ICS 71.100.70
Y 42
备案号：

QB

中 华 人 民 共 和 国 轻 工 行 业 标 准

QB/T XXXXX—XXXX

化妆品中凝血酸的测定 高效液相色谱法

Determination of tranexamic acid in cosmetics - High performance liquid chromatography

（在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上）

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部　　发布

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：
本标准起草人：×××、×××、×××。

化妆品中凝血酸的测定　高效液相色谱法

1　范围

本标准规定了化妆品中凝血酸的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于水剂类、乳液类和非蜡基膏霜类化妆品中凝血酸的测定。

本标准的方法检出限和定量限：水类、乳液类和非蜡基膏霜类化妆品中凝血酸的检出限均为3.0 mg/kg，定量限均为10.0 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，仅所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

试样中的凝血酸用80%乙腈溶液提取，提取液经正己烷净化，丹磺酰氯衍生，然后用高效液相色谱仪检测，以保留时间和光谱图定性，外标法定量。必要时使用高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪确证。

4　试剂或材料

除另有说明外，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　**正己烷**：色谱纯。

4.3　**甲酸**：色谱纯。

4.4　**碳酸氢钠**：优级纯。

4.5　**磷酸**：优级纯。

4.6　**磷酸溶液**：磷酸+水=1+9。准确量取 10 mL 磷酸（4.5），加入到 90 mL 水中，混匀后备用。

4.7　**0.1%甲酸溶液**：准确量取 1 mL 甲酸（4.3）至 1 000 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

4.8　**0.1%甲酸乙腈溶液**：准确量取 1 mL 甲酸（4.3）至 1000mL 容量瓶中，用乙腈（4.1）稀释至刻度。

4.9　**80%乙腈溶液**：准确量取 80 mL 乙腈（4.1）至 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

4.10　**丹磺酰氯**：纯度大于 98%。

4.11　0.1 mol/L **碳酸氢钠缓冲溶液**：准确称取 0.84 g 碳酸氢钠（4.4），溶于 90 mL 水中，用磷酸溶液（4.6）调节 pH 至 9.5，移入 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

4.12　2 mg/mL **丹磺酰氯溶液**：准确称取 20.0 mg 丹磺酰氯（4.10）至 10 mL 棕色容量瓶中，用乙腈（4.1）溶解、定容。于 4 ℃下避光密封保存，现用现配。

4.13　**凝血酸标准物质**： 纯度大于 98.0%，标准物质的中文名称、INCI（国际化妆品原料名称）名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及化学结构式见附录 A 表 A.1。

4.14　**凝血酸标准工作溶液**：准确称取凝血酸（4.13）12.5 mg（精确至 0.1 mg），置于 25 mL 棕色容量瓶中，用乙腈（4.1）定容，得到浓度为 500 mg/L 的标准储备液（于 4℃避光保存，可保存 3 个月）。准确移取适量的标准储备液，用乙腈逐级稀释成质量浓度为 0.4 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L 的标准工作溶液，现配现用。

4.15　**滤膜**：孔径为 0.22 μm 的有机系滤膜。

5　仪器和设备

5.1　**高效液相色谱（配二极管阵列检测器）**。

5.2　**高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪（配电喷雾离子源）**。

5.3　**分析天平**：感量为 0.001g 和 0.0001 g。

5.4　**漩涡振荡器**。

5.5　**超声波清洗仪**。

5.6　**离心机**：最高转速不低于 4 000 r/min。

6　实验步骤

6.1　试样处理

称取试样0.5 g（精确至0.001 g），置于50 mL具塞塑料离心管中，加入10 mL 80%乙腈溶液（4.9），涡旋振荡1 min，超声提取10 min，冷却至室温，然后加入5 mL正己烷（4.2），涡旋振荡1 min，4 000 r/min离心2 min，准确移取下层清液1.0 mL，加入0.5 mL碳酸氢钠溶液（4.11）和0.5 mL丹磺酰氯溶液（4.12），涡旋混合均匀，50℃下反应5 min，清液经滤膜过滤后供高效液相色谱仪测定。

6.2　测定

6.2.1　高效液相色谱参考工作条件

高效液相色谱参考工作条件如下：

a) 色谱柱：C_{18}柱，5.0 μm，150 mm ×4.6 mm（内径）；

b) 流动相：0.1%甲酸乙腈溶液（4.8）和0.1 %甲酸溶液（4.7），梯度洗脱条件见表1；

c) 流速：1.0 mL/min；

d) 柱温：30 ℃；

e) 进样量：10 μL；

f) 检测波长：250 nm。

表1　高效液相色谱梯度洗脱条件

时间（min）	0.1%甲酸乙腈溶液（%）	0.1%甲酸溶液（%）
0.0	20	80
5.0	80	20
8.0	80	20
8.1	20	80
10.0	20	80

6.2.2　标准工作曲线绘制

准确移取各标准工作溶液（4.14）1.0 mL，加入0.5 mL碳酸氢钠溶液（4.11）和0.5 mL丹磺酰氯溶液（4.12），涡旋混合均匀，50℃下反应5 min，清液经滤膜过滤后按高效液相色谱参考工作条件（6.2.1）进行测定，以色谱峰的峰面积为纵坐标，与其对应的溶液浓度为横坐标作图，绘制标准工作曲线。

凝血酸标准物质溶液的液相色谱图参见附录 B 图 B.1。

6.2.3　试样测定

按高效液相色谱参考工作条件（6.2.1）测定试样溶液（6.1），如果检出的色谱峰的保留时间与标准物质的一致，并且在扣除背景后的样品色谱图中，该物质的光谱图与标准物质的一致，则可初步认定样品为阳性样品，记录色谱峰的峰面积，以外标法定量。试样溶液中被测物的响应值应在标准工作曲线的线性范围之内，超出线性范围的试样溶液可适当稀释后进行测定。需要时，用高效液相色谱-质谱/质谱法进行确证实验（参见附录C）。

6.3　空白试验

除不称取试样外，均按 6.1～6.2 进行测定。

7　试验数据处理

试样中凝血酸的含量按下式计算：

$$w=\frac{(c-c_0)\times V\times 1000}{m\times 1000}$$

式中：

w ——试样中凝血酸的含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

c ——从标准曲线得到的试样溶液中凝血酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

c_0 ——从标准曲线得到的空白试样中凝血酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

V ——定容体积，单位为毫升（mL）。

结果精确至小数点后一位数字。

8 回收率与精密度

在添加浓度为10.0 mg/kg～100.0 mg/kg浓度范围内，回收率在80%～110%之间，相对标准偏差小于10%。

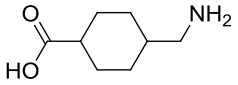
9 允许差

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

附　录　A
（资料性附录）
凝血酸标准物质的信息

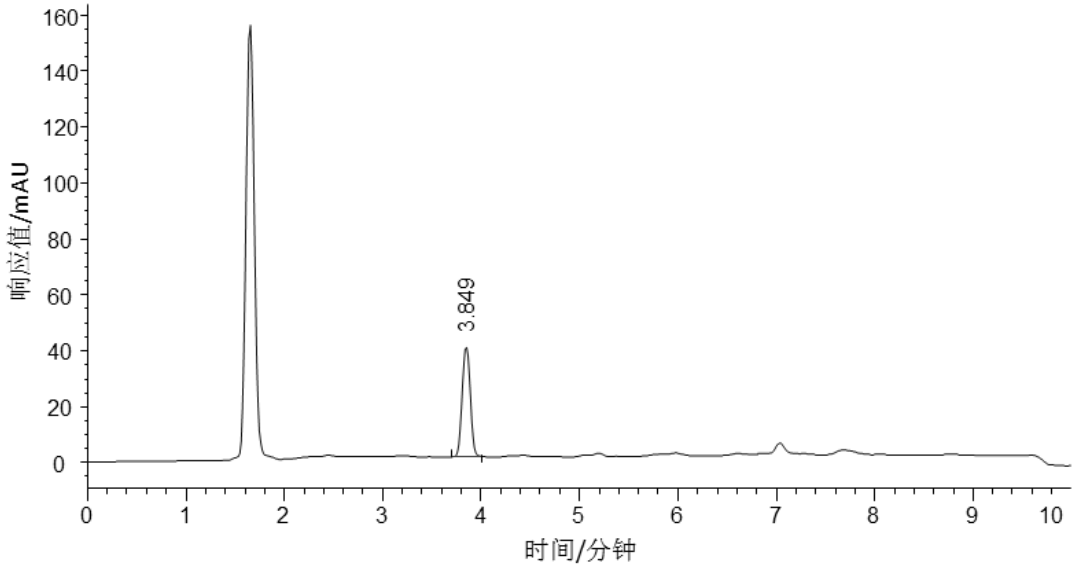
凝血酸的中文名称、INCI 名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及化学结构式参见表 A.1。

表A.1　凝血酸标准物质的中文名称、INCI 名称/英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量及化学结构式

中文名称	INCI 名称/英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	化学结构式
凝血酸	Tranexamic acid	1197-18-8	$C_8H_{15}NO_2$	157.21	

附　录　B
（资料性附录）
凝血酸标准物质的高效液相色谱图信息

凝血酸标准物质溶液的高效液相色谱图参见图 B.1。



图B.1　凝血酸标准溶液的高效液相色谱图（检测波长 250 nm）

附 录 C
（资料性附录）
确 证 试 验

C.1 液相色谱参考工作条件

液相色谱参考工作条件如下：

a) 色谱柱：AQ-C_{18}柱，3.0 μm，100 mm ×2.1 mm（内径）；

b) 流动相：A 为 0.1%甲酸乙腈溶液，B 为 0.1%甲酸溶液，梯度洗脱程序：0 min ~ 3.0 min，20% ~ 80% A；3.0 min ~ 6.0 min，80% A；6.0 min ~ 6.1 min，80% A ~ 20% A；6.1 min ~8.0 min，20% A；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：30 ℃；

e) 进样量：5 μL。

C.2 质谱参考工作条件

质谱参考工作条件如下：

a）离子源：电喷雾离子源（ESI）；

b) 扫描方式：正离子扫描；

c) 毛细管电压：3000 V；

d) 干燥气：氮气，260℃，14.0 L/min；

e) 鞘气：氮气，300℃，11.0 L/min；

f) 检测方式：多反应监测（MRM）；

凝血酸衍生物的保留时间、母离子、子离子、去簇电压和碰撞电压见表 C.1，提取离子色谱图见图 C.1。

表C.1 凝血酸衍生物的质谱 MRM 模式优化参数

化合物	保留时间（min）	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	去簇电压（V）	碰撞电压（V）
凝血酸	3.22	158.1	95.1[a]，123.0	380	23.0，8.0

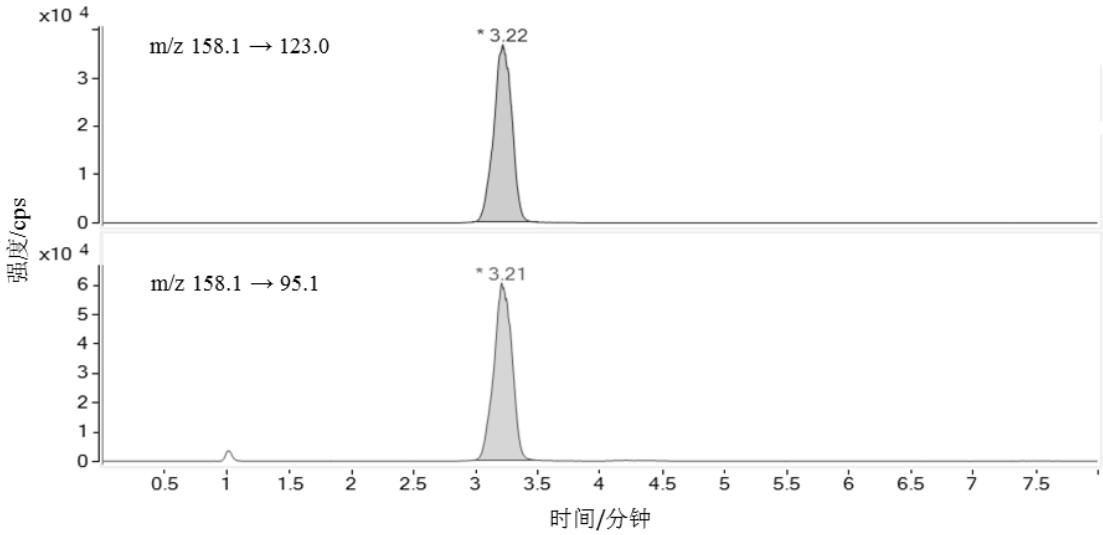
注：[a] 定量离子

C.3 定性测定

进行试样测定时，将试样适当稀释，按液相色谱和质谱参考工作条件（C.1 和 C.2）测定样液和标准工作溶液，如果检出色谱峰的保留时间与标准物质的相一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现，而且选择离子的相对丰度与标准物质的进行比较，相对偏差不超过表 C.2 规定的范围，则可判断该样品为阳性样品。

表C.2　定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	> 50	> 20-50	> 10-20	≤ 10
允许的最大偏差 (%)	±20	±25	±30	±50



图C.1　凝血酸衍生物的提取离子色谱图