



中华人民共和国国家标准

GB/T xxxx—xxxx

化妆品中秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的 测定

液相色谱-质谱/质谱法

Simultaneous determination of colchicine and its derivative
demecolcine

in cosmetics— Liquid chromatography— mass /mass spectrography

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

国家市场监督管理总局
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：深圳海关食品检验检疫技术中心、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：

引 言

本标准的被测物质中秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺是我国《化妆品安全技术规范（2015年版）》规定的禁用物质。

禁用物质是指不能作为化妆品生产原料即组分添加到化妆品中的物质。《化妆品安全技术规范（2015年版）》规定：若技术上无法避免禁用物质作为杂质带入化妆品时，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，本标准的制定，仅对化妆品中测定这些物质提供检测方法。

化妆品中秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了化妆品中秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的高效液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于水基、乳液、膏霜、凝胶、蜡基、粉基类等化妆品中秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的测定。

本标准的方法检出限：秋水仙碱、秋水仙胺均为10 µg/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，仅所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 试验方法

3.1 原理

样品经提取液超声提取、离心后，用液相色谱串联质谱法测定和确证，外标法定量。

3.2 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。

3.2.1 甲醇：色谱纯。

3.2.2 乙腈：色谱纯。

3.2.3 无水乙醇：色谱纯。

3.2.4 正己烷：色谱纯。

3.2.5 乙酸铵：色谱纯。

3.2.6 乙酸铵。

3.2.7 甲酸：色谱纯。

3.2.8 甲醇乙腈溶液：移取 500mL 甲醇（3.2.1）至 1000mL 容量瓶中，用乙腈（3.2.2）定容至刻度，混匀备用。

3.2.9 正己烷饱和甲醇乙腈溶液：量筒分别量取 100mL 正己烷（3.2.4）和 400mL 甲醇乙腈溶液（3.2.8）置于试剂瓶中振摇静置分层，除去上层正己烷，下层即为正己烷饱和甲醇乙腈溶液。

3.2.10 5 mmol乙酸铵溶液（含0.1%甲酸）：准确称取0.3854g乙酸铵（3.2.5），加入800 mL水溶解，加入1mL甲酸（3.2.7），转移至1000 mL容量瓶中，用水定容至刻度。

3.2.11 标准物质：秋水仙碱、秋水仙胺中文名称、英文名称、CAS号、分子式、结构式、相对分子质量参见附录A表A.1，纯度不小于95%。

3.2.12 标准储备液：准确称取适量各标准物质（3.2.11）分别置于50 mL容量瓶中，用无水乙醇（3.2.3）溶解并定容至刻度，分别配制成浓度为100 mg/L的标准储备液，于-30℃下保存，有效期6个月。

3.2.13 混合标准溶液的配制：分别准确移取1 mL标准储备液（3.2.12）至100 mL的容量瓶中，用甲醇溶液（3.2.1）定容至刻度，配制成浓度为1 mg/L的混合标准溶液，于-30℃下保存，有效期1个月。

3.3 仪器和设备

3.3.1 液相色谱-串联质谱仪（LC-MS/MS）：配有电喷雾离子源（ESI）。

3.3.2 离心机：转速不低于9500 r/min。

3.3.3 电子天平：感量为0.0001 g和0.001 g。

3.3.4 涡旋混合器。

3.3.5 超声波清洗器。

3.3.6 有机系微孔滤膜：0.22 μm。

3.3.7 容量瓶：10mL、50 mL、100 mL、1000mL。

3.3.8 具塞离心管：15mL、50mL。

3.4 分析步骤

3.4.1 样品溶液制备

3.4.1.1 水基、乳液、凝胶、粉基类样品的制备

称取试样约1 g（精确至0.001 g）样品于10 mL容量瓶中，用正己烷饱和甲醇乙腈溶液（3.2.9）定容至刻度，涡旋混匀，超声提取15 min；转移至15mL具塞离心管中，以9500 r/min离心5 min，取上清液5.0 mL于10mL容量瓶中，用水定容至刻度，混匀；取5.0 mL至15 mL离心管中，加入5.0 mL正己烷，涡旋，以9500 r/min离心5 min，弃去上层正己烷后，移取1.0 mL下层清液，过微孔滤膜（3.3.6），待测定。

3.4.1.2 膏霜类样品的制备

称取试样约1 g（精确至0.001 g）样品于10 mL容量瓶中，加入0.2 g乙酸铵（3.2.6），用正己烷饱和甲醇乙腈溶液（3.2.9）定容至刻度，涡旋混匀，超声提取15 min；转移至15 mL具塞离心管中，以9500 r/min离心5 min，取上清液5.0 mL于10 mL容量瓶中，用水定容至刻度，混匀；取5.0 mL至15 mL离心管中，加入5.0 mL正己烷，涡旋，以9500 r/min离心5 min，弃去上层正己烷后，移取1.0 mL下层清液，过微孔滤膜（3.3.6），待测定。

3.4.1.3 蜡基类样品的制备

称取试样约 1 g (精确至 0.001 g) 样品于 50 mL 具塞离心管中, 准确加入 5 mL 正己烷 (3.2.4), 涡旋均匀后准确加入 10 mL 正己烷饱和甲醇乙腈 (3.2.9), 涡旋混匀, 超声提取 15 min; 以 9500 r/min 离心 5 min, 取下清液 5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀; 转移至 15 mL 具塞离心管中, 以 9500 r/min 离心 5 min, 移取 1.0 mL 下层清液, 过微孔滤膜 (3.3.6), 待测定。

3.4.2 液相色谱参考条件

液相色谱分析条件参考如下:

- 色谱柱: C₁₈ 柱, 2.1×100mm, 1.7μm, 或其他效果等同的色谱柱;
- 流动相: A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸) (3.2.10), B: 甲醇 (3.2.1);
- 流速: 0.300 mL/min;
- 柱温: 40 °C;
- 进样量: 5μL;
- 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱流动相及参考分离条件

时间/min	A/%	B/%
0	90	10
6	5	95
6.5	90	10
10	90	10

3.4.3 串联质谱参考条件

- 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式;
- 数据采集: 多反应监测 (MRM), 质谱参数参见表 2;
- 离子化温度: 310°C;
- 辅助气流速: 12 L/min;
- 喷雾器温度: 330°C;
- 鞘气流速: 40 L / min;
- 电喷雾电压: 3500 V;
- 碰撞气: 氩气, 1.5 mTorr。

表 2 化合物的母离子及定量定性离子、碰撞电压和射频电压

化合物名称	英文名	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞电压 (V)	射频电压 (V)
秋水仙胺	demecolcine	372.21	310.04*	20	167
		372.21	341.11	16	167
秋水仙碱	colchicine	400.21	358.11*	21	185
		400.21	310.04	25	185

注: *为定量离子

3.4.4 混合标准工作溶液的制备

取相应的空白样品,按照 3.4.1 步骤进行处理,用得到的空白样品提取液将混合标准溶液(3.2.13)逐级稀释得到秋水仙碱、秋水仙胺浓度为0.500 $\mu\text{g/L}$ 、1.00 $\mu\text{g/L}$ 、3.00 $\mu\text{g/L}$ 、5.00 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作溶液,浓度由低到高进行检测,以定量离子峰面积对质量浓度作图,做出标准曲线回归方程。

3.4.5 测定步骤

按照 3.4.1 步骤对样品溶液进行测定。样品溶液中各组分的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样测定。

3.4.6 定性判定

在相同条件测定样品溶液和标准溶液,如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准溶液中的某种组分的保留时间一致(变化范围在 $\pm 2.5\%$),并且所选择的两对子离子的质荷比一致,样品溶液中定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液中定性离子的相对丰度进行比较时,相对偏差不超过表3规定的范围,则可判断样品中存在该组分。

秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的定量离子与定性离子色谱图参见附录B图B.1- B.4。

表 3 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

3.5 空白试验

除不加试样外,均按上述测定条件和步骤进行。

4 结果计算

试样中待测组分含量按式(1)计算,计算结果保留小数点后两位。

$$X_i = \frac{C_i \times V \times K}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_i ——样品中待测组分含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$)

C_i ——由标准曲线得出的测试液中某种组分的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)

V ——定容体积,单位为毫升(mL)

K ——稀释倍数

m ——样品质量,单位为克(g)

5 回收率与精密度

在添加浓度 $10.0\mu\text{g/L}$ ~ $100\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内，回收率在71.6%~106%之间，相对标准偏差在1.32%~7.43%之间。

6 允许差

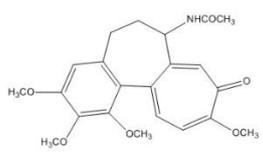
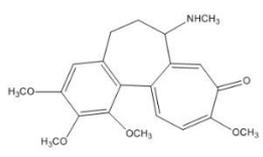
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

附录 A

(资料性附录)

秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、结构式及相对分子质量参见表 A.1。

表 A.1 秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、结构式及相对分子质量

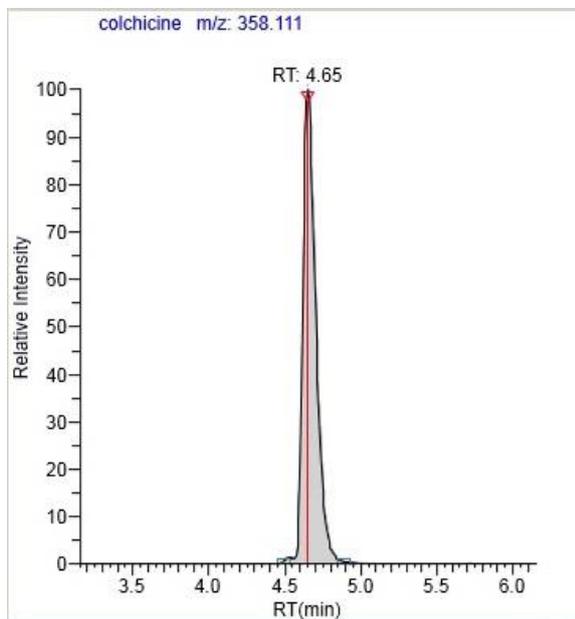
序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	结构式	相对分子质量
1	秋水仙碱	Colchicine	64-86-8	$C_{22}H_{25}NO_6$		399.44
2	秋水仙胺	Demecolcine	477-30-5	$C_{21}H_{25}NO_5$		371.43

附录 B

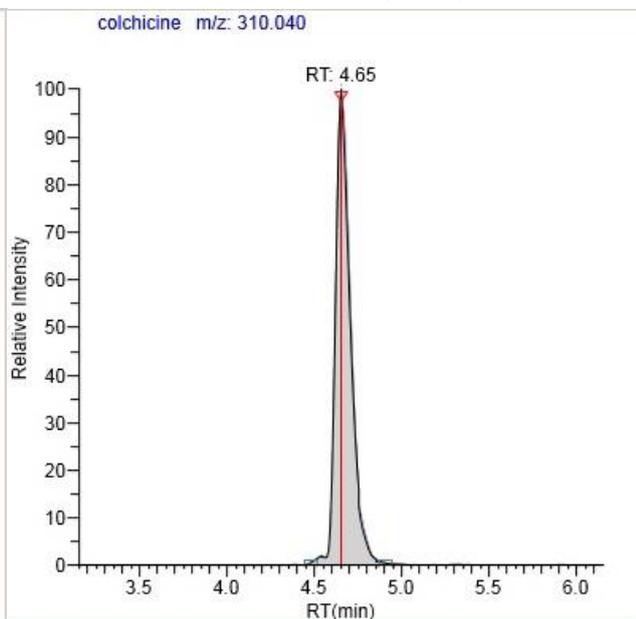
(资料性附录)

标准物质选择离子质量色谱图

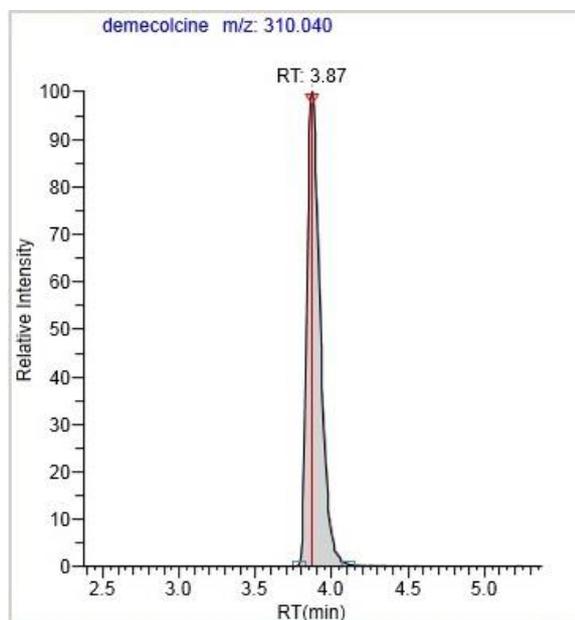
秋水仙碱及其衍生物秋水仙胺标准物质选择离子质量色谱图参见图B. 1； B. 2； B. 3； B. 4



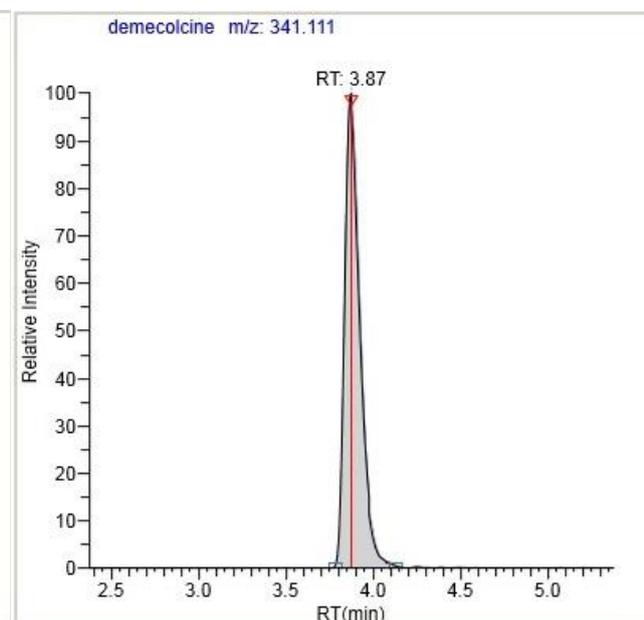
图B. 1秋水仙碱标准物质定量离子质量色谱图



图B. 2秋水仙碱标准物质定性离子质量色谱图



图B. 3秋水仙胺标准物质定量离子质量色谱图



图B. 4秋水仙胺标准物质定性离子质量色谱图