

团体标准

T/ NAIA×××-××××

化妆品中芦丁等6种黄酮类化合物的测定 高效液相色谱法

Determination of Rutin and other flavonoid in cosmetics
by High-performance liquid chromatography

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会

发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由宁夏回族自治区药品检验研究院提出。

本文件由宁夏化学分析测试协会归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏）），
宁夏回族自治区药品质量控制与评价重点实验室，。

本文件主要起草人：肖哲丽、王宁霞、翟宇、马玲。

本文件为首次发布。

化妆品中芦丁等6种黄酮类化合物的测定 高效液相色谱法

Determination of Rutin and other flavonoid in cosmetics by High-performance liquid chromatography

1 范围

本文件规定了高效液相色谱法测定化妆品中芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚 6 种黄酮类化合物含量的测定方法。

本文件适用于化妆品水剂类、乳液类、膏霜类、贴面面膜类中芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚 6 种黄酮类化合物的定性与定量测定。

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 方法提要

样品经 80%甲醇水溶液超声提取后，采用高效液相色谱系统分离，二极管阵列检测器（DAD），在波长 360nm 处检测，根据保留时间定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。

本方法对芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚 6 种黄酮类化合物的检出限均为 2ng，定量下限均为 10ng，当取样量为 0.5g 时，检出浓度为 4μg/g，最低定量浓度为 20μg/g。

5 试剂与材料

除另有说明外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 磷酸：H₂PO₃，CAS号：7664-38-2，色谱纯。

5.3 80%甲醇溶液：准确移取800 mL甲醇置于适量水中，再加水稀释至1000 mL，混匀。

5.4 0.1%磷酸溶液：准确移取0.5 mL磷酸置于适量水中，再加水稀释并1000 mL，混匀。

5.5 标准品

芦丁（CAS 号 153-18-4）、杨梅酮（CAS 号 529-44-2）、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷（CAS 号 604-80-8）、槲皮素（CAS 号 117-39-5）、木樨草素（CAS 号 491-90-3）、山奈酚（CAS 号 520-18-3）标准品：纯度≥91.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.6 标准品储备溶液

5.6.1 标准储备溶液：分别准确称取芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚的标准品各10mg(精确至0.01mg),于不同10mL容量瓶中，用适量甲醇（5.1）溶解并定容至刻度，配制成1000mg/L标准储备溶液。

5.6.2 混合标准储备溶液 准确移取上述标准储备溶液（5.6.1）各2.5mL，置于同一50mL容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成50mg/L的混合标准储备溶液。使用时，稀释至所需要的质量浓度的混合标准工作溶液。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器（DAD）。

6.2 十万分之一分析天平，感量0.00001 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 超纯水机。

6.5 涡旋混匀仪。

6.6 微孔滤膜：0.45μm，有机系。

7 试样制备

准确称取化妆品试样 0.5g(精确到 0.0001g),于 15mL 具塞比色管中，若试样为贴面膜类样品应取液体部分，加入 80%甲醇水溶液，约 6-9mL，涡旋震荡使试样与提取溶剂充分混匀，超声提取 20min，冷却至室温。加入 80%甲醇水溶液定容至刻度，经孔径为 0.45μm 有机微孔滤膜过滤后，滤液作为样品待测溶液。

8 测定

8.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱: C₁₈ 柱 (4.6mm×250mm, 5 μm), 或等效色谱柱。

柱温: 25 °C。

流动相: A:0.1%磷酸 (5.4), B:甲醇 (5.1)。

检测波长: 360 nm。

流速: 0.8mL/min。

进样量: 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	51	49
10	51	49
13	30	70
20	30	70
23	51	49
28	51	49

8.2 标准曲线的绘制

分别准确量取已配好的混合标准储备溶液 (5.6.2) 0.2mL、0.4mL、1.0mL、2.0mL、5.0mL 用甲醇稀释至 10mL, 得到浓度为 1.0μg/mL、2.0μg/mL、5.0μg/mL、10.0μg/mL、25.0μg/mL、50μg/mL 的混合标准工作溶液。取上述系列溶液按“8.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 以对照品溶液浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 准为纵坐标, 绘制标准曲线。

8.3 试样测定

取样品制备项下的试样溶液, 进行色谱分析, 根据相对保留时间和紫外光图谱定性, 色谱图峰面积外标法定量。试样中各组分的响应值均应在标准曲线范围内, 超过线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

9 分析结果的表述

8.1 计算

试样中芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚 6 种黄酮类化合物的含量按以下公式计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D}{m \times 1000}$$

其中： ω ——试样中芦丁等 6 种黄酮类化合物含量的数值，单位为毫克每克 (mg/g)；

ρ ——代入标准曲线测得试样中芦丁等 6 种黄酮类化合物的质量浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

m ——试样的质量，单位为克 (g)；

V ——试样中加入并定容的提取溶液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

D ——为稀释倍数；

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

10 回收率和精密度

方法回收率为 80%–120%，相对标准偏差小于 10% (n=6)

11 其他

芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚 6 种黄酮类化合物标准溶液色谱图见附录 A。

附录 A

(资料性附录)

芦丁、杨梅酮、异鼠李素-3-O- β -D-芸香糖苷，槲皮素、木樨草素、山奈酚
6种黄酮类化合物标准品色谱图

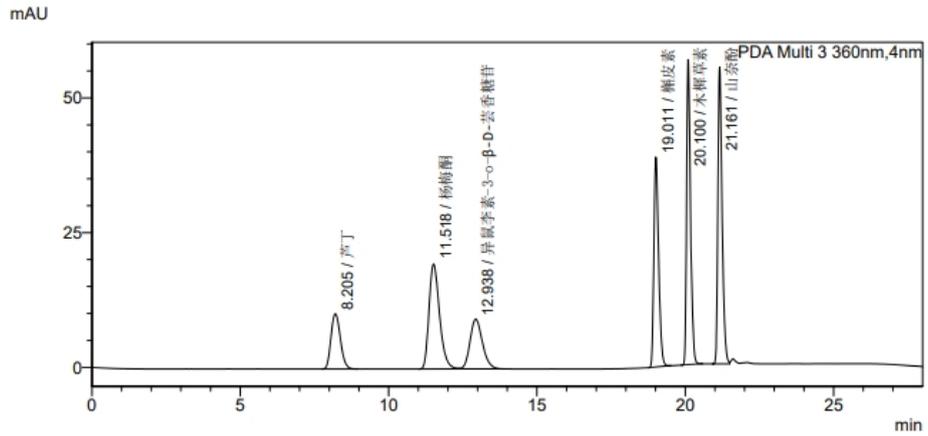


图 A. 混合标准溶液色谱图

1: 芦丁 (8.205min) ;2:杨梅酮 (11.518min) ;3: 异鼠李素-3-O- β -D-芸香糖苷 (12.938min) ;4: 槲皮素 (19.011min) ;5:木樨草素 (20.100min) ;6:山奈酚 (21.161min)