

超高效液相色谱法测定化妆品中对羟基苯乙酮含量

刘玉玲, 潘小红, 殷 帅, 姜成君, 孟庆玉*

(湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定化妆品中对羟基苯乙酮含量的分析方法。**方法** 样品前处理以甲醇为溶剂, 超声 30 min, 采用色谱柱 Atlantis® d C₁₈ 分离, 以甲醇-水(25:75, V:V)为流动相, 流速为 0.2 mL/min, 检测波长为 275 nm, 经 UPLC 检测; 同时对提取剂和提取时间、流动相比比例、检测波长等条件进行优化。**结果** 对羟基苯乙酮浓度在 0.4376~21.83 µg/mL 范围内呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9996, 膏霜、乳、液等不同剂型样品回收率高, 平均回收率分别为 99.89%、99.83% 和 100.24%, RSD 分别为 0.75%、0.65% 和 0.46%。方法检出限为 1.38 µg/g。**结论** 该方法简单、快速、准确, 可适用于化妆品中对羟基苯乙酮含量的测定。

关键词: 对羟基苯乙酮; 超高效液相色谱法; 化妆品

Determination of 4-hydroxyacetophenone in cosmetics by ultra performance liquid chromatography

LIU Yu-Ling, PAN Xiao-Hong, YIN Shuai, JIANG Cheng-Jun, MENG Qing-Yu*

(Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4-hydroxyacetophenone in cosmetics by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** Samples were extracted with methanol by ultrasonic extraction for 30 min, and separated by an Atlantis® d C₁₈ column with methanol-water (25:75, V:V) as mobile phase at the flow rate of 0.2 mL/min, and then detected by UPLC under the detection wavelength of 275 nm. Meanwhile, extraction solvent and extraction time, mobile phase ratio and detection wavelength were optimized. **Results** 4-Hydroxyacetophenone had a good linear relationship in the range of 0.4376~21.83 µg/mL with the correlation coefficient of 0.9996. The recovery rates of different dosage forms such as paste, emulsion and liquid preparation were high. The average recoveries of paste, emulsion and liquid preparation were 99.89%, 99.83% and 100.24%, and relative standard deviations (RSDs) were 0.75%, 0.65% and 0.46%, respectively. The limit of detection was 1.38 µg/g. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can be used for the determination of 4-hydroxyacetophenone in cosmetics.

KEY WORDS: 4-hydroxyacetophenone; ultra performance liquid chromatography; cosmetic

*通讯作者: 孟庆玉, 研究员, 主要研究方向为食品、药品、保健食品及化妆品的检验及研发。E-mail: 2496125098@qq.com

*Corresponding author: MENG Qing-Yu, Researcher, Hunan Institute for Food and Drug Control, No. 60, Bayi Road, Furong District, Changsha 410001, China. E-mail: 2496125098@qq.com

1 引言

对羟基苯乙酮是一种天然植物提取物,天然存在于菊科植物滨蒿的茎、叶,茵陈蒿、萝藦科植物、人参娃儿藤等植物的根中,具有清利湿热、利胆退黄的作用,对由于肝炎等疾病导致的眼黄有很好的疗效,对由于其他原因导致的眼球发黄也有很好的辅助疗效,常用于制造利胆药及其他有机合成^[1]。对羟基苯乙酮是一款防腐促进剂,兼具抗氧化、抗刺激性等多重功效。其抗氧化性及抑菌性都来自于羟基基团,是一种抗氧化剂(酚、酮特性),对真菌有效,对黑曲霉的杀灭能力很强,对铜绿假单胞菌也有一定的抑制效果^[2];高低 pH 和温度范围内都有优异的稳定性;能够在高温条件下延长其他物质有效成分的保质期,能够促进各种防腐剂的防腐功效;与各种化妆品成分和包材都有很好的兼容性^[3]。因此可在各类配方,包括防晒剂和香波等化妆品中作为防腐剂使用。

对羟基苯乙酮的测定方法主要有气相色谱法^[4,5]、气质联用色谱法^[6,7]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8,9],尤其高效液相色谱法具有稳定性好、仪器成本较低且操作简单等优点,常用于药品中对羟基苯乙酮的测定。经与《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[10]、美国和加拿大限用的 72 种防腐剂、欧盟《化妆品条例》(2009 年)^[11]列出的 54 种防腐剂及日本《化妆品标准》(2000 年)^[12]列出的 48 种防腐剂比较,对羟基苯乙酮不是我国规范、欧盟、美国、加拿大、日本等国家防腐剂使用范围。同时它也不在化妆品安全技术规范(2015 年版)禁用的 1290 种物质之列,因此化妆品生产商推出无添加防腐剂的概念,吸引消费者,事实上这个概念有失偏颇。根据近年来国家化妆品监督抽检中防腐剂的检测情况分析,有不少化妆品中添加有对羟基苯乙酮作为防腐剂。

动物实验表明,对羟基苯乙酮可增加大鼠胆汁的分泌,同时也能增加胆汁中固体物、胆酸、胆红素的排出量,对四氯化碳引起的肝损伤也有同样作用。因此吞食本品有害,接触对眼睛、呼吸系统和皮肤有刺激作用^[13,14]。由于检验方法和限量缺失等原因,化妆品中防腐剂的使用有待进一步规范。

本研究采用超高效液相色谱法测定化妆品中防腐剂对羟基苯乙酮的含量,并对对羟基苯乙酮提取条件及色谱条件进行研究,为完善化妆品中对羟基苯乙酮含量的测定提供参考,进一步规范化妆品中防腐剂的使用,有效控制产品的内在质量。

2 材料与方法

2.1 实验材料

超市、专柜购买标识中称含对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品(美迪惠尔、御泥坊等品牌)及其标识中

未标识有对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品。

2.2 仪器与试剂

UHPLC LC-30A 超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); UV-2550 紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); SBZS-12D 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); TB-215D 电子分析天平(美国 Denver 公司)。

对羟基苯乙酮标准品:由 stanford chemicals 提供,批号为 AL150209-18,纯度 98.14%。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Atlantis® d C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 3 μm); 检测器: PDA; 流动相: 甲醇:水 (25:75, V/V); 流速: 0.2 mL/min; 扫描波长: 190~400 nm; 检测波长: 275 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

2.3.2 标准溶液的配制

取对羟基苯乙酮对照品适量,加甲醇配制成 1 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1、0.1、0.1、0.1、0.02 mL 分别置于 50、10、25、50、50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,作为标准系列工作溶液。

2.3.3 样品前处理

取样品混匀,取样品约 1 g,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加入甲醇 20 mL,密塞,超声处理(功率 300 W,频率 25 kHz) 30 min,放冷,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得。过 0.22 μm 滤膜,供 UPLC 仪分析用。

3 结果与分析

3.1 提取条件的选择

根据对羟基苯乙酮的结构以及理化性质,分别对提取方法进行考察,筛选合理的提取方法。在实验过程中分别考察了以不同浓度的甲醇、乙腈作为提取溶剂测定供试品含量,其中采用甲醇作为提取溶剂进行处理的,含量测定结果最高,因此选取甲醇作为提取溶剂。以甲醇为提取溶剂,考察了超声 15、30、50 min 提取情况,结果表明超声 30 min 可提取完全。故选择以甲醇作为提取溶剂,超声 30 min 作为前处理条件。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 检测波长的选择

对羟基苯乙酮标准溶液在 190~400 nm 波长范围内进行光谱扫描,结果显示,对羟基苯乙酮的最大吸收波长为 275 nm。

3.2.2 流动相及流动相比比例的确

对羟基苯乙酮测定时曾分别采用乙腈-0.3%醋酸溶液为流动相,出峰时间过早,且前延严重。实验中曾采用甲醇-0.3%醋酸溶液为流动相,测定拖尾现象严重,采用甲醇-水为流动相时峰形良好。故选择甲醇-水作为流动相。当

流动相比比例为甲醇-水=15:85(*V/V*)时, 对羟基苯乙酮峰保留时间约为 10 min, 有拖尾现象; 当流动相比比例为甲醇-水=25:75(*V/V*)时, 保留时间约为 7 min, 峰型较好(见图 1)。因此, 采用甲醇-水(25:75, *V/V*)作为流动相进行等度洗脱。

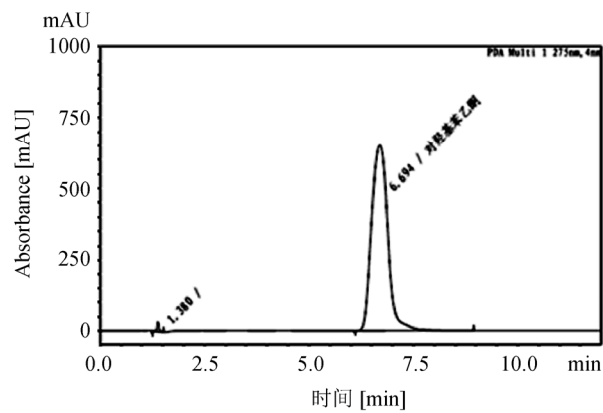


图 1 对羟基苯乙酮的标准色谱图
Fig. 1 Standard chromatogram of 4-hydroxyacetophenone

3.3 方法学考察

3.3.1 线性结果分析

经 UPLC 分析后得到标准曲线见图 2。结果表明, 该方法在 0.4376~21.83 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系。回归方程为 $Y=186789X+32938$ ($r^2=0.9996$)。按 $S/N=3$ 计算得仪器检出限为 0.06 ng, 方法检出限为 1.38 μg/g。

3.3.2 精密度考察

取同一供试品溶液在相同条件下, 测量 6 次, RSD 为 0.39%。实验证明, 该方法精密度高。

3.3.3 重复性考察

平行配制 6 份供试品溶液, 在相同条件下上机测量, RSD 为 0.61%。实验证明, 该方法重复性好。

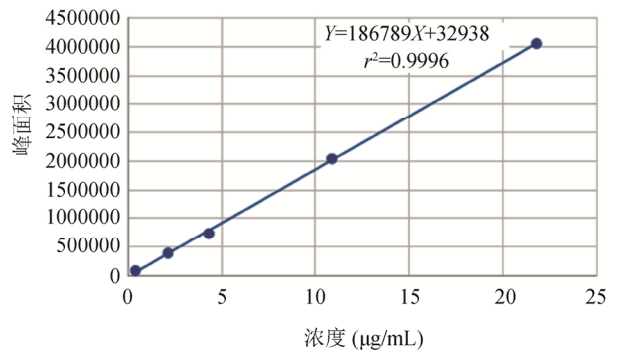


图 2 对羟基苯乙酮标准曲线
Fig. 2 Standard curve of 4-hydroxyacetophenone

3.3.4 基质加标回收率考察

取膏霜、乳、液 3 种不同基质的空白样品做高、中、低 3 个浓度水平的加标回收实验, 按前文实验方法操作, 结果见表 1~3。经计算膏剂平均回收率为 99.89%, RSD 值为 0.75%; 乳剂平均回收率为 99.83%, RSD 值为 0.65%; 液体剂剂平均回收率为 100.24%, RSD 值为 0.46%, 结果表明该方法准确可靠, 基质无干扰。

3.4 样品测定结果分析

市面上购买的标识中未标识有对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品未检出对羟基苯乙酮, 基质对对羟基苯乙酮无干扰, 样品色谱图 3A。对标识中称含对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品的样品进行测定, 均能检出对羟基苯乙酮, 样品色谱图见图 3B。样品结果见表 4。

表 1 膏剂回收率结果
Table 1 Recovery rates of paste preparation

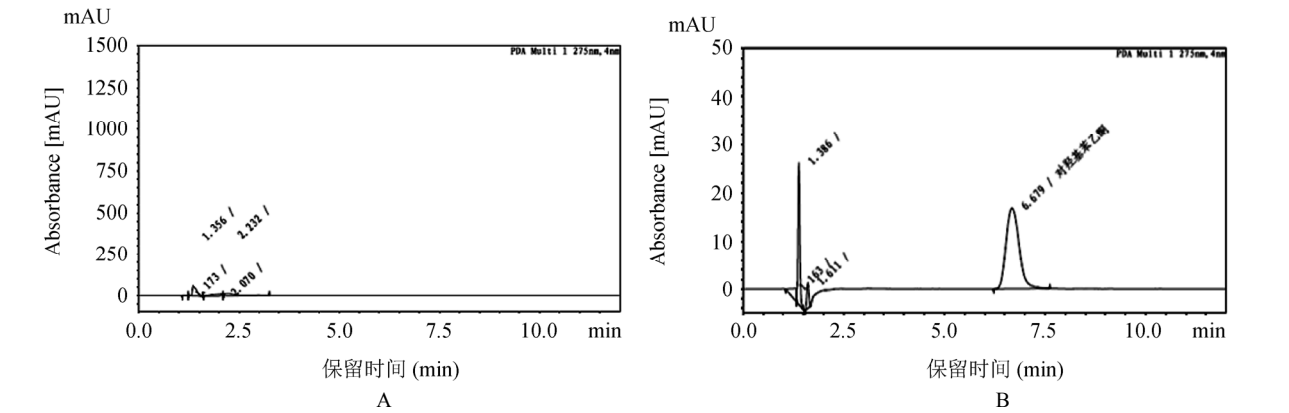
膏剂	样品取样量 (g)	样品原含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测定值 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
低浓度	0.5001	0	0.523832064	0.52	99.27			
低浓度	0.5029	0	0.523832064	0.522	99.65	99.90		
低浓度	0.5048	0	0.523832064	0.528	100.80			
中浓度	0.5017	0	4.3652672	4.365	99.99			
中浓度	0.5009	0	4.3652672	4.301	98.53	99.85	99.89	0.75
中浓度	0.5026	0	4.3652672	4.41	101.02			
高浓度	0.5033	0	17.4610688	17.463	100.01			
高浓度	0.5024	0	17.4610688	17.397	99.63	99.92		
高浓度	0.5068	0	17.4610688	17.479	100.10			

表 2 乳剂回收率结果
Table 2 Recovery rates of emulsion preparation

乳剂	样品取样量 (g)	样品原含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测定值 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
低浓度	0.5015	0	0.523832064	0.521	99.46			
低浓度	0.5046	0	0.523832064	0.519	99.08	99.78		
低浓度	0.5037	0	0.523832064	0.528	100.80			
中浓度	0.5007	0	4.3652672	4.32	98.96			
中浓度	0.5069	0	4.3652672	4.39	100.57	99.73	99.83	0.65
中浓度	0.5026	0	4.3652672	4.35	99.65			
高浓度	0.5053	0	17.4610688	17.39	99.59			
高浓度	0.5014	0	17.4610688	17.51	100.28	99.99		
高浓度	0.5038	0	17.4610688	17.48	100.11			

表 3 液体制剂回收率结果
Table 3 Recovery rates of liquid preparation

液体制剂	样品取样量 (g)	样品原含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测定值 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
低浓度	0.5044	0	0.523832064	0.526	100.41			
低浓度	0.5005	0	0.523832064	0.522	99.65	100.41		
低浓度	0.5086	0	0.523832064	0.53	101.18			
中浓度	0.5067	0	4.3652672	4.36	99.88			
中浓度	0.5049	0	4.3652672	4.39	100.57	100.18	100.24	0.46
中浓度	0.5062	0	4.3652672	4.37	100.11			
高浓度	0.5031	0	17.4610688	17.44	99.88			
高浓度	0.5024	0	17.4610688	17.397	99.63	100.11		
高浓度	0.5068	0	17.4610688	17.479	100.10			



注: A 为未标识有对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品; B 为标识中称含对羟基苯乙酮以及茵陈蒿花提取物的化妆品。

图 3 样品色谱图
Fig. 3 Chromatograms of samples

表 4 样品中对羟基苯乙酮含量测定结果
Table 4 Determination results of 4-hydroxyacetophenone in samples

样品名称	是否标识含有对羟基苯乙酮	剂型	对羟基苯乙酮含量(μg/g)
样品 1	否	膏剂	未检出
样品 2	否	膏剂	未检出
样品 3	否	乳剂	未检出
样品 4	否	乳剂	未检出
样品 5	否	液体制剂	未检出
样品 6	否	液体制剂	未检出
样品 7	是	膏剂	5.89
样品 8	是	膏剂	21.46
样品 9	是	膏剂	9.08
样品 10	是	乳剂	46.49
样品 11	是	乳剂	23.55
样品 12	是	乳剂	17.63
样品 13	是	液体制剂	5.36
样品 14	是	液体制剂	92.78
样品 15	是	液体制剂	38.03

4 结 论

对羟基苯乙酮是高温辅助活性稳定剂天然产物, 经过多年的临床检验, 证明对羟基苯乙酮具有确切疗效和极低毒性, 安全稳定性好, 在化妆品领域有着广泛的应用前景。但我国未制定对羟基苯乙酮在化妆品中作为防腐剂使用的限量, 亦未见相关的检验方法。本研究建立了超高效液相色谱法测定化妆品中对羟基苯乙酮含量的测定方法。该方法具有操作简便、回收率高、精密度高、重复性好和灵敏度高等优点, 为化妆品中对羟基苯乙酮成分的检验提供了参考。

参考文献

[1] 王静, 张玉萍, 刘影. 不同采收期茵陈中对羟基苯乙酮的含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 7-10.
Wang J, Zhang YP, Liu Y. Content determination of hydroxyacetophenone in artemisia capillaris from different collection time by HPLC [J]. Chin Med J Res Prac, 2011, 25(3): 7-10.

[2] 李程碑, 窦杰, 杨杰. 化妆品用无添加防腐剂体系[J]. 工业微生物, 2016, 46(4): 41-48.
Li CB, Dou J, Yang J. Cosmetics with no preservative system [J]. Ind Microbiol, 2016, 46(4): 41-48.

[3] 孔秋婵, 张怡, 冯小玲, 等. 一种化妆品复配防腐体系的功效研究[J]. 日用化学工业, 2015, 45(5): 269-278.

Kong QC, Zhang Y, Feng XL, *et al.* Antimicrobial efficacy study of a blended preservation system for cosmetics [J]. China Surf Deter Cosm, 2015, 45(5): 269-278.

[4] Hassani A, Meklati BY. Gas chromatographic behaviour of monosubstituted benzenes, benzaldehydes and acetophenones on OV polymethylphenyl-silicone stationary phases [J]. Chromatographia, 1992, 33(5/6): 267-271.

[5] Lalel HJD, Singh Z, Chye TS. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity [J]. Postharv Biol Technol, 2003, 29(2): 205-218.

[6] Shiratsuchi H, Shimoda M, Imayoshi K. Volatile flavor compounds in spray-dried skim milk powder [J]. Agric Food Chem, 1994, 42(4): 984-988.

[7] Pontes M, Marques JC, Camara JS. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry [J]. Talanta, 2007, 74(1): 91-103.

[8] 管珂, 郑健, 过立农, 等. HPLC 法测定民族药材青阳参中对羟基苯乙酮的含量[J]. 中国药事, 2015, 29(12): 1310-1314.
Zan K, Zhen J, Guo LN, *et al.* Determination of 4-hydroxyacetophenone in *Cynanchum otophyllum* Schneid by HPLC [J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(12): 1310-1314.

[9] 谭雄斯, 曹娟娟. HPLC 法测定肝友胶囊中的槲皮素、木犀草素、对羟基苯乙酮、滨蒿内酯和白藜芦醇[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2101-2106.
Tan XS, Cao JJ. Determination of quercetin, luteolin, 4'-hydroxyacetophenone, scoparone and resveratrol in Ganyou capsules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(10): 2101-2106.

[10] 化妆品安全技术规范(2015 年版)[S].
Cosmetics safety technical specification (2015 Edition) [S].

[11] Union. Regulation (EC) No 1223/2009 [S].

[12] Standards for Cosmetics [S].

[13] 化学化工大辞典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003
Chemical engineering dictionary [M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2003

[14] 张明森. 精细有机化工中间体全书[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
Zhang MS. Fine chemical industrial raw materials & intermediates [M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2008.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘玉玲, 药师, 主要研究方向为药品、食品、保健食品及化妆品的检验及研发。
E-mail: lyl1826705670@126.com



孟庆玉, 研究员, 主要研究方向为食品、药品、保健食品及化妆品的检验及研发。
E-mail: 2496125098@qq.com