附件16

化妆品中丙烯酰胺的检验方法

Determination of Acrylamide in Cosmetics

1 范围

本方法规定了液相色谱-串联质谱法测定化妆品中丙烯酰胺的含量。

本方法适用于液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类化妆品中丙烯酰胺含量的测定。

2 方法提要

样品提取、净化后，采用高效液相色谱仪分离，质谱检测器检测，根据保留时间和特征离子对的相对丰度比定性、定量离子对内标法定量，以标准曲线法计算含量。

本方法取样量为1.0 g时，检出浓度为0.01 mg/kg，最低定量浓度为0.03 mg/kg。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 标准品：丙烯酰胺、氘代丙烯酰胺（2,3,3-D3）标准品信息详见附录A。

3.2 甲醇，色谱纯。

3.3 石油醚（30~60 ℃）。

3.4 甲酸，色谱纯。

3.5 5%甲酸溶液：吸取甲酸（3.4）5 mL，加水至100 mL，摇匀，即得。

3.6 0.05%甲酸溶液：吸取甲酸（3.4）0.5 mL，加水至1000 mL，摇匀，即得。

3.7 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取丙烯酰胺标准品（3.1）10 mg（精确至0. 00001 g），置10 mL容量瓶中，加水使溶解并定容至刻度，摇匀，即得。

3.8 标准工作溶液（10.0 µg/mL）：精密量取标准储备溶液（3.7）1 mL，置100 mL容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

3.9 标准工作溶液（1.0 µg/mL）：精密量取标准储备溶液（3.8）10 mL，置100 mL容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

3.10 标准工作溶液（1.0 µg/mL）：称取氘代丙烯酰胺（2,3,3-D3）标准品（3.1）10 mg（精确至0.00001 g），置100 mL容量瓶中，加水使溶解并定容至刻度，摇匀，即得。

3.11 内标工作溶液（1.0 µg/mL）： 精密量取内标标准储备溶液（3.10）1 mL，置100 mL容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

3.12 微孔滤膜（0.22 µm）。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪。

4.2 天平。

4.3 超声波清洗器。

4.4 离心机，转速不低于12000 r/min。

4.5 涡旋混合仪。

5 分析步骤

5.1 标准系列溶液的制备

分别精密吸取1.0 µg/mL的标准工作溶液（3.9）20、50、200 µL，10.0 µg/mL的标准工作溶液（3.8）50、100、200 µL，置不同的10 mL容量瓶中，分别精密加入1.0 μg/mL的内标工作溶液（3.11）200 μL，用水稀释至刻度，摇匀，配制得丙烯酰胺的质量分数分别为0.02、0.05、0.2、0.5、1、2 mg/kg的标准系列溶液。

注：上述标准系列溶液中丙烯酰胺的质量分别为0.02、0.05、0.2、0.5、1、2 μg，内标的质量均为0.2 μg，折算到样品中（称样量以1.0 g计），相当于丙烯酰胺的质量分数分别为0.02、0.05、0.2、0.5、1、2 mg/kg。

5.2 样品处理

称取样品1.0 g（精确至0.001 g），精密加入1.0 μg/mL的内标工作溶液（3.11）200 μL，涡旋30 s，加水10 mL、石油醚（3.3）10 mL，涡旋1 min，超声处理10 min，于12000 r/min离心10 min，取下层水溶液3 mL，加5%甲酸溶液（3.5）60 µL、石油醚（30～60 ℃）（3.3）3 mL，涡旋30 s，于12000 r/min离心10 min，取下层水溶液，经微孔滤膜（3.12）过滤，取续滤液作为待测溶液。

5.3 参考液相色谱-三重四极杆质谱联用条件

5.3.1 色谱条件

色谱柱：C18柱（4.6 mm×150 mm，3.0 μm），或等效色谱柱；

流动相：A：0.05%甲酸溶液（3.6），B：甲醇（3.2）；梯度洗脱程序见表1；

表1 流动相梯度洗脱程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间/min | V（A）/% | V（B）/% |
| 0.0 | 90 | 10 |
| 8.0 | 90 | 10 |
| 8.5 | 0 | 100 |
| 12.0 | 0 | 100 |
| 13.0 | 90 | 10 |
| 19.0 | 90 | 10 |

流速：0.3 mL/min；

柱温：25 ℃；

进样量：10 μL。

5.3.2 质谱条件

离子源： 电喷雾离子源（ESI源）；

监测模式： 正离子监测模式；监测离子对及相关参数设定见表2（可根据仪器情况调整）。

表2 监测离子对及相关电压参数设定表

| 编号 | 物质名称 | 母离子（m/z） | 子离子（m/z） | CE（eV） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 丙烯酰胺 | 72.0 | 55.0\* | 18 |
| 54.0 | 24 |
| 2 | 内标 | 75.0 | 58.0\* | 18 |
| 44.0 | 27 |

注：“\*”为丙烯酰胺定量离子。m/z 54.0、m/z 44.0为丙烯酰胺定性离子，可根据所用仪器的实际情况进行选择。

5.4 定性判定

用液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中应呈现定量离子和至少一个定性离子的色谱峰，样品中各离子的保留时间应与标准溶液中各离子的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表3规定范围，则可以判断样品中存在丙烯酰胺。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

5.5 定量测定

在“5.3”项液相色谱-三重四极杆质谱联用条件下，取标准系列溶液（5.1）分别进样，以丙烯酰胺的质量分数为横坐标，丙烯酰胺峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，进行线性回归，绘制标准曲线，其线性相关系数应大于0.995。

取“5.2”项下处理得到的待测溶液进样，将丙烯酰胺峰面积与内标峰面积的比值代入标准曲线，计算丙烯酰胺的质量分数，按“6”项下公式，计算样品中丙烯酰胺的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

|  |  |
| --- | --- |
| *ω =*  | *C* × 1.0 |
| *m*  |

式中：*ω*—— 化妆品中丙烯酰胺的含量，mg/kg；

*C* —— 从标准曲线得到的丙烯酰质量分数，mg/kg；

*m* —— 样品称取量，g。

1.0 —— 样品称取量理论值，g。

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

6.2 回收率和精密度

多家实验室的回收率为90.2%～116.7%，相对标准偏差小于10%（n=6）。

7 图谱

****

图1 标准溶液HPLC-MS/MS色谱图

1：丙烯酰胺；2：氘代丙烯酰胺（内标）

附录 A

（资料性附录）

表A.1 丙烯酰胺及氘代丙烯酰胺标准品信息表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 原料名称 | CAS号 | 分子式 | 相对分子质量 | 纯度（%） | 氘代度（%） |
| 1 | 丙烯酰胺 | 79-06-1 | C3H5NO | 71.1 | ≥98 | / |
| 2 | 氘代丙烯酰胺 | 122775-19-3 | C3H2D3NO | 74.1 | ≥ 98 | ≥99.5 |