



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

化妆品中乙酰胆碱及其盐类的测定 液相 色谱-串联质谱法

Determination of acetylcholine and its salts in cosmetics by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中华人民共和国国家市场监督管理总局

发布

中国国家标准化管理委员会

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。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国香料香精化妆品标准化技术委员会（SAC/TC 257）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

本文件的被测物质是我国《化妆品安全技术规范（2015年版）》规定的禁用原料。

禁用原料是指不得作为化妆品原料使用的物质。《化妆品安全技术规范（2015年版）》规定：若技术无法避免禁用物质作为杂质带入化妆品时，国家有限量规定的应符合其规定；未规定限量的，应进行安全性风险评估，确保在正常、合理及可预见的使用条件下不得对人体健康产生危害。

目前我国尚未规定这些物质的限量值，本文件的制定，仅对化妆品中测定这些物质提供检测方法。

化妆品中乙酰胆碱及其盐类的测定 液相色谱-串联质谱法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题，使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件描述了化妆品中禁用物质乙酰胆碱及其盐类的液相色谱-串联质谱测定方法的原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤、试验数据处理、回收率及精密度等内容。

本文件适用于水剂类、膏霜类、乳液类和精油类化妆品中乙酰胆碱及其盐类的测定。

本文中乙酰胆碱及其盐类（以乙酰胆碱计）的检出限为0.05 mg/kg，定量限为0.1 mg/kg。

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 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 原理

试样经超声辅助溶剂萃取，正己烷除脂，离心过滤后，以液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯。

5.1 水，GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 乙酸：色谱纯。

5.4 正己烷：色谱纯。

5.5 乙酸铵：分析纯。

5.6 乙酰胆碱标准物质：分子式 $C_7H_{16}NO_2$ ，CAS 号 51-84-3，相对分子质量 146.2，纯度均不小于 99.0%，化学结构式见附录 A 中图 A.1。

5.7 50%乙腈-水：量取 25 mL 乙腈（5.2）置于 50 mL 容量瓶中，加入 25 mL 水并定容至刻度，得到 50%乙腈-水（体积分数）。

5.8 乙酰胆碱标准储备液（100 mg/L）：用分析天平（6.2）称取乙酰胆碱标准物质（5.6）0.010 g（精确至 0.0001 g）至 100 mL 容量瓶（6.6）中，用 50%乙腈-水（5.7）溶解并定容至刻度，于 4 °C 避光保存，可使用三个月。

5.9 具塞聚四氟乙烯塑料离心管：15 mL。

5.10 微孔滤膜：0.22 μm，有机相。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）仪：配电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量为 0.001 g 和 0.000 1 g。

6.3 超声波清洗器：功率不低于 400 W/40 kHz。

6.4 离心机：转速不低于 8 000 r/min。

6.5 具塞比色管：10 mL。

6.6 容量瓶：100 mL。

7 试验步骤

7.1 样品处理

7.1.1 水剂类样品

称取 0.5 g（精确至 0.001 g）试样，置于 10 mL 具塞比色管（6.5）中，加入 2 mL 50%乙腈-水（5.7），涡旋分散均匀，继续加入 8 mL 50%乙腈-水（5.7），在超声波清洗器（6.3）中超声提取 20 min，冷却至室温；将样液转移至 15 mL 具塞聚四氟乙烯塑料离心管（5.9）中，8 000 r/min 离心 10 min，取部分上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜（5.10）过滤后，滤液供上机测定。

7.1.2 膏霜、乳液和精油类样品

称取 0.5 g（精确至 0.001 g）试样，置于 10 mL 具塞比色管（6.5）中，加入 2 mL 50%乙腈-水（5.7），涡旋分散均匀，再加入 2 mL 正己烷（5.4）和 8 mL 50%乙腈-水（5.7），涡旋振荡 1 min，在超声波清洗器（6.3）中超声提取 20 min，冷却至室温；弃去上层正己烷，吸取下层样液至 15 mL 具塞聚四氟乙烯塑料离心管（5.9）中，8 000 r/min 离心 10 min，经 0.22 μm 微孔滤膜（5.10）过滤后，滤液供上机测定。

7.1.3 平行试验

平行做两份试验。

7.2 测定条件

7.2.1 液相色谱参考工作条件

液相色谱参考工作条件如下：

- a) 色谱柱：HILIC 柱，1.7 μm，100 mm × 2.1 mm（内径），或相当者；
- b) 流动相：A - 10 mM 乙酸铵水溶液（含 0.1% 乙酸）；B - 乙腈；梯度洗脱：0 ~ 2 min，95%B；2 ~ 4 min，95%B ~ 60%B；4 ~ 6 min，60%B；6 ~ 6.1 min，60%B ~ 95%B；6.1 ~ 8 min，95%B；

- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- e) 进样量：2 μ L；

7.2.2 质谱参考工作条件

质谱参考工作条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 毛细管电压：3.2 kV；
- d) 锥孔电压：28.0 V；
- e) 离子源温度：150 °C；
- f) 脱溶剂气：氮气，流速 1000 L/h，温度 500 °C；
- g) 锥孔气：氮气，流速 50 L/h；
- h) 碰撞气：氩气；
- i) 扫描模式：多反应监测；
- j) 乙酰胆碱及其盐类的保留时间、母离子、子离子、锥孔电压和碰撞能量参数见表1。

表 1 乙酰胆碱及其盐类的保留时间及质谱分析参数

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
乙酰胆碱 及其盐类	4.9	146	87*, 60	28	15, 10
* 定量离子					

7.3 标准工作曲线的绘制

用 50% 乙腈-水（5.7）将乙酰胆碱标准储备液逐级稀释得到浓度为 200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL 和 5 ng/mL 的标准工作溶液，按 7.2 测定条件浓度由低到高进样测定，以浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标作图，得到标准工作曲线回归方程。

7.4 测定

按 7.2 测定条件对待测样液进行测定，如果检出乙酰胆碱的色谱峰的保留时间与标准品相一致（偏差在 $\pm 2.5\%$ 之间），并且在扣除背景后的样品质谱图中定性离子和定量离子均出现，而且其相对丰度与浓度相近的标准品进行比较，相对标准偏差不超过表 2 的规定，可判定试样中含有乙酰胆碱或其盐类。记录定量离子色谱峰的面积，以外标法定量。试样中乙酰胆碱及其盐类的响应值（以乙酰胆碱计）应在标准曲线范围之内，超出线性范围可用 50% 乙腈-水（5.7）稀释后进行测定。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 $k/\%$	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
允许的最大偏差/ $\%$	± 20	± 25	± 30	± 50

乙酰胆碱标准溶液的液相色谱-选择离子质量色谱图参见附录 A 中图 A.2。

7.5 空白试验

除不称取样品外，均按上述测定条件和步骤进行。

8 结果计算

试样中乙酰胆碱及其盐类的含量，按式（1）计算：

$$w = \frac{(\rho - \rho_0) \times V}{m \times 1000} \times k \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- w —— 试样中乙酰胆碱及其盐类的含量（以乙酰胆碱计），单位为毫克每千克（mg/kg）；
 - ρ —— 从标准工作曲线上得到的试样溶液中乙酰胆碱的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 - ρ_0 —— 从标准工作曲线上得到的空白溶液中乙酰胆碱的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 - 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）；
 - k —— 超过线性范围的稀释倍数；
- 计算结果表示到小数点后两位。

9 回收率

在添加浓度为0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg的范围内，回收率在80% ~ 115%之间。

10 精密度

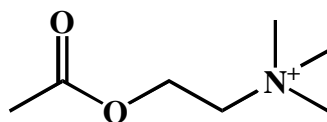
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

附录 A

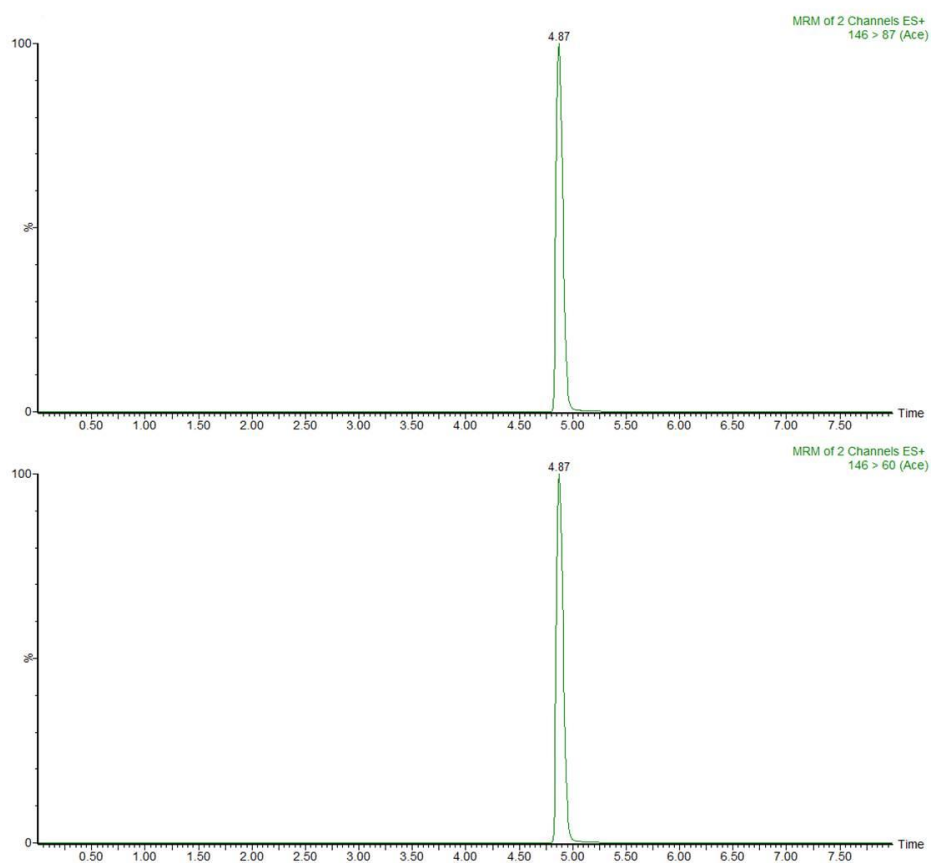
(资料性)

乙酰胆碱的化学结构式、乙酰胆碱标准溶液的选择离子质量色谱图

乙酰胆碱的化学结构式见图A.1。乙酰胆碱标准溶液的选择离子质量色谱图见图A.2。



图A.1 乙酰胆碱的化学结构式



图A.2 乙酰胆碱标准溶液的选择离子质量色谱图