



Realizacja zadań projektu pn.

„Innowacyjne dermokosmetyki z układami peptydowymi i niejonowymi cząsteczkami metali szlachetnych dla ograniczenia reaktywności skórnej osób dorosłych”

Ekstrakcja i oznaczanie bakteriocyn w preparatach kosmetycznych

Optymalizacja procedury wytwarzania kosmetyków do linii technologicznej będącej na wyposażeniu firmy

Marcin Wasylewski¹, Dariusz Dziga²

1. Prof. Cosmetics ul Sierakowska 29, 05-092 Łomianki, Poland
2. Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 31-007 Kraków, Poland

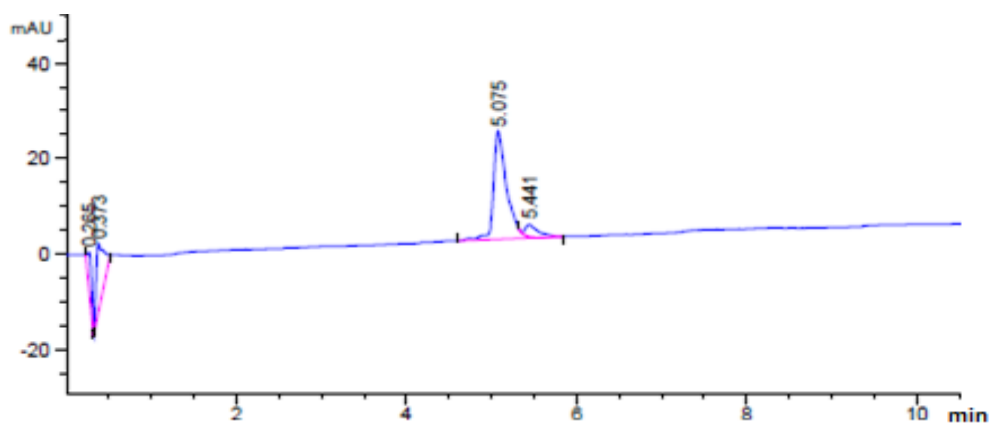
Peptydy kosmeceutyczne można podzielić według ich aktywności jako cząsteczki sygnałowe, nośnikowe oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP). AMP są obfite w różne formy życia, od bakterii po rośliny i zwierzęta. Lantibiotyki to AMP zawierające aminokwas lantioninę. Bakteriocyny działają przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (działającym na peptydoglikan), ale wykazują niską aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, pleśni i drożdży. Bakterie Gram-ujemne są odporne ze względu na błony zewnętrzne, jednak dodanie czynnika chelatującego, takiego jak EDTA, może destabilizować błony, czyniąc komórki bardziej wrażliwymi na nizynę. Nizyna, produkowana przez *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, atakuje ściany komórkowe i powoduje lizę docelowych mikroorganizmów. Peptyd ten jest stosowany do zapobiegania rozwojowi patogennych bakterii w produktach spożywczych. Szczepy wytwarzające nizynę mogą syntetyzować tę bakteriocynę in situ i wykonywać inne procesy, takie jak fermentacja, ale stosuje się różne podejścia. To sprawia, że konieczne jest uzyskanie wiarygodnych sposobów oczyszczania i analizy bakteriocyn. Ponieważ kosmetyki, w tym kremy, podkłady, pomadki do ust, proszki, płyny, oleje, mleczka i wody są złożonymi matrycami i różnią się składem i właściwościami, do ich przetwarzania zazwyczaj wymagane są różne zabiegi z użyciem próbek. W tym celu wykorzystuje się techniki ekstrakcji. Najbardziej odpowiednią techniką chromatograficzną w przypadku peptydów w kosmetykach jest RP HPLC. Etap ekstrakcji może się różnić w zależności od rodzaju materii i analitu, ale najczęściej obejmuje ekstrakcję w fazie stałej (SPE).

Poniżej prezentowane są wyniki badań prowadzących do opracowania metody oznaczenia nizyny w produktach kosmetycznych z zastosowaniem technik ekstrakcyjnych (ekstrakcja do fazy stałej: SPE - ang. solid-phase extraction) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Techniki ekstrakcyjne miały umożliwić przygotowanie próbki poprzez wyodrębnienie wybranych składników a w tym peptydów z produktu kosmetycznego do roztworu wodno-organicznego (mieszanki wody, acetonitrylu i/lub metanolu) oraz zagęszczenie poszukiwanego analitu.

Technika HPLC była używana wcześniej w analizach próbek nizyny a badania były realizowane z użyciem aparatu Agilent 1220 Infinity z pompą gradientową i zintegrowanym urządzeniem do odgazowania oraz automatycznym podajnikiem próbek. Próbki rozdzielono stosując kolumnę Pursuit C18 RP-18 i fazy: 0,05% wody TFA (rozpuszczalnik A) i 0,05% TFA w ACN (rozpuszczalnik B). Analizy przeprowadzono stosując następujący gradient liniowego: 0-4 min 20% B, 11 min 80% B, 11,5 -13,5 min 100%B 14-16 min 20% B. Stosowano nastrojek próbki o objętości 5 ul.

W pierwszej kolejności analizowano próbkę o najwyższej czystości za pomocą techniki HPLC (próbka nr 1143)



Ryc 1 Chromatogram HPLC nizyny

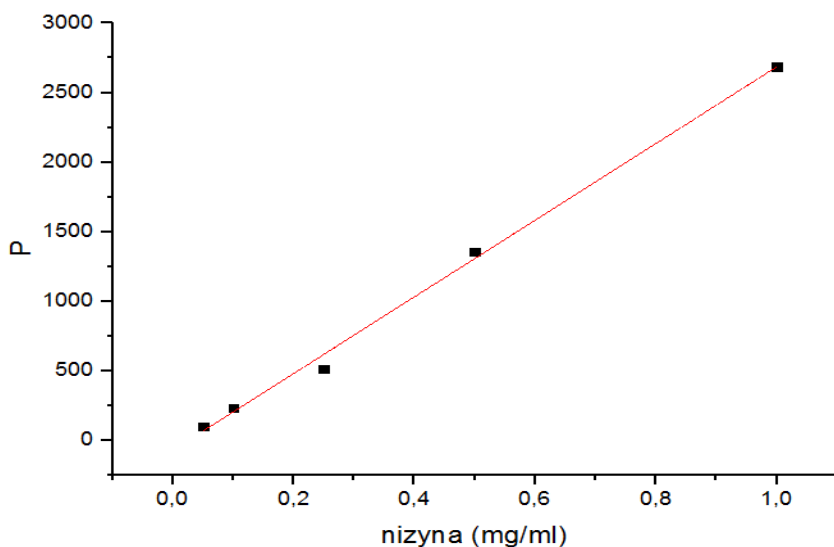
Zaobserwowano pik o czasie elucji 5,1 minuty odpowiadający nizynie. W celu sprawdzenia powtarzalności metody i zakresu stosowalności sporządzono serię rozcieńczeń w zakresie 0,05 mg/ml do 1 mg/ml

Tak przygotowane roztwory rozdzielano za pomocą techniki HPLC i pola pików o czasie retencji 5,1 min wykreślono w funkcji stężenia nizyny

Wyniki zebrano w tabeli:

Nizyna (mg/ml)	Pole (mAu*min)
1	2684
0,5	1357
0,25	512
0,1	233
0,05	99

i na wykresie:



Ryc. 2 Krzywa kalibracyjna oznaczenia HPLC nizyny

Uzyskane dopasowanie liniowe charakteryzuje się wysoką wartością parametru R^2 wynoszącym 0,998 co pozwala uznać stosowalność tej metody oznaczania nizyny.

Analogicznie analizowano próbkę nizyny („brzeczke”) w ten sam sposób uzyskując podobne wyniki zarówno w aspekcie jakościowym (ten sam czas retencji) jak i ilościowym (pola wskazujące na zawartość nizyny w brzeczce na poziomie 2% tak jak oznaczono we wcześniejszych badaniach). Widoczna jest obecność innych składników co wynika z niższej czystości próbki. W celu wstępnego oczyszczenia próbki zastosowano technikę ekstrakcji w fazie stałej (SPE) w sposób opisany poniżej. Roztwór „brzeczki” o stężeniu 0,57% w 0,01% TFA w wodzie i pH=3,0 został poddany ekstrakcji z fazy stałej z zastosowaniem złoża oktadecylowego BAKERBOND™ Octadecyl (C18) firmy J.T Baker o masie 1g. Roztwór „brzeczki” był nakładany na kolumnę SPE, płukany 0,01% TFA w wodzie a następnie kolumnę wmywano metanolem o objętości 1 ml. Zebrany wyciek metanolowy suszono pod strumieniem suchego azotu w temperaturze 60°C do a następnie rozpuszczano w mieszaninie wody i acetonitrylu w proporcji 2:8 zawierającego 0,05% TFA o objętości 50 ul. Analizowano wyciek zebrany w trakcie:

- 1) nakładania brzeczki na kolumnę SPE; (przebiecie)
- 2) odmywania kolumny SPE wodą z 0,01% TFA; (płukanie)
- 3) odmywania metanolem (elucja)

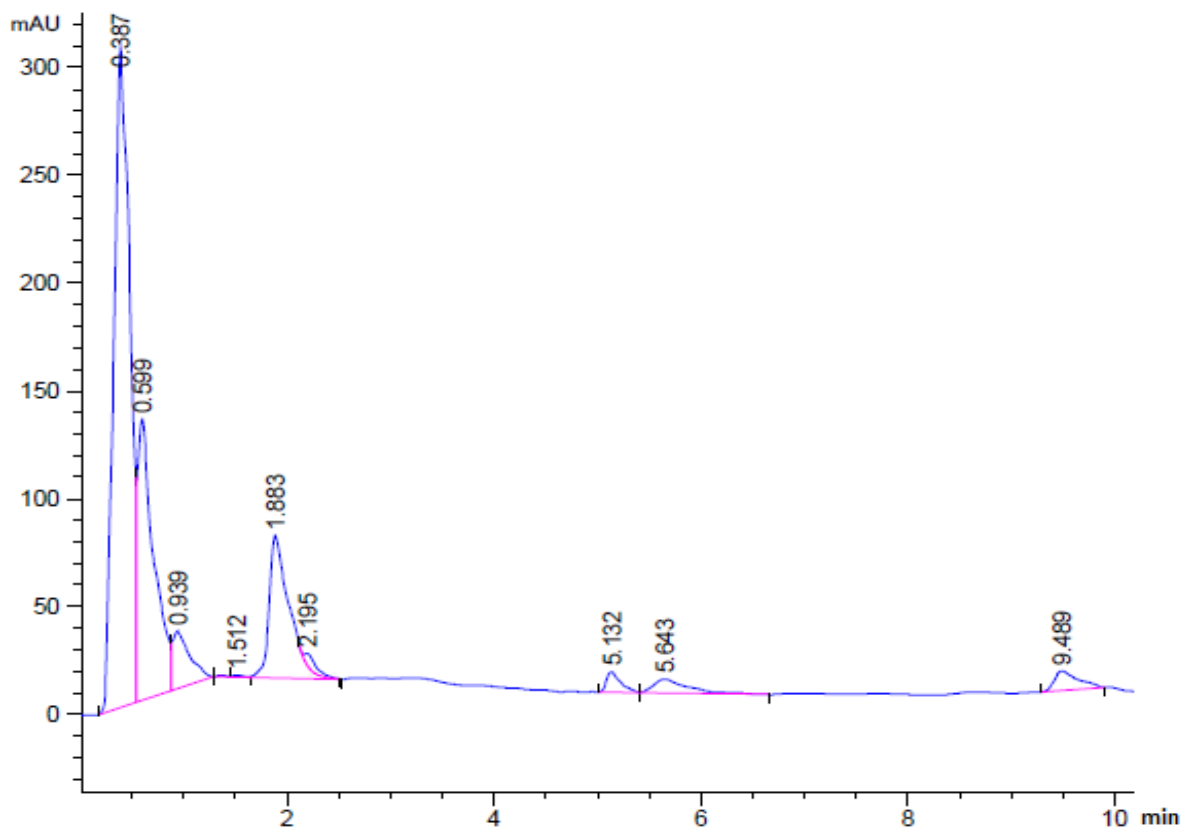
Dla próbek 1 i 2 nie zaobserwowano obecności nizyny co oznacza że nizyna zgodnie z przewidywaniami wiąże się do złoża oktadecylowego a nizyna została zaobserwowana w próbce 3 to znaczy że może być wymyta ze złoża za pomocą metanolu.

Tę samą procedurę z użyciem SPE zastosowano względem dwóch produktów kosmetycznych: emulsji (produkt A) i toniku (produkt B).

W pierwszej kolejności przygotowano próbki kosmetyku w następujący sposób: 200 mg produktu kosmetycznego zmieszano z 50 ml wody zawierającej 0,01% TFA. Próbkę wirowano przez 3 minuty przy 5000 g, a następnie zanurzono w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut. Zawiesinę przesączono stosując filtr Whatman GF / C 1,2 μ m. Tak otrzymany roztwór rozdzielano za pomocą techniki SPE w sposób opisany powyżej a próbki po zagęszczeniu analizowano za pomocą techniki HPLC.

Próbki z frakcji przebiecia i płukania nie zawierały nizyny, ale zaobserwowano je we frakcji elucji.

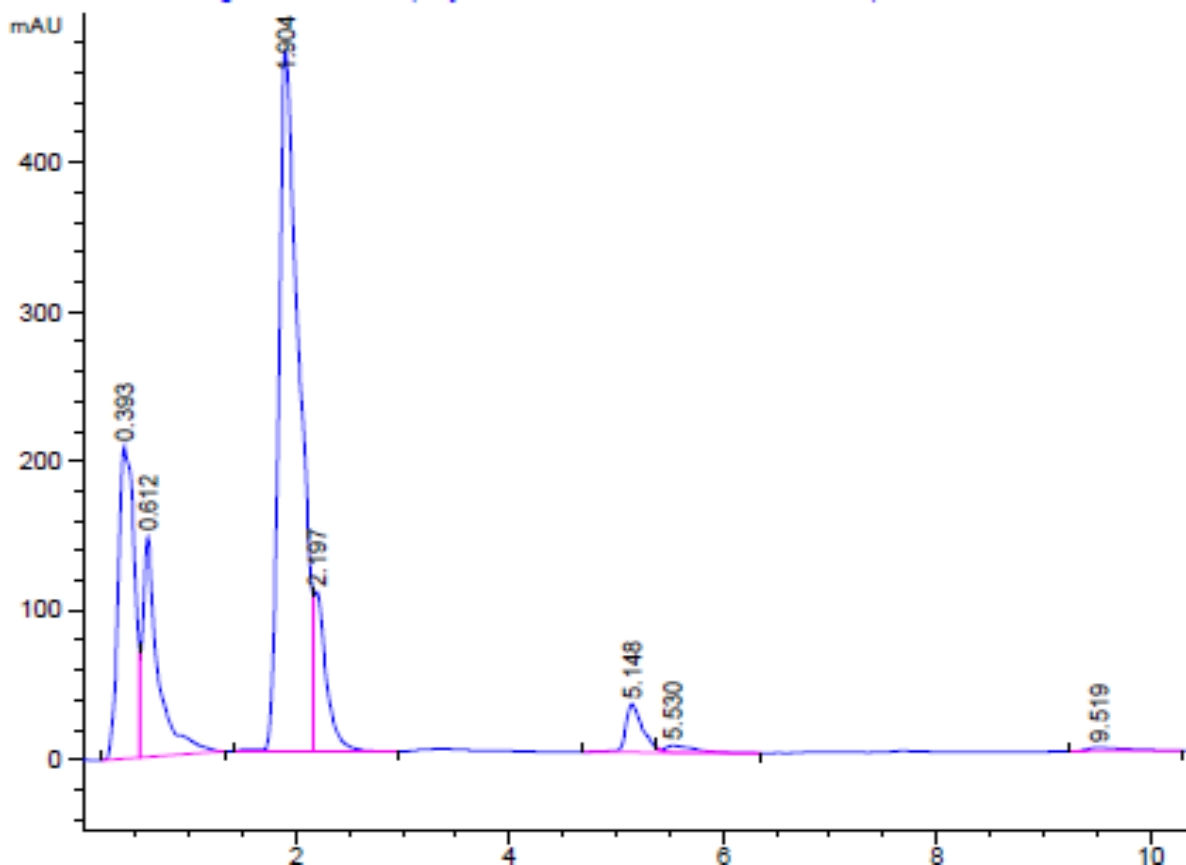
Typowy chromatogram zatężonej frakcji wmytej produktu A pokazano na ryc. 3



Ryc 3 Chromatogram HPLC próbki A

Na ryc. 3. można zaobserwować szereg pików chromatograficznych przy czasie elucji do ok. 2,2 minuty. Po tej grupie pików następuje pik przy 5,1 min odpowiadający nizinie i piki przy 5,6 i 9,5 minuty. Pik nizinie jest oddzielony od innych pików i może być analizowany zarówno jakościowo, jak i ilościowo.

Ta sama procedura została zastosowana do produktu B.



Ryc 4 Chromatogram HPLC próbki B

Chromatogram produktu kosmetycznego B przedstawiony na ryc. 4 wykazuje podobny profil do produktu A, jednak na ryc. 4 pik nizyny ma większy względny obszar. Ponieważ produkt B jest tonikiem, ma mniejszą gęstość i zawiera mniej innych substancji, które można zaobserwować na chromatogramie w porównaniu z produktem A, który jest balsamem.

Proponowana metoda jest odpowiednia do oznaczania nizyny w produktach kosmetycznych. Metoda chromatograficzna wykazuje liniowość w konfrontacji nizyny w zakresie od 0,01 do 1 mg ml⁻¹. Dzięki zastosowaniu metody ekstrakcji w fazie stałej (SPE) nadaje się do różnych produktów kosmetycznych.

English version:

Extraction and determination of bacteriocins in cosmetic formulations

Abstract

Cosmetic products are today increasingly complex and contain a growing number of ingredients. Among them peptides of various functions are used. This necessitates the creation of new analytical methodologies for the determination of such substances. The complexity of cosmetics impedes the extraction of the analyte from the matrix of cosmetic product. For this reason analytical chromatographic techniques should be preceded by an extraction technique. In this publication an analysis method of antimicrobial peptide nisin present in two cosmetic products has been described. The first step was solid phase extraction with the use of C18 RP. The obtained samples were analysed using RP HPLC. This method allows to determine nisin in cosmetic products.

1. Introduction

Today the market of cosmetic products is an important and fast growing sector of the global economy (1) and this development not only refers to its value but also to new types of introduced cosmetic products and the fact that cosmetics are becoming increasingly more complex. An important group of new cosmetic products are cosmeceuticals (2) which are cosmetic products that contain compounds exhibiting biologic activity. Active substances may belong to different groups of chemical substances and among them peptides play an important and diverse role. In the year 2009, about 25 peptides were found among skin care products in the USA while many more were being developed (3). Peptides take part in many natural processes occurring in the skin including cell proliferation, cell migration, inflammation, angiogenesis, melanogenesis, protein synthesis and regulation and signal transduction. They bind with molecular targets as active substances or as mimetics of proteins. The cosmeceutical peptides may be divided according to their activity as signal, neurotransmitter-affecting and carrier molecules (4), however other possible categories of active peptides have been developed, for example antimicrobial peptides (AMP). AMP are abundant in various forms of life from bacteria to plants and animals (5). Bacterial AMPs known as bacteriocins are classified into two categories: lantibiotics and non-lantibiotics. Lantibiotics are AMPs containing a non-natural amino acid lanthionine. Nisin, a lantibiotic, was one of the first AMPs isolated and characterized from *Lactococcus lactis* in 1947. These ribosomally

synthesized peptides generally target the cell wall precursor lipid II during their antimicrobial mechanism and exert their inhibitory activity by inhibition of cell wall biosynthesis, or formation of pore in the target membrane (6). Bacteriocins act against Gram-positive bacteria (operating in the peptidoglycan walls), but exhibit low activity against Gram-negative bacteria, moulds and yeasts. Gram-negative bacteria are resistant because of their outer membranes, however an addition of a chelating agent such as EDTA, may destabilize membranes, making cells more sensitive to nisin. Nisin consists of 34 amino acid residues and contains unusual amino acids including lanthionine (Lan), methyllanthionine (MeLan), didehydroalanine (Dha), and didehydroaminobutyric acid (Dhb) but no aromatic amino acids. In nisin structure, five thioether bridges may be observed (7). Nisin, produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, attacks cell walls and causes lysis of the target microorganisms. This peptide is used for the prevention of the growth of pathogenic bacterial in food products. Nisin producing strains can synthesise this bacteriocin *in situ* and perform other processes like fermentation but different approaches are used (8). This renders it necessary to obtain reliable ways of bacteriocin purification and analysis (9). Novel ways of using nisin include its topical application in veterinary (10) or cosmetic products (11). The features of antimicrobial peptides which make them inappropriate in intravenous or oral administration at the same time make them suitable for topical use, thus a growing number of such substances are reported (12). For this reason analytical procedures for such cosmetic components are required. Such procedures are described for a large group of compounds and to some extent form part of legislation. For instance in the European Union member states, the Seventh Commission Directive 96/45/EC of 2 July 1996 describes the procedures relating to analytical methods necessary to determine the composition of cosmetic products. Although the regulatory aspect of analytical procedures is important in case of cosmetic products, at first valid and suitable techniques must be established. Since there is a large group of ingredients and a number of cosmetic formulations, establishing the methodology may be a complex task (13). Analytical methodology must comply with a given type of analyte and of cosmetic formulation. In case of organic compounds, liquid chromatography is the most useful method. Since cosmetics including creams, foundations, lipsticks, powders, lotions, oils, milks and waters are complex matrices and vary in their composition and properties, different sample treatments are usually required for their processing. For this purpose extraction techniques are used. The most suitable chromatographic technique in case of peptides in cosmetics is RP HPLC (14), however hydrophilic interaction liquid chromatography (16) or ion pair chromatography (17) are also applied. UV absorption and/or mass spectrometry are used for

the purpose of detection (14, 15). The extraction step may vary depending on the type of matrix and the analyte but the most common include solid-phase extraction (SPE) and liquid–liquid extraction (LLE) however, novel techniques are being developed (18).

The aim of the current paper was to provide a simple method of nisin extraction from some common cosmetics and its detection by HPLC technique.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Trifluoroacetic acid (TFA) was from Sigma (St Louis, MO, USA), acetonitrile (ACN) and Pursuit C18 were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Sample preparation.

200 mg of cosmetic product was mixed with 50 ml of water containing 0.01% TFA. The sample was vortexed for 3 minutes and then immersed in ultrasound bath for 10 minutes. The suspension was filtered using a Whatman GF/C filter, grade: 1.2 μm .

2.3 SPE.

The filtered solution was applied to a column containing 1 g of J.T.Baker®, BAKERBOND SPE™ C18, then the column was washed with 20 ml of water containing 0.01% TFA. The dry bed was eluted with 1 ml of methanol which was collected and subsequently dried at 60°C under nitrogen flow. The dry sample was dissolved in 50 μl of water and ACN (4:1) containing 0.05 % TFA and centrifuged with $r_{\text{cf}} = 16000 \text{ g}$ for 10 minutes at room temperature. The supernatant samples were transferred to HPLC vials and analysed.

2.4. HPLC and MS analyses

HPLC analyses were performed using an Agilent 1220 Infinity Gradient DAD LC System with a gradient pump and an integrated degassing unit, auto-sampler, column oven and diode array detector. The injection volume was 5 μl if not stated otherwise. Nisin was separated and quantified using a Pursuit C18 RP-18 end-capped column. The mobile phase consisted of a gradient of 0.05% aqueous TFA (solvent A) and 0.05% TFA in ACN (solvent B). The assays were performed with the following linear gradient program: 0 min 20 % B, 10 min 50 % B, 10.2 min 100 % B, 14.2 min 100 % B, 14.4 min 20 % B, 16 min 20 % B. The UV signal was recorded at 214 nm.

MS analyses were performed using a Bruker Daltonics HCT Ultra Ion Trap MS with an electrospray (ESI) ion source operated in the positive electrospray ion mode. The drying gas temperature and flow rate were set at 350°C and 8 L min⁻¹, respectively. The Purospher STAR RP-18 end-capped column (55 × 4 mm, 3 μm particles) was kept at 40°C.

3. Results and Discussion.

The nisin samples were analysed using the described conditions. The nisin sample at a concentration of 0.1 mg ml⁻¹ was analysed and the chromatogram was as follows. The main observed peak with elution time of 5.1 min was related to nisin elution (Fig. 1) which was confirmed by a mass spectrometry analysis. The main detected component had a parent ion $m/z = 667.1$ (5+) and molecular mass of 3328.6 Da refers to nisin Z variant (18).

To check the reproducibility and the applicability range of the method, the nisin was analysed using HPLC at a concentration range from 0.01 to 1 mg ml⁻¹ in duplicates. The area of each plot peak was plotted against the concentration (Fig .2).

To check if SPE may be applied to extract nisin, 50 μl of nisin solution at a concentration of 0.1 mg ml⁻¹ was dissolved in 10 ml of mixture of water and ACN (4:1) containing 0.01% TFA and this solution was applied to a column containing 1 g of J.T.Baker BAKERBOND Octadecyl (C18) bed. The SPE column was washed with water containing 0.01% TFA and then eluted with 1 ml of methanol.

The opportunity of nisin extraction from cosmetic samples was verified by using SPE method. The followed fractions were collected: (1) flow through, (2) wash, and (3) elution. The collected elution fraction was dried at 60°C using nitrogen. The dried sample was dissolved in 50 μl of mixture of water and acetonitrile (4:1) containing 0.05% TFA and centrifuged for 10 minutes at 16000g at room temperature. HPLC analysis indicated that the flow through and wash fractions contained no nisin whereas the peptide was observed in the elution fraction and the efficiency of such extraction procedure was higher than 90%.

The same procedure using SPE was applied to two cosmetic products: emulsion (product A) and toner (product B). The samples from flow through and wash fractions contained no nisin, but it was observed in the elution fraction. A typical chromatogram of concentrated elution fraction of product A has been shown in Fig 3.

In Fig. 3. a number of chromatographic peaks may be observed with elution time from 0 to ca. 2.2 minutes. This group of peaks is followed by a peak at 5.1 min corresponding to nisin and

peaks at 5.6 and 9.5 minutes. The nisin peak is separated from the other peaks and may be analysed both qualitatively and quantitatively. The same procedure was applied to product B.

Cosmetic product B chromatogram presented in Fig. 4 exhibits a similar profile to product A, however in Fig. 4 the nisin peak has a higher relative area. Since product B is a toner, it has lower density and contains fewer other compounds which may be observed in the chromatogram compared with product A which is a balm.

The proposed method is suitable for nisin determination. The chromatographic method exhibits linearity in nisin concentration at a range from 0.01 to 1 mg ml⁻¹. Due to the application of the solid phase extraction method, it is suitable for different cosmetic products.

Literature

- (1) Insight, G. (2007). A Study of the European Cosmetics Industry. Final Report.
- (2) Sharad, J. (2019). Cosmeceuticals. *Advances in Integrative Dermatology*, 393-411.
- (3) Zhang, L., & Falla, T. J. (2009). Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in dermatology*, 27(5), 485-494.
- (4) Lupo, M. P., & Cole, A. L. (2007). Cosmeceutical peptides. *Dermatologic therapy*, 20(5), 343-349.
- (5) Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- (6) Islam, M. R., Nagao, J. I., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2012). Antimicrobial mechanism of lantibiotics.
- (7) Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(8), 1262-1274.
- (8) Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- (9) Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., ... & Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(4), 1323-1335.
- (10) Fernandez, L., Delgado, S., Herrero, H., Maldonado, A., & Rodriguez, J. M. (2008). The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of Human Lactation*, 24(3), 311-316.
- (11) Maurício, E., Rosado, C., Duarte, M., Verissimo, J., Bom, S., & Vasconcelos, L. (2017). Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products. *Cosmetics*, 4(4), 41.
- (12) Rahnamaeian, M., & Vilcinskas, A. (2015). Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(21), 8847-8855.

- (13) Lores, M., Llompart, M., Alvarez-Rivera, G., Guerra, E., Vila, M., Celeiro, M., ... & Garcia-Jares, C. (2016). Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls—A review. *Analytica chimica acta*, 915, 1-26.
- (14) Salvador, A., & Chisvert, A. (Eds.). (2011). *Analysis of cosmetic products*. Elsevier.
- (15) Chirita, R. I., Chaimbault, P., Archambault, J. C., Robert, I., & Elfakir, C. (2009). Development of a LC-MS/MS method to monitor palmitoyl peptides content in anti-wrinkle cosmetics. *Analytica chimica acta*, 641(1-2), 95-100.
- (16) Zhou, W., Wang, P. G., Krynitsky, A. J., & Rader, J. I. (2011). Rapid and simultaneous determination of hexapeptides (Ac-EEMQRR-amide and H₂N-EEMQRR-amide) in anti-wrinkle cosmetics by hydrophilic interaction liquid chromatography–solid phase extraction preparation and hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(44), 7956-7963.
- (17) Papagianni, P., Varvaresou, A., Papageorgiou, S., & Panderi, I. (2011). Development and validation of an ion-pair RP-HPLC method for the determination of oligopeptide-20 in cosmeceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(3), 645-649.
- (18) Cabaleiro, N., De La Calle, I., Bendicho, C., & Lavilla, I. (2013). Current trends in liquid–liquid and solid–liquid extraction for cosmetic analysis: a review. *Analytical Methods*, 5(2), 323-340.
- (19) Schneider, N., Werkmeister, K., & Pischetsrieder, M. (2011). Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food chemistry*, 127(2), 847-854.

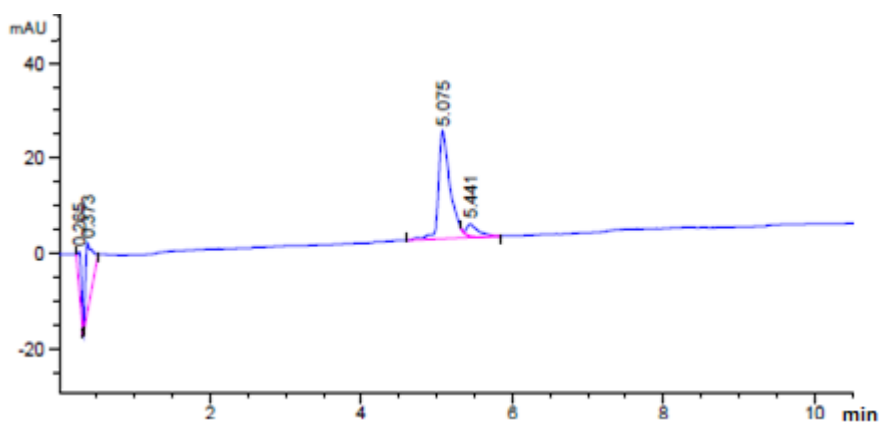


Fig. 1. The nisin HPLC chromatogram.

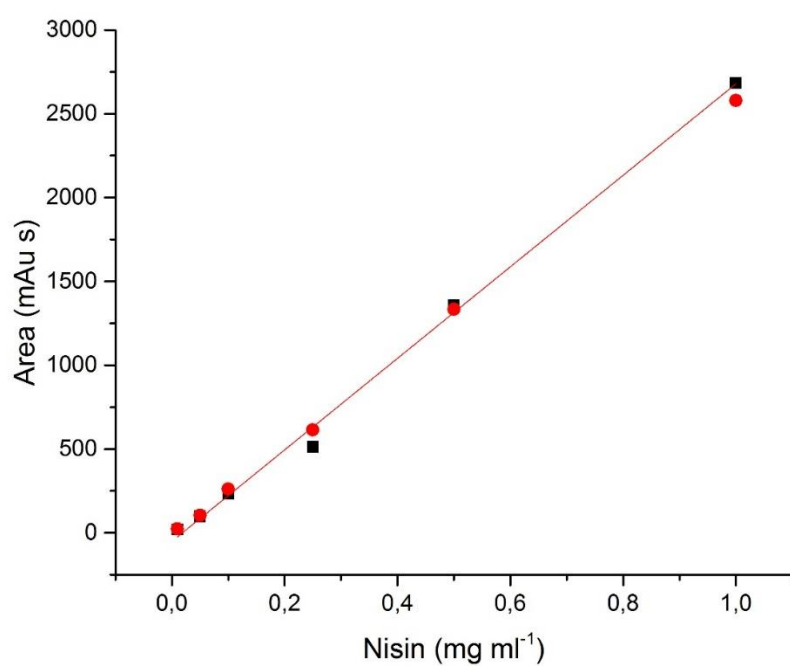


Fig. 2. The nisin calibration curve.

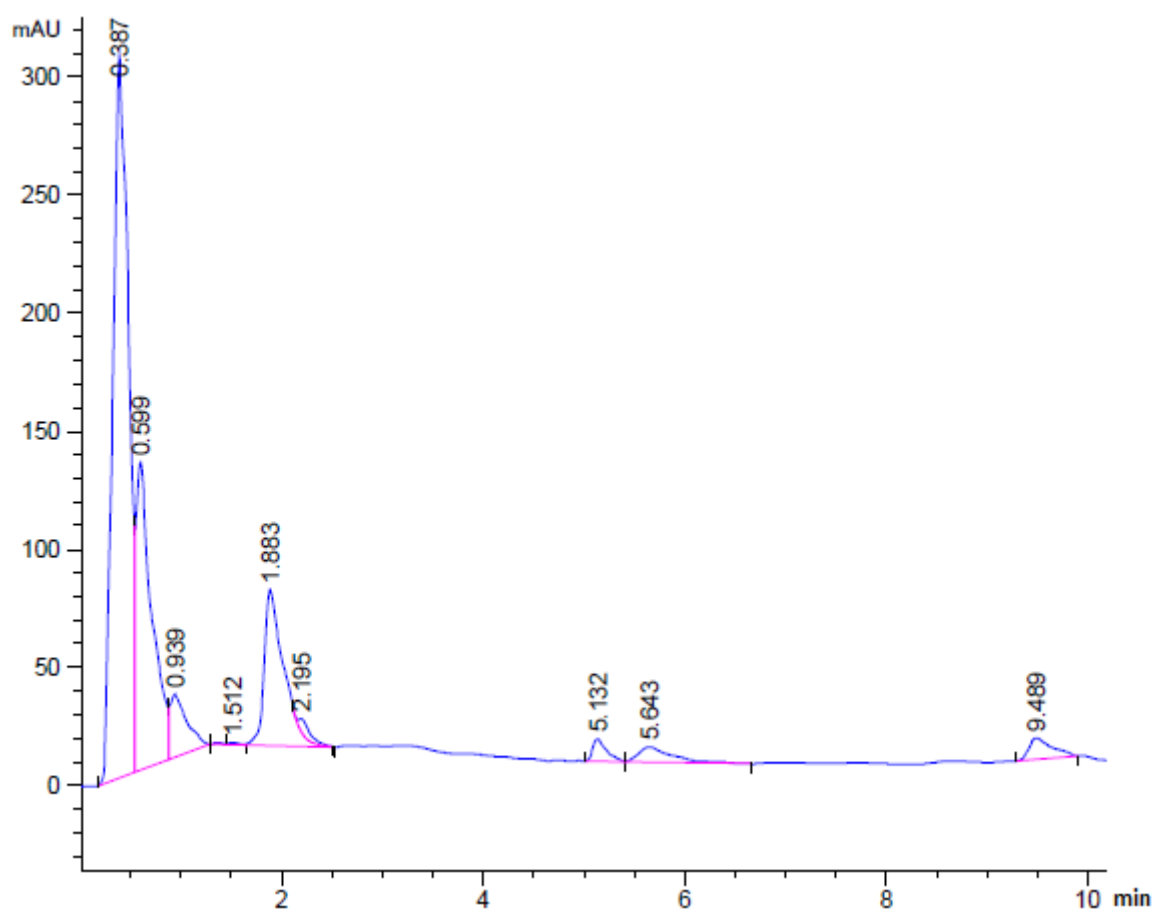


Fig 3 Chromatogram of SPE elution of product A

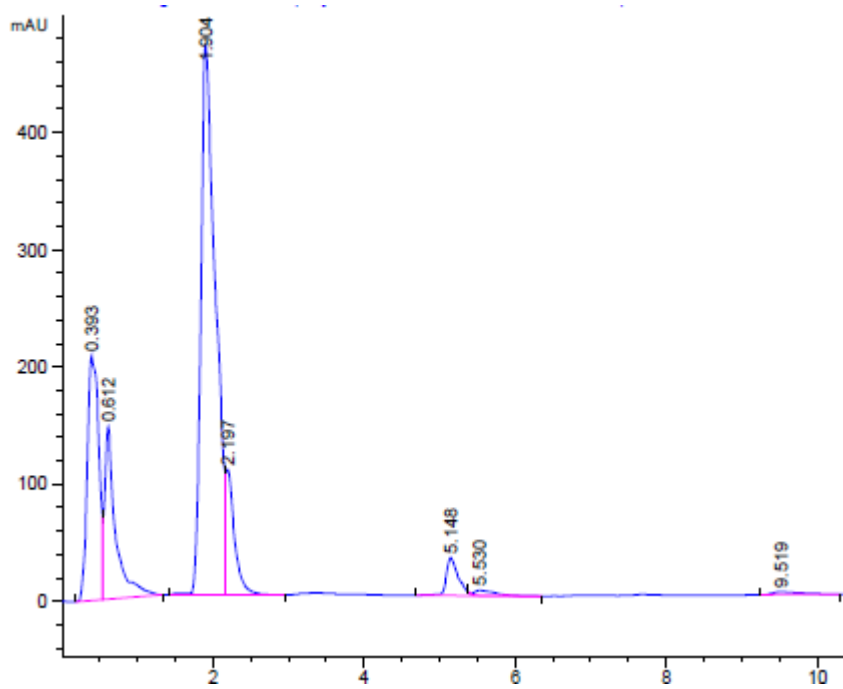


Fig 4 Chromatogram of SPE elution of product B

Kraków, wrzesień 2019