

高效液相色谱法测定化妆品中三肽-1铜的含量

杨 铭, 王晨蕾, 胡 丹, 傅路阳, 吴智慧

浙江方圆检测集团股份有限公司, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年11月8日; 录用日期: 2022年12月21日; 发布日期: 2022年12月30日

摘 要

建立了高效液相色谱法测定化妆品中三肽-1铜含量的方法。分别对样品的前处理和色谱条件进行了优化, 发现水剂类化妆品无需加入破乳剂, 乳化类化妆品中需加入破乳剂才能将目标物质提取完全。方法学考察结果表明, 三肽-1铜含量在5~500 mg/L范围内线性良好, 相关系数可达0.9999, 其回收率为92.5%~99.6%之间, 相对标准偏差(RSD)在2.27%~3.25%之间, 检出限为10 mg/kg。实验结果证明, 该方法适于化妆品中三肽-1铜含量的测定。

关键词

三肽-1铜, 高效液相色谱法, 化妆品

Determination of Copper Tripeptide-1 in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography

Ming Yang, Chenlei Wang, Dan Hu, Luyang Fu, Zhihui Wu

Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou Zhejiang

Received: Nov. 8th, 2022; accepted: Dec. 21st, 2022; published: Dec. 30th, 2022

Abstract

A method for the determination of copper tripeptide-1 in cosmetics by HPLC was established. The pretreatment of samples and chromatographic conditions were optimized respectively. It was found that demulsifiers were not necessary for aqueous cosmetics, and demulsifiers were needed for emulsified cosmetics to extract the target substances completely. The results of methodology investigation showed that the copper content of tripeptide-1 was linear within the range of 5-500 mg/L, the correlation coefficient was 0.9999, the recovery was 92.5%~99.6%, the relative standard deviation (RSD) was 2.27%~3.25%, and the detection limit was 10 mg/kg. The experimental

results show that the method is suitable for the determination of copper tripeptide-1 in cosmetics.

Keywords

Copper Tripeptide-1, HPLC, Cosmetics

Copyright © 2022 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

小分子多肽类添加物以安全、稳定、易吸收、效果好等优点在化妆品行业扮演着越来越重要的角色，含有肽类的功能型化妆品也日渐走俏。能在化妆品中应用的肽多数为二肽至十肽之间的小分子肽[1]，其中自 1973 年 Pickart 成功地从人类血清中分离得到三肽-1 铜，并发现该成分能让老龄肝脏组织恢复年轻态，重获年轻组织的蛋白质合成能力之后，关于三肽-1 铜(三肽-1 铜)的研究就一发不可收拾[2]。三肽-1 铜的多肽部分是一个三肽结构(GHK)，其氨基酸序列为甘氨酸-L-组氨酸-L-赖氨酸，人们进一步发现该三肽结构与铜有很强的亲和力，很容易形成配合物 GHK-Cu 结构式如图 1 所示，并且相比单一的 GHK 结构，GHK-Cu 复合物具有更好的生物活性，能加速伤口愈合和收缩、改善皮肤移植效果、还具有抗炎、抗衰、提亮等多种作用，因此被广泛的应用到化妆品中。

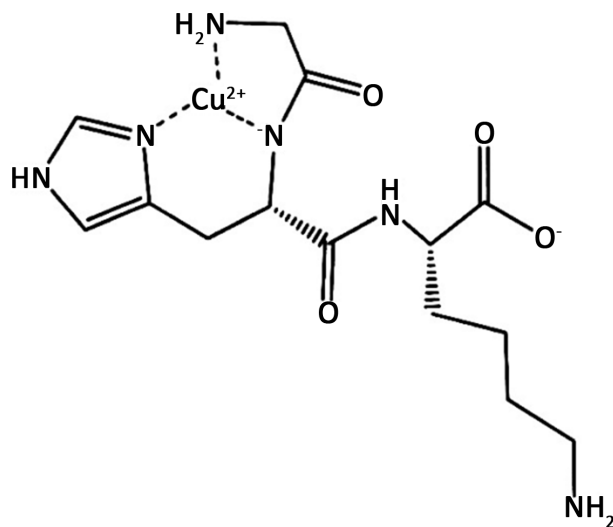


Figure 1. Tripeptide-1 copper structural formula

图 1. 三肽-1 铜结构式

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，化妆品中小分子肽的检测方法也偶有报道，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、分光光度法等[3]-[12]，但鲜有文献报道化妆品中三肽-1 铜的含量的测定。为制造有竞争力的产品，化妆品企业必须严格考量三肽-1 铜的使用和添加量。另一方面，从保障消费者权益和安全健康方面考虑，也需要确定宣称添加了三肽-1 铜的中的三肽-1 铜含量。因此建立科学、高效的化妆品中的三肽-1 铜测定方法已经迫在眉睫。本工作通过优化色谱条件和实际样品前处理条件，建立了化

妆品中三肽-1 铜测定方法，可为企业证明和政府监督提供技术依据。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

1260 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 5500 PLUS 三重四极杆串联质谱仪(AB 公司); 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 3~18 K 高速冷冻离心机(sigma), Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

三肽-1 铜为标准品, 甲醇、四氢呋喃均为色谱纯; 三氟乙酸为色谱纯, 氯化钠为分析纯; 实验用水为超纯水。

2.2. 标准溶液配制

称取三肽-1 铜标准物质 0.01 g (精确到 0.0001 g)至 10 mL 容量瓶中, 用 0.1%三氟乙酸水溶液(3.3)定容到刻度, 制成浓度为 1000 mg/L 标准储备液。分别移取 0.05 mL、0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1%三氟乙酸水溶液(3.3)定容配制成 5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、500 mg/L 的标准工作溶液, 待用。

2.3. 样品前处理

准确称取样品 0.2 g, 精确至 0.001 g, 置于具塞比色管中, 用含 1% NaCl 的 0.1%三氟乙酸水溶液(3.4)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 μ m 滤膜过滤, 滤液作为待测溶液。

2.4. 色谱条件

色谱柱: C18 柱(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m);

检测波长: 220 nm;

进样量: 5 μ L;

柱温: 25 $^{\circ}$ C;

流速: 1.0 mL/min。

流动相: 梯度洗脱见表 1: A: 水, B: 甲醇, C: 0.1%三氟乙酸水溶液。

Table 1. Gradient elution procedure

表 1. 梯度洗脱程序

时间 min	A%	B%	C%
0	0	5	95
10	0	5	95
10.01	90	10	0
15	90	10	0
24	0	100	0
34	0	100	0
34.01	95	5	0
35	95	5	0
35.01	0	5	95
45	0	5	95

3. 结果与讨论

3.1. 前处理优化

鉴于三肽-1 铜的水溶性，试验首先比较了采用 100% 水提取和 0.1% 三氟乙酸水溶液提取目标物质。发现两者之间的差别就是用 100% 水提取保留时间会发生漂移，0.1% 三氟乙酸水溶液则适合作为提取剂，但仅适用于水剂类化妆品。如果是乳化类化妆品，采用 0.1% 三氟乙酸水溶液测定结果与实际添加结果相差较大。因此，实验选择氯化钠作为破乳剂加入到提取溶剂中，发现在 0.1% 三氟乙酸水溶液中添加 1% NaCl 作为提取剂时实测值与理论添加结果一致。

3.2. 色谱柱及柱温的选择

C18 和 C8 色谱柱是实验室常用的色谱柱。本实验中选择 C18 和 C8 色谱柱，规格均为 (250 mm × 46 mm, 5 μm)，结果表明，三肽-1 铜在 C18 柱较 C8 柱峰型尖锐，响应高。柱温在室温范围内，实验结果无明显差异，设置恒定柱温 25℃。

3.3. 流动相种类的选择

实验室尝试了采用 a (水 + 甲醇) 和 b (0.1% 三氟乙酸水溶液 + 甲醇) 作为流动相，流动相比例为甲醇 95%，其余 5% 水。实验结果发现，采用 b (0.1% 三氟乙酸水溶液 + 甲醇) 峰型效果明显好于 a (水 + 甲醇)。推测三氟乙酸可以与肽类物质上的正电荷及极性基团相结合以减少极性保留，并且以同样的方式，屏蔽了固定相上残留的极性表面。可通过在流动相中添加三氟乙酸来改善峰形、克服峰展宽和拖尾问题。因此实验选用 0.1% 三氟乙酸水溶液 + 甲醇作为流动相。但在实验中发现，保持在该流动相比例下目标物质的保留时间会发生不断的漂移，推测三氟乙酸在柱子表面形成的平衡可能被铜离子破坏。经过多次试验发现，1.4 中的色谱条件可以很好的保持保留时间不变。标准品三肽-1 铜色谱图如图 2 所示。

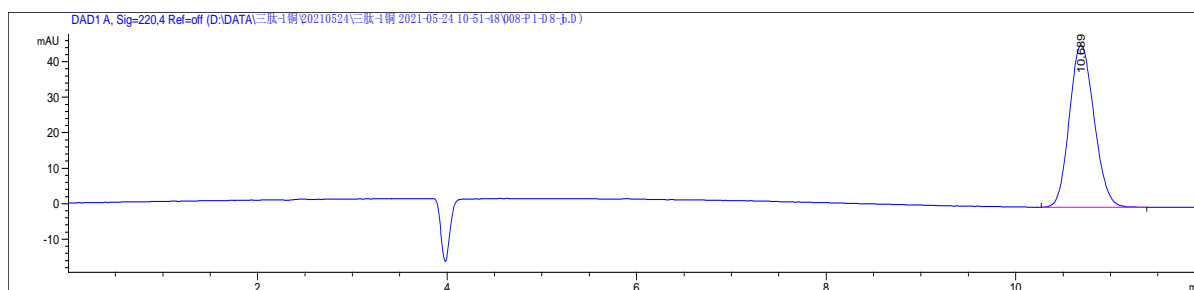


Figure 2. Chromatogram of copper tripeptide-1 (10.689 min)

图 2. 三肽-1 铜色谱图(10.689 min)

3.4. 线性关系和检出限

分别移取三肽-1 铜标准储备溶液(1000 mg/L)分别移取 0.05 mL、0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中，用 0.1% 三氟乙酸水溶液(3.3)定容，配制成 5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、500 mg/L 的标准工作溶液按照 1.4 的色谱条件进行测定，以峰面积对溶液浓度进行线性回归，得回归方程为： $y = 3.10638x - 14.00470$ ， $R = 0.9999$ ，表明三肽-1 铜在浓度 5~500 mg/L 范围内线性良好。以信噪比 $S/N = 3$ 计算，得到的检出限为 10 mg/kg。

3.5. 回收率和重复性

为验证该方法的可靠性和准确性，进行了加标回收实验，加入 5, 50, 500 mg/L 3 个不同浓度的标准

溶液, 每个浓度平行测定 6 次, 加标回收率在 92.5%~99.6%之间(如表 2 所示), 相对标准偏差(RSD)在 2.27%~3.25%之间。

Table 2. Recovery rate of spiking
表 2. 加标回收率

项目	样品浓度(mg/kg)	理论加标浓度(mg/L)	实际检出浓度(mg/L)	回收率, %
三肽-1 铜	N.D	5.0	4.6234	92.5
	N.D	50.0	47.6385	95.3
	N.D	500.0	498.0742	99.6

3.6. 样品的测定

生产工艺上三肽-1 铜的推荐添加量一般在 0.05%~0.2%之间, 按照上述方法, 实验室选择市场上标称含有三肽-1 铜的产品, 包括面膜类、乳液、膏霜类共计 12 款, 分别按照建立的方法对这些产品进行检测。实验发现, 1 款产品未检出三肽-1 铜, 4 款产品含量在 0.05%以下, 7 款产品含量在 0.05%~0.2%之间。以上情况说明, 化妆品监督检查一般都注重在非法添加、原料带入等有毒有害物质上, 为了让企业合规生产, 规范产品宣称, 保护消费者权益, 功效成分也需要引起足够的关注。

4. 结论

三肽-1 铜在化妆品行业有着广阔的应用前景, 但由于缺乏有效的标准检验方法, 其使用未得到有效的监管, 不利于行业良性发展。本文通过优化样品前处理方式及色谱参数, 建立了高效液相色谱法测定化妆品中三肽-1 铜含量的方法, 该方法重现性好, 灵敏度高, 应用性强, 操作简便、高效, 可为企业生产和政府监督提供技术依据。

基金项目

浙江方圆检测集团股份有限公司自立科技项目(ZL202208)。

参考文献

- [1] 吴可克. 功能性化妆品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 张风龙, 高恩, 杨小琳, 等. GHK 三肽的最新研究进展[J]. 科技创新与应用, 2018(6): 1-6.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [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.J., Romero, M.P., *et al.* (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.I., Chaimbault, P., Archambault, J.C., *et al.* (2009) Development of a LC-MS/MS Method to Monitor Palmitoyl Peptides Content in Antiwrinkle Cosmetics. *Analytica Chimica Acta*, **641**, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.015>
- [9] Giannakou, M., Varvaresou, A., Kiriazopoulos, 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] Gotti, R., Andrisano, V., Cavrini, V., *et al.* (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>
- [11] 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.
- [12] 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.