

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 1/7
---	------------------------	---

ĐỊNH LƯỢNG PARABENS TRONG MỸ PHẨM BẰNG LC/MS/MS
*(Isopropylparaben, Isobutylparaben, Phenylparaben
Benzylparaben và Pentymparaben)*

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01	B.	Sử dụng format SOP mới	24/11/2017
		Bổ sung qui định thực hiện QA/QC.	
		Thay đổi hệ số pha loãng trong chiết mẫu Hệ số cũ: cân 2g lên 100 Hệ số mới 2g lên 50	

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 2/7
--	--------------------------------	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng PARABENS trong mỹ phẩm bằng LC/MS/MS.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD/MDL) và giới hạn định lượng LOQ:

Chỉ tiêu phân tích	LOD/ MDL, ppm	LOQ, ppm
Isopropylparaben	0.3	1
<i>Isobutylparaben</i>		
<i>Phenylparaben</i>		
<i>Benzylparaben</i>		
<i>Pentylparaben</i>		

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được xây dựng theo:
 - o CLG – BSP.01, Guidebook method, May 1993
 - o Journal of Chromatography A, 1073(2005) 393 - 397

III. Nguyên lý phương pháp

- Mẫu được chiết trong hỗn hợp Methanol/ nước (7:3) và được định tính và định lượng trên LC/MS/MS.

IV. An toàn phòng thí nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hóa chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- Màng lọc PTFE/ Nilon, 13 mm, 0,45 µm
- Ống ly tâm 15mL, 50mL có nắp đậy

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 3/7
--	--------------------------------	---

- Bình định mức: 10mL, 25 mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại

2. Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống LC/MS/MS bao gồm:
 - o Accela 1250 Pump.
 - o Accela autosampler.
 - o Đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra (Thermal Scientific).
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo: C₁₈, 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất và dung dịch thử

a. Hóa chất

- Nước cất khử ion LC/MS – J.T Backer
- Acetonitrile, HPLC – Fisher
- Methanol, LC/MS – J.T Backer
- Methanol, HPLC - Fisher
- HCOOH – Merck
- Ethanol - Cemaco

b. Dung dịch pha động:

- H₂O (0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L nước LC/MS.
- Acetonitrile (0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L Acetonitrile.

2. Chất chuẩn

a. Chất chuẩn: Chuẩn được sử dụng của sigma aldrich hoặc tương đương.

- Isopropyl paraben
- Butyl paraben
- Phenyl paraben
- Benzyl paraben
- Pentyl paraben

b. Dung dịch chuẩn

- Nồng độ dung dịch chuẩn được tính theo công thức sau:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 4/7
--	--------------------------------	---

$$C(\text{mg/L}) = \frac{m}{V} \times \frac{M_{\text{Base}}}{M} \text{ pure}$$

Trong đó:

- o m : khối lượng chất chuẩn (mg)
- o M_{base} : khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản.
- o M : khối lượng phân tử ở dạng đóng gói (của nhà sản xuất).
- o V : Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)
- o Pure : độ tinh khiết của chuẩn

• Dung dịch chuẩn gốc Parapens:

- o Cân khoảng 10 mg chuẩn Parapens vào các bình định mức 10 mL, định mức đến vạch Methanol. Ghi nhận khối lượng đã cân và lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.
- o Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ $< 0^{\circ}\text{C}$. Sử dụng tối đa 01 năm.

• Lưu ý: Nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên khối lượng cân thực tế.

c. Dung dịch chuẩn trung gian:

- Dung dịch chuẩn 40 mg/L: Rút 1.0 mL chuẩn gốc (1000 mg/L) vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng methanol. Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ $< 0^{\circ}\text{C}$. Sử dụng tối đa 06 tháng.
- Dung dịch chuẩn 2000mcg/L: Rút 0.5 mL chuẩn 40 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng H_2O . Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ $4^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$. Sử dụng tối đa 01 tháng

d. Dung dịch chuẩn làm việc: (bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 7 ngày)

🌈 Dung dịch chuẩn làm việc được pha như sau:

STT	Nồng độ chất chuẩn sử dụng, ppb	Thể tích chất chuẩn, mL	Thể tích định mức, mL	Nồng độ điểm chuẩn, ppb	Dụng cụ rút chuẩn
Std 01	2000	0.05	10	10	Micropipet 200 μl
Std 02		0.10		20	
Std 03		0.20		40	
Std 04		0.50		100	Pipet 2mL
Std05		1.00		200	
Std 06		2.00		400	

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 5/7
--	--------------------------------	---

III. Quy định thực hiện QA/QC


- Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.
 - Mẫu Blank hóa chất:
 - Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
 - Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix
- Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục B.IV.

IV. Quy trình phân tích

1. Xử lý mẫu

Cân 2g mẫu vào ống ly tâm 20ml, thêm 35ml Ethanol 70% vào, Vortex trong 5 phút, lắc 10 phút. Sau đó ly tâm 3000 vòng/ phút. Lấy lớp trên cho vào bình định mức 50ml, Chiết lại phần cặn với 10mlx2. Gộp chung dịch chiết vào bình 50ml, định mức lên đến vạch bằng Ethanol 70%. Lọc qua màng lọc 0.2µm vào Vial và phân tích trên LC/MS/MS.

2. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS:

 Điều kiện LC/MS/MS

Cột sắc ký	Autosampler	LC						Sắc ký - MS	
C ₁₈ : 150mm x 4.6mm x 5µm Hoặc cột tương đương	Injection: 20µm	Thời i gian (min)	Tốc độ dòng (µL/mi n)	H ₂ O 0.1 % FA (%)	Acetonitri le 0.1% FA (%)		✓ Interface: H-ESI (-) ✓ CID: 1.2 mTorr ✓ Tune file: Neg Tuning – 25022015.TSQTune		
		0	400	70	30				
		1		70	30				
		1.5		100	0				
		3.5		100	0				
		4		70	30				
		6		70	30				
	Hoạt chất	Ion mẹ		Ion con		CE	Tube lens		
	Isopropylparaben	179		92; 137		24; 17	68		
	Isobutylparaben	193		92; 136		26; 20	77		
	Phenylparaben	228		92; 137		29; 19	73		

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 6/7
--	--------------------------------	---

Benzylparaben	227	92; 136	27; 17	76
heptylparaben	207	92; 137	26; 18	70

3. Trình tự phân tích trên LC/MS/MS

- Mẫu được phân tích trên thiết bị LC/MS/MS theo trình tự sau
 - Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
 - Dây chuẩn.
 - Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
 - Chuẩn check.
 - Mẫu Blank.
 - Mẫu
 - Mẫu QC
 - Chuẩn check
- Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

- Hàm lượng Paraben trong mẫu kiểm được tính theo công thức sau:

$$C = \left(\frac{C_0 \times V_{dm}}{1000 \times m} \times f \right)$$

Trong đó:

- C: hàm lượng Paraben có trong mẫu kiểm, mg/kg
- C₀: nồng độ Paraben trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, µg/L
- V_{dm}: Thể tích định mức, mL
- m: khối lượng mẫu phân tích, g
- f: Hệ số pha loãng nếu có.
- 1/1000: Hệ số quy đổi từ ppb về ppm

Lưu ý: Với những mẫu không phát hiện, không cần xây dựng đường chuẩn mà chỉ cần tiêm chuẩn ở một nồng độ duy nhất để xác nhận và so sánh.

D. KIỂM SOÁT QA\QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm Zero) với $r^2 \geq 0.995$.
- ✓ Hiệu suất thu hồi: 80 – 120%
- ✓ Độ lệch của thời gian lưu: $\leq 2.5\%$ ($\leq 12s$)
- ✓ Tỷ số ion:

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
------------------	-------------------------

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.080 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 24/11/2017 Trang: 7/7
--	--------------------------------	---

> 50%	± 20%
> 20% - 50%	± 25%
> 10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Kết quả được ghi nhận và báo cáo theo các biểu mẫu sau
oBM.156.06;
oBM.15.04a.