

反相高效液相色谱法同时测定化妆品中7种萘二酚类物质

陈立坚, 黄金凤, 何敏恒, 林森煜, 郭新东*

(广州市质量监督检测研究院, 广东 广州 510110)

摘要: 建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)同时测定化妆品中7种萘二酚类物质的分析方法。膏霜类、乳液类和水类样品用95%(v/v)乙醇提取,粉类样品用95%乙醇-0.1%乙酸(3:2,v/v)溶液提取,经离心、过滤后,用C18柱,以甲醇-0.1%乙酸溶液为流动相梯度洗脱分离,使用二极管阵列检测器检测,以保留时间定性,并以紫外吸收光谱图辅助定性,外标法定量。结果表明,萘二酚类物质在线性范围内线性关系良好,相关系数均不低于0.9990,方法的定量限(以信噪比为10计)为0.5~1.2 mg/kg,添加水平为5.0~50 mg/kg时回收率为84.0%~102%,相对标准偏差($n=6$)为1.3%~5.7%。该法前处理简单、回收率高、精密度好,适用于非蜡基类化妆品中萘二酚类物质的测定。

关键词: 反相高效液相色谱法; 萘二酚; 化妆品

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)06-0630-05

Simultaneous determination of seven naphthalenediols in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography

CHEN Lijian, HUANG Jinfeng, HE Minheng, LIN Senyu, GUO Xindong*

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: A novel analytical method for the simultaneous determination of seven naphthalenediols (2,6-naphthalenediol, 1,5-naphthalenediol, 1,6-naphthalenediol, 2,7-naphthalenediol, 1,7-naphthalenediol, 1,3-naphthalenediol and 2,3-naphthalenediol) in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a diode array detector was established. The moisturizer, cream, emulsion and water-like cosmetic samples were extracted with 95% ethanol (v/v), and the powder-like cosmetic samples were extracted with 95% ethanol-0.1% acetic acid (3:2, v/v), then the extracts were centrifuged, filtrated, and analyzed by RP-HPLC using a C₁₈ column, employing methanol-0.1% acetic acid aqueous solution as the mobile phases under the condition of gradient elution. The naphthalenediols were qualitatively determined by retention times, and confirmed by ultraviolet spectra. The external standard method was applied for the quantification. The results indicated that the limits of quantification (LOQs) of the seven naphthalenediols were ranged from 0.5 mg/kg to 1.2 mg/kg ($S/N=10$); meanwhile, the linear correlation coefficients of them were all no less than 0.9990 within the linear ranges. Their recoveries in spiked samples at the levels of 5.0–50 mg/kg were ranged from 84.0% to 102% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.3%–5.7% ($n=6$). The method is simple, precise and suitable for the determination of naphthalenediols in cosmetic samples.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); naphthalenediols; cosmetics

* 通讯联系人: 郭新东, 博士, 高级工程师. Tel: (020) 83187077, E-mail: gdone@21cn.com.

基金项目: 广东省地方标准计划项目(No. [2010] 299).

收稿日期: 2012-02-10

萘二酚类物质有多种异构体,是合成媒染偶氮染料的中间体,亦可用于制备偶氮染料等,涉及的下游产品众多,是常用的中间原料。该类物质具有刺激性,能引起过敏反应。我国卫生部发布的《化妆品卫生规范》(2007版)允许在化妆品中使用1,5-萘二酚和2,7-萘二酚,但限定其与氧化乳混合使用时,最大使用浓度应为0.5%,而且不可用于眉毛和睫毛毛化妆品^[1]。虽然我国还没有其他萘二酚异构体的限量要求,但鉴于它们与1,5-萘二酚和2,7-萘二酚有类似的危害,为保护消费者的健康,为化妆品质量监控提供技术支持,建立化妆品中萘二酚类物质的检测方法是十分必要的。由于化妆品大多用偶氮染料调色,本文对带有颜色的化妆品基质进行了研究,既可为超范围超量使用1,5-萘二酚和2,7-萘二酚提供技术支持,也可为化妆品中萘二酚类中间体现残留量的风险评估监测提供有效方法。

近年来,特别是《化妆品卫生规范》(2007版)发布后,人们越来越重视化妆品中染料和中间体的检测方法研究^[2-16],但是关于萘二酚含量测定的文献报道还较少。田世雄等^[2]采用反相液相色谱法测定了1,5-萘二酚及5-羟基萘满酮;饶燕等^[3]用高效液相色谱法(HPLC)测定了育宁乳膏中1,4-萘二酚的含量;陈娟等^[4]利用HPLC-二极管阵列检测器测定了化妆品中的9种染料及中间体,其中一种为1,7-萘二酚;朱会卷等^[5]用HPLC测定了染发剂中的22种染料成分(包括2,7-萘二酚和1,5-萘二酚);于文莲等^[6]采用超高效液相色谱-串联质谱法测定了染发剂中7种酚类化合物,其中包括1,7-萘二酚和2,3-萘二酚。本文利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对非蜡基类化妆品中的7种萘二酚进行了定性、定量研究,方法简便易行,回收率高,精密度好,适用于化妆品的实际检验工作。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配备二极管阵列检测器); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); 3K15 高速离心机(美国 Sigma 公司); MS3 basic 漩涡混合器(德国 IKA 公司); KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1,5-萘二酚(1,5-naphthalenediol, 含量 99.5%, Chem Service Inc.), 1,6-萘二酚(1,6-naphthalenediol, 含量 97.0%, Alfa Aesar 公司), 1,3-萘二酚(1,3-naphthalenediol, 含量 99.0%)、

1,7-萘二酚(1,7-naphthalenediol, 含量 97.0%)、2,3-萘二酚(2,3-naphthalenediol, 含量 98.0%)、2,6-萘二酚(2,6-naphthalenediol, 含量 98.0%)和2,7-萘二酚(2,7-naphthalenediol, 含量 97.0%)均购自 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇和冰醋酸(色谱纯), 95%乙醇(分析纯), 去离子水(18.0 MΩ·cm)。

1.2 标准溶液的配制

用甲醇将各萘二酚标准品配制成 1 000 mg/L 的标准贮备液, 分别准确移取萘二酚标准储备液各 10.0 mL, 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 配成质量浓度均为 100 mg/L 的萘二酚混合贮备液。各标准贮备液应于 4 °C 避光保存, 混合贮备液现配现用。

1.3 色谱条件

色谱柱: Dikma C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: A, 甲醇; B, 0.1% (v/v) 乙酸溶液。梯度洗脱程序: 0.0 ~ 35.0 min, 25% A ~ 85% A; 35.1 ~ 45.0 min, 25% A。流速: 1.0 mL/min。柱温: 30 °C; 检测波长: 230 nm; 进样量: 20 μL。

1.4 样品处理

1.4.1 膏霜类、乳液类和水类试样 准确称取 0.5 g (精确至 0.001 g) 试样, 于 10 mL 具塞比色管中, 加入 4 mL 95% (v/v) 乙醇, 于漩涡振荡器上振荡混匀后, 超声提取 15 min, 冷却至室温, 用 95% 乙醇 (v/v) 定容至 5 mL。取部分溶液于离心管中, 在 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 上清液经滤膜过滤后测定。

1.4.2 粉类试样 准确称取 0.5 g (精确至 0.001 g) 试样, 于 10 mL 具塞比色管中, 加入 2 mL 95% (v/v) 乙醇, 于漩涡振荡器上振荡混匀后, 再加入 2 mL 0.1% (v/v) 乙酸溶液, 超声提取 15 min, 冷却至室温, 用 95% (v/v) 乙醇定容至 5 mL。取部分溶液于离心管中, 在 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 上清液经滤膜过滤后测定。

2 结果与讨论

2.1 仪器分析条件的优化

比较了乙腈和甲醇两种有机相。等度洗脱时, 两种有机相的分离效果均比较差。梯度洗脱时, 甲醇-0.1% 乙酸溶液体系分离效果较好, 7 种萘二酚均能达到基线分离, 故选用甲醇作为有机相。比较了纯水、0.1% 乙酸溶液、0.1% 甲酸溶液、0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液和 0.02 mol/L 乙酸铵 5 种水相。结果显示, 纯水作为水相时, 1,3-萘二酚与 2,3-萘二酚无法分离; 0.02 mol/L 乙酸铵作为水相

时 响应值比较低 ,而且只能洗脱出 4 个峰; 0.1% 乙酸溶液、0.1% 甲酸溶液或 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液作为水相时 ,分离效果均较好 ,但是采用 0.1% 乙酸溶液时峰形对称性较好 ,故选用乙酸溶液作为水相。考察了乙酸体积分数为 0.01% , 0.05% , 0.1% 和 0.5% 时各组分的分离度、响应值和峰形。结果表明 4 种乙酸溶液均可令 7 种萘二酚达到基线分离; 乙酸浓度的高低对各组分的响应值没有显著影响(见图 1) ,但用 0.1% 乙酸溶液作为水相时 ,峰形最好。故选择 0.1% 乙酸溶液作为水相。

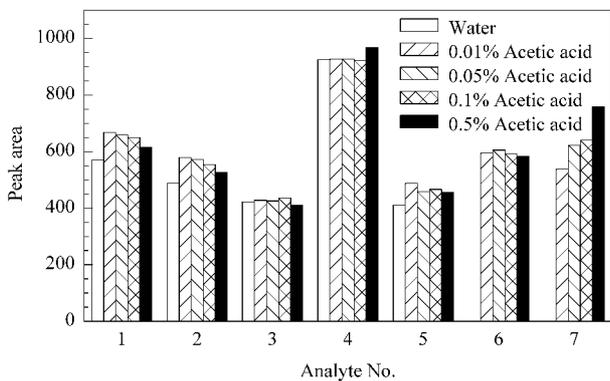


图 1 7 种萘二酚在不同乙酸含量流动相下的峰面积对比

Fig. 1 Comparison of peak areas of the seven naphthalenediols in mobile phase with different acetic acid contents

The LC system was equipped with a Dikma C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm , 5 μm) and the column oven temperature maintained at 30 °C. The mobile phase was constituted by solvent A (methanol) and solvent B (acetic acid aqueous solution). The mobile phase flow rate was 1.0 mL/min with a linear gradient at the following conditions: 0 - 35.0 min , 25% A - 85% A; 35.1 - 45.0 min , 25% A. The detection wavelength was 230 nm. The injection volume was 20 μL.

Analytes: 1. 2,6-naphthalenediol; 2. 1,5-naphthalenediol; 3. 1,6-naphthalenediol; 4. 2,7-naphthalenediol; 5. 1,7-naphthalenediol; 6. 1,3-naphthalenediol; 7. 2,3-naphthalenediol.

在优化好的色谱条件下(详见 1.3 节) , 7 种萘二酚混合标准溶液的色谱图见图 2。

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取剂的选择

化妆品按基质主要分为蜡基类和非蜡基类 ,非蜡基类包括膏霜类、乳液类、水

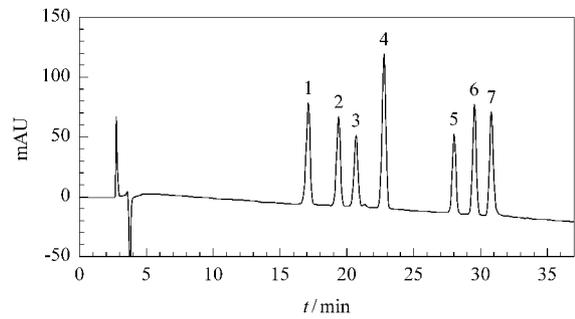


图 2 7 种萘二酚混合标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a mixture of seven naphthalenediol standards

The peaks are the same as the Nos. in Fig. 1.

类和粉类。本文选择具有代表性的唇膏(蜡基类) 、面霜(非蜡基类) 、洁面乳(非蜡基类) 、粉饼(非蜡基类) 、爽肤水(非蜡基类) 样品 ,比较了甲醇、乙腈、95% 乙醇、丙酮、甲醇-0.1% 乙酸(25: 75 , v/v) 、甲醇-水(1: 1 , v/v) 、乙醇-水(1: 1 , v/v) 、乙腈-水(1: 1 , v/v) 和纯水等多种提取剂的提取效果。结果表明 ,对于面霜、洁面乳、爽肤水样品 ,用 95% 乙醇作为提取剂时 ,基质分散均匀 ,峰形好 ,杂质干扰少 ,提取率高; 对于粉饼样品 ,用 95% 乙醇-0.1% 乙酸(3: 2 , v/v) 时 ,效果最优。对于唇膏样品 ,所尝试的提取剂效果均不理想。所以 ,本方法仅适用于非蜡基类化妆品中萘二酚类物质的测定。

2.2.2 提取条件的选择

比较了振荡提取和超声提取两种提取方法 ,结果表明 ,超声提取操作简便 ,提取效率较高。研究了超声时间为 5、10、15、20、30 min 时的提取率。发现超声时间对测定结果影响不大。考虑到不同品牌样品的密度、黏性等不同 ,为了避免由于时间过短而导致回收率偏低 ,超声时间选择 5 ~ 30 min 的中间点 15 min。

2.3 线性关系与方法定量限

用甲醇逐级稀释萘二酚混合贮备液 ,分别对系列浓度的混合标准工作溶液进行测定 ,以萘二酚的色谱峰面积 y 对其质量浓度 x (mg/L) 进行线性回归。线性回归方程、相关系数、方法定量限见表 1。

表 1 7 种萘二酚的线性回归方程、相关系数(r^2) 与定量限(LOQ)

Table 1 Regression equations , correlation coefficients (r^2) and quantification limits (LOQ) of the seven naphthalenediols

No.	Analyte	CAS No.	Regression equation	r^2	LOQ / (mg/kg)
1	2,6-naphthalenediol	581-43-1	$y = 305.07x + 36.174$	0.9993	0.7
2	1,5-naphthalenediol	83-56-7	$y = 262.57x + 33.938$	0.9992	0.8
3	1,6-naphthalenediol	575-44-0	$y = 209.59x + 25.802$	0.9993	1.2
4	2,7-naphthalenediol	582-17-2	$y = 436.05x + 76.389$	0.9990	0.5
5	1,7-naphthalenediol	575-38-2	$y = 214.87x + 33.097$	0.9996	1.0
6	1,3-naphthalenediol	132-86-5	$y = 303.19x + 25.805$	0.9992	0.6
7	2,3-naphthalenediol	92-44-4	$y = 311.27x + 27.023$	0.9993	0.7

y : peak area; x : mass concentration , mg/L.

从表1可以看出,7种萘二酚在0.1~200 mg/L范围内线性关系良好,相关系数均大于0.9990。方法定量限(以10倍信噪比($S/N=10$)计)为0.5~1.2 mg/kg。

2.4 回收率与精密度

选取黑发霜(黑色)、洁面乳(绿色)、胭脂(红色)、爽肤水(粉红色)阴性样品进行回收率与精密度试验。添加水平分别为5.0、10、50 mg/kg,按试样处理方法处理后进行测定,测定结果见表2。不同样品在添加浓度范围内,1,3-萘二酚、1,5-萘二酚、1,6-萘二酚、1,7-萘二酚、2,3-萘二酚、2,6-萘二

酚和2,7-萘二酚的回收率分别为84.0%~102%、84.9%~93.0%、84.2%~101%、85.7%~92.7%、84.7%~101%、85.1%~96.0%和85.8%~99.9%,相对标准偏差(RSD)为1.3%~5.7%($n=6$)。

2.5 实际样品的检测

使用本方法对24种膏霜类(包括10种染发剂)、5种乳液类、6种粉类以及3种水类等各类国内外化妆品进行了检测。有2种染发膏含有2,7-萘二酚,含量在限量(0.5%)以下(其中一种样品的色谱图及相关紫外光谱图见图3);其他各类化妆品中未检出所测的7种待测物。

表2 回收率和精密度测定结果($n=6$)
Table 2 Determination results of recoveries and precisions ($n=6$)

Analyte	Added/ (mg/kg)	Hair cream sample		Cleansing milk sample		Powder sample		Toner sample	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
2,6-Naphthalenediol	5.0	89.8	4.2	85.9	4.1	85.1	4.6	86.2	4.7
	10	91.6	4.1	88.9	2.8	87.7	3.5	89.9	2.5
	50	96.0	3.8	91.4	2.5	91.3	2.5	91.1	2.0
1,5-Naphthalenediol	5.0	86.1	3.9	87.6	2.4	84.9	3.3	85.4	3.6
	10	88.5	2.9	89.3	3.3	86.4	3.0	86.5	3.0
	50	90.5	2.6	90.3	4.4	88.5	2.5	93.0	2.8
1,6-Naphthalenediol	5.0	91.4	3.6	85.9	3.8	84.2	3.5	84.3	4.0
	10	92.1	3.1	89.2	3.0	86.0	3.2	86.7	2.9
	50	101	2.2	92.5	2.4	88.0	2.9	88.5	2.6
2,7-Naphthalenediol	5.0	90.4	5.3	85.8	3.9	90.4	4.3	93.7	5.3
	10	93.2	3.3	87.6	3.1	97.9	3.6	98.4	2.9
	50	98.7	3.1	94.9	2.4	98.8	3.4	99.9	2.5
1,7-Naphthalenediol	5.0	87.4	5.7	86.3	4.7	85.7	5.0	86.7	4.0
	10	91.5	3.7	88.4	2.3	87.8	4.3	88.3	3.4
	50	92.7	2.2	91.3	2.0	90.5	3.4	92.5	2.7
1,3-Naphthalenediol	5.0	91.9	3.9	84.0	3.8	91.5	4.6	93.3	3.7
	10	96.3	3.2	86.0	3.5	94.5	3.5	97.8	3.4
	50	100	2.6	87.2	3.0	102	3.0	99.2	2.1
2,3-Naphthalenediol	5.0	89.1	4.1	91.9	3.6	84.7	5.6	94.7	3.8
	10	88.3	3.1	97.0	2.2	87.7	4.3	95.6	1.6
	50	100	2.6	100	1.9	89.0	2.5	101	1.3

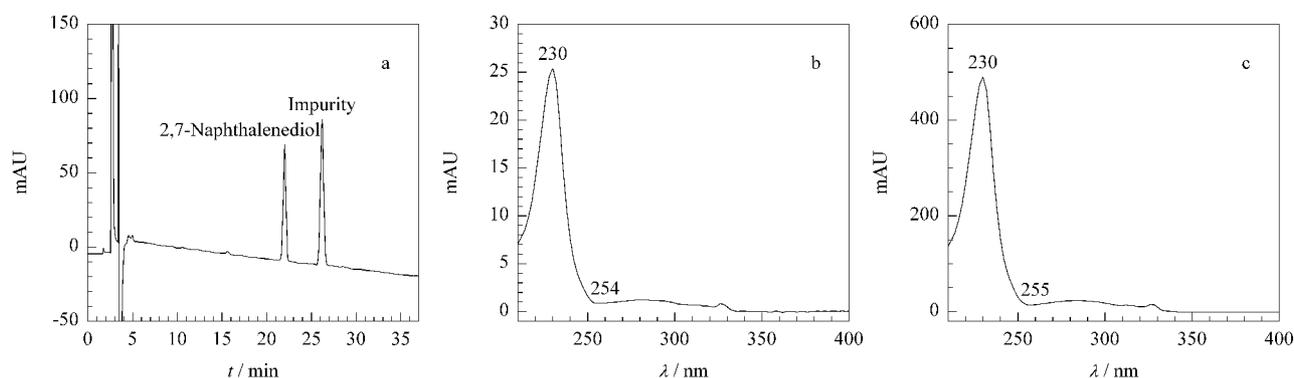


图3 (a) 阳性样品的色谱图及(b) 阳性样品中2,7-萘二酚的紫外光谱图
(c) 2,7-萘二酚标准溶液的紫外光谱图

Fig. 3 (a) Chromatogram of a positive sample and (b) ultra-violet spectrum of 2,7-naphthalenediol in a positive sample, and (c) ultra-violet spectrum of the 2,7-naphthalenediol standard

3 结论

建立了化妆品中 7 种萘二酚的反相高效液相色谱检测方法。使用二极管阵列检测器检测,以保留时间定性,并以紫外吸收光谱图辅助定性,方法前处理简单、回收率高,适用于化妆品中萘二酚类物质的测定。

参考文献:

- [1] Ministry of Health of the People's Republic of China. Hygienic Standard for Cosmetics(中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范). (2007-01-04) [2012-02-10]. http://www.moh.gov.cn/open/web_edit_file/20070124145740.pdf
- [2] Tian S X, Wang T, Wang Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (田世雄,王涛,王征,等. 色谱), 1991, 9(1): 57
- [3] Rao Y, An C X. China Pharmacist (饶燕,安彩贤. 中国药师), 2007, 10(2): 158
- [4] 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
- [5] Zhu H J, Yang Y W, Zhang W Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (朱会卷,杨艳伟,张卫强,等. 色谱), 2008, 26(5): 554
- [6] Yu W L, Zhao K J, Sun X, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (于文莲,赵开径,孙鑫,等. 理化检验-化学分册), 2010, 46(3): 220
- [7] Lai Y, Chen H X, Lin R, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (赖莺,陈和秀,林睿,等. 高等学校化学学报), 2011, 32(10): 2286
- [8] Akyüz M, Ata S. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(1): 68
- [9] Wang P G, Krynitsky A J. J Chromatogr B, 2011, 879(50): 1795
- [10] Zhao K J, Yu W L, Sun X, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (赵开径,于文莲,孙鑫,等. 分析实验室), 2010, 29(6): 66
- [11] Feng L, Wang L Y, Ying Y, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (冯靓,王立媛,应英,等. 中国卫生检验杂志), 2011, 21(6): 1352
- [12] Lu Y C, Wang H Y, Song P P, et al. Chinese Journal of Chromatography (卢玉超,王海燕,宋萍萍,等. 色谱), 2011, 29(11): 1122
- [13] Zhu H J, Yang Y W, Zhang W Q, et al. Journal of Environment and Health (朱会卷,杨艳伟,张卫强,等. 环境与健康杂志), 2008, 25(8): 719
- [14] Cao M L, Xu L, Mai Q, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (曹美龄,徐立,麦琦,等. 中国卫生检验杂志), 2008, 18(1): 168
- [15] Dong Q H, Chen Y M, Shi J E, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (董巧红,陈艳美,石金娥,等. 中国卫生检验杂志), 2009, 19(11): 2533
- [16] Yu W L, Chen W, Zhou X, et al. Journal of Instrumental Analysis (于文莲,陈伟,周新,等. 分析测试学报), 2009, 28(8): 975