

# 双进样液相色谱仪测定化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂含量

LC-304

**摘要：** 本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了快速测定对苯二胺等 32 种染发剂含量的方法。32 种染发剂组分 10-400 m/L 浓度范围内，其相关系数大于 0.999，各浓度点的回读准确度在 91.0%~113.6% 之间，线性相关性良好。稳定性考察中，32 种组分的保留时间相和峰面积的相对标准偏差分别在 0.012~0.17% 和 0.039~2.88% 之间，仪器精密度良好；并对实际样品进行分析。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，分析快速，能满足国家药监局（2021 年第 17 号）通告发布的《化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的检测方法》中液相方法的检测需求。

**关键词：** 双进样液相色谱仪 染发剂 对苯二胺

染发剂是给头发染色的一种化妆品，普遍含有对苯二胺类物质，这是染发剂中必须用到的一种着色剂。这类化合物是《化妆品安全技术规范（2015 年版）》中规定准用组分，同时还有些物质如氢醌，是规定不允许添加的，属于染发剂的禁用物质。因此在染发剂等化妆品的相关管理中，需要有合适的检测方法来进行监控。

2021 年 3 月 2 日，国家药监局发布通告（2021

年第 17 号），公布了最新修订的《化妆品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》，此次修订，增加了一种液相色谱法和液质确证方法，并将检测方法纳入《化妆品安全技术规范（2015 年版）》。

本文参考《化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的检测方法》中“参考色谱条件 2”；采用岛津双进样液相色谱仪建立测定化妆品中 32 种染发组分的液相分析方法。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津双进样液相色谱仪，具体配置为：

输液泵：LC-40B XR、LC-40D XR (LPGE)

脱气机：DGU-405×2

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

系统控制器：CBM-40A

检测器：SPD-M40×2

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

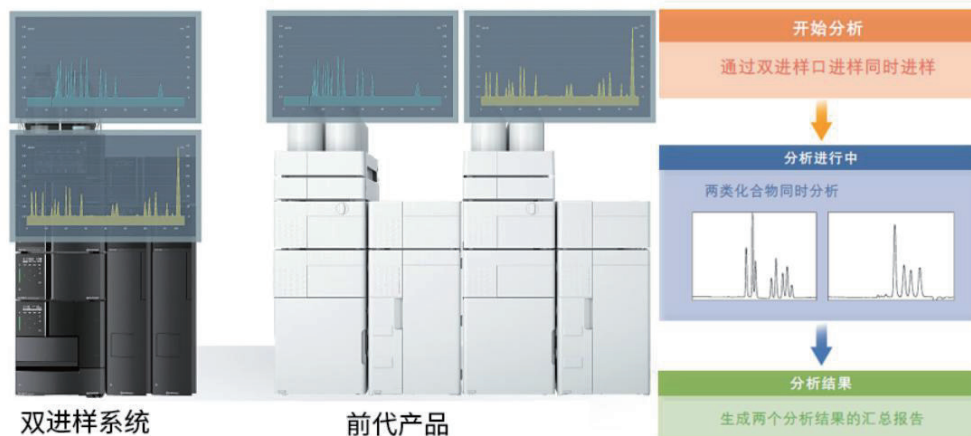
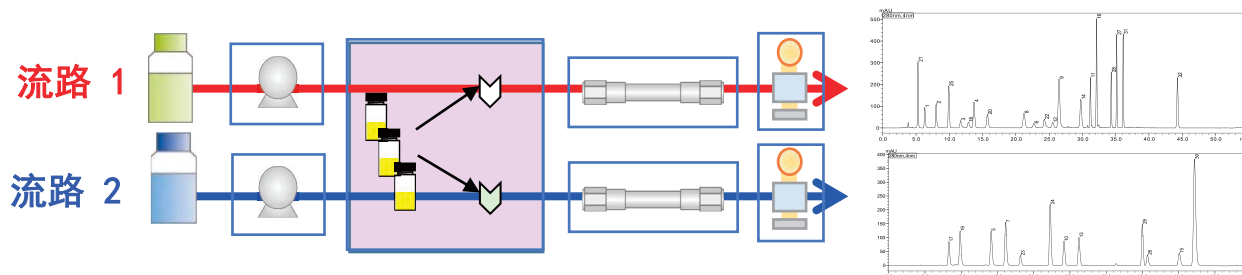


图 1 双进样液相色谱仪

## 1.2 系统介绍

### 1.2.1 工作原理

该系统有两套独立的色谱流路，共用一个自动进样器；自动进样器有两个进样口，可以将同一瓶号样品（或不同瓶号样品）分别注入两条色谱流路中，然后同时触发两条色谱流路同时进行数据采集。流路图如下：



- 注：1. 该系统具有两个独立液相流路，既可以同时使用，也可以单独使用。  
2. 该系统也可配置两个四元系统、两个二元系统或者四元系统 + 二元系统。  
3. 两个流路检测器可以配置紫外 +PDA；也可配置 PDA+PDA

### 1.2.2 软件设置

该系统只需使用一个 Labsolutions 软件即可进行两条流路的方法编辑以及数据采集。

#### 1> 两个流路的梯度程序设定

流路 1 是四元系统，运行第一组方法；流路 2 是二元系统，运行第二组方法，采集第二组样品

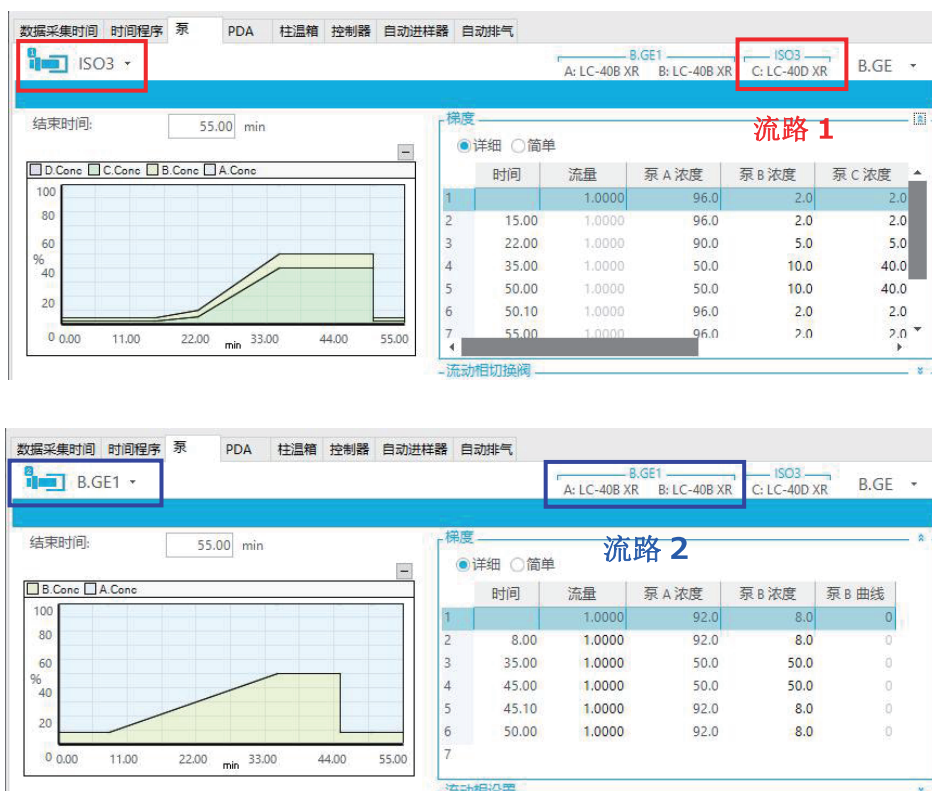


图 3 双进样液相色谱的梯度设置界面

## 2> 自动进样器的双进口与批处理表设置

分析	样品编号	样品瓶架	进样体积	样品编号 (端口)	样品瓶架	进样体积	样品名	样品ID	样品类型	方法文件	数据文件
1	20	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
2	20	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
3	1	1	5	1	1	5	G1*G2	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
4	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
5	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
6	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
7	1	1	5	1	1	5	G1*G2	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
8	1	1	5	1	1	5	G1*G2	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
9	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
10	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
11	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)
12	1	1	5	1	1	5	G1	STD-250ppm	0:未知	SJ\染发剂项目\LC方法-3.1cm	(自动命名文件)

图 4 双进样液相色谱工作站中自动进样器与批处理的设置

### 1.2.3 优势与特点

1> 工作效率提升。在本案例中，根据标准规定 32 种染发剂的测定，需两针进样来完成两组化合物的测试，第一组 55 min+ 第二组 50 min，两针供需 105 min；采用该系统后，两针进样同时进行，总用时 55 min；耗时降低一倍，可有效提升工作效率。

2> 性价比提升。相比较传统需要两套独立 HPLC 进行两个独立方法运行的方式，双进样系统通过共用进样器、柱温箱、工作站等单元和部件，节省了仪器采购费用，提升性价比。

3> 有效减少样品降解。染发剂样品易降解，标准规定样品处理后，需 48 小时内完成测试，分析时间的减半，有效减少样品降解。

因此，对易降解、分析时间长的样品分析，尤其是同一个检测项目需要两个方法两针进样的使用场景，该系统优势突出。

### 1.3 分析条件

液相色谱条件 1: (第一组 (G1) 测定 20 种染发剂的色谱条件)

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),  
(P/N:227-30017-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相: A 20 mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) B 甲醇 C 乙腈

流速: 1 mL/min 柱温: 25°C

进样体积: 5 μL 波长: 280 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表 1。

表 1 第一组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	96	2	2
15	96	2	2
22	90	5	5
35	50	10	40
50	50	10	40
50.1	96	2	2
55	96	2	2

液相色谱条件 2: (第二组 (G2) 测试 12 种染发剂的色谱条件)

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm),  
(P/N:227-30017-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相: A 20 mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) B 甲醇

流速: 1 mL/min 柱温: 25°C

进样体积: 5 μL 波长: 280 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表 2。

表 2 第二组梯度洗脱时间程序

Time(min)	A(%)	B(%)
0	92	8
8	92	8
35	50	50
45	50	50
45.1	92	8
55	92	8

### 1.4 混合标准溶液配置

参照国家药品监督管理局 2021 年 第 17 号通告的附件内容《化妆品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》。

标准储备溶液: 准确称取各染料对照品 0.1g (精确到 0.0001g), 分别置 10 mL 容量瓶中, 以 2 g/L 亚硫酸氢钠水溶液和无水乙醇 (1+1) 的混合溶液溶解并定容至 10 mL, 制成浓度约为 10 g/L 的各染料标准储备溶液。

标准工作溶液: 取标准储备溶液适量于 10 mL 容量瓶中, 使用无水乙醇稀释, 配制成浓度为 10、25、50、100、250 和 400 mg/L 的标准工作溶液。现用现配。

## 1.5 样品前处理方法

参照国家药品监督管理局 2021 年 第 17 号通告的附件内容《化妆品中对苯二胺等 32 种组分检验方法》。

准确称取样品 0.5 g (精确到 0.0001 g) 于 10 mL 具塞比色管中, 加无水乙醇 / 水 (1:1) 的混合溶液至 10 mL, 涡旋 1 min, 冰浴超声提取 15 min。如为浑浊溶液, 可取适量离心 (5000 rpm) 5 min, 取上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 滤液作为待测溶液, 并于 48 小时内完成检测。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准溶液色谱图

混合标准溶液 500  $\mu\text{g/mL}$  的色谱图图 5-6 所示。

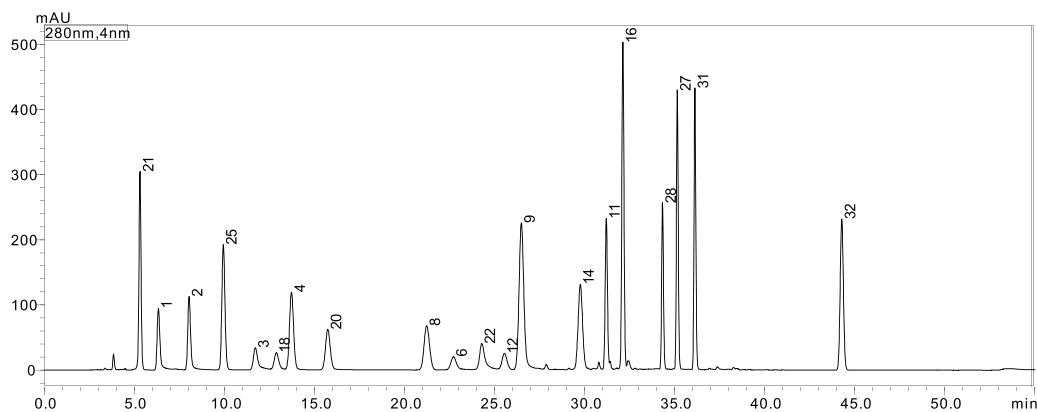


图 5 标准品溶液色谱图 (400  $\mu\text{g/mL}$ , 第一组)

(21: 2-氨基-3-羟基吡啶; 1: p-苯二胺; 2: p-氨基苯酚; 25: 2,6-二氨基吡啶; 3: 甲苯-2,5-二胺硫酸盐; 18: 2,4-二氨基苯氧基乙醇 HCl; 4: m-氨基苯酚; 20: 4-氨基-m-甲酚; 8: 间苯二酚; 6: 2-氯-p-苯二胺硫酸盐; 22: N,N-双(2-羟乙基)-p-苯二胺硫酸盐; 12: 2-甲基雷琐辛; 9: 2-硝基-p-苯二胺; 14: 苯基甲基吡啶啉酮; 11: 4-氨基-2-羟基甲苯; 16: 4-氨基-3-硝基苯酚 28: 4-氯雷琐辛; 27: 6-羟基吡啶; 31: 1,5-萘二酚; 32: 1-萘酚)

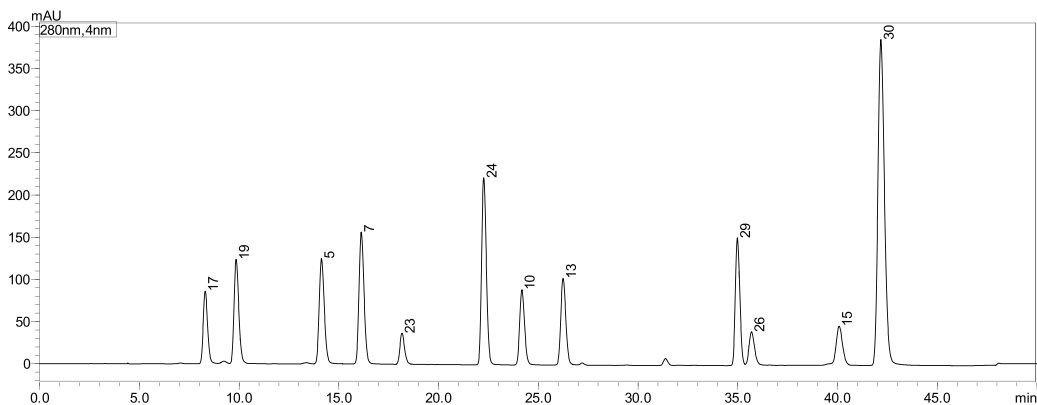


图 6 标准品溶液色谱图 (400  $\mu\text{g/mL}$ , 第二组)

(17: m-苯二胺; 19: 氢醌; 5: o-苯二胺; 7: o-氨基苯酚; 23: p-甲基氨基苯酚硫酸盐; 24: 4-硝基-o-苯二胺; 10: 甲苯-3,4-二胺; 13: 6-氨基-m-甲酚; 29: 2,7-萘二酚; 26: N,N-二乙基-p-苯二胺硫酸盐; 15: N,N-二乙基甲苯-2,5-二胺 HCl; 30: N-苯基-p-苯二胺)

## 2.2 线性范围

将不同浓度的标准品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，部分化合物结果如图 3 所示。在 10 ~ 400 mg/L 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 > 0.999，具体结果见表 1。

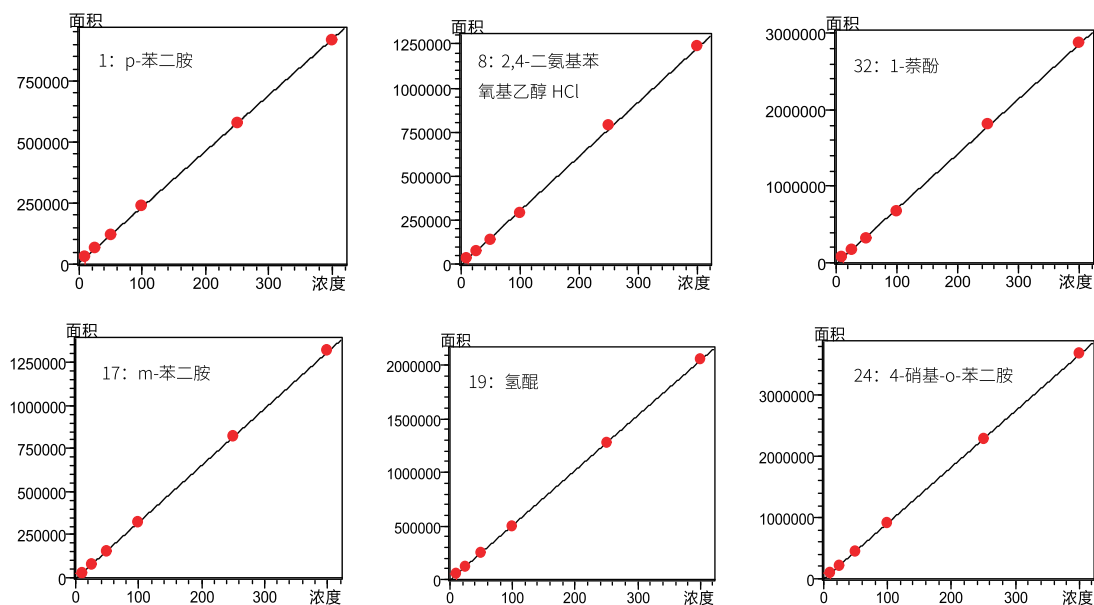


图 7 部分化合物的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 r	准确度 (%)	检出限 (μg/kg)
1	p- 苯二胺	$Y = (2286.21)X + (6257.97)$	0.9998	97.1~103.3	23.2
2	p- 氨基苯酚	$Y = (3008.03)X + (-9180.41)$	0.9992	91.2~111.4	19.8
3	甲苯 -2,5- 二胺硫酸盐	$Y = (1464.55)X + (8844.79)$	0.9998	93.5~104.7	30.4
4	m- 氨基苯酚	$Y = (5393.70)X + (-9234.72)$	0.9996	93.8~107.0	12.6
5	o- 苯二胺	$Y = (5568.37)X + (-5105.54)$	0.9999	98.6~103.1	4.4
6	2- 氯 -p- 苯二胺硫酸盐	$Y = (1072.01)X + (5984.37)$	0.9998	95.5~106.0	43
7	o- 氨基苯酚	$Y = (6858.88)X + (-7767.02)$	0.9999	98.7~103.1	3.6
8	间苯二酚	$Y = (3081.84)X + (-4109.06)$	0.9993	91.0~109.4	26.4
9	2- 硝基 -p- 苯二胺	$Y = (9240.64)X + (-13747.0)$	0.9990	93.0~108.3	7.6
10	甲苯 -3,4- 二胺	$Y = (3842.33)X + (-4183.93)$	0.9999	98.2~103.0	6.6
11	4- 氨基 -2- 羟基甲苯	$Y = (4493.80)X + (-1063.18)$	0.9998	95.4~103.2	6.2
12	2- 甲基雷琐辛	$Y = (764.315)X + (-1047.33)$	0.9996	94.6~107.3	85.8
13	6- 氨基 -m- 甲酚	$Y = (4537.99)X + (-4619.14)$	0.9999	98.6~102.9	5.6
14	苯基甲基吡啶啉酮	$Y = (5598.30)X + (-9670.34)$	0.9998	94.7~105.2	11.4
15	N,N- 二乙基甲苯 -2,5- 二胺 HCl	$Y = (2625.35)X + (-10114.5)$	0.9995	93.2~111.4	15.8
16	4- 氨基 -3- 硝基苯酚	$Y = (8519.87)X + (-10445.9)$	0.9996	93.4~107.4	3.4
17	m- 苯二胺	$Y = (3294.13)X + (-6766.67)$	0.9998	97.2~105.8	7.6

18	2,4- 二氨基苯氧基乙醇 HCl	$Y = (3004.17)X + (-12197.9)$	0.9995	91.8~109.6	40.4
19	氢醌	$Y = (5127.96)X + (-6359.88)$	0.9999	98.5~103.3	4.8
20	4- 氨基 -m- 甲酚	$Y = (3012.78)X + (-4161.02)$	0.9998	95.0~104.4	24.4
21	2- 氨基 -3- 羟基吡啶	$Y = (4067.63)X + (-17881.2)$	0.9995	92.8~113.6	12.6
22	N,N- 双 (2- 羟乙基 )-p- 苯二胺硫酸盐	$Y = (1791.25)X + (-3055.88)$	0.9998	94.5~103.9	43.2
23	p- 甲基氨基苯酚硫酸盐	$Y = (1513.74)X + (1315.50)$	0.9997	92.3~104.9	12.4
24	4- 硝基 -o- 苯二胺	$Y = (9171.01)X + (-6435.17)$	0.9999	98.9~102.1	2.6
25	2,6- 二氨基吡啶	$Y = (5649.45)X + (-14363.1)$	0.9995	92.7~108.8	10.2
26	N,N- 二乙基 -p- 苯二胺硫酸盐	$Y = (1923.78)X + (-3246.33)$	0.9999	98.5~104.5	15.8
27	6- 羟基吡啶	$Y = (6735.51)X + (-4262.91)$	0.9997	94.5~105.5	3.4
28	4- 氯雷琐辛	$Y = (4426.69)X + (-5052.74)$	0.9996	93.7~107.1	5.6
29	2,7- 萘二酚	$Y = (5992.52)X + (-1310.92)$	0.9999	99.3~100.7	3.4
30	N- 苯基 -p- 苯二胺	$Y = (21936.2)X + (-15984.6)$	0.9999	99.3~102.0	1.4
31	1,5- 萘二酚	$Y = (7911.10)X + (-8755.74)$	0.9996	94.0~106.8	3.2
32	1- 萘酚	$Y = (7170.95)X + (-10225.3)$	0.9995	93.7~107.5	6.4

### 2.3 精密度实验

不同浓度的标准品溶液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.012~0.42% 和 0.039~3.99% 之间，仪器精密度良好。

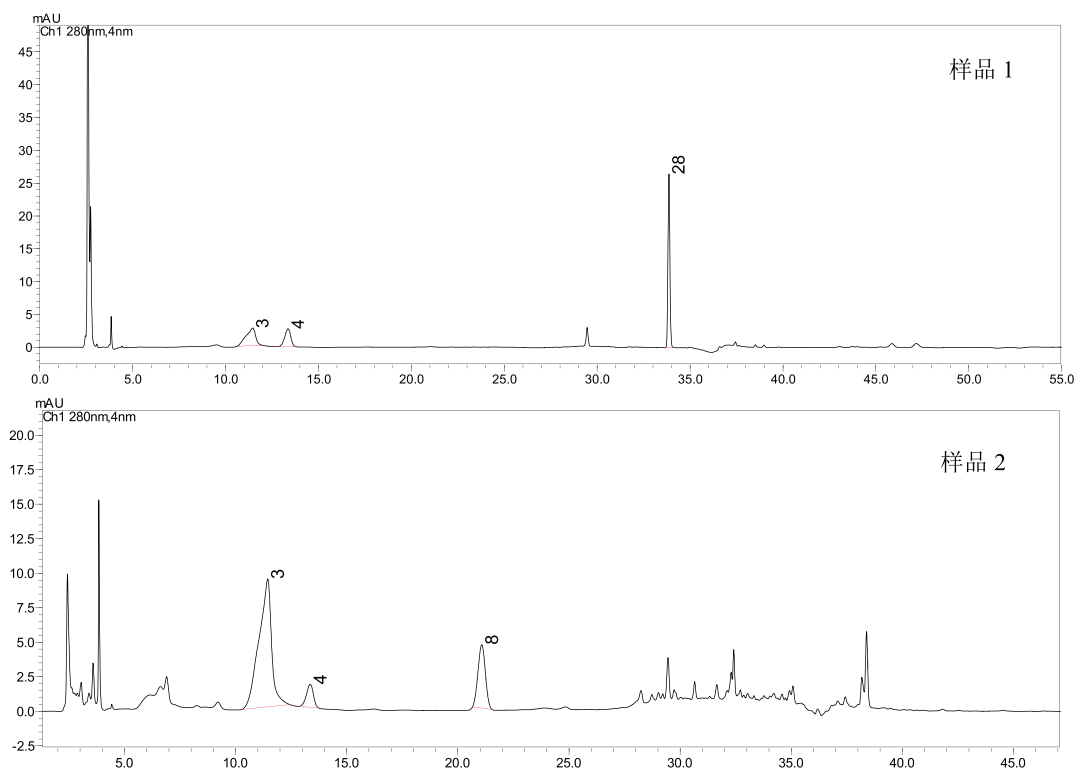
表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	名称	RSD% (10 mg/L)		RSD% (50 mg/L)		RSD% (250 mg/L)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	p- 苯二胺	0.019	0.132	0.054	0.130	0.076	0.227
2	p- 氨基苯酚	0.065	0.318	0.025	0.119	0.072	0.189
3	甲苯 -2,5- 二胺硫酸盐	0.088	1.194	0.049	0.326	0.067	0.231
4	m- 氨基苯酚	0.074	0.757	0.024	0.669	0.039	0.653
5	o- 苯二胺	0.106	0.904	0.153	0.319	0.151	0.415
6	2- 氯 -p- 苯二胺硫酸盐	0.091	0.471	0.026	0.379	0.052	0.284
7	o- 氨基苯酚	0.087	0.588	0.137	0.314	0.155	0.510
8	间苯二酚	0.087	0.615	0.032	0.370	0.043	0.241
9	2- 硝基 -p- 苯二胺	0.050	0.295	0.017	0.066	0.037	0.223
10	甲苯 -3,4- 二胺	0.044	1.405	0.053	0.284	0.025	0.309
11	4- 氨基 -2- 羟基甲苯	0.012	0.298	0.009	0.166	0.023	0.637
12	2- 甲基雷琐辛	0.060	1.008	0.020	0.514	0.036	0.226
13	6- 氨基 -m- 甲酚	0.045	1.307	0.038	0.206	0.020	0.355
14	苯基甲基吡啶啉酮	0.024	1.077	0.020	0.261	0.021	0.262
15	N,N- 二乙基甲苯 -2,5- 二胺 HCl	0.167	2.879	0.021	0.774	0.056	0.362
16	4- 氨基 -3- 硝基苯酚	0.011	0.039	0.008	0.100	0.022	0.394

17	m- 苯二胺	0.326	0.894	0.422	0.154	0.367	0.300
18	2,4- 二氨基苯氧基乙醇 HCl	0.118	2.329	0.057	1.274	0.104	3.994
19	氢醌	0.172	0.753	0.162	0.308	0.178	0.439
20	4- 氨基 -m- 甲酚	0.136	0.473	0.032	0.101	0.061	0.318
21	2- 氨基 -3- 羟基吡啶	0.052	0.596	0.072	0.405	0.068	0.488
22	N,N- 双 (2- 羟乙基 )-p- 苯二胺硫酸盐	0.089	1.119	0.024	0.338	0.060	0.826
23	p- 甲基氨基苯酚硫酸盐	0.080	2.254	0.116	0.684	0.134	0.395
24	4- 硝基 -o- 苯二胺	0.046	0.702	0.067	0.262	0.044	0.297
25	2,6- 二氨基吡啶	0.065	0.137	0.033	0.073	0.053	0.347
26	N,N- 二乙基 -p- 苯二胺硫酸盐	0.154	2.031	0.019	0.685	0.029	0.296
27	6- 羟基吲哚	0.012	0.064	0.008	0.070	0.022	0.168
28	4- 氯雷琐辛	0.013	0.123	0.011	0.117	0.021	0.291
29	2,7- 萘二酚	0.030	0.817	0.018	0.283	0.029	0.284
30	N- 苯基 -p- 苯二胺	0.035	0.935	0.024	0.369	0.081	0.309
31	1,5- 萘二酚	0.013	0.032	0.009	0.088	0.022	0.307
32	1- 萘酚	0.019	0.132	0.012	0.228	0.024	0.187

## 2.4 样品测试

取 5 个染发剂样品，分别准确称量 0.5 g，参考 1.4 的样品前处理方法，制备上机。具体测试结果如下表 5。其样品色谱图如图 8。



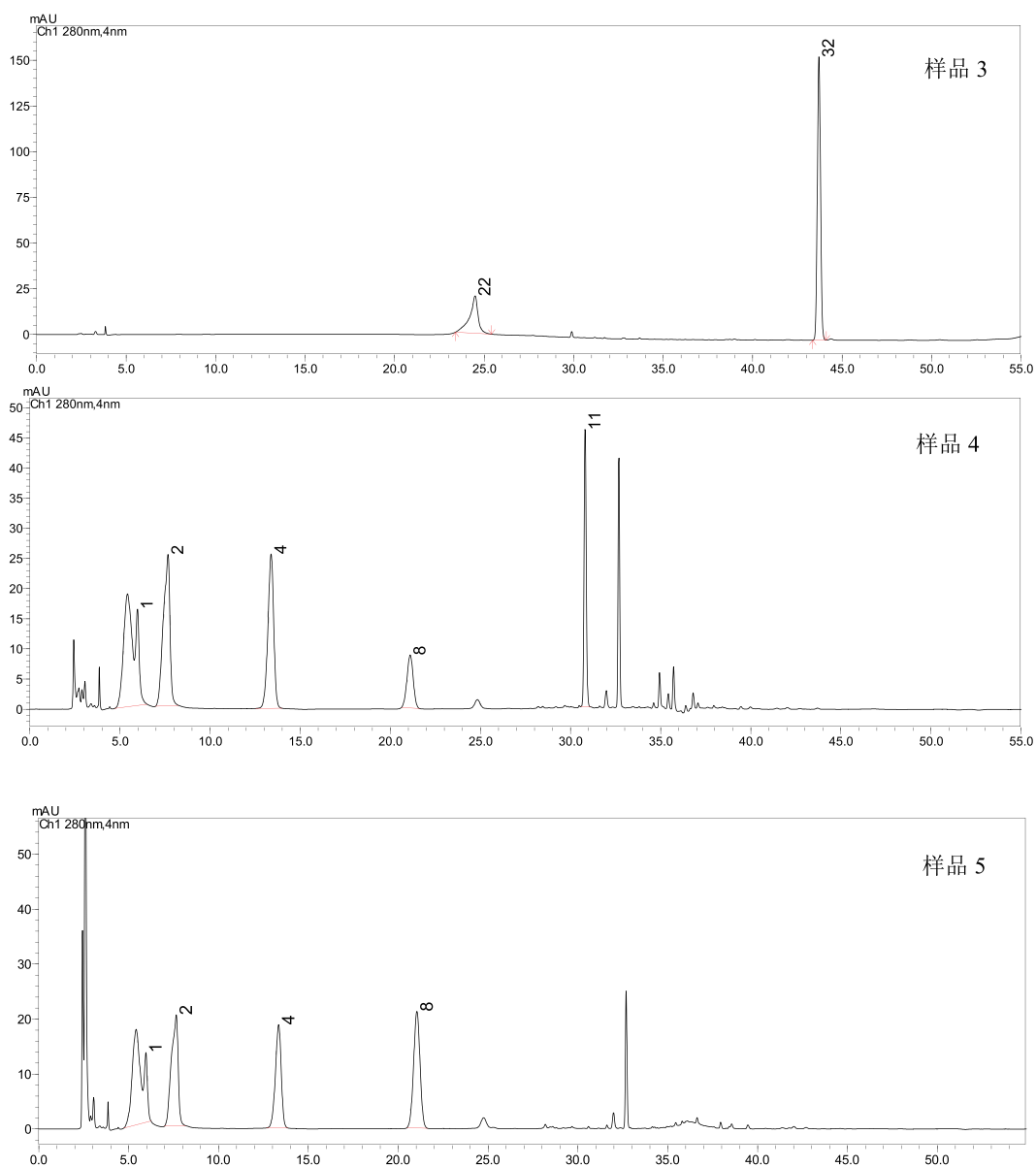


图 8 样品色谱图

表 5 样品测试结果

No.	化合物	样品浓度 (%)				
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
1	p- 苯二胺				0.72%	0.60%
2	p- 氨基苯酚				0.43%	0.35%
3	甲苯 -2,5- 二胺硫酸盐	0.12%	0.49%			
4	m- 氨基苯酚	0.03%	0.02%		0.22%	0.16%
8	间苯二酚		0.07%		0.14%	0.34%
11	4- 氨基 -2- 羟基甲苯				0.17%	
22	N,N- 双 (2- 羟乙基 )-p- 苯二胺硫酸盐			0.75%		
28	4- 氯雷琐辛	0.09%				
32	1- 萘酚			0.54%		

## ■ 结论

本文使用岛津双进样液相色谱仪建立快速测定对苯二胺等 32 种染发剂含量的方法，并考察了线性、重复性、实际样品测试等，可以满足国家药监局（2021 年 第 17 号）通告发布的《化妆品中对苯二胺等 32 种染发剂的检测方法》的检测需求。双进样液相色谱仪可以实现一次进样同时分析两组样品，分析耗时降低一倍，防止样品降解的可能，可供相关行业参考。

