

仪器应用

聚 N-异丙基丙烯酰胺硅胶键合相
RP-HPLC 检测化妆品中防腐剂

董伟 范旭 曹光群 崔莹

(江南大学化学与材料工程学院, 无锡, 214122)

摘要 以聚 N-异丙基丙烯酰胺硅胶键合相为固定相,建立了化妆品中苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯 5 种防腐剂的反相高效液相色谱测定方法。以不锈钢色谱柱(250mm×4.6mm,5 μ m)作为分离柱,以甲醇-磷酸盐缓冲液(55:45, pH = 2.5)为流动相,流速 0.5 mL/min,紫外检测波长 254 nm。样品先通过氧化铝柱进行分离处理,馏出液用于色谱分析。校正曲线的线性范围分别为:40~1000mg/L(苯甲酸),4~100mg/L(对羟基苯甲酸甲酯,一乙酯,一丙酯),8~200mg/L(对羟基苯甲酸丁酯)。回收率 96.6%~106.9%,相对标准偏差 0.60~1.70%。

关键词 聚 N-异丙基丙烯酰胺硅胶键合相 反相高效液相色谱 化妆品 防腐剂 苯甲酸 对羟基苯甲酸酯类

1 前言

添加防腐剂是预防化妆品受到微生物污染、保持化妆品质量的主要手段。苯甲酸、对羟基苯甲酸酯类是化妆品中应用非常广泛的防腐剂,通常根据化妆品的结构性能,添加上述不同比例配合的防腐剂。虽然防腐剂对抑制和杀灭化妆品中的各种细菌有良好效果,但也是引起化妆品性皮炎的因素之一^[1]。国家《化妆品卫生规范》^[2](2007)规定防腐剂在化妆品中最大允许浓度为:单一酯 0.4%,混合酯 0.8%(质量分数,以酸计)。

分离检测化妆品中防腐剂的方法很多,高效液相色谱法是最常用的方法之一。国外采用 BDS 氰丙基柱^[3]及毛细管电泳法^[4]成功地测定了化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂;国内大都是采用十八烷基硅胶键合固定相(ODS)检测化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂,但是 ODS 色谱柱的缺点是样品的保留时间长、峰形对称性不好、相对标准偏差大^[5-9]。本实验室通过柱色谱分离样品,以甲醇-磷酸盐缓冲液为流动相,以聚 N-异丙基丙烯酰胺硅

胶键合相(Sil-NIPAM_n)为固定相^[10,11],建立了反相高效液相色谱法测定化妆品中苯甲酸和对羟基苯甲酸酯类(甲酯 Me-、乙酯 Et-、丙酯 Pr-、丁酯 Bu-PHBA)等 5 种防腐剂的方法,能比常规商品柱 ODS 更迅速、良好地分离分析化妆品中的防腐剂。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统(Waters,美国),包括 515 泵,2487 双波长紫外吸收检测器和 Millennium32 色谱工作站等;元素分析仪(Vario EL III,德国);红外光谱仪(ABB FTLA 2000,加拿大)。

N-异丙基丙烯酰胺(上海物竞化工科技有限公司,纯度 98%,纯化后使用);3-巯丙基三甲氧基硅烷(张家港国泰华荣化工新材料有限公司);偶氮二异丁腈(上海试剂四厂,化学纯,经乙醇重结晶后使用);YMC120-S5 硅胶(YMC 公司,粒径为 5 μ m,孔径 120 μ m,比表面积 300m²/g);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,色谱纯);水为二次蒸馏水,经 0.45 μ m 微膜过滤;其它试剂均为分析纯。

基金项目:教育部留学回国人员启动基金(1044130201080100),江南大学青年科学基金资助项目(10400052210730)

作者简介:董伟,女,1970 年出生,辽宁人,博士,主要从事高效液相色谱固定相研究工作。

标准溶液: 称取适量 5 种防腐剂标准样品, 用甲醇溶解后, 置于 100 mL 容量瓶, 并用甲醇定容, 配成标准原液, 工作溶液取原液用甲醇稀释而成。

2.2 键合固定相的制备^[10,11]

称取 N-异丙基丙烯酰胺 10.0g, 置于 250mL 圆底三颈烧瓶中, 加入甲醇 100mL, 3-巯基三甲氧基硅烷 1mL, 偶氮二异丁腈 0.1g, 在氮气保护下 65℃ 反应 10h。产物用丙酮溶解后滴入正己烷中沉淀, 抽滤后真空干燥, 即得末端带有活性基团的聚 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM_n)。

取上述产物 4.0g, 置于 100mL 圆底二颈烧瓶中, 加入硅胶 4.0g, 干燥异丙醇 50mL, 80℃ 下反应 168h。抽滤后依次用苯、丙酮、甲醇淋洗数次, 真空干燥即得白色粉末状键合相(Sil-NIPAM_n), 其红外光谱的表征结果如图 1 所示。

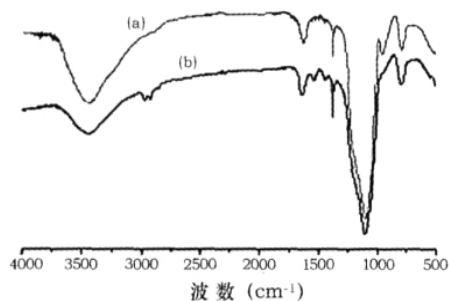


图 1 YMC 硅胶(a)和 Sil-NIPAM_n(b)的红外光谱图

图 1 为聚 N-异丙基丙烯酰胺键合硅胶前后的红外光谱图。通过对比发现, 键合相在 2857cm⁻¹~2950cm⁻¹之间出现了 CH₃ 和 CH₂ 伸缩振动峰, 1458cm⁻¹处出现了 C—H 键的弯曲振动峰; 1636cm⁻¹处出现了酰胺 I 峰(即 V_{C=O}), 1558cm⁻¹处出现了酰胺 II 峰(即 δ_{N-H} + V_{C-N})。根据特征峰的出现可以判断, 聚 N-异丙基丙烯酰胺已成功键合在硅胶上。

对 Sil-NIPAM_n的元素分析结果为: C 12.58%, H 2.19%, S 1.53%。

委托大连依利特分析仪器有限公司将 Sil-NIPAM_n填充入不锈钢柱(250mm×4.6mm)作为色谱柱。

2.3 氧化铝柱的准备

将中性氧化铝于马弗炉中 500℃ 活化 4h, 冷却后加入少量去离子水, 使之部分失活, 置于干燥器中平衡 24h, 用湿法装柱(300mm×15mm)。

2.4 化妆品的处理

称取市售某品牌护手霜、隔离霜、洗面奶、沐浴露各 0.5000g, 加入 10mL 甲醇-磷酸盐缓冲液(pH=2.5), 超声震荡 30min, 以 10000r/min 的速度离心 10min, 吸取上清液 2mL。然后通过氧化铝柱, 用甲醇淋洗, 馏分经 0.45μm 有机滤膜过滤后作为液相色谱分析样品。

2.5 色谱条件

流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(55:45, pH=2.5)(使用前过滤), 流速 0.5mL/min; 检测波长 254nm; 进样量 20μL。

3 结果与讨论

3.1 提取时间

考察了 10~60min 不同时间段超声波的提取率。随提取时间的增加, 提取率明显增大, 但 30min 以上提取率没有明显改善, 所以, 本实验选择 30min 为超声提取时间。

3.2 分离效果

在选定的色谱条件下, 标准混合物和化妆品样品的色谱图如图 2 和图 3 所示。由图可见, 对于混合标准溶液, Sil-NIPAM_n 基本可以达到基线分离。与 ODS^[5]相比, 样品保留时间大大缩短。这主要是由于 Sil-NIPAM_n 柱的聚合物主链与侧基中的异丙基是疏水性的, 对样品的洗脱顺序与 ODS 柱相一致, 说明 Sil-NIPAM_n 柱具有反相液相色谱性能; 但是酰胺键的存在大大改善了 Sil-NIPAM_n 柱的亲水性, 从而削弱了 Sil-NIPAM_n 与样品分子间的疏水作用力, 使得样品被迅速洗脱, 减小了峰拖尾现象, 峰形得到较大改善。

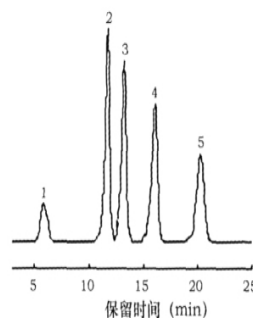


图 2 混合标准溶液色谱分离图

1. 苯甲酸 2. Me-PHBA 3. Et-PHBA 4. Pr-PHBA
5. Bu-PHBA

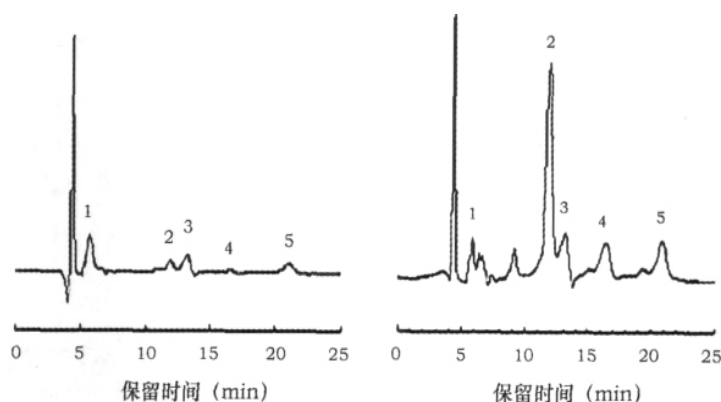


图 3 实际样品色谱分离图

1. 苯甲酸 2. Me-PHBA 3. Et-PHBA 4. Pr-PHBA 5. Bu-PHBA

3.3 流动相 pH 值的选择

流动相的 pH 值对 5 类防腐剂的保留时间、分离度和灵敏度能产生一定影响。本实验考察了以磷酸盐缓冲液将 pH 值调节为 2.5、3.0 和 4.0 时流动相对分离效果的影响。结果表明,在 pH 为 2.5 时,各组分的分离度好。

3.4 工作曲线

在实验条件下分别对配制的 5 种防腐剂工作溶液进样分析,平行测定 3 次,以浓度(x , mg/L)对峰面积(y)绘制工作曲线,并按信噪比($S/N=3$)计算检出限,结果见表 1。

3.5 精密度试验

用标准原液配成低浓度和高浓度两种标准系列溶液,以此计算各防腐剂的保留时间和峰面积的相

表 1 防腐剂的线性回归方程、相关系数及检出限

防腐剂	回归方程	R^2	检出限 (μg)
苯甲酸	$y = 12.669x + 0.137$	0.9994	0.080
Me-PHBA	$y = 232.33x + 0.2658$	0.9991	0.008
Et-PHBA	$y = 180.5x + 0.0013$	0.9999	0.008
Pr-PHBA	$y = 179.22x - 0.0602$	0.9999	0.008
Bu-PHBA	$y = 162.91x - 0.127$	0.9999	0.016

对标准偏差(RSD),确定该分析方法的精密度,结果见表 2 (6 次测定平均值)。由表可见,不论是低浓度还是高浓度标准系列溶液,RSD 值均在 0.34%~1.84%之间,说明该方法的分析精密度较好。

表 2 五种防腐剂精密度试验结果($n=6$)

防腐剂	低浓度			低浓度		
	浓度 (mg/L)	RSD (%)		浓度 (mg/L)	RSD (%)	
		保留时间	峰面积		保留时间	峰面积
苯甲酸	1	0.68	1.50	10	1.30	1.84
Me-PHBA	0.1	0.40	0.80	1	1.50	1.76
Et-PHBA	0.1	1.20	0.96	1	0.58	1.20
Pr-PHBA	0.1	0.60	0.84	1	0.86	1.60
Bu-PHBA	0.2	0.34	1.20	2	0.94	1.38

3.6 稳定性试验

取防腐剂混合标准液放置 0、2、8、12、24 h 后进样,记录各峰面积,并计算 RSD,分别为:2.64%,1.83%,2.75%,0.95%和 1.78%,表明标准品溶液

在 24 h 内稳定性良好。

3.7 回收率试验

在化妆品中外加标样进行回收率试验,结果见表 3。

表 3 防腐剂回收率的测定

(n = 6)

防腐剂	加入量 (g/mL)	检出量 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
苯甲酸	10	10.02	100.2	1.20
Me-PHBA	10	16.90	106.9	0.60
Et-PHBA	10	9.66	96.6	0.90
Pr-PHBA	10	13.57	103.8	1.30
Bu-PHBA	10	10.14	101.4	1.70

* 表示 6 次测定平均值

由表 3 可知,各种防腐剂的回收率在 96.6%~106.9%之间,RSD 在 0.60%~1.70%之间。分析实验中,分析对象回收率一般在 90%~110%之间,回收效果较为理想。

3.8 实际样品分析

用此方法检测了超市出售的隔离霜、护手霜、洗面奶、沐浴露,结果见表 4。结果表明,样品中 5 类防腐剂检出率比较高的是对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丁酯,对羟基苯甲酸乙酯检出率较低,被测样品所含防腐剂量全部符合国家标准。

表 4 样品测定结果

样品	防腐剂含量(wt, %)				
	苯甲酸	Me-PHBA	Et-PHBA	Pr-PHBA	Bu-PHBA
隔离霜	0.19	0.004	—	0.001	0.006
护手霜	0.16	0.007	—	—	0.003
洗面奶	0.036	0.003	0.015	0.002	0.018
沐浴露	—	0.044	0.013	0.009	0.015

“—”表示未检出

4 结 论

聚 N-异丙基丙烯酰胺硅胶键合相反相高效液相色谱法能够用于化妆品中苯甲酸和 4 种对羟基苯甲酸酯类化合物的定量分析,色谱峰形明显优于 ODS 柱,提高了检测的准确性。聚 N-异丙基丙烯酰胺硅胶键合相与常规商品 ODS 柱相比,保留时间大大缩短,峰形明显改善,为实现样品的快速分离分析提供了可能,因此具有潜在的实际应用价值。

参考文献

- [1] 郑萍,陈西平. 环境与健康杂志, 2008, 25(2): 114-116.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范, 2007 年版. 北京: 中华人民共和国卫生部, 化妆品卫生规范 2007: 72.
- [3] Sottofattori E, Anzaldi M, Balbi A, et al. J Pharma-

ceut Biomed, 1998, 18 (1, 2): 213-217.

- [4] Labat L, Kummer E, Dallet P, et al. J Pharmaceut Biomed, 2000, 23 (4): 763-769.
- [5] 谢华林, 胡波年, 苑世领, 等. 日用化学工业, 2004, 34 (6): 398-400.
- [6] 王健辉, 胡家庆, 张欣荣, 等. 日用化学工业, 2009, 39(2): 138-140.
- [7] 靳克林. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 317, 348.
- [8] 刘奋, 戴京晶, 梁伟, 等. 实用预防医学, 2006, 13 (5): 1121-1123.
- [9] 白桦, 陈伟, 刘娟. 分析试验室, 2006, 25(4): 93-96.
- [10] 徐荣来, 杨同华, 董伟. 色谱, 2008, 26(2): 246-249.
- [11] 董伟, 范归, 曹光群, 等. 应用化工, 2010, 39(6): 840-843.

收稿日期: 2010-07-19

Determination of preservatives in cosmetics by RP-HPLC using poly(N-isopropylacrylamide)-grafted silica as stationary phase. Dong Wei, Fan Xu, Cao Guangqun, Cui Ying (School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122)

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was developed using

poly(N-isopropylacrylamide)-grafted silica as stationary phase for the determination of preservatives benzoic acid and, methyl-, ethyl-, propyl-, and n-butyl p-hydroxybenzoate in cosmetics. The separation was performed on a stainless steel column (250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m). The methanol-phosphate buffer (55:45, pH=2.5) was used as mobile phase with a flow rate of 0.5mL/min and the detection was at 254nm. The sample was firstly pretreated on an aluminium oxide column. The eluent was analyzed by RP-HPLC. The calibration curves were linear in the ranges of 40~1000mg/L for benzoic acid, 4~100mg/L for methyl-, ethyl- and propyl-p-hydroxybenzoate, and 8~200 μ g/L for n-butyl p-hydroxybenzoate. The recoveries were 96.6%~106.9%, and RSDs were 0.60%~1.70%.