

## 柱前衍生-萃取阻断反应-高效液相色谱法测定化妆品中游离甲醛

吕春华<sup>1\*</sup>, 黄超群<sup>1</sup>, 陈梅<sup>2</sup>, 谢文<sup>1</sup>, 陈笑梅<sup>1</sup>

(1. 浙江出入境检验检疫局, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:** 建立了柱前衍生化-萃取阻断反应-高效液相色谱 (HPLC) 测定化妆品中甲醛的方法。化妆品中甲醛检测的难点是: 甲醛缓释剂类防腐剂在衍生过程中释放甲醛, 影响游离甲醛的准确测定。以 2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 乙腈溶液-磷酸盐缓冲液 (pH 2) (1:1, v/v) 为提取溶液, 于室温下快速衍生 2 min 后, 立即加入二氯甲烷萃取, 阻断衍生反应, 经乙腈稀释后进行 HPLC 测定。以 Agilent C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分离柱, 乙腈-水 (60:40, v/v) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 于 355 nm 波长下检测。在洗发水、乳液、膏霜、洗手液、牙膏、指甲油、粉饼中分别添加 50、100、500、1 000 μg/g 4 个浓度水平的甲醛, 其回收率为 81% ~ 106%, 相对标准偏差 ( $n=6$ ) < 5.0%。方法的定量限 (以信噪比 ( $S/N$ ) > 10 计) 为 50 μg/g。该方法快速、简便、重现性好, 且可以有效避免甲醛缓释剂类防腐剂分解释放甲醛, 适用于化妆品中游离甲醛的测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 柱前衍生; 甲醛缓释剂; 游离甲醛; 化妆品

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)12-1287-05

## Determination of free formaldehyde in cosmetics by pre-column derivatization, extraction inhibition and high performance liquid chromatography

LÜ Chunhua<sup>1\*</sup>, HUANG Chaoqun<sup>1</sup>, CHEN Mei<sup>2</sup>, XIE Wen<sup>1</sup>, CHEN Xiaomei<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China; 2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** Pre-column derivatization and inhibition by solvent extraction were applied to determine free formaldehyde in cosmetics by high performance liquid chromatography (HPLC). Due to the rapid decomposition of formaldehyde donors in the derivatization, it is hard to detect the amount of the free formaldehyde in cosmetics. The formaldehyde directly reacted with 2,4-dinitrophenylhydrazine in acetonitrile-phosphate buffer (pH 2) (1:1, v/v) solution for 2 min, then dichloromethane extraction was used to induce the decomposition of formaldehyde donors. The extract was diluted with acetonitrile and then determined by HPLC. The formaldehyde derivative was separated on an Agilent C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 30 °C with acetonitrile-water (60:40, v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and detected at the wavelength of 355 nm. The recoveries were from 81% to 106% at the spiked levels of 50, 100, 500, 1 000 μg/g of formaldehyde in shampoo, milk, cream, hand cleaner, toothpaste, nail polish, powder separately, and the relative standard deviations ( $n=6$ ) were less than 5.0%. The limit of quantification of the formaldehyde in cosmetics was 50 μg/g. The method has been applied to the determination of free formaldehyde in real samples and the results showed that the release by formaldehyde donors was inhibited. The method has the advantages of simple operation, good accuracy and meets the requirement of determination of free formaldehyde in cosmetics.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); pre-column derivatization; formaldehyde donors; free formaldehyde; cosmetics

\* 通讯联系人: 吕春华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为理化检验。E-mail: lvch@ziq.gov.cn.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局课题。

收稿日期: 2012-07-22

近日 欧盟非食品消费类产品快速预警系统通报了出口欧洲的化妆品中游离甲醛含量超标问题。甲醛被世界卫生组织确认为致癌和致畸物质,在我国有毒化学品控制名单上高居第二位。化妆品中甲醛超标问题越来越引起消费者的关注。

化妆品中含有甲醛以及可释放甲醛的杀菌防腐剂。甲醛缓释剂通常被添加至化妆品中,通过缓慢释放甲醛或其衍生物达到杀菌防腐目的。我国《化妆品卫生规范》(2007版)<sup>[1]</sup>规定甲醛为限用物质,口腔卫生产品中含量 $\leq 0.1\%$ (质量分数,以下不注明者均同此),其他产品中含量 $\leq 0.2\%$ ,指甲硬化剂中含量 $\leq 5\%$ ,同时禁止用于喷雾产品。《化妆品卫生规范》(2007版)同时规定甲醛缓释剂(如季铵盐-15、乌洛托品、多聚甲醛等)的限量为 $0.1\% \sim 0.6\%$ 。所有含甲醛或可释放甲醛物质的化妆品,当成品中甲醛含量超过 $0.05\%$ (以游离甲醛计)时,必须在产品标签上标印“含甲醛”。

目前,对于化妆品中甲醛的测定主要采用分光光度法<sup>[1]</sup>、比色法<sup>[2]</sup>、柱前衍生-色谱法<sup>[3-9]</sup>。由于化妆品中甲醛缓释剂的存在,以上文献报道的方法在样品前处理过程中,甲醛缓释剂会大量分解,其检测结果应为游离甲醛及甲醛缓释剂的总量。如应用其测定化妆品中游离甲醛会导致检测结果偏高,无法准确反映化妆品中游离甲醛的真实含量。核磁共振法<sup>[10]</sup>作为一种纯物理方法,虽不会影响游离甲醛和甲醛缓释剂之间的平衡,但核磁共振仪器昂贵,方法难以推广。

本文旨在通过研究建立一种准确测定化妆品中游离甲醛的方法。通过对甲醛和2,4-二硝基苯肼的衍生反应条件、提取溶剂的选择以及萃取条件的研究,建立了柱前衍生-萃取阻断反应-高效液相色谱测定方法,有效提取化妆品中游离甲醛,避免了甲醛缓释剂分解导致检测结果偏高的问题。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 配 G1315B 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);高速离心机(美国 Thermo 公司);涡旋仪(华利达公司)。甲醛标准溶液(100 mg/L,环境保护部标准样品研究所),安瓿瓶封装,打开后一次性使用;2,4-二硝基苯肼(DNPH,优级纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈、甲醇、二氯甲烷均为色谱纯。实验所用试剂为分析纯,所用水为去离子水。所用化妆品洗发水、乳液、膏霜、洗手液、牙膏、指甲油、粉饼由企业供

DNPH 衍生剂溶液的配制:称取适量的 DNPH,用乙腈配制 2.0 g/L 的溶液。磷酸盐缓冲液的配制(pH 2):配制 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液,用磷酸调节 pH 值至 2.0。衍生液的配制:取上述配制好的适量 DNPH 衍生剂溶液与磷酸盐缓冲液,按 1:1 的体积比混合即得。

### 1.2 样品前处理

称取化妆品样品 0.1 g(精确至 0.001 g),置于 10 mL 刻度离心管中,用衍生液定容至 5 mL,盖上塞后涡旋混匀 1 min,室温下静置 2 min。立即加入 2 mL 二氯甲烷,盖上塞后涡旋混匀 1 min,然后以不低于 3 000 r/min 的速率离心 5 min。弃去上层水溶液,下层有机相溶液用乙腈定容至 10 mL。取提取液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,滤液于 2 h 内测定。

### 1.3 甲醛衍生物标准溶液的制备

移取适量的甲醛标准工作溶液,置于 10 mL 具塞刻度试管中,补加磷酸盐缓冲液至 5.0 mL,再用 DNPH 衍生剂溶液定容至 10.0 mL,盖上塞后混匀,室温下静置 2 min。溶液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,滤液供 HPLC 测定。

### 1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-水(60:40, v/v);流速:1.0 mL/min;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长:355 nm;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甲醛标准品衍生条件的选择

甲醛释放体释放甲醛量的多少和甲醛释放体所处的物理及化学环境有关,随着 pH 值、温度和时间增加所释放的甲醛量增加<sup>[11]</sup>。试验选择甲醛标准品在低温下的快速衍生条件。分别用 40% 盐酸溶液配制 DNPH 溶液(2 g/L)、2 mol/L 磷酸溶液配制 DNPH 溶液(0.2 g/L)、乙腈-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2)(1:1, v/v)配制 DNPH 溶液(1 g/L),在室温下衍生甲醛标准品,结果表明乙腈-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液的衍生效率较高。取 0.10 mL 甲醛标准溶液,分别用乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 2)(1:1, v/v)、乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 5)(1:1, v/v)、乙腈-水(pH 7)(1:1, v/v)配制的 DNPH 溶液定容至 10 mL,涡旋混匀 1 min。室温下衍生,甲醛衍生物的峰面积与衍生时间的曲线见图 1a。采用 pH 2 衍生液、pH 5 衍生液和 pH 7 衍生液,分别在室温下静置 5、20 和 120 min 时,甲醛衍生完全。分别移取 0.10、1.00、2.00、4.00 mL 甲醛标准溶液,按 1.3

节方法进行衍生。甲醛衍生物的峰面积与衍生时间曲线见图 1b。上述甲醛的质量浓度分别为 1、10、20 mg/L 时,室温下静置 2 min 可衍生完全;质量浓度为 40 mg/L 时,室温下静置 2 min 未能衍生完全。

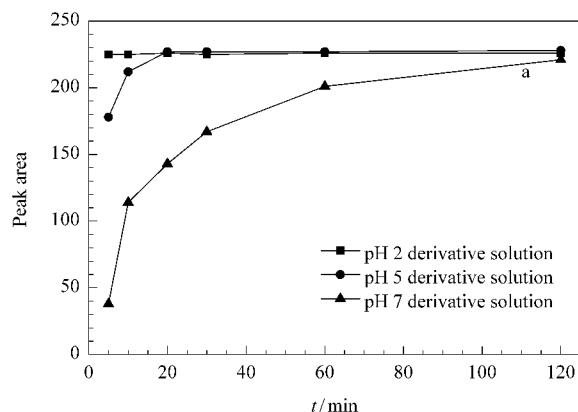
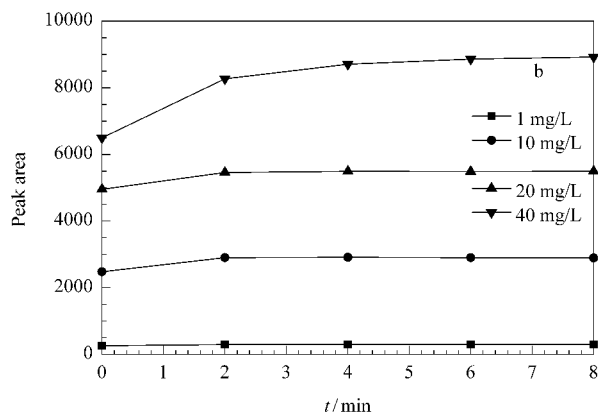


图 1 甲醛衍生物的峰面积随衍生时间的变化

Fig. 1 Peak area of formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivative versus derivatization time

a. in different derivative solutions with formaldehyde concentration of 1 mg/L; b. in pH 2 derivative solution with formaldehyde mass concentrations of 1, 10, 20 and 40 mg/L.

因此甲醛的质量浓度  $\leq 20$  mg/L 时,试验选择 DNPH 乙腈溶液-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2) (1:1, v/v) 为衍生液,衍生条件为涡旋混匀 1 min,室温下静置 2 min。



## 2.2 提取溶剂的选择

选择化妆品中使用率较高的 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、双(羟甲基)咪唑烷基脲、咪唑烷基脲、1,3-二羟甲基-5,5-二甲基海因(DMDM 乙内酰脲)、季铵盐-15、乌洛托品、多聚甲醛以及指甲油中常用的甲苯磺酰胺甲醛树脂这 8 种甲醛缓释剂,试验提取溶剂对甲醛缓释剂释放甲醛量的影响。

文献<sup>[3,4]</sup>报道的柱前衍生方法通常为采用水或乙腈为提取溶剂,于室温或 40 °C 水浴中提取 1~2 h,再在 60 °C 下衍生 15~30 min。参照文献<sup>[3,4]</sup>方法,分别用水、乙腈提取 8 种甲醛缓释剂,室温下静置 5 min,取适量提取液于室温下衍生 20 min。另外用衍生液提取甲醛缓释剂,于室温下静置 5 min。检

测结果见表 1。《化妆品卫生规范》(2007 版)规定化妆品中甲醛缓释剂的限量为 0.1%~0.6%,游离甲醛的限量为 0.05%。试验称取甲醛缓释剂 10 mg,相当于 1 g 样品中添加 1% 的甲醛缓释剂。采用水、乙腈和衍生液提取时,甲醛缓释剂释放的甲醛总量分别相当于 0.425%、0.196% 和 0.054%。因此,采用文献<sup>[3,4]</sup>的柱前衍生方法,提取时间长、衍生温度高,甲醛缓释剂会释放大量的甲醛,导致甲醛的检测结果呈假阳性。采用衍生液室温下提取 5 min,8 种甲醛缓释剂释放甲醛总量与我国法规限量要求相接近。因此,化妆品样品检测时,采用衍生液室温提取 2 min,且样品中含甲醛缓释剂的种类较少,可有效避免甲醛假阳性结果。

表 1 不同提取溶剂对化妆品中甲醛缓释剂(10 mg)释放甲醛量的影响

Table 1 Effects of different extraction solvents on the amounts of formaldehyde released by formaldehyde donors (10 mg) in cosmetics

| Extraction solvent  | Formaldehyde donor <sup>*</sup> |     |     |      |     |     |    |    | Total formaldehyde |
|---------------------|---------------------------------|-----|-----|------|-----|-----|----|----|--------------------|
|                     | 1                               | 2   | 3   | 4    | 5   | 6   | 7  | 8  |                    |
| Water               | 8                               | 885 | 645 | 1802 | 307 | 539 | 61 | 3  | 4250               |
| Acetonitrile        | 2                               | 140 | 103 | 916  | 115 | 587 | 42 | 57 | 1962               |
| Derivative solution | 0                               | 216 | 13  | 84   | 135 | 57  | 36 | 2  | 543                |

\* Formaldehyde donors: 1. 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol; 2. diazolidinyl urea; 3. imidazolidinyl urea; 4. dimethylol dimethyl (DMDM) hydantoin; 5. quaternium-15; 6. methenamine; 7. paraformaldehyde; 8. poly(p-toluenesulfonamide-co-formaldehyde).

## 2.3 衍生反应的阻断

由甲醛标准品的衍生条件试验可知,反应体系中乙腈的含量为 50% (体积分数) 时的反应效率高<sup>[12]</sup>,乙腈含量为 100% 时的反应效率低。采用衍生液提取时,甲醛缓释剂随着提取时间的增加释放

的甲醛总量递增。采用有机溶剂萃取衍生产物可以有效阻断衍生反应。试验以正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷和三氯甲烷作为萃取剂,发现二氯甲烷的萃取阻断效果最佳。萃取后通过加入乙腈稀释提取液可改善色谱分离的峰形。分别配制质量浓度分别为

1、10、20 mg/L 的甲醛标准溶液,衍生后经二氯甲烷萃取、乙腈定容后,甲醛的回收率为 96.5% ~ 99.5%。如表 2 所示 8 种甲醛缓释剂采用衍生液于室温下提取 5 min、二氯甲烷萃取阻断衍生反应后,

静置 2 h 时甲醛的释放总量比静置 20 min 时增加 5.6%,静置 24 h 时甲醛的释放总量增加 20%。因此选择二氯甲烷萃取阻断衍生反应后,提取液在 2 h 内进行 HPLC 测定。

表 2 衍生反应阻断后放置时间对甲醛缓释剂释放甲醛量的影响

Table 2 Effect of resting time after inhibition of derivatization on the amounts of formaldehyde released by formaldehyde donors

| Resting time | Formaldehyde donor* |     |    |     |     |    |    |    | Total formaldehyde<br>μg |
|--------------|---------------------|-----|----|-----|-----|----|----|----|--------------------------|
|              | 1                   | 2   | 3  | 4   | 5   | 6  | 7  | 8  |                          |
| 20 min       | 0                   | 231 | 11 | 105 | 128 | 31 | 33 | 2  | 540                      |
| 1.0 h        | 0                   | 232 | 12 | 111 | 130 | 31 | 41 | 2  | 558                      |
| 2.0 h        | 0                   | 233 | 13 | 111 | 131 | 31 | 48 | 3  | 570                      |
| 24 h         | 1                   | 250 | 15 | 118 | 156 | 35 | 59 | 14 | 648                      |

\* Formaldehyde donors were the same as in Table 1.

## 2.4 校正曲线、检出限及回收率

在方法所确定的实验条件下,甲醛标准溶液的质量浓度( $X$ )在 0.5 ~ 20.0 mg/L 范围内与其峰面积( $Y$ )呈现良好的线性关系,得到的校正曲线为  $Y = 218X + 8.21$ ,  $r^2 = 0.9999$ 。选择洗发水、乳液、面霜、洗手液、牙膏、指甲油、粉饼 7 种基质,分别添加 50、100、500、1 000 μg/g 4 个浓度水平的甲醛,平行测定 6 次,甲醛的回收率为 81% ~ 106%,相对标准偏差(RSD) < 5.0%,方法的定量限(以信噪比( $S/N$ ) > 10 计)为 50 μg/g。

## 2.5 样品测定

通过对多种基质的化妆品进行甲醛检测,未发现色谱干扰峰。大部分样品中游离甲醛的检测结果低于 50 μg/g。检测了 208 个指甲油样品,甲醛的检出率达 7.7%,含量为 65 ~ 395 μg/g。检测的牙膏样品中有的甲醛含量可高达 466 μg/g。部分样品在检测甲醛时,如未经衍生反应的阻断,随着衍生时间的增加,检测出甲醛含量递增明显,表明样品中含有甲醛缓释剂。图 2 为洗手液样品和洗手液中添加甲醛样品的色谱图。

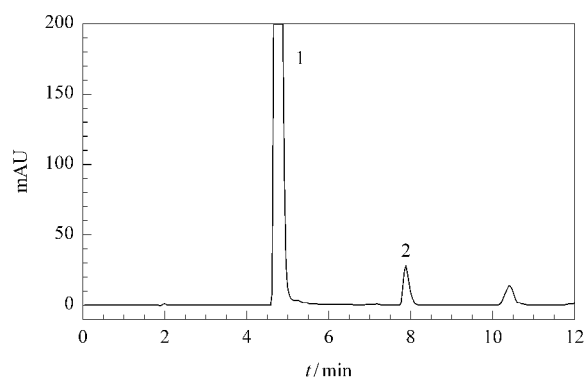
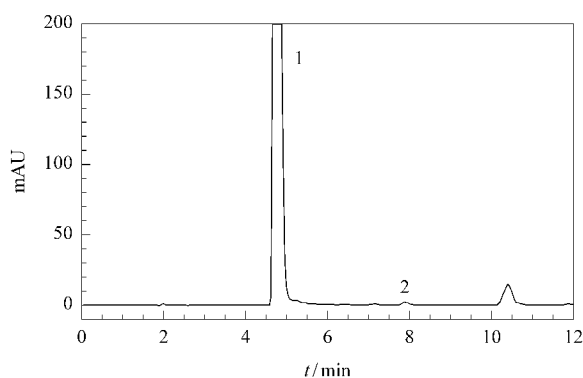


图 2 (a) 洗手液样品和(b) 洗手液中添加甲醛(50 μg/g)样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) a hand cleaner sample and (b) a hand cleaner sample spiked with formaldehyde at 50 μg/g

1. derivative agent; 2. formaldehyde derivative.

## 3 结论

以 2,4-二硝基苯肼乙腈溶液-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2)(1:1, v/v)提取化妆品中游离甲醛,室温下快速衍生 2 min,立即加入二氯甲烷萃取,阻断衍生反应,经乙腈稀释后用高效液相色谱测定。柱前快速衍生、溶剂萃取阻断衍生反应有效地避免了甲醛缓释剂分解导致游离甲醛检测结果偏高的问题。方法快速、简便、重现性好,适用于化妆品中游离甲醛的测定。

## 参考文献:

- [1] Ministry of Health of the people's Republic of China. Hygienic Standard for Cosmetics (2007 Version). Beijing: Military Medical Science Press (中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范(2007 版). 北京: 军事医学科学出版社), 2007
- [2] Commission of the European Communities, Directorate General for Industry Pharmaceuticals and Cosmetics. The Rules Governing Cosmetic Products in the European Union. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1999: 49
- [3] Wang L Z, Wang D F, Liang M, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (王连珠, 王登飞, 梁鸣, 等. 理化检验: 化学分册), 2006, 42(9): 723

- [4] Xu Y H, Du D A. Journal of Hygiene Research (许瑛华, 杜达安. 卫生研究), 2003, 32(4): 375
- [5] Lü C H, Chen X M, Shi Y Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (吕春华, 陈笑梅, 史颖珠, 等. 色谱), 2010, 28(10): 940
- [6] Liu X L, Zhang W W, Sui G H, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘秀玲, 张武畏, 隋国红, 等. 色谱), 2007, 25(4): 562
- [7] Groot A D, White I R, Flyvholm M A, et al. Contact Dermatitis, 2010, 62: 18
- [8] Doi T, Kajimura K, Taguchi S. J Heal Sci, 2010, 56(1): 116
- [9] Zheng Y Y, Li Q, Zhang J, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (郑芸芸, 李琼, 张健, 等. 理化检验: 化学分册), 2011, 47(10): 1129
- [10] Emeis D, Anker W, Wittern K P. Anal Chem, 2007, 79: 2096
- [11] Klinkner E R. Chromatographia, 1985, 20(9): 559
- [12] Chen X M, Shi X X, Zhu W J, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (陈笑梅, 施旭霞, 朱卫建, 等. 分析化学), 2004, 32(11): 1489