

超声辅助萃取-高效液相色谱法同时检测化妆品中10种防腐剂

李艺璇, 罗敏, 邓媛媛, 李楠, 朱军, 张晓玲*

南京医科大学公共卫生学院卫生检验学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:建立超声辅助萃取-高效液相色谱同时测定化妆品中10种常见防腐剂的方法。方法:用甲醇超声提取化妆品中的防腐剂,高效液相色谱仪分析测定。结果:10种防腐剂在32 min内彼此完全分离,在2.5~600.0 mg/L范围内,峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,绝大多数相关系数 $r > 0.998$ 。高、中、低不同水平的加标回收率为71.89%~113.38%,相对标准偏差为0.38%~4.54%。结论:该方法能够经济、灵敏、简便、快速、重复性地测定化妆品中的防腐剂,可用于化妆品中多种防腐剂的同时测定。

[关键词] 高效液相色谱;紫外-可见光检测器;化妆品;防腐剂

[中图分类号] R194.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0049-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180111

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,同时防止二次污染的一类添加剂。防腐剂广泛用于各类化妆品,是化妆品中必不可少的添加成分。由于防腐剂种类繁多且具有一定毒性,大多数防腐剂对人的皮肤会产生不同程度的刺激^[1],因此我国《化妆品卫生规范》^[2]视其为限用物质,并对其中55种防腐剂作出限量使用的规定。目前,防腐剂测定的方法主要有气相色谱法^[3]、薄层色谱法、高效液相色谱法^[4-6]、滴定法和伏安法^[7]等,但这些方法同时检测的防腐剂种类有限,所以快速、高效、灵敏的检测方法依然是广大学者致力于研究的方向。同时,由于化妆品样品成分复杂,通常需要进行前处理后才可进行各种仪器分析。目前国内使用较多的化妆品样品前处理方法主要有稀释、过滤、沉淀、透析、超滤、液-液萃取、固相萃取、超临界流体萃取等^[8],但分离效果有待提高,故样品前处理技术也成为化妆品中防腐剂检测的重要课题。为了完善和补充原有的防腐剂测定方法,本研究采用超声辅助萃取法进行样品前处理,并进一步优化了国标及相关文献^[9-12]中样品前处理的具体条件,采用高效液相色谱(HPLC)对常用的10种防腐剂(苯甲酸、苯甲醇、山梨酸、苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸正丁酯、对羟基苯甲酸异

丁酯、三氯生)进行分析检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

SHIMADZU 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司),配 SPD-10Avp 紫外-可见检测器;十万分之一分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TDZ5-WS 离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);ELGA PURELAB Ultra 纯水机(上海威立雅水处理技术有限公司);GM-0.33B 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司),配 0.45 μm 水相滤膜。

1.1.2 试剂

10种标准物质:对羟基苯甲酸甲酯(纯度99.9%)、对羟基苯甲酸乙酯(纯度99.9%)、对羟基苯甲酸丙酯(纯度99.5%)、对羟基苯甲酸正丁酯(纯度99.5%)、对羟基苯甲酸异丁酯(纯度99.7%)、苯甲酸(纯度99.5%)、苯甲醇(纯度99.5%)、山梨酸(纯度99.4%)、苯氧基乙醇(纯度99.5%)、三氯生(纯度99.0%)均购于德国 Dr.Ehren-storfer 公司。甲醇、乙腈均为色谱纯试剂(纯度99.8%)。磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钾、磷酸均为分析纯试剂(纯度99.0%)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:美国 Agilent 5HC-C18 反相柱(150 mm \times

[基金项目] 江苏省大学生创新创业训练计划(201510312004Z);江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者(Corresponding author),E-mail: zhangxl3@njmu.edu.cn

4.6 mm, 5 μ m); 流动相:A:乙腈;B:0.01 mol/L磷酸二氢钾水溶液,pH4.9。流动相梯度洗脱条件见表1。流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。以保留时间定性,峰面积定量。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0	1.0	30	70
10	1.0	40	60
20	1.0	40	60
30	1.0	90	10
37	1.0	30	70

1.2.2 标准溶液配制

取苯甲酸、苯甲醇、山梨酸、苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸正丁酯、对羟基苯甲酸异丁酯、三氯生标准品约0.01 g,精密称定,分别置于10 mL容量瓶中,甲醇定容,混匀,制成质量浓度均为1 000 mg/L的标准储备液。准确量取三氯生标准储备液0.5 mL,其他各标准储备液1.0 mL,置于10 mL容量瓶中,以甲醇定容至刻度,配成10种标准品的混合储备液。以浓度为横坐标(X),对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。

1.2.3 样品预处理

取样品约250 mg,精密称定,置于25 mL具塞比色管中,必要时,水浴去除乙醇等挥发性有机溶剂^[1-2]。加甲醇至10 mL,充分振摇,超声提取20 min,离心15 min。上清液经0.45 μ m滤膜过滤,滤液作为待测样液。

1.2.4 回收率与精密度试验

取9份空白样品,每份约250 mg,精密称定,分别加入高中低3个浓度的10种防腐剂混合标准溶液作为加标样,每个浓度平行做3份,按样品处理方法进行提取、分析,计算平均加标回收率和精密度(相对标准偏差)。

2 结果

2.1 实验条件的优化

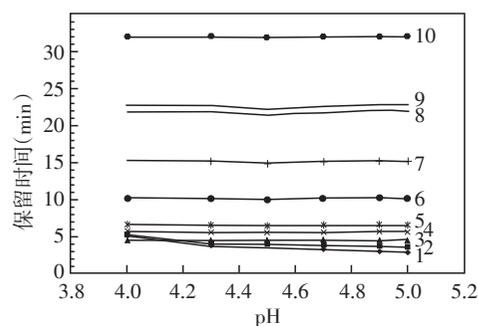
2.1.1 流动相组成

流动相的选择主要是缓冲盐体系和有机相。通过实验比较甲醇和乙腈两种有机相作流动相时对10种防腐剂出峰的影响,结果显示甲醇不能将10种防腐剂完全分离,而乙腈洗脱能力比甲醇强,很少与样品发生反应,用作流动相时柱压要比甲醇低很

多,且截止波长比甲醇低,用乙腈做流动相能将10种防腐剂完全分离且峰形良好。磷酸盐的加入使各种防腐剂的分离度更好。考虑上述因素,选择乙腈和磷酸盐作为缓冲液。

2.1.2 不同pH值对分离的影响

最初实验结果显示,在中性或弱碱性条件下,以乙腈-磷酸缓冲盐为流动相,苯甲酸和山梨酸的色谱峰有较严重的前延,且有部分重叠。苯甲酸(pKa=4.19)和山梨酸(pKa=4.76)在此条件下均以阴离子的形式存在^[13],与固定相之间的相互作用比较弱。随着pH的减小,二者以中性分子形式存在的比例逐渐增大,在色谱柱上的保留也逐渐增强^[14]。因此,考虑采用酸性流动相,本实验考察了流动相pH值在4.00~5.00范围内(用磷酸和氢氧化钾调节pH值)10种防腐剂在色谱柱上的保留行为(图1)。由图可知,苯甲醇、苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸正丁酯、对羟基苯甲酸异丁酯、三氯生的保留几乎不受pH值变化的影响,这主要是因为以上分析物在此pH范围内,存在形式保持不变。综上所述,最终选择流动相的pH为4.90,此时10种防腐剂的分离效果最好。



1:苯甲酸;2:山梨酸;3:苯甲醇;4:苯氧乙醇;5:对羟基苯甲酸甲酯;6:对羟基苯甲酸乙酯;7:对羟基苯甲酸丙酯;8:对羟基苯甲酸正丁酯;9:对羟基苯甲酸异丁酯;10:三氯生。

图1 流动相中缓冲溶液的pH值对分析物保留时间的影响

2.1.3 不同的梯度条件

由于10种化妆品防腐剂在色谱柱上的保留行为相差较大,多次实验后发现无法通过等度洗脱实现快速有效分离,因此选择梯度洗脱。在选定乙腈和0.01 mol/L的磷酸二氢钾缓冲盐为流动相的条件下,考察了多种梯度洗脱程序下10种化妆品防腐剂的分离情况,不同梯度洗脱条件下10种化妆品防腐剂的分离色谱图见图2。实验结果表明:在程序(a)条件下进行分析,苯甲酸和山梨酸的分离度并不理

想,且在该条件下随着样品浓度的不断增大,苯甲酸和山梨酸色谱峰的重叠程度越来越大,分离度越来越差。为了使苯甲酸和山梨酸的分离度增大,设计了程序(b)。在程序(b)下进行分析,虽然苯甲酸和山梨酸的分离度得到很大改善,但由于出峰时间较晚,总的分析时间较长,不能满足快速、高效分析

的要求。因此进一步优化洗脱条件,设计了程序(c)。在程序(c)下进行分析,分析时间大大缩短,但丁酯和异丁酯的分离度有所下降。为了达到所有物质更好的分离分析效果和较短的分析时间,设计了程序(d)。最后分析时间为37 min,本文最终以程序(d)为实验所采用的梯度洗脱程序^[14]。

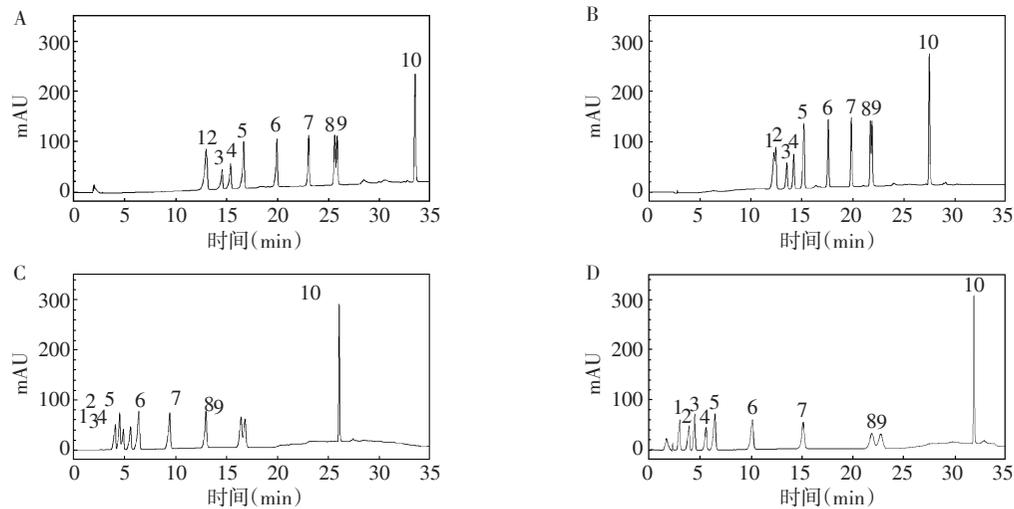


图2 10种化妆品防腐剂在不同流动相梯度洗脱程序(a~d)条件下色谱图($\lambda=210\text{ nm}$)

A: 程序 a, 0~40 min, 5% A~95%A; 40~45 min, 95%A~5%A; B: 程序 b, 0~4 min, 5% A~15%A; 4~30 min, 15%A~95%A; 30~33 min, 95%A; 33~40 min, 95%A~5%A; C: 程序 c, 0~10 min, 30% A~47%A; 10~15 min, 47%A; 15~25 min, 47%A~90%A; 25~30 min, 90%A~30%A; D: 程序 d, 0~10 min, 30% A~40%A; 10~20 min, 40%A; 20~30 min, 40%A~90%A; 30~37 min, 90%A~30%A^[15]。1: 苯甲酸; 2: 山梨酸; 3: 苯甲醇; 4: 苯氧乙醇; 5: 对羟基苯甲酸甲酯; 6: 对羟基苯甲酸乙酯; 7: 对羟基苯甲酸丙酯; 8: 对羟基苯甲酸正丁酯; 9: 对羟基苯甲酸异丁酯; 10: 三氯生。

2.1.4 检测波长的选择

由于以上10种化妆品防腐剂均具有紫外吸收,因此考虑采用紫外-可见光检测器进行检测。在一定实验条件下,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸正丁酯、对羟基苯甲酸异丁酯、苯甲酸、苯甲醇、山梨酸、苯氧乙醇、三氯生的最大吸收波长分别为256.8、258.0、258.8、258.0、256.0、226.0、200.0、258.0、270.0、282.0 nm^[16-18]。在尝试254 nm的波长下进行检测后,发现苯甲醇、苯甲酸反应的灵敏度较低,因此依次尝试在200.0、210.0、230.0、258.0 nm的波长下进行检测,多次重复实验后发现在210.0 nm的波长下,响应与分离度为最佳。因此,本文最终以210.0 nm作为实验所采用的紫外吸收波长。

2.1.5 样品提取方法的选择

2.1.5.1 超声波提取时间的选择

在离心转速3 000 r/min,离心时间15 min的条件下,超声时间10~30 min对样品中防腐剂提取率的影响见表2。实验发现:超声时间为20 min时,能得到最好的提取率;当超声时间少于20 min时,样品

中的防腐剂未能充分提取;当超声时间多于20 min时,提取率反而有所下降,有可能是长时间超声使仪器内水温上升,导致某些易挥发性待测组分损失。因此,综合考虑,选择20 min为样品的超声波提取时间。

2.1.5.2 样品离心提取时间的选择

研究了在离心转速3 000 r/min,超声提取20 min的条件下,10~20 min不同时间段内样品离心时间对待测组分提取率的影响。不同离心时间下化妆品中防腐剂含量的测定结果见表2。实验发现:样品离心提取时间为15 min时,能得到最好的提取率;当离心时间少于15 min时,样品中的防腐剂因离心时间较短未能完全提取出而导致提取率相对较低;当离心时间多于15 min时,提取率反而有所下降。因此,综合考虑后,选择15 min为样品的离心提取时间。

表2 祛痘乳样品中2种防腐剂的测定结果

样品中组分	(mg/kg)					
	超声时间(min)			离心时间(min)		
	10	20	30	10	15	20
对羟基苯甲酸甲酯	3 040	3 540	3 150	3 495	3 540	3 485
三氯生	890	1 010	900	870	1 010	860

2.2 方法特性

2.2.1 检出限和线性关系的考察

10种防腐剂在 2.5~600.0 mg/L 范围内,峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,大多相关系数 $r >$

0.998。在最佳的色谱分离条件下,配制5个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,用 Origin Pro 软件对所得数据进行分析(表3)。

表3 10种防腐剂的线性范围、线性方程、回归系数和检出限

防腐剂	线性范围 (mg/L)	线性方程	回归系数 (r)	检出限 (mg/L)
苯甲酸	5.0~60.0	$y=7 \times 10^7 x + 182\ 027$	0.963 4	0.550 4
山梨酸	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 510\ 592$	0.994 9	0.209 6
苯甲醇	5.0~60.0	$y=5 \times 10^7 x - 2\ 487.3$	0.985 7	0.364 7
苯氧乙醇	5.0~60.0	$y=8 \times 10^7 x - 123\ 398$	0.999 0	0.068 8
对羟基苯甲酸甲酯	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 228\ 905$	0.999 3	0.111 5
对羟基苯甲酸乙酯	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 96\ 911$	0.999 3	0.106 6
对羟基苯甲酸丙酯	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 51\ 208$	0.998 6	0.577 1
对羟基苯甲酸异丁酯	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 27\ 354$	0.999 9	0.111 7
对羟基苯甲酸丁酯	5.0~60.0	$y=1 \times 10^8 x - 31\ 425$	0.999 4	0.002 6
三氯生	2.5~30.0	$y=2 \times 10^8 x + 582\ 772$	0.988 3	0.001 2

2.2.2 精密度与回收率试验

为了评价方法的准确度,采用优化后的分离和测定条件对10种防腐剂进行加标回收率实验,同时测定方法的精密度,结果见表4。

2.3 实际样品测定

用本法测定实际样品中的防腐剂,3种样品检测的色谱图见图3,结果见表5。

3 讨论

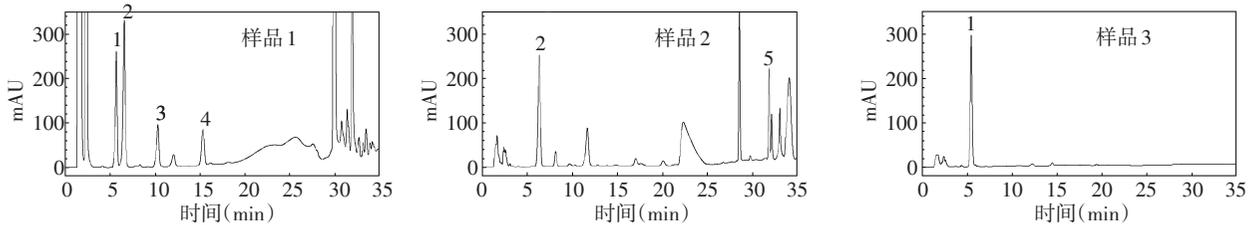
本研究建立了基于超声辅助萃取-高效液相色谱同时测定化妆品中10种常见防腐剂的分析方法。实验过程中对流动相的组成、流动相 pH 值、流动相梯度洗脱程序、紫外检测波长进行条件优化,最终确定以 pH 为 4.90 的乙腈-磷酸缓冲盐为流动相对化妆品中10种防腐剂进行梯度洗脱(0~10 min, 30% A~40% A; 10~20 min, 40% A; 20~30 min, 40% A~90% A; 30~37 min, 90% A~30% A),并在 210.0 nm 的紫外吸收波长下进行检测,此时10种防腐剂峰形良好且分离效果最好。

化妆品中的组分复杂,因此样品的前处理是非常重要的环节。由于国标和相关文献对化妆品样品前处理的具体条件并未做严格规定,因此本研究对样品前处理的离心时间、超声提取时间进行条件优化。经多次实验,最终选择超声提取 20 min, 3 000 r/min 离心提取 15 min,得到样品的最佳提取率。

在实验条件的优化过程中,发现山梨酸在弱碱性条件下总是会出2个峰,而在酸性条件下会正常出现1个峰,通过文献查阅暂时无法得到明确的解

表4 10种防腐剂的加标回收率和精密度

分析物质	加标 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
苯甲酸	15	71.89	0.89
	30	73.09	2.47
	45	74.02	2.53
山梨酸	15	113.38	2.22
	30	103.42	1.16
	45	103.85	1.72
苯甲醇	15	103.84	2.06
	30	87.73	1.33
	45	91.90	4.54
苯氧乙醇	15	75.81	2.97
	30	89.29	2.35
	45	86.36	0.38
对羟基苯甲酸甲酯	15	86.19	3.57
	30	91.48	3.11
	45	98.08	0.81
对羟基苯甲酸乙酯	15	102.68	1.65
	30	97.08	2.14
	45	109.28	1.84
对羟基苯甲酸丙酯	15	101.98	2.62
	30	101.29	2.33
	45	102.54	1.01
对羟基苯甲酸异丁酯	15	110.18	1.19
	30	89.29	1.10
	45	97.50	2.25
对羟基苯甲酸丁酯	15	84.83	3.69
	30	85.73	1.94
	45	97.08	1.85
三氯生	15	76.33	2.51
	30	108.85	2.71
	45	74.68	1.20



A: 样品1; B: 样品2; C: 样品3。1: 苯氧乙醇; 2: 对羟基苯甲酸甲酯; 3: 对羟基苯甲酸乙酯; 4: 对羟基苯甲酸丙酯; 5: 三氯生。

图3 化妆品样品的液相色谱图

表5 化妆品样品中10种防腐剂的含量测定

样品中的组分	(mg/kg)		
	样品1 (隔离)	样品2 (祛痘乳)	样品3 (护发素)
苯甲酸	ND	ND	ND
山梨酸	ND	ND	ND
苯甲醇	ND	ND	ND
苯氧乙醇	1 583.00	ND	2 240.71
对羟基苯甲酸甲酯	1 924.50	1 170.99	ND
对羟基苯甲酸乙酯	680.80	ND	ND
对羟基苯甲酸丙酯	550.21	ND	ND
对羟基苯甲酸异丁酯	ND	ND	ND
对羟基苯甲酸丁酯	ND	ND	ND
三氯生	ND	364.00	ND

ND: 未检测到。

释, 留待进一步研究。

本研究方法能够经济、灵敏、简便、快速地测定化妆品中10种常见防腐剂, 有利于化妆品中多种防腐剂的同时测定。同时, 由于本方法对仪器并无较高要求, 其对化妆品检验课程的本科教学有一定指导意义。

[参考文献]

[1] 武婷, 王超, 王星, 等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中的24种防腐剂[J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1439-1443

[2] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 2007

[3] 林建, 薛晓康, 丁卯. 静态顶空结合气相色谱-质谱联用法测定3种不同性状化妆品中的甲醛[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(23): 4013-4015

[4] 朱会卷, 张卫强, 杨艳伟, 等. 高效液相色谱分析化妆品中的防腐剂氯苯甘醚[J]. 色谱, 2014, 32(1): 95-99

[5] 符策奕, 梁颖, 许文佳, 等. 液相色谱串联质谱法同时测定6类不同剂型化妆品中10种防腐剂[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1456-1464

[6] Jeon JS, Kim HT, Kim MG, et al. Simultaneous determination of water-soluble whitening ingredients and adenosine

in different cosmetic formulations by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection[J]. Int J Cosmet Sci, 2016, 38(3): 286-293

[7] 王萍, 柳玉红. 我国化妆品用防腐剂及分析方法研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(7): 557-559

[8] Fang H, Gao Y, Li G, et al. Advanced oxidation kinetics and mechanism of preservative propylparaben degradation in aqueous suspension of TiO₂ and risk assessment of its degradation products[J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(6): 2704-2712

[9] 张晓玲, 王炳玲, 陆晓梅, 等. 超声辅助萃取-气相色谱-负化学电离源质谱法测定室内灰尘样品中8种常见多溴联苯醚[J]. 色谱, 2012, 30(12): 1241-1245

[10] 刘湘军, 赵妍, 赵珊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定日化产品中的三氯生和三氯卡班[J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 64-68

[11] 司晓喜, 朱瑞芝, 刘志华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定纸质包装材料中多类防腐剂[J]. 分析测试实验室, 2015, 34(8): 984-987

[12] 李晓晶, 陈旻实, 戴金兰, 等. 固相萃取高效液相色谱-质谱法同时检测啤酒中5种痕量防腐剂[J]. 分析测试学报, 2013, 32(8): 973-977

[13] 李秀琴, 张庆合, 杨总. 高效液相色谱法同时测定肉制品中的6种食品添加剂[J]. 色谱, 2010, 28(12): 1204-1208

[14] 马康, 蒋孝雄, 赵敏, 等. 高效液相色谱法同时测定软饮料中20种食品添加剂[J]. 分析化学, 2012, 40(11): 1661-1667

[15] 凌云, 储晓刚, 张峰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定调味料中的17种防腐剂和抗氧化剂[J]. 色谱, 2011, 29(8): 723-730

[16] 叶旭炎, 楼莉, 潘小红, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中的4种防腐剂[J]. 日用化学品科学, 2015, 38(9): 22-24

[17] 刘昕, 贡辉. 高效液相色谱法同时测定化妆品中的4种可成盐防腐剂[J]. 日用化学品科学, 2015, 38(11): 27-30

[18] 张志成, 张耀元. HPLC法同时测定化妆品中的12种防腐剂[J]. 香料香精化妆品, 2014(2): 44-50

[收稿日期] 2016-10-31