

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 005—2021

化妆品中视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇 棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法

Determination of RETINOL, RETINYL ACETATE, RETINYL,
PALMITATEHYDROXYPINACOLONE RETINOATE in Cosmetics by HPLC- and
HPLC-MS/MS

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2022年5月19日)

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

广东省化妆品学会 发布

目 次

| | |
|----------------------------------|---|
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 高效液相色谱法 | 1 |
| 4.1 原理 | 1 |
| 4.2 试剂或材料 | 1 |
| 4.3 仪器和设备 | 1 |
| 4.4 测试步骤 | 2 |
| 4.5 结果计算 | 2 |
| 4.6 检出限和定量限 | 2 |
| 4.7 精密度 | 3 |
| 5 液相色谱-串联质谱法 | 3 |
| 5.1 原理 | 3 |
| 5.2 试剂或材料 | 3 |
| 5.3 仪器和设备 | 3 |
| 5.4 测试步骤 | 3 |
| 5.5 结果计算 | 4 |
| 5.6 检出限和定量限 | 5 |
| 5.7 精密度 | 5 |
| 附录 A (资料性) 标准物质信息 | 6 |
| 附录 B (资料性) 视黄醇等标准物质高效液相色谱图 | 7 |
| 附录 C (资料性) 视黄醇等标准物质多反应监测图 | 8 |

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××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品中视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的测定

高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法测定化妆品中视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的含量。

本文件适用于水剂、乳液、膏霜类化妆品中视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的含量测定。

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 6379 测量方法与结果的准确度

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 高效液相色谱法

4.1 原理

样品经有机溶剂提取后用高效液相色谱分离，经二极管阵列检测器检测，外标法定量。

4.2 试剂或材料

4.2.1 甲醇：色谱纯。

4.2.2 四氢呋喃：色谱纯。

4.2.3 纯化水：GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.4 标准物质：纯度均不小于 95%，视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯及羟基频哪酮视黄酸酯的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、化学结构式及相对分子质量参见附录 A 中表 A.1。

4.2.5 单一标准储备液：分别准确称取适量视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯或羟基频哪酮视黄酸酯标准品于棕色容量瓶中，加甲醇溶解并定容，配成 1mg/mL 的单一标准储备溶液，现配现用。

4.2.6 单一或混合作溶液配制：分别准确移取一定量的标准储备液，用甲醇稀释成质量浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列工作溶液，绘制标准工作曲线，标准工作曲线的 R^2 值不低于 0.999。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱仪：带二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平：感量 0.0001g。

4.3.3 漩涡振荡器。

4.3.4 超声波清洗器。

4.3.5 定量移液管。

4.3.6 离心机。

4.4 测试步骤

4.4.1 样品制备

称取0.5g(精确到0.0001g)样品于25ml棕色比色管中,用甲醇定容到刻度(必要时用四氢呋喃先分散再定容),通过超声、涡旋、震荡等方法,使样品混合均匀。取上层清液(必要时离心)过0.45 μm有机滤膜,滤液收集于棕色液相小瓶中,待测。样品处理过程避免强光照射。如果待测液中待测成分浓度超出“4.2.6”的标准工作曲线范围,应稀释到合适浓度范围内。

4.4.2 液相色谱分析参考条件

色谱参考工作条件如下:

——色谱柱: C18 柱(4.6×250mm, 5 μm), 或同等性能的色谱柱;

——柱温: 30℃;

——进样体积: 10 μL;

——流动相: 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水, 梯度洗脱程序见表 1;

——流速: 1.0mL/min;

——检测波长: 视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯均为 325nm, 羟基频哪酮视黄酸酯为 358nm。

色谱图: 视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯参考色谱图见附录 B 图 B.1, 羟基频哪酮视黄酸酯参考色谱图见附录图 B.2。

表 1 流动相梯度洗脱程序

| 时间/min | 流速/(mL/min) | 流动相 A (甲醇) /% | 流动相 B (水) /% |
|--------|-------------|---------------|--------------|
| 0 | 1.0 | 95 | 5 |
| 1 | 1.0 | 95 | 5 |
| 8 | 1.0 | 100 | 0 |
| 32 | 1.0 | 100 | 0 |
| 33 | 1.0 | 95 | 5 |
| 36 | 1.0 | 95 | 5 |

注: 不同型号仪器可作适当调整。

4.4.3 样品测定

取待测液进样,进行高效液相色谱仪分析,测得峰面积,采用外标法,根据上述标准曲线得到待测溶液中各测定组分的浓度,按“4.5”计算样品中各待测组分的含量。

4.5 结果计算

样品中待测组分的含量按式(1)计算:

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

式中:

X——样品中待测组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ——根据标准曲线计算得到的样品中待测组分的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V——定容体积,单位为毫升(mL);

m——试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

4.6 检出限和定量限

本方法对视黄醇的检出限0.5mg/kg,定量限1mg/kg;对视黄醇乙酸酯的检出限0.5mg/kg,定量限1mg/kg;对视黄醇棕榈酸酯的检出限2mg/kg,定量限5mg/kg;对羟基频哪酮视黄酸酯的检出限0.5mg/kg,定量限1mg/kg。

4.7 精密度

精密度应符合GB/T 6379的规定。

5 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

样品经有机溶剂提取后用液相色谱分离，串联质谱检测，外标法定量。

5.2 试剂或材料

5.2.1 甲醇：色谱纯。

5.2.2 甲酸：色谱纯。

5.2.3 四氢呋喃：色谱纯。

5.2.4 纯化水：GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.5 标准物质：纯度均不小于 95%，视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯及羟基频哪酮视黄酸酯的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、化学结构式及相对分子质量参见附录 A 中表 A.1。

5.2.6 0.1%甲酸溶液：准确量取 1.0mL 甲酸至 1000mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。

5.2.7 单一标准储备液：分别准确称取适量视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯或羟基频哪酮视黄酸酯标准品于棕色容量瓶中，加甲醇溶解并定容，配成 1 mg/mL 的单一标准储备溶液，现配现用。

5.2.8 单一或混合工作溶液配制：分别准确移取一定量的标准储备液，甲醇稀释成质量浓度为 0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、2 μg/mL 的系列工作溶液，绘制标准工作曲线，标准工作曲线的 R^2 值不低于 0.999。

5.3 仪器和设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪，带电喷雾离子源（ESI 源）。

5.3.2 分析天平：感量 0.0001g。

5.3.3 漩涡混合器。

5.3.4 超声波清洗器。

5.3.5 定量移液管。

5.3.6 离心机。

5.4 测试步骤

5.4.1 样品制备

称取 0.5g (精确到 0.0001g) 试样于 25mL 棕色比色管中，用甲醇定容到刻度（必要时用四氢呋喃先分散再定容），通过超声、涡旋、震荡等方法，使样品混合均匀。取上层清液（必要时离心）过 0.22 μm 有机滤膜，滤液收集于棕色液相小瓶中，待测。试样处理过程避免强光照射。如待测液超出线性范围，根据需求稀释至线性范围内。如果待测液中待测成分浓度超出“5.2.8”的标准工作曲线范围，应稀释到合适浓度范围内。

5.4.2 仪器测定条件

5.4.2.1 液相色谱参考工作条件

液相色谱参考工作条件如下：

——色谱柱：C8 柱 (2.1×50mm, 1.7 μm)，或同等性能的色谱柱；

——柱温：25℃；

——进样体积：2 μL；

——流速：0.3mL/min；

——流动相 A：0.1%甲酸水溶液；

——流动相 B：甲醇。

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 (0.1%甲酸水溶液) | 流动相 B (甲醇) /% |
|--------|--------------|-------------------|---------------|
| / | 0.3 | 20 | 80 |
| 1.00 | 0.3 | 20 | 80 |
| 2.00 | 0.3 | 5 | 95 |
| 5.00 | 0.3 | 5 | 95 |
| 5.50 | 0.3 | 20 | 80 |
| 7.00 | 0.3 | 20 | 80 |

5.4.2.2 质谱参考工作条件

质谱参考工作条件如下：

- 离子源：电喷雾粒子源，正离子 (ESI+)；
- 毛细管电压：3000V；
- 锥孔电压：30V；
- 离子源温度：150℃；
- 锥孔气流：50L/Hr；
- 脱溶剂温度：400℃；
- 去溶剂化气流：800L/Hr。

视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的定性定量离子参数见表3，多反应监测图见附录C。

表3 视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、羟基频哪酮视黄酸酯的质谱参数

| 物质名称 | 保留时间/min | 定量离子对/ (m/z) | 锥孔电压/V | 锥孔电压/V |
|-----------|----------|--------------|--------|--------|
| 视黄醇 | 1.61 | 269.2/ 93.0 | 30 | 20 |
| 羟基频哪酮视黄酸酯 | 2.21 | 421.1/139.0 | 30 | 20 |
| 视黄醇乙酸酯 | 2.36 | 269.2/93.0 | 30 | 20 |
| 视黄醇棕榈酸酯 | 3.76 | 269.2/ 93.0 | 30 | 20 |

5.4.3 样品的定性分析

取试样溶液与标准工作溶液在相同试验条件下测定，试样溶液中待测组分的保留时间与标准溶液中对应组分的保留时间一致（偏差在±2.5%之内），且定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应组分的定性离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表4规定的范围，即可判定试样中存在该组分。

表4 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

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

5.4.4 样品测定

取待测液进样，进行液相色谱-串联质谱仪分析，测得峰面积，采用外标法，根据上述标准曲线得到待测溶液中各测定组分的浓度，按“5.5”计算样品中各待测组分的含量。

5.5 结果计算

样品中待测组分的含量按式(2)计算：

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——样品中待测组分的含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

ρ ——根据标准曲线计算得到的样品中待测组分的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

5.6 检出限和定量限

本方法对视黄醇的检出限0.1mg/kg,定量限0.5mg/kg;对视黄醇醋酸酯的检出限0.1mg/kg,定量限0.5mg/kg;对视黄醇棕榈酸酯的检出限0.2mg/kg,定量限1mg/kg;对羟基频哪酮视黄酸酯的检出限0.1mg/kg,定量限0.5mg/kg。

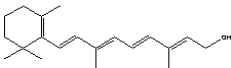
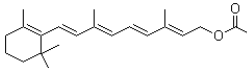
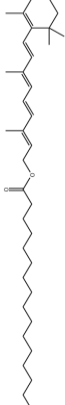
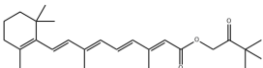
5.7 精密度

精密度应符合GB/T 6379的规定。

附 录 A
(资料性)
标准物质信息

视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯及羟基频哪酮视黄酸酯标准物质的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、化学结构式及相对分子质量见表A.1

表A.1 中文名称、英文名称、CAS号、分子式、化学结构式及相对分子质量

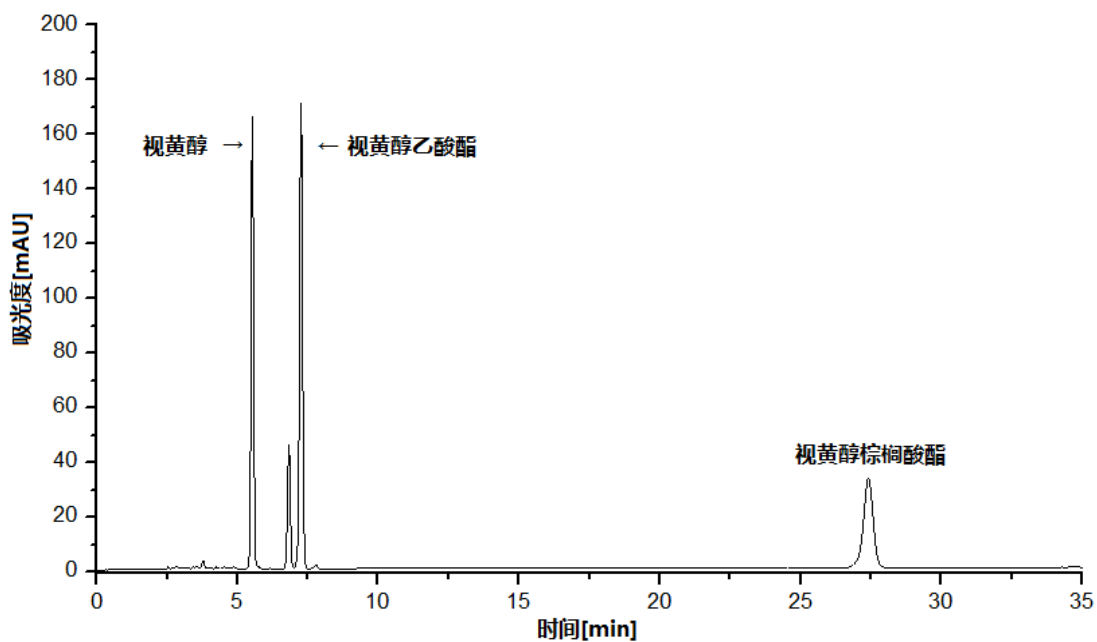
| 中文名称 | 视黄醇 | 视黄醇乙酸酯 | 视黄醇棕榈酸酯 | 羟基频哪酮视黄酸酯 |
|--------|--|--|---|--|
| 英文名称 | RETINOL | RETINYL ACETATE | RETINYL PALMITATE | HYDROXYPINACOLONE RETINOATE |
| CAS号 | 68-26-8;11103-57-4 | 127-47-9 | 79-81-2 | 893412-73-2 |
| 分子式 | $C_{20}H_{30}O$ | $C_{22}H_{30}O_3$ | $C_{36}H_{50}O_2$ | $C_{26}H_{38}O_3$ |
| 化学结构式 |  |  |  |  |
| 相对分子质量 | 286.4516 | 342.4718 | 524.86 | 398.58 |

附录 B

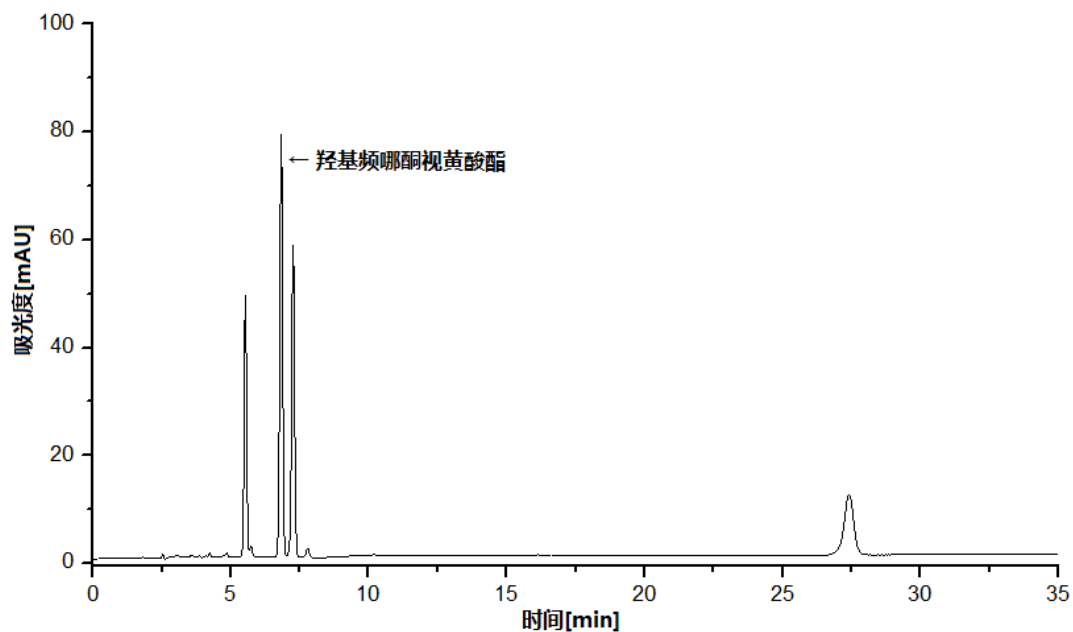
(资料性)

视黄醇等标准物质高效液相色谱图

视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯标准物质液相色谱图见图B.1。羟基频哪酮视黄酸酯标准物质液相色谱图见图B.2。



图B.1 视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯标准物质液相色谱图



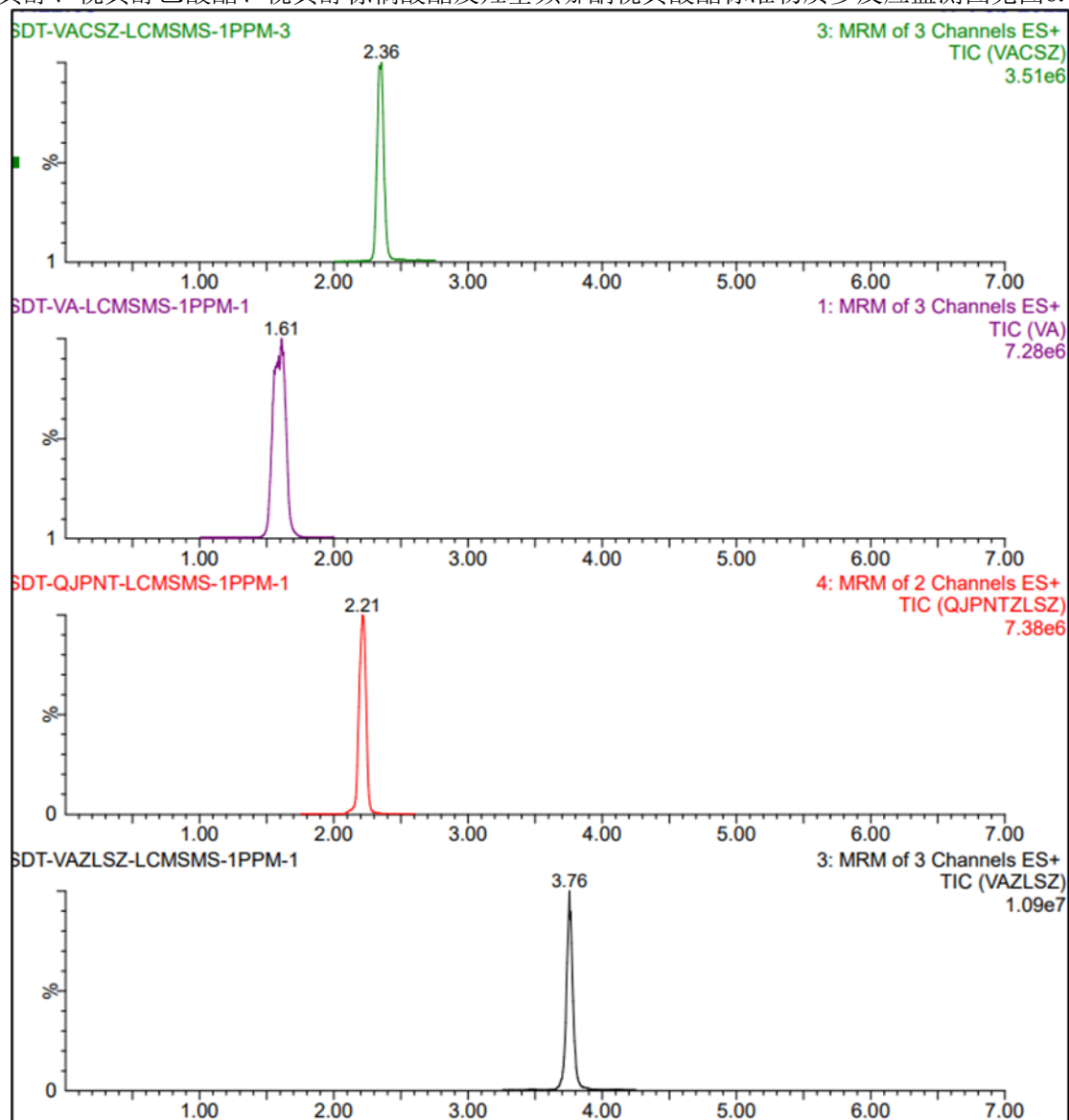
图B.2 羟基频哪酮视黄酸酯标准物质液相色谱图

附录 C

(资料性)

视黄醇等标准物质多反应监测图

视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯及羟基频哪酮视黄酸酯标准物质多反应监测图见图C. 1。



图C. 1 视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯及羟基频哪酮视黄酸酯标准物质多反应监测图