SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3897—2014

化妆品中四环素类抗生素的测定

Determination of tetracycline antibiotics in cosmetics

2014-01-13 发布　　2014-08-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行　业　标　准
化妆品中四环素类抗生素的测定
SN/T 3897—2014
*
中 国 标 准 出 版 社 出 版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230　1/16　印张 1　字数 24 千字
2014 年 12 月第一版　2014 年 12 月第一次印刷
印数 1—1 300
*
书号:155066·2-27640　定价 18.00 元

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：黄超群、谢文、侯建波、史颖珠、陈玲玲、楼成杰、帅大尧、孙成琪。

化妆品中四环素类抗生素的测定

1 范围

本标准规定了化妆品中二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素、差向脱水四环素、脱水四环素等9种四环素类抗生素测定的高效液相色谱(HPLC)和液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)检测方法。

本标准适用于爽肤水、润肤乳、面膜、香皂、洗面奶、祛痘霜中9种四环素类抗生素的测定。

本标准的液相色谱-质谱/质谱法为仲裁法。

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

第一法 高效液相色谱法

3 方法提要

以甲醇-草酸溶液为溶剂,超声提取、离心、过滤,用配有二极管阵列检测器的液相色谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,所用试剂均为分析纯,所用水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 乙腈:液相色谱纯。

4.2 甲醇:液相色谱纯。

4.3 草酸:优级纯。

4.4 甲酸:液相色谱纯。

4.5 氨水。

4.6 磷酸:优级纯。

4.7 0.2 %磷酸溶液:移取2.0 mL磷酸(4.6),用水定容至1 000 mL。

4.8 0.02 mol/L草酸溶液:称取0.90 g草酸(4.3),用水溶解并定容至500 mL。

4.9 甲醇-草酸溶液(1+1,体积比):量取500 mL甲醇(4.2)与500 mL草酸溶液(4.8)混合。

4.10 二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素、差向脱水四环素、脱水四环素标准品:纯度大于或等于90%,参见附录A中表A.1。

4.11 标准储备溶液:分别称取经折算适量标准品(4.10),分别用甲醇溶解并定容,溶液浓度为200 μg/mL,该标准储备液贮存于−18℃以下,有效期6个月。

4.12 混合标准中间溶液:分别准确移取5.0 mL二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、

甲烯土霉素、强力霉素，2.0 mL 差向脱水四环素、脱水四环素标准储备溶液(4.11)，用甲醇定容至100 mL，配制成二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素浓度为10 μg/mL，差向脱水四环素、脱水四环素浓度为4.0 μg/mL 的混合标准中间溶液。该标准中间溶液贮存于－18℃以下。

4.13 混合标准工作溶液：根据需要，将混合标准中间溶液(4.12)用甲醇-草酸溶液(4.9)稀释成适当浓度的标准工作溶液。

4.14 微孔滤膜：0.22 μm，有机相。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱仪：配二极管阵列检测器。

5.2 分析天平：感量 0.000 1 g 和 0.01 g。

5.3 涡旋混合器。

5.4 超声波清洗器。

5.5 台式离心机：转速不低于 4 000 r/min。

5.6 pH 计。

6 测定步骤

6.1 样品处理

准确称取 1 g 均匀试样(精确至 0.01 g)，置入 50 mL 塑料离心管中，加入约 20 mL 甲醇-草酸溶液(4.9)，涡旋混匀后，用甲酸(4.4)或氨水(4.5)调节 pH 至 7.0，超声提取 20 min，以 4 000 r/min 离心 3 min。上清液转移至 25 mL 容量瓶，用甲醇定容。过 0.22 μm 滤膜(4.14)，供高效液相色谱仪测定。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱条件

6.2.1.1 色谱柱：C_{18}，250 mm×4.6 mm(内径)，5 μm，或相当者；

6.2.1.2 流动相：乙腈-0.2%磷酸溶液，梯度洗脱程序见表 1；

6.2.1.3 检测波长：程序可变波长，0 min～11.50 min 为 360 nm，11.51 min～23.00 min 为 270 nm；

6.2.1.4 柱温：25 ℃；

6.2.1.5 流速：1.0 mL/min；

6.2.1.6 进样量：50 μL；

6.2.1.7 后运行时间：4.0 min。

表 1 液相色谱法梯度洗脱程序

时间/min	乙腈/%	0.2%磷酸/%
0.00	10	90
6.00	25	75
16.00	35	65
18.00	60	40
23.00	60	40

6.2.2 液相色谱测定

根据样品中被测物的含量，选定峰面积相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样液中各种四环素抗生素的响应值均应在仪器的线性范围内。标准工作溶液和样液等体积穿插进样测定，在上述色谱条件下，各目标化合物的参考保留时间参见附录 B 中表 B.1。标准溶液的液相色谱图参见附录 C 中图 C.1。

7 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

8 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算试样中四环素类抗生素的含量，计算结果须扣除空白值：

$$X_i = \frac{c_i \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X_i ——试样中待测物质的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

c_i ——从标准曲线上得到的待测物质的溶液浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m ——最终样液所代表的试样质量，单位为克(g)；

9 测定低限和回收率

9.1 测定低限

本标准对于化妆品中二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素的测定低限均为 2.5 mg/kg，差向脱水四环素和脱水四环素的测定低限为 1.0 mg/kg。

9.2 回收率

本标准的添加浓度与回收率范围参见附录 E 中表 E.1。

第二法 液相色谱-质谱/质谱法

10 方法提要

以甲醇-草酸溶液为溶剂，超声提取、离心、过滤，液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。

11 试剂和材料

除特殊注明外，所用试剂和材料均同 4.2～4.5，4.8～4.11，4.14。

11.1 甲酸溶液：0.1%。移取 1.0 mL 甲酸(4.4)，用水定容至 1 000 mL。

11.2 混合标准中间溶液：分别准确移取 0.50 mL 土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、强力霉素、差向脱水四环素、脱水四环素，0.20 mL 甲烯土霉素，1.0 mL 二甲胺四环素标准储备溶液(4.11)，用甲醇定容

至100 mL，配制成土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、强力霉素、差向脱水四环素、脱水四环素浓度为1.0 μg/mL，甲烯土霉素浓度为0.4 μg/mL，二甲胺四环素浓度为2.0 μg/mL的混合标准中间溶液。该标准中间溶液贮存于－18 ℃以下。

11.3 混合标准工作溶液：根据需要，将混合标准中间溶液(11.2)用甲醇-草酸溶液(4.9)稀释成适当浓度的标准工作溶液。

12 仪器和设备

除特殊注明外，所用仪器和设备均同5.2～5.6。

液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源(ESI)。

13 测定步骤

13.1 样品处理

准确称取0.25 g均匀试样(精确至0.01 g)，置入50 mL塑料离心管中，加入约40 mL甲醇-草酸溶液(4.9)，涡旋混匀后，用甲酸(4.4)或氨水(4.5)调节pH至7.0，超声提取20 min，以4 000 r/min离心3 min。上清液转移至50 mL容量瓶，用甲醇定容。过0.22 μm滤膜(4.14)，供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

13.2 测定

13.2.1 色谱条件

13.2.1.1 色谱柱：C_{18}，150 mm×4.6 mm(内径)，5 μm，或相当者；

13.2.1.2 柱温：25℃；

13.2.1.3 进样量：10 μL；

13.2.1.4 流动相：甲醇-0.1 %甲酸溶液，梯度洗脱程序见表2；

13.2.1.5 流速：0.4 mL/min。

表2 液相色谱-质谱/质谱法梯度洗脱程序

时间/min	甲醇/%	0.1%甲酸/%
0.00	20	80
2.00	20	80
8.00	65	35
12.00	65	35
13.00	90	10
16.00	90	10
17.00	20	80
20.00	20	80

13.2.2 质谱条件

13.2.2.1 离子源：电喷雾离子源；

13.2.2.2　扫描方式：正离子扫描；

13.2.2.3　检测方式：多反应监测；

13.2.2.3　鞘气、辅助气均为高纯氮气；碰撞气为高纯氩气；使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求，参考条件参见附录 D；

13.2.2.4　监测离子对见附录 D 中表 D.1。

13.2.3　液相色谱-质谱/质谱测定

13.2.3.1　定量测定

根据试样中被测样液的含量，选定浓度相近的混合标准溶液，待测物的响应值应在仪器检测的线性范围内。对混合标准溶液及样液等体积参插进样测定，如果含量超过标准曲线范围，应稀释到适当浓度后分析。在上述色谱条件下，各目标化合物的参考保留时间参见附录 B 中表 B.1。标准溶液的多反应监测色谱图参见附录 C 中图 C.2。

13.2.3.2　定性测定

按照上述仪器条件测定样品和标准工作溶液，如果样品与标准工作液中待测物质色谱峰相对保留时间在±2.5%范围内；定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许误差不超过表 3 规定的范围，则可判断样品中存在相应的被测物。

表 3　相对离子丰度最大容许误差

相对离子丰度(基峰)%	＞50	≤50～＞20	≤20～＞10	≤10
最大容许误差%	±20	±25	±30	±50

14　空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

15　结果计算和表述

同第 8 章。

16　测定低限和回收率

16.1　测定低限

本标准对于化妆品中土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、强力霉素、差向脱水四环素和脱水四环素的测定低限均为 0.5 mg/kg，甲烯土霉素的测定低限为 0.2 mg/kg，二甲胺四环素的测定低限为1.0 mg/kg。

16.2　回收率

本标准的添加浓度与回收率范围参见附录 E 中表 E.2。

附 录 A
（规范性附录）
标准物质信息

表 A.1 标准物质 CAS 号、分子式及相对分子质量

化合物	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
二甲胺四环素盐酸盐	Minocycline hydrochloride	13614-98-7	$C_{23}H_{27}N_3O_7 \cdot HCl$	493.94
土霉素盐酸盐	Oxytetracycline hydrochloride	2058-46-0	$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$	496.89
四环素盐酸盐	Tetracycline hydrochloride	64-75-5	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	480.90
去甲金霉素盐酸盐	Demeclocycline hydrochloride	64-73-3	$C_{21}H_{21}ClN_2O_8 \cdot HCl$	501.31
金霉素盐酸盐	Chlortetracycline hydrochloride	67-42-2	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8 \cdot HCl$	515.34
甲烯土霉素盐酸盐	Metacycline hydrochloride	3963-95-9	$C_{22}H_{22}N_2O_8 \cdot HCl$	478.90
强力霉素盐酸盐	Doxycycline hyclate	24390-14-5	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0.5H_2O \cdot 0.5C_2H_6O$	512.94
差向脱水四环素盐酸盐	4-Epianhydrotetracycline hydrochloride	4465-65-0	$C_{22}H_{22}N_2O_7 \cdot HCl$	462.88
脱水四环素盐酸盐	Anhydrotetracycline hydrochloride	13803-65-1	$C_{22}H_{22}N_2O_7 \cdot HCl$	462.88

附 录 B
（资料性附录）
参考保留时间

表 B.1 九种四环素类抗生素的参考保留时间

化合物	HPLC 法参考保留时间/min	LC-MS/MS 法参考保留时间/min
二甲胺四环素	6.0	9.2
土霉素	8.8	10.3
四环素	9.6	10.1
去甲金霉素	10.8	11.0
金霉素	12.5	11.7
甲烯土霉素	13.0	12.4
强力霉素	13.7	12.9
差向脱水四环素	14.4	12.9
脱水四环素	16.2	14.3

附 录 C

（资料性附录）

高效液相色谱图与液相色谱-质谱/质谱法多反应监测色谱图

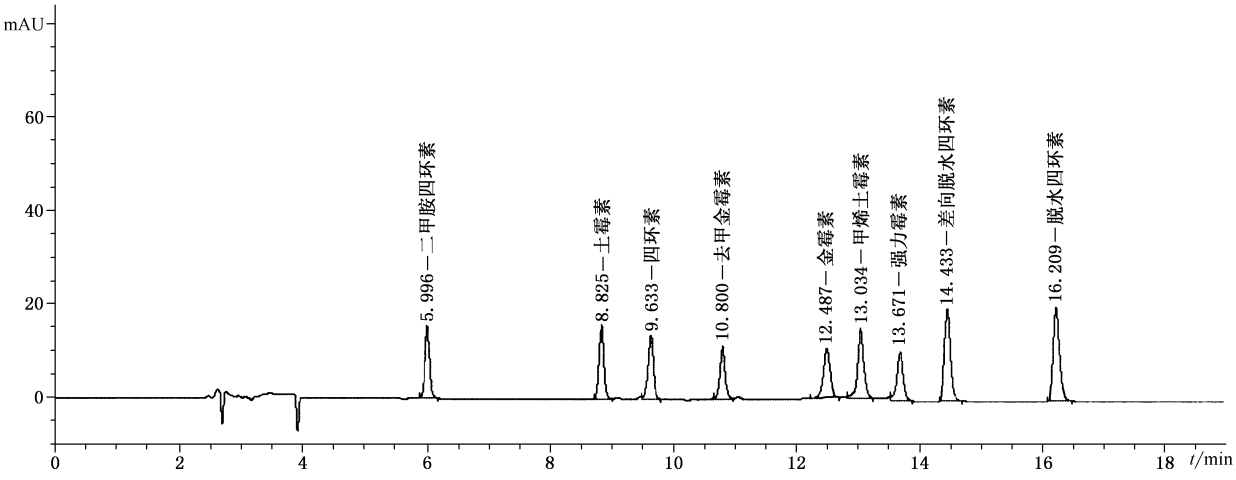

图 C.1 九种四环素类抗生素标准溶液的液相色谱图

（二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素：1.0 μg/mL；差向脱水四环素、脱水四环素：0.4 μg/mL）

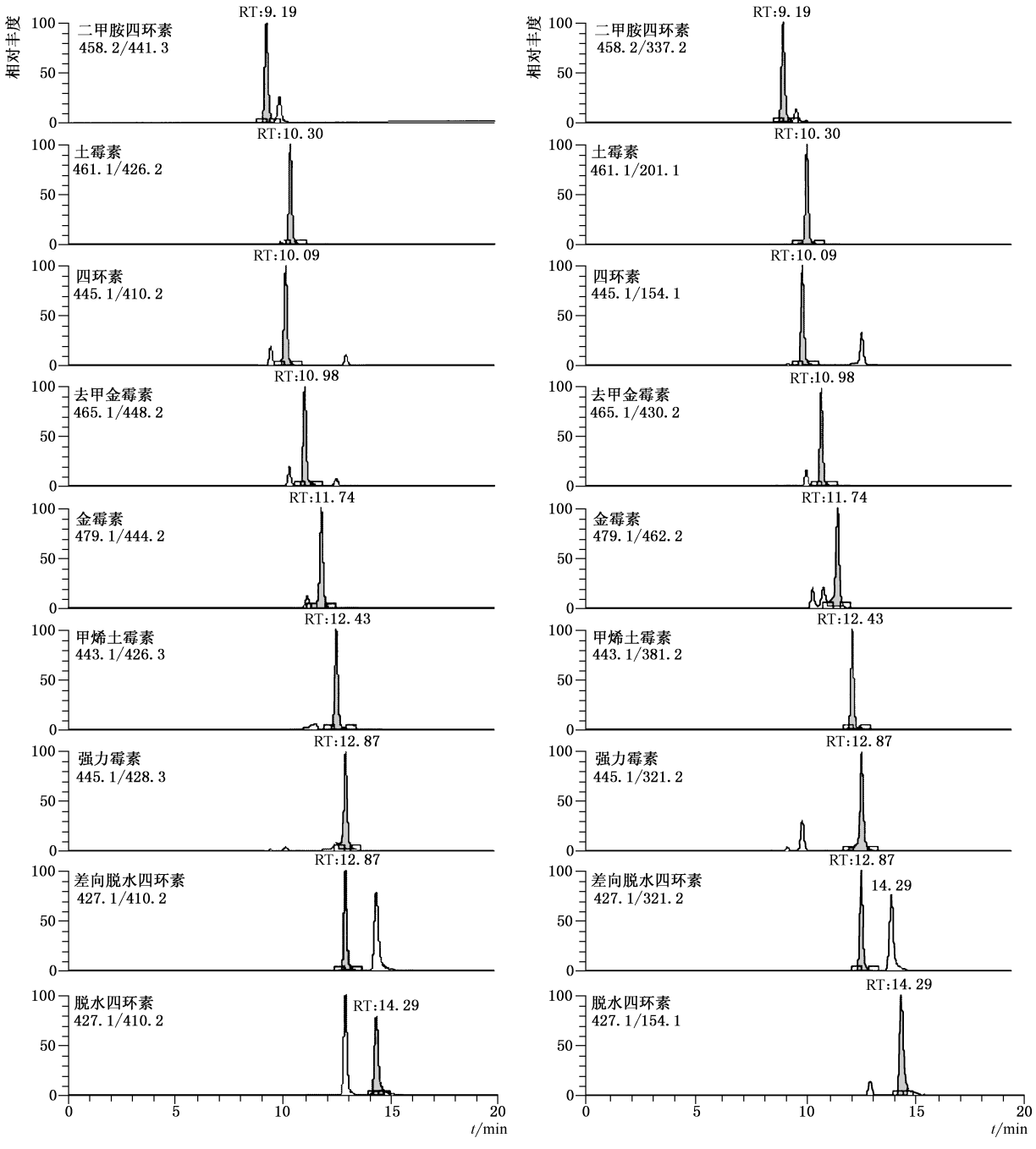

图 C.2　九种四环素类抗生素标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

(土霉素、四环素、去甲金霉素、金霉素、强力霉素、差向脱水四环素、脱水四环素:0.005 μg/mL;甲烯土霉素:0.002 μg/mL;二甲胺四环素、0.01 μg/mL)

附 录 D
（资料性附录）
液相色谱-质谱/质谱法仪器参数与监测离子[1)]

参数与监测离子：

a） 电喷雾电压：3 500V；

b） 离子源温度：300 ℃；

c） 鞘气压力：40 Arb；

d） 辅助气压力：15 Arb；

e） 毛细管温度：270 ℃；

f） 碰撞气压力：1.5 mTorr；

g） 监测离子对信息、碰撞能量等参数见表 D.1。

表 D.1 九种四环素类抗生素的监测离子对和碰撞能量

化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	碰撞能量/V
二甲胺四环素	458.2	441.3*	18
		337.2	34
土霉素	461.1	426.2*	19
		201.1	37
四环素	445.1	410.2*	19
		154.1	27
去甲金霉素	465.1	448.2*	15
		430.2	21
金霉素	479.1	444.2*	20
		462.2	16
甲烯土霉素	443.1	426.3*	17
		381.2	27
强力霉素	445.1	428.3*	18
		321.2	30
差向脱水四环素	427.1	410.2*	18
		321.2	28
脱水四环素	427.1	410.2*	18
		154.1	27

注：带 * 为定量离子。

1） 非商业性声明：附录 D 所列参考质谱条件是在 TSQ Quantum ULTRA AM 液质联用仪上完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

附 录 E
（资料性附录）
高效液相色谱法与液相色谱-质谱/质谱法回收率数据

表 E.1 化妆品中四环素类抗生素添加浓度及回收率试验数据（HPLC 法）

化合物	添加浓度 mg/kg	回收率范围/%					
		爽肤水	润肤乳	面膜	香皂	洗面奶	祛痘霜
二甲胺四环素	2.5	95.6～109	94.8～106	91.6～101	94.8～110	85.6～96.4	89.6～104
	5.0	95.8～108	94.4～104	92.4～99.0	93.4～102	87.8～97.4	95.0～99.2
	10	94.3～103	92.4～103	94.8～100	90.6～101	97.5～104	92.1～100
土霉素	2.5	94.6～101	93.2～106	92.0～99.6	93.2～108	97.0～102	87.6～96.4
	5.0	96.2～104	94.6～106	87.4～92.4	92.4～104	90.6～99.8	91.4～95.6
	10	95.0～109	96.8～104	91.0～100	85.8～102	95.1～99.1	91.5～97.0
四环素	2.5	96.8～106	88.0～93.2	84.8～92.0	93.2～103	80.4～85.6	83.2～96.4
	5.0	93.6～102	92.6～107	85.6～93.4	91.2～103	83.8～95.0	89.4～95.2
	10	98.2～105	95.2～100	90.1～102	89.0～98.2	93.7～100	90.1～95.1
去甲金霉素	2.5	95.2～101	89.6～96.8	94.0～96.8	92.8～103	80.0～89.6	86.4～94.4
	5.0	91.6～102	91.8～104	90.8～96.0	89.0～99.2	87.6～96.4	89.8～95.8
	10	96.8～102	91.2～99.0	92.5～102	86.2～95.2	84.5～91.1	86.0～93.6
金霉素	2.5	90.6～100	83.6～104	95.2～108	84.0～94.4	82.0～88.8	91.2～108
	5.0	90.4～103	80.2～102	88.0～96.0	83.8～96.4	83.2～90.2	92.2～99.0
	10	92.0～99.2	80.0～94.9	92.0～101	82.4～89.2	87.1～95.4	84.1～106
甲烯土霉素	2.5	93.2～110	81.2～90.8	95.2～97.6	96.4～108	90.8～96.0	94.0～99.6
	5.0	95.4～105	86.2～89.4	85.8～93.0	90.6～102	81.8～88.6	88.6～102
	10	98.5～105	84.3～95.1	93.2～101	84.8～97.3	82.3～88.2	82.5～98.3
强力霉素	2.5	92.6～108	89.2～95.6	95.6～103	96.0～109	85.2～90.0	95.2～107
	5.0	93.6～104	87.2～93.2	85.8～91.4	96.8～104	86.6～98.0	89.4～98.4
	10	98.0～105	88.2～97.8	91.6～99.2	87.3～94.3	82.0～87.4	82.3～96.3
差向脱水四环素	1.0	84.7～93.4	89.0～94.5	86.9～93.8	85.8～98.4	86.1～98.9	81.2～102
	2.0	93.0～102	92.4～106	84.5～95.5	91.5～109	80.0～92.5	83.5～89.5
	4.0	97.2～105	95.2～102	90.0～101	93.8～104	89.0～106	85.0～97.0
脱水四环素	1.0	90.2～96.6	84.6～98.0	92.3～104	84.4～98.3	91.0～107	93.5～109
	2.0	96.4～105	84.2～94.5	92.0～99.0	94.5～109	89.0～101	93.0～104
	4.0	95.2～105	95.0～110	92.5～102	96.5～106	95.5～108	87.2～107

SN/T 3897—2014

表 E.2　化妆品中四环素类抗生素添加浓度及回收率试验数据(LC-MS/MS 法)

化合物	添加浓度 mg/kg	回收率范围/%					
		爽肤水	润肤乳	面膜	香皂	洗面奶	祛痘霜
二甲胺四环素	1.0	91.7～102	83.8～101	90.0～100	88.2～100	84.1～102	84.0～100
	2.0	88.0～102	88.0～97.0	91.0～99.0	84.0～104	89.0～106	84.0～103
	4.0	86.3～102	90.0～103	86.5～107	87.3～104	86.3～105	89.5～103
土霉素	0.5	82.2～96.2	85.4～100	82.0～105	84.4～107	83.4～104	94.0～107
	1.0	87.1～106	85.6～95.4	87.6～105	85.7～103	96.2～103	93.7～104
	2.0	92.5～105	91.5～102	89.5～107	86.0～103	93.0～103	86.0～97.0
四环素	0.5	85.4～105	82.2～106	84.0～100	87.8～107	82.4～102	85.8～106
	1.0	90.6～106	89.5～106	89.2～102	88.8～107	94.6～105	86.1～103
	2.0	83.5～103	94.0～106	87.5～99.0	86.0～104	96.5～102	91.0～100
去甲金霉素	0.5	88.4～103	87.8～101	86.4～105	85.0～107	83.8～102	86.0～104
	1.0	86.8～105	90.8～106	86.2～103	91.2～102	85.2～102	89.6～103
	2.0	86.0～105	92.5～102	87.0～105	87.5～103	87.5～105	88.5～97.5
金霉素	0.5	88.0～109	88.6～100	86.6～105	82.8～93.2	85.8～106	90.0～106
	1.0	82.2～99.1	87.6～104	88.3～101	88.8～106	88.2～103	85.6～100
	2.0	86.5～105	85.5～104	87.0～104	86.0～98.5	86.0～104	90.0～103
甲烯土霉素	0.2	86.5～106	83.5～91.0	83.0～106	84.5～104	86.0～101	87.0～107
	0.4	85.8～104	85.3～103	83.5～103	82.3～105	82.8～103	85.3～95.5
	0.8	86.1～100	86.4～97.4	88.3～104	91.8～106	90.3～105	87.8～100
强力霉素	0.5	84.8～96.0	89.8～105	84.2～100	84.2～102	88.4～103	91.4～105
	1.0	83.6～97.0	84.4～105	91.9～107	85.3～103	85.8～104	93.0～102
	2.0	87.5～106	87.0～105	88.5～106	85.5～103	93.0～105	87.0～101
差向脱水四环素	0.5	86.0～105	86.8～98.8	82.6～107	90.4～107	85.2～105	86.6～102
	1.0	87.2～102	86.0～102	86.5～102	84.8～104	91.8～108	87.2～102
	2.0	84.5～100	89.0～104	89.0～104	87.0～102	86.0～102	87.5～106
脱水四环素	0.5	85.0～102	81.0～101	95.6～103	86.2～100	88.0～103	83.4～102
	1.0	90.9～103	81.2～104	91.0～106	92.7～106	87.7～96.2	87.4～94.7
	2.0	89.0～103	86.0～100	86.0～104	89.0～101	87.5～101	93.0～106

SN/T 3897-2014

书号:155066・2-27640

定价:　18.00 元