

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ PARABEN CÓ TRONG MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Thị Hồng Hạnh^{*}, Bùi Thị Thanh Châm, Bùi Thị Luyên
Trường Đại học Y Dược – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Để góp phần vào công tác kiểm tra, phát hiện các chất cấm có trong mỹ phẩm, chúng tôi đã tiến hành xác định một số paraben bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và áp dụng quy trình đã xây dựng để xác định paraben trong một số đối tượng mỹ phẩm như kem dưỡng da, son dưỡng môi. Mẫu được hòa tan bằng methanol: nước (50:50), lọc và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, cột sắc ký pha đảo cột pha đảo (C8, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm), pha động methanol / nước (60:40 v/v) tốc độ dòng chảy là 1.0 ml / phút, bước sóng phát hiện 254 nm. Phương pháp phân tích có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng phù hợp để xác định paraben có trong mỹ phẩm. Bằng phương pháp này, chúng tôi đã xác định paraben trong 07 mẫu mỹ phẩm (gồm 04 mẫu kem dưỡng da, 03 mẫu son môi) đang có mặt trên thị trường tỉnh Thái Nguyên. Kết quả có 02 mẫu chứa cả MP và PP, 04 mẫu chỉ chứa MP và 01 mẫu chỉ chứa PP.

Từ khóa: *paraben, methylparaben, propylparaben, mỹ phẩm*

Ngày nhận bài: 12/10/2018; Ngày hoàn thiện: 13/01/2019; Ngày duyệt đăng: 31/01/2019

DETERMINATION OF PARABENS IN COSMETIC PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Thi Hong Hanh^{*}, Bui Thi Thanh Cham, Bui Thi Luyen
University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

In order to contribute and detection of substances not banned in cosmetics, we have developed to determined some parabens by high-performance liquid chromatography (HPLC) in lotion, lip balm. The samples have dissolved by methanol : water (50:50), filtered and eluted by high-performance liquid chromatography, reverse phase column chromatography column (C8, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm), methanol / water mobile phase (60:40 v / v) flow rate is 1.0 ml / min, detection wavelength is 254 nm. The analytical method has specificity, linearity, accuracy, repeatability, limit of detection, LOD and limit of quantitation, LOQ suitability for determining parabens in cosmetics. By this method, we have successfully applied to identify parabens in 07 cosmetic samples (including 04 samples of skin lotion, 03 sample of lipstick) have been in Thai Nguyen province. There were 02 samples containing both MP and PP, 04 samples containing only MP and 01 sample containing only PP.

Key words: *parabens, methylparaben, propylparaben, cosmetic.*

Received: 12/10/2018; Revised: 13/01/2019; Approved: 31/01/2019

^{*} Corresponding author: *Tel: 0985 810888; Email: hanhnguyen1388@gmail.com*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Paraben là các ester của acid 4-hydroxy benzoic. Trước đây, paraben được chấp nhận như phương thức rẻ tiền và không thể thiếu được để kiểm chế sự phát triển của vi khuẩn, lên men và nấm mốc trong các sản phẩm mỹ phẩm chăm sóc sắc đẹp cá nhân bao gồm: kem dưỡng da, kem dưỡng thể, sữa rửa mặt, dầu gội đầu, dầu xả, gel cạo râu, kem chống nắng,... Dù chưa có đủ bằng chứng để khẳng định nhưng nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các paraben được sử dụng phổ biến trong công nghiệp sản xuất mỹ phẩm có liên quan đến ung thư, đặc biệt là ung thư vú ở phụ nữ thường xuyên dùng mỹ phẩm [5], [6]. Vì vậy, dựa trên kết quả họp định kì của Hội đồng mỹ phẩm ASEAN 21, Cục quản lý dược đã ban hành công văn 6577/QLD-MP cập nhật quy định về các chất dùng trong mỹ phẩm. Trong đó có 5 loại paraben không được dùng trong mỹ phẩm là isopropylparaben, isobutylparaben, benzylparaben, phenylparaben, pentylparaben.

Nhằm mục đích kiểm soát chất lượng của các chất bảo quản nói trên trong các sản phẩm mỹ phẩm, chúng tôi nghiên cứu xây dựng quy trình xác định một số chất bảo quản paraben (methylparaben (MP) và propylparaben (PP)) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và áp dụng quy trình đã xây dựng để xác định chúng trong một số đối tượng mỹ phẩm (sữa rửa mặt, kem dưỡng da, tẩy trắng da, tái tạo da, trị nám, trị mụn,...) đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

THỰC NGHIỆM

Thiết bị, dụng cụ, chất chuẩn đối chiếu, hóa chất:

Thiết bị, dụng cụ:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi LaChrom Elite L-2400 UV Detectors.
- Cột sắc ký RESTEK C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm).
- Cân phân tích Precisa XB 220A.
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

Hóa chất, chất chuẩn:

- Các chất chuẩn methylparaben và propylparaben của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.
- Hóa chất (Merck): ethanol, acid sulfuric, methanol, acetonitril, tetrahydrofuran,...

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu:

Phương pháp nghiên cứu được xây dựng, thẩm định và áp dụng để xác định MP và PP trong một số mẫu mỹ phẩm như sữa rửa mặt, kem dưỡng da, son môi,...

Phương pháp nghiên cứu:

Xây dựng phương pháp định lượng:

- Khảo sát phương pháp chiết tách MP và PP từ các nền mẫu mỹ phẩm khác nhau: cách phân tán mẫu, lựa chọn dung môi, điều kiện thích hợp, phương pháp chiết lỏng rắn,...
- Điều kiện sắc ký: Tham khảo các điều kiện trong phương pháp hòa hợp của ASEAN [1] để lựa chọn chương trình sắc ký cho phù hợp với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện sắc ký

Sau quá trình khảo sát: thành phần pha động, tỉ lệ dung môi hữu cơ, nhiệt độ cột, tốc độ dòng, chương trình sắc ký để định lượng MP và PP trong mẫu mỹ phẩm được xây dựng như sau:

Pha động: Methanol – Nước (60:40).

Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký pha đảo C8 (150 mm × 4,6 mm) được nhồi octylsilan (5μm).

Detector quang phổ hấp thụ tử ngoại được đặt ở bước sóng 254 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Phương pháp xử lý mẫu

Dung dịch chuẩn: cân chính xác khoảng 0,01 mg MP và PP chuẩn vào bình định mức dung tích 100 ml, thêm methanol vừa đủ 100 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5g mẫu thử vào bình định mức 50ml, thêm 1ml acid H₂SO₄ 2M và 25 ml methanol. Lắc siêu âm 10 phút, thêm nước vừa đủ 50 ml dung dịch. Lắc đều, lọc qua giấy lọc rồi lọc qua màng lọc 0,45µm để tiêm sắc ký (dung dịch này chỉ sử dụng được trong vòng 24 giờ).

Phương pháp định lượng

- Xây dựng phương pháp định lượng bằng HPLC: Khảo sát pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm.

- Thẩm định phương pháp đã xây dựng: về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ thu hồi và lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, tính tuyến tính [1], [2].

- Ứng dụng để phân tích 1 số mẫu mỹ phẩm có trên địa bàn tỉnh Thái nguyên.

Thẩm định phương pháp:

Thẩm định các chỉ: tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Xây dựng phương pháp phân tích:

Lựa chọn điều kiện sắc ký:

Chọn bước sóng phát hiện:

Trên cơ sở tham khảo các tài liệu [3, 4, 5, 6], và xác định bước sóng thích hợp để phát hiện MP và PP, chúng tôi tiến hành quét phổ UV của dung dịch MP và PP 50 µg/ml trên máy quang phổ UV-vis. Kết quả cực đại hấp thụ của 2 dung dịch này là 254 nm.

Pha động: dựa vào tài liệu tham khảo và điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn hệ dung môi là methanol: nước và khảo sát với các tỉ lệ khác nhau.

- Methanol: nước = 50:50: đường nền nhiễu, pic của MP và PP không cân xứng.

- Methanol: nước = 60:40: pic chất cân đối, chân pic gọn.

- Methanol: nước = 40:60: pic chất được rửa giải sớm, chân pic doãng.

Như vậy tỉ lệ pha động tốt nhất là methanol: nước = 60:40.

Tốc độ dòng: khảo sát lần lượt ở tốc độ 0,5

ml/ phút; 1,0 ml/ phút; 1,5 ml/ phút thì nhận thấy: với tốc độ dòng là 1 ml/ phút thời gian lưu chất phân tích ngắn hơn và áp suất không quá lớn.

Thể tích tiêm mẫu: tiêm 20 µl cho pic chất phân tích gọn so với khi tiêm 15µl.

Từ các khảo sát trên, chúng tôi xây dựng quy trình sắc kí có khả năng phân tích MP và PP như sau: Cột sắc ký pha đảo C8 (150 mm × 4,6 mm) được nhồi octylsilan (5µm); pha động: methanol – nước (60:40); detector quang phổ hấp thụ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm; tốc độ dòng: 1 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl.

Khảo sát quy trình xử lý mẫu:

Sau quá trình khảo sát sơ bộ trên một số dung môi hòa tan mẫu như nước, ethanol, methanol, acetonitril, ethanol - nước, methanol - nước, acetonitril - nước,... chúng tôi nhận thấy hỗn hợp dung môi methanol - nước (50 : 50) là hệ dung môi phù hợp, hòa tan được hoạt chất cần phân tích, ít lẫn tạp chất và loại được nhiều thành phần khác có trong các nền mẫu, cho pic MP và PP cân đối.

Quy trình xử lý mẫu được tiến hành như sau: Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu thử vào bình định mức 50 ml, thêm 1ml acid H₂SO₄ 2M và 25 ml methanol. Lắc siêu âm 10 phút, thêm nước vừa đủ 50 ml dung dịch. Lắc đều, lọc qua giấy lọc rồi lọc qua màng lọc 0,45 µm để tiêm sắc ký (dung dịch này chỉ sử dụng được trong vòng 24 giờ).

Thẩm định phương pháp:

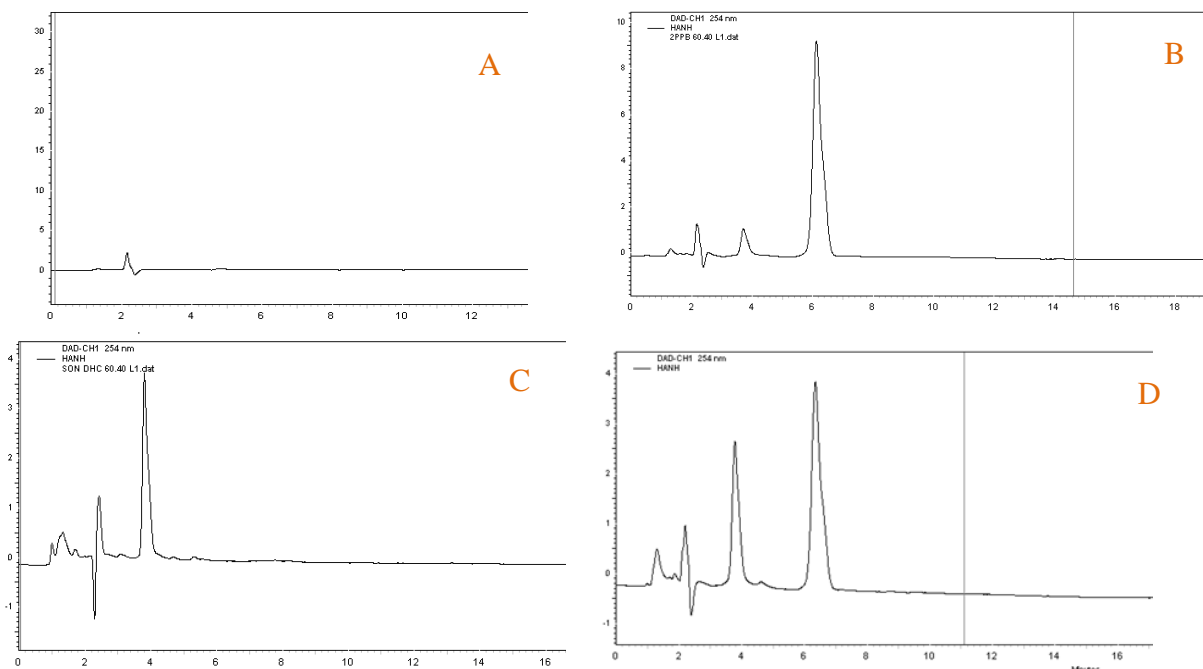
2.1. Tính đặc hiệu:

Với điều kiện sắc ký như mục 1.1, tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch sau:

- Dung môi pha mẫu.

- Dung dịch chuẩn: Dung dịch chuẩn hỗn hợp MP và PP trong dung môi pha mẫu có nồng độ khoảng 5 µg/ml.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu mỹ phẩm (son và kem dưỡng da) và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã nêu ở mục Hóa chất.



Hình 1. Kết quả đánh giá tính đặc hiệu với MP và PP

A: Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu; **B:** Sắc ký đồ của mẫu chuẩn MP và PP; **C, D:** Sắc ký đồ của mẫu thử

Kết quả thu được cho thấy: trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (A) không xuất hiện bất kỳ pic nào; trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu có thêm hỗn hợp chuẩn MP và PP (B) xuất hiện rõ ràng 2 pic MP và PP có thời gian lưu tương ứng là khoảng 4 phút và 6 phút; trên sắc ký đồ của mẫu thử C và D cũng xuất hiện rõ ràng 2 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của MP và PP và được tách xa nhau. Như vậy, phương pháp nghiên cứu có tính đặc hiệu đối với cả MP và PP.

Tính tương thích hệ thống:

Tính tương thích hệ thống được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic thu được trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ methylparaben và propylparaben khoảng 5 µg/ml. Tiến hành sắc ký theo các điều kiện ở mục 1.1, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic của MP và PP. Kết quả thu được cho thấy: phương pháp phân tích MP và PP với các điều kiện sắc ký đã chọn có tính tương thích hệ thống rất tốt với RSD của thời gian lưu và diện tích pic của MP và PP đều nhỏ hơn 0,2% (RSD của thời gian lưu tương ứng

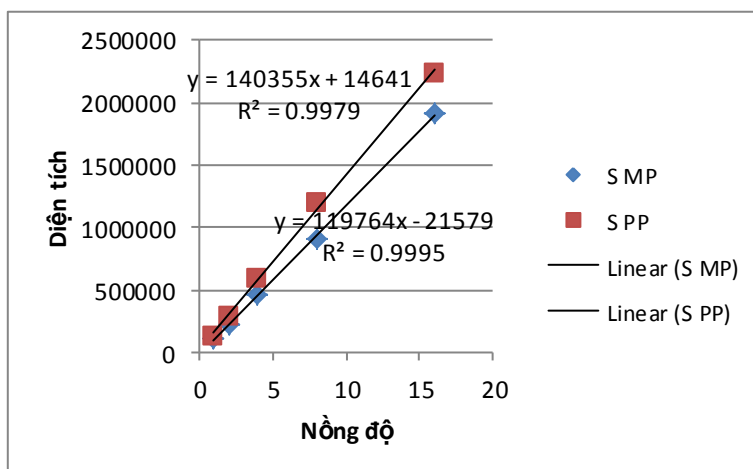
là 0,09% và 0,13%, RSD của diện tích pic tương ứng là 0,1% và 0,09%). Bên cạnh đó, số đĩa lý thuyết (tương ứng là 3744 và 7171), hệ số bất đối của các pic MP (1,05) và PP (1,06), độ phân giải giữa pic MP với pic PP (bằng 17,12) đạt yêu cầu theo quy định của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thông số	Kết quả	
		MP	PP
1	Thời gian lưu (tR) (phút)	4,004	6,47
2	RSD của thời gian lưu (%)	0,09	0,13
3	RSD của diện tích pic (%)	0,10	0,09
4	RSD của chiều cao pic (%)	0,12	0,11
5	Số đĩa lý thuyết	3744	7171
6	Hệ số đối xứng	1,05	1,06

Khoảng nồng độ tuyến tính:

Để đánh giá khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp, chúng tôi chuẩn bị một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ MP và PP chính xác khoảng 1; 2; 4; 8; 16 µg/ml trong dung môi pha mẫu, lọc qua màng lọc 0,45µm. Tiến hành sắc ký như mục 1.1, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic của MP và PP, thu được phương trình hồi quy tuyến tính như trên đồ thị.



Hình 2. Đường hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ của MP và PP

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ đúng của phương pháp

Lượng mẫu (g)	Lượng thêm vào (µg/ml)		Lượng tìm thấy (µg/ml)		Tỷ lệ thu hồi (%)		Số liệu thống kê
	MP	PP	MP	PP	MP	PP	
0,5011	10,0	10,0	9,892	9,946	98,92	99,46	MP: $X_{TB} = 98,11\%$ $RSD = 1,21\%$
0,5025	10,0	10,0	9,761	9,852	97,61	98,52	
0,5021	10,0	10,0	9,605	9,788	96,05	97,88	
0,5018	10,0	10,0	9,783	9,802	97,83	98,02	PP: $X_{TB} = 99,50\%$ $RSD = 1,35\%$
0,5002	10,0	10,0	9,911	10,149	99,11	101,49	
0,5019	10,0	10,0	9,913	9,965	99,13	99,65	

Từ các kết quả thu được, tính toán và xử lý số liệu bằng phương pháp hồi quy tuyến tính (bình phương tối thiểu) để xác định khoảng tuyến tính của phương pháp, kết quả được minh họa ở Hình 2. Kết quả thu được cho thấy: trong một khoảng nồng độ khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính rất chặt chẽ giữa diện tích pic MP và PP với nồng độ của MP và PP với hệ số tương quan R tương ứng bằng 0,9989 và 0,9997.

Độ lặp lại và độ đúng:

Việc đánh giá độ lặp lại và độ đúng của phương pháp được thực hiện đồng thời trên mẫu kem dưỡng da thêm chuẩn MP và PP. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của kết quả hàm lượng MP và PP của 6 lần phân tích độc lập trên mẫu thêm chuẩn. Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách so sánh lượng MP và PP tìm lại được trong mẫu thêm chuẩn so với lượng MP và PP cho vào ban đầu.

Cân chính xác khoảng 0,5g mẫu với 6 lần cân khác nhau từ cùng một mẫu kem dưỡng da không chứa MP và PP (KD), thêm chính xác khoảng 200 µg chất chuẩn MP và PP vào mỗi mẫu thử, trộn đều và tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã nêu ở mục 1.2. Tiến hành sắc ký theo các điều kiện ở mục 1.1, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic MP và PP. Song song tiến hành với một dãy mẫu chuẩn MP và PP (không có nền mẫu) trong cùng điều kiện có nồng độ MP và PP chính xác khoảng 4; 8; 16; 32 và 64 µg/ml trong dung môi pha mẫu. Từ diện tích pic của các mẫu chuẩn, các mẫu thử thu được và hàm lượng của chất chuẩn MP và PP, tính toán và xử lý số liệu. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ đúng của phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

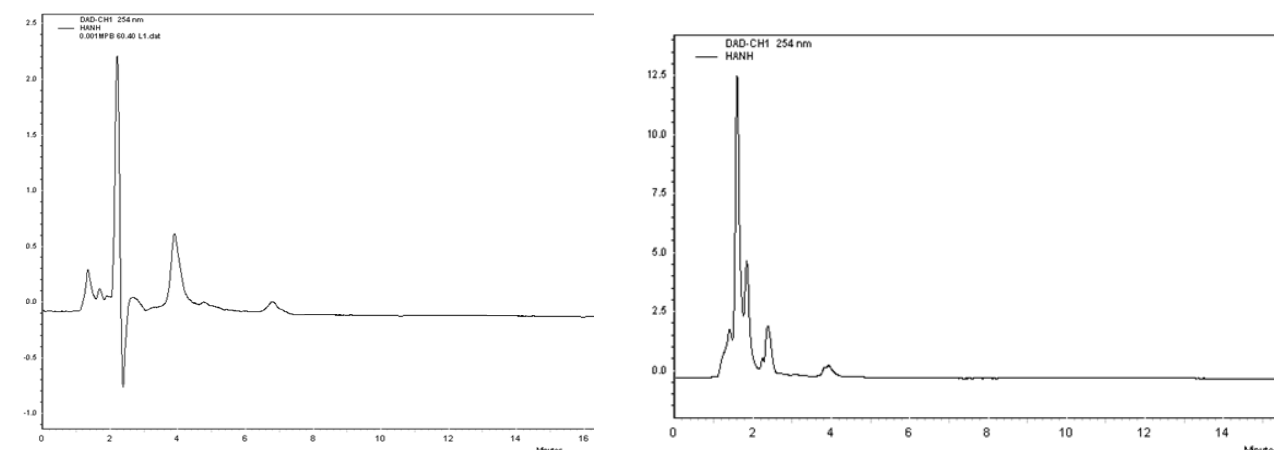
Kết quả thu được cho thấy: với các điều kiện sắc ký đã chọn, kết quả của 6 lần định lượng MP và PP trong mẫu mỹ phẩm thêm chuẩn cho độ lặp lại tương đối tốt. Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại có thể chấp nhận

được với mẫu mỹ phẩm có nền phức tạp. Kết quả thu được cũng cho thấy: phương pháp xác định MP và PP đã nghiên cứu có độ đúng tốt (tỷ lệ tìm lại MP nằm trong khoảng 96,05% ÷ 99,13%; tỷ lệ tìm lại PP nằm trong khoảng 97,88% ÷ 101,49%).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:

Pha loãng dung dịch chuẩn MP và PP trong dung môi pha mẫu đến nồng độ thấp nhất mà

tín hiệu của máy vẫn đáp ứng được (gấp 3 lần so với nhiễu đường nền) để xác định giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. LOD xác định được là 0,001 µg/ml đối với MP và 0,01 µg/ml đối với PP. Kết quả xác định LOD được minh họa ở Hình 3. Từ đó xác định giới hạn định lượng lần lượt là 0,003 µg/ml với MP và 0,03 µg/ml với PP.



Hình 3. Kết quả xác định giới hạn phát hiện

A: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn MP và PP có nồng độ 0,01 µg/ml;

B: Sắc ký đồ của mẫu chuẩn MP và PP có nồng độ 0,001 µg/ml.

Áp dụng phương pháp để phân tích một số mẫu mỹ phẩm thực tế:

Với quy trình đã xây dựng được, chúng tôi áp dụng để phát hiện và định lượng MP và PP trong 05 mẫu mỹ phẩm (gồm 03 mẫu son, 04 mẫu kem dưỡng da) đang có mặt trên thị trường Thái Nguyên. Kết quả thu được ở Bảng 3 cho thấy: có 02 mẫu chứa cả MP và PP, 04 mẫu chỉ chứa MP và 01 mẫu chỉ chứa PP.

Bảng 3. Kết quả xác định MP và PP trong mỹ phẩm

TT	Tên mẫu	Hàm lượng (mg/g) ^(*)	
		MP	PP
1	Son dưỡng môi Lipice	0,138	-
2	Son dưỡng môi DHC	0,225	-
3	Son L'Ocean	-	0,286
4	Kem nẻ Valentine Thái Dương	0,463	-
5	Kem nẻ Nivea	0,121	-
6	Kem Nghệ Thái Dương	0,519	0,341
7	Kem nẻ bubchen	0,302	0,620

Ghi chú: (-): không phát hiện

KẾT LUẬN

- Quy trình phân tích MP và PP trong mỹ phẩm đã được xây dựng bao gồm phương pháp xử lý mẫu và phương pháp phân tích bằng HPLC. Qua khảo sát, đã chọn được dung môi pha mẫu là methanol- nước (50 : 50), các điều kiện phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao phù hợp về cột, pha

động, detector, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu cho phép phân tích MP và PP trong mỹ phẩm với giới hạn phát hiện nhỏ.

- Phương pháp xây dựng đã được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu như tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng nồng độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng... đáp ứng yêu cầu phân tích MP và PP trong các mẫu mỹ phẩm.

- Phương pháp đã được áp dụng để phân tích MP và PP trong 07 mẫu mỹ phẩm (gồm 04 mẫu kem dưỡng da và 03 mẫu son) đang có mặt trên thị trường tỉnh Thái Nguyên.

Khuyến nghị:

Phát triển phương pháp đã xây dựng để tiến hành định lượng được nhiều chất cấm có trong mỹ phẩm và mở rộng thêm đối tượng nghiên cứu trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Tử An (2010), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

2. ASEAN (2005), *Identification and Determination of 2-phenoxy-ethanol, methyl, ethyl, prpyl, and butyl 4-hydroxybenzoate in cosmetic products by TLC and HPLC*, pp. 1-10

6. Xiaoyun Ye, Zsuzsanna Kuklenyik, (2006), "Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, 844, pp. 53-59.

5. Rebbeck C. et al. (2006), "Solid-Phase Extraction and HPLC Analysis of Methylparaben and Propylparaben in a Concentrated Antibiotic Suspension", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32, pp.1095-1102.

4. Irena Baranowska, Iwona Wojciechowska, (2013), "The Determination of Preservatives in Cosmetics and Environmental Waters by HPLC", *Pol. J. Environ. Stud.*, Vol. 22, No. 6, pp. 1609-1625.

3. Archana Jain, Soumitra Soni, (2015), "Determination of Parabens in Cosmetics by Liquid-Phase Microextractions and High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, pp. 82-91.

