

doi:10.16112/j.cnki.53-1223/n.202506260002

引用格式:刘智敏,袁敬栩,万园媛,等.苯己基柱液相色谱法高效分析食品和化妆品中的曲酸[J].昆明理工大学学报(自然科学版),2026,51(1):182-190.

Citation:LIU Zhimin, YUAN Jingxu, WAN Yuanyuan, et al. Detection of Kojic Acid in Food and Cosmetic Samples by Phenylhexyl Column - Based High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Kunming University of Science and Technology (Natural Science), 2026,51(1):182-190.

苯己基柱液相色谱法高效分析食品和化妆品中的曲酸

刘智敏¹,袁敬栩¹,万园媛¹,曹晓梅¹,蒋薇²,张凤梅²,
彭琪媛²,司晓喜²,许志刚^{1*}

(1. 昆明理工大学理学院,云南昆明650500;2. 云南中烟工业有限责任公司技术中心,云南昆明650231)

摘要:为建立合适的曲酸含量检测方法并应用于实际,通过优化色谱条件确立最佳检测方案.采用苯己基柱为色谱柱,以乙腈-0.1%乙酸(体积比,10:90)为流动相,流速为0.6 mL/min,柱温为30℃,紫外检测波长270 nm为实验条件,绘制标准曲线并对食品和化妆品样品进行曲酸检测,开展不同浓度水平的加标回收实验.结果显示,所建方法的线性方程为 $y = 2.597x - 0.0886$,线性相关系数 $R^2 = 0.9998$,检出限(LOD)为0.0033 mg/L,定量限(LOQ)为0.010 mg/L;实际样品中曲酸检测浓度范围为0.063~0.30 mg/L,加标回收率为84.59%~115.26%,相对标准偏差(RSD, $n = 3$)为0.45%~5.85%.建立的曲酸检测方法简便、可靠且高效,可满足实际样品中曲酸的常规分析检测需求.

关键词:曲酸;苯己基柱;食品分析;化妆品;高效液相色谱

中图分类号:O657.72;TQ658;TS207.3 文献标识码:A 文章编号:1007-855X(2026)01-0182-09

Detection of Kojic Acid in Food and Cosmetic Samples by Phenylhexyl Column - Based High Performance Liquid Chromatography

LIU Zhimin¹, YUAN Jingxu¹, WAN Yuanyuan¹, CAO Xiaomei¹, JIANG Wei²,
ZHANG Fengmei², PENG Qiyuan², SI Xiaoxi², XU Zhigang^{1*}

(1. Faculty of Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. R&D Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China)

Abstract: A rapid and sensitive method for the determination of kojic acid was established and applied to actual sample analysis. The chromatographic conditions were optimized. The results indicated that the optimal chromatographic column proved to be the phenylhexyl column, the optimal mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid (volume ratio, 10:90), the optimal flow rate was 0.6 mL/min, the optimal column temperature was 30℃, and the optimal UV detection wavelength was 270 nm. By using the method to construct a calibration curve, the obtained linear equation was $y = 2.597x - 0.0886$, the linear correlation coefficient (R^2) was 0.9998, the limit

收稿日期:2025-06-26. 基金项目:云南中烟工业有限责任公司科技项目(2025YJ01);云南省科技厅科技计划项目“技术创新人才培养对象项目”(202105AD160006).

作者简介:刘智敏(1978-),女,博士,高级实验师.主要研究方向:色谱分析. E-mail: lab_chem@126.com

通信作者:许志刚(1979-),男,博士,教授.主要研究方向:样品前处理方法与技术,色谱分析.

E-mail: chemxuzg@kust.edu.cn.

of detection (*LOD*) was 0.003 3 mg/L, and the limit of quantification (*LOQ*) was 0.010 mg/L. The established method was applied to analyze kojic acid in food and cosmetic samples. The detected kojic acid ranged from 0.063 to 0.30 mg/L. Spiked recovery tests were conducted at multiple concentration levels. The spiked recovery rates ranged from 84.59% to 115.26%. The *RSD* ($n=3$) ranged from 0.45% to 5.85%. The proposed method is simple, reliable and highly efficient.

Keywords: kojic acid; phenylhexyl column; food analysis; cosmetics; high performance liquid chromatography

0 引言

曲酸(kojic acid)是一种由曲霉属和青霉属真菌经好氧发酵生成的杂环有机酸,亦称曲菌酸.该化合物具有显著的抑菌与抗氧化活性^[1],在食品工业中被广泛应用于防腐、保鲜及护色等领域^[2].此外,曲酸因其能够抑制黑色素合成关键酶(酪氨酸酶)的活性^[3],被广泛添加于美白类化妆品中.然而,曲酸的潜在健康风险不容忽视.其分子结构中的羟基可能诱发自由基累积,进而导致致癌、致畸及胚胎毒性等不良反应.世界卫生组织(WHO)在2017年发布的致癌物清单中将其列为第3类致癌物;美国食品药品监督管理局(USFDA)亦已限制其在非处方药中的使用^[4].欧盟食品安全局(EFSA)建议其每日允许摄入量不得超过0.5 mg/kg体重.鉴于曲酸在食品与化妆品中的广泛应用及其潜在风险,建立准确、灵敏的检测方法尤为重要.目前,曲酸的常见分析方法包括薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法、红外光谱法、电化学分析法及比色法等^[5-6].其中,高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)因具备良好的分离能力、较高的灵敏度与较强的重复性,已成为目前最为常用的检测技术.

HPLC是一种基于液相色谱技术的高效分离分析技术,能够对复杂混合物中的各组分进行分离、鉴定与定量测定^[7].该方法凭借其高压、高速、高效、高灵敏度及广泛适用性等“四高一广”的特点^[8],已成为化学、生物、医药、食品及环境等多个领域中最为常用的分离分析手段之一.色谱柱作为高效液相色谱分离系统的核心^[9],其类型直接影响分离效果,常用的色谱模式包括反相色谱、正相色谱、亲水相互作用色谱以及手性色谱等^[10].在采用HPLC对目标分析物进行分析时,需依据目标物的理化特性系统优化色谱条件,关键参数涵盖色谱柱类型、检测器种类、流动相组成与比例、柱温及流速等^[11].合理设置这些条件不仅有助于维持仪器稳定运行、延长系统使用寿命,更是获得准确、可靠分析结果的重要保障.

随着人们对食品安全的认识逐渐提高,食品安全分析也日渐重要.HPLC能同时检测多种痕量有害成分,因而在保障食品安全、防范健康风险方面发挥着不可替代的作用^[12-13].与此同时,化妆品已从基础护肤用品逐渐扩展至具有防晒、美白、抗衰老等多种功效的日常必需品,其使用范围持续扩大.然而,化妆品中潜在的健康风险亦不容忽视^[14-15],部分化妆品中可能含有防腐剂、激素、重金属等有害成分,长期使用或不当使用可能引发皮肤过敏、内分泌失调甚至更严重的健康问题^[16].

本研究在现有文献报道的基础上^[13-15],建立了一种基于水涡旋提取结合高效液相色谱的分析方法,系统优化了色谱柱与分离条件,实现了对面粉、小麦粉及防晒霜样品中曲酸增白剂的简便、快速、高效测定.本工作作为食品与化妆品中曲酸的安全性评估提供了可靠的方法学参考.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Dionex Ultimate 300 高效液相色谱仪(上海智鸢机电设备有限公司),配备DAD检测器、自动进样器,Venusil BP C18(A)色谱柱(4.6×250 mm,5 μm,天津博纳艾杰尔科技有限公司),Phenyl Hexyl Valid Column 色谱柱(4.6×250 mm,5 μm,铂金埃尔默仪器有限公司),Venusil HILIC 色谱柱(4.6×250 mm,5 μm,天津博纳艾杰尔科技有限公司),YMC-Pack CN 色谱柱(250×4.6 mm,D S-5 μm,12 nm,YMC股份有限公司),超声波清洗机(L-UC-3L,北京兰杰柯科技有限公司)

曲酸(99%,上海麦克林生化科技有限公司),甲醇(色谱纯,北京百灵威科技有限公司),乙腈(色谱

纯,天津致远化学试剂有限公司),乙酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司),甲酸(色谱纯,天津致远化学试剂有限公司),纯净水(娃哈哈),所有的样品均购于当地商店。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制及色谱条件

准确称取 50 mg 曲酸标准品,以色谱纯乙腈溶解并定容至 50 mL,制得 1.0 g/L 储备液。取 75 μ L 储备液,用水定容至 25 mL,得 3.0 mg/L 中间液。所有溶液于 4 $^{\circ}$ C 避光保存,现用现配。进一步稀释制得 0.010、0.050、0.10、0.50、1.0、5.0、10、20 mg/L 系列标准溶液,用于建立 0.010 ~ 20 mg/L 的标准曲线。

采用 HPLC 测定食品及化妆品中曲酸的含量。将浓度为 3.0 mg/L 的曲酸标准溶液在 Dionex Ultimate - 300 HPLC 系统上进行分析。初始色谱条件设定为:C18 色谱柱;检测波长为 270 nm;流动相为乙腈 - 0.1% 乙酸水溶液(7:93)(体积比,下同);流速为 0.7 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}$ C;进样量为 20 μ L。后续实验通过对色谱柱类型、流动相组成、比例、流速及柱温等关键条件进行系统优化,确定最佳色谱分离条件。定量分析采用外标法,以峰面积对浓度绘制标准曲线,建立线性关系,并进一步分析实际样品(化妆品和食品)中曲酸的含量。

1.2.2 实际样品的前处理

食品样品面粉和小麦粉均在当地的超市购买,化妆品样品防晒霜通过网络购买。

食品类样品:精确称取 1.00 g 面粉或小麦粉样品于 15 mL 具塞离心管中,加入 5.0 mL 纯净水,涡旋振荡 15 min 使样品充分分散与提取。随后于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤两次,收集滤液至 2 mL 进样瓶中,待 HPLC 分析。

化妆品类样品:准确量取 1.00 mL 待测样品(防晒霜等)置于 15 mL 具塞离心管中,加入 5.0 mL 纯净水,涡旋振荡 15 min 使其充分乳化并提取。随后以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜,弃去初滤液约 1 mL 后,收集续滤液于 2 mL 进样瓶中,待 HPLC 分析。

1.3 标准曲线的建立

在确定的色谱条件下(检测波长 270 nm,进样体积 20 μ L),对一系列浓度梯度的曲酸标准溶液进行分析,记录其峰面积。以标准溶液浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。在既定实验条件下,曲酸浓度与峰面积之间呈良好线性关系。采用最小二乘法对数据进行线性拟合,得到线性回归方程及相关系数(R^2)。基于所得标准曲线方程,可对实际样品中曲酸的含量进行定量计算。色谱保留行为的评价通过容量因子 k 值表征,计算公式如下:

$$k = (t_R - t_m) / t_m$$

式中, t_R 为目标物曲酸的色谱峰保留时间, t_m 为流动相在色谱系统中的死时间。

1.4 实际样品的测定及加标回收

采用经优化建立的 HPLC 方法,对采购的面粉、小麦粉及防晒霜样品进行曲酸含量测定。所有样品均按 1.2.2 所述方法进行前处理,在最优色谱条件下进行分析,每组样品平行测定 3 次。测定结果通过标准曲线定量,并计算样品中曲酸的平均含量及相对标准偏差(RSD),以评估方法的重复性与样品中目标物的实际残留水平。

为进一步验证方法的准确度和精密度,分别对面粉、小麦粉和防晒霜样品提取液进行加标回收实验。添加 3 个浓度水平(0.10、1.0、5.0 mg/L)的曲酸标准溶液,经滤膜过滤后,进样 20 μ L 进行分析,每个加标水平平行测定 3 次。基于 1.3 部分建立的标准曲线,根据加标样品的峰面积计算加标后曲酸总量,并扣除样品本底值,计算加标回收率和各加标水平下回收率的 RSD ,以评估方法的精密度。

2 结果与讨论

2.1 曲酸检测色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱对曲酸分离效果的影响

为优化色谱分离条件,首先考察了不同色谱柱对曲酸分离性能的影响。在固定了流动相为乙腈 - 0.1% 乙酸(7:93)、流速为 0.7 mL/min、柱温为 30 $^{\circ}$ C,检测波长为 270 nm 的条件下,分别采用 C18 柱、CN

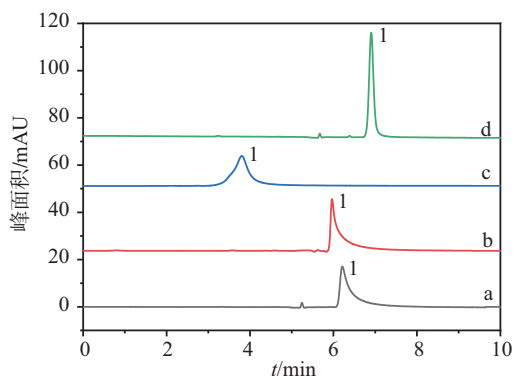
柱、HILIC 柱及苯己基柱对 3.0 mg/L 曲酸标准溶液进行分析, 结果如图 1 所示。

曲酸是一种中等偏强极性物质, 其结构含芳香杂环、酚羟基及羰基等基团, 水溶性良好。不同色谱柱对其保留行为影响显著。虽然四种色谱柱所得的峰面积响应值相近, 但保留时间差异明显: HILIC 柱出峰时间最短, 保留能力最弱, 可能导致分离不充分, 而苯己基柱的出峰时间最长, 保留能力最强, 可能是苯基的 $\pi-\pi$ 相互作用增强了保留能力。在峰形与柱效方面, CN 柱与苯己基柱表现突出, 峰宽均约为 0.2 min, 峰形对称, 理论塔板数高, 分离效率高。而 HILIC 柱峰宽较大 (0.59 min), 可能与其对曲酸的选择性较低、传质阻力较大有关, 或者由于流动相中水相比例不足, 导致极性组分保留过弱、谱带展宽严重。CN 柱与苯己基柱在峰形与柱效上均表现优异, 其中苯己基柱因具有更强的保留能力, 更适用于复杂基质样品的分离分析。

C18 色谱柱主要依靠疏水作用保留目标物。然而, 曲酸具有较强的极性, 导致其与 C18 长链烷基固定相之间的疏水相互作用较弱, 表现为保留时间较短, 且从曲线 a 可见色谱峰存在明显拖尾。CN 柱虽带有一定极性, 但对芳香结构的选择性较低, 曲酸在其上的保留时间同样较短, 且色谱峰呈现严重拖尾 (曲线 b)。HILIC 柱通过亲水分配作用实现分离, 但其固定相难以与曲酸的芳香环形成 $\pi-\pi$ 堆叠作用, 主要依赖羟基等极性基团的亲水作用维持保留, 因此保留效率较低。曲线 c 对应的色谱峰保留时间极短, 且分离效能不佳。相比之下, 苯己基柱的固定相同时含有苯基与己基结构, 苯基能够与曲酸芳香环发生 $\pi-\pi$ 堆叠作用, 提供特异性保留; 己基则贡献适度的疏水相互作用, 弥补了曲酸因极性较强而疏水性不足的缺陷。这种“ $\pi-\pi$ 堆叠与适度疏水”的双重保留机制, 使得曲酸在苯己基柱上表现出更强的保留、更高的峰响应以及更尖锐对称的峰形 (曲线 d)。综合比较, 苯己基柱在分离效率、峰形及保留能力等方面均表现最优, 因此本研究选取苯己基柱作为曲酸分析的色谱柱。与文献^[3]报道的传统方法相比, C18 柱、HILIC 柱分离曲酸时易出现峰前展、拖尾等现象, 本研究所采用的苯己基柱有效克服了这些问题, 在实现快速分离的同时, 获得了峰形对称、分离效果良好的色谱峰。

2.1.2 流动相组成对曲酸分离效果的影响

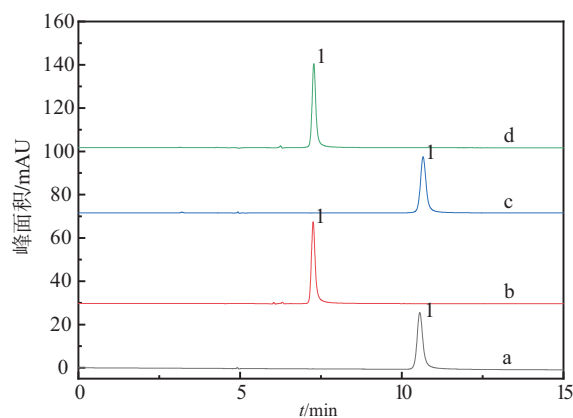
为考察不同流动相对曲酸色谱行为的影响, 以有机相 (乙腈、甲醇) 与酸性添加剂 (0.1% 乙酸、0.1% 甲酸) 组合构建四种流动相体系, 在苯己基色谱柱上进行分离测试。固定色谱条件为: 柱温 30℃, 流速 0.7 mL/min, 检测波长 270 nm, 流动相中有机相比例为 7%, 对 3.0 mg/L 曲酸标准溶液进行分析。有机相种类与酸性添加剂的选择直接影响洗脱强度、选择性及目标物峰形。乙腈洗脱能力通常弱于甲醇, 有利于增强保留; 甲酸与乙酸则可通过降低流动相 pH, 抑制曲酸酸性基团的解离, 并竞争性掩蔽固定相表面残留硅羟基, 从而减少次级相互作用, 改善峰形, 提高分离效率。通过比较四种流动相下曲酸的保留时间、峰对称性、理论塔板数及分离度等参数, 可系统评估不同洗脱体系对分离效果的影响, 从而筛选出在保持适宜保留的同时, 兼具良好峰形和高效分离的最佳流动相组成, 最终实现曲酸的高效、稳定分离。



a: C18 色谱柱; b: CN 柱; c: HILIC 柱; d: 苯己基柱; 1: 曲酸

图 1 不同类型色谱柱分离曲酸的色谱图

Fig. 1 Chromatograms for separating kojic acid by different columns



a: 甲醇-0.1% 乙酸; b: 乙腈-0.1% 乙酸; c: 甲醇-0.1% 甲酸; d: 乙腈-0.1% 甲酸; 1: 曲酸

图 2 不同流动相体系分离曲酸的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the separation of kojic acid with different mobile phase compositions

由图 2 可知甲醇作为流动相中的有机相时,流动相中的水相无论是乙酸还是甲酸,出峰时间都在 10.5 min 以上,保留时间较长.相比之下,使用乙腈作为有机相可显著缩短保留时间,同时峰宽减小,说明乙腈具有更强的洗脱效率和更低的黏度,有利于实现更快速、更尖锐的色谱分离.从峰面积的角度上来看,四种流动相体系对曲酸的检测灵敏度相近,虽然甲醇-0.1% 乙酸体系的峰面积略高,但乙腈体系具有更快的分析速度和更优的峰形.此外,考虑到苯己基色谱柱的适用 pH 范围(2.5~7.5),酸性较强的甲酸可能影响柱效,而乙酸更为温和.因此,综合考虑分离效率、峰形及色谱柱耐受性,本研究选择乙腈-0.1% 乙酸作为流动相体系.

2.1.3 不同浓度的酸性添加剂对曲酸分离效果的影响

为探究流动相 pH 对曲酸分离行为的影响,通过调节流动相中乙酸的含量(0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、1%)改变体系 pH,以破坏曲酸的螯合环境,改善分离效果.在苯己基色谱柱上,固定乙腈比例为 7%、流速为 0.7 mL/min、柱温为 30 °C 及检测波长为 270 nm,对 3.0 mg/L 曲酸标准溶液进行分析.如图 3 所示,1.0% 乙酸条件下表现出最短的保留时间,容量因子 k 随着乙酸浓度升高而逐渐降低,说明其在固定相上的保留减弱,与保留时间的变化规律一致.但是综合考虑 pH 等因素,为保护色谱柱、确保方法的长期稳定性,最终选择在既满足分离要求的同时更为温和的乙腈-0.1% 乙酸作为流动相.

2.1.4 流动相比比例不同对曲酸分离效果的影响

曲酸作为极性较强的酸性化合物,其保留行为对流动相中有机相比比例较为敏感.较低的有机相比比例有助于延长保留时间、改善峰形,但比例过低可能导致峰展宽和分析时间过长;反之,过高的有机相比比例则易引起保留不足、与杂质共洗脱,从而降低分离度.因此,需优化有机相比比例以平衡分离效率与分析速度.基于前述优化的色谱条件(苯己基柱、流动相为乙腈-0.1% 乙酸、流速为 0.7 mL/min、柱温为 30 °C、检测波长为 270 nm),进一步考察了不同乙腈比例(7%、10%、13%、16%、19%)对 3.0 mg/L 曲酸标准溶液分离效果的影响.

如图 4 所示,随着有机相比比例降低,曲酸的保留时间相应延长(从 4.833 min 延长至 6.873 min),表明洗脱强度减弱.虽然各比例下峰面积变化不大,但峰形与柱效存在明显差异.其中,乙腈-0.1% 乙酸(10:90)时,色谱峰展宽最小(约 0.1 min),峰形尖锐对称,柱效最高.尽管乙腈-0.1% 乙酸(19:81)比例下峰展宽亦较小,但 10% 乙腈比例在保证足够保留的同时,实现了更优的峰形与分离效率.综合保留行为、峰形及柱效,最终选择乙腈:0.1% 乙酸(10:90)作为最佳流动相比比例.

2.1.5 流速对曲酸分离的影响

优化流速有助于平衡分离效率、分析速度及系统压力.对于曲酸这类极性化合物,其保留时间随流速升高而缩短,但过高流速可能导致柱效下降、峰面积减小及柱压升高.基于已优化的色谱条件(苯己基

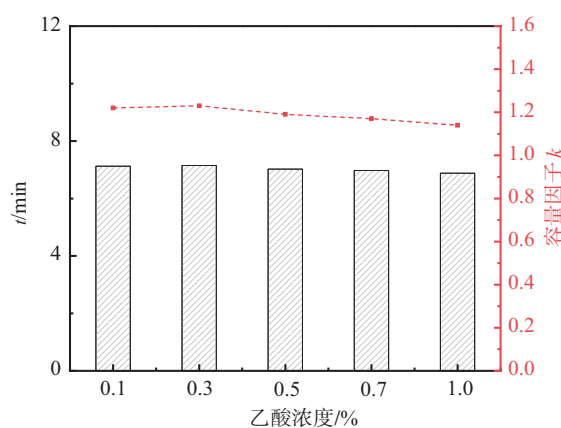
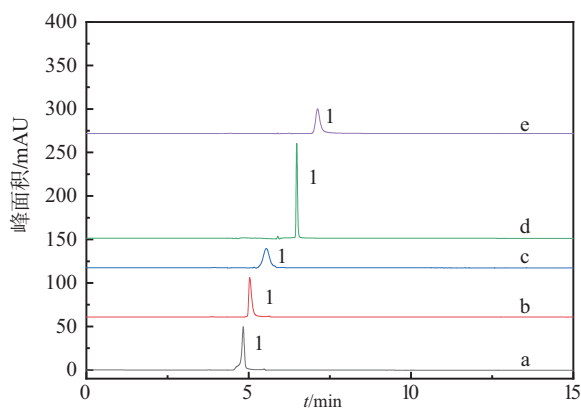


图 3 不同乙酸浓度作水相流动相的对曲酸分离的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of acetic acid as aqueous mobile phase on the separation of kojic acid



a: 乙腈-0.1% 乙酸(19:81); b: 乙腈-0.1% 乙酸(16:84);
c: 乙腈-0.1% 乙酸(13:87); d: 乙腈-0.1% 乙酸(10:90);
e: 乙腈-0.1% 乙酸(7:93); 1: 曲酸

图 4 流动相比比例的优化色谱图

Fig. 4 Chromatograms of optimized mobile phase ratios

柱, 流动相为乙腈-0.1%乙酸(10:90), 柱温为30℃, 检测波长为270 nm), 考察了流速在0.6~1.0 mL/min范围内对3.0 mg/L 曲酸标准溶液分离的影响。

如图5所示, 随着流速增加, 曲酸的保留时间从7.033 min 缩短至4.243 min, 表明提高流速可显著加快洗脱。然而, 伴随流速升高, 峰面积逐渐减小, 这可能是由于样品在色谱柱内停留时间不足, 导致部分物质未能充分响应。同时, 虽然较低流速下峰展宽略有增加, 但分离更为充分, 柱效更高; 而高流速下分析时间虽短, 却可能牺牲分离度与灵敏度。综合考虑分离效果、分析效率及系统稳定性, 选择0.6 mL/min 作为最佳流速。该条件在保证良好分离的前提下, 兼顾了合理的分析时间与稳定的柱压。

2.1.6 柱温对曲酸分离的影响

柱温是影响色谱分离效能与分析效率的关键因素。提高柱温可降低流动相黏度, 提升色谱柱的渗透性能, 进而加快分析进程, 缩短目标组分的保留时间。实验采用苯己基色谱柱, 以乙腈-0.1%乙酸(10:90)为流动相, 设定流速为0.6 mL/min, 紫外检测波长为270 nm, 对浓度为3.0 mg/L 的曲酸标准溶液进行检测, 并在15~35℃的范围内进一步考察了柱温对曲酸色谱分离效果的影响。

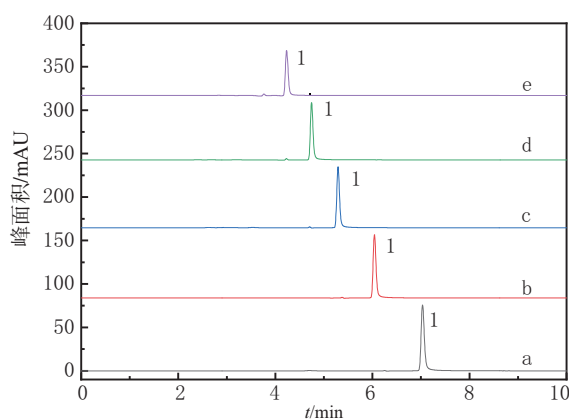
由图6可知, 随着柱温从25℃升高至35℃, 曲酸的保留时间逐渐缩短。温度升高可降低流动相黏度, 提高溶质在流动相中的扩散速率, 从而加快其在色谱柱中的传质过程, 同时可能减弱溶质与固定相之间的相互作用, 导致保留时间减少。此外, 随着柱温的升高, 容量因子 k 也有所降低。综合考量分析效率、柱效及容量因子, 最终选择30℃作为最佳柱温条件。

2.2 最优色谱条件下曲酸的分离效果

通过对色谱柱类型、流动相组成、流动相中乙酸含量、流速及柱温等关键参数进行系统优化, 最终确定了检测曲酸的色谱条件, 即以苯己基柱为色谱分离柱, 流动相组成为乙腈-0.1%乙酸(10:90), 流动相的流速为0.6 mL/min, 柱温为30℃, 紫外检测波长为270 nm。

2.3 曲酸标准曲线的测定

为构建曲酸的定量分析方法, 首先配制浓度梯度为0.010~20 mg/L 的曲酸标准样品系列。所有样品的色谱分析均在已优化的最佳条件下进行: 色谱柱选用苯己基柱, 流动相为乙腈-0.1%乙酸水溶液(10:90), 流速设定为0.6 mL/min, 柱温为30℃, 紫外检测波长为270 nm, 进样体积为20 μL。通过高效液相色谱仪依次进样分析, 记录各标准样品及空白样品的



a:0.6 mL/min; b:0.7 mL/min; c:0.8 mL/min; d:0.9 mL/min; e:1.0 mL/min; 1: 曲酸

图5 不同流速下曲酸分离色谱图

Fig.5 Separation chromatograms of kojic acid at different flow rates

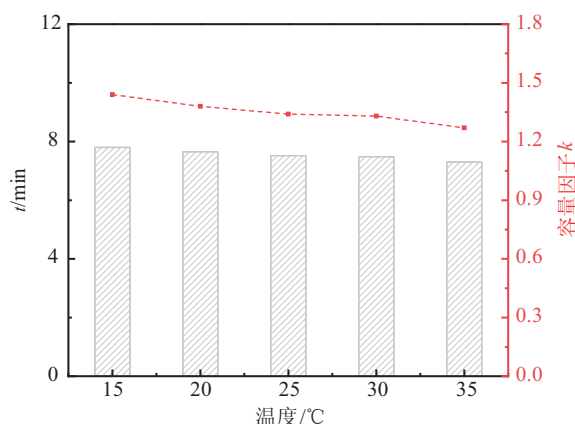


图6 不同柱温对曲酸分离的影响

Fig.6 Effect of column temperature on the separation of kojic acid

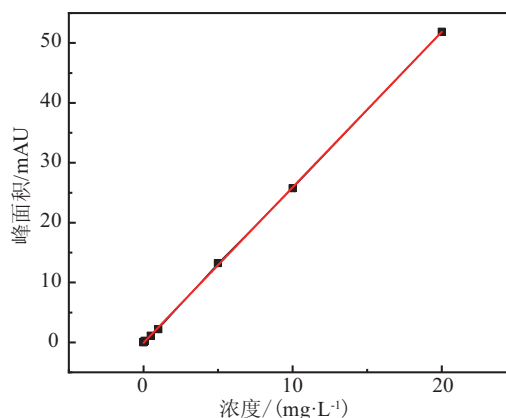


图7 曲酸标准溶液的色谱分析工作曲线

Fig.7 Chromatographic analysis calibration curve of kojic acid standard solution

峰面积. 数据处理阶段, 将每个加标样品的峰面积减去空白样品峰面积, 获得净响应值. 以目标物加标浓度 (mg/L) 为横坐标, 净峰面积为纵坐标, 通过最小二乘法拟合标准曲线, 得到工作曲线 $y = 2.597x - 0.0886$ (如图 7 所示), 相关系数 $R^2 = 0.9998$, 线性范围为 $0.010 \sim 20$ mg/L, LOD 为 0.0033 mg/L, LOQ 为 0.010 mg/L.

2.4 实际样品中曲酸的测定及加标实验

按照步骤 1.2.2 的操作对市售的食品样品 (面粉和小麦粉) 和化妆品样品 (防晒霜) 进行目标分析物的提取, 并用高效液相色谱检测分析, 结果如图 8 所示, 曲酸在食品样品和化妆品样品中均有检出, 检出浓度在 $0.063 \sim 0.30$ mg/L 之间.

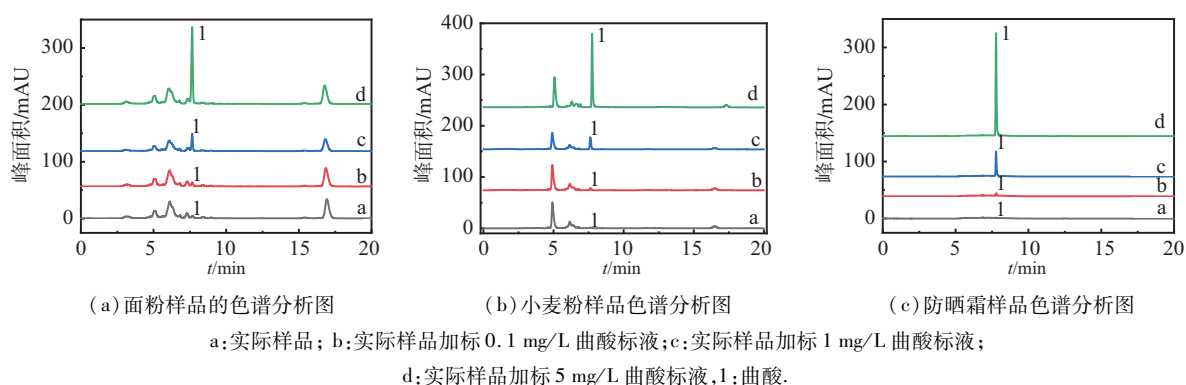


图 8 实际样品色谱分析图

Fig. 8 Chromatographic analysis of actual samples

为验证本方法的准确性与可靠性, 选取市售食品与化妆品样品开展加标回收试验, 设置 0.1 、 1.0 、 5.0 mg/L 三个加标浓度梯度, 所得结果见表 1. 其中, 面粉样品的加标回收率为 $84.59\% \sim 101.88\%$, RSD 为 $0.45\% \sim 5.54\%$; 小麦粉样品的加标回收率为 $92.18\% \sim 105.50\%$, RSD 为 $2.15\% \sim 5.85\%$; 防晒霜样品的加标回收率为 $104.59\% \sim 115.26\%$, RSD 为 $1.29\% \sim 5.48\%$. 本方法在准确度与精密度等核心验证指标上, 均满足甚至优于所适用的相关标准和规范的要求^[17-18]. 结果表明, 该方法稳定、可靠, 适用于所述各类样品的定量检测.

表 1 实际样品中测得曲酸的含量及加标回收率

Tab. 1 Detection of kojic acid in actual samples and its recovery of spiked samples

样品	曲酸浓度本底值 (平均值 + SD, mg/L) (RSD, %)	加标检测 ($n = 3$)		
		加标量/(mg · L ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
面粉	0.30 ± 0.01 (0.34)	0.1	95.10	0.45
		1.0	84.59	4.01
		5.0	101.88	5.54
小麦粉	0.17 ± 0.01 (2.15)	0.1	105.50	2.15
		1.0	97.39	2.89
		5.0	92.18	5.85
防晒霜	0.063 ± 0.003 (1.29)	0.1	109.43	1.29
		1.0	115.26	3.61
		5.0	104.59	5.48

2.5 方法比较

与文献报道的常规 HPLC - C18 法相比^[3], 本研究所建立的基于苯己基柱的 HPLC 方法展现出更优的分析性能. 苯己基柱因其固定相中的苯基可与曲酸芳香结构形成 $\pi - \pi$ 堆叠作用, 具有更强的保留选择性和更好的抗基质干扰能力, 从而显著提升了方法灵敏度与稳定性. 具体而言, 本方法的 LOD 低至 0.0033 mg/L, 线性范围为 $0.010 \sim 20$ mg/L; C18 柱法的 LOD 为 0.05 mg/L, 线性范围为 $0.1 \sim 10$ mg/L^[3]; 陈卓等^[19] 的研究

中 LOD 为 0.002 5 mg/L, 但回收率却最低. 在实际样品分析中, 苯己基柱法所得回收率的 RSD 为 0.45% ~ 5.85% ($n=3$), 表明方法重复性良好、抗干扰能力强; C18 柱法在相似条件下的 RSD 则为 2.74% ~ 5.64% ($n=3$). 虽然两种方法的分析时间相近, 且苯己基柱法采用的流速略低, 但其在分离选择性、灵敏度及稳定性方面均表现出明显优势. 本文的分析方法与文献的方法比较如表 2 所示.

表 2 分析方法比较

Tab. 2 Comparison of the developed methods with reported methods

液相色谱柱	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	R^2	检出限/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%	方法来源
C18 柱	0.1 ~ 1	0.9985	0.05	0.15	82.3 ~ 118.7 ($n=3$)	文献[3]
Waters Atlantis T3 柱	0.005 ~ 15	0.9992	0.0025	0.008	80.2 ~ 96.2 ($n=6$)	文献[19]
苯己基柱	0.01 ~ 20	0.9998	0.0033	0.01	84.59 ~ 115.26 ($n=3$)	

3 结语

本研究通过系统优化色谱条件, 建立了基于苯己基柱的 HPLC 方法, 用于食品与化妆品中曲酸的测定. 该方法线性范围宽、灵敏度高, 并成功应用于面粉、小麦粉及防晒霜样品中曲酸含量的检测, 为相关产品中曲酸的安全监测提供了简便、快速的分析手段, 但在复杂基质干扰消除方面仍存在一定的局限性. 该方法仅针对基质相对简单的样品开展检测, 尚未涉及发酵食品、高黏度或高油脂类化妆品等更为复杂的样品体系; 加标回收实验亦未在原始样品中添加, 难以完全反映实际样品前处理过程中的损失与干扰. 此外, 样品前处理采用单一水相涡旋提取, 可能存在提取效率不足、净化不彻底等问题, 可能对定量结果的准确性产生影响. 未来研究可围绕复杂基质的针对性前处理方法、提取溶剂与条件的优化以及样品净化步骤的强化等方面进一步深入, 以提升方法的适用性与可靠性.

参考文献:

- [1] SHEIKHSHOAIE M, SHEIKHSHOAIE I, RANJBAR M. Analysis of kojic acid in food samples uses an amplified electrochemical sensor employing V_2O_5 nanoparticle and room temperature ionic liquid[J]. Journal of Molecular Liquids, 2017, 231: 597 - 601.
- [2] LI H H, DU X Y, CHEN C Y, et al. Integrating transcriptomics and metabolomics analysis on kojic acid combating *Acinetobacter baumannii* biofilm and its potential roles[J]. Microbiological Research, 2022, 254: 126911.
- [3] 余诗雨, 刘育坚, 杨怡, 等. 曲酸的液相色谱分离方法研究及其在化妆品分析中的应用[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(9): 1724 - 1727.
YU S Y, LIU Y J, YANG Y, et al. Investigation of liquid chromatography methods on the separation of kojic acid and its application in cosmetics analysis[J]. Chemical Research and Application, 2020, 32(9): 1724 - 1727.
- [4] 聂燕敏, 齐丽娟, 宁钧宇, 等. 曲酸对健康影响的危害评估[J]. 毒理学杂志, 2024, 38(2): 109 - 115.
NIE Y M, QI L J, NING J Y, et al. Hazard assessment of the effects of kojic acid on the health[J]. Journal of Toxicology, 2024, 38(2): 109 - 115.
- [5] 顾娟红, 杨天宇. 曲酸的安全性及检测方法研究进展[J]. 理化检验 - 化学分册, 2012, 48(2): 247 - 249 + 252.
GU J H, YANG T Z. Advance of researches on determination of kojic acid and its safety in applications[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis), 2012, 48(2): 247 - 249 + 252.
- [6] 熊慧霞, 郭舒岗, 张蕤, 等. 液相色谱串联质谱法测定液态发酵食品中曲酸[J]. 化学分析计量, 2024, 33(12): 64 - 69.
XIONG H X, GUO S G, ZHANG R, et al. Determination of kojic acid in liquid fermented food by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2024, 33(12): 64 - 69.
- [7] BHATI C, MINOCHA N, PUROHIT D, et al. High performance liquid chromatography: Recent patents and advancement[J]. Biomedical and Pharmacology Journal, 2022, 15(2): 729 - 746.
- [8] 王奕霏, 王珊珊, 陈丰, 等. 高效液相色谱法测定茶叶中有效成分含量的方法综述[J]. 化工设计通讯, 2020, 46(6): 156 + 158.
WANG Y F, WANG S S, CHEN F, et al. Review on the determination of active ingredients in tea by high performance liquid

- chromatography[J]. *Chemical Engineering Design Communications*,2020,46(6):156 + 158.
- [9] 伍鹏,汤波,路振宇,等. 冠醚固定相的制备及手性拆分[J]. *化学研究*,2015,26(1):49 - 53.
WU P,TANG B,LU Z Y,et al. Crown ether stationary phase for chiral separation[J]. *Chemical Research*, 2015, 26(1): 49 - 53.
- [10] 刘育坚,王丹,许志刚. HILIC 色谱柱拆分抗坏血酸对映体及其在药物分析中的应用[J]. *化学研究*,2017,28(6): 726 - 729.
LIU Y J,WANG D,XU Z G. Enantiomeric separation of ascorbic acid by HILIC column and its application in drug analysis[J]. *Chemical Research*,2017,28(6):726 - 729.
- [11] 殷海霞,钟延霞,李贵敏,等. 浅谈高效液相色谱法分析条件的选择及在检验领域的应用与发展[J]. *当代化工研究*, 2021(2):163 - 164.
YIN H X,ZHONG Y X,LI G M,et al. Discussion on the selection of analytical conditions of high - performance liquid chromatography and its application and development in the field of inspection [J]. *Modern Chemical Research*, 2021 (2): 163 - 164.
- [12] LIN D Y,YU C Y,KU C N,et al. Design,fabrication,and applications of SERS substrates for food safety detection: Review[J]. *Micromachines*,2023,14(7):1343.
- [13] 周书来,景赞,吴丽. 两种色谱法检测小麦粉中曲酸的含量[J]. *现代食品*,2021,27(14):151 - 153 + 173.
ZHOU S L,JING Z,WU L. Determination of kojic acid in wheat flour by two chromatographic methods [J]. *Modern Food*, 2021,27(14):151 - 153 + 173.
- [14] 何海彤,汤曜名,范伟焯. 高效液相色谱法同时检测小麦粉中 6 种非法添加剂[J]. *食品安全质量检测学报*,2024,15(12):269 - 275.
HE H T,TANG Y M,FAN W X. Determination of 6 kinds of illegal additives in wheat flour by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*,2024,15(12):269 - 275.
- [15] 胡积东,吴爱平,孙乐,等. 高效液相色谱法测定化妆品中 12 种美白成分[J]. *化学研究与应用*,2024,36(7): 1658 - 1663.
HU J D,WU A P,SUN L,et al. Determination of 12 whitening ingredients in cosmetics by high performance liquid chromatography[J]. *Chemical Research and Application*,2024,36(7):1658 - 1663.
- [16] 袁佳琪,武羽洁,刘屹,等. 2023—2024 年云南省祛痘类化妆品中水杨酸的使用情况分析[J]. *云南化工*,2025,52(2):130 - 133.
YUAN J Q,WU Y J,LIU Y,et al. Analysis of the use of salicylic acid in anti acne cosmetics in Yunnan Province from 2023 to 2024[J]. *Yunnan Chemical Technology*,2025,52(2):130 - 133.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [18] 国家食品药品监督管理总局化妆品标准专家委员会. 化妆品安全技术规范(2015年版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [19] 陈卓,周楠,张培毅,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定小麦粉中 4 种新型非法添加剂[J]. *食品安全质量检测学报*,2021,12(16):6417 - 6423.
CHEN Z,ZHOU N,ZHANG P Y,et al. Simultaneous determination of 4 kinds of new illegal additives in wheat flour by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety and Quality*,2021,12(16): 6417 - 6423.

(编辑:李媛)