**ĐỊNH LƯỢNG PARABENS TRONG MỸ PHẨM BẰNG LC/MS/MS**

*(Isopropylparaben, Isobutylparaben, Phenylparaben*

*Benzylparaben và Pentylparaben)*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 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** |  | Sử dụng format SOP mới | **24/11/2017** |
| **B.** | Bố 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 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

# TỔNG QUAN

# 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 |
| *Isobutylparaben* |
| *Phenylparaben* |
| *Benzylparaben* |
| *Pentylparaben* |

# Tài liệu tham khảo

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

1. **Nguyên lý phương pháp**

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

1. **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.

1. **PHÂN TÍCH**
2. **Thiết bị và dụng cụ**
3. 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
  + 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:
* Accela 1250 Pump.
* Accela autosampler.
* 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).

## Hóa chất và dung dịch hóa chất

### Hóa chất và dung dịch thử

### Hóa chất

### Nước cất khử ion LC/MS – J.T Backer

### Acetolnitrile, HPLC – Fisher

### Methanol, LC/MS – J.T Backer

### Methanol, HPLC - Fisher

### HCOOH – Merck

### Ethanol - Cemaco

### 

### 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

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

### Isopropyl paraben

### Butyl paraben

### Phenyl parapen

### Benzyl parapen

### Pentyl parapen

1. Dung dịch chuẩn

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



*Trong đó:*

* + *m: khối lượng chất chuẩn (mg)*
  + *Mbase: khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản.*
  + *M: khối lượng phân tử ở dạng đóng gói ( của nhà sản xuất).*
  + *V: Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)*
  + *Pure: độ tinh khiết của chuẩn*

### Dung dịch chuẩn gốc Parapens*:*

### 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.

### Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ < 00C. 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.

### 

### 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 < 00C. 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 H2O. Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ 40C - 200C. Sử dụng tối đa 01 tháng

### 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 | Micpropipet 200µl |
| 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 |

1. **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.

1. **Quy trình phân tích**
2. **Xử lý mẫu**

Cân 2g mẫu vào ống ly tâm 20ml, thêm 35ml Ethanol 70% vào, Votex 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 căn 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.

1. **Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS:**

### Điều kiện LC/MS/MS

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Cột sắc ký** | | **Autosampler** | | **LC** | | | **Sắc ký - MS** | | |
| C18:150mm x 4.6mm x 5µmHoắc cột tương đương | | Injection: 20µm | | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | *Thời gian (min)* | *Tốc độ dòng (µL/min)* | *H2O 0.1% FA (%)* | *Acetonitrile 0.1% FA (%)* | | *0*  *1*  *1.5*  *3.5*  *4*  *6* | *400* | *70*  *70*  *100*  *100*  *70*  *70* | *30*  *30*  *0*  *0*  *30*  *30* | | | | Interface: H-ESI (-)CID: 1.2 mTorrTune file: Neg Tuning – 25022015.TSQTune | | |
| **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 |
| Benzylparaben | | 227 | | 92; 136 | 27; 17 | | 76 |
| heptylparaben | | 207 | | 92; 137 | 26; 18 | | 70 |

### 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.

### Dãy 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.*

# TÍNH KẾT QUẢ

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

### 

### Trong đó:

### C: hàm lượng Paraben có trong mẫu kiểm, mg/kg

### Co: nồng độ Paraben trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, μg/L

### Vdm: 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.*

1. **KIỂM SOÁT QA\QC**

* Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn ( bao gồm điểm Zero) với r2 ≥ 0.995.
* Hiệu suất thu hồi: 80 – 120%
* Độ lệch của thời gian lưu: ≤ 2.5% ( ≤ 12s)
* Tỷ số ion:

|  |  |
| --- | --- |
| **Tỷ số ion** | **Độ lệch cho phép** |
| > 50%  > 20% - 50%  > 10% - 20%  ≤ 10% | ± 20%  ± 25%  ± 30%  ± 50% |

### **BÁO CÁO KẾT QUẢ**

### Kết quả được ghi nhận và báo cáo theo các biểu mẫu sau

### BM.156.06;

### BM.15.04a.