

LC-MS/MS 法测定化妆品中水杨酸等 26 种防腐剂

LCMSMS-604

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定化妆品中 26 种防腐剂的方法。化妆品样品采用甲醇提取，LC-MS/MS 分析。26 种防腐剂在 15 min 时间内分析完成，部分同分异构体分离良好。26 种防腐剂在指定的浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.2~20 ng/mL。加标回收和精密度实验测试表明，方法准确度高，重复性好。该方法快速、有效，可应对化妆品中常见防腐剂的风险监测需求。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 化妆品 防腐剂

化妆品防腐剂是指以抑制微生物在化妆品中的生长和繁殖为目的而在化妆品中加入的物质。常见的化妆品中防腐剂有羟苯酯类、苯氧乙醇类、咪唑烷基脲类、甲基异噻唑啉酮（卡松）、苯甲醇类、1,2- 二元醇类和布罗波尔等。由于化妆品的保质期通常较长，许多化妆品离不开防腐剂，特别是液态水基类化妆品。然而，一些不法厂家肆意过量地添加化妆品，可能给使用者带来安全隐患，如卡松可能对皮肤产生刺激作用，羟苯酯类可能会影响激素的分泌、布罗波尔类可能会导致致癌物质亚硝胺的产生。

《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中列出了化妆品中 51 种准用防腐剂，并规定了每一种防腐剂的最大使用限量和使用范围，因此需要开发合适的检测

方法进行化妆品中防腐剂的准确定量。另外，部分化妆品中实际防腐剂成分和外包装上标识成分不一致，这可能暗示着该化妆品生产过程中存在违规操作的可能，因此准确的防腐剂定性确证方法也必不可少。

化妆品中防腐剂的检测方法包括 LC 法、GC 法、LCMSMS 法和 GCMS 法等。2021 年 3 月国家药品监督管理局发布《化妆品中防腐剂检验方法》（2021 年第 17 号通告），其中包括了《化妆品安全技术规范》中 51 种准用防腐剂的检测方法。

本文参照该通告中的方法，建立了 LC-MS/MS 法测定化妆品中 26 种防腐剂的方法。该方法快速、准确，可以很好地应对化妆品中防腐剂的快速筛查、定性确证和定量分析。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	对应（2021 年第 17 号公告）中的方法
1	水杨酸	Salicylic acid	69-72-7	C ₇ H ₆ O ₃	138.03	4.2
2	甲基异噻唑啉酮	Methylisothiazolinone	2682-20-4	C ₄ H ₅ NOS	115.01	4.1
3	苯甲酸	Benzoic acid	65-85-0	C ₆ H ₅ COOH	122.04	4.1
4	2- 溴 -2 硝基丙烷 -1,3- 二醇	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	52-51-7	C ₃ H ₆ BrNO ₄	198.95	4.1
5	4- 羟基苯甲酸	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	C ₇ H ₆ O ₃	138.03	4.1
6	脱氢乙酸	Dehydroacetic acid	520-45-6	C ₈ H ₈ O ₄	168.04	4.1
7	甲基氯异噻唑啉酮	METHYLCHLOROISOTHIAZOLINONE	26172-55-4	C ₄ H ₄ ClNOS	148.97	4.1
8	硫柳汞钠	Thimerosal	54-64-8	C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S	404.81	4.2

序号	中文名称	英文名称	CAS	分子式	分子量	对应 (2021 年第 17 号公告) 中的方法
9	4-羟基苯甲酸甲酯	Methylparaben	99-76-3	C ₈ H ₈ O ₃	152.05	4.1
10	4-羟基苯甲酸乙酯	Ethylparaben	120-47-8	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.06	4.1
11	4-羟基苯甲酸异丙酯	Isopropylparaben	4191-73-5	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.08	4.1
12	对氯间甲酚	4-Chloro-3-methylphenol	59-50-7	C ₇ H ₇ ClO	142.58	4.2
13	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	C ₈ H ₁₂ INO ₂	280.99	4.2
14	4-羟基苯甲酸丙酯	Propylparaben	94-13-3	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.08	4.1
15	4-羟基苯甲酸苯酯	Phenylparaben	17696-62-7	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	214.06	4.1
16	邻苯基苯酚	2-Phenylphenol	90-43-7	C ₁₂ H ₁₀ O	170.21	4.2
17	氯二甲酚	4-Chloro-3,5-dimethylphenol	88-04-0	C ₈ H ₉ ClO	156.61	4.2
18	4-羟基苯甲酸异丁酯	Isobutylparaben	857259	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.09	4.1
19	4-羟基苯甲酸丁酯	Butylparaben	94-26-8	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.09	4.1
20	4-羟基苯甲酸苄酯	Benzylparaben	94-18-8	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.08	4.1
21	氯咪巴唑	Climbazole	38083-17-9	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	292.76	4.2
22	4-羟基苯甲酸戊酯	4-HYDROXYBENZOIC ACID N-AMYL ESTER	6521-29-5	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.11	4.1
23	苄氯酚	Clorofene	120-32-1	C ₁₃ H ₁₁ OCl	218.68	4.2
24	溴氯酚	BROMOCHLOROPHEN	15435-29-7	C ₁₃ H ₈ Br ₂ Cl ₂ O ₂	423.83	4.2
25	三氯卡班	Triclocarban	101-20-2	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	313.98	4.2
26	三氯生	Triclosan	3380-34-5	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	287.95	4.2

1.2 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A
 脱气机：DGU-20A₅
 输液泵：LC-30AD×2
 自动进样器：SIL-30AC
 柱温箱：CTO-20A
 质谱检测器：LCMS-8050
 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

1.3 分析条件

液相条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN:227-30001-02)

流动相：A 相 -5 mM 乙酸铵水溶液；B 相 - 甲醇

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，洗脱程序见表 2

流速：0.3 mL/min
 进样量：2 μL

柱温：40°C

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	10
2.00	泵	B.Conc	50
4.00	泵	B.Conc	50
5.00	泵	B.Conc	55
8.00	泵	B.Conc	55
11.00	泵	B.Conc	90
12.00	泵	B.Conc	90
12.10	泵	B.Conc	10
15.00	Controller	Stop	

质谱条件:	接口温度: 300°C
分析仪器: LCMS-8050	DL 温度: 250°C
离子化模式: ESI+/- 同时扫描	加热模块温度: 400°C
离子源接口电压: 4.0 kV	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
雾化气: 氮气 3.0 L/min	驻留时间: 30 ms
干燥气: 氮气 10.0 L/min	延迟时间: 3 ms
碰撞气: 氩气	

表 3 MRM 优化参数

No.	化合物	离子化方式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	水杨酸	-	136.90	92.90*	15	18	10
				65.00	15	30	24
2	甲基异噻唑啉酮	+	116.00	100.90*	-12	-22	-19
				84.90	-12	-24	-17
3	苯甲酸	-	121.00	77.00*	15	11	10
				120.00	14	14	14
4	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	-	170.00	87.90*	13	11	18
				80.80	13	23	24
5	4-羟基苯甲酸	-	136.90	92.90*	15	18	10
				65.00	15	30	24
6	脱氢乙酸	-	167.10	83.00*	17	15	16
				123.00	12	12	13
7	甲基氯异噻唑啉酮	+	150.00	86.90*	-11	-38	-17
				58.00	-10	-30	-23
8	硫柳汞	-	383.10	108.05*	11	25	21
				339.15	11	13	23

No.	化合物	离子化方式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
9	4-羟基苯甲酸甲酯	-	150.70	92.00*	19	22	17
				135.80	19	19	22
10	4-羟基苯甲酸乙酯	-	165.00	92.00*	12	24	19
				137.20	12	17	13
11	4-羟基苯甲酸异丙酯	-	179.20	92.10*	12	24	17
				137.00	12	17	13
12	对氯间甲酚	-	141.10	105.30*	12	20	10
				35.00	15	22	10
13	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	+	281.60	165.00*	-19	-20	-15
				57.10	-20	-10	-25
14	4-羟基苯甲酸丙酯	-	179.20	92.10*	12	24	17
				137.00	12	17	13
15	4-羟基苯甲酸苯酯	-	213.40	65.00*	11	52	13
				93.10	11	21	19
16	邻苯基苯酚	-	169.20	115.05*	11	30	22
				93.00	20	27	14
17	氯二甲酚	-	155.10	118.80*	17	19	12
				34.90	17	18	13
18	4-羟基苯甲酸异丁酯	-	193.00	92.10*	14	25	15
				136.10	10	18	12
19	4-羟基苯甲酸丁酯	-	193.00	92.10*	14	25	15
				136.10	10	18	12
20	4-羟基苯甲酸苄酯	-	226.60	135.70*	17	16	14
				91.90	24	26	10
21	氯咪巴唑	+	293.00	197.00*	-11	-16	-19
				69.10	-11	-22	-26
22	4-羟基苯甲酸戊酯	-	207.10	136.00*	11	18	14
				92.00	23	26	18
23	苄氯酚	-	216.90	181.20*	11	19	18
				34.90	11	25	12
24	溴氯酚	-	424.80	207.00*	21	28	21
				204.80	22	28	22
25	三氯卡班	-	312.90	159.80*	16	13	11
				125.80	16	24	13
26	三氯生	-	288.90	35.10*	14	8	13
				35.10	14	8	13

注：* 表示定量离子

1.4 标准品的配制

26 种防腐剂储备溶液分别来源于岛津上海实验器材有限公司和客户，溶剂为甲醇。

混合标准中间液：准确移取适量储备液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得到浓度为 2500 ng/mL（以水杨酸计）的混合标准中间溶液。

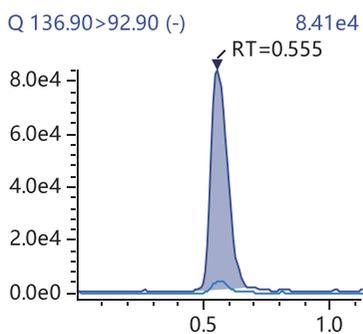
标准曲线配制：以 50% 甲醇水为溶剂，将混合标准中间液逐级稀释至浓度为 0.5、1、2、20、5、10、20、50、100、200、500 ng/mL（以水杨酸计）的标准点，上机分析。

1.5 样品前处理方法

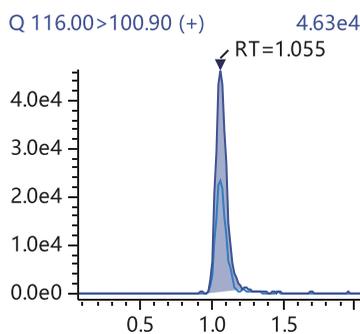
准确称取样品 1.0 g，置于具塞比色管中，加入 8 mL 甲醇，涡旋混匀，超声提取 20 min，用甲醇定容至 10 mL，摇匀。取上清液 5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。样液以 10000 r/min 的转速离心 5 min，经 0.22 μm 滤膜过滤后，上机分析。

■ 结果与讨论

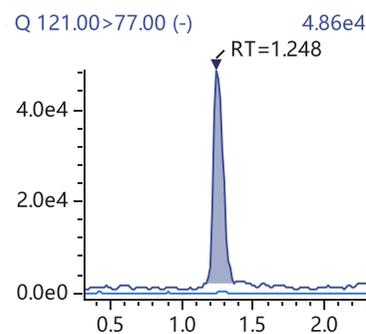
2.1 26 种防腐剂色谱图



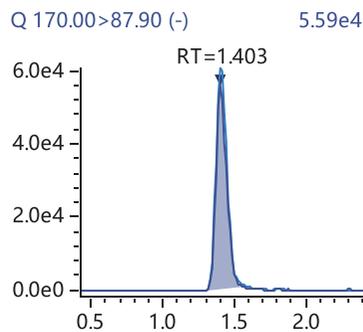
水杨酸



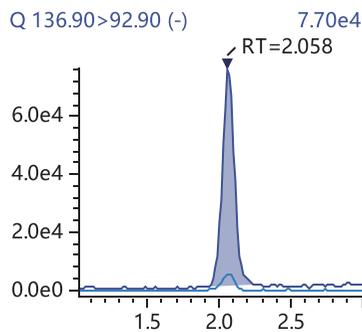
甲基异噻唑啉酮



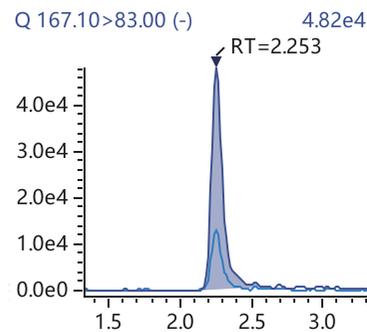
苯甲酸



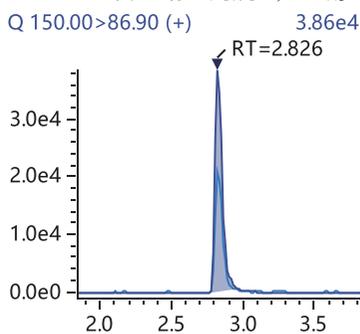
2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇



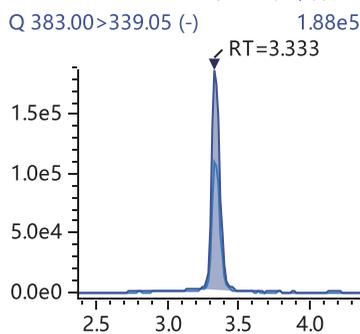
4-羟基苯甲酸



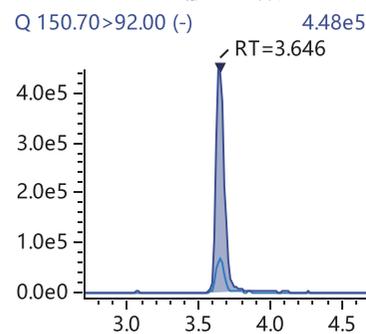
脱氢乙酸



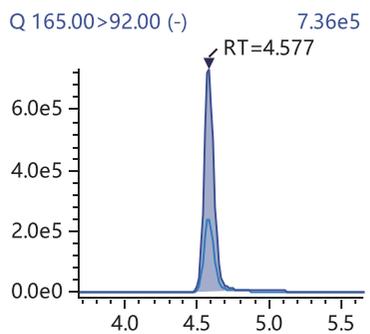
甲基异噻唑啉酮



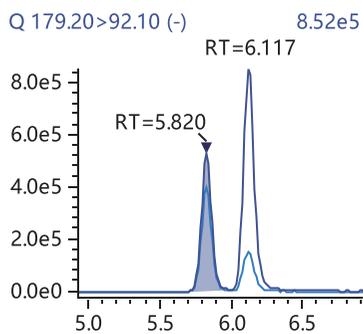
硫柳汞



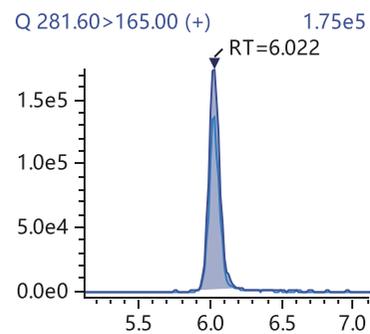
4-羟基苯甲酸甲酯



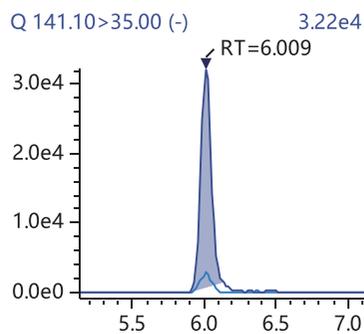
4-羟基苯甲酸乙酯



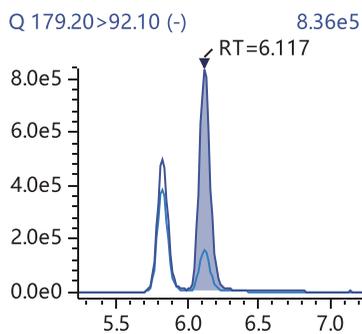
4-羟基苯甲酸异丙酯



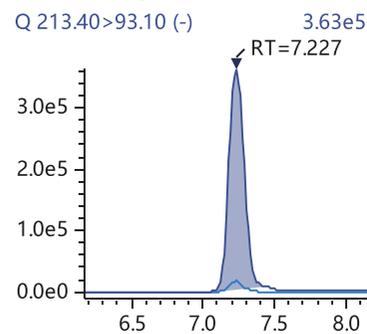
碘丙炔醇丁基氨甲酸酯



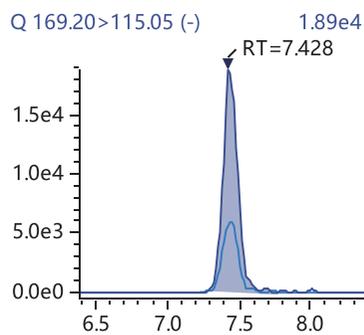
对氯间甲酚



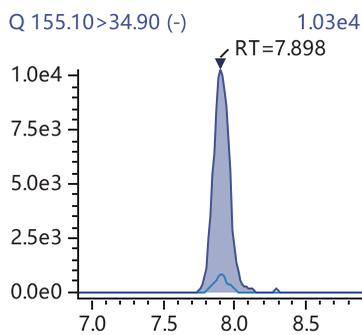
4-羟基苯甲酸丙酯



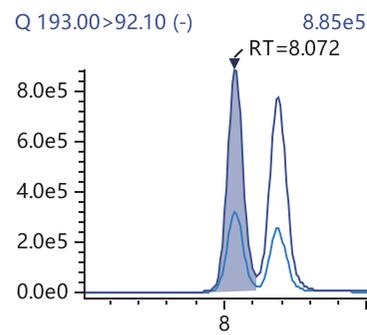
4-羟基苯甲酸苯酯



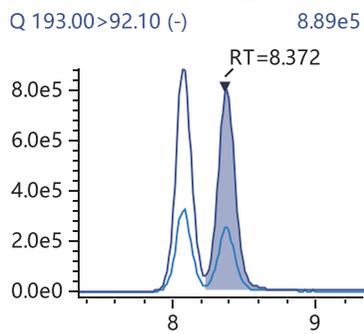
邻苯基苯酚



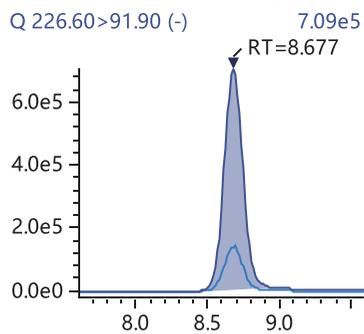
氯二甲酚



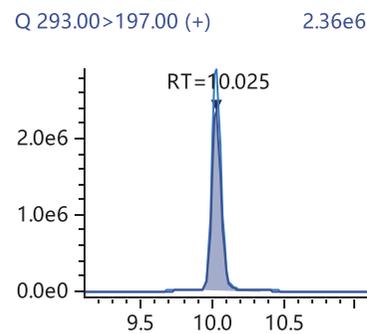
4-羟基苯甲酸异丁酯



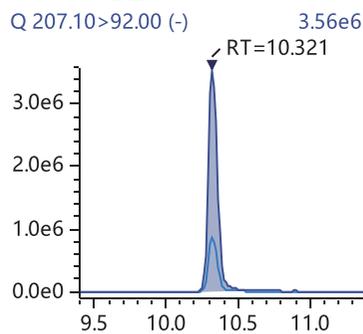
4-羟基苯甲酸丁酯



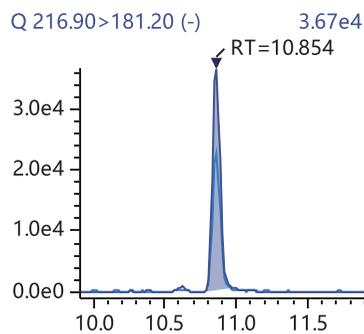
4-羟基苯甲酸苄酯



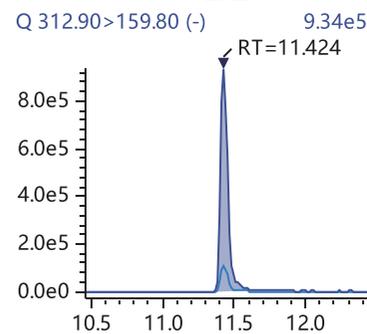
氯咪巴唑



4-羟基苯甲酸戊酯



苜氯酚



三氯卡班

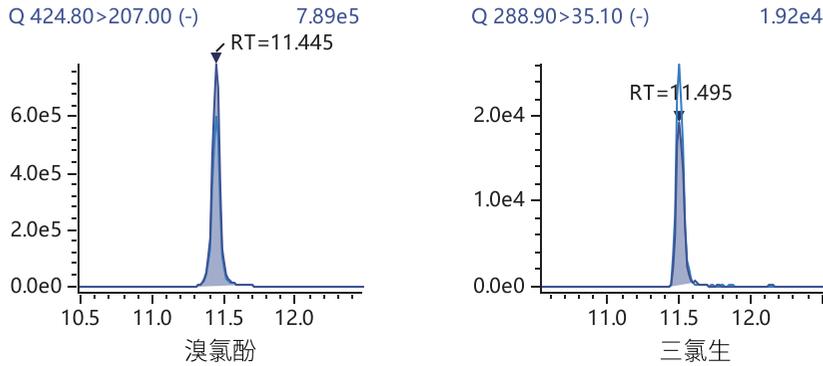


图 1 26 种防腐剂 MRM 色谱图

2.2 线性范围

按照 1.4 项下配制方法，配制标准曲线。以化合物浓度 X 为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，26 种防腐剂在指定浓度内线性良好，相关系数均大于 0.995。以标准曲线浓度最低点使用 3 倍信噪比的方式计算检出限，26 种防腐剂的检出限为 0.2~20 ng/mL。

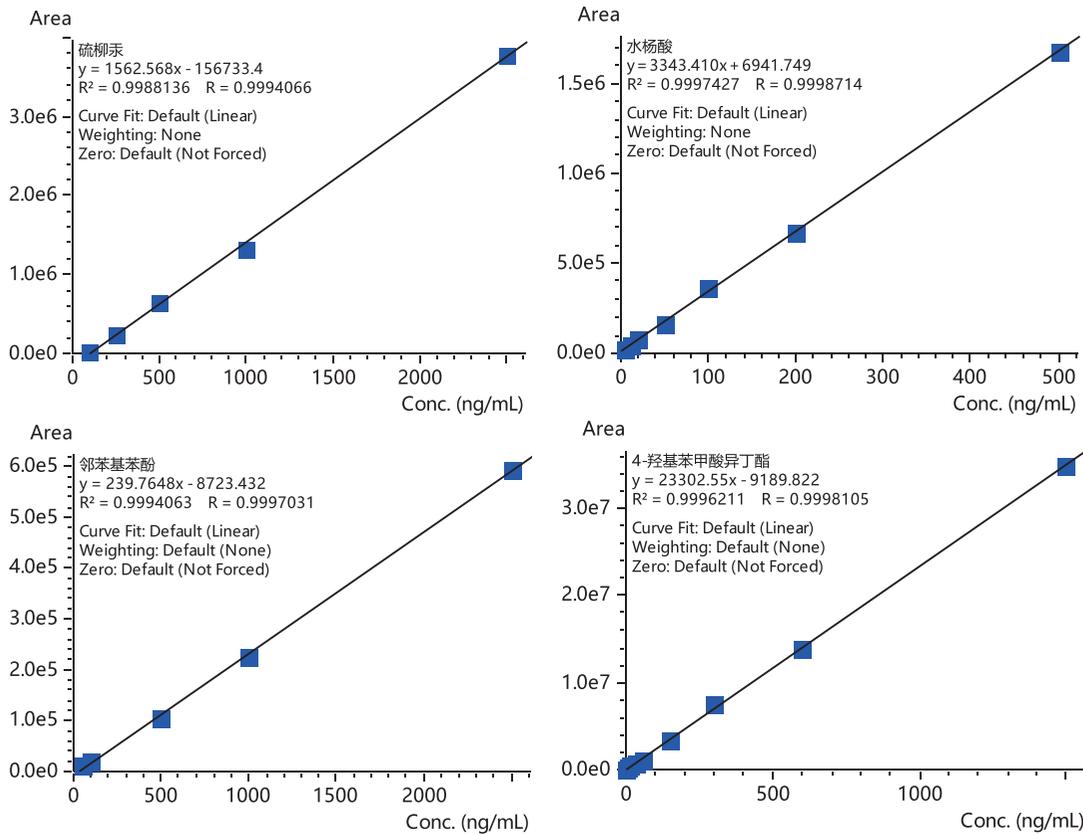


图 2 防腐剂标准曲线（部分）

表 4 26 种防腐剂标准曲线参数

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	加权系数	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
1	水杨酸	5~500	0.9998	无	95~105	2
2	甲基异噻唑啉酮	2~500	0.9997	1/C	91~108	0.5
3	苯甲酸	25~2500	0.9998	无	93~109	15
4	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	10~4000	0.9962	1/C ²	91~108	2
5	4-羟基苯甲酸	25~1500	0.9992	无	95~105	10
6	脱氢乙酸	10~2500	0.998	1/C	92~111	2
7	甲基氯异噻唑啉酮	2~500	0.9993	1/C	91~108	0.5
8	硫柳汞钠	50~2500	0.9994	无	93~105	20
9	4-羟基苯甲酸甲酯	2~500	0.9989	1/C	89~108	1
10	4-羟基苯甲酸乙酯	1~500	0.9993	1/C	88~108	0.5
11	4-羟基苯甲酸异丙酯	1~500	0.9992	1/C	89~109	0.5
12	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	2~500	0.9987	1/C	98~106	0.5
13	对氯间甲酚	25~2500	0.9983	1/C	89~107	5
14	4-羟基苯甲酸丙酯	1~500	0.9986	1/C	93~107	0.5
15	4-羟基苯甲酸苯酯	5~1000	0.9965	1/C	87~108	1
16	邻苯基苯酚	25~2500	0.9997	无	95~107	10
17	氯二甲酚	25~2500	0.9992	无	91~105	10
18	4-羟基苯甲酸异丁酯	1~500	0.9998	无	97~106	0.5
19	4-羟基苯甲酸丁酯	1~500	0.9996	无	92~109	0.5
20	4-羟基苯甲酸苄酯	1~500	0.9988	1/C	97~110	0.5
21	氯咪巴唑	0.5~500	0.9984	1/C	92~108	0.2
22	4-羟基苯甲酸戊酯	0.5~500	0.9988	1/C	94~109	0.2
23	苊氯酚	5~500	0.9984	1/C	95~113	2
24	三氯卡班	0.5~500	0.9988	1/C	97~109	0.2
25	溴氯酚	0.5~500	0.9973	1/C ²	92~114	0.2
26	三氯生	5~500	0.9981	1/C	91~106	2

2.3 重复性

对 100 ng/mL (以水杨酸计) 混合标准溶液连续分析 6 次, 计算重复性。结果见表 5。26 种化合物的保留时间 RSD 为 0.02~0.31%, 峰面积 RSD 为 0.79%~5.91%, 重复性良好。

表 5 26 种防腐剂重复性结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %	No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %
1	水杨酸	0.23	2.49	14	4-羟基苯甲酸苯酯	0.16	1.93
2	甲基异噻唑啉酮	0.31	5.91	15	4-羟基苯甲酸丙酯	0.16	1.93
3	苯甲酸	0.16	3.71	16	邻苯基苯酚	0.14	4.71

No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %	No.	化合物	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %
4	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇:	0.25	2.46	17	氯二甲酚	0.21	4.04
5	4-羟基苯甲酸	0.21	2.56	18	4-羟基苯甲酸异丁酯	0.14	1.13
6	脱氢乙酸	0.22	4.91	19	4-羟基苯甲酸丁酯	0.14	1.34
7	甲基氯异噻唑啉酮	0.11	5.44	20	4-羟基苯甲酸苄酯	0.18	1.81
8	硫柳汞钠	0.06	2.35	21	氯咪巴唑	0.04	1.13
9	4-羟基苯甲酸甲酯	0.07	2	22	4-羟基苯甲酸戊酯	0.04	0.79
10	4-羟基苯甲酸乙酯	0.1	1.22	23	苄氯酚	0.04	4.54
11	4-羟基苯甲酸异丙酯	0.1	1.6	24	三氯卡班	0.02	1.22
12	碘丙炔醇丁基氨基甲酸酯	0.08	2.61	25	溴氯酚	0.02	1.86
13	对氯间甲酚	0.14	4.39	26	三氯生	0.02	3.95

2.4 方法准确性和精密度

取某品牌柔肤水，按照 1.5 前处理方式进行处理，样品中检出水杨酸和 4-羟基苯甲酸甲酯，浓度分别为 6.1 mg/kg 和 498 mg/kg。向样品中添加浓度为 0.5、5.0 mg/kg（以甲基异噻唑啉酮计）2 个水平的加标量，每个水平重复 3 次，进行加标回收率和精密度试验。其中水杨酸的低浓度点和 4-羟基苯甲酸甲酯因为本底浓度远高于加标浓度，没有计算回收率。表 6 为实验结果，25 种化合物的平均回收率为 83.3%~108%，相对标准偏差为 1.96%~9.33%。

表 6 26 种防腐剂加标回收和精密度结果 (n=3)

No.	化合物	样品浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/ kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
1	水杨酸	6.1	-	-	-
			5	89.1	4.41
2	甲基异噻唑啉酮	N.D.	0.5	84.3	2.59
			5	85.9	3.70
3	苯甲酸	N.D.	4	90.3	8.31
			40	95.6	3.17
4	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	N.D.	12.5	92.8	4.33
			125	84.1	2.90
5	4-羟基苯甲酸	N.D.	1.5	83.8	3.62
			15	85.4	2.62
6	脱氢乙酸	N.D.	2.5	91.7	7.04
			25	102.6	3.33
7	甲基氯异噻唑啉酮	N.D.	0.5	87.7	3.32
			5	96.1	2.35
8	硫柳汞钠	N.D.	5	93.1	5.57
			50	105	4.77

No.	化合物	样品浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/ kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
9	4-羟基苯甲酸甲酯	498	-	-	-
			-	-	-
10	4-羟基苯甲酸乙酯	N.D.	2	84.9	7.34
			20	98.6	3.79
11	4-羟基苯甲酸异丙酯	N.D.	2	92.8	6.97
			20	101	6.97
12	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	N.D.	0.5	83.3	5.89
			5	85.1	5.31
13	对氯间甲酚	N.D.	5	92.7	8.29
			50	108	2.02
14	4-羟基苯甲酸丙酯	N.D.	2	102	6.92
			20	107	7.01
15	4-羟基苯甲酸苯酯	N.D.	0.5	105	3.42
			5	107	5.86
16	邻苯基苯酚	N.D.	5	105	4.05
			50	99.7	2.51
17	氯二甲酚	N.D.	5	86	5.71
			50	97.4	7.15
18	4-羟基苯甲酸异丁酯	N.D.	2.5	91.3	5.95
			25	103	3.27
19	4-羟基苯甲酸丁酯	N.D.	2.5	90.7	9.33
			25	99.6	2.81
20	4-羟基苯甲酸苄酯	N.D.	0.5	91.8	6.73
			5	92.3	3.96
21	氯咪巴唑	N.D.	0.5	89.1	8.83
			5	99.2	5.61
22	4-羟基苯甲酸戊酯	N.D.	0.5	95.1	7.80
			5	102	4.85
23	苄氯酚	N.D.	0.5	85.4	8.89
			5	101	4.82
24	三氯卡班	N.D.	0.5	86.5	7.76
			5	94.5	1.96
25	溴氯酚	N.D.	0.5	96.1	9.22
			5	92.8	4.88
26	三氯生	N.D.	0.5	99	2.17
			5	104	4.51

注：N.D. 表示未检出。

2.5 实际样品测试

取某品牌洗发水和护发素,按照 1.5 的前处理方式处理后上机测试。测试结果见表 7,两种样品的色谱图如图 3、图 4 所示。测试出的防腐剂种类与产品外包装相符。

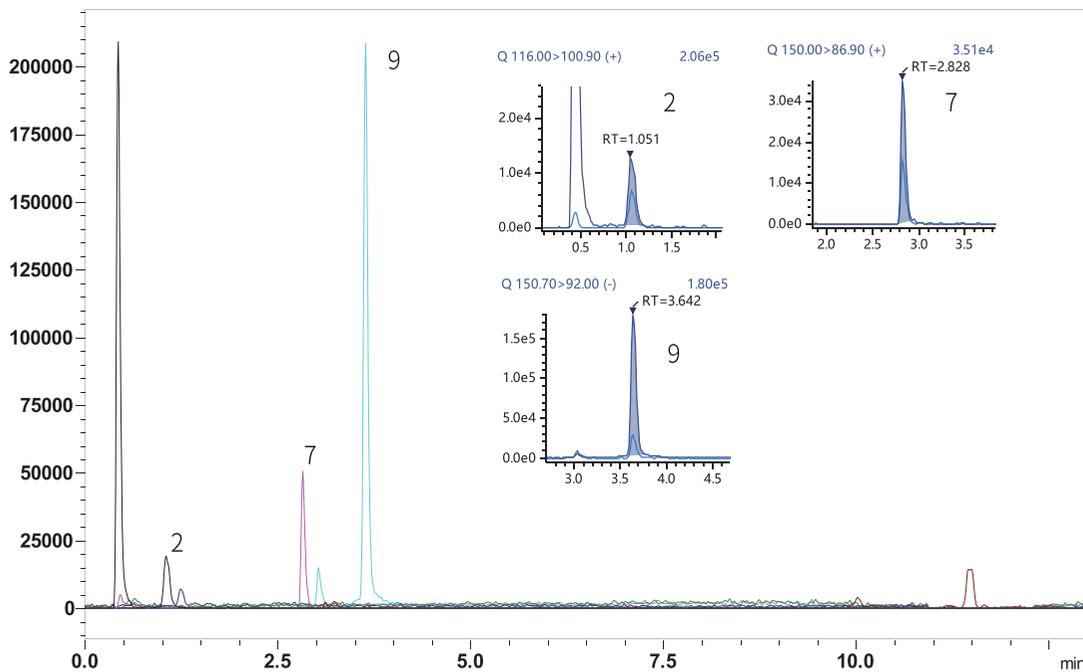


图 3 某洗发水提取液 TIC 色谱图和检出防腐剂 MRM 色谱图

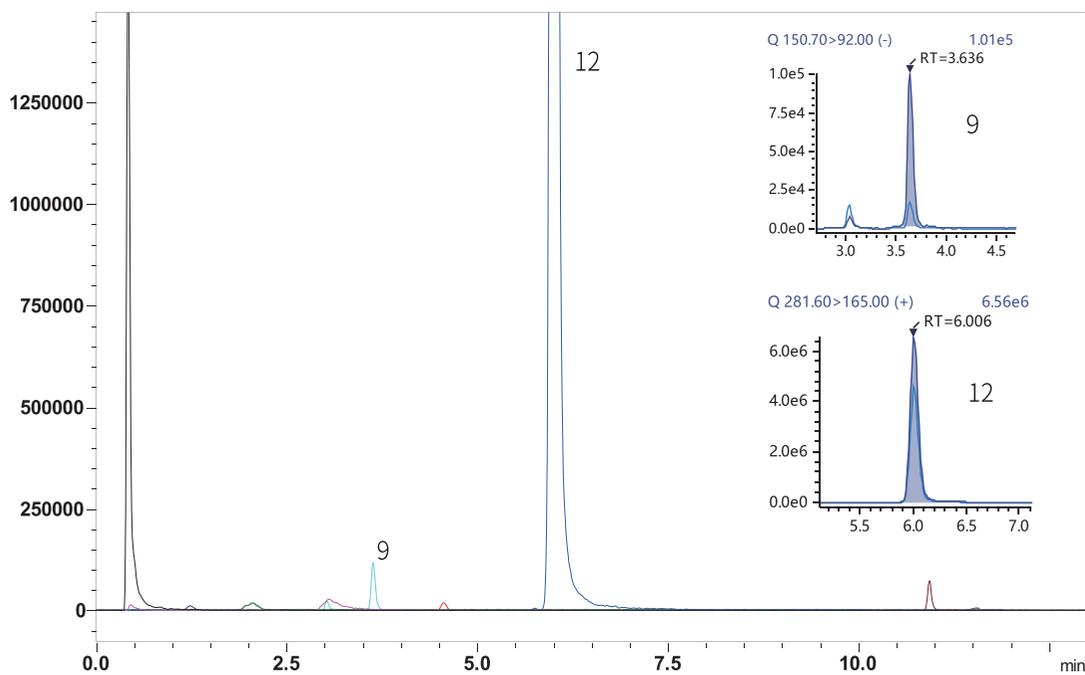


图 4 某护发素提取液 TIC 色谱图和检出防腐剂 MRM 色谱图

表 7 实际样品中防腐剂测试结果

样品名称	检出化合物编号	化合物名称	含量 (mg/kg)	标准样品离子丰度比 (%)	允许偏差范围 (%)	样品离子丰度比 (%)
洗发水	2	甲基异噻唑啉酮	0.68	49.79	40.39 - 60.58	46.56
	7	甲基氯异噻唑啉酮	1.88	47.30	36.01 - 60.02	43.67
	9	4-羟基苯甲酸甲酯	2.68	15.20	10.05 - 18.67	15.68
护发素	9	4-羟基苯甲酸甲酯	1.36	15.20	10.05 - 18.67	16.32
	12	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	82.9	64.51	50.85 - 76.27	69.41

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定化妆品中常见的 26 种防腐剂含量的方法。方法参照国家药品监督管理局发布《化妆品中防腐剂检验方法》(2021 年第 17 号通告) 中的方法, 其中 26 个化合物包括了公告中《4.1 甲基异噻唑啉酮等 23 个组分》LCMSMS 确证部分的 15 个化合物、以及《4.2 吡硫鎓锌等 19 个组分》LCMSMS 确证部分的 11 个化合物。该方法在 15 min 内完成 26 种防腐剂的检测。方法采用外标法定量, 各化合物在指定浓度范围内相关系数均大于 0.995, 检出限为 0.2~20 ng/mL。样品采用甲醇提取后上机分析。加标结果显示防腐剂化合物在 0.5、5.0 mg/kg (以水杨酸计) 2 个浓度水平下, 平均回收率为 83.3%~108%, 相对标准偏差为 1.96%~9.33%。该方法已成功的应用于实际样品中防腐剂的检测, 结果与样品外包装标识成分一致。本文所建立的方法快速、有效, 可应对化妆品中常见防腐剂的日常风险监测和阳性确证工作。

岛津应用云

