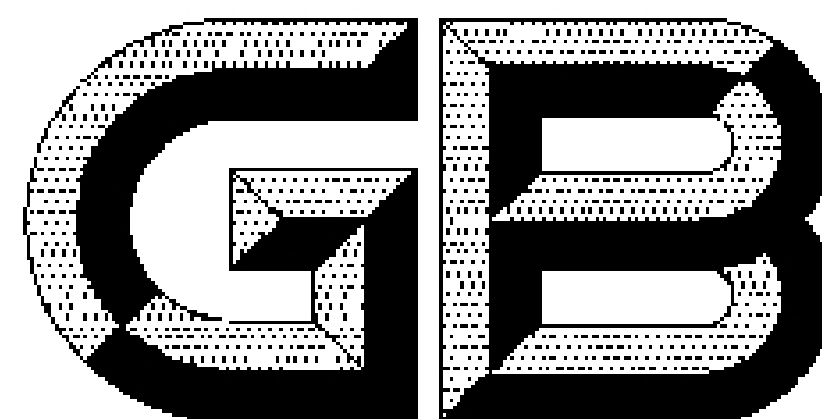




中华人民共和国国家标准

GB/T 30926—2014

化妆品中 7 种维生素 C 衍生物的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 7 kinds of vitamin C derivatives in Cosmetics—
High performance liquid chromatography-tandem Mass spectrometry

2014-07-08 发布

2014-11-01 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。

本标准由中国轻工业联合会提出。

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)、大连标准检测技术研究中心、上海市日用化学工业研究所、上海香料研究所。

本标准主要起草人：毛希琴、郑顺利、胡侠、潘炜、沈敏、钱茵。

化妆品中 7 种维生素 C 衍生物的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中 7 种维生素 C 衍生物[抗坏血酸葡萄糖苷、3-O-乙基抗坏血酸、抗坏血酸磷酸酯盐(以抗坏血酸磷酸酯计)、抗坏血酸硬脂酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸二棕榈酸酯、抗坏血酸四异棕榈酸酯]的测定——高效液相色谱串联质谱法。

本标准规定的高效液相色谱串联质谱法适用于化妆品中 7 种维生素 C 衍生物的定量测定。

本标准方法对所有目标化合物检出限均为 3 $\mu\text{g/g}$, 对所有目标化合物定量限均为 10 $\mu\text{g/g}$ 。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

利用水和二氯甲烷双液相体系将水溶性维生素 C 衍生物(抗坏血酸葡萄糖苷, 3-O-乙基抗坏血酸, 抗坏血酸磷酸酯盐)与化妆品中油溶性成分及表面活性剂初步分离, 水提物用 C_{18} 固相萃取小柱脱除其中的非极性强的干扰成分后, 用反相高效液相色谱分离, 串联四级杆质谱检测, 标准曲线外标法定量。

油溶性维生素 C 衍生物(抗坏血酸硬脂酸酯, 抗坏血酸棕榈酸酯, 抗坏血酸二棕榈酸酯, 抗坏血酸四异棕榈酸酯)用有机溶剂溶解提取, 必要时用硅胶固相萃取小柱脱除蜡基基质后, 用反相高效液相色谱分离, 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, 所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 标准物质: 7 种维生素 C 衍生物的化合物名称、INCI 名称、CAS 号、分子式、结构式、相对分子质量和纯度参见附录 A。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 异丙醇: 色谱纯。

4.4 甲酸: 色谱纯。

4.5 二氯甲烷。

4.6 无水乙醇。

4.7 四氢呋喃。

4.8 环己烷。

4.9 丁基羟基茴香醚(BHA)。

4.10 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)。

- 4.11 维生素 E 醋酸酯。
- 4.12 柠檬酸。
- 4.13 亚硫酸氢钠(NaHSO_3)。
- 4.14 甲酸。
- 4.15 乙二胺四乙酸(EDTA)二钠。
- 4.16 C_{18} 固相萃取小柱:200 mg/3 mL。使用前,依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化。
- 4.17 硅胶固相萃取小柱:200 mg/3 mL。使用前,用 3 mL 环己烷(4.8)活化。
- 4.18 溶液 I:称取 0.003 7 g EDTA 二钠,0.5 g NaHSO_3 ,用 500 mL 蒸馏水溶解。
- 4.19 溶液 II:称取 0.003 7 g EDTA 二钠,0.5 g NaHSO_3 ,用 500 mL 20% 甲醇水溶液(以 100 mL 甲醇+400 mL 水配制)溶解。
- 4.20 溶液 III:称取 BHA,BHT,VE 醋酸酯,柠檬酸各 0.1 g,用 500 mL 无水乙醇(4.6)溶解。
- 4.21 溶液 IV:称取 BHA,BHT,VE 醋酸酯,柠檬酸各 0.1 g,用 500 mL 四氢呋喃(4.7)溶解。
- 4.22 溶液 V:称取 BHA,BHT,VE 醋酸酯各 0.1 g,用 500 mL 环己烷(4.8)溶解。
- 4.23 溶液 VI:向 200 mL 溶液 III(4.20)中加入 1 mL 甲酸(4.14)。
- 4.24 溶液 VII:称取 0.003 7 g EDTA 二钠(4.15),0.5 g NaHSO_3 (4.13),用 500 mL 40% 甲醇水溶液(以 200 mL 甲醇+300 mL 水配制)溶解。
- 注:溶液 I~VII 配制均应尽量选择棕色瓶,配制后应注意避光保存,建议保存时间不超过 2 周。
- 4.25 0.05% 甲酸的水溶液:向 1 L 水中加入 0.5 mL 甲酸(4.4)。
- 4.26 0.05% 甲酸的甲醇异丙醇溶液:500 mL 甲醇 + 500 mL 异丙醇 + 0.5 mL 甲酸(4.4)。
- 4.27 0.05% 甲酸的甲醇溶液:向 1 L 甲醇中加入 0.5 mL 甲酸(4.4)。

4.28 标准储备液

4.28.1 油溶性维生素 C 衍生物标准储备液

准确称取油溶性维生素 C 衍生物(抗坏血酸硬脂酸酯,抗坏血酸棕榈酸酯,抗坏血酸二棕榈酸酯,抗坏血酸四异棕榈酸酯)各标准物质 250 mg 分别置于 4 个 25 mL 的棕色容量瓶中,用溶液 IV(4.21)溶解定容,配制浓度为 10 mg/mL 的标准储备溶液,于 4℃~6℃ 条件下避光保存,抗坏血酸硬脂酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯和抗坏血酸二棕榈酸酯的保存期为 3 天,抗坏血酸四异棕榈酸酯的保存期为 2 周。

4.28.2 水溶性维生素 C 衍生物标准储备液

准确称取 3 种水溶性维生素 C 衍生物(抗坏血酸葡萄糖苷,3-O-乙基抗坏血酸,抗坏血酸磷酸酯钠)各标准物质 250 mg 分别置于 4 个 25 mL 的棕色容量瓶中,用溶液 II(4.19)溶解定容,配制浓度为 10 mg/mL 标准储备液,于 4℃~6℃ 条件下避光保存,保存期为 3 天。

4.29 系列标准溶液

4.29.1 系列标准溶液 A

将 4 种油溶性维生素 C 衍生物的标准储备液(4.28.1)等体积混合并用溶液 IV(4.21)稀释 10 倍,配制 1 mg/mL 的混合标准溶液。用溶液 IV(4.21)逐级稀释,配制成浓度分别为 1 000 $\mu\text{g/L}$,800 $\mu\text{g/L}$,600 $\mu\text{g/L}$,200 $\mu\text{g/L}$,100 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准混合溶液。需现用现配。

4.29.2 系列标准溶液 B

将 3 种水溶性维生素 C 衍生物的标准储备液(4.28.2),等体积混合并用溶液 I(4.18)稀释 10 倍,配制 1 mg/mL 的混合标准溶液。用溶液 I(4.18)逐级稀释,配制成浓度分别为 1 000 $\mu\text{g/L}$,

800 $\mu\text{g/L}$, 600 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准混合溶液。需现用现配。

注：鉴于本方法中抗坏血酸磷酸酯盐（一般为镁盐或钠盐形式）均以抗坏血酸磷酸酯形式被检出，方法无法分辨是抗坏血酸的哪种盐形式。为统一测试结果，建议选择抗坏血酸磷酸酯钠作为标准物质，测试结果则报告以抗坏血酸磷酸酯计的含量[按式(2)进行]。

4.30 0.2 μm 微孔聚丙烯滤膜针式过滤器。

4.31 0.2 μm 微孔尼龙滤膜针式过滤器。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪(ESI 源)。

5.2 分析天平：感量 0.1 mg；0.01 mg。

5.3 漩涡混合器。

5.4 超声波清洗器。

5.5 离心机：转速不小于 5 000 r/min，离心试管容量 10 mL，15 mL。

5.6 离心机：转速不小于 12 000 r/min，离心试管容量 2 mL。

5.7 移液枪或移液器。

6 分析步骤

6.1 油溶性维生素 C 衍生物的分析

6.1.1 试样制备

6.1.1.1 膏霜、乳液、化妆水、粉基类等化妆品样品的制备

称取 0.1 g 样品（精确至 0.001 g）于 10 mL 具塞离心管中，准确加入 5 mL 溶液Ⅳ（4.21），涡旋混合 1 min，室温超声 10 min 后，移取 1 mL~2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，12 000 r/min 离心 5 min，转入进样瓶中待测，或涡旋混匀后的溶液 5 000 r/min 离心 10 min 后经聚丙烯滤膜过滤（4.30）转入进样瓶中待测。

6.1.1.2 甲油类化妆品样品的制备

称取 0.1 g 样品（精确至 0.001 g）于 10 mL 具塞离心管中，向离心管中分别准确加入 4 mL 溶液Ⅳ（4.21）和 1 mL 溶液Ⅴ（4.22），涡旋混合 1 min，移取 1 mL~2 mL 于 2 mL 具塞塑料离心管中，12 000 r/min 离心 5 min，转入进样瓶中待测，或涡旋混匀后的溶液 5 000 r/min 离心 10 min 后经聚丙烯滤膜过滤器（4.30）转入进样瓶中待测。

6.1.1.3 唇膏等蜡基化妆品样品的制备

称取 0.1 g 样品（精确至 0.001 g）于 10 mL 具塞离心管中，向离心管中准确加入 2 mL 溶液Ⅴ（4.22）于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中超声分散至澄清透明，然后向离心管中准确加入 3 mL 溶液Ⅲ（4.20），涡旋混匀 1 min，移取 1 mL~2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，12 000 r/min 离心 5 min，转入进样瓶中待测，或涡旋混匀后的溶液 5 000 r/min 离心 10 min 后经聚丙烯滤膜过滤器（4.30）转入进样瓶中待测。

必要时，用硅胶固相萃取小柱脱除蜡基基质。具体操作如下：

称取 0.1 g 样品（精确至 0.001 g）于 10 mL 具塞离心管中，向离心管中加入 3 mL 溶液Ⅴ（4.22）于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中超声分散至澄清透明。将所有溶液趁热过硅胶固相萃取小柱（4.17），再用 1 mL~2 mL 环己烷（4.8）（50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热）润洗离心管，润洗溶液一并加入硅胶固相萃取小柱，待上述所有溶液通过

固相萃取小柱后,用 3 mL~5 mL 环己烷(4.8)(50 ℃水浴中预热)淋洗柱床,最后准确移取 5 mL 溶液 VI(4.23)洗脱柱床,用刻度试管收集洗脱溶液。溶液体积应为 5 mL,若溶液体积不足 5 mL,需用溶液 VI(4.23)定容至 5 mL,涡旋混匀,转入进样瓶中待测。

注 1: 鉴于抗坏血酸四异棕榈酸酯在上述条件下将与蜡基一起脱除,因此本方法不适用于唇膏中抗坏血酸四异棕榈酸酯的检测。

注 2: 对于目标物含量低于 100 ppm 的测试样品或其他均一性难以保证的样品,为保证测试结果的准确性和重复性,建议将取样量增加至 0.5 g~1 g,并适当增加提取溶液的体积,再按照上述步骤进行分析测试。

6.1.2 测定

6.1.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱测定参考条件如下:

- a) 色谱柱:SB-Aq,3 μm,3 mm I.D.×100 mm。或其他相当的具亲水作用色谱柱;
- b) 柱温:30 ℃;
- c) 流动相:A 相 0.05%甲酸的水溶液(4.25);B 相 0.05%甲酸的甲醇异丙醇溶液(4.26);
- d) 流速:0.25 mL/min;
- e) 进样量:2 μL;
- f) 液相色谱分离条件见表 1。

表 1 液相色谱分离条件

时间 min	流速 mL/min	流动相 A 含量 %	流动相 B 含量 %
0	0.25	20	80
4	0.25	0	100
7	0.25	0	100
7.1	0.25	20	80
10	0.25	20	80

注 1: 0 min~7 min 为色谱分离过程,7 min~10 min 为色谱柱重新平衡过程。

注 2: 色谱柱的型号,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: 流动相中甲酸添加比例可根据不同型号的质谱响应情况在 0.02%~0.1%之间调节。

注 4: 流动相的梯度设置可根据不同色谱柱上目标化合物的保留时间做相应调整。

6.1.2.2 质谱参考条件

质谱测定参考条件如下:

- a) 电离方式:电喷雾电离;
- b) 雾化气:氮气,35 Psi;
- c) 干燥气:氮气,流速 10 L/min,温度:350 ℃;
- 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 2。



表 2 油溶性维生素 C 衍生物质谱分析参考参数

化合物名称	抗坏血酸棕榈酸酯	抗坏血酸硬脂酸酯	抗坏血酸二棕榈酸酯	抗坏血酸四异棕榈酸酯
ESI 模式	(-)	(-)	(-)	(+)
母离子	413.2	441.2	651.5	1 151.9
碎裂电压	240	165	220	220
定量离子 (碰撞电压)	255.2 (20)	283.3 (20)	255.2 (36)	913.4 (35)
定性离子 (碰撞电压)	157.0 (14)	157.0 (14)	413.2 (22)	675.1 (55)

6.1.2.3 定性分析

在同一色谱/质谱条件下进行标准溶液(4.29.1 系列标准溶液 A)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 2 对监测离子对的质荷比也一致,而且样品溶液中监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的监测离子对的相对丰度比的偏差不超过表 3 规定范围,则可判定样品中存在相应的目标成分。油溶性维生素 C 衍生物标准物质总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图参见附录 B。

表 3 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

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

6.1.2.4 定量测定

样品溶液中油溶性维生素 C 衍生物含量,用标准曲线外标法确定。化妆品样品中油溶性维生素 C 衍生物含量(μg/g)则按式(1)进行计算。

$$\text{样品中目标物的含量} = \frac{c \times V}{m} \times 10^{-3} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- 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)。

计算结果至少保留 3 位有效数字。

注:为保证定量测试的准确性,测试过程应尽量在 10 h 内完成。

6.2 水溶性维生素 C 衍生物的分析

6.2.1 膏霜、乳液、化妆水、沐浴液,洗面奶,粉类等化妆品样品的制备

称取 0.1 g 样品(精确至 0.001 g)于 15 mL 具塞离心管中,向离心管中准确加入 4 mL 溶液 I(4.18),涡旋混合使样品均匀分散后,向离心管中加入 3 mL 二氯甲烷(4.5),涡旋混合 1 min,然后于 5 000 r/min 离心 10 min,准确移取上层清液 2 mL,过 C₁₈ 固相萃取小柱(4.16)。

抗坏血酸磷酸酯盐的测试:弃去前 5 滴流出溶液后,在萃取小柱出口位置放置 5 mL 试管收集后面

所有流出溶液,涡旋混匀并经有机尼龙膜过滤器(4.31)后转入进样瓶中待测。

抗坏血酸葡萄糖苷和 3-O-乙基抗坏血酸的测试:待上样液自然流干后,在萃取小柱出口位置放置 10 mL 刻度试管收集洗脱溶液。用 5 mL 溶液Ⅶ(4.24)洗脱柱床,待洗脱液自然流干后,取下试管。试管中溶液体积应为 5 mL,若试管中溶液体积不足 5 mL,需用溶液Ⅶ(4.24)定容至 5 mL。涡旋混匀,取 1 mL 过有机尼龙膜过滤器(4.31)后转入进样瓶中待测。

注:对于目标物含量低于 100 ppm 的测试样品或其他均一性难以保证的样品,为保证测试结果的准确性和重复性,建议将取样量增加至 0.5 g~1 g,同时溶液 I (4.18)和二氯甲烷(4.5)的添加量适当增加至 15 mL 和 5 mL,用 50 mL 离心管进行涡旋混合后按照上述步骤进行分析测试。

6.2.2 测定

6.2.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱测定参考条件如下:

- a) 色谱柱:SB-Aq, 3 μ m, 3 mm(i.d.) $\times$ 100 mm。或其他相当的具亲水作用色谱柱;
- b) 柱温:25 $^{\circ}$ C;
- c) 流动相:A 相 0.05%甲酸的水溶液(4.25);B 相 0.05%甲酸的甲醇溶液(4.27);
- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 进样量:2 μ L;
- f) 液相色谱分离条件:75% A 相+ 25% B 相等度洗脱。

注:流动相中甲酸添加比例可根据不同型号的质谱响应情况在 0.02%~0.1%之间调节;流动相的梯度可根据不同色谱柱上目标化合物的保留时间在 10%~25%范围做相应调整。

6.2.2.2 质谱参考条件

质谱测定参考条件如下:

- a) 电离方式:电喷雾电离;
- b) 雾化气:氮气,35 Psi;
- c) 干燥气:氮气,流速 10 L/min,温度:350 $^{\circ}$ 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 4。

表 4 水溶性维生素 C 衍生物质谱分析参考参数

化合物名称	抗坏血酸葡萄糖苷	抗坏血酸磷酸酯盐	3-O-乙基抗坏血酸
ESI 模式	(-)	(-)	(-)
母离子	337.0	254.9	203.0
碎裂电压	140	110	70
定量离子 (碰撞电压)	277.0 (16)	236.8 (2)	85.1 (4)
定性离子 (碰撞电压)	174.0 (20)	79.2 (22)	174.1 (2)

6.2.2.3 定性分析

在同一色谱/质谱条件下进行标准溶液(4.29.2 系列标准溶液 B)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 2 对监测离子对的质荷比也一致,而且样品溶液中监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的监测离子对的相对丰度比的偏差不超过表 3 规定范围,则可判定样品中存在相应的目标成分。水溶性维生素 C 衍生物标准物质总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图见附录 B。

6.2.2.4 定量测定

对以抗坏血酸磷酸酯计的含量($\mu\text{g/g}$)测定则需先按式(1)计算出样品中以标准物质抗坏血酸磷酸酯钠计的含量,然后再按式(2)进行折算。

$$\text{样品中抗坏血酸磷酸酯的含量} = \frac{256.10}{322.05} \times \text{样品中以抗坏血酸磷酸酯钠计的含量} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

256.10——抗坏血酸磷酸酯的相对分子质量;

322.05——抗坏血酸磷酸酯钠的相对分子质量。

注:为保证定量测试的准确性,测试过程应尽量在 10 h 内完成。

7 检出限和定量限

所有目标化合物检出限均为 $3 \mu\text{g/g}$,目标化合物定量限均为 $10 \mu\text{g/g}$ 。

8 回收率和精密度

油溶性维生素 C 衍生物目标物含量在 $10 \mu\text{g/g} \sim 1\,000 \mu\text{g/g}$ 范围内,回收率为 $80\% \sim 110\%$,相对标准偏差小于 10% 。

水溶性维生素 C 衍生物目标物含量在 $10 \mu\text{g/g} \sim 1\,000 \mu\text{g/g}$ 范围,回收率为 $85\% \sim 105\%$,相对标准偏差小于 10% 。

9 允许差

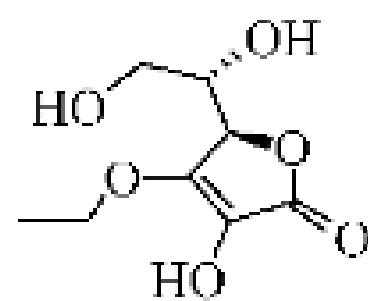
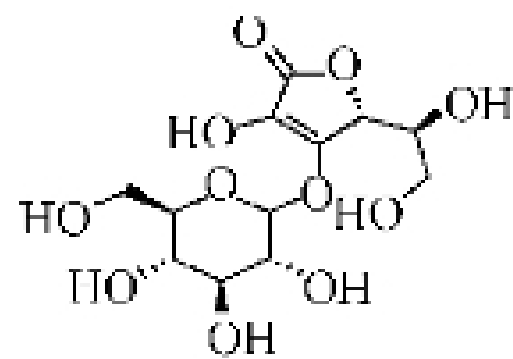
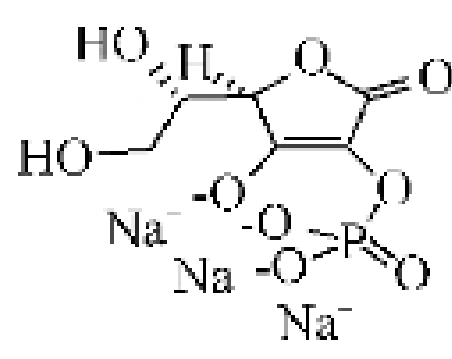
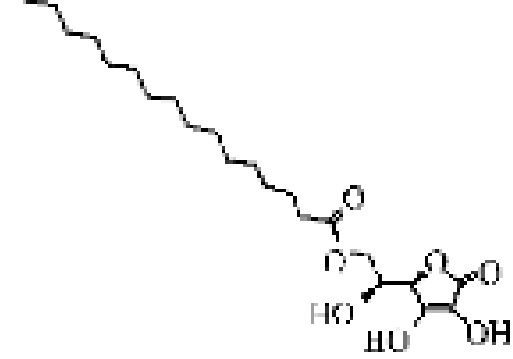
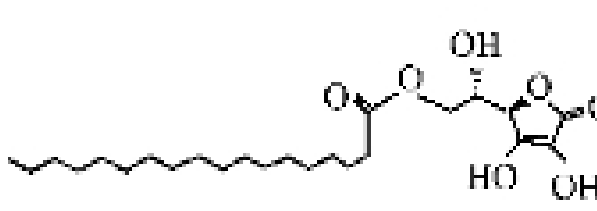
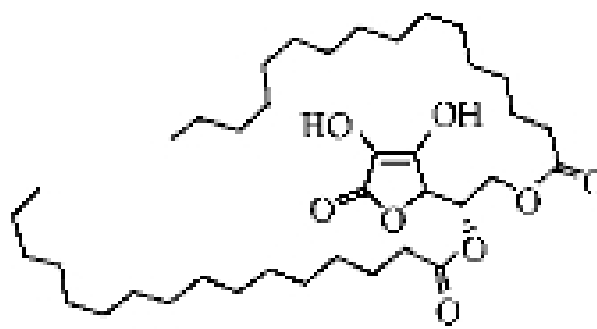
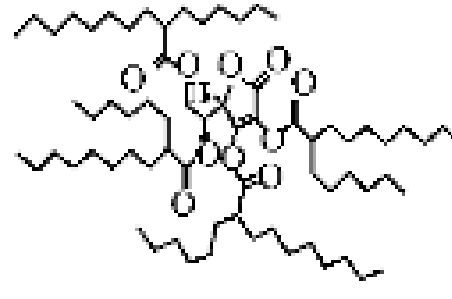
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的 10% 。



附 录 A
(资料性附录)

7 种维生素 C 衍生物的化合物名称、INCI 名称、CAS 号、分子式、结构式、相对分子质量和纯度

表 A.1 7 种维生素 C 衍生物的化合物名称、INCI 名称、CAS 号、分子式、结构式、
相对分子质量和纯度

序号	化合物名称	INCI 名称	CAS 号	分子式	结构式	相对分子质量	纯度
1	3-O-乙基抗坏血酸	3-O-ethyl-L-ascorbic acid	86404-04-8	C ₈ H ₁₂ O ₆		204.18	≥98%
2	抗坏血酸葡萄糖苷	ascorbyl glucoside	129499-78-1	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁		338.26	
3	抗坏血酸磷酸酯钠	sodium ascorbyl phosphate	66170-10-3	C ₆ H ₆ Na ₃ O ₉ P		322.05	
4	抗坏血酸棕榈酸酯	ascorbyl palmitate	137-66-6	C ₂₂ H ₃₈ O ₇		414.53	
5	抗坏血酸硬脂酸酯	ascorbyl stearate	25395-66-8	C ₂₄ H ₄₂ O ₇		442.59	
6	抗坏血酸二棕榈酸酯	ascorbyl dipalmitate	28474-90-0	C ₃₈ H ₆₈ O ₈		652.94	
7	抗坏血酸四异棕榈酸酯 ^a	ascorbyl tetraisopalmitate ^b	183476-82-6	C ₇₀ H ₁₂₈ O ₁₀		1 129.76	
^a 国食药监许[2010]479 号《国际化妆品原料标准中文名称目录(2010 年版)》中文名称为四己基癸醇抗坏血酸酯。							
^b 国食药监许[2010]479 号《国际化妆品原料标准中文名称目录(2010 年版)》INCI 名称为 Tetrahexyldecyl ascorbate。							

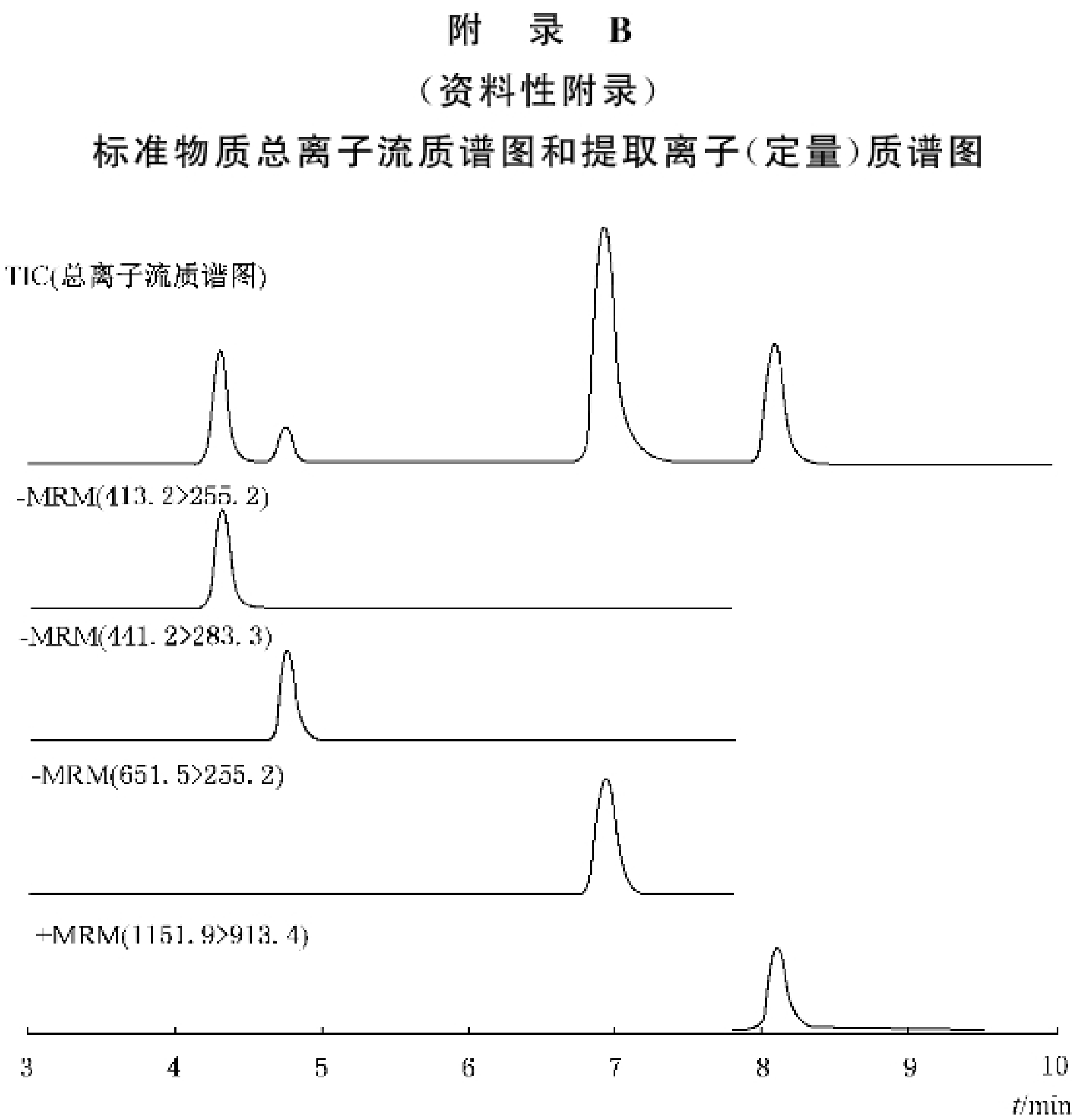


图 B.1 油溶性维生素 C 衍生物总离子流质谱图及提取离子(定量)质谱图

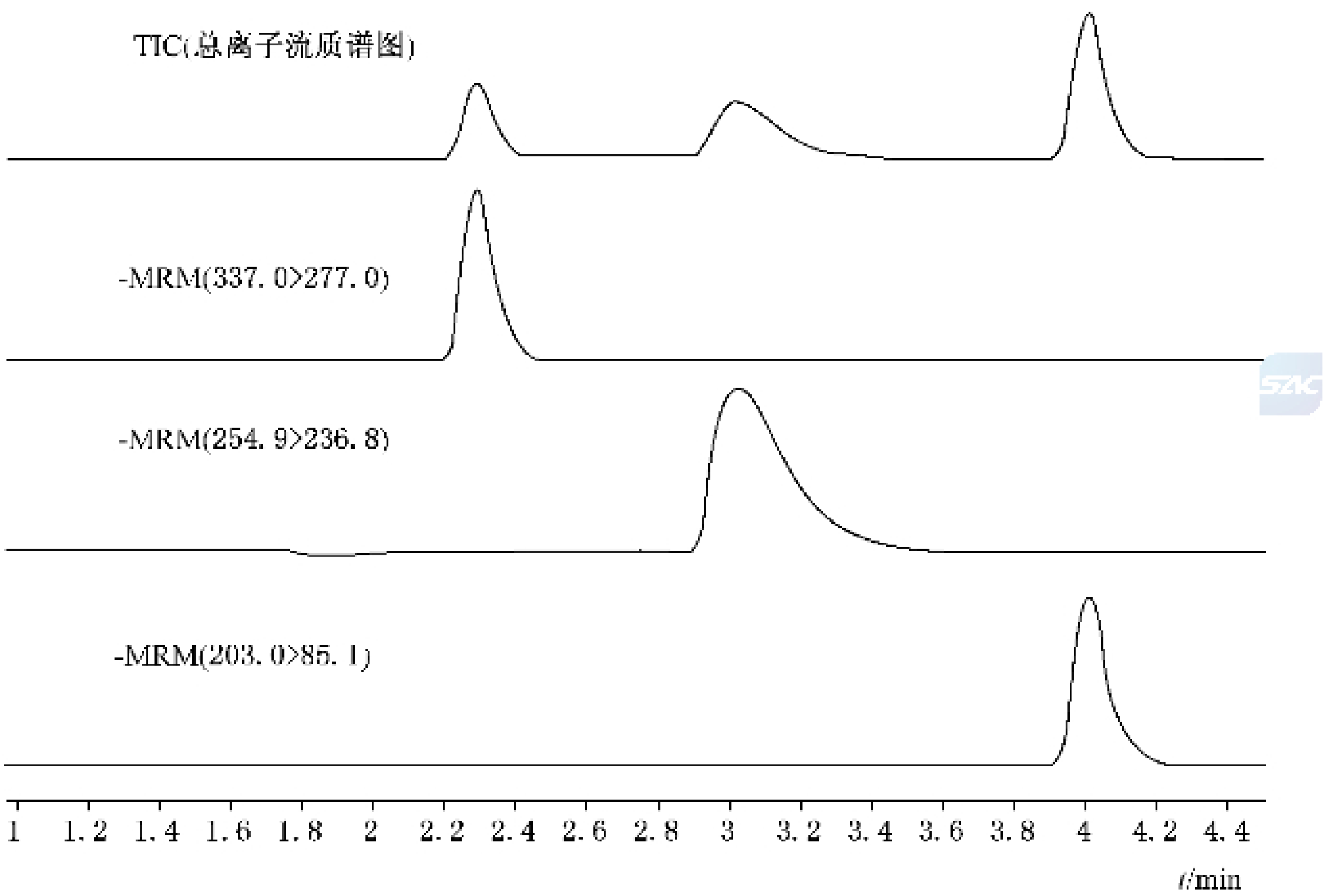


图 B.2 水溶性维生素 C 衍生物总离子流质谱图及提取离子(定量)质谱图