

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13642:2023

Xuất bản lần 1

**MỸ PHẨM – PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH –
ĐỊNH TÍNH TRETINOIN (RETINOIC ACID) BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO
(HPLC)**

*Cosmetics – Analytical methods – Identification of tretinoin (retinoic acid) by
high-performance liquid chromatography (HPLC)*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13642:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ACM 001 - *Identification of Tretinoin (Retinoic acid) in cosmetic products by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC)*.

TCVN 13642:2023 do Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 13642:2023

Lời giới thiệu

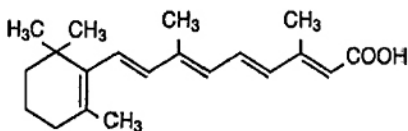
Tretinoin là một chất chống oxy hóa thuộc nhóm retinoid, hay còn được gọi với tên khác là *all-trans* retinoic acid (ATRA).

Công thức phân tử: $C_{20}H_{28}O_2$

Khối lượng phân tử: 300,4

ID IUPAC: (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-4,6,8-tetraenoic acid

Công thức cấu tạo:



Khi sử dụng trên da, tretinoin kích thích phân bào và thúc đẩy đổi mới tế bào biểu bì, kích thích tạo thành keratin, kích thích tái tạo mô liên kết. Trong da liễu, các tác dụng đó được sử dụng để điều trị trứng cá, vẩy nến, vẩy cá, dày sừng quang hóa dưới sự chỉ định của bác sĩ.

Theo quy định hiện nay, tretinoin (dưới dạng acid tretinoic và các muối của nó) không được sử dụng trong mỹ phẩm (được liệt kê trong Phụ Lục II – Danh mục các chất không được có trong thành phần sản phẩm mỹ phẩm)

Một số phương pháp xác định tretinoin như phương pháp hóa học, sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao theo được điển trong và ngoài nước.

Phương pháp phân tích này sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA hoặc tương đương định tính tretinoin trong sản phẩm mỹ phẩm.

Mỹ phẩm – Phương pháp phân tích – Định tính tretinoin (retinoic acid) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Cosmetics – Analytical methods – Identification of Tretinoin (Retinoic acid) by high-performance liquid chromatography (HPLC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính tretinoin trong các sản phẩm mỹ phẩm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

3 Nguyên tắc

Tretinoin được định tính bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng đầu dò PDA hoặc tương đương.

4 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương.

CẢNH BÁO: Công việc phân tích phải được tiến hành trong môi trường phòng thử nghiệm phù hợp, được trang bị bảo hộ cá nhân (ví dụ: kính bảo hộ, quần áo bảo hộ lao động, găng tay).

4.1 Nước

4.2 Methanol

4.3 Acid acetic băng

4.4 Pha động: methanol – nước – acid acetic băng (85:15:0,5)

4.5 Chất chuẩn, Tretinoin, chuẩn gốc hoặc chuẩn thứ cấp được bảo quản ở trong môi trường khí nitơ và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA hoặc tương đương được trang bị bơm, hệ thống bơm mẫu tự động, bộ điều nhiệt cho cột, detector và phần mềm xử lý số liệu

5.2 Cột phân tích HPLC, cột C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm) hoặc tương đương

5.3 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg; 0,01 mg

5.4 Ống ly tâm có nắp đậy, dung tích 30 mL

5.5 Lọ đựng mẫu cho HPLC, loại 2 mL hay tương đương (phù hợp thiết bị)

5.6 Màng lọc PVDF, kích thước lỗ lọc 0,45 μ m; hoặc tương đương.

5.7 Giấy nhôm

5.8 Bình định mức, loại A với các dung tích khác nhau

6 Cách tiến hành

LƯU Ý:

Thao tác cân và xử lý mẫu đối với chuẩn tretinoin và mẫu thử phải được tiến hành nhanh chóng và tránh ánh sáng để giảm thiểu sự phân hủy của tretinoin.

Nếu không có sẵn các dụng cụ thủy tinh tránh ánh sáng, có thể sử dụng giấy nhôm (5.7) để bao xung quanh.

6.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn (0,05 mg/mL)

Cân khoảng 5 mg tretinoin (4.5), chính xác đến 0,01 mg vào bình định mức dung tích 100 mL (5.8), thêm 50 mL methanol (4.2), siêu âm 5 min, bổ sung methanol đến thể tích.

Dung dịch này phải được pha mới và sử dụng trong vòng 24 h.

6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

6.2.1 Mẫu dạng dung dịch

Lọc dung dịch mẫu thử qua màng lọc PVDF 0,45 μ m (5.6), loại bỏ một vài mL dung dịch đầu tiên. Dịch thu được là dung dịch thử.

6.2.2 Mẫu dạng kem

Cân khoảng 1,000 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg cho vào ống ly tâm có nắp đậy dung tích 30 mL (5.4) đã được bọc giấy nhôm (5.7) tránh ánh sáng. Thêm 10 mL methanol (4.2) lắc xoáy trong 5 min. Làm lạnh trong nước đá 15 min. Lọc dung dịch qua màng lọc PVDF 0,45 μ m (5.6), dịch lọc thu được là dung dịch thử.

6.3 Xác định bằng HPLC

6.3.1 Điều kiện sắc ký

- Pha động: methanol – nước – acid acetic băng (85:15:0,5)
- Nhiệt độ buồng cột: 30 °C.
- Tốc độ dòng: 1,4 mL/min
- Detector PDA hoặc tương đương bước sóng phát hiện 353 nm.
- Khoảng bước sóng: 200 + 500 nm.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.
- Thời gian sắc ký: 30 min.

6.3.2 Tương thích hệ thống: Tiêm 6 Lần dung dịch chuẩn (6.1), RSD % của diện tích và thời gian lưu của pic chính phải nhỏ hơn 2,0 %.

6.3.3 Tiêm 20 μ L cho mỗi dung dịch chuẩn (6.1), dung dịch thử (6.2), ghi nhận sắc ký đồ và phổ UV

7 Đánh giá kết quả

7.1 So sánh thời gian lưu và phổ hấp thụ UV (200 + 500 nm) của pic dung dịch thử với pic dung dịch chuẩn.

7.2 Mẫu thử được xem là dương tính khi xuất hiện pic của dung dịch thử có thời gian lưu khác biệt không quá 2,0 % so với thời gian lưu của pic tretinoin tương ứng trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Phổ hấp thụ UV của pic tương ứng trong dung dịch thử phải tương thích với phổ hấp thụ UV của pic tretinoin trong dung dịch chuẩn.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- a) Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết mẫu;
- b) Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết phòng thí nghiệm thực hiện thử nghiệm;
- c) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) Ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- e) Ngày nhận mẫu phòng thí nghiệm;

TCVN 13642:2023

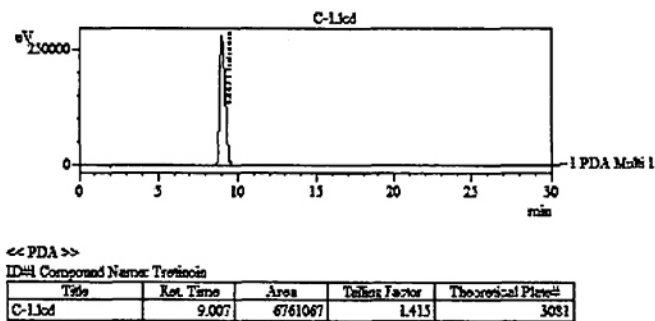
- f) Ngày kết thúc thử nghiệm;
- g) Kết quả thu được và đơn vị biểu thị kết quả;
- h) Bất kỳ thao tác nào không được qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.
- i) Nhận dạng và chữ ký của người chịu trách nhiệm đối với báo cáo thử nghiệm.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin phương pháp HPLC

- A.1 Thời gian lưu của tretinoin khoảng 9 min.
- A.2 Giới hạn phát hiện (LOD) là 20 µg/g
- A.3 Phương pháp này có thể sử dụng để định tính isotretinoin (dạng 13-*cis* của retinoic acid).
- A.4 Tretinoin hay còn gọi là retinoic acid hay dạng acid của Vitamin A được Liệt kê trong Phụ Lục II – Danh mục các chất không được có trong thành phần sản phẩm mỹ phẩm.



Hình A.1- Sắc kí đồ và thông tin pic của tretinoin

Phụ lục B

(Tham khảo)

Định tính tretinoin (retinoic acid) bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)

B.1 Phạm vi áp dụng

Phương pháp này dùng để định tính tretinoin trong các sản phẩm mỹ phẩm

B.2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là rất cần thiết khi áp dụng phương pháp này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các bản sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

B.3 Nguyên tắc

Tretinoin được định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

B.4 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích hoặc có chất lượng tương đương.

CẢNH BÁO: Công việc phân tích phải được tiến hành trong môi trường phòng thử nghiệm phù hợp, được trang bị bảo hộ cá nhân (ví dụ: kính bảo hộ, quần áo bảo hộ lao động, găng tay).

B.4.1 Ethanol tuyệt đối

B.4.2 n-Hexan

B.4.3 Ether

B.4.4 Methanol

B.4.5 Cyclohexan

B.4.6 Aceton

B.4.7 Acid acetic băng

B.4.8 Dung môi khai triển:

Hệ dung môi A: n-hexan – dung dịch acid acetic 0,33 % trong ethanol tuyệt đối (9:1)

Hệ dung môi B: *n*-hexan – aceton (6:4)

Hệ dung môi C: Cyclohexan – ether – aceton – acid acetic băng (54:40:4:2)

B.4.9 Thuốc thử phát hiện: Dung dịch acid phosphomolybdic 5 % trong ethanol tuyệt đối

B.4.10 Chất chuẩn đối chiếu: Tretinoin, chuẩn gốc hoặc chuẩn thử cấp được bảo quản ở trong môi trường khí nitơ và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng.

B.5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

B.5.1 Bàn mỏng TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 10 cm x 20 cm; bề dày 0,25 mm (Merck hoặc tương đương)

B.5.2 Đèn soi UV, bước sóng 254 nm

B.5.3 Dụng cụ phun thuốc thử

B.5.4 Màng lọc PTFE, kích thước lỗ lọc 0,45 µm hoặc tương đương

B.5.5 Dụng cụ tối màu

B.5.6 Ống ly tâm có nắp đậy, dung tích 30 mL

B.5.7 Máy lắc ống nghiệm

B.5.8 Giấy lọc Whatman, số 41 hoặc tương đương

B.5.9 Máy sấy để sấy bản mỏng

B.5.10 Bình định mức, loại A với các dung tích khác nhau

B.5.11 Pipet thủy tinh, loại A với các dung tích khác nhau

B.5.12 Bình sắc ký, có kích thước phù hợp với bản mỏng

B.5.13 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg

B.5.14 Giấy nhôm

B.5.15 Hệ thống thổi khí nitơ

B.5.16 Mao quản chấm sắc ký – micropipet

B.6 Cách tiến hành

LƯU Ý:

Thao tác cân và xử lý mẫu đối với chuẩn tretinoin và mẫu thử phải được tiến hành nhanh chóng, tránh ánh sáng để giảm thiểu sự phân hủy của tretinoin.

Nếu không có sẵn các dụng cụ tối màu, có thể sử dụng giấy nhôm (B.5.14) để bao xung quanh.

TCVN 13642:2023

B.6.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn (1 mg/mL)

Cân chính xác khoảng 10 mg tretinoin vào bình định mức 10 mL (B.5.10). Thêm 5 mL methanol (B.4.4), siêu âm 5 min và bổ sung đến thể tích bằng methanol (B.4.4).

B.6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

B.6.2.1 Mẫu dạng kem:

Cân chính xác khoảng 3,0 g cho vào ống ly tâm 30 mL (B.5.6) đã được bọc bằng giấy nhôm (B.5.14). Thêm 10 mL methanol (B.4.4) vào ống và tiến hành lắc trên máy lắc (B.5.7) trong 5 min. Làm lạnh ống ly tâm (B.5.6) trong nước đá trong 15 min và tiến hành lọc dung dịch trong ống qua giấy lọc Whatman (B.5.8).

B.6.2.2 Mẫu dạng nước (dung dịch và gel):

Cân chính xác khoảng 10,0 g mẫu thử vào trong bình gạn; đối với mẫu thử dạng gel, thêm 5 mL nước để hòa tan, tiến hành chiết với 50 ml *n*-hexan (B.4.2), rửa dịch chiết *n*-hexan với 10 mL nước. Thổi khô lớp *n*-hexan đến cân bằng khí nitơ (B.5.15) ở nhiệt độ phòng. Hòa tan cân thu được với 1 mL methanol (B.4.4) và lọc qua màng lọc PTFE (B.5.4).

B.6.3 Tiến hành sắc ký

B.6.3.1 Bảo hòa bình sắc ký (B.5.12) với dung môi khai triển (B.4.8).

Đối với mẫu dạng kem, sử dụng hệ dung môi A (B.4.8). Nếu phát hiện được tretinoin, lặp lại thí nghiệm với hệ dung môi B (B.4.8).

Đối với mẫu dạng nước, sử dụng hệ dung môi C (B.4.8).

B.6.3.2 Chấm lên bản mỏng 5 + 20 µL dung dịch thử và 5 µL dung dịch chuẩn.

B.6.3.3 Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi khoảng 15 cm (tránh ánh sáng).

B.6.4 Phát hiện

B.6.4.1 Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Quan sát dưới đèn soi UV, bước sóng 254 nm (B.5.2).

B.6.4.2 Phun thuốc thử phát hiện (B.4.9). Sấy khô bản mỏng, quan sát màu của vết thu được.

B.7 Đánh giá kết quả

B.7.1 Tính giá trị R_f của mỗi vết quan sát được bằng công thức sau:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Trong đó:

a: khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm của vết.

b: khoảng cách đường đi của dung môi.

B.7.2 So sánh vị trí và màu sắc: các vết sắc ký khi soi đèn và sau khi phun thuốc thử của dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

B.7.3 Lưu ý: thông tin tham khảo

Bảng B.1- Vị trí và màu sắc các vết sắc ký khi soi đèn và sau khi phun thuốc thử của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

Hoạt chất	Giá trị R_f ước tính	Màu sắc của vết quan sát được sau khi phun thuốc thử
Tretinoin	0,1 – 0,3 (Hệ dung môi A) Khoảng 0,5 (Hệ dung môi B) Khoảng 0,4 (Hệ dung môi C)	Màu xanh nhạt

- Giới hạn phát hiện (LOD) trong mẫu là 12,5 µg/g
- Thử nghiệm để xác nhận rõ hơn sẽ được thực hiện bằng phương pháp HPLC.