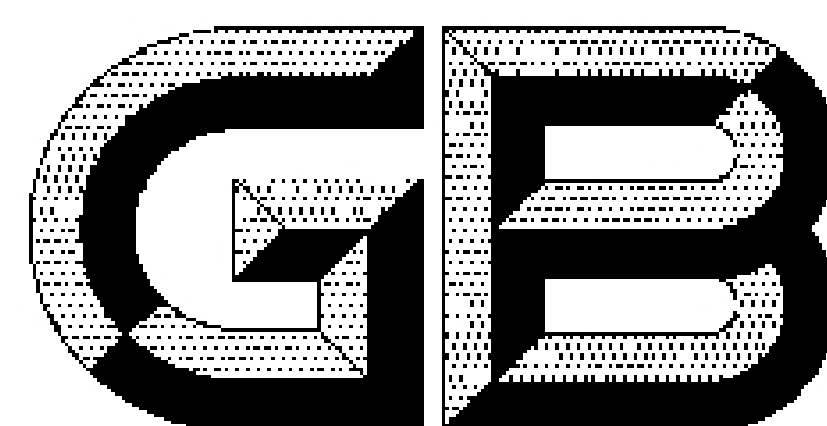




中华人民共和国国家标准

GB/T 35798—2018

化妆品中香豆素及其衍生物的测定 高效液相色谱法

Determination of coumarin and its derivatives in cosmetics—
High performance liquid chromatography

2018-02-06 发布

2018-09-01 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：中国检验检疫科学研究院、上海市日用化学工业研究所。
本标准主要起草人：孟宪双、马强、王宏伟、吕庆、李俊芳、李亚辉、王峰、沈敏。



引 言

本标准的部分被测物质(双香豆素、7-甲氧基香豆素、二氢香豆素、醋硝香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素和环香豆素)是我国《化妆品安全技术规范》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》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。



化妆品中香豆素及其衍生物的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中香豆素及二氢香豆素等 7 种香豆素衍生物的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于水剂、膏霜、香波、散粉和唇膏类化妆品中香豆素及二氢香豆素等 7 种香豆素衍生物的测定。

本标准的检出限和定量限：香豆素的检出限为 4 mg/kg，定量限为 8 mg/kg；二氢香豆素的检出限为 10 mg/kg，定量限为 20 mg/kg；7-甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、环香豆素、双香豆素和醋硝香豆素的检出限为 5 mg/kg，定量限为 10 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

试样经溶剂提取、离心、微孔滤膜过滤后，用高效液相色谱测定，外标法定量，液相色谱-质谱确认。

4 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 二氯甲烷。

4.4 四氢呋喃。

4.5 乙酸铵。

4.6 冰醋酸。

4.7 氢氧化钠。

4.8 0.05 mol/L 乙酸铵溶液：称取 1.925 g 乙酸铵(4.5)，加水溶解后转移至 500 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，备用。

4.9 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 0.400 g 氢氧化钠(4.7)，加水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中，定容至刻度。

4.10 0.1 mol/L 氢氧化钠-乙腈混合溶液(1+9)(体积+体积)：量取 90 mL 乙腈(4.1)至 100 mL 容量瓶中，加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.9)至刻度，混匀。

4.11 香豆素、二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、环香豆素、双香豆素和醋硝香豆素的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、结构式和相对分子质量参见附录 A 中的

表 A.1,标准品纯度均不小于 98%。

4.12 香豆素及其衍生物的标准储备溶液(1 000 mg/L):分别称取各标准品(4.11)10 mg(精确至 0.1 mg)至 10 mL 容量瓶中,除双香豆素先用 5 mL 二氯甲烷(4.3)溶解,再用乙腈(4.1)定容至刻度外,其余标准品均以甲醇(4.2)溶解并定容至刻度,于 4 °C 避光保存,可使用 3 个月。

4.13 香豆素及其衍生物的混合标准溶液:分别移取 1 mL 香豆素及其衍生物的标准储备液(4.12)至 10 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,根据需要用甲醇(4.2)稀释成适宜浓度的混合标准工作溶液,于 4 °C 避光保存,可使用 3 个月。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱(HPLC)仪:配有二极管阵列检测器。

5.2 液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.3 超声波水浴。

5.4 离心机:转速不低于 5 000 r/min。

5.5 涡旋混合器。

5.6 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.001 g。

5.7 具塞比色管:25 mL。

5.8 具塞塑料离心管:10 mL。

5.9 微孔滤膜:0.45 μm,有机相。

6 测定步骤



6.1 样品处理

6.1.1 水剂、膏霜、香波和散粉类样品

称取 0.5 g(精确至 0.001 g)试样于 25 mL 具塞比色管(5.7)中,加入 8 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠-乙腈混合溶液(4.10),涡旋混合后,在超声波水浴(5.3)中超声提取 30 min,以冰醋酸(4.6)调节 pH 至中性,并用乙腈定容至 10 mL 刻度,混匀。取部分溶液转移至 10 mL 具塞塑料离心管(5.8)中,以 5 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜(5.9)过滤,供高效液相色谱测定。

6.1.2 唇膏类样品

称取 0.5 g(精确至 0.001 g)试样于 25 mL 具塞比色管(5.7)中,加入 2 mL 四氢呋喃(4.4),涡旋混合后再加入 6 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠-乙腈混合溶液(4.10),涡旋混合,以下步骤同 6.1.1。

6.2 测定条件

高效液相色谱测定条件如下:

- a) 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈, 5 μm, 250 mm × 4.6 mm(内径),或相当者;
- b) 流动相:见表 1;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:30 °C;
- e) 检测波长:香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素和环香豆素:280 nm,双香豆素和醋硝香豆素:306 nm,7-甲氧基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素:320 nm;
- f) 进样量:10 μL。

表 1 流动相

步骤	时间/min	0.05 mol/L 乙酸铵溶液 (含 0.25%乙酸)/%	乙腈/%
0	0	70	30
1	5.0	55	45
2	8.0	50	50
3	8.2	10	90
4	13.0	10	90
5	13.2	5	95
6	16.0	5	95
7	16.2	70	30
8	18.0	70	30
注：%表示体积分数。			

6.3 标准曲线的绘制

用甲醇(4.2)将香豆素及其衍生物的混合标准溶液逐级稀释得到浓度为 0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL 的混合标准工作溶液,按 6.2 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。

香豆素及其衍生物的高效液相色谱图参见附录 B 中的图 B.1。

6.4 测定

按 6.2 的测定条件对待测样液进行测定,用外标法定量。待测试样中对香豆素及其衍生物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分析。进行样品测定时,如果检出香豆素或其衍生物的色谱峰保留时间与标准品相一致,并且在扣除背景后的样品色谱图中,该物质的紫外吸收光谱与标准品一致,则可初步确认样品中存在被测香豆素或其衍生物。必要时,阳性样品需用液相色谱-质谱进行确认试验,试验方法参见附录 C。

6.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

7 结果计算

结果按式(1)计算,计算结果保留两位小数(计算结果应扣除空白值):

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

.....(1)

式中:

- W ——化妆品中香豆素或其衍生物的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c ——从标准工作曲线上查出的样液中被测香豆素或其衍生物的浓度,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 ——试样的质量,单位为克(g)。

8 检出限和定量限

本标准的检出限和定量限:香豆素的检出限为 4 mg/kg,定量限为 8 mg/kg;二氢香豆素的检出限为 10 mg/kg,定量限为 20 mg/kg;7-甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素、环香豆素、双香豆素和醋硝香豆素的检出限为 5 mg/kg,定量限为 10 mg/kg。

9 回收率和精密度

在添加浓度 8 mg/kg ~ 200 mg/kg 范围内,回收率在 86.5% ~ 100.7%之间,相对标准偏差为 0.8% ~ 9.7%。

10 允许差

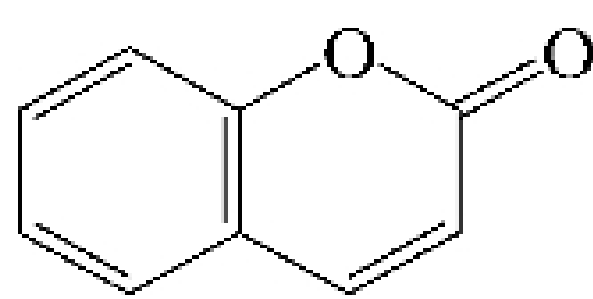
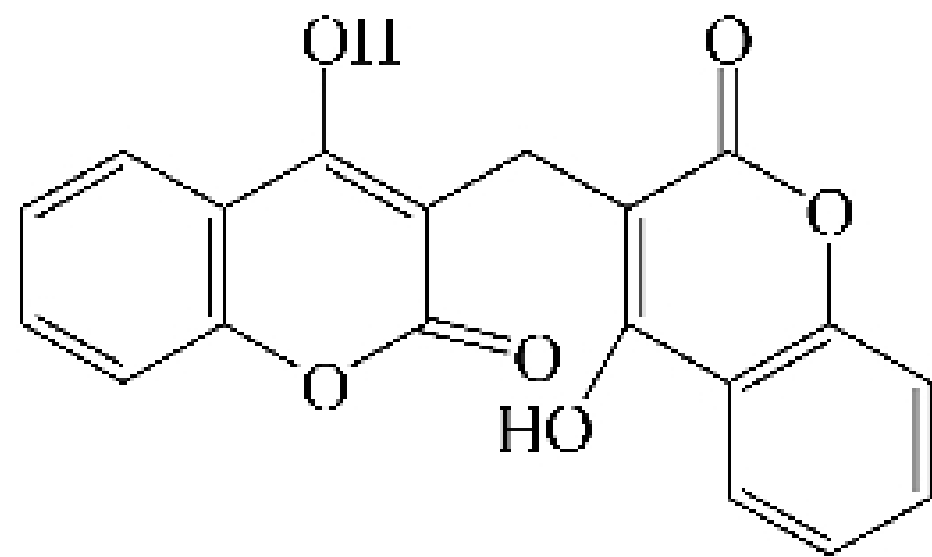
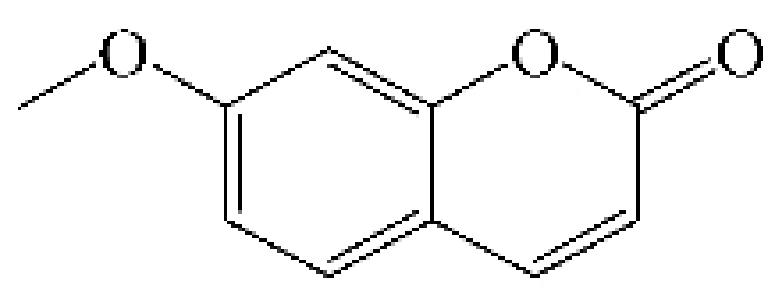
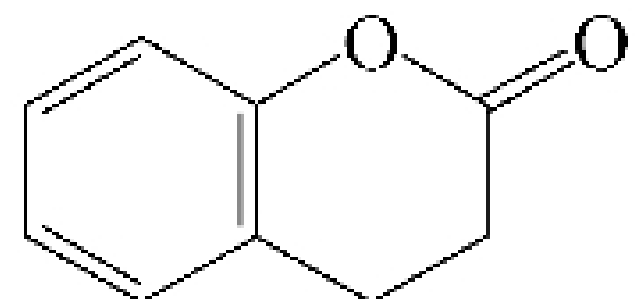
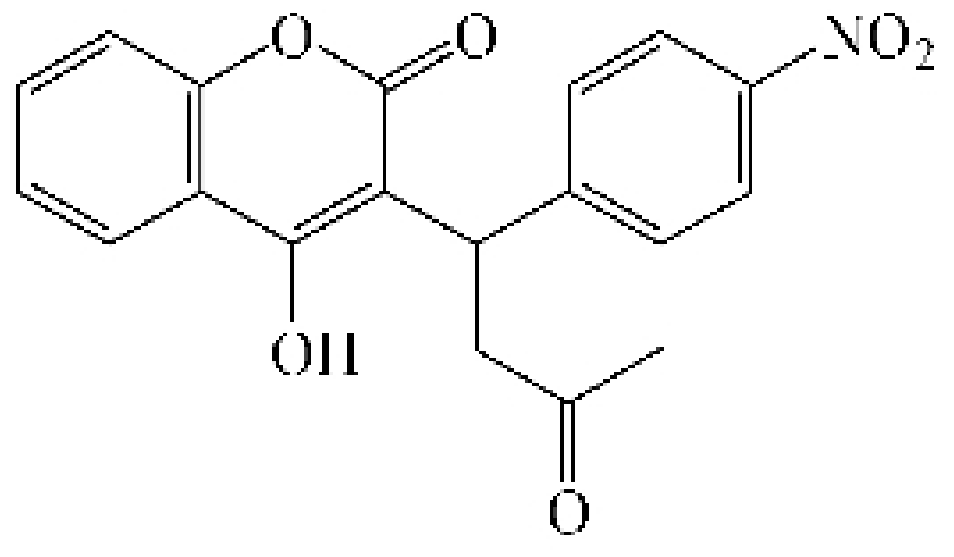
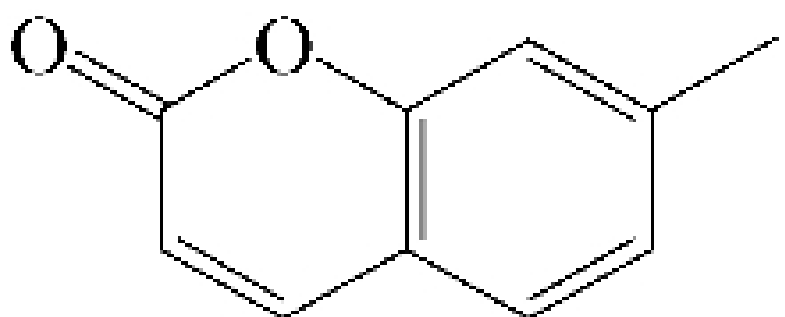
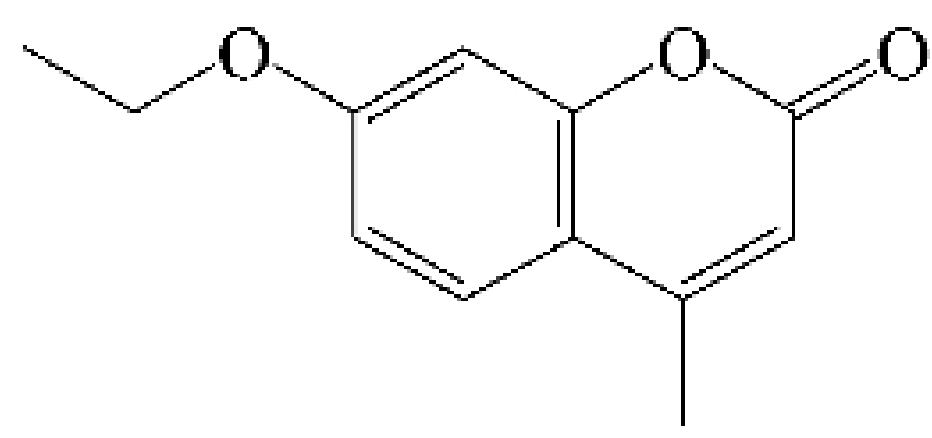
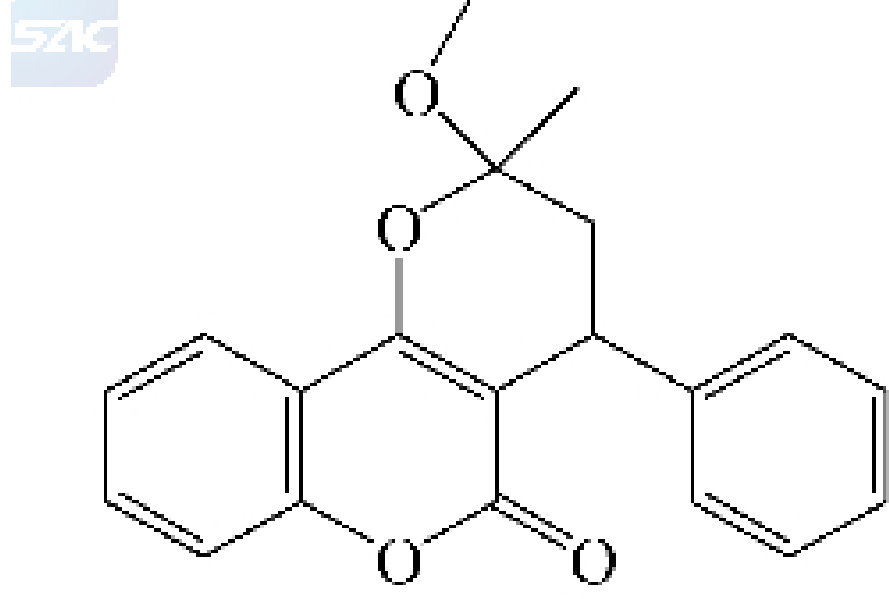
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)

香豆素及其衍生物的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、结构式和相对分子质量

香豆素及其衍生物的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、结构式和相对分子质量见表 A.1。

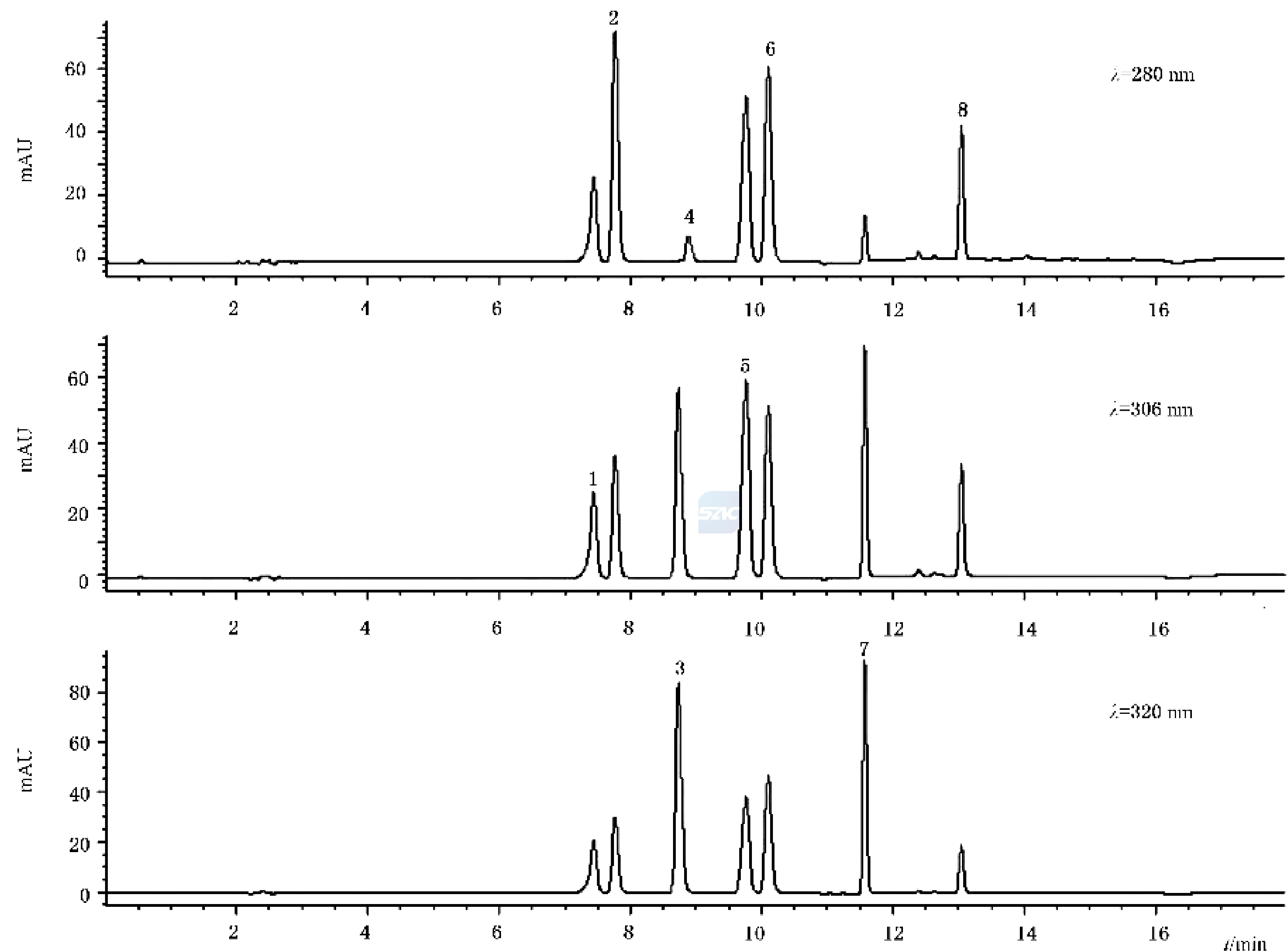
表 A.1 香豆素及其衍生物的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、结构式和相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	结构式	相对分子质量
香豆素	Coumarin	91-64-5	C ₉ H ₆ O ₂		146.15
双香豆素	Dicoumarolum	66-76-2	C ₁₉ H ₁₂ O ₆		336.30
7-甲氧基香豆素	7-Methoxycoumarin	531-59-9	C ₁₀ H ₈ O ₃		176.17
二氢香豆素	Dihydrocoumarin	119-84-6	C ₉ H ₈ O ₂		148.17
醋硝香豆素	Acenocoumarol	152-72-7	C ₁₉ H ₁₅ NO ₆		353.33
7-甲基香豆素	7-Methylcoumarin	2445-83-2	C ₁₀ H ₈ O ₂		160.17
7-乙氧基-4-甲基香豆素	7-Ethoxy-4-methylcoumarin	87-05-8	C ₁₂ H ₁₂ O ₃		204.22
环香豆素	Pyranocoumarin	518-20-7	C ₂₀ H ₁₈ O ₄		322.35

附录 B
(资料性附录)

香豆素及其衍生物的高效液相色谱图

香豆素及其衍生物的高效液相色谱图见图 B.1。



- 说明：
- 1——双香豆素；
 - 2——香豆素；
 - 3——7-甲氧基香豆素；
 - 4——二氢香豆素；
 - 5——醋硝香豆素；
 - 6——7-甲基香豆素；
 - 7——7-乙氧基-4-甲基香豆素；
 - 8——环香豆素。

图 B.1 香豆素及其衍生物的高效液相色谱图

附 录 C
(资料性附录)
确 认 试 验

C.1 液相色谱条件

液相色谱测定参考条件如下：

- a) 色谱柱：XBridge C₁₈柱,3.5 μm,150 mm × 2.1 mm(内径),或相当者；
- b) 流动相：见表 C.1；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：35 ℃；
- e) 进样量：5 μL。

表 C.1 流动相

步骤	时间/min	水/%	乙腈/%
0	0	70	30
1	4.5	35	65
2	5.0	5	95
3	6.0	5	95
4	6.1	70	30
5	8.0	70	30

C.2 质谱条件

质谱测定参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离；
- b) 毛细管电压：3.0 kV；
- c) 萃取电压：3.0 V；
- d) 射频透镜电压：0.0 V；
- e) 离子源温度：150 ℃；
- f) 脱溶剂气：氮气,流速 1 000 L/h,温度 500 ℃；
- g) 锥孔气：氮气,流速 50 L/h；
- h) 碰撞气：氩气；
- i) 扫描模式：多反应监测,香豆素及其衍生物的保留时间、电离方式、定性离子对、定量离子对、锥孔电压、碰撞能量、相对丰度和允许偏差参见表 C.2。

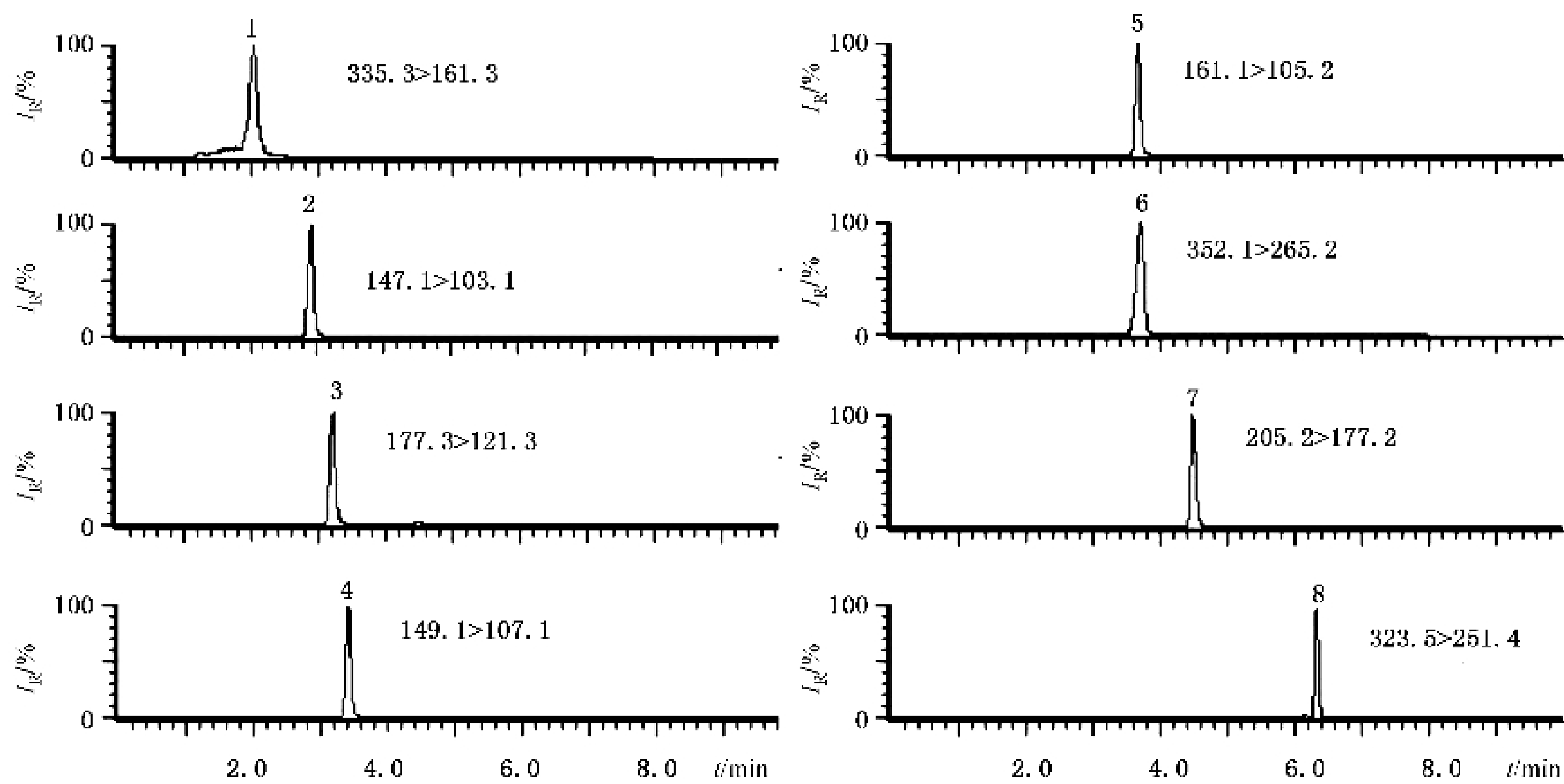
表 C.2 香豆素及其衍生物的保留时间、电离方式、定性离子对、定量离子对、锥孔电压、碰撞能量、相对丰度和允许偏差

中文名称	保留时间 min	电离方式	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV	相对丰度 %	允许偏差 %
双香豆素	2.04	ESI ⁻	335.3/161.3 335.3/117.2	335.3/161.3	17	15 39	100 67	±20%
香豆素	2.92	ESI ⁺	147.1/103.1 147.1/91.1	147.1/103.1	26	16 22	100 72	±20%
7-甲氧基香豆素	3.23	ESI ⁺	177.3/121.3 177.3/133.3	177.3/121.3	30	22 17	100 46	±25%
二氢香豆素	3.41	ESI ⁺	149.1/121.1 149.1/107.1	149.1/107.1	26	15 16	21 100	±25%
7-甲基香豆素	3.66	ESI ⁺	161.1/105.2 161.1/117.2	161.1/105.2	26	20 15	100 58	±20%
醋硝香豆素	3.70	ESI ⁻	352.1/295.3 352.1/265.2	352.1/265.2	36	22 30	51 100	±20%
7-乙氧基-4-甲基香豆素	4.48	ESI ⁺	205.2/177.2 205.2/121.1	205.2/177.2	28	18 25	100 30	±25%
环香豆素	6.33	ESI ⁺	323.5/251.4 323.5/173.3	323.5/251.4	22	18 32	29 100	±25%

C.3 定性判定

按照上述条件测定试样和标准工作溶液，如果试样中的质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致（变化范围在±2.5%之内），且试样中目标化合物的两个子离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表 C.2 规定的范围，则可判断样品中存在对应的香豆素或其衍生物。

香豆素及其衍生物的选择离子质量色谱图参见图 C.1。



说明：

1——双香豆素；

2——香豆素；

3——7-甲氧基香豆素；

4——二氢香豆素；

5——7-甲基香豆素；

6——醋硝香豆素；

7——7-乙氧基-4-甲基香豆素；

8——环香豆素。

图 C.1 香豆素及其衍生物的选择离子质量色谱图