

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2019.07.010

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定 化妆品中5种含溴防腐剂

潘晨, 王枚博, 吴思霖, 王欣美, 于建, 张凯, 王柯, 郑荣*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要:建立了同时测定化妆品中苯扎溴铵、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、甲基二溴戊二腈、溴氯芬5种含溴防腐剂的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)。样品经含0.1%甲酸的甲醇溶液超声提取后,采用Agilent Eclipse-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱分离,以0.1%甲酸-甲醇为流动相进行梯度洗脱,ICP-MS测定组分中的⁷⁹Br,以保留时间定性,外标法定量。5种含溴防腐剂均在0.5~100 mg/L范围内线性关系良好($r>0.999$),检出限为1.5~3.0 μg/g,不同基质化妆品中的回收率为91.2%~108%,相对标准偏差($n=6$)为1.3%~4.2%。该方法快速、准确、灵敏、专属性强,适用于化妆品中5种含溴防腐剂的定性定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱; 含溴防腐剂; 化妆品

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)07-0830-05

Determination of Five Bromine Contained Preservatives in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

PAN Chen, WANG Mei-bo, WU Si-lin, WANG Xin-mei, YU Jian,
ZHANG Kai, WANG Ke, ZHENG Rong*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: A novel high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) was established for the determination of five bromine contained preservatives, i. e. benzalkonium bromide, 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane, methyl dibromo glutaronitrile and bromochlorophene in cosmetics. The samples were ultrasonically pretreated with methanol containing 0.1% formic acid. The analytes containing ⁷⁹Br were separated on an Agilent Eclipse-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) using 0.1% formic acid-methanol as mobile phases by gradient elution, and then analyzed by ICP-MS with external standard method. There were good linear relationships for five analytes in the range of 0.5-100 mg/L with correlation coefficients (r) larger than 0.999. The detection limits for five bromine contained preservatives were in range of 1.5-3.0 μg/g. Recoveries for the analytes in different spiked cosmetics matrixes ranged from 91.2% to 108% with relative standard deviations ($n=6$) of 1.3%-4.2%. The method was fast, accurate, sensitive and selective, and was suitable for the simultaneous determination of five bromine contained preservatives in cosmetics.

Key words: high performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; bromine contained preservatives; cosmetics

苯扎溴铵、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、甲基二溴戊二腈、溴氯芬是一类含溴的有机化合物,由于抑菌效果强,可用作药物制剂和化妆品中的防腐剂,使产品在生产使用和保存过程中免受微生物污染,延长其货架寿命。但上述防腐剂可能导致过敏性接触传染和接触性皮炎^[1]。

收稿日期: 2018-11-21; 修回日期: 2018-12-17

基金项目: 中国食品药品检定研究院“化妆品中防腐剂的研究(2015-2017)”项目

* 通讯作者: 郑荣, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 食品化妆品监督检验和检测技术, E-mail: zhengrong@sfdc@163.com

我国现行的《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[2]对上述防腐剂的限量有严格规定,并将甲基二溴戊二腈列为禁用物质。因此,开发适用于化妆品中含溴防腐剂的测定方法具有重要意义。

目前,化妆品中含溴防腐剂的检测方法有高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[3-5]、高效液相色谱-电化学检测法(HPLC-ECD)^[6]和气相色谱法(GC)^[7]。这些方法存在一定不足,HPLC-UV法测定时在低波长附近的干扰大,易出现假阳性结果。HPLC-ECD法虽有较高灵敏度,但ECD检测器对HPLC系统中存在的氧(空气)非常敏感,易造成检测器不稳定^[8]。GC法可分析在UV上无特异吸收峰的化合物,但本课题组在前期筛查中发现,部分含溴化合物(如溴氯芬)的响应不理想,2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇的线性范围窄。《化妆品安全技术规范》(2015年版)也仅对2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇的液相色谱测定法进行规定,其余4种防腐剂的检测方法未作收录。

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)是近年来快速发展的一种非常适合元素形态分析的方法。该方法结合了HPLC的高效分离能力及ICP-MS的高灵敏特点,为溴及含溴化合物的测定提供了强有力的检测手段^[9-14]。本课题组前期建立了2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇的HPLC-ICP-MS测定法^[15],但其流动相的有机相比比例超过5%时易造成ICP-MS锥孔堵塞甚至熄火。本文进一步建立了同时测定化妆品中5种含溴防腐剂的HPLC-ICP-MS法,通过引入氩氧混合气作为ICP-MS的反应气,可实现流动相中高比例有机相分析,拓展了方法的适用范围。该方法灵敏度高,准确性好,可用于化妆品中含溴防腐剂的快速筛查。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

7900型电感耦合等离子体质谱仪、1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);DS-800DTH型超声仪(上海生析超声仪器有限公司);MS3basic型涡旋仪(德国IKA公司);5810R型离心机(德国Eppendorf公司);Milli-Q Reference A+型超纯水仪(德国Millipore公司)。

苯扎溴铵(纯度95%,TRC公司);2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷(纯度均为98%,Aladdin公司);甲基二溴戊二腈(纯度98.5%,Sigma-Aldrich公司);溴氯芬(纯度95%,TCI公司);甲醇(MeOH)、甲酸(HAc)均为色谱纯。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A为0.1%甲酸,B为甲醇,梯度洗脱程序:0~3 min,75% A;3~8 min,75%~40% A;8~10 min,40%~0% A;10~13 min,0% A;13~14 min,0%~75% A;14~15 min,75% A;流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为室温,进样体积为10 μL。

1.2.2 质谱条件 射频功率:1 550 W;采样深度:10.0 mm;载气流量:0.7 L·min⁻¹;冷却气流速:15.0 L·min⁻¹;反应气比例:17%,反应气为氩氧混合气(体积比4:1);蠕动泵转速:0.40 r/s;雾化室温度:-2℃;采集质量数:⁷⁹Br;碰撞反应模式,氦气流速:4.0 mL·min⁻¹;采用TRA模式,积分时间:0.5 s,采集时间:960 s。采用有机进样专用炬管。

1.3 标准储备溶液的制备

精密称取苯扎溴铵、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、甲基二溴戊二腈、溴氯芬对照品各50 mg,置于同一50 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为1 000 mg/L的混合标准储备溶液,置于4℃冰箱保存。

1.4 样品前处理

称取样品1.0 g,置于50 mL聚丙烯离心管中,加入含0.1%(体积分数)甲酸的甲醇溶液10 mL,充分涡旋振荡混匀,超声提取20 min,静置至室温,以10 000 r/min离心5 min,取适量上清液过0.22 μm滤膜,滤液备用。同时进行空白实验。

2 结果与讨论

2.1 ICP-MS条件的优化

由于Br的电离能较高,其在ICP-MS上的灵敏度比其它元素低,为获得含溴化合物的最佳响应

值, 在 1 300 ~ 1 600 W 范围内对射频功率进行了优化。结果显示, 射频功率对目标分析物灵敏度的影响较为显著, 响应值随着射频功率的增大而增强, 当射频功率大于 1 550 W 时响应值增加不明显, 因此选择最佳射频功率为 1 550 W。

本实验在梯度洗脱时有机相比例达 100%, 可能导致 ICP-MS 信号不稳定, 并且有机相分解产生的碳粉亦可能导致 ICP-MS 锥口堵塞而熄火。通过引入氩氧混合气(体积比 4 : 1)作为反应气^[16-17], 使有机物与氧气燃烧, 可消除炬管和锥孔的碳沉积。实验发现, 目标分析物的响应随着反应气加入量的增大而降低, 可能是因为氧气过多不利于等离子体的维持。当反应气比例为 17% 时, 既能够有效消除积碳, 且能达到较高的灵敏度。此外, 通过降低雾化器的制冷温度至 -2 °C, 可降低有机溶剂的蒸气压, 减少其到达等离子体炬焰的量, 从而消除积碳。最终优化的质谱条件如“1. 2. 2”所示。

2. 2 同位素的选择

在质量数选择方面, Br 的测定可以选择⁷⁹Br(50.54%)和⁸¹Br(49.46%)两个同位素^[10]。Br 的质谱分析主要为多原子干扰, 受 Ar 的干扰明显, 其中⁴⁰Ar⁴⁰Ar¹H 干扰⁸¹Br 的测定,⁴⁰Ar³⁸Ar¹H 干扰⁷⁹Br 的测定。由于³⁸Ar 的相对丰度(0.063%)远低于⁴⁰Ar(99.600%), 故⁴⁰Ar³⁸Ar¹H 对⁷⁹Br 的干扰远小于⁴⁰Ar⁴⁰Ar¹H 对⁸¹Br 的干扰。而在标准品和样品的测定中,⁷⁹Br 的基线噪音也优于⁸¹Br, 因此选择⁷⁹Br 作为测量同位素。

2. 3 色谱条件的优化

分别考察了甲醇-水和乙腈-水 2 种流动相的分离效果, 发现乙腈为有机相时更易产生积碳且信号不稳定, 这是由于乙腈含碳比例高所致, 因此选择甲醇为有机相。进一步比较了甲醇-水、0.1% 甲酸-甲醇两种流动相, 发现采用 0.1% 甲酸-甲醇梯度洗脱可提高待测成分的响应, 峰形尖锐, 因此选择 0.1% 甲酸-甲醇作为流动相。

2. 4 提取溶剂的选择

根据目标化合物的极性, 分别考察了甲醇、90% 甲醇水溶液、含 0.1% 甲酸的甲醇溶液作为提取溶剂对 5 种目标化合物的提取效果。结果显示, 液态水基类、膏霜乳液类样品均能很好地分散于上述 3 种溶剂中, 提取回收率均在 90% 以上, 且差异不明显。但对于凝胶类样品, 采用甲醇和 90% 甲醇水溶液提取时, 溴氯酚的回收率均低于 70%, 而改用 0.1% 甲酸的甲醇溶液提取时, 其回收率得到显著改善, 且 5 种化合物的回收率均在 90% 以上(图 1)。故最终选用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液作为提取溶剂。

2. 5 线性关系与检出限

精密移取适量 1 000 mg/L 的混合标准储备溶液, 用流动相逐级稀释, 配制成 5 种含溴防腐剂质量浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50、100 mg/L 的混合标准系列工作溶液。取上述溶液 10 μL 进样测定, 以各待测物的峰面积(y)对相应的质量浓度(x , mg/L)绘制标准曲线。由表 1 可知, 5 种含溴防腐剂均在 0.5 ~ 100 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r)均大于 0.999。50 mg/L 混合标准溶液的色谱图见图 2。

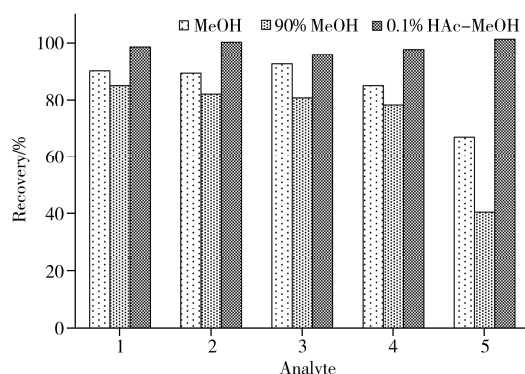


图 1 3 种提取溶剂对凝胶类样品提取效果的比较
Fig. 1 Comparison of extraction efficiencies for gel samples by three solvents

1. benzalkonium bromide; 2. 2-bromo-2-nitro-1, 3-propanediol;
3. 5-bromo-5-nitro-1, 3-dioxane; 4. methyl-di-bromo glutaronitrile; 5. bromochlorophene

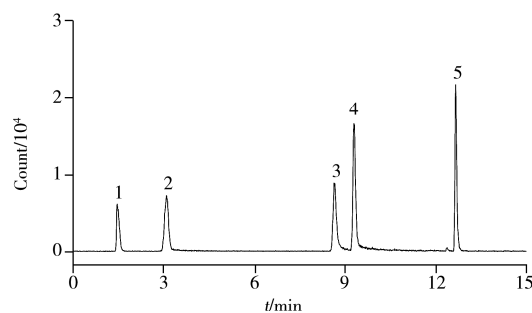


图 2 5 种含溴防腐剂混合标准溶液(50 mg/L)的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of five bromine contained preservatives standard solution(50 mg/L)
the numbers denoted are the same as those in Fig. 1

50 mg/L 混合标准溶液的色谱图见图 2。

筛选液态水基类、膏霜乳液类、凝胶类阴性样品, 各称取 1.0 g, 添加混合标准储备溶液适量, 按本方法进行前处理并测定。信噪比(S/N)为 3 时, 得到方法的检出限(LOD)为 1.5~3.0 $\mu\text{g/g}$ (见表 1)。其中, 本方法对 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇的检出限(3.0 $\mu\text{g/g}$)远低于《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中高效液相色谱法的检出限(300 $\mu\text{g/g}$)。

表 1 5 种含溴防腐剂的线性范围、线性方程、相关系数与检出限
Table 1 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients and limits of detection of five bromine contained preservatives

Compound	Linear range(mg/L)	Linear equation	r	LOD($\mu\text{g/g}$)
Benzalkonium bromide(苯扎溴铵)	0.5~100	$y = 405.52x + 38.808$	1.000 0	3.0
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol(2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇)	0.5~100	$y = 733.06x + 0.809 00$	0.999 9	3.0
5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane(5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷)	0.5~100	$y = 737.62x + 0.809 00$	1.000 0	3.0
Methyldibromo glutaronitrile(甲基二溴戊二腈)	0.5~100	$y = 1 089.1x + 35.213$	0.999 7	1.5
Bromochlorophene(溴氯芬)	0.5~100	$y = 1 005.4x + 14.075$	0.999 9	1.5

2.6 准确度与精密度

取液态水基类、膏霜乳液类、凝胶类阴性样品各 1.0 g, 平行 6 份, 分别加入不同体积的混合标准储备溶液, 按照本方法进行前处理并测定, 方法的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 2。由表 2 可知, 5 种含溴防腐剂的回收率为 91.2%~108%, RSD($n=6$)为 1.3%~4.2%, 表明本方法的准确度和精密度较高。

表 2 回收率与重复性实验结果
Table 2 Results of spiked recovery and repeatability test

Compound	Added($\mu\text{g/g}$)	Water-based		Cream		Gel	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Benzalkonium bromide	20, 500	99.9, 104	3.7, 1.6	96.8, 102	3.8, 1.3	94.5, 106	2.4, 1.6
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	20, 500	97.0, 104	2.7, 1.8	98.9, 97.4	4.0, 2.4	94.5, 106	2.7, 1.8
5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane	20, 500	101, 100	3.5, 2.3	98.1, 103	4.2, 3.3	97.9, 103	3.5, 2.3
Methyldibromo glutaronitrile	20, 500	97.2, 104	3.8, 1.3	97.4, 102	3.3, 2.3	91.7, 108	3.8, 1.3
Bromochlorophene	20, 500	98.0, 102	3.9, 1.9	95.5, 91.2	1.9, 2.7	97.1, 102	3.9, 1.9

2.7 实际样品的测定

《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中规定, 苯扎溴铵、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、溴氯芬为允许添加的防腐剂, 甲基二溴戊二腈为禁用防腐剂。从抽检样品中随机选取液态水基类、膏霜乳液类、凝胶类化妆品共 20 批, 按上述条件测定。结果显示, 2 批样品(1 批儿童润肤乳, 1 批护手霜)中均检出苯扎溴铵和 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇, 此 2 种化合物的含量均符合《化妆品安全技术规范》(2015 年版)的限量要求。以某儿童润肤乳为典型样品, 检出苯扎溴铵的含量为 0.003 2%, 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇为 0.039% (图 3), 但该样品的配方表未对这两种成分进行标注。因此有必要进一步加强对化妆品中防腐剂的监管力度。

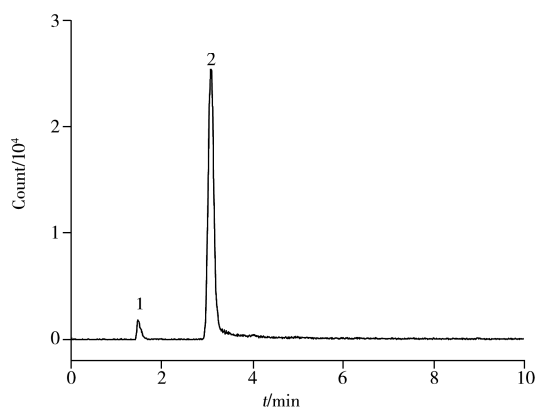


图 3 典型样品的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of a typical sample
1. benzalkonium bromide; 2. 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol

针对阳性样品, 采用现有国标方法^[2]与本方法进行对比。由于苯扎溴铵尚无国标检测方法, 故仅对 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇作方法比较。结果表明, 采用本方法测得护手霜和儿童润肤乳中 2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇的含量分别为 0.020% 和 0.039%, 国标方法测得的含量分别为 0.021% 和 0.041%。两种方法测定结果的相对偏差小于 5%, 说明本方法具有较高的准确性。

3 结 论

本研究建立了化妆品中苯扎溴铵、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、甲基二溴戊二腈、溴氯芬5种含溴防腐剂的HPLC-ICP-MS测定方法。该方法样品处理简单、回收率稳定、灵敏度高、专属性强,适用于多种化妆品基质中含溴防腐剂的定性定量分析。该方法的建立进一步拓展了含溴防腐剂的的分析技术,可为化妆品监管提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] Wang Y S, Zhu Y Y, Dong Y M. *Detergent Cosmetics*(王友升,朱昱燕,董银卯.日用化学品科学), **2007**, 30(12): 15-18.
- [2] Safety and Technical Standards for Cosmetics(2015). Beijing: China Food and Drug Administration(化妆品安全技术规范2015年版.北京:国家食品药品监督管理总局), **2015**.
- [3] Yin J Z, Sun Y M, Zhang S, Zhao H. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*(尹家振,孙宇梅,张珊,赵华.日用化学工业), **2012**, 42(6): 465-468.
- [4] Liu Y Q, Wang H, Yang H M, Shi H L, Guo Q L. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*(刘艳琴,王浩,杨红梅,史海良,郭启雷.日用化学工业), **2011**, 41(1): 73-75.
- [5] Li J, Zhao J H. *Chin. J. Health Lab. Technol.*(李洁,赵金辉.中国卫生检验杂志), **2000**, 10(5): 520-521.
- [6] Rastogi S C. *Contact Dermatitis*, **2000**, 43: 339-343.
- [7] Zhong J Q, Zheng R, Chen D D, Liu C, Wang K. *Chin. J. Pharm. Anal.*(钟吉强,郑荣,陈丹丹,刘畅,王柯.药物分析杂志), **2018**, 38(5): 806-811.
- [8] Rastogi S C, Johansen S S. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 692: 53-57.
- [9] Yang Z Y, Deng X J. *Phys. Test. Chem. Anal. ; Chem. Anal.*(杨振宇,邓晓军.理化检验-化学分册), **2009**, 45(4): 471-473.
- [10] Liu W, Li B, Yang H X, Xu S Q. *Chin. J. Anal. Chem.*(刘崴,李冰,杨红霞,徐思琦.分析化学), **2009**, 37(9): 1337-1340.
- [11] Fu H, Li X Q, Wei C, Shao M W, Zhang Q H, Li Q. *Chin. J. Anal. Chem.*(符惠,李秀琴,韦超,邵明武,张庆合,李清.分析化学), **2013**, 41(12): 1881-1886.
- [12] Lin L, Chen Y H, Wang H B. *Food Sci.*(林立,陈玉红,王海波.食品科学), **2010**, 31(12): 226-228.
- [13] Perkin Elmer Company(Shanghai). *Mod. Sci. Instrum.*(珀金埃尔默仪器(上海)有限公司.现代科学仪器), **2011**, (5): 186-188.
- [14] Shao M W, Wei C, Jia Y J, Dai X H, Fang X. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(12): 5154-5159.
- [15] Wang M B, Zhong J Q, Chen D D, Mao B P, Wang X M, Zheng R, Liu C, Wang K. *J. Instrum. Anal.*(王枚博,钟吉强,陈丹丹,毛北萍,王欣美,郑荣,刘畅,王柯.分析测试学报), **2017**, 36(7): 925-928.
- [16] Leng T H, Zhou Y, Duan W F, Xie N. *Chin. J. Anal. Lab.*(冷桃花,周瑶,段文锋,解楠.分析实验室), **2013**, 32(7): 75-78.
- [17] Yu Z H, Zhang J, Wang X R. *Chin. J. Anal. Chem.*(于振花,张杰,王小如.分析化学), **2011**, 39(4): 544-547.

(责任编辑:丁岩)