附件1

化妆品中壬二酸等2种原料的检验方法

（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壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾的含量。

本方法适用于膏霜乳类、液体类、凝胶类、粉剂类、泥类、贴膜类化妆品中壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾的测定。

2 方法提要

样品提取净化后，经高效液相色谱仪分离，二极管阵列检测器检测，根据保留时间和紫外光谱定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

本方法壬二酸的检出限为0.05μg，定量下限为0.17μg，壬二酰二甘氨酸钾的检出限为0.02μg，定量下限为0.07μg；当取样量为1.0g，稀释定容体积为20mL时壬二酸的检出浓度为0.005%，最低定量浓度为0.017%；壬二酰二甘氨酸钾的检出浓度为0.002%，定量下限为0.007%。

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甲醇。

3.2 氨水。

3.3 磷酸。

3.4乙腈，色谱纯。

3.5 氨溶液：量取氨水（3.2）1mL，用水稀释至100mL。

3.6 2%磷酸甲醇溶液：量取磷酸（3.3）2mL，用甲醇（3.1）稀释至100mL。

3.7 0.1%磷酸溶液：量取磷酸（3.3）1.0mL，用水稀释至1000mL。

3.8 标准品：壬二酸、壬二酰二甘氨酸钾标准品信息详见附录A，如使用非标准品级别的壬二酰二甘氨酸钾，使用前应按附录C方法进行标定。

3.9壬二酸标准储备溶液：称取壬二酸标准品40mg（精确到0.00001g）于10mL容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度（可先加少量甲醇超声助溶），摇匀，即得浓度为4mg/mL的壬二酸标准储备溶液。

3.10 壬二酰二甘氨酸钾标准储备溶液：称取壬二酰二甘氨酸钾标准品20mg（精确到0.00001g）于10mL容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得浓度为2mg/mL的壬二酰二甘氨酸钾标准储备溶液。

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 涡旋振荡器。

4.5 离心机。

4.6 混合阴离子固相萃取柱（填料质量≥150mg），使用前依次用15mL甲醇、15mL水活化。

4.7固相萃取装置。

5 分析步骤

5.1 混合标准系列溶液的制备

分别准确移取壬二酸标准储备溶液（3.9）、壬二酰二甘氨酸钾标准储备溶液（3.10）适当量，用水稀释配制成混合标准溶液，各原料标准系列溶液浓度见表1。

表1 壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾标准系列溶液浓度

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 混合标准系列溶液浓度（μg/mL） | | | | |
| 壬二酸 | 3 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| 壬二酰二甘氨酸钾 | 1.5 | 5 | 10 | 25 | 50 |

5.2样品处理

5.2.1 洗面奶、洗发水、沐浴露等淋洗类化妆品

称取样品1.0g（精确到0.0001g）于10mL具塞比色管中，加甲醇（3.1）约8mL，涡旋分散后超声提取10min，放冷后定容至刻度，准确量取5mL上清液（必要时可离心或过滤），置10mL具塞比色管中，用水定容至刻度，摇匀，滤过，即得待测溶液。

5.2.2 其他类化妆品

称取样品1.0g（精确到0.0001g）于10mL具塞比色管中，加甲醇（3.1）2mL，涡旋分散，加水约6mL，加氨溶液（3.5）0.5mL，充分涡旋2min后超声提取10min，放冷后用水定容至刻度，涡旋混匀。准确量取0.5-5mL上清液（必要时可离心或过滤）置固相萃取柱上，待样品溶液流尽后，依次用水15mL、甲醇15mL淋洗固相萃取柱，弃去淋洗液，再用2%磷酸甲醇溶液（3.6）5mL洗脱，收集洗脱液置10mL比色管中，用水定容至刻度，摇匀，滤过，即得待测溶液。

注1：待测原料含量比较大的样品可通过适当稀释或减少上样体积以确保待测溶液浓度在标准曲线范围内。

注2：凝胶类样品推荐上样量不超过2mL。

5.3色谱条件

色谱柱： 金刚烷基键合硅胶色谱柱（5μm，4.6×250mm），或等效色谱柱；

流动相： A：乙腈（3.4）； B：0.1%磷酸溶液（3.7）；梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间/min | V（A）/% | V（B）/% |
| 0 | 17 | 83 |
| 6 | 17 | 83 |
| 8 | 26 | 74 |
| 15 | 26 | 74 |
| 17 | 90 | 10 |
| 22 | 90 | 10 |

流速：1.0mL/min；

柱温：40℃；

进样量：20μL；

检测波长：210nm。

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测定原料的浓度。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



式中: *ω*——化妆品中待测原料的质量分数，%；

*ρ*——从标准曲线得到待测原料的浓度，μg/mL；

*V*——样品稀释定容体积，mL；

*m*——样品取样量，g。

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%。

6.2 回收率和精密度

壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾原料的回收率在85.2%～108.1%之间，相对标准偏差小于10%。

7 图谱

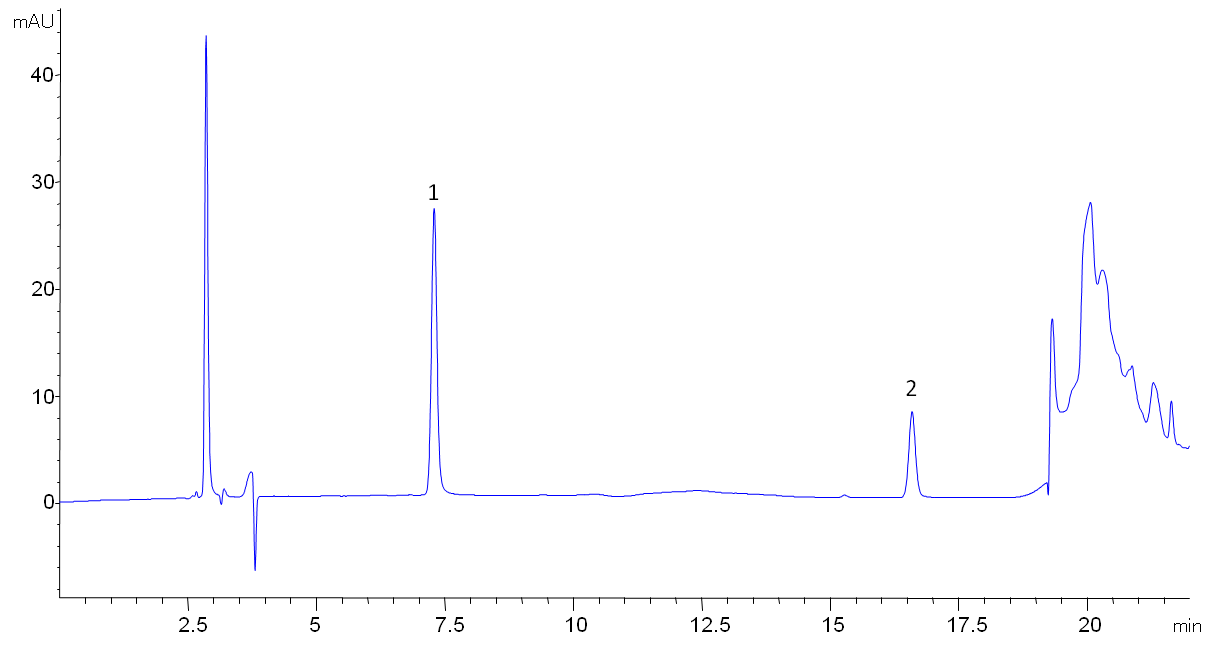


图1 混合标准溶液的色谱图

1、壬二酰二甘氨酸钾（7.3min） 2、壬二酸（16.8min）

附录 A

表A 壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾标准品信息

| 序号 | 名称 | 分子式 | CAS | 相对分子质量 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 壬二酸 | C9H16O4 | 123-99-9 | 188.00 |
| 2 | 壬二酰二甘氨酸钾 | C13H21N2O6K | 477773-67-4 | 340.42 |

附录B

壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾原料结果的确证

如液相色谱方法中检出结果存在不确定因素，可采用液相色谱-质谱法进行确认。

B.1 样品前处理过程见5.2 样品处理。

B.2 参考色谱条件

色谱柱：C18柱（2.7μm，3.0×100mm），或等效色谱柱；

流动相：A：乙腈；B：0.05%甲酸溶液。

梯度洗脱程序见表B.1；

表B.1 流动相梯度洗脱程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间/min | V（A）/% | V（B）/% |
| 0 | 35 | 65 |
| 3 | 35 | 65 |
| 7 | 90 | 10 |
| 8 | 90 | 10 |
| 8.1 | 35 | 65 |
| 10.5 | 35 | 65 |

流速：0.3 mL/min；

柱温：40℃；

进样量：2 μL。

B.3 参考质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）；

监测模式：负离子多反应监测模式（MRM）；监测离子对及相关电压参数设定见表B.2；

表B.2 监测离子对及相关电压参数设定表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 碰撞能(CE) |
| 壬二酸 | 187.1 | 97.0\* | -24 |
| 125.1 | -20 |
| 壬二酰二甘氨酸钾 | 301.1 | 74.2\* | -44 |
| 125.1 | -33 |

\*为推荐定量离子。

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到最佳

B.4 定性

用液相色谱-三重四极杆串联质谱仪进行定性。如样品检出的特征离子峰的保留时间与浓度相近的标准溶液中对应原料一致，且样品所选择的监测离子对的相对丰度比与标准溶液的监测离子对的相对丰度比的偏差不超过表B.3规定范围，则可判断样品中存在对应的待测原料。

表B.3结果确证时离子对相对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% |

附录C

壬二酰二甘氨酸钾的标定

C.1 原理

壬二酰二甘氨酸钾在催化加热条件下被分解，产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵。碱化蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后以盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量计算氮含量，再乘以换算系数，即为壬二酰二甘氨酸钾的含量。

C.2 试剂和材料

除另有规定外，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。

C.2.1 硫酸铜。

C.2.2 硫酸钾。

C.2.3 硫酸，优级纯。

C.2.4 硼酸。

C.2.5 无水碳酸钠，工作基准试剂。

C.2.6 盐酸标准溶液[c（HCl）=0.1mol/L]：量取盐酸9mL，注入1000mL水中，摇匀，并按如下方法标定浓度：

准确称取于270~300℃高温炉中灼烧至恒量的工作基准试剂无水碳酸钠（C.2.5）0.2g，溶于50mL水中，加10滴溴甲酚绿-甲基红指示液，用配制的盐酸溶液滴定至溶液由绿色变为暗红色，煮沸2min，加盖具钠石灰管的橡胶塞，冷却，继续滴定至溶液再呈暗红色。同时做空白试验。按下式计算盐酸溶液的浓度：



式中：*c(HCl)*——盐酸标准溶液的浓度，mol/L；

*m*——无水碳酸钠质量，g；

*V1*——盐酸标准溶液体积，mL；

*V2*——空白试验消耗盐酸标准溶液体积，mL；

*M*——无水碳酸钠的摩尔质量，M(1/2Na2CO3)=52.994g/mol。

也可购买按照GB/T 601配制并标定的市售商品化标准溶液。

C.2.7 自动凯氏定氮仪，使用前按照仪器说明书配制并加入氢氧化钠溶液、含有指示剂的硼酸溶液以及盐酸标准溶液（C.2.6）。

C.3 分析步骤

准确称取壬二酰二甘氨酸钾标准溶液适当量（约相当于30mg~40mg氮），至消化管中，再加入0.4g硫酸铜（C.2.1）、6g硫酸钾（C.2.2）及20mL硫酸（C.2.3）于消化炉进行消化。当消化炉温度达到420℃之后，继续消化约1h至消化管中的液体呈绿色透明状，取出冷却后加入50mL水，于凯氏定氮仪上自动加液、蒸馏、滴定并记录滴定数据。同时做试剂空白。

C.4 分析结果的表述

按下式计算壬二酰二甘氨酸钾的含量：



式中：*ω*——壬二酰二甘氨酸钾的含量，%（w/w）；

V1——样品消耗盐酸标准溶液体积，mL；

V2——空白试验消耗盐酸标准溶液体积，mL；

*c*——盐酸标准溶液的浓度，mol/L；

0.0140——1.0mL盐酸标准溶液（1.000mol/L）相当的氮的质量，g；

*m*——样品取样量，g；

*F*——氮换算为壬二酰二甘氨酸钾的系数，为340.41/28=12.1575。

化妆品中壬二酸等2种原料的检验方法起草说明

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壬二酸及壬二酰二甘氨酸钾原料检测方法的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本检测方法目的是为化妆品中壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾的筛查、定量、确证提供方法。该方法适用于化妆品多种基质的检测，本检测方法兼具先进性、准确性以及可操作性强的特点，采用目前一般检测试验普遍具备的分析技术，选择适宜、可行、便于操作的分析条件，保证检测方法的准确性和重现性。

二、起草过程

中国食品药品检定研究院于2021年12月委托深圳市药品检验研究院联合联合北京工商大学开展“化妆品中壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾的测定”方法建立和验证工作（即《化妆品中壬二酸等2种原料的检验方法》）。通过查阅国内外相关文献资料，按照委托协议，深圳院建立了壬二酸等2种原料的检测方法，并于2022年3月委托三家机构开展实验室间方法学验证，最终形成了《化妆品中壬二酸等2种原料的检验方法》。

三、与我国已有相关标准的关系

目前，对国内外壬二酸及壬二酰二甘氨酸钾的检测标准查询、梳理，目前尚无壬二酰二甘氨酸钾的检测标准。2021年10月国标委和市场监管总局发布了《GB/T 40845-2021 化妆品中壬二酸的检测 气相色谱法》，该标准使用衍生试剂将壬二酸衍生为壬二酸二乙酯后使用气相色谱-氢焰离子化检测器检测，同时使用气相色谱-质谱联用仪进行验证；国家食品药品监督管理局于2006年发布的药品标准“壬二酸乳膏”，使用滴定法测定壬二酸的含量。

四、国际相关标准情况

目前国外未见公开发布的相关标准。

五、实验室验证情况

根据《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）及《化妆品补充检验方法研究起草技术指南》（国家药监局2021年第28号通告），对本方法进行实验室内和实验室间方法学验证。本实验室内部验证结果显示高、低浓度标准溶液日内稳定性RSD为0.29%-3.7%，日间稳定性RSD为0.55%-8.8%。选择7种基质的化妆品空白样品，低浓度回收率在89.9%-105之间，RSD介于1.2-6.0%；中浓度回收率在85.8%-101.9%之间，RSD介于1.7-7.7%；高浓度回收率在86.1%-97.6%之间，RSD介于0.7-5.0%

经外部验证，回收率介于81.6%~112.4%，相对标准偏差介于0.1%~5.8%。另外，收集的3批阳性样品，实验室内部与外部的检测结果平均偏差范围在0-8%之间。

六、其它应予说明的问题

1、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》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阅读和实际操作。

2、关于检测方法的建立和验证

本方法规定了采用高效液相色谱法测定化妆品中壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾，并对阳性结果进行液相色谱-质谱法确证。方法使用标准物质优化仪器条件，经过对样品前处理方法的选择，分析条件的优化，最终建立了化妆品中壬二酸和壬二酰二甘氨酸钾的液相色谱检测方法，并辅以液相色谱-质谱法进行阳性结果确证。

3、关于壬二酰二甘氨酸钾对照品的定值

目前市售壬二酰二甘氨酸钾标准品基本为不同浓度的水溶液，存在定值困难。定制壬二酰二甘氨酸钾纯品后根据壬二酰二甘氨酸的结构式，选用凯氏定氮法进行定值。已用纯品定值的标准品溶液与凯氏定氮两种定值方法结果RSD≤3.0%，且经过三家单位验证，凯氏定氮法定值RSD为1.8%。