

XÂY DỰNG VÀ ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CHẤT BẢO QUẢN METHYLPARABEN TRONG CHẾ PHẨM GEL BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Phạm Thị Tú Uyên^a, Nguyễn Trần Tường Vy^b, Võ Hồng Ngọc^c,
Nguyễn Thị Ngọc Tuệ^d, Nguyễn Văn Nhật^e, Ngô Đăng Trường Hải^f

Tóm tắt:

Methylparaben là chất bảo quản phổ biến trong mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm, tuy nhiên việc sử dụng lâu dài có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe. Nghiên cứu này nhằm xây dựng và ứng dụng quy trình định lượng methylparaben trong chế phẩm gel bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Đối tượng nghiên cứu gồm mẫu gel tự tạo và 06 mẫu gel trên thị trường bao gồm mỹ phẩm và dược phẩm. Quá trình xử lý mẫu được tối ưu hóa bằng phương pháp chiết nhiệt với dung môi ethanol, lọc và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng cột pha đảo C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 255 nm, pha động bao gồm hỗn hợp acetonitrile và nước (50:50, tt/tt), tốc độ dòng 0,8 mL/phút và nhiệt độ cột 30 °C. Kết quả cho thấy phương pháp đạt về độ đặc hiệu, hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,99998$, độ lặp lại và độ chính xác trung gian đều có RSD% < 2,0%, tỷ lệ thu hồi đạt 98,0% - 102,0%. Khoảng xác định từ 16 - 24 μg/mL, giới hạn phát hiện và định lượng lần lượt là 0,008 và 0,026 μg/mL. Phương pháp đã xây dựng đáp ứng đầy đủ yêu cầu thẩm định và được ứng dụng thành công để định lượng methylparaben trong các mẫu gel thị trường.

Từ khoá: methylparaben, gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, HPLC.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF THE PRESERVATIVE METHYLPARABEN IN GEL FORMULATIONS

Abstract:

Methylparaben is a commonly used preservative in cosmetics, pharmaceuticals, and food products; however, long-term exposure may pose health risks. This study aimed to develop and apply a quantification method for methylparaben in gel formulations using high-performance liquid chromatography (HPLC). The study samples included a self-

^a Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: uyen93565@donga.edu.vn

^b Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: vy93075@donga.edu.vn

^c Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: ngoc95398@donga.edu.vn

^d Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: tue94757@donga.edu.vn

^e Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: nhat92929@donga.edu.vn

^f Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. email: haindt@donga.edu.vn

prepared gel and six commercial gel products comprising both cosmetics and pharmaceuticals. Sample preparation was optimized using thermal extraction with ethanol as the solvent, followed by filtration and quantification via HPLC. The chromatographic conditions employed a reversed-phase C18 column (250 × 4,6 mm; 5 μm), a PDA detector at a detection wavelength of 255 nm, and a mobile phase consisting of acetonitrile and water (50:50, v/v), with a flow rate of 0,8 mL/min and column temperature maintained at 30°C. The method demonstrated good specificity, with a linear correlation coefficient (R^2) of 0,99998, repeatability and intermediate precision with RSD% < 2,0%, and recovery rates within the range of 98,0% – 102,0%. The quantification range was 16 – 24 μg/mL, with a limit of detection (LOD) of 0,008 μg/mL and a limit of quantification (LOQ) of 0,026 μg/mL. The validated method met all required analytical criteria and was successfully applied to determine methylparaben content in commercial gel samples.

Keywords: *methylparaben, gel, high-performance liquid chromatography, HPLC.*

Đặt vấn đề

Methylparaben (MP) là một chất bảo quản nhóm paraben được sử dụng phổ biến trong ngành mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm nhờ có khả năng kháng khuẩn giúp ổn định sản phẩm (Taibullah M. & Muhammad H., 2023). Tuy nhiên, việc sử dụng các sản phẩm chứa methylparaben trong thời gian dài tiềm ẩn các độc tính ảnh hưởng đến sức khỏe con người như: viêm da tiếp xúc, gây rối loạn nội tiết và chuyển hoá, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú (Shifa Mohamed Rafi et al., 2024).

Để định lượng chính xác các chất bảo quản, nhiều phương pháp đã được áp dụng như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GC), quang phổ (UV-Vis), v.v. Trong đó, phương pháp HPLC có nhiều ưu điểm như độ chính xác cao, độ lặp lại tốt, đồng thời có thể phân tách, nhận dạng và xác định hàng loạt các hợp chất mà một số phương pháp trước đây gặp nhiều khó khăn.

Hiện nay, nhiều công trình về methylparaben đã được công bố, tuy nhiên các nghiên cứu về định lượng methylparaben trong gel vẫn còn hạn chế. Gel là một dạng bào chế có nền mẫu phức tạp, quá trình tách chiết các hoạt chất phân tích ra khỏi nền mẫu này thường gặp rất nhiều khó khăn, đặc biệt là khi phân tích bằng HPLC – với yêu cầu độ tinh khiết mẫu thử cao. Bên cạnh đó, một số dược điển tham chiếu hiện hành như Dược điển Việt Nam V, Dược điển Anh, Dược điển Mỹ, Dược điển Châu Âu vẫn chưa có các chuyên luận đề cập đến việc định lượng chất bảo quản methylparaben trong chế phẩm gel. Việc xây dựng một phương pháp định lượng methylparaben trong gel vừa đơn giản, vừa đảm bảo được độ chính xác và có thể ứng dụng trong phân tích dược phẩm và mỹ phẩm là rất cần thiết.

Vì vậy, nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài “*Xây dựng và áp dụng phương pháp định lượng chất bảo quản methylparaben trong chế phẩm gel bằng sắc ký lỏng hiệu năng*”

cao (HPLC)” nhằm mục đích hoàn thiện phương pháp phân tích methylparaben trong gel, đảm bảo độ chính xác trong phân tích định lượng methylparaben của dạng bào chế gel, qua đó hỗ trợ cơ quan quản lý dược trong việc kiểm soát chất lượng các sản phẩm gel.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Mẫu tự tạo: Mẫu thử chứa methylparaben 0,2%, gentamicin 0,3% và tá dược (glycerin, carbopol 940, HPMC, propylen glycol, dung dịch đệm phosphat pH 7,4, triethylamin) vừa đủ 100,0 g. Mẫu giả dược có thành phần giống mẫu thử nhưng không chứa methylparaben.

Chế phẩm thị trường: lựa chọn dựa trên các yêu cầu sau:

Đối với mẫu dược phẩm: phải chứa chất bảo quản methylparaben trong sản phẩm, đơn hoặc đa hoạt chất và còn hạn sử dụng.

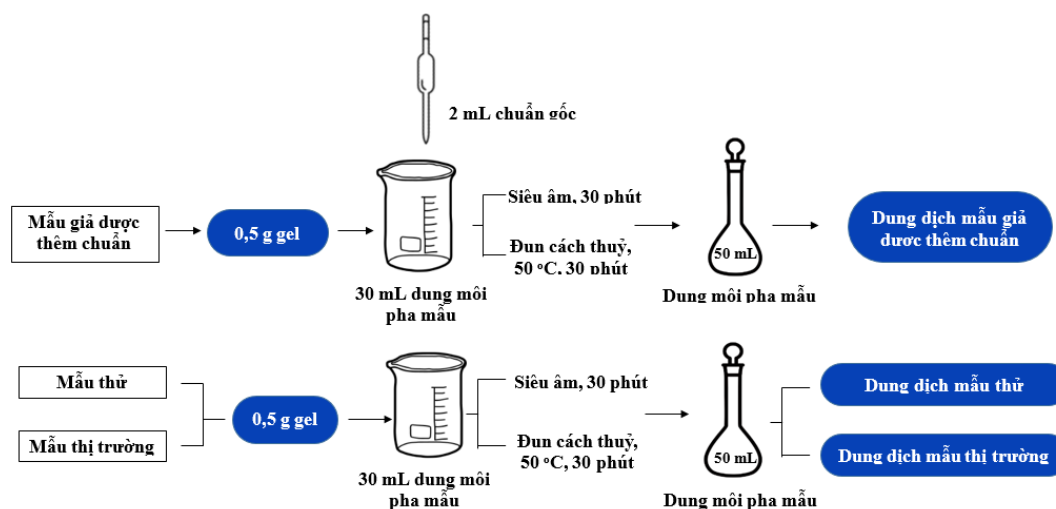
Đối với mẫu mỹ phẩm: còn hạn sử dụng.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định lượng methylparaben trong chế phẩm gel bằng phương pháp HPLC:

Khảo sát dung môi pha mẫu: methanol và ethanol – hai dung môi thường được sử dụng nhiều trong quá trình xử lý mẫu chứa paraben (Nguyễn Hữu Lạc Thủy et al., 2016; Thái Nguyễn Hùng Thu et al., 2020). Mẫu thử và mẫu chuẩn được xử lý với hai dung môi, sau đó tiến hành sắc ký và đánh giá để lựa chọn dung môi phù hợp.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu được thực hiện theo hai phương pháp: chiết bằng sóng siêu âm và chiết nhiệt để phân tách methylparaben. Quy trình chuẩn bị mẫu được thực hiện như hình 1. Mẫu thử, mẫu thị trường và mẫu giả dược thêm chuẩn trong mỗi phương pháp được tiến hành sắc ký và đánh giá để lựa chọn phương pháp thích hợp.



Hình 1. Quy trình chuẩn bị mẫu giả dược thêm chuẩn, mẫu thử và mẫu thị trường

Khảo sát hệ pha động: nhóm nghiên cứu khảo sát 03 hệ dung môi pha động trên mẫu chuẩn, cụ thể: Hệ (I) MeOH – H₂O (50:50, tt/tt), hệ (II) ACN – H₂O (50:50, tt/tt) và hệ (III) ACN – CH₃COOH 1% (50:50, tt/tt) (Nguyễn Hữu Lạc Thủy et al., 2016; Thái Nguyễn Hùng Thu et al., 2020), sau đó đánh giá để lựa chọn hệ pha động phù hợp.

Khảo sát các điều kiện sắc ký khác: sẽ khảo sát theo phương pháp đơn biến (One Factor at a Time - OFAT). Nhóm nghiên cứu sẽ cố định một số thông số: cột sắc ký, thể tích tiêm, hệ pha động (đã được khảo sát), sau đó lần lượt thay đổi để khảo sát các thông số còn lại, bao gồm: tỷ lệ pha động, tốc độ dòng và nhiệt độ cột.

Thẩm định quy trình định lượng methylparaben

Quy trình phân tích được tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của ICH, bao gồm các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, khoảng xác định, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

Ứng dụng định lượng thành phần methylparaben trong một số sản phẩm trên thị trường.

Các sản phẩm gel trên thị trường được chọn trong đề tài này gồm có 04 mẫu dược phẩm (Maxxacne-C, Gelacmeigel, Remos IB, Ciacca) và 02 mẫu mỹ phẩm (Sữa rửa mặt Simple, Sữa rửa mặt CeraVe). Áp dụng phương pháp đã xây dựng định lượng MP trong các mẫu gel đã chọn.

Kết quả và thảo luận

Xây dựng quy trình định lượng methylparaben trong chế phẩm gel bằng HPLC

Khảo sát dung môi pha mẫu

Mẫu chuẩn: Dung dịch mẫu chuẩn methylparaben trong dung môi pha mẫu có nồng độ 20 µg/mL. Mẫu thử: Dung dịch mẫu thử được chuẩn bị từ 0,5 g mẫu, chiết theo quy trình xử lý bằng phương pháp siêu âm.

Các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử được pha trong hai dung môi khác nhau là ethanol và methanol, sau đó được phân tích bằng phương pháp sắc ký. Kết quả khảo sát ở bảng 1 cho thấy dung môi pha mẫu MeOH và EtOH ảnh hưởng không đáng kể đến độ tinh khiết pic và thời gian lưu, nhưng có sự chênh lệch về hệ số đối xứng. Khi sử dụng dung môi EtOH để pha mẫu chuẩn và mẫu thử, hình dạng pic cân đối với hệ số đối xứng (1,20 – 1,22) tối ưu hơn. Hệ số đối xứng khi dùng dung môi MeOH nằm trong khoảng từ 1,27 – 1,32, pic có xu hướng bị kéo đuôi nhiều hơn. Do đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn dung môi EtOH để chiết xuất MP.

Bảng 1. Kết quả khảo sát dung môi pha mẫu

Dung môi	Mẫu	m (g)	T _R (phút)	S (mAu× phút)	As (0,8-1,5)	Độ tinh khiết pic
EtOH	Chuẩn	0,0501	4,587	5425464	1,19973	1,000000
	Thử	0,5011	4,587	4860834	1,22234	1,000000
MeOH	Chuẩn	0,0501	4,593	5391661	1,26595	1,000000
	Thử	0,5084	4,587	4894235	1,31704	1,000000

(*) m: khối lượng cân, T_R: thời gian lưu, S: diện tích pic, A_s: hệ số đối xứng

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Dung dịch mẫu thử và mẫu thị trường được chuẩn bị từ 0,5 g gel tương ứng mỗi mẫu. Dung dịch mẫu giả được thêm chuẩn được chuẩn bị bằng cách cân 0,5 g gel giả được và thêm 2 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben pha trong ethanol có nồng độ 500 µg/mL. Các mẫu được chiết theo hai phương pháp siêu âm và nhiệt, mỗi mẫu được tiến hành lặp lại hai lần đối với từng phương pháp.

Các dung dịch mẫu thử, mẫu thị trường và mẫu giả được thêm chuẩn được tiến hành sắc ký. Kết quả khảo sát ở bảng 2 cho thấy hàm lượng MP và tỷ lệ thu hồi trong các mẫu giữa hai phương pháp không có sự khác biệt đáng kể và đều thể hiện hiệu suất chiết cao. Tuy nhiên, phương pháp chiết nhiệt có độ lặp lại và độ chính xác cao hơn so với phương pháp chiết siêu âm, thể hiện qua %RSD và %RE thấp hơn. Vì vậy, nhóm nghiên cứu chọn phương pháp chiết nhiệt để tiến hành khảo sát các điều kiện tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả khảo sát phương pháp xử lý mẫu

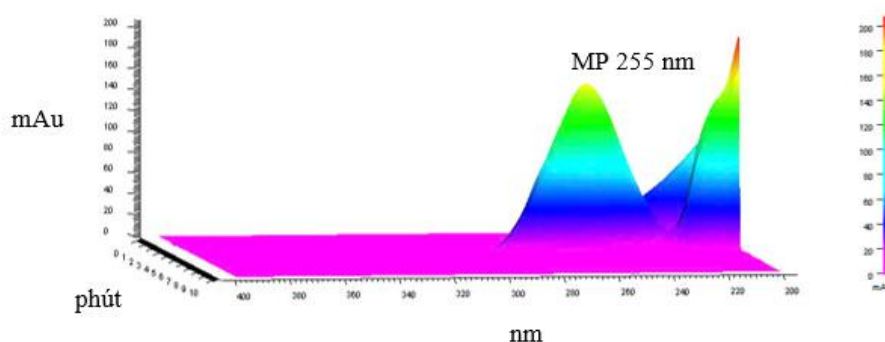
Đánh giá	Mẫu	Nhiệt	Siêu âm
%Hàm lượng	Thử	97,09	96,57
	Thị trường	0,09	0,09
% Tỷ lệ thu hồi	Giả được thêm chuẩn	98,99	99,65
%RSD	Thử	0,80	0,44
	Thị trường	0,06	1,61
%RE	Giả được thêm chuẩn	1,01	1,55
Chú thích: Không tối ưu		Tối ưu	

(*) %RSD: %độ lệch chuẩn tương đối, %RE: sai số tương đối

Khảo sát hệ pha động

Các tài liệu đã công bố trước đây cho biết: MP có độ hấp thụ trong khoảng bước sóng 254 - 258 nm (Maslarska et al., 2018; Thái Nguyễn Hùng Thu et al., 2020), giá trị này có thể thay đổi tùy thuộc vào điều kiện thí nghiệm. Để lựa chọn bước sóng cho phương pháp phân tích, nhóm nghiên cứu tiến hành xác định bước sóng cực đại của MP.

Kết quả ở hình 2 cho thấy bước sóng hấp thu cực đại của MP là 255 nm. Do đó, nhóm nghiên cứu quyết định sử dụng bước sóng 255 nm để định lượng MP.



Hình 2. Phổ 3D bước sóng hấp thu cực đại của methylparaben

Kết quả khảo sát ở bảng 3, hệ I (MeOH - H₂O) có hệ số đối xứng lớn nhất, thời gian lưu dài nhất, số đĩa lý thuyết (N) và độ tinh khiết thấp nhất trong 03 hệ. Vì vậy, hệ I không phù hợp. So sánh giữa hệ II (ACN - H₂O) và hệ III (ACN - CH₃COOH 1%), cả hai đều có thời gian lưu tương đồng. Tuy nhiên, hệ II có số đĩa lý thuyết cao hơn, giúp cột sắc ký đạt được sự cân bằng và ổn định tốt hơn. Đặc biệt, hệ II có độ tinh khiết pic đạt 1,000, thể hiện khả năng phân tách và chọn lọc tốt hơn so với hệ III. Vì vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn hệ II (ACN - H₂O) để tiến hành khảo sát các điều kiện tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả khảo sát hệ pha động

Hệ	Thành phần	T _R (phút)	S (mAu × phút)	N	A _s (0,8 - 1,5)	Độ tinh khiết pic
I	MeOH - H ₂ O (50:50, tt/tt)	8,347	5500371	5634	1,25518	0,974334
II	ACN - H ₂ O (50:50, tt/tt)	4,587	5425464	6276	1,19973	1,000000
III	ACN - CH ₃ COOH 1% (50:50, tt/tt)	4,533	5421800	5999	1,20199	0,992041

(*) T_R: thời gian lưu, S: diện tích pic, N: số đĩa lý thuyết, A_s: hệ số đối xứng

Khảo sát điều kiện sắc ký khác

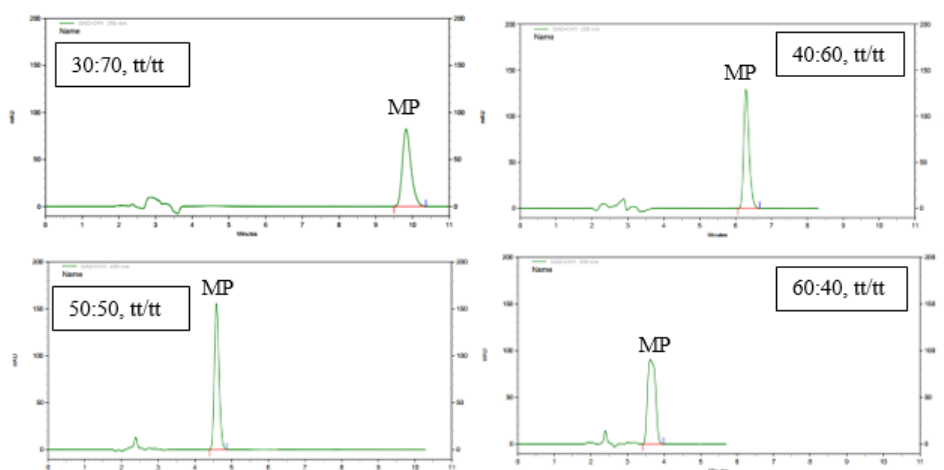
Khảo sát tỷ lệ pha động

Khảo sát tỷ lệ pha động theo tỷ lệ ACN tăng dần như sau: ACN - H₂O (30:70, tt/tt), (40:60, tt/tt), (50:50, tt/tt) và (60:40, tt/tt). Tiến hành sắc ký mẫu chuẩn, kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 3.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tỷ lệ pha động

Tỷ lệ pha động ACN - H ₂ O (tt/tt)	T _R (phút)	S (mAu×phút)	N	A _s (0,8-1,5)	Độ tinh khiết pic
30:70	9,827	5378023	8407	1,29729	1,000000
40:60	6,287	5400295	8213	1,31348	1,000000
50:50	4,587	5425464	6276	1,19973	1,000000
60:40	3,620	5444044	1588	1,33344	0,998615

(*) T_R: thời gian lưu, S: diện tích pic, N: số đĩa lý thuyết, A_s: hệ số đối xứng

**Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát tỷ lệ pha động**

Dựa vào kết quả khảo sát ở bảng 4 và hình 3, có thể nhận thấy rằng tỷ lệ 60:40 không phù hợp vì có số đĩa lý thuyết (1588) và độ tinh khiết pic (0,999) thấp nhất ảnh hưởng đến sự cân bằng cột, hiệu năng phân tách chất không tốt, đỉnh pic tù làm kết quả định lượng kém chính xác. So sánh 03 tỷ lệ còn lại, tỷ lệ 50:50 có hệ số đối xứng (1,200) và thời gian lưu (4,587) thấp nhất, số đĩa lý thuyết tuy thấp hơn tỷ lệ 30:70 và 40:60 nhưng vẫn đảm bảo hiệu năng phân tích chất tốt. Với những nhận xét như trên, nhóm nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ pha động ACN - H₂O (50:50, tt/tt) để tiến hành khảo sát các điều kiện tiếp theo.

Khảo sát tốc độ dòng

Kết quả khảo sát ở bảng 5 cho thấy: khi tăng tốc độ dòng từ 0,6 mL/phút đến 1,5 mL/phút thì thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết giảm dần. Trong đó, tốc độ dòng 0,6, 0,8 và 1,5 mL/phút có hệ số đối xứng tốt hơn so với hai tốc độ dòng còn lại. Vì vậy, nhóm xem xét lựa chọn một trong ba tốc độ dòng này. Tốc độ dòng 1,5 mL/phút cho pic có hệ số đối xứng tốt nhưng diện tích pic và số đĩa lý thuyết thấp, làm ảnh hưởng đến khả năng định lượng chất ở nồng độ thấp. Tốc độ dòng 0,8 mL/phút có thời gian lưu (5,760 phút) ngắn hơn tốc độ dòng 0,6 mL/phút (7,693 phút) nhưng vẫn đảm bảo được khả năng phân tích chất tốt, hình dạng pic cân đối. Ngoài ra, tốc độ dòng cao có thể làm tăng áp suất của hệ thống, ảnh hưởng đến hiệu suất hệ thống bơm và giảm tuổi thọ của

cột. Do đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn tốc độ dòng 0,8 mL/phút để tiếp tục tiến hành khảo sát điều kiện tiếp theo.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng (mL/phút)	T_R (phút)	S (mAu×phút)	N	A_S (0,8-1,5)	Độ tinh khiết pic
0,6	7,693	9032721	6724	1,16752	1,00000
0,8	5,760	6785710	6200	1,16998	1,00000
1,0	4,593	5408650	6057	1,23361	1,00000
1,2	3,813	4532864	5925	1,23972	1,00000
1,5	3,047	3624951	5400	1,16108	1,00000

(*) T_R : thời gian lưu, S: diện tích pic, N: số đĩa lý thuyết, A_S : hệ số đối xứng

Khảo sát nhiệt độ cột

Sau khi đã cố định các thông số đã khảo sát, tiếp tục khảo sát nhiệt độ cột. Kết quả được trình bày ở bảng 6 cho thấy các thông số thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và độ tinh khiết không có sự khác biệt đáng kể giữa các điều kiện nhiệt độ cột khảo sát. Theo các nghiên cứu trước đó (Ahmed Kareem Abbas, 2022; Kim Ngọc Đức et al., 2022), nhóm nghiên cứu thấy rằng nhiệt độ cột 30°C thường được lựa chọn vì đây là mức nhiệt độ ổn định, phù hợp, giúp đảm bảo độ lặp lại, đồng thời không gây ảnh hưởng đến hiệu suất phân tách cũng như tuổi thọ cột sắc ký. Khi ở điều kiện nhiệt độ cao có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của cột, mẫu có thể bị phân huỷ, pha tĩnh silica có thể bị hoà tan và tiêu hao năng lượng làm giảm độ bền của cột (Trần Tử An, 2016). Do đó, nhóm nghiên cứu quyết định chọn nhiệt độ cột 30°C để áp dụng cho các khảo sát tiếp theo.

Bảng 6. Kết quả khảo sát nhiệt độ cột

Nhiệt độ	T_R (phút)	S (mAu×phút)	A_S (0,8-1,5)	Độ tinh khiết pic
25 °C	5,927	6781296	1,18074	1,00000
30 °C	5,760	6785710	1,16998	1,00000
35 °C	5,620	6775409	1,17090	1,00000
40 °C	5,467	5777482	1,18244	1,00000

(*) T_R : thời gian lưu, S: diện tích pic, A_S : hệ số đối xứng

Tổng hợp kết quả xây dựng quy trình định lượng methylparaeben trong chế phẩm gel bằng HPLC

Từ các kết quả khảo sát đã thu được, nhóm nghiên cứu đề xuất quy trình định lượng MP trong chế phẩm gel bằng phương pháp HPLC như sau:

Chuẩn bị mẫu:

Pha động: Pha động ACN – H₂O (50:50, tt/tt)

Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu

Quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn chạy sắc ký: Cân chính xác khoảng 50 mg chất chuẩn methylparaben cho vào bình định mức 100 mL, thêm 50 mL ethanol để hòa tan hoàn toàn, thêm ethanol đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2 mL dung dịch vừa pha cho vào bình định mức 50 mL. Thêm ethanol đến vạch, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ MP khoảng 20 µg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Quy trình chuẩn bị mẫu thử chạy sắc ký: Cân chính xác khoảng 0,5 g gel cho vào cốc có mỏ 50 mL, thêm 30 mL dung môi ethanol, khuấy đều, đun trên bếp cách thủy ở nhiệt độ 50 °C trong 30 phút. Để nguội, cho vào bình định mức 50 mL và thêm dung môi ethanol đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Quy trình chuẩn bị mẫu giả dược chạy sắc ký: tương tự như mẫu thử, khác biệt ở việc sử dụng 0,5 g gel mẫu giả dược ở bước đầu tiên.

Điều kiện sắc ký:

Pha động: ACN – H₂O (50:50, tt/tt)

Cột sắc ký: Cột pha đảo C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm)

Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút

Thể tích tiêm mẫu: 10 µL

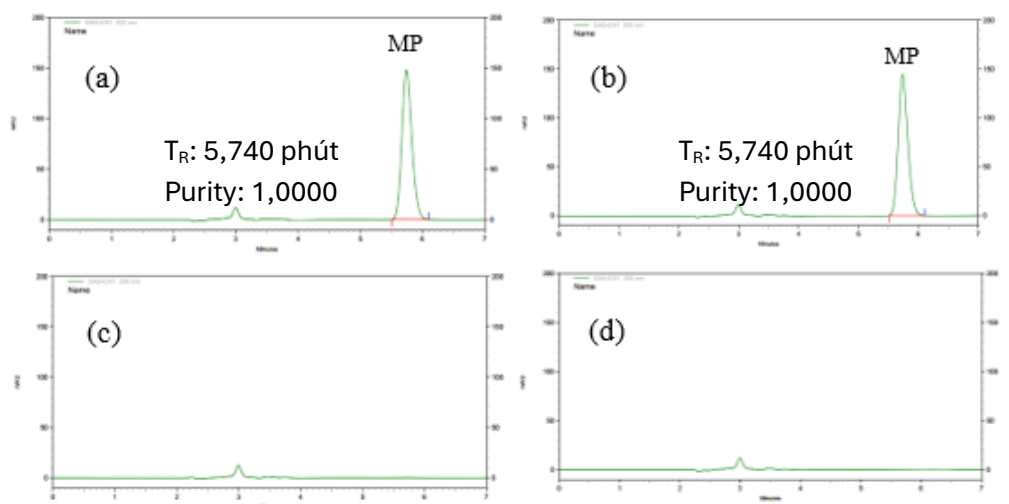
Nhiệt độ cột: 30°C

Đầu dò PDA: Bước sóng phát hiện 255 nm

Thẩm định quy trình định lượng methylparaben

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng, mẫu giả dược, mẫu chuẩn và mẫu thử. Kết quả ở hình 5 cho thấy pic sắc ký đồ của mẫu thử (hình 5b) có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic MP trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn (hình 5a) và pic có độ tinh khiết 1,000, Sắc ký đồ của mẫu giả dược (hình 5c) và mẫu dung môi (hình 5d) không hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic MP trong mẫu chuẩn và mẫu thử. Do đó, quy trình phân tích đạt yêu cầu về chỉ tiêu tính đặc hiệu.



Hình 5. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu

(a. mẫu chuẩn; b. mẫu thử; c. mẫu giả dược; d. mẫu dung môi; T_R : thời gian lưu, Purity: độ tinh khiết pic)

Tính tương thích hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần dung dịch chuẩn MP có nồng độ khoảng 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vào hệ thống sắc ký. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày ở bảng 7.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

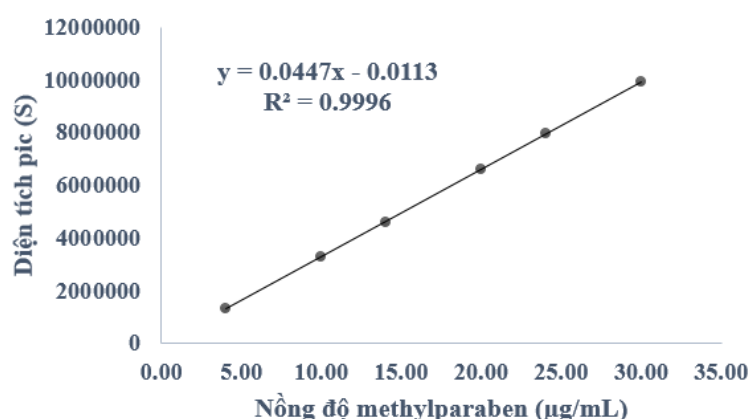
	T_R (phút)	S (mAu \times phút)	N	A_s
Trung bình	5,74	6577388	5881	1,17
%RSD	0,06	0,03	0,25	-

(*) T_R : thời gian lưu, S: diện tích pic, N: số đĩa lý thuyết, A_s : hệ số đối xứng

Kết quả cho thấy: phần trăm độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết lần lượt là 0,06%, 0,03% và 0,25% (đều $\leq 2,0\%$); hệ số đối xứng của các pic sắc ký nằm trong khoảng 1,15 - 1,19 (khoảng chấp nhận $0,8 \leq A_s \leq 1,5$). Vì vậy, phương pháp đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống.

Tính tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc MP (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pha loãng thành 06 dung dịch chuẩn có nồng độ MP chính xác khoảng (4, 10, 14, 20, 24, 30) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiến hành sắc ký ở điều kiện khảo sát thu được diện tích pic tương ứng với từng nồng độ. Sử dụng phần mềm Excel, tính toán xây dựng phương trình hồi quy biểu diễn nồng độ của MP theo diện tích pic của mỗi mẫu dung dịch chuẩn. Kết quả hình 6 cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng khảo sát với phương trình hồi quy $y = 330872x - 10414$ và hệ số tương quan (R^2) là 0,99998 $>$ 0,999. Vì thế, quy trình định lượng đạt yêu cầu về chỉ tiêu tính tuyến tính.



Hình 6. Sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ methylparaben

Độ đúng

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn: thêm chính xác một lượng MP vào các mẫu giả dược. Chuẩn bị 09 mẫu giả dược, lượng chất chuẩn được thêm vào tương ứng với 03 mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng, mỗi nồng độ chuẩn bị 03 mẫu. Tiến hành phân tích mẫu theo quy trình phân tích, ghi nhận lượng tìm thấy so với lượng thêm vào để tính % tỉ lệ thu hồi. Kết quả khảo sát độ đúng trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ đúng

Mức nồng độ	% Tỷ lệ thu hồi trung bình	%RSD (n=3)
80%	100,26	0,38
100%	99,97	0,52
120%	101,19	0,71

(*)%RSD: % độ lệch chuẩn tương đối

Kết quả khảo sát độ đúng (bảng 8) cho thấy trung bình % tỷ lệ độ thu hồi của 09 mẫu ở 03 mức nồng độ trong khoảng từ 99,97 - 101,19% (yêu cầu tỷ lệ thu hồi trong khoảng từ 98,0% - 102,0%), %RSD độ đúng của 09 mẫu tại 03 nồng độ là 0,38% - 0,71% (yêu cầu %RSD ≤ 2,0%). Như vậy, quy trình phân tích đạt yêu cầu về chỉ tiêu độ đúng.

Độ chính xác

Độ lặp lại

Tiến hành phân tích 06 mẫu thử độc lập trong cùng một điều kiện xác định, không có sự thay đổi về thiết bị. Xác định hàm lượng MP có trong các mẫu thử. Kết quả khảo sát độ lặp lại được trình bày ở bảng 9.

Độ chính xác trung gian

Tiến hành như độ lặp lại trong một ngày khác và kiểm nghiệm viên khác. Kết quả độ chính xác trung gian được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian

STT	Độ lặp lại (Ngày 1)		Độ chính xác trung gian (Ngày 2)	
	Mẫu	Hàm lượng%	Mẫu	Hàm lượng%
1	Mẫu 1	98,08	Mẫu 1	98,43
2	Mẫu 2	99,06	Mẫu 2	99,40
3	Mẫu 3	99,65	Mẫu 3	100,97
4	Mẫu 4	98,34	Mẫu 4	99,28
5	Mẫu 5	100,38	Mẫu 5	99,43
6	Mẫu 6	99,46	Mẫu 6	100,32
	TB = 99,16%; %RSD = 0,86% (n=6)		TB = 99,64%; %RSD = 0,89% (n=6)	
	TB = 99,40%; %RSD = 0,87% (n=12)			

(*) TB: trung bình, %RSD: % độ lệch chuẩn tương đối

Kết quả bảng 9 cho thấy %RSD của độ lặp lại trong ngày là 0,86% và 0,89%; độ lặp lại giữa hai ngày là 0,87%, đều đạt yêu cầu %RSD < 2,0%.

Sử dụng phần mềm Excel, phân tích ANOVA một chiều so sánh độ chính xác giữa hai ngày (độ lặp lại và độ chính xác trung gian) (bảng 10).

Bảng 10. Kết quả phân tích ANOVA một chiều giữa 2 ngày kiểm nghiệm

Source of Variation	ss	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,680	1	0,681	0,894	0,367	4,965
Within Groups	7,610	10	0,761	-	-	-
Total	8,290	11	-	-	-	-

Kết quả phân tích cho thấy: $F < F_{crit}$ ($0,89 < 4,97$), chứng tỏ hai tập số liệu thực nghiệm không khác nhau nên có ý nghĩa thống kê.

Vì vậy, quy trình định lượng MP trong chế phẩm gel bằng phương pháp HPLC đạt yêu cầu về độ chính xác.

Khoảng xác định

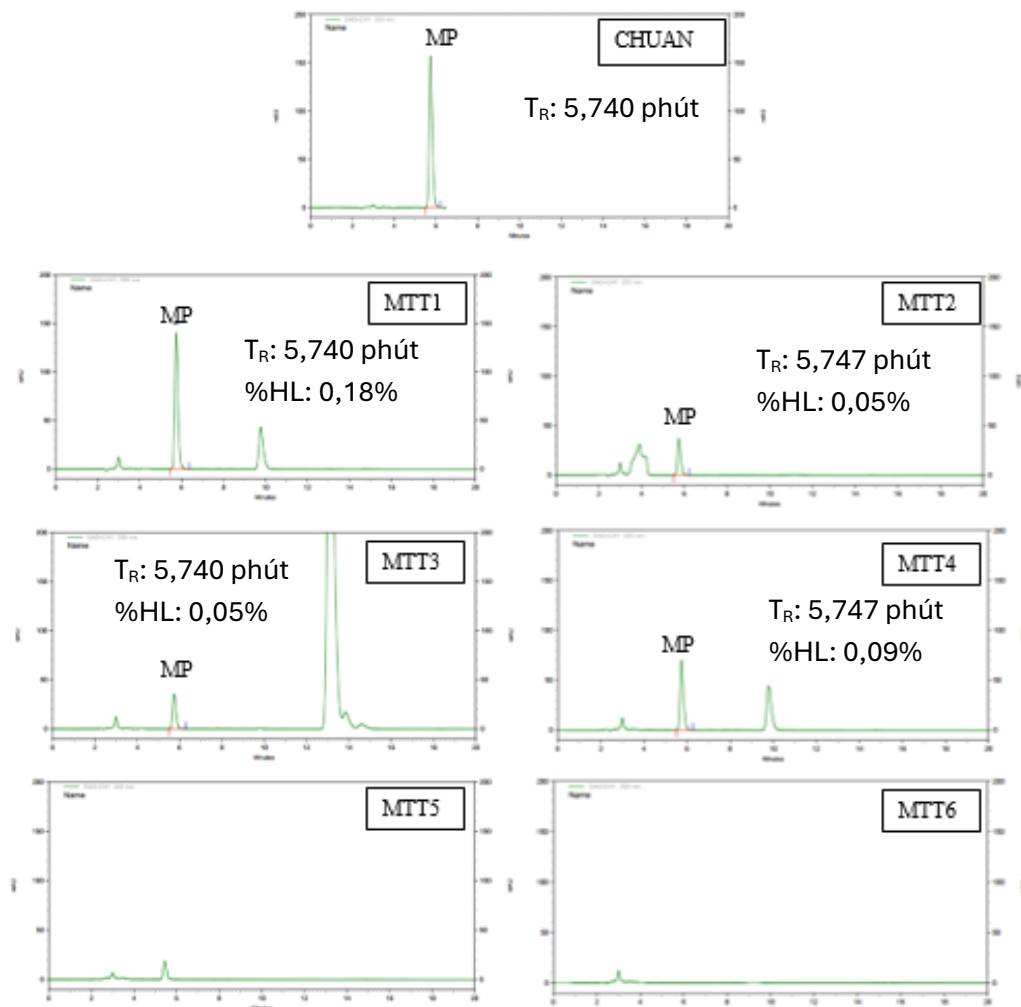
Từ kết quả khảo sát tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác, suy ra khoảng xác định của quy trình định lượng MP đã xây dựng là 16 – 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tương ứng 80 – 120% nồng độ định lượng).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn có nồng độ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đến nồng độ thấp nhất mà thiết bị có thể ghi nhận được tín hiệu. Từ đó có thể xác định được giá trị LOD và LOQ ($\text{LOQ} = 3,3\text{LOD}$). Kết quả thu được LOD của phương pháp phân tích định lượng MP là 0,008 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) và LOQ là 0,026 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Ứng dụng định lượng thành phần methylparaben trong một số mẫu gel trên thị trường

Áp dụng quy trình định lượng MP đã xây dựng và thẩm định để định lượng MP trong một số mẫu gel trên thị trường. Từ sắc ký đồ (hình 7), có thể thấy trong 4 mẫu gel được phẩm (MTT1, MTT2, MTT3 và MTT4) xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic MP trong mẫu chuẩn, đường nền ổn định, ít nhiễu, pic MP cân đối và tách hoàn toàn với pic của các chất khác. Hàm lượng MP dao động từ 0,05% - 0,18%, phù hợp với giới hạn của Hiệp định Mỹ phẩm ASEAN (Bộ Y tế - Cục quản lý Dược, 2015). Mẫu gel mỹ phẩm MTT5 xuất hiện pic gần với thời gian lưu của MP; mẫu gel mỹ phẩm MTT6 không xuất hiện pic MP.



Hình 7. Sắc ký đồ mẫu chuẩn và 06 mẫu gel chọn trong nghiên cứu

(T_R: thời gian lưu, %HL: %Hàm lượng)

Từ các kết quả đạt được cho thấy quy trình phân tích đã xây dựng có thể ứng dụng để định lượng MP trong một số mẫu gel trên thị trường hiện nay.

Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu, tiến hành thực nghiệm, xử lý và đánh giá các kết quả thu được, nhóm nghiên cứu đã đạt được những kết quả sau:

Xây dựng được quy trình định lượng chất bảo quản methylparaben trong chế phẩm gel bằng phương pháp HPLC. Quá trình xử lý mẫu được tối ưu hóa phương pháp chiết nhiệt với dung môi ethanol, lọc và định lượng bằng phương pháp HPLC. Pha động bao gồm hỗn hợp acetonitrile và nước (50:50, tt/tt). Các điều kiện sắc ký trong quá trình phân tích được tối ưu hóa với thông số như sau: cột pha đảo C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm), đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 255 nm, nhiệt độ cột: 30 °C, tốc độ dòng: 0,8 mL/phút, thể tích tiêm: 10 μL.

Quy trình phân tích đã xây dựng đạt các yêu cầu về thẩm định theo hướng dẫn ICH. Kết quả thẩm định: quy trình đạt độ đặc hiệu; hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,99998$; độ lặp lại và độ chính xác trung gian đều có $RSD\% < 2,0\%$; độ đúng với tỷ lệ thu hồi trong giới hạn 98,0% - 102,0%; khoảng xác định: 16 - 24 μg/mL; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,008 μg/mL và 0,026 μg/mL.

Quy trình được áp dụng để định lượng được methylparaben trong 06 mẫu gel trên thị trường, trong đó 04 mẫu gel dược phẩm có chứa MP đều nằm trong giới hạn cho phép của FDA và 02 mẫu gel mỹ phẩm không có chứa MP.

Tài liệu tham khảo

- Ahmed Kareem Abbas, K. F. A. (2022). Innovation and Validation of a new RP- HPLC Method for the Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate, Phenylephrine HCl, Glycerylguaiacolate, Methylparaben, Propylparaben and Yellow No.6 in Pharmaceutical Syrup [Phát triển và thẩm định phương pháp RP-HPLC định lượng đồng thời Chlorpheniramine Maleate, Phenylephrine HCl, Glycerylguaiacolate, Methylparaben, Propylparaben và màu vàng số 6 trong siro dược phẩm]. *AIP Conference Proceedings*, 2394(1). doi:10.1063/5.0121434
- Công văn số 6577/QLD-MP ban hành ngày 13/04/2015 về Cập nhật quy định về các chất dùng trong mỹ phẩm. (2015).
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology [Phương pháp thử trong thẩm định quy trình phân tích]. *Q2 (R1)*, 1(20). 05.
- Kim Ngọc Đức, Nguyễn Lâm Hồng, Nguyễn Thị Vân, Nguyễn Văn Bình, & Lê Quang Thảo (2022). Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời rupatadin, methylparaben và propylparaben trong siro bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo, *Tạp chí KIỂM NGHIỆM THUỐC*, *Tập 20*(78). 6-12.
- Maslarska, V., Tsvetkova, B., Peikova, L., & Bozhanov, S. (2018). HPLC method for simultaneous determination of metronidazole and preservatives in vaginal gel formulation [Phương pháp HPLC để định lượng đồng thời metronidazole và các chất bảo quản trong chế phẩm gel âm đạo]. *Acta Chromatographica*, 30(2). 127-130, doi:10.1556/1326.2017.00098
- Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Trần Hữu Tài, & Võ Thị Bạch Huệ (2016). Xây dựng quy trình định lượng đồng thời triamcinolon, methylparaben và propylparaben trong chế phẩm dạng gel bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 20(2). 365-370,
- Shifa Mohamed Rafi, Zainab Saleh Sayeed Al Jabri Hazrami, Madeeha Nayeem, Riya Mary Richard, Shaista Rizwan Ahamed Alurkar, & Naga Harika Korrapati (2024). Understanding parabens – A literature review [Tìm hiểu về parabens – Tổng quan tài liệu]. *Cosmoderma*, 4. doi:10.25259/csdm_241_2023

Taibullah M., & Muhammad H. (2023). The chemical composition of paraben and its effects on health [Hợp chất của paraben và ảnh hưởng của nó đến sức khỏe]. *Bulletin of Toraighyrov University. Chemistry & Biology series*(1,2023). doi:10,48081/anlg1171

Thái Nguyễn Hùng Thu, Võ Trần Ngọc Hùng, Lê Thị Hương Hoa, Nguyễn Thị Việt Ái, & Hoàng Thanh Tâm. (2020). Nghiên cứu xây dựng quy trình định tính đồng thời 9 paraben trong một số mỹ phẩm bằng phương pháp HPLC. *Tạp chí KIỂM NGHIỆM THUỐC, Tập 18*, 14-18.

Trần Tử An (2016). *Hoá phân tích* (Vol. 2). Hà Nội: Nhà xuất bản Y học.