



中华人民共和国国家标准

GB/T 29659—2013

化妆品中丙烯酰胺的测定

Determination acrylamide in cosmetics

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
中国国家标准化管理委员会 发布

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：上海市日用化学工业研究所、广州市产品质量监督检验院、上海香料研究所。

本标准主要起草人：

第一法：武晓剑、李琼、沈敏、康薇；

第二法：洗燕萍、陈意光、罗东辉、罗海英、郭新东、吴玉銮。

化妆品中丙烯酰胺的测定

1 范围

本标准规定了化妆品中丙烯酰胺的液相色谱和液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于膏霜、乳液、化妆水等皮肤护理类化妆品中丙烯酰胺的测定。

本标准高效液相色谱-二极管阵列检测器法对丙烯酰胺的检出限为 $30\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $90\ \mu\text{g}/\text{kg}$; 高效液相色谱-质谱/质谱法对丙烯酰胺的检出限为 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $15\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 第一法 高效液相色谱-二极管阵列检测器法

3.1 原理

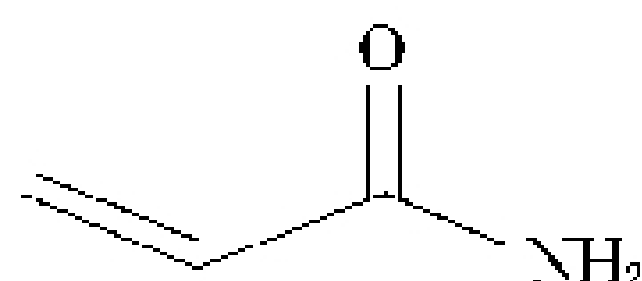
试样用水和甲醇的混合提取剂超声提取, 过滤后, 经配有二极管阵列检测器的高效液相色谱仪检测, 外标法定量。

3.2 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。

3.2.1 甲醇: 色谱纯。

3.2.2 丙烯酰胺标准物质: CAS 号 79-06-1, 相对分子质量 71, 纯度不小于 99.0 %, 结构式:



3.2.3 丙烯酰胺标准储备液: 准确称取 100 mg (精确到 0.1 mg) 标准品 (3.2.2) 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 于 4 °C 避光保存。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高效液相色谱仪 (HPLC): 配有二极管阵列检测器 (DAD)。

3.3.2 分析天平: 感量分别为 0.000 1 g 和 0.01 g。

3.3.3 超声波清洗仪。

3.3.4 离心机: 大于 5 000 r/min。

3.3.5 可调移液器: 量程分别为 10 μL ~ 200 μL 和 100 μL ~ 1 000 μL 。

3.3.6 0.22 μm 微孔滤膜 (避免使用尼龙材质)。

3.4 分析步骤

3.4.1 样品预处理

称取 1.0 g(精确至 0.01 g)试样于 10 mL 比色管中,加入水-甲醇(95 : 5,体积分数)至刻度,超声提取 20 min 后,离心机(3.3.4)离心 20 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,以待进样。

3.4.2 高效液相色谱仪条件

高效液相色谱测定的参考条件如下:

- a) 色谱柱:AQ-C₁₈柱,i. d. 5 μm ,250 mm×4.6 mm(内径),或相当者;
- b) 流动相:水 : 甲醇=95 : 5(体积分数),等度洗脱;
- c) 流速:0.5 mL/min;
- d) 柱温:40 ℃;
- e) 检测波长:210 nm;
- f) 进样量:20 μL。

3.4.3 校准曲线的绘制

分别取标准储备液(3.2.3)0.01 mL、0.05 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL 用一级水定容至 100 mL,浓度分别为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL。取校准曲线各浓度溶液注入高效液相色谱仪,以峰面积与校准浓度绘制校准曲线。丙烯酰胺标准溶液色谱图见附录 A。

3.4.4 样品测定

取样品溶液(3.4.1)注入高效液相色谱仪,根据峰的保留时间和紫外光谱图定性。记录色谱峰面积,从校准曲线上获得对应的丙烯酰胺质量浓度。

3.4.5 定性确认

液相色谱仪对样品进行定性测定,进行样品测定时,如果检出的丙烯酰胺的色谱峰的保留时间与标准物质一致,并且在扣除背景后的样品色谱图,该物质的紫外吸收图谱与标准物质的紫外吸收图谱相一致,则可初步确认存在丙烯酰胺。必要时,阳性样品需要“第二法 液相色谱-质谱/质谱法”进行确认。

3.4.6 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

3.4.7 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

3.5 结果计算

试样中丙烯酰胺的含量由色谱数据处理器或按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m}$$

.....(1)

式中:

- X ——试样中丙烯酰胺的含量,单位为微克每克(μg/g);
- C ——校准曲线查出测试溶液中丙烯酰胺的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V ——试样定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g)。

3.6 回收率和精密度

在添加浓度为 $5\ \mu\text{g/g}$ ~ $150\ \mu\text{g/g}$ 的范围内,回收率在 90%~106%之间,相对标准偏差小于 5%。

3.7 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应超过算术平均值的 10%。

4 第二法 高效液相色谱-质谱/质谱法

4.1 原理

试样用丙酮超声提取,氮吹浓缩,以水溶解残渣,经 C_{18} 固相萃取柱净化,净化液用高效液相色谱-质谱/质谱测定,内标法定量。

4.2 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。

4.2.1 乙腈:色谱纯。

4.2.2 甲醇:色谱纯。

4.2.3 丙酮:分析纯。

4.2.4 乙酸:色谱纯。

4.2.5 0.3%乙酸溶液:准确量取 3 mL 乙酸(4.2.4)于 1 L 容量瓶中,用水定容,混匀。过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜(4.3.8)备用。

4.2.6 C_{18} 固相萃取小柱:3 cm/500 mg;使用前依次以 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化。

4.2.7 丙烯酰胺标准物质:同 3.2.2。

4.2.8 丙烯酰胺同位素内标($1,2,3\text{-}^{13}\text{C}$):纯度不小于 99.0%。

4.2.9 丙烯酰胺标准储备液:准确称取 100 mg(精确到 0.1 mg)标准品(4.2.7)于 100 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,配制成浓度为 $1\ \text{mg/mL}$ 的标准储备液,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 避光保存。

4.2.10 丙烯酰胺同位素内标储备液:准确称取 5 mg(精确到 0.1 mg)内标标准品(4.2.8)于 100 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,配制成浓度为 $50\ \mu\text{g/mL}$ 的内标储备液,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 避光保存。

4.2.11 丙烯酰胺同位素内标使用液:以水稀释丙烯酰胺同位素内标储备液(4.2.10)至浓度为 $500\ \mu\text{g/L}$ 。

4.2.12 基质溶液:称取阴性样品按步骤(4.4.1)处理后得到的溶液。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪(HPLC-MS/MS):配有电喷雾离子源(ESI)。

4.3.2 分析天平:感量为 $0.000\ 1\ \text{g}$ 和 $0.01\ \text{g}$ 。

4.3.3 离心机:转速不低于 $4\ 000\ \text{r/min}$ 。

4.3.4 超声波清洗仪。

4.3.5 固相萃取装置。

4.3.6 水浴恒温氮气吹干仪。

4.3.7 涡旋混合器。

4.3.8 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜(避免使用尼龙材质)。

4.4 分析步骤

4.4.1 样品处理

4.4.1.1 提取

称取 2 g(精确至 0.01 g)试样于具塞塑料离心管中,加入内标使用液(4.2.11)1.0 mL。加入 10 mL 丙酮,超声提取 10 min,再涡旋振荡提取 5 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,上清液移至吹氮管中。重复提取一次,合并提取液,置于 40 ℃水浴恒温氮气吹干仪中浓缩至干。加入 2 mL 水涡旋溶解残渣,待净化。

4.4.1.2 净化

将(4.4.1.1)中的待净化液转移至固相萃取柱(4.2.6)中,收集下滴溶液。当液面低于萃取柱填料时,加入 3 mL 水,收集合并下滴溶液,以水定容至 5.0 mL。摇匀,过微孔滤膜(4.3.8)后,供 HPLC-MS/MS 测定。

4.4.2 高效液相色谱-质谱/质谱测定条件

4.4.2.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱测定的参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱, 150 mm $\times$ 4.6 mm(i. d.) $\times$ 5 μ m, 或相当者;
- b) 流动相: 0.3% 乙酸溶液: 乙腈 = 95:5(体积分数), 等度洗脱;
- c) 流速: 0.5 mL/min;
- d) 柱温: 40 ℃;
- e) 进样量: 20 μ L。

4.4.2.2 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;
- b) 离子喷雾电压: 5.5 kV;
- c) 雾化气: 氮气, 40 psi;
- d) 干燥气: 氮气, 流速 6 L/min, 温度 450 ℃;
- e) 碰撞气: 氮气;
- f) 分辨率: Q1(unit)Q3(unit);
- g) 扫描模式: 多反应监测(MRM), 丙烯酰胺, 母离子 m/z 72, 子离子 m/z 55 和 m/z 44(定量离子); 同位素内标, 母离子 m/z 75, 子离子 m/z 58(定量离子);
- h) 停留时间: 0.2 s;
- i) 裂解电压: 33 V;
- j) 碰撞能量: m/z 72/55 为 17 V, m/z 72/44 为 20 V。

4.4.3 标准曲线的绘制

加入适量内标使用液(4.2.11)后,用基质溶液(4.2.12)将标准储备液(4.2.9)逐级稀释得到浓度为 20 μ g/L、40 μ g/L、80 μ g/L、150 μ g/L、300 μ g/L 的标准工作液(含 100 μ g/L 内标),按浓度由低到高进样检测,以标准溶液的浓度为横坐标、标准溶液的定量离子峰面积与内标溶液的定量离子峰面积比

($\frac{A_{\text{标准}}}{A_{\text{内标}}}$)为纵坐标做图,得到标准曲线回归方程。在上述色谱条件下,丙烯酰胺保留时间约为 4.15 min,丙烯酰胺标准溶液及其内标溶液的提取离子色谱图见附录 B。

4.4.4 定性定量测定

取样品溶液(4.4.1.2)注入高效液相色谱-质谱/质谱仪。在相同试验条件下,试样中待测物质与同时检测的丙烯酰胺标准物质具有相同的保留时间,并且所选择的离子对丰度比与丙烯酰胺的离子对丰度比相一致,则可判定为样品中存在丙烯酰胺残留。以内标法定量。待测样液中丙烯酰胺面积比应在标准曲线面积比的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

4.4.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

4.4.6 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

4.5 结果计算

试样中丙烯酰胺的含量由色谱数据处理器或按式(2)计算:

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

式中:

X ——试样中丙烯酰胺的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C ——根据试样溶液中待测物的定量离子峰面积与内标溶液的定量离子峰面积的比值($\frac{A_{\text{待测物}}}{A_{\text{内标}}}$)在

标准曲线上查得丙烯酰胺的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g)。

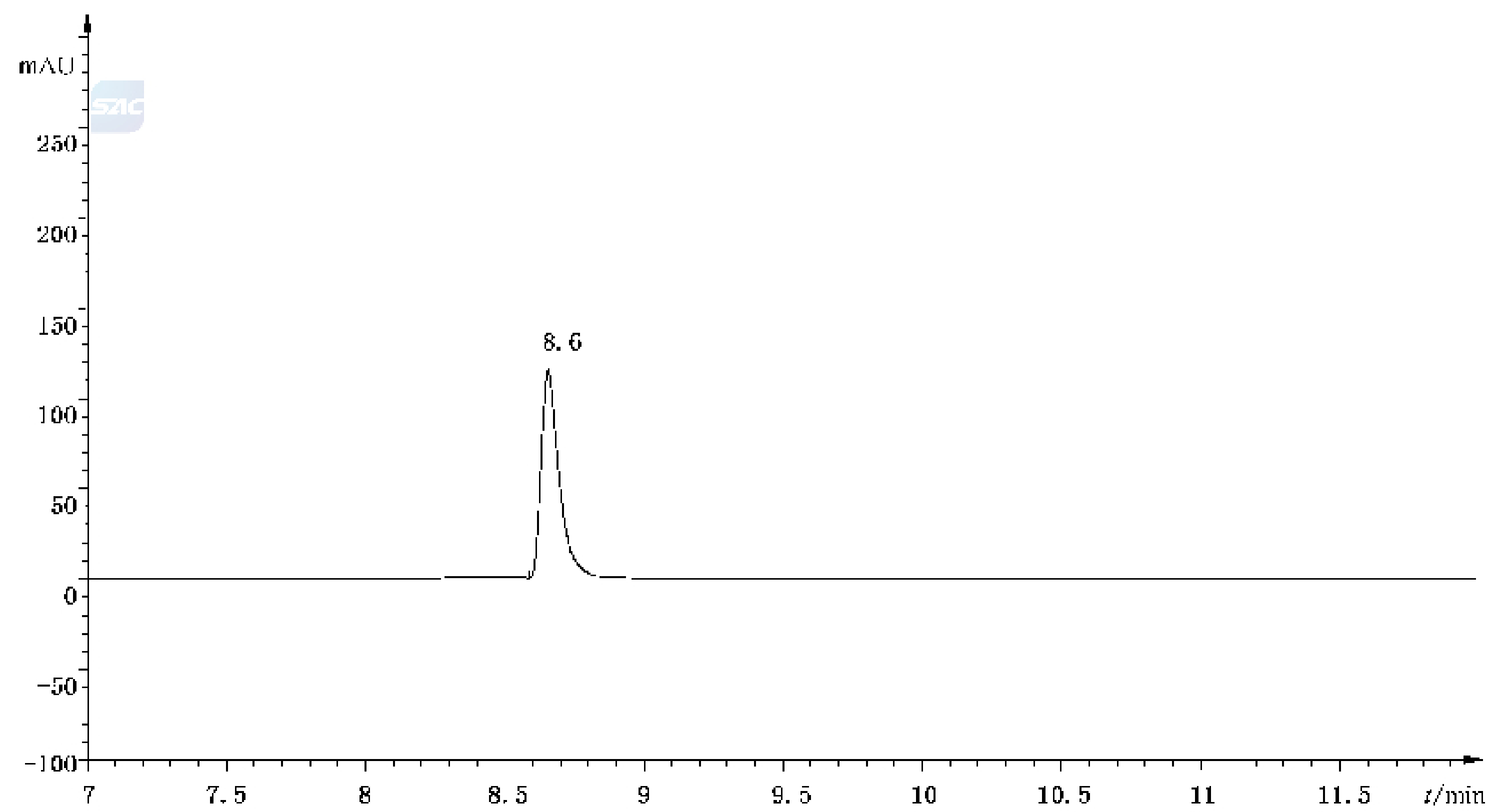
4.6 回收率和精密度

在添加浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 750 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内,回收率在 $83.7\% \sim 95.0\%$ 之间,相对标准偏差小于 10% 。

4.7 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应超过算术平均值的 15% 。

附 录 A
(资料性附录)
丙烯酰胺标准溶液液相色谱法

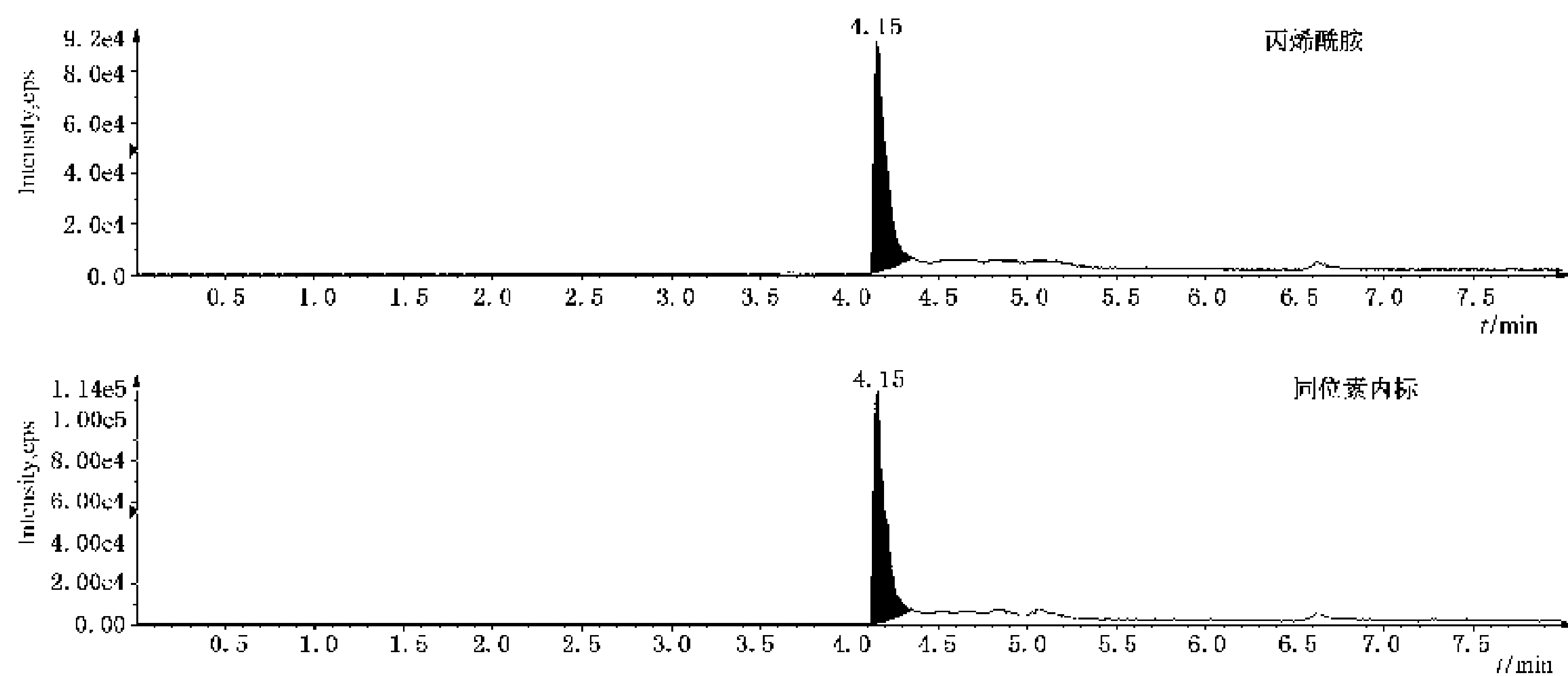


注：保留时间 8.6 min, 丙烯酰胺标准溶液浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 A.1 丙烯酰胺标准溶液液相色谱图

附录 B
(资料性附录)

丙烯酰胺标准溶液及其内标溶液提取离子色谱图



注：保留时间 4.15 min, 丙烯酰胺标准溶液浓度为 300 $\mu\text{g/L}$ 。

图 B.1 丙烯酰胺标准溶液及其内标溶液提取离子色谱图