

## 附件 1

# 化妆品中丙烯酰胺的检测方法 (征求意见稿)

### 1 范围

本方法规定了化妆品中丙烯酰胺的液相色谱-串联质谱测定方法。

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的测定。

### 2 方法提要

样品提取、净化后用液相色谱-串联质谱法测定，采用特征离子丰度比进行定性，内标法定量。

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 丙烯酰胺标准品（纯度 $\geq 98\%$ ）。

3.2 氘代丙烯酰胺（2,3,3-D3）（纯度 $\geq 98\%$ ）。

3.3 甲醇，色谱纯。

3.4 石油醚（30℃ ~ 60℃），分析纯。

3.5 甲酸，色谱纯。

3.6 5%甲酸溶液：吸取甲酸（3.5）5 mL，加水 95 mL，摇匀，即得。

3.7 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取丙烯酰胺（3.1）10 mg（精确至 0.01 mg），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  $\mu\text{g/mL}$ ）：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 内标标准储备溶液（0.1 mg/mL）：称取氘代丙烯酰胺（2,3,3-D3）（3.2）10 mg（精确至 0.01 mg），置 100 mL 容量瓶中，加水使溶解并定容至刻度，摇匀，即得。

3.10 内标工作溶液（1.0  $\mu\text{g/mL}$ ）：精密量取内标储备溶液（3.9）1 mL，置 100 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

### 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 超声波清洗仪。

4.4 离心机。

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 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作溶液 (3.8) 2.0  $\mu\text{L}$ 、5.0  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ ，置不同的 10 mL 容量瓶中，分别精密加入 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的内标工作溶液(3.10) 200  $\mu\text{L}$ ，用水稀释至刻度，摇匀，配制得浓度分别为 2.0  $\text{ng/mL}$ 、5.0  $\text{ng/mL}$ 、10  $\text{ng/mL}$ 、20  $\text{ng/mL}$ 、50  $\text{ng/mL}$ 、100  $\text{ng/mL}$ 、200  $\text{ng/mL}$  的标准系列溶液，内标浓度为 20  $\text{ng/mL}$ 。

### 5.2 样品处理

称取样品 1.0 g，精密加入 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的内标工作溶液 (3.10) 200  $\mu\text{L}$ ，涡旋 30 s，加水 10 mL、石油醚 (3.4) 10 mL，涡旋 1 min，超声处理 10 min，于 12 000 r/min 离心 10 min，取水层 3 mL，加 5%甲酸溶液 (3.6) 60  $\mu\text{L}$ 、石油醚 (3.4) 3 mL，涡旋 30 s，于 12 000 r/min 离心 10 min，取水层，过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜，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：Prodigy  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.0  $\mu\text{m}$ )，或等效色谱柱；

流动相 A：0.05%甲酸溶液；

流动相 B：甲醇；

流动相梯度洗脱程序见表 1；

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	V (流动相 A) /%	V (流动相 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；

离子源喷雾电压（IS）：5500 V；

气帘气压力(CUR)：45 psi；

雾化气压力(GS1)：80 psi；

辅助气压力(GS2)：60 psi；

离子源温度(TEM)：600 ℃；

碰撞气：氮气；

其它质谱条件参见表 2；

表 2 三重四极杆离子对及相关电压参数设定表

编号	物质名称	母离子 (m/z)	去簇电压(V)	子离子 (m/z)	CE (V)
1	丙烯酰胺	72.0	40	55.0*	18
			40	54.0	24
			40	44.0	27
			40	27.0	32
2	内标	75.0	43	58.0	18

注：“\*”为丙烯酰胺定量离子，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定性离子（至少一个）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，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，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，将峰面积代入标准曲线，计算丙烯酰胺的浓度，按“6”项下公式，计算样品中丙烯酰胺的质量分数。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 计算

$$\omega = \frac{C \times 10}{m \times 1000}$$

式中： $\omega$ —— 化妆品中测定组分的质量分数，mg/kg；

$C$ —— 样品测得浓度，ng/mL；

$m$ —— 样品称取量，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

四家实验室的方法回收率为 90.2%~116.7%，相对标准偏差小于 10.0 %。

## 7 图谱

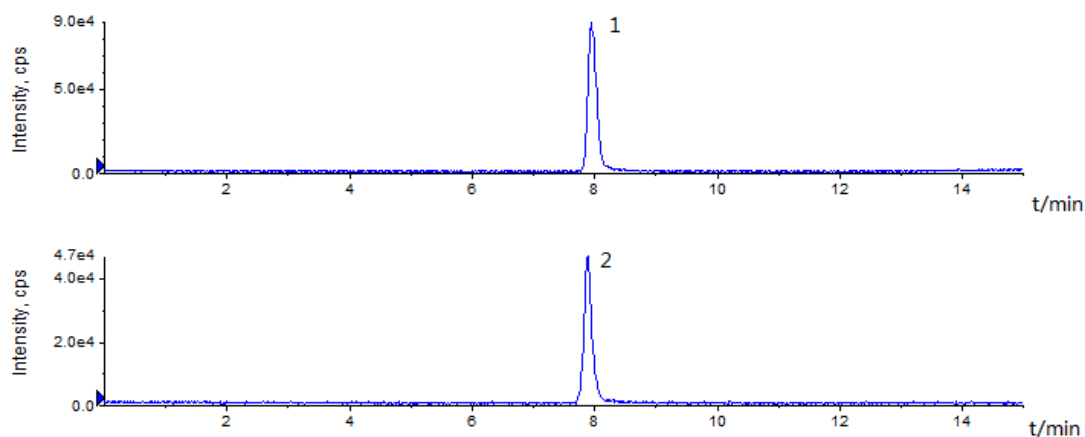


图 1 丙烯酰胺标准溶液的 HPLC-MS/MS 质谱图

1: 丙烯酰胺; 2: 内标。

# 化妆品中丙烯酰胺的检测方法修订说明

为进一步完善化妆品中禁限用物质检测方法标准体系，加强化妆品中禁限用物质的监督管理，受中国食品药品检定研究院委托，我所对化妆品中丙烯酰胺检测方法进行修订完善，现就方法完善工作有关情况说明如下：

## 1 方法完善的必要性

目前化妆品中丙烯酰胺的法定测定方法为国食药监许[2011]96号文附件1。该方法样品前处理时间长，净化效果不佳，在一部分样品测定中方法灵敏度差，不能满足限度要求。为解决上述问题，有必要对化妆品中丙烯酰胺检测方法进行完善。

## 2 修订依据及文献

- (1) 《化妆品卫生规范》（2007年版）
- (2) 国食药监许[2011]96号文附件1
- (3) 金薇，李薇，江文明，等. 液相色谱-串联质谱法测定化妆品中丙烯酰胺单体残留量，药物分析杂志，2010，30（10）：1887~1890
- (4) 马强，王超，白桦，等. 同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定化妆品中残留的丙烯酰胺，色谱，2009，27（6）：856~859

## 3 修订原则

本检测方法尽量采用目前化妆品检测实验室普遍具备的先进的分析技术，选择准确、可行、简便、经济的分析条件，保证检测方法的可操作性和重现性。

## 4 修订过程

受中检院委托，我所对化妆品中丙烯酰胺的检测方法进行了完善研究。首先对现有方法的缺陷进行了整理。其次选择存在这些缺陷的样品，分别从样品前处理方法、仪器分析方法进行优化处理。再分别考察了液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类化妆品的前处理方法和仪器分析方法，最终形成了可克服现有方法缺陷的检测方法。

建立的方法分别经浙江省食品药品检验研究院、辽宁省药品检验检测院、广西壮族自治区食品药品检验所进行了验证复核。

## 5 重点说明的问题

### (1) 关于体例

本检测方法的体例主要参照国家食品药品监督管理局已发布的化妆品中禁限用物质检测方法的体例，便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

### (2) 关于检测方法的建立和验证

色谱柱的选择是本方法的关键之一。若减小色谱柱的内径至液质联用法中常用的 2.1 mm，则在进样体积为 10 $\mu$ L 时，峰形将变差。另外，若色谱柱的柱效低于本方法的柱效，则可能存在较强的基质效应。

### (3) 关于定性离子

由于各离子在不同厂家的液质联用仪中存在响应差异，因此设定 m/z 27.0、m/z 44.0、m/z 54.0 作为参考定性离子，各实验室可根据实际情况选择定性离子，以满足检测灵敏度的需要。

# 化妆品中丙烯酰胺的检测方法编制说明

## 1 任务来源

根据中国食品药品检定研究院与上海市食品药品检验所签订的协议,上海市食品药品检验所承担化妆品中丙烯酰胺的检测方法完善工作。

## 2 研究背景

丙烯酰胺是一种无色无味的结晶性固体,对人体具有神经毒性、致癌毒性及致畸毒性。丙烯酰胺可用于合成聚丙烯酰胺等聚合物。聚丙烯酰胺本身并无毒性,在化妆品中具有多种用途,例如,可用作稳定剂、起泡剂、润滑剂,但残留的丙烯酰胺单体常被发现存在于化妆品中。因此,有必要对化妆品中的丙烯酰胺单体进行严格监控。目前我国《化妆品卫生规范》(2007年版)规定驻留类护肤产品中丙烯酰胺单体残留量不得过 0.1 mg/kg,其它产品的限量为 0.5 mg/kg<sup>[1]</sup>。

## 3 研究现状

目前化妆品中丙烯酰胺的测定方法有 GC 法<sup>[2]</sup>、HPLC 法<sup>[3]</sup>和 LC-MS/MS 法<sup>[4-7]</sup>等。GC 法和 HPLC 法的灵敏度与专属性较差,不能满足测定要求。LC-MS/MS 法是目前化妆品中丙烯酰胺的主要测定方法,但由于丙烯酰胺极性较强,在普通 C<sub>18</sub>柱上保留能力较差,且化妆品中的极性基质较多,故在 LC-MS/MS 测定中常发生较强的基质抑制效应,造成方法灵敏度不能满足要求。另外,由于丙烯酰胺极性较强,故提取溶剂主要为水。以水为提取溶剂时,有些样品的提取液难以离心分层,在过滤和固相萃取时因阻力过大而无法进一步实验。有文献<sup>[7]</sup>采用极性有机溶剂(丙酮)提取化妆品中的丙烯酰胺,吹干复溶后直接测定或以固相萃取技术进一步净化后测定。但固相萃取法分析成本较高,前处理时间较长,部分样品仍存在较强的基质抑制效应。因此,有必要对现有方法进行完善研究。

本课题拟在现有方法的基础上,优化前处理方法和仪器分析方法,建立耐用性较强的丙烯酰胺测定方法。

## 4 方法概述

### 4.1 仪器

超高效液相色谱仪(配备自动进样器、二元泵、脱气机,美国 Waters 公司); API 4000 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);超高效液相色谱仪与质谱仪串联。MS3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 4.2 试剂

丙烯酰胺标准品 (Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号 90806, 纯度 99.5%)。氘代丙烯酰胺 (2,3,3-D<sub>3</sub>) (ALDRICH 公司, 批号 SZ2027, 纯度 98%)。甲醇、甲酸 (色谱纯)。石油醚 (30℃ ~ 60℃) (分析纯)。甲酸 (色谱纯)。

## 4.3 方法

### 4.3.1 色谱条件

色谱柱: Prodigy C<sub>18</sub> 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;

流动相 B: 甲醇;

流动相梯度洗脱程序见表 1;

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	V (流动相 A) /%	V (流动相 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 °C;

进样量: 10 μL。

### 4.3.2 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;

离子源喷雾电压 (IS): 5500 V;

气帘气压力(CUR): 45 psi;

雾化气压力(GS1): 80 psi;

辅助气压力(GS2): 60 psi;

离子源温度(TEM): 600 °C;

其它质谱条件参见表 2;



表 2 三重四极杆离子对及相关电压参数设定表

编号	物质名称	母离子 (m/z)	去簇电压(V)	子离子 (m/z)	CE (V)
1	丙烯酰胺	72.0	40	55.0*	18
			40	54.0	24
			40	44.0	27
2	内标	75.0	43	58.0	18

注：“\*”为定量离子。

#### 4.3.3 标准系列溶液的制备

分别精密吸取 10.0 µg/mL 的标准工作溶液 2.0 µL、5.0 µL、10 µL、20 µL、50 µL、100 µL、200 µL，置于不同的 10 mL 容量瓶中，分别精密加入 1.0 µg/mL 的内标工作溶液 200 µL，用水稀释至刻度，摇匀，配制得浓度分别为 2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准系列溶液，内标浓度为 20 ng/mL。

#### 5.3.4 样品处理

称取样品 1.0 g，精密加入 1.0 µg/mL 的内标工作溶液 200 µL，涡旋 30 s，加水 10 mL、石油醚（30℃ ~ 60℃）10 mL，涡旋 1 min，超声处理 10 min，于 12 000 r/min 离心 10 min，取水层 3 mL，加 5% 甲酸溶液 60 µL、石油醚（30℃ ~ 60℃）3 mL，涡旋 30 s，于 12 000 r/min 离心 10 min，取水层，过 0.22 µm 微孔滤膜，滤液作为待测溶液。

#### 4.3.5 计算

根据峰面积，于校准曲线上得出丙烯酰胺的质量浓度。若样品中丙烯酰胺浓度超出标准曲线上限，应适当减小取样量后再重新测定。

## 5 方法研究

### 5.1 样品前处理

#### 5.1.1 现行标准的缺陷

目前丙烯酰胺的法定检验方法为国食药监许[2011]96 号文附件 1<sup>[6]</sup>。该方法主要以乙腈作为溶剂进行样品的提取，但缺点是部分样品的方法灵敏度差，不能满足限度要求。另有 GB/T 29659-2013<sup>[7]</sup>分别采用 HPLC 法和 LC-MS/MS 法测定化妆品中的丙烯酰胺，但 HPLC 法的灵敏度不高，不能满足测定要求；LC-MS/MS 法需要丙酮提取-固相萃取步骤，成本较高，前处理时间较长，部分样品的固相萃取净化效果不佳，在 LC-MS/MS 测定中存在较强的基质抑制效应。

#### 5.1.2 文献方法的缺陷

有文献<sup>[3]</sup>报道以固相萃取方法进行样品前处理。但缺点是部分样品水提液以滤膜过滤时

存在困难，浑浊的溶液上样后流速极慢，无法进行后续操作。另外，固相萃取的分析成本较高，故暂不考虑。

另有文献<sup>[4]</sup>报道以 0.1%甲酸溶液-石油醚（30 °C ~ 60 °C）作为提取溶剂进行样品的前处理，但缺点是部分样品溶液以滤膜过滤时存在困难。

### 5.1.3 我所的方法摸索

本研究先将样品加水、石油醚（30 °C ~ 60 °C）进行提取，离心。石油醚（30 °C ~ 60 °C）的作用主要是帮助样品分散并去除一部分脂溶性基质。离心后的水层液加甲酸的目的是帮助化妆品中酸不溶性成分的析出。此时部分样品的提取液以滤膜过滤时仍阻力较大，但再加石油醚（30 °C ~ 60 °C）提取后，以滤膜过滤时阻力明显变小，滤液体积可满足进样需求。

取样品，分别加水、甲酸，使甲酸的含量分别为 0.1%、0.5%，再加石油醚（30 °C ~ 60 °C），涡旋、离心，结果甲酸浓度为 0.1%的样品溶液分层效果较好，水提液较易滤过，因此，将甲酸的浓度定为 0.1%。

取样品，加水后分别加二氯甲烷、石油醚（30 °C ~ 60 °C）进行涡旋、离心，取水液进行液质联用分析，结果加石油醚（30 °C ~ 60 °C）的样品响应较高。因此，选择石油醚（30 °C ~ 60 °C）进行脂溶性成分的提取。

## 5.2 流动相

### 5.2.1 有机相的选择

分别选择甲醇、乙腈进行试验，结果以乙腈为有机相时，虽然丙烯酰胺的峰形较好，但保留时间较短，易受到基质的干扰，导致响应变弱；减小流动相中乙腈的含量后，虽可延长丙烯酰胺的保留时间，但流动相中乙腈的含量偏少，不利于色谱柱的保护。若选择甲醇为有机相，丙烯酰胺的保留时间增长，有利于丙烯酰胺与干扰基质的分离，并且流动相中的甲醇含量保持在 10%以上，有利于色谱柱的保护，因此选择甲醇作为有机相。

### 5.2.2 水相的选择

水相的选择主要考察水中不同甲酸浓度的影响。以甲醇为有机相，分别以 0.01%甲酸溶液、0.02%甲酸溶液、0.05%甲酸溶液、0.1%甲酸溶液、0.3%甲酸溶液为水相，考察丙烯酰胺在实际样品中的分析效果。选择的实际样品为以国食药监许[2011]96 号文附件 1 方法检测时基质抑制效应较高的样品。结果不同浓度的甲酸溶液不影响丙烯酰胺的保留时间，但可影响样品基质中干扰成分的保留，从而影响丙烯酰胺在实际样品中的响应。在水相为 0.05%甲酸溶液时，丙烯酰胺的响应最高，基质抑制效应最小。因此，选择 0.05%甲酸溶液作为水相。

### 5.3 色谱柱的选择

本研究曾选择4种色谱柱对基质抑制效应较强的3个膏霜类样品、1个液态油基类样品进行试验,色谱柱分别为:(1)HSS T3柱(1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$  100 mm)、(2)Capcell core C<sub>18</sub>柱(2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$  150 mm)、(3)Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>柱(2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$  100 mm)、(4)Prodigy C<sub>18</sub>柱(3.0  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm),流动相均为甲醇-0.05%甲酸溶液(10:90),结果丙烯酰胺在色谱柱(4)上的保留时间最长,基质抑制效应最小,因此选择色谱柱(4)作为分析柱。

### 5.4 监测离子的选择

国食药监许[2011]96号文附件1规定了丙烯酰胺的监测离子对为  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  55.0、 $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  44.0 及  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  27.0。在实际样品中,  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  55.0 的响应较高,适于定量分析,但  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  44.0 和  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  27.0 的本底信号均较高,信噪比低,不能满足灵敏度要求。经扫描丙烯酰胺的子离子,发现子离子除  $m/z$  44.0 和  $m/z$  27.0 外,尚有  $m/z$  54.0 (见图1)<sup>[8,9]</sup>。经试验,  $m/z$  54 的本底信号较低,信噪比较高(见图2),可满足灵敏度要求。因此,本研究选择  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  55.0 和  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  54.0 作为监测离子对。

由于丙烯酰胺在不同厂家的质谱仪中具有不同的碎片离子响应,故在检验方法正文中同时列出  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  54.0、 $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  44.0 及  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  27.0 三种定性离子对,不同检测机构可根据实际情况进行选择。

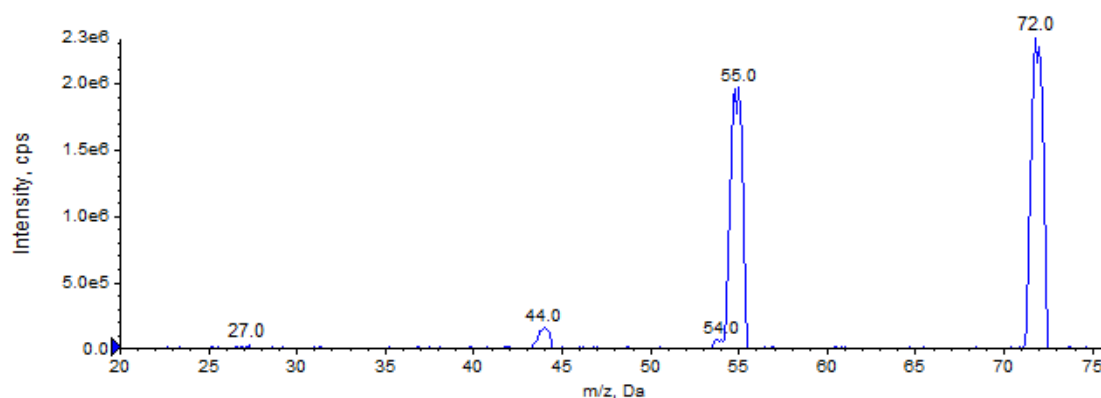


图1 丙烯酰胺的子离子扫描图

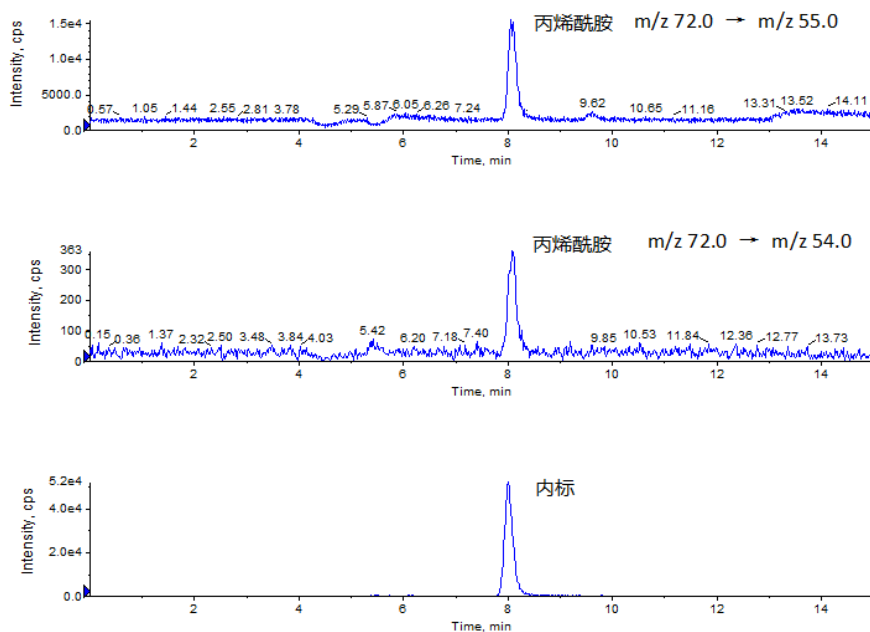


图 2 加标样品 (0.05mg/kg) 典型 MRM 图

注：丙烯酸酰胺  $m/z$  72.0  $\rightarrow$   $m/z$  54.0 图谱经过平滑处理

### 5.5 方法特异性

分别取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个基质的空白样品，依法测定，结果 5 种化妆品基质中存在的物质对丙烯酸酰胺的测定无干扰（见图 3）。

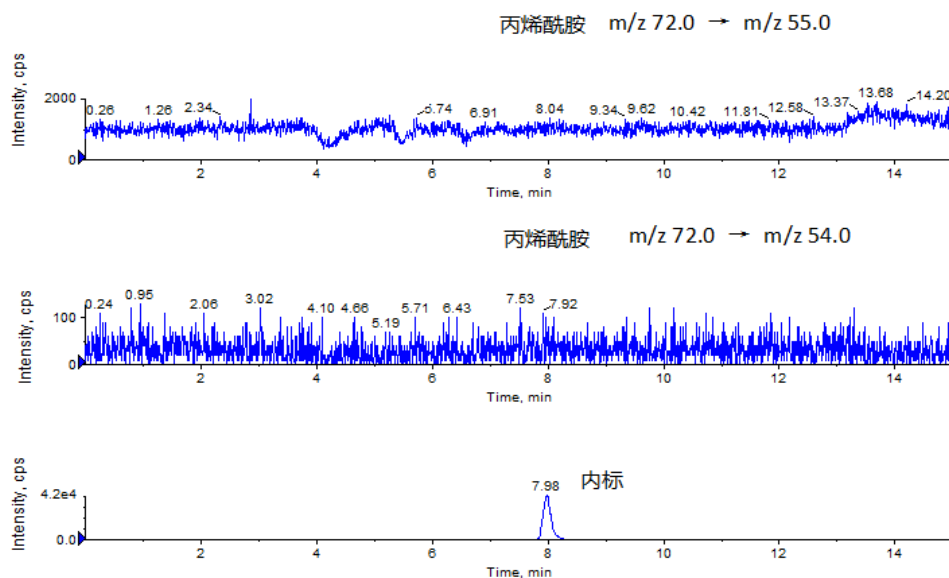


图 3 空白样品的典型 MRM 图

### 5.6 线性范围

在设定条件下，取浓度 (X) 为 2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准溶液（内标浓度均为 20 ng/mL），进样测定，计算丙烯酸酰胺与

其内标的峰面积比 (Y) (见表 3), 以 Y 对 X 进行线性回归计算, 结果线性良好, 线性方程为  $Y = 0.0385 X + 0.0148$  ( $r = 0.9999$ , 权重系数 =  $1/X$ )。

表 3 不同浓度下丙烯酰胺与其内标的响应比

浓度 (ng/mL)	样品中浓度 (mg/kg)	峰面积比 (Y)	丙烯酰胺与其内标的浓度比	相同浓度下丙烯酰胺与其内标的响应比	响应比平均值	响应比 RSD
2	0.02	0.0834	0.1	0.834	0.80	4.3
5	0.05	0.212	0.25	0.848		
10	0.1	0.383	0.5	0.766		
20	0.2	0.813	1	0.813		
50	0.5	1.94	2.5	0.776		
100	1.0	3.89	5	0.778		
200	2.0	7.63	10	0.763		

### 5.7 重复性试验

取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个不同基质的空白样品, 分别加入  $10 \mu\text{g/mL}$  的标准溶液  $10 \mu\text{L}$ , 振荡混匀后, 静置 2 h, 制得浓度为  $0.1 \text{ mg/kg}$  的加标样品, 然后按供试品溶液的处理方法进行操作, 计算含量及其相对标准偏差 (RSD)。结果 (见表 4) 表明方法重复性良好。

表 4 方法重复性实验结果

基质类型	添加水平 (mg/kg)	测得含量 (mg/kg)							RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	平均	
水基	0.1	0.111	0.109	0.110	0.107	0.106	0.108	0.109	1.6
油基	0.1	0.099	0.100	0.101	0.098	0.098	0.110	0.101	4.4
凝胶	0.1	0.105	0.106	0.114	0.109	0.103	0.105	0.107	3.5
霜	0.1	0.107	0.106	0.112	0.106	0.100	0.096	0.105	5.3
粉	0.1	0.107	0.104	0.111	0.103	0.105	0.110	0.107	3.2

### 5.8 精密度试验

#### 5.8.1 日内精密度试验

取液态水基类空白样品, 分别加入  $10 \mu\text{g/mL}$  的标准溶液 3、 $100 \mu\text{L}$ , 振荡混匀后, 静置 2 h, 制得浓度分别为  $0.03 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg}$  的加标样品, 然后按供试品溶液的处理方法进行操作, 制得低浓度精密度试验用供试品溶液和高浓度精密度试验用供试品溶液。连续进样 6 次, 计算含量及其 RSD。结果 (见表 5) 表明日内精密度良好。

表 5 日内精密度试验结果

编号	添加水平 (mg/kg)	
	0.03	1
1	0.0328	1.05
2	0.0298	1.10
3	0.0304	1.02
4	0.0336	1.05
5	0.0319	1.04
6	0.0334	1.03
平均	0.0320	1.05
RSD (%)	4.9	2.6

## 5.8.2 日间精密度试验

取液态水基类空白样品，分别精密加入 10  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液 5  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后，静置 2 h，制得浓度分别为 0.05 mg/kg、0.2 mg/kg 的加标样品，然后按供试品溶液的处理方法进行操作，进样测定。每个浓度每天制备 2 份溶液进行测定，共测定 4 天。计算测得含量平均值的 RSD。结果（见表 6）表明日间精密度良好。

表 6 日间精密度试验结果

添加水平	测得含量 (mg/kg)					RSD (%)
	1	2	3	4	平均	
0.05mg/kg	0.0529	0.0485	0.056	0.0506	0.0520	6.2
0.2mg/kg	0.206	0.203	0.222	0.200	0.2078	4.7

## 5.9 稳定性试验

## 5.9.1 日内稳定性试验

取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个不同基质的空白样品，分别加入 10  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液 10、100  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后，静置 2 h，制得浓度分别为 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的加标样品，然后按供试品溶液的处理方法进行操作。在一天内分数次进样测定，计算含量及其 RSD。结果（见表 7）供试品溶液在 24h 内基本保持稳定。

表 7 日内稳定性试验结果

基质	水基	油基	凝胶	霜	粉
----	----	----	----	---	---

类型										
时间 (h)	浓度 (mg/kg)		浓度 (mg/kg)		浓度 (mg/kg)		浓度 (mg/kg)		浓度 (mg/kg)	
	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1
0	0.110	1.06	0.104	1.06	0.102	1.04	0.106	1.07	0.108	1.07
4	0.102	1.05	0.099	1.07	0.098	1.01	0.098	1.10	0.104	1.08
8	0.104	1.01	0.104	1.05	0.105	1.05	0.108	1.03	0.105	1.02
13	0.107	1.04	0.102	1.05	0.106	1.01	0.103	1.05	0.105	1.04
18	0.107	1.04	0.101	1.05	0.106	1.02	0.100	1.03	0.101	1.03
24	0.106	1.02	0.103	1.04	0.104	1.03	0.105	1.03	0.105	1.03
平均值	0.106	1.04	0.102	1.05	0.103	1.03	0.104	1.05	0.105	1.05
RSD	2.8	1.6	2.0	1.1	2.9	1.5	3.5	2.7	2.2	2.5

### 5.9.2 日间稳定性试验

取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个不同基质的空白样品，分别加入 10 µg/mL 的标准溶液 10、100 µL，振荡混匀后，静置 2 h，制得浓度分别为 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的加标样品，然后按供试品溶液的处理方法进行操作。每天测定 1 次，计算含量及其 RSD。结果（见表 8）供试品溶液在 4 天内基本保持稳定。

表 8 日间稳定性试验结果

基质 类型	水基		油基		凝胶		霜		粉	
	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)	浓度 (mg/kg)
时间 (h)	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1
第 1 天	0.110	1.06	0.106	1.07	0.106	1.068	0.106	1.068	0.106	1.068
第 2 天	0.100	1.066	0.100	1.07	0.100	1.066	0.100	1.066	0.100	1.066
第 3 天	0.106	1.025	0.106	1.03	0.106	1.025	0.106	1.025	0.106	1.025
第 4 天	0.106	1.045	0.106	1.04	0.106	1.045	0.106	1.045	0.106	1.045
平均值	0.105	1.048	0.104	1.05	0.104	1.051	0.104	1.051	0.104	1.051
RSD	3.9	1.6	2.8	1.9	2.8	1.9	2.8	1.9	2.8	1.9

### 5.10 最低检出浓度 (LOD) 和最低定量浓度 (LOQ)

分别取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个基质的样品进行 LOD 和 LOQ 测定。取上述样品，分别精密加入不同量的丙烯酰胺，涡旋混匀后依法测定，计算 m/z 72.0 → m/z 55.0 的信噪比。结果在丙烯酰胺添加浓度为 0.01 mg/kg 时，信噪比约为 3（见图 4），在添加浓度为 0.03 mg/kg 时，信噪比约为 10。分别以信噪比为 3、10 时的浓度作为 LOD、LOQ，结果 LOD、LOQ 分别为 0.01 mg/kg、0.03 mg/kg。LOD、LOQ 满足《化妆品卫生规范》（2007 年版）的要求。

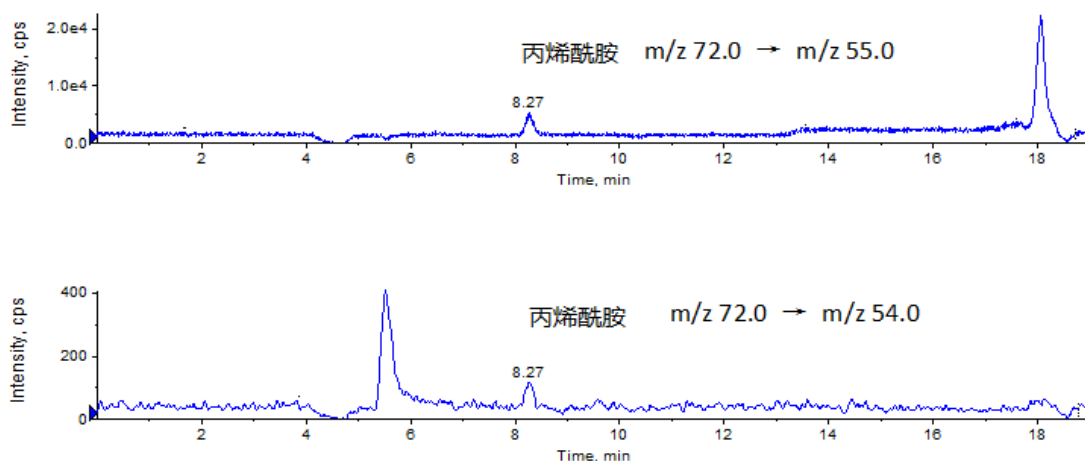


图4 加标样品 (0.01mg/kg) 典型 MRM 图

注：丙烯酰胺 m/z 72.0 → m/z 54.0 图谱经过平滑处理

### 5.11 准确度

取液态水基类、液态油基类、凝胶类、膏霜乳液类、粉类 5 个不同基质的空白样品，分别加入 10  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液 3、10、100  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后，静置 2 h，制得浓度分别为 0.03mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg 的加标样品，然后按供试品溶液的处理方法进行操作，以标准曲线计算回收率及其 RSD。结果（见表 9）回收率良好。

表 9 5 种基质的加标回收率结果

基质类型	添加水平 (mg/kg)	回收率 (%)							RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	平均	
水基	0.03	110.6	101.9	107.4	94.0	111.7	105.3	105.2	6.2
	0.1	111.4	108.9	109.6	107.4	106.3	108.1	108.6	1.6
	1	106.2	105.6	107.8	103.7	106.8	107.5	106.3	1.4
油基	0.03	96.7	107.0	94.5	100.6	104.5	95.8	99.8	5.1
	0.1	98.6	100.3	100.7	97.6	98.5	109.6	100.9	4.4
	1	111.7	105.2	110.1	107.0	110.0	108.5	108.7	2.2
凝胶	0.03	109.4	96.9	109.7	97.2	100.7	100.8	102.5	5.6
	0.1	105.4	106.0	113.7	109.3	103.3	105.0	107.1	3.5
	1	104.6	104.4	105.2	104.1	104.9	104.1	104.5	0.4
霜	0.03	112.2	91.8	105.9	92.7	101.0	90.2	98.9	9.0
	0.1	107.3	105.6	112.1	105.6	100.1	96.4	104.5	5.3
	1	104.1	103.6	105.3	102.0	103.0	102.7	103.4	1.1
粉	0.03	108.4	107.5	114.5	112.3	102.2	104.9	108.3	4.2
	0.1	107.4	104.2	111.4	102.8	105.2	110.4	106.9	3.2
	1	103.0	102.5	104.5	103.1	103.0	103.5	103.3	0.6

### 5.12 样品测定



利用本法，对 265 批包含上述 5 种基质的样品进行测定，结果：（1）滤过均不存在明显困难，个别样品的滤液较少，可装在内衬管中以满足进样要求；（2）由于丙烯酰胺的响应约为内标响应的 80%（见表 3），故可根据内标的响应判断丙烯酰胺在特定样品中的灵敏度；与标准溶液中内标的响应相比，所有样品中内标的响应均较好，故可判断 265 批样品中丙烯酰胺的灵敏度均符合要求；（3）28 批样品中检出丙烯酰胺，但均不大于 0.1 mg/kg（见表 10），另外 1 批面膜样品中检出含丙烯酰胺 8.0 mg/kg，超出限度要求；（4）经过试验表明，本法样品前处理操作简便、回收率高、色谱峰重现性好（见图 5）。

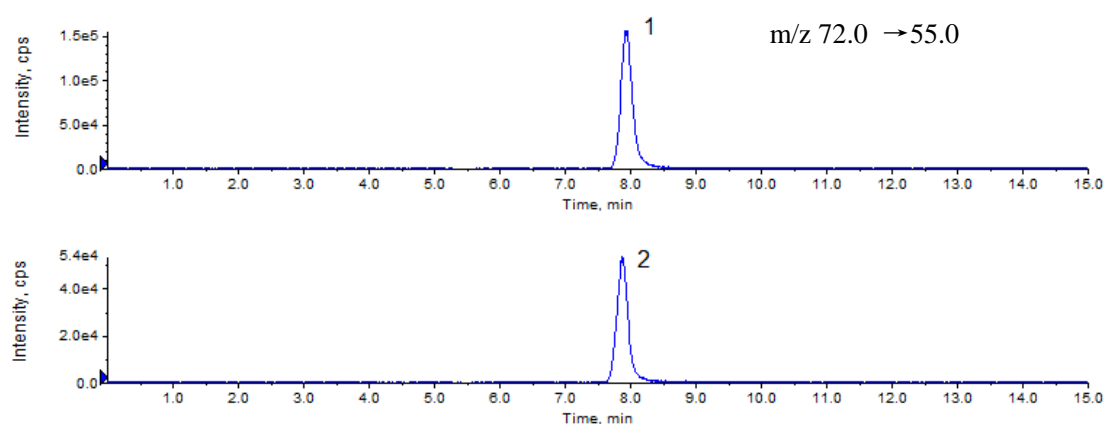


图 5 典型样品色谱图

1: 丙烯酰胺; 2: 内标

表 10 28 批样品测定结果

编号	样品名称	测得结果(mg/kg)
1	净化美白霜	0.085
2	橄榄精油嫩白沐浴露	0.084
3	润白洁面啫喱	0.091
4	修复晚霜	0.093
5	营养滋润霜	0.059
6	紧实眼袋眼霜	0.061
7	长翘睫毛膏	0.039
8	五色眼影	0.044
9	婴儿洗发沐浴露	0.015
10	婴儿柔嫩沐浴露	0.018
11	儿童防晒霜	0.053
12	美白洗面奶	0.056
13	婴儿泡泡浴露	0.046
14	美白精华液	0.089
15	婴儿沐浴露	0.096
16	儿童清凉沐浴露	0.057
17	幼嫩安敏低泡洗发沐浴露	0.076
18	紧致特润修护精华眼霜	0.064
19	浓密睫毛膏	0.038
20	花萃嫩白保湿洗颜霜	0.044
21	柔白清润洁面乳	0.054
22	美白保湿乳	0.052
23	薰衣草美白霜	0.034
24	珍珠粉面膜	0.063
25	透白乳液	0.069
26	修复晚霜	0.048
27	控油洗面奶	0.075
28	植物精华霜	0.071

### 5.13 其它化妆品基质类别的研究情况简介

化妆品中添加了以丙烯酰胺为合成单体的原料，从而不可避免地带有微量的丙烯酰胺的单体残留物，进而在化妆品中检出丙烯酰胺。可能会用到这些原料的化妆品主要有膏霜乳液类、液态水剂类及凝胶类样品，少数粉类样品及个别液态油基类样品。从历年日常监督的产品类型及基质（约 2000 余批次）来看，需要进行丙烯酰胺检验的样品一般也仅是针对膏霜乳液类、液态水剂类、凝胶类、粉类及液态油基类样品，并未涉及液态气雾剂类、液态有机溶剂类及蜡基类 3 类基质的样品。

本研究曾取液态气雾剂类、液态有机溶剂类及蜡基类 3 类化妆品样品同步进行了研究，但由于这 3 类样品的基质类型特殊，即使反复摸索（改变净化方法、调节流动相比例、更换色谱柱及优化质谱参数等），其检测灵敏度和回收率难以满足要求。

综上，本方法经研究验证，现将方法适用范围限定为膏霜乳液类、液态水剂类、凝胶类、粉类及液态油基类样品，可以适应普遍的实际检验需求。而液态气雾剂类、液态有机溶剂类及蜡基类 3 类基质由于上述原因未被纳入适用范围。

#### 5.14 验证结果评价

浙江省食品药品检验研究院、辽宁省药品检验检测院、广西壮族自治区食品药品检验所按照《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》(国食药监许[2010]455 号文)的要求分别对修订后的方法进行了验证。

结果表明，本方法在 0.02 mg/kg ~ 2 mg/kg 范围内线性关系良好，若取 1.0g 样品进行测定，本方法最低检出浓度为 0.01 mg/kg，最低定量浓度为 0.03 mg/kg。

经验证，该方法的特异性、最低检出浓度、线性范围、回收率、精密度、稳定性、重复性等各项指标均满足国食药监许[2010]455 号《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》要求。

关于丙烯酰胺子离子的选择，由于各子离子在不同厂家的液质联用仪中存在响应差异，广西所建议设定 m/z 27.0、m/z 44.0、m/z 54.0 作为参考定性离子，各实验室可根据实际情况选择定性离子以满足检测灵敏度的需要。我所同意采纳该意见。

表 11 3 家单位验证结果

验证单位	浙江院	辽宁院	广西所
线性	良好	良好	良好
重复性 (RSD, %)	0.8~1.4	1.4~2.6	0.7~1.2
日内精密度 (RSD, %)	0.5~0.6	1.1~2.1	0.6~0.8
日间精密度 (RSD, %)	1.2~2.2	0.8~1.8	0.7~2.6
日内稳定性 (RSD, %)	1.0~2.1	0.8~3.6	0.3~1.6
日间稳定性 (RSD, %)	0.4~2.9	1.0~2.9	0.6~2.2
回收率 (%)	90.5~100.4	95.0~116.7	97.9~99.2
最低检出浓度 (mg/kg)	符合要求	符合要求	符合要求

#### 参考文献

- [1] 《化妆品卫生规范》(2007 年版): 65
- [2] 李宏亮, 詹铭, 蒋志华, 等. 固相萃取-衍生化-气相色谱法测定化妆品中丙烯酰胺. 中国卫生检验杂志, 2012, 22 (7) : 1449-1501
- [3] 郭新东, 洗燕萍, 杜志峰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定化妆品中丙烯酰胺. 日用化学工业, 2009, 39 (4): 294~296

- [4] 金薇, 李薇, 江文明, 等. 液相色谱-串联质谱法测定化妆品中丙烯酰胺单体残留量, 药物分析杂志, 2010, 30 (10): 1887~1890
- [5] 马强, 王超, 白桦, 等. 同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定化妆品中残留的丙烯酰胺, 色谱, 2009, 27 (6): 856~859
- [6] 国食药监许[2011]96号文附件 1
- [7] GB/T 29659-2013
- [8] E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou, *et al.* Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 559: 207-214
- [9] Eden Tareke, Per Rydberg, Patrik Karlsson, *et al.* Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50: 4998-5006