



中华人民共和国国家标准

GB/T 37628—2019

化妆品中黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和 连翘酯苷 A 的测定 高效液相色谱法

Determination of astragaloside, paeoniflorin, forsythin and forsythoside A 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：河北省食品检验研究院(国家果类及农副加工产品质量监督检验中心)、苏州世谱检测技术有限公司、上海市日用化学工业研究所。

本标准主要起草人：张岩、李挥、曹梅荣、孙文毅、吴春敏、赵晓雅、刘亮、刘红冉、孟志娟、王娟、王岩、张春林、代丹。



化妆品中黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 含量的高效液相色谱的定性定量检测方法的原理、设备和材料、分析步骤、结果计算、回收率和精密度、允许差等内容。

本标准适用于水剂、乳液、膏霜中黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 含量的测定。

本标准方法对于黄芪甲苷的检出限为 15 mg/kg,定量限为 45 mg/kg;芍药苷的检出限为 3 mg/kg,定量限为 8 mg/kg;连翘苷和连翘酯苷 A 的检出限为 20 mg/kg,定量限为 60 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 黄芪甲苷

3.1 原理

黄芪甲苷用热水溶解后经水饱和的正丁醇提取,氨试液洗涤,C₁₈固相萃取柱净化,高效液相色谱仪分离,蒸发光散射检测器测定,外标法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.2.1 甲醇。

3.2.2 20%甲醇溶液:量取甲醇(3.2.1)20 mL 与 80 mL 水混合。

3.2.3 正丁醇:分析纯。

3.2.4 乙腈。

3.2.5 氨水。

3.2.6 氨试液:取氨水(3.2.5)400 mL,用去离子水定容至 1 L。

3.2.7 黄芪甲苷标准物质:纯度不小于 96%。黄芪甲苷的中英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式参见附录 A 中表 A.1。

3.2.8 黄芪甲苷标准工作溶液:准确称取 100 mg 黄芪甲苷标准物质(3.2.7)(精确到 0.1 mg)置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成浓度为 1 000 mg/L 的黄芪甲苷标准储备溶液,于 4℃避光保存,有效期 2 个月。分别精确移取黄芪甲苷标准储备溶液 2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、10 mL、50 mL 于 100 mL 棕色容量瓶后,用甲醇定容至刻度,配制质量浓度分别为 20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、500 mg/L 的黄芪甲苷标准工作溶液,于 4℃避光保存,可使用一周。

3.2.9 C₁₈固相萃取柱:200 mg,3 mL。

3.2.10 微孔滤膜:0.45 μm ,有机相。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高效液相色谱仪:配蒸发光散射检测器。

3.3.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g。

3.3.3 高速冷冻离心机。

3.3.4 具塞锥形瓶:250 mL。

3.4 分析步骤

3.4.1 样品处理

3.4.1.1 提取

称取 2.5 g 样品(准确至 0.001 g)置于具塞锥形瓶(3.3.4)中,加入 50 mL 热水($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$),振摇使之最大化分散,分别以 60 mL、40 mL、40 mL、40 mL 用水饱和的正丁醇振摇 4 次,合并正丁醇液,用氨试液(3.2.6)洗涤 3 次(加入氨试液是为除去含酚羟基的成分和其他酸性干扰物质),每次 40 mL,弃去氨液,回收正丁醇至干(减压浓缩至干),残渣加水 10 mL 复溶。

3.4.1.2 净化

C_{18} 固相萃取柱(3.2.9)依次用 5 mL 甲醇(3.2.1)和 5 mL 水预处理,取黄芪甲苷水复溶液过固相萃取柱,先用 3 mL 去离子水洗涤,然后用 20% 甲醇溶液(3.2.2)5 mL 洗涤,弃去洗涤液。用甲醇(3.2.1)20 mL 洗脱,收集洗脱液,洗脱液挥干溶剂,用甲醇(3.2.1)定容至 5 mL,取 1 mL 过微孔滤膜(3.2.10)待测。

3.4.2 测定条件

高效液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:ODS C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);或相当者;
- b) 流动相:乙腈(3.2.4)-水(32+68,体积比);
- c) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- d) 流速:1 mL/min;
- e) 进样量:20 μL ;
- f) 蒸发光散射检测条件:漂移管温度:60 $^{\circ}\text{C}$;载气流量:1.8 mL/min;放大系数:2。

3.4.3 标准曲线的绘制

黄芪甲苷标准工作溶液(3.2.8)按照浓度由低到高顺序进行测定。以进样质量的常用对数值为横坐标,峰面积的常用对数值为纵坐标进行线性回归,得到标准曲线。

3.4.4 测定

按照 3.4.2 的测定条件对待测物进行测定,用外标法定量。待测液中黄芪甲苷的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样测定。根据保留时间定性,根据峰面积进行定量。黄芪甲苷标准物质的液相色谱图参见附录 B 中图 B.1。

3.4.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

3.5 结果计算

分析结果按式(1)计算:

$$w = \frac{c \times V}{m}$$

.....(1)

式中:
w ——化妆品中黄芪甲苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
c ——测定成分黄芪甲苷质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
V ——样品定容体积,单位为毫升(mL);
m ——样品取样量,单位为克(g)。

3.6 回收率和精密度

添加水平 50 mg/kg~500 mg/kg 范围时,黄芪甲苷的回收率在 80.8%~98.2%之间,相对标准偏差小于 10%。



3.7 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%。

4 芍药苷

4.1 原理

芍药苷经甲醇超声提取,高效液相色谱仪分离,紫外检测器检测,外标法定量。

4.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.2.1 甲醇。
- 4.2.2 乙腈。

4.2.3 0.1%磷酸水溶液:取 1 mL 磷酸(分析纯)于 1 L 容量瓶中,用去离子水定容至刻度,过 0.45 μm 滤膜。

4.2.4 芍药苷标准物质:纯度不小于 96%。芍药苷的中英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式参见表 A.1。

4.2.5 芍药苷标准工作溶液:准确称取 100 mg 芍药苷标准物质(4.2.4)(精确到 0.1 mg)置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成浓度为 1 000 mg/L 的芍药苷标准储备溶液,于 4 ℃避光保存,有效期 2 个月。分别精确移取标准储备溶液 0.1 mL、0.3 mL、1.2 mL、3 mL、6 mL、12 mL 于 100 mL 棕色容量瓶后,用甲醇定容至刻度,配制成浓度分别为 1 mg/L、3 mg/L、12 mg/L、30 mg/L、60 mg/L 和 120 mg/L 的芍药苷标准工作溶液,于 4 ℃避光保存,可使用一周。

4.2.6 微孔滤膜:0.45 μm,有机相。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器(或等效检测器)。
- 4.3.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g。
- 4.3.3 超声波清洗器。
- 4.3.4 具塞离心管:50 mL。

4.4 分析步骤

4.4.1 样品处理

准确称取 1.00 g(准确至 0.001 g)化妆品样品(保湿水、保湿乳液和保湿霜)于 50 mL 具塞离心管中(4.3.4),加入 15 mL 甲醇(4.2.1)振荡、摇匀,在超声波清洗器(4.3.3)中超声提取 30 min,放置室温用甲醇定容 25 mL,摇匀,过 0.45 μm 滤膜(4.2.6),待测。

4.4.2 测定条件

高效液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:ODS C_{18} , (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);或相当者。
- b) 流动相:0.1%磷酸水溶液(4.2.3)-乙腈(4.2.2)(85+15,体积比),等度洗脱。
- c) 流速:1.0 mL/min。
- d) 检测波长:232 nm。
- e) 进样量:10 μL 。
- f) 柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.4.3 标准曲线的绘制

芍药苷标准工作溶液(4.2.5),按 4.4.2 的测定条件浓度由低到高进样测定,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。

4.4.4 测定

按照 4.4.2 的测定条件对待测物进行测定,用外标法定量。待测液中芍药苷的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样测定。根据保留时间定性,根据峰面积进行定量。芍药苷标准物质的液相色谱图参见图 B.2。

4.4.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

4.5 结果计算

分析结果按式(2)计算:

$$w = \frac{c \times V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

w ——化妆品中芍药苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——测定成分芍药苷质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——样品定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品取样量,单位为克(g)。

4.6 回收率和精密度

添加水平 8 mg/kg~50 mg/kg 范围时,芍药苷的回收率在 87.3%~102.9%之间,相对标准偏差小于 10%。

4.7 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%。

5 连翘苷和连翘酯苷 A

5.1 原理

连翘苷和连翘酯苷 A 经甲醇超声提取,高效液相色谱仪分离,紫外检测器检测,外标法定量。

5.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 甲醇。

5.2.2 50%甲醇溶液:量取甲醇(5.2.1)50 mL 和 50 mL 水,混合。

5.2.3 1%乙酸溶液:量取乙酸 1 mL 和 99 mL 水,混合。

5.2.4 连翘苷和连翘酯苷 A 标准物质:纯度不小于 96%。连翘苷和连翘酯苷 A 的中英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式参见表 A.1。

5.2.5 连翘苷和连翘酯苷 A 标准工作溶液:准确称取 100 mg 连翘苷标准品(精确到 0.1 mg),用 50%甲醇(5.2.2)溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,制得浓度为 1 000 mg/L 的连翘苷标准储备溶液(于 4℃避光保存,有效期 2 个月)。准确称取准确称取 100 mg 连翘酯苷 A 标准品(精确到 0.1 mg),用 50%甲醇(5.2.2)溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,制得浓度为 1 000 mg/L 的连翘酯苷 A 标准储备溶液(于 4℃避光保存,有效期 2 个月)。分别精确移取连翘苷标准储备溶液和连翘酯苷 A 标准储备溶液 0.2 mL、0.5 mL、1 mL、1.2 mL、1.5 mL、2 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用 50%甲醇(5.2.2)定容至刻度,制得浓度为 2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、12 mg/L、15 mg/L 和 20 mg/L 标准工作溶液(于 4℃避光保存,可使用一周)。

5.2.6 微孔滤膜:0.45 μm,有机相。

5.3 仪器和设备

5.3.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器(或等效检测器)。

5.3.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g。

5.3.3 超声波清洗仪。

5.3.4 高速冷冻离心机。

5.3.5 氮吹仪。

5.4 分析步骤

5.4.1 样品处理

精确称取 1.0 g(准确至 0.001 g)试样于 50 mL 容量瓶中,用 50%甲醇(5.2.2)定容至刻度,超声波清洗仪(5.3.3)超声提取 10 min,取上清液 10 mL 于 1 0000 r/min 离心 5 min,取 5 mL 上层清液氮吹至小于 1 mL,用甲醇(5.2.1)定容至 1 mL,过微孔滤膜(5.2.6)后待测。

5.4.2 测定条件

高效液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:ODS C₁₈柱,250 mm×4.6 mm(内径),5 μm;或相当者;

- b) 流动相:甲醇(5.2.1)-1%乙酸溶液(5.2.3)(70+30,体积比),等度洗脱;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 检测波长:280 nm;
- e) 柱温:30 ℃;
- f) 进样量:20 μL。

5.4.3 标准曲线的绘制

连翘苷和连翘酯苷 A 标准工作溶液(5.2.5),按 5.4.2 的测定条件浓度由低到高进样测定,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。

5.4.4 测定

按照 5.4.2 的测定条件对待测物进行测定,用外标法定量。待测液中连翘苷和连翘酯苷 A 的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样测定。根据保留时间定性,根据峰面积进行定量。连翘苷和连翘酯苷 A 标准物质的液相色谱图参见图 B.3。

5.4.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

5.5 结果计算

分析结果按式(3)计算:

$$w = \frac{c \times V}{m} \quad \text{SZIC} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- w ——化妆品中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c ——测定成分连翘苷和连翘酯苷 A 质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V ——样品定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品取样量,单位为克(g)。

5.6 回收率和精密度

添加水平 100 mg/kg~500 mg/kg 范围时,连翘苷的回收率在 81.6%~103%之间,连翘酯苷 A 的回收率在 87.7%~109.2%之间,相对标准偏差小于 10%。

5.7 允许差

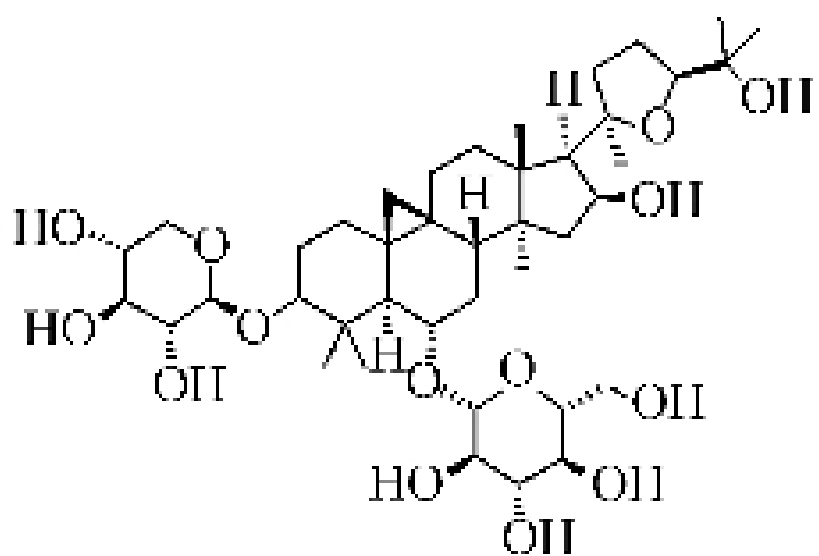
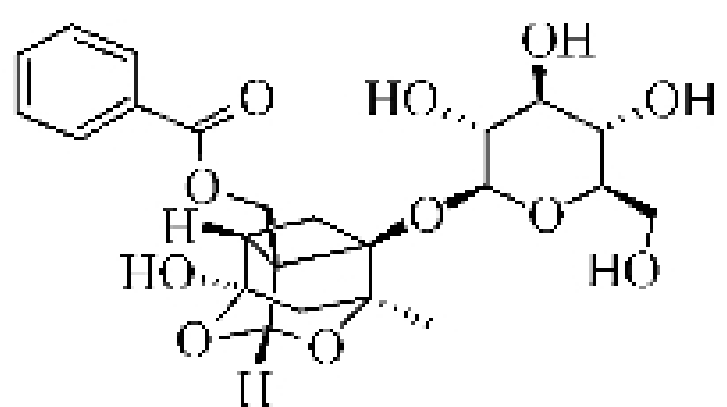
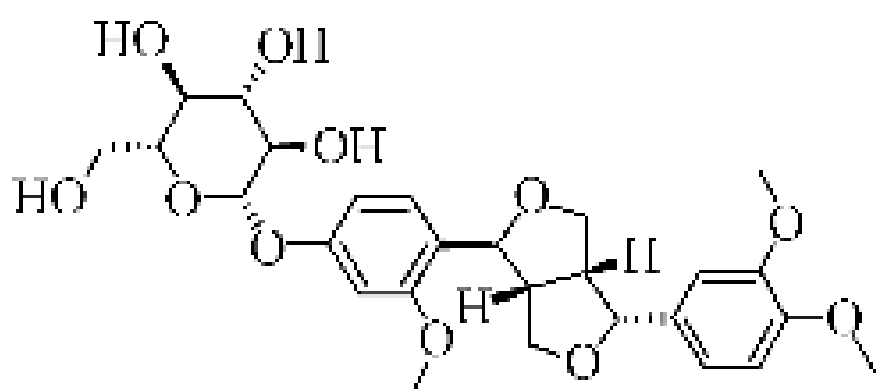
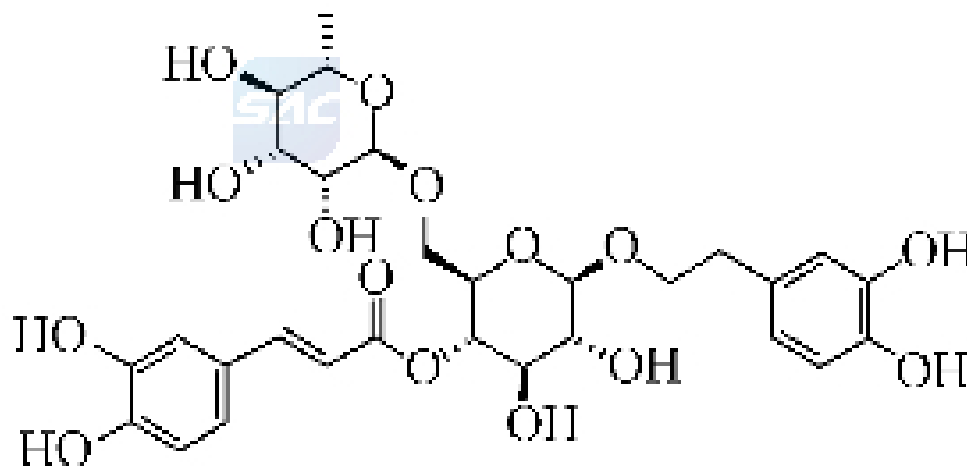
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)

黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 的中英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 的中英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式见表 A.1。

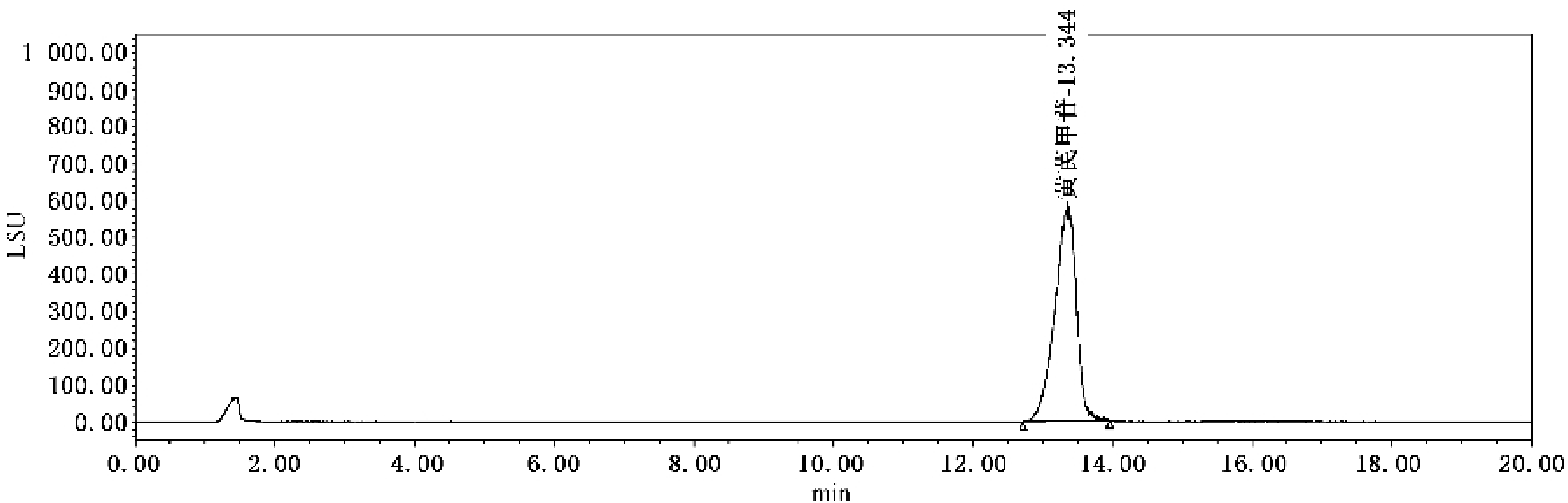
表 A.1 黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 的中英文名称、CAS 号、分子式、
相对分子质量和结构式

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	结构式
1	黄芪甲苷	astragaloside	84687-43-4	$C_{41}H_{68}O_{14}$	784.97	
2	芍药苷	paeoniflorin	23180-57-6	$C_{23}H_{28}O_{11}$	480.46	
3	连翘苷	forsythin	487-41-2	$C_{27}H_{34}O_{11}$	534.55	
4	连翘酯苷 A	forsythoside A	79916-77-1	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.59	

附 录 B
(资料性附录)

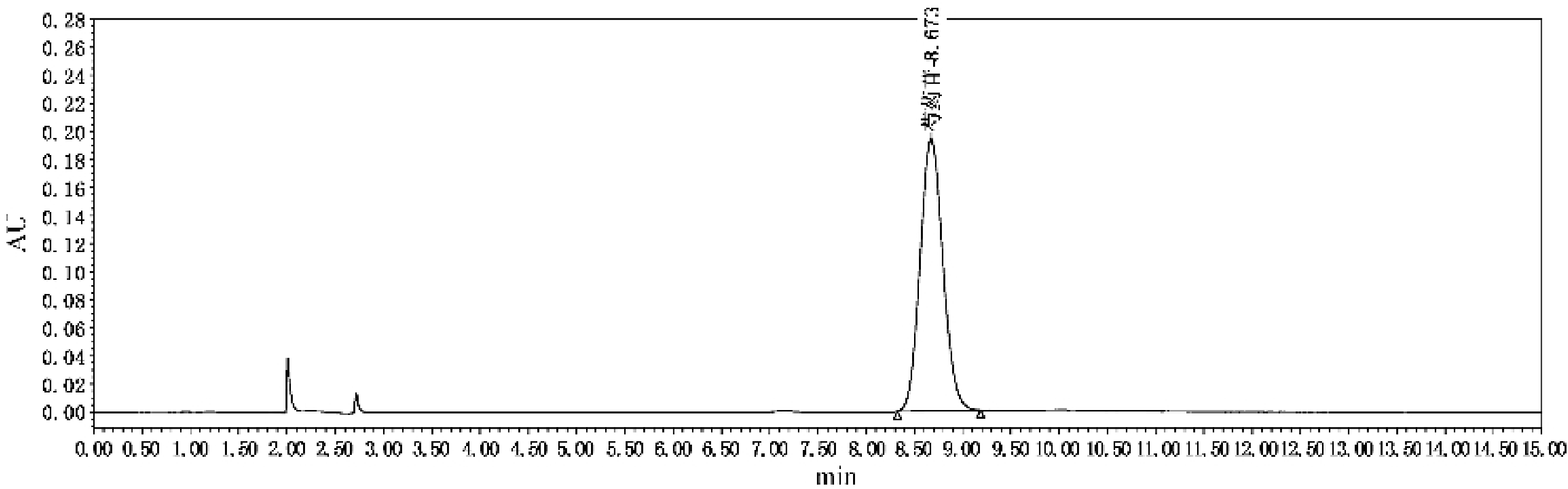
黄芪甲苷、芍药苷、连翘苷和连翘酯苷 A 标准物质的液相色谱图

黄芪甲苷标准物质的液相色谱图参见图 B.1。芍药苷标准物质的液相色谱图参见图 B.2。连翘苷和连翘酯苷 A 标准物质的液相色谱图参见图 B.3。



黄芪甲苷出峰时间为 13.34 min。

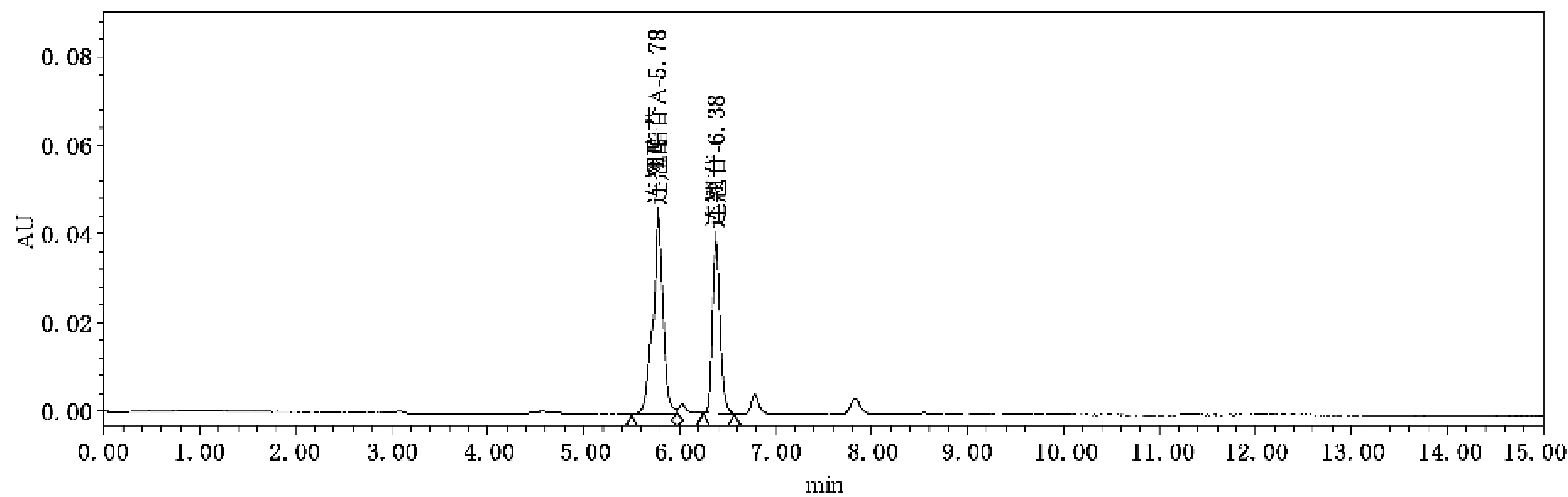
图 B.1 黄芪甲苷标准物质的液相色谱图



芍药苷出峰时间为 8.67 min。

图 B.2 芍药苷标准物质的高效液相色谱图





连翘苷出峰时间为 6.38 min,连翘酯苷 A 出峰时间为 5.78 min。

图 B.3 连翘苷和连翘酯苷 A 标准物质的高效液相色谱图
