

《化妆品中羟吡啶酮的测定 高效液相色谱法》 编制说明

(征求意见稿)

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第三批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发[2023]58 号)制定,项目名称为《化妆品中羟吡啶酮的测定 高效液相色谱法》,项目编号为 20241549-T-607,主要起草单位为广州质量监督检测研究院。项目周期 18 个月,计划应完成时间为 2025 年 11 月。

1.2 主要工作过程

(1) 起草阶段

2024 年 6 月,广州质量监督检测研究院按照全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)的要求成立了标准起草工作组,并制订了标准研制计划。

2024 年 7 月-2024 年 9 月,标准起草工作组进行了大量的研究分析、资料查证及方法确认等工作,初步设计了实验方案。

2024 年 10 月-2025 年 3 月,根据实验方案,优化确定衍生条件和色谱分离条件,优化确定液体类、粉类洗涤剂的提取、测定条件,考察方法的灵敏度、准确性、线性范围和适用性,并组织单位进行方法验证;2025 年 4 月 21 完成标准征求意见稿和编制说明。

1.3 主要参加单位和工作组成员等

本标准主要起草单位为 XXX 等。

工作组主要成员:XXX 等。

二、标准编制原则和主要内容

2.1 标准编制原则

本标准的制定符合产业发展的原则。本着先进性、科学性、合理性和可操作性的原则,以及标准的目标、统一性、协调性、适用性、一致性和规范性原则来进行本标准的制定工作。

本标准是按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分:标准的结构和编写》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分:试验方法标准》的要求编写的。

2.2 标准研制背景

羟吡啶酮，英文名：Hydroxypyridinone，CAS 号：822-89-9，为 1-羟基-2 吡啶酮类化合物，因含有与曲霉酸相似的异羟肟酸结构，从而具有抑菌作用，可用来治疗溢脂性皮炎、口腔黏膜疾病及由真菌、细菌引起的皮肤感染疾病。然而，相关毒理学数据表明，羟吡啶酮具有严重眼损伤/眼刺激的健康危害性，其危险性类别为类别 1（根据《危险化学品目录》规定，类别 1 为危害性最大的类别），有造成严重眼损伤、引起呼吸道刺激等风险。鉴于其危害性，《化妆品安全技术规范》（2015 年版）将羟吡啶酮列为禁用原料。通过对化妆品中羟吡啶酮的可能来源分析发现，羟吡啶酮是收录进《已使用化妆品原料目录》（2021 年版）和《国际化妆品原料标准中文名称目录》（2010 年版）的已使用原料；而化妆品用原料吡硫鎓锌中可能含有羟吡啶酮杂质；此外，2-羟基吡啶-N-氧化物（HOPO）作为一种重要的化工原料，与羟吡啶酮存在互变异构现象（见图 1），且羟吡啶酮是较稳定的一种存在形态。综上，羟吡啶酮可能存在误用以及由于吡硫鎓锌等原料的使用而导致残留的风险。目前，尚无化妆品中羟吡啶酮的测定方法。因此，亟需建立化妆品中羟吡啶酮检测方法，为化妆品质量安全监管提供有效的技术手段。

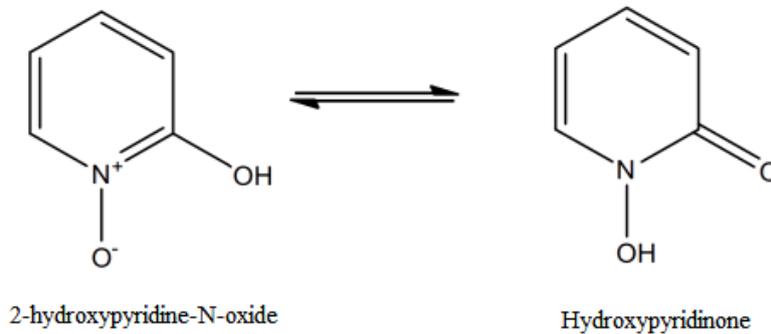


图 1 HOPO 两种形态的互变异构

广州质检院采用建立的羟吡啶酮检测方法对部分市售化妆品进行测定，14 批次产品检出羟吡啶酮，检出范围为 16.8 mg/kg~120.2 mg/kg。因此，建立化妆品中羟吡啶酮的标准检测方法，将有效填补相关检测方法领域的空白，进一步完善化妆品标准体系，加大监管范围和力度，保障消费者权益和健康。

目前，国内外暂无检测羟吡啶酮的相关报道。在前期的研究中发现，羟吡啶酮的极性强，反相色谱保留能力较弱，且羟吡啶酮和 2-羟基吡啶-N-氧化物（HOPO）存在互变异构现象（图 1）。然而，HOPO 与色谱系统中的金属离子可能存在较强的络合作用，两种互变异构形态在色谱柱上的异构互变则会引起色谱峰严重拖尾或者分峰现象，从而给

色谱分析带来了一定的困难。本标准项目以去屑洗发露为考察基质，通过优化仪器方法（包括色谱柱、检测波长、流动相等）及提取条件（包括提取溶剂、提取方式等），解决了羟吡啶酮难以保留、峰形差和杂质干扰等问题，已建立了羟吡啶酮的高效液相色谱仪器检测方法。另外，由于洗发水的配方组分复杂，常用的吡硫鎓锌、吡罗克酮等去屑剂与羟吡啶酮有相似的特征吸收，可能存在干扰而产生假阳性。为保证检测结果的准确性，本项目采用化妆品常用的液相色谱-串联质谱检测技术，结合硫酸二甲酯衍生化处理，建立了一种洗发露中禁用原料羟吡啶酮的快速、准确、灵敏的测定方法和质谱确证方法。本标准的建立，将为监管部门对产品开展安全监管以及企业对产品和原料进行质量监控提供技术支撑和依据，进一步促进原料生产工艺的改进，助力化妆品高质量发展。

2.3 解决的主要问题

本方法通过优化目标化合物的液相色谱参数，以及对不同类型样品的衍生前处理方法条件进行摸索，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）优化化妆品中羟吡啶酮的高效液相色谱方法，包括色谱柱、流动相、吸收波长及洗脱方法；

（2）建立提取方法，包括提取溶剂、提取时间的选择等；

（3）完成方法学的考察，包括方法特异性、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）建立化妆品中羟吡啶酮的高效液相色谱-串联质谱确证方法，包括羟吡啶酮衍生试剂的选择，衍生温度和时间的选择，以及仪器条件的选择等；

（5）完成方法适用性实验，对市售的去屑产品以及吡硫鎓锌原料中的羟吡啶酮进行检测。

2.4 标准的技术路线和确定依据

2.4.1 主要技术路线

主要技术路线图见图 2。

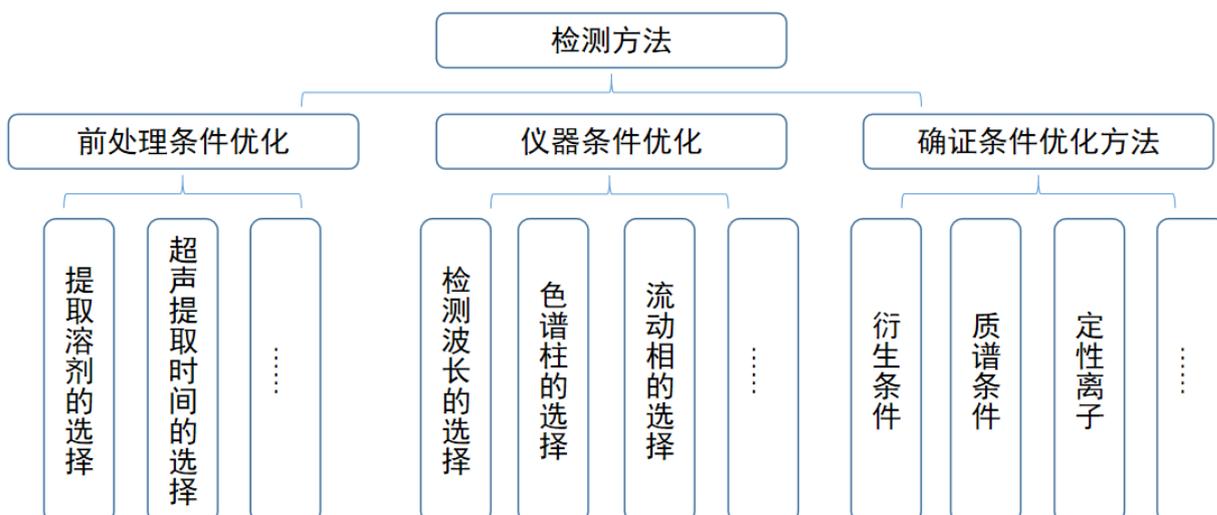


图 2 主要技术路线图

2.4.2 前处理条件的优化

2.4.2.1 提取溶剂的选择

比较了不同比例的乙腈—水对羟吡啶酮的提取效果，结果如图 3 所示，当提取溶剂为 10% 和 50% 乙腈水时，杂质峰及目标化合物的色谱峰严重变形。这是由于 10% 和 50%

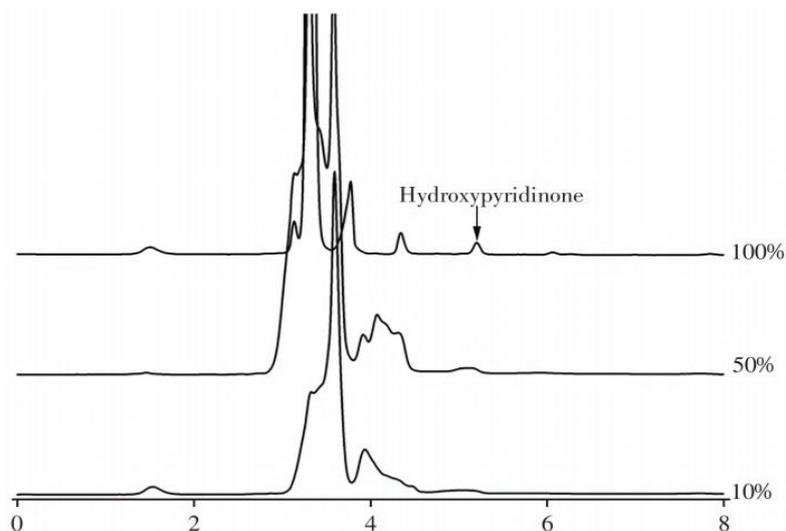


图 3 不同乙腈浓度提取的羟吡啶酮色谱图

乙腈在 Hilic 柱上的洗脱能力强于流动相，可能存在溶剂效应使峰形展宽。另外，由于乙腈—水体系极性更大，减弱了目标化合物的分子内氢键，不利于发生分子内质子转移，反而导致分子间二聚体发生质子转移形成新的化合物，该原因也会导致峰形展宽。而采用纯乙腈作为提取溶剂，进行阴性样品加标实验时，其回收率均在 90% 以上且羟吡啶酮的峰形对称。因此本文采用纯乙腈为提取溶剂。

2.4.2.2 超声时间的选择

超声提取具有操作方便、高效等特点，考察了超声时间对加标回收率的影响。将样品涡旋提取后，分别超声 0、5、10、15、20 min，取样液进行分析。结果显示，随着超声时间的增加，目标化合物的峰面积有所增加，但超过 15 min 后，峰面积无明显增加，所以选择超声 15 min 进行提取。

2.4.2.3 最终确定样品前处理条件

称取样品 0.5 g（精确至 0.001 g）于 10 mL 具塞比色管中，加入 1 mL 乙腈，涡旋 30 s 使样品分散，再用乙腈定容至刻度，涡旋 30 s 后，超声提取 15 min。冷却至室温后，经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

2.4.3 色谱条件的优化

2.4.3.1 色谱柱的选择

羟吡啶酮的 $\log P$ 值为 -0.65，亲水性强，极性较大，难以在色谱柱上获得较好保留，因此对比了几种规格相同（4.6 mm \times 250 mm \times 5 μm ）的 C_{18} 柱（Pronto SIL- C_{18} 、Ultimate AQ C_{18} ）和 Waters Atlantis Hilic 色谱柱的效果。以 100% 水为流动相对 2 $\mu\text{g/mL}$ 羟吡啶酮标准溶液进行分析发现， C_{18} 柱对羟吡啶酮的保留较弱，且色谱峰拖尾难以消除，因此难以对低浓度羟吡啶酮准确定量；而使用 Hilic 色谱柱时目标物的保留时间较使用 C_{18} 柱有所延长，峰形更加对称，因此选用 Hilic 柱进行后续方法开发。

2.4.3.2 检测波长的选择

采用配备二极管阵列检测器的高效液相色谱仪对标准溶液进行检测，羟吡啶酮的紫外吸收光谱图见图 4，其特征吸收波长为 228 nm 和 306 nm。在实际样品测试过程中，虽然羟吡啶酮的摩尔吸收系数 $\epsilon_{228\text{nm}}$ 大于 $\epsilon_{306\text{nm}}$ ，但在 228 nm 波长下样品中基质成分带来的干扰较大，且羟吡啶酮在 306 nm 波长处的响应值满足方法灵敏度与稳定性要求。综合考虑，本方法选定羟吡啶酮的检测波长为 306 nm。

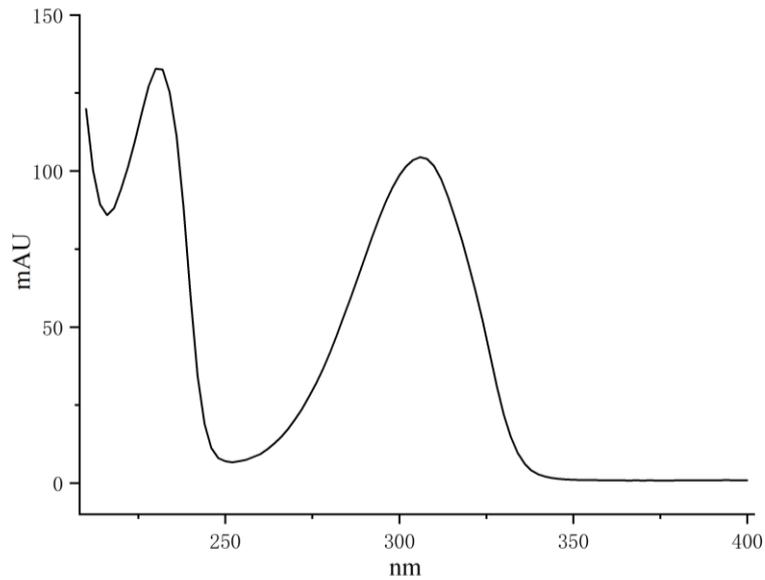


图 4 羟吡啶酮对照物质紫外吸收图

2.4.3.3 流动相的选择

比较了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-20 mmol/L 醋酸铵水溶液、乙腈（含 0.1%甲酸）-甲醇和乙腈-草酸水溶液 5 种流动相体系对羟吡啶酮的分离效果。结果显示，使用前 3 种流动相对羟吡啶酮进行分析，色谱峰均存在不同程度分峰现象；使用 95%乙腈（含 0.1%甲酸）-5%甲醇作流动相时，分峰现象有所改善，但拖尾仍然严重；采用乙腈-10 mmol/L 草酸水溶液为流动相，羟吡啶酮的分峰和拖尾现象被有效消除，色谱峰形良好。这可能是由于草酸水溶液能够大大降低色谱柱上残留金属离子与化合物的络合作用所致。

进一步比较了不同浓度的草酸（5、10、20、40 mmol/L）对羟吡啶酮的色谱分离效果。结果显示，随着草酸浓度增大，羟吡啶酮的保留时间有所增加，草酸浓度达 20 mmol/L 后，保留时间无明显延长。考虑到高浓度草酸溶液在高比例乙腈中有析出风险，初步选择 20 mmol/L 草酸乙腈溶液为流动相，预先混合后使用。

在实际样品测定时发现，随着进样次数的增加，羟吡啶酮色谱峰形逐渐变宽，出现拖尾现象。向缓冲盐流动相中加入三乙胺作为竞争性胺类与硅羟基反应，可进一步抑制羟吡啶酮的峰拖尾，获得对称峰形。

更进一步比较了不同的酸（甲酸、草酸、磷酸）对羟吡啶酮的色谱分离效果。结果如图 5~7 显示，流动相添加磷酸时，保留时间比草酸有所增加，峰形最为尖锐对称，因此

最终选择乙腈-磷酸-三乙胺水溶液（乙腈:水:磷酸:三乙胺=950:50:2:1，v/v）作为最终流动相，预先混合后使用。

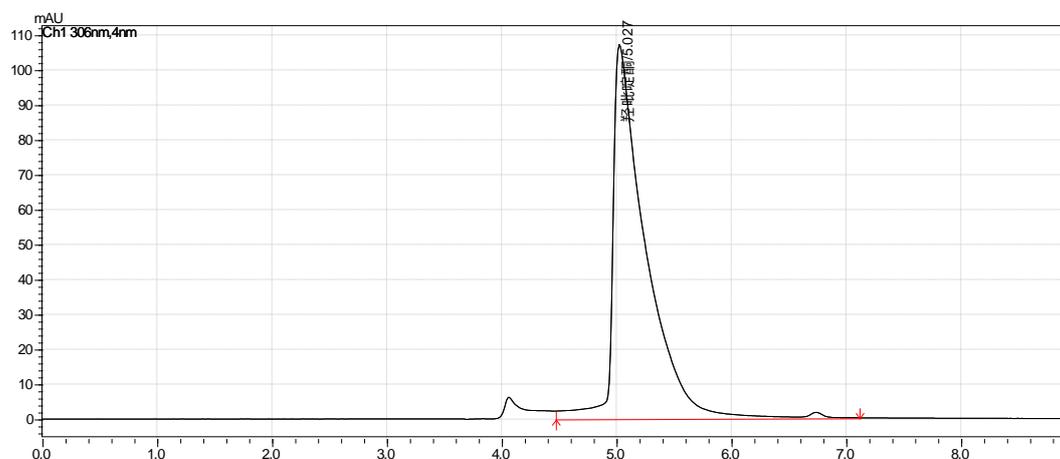


图 5 乙腈:水:甲酸:三乙胺=950:50:2:1，v/v

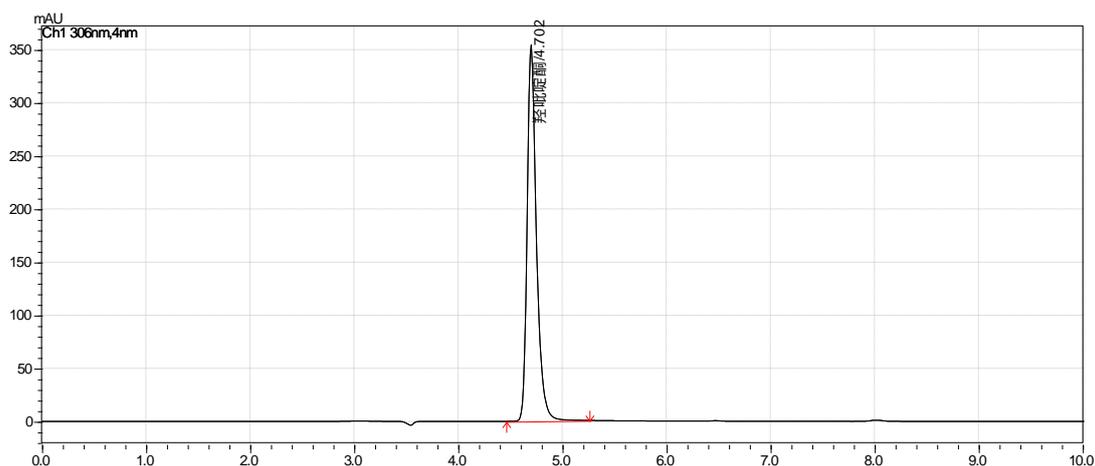


图 6 乙腈:20 mmol/L 草酸水溶液:三乙胺=950:50:1，v/v

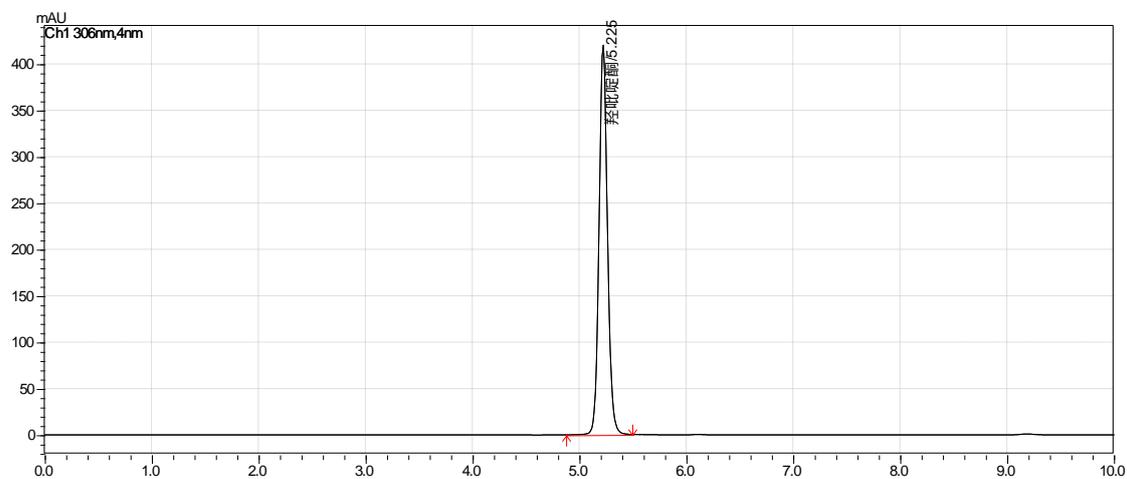


图 7 乙腈:水:磷酸:三乙胺=950:50:2:1，v/v

2.4.3.4 最终确定的仪器分析条件

通过进一步选择、优化色谱条件，得到最终的液相色谱分析参考条件：

色谱柱：Hilic（4.6 mm×250 mm×5 μm）；

流动相：乙腈-磷酸-三乙胺水溶液（乙腈:水:磷酸:三乙胺=950:50:2:1，v/v），等度洗脱；

流速：1.0 mL/min；

进样量：20 μL；

柱温：30 °C，

检测波长：306 nm。

典型标准溶液的高效液相色谱图见图 7。

2.4.4 液质联用阳性确证方法

由于化妆品样品种类繁多，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，建立了羟吡啶酮的液相色谱-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。

2.4.4.1 仪器条件

经优化，液相色谱分离条件和质谱参数如下：

（1）液相色谱条件：

a) 色谱柱：Agilent SB C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)；

b) 流动相：A: 0.1% 甲酸水溶液，A 为乙腈，等度洗脱（vA:vB = 9:1）；

c) 柱温：30°C；

d) 流量：0.3 mL/min；

e) 进样量：2 μL。

（2）质谱条件：

a) 电离方式：ESI+

b) 喷雾电压：4500 V；

c) 气帘气：137 kPa；

d) 雾化气：344.7 kPa；

e) 碰撞气：62.1kPa；

f) 气离子源温度：450 °C；

g) 扫描模式：多反应监测（MRM）模式，羟吡啶酮衍生物的质谱参数见表 1

表 1 羟吡啶酮的质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子(m/z)	CE/eV	DP/V
羟吡啶酮 衍生物	126.1	95	30	20.0
		67	35	23.0

2.4.4.2 标准溶液制备

移取适量体积的标准储备液，用乙腈配制成浓度为 500 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。移取标准工作溶液 1 mL 于比色管内，加入 0.5 mL 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液，涡旋 30 s 后，加入 50 μL 硫酸二甲酯，涡旋 30 s，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min 后，再加入 50 μL 三乙胺，涡旋 30 s，取衍生后的标准溶液用纯水稀释 10 倍，经 0.22 μm 滤膜过滤后测定。

2.4.4.3 试样制备

取按液相测定时制备的样液 1 mL 于比色管中，加入 0.5 mL 0.3 mol/L 的氢氧化钠溶液，涡旋 30 s 后，加入 50 μL 硫酸二甲酯，涡旋 30 s，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min 后，再加入 50 μL 三乙胺，涡旋 30 s，取样液用纯水稀释 10 倍（必要时可增大稀释倍数），经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

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）情况分析、综述结论

3.1 试验分析

3.1.1 标准曲线的配制和线性关系

标准储备溶液，1000 mg/L（以酸计）：分别准确称取适量羟吡啶酮对照物质，分别用水溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，混匀。

标准工作溶液：分别移取适量的标准储备液配制系列不同浓度的标准溶液，在优化的条件下，对羟吡啶酮进行测定，分别以浓度为横坐标，对应峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，结果见表 2。

表2 线性方程、线性范围、相关系数

化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数(r)
羟吡啶酮	1.0~100.0	$Y=27.765X-12.218$	0.9999

结果表明, 在 1.0 mg/L~100.0 mg/L 范围内, 羟吡啶酮呈现良好的线性关系。

3.1.2 检出限和定量限

选择空白样品, 定量添加羟吡啶酮标准溶液, 按照最终确定的方法步骤, 考察方法的测定低限。将所得谱图的信噪比大于 3 时羟吡啶酮的添加量定为方法的检出限, 将所得谱图的信噪比大于 10 时羟吡啶酮的添加量定为方法的定量限。结果表明, 本方法中羟吡啶酮的检出限为 8 mg/kg, 定量限均 20 mg/kg。

3.1.3 回收率和精密度

平行称取洗发水空白样品各6份, 每份约1g, 共三组, 分别定量加入羟吡啶酮标准溶液。羟吡啶酮的添加水平分别为1 mg/L、5.0 mg/L、50.0 mg/L, 按试样处理方法处理后进行测定, 结果见表3。从表中可看出, 羟吡啶酮不同浓度下的平均加标回收率为92.8~100.3%, 相对标准偏差为1.81~2.95% (n=6)。结果表明, 本方法具有良好的回收率和精密度, 满足相关定量分析要求。

表3 样品加标回收率测定结果 (n=6)

化妆品 基质	添加量 (mg/L)	回收率(%)						平均回收 率(%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
乳霜类 样品	1	98.00	97.11	97.39	98.97	96.3	94.02	97.0	1.75
	5.0	96.82	97.32	98.25	99.22	101.26	99.12	98.7	1.61
	50.0	98.68	102.82	99.31	99.33	101.99	99.70	100.3	1.67
液态类 样品	1	100.78	102.34	103.65	97.25	98.85	101.52	100.7	2.32
	5.0	99.64	95.68	96.35	100.37	98.84	97.78	98.1	1.88
	50.0	101.24	99.67	104.35	102.44	100.67	103.54	102.0	1.75

3.1.4 稳定性

取浓度为1.0 µg/mL与50.0 µg/mL的标准工作溶液, 常温(25 °C)放置3d, 分别于0h、2h、4h、8h、12h、24h、48h、72h进行测定, 将测得峰面积代入标准曲线计算被测物质

的浓度，计算浓度值的RSD 以考察被测物质在日内和三日间的稳定性。化合物的日内、日间稳定性结果见表4。

表4 稳定性试验结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	放置 0h	放置 2h	放置 4h	放置 8h	放置 12h	放置 24h	日内 RSD (%)	放置 48h	放置 72h	日间 RSD (%)
1.0	1.081	1.090	1.066	1.061	1.073	1.074	0.97	1.050	1.044	1.86
50.0	50.786	50.616	50.903	50.842	50.871	50.491	0.32	50.595	50.289	0.46

3.1.5 实际样品测定

采用本方法对市售的 30 批次去屑洗发水中羟吡啶酮进行测定，结果发现 14 批次产品检出羟吡啶酮，结果在 16.8 mg/kg ~ 120.2 mg/kg 之间。

3.2 验证分析

3.2.1 测试样品

对化妆品进行加标回收实验，每种基质 3 个添加水平，羟吡啶酮的添加水平分别为 1.0 mg/L、5.0 mg/L、50.0 mg/L，每个水平分别平行测定 6 次。

3.2.2 验证结果

本方法邀请广东省药品检验所、深圳市药品检验研究院、珠海市食品药品检验所等 3 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及实际样品测定。3 家验证结果表明，羟吡啶酮在 1.0~ 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系均良好。目标化合物均可达到方法给出的检出限和定量限。

3 家验证单位测得羟吡啶酮在三水平添加范围内平均加标回收率在 95.3%~108.2% 之间，相对标准偏差在 0.8%~4.8% ($n=6$) 之间，具体结果见表 6。结果表明，该方法准确可靠，精密度高。

表6 验证结果汇总表 ($n=6$)

化妆品基 质	添加值 (mg/kg)	实验室 1		实验室 2		实验室 3	
		平均回收 率(%)	RSD (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
乳霜样品	1.0	102.2	3.73	105.0	2.8	108.2	1.81
	5.0	99.3	1.25	102.6	1.8	97.6	1.99
	50.0	101.2	1.24	98.4	0.9	97.8	0.91
液态样品	1.0	99.7	3.12	104.6	4.8	105.4	1.69
	5.0	95.3	1.85	105.6	2.3	102.2	1.15
	50.0	101.4	0.80	100.0	1.6	99.2	2.31

四、标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利问题。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

本标准的制定，可为广大化妆品行业的检测机构和企业用户提供一种快捷简便、准确高效的测定方法；对完善化妆品检验标准体系、保证化妆品质量都具有重要意义。通过制订该标准，可以更好地为行业、企业服务，有利于产业结构调整 and 升级。

本标准的制定可以提升化妆品行业的质量安全和风险控制能力，保障相关行业健康有序发展，具有明显的社会效益，同时创造一定的经济效益。

六、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。

七、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。

八、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

羟吡啶酮属于《化妆品安全技术规范》（2015年版）中禁用组分列表中第850项所列成分，所以本标准作为相应的检测方法，为去屑产品及原料中羟吡啶酮的定性和定量提供重要技术依据。本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

九、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

十、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。全国香料香精化妆品标准化技术委员会负责组织该项标准的宣贯工作。该标准属首次起

草，无废止现行相关标准的建议。

十一、其他应予说明的事项

无。

标准起草工作组

2025年4月21日