

高效液相色谱法同时测定化妆品中9种着色剂

李静, 周智明*

(广东省药品检验所, 广东 广州 510663)

[摘要]目的: 建立同时测定化妆品中专利蓝(V)等9种着色剂的高效液相色谱检测方法。**方法:** 样品经过四氢呋喃-甲醇-乙腈(1:1:8)或乙腈超声提取, 滤过, 采用菲罗门 Titank C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm), 以 pH7.0 磷酸盐缓冲溶液-乙腈为流动相, 流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 30 °C, 梯度洗脱, 采用二极管阵列检测器, 在 310 nm 处测定食品黄 3、酸性橙 10、食品红 17、酸性红 1、酸性蓝 1、酸性黑 1、酸性橙 7、专利蓝 V 和 260nm 处测定橙黄 I。**结果:** 该方法中各组分在 0.5~10.0 μg/mL 线性范围内, 相关系数大于 0.99。平均回收率为 81.3%~116.6%, RSD 为 1.4%~4.7%。方法检出限为 3.2~4.2 μg/g。结论: 本方法专属性强, 灵敏度高, 适用于化妆品中 9 种着色剂的检测分析。

[关键词] 化妆品; 着色剂; 高效液相色谱法

[中图分类号] O65

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-1865(2020)13-0154-02

Determination of 9 colorants in cosmetics by HPLC

Li Jing, Zhou Zhiming*

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

Abstract: Objective: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of 9 colorants including patent blue (V) in cosmetics. **Methods:** The sample was subjected to ultrasonic extraction with a mixture of tetrahydrofuran-methanol-acetonitrile (1:1:8) or acetonitrile. filtration. The chromatographic was performed using a Phenomenex Titank C18 column (250×4.6 mm, 5 μm), with gradient elution and diode array detector of pH=7.0 phosphate mixed solution-acetonitrile as mobile phase, flow rate: 1.0ml/min, sample quantity: 5 μL, column temperature: 30 °C, choose 310 nm (Food Yellow 3, Acid Orange 10, Food Red17, Acid Red 1, Acid Blue 1, Acid Black1, Acid Orange7, Patent Blue V) and 260 nm (Orange I) as a detection wavelength. **Results:** In the linear range of 0.5~10.0 μg/mL, the correlation coefficient is greater than 0.99. The recoveries were 81.3%~116.6% and the RSDs were 1.4%~4.7%. The method detection limits were 3.2~4.2 μg/g. **Conclusion:** This method has high specificity and sensitivity, and is suitable for the detection and analysis of 9 colorants in cosmetics.

Keywords: cosmetics; colorant; high performance liquid chromatography

着色剂又称为色素或色料, 指用来改变其他物质或制品颜色的物质的总称。着色剂添加在化妆品中可以使化妆品起到美化、修饰的作用, 还可以调整某些原料对产品色调的影响^[1]。通常化妆品中着色剂根据其作用、性能和着色方式可分为染料和颜料两大类, 染料又分为天然染料和合成染料, 颜料则分为无机颜料和有机颜料; 按其来源则可分为合成色素、无机色素和动植物天然色素三大类。化妆品中使用的着色剂多数是合成染料, 而大多数的合成着色剂对人体是有危害的, 长期使用往往会对人体造成不同程度的危害, 例如, 一些合成色素可引起光敏反应, 导致生育能力下降、畸胎, 甚至诱发癌症^[2-3], 还有一些着色剂可能会引起儿童多动症^[4]。因此, 我国《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[5]中对化妆品用着色剂品种、使用范围和限制条件都作了明确的规定。

《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[5]中化妆品的准用着色剂高达 157 项, 仅记载了着色剂的两个检测方法, 一个是对碱性橙 31 等 7 种组分的检测, 适用于染发类和烫发类化妆品; 另一个是对着色剂 CI 59040 等 10 种组分的检测, 适用于胭脂、口红、粉底、指甲油、睫毛膏、眼影等修饰类化妆品。所涉及的种类有限且某些种类较为少见, 不利于化妆品的安全监管。目前, 化妆品中着色剂的测定方法主要有超高效液相色谱-串联质谱法^[6]、高效液相色谱-串联质谱法^[7]、离子液体萃取-高效液相色谱法^[8]、固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法^[9]、高效液相色谱法^[10]。因此, 本文通过建立一个简单快速、可靠、高效结合应用高效液相色谱法同时测定化妆品中 9 种常用着色剂的检测方法, 为化妆品安全监管提供技术参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AT/四元梯度泵高效液相色谱仪(配有 SIL-20A 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器); Elma S300H 超声波清洗器; Eppendorf 5801R 型高速离心机; Ika LabDancer 型涡旋混合器; Millipore Milli Q Reference 型超纯水发生器; METTLER MSDU 电子天平(十万分之一)。

1.1.2 试剂

食品黄 3、酸性橙 10、食品红 17、酸性红 1、橙黄 I、酸性蓝 1、酸性黑 1、酸性橙 7、专利蓝 V(纯度均大于 99%); 乙腈、四氢呋喃、甲醇、乙醇、二甲基亚砜均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.2 标准溶液的配制

混合标准储备液: 取 1.1.2 中 9 种着色剂的标准物质各约 10 mg, 精密称定, 置同一 50 mL 量瓶中, 用四氢呋喃-甲醇-水(1:1:1)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 于 4 °C 下冷藏保存, 备用。

混合标准工作液: 精密量取混合标准储备液 20 mL 置 100 mL 量瓶中, 用四氢呋喃-甲醇-水(1:1:1)稀释至刻度, 摇匀, 于 4 °C 下冷藏保存, 备用。

混合标准系列溶液: 精密量取混合标准工作液适量, 用四氢呋喃-甲醇-水(1:1:1)稀释, 配制成 10 μg/mL、5 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL、0.5 μg/mL 浓度的混合标准系列溶液。于 4 °C 下冷藏保存, 备用。

1.4 样品前处理

1.4.1 散粉类样品

精密称取样品 0.5 g, 置于 10 mL 具塞比色管中, 加四氢呋喃-二甲基亚砜-乙腈(1:1:8) 8 mL, 涡旋, 使试样与提取溶剂充分混匀, 超声提取 20 min, 用四氢呋喃-二甲基亚砜-乙腈(1:1:8)稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为待测溶液。

1.4.2 乳液、霜类样品

精密称取样品 0.5 g, 置于 10 mL 具塞比色管中, 加乙腈 8 mL, 涡旋, 使试样与提取溶剂充分混匀, 超声提取 20 min, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为待测溶液。

1.5 液相色谱条件

采用菲罗门 Titank C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 流速: 1.0 mL/min; 采用二极管阵列检测器, 在 310 nm 处测定食品黄 3、酸性橙 10、食品红 17、酸性红 1、酸性蓝 1、酸性黑 1、酸性橙 7、专利蓝 V 和 260 nm 处测定橙黄 I; 以 pH=7.0 磷酸盐缓冲液(称取十二水合磷酸氢二钠 14 g 和磷酸二氢钠 6 g, 加水溶解并稀释至 4 L, 混匀, 制成 10 mmol/L 磷酸盐混合溶液, 用磷酸调 pH 值至 7.0)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱程序见表 1。

[收稿日期] 2020-05-25

[作者简介] 李静(1989-), 女, 广东茂名, 本科, 药师, 从事药品和化妆品的质量研究。

*为通讯作者: 周智明(1985-), 女, 江西吉安人, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为药物分析技术。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
5	95	5
10	50	50
50	50	50
55	95	5
60	95	5

1.6 定性判定与定量计算

试样提取后,采用高效液相色谱仪进行测定,记录色谱图和光图谱,根据色谱图保留时间和紫外光谱图定性,峰面积定量,以标准曲线法计算含量。

2 方法选择与优化

2.1 提取条件的选择

由于化妆品基质和性状比较复杂,因此对于不同剂型的化妆品前处理也有不同的方法,本文着重选择了散粉、乳霜类样品作为研究对象,进行了前处理方法的分析讨论。根据相关文献^[11-15],溶解着色剂的常用溶剂为水、甲醇、四氢呋喃。因此,本文考察了9种着色剂在不同溶剂中的溶解情况,经试验,食品黄3、食品红17、橙黄1、酸性蓝1、酸性黑1、酸性橙7可溶于甲醇,酸性橙10可溶于四氢呋喃,酸性红1、专利蓝V可溶于水。故选取了四氢呋喃-甲醇-水(1:1:1)混合溶剂溶解标准品。根据文献^[16],散粉类的提取溶剂为四氢呋喃-二甲基亚砜-乙腈(1:1:8),乳霜类样品提取溶剂为乙腈。本文根据目标着色剂的理化性质,分别考察了散粉类、乳霜类提取溶剂中的乙腈更换为甲醇、乙醇的提取效果。实验结果显示,散粉类提取效果甲醇最佳,乙腈次之,乙醇较差。乳霜类中甲醇与乙腈的提取效果较为接近,乙醇提取效果较差。综合考虑,选取毒性较小的乙腈。同时考察了散粉类、乳霜类提取溶剂的不同提取体积(5 mL、10 mL、20 mL)、超声提取时间(10 min、20 min、30 min、40 min)对提取效果的影响,经试验,提取溶剂为10 mL,超声提取20min能取得满意的提取效果。

2.2 色谱柱的选择

C18柱是目前适用范围最广的色谱柱,适用于非极性、弱极性和中等极性化合物分析,分子量要求1000以下^[17]。着色剂为弱极性化合物,且分子量基本在300~1000之间。因此,本实验选取C18色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm)进行分析。同时考察了不同品牌不同型号的C18色谱柱(ACE Excel SuperC18(250×4.6

mm, 5 μm)、ACE Excel 5-C18-AR(250×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5-C18(250×4.6 mm, 5 μm)、菲罗门 Tiank C18 5u(250×4.6 mm, 5 μm)对色谱行为的影响。结果表明,菲罗门 Tiank C18 5u(250×4.6 mm, 5 μm)峰形和分离度最佳,能满足系统适应性要求。

2.3 流动相种类及其 pH 值对色谱行为的影响

实验考察水和10 mmol/L磷酸盐混合溶液(pH值为5.0、6.0、7.0、8.0和9.0)分别作流动相对色谱行为的影响。结果表明:10 mmol/L磷酸盐混合溶液(pH=7.0)作流动相时,着色剂各组分的峰形和分离度最佳。2.4 柱温对色谱行为的影响

调节柱温分别为20℃、25℃、30℃、35℃和40℃,每个条件平行测定2次,考察其色谱行为。结果表明,30℃时各组分峰形和分离度最佳,能满足系统适应性要求。

3 方法学考察

3.1 线性关系试验

取“1.2”项下系列混合标准溶液,按“1.5”项下液相色谱条件进行测定并记录色谱图。以目标组分的峰面积(y)为纵坐标,质量浓度(x, mg/L)为横坐标绘制标准曲线。线性回归方程和相关系数,检出限(LOD)如表2所示。

表2 9种着色剂的线性回归方程、相关系数和方法检出浓度
Tab.2 Linear regression equation, correlation coefficient and detection limit of 9 colorants

化合物	线性方程	相关系数(r ²)	检出限/(μg/g)
食品黄3	y=8177.5x-1521.2	0.9983	3.8
酸性橙10	y=4761.2x-565.37	0.9987	3.2
食品红17	y=6389.6x-753.99	0.9991	4.0
酸性红1	y=2787.4x-392.43	0.9991	4.0
橙黄1	y=8508.8x-1026.4	0.9994	4.0
酸性蓝1	y=3095.2x-436.42	0.9993	4.0
酸性黑1	y=4743.4x-611.5	0.9992	4.0
酸性橙7	y=7386.3x-1056.3	0.9990	4.2
专利蓝V	y=3148.9x-499.02	0.9994	4.2

3.2 方法精密度和回收率

取散粉和乳霜类2种阴性样品,加入40 μg/mL混合标准溶液0.2 mL,按“1.4”方法处理,每种基质类型平行配制6份,按照“1.5”项下色谱条件测定并记录色谱图。计算9种着色剂精密度的加标回收率及相对标准偏差。结果见表3。

表3 回收率和精密度测定结果(n=6)

Tab.3 The results of recovery and precision measurement(n=6)

化合物	精密度(%, n=6)	基质类型	加标量/mg	回收率/%	RSD(%, n=6)	基质类型	加标量/mg	回收率/%	RSD(%, n=6)
食品黄3	0.13	散粉类	0.008	98.2	3.05	乳霜类	0.008	81.28	2.40
酸性橙10	0.61	散粉类	0.008	87.47	2.83	乳霜类	0.008	81.88	1.36
食品红17	0.21	散粉类	0.008	98.32	4.20	乳霜类	0.008	87.16	1.67
酸性红1	0.25	散粉类	0.008	105.44	2.52	乳霜类	0.008	92.43	1.99
橙黄1	0.17	散粉类	0.008	113.64	1.93	乳霜类	0.008	85.27	1.42
酸性蓝1	0.42	散粉类	0.008	116.57	1.38	乳霜类	0.008	105.93	2.57
酸性黑1	0.19	散粉类	0.008	98.43	4.67	乳霜类	0.008	81.34	1.67
酸性橙7	0.52	散粉类	0.008	108.62	2.43	乳霜类	0.008	102.43	2.10
专利蓝V	0.42	散粉类	0.008	109.58	2.82	乳霜类	0.008	97.65	2.91

4 结论

建立了应用高效液相色谱法同时测定化妆品中专利蓝(V)等9种常用着色剂的定性定量方法,本实验方法优化了色谱条件和样品前处理,能更好地分离多种常用着色剂且此方法专属性强、灵敏度高,操作简便,适用于化妆品中专利蓝(V)等9种常用着色剂的检测分析,并能为化妆品质量监管提供有效的技术手段。

参考文献

[1] 杨艳伟,朱英,刘思然,等.化妆品中着色剂使用情况的调查[J].环境与健康杂志,2012,29(2):170-172.
[2] 任国杰,孙稚菁,王灵芝,等.彩妆中着色剂的使用情况研究[J].香料香精化妆品,2017(01):42-45.

[3] 姜子波,任国杰,毛希琴,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中14种禁用着色剂[J].分析测试学报,2016,35(07):792-798.
[4] 丁成翔,代汉慧,陈冬东.六种着色剂毒性研究进展[J].检验检疫学刊,2009,19(02):70-73.
[5] 中国食品药品监督管理局.化妆品安全技术规范(M).2015版.北京:人民卫生出版社,2016.
[6] 陈丹丹,王柯,茹歌,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中10种着色剂[J].香料香精化妆品,2018(05):57-61+67.
[7] 姜子波,任国杰,毛希琴,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中14种禁用着色剂[J].分析测试学报,2016,35(07):792-798.
[8] 孟红燕,陈德文,陈梅兰,等.离子液体萃取-高效液相色谱测定化妆品中7种限用着色剂[J].化学试剂,2016,38(10):978-980+1019.
(下转第160页)

较大的实用价值和现实意义。

参考文献

- [1]陈斌,董海胜,张国文,等.特殊医学用途配方食品及其应用研究[J].食品科学技术学报,2017,35(01):6-16.
- [2]FOX C S, GOLDEN S H, ANDERSON C, et al. Update on prevention of cardiovascular disease in adults with type 2 diabetes mellitus in light of recent evidence: a scientific statement from the American heart association and the American diabetes association[J]. Diabetes Care, 2015, 38(9): 691-718.
- [3]HAN J H. China's special dietary food standard system construction[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(1): 12-13.
- [4]YANG R F, ZHAO C, CHEN X, et al. Chemical properties and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum*) polysaccharides extracted by different methods[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17(6): 903-909.
- [5]国家卫生和计划生育委员会.特殊医学用途配方食品通则 GB29922-2013[S].北京:中国标准出版社,2013:7-10.
- [6]贺舒文,刘莹,薛伟峰.极谱法同时测定海水中的铜、镉、铅、锌[J].化学分析计量,2019,28(02):35-38.
- [7]聂鹏,廖海伟,何施纤.DMA 80 直接测汞仪检测卷烟中的汞含量[J].食品工业,2019,40(08):303-305.
- [8]毛娅.分光光度法测定动物饲料中的锌[J].广东化工,2019,46(09):223-224.
- [9]袁超璐,曾媛,郑平安,等.原子吸收光谱法测定特殊医学配方食品中钾元素分析条件的优化[J].食品安全质量检测学报,2018,9(20):5410-5415.
- [10]那斯琴高娃,常建军,宋晓东.火焰原子吸收法测定奶粉中的锰[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3600-3604.
- [11]庞恩,黄玲珠,李庚.ICP-MS 同时测定医疗透析水中 18 种重金属元素[J].广东化工,2019,46(16):168-170.
- [12]曾涛,沈倩.电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)应用进展及展望[J].广东化工,2018,45(18):116-119.

- [13]FIHO P M F C, JOCA J F S, GAUBEUR I. Development of an Analytical Method to Determine Chromium, Iron, Nickel, and Zinc in Mouthwash by ICP-OES and Assessment of Possible Metal Migration from Stainless Steel[J]. Spectroscopy, 2019, 34(9): 28-34.
- [14]OLIVEIRA A A, TREVIZAN L C, NOBREGA J A. Iodine Determination by Inductively Coupled Plasma Spectrometry[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2010, 45(6): 447-473.
- [15]沈明丽,许丽梅,字肖萌,等.电感耦合等离子体发射光谱法测定茶叶中的微量元素[J].中国农学通报,2018,34(31):72-75.
- [16]JUROWSKI, TATAR M, PIEKOSZEWSKI M, et al. The Toxicological Analysis of Ni and Cr in Prescription Food for Special Medical Purposes and Modified Milk Products for Babies in Infancy Available in Pharmacies in Poland[J]. Biological Trace Element Research, 2019, 192(2): 152-154.
- [17]MAKI K C, GEOHAS J G, DICKIN M R, et al. Safety and lipid-altering efficacy of a new omega-3 fatty acid and antioxidant-containing medical food in men and women with elevated triacylglycerols[J]. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2015(1): 41-46.
- [18]王春颖.特殊医学用途配方食品的现状分析[M].农产品加工.2015(11):63-67.
- [19]ZHANG L, TU Z C, WANG H, et al. Response surface optimization and physicochemical properties of polysaccharides from *Nelumbo nucifera* leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74(6): 103-110.
- [20]WEENEN T C, COMMANDEUR H, CLAASSEN E. A critical look at medical nutrition terminology and definitions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 38(1): 34-46.

(本文文献格式:李樑,邓文娟,陈景周,等.超级微波消解-ICP-OES/ICP-MS 测定特殊医学用途配方食品中 13 种元素[J].广东化工,2020,47(13):157-160)

(上接第 153 页)

绿原酸的标准曲线如图 2 所示,对浓度和吸光强度进行拟合,可得一具有良好线性关系的直线,线性相关性系数为 0.99,可用荧光分析法测量绿原酸的含量。将绿色咖啡豆粉碎成粉末,以质量分数为 50%的乙醇为溶剂按照前述实验方法进行提取,并对所得萃取液测量其荧光强度,多次测量以减小误差,测得咖啡豆中绿原酸含量可达到 8%以上,说明在众多植物中,咖啡豆中绿原酸的含量较高,海南咖啡广泛种植,可利用其为原料开发绿原酸的提取、生物活性研究等更多应用。

3 结论

由于绿原酸的乙醇溶液具有较强的荧光,采用乙醇为溶剂,超声波辅助提取,利用荧光分析法直接测量了萃取液中绿原酸的含量,无须分离纯化,方法简便、灵敏度高,可用于咖啡豆中绿原酸的快速测量。

参考文献

- [1]陈通通,黄念雪,方天星,等.乙醇为溶剂超声波辅助提取胶股蓝皂苷工艺的研究[J].高校实验室工作研究,2016(03):67-69.
- [2]王飞,杨晨晖,陈榕.超声波辅助提取咖啡豆中的绿原酸[J].高校实验室工作研究,2015(04):44-45.
- [3]胡荣锁,初众,谷凤林,等.海南主要地域生咖啡豆挥发性化学成分对比研究[J].光谱学与光谱分析,2013,33(02):548-553.
- [4]李满秀,张瑶,杨淑英.绿原酸的直接荧光分析法及其抗氧化性研究[J].分析科学学报,2011,27(02):203-206.
- [5]孟维,龙立平,蒲云月,等.绿原酸荧光熄灭法测定 Fe(III)[J].湖南城市学院学报(自然科学版),2012,21(01):65-68.

(本文文献格式:周京成,郑中平,王婷婷,等.乙醇为溶剂超声波提取结合荧光分析法快速测定咖啡豆中绿原酸含量[J].广东化工,2020,47(13):153)

(上接第 155 页)

- [9]钱晓燕,刘海山,朱晓雨,等.固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 12 种合成着色剂[J].分析测试学报,2014,33(05):527-532.
- [10]毛希琴,李春玲,任国杰,等.高效液相色谱法同时检测化妆品中 38 种限用着色剂[J].色谱,2015,33(03):282-290.
- [11]李英,张琛,刘丽,等.粉状化妆品中 9 种有机着色剂的高效液相法测定[J].香料香精化妆品,2009(06):29-33.
- [12]聂磊,葛淑丽,杨晋青,等.超高效液相色谱-质谱法同时测定彩妆中的 17 种禁用合成着色剂[J].香料香精化妆品,2019(02):27-32.
- [13]刘海山,钱晓燕,吕春华,等.高效液相色谱法同时测定化妆品中的 10 种合成着色剂[J].色谱,2013,31(11):1106-1111.
- [14]毛希琴,李春玲,任国杰,等.高效液相色谱法同时检测化妆品中 38 种限用着色剂[J].色谱,2015,33(03):282-290.

- [15]赵雪蓉,于一茫,徐伟,等.高效液相色谱法同时检测化妆品中 7 种禁用着色剂[J].精细石油化工,2012,29(06):30-34.
- [16]梁静文,周智明,曾子君,等.高效液相色谱法测定化妆品中 5 种着色剂含量[J].香料香精化妆品,2019(02):65-69.
- [17]Gisela de Aragão Umbuzeiro, Harold S. Freeman, Sarah H. Warren, Danielle Palma de Oliveira, Yoshiyasu Terao, Tetsushi Watanabe, Larry D. Claxton. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River[J]. Chemosphere, 2004, 60(1).

(本文文献格式:李静,周智明.高效液相色谱法同时测定化妆品中 9 种着色剂[J].广东化工,2020,47(13):154-155)