

Xây dựng qui trình định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong kem bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Mai Thanh Nhân, Nguyễn Thị Thu Thảo

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
mtnhan@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Các chất bảo quản methylparaben và propylparaben được dùng chủ yếu trong dược phẩm và mỹ phẩm. Tuy nhiên, việc kiểm soát các chất bảo quản là cần thiết, do các chất bảo quản này cần được sử dụng trong nồng độ cho phép để đảm bảo sự an toàn của người tiêu dùng. Nghiên cứu nhằm mục đích đưa ra qui trình định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong kem bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao. Qui trình gồm các bước hòa tan mẫu trong ethanol:H₂O (70:30, v/v) và định lượng bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, sử dụng cột RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm), đầu dò photo diode array (PDA) với bước sóng phát hiện 256 nm, pha động methanol:đệm kali dihydrophosphat (65:35, v/v). Phương pháp phân tích có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại đạt yêu cầu theo hướng dẫn nội dung và phương pháp của Hội nghị Hải hòa Quốc tế (International Conference on Harmonization – ICH). Phương pháp này phù hợp để phân tích các loại kem bôi da có chứa thành phần chất bảo quản methylparaben và propylparaben.

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 07/06/2023
Được duyệt 31/07/2023
Công bố 12/09/2023

Từ khóa
định lượng,
methylparaben,
propylparaben,
thuốc kem bôi da,
chiết siêu âm,
li tâm,
phương pháp HPLC

1 Giới thiệu

Methylparaben và propylparaben có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm hiệu quả, đồng thời cũng là những chất bảo quản thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm quan trọng. Methylparaben và propylparaben dùng phổ biến nhất để kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn do phổ kháng khuẩn rộng và khả năng kháng khuẩn tốt. Methylparaben và propylparaben thường được dùng kết hợp vì có tác dụng mạnh khi được sử dụng cùng nhau [1]. Vì vậy, việc xác định các chất bảo quản này trong dược phẩm đóng vai trò quan trọng để đảm bảo chất lượng thuốc và sự an toàn của người tiêu dùng. Methylparaben có công thức hóa học C₈H₈O₃, là metyl este của axit p-hydroxybenzoic, tồn tại dạng bột, tinh thể màu trắng, gần như không mùi, có vị đắng nhẹ và có khả năng chống lại nấm men và nấm mốc trên pH rộng từ 3-8. Bên cạnh đó, propylparaben là propyl 4-hydroxybenzoate, tồn tại dạng bột, kết tinh màu trắng,

rất ít tan trong nước, dễ tan trong ethanol 96 % và methanol (MeOH) [2].

Gần đây đã có một số công bố đề cập đến việc dùng phương pháp phân tích sắc kí lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography – HPLC) để định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong một số nền mẫu khác nhau như trong mỹ phẩm, viên nang mềm và dung dịch huyền phù. Có nghiên cứu đã xác định một số paraben trong mỹ phẩm phù hợp cho đối tượng mẫu không chứa mỡ trần hoặc nền mẫu không chứa hàm lượng béo cao như son dưỡng môi DHC (gồm dầu olive, lá lô hội, cam thảo và vitamin E), kem nghệ Thái Dương (gồm nghệ, vitamin E, vitamin B2, nano bạc, dầu paraffin) và kem dưỡng ẩm Nivea (gồm panthenol, axit citric, glycerin, vitamin E) [3]. Tuy nhiên, phạm vi ứng dụng của nghiên cứu chưa mở rộng cho đối tượng mẫu có hàm lượng béo cao như nền mẫu kem bôi da, trong đó gồm các thành phần

cloramphenicol, polawax GB 200, cetyl alcohol, glycerin monostearat, sáp ong, mỡ trăn, propylen glycol, polysorbat 80, nipagin, nipasol và nước tinh khiết. Nền mẫu chứa mỡ trăn có các axit béo không bão hòa gồm oleic, axit linoleic, glycerin palmitat,... nên việc sử dụng dung môi MeOH:H₂O (50:50; v/v) có thể chưa phù hợp và không chiết hoàn toàn chất phân tích ra khỏi nền mẫu, từ đó sẽ ảnh hưởng đến việc xác định hàm lượng hoạt chất có trong mẫu thử. Năm 2019, tác giả Trương Quốc Kỳ và cộng sự đã xây dựng qui trình định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong vỏ nang mềm bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA. Nhóm tác giả này đã áp dụng điều kiện sắc kí theo Dược điển Mỹ USP 41 (United States Pharmacopoeia), dùng cột C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm), pha động gồm MeOH – dung dịch đệm kali dihydrophosphat (55:45, v/v). Kết quả thu được methylparaben và propylparaben tách nhau hoàn toàn và hình dạng peak đối xứng, với hệ số kéo đuôi 1,15 và độ phân giải 10,33. Vì vậy, nghiên cứu chọn pha động gồm MeOH – dung dịch đệm kali dihydrophosphat. Ngoài ra, một nguyên cứu khác xác định đồng thời các chất bảo quản methylparaben và propylparaben trong huyền phù sucralfat bằng phương pháp HPLC. Quá trình phân tách được thực hiện bằng cách sử dụng pha động là acetonitril:H₂O (50:50, v/v) đi qua cột C18 để phân tách methylparaben và propylparaben với bước sóng phát hiện 205 nm. Nhược điểm của phương pháp là bước sóng phát hiện của hợp chất gần với bước sóng của dung môi [3-5]. Một tài liệu nghiên cứu khác xác định đồng thời 4 hợp chất gồm miconazole, triamcinolone, methylparaben và propylparaben trong mẫu kem bôi da, nhóm nghiên cứu dùng cột C8 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm), pha động gồm hỗn hợp axit trichloroacetic 5 mM trong axit photphoric 0,05 % và acetonitril theo tỉ lệ 52:48 (v/v), tốc độ dòng pha động 0,9 mL.min⁻¹, bước sóng phát hiện 264 nm và sử dụng nasteride làm chất nội chuẩn. Kết quả thu được, đối với % tỉ lệ phục hồi methylparaben (91,2-95,4) %, propylparaben (91,1-95,2) %, triamcinolone (97,1-99,6) %, miconazole (100,7-104,6) % [6]. Với qui trình phân tích này methylparaben và propylparaben chưa đáp ứng yêu cầu về % tỉ lệ phục hồi (98-102) %. Nhằm mục đích kiểm soát chất lượng của các chất bảo quản nói trên trong dược phẩm và tối ưu qui trình phân tích đơn giản, có thể áp dụng dễ dàng cho các công ty dược phẩm, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu xây dựng qui

trình định lượng chất bảo quản gồm methylparaben và propylparaben bằng HPLC và áp dụng qui trình đã xây dựng trên đối tượng kem bôi da.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Dung môi: methanol, ethanol, kali dihydrophosphat (tất cả của Supelco, Đức); chất chuẩn methylparaben, propylparaben hàm lượng nguyên trạng 100,03 % (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương); mẫu thử kem bôi da Trangusa AAA lọ 8 g (Bidopharma USA, Việt Nam).

2.1.2 Thiết bị: máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (Shimadzu, Nhật Bản), cân phân tích (Shimadzu, Nhật Bản) với độ chính xác 0.0001 g, bộ lọc rút chân không (Agilent, Mỹ), bể siêu âm (Elma, Đức), ống li tâm 50 mL (Finetech, Việt Nam), cột sắc kí RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm) (Shimadzu, Nhật Bản), máy li tâm (Hettich, Đức).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện tối ưu cho qui trình phân tích

2.2.1.1 Khảo sát tỉ lệ thành phần pha động

Tỉ lệ thành phần pha động ảnh hưởng đến quá trình rửa giải các chất phân tích ra khỏi cột sắc kí. Khi tỉ lệ thành phần pha động thay đổi thì lực rửa giải của dung môi pha động thay đổi, nghĩa là làm thay đổi thời gian lưu của các chất phân tích. Vì vậy, để có được tỉ lệ thành phần pha động phù hợp, cần tiến hành khảo sát hệ sắc kí với tỉ lệ thành phần pha động khác nhau, cùng các điều kiện sắc kí [7].

Bảng 1 Các điều kiện sắc kí

Cột sắc kí	RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm)
Nhiệt độ cột	40 °C
Thể tích tiêm	20 µL
Bước sóng	256 nm
Dung dịch chuẩn	Methylparaben 10 µg.mL ⁻¹ Propylparaben 5 µg.mL ⁻¹
Pha động MeOH – đệm kalidihydrophosphat	Tỉ lệ MeOH:đệm (50:50, v/v) Tỉ lệ MeOH:đệm (60:40, v/v) Tỉ lệ MeOH:đệm (65:35, v/v) Tỉ lệ MeOH:đệm (70:30, v/v) Tỉ lệ MeOH:đệm (80:20, v/v)

Dung dịch chuẩn gốc methylparaben: cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn methylparaben vào bình định mức 100 mL, thêm pha động tới vạch, trộn đều.

Dung dịch chuẩn gốc propylparaben: cân chính xác khoảng 25 mg chuẩn propylparaben vào bình định mức 100 mL, thêm pha động tới vạch, trộn đều.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn: Lấy chính xác 1.0 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben và 1.0 mL dung dịch chuẩn gốc propylparaben vào bình định mức 50 mL, thêm pha động tới vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0.45 μm .

2.2.1.2 Khảo sát qui trình xử lý mẫu

a) Khảo sát dung môi pha mẫu methanol và nước

Qui trình xử lý mẫu dùng kỹ thuật chiết siêu âm với ưu điểm làm giảm lượng dung môi, thời gian chiết và tăng hiệu quả chiết xuất hơn so với phương pháp ngâm lạnh hay chiết Soxhlet cổ điển. Sóng siêu âm có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chất tan vào dung môi và tăng quá trình khuếch tán chất tan. Kỹ thuật chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm thường được dùng trong qui trình chuẩn bị mẫu phân tích. Kỹ thuật này thực hiện bằng cách nhúng bình chiết vào một bể siêu âm có chứa nước, sóng siêu âm phát ra từ các đầu phát sẽ truyền qua môi trường nước và đi vào hỗn hợp chiết, có thể gia nhiệt để quá trình chiết được nhanh hơn [8-10]. Đồng thời, kem mỡ bôi da gồm nhiều thành phần khác như betamethason dipropionate, chloramphenicol, propylene glycol, axit salicylic, cetyl alcohol, glycerin monostearat, sáp ong và mỡ trăn. Vì vậy, việc lựa chọn dung môi phù hợp sau khi mẫu được siêu âm, kết hợp với phương pháp li tâm để chiết hỗn hợp chứa methylparaben và propylparaben ra khỏi nền mẫu là điều quan trọng. Dung môi pha mẫu (DMPM) theo tỉ lệ MeOH tăng dần như sau: MeOH:H₂O (30:70, v/v), (40:60, v/v), (50:50, v/v), (60:40, v/v), (70:30, v/v).

Pha hỗn hợp chuẩn methylparaben và propylparaben có nồng độ lần lượt là 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ và 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

Dung dịch thử: trộn đều mẫu kem của 20 lọ, cân chính xác khoảng 1.25 g chế phẩm vào ống li tâm 50 mL, thêm 40 mL DMPM, đun cách thủy ở 60 °C, lắc, siêu âm (tần số 37 kHz và công suất siêu âm 380 W) trong 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, Sau đó, cho dung dịch mẫu vào bình định mức 50 mL, thêm DMPM vừa đủ thể tích, lắc đều, li tâm 10 phút, lọc qua màng lọc 0.45 μm .

Dung dịch chuẩn thêm mẫu: trộn đều mẫu kem của 20 lọ, cân chính xác khoảng 1,25 g chế phẩm vào ống li tâm 50 mL và lấy chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben và 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc propylparaben, thêm 40 mL DMPM, đun cách thủy ở 60 °C, lắc, siêu âm 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng. Sau đó, cho dung dịch mẫu vào bình định mức 50 mL, thêm DMPM vừa đủ thể tích, trộn đều, li tâm 10 phút, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

b) Khảo sát dung môi pha mẫu ethanol và nước

Dung môi pha mẫu theo tỉ lệ dung môi ethanol tăng dần như sau: ethanol:H₂O (30:70, v/v), (40:60, v/v), (50:50, v/v), (70:30, v/v), (80:20, v/v), (90:10, v/v).

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: lấy chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben và 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc propylparaben vào bình định mức 50 mL, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Dung dịch thử: trộn đều mẫu kem của 20 lọ, cân chính xác khoảng 1,25 g chế phẩm vào ống li tâm 50 mL, thêm 40 mL DMPM, đun cách thủy ở 60 °C, lắc, siêu âm 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng. Sau đó, cho dung dịch mẫu vào bình định mức 50 mL, thêm DMPM vừa đủ thể tích, lắc đều, li tâm 10 phút, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Dung dịch chuẩn thêm mẫu: trộn đều mẫu kem của 20 lọ, cân chính xác khoảng 1,25 g chế phẩm vào vào ống li tâm 50 mL và lấy chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben và 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc propylparaben, thêm 40 mL DMPM, đun cách thủy ở 60 °C, lắc, siêu âm 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng. Sau đó, cho dung dịch mẫu vào bình định mức 50 mL, thêm DMPM vừa đủ thể tích, lắc đều, li tâm, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Thẩm định qui trình phân tích gồm tính tương thích của hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp đạt yêu cầu phân tích theo ICH [11-14].

2.2.2.1 Tính tương thích hệ thống sắc kí

Pha hỗn hợp chuẩn methylparaben và propylparaben có nồng độ lần lượt 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ và 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn: lấy chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc methylparaben và 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc propylparaben vào bình định mức 50 mL, thêm pha động tới vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm . Yêu cầu đạt được gồm % độ lệch chuẩn tương đối (%Relative standard deviation – %RSD) hệ số kéo đuôi của các peak và các lần tiêm lặp < 2,0, hệ số phân giải của hai peak (Resolution – Rs) $\geq 2,0$ và số đĩa lí thuyết ≥ 3000 .

2.2.2.2 Tính tuyến tính

Pha các dung dịch chuẩn methylparaben có nồng độ tương ứng (2, 5, 8, 10, 15, 20) $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ và propylparaben có nồng độ tương ứng (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12) $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Tiến hành tiêm các dung dịch mẫu vào hệ thống máy HPLC: Xây dựng đường chuẩn $S = aCx + b$ với trục [x] biểu thị nồng độ và trục [S] là diện tích peak của mỗi mẫu chuẩn. Xác định hệ số tương quan (R) giữa diện tích peak (S) và nồng độ (x). Yêu cầu $R^2 \geq 0,99$.

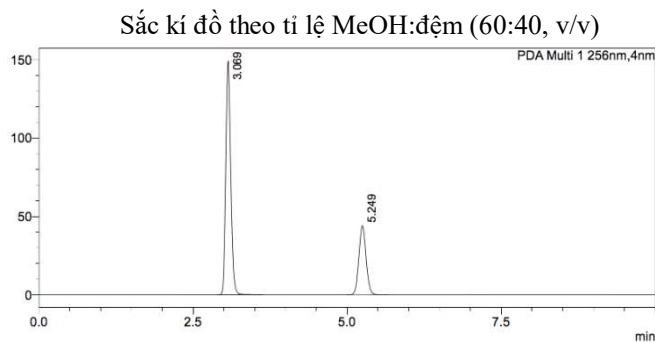
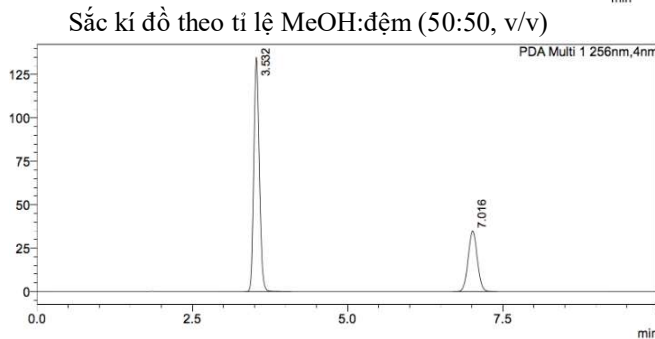
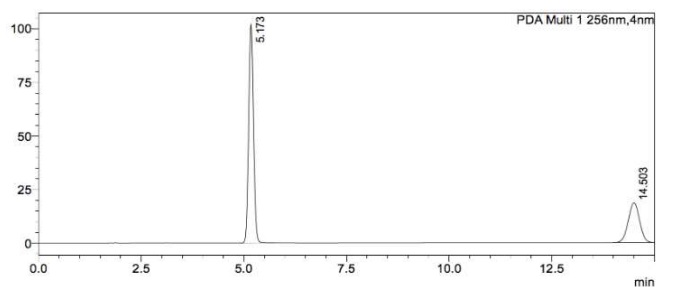
2.2.2.3 Tính đặc hiệu: chuẩn bị 4 loại mẫu cho thực nghiệm gồm dung dịch mẫu trắng (dung môi), mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn được tiêm vào hệ thống HPLC trong cùng các điều kiện thử nghiệm, sắc kí đồ được ghi lại cho từng dung dịch và hình dạng của các peak.

2.2.2.4 Độ đúng: độ đúng của phép thử được xác định bằng cách thêm vào ở các mức (80, 100 và 120) % so với nồng độ lí thuyết của chất chuẩn vào lượng mẫu thử. Ghi lượng tìm thấy so với lượng thêm vào để tính % tỉ lệ phục hồi. Khoảng giới hạn cho phép với % tỉ lệ phục hồi (98-102) %.

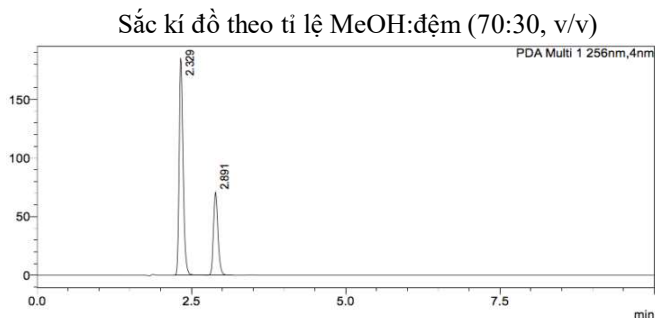
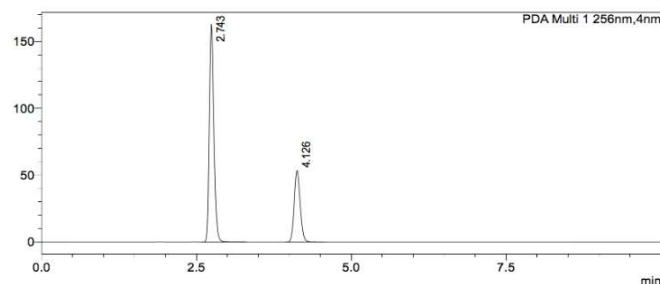
2.2.2.5 Độ lặp lại: độ lặp lại của phương pháp được xác định từ diện tích peak của 6 lần tiêm từ 6 mẫu thử, cùng qui trình thực hiện, cùng điều kiện thí nghiệm. Yêu cầu %RSD < 2,0 khi tiến hành trên các mẫu thử đã chọn.

3 Kết quả nghiên cứu

3.1 Khảo sát tỉ lệ thành phần pha động



Sắc kí đồ theo tỉ lệ MeOH:đệm (65:35, v/v)



Sắc kí đồ theo tỉ lệ MeOH:đệm (80:20, v/v)

Hình 1 Khảo sát tỉ lệ dung môi MeOH:đệm

Sắc kí đồ ở Hình 1 cho thấy các tỉ lệ dung môi MeOH:đệm trong nghiên cứu đều có khả năng tách hai peak tốt. Khi dùng tỉ lệ MeOH:đệm (50:50, v/v) thì thời gian lưu trong cột sắc kí của methylparaben và propylparaben lần lượt là 5,17 phút và 14,50 phút, chậm hơn so với tỉ lệ MeOH:đệm (80:20, v/v) tương ứng methylparaben và propylparaben lần lượt là 2,33 phút và 2,99 phút. Kết quả đó thể hiện rõ khi càng tăng tỉ lệ MeOH thì các hợp chất càng ra sớm. So sánh về sắc kí đồ giữa MeOH:đệm (65:35, v/v) và 2 tỉ lệ còn lại gồm MeOH:đệm (60:40, v/v), MeOH:đệm (70:30, v/v) đều thu được hình dạng peak đối xứng và tách nhau hoàn toàn. Nghiên cứu chọn MeOH:đệm theo tỉ lệ (65:35, v/v) làm thành phần pha động để đáp ứng yêu cầu sắc kí đồ HPLC gồm hình dạng peak đối xứng, thời gian lưu có độ lặp lại và ổn định với độ lệch chuẩn tương đối thấp giữa các lần tiêm (%RSD < 2,0), hệ số kéo đuôi sắc kí trong khoảng (0,8-1,5). Kết quả của các thông số trên thể hiện rõ ở Bảng 4 và Bảng 5.

3.1.2 Khảo sát dung môi pha mẫu

Dung môi pha mẫu theo tỉ lệ MeOH tăng dần như sau: MeOH:H₂O (30:70, v/v), (40:60, v/v), (50:50, v/v), (60:40, v/v), (70:30, v/v). Chuẩn bị các dung dịch thể hiện ở Mục 2.2.1.2.

Bảng 2 Khảo sát tỉ lệ dung môi pha mẫu

MeOH: H ₂ O, v/v	%HSTH methyl paraben	%RSD (n = 3)	%HSTH propyl paraben	%RSD (n = 3)
30:70	44,33	0,98	41,28	1,07

40:60	86,46	0,62	75,40	0,78
50:50	96,96	0,31	81,32	0,42
60:40	92,42	0,45	75,06	0,40
70:30	90,00	0,60	64,19	0,50

(*)%RSD: %độ lệch chuẩn tương đối, %HSTH: %hiệu suất thu hồi, n: số lần thí nghiệm

Nhằm mục đích chiết methylparaben và propylparaben ra khỏi nền mẫu thuốc bôi da, dùng kỹ thuật chiết bằng sóng siêu âm. Sóng siêu âm với tần số 37 KHz có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chất tan vào dung môi và tăng quá trình khuếch tán chất tan ra khỏi nền mẫu.

Kết quả thu được Bảng 2 cho thấy tỉ lệ MeOH:H₂O (30:70, v/v), (40:60, v/v), (50:50, v/v), (60:40, v/v), (70:30, v/v) đều chiết được methylparaben và propylparaben ra khỏi nền mẫu. Tuy nhiên, %hiệu suất thu hồi của hai hợp chất chiết tăng dần theo thứ tự tỉ lệ MeOH:H₂O (30:70, v/v) < MeOH:H₂O (40:60, v/v) < MeOH:H₂O (50:50, v/v), khi tăng tỉ lệ từ MeOH:H₂O (60:40, v/v) đến (70:30, v/v) thì hiệu suất thu hồi giảm so với tỉ lệ MeOH:H₂O (50:50, v/v) nhưng cao hơn 2 tỉ lệ MeOH:H₂O (30:70, v/v) và MeOH:H₂O (40:60, v/v). Như vậy, tỉ lệ MeOH:H₂O (50:50, v/v) là dung môi chiết có % hiệu suất thu hồi tốt nhất so với các tỉ lệ dung môi còn lại, trong đó %hiệu suất thu hồi methylparaben là 96,96 % và propylparaben là 81,32 %. Để chiết hoàn toàn các hợp chất ra khỏi nền mẫu và đáp ứng khoảng giới hạn cho phép % tỉ lệ phục hồi (98-102) % theo hướng dẫn của ICH, nhóm tác giả thay thế methanol bằng ethanol vì propylparaben dễ tan trong ethanol 96% [15].

Khảo sát dung môi pha mẫu ethanol:H₂O theo tỉ lệ như sau: (30:70, v/v), (40:60, v/v), (50:50, v/v), (70:30, v/v), (80:20, v/v), 90:10, v/v). Kết quả khảo sát tỉ lệ dung môi ethanol được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Khảo sát tỉ lệ dung môi pha mẫu

Ethanol: H ₂ O, v/v	%HSTH methyl paraben	%RSD (n = 3)	%HSTH propyl paraben	%RSD (n = 3)
30:70	97,89	0,32	75,88	0,44
40:60	98,63	0,21	81,72	0,31
50:50	99,81	0,12	90,20	0,22
70:30	100,25	0,14	99,50	0,18
80:20	98,30	0,35	99,80	0,13
90:10	91,80	0,40	100,45	0,12

(*)%RSD: %độ lệch chuẩn tương đối, %HSTH: %hiệu suất thu hồi, n: số lần thí nghiệm

Kết quả thu được Bảng 3 cho thấy, tỉ lệ ethanol:H₂O (30:70, v/v) đến ethanol:H₂O (90:10, v/v) đều chiết

được methylparaben và propylparaben ra khỏi nền mẫu. Tuy nhiên, đối với methylparaben, khi tăng tỉ lệ ethanol thì %hiệu suất thu hồi cũng tăng dần (từ ethanol:H₂O (30:70, v/v) đến ethanol:H₂O (70:30, v/v) tương ứng 97,89 % đến 100,25 %, nhưng từ tỉ lệ ethanol:H₂O (80:20, v/v) đến ethanol:H₂O (90:10, v/v) thì %hiệu suất thu hồi giảm dần từ 98,30 % xuống còn 91,80 %. Ngược lại, đối với propylparaben, tỉ lệ ethanol tăng thì % hiệu suất thu hồi càng tăng (từ tỉ lệ ethanol:H₂O (30:70, v/v) đến ethanol:H₂O (90:10, v/v) tương ứng 75,88 % đến 100,45 %). Tại tỉ lệ ethanol:H₂O (70:30, v/v), % hiệu suất thu hồi methylparaben (100,25 %), propylparaben (99,50 %) và hình dạng peak đối xứng, tách hoàn toàn các peak tạp (Hình 3). Vì vậy, nghiên cứu này chọn tỉ lệ ethanol:H₂O (70:30, v/v) làm dung môi để chiết methylparaben và propylparaben trong kem bôi da.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc kí

Tiêm lập 6 lần dung dịch chuẩn gồm methylparaben và propylparaben có nồng độ lần lượt 10 µg.mL⁻¹ và 5 µg.mL⁻¹ vào hệ thống máy sắc kí. Ghi nhận các thông số gồm thời gian lưu (t_R), hệ số kéo đuôi (As), số đĩa lí thuyết (N), hệ số phân giải của hai peak (methylparaben và propylparaben), diện tích peak (S) của 6 lần tiêm để khảo sát tính tương thích hệ thống.

Bảng 4 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống methylparaben

STT	t _R	S (mAu)	N	As
1	3,069	831.763	5.352	1,15
2	3,069	831.321	5.338	1,14
3	3,069	831.456	5.354	1,14
4	3,068	837.761	5.345	1,15
5	3,070	834.391	5.342	1,14
6	3,070	833.620	5.366	1,15
TB	3,07	833.385,33	5.349,50	1,14
%RSD (n = 6)	0,025	0,29	0,21	0,40

(*)S: diện tích peak, t_R: thời gian lưu (phút), As: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lí thuyết, TB: trung bình, n = 6: số lần tiêm lập, %RSD: %độ lệch chuẩn tương đối

Bảng 5 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống propylparaben

STT	t _R	S (mAu)	N	As	Rs
1	5,244	356.295	8.410	1,06	10,96
2	5,249	356.006	8.393	1,07	10,98
3	5,249	356.149	8.406	1,07	10,99

4	5,248	356.616	8.448	1,08	10,92
5	5,248	355.383	8.413	1,06	10,98
6	5,248	354.814	8.467	1,06	10,96
TB	5,25	355.877,17	8.422,83	1,07	10,96
%RSD (n = 6)	0,035	0,19	0,34	0,49	0,21

(*)S: diện tích peak, t_R : thời gian lưu (phút), As: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lý thuyết, Rs: hệ số phân giải của hai peak (methylparaben và propylparaben), TB: trung bình, n = 6: số lần tiêm lặp, %RSD: %độ lệch chuẩn tương đối

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được thể hiện rõ ở Bảng 4 và Bảng 5. Trên sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn, hệ số phân giải giữa hai peak methylparaben và propylparaben $10,96 > 2,0$. Trong đó, methylparaben có % RSD thời gian lưu và diện tích peak lần lượt 0,025 và 0,29 ($< 2,0\%$), hệ số kéo đuôi của peak sắc ký 1,14, số đĩa lý thuyết 5349,50 (> 3000 đĩa). Đối với propylparaben %RSD thời gian lưu và diện tích peak lần lượt 0,035 và 0,19 ($< 2,0\%$), hệ số kéo đuôi của peak sắc ký 1,07, số đĩa lý thuyết 8422,83 (> 3000 đĩa). Như vậy, phương pháp đạt về tính tương thích hệ thống.

3.2.2 Xác định tính tuyến tính

Pha dãy chuẩn methylparaben nồng độ từ (2,02-20,17) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ và propylparaben nồng độ từ (1,01-12,6) $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tiêm vào máy sắc ký lỏng lần lượt các dung dịch chuẩn và ghi nhận diện tích peak tương ứng. Thiết lập phương trình hồi qui giữa nồng độ và diện tích peak.

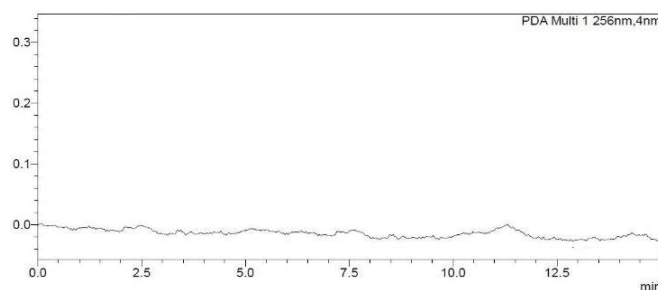
Bảng 6 Kết quả xây dựng đường tuyến tính

STT	Methylparaben		Propylparaben	
	Nồng độ chuẩn ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Diện tích peak (mAu)	Nồng độ chuẩn ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Diện tích peak (mAu)
1	2,02	170.693	1,01	75.863
2	5,04	426.734	2,52	181.096
3	8,07	675.350	5,04	355.877
4	10,08	837.761	7,56	530.213
5	15,12	1.265.830	10,08	700.001
6	20,17	1.677.773	12,60	843.950
S = 83058Cx + 4881,3 $R^2 = 1$		S = 66915Cx + 1490 $R^2 = 0,999$		

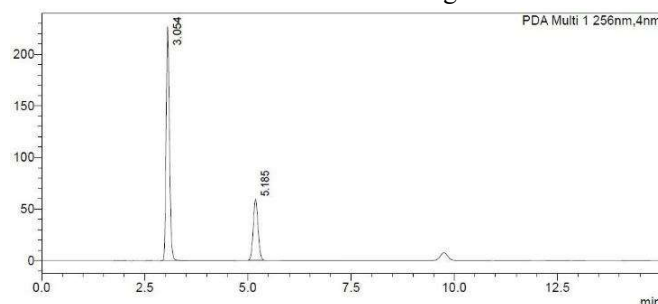
Kết quả cho thấy $R^2 = 1$ đối với methylparaben, $R^2 = 0,999$ đối với propylparaben, đạt yêu cầu $R^2 \geq 0,99$. Như vậy qui trình định lượng có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.2.3 Xác định tính đặc hiệu

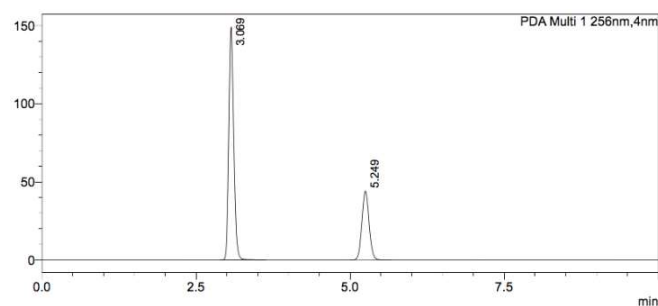
Tiêm vào hệ thống sắc ký các dung dịch với thể tích tiêm 20 μL đã chuẩn bị ở mục 2.2.2.3.



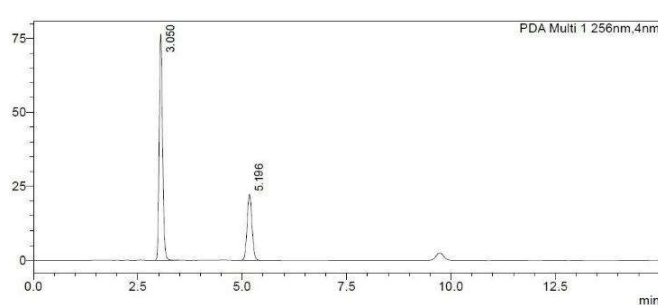
Sắc ký đồ mẫu trắng



Sắc ký đồ mẫu thêm chuẩn vào mẫu thử



Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Sắc ký đồ mẫu thử

Hình 2 Sắc ký đồ tính đặc hiệu của qui trình định lượng

Mẫu trắng không ghi nhận peak ở thời gian lưu khoảng 3 phút và 5 phút. Các mẫu chuẩn, thử và chuẩn thêm thử có mức thời gian lưu của hoạt chất tương đồng nhau, hai peak methylparaben và propylparaben tách

hoàn toàn nhau và xa peak tạp được thể hiện ở Hình 2. Qui trình định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.4 Độ đúng của phương pháp

Thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử ở 3 nồng độ khác nhau (80, 100, 120) % và xác định lại lượng hoạt chất có trong mẫu.

Bảng 7 Kết quả %tỉ lệ phục hồi methylparaben

Độ đúng (%)	Lượng cân mẫu (mg)	Diện tích peak (mAu)	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Lượng chuẩn tìm thấy ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%Tỉ lệ phục hồi
80	1.305,5	1.048.776	8,07	8,07	100,00
	1.305,5	1.048.354	8,07	8,06	99,94
	1.304,5	1.046.407	8,07	8,04	99,64
100	1.304,5	1.205.132	10,08	9,96	98,76
	1.305,2	1.207.082	10,08	9,98	99,00
	1.305,2	1.209.567	10,08	10,01	99,29
120	1.305,5	1.393.938	12,10	12,24	101,18
	1.305,5	1.372.782	12,10	11,99	99,07
	1.304,5	1.375.938	12,10	12,02	99,38
TB					100,22
%RSD					0,77

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

Bảng 8 Kết quả %tỉ lệ phục hồi propylparaben

Độ đúng (%)	Lượng cân mẫu (mg)	Diện tích peak (mAu)	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Lượng chuẩn tìm thấy ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%Tỉ lệ phục hồi
80	1.305,5	510.515	4,03	4,05	100,40
	1.305,5	507.101	4,03	4,01	99,38
	1.304,5	511.112	4,03	4,06	100,58
100	1.304,5	595.604	5,04	5,08	100,74
	1.305,2	592.745	5,04	5,04	100,06
	1.305,2	590.758	5,04	5,02	99,58
120	1.305,5	671.938	6,05	6,00	99,22
	1.305,5	678.938	6,05	6,09	100,62
	1.304,5	678.075	6,05	6,08	100,45
TB					99,57
%RSD					0,42

(*)%RSD: %độ lệch chuẩn tương đối, TB: trung bình
 Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình định lượng methylparaben và propylparaben trong kem bôi da có % tỉ lệ phục hồi trong khoảng (99,00-101,18) % nằm trong khoảng yêu cầu (98,0-102,0) % và giá trị %RSD < 2,0 (Bảng 7, Bảng 8). Như vậy, quy trình định lượng đạt về độ đúng.

3.2.5 Độ lặp lại

Tiến hành tiêm 6 dung dịch mẫu thử vào hệ thống HPLC và ghi nhận kết quả.

Bảng 9 Kết quả độ lặp lại của hàm lượng mẫu thử

STT	Lượng cân mẫu (mg)	Methylparaben		Propylparaben	
		S (mAu)	Hàm lượng (mg/lq)	S (mAu)	Hàm lượng (mg/lq)
1	1.305,5	383.135,00	2,84	175.815,00	1,53
2	1.305,5	388.377,00	2,88	176.127,00	1,53
3	1.304,5	387.001,00	2,87	174.805,00	1,52
4	1.304,5	388.711,00	2,88	177.559,00	1,54
5	1.305,2	382.068,00	2,83	175.952,00	1,53
6	1.305,2	384.237,00	2,85	174.660,00	1,52
TB	1.305,07	385.588,17	2,86	175.819,67	1,53
%RSD	0,035	0,73	0,75	0,60	0,60

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

Giá trị %RSD của thời gian lưu và diện tích peak của 6 lần mẫu thử và %RSD trong 6 lần định lượng < 2,0 (Bảng 9). Vậy qui trình có tính chính xác cao.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng để xác định đồng thời methylparaben và propylparaben trong kem bôi da. Phương pháp đã tối ưu điều kiện sắc kí với tỉ lệ thành phần pha động gồm MeOH : dung dịch dikali hydrogenphosphat theo tỉ lệ thể tích (65:35; v/v), dùng cột pha đảo RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm) thu được hình dạng peak đối xứng, giảm thời gian phân tích và dung môi. Đồng thời, nghiên cứu lựa chọn được tỉ lệ dung môi phù hợp để chiết hoàn toàn hoạt chất methylparaben và propylparaben ra khỏi nền mẫu kem bôi da là ethanol:H₂O theo tỉ lệ thể tích (70:30, v/v). Phương pháp đã thẩm định các thông số theo hướng dẫn của ICH và đạt yêu cầu gồm độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại với %độ lệch chuẩn tương đối < 2,0, %tỉ lệ phục hồi trong khoảng (99,00-101,18) % và khoảng tuyến tính methylparaben nồng độ từ (2,02-20,17) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ với $R^2 = 1$ và propylparaben nồng độ từ (1,01-12,6) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ với $R^2 = 0,999$. Do đó, phương pháp đề xuất có thể được áp dụng để xác định hàm lượng có trong mẫu nguyên liệu, hoặc chế phẩm chứa hoạt chất methylparaben và propylparaben trong kem bôi da tại các công ty Dược phẩm.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2012), *Hóa dược 1*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, tr. 186-189.
2. Hội đồng Dược điển (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, tr. 256-257.
3. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Bùi Thị Thanh Châm, Bùi Thị Luyến (2019), Xác định một số paraben có trong mỹ phẩm bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, Số 194(1), tr. 181-187.
4. Trương Quốc Kỳ, Võ Hoàng Nam, Nguyễn An Công, Đặng Minh Đức (2019), Xây dựng qui trình định lượng đồng thời methylparaben và propylparaben trong vỏ nang mềm bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, Số 23(3), tr. 378-383.
5. Rajesh M. Kamble, Santosh G. Singh, Shrawan Singh (2011), Simultaneous determination of preservatives (methylparaben and propylparaben) in sucralfate suspension using high performance liquid chromatography, *E-Journal of Chemistry*, 8(1), pp. 340-346.
6. Z.Z. Ei et al. (2016), Development and validation of high-performance liquid chromatography method for determination of miconazole, triamcinolone, methylparaben and propylparaben in cream, *Mahidol Univ J Pharm Sci*, 43(4), pp. 211-221.
7. The United states Pharmacopoeia 41, *The United states Pharmacopeial Convention*, edition 27th.
8. Ngô Văn Thu, Trần Hùng (2017), *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học, tr. 70-71.
9. Tania Martínez-Ramos et al. (2020), Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.), *Food and Bioproducts Processing*, 122, pp. 41-54.
10. Anahí J. Borrás-Enríquez et al. (2021), Effect of ultrasound-assisted extraction parameters on total polyphenols and its antioxidant activity from Mango Residues (*Mangifera indica* L. var. Manililla), *Separations*, 94(8), pp. 1-18.
11. European Medicines Agency (2006), International Conference on Harmonization Topic (ICH), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, pp. 1-15.
12. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
13. Serban Moldoveanu, Victor David (2012), *Essentials in modern HPLC separations*, Elsevier, pp. 465-519.
14. Bộ Y tế (2012), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nhà xuất bản Y học, tr. 84-90.
15. Fenhua Xu, Dandan Zhao, Zhimin Liu (2016), Parabens analysis in cosmetics by ultrasonic extraction coupled with HPLC detection, *Atlantis Press*, pp. 255-258.

Validation of quantitative procedure for determination methylparaben and propylparaben in ointment by high performance liquid chromatography

Mai Thanh Nhan (mtnhan@ntt.edu.vn), Nguyen Thi Thu Thao

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

Abstract The preservatives methylparaben and propylparaben are mainly used in pharmaceutical and cosmetic products. However, monitoring of these preservatives is essential as they need to be used with the allowable concentration to ensure the safety of consumers. The aim of study is to develop an analytical method for the simultaneous quantitative determination of methylparaben and propylparaben in ointments by high performance liquid chromatography. The samples are dissolved by ethanol:H₂O (70:30, v/v) and quantifies by high – performance liquid chromatography, using stainless steel RP–18 column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size), with a mobile phase containing methanol:kali dihydrophosphat (65:35, v/v) and PDA detector at 256 nm. This method meets requirements for specificity, system compatibility, precision, linearity and accuracy according to the ICH guideline. The extraction and measurement method could be applicable for ointments containing methylparaben and propylparaben.

Keywords Methylparaben, propylparaben, High performance liquid chromatography (HPLC), Ointment, Validation, Ultrasonic extraction, Centrifugation.

