

高效液相色谱法同时测定化妆品中的3种苯扎氯铵同系物

刘艳琴, 王浩*, 杨红梅, 史海良, 郭启雷

(北京市海淀区产品质量监督检验所, 北京 100094)

摘要: 建立了采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)同时检测化妆品中3种苯扎氯铵同系物($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ 、 $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ 、 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$)的方法。采用含0.5%甲酸的甲醇超声提取样品,以CAPCELL PAK SCX色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离,流动相为40 mmol/L乙酸铵水溶液(含0.1%三乙胺, pH 4.0)和乙腈,梯度洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长260 nm,柱温25 °C,进样量20 μL。该方法的检出限50.0 mg/kg,定量限200.0 mg/kg,线性范围5.0 ~ 3 000.0 mg/L,加标回收率92.5% ~ 102.1%,相对标准偏差为3.81% ~ 6.66%。结果表明,该方法快速、准确,能够同时测定化妆品中3种苯扎氯铵同系物。

关键词: 高效液相色谱法; 苯扎氯铵同系物; 化妆品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)05-0458-04

Simultaneous determination of 3 benzalkonium chloride homologs in cosmetics by high performance liquid chromatography

LIU Yanqin, WANG Hao*, YANG Hongmei, SHI Hailiang, GUO Qilei

(Haidian District Institute of Products Quality Supervision and Inspection, Beijing 100094, China)

Abstract: An analytical method based on high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) has been established for the simultaneous determination of 3 benzalkonium chloride homologs ($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$, $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$, $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$) in cosmetics. The sample was extracted with methanol (including 0.5% formic acid) under ultrasonic operation, the HPLC separation was carried out on a CAPCELL PAK SCX column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phases were 40 mmol/L ammonium acetate solution (including 0.1% triethylamine) and acetonitrile with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 20 μL. The limit of detection was 50.0 mg/kg and the quantitation limit was 200.0 mg/kg for 3 benzalkonium chloride homologs in cosmetics. The linear plots were obtained between 5.0 mg/L and 3 000.0 mg/L. Overall recoveries were between 92.5% and 102.1% with the relative standard deviations (RSDs) between 3.81% and 6.66%. The method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of 3 benzalkonium chloride homologs in cosmetics.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); benzalkonium chloride homologs; cosmetics

苯扎氯铵又名洁尔灭(BAC),是具有杀菌作用的季铵盐类阳离子表面活性剂,主要由3种正烷基取代的苯扎氯铵($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ($\text{C}_{12}\text{-BAC}$)、 $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ($\text{C}_{14}\text{-BAC}$)、 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{-C}_9\text{H}_{13}\text{NCl}$ ($\text{C}_{16}\text{-BAC}$))组成。3种同系物的杀菌特性不同:

$\text{C}_{12}\text{-BAC}$ 是有效的酵母菌和真菌抑制剂; $\text{C}_{14}\text{-BAC}$ 、 $\text{C}_{16}\text{-BAC}$ 分别能够作用于革兰氏阳性菌和阴性菌。它们被广泛应用于复方消毒剂、健康护理液(滴眼液、滴鼻液等)及化妆品中,添加的总量按用途的不同,一般在0.1%~0.8%。目前,我国《化妆品卫生

* 通讯联系人: 王浩, 硕士, 高级工程师, 主要从事色谱检测方面研究。Tel: (010) 82479365, E-mail: haowang2003@163.com.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局质量监督公益性行业科研专项项目(200910267-02).

收稿日期: 2011-01-21

规范》^[1]、欧盟化妆品规程(Council Directive 76/768/EEC)^[2]均明确了苯扎氯铵为化妆品组份中限用物质(淋洗类发用产品最大允许限量为3%,其他产品最大允许限量为0.1%)。因此,建立简便、快速、准确、敏感性高的化妆品中苯扎氯铵的检测方法才能满足日趋严格的残留限量要求,从而保障人们使用化妆品的卫生和安全。

测定苯扎氯铵的检测方法主要有毛细管电泳法^[3]、示差分光光度法^[4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5-8]等。其中HPLC是目前最常用的检测苯扎氯铵的方法,但是该法一般都使用反相C18色谱柱分离,特异性较差,易造成假阳性,不适合于化妆品这类基质复杂样品的检测。针对苯扎氯铵的结构特点(弱碱性化合物),本文采用酸性甲醇(含0.5%甲酸)超声提取样品中的苯扎氯铵,选择特异性较强的SCX阳离子色谱柱分离,利用二极管阵列检测器对其进行测定,取得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪,配自动进样器,Agilent G1315B二极管阵列检测器(美国Agilent公司);RE-2000型旋转蒸发器(上海市亚荣生化仪器厂);KQ-5200型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16M型高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);Milli-Q去离子水发生器(美国Milli-Q公司)。

乙腈(色谱纯,Fisher公司);甲酸、乙酸铵、三乙胺、冰醋酸(分析纯,北京化工厂);C₁₂-BAC、C₁₄-BAC、C₁₆-BAC(纯度≥99%,美国Sigma公司)。

样品:本单位检验样品。

1.2 标准储备溶液、工作溶液及缓冲溶液的配制

分别准确称取C₁₂-BAC、C₁₄-BAC、C₁₆-BAC标准品各0.1g,精确至0.0001g,用20%甲醇水溶液配成10g/L的标准储备液,该溶液在4℃下保存。

取适量的上述3种标准储备液,用含0.5%甲酸的甲醇配成分别为5.0、25、100.0、500.0、1000.0、3000.0mg/L的混合标准工作溶液。

乙酸铵缓冲溶液:称取3.08g乙酸铵置于烧杯中,加水溶解并定容至1000mL,加1mL三乙胺,用冰醋酸调节pH至4.0,过0.45μm滤膜,待用。

1.3 样品处理方法

1.3.1 护发素等膏霜类样品

称取0.5g样品,精确至0.01g,置于25mL比色管中,加入20mL含0.5%甲酸的甲醇超声波提

取20min,然后加入0.2g氯化钠,用含0.5%甲酸的甲醇定容至刻度,经滤纸过滤,吸取15mL滤液至100mL蒸发瓶内,并将其接至旋转器上,于45℃水浴中减压蒸馏至干,然后准确用3mL含0.5%甲酸的甲醇溶解,经滤纸过滤,过0.45μm滤膜,滤液供HPLC分析。

1.3.2 洗发水等液态样品

称取1.0g样品,精确至0.01g,置于10mL容量瓶中,加入9mL含0.5%甲酸的甲醇,超声波提取10min,用含0.5%甲酸的甲醇定容至刻度,经滤纸过滤,过0.45μm滤膜,滤液供HPLC分析。

1.4 HPLC条件

色谱柱:资生堂CAPCELL PAK SCX柱(250mm×4.6mm,5μm);柱温:30℃;进样量:20μL;检测波长:260nm;流动相:(A)乙腈和(B)乙酸铵缓冲溶液(pH4.0);梯度洗脱程序:0~15min,100%A线性降至75%A;15~20min,75%A;20~26min,100%A。流速:1.0mL/min。

1.5 定性定量方法

采用标准物质的保留时间和峰扫描光谱纯度对照两种方式对样品峰进行定性,以外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 样品提取

为了充分提取样品中的苯扎氯铵,本实验首先分别选择乙腈、甲醇、正己烷作为样品提取溶液进行提取,但试验结果均不理想(加标回收率低于50%)。考虑到苯扎氯铵为弱碱性化合物,经过反复试验,发现含0.5%甲酸的甲醇能有效地提取样品中苯扎氯铵(平均加标回收率高于90%),因此选择此溶液作为样品提取液。此外,为了提高方法的检出限,本实验选择将护发素等膏霜类样品提取溶液旋转蒸发富集后再进行色谱分析。

2.2 HPLC条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

据文献[5-8]报道,目前可用于分离苯扎氯铵的色谱柱主要为反相C18色谱柱,其特点是适用范围广,但特异选择性较差,容易造成假阳性。考虑到苯扎氯铵为季铵盐类阳离子,而且化妆品中基质干扰较大,为了简化样品的前处理净化步骤,本实验选择SCX阳离子色谱柱作为本方法的色谱分析柱。

2.2.2 流动相的选择

苯扎氯铵为弱碱性化合物,而且3种苯扎氯铵同系物的性质极为相近,为了有利于色谱峰的分离及峰形的改善,本方法采用乙酸铵缓冲溶液(pH

4. 0) 和乙腈为流动相,利用梯度洗脱的方法提高分离效果。测试开始时,流动相中乙酸铵缓冲溶液(pH 4. 0)与乙腈的比例为 0: 100,然后在 0 ~ 15 min 内将二者的比例调整为 25: 75,通过上述梯度,可以较好地分离 3 种苯扎氯铵同系物。

2. 2. 3 检测波长的选择

对苯扎氯铵标准溶液分别用紫外光谱仪进行扫描,发现其在 215 nm 和 260 nm 附近有共同较大吸收峰,215 nm 处响应值比 260 nm 响应值高 10 倍左右,但是 215 nm 为紫外区域的极限,大多数化合物在此有强吸收,因此从色谱测定角度考虑,本方法选择 260 nm 为检测波长。

在上述优化的色谱条件下得到了令人满意的结果(见图 1)。

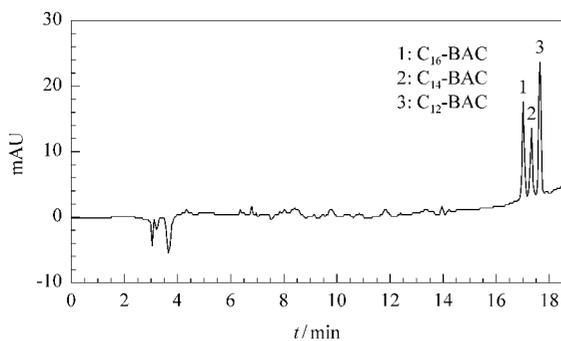


图 1 3 种苯扎氯铵同系物混合标准溶液的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of a mixed standard solution of 3 benzalkonium chloride homologs

表 1 3 种苯扎氯铵同系物在空白样品中的加标回收率(n=6)

Table 1 Recoveries of 3 benzalkonium chloride homologs spiked in blank samples (n=6)

Benzalkonium chloride homolog	200 mg/kg		400 mg/kg		1000 mg/kg		%
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	
C ₁₂ -BAC	94.4	6.66	94.0	5.58	101.7	5.13	
C ₁₄ -BAC	95.6	6.10	93.8	5.76	101.6	4.66	
C ₁₆ -BAC	92.5	5.46	93.7	4.68	102.1	3.81	

2. 5 实际样品的检测

利用本方法对市场销售的 25 种各类化妆品进行检测,其中 2 种品牌的洗发水检出 C₁₄-BAC,含量

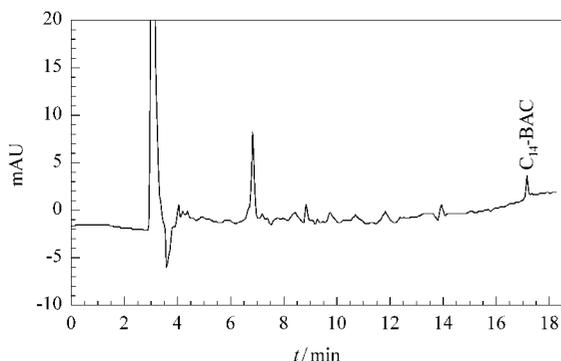


图 2 一种阳性样品的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of a positive sample

2. 3 标准曲线、线性范围和检出限

将逐级稀释的标准工作液(5. 0、25. 0、100. 0、500. 0、1 000. 0、3 000. 0 mg/L)分别进样 20 μL,以分析物的质量浓度 x(mg/L)为横坐标,峰面积 y 为纵坐标进行线性回归,在 5. 0 ~ 3 000. 0 mg/L 范围内得到的线性关系: C₁₂-BAC, $y = 0. 847x - 1. 635$ ($r = 0. 9999$); C₁₄-BAC, $y = 0. 580x - 0. 569$ ($r = 0. 9999$); C₁₆-BAC, $y = 1. 218x + 0. 568$ ($r = 0. 9999$)。同时进行样品添加试验,以信噪比(S/N)为 3 确定 3 种苯扎氯铵同系物的检出限,用空白样品提取液进行实验,在信噪比均大于 3 的条件下,将此添加量定为检出限。在空白样品(护发素)中添加 200 mg/kg 的 3 种苯扎氯铵同系物混合标准溶液,按 1. 3. 1 节方法处理后,经测定 6 个平行样品中 3 种苯扎氯铵同系物的 S/N 均大于 10,平均回收率大于 92%,相对标准偏差(RSD) 低于 7%,因此将 200 mg/kg 定为方法的定量限。

2. 4 回收率和精密度

每组准确称取空白护发素类样品 6 份,每份 0. 50 g,共 3 组,分别定量加入 C₁₂-BAC、C₁₄-BAC、C₁₆-BAC 标准品,添加水平分别为 200、400、1 000 mg/kg,按 1. 3. 1 节方法制备后进行测定,结果见表 1。从表 1 中可看出,不同浓度的平均加标回收率为 92. 5% ~ 102. 1%,平均 RSD 为 3. 81% ~ 6. 66% (n = 6),满足实验要求。

分别为 317. 74 mg/kg 和 222. 18 mg/kg,其他各类化妆品未检出目标化合物。图 2 为其中一种阳性样品的色谱图。

3 结语

建立了化妆品中 3 种苯扎氯铵同系物同时测定的 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 20 min 内 3 种苯扎氯铵同系物可达到完全基线分离,而且能有效地排除基质中其他物质的干扰。方法的线性关系、回收率及精密度等各项参数表明,方法的灵敏度和准确度均满足实际样品检测的需要。该方法的样品前处理简单易行,分析快速,对化妆品中 3 种苯扎氯铵同系物能有有效的提取、分离和测定,结果良好。

参考文献:

- [1] Ministry of Public Health. Hygienic Standard for Cosmetics (2007 Edition) of the People's Republic of China (卫生部. 化妆品卫生规范. 2007 年版). (2007-01-04). <http://www.fsi.gov.cn>
- [2] Council Directive 76/768/EEC
- [3] Zhou M, Duan G L, Liu Z. Journal of Environmental & Occupational Medicine (周密, 段更利, 刘振. 环境与职业医学), 2002, 19(5): 308
- [4] Ding X J, Chen Y P, Zhao H Y, et al. Journal of Instrumental Analysis (丁晓静, 车宜平, 赵海燕, 等. 分析测试学报), 2006, 25(6): 63
- [5] Han W F, Han B P, Zhu Q D, et al. Food and Drug (韩文芳, 韩保萍, 朱启登, 等. 食品与药品), 2010, 12(11): 425
- [6] Liu J Q, Zhang X B, Yang R C, et al. Chinese Journal of Disinfection (刘吉起, 张向兵, 杨瑞春, 等. 中国消毒学), 2010, 27(6): 682
- [7] Chen Q F, Wang X L. Chinese Journal of Pharmaceuticals (陈秋芬, 王小琳. 中国医药工业杂志), 2008, 36(9): 564
- [8] Wang J. Chinese Journal of Pharmaceuticals (汪洁. 中国医药工业杂志), 1996, 27(9): 413