[13]尹兴晓. A组人轮状病毒VP6蛋白表达及其免疫学分析[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
[14]HAGBOM M, D E FARIA F M, WINBERG M E, et al. Neurotrophic factors protect the intestinal barrier from Rotavirus insult in mice[J]. mBio, 2020, 11（1）: e02834-19.
[15]ZHANG D K, HE F Q, LI T K, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis[J]. J Pathol, 2010, 222（2）: 213-222.
[16]盛华西. 酪酸梭菌活菌散联合干扰素治疗轮状病毒感染性腹泻的效果及对患儿乳酸、炎症因子水平的影响[J]. 中国当代医药, 2022, 29（26）: 127-129, 141.
[17]李玉兰, 张栖, 邓文辉. 复合乳酸菌联合蒙脱石散治疗小儿轮状病毒感染性腹泻的疗效及对血清炎性因子的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14（19）:147-149.
[18]布月青, 董胜英. 轮状病毒肠炎IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α的变化及意义[J]. 实用预防医学, 2006, 13（4）: 859-861.
[19]LI Y, LI Y, ZHANG Q, et al. The role of enteric glial cells in intestinal neuroimmunomodulation[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2022, 38（1）: 84-88.

（责任编辑：李 晓）

高效液相色谱法同时测定化妆品中的多种防腐剂

方田田，陈玉婷，唐焕文* （广东医科大学公共卫生学院，广东东莞 523808）

摘 要：目的 建立高效液相色谱法同时测定化妆品中氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸等5种防腐剂含量方法。**方法** 美白类化妆品样品经甲醇溶剂超声辅助提取，C18色谱柱分离，以5 mmol/L乙酸铵-1‰甲酸/甲醇溶液（30/70，v/v）为流动相等度洗脱，流速为1 mL/min，柱温35 ℃，进样量为10 μL。**结果** 氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸等5种防腐剂在各自线性范围内线性关系良好（r>0.992），平均加样回收率为97.82%~111.11%，相对标准偏差为0.23 %~1.64 %。采用该方法对采购的美白类化妆品样品24批次进行检测，该法能有效检出化妆品中苯酚、儿茶酚、苯甲酸和山梨酸，氢醌均未检出。**结论** 该方法操作简单，灵敏度高，重现性好，可用于美白化妆品中氢醌等5种防腐剂的同时检测。

关键词： 高效液相色谱法；化妆品；防腐剂
中图分类号： R 115 **文献标志码：** A **文章编号：** 2096-3610（2024）04-0364-04

Simultaneous determination of several preservatives in cosmetics using high performance liquid chromatography

FANG Tian-tian, CHEN Yu-ting, TANG Huan-wen* (School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay for simultaneous detection of 5 preservatives including hydroquinone, phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid in cosmetics. Methods The whitening cosmetics were extracted ultrasonically with methanol solvent, separated on C18 chromatographic column, and eluted with 5 mmol/L ammonium acetate-1‰ formic acid/methanol solution (30/70) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 35 ℃, and injection volume was 10 μL. Results There were good linear relationships among hydroquinone, phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid (r>0.992). The average recovery rates were 97.82%-111.11%, and relative standard deviations were 0.23%-1.64%. Twenty-four batches of whitening cosmetics were detected by this method. Phenol, catechol, benzoic acid, and sorbic acid were effectively determined, but hydroquinone was not. Conclusion This method is simple, sensitive, and reproducible, and can be used for simultaneous detection of 5 preservatives such as hydroquinone in whitening cosmetics.

Key words: HPLC; cosmetics; preservatives

收稿日期： 2024-03-12
基金项目： 国家自然科学基金（82073582），广东省普通高校特色创新项目（2020KTSCX048），广东医科大学学科建设项目（4SG23003G）
作者简介： 方田田，女，硕士，实验师，E-mail: fangtiantian@gdmu.edu.cn
通信作者： 唐焕文，男，博士，教授，E-mail: thw@gdmu.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net

随着人们生活水平及审美标准的提高，美白化妆品的开发日趋活跃，其质量问题也受到越来越多的关注。氢醌、苯酚和儿茶酚（邻苯二酚）等苯系物具有美白、防腐的作用，长期接触会对人体产生致癌作用，会损伤细胞并腐蚀黏膜和中枢神经系统，诱发白血病和心脏病[1-3]。苯甲酸和山梨酸具有杀菌防腐作用，被广泛用于化妆品中，但是它们也具有一定程度的刺激性和毒性，长期接触会对身体造成一定的危害[4-6]。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）规定氢醌、苯酚和儿茶酚均为化妆品的禁用物质，苯甲酸和山梨酸最大使用量分别不超过 0.5% 和 0.6%[7-8]。

目前，针对化妆品中氢醌、苯酚、苯甲酸及山梨酸的检测常见方法主要有高效液相色谱法[9-10]和气相色谱质谱法[11]，化妆品中常见的防腐剂检测主要有对羟基苯甲酸酯类[12]、季铵盐类[13]、氯代酚类[14]等化合物，未见有化妆品中儿茶酚的检测及同时检测儿茶酚、氢醌、苯酚、苯甲酸及山梨酸等 5 种防腐剂的研究。本文通过优化样品前处理方法，建立高效液相色谱法同时测定美白类化妆品中儿茶酚、氢醌、苯酚、苯甲酸及山梨酸等 5 种防腐剂，该方法操作简单、准确、高效，对于美白类化妆品安全监管具有重要意义。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

高效液相色谱仪（LC-20A 型，日本岛津公司）；精密分析天平（AUW120D 型，日本岛津公司）；超声波清洗器（KQ-500DE 型，上海精密科技有限公司）；高速离心机（3-15 型，美国 SIGMA 公司）；涡旋振荡器（V0RTEX-5 型，海门其林贝尔仪器制造有限公司）。

氢醌标准品（批号 FCB083845，纯度 99.0%），fluorochem 品牌；苯酚标准品（批号：G990776，纯度 99.6%），德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司；儿茶酚标准品（批号：ZT-70154，纯度≥98.0%），zzstandard 品牌；苯甲酸钠、山梨酸钾，均为分析纯，中国计量科学研究院；甲醇、甲酸均为色谱级，美国 Fisher 公司；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。市售膏霜类、水类、乳液类等 24 个美白化妆品。

1.2　溶液的配制

1.2.1　标准品混合贮备液　精密称定氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸对照品适量，加甲醇制备成混合贮备液，吸取适量，置于 10 mL 容量瓶内，甲醇稀释至刻度，振荡摇匀，即得各成分质量浓度分别为 1.0、100.0、2.5、5.0、5.0 mg/L 的对照品混合贮备液，于 4 ℃下保存。

1.2.2　样品溶液　取各美白化妆品样品，精密称定后置于具塞锥形瓶中，加入甲醇 10 mL，涡旋分散，超声处理 10 min（功率 200 W，频率 40 kHz），用甲醇补足至刻度线，摇匀，10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤，滤液作为待测溶液。

1.3　色谱条件

色谱柱：Venusil MP C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 5 μmol/L 乙酸铵 –1‰ 甲酸溶液，流动相 B 为甲醇；等度洗脱；流动相 A/B=30/70；流速 1 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。见图 1。

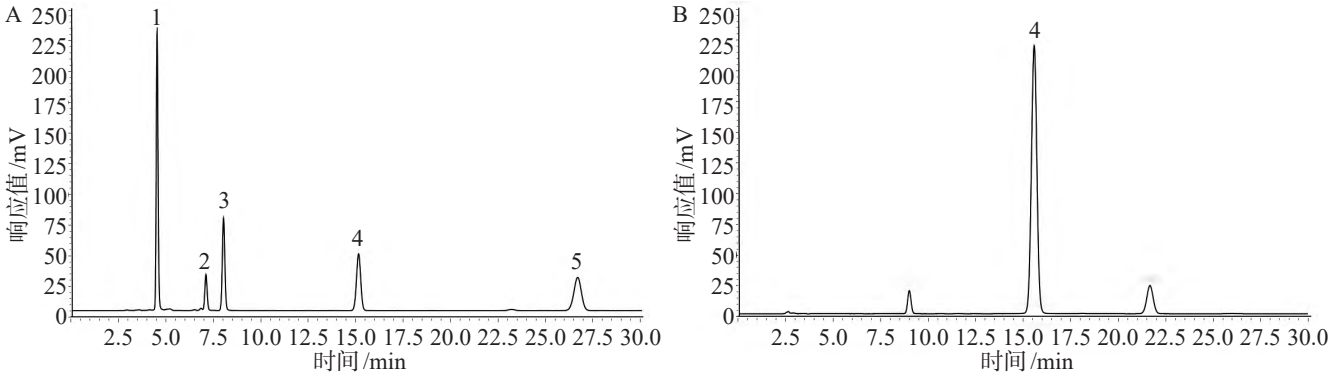
2　结果与讨论

2.1　样品前处理条件的优化

溶剂的选择：分别考察了用 50% 甲醇、甲醇、50% 乙腈、乙腈[15-16]作为提取溶剂，结果表明使用甲醇提取化妆品的回收率较好，所以本实验选择甲醇作为溶出美白类化妆品中氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸等 5 种防腐剂的提取溶剂。

2.2　色谱条件的优化

2.2.1　流动相的选择　分别考察了水 – 甲醇、水 – 乙



1. 氢醌；2. 苯酚；3. 儿茶酚；4. 苯甲酸钠；5. 山梨酸钾

图 1　高效液相色谱法测定 5 种成分的混合标准品溶液（A）和样品（B）色谱图

中国知网　https://www.cnki.net

腈、5 mmol/L乙酸铵–甲醇、5 mmol/L乙酸铵–乙腈、5 mmol/L乙酸铵+1‰甲酸–甲醇溶液、5 mmol/L乙酸铵+1‰甲酸–乙腈溶液体系作为流动相。结果表明，水–乙腈未出峰，水相中加入缓冲盐体系，色谱峰分离更好，再加入1‰甲酸后，出峰时间更早。因此，本文采用5 mmol/L乙酸铵+1‰甲酸–甲醇溶液作为流动相。

2.2.2 流速的选择 分别考察了流速为0.6、0.8、1.0、1.2和1.6 mL/min[17]时，氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸及山梨酸的出峰情况，结果表明流速低于1.0 mL/min时，随着流速的增加，出峰时间越快，色谱峰分离度也更好，但是，当流速大于1.0 mL/min时，氢醌与苯酚出峰时间几乎接近，分离度较低。因此，本文选用1.0 mL/min作为流速。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“1.2.1”项下配置的混合对照品储备液适量于10 mL容量瓶中，按照一定梯度比例加甲醇稀释定容至刻度，摇匀，即得标准溶液。在“1.3”项条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，各组分均具有良好的线性，各组分的标准曲线、相关系数和线性范围良好，见表1。

2.4 精密度试验

稀释“1.2.1”项下制备的混合标准品溶液100倍后，在“1.3”项下色谱条件连续进样6次，结果显示，氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸和山梨酸峰面积的RSD分别为1.87%、0.23%、1.02%、0.87%、0.24%，表明该方法的精密度良好。

2.5 稳定性试验

室温下取供试样品，在“1.2.2”项下方法制的样品溶液，分别于0、2、4、6、8、12、24 h时进样，计算氢醌、苯酚、儿茶酚、苯甲酸和山梨酸的峰面积RSD分别为1.59%、0.23%、0.92%、0.34%、0.15%（n=6），表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表1 各成分线性回归方程和线性范围

成 分	回归方程	R^2值	线性范围/（mg·L^{-1}）	检出限/（mg·L^{-1}）	平均回收率/%	RSD（n=6）/%
氢醌	y=4.3675e6 x–3.3620e5	0.9959	5~100	4	111.11	1.64
苯酚	y=2.5377e6 x–2.7026e5	0.9922	20~400	20	106.02	1.02
儿茶酚	y=5.9243e6 x–1.5826e5	0.9968	10~500	10	108.41	0.23
苯甲酸钠	y=4.2058e6 x+2.7663e4	0.9988	1~20	1	97.82	0.87
山梨酸钾	y=4.6949e6 x–1.5001e4	0.9990	2~40	1	98.56	0.24

表2 样品中5种防腐剂质量分数 （%，n=3）

种类	样品编号	氢醌	儿茶酚	苯酚	苯甲酸	山梨酸
水类	1#	—	—	0.006	0.009	—
	2#	—	—	0.002	0.338	—
	3#	—	—	5.560	0.033	—
	4#	—	—	3.681	—	—
	5#	—	—	3.751	0.012	—
	6#	—	—	—	—	—
乳类	1#	—	—	—	—	0.001
	2#	—	—	—	0.216	—
	3#	—	0.428	—	0.112	0.019
	4#	—	—	—	—	—
	5#	—	—	—	2.599	0.006
	6#	—	—	—	3.134	0.012
精华类	1#	—	—	—	0.037	0.022
	2#	—	—	—	0.058	0.029
	3#	—	—	—	0.789	0.053
	4#	—	—	—	—	0.002
	5#	—	—	—	—	0.003
	6#	—	—	2.449	—	—
霜类	1#	—	—	2.385	—	0.004
	2#	—	—	—	0.003	0.064
	3#	—	—	—	—	0.053
	4#	—	—	6.528	—	0.001
	5#	—	—	0.003	1.469	—
	6#	—	—	—	0.030	0.017

中国知网 https://www.cnki.net

2.6　加样回收率试验

精密称定各成分含量已知的美白化妆品 5 份，在线性范围内加入标准品做加标回收试验，按 “1.2.2” 项下方法制备样品溶液，按 “1.3” 项下色谱条件进样测定，计算平均回收率及RSD值。本方法平均回收率为 111.11%、106.02%、108.41%、97.82%、98.56%，且RSD分别为 0.43%、1.02%、0.98%（n=6）。

2.7　实际样品检测

将购买的膏霜类、水类、乳液类等 24 个美白化妆品，分别精密量取 “2.1.1” 项下配置样品溶液，用本方法检测分析，在 9 个样品中检出禁用防腐剂苯酚，检出量为 0.002%~6.528%，1 个样品检出禁用防腐剂儿茶酚，检出量为 0.428%，在 4 个样品中检出限用防腐剂苯甲酸含量超标，限用防腐剂三梨酸添加量均没有超过卫生部门规定，氢醌均未检出。

3　结论

建立了一种高效液相色谱法同时检测美白化妆品中多种苯系物（氢醌、苯酚、儿茶酚）和有机酸类（苯甲酸、山梨酸）禁限用防腐剂的分析方法，该方法分离度好、稳定性、精密度高，为快速科学评价与有效控制化妆品防腐剂提供新方法。

参考文献：

[1] REGEV L, WU M, ZLOTOLOW R, et al. Hydroquinone, a benzene metabolite, and leukemia: A case report and review of the literature [J]. Toxicol Ind Health, 2012, 28(1): 64-73.

[2] LEE Y C, CHIOU J T, WANG L J, et al. Hydroquinone destabilizes BIM mRNA through upregulation of p62 in chronic myeloid leukemia cells [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 199: 115017.

[3] YU C H, YANG S Q, Li L, et al. Identification of potential pathways and microRNA-mRNA networks associated with benzene metabolite hydroquinone-induced hematotoxicity in human leukemia K562 cells [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2022, 23(1): 20.

[4] 朱沁玲，余蓓，蒲玟静，等. 食品防腐剂苯甲酸钠多次给药对雌性大鼠肝脏、肾脏及卵巢毒性的研究 [J]. 广东医学，2018，39(3)：355-358.

[5] 吕娜，沈明浩. 食品防腐剂苯甲酸钠的蓄积毒性及精子毒性研究 [J]. 毒理学杂志，2011，25(3)：241-242.

[6] 敬海明，何立伟，何雨欣，等. 山梨酸及其钾盐的危害识别 [C]. 中国毒理学会第七次全国会员代表大会暨中国毒理学会第六次中青年学者科技论坛论文摘要 . 2018：2.

[7] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范 (2015 版) [S]. 北京：人民卫生出版社，2015.

[8] 李莉，李硕，王海燕，等. 高效液相色谱法测定祛斑美白类化妆品中 4 种具有美白功效的物质 [J]. 理化检验 (化学分册)，2021，57(11)：1037-1040.

[9] 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.

[10] 李彦君，漆爱明，肖树雄，等. 高效液相色谱法同时测定化妆品中 4 种表外防腐剂 [J]. 生物化工，2022，8(3)：54-58.

[11] 肖昭竞，童兰艳，李根容，等. 气相色谱 - 质谱 / 质谱法测定美白化妆品中 5 种酚类物质 [J]. 日用化学工业，2022，52(1)：84-90.

[12] 陈科，刘翠红，李练培. 超高效液相色谱法测定化妆品中的 6 种防腐剂 [J]. 广东化工，2016，43(17)：189-191.

[13] 丁晓爽，宋玉琴，安佰平. 高效液相色谱法同时测定化妆品中 3 种防腐剂的含量方法学研究 [J]. 日用化学品科学，2022，45(6)：17-20.

[14] 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(10)：1439-1443.

[15] 漆爱明，谭婉清，肖树雄. 高效液相色谱法测定化妆品中 4 种有机酸和 3 种苯酚类禁限用防腐剂 [J]. 香料香精化妆品，2021(1)：61-64.

[16] 张卓娜，林少彬，杨艳伟. 高效液相色谱法同时测定化妆品中 5 种防腐剂 [J]. 日用化学工业，2017，47(7)：418-420.

[17] 刘素娟，邵艳秋，崔术新，等. 高效液相色谱法快速测定化妆品及药品中 4 种防腐剂 [J]. 湖北农业科学，2015，54(11)：2735-2737.

（责任编辑：李阳飞）

中国知网　https://www.cnki.net