

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 014—2023

化妆品中肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8 的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of carnosine, syn-ake acetate, palmitoyl tripeptide-5, acetyl octapeptide-3, and acetyl hexapeptide-8 in cosmetics—High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省化妆品学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品中肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8 的测定 高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了化妆品中肌肽、类蛇毒肽（二肽二氨基丁酰苄基酰胺二乙酸盐）、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8的检测方法。

本文件适用于化妆品中（原料及成品）以上肽类原料的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8经一定的前处理，离心过滤后，进行高效液相色谱质谱串联方法测定，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 水：应为蒸馏水或达到 GB/T 6682 一级水要求。

5.2 甲酸：色谱纯试剂。

5.3 甲酸铵：色谱纯试剂。

5.4 甲醇：色谱纯试剂。

5.5 乙酸：色谱纯试剂。

5.6 5mmol/L 甲酸铵溶液（0.1%甲酸）：准确称取 63.06g 甲酸铵（5.3），加水溶解定容至 1L，得到 1mol/L 甲酸铵溶液。取 5mL 1mol/L 甲酸铵溶液加入 1mL 甲酸（5.2）加水定容至 1L，得到 5mmol/L 甲酸铵溶液。

5.7 标准品：肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8：纯度 \geq 98.0%。化学名称、分子式、相对分子质量和 CAS 编号见附录 A，标准溶液色谱图见附录 B。

5.8 90%甲醇水（0.1mol/L 乙酸铵）：准确称取 77.082g 乙酸铵，加水溶解定容至 1L，得到 1mol/L 乙酸铵溶液。取 100mL 1mol/L 乙酸铵加入甲醇定容至 1L。

5.9 标准储备液：准确称取适量标准品肌肽、类蛇毒肽、乙酰基六肽-8、乙酰基八肽-3、棕榈酰三肽-5（5.7）用稀释溶液（5.8）溶解分别配置成浓度为 1000mg/L 的标准储备液，于-18℃下保存，有效期 1 个月。

5.10 混合标准储备液：分别移取 1mL 标准储备液（5.9）至 100mL 容量瓶中，用稀释溶液（5.8）定容至刻度，配制成浓度为 10mg/L 的混合标准储备液，于-18℃下保存，有效期 1 周。

5.11 混合标准工作液：将混合标准储备液用稀释溶液（5.7）稀释为混合标准工作液（肌肽、类蛇毒肽、乙酰基六肽-8、棕榈酰三肽-5 为 1.00 μ g/L、2.00 μ g/L、5.00 μ g/L、10.0 μ g/L、20.0 μ g/L、40.0

$\mu\text{g/L}$ 、 $100\ \mu\text{g/L}$ 、 $200\ \mu\text{g/L}$ ，乙酰基八肽-3 为 $5.00\ \mu\text{g/L}$ 、 $10.0\ \mu\text{g/L}$ 、 $25.0\ \mu\text{g/L}$ 、 $50.0\ \mu\text{g/L}$ 、 $100\ \mu\text{g/L}$ 、 $200\ \mu\text{g/L}$ 、 $500\ \mu\text{g/L}$ 、 $1000\ \mu\text{g/L}$ ），待用。

5.12 微孔滤膜： $0.22\ \mu\text{m}$ ，有机相。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪串联四极杆质谱联用仪（ESI 源）。

6.2 超声波清洗仪。

6.3 台式高速冷冻离心机： $>5000\text{r/min}$ 。

6.4 分析天平，感量为 0.0001g 。

6.5 涡旋混合器。

7 试验步骤

7.1 试样处理

7.1.1 水剂类样品

称取 0.5g 样品（精确至 0.0001g ）置于 10mL 具塞试管中，准确加入 5mL 水并超声波提取 20min ，然后加入水并定容至 10mL ，涡旋混匀 1min ，移取 $1\text{mL}\sim 2\text{mL}$ 于 2mL 离心管中， 12000r/min 离心 10min 后经微孔滤膜（5.12）转入进样瓶中待测。

7.1.2 膏霜和粉基类样品

称取 0.5g 样品（精确至 0.0001g ）置于 10mL 具塞试管中，加入含有 0.1mol/L 90% 甲醇水溶液（5.9），超声波提取 20min ，并定容至 10mL ，涡旋混匀 1min ，移取 $1\text{mL}\sim 2\text{mL}$ 于 2mL 离心管中， 12000r/min 离心 10min 后经微孔滤膜（5.12）转入进样瓶中待测。

7.1.3 原料类样品

称取 20mg 样品（精确至 0.0001g ）置于 10mL 具塞试管中，准确加入 10mL 甲醇并定容，涡旋混匀 1min ，经微孔滤膜（5.12）转入进样瓶中待测。

7.2 色谱条件分析测定

以下分析条件可供参考，色谱淋洗梯度见表 1，采用其他条件应验证其适用性。

- 色谱柱： C18 （ $2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$ ， $2.5\ \mu\text{m}$ ）；
- 流动相 A： 5mmol 甲酸铵溶液（ 0.1% 甲酸）；
- 流动相 B：甲醇（ 0.1% 甲酸）；
- 流速： 0.4mL/min ；
- 柱温： 40°C ；
- 进样量： $5\ \mu\text{L}$ ；
- 进样量： $10\ \mu\text{L}$ 。

表 1 色谱淋洗梯度

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
0.0	97	3	0.4
1.2	97	3	0.4
3.0	1	99	0.4
5.0	1	99	0.4
5.1	97	3	0.4
7	97	3	0.4

7.2 质谱条件

以下分析条件可供参考，质谱条件见表2，采用其他条件应验证其适用性。

- 离子喷雾电压 (IS)：5000V；
- 喷雾气 (GS1)：65psi；
- 辅助加热气 (GS2)：50psi；
- 加热温度 (TEM)：650℃；
- 气帘气 (CUR)：40psi；
- 碰撞气 (CAD)：Medium；
- 检测方式：多反应检测模式 (MRM)。

表2 质谱条件

化合物	去簇电压 DP (V)	定量离子对	碰撞能量 CE (V)	定性离子对	碰撞能 CE (V)
肌肽	65	227.1/210.2	17	227.1/110.0	33
类蛇毒肽	90	376.2/359.2	26	376.2/269.2	21
乙酰基六肽-8	105	445.2/102.0	56	445.2/83.9	72
棕榈酰三肽-5	75	306.8/84.1	48	306.8/129.2	22
乙酰基八肽-3	120	538.3/102.0	39	538.3/84.0	82

7.3 标准工作曲线制作

采用液相色谱分析条件 (7.2和7.3) 对系列标准工作溶液 (5.11) 进行测定，纵坐标为目标化合物峰面积，横坐标为目标化合物浓度，建立标准工作曲线。

每进行20次样品测定后，应加入一个中等浓度的工作标准溶液，如果测得的值与原值相差超过10%，则应重新进行整个标准工作曲线的制作。

7.4 平行试验

按上述步骤，对同一试样进行两次平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外，均按上述分析步骤进行。

8 结果计算与表述

根据式 (1) 计算出样品中肽类的含量 (%)。

$$X = \frac{C \times V}{10^7 \times m} \times 100 \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——样品中目标物的质量分数，%；

C ——从标准曲线中计算出的目标物的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

V ——样品定容体积， mL ；

M ——样品的质量， g ；

f ——稀释倍数。

9 回收率、检出限和定量限

本方法回收率、检出限和定量限见表3。

表 3 方法的回收率、检出限和定量限

化合物名称	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
肌肤	0.5	1.5
类蛇毒肽	1	5
棕榈酰三肽-5	0.5	1.5
乙酰基八肽-3	5	15
乙酰基六肽-8	0.5	1.5

回收率和精密度：在添加浓度为0.1μg/g~10μg/g的范围内，回收率在80%~110%之间，相对标准偏差小于10%。

附录 A

(资料性)

化学名称、分子式、结构式、CAS 编号和相对分子质量

化学名称、分子式、结构式、CAS 编号和相对分子质量见表 A. 1。

表 A. 1 化学名称、分子式、结构式、CAS 编号和相对分子质量

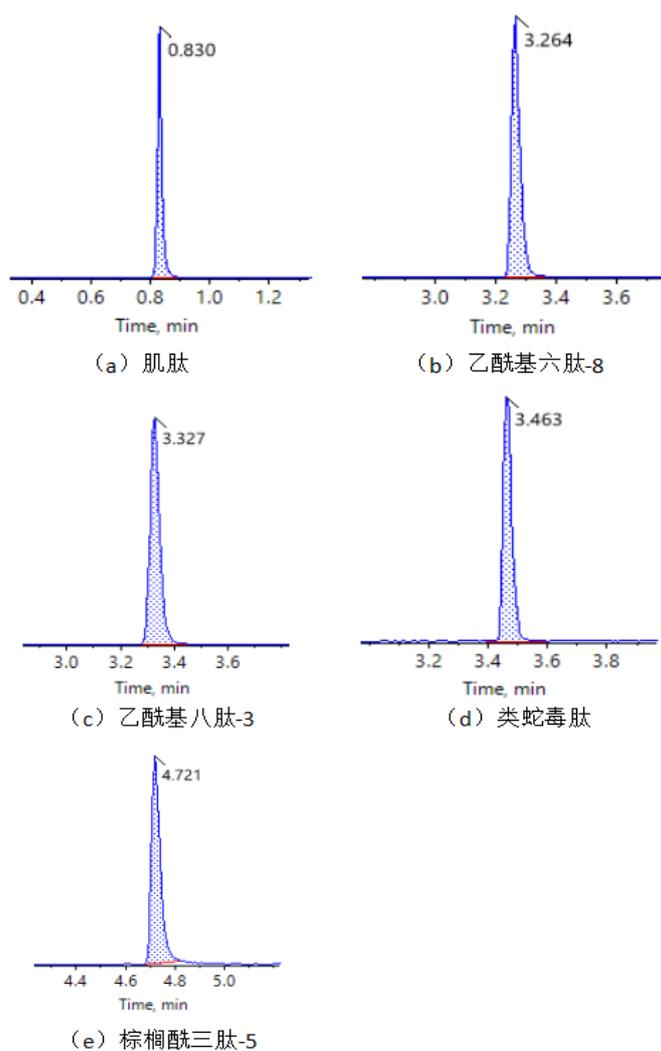
名称	化学名称	分子式	相对分子质量	CAS 编号
肌肽	N-beta-丙氨酸-L-组氨酸	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	226. 23	305-84-0
类蛇毒肽 (二肽二氨基丁酰苄基酰胺二乙酸盐)	二肽二氨基丁酰苄基酰胺二乙酸盐 (2S)-BETA-丙氨酸-L-脯氨酸- 2, 4-二氨基-N-(苄甲基)丁酰胺乙 酸盐	C ₂₃ H ₃₇ N ₅ O ₇	495. 57	823202-99-9
棕榈酰三肽-5	(S)-6-Amino-2-((S)-2-((S)-6-amino-2-palmitamidohexanamido)-3-methylbutanamido)hexanoic acid compound with 2, 2, 2-trifluoroacetic acid (1:2) Palmitoyl Tripeptide-5	C ₃₇ H ₆₇ F ₆ N ₅ O ₉	839. 95	623172-56-5
乙酰基八肽-3	N-Acetyl-L-alpha-glutamyl-L-alpha-glutamyl-L-methionyl-L-glutamyl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanyl-L-alpha-asparagine	C ₄₃ H ₇₄ N ₁₆ O ₁₈ S	1135. 21	868844-74-0
乙酰基六肽-8	(4S)-4-acetamido-5-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-5-amino-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-amino-5-(diaminomethylideneamino)-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-(diaminomethylideneamino)-1-oxopentan-2-yl]amino]-1, 5-dioxopentan-2-yl]amino]-4-methylsulfanyl-1-oxobutan-2-yl]amino]-4-carboxy-1-oxobutan-2-yl]amino]-5-oxopentanoic acid	C ₃₄ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₂ S	888. 99	616204-22-9

附录 B

(资料性)

肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8 标准溶液色谱图

肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8 标准溶液色谱图见图 B.1。



图B.1 肌肽、类蛇毒肽、棕榈酰三肽-5、乙酰基八肽-3、乙酰基六肽-8 标准溶液色谱图

参 考 文 献

- [1] GB/T 30926-2014 化妆品中7种维生素C衍生物的测定 高效液相色谱-串联质谱法.
 - [2] GB/T 37625-2019 化妆品检验规则.
 - [3] GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）.
 - [4] T/SDAS 397-2022 化妆品原料 三肽-1铜.
-