



中华人民共和国国家标准

GB/T 27577—2011

化妆品中维生素 B₅ (泛酸) 及维生素原 B₅ (D-泛醇) 的测定 高效液相色谱紫外 检测法和高效液相色谱串联质谱法

Determination of vitamin B₅ (pantothenic acid) and provitamin B₅ (D-pantothenol)
in cosmetics—HPLC/UV and HPLC MS/MS

2011-12-05 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国香料香精化妆品标准化技术委员会(SAC/TC 257)归口。

本标准起草单位:大连市产品质量监督检验所(国家日化产品质量监督检验中心)、上海市日用化学工业研究所(国家香料香精化妆品质量监督检验中心)、大连标准检测技术研究中心。

本标准主要起草人:毛希琴、胡侠、潘炜、郑顺利、李鹏、李琼。

化妆品中维生素 B₅ (泛酸) 及维生素原 B₅ (D-泛醇) 的测定 高效液相色谱紫外检测法和高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中维生素 B₅ (泛酸) 及维生素原 B₅ (D-泛醇) 测定的高效液相色谱紫外检测法和高效液相色谱串联质谱法两种方法。

本标准适用于化妆品中维生素 B₅ (泛酸) 及维生素原 B₅ (D-泛醇) 的定量测定, 高效液相色谱紫外检测法对泛酸、D-泛醇的检出限为 30 μg/g, 定量限为 100 μg/g。高效液相色谱串联质谱法对泛酸、D-泛醇的检出限为 30 ng/g; 定量限为 100 ng/g。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分: 总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

在水和与水不互溶的有机溶剂(如三氯甲烷或异辛烷等)形成的双液相体系中, 维生素 B₅ (泛酸及其盐类(如泛酸钠及泛酸钙)) 和维生素原 B₅ (D-泛醇) 均分布于水相, 化妆品中油性成分易溶于有机相, 而化妆品中的表面活性剂则富集于油水界面处。利用双液相体系可将维生素 B₅ 和维生素原 B₅ 与化妆品中油性成分及表面活性剂初步分离, 亚铁氰化钾-醋酸锌共沉淀剂去除提取液中的大分子基质。在酸性条件下将泛酸和 D-泛醇富集于固相萃取 C₁₈ 固定相上, 脱除其他水溶性干扰物后, 用 40% 甲醇水溶液洗脱, 用反相高效液相色谱分离, 紫外检测器或串联四级杆质谱检测, 标准曲线外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明, 所用水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 标准物质英文名称、CAS 号、分子式、分子结构式、相对分子质量、纯度见表 1。

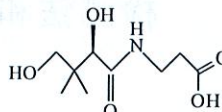
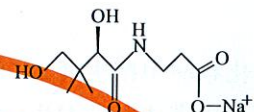
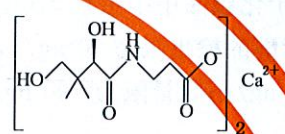
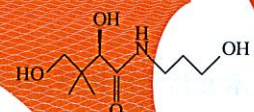
4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 甲醇: 分析纯。

4.4 甲酸: 分析纯。

4.5 甲酸: 色谱纯。

表 1 标准物质英文名称、CAS 号、分子式、分子结构式、相对分子质量、纯度

化合物名称	英文名称	CAS 号	分子式	分子结构式	相对分子质量	纯度
泛酸	pantothenic acid	79-83-4	$C_9H_{17}NO_5$		219.23	>99%
泛酸钠	sodium pantothenate	867-81-2	$C_9H_{15}NNaO_5$		241.22	
泛酸钙	calcium pantothenate	137-08-6	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$		476.53	
D-泛醇	D-panthenol	81-13-0	$C_9H_{19}NO_4$		205.25	

4.6 三氯甲烷:分析纯。

4.7 乙酸丁酯:分析纯。

4.8 异辛烷:分析纯。

4.9 0.2 mol/L 甲酸:移取 3.8 mL 甲酸(4.4),用水稀释定容至 500 mL。

4.10 0.1 mol/L 甲酸:移取 1.9 mL 甲酸(4.4),用水稀释定容至 500 mL。

4.11 醋酸锌溶液:称取 21.9 g $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$ (分析纯),用 0.2 mol/L 甲酸(4.9)溶解并定容至 100 mL。

4.12 亚铁氰化钾溶液:称取 10.6 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (分析纯),用水溶解并定容至 100 mL。

4.13 乙酸丁酯-三氯甲烷混合溶剂:乙酸丁酯(4.7):三氯甲烷(4.6)体积比(1+1)。

4.14 40%甲醇水溶液:甲醇(4.3):蒸馏水体积比(2+3)。

4.15 C_{18} 固相萃取小柱:200 mg/3 mL,使用前,依次用 3 mL 甲醇(4.3)、3 mL 蒸馏水进行活化。

4.16 一次性针式样品过滤器:0.2 μm ,尼龙膜。

4.17 标准储备溶液:分别准确称取标准物质泛酸 1.0 g(或 1.1 g 泛酸钠或者泛酸钙,折合为泛酸 1.0 g)和 D-泛醇 1.0 g(以上质量均精确至 0.1 mg),用蒸馏水溶解定容至 25 mL,配置成浓度为 40 mg/mL 的标准储备液于 4 $^{\circ}C$ ~6 $^{\circ}C$ 条件下保存。

4.18 系列标准溶液 A:首先将泛酸和 D-泛醇标准储备液(4.17)等体积混合配置成泛酸和 D-泛醇浓度均为 20 mg/mL 的溶液,然后用蒸馏水稀释配置成泛酸和泛醇浓度均分别为 1 $\mu g/mL$ 、10 $\mu g/mL$ 、50 $\mu g/mL$ 、100 $\mu g/mL$ 、200 $\mu g/mL$ 、400 $\mu g/mL$ 、800 $\mu g/mL$ 、1 000 $\mu g/mL$ 的系列标准混合溶液于 4 $^{\circ}C$ ~6 $^{\circ}C$ 条件下保存(适用于高效液相色谱紫外检测法)。

4.19 系列标准溶液 B:用蒸馏水稀释泛酸和 D-泛醇浓度均为 100 $\mu g/mL$ 的标准溶液(4.18),配置成泛酸和 D-泛醇浓度均分别为 1 $\mu g/L$ 、10 $\mu g/L$ 、50 $\mu g/L$ 、100 $\mu g/L$ 、200 $\mu g/L$ 、400 $\mu g/L$ 、800 $\mu g/L$ 和 1 000 $\mu g/L$ 的系列标准溶液于 4 $^{\circ}C$ ~6 $^{\circ}C$ 条件下保存(适用于高效液相色谱串联质谱法)。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪紫外检测器(高效液相色谱紫外检测法)。
- 5.2 高效液相色谱仪串联四级杆质谱(ESI源)(高效液相色谱串联质谱法)。
- 5.3 分析天平:感量0.1 mg,0.01 mg。
- 5.4 氮吹仪。
- 5.5 漩涡混合器。
- 5.6 超声波清洗器。
- 5.7 离心机:转速不小于5 000 r/min,离心试管容量15 mL。
- 5.8 移液枪或移液器。

6 试样制备

6.1 化妆水、乳液、中性及弱油性膏霜等水易分散的化妆品样品的制备

称取0.2 g样品(精确至0.01 g)于15 mL具塞塑料离心管中,50℃条件下氮吹,尽量除去样品中的水分。向离心管中加入3.6 mL 0.1 mol/L甲酸(4.10)及200 μL醋酸锌溶液(4.11),漩涡混合使样品均匀分散,然后向溶液中准确添加200 μL亚铁氰化钾溶液(4.12),震荡摇匀,向离心管中加入3 mL三氯甲烷(4.6),漩涡混合2 min,然后于5 000 r/min离心5 min~20 min。

准确移取2 mL上层溶液过C₁₈固相萃取小柱(4.15),1 mL 0.1 mol/L甲酸(4.10)淋洗柱床后,在小柱出口处放置2 mL小试剂瓶,准确添加1 mL 40%甲醇水溶液(4.14)淋洗柱床,收集流出溶液,漩涡混合,待测。

6.2 油性膏霜、油剂类化妆品等水不易分散的化妆品样品的制备

称取0.2 g样品(精确至0.01 g)于15 mL具塞塑料离心管中,先向离心管中加入2 mL三氯甲烷(4.6),漩涡混合至样品均匀分散后,再向离心管中准确加入3.6 mL 0.1 mol/L甲酸(4.10)及200 μL醋酸锌溶液(4.11),漩涡混合2 min后,继续向离心管中准确加入200 μL亚铁氰化钾溶液(4.12),漩涡混合后,于5 000 r/min离心5 min~20 min。

余下步骤与6.1相同。

6.3 唇膏、唇彩、发蜡等蜡基化妆品样品的制备

称取0.2 g样品(精确至0.01 g)于15 mL具塞塑料离心管中,向离心管中加入2 mL异辛烷(4.8),漩涡,若样品不能够完全分散,需将离心管置于80℃水浴中5 min,待样品完全融化后,向离心管中准确加入3.6 mL 0.1 mol/L甲酸(4.10)(80℃水浴预热)及200 μL醋酸锌溶液(4.11),漩涡1 min后,将离心管重新置于80℃水浴平衡5 min,取出再漩涡1 min。待冷却后,向溶液中准确添加200 μL亚铁氰化钾溶液(4.12)及2 mL三氯甲烷(4.6),震荡摇匀,必要时于5 000 r/min离心5 min~20 min。若样品能够完全分散,则无需水浴加热,直接向离心管中准确加入3.6 mL 0.1 mol/L甲酸(4.10)(80℃水浴预热)及200 μL醋酸锌溶液(4.11),漩涡2 min,然后向溶液中准确添加200 μL亚铁氰化钾溶液(4.12),漩涡混合。必要时于5 000 r/min离心5 min~20 min。

余下步骤与6.1相同。

6.4 指甲油样品的制备

称取0.2 g样品(精确至0.01 g)于15 mL具塞塑料离心管中,向离心管中加入2 mL乙酸丁酯-三

氯甲烷混合溶剂(4.13),涡旋混合至样品完全溶解并均匀分散,再向离心管中准确加入 3.6 mL 0.1 mol/L 甲酸(4.10)及 200 μ L 醋酸锌溶液(4.11),涡旋混合 2 min 后,再向溶液中准确添加 200 μ L 亚铁氰化钾溶液(4.12),涡旋混合。必要时于 5 000 r/min 离心 5 min~20 min。

余下步骤与 6.1 相同。

7 分析步骤

7.1 高效液相色谱紫外检测法

7.1.1 液相色谱分析参考条件

以下为液相色谱参考条件:

- 色谱柱: Bonus RP(或相当者), 1.8 μ m, 3 mm \times 100 mm;
- 柱温: 室温;
- 流动相 A: 2% 甲醇水溶液(含 0.05% 甲酸); 流动相 B: 40% 甲醇水溶液(含 0.05% 甲酸);
- 流速: 0.3 mL/min;
- 检测波长: 200 nm;
- 进样量: 5 μ L;
- 液相色谱分离条件见表 2。

表 2 液相色谱分离条件

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	0.3	100	0
15	0.3	100	0
15.1	0.3	0	100
20	0.3	0	100
20.1	0.3	100	0
30	0.3	100	0

注 1: 若上述液相色谱条件下遇到干扰,可改用 2% 甲醇水溶液(含 0.05% 乙酸)为 A 相重新进行测试。B 相相应改为 40% 甲醇水溶液(含 0.05% 乙酸),相应流动相切换时间也需根据情况进行调整。

注 2: 柱的内径和长度及色谱填料粒径可根据色谱分离情况自由选择。

注 3: 泛酸和 D-泛醇的最大吸收均在波长 195 nm 附近,为尽量避免流动相紫外吸收的干扰,确定检测波长为 200 nm。

7.1.2 定性分析

将在相同的液相色谱条件下获得的样品溶液的液相色谱分离谱图与标准物质的液相色谱分离谱图进行比较,若样品谱图中存在保留时间与某标准物质的保留时间一致的色谱峰,并且其扣除背景后的紫外吸收图谱与该标准物质的紫外吸收图谱一致,则可确认样品中存在该物质。甲酸为流动相酸性改性剂及乙酸为流动相酸性改性剂的标准物质的液相色谱分离谱图分别参见附录 A 中的图 A.1 及图 A.2,标准物质紫外吸收光谱谱图参见附录 A 中的图 A.3,实际样品液相色谱分离谱图(甲酸为流动相酸性改性剂)参见附录 B 中的图 B.1。

7.1.3 定量测定

移取系列标准溶液 A(4.18),注入高效液相色谱仪中进行测定,以色谱峰的峰面积对目标化合物的浓度制作标准曲线。样品溶液中维生素 B₅(以泛酸计)与维生素原 B₅(D-泛醇)的含量,用标准曲线外标法确定。化妆品样品中维生素 B₅(以泛酸计)与维生素原 B₅(D-泛醇)的含量则按式(1)进行计算。

$$X = \frac{c \times V}{m} \times 10^{-3} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 样品中目标物的含量,单位为毫克每克(mg/g);
- c —— 从标准曲线中计算出的样品溶液中目标物的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V —— 按稀释倍数折算的被测样液总体积,单位为毫升(mL);
- m —— 称取样品的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位。

7.1.4 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

乳液类、沐浴液类化妆品中泛酸和 D-泛醇测定的重复性标准差以及再现性标准差的值参见附录 C 中的表 C.1,要求在重复性和再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值,不超过根据附录 C 中的表 C.1 确定的重复性标准差和再现性标准差。

对其他类化妆品中泛酸和 D-泛醇测定,要求在重复性和再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值,不超过将两次测试结果的算术平均值代入乳液类与沐浴液类化妆品的重复性标准差方程和再现性标准差方程所获得的最大值。

7.2 高效液相色谱串联质谱法

7.2.1 色谱分离参考条件

以下为色谱分离参考条件:

- a) 色谱柱: Bonus RP(或相当者), 1.8 μm , 3 mm \times 100 mm;
- b) 柱温: 室温;
- c) 流动相: 20% 甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸);
- d) 流速: 0.2 mL/min;
- e) 进样量: 2 μL 。

注: 柱的内径和长度及色谱填料粒径可根据色谱分离情况自由选择。

7.2.2 质谱参考条件

以下为质谱参考条件:

- a) 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式, ESI(+);
- b) 雾化气: 氮气, 241 kPa(35 Psi);
- c) 干燥气: 氮气, 流速 10 L/min, 温度: 350 $^{\circ}\text{C}$;
- d) 碰撞气: 氮气;
- e) 毛细管电压: 3 500 V;
- f) 检测方式: 多反应监测(MRM);
- g) 其他质谱条件见表 3。

表 3 泛酸和 D-泛醇质谱分析参考参数

项 目	泛 酸	D-泛醇
母离子	220.2	206.1
碎裂电压	90	100
定量离子(碰撞电压)	90.1(10)	76.1(10)
定性离子 1(碰撞电压)	202.1(6)	188.0(8)
定性离子 2(碰撞电压)	184.0(8)	170.1(10)

7.2.3 定性分析

在同一色谱/质谱条件下进行标准溶液和样品溶液的测定,如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与某标准物质色谱峰的保留时间一致,所选择的三对子离子的质荷比也一致,而且样品定性离子的相对丰度与浓度相当标准工作溶液的定性离子的相对丰度相比较,相对偏差不超过表 4 规定的范围,则可判定样品中存在该物质。标准物质总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图见附录 A 中的图 A.4。

表 4 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

以%表示

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

7.2.4 定量测定

移取系列标准溶液 B(4.19),注入高效液相色谱串联质谱仪中进行测定,以色谱峰的峰面积对目标化合物的浓度制作标准曲线。样品溶液中维生素 B₅(以泛酸计)与维生素原 B₅(D-泛醇)的含量,用标准曲线外标法确定。化妆品样品中维生素 B₅(以泛酸计)与维生素原 B₅(D-泛醇)的含量则按式(2)进行计算(如果所测样品溶液中泛酸或 D-泛醇的浓度大于 1 μg/g,应对待测样品溶液进行适当的稀释后重新进行测定)。

$$X = \frac{c \times V}{m} \times 10^{-3} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——样品中目标物的含量,单位为微克每克(μg/g);

c ——从标准曲线中计算出的样品溶液中目标物的质量浓度,单位为微克每升(μg/L);

V ——按稀释倍数折算的被测样液总体积,单位为毫升(mL);

m ——称取样品的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位。

7.2.5 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

指甲油类化妆品、唇膏类化妆品中泛酸和 D-泛醇测定的重复性标准差以及再现性标准差的值参见附录 C 中的表 C.1,要求在重复性和再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值,不超过根据附

录 C 中的表 C.1 确定的重复性标准差和再现性标准差。

对其他类化妆品中泛酸和 D-泛醇测定,要求在重复性和再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值,不超过将两次测试结果的算术平均值带入指甲油类与唇膏类化妆品的重复性标准差方程和再现性标准差方程所获得的最大值。



附录 A
(资料性附录)

标准物质液相色谱分离谱图、紫外吸收光谱谱图、总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图

标准物质液相色谱分离谱图、紫外吸收光谱谱图、总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图见图 A.1~图 A.4。

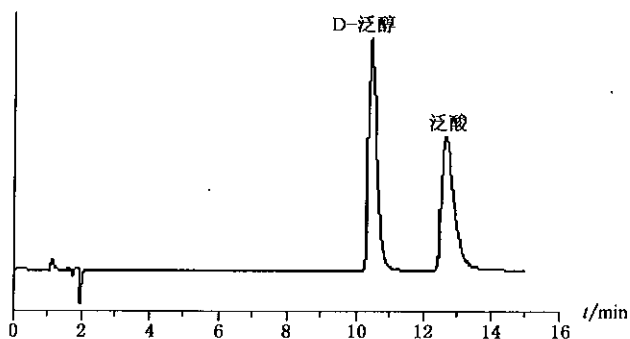


图 A.1 标准物质液相色谱分离谱图(甲酸为流动相酸性改性剂)

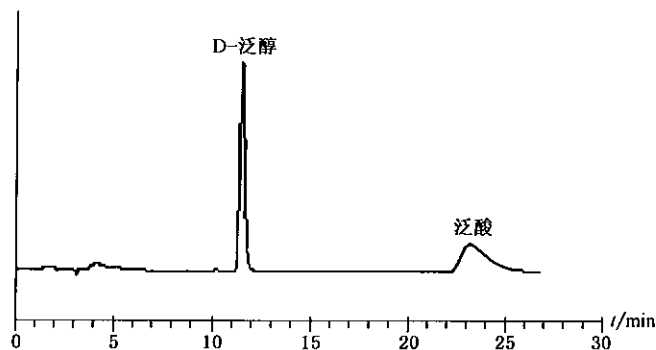


图 A.2 标准物质液相色谱分离谱图(乙酸为流动相酸性改性剂)

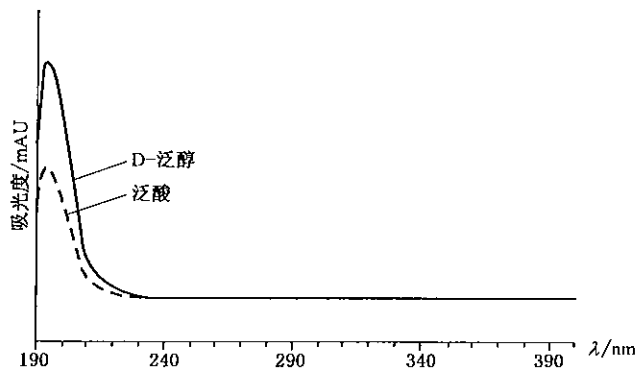


图 A.3 标准物质紫外吸收光谱谱图

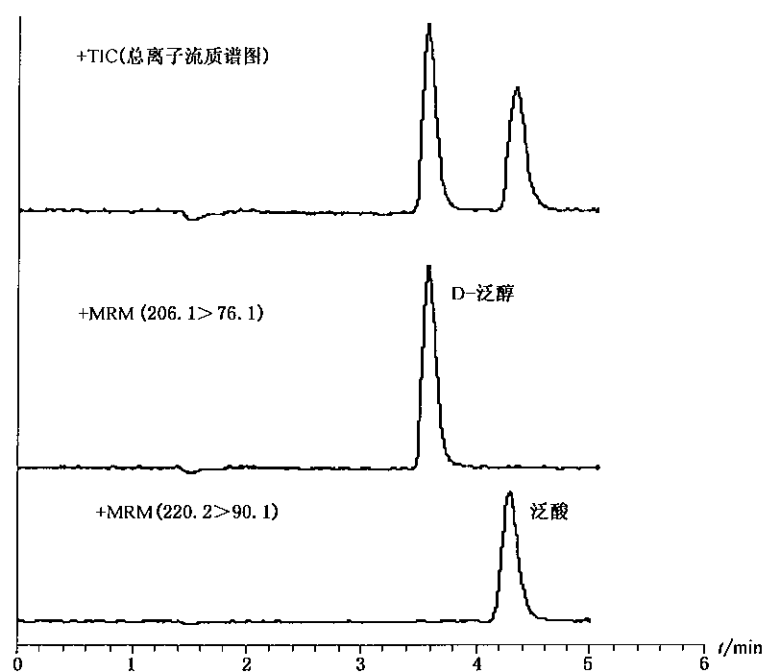


图 A. 4 标准物质总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图

附录 B
(资料性附录)
实际样品液相色谱分离谱图

实际样品液相色谱分离谱图见图 B.1。

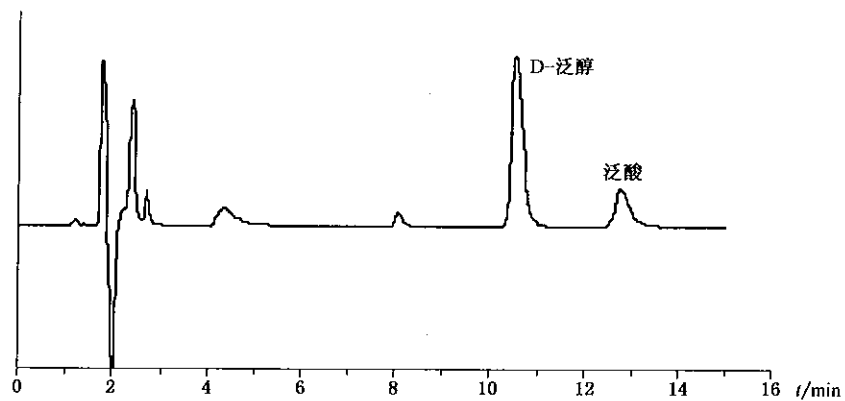


图 B.1 实际样品液相色谱分离谱图(甲酸为流动相酸性改性剂)

附 录 C
(资料性附录)

不同基质化妆品中泛酸与 D-泛醇测定的重复性标准差和再现性标准差

不同基质化妆品中泛酸与 D-泛醇测定的重复性标准差和再现性标准差见表 C.1。

表 C.1 不同基质化妆品中泛酸与 D-泛醇测定的重复性标准差和再现性标准差

采用方法	样品名称	含量范围	D-泛醇		泛 酸	
			重复性标准差 (S_r)	再现性标准差 (S_R)	重复性标准差 (S_r)	再现性标准差 (S_R)
液相色谱紫外 检测法	沐浴液	0.1 mg/g~ 10 mg/g	$S_r=0.082\ 32m+$ 0.012 6	$S_R=0.128\ 8m+$ 0.016 8	$S_r=0.098\ 56m+$ 0.015 12	$S_R=0.127\ 68m+$ 0.024 36
	乳液		$S_r=0.063\ 28m+$ 0.004 2	$S_R=0.097\ 16m+$ 0.006 72	$S_r=0.067\ 48m+$ 0.016 8	$S_R=0.101\ 08m+$ 0.021 56
液相色谱串联 质谱法	唇膏	0.1 μ g/g~ 10 μ g/g	$S_r=0.089\ 04m+$ 0.018 2	$S_R=0.142\ 52m+$ 0.050 4	$S_r=0.103\ 88m+$ 0.006 72	$S_R=0.130\ 2m+$ 0.028 28
	指甲油		$S_r=0.071\ 12m+$ 0.009 52	$S_R=0.138\ 6m+$ 0.013 44	$S_r=0.081\ 76m+$ 0.014 28	$S_R=0.145\ 6m+$ 0.029 96

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 妆 品 中 维 生 素 B₅ (泛 酸) 及 维 生 素 原 B₅
(D-泛醇) 的 测 定 高 效 液 相 色 谱 紫 外
检 测 法 和 高 效 液 相 色 谱 串 联 质 谱 法
GB/T 27577—2011

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 市 朝 阳 区 和 平 里 西 街 甲 2 号 (100013)
北 京 市 西 城 区 三 里 河 北 街 16 号 (100045)
网 址 www.spc.net.cn
总 编 室: (010)64275323 发 行 中 心: (010)51780235
读 者 服 务 部: (010)68523946
中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

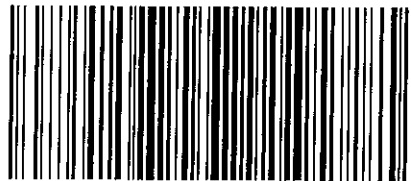
*

开 本 880×1230 1/16 印 张 1 字 数 23 千 字
2012 年 2 月 第 一 版 2012 年 2 月 第 一 次 印 刷

*

书 号: 155066·1-44155 定 价 18.00 元

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换
版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话: (010)68510107



GB/T 27577-2011