

国家标准《化妆品中功效组分虾青素的测定 高效液相色谱法》征求意见稿编制说明

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准根据国标委发[2020]53号《国家标准化管理委员会关于下达2020年第四批国家标准制订计划的通知》制定，项目名称《化妆品中功效组分虾青素的测定 高效液相色谱法》，项目编号为20205010-T-607。主要起草单位：北京市产品质量监督检验研究院，项目周期24个月，计划应完成时间为2022年。

1.2 主要工作过程

起草阶段：

2020年12月标准立项后成立起草小组，广泛收集国内外化妆品中虾青素的检测方法标准与文献资料，总结目前国内外常用的试验方法，从试验原理、适用范围、仪器设备、试验条件、试验参数、试验步骤等方面对各试验方法进行全面细致的对比研究。在符合标准工作规划和标准化计划要求的基础上，开展化妆品中虾青素的测定方法标准的研制。确定标准编制原则和结构框架，基于标准、文献资料提出了化妆品中虾青素的检测方法及方法的适用范围，确定试验原理及前处理方法、研究选择适用的检测仪器，优化前处理条件及仪器运行参数；选取代表性样品按照标准中规定的试验方法进行实验室内与实验室间的比对试验，以此评估制定标准的可靠性、先进性和适用性。在此基础上，形成了征求意见稿及其编制说明。

1.3 主要参加单位和工作组成员：

本标准由北京市产品质量监督检验研究院、上海香料研究所有限公司起草。

二、标准编制原则和主要内容

2.1 标准编制原则

本标准起草过程中，主要按 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》和 GB/T20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分：试验方法标准》的要求进行编写。

2.2 标准制定中各项技术内容的确定

2.2.1 虾青素的理化性质

表 1 虾青素的名称、INCI 名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

序号	名称	INCI名称	CAS号	分子式	相对分子质量
1	虾青素	Astaxanthin	472-61-7	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	596.84

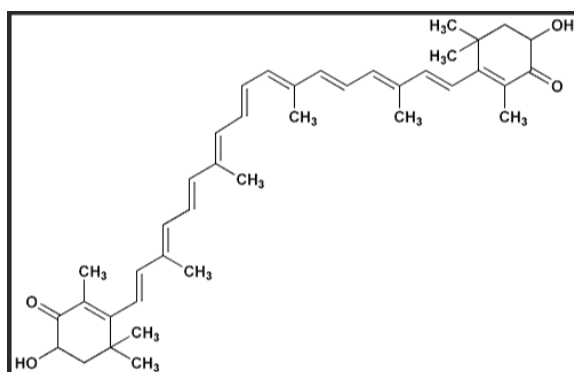


图 1 虾青素结构式

2.2.2 样品提取条件的选择

由于虾青素样品不稳定，遇光、热等容易发生降解，因此样品溶液应加入 BHT 抗氧化剂，增加分析过程中样品溶液的稳定性。同时，由于虾青素属于脂溶性的酮式类胡萝卜素，故采用 β -阿朴胡萝卜素醛作为内标，内标法定量，以保证化妆品中虾青素含量的准确测定。

2.2.2.1 提取溶剂的选择

虾青素易溶于大部分有机溶剂，本实验选取乙醚、石油醚、正己烷、甲醇-二氯甲烷（3:1，v/v）四种非极性溶剂作为提取溶剂，比较不同提取溶剂对化妆

品中虾青素回收率的影响。结果表明，甲醇-二氯甲烷（3:1，v/v）对虾青素提取效果最佳，显著高于其他提取溶剂（ $p<0.05$ ）（见表 2）。

表 2 不同提取溶剂对虾青素提取效果的影响

提取溶剂	虾青素回收率 (%) ^a
乙醚	72.2±1.47
石油醚	72.9±2.61
正己烷	61.2±1.82
甲醇-二氯甲烷（3:1，v/v）	95.8±1.73

a. $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

2.2.2.2 皂化液浓度的选择

皂化液浓度影响虾青素的提取效果，不同皂化液浓度提取结果见表 3。由表 3 可知，在 0~4℃条件下，随着皂化液浓度的增加，虾青素的回收率先增加后下降，0.1 mol/L 的浓度，虾青素回收率最高为（95.8±1.73）%，显著高于其他浓度（ $p<0.05$ ）（见表 3）。

表 3 不同浓度皂化液（氢氧化钠-甲醇）对虾青素提取效果的影响

氢氧化钠-甲醇浓度 (mol/L)	虾青素回收率 (%) ^a
0.01	72.5±2.17
0.05	83.5±2.68
0.1	95.8±1.73
0.5	66.8±2.03

a. $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

2.2.2.3 皂化时间的选择

皂化时间影响虾青素的提取效果，不同皂化时间提取结果见表 4。由表 4 可知，在 0~4℃条件下，随着皂化时间的延长，虾青素的回收率增加，12h 时皂化完全，虾青素回收率为（95.8±1.73）%，皂化时间继续延长至 16h，虾青素回收率显著下降。表 4 中皂化后的虾青素回收率显著高于未皂化的虾青素（ $p < 0.05$ ）。但是，当皂化时间过长时，虾青素会发生不同程度的降解，结果导致虾青素回收率降低。故皂化时间控制在 12h 最佳。

表 4 不同皂化时间对虾青素提取效果的影响

时间 (h)	虾青素回收率 (%) ^a
空白	33.0±2.62

2h	66.5±1.63
4h	77.7±2.55
8h	83.1±1.76
12h	95.8±1.73
14h	92.1±1.35
16h	85.8±2.05

a. $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

2.2.3 色谱条件的选择

2.2.3.1 色谱柱的选择

Shim-pack GIST C18 (2 μ m, 2.1 mm×100mm)、Kinetex[®] F5 100A (1.7 μ m, 2.1 mm×100mm)、ACQUITY UPLC[™] BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm×100mm)、shim-pack XR ODSIII (1.6 μ m, 2.0 mm×100mm)

实验比较了 4 种色谱柱的分离效果。结果显示, 使用 Shim-pack GIST C18 (2 μ m, 2.1 mm×100mm) 和 Kinetex[®] F5 100A (1.7 μ m, 2.1 mm×100mm) 色谱柱, 虾青素在色谱柱上保留较弱, 色谱峰展宽, 与杂质成分色谱峰相互重叠。使用 ACQUITY UPLC[™] BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm×100mm) 和 shim-pack XR ODSIII (1.6 μ m, 2.0 mm×100mm) 色谱柱对目标化合物进行分离, 虾青素化合物能够与杂质成分达到很好的分离效果, 两种色谱柱分别采用 1.7 μ m 和 1.6 μ m 填料, 100mm 和 150mm 柱长。shim-pack XR ODS III (1.6 μ m, 2.0 mm×100mm) 在相同的液相条件下, 不仅保证了较理想的峰形, 而且对虾青素化合物的分离效果更为显著。为此最终选择 shim-pack XR ODSIII (1.6 μ m, 2.0 mm×100mm) 色谱柱为分离色谱柱。

2.2.3.2 流动相的选择

实验比较了甲醇、甲醇-异丙醇 (95:5, v/v)、甲醇-1%磷酸 (85:15, v/v)、甲醇-水 (85:15, v/v)、甲醇-水 (95:5, v/v) 等流动相体系洗脱。结果显示, 所考察的 5 种以甲醇为主成分的流动相, 在 100% 甲醇和甲醇-异丙醇 (95:5, v/v) 等度洗脱时, 虾青素保留时间短, 样品中非极性杂质化合物与虾青素目标化合物分离效果不显著, 存在共流出现象, 对虾青素准确性、定量分析有一定的干扰。在甲醇-1%磷酸 (85:15, v/v)、甲醇-水 (85:15, v/v) 等度洗脱时, 虾青素保留时间延长, 与杂质化合物分离效果较好, 但虾青素峰形展宽, 且不能够实现快速分析的目的。在甲醇-水 (95:5, v/v) 等度洗脱时, 虾

青素能够获得理想的保留时间，但部分杂质化合物，在采集时间内，不能够充分洗脱，重复采集过程中，对重复性产生影响。故确定甲醇-水（95:5，v/v）为初始条件，采取梯度洗脱的方式，绝大部分杂质能够有效洗脱去除，分离效果较好。

2.2.3.3 梯度洗脱条件的优化

以上述确定流动相为初始条件，通过不断优化梯度洗脱条件，最终确定的色谱梯度条件见表5。

表 5 梯度洗脱程序

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0.00	95	5
3.95	95	5
4.00	100	0
8.00	100	0
8.05	95	5
12.00	95	5

2.2.3.4 紫外检测波长优化

对虾青素化合物在 200-800nm 波长范围，全波长扫描，虾青素在 471nm 具有最强吸收，因此选择 471nm 作为虾青素的液相分析波长。

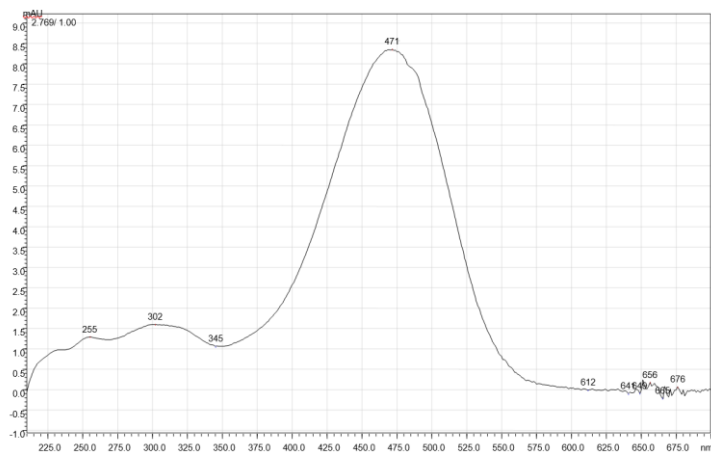


图 2 虾青素紫外谱图

2.2.4 方法验证

2.2.4.1 标准溶液的配制及标准曲线的绘制

(1) 标准溶液的配制

虾青素标准储备溶液：准确称取虾青素标准品 10mg（精确至 0.1 mg）于棕色容量瓶中，用丙酮溶解后定容至 100 mL，配制成浓度为 100 μ g/mL 的标准储备液, 充氮密封，置于-18 $^{\circ}$ C冰箱中避光保存，有效期 1 个月。

内标标准储备溶液：准确称取 β -阿朴胡萝卜素醛标准品 10mg（精确至 0.1 mg）于棕色容量瓶中，用丙酮溶解后定容至 100 mL，配制成浓度为 100 μ g/mL 的标准储备液, 充氮密封，-18 $^{\circ}$ C避光保存，有效期 1 个月。

虾青素标准中间液（10 μ g/mL）：从虾青素标准储备溶液中准确移取 10.0mL溶液于100 mL棕色容量瓶中，用甲醇-二氯甲烷溶液定容至刻度，-18 $^{\circ}$ C避光保存。

标准工作溶液：准确移取虾青素标准中间液至10mL棕色容量瓶中，以甲醇-二氯甲烷溶液稀释，配制成0.05 μ g/mL，0.1 μ g/mL，0.2 μ g/mL，0.5 μ g/mL，1.0 μ g/mL，2.0 μ g/mL的系列标准溶液，再加入内标标准储备溶液200 μ L，用甲醇-二氯甲烷溶液定容，-18 $^{\circ}$ C避光保存，现用现配。

(2) 标准色谱图

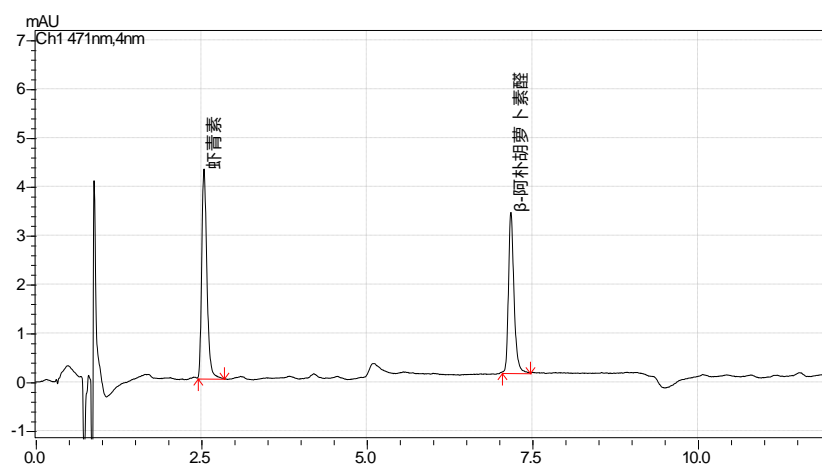


图3 虾青素标准溶液色谱图

(3) 标准曲线图

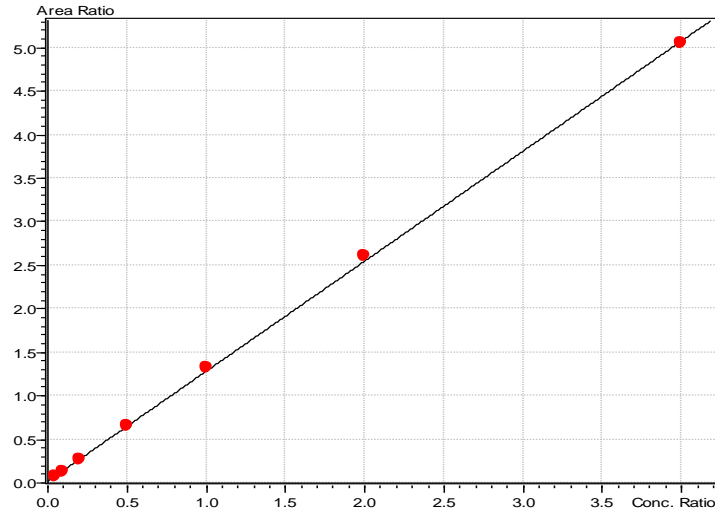


图4 虾青素标准曲线图

2.2.4.2 线性范围、相关系数、检出限和定量限

配制标准系列溶液，以峰面积对质量浓度绘制标准曲线，结果表明，在相应的质量浓度内，虾青素的峰面积与质量浓度具有良好的线性关系。根据不同基质，向不含目标物质的空白样品中定量添加虾青素溶液，采取内标法定量。按优化后的前处理方法及色谱方法，进行检测，计算信噪比（S/N）。以S/N=3为检出限，以S/N=10为定量限。结果如表6所示。

表6 虾青素线性范围，相关系数、检出限和定量限

序号	化合物名称	线性范围 (mg/kg)	相关系数	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
1	虾青素	0.1~20.0	0.9999	0.15	0.50

2.2.4.3 方法回收率及精密度

向不含目标物的精华、化妆水、面膜基质中定量添加目标化合物的标准溶液，进行样品处理后，用标准曲线内标法计算出实际样品中目标物的含量与实际添加量之比的百分数作为方法回收率。进行加标回收试验，每个水平平行测定6次，结果见表7。

试验选取3种有代表性的阴性空白样品基质（精华、化妆水、面膜），分别定量添加低、中、高3个浓度水平，每一个添加水平重复测定6次，结果见表

7。

表 7 方法的回收率和精密度实验结果

样品名称	本底值 mg/kg	添加水平 mg/kg	实测值 mg/kg	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	相对标准偏 差 RSD%
精华	<0.5	0.50	0.412	82.4	85.2	2.5
			0.436	87.2		
			0.415	83.0		
			0.432	86.4		
			0.424	84.8		
			0.437	87.4		
		1.0	0.894	89.4	89.6	2.5
			0.935	93.5		
			0.902	90.2		
			0.866	86.6		
			0.887	88.7		
			0.892	89.2		
		5.0	4.57	91.4	92.8	1.7
			4.61	92.2		
			4.72	94.4		
			4.66	93.2		
			4.73	94.6		
			4.54	90.8		
化妆水	<0.5	0.50	0.405	81.0	85.8	5.2
			0.443	88.6		
			0.455	91.0		
			0.425	85.0		
			0.401	80.2		
			0.445	89.0		
		1.0	0.865	86.5	88.0	1.6
			0.863	86.3		
			0.895	89.5		
			0.891	89.1		
			0.872	87.2		
			0.891	89.1		

		5.0	4.67	93.4	92.0	2.8		
			4.42	88.4				
			4.74	94.8				
			4.68	93.6				
			4.46	89.2				
			4.63	92.6				
面膜	<0.5	0.50	0.432	86.4	89.2	3.3		
			0.435	87.0				
			0.442	88.4				
			0.441	88.2				
			0.471	94.2				
			0.455	91.0				
		1.0	0.895	89.5			90.5	1.4
			0.888	88.8				
			0.902	90.2				
			0.913	91.3				
			0.922	92.2				
			0.907	90.7				
	5.0	4.49	89.8	91.7	2.3			
		4.69	93.8					
		4.72	94.4					
		4.45	89.0					
		4.59	91.8					
		4.57	91.4					

2.3 解决的主要技术问题

本研究通过优化目标化合物的色谱分析参数，以及对不同类型样品的前处理方法进行摸索，最终建立了一套标准性的检测方法，解决的主要问题包括：

- (1) 确立了高效液相色谱法的检测参数，包括色谱柱、梯度洗脱程序、流动相、检测波长等的选择；
- (2) 确定了前处理方法，包括提取溶剂、提取方式的选择；
- (3) 完成了方法学的考察，包括线性范围、方法检出限和定量限、回收率

和精密度等；

(4) 完成了方法的适用性试验，对市售精华、化妆水、面膜等样品进行了检测。

2.4 修订标准时应列出与原标准的主要差异和水平对比

该标准属首次起草，无与原标准的主要差异和水平对比。

三、主要试验（或验证）情况分析、综述结论

3.1 实际样品检验

使用本研究建立的分析方法，测定了市售的精华、化妆水、面膜等样品，结果如表8所示。

表8 实际样品检测结果

编号	样品名称	虾青素含量 (mg/kg)
1	XX 原液	5.93
2	XX 精华液	0.742
3	XX 赋活精华液	0.6
4	XX 双抗精华	ND
5	XX 双效精华液	ND
6	XX 修护精华液	5.21
7	XX 美白祛斑精华	ND
8	XX 修护动力肌底液	24.5
9	XX 肌活精华原液	15.1
10	XX 抗皱精华	ND
11	XX 抗初老精华	ND
12	XX 青春精华水	ND
13	XX 凝时精华水	ND
14	XX 赋活爽肤水	ND
15	XX 爽肤水	ND
16	XX 淡印爽肤水	ND

17	XX 亮泽修护水	ND
18	XX 肌活水	ND
19	XX 紧致焕亮安瓶面膜	32.4
20	XX 补水修护面膜	ND
21	XX 提亮修护面膜	ND
22	XX 紧致面膜	ND
23	XX 保湿修护面膜	ND
24	XX 提亮面膜	ND
25	XX 紧致安瓶面膜	4.82

注：ND代表未检出

3.2 多方实验室方法比对验证

3.2.1 检测单位

- (1) 单位1：北京市食品安全监控和风险评估中心（北京市食品检验所）
- (2) 单位2：中国海关科学技术研究中心
- (3) 单位3：中国检验检疫科学研究院化妆品技术中心

3.2.2 检测内容

按照多家实验室方法验证的技术要求，三家验证单位对已建立的标准方法的特异性、线性、检出限、定量限、回收率、精密度进行了考察。实验结果统计见表9。

3.2.3 特异性

按照已建立的分析条件，对三种空白基质样品（精华、化妆水和面膜）和空白加标样品进行了分析，三家验证单位的分析结果表明三种空白基质对虾青素采用高效液相色谱法无干扰。

3.2.4 线性及检出限

三家实验室验证结果表明，虾青素在0.1mg/kg~20.0 mg/kg浓度范围内，线性关系良好。虾青素在方法给出的检出限浓度均可检出，方法给出的定量限合理。

3.2.5 回收率

三家实验室验证结果表明，虾青素在三种空白基质（精华、化妆水和面

膜)高、中、低3个浓度水平的方法回收率均在84.8%~93.7%之间。

3.2.6 精密度

三家实验室验证结果表明,实验室间的平均精密度在1.4%~3.2%之间。

表9 验证试验结果

化妆品基质	目标物	添加值(mg/kg)	回收率(%)			平均回收率(%)	RSD(%)
			单位1	单位1	单位1		
精华	虾青素	0.50	87.2	85.7	84.4	85.8	3.2
		1.0	89.2	89.3	89.2	89.2	2.0
		5.0	94.3	92.0	93.0	93.1	1.5
化妆水		0.50	86.2	84.1	87.4	85.9	2.5
		1.0	90.4	87.8	88.4	88.9	1.4
		5.0	96.0	91.4	93.8	93.7	2.5
面膜		0.50	83.7	83.7	86.9	84.8	3.0
		1.0	90.4	88.4	88.1	89.0	1.5
		5.0	94.8	91.3	93.3	93.1	1.7

3.3 技术经济论证,预期的经济效果

虾青素(Astaxanthin), 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素是类胡萝卜素的一种,广泛存在于自然界,如大多数甲壳类动物中。虾青素具有多种生物功能,抗氧化能力极高,并且在抗炎、抗肿瘤、增强免疫功能、延缓衰老等方面有一定效果,广泛应用于饲料、食品、医药及化妆品等行业。

在现阶段,虾青素作为一种新型化妆品原料出现在人们的视野,可添加在化妆水、精华、面膜中延缓皮肤衰老。但虾青素的生产成本高,有些化妆品厂家可能对自家产品添加虾青素进行虚假宣传,但并未真实添加或添加了极低量的虾青素。因此,为了维护消费者的权益,建立化妆品中虾青素的检测方法,有利于提升整个行业的产品质量水平,同时也利于行政监管部门的监督管理。

对于虾青素的检测,目前国内外报道的方法有分光光度法和高效液相色谱法等。分光光度法具有快速简单、适用范围广、成本低等优点,但是只能对虾青素总量进行估算。高效液相色谱法分离效果好、灵敏度高、选择性好成为目前测定虾青素的常用方法。我国测定虾青素的标准方法主要适用于水产品、动物源性食品、红球藻等。目前法定标准中没有针对化妆品中的虾青素含量的测定方法。因此,建立化妆品中的虾青素的检测方法,有利于提升整个行业的产品

质量水平，有利于规范企业的生产管理及市场经营，同时也利于行政监管部门的监督管理，做到有法可依，有章可循。

四、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况

据查证，目前尚无相关国际标准或国外先进标准。

五、与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

本标准技术指标符合我国现行相关法律、法规、规章及相关标准要求。

六、其它应予说明的事项

无。