

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

牙膏中 6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定 高效液相色谱法

Determination of 6-Methylcoumarin, Dihydrocoumarin, 7-Methylcoumarin, 7-Methoxycoumarin, 7-Ethoxy-4-methylcoumarin in toothpastes High Performance Liquid Chromatography

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照 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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国口腔护理用品标准化技术委员会（SAC/TC 492）归口。

本文件起草单位：***。

本文件主要起草人：***。

牙膏中 6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定 高效液相色谱法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关规定的条件。

1 范围

本文件描述了牙膏中6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的高效液相色谱测定方法的原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤、结果计算、回收率和精密度、允许差等内容。

本文件适用于牙膏中6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的测定。

本文件中6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的检出限均为0.3 mg/kg，定量限均为1.0 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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

牙膏中6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素经甲醇提取后，采用高效液相色谱-二极管阵列检测器检测，以保留时间和光谱图定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为色谱纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇。

5.3 乙腈。

5.4 磷酸：分析纯。

5.5 甲酸。

5.6 0.1%磷酸溶液（体积分数）：取 1 mL 磷酸（5.4），加入 999 mL 水（5.1），混合均匀。

- 5.7 20%甲醇溶液（体积分数）：准确量取 20 mL 甲醇（5.2），加水（5.1）至 100 mL，混合均匀。
- 5.8 标准品：6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准品的英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和化学结构式见附录 A 表 A.1，纯度均不小于 98%。
- 5.9 标准储备液：分别准确称取各标准品（5.8）10 mg（精确至 0.0001 g）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2）溶解并稀释至刻度，即得质量浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，可保存 6 个月。
- 5.10 滤膜：孔径 0.22 μm ，材质为聚四氟乙烯。

6 仪器设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配有二极管阵列检测器。
- 6.2 分析天平：感量 0.001 g 和 0.000 1 g。
- 6.3 漩涡振荡器。
- 6.4 超声波清洗仪：工作频率不低于 40 kHz。
- 6.5 离心机：最高转速不低于 10 000 r/min。
- 6.6 氮吹浓缩仪。

7 试验步骤

7.1 试样处理

称取 1 g（精确至 0.00 1 g）试样，置于 50 mL 具塞离心管中，准确加入 10 mL 甲醇（5.2），具塞后涡旋混合混匀，超声 15 min。冷却后 10 000 r/min 离心 5 min。取 1.0 mL 上层清液于玻璃试管中，45 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干，加入 1.0 mL 20% 甲醇溶液（5.6）复溶，经 0.22 μm 滤膜过滤后待高效液相色谱仪测定。

7.2 测定

高效液相色谱测定参考条件如下：

- 色谱柱规格：T₃ 色谱柱，1.8 μm ，150 mm \times 2.1 mm，或性能相当者；
- 流动相：乙腈（5.3）：和 0.1% 磷酸溶液，梯度洗脱条件见表 1；
- 流动相流速：0.3 mL/min；
- 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 检测波长：225 nm 和 320 nm；
- 进样量：10 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	乙腈 (%)	0.1% 磷酸溶液 (%)
0	10	10
5	20	80
20	30	70
25	80	20
30	80	20
31	10	90
35	10	90

7.3 标准工作曲线绘制

混合标准中间液：分别移取各标准储备溶液（5.9）0.50 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释

至刻度，混匀。得到质量浓度均为 50 mg/L 的混合标准储备液。

标准工作溶液：用 20% 甲醇溶液（5.7）逐级稀释混合标准中间液，得到浓度均为 0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL 标准工作溶液。

按色谱条件（7.2）对标准工作溶液进行测定，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。

6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准品溶液的高效液相色谱图见附录B图B.1，紫外吸收光谱图见附录B图B.2至图B.6。

7.4 试样测定

按色谱条件测定试样溶液（7.1），如果检出目标物质的色谱峰的保留时间与标准品一致，且紫外吸收光谱图与标准品一致，可认定样品中存在目标物质，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均应在标准曲线的线性范围之内，超出线性范围的试样溶液可用 20% 甲醇溶液（5.7）适当稀释后进行测定。需要时，可采用高效液相色谱串联质谱法进行确证实验，参见附录 C。

7.5 空白试验

除不称取试样外，均按7.1~7.2步骤进行测定。

8 结果计算

试样中目标物含量按公式（1）计算：

$$X_i = \frac{(c_i - c_0) \times V \times 1000}{m \times 1000} \times k \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i ——试样中目标物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c_i ——从标准曲线得到的试样溶液中目标物的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_0 ——从标准曲线得到的空白样品溶液中目标物的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——加入甲醇溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

k ——超线性范围的稀释倍数。

计算结果以两次平行测定结果的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 回收率

在添加浓度为1.0 mg/kg ~ 10 mg/kg范围内，回收率在80% ~ 110 %之间。

10 精密度

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

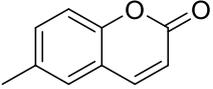
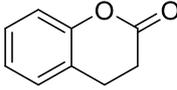
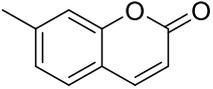
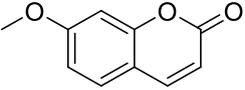
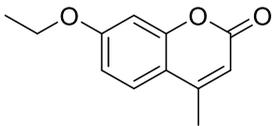
附录 A

(资料性)

6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准品信息

6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量及化学结构式见表A.1。

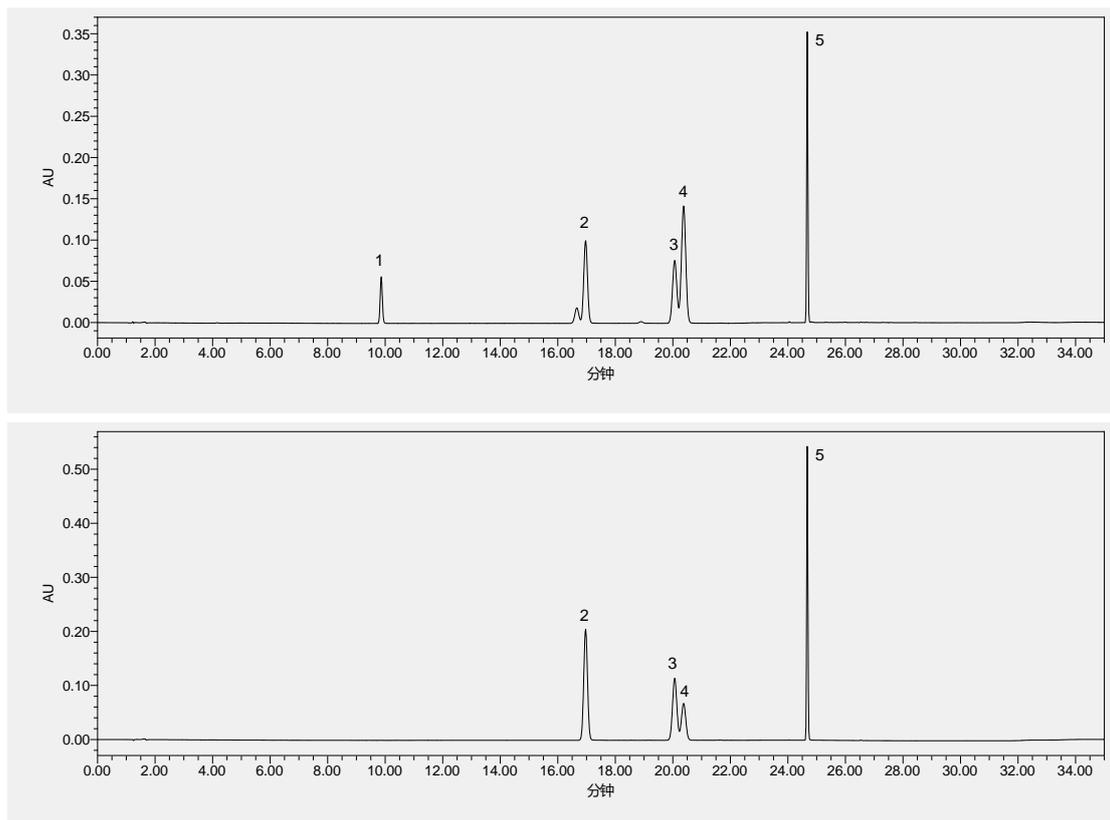
表 A.1 6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准品信息

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	化学结构式
1	6-甲基香豆素	6-Methylcoumarin	92-48-8	C ₁₀ H ₈ O ₂	160.17	
2	二氢香豆素	Dihydrocoumarin	119-84-6	C ₉ H ₈ O ₂	148.16	
3	7-甲基香豆素	7-Methylcoumarin	2445-83-2	C ₁₀ H ₈ O ₂	160.17	
4	7-甲氧基香豆素	7-Methoxycoumarin	531-59-9	C ₁₀ H ₈ O ₃	176.17	
5	7-乙氧基-4-甲基香豆素	7-Ethoxy-4-methylcoumarin	87-05-8	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	204.23	

附录 B (资料性)

6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的色谱图和光谱图

6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的高效液相色谱图见图 B.1，光谱图见图 B.2 至图 B.6。



1——二氢香豆素；2——7-甲氧基香豆素；3——6-甲基香豆素；4——7-甲基香豆素；5——7-乙氧基-4-甲基香豆素

图 B.1 6-甲基香豆素、二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的高效液相色谱图（上：225 nm，下：320 nm）

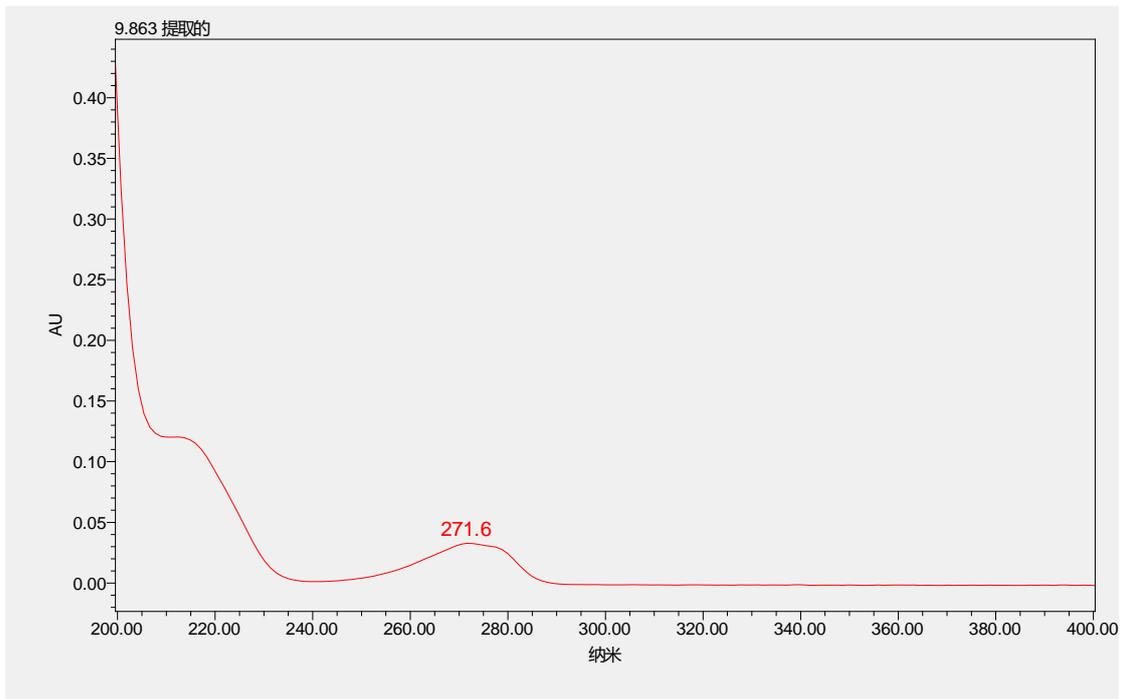


图 B.2 二氢香豆素标准溶液的光谱图

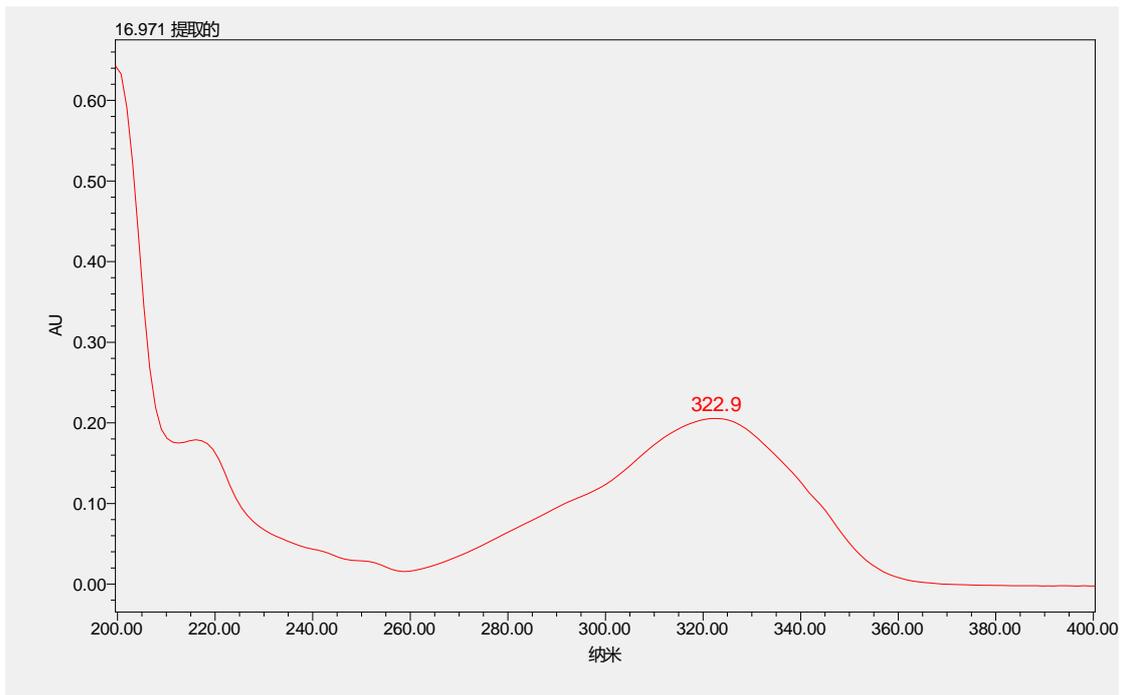


图 B.3 7-甲氧基香豆素标准溶液的光谱图

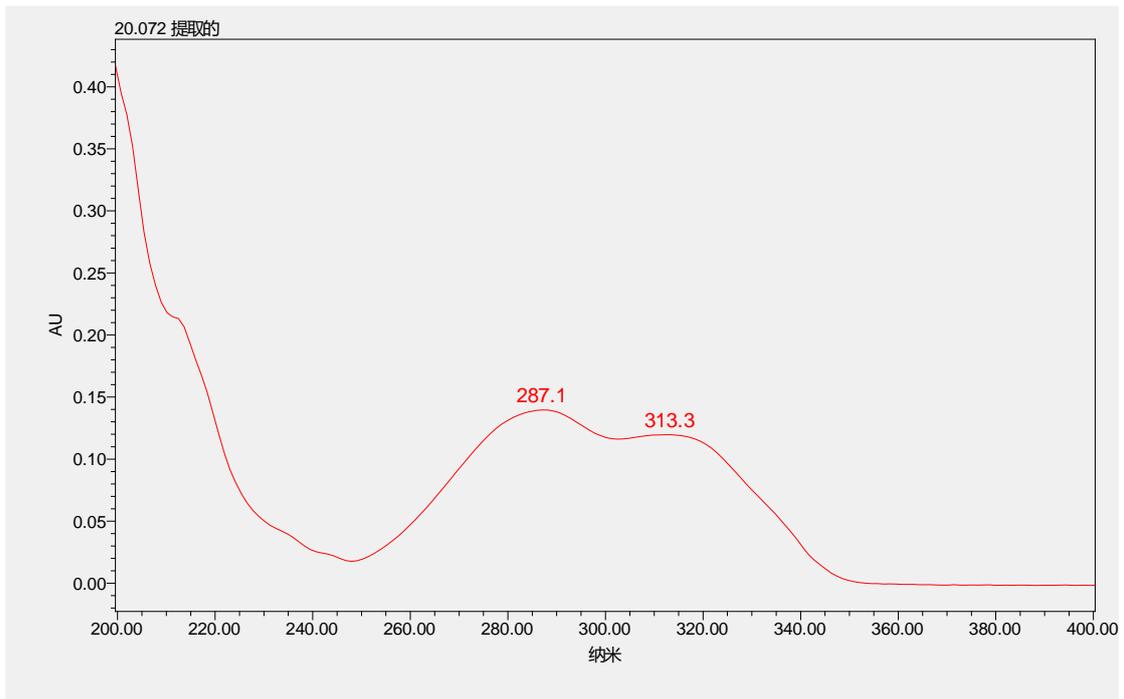


图 B.4 6-甲基香豆素标准溶液的光谱图

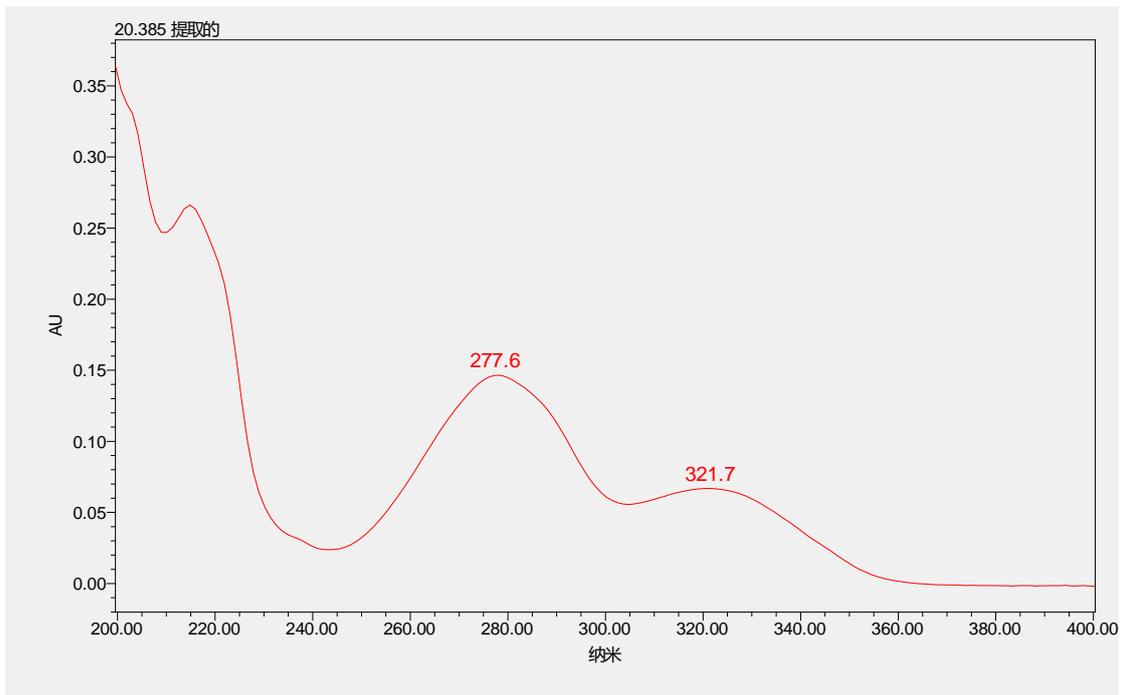


图 B.5 7-甲基香豆素标准溶液的光谱图

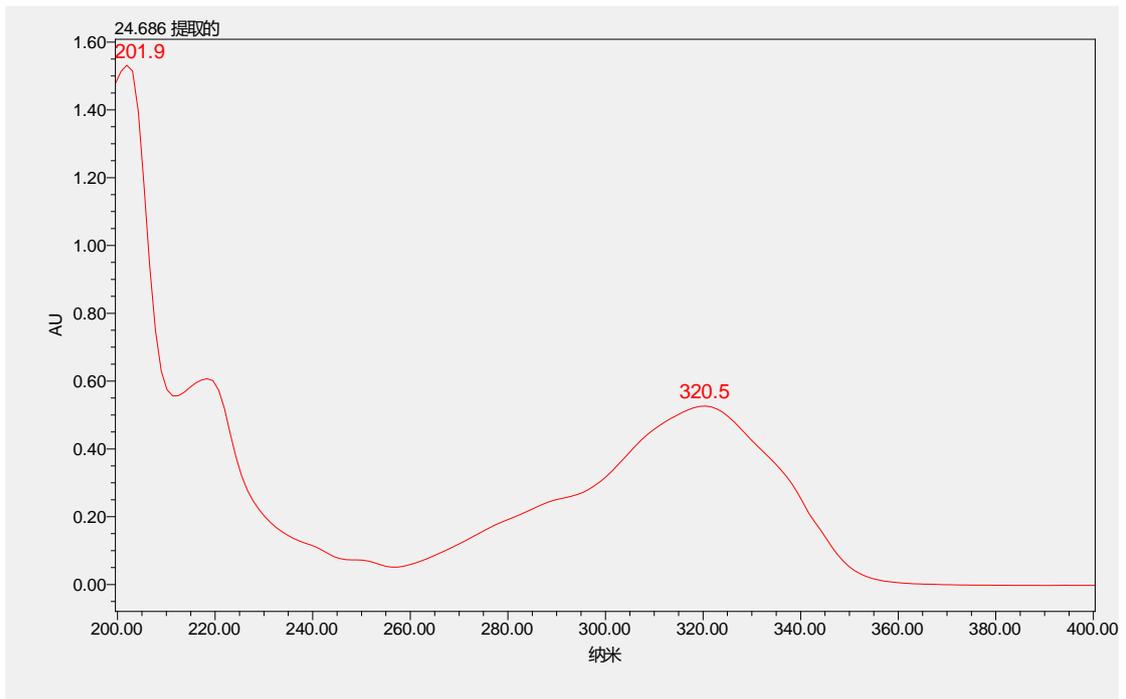


图 B. 6 7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的光谱图

附 录 C
(资料性附录)
确证实验

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：T₃ 柱，1.8 μm，150 mm×2.1 mm（内径）；
- b) 流动相：A 为乙腈，B 为 0.1% 甲酸水溶液，梯度洗脱程序：0 min ~ 5 min，10% ~20% A；5 min ~20 min，20% ~30% A；20 min ~ 25 min，30% ~ 80% A；25 min ~30 min，80% A；30 min ~ 31 min，80% ~10% A；31 min ~ 35 min，10% A；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- 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) 喷雾电压（IS）：5000 V；
- d) 离子源温度（TEM）：500°C；
- e) 雾化气压力（GS1）：50 psi；
- f) 辅助气压力（GS2）：50 psi；
- g) 气帘气压力（CUR）：40 psi；
- h) 碰撞气压力（CAD）：9 psi；
- i) 检测方式：多反应监测模式（MRM），5 种香豆素的母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量，见表 C.1；提取离子色谱图见图 C.1。

表 C.1 5 种香豆素的质谱 MRM 模式优化参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
二氢香豆素	149.2	107.1, 121.0	40	25, 20
7-甲氧基香豆素	177.2	121.2, 133.2	80	30, 20
6-甲基香豆素	161.2	105.0, 115.2	60	30, 25
7-甲基香豆素	161.2	105.0, 115.2	70	32, 26
7-乙氧基-4-甲基香豆素	205.2	177.1, 105.2	100	25, 31

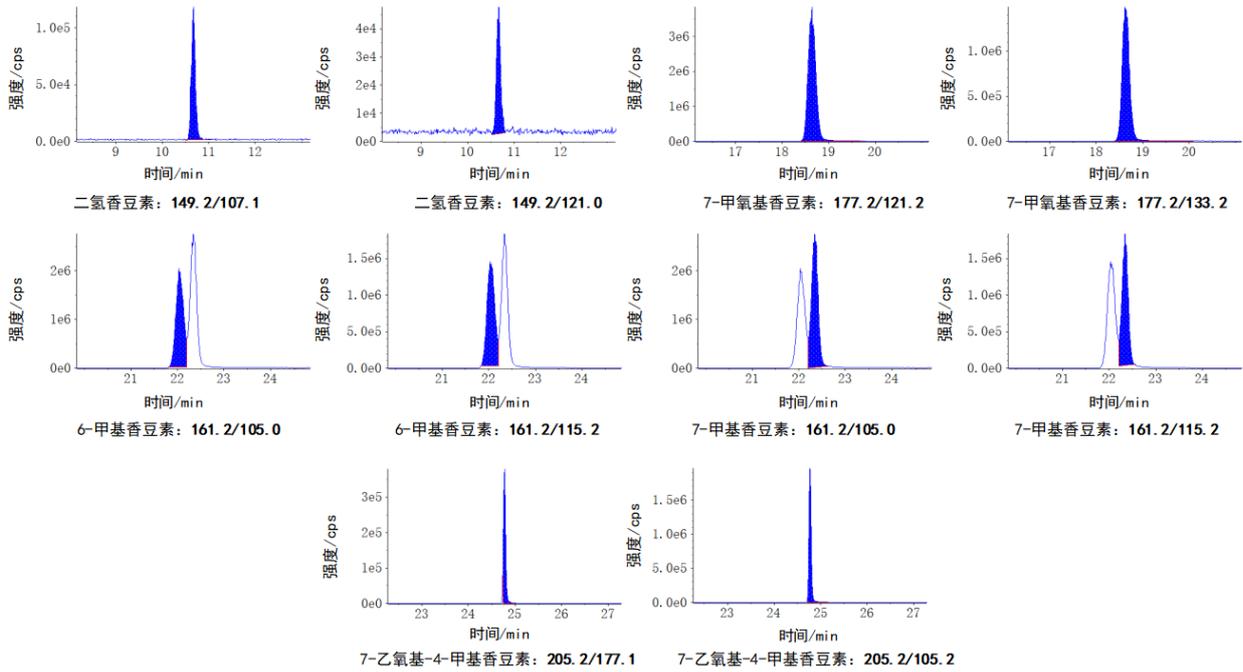


图 C.1 5 种香豆素提取离子色谱图

C.3 定性测试

进行试样测定时，将试样适当稀释，按液相色谱参考工作条件（见 C.1）和质谱参考工作条件（见 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的相一致，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，相对偏差不超过规定的范围（见表 C.2），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 $k/\%$	$k \geq 50$	$50 > k \geq 20$	$20 > k \geq 10$	$k < 10$
允许的最大偏差/ $\%$	± 20	± 25	± 30	± 50