附件3

化妆品中葡糖酸等3种原料的检验方法（征求意见稿）

Determination of Gluconic Acid and Other 3 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酸等3种原料的含量。

本方法适用于水剂类、凝胶类、膏霜乳液类化妆品中葡糖酸等3种原料含量的测定。

本方法所指的葡糖酸等3种原料包括葡糖酸、乳糖酸、葡糖酸内酯。

2 方法提要

以水提取化妆品中葡糖酸、葡糖酸内酯、乳糖酸等3种原料，在氢氧化钠的作用下葡糖酸、葡糖酸内酯、乳糖酸转化为葡糖酸盐和乳糖酸盐。用高效液相色谱仪进行分析，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。

本方法中葡糖酸等3种原料的检出限、定量下限及取样量为1.0 g时检出浓度和最低定量浓度见表1。

表 1 葡糖酸等3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 | 定量下限 | 检出浓度 | 最低定量浓度 |
| （μg） | （μg） | （μg/g） | （μg/g） |
| 1 | 葡糖酸 | 0.05 | 0.15 | 100 | 300 |
| 2 | 乳糖酸 | 0.25 | 0.75 | 500 | 1500 |
| 3 | 葡糖酸内酯 | 0.05 | 0.15 | 100 | 300 |

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 氢氧化钠。

3.4 甲醇，色谱纯。

3.5 乙腈，色谱纯。

3.6 甲酸，色谱纯。

3.7 0.04 mol/L的磷酸氢二铵溶液：称取5.28 g磷酸氢二铵（3.1），加水1000 mL溶解，用0.22 μm滤膜过滤。

3.8 0.2 mol/L的NaOH溶液：称取0.8 g氢氧化钠（3.3），置于200mL烧杯中，加水100 mL溶解。

3.9 标准品：3种原料标准品信息详见附录A。

3.10 标准储备溶液

分别精密称取葡糖酸钠、乳糖酸钠（3.9）各0.2 g（精确到0.0001 g）于同一20 mL容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，摇匀，配制成标准储备溶液。

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。

4.3 超声波清洗器。

4.4 高速离心机。

4.5 pH 计。

4.6 涡旋振荡器。

5 分析步骤

5.1 标准系列溶液的制备

精密移取不同体积的标准储备溶液（3.10）于10 mL容量瓶中，用水定容。标准系列浓度见表2。

表2 标准储备溶液和标准系列浓度

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组分 | 标准储备液浓度（mg/mL） | 混合标准系列溶液浓度（mg/mL） |
| 葡糖酸钠 | 10 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2.5 | 5 |
| 乳糖酸钠 | 10 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2.5 | 5 |

5.2 样品处理

称取样品1.0 g（精确到0.0001 g）于10 mL具塞比色管中，加水6 mL，用0.2 mol/L的NaOH溶液（3.8）调pH 9-12范围内，加水至10 mL刻度，充分涡旋混合30 s，超声提取30 min，取适量样品在10000 rpm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。

5.3 参考色谱条件

色谱柱：Hilic + 阴离子排斥柱（150 mm×4.6 mm，3 μm），或等效色谱柱；

流动相：乙腈 + 0.04 mol/L的磷酸氢二铵溶液（3.7）[磷酸（3.2）调pH值为2.6]（75+25）；

流速：0.6 mL/min；

检测波长：214 nm；

柱温：35°C；

进样量：5 μL。

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 葡糖酸

$$ω=\frac{ρ×V×D×196.16}{m×218.14}×103$$

式中：*ω*——化妆品中葡糖酸的质量分数，μg/g；

*ρ*——从标准曲线得到待测原料的质量浓度，mg/mL；

*V*——样品定容体积，mL；

*m*——样品取样量，g；

*D* —— 稀释倍数（不稀释则取1）；

196.16——葡糖酸的摩尔质量，g/mol；

218.14——葡糖酸钠的摩尔质量，g/mol。

6.1.2 乳糖酸

$$ω=\frac{ρ×V×D×358.30}{m×380.28}×103$$

式中：*ω*——化妆品中乳糖酸的质量分数，μg/g；

*m*——样品取样量，g；

*ρ*——从标准曲线得到待测原料的质量浓度，mg/mL；

*V*——定容体积，mL；

*D*——稀释倍数（不稀释则取1）；

358.30——乳糖酸的摩尔质量，g/mol；

380.28——乳糖酸钠的摩尔质量，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%（n=6）。

7 图谱



图1 葡糖酸钠和乳糖酸钠标准溶液色谱图

1：葡糖酸钠（9.039 min）；2：乳糖酸钠（16.668 min）

附录A

表A 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 | 葡糖酸钠 | Sodium gluconate | 527-07-1 | C6H11NaO7 | 218.14 |
| 2 | 乳糖酸钠 | Sodium lactobionate | 27297-39-8 | C12H21NaO12 | 380.28 |
| 3 | 葡糖酸内酯 | Gluconolactone | 90-80-2 | C6H10O6 | 178.14 |

附录B

化妆品中葡糖酸等3种原料阳性结果的确证

因葡糖酸和乳糖酸极性大，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，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%≥k>20% | 20%≥k>10% | k≤10% |
| 允许的最大偏差 |  | ±20% | ±25% | ±30% | ±50% |

B.1 仪器参考条件

B.1.1 色谱条件

色谱柱：C18柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），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°C；

进样量：5 μL；

B.1.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI源）；

监测模式：负离子多反应监测模式；监测离子对及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：负离子：3000 V。

表B.3 监测离子对及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 | 葡糖酸 | 195 | 75.1\* | -15 |
| 98.8 | -16 |
| 2 | 乳糖酸 | 357.1 | 74.8\* | -25 |
| 58.9 | -28 |

\*为推荐的定量离子。

注：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

化妆品中葡糖酸等3种原料的检验方法（征求意见稿）

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葡糖酸等3种原料的检验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

本方法的起草本着科学合理、简单易行的原则。采用目前一般检测实验室普遍具备的分析技术，选择适宜、可行、便于实际操作的分析条件，保证检测方法的精确性和重现性。

二、起草过程

本方法于2021年10月由化妆品专家标准委员会立项。起草过程包括：拟定研究内容；建立化妆品中葡糖酸等3种原料的检验方法；开展实验室间验证；形成方法草案。

三、与我国已有相关标准的关系

目前未见该方法的国家标准或行业标准。

四、与《化妆品安全技术规范》（2015年版）（以下简称《规范》）中原方法的对比情况

《规范》中未纳入葡糖酸、乳糖酸和葡糖酸内酯的检验方法。

五、国际相关标准情况

目前未查询到国外公开发布的关于化妆品中葡糖酸等3种原料的测定方法的相关标准。

六、实验室验证情况

本实验室和三家外部实验室均对水剂、膏霜、乳液、凝胶类4种化妆品基质的方法学进行了验证，包括方法的特异性、线性、检出浓度、最低定量浓度、精密度、回收率、稳定性等。实验结果均能满足《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）的要求。

1、本实验室内部验证结果

3种原料在各自质量浓度范围内均呈良好的线性关系，相关系数R均大于0.999。日内、日间精密度相对标准偏差均小于5%，日内、日间稳定性相对标准偏差均小于5%。4种基质样品3种原料平均加标回收率均在85%~115%范围内，相对标准偏差均小于5%，检出浓度、最低定量浓度结果见表1。

表1 检出浓度、最低定量浓度及线性范围

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 组分 | 检出浓度（μg/g） | 最低定量浓度（μg/g） | 线性范围（μg/mL） |
| 1 | 葡糖酸 | 100 | 300 | 112.84~4513 |
| 2 | 乳糖酸 | 500 | 1500 | 121.61~4864 |
| 3 | 葡糖酸内酯 | 100 | 300 | / |

2、外部验证结果

经三家外部实验室验证，3种原料在各自质量浓度范围内均呈良好的线性关系，相关系数R均大于0.999。日内、日间精密度相对标准偏差均小于5%，日内、日间稳定性相对标准偏差均小于10%。4种基质样品3种原料平均加标回收率均在85%~115%范围内，相对标准偏差均小于10%。检出浓度、最低定量浓度等参数均能满足拟定方法的要求。

七、其他需说明的问题

1、关于体例

本方法的体例主要参照《规范》的理化检验方法的体例，方便化妆品检验领域相关检验人员的阅读和使用。

2、关于检测方法的建立

本方法规定了高效液相色谱法测定水剂类、凝胶类、膏霜乳液类化妆品中葡糖酸等3种原料的含量。方法使用标准物质优化仪器条件，建立化妆品中葡糖酸等3种原料检验方法。以水提取化妆品中葡糖酸、葡糖酸内酯、乳糖酸等3种原料，在氢氧化钠的作用下葡糖酸、葡糖酸内酯、乳糖酸转化为葡糖酸钠和乳糖酸钠。用高效液相色谱仪进行分析，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。葡糖酸、葡糖酸内酯、乳糖酸含量以酸计。