

反相高效液相色谱法测定化妆品中的 24 种防腐剂

武婷* 王超 王星 马强 张帆 刘柳

(中国检验检疫科学研究院,北京 100025)

摘要 建立了同时检测化妆品中 24 种防腐剂含量的反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)。采用 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以磷酸盐缓冲溶液 (pH = 4.26) 为流动相,梯度洗脱。样品经甲醇超声提取,然后采用 RP-HPLC 二极管阵列检测法测定,对样品前处理和色谱条件进行研究和优化。方法的相对标准偏差为 1.3% ~ 3.3%;回收率为 90.6% ~ 97.8%;各种防腐剂的线性相关系数 0.9997,具有较高的准确度和精密度,可用于化妆品中 24 种防腐剂含量的分析。

关键词 反相高效液相色谱,化妆品,防腐剂

1 引言

化妆品中的防腐剂是为了使化妆品在生产、使用和保存过程中免受微生物污染的一类化妆品添加剂。但大多数防腐剂对人的皮肤会产生不同程度的刺激。因此,化妆品中防腐剂的用量必须以安全性作为前提。我国《化妆品卫生规范》^[1]对化妆品中防腐剂的使用浓度和范围做了相关的规定。目前,国内外对化妆品中防腐剂的测定一般多采用高效液相色谱法^[2~4]、气相色谱法^[5]、气相色谱质谱法^[6]、胶束电动色谱法^[7]、毛细管电泳法^[8]和伏安法^[9]等,而同时测定的防腐剂一般仅为 4 ~ 8 种,最多可同时测定 18 种,采用的方法均为气相色谱质谱法。

本实验研究了化妆品中的 24 种常用防腐剂的样品前处理方法和 HPLC 分离条件,建立了化妆品中 24 种常用防腐剂同时检测的 HPLC 法。结果表明,本方法简便、快速、准确,应用于实际化妆品中防腐剂的测定,结果满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国 Agilent 1100 系列),由四元低压泵、柱温箱、二极管阵列检测器及自动进样器组成;KQ-600 型超声波清洗仪器 (昆山市超声仪器有限公司)。

对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、水杨酸、5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮、2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮、苯甲醇、苯氧基乙醇、4-氯-3-甲苯酚、三氯生及三氯卡班 (Sigma 公司);苯甲酸甲酯、苯甲酸乙酯、苯甲酸苯酯及溴硝丙醇 (Acros Organics 公司);2,4-二氯-3,5-二甲酚、对羟基苯甲酸异丙酯、2-苯酚、4-氯-3,5-二甲酚、对羟基苯甲酸异丁酯及 2-苄基-4-氯酚 (东京化成工业株式会社);苯甲酸、山梨酸 (国家标准物质中心)。乙腈为色谱纯,甲醇为优级纯;无水乙醇、四氢呋喃等试剂均为国产分析纯;Millipore 超纯水。

2.2 标准品混合溶液和供试品溶液的制备

分别准确称取一定量的 24 种防腐剂标准品,用甲醇溶液定容,配制成 2 g/L 的标准储备液。分别移取一定体积的上述标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配成混合标准储备液。

准确称取化妆品 0.2 g (精确到 0.001 g) 于 50 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 甲醇,超声提取 30 min,取部分溶液放入离心管中,在离心机上以 5000 r/min 高速离心 10 min 后,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液供 RP-HPLC 检测。

2006-12-25 收稿;2007-05-17 接受

* E-mail: ppwpp@126.com

2.3 色谱条件

色谱柱:伊利特 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A. 甲醇, B. 0.025 mol/L NaH₂PO₄ 溶液, pH 4.26。线性梯度洗脱条件见表 1。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 程序可变波长扫描 (见表 2); 进样量: 10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Condition of gradient elution

时间 Time (min)	A (%)	B (%)	时间 Time (min)	A (%)	B (%)	时间 Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	45	55	10.0	45	55	20.0	70	30
30.0	85	15	37.0	85	15	45.0	45	55

表 2 程序可变波长扫描条件

Table 2 Condition of timed wavelength

时间 Time (min)	波长 (nm) Wavelength						
0.00	280	3.00	280	3.01	230	7.65	230
7.66	254	8.50	254	8.51	230	12.00	230
12.01	280	37.00	280				

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

3.1.1 缓冲溶液 pH 的选择 在 24 种防腐剂中,受 pH 影响的只有苯甲酸、山梨酸和水杨酸。因此,着重考察了不同 pH 值 (2.5 ~ 5.5) 对以上 3 种酸分离情况的影响。发现在 pH 4.26 时,苯甲酸、山梨酸和水杨酸能与溴硝丙醇、苯甲醇、苯氧基乙醇和对羟基苯甲酸甲酯达到很好的分离,峰形良好。

3.1.2 NaH₂PO₄ 浓度的选择 在考察了 0.01、0.025 和 0.05 mol/L NaH₂PO₄ 溶液对分离的影响后,发现 0.025 mol/L NaH₂PO₄ 可达到较好的分离,且峰形良好。

3.2 检测波长的选择

通过全波长扫描可得到 24 种物质各自的吸收图谱。综合各物质在不同波长下的响应值和不同波长对基线的影响,最终确定采用程序可变波长进行扫描 (见表 2),即根据不同组分的出峰顺序,在不同时间段,分别用各组分的最佳吸收波长进行检测,从而提高检测的灵敏度,达到最佳的扫描效果。

3.3 样品提取方法的选择

3.3.1 样品提取溶剂的选择 在相同的色谱条件下,比较了甲醇、乙醇、四氢呋喃和流动相等 4 种溶剂对不同种类化妆品 (膏霜类、水类、固体类) 的提取效果。结果表明,乙醇和四氢呋喃提取后的色谱图在 2.0 ~ 4.5 min 的色谱峰的峰形欠佳,无法准确计算溴硝丙醇和水杨酸的含量,而流动相提取口红时,不能将口红完全溶解,且在 28.26 min 时基线干扰较大,影响被测物质含量的测定。从提取结果可看出,乙醇、四氢呋喃和流动相对某些物质的提取率偏低,而甲醇对各物质的提取率都较高,提取效果最佳,因此选择甲醇作为样品超声提取的溶剂。

3.3.2 超声波提取时间的选择 研究了 10 ~ 60 min 不同时间段内,超声波的提取率。发现 30 min 以上对提取率没有明显增大,且随着超声时间的延长,会使超声波仪器内的水温上升,导致某些易挥发的成分挥发,反而降低了提取率。所以,综合考虑,选择 30 min 为超声提取时间。图 1 是 24 种防腐剂在确定的色谱条件下的液相色谱图。

3.4 线性关系、检出限、回收率和精密度

在确定的最佳分离色谱条件下,配制一系列不同浓度的混合标准溶液进行色谱测定,以各组分的峰面积 (Y) 对浓度 X (mg/L) 绘制标准曲线。当信噪比 (S/N) 为 3 时,测得各防腐剂组分的检出限。各组分的线性方程、相关系数和检出限见表 3。

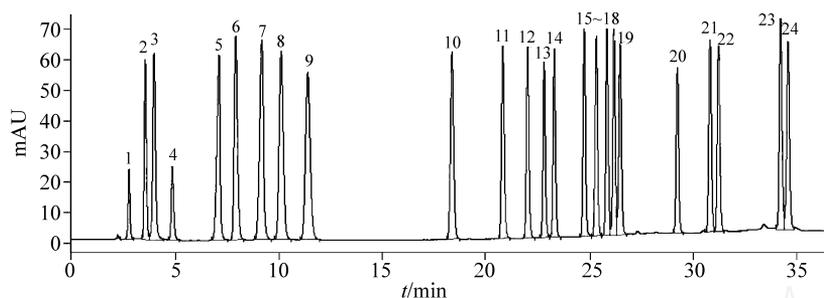


图 1 24种防腐剂混合标准溶液的液相色谱图

Fig 1 Chromatogram of standard solution of 24 preservatives

1. 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 (2-methyl-4-isothiazoline-3-ketone); 2. 溴硝丙醇 (bromopol); 3. 水杨酸 (salicy acid); 4. 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 (5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-ketone); 5. 苯甲酸 (benzoic acid); 6. 苯甲醇 (benzyl alcohol); 7. 山梨酸 (sorbic acid); 8. 苯氧基乙醇 (2-phenoxyethanol); 9. 对羟基苯甲酸甲酯 (methyl-*p*-hydroxy benzoate); 10. 对羟基苯甲酸乙酯 (ethyl-*p*-hydroxy benzoate); 11. 苯甲酸甲酯 (methyl benzoate); 12. 对羟基苯甲酸异丙酯 (4-hydroxybenzoic acid isopropyl ester); 13. 对羟基苯甲酸丙酯 (propyl-*p*-hydroxy benzoate); 14. 4-氯-3-甲苯酚 (4-chloro-3-methylphenol); 15. 苯甲酸乙酯 (ethyl benzoate); 16. 2-苯酚 (2-phenylphenol); 17. 对羟基苯甲酸异丁酯 (4-hydroxybenzoic acid iso-butyl ester); 18. 对羟基苯甲酸丁酯 (butyl-*p*-hydroxy benzoate); 19. 4-氯-3,5-二甲酚 (4-chloro-3,5-dimethylphenol); 20. 苯甲酸苯酯 (phenyl benzoate); 21. 2,4-二氯-3,5-二甲酚 (2,4-dichloro-3,5-dimethylphenol); 22. 2-苯基-4-氯酚 (2-benzyl-4-chlorophenol); 23. 三氯卡班 (triclocarban); 24. 三氯生 (triclosan)。

称取 3 种经测定含防腐剂较少,且基线干扰较小的化妆品 0.2 g (精确到 0.001 g),分别添加高、中、低 3 个浓度水平的混合标准溶液,每种样品重复 6 次,按上述实验条件进行样品处理和测定,计算回收率和精密度,结果见表 3。

表 3 线性方程、检出限、精密度与平均回收率

Table 3 Regression equation, detection limit, RSD and mean recovery

防腐剂 Preservative	线性方程 Regression equation	线性系数 (<i>r</i>) Correlation coefficient	检出限 Detection limit (mg/L)	平均回收率 Mean recovery (%)	RSD (%, <i>n</i> = 6)
2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 2-Methyl-4-isothiazoline-3-ketone	$Y = 46.927X + 5.199$	0.9999	0.05	92.9	2.7
溴硝丙醇 Bromopol	$Y = 3.214X + 0.343$	0.9999	1.5	93.0	2.4
水杨酸 Salicy acid	$Y = 27.604X - 2.561$	0.9999	0.25	90.6	3.3
5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-ketone	$Y = 15.955X + 10.418$	0.9997	0.20	93.9	2.5
苯甲酸 Benzoic acid	$Y = 40.868X + 4.988$	0.9999	0.20	97.3	2.7
苯甲醇 Benzyl alcohol	$Y = 0.765X + 0.870$	0.9999	4.6	92.7	1.8
山梨酸 Sorbic acid	$Y = 41.411X + 0.147$	0.9998	0.25	94.7	2.7
苯氧基乙醇 2-Phenoxyethanol	$Y = 6.550X + 0.998$	0.9998	1.6	94.1	2.2
对羟基苯甲酸甲酯 Methyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	$Y = 10.702X + 0.808$	0.9998	1.0	93.3	2.9
对羟基苯甲酸乙酯 Ethyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	$Y = 15.689X + 0.681$	0.9999	0.50	91.0	1.3
苯甲酸甲酯 Methyl benzoate	$Y = 3.218X + 0.399$	0.9999	2.2	91.1	1.5
对羟基苯甲酸异丙酯 4-Hydroxybenzoic acid isopropyl ester	$Y = 14.431X - 0.054$	0.9999	0.44	92.1	2.1
对羟基苯甲酸丙酯 Propyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	$Y = 14.965X + 1.275$	0.9998	0.15	90.5	2.2
4-氯-3-甲苯酚 4-Chloro-3-methylphenol	$Y = 6.188X + 0.977$	0.9998	1.00	91.8	1.5
苯甲酸乙酯 Ethyl benzoate	$Y = 2.907X - 1.280$	0.9999	2.4	92.4	1.9
2-苯酚 2-Phenylphenol	$Y = 12.746X + 1.805$	0.9999	0.10	95.8	3.2
对羟基苯甲酸异丁酯 4-Hydroxybenzoic acid iso-butyl ester	$Y = 13.761X - 1.044$	0.9999	0.50	92.3	2.6
对羟基苯甲酸丁酯 Butyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	$Y = 14.250X - 0.443$	0.9999	0.50	92.6	2.9
4-氯-3,5-二甲酚 4-Chloro-3,5-dimethylphenol	$Y = 5.317X + 1.761$	0.9999	1.2	90.8	2.3
苯甲酸苯酯 Phenyl benzoate	$Y = 3.661X + 2.148$	0.9999	1.5	91.3	1.6

续表 3 (continued to Table 3)

防腐剂 Preservative	线性方程 Regression equation	线性系数 (r) Correlation coefficient	检出限 Detection limit (mg/L)	平均回收率 Mean recovery (%)	RSD (%, $n=6$)
2,4-二氯-3,5-二甲酚 2,4-Dichloro-3,5-dimethylphenol	$Y=4.420X-1.299$	0.9999	1.6	91.1	1.8
2-苄基-4-氯酚 2-Benzyl-4-chlorophenol	$Y=5.506X-5.565$	0.9998	1.2	92.7	1.9
三氯卡班 Triclocarban	$Y=31.233X+9.040$	0.9998	0.10	93.4	2.0
三氯生 Triclosan	$Y=9.266X+6.213$	0.9998	0.76	97.8	2.2

3.5 实际样品分析

用所建立的检测方法,对膏霜类、水类和固体类等 9 个实际化妆品样品进行测定,以标准样品色谱图中各防腐剂的保留时间对化妆品中的防腐剂进行定性,以样品中各防腐剂色谱峰的峰面积与标准曲线相对应进行定量分析。表 4 仅列出了 9 个化妆品中检测出的 9 种防腐剂的检测结果(其余 15 种防腐剂均未检出)。样品 2 的液相色谱图如图 2。从结果可以发现,大多数化妆品中都含有对羟基苯甲酸酯类和苯氧基乙醇,其它种类的防腐剂较少。其中以对羟基苯甲酸甲酯最常见,含量也较高。

表 4 化妆品中防腐剂的测定结果 (mg/g, $n=2$)Table 4 Contents of preservatives in cosmetics (mg/g, $n=2$)

防腐剂 Preservatives	1	2	3	4	5	6	7	8	9
水杨酸 Salicylic acid	ND	ND	4.14	ND	ND	1.90	ND	ND	ND
山梨酸 Sorbic acid	ND	0.47	ND						
苯氧基乙醇 2-Phenoxyethanol	ND	3.94	ND	ND	ND	ND	1.75	1.71	7.01
对羟基苯甲酸甲酯 Methyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	1.35	2.30	ND	0.86	2.19	2.62	0.42	ND	1.56
对羟基苯甲酸异丙酯 4-Hydroxybenzoic acid iso-propyl ester	ND	0.34	ND						
对羟基苯甲酸丙酯 Propyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	ND	ND	ND	0.21	ND	0.03	0.05	ND	0.18
对羟基苯甲酸异丁酯 4-Hydroxybenzoic acid iso-butyl ester	ND	0.25	ND	ND	ND	0.32	ND	ND	0.18
对羟基苯甲酸丁酯 Butyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	ND	0.27	ND	ND	ND	0.66	0.12	ND	0.36

ND: 未检出 (not detected)。

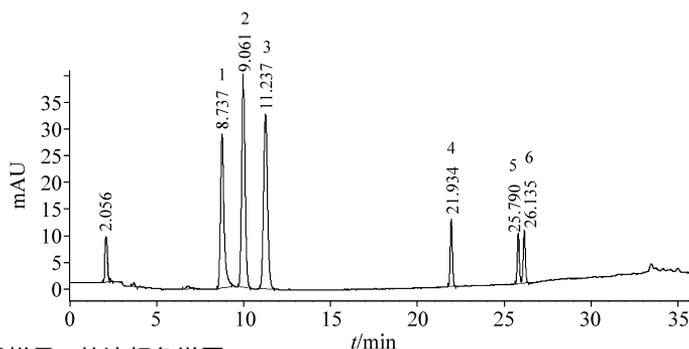


图 2 化妆品样品 2 的液相色谱图

Fig 2 Chromatogram of cosmetic sample solution 2#

1. 山梨酸 (sorbic acid); 2. 苯氧基乙醇 (2-phenoxyethanol); 3. 对羟基苯甲酸甲酯 (methyl-*p*-hydroxy benzoate); 4. 对羟基苯甲酸异丙酯 (4-hydroxybenzoic acid iso-propyl ester); 5. 对羟基苯甲酸异丁酯 (4-hydroxybenzoic acid iso-butyl ester); 6. 对羟基苯甲酸丁酯 (butyl-*p*-hydroxy benzoate)。

综上所述,采用超声波提取,高效液相色谱分析,程序可变波长检测,同时测定化妆品中 24 种常用防腐剂含量的方法,操作简便,结果可靠。用于化妆品质量控制,及进出口化妆品检验具有重要意义。

References

- 1 *Hygienic Standard for Cosmetics* (化妆品卫生规范). Beijing (北京): Ministry of Health of the People's Republic of China (中华人民共和国卫生部), 2002: 56~60
- 2 Liu Chao (刘超). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2004, 22(6): 659

- 3 Borremans M, van Loco J, Roos P, Goeyens L. *Chromatographia*, **2004**, 59(1/2): 47 ~ 53
- 4 Rastogi S C, Zachariae C, Johansen J D, Devantier C, Menn é T. *J. Chromatogr A*, **2004**, 1031: 315 ~ 317
- 5 Liu Gang (刘 刚), Zhao Gang (赵 刚), Wang Xiao-Fang (王小芳). *Chinese Journal of Chromatography (色谱)*, **2002**, 20(3): 274 ~ 276
- 6 Li Ying (李 英), Liu Li (刘 丽), Liu Zhi-Hong (刘志红). *Chinese Journal of Chromatography (色谱)*, **2003**, 21(2): 170 ~ 173
- 7 Wang Ping (王 萍), Ding Xiao-Jing (丁晓静). *Chinese Journal of Chromatography (色谱)*, **2005**, 23(3): 315
- 8 Öztekin N, Erim F B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 37: 1121 ~ 1124
- 9 Wang L H, Tsai S J. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 441: 107 ~ 116

Determination of 24 Preservatives in Cosmetics by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Wu Ting*, Wang Chao, Wang Xing, Ma Qiang, Zhang Fan, Liu Liu
(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025)

Abstract A reversed phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method has been developed for the simultaneous determination of twenty-four preservatives in cosmetics. A Kromasil C₁₈ column was used with phosphate buffer solution (pH = 4.26) as the mobile phase under the condition of gradient elution. Preservatives were extracted with methanol by ultrasonic, then analyzed by RP-HPLC-diode array detection. The pre-treatment method of sample and the chromatographic condition of analysis were critically examined. The relative standard deviations (RSD) were 1.3% - 3.3%, recoveries were 90.6% - 97.8%, all the correlation coefficients (r) were no less than 0.9997. The method was precise and accurate, and could be used for analyzing the preservatives in cosmetic products.

Keywords Reversed phase high performance liquid chromatography, cosmetics, preservative

(Received 25 December 2006; accepted 17 May 2007)

中国化学会第 26 届学术年会 (第一轮通知)

中国化学会第 26 届学术年会定于 2008 年 7 月 13 ~ 16 日在天津举行。会议由中国化学会主办,南开大学承办,天津师范大学、天津理工大学协办。

大会主题:化学与和谐社会

会议内容包括:大会特邀报告、分会邀请报告、专题报告与讨论、论文墙报展讲,同时设置专题学术论坛。会议期间还将组织展览展示。欢迎广大科技工作者积极参加,踊跃投稿。热烈欢迎相关企业、高校、科研院所利用此次契机,扩大影响,参与会展。

分析化学分会的征文范围

本次学术年设置绿色化学、环境化学、化学生物学等 20 个学术分会;专题论坛 1 个及新技术新仪器专场展示。其中分析化学为第 9 分会。征文范围:(1) 原子光谱分析方法;(2) 分子光谱分析方法;(3) 色谱法与分离技术;(4) 电分析化学与传感器;(5) 环境分析化学;(6) 生物分析化学;(7) 波谱法;(8) 质谱分析;(9) 分析仪器与联用技术。

征文联系及收集人:张 毅

单 位:南开大学化学系

地 址:天津市卫津路 94 号

邮政编码:300071

电 话:022 - 23506075

电子信箱:nkgcms@gmail.com