

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

指甲油鄰苯二甲酸酯分析方法開發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-041-004-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：林維炤

共同主持人：王翠霜

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 10 月 31 日

中文摘要

鄰苯二甲酸酯類 (phthalates) 在工業上被廣泛使用，在化粧品上，常被用來做為指甲油中的塑型劑與香水中的安定劑。然而，近年來鄰苯二甲酸酯逐漸被視為環境荷爾蒙。因此建立分析指甲油中鄰苯二甲酸酯的分析方法實為一重要課題。

本研究開發利用液液萃取方式將鄰苯二甲酸酯自指甲油中萃取出來，以高效率液相層析儀進行分離與定量的分析方法。研究中探討萃取溶劑，水洗體積與鹽析效果，結果顯示，萃取溶劑為乙醇與正己烷 1:1 時萃取效果最佳，除了 dimethyl phthalate(DMP) 回收率較差外，其餘均在 85% 以上。水洗量越多，對於 DMP 的影響越大。以 NaCl 取代純水進行水洗，可以增加 DMP 回收率

關鍵字: 鄰苯二甲酸酯, 高效率液相層析, 指甲油



Abstract

Phthalates are widely used in industry. For the application in cosmetic industry, phthalates are common added in nail enamel as stabilizer. However, In recent year, phthalates are recognize as environmental hormone. To develop an analytical method for the determination of phthalates in nail enamel become an important issue.

In this study, A analytical method based on liquid-liquid extraction followed by high performance liquid chromatography was studied. Several factored were evaluated including extraction solvents, wash volume and the addition of sodium chloride. The results showed that the mixture of ethanol:hexane (1:1) gave best recoveries. The recoveries of all phthalates except dimethyl phthalate (DMP) are above 85% . The increasing wash volume decrease the recovery of DMP significantly. The addition of NaCl in the wash water increases the recovery of DMP.

Key word: phthalates, high performance liquid chromatography, nail polish

前言

鄰苯二甲酸酯類(Phthalate esters)是鄰苯二甲酸(Phthalate acid)的衍生物，其為具有芳香氣味的無色液體，中等黏度、高分子量、高穩定性、低揮發性，在水中溶解度很小，但易溶於多數有機溶劑中。早在 1998 年日本環境廳所公告的疑似環境荷爾蒙中，就包括了八種工業上做為可塑劑的鄰苯二甲酸酯類，其中用量最大的兩種：鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Bis-(2-ethyl hexyl) phthalate, BEHP)及鄰苯二甲酸二丁酯(di-butylphthalate, DBP)，於中華民國八十八年十二月二十四日也由我國環保署所列管。

自 1992 年丹麥有關人類精子產量減少之報告出現，許多有關精子數目變化之相關研究進行著。目前雖尚未能對精子的增減傾向導出最終之結論，或確定直接致因物質，但已有英國報告指出，將大量(0.3g/day)之 phthalate esters 給予小白鼠及老鼠，會影響其精巢的發育；若將 phthalate esters、bisphenol A 等加入飲用水中(1 μ g/l)，會造成暴露之老鼠之後代，公鼠精子數目減少等生殖機能障礙。

雖然目前鄰苯二甲酸酯類(phthalate esters)的資料尚無法證實會對人體產生直接的傷害，但已有不少的動物實驗顯示出此類物質對生物體的確是有影響的；對本實驗中的主角—「指甲油」的組成而言，它更是佔著成品好壞判定的一個指標，在這個重視外表的社會裡，指甲油被普遍地使用著，當然其中的毒性更應該是大家所欲關心的。

鄰苯二甲酸二丁酯(di-butylphthalate, DBP)更是常被運用在指甲油中作為塑型劑，以幫助指甲油中的樹脂類成份(通常為硬化劑)在指甲上乾燥後，能夠較柔韌而不致輕易破裂；另可使香水中的香味達時間較久的功效，所以亦在香水中普遍地被使用著；又若添加於頭髮定型劑中，則可使頭髮上形成一柔韌的薄膜，使髮型看來較不死板，而有活力。

目前鄰苯二甲酸類在化粧品中較常被使用的有 DMP(di-methyl phthalate)、DEP(di-ethyl phthalate)、DBP(di-butyl phthalate)等三種。

研究目的

本研究針對六種工業中常用的鄰苯二甲酸酯類建立高效能液相層析儀／紫外線偵測器(HPLC／UV)的分析條件，並由此條件對指甲油中的鄰苯二甲酸酯類開發一個適當的前處理方法。

研究中針對「不同極性之溶劑萃取效果」、「不同水洗量探討」以及「以鹽類水溶液代替二次水之萃取效果」三部份加以探討，找出最佳條件，最後以最佳條件套用在隨意選擇的二款市售指甲油的成份，以評估方法的可行性。

研究方法

(A) 藥品

本實驗中所使用之藥品及稀釋用之溶劑，其資料皆詳列於表一、表二中。

表一 本實驗中所使用之藥品

名稱	CAS	廠牌	純度
Dimethyl Phthalate (DMP)	131-11-3	CHEM SERVICE	99%
Diethyl Phthalate (DEP)	84-66-2	CHEM SERVICE	99%
Di-n-butyl Phthalate (DBP)	84-74-2	CHEM SERVICE	99%
Butyl benzyl Phthalate (BBP)	85-68-7	CHEM SERVICE	99%
Bis(2-ethyl hexyl) Phthalate (BEHP)	117-81-7	CHEM SERVICE	99%
Di-n-octyl Phthalate (DOP)	117-84-0	CHEM SERVICE	99%

表二 本實驗中所使用之稀釋溶劑

名稱	廠牌	等級
Methanol	MERCK	Gradient for liquid chromatography
Ethanol	J.T.Baker	純度 99.9% A.C.S
Propanol	J.T.Baker	純度 99.9%
Iso-Propanol	TEDIA	純度 99.9%
n-Hexane	TEDIA	純度 95%

(B) 儀器設備

實驗中所使用的高效能液相層析儀(HPLC)為 HITACHI L-7100 HPLC Pump(Tokyo, Japan)，是提供系統溶劑與高壓的 HPLC 往復式高壓幫浦，可在此做梯度沖提之設定。所使用的偵測器型號為 HITACHI L-7420 UV-VIS Detector 其可偵測的光範圍為 200nm~400nm。所使用的管柱，其廠牌為 PHENOMENEX，型號 SYNERGI 4u POLAR-RP 80A 的 C-18 管柱。樣品注入量為 20 μ l 分離過程中以梯度變化方式進行分離，波長選擇為 275nm。

(C) 實驗方法

(I) 模擬配方

評估萃取條件時，為了能確實知道指甲油中的鄰苯二甲酸酯類的含量與了解配方中的成份對回收率的影響。實驗室參考了常用的指甲油配方，自行調製指甲油，其配方如表三、表四。

表三 配方一之成份表列

成分名稱	實際添加克數(g)	重量百分比(%)	成分功能
Butyl acetate	12.249	24.539	有機溶劑一
Toluene	12.021	24.082	稀釋劑
Ethyl acetate	7.699	15.424	有機溶劑二
Nitrocellulose	5.010	10.037	硬化劑一
Santolite	4.004	8.021	硬化劑二
IPA	3.060	6.130	有機溶劑三
Phthalates (mix)	3.012	6.034	塑型劑
Camphor	1.056	2.116	使薄膜柔韌
Pigment (Red)	1.806	3.618	增加色彩

表四 配方二之成份表列

成分名稱	實際添加克數(g)	重量百分比(%)	成分功能
Butyl acetate	19.314	38.628	有機溶劑一
Ethyl acetate	9.029	18.058	有機溶劑二
Nitrocellulose	8.022	16.044	硬化劑一
Polyester Resin	5.214	10.428	硬化劑二
IPA	3.005	6.010	有機溶劑三
Phthalates (mix)	3.000	6.000	塑型劑
Camphor	1.010	2.020	使薄膜柔韌
Stearalkonium Hectorite	0.751	1.502	增黏劑、分散劑
Pigment (Blue)	0.375	0.750	增加色彩
Pigment (Yellow)	0.280	0.560	增加色彩

此兩種指甲油雖配方相似，但配方二之中除了硝化纖維素(Nitrocellulose)之外，還另外加入了 Polyester Resin，這是市面上指甲油為求快速乾燥、成型的配方中所用的小技巧，且加入 Polyester Resin 還可以增加指甲膜亮度及提高膜對指甲附著力，

(II) 樣品萃取流程

- 1、取樣品 0.5g 加入約 8ml 之萃取溶劑，離心約 15 分鐘後，取其澄清液，並以相同之萃取溶劑定量到 10ml。
- 2、取 0.5ml 之萃取液加入 4ml 之 n-hexane 中，混合均勻。
- 3、加入 10ml 二次水，與 2、充分 partition 後，取走水層。
- 4、重複 3、
- 5、取出 n-hexane 層，以 n-hexane 定量到 5ml，再以氮氣做溶劑置換，最終以 ethanol 定量回 5ml，上 HPLC 測試。

(III) 檢量線之配製

本實驗所配製之檢量線共有兩組，一為低濃度，其範圍在 1ppm~60ppm 之間，分別取 200ppm 的 phthalate esters(六種混合)25、200、625 μ l 及 1、1.5ml 分別置於 5ml 定量瓶中，以分析級乙醇為稀釋溶劑，將其定量至 5ml，得 1ppm、8ppm、25ppm、40ppm、60ppm 共五瓶檢量線溶液。

另一組則為高濃度檢量線，範圍在 50ppm~500ppm 之間，分別取 2000 μ l 的 phthalate esters(六種混合)125、250、500、875 μ l 及 1.25ml 分別置於 5ml 定量瓶中，以分析級乙醇為稀釋溶劑，將其定量至 5ml，得 50ppm、100ppm、200ppm、350ppm、500ppm 共五瓶檢量線溶液。

兩組檢量線溶液上 HPLC 測試，此檢量線之線性關係分別如圖三圖四所示，而其線性相關係數皆在 0.9995 以上。

(V) 真實樣品

本實驗中之指甲油樣品來源共有四種，其中兩種為市售之指甲油，其一為一般指甲油，品名為 KEBIYA，其二為彩繪指甲油，品名為 NIMET，二者所標示的主要成份皆為乙酸乙酯、硝化纖維素及乙酸丁酯。另二者為實驗室自行配製，已於 2-3-1 說明。

結果與討論

(I) 最佳分離條件

UV-VIS Detector 設定波長為 275nm 流速維持 1.000ml/min

時間(分鐘)	0	12	18	20
移動相-甲醇(%)	72	95	95	72
移動相-水(%)	28	5	5	28

圖一 為 50ppm 鄰苯二甲酸酯類六種混合之 HPLC 層析圖

(II) 不同溶劑萃取效果

基於鄰苯二甲酸酯類易溶於有機溶劑，所以最初先以毒性最低之乙醇(ethanol)來試著萃取，但六種鄰苯二甲酸酯類中的 Di-methyl phthalate (DMP)的回收率大約只有 55%~60%，追溯原因後，覺得有可能是因為 DMP 是其中最易溶於乙醇的，而在我們的實驗步驟中，萃取液溶解了鄰苯二甲酸酯類後，還需以水洗的方式去除指甲油中其他的雜質，同時，也因為乙醇與水的相溶性亦高的情況之下，很有可能將與乙醇已溶解的鄰苯二甲酸酯類(尤其是 DMP)也溶入了二次水中，而導致流失。

故在不同極性的溶劑對水的溶解度不同的關係下，嘗試以不同極性的溶劑做為萃取溶劑，其中包含了甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)、丙醇(n-propanol)、異丙醇(iso-propanol)及以乙醇(ethanol)和正己烷(n-hexane)依不同比例配成的三種(1:1、1:4、1:5)不同極性之溶劑，分別萃取配方一和配方二之指甲油，來比較其回收率。結果發現，選擇以乙醇(ethanol)和正己烷(n-hexane)按 1:1 的比例之萃取溶劑，對配方一中各鄰苯二甲酸酯類的回收率皆有提升的效果，由原先的 61%~93%的回收率增加到 65%~95%，其中 DMP 亦拉升至 65%；而對於配方二則是以乙醇(ethanol):正己烷(n-hexane)=1:4 的萃取溶劑對各鄰苯二甲酸酯類會有較好的回收率提升效果，其回收率亦從原先的 56%~91%提高到 63%~97%之間。其各回收率之比較如圖二、圖三所示。

(III) 水洗條件探討

(a) 不同水洗量之探討

正如同在「不同溶劑萃取效果」中所提到的，以二次水在去除雜質時，也會無意中帶走已溶在萃取溶劑中的 Phthalate esters，所以，試著以較少的水洗量的水洗方式來觀察是否能夠使回收率有所提升。

於是以乙醇(ethanol)為萃取溶劑，對配方作萃取，但將水洗量分以 5ml 水洗兩次、以 10ml 水洗兩次，及以 15ml 水洗兩次為三組，分別做三重覆，其所得的回收率範圍分別為「5ml 水洗兩次」的 58%~95%、「以 10ml 水洗兩次」的 42%~95% 及「以 15ml 水洗兩次」的 33%~95%，顯示出「以 5ml 水洗兩次」的效果會最好，也再次應證了先前的推論。其各回收率之比較如圖四、圖五所示。

(b) 以鹽類水溶劑代替二次水

由於水對於氯化鈉(NaCl)的互溶程度更大於對有機溶劑的，所以在此處，以已事先加入了氯化鈉(NaCl)的水溶液來代替原本的二次水做清除雜質的動作，並以不

同的氯化鈉(NaCl)濃度及改變水洗的次數來作觀察。

結果最後亦顯示，不論是配方一或配方二都是以 2M 氯化鈉(NaCl)水溶液清洗兩次，可得到較乾淨的上機樣品，且回收率亦較高。其各回收率之比較如圖六、圖七所示。

(IV)最佳條件

綜合以上三種不同探討方向所得之結果為：對於配方一而言，最適合的萃取溶劑是乙醇：正己烷=1：1 (Ethanol：n-Haxane=1：1) 的溶劑，最佳的水洗條件是以 5ml 的氯化鈉(NaCl)水溶液清洗兩次；對於配方二來說，最適合的萃取溶劑則是乙醇：正己烷=1：4 (Ethanol：n-Haxane=1：1) 的溶劑，而最佳的水洗條件仍然是以 5ml 的氯化鈉(NaCl)水溶液清洗兩次。

配合以上條件，分別針對配方一和配方二做三重覆的確認，配方一中六種鄰苯二甲酸酯類的回收率皆在%以上。而配方二則亦在%以上。各鄰苯二甲酸酯類的回收率則記於表五之中。

表五 以最佳萃取條件萃取配方一及配方二之回收率

	DMP	DEP	DBP	BBP	BEHP	DOP
配方一	79.07%	93.43%	95.41%	94.83%	87.88%	92.04%
配方二	81.46%	95.98%	98.50%	98.22%	87.09%	96.61%

(V) 真實樣品分析

自先前從各不同變因的實驗中，得到最高回收率的萃取條件，將其綜合，並以市售指甲油為樣品，評估此萃取方法是否適當。萃取方法再述於下：

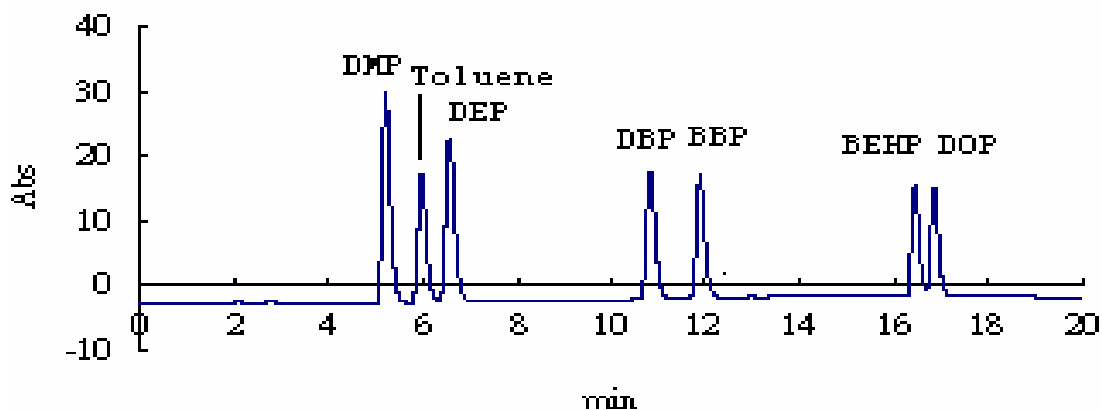
(一)樣品：KEBIYA 一般指甲油

NIMEI 彩繪指甲油

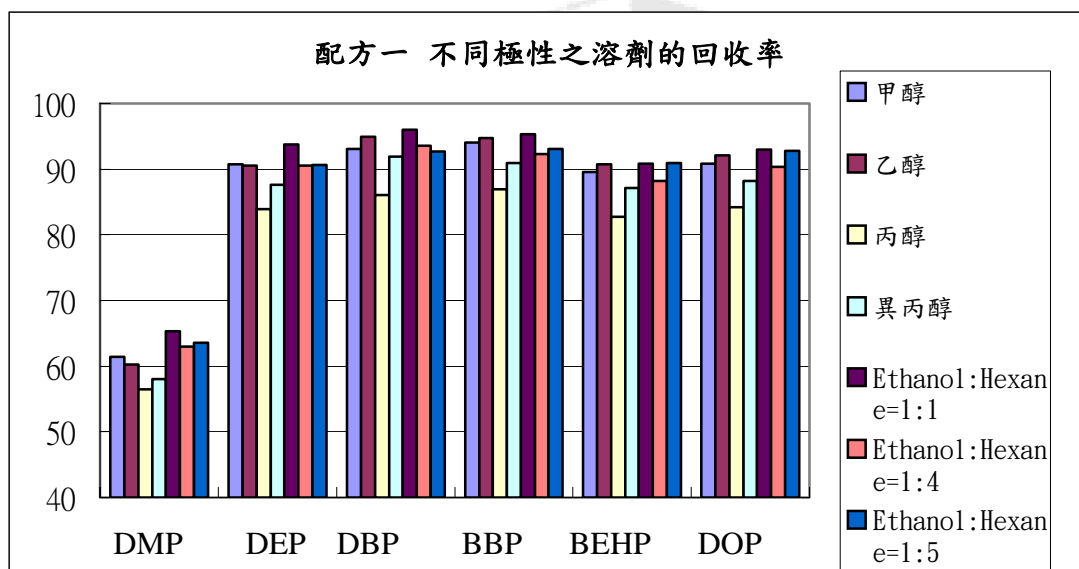
表九 真實樣品回收率

	DMP	DEP	DBP	BBP	BEHP	BBP
KEBIYA	61.08%	71.35%	43.19%	74.71%	76.56%	73.36%
NIMEI	63.89%	74.93%	76.68%	74.91%	77.03%	75.25%

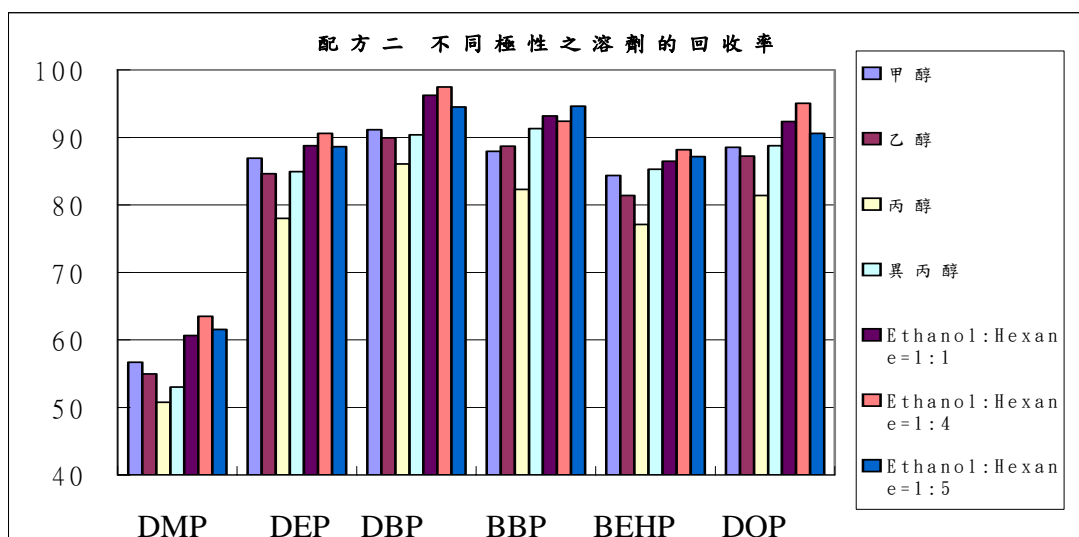
50ppm Phthalate Esters



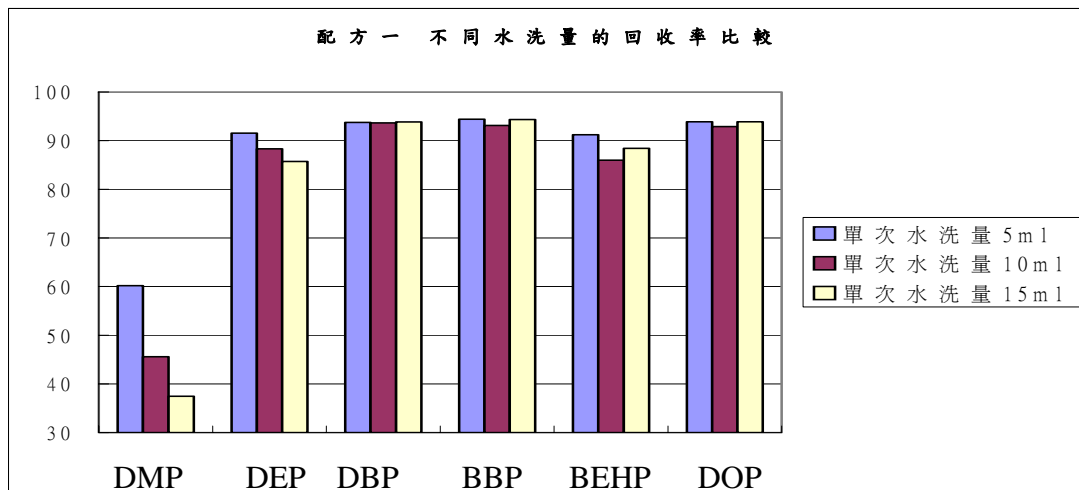
圖一 50ppm 六種鄰苯二甲酸酯混合之 HPLC 層析圖



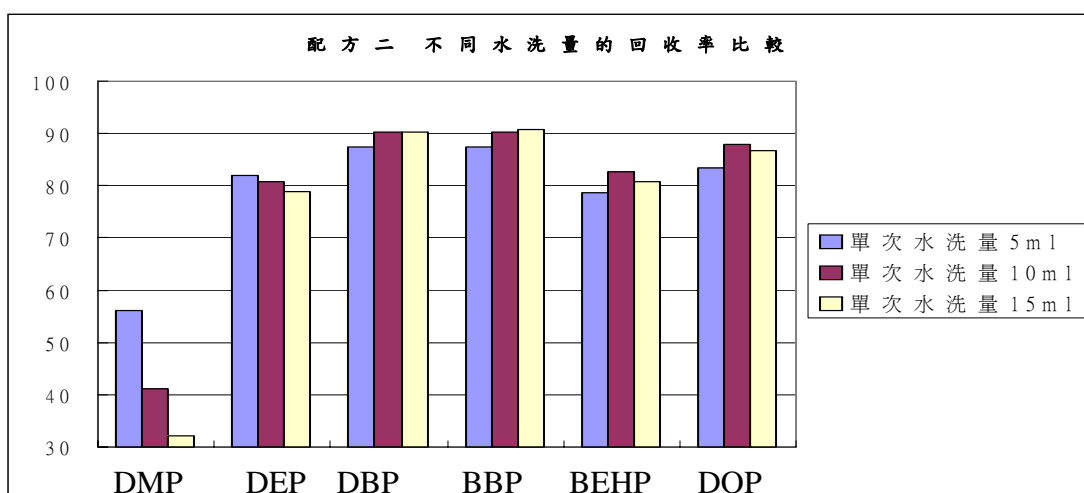
圖二 配方一 不同極性之溶劑的回收率



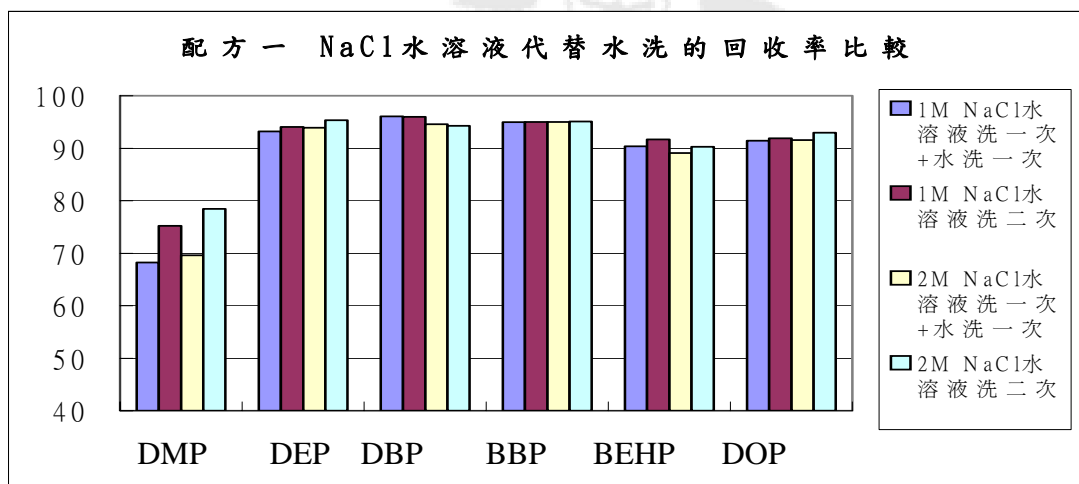
圖二 配方二 不同極性之溶劑的回收率



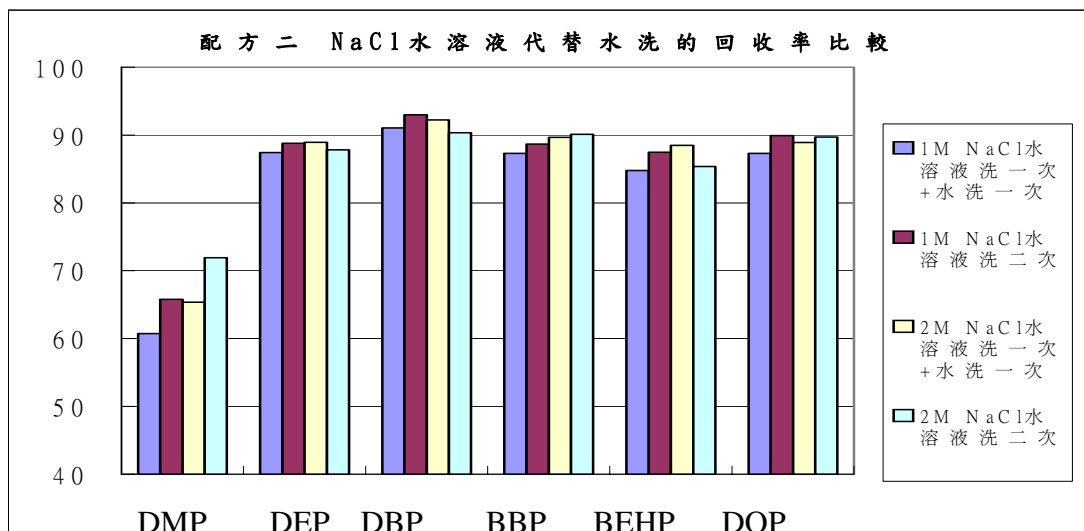
圖三 對配方一使用不同水洗量所得之回收率



圖四 對配方二使用不同水洗量所得之回收率



圖五 對配方一使用氯化鈉水溶液進行水洗所得之回收率



圖六 對配方一使用氯化鈉水溶液進行水洗所得之回收率



參考資料:

1. Kleinsasser, N.H., et al., *Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2000. 257(6): p. 337-342.
2. Tsumura, Y., et al., *Simultaneous determination of 11 phthalates and di(2-ethylhexyl) adipate in foods by GC/MS (SIM)*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2000. 41(4): p. 254-260.
3. Kataoka, H., M. Ise, and S. Narimatsu, *Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics*. Journal of Separation Science, 2002. 25(1-2): p. 77-85.
4. Kato, K., et al., *Preparation of samples for gas chromatography/mass spectrometry analysis of phthalate and adipate esters in plasma and beverages by steam distillation and extraction*. Journal of Aoac International, 2002. 85(3): p. 719-723.
5. Hyotylainen, T., et al., *Reversed phase HPLC coupled on-line to GC by the vaporizer precolumn solvent split gas discharge interface; Analysis of phthalates in water*. Hrc-Journal of High Resolution Chromatography, 1997. 20(8): p. 410-416.
6. Janos, P. and J. Skoda, *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of ionogenic compounds: comparison of retention models*. Journal of Chromatography A, 1999. 859(1): p. 1-12.
7. Jara, S., et al., *Determination of phthalates in water samples using polystyrene solid-phase extraction and liquid chromatography quantification*. Analytica Chimica Acta, 2000. 407(1-2): p. 165-171.
8. Kleinsasser, N.H., et al., *Genotoxicity of di-butyl-phthalate and di-iso-butyl-phthalate in human lymphocytes and mucosal cells*. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 2001. 21(3): p. 189-196.
9. Lega, R., et al., *Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS*. Chemosphere, 1997. 34(8): p. 1705-1712.
10. Luks-Betlej, K., et al., *Solid-phase microextraction of phthalates from water*. Journal of Chromatography A, 2001. 938(1-2): p. 93-101.