); 96.06789(53)	142.06085(100);96.06799(24)
33	Ronidazole	[M+H] <sup>+</sup>	140.04504(100)	140.04506(100)
34	Metronidazole	[M+H] <sup>+</sup>	128.04511(100); 172.07139(44)	128.04514(100);172.07143(40)
35	Hydroxymetronidazole	[M+H] <sup>+</sup>	126.03006(100); 123.05563(84)	123.05567(100);126.03000(95);144.04045(45)
36	2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole	[M+H] <sup>+</sup>	140.04560(100)	140.04554(100);158.05599(24)

CID 和 HCD 两种不同碰撞模式下的碎片信息均可作为化合物确认的有效依据。两种碰撞模式的机制不同, 因此很多时候相近的碰撞能量, 碎片信息却差异很大。CID 模式下 35% 的归一化碰撞能量适用于绝大多数化合物; 而 HCD 高能碰撞模式下, 不同的碰撞能量差异较大。另外, CID 碰撞模式下碎片全扫描的最低质量数存在“cut off”效应(即所谓的“三分之一效应”), HCD 高能碰撞则克服了这一点, 可增加低质量数端的碎片信息。最终化合物的二级碎片确证可根据两种不同碰撞模式下碎片信息哪个更为丰富, 或者碎片的响应哪个高, 来决定采用二级碎片的碎裂模式。参照欧盟 2002/657/EC 中对质谱定性的相关规定: 高分辨质谱准分子离子可获得的识别点数是 2.0, 高分辨质谱子离子可获得的识别点数是 2.5。无论采用哪个碰撞模式, 至少可获得 1 个准分子离子和 1 个

二级碎片离子, 可达识别点  $\geq 4.5$  的定性分数, 足够满足欧盟 2002/657/EC 对禁用药物确认需要最少 4 个识别点的规定。

### 3.4 稳定性讨论

磺胺类抗生素和喹诺酮及氟喹诺酮类抗生素稳定性良好, 但硝基咪唑类抗生素稳定性较差, 见光易降解。因此, 样品前处理结束后, 应尽快进样分析。本实验采用样品处理结束后和冰箱冷藏条件下保存 24 h 后分别进样的方式, 考察了硝基咪唑类化合物的稳定性。结果表明, 冰箱冷藏条件下 24 h 内降解不明显。

### 3.5 方法学评价

#### 3.5.1 线性关系及检出限

通过高分辨质谱提取精确质量数得到的基线噪

声极低,以  $S/N$  计算的检出限和定量限与方法的真实性可能存在差距,因此在确定方法检出限时采用了美国国家环境保护局(Environmental Protection Agency, EPA)推荐方法<sup>[15]</sup>:制备 1 份相对低浓度的加标样品,重复进样 7 次,根据测试结果的标准偏差确定检出限。将 36 种抗生素化合物的标准溶液用基质空白(以膏霜类基质为例)提取液稀释成合适浓度的系列标准工作液,以化合物浓度和峰面积绘制标准曲线,得到各化合物的线性范围和检出限等见表 3。

### 3.5.2 回收率

本研究选取常见的水剂类、乳膏类、精油类等 3 种剂型的化妆品作为典型代表基质,在空白样品中进行了 LOQ、2LOQ、10LOQ 等 3 个浓度水平的加标回收实验,每个水平进行 6 次重复实验,计算

回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSD),结果表明 36 种常见抗生素化合物的平均回收率为 54.15%~117.55%,RSD 值为 1.19%~13.25% (表 4)。

### 3.6 实际样品的检测

LTQ orbitrap 组合式高分辨质谱仪同时具备高分辨质谱和离子阱质谱的功能,用数据关联平行采集模式同时得到分析物的精确分子量和多级质谱碎片,可以大大降低假阳性的出现率,显著提高方法的选择性。

应用本研究建立的方法对进出口及国产的香水类、霜膏类、精油类等不同剂型的化妆品样品共 50 份进行了分析检测,测试结果经标准样品比对及二级特征碎片离子确证,均未检出阳性样品。

表 3 36 种抗生素化合物线性范围、相关系数和检出限  
Table 3 Linear ranges, correlation coefficients of 36 kinds of antibiotics

Compounds	ESI mode	$r^2$	Linear range( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Compounds	ESI mode	$r^2$	Linear range( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Sulfadiazine	ESI <sup>+</sup>	0.9997	5~500	5	Levofloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9984	5~500	5
Sulfadoxine	ESI <sup>+</sup>	0.9985	5~500	5	Norfloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9971	5~500	5
Sulfadimethoxine	ESI <sup>+</sup>	0.9953	5~500	5	Enrofloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9990	5~500	5
Trimethoprim	ESI <sup>+</sup>	0.9999	5~500	5	Danofloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9983	5~500	5
Sulfamethazine	ESI <sup>+</sup>	0.9988	5~500	5	Sarafloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9976	5~500	5
Sulfacetamide	ESI <sup>+</sup>	0.9997	5~500	5	Lomefloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9994	5~500	5
Sulfapyridine	ESI <sup>+</sup>	0.9996	5~500	5	Flumequine	ESI <sup>+</sup>	0.9987	5~500	5
Sulfathiazole	ESI <sup>+</sup>	0.9970	5~500	5	Pipemidic acid	ESI <sup>+</sup>	0.9976	5~500	5
Sulfamerazine	ESI <sup>+</sup>	0.9999	5~500	5	Enoxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9969	5~500	5
Sulfisoxazole	ESI <sup>+</sup>	0.9939	5~500	5	Difloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9991	5~500	5
Sulfamethoxy pyridazine	ESI <sup>+</sup>	0.9982	5~500	5	Marbofloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9982	5~500	5
Sulfamonomethoxine	ESI <sup>+</sup>	0.9993	10~1000	10	Cinoxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9999	5~500	5
Sulfaclorpyridazine	ESI <sup>+</sup>	0.9989	5~500	5	Oxolinic acid	ESI <sup>+</sup>	0.9978	5~500	5
Sulfamethoxazole	ESI <sup>+</sup>	0.9999	5~500	5	Unizole	ESI <sup>+</sup>	0.9998	5~500	5
Sulfaquinoxaline	ESI <sup>+</sup>	0.9999	5~500	5	Ronidazole	ESI <sup>+</sup>	0.9965	5~500	5
Sulfaphenazole	ESI <sup>+</sup>	0.9972	5~500	5	Metronidazole	ESI <sup>+</sup>	0.9993	5~500	5
Sulfamethizole	ESI <sup>+</sup>	0.9995	5~500	5	Hydroxymetronidazole	ESI <sup>+</sup>	0.9990	5~500	5
Ciprofloxacin	ESI <sup>+</sup>	0.9980	5~500	5	2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole	ESI <sup>+</sup>	0.9995	5~500	5



表 4 空白化妆品中 36 种抗生素化合物的添加回收率( $n=6$ )  
 Table 4 Recoveries of the 36 antibiotics spiked in cosmetic samples ( $n=6$ )

Compound	Add Level ( $\mu\text{g/L}$ )	Aqueous		Cream		Oil		Compound	Add Level ( $\mu\text{g/L}$ )	Aqueous		Cream		Oil	
		Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)			Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)		
Sulfadiazine	5	68.14	6.31	75.86	6.92	77.85	1.85	Levofloxacin	5	79.54	3.50	88.57	4.69	80.53	6.91
	10	63.08	9.00	70.16	8.19	86.27	2.42		10	84.59	3.59	94.14	3.30	79.77	2.19
	50	68.14	7.34	75.84	7.38	99.29	7.62		50	69.27	4.39	77.08	3.46	84.21	3.78
Sulfadoxine	5	64.62	6.13	71.88	4.95	93.37	2.84	Norfloxacin	5	75.30	2.85	83.81	2.87	87.93	3.49
	10	75.05	3.85	83.52	3.39	107.23	3.57		10	90.46	2.96	100.69	3.22	98.96	6.60
	50	105.97	4.46	117.90	3.49	102.93	4.02		50	68.25	8.22	75.95	8.01	101.53	8.92
Sulfadimethoxine	5	56.13	5.09	62.54	7.24	77.68	6.89	Enrofloxacin	5	82.70	6.35	92.04	6.18	103.15	8.56
	10	79.60	7.10	88.61	7.53	90.36	5.22		10	89.55	5.50	99.72	6.49	108.61	6.08
	50	89.79	3.00	99.94	3.24	101.44	6.50		50	88.51	3.40	98.59	5.51	112.41	3.96
Trimethoprim	5	70.20	8.53	78.22	7.55	74.10	4.02	Danofloxacin	5	75.80	5.33	84.34	4.50	98.43	9.83
	10	77.66	5.25	86.44	5.17	77.96	2.50		10	70.97	6.67	78.95	5.72	93.12	3.18
	50	85.97	2.63	95.67	2.04	76.81	7.51		50	71.36	4.94	79.45	5.91	95.94	4.45
Sulfamethazine	5	84.92	3.45	94.52	3.63	75.33	2.38	Sarafloxacin	5	86.23	4.76	96.02	5.82	82.42	9.78
	10	84.84	4.83	94.46	5.59	76.06	3.36		10	89.09	2.88	99.20	4.28	84.17	6.43
	50	90.32	3.14	100.51	2.04	89.87	4.91		50	71.31	6.82	79.40	7.56	78.28	9.79
Sulfacetamide	5	67.30	6.50	74.85	5.05	80.79	4.09	Lomefloxacin	5	82.82	7.05	92.09	5.24	87.70	1.29
	10	80.18	4.73	89.29	6.03	83.62	4.14		10	108.64	2.82	120.90	2.01	98.24	6.48
	50	84.79	3.15	94.38	3.58	93.19	3.84		50	75.33	7.48	83.80	6.65	101.68	5.87
Sulfapyridine	5	83.65	4.55	93.08	3.87	84.94	3.25	Flumequinone	5	72.76	5.32	80.97	4.80	68.67	5.81
	10	74.05	3.80	82.45	4.68	84.11	2.41		10	80.86	6.73	90.03	7.41	67.68	3.68
	50	82.33	5.59	91.68	6.65	98.67	5.09		50	60.39	10.68	67.30	9.48	90.03	9.33
Sulfathiazole	5	85.35	3.69	95.01	4.16	68.33	9.45	Pipemidilic acid	5	72.18	5.76	80.40	7.34	58.50	7.30
	10	74.97	4.88	83.44	4.68	87.61	6.36		10	69.16	7.20	77.04	8.43	83.15	2.07
	50	77.83	6.55	86.67	7.69	99.71	2.78		50	78.24	7.85	87.12	8.59	103.64	8.06
Sulfamerazine	5	70.12	7.24	78.02	6.85	100.35	5.40	Enoxacin	5	77.21	7.64	85.90	6.87	84.56	4.35
	10	85.65	5.31	95.35	5.74	89.25	6.77		10	71.51	13.25	79.67	7.61	82.40	2.31
	50	86.89	6.55	96.70	6.43	99.23	4.50		50	78.95	3.61	87.85	2.78	92.96	4.25
Sulfisoxazole	5	91.37	2.49	79.49	3.62	95.72	5.12	Difloxacin	5	86.42	6.30	96.18	6.24	81.76	3.48
	10	93.34	5.98	81.21	6.69	93.53	3.97		10	90.42	5.01	100.66	5.47	88.72	2.98
	50	103.75	2.61	90.29	4.60	79.46	7.94		50	66.62	6.92	74.08	5.21	92.13	3.69
Sulfamethoxyypyridazine	5	96.03	4.35	83.04	2.87	82.81	1.61	Marbofloxacin	5	60.34	3.50	67.16	3.78	76.40	9.87
	10	82.21	5.39	91.52	5.71	73.36	4.78		10	86.84	7.71	96.54	5.45	94.16	2.44
	50	74.61	3.43	106.83	3.43	93.55	5.49		50	55.37	10.97	61.67	9.42	86.27	1.56
Sulfamonomethoxine	10	72.57	2.70	80.76	2.22	74.45	3.99	Cinoxacin	5	75.68	6.31	84.18	5.08	91.57	6.21
	20	85.46	3.21	95.13	3.63	67.03	1.57		10	98.30	5.46	109.36	4.50	98.39	4.51
	100	54.15	2.65	60.27	2.49	79.18	6.48		50	74.16	3.97	82.54	4.26	103.65	6.79

续表 4

Compound	Add Level (µg/L)	Aqueous		Cream		Oil		Compound	Add Level (µg/L)	Aqueous		Cream		Oil	
		Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)			Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)		
Sulfactor pyridazine	5	65.11	7.70	72.42	6.49	81.32	5.28	Oxolinic acid	5	73.65	4.94	81.93	3.60	80.05	8.80
	10	59.72	8.37	69.73	8.39	84.44	3.22		10	78.23	4.49	87.04	3.59	75.37	1.77
	50	67.62	6.45	75.24	6.07	110.96	3.60		50	60.30	3.62	67.15	5.09	108.90	3.17
Sulfamethoxazole	5	75.45	2.98	83.97	2.42	74.26	5.94	Unizole	5	81.04	3.05	90.20	3.18	79.72	8.57
	10	93.37	1.41	103.95	2.50	96.16	3.74		10	88.63	2.63	98.66	3.30	89.39	2.63
	50	78.77	3.31	87.68	3.50	100.49	5.65		50	74.48	5.68	82.97	7.38	104.86	3.35
Sulfaquin oxaline	5	99.79	2.55	111.08	2.84	78.34	6.08	Ronidazole	5	92.00	3.64	79.98	1.64	86.21	2.93
	10	93.54	3.56	104.12	3.85	85.58	7.93		10	103.53	6.63	90.06	6.69	95.81	4.31
	50	67.38	6.52	74.99	6.31	93.12	3.86		50	106.09	6.95	92.41	9.33	99.43	4.78
Sulfaphenazole	5	83.11	6.75	92.43	4.93	97.58	1.66	Metronidazole	5	107.77	6.38	93.89	9.11	87.24	2.64
	10	87.67	4.56	97.55	3.90	90.09	2.60		10	113.59	5.57	98.80	5.87	90.62	6.42
	50	57.67	4.20	64.17	3.12	102.50	5.76		50	117.55	2.25	102.35	5.65	81.64	7.11
Sulfamethizole	5	84.23	5.39	93.68	3.37	76.26	8.77	Hydroxy metronidazole	5	102.83	7.84	89.67	11.37	99.72	4.76
	10	76.53	11.85	85.10	7.68	86.46	2.30		10	97.39	1.37	84.75	3.78	101.18	6.64
	50	67.10	4.75	74.67	4.07	93.63	3.83		50	100.38	4.65	87.27	3.71	84.43	7.65
Ciprofloxacin	5	69.08	2.94	76.87	1.92	84.98	6.71	2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole	5	71.60	11.25	62.24	10.55	113.03	3.94
	10	91.58	3.08	101.92	2.72	79.61	2.04		10	91.62	5.50	79.85	8.89	113.58	3.86
	50	67.09	6.26	74.62	4.54	81.28	1.58		50	104.29	1.19	90.74	3.42	111.80	3.79

## 4 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱质谱对化妆品中抗生素类成分的快速筛查和确证方法, 在 8 min 内完成了对 36 种抗生素的筛查和确证, 获得了满意的分离效果和检测灵敏度。方法具有前处理简单、质量精度高、分析速度快的特点, 能够满足化妆品中抗生素类成分的快速筛选分析需要。

### 参考文献

- [1] 庞国芳. 农药兽药残留现代分析技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] Regulation (EC) No 1223/2009 of The European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products [Z].
- [3] 化妆品卫生规范[Z]. 2007 .
- [4] Wu ZJ, Peng Y. Analysis of penicillin antibiotics in cosmetics using ultra performance liquid chromatography[J]. Adv Mater Res, 2011, 233-235: 87-90.
- [5] Jin W, Yang YJ, Wang WY, *et al.* Simultaneous determination of antibiotics in anti-acne cosmetics by rapid LC with DAD [J]. Chromatographia, 2009, 69: 1221-1226.
- [6] 郑和辉, 王萍, 李洁. 超高效液相色谱法检测化妆品中的 12 种磺胺类抗生素[J]. 色谱, 2007, 25(2): 238-240.
- [7] 陈静, 郑荣, 季申, 等. 超高效液相色谱法同时测定化妆品中的 19 种喹诺酮类抗生素[J]. 分析化学, 2013, 41(6): 931-935.
- [8] Wu CS, Zhang JL, Qiao YL, *et al.* Simultaneous determination of 14  $\beta$ -lactam antibiotics in cosmetic products by liquid chromatography [Z]. 2007

- chromatography tandem mass spectrometry method [J]. *Chin Chem Lett*, 2011, 22: 334-337.
- [9] 刘华良, 李放, 杨润, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法分析化妆品中的常见抗生素及甲硝唑[J]. *色谱*, 2009, 27(1): 50-53.  
Liu HL, Li F, Yang R, *et al.* Determination of common antibiotics and metronidazole in cosmetics by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(1): 50-53.
- [10] 马强, 王超, 王星, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中的 22 种磺胺类药物[J]. *分析化学*, 2008, 36(12): 1683-1689.  
Ma Q, Wang C, Wang X, *et al.* Simultaneous determination of 22 sulfonamides in cosmetics by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(12): 1683-1689.
- [11] 修晓丽, 罗忻, 牛增元, 等. 高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱筛查和确证纺织品中的致癌染料[J]. *色谱*, 2013, 31(10): 961-968.  
Xiu XL, Luo X, Niu ZY, *et al.* Screening and confirmation of carcinogenic dyes in textiles by high performance liquid chromatography-linear ion trap/Orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(10): 961-968.
- [12] Hurtaud-Pessel D, Jagadeshwar-Reddy T, Verdon E. Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument [J]. *Food Addit Contam*, 2011, 28(10): 1340-1351.
- [13] 马强, 王超, 王星, 等. 超高效液相色谱法同时测定化妆品中的 15 种激素[J]. *色谱*, 2007, 25(4): 541-545.  
Ma Q, Wang C, Wang X, *et al.* Simultaneous determination of 15 hormones in cosmetics using ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2007, 25(4): 541-545.
- [14] Pichler P, Köcher T, Holzmann J, *et al.* Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-Plex and iTRAQ 8-Plex on LTQ Orbitrap [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(15): 6549-6558.
- [15] US EPA. Title 40: Part 136, Appendix B to Part 136. [1986-06-30].  
[EB/OL]. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2011-title40-vol23/pdf/CFR-2011-title40-vol23-part136-appB.pdf>

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



王凤美, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为药物残留分析。

E-mail: fengmeiw@126.com



牛增元, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品和消费品中有毒有害物质的检测技术。

E-mail: zyniuqd@163.com