

• 监测技术 •

离子对高效液相色谱法同时测定氧化型染发剂中5种染料

李莉¹, 徐海娥², 吉文亮¹

(1. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009;

2. 南京医科大学第二附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要: 采用离子对高效液相色谱法同时测定氧化型染发剂中5种染料成分, 选择 Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱 (2.6 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), 以 10 mmol/L 辛烷磺酸钠水溶液 (pH 值 2.5) + 甲醇 (体积比 60:40) 为流动相, 采用 DAD 检测器, 检测波长 280 nm, 以保留时间和紫外光谱特征定性, 外标法定量。5种染料在 20.0 mg/L ~ 100 mg/L 范围内线性关系良好, 最低检出质量分数氢醌为 0.02%, 间苯二酚为 0.03%, 邻氨基苯酚为 0.02%, 邻苯二胺为 0.04%, 4-氨基-2-羟基甲苯为 0.03%。低浓度基质加标平均回收率为 82.5% ~ 106%, RSD 为 1.4% ~ 6.1%, 中浓度基质加标平均回收率为 82.0% ~ 105%, RSD 为 0.4% ~ 2.2%, 高浓度基质加标平均回收率为 78.5% ~ 105%, RSD 为 1.7% ~ 4.5%。

关键词: 氢醌; 间苯二酚; 邻氨基苯酚; 邻苯二胺; 4-氨基-2-羟基甲苯; 离子对高效液相色谱法; 氧化型染发剂

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2013)04-0031-05

Simultaneous Determination of Five Dyes in Hair Dying Formulations by Ion-Pair HPLC

LI Li¹, XU Hai-e², JI Wen-liang¹

(1. Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China;

2. Nanjing Medical University, Second Affiliated Hospital, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: An ion-pair high performance liquid chromatographic method was established to simultaneous determination five dyes in oxidized hair dyes. The chromatographic conditions were as follows: Phenomenex kinetex C₁₈ column (2.6 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) was selected, with 10 mmol/L Octanesulfonic acid sodium solution (pH 2.5) - methanol (60:40, V/V) as the mobile phase, a diode array detector was used, detection wavelength at 280 nm, qualitative analysis by retention time and UV spectra characteristics, quantitative analysis by external standard method. Results showed good linearity for the 5 compounds ranging from 20.0 mg/L to 100 mg/L, lowest detective limits for Quinhydrone is 0.02%, Resorcinol is 0.03%, o-aminophenol is 0.02%, o-phenylenediamine is 0.04%, 4-amino-2-hydroxytoluene is 0.03%. Average spiked recoveries of matrices at lower level were between 82.5% and 106%, with RSD between 1.4% and 6.1%. Average spiked recoveries of matrices at middle level were between 82.0% and 105%, with RSD between 0.4% and 2.2%. Average spiked recoveries of matrices at high level were between 78.5% and 105%, with RSD between 1.7% and 4.5%.

Key words: Quinhydrone; Resorcinol; o-aminophenol; o-phenylenediamine; 4-amino-2-hydroxytoluene; Ion-pair high performance liquid chromatographic; Oxidized hair dyes

染发剂是人们日常生活中常用的一类化妆品, 氧化型染发剂因染色效果好、色调变化宽、维持时间长等优点而最受欢迎。染发剂中的染料成分多属于芳香类化合物, 包括芳香胺和酚类化合物, 其中许多化合物具有一定的毒性。由染发剂引起的

收稿日期: 2012-06-04; 修订日期: 2013-04-18

基金项目: 江苏省临床医学中心(高技术平台)基金资助项目 (ZX201109)

作者简介: 李莉(1956—), 女, 江苏如东人, 主任技师, 学士, 从事化妆品、食品的理化检验工作。

过敏反应非常普遍,长期使用不合格的染发剂还可能引起致畸、致突变、致癌及内分泌失调等疾病。鉴于染发剂存在各种安全隐患,以及接触和使用染发剂的群体数目庞大,加强对染发剂的卫生管理和日常监督非常必要。

我国2007年颁布的《化妆品卫生规范》对93种暂时允许使用的染发剂作了限量使用规定,对邻苯二胺及其盐类作了禁用规定,同时推荐了对苯二胺、对氨基苯酚、氢醌、甲苯2,5-二胺、邻苯二胺、间氨基苯酚、间苯二酚、对甲氨基苯酚等8种氧化型染料的液相色谱检测方法^[1-2],采用乙腈+三乙醇胺水溶液(体积比5:95,pH值7.7)作为流动相,能较好地分离上述8种染料。文献也报道了类似的测定方法^[3-4],如鲁琳等^[5]采用该方法测定了染发剂中9种染料成分(增加了间苯二胺),样品前处理过程略有变化,但色谱条件均相同。朱英等^[6]采用气相色谱-质谱法也能实现上述8种染料的同时测定。薄层层析法虽然较为简单,分离效果也较好,但在定量分析方面存在一定的局限性^[7]。在实际检测工作中发现,除了上述8种染料之外,有些彩色染发剂中还含有邻氨基苯酚和4-氨基-2-羟基甲苯,其限量分别为2.0%和3.0%,但目前缺乏相关的标准检测方法。今采用离子对反相高效液相色谱法,实现了邻氨基苯酚和4-氨基-2-羟基甲苯的定量分析,该方法还可以同时测定染发剂中的氢醌、间苯二酚和邻苯二胺。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

2695型高效液相色谱仪,美国Waters公司;2996型二极管阵列检测器;AutoScience 20500A型超声波清洗器;雷磁PHS-3C型精密pH计;Sartorius sigma 1-14型高速离心机;Mettler PM 200型电子天平。

氢醌(QK)标准品,Dr. Ehrenstorfer. GmbH公司;间苯二酚(RCN,纯度99%)、邻氨基苯酚(OAP,纯度99%)、邻苯二胺(OPD,纯度98%)标准品,上海迈瑞尔化学技术有限公司;4-氨基-2-羟基甲苯(PAOC,纯度97%),Acros Organics公司;5种染料标准储备液(1000 mg/L):准确称取各标准品50.0 mg,分别置于50 mL棕色容量瓶中,加入30 mL甲醇,超声5 min,冷却至室温,用甲醇稀释至刻度;10 mmol/L辛烷磺酸钠水溶液:称

取2.20 g辛烷磺酸钠于1000 mL水中,用10%磷酸溶液准确调节pH值至2.5;甲醇(色谱纯);磷酸(分析纯)。

1.2 色谱条件

DAD检测器,检测波长280 nm;Phenomenex kinetex C₁₈色谱柱(2.6 μm,100 Å,4.6 mm×150 mm);柱温25℃;进样体积5 μL。流动相A为甲醇,流动相B为10 mmol/L辛烷磺酸钠水溶液,体积比40:60,流量0.25 mL/min。

1.3 样品前处理

准确称取膏状样品约0.25 g(精确至0.0001 g),置于25 mL具塞比色管中,加20 mL甲醇溶解,于25℃超声20 min,冷却至室温,用甲醇定容至刻度,混匀。吸取1.5 mL样液于1.5 mL离心管中,以13000 r/min的转速离心5 min,经0.45 μm滤膜过滤后待测。

1.4 标准曲线绘制

准确吸取5种染料标准储备液各0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得20.0 mg/L、40.0 mg/L、60.0 mg/L、80.0 mg/L、100 mg/L混合标准工作溶液系列。在设定的色谱条件下,分别取各混合标准工作溶液5 μL,注入高效液相色谱仪,以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。用高效液相色谱仪分析,以保留时间(Rt)和紫外吸收光谱定性,峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择与优化

5种染料组分均属于酚类、苯胺类极性化合物,易溶于乙腈、甲醇、乙醇和水。标准方法采用乙腈+三乙醇胺水溶液(体积比5:95)为流动相,pH值为7.7,该试验采用甲醇+10 mmol/L辛烷磺酸钠水溶液(体积比40:60)为流动相。为了确保待测组分的离子化程度,应使流动相保持酸性,pH值越低,离子化程度越高,因而将流动相pH值调至2.5。负离子对试剂辛烷磺酸钠可与待测组分结合成离子对而呈中性,使非极性表现出来,从而在色谱柱上有保留行为。考察了5 mmol/L~20 mmol/L范围内共4个浓度水平的辛烷磺酸钠溶液用作流动相的情况,结果发现当其浓度达到10 mmol/L时,5种组分的色谱峰才能得到有效分离;当浓度继续增大时,5种组分的色谱峰分离度

仅略微变大。考虑到高浓度离子对试剂溶液易对色谱柱造成损坏,且不易冲洗干净,该试验选择辛烷磺酸钠溶液浓度为10 mmol/L。需要注意的是,用含有离子对试剂的流动相进行初始平衡时,色谱柱吸收和释放离子对试剂的过程缓慢,柱平衡较慢,需要证实保留值能重现后方可测定。

2.2 色谱柱的选择

分别采用 Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 和 Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱,试验结果表明,前者虽然能将5种染料组分完全分离,但峰形欠佳(见图1);后者不仅能达到基线分离,且峰形对称(见图2)。

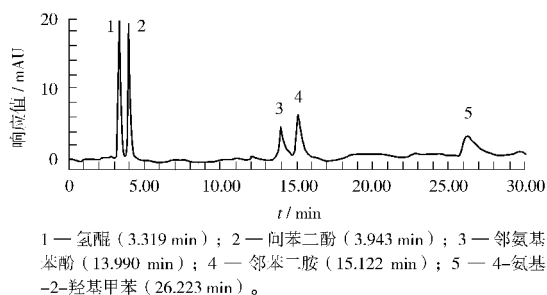


图1 标准溶液色谱峰(Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱)

Fig.1 Chromatogram of standard solution
(by Zorbax SB - C₁₈ column)

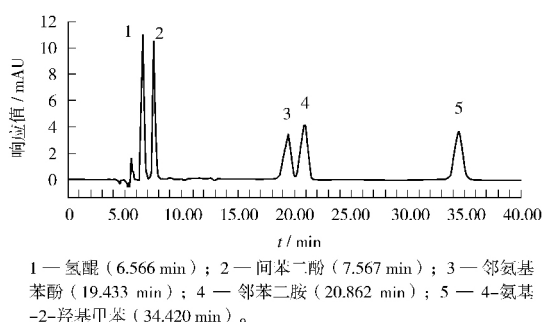


图2 标准溶液色谱峰(Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱)

Fig.2 Chromatogram of standard solution
(by Phenomenex kinetex C₁₈ column)

2.3 干扰试验

对苯二胺(PPD)、甲苯2,5-二胺硫酸盐(PTD)、对氨基苯酚(PAP)、间氨基苯酚(MAP)、对甲氨基苯酚硫酸盐(PMAOS)是化妆品中可能添加的主要功效成分。将其添加至含有氢醌(Rt 6.76 min)、间苯二酚(Rt 7.83 min)、邻氨基苯酚

(Rt 20.05 min)、邻苯二胺(Rt 21.53 min)、4-氨基-2-羟基甲苯(Rt 35.6 min)等5种组分的混合标准溶液中,在上述色谱条件下测定,结果表明出峰时间基本无干扰(见图3)。

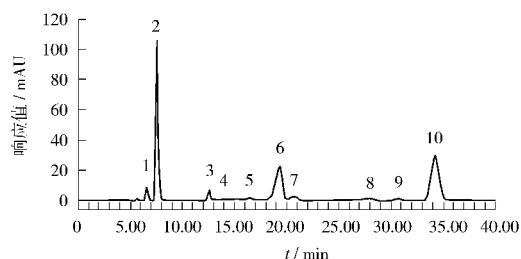


图3 10种染料组分散谱峰

Fig.3 Chromatogram of 10 hair dyes

在某些市售染发剂产品中,杂质峰的保留时间与邻苯二胺相近,对其测定有干扰。如图4中 Rt 21.463 min 处为杂质峰,可以参照两者的紫外光谱加以辨别(分别见图5和图6)^[4-5]。

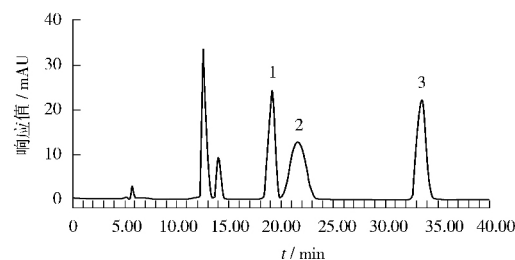


图4 某样品色谱峰

Fig.4 Chromatogram of sample solution

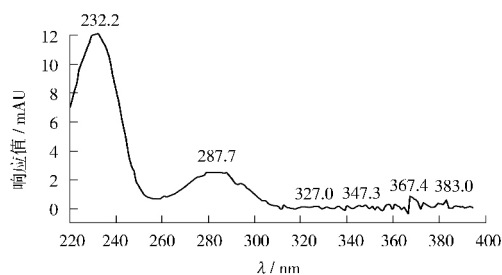


图5 邻苯二胺的紫外光谱

Fig.5 UV spectrum of o-phenylenediamine

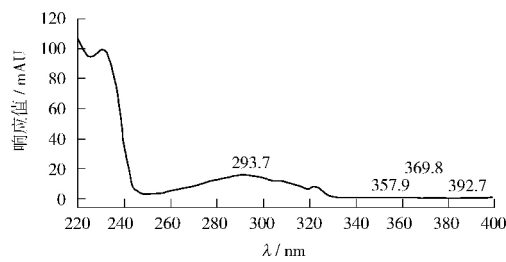


图 6 样品中杂质的紫外光谱
Fig.6 UV spectrum of impurities in the sample solution

2.4 标准溶液稳定性试验

将 5 种染料组分混合标准溶液置冰箱中于 4 ℃ 保存,每隔 24 h 测量峰面积,考察其稳定性。试验结果表明,放置 24 h 后,5 种组分的峰面积基本无变化;放置 48 h 后,仅邻氨基苯酚的低质量浓度溶液(20.0 mg/L) 峰面积下降较明显,至 72 h 后下降 15.1%,中质量浓度溶液(60.0 mg/L) 峰面积下降 6.8%。20.0 mg/L 混合标准溶液峰面积变化见表 1。

表 1 混合标准溶液(20.0 mg/L) 峰面积变化

Table 1 Peak area change rate of mixed standard solution (20.0 mg/L)

放置时间 <i>t</i> /h	氢醌	间苯二酚	邻氨基苯酚	邻苯二胺	4-氨基-2-羟基甲苯
0	410 246	343 293	270 338	392 375	341 888
24	416 841	342 611	267 356	377 695	340 737
48	431 779	356 324	258 673	372 450	333 062
72	435 309	353 013	229 470	370 492	325 754

2.5 标准曲线与检出限^[7-8]

5 种染料组分在 20.0 mg/L ~ 100 mg/L 范围内线性良好,回归方程与相关系数见表 2。

以 3 倍信噪比(*S*/*N* = 3) 确定检出限,并配制约检出限 3.3 倍的混合标准溶液,添加至样品空白基质中,确定其定量下限,结果见表 2。

表 2 标准曲线与检出限

Table 2 The standard curve and the detection limit

化合物	回归方程	相关系数 <i>r</i>	检出限 <i>m</i> /μg	定量下限 <i>m</i> /μg	最低检出质量分数 <i>w</i> /%
氢醌	<i>y</i> = 20 630 <i>x</i> - 22 810	0.999 9	0.01	0.04	0.02
间苯二酚	<i>y</i> = 17 516 <i>x</i> - 5 633. 5	0.999 9	0.015	0.05	0.03
邻氨基苯酚	<i>y</i> = 12 461 <i>x</i> + 35 275	0.999 0	0.01	0.03	0.02
邻苯二胺	<i>y</i> = 19 325 <i>x</i> - 8 538. 2	0.999 8	0.02	0.07	0.04
4-氨基-2-羟基甲苯	<i>y</i> = 16 979 <i>x</i> - 10 796	0.999 9	0.015	0.05	0.03

2.6 精密度与加标回收试验

称取 18 份膏状空白样品约 0. 25 g(精确至 0. 000 1 g), 每 6 份作为 1 个添加水平,分别准确加入 1 000 mg/L 5 种染料标准储备液 0. 2 mL、

0. 6 mL、1. 0 mL,即加标 20. 0 mg/L、60. 0 mg/L、100 mg/L。按样品操作步骤前处理后,作为基质低、中、高质量浓度测试溶液,在上述色谱条件下测定,结果见表 3。

表 3 精密度与加标回收试验结果

Table 3 Results of precision and spiked recovery test

化合物	加标量 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	测定均值 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	平均回收率/%	标准偏差 <i>s</i> /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%
氢醌	20.0	21.3	106	0.31	1.5
	60.0	63.1	105	0.27	0.4
	100	105	105	1.77	1.7
间苯二酚	20.0	20.3	102	0.28	1.4
	60.0	61.5	102	0.52	0.8
	100	103	103	1.95	1.9
邻氨基苯酚	20.0	18.3	91.5	1.11	6.1
	60.0	49.2	82.0	1.07	2.2

续表

化合物	加标量 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	测定均值 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	平均回收率 / %	标准偏差 $s / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD / %
邻苯二胺	100	78.5	78.5	3.50	4.5
	20.0	16.5	82.5	0.39	2.4
	60.0	52.6	87.7	0.69	1.3
4-氨基-2-羟基甲苯	100	87.8	87.8	2.60	3.0
	20.0	20.3	102	0.55	2.7
	60.0	60.2	100	0.47	0.8
	100	102	102	2.06	2.0

2.7 实际样品测定

采用该方法测定 4 份已知配方的国内市场销售的染发剂样品,通过比较实测值与配方值之间的

相对误差,评价定量结果的准确度。实际样品测定结果见表 4,色谱峰见图 7。4 个样品所含成分的测定值均与配方值符合,相对误差 < 10%。

表 4 实际样品测定结果

Table 4 Determination results of samples

样品	氢醌	间苯二酚	邻氨基苯酚	邻苯二胺	4-氨基-2-羟基甲苯
1	—	—	0.58	—	0.82
2	—	—	0.82	—	0.76
3	—	—	0.43	—	0.71
4	—	—	0.59	—	0.59

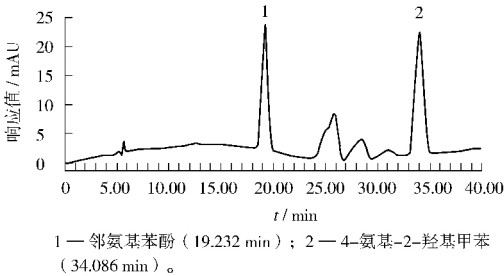


图 7 实际样品色谱峰

Fig. 7 The actual sample chromatogram

3 结语

采用离子对高效液相色谱法,可以使 5 种染料组分达到完全分离,且相互之间没有干扰,方法的线性关系、精密度与回收率均能满足实际样品的检测需要。鉴于目前国家没有相应的方法检测染发剂中的邻氨基苯酚和 4-氨基-2-羟基甲苯,该方法可以为染发剂的质量监测与监督提供技术支持。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范 第三部分 卫生化学检验方法 [J]. 北京: 军事医学科学出版社, 2007.

[2] 郑星权, 周淑玉, 周世伟. 化妆品卫生检验手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 135-405.

[3] 肖怀, 崔胜男, 白志英. 天然染发剂中对苯二胺定量分析 [J]. 大理学院学报(综合版), 2011, 10(6): 1-3.

[4] 鲁琳, 龙朝阳, 许秀敏. 9 种氧化型染发剂中染料的高效液相色谱测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(2): 182-184.

[5] 朱英, 杨艳伟, 李静. 气相色谱-质谱法同时测定氧化型染发剂中的多种染料中间体 [J]. 色谱, 2005, 23(5): 566.

[6] 朱英, 朱会卷. 染发剂的安全性及其检测方法研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(7): 888-890.

[7] 陈蓓, 李莉, 吉文亮. 高效液相色谱法测定化妆品中二苯酮-2、二苯酮-3 与甲氧基肉桂酸乙基己酯 [J]. 环境监测管理与技术, 2010, 22(6): 61-63.

[8] 桂英爱, 王洪军, 马琳, 等. 高效液相色谱法同时测定海水中孔雀绿和无色孔雀石绿 [J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20(2): 44-45.

后 事

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中,以数字化方式复制、汇编、发行信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意上述声明。