

附件 3

化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法

Determination of L-Ascorbic acid 2-phosphate magnesium ester and other 11 kinds of components
in cosmetics

(征求意见稿)

1 范围

本方法规定了高效液相色谱法测定化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、苯乙基间苯二酚、4-丁基间苯二酚、甲氧基水杨酸钾、阿魏酸、烟酰胺、曲酸、3-邻-乙基抗坏血酸、鞣花酸、凝血酸11种原料的含量。

本方法第一部分适用于化妆品含水剂类、乳液类、凝胶类、面膜类、低含油量膏霜类(水基和水包油型)，高含油量膏霜类和粉底类(油包水型)化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、苯乙基间苯二酚、4-丁基间苯二酚、甲氧基水杨酸钾、阿魏酸、烟酰胺、曲酸、3-邻-乙基抗坏血酸、鞣花酸含量的测定。本方法第二部分适用于水剂类、膏霜类、乳液类、凝胶类、面膜类化妆品中凝血酸含量的测定。

第一部分 化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 10 种原料的检测

2 方法提要

样品经甲醇水溶液(或添加少量二氯甲烷促溶解)超声提取后,采用高效液相色谱系统分离,二极管阵列检测器(DAD)检测,根据保留时间定性,峰面积定量,以标准曲线法计算含量。

本方法中 10 种原料的检出限、定量下限及取样量为 0.5 g 时检出浓度和最低定量浓度见表1。

表1 10种原料的检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

序号	成分	检出限 (ng)	定量下限 (ng)	检出浓度 ($\mu\text{g/g}$)	最低定量浓度 ($\mu\text{g/g}$)
1	抗坏血酸磷酸酯镁	0.4	1.3	0.8	2.6
2	抗坏血酸葡萄糖苷	1.0	3.1	2.0	6.2
3	苯乙基间苯二酚	4.6	8.7	9.2	17.4
4	4-丁基间苯二酚	2.7	4.9	5.4	9.8
5	甲氧基水杨酸钾	0.4	1.0	0.8	2.0

6	阿魏酸	0.5	1.2	1.0	2.4
7	烟酰胺	1.0	3.3	2.0	6.6
8	曲酸	1.1	2.1	2.2	4.2
9	3-邻-乙基抗坏血酸	1.4	2.7	2.8	5.4
10	鞣花酸	2.7	6.1	5.4	12.2

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 甲醇，色谱纯。

3.2 磷酸二氢钾。

3.3 氢氧化钾。

3.4 二氯甲烷。

3.5 甲醇-水（1+1）溶液：移取 250 mL 甲醇（3.1）加入 250 mL 水，混匀，即得。

3.6 氢氧化钾溶液（1 g/L）：称取 0.5 g 氢氧化钾（3.3），置于1 L烧杯中，加入500 mL 水，用玻璃棒搅拌至溶解，即得。

3.7 抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、苯乙基间苯二酚、4-丁基间苯二酚、甲氧基水杨酸钾、阿魏酸、烟酰胺、曲酸、3-邻-乙基抗坏血酸、鞣花酸标准品（纯度大于 97 %）

3.8 流动相的配制：

流动相A：0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液；流动相B：甲醇；

3.9 标准储备溶液

3.9.1 分别称取上述标准品（抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、曲酸、烟酰胺、3-邻-乙基抗坏血酸、甲氧基水杨酸钾）（3.7） 100 mg（精确至0.01 mg），用适量水溶解并定容至 10 mL，配制成 10 mg/mL 的标准储备溶液，-18℃下避光保存，有效期 1 个月。

3.9.2 分别称取上述标准品（4-丁基间苯二酚、苯乙基间苯二酚、阿魏酸）（3.7）100 mg（精确至 0.01 mg），用适量甲醇（3.1）溶解并定容至 10 mL，配制成10 mg/mL 的标准储备溶液，-18℃下避光保存，有效期1个月。

3.9.3 称取鞣花酸（3.7）标准品 20 mg（精确至0.01mg）置于100 mL容量瓶中，以少量甲醇-水（1+1）溶液（3.5）溶解，用 1 g/L 氢氧化钾溶液（3.6）调节 pH 至10，用甲醇（3.1）稀释至刻度，配制成 200 µg/mL的标准储备液（现用现配）。

3.9.4 混合标准储备溶液的制备：精密移取上述标准储备溶液（3.9.1-3.9.2）（除鞣花酸）各 5 mL，置于100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，得 500 µg/mL的混合标准储备溶液，

转移至聚丙烯管中于-18℃下保存，有效期1个月，使用时稀释至所需质量浓度。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器（DAD）。

4.2 分析天平，感量分别为 0.1mg、0.01mg。

4.3 高速离心机（转速 \geq 14000 r/min）。

4.4 超声波清洗器。

4.5 涡旋振荡器。

4.6 台式pH计。

4.7 微孔滤膜（0.22 μm ）

5 分析步骤

5.1 混合标准工作溶液的制备

量取已配好的混合标准储备溶液（3.9.4） 1 mL，鞣花酸标准溶液（3.9.3） 2.5 mL，至于10 mL容量瓶中，用水稀释至刻度。再用水逐级稀释至6个系列浓度：1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.2 样品处理

水基、水包油型化妆品：准确称取化妆品试样 0.5 g（精确到 0.0001 g）于 15 mL 具塞比色管中，加入甲醇-水（1+1）溶液（3.5）至约 9 mL，涡旋振荡使试样与提取溶剂充分混匀，超声提取 20 min，冷却至室温。转移至10 mL容量瓶中，加入甲醇-水（1+1）溶液定容至刻度，混匀后转移至离心管中，以 12000 r/min 的转速离心 15 min。上清液经孔径 0.22 μm 的滤膜过滤后，滤液作为样品待测溶液。

油包水型化妆品：准确称取化妆品试样 0.5 g（精确到0.0001g）于 15 mL具塞比色管中，加入 3 mL 二氯甲烷（3.4），涡旋振荡至待样品完全分散后，加入甲醇-水（1+1）溶液（3.5）至约 9 mL，涡旋振荡使试样与提取溶剂充分混匀，超声提取 20 min，冷却至室温。转移上清液至 10 mL容量瓶中，加甲醇-水（1+1）溶液定容至刻度，混匀后转移至离心管中，以 12000 r/min 的转速离心 15 min。上清液经孔径 0.22 μm 的滤膜过滤后，滤液作为样品待测溶液。

5.3 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ），或等效色谱柱；

流动相：A：0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液；B：甲醇；

进样量：10 μL ；

流动相流速：1.0 mL/min；

柱温：25℃；

检测波长：烟酰胺为 230 nm，抗坏血酸磷酸酯镁、抗坏血酸葡萄糖苷、曲酸、3-邻-乙基抗坏血酸、甲氧基水杨酸钾、鞣花酸为 250 nm，阿魏酸、4-丁基间苯二酚、苯乙基间苯二酚为 280 nm；

洗脱方式：按表2进行梯度洗脱：

表2 梯度洗脱程序

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	95	5
3	95	5
8	60	40
14	40	60
18	30	70
25	95	5
30	95	5

5.4 测定

在“5.3”色谱条件下，取混合标准系列工作溶液（5.1）分别进样，进行色谱分析，以标准系列溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

取“5.2”项下的待测溶液进样，根据保留时间定性，测得峰面积，根据标准曲线得到待测溶液中各物质的浓度。按“6”计算样品中各物质的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

$$X=C \times \frac{V}{M} \times f \times 10^{-4}$$

式中：X——样品中被测组分的含量，%（g/100g）；

C——按标准曲线得到的被测组分溶液浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V——提取溶液的体积，mL；

M——样品称样量，g。

f ——样品溶液稀释倍数（如未稀释则为 1）

6.2 回收率和精密度

方法回收率为80%-114.8%，相对标准偏差小于10%。

7 图谱

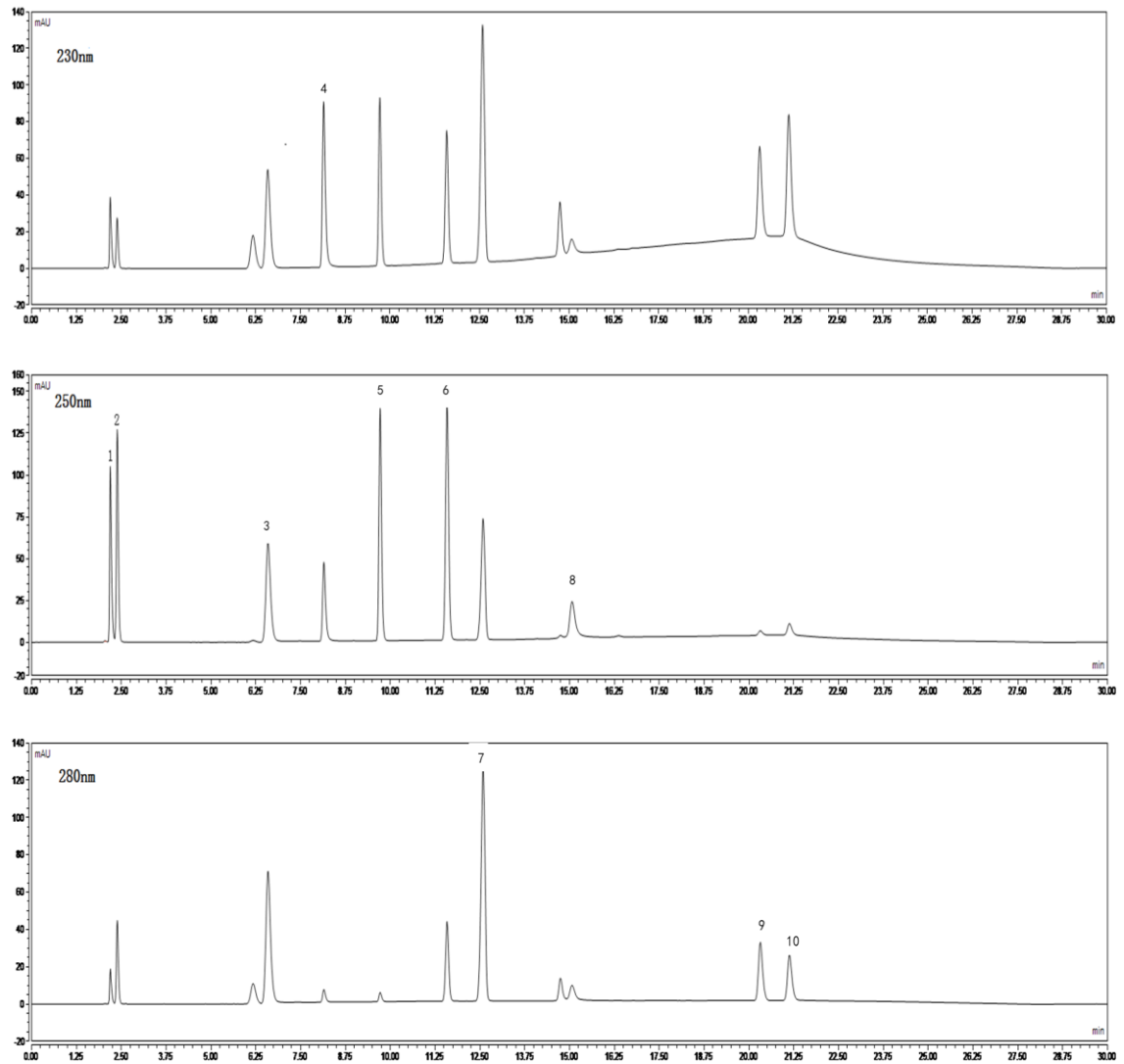


图1 标准溶液的液相色谱图

- 1: 抗坏血酸磷酸酯镁; 2: 抗坏血酸葡萄糖苷; 3: 曲酸; 4: 烟酰胺; 5: 3-邻-乙基抗坏血酸 ;
6: 甲氧基水杨酸钾; 7: 阿魏酸; 8: 鞣花酸; 9: 4-丁基间苯二酚; 10: 苯乙基间苯二酚;

第二部分 化妆品中凝血酸的检测

2 方法提要

样品经甲醇水溶液超声提取后,采用高效液相色谱系统分离,二极管阵列检测器(DAD),根据保留时间定性,峰面积定量,以标准曲线法计算含量。

本方法中凝血酸的检出限为 22.2 ng,定量下限为 48.0 ng,以取样量为 0.5 g 计时,检出浓度为 22.2 µg/g和最低定量浓度为 48.0 µg/g。

3 试剂和材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 甲醇,色谱纯。

3.2 磷酸二氢钾。

3.3 磷酸,优级纯

3.4 5% 甲醇溶液:移取 25 mL 甲醇(3.1)加入 500 mL 水,混匀,即得。

3.5 凝血酸标准品(纯度大于 97%)

3.6 流动相的配制:

A相 :B相=95 : 5 (A相: 0.05 mol/L KH_2PO_4 -0.2% H_3PO_4 溶液,取 KH_2PO_4 6.8g,加水1000 mL使溶解,加入2 mL H_3PO_4 ,混匀即得; B相: 甲醇)

3.7 标准储备溶液

精密称取 10 mg的凝血酸标准品于 10 mL容量瓶中,用超纯水溶解并定容,配制成 1 mg/mL 的标准储备溶液,4 °C 避光保存1个月。

4 仪器和设备

同第一部分 4.1-4.7。

5 分析步骤

5.1 标准工作溶液的制备

取凝血酸标准储备溶液(3.7) 1mL,用水逐级稀释至五个系列浓度:5 µg/mL ,10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL。

5.2 样品处理

准确称取化妆品试样 0.5 g (精确到 0.0001 g)于 15 mL 具塞比色管中,加入 5%甲醇

溶液(3.4)至约 9 mL, 涡旋振荡使试样与提取溶剂充分混匀, 超声提取 10 min, 冷却至室温。转移至 10 mL容量瓶中, 加 5 %甲醇溶液定容至刻度, 混匀后转移至离心管中, 以 12000 r/min的转速离心 10 min。上清液经孔径 0.22 μm 的滤膜过滤后, 滤液作为样品待测溶液。

5.3 参考色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 或等效色谱柱;

流动相: A相:B相 = 95:5 (A 相: 0.05 mol/L KH_2PO_4 -0.2% H_3PO_4 溶液, B 相: 甲醇)

进样量: 20 μL ;

流动相流速: 1.0 mL/min;

柱温: 30 $^\circ\text{C}$;

检测波长: 210 nm

5.4 测定

在“5.3”色谱条件下, 取标准系列工作溶液(5.1)分别进样, 进行色谱分析, 以标准系列溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

取“5.2”项下的待测溶液进样, 根据保留时间定性, 测得峰面积, 根据标准曲线得到待测溶液中凝血酸的浓度。按“6”计算样品中凝血酸的含量。

6 分析结果的表述

同第一部分 6.1 计算

6.2 回收率和精密度

方法回收率为87.1%-114.0%, 相对标准偏差小于10%。

7 图谱

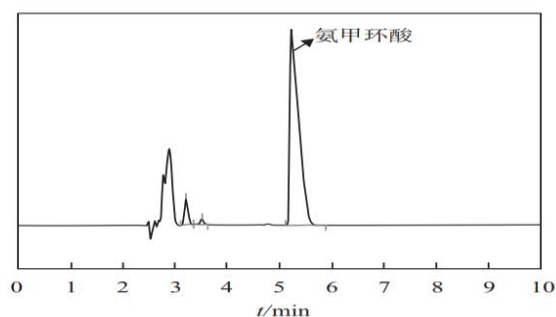
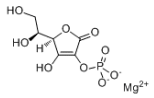
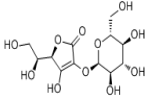
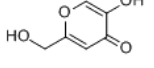
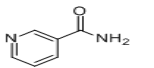
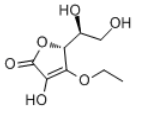
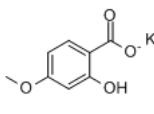
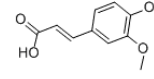
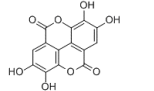
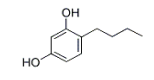
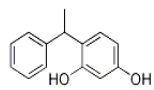
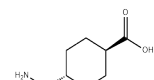


图2 凝血酸标准溶液的液相色谱图

附录A

(资料性附录)

抗坏血酸磷酸酯镁等11种原料标准物质基本信息表

序号	中文名称	CAS 登录号	分子式	精确分子量	结构式
1	抗坏血酸磷酸酯镁	113170-55-1	$Mg_3 \cdot (C_6H_6O_9P)_2$	579.08	
2	抗坏血葡萄糖苷	129499-78-1	$C_{12}H_{18}O_{11}$	338.26	
3	曲酸	501-30-4	$C_6H_6O_4$	142.11	
4	烟酰胺	98-92-0	$C_6H_6N_2O$	122.12	
5	3-邻-乙基抗坏血酸	86404-04-8	$C_8H_{12}O_6$	204.18	
6	甲氧基水杨酸钾	152312-71-5	$C_8H_7KO_4$	206.24	
7	阿魏酸	1135-24-6	$C_{10}H_{10}O_4$	194.18	
8	鞣花酸	476-66-4	$C_{14}H_6O_8$	302.19	
9	4-丁基间苯二酚	18979-61-8	$C_{10}H_{14}O_2$	166.22	
10	苯乙基间苯二酚	85-27-8	$C_{14}H_{14}O_2$	214.26	
11	凝血酸	701-54-2 (1197-18-8)	$C_8H_{15}NO_2$	157.21	

化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法

起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法的研究制定工作，现就工作有关情况说明如下：

一、 起草原则

本方法制订时，尽量采用目前化妆品实验室普遍具有的分析仪器，以便于方法的推广、执行。方法兼具先进性与可行性，条理清晰，操作性强，选择准确、可行、便于实际操作的分析条件，保证了检测方法的可操作性和重现性。

二、 起草过程

通过市场调研，结合以往工作经验和研究基础，于 2018 年开展了本方法的起草研究。2022 年 12 月完成了“化妆品中抗坏血酸磷酸酯镁等 11 种原料的检测方法”。

三、 与我国已有相关标准的关系

本方法参考 GB/T 35954-2018《化妆品中 10 种美白祛斑剂的测定 高效液相色谱法》，对前处理方法进行了改进，增加了原料种类，降低了方法检出浓度，进一步满足工作需求。制定后的方法将被《化妆品安全技术规范》收录。

四、 与《规范》中原方法的对比情况

无。

五、 国际相关标准情况

无。

六、 实验室验证情况

本实验室内部验证和三家实验室外部验证，通过了水剂类、乳液类、凝胶类、面膜类、膏霜类和粉底类 6 种化妆品基质的方法学实验，包括对方法的线性、检出浓度、最低定量浓度、精密度、回收率、稳定性等指标进行了验证。实验结果满足《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》（国食药监许[2010]455 号）和《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范》的要求。

七、 其它需要说明的问题

无。