

化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检测方法 (征求意见稿)

1 范围

本方法规定了高效液相色谱法测定化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的含量。本方法适用于水剂类、膏霜类、乳液类、凝胶类、面膜类、粉类化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚含量的测定。

2 方法提要

样品经甲醇超声提取后,采用高效液相色谱系统分离,荧光检测器检测,根据保留时间定性,峰面积定量,以标准曲线法计算含量。如有阳性结果,应用液相色谱-串联质谱法、气相色谱-串联质谱法进行确证。

本方法中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检出限、定量下限及取样量为1.0g时检出浓度和最低定量浓度见表1。

表1 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检出限、检出浓度、定量下限和最低定量浓度

组分	检出限 (ng)	定量下限 (ng)	检出浓度 ($\mu\text{g/g}$)	最低定量浓度 ($\mu\text{g/g}$)
α -熊果苷	1	2.5	2	5
β -熊果苷	1	2.5	2	5
氢醌	0.05	0.15	0.1	0.3
苯酚	0.1	0.3	0.2	0.6

3 试剂和材料

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

3.1 甲醇,色谱纯。

3.2 微孔滤膜(0.45 μm)。

3.3 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌、苯酚4种标准物质。

3.4 标准储备溶液

分别称取 α -熊果苷标准物质、 β -熊果苷标准物质、氢醌标准物质和苯酚标准物质(3.3)各10 mg(精确到0.0001 g),置不同10 mL容量瓶中,用甲醇(3.1)溶解并定容至刻度,配制成浓度分别为1 mg/mL的标准储备溶液。

4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱仪，荧光检测器。
- 4.2 天平。
- 4.3 高速离心机（转速 ≥ 14000 rpm）。
- 4.4 超声波清洗器。
- 4.5 涡旋振荡器。

5 分析步骤

5.1 混合标准溶液的制备

分别准确量取 α -熊果苷标准储备溶液（3.4）1 mL、 β -熊果苷标准储备溶液（3.4）1 mL、氢醌标准储备溶液（3.4）0.1 mL和苯酚标准储备溶液（3.4）0.2 mL，置同一个10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1）定容至刻度，配制成 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚浓度分别为100 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液。

5.2 混合标准系列溶液的制备

准确量取不同体积的混合标准溶液（5.1），用甲醇（3.1）配制成浓度如表2所示的混合标准系列溶液。

表2 储备溶液浓度及混合标准系列浓度

组分	α -熊果苷	β -熊果苷	氢醌	苯酚
储备液, $\mu\text{g/mL}$	1000	1000	1000	1000
混合标准溶液, $\mu\text{g/mL}$	100	100	10	20
	0.25	0.25	0.025	0.05
	0.5	0.5	0.05	0.1
混合标准系列溶液,	1	1	0.1	0.2
$\mu\text{g/mL}$	2	2	0.2	0.4
	8	8	0.8	1.6
	20	20	2	4

5.3 样品处理

称取样品1.0 g（精确到0.001 g），置10 mL具塞比色管中，加入甲醇至10 mL，在涡旋混合器上高速振荡30 s，使样品与提取溶剂充分混匀。密塞，超声提取20 min，静置至室温，

取适量样品溶液离心（转速14000 rpm）5 min，取上清液经微孔滤膜（3.2）过滤，取续滤液作为待测溶液。必要时用适量甲醇稀释。

5.4 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈柱（250 mm×4.6 mm×5 μm）；

流动相：A：水；B：甲醇；

柱温：20℃；

流速：0.5 mL/min

进样量：5 μL；

检测波长见表3；

流动相梯度洗脱程序见表4。运行完后平衡10分钟。

表3 α-熊果苷、β-熊果苷、氢醌和苯酚的检测波长

组分	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
α-熊果苷	292	337
β-熊果苷	292	337
氢醌	298	345
苯酚	280	318

表4 流动相梯度洗脱程序

时间/min	V (流动相A) /%	V (流动相B) /%
0	95	5
21.0	95	5
22.0	55	45
43.0	50	50
48.0	50	50
48.1	0	100
50.0	0	100

5.5 测定

在“5.4”色谱条件下，取混合标准系列溶液（5.2）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“5.3”项下的待测溶液进样，根据保留时间定性，测得峰面积，根据标准曲线得到待测溶液中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的浓度。按“6”计算样品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的含量。必要时按附录A方法进行定性确证。

6 分析结果的表述

6.1 计算

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

式中：

ω ---- 样品中待测组分的质量分数， $\mu\text{g/g}$ ；

ρ ---- 从标准曲线得到待测组分的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V ---- 样品定容体积， mL ；

m ---- 样品取样量， g ；

D ---- 稀释倍数（如未稀释则为1）。

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

回收率为85%~115%，相对标准偏差小于10%（ $n=6$ ）。

7 图谱

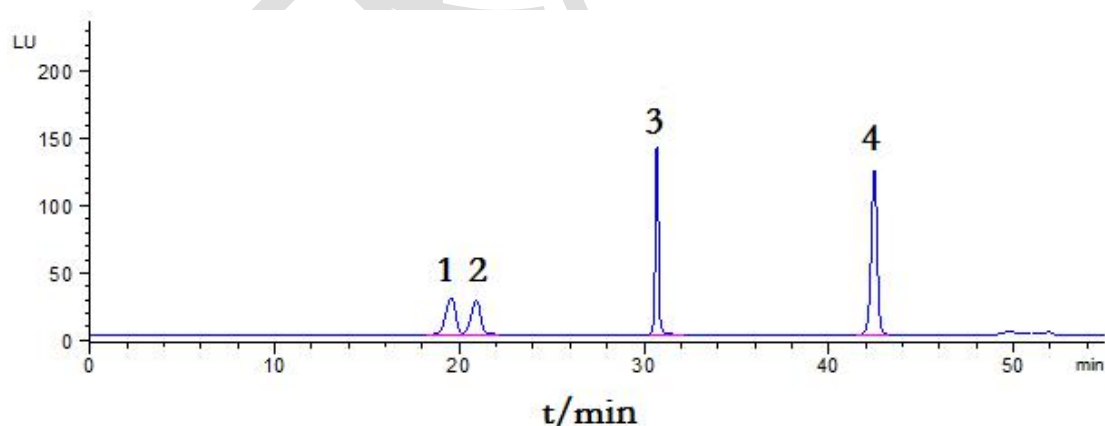


图1 标准溶液的液相色谱图

1: β -熊果苷（19.567 min）；2: α -熊果苷（20.920 min）；3: 氢醌（30.685 min）；4: 苯酚（42.472 min）。

附录A（规范性附录）

α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚结果的确证

1. α -熊果苷和 β -熊果苷的液相色谱-串联质谱法确证

1.1 试剂和材料

1.1.1 微孔滤膜（0.22 μm ）。

1.2 仪器和设备

1.2.1 液相色谱-串联质谱联用仪，带电喷雾离子源（ESI源）。

1.2.2 高速离心机（转速 ≥ 12000 rpm）。

1.3 样品处理

取正文“5.3 样品处理”项下待测溶液，加适量水稀释后，离心（转速4000 rpm）5 min，取上清液，用微孔滤膜（1.1.1）过滤，取续滤液作为待测溶液。

1.4 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈柱（100 mm \times 4.6 mm \times 2.7 μm ），或等效色谱柱；

柱温：20 $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量：2 μL ；

流动相：A：水，B：甲醇。梯度洗脱程序见表A-1。

表A-1 α -熊果苷、 β -熊果苷梯度洗脱程序

时间/min	流速/mL/min	V（流动相A）/%	V（流动相B）/%
0	0.3	95	5
10.0	0.3	95	5
12.0	0.3	5	95
15.0	0.3	5	95
15.1	0.3	95	5
20.0	0.3	95	5

1.5 参考质谱条件

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A-2；

离子源喷雾电压：-4500 V；

气帘气压力：25 psi；

雾化气压力：45psi；

辅助气压力：20 psi；

离子源温度：450℃。

表A-2 质谱监测离子对相关电压参数设定表

待测物	母离子 (m/z)	去簇电压(V)	子离子 (m/z)	CE (V)
α-熊果苷	271.0	-65	151.0	-18
	271.0	-65	108.0	-30
β-熊果苷	271.0	-65	161.0	-12
	271.0	-65	108.0	-24

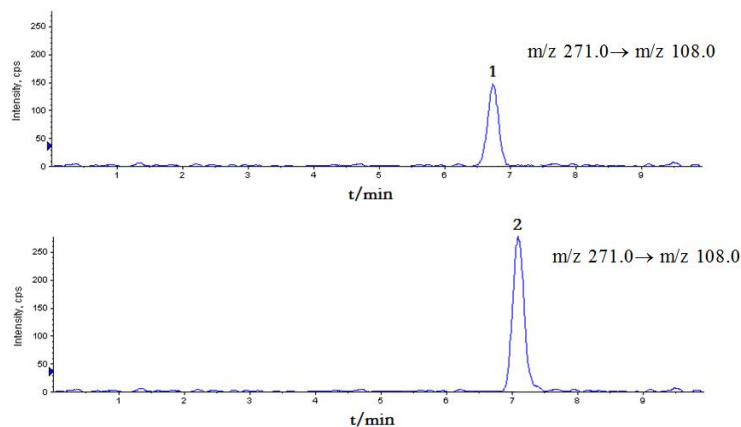
1.6定性判定

用液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中应呈现两个监测离子的色谱峰，样品中各离子的保留时间应与相应标准溶液中各离子的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表 A-3 规定范围，则可以判断样品中存在相应待测物。

表 A-3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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%

1.7图谱



图A-1 α-熊果苷、β-熊果苷标准溶液的液相色谱-串联质谱MRM图

1: β-熊果苷 (6.731 min) ; 2: α-熊果苷 (7.088 min) 。

2. 氢醌的液相色谱-串联质谱法确证

2.1 试剂和材料

2.1.1 甲醇（色谱纯）。

2.1.2 维生素C（分析纯）。

2.1.3 氯化钠（分析纯）。

2.1.4 固相萃取小柱（60 mg/3 mL），吸附剂为含吡咯烷酮基的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物。

2.1.5 微孔滤膜（0.22 μm）。

2.1.6 进样小瓶内衬管。

2.1.7 15%甲醇溶液：量取甲醇（2.1.1）15 mL，用水稀释至100 mL。

2.1.8 维生素C溶液：取维生素C（2.1.2）适量，用水溶解并配成浓度为100 mg/mL的溶液。

2.2 仪器和设备

2.2.1 液相色谱-串联质谱联用仪，带电喷雾离子源（ESI源）。

2.2.2 旋转蒸发仪。

2.2.3 高速离心机（转速≥12000 rpm）。

2.3 样品处理

称取样品1.0 g，准确加入15%甲醇溶液（2.1.7）10 mL、维生素C溶液（2.1.8）0.2 mL，涡旋振荡1 min，再加入氯化钠（2.1.3）2 g，涡旋振荡1 min，离心（转速12000 rpm）15 min，取5 mL上清液，待净化。取固相萃取小柱（2.1.4），依次预先用3 mL甲醇（2.1.1）、10 mL水进行活化。将待净化液倒入小柱中，自然流尽后，用10 mL水清洗小柱，待清洗液自然流尽后，加甲醇（2.1.1）6 mL洗脱，收集洗脱液于尖底烧瓶中，用旋转蒸发仪（水浴温度35℃）减压浓缩至近干，加甲醇（2.1.1）0.2 mL，涡旋振荡30 s，用微孔滤膜（2.1.5）过滤至内衬管中（2.1.6），作为待测溶液。

2.4 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈柱（100 mm×4.6 mm×2.7 μm），或等效色谱柱；

柱温：20 ℃；

进样量：5 μL；

流动相：A：水，B：甲醇。氢醌的梯度洗脱程序见表A-4。

表A-4 氢醌梯度洗脱程序

时间/min	流速/ mL/min	V (流动相A) /%	V (流动相B) /%
0	0.2	90	10
5.0	0.2	90	10
10.0	0.2	75	25
15.0	0.2	72	28
16.0	0.2	20	80
20.0	0.2	20	80
20.1	0.2	90	10
26.0	0.2	90	10

2.5 参考质谱条件

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A-5；

离子源喷雾电压：-4500 V；

气帘气压力：25 psi；

雾化气压力：45psi；

辅助气压力：20 psi；

离子源温度：450℃。

表A-5 质谱监测离子对及相关电压参数设定表

待测物	母离子 (m/z)	去簇电压(V)	子离子 (m/z)	CE (V)
氢醌	109.0	-59	81.0	-17
	109.0	-59	53.0	-18

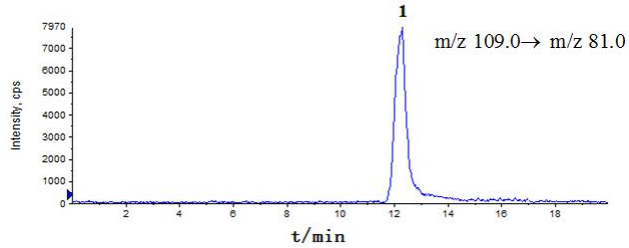
2.6 定性判定

用液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中应呈现两个监测离子的色谱峰，样品中各离子的保留时间应与相应标准溶液中各离子的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表 A-6 规定范围，则可以判断样品中存在相应待测物。

表 A-6 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

2.7 图谱



图A-2 氢醌标准溶液的液相色谱-串联质谱MRM图

1: 氢醌 (12.280 min)。

3. 苯酚的气相色谱-串联质谱法确证

3.1 仪器：气相色谱-串联质谱联用仪，带电子轰击离子源（EI源）。

3.2 样品处理

取正文“5.3 样品处理”项下待测溶液直接进行测定。

3.3 参考气相色谱-质谱条件

色谱柱：聚乙二醇键合交联固定相毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），或等效色谱柱；

柱温：120 °C/min保持1 min，以20 °C/min程序升温至220 °C，保持4 min；

进样口温度：230 °C；

载气流速：1.5 mL/min；

分流比：1:1；

溶剂延迟：2.5 min；

进样量：1 μL；

离子源：EI源；

离子源温度：200°C；

传输线温度：230°C；

电离能量：70 eV；

扫描方式：多反应离子监测，监测离子对及相关电压参数设定见表A-7；

表A-7 质谱监测离子对相关电压参数设定表

待测物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (eV)
苯酚	94.0	66.0	9
	94.0	55.0	15

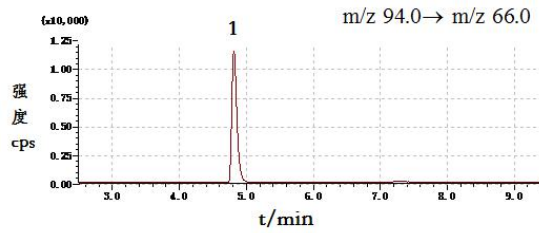
3.4定性判定

用气相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中应呈现两个监测离子的色谱峰，样品中各离子的保留时间应与标准溶液中各离子的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表 A-8 规定范围，则可以判断样品中存在相应待测物。

表 A-8 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

3.5图谱



1: 苯酚 (4.815 min)。

图A-3 苯酚标准溶液的气相色谱-串联质谱MRM图

附录B （资料性附录）

α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚4种标准物质基本信息表

表 B-1 标准物质基本信息表

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式
α -熊果苷	α - arbutin	84380-01-8	C ₁₂ H ₁₆ O ₇
β -熊果苷	β - arbutin	497-76-7	C ₁₂ H ₁₆ O ₇
氢醌	hydroquinone	123-31-9	C ₆ H ₆ O ₂
苯酚	phenol	108-95-2	C ₆ H ₆ O

化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检测方法

起草说明

为加强化妆品监督管理，进一步提高化妆品产品安全性，受国家药品监督管理局委托，中国食品药品检定研究院组织开展了“化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检测方法”的建立和验证工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草必要性

α -熊果苷、 β -熊果苷为差向异构体，是美白化妆品中常见的美白成分。目前相关检验标准仅为《化妆品中熊果苷的检测方法》(SN/T 1475-2004)，该标准中的检测方法不能区别 α -熊果苷、 β -熊果苷。实际检验发现，化妆品标签中熊果苷的标注存在不规范的地方，有的仅标注熊果苷，有的标注为 α -熊果苷、 β -熊果苷。由于 α -熊果苷、 β -熊果苷的价格差异较大，故标签的不规范伤害了广大消费者的利益。另外，据文献报道， α -熊果苷、 β -熊果苷在一定的条件下（例如强酸、强碱、高温）可降解产生毒性较强的氢醌。氢醌和苯酚具有美白效果，但因毒性较强，是化妆品的禁用组分。《化妆品安全技术规范》（2015年版）中规定了氢醌、苯酚的检测方法，检出限分别为7 $\mu\text{g/g}$ 、2 $\mu\text{g/g}$ ，欧盟消费者安全科学委员会（SCCS）认为含 β -熊果苷的化妆品中氢醌的含量应小于1 $\mu\text{g/g}$ 。因此《化妆品安全技术规范》（2015年版）中氢醌的检测灵敏度不能满足检测需求，有必要进行修订。

二、起草原则

本方法修订时，尽量采用目前化妆品实验室普遍具有的先进分析技术，以便于方法的推广、执行。方法兼具先进性与可行性，条理清晰，操作性强，选择准确、可行、便于实际操作的分析条件，保证了检测方法的可操作性和重现性。

三、起草过程

通过查阅国内外文献，结合以往工作经验和研究基础，于2017年开展了本方法的起草研究，在2018年建立了化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的检测方法。2018年9月向三家验证单位寄送了本方法的验证技术资料、验证用标准品和样品，于2018年10月、12月陆续收到验证报告，并对验证报告进行了总结和分析，进一步完善了检测方法。2019年5月中国食品药品检定研究院组织召开了专家评审论证会，会后根据专家意见对本方法进行了修改完善，形成征求意见稿。

四、重点问题的说明

(一) 关于体例。本检测方法的体例主要参照《化妆品安全技术规范》(2015年版)的理化检验方法的体例,便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

(二) 关于检测方法的建立和验证。本课题以选用高效液相色谱进行研究,经3家单位验证,方法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相关技术要求,适用于不同基质化妆品中 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌和苯酚的定性定量测定。

(三) 考虑到方法的灵敏度、实际样品的干扰情况、样品的阳性情况,采用液相色谱-串联四极杆质谱联用法进行 α -熊果苷、 β -熊果苷、氢醌的确证;采用气相色谱-串联四极杆质谱联用法进行苯酚的确证。

五、起草依据及文献

- [1] 《化妆品安全技术规范》(2015年版)
- [2] 《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)
- [3] SN/T 1475-2004《化妆品中熊果苷的检测方法》
- [4] 房军,杨艳伟,张伟,等. 化妆品中 β -熊果苷稳定性研究[J].卫生研究,2009,38(2): 214 -215.
- [5] 秦良,刘有停,陈毅明,等. 基础环境因素对 α -熊果苷和 β -熊果苷稳定性的影响[J].日用化学工业,2014,44(10): 580 - 583.
- [6] SCCS, Gisela H. Opinion of the scientific committee on consumer safety (SCCS) - opinion on the safety of the use of α -arbutin in cosmetic products [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016, (74): 75 -76.
- [7] SCCS, Gisela H. Opinion of the scientific committee on consumer safety (SCCS) - opinion on the safety of the use of β -arbutin in cosmetic products [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2015, (73): 866 -867.