

消毒剂与抗菌剂中激素的检测方法

Analytical method for hormones in disinfectant and antibacterial and bacteriostatic agents

2024 - 10 - 11 发布

2025 - 03 - 01 实施

国家疾病预防控制局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 检测方法	1
5 其它激素类药物的检测方法	5
附录 A（资料性） 标准品相关信息	6
附录 B（资料性） 超高效液相色谱梯度洗脱程序	7
附录 C（资料性） 质谱参考条件	8
附录 D（资料性） 标准图谱	9
附录 E（规范性） 方法检出限、定量限及定量内标的选定	11

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会消毒标准专业委员会提出，国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、南京医科大学、无锡市疾病预防控制中心、南宁市疾病预防控制中心、国家食品安全风险评估中心。

本文件主要起草人：徐燕、朱峰、吴晓松、夏彦恺、吉文亮、李放、孙宏、孟元华、范云燕、陈达炜。

消毒剂与抗菌剂中激素的检测方法

1 范围

本文件规定了消毒剂与抗菌剂中激素的检测方法。

本文件适用于液体、凝胶剂型消毒剂及液体、凝胶、膏剂、霜剂剂型抗菌剂中泼尼松、倍他米松、地塞米松、曲安奈德、氢化可的松醋酸酯、泼尼松醋酸酯、可的松醋酸酯、地塞米松醋酸酯、氟轻松醋酸酯、氯倍他索丙酸酯、异氟泼尼松11种糖皮质激素及其它激素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

WS/T 466—2014 消毒专业名词术语

中华人民共和国药典

化妆品安全技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

消毒剂 disinfectant

采用一种或多种化学或生物的杀微生物因子制成的用于消毒的制剂。

[来源：WS/T 466—2014, 3.40]

3.2

抗菌剂 antibacterial and bacteriostatic agents

抗菌剂和抑菌剂的总称。抗菌剂指能够灭杀微生物或抑制其生长和繁殖的制剂；抑菌剂指对细菌的生长繁殖有抑制作用，但不能将其杀死的制剂。

[来源：WS/T 466—2014, 3.15, 3.44]

4 检测方法

4.1 原理

试样经水分散，用乙腈从分散液中提取激素类药物，用亚铁氰化钾和乙酸锌从提取液中沉淀大分子基质，膏剂、霜剂类基质用增强型脂质去除净化填料进一步去除脂质，加入盐析剂涡旋离心，上清液经基质固相分散剂净化，用超高效液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，实验用水为GB/T 6682规定的一级水。

4.2.1 试剂

4.2.1.1 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。

4.2.1.2 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。

4.2.1.3 亚铁氰化钾 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

4.2.1.4 乙酸锌 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

4.2.1.5 盐析剂 (含 1 g 氯化钠和 4 g 硫酸钠)。

4.2.1.6 基质固相分散净化管 (含 20 mg 石墨化炭黑、100 mg 十八烷基吸附剂、100 mg 乙二胺-N-丙基硅烷和 150 mg 硫酸镁)。

4.2.1.7 增强型脂质去除净化填料 (Enhanced matrix removal; EMR)。

4.2.2 试剂配制

4.2.2.1 10%亚铁氰化钾溶液：称取 115 g 亚铁氰化钾，用水溶解定容至 1 L。

4.2.2.2 20%乙酸锌溶液：称取 239 g 乙酸锌，用水溶解定容至 1 L。

4.2.2.3 乙腈水溶液：取乙腈 200 mL，加水 800 mL，混匀。

4.2.3 标准品

11种激素标准物质和9种同位素内标纯度均大于96.3%或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质，相关信息见附录A。

4.2.4 标准溶液配制

4.2.4.1 标准储备液 (约 1.0 mg/mL)：分别准确称取 11 种激素标准物质约 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定至刻度，配成浓度约为 1.0 mg/mL 的标准储备液，在 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下冷冻保存，有效期为 3 个月。

4.2.4.2 混合标准中间液 (10 $\mu\text{g/mL}$)：分别准确吸取适量各单一标准储备液于 25 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液，冷藏避光保存，有效期为 1 个月。

4.2.4.3 内标化合物标准储备液 (约 1.0 mg/mL)：分别称取 9 种同位素内标化合物约 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，配成浓度约为 1.0 mg/mL 的内标储备液，在 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下冷冻保存，有效期为 6 个月。

4.2.4.4 混合内标化合物标准中间液：分别吸取适量单一内标储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，配制成 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合内标中间液，冷藏避光保存，有效期为 3 个月。

4.2.4.5 混合标准溶液：用乙腈水溶液将激素类药物标准中间液配制成混合标准系列溶液，如标准系列中各目标物的质量浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL，标准系列中各内标化合物的质量浓度均为 10 ng/mL，超高效液相色谱-串联质谱仪测定。临用现配。

4.2.5 材料

有机系滤膜：孔径为 0.22 μm 。

4.3 仪器和设备

4.3.1 超高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI 源）。

4.3.2 分析天平：感量为 0.1 mg。

4.3.3 离心机：转速 \geq 12000 r/min。

4.3.4 涡旋混合器。

4.4 分析步骤

4.4.1 样品前处理

4.4.1.1 液体剂型和凝胶剂型

称取1.000 g（精确至1 mg）混合均匀的样品，置于50 mL离心管中，先加入50.0 μL 混合内标化合物标准中间液，再分别加入5.0 mL水和10.0 mL乙腈，涡旋提取10 min，加入10%亚铁氰化钾和20%的乙酸锌各0.20 mL，涡旋5 min，加入盐析剂，涡旋5 min，10000 r/min离心5 min，取1.5 mL上清液转移至基质分散固相净化管中，涡旋1 min，12000 r/min离心5 min，取0.80 mL上清液吹干，最后用0.40 mL乙腈水溶液复溶，上机检测。

4.4.1.2 膏剂和霜剂剂型

称取1.000 g（精确至1 mg）混合均匀的样品，置于50 mL离心管中，先加入50.0 μL 混合内标化合物标准中间液，再分别加入5.0 mL水和10.0 mL乙腈，涡旋提取10 min，加入10%亚铁氰化钾和20%的乙酸锌各0.20 mL，再加入1 g增强型脂质去除净化填料，涡旋5 min，加入盐析剂，涡旋5 min，将离心管置于-18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置30 min后以10000 r/min离心5 min，取1.50 mL上清液转移至基质分散固相净化管中，涡旋1 min，12000 r/min离心5 min，取0.80 mL上清液吹干，最后用0.40 mL乙腈水溶液复溶，过膜，上机检测。

4.4.2 样品测定

4.4.2.1 超高效液相色谱参考条件

超高效液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱： C_{18} 柱（柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.8 μm ），或相当者；
- 流动相：A相为水，B相为乙腈；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 进样体积：5.0 μL ；
- 梯度洗脱程序：见附录B。

4.4.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 电离方式： ESI^+ ；
- 离子源温度：550 $^{\circ}\text{C}$ ；

- c) 毛细管电压: ESI⁺: 5.5 kV;
- d) 气帘气: 2.1×10^5 Pa;
- e) 雾化气: 4.5×10^5 Pa;
- f) 辅助气: 4.5×10^5 Pa;
- g) 监测模式: 多反应监测 (MRM) 模式;
- h) 其它质谱参数: 见附录 C。

4.4.2.3 标准曲线的制作

将混合标准系列溶液, 按质量浓度由低到高依次注入超高效液相色谱-串联质谱仪中, 测得相应的峰面积, 以被测组分定量离子峰面积与内标化合物定量离子峰面积之比对相应的质量浓度做标准曲线, 以离子对定性, 采用内标法进行定量分析, 标准图谱见附录 D。

4.4.2.4 定性测定

被测组分选择 1 个母离子, 2 个子离子, 在相同实验条件下, 样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内; 且样品图谱中被测组分监测离子的相对丰度与浓度接近的标准工作溶液图谱中对应的监测离子的相对丰度进行比较, 偏差不超过表 1 规定的范围, 则可判定样品中存在对应的检测物。

表 1 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~≤50	>10~≤20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

4.4.2.5 定量测定

本方法采用内标法定量。纵坐标为被测组分定量离子峰面积与内标化合物定量离子峰面积之比, 横坐标为样品中被测组分的质量浓度, 各目标化合物对应的定量内标见附录 E。

4.4.2.6 测定

将试样溶液注入超高效液相色谱-串联质谱仪中, 以保留时间和两对离子 (特征离子/定量离子) 所对应的色谱峰面积相对丰度进行定性, 根据标准曲线计算试样中目标化合物的质量浓度。

4.4.3 空白试验

除不加试样外, 均按 4.4.1 步骤进行。

4.4.4 结果计算和表述

样品中目标化合物的含量按式 (1) 计算:

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中待测组分的含量, 单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ ——试样溶液中被测组分按照内标法在标准曲线中对应的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V——试样最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m ——样品称样量，单位为克（g）；

f ——稀释倍数；

计算结果保留三位有效数字。

4.4.5 精密度

在重复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15%。

4.4.6 检出限和定量限

当取样量为1.0 g，提取液体积为10.0 mL（按乙腈体积计），本方法的检出限和定量限见附录E。

5 其它激素类药物的检测方法

参照《中华人民共和国药典》和《化妆品安全技术规范》方法并进行方法验证后执行。

附 录 A
(资料性)
标准品相关信息

标准品相关信息见表A.1。

表A.1 标准品相关信息

序号	中文名称	英文名称	CAS 编号	分子式
1	泼尼松	Prednisone	1247-42-3	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
2	倍他米松	Betamethasone	378-44-9	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
3	地塞米松	Dexamethasone	50-02-2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
4	曲安奈德	Triamcinolone acetonide	76-25-5	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆
5	氢化可的松醋酸酯	Hydrocortisone 21-acetate	50-03-3	C ₂₃ H ₃₂ O ₆
6	泼尼松醋酸酯	Prednisone 21-acetate	125-10-0	C ₂₃ H ₂₈ O ₆
7	可的松醋酸酯	Cortisone 21-acetate	50-04-4	C ₂₃ H ₃₀ O ₆
8	地塞米松醋酸酯	Dexamethasone 21-acetate	1177-87-3	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆
9	氟轻松醋酸酯	Fluocinonide	356-12-7	C ₂₆ H ₃₂ F ₂ O ₇
10	氯倍他索丙酸酯	Clobetasol 17-propionate	25122-46-7	C ₂₅ H ₃₂ ClFO ₅
11	异氟泼尼松	Isoflupredone	338-95-4	C ₂₁ H ₂₇ FO ₅
12	泼尼松-D ₄	Prednisone-D ₄	N/A	C ₂₁ H ₂₂ D ₄ O ₅
13	可的松-D ₈	Cortisone-D ₈	N/A	C ₂₁ H ₂₀ D ₈ O ₅
14	倍他米松-D ₅	Betamethasone-D ₅	N/A	C ₂₂ H ₂₄ D ₅ FO ₅
15	地塞米松-D ₅	Dexamethasone-D ₅	358731-91-6	C ₂₂ H ₂₄ D ₅ FO ₅
16	氟米松-D ₃	Flumethasone-D ₃	N/A	C ₂₂ H ₂₅ D ₃ F ₂ O ₅
17	曲安奈德-D ₇	Triamcinolone acetonide-D ₇	352431-33-5	C ₂₄ H ₂₄ D ₇ FO ₆
18	地夫可特-D ₃	Deflazacort-D ₃	N/A	C ₂₅ H ₂₈ D ₃ NO ₆
19	丙酸氯倍他索-D ₅	Clobetasol 17-propionate-D ₅	N/A	C ₂₅ H ₂₇ D ₅ ClFO ₅
20	丙酸倍氯米松-D ₁₀	Beclomethasone dipropionate-D ₁₀	N/A	C ₂₈ H ₂₇ D ₁₀ ClO ₇

附 录 B
(资料性)
超高效液相色谱梯度洗脱程序

超高效液相色谱梯度洗脱程序见表B.1。

表B.1 超高效液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	65	35
0.5	65	35
11.0	20	80
12.5	2	98
14.0	2	98
14.1	65	35
16.0	65	35

附 录 C
(资料性)
质谱参考条件

激素类化合物及同位素内标化合物的质谱参数见表C.1。

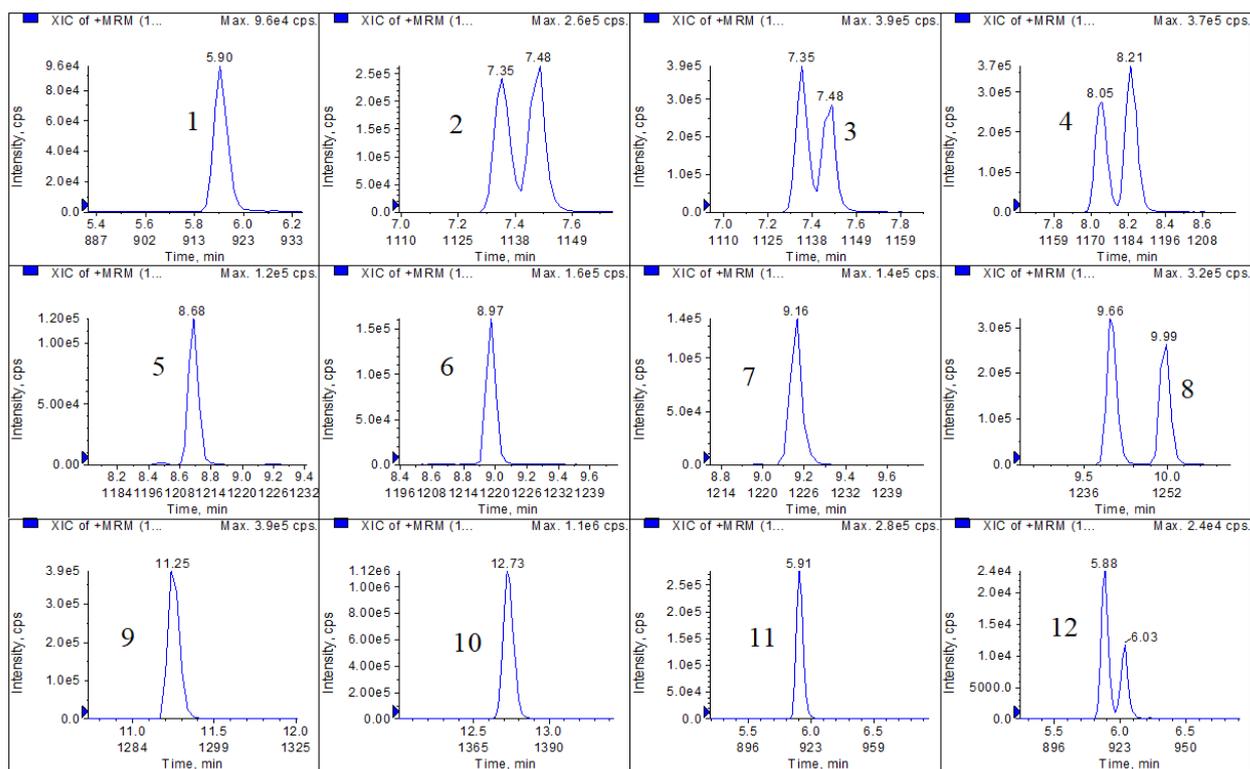
表C.1 激素类化合物及同位素内标化合物的质谱参数

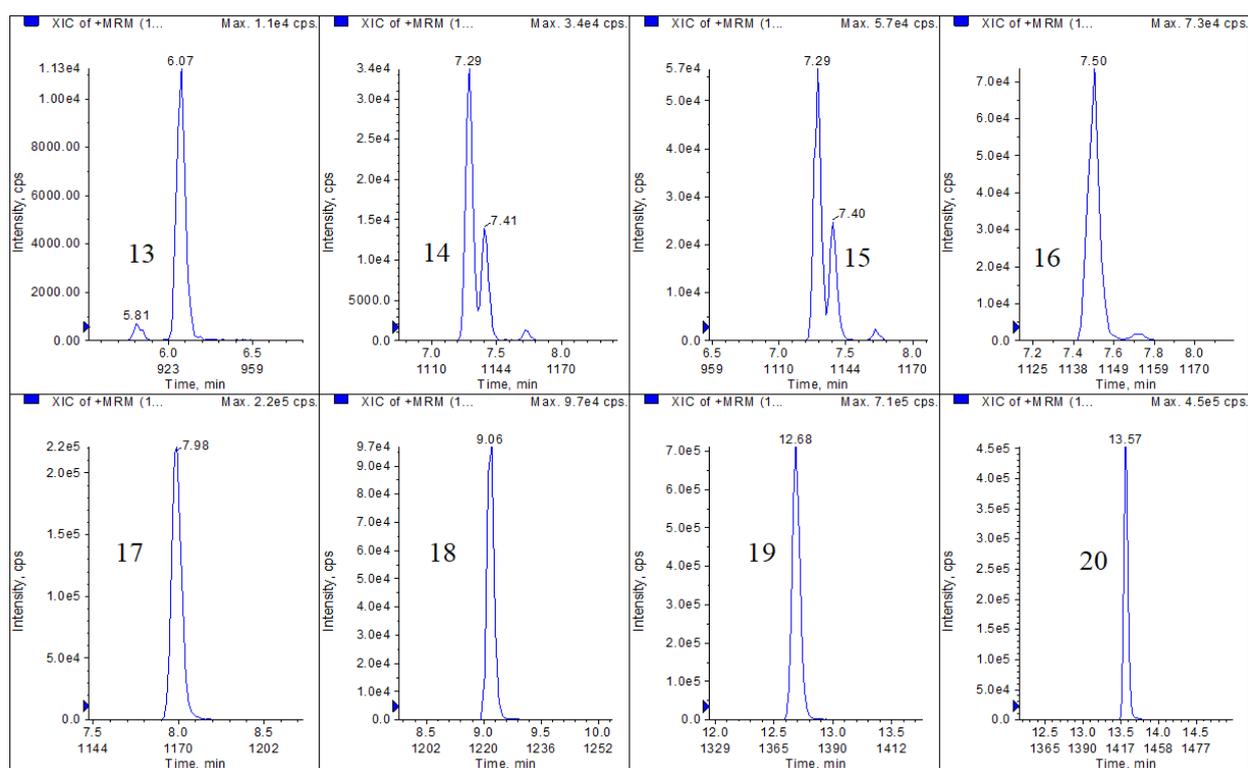
化合物	母离子	子离子	保留时间 (min)	DP 电压 (V)	碰撞能 (eV)
泼尼松	359.2	341.2	5.90	80	15
	359.2	147.2*	5.90	80	35
倍他米松	393.2	355.2*	7.35	80	15
	393.2	337.3	7.35	80	19
地塞米松	393.2	373.4	7.48	80	15
	393.2	355.2*	7.48	80	15
曲安奈德	435.2	339.2	8.05	80	15
	435.2	397.2*	8.05	80	15
氢化可的松醋酸酯	405.3	309.2	8.68	100	24
	405.3	327.2*	8.68	100	23
泼尼松醋酸酯	401.2	295.2*	8.97	80	23
	401.2	147.2	8.97	80	39
可的松醋酸酯	403.2	163.2*	9.16	140	31
	403.2	343.2	9.16	140	26
地塞米松醋酸酯	435.3	415.2*	9.99	80	15
	435.3	337.0	9.99	80	17
氟轻松醋酸酯	495.2	337.2*	11.25	80	24
	495.2	121.1	11.25	80	60
氯倍他索丙酸酯	467.2	355.2	12.73	80	18
	467.2	373.2*	12.73	80	13
异氟泼尼松	379.2	359.3*	5.91	70	12
	379.2	341.3	5.91	70	18
泼尼松-D ₄	363.4	147.2*	5.88	58	28
可的松-D ₈	369.2	168.2*	6.07	140	34
倍他米松-D ₅	398.0	150.2*	7.29	60	33
地塞米松-D ₅	398.2	150.2*	7.40	80	37
氟米松-D ₃	414.4	253.3*	7.50	80	23
曲安奈德-D ₇	442.4	404.3*	7.98	80	21
地夫可特-D ₃	445.2	403.2*	9.06	80	36
丙酸氯倍他索-D ₅	472.2	373.1*	12.68	60	16
丙酸倍氯米松-D ₁₀	531.2	62.1*	13.57	44	74

注：*表示定量离子。

附录 D
(资料性)
标准图谱

激素类化合物的标准色谱图（11种目标物和9种同位素内标）见图D.1





标引序号说明：

- 1——泼尼松 (5.90 min)；
- 2——倍他米松 (7.35 min)；
- 3——地塞米松 (7.48 min)；
- 4——曲安奈德 (8.05 min)；
- 5——氢化可的松醋酸酯 (8.68 min)；
- 6——泼尼松醋酸酯 (8.97 min)；
- 7——可的松醋酸酯 (9.16 min)；
- 8——地塞米松醋酸酯 (9.99 min)；
- 9——氟轻松醋酸酯 (11.25 min)；
- 10——氯倍他索丙酸酯 (12.73 min)；
- 11——异氟泼尼松 (5.91 min)；
- 12——泼尼松-D₄ (5.88 min)；
- 13——可的松-D₈ (6.07 min)；
- 14——倍他米松-D₅ (7.29 min)；
- 15——地塞米松-D₅ (7.40 min)；
- 16——氟米松-D₃ (7.50 min)；
- 17——曲安奈德-D₇ (7.98 min)；
- 18——地夫可特-D₃ (9.06 min)；
- 19——丙酸氯倍他索-D₅ (12.68 min)；
- 20——丙酸倍氯米松-D₁₀ (13.57 min)；

图D.1 激素类化合物的标准色谱图（11种目标物和9种同位素内标）

附 录 E
(规范性)
方法检出限、定量限及定量内标的选定

方法检出限、定量限及定量内标的选定见表E.1。

表E.1 方法检出限、定量限及定量内标

序号	中文名称	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)	定量内标
1	泼尼松	2.50	8.32	泼尼松-D ₄
2	倍他米松	1.25	4.16	倍他米松-D ₅
3	地塞米松	0.85	2.83	地塞米松-D ₅
4	曲安奈德	0.75	2.50	曲安奈德-D ₇
5	氢化可的松醋酸酯	1.60	5.33	丙酸倍氯米松-D ₁₀
6	泼尼松醋酸酯	1.25	4.16	地夫可特-D ₃
7	可的松醋酸酯	1.00	3.33	可的松-D ₈
8	地塞米松醋酸酯	0.50	1.67	地塞米松-D ₅
9	氟轻松醋酸酯	0.45	1.50	氟米松-D ₃
10	氯倍他索丙酸酯	0.23	0.77	丙酸氯倍他索-D ₅
11	异氟泼尼松	0.60	2.00	泼尼松-D ₄

注：检测结果在方法定量限以上时，按照具体检出值报送结果；检测结果在方法检出限以下时，注明“未检出，检出限值”；检测结果在方法检出限以上、定量限以下时，注明“检出且小于定量限，定量限值，检出限值”。