

高效液相色谱法同时测定化妆品中的 9 种水溶性着色剂

孙小颖*, 李英, 刘丽, 张琛, 李彬, 梁通雯

(深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518045)

摘要:建立了用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)同时检测化妆品中 9 种水溶性着色剂(溶剂绿 7、食品黄 3、食品红 17、酸性黄 1、酸性红 33、食品红 4、食品红 1、橙黄、酸性橙 7)的检测方法。不同种类的化妆品采用不同的样品前处理方法提取后,用 Diamonsil C18 色谱柱分离,以乙腈-磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 6)为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 240 nm, 15 min 内可对 9 种目标物同时进行检测,且各化合物都达到基线分离。经测定,该方法的平均回收率(n = 9)为 85.33% ~ 100.2%, 相对标准偏差(RSD)为 3.68% ~ 8.20%, 检出限为 0.01 ~ 0.1 mg/L。方法简单、快速,能有效地提取、分离和测定化妆品中 9 种水溶性着色剂。将该方法用于实际化妆品的检测,结果令人满意。

关键词:高效液相色谱法;二极管阵列检测;水溶性着色剂;化妆品

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2009)06-0852-04 **栏目类别:** 技术与应用

Simultaneous determination of 9 water-soluble colorants in cosmetics by high performance liquid chromatography

SUN Xiaoying*, LI Ying, LIU Li, ZHANG Chen, LIB in, LIANG Tongwen

(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: An analytical method based on high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) has been established for the simultaneous determination of 9 water-soluble colorants (Solvent Green 7, Food Yellow 3, Food Red 17, Acid Yellow 1, Acid Red 33, Food Red 4, Food Red 1, Orange, Acid Orange 7) in cosmetics. The different kinds of samples were treated with different preparation methods. The obtained liquid samples were analyzed by HPLC using a Diamonsil C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) buffer solution (pH 6) was used as the mobile phase for gradient elution. The 9 water-soluble colorants were well separated within 15 min. The average recoveries (n = 9) were from 85.33% to 100.2% with the relative standard deviations (RSDs) between 3.68% and 8.20%. The limits of detection (LOD) were in the range of 0.01 - 0.1 mg/L. The method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of 9 water-soluble colorants in cosmetics.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); diode array detection (DAD); water-soluble colorants; cosmetics

在很多化妆品尤其是彩妆产品(如唇膏、胭脂、眼影、睫毛膏等)中大量使用了着色剂。化妆品中使用的着色剂多数是合成染料,长期或过量使用会对人体健康产生潜在的危害,如有的着色剂会引起人的过敏反应,有的着色剂会引起眼睛、口腔等器官发炎,还有的着色剂能透过皮肤被人体吸收,有明显的致突变作用,长期使用此类产品甚至可以诱发癌症。因此,世界上很多国家如美国、日本以及欧盟等

纷纷立法对化妆品中着色剂的用量加以限制。我国 GB 7916-87《化妆品卫生标准》中也规定了化妆品成分中暂用着色剂的种类、允许的使用范围及限制条件。本文测定的 9 种水溶性着色剂均为《化妆品卫生标准》中的暂用着色剂。

目前,国内外有采用高效液相色谱-紫外可见检测法(HPLC-UV)^[1-4]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[4]及高效液相色谱-二极管阵列检

*通讯联系人: 孙小颖, 硕士, 主要从事色谱方面的研究。Tel: (0755) 83886194, E-mail: gracesxy@126.com.

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科研项目(SZK17-2004).

收稿日期: 2009-03-19

测法 (HPLC-DAD)^[5-9] 检测化妆品中着色剂的文献报道,且大多采用固相萃取^[9,10]、薄层色谱法^[11,12]、微波萃取法^[13]等样品前处理方法。但尚未见国内外同时检测本文所述的 9 种水溶性着色剂的相关文献及成果的报道。本文根据化妆品的种类和基体的复杂程度,采用液-液萃取、超声萃取等更为简单易行的不同样品前处理方法提取后,用 HPLC-DAD 对 9 种目标物同时进行检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

漩涡混合仪 (MS2, 德国 Heidolph 公司), 离心机 (ROTINA35, 德国 HETTICH 公司), pH 计 (DELTA320A, 瑞士梅特勒公司), 纯水机 (Synergy UV, 美国 Millipore 公司), 高效液相色谱仪 (1200HPLC, 美国 Agilent 公司), 配 G1329A 自动进样器和 G1315C 二极管阵列检测器。

分析纯三氯甲烷 (用于样品溶解或分散) 由广州化学试剂厂提供; 色谱纯乙腈 (用于色谱分析) 由美国 Fisher 公司提供; 分析纯氢氧化钠 (用于调节 pH 值) 由广州化学试剂厂提供; 分析纯磷酸二氢钾 (用于配制缓冲溶液) 由汕头市化学试剂厂提供; 分析纯醋酸及醋酸铵 (用于配制缓冲溶液) 均由国药集团化学试剂有限公司提供; 水为去离子水, 由美国 Millipore Synergy UV 纯水机制得。9 种着色剂标准品: 溶剂绿 7 (Solvent Green 7)、食品黄 3 (Food Yellow 3)、食品红 17 (Food Red 17)、酸性黄 1 (Acid Yellow 1)、酸性红 33 (Acid Red 33)、食品红 4 (Food Red 4)、食品红 1 (Food Red 1)、橙黄 (Orange)、酸性橙 7 (Acid Orange 7)。

样品: 市售各类化妆品包括口红、眼影、腮红、粉饼、化妆水、卸妆液等各类国内外化妆品 49 种。

1.2 标准溶液、工作溶液及缓冲溶液的配制

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取一定量的上述 9 种着色剂标准品, 分别用去离子水配制 1 g/L 水溶液。避光保存。

1.2.2 工作溶液的配制

准确称取一定量的上述 9 种着色剂标准品, 分别用去离子水配制成一定浓度的标准储备液。吸取适量的标准储备溶液, 配制成适当浓度的工作溶液。

1.2.3 磷酸二氢钾缓冲溶液的配制

称取 2.0 g 磷酸二氢钾置于烧杯中, 加水溶解并定容至 1 000 mL, 用 10 g/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6。

所用溶剂和溶液分析前过 0.45 μm 滤膜并用超声脱气。

1.3 样品前处理方法

1.3.1 唇膏等蜡状样品

准确称取 0.1~0.5 g 唇膏样品均匀地涂于 50 mL 旋盖离心管中, 加入 10 mL 三氯甲烷, 旋紧管盖, 用漩涡混合仪将样品溶解或分散均匀, 再加入 10 mL 水, 经漩涡混合仪混匀后高速离心, 取上层清液过 0.45 μm 滤膜后供 HPLC 分析。

1.3.2 粉饼、眼影等粉状样品

称取样品 0.1~2.0 g 于 50 mL 旋盖离心管中, 加入甲醇-水 (体积比为 1:1) 10 mL, 置于超声波清洗器中超声, 水浴 (70 ℃) 提取 15 min 后离心 (2 300 r/min) 10 min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜后待测。

1.3.3 漱口水、眼部化妆去除液等液体样品

该类样品过 0.45 μm 滤膜后直接测定。

1.4 HPLC 测定条件

色谱柱: Diamonsil C18 柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL; 检测波长 240 nm; 流动相: 乙腈 (A) 和磷酸二氢钾缓冲溶液 (pH 6) (B); 流速 1.0 mL/min; 台阶梯度洗脱程序: 0~5.0 min, 78% A; 5.0~8.0 min, 78% A 线性降至 55% A; 8.0~12.0 min, 55% A; 12.0~17.0 min, 55% A 线性降至 25% A; 17.0~22.0 min, 25% A。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

9 种目标化合物都是水溶性的钠盐化合物, 其化学性质相似。为了能够在最短的时间内达到基线分离, 以 C18 柱为分离柱, 分别以甲醇-磷酸二氢钾缓冲液、乙腈-磷酸二氢钾缓冲液体系作流动相对 9 种目标物的分离效果进行了考察。结果表明乙腈-磷酸二氢钾缓冲液体系对混合标准品的分离最有利。同时还对缓冲溶液的 pH 值为 4, 5, 6, 7 时的灵敏度及分离情况进行考察, 发现当 pH 值为 6 时, 灵敏度及分离效果均最好。故最终确定流动相为乙腈-磷酸二氢钾缓冲溶液 (pH 6)。在此条件下, 9 种着色剂混合标准溶液的色谱图见图 1。

2.2 样品前处理条件的选择

2.2.1 唇膏等蜡状样品

由于唇膏基体多是脂溶性的, 易溶于有机溶剂, 而 9 种待测物为水溶性的, 为了减少操作步骤, 获得尽可能高的提取效率, 且有效避免唇膏基体等其他杂质的干扰, 采取用有机溶剂溶解或分散样品后再用水作萃取溶剂的液-液萃取方式对样品进行前处理。比较了甲醇、甲醇-水、三氯甲烷、正己烷、四氢呋喃、环己烷等提取溶剂对实际唇膏样品的溶解或分散情况。结果表明, 只有三氯甲烷不仅能完全溶

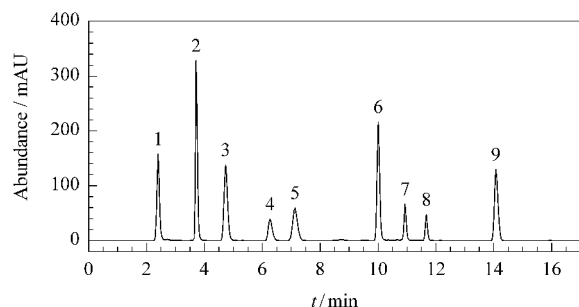


图 1 9种着色剂混合标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the mixed standard solution of 9 water-soluble colorants

Peaks: 1. Solvent Green 7; 2. Food Yellow 3; 3. Food Red 17; 4. Acid Yellow 1; 5. Acid Red 33; 6. Food Red 4; 7. Food Red 1; 8. Orange I; 9. Acid Orange 7.

解或分散唇膏样品,且密度比水大而与不互溶,离心后水萃取层在上层,可有效避免其他杂质对测定造成的干扰,从而达到液液萃取的目的,因此,本文最终选用三氯甲烷作唇膏样品的提取溶剂。

此外,还对萃取溶剂(水)的体积进行了优化,实验结果表明,水萃取体积在 5~15 mL 范围内,提取效率基本一致。但是考虑到唇膏中的基质主要由蓖麻油、酯类等脂蜡组成,且不同品牌的唇膏脂蜡组成不同,造成其密度、致密性、黏度等不同,经三氯甲烷溶解、分散后,为了能完全萃取唇膏中的着色剂,我们选用 5~15 mL 的中间体积 10 mL。

2.2.2 粉饼、眼影等粉状样品

对于粉状样品采用超声方式对样品进行提取,分别考察了乙醇、甲醇、三氯甲烷、正己烷、四氢呋喃、乙腈、异丙醇、异丙醇水、乙醇水、乙腈水、甲醇水以及四氢呋喃水等多种提取溶剂对含有着色剂食品红 4 的阳性眼影实际样品测定结果的影响。结果表明,甲醇水(体积比为 1:1)、四氢呋喃水(体积比为 1:1)体系的待测物峰面积最大,且两者提取效率相当。考虑到四氢呋喃毒性较大,最终选择甲醇水(体积比为 1:1)为最佳提取溶剂。

对同一阳性眼影样品用超声方式进行提取,优化提取温度和提取时间,发现在 70 °C 下提取 15 min 时的效果最好。

2.3 方法的线性关系和检出限

分别配制 9 种着色剂 11 个不同质量浓度(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L)的混合工作溶液,在最佳实验条件下进行分析,以质量浓度 X (mg/L) 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线。实验结果表明,在 0.05~100.0 mg/L 范围内,9 种着色剂的质量浓度与相应的峰面积呈良好的线性关系。线性方程、相关系数和方法的检出限见表 1。

表 1 9种水溶性着色剂的线性方程、相关系数及检出限
Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r) and limits of detection (LODs) of 9 water-soluble colorants

Analyte	Regression equation [*]	r	LOD / (mg/L)
Solvent Green 7	Y = 35.438X + 2.9362	0.9999	0.01
Food Yellow 3	Y = 55.194X + 4.9499	0.9999	0.01
Food Red 17	Y = 45.334X - 2.5019	0.9999	0.01
Acid Yellow 1	Y = 15.344X - 2.821	0.9996	0.05
Acid Red 33	Y = 29.645X - 2.7084	0.9998	0.05
Food Red 4	Y = 54.739X - 5.823	0.9997	0.01
Food Red 1	Y = 13.367X - 4.8234	0.9986	0.05
Orange	Y = 10.316X - 7.0278	0.9976	0.1
Acid Orange 7	Y = 43.172X - 3.3054	0.9999	0.01

* Y: peak area; X: mass concentration, mg/L; linear range: 0.05 - 100.0 mg/L for each analyte.

2.4 精密度与回收率

采用在空白样品中加标的方法进行精密度和回收率试验。称取空白样品(膏状、固态、水剂各 1 种) 0.5 g, 分别加入质量浓度为 5, 50, 500 mg/L 3 个添加水平的 9 种着色剂混合标准溶液 1 mL, 充分混匀, 按照 1.3 节所述方法处理后上机测定, 每个添加水平下的每个样品平行测定 3 次, 其回收率为 85.33%~100.2%, 相对标准偏差为 3.68%~8.20%。

2.5 实际样品的检测

采用本方法对 49 种国内外各类化妆品进行测定, 其中有 4 种样品检出食品红 17, 其他各类化妆品未检出所测 9 种目标物。图 2 为其中一种阳性眼影样品的色谱图及相关光谱图。

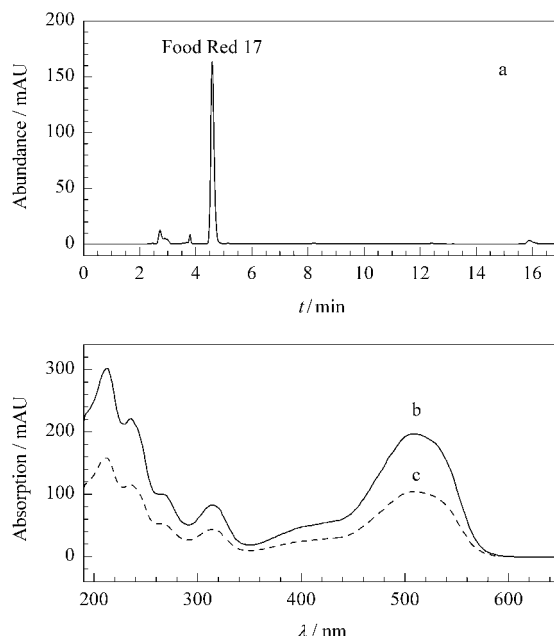


图 2 (a)食品红 17 阳性样品的色谱图、(b)阳性样品中食品红 17 的光谱图及 (c)食品红 17 标准品的光谱图

Fig. 2 (a) Chromatogram of a positive sample and spectra of (b) Food Red 17 in a positive sample and (c) standard solution

3 结语

本文建立了化妆品中 9 种水溶性着色剂同时测定的 HPLC 方法。通过对实验条件进行选择和优化,确定了色谱条件,在 15 min 内 9 种目标物可完全达到基线分离。方法的线性相关系数、回收率、相对标准偏差等各项参数表明,方法的灵敏度和精确度均满足实际样品检测的需要。通过对 3 种状态、不同品牌的化妆品进行检测,在粉状眼影中检出着色剂食品红 17;其他种类的化妆品均未检出所测 9 种目标物。该方法的样品前处理技术简单易行,分析快速,对化妆品中 9 种水溶性着色剂能有效地提取、分离和测定,结果良好。

参考文献:

- [1] Wegener J W, Klammer J C, Govers H, et al. Chromatographia, 1987, 24: 865
- [2] Wegener J W M, Grönbauer H J M, Fordham R J, et al. J Liq Chromatogr, 1984, 7(4): 809
- [3] Ge B K, Chen Q Y, Zhao K X, et al. Journal of Environment and Health (葛宝坤, 陈其勇, 赵孔祥, 等. 环境与健康杂志), 2007, 24(11): 917
- [4] Noguero I Cal R, López Vilariño J M, Fernández Martínez G, et al. J Chromatogr A, 2008, 1179: 152
- [5] Wu K S, Wu A B, Huang M C, et al. Journal of Food and Drug Analysis, 1999, 7(2): 95
- [6] Chen J, Wang C, Wang X, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈娟, 王超, 王星, 等. 色谱), 2007, 25(6): 867
- [7] Rastogi S C, Barwick V J, Carter S V. Chromatographia, 1997, 45: 215
- [8] Lu J, Li M H. Flavour Fragrance Cosmetics (卢剑, 郦明浩. 香料香精化妆品), 2008(1): 20
- [9] Zhu J M, Xie J F, Du D A. Preventive Medicine Tribune (朱杰民, 谢剑锋, 杜达安. 预防医学论坛), 2005, 11(4): 423
- [10] Zheng X Q, Zhou S Y, Zhou S W. Handbook for cosmetics hygienic detection. Beijing: Chemical Industry Press (郑星泉, 周淑玉, 周世伟. 化妆品卫生检验手册. 北京: 化学工业出版社), 2003: 286
- [11] Sjöberg A M, Olkkonen C. J Chromatogr, 1985, 318: 149
- [12] Mao P K, Zhang B X. Functional evaluation and analytical methods for cosmetics. Beijing: China Light Industry Press (毛培坤, 张宝旭. 化妆品功能性评价和分析方法. 北京: 中国轻工业出版社), 1998: 148
- [13] Wang Z M, Zhou X, Zheng J, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (汪子明, 周新, 郑健, 等. 高等学校化学学报), 2005, 26(9): 1623