

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHẤT CẤM HOẶC SỬ DỤNG CÓ GIỚI HẠN TRONG MỸ PHẨM

Xác định một số chất cấm/giới hạn HL trong mỹ phẩm

Các chất cấm/giới hạn HL

- Chất màu
- Chất có tác dụng dược lý
- Chất bảo quản

Phương pháp phân tích

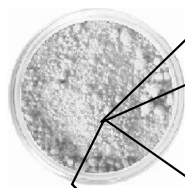
- PP Sắc ký lớp mỏng (TLC)
- PP Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Ứng dụng trong KNMP

- Phương pháp hòa hợp ASEAN
- Quy trình phân tích theo phương pháp VKNTW

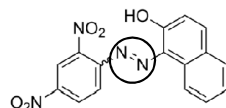
Một số chất màu bị cấm

• Metanil yellow (MY)



Tên khác: Permenant orange,
Light orange R, Orange pigment
X, Carnelio red 2GL...

Mã màu: 12075

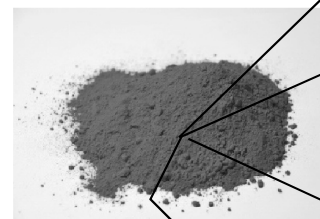


Độc tính: có thể gây kích ứng
da, mắt, gây đột biến gen

Thường được sử dụng trong
mực, sơn, sản phẩm nhựa
và cao su...

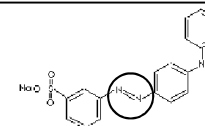
Một số chất màu bị cấm

• Pigment orange 5 (PO)



Tên khác: acid yellow 36,
tropaeolin G...

Mã màu: 13065



Độc tính: có thể gây kích ứng
da, mắt

Được dùng làm phẩm nhuộm
(vải từ sợi tự nhiên: cotton, lông
cừu, lụa..., tổng hợp: polyester,
acrylic...) – ít dùng: mực, sơn,
sản phẩm nhựa...

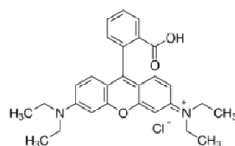
Một số chất màu bị cấm

• Rhodamin B (RB)



Tên khác: Rhodamine 610, C.I. Pigment Violet 1, Basic Violet 10 ...

Mã màu: 45170



Độc tính: có thể gây kích ứng da, mắt, có khả năng gây ung thư...

Được dùng làm thuốc nhuộm (giấy), thuốc thử cho các KL, ứng dụng trong CNSH...

Phương pháp phân tích

- Sắc ký lớp mỏng (TLC)
- Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Ứng dụng phát hiện chất màu cấm trong mỹ phẩm

• Phương pháp hòa hợp ASEAN – ACM 002

Định tính chất màu cấm trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC (PO, MY, RB)

ACM 002

• TCL

Chuẩn bị:

- Mẫu chuẩn:

- + PO: pha dung dịch có nồng độ 0,1 mg/ml trong dung môi dichloromethan/ hỗn hợp DM (N,N-dimethylformamid/ acid phosphoric: 95/5) – siêu âm trong 30' đến tan hoàn toàn
- + MY, RB: pha dung dịch có nồng độ 0,2 mg/ml trong methanol/ DMF/ hỗn hợp DM

ACM 002

• TLC

Chuẩn bị:- **Mẫu thử:**

+ Mỹ phẩm màu: hòa tan 0,1-0,3 g mẫu vào 2 ml hỗn hợp DM – đun đến 90°C trong 1h đến tan hoàn toàn (nếu cần)

Lưu ý: mỹ phẩm nghi có PO: chiết bằng DCM

Mỹ phẩm dầu: loại bỏ chất béo bằng 5ml n-hexan/2 lần (nếu lần màu thì chiết lại bằng 3 ml HHDM)

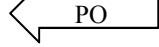
+ Mỹ phẩm nước/sản phẩm tẩy rửa (toilettries):

Hòa tan 1-5g mẫu vào 20ml DMF - đun cách thủy/10ph, để nguội đến t° phòng, lọc – loại bỏ lớp dầu thừa bằng 40ml ether dầu hỏa – cô lớp DMF/ đun cách thủy (cô cả lớp ether dầu hỏa có phần chất màu tan trong dầu) – Hòa tan cân trong 0,5-1ml methanol

ACM 002

• TCL

Dung môi khai triển sắc ký:

- DS1: Dichloromethan 
- DS2: Ethyl acetat/Methanol/(Amoniac/Nước: 3/7):15/3/3
- DS3: Ethanol/Nước/Iso-Butanol/Amoniac: 31 / 32/40/1
- DS4: Isopropanol/Amoniac: 100/25
- DS5: n-butanol/Ethanol/water/Acetic acid: 60/10/20/0,5
- DS6: Ethyl acetate/n-butanol/Amoniac: 20/55/25

ACM 002

• TLC

Phát hiện vết:

- Dưới ánh sáng ban ngày:

+ PO cho màu cam

+ MY cho màu vàng

+ RB cho màu hồng sáng

- Soi dưới ánh sáng tử ngoại (254nm): RB có huỳnh quang màu hồng sáng chói

Giới hạn phát hiện:

Màu/Giới hạn	Chuẩn (µg)	Mỹ phẩm màu (µg/g)	Sản phẩm dùng tẩy rửa (µg/g)
PO	0,02	133-400	0,4-4
MY	0,005	33-100	0,1-1
RB	0,04	266-800	0,8-8

ACM 002

• HPLC

Chuẩn bị Mẫu chuẩn và Mẫu thử: tương tự PP SKLM

Pha động:

- Dung dịch Tetrabutylamoni (TBA) 0,005M: Nước: 75:25

Điều kiện sắc ký:

- Cột : Hypersil ODS (C18), 5µm, 200x4,6mm hoặc tương đương
- Nhiệt độ cột: 30°C
- Tốc độ dòng: 1ml/ph
- Bước sóng: 435nm cho MY ; 535 cho PO, RB
- Vùng đọc phổ: 275 đến 760nm
- Thể tích tiêm: 10µl
- Thời gian chạy SK: 35 phút

ACM 002

• HPLC

Thời gian lưu tương ứng: PO -13ph, RB 6ph,
MY- 3ph

Giới hạn phát hiện:

Màu/Giới hạn	Chuẩn (µg/ml)	Mỹ phẩm màu (µg/g)	Sản phẩm dùng tẩy rửa (µg/g)
PO	16	153	32
MY	3	70	6
RB	40	800	80

Quy trình phân tích chất màu cảm do VKN xây dựng

• Metanil Yellow

Chuẩn bị

Dung môi chiết: DMF: acid phosphoric (95:5)

Mẫu thử

- 2g MP + khoảng 5ml DM chiết mẫu, khuấy kỹ, chuyển dung dịch thu được vào bình gan.
- Thêm khoảng 20ml n-hexan vào bình gan, tráng lại cốc đựng mẫu bằng DM chiết mẫu 2 lần x 5ml rồi chuyển vào bình gan, lắc kỹ/5ph, để lắng cho phân lớp, gan lấy phần dung môi chiết mẫu (lớp dưới).
- Nếu lớp n-hexan vẫn còn màu, thêm 4ml DM chiết mẫu vào bình gan chiết lần 2.

Gộp dịch chiết, thêm DM chiết mẫu vừa đủ 20,0ml, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, màng lọc 0,45µm, tiêm sắc ký

Quy trình phân tích chất màu cảm do VKN xây dựng

• HPCL

Điều kiện sắc ký

- Cột Apollo C18 (250x4,6mm; 5µm) hoặc cột có tính năng tương đương
- Detector PDA đặt trong dải bước sóng từ 200-900nm, chọn bước sóng 424nm
- Pha động: methanol – dung dịch đệm pH 6,2 (55:45)
- Tốc độ dòng: 1,0ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 20µl
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng

Thời gian lưu: MY 16ph, LOD 1,2µg/g, LOQ 4,0 µg/g

Quy trình phân tích chất màu cảm do VKN xây dựng

• Rhodamin B

Chuẩn bị

Dung môi chiết: acetonitril: nước (1:1)

Mẫu thử:

- *Son và son móng*: 0,5g mẫu vào cốc có mỏ, dùng thìa thủy tinh phân tán đều trong cốc, dùng 15ml n-hexan chuyển mẫu và tráng cốc vào bình gan.

Thêm 25ml DM chiết mẫu vào bình gan, lắc kỹ trong 30ph, để lắng cho phân lớp, gan lớp dưới.

Lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm SK

- *Phấn mắt*: 0,5g MP + 25,0ml DM chiết mẫu lắc kỹ, chuyển vào ống ly tâm, ly tâm với tốc độ 5000 v/ph trong 5ph.

Lọc dịch ly tâm qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• HPLC

Điều kiện sắc ký

- Cột Alltech, Grace RP18 (250x4,6mm; 5µm)
 - Detector PDA: quét phổ UV-VIS từ 300-900nm, chọn bước sóng 550nm
 - Pha động: Acetonitril: Tetrahydrofuran:: Dung dịch đệm pH 9,0 (2:3:5)
 - Tốc độ dòng: 1,0ml/ph
 - Thể tích tiêm mẫu: 100 µl
 - Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Thời gian lưu: 8,9 phút, LOD 2,0 µg/g*

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• Pigment orange 5

Chuẩn bị:

DM chiết mẫu: DMF: acid phosphoric (95:5)

Mẫu thử: 0,5g MP (son, sơn móng) vào cốc có mỏ 20ml (thêm 2ml dichloromethan với mẫu son dạng thỏi), dùng thìa thủy tinh phân tán, thêm 10ml DM chiết mẫu, lắc siêu âm khoảng 10ph, chuyển vào bình định mức 20,0ml.

Tráng, rửa cốc, thêm DM chiết mẫu đến vạch.

Lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm, tiêm SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• HPLC

Điều kiện sắc ký

Tương tự MY, thay đổi:

- Bước sóng: 490nm
- Tỷ lệ pha động: MeOH-DD đệm pH 6,2 (85:15)

Thời gian lưu: 10,5ph – LOD 26µg/g (0,65µg/ml)

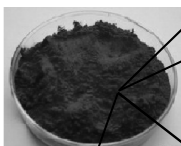
Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

Một số chất màu cấm không có trong phương pháp hòa hợp ASEAN

- Pigment red 53
- Crystal violet
- Sudan

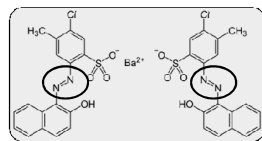
Một số chất màu cam không có trong phương pháp hòa hợp ASEAN

Pigment red 53 (PR)



Tên khác: Pigment red 53:1, Red lake, red 1860, Brilliant red...

Mã màu: 15585

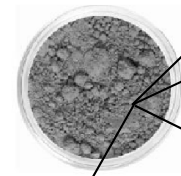


Có thể gây kích ứng cho da, mắt, nguyên nhân nhiều bệnh về hệ tạo máu ở lách, gan, thận khi dùng lâu dài

Thường được sử dụng làm phẩm màu trong mực

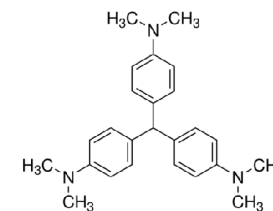
Một số chất màu cam không có trong phương pháp hòa hợp ASEAN

Crystal violet (CV)



Tên khác: Tím tinh thể, Tím gentian, Methyl violet 10B...

Mã màu: 42555

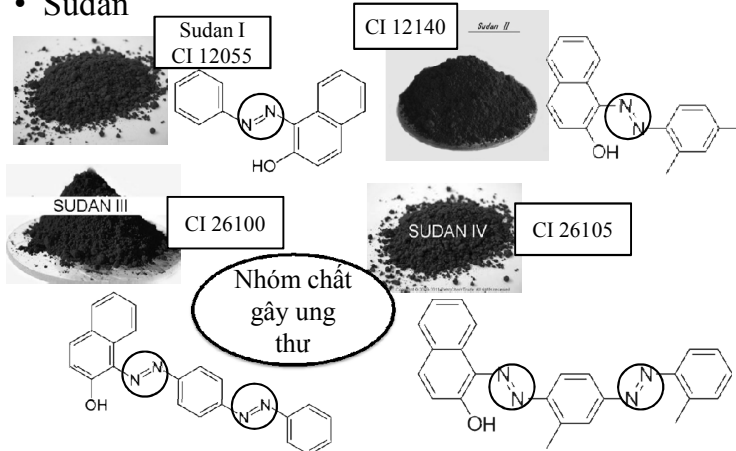


Có thể gây đột biến gen

Phẩm nhuộm triphenylmethan, ứng dụng nhiều trong phân loại vi khuẩn và hóa học

Một số chất màu cam không có trong phương pháp hòa hợp ASEAN

• Sudan



Quy trình phân tích chất màu cam do VKN xây dựng

• Pigment red 53

Chuẩn bị

DM chiết mẫu: Dimethyl sulfoxid (DMSO)

- **Mẫu chuẩn:** 50mg PR + 40ml DMSO → lắc siêu âm/10ph – thêm DM vừa đủ 100ml. Hút 2,0ml dung dịch + DMSO vừa đủ 50ml. Hút 3,0ml + 7ml DMSO + pha động vừa đủ 50ml. Lọc qua màng 0,45μm, tiệt SK

- Mẫu thử:

+ **Son nước, son rắn:** 0,5g MP + 1ml THF → khuấy để phân tán + 10ml DMSO → siêu âm/10ph + DMSO vừa đủ 20,0ml. Lọc, bỏ 5ml dịch lọc đầu, hút 5ml + pha động vừa đủ 25ml. Lọc qua màng 0,45μm, tiệt SK

+ **Phấn:** 0,5g MP + 15ml DMSO → siêu âm/10ph + DMSO đến vạch 20ml. Lọc, bỏ 5ml dịch lọc đầu, hút 5ml + pha động vừa đủ 25ml. Lọc qua màng 0,45μm, tiệt SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• HPLC

Điều kiện sắc ký

Tương tự PO, thay đổi:

- Tỷ lệ pha động: MeOH-DD đệm pH 6,2 (65:35)
- Nhiệt độ cột: 30°C

Thời gian lưu: 7ph – LOD 80µg/g (0,4µg/ml) – LOQ 240µg/g (1,2µg/ml)

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• Crystal violet (CV)

Chuẩn bị

DM chiết mẫu: ACN: NH₃ pH 9,5-10 (2:5)

- **Mẫu chuẩn:** chuẩn + DM chiết mẫu → 0,8µg/ml

- Mẫu thử:

- + **Son nước, son rắn:** 0,5g MP + 7,5ml THF → khuấy để phân tán + DM chiết mẫu đến 25ml → ly tâm 5000v/ph trong 5ph. Lọc lấy dịch ly tâm, lọc qua màng 0,45µm, tiêm SK
- + **Phấn:** 0,5g MP + 25ml DM chiết mẫu → ly tâm 5000v/ph trong 5ph Lọc lấy dịch ly tâm, lọc qua màng 0,45µm, tiêm SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• HPLC

Điều kiện sắc ký

Tương tự RB, thay đổi:

- Bước sóng: 590nm

Thời gian lưu: 8,6ph – LOD 2µg/g (0,04µg/ml)

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

• Sudan

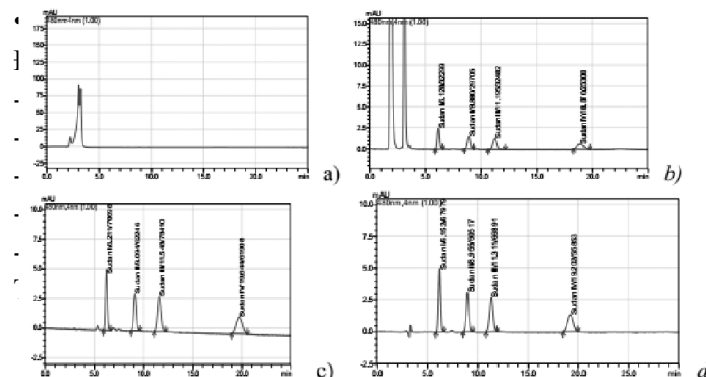
Chuẩn bị

DM chiết mẫu: Methanol: ethyl acetat (1:1)

- **Mẫu chuẩn:** Sudan I & II/ MeOH; Sudan III & IV/ Ethyl acetat

- **Mẫu thử:** 1g MP (son gió, son môi dạng thời) + 10ml DM chiết mẫu → đun cách thủy ở 60°C/5-10ph, lắc siêu âm 15ph, ly tâm 3000-400 v/ph trong 10ph, làm lạnh trong nước đá 30ph, lọc lấy phần dung dịch. Lọc qua màng 0,45µm, tiêm SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng



Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

- Phân tích đồng thời 4 chất màu PR, PO, MY, RB

Chuẩn bị:

DM chiết mẫu: DMF: acid phosphoric (95:5)

Mẫu thử: 0,5g MP (son) +10ml n-hexan, 10ml DM chiết mẫu trắng cốc → bình gạn, lắc kỹ 15ph, gạn lớp dưới vào BDM 20ml, tráng cốc bằng 10ml DM chiết mẫu, làm lại lần 2, thêm DM đến vạch. Lọc qua màng 0,45μm, tiêm SK

Quy trình phân tích chất màu cấm do VKN xây dựng

- Phân tích đồng thời 4 chất màu PR, PO, MY, RB

Điều kiện sắc ký:

- Cột Phenomenex C18
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Pha động: nước – TBA 0,005M (30;70)
- Tốc độ dòng: 1ml/ph
- Vùng quét phổ: 275-760nm
- Bước sóng: 435nm cho MY, PR, PO – 535nm cho RB
- Thể tích tiêm mẫu: 20μl

STT	MY	PR	PO	RB
LOD (μg/ml)	0,022	0,079	0,0061	0,0012
LOQ (μg/ml)	0,073	0,259	0,0202	0,0040

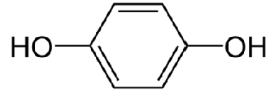
Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

- Hydroquinon
- Tretinoin
- Glucocorticoid
- BHA (acid salicylic)
- AHA (acid glycolic & acid lactic)

Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

- **Hydroquinon (HQ)**

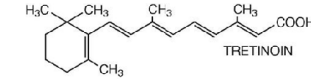
- Tên khác: Idrochinone, quinol
- Ức chế sản xuất melanin, sắc tố chính khiến da nám – dùng dài ngày gây mỏng da, rối loạn sắc tố da
- Theo ASEAN: chất cấm theo phụ lục II (số tham chiếu 1339), trừ trường hợp dùng làm móng giả $\leq 0,02\%$ (chỉ dùng chuyên nghiệp, tránh tiếp xúc da, đọc kỹ hướng dẫn trước khi sử dụng)



Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

- **Tretinoin**

- Tên khác: acid retinoic, retin A, Avita...
- Là dẫn chất của Vitamin A dùng để điều trị trứng cá và tàn nhang, làm giảm nhăn da
- Khi dùng dài ngày có thể gây viêm tại chỗ hay khô da, có vảy, đỏ da, tăng nhạy cảm ánh sáng, nguy cơ cháy nắng
- Theo ASEAN: Một trong những chất bị cấm sử dụng trong MP



Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

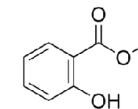
- **Các Glucocorticoid**

- Là nhóm thuốc có gốc steroid hay được sử dụng nhờ tác dụng chống viêm, chống dị ứng, ức chế miễn dịch
- Nhờ t/d chống viêm: làm nhẵn bóng da nên dễ bị trộn trong kem bôi da
- Dùng lâu dài gây teo da, xơ cứng bì, viêm da, ửng đỏ, mụn trứng cá, bội nhiễm nấm, chậm liền sẹo, đục thủy tinh thể, tăng nhãn áp...
- Theo ASEAN: là những chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm

Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

- **Acid salicylic**

- Là 1 beta hydroxy acid (BHA)
- Được sử dụng trong các sản phẩm chăm sóc da với tác dụng tẩy tế bào chết và trị mụn
- Tan tốt trong ethanol và methanol
- Tác dụng phụ: dễ gây kích ứng da (nổi mẩn đỏ, ngứa, da bong tróc...)

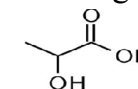
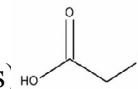


Ref No ACD # (EU #)	Substance/CAS No ⁽¹⁸⁾	Restrictions			Conditions of use and warning which must be printed on the labels
		Field of application and/or use	Maximum authorised concentration in the ready for use preparation	Other limitations and requirements	
A	B	C	D	E	F
98	Berzoic acid, 2-hydroxy- Salicylic acid CAS No 69-72-7 QUY ĐỊNH GIỚI HẠN	(a) Rinse-off hair products (b) Other products	(a) 3.0 % (b) 2.0%	Not to be used in preparations for children under three years of age, except for shampoos For purposes other than inhibiting the development of microorganisms in the product. This purpose has to be apparent from the presentation of the product As a preservative, see Annexe VI, Part 1, No 3	Not to be used for children under three years of age ⁽⁹⁾

Một số chất có tác dụng dược lý cấm/giới hạn hàm lượng trong MP

- Acid glycolic, acid lactic**

- Là alpha hydroxy acid (AHAs)
- Sử dụng trong các sản phẩm chăm sóc da với vai trò làm trắng, chống lão hóa thông qua tác dụng tẩy tế bào chết dịu nhẹ
- Tan tốt trong nước
- Tác dụng phụ: dễ gây kích ứng da (nổi mẩn đỏ, ngứa, da bong tróc...), mẫn cảm với tia UV



ACD # (EU #)	Substance/CAS No ⁽¹⁸⁾	Field of application and/or use	Maximum authorised concentration in the ready for use preparation	Other limitations and requirements	which must be printed on the labels
A	B	C	D	E	F
A6	Glycolic and lactic acid, their common salts and simple esters QUY ĐỊNH GIỚI HẠN	(a) Skin products (i) For general use (ii) For professional use (iii) For use by a qualified medical practitioner For Thailand only: (iii) For use by a qualified medical practitioner (b) Other products	(a) Skin products (i) ≤ 10% total when calculated as the acids (ii) > 10% - 20% total when calculated as the acids (iii) > 20%, total when calculated as the acids (iii) > 20%-30% total when calculated as the acids (b) Other products None	(a) Skin products (i) Final formulation ≥ pH 3.5 (ii) Final formulation ≥ pH 3.0 (iii) Final formulation ≥ pH 3.0 for products up to 30% total when calculated as the acids. (iii) Final formulation ≥ pH 3.0. (b) Other products None	(a) Skin products All Sunburn alert: This product contains an alpha hydroxy acid (AHA) that may increase your skin's sensitivity to the sun and particularly the possibility of sunburn. Use a sunscreen, wear sun protective clothing, and limit sun exposure while using this product and for a week afterwards. ⁽¹³⁾ (i) For professional use only (ii) For use by a qualified medical practitioner only. (b) Other products None

Ứng dụng phát hiện các chất có TDDL bị cấm/giới hạn trong MP

- ACM 001 (Tretinoin)
- ACM 003 (Hydroquinon)
- ACM 007 (Glucocorticoid)
- ACM 009 (Acid salicylic)
- ACM 010 (Acid glycolic và acid lactic)

ACM 001

• TLC

Chuẩn bị

- *Mẫu chuẩn*: hòa tan Tretinoin trong MeOH → dd 1mg/ml
- *Mẫu thử*:
 - + *Kem*: 3g MP + 10ml methanol → lắc xoáy/5ph, làm lạnh với nước đá/15ph, lọc qua giấy lọc
 - + *Dung dịch/gel*: 10g MP (dạng gel: +5ml nước cất) vào bình gạn – Chiết bằng 50ml n-hexan, rửa dịch chiết với 10ml nước cất. Thổi kho lớp n-hexan bằng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Hòa tan cặn trong 1ml methanol lọc qua màng lọc 0,45µm

ACM 001

• TLC

Dung môi khai triển SK:

- Hệ A: n-hexan/acid acetic 0,33% trong ethanol (9/1)
- Hệ B: n-hexan/acetone (6/4)
- Hệ C: cyclohexan/Ether/Acetone/acid acetic (54/40/4/2)

Hệ A,B: kem – Hệ C: gel/dung dịch

Thuốc thử phun phát hiện: acid phosphomolybdic 5% trong ethanol mới pha

Phát hiện vết:

- Soi dưới đèn UV (254nm)
- Phun thuốc thử: vết xanh đậm, (dark blue), thổi khí nóng vết chuyển màu bluish green

Giới hạn phát hiện: 0,125µg

ACM 001

• HPLC

Chuẩn bị: tương tự TLC

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Hypersil ODS-C18 (200x4,6mm; 5µm), hoặc tương đương
 - Detector UV, bước sóng 353nm
 - Pha động: methanol/nước/acid acetic (85:15:0,5)
 - Tốc độ dòng: 1,4ml/ph
 - Nhiệt độ cột: 30°C
 - Thể tích tiêm: 20µl
- Thời gian lưu: 9 phút – LOD 2 µg/ml

ACM 003

• TLC

Chuẩn bị

- *Mẫu chuẩn*: 0,05g HQ/ ethanol vừa đủ 25ml
- *Mẫu thử*: 1,5g MP + thêm từ từ 15ml ethanol 96%, khuấy kỹ, siêu âm 10 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, thêm ethanol vừa đủ 25ml, làm lạnh để tách lớp, lọc qua giấy lọc

Dung môi khai triển SK:

- Hệ 1: n-hexan/Acetone (3/2)
- Hệ 2: toluen/acid acetic băng (8/2)

ACM 003

• TLC

Thuốc thử phát hiện: thêm NH_3 vào dung dịch AgNO_3 5% đến tủa tan hoàn toàn – dung dịch phosphomolybdic 5% trong ethanol, sấy bản mỏng ở 100°C trong 10 phút

Phát hiện:

- Soi đèn tử ngoại (254nm)
- Phun thuốc thử

ACM 003

• HPLC

Chuẩn bị

- *Mẫu chuẩn:* 0,05g HQ + DM Pha động vừa đủ 50ml – hút 5ml pha loãng thành 50ml bằng DM pha động
- *Mẫu thử:* $1 \pm 0,1$ g MP + 25ml DM pha động, khuấy kỹ, lắc xoáy trong 1ph, đun cách thủy ở $60^\circ\text{C}/15\text{ph}$, để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm DM pha động vừa đủ 50ml – Lọc qua màng lọc $0,45\mu\text{m}$ (có thể ly tâm trong 10ph nếu cần)

ACM 003

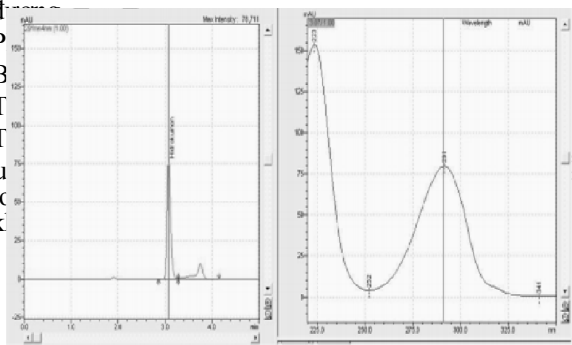
• HPLC

Điều kiện sắc ký:

- Cột thép không gỉ ODS (150x4,6mm; $10\mu\text{m}$), hoặc tương đương

- P
- B
- T
- T

Nếu
l
k



in pha
chuẩn

ACM 007

• Định tính 5 steroid bằng TLC và HPLC

- Hydrocortison acetat
- Dexamethason
- Betamethason
- Betamethason 17-valerat
- Triamcinolon acetonid

ACM 007

Nguyên tắc

Mẫu lỏng nghi ngờ chứa steroid được trung hòa và chiết bởi ethyl acetat. Mẫu kem nghi ngờ chứa steroid được chiết bởi methanol. Dịch chiết được thổi khô đến cạn. Hòa tan cần trong methanol để định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao

ACM 007

• TCL

Chuẩn bị

- **Mẫu chuẩn:** 10mg chuẩn +methanol vừa đủ 10ml
- **Mẫu thử:**
 - + **Mẫu lỏng:** 15ml MP - trung hòa đến pH 7 bằng dd HCl 0,5M hoặc dd NH₃, chiết 2 lần bằng 20ml ethyl acetat, bỏ lớp nước. Gộp dịch chiết (lọc nếu cần), cô cạn bằng cách đun cách thủy. Hòa tan cần trong 5ml methanol, lọc
 - + **Mẫu kem:** 5g MP + 20ml methanol – đun cách thủy/10ph – lắc mạnh/5ph. – ly tâm 3000-4000v/ph trong 10ph, làm lạnh trong 10 phút. Gạn lấy dịch nổi đem cô cạn/cách thủy. Hòa tan cần trong 5ml methanol, lọc

ACM 007

• TLC

Dung môi khai triển: Dichlormethan/Methyl acetat/nước (100/50/50) – Lấy lớp dưới

Thuốc thử phát hiện: Dung dịch anisaldehyd trong acid acetic – sulfuric (sấy bản mỏng ở 120°C/10ph) và Dung dịch xanh tetrazolium trong kiềm

Phát hiện vết:

Steroid	Màu vết sắc ký		R _f
	Thuốc thử anisaldehyd	Thuốc thử xanh tetrazolium	
Hydrocortison	Nâu đậm	Xanh tím	0,4
Dexamethason	Xám	Xanh tím	0,2
Betamethason	Xanh lá ngả xám	Xanh tím	0,2
Triamcinolon acetonid	Xanh lá ngả vàng	Xanh tím	0,3
Betamethason 17-valerat	Tím sẫm	Xanh tím	0,35

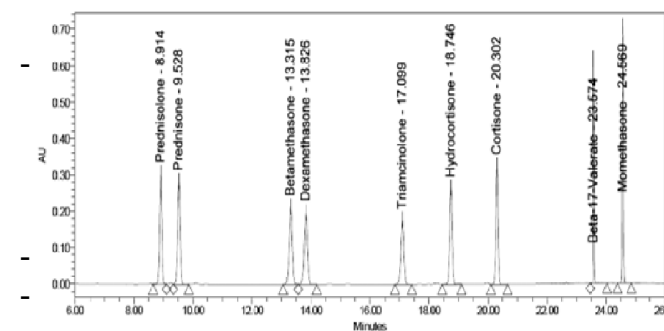
ACM 007

• HPLC

Chuẩn bị: mẫu thử và mẫu chuẩn tương tự TLC

Điều kiện sắc ký:

- Cột tháp không gỉ ODS (250x4,6mm; 5µm) hoặc



ACM 007

Steroids	Estimated retention time (RT) (min)
Betamethasone	15
Dexamethasone	16
Triamcinolone Acetonide	19
Hydrocortisone Acetate	20
Betamethasone 17-valerate	22

Steroids	LOD			LOQ		
	Standards (mg/mL)	Samples		Standards (mg/mL)	Samples	
		Liquid (μ g/mL)	Cream (μ g/g)		Liquid (μ g/mL)	Cream (μ g/g)
Hydrocortisone Acetate	0.02	7	20	0.07	23	70
Triamcinolone Acetonide	0.04	14	40	0.13	46	130
Betamethasone	0.05	17	50	0.15	58	150
Dexamethasone	0.05	17	50	0.16	62	160
Betamethasone 17-valerate	--	--	--	--	--	--

Phương pháp này có thể áp dụng định tính các steroid: cortison acetat, prednisolon, prednison, flucinolon acetamid, betamethason 21-valerat và hydrocortison

ACM 009

• Định lượng acid salicylic bằng HPLC

Nguyên tắc

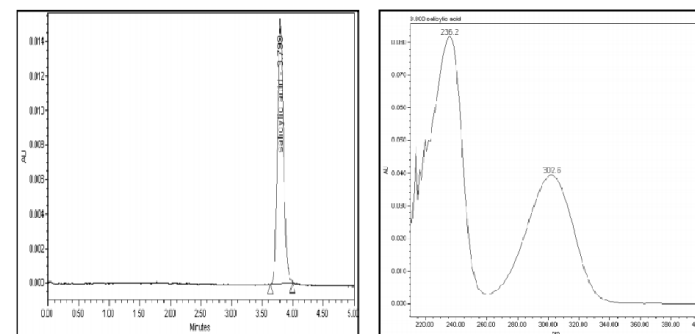
Acid salicylic là beta hydroxy acid (BHA). Acid salicylic được sử dụng trong sản phẩm chăm sóc da với vai trò tẩy tế bào chết và trị mụn. Acid salicylic tan được trong ethanol, methanol. Nồng độ acid salicylic trong mỹ phẩm được xác định dựa trên diện tích pic trong mẫu tính theo đường chuẩn acid salicylic chuẩn.

Acid salicylic được định lượng theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

ACM 009

- **Chuẩn bị mẫu:** cân chính xác 0,25g mẫu, hòa tan với 10 ml methanol bằng siêu âm hoặc lắc vortex hoặc đun ở 60°C trong 2-5 phút nếu cần đến khi kem đồng nhất. Để nguội ở nhiệt độ phòng, thêm pha động vừa đủ 25 ml. Pha loãng nếu cần. Lọc qua màng lọc, tiêm sắc ký.
- **Điều kiện sắc ký:**
 - + Pha động: MeOH: acid acetic băng 1,5% (55:45)
 - + Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
 - + Detector PDA 200 – 350 nm và λ_{\max} 236/302 nm
 - + Cột: C18 (150x4,6mm; 5 μ m)
 - + Thể tích tiêm: 20 μ l
 - + Thời gian: 5 phút (chuẩn), 8 – 15 phút (thử)

Hợp chất	%RSD diện tích pic (n=3)	Hệ số đối xứng	Hệ số lưu giữ
Acid salicylic	≤ 3	$\leq 2,0$	≥ 2



Parameter	Cream product (%w/w)
Limit of Detection (LOD)	0.005
Limit of Quantitation (LOQ)	0.01

ACM 010

• Định lượng acid glycolic và acid lactic

Nguyên tắc

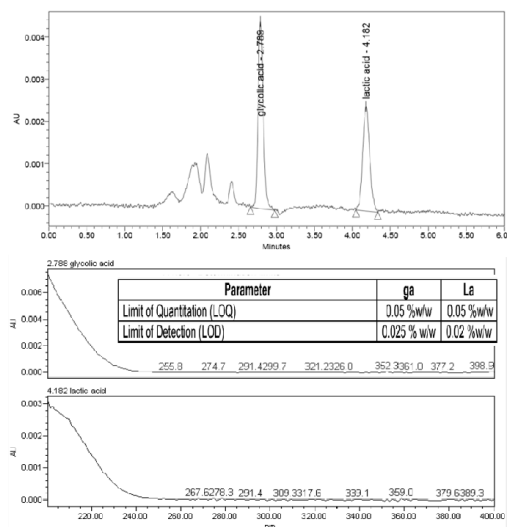
Các alpha hydroxy acid (AHAs) như acid glycolic và acid lactic được sử dụng trong sản phẩm chăm sóc da với tác dụng làm trắng và chống lão hóa bằng cách tẩy nhẹ. Những chất này dễ tan trong nước, có thể phân tích được bằng HPLC. Nồng độ acid glycolic và acid lactic trong mỹ phẩm được xác định bằng diện tích pic của acid glycolic và acid lactic trong mẫu thử dựa trên đường chuẩn.

ACM 010

- **Chuẩn bị mẫu:** Cân chính xác 0,5 g mẫu, thêm khoảng 10 ml methanol, lắc vortex 3-5 phút, thêm 10 ml pha động và lắc xoáy 5 phút/ siêu âm 10-15 phts nếu cần, thêm pha động vừa đủ 25 ml. Pha loãng nếu cần. Lọc qua màng lọc, tiêm sắc ký.

- Điều kiện sắc ký:

- + Pha động: đệm phosphat 0,2 M pH 3,2
- + Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút
- + Detector PDA 200-350 nm và λ_{\max} 210 nm
- + Thời gian: 6 phút



Quy trình phân tích Hydroquinon trong MP do VKN xây dựng

Chuẩn bị

DM chiết mẫu: methanol: đệm phosphat pH5,5 (50:50)

- *Mẫu thử:* 1g kem + 10ml DM chiết mẫu, rửa cốc bằng 10ml n-hexan, gộp vào bình gạn, lắc kỹ 10ph, để lắng cho phân lớp, gạn lớp dưới, tráng cốc bằng 10ml DM chiết mẫu, cho vào bình gạn, làm tương tự. Gộp dịch chiết, thêm DM chiết mẫu đến vạch 20ml. Lọc qua giấy lọc, lọc qua màng 0,45µm
- *Mẫu chuẩn:* hòa tan HQ trong DM chiết mẫu

Quy trình phân tích Hydroquinon trong MP do VKN xây dựng

Điều kiện sắc ký

- Cột Apollo C8 (250x4,6mm; 5 μ m)
- Pha động: methanol: đệm phosphat pH 5,5 (5:95)
- Bước sóng: 285nm
- Thể tích tiêm: 20 μ l
- Tốc độ dòng: 1,0ml/ph

Thời gian lưu: 12,5ph - LOD 0,3 μ g/ml- LOQ: 1 μ g/ml

Quy trình phân tích Tretinoin trong MP do VKN xây dựng

• Chuẩn bị

Mẫu thử: 2g mẫu kem + cx, 10,0ml methanol, đun cách thủy ở 60°C/5-10 phút - lắc siêu âm 15 phút - ly tâm 3000-4000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, làm lạnh trong nước đá 30 - 60 phút. Lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45 μ m

Điều kiện sắc ký

- Cột Apollo C18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m)
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Bước sóng lấy sắc ký đồ: 353 nm
- Pha động: methanol - acid acetic 5% (90:10)
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l.

Thời gian lưu: 12,5ph – LOD 1 μ g/ml – LOQ 3,3 μ g/ml

Quy trình phân tích steroid bị cấm trong MP do VKN xây dựng

• Phân tích đồng thời 12 steroid trong mỹ phẩm bằng HPLC

STT	Steroid	STT	Steroid
1	Prednison	7	Cortison acetat
2	Dexamethason	8	Dexamethason acetat
3	Triamcinolon acetamid	9	Betamethason valerat
4	Flucinolol acetamid	10	Clobetason propionat
5	Prednison acetat	11	Mometason furoat
6	Hydrocortison acetat	12	Betamethason propionat

Quy trình phân tích steroid bị cấm trong MP do VKN xây dựng

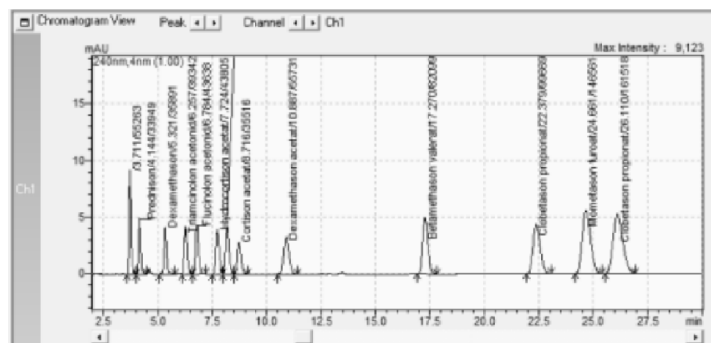
• Phân tích đồng thời 12 steroid trong mỹ phẩm bằng HPLC

Chuẩn bị mẫu thử: 0,2 g chế phẩm + 50 ml HH dicloromethan - methanol (9:1), khuấy kỹ và đun cách thủy, làm nguội trong nước đá 1 h, lọc qua giấy lọc và bốc hơi cách thủy tới khô. Hòa lại cân trong 25 ml acetonitril - methanol - nước (20:30:30), lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Điều kiện sắc ký

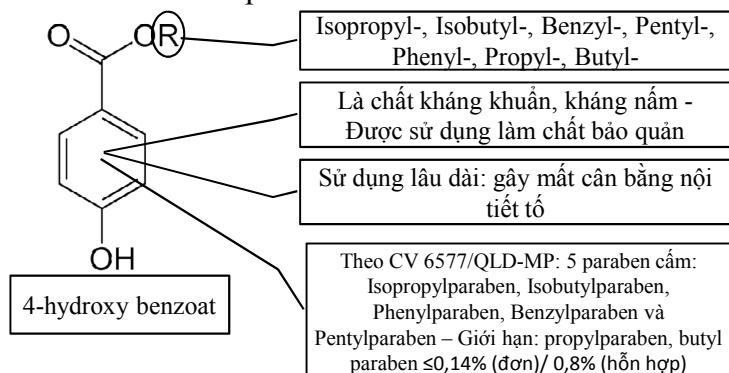
- Cột Phenomenex C18 (250x4,6mm; 5 μ m)
- Pha động: acetonitril: nước (48: 52)
- Tốc độ dòng: 1,0ml
- Bước sóng: 240nm
- Thể tích tiêm: 5 μ l

Phân tích đồng thời 12 steroid trong mỹ phẩm bằng HPLC



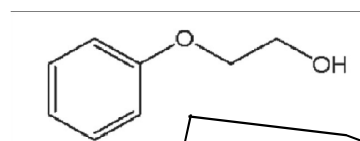
Một số chất bảo quản bị cấm/ giới hạn trong MP

• Các dẫn chất paraben



Một số chất bảo quản bị cấm/ giới hạn trong MP

• 2-phenoxy ethanol



Theo ASEAN : nồng độ cho phép tối đa 1,0%

- Với nồng độ cao có thể gây ôi, tiêu chảy, ức chế thần kinh, với nồng độ hơi cao trên 2,2% có thể gây ngứa và xốn mắt...
- Với nồng độ thấp, dưới 1%, là chất bảo quản hiệu quả và vô hại.

ACM 004

Phát hiện và định lượng 2-phenoxyethanol, methyl, ethyl, propyl, butyl paraben trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC

• TLC

Nguyên tắc

Các chất bảo quản được chiết từ mẫu mỹ phẩm đã được acid hóa với aceton. Sau khi lọc, dịch chiết aceton được trộn lẫn với nước, trong môi trường kiềm thì các acid béo kết tủa dạng muối calci. Sau khi acid hóa, các chất bảo quản được chiết bằng diethylether. Chấm sắc ký dịch chiết diethylether lên bản mỏng silicagel. Sau khi triển khai sắc ký, sắc kí đồ được quan sát dưới đèn tử ngoại và phun hiện vết bằng thuốc thử Millon.

ACM 004

TLC**Chuẩn bị**

- *Mẫu chuẩn*: pha trong ethanol
- *Mẫu thử*:
- + 1g MP + 4j HCl 4M + 40ml acetone, trộn, đun ở 60°C trong 10ph – để nguội và lắc xoáy/1ph – điều chỉnh pH ≤3 bằng chỉ thị dùng HCl 4M – lắc xoáy/1ph – lọc qua giấy lọc
- + Hút 20ml + 60ml nước – điều chỉnh pH đến 10 bằng KOH 4M + 1gCaCl₂.2H₂O – lắc – lọc – chiết bằng 75ml diethyl ether, lắc/5ph; để phân lớp – lấy lớp dưới – điều chỉnh pH đến 2 bằng HCl 4M – chiết bằng 10ml diethyl ether, lắc 5ph, để phân lớp, lấy lớp trên

ACM 004

• **TLC**

Dung môi khai triển: n-pentan: acid acetic (88:12)

Thuốc thử phát hiện: Thuốc thử Millon (thủy ngân (II) nitrat)

Chất bảo quản	R _f	Màu
Methylparaben	0,12	Hồng ++++
Ethylparaben	0,17	Hồng +++
Propylparaben	0,21	Hồng ++
Butylparaben	0,26	Hồng sáng
2-phenoxyethanol	0,29	Vàng chanh

Phương pháp TLC: không tách được acid 4-hydroxybenzoic với methyl paraben, benzylparaben với ethylparaben

ACM 004

• **HPLC****Nguyên tắc**

Mẫu thử được acid hóa bằng acid sulfuric, phân tán vào hỗn hợp ethanol và nước. Đun nóng nhẹ hỗn hợp làm tan pha dầu để tăng hiệu suất chiết, lọc hỗn hợp. Chất bảo quản được chiết, lọc và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo với isopropyl 4-hydroxybenzoat hoặc ethylparaben là chất chuẩn nội.

ACM 004

• **HPLC****Chuẩn bị**

- *Mẫu chuẩn tiêm sắc ký*: pha dãy chuẩn có IS trong hỗn hợp ethanol/ nước (9:1)
- *Mẫu thử không IS*: 1g MP vào bình nón nút mài + 1ml H₂SO₄ 2M + 50ml HH EtOH/Nước (9:1) + 1g đá sôi – lắc mạnh/1p được hỗn dịch đồng nhất – đun cách thủy ở 60°C/5ph – làm lạnh – để tủ lạnh/1h – lọc qua màng 0,45µm (ly tâm nếu cần)
- *Mẫu thử có IS*: nt (40 ml hh EtOH/nước + 10 ml dd IS isopropylparaben (hoặc ethylparaben) 0,5 mg/ml)

ACM 004

• HPLC

Điều kiện sắc ký

- Cột thép không gỉ Nucleosil C18 (250x4,6mm; 5µm), hoặc tương đương
- Bước sóng: 280nm
- Pha động: THF/Nước/MeOH/ACN (5/60/10/25)
- Tốc độ dòng: 1,5ml/ph

Khoảng tuyến tính**Tính thích hợp hệ thống**

Tiêm lặp lại 6 lần 20 µl dung dịch chuẩn và chuẩn nội (dung sai ≤ 2%). Xác định hệ số đối xứng.

ACM 004

• HPLC

Định lượng

- Tiêm sắc ký mẫu thử và mẫu chuẩn, lưu lại sắc ký đồ.
- Nếu trên sắc ký đồ của mẫu thử không có pic có thời gian lưu tương ứng với isopropylparaben hoặc ethylparaben, tiếp tục tiêm 20 µl mẫu thử có IS. Ghi lại sắc ký đồ và chiều cao pic (hoặc diện tích)
- Tính tỉ lệ chiều cao pic (hoặc diện tích) của chất bảo quản với chất chuẩn nội. Đảm bảo nồng độ chuẩn nằm trong khoảng tuyến tính.
- Hàm lượng chất bảo quản: $\%w_i = b_i \cdot 51 / (10000 \times a)$
 b_i là nồng độ chất bảo quản (µg/ml) I trong dung dịch thử tính theo đường chuẩn
 A là khối lượng (g) dung dịch thử.

Quy trình phân tích paraben do VKN xây dựng

• Phân tích đồng thời Isopropyl, Isobutyl, Benzylparaben bằng HPLC

Chuẩn bị- **Mẫu thử:**

- + *Son nước và son rắn*: 0,5g cp + 25ml methanol, lắc siêu âm 10ph, thêm nước đến vạch 50ml. Lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 5ml dịch lọc đầu, lọc qua màng lọc
- + *Phấn và kem bôi da*: 0,5g cp vào bdm 50ml, thêm 25ml methanol, lắc siêu âm 10ph, thêm nước đến vạch, lọc qua màng lọc (mẫu kem, lọc trước qua giấy lọc)
- **Mẫu chuẩn**: cân chính xác khoảng 20,0mg chuẩn vào bdm 50ml, thêm 50ml methanol đến vạch, pha loãng bằng pha động

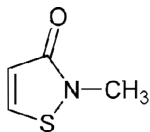
Quy trình phân tích paraben do VKN xây dựng

Điều kiện sắc ký

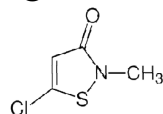
- Cột Chromaphase C18, 250x4,6mm, 5µm
- Nhiệt độ cột: 40°C
- Pha động: methanol: nước (47:53)
- Tốc độ dòng: 1,0ml/ph
- Bước sóng phát hiện: 254nm
- Thể tích tiêm 20µl

Mẫu thử	Thời gian lưu (phút)			STT	Tên chất phân tích	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
	Isopropyl paraben	Isobutyl paraben	Benzyl paraben				
Mẫu son	22,54	47,64	52,59	1	Isopropylparaben	0,08	0,25
Mẫu kem	22,53	47,56	52,48	2	Isobutylparaben	0,09	0,30
Mẫu phấn	22,53	47,59	52,49	3	Benzylparaben	0,12	0,40
Mẫu chuẩn	22,49	47,52	52,45				

Quy trình phân tích MIT, MCT do VKN xây dựng



Methylisothiazolinon
MIT



Methylchloroisothiazolinon
MCT

- MIT, MCT có khả năng tan tốt trong nước, hạn chế sự phát triển của các VSV, hiệu lực cao nhất khi phối hợp theo tỷ lệ 1: 3.
- Được sử dụng nhiều, đặc biệt trong các sản phẩm có thành phần lớn là nước như dầu gội đầu, khăn ướt, nước giữ ẩm.
- Tuy nhiên MIT, MCT có những tác động có hại tới môi trường hệ sinh thái và cả sức khỏe con người. hay gặp nhất là phản ứng dị ứng

Quy trình phân tích MIT, MCT do VKN xây dựng

• HPLC

Chuẩn bị

Mẫu chuẩn: pha/methanol được nồng độ MIT 0,16µg/ml, MCT 0,5µg/ml

Mẫu thử:

- **Dầu gội đầu:** 1,0g dầu gội + 20,0ml methanol, lắc siêu âm 10ph, làm lạnh trong đá 30ph và ly tâm 5000v/ph trong 10ph, lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm
- **Khăn ướt:** 1,0 g khăn ướt (đã cắt nhỏ) + 20,0ml Methanol, lắc siêu âm 10ph, làm nguội dưới vòi nước chảy, lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm.
- **Nước giữ ẩm:** 1,00g nước giữ ẩm + 20,0ml methanol, lắc siêu âm 10ph, làm nguội dưới vòi nước chảy, lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0,45µm

Quy trình phân tích MIT, MCT do VKN xây dựng

• Điều kiện sắc ký:

- Cột Phenomenex C8, 5µm, 250mmx4,6mm
- Bước sóng quét phổ: 200-800nm, MIT 274nm, MCT 271nm
- Bước sóng 274nm
- Pha động: Dầu gội đầu: MeOH-nước 10:90
Khăn ướt, nước giữ ẩm: MeOH-Nước (30:70)
- Tốc độ dòng: 1ml/ph
- Thể tích tiêm: khăn ướt, nước giữ ẩm: 20µl – Dầu gội : 50µl

Thời gian lưu: Dầu gội đầu: MIT 7,8ph, MCT 33ph

Khăn ướt, nước giữ ẩm: MIT 4,3ph, MCT: 9,5ph

LOD, LOQ: Dầu gội đầu MIT LOD 0,33µg/g – LOQ 1,32µg/g,
MCT LOD 0,96µg/g LOQ 3,84µg/g

Khăn ướt, nước giữ ẩm: MIT LOD 0,998µg/g - LOQ 3,992µg/g,
MCT LOD 2,88µg/g - LOQ 11,52µg/g