

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13645:2023

Xuất bản lần 1

**MỸ PHẨM – PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH –
ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG 2-PHENOXYETHANOL,
METHYLPARABEN, ETHYLPARABEN,
PROPYLPARABEN VÀ BUTYLPARABEN
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG
HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Cosmetics – Analytical methods – Identification and determination of 2-phenoxyethanol,
methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben by high-performance
liquid chromatography (HPLC)*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13645:2022 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ACM 004 - Identification and determination of 2-phenoxyethanol, methyl, ethyl, propyl and butyl 4- Hydroxybenzoate in cosmetic products by high-performance liquid chromatography (HPLC)

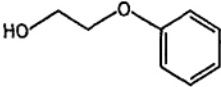
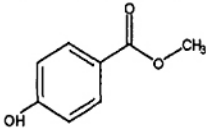
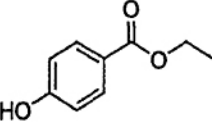
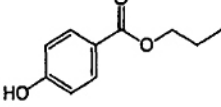
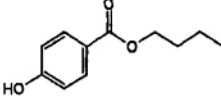
TCVN 13645:2022 do Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben là những chất bảo quản được sử dụng phổ biến trong nhiều Loại thực phẩm, thuốc, mỹ phẩm vì có giá tương đối thấp, hiệu quả cao và dễ sử dụng.

Một hay hỗn hợp các chất trên có thể bảo vệ sản phẩm khỏi nhiều loại vi sinh vật và trong khoảng môi trường pH rộng từ 3 đến 8, có nghĩa là gần như có thể bao quát tất cả các sản phẩm chăm sóc da trên thị trường. Tuy nhiên, với liều lượng đủ Lớn trong mỹ phẩm có thể gây kích ứng cho những người da nhạy cảm. Ngoài ra còn có nguy cơ tiềm ẩn gây hại cho sức khỏe. Hiện tại, khối ASEAN có quy định về giới hạn các chất trên trong các sản phẩm mỹ phẩm (Phụ Lục VI)

Bảng 1- Các paraben trong mỹ phẩm

<i>Tên</i>	<i>Công thức phân tử</i>	<i>CAS number</i>	<i>Danh pháp IUPAC</i>	<i>Cấu trúc phân tử</i>
2 - Phenoxyethanol	$C_8H_{10}O_2$	122-99-6	2-Phenoxyethan-1-ol	
Methylparaben	$C_8H_8O_3$	99-76-3	Methyl 4-hydroxybenzoate	
Ethylparaben	$C_9H_{10}O_3$	120-47-8	Ethyl 4-hydroxybenzoate	
Propylparaben	$C_{10}H_{12}O_3$	94-13-3	Propyl 4-hydroxybenzoate	
Butylparaben	$C_{11}H_{14}O_3$	94-26-8	Butyl 4-hydroxybenzoate	

Một số phương pháp định lượng các chất trên bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA đã có trong Dược điển Việt Nam và Dược điển các nước .

Phương pháp phân tích này sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA hoặc tương đương định lượng các chất trên trong sản phẩm mỹ phẩm.

Mỹ phẩm – Phương pháp phân tích – Định tính và định lượng 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Cosmetics – Analytical methods – Identification and determination of 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben by high-performance liquid chromatography (HPLC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính và định lượng 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben trong các sản phẩm mỹ phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

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

Mẫu thử được acid hóa bằng acid sulfuric sau đó phân tán trong hỗn hợp ethanol - nước. Sau khi gia nhiệt nhẹ làm tan chảy pha dầu để xúc tiến quá trình chiết tách, hỗn hợp được lọc. Các chất bảo quản trong dịch lọc được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao dùng benzophenon làm chuẩn nội.

4 Thuốc thử

TCVN 13645:2023

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 Methanol

4.2 Tetrahydrofuran

4.3 Acetonitril

4.4 Nước

4.5 Ethanol, tuyệt đối

4.6 Dung dịch acid sulfuric (H_2SO_4) 2 M

4.7 Hỗn hợp ethanol – nước (9:1)

4.8 Chất chuẩn

4.8.1 2-phenoxyethanol

4.8.2 Methyl 4-hydroxybenzoat (methylparaben)

4.8.3 Ethyl 4-hydroxybenzoat (ethylparaben)

4.8.4 n-Propyl 4-hydroxybenzoat (propylparaben)

4.8.5 n-Butyl 4-hydroxybenzoat (butylparaben)

4.8.6 Benzophenon

4.9 Pha động: hỗn hợp Tetrahydrofuran – nước – methanol – acetonitril (5:60:10:25)

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, C18 (4,6 mm x 250 mm; 5 μ m) hoặc tương đương.

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

5.4 Máy lắc

5.5 Máy ly tâm

5.6 Bể cách thủy, duy trì được ở nhiệt độ 60 °C

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

5.8 Pipet thủy tinh, loại A với các dung tích khác nhau

5.9 Ống thủy tinh, 100 mL, có nắp đậy kín hoặc tương đương.

5.10 Màng lọc PVDF, kích thước lỗ lọc 0,45 μm hoặc tương đương

5.11 Bình nón, 125 mL, có nắp đậy kín

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn

6.1.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 50 mg mỗi chuẩn methylparaben, ethylparaben, propylparaben butylparaben và 200 mg chuẩn 2-phenoxyethanol, chính xác đến 0,1 mg, vào bình định mức 100 mL (5.7).

Thêm 50 mL hỗn hợp ethanol – nước (9:1) (4.7), lắc để hòa tan và định mức đến thể tích, trộn đều.

6.1.2 Dung dịch chuẩn:

Lấy chính xác 20,0 mL, 10,0 mL, 5,0 mL, 2,0 mL và 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc vào từng bình định mức 50 mL (5.7) riêng rẽ.

Thêm vào mỗi bình 10,0 mL dung dịch chuẩn nội (6.2.3) và 1,0 mL dung dịch H_2SO_4 2 M (4.5), thêm hỗn hợp ethanol – nước (9:1) đến thể tích lắc đều, lọc qua giấy lọc 0.45 μm (5.10), dung dịch chỉ pha khi dùng.

6.1.3 Dung dịch chuẩn nội

Cân chính xác 125 mg benzophenon, chính xác đến 0,1 mg, vào bình định mức 250 mL (5.7), hòa tan và bổ sung đến thể tích với hỗn hợp ethanol-nước (9:1).

6.1.4 Dung dịch chuẩn định tính

Chuẩn bị dung dịch riêng biệt của từng chất 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben giống dung dịch chuẩn.

6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

Cân chính xác khoảng 1,000 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, vào vào bình nón 125 mL có nắp đậy kín (5.11), thêm 1 mL dung dịch H_2SO_4 2 M (4.5), 40 mL hỗn hợp ethanol – nước (9:1), 1 g bi thủy tinh (nếu cần) thêm 10 mL dung dịch chuẩn nội (6.2.3), lắc 1 min bằng máy lắc (5.4), đặt trong bể cách thủy (5.6) ở khoảng 60 °C trong 5 min, lấy ra làm nguội dưới nước lạnh, để trong tủ lạnh 1 giờ, đưa về nhiệt độ phòng khoảng 10-15 min (nếu cần).

Lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 μm (5.10) (sau ly tâm nếu cần).

TCVN 13645:2023

Cần phân tích dịch lọc bằng HPLC trong vòng 24 h.

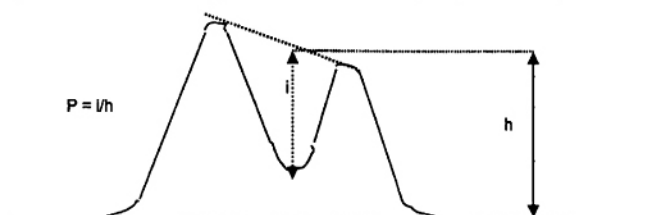
6.3 Xác định bằng HPLC

6.3.1 Điều kiện sắc ký

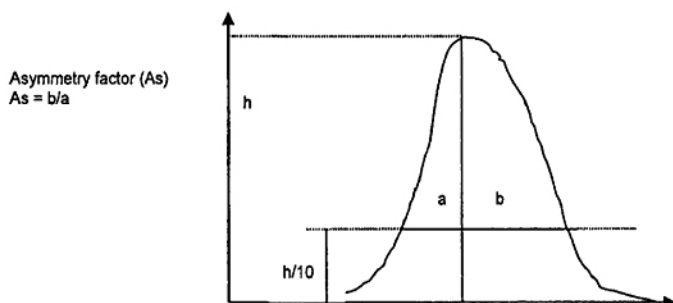
- Pha động: Tetrahydrofuran – nước – methanol – acetonitril (5:60:10:25)
- Bước sóng phát hiện: PDA hoặc tương đương bước sóng 280 nm
- Thể tích tiêm: 20 μL
- Tốc độ dòng: 1 mL/min

6.3.2 Phân tích mẫu

- Tương thích hệ thống: Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn làm việc (RSD tỷ số diện tích hay chiều cao pic của chất chuẩn và chất chuẩn nội pic $\leq 2,0\%$).
- Tiêm lần lượt 20 μL các dung dịch chuẩn định tính (4.10) ghi lại sắc ký đồ. Từ sắc ký đồ thu được dung dịch chuẩn định tính xác định tên từng pic 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben trong sắc kí đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử.
- Tiêm lần lượt 20 μL các dung dịch chuẩn làm việc (4.9.2), ghi lại sắc ký đồ. Từ sắc ký đồ thu được tính tỷ số chiều cao (hoặc diện tích) giữa các pic chuẩn và pic chuẩn nội. Xây dựng đường hồi quy tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc của tỷ lệ chiều cao (hoặc diện tích) theo nồng độ của từng chất chuẩn.
- Tiêm 20 μL dung dịch thử (6.1) và ghi lại sắc ký đồ. Tính tỷ số chiều cao pic (hoặc diện tích) của pic chuẩn so với pic chuẩn nội.
- Nếu diện tích pic của mẫu thử quá cao hoặc quá thấp, cần giảm hoặc tăng lượng mẫu thử để diện tích pic nằm trong khoảng tuyến tính.
- Sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn và dung dịch thử phải đáp ứng các yêu cầu sau:
Pic trong sắc ký đồ phải tách rõ. Nếu không tách, có thể thay đổi cột, hoặc chỉnh tỷ lệ pha động nếu cần. Độ phân giải $\geq 1,5$.
- Sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn và dung dịch thử phải đáp ứng các yêu cầu sau:
Pic trong sắc ký đồ phải tách rõ và có tỷ số đỉnh – hõm $\geq 0,90$ (xem hình)



- Nếu không đạt được yêu cầu tách, có thể thay đổi cột có hiệu lực tách tốt hơn, hoặc chỉnh tỷ lệ pha động nếu cần.
- Hệ số đối xứng (As) của tất cả các pic phải từ 0,9 – 1,5, sắc ký đồ xác định hệ số đối xứng nên được ghi với tốc độ biểu đồ ít nhất 2 cm/phút (xem hình)



7 Tính kết quả

7.1 So sánh thời gian lưu và phổ hấp thụ UV của pic dung dịch thử với pic dung dịch chuẩn. Mẫu thử được xem là có 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben khi xuất hiện các pic của dung dịch thử có thời gian lưu khác biệt không quá 2,0 % so với thời gian lưu của các pic tương ứng trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Phổ hấp thụ UV của pic tương ứng trong dung dịch thử với phổ của pic trong dung dịch chuẩn có chỉ số tương đồng không ít hơn 90 %.

7.2 Tính nồng độ các chất bảo quản có trong mẫu thử từ tỷ lệ diện tích (hay chiều cao) giữa các pic chuẩn và chuẩn nội trong sắc ký đồ mẫu thử dựa trên phương trình đường hồi quy của các chất bảo quản tương ứng.

Xác định hàm lượng % (kl/kl) của 2-phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben và butylparaben trong mẫu thử theo công thức:

$$\% w_i (w/w) = b_i \cdot 51 / (10000 \times a)$$

Trong đó:

b_i = nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) của chất bảo quản i trong mẫu thử tính từ đường hồi quy dung dịch chuẩn.

a = khối Lượng mẫu thử (g)

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết mẫu;
- Tất cả thông tin cần thiết để nhận biết phòng thí nghiệm thực hiện thử nghiệm;
- Viện dẫn tiêu chuẩn này;

TCVN 13645:2023

- d) Ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- e) Ngày nhận mẫu phòng thí nghiệm;
- 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 Độ đặc hiệu****Bảng A.1- Tính đặc hiệu**

Hoạt chất	Thời gian Lưu (min)	Độ Phân giải	Yêu cầu
2 phenoxyethanol	5,747		Độ phân giải $\geq 1,5$
Methylparaben	6,763	3,295	
Ethylparaben	10,320	9,110	
Propylparaben	17,665	13,818	
Butylparaben	32,296	18,035	

A.2 Độ chụm**Bảng A.2- Độ Lặp**

Hoạt chất	RSD (%)	Horrat	Yêu cầu
2 phenoxyethanol	1,383	0,27	Horrat ≤ 2
Methylparaben	1,417	0,22	
Ethylparaben	1,470	0,23	
Propylparaben	1,588	0,25	
Butylparaben	1,499	0,23	

A.3 Độ đúng**Bảng A.3- Độ đúng**

Hoạt chất	Độ thu hồi	Yêu cầu
2 phenoxyethanol	104,95	90 % - 110 %
Methylparaben	105,59	
Ethylparaben	105,60	
Propylparaben	105,56	
Butylparaben	105,48	

A.4 Khoảng tuyến tính

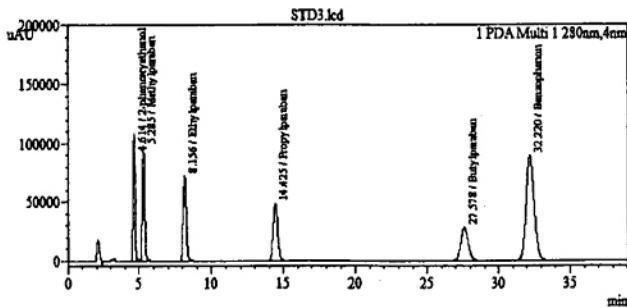
Bảng A.4- Khoảng tuyến tính

Hoạt chất	Khoảng nồng độ (µg/mL)	Hệ số hồi qui (r)	Yêu cầu
2 phenoxyethanol	40 ÷ 400	0,99959	r ≥ 0,995
Methylparaben	10 ÷ 100	0,99973	
Ethylparaben	10 ÷ 100	0,99980	
Propylparaben	10 ÷ 100	0,99982	
Butylparaben	10 ÷ 100	0,99982	

A.5 Giới hạn định lượng LOQ

Bảng A.5- Giới hạn định lượng LOQ

Hoạt chất	Kết quả (µg/g)
2 phenoxyethanol	3,69
Methylparaben	2,17
Ethylparaben	1,95
Propylparaben	0,94
Butylparaben	7,07



<< FDA >>					
ID#1 Compound Name: 2-phenoxyethanol	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	4.614	976833	1.210
ID#2 Compound Name: Methylparaben	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	5.285	1178998	1.087
ID#3 Compound Name: Ethylparaben	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	8.156	1117831	1.099
ID#4 Compound Name: Propylparaben	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	14.425	1047921	1.093
ID#5 Compound Name: Butylparaben	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	27.578	984362	1.100
ID#6 Compound Name: Benzophenone	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor
	STD3.lcd	Chuan	32.220	3406631	1.071

Hình A.1- Sắc kí đồ và thông tin pic của dung dịch chuẩn hỗn hợp