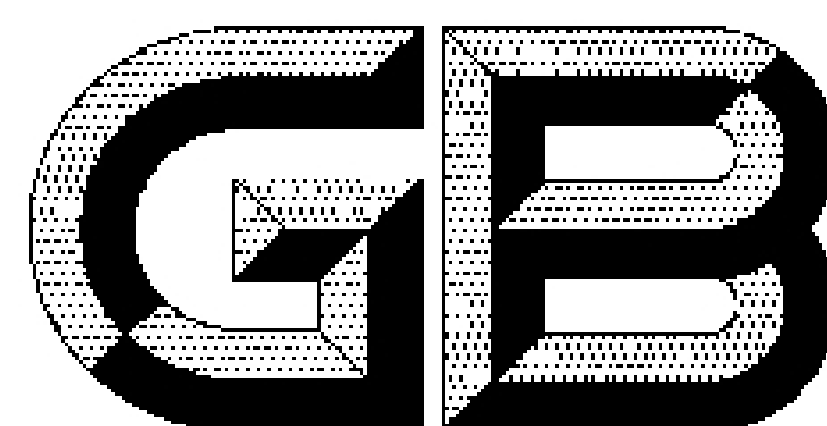




中华人民共和国国家标准

GB/T 37544—2019

化妆品中邻伞花烃-5-醇等 6 种酚类 抗菌剂的测定 高效液相色谱法

Determination of 6 kinds of phenolic antibacterial agent including
o-cymen-5-ol in cosmetics—High performance liquid chromatography

2019-06-04 发布

2020-01-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)归口。

本标准起草单位：江苏省产品质量监督检验研究院、苏州世谱检测技术有限公司、无限极(中国)有限公司、上海市日用化学工业研究所、广州华鑫检测技术有限公司、欧诗漫生物股份有限公司、完美(广东)日用品有限公司、广州质量监督检测研究院、苏州质量检测科学研究院、江苏省食品药品监督检验研究院。

本标准主要起草人：张晓强、卢剑、黄金凤、孙红梅、寻知庆、李晓敏、代丹、廖华勇、沈敏、张丽华、戴结玲、张征、邹洁、杨安全、袁利文、彭玉睿、李海、赵春晓、王常捷、康薇、武中平、杨洋、曲梅、孙姗姗、曹倩文、叶竹洪、施兵、叶嘉荣、汪晨霞、刘香梅、陈意光、冼燕萍、侯向昶、吴玉銮、郭新东。

引 言

本标准的被测物质苯酚、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚是我国《化妆品安全技术规范(2015年版)》规定的禁用物质。

禁用物质是指不能作为化妆品生产原料即组分添加到化妆品中的物质。《化妆品安全技术规范(2015年版)》规定:若技术上无法避免禁用物质作为杂质带入化妆品时,应进行安全性风险评估,确保在正常、合理及可预见的使用条件下不得对人体健康产生危害。

目前我国尚未规定这些物质的限量值,本标准的制定,仅对化妆品中测定这些物质提供检测方法。



化妆品中邻伞花烩-5-醇等 6 种酚类 抗菌剂的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚 6 种酚类抗菌剂的高效液相色谱测定方法的原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤、结果计算、回收率与精密度、允许差等内容。

本标准适用于化妆品中苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚 6 种酚类抗菌剂的测定。

本标准的方法检出限和定量限：水剂类、乳液类、膏霜类、粉类化妆品中苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚的方法检出限为 2.5 mg/kg，方法定量限为 8.5 mg/kg；蜡基类化妆品中苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚的方法检出限为 5.0 mg/kg，方法定量限为 17.0 mg/kg。

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

3 原理

试样中的苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚经溶剂提取，离心过滤后，用配有二极管阵列检测器的高效液相色谱仪测定，保留时间和光谱图定性，外标法定量。高效液相色谱-质谱/质谱法确证。

4 试剂和材料

- 4.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 甲酸：色谱纯。
- 4.4 乙酸铵：色谱纯。
- 4.5 乙腈水溶液：准确量取 70 mL 乙腈(4.2)和 30 mL 水，混匀后备用。
- 4.6 标准物质：纯度不小于 98%。苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烩-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚的中文名称、INCI 名称(国际化妆品原料名称)、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及化学结构式参见附录 A 表 A.1。
- 4.7 混合标准工作溶液：分别准确称取适量标准物质(4.6)(精确至 0.1 mg)，用乙腈(4.2)配制成质量浓度为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液(于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，可保存 6 个月)。准确吸取各标准储备溶液 500.0 μL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈水溶液(4.5)定容，混匀，得到混合标准储备溶液(100.0 $\mu\text{g/mL}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存)。准确移取适量混合标准储备溶液，用乙腈水溶液(4.5)逐级稀释成质量浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、

0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.00 μg/mL、2.50 μg/mL、5.00 μg/mL、10.0 μg/mL 和 50.0 μg/mL 的系列混合标准工作溶液(现配现用)。

4.8 微孔滤膜:孔径为 0.22 μm 的有机过滤膜。

5 仪器设备

实验室常规设备,及下列仪器:

- a) 高效液相色谱(HPLC)仪:配有二极管阵列检测器;
- b) 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪;
- c) 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g;
- d) 涡旋振荡器;
- e) 超声波清洗仪:超声功率 250 W;
- f) 离心机:最大转速不低于 4 000 r/min。

6 试验步骤

6.1 试样处理

6.1.1 水剂类、乳液类、膏霜类、粉类化妆品

称取试样 0.2 g(精确至 0.001 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中,加乙腈水溶液(4.5)至 5.0 mL,涡旋振荡 2 min,超声提取 10 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜,待测定。

6.1.2 蜡基类化妆品

称取试样 0.1 g(精确至 0.001 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中,加入 0.5 mL 四氢呋喃,涡旋至样品全部溶解,再加乙腈水溶液(4.5)至 5.0 mL,涡旋振荡 2 min,超声提取 10 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜,待测定。

6.2 测定条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:多环芳烃专用色谱柱,5 μm,250 mm×4.6 mm(内径),或相当者;
- b) 流动相:乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液[用甲酸(4.3)调至 pH 5.0],梯度洗脱程序参见表 1;
- c) 流速:1.2 mL/min;
- d) 柱温:30 ℃;
- e) 检测波长:280 nm;
- f) 进样量:20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH5.0)/%	乙腈/%
0.0	80	20
7.0	70	30
10.0	65	35
20.0	65	35
23.0	10	90

表 1 (续)

时间/min	10 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH5.0)/%	乙腈/%
30.0	10	90
31.0	80	20
39.0	80	20

6.3 标准工作曲线绘制

按测定条件(6.2)对系列混合标准工作溶液(4.7)进行测定,以色谱峰的峰面积为纵坐标,对应的溶液浓度为横坐标作图,绘制标准工作曲线。

6 种标准物质的高效液相色谱图参见附录 B 图 B.1。

6.4 试样测定

按测定条件(6.2)对试样溶液进行测定,试样溶液中的被测物根据保留时间和光谱图定性。由试样溶液的峰面积,从标准曲线上查出相应的被测物浓度。试样溶液中被测物的响应值均应在仪器测定的线性范围之内,超出线性范围的试样溶液需用乙腈水溶液(4.5)稀释后再测定。必要时,用高效液相色谱-质谱/质谱法进行确证实验,参见附录 C。

6.5 空白试验

除不加入试样外,均按 6.1~6.2 进行测定。

7 结果计算

按式(1)计算试样中被测物的含量:



$$w = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- w —— 试样中各被测物的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ —— 试样溶液中各被测物峰面积对应的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- ρ₀ —— 空白试验中各被测物的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V —— 定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量,单位为克(g)。

计算结果精确至小数点后一位数字。

8 回收率与精密度

水剂类、乳液类、膏霜类、粉类化妆品中,苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烃-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚在添加浓度为 8.5 mg/kg~85.0 mg/kg 范围内,回收率在 80%~110%之间,相对标准偏差小于 10%;

蜡基类化妆品中,苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烃-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚在添加浓度为 17.0 mg/kg~170.0 mg/kg 范围内,回收率在 80%~110%之间,相对标准偏差小于 10%。

9 允许差

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

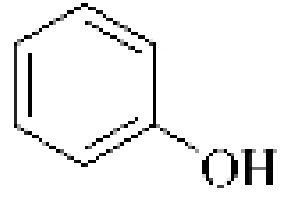
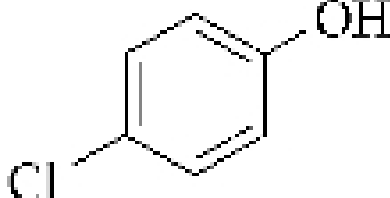
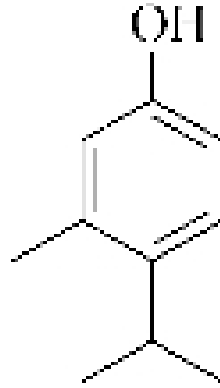
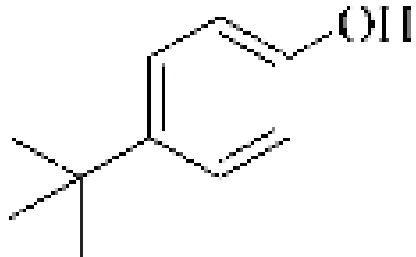
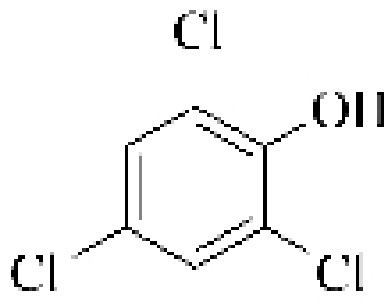
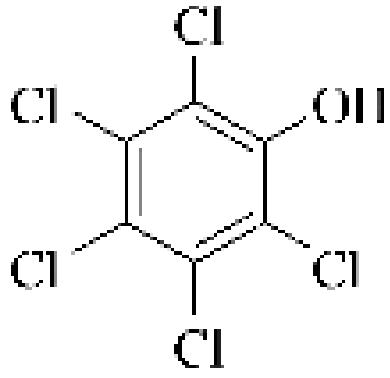
附 录 A

(资料性附录)

6 种酚类抗菌剂标准物质的信息

6 种酚类抗菌剂的中文名称、INCI 名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及化学结构式参见表 A.1。

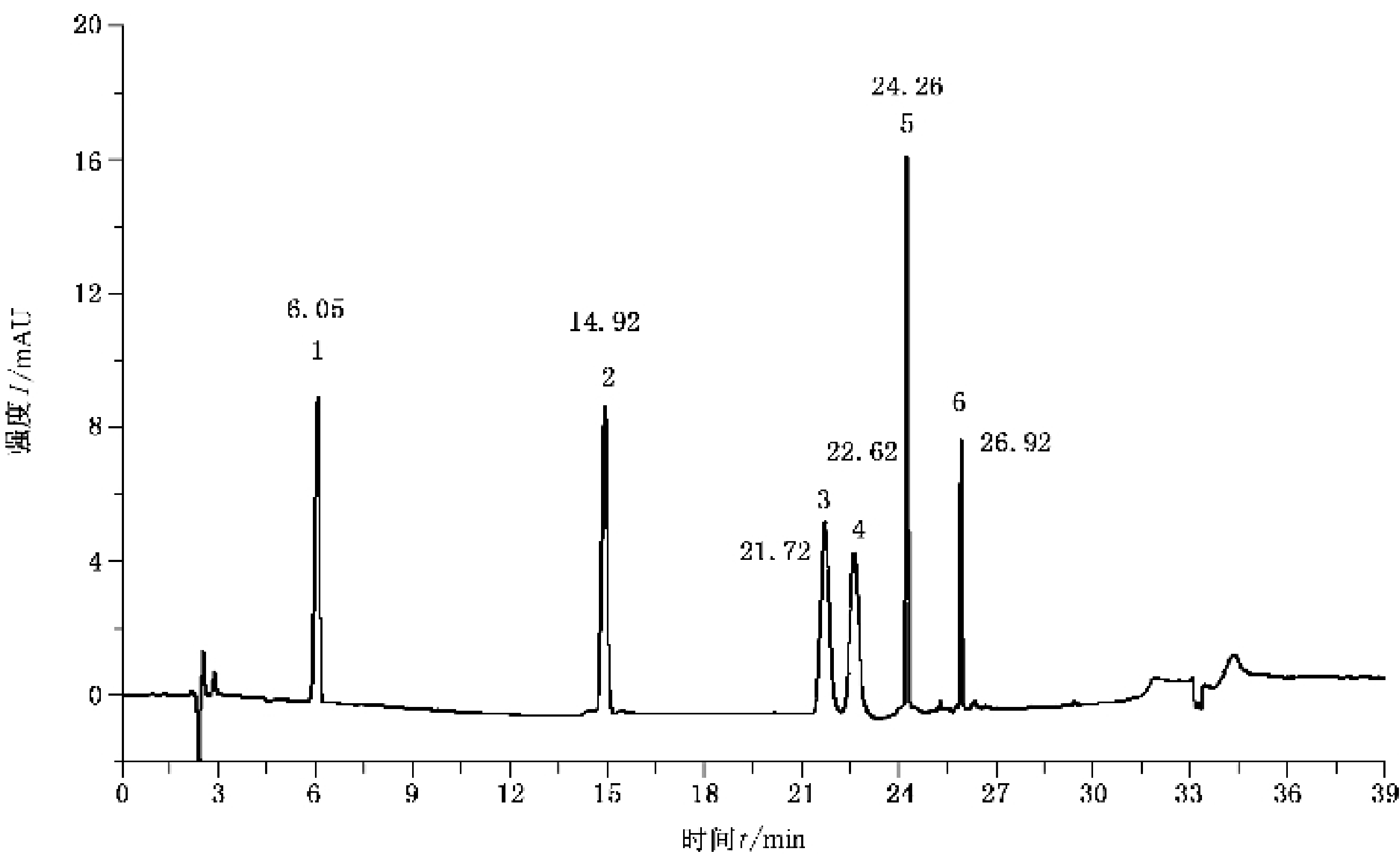
表 A.1 6 种酚类抗菌剂的中文名称、INCI 名称/英文名称、CAS 号、分子式、
相对分子质量及化学结构式

中文名称	INCI 名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	化学结构式
苯酚	—	phenol	108-95-2	C ₆ H ₅ OH	94.1	
对氯间甲酚	<i>p</i> -chloro- <i>m</i> -cresol	4-chloro- <i>m</i> -cresol	59-50-7	C ₇ H ₇ ClO	142.6	
邻伞花烃-5-醇	<i>o</i> -cymen-5-ol	4-isopropyl- <i>m</i> -cresol	3228-02-2	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	
4-叔丁基苯酚	—	4- <i>tert</i> -butylphenol	98-54-4	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	
2,4,6-三氯苯酚	—	2,4,6-trichlorophenol	88-06-2	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.5	
五氯苯酚	—	pentachlorophenol	87-86-5	C ₆ HCl ₅ O	266.3	

附 录 B
(资料性附录)

苯酚、对氯间甲酚、邻伞花烃-5-醇、4-叔丁基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚高效液相色谱图

6 种酚类抗菌剂的高效液相色谱图参见图 B.1。



说明：

- 1——苯酚；
- 2——对氯间甲酚；
- 3——邻伞花烃-5-醇；
- 4——4-叔丁基苯酚；
- 5——2,4,6-三氯苯酚；
- 6——五氯苯酚。

图 B.1 6 种酚类抗菌剂的高效液相色谱图



附 录 C
(资料性附录)
确 证 试 验

C.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱： C_{18} 柱， $1.7\ \mu\text{m}$ ， $150\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}$ (内径)；
- b) 流动相： $5\ \text{mmol}$ 乙酸铵水溶液+乙腈=60+40(体积比)；
- c) 流速： $0.3\ \text{mL/min}$ ；
- d) 柱温： $30\ ^\circ\text{C}$ ；
- e) 进样量： $5\ \mu\text{L}$ 。

C.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 电喷雾电压： $-4\ 500\ \text{V}$ ；
- d) 离子源温度： $500\ ^\circ\text{C}$ ；
- e) 气帘气：氮气， $0.207\ \text{MPa}$ ；
- f) 碰撞气：氮气， $0.055\ \text{MPa}$ ；
- g) 检测方式：多反应监测(MRM)。

6 种酚类抗菌剂的保留时间、定量离子对、定性离子对、去簇电压、碰撞电压参见表 C.1。6 种酚类抗菌剂标准品溶液的提取离子色谱图参见图 C.1。

表 C.1 6 种酚类抗菌剂的质谱 MRM 模式优化参数

目标物	保留时间/min	定量离子对 (m/z)	定性离子对 (m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
苯酚	2.37	93.0/65.0	93.0/93.0	-75.0	-5.0，-24.0
对氯间甲酚	5.10	141.0/105.0	141.0/114.0	-75.0	-50.0，-21.0
邻伞花烃-5-醇	8.20	149.1/133.0	149.1/117.0	-75.0	-63.0，-21.0
4-叔丁基苯酚	8.59	149.1/133.0	149.1/117.0	-75.0	-63.0，-21.0
2,4,6-三氯苯酚	4.56	196.9/161.0	196.9/123.0	-75.0	-39.0，-30.0
五氯苯酚	3.69	265.8/265.8	263.6/263.6	-75.0	-5.0，-5.0

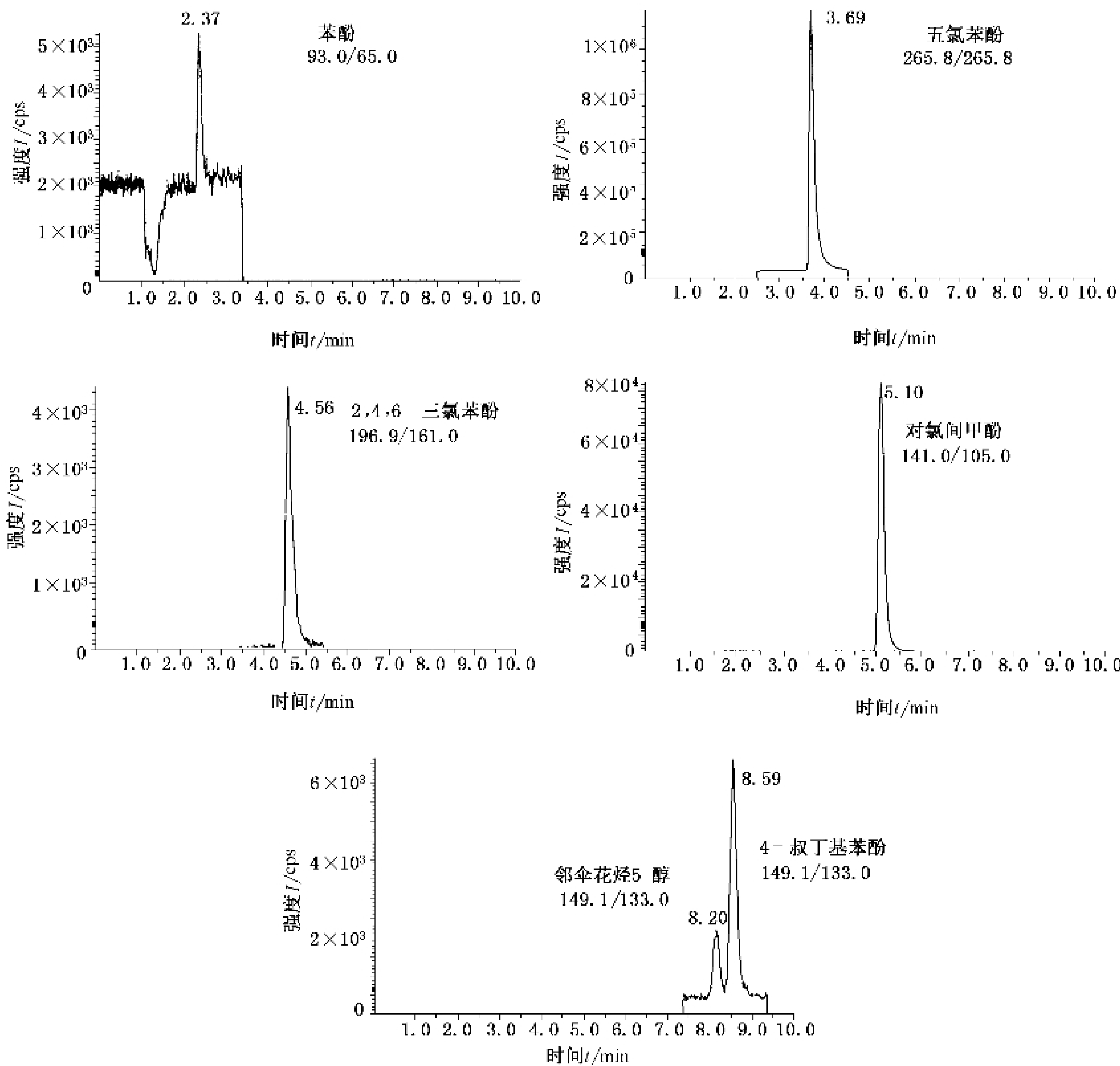


图 C.1 6 种酚类抗菌剂的提取离子色谱图

C.3 定性测定

进行试样测定时,将试样适当稀释,按液相色谱-质谱/质谱条件测定样液和标准工作溶液,如果检出色谱峰的保留时间与标准物质的一致,并且在扣除背景后的样品质谱图中,所选择的离子均出现,而且选择离子的相对丰度与标准物质的进行比较,相对偏差不超过表 C.2 规定的范围,则可判断样品中存在这些酚类抗菌剂。

表 C.2 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

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