

国家标准《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》征求意见稿 稿编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

本标准根据国标委发[2021]41号《国家标准化管理委员会关于下达2021年第四批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》立项，项目名称《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》，项目编号为20214625-T-607。主要起草单位：苏州世谱检测技术有限公司、苏州质量检测科学研究院、广州质量监督检测研究院等。项目周期24个月，计划应完成时间2023年12月31日。

2. 制定背景

口腔清洁护理用品产业蓬勃发展，牙膏等产品已成为人们每天使用的日用产品，其质量安全性问题的关注度日益提高。监控口腔清洁护理用品牙膏的质量安全具有重要意义。

香豆素类化合物是一类具有芳香气味，母核为苯并吡喃酮结构的天然产物，广泛分布于植物界，可作为香料被用于添加在牙膏中；也可能会随着天然植物提取成分的添加带入到牙膏中。而研究表明，香豆素类化合物存在一定的毒副作用，如二氢香豆素可引起过敏反应；部分香豆素化合物可引起肝损伤。GB 22115-2008《牙膏用原料规范》将6-甲基香豆素列为限用组分，规定其最大允许使用浓度为0.003%；将二氢香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素、7-乙氧基-4-甲基香豆素列为禁用组分。因此，制订牙膏中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-甲基香豆素的检测方法标准，有助于填补国内相关领域检测标准的空白，健全口腔清洁护理牙膏用品中禁限用原料检测标准体系，为政府部门对国内口腔清洁护理用品牙膏生产、销售市场的监管提供技术支撑，有效打击不法企业，规范市场良性竞争，解决国内口腔清洁护理用品质量存在严重的隐患问题，提高我国口腔清洁护理用品质量水平，切实保障消费者的健康安全和权益。

目前对于牙膏中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-甲基香豆素的测定还缺乏统一的国家检测方法标准。也无相关文献报道。因此研究相关的检测技术是十分有必要的。本标准采用高效液相色谱技术，建立牙膏中 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-甲基香豆素含量的高效液相色谱法，为生产企业提供质量监控方法，主管部门加强对口腔清洁护理用品的监管提供必要的技术支持。

3. 主要工作过程

起草阶段：2022 年 1 月，根据国标委发[2021]41 号下达的国家标准制修订计划任务的通知，项目承担单位组建了标准编制工作小组，查询、收集和认真研究国内外标准及相关资料，并结合实验室的条件、牙膏基质特性和方法技术特点，初步设计实验方案。进行实验研究工作，优化确定仪器检测条件，优化确定产品的提取、净化条件，考察和论证方法的灵敏度、准确性、线性范围和适用性，并组织单位进行方法验证；于 2023 年 9 月 10 日完成并提交标准征求意见稿和编制说明。

征求意见阶段：***。

4. 主要参加单位和工作组成员等

本标准由苏州世谱检测技术有限公司、苏州质量检测科学研究院、广州质量监督检测研究院等负责联合起草。

本标准主要起草人：***、***、***、***等。

二、标准编制原则和主要内容

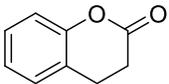
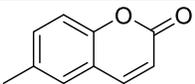
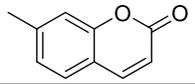
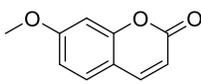
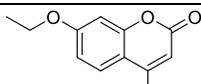
2.1. 标准编制原则

本标准的编制原则是既参考国外的最新方法技术，又考虑国内现有检测机构的检测能力和实际情况，确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。遵循 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/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的编写规则，并参考了国家食品药品监督管理总局发布的《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》。

2.2. 标准物质信息

二氢香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素、7-甲氧基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素标准物质信息可见表 1。

表 1 标准物质信息

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

2.3. 仪器参数的选择和优化

2.3.1 主要技术路线

称取 1 g (精确至 0.001 g) 试样, 置于 50 mL 具塞离心管中, 准确加入 10 mL 甲醇, 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℃氮吹至干, 加入 1.0 mL 20% 甲醇溶液复溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤后待高效液相色谱仪测定。

2.3.2 高效液相色谱参数的选择与优化

2.3.2.1 香豆素的紫外吸收光谱

选用配备二极管阵列检测器的高效液相色谱仪 (HPLC) 进行测定, 紫外光谱图用以目标物的定性。配制 10 mg/L 的二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素混合标准溶液, HPLC 检测后获得其紫外光谱图如图 1~5 所示。二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素分别在 200-290 nm、200-370 nm、200-360 nm、200-370 nm、200-365 nm 之间存在紫外吸收, 且 5 个香豆素化合物皆在低波长处有较强吸收。

二氢香豆素在 271.6 nm 处有紫外吸收峰, 但强度较低, 为满足检测需求, 选择在较短波长 225 nm 作为检测波长。7-甲氧基香豆素在 322.9 nm 处有紫外吸收峰, 6-甲基香豆素为 287.1 nm 和 313.3 nm 处存在 2 个紫外吸收峰, 7-甲基香豆素为 277.6 nm 和 321.7 nm 处存在 2 个紫外吸收峰, 7-乙氧基-4-甲基香豆素在 320.5 nm 处有 1

个紫外吸收峰。综上所述，7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素均有 1 个紫外吸收峰接近 320 nm，为排除低检测波长的可能存在的杂质干扰，选择 320 nm 作为检测波长。

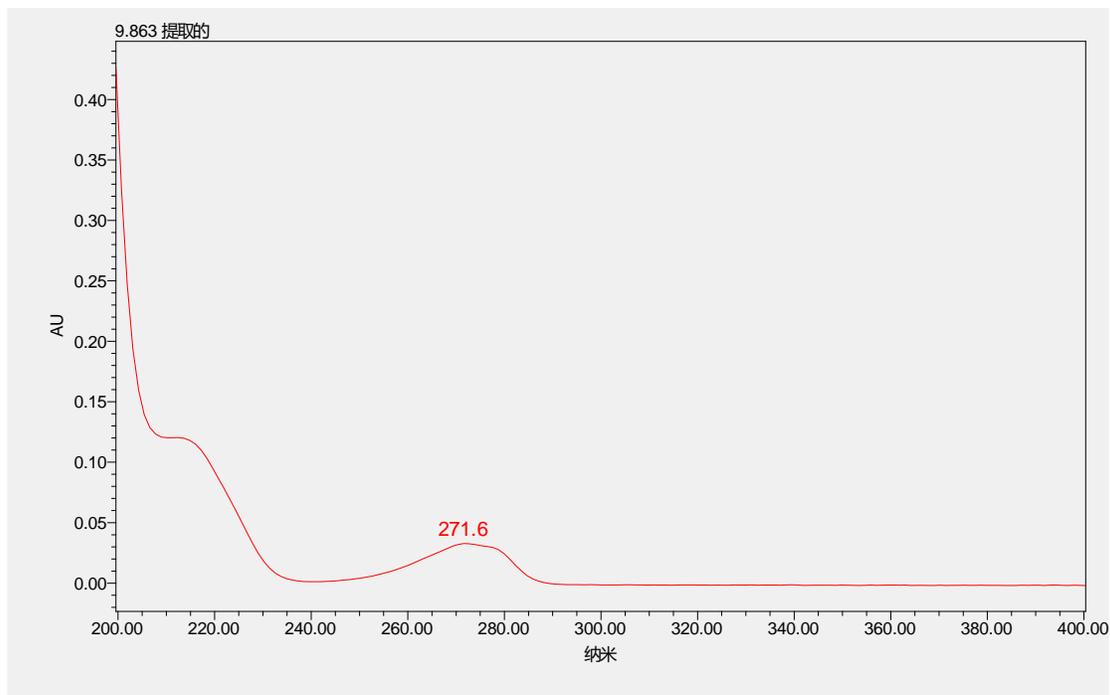


图 1 二氢香豆素标准溶液的光谱图

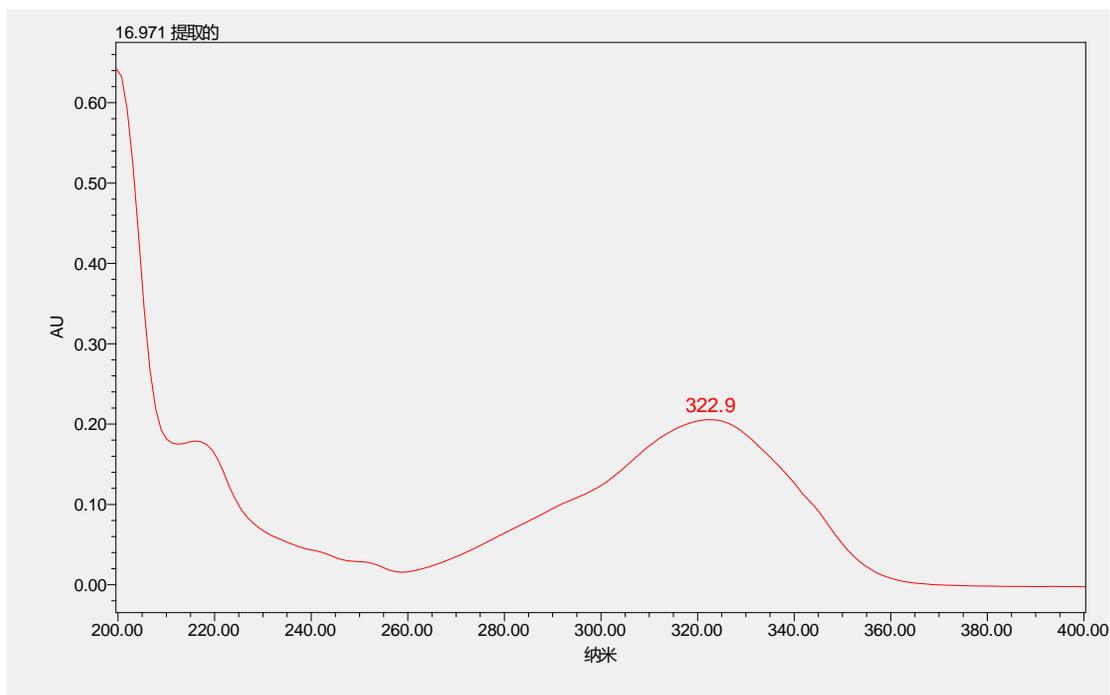


图 2 7-甲氧基香豆素标准溶液的光谱图

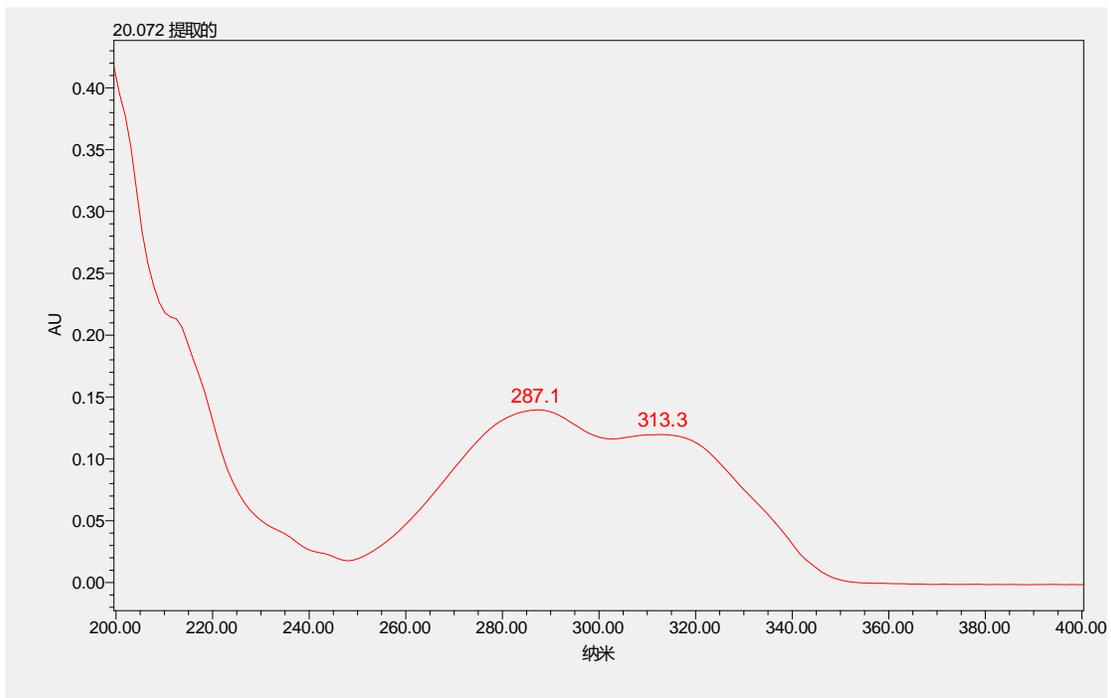


图3 6-甲基香豆素标准溶液的光谱图

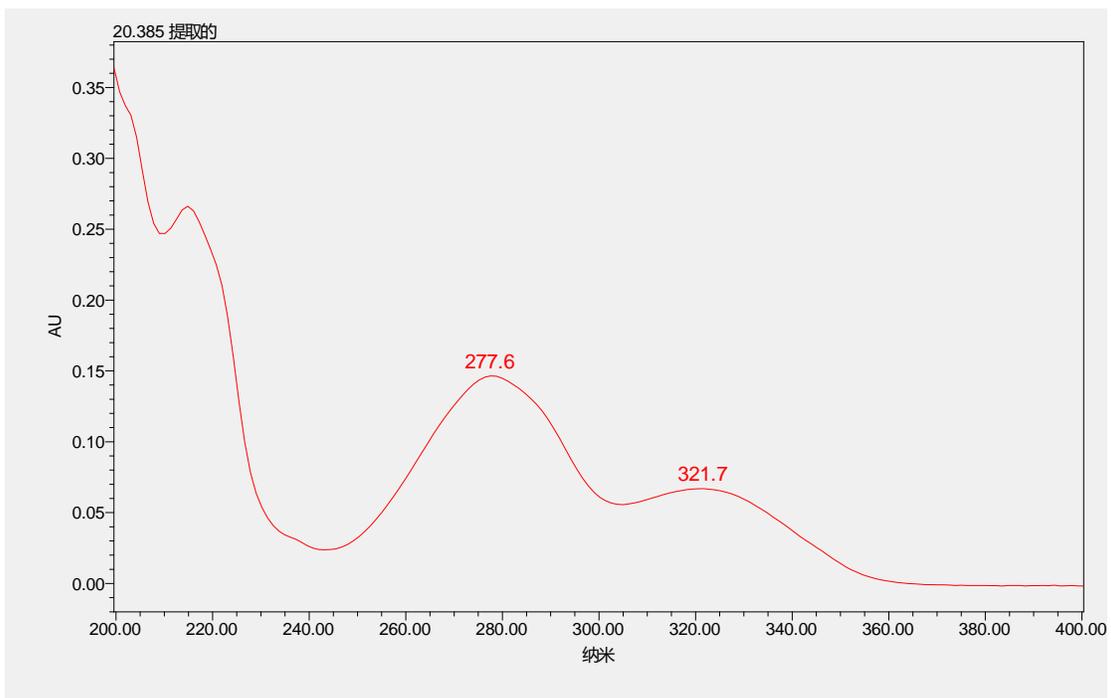


图4 7-甲基香豆素标准溶液的光谱图

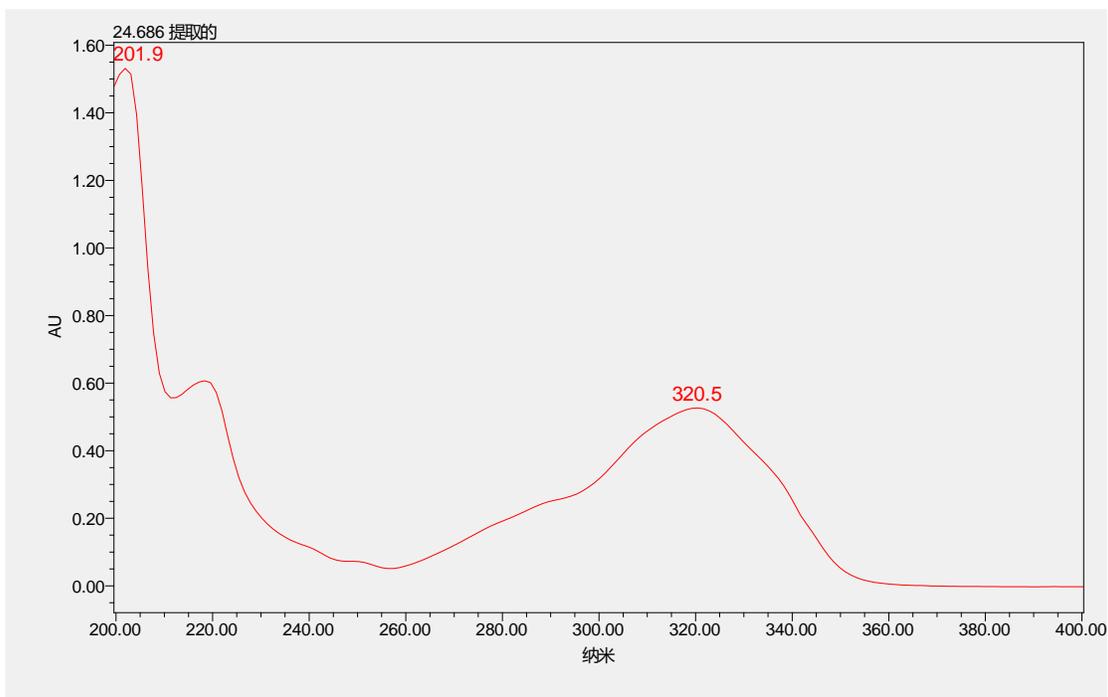


图5 7-乙氧基-4-甲基香豆素标准溶液的光谱图

2.3.2.2 色谱柱的选择

试验以乙腈-0.1%磷酸/水为流动相，比较了实验室常用的 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素的分离效果。结果发现6-甲基香豆素和7-甲基香豆素这对同分异构体无法分开（见图6）。

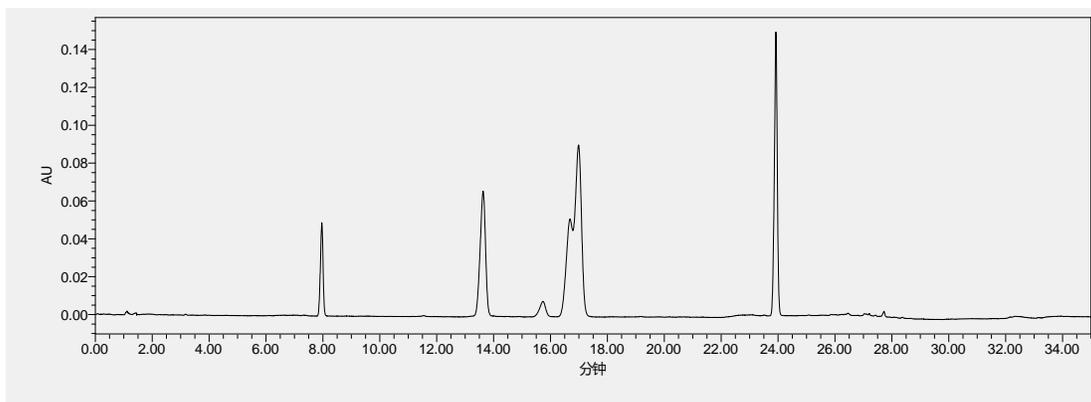


图6 香豆素化合物在常规 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离效果

为增加分离度，选择 Agilent poroshell EC C₁₈ (150 mm × 2.1mm, 2.7 μm) 色谱柱进行试验，结果发现分离度增加（见图7），但测试牙膏样本中发现由于样本杂质较多，表面活性剂等容易污染色谱柱，尝试继续更换成 Waters ACQUITY UPLC®

HSS T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱进行试验, 色谱柱污染现象改善, 且分离度及半峰宽皆有改善 (见图 8)。因此选择 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱作为本实验的色谱柱。

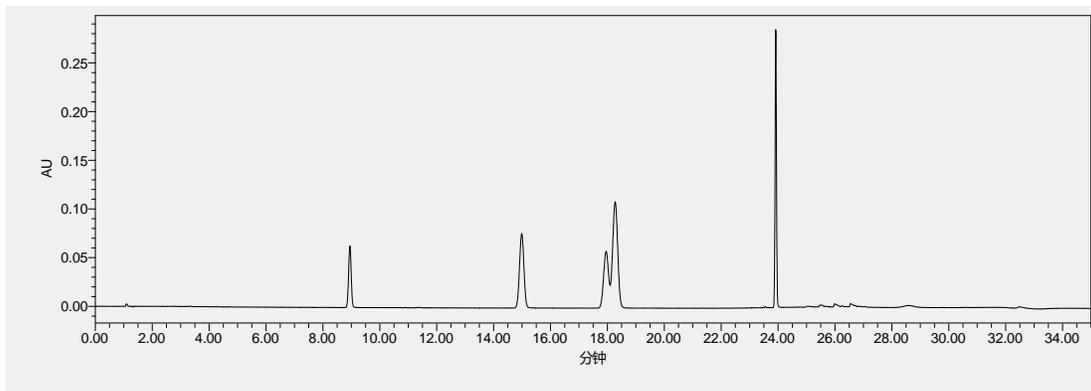


图 7 香豆素化合物在 Agilent poroshell EC C18 色谱柱分离效果

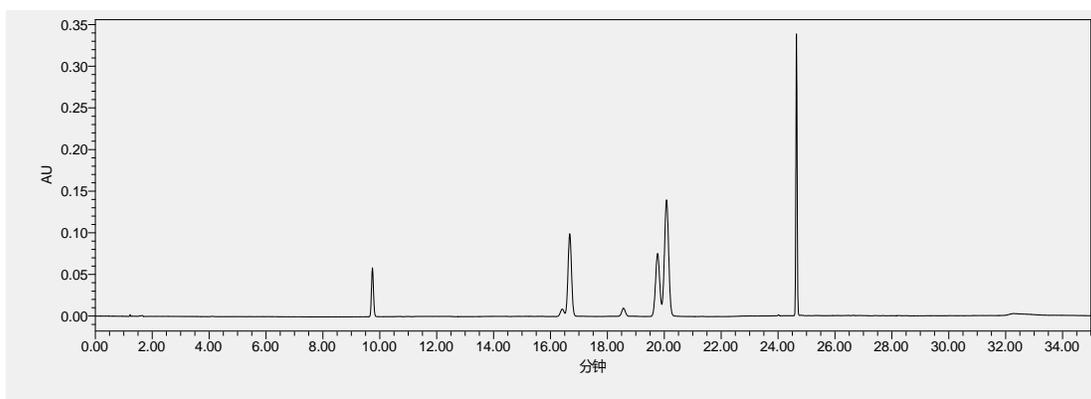


图 8 香豆素化合物在 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 色谱柱分离效果

2.3.2.3 流动相组成的选择

选择 HSS T3 色谱柱 (150 mm × 2.1mm, 1.8 μm), 考察流动相对二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素的分离效果。试验比较了乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸/水作为流动相系统时, 香豆素化合物的分离度。在使用乙腈和水作为流动相时, 二氢香豆素未见峰, 6-甲基香豆素和 7-甲基香豆素无法分离 (见图 9), 而将水相更改为 0.1%磷酸/水溶液后, 二氢香豆素正常出峰, 5 个化合物峰形尖锐对称, 且 6-甲基香豆素和 7-甲基香豆素分离度明显增加 (见图 10)。因此最终选择乙腈-0.1%磷酸/水作为本实验流动相。

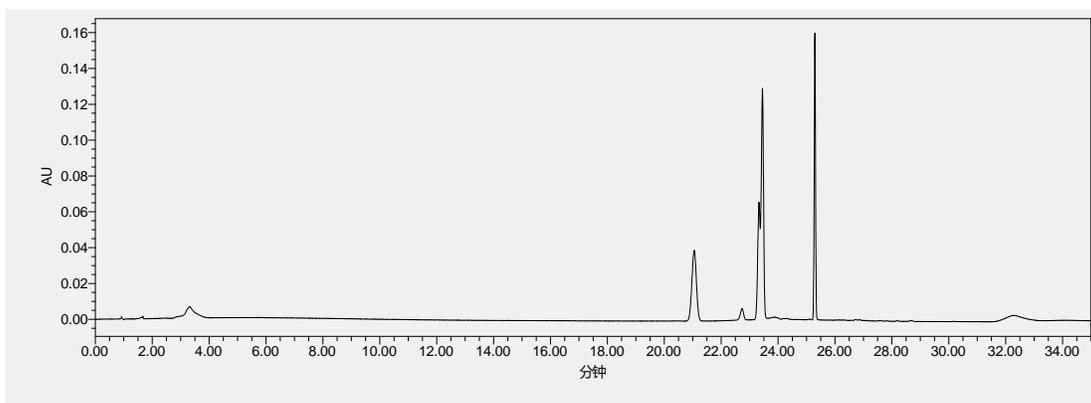


图 9 乙腈-水为流动相时，香豆素化合物出峰色谱图

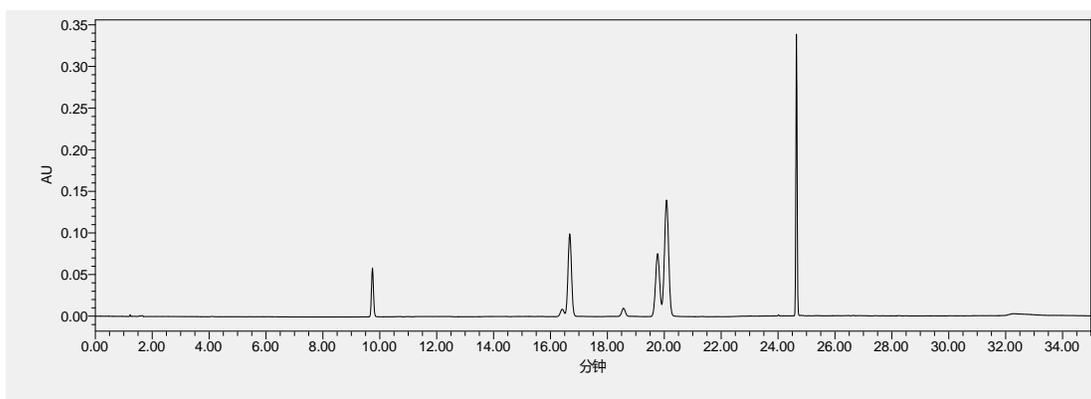


图 10 乙腈-0.1%磷酸/水为流动相时，香豆素化合物出峰色谱图

2.3.2.4 最终确定的高效液相色谱参数

- a) 色谱柱：HSS T3 色谱柱（150 mm × 2.1mm，1.8 μm），或性能相当者；
- b) 流动相：A：乙腈，B：0.1%磷酸/水；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30°C；
- e) 波长：225 nm 和 320 nm；
- f) 进样量：10 μL。

2.3.3 前处理条件的选择与优化

2.3.3.1 前处理条件

由于口腔清洁护理用品牙膏多以膏状存在，且原料复杂包括摩擦剂、洁净剂、润湿剂、胶粘剂、防腐剂、芳香剂、甜味剂、着色剂等，为尽量减少操作步骤和获得尽可能高的提取效率，实验首先选取牙膏采用混合有机溶剂直接超声提取。由于

香豆素类化合物在甲醇等有机溶剂中溶解性良好，在冷水中溶解度略差，实验选取甲醇/水混合溶剂进行提取。为系统研究不同比例甲醇水对牙膏中香豆素类化合物的提取效果，选取 3 个空白牙膏基质加标，制得含二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素 10 mg/kg 的试样，由于在检测时发现有机相比例高于 30% 时，香豆素类化合物有明显溶剂效应，因此分别考察 10% 甲醇水（初始流动相）、20% 甲醇水、30% 甲醇水和甲醇共 4 种溶剂的提取效果，其中使用甲醇时，采用先萃取后氮气吹干再复溶的步骤。每个样本平行测定 2 次，计算平均提取效率，结果见表 2。

表 2 不同比例混合溶剂对牙膏中 5 种香豆素化合物的提取效果

化合物	平均提取率 (%)			
	10% 甲醇水	20% 甲醇水	30% 甲醇水	甲醇
二氢香豆素	68.2	70.5	74.8	82.5
7-甲氧基香豆素	74.2	81.6	85.5	96.3
6-甲基香豆素	66.7	71.7	74.5	88.2
7-甲基香豆素	61.6	62.1	70.8	90.8
7-乙氧基-4-甲基香豆素	37.0	56.8	64.2	91.5

从表 2 可以看出，10% 甲醇水（初始流动相）、20% 甲醇水、30% 甲醇水提取回收率均未达到要求，尤其是 7-乙氧基-4-甲基香豆素在使用 10% 甲醇水提取时回收率仅为 37%，这可能是由于香豆素疏水性较高，在低比例有机相中的溶解度低。使用纯甲醇进行提取时，5 种香豆素回收率皆大于 80%。因此，实验中最终选取纯甲醇为提取溶剂。

2.3.3.2 超声提取时间的设置

本实验考察了超声时间对提取率的影响，并进行了优化，通过加标浓度为 10 mg/kg 的牙膏样品，分别考察超声功率为 250 W 时，超声 5 min、10 min、15 min、20 min 和 30 min 对提取率的影响，平行测定 2 次，计算平均提取效率。试验结果如表 3 所示，超声 15 min 之后，回收率未有明显变化，表明超声 15 min 已提取充分，因此，本实验选择超声 15 min。

表 3 不同超声时间对牙膏中的 5 中香豆素化合物的提取效果

化合物	平均提取率 (%)				
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
二氢香豆素	74.1	77.5	82.7	86.4	81.5
7-甲氧基香豆素	85.6	83.6	96.1	91.4	92.5
6-甲基香豆素	74.2	81.0	98.5	92.0	103.0
7-甲基香豆素	70.5	78.8	101.6	99.5	97.5
7-乙氧基-4-甲基香豆素	73.0	80.9	91.7	96.1	97.3

2.3.4 最终确定的样品前处理条件

称取1 g（精确至 0.001 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℃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。

2.3.5 液质联用阳性确证方法

由于牙膏样品种类繁多，配方组分也是各不相同，而液相色谱在定性方面存在不足，为了避免出现误判，建立了5种香豆素的液相色谱-质谱/质谱确证方法。必要时可以用于阳性样品或是疑似阳性样品的确证，保证检测结果的准确性。

经优化，液相色谱分离条件和质谱参数如下：

（a）液相色谱参考工作条件如下：

色谱柱：T3柱，1.8 μm，150 mm×2.1 mm（内径）；

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；

流速：0.3 mL/min；

柱温：30℃；

进样量：5 μL。

（b）质谱参考工作条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）；

扫描方式：正离子扫描；

喷雾电压（IS）：5000 V；

离子源温度 (TEM) : 500°C;

雾化气压力 (GS1) : 50 psi;

辅助气压力 (GS2) : 50 psi;

气帘气压力 (CUR) : 40 psi;

碰撞气压力 (CAD) : 9 psi;

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4; 提取离子色谱图见图11。

表 4 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

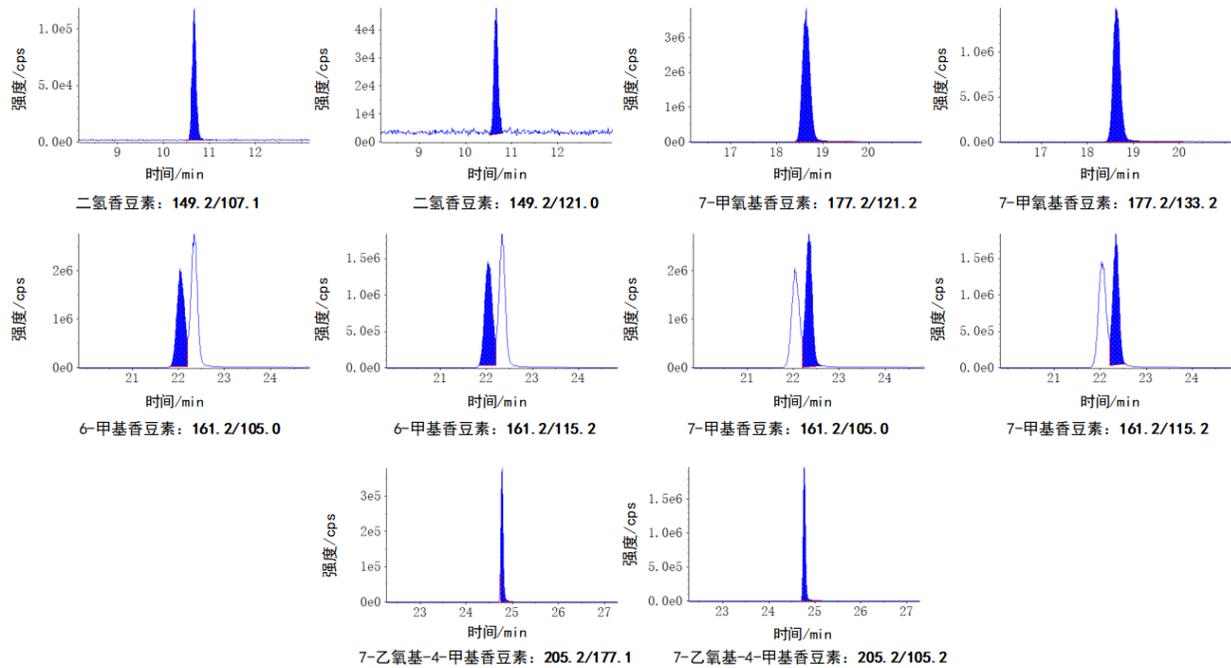


图 11 5种香豆素提取离子色谱图

2.3.6 标准溶液稳定性

将配置好的 50 mg/L 的单标标准贮备液, 在 4°C条件下放置 6 个月, 每隔 1 个月取出标液, 稀释为 5.0 mg/L 的测试液, 采用相同的设备和色谱条件进行测定, 观

察出峰峰面积变化，以此评价标准溶液稳定性，测试结果见表 5。结果表明在 6 个月内，5 个香豆素化合物的峰面积变化的相对标准偏差为 1.0%-1.8%，相对极差为 3.5%-4.9%。考虑到不同时间检测时，配置标准溶液浓度的误差，相对极差皆未超过 5%，表明目标物标准储备液在 6 个月内是稳定的。

表 5 5 种香豆素化合物放置不同时间的峰面积

化合物 (5 mg/L)	峰面积									
	0 天	15 天	1 个月	2 个月	3 个月	4 个月	5 个月	6 个月	相对标准 偏差 (%)	相对极差 (%)
二氢香豆素	151868	148759	154924	151556	147609	152702	148557	152873	1.7	4.8
7-甲氧基香豆素	901216	899551	881504	901655	898999	909551	911433	900872	1.0	3.3
6-甲基香豆素	582186	579860	609032	587832	588776	602534	590154	581149	1.8	4.9
7-甲基香豆素	357716	349150	347996	351333	357000	360214	349058	357941	1.4	3.5
7-乙氧基-4-甲基 香豆素	790082	789853	818706	801250	791615	810088	809358	794592	1.4	3.6

2.3.6 线性关系、检出限和定量限

使用 20% 甲醇水配制浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 种香豆素化合物混合标准工作溶液，经 HPLC 测定，以峰面积为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，进行线性回归，制得标准工作曲线（y 为峰面积，x 为浓度， $\mu\text{g/mL}$ ）；选择空白样品，定量添加混合标准工作溶液，按照试样前处理方法和仪器条件进行测定，以信噪比 $S/N=3$ 确定方法检出限，以信噪比 $S/N=10$ 确定方法定量限。最终方法检出限为 0.3 mg/kg，方法定量限为 1.0 mg/kg。标准曲线相关结果见表 6 和图 12~图 16 所示，标准溶液、检出限和定量限加标样品的色谱图见图 17~图 22。

表 6 5 种香豆素化合物的线性关系、检出限和定量限

化合物 ($\mu\text{g/mL}$)	峰面积								线性方程	相关系数 (R^2)
	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0			
二氢香豆素	4440	8534	21388	40409	68825	164958	327932	$y=3.24 \times 10^4 x + 3.92 \times 10^3$	0.9996	
7-甲氧基香豆素	18819	34465	90178	190374	345174	902421	1897846	$y = 1.89 \times 10^5 x - 1.05 \times 10^4$	0.9992	
6-甲基香豆素	11424	23065	58028	121654	221376	578202	1220731	$y = 1.21 \times 10^5 x - 7.09 \times 10^3$	0.9991	

7-甲基香豆素	7575	13905	35523	74664	133979	348924	733842	$y = 7.30 \times 10^4 x - 3.41 \times 10^3$	0.9992
7-乙氧基-4-甲基香豆素	17281	31209	80452	168218	305378	794543	1671643	$y = 1.66 \times 10^5 x - 8.33 \times 10^3$	0.9992

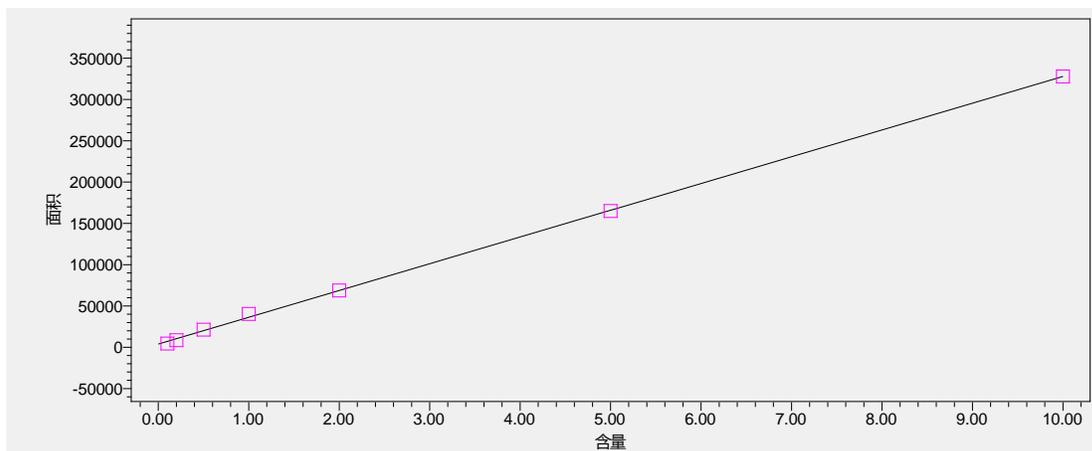


图 12 二氢香豆素的标准曲线图

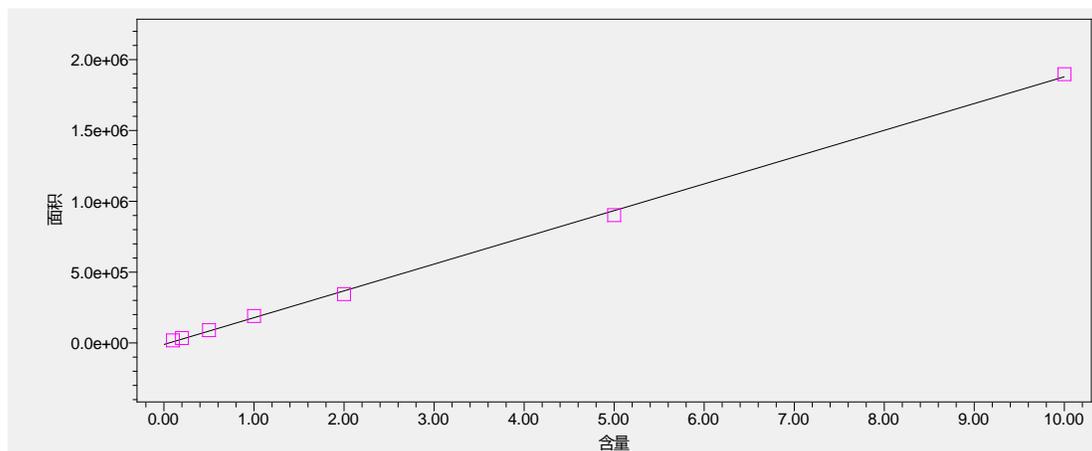


图 13 7-甲氧基香豆素的标准曲线图

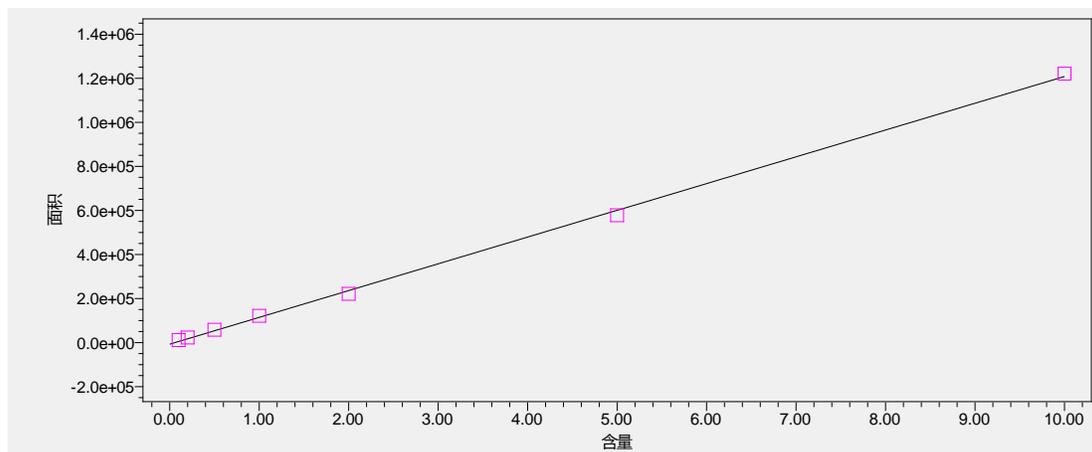


图 14 6-甲基香豆素的标准曲线图

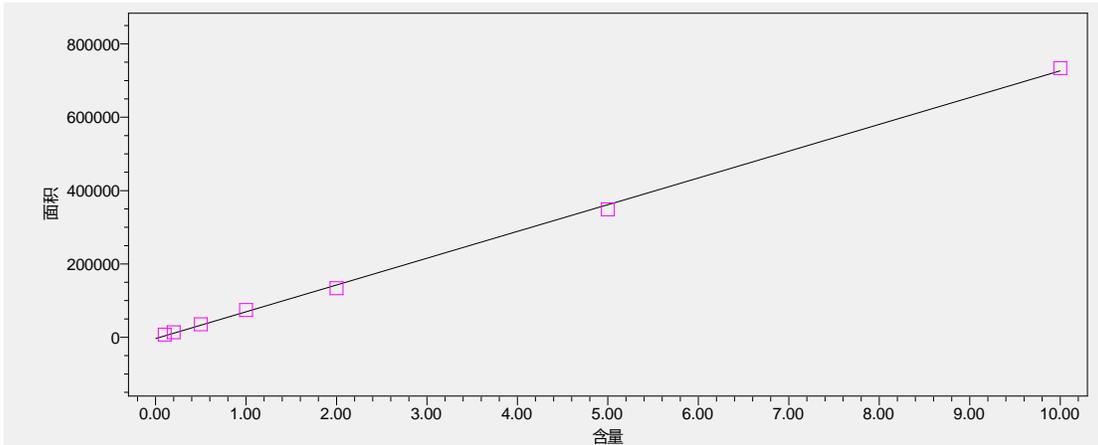


图 15 7-甲基香豆素的标准曲线图

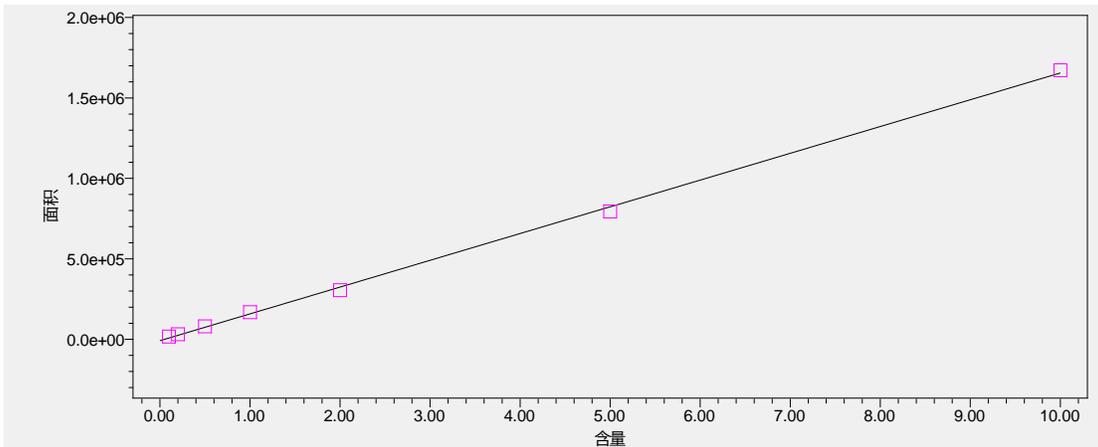


图 16 7-乙氧基-4-甲基香豆素的标准曲线图

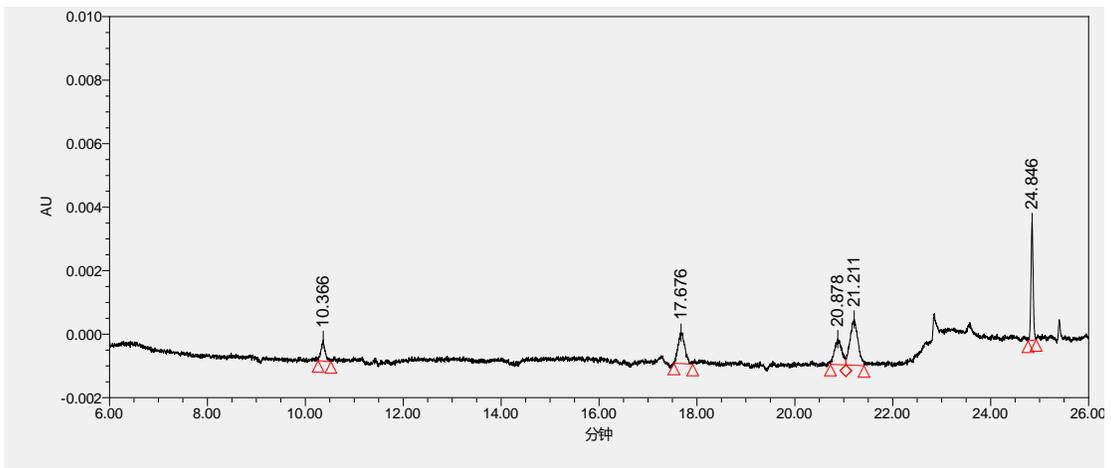


图 17 0.1 µg/mL 标准溶液的色谱图 (225 nm 通道)

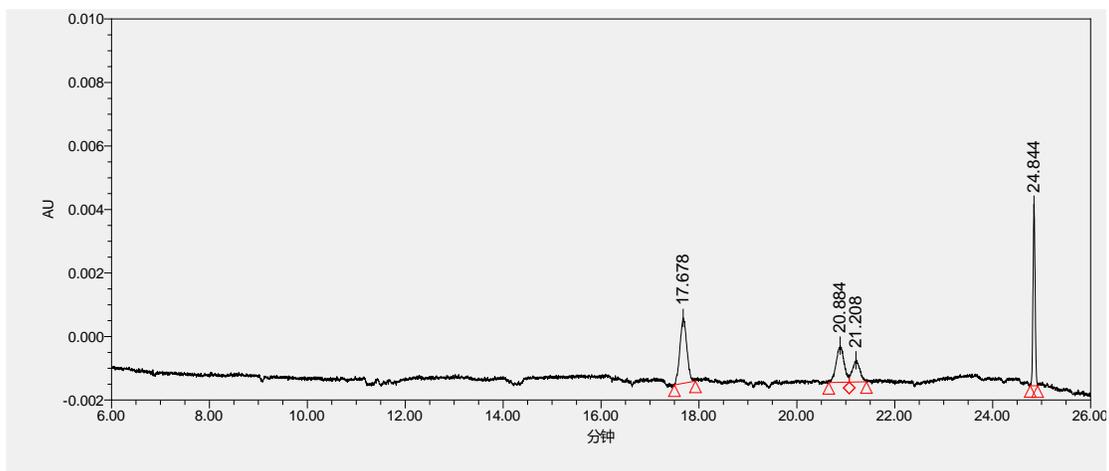


图 18 0.1 µg/mL 标准溶液的色谱图 (320 nm 通道)

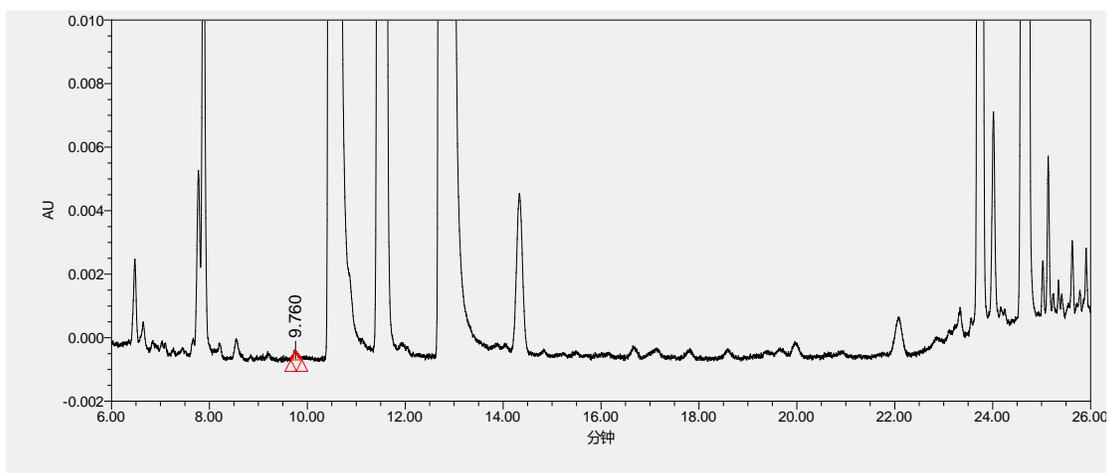


图 19 牙膏样品中二氢香豆素检出限加标的色谱图 (225 nm 通道)

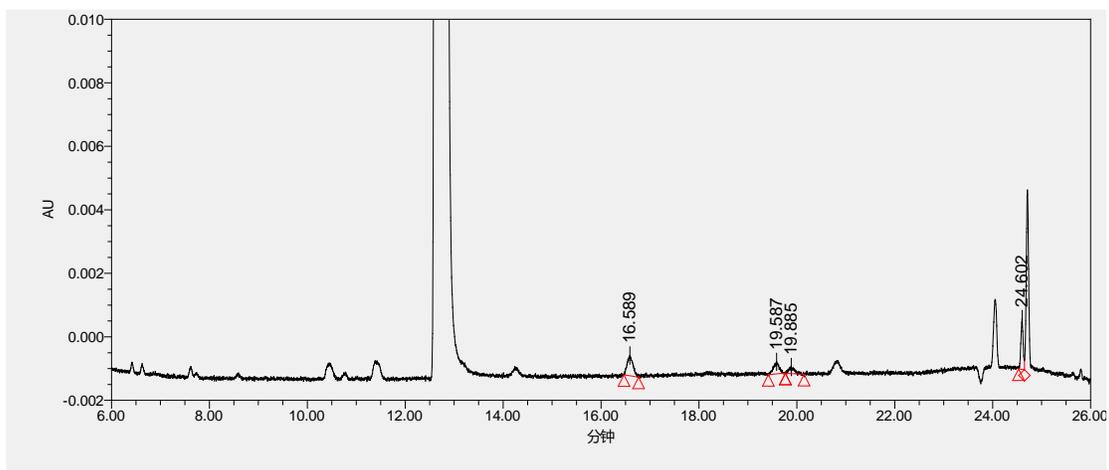


图 20 牙膏样品中 7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素
检出限加标的色谱图 (320 nm 通道)

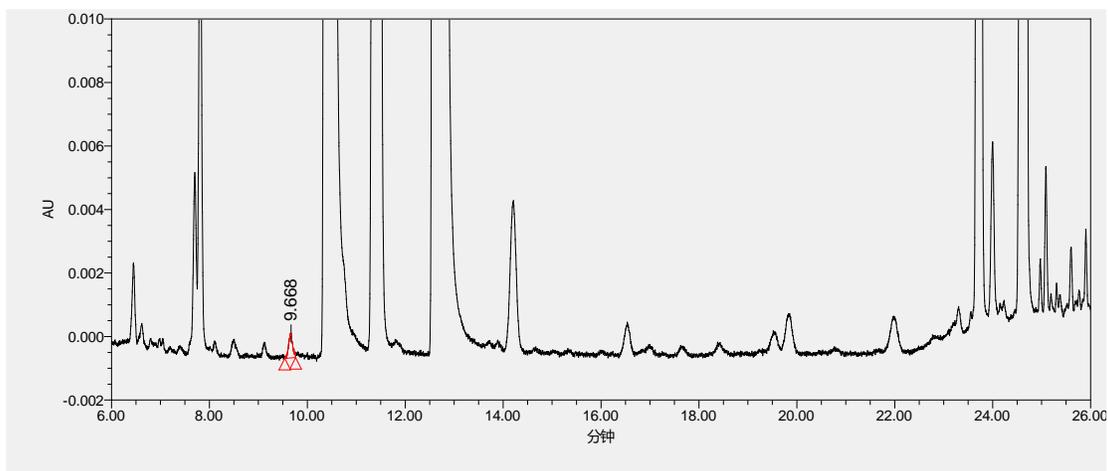


图 21 牙膏样品中二氢香豆素定量限加标的色谱图（225 nm 通道）

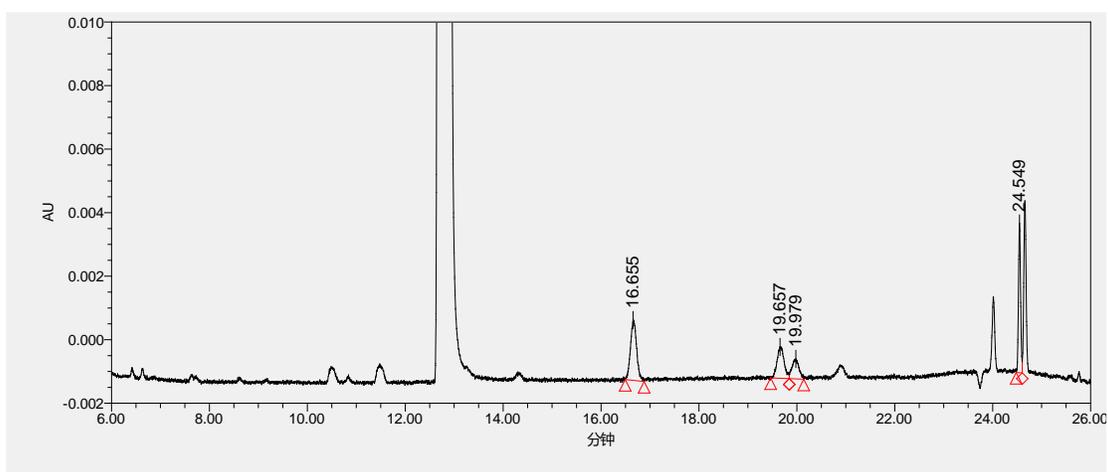


图 22 牙膏样品中 7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素定量限加标的色谱图（320 nm 通道）

2.3.7 回收率与精密度

选取阴性的牙膏样本，按本方法进行 4 个添加水平（1 倍方法定量限、2 倍方法定量限、10 倍方法定量限、6-甲基香豆素限量值，即 1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、10.0 mg/kg 和 30.0 mg/kg）回收试验，平行测定 6 次，计算回收率和精密度。回收率和相对标准偏差（RSD， $n = 6$ ）见表 7。可见，在添加浓度范围内，5 种香豆素化合物的回收率在 80.6-100.3% 之间，六平行四水平加标平均回收率在 85.1% ~ 94.5% 之间，相对标准偏差（RSD， $n = 6$ ）在 1.6% ~ 5.8% 之间；具有良好的回收率和精密度，能够满足日常检测定量分析的要求。

表 7 5 种香豆素的回收率和精密度（ $n=6$ ）

化合物	添加量	回收率 (%)	平均值	RSD
-----	-----	---------	-----	-----

	(mg/kg)	1	2	3	4	5	6	(%)	(%)
二氢香豆素	1.0	85.9	87.4	85.7	91.8	88.8	87.5	87.9	2.6
	2.0	95.4	88.0	85.3	84.0	91.8	87.7	88.7	4.8
	10.0	95.2	89.2	91.4	92.3	86.3	97.0	91.9	4.2
	30.0	87.8	96.4	92.3	92.1	92.7	87.6	91.5	3.6
7-甲氧基香豆素	1.0	82.9	85.9	81.9	90.0	82.5	89.4	85.4	4.2
	2.0	92.1	90.9	88.4	92.7	87.3	87.6	89.8	2.7
	10.0	88.6	90.0	100.3	93.6	99.9	94.7	94.5	5.2
	30.0	99.0	89.4	92.5	91.0	94.4	98.1	94.0	4.1
6-甲基香豆素	1.0	85.5	83.8	85.0	89.8	87.8	78.7	85.1	4.5
	2.0	86.8	84.5	85.8	92.6	92.4	85.4	87.9	4.1
	10.0	82.5	89.8	80.6	91.4	83.5	92.2	86.6	5.8
	30.0	96.0	90.8	90.6	94.3	94.0	91.5	92.9	2.4
7-甲基香豆素	1.0	89.1	88.3	89.0	90.0	95.1	86.8	89.7	3.2
	2.0	88.0	93.7	93.3	91.3	95.1	96.8	93.0	3.3
	10.0	91.0	85.9	97.9	85.7	91.6	87.8	90.0	5.1
	30.0	92.1	96.6	94.3	89.8	93.6	91.6	93.0	2.5
7-乙氧基-4-甲基香豆素	1.0	87.6	88.9	89.7	85.6	87.8	87.2	87.8	1.6
	2.0	93.1	85.9	92.1	88.5	87.0	81.4	88.0	4.9
	10.0	84.5	95.0	91.3	95.9	92.5	84.3	90.6	5.6
	30.0	92.9	96.9	97.4	88.5	98.2	91.9	94.3	4.0

2.3.8 方法稳定性

2.3.8.1 日内稳定性

选取阴性牙膏样品添加 2 倍和 10 倍方法定量限水平进行加标回收实验, 常温放置 24 h, 选取 6 个时间段分别进行测定, 计算加标回收率及其相对标准偏差 (RSD), 结果见表 8。由表 8 可知, 在 24 h 之内, 5 种香豆素化合物加标回收率的相对标准偏差在 1.2%~8.2% 之间, 日内稳定性良好。

表 8 日内稳定性试验结果

化合物	加标量	回收率 (%)	平均值	RSD (%)
-----	-----	---------	-----	---------

	(mg/kg)	放置 0 h	放置 2 h	放置 4 h	放置 8 h	放置 12 h	放置 24 h	(%)	
二氢香豆素	2.0	82.5	80.0	84.0	81.0	82.5	80.5	81.8	4.9
	10.0	89.9	89.2	89.7	89.7	89.9	90.3	89.8	1.2
7-甲氧基香豆素	2.0	96.0	98.0	100.0	99.0	99.5	101.5	99.0	5.6
	10.0	95.3	96.1	96.7	95.9	96.2	95.8	96.0	1.5
6-甲基香豆素	2.0	93.0	97.0	96.0	99.0	101.0	99.5	97.6	8.2
	10.0	96.0	95.7	95.8	95.3	94.5	95.1	95.4	1.6
7-甲基香豆素	2.0	91.0	93.5	91.5	95.5	92.0	93.0	92.8	4.9
	10.0	96.3	95.3	95.7	95.4	95.4	95.1	95.5	1.3
7-乙氧基-4-甲基香豆素	2.0	93.0	94.5	92.5	96.0	93.0	94.5	93.9	3.7
	10.0	96.6	95.7	95.5	95.5	95.6	97.1	96.0	1.7

2.3.8.2 日间稳定性

选取阴性牙膏样品添加 2 倍和 10 倍方法定量限水平进行加标回收实验，常温放置 3 天，每天分别进行测定，计算加标回收率和极差，结果见表 9。由表 9 可知，在 3 天之内，5 种香豆素化合物加标回收率的极差在 3.5%~8.7%之间，极差不超过平均值的 10%，日间稳定性良好。

表 9 日间稳定性试验结果

化合物	加标量 (mg/kg)	回收率 (%)				平均值 (%)	极差 (%)
		放置 0 天	放置 1 天	放置 2 天	放置 3 天		
二氢香豆素	2.0	92.0	94.5	95.5	92.0	93.5	3.7
	10.0	100.2	97.8	96.2	100.8	98.8	4.7
7-甲氧基香豆素	2.0	89.0	91.5	93.0	95.0	92.1	6.5
	10.0	96.1	91.1	95.2	97.1	94.9	6.3
6-甲基香豆素	2.0	93.0	94.0	98.0	96.5	95.4	5.2
	10.0	91.3	94.3	90.5	96.4	93.1	6.3
7-甲基香豆素	2.0	96.0	94.5	103.0	97.0	97.6	8.7
	10.0	99.3	102.1	95.2	95.6	98.1	7.0
7-乙氧基-4-甲基香豆素	2.0	100.5	98.0	97.0	99.5	98.8	3.5
	10.0	101.3	105.2	99.8	97.5	101.0	7.6

2.3.9 方法特异性

方法的特异性是指方法区分目标分析物和其他物质的能力，不得存在导致目标分析物定性错误和影响定量准确的干扰因素（信号、干扰峰等）。本方法通过分析具有代表性的空白样品和空白样品加标样品，按照样品前处理方法处理后，进样检测分析，考察实验样品中除 5 种香豆素化合物以外的其他组分对测定有无干扰；结果未发现存在。部分阴性样品及加标色谱图见图 23~图 26。

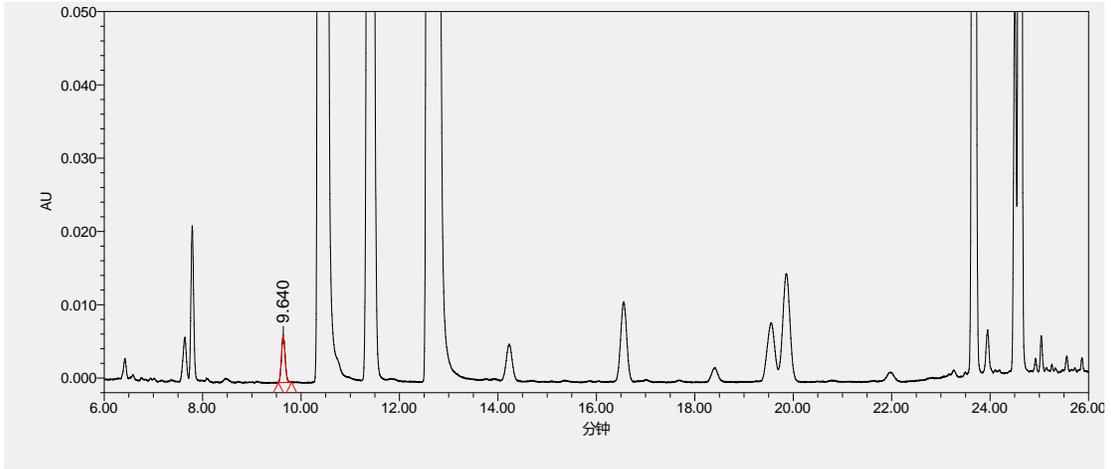


图 23 牙膏样品 1 二氢香豆素加标色谱图（225 nm 通道）

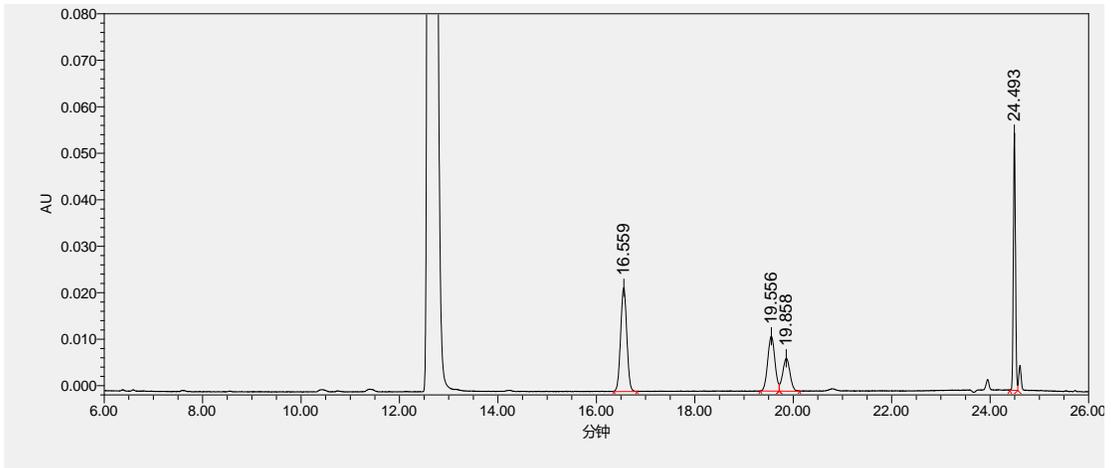


图 24 牙膏样品 1 7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素加标色谱图（320 nm 通道）

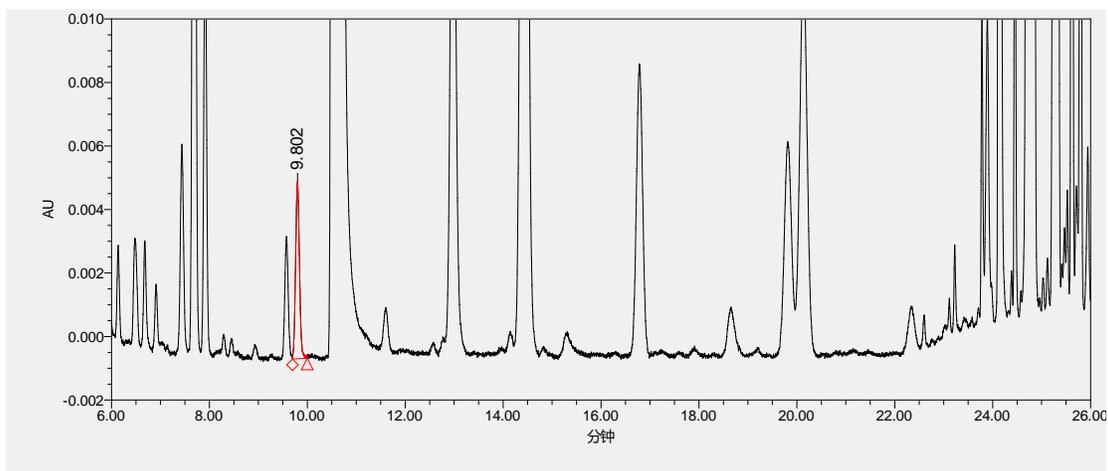


图 25 牙膏样品 2 二氢香豆素加标色谱图 (225 nm 通道)

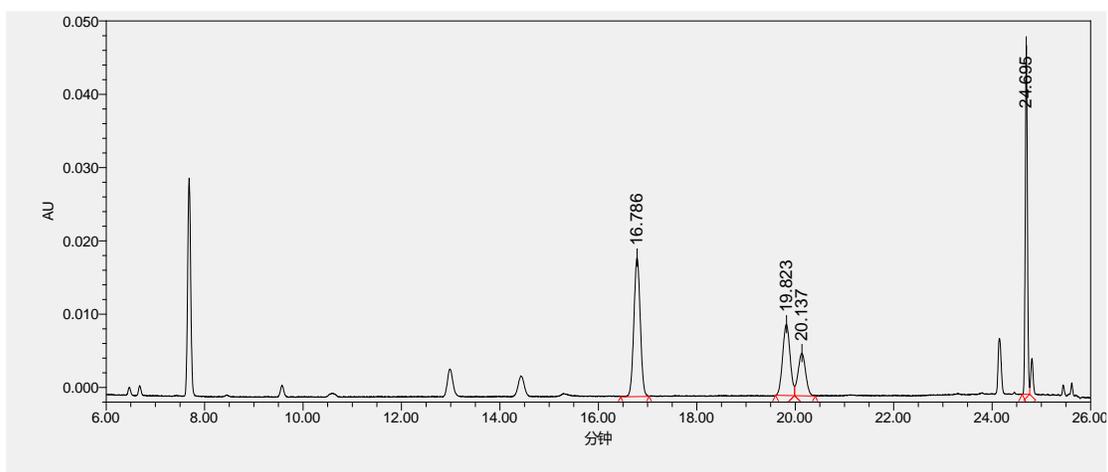


图 26 牙膏样品 2 7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和 7-乙氧基-4-甲基香豆素加标色谱图 (320 nm 通道)

2.4 解决的主要问题

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仪的检测参数，包括色谱柱、液相色谱条件、流动相、的选择；
- (2) 确定了前处理方法，包括提取溶剂、提取条件的选择；
- (3) 完成了方法学的考察，包括标准溶液稳定性、线性范围、方法检出限和定量限、回收率和精密度、方法稳定性等；
- (4) 完成了方法的适用性试验，对市售的牙膏进行了检测。

2.5、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）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

3.1 验证情况

选取阴性牙膏样品邀请广东产品质量监督检验研究院、河北省食品检验研究院、南京市产品质量监督检验院、广东省疾病预防控制中心和深圳市计量质量检测研究院 5 家实验室对本标准方法的线性、检出限和定量限、方法回收率和精密度进行验证，方法添加 1 倍、2 倍、10 倍方法定量限和限量水平进行加标回收实验，验证结果见表 10。

表 10 验证结果汇总表

化合物	添加值 (mg/kg)	平均回收率/% (n=5)					平均值 (%)	RSD (%)
		单位 1	单位 2	单位 3	单位 4	单位 5		
二氢香豆素	1.0	88.2	89.2	90.5	89.1	82.5	87.9	3.5
	2.0	81.7	83.1	95.0	85.7	90.3	87.2	6.3
	10.0	93.4	92.3	91.0	84.3	89.5	90.1	3.9
	30.0	82.1	82.6	94.0	95.2	90.7	88.9	7.0
7-甲氧基香豆素	1.0	95.8	84.5	88.4	93.6	96.5	91.7	5.6
	2.0	95.8	83.2	93.5	97.0	88.0	91.5	6.3
	10.0	94.6	86.2	88.2	82.7	88.9	88.1	4.9
	30.0	95.9	89.8	90.3	90.0	93.1	91.8	2.9
6-甲基香豆素	1.0	83.8	83.2	92.6	95.0	83.4	87.6	6.5
	2.0	90.1	89.0	87.1	89.7	91.7	89.5	1.9
	10.0	88.0	86.8	93.3	87.1	87.4	88.5	3.1
	30.0	89.3	85.3	94.0	82.9	81.9	86.7	5.7
7-甲基香豆素	1.0	84.3	84.8	88.2	92.3	87.7	87.5	3.6
	2.0	85.2	95.1	81.3	93.4	82.4	87.5	7.3
	10.0	81.7	82.9	84.5	89.5	88.9	85.5	4.1
	30.0	85.9	92.3	90.8	95.8	86.1	90.2	4.7
7-乙氧基	1.0	89.8	90.5	89.1	86.7	86.3	88.5	2.1

化合物	添加值 (mg/kg)	平均回收率/% (n=5)					平均值 (%)	RSD (%)
		单位1	单位2	单位3	单位4	单位5		
-4-甲基香 豆素	2.0	91.9	87.7	93.8	94.8	91.2	91.9	3.0
	10.0	87.8	93.3	95.7	84.7	91.0	90.5	4.8
	30.0	93.4	94.8	89.7	91.4	89.9	91.8	2.4

综述报告：5家验证结果表明，5种香豆素化合物在0.1 ~ 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。目标化合物在方法给出的检出限浓度均可检出，方法给定的检出限合理。不同验证单位测得5种香豆素化合物在三水平添加范围内平均回收率在81.3 % ~ 97.0%之间，实验室间的精密度为1.9% ~ 7.3%，表明方法具有良好的回收率和精密度。

3.2 市售样品分析

随机抽取市售的60份牙膏样品，分别应用本项目建立的方法进行检测，以标准曲线法计算含量。结果发现样品均未检出二氢香豆素、7-甲氧基香豆素、6-甲基香豆素、7-甲基香豆素和7-乙氧基-4-甲基香豆素。部分阴性样品见图27~图30。

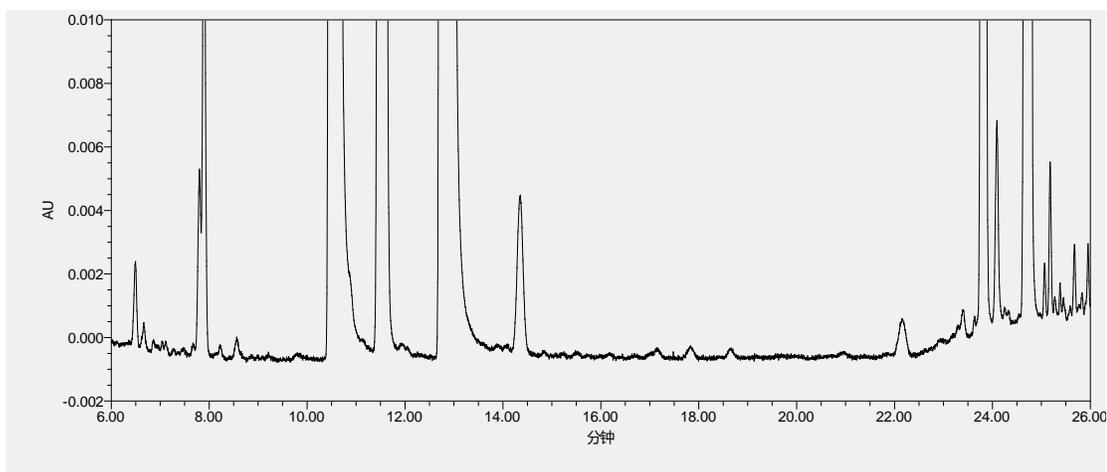


图27 牙膏样本1色谱图 (225 nm 通道)

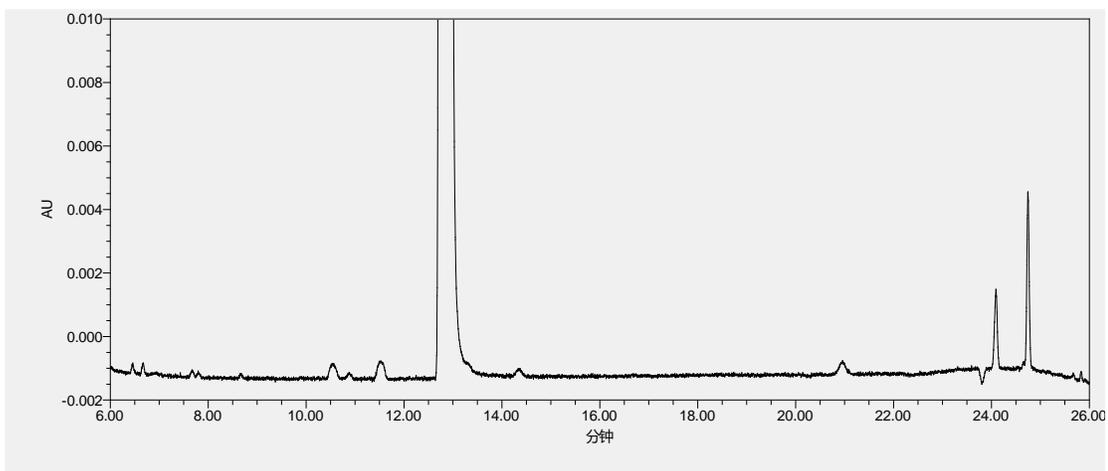


图 28 牙膏样本 1 色谱图 (320 nm 通道)

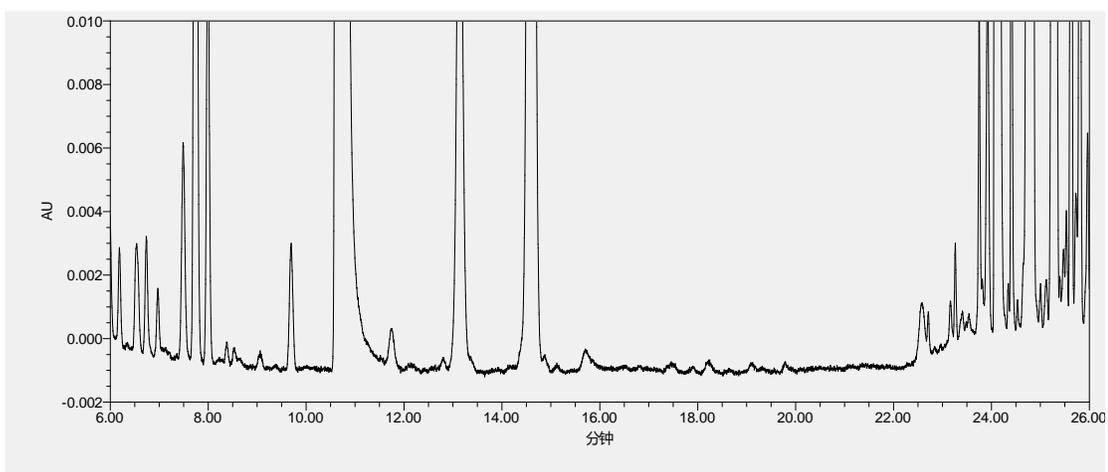


图 29 牙膏样本 2 色谱图 (225 nm 通道)

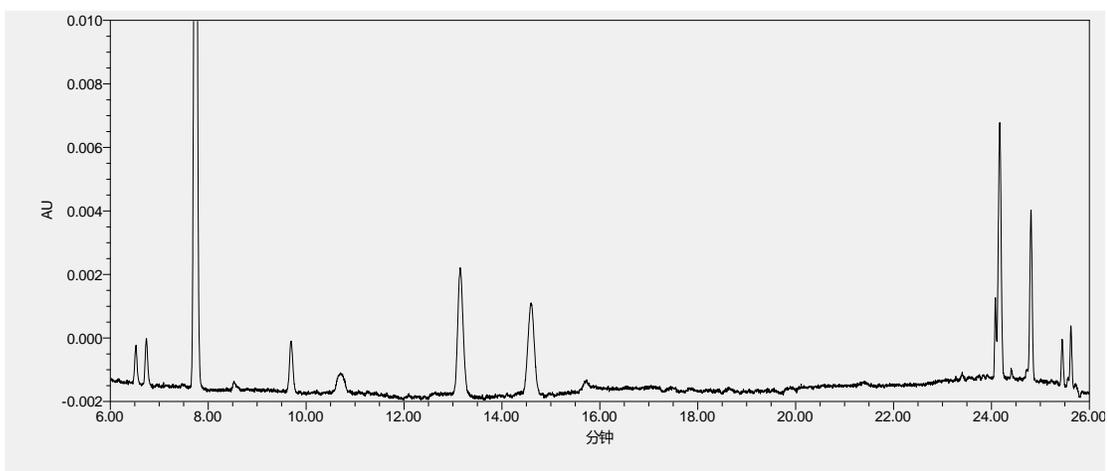


图 30 牙膏样本 2 色谱图 (320 nm 通道)

3.3.技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

国家标准“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”系统的建立了口腔清洁用品中香豆素类化合物的检测方法，补充了 GB 22115-2008《牙膏用料规范》，并协调一致。该标准的发布实施一方面可以提升行政监管部门监管口腔清洁用品质量安全的履职能力，有效的监测口腔清洁用品的安全性，极大的规范贸易市场，保障消费者的健康安全和权益；另一方面可增强检验机构的服务能力，为企业提供相关检测服务，保障相关口腔清洁用品生产企业健康有序发展，具有明显的社会效益，同时也可创造出一定的经济效益。

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，目前尚无该产品国际标准或国外先进标准。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

据查证，目前尚无相关国际标准或国外先进标准。

六、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。

七、重大分歧意见与处理经过与依据

本标准在制定时对制造商、供应商、市场的流通与销售以及消费者等各方面的权益均作出了分析和考虑。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议本标准以推荐性国家标准的形式发布。建议本标准于发布日期 6 个月后实施。全国口腔护理用品标准化技术委员会牙膏分技术委员会负责组织该项标准的宣传贯彻工作。该标准属首次起草，无废止现行相关标准的建议。

十、其他应予说明的事项

无。