

试验与研究

高效液相色谱法测定化妆品中甲醛缓释体 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲

郑芸芸¹, 李 琼^{1,2*}, 张 健²

(1. 上海香料研究所, 上海 200235; 2. 上海应用技术学院, 上海 200233)

摘要: 提出了化妆品测定 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(DMDMH)的间接方法。样品用纳什试剂处理后于沸水浴加热 20 min 使甲醛衍生化,离心分离,移取上清液经 C₁₈ 固相萃取小柱纯化,所得洗脱液用反相高效液相色谱分析。用 DAD 检测器分别在波长 210,410 nm 处测定 5,5-二甲基乙内酰脲(DMH)及甲醛。根据所得 DMH 量及甲醛总量可分别换算出 DMDMH 的量。用 Kromasil C₁₈ 色谱柱进行分离,以不同比例混合的乙腈及水混合溶液作为流动相进行梯度淋洗。DMH 及甲醛的线性范围依次为 2.8~280, 0.11~22 mg·L⁻¹,检出限(3S/N)为 0.81, 0.033 μg·g⁻¹。以 3 种化妆品实样为基体做加标回收试验,测得回收率依次在 93.4%~107.8% 和 97.9%~109.9% 之间,相对标准偏差(n=5)依次在 1.7%~7.3% 和 0.8%~2.3% 之间。

关键词: 高效液相色谱法; 固相萃取; 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲; 甲醛; 化妆品

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)10-1129-05

HPLC Determination of 1,3-Dihydroxymethyl-5,5-dimethylhydantoin in Cosmetics Added as Formaldehyde-releasing Retardant

ZHENG Yun-yun¹, LI Qiong^{1,2*}, ZHANG Jian²

(1. Shanghai Research Institute of Fragrance & Flavor Industry, Shanghai 200235, China;

2. Shanghai Institute of Applied Technology, Shanghai 200233, China)

Abstract: An indirect method for determination of DMDMH in cosmetics was proposed. The sample was treated with Nash's reagent and heated for 20 min in a boiling water bath to derivatize formaldehyde. The supernatant were taken after centrifugation and purified by passing through C₁₈ SPE column. The eluate was used for determination of 5,5-dimethylhydantoin (DMH) and formaldehyde by RP-HPLC with DAD at 210 nm and 410 nm respectively. From the total amount of DMH and HCHO found, amount of DMDMH was calculated. The sample solution was separated by using Kromasil C₁₈ column and acetonitrile-water mixtures with different proportions were used as mobile phase in gradient elution. Ranges of linearity found were between 2.8–280 mg·L⁻¹ (for DMH) and between 0.11–22 mg·L⁻¹ (for HCHO), with detection limits (3S/N) of 0.81 μg·g⁻¹ and 0.033 μg·g⁻¹ respectively. Recovery was tested by addition of standards to 3 substantial cosmetic samples, giving values of recovery in the ranges of 93.4%–107.8% (for DMH) and 97.9%–109.9% (for HCHO) with values of RSD's (n=5) ranged from 1.7% to 7.3% and 0.8% to 2.3% respectively.

Keywords: HPLC; SPE; 1,3-Dihydroxymethyl-5,5-dimethylhydantoin (DMDMH); Formaldehyde; Cosmetic

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: 质检公益性行业科研专项(No. 200810846)

作者简介: 郑芸芸(1986-),女,四川德阳人,硕士研究生,研究方向为化妆品分析。

* 联系人

1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(DMDMH)是一种常用的化妆品防腐剂。据统计,近年来化妆品防腐剂使用频率排名中,DMDMH 一直位于前十位^[1]。我国化妆品卫生规范、欧盟、日本、美国

相关法规都对其用量作出了限定^[2-3]。

DMDMH 属于甲醛缓释体类防腐剂,在溶于水或其它极性溶剂时会释放出甲醛,分解成几种不同的化合物。DMDMH 水溶液中有^[4]:5,5-二甲基乙内酰脲(DMH)、3-羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(3MDMH)、1-羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(1MDMH)、1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(DMDMH) 4 种化合物及甲醛;随其含量的降低、时间的推移、pH 值的增加、温度的升高,都会使 DMDMH 分解加速。因此很难确定化妆品中 DMDMH 的添加量,在国内外都没有检测 DMDMH 用量的标准方法。

甲醛缓释体过敏可能是甲醛导致,也可能是甲醛缓释体本身所导致^[5]。目前,对 DMDMH 的检测,一般采取测定甲醛当量^[6-8]或含氮量的方法^[9]。甲醛当量法关注的对象是甲醛而非甲醛缓释体本身。含氮量测试一般适用于原料纯度的检测而非化妆品中的 DMDMH 的测定。

本工作采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定 DMDMH 的释放物甲醛的含量和完全释放甲醛后的底物 DMH 的含量,以此推算化妆品中 DMDMH 含量,解决了《化妆品卫生规范》规定的化妆品中 DMDMH 最大使用量的监测难题。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配 Agilent 1200 二极管阵列检测器(DAD);Waters Ultra Performance 液相色谱仪,配光电二极管阵列检测器和 Quattro Premier XE 质谱检测器;CNW 固相萃取装置,LC-C₁₈ 固相萃取柱(500 mg/3 mL,粒径为 50 μm)。

纳什(Nash's)试剂:乙酸铵 15.4 g,冰乙酸 0.3 mL 和乙酰丙酮(纯度不小于 99%) 0.2 mL 以水定容至 100 mL,当天配制。

标准储备溶液:称取 DMH 0.100 0 g,移取 11.0 g·L⁻¹ 甲醛标准溶液 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,以水定容,此溶液为含 DMH 1.000 g·L⁻¹,甲醛 0.11 g·L⁻¹ 的标准储备溶液。

试验用水为超纯水,乙腈和甲醇为色谱级,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器工作条件

液相条件:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱

(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相为乙腈-水(3+97)溶液,流量为 0.2 mL·min⁻¹,进样量为 1 μL。

质谱条件:大气压电喷雾电离模式(ESI⁺),毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 30 V,离子源温度 110 °C,脱溶剂温度 350 °C,脱溶剂气流量 500 L·h⁻¹,电子倍增电压 650 V,碰撞电压 20 V,分析器低端和高端分辨率皆为 15 V。

HPLC 条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5.0 μm),进样量 5 μL,检测时间 13 min。流动相 A 为乙腈,B 为水。梯度洗脱程序:0~4 min,A 为 5%;4~8 min,A 为 40%;8~14 min,A 为 5%。前 7 min 检测波长为 210 nm,测定 DMH;后 6 min 检测波长为 410 nm,测定甲醛。

1.3 试验方法

称取化妆品试样 0.200 0 g 于 10 mL 具塞比色管中,加入纳什试剂 1 mL,加水至约 10 mL。超声 10 min 溶解分散试样,于沸水浴加热 20 min 后,冰水浴冷却至室温,加水定容至 10 mL,振摇混匀后,以 8 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min,取离心后上层清液 2 mL 分两次通过 C₁₈ 固相萃取小柱,抽干,弃去;用 1 mL 水淋洗,抽干,弃去;加甲醇-水(60+40)溶液 2 mL 分两次洗脱,收集洗脱液;以水定容至 3 mL。超声振摇混匀后,按 HPLC 条件分别测定 DMH、甲醛含量,再换算得到 DMDMH 用量。

2 结果与讨论

2.1 检测方法的建立

物理化学环境的改变都会使 DMDMH 释放甲醛的平衡被打破,很难得到准确量的 DMDMH 溶液作为对照品,因此直接测定 DMDMH 的含量很难实现;同样测定 DMDMH 水溶液中 4 种化合物的含量也很难实现。

测定总甲醛量可以反映 DMDMH 已经分解释放,及还存在于化妆品中的甲醛和还未分解释放的甲醛量的和,这个值在一定程度上能反映化妆品中 DMDMH 的添加量,但在放置过程中部分甲醛可能已经释放出化妆品或已用来对抗微生物,因此测定值会小于实际添加量。

DMDMH 完全释放甲醛后的产物 DMH 较为稳定。若将 DMDMH、1MDMH 和 3MDMH 全部转化为 DMH,则 DMH 的量可以反映化妆品中 DMDMH 的添加量。在商品 DMDMH 溶液中会有

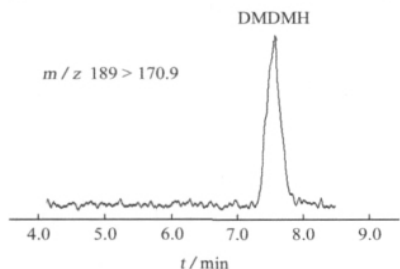
少量的 DMH、1MDMH 和 3MDMH,因此以 DMH 的量换算得到 DMDMH 量会略大于实际添加量。

将化妆品中 DMDMH、1MDMH 和 3MDMH 全部分解生成 DMH 和甲醛后,同时检测总甲醛和 DMH 的含量,可以间接测定化妆品中 DMDMH 的用量。一分子 DMDMH 对应一分子 DMH 和两分子甲醛,以 DMH 量和总甲醛量分别换算出 DMDMH 的量,DMDMH 的实际添加量在两个换算值之间。

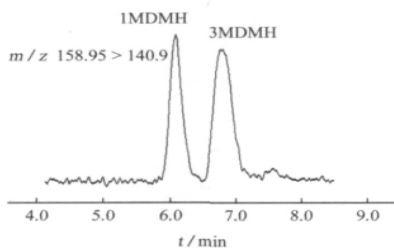
2.2 检测条件的选择

2.2.1 衍生条件

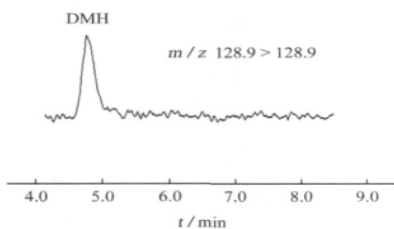
以质谱多反应监测(MRM)技术确定在反相 C_{18} 液相色谱柱上 DMDMH 水溶液中 DMH、1MDMH、3MDMH 和 DMDMH 4 种化合物的保留时间分别为 5.01, 6.51, 7.22, 7.84 min(图 1)。



(a) DMDMH



(b) 1MDMH 和 3MDMH



(c) DMH

图 1 DMDMH 水溶液 TIC 色谱图(MRM 模式)

Fig. 1 TIC chromatogram of aq. solution of DMDMH (MRM mode)

试验要求衍生过程中 DMDMH 完全释放出甲醛生成 DMH。

化妆品卫生规范中检测甲醛的加热温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[2]。高温会加速 DMDMH 的分解,因此选择沸水浴优化加热时间。稀释会加速 DMDMH 的分解,质量浓度小于 $0.022\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DMDMH 水溶液沸水浴加热 20 min 时,以紫外吸收峰面积计,DMH 峰面积能达到 4 种化合物总峰面积和的 95% 以上。DMH 水溶液加入纳什试剂沸水浴加热前后,DMH 峰面积基本不变,说明纳什试剂衍生甲醛的反应不会使 DMH 分解。质量浓度小于 $0.022\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DMDMH 水溶液加入纳什试剂沸水浴加热 20 min,能完全释放出键合甲醛生成 DMH。控制前处理过程中样品稀释度可以使样品溶液中的 DMDMH 质量浓度小于 $0.022\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 固相萃取条件

化妆品样品一般由水相和油相混合得到,配方复杂的样品杂质干扰较多。试验用 SUPELCO LC- C_{18} 3ML 反相固相萃取柱净化样品。选择甲醇-水(60+40)溶液体系作为洗脱液,上样量 2 mL,洗脱液体积 2 mL 分两次洗脱,以水定容。比较不同体积比的甲醇-水溶液对 DMH 和甲醛衍生物的洗脱效果,结果表明:DMH 和甲醛衍生物在甲醇-水(60+40)溶液中可完全洗脱。以此方法净化样品可得到杂质干扰较少的液相色谱待测液;含有 DMDMH 香波的液相色谱图见图 2。

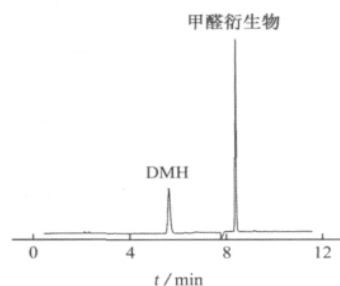


图 2 含有 DMDMH 香波样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of hair shampoo containing DMDMH

2.2.3 色谱条件

DMH 在紫外可见光吸收中没有特征吸收峰,兼顾较强吸收和较弱末端吸收干扰,选取 210 nm 为检测波长。甲醛衍生产物在波长 410 nm 处有特征吸收,选取 410 nm 为测定波长。因测定波长有 210 nm ,选取截止波长较短的乙腈作为流动相中的有机相。DMH 极性较大,选取乙腈-水(5+95)溶

液作为起始流动相,优化梯度洗脱程序,使 DMH 和 甲醛衍生物能在适当的时间出峰并分离开,试验选 择的洗脱程序见 1.3 节。

2.3 标准曲线和检出限

分别移取标准储备溶液 0.2,0.5,1.0,1.5, 2.0 mL 于 5 支 10 mL 具塞比色管中,按试验方法配 制标准溶液。在仪器工作条件下测定标准溶液系 列,以峰面积为纵坐标,以组分的质量浓度为横坐标 绘制标准曲线,DMH 的质量浓度在 2.8~280 mg · L⁻¹ 范围内呈线性,线性回归方程为 $y=6.11\rho-$

7.07;甲醛的质量浓度在 0.11~22 mg · L⁻¹ 范围内 呈线性,线性回归方程为 $y=61.91\rho+0.31$ 。对香 波空白样品进行测定,以 3 倍信噪比作为方法检出 限,10 倍信噪比作为测定下限。DMH 的检出限为 0.81 μg · g⁻¹,测定下限为 2.71 μg · g⁻¹;甲醛的检 出限为 0.033 μg · g⁻¹,测定下限为 0.11 μg · g⁻¹。

2.4 回收试验

按试验方法对香波、凝胶、乳液、空白样品做加 标回收试验,回收率和相对标准偏差($n=5$)结果见 表 1。

表 1 回收试验结果($n=5$)
Tab. 1 Results of tests for recovery

样品	化合物	加标量 /(mg · L ⁻¹)	回收率 /%	RSD /%	样品	化合物	加标量 /(mg · L ⁻¹)	回收率 /%	RSD /%
凝胶	DMH	15	105.2	2.31	凝胶	甲醛	3	98.2	1.09
		30	105.3	1.71			6	97.9	0.89
		45	99.6	3.45			9	102.5	1.97
乳液	DMH	15	107.8	3.65	乳液	甲醛	3	109.9	0.81
		30	107.4	4.89			6	103.5	1.23
		45	101.3	7.28			9	99.8	2.12
香波	DMH	15	93.4	2.17	香波	甲醛	3	98.2	2.21
		30	99.6	2.94			6	102.7	2.13
		45	102.3	4.45			9	105.7	1.01

2.5 样品分析

按试验方法对 9 种标注含有 DMDMH 的化妆

品(样品 1~9)和一种标注未含 DMDMH 的化妆品 (样品 10)进行分析,结果(质量分数)见表 2。

表 2 市售化妆品分析结果
Tab. 2 Results of analysis of cosmetics sold on market

样号	甲醛	DMH	DMDMH	样号	甲醛	DMH	DMDMH	%
1	0.048 5	0.141	0.151~0.207	6	0.025 7	0.131	0.080 5~0.192	
2	0.055 3	0.190	0.173~0.279	7	0.034 1	0.166	0.107~0.244	
3	0.034 4	0.114	0.108~0.167	8	0.030 1	0.137	0.094 4~0.202	
4	0.013 9	0.056 7	0.043 6~0.083 9	9	0.042 4	0.171	0.133~0.252	
5	0.017 2	0.113	0.053 8~0.166	10	0.040 0	—	—	

由表 2 结果可以看出:9 种化妆品中 DMDMH 含量都在国家规定的用量范围(0.6%)以内。样品 10 测定结果检出了甲醛但未检出 DMH,说明该样 品中含有 DMDMH 以外的甲醛供体。

试验通过优化梯度洗脱程序、波长变化程序和 固相萃取条件,同时测定甲醛释放体的释放物甲醛 的量和释放甲醛后产物的量,间接得到化妆品中甲 醛释放体 DMDMH 的用量。因为不同甲醛释放体 的底物不同,该方法可以将 DMDMH 与其它甲醛

释放体相区分。对市售化妆样品进行了检测可以得 到满意结果,所建立的方法能够满足对化妆品中限 用物 DMDMH 的用量检测要求。

参考文献:

- [1] 冯士清,赵华.从使用频率看化妆品防腐剂走势[J].日用化学科学,2006,29(12):32-36.
- [2] 赵刚同.化妆品卫生规范[M].北京:军事医学科学出版社,2007:71,207.
- [3] WU Pai-wen, CHANG Chieu-chen, CHOU Shin-

- shou. Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and acetylacetone method[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2003,11(1):8-15.
- [4] EMEIS D, ANKER W, WITTERN K P. Quantitative ^{13}C NMR spectroscopic studies on the equilibrium of formaldehyde with its releasing cosmetic preservatives [J]. Anal Chem, 2007,79:2096-2100.
- [5] FROSCHE P J, BASKETTER D, AGNER T, et al. Contact dermatitis[M]. 4th ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006:498.
- [6] 胡艾希,赵海涛. 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰胺防腐剂的荧光光谱测定[J]. 日用化学工业, 2001, 5(10):35-45.
- [7] RUSSELL W. Characterization of formaldehyde and formaldehyde-releasing preservatives by combined reversed-phase cation-exchange high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization using Nash's reagent[J]. Anal Chem, 1990,62(14):1397-1402.
- [8] KIJIMA K, TAKEDA M, OKAYA Y, et al. A study on release of formaldehyde from its donor type preservatives[J]. Analytical Science, 1991,7:913-916.
- [9] 郑艳芝,张若昕. 化妆品中 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基海因含量的测定[J]. 日用化学工业, 2008,8:273-276.

2011 年 12 月份一、二级理化检验人员技术培训班报到通知

机械工业理化检验人员技术培训和资格鉴定委员会秘书处,中国机械工程学会理化检验分会,上海材料研究所检测中心经研究决定,于 2011 年 11 月 30 日~12 月 28 日在上海材料研究所联合举办化学分析、光谱分析、力学性能、金相检验四个专业检验人员技术资格培训班,培训结束后并根据《机械工业理化检验人员技术培训和资格鉴定工作细则》进行考核,合格者将发给相应级别(一级、二级)的理化检验人员资格证书。现将有关事项通知如下:

报到地点:上海材料研究所 1 号楼 302 室,邯郸路 99 号。

培训地点:上海市辉河路 100 号 3 号楼 6 楼(新港悦大酒店楼上)。

金相检验:报到时间:2011 年 11 月 30 日

培训时间:2011 年 12 月 1 日~2011 年 12 月 7 日

力学性能:报到时间:2011 年 12 月 7 日

培训时间:2011 年 12 月 8 日~2011 年 12 月 14 日

光谱分析:报到时间:2011 年 12 月 14 日

培训时间:2011 年 12 月 15 日~2011 年 12 月 21 日

化学分析:报到时间:2011 年 12 月 21 日

培训时间:2011 年 12 月 22 日~2011 年 12 月 28 日

报名条件:

1. 凡具备下列条件之一者可申请一级理化检验人员资格:

a) 本专业中专毕业以上学历(含中专),连续从事本专业工作年限满一年;

b) 高中、中技毕业学历及非本专业中专毕业以上学历(含中专),连续从事本专业工作年限满二年。

2. 凡具有助理工程师职称或高级工资格,且同时具备下列条件之一者,可申请二级理化检验人员资格:

a) 取得本专业一级资格证书三年以上者;

b) 大学本科毕业学历,连续从事本专业工作年限满一年以上者;

c) 大专毕业学历,连续从事本专业工作年限满二年以上者;

d) 中专、高中、中技毕业学历,连续从事本专业工作年限满四年以上者;

e) 连续从事本专业工作年限满十年以上者。

费用:各专业培训费 1500 元(一级),2000 元(二级),食宿自理(中午提供免费午餐一份)。

外地学员可以自己安排就近住宿,如需秘书处联系住宿的,请提前 15 天与秘书处联系。

联系人:金永祥,张海波,陶美娟。

电话:021-65556775-251/021-55541227,传真:021-65539089,邮箱:hbzhang@ptcai.org。

联系地址:上海材料研究所检测中心,上海市邯郸路 99 号;邮编:200437。

网址:www.sct.org.cn/www.ptcai.org

报到时请提供报名表原件、近期 1 寸免冠照片二张(每个专业)、学历及职称证书复印件。

机械工业理化检验人员技术培训和资格鉴定委员会秘书处

中国机械工程学会理化检验分会

上海材料研究所检测中心