

ICS 71.100.70  
CCS Y42

# T/FSBMEA

佛山市生物医学工程学会团体标准

T/FSBMEA XXXX—XXXX

## 化妆品常用植物提取物中 16 种香豆素类 化合物的测定 液质联用法

Simultaneous Determination of 16 Coumarin Compounds in  
Cosmetics Plant Extract RawMaterials by Ultra  
Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX发布

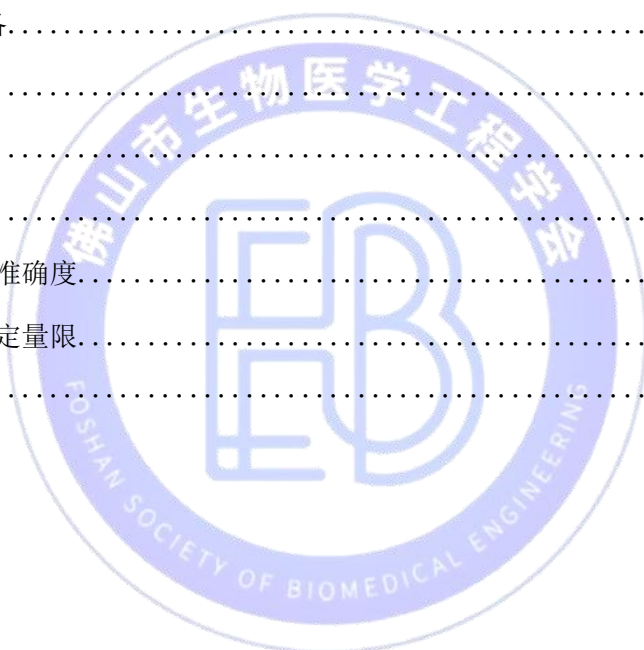
XXXX-XX-XX实施

佛山市生物医学工程学会

发布

# 目 次

|                 |    |
|-----------------|----|
| 前言.....         | II |
| 1 范围.....       | 1  |
| 2 规范性引用文件.....  | 1  |
| 3 术语和定义.....    | 1  |
| 4 原理 .....      | 1  |
| 5 试剂.....       | 1  |
| 6 仪器和设备.....    | 2  |
| 7 样品.....       | 3  |
| 8 试验步骤 .....    | 3  |
| 9 结果计算.....     | 5  |
| 10 精密度和准确度..... | 6  |
| 11 检出限和定量限..... | 6  |
| 12 图谱.....      | 7  |



## 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。

本文件由佛山市生物医学工程学会提出并归口。

本文件起草单位：佛山市食品药品检验检测中心、佛山科学技术学院、佛山市仁汇医药科技有限公司、佛山市安安美容保健品有限公司、广东诗妃化妆品有限公司。

本文件主要起草人：张艳萍、黄婉锋、何作民、杨安平、周宗洲、杨定霖、马志浩、郑衡阳。

本文件的所有权和解释权归佛山市生物医学工程学会。



# 化妆品常用植物提取物中 16 种香豆素类 化合物的测定 液质联用法

## 1 范围

本文件规定了化妆品中常用植物提取物中 16 种香豆素类化合物的液质联用测定方法。

本文件适用于液体类常用植物提取物中 16 种香豆素类化合物的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

样品提取后，采用高效液相色谱仪分离，质谱检测器检测。根据保留时间和特征离子对的相对丰度比定性、定量离子对峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

## 5 试剂

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 乙腈：色谱纯。

5.2 甲酸：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 0.1%甲酸溶液：取 1 mL 甲酸（5.2）用水定容至 1000 mL，混匀。

5.5 标准品：香豆素、7-羟基香豆素、补骨酯素、7-甲基香豆素、异补骨酯素、8-甲氧基补骨酯素、欧前胡素、异欧前胡素、6,7-二甲氧基香豆素、新补骨酯异黄酮、补骨酯二氢黄酮、4-甲基-7-羟基香豆素、4-甲基-7-乙氧香豆素、5-甲氧基补骨酯素、2,4,8-三甲基补骨酯素、环香豆素标准品纯度均≥98%。

5.6 标准储备溶液：称取香豆素、7-羟基香豆素、补骨酯素、7-甲基香豆素、异补骨酯素、8-甲氧基补骨酯素、欧前胡素、异欧前胡素、6,7-二甲氧基香豆素、新补骨酯异黄酮、补骨酯二氢黄酮、4-甲基-7-羟基香豆素、4-甲基-7-乙氧香豆素、5-甲氧基补骨酯素、2,4,8-三甲基补骨酯素、环香豆素各 10 mg（精确到 0.00001 g），分别置于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.3）溶解并定容至刻度，混匀。制成标准储备溶液的质量浓度均为 1000 mg/L。置于-18℃以下冰箱中保存，有效期 3 个月。

**5.7 混合标准中间溶液:**准确移取各标准储备溶液适量置于20 mL棕色容量瓶中,用甲醇(5.3)并定容至刻度,摇匀,制成配制香豆素质量浓度范围约为80 μg/mL, 7-羟基香豆素、补骨酯素、7-甲基香豆素、异补骨酯素、8-甲氧基补骨酯素质量浓度范围约为40 μg/mL, 欧前胡素、异欧前胡素、6,7-二甲氧基香豆素、新补骨酯异黄酮、补骨酯二氢黄酮质量浓度范围约为8.0 μg/mL, 4-甲基-7-羟基香豆素、4-甲基-7-乙氧香豆素、5-甲氧基补骨酯素、2,4,8-三甲基补骨酯素、环香豆素质量浓度范围约为4.0 μg/mL的混合标准中间溶液。置于-18℃中避光保存,有效期1个月。

**5.8 混合标准工作溶液的制备:**精密移取适量混合对照品中间溶液,用甲醇(5.3)配制香豆素质量浓度范围约为0.20 μg/mL~8.0 μg/mL, 7-羟基香豆素、补骨酯素、7-甲基香豆素、异补骨酯素、8-甲氧基补骨酯素质量浓度范围约为0.10 μg/mL~4.0 μg/mL, 欧前胡素、异欧前胡素、6,7-二甲氧基香豆素、新补骨酯异黄酮、补骨酯二氢黄酮质量浓度范围约为0.02 μg/mL~0.80 μg/mL, 4-甲基-7-羟基香豆素、4-甲基-7-乙氧香豆素、5-甲氧基补骨酯素、2,4,8-三甲基补骨酯素、环香豆素质量浓度范围约为0.01 μg/mL~0.40 μg/mL的混合标准工作溶液,具体浓度见表1。

表1 香豆素等16种组分的基质混合标准工作溶液浓度

| 序号 | 名称            | 混合基质标准工作溶液浓度 ( μg/mL) |       |      |      |      |      |
|----|---------------|-----------------------|-------|------|------|------|------|
| 1  | 香豆素           | 0.20                  | 0.50  | 1.0  | 2.0  | 4.0  | 8.0  |
| 2  | 7-羟基香豆素       | 0.10                  | 0.25  | 0.50 | 1.0  | 2.0  | 4.0  |
| 3  | 补骨酯素          | 0.10                  | 0.25  | 0.50 | 1.0  | 2.0  | 4.0  |
| 4  | 7-甲基香豆素       | 0.10                  | 0.25  | 0.50 | 1.0  | 2.0  | 4.0  |
| 5  | 异补骨酯素         | 0.10                  | 0.25  | 0.50 | 1.0  | 2.0  | 4.0  |
| 6  | 8-甲氧基补骨酯素     | 0.10                  | 0.25  | 0.50 | 1.0  | 2.0  | 4.0  |
| 7  | 欧前胡素          | 0.02                  | 0.05  | 0.10 | 0.20 | 0.40 | 0.80 |
| 8  | 异欧前胡素         | 0.02                  | 0.05  | 0.10 | 0.20 | 0.40 | 0.80 |
| 9  | 6,7-二甲氧基香豆素   | 0.02                  | 0.05  | 0.10 | 0.20 | 0.40 | 0.80 |
| 10 | 新补骨酯异黄酮       | 0.02                  | 0.05  | 0.10 | 0.20 | 0.40 | 0.80 |
| 11 | 补骨酯二氢黄酮       | 0.02                  | 0.05  | 0.10 | 0.20 | 0.40 | 0.80 |
| 12 | 4-甲基-7-羟基香豆素  | 0.01                  | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.40 |
| 13 | 4-甲基-7-乙氧香豆素  | 0.01                  | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.40 |
| 14 | 5-甲氧基补骨酯素     | 0.01                  | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.40 |
| 15 | 2,4,8-三甲基补骨酯素 | 0.01                  | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.40 |
| 16 | 环香豆素          | 0.01                  | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.40 |

6 仪器和设备

**6.1 高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,** 配电喷雾离子源 (ESI 源)。

**6.2 分析天平:** 感量 0.0001g 和 0.00001 g。

**6.3 超声波清洗器。**

6.4 涡旋混合仪。

6.5 高速离心机，转速不低于 6000 r/min。

6.6 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ 。

## 7 样品

精密称取不同柑橘类、石斛类、当归类、马齿苋类等化妆品植物提取物品种植物提取物 1.0 g（精确至 0.1 mg）于 20 mL 容量瓶中，加入适量甲醇，漩涡 2 min 后，移至超声器超声提取 20 min，甲醇定容，混匀后取适量溶液至离心管中，8000 r/min 离心 8 min，取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，进样，分析测定。

## 8 试验步骤

### 8.1 仪器参考条件

#### 8.1.1 色谱条件

色谱柱：C<sub>18</sub> 柱（2.1 mm×100.0mm，1.7  $\mu\text{m}$ ），或等效色谱柱；

流动相：A 为乙腈（5.1），B 为 0.1%甲酸溶液（5.4），梯度洗脱程序见表 2。

流速：0.30 mL/min；

柱温：30  $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量：1  $\mu\text{L}$ 。

表 2 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|----------|-----------|-----------|
| 0.00     | 5         | 95        |
| 1.00     | 5         | 95        |
| 2.00     | 25        | 75        |
| 7.00     | 25        | 75        |
| 9.00     | 70        | 30        |
| 11.00    | 70        | 30        |
| 13.00    | 90        | 10        |
| 15.00    | 90        | 10        |
| 15.10    | 5         | 95        |
| 17.10    | 5         | 95        |

#### 8.1.2 质谱条件

监测模式：正离子多反应监测模式（MRM），监测离子对及相关参数设定见表 3。

毛细管电压：3600V

毛细管温度：500 $^{\circ}\text{C}$

离子源温度：150 $^{\circ}\text{C}$

表 3 16 种香豆素类化合物质谱检测参数

Table3 Mass spectrometric condition for monitoring of 16 coumarin compounds

| 序号 | 名称            | 保留时间(min) | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 锥孔电压(V) | 碰撞电压(v) |
|----|---------------|-----------|----------|----------|---------|---------|
| 1  | 香豆素           | 5.43      | 146.9    | 90.9*    | 32      | 20      |
|    |               |           |          | 76.9     |         | 22      |
| 2  | 7-甲基香豆素       | 8.35      | 160.9    | 104.9*   | 34      | 20      |
|    |               |           |          | 90.8     |         | 20      |
| 3  | 7-羟基香豆素       | 4.00      | 162.9    | 106.9 *  | 34      | 22      |
|    |               |           |          | 76.8     |         | 28      |
| 4  | 4-甲基-7-羟基香豆素  | 4.76      | 176.9    | 120.9*   | 38      | 22      |
|    |               |           |          | 104.9    |         | 20      |
| 5  | 补骨酯素          | 8.21      | 186.9    | 130.9*   | 34      | 26      |
|    |               |           |          | 76.8     |         | 36      |
| 6  | 异补骨脂素         | 8.47      | 186.9    | 130.8*   | 34      | 22      |
|    |               |           |          | 76.9     |         | 34      |
| 7  | 4-甲基-7-乙氧香豆素  | 9.20      | 205.0    | 176.9*   | 32      | 20      |
|    |               |           |          | 104.9    |         | 22      |
| 8  | 6,7-二甲氧基香豆素   | 5.06      | 207.0    | 106.9*   | 36      | 34      |
|    |               |           |          | 150.9    |         | 22      |
| 9  | 8-甲氧基补骨脂素     | 8.54      | 217.0    | 201.9*   | 36      | 22      |
|    |               |           |          | 89.5     |         | 36      |
| 10 | 5-甲氧基补骨脂素     | 8.92      | 217.0    | 202.0*   | 34      | 24      |
|    |               |           |          | 117.9    |         | 32      |
| 11 | 2,4,8-三甲基补骨脂素 | 9.73      | 229.1    | 141.8*   | 42      | 24      |
|    |               |           |          | 173.0    |         | 22      |
| 12 | 异欧前胡素         | 10.14     | 271.1    | 203.0*   | 16      | 12      |
|    |               |           |          | 90.8     |         | 40      |
| 13 | 欧前胡素          | 9.79      | 271.1    | 146.9*   | 18      | 34      |
|    |               |           |          | 202.9    |         | 12      |
| 14 | 环香豆素          | 10.44     | 323.2    | 120.9*   | 24      | 44      |
|    |               |           |          | 251.0    |         | 18      |
| 15 | 新补骨酯异黄酮       | 9.35      | 323.2    | 267.0*   | 32      | 18      |
|    |               |           |          | 255.0    |         | 20      |
| 16 | 补骨酯二氢黄酮       | 9.47      | 325.2    | 64.8*    | 34      | 44      |
|    |               |           |          | 148.9    |         | 24      |

\*为推荐的定量离子。

注：当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

## 8.2 定性判定

取样品溶液与标准溶液在相同分析条件下测定，样品中如呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰，被测成分的特征离子峰保留时间与标准溶液对应的保留时间一致，且选择的定性离子的相对丰度比与相当浓度标准品溶液的定性离子的相对丰度比的最大偏差不超过表 4 规定的范围，则可以确定试样中检出对应的成分。

表 4 定性确证时相对离子丰度比的最大允许偏差

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

### 8.3 定量测定

取混合标准工作溶液（5.8）依次测定，以待测组分的系列浓度为横坐标，待测组分的峰面积为纵坐标，进行线性回归，绘制标准曲线，其线性相关系数应大于 0.99。取样品溶液（7.1）测定，将对应的定量离子色谱峰面积代入线性回归方程。按“8”计算样品中待测组分的含量。供试品溶液中待测组分的响应值应在标准曲线线性范围内。

### 8.4 平行试验

按以上步骤，对同一样品进行平行试验测定。

### 8.5 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤完成测定。

## 9 结果计算

结果按式(1)计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\omega$ —样品中 16 种香豆素类化合物的质量分数，mg/kg；

$\rho$ —供试品溶液中 16 种香豆素类化合物质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$V$ —样品定容体积，mL；

$m$ —样品取样量，g；

$D$ —稀释倍数（如未稀释则为 1）。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 精密度和准确度

定量下限浓度回收率为 70%~120%，相对标准偏差小于 9.5%（n=6），中、高浓度回收率为 85%~115%，相对标准偏差小于 8.0%（n=6）。

11 检出限和定量限

本方法中各组分的检出限、定量下限和取样量为 0.2 g 时的检出浓度、最低定量浓度见表 5。

表 5 16 种香豆素类化合物的检出限、定量下限、检出浓度和最低定量浓度

| 序号 | 组分名称          | 检出限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量下限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 检出浓度<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | 最低定量浓度<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) |
|----|---------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1  | 香豆素           | 0.18                       | 0.6                         | 18.0                         | 60.0                           |
| 2  | 7-羟基香豆素       | 0.13                       | 0.43                        | 13.0                         | 43.0                           |
| 3  | 补骨酯素          | 0.28                       | 0.93                        | 28.0                         | 93.0                           |
| 4  | 7-甲基香豆素       | 0.23                       | 0.77                        | 23.0                         | 77.0                           |
| 5  | 异补骨脂素         | 0.27                       | 0.9                         | 27.0                         | 90.0                           |
| 6  | 8-甲氧基补骨脂素     | 0.1                        | 0.33                        | 10.0                         | 33.0                           |
| 7  | 欧前胡素          | 0.03                       | 0.1                         | 3.0                          | 10.0                           |
| 8  | 异欧前胡素         | 0.01                       | 0.033                       | 1.0                          | 3.3                            |
| 9  | 6,7-二甲氧基香豆素   | 0.01                       | 0.033                       | 1.0                          | 3.3                            |
| 10 | 新补骨酯异黄酮       | 0.007                      | 0.022                       | 0.7                          | 2.2                            |
| 11 | 补骨酯二氢黄酮       | 0.013                      | 0.045                       | 1.3                          | 4.5                            |
| 12 | 4-甲基-7-羟基香豆素  | 0.006                      | 0.02                        | 0.6                          | 2.0                            |
| 13 | 4-甲基-7-乙氧香豆素  | 0.18                       | 0.6                         | 0.7                          | 2.2                            |
| 14 | 5-甲氧基补骨脂素     | 0.13                       | 0.43                        | 0.8                          | 2.8                            |
| 15 | 2,4,8-三甲基补骨脂素 | 0.28                       | 0.93                        | 0.3                          | 1.0                            |
| 16 | 环香豆素          | 0.23                       | 0.77                        | 0.6                          | 2.0                            |

## 12 图谱

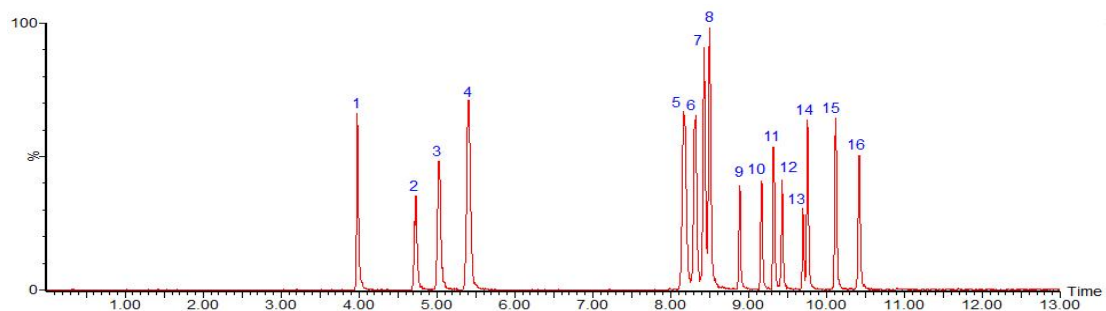


图1 标准 TIC 图谱

1. 7-羟基香豆素 2. 4-甲基-7-羟基香豆素 3. 6,7-二甲氧基香豆素 4. 香豆素 5. 补骨酯素 6. 7-甲基香豆素 7. 异补骨脂素 8. 8-甲氧基补骨脂素 9. 5-甲氧基补骨脂素 10. 4-甲基-7-乙氧香豆素 11. 新补骨酯异黄酮 12. 补骨酯二氢黄酮 13. 2,4,8-三甲基补骨脂素 14. 欧前胡素 15. 异欧前胡素 16. 环香豆素