

## 附件 6

### 化妆品中葡糖醛酸等 14 种原料的检验方法

Determination of Glucuronic Acid and Other 13 Kinds of Components in Cosmetics

#### 1 范围

本方法规定了高效液相色谱法测定化妆品中葡糖醛酸等14种原料的含量。

本方法适用于液体类、凝胶类、膏霜乳类化妆品中葡糖醛酸等14种原料含量的测定。

本方法所指的14种原料包括葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2-羟基丁酸、乳酸甲酯、扁桃酸、乳酸乙酯、乳酸丁酯、二苯乙醇酸、柠檬酸三乙酯、羟基辛酸。

#### 2 方法提要

以水提取化妆品中葡糖醛酸等14种原料，用高效液相色谱仪进行分离，二极管阵列检测器检测，以保留时间和紫外光谱图定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

本方法中14种原料的检出限、定量下限及取样量为1.0 g，定容体积为10 mL时检出浓度和最低定量浓度见表1。

表1 14种原料的检出限、定量下限和检出浓度、最低定量浓度

序号	原料名称	检出限 ( $\mu\text{g}$ )	定量下限 ( $\mu\text{g}$ )	检出浓度 ( $\mu\text{g/g}$ )	最低定量浓度 ( $\mu\text{g/g}$ )
1	葡糖醛酸	0.08	0.24	160	480
2	酒石酸	0.03	0.09	60	180
3	羟基乙酸	0.02	0.06	40	120
4	苹果酸	0.02	0.06	40	120
5	乳酸	0.05	0.15	100	300
6	柠檬酸	0.02	0.06	40	120
7	2-羟基丁酸	0.04	0.12	80	240
8	乳酸甲酯	0.04	0.12	80	240
9	扁桃酸	0.001	0.003	2	6
10	乳酸乙酯	0.04	0.12	80	240
11	乳酸丁酯	0.04	0.12	80	240
12	二苯乙醇酸	0.001	0.003	2	6
13	柠檬酸三乙酯	0.04	0.12	80	240
14	羟基辛酸	0.02	0.06	40	120

### 3 试剂和材料

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

3.1 磷酸氢二铵。

3.2 磷酸，优级纯。

3.3 甲醇，色谱纯。

3.4 乙腈，色谱纯。

3.5 甲酸，色谱纯。

3.6 0.05 mol/L的磷酸氢二铵溶液：称取6.60 g磷酸氢二铵，加水1000 mL溶解，用0.22 μm滤膜过滤。

3.7 标准品：14种原料标准品信息详见附录A。

3.8 葡糖醛酸等9种组分混合标准储备溶液

分别精密称取（精确到0.0001 g）葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2-羟基丁酸、扁桃酸和二苯乙醇酸（3.7）适量于同一容量瓶中，加水适量，60 °C超声15 min使溶解，用水定容，摇匀，配制成混合标准储备溶液备用，转入棕色储液瓶中，4 °C避光保存，有效期1个月。标准储备溶液浓度见表2。

3.9 羟基辛酸单标标准储备溶液

精密称取（精确到0.0001 g）羟基辛酸（3.7）适量于容量瓶中，加水适量，60 °C超声15 min使溶解，用水定容，配制成单标标准储备溶液备用，转入棕色储液瓶中，4 °C避光保存，有效期1个月。标准储备溶液浓度见表2。

3.10 乳酸甲酯等3种组分混合标准储备溶液

分别精密称取（精确到0.0001 g）乳酸甲酯、乳酸乙酯、柠檬酸三乙酯（3.7）适量于同一容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，摇匀，配制成混合标准储备溶液备用，转入棕色储液瓶中，4 °C避光保存，有效期1个月。标准储备溶液浓度见表2。

3.11 乳酸丁酯单标标准储备溶液

精密称取（精确到0.0001 g）乳酸丁酯（3.7）适量于容量瓶中，加2 mL甲醇（3.3）溶解，用水定容，摇匀，配制成单标标准储备溶液备用，转入棕色储液瓶中，4 °C避光保存，有效期1个月。标准储备溶液浓度见表2。

### 4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器。

4.2 天平，感量分别为0.1 mg、0.01 mg。

4.3 超声波清洗器，功率100 W。

4.4 高速离心机，转速 $\geq 14000$  r/min。

4.5 pH计，精度0.01。

4.6 涡旋振荡器。

## 5 分析步骤

### 5.1 混合标准系列溶液的制备

分别精密移取不同体积的葡糖醛酸等 9 种组分混合标准储备溶液（3.8）、羟基辛酸单标准储备溶液（3.9）、乳酸甲酯等 3 种组分混合标准储备溶液（3.10）及乳酸丁酯单标准储备溶液（3.11）于 10 mL 容量瓶中，用水定容。标准系列溶液现用现配。标准系列溶液浓度见表 2。

表2 14种原料的标准储备溶液和标准系列浓度

原料名称	标准储备溶液浓度 (mg/mL)		混合标准系列溶液浓度 (mg/mL)					
葡糖醛酸	8	0.1	0.2	0.4	0.8	2	4	
酒石酸	4	0.05	0.1	0.2	0.4	1	2	
羟基乙酸	8	0.1	0.2	0.4	0.8	2	4	
苹果酸	8	0.1	0.2	0.4	0.8	2	4	
乳酸	10	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
柠檬酸	10	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
2-羟基丁酸	10	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
乳酸甲酯	50	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
扁桃酸	0.2	0.0025	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	
乳酸乙酯	40	0.1	0.2	0.4	0.8	2	4	
乳酸丁酯	50	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
二苯乙醇酸	0.2	0.0025	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	
柠檬酸三乙酯	50	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	
羟基辛酸	50	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5	

### 5.2 样品处理

称取混合均匀的样品1.0 g（精确到0.001 g）于10 mL具塞比色管中，加水至10 mL刻度，充分涡旋混合30 s，60 °C超声提取30 min，取适量样品在10000 r/min下高速离心15 min，取上清液过0.45 μm的滤膜，取续滤液作为待测溶液。如样品为油包水等难于在水中分散剂型，可先加入1 mL异丙醇涡旋混合30 s使分散均匀，再加水至10 mL刻度。

### 5.3 参考色谱条件

色谱柱：C<sub>18</sub>柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），或等效色谱柱；

流动相：A：0.05 mol/L的磷酸氢二铵溶液（3.6），用磷酸（3.2）调pH值为3.0；

B：甲醇；

检测波长：214 nm；

柱温：室温；

进样量：5 μL。

表3 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流速/mL/min	V（流动相A）/%	V（流动相B）/%
0	0.7	100	0
6.5	0.7	100	0
6.6	1.0	100	0
15	1.0	60	40
30	1.0	30	70
40	1.0	30	70
40.1	0.7	100	0
50	0.7	100	0

### 5.4 测定

在“5.3”色谱条件下，取混合标准系列溶液（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，根据保留时间和紫外光谱图定性，测得峰面积，根据标准曲线得到待测溶液中各原料的浓度。按“6”计算样品中各原料的含量。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 计算

#### 6.1.1 葡糖醛酸等10种α-羟基酸

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D}{m} \times 10^3$$

式中： $\omega$ ——化妆品中葡糖醛酸等10种 $\alpha$ -羟基酸原料的质量分数， $\mu\text{g/g}$ ；

$\rho$ ——从标准曲线得到待测原料的质量浓度， $\text{mg/mL}$ ；

$V$ ——样品定容体积， $\text{mL}$ ；

$m$ ——样品取样量， $\text{g}$ ；

$D$ ——稀释倍数（不稀释则取1）。

### 6.1.2 乳酸甲酯等3种乳酸酯类

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D \times 90.08}{m \times \text{各待测原料分子量}} \times 10^3$$

式中： $\omega$ ——化妆品中乳酸甲酯等3种乳酸酯类原料的质量分数（以乳酸计）， $\mu\text{g/g}$ ；

$m$ ——样品取样量， $\text{g}$ ；

$\rho$ ——从标准曲线得到待测原料的质量浓度， $\text{mg/mL}$ ；

$V$ ——定容体积， $\text{mL}$ ；

$D$ ——稀释倍数（不稀释则取1）；

90.08——乳酸的摩尔质量， $\text{g/mol}$ 。

### 6.1.3 柠檬酸三乙酯

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D \times 192.12}{m \times \text{待测原料分子量}} \times 10^3$$

式中： $\omega$ ——化妆品中柠檬酸三乙酯的质量分数（以柠檬酸计）， $\mu\text{g/g}$ ；

$m$ ——样品取样量， $\text{g}$ ；

$\rho$ ——从标准曲线得到待测原料的质量浓度， $\text{mg/mL}$ ；

$V$ ——定容体积， $\text{mL}$ ；

$D$ ——稀释倍数（不稀释则取1）；

192.12——柠檬酸的摩尔质量， $\text{g/mol}$ 。

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

## 6.2 回收率和精密度

方法回收率为85%~115%，相对标准偏差小于10%。

## 7 图谱

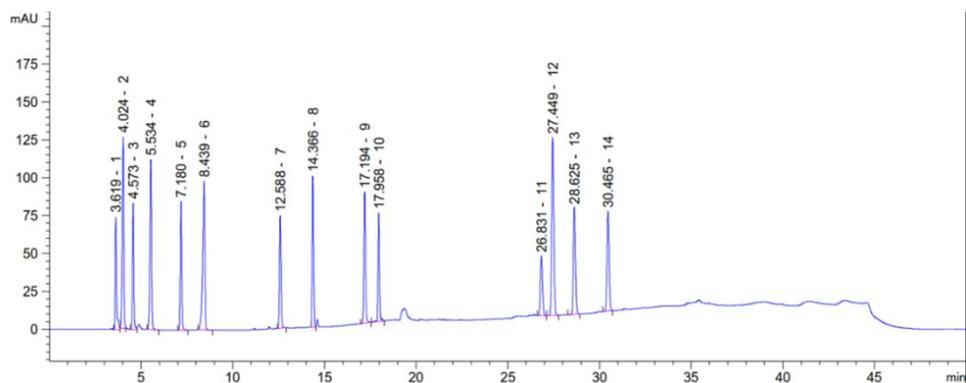


图1 14种混合标准溶液色谱图

1: 葡糖醛酸 (3.619 min); 2: 酒石酸 (4.024 min); 3: 羟基乙酸 (4.573 min); 4: 苹果酸 (5.534 min); 5: 乳酸 (7.180 min); 6: 柠檬酸 (8.439 min); 7: 2-羟基丁酸 (12.588 min); 8: 乳酸甲酯 (14.366 min); 9: 扁桃酸 (17.194 min); 10: 乳酸乙酯 (17.958 min); 11: 乳酸丁酯 (26.831 min); 12: 二苯乙醇酸 (27.449 min); 13: 柠檬酸三乙酯 (28.625 min); 14: 羟基辛酸 (30.465 min)

## 附录 A

(资料性附录)

## 葡糖醛酸等14种原料标准品信息表

表A.1 葡糖醛酸等14种原料标准品信息表

序号	中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子质量
1	葡糖醛酸	Glucuronic acid	6556-12-3	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	194.14
2	酒石酸	Tartaric acid	87-69-4	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	150.09
3	羟基乙酸	Glycolic acid	79-14-1	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	76.05
4	苹果酸	Malic acid	97-67-6	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	134.09
5	乳酸	Lactic acid	79-33-4	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90.08
6	柠檬酸	Citric acid	77-92-9	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192.12
7	2-羟基丁酸	2-Hydroxybutyric Acid	600-15-7	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	104.10
8	乳酸甲酯	Methyl lactate	547-64-8	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	104.11
9	扁桃酸	Mandelic acid	90-64-2	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152.15
10	乳酸乙酯	Ethyl lactate	97-64-3	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	118.13
11	乳酸丁酯	Butyl lactate	138-22-7	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	146.21
12	二苯乙醇酸	Benzilic acid	76-93-7	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228.24
13	柠檬酸三乙酯	Triethyl citrate	77-93-0	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	276.28
14	羟基辛酸	Hydroxycaprylic acid	617-73-2	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	160.21

注：标准品可能存在不同形式，其 CAS 号也会不同，当与目标成分不同时需进行必要的折算。

## 附录B

### (规范性附录)

#### 葡糖醛酸等14种原料阳性结果的确证

因 $\alpha$ -羟基酸极性大,紫外吸收接近截止波长,测定时易出现干扰,必要时可采用液相色谱-质谱法确证结果,以排除基质中其他组分的干扰。在相同的液相色谱-质谱实验条件下,如果样品中色谱峰的保留时间和紫外光谱图与标准溶液中对应成分一致(相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内),所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子对的相对丰度比的偏差不超过表B.1规定范围,则可以判定样品中存在对应的测定成分。

表 B.1 结果确证时相对离子丰度比的最大允许偏差

相对离子丰度 (k)	k > 50%	50% $\geq$ k > 20%	20% $\geq$ k > 10%	k $\leq$ 10%
允许的最大偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

#### B.1 仪器参考条件

##### B.1.1 色谱条件

色谱柱: C<sub>18</sub>柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m), 或等效色谱柱;

流动相: A: 乙腈(含0.1%甲酸); B: 0.1%甲酸水溶液;

表 B.2 流动相梯度洗脱程序

时间/min	V(流动相A)/%	V(流动相B)/%
0	0	100
4	0	100
15	95	5
17	95	5
17.1	0	100
22	0	100

流速: 0.2 mL/min;

柱温: 30  $^{\circ}$ C;

进样量: 5  $\mu$ L。

##### B.1.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI源);

监测模式: 正、负离子多反应监测模式; 监测离子对相关电压参数设定见表B.3;

鞘气流速: 11 L/min;

干燥气流速: 14 L/min;

鞘气温度：350 °C；

干燥气温度：230 °C；

碰撞气：Ar, 20 psi；

离子源电压（IS）电压：正离子：4000 V；负离子：3000 V。

表B.3 14种原料的监测离子对相关电压参数设定表

序号	组分名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE(V)
1	葡糖醛酸	193.2	113.1*	-14
			131.1	-11
2	酒石酸	149.1	73.0*	-14
			87.1	-18
3	羟基乙酸	75.2	47.1*	-16
			45.1	-15
4	苹果酸	133.2	115.0*	-16
			71.2	-17
5	乳酸	89.2	43.1*	-13
			45.1	-15
6	柠檬酸	191.1	111.1*	-12
			87.1	-11
7	2-羟基丁酸	103.2	57.1*	-13
			45.1	-16
8	乳酸甲酯	104.9	45.0*	9
			33.0	15
9	扁桃酸	151.2	107.1*	-15
			76.9	-23
10	乳酸乙酯	118.9	45.0*	17
			47.1	11
11	乳酸丁酯	147.3	45.1*	14
			63.0	8
12	二苯乙醇酸	227.1	183.2*	-15
			121.2	-9
13	柠檬酸三乙酯	299.2	210.7*	13
			178.7	15
14	羟基辛酸	159.2	113.2*	-16
			45.0	-17

\*为推荐的定量离子。

注：柠檬酸三乙酯母离子为加钠离子。当柠檬酸三乙酯母离子为加氢离子时，参考母离子为 277.1 m/z，子离子为 157.0\* m/z、203.1 m/z。CE 为 15 V、12 V。当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化。