

液相色谱 - 串联质谱法测定化妆品中7种小分子肽含量

杨 铭¹, 徐建明², 王晨蕾¹, 李长于¹, 胡 丹¹, 廖上富¹

¹浙江方圆检测集团股份有限公司, 浙江 杭州

²欧诗漫生物股份有限公司, 浙江 湖州

收稿日期: 2024年10月19日; 录用日期: 2024年11月13日; 发布日期: 2024年11月28日

摘 要

建立了液相色谱 - 串联质谱法测定化妆品中肌肽等7种小分子肽含量的方法。样品采用1%氯化钠水溶液: 甲醇: 乙酸 = 6:3:1混合溶剂超声提取, 液相分离, 质谱外标法定量。结果表明, 7种小分子肽在各自范围内线性关系良好(相关系数 > 0.996), 检出限在0.05~0.5 $\mu\text{g/L}$ 之间, 在低、中、高三个添加水平级别, 加标回收率在82.7%~109.5%之间, RSD在1.1%~6.7%之间。该方法前处理简单高效, 专属性强, 灵敏度高, 准确性好, 可用于化妆品中7种小分子肽的筛查和含量测定。

关键词

液相色谱 - 串联质谱, 化妆品, 小分子肽

Determination of 7 Kinds of Small Molecular Peptides in Cosmetics by HPLC-MS/MS

Ming Yang¹, Jianming Xu², Chenlei Wang¹, Changyu Li¹, Dan Hu¹, Shangfu Liao¹

¹Zhejiang Fangyuan Testing Group Co., Ltd., Hangzhou Zhejiang

²Oshman Biology Co., Ltd., Huzhou Zhejiang

Received: Oct. 19th, 2024; accepted: Nov. 13th, 2024; published: Nov. 28th, 2024

Abstract

A HPLC-MS/MS method was developed for the determination of 7 small molecular peptides in cosmetics. The samples were extracted with 1% NaCl solution: methanol: acetic acid = 6:3:1 mixed solvent by ultrasonic, separated by liquid phase, and quantified by external standard mass spectrometry. The results showed that the linear relationship of the 7 peptides was good (correlation coefficient > 0.996), and the detection limit was between 0.05~0.5 $\mu\text{g/L}$, the recoveries ranged from 82.7% to

文章引用: 杨铭, 徐建明, 王晨蕾, 李长于, 胡丹, 廖上富. 液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 7 种小分子肽含量[J]. 分析化学进展, 2024, 14(4): 229-236. DOI: 10.12677/aac.2024.144027

109.5%, and the RSD ranged from 1.1% to 6.7%. The method is simple and efficient with high specificity, high sensitivity and accuracy. It can be used for screening and determination of 7 small molecular peptides in cosmetics.

Keywords

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Cosmetics, Small Molecular Peptides

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着化妆品行业的不断推陈出新,小分子肽类添加物越来越多地参与到化妆品研发和应用中,并且由于氨基酸组成不同,在化妆品中发挥的作用也多种多样,主要的功能有保湿、修复、抗过敏、抗氧化、紧致抗皱、抑制黑色素生成等[1]。小分子肽种类繁多,化妆品行业中常用的有肌肽、谷胱甘肽、铜肽、乙酰基六肽-8等[2][3],这些物质通过调节酶的活性、清除自由基、螯合重金属等原理而发挥作用,以安全、稳定、易吸收、效果好等优点引得人们关注,但国内和国外的法规中均没有明确规定化妆品中小分子肽的评价测试方法,不利于行业发展和市场监督。

目前国内外关于肽的检测方法研究主要集中于食品、生物医药等领域,分析方法主要有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱、毛细管电泳法、分光光度法[4]-[9]。黄颖等[10]建立了一种利用毛细管电泳(HPCE)法同时测定脑脊液等生物体液中肌肽、鹅肌肽和高肌肽的检测方法。王宝平等[11]采用高效毛细管电泳法测定原料药肌肽的含量。化妆品中小分子肽的检测方法也偶有报道,如GOTTI等[12]通过衍生前处理后采用HPLC-FLD测定化妆品中的谷胱甘肽,毛善巧等[13]采用HPLC-UV测定化妆品中乙酰基六肽-8,陈意光等[14]采用液相色谱-串联质谱法测定化妆品中5种棕榈酰多肽的含量,测定下限均为2 µg/L。许勇[15]等通过高效液相色谱法测定化妆品中L-肌肽、乙酰基四肽-5、谷胱甘肽和乙酰基六肽-8的含量,检出限为30 mg/kg。上述方法存在检测种类少、覆盖范围小、检出限高等问题,本文拟建立采用液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中使用频率较高的7种小分子肽(主要包括肌肽、谷胱甘肽、铜肽、乙酰基六肽-8、棕榈酰五肽-4、棕榈酰三肽-5、棕榈酰四肽-7)的方法,弥补现有方法的不足,以期为企业有利的产品证明,让消费者使用的更加放心,并为政府实施监督管理提供技术支持。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

甲醇、乙腈, HPLC, TEDIA 公司, 三氟乙酸, 分析纯, 麦克林公司, 肌肽、谷胱甘肽等 7 种小分子肽, 纯度 ≥ 95%, 上海安谱实验科技有限公司和源叶生物。

超高效液相色谱串联四极杆质谱联用仪, 5500+, SCIEX, 纯水仪, Milli-Q, Millipore 公司, 离心机, 2-16P, Sigma 公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 液相色谱条件

色谱柱: Waters BEH C18 3 mm × 100 mm, 1.7 µm;

进样量：5 μ L；
流速：0.3 mL/min；
柱温：40℃；
流动相：A 相：0.1%三氟乙酸水溶液，B 相：0.1%三氟乙酸乙腈溶液，梯度洗脱，梯度洗脱比例详见表 1。

Table 1. Gradient elution ratio table
表 1. 梯度洗脱比例表

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	98	2
1	98	2
4	35	65
5.5	5	95
7	5	95
7.1	98	2
10	98	2

2.2.2. 质谱条件

电离方式：ESI+；
离子源温度：500℃；
毛细管电压：ESI+：5500 V；
气帘气：30 psi；
雾化气：55 psi；
辅助气：55 psi；
监测模式：多反应监测(MRM)模式；
其他质谱参数见表 2。

Table 2. Mass spectrometry parameters of 7 small molecule peptides
表 2. 7 种小分子肽质谱参数

检测物质	母离子	子离子	保留时间/min	DP 电压/V	碰撞能/eV
肌肽	227.1	210	1.76	85	18
	227.1	110.1	1.76	85	32
	227.1	156.2	1.76	85	20
铜肽	308.1	179.1	2.81	82	18
	308.1	162.2	2.81	82	24
	308.1	76.1	2.81	82	35
谷胱甘肽	341.2	195.1	1.89	100	24
	341.2	178.1	1.89	100	33
	341.2	110.2	1.89	100	45

续表

乙酰基六肽-8	307	129.1	6.44	100	25
	307	246.2	6.44	100	19
	307	306.6	6.44	100	10
棕榈酰五肽-4	402	129.3	6.17	100	27
	402	436.3	6.17	100	22
	402	234.1	6.17	100	27
棕榈酰三肽-5	695.5	255.3	6.85	120	50
	695.5	296.4	6.85	120	55
	695.5	158.2	6.85	120	55
棕榈酰四肽-7	445.4	359.6	3.96	100	28
	445.4	172.1	3.96	100	32
	445.4	295.2	3.96	100	31

2.3. 标准溶液的配制

分别准确称取肌肽、铜肽、谷胱甘肽、乙酰基六肽-8、棕榈酰五肽-4、棕榈酰三肽-5、棕榈酰四肽-7 约 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用混合溶剂(水:甲醇:乙酸 = 60:30:10, 体积比)溶解并定容至刻度, 配成浓度约为 1000 mg/L 的标准储备溶液。

分别准确吸取适量各单一标准储备液至 100 mL 容量瓶中, 用混合溶剂定容, 配制成浓度为 1.0 mg/L 的混合标准中间溶液。分别移取适量混合标准中间溶液至 10 mL 容量瓶中, 用混合溶剂定容, 得到 0.5、1、10、20、50、100 µg/L 的混合标准工作溶液。

2.4. 供试品溶液的制备

准确称取样品 0.2 g, 精确至 0.001 g, 置于具塞比色管中, 用水(1% NaCl): 甲醇:乙酸 = 6:3:1 混合溶液定容至 10 mL, 摇匀, 涡旋振荡 60 s, 以 10,000 r/min 离心 5 min, 经 0.45 µm 滤膜过滤, 滤液作为待测溶液。

3. 结果与讨论

3.1. 色谱条件的优化

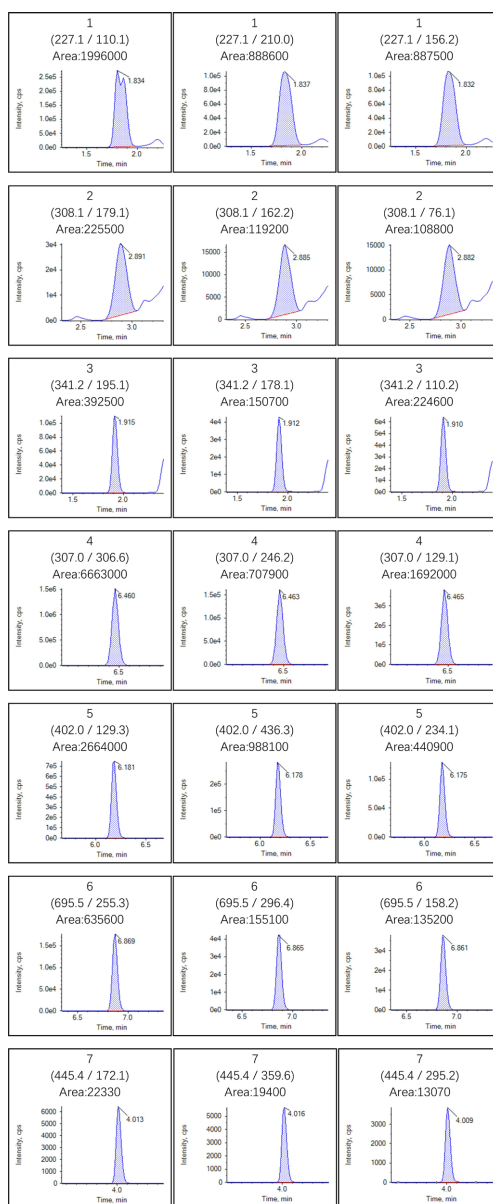
3.1.1. 色谱柱的选择

不同的色谱柱对多肽的吸附能力不同, 从而使得各多肽的出峰时间不同, 分离效果不同。实验考察了 Waters BEH C18 柱、Waters CSH C18 柱、Waters HSS C18 柱等色谱柱对 7 种多肽的分离效果, Waters CSH C18 柱、Waters HSS C18 柱均存在峰分离度差, 出峰不完全, 峰型不佳等情况, 而 BEH C18 柱能够很好的将 7 种多肽分离开来, 且各目标化合物的峰形良好, 能通过对液相条件的优化调整可实现这 7 种多肽的完全分离, 因此选择 Waters BEH C18 色谱柱作为适宜色谱柱。

3.1.2. 流动相比比例选择

多肽测定文献大多选择水、乙腈、乙酸水溶液、甲酸水溶液或三氟乙酸水溶液作为流动相。本实验为得到较好的分离度以及较快的分析时间, 试验了不同的流动相组合对 7 种肽混合标准溶液进行分离, 从实验结果来看, 当采用梯度洗脱程序: 0~1 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 98%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 2%;

1~4 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 98%~35%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 2%~65%; 4~5.5 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 35%~5%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 65%~95%; 5.5~7 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 5%~5%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 95%~95%; 7~7.1 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 5%~98%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 95%~2%; 7.1~10 min, 5.5~7 min, 0.1%三氟乙酸水溶液 98%~98%, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液 2%~2%时, 混合标准溶液中 7 种多肽能够被完全分离, 峰形良好, 且分离混标溶液所需的时间较短, 因此选择该程序为最优的梯度洗脱程序。在该条件下所得的谱图如图 1 所示。



1、肌肽: 1.834 min; 2、谷胱甘肽: 2.891 min;
3、铜肽: 1.915min; 4、棕榈酰三肽-5: 6.460 min;
5、棕榈酰五肽-4: 6.181 min; 6、棕榈酰四肽-7:
6.869min; 7、乙酰基六肽-8: 4.013 min。

Figure 1. Standard spectra of 7 small molecule peptides
图 1. 7 种小分子肽标准谱图

3.2. 前处理方法优化

在 25℃ 水浴中超声提取 30 min 的条件下, 考察了水、0.1% 三氟乙酸水溶液、30% 乙腈水溶液、三氟乙酸水溶液、水: 甲醇: 乙酸 = 6:3:1、水(1% NaCl): 甲醇: 乙酸 = 6:3:1 等 5 种不同提取溶剂对小分子肽的提取效率, 结果如表 3 所示。实验发现, 加入 1% NaCl 有助于化妆品中小分子肽的提取, 因此适宜提取条件为: 1% 氯化钠水溶液: 甲醇: 乙酸 = 6:3:1, 25℃ 下提取 30 min。

Table 3. Extraction efficiency under different extraction solvents

表 3. 不同提取溶剂下的提取效果

各目标化合物	不同提取溶剂下的提取效果/%				
	水	0.1% 三氟乙酸水溶液	30% 乙腈水溶液	水: 甲醇: 乙酸=6:3:1	水(1% NaCl): 甲醇: 乙酸 = 6:3:1
肌肽	68	82	90	94	98
谷胱甘肽	77	95	88	95	102
铜肽	75	98	70	93	105
棕榈酰三肽-5	80	78	66	85	92
棕榈酰五肽-4	77	75	75	90	94
棕榈酰四肽-7	87	88	78	97	100
乙酰基六肽-8	82	86	71	95	101

3.3. 方法学考察

3.3.1. 标准曲线和检出限

将配制好的一系列标准工作溶液, 在最优的仪器条件下进行分析, 得到 7 种多肽的标准曲线。再分别以 3 倍信噪比(S/N = 3)来计算检出限, 所得结果见表 4。结果表明, 7 种小分子肽在对应线性范围内线性良好, 各相关系数在 0.99 以上。

Table 4. Linear regression equations and detection limits for 7 peptides

表 4. 7 种多肽的线性回归方程和检出限

目标化合物	检出限/(μg/L)	线性范围/(μg/L)	线性回归方程	相关系数
肌肽	0.05	0.2~100	y = 19960x + 141	0.99976
谷胱甘肽	0.1	0.5~100	y = 2901x + 357	0.99614
铜肽	0.2	0.5~100	y = 3868x + 663	0.99744
棕榈酰三肽-5	0.05	0.2~100	y = 64549x + 101	0.99856
棕榈酰五肽-4	0.05	0.2~100	y = 26510x + 254	0.99987
棕榈酰四肽-7	0.05	0.2~100	y = 6350x + 230	0.99992
乙酰基六肽-8	0.05	0.2~100	y = 259x + 37	0.99724

3.3.2. 方法回收率及精密度

按试验方法对空白样品中加入 7 种小分子肽的标准溶液进行加标回收实验, 在优化条件下平行测定 6 次, 计算回收率与相对标准偏差, 结果见表 5。由表 5 可知, 7 种小分子肽的加标回收率在 82.7%~109.5% 之间, RSD 在 1.1%~6.7% 之间, 符合化妆品中 7 种小分子肽含量测定的要求。

Table 5. Recovery rate and precision of spiked blank samples
表 5. 空白样品的加标回收率和精密度表

种类	加标量/($\mu\text{g/L}$)	平均回收率/%	RSD/% (n = 6)
肌肽	0.2	96.4	3.2
	10	99.5	4.7
	100	94.0	3.7
谷胱甘肽	1	85.8	5.1
	10	91.1	6.0
	50	95.5	1.5
铜肽	0.5	88.7	3.0
	10	93.4	2.7
	100	95.4	2.4
棕榈酰三肽-5	0.2	86.0	5.4
	10	88.7	3.6
	100	101.8	2.7
棕榈酰五肽-4	0.2	101.5	2.6
	10	91.4	4.4
	100	92.0	1.2
棕榈酰四肽-7	0.2	88.0	5.2
	10	88.7	3.5
	100	94.7	1.0
乙酰基六肽-8	0.2	87.4	5.8
	10	90.9	3.9
	50	104.7	2.2

3.4. 实际样品测试

按建立的实验方法对从市场上采购的不同品牌的 20 批次化妆品进行分析, 结果表明, 有 5 批次化妆品中检出铜肽, 含量为 0.10%~0.8%, 有 6 批次化妆品中检出乙酰基六肽-8, 含量为 0.01%~0.014%, 5 批次检出肌肽, 含量为 0.1%~0.3%, 与标识相符, 4 批次未检出标识的小分子肽, 说明有概念性添加或者未实际添加的情况。

4. 结论

本文通过优化设备参数和样品前处理条件, 建立了采用液相色谱质谱法测定化妆品中 7 种小分子肽的定性定量方法, 将该方法应用于 20 批次实际样品的测试, 结果有 4 批次检测结果与标签标识不一致。所建立的方法涵盖种类多, 前处理简单快速, 方法选择性好, 灵敏度高, 精密度好, 可用于化妆品中 7 种小分子肽的测定, 有助于研发质量监控以及为政府监督提供技术依据。

基金项目

浙江省市场监督管理局科技计划项目(ZC2023047)。

参考文献

- [1] 廖燕燕, 孟娇龙, 姜雪峰. 化妆品中的肽化学[J]. 化学教育(中英文), 2022, 43(22): 1-11.
- [2] 涂平. 蓝铜胜肽的基础研究与临床皮肤护理应用[J]. 中国化妆品, 2024(3): 66-73.
- [3] 马月滢, 刘琦, 加萌, 王俊杰, 王伟, 赵华. 一款紧致化妆品的功效评价方法研究[J]. 日用化学工业(中英文), 2024, 54(1): 73-79.
- [4] 戴璐瑶, 朱仙娜, 陈玉燕, 等. 反相高效液相色谱与离子交换色谱测定牛肉中肌肽含量的对比研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(5): 805-812.
- [5] 周鑫悦, 张诗琪, 林露, 等. 高效毛细管电泳法同时分离检测六种地龙多肽[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(12): 2569-2575.
- [6] 杨菁, 吴国强, 白剑, 等. 邻苯二甲酰柱前衍生化高效液相色谱法测定组织中肌肽含量[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 258-260.
- [7] Macià, A., Motilva, M., Romero, M., Labrador, A., Domínguez, A. and Peiro, L. (2012) Improved Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of the Bioactive Dipeptides, Carnosine and Anserine: Application to Analysis in Chicken Broth. *Talanta*, **93**, 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.036>
- [8] Chirita, R., Chaimbault, P., Archambault, J., Robert, I. and Elfakir, C. (2009) Development of a LC-MS/MS Method to Monitor Palmitoyl Peptides Content in Anti-Wrinkle Cosmetics. *Analytica Chimica Acta*, **641**, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.015>
- [9] Giannakou, M., Varvaresou, A., Kiriazopoulos, E., Papageorgiou, S., Kavvalou, E., Tsihrivas, E., et al. (2018) Quantification of Oligopeptide-20 and Oligopeptide-24 in Cosmetic Creams Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Separation Science Plus*, **1**, 159-167. <https://doi.org/10.1002/sscp.201800016>
- [10] 黄颖, 蒋秀燕, 段建平, 等. 毛细管电泳同时测定肌肽、鹅肌肽和高肌肽[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(Z1): 111-112.
- [11] 王宝平, 胡清宇, 杨芳, 等. 高效毛细管电泳法测定肌肽含量方法的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(12): 1040-1041.
- [12] Gotti, R., Andrisano, V., Cavrini, V. and Bongini, A. (1994) Determination of Glutathione in Pharmaceuticals and Cosmetics by HPLC with UV and Fluorescence Detection. *Chromatographia*, **39**, 23-28. <https://doi.org/10.1007/bf02320453>
- [13] 毛善巧, 谢佳爱, 黄春青, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中乙酰基六肽-8 的含量[J]. 广东化工, 2019, 46(20): 110-112.
- [14] 陈意光, 谭建华, 王继才, 等. 液相色谱-串联质谱法测定护肤类化妆品中 5 种棕榈酰多肽[J]. 理化检验-化学分册, 2021, 57(2): 140-145.
- [15] 许勇, 韩晶, 潘晨, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中 L-肌肽、乙酰基四肽-5、谷胱甘肽和乙酰基六肽-8 的含量[J]. 上海预防医学, 2021, 33(8): 745-749.