

附件 4

化妆品中维甲酸及其衍生物的检测方法

征求意见稿

1 范围

本方法规定了高效液相色谱法测定化妆品中维甲酸等8种组分的含量。本方法适用于膏霜、乳液、凝胶类化妆品中维甲酸等8种组分的含量测定。

2 方法提要

样品经甲醇超声提取后,采用高效液相色谱仪分离,二极管阵列检测器检测,根据保留时间和紫外光谱定性,峰面积定量,以标准曲线法计算含量。

取0.5g样品时,本方法对维甲酸等8种组分的检出浓度、最低定量浓度见下表。

序号	组分名称	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	检出限浓度 ($\mu\text{g/g}$)	定量下限 ($\mu\text{g/mL}$)	最低定量浓度 ($\mu\text{g/g}$)
1	他卡西醇	0.08	1.6	0.2	4
2	他扎罗汀	0.02	0.4	0.05	1
3	阿维 A	0.02	0.4	0.05	1
4	异维甲酸	0.02	0.4	0.05	1
5	维甲酸	0.02	0.4	0.05	1
6	依曲替酯	0.02	0.4	0.05	1
7	维胺酯	0.02	0.4	0.05	1
8	阿达帕林	0.04	0.8	0.08	1.6

3 试剂和材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯或以上规格,水为GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 甲醇,色谱纯。

3.2 乙酸,优级纯。

3.3 四氢呋喃,色谱纯。

3.4 流动相的配制:

流动相A: 0.5%乙酸溶液: 量取乙酸(3.2) 5mL,加水稀释至1000mL。

流动相B：甲醇（3.1）。

3.5 标准储备溶液：称取他扎罗汀、阿维A、异维甲酸、维甲酸、依曲替酯、维胺酯各10mg（精确至0.00001g），分别置于10mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀（阿维A、依曲替酯较难溶解，可先以少许四氢呋喃溶解后，再加甲醇稀释至刻度）；称取阿达帕林10mg（精确至0.00001g），置于25mL容量瓶中，以少许四氢呋喃溶解后，加甲醇稀释至刻度；称取他卡西醇10mg（精确至0.00001g），置50mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器。

4.2 天平。

4.3 离心机。

4.4 涡旋振荡器。

4.5 超声波清洗器

5 分析步骤

5.1 混合标准系列溶液制备

准确移取标准储备溶液（3.5）适量，于10mL容量瓶中，用甲醇（3.1）稀释至刻度，配制成混合标准系列溶液，临用现配。

5.2 样品处理

序号	组分名称	混合标准系列溶液(mg/L)					
		Std1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6
1	他卡西醇	0.2	1	2	4	10	20
2	他扎罗汀	1	5	10	20	50	100
3	阿维 A	1	5	10	20	50	100
4	异维甲酸	1	5	10	20	50	100
5	维甲酸	1	5	10	20	50	100
6	依曲替酯	1	5	10	20	50	100
7	维胺酯	1	5	10	20	50	100
8	阿达帕林	0.4	2	4	8	20	40

称取样品0.5g（精确到0.0001g）于10mL具塞比色管中，加适量甲醇（3.1）涡旋处理1min，再加甲醇（3.1）定容至刻度，摇匀，超声提取15min，4000r/min离心5min，取上清液经0.45 μ m滤膜过滤，滤液作为待测溶液，立即测定。

5.3 色谱参考条件

色谱柱：C₁₈ 柱（250mm×4.6mm×5μm），或等效色谱柱；

流动相梯度洗脱程序：

时间/min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	20	80
15	20	80
20	15	85
30	0	100
31	20	80
40	20	80

流速：1.0 mL/min；

检测波长：355nm；（他卡西醇、阿达帕林检测波长为269 nm，如有干扰阿达帕林可选检测波长320nm）；

柱温：35℃；

进样量：10 μL。

5.4 测定

在“5.3”项色谱条件下，取“5.1”项下的系列标准溶液分别进样，进行液相色谱分析，以系列标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立标准曲线，得到回归方程。

取“5.2”项下处理得到的待测溶液进样，进行色谱分析，根据保留时间定性，测得峰面积，根据标准曲线计算待测溶液中各组分的浓度。按“6”计算样品中各组分的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m}$$

式中：ω——化妆品中待测组分的含量，mg/kg；

m——样品取样量，g；

ρ——代入标准曲线计算得到的样品中各组分的浓度，mg/L；

V——定容体积，mL。

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

6.2 回收率和精密度

回收率为85%~115%，相对标准偏差小于10% (n=6)。

7 图谱

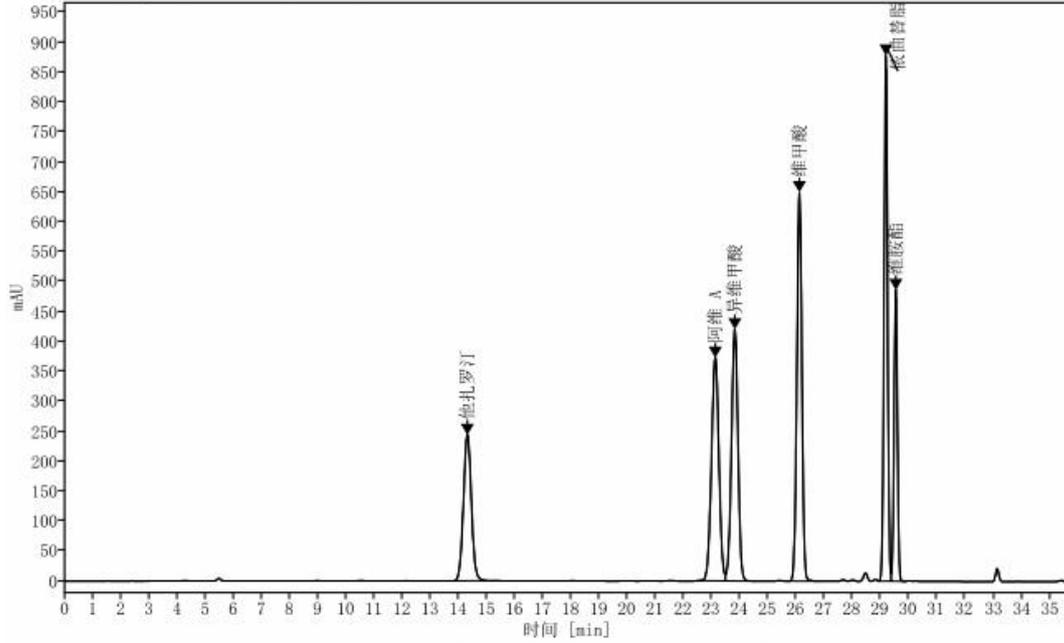


图1 标准溶液色谱图 ($\lambda=355\text{nm}$)

- 1: 他扎罗汀 (14.313min) ; 2: 阿维A (23.115min) ; 3: 异维甲酸 (23.809) ;
4: 维甲酸 (26.104min) ; 5: 依曲替酯 (29.174min) ; 6: 维胺酯 (29.527min)

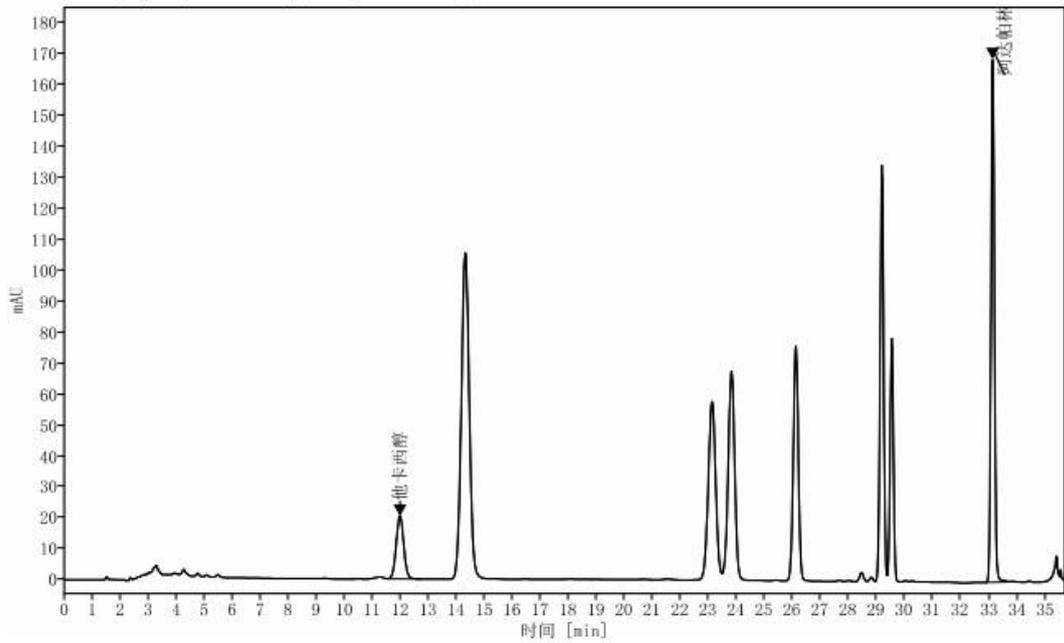


图2 标准溶液色谱图 ($\lambda=269\text{nm}$)

- 1: 他卡西醇 (11.982 min)

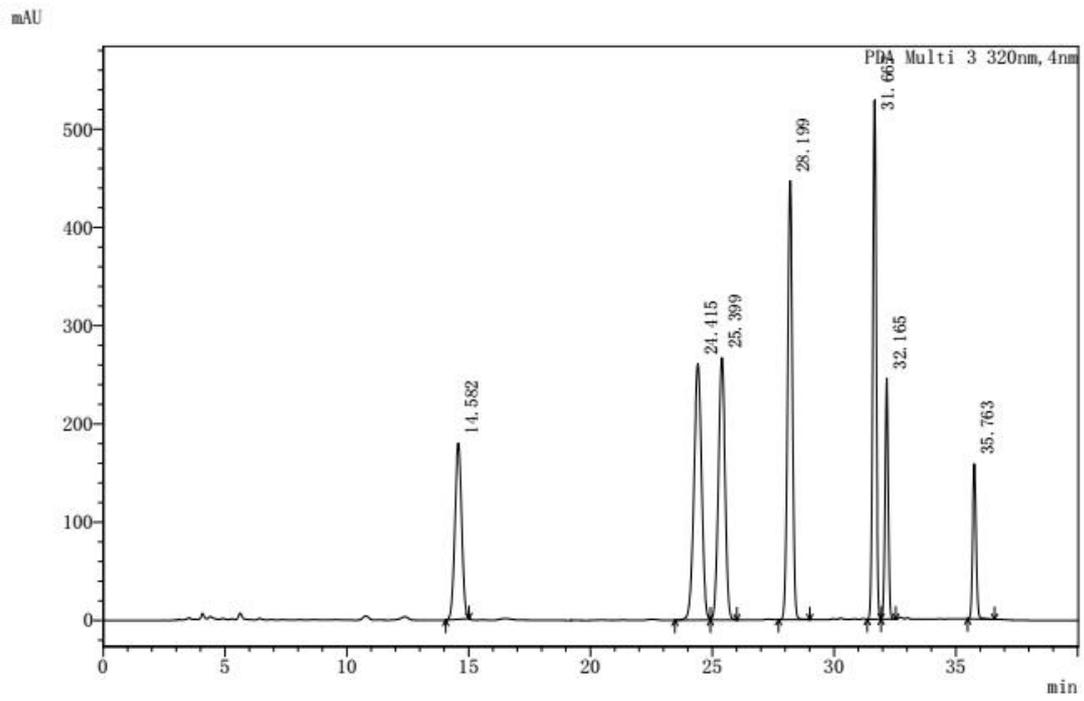


图3 标准溶液色谱图 ($\lambda=320\text{nm}$)

1: 阿达帕林 (35.763 min)

附录A

(规范性附录)

化妆品中维甲酸及其衍生物检测结果的确证

若样品检出阳性，必要时可采用液相色谱-质谱法进行结果确证。

A.1 仪器参考条件

A.1.1 色谱条件

色谱柱：C₁₈柱（50 mm×2.1 mm×1.8 μm），或等效色谱柱；

流动相：A：0.1%甲酸水溶液；B：甲醇（含0.1%甲酸）；

流动相梯度洗脱程序：

时间/min	V（流动相A）/%	V（流动相B）/%
0	30	70
4	10	90
5	10	90
7	5	95
7.1	30	70
10	30	70

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 °C；

进样量：2 μL；

A.1.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI源）；

监测模式：正/负离子多反应监测模式；监测离子对相关电压参数设定见表1；

雾化气流速：3 L/min；干燥气流速：10 L/min；脱溶剂管温度：500 °C；离子源电压：4000 V。

表1 各组分的监测离子对相关电压参数设定表

序号	监测模式	组分名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE(V)
1	正离子	他卡西醇	418.0	400.7	12
				382.6	15
2		他扎罗汀	352.2	324.1	28
				294.0	45
3		依曲替酯	354.9	308.8	14
				204.8	13
4		维胺酯	448.3	282.9	17
				161.1	24
5	负离子	阿维 A	325.1	281.1	10
				266.0	13
6		异维甲酸	299.2	255.3	15
				119.1	25
7		维甲酸	299.1	255.3	15
				119.1	25
8		阿达帕林	411.2	367.3	24
				352.1	43

A.2 定性

在相同的液相色谱-质谱实验条件下，如果样品中色谱峰的保留时间和紫外光谱图与标准溶液中对应组分一致，所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的差不超过表2规定范围，则可以判定样品中存在对应的测定组分。

表2 结果确证时相对离子丰度比的最大允许偏差

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

A.3 图谱

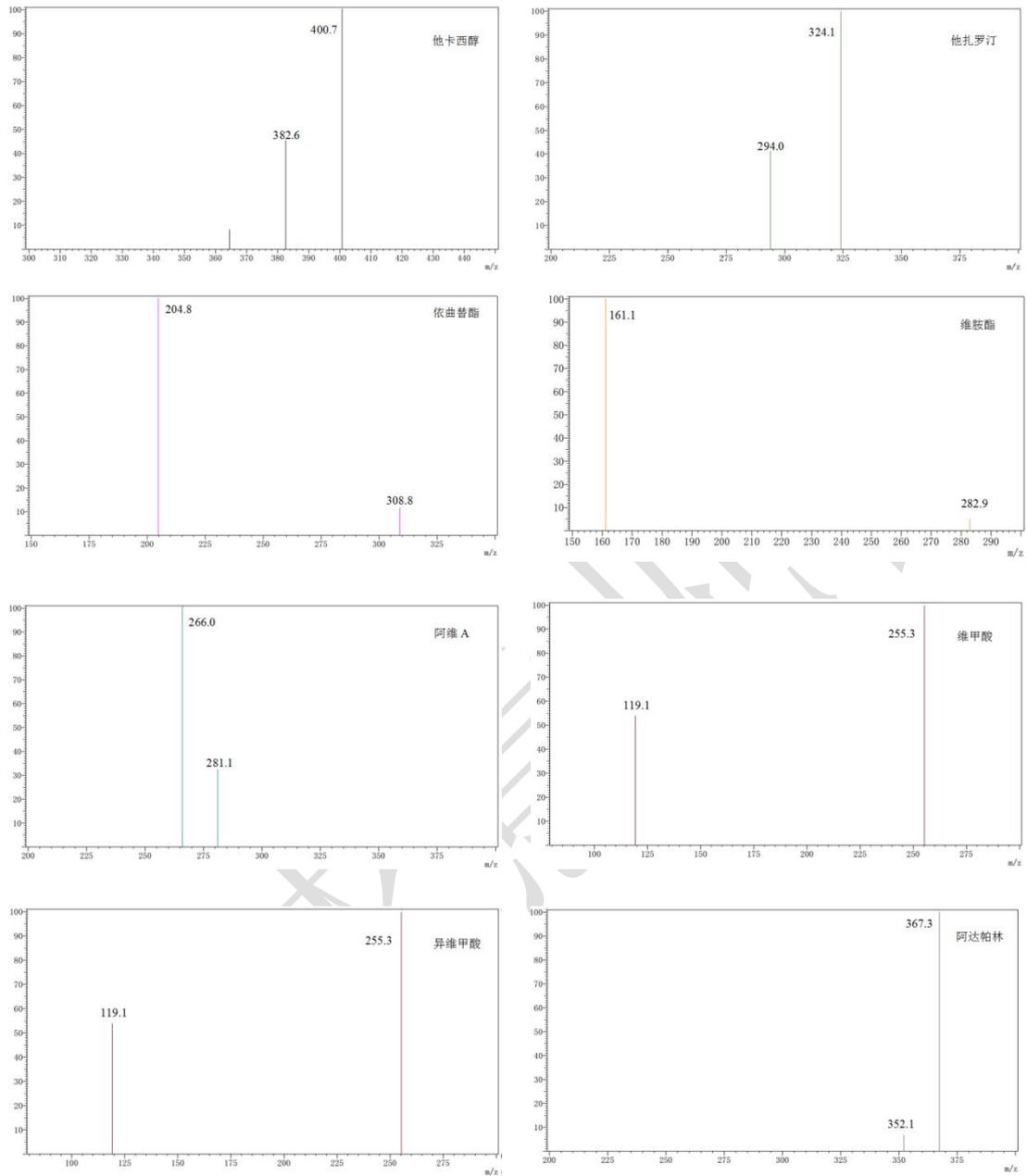


图1 待测组分质谱图

附录B

维甲酸等8种组分的基本信息表

序号	中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	分子量
1	他卡西醇	Tacalcitol	57333-96-7	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	416.64
2	他扎罗汀	Tazarotene	118292-40-3	C ₂₁ H ₂₁ NO ₂ S	351.46
3	阿维 A	Acitretin	55079-83-9	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	326.43
4	异维甲酸	Isotretinoin	4759-48-2	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.44
5	维甲酸	Tretinoin	302-79-4	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.44
6	依曲替酯	Etretinate	54350-48-0	C ₂₃ H ₃₀ O ₃	354.48
7	维胺酯	Viaminate	53839-71-7	C ₂₉ H ₃₇ NO ₃	447.62
8	阿达帕林	Adapalene	106685-40-9	C ₂₈ H ₂₈ O ₃	412.53

化妆品中维甲酸及其衍生物的检测方法

起草说明

为加强化妆品中禁用物质的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药品监督管理局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了化妆品中维甲酸及其衍生物的检测方法的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草的必要性

维甲酸类药物是常用的抗角质异化药，它们能调节细胞分化和增殖，维持上皮正常角化，有较强的角质剥脱作用，可抑制皮肤滞留性角化过度，防止新的阻塞和炎症性损害的形成，也能减少皮脂分泌，减少粉刺形成，减少皮脂腺导管部位角化过度等作用，被广泛应用于皮肤的抗角化、抑制粉刺、抗炎等方面。但长期使用这类药物易产生皮肤瘙痒、干燥、灼热、红斑、水肿、脱屑、刺痛等不良反应，重则引起肝损害和胎儿畸形。为此，我国《化妆品安全技术规范》（2015年版）中规定禁止在化妆品中添加维甲酸及其盐类等抗角质异化药。一些不良商家在化妆品中非法添加维甲酸类药物以快速达到增加皮肤细腻、润泽、光滑的作用，但长时间不恰当的使用这类产品会严重危害消费者的健康。因此，加强这类物质的监测是非常有必要的。

维甲酸类抗角质异化药物按其结构和发展顺序可分为三代：第一代是以全反式维甲酸为代表的主要改变极性基团及侧链部分的维甲酸衍生物，如维甲酸、异维甲酸、维胺酯；第二代是改脂肪环为芳香环的芳香维甲酸，如阿维 A、依曲替酯；第三代是改变多烯侧链的芳香维甲酸，如阿达帕林、他扎罗汀、他卡西醇。《化妆品安全技术规范》（2015年版）理化检验方法 2.28 中仅建立了维甲酸、异维甲酸两种化合物的检测方法，检验方法滞后于该类药物的应用及发展，无法满足禁用物质的检测需求。因此，本研究建立了维甲酸及其衍生物的检测方法，该方法按照相关要求进行了实验室内及实验室间的验证。

二、起草依据及主要参考文献

《化妆品安全技术规范》（2015年版）收录维甲酸、异维甲酸两种物质的检测方法，为高效液相色谱法。《中国药典》（2015版）收录的维甲酸、异维甲酸、阿维A、他扎罗汀、阿达帕林5种维甲酸类化合物的检测方法同样为高效液相色谱法。文献研究表明，目前对维甲酸类化合物的研究方法主要为高效液相色谱法，研究的目标化合物包括维甲酸、异维

甲酸、阿达帕林、他扎罗汀、依曲替酯等，均可以采用高效液相色谱法进行检测分析。

因此，综合比较选择液相色谱法对维甲酸及其衍生物进行定量分析并辅以液相色谱-质谱法进行结果确证。

本方法起草过程中的依据和参考文献资料如下：

[1] 化妆品安全技术规范（2015年版）；

[2] 化妆品及其原料中禁限用物质检测方法验证技术规范；

[3] 中华人民共和国药典（2015版）二部；

[4] 严晓明, 谭妙娟, 何炳洪. 建立检测祛痘类化妆品中违禁添加维A酸的液相分析法[J]. 中国药事, 2014, 28(6):580-583;

[5] 陈张好, 方继辉, 刘小娟. 高效液相色谱法测定化妆品中维甲酸和异维甲酸[J]. 理化检验（化学分册）, 2013, 49:208-215;

[6] 胡俊明, 段鹤君, 赵月朝, 等. 高效液相色谱法测定祛斑类化妆品中常用的功效成分[J]. 卫生研究, 2003, 32(5):499-500;

[7] 张春泓, 赵迎春, 韩春晖, 等. 高效液相色谱法同时测定阿达帕林凝胶剂中的主药阿达帕林和两种防腐剂[J]. 色谱, 2008, 26(5):260-262;

[8] 杜威, 王红青, 屠海云, 等. 用高效液相色谱法测定化妆品中4种维甲酸类物质[J]. 中国食品, 2012(14):72-75;

[9] 黄蔚, 魏雪芳. HPLC法测定银屑灵胶囊中依曲替酯的含量[J]. 广东药学院学报, 1998,14(3):197-198;

[10] 刘莹, 李启艳, 王小兵, 等. 高效液相色谱法检测化妆品中非法添加的6种抗角化药物[J]. 卫生研究, 2017,46(5):847-849。

三、起草原则

本检测方法兼具先进性、准确性以及可操作性强的特点，采用目前一般检测实验室普遍具备的分析技术，选择适宜、可行、便于实际操作的分析条件，保证检测方法的精确性和重现性。

四、重点说明的问题

（一）关于体例。本检测方法的体例主要参照现行《化妆品安全技术规范》（2015版）的卫生化学检验方法的体例，便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

（二）本实验确定待测组分极性较弱，疏水性强，且检测波长偏紫外长波长区域，化妆品基质中的其它成分几乎不对其产生干扰。仅阿达帕林浓度较低时可能会受到流动相梯度变

化的干扰，可以选择次强的吸收峰322nm左右处检测。

(三)本实验确定的 8 种组分对光敏感，见光遇光不稳定，因此实验过程中要注意避光，样品制备后应尽快测定。

征求意见稿