



中华人民共和国国家标准

GB/T 29664—2013

化妆品中维生素 B₃ (烟酸、烟酰胺) 的测定 高效液相色谱法和 高效液相色谱串联质谱法

Determination of vitamin B₃ (nicotinic acid and nicotinamide)
in cosmetics—HPLC and HPLC-MS/MS

2013-09-06 发布

2014-02-15 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、郑顺利、胡侠、孙稚菁、吴海霞、潘炜、武晓剑、康薇。



化妆品中维生素 B₃ (烟酸、烟酰胺) 的测定

高效液相色谱法和 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 B₃ (烟酸、烟酰胺) 测定的高效液相色谱法及高效液相色谱串联质谱法。

本标准适用于膏霜、乳液、化妆水、皂基如美容皂、蜡基如唇膏等化妆品中维生素 B₃ (烟酸、烟酰胺) 的定量测定, 其中高效液相色谱法对烟酸、烟酰胺的检出限均为 2 $\mu\text{g/g}$, 定量限均为 6 $\mu\text{g/g}$; 高效液相色谱串联质谱法对烟酸、烟酰胺的检出限均为 100 $\mu\text{g/kg}$, 定量限均为 300 $\mu\text{g/kg}$ 。

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

烟酸、烟酰胺为极性化合物易溶于水相, 化妆品中的油溶性成分易溶于有机相, 而化妆品中的表面活性剂则富集于有机相与水相界面处。利用水和二氯甲烷(或异辛烷)双液相体系将目标物与化妆品中油溶性成分及表面活性剂初步分离。酸性条件下用反相及强阳离子交换混合型固相萃取材料吸附富集目标物, 脱除干扰物质后, 洗脱, 定容, 用反相高效液相色谱分离, 二极管阵列检测器检测(高效液相色谱法)或串联四级杆质谱检测(高效液相色谱串联质谱法), 标准曲线外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定, 所用试剂均为分析纯。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 甲醇: 分析纯。

4.3 氨水: 分析纯。

4.4 甲酸: 色谱纯。

4.5 甲酸: 分析纯。

4.6 二氯甲烷: 分析纯。

4.7 异辛烷: 分析纯。

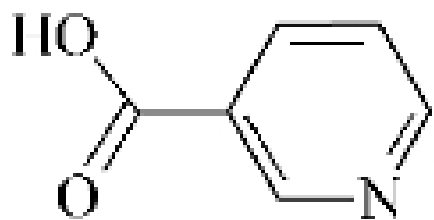
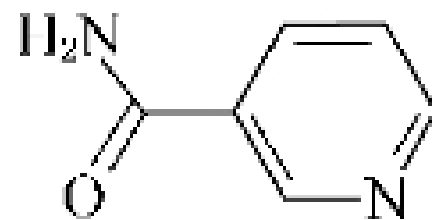
4.8 2%甲酸水溶液: 移取 2 mL 甲酸(4.5), 用水稀释定容至 100 mL。

4.9 2%氨水氨化甲醇: 移取 2 mL 氨水(4.3), 用甲醇稀释定容至 100 mL。

4.10 1%甲酸水溶液: 移取 1 mL 甲酸(4.5), 用水稀释定容至 100 mL。

- 4.11 Strara-X-C 固相萃取小柱或相当者:60 mg,3 mL。使用前,依次用 2 mL 甲醇和 2 mL 水活化。
- 4.12 标准储备液:准确称取烟酸和烟酰胺标准物质各 250 mg 分别置于两个 25 mL 的棕色容量瓶中,用蒸馏水溶解定容,配置成浓度为 10 mg/mL 的标准储备溶液,于 4℃~6℃条件下保存。保存期一般不应超过 2 周。
- 4.13 系列标准溶液
- 4.13.1 系列标准溶液 A:首先将两种标准储备液等体积混合,配置成 5 mg/mL 的混合标准溶液,然后用 2%甲酸水(4.8)稀释配置成烟酸和烟酰胺浓度均分别为 1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、500 μg/mL、1 000 μg/mL 的系列标准混合溶液用于液相色谱测试。以上系列标准溶液,均需现用现配。
- 4.13.2 系列标准溶液 B:首先将两种标准储备液等体积混合,配置成 5 mg/mL 的混合标准溶液,然后用 2%甲酸水(4.8)稀释配置成烟酸和烟酰胺浓度均分别为 5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L 的系列标准混合溶液用于液质联用测试。以上系列标准溶液,均需现用现配。
- 4.14 0.2 μm 微孔尼龙滤膜。
- 4.15 标准物质见表 1。

表1 标准物质英文名称、INCI 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	烟 酸	烟酰胺
英文名称	Nicotinic acid	Nicotinamide
INCI 名称	Niacin	Niacinamide
CAS 号	59-67-6	98-92-0
分子式	C ₆ H ₅ NO ₂	C ₆ H ₆ N ₂ O
分子结构式		
相对分子质量	123.11	122.13
纯度	≥99.0%	

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪-二极管阵列检测器(高效液相色谱法)。
- 5.2 高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪(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 膏霜、乳液、化妆水、洗发水等化妆品样品的制备

6.1.1 称取 0.2 g 样品(精确至 0.01 g)于 15 mL 具塞塑料离心管中,60 °C 条件下氮吹,尽量除去样品中的水分。向离心管中准确加入 4 mL 2%甲酸水溶液(4.8),涡旋混合使样品均匀分散后超声 15 min~30 min,向离心管中加入 3 mL 二氯甲烷(4.6),涡旋混合 2 min,然后于 5 000 r/min 离心 5 min~20 min。

6.1.2 准确移取 1 mL 上层溶液过 Strata-X-C 固相萃取小柱(4.11),待自然流干后,依次加入 1 mL 1%甲酸水溶液(4.10)和 1 mL 甲醇(4.2)淋洗柱床,最后添加 4 mL 2%氨水氨化甲醇(4.9)进行洗脱,待自然流干后,吹出柱床内溶液并收集所有流出溶液,氮吹挥干溶剂,准确添加 1 mL 水溶解,涡旋混合 1 min,确保瓶内残留物全部溶解后,用 0.2 μm 微孔尼龙滤膜过滤,待测。

6.2 美容皂等固态基类化妆品样品的制备

6.2.1 用刮铲或小刀将皂基样品刨成碎屑或丝状薄片,刨碎后迅速密封在容器中,并尽快进行称量。称取 0.2 g(精确至 0.01 g),于 15 mL 具塞塑料离心管中,先向离心管中准确加入 4 mL 2%甲酸水溶液(4.8)并置于沸水浴中 5 min~10 min 使皂基融化,涡旋混合使样品溶解并均匀分散,待冷却,继续向离心管中加入 3 mL 二氯甲烷(4.6),涡旋混合 2 min 后,于 5 000 r/min 离心 5 min~20 min。

6.2.2 余下步骤与 6.1.2 相同。

注:由于皂基变成碎屑或薄片时,样品表面积显著增大,皂中的水分会迅速挥发,带来称量误差。因此建议尽量缩短取皂、碎皂及称量的时间,且实验室湿度高于 50%,温度低于 25 °C。

6.3 唇膏等蜡基化妆品样品的制备

6.3.1 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(4.7),涡旋。若样品不能够完全分散,需将离心管置于 80 °C 水浴中 3 min~5 min,待样品完全融化后,向离心管中准确加入 4 mL 2%甲酸水溶液(4.8)(80 °C 水浴预热),涡旋 1 min 后,将离心管重新置于 80 °C 水浴平衡 5 min,取出再涡旋 1 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 4 mL 2%甲酸溶液(4.8)(80 °C 水浴预热),涡旋 2 min。必要时于 5 000 r/min 离心 5 min~20 min。

6.3.2 取 1 mL 下层水相,0.2 μm 微孔尼龙滤膜(4.14)过滤,待测。如遇干扰,可参照步骤 6.1.2 对样品进行净化处理。

注:对烟酸、烟酰胺含量超过 1%的化妆品样品建议将提取溶液 2%甲酸水溶液的体积增加为 8 mL,其他条件不变,以避免超出固相萃取小柱的柱负载量,导致目标物回收率的降低。

7 分析步骤

7.1 高效液相色谱法

7.1.1 液相色谱分析参考条件

液相色谱测定的参考条件如下:

- a) 色谱柱:SB-Aq(或相当者),1.8 μm,3 mm×100 mm;
- b) 柱温:30 °C;
- c) 流动相:A 为 100%水(含 0.1%甲酸);B 为 100% 甲醇(含 0.1%甲酸);



- d) 流速:0.3 mL/min;
- e) 检测波长:260 nm;
- f) 进样量:2 μL;
- g) 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
6.0	0.3	100	0
6.1	0.3	40	60
9.0	0.3	40	60
9.1	0.3	100	0
13.0	0.3	100	0

注 1: 0~6 min 为色谱分离过程,6 min~9 min 为洗脱强保留杂质的过程,9 min~13 min 为色谱柱重新平衡过程。

注 2: 若上述液相色谱条件下遇到干扰,可改用 100%水(含 0.1%乙酸)为 A 相重新进行测试。B 相相应改为 60% 甲醇水溶液(含 0.1%乙酸),相应流动相切换时间也需根据情况进行调整。

注 3: 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。

7.1.2 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。0.1%甲酸为流动相及 0.1%乙酸为流动相的标准物质的液相色谱分离谱图分别参见附录 A 中图 A.1 及图 A.2,标准物质紫外吸收光谱谱图参见附录 A 中图 A.3,实际样品液相色谱分离谱图(0.1%甲酸为流动相)参见附录 B 中图 B.1。

7.1.3 定量分析

各取 1 mL 系列标准溶液 A(4.13.1)过 Strara-X-C 固相萃取小柱(4.11),待自然流干后,依次加入 1 mL 1%甲酸水溶液(4.10)和 1 mL 甲醇(4.2)淋洗柱床,最后添加 4 mL 2%氨水氨化甲醇(4.9)进行洗脱,待自然流干后,吹出柱床内溶液,收集所有流出溶液,氮吹挥干溶剂,准确添加 1 mL 水(80 ℃水浴中预热)定容溶解,涡旋混合 1 min,确保瓶内残留物全部溶解后,用 0.2 μm 微孔尼龙滤膜过滤,待测。移取上述系列溶液,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原始浓度制作标准曲线。

样品溶液中烟酸和烟酰胺的含量,用标准曲线外标法确定。化妆品样品中烟酸和烟酰胺的含量则按式(1)进行计算。样品中维生素 B₃ 的含量则等于样品中烟酸和烟酰胺的含量之和。(对样品溶液中目标物的含量高于 1 000 μg/mL 的样品,为提高定量的准确性,建议减少进样量或适当稀释后进样。)

样品中目标物的含量(mg/g) = $\frac{c \times V}{m} \times 10^{-3}$ (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)。
计算结果至少保留两位有效数字。

7.1.4 回收率和精密度

在添加浓度 $0.01\text{ mg/g}\sim 10\text{ mg/g}$ 的范围内，回收率在 $80\%\sim 100\%$ 之间，相对标准偏差为 $0.2\%\sim 6.2\%$ 。

7.1.5 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% 。

7.2 高效液相色谱串联质谱法

7.2.1 液相色谱分离参考条件

- 液相色谱测定的参考条件如下：
- a) 色谱柱：SB-Aq(或相当者)， $1.8\text{ }\mu\text{m}$ ， $3\text{ mm}\times 100\text{ mm}$ ；
 - b) 柱温： $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
 - c) 流动相： 5% 甲醇水溶液(含 0.05% 甲酸)；
 - d) 流速： 0.2 mL/min ；
 - e) 进样量： $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

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

- 质谱测定的参考条件如下：
- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式，ESI(+)；
 - b) 雾化气：氮气， 241.325 kPa (约合 35 psi)；
 - c) 干燥气：氮气，流速 10 L/min ，温度： $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
 - d) 碰撞气：氮气；
 - e) 毛细管电压： $3\text{ }500\text{ V}$ ；
 - f) 检测方式：多反应监测(MRM)；
 - g) 其他质谱条件见表 3。

表 3 烟酸和烟酰胺质谱分析参考参数

	烟 酸	烟酰胺
母离子	124.1	123.1
碎裂电压	110	110
定量离子(碰撞电压)	79.9(22)	80.0(22)
定性离子 1(碰撞电压)	78.0(24)	78.0(24)
定性离子 2(碰撞电压)	52.9(32)	53.1(32)

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 3 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 中图 A.4。

表 4 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

7.2.4 定量分析

各取 1 mL 系列标准溶液 B(4.13.2)过 Strara-X-C 固相萃取小柱(4.11),待自然流干后,依次加入 1 mL 1%甲酸水溶液(4.10)和 1 mL 甲醇(4.2)淋洗柱床,最后添加 3 mL 2%氨水氨化甲醇(4.9)进行洗脱,待自然流干后,吹出柱床内溶液并收集所有流出溶液,氮吹挥干溶剂,准确添加 1 mL 水(80℃水浴中预热)定容溶解,涡旋混合 1 min,确保瓶内残留物全部溶解后,用 0.2 μm 微孔尼龙滤膜过滤,待测。移取上述系列溶液,以色谱峰的峰面积对目标化合物的原始浓度制作标准曲线。

样品溶液中烟酸和烟酰胺的含量,用标准曲线外标法确定。化妆品样品中烟酸和烟酰胺的含量则按公式(2)进行计算。样品中维生素 B₃ 的含量则等于样品中烟酸和烟酰胺的含量之和。(对样品溶液中目标物的含量高于 1 000 μg/L 的样品,为提高定量的准确性,建议减少进样量或适当稀释后进样。)

样品中目标物的含量(μg/g) = $\frac{c \times V}{m} \times 10^{-3}$ (2)

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)。
计算结果至少保留两位有效数字。

7.2.5 回收率和精密度

在添加浓度 0.1 μg/g~10 μg/g 的范围内,回收率在 80%~110%之间,相对标准偏差为 0.5%~7%。

7.2.6 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)

烟酸、烟酰胺标准物质液相色谱图、紫外吸收光谱图及
总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图

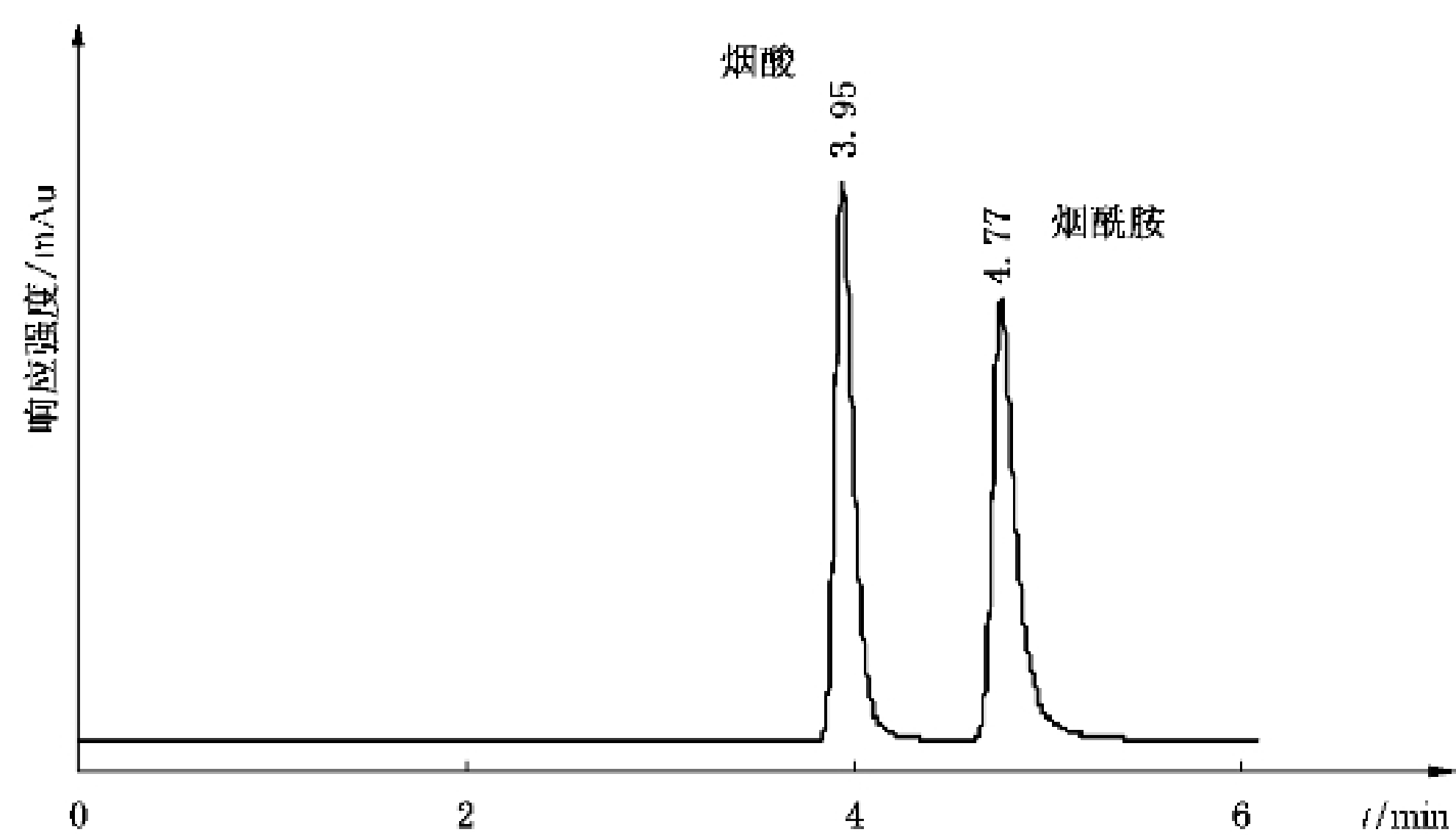


图 A.1 标准物质液相色谱图(0.1%甲酸水为流动相)

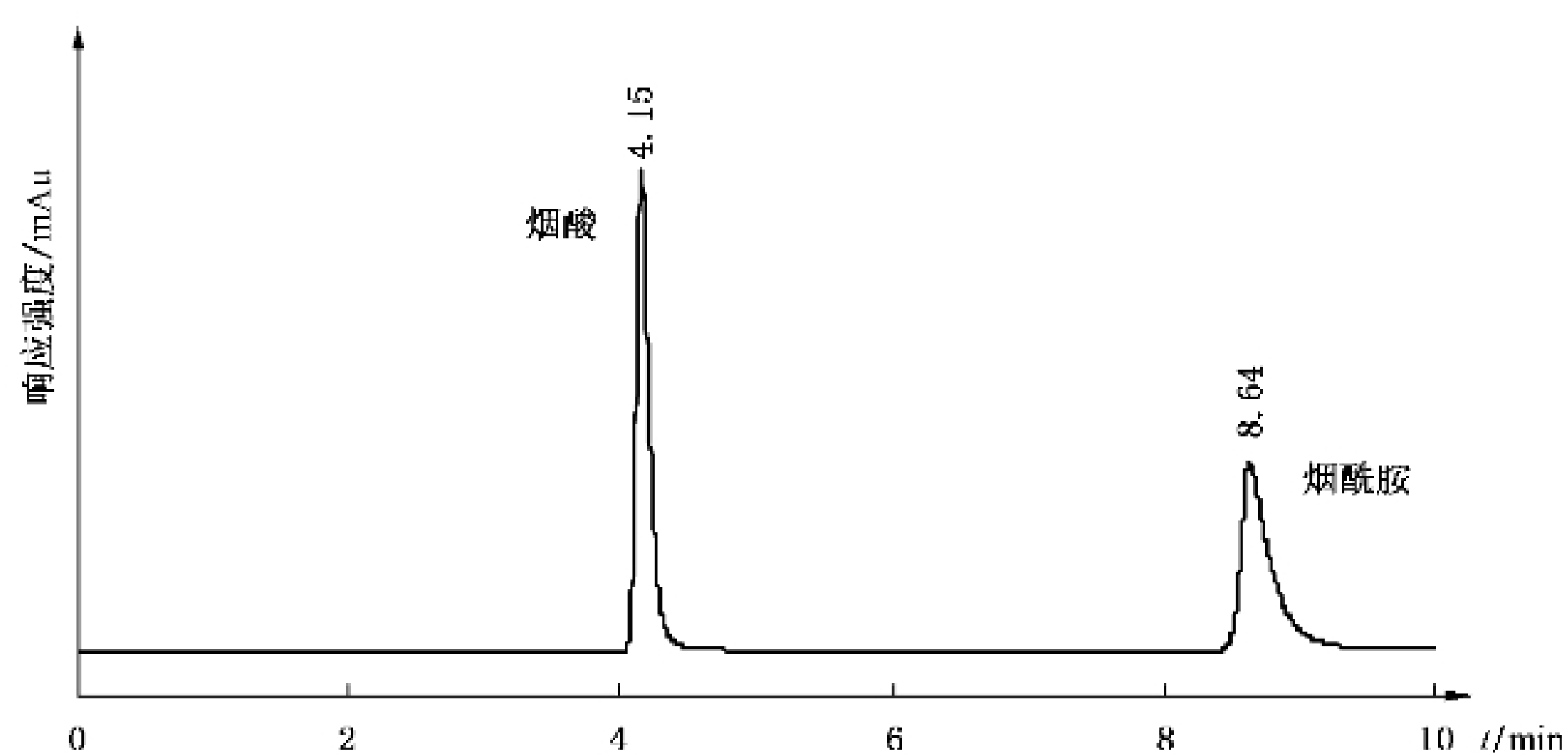


图 A.2 标准物质液相色谱图(0.1%乙酸水为流动相)

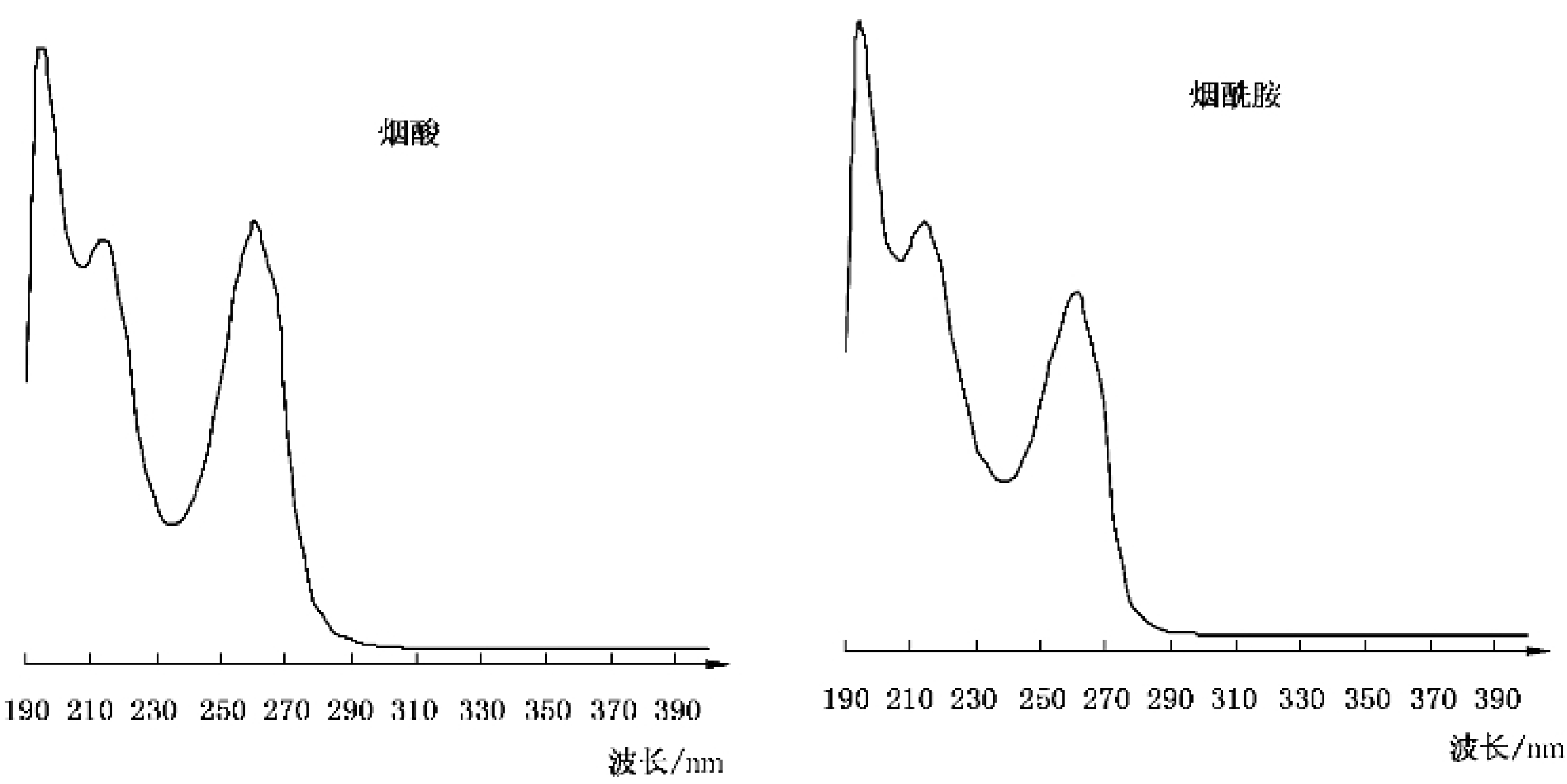


图 A.3 标准物质紫外吸收光谱图

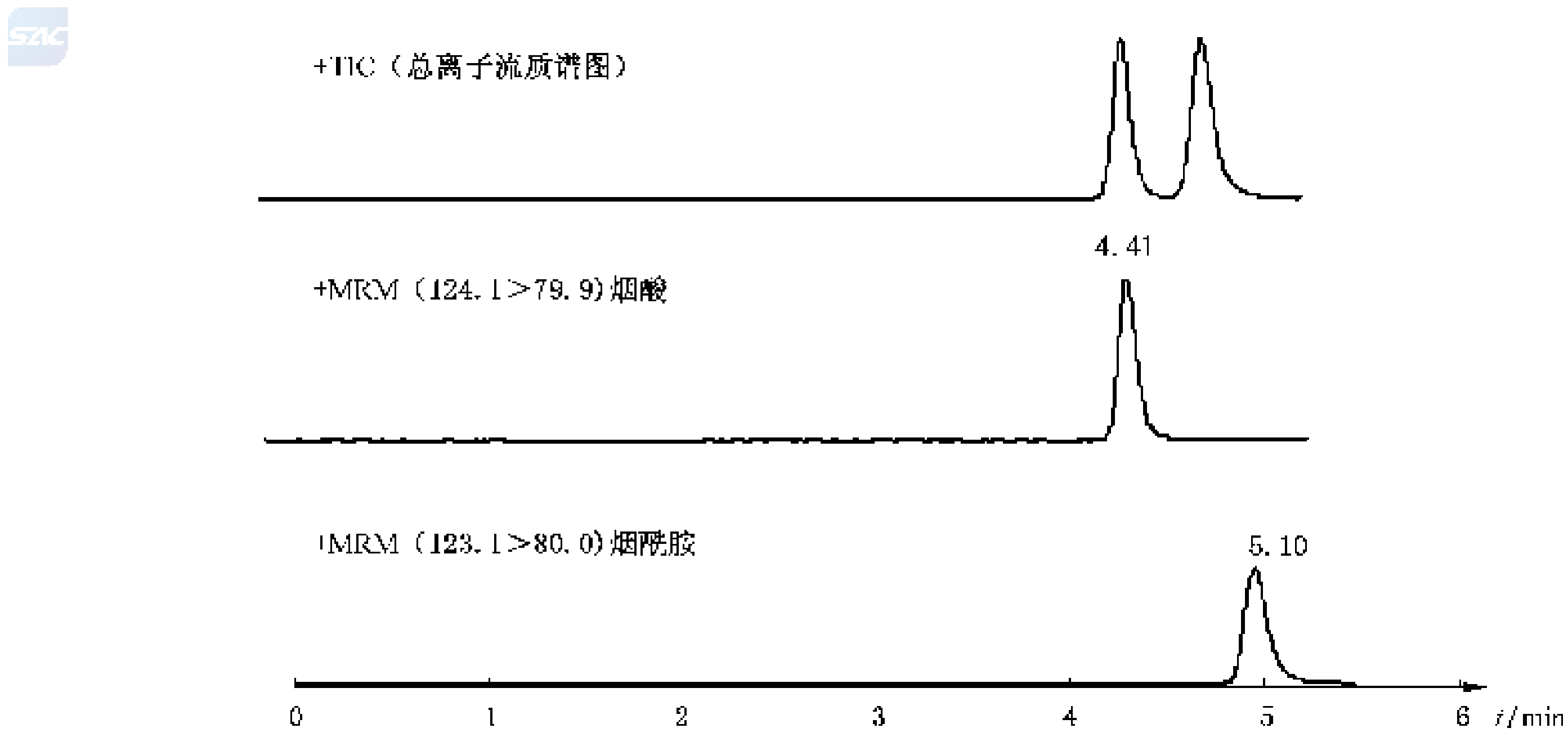


图 A.4 标准物质总离子流质谱图和提取离子(定量)质谱图

附录 B
(资料性附录)
实际样品液相色谱图

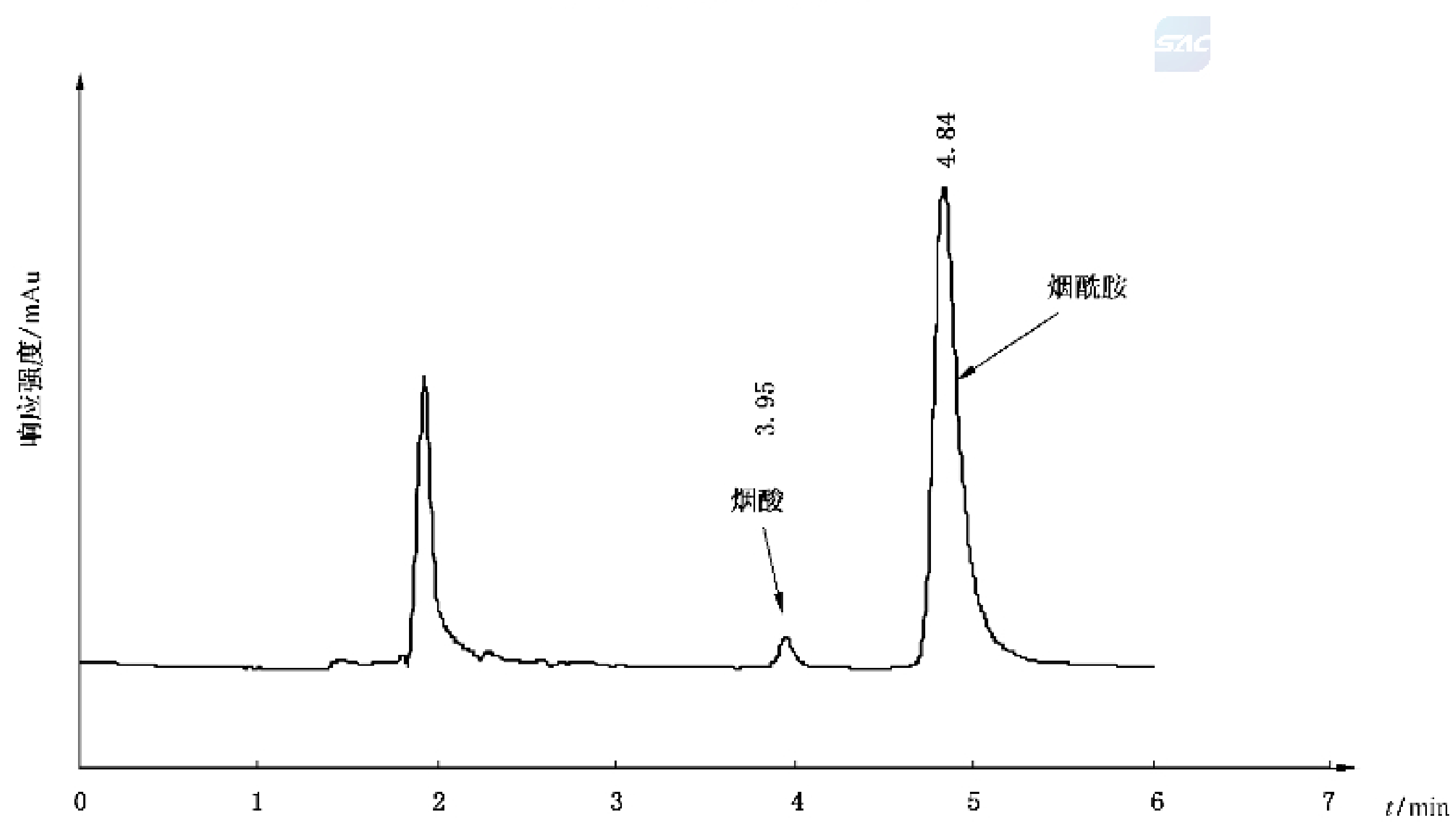


图 B.1 实际样品液相色谱图(0.1%甲酸水为流动相)