



中华人民共和国国家标准

GB/T 33309—2016

化妆品中维生素 B₆ (吡哆素、盐酸吡哆素、 吡哆素脂肪酸酯及吡哆醛 5-磷酸酯) 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin B₆ (pyridoxine, pyridoxine hydrochloride,
pyridoxine fatty acid esters and pyridoxal 5-phosphate) in cosmetics—
High performance liquid chromatography

2016-12-13 发布

2017-07-01 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：山东省产品质量监督检验研究院、聊城大学、山东省食品药品检验研究院、上海市日用化学工业研究所。

本标准主要起草人：霍艳敏、王骏、张娟、张卉、周莉莉、段文增、邹惠玲、王艳丽、薛霞、宿书芳、刘艳明、崔玉花、刘桂亮、张艳侠、沈敏。

化妆品中维生素 B₆ (吡哆素、盐酸吡哆素、 吡哆素脂肪酸酯及吡哆醛 5-磷酸酯) 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中维生素 B₆ (吡哆素、盐酸吡哆素、吡哆素脂肪酸酯及吡哆醛 5-磷酸酯) 的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于膏霜、乳液、液体类等化妆品中吡哆素、盐酸吡哆素、吡哆素脂肪酸酯及吡哆醛 5-磷酸酯的测定。

本标准方法检出限为：吡哆醛 1.0 mg/kg、吡哆素 0.3 mg/kg，定量限为：吡哆醛 2.5 mg/kg、吡哆素 1.2 mg/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

本标准通过酶解、皂化反应将样品中的维生素 B₆ 均转化为吡哆素或吡哆醛的形式，利用高效液相色谱配荧光检测器进行分离及分析，保留时间定性，外标法定量测定维生素 B₆ 的含量。

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 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 七氟丁酸：色谱纯。

4.3 碱性磷酸酶：酶活力不小于 10 U/mg。

4.4 磷酸：优级纯。

4.5 氨水：优级纯，含量为 25%~28%。

4.6 磷酸二氢铵：优级纯。

4.7 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·2H₂O)。

4.8 乙醇。

4.9 盐酸。

4.10 氢氧化钾水溶液：称取固体氢氧化钾 250 g，加入 200 mL 水溶解。

4.11 30% 磷酸水溶液(体积分数)：准确量取 30 mL 磷酸(4.4)和 70 mL 水，混匀后备用。

4.12 30% 氨水溶液(体积分数)：准确量取 30 mL 氨水(4.5)和 70 mL 水，混匀后备用。

- 4.13 盐酸溶液(5.0 mol/L,0.1 mol/L):量取 40 mL、0.8 mL 盐酸(4.9)分别放入两个 100 mL 容量瓶中,用水定容,分别得 5.0 mol/L、0.1 mol/L 盐酸溶液。
- 4.14 氢氧化钠溶液(5.0 mol/L,0.1 mol/L):称取 20 g、0.4 g 氢氧化钠用水溶解,分别放入两个 100 mL 容量瓶中,用水定容,分别得 5.0 mol/L、0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。
- 4.15 离子对试剂缓冲溶液[0.02 mol/L 磷酸二氢铵缓冲溶液(含 0.001 mol/L 七氟丁酸)]:称取 2.30 g 磷酸二氢铵,加入约 980 mL 水溶解,用 30%磷酸(4.11)或 30%氨水(4.12)调节 pH 值至 4.5,加入 170 μ L 七氟丁酸(4.2),用水定容至 1 L 备用。
- 4.16 磷酸氢二钠溶液(0.1 mol/L):称取 17.8 g 磷酸氢二钠(4.7),用水溶解,定容至 1 000 mL,用氢氧化钠溶液(4.14)调节 pH 值至 9.8,备用。
- 4.17 碱性磷酸酶溶液(1.0 g/L):称取 50 mg 碱性磷酸酶,用水定容至 50 mL。临用前配制。
- 4.18 标准样品:吡哆素和吡哆醛,纯度不小于 99.0%。维生素 B₆(吡哆素、盐酸吡哆素、吡哆素脂肪酸酯和吡哆醛 5-磷酸酯)的 CAS 号、分子式、相对分子质量、化学结构式参见附录 A。
- 4.19 维生素 B₆(吡哆素、吡哆醛)标准贮备液(1 mg/mL):准确称取 0.025 g(精确至 0.000 1 g)吡哆素、吡哆醛标准品,分别置于 25 mL 容量瓶中,用水溶解定容,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,于 4 $^{\circ}$ C 避光保存,有效期 3 个月。
- 4.20 维生素 B₆(吡哆素、吡哆醛)混合标准中间液 1(100 μ g/mL)、混合标准中间液 2(10 μ g/mL):分别准确吸取维生素 B₆ 标准贮备液(4.19)5 mL、0.5 mL 至 50 mL 容量瓶中,用水溶解、定容,混匀。
- 4.21 维生素 B₆(吡哆素、吡哆醛)混合标准系列工作液:分别准确吸取维生素 B₆ 混合标准中间液 2(4.20)0.1 mL、1.0 mL,混合标准中间液 1(4.20)1.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、20.0 mL 至 100 mL 容量瓶中,用水溶解定容。该标准系列浓度分别为 0.01 μ g/mL、0.1 μ g/mL、1.0 μ g/mL、5.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL。临用前配制。
- 4.22 微孔滤膜:0.45 μ m,有机相。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱(HPLC)仪:配有荧光检测器。
- 5.2 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 水浴振荡器。
- 5.5 pH 计。
- 5.6 具塞塑料离心管;50 mL。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 试样标签中标注含吡哆醛 5-磷酸酯的试样

称取 1.0 g 混合均匀试样(精确至 0.000 1 g)置于 50 mL 具塞塑料离心管(5.6)中,加入 1.0 mL 碱性磷酸酶溶液(4.17)、用磷酸氢二钠溶液(4.16)定容至 10.0 mL,用涡旋混合器(5.3)充分混匀,置于水浴振荡器(5.4)上,于(37 \pm 1) $^{\circ}$ C 振荡酶解 12 h 以上。

6.1.2 试样标签中标注含吡哆素、盐酸吡哆素及吡哆素脂肪酸酯的试样

称取 1.0 g 混合均匀试样(精确至 0.000 1 g)置于 50 mL 具塞塑料离心管(5.6)中,加入 10.0 mL

水,用涡旋混合器(5.3)充分混匀。

6.2 待测液的制备

于上述处理的试样溶液(6.1.1或6.1.2)中加入20.0 mL乙醇,充分混匀后加入1.0 mL氢氧化钾溶液(4.10)混匀,置于水浴振荡器(5.4)上,于45 ℃ ± 2 ℃避光振荡皂化45 min。皂化完成后,取出冷却至室温,加入1.05 mL盐酸(4.9),用盐酸溶液(4.13)或氢氧化钠溶液(4.14)调节试样pH值至7.0,将试样转移至50.0 mL容量瓶中,用水定容至50.0 mL(V_1),混匀,静置。准确移取5.0 mL(V_2)上层清液于25.0 mL容量瓶中,用水定容至25.0 mL(V_3),混匀,上清液过微孔滤膜(4.22)后,供HPLC测定。

6.3 测定

6.3.1 参考条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱, 250 mm × 4.6 mm (i.d.), 5 μ m, 或相当者。
- b) 流动相: 溶剂 A: 甲醇, 溶剂 B: 离子对试剂缓冲溶液(4.15)。
- c) 流速: 1.0 mL/min。
- d) 检测波长: 激发波长 293 nm, 发射波长 395 nm。
- e) 柱温: 35 ℃。
- f) 进样量: 10 μ L。
- g) 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0	10	90
12.0	10	90
15.0	25	75
25.0	25	75
26.0	10	90
35.0	10	90

6.3.2 标准工作曲线绘制

系列标准工作液(4.21)按色谱条件(6.3.1)进行测定,以色谱峰的峰面积为纵坐标,对应的溶液浓度为横坐标作图,绘制标准工作曲线。吡哆醛、吡哆素标准样品色谱图参见附录 B。

6.3.3 试样测定

试样溶液(6.2)按色谱条件(6.3.1)进行测定,记录色谱峰的保留时间和峰面积,由色谱峰的峰面积从标准曲线上求出相应的吡哆醛、吡哆素的浓度。样品溶液中被测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内,超过线性范围的应稀释后再进样分析。

6.4 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

7 结果计算

试样中吡哆醛或吡哆素的含量按式(1)计算:

$$X_i = \frac{c_i \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{m \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i —— 试样中被测组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_i —— 从标准曲线上得到的待测液中维生素 B₆ 各组分的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_1 —— 样品提取液总体积,单位为毫升(mL);

V_2 —— 稀释用样品体积,单位为毫升(mL);

V_3 —— 稀释液体积,单位为毫升(mL);

m —— 试样质量,单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值,保留至小数点后一位。

注: 试样中盐酸吡哆素及吡哆素脂肪酸酯以吡哆素计,吡哆醛 5-磷酸酯以吡哆醛计。

8 回收率

吡哆素和吡哆醛分别在添加浓度 1.2 mg/kg~20 000 mg/kg 和 2.5 mg/kg~20 000 mg/kg 浓度范围内,回收率在 91.6%~108.1%之间,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得超过算术平均值的 10%。

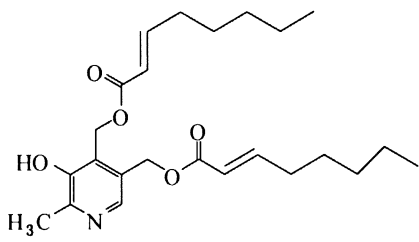
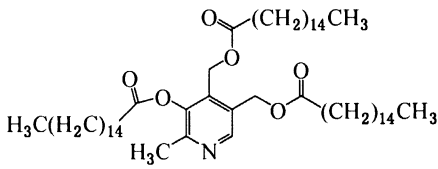
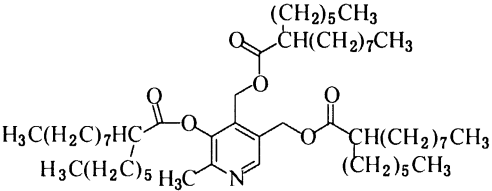
附录 A

(资料性附录)

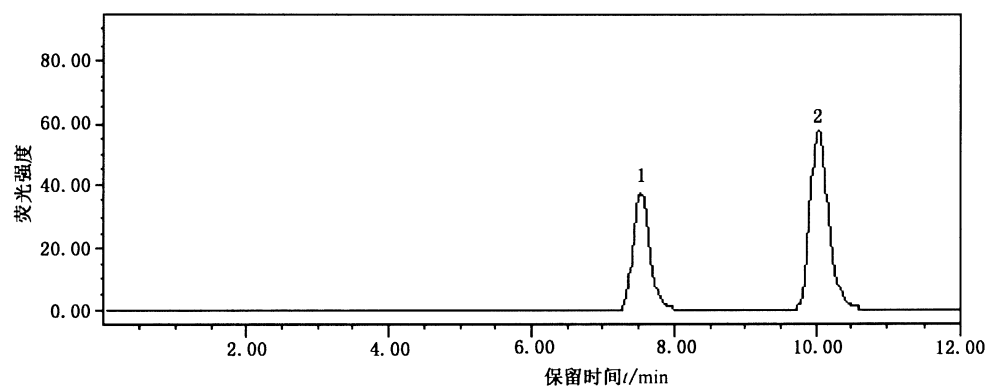
吡哆素、盐酸吡哆素、吡哆素脂肪酸酯和吡哆醛 5-磷酸酯的
CAS 号、分子式、相对分子质量和化学结构式表 A.1 吡哆素、盐酸吡哆素、吡哆素脂肪酸酯和吡哆醛 5-磷酸酯的
CAS 号、分子式、相对分子质量和化学结构式

中文名 (英文名)	CAS 号	分子式	相对分子 质量	化学结构式
吡哆素 (Pyridoxine)	65-23-6	$C_8H_{11}NO_3$	169.18	
盐酸吡哆素 (Pyridoxine hydrochloride)	58-56-0	$C_8H_{12}NO_3Cl$	205.64	
吡哆素二棕榈酸酯 (Pyridoxine dipalmitate)	635-38-1	$C_{40}H_{71}NO_5$	646.00	
吡哆素二辛酸酯 (Pyridoxine dicaprylate)	106483-04-9	$C_{24}H_{39}NO_5$	421.57	
吡哆醛 5-磷酸酯 (Pyridoxal 5-phosphate)	54-47-7	$C_8H_{10}NO_6P$	247.14	
吡哆素二月桂酸酯 (Pyridoxine dilaurate)	—	$C_{32}H_{55}NO_5$	533.78	

表 A.1 (续)

中文名 (英文名)	CAS号	分子式	相对分子 质量	化学结构式
吡哆素二辛烯酸酯 (Pyridoxine dioctenoate)	59599-61-0	$C_{24}H_{35}NO_5$	417.54	
吡哆素三棕榈酸酯 (Pyridoxine tripalmitate)	4372-46-7	$C_{56}H_{101}NO_6$	884.40	
吡哆素三-己基癸酸酯 (Pyridoxine tris-hexyldecanoate)	—	$C_{56}H_{101}NO_6$	884.40	

附录 B
(资料性附录)
吡哆醛、吡哆素标准样品色谱图



说明:

1——吡哆醛, $t_R = 7.5$ min;

2——吡哆素, $t_R = 10.1$ min。

图 B.1 吡哆醛、吡哆素混合标准样品色谱图