

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00110

· 短篇论著 ·

高效液相色谱-紫外检测法同时测定染发剂中的 20 种染料成分

钱 跣, 金柔男, 赵 亮, 吕 磊, 张 海, 李悦悦, 张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱(HPLC)-二极管阵列检测器(DAD)法测定染发剂中 20 种染料成分的含量,对《化妆品卫生规范》中的氧化型染料的 HPLC 检测方法进行改进和补充。**方法** 样品经乙醇-水超声提取,过滤后进样检测。色谱柱:Agilent Zorbax Bonus-RP (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A相为乙腈,B相为 4 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0,含 0.1%的辛烷磺酸钠离子对试剂),梯度洗脱:0~24 min,10% A;24~26 min,10%~40% A;26~45 min,40% A;45~47 min,40%~80% A;47~52 min,保持 80% A 不变;流速 1 mL/min;柱温 15℃,使用 DAD 进行检测,检测波长为 280 nm,进样量 5 μL。**结果** 各染料成分在 50 min 内基线分离。在 10.0~500.0 mg/L 浓度范围内,线性关系良好,相关系数均高于 0.999,日内及日间精密度均小于 4%,加样回收率为 81.90%~119.88%。**结论** 该方法简便、快速、准确,适于氧化型染发剂中染料成分的检测。

[关键词] 高压液相色谱法;染料;染发剂**[中图分类号]** R 917.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0110-05

HPLC-DAD for simultaneous determination of 20 colorants in hair dyes

QIAN Xian, JIN Rou-nan, ZHAO Liang, LÜ Lei, ZHANG Hai, LI Yue-yue, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To develop a high-performance liquid chromatography (HPLC)-diode array detector (DAD) method for determination of 20 colorants in hair dyes, so as to improve the method for determining oxidative hair dyes in *Hygienic Standard for Cosmetics*. **Methods** After ultrasonic extraction with ethanol-water, samples were analyzed by HPLC. The separation was achieved on an Agilent Zorbax Bonus-RP column (4.6 mm×250 mm,5 μm) using a gradient mobile phase system of A: acetonitrile and B: 4 mmol/L PBS (pH=6.0) containing 0.1% 1-octanesulfonic acid sodium salt solution at a flow rate of 1 mL/min. The gradient elution program was as follows: 0-24 min, 10% A; 24-26 min, 10%-40% A; 26-45 min, 40% A; 45-47 min, 40%-80% A; 47-52 min, keep 80% A unchanged. The detection wavelength was set at 280 nm, the temperature of column was 15℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** All the components were separated at baseline within 50 min. Within the concentration range of 10.0-500.0 mg/L, the peak areas and concentrations of colorants had good linear relationship, with the linear correlation coefficients being higher than 0.999. The intra-day and inter-day precisions were within 4% and the average recoveries ranged from 81.90% to 119.88%. **Conclusion** The present method is simple, rapid and accurate and is suitable for determination of colorants in oxidative hair dyes.

[Key words] high pressure liquid chromatography; colorants; hair dyes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1):110-114]

近年来随着人们生活水平的不断提高,染发已成为常见的美容方式之一。城市中青少年彩色染发者逐年增多,中老年人群中染发者比例也呈上升趋势^[1]。目前市售的染发剂有氧化型、直接型、金属盐

类和天然植物型等类型,其中以氧化型染发剂为主。氧化型染发剂由氧化型染料和氧化剂组成,它具有染色效果好、色调变化宽、维持时间长等诸多优点^[2]。氧化型染料多数属于芳香胺类化合物,对人

[收稿日期] 2013-07-10

[接受日期] 2013-09-09

[作者简介] 钱 跣, 硕士生, E-mail: cpuqianxian@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

体有一定的潜在危害性,因此也日益受到人们的关注。使用染发剂而引起的过敏反应非常普遍,长期使用还可能致突变、致敏、致癌、对神经行为功能及子代产生影响,因此国家2007版《化妆品卫生规范》中对暂时允许使用的93种染发剂中有关物质提出了限量标准,并对氢醌、对氨基苯酚、邻苯二胺、间苯二酚、对苯二胺、甲苯2,5-二胺、对甲氨基苯酚、间氨基苯酚等染料成分提出了测定方法^[3],而常用的邻氨基苯酚等染料目前尚未有国家标准检测方法。

目前测定氧化型染发剂中染料成分的常见方法主要有薄层色谱^[4]、高效液相色谱(HPLC)^[5-7]、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)^[8]、气相色谱^[9]、气相色谱-质谱^[10]、毛细管电泳^[11]等。其中薄层色谱法前处理步骤复杂,定量的准确度和重现性较差;毛细管电泳法上样量小,检出灵敏度相对较低;质谱法运行成本高。HPLC法具有灵敏度高、准确性好、通用性强等特点,是目前最理想的检测染料的方法。本研究选择市场上使用频率较高的染料成分为研究对象,优化样品前处理方法,摸索色谱柱及流动相等液相条件,建立染发剂中20种染料成分的HPLC-二极管阵列检测器(DAD)检测方法。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元泵、柱温箱、自动进样器和DAD(安捷伦公司,美国);pH计(Orion公司,美国);0.45 μm 微孔滤膜。

1.2 试剂 对苯二胺(1,4-diaminobenzene)、4-氨基酚(4-aminophenol)、3-氨基酚(3-aminophenol)、2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐(2-chloro-1,4-diaminobenzol-sulfat)、间苯二酚(1,3-benzenediol)、2-硝基-1,4-苯二胺(2-nitro-1,4-penylenediamine)、3,4-二氨基甲苯(3,4-diaminoluene)、5-氨基-邻甲酚(5-amino-o-cresol)、2-甲基雷锁辛(2-methylresorcinol)、2-氨基-5-甲基苯酚(2-amino-5-methylphenol)、3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)、4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺(4-N,N-diethyl-2-methyl-p-phenylene-diamine)、4-氨基-3-硝基苯酚(4-amino-3-nitophenol)、6-羟基吡啶

(6-hydroxyindole)、4-氯间苯二酚(4-chlororesorcinol)、2,7-二羟基-萘(2,7-dihydroxy-naphthalene)、1,5-二羟基-萘(1,5-dihydroxy-naphthalene)、N-苯基-1,4-苯二胺(N-phenyl-1,4-phenylene-diamine)、邻氨基酚(2-aminophenol)、1-萘酚(1-naphthol)等20种染料标准品购于美国Sigma公司。乙腈、辛酸磺酸钠(色谱纯);磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、亚硫酸钠、磷酸、95%乙醇(均为分析纯);水为超纯水。样品染发剂A和B均为市售。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 磷酸盐缓冲体系 称取十二水合磷酸氢二钠3.6 g、磷酸二氢钾4.2 g和辛酸磺酸钠1 g溶于1 L水中混匀,配制成含0.1%辛酸磺酸钠的4 mmol/L磷酸盐缓冲液,并用磷酸调节pH至6.0。用0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.1.2 标准溶液的配制 称取各染料对照品约25 mg(精确至0.1 mg),按2 mg/mL浓度水平加入亚硫酸钠,并用95%乙醇-水(体积比为1:1)混合溶液定容至2 mL,分别配成约12.5 mg/mL的染料单标储备液。以下几种物质在上述溶剂中的溶解性较差,需要采取不同的措施溶解:2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐加入几滴10%氨水以增加其溶解性;3,4-二氨基甲苯可直接用95%乙醇溶液定容;2-硝基-1,4-苯二胺需将称样量减至12.5 mg,再用95%乙醇溶液定容,配成约6.25 mg/mL的单标储备液。各染料的单标储备液保存于4℃冰箱中,存储期限为2 d。

用移液管移取各单标储备液适量至10 mL容量瓶中,用95%乙醇稀释至浓度为10.0、25.0、50.0、100.0、200.0和500.0 mg/L,作为混合标准溶液。

2.2 样品前处理 称取样品约0.25 g(精确至1 mg),用95%乙醇-水(体积比为1:1)定容至5 mL,超声提取15 min,4 458×g离心10 min,上清液用0.45 μm微孔滤膜过滤,待测。

2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax Bonus-RP柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-4 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.0,含0.1%的辛酸磺酸钠离子对试剂),A相为乙腈,B相为磷酸盐缓冲

液。梯度洗脱:0~24 min, 10% A; 24~26 min, 10%~40% A; 26~45 min, 40% A; 45~47 min, 40%~80% A; 47~52 min, 保持80% A不变。流速1 mL/min; 柱温15℃; 进样量5 μL; 检测波长280 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性实验 分别配制空白溶剂、20种染料混合对照品溶液及样品溶液5 μL进样分析,根据各对照品和样品溶液色谱峰中各成分的保留时间和紫外吸收,可确定20种染料所对应的色谱峰,如图1所示。

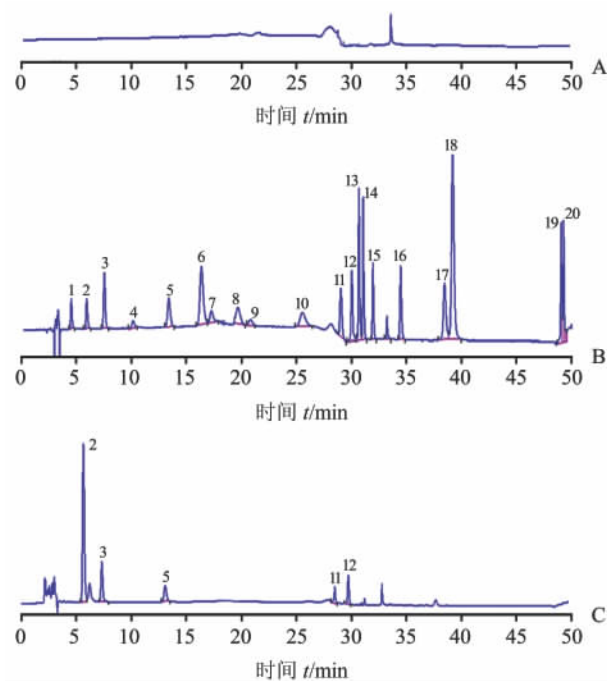


图1 空白溶剂(A)、混合对照品溶液(B)及样品溶液(C)的HPLC图

1: 对苯二胺; 2: 4-氨基酚; 3: 3-氨基酚; 4: 2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐; 5: 间苯二酚; 6: 2-硝基-1,4-苯二胺; 7: 3,4-二氨基甲苯; 8: 5-氨基-邻甲酚; 9: 2-甲基雷锁辛; 10: 2-氨基-5-甲基苯酚; 11: 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮; 12: 4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺; 13: 4-氨基-3-硝基苯酚; 14: 6-羟基吡啶; 15: 4-氯间苯二酚; 16: 2,7-二羟基-萘; 17: 1,5-二羟基-萘; 18: N-苯基-1,4-苯二胺; 19: 邻氨基酚; 20: 1-萘酚

2.4.2 标准曲线、线性范围和检测限 分别吸取2.1.2项下配制的6个浓度的混合对照品溶液5 μL,按2.3项下色谱条件进行HPLC分析,计算线性回

归方程。结果表明,在10.0~500.0 mg/L质量浓度范围内,各染料成分的峰面积和浓度间具有良好的线性关系,相关系数均高于0.999。将标准溶液逐级稀释,计算信噪比(S/N);以S/N=3为检测限,S/N=10为定量限。结果见表1。

2.4.3 精密度实验 将浓度为25.0、100.0和500.0 mg/L混合标准溶液在1 d内分别连续进样6次,以及连续3 d分别进样,根据所得峰面积分别计算日内精密度和日间精密度。结果显示,20种染料成分日内及日间精密度RSD值均小于4%,表明该方法的精密度良好。

2.4.4 加样回收率 由于染发剂的空白样品难以得到,故实验中选择含染料种类少的样品扣除本底后作为基体样,分别加入25.0、100.0和500.0 mg/L低、中、高3种浓度的混合标准溶液进行加样回收实验。结果显示,各染料成分的低浓度加样回收率为81.90%~115.08%,中浓度的加样回收率为91.29%~119.88%,高浓度的加样回收率为88.25%~118.19%,基本满足分析要求。

2.4.5 稳定性考察 取制备的染发剂样品溶液,分别在0、2、4、6、8、12、24 h时测定20种染料的峰面积,考察稳定性。结果显示各成分峰面积RSD均小于2%,表明供试品溶液在24 h内保持稳定。

2.5 样品测定 市售2种染发剂按2.2项下方法平行处理5份,每份测定2次,计算含量,结果见表2。两种染发剂均有含量标识,通过比较实测值和配方值之间的相对误差评价结果的准确度。所含成分的含量测定值和配方值基本符合,共检测出4-氨基酚、3-氨基酚、2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐、间苯二酚、3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮、4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺、4-氯间苯二酚等7种成分。对于商品包装上明确标出的“无对苯二胺”,在本研究中也未检测到该成分。

3 讨论

3.1 提取条件的选择 由于2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐等染料成分可能以盐的形式存在于样品中,为确保提取完全,本实验考察了不同比例乙醇-水作提取溶剂的提取效率,结果表明,采用95%乙醇-水

(体积比为1:1)能达到最佳提取效果,并能提高进样溶液和流动相的混合性。

表1 20种染料成分的标准曲线、相关系数、检测限和定量限

染料成分	标准曲线	相关系数	检测限 m/ng	定量限 m/ng
对苯二胺	$y=2.1298x+1.7571$	1.0000	2.31	7.25
4-氨基酚	$y=2.4068x+3.8335$	0.9999	2.32	7.32
3-氨基酚	$y=4.9492x-1.2492$	1.0000	1.25	3.13
2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐	$y=0.8765x+5.0098$	0.9999	3.03	12.50
间苯二酚	$y=4.2557x-2.0087$	1.0000	2.50	7.72
2-硝基-1,4-苯二胺	$y=10.822x+23.49$	0.9997	1.15	3.13
3,4-二氨基甲苯	$y=4.0517x+15.025$	0.9997	3.75	11.50
5-氨基-邻甲酚	$y=5.4065x-53.685$	0.9994	6.94	22.30
2-甲基雷锁辛	$y=1.9018x-10.429$	0.9995	3.33	10.50
2-氨基-5-甲基苯酚	$y=4.5461x-6.7442$	0.9997	4.76	14.47
3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮	$y=5.4330x-7.4922$	0.9996	1.50	5.21
4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺	$y=3.2635x+8.9171$	0.9991	0.68	2.54
4-氨基-3-硝基苯酚	$y=8.7346x+13.905$	1.0000	0.45	1.56
6-羟基吡啶	$y=7.5197x+12.988$	0.9999	0.48	1.70
4-氯间苯二酚	$y=4.5449x+11.399$	1.0000	0.87	2.37
2,7-二羟基-萘	$y=5.8712x+7.8431$	1.0000	0.91	3.14
1,5-二羟基-萘	$y=6.2540x+41.816$	0.9995	1.20	3.89
N-苯基-1,4-苯二胺	$y=22.7290x+47.847$	0.9999	0.38	1.25
邻氨基酚	$y=6.5973x+26.153$	1.0000	0.54	1.66
1-萘酚	$y=4.5824x+17.565$	0.9998	0.53	1.75

表2 染发剂A及染发剂B染料成分及含量

$$n=5, \bar{x} \pm s, w_B/(mg \cdot g^{-1})$$

成分	染发剂A	染发剂B
4-氨基酚	7.54 ± 0.24	-
3-氨基酚	0.87 ± 0.01	6.77 ± 0.14
间苯二酚	0.68 ± 0.02	-
2-氯-1,4-二氨基-苯-硫酸盐	-	18.15 ± 0.31
3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮	0.33 ± 0.01	1.58 ± 0.05
4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺	1.66 ± 0.04	8.77 ± 0.39
4-氯间苯二酚	-	1.20 ± 0.01

3.2 色谱柱的选择 实验分别考察了6种类型3种规格的Agilent色谱柱,即SB-C₁₈柱(3.0 mm×100 mm, 3.5 μm)、Extend-C₁₈柱(3.0 mm×100 mm, 5 μm)、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm)、Eclipse Plus-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、SB-C₁₈柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm)以及Zorbax Bonus-RP柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),结果显示后4个色谱柱较适用于本实验分离要求,但使用Eclipse Plus Phenyl-Hexyl柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm)对苯二胺和4-氨基酚在同一位置出峰,提高乙腈比例虽然可以改善分

离,但会影响其他成分分离效果;使用Eclipse Plus-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 3,4-二氨基甲苯和2-甲基雷锁辛、邻氨基酚和1-萘酚分离度不够,同时3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮峰展宽严重,峰形还有待改善;使用SB-C₁₈柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm)对苯二胺和4-氨基酚、2-氨基-5-甲基苯酚和3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮未能达到理想的分离效果,只有Zorbax Bonus-RP柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)能够同时分离这20种染料成分,且峰形较好。

3.3 流动相的选择 在研究初期我们比较了甲醇-水和乙腈-水系统对分离的影响,结果表明乙腈-水系统更利于目标染料的分离。提高离子对试剂的烷基量有助于提高分离度^[6-7],因此考察了庚烷磺酸钠和辛烷磺酸钠作为离子对试剂的效果。采用庚烷磺酸钠作离子对试剂时,4-氨基酚和3-氨基酚、2-氨基-5-甲基苯酚和4-N,N-二乙基-2-甲基-对次苯基-二胺、6-羟基吡啶和4-氯间苯二酚未完全分离,而辛烷磺酸钠能更有效地提高分离度。同时考察了流动相梯度、离子对试剂浓度、磷酸盐缓冲液浓度、pH值、柱温等条件对分离的影响,最终确定2.3项下色谱

条件为最优。

3.4 检测波长的选择 根据紫外全扫光谱图,统计各染料成分特征吸收波长的分布情况。结果表明,20种染料成分在220~240 nm和270~310 nm处均有特征吸收,230 nm和280 nm均可选作检测波长。由于在230 nm低波长处干扰较多,对基线影响较大,因此本实验选择280 nm作为通用检测波长。

本实验建立了HPLC-DAD法同时测定染发剂中20种染料成分含量,并对该方法进行了系统的方法学验证。通过对实验条件的优化,确定色谱条件,在50 min内分离了20种目标化合物。方法的线性相关系数、加样回收率、相对标准偏差等各项参数表明,实验的灵敏度和精确度均满足实际样品检测需要。该检测方法简便、快速,较好地覆盖了目前染发产品中常用的染料成分,为染发剂的监督检测提供了一定的技术支持,是对《化妆品卫生规范》中的氧化型染料测定方法的有效修改和补充。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Nohynek G J, Fautz R, Benech-Kieffer F, Toutain H. Toxicity and human health risk of hair dyes[J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 517-543.
- [2] 徐燕英,童建.氧化型染发剂毒性研究进展[J]. *环境与职业医学*, 2004, 21: 403-404.
- [3] 中华人民共和国卫生部.化妆品卫生规范[S].北京:卫生部, 2007: 237-238.
- [4] Koh D, Tan C, Ng S K, Tan B T, Leow Y H, Goh C L. Screening for p-phenylenediamine (PPD) in hair-care products by thin-layer chromatography (TLC) [J]. *Contact Dermatitis*, 2000, 43: 182-183.
- [5] 祝伟霞,王彩娟,杨冀州,魏蔚,孙转莲,张书胜.高效液相色谱法同时测定染发剂中11种氨基苯酚[J]. *色谱*, 2012, 30: 870-875.
- [6] Lai Y, Wang H, Dong Q, Chen H, Lin R, Cai Y. Simultaneous determination of 13 components in oxidative hair dyes by high-performance chromatography using an ion-pair reagent [J]. *J Cosmet Sci*, 2012, 63: 321-331.
- [7] Penner N A, Nesterenko P N. Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene [J]. *Analyst*, 2000, 125: 1249-1254.
- [8] Eggenreich K, Golouch S, Töschler B, Beck H, Kuehnelt D, Wintersteiger R. Determination of 4-amino-m-cresol and 5-amino-o-cresol and metabolites in human keratinocytes (HaCaT) by high-performance liquid chromatography with DAD and MS detection [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 61: 23-34.
- [9] Schettgen T, Heinrich K, Kraus T, Gube M. Determination of 2,5-toluylenediamine (2,5-TDA) and aromatic amines in urine after personal application of hair dyes: kinetics and doses [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85: 127-133.
- [10] Di Gioia M L, Leggio A, Le Pera A, Liguori A, Napoli A, Perri F, et al. Determination by gas chromatography/mass spectrometry of p-phenylenediamine in hair dyes after conversion to an imine derivative [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066: 143-148.
- [11] Masukawa Y. Separation and determination of basic dyes formulated in hair care products by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108: 140-144.
- [12] 周永贵,李真观.染发剂的致突变、致癌和毒代动力学的研究进展[J]. *环境与职业医学*, 2008, 25: 103-104.

[本文编辑] 尹茶