

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



LÊ THỊ HƯỜNG HOA

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY
TRÌNH PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH
HÀM LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT BỊ
CẤM SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2013

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



LÊ THỊ HƯỜNG HOA

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT BỊ CẤM SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM

CHUYÊN NGÀNH: **Kiểm nghiệm thuốc - Độc chất**
MÃ SỐ: **62 72 04 10**

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu**

TS. Đoàn Cao Sơn

HÀ NỘI - 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Thái Nguyễn Hùng Thu và TS. Đoàn Cao Sơn. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Lê Thị Hương Hoa

LỜI CẢM ƠN

Sau thời gian học tập và tiến hành nội dung của luận án dưới sự hướng dẫn của PGS.TS.Thái Nguyễn Hùng Thu và TS. Đoàn Cao Sơn,

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu, Phó hiệu trưởng trường đại học Dược Hà Nội, trưởng bộ môn Hóa Phân tích-Độc chất và **TS. Đoàn Cao Sơn**, Viện trưởng viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, là hai người Thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và cho tôi những kiến thức quý báu để tôi hoàn thành luận án.

Ban Giám đốc viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án đúng thời gian quy định.

PGS.TS. Trần Tử An, nguyên trưởng bộ môn Hóa Phân tích-Độc chất trường đại học Dược Hà Nội, **PGS.TS. Trịnh Văn Quỳ**, nguyên Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, những người Thầy đã đóng góp ý kiến, chỉ dẫn và động viên tôi thực hiện luận án.

Các anh chị em khoa Mỹ phẩm – Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, đã động viên, giúp đỡ và chia sẻ những khó khăn với tôi trong công việc.

Các thầy, cô và các anh chị bộ môn Hóa Phân tích-Độc chất, phòng Sau đại học, Trường đại học Dược Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập tại trường.

Và cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè đã quan tâm động viên tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tác giả luận án

Lê Thị Hương Hoa

MỤC LỤC

Trang

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ

1

Chương I-TỔNG QUAN

3

1.1. QUẢN LÝ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG MỸ PHẨM

3

1.1.1. Một số nét cơ bản về quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm trên thế giới

3

1.1.2. Quá trình hình thành và hoàn thiện công tác quản lý chất lượng mỹ phẩm tại Việt Nam

5

1.1.3. Một số nội dung về quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm theo Thông tư 06/2011/TT-BYT

9

1.2. MỘT SỐ HỢP CHẤT CẤM SỬ DỤNG VÀ CẦN KIỂM SOÁT HÀM LƯỢNG NGHIÊN CỨU TRONG ĐỀ TÀI

10

1.2.1. Một số hợp chất màu bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm

10

1.2.2. Một số hợp chất có tác dụng dược lý mà bị cấm hoặc giới hạn hàm lượng sử dụng trong mỹ phẩm

17

1.2.3. Các nguyên tố độc

19

1.3 MỘT SỐ KỸ THUẬT THƯỜNG DÙNG TRONG KIỂM NGHIỆM MỸ PHẨM

26

1.3.1. Một số kỹ thuật phân tích mỹ phẩm

26

1.3.2. Một số phương pháp hóa lý được ASEAN dùng trong phân tích mỹ phẩm

26

Chương II- ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

41

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

41

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu và đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

41

2.1.2. Mẫu dùng để nghiên cứu xây dựng, thẩm định các quy trình

41

2.2. CHẤT CHUẨN, DUNG MÔI, HÓA CHẤT

43

2.2.1. Chất chuẩn

43

2.2.2. Dung môi, hóa chất

43

2.3. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

44

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

45

2.4.1. Phương pháp HPLC

45

2.4.2. Phương pháp AAS

50

2.4.3. Thẩm định tính khả thi của qui trình ASEAN

53

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu phân tích

53

Chương III-KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

55

3.1. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỘT SỐ HỢP CHẤT BỊ CẤM SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM

55

3.1.1. Metanil yellow

55

3.1.2. Rhodamin B

60

3.1.3. Pigment red 53

65

3.1.4. Pigment orange 5

69

3.1.5. Crystal violet

75

3.1.6. Các chất Sudan

80

3.1.7. Định tính, định lượng đồng thời Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5

88

3.2. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ BỊ CẤM HOẶC CÓ GIỚI HẠN SỬ DỤNG TRONG

97

MỸ PHẨM	
3.2.1. Hydroquinon	97
3.2.2. Tretinoin	102
3.2.3. Các steroid	105
3.3. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH CÁC KIM LOẠI NẶNG	109
3.3.1. Thủy ngân	109
3.3.2. Chì (Pb)	118
3.3.3. Arsen (As)	122
3.4. KẾT QUẢ KIỂM TRA MỘT SỐ HỢP CHẤT BỊ CẤM VÀ CÓ GIỚI HẠN SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM LƯU HÀNH TRÊN THỊ TRƯỜNG	125
3.4.1. Metanil yellow	125
3.4.2. Rhodamin B	126
3.4.3. Pigment red 53	127
3.4.4. Pigment orange 5	128
3.4.5. Crystal violet (Tím tinh thể)	129
3.4.6. Sudan	130
3.4.7. Kiểm tra đồng thời Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5	130
3.4.8. Hydroquinon	131
3.4.9. Tretinoin	131
3.4.10. Các glucocorticoid	131
3.4.11. Thủy ngân	132
3.4.12. Chì	132
Chương IV-BÀN LUẬN	133
4.1. VỀ VIỆC TRIỂN KHAI CÁC PHƯƠNG PHÁP CỦA ASEAN	133
4.2. VỀ CÁC QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỚI THIẾT LẬP	135
4.2.1. Về các qui trình phát hiện các chất màu cấm	135
4.2.2. Về qui trình định tính, định lượng Hydroquinon	139
4.2.3. Về qui trình định tính 12 chất steroid trong kem bôi da	139
4.2.4. Về qui trình phân tích thủy ngân trong mỹ phẩm dạng kem và phấn bôi da	140
4.3. TÓM TẮT NHỮNG ĐỔI MỚI TRONG TỪNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH	141
4.3.1. Quy trình phân tích đồng thời 4 chất màu cấm trong son môi	141
4.3.2. Quy trình phát hiện, định lượng đồng thời 4 chất Sudan	142
4.3.3. Quy trình phát hiện đồng thời 12 chất steroid trong kem bôi da	143
4.3.4. Quy trình phân tích thủy ngân trong mỹ phẩm dạng kem và phấn bôi da	143
4.3.5. Về qui trình định tính, định lượng Hydroquinon	144
4.3.6. Về 5 quy trình phân tích từng chất màu riêng biệt còn lại	144
4.4. VỀ KHẢ NĂNG ÁP DỤNG CỦA CÁC QUI TRÌNH	145
4.5. VỀ TÌNH HÌNH NHIỆM CÁC CHẤT CẤM TRONG MỸ PHẨM	146
4.6. VỀ NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA ĐỀ TÀI	147
4.5.1. Về xây dựng và thẩm định các qui trình phân tích	147
4.5.2. Về đào tạo chuyên môn kỹ thuật	147
4.5.3. Về đánh giá thực trạng tình hình chất lượng mỹ phẩm	148
Chương V- KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	149
KẾT LUẬN	149
KIẾN NGHỊ	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh hoặc tên khoa học	Tiếng việt
AAS	Atomic Absorption Spectrophotometry	Quang phổ hấp thụ nguyên tử
ACC	Asean Cosmetic Committee	Ủy ban Mỹ phẩm Asean
ACD	Asean Cosmetic Directive	Định hướng mỹ phẩm Asean
ACSB	Asean Cosmetic Science Body	Hội đồng khoa học mỹ phẩm Asean
ACTLC	Asean Cosmetic Testing Laboratory Council	Ủy ban kiểm nghiệm mỹ phẩm Asean
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội những nhà hóa học phân tích chính thức
ASEAN	Association of Southeast Asian Nations	Hiệp hội các quốc gia Đông Nam Á
CFS	Certificate of Free Sale	Giấy chứng nhận lưu hành tự do
CGMP	Cosmetic Good Manufacturing Practices	Thực hành tốt sản xuất mỹ phẩm
CIR	US Cosmetic Ingredient Review Board	Ủy ban xem xét thành phần mỹ phẩm của Mỹ
COLIPA	European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association	Hiệp hội mỹ phẩm, vật dụng vệ sinh và nước hoa châu Âu
DMPM		Dung môi pha mẫu
DMF	N,N dimethylformamid	
DSC	Differential Scanning calorimetry	Quét nhiệt vi sai
EEC	European Economic Community	Khối thị trường chung châu Âu
EDL	Electrodeless Discharge Lamp	Đèn phóng điện không điện cực
ETA-AAS	Electro-Thermal Atomization Atomic Absorption Spectrophotometry	Kỹ thuật nguyên tử hóa không ngọn lửa
EU	European Union	Cộng đồng châu Âu
EUCD	European Union Cosmetic Directive	Định hướng mỹ phẩm của cộng đồng các nước châu Âu
F-AAS	Flame Atomic Absorption Spectrophotometry	Kỹ thuật nguyên tử hóa ngọn lửa
FDA	Food and Drug Administration	Cục Quản lý Thực Phẩm và Dược phẩm Hoa kỳ
GLP	Good Laboratory Practices	Thực hành tốt phòng thí nghiệm
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IARC	International Agency for Research on	Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế

Từ viết tắt	Tiếng Anh hoặc tên khoa học	Tiếng việt
	Cancer	
ICH	International Conference on Harmonisation	Hội nghị về hòa hợp quốc tế
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy	Quang phổ phát xạ nguyên tử Plasma
IFRA	International Fragrance Association	Hiệp hội hương liệu quốc tế
ISO	International Organization for Standardization	Tổ chức tiêu chuẩn quốc tế
KH & CN		Khoa học và công nghệ
MoH	Ministry of Health	Bộ Y tế
MRA	Mutual Recognition Agreement	Hiệp định thừa nhận lẫn nhau
MY	Metanil yellow	
PAL	Pharmaceutical Affairs Law	Luật công tác Dược
PIF	Product Information File	Hồ sơ thông tin sản phẩm
PO	Pigment orange 5	
PR	Pigment red 53	
ppb	parts per billion	Phần tỷ
ppm	parts per million	Phần triệu
RB	Rhodamin B	
SCCP	EU Scientific Committee on Consumer Products	Hội đồng khoa học các sản phẩm tiêu dùng châu Âu
SFDA	the State Food and Drug Administration	Cục quản lý Dược và thực phẩm
SKĐ		Sắc ký đồ
SPF	Sun protect factor	Hệ số chống nắng
TBA	Tetrabutylamonium hydroxyd	
TGA	Thermogravimetric analysis	Phân tích nhiệt trọng lực
THF	Tetrahydrofuran	
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
US	Unites States	Hợp chủng quốc Hoa kỳ

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Một số quy định của EU, Mỹ và Nhật Bản về các nội dung cần quản lý đối với mỹ phẩm.	4
Bảng 1.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất Glucocorticoid	31
Bảng 1.3. Điều kiện vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng	38
Bảng 1.4. Chế độ đo lò graphit	39
Bảng 1.5. Các điều kiện phân tích arsen và thủy ngân bằng kỹ thuật hydrid	39
Bảng 1.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các nguyên tố	39
Bảng 1.7. Giới hạn kim loại nặng (ACM THA 05 Testing Method)	40
Bảng 2.1. Giới hạn chấp nhận về độ đúng của phương pháp theo AOAC	48
Bảng 2.2. Giới hạn chấp nhận về độ chính xác của phương pháp theo AOAC	49
Bảng 3.1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký với Metanil yellow	56
Bảng 3.2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của Metanil yellow	58
Bảng 3.3. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của Metanil yellow trên mẫu tự tạo có nền son môi (MY01)	58
Bảng 3.4. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của MY trên mẫu tự tạo có nền mẫu son móng tay (MY02)	59
Bảng 3.5. Độ đúng của Metanil yellow trên 2 nền mẫu: son môi và son móng	60
Bảng 3.6. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của RB	63
Bảng 3.7. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của RB trên nền mẫu RB14 (phát hiện có Rhodamin B)	64
Bảng 3.8. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của RB trên nền mẫu N1	64
Bảng 3.9. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ đúng trên các nền mẫu có thêm chất chuẩn và mẫu có chứa RB	65
Bảng 3.10. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của Pigment red 53	68
Bảng 3.11. Khảo sát độ đúng, độ lặp lại trên nền mẫu son nước (PR07) có thêm chuẩn	68
Bảng 3.12. Khảo sát độ đúng, độ lặp lại trên nền mẫu son rắn (PR10) có thêm chuẩn	69
Bảng 3.13. Khảo sát độ đúng - độ lặp lại với PR trên nền mẫu tự tạo	69
Bảng 3.14. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của Pigment orange 5	71
Bảng 3.15. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp	72
Bảng 3.16. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp trên nền mẫu PO02	73
Bảng 3.17. Kết quả khả năng tìm lại của Pigment orange 5 trên mẫu PO01	73
Bảng 3.18. Kết quả khả năng tìm lại của Pigment orange 5 trên mẫu PO03	74
Bảng 3.19. Kết quả khảo sát độ lặp lại - và độ đúng trên mẫu nền N1 (CV13)	78
Bảng 3.20. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền N2 (CV15)	78
Bảng 3.21. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền N3 (CV11)	79
Bảng 3.22. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền 4 (CV03)	79
Bảng 3.23. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký phân tích các Sudan	81
Bảng 3.24. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của các Sudan	83
Bảng 3.25. Độ lặp lại của phương pháp trên các mẫu tự tạo	84
Bảng 3.26. Độ đúng phương pháp phân tích đồng thời 4 Sudan trên nền mẫu SD03	85
Bảng 3.27. Độ đúng phương pháp phân tích đồng thời 4 Sudan trên nền mẫu	86

SD05

Bảng 3.28. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký với phát hiện đồng thời các chất màu	90
Bảng 3.29. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của hỗn hợp các chất màu cảm	93
Bảng 3.30. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp với các chất màu	94
Bảng 3.31. Kết quả khảo sát độ đúng với MY và RB	95
Bảng 3.32. Kết quả khảo sát độ đúng với PR và PO	96
Bảng 3.33. Giới hạn phát hiện của MY, RB, PR và PO	96
Bảng 3.34. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của Hydroquinon	100
Bảng 3.35. Khảo sát độ lặp lại của Hydroquinon trên một số nền mẫu	100
Bảng 3.36. Khả năng tìm lại của Hydroquinon trên một số nền mẫu	101
Bảng 3.37. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của Tretinoin	104
Bảng 3.38. Khảo sát độ lặp lại của Tretinoin	104
Bảng 3.39. Khảo sát khả năng tìm lại của Tretinoin	104
Bảng 3.40. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký	106
Bảng 3.41. Kết quả xác định khoảng nồng độ tuyến tính của các corticoid	107
Bảng 3.42. Kết quả khảo sát độ chính xác của các corticoid	108
Bảng 3.43. Kết quả khảo sát độ đúng của các corticoid	109
Bảng 3.44. LOD và LOQ của các corticoid	109
Bảng 3.45 - Chương trình nhiệt độ cho thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng.	110
Bảng 3.46. Các hỗn hợp đã thử nghiệm trong vô cơ hóa mẫu kem bôi da	111
Bảng 3.47. Các hỗn hợp đã thử nghiệm trong vô cơ hóa mẫu phấn bôi da	111
Bảng 3.48. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu	115
Bảng 3.49. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của thủy ngân	115
Bảng 3.50. Kết quả đánh giá độ lặp lại trên mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da	116
Bảng 3.51. Kết quả đánh giá độ lặp lại trên mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da	116
Bảng 3.52. Kết quả đánh giá độ đúng trên mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da	117
Bảng 3.53. Kết quả đánh giá độ đúng trên mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da	117
Bảng 3.54. Chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng	118
Bảng 3.55. Chương trình nhiệt độ tối ưu để phân tích chì	119
Bảng 3.56. Khoảng tuyến tính của phương pháp	120
Bảng 3.57. Kết quả đánh giá độ lặp lại, độ đúng của phương pháp trên mẫu không chứa chì.	121
Bảng 3.58. Kết quả độ lặp lại và độ đúng của phương pháp trên mẫu có chứa chì	121
Bảng 3.59. Chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng	122
Bảng 3.60. Khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng arsen	124
Bảng 3.61. Kết quả đánh giá độ lặp lại, độ đúng của phương pháp trên mẫu.	125
Bảng 3.62. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Metanil yellow	126
Bảng 3.63. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Rhodamin B	127
Bảng 3.64. Kết quả kiểm tra các mẫu mỹ phẩm để phát hiện Pigment red 53.	128
Bảng 3.65. Kết quả định lượng các mẫu phát hiện có Pigment Red 53	128
Bảng 3.66. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Crystal violet	129
Bảng 3.67. Kết quả phân tích Sudan trong một số mẫu son	130
Bảng 3.68. Kết quả phân tích đồng thời các chất màu cảm MY, PR53, PO5, RB	131
Bảng 3.69. Kết quả phân tích đồng thời các glucocorticoid	132
Bảng 3.70. Kết quả xác định hàm lượng thủy ngân trong một số mẫu mỹ phẩm	132

DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Phổ hấp thụ UV-VIS của Rhodamin B	12
Hình 1.2. Phổ hấp thụ UV-VIS của Crystal violet	14
Hình 1.3. Nguyên tố thủy ngân trong tự nhiên	23
Hình 1.4. Sơ đồ nguyên tắc cấu tạo hệ thống máy AAS	32
Hình 2.1. Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Hitachi Z-5000	45
Hình 2.2. Máy lọc nước trao đổi ion	45
Hình 2.3. Lò vi sóng Milestone Start-D	45
Hình 3.1. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với Metanil yellow.	57
Hình 3.2. Sắc ký đồ của mẫu RB	62
Hình 3.3. Sắc ký đồ mẫu RB14 và kết quả so sánh phổ UV-VIS của pic nghi ngờ với pic RB chuẩn.	62
Hình 3.4. Sự phụ thuộc của chiều cao pic vào nồng độ RB	63
Hình 3.5. Sắc ký đồ của mẫu PR	67
Hình 3.6. Kết quả so sánh phổ UV- VIS của pic PR trên mẫu chuẩn và mẫu tự tạo	67
Hình 3.7. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với PO	71
Hình 3.8. Sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ của Pigment orange 5	72
Hình 3.9. Sắc ký đồ dung dịch ở giới hạn phát hiện 0,65 µg/ml (26 µg/1g chế phẩm)	74
Hình 3.10. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với Crystal violet	76
Hình 3.11. SKĐ của các dung dịch đánh giá độ đặc hiệu với Sudan	82
Hình 3.12. Chồng phổ UV của các pic ứng trên SKĐ của dung dịch thử tự tạo và dung dịch chuẩn	82
Hình 3.13. Sắc ký đồ của hỗn hợp một số chất màu lấy tại bước sóng 435nm.	91
Hình 3.14. Chồng phổ UV của các pic từ mẫu thử tự tạo và mẫu hỗn hợp chuẩn tại bước sóng 435 nm	91
Hình 3.15. Sắc ký đồ của hỗn hợp một số chất màu lấy tại bước sóng 535nm.	92
Hình 3.16. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu với Hydroquinon	99
Hình 3.17. Kết quả chồng phổ UV- VIS của pic Hydroquinon trên sắc ký đồ của dung dịch tự tạo và của dung dịch chuẩn.	99
Hình 3.18. SKĐ đánh giá độ đặc hiệu với Tretinoin	103
Hình 3.19. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu với 12 corticoid	107
Hình 3.20. Sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào tổng lượng thủy ngân	115
Hình 3.21. Độ hấp thụ của chì tại 283,3nm của các dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn và mẫu trắng.	120
Hình 3.22. Sắc ký đồ và kết quả so sánh phổ UV-VIS khi phân tích với mẫu sơn móng tay không rõ nguồn gốc có chứa Metanil yellow.	126
Hình 3.23. Kết quả phân tích mẫu sơn nước số RB14 có chứa Rhodamin B.	126
Hình 3.24. So sánh SKĐ và phổ UV-VIS giữa mẫu CV05 và dd chuẩn Crystal violet	129

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ xa xưa con người đã có nhu cầu làm đẹp, đã biết làm đẹp. Ngày nay, khi xã hội phát triển, kinh tế phát triển, nhu cầu làm đẹp ngày càng tăng cao. Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, khi nền kinh tế được mở cửa, đi đến đâu cũng có thể thấy những sản phẩm “làm đẹp” cho con người. Đó chính là mỹ phẩm.

Chất lượng mỹ phẩm là một vấn đề cần phải được quan tâm bởi vì mỹ phẩm được sử dụng tiếp xúc trực tiếp với những bộ phận bên ngoài của cơ thể, không có qui định về thời gian và liều lượng sử dụng, có thể ảnh hưởng đến sức khỏe và vẻ đẹp của cơ thể. Trong phân loại sản phẩm, hàng hóa theo tính an toàn, mỹ phẩm thuộc nhóm 2 - cần có sự quản lý của nhà nước về tính an toàn của sản phẩm.

Hiện nay, trong nền kinh tế thị trường, việc sản xuất, kinh doanh, xuất nhập khẩu mỹ phẩm đang phát triển nhanh, mạnh ở nhiều vùng, miền. Mỹ phẩm là loại sản phẩm, hàng hóa có lợi nhuận cao nên vì lợi nhuận mà việc sản xuất, kinh doanh, buôn bán mỹ phẩm kém chất lượng, không an toàn là khó tránh khỏi.

Đặc biệt hiện nay, nền kinh tế Việt Nam đã và đang nằm trong tiến trình hội nhập và toàn cầu hóa. Năm 2003, Chính phủ Việt Nam đã ký kết “Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm”. Ngày 07/11/2006, Việt Nam đã chính thức trở thành thành viên thứ 150 của tổ chức thương mại thế giới. Chúng ta đã bước vào “sân chơi chung” và phải tuân thủ “luật chơi chung”. Đó là những qui định, ràng buộc... cần tuân thủ để có một sự hòa hợp, công nhận lẫn nhau và phát triển. Quản lý chất lượng hàng hóa nói chung và chất lượng mỹ phẩm nói riêng sao cho phù hợp là một nhu cầu tất yếu và cấp bách.

Đánh giá, giám sát chất lượng mỹ phẩm là một trong những nhiệm vụ quan trọng của hệ thống kiểm nghiệm. Nhiệm vụ chính của công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm là giám sát các chỉ tiêu ảnh hưởng tới sự an toàn của mỹ phẩm, trong đó quan trọng nhất là việc kiểm soát sự có mặt của các chất bị cấm, hoặc bị giới hạn về nồng độ, hàm lượng được phép sử dụng, có mặt trong các sản phẩm mỹ phẩm lưu hành trên thị trường Việt Nam. Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm mà Việt Nam đã tham gia ký kết từ năm 2003 [1], trong bản bổ sung mới nhất vào năm 2013 có quy định danh sách 1373 chất và nhóm chất không được phép có mặt trong các sản phẩm mỹ phẩm (Phụ lục II, phần 1) cũng như 285 chất và nhóm chất không được phép sử dụng trừ những trường hợp ngoại lệ nhưng phải tuân theo các giới hạn và điều kiện quy định kèm theo (Phụ lục III, phần 1) [57]. Không giống như lĩnh vực quản lý dược phẩm đã có hệ thống Dược điển được xây dựng chặt chẽ từ nhiều năm, hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa có hệ thống phương pháp chuẩn để kiểm tra các chất cấm, chất cần kiểm soát giới hạn hàm lượng trong mỹ phẩm theo yêu cầu của Hiệp

định hệ thống hòa hợp ASEAN. Bản thân ASEAN cho đến nay cũng chỉ mới ban hành được 8 phương pháp hòa hợp chung. Trong số đó có 6 phương pháp hóa lý để xác định hay định tính và định lượng một số kim loại nặng [50], tretinoin [51], 2-phenoxy ethanol và một số alkyl 4-hydroxybenzoat [53], hydroquinon [54], một số chất màu cấm [52] và một số glucocorticoid trong mỹ phẩm [55].

Bản thân những phương pháp này mới chỉ đáp ứng một phần rất nhỏ yêu cầu về mặt kỹ thuật để kiểm tra, giám sát các đối tượng chất cấm trong mỹ phẩm, hơn nữa bản thân những phương pháp này, nếu muốn triển khai trên thực tế tại Việt Nam, cũng cần được đánh giá thực nghiệm về sự phù hợp khi áp dụng trên các mẫu mỹ phẩm đang có mặt tại Việt Nam cũng như điều kiện thực tế trang thiết bị của nước ta (thẩm định chuyển giao phương pháp) [44].

Những yêu cầu, tồn tại thực tế trên đây trong công tác kiểm nghiệm mỹ phẩm đã cho thấy tính cấp thiết trong việc triển khai nghiên cứu xây dựng các phương pháp chuẩn để kiểm tra chất cấm, chất cần kiểm soát giới hạn hàm lượng trong mỹ phẩm. Những nghiên cứu này bao gồm cả việc triển khai áp dụng thực tiễn các phương pháp hòa hợp sẵn có của ASEAN, cũng như xây dựng các phương pháp mới cho các đối tượng chưa có sẵn phương pháp hòa hợp. Đề tài “***Nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện và xác định hàm lượng một số chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm***” được thực hiện với các mục tiêu sau:

1) *Thẩm định chuyển giao các phương pháp phân tích hòa hợp của ASEAN trong quản lý mỹ phẩm*

2) *Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích xác định một số chất bị cấm trong mỹ phẩm.*

3) *Kiểm tra, phát hiện các chất bị cấm và chất có giới hạn hàm lượng sử dụng đã được nghiên cứu trong một số dạng mẫu mỹ phẩm trên thị trường.*

Để đạt được mục tiêu nêu trên, cần tiến hành thực hiện các nội dung nghiên cứu như sau:

- 1- Triển khai, thẩm định chuyển giao các phương pháp hòa hợp của ASEAN
- 2- Thiết lập và đánh giá các quy trình phân tích mới cho các đối tượng chưa có phương pháp hòa hợp
- 3- Áp dụng các quy trình mới xây dựng, các quy trình thẩm định chuyển giao kiểm tra một số chất bị cấm và có giới hạn sử dụng trong các mẫu mỹ phẩm trên thị trường

Chương I

TỔNG QUAN

1.1. QUẢN LÝ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG MỸ PHẨM

1.1.1. Một số nét cơ bản về quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm trên thế giới

Mỹ phẩm đại diện cho ngành công nghiệp toàn cầu có giá trị doanh thu rất lớn ở cộng đồng châu Âu (European Union (EU)), hợp chủng quốc Hoa kỳ (Unites States (US)) và Nhật bản cũng như nhiều nước khác trên thế giới.

Để đảm bảo an toàn và hiệu quả, các sản phẩm mỹ phẩm cần được kiểm soát và kiểm tra chất lượng trên toàn cầu. Tuy nhiên, qui định của các quốc gia vẫn có những điểm khác biệt. Các tác giả Amparo Salvador và Alberto Chisvert đã có công trình nghiên cứu và tổng hợp các quy định cũng như các phương pháp phân tích mỹ phẩm trong cuốn sách “Phân tích các sản phẩm mỹ phẩm” được xuất bản lần đầu tiên vào năm 2007. Cuốn sách này đã cho ta một cách nhìn tổng quát về công tác quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm trên thế giới [47]. Để kiểm soát an toàn và kiểm tra chất lượng của mỹ phẩm, người ta đặc biệt lưu ý đến các thành phần có mặt trong các sản phẩm mỹ phẩm và các phương pháp phân tích các sản phẩm mỹ phẩm. Sau đây là một số nét chính của công tác này.

❖ *Các thành phần chính có mặt trong các sản phẩm mỹ phẩm:*

Các nước châu Âu tuân thủ theo định hướng mỹ phẩm của Cộng đồng các nước này (The European Union Cosmetic Directive) được phê duyệt từ năm 1976, đã có nhiều lần bổ sung, cho đến nay có những phụ lục chính:

- Danh mục gồm 20 nhóm sản phẩm (Phụ lục I)
- Danh mục các chất bị cấm: 1132 chất và nhóm chất (Phụ lục II)
- Danh mục các chất có giới hạn về hàm lượng, nồng độ và điều kiện sử dụng: 396 chất (Phụ lục III)
- Danh mục các chất màu được phép sử dụng (Phụ lục IV)
- Danh mục các chất bảo quản (Phụ lục VI)
- Danh mục các chất lọc tia UV (Phụ lục VII)

Ở Mỹ (Hợp chủng quốc Hoa kỳ, United States)), mỹ phẩm được quản lý theo quy định của Cục quản lý thực phẩm và thuốc gọi tắt là FDA (Food and Drug Administration, từ năm 1938 gọi là Food, Drug & Cosmetic Act): quy định đảm bảo về tính an toàn và hiệu quả của mỹ phẩm.

FDA không yêu cầu bắt buộc tiền kiểm mỹ phẩm, tuy nhiên nếu một trong các thành phần của mỹ phẩm chưa được đánh giá tính an toàn thì trên nhãn sản phẩm cần ghi chú: “An toàn của sản phẩm này chưa được xác định”

Nhật Bản quản lý mỹ phẩm theo luật công tác Dược - PAL (Pharmaceutical Affairs Law) được phê duyệt lần đầu tiên vào năm 1943, có sửa đổi vào những năm 1948, 1960 và 1979. Luật này đã được xem xét lại và phát triển vào năm 2001. PAL đã đưa ra những quy định cho thuốc, những sản phẩm giống như thuốc và mỹ phẩm.

Tổng hợp lại những quy định của EU, Mỹ và Nhật Bản có thể được so sánh trong bảng sau:

Bảng 1.1. Một số quy định của EU, Mỹ và Nhật Bản về các nội dung cần quản lý đối với mỹ phẩm.

Nội dung quản lý	EU (Châu Âu)	US (Mỹ)	Nhật Bản
Thông tin sản phẩm	Có	Không bắt buộc (tự nguyện)	Có
Kiểm tra trên thị trường	Có	Có	Có
An toàn sản phẩm (nhà sản xuất chịu trách nhiệm)	Có	Có	Có
Danh mục chất cấm	Có	Có	Có
Danh mục chất màu	Có	Có	Có
Danh mục chất bảo quản	Có	Không	Có
Danh mục chất lọc tia UV	Có	Có	Có
Danh pháp quốc tế thành phần mỹ phẩm	Có	Có	Có
Loại sản phẩm	Mỹ phẩm hay thuốc	Mỹ phẩm, sản phẩm OTC hay thuốc	Mỹ phẩm, sản phẩm giống thuốc hay thuốc

Việc quản lý mỹ phẩm ở Trung Quốc được quy định bởi Bộ Y tế, cục quản lý Dược và thực phẩm (Ministry of Health, the State Food and Drug Administration (SFDA)) và một số cơ quan liên quan khác. Về cơ bản là theo “Định hướng mỹ phẩm châu Âu”, nhưng họ đã chia ra 2 nhóm: mỹ phẩm thông thường (các sản phẩm chăm sóc da, trang điểm, chăm sóc tóc, sản phẩm làm thơm...) và các mỹ phẩm chức năng đặc biệt (chống gàu, chống rụng tóc, chống nắng...). Các sản phẩm cần được đăng ký trước khi ra thị trường. Thành phần mỹ phẩm cũng có danh mục các chất cấm, chất có giới hạn hàm lượng, chất màu được phép sử dụng... giống EU (trừ danh mục chất màu nhuộm tóc). Tất cả các thành phần của mỹ phẩm cần nằm trong danh mục các chất hóa học hiện hành đã được liệt kê hoặc các chất mới sau khi đã được đánh giá an toàn bởi các cơ quan chức năng của Trung Quốc.

Năm 2003, “Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm” đã được các nước trong khối ASEAN thông qua, ký kết và cam kết thực hiện. Về cơ bản định hướng mỹ phẩm ASEAN (Asean Cosmetic Directive hay gọi tắt là ACD) theo định hướng mỹ phẩm của châu Âu, cũng có qui định về danh mục các chất bị cấm trong mỹ phẩm (Phụ lục II), danh mục các chất được sử dụng có giới hạn về hàm lượng, nồng độ và điều kiện sử dụng (Phụ lục III)... [1].

❖ ***Các phương pháp phân tích các sản phẩm mỹ phẩm*** [47]

- Châu Âu: Có 38 phương pháp chính thức liên quan tới 60 nguyên liệu hay nhóm chất chủ yếu là các chất bị cấm sử dụng hay các chất bảo quản.
- Mỹ, Nhật Bản: Không có phương pháp phân tích chính thức cho mỹ phẩm.
- Hàn Quốc: Một số phương pháp chính thức cho kiểm tra kim loại nặng, methanol và pH.
- Trung Quốc: 23 phương pháp chính thức để đánh giá chất lượng mỹ phẩm trước khi cấp phép lưu hành trên thị trường.
- Các nước ASEAN: đã ban hành chính thức 8 phương pháp (bao gồm 6 phương pháp hóa lý và 2 phương pháp vi sinh) như đã nêu ở phần đặt vấn đề là một con số quá nhỏ so với danh mục các chất cần kiểm soát và kiểm tra để đảm bảo tính an toàn của sản phẩm.
- Một số nguyên liệu mỹ phẩm được dùng trong dược phẩm có chuyên luận và phương pháp kiểm nghiệm trong các dược điển (USP, BP, ĐĐVN ...). Ví dụ: Vitamin E, octyl methoxycinnamat (octinoxate), tital dioxyd, bột talc...
- Các phương pháp chính thức không đáp ứng được toàn bộ yêu cầu kiểm nghiệm các sản phẩm mỹ phẩm. Vì vậy các nhà sản xuất, nhà phân tích kiểm nghiệm cần các phương pháp mới để đáp ứng yêu cầu đánh giá chất lượng của những sản phẩm mới. Các hiệp hội quốc tế đã đưa ra một số phương pháp kiểm nghiệm. Ví dụ: Các phương pháp chính thức của Hiệp hội quốc tế những nhà hóa học phân tích (Association of Analytical Chemists International (AOAC International)) dùng cho kiểm nghiệm mỹ phẩm gồm 6 nhóm: Các phương pháp chung; chế phẩm khử mùi và ngăn mồ hôi; chế phẩm làm rụng lông; phấn mặt; chế phẩm dùng cho tóc; chế phẩm gây bắt nắng.

Các phương pháp của Hiệp hội mỹ phẩm châu Âu (Cosmetic Europe – The Person care Association, trước đây là COLIPA) cũng gồm 6 nhóm: Các chất bị cấm sử dụng (Phụ lục 2); các chất được phép sử dụng nhưng có giới hạn về hàm lượng và theo mục đích sử dụng (Phụ lục 3); phương pháp phân tích một số chất không liệt kê trong phụ lục qui định quản lý mỹ phẩm châu Âu; chất màu được phép sử dụng trong mỹ phẩm (Phụ lục 4), chất bảo quản được phép sử dụng trong mỹ phẩm (Phụ lục 6); chất lọc tia UV có thể dùng trong mỹ phẩm (Phụ lục 7)

Ngoài ra, nhà sản xuất còn có các phương pháp kiểm tra các chỉ tiêu cần thiết của sản phẩm riêng của mình. Phương pháp của nhà sản xuất là bí mật riêng, do nhà sản xuất quản lý trong hồ sơ thông tin sản phẩm (PIF) và cần được trình lên cơ quan quản lý khi có yêu cầu.

1.1.2. Quá trình hình thành và hoàn thiện công tác quản lý chất lượng mỹ phẩm tại Việt Nam

Theo định nghĩa mới nhất trong Nghị định của Cộng đồng Châu Âu và cũng là

trong “Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm”: “Sản phẩm mỹ phẩm là một chất hay chế phẩm được sử dụng để tiếp xúc với những bộ phận bên ngoài cơ thể (da, hệ thống lông, tóc, móng tay, móng chân, môi và phía ngoài cơ quan sinh dục) hoặc với răng và niêm mạc miệng, với mục đích duy nhất hoặc chính là để làm sạch, làm thơm, thay đổi diện mạo, hình thức và/hoặc làm điều chỉnh mùi cơ thể và/hoặc bảo vệ chúng hoặc giữ chúng trong điều kiện tốt” [1].

Đầu những năm 90 của thế kỷ XX, Việt Nam chỉ mới sản xuất một số mặt hàng mỹ phẩm đơn giản như xà phòng tắm, thuốc đánh răng... Việc quản lý chất lượng đã được quan tâm nhưng chủ yếu ở mức xây dựng và ban hành tiêu chí về chất lượng (tiêu chuẩn, qui chuẩn về kỹ thuật) của các sản phẩm này mà chưa chú ý nhiều đến các chỉ tiêu về an toàn. Việc xây dựng các tiêu chuẩn, qui chuẩn cấp quốc gia do các cơ quan biên soạn tùy theo loại sản phẩm được quản lý và phân công. Trong “Tuyển tập tiêu chuẩn về hóa mỹ phẩm” do Trung tâm Thông tin của Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường chất lượng biên soạn năm 2003 cho đến nay có 33 tiêu chuẩn của Việt Nam cho các mặt hàng: bột giặt, xà phòng tắm, xà phòng giặt, kem đánh răng, nước gội đầu, phấn rôm, thuốc uốn tóc...[37].

Pháp lệnh chất lượng hàng hóa năm 1999 [40] đã có đổi mới nhận thức theo nguyên tắc cơ bản của quản lý nhà nước về chất lượng hàng hóa và việc phân định quyền và trách nhiệm quản lý chất lượng sản phẩm. Các nguyên tắc đó là:

- Nhà sản xuất, nhà nhập khẩu và người bán tổ chức quản lý chất lượng sản phẩm theo tiêu chuẩn do mình công bố hoặc ký hợp đồng đối với các đối tác thương mại.

- Quản lý nhà nước về chất lượng theo quy chuẩn kỹ thuật: Nhà nước tổ chức quản lý, kiểm soát những sản phẩm, giai đoạn có yêu cầu trực tiếp đến việc đảm bảo an toàn của sản phẩm.

Nghị định của Chính phủ số 179/2004/NĐ-CP ngày 21-10-2004 quy định quản lý nhà nước về chất lượng sản phẩm, hàng hóa. Nghị định này quy định chi tiết việc thi hành Pháp lệnh Chất lượng hàng hóa và các quy định khác của pháp luật có liên quan đến quản lý nhà nước về chất lượng sản phẩm, hàng hóa đối với các cơ quan quản lý nhà nước, các tổ chức, cá nhân sản xuất, kinh doanh, các tổ chức hoạt động trong lĩnh vực tiêu chuẩn, chất lượng sản phẩm, hàng hóa [18].

Trong vòng 10 năm trở lại đây, các sản phẩm mỹ phẩm được sản xuất, nhập khẩu, phân phối, lưu thông trên thị trường rất phong phú, nhiều chủng loại. Bộ Y tế được giao nhiệm vụ quản lý những sản phẩm, hàng hóa đặc thù “ảnh hưởng đến sức khỏe con người”: xà phòng và hóa chất gia dụng, phấn rôm, thuốc đánh răng, mỹ phẩm [18].

Năm 1996, Bộ Y tế có Quyết định số 2585/1996/QĐ-BYT ngày 28/12/1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc giao nhiệm vụ kiểm nghiệm mỹ phẩm cho Viện Kiểm nghiệm (nay là Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương), Phân viện Kiểm nghiệm (nay là Viện Kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh) và các trung tâm kiểm nghiệm tỉnh, thành phố [12].

Năm 1998, Bộ Y tế có Quyết định số 3629/1998/QĐ - BYT ngày 19/12/1998 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành “Danh mục các loại mỹ phẩm bắt buộc đăng ký chất lượng tại Bộ Y tế”. Theo Quyết định này, có 05 nhóm hàng mỹ phẩm bắt buộc đăng ký chất lượng tại Bộ Y tế gồm: dầu gội đầu, son môi, kem dưỡng da, sữa rửa mặt và thuốc nhuộm tóc. Năm 1998 cũng là năm Khoa kiểm nghiệm Mỹ phẩm của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương được thành lập [45].

Ngày 02/9/2003, Chính phủ Việt Nam đã ký “Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm”. Theo Hiệp định này, 10 nước ASEAN đã cam kết thực hiện tiến trình hòa hợp và từ 01/1/2008, Hiệp định bắt đầu có hiệu lực [1].

Để thực hiện nhiệm vụ về quản lý mỹ phẩm, theo từng mốc thời gian Bộ Y tế đã có các văn bản, qui định cho việc đăng ký, tự công bố tiêu chuẩn cho các doanh nghiệp, văn bản về một số chỉ tiêu và phương pháp thử trong kiểm tra chất lượng mỹ phẩm:

Ngày 14/4/2008, Cục Quản lý dược Việt nam - Bộ Y tế ra thông báo về việc tiếp nhận phiếu công bố sản phẩm mỹ phẩm theo qui định mới (Công văn số 3307/QLD-MP) [10]

Ngày 14/8/2006, Bộ Y tế có quyết định số 24/2006/QĐ - BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc Triển khai áp dụng và hướng dẫn thực hiện các nguyên tắc, tiêu chuẩn “thực hành tốt sản xuất mỹ phẩm” (Cosmetic Good Manufacturing Practices - CGMP) của hiệp hội các nước Đông Nam Á [13].

Gần đây nhất, ngày 25/01/2011, Bộ Y tế có Thông tư số 06/2011/TT - BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành “Qui định về quản lý mỹ phẩm” gồm 11 chương, 53 điều. Thông tư này có hiệu lực thi hành kể từ ngày 01/04/2011, những điều trái với thông tư này đều bãi bỏ [14].

Theo Thông tư này, Bộ Y tế quản lý 20 nhóm mặt hàng mỹ phẩm. Về việc công bố sản phẩm mỹ phẩm: tổ chức, cá nhân chỉ được phép đưa sản phẩm ra thị trường sau khi đã công bố sản phẩm mỹ phẩm tại Cục Quản lý Dược Việt Nam với các mỹ phẩm nhập khẩu và công bố sản phẩm mỹ phẩm tại các Sở Y tế (có số tiếp nhận bản công bố mỹ phẩm). Tổ chức, cá nhân này “chịu hoàn toàn trách nhiệm về tính an toàn, hiệu quả của sản phẩm mỹ phẩm đưa ra thị trường và phải tuân thủ theo qui định của pháp luật Việt Nam”. Theo thông báo của Cục Quản lý Dược, hiện nay có 872 doanh nghiệp công bố mỹ phẩm nhập khẩu với gần 100000 loại sản phẩm và 408 doanh nghiệp sản

xuất trong nước. Các cơ sở sản xuất đều cam kết thực hiện theo nguyên tắc thực hành tốt sản xuất mỹ phẩm, tiến hành lập hồ sơ theo dõi sản phẩm. Tuy nhiên, cho đến nay, có khoảng 10 cơ sở sản xuất trong nước được cấp chứng nhận đạt tiêu chuẩn “thực hành tốt sản xuất mỹ phẩm” (CGMP). Một số cơ sở đang chuẩn bị hoàn thiện về cơ sở vật chất, trang thiết bị, hồ sơ để đề nghị công nhận.

Nền kinh tế mở rất thuận lợi cho buôn bán, trao đổi hàng hóa, các sản phẩm mỹ phẩm nhập khẩu rất phong phú, đa dạng, có loại chất lượng cao, không loại trừ có cả hàng kém chất lượng, hàng nhái, hàng giả. Thực tế cho thấy, mỹ phẩm sản xuất trong nước đa số là sản xuất nhỏ lẻ, nhiều cơ sở chưa đạt yêu cầu về cơ sở vật chất, trang thiết bị, vệ sinh an toàn... Vì vậy, để sản xuất, buôn bán, trao đổi mỹ phẩm phát triển lành mạnh, bền vững, đảm bảo an toàn cho người sử dụng, ngoài việc cần có cơ chế quản lý phù hợp cho mặt hàng này, cần phải có hệ thống phương pháp hoàn chỉnh để có thể kiểm soát được tính an toàn của sản phẩm bởi vì mỹ phẩm thuộc nhóm “sản phẩm, hàng hóa có khả năng gây mất an toàn” (nhóm 2). [40]

Cơ quan quản lý cần sớm ban hành những quy chuẩn kỹ thuật và tổ chức đánh giá sự phù hợp để đánh giá tính an toàn của sản phẩm. Theo “Hiệp định hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm” phiên bản cập nhật đến 2013 có qui định 1373 chất và nhóm chất cấm sử dụng trong mỹ phẩm, 285 chất và nhóm chất có qui định về giới hạn, nồng độ và hàm lượng sử dụng (phụ lục II và III của hiệp định) [57]. Hiệp định này cũng đã qui định danh mục các chất màu, các chất bảo quản, các chất chống tia tử ngoại... được phép sử dụng. Một số nước ASEAN còn qui định thêm danh mục các chất không được có trong các sản phẩm mỹ phẩm ngoài các chất cấm đã qui định. Ví dụ: theophyllin (Malaysia, Singapore) thorium và các hợp chất (Indonesia)...

Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, Viện Kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh - những cơ quan đầu ngành kiểm nghiệm đang bước đầu triển khai áp dụng các qui trình của ASEAN. Để hòa hợp tiêu chuẩn với các nước ASEAN trong quản lý, kiểm tra chất lượng mỹ phẩm, từ những năm 2010 các Viện đã đầu tư mua sắm các thiết bị phân tích, các chất cấm ở dạng chất chuẩn, dung môi hóa chất... và đào tạo nhân lực đủ trình độ để triển khai, thực hiện các kỹ thuật phân tích hiện đại... Đến nay đã triển khai các qui trình phân tích của ASEAN để phát hiện một số chất cấm, để định lượng các nguyên tố độc (thủy ngân, chì, arsen, cadmi...) còn rất nhiều các chất cấm, các chất có giới hạn về nồng độ hàm lượng sử dụng... cần được nghiên cứu, xây dựng qui trình để phát hiện, định lượng.

Cho đến nay, 63 Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm ở các tỉnh, thành trên cả nước đa số chưa thực hiện được các phương pháp hòa hợp ASEAN vì thiếu thiết bị, dung môi hóa chất, chất chuẩn... nhân lực chưa được đào tạo.

1.1.3. Một số nội dung về quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm theo Thông tư 06/2011/TT-BYT

Để triển khai Hiệp định hòa hợp trong quản lý mỹ phẩm các nước ASEAN (gọi tắt là Hiệp định mỹ phẩm ASEAN), Bộ Y tế quy định về quản lý mỹ phẩm trong Thông tư 06/2011/TT-BYT ngày 25/01/2011 bao gồm: 11 chương, 53 điều [14]. Trong đó có một số chương và điều liên quan trực tiếp đến công tác quản lý và kiểm tra chất lượng mỹ phẩm và danh mục các nhóm hàng mỹ phẩm thuộc diện quản lý của Bộ Y tế. Sau đây là một số nội dung liên quan đến quản lý, kiểm tra chất lượng mỹ phẩm được qui định trong Thông tư.

❖ Một số qui định chung

Phạm vi điều chỉnh của Thông tư này (được quy định tại Điều 1, khoản 1) bao gồm việc quản lý các sản phẩm mỹ phẩm sản xuất trong nước, mỹ phẩm nhập khẩu để lưu thông trong phạm vi lãnh thổ Việt Nam, bao gồm: công bố sản phẩm mỹ phẩm; hồ sơ thông tin sản phẩm; yêu cầu về an toàn sản phẩm; ghi nhãn mỹ phẩm; quảng cáo mỹ phẩm; xuất khẩu, nhập khẩu mỹ phẩm; lấy mẫu mỹ phẩm để kiểm tra chất lượng; kiểm tra, thanh tra và xử lý vi phạm; trách nhiệm của tổ chức, cá nhân sản xuất, buôn bán, nhập khẩu mỹ phẩm và quyền của người tiêu dùng.

Điều 1, khoản 2 trong Thông tư qui định đối tượng áp dụng là các cơ quan quản lý nhà nước về mỹ phẩm, các tổ chức, cá nhân tiến hành các hoạt động liên quan đến công bố sản phẩm mỹ phẩm, thông tin, quảng cáo, xuất khẩu, nhập khẩu, sản xuất, buôn bán sản phẩm mỹ phẩm tại Việt Nam.

Điều 11 trong Thông tư qui định mỗi sản phẩm mỹ phẩm khi đưa ra lưu thông trên thị trường phải có Hồ sơ thông tin sản phẩm (PIF - Product Information File) theo hướng dẫn của ASEAN lưu giữ tại địa chỉ của tổ chức, cá nhân chịu trách nhiệm đưa sản phẩm ra thị trường.

Nội dung của Hồ sơ thông tin sản phẩm mỹ phẩm được qui định tại Điều 12. Hồ sơ Thông tin sản phẩm mỹ phẩm gồm có 4 phần như sau: Tài liệu hành chính và tóm tắt về sản phẩm; Chất lượng của nguyên liệu; Chất lượng của thành phẩm và An toàn và hiệu quả. Nội dung chi tiết của Hồ sơ Thông tin sản phẩm mỹ phẩm (PIF) quy định tại Phụ lục số 07-MP, bao gồm các nội dung sau: Tài liệu hành chính và tóm tắt về sản phẩm, chất lượng của nguyên liệu, chất lượng của thành phẩm, an toàn và hiệu quả.

❖ Yêu cầu về an toàn sản phẩm mỹ phẩm

Yêu cầu về an toàn sản phẩm mỹ phẩm được qui định tại Điều 13.

Các tổ chức, cá nhân chịu trách nhiệm đưa sản phẩm mỹ phẩm ra thị trường phải đảm bảo các sản phẩm của mình không có hại đối với sức khỏe con người khi được dùng trong những điều kiện bình thường hoặc những điều kiện thích hợp được

hướng dẫn, phù hợp với dạng bào chế, thông tin ghi trên nhãn, hướng dẫn sử dụng, thận trọng đặc biệt, cũng như các thông tin khác cung cấp bởi nhà sản xuất hoặc chủ sở hữu sản phẩm.

Nhà sản xuất, chủ sở hữu sản phẩm phải đánh giá tính an toàn trên mỗi sản phẩm mỹ phẩm theo Hướng dẫn đánh giá tính an toàn mỹ phẩm của ASEAN. Giới hạn kim loại nặng và vi sinh vật trong mỹ phẩm phải đáp ứng yêu cầu của ASEAN quy định tại Phụ lục số 06-MP. Thành phần công thức mỹ phẩm phải đáp ứng theo các Phụ lục (Annexes) - bản mới nhất của Hiệp định mỹ phẩm ASEAN [57].

❖ *Các thành phần cấm dùng hoặc có quy định về giới hạn nồng độ, hàm lượng*

Các thành phần chất cấm, các thành phần có quy định về giới hạn nồng độ, hàm lượng và điều kiện sử dụng trong công thức sản phẩm mỹ phẩm được quy định tại Điều 14 và các Phụ lục kèm theo.

❖ *Các quy định về lấy mẫu để kiểm tra, kiểm tra, thanh tra và xử lý vi phạm*

Nguyên tắc lấy mẫu được quy định tại Điều 36, được quy định cụ thể về cách lấy mẫu mỹ phẩm, lượng mẫu cần lấy, cách lưu mẫu, cách lập biên bản lấy mẫu mỹ phẩm.

Quyền hạn và trách nhiệm của người lấy mẫu được quy định tại Điều 37. Vận chuyển và bàn giao mẫu được quy định tại Điều 38.

Kết luận kết quả kiểm tra chất lượng các mẫu mỹ phẩm được quy định tại Điều 39

Hệ thống kiểm tra nhà nước về chất lượng mỹ phẩm được quy định tại Điều 41, gồm các cơ quan kiểm tra chất lượng mỹ phẩm và hệ thống kiểm nghiệm của nhà nước về mỹ phẩm.

Hình thức kiểm tra, thanh tra (Điều 42) và nội dung kiểm tra, thanh tra (Điều 43) được quy định cụ thể. Việc kiểm tra, thanh tra giám sát hậu mại mỹ phẩm cần tập trung tại các đơn vị nhập khẩu, phân phối, sản xuất. Thứ tự ưu tiên trong việc kiểm tra giám sát hậu mại mỹ phẩm dựa vào loại sản phẩm, nguồn gốc xuất xứ, nhãn hàng, thương hiệu công ty, thành phần công thức sản phẩm theo hướng dẫn của ASEAN về kiểm tra giám sát hậu mại (Phụ lục số 08-MP). Tài liệu hướng dẫn của ASEAN về kiểm tra hậu mại bao gồm các nội dung: Xây dựng chiến lược kiểm tra hậu mại và một số chỉ tiêu, thành phần cần chú ý.

1.2. MỘT SỐ HỢP CHẤT BỊ CẤM SỬ DỤNG VÀ CẦN KIỂM SOÁT HÀM LƯỢNG NGHIÊN CỨU TRONG ĐỀ TÀI

1.2.1. Một số hợp chất màu bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm

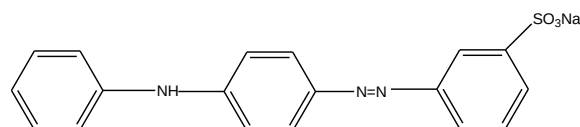
Các hợp chất màu là những chất có màu ở trạng thái rắn và trong dung dịch, tức là có khả năng truyền màu cho một chất nền [8]. Các chất màu bị cấm thường là các chất màu được sử dụng trong công nghiệp (ngành sơn, giấy, thuộc da, dệt may...),

trong hóa học (chỉ thị, kính hiển vi huỳnh quang...), trong sinh học (nhuộm tiêu bản...). Chúng là các chất có khả năng gây độc cho con người. Hiệp định “Hệ thống hòa hợp ASEAN trong mỹ phẩm” có qui định 12 chất màu và nhóm chất màu bị cấm sử dụng tại phụ lục II, phần 1 [57]. Tuy nhiên, do chúng có màu sắc đẹp (vàng, vàng cam, đỏ, tím...), bền màu, giá thành rẻ hơn nhiều so với chất màu tự nhiên nên chúng rất dễ bị lợi dụng cho vào các sản phẩm làm đẹp như: son môi, phấn trang điểm (phấn má, phấn mắt...), son móng, thuốc nhuộm tóc... Sau đây là một số đặc điểm và tính chất của một số chất màu bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm.

1.2.1.1. Metanil yellow (MY)

Tên khác: Tropaeolin G, Acid Yellow 36

Mã: CI 13065[49]



Tên khoa học: 3-(4-Anilinophenylazo)-benzenesulfonat natri

Công thức phân tử: $C_{18}H_{14}N_3O_3SNa$.

Khối lượng phân tử: 375,391 [7], [89]

❖ Tính chất vật lý:

Metanil yellow là một chất màu tổng hợp, là bột màu vàng. Tan trong nước (5,4%) và tan trong ethanol (1,4%). Hấp thụ ánh sáng mạnh ở các bước sóng 536nm, 435nm, 414nm. Metanil yellow chuyển đổi màu từ màu tím sang màu vàng ở pH 1,5-2,7 [89].

❖ Ứng dụng:

Metanil yellow là chất màu được sử dụng phổ biến trong công nghiệp thuộc da, giấy và dệt. Metanil yellow cũng được dùng trong một số phương pháp nhuộm ba màu và nhuộm vàng collagen tạo sự tương phản với huyết tương được nhuộm đỏ [112].

❖ Độc tính:

Metanil yellow có tác động lên tế bào gan khi dùng đường uống với tỷ lệ 430 mg/kg thể trọng trên 4 loài động vật trong 7 ngày đã cho ta kết quả: coenzym GST (glutathion-S-transferase) tăng 136%, QR (quinone reductase) là 92% và cảm ứng cytocrom P₄₅₀, ảnh hưởng đến khả năng khử độc của gan [112]. Ngoài ra với nhiều nghiên cứu khác cũng thấy độc tính của Metanil yellow trên chuột nhắt và chuột cống đều cho kết quả là lông và da của con vật trở nên xù xì [73].

Metanil yellow còn tác động trên não của chuột trưởng thành làm thay đổi hành vi, khả năng ghi nhớ, ảnh hưởng đến các vùng điều khiển noradrenalin, làm giảm hoạt động của cholinesterase, serotonin... [112].

Do vậy, metanil yellow nằm trong danh mục cấm sử dụng trong mỹ phẩm theo Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm [57].

❖ Một số phương pháp phân tích metanil yellow:

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02 đã đưa ra phương pháp định tính

metanil yellow bằng TLC và HPLC [52].

Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng sử dụng sắc ký lỏng pha đảo tạo cặp ion với detector PDA và MS để phát hiện metanil yellow [97], [98].

1.2.1.2. Rhodamin B (RB)

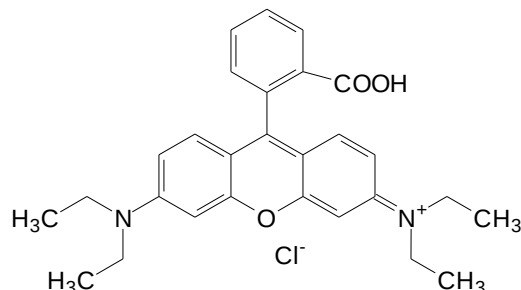
Tên khác: Rhodamine 610, CI pigment Violet 1, Basic Violet 10

Mã màu: CI 145170 [57]

Tên khoa học: [9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium clorid

Công thức phân tử: $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$

Khối lượng phân tử: 479,02.

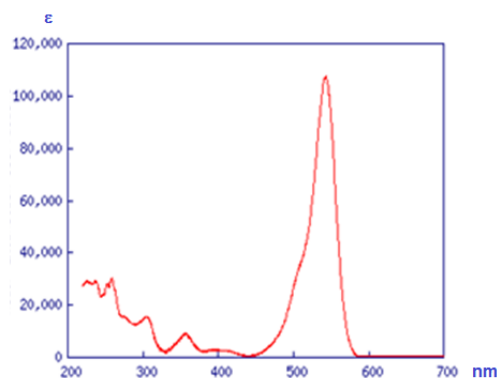


❖ Tính chất vật lý:

Rhodamin B thuộc nhóm phẩm nhuộm fluorron, dạng bột màu vàng cam. Nhiệt độ chảy: 210 °C - 211°C. Dễ tan trong nước (khoảng 50g/l), methanol và ethanol. Phổ hấp thụ UV-VIS của dung dịch trong ethanol cho cực đại hấp thụ ở bước sóng 526 nm (Hình 1) [25], [74].

❖ Ứng dụng:

Rhodamin B phát huỳnh quang nên được ứng dụng nhiều trong công nghệ sinh học như kính hiển vi huỳnh quang, đếm tế bào dòng chảy, quang phổ huỳnh quang ...[123]. Nó còn được dùng để tạo màu và nhuộm màu trong công nghiệp sợi, nhuộm màu để xét nghiệm tế bào.



Hình 1.1. Phổ hấp thụ UV-VIS của Rhodamin B

❖ Độc tính:

Nói chung, rhodamin B là một chất màu độc, có khả năng gây ung thư [74], [99] và nằm trong danh mục cấm sử dụng trong mỹ phẩm theo Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm [1].

❖ Một số phương pháp phân tích:

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02 đã đưa ra phương pháp định tính rhodamin B bằng TLC và HPLC với detector UV-VIS [52]. Một số nghiên cứu khác phát hiện và định lượng rhodamin B bằng HPLC với detector PDA [74], huỳnh quang [39], [92], tử ngoại khả kiến [25], [39], khối phổ [104].

1.2.1.3. Pigment red 53 (PR)

Tên khác: Pigment Red 53:1, Pigment Red SBK800, Bronze Red C-P

CAS No.: 5160-02-1

Mã màu CI: 15585 [1]

Tên khoa học: *barium bis [2 - chloro - 5 - [(hydroxy -1-naphthyl) azo] toluen - 4 - sulphonat]*

Công thức phân tử: $C_{34}H_{24}Cl_2N_4O_8S_2Ba$, có thể có dạng muối Natri

Khối lượng phân tử: 888,98.

❖ *Tính chất vật lý:*

Pigment red 53 (PR53) là chất thuộc nhóm chất màu azoic. Bột màu đỏ hoặc vàng, ít tan trong nước và ethanol, không tan trong aceton và benzen. Ít tan trong dung dịch Natri hydroxid 10% cho màu vàng, trong dung dịch kali hydroxid trong ethanol cho màu đỏ nâu đậm. Bị phân hủy dưới nhiệt độ nóng chảy 330 °C [100].

❖ *Ứng dụng:*

Pigment red 53 được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp giấy, dệt, mực in và sơn [100].

❖ *Độc tính:*

PR53 có thể được hấp thu qua đường miệng, gây kích ứng da và mắt. Dùng lâu dài, PR53 là nguyên nhân của nhiều bệnh về hệ tạo máu ở lách, gan, thận. PR53 bị cấm ở Mỹ từ năm 1986, hiện nay EU cũng không cho phép có mặt trong bất cứ sản phẩm nào [69], [75], [101], [108], [122]. PR53 có mặt trong danh sách các chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm theo quy định của Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm [1].

❖ *Một số phương pháp phân tích:*

Một số nghiên cứu sử dụng phương pháp HPLC để phân tích Pigment red 53, [8], [107], [121]

1.2.1.4. Pigment orange 5 (PO)

Tên khác: Lightoranger, Oralithred2gl, carneliorred2g

Mã chất màu: CI 12075 [49]

Tên khoa học:

2-naphthalenol, 1-[(2,4-dinitrophenyl)azo]

Công thức phân tử: $C_{16}H_{10}N_4O_5$

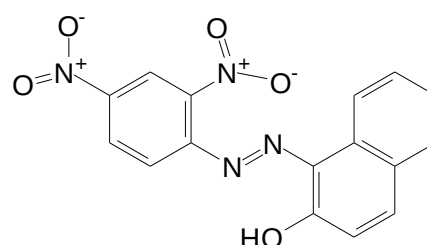
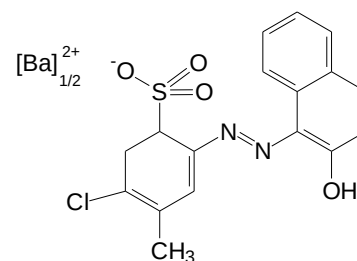
Khối lượng phân tử: 338,27

❖ *Tính chất vật lý:*

Pigment orange 5 là chất màu thuộc nhóm hợp chất azo, dạng bột màu vàng cam, không tan trong nước.

❖ *Ứng dụng:*

Pigment orange 5 thường được dùng nhiều trong các ngành sản xuất sơn, chất phủ và chất kết dính, mực in và trong hóa học.



❖ *Độc tính:*

Pigment orange 5 có thể gây đột biến gen, ung thư gen và tác động tới chuyển hóa [102] nên cũng nằm trong danh mục cấm sử dụng trong mỹ phẩm theo Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm [1]

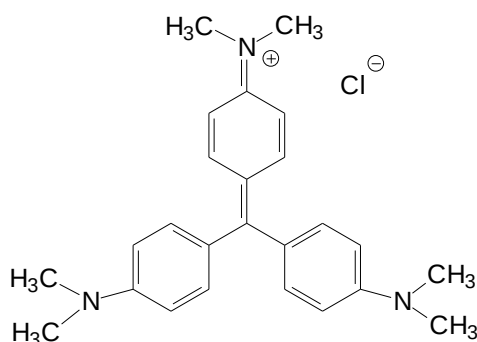
❖ *Một số phương pháp phân tích:*

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02 đã đưa ra phương pháp định tính Pigment orange 5 bằng TLC và HPLC [52]. Trong một nghiên cứu khác, HPLC với detector khối phổ (HPLC/MS/MS) cũng đã được sử dụng để xác định Pigment orange 5 [105].

1.2.1.5. Crystal violet (CV)

Tên khác: Getian violet, Methyl Violet 10B, hexamethyl pararosanilin clorid, hoặc pyoctanin, Tím tinh thể.

Mã chất màu: CI 42555 [1]



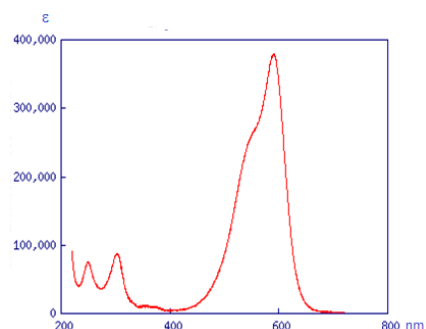
Tên khoa học: *Tris (4-(dimethylamino)phenyl) methyl clorid*

Công thức phân tử: $\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_{30}\text{Cl}$

Khối lượng phân tử: 407,98

❖ *Tính chất vật lý:*

Crystal violet là một phẩm nhuộm triphenylmethan, dạng tinh thể màu tím đậm, dễ tan trong nước. Nhiệt độ chảy: 205 °C. Phổ hấp thụ của Crystal violet hòa tan trong nước, cho cực đại hấp thụ ở bước sóng 588 nm (Hình 1.2).



Hình 1.2. Phổ hấp thụ UV-VIS của Crystal violet

❖ *Ứng dụng:*

Crystal violet được ứng dụng nhiều trong phân loại vi khuẩn (nhuộm tiêu bản Gram) và trong hóa học (làm chất chỉ thị) [111].

❖ *Độc tính:*

Crystal violet có thể gây đột biến gen nên nằm trong danh mục cấm sử dụng trong mỹ phẩm theo Hiệp định hòa hợp Mỹ phẩm ASEAN [1].

❖ *Một số phương pháp phân tích:* Phương pháp HPLC detector UV, khối phổ để phân tích crystal violet cùng một số chất màu khác [58], [105], phân tích định lượng crystal violet bằng phổ Raman [110].

1.2.1.6. Sudan

Mã số màu:

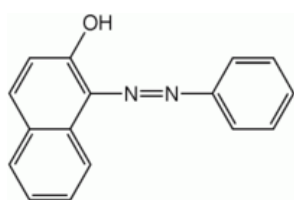
- Sudan I: CI 12055

- Sudan II: CI 12140

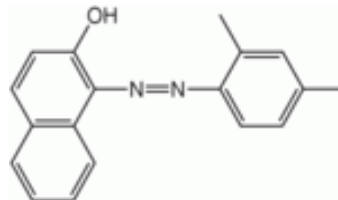
- Sudan III: CI 26100

-Sudan IV: CI 26105

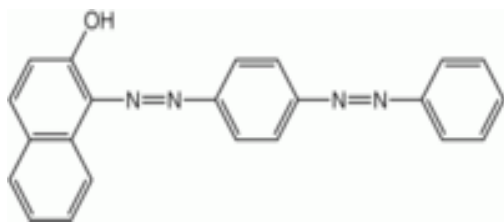
Sudan thuộc nhóm các chất azo làm phẩm màu (chất có liên kết N=N trong cấu tạo phân tử). Công thức hoá học của sudan I, II, III, IV như sau:



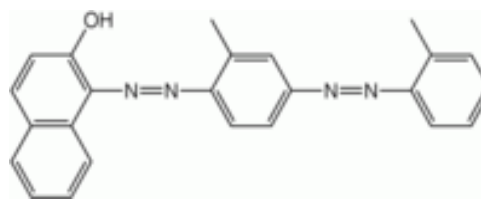
Sudan I



Sudan II



Sudan III



Sudan IV

Tên khoa học:

Sudan I: (1-(phenylazo)-2-naphthol) hay benzen-(azo-1)-2-hydroxynaphthalen

Sudan II: (1-{2,4-dimethylphenyl}azo)-2-naphthalenol

Sudan III: (1-(4-phenylazophenylazo)-2-naphthalenol

Sudan IV: (1-[2-methyl-4-[2-methylphenyl]-azo]phenylazo)-2-naphthalenol

Công thức phân tử:

Sudan I: $C_{16}H_{12}N_2O$

Sudan II: $C_{18}H_{16}N_2O$

Sudan III: $C_{22}H_{16}N_4O$

Sudan II: $C_{24}H_{20}N_4O$

Khối lượng phân tử:

Sudan I: 248,28

Sudan II: 276,33

Sudan III: 352,4

Sudan IV: 380,45

❖ *Tính chất vật lý:*

- Sudan I: Các tinh thể dạng hình kim màu đỏ, nhiệt độ nóng chảy 138 - 139 °C. Hòa tan trong benzen, ether cho dung dịch màu cam; không tan trong kiềm, trong dung dịch acid sulfuric có màu đỏ đậm.

- Sudan II: Tinh thể hình kim, màu đỏ nâu, sáng ánh, nhiệt độ nóng chảy 161-163 °C. Không tan trong nước, kiềm, acid yếu, tan ít trong ethanol. Tan trong ether cho

dung dịch màu cam.

- Sudan III: Dạng bột màu nâu, ánh xanh lá cây, nhiệt độ nóng chảy 195 °C. Không tan trong nước, tan tốt trong cloroform cho dung dịch màu cam. Tan trong ethanol, ether, aceton, glycerin.

- Sudan IV: Dạng bột màu nâu tối, nhiệt độ nóng chảy 181 °C -188 °C, phân hủy hoàn toàn ở 206 °C. Không tan trong nước, tan trong cloroform, ethanol, benzen, aceton. Tan tốt trong dầu mỡ, chất béo.

❖ *Ứng dụng:*

Sudan là nhóm chất được sử dụng để tạo màu và nhuộm màu trong công nghiệp, trong nghiên cứu sinh hoá học. Sudan có màu đỏ tươi, bền màu nên dễ bị lợi dụng cho vào các thực phẩm, mỹ phẩm để tạo màu cho sản phẩm [116].

❖ *Độc tính:*

Các nhà khoa học đã chứng minh sudan có khả năng làm biến đổi cấu trúc của gen và gây ung thư cho người. Công bố đầu năm 2007 của An Y và cộng sự cho rằng sudan I tác động "phá vỡ" cấu trúc của DNA và nhiễm sắc thể (NST) khi đưa vào môi trường nuôi cấy tế bào [59]. Khả năng oxi hóa của sudan có thể được thực hiện bởi ion benzenediazone. Các quá trình biến đổi làm Sudan có khả năng kết hợp với các DNA tạo liên kết sudan-DNA (sudan-DNA adducts). Đặc biệt, Cytochrome P₄₅₀ 1A1 (CYP1A1)- một trong những enzyme quan trọng tham gia vào quá trình biến đổi các chất gây ung thư, cũng được chứng minh là có liên quan đến biến đổi của Sudan và các dẫn chất của nó để tạo ion benzenediazone (Stiborova và cs, 1995) [116].

Nhiều phương pháp hiện đại khác nhau trong sinh học phân tử đã được dùng để chứng minh sự can thiệp của sudan vào cấu trúc DNA. Bằng phương pháp thí nghiệm sử dụng Baculovirus tái tổ hợp mang gene CYP1A1 của người, nhóm nghiên cứu của Stiborowa đã chứng minh khả năng gây biến đổi DNA của sudan hoàn toàn có thể xảy ra khi nó "tiếp xúc được" với hệ thống enzyme vận chuyển điện tử trong các tế bào của cơ thể người [116].

Các quốc gia thuộc cộng đồng châu Âu (EU) và một số nước cấm sử dụng các loại sudan I, II, IV trong mỹ phẩm. Riêng sudan III được phép sử dụng là chất màu trong mỹ phẩm nhưng không được sử dụng trong các sản phẩm mỹ phẩm trực tiếp trên niêm mạc (son môi, thuốc đánh răng...). EU cũng không yêu cầu các phòng thí nghiệm phải tuân theo các phương pháp đã định sẵn nhưng vẫn đưa ra giới hạn phát hiện của sudan 0,5-1mg/kg và phải thu hồi bất cứ thực phẩm nào có hàm lượng Sudan nhiều hơn giới hạn này [113].

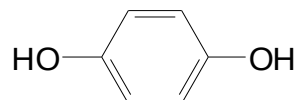
❖ *Một số phương pháp phân tích sudan:*

Một số công trình nghiên cứu phân tích phát hiện sudan trong thực phẩm bằng HPLC với detector UV-VIS [88], khối phổ (MS) [83] hay điện hóa [124].

1.2.2. Một số hợp chất có tác dụng dược lý mà bị cấm hoặc giới hạn hàm lượng sử dụng trong mỹ phẩm

1.2.2.1. Hydroquinon

Tên khác: Idrochinone, Quinol



Tên khoa học: *benzene-1,4-diol* hoặc *p-dihydroxy benzen*

Công thức phân tử: $C_6H_4(OH)_2$.

Khối lượng phân tử: 110,11

❖ Tính chất vật lý:

Hydroquinon là hợp chất hữu cơ có chứa nhân thơm, có cấu trúc gồm 2 nhóm hydroxyl gắn vào vòng benzen tại vị trí para [7]. Bột kết tinh màu trắng, tinh thể hình kim, tan trong nước với tỷ lệ 5,9g/100ml (15 °C). Tỷ trọng: 1,3g/cm³. Nhiệt độ nóng chảy là: 172 °C, nhiệt độ sôi là: 287 °C.

Hydroquinon có các nhóm hydroxyl nên có tính acid yếu. Hydroquinon có thể nhường một H⁺ từ nhóm OH để trở thành dạng monophenolat hoặc mất hai H⁺ từ cả hai nhóm OH thì tạo thành ion diphenolat [17].

❖ Ứng dụng:

Hydroquinon là chất được ứng dụng rộng rãi để hiện hình trong công nghệ kỹ thuật ảnh, là chất chống oxy hoá làm trắng da do cơ chế ngăn chặn tế bào hạt sinh sắc tố melamin làm cho da đỡ bị sạm nếu dùng dài ngày da bị mỏng [17].

❖ Độc tính:

Hydroquinon và các chế phẩm có chứa hydroquinon được lạm dụng như một tác nhân làm trắng da. Cơ chế hoạt động của nó thì dựa trên sự ức chế tổng hợp melamin. Khi sử dụng kem hoặc gel làm trắng da có chứa Hydroquinon đều có thể nguy hiểm do các biến chứng nó gây ra [103]. Một số biểu hiện gây dị ứng khi dùng các chế phẩm có chứa hydroquinon là gây kích ứng da, nhạy cảm, làm tăng sắc tố, dùng lâu ngày chất này gây ra bệnh bạch cầu. Thêm vào đó đã có một số nghiên cứu đã chỉ ra Hydroquinon làm biến đổi gel ở động vật [66].

Theo hiệp định hệ thống hoà hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm tại annex III, hydroquinon là một trong những chất có giới hạn sử dụng trong một số mỹ phẩm: như thuốc nhuộm tóc tối đa là 0,3% . Không được dùng trong các sản phẩm trang điểm mắt, không được dùng cho trẻ em dưới 12 tuổi. Tài liệu Châu Âu qui định giới hạn cho hydroquinon trong kem bôi da là 2% [49].

❖ Một số phương pháp phân tích:

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM INO 03 đã đưa ra quy trình định tính và định lượng hydroquinon trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [54].

Ngoài ra một số nghiên cứu khác đã sử dụng các kỹ thuật HPLC [66], điện di

mao quản hay sắc ký điện động mixen để phân tích hydroquinon [67], [82], [85].

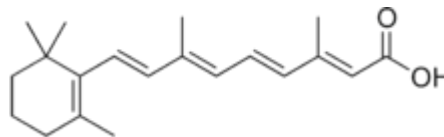
1.2.2.2. **Tretinoin**

Tên khác: Retinoic acid, Avita, Eudyna, Renova, Retacnyl, Retin-A and Vesanoid.

Tên khoa học: acid retinoic [119]

Công thức hóa học: $C_{20}H_{28}O_2$

Khối lượng phân tử: 300,44



❖ *Tính chất:*

Tretinoin là dạng acid cacboxylic của vitamin A và còn được gọi là acid retinoic

❖ *Tác dụng:*

Tretinoin là dẫn chất của vitamin A dùng để điều trị trứng cá và tàn nhang do tiếp xúc nhiều với ánh nắng, làm giảm nhăn da. Nó được đưa vào trong kem thuốc để chỉ định điều trị các bệnh trên [77], [115].

❖ *Độc tính:*

Khi dùng tretinoin dài ngày có thể gây viêm tại chỗ, nhói nhẹ hoặc nóng, hay xảy ra khô da, có vảy và đỏ da, làm tăng nhạy cảm với ánh sáng và có thể dẫn đến nguy cơ cháy nắng.

Tretinoin là một trong những chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm [57].

❖ *Một số phương pháp định tính, định lượng:*

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 01 đã đưa ra quy trình định tính và định lượng tretinoin trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [51]. Dược điển Mỹ (USP 34) và một số nghiên cứu khác đã sử dụng các kỹ thuật HPLC [119], để định tính, định lượng tretinoin trong các chế phẩm

1.2.2.3. **Glucocorticoid**

❖ *Tác dụng và độc tính:*

Glucocorticoid là nhóm thuốc có gốc steroid hay được sử dụng vì đặc tính được lực quý báu là chống viêm mạnh, chống dị ứng và ức chế miễn dịch [9]. Do có tác dụng chống viêm, làm nhẵn bóng da, giảm ngứa nên dễ bị lợi dụng trộn trái phép vào các kem bôi da mỹ phẩm [103]. Các chất thuộc nhóm glucocorticoid là những chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm (số 300 trang 312, annex II, Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm) vì nhóm chất này có nhiều tác dụng phụ khi dùng tại chỗ: teo da, xơ cứng bì, viêm da ứng đỏ, mụn trứng cá hoặc bội nhiễm nấm, vi khuẩn và vi rus, chậm liền sẹo, đục thủy tinh thể hoặc tăng nhãn áp [9].

❖ *Một số phương pháp phân tích:*

- Định tính bằng các phản ứng hoá học chung đặc trưng cho glucocorticoid:

- Bị oxy hóa với tác nhân H_2SO_4 đặc, có màu đỏ (thường kèm huỳnh quang).

Pha loãng với nước, màu biến mất [5], [9]

- Cho phản ứng với phenylhydrazin trong môi trường acid cho dẫn chất phenylhydrazon có màu vàng [5], [9]

- Định tính bằng phương pháp quang phổ:

- Quang phổ hồng ngoại (IR): bằng cách so sánh phổ IR của chất phân tích với phổ IR của chất chuẩn trong cùng điều kiện phân tích. Phương pháp này thường được áp dụng để định tính nguyên liệu và một vài chế phẩm đơn chất.

- Quang phổ UV-VIS: Tạo dẫn xuất với xanh tetrazolium cho sản phẩm có màu, đo quang ở vùng khả kiến (400 – 760 nm).

- Các phương pháp sắc ký:

Sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao detector UV-VIS [5], [9], [15], HPLC với detector UV [72], [109] hay khối phổ [76], [106] thường được dùng để xác định các glucocorticoid trong các chế phẩm.

- Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 01 đã đưa ra quy trình định tính và định lượng glucocorticoid trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [55].

1.2.3. Các nguyên tố độc

1.2.3.1. Arsen và các hợp chất của arsen:

Arsen là một nguyên tố hóa học thuộc phân nhóm V A trong bảng tuần hoàn [29]. Arsen (còn gọi là thạch tín), lần đầu tiên được Albertus Magnus (Đức) viết về nó vào năm 1250 [70].

Arsen và các hợp chất của arsen là những tạp chất trong các nguyên liệu đầu vào hoặc bị nhiễm trong quá trình sản xuất mỹ phẩm.

Ký hiệu hóa học:	As
Khối lượng nguyên tử:	74,92
Nhiệt độ nóng chảy:	817 °C. Nhiệt bay hơi: 615 °C
Tỷ trọng (d^{20}):	5,7g/cm ³
Cấu hình electron lớp ngoài cùng:	4s ² 4p ³
Vạch phát xạ đặc trưng:	193,7 nm.

❖ Tính chất hóa học:

Tương tự như phospho, nó tạo thành các oxit kết tinh, không màu, không mùi như As₂O₃ và As₂O₅ là những chất hút ẩm và dễ dàng hòa tan trong nước để tạo thành các dung dịch có tính acid. Acid arsenic (V), tương tự như acid phosphoric, là một acid yếu. Tương tự như phospho, arsen tạo thành hydrua dạng khí và không ổn định, đó là arsin (AsH₃)

Khi bị nung nóng trong không khí, nó bị oxy hóa để tạo ra trioxid arsen, hơi từ phản ứng này có mùi như mùi tỏi. Arsen (và một số hợp chất của arsen) thăng hoa khi bị nung nóng ở áp suất thường. Trạng thái lỏng xuất hiện ở áp suất 20 at trở lên, Điều này giải thích tại sao điểm nóng chảy lại cao hơn điểm sôi.

Trạng thái oxy hóa phổ biến nhất của nó là -3 (thông thường trong các hợp chất liên kim loại tương tự như hợp kim), +3 (arsenid), +5 (arsenat). Phần lớn các hợp chất vô cơ chứa oxy của arsen ổn định. Arsen cũng dễ tự liên kết với chính nó, chẳng hạn tạo thành các cặp As-As trong sulfua đỏ hùng hoàng ($\alpha\text{-As}_4\text{S}_4$)... Ở trạng thái oxy hóa +3, tính chất hóa học lập thể của arsen chịu ảnh hưởng bởi sự có mặt của cặp electron không liên kết.

❖ *Ứng dụng:*

Arsen là một á kim có nhiều dạng thù hình: dạng màu vàng (phân tử phi kim) thì mềm, dẻo như sáp và không ổn định, một vài dạng màu đen và xám (á kim) chỉ là số ít mà người ta có thể nhìn thấy. Ba dạng có tính kim loại của arsen với cấu trúc tinh thể khác nhau cũng được tìm thấy trong tự nhiên (các khoáng vật arsen sensu stricto và hiếm hơn là arsenolamprit cùng pararsenolamprit), nhưng nói chung nó hay tồn tại dưới dạng các hợp chất arsenid và arsenat. Arsen và các hợp chất của nó được sử dụng như là thuốc trừ dịch hại, thuốc trừ cỏ, thuốc trừ sâu và trong một loạt các hợp kim.

❖ *Độc tính:*

Arsen về tính chất hóa học rất giống với nguyên tố đứng trên nó là phospho. Sự tương tự lớn đến mức arsen sẽ thay thế phần nào cho phospho trong các phản ứng hóa sinh học trong cơ thể và vì thế nó gây ra ngộ độc (Arsen phá vỡ việc sản xuất ATP thông qua một vài cơ chế...). Arsen nguyên tố và các hợp chất của arsen được phân loại là "độc" và "nguy hiểm cho môi trường" tại Liên minh châu Âu theo chỉ dẫn 67/548/EEC.

IARC công nhận arsen nguyên tố và các hợp chất của arsen như là các chất gây ung thư nhóm 1, còn EU liệt kê trioxyd arsen, pentoxyd arsen và các muối arsenat như là các chất gây ung thư loại 1. Ung thư da là độc tính phổ biến nhất của Arsen. Dùng nước sinh hoạt bị nhiễm arsen gây ra những tổn thương cho da [61]. Tuy nhiên, ở các liều nhỏ (thấp hơn mức gây ngộ độc) thì các hợp chất arsen hòa tan lại đóng vai trò của các chất kích thích và đã từng phổ biến như là các loại thuốc chữa bệnh cho con người vào giữa thế kỷ XVIII [26], [30], [60].

❖ *Một số phương pháp phân tích:*

Xác định giới hạn Arsen bằng phương pháp so màu [16] [64], tạo phức màu rồi đo quang, phương pháp điện hóa [26], phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, kỹ thuật đo lò graphit hay hydrid của ASEAN [20], [50], phương pháp xác định As (III) bằng thuốc thử fluorescein [114]...

1.2.3.3. Chì và các hợp chất của chì:

Chì là nguyên tố hóa học thuộc phân nhóm IV A trong bảng tuần hoàn.[28]

Kí hiệu hóa học:	Pb
Khối lượng nguyên tử:	207,2

Nhiệt độ nóng chảy: 327°C. Nhiệt độ sôi: 1740 °C

Tỷ trọng (d^{20}): 11,43

Cấu hình electron lớp ngoài cùng: $6s^2 6p^2$

Vạch phát xạ đặc trưng: 217,0 nm và 283,3 nm.

❖ *Tính chất:* [26], [29]

Chì là kim loại có màu xám nhạt, mặt cắt sáng, mềm, dễ uốn dẻo.

Chì và các hợp chất của chì là những tạp chất trong các nguyên liệu đầu vào hoặc bị nhiễm trong quá trình sản xuất mỹ phẩm.

❖ *Độc tính:* [28], [30], [35], [95]

Chì và các hợp chất của nó rất độc hại với cơ thể người và động vật.

- Trên hệ tạo máu: Chì tác dụng lên các hệ enzym cơ bản, nhất là enzym vận chuyển hydro. Nó ức chế các enzym có chứa nhóm sulfurhydryl (-SH) và một số enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp HEM, ức chế sự liên hợp của Fe^{+2} vào phân tử protoporphyrin, ức chế enzym Na-K-ATPase, làm giảm áp lực thẩm thấu ở màng hồng cầu, làm mất kali nội bào. Chì có thể thay thế calci hoạt tính gây ức chế sự dẫn truyền sau synap.

- Tại gan: Chì ức chế việc tạo protein chứa HEM, Cytocrom P₄₅₀ nên gan mất khả năng chuyển hóa và loại bỏ các chất độc nội sinh và ngoại sinh.

- Tại thận: Phơi nhiễm chì cấp sẽ gây rối loạn chức năng ở ống lượn gần, sinh ra protein niệu, glucose niệu và phosphat niệu, giảm phosphat huyết, tăng natri và giảm bài tiết acid uric, những ảnh hưởng này là thuận nghịch.

- Hệ thần kinh: Hội chứng đầu tiên của bệnh não do nhiễm độc chì là chứng ngủ lịm, nôn, kích thích, chán ăn, chóng mặt tiến triển đến mất điều hòa và giảm ý thức, có thể gây hôn mê và chết. Ở trẻ em sau khi hồi phục từ các bệnh não do nhiễm độc chì thường để lại di chứng như chậm phát triển trí tuệ, động kinh, các bệnh về thần kinh thị giác và có thể gây mù, giảm chỉ số thông minh.

- Tại ruột: Cơ đau quặn ruột, đau bụng, táo bón, buồn nôn, nôn, chán ăn, giảm trọng lượng là những hội chứng ban đầu của nhiễm độc chì.

- Tại vùng tận cùng của mạch máu: Da có màu xám do co mạch, niêm mạc có màu đen do tích tụ các hạt PbS, một triệu chứng khá phổ biến là viêm chân răng gây mủ, có thể gây sâu răng.

- Tại cơ xương: Gây chuột rút, đau khớp (Trong trường hợp ngộ độc chì thay thế calci trong xương)

- Gần chục năm trở lại đây người ta xác định chắc chắn rằng: Chì trong cơ thể xúc tác cho gốc tự do nguy hại O_2^- (anion superoxyd), OH (gốc hydroxyl), và H_2O_2 (hydroxyperoxyd). Các gốc này phân hủy màng tế bào do quá trình POL (Peroxydlipid), làm hư hại các phân tử sinh học (enzym, hormon, protein) và vật liệu

di truyền (ADN). Có thể nói đây là nguyên nhân chính gây ra độc tính của chì đối với sự sống.

❖ **Thuốc giải độc chì** [38], [94], [95]

Thuốc giải độc chì là những thuốc có khả năng tạo phức với chì, ngăn cản nó kết hợp với các phối tử sinh học trong cơ thể, giải phóng enzyme do cạnh tranh tạo phức, thường dùng là CaNa_2EDTA , Dimercaprol (BAL) và D-Penicillamin, các thuốc này có thể dùng riêng lẻ hoặc phối hợp. Người ta hay dùng phối hợp CaNa_2EDTA và Dimercaprol (BAL) trong điều trị nhiễm độc chì khi có các biến chứng não.

❖ **Một số phương pháp định lượng chì:**

- Phương pháp quang phổ hấp thụ UV – VIS [6], [17], [22], [32]: Dùng thuốc thử dithizon (diphenylthiocarbazon) tạo phức càng cua có màu với một số các ion kim loại, trong đó có chì. Phức chì dithizonat khó tan trong nước nhưng dễ tan trong các dung môi hữu cơ như: CHCl_3 , cùng bị chiết với chì có tali, bismuth và thiếc (II). Tali không cản trở việc xác định chì nên không phải tách riêng, bismuth và thiếc cần phải tách trước khi hòa tan trong môi trường acid. Trong phân tích nhiều khi phải xác định hàm lượng các nguyên tố ở nồng độ nhỏ ($\leq 10^{-7}\text{g/ml}$), tại nồng độ này thì không thể định lượng bằng phương pháp UV-VIS. Trong trường hợp này, muốn sử dụng phương pháp UV-VIS phải làm giàu các nguyên tố cần phân tích trước khi đo. Tuy nhiên quá trình làm giàu mẫu có thể sẽ gây mất hoặc nhiễm nguyên tố cần phân tích.

- Phương pháp cực phổ [5], [62]: Ion chì (II) là một trong các ion có hoạt tính cực phổ, bị khử trên cathod thủy ngân thành chì kim loại. Cơ sở lý thuyết của phương pháp này dựa trên việc theo dõi sự biến đổi dòng khuếch tán của quá trình điện hóa xảy ra trên điện cực giọt thủy ngân khi biến thiên điện áp một chiều theo một hàm tuyến tính với thời gian.

Phương pháp này cho phép xác định tới nồng độ 10^{-8} tới 10^{-10} mol/lit. Trong một số trường hợp, áp dụng phương pháp cực phổ hiện đại để định lượng một số nguyên tố vi lượng thuận lợi hơn so với phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

- Phương pháp vol-ampe hòa tan [5], [62]: Nguyên tắc: Điện phân làm giàu chất cần phân tích trên bề mặt điện cực tại thế không đổi rồi hòa tan chất cần phân tích đã tích lại trên điện cực bằng cách phân cực ngược chiều và ghi đường cong vol-ampe. Trên đường cong vol-ampe sẽ xuất hiện một píc có chiều cao là hàm số nồng độ của chất cần phân tích. Nhược điểm là độ lặp lại kém, cần sử dụng nhiều hóa chất.

- Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử [22]: Nguyên tắc: chì được nguyên tử hoá chuyển thành các nguyên tử tự do ở dạng hơi. Các nguyên tử tự do ở trạng thái cơ bản được kích thích bằng năng lượng của ánh sáng, ngọn lửa, lò, tia lửa điện, hồ quang... sẽ chuyển sang trạng thái kích thích. Từ trạng thái kích thích khi chuyển về trạng thái cơ bản các nguyên tử sẽ phát ra các bức xạ có bước sóng $\lambda = 283,3$ nm. Hàm

lượng chì trong mẫu tỷ lệ với cường độ bức xạ và tuân theo định luật Lambert - Beer - Bugar.

- Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử [22], [23], [26], [36], [79], [91] Phương pháp hay được sử dụng nhất để định lượng, phát hiện chì là phương pháp AAS với kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu bằng ngọn lửa (F-AAS) hay nguyên tử hóa mẫu bằng lò graphit (ETA- AAS). Trong đó, kỹ thuật ETA- AAS cho giới hạn phát hiện tốt hơn ở nồng độ phân tích rất nhỏ (ppb).

1.2.3.4. Thủy ngân

Thủy ngân là nguyên tố hoá học thuộc phân nhóm II B trong bảng tuần hoàn.[20], [27], [30], [33], [41]

Ký hiệu hóa học: Hg.

Khối lượng nguyên tử: 200,59.

Màu sắc: trắng bạc.

Ở dạng lỏng ở điều kiện thường.

Nhiệt độ nóng chảy: -38,87 °C. Nhiệt độ sôi: 356,72 °C.

Nồng độ hơi bão hòa (20 °C): 20mg/m³.

Tỷ trọng (d²⁵): 13,534. Thể tích phân tử: 14,09 cm³/mol.

Cấu hình electron lớp ngoài cùng: 4f¹⁴5d¹⁰6s².

- Hấp thụ cực đại tại 184,9nm và 253,7nm, trong đó vạch phổ ở 253,7nm là vạch nhạy nhất được sử dụng để đo phổ hấp thụ của thủy ngân [80].

❖ *Tính chất:*



Hình 1.3. Nguyên tố thủy ngân trong tự nhiên

Ở nhiệt độ thường, thủy ngân lỏng hầu như không tan trong nước (5 mcg/l ở 25°C). Thủy ngân cũng không tan trong dung dịch acid hydrocloric loãng, acid sulfuric nguội và dung dịch kiềm, tan một phần trong lipid, pentan, acid nitric đặc và acid sulfuric đặc nóng [27].

❖ *Thủy ngân trong tự nhiên, trong sản xuất và đời sống:*

Thủy ngân là nguyên tố chiếm 8.10⁻⁶ % (80 µg/kg) trọng lượng Trái Đất. Các đồng vị có thể có là: ²⁰²Hg(29,86%), ²⁰¹Hg(13,18%), ²⁰⁰Hg(23,1%), ¹⁹⁹Hg(16,87%), ¹⁹⁸Hg (9,97%), ²⁰⁴Hg (6,87%), ¹⁹⁶Hg (0,15%) [27], [41], [87].

Trong tự nhiên thủy ngân có thể tồn tại ở các dạng như: [27], [33], [34], [41]

- Dạng tinh khiết hay dạng kim loại lỏng hay hơi trong không khí.
- Dạng hợp chất vô cơ trong các quặng như Cinnabar (dạng sunfua), trong các khoáng vật như: Thần sa (HgS), Timanic (HgSe), Colodoit (HgTe), Livingstonite (HgSb₄O₇), Calomel (Hg₂Cl₂)...
- Thủy ngân có thể kết hợp với carbon tạo thành hợp chất thủy ngân hữu cơ như: dimethyl thủy ngân, phenyl thủy ngân, ethyl thủy ngân và phổ biến nhất là methyl thủy ngân. Thủy ngân hữu cơ là nguyên nhân chính gây ô nhiễm thủy sinh vật.

Do có khả năng bay hơi ở điều kiện thường, thủy ngân bốc hơi từ đất, đá, nước vào không khí rồi được gió, dòng chảy sông suối vận chuyển đi khắp nơi. Các hoạt động như khai thác mỏ, nấu kim loại, sản xuất xi măng, ngành công nghiệp sử dụng than làm nguồn nhiên liệu, hoá táng, xử lý hoá chất và chất thải y tế, tinh chế vàng.... góp phần quan trọng gây ô nhiễm thủy ngân.

Các sinh vật dưới nước (cá, tôm, cua, sò, hên...) tích lũy thủy ngân trong cơ thể chúng, thường là dạng methyl thủy ngân rất độc. Giun đất cũng tích lũy thủy ngân, một số loài nấm cũng có chứa thủy ngân [38], [41], [93].

❖ *Ứng dụng:*

Thủy ngân được ứng dụng rộng rãi trong đời sống và sản xuất công nghiệp. Một lượng lớn thủy ngân được sử dụng làm điện cực trong công nghiệp sản xuất Cl₂ và NaOH bằng phương pháp điện phân. Thủy ngân cũng được sử dụng trong nhiều nhà máy thiết bị điện: đèn thủy ngân cao áp, bóng đèn X-quang, pin, dụng cụ ngắt điện... Ngoài ra thủy ngân còn được sử dụng trong xử lý quặng vàng, bạc, dùng để chế các hỗn hống, các máy đo (nhiệt kế, áp kế, điện cực Calomel...) [27], [30], [34], [41].

Thủy ngân được sử dụng làm thuốc từ lâu: [33], [41]: Chu sa, Thần sa (HgS) là vị thuốc có công dụng trấn tâm, an thần. Thủy ngân (II) clorid (HgCl₂); thủy ngân (II) oxyd (HgO); thủy ngân (II) iodid (HgI₂); thủy ngân (I) acetat, thủy ngân (I) clorid (Hg₂Cl₂) được dùng làm thuốc sát trùng, diệt nấm và vi khuẩn, thuốc lợi tiểu, thuốc nhuận tràng. Trước đây, thủy ngân vô cơ được dùng rộng rãi trong sản xuất xà phòng và kem làm trắng da. Một số hỗn hống thủy ngân dùng trong nha khoa.

❖ *Tác dụng sinh học và độc tính của thủy ngân:*

Độc tính của thủy ngân phụ thuộc vào dạng hóa học của nó [27], [30], [34], [41], [93].

- Thủy ngân nguyên tố lỏng là ít độc tuy nhiên thủy ngân bay hơi ở nhiệt độ thường và với một lượng lớn nên có thể gây độc. Gần 80% hơi thủy ngân hít vào được giữ ngay lại cơ thể, hấp thu vào phổi và từ đó xâm nhập vào não gây rối loạn thần kinh trung ương.

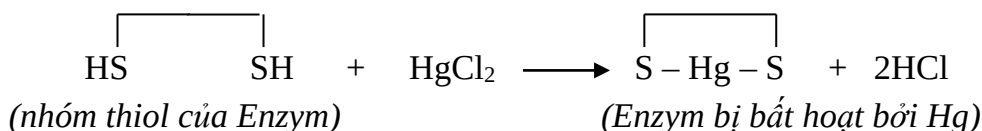
- Thủy ngân vô cơ khó xâm nhập vào cơ thể (dưới 0,001%) và ít ảnh hưởng tới

hệ thần kinh trung ương, bào thai. Tuy nhiên nếu ăn phải một lượng lớn thủy ngân vô cơ cũng gây tổn thương thận.

- Thủy ngân hữu cơ thường được tích lũy trong các dây truyền thực phẩm đặc biệt tích lũy trong cá với nồng độ cao gấp hàng nghìn lần so với lúc đầu. Khi liên kết với cystein (một loại axit amin có chứa nhóm SH) thủy ngân methyl dễ dàng hấp thu qua đường tiêu hóa. Do dễ hòa tan trong mỡ nên hợp chất này có thể xâm nhập vào hệ thần kinh trung ương gây rối loạn hoạt động các cơ quan.

- Mặt khác cần hết sức chú ý khi methyl thủy ngân tồn tại trong cơ thể phụ nữ mang thai vì sự hấp thụ của bào thai nhạy cảm hơn người lớn rất nhiều: gây ra sự phá hoại không hồi phục hệ thần kinh trung ương bao gồm sự phân liệt thần kinh, kém phát triển trí tuệ, co giật. Nhiễm methyl thủy ngân cũng dẫn đến nhiễm sắc thể bị phân lập, phá vỡ nhiễm sắc thể và ngăn cản sự phân chia tế bào.

Kết quả nghiên cứu cho thấy dù xâm nhập vào cơ thể qua đường nào thì thủy ngân cũng qua máu và tích lũy nhiều nhất ở thận. Hầu hết các dạng thủy ngân sau khi xâm nhập vào các tổ chức đều tích lũy dưới dạng ion Hg^{2+} . Thủy ngân (II) không qua được màng sinh học nhưng do có ái lực mạnh với nguyên tử S nên nó dễ dàng kết hợp với các axit amin chứa S của protein (Hemoglobin, Albumin). Đặc biệt nó làm bất hoạt các Enzym có chứa nhóm thiol cần thiết cho cơ thể theo phản ứng sau:



Dựa vào đặc tính trên của Hg^{2+} người ta đưa ra biện pháp điều trị nhiễm độc thủy ngân đặc hiệu bằng các chất chứa nhóm thiol có ái lực mạnh với thủy ngân (như BAL).

❖ Một số phương pháp định lượng thủy ngân

- Phương pháp chuẩn độ Dithizon [4], [117]: Nguyên tắc: Thủy ngân ở dưới dạng Hg^{+2} kết hợp với anion Cl^- tạo thành hợp chất ít phân ly: $Hg^{+2} + 2Cl^- = HgCl_2$ và khi đạt đến điểm tương đương, phát hiện một lượng thừa Hg^{+2} bằng chỉ thị diphenylcarbazol (diphenylcarbazol kết hợp với Hg^{+2} thành tủa màu xanh).

- Phương pháp quang phổ hấp thụ UV – VIS [6], [21], [34]: Nguyên tắc: Hòa tan chất phân tích vào một dung môi thích hợp sau đó cho tác dụng với thuốc thử ở một điều kiện nhất định để tạo ra một phức chất cho phổ hấp thụ tử ngoại hoặc khả kiến. Sau đó tiến hành đo mật độ quang của dung dịch đó [6], [34]. Với thủy ngân người ta dùng phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng của Hg^{2+} với dung dịch KI tạo HgI_2 . Sau đó HgI_2 kết hợp với CuI tạo phức màu hồng $Cu_2[HgI_4]$. Thủy ngân cũng có thể tạo phức với Dithizon ở pH từ 0,5 – 1 trong dung môi CCl_4 và đo mật độ quang ở bước sóng 485nm. Tuy nhiên, phương pháp đo quang ít được sử dụng

để phân tích thủy ngân vì khả năng phát hiện kém khi hàm lượng thủy ngân trong mẫu thấp (10^{-7}) [87].

- Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử [2], [20], [22], [81], [93]: Phương pháp hay được sử dụng nhất để định lượng, phát hiện thủy ngân là phương pháp AAS sử dụng kỹ thuật hóa hơi lạnh (Cold evaporation): Lượng thủy ngân có mặt trong mẫu mỹ phẩm được chuyển về dạng Hg^{2+} hòa tan nhờ quá trình vô cơ hóa mẫu bằng các tác nhân oxy hóa (HNO_3 đặc, H_2O_2 30%, dung dịch $KMnO_4$ 5%...). Trong môi trường acid mạnh, Hg^{2+} sẽ tác dụng với tác nhân khử ($SnCl_2$ hay $NaBH_4$ trong môi trường acid mạnh) tạo thành hơi thủy ngân tự do ngay ở điều kiện nhiệt độ thường, có thể phát hiện trực tiếp bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

Phương pháp hòa hợp ASEAN ACM THA 05 đã sử dụng phương pháp này để phát hiện thủy ngân trong mỹ phẩm [50].

1.3. MỘT SỐ KỸ THUẬT THƯỜNG DÙNG TRONG KIỂM NGHIỆM MỸ PHẨM

1.3.1. Một số kỹ thuật phân tích mỹ phẩm [47]

❖ **Các kỹ thuật sắc ký:** bao gồm cả HPLC, GC, TLC, HPTLC...

- Định tính, định lượng các thành phần chất màu, chất lọc tia UV, chất bảo quản, tinh dầu, các vitamin...
- Phát hiện sự có mặt của các chất bị cấm sử dụng (corticoid, chất màu, tretinoin, dung môi độc...)

❖ **Các kỹ thuật quang phổ:**

- UV-VIS: Định tính, định lượng các thành phần chất màu, chất bảo quản, đánh giá chỉ số chống nắng SPF
- AAS, ICP: Xác định các kim loại nặng (As, Pb, Hg, Cd...)

❖ **Các kỹ thuật khác:**

- Phân tích nhiệt (DSC, TGA, tử sấy...): Đánh giá độ ổn định, thể chất chế phẩm...
- Các kỹ thuật vi sinh: Đánh giá giới hạn vi sinh vật, hiệu quả chất bảo quản...
- Kỹ thuật xác định chỉ tiêu chất lượng khác: độ nhớt, độ đồng nhất...
- Kỹ thuật xác định chỉ tiêu an toàn: kích ứng da, mắt...

1.3.2. Một số phương pháp hóa lý được ASEAN dùng trong phân tích mỹ phẩm

1.3.2.1. Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng (TLC) là một kỹ thuật tách các chất được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh trên đó đã chấm hỗn hợp các chất cần tách. Phương pháp sắc ký lớp mỏng được dùng để định tính, thử tinh khiết và đôi khi để bán định lượng hoặc định lượng hoạt chất thuốc. TLC thường được sử dụng như một phương pháp sàng lọc do nó không thể cho kết quả định lượng chính xác. Hơn nữa giới hạn phát hiện của phương pháp thường rất lớn (độ nhạy kém). Để định tính một chất

thường phải được so sánh với chất chuẩn với một số hệ dung môi khai triển khác nhau. Các phương pháp hòa hợp ASEAN đã ứng dụng kỹ thuật TLC trong phân tích mỹ phẩm: phát hiện các chất màu, hydroquinon, tretinoin và các glucocorticoid. Đa số các chất này đều có cấu trúc phân tử có chứa nhân thơm và các nối đôi nên có hấp thụ ánh sáng tử ngoại và khả kiến, có thể phát hiện bằng cách kiểm tra bản mỏng dưới ánh sáng thường (các chất màu), ánh sáng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc 366 nm.

- *Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 02:*

ACM SIN 02 (được ban hành ngày 02/12/2005) [52] cho phép định tính 3 chất màu (MY, PO5, RB) gồm các bước tiến hành như sau:

Dùng hỗn hợp của N,N-dimethylformamid (DMF) với acid phosphoric (95 : 5) để hòa tan mẫu thử. Chuẩn bị mẫu ngay trước khi dùng. Chú ý, đối với mẫu có PO5 có thể chiết bằng dicloromethan (DCM), nếu cần có thể đun nóng ở 90°C trong 1h đến khi hòa tan. Với sản phẩm mỹ phẩm dầu, chiết loại bỏ chất béo bằng n-hexan (chiết lỏng- lỏng). Dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,45µm để dùng cho TLC và HPLC.

Dung dịch metanil yellow và rhodamin B chuẩn: Hòa tan các chất chuẩn trong methanol hoặc N,N-dimethylformamid (DMF) hoặc hỗn hợp của N,N-dimethylformamid (DMF) với acid phosphoric (95 : 5). Chuẩn bị ngay trước khi dùng để có được dung dịch chuẩn với nồng độ khoảng 0,2 mg/ml.

Dung dịch Pigment orange 5 chuẩn: Hòa tan PO5 chuẩn trong dicloromethan để được dung dịch có nồng độ 0,1 mg/ml.

Có thể sử dụng 6 hệ dung môi triển khai sắc ký: trong đó Hệ 1 dùng để định tính Pigment orange 5, các hệ còn lại dùng để định tính metanil yellow (MY) và rhodamin B (RB) trong các sản phẩm mỹ phẩm có màu:

- Hệ 1: Dicloromethan (methylen clorid)
- Hệ 2: Ethyl acetat - methanol - hỗn hợp amoniac/nước (3/7) (15 : 3 : 3)
- Hệ 3: Ethanol - nước - isobutanol - amoni hydroxyd (31 : 32 : 40 : 1)
- Hệ 4: Isopropanol - amoniac (100 : 25)
- Hệ 5: n-butanol - ethanol - nước - acid acetic (60 : 10 : 20 : 0,5)
- Hệ 6: Dicloromethan (methylen clorid)
- Hệ 7: Ethyl acetat - n-butanol - amoni hydroxyd (20 : 55 : 25)

Phát hiện các vết và so với vết thu được từ dung dịch chuẩn tương ứng bằng quan sát dưới ánh sáng thường: PO5 cho màu cam, MY cho màu vàng, RB cho màu hồng sáng. Đặc biệt, khi soi bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm, vết của RB cho huỳnh quang màu hồng sáng chói.

Giới hạn phát hiện của phương pháp tính trên 1g mẫu mỹ phẩm là 133-140 µg cho PO5, 33 -100 µg cho MY, 266 - 800 µg cho RB.

- Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM INO 03

ACM INO 03 (được ban hành ngày 02/12/2005) [54] dùng để định tính Hydroquinon bằng TLC:

Hòa tan hydroquinon trong ethanol để thu được dung dịch có nồng độ 2 mg/ml, chấm 20 µl rồi triển khai sắc ký trong 2 hệ dung môi là:

- Hệ 1: n-hexan – aceton (3 : 2)
- Hệ 2: Toluen – acid acetic khan (8 : 2)

Phát hiện vết bằng cách quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc phun dung dịch bạc nitrat 5% trong nước vừa mới pha hoặc phun dung dịch acid phosphoric 5% trong ethanol.

- Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 01

ACM SIN 01 (được ban hành ngày 02/12/2005) [51] dùng để định tính tretinoin bằng TLC: Hòa tan tretinoin trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml, chấm 5 µl, triển khai sắc ký với các hệ dung môi sau:

- Hệ 1: n-hexan – acid acetic 0,33% trong ethanol tuyệt đối (9 : 1)
- Hệ 2: n-hexan – aceton (6 : 4)
- Hệ 3: Cyclohexan - ether ethylic - aceton - acid acetic (54 : 40 : 4 : 2)

Phát hiện vết bằng soi dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm và phun dung dịch acid phosphomolypdic 5% trong ethanol tuyệt đối.

- Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM MAL 07

ACM MAL 07 (được ban hành ngày 2/12/2005) [55] dùng để định tính hydrocortison acetat, dexamethason acetat, betamethason, betamethason 17- valerat và triamcinolon acetonid bằng TLC: Hòa tan các chất trong methanol để được dung dịch có nồng độ 2 mg/ml, chấm 20 µl rồi triển khai sắc ký trong hệ dung môi là: Diclorometan – methyl acetat - nước (100 : 50 : 50), lắc kỹ, lấy lớp dưới.

Phát hiện vết bằng soi dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm và phun dung dịch anisaldehyd trong acid sulfuric (có thể phun dung dịch xanh tetrazolium trong kiềm)

Với tất cả các phương pháp định tính đã nêu, để kết luận định tính chắc chắn ngoài kết quả của phương pháp TLC (giá trị R_f , màu sắc vết thử phải giống vết chuẩn), ASEAN yêu cầu cần có kết quả của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao: thời gian lưu của píc và phổ thu được từ dung dịch thử phải tương đương thời gian lưu của píc và phổ thu được từ dung dịch chuẩn.

1.3.2.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

❖ Nguyên tắc của quá trình sắc ký [3], [6], [15], [31]

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) là kỹ thuật phân tích nhằm tách, định tính, định lượng các chất dựa

trên ái lực khác nhau giữa các chất có trong hỗn hợp với hai pha luôn tiếp xúc nhưng không hòa lẫn vào nhau là pha tĩnh và pha động.

Khi nạp mẫu phân tích gồm hỗn hợp 2 chất A, B (có thể nhiều hơn) vào cột phân tích thì kết quả là 2 chất A, B sẽ được tách ra khỏi nhau nhờ pha động và được rửa giải ra khỏi cột. Tùy thuộc vào bản chất của pha động, pha tĩnh, chất phân tích mà các chất được rửa giải ra khỏi cột với tốc độ khác nhau.

❖ **Các phương pháp HPLC được ASEAN dùng trong phân tích mỹ phẩm**

Trong những năm gần đây, phương pháp HPLC đóng vai trò rất quan trọng trong việc tách và phân tích các chất trong nhiều lĩnh vực khác nhau, nhất là các lĩnh vực hóa dược, sinh hóa, hóa thực phẩm, hóa dầu, hóa học các hợp chất thiên nhiên, nông hóa... đặc biệt là phân tích lượng vết các chất trong các nền mẫu phức tạp.

- *Phát hiện các chất màu cấm*: Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 02 [52] định tính các chất màu bằng phương pháp HPLC nêu ra như sau:

- Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn: như phần chuẩn bị mẫu để áp dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng (xem mục 1.3.2.1.).

- Pha động: Dung dịch tetrabutylammonium (TBA) 0,005 M – nước (75 : 25)

Dung dịch tetrabutylammonium 0,005 M được chuẩn bị như sau: Hòa tan 2,8 g kali hydroxyd trong 10 ml nước, thêm 65 ml dung dịch tetrabutylammonium hydroxid 20% (Merck), thêm nước vừa đủ thành 100 ml. Điều chỉnh tới pH 7 với acid phosphoric thu được dung dịch TBA 0,5 M. Dung dịch này có chứa 0,385mol TBA và 0,385 mol kali hydroxyd. Hòa loãng 10 ml dung dịch TBA 0,5M này với methanol thành 1 lít, lắc đều, dung dịch trở lên đục, để yên vài giờ, lọc qua màng lọc 0,45µm.

- Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký: Hypersil ODS (C18), 5µm, 200 x 4,6 mm hoặc tương đương. Nhiệt độ cột: 30 °C. Tốc độ dòng: 1 ml/ phút. Bước sóng phát hiện: 435 nm cho MY; 535 nm cho PO5 và RB. Vùng đọc phổ: 275 – 760 nm. Thể tích tiêm: 10 µl. Thời gian sắc ký: 35 phút.

- Giới hạn phát hiện của phương pháp: Pigment orange 5 là 153 µg/g; metanil yellow là 70 µg/g và rhodamin B là 800 µg/g.

- *Định tính, định lượng hydroquinon*: Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM INO 03 [54] (được ban hành ngày 02/12/2005) dùng để định tính, định lượng hydroquinon bằng HPLC:

Chuẩn bị dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1 g mẫu, hòa tan rồi thêm vừa đủ 50 ml bằng pha động, lọc trong qua giấy lọc 0,45 µm (ly tâm nếu cần).

Dung dịch chuẩn: Hòa tan hydroquinon chuẩn trong pha động để được dung dịch có nồng độ 0,1 µg/ml.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký: Cột thép không rỉ, được nhồi pha tĩnh ODS, 150 x 4,6 mm, 10 μ m. Pha động: methanol – nước (55:45). Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Bước sóng phát hiện: 295 nm. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l

Tính kết quả bằng cách so sánh diện tích pic thu được từ dung dịch thử với pic thu được từ dung dịch chuẩn. Phương pháp cũng nêu yêu cầu: mẫu có hàm lượng hydroquinon khoảng 2,0% thì độ lặp lại của phương pháp (bao gồm cả độ lặp lại trong ngày và độ tái lặp đều có độ lệch chuẩn $RSD \leq 2\%$)

- *Phát hiện tretinoin*: Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 01 [51] (được ban hành ngày 02/12/2005) dùng để định tính tretinoin bằng HPLC.

Chuẩn bị dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1 g mẫu kem vào ống ly tâm 30 ml đã được bao bởi phoi nhôm, thêm 10 ml methanol, lắc cơ học trong 5 phút. Để lạnh trong nước đá 15 phút, lọc, bỏ vài mililit dịch lọc đầu, dịch lọc sau khi lọc qua giấy lọc được lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan tretinoin chuẩn trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,05 mg/ml.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Hypersil ODS – C18, 5 μ m, 200 x 4,6 mm hoặc cột có tính năng tương đương. Nhiệt độ cột: 30°C. Pha động: hỗn hợp của methanol – nước - acid acetic (85:15:0,5). Tốc độ dòng: 1,4 ml/phút. Bước sóng phát hiện: 353 nm. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l. Thời gian sắc ký: 30 phút.

Trong qui trình phân tích này, ASEAN đã nêu rõ: định tính bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ của pic thu được từ dung dịch thử với pic thu được từ dung dịch chuẩn. Phương pháp này cũng được dùng để định lượng tretinoin, chú ý nồng độ dung dịch thử và dung dịch chuẩn cần tương đương, không khác nhau quá 10%.

- *Định tính các Glucocorticoid*: Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM MAL 07 [55] (được ban hành ngày 02/12/2005) dùng để định tính hydrocortison acetat, dexamethason, betamethason và triamcinolon acetonid, betamethason 17-valerat bằng HPLC.

Chuẩn bị dung dịch thử: Mẫu kem có chứa các chất corticoid được chiết với methanol, bay hơi dung dịch tới gần rồi hòa tan gần trong một thể tích định mức methanol, lọc trong qua giấy lọc và qua màng lọc 0,45 μ m (ly tâm nếu cần).

Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chất chuẩn hydrocortison acetat, dexamethason, betamethason và triamcinolon acetonid trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1mg/ml.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký: cột thép không gỉ, nhồi pha tĩnh ODS, 10 μ m, 250 x 4,6 mm. Bước sóng phát hiện: 245 nm. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l. Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút. Pha động: Acetonitril - nước theo chương trình gradient dung môi: ACN : nước (30 : 70) đến phút thứ 15, thay đổi tuyến tính về ACN : nước (60 : 40) đến phút

thứ 21, về ACN : nước (50 : 50) phút thứ 30 và trở lại ACN : nước (30 : 70) ở phút thứ 35.

Thời gian lưu của các píc lần lượt là: betamethason (15 phút), dexamethason (16 phút), triamcinolon acetonid (19 phút), hydrocortison acetat (20 phút), Betamethason17-valerat (22 phút).

Bảng 1.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất Glucocorticoid

Tên chất	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
Hydrocortison acetat	0,02	0,07
Triamcinolon acetonid	0,04	0,13
Betamethason	0,05	0,15
Dexamethason	0,05	0,16
Betamethason17-valerat	-	-

ASEAN cũng nêu rất rõ nội dung cần báo cáo khi có kết quả phân tích các chất cấm: Nếu kết quả thấp hơn LOD: “*Không phát hiện thấy*”, nếu kết quả cao hơn LOD nhưng thấp hơn LOQ: Cần báo cáo “*Phát hiện thấy nhưng thấp hơn LOQ*”.

1.3.2.3. Quang phổ hấp thụ nguyên tử

Sự phát hiện hiệu ứng hấp thụ nguyên tử được công bố lần đầu tiên vào năm 1802 khi Wollaston nhận thấy những vạch tối trong phổ ánh sáng mặt trời. Năm 1961, người ta bắt đầu sản xuất hàng loạt phổ kế hấp thụ nguyên tử có ứng dụng phân tích. Trong những năm gần đây, phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (Atomic Absorption Spectrometry – AAS) đã được ứng dụng khá rộng rãi để xác định kim loại trong các mẫu quặng, đất, đá, nước, các mẫu của y học, sinh học, các sản phẩm công nghiệp, rau quả, thực phẩm; các nguyên tố vi lượng trong phân bón, thức ăn gia súc... Trong ngành Dược cũng đã áp dụng phương pháp AAS để định lượng các nguyên tố vi lượng trong các chế phẩm thuốc, xác định giới hạn các kim loại độc trong các dược liệu, tá dược và nguyên liệu làm thuốc [36], [63], [71].

❖ Các quá trình thực hiện trong phép đo AAS [22], [24]

- *Nguyên tắc:* Muốn thực hiện được phép đo quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) cần phải có các quá trình sau:

- Chọn các điều kiện và trang thiết bị phù hợp để chuyển mẫu phân tích từ trạng thái ban đầu sang trạng thái hơi của nguyên tử tự do.

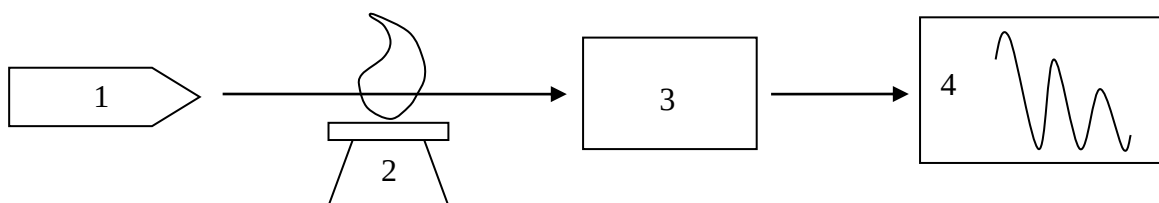
- Chiều chùm tia sáng thích hợp (với nguyên tố cần phân tích và còn được gọi là bức xạ cộng hưởng) qua đám hơi nguyên tử vừa tạo ra ở trên. Đám hơi này chính là môi trường hấp thụ bức xạ. Các nguyên tử của nguyên tố cần phân tích trong đám hơi sẽ hấp thụ một phần bức xạ và tạo ra phổ hấp thụ nguyên tử. Phần bức xạ bị hấp thụ phụ thuộc vào nồng độ của nguyên tử đó trong môi trường hấp thụ.

Do đó, quá trình nguyên tử hoá mẫu ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả phân tích một nguyên tố. Mục đích của nguyên tử hoá mẫu là tạo ra được đám hơi các nguyên tử tự do từ mẫu phân tích với hiệu suất cao và ổn định để phép đo đạt kết quả chính xác và độ lặp lại cao.

- Nhờ các bộ phận của máy quang phổ mà người ta thu, phân ly và chọn vạch phổ của nguyên tố cần nghiên cứu và đo cường độ của nó. Cường độ đó chính là tín hiệu hấp thụ của vạch phổ hấp thụ nguyên tử. Trong một giới hạn nhất định của nồng độ C, giá trị cường độ này phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ C của nguyên tố trong mẫu phân tích theo phương trình (4).

- *Trang bị của phép đo* [22], [23], [24], [80], [86]

Một cách tổng quát có thể minh họa hệ thống máy đo AAS gồm 4 phần chính mô tả như sơ đồ trong hình 1.4:



Hình 1.4. Sơ đồ nguyên tắc cấu tạo hệ thống máy AAS.

- Phần 1: Nguồn phát tia phát xạ cộng hưởng để chiếu vào môi trường hấp thụ chứa các nguyên tử tự do của nguyên tố. Nguồn có thể là đèn catot rỗng (HCL-Hollow Cathode Lamp), đèn phóng điện không điện cực (EDL-Electrodeless Discharge Lamp) hoặc nguồn phát bức xạ liên tục đã được biến điệu, các loại nguồn đơn sắc khác (ống phát xạ đặc biệt, tia laser).

- Phần 2: Hệ thống nguyên tử hóa mẫu phân tích. Hệ thống này được chế tạo theo ba loại kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu, đó là:

- Kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu bằng ngọn lửa (phép đo F-AAS): gồm 2 phần chính: buồng aerosol hóa (Nebulizer system) và đèn nguyên tử hóa mẫu (burner head)

- Kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu không ngọn lửa (phép đo ETA-AAS): gồm 3 phần chính: cuvet hay thuyền tantan (Ta), nguồn năng lượng và bộ điều khiển.

- Kỹ thuật hóa hơi lạnh (phép đo CV-AAS) gồm: bình phản ứng, cuvet thạch anh và bộ điều khiển.

- Phần 3: Máy quang phổ (hệ quang và detector): có nhiệm vụ thu, tán sắc và chọn tia sáng (vạch phổ) cần đo hướng vào nhân quang điện để phát tín hiệu hấp thụ AAS của vạch phổ.

- Phần 4: Bộ phận Readout là bộ phận để chỉ thị kết quả đo phổ AAS. Bộ phận này có thể là một điện kế chỉ năng lượng hấp thụ của vạch phổ hay một máy tự ghi, máy in, máy tính...

❖ **Các phương pháp vô cơ hóa mẫu** [4], [6], [17], [20], [22], [117]

Các nguyên tố trong mẫu phân tích thường ở dạng hợp chất hữu cơ hoặc hợp chất vô cơ nhưng có lẫn các tạp chất hữu cơ. Trước khi định lượng thông thường, mẫu được vô cơ hóa và chuyển các nguyên tố cần xác định về dạng muối vô cơ hòa tan trong dung dịch đo. Các phương pháp sau hay được dùng để vô cơ hóa mẫu: Vô cơ hoá khô, vô cơ hoá ướt, vô cơ hoá trong lò vi sóng và lên men.

- *Phương pháp vô cơ hoá khô:*

Nguyên tắc: Đốt cháy các chất hữu cơ có trong mẫu phân tích để giải phóng kim loại ra dưới dạng oxit hoặc muối của chúng bằng nhiệt. Sau đó, hoà tan căn trong acid để tạo dung dịch.

Phương pháp này thực hiện đơn giản, vô cơ hoá được triệt để nhưng có nhược điểm chính là nhiệt độ tro hoá cao (khoảng 500 °C - 600 °C) nên làm mất các nguyên tố dễ bị bay hơi như: Pb, Cd, Se, As, Hg... thời gian xử lý mẫu kéo dài. Người ta khắc phục bằng cách cho thêm chất bảo vệ như $Mg(NO_3)_2$ hoặc KNO_3 và chọn nhiệt độ thích hợp.

- *Phương pháp vô cơ hoá ướt:*

Nguyên tắc: Oxy hoá chất hữu cơ bằng một acid hoặc một hỗn hợp acid có tính oxy hoá mạnh thích hợp.

Phương pháp này rút ngắn được thời gian phân tích so với phương pháp vô cơ hoá khô, bảo toàn được chất phân tích (vì nhiệt độ vô cơ hoá không cao) nhưng phải dùng một lượng acid lớn (thường gấp 3 đến 5 lần mẫu). Vì vậy, phương pháp này đòi hỏi các acid sử dụng phải có độ tinh khiết cao, thời gian vô cơ hoá tương đối dài.

- *Phương pháp vô cơ hoá mẫu trong lò vi sóng:*

Nguyên tắc: Dùng năng lượng vi sóng, trong điều kiện kín, áp suất cao, nhiệt độ cao và các tác nhân oxy hóa, nên mẫu sẽ dễ dàng được vô cơ hóa.

Đây là phương pháp xử lý mẫu hiện đại nhất hiện nay, làm giảm đáng kể thời gian xử lý mẫu, không mất mẫu và vô cơ hoá triệt để, có thể vô cơ hoá nhiều mẫu cùng một đối tượng cùng một lúc. Có thể điều khiển quá trình vô cơ hoá từ xa bằng một máy vi tính do đó làm tăng độ an toàn cho người sử dụng và độ tin cậy của hệ thống. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ vô cơ hoá được một lượng mẫu nhỏ và đòi hỏi thiết bị đắt tiền.

- *Phương pháp lên men.*

Nguyên tắc: Hoà tan mẫu thành dung dịch huyền phù, thêm men xúc tác và lên men ở nhiệt độ 37 °C - 40 °C trong thời gian 7 - 10 ngày. Trong thời gian lên men, các chất hữu cơ bị phân huỷ thành khí CO_2 , acid, nước và giải phóng kim loại trong hợp chất hữu cơ dưới dạng cation trong dung dịch nước.

Phương pháp lên men là phương pháp vô cơ hoá mẫu êm dịu, không cần hoá chất, không làm mất nguyên tố cần phân tích, rất thích hợp cho việc phân huỷ các mẫu đường, nước ngọt, nước giải khát, tinh bột nhưng thời gian xử lý mẫu lâu và phải chọn được loại men thích hợp.

- Phương pháp chiết

Nguyên tắc: dùng một dung môi thích hợp có khả năng tạo phức hoặc hòa tan chọn lọc nguyên tố cần phân tích để tách riêng nguyên tố này ra khỏi nền mẫu.

❖ **Các tác nhân vô cơ hoá** [22], [24], [79], [81], [117]

Khi xử lý mẫu bằng phương pháp vô cơ hoá ướt và trong lò vi sóng thì việc lựa chọn các tác nhân oxy hoá phải căn cứ vào khả năng, đặc tính oxy hoá của thuốc thử và đối tượng mẫu.

Acid Nitric (HNO_3): là tác nhân oxy hoá mạnh dùng để oxy hoá các chất hữu cơ, được sử dụng rộng rãi để giải phóng các nguyên tố từ các cốt sinh học và thực vật. Nhiệt độ sôi là $120^\circ C$.

Acid sulfuric (H_2SO_4): có tính oxy hoá mạnh, nhiệt độ sôi $339^\circ C$, có khả năng phá huỷ hoàn toàn hầu hết các chất hữu cơ, có thể phối hợp với HNO_3 .

Acid percloric ($HClO_4$): có tính oxy hoá mạnh, có thể ăn mòn các kim loại, không phản ứng với các acid khác, phá huỷ được các hợp chất hữu cơ. $HClO_4$ gây nổ mạnh khi tiếp xúc với nguyên liệu hữu cơ và chất vô cơ dễ bị oxy hoá nên phải oxy hoá bằng HNO_3 trước khi sử dụng $HClO_4$, nhiệt độ sôi là $200^\circ C$.

Ngoài ra, acid hydrochloric, acid hydrofluoric, hydroperoxyd ... cũng được dùng làm tác nhân oxy hoá.

Trong nhiều trường hợp, phải sử dụng hỗn hợp các acid để đạt được mục đích vô cơ hoá. Các hỗn hợp hay được sử dụng: acid sulfuric - hydroperoxyd; acid nitric - hydroperoxyd; acid sulfuric - acid nitric; acid sulfuric - acid nitric - acid percloric; acid nitric - acid percloric; acid sulfuric - acid nitric - acid hydrochloric; acid sulfuric - acid nitric - acid hydrofluoric.

❖ **Các kỹ thuật thường dùng trong AAS:** [22], [24], [79], [81]

- Kỹ thuật nguyên tử hoá mẫu bằng ngọn lửa (F – AAS)

Nguyên tắc: Dùng năng lượng nhiệt của ngọn lửa đèn khí để đốt cháy một hỗn hợp khí có chứa dung dịch mẫu ở thể sol khí, để hoá hơi và nguyên tử hoá mẫu phân tích.

Đặc điểm: Kỹ thuật này ra đời đầu tiên, có thể xác định nhanh, chính xác khoảng 65 nguyên tố với độ nhạy cỡ ppm. Độ nhạy của kỹ thuật này kém kỹ thuật nguyên tử hoá không ngọn lửa nhưng lại có độ ổn định cao hơn.

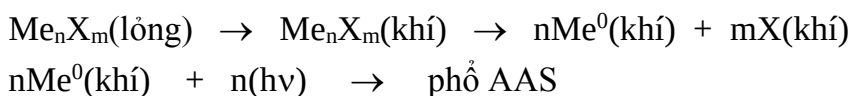
Trong phép đo F – AAS, mọi quá trình xảy ra trong khi nguyên tử hoá mẫu phụ thuộc vào các tính chất và đặc trưng của ngọn lửa đèn khí, chủ yếu là nhiệt độ của

ngọn lửa. Nhiệt độ của ngọn lửa lại phụ thuộc rất nhiều vào bản chất, thành phần của chất khí được đốt cháy và tốc độ dẫn khí vào để tạo ra ngọn lửa.

Điều đó có nghĩa là ứng với mỗi hỗn hợp khí cháy sẽ cho ngọn lửa có nhiệt độ khác nhau. Thành phần của hỗn hợp khí cháy thay đổi thì nhiệt độ của ngọn lửa cũng bị thay đổi. Nói chung, nhiệt độ của các loại đèn khí nằm trong vùng từ 1900 - 3300 °C. Hai loại hỗn hợp khí đã và đang được sử dụng phổ biến trong phép đo F - AAS là hỗn hợp của không khí nén và acetylen hoặc nitơ oxid và acetylen.

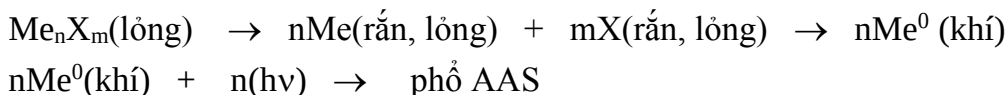
- Các quá trình xảy ra trong ngọn lửa: Đây là một quá trình động gồm nhiều quá trình xảy ra liên tiếp đồng thời với nhau. Mẫu phân tích đã chuẩn bị ở trạng thái dung dịch (ví dụ dạng dung dịch muối Me_nX_m), được trộn đều với khí mang và khí cháy tạo thành các hạt sol khí (thể aerosol). Sau đó, dẫn hỗn hợp aerosol cùng hỗn hợp khí đốt vào đầu đốt. Dưới tác dụng của nhiệt độ ngọn lửa, dung môi trong các hạt sol khí bay hơi làm cho Me_nX_m trong dung dịch chuyển thành các hạt rắn nhỏ mịn. Các hạt Me_nX_m bị nóng chảy ở nhiệt độ cao chuyển sang dạng Me_nX_m lỏng. Tiếp theo là quá trình hoá hơi và nguyên tử hoá với hai cơ chế chính xảy ra như sau:

1) Nếu $E_h < E_a$, tức là năng lượng hoá hơi E_h nhỏ hơn năng lượng nguyên tử hoá E_a thì các phân tử Me_nX_m sẽ hoá hơi. Sau đó các phân tử khí này sẽ bị phân ly (nguyên tử hoá) thành các nguyên tử tự do. Các nguyên tử này sẽ hấp thụ bức xạ tạo ra phổ AAS của nó.



Các muối halogenid, acetat, clorat và một số muối nitrat của các kim loại thường xảy ra theo cơ chế này. Cơ chế này cho phép đo có độ nhạy và độ ổn định cao.

2) Nếu $E_h > E_a$, các phân tử Me_nX_m sẽ bị phân ly thành nguyên tử. Sau đó, các nguyên tử mới hoá hơi và hấp thụ tia bức xạ để tạo ra phổ AAS của nó.



Muối sulfat, phosphat, cacbonat, nitrat và silicat của các kim loại thường xảy ra theo cơ chế này. Cơ chế này cho phép đo có độ nhạy và độ ổn định kém cơ chế 1 (tiêu biểu là các hợp chất, muối cacbonat của kim loại kiềm thổ).

Bên cạnh quá trình chính như trên, trong ngọn lửa còn có các quá trình phụ làm ảnh hưởng đến kết quả của phép đo như:

- Quá trình ion hoá của nguyên tố phân tích, làm giảm số nguyên tử tự do trong ngọn lửa, do đó làm giảm cường độ của vạch hấp thụ.

- Quá trình hấp thụ của các phân tử ở trạng thái hơi hoặc của các hạt mẫu rắn chưa bị hoá hơi trong ngọn lửa gây nên sự hấp thụ giả.

- Sự tạo thành các hợp chất bền nhiệt: một số kim loại có thể hình thành các hợp chất bền nhiệt kiểu monoxid. Các hợp chất này sẽ khó phân ly thành các nguyên tử tự do trong ngọn lửa đèn khí.

- Sự phát xạ của một số nguyên tử có vạch phát xạ gần với vạch phát xạ của nguyên tố phân tích sẽ sinh ra phổ nền và sự hấp thụ giả.

- *Kỹ thuật nguyên tử hóa không ngọn lửa (ET-AAS)*

Nguyên tắc: Quá trình nguyên tử hóa được thực hiện trong cuvet graphit và môi trường khí trơ (thường sử dụng khí argon) và xảy ra tức thời trong khoảng thời gian rất ngắn nhờ năng lượng của dòng điện công suất lớn.

- Đặc điểm: Kỹ thuật này có độ nhạy rất cao, có thể xác định nguyên tố cần phân tích ở nồng độ ng/ml (ppb). Đây là ưu điểm nổi bật của kỹ thuật này trong phân tích các nguyên tố tồn tại ở dạng vết (không cần làm giàu mẫu, tránh nhiễm bẩn, mất mẫu...). Lượng mẫu nhỏ, chỉ cần từ 10-50 μ l.

- Các quá trình: Quá trình xảy ra theo 3 giai đoạn kế tiếp nhau:

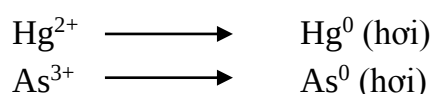
Giai đoạn làm khô: Để làm bay hơi dung môi hòa tan mẫu, chuyển mẫu về dạng rắn khô mà không làm biến mất mẫu.

Giai đoạn tro hóa luyện mẫu: Để tro hóa nền mẫu (đốt cháy hoàn toàn các chất hữu cơ còn lại sau giai đoạn vô cơ hóa mẫu) nhưng không được làm mất mẫu. Nhiệt độ và thời gian tro hóa mẫu có ảnh hưởng rất quan trọng đến hiệu suất nguyên tử hóa, vì vậy cần lựa chọn nhiệt độ tro hóa mẫu phù hợp, tạo điều kiện cho giai đoạn nguyên tử hóa mẫu đạt hiệu suất cao và ổn định.

Giai đoạn nguyên tử hóa: là giai đoạn quyết định tới cường độ vạch phổ và cũng chịu ảnh hưởng của 2 giai đoạn làm khô và tro hóa mẫu. Giai đoạn này được thực hiện trong thời gian rất ngắn (3-5 giây), nhiệt độ được tăng đột ngột (1800 °C - 2500°C/giây) nhằm nguyên tử hóa hoàn toàn nguyên tố cần phân tích trong khoảng thời gian ngắn nhất và cuối cùng là làm sạch cuvet.

- *Kỹ thuật hoá hơi lạnh*: [2], [22], [24], [78]

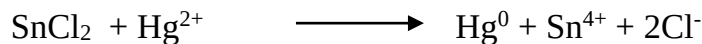
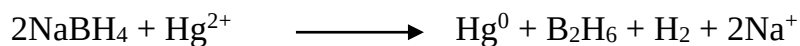
Hai kỹ thuật nguyên tử hóa mẫu bằng ngọn lửa và không ngọn lửa đều sử dụng năng lượng nhiệt để nguyên tử hóa mẫu. Tuy nhiên có một số nguyên tố có nhiệt độ nguyên tử hóa mẫu rất cao, nghĩa là nhiệt độ chuyển từ dạng ion về dạng nguyên tử tự do cao nhưng nhiệt độ bay hơi của chúng lại rất thấp. Do vậy các nguyên tử tự do sẽ bị mất trong quá trình đo như:



Kỹ thuật hoá hơi lạnh dựa trên việc chuyển các nguyên tố cần xác định về dạng hợp chất hydrid hoặc nguyên tử tự do dễ bay hơi. Kỹ thuật này được áp dụng cho các nguyên tố Hg, As, Se, Te, Sb, Sn, Bi... là những nguyên tố dễ bay hơi nhờ phản ứng

với chất khử nào đó. Các chất khử thường được dùng là: bột Zn, bột Mg, NaBH₄, SnCl₂...

Phản ứng của NaBH₄ và SnCl₂ với Hg²⁺ trong mẫu xảy ra như sau:



hoặc phản ứng của NaBH₄ với As³⁺



Các phản ứng trên được diễn ra trong một thiết bị kín, sau đó được dẫn tới cuvet thạch anh nằm trên đường sáng của đèn catốt rỗng nhờ một dòng khí đẩy là Ar hoặc N₂.

Do kỹ thuật hoá hơi lạnh có độ chính xác và độ nhạy cao, thao tác dễ dàng nên được áp dụng rất phổ biến.

❖ **Các yếu tố ảnh hưởng** [22], [24]

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích trong phép đo AAS rất đa dạng và phức tạp, có khi xuất hiện, cũng có khi không xuất hiện, có ảnh hưởng hay không là tùy thuộc vào thành phần của mẫu và nền của nó. Xét một cách toàn diện, có thể chia thành 6 nhóm yếu tố.

- *Nhóm 1:* là các thông số của hệ máy đo phổ. Các thông số này cần được khảo sát và lựa chọn cho từng trường hợp cụ thể.

- *Nhóm 2:* là các điều kiện nguyên tử hoá mẫu. Các yếu tố này thể hiện rất khác nhau tùy thuộc vào kỹ thuật được lựa chọn để nguyên tử hoá mẫu.

- *Nhóm 3:* là các ảnh hưởng về phổ như sự hấp thụ nền, sự chen lấn của vạch phổ và sự hấp thụ của các hạt rắn.

- *Nhóm 4:* là các kỹ thuật và phương pháp xử lý mẫu. Đây là một công việc quan trọng có thể làm mất hay nhiễm bẩn thêm nguyên tố phân tích vào mẫu gây cho kết quả phân tích không đúng với thực tế của mẫu (các vấn đề về môi trường làm việc, dung môi hóa chất chưa đủ sạch, mức độ tinh khiết cao, nước để phân tích, các chất chuẩn, xử lý dụng cụ, phương pháp xử lý mẫu chưa phù hợp...)

- *Nhóm 5:* là các yếu tố vật lý như độ nhớt và sức căng bề mặt dung dịch mẫu thường thể hiện nhiều trong phép đo F - AAS, nhất là khi mẫu phân tích có nồng độ lớn. Các yếu tố khác như sự ion hoá và kích thích phổ phát xạ chỉ có ý nghĩa khi phân tích phổ hấp thụ của kim loại kiềm và kiềm thổ.

- *Nhóm 6:* là các yếu tố hoá học như nồng độ acid và loại acid trong dung dịch mẫu, ảnh hưởng của các cation và anion khác nhau trong dung dịch, ảnh hưởng của thành phần nền và ảnh hưởng của dung môi hữu cơ.

Vì vậy, để kết quả chính xác và tin cậy đòi hỏi người phân tích phải biết xử lý hóa học, tách loại, làm giàu, tránh các yếu tố ảnh hưởng về mặt hoá học cũng như về phổ hấp thụ trong mỗi trường hợp.

❖ **Một số ứng dụng của AAS trong phân tích mỹ phẩm**

Phương pháp AAS thường được ứng dụng để phân tích các kim loại nặng (As, Cd, Pb, Hg...) dựa trên nguyên tắc: Các chất hữu cơ trong mẫu được đốt cháy hoàn toàn bằng phương pháp vô cơ hóa ướt hoặc vô cơ hóa khô hoặc vô cơ hóa trong lò vi sóng dưới áp suất cao và xác định hàm lượng các nguyên tố độc bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử. Chế độ đo thường là dùng kỹ thuật không ngọn lửa (nguyên tử hóa mẫu bằng lò graphit) [50].

- **Chuẩn bị mẫu thử**

- Phương pháp vô cơ hóa trong lò vi sóng (áp dụng cho As, Cd, Pb, Hg): Cân một lượng chính xác 0,15 – 0,2 g mẫu vào cốc teflon, thêm 3 ml acid nitric đặc, 1 ml nước oxy già 30% (có thể thêm 1 ml acid hydrocloric nếu cần). Đậy nắp cốc, để yên 15 phút cho phản ứng. Chuyển vào lò vi sóng để vô cơ hóa theo điều kiện sau:

Bảng 1.3. Điều kiện vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

Loại mẫu	Công suất cực đại (W)	Nhiệt độ tối đa (°C)	Áp suất tối đa (bar)	Thời gian (phút)
Kem	800	250	75	50
Phấn	1000	300	75	40
Son	900	200	75	50

Sau khi để nguội về nhiệt độ phòng, thêm 20 ml nước trao đổi ion, tráng rửa kỹ bên trong và nắp cốc bằng nước trao đổi ion. Lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50 ml và thêm nước trao đổi ion cho đủ thể tích, lắc đều.

- Phương pháp vô cơ hóa khô (ứng dụng cho As, Cd, Pb): Cân một lượng chính xác 2,5 g mẫu vào cốc silica, thêm 3 ml dung dịch magnesi nitrat 50%. Bốc hơi trên cách thủy đến khô, đốt cháy cẩn đến khi không còn khói rồi đốt ở 500°C trong 3 giờ. Để nguội, thêm 25 ml HCl 6M, khuấy đều, lọc vào bình định mức 50 ml, thêm nước vừa đủ tới vạch định mức, lắc đều được dung dịch thử để đo As, Cd, Pb.

- Phương pháp vô cơ hóa ướt (ứng dụng cho Hg): Cân một lượng chính xác 2,5 g mẫu vào bình có nút mài, thêm 7 ml HNO₃ đặc, đun nóng trong cách thủy ở 60°C trong 3 giờ, Để nguội và hòa loãng thành 50 ml với nước, để trong tủ lạnh 24 giờ đối với mẫu kem và son. Lọc qua giấy lọc. Dung dịch được dùng để đo Hg theo kỹ thuật hóa hơi lạnh.

- **Chế độ đo:**

- Chế độ lò graphit: ứng dụng cho As, Cd, Pb với các điều kiện đo như sau:

Bảng 1.4. Chế độ đo lò graphit

Đèn cathod rỗng	Bước sóng (nm)	Nhiệt độ tro hóa (°C)	Nhiệt độ nguyên tử hóa (°C)	Thể tích mẫu (μl)
As	193,7	1250	2100	20
Cd	228,8	550	1550	20
Pb	283,3	550	1550	20

Chú ý: Dung dịch nền để đo As là dung dịch paladi (Pd) với nồng độ 1,000 μg/ml. Dung dịch nền để đo Pb, Cd là hỗn hợp đồng thể tích của dung dịch magnesi nitrat hexahydrat ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) 0,2% trong acid nitric 0,5% và dung dịch amoni dihydrophosphat ($NH_4H_2PO_4$) trong acid nitric 0,5%.

- Đo Arsen bằng kỹ thuật hydrid:

Cần chuẩn bị thêm như sau: Lấy 10 ml nước trao đổi ion (như là mẫu trắng chuẩn), 10 ml mỗi dung dịch trắng thử (bao gồm các thuốc thử như dung dịch thử), dung dịch mẫu chuẩn, dung dịch mẫu thử trong phần vô cơ hóa khô cho vào mỗi bình định mức 100 ml tương ứng. Thêm vào mỗi bình 10 ml HCl đặc, 10 ml hỗn hợp đồng thể tích của dung dịch KI 10% và dung dịch acid ascorbic 10%. Để yên 45 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm nước trao đổi ion vừa đủ 100 ml, lắc đều. Nồng độ cuối cùng của các dung dịch chuẩn là 2,0; 4,0; 6,0 và 8,0 μg/l.

Các điều kiện phân tích arsen và thủy ngân bằng kỹ thuật hydrid như sau:

Bảng 1.5. Các điều kiện phân tích arsen và thủy ngân bằng kỹ thuật hydrid

Đèn cathod rỗng	Bước sóng (nm)	Tác nhân khử hóa	Dung dịch dẫn mẫu	Nhiệt độ nguyên tử hóa (°C)	Thể tích tiêm mẫu (μl)
As	193,7	$NaBH_4$ 0,2 % (trong $NaOH$ 0,05 %)	HCl 10%	900	500
Hg	253,7	Dung dịch $SnCl_2$ 1,1% (trong HCl 0,3 %) hoặc $NaBH_4$ 0,2 % (trong $NaOH$ 0,05%)	HCl 3 %	300	500

Sau đây là giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp đối với một số nguyên tố:

Bảng 1.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các nguyên tố

Nguyên tố	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
As	0,5	2,5
Cd	0,1	1,0
Pb	1,0	5,0
Hg	0,1	0,3

Một nghiên cứu để phân tích arsen đã được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh. Các tác giả dùng phương pháp vô cơ hóa khô với tác nhân vô

cơ hóa là MgO, MgNO₃ và nung ở 500 °C rồi hòa cần trong acid hydrochloric 4N và đo AAS với kỹ thuật hydrid [19].

❖ **Giới hạn của các nguyên tố độc trong mỹ phẩm**

Mỹ phẩm là loại hàng hóa được dùng một cách thường xuyên, không có liều lượng, các nguyên tố độc và hợp chất của chúng là các chất bị cấm có mặt trong các sản phẩm. Tuy nhiên, do quá trình sản xuất, bảo quản, vận chuyển có thể bị nhiễm (chưa kể có thể cố ý đưa vào công thức do một tác dụng nào đó... ví dụ Hg trong kem làm trắng da, chống nám, chất màu cấm trong son, phấn...). Độc tính của một sản phẩm phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng và cách dùng, thời gian sử dụng. Vì vậy, tùy theo yêu cầu quản lý, các quốc gia đã đưa ra qui định giới hạn các nguyên tố độc trong sản phẩm mỹ phẩm. Ví dụ Canada qui định về các kim loại nặng trong mỹ phẩm: Chì: ≤ 10 ppm, As: ≤ 3 ppm, Cd: ≤ 3 ppm, Hg: ≤ 3 ppm, Antimon: ≤ 5 ppm. Bộ y tế Đức đưa ra giới hạn chấp nhận về các kim loại nặng trong thuốc đánh răng là: Chì: ≤ 1 ppm, As: ≤ 0,5 ppm, Cd: ≤ 0,1 ppm, Hg: ≤ 0,2 ppm, Antimon: ≤ 0,5 ppm [125].

Các nước ASEAN đã đưa ra kiến nghị trong hội nghị lần thứ 8 của Hội đồng mỹ phẩm (ACC), Hội đồng khoa học (ASBC) và hội đồng tư vấn về tiêu chuẩn và chất lượng Asean (ACCSQ) tổ chức vào tháng 11 năm 2007 tại thành phố Hồ Chí Minh – Việt Nam. Điều này cũng được ghi cụ thể trong thông tư số 06/TT-BTY/2011 của Bộ Y tế [14], cụ thể theo bảng sau:

Bảng 1.7. Giới hạn kim loại nặng (ACM THA 05 Testing Method)

STT	Chỉ tiêu	Giới hạn
1	Thủy ngân (Hg)	≤ 1ppm
2	Arsen (As)	≤ 5 ppm
3	Chì (Pb)	≤ 20 ppm
4	Cadmi (Cd)*	≤ 1 ppm

(Cd)*: giới hạn Cd có nêu ở phương pháp hòa hợp ASEAN, nếu vượt quá ngưỡng qui định cần có sự cảnh báo, nhưng không nêu ở thông tư số 06/2011/BYT-TT, ngày 25 tháng 1 năm 2011 của Bộ Y tế qui định về quản lý mỹ phẩm.

Chương II

ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu và đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu mỹ phẩm lưu hành trên thị trường bao gồm những mẫu có đầy đủ nguồn gốc xuất xứ và cả các mẫu nghi ngờ có chứa chất cấm kinh doanh trôi nổi tại các chợ.

Các mẫu mỹ phẩm thường có thành phần, thể chất phức tạp và rất khác nhau, đối tượng và chỉ tiêu phân tích rất đa dạng. Vì vậy, kiểm nghiệm mỹ phẩm thường sử dụng các kỹ thuật phân tích hóa học, hóa lý, vi sinh sẵn có. Thông thường kiểm nghiệm mỹ phẩm nhằm phát hiện các chất cấm hay có giới hạn hàm lượng để đánh giá độ an toàn của sản phẩm đối với người dùng. Xử lý mẫu đóng vai trò quan trọng trong kiểm nghiệm mỹ phẩm, đặc biệt tìm các chất cấm (thường có hàm lượng rất nhỏ, dạng vết, lại chưa biết là chất gì...). Các kỹ thuật thường được áp dụng để xử lý mẫu mỹ phẩm là: Chiết (lỏng/lỏng, lỏng/rắn, chiết pha rắn – SPE), ly tâm, vô cơ hóa (vô cơ hóa ướt, vô cơ hóa khô, vô cơ hóa trong lò vi sóng...)

2.1.2. Mẫu dùng để nghiên cứu xây dựng, thẩm định các quy trình

2.1.2.1. *Metanil yellow*:

- Sơn nước Lip on Lip của hãng Rohto (Việt Nam): màu hồng tro (MY01).
- Sơn vẽ móng của hãng Zhi Yan (Thái Lan): màu vàng (MY02).

2.1.2.2. *Rhodamin B*:

- Phấn mắt Belove tím (RB03, nền N1).
- Sơn móng Melia tím (RB11, nền N2).
- Sơn nước Starshine 08 (RB13, nền N3).
- Sơn thỏi Essance RD201 (RB15, nền N4).
- Sơn Lipgloss Zhoubang (RB14).

2.1.2.3. *Pigment red 53*:

- Sơn nước Lipgloss 3D 06 Zhoubang (Trung quốc) (PR07).
- Sơn rắn Rose Lady 109 VOV Moisturizing coloring effect (Thái Lan) (PR10).
- Phấn má Color Song Blusher 21 VOV cosmetic Co, Ltd (Hàn Quốc) (PR17).

2.1.2.4. *Pigment orange 5*:

- Mẫu sơn nước Star Shine Lip Gloss orange avenues, sản xuất tại Hàn quốc (PO01).

- Son thỏi Mayberline Water Shine Pune Lipcolon 06, sản xuất tại Thái Lan (PO02).
- Son vẽ móng tay Chen Xi màu vàng cam, sản xuất tại Trung quốc (PO03).

2.1.2.5. Định tính, định lượng đồng thời MY, RB, PR, PO:

- Mẫu son nước Water lip bloom pink BP 01 (HM02), NSX: 21/2/2013 hạn dùng: 21/02/2016 Rohto (Việt Nam).
- Mẫu son thỏi Miracle Apo H002 Pinky orange (HM03), sản xuất tại Trung Quốc.

2.1.2.6. Crystal violet:

- Son nước Starshine 08 (CV13, nền N1).
- Son thỏi Essance RD 201 (CV15, nền N2).
- Son móng Melia tím (CV11, nền N3).
- Phấn mắt Belove tím (CV03, nền N4).

2.1.2.7. Sudan:

- Son môi Sivana colors, Item: DF915 số 05, lô HF 13A01, Thái Lan.(Ký hiệu SD 03)
- Son môi Zendori Magic Lipcar orange, Thái Lan, Mfd: 185/270611 (Ký hiệu SD 05)

2.1.2.8. Hydroquinon:

- Kem dưỡng trắng da Esance whitening cream (HQ01).
- Kem dưỡng trắng da sản xuất tại Hải Phòng (HQ02).
- Kem dưỡng trắng da ROJZY JIALA (HQ03).

2.1.2.9. Các Steroid:

- Kem dưỡng trắng da Impress IC Kanebo, sản xuất tại Nhật Bản.

2.1.2.10. Tretinoin:

- Kem dưỡng da chống, trị nám Bảo Lâm (TR01), NSX:10/04/2010, HD: 10/04/2013, SDK: QLD-CL/2340/05, nơi sản xuất: Công ty cổ phần Đông Y học Bảo Lâm.
- Extra pearl cream (TR10), NSX:01/2010, HD:2013, nơi sản xuất: Punnee cosmetic Ltd.part. (Thái Lan).
- Kem trị nám dưỡng da (TR14), HD: 18/11/2013, NSX: Trung Quốc.

2.1.2.11. Thủy ngân:

- Kem làm trắng da Essence Whitening Cream, lấy mẫu tại chợ Đồng Xuân.
- Kem trị nám Bảo Ngọc Lan, lấy mẫu tại chợ Đồng Xuân.
- Sữa rửa mặt Hazelin, lấy mẫu tại Siêu thị Le's Mart, Hà Nội.
- Dầu gội đầu X-men, lấy mẫu tại Siêu thị Big C – Hà Nội.
- Essance whitening Việt Nam, lấy mẫu tại Siêu thị Le's Mart, Hà Nội.
- Phấn mắt 5 màu WN - 1 Trung Quốc, lấy mẫu tại Siêu thị Big C – Hà Nội.

2.1.2.12. Chì:

- Kem dưỡng da Baiyili, sản xuất tại Trung Quốc (PB01).

- Sơn môi Mentholatum, sản xuất tại Trung Quốc (PB02).
- Dầu gội đầu Shalima, sản xuất tại Trung Quốc (PB03).
- Phấn má Flower cheek, sản xuất tại Hàn Quốc (PB04).
- Sữa rửa mặt Dưa leo, sản xuất tại Việt Nam (PB05).

2.2. CHẤT CHUẨN, DUNG MÔI, HÓA CHẤT

2.2.1. Chất chuẩn

- Chất đối chiếu Metanil yellow (Lô: K6256467 738, Merck, Đức).
- Chất đối chiếu Rhodamin B (Lô: FN1081999 903, CI 45170, Merck, Đức)
- Chất đối chiếu Pigment Red 53 (Lake Red CBA, CI 15585, Lô: L 074, Hàn Quốc)
- Chất đối chiếu Pigment orange 5 (Lô: P0587, CI 12075, Hàn Quốc).
- Chất đối chiếu Crystal violet (Merck, Đức).
- Chất đối chiếu Sudan: Sudan I (Mã hàng C 16986101, Lô: 50531, HL: 90,0% , GmbH, Đức). Sudan II (Mã hàng C 16986102, Lô: 50404, HL: 90,0% , GmbH, Đức). Sudan III (Mã hàng C 16986103, Lô: 50503, HL: 96,0% , GmbH, Đức). Sudan IV (Mã hàng C 16986104, Lô: 50421, HL: 92,0% , GmbH, Đức)
- Chất đối chiếu Tretinoin (Merck, Đức, xin từ phòng thí nghiệm của Thái Lan).
- Các chất đối chiếu nhóm Steroid: 10 chất chuẩn quốc gia và 2 chuẩn phòng thí nghiệm của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương: Prednison (SKS: WS.0107235; HL:98,6%; ẩm: 0,15%), Dexamethason (SKS: 0197025, HL: 99,61%; ẩm: 0,13%), Fluocinolon acetonid (SKS:0199049, HL: 97,2%; ẩm: 0,6%), Presnison acetat (SKS: 0102149; HL: 99,64%; ẩm: 0,06%), Hydrocortison acetat (SKS:0198038; HL: 99,5%; ẩm: 0,1%), Cortison acetat (SKS: 0103092; HL: 100,01%; ẩm:0,05%), Dexamethason acetat (SKS:0200014; HL:99,6%), Betamethason valerat (SKS: 0103125; HL: 100,43%; ẩm: 0,14%), Clobetasol propionat (SKS:0103170; HL: 99,4%, ẩm: 0,12%), Triamcinolon acetonid (Số lô: M 191077a; HL: 99,11%; ẩm: 1,84%), Betamethason dipropionat (chuẩn PTN, HL: 101,2%), Mometason furoat (chuẩn PTN, HL: 100,1%)
- Chất đối chiếu Hydroquinon (Lô: K28958333, HL: 99,0, Merck, Đức).
- Dung dịch chuẩn gốc thủy ngân 1000 ppm (Lô: HC 078703, Merck, Đức).
- Dung dịch chuẩn gốc chì 1000 ppm (Lô: HC 095295, Merck, Đức).
- Dung dịch chuẩn gốc arsen 1000 ppm (Lô: HC 088963, Merck, Đức).

2.2.2. Dung môi, hóa chất

- Methanol tinh khiết HPLC (Merck, Đức).
- Acetonitril (ACN) tinh khiết HPLC (Merck)
- Tetrahydrofuran tinh khiết HPLC (Merck)

- Triethylamin P.A. (Merck, Đức).
- Acid acetic P.A. (Merck, Đức).
- n-hexan P.A. (Merck, Đức).
- Acid phosphoric 85% P.A. (Merck, Đức).
- N, N dimethylformamid (DMF) P.A. (Merck, Đức).
- Acid nitric 65% tinh khiết cho AAS (Merck, Đức).
- Hydroperoxid 30% P.A. (Merck, Đức).
- Hydroxylamin P.A. (Merck, Đức).
- Thiếc (II) clorid P.A. (Merck, Đức).
- Kali permanganat P.A. (Merck, Đức).
- Acid sulfuric đặc P.A. (Merck, Đức).
- Dimethylsulfoxid P.A. (Merck)
- Tetrabutylammonium hydroxyd (TBA) 40% P.A.
- Dung dịch amoniac đậm đặc P.A.
- Kali dihydrophosphat P.A.
- Acid citric P.A.
- Dicloromethan P.A.
- Nước cất được lọc qua màng milipore 0,45µm

2.3. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

Các thiết bị, máy phân tích tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương được hiệu chuẩn theo qui định [42] gồm:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu có trang bị detector PDA.
- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Z-5000 (Hitachi, Nhật Bản) được trang bị bộ dụng cụ phân tích thủy ngân chuyên dụng "A.A- Mercury Reduction Unit" và bộ phân tích hóa hơi hydrid chuyên dụng.
- Cân phân tích Mettler Toledo AB204S chính xác đến 0,1mg.
- Thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng Milestone Start-D (Mỹ).
- Hệ thống lọc nước trao đổi ion (Easypure UV/UF, Barnsted, Mỹ).
- Bộ cốc teflon chuyên dụng cho AAS.
- Nồi cách thủy, bếp điện.
- Thiết bị lắc siêu âm.
- Dụng cụ thủy tinh chính xác cấp A (pipet, bình định mức...).
- Dụng cụ thủy tinh: Bình gạn, cốc có mở...



Hình 2.1- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Hitachi Z-5000



Hình 2.2 - Máy lọc nước trao đổi ion



Hình 2.3 - Lò vi sóng Milestone Start-D

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Phương pháp HPLC

2.4.1.1. Khảo sát, lựa chọn qui trình phân tích:

❖ Khảo sát, lựa chọn phương pháp xử lý mẫu: chọn dung môi và phương pháp chiết sao cho chiết được hoàn toàn chất phân tích từ nền mẫu, loại bỏ tối đa ảnh hưởng của nền mẫu, chất phân tích bền trong môi trường pha mẫu:

- Sơn môi và sơn móng (có sáp, dầu, chất màu, thuốc nhuộm, thường không thân nước, thể chất quánh) sử dụng một trong các cách chiết sau:

- Chiết lỏng/lỏng giữa dung môi chiết mẫu và n-hexan (giống ASEAN)
- Phân tán mẫu bằng lượng nhỏ tetrahydrofuran hoặc dimethyl formamid để rồi chiết bằng dung môi chiết mẫu: đơn giản hơn, nhanh hơn chiết lỏng/lỏng vì không phải chờ phân lớp.

- Phân trang điểm (dạng bột màu): Nghiền mịn và chiết bằng dung môi chiết mẫu

- Sản phẩm dạng kem (kem bôi da, dầu gội đầu, sữa rửa mặt: thành phần phức tạp có vaselin, lanolin, glycerin, sáp ong, gôm, nước, chất diện hoạt, chất làm thơm, chất tạo màu, chất bảo quản... thường rửa được bằng nước): Dùng dung môi chiết mẫu, làm lạnh trong nước đá để tủa tá được. Có thể chiết nhiều lần và ly tâm trước khi lọc.

- ❖ Khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp: cột sắc ký, nhiệt độ cột, pha động, tốc độ dòng, bước sóng phân tích với detector PDA, thể tích tiêm mẫu.
- ❖ Định tính bằng so sánh thời gian lưu, độ tinh khiết pic và chồng phổ UV -VIS, so sánh hệ số tương đương của pic nghi ngờ thu được từ mẫu thử với pic thu được từ mẫu chuẩn.
- ❖ Định lượng bằng cách so sánh diện tích pic hoặc độ hấp thụ thu được từ mẫu thử với mẫu chuẩn.

2.4.1.2. Đánh giá phương pháp phân tích:

Với đối tượng nghiên cứu là các chất cấm nên trong thẩm định đánh giá phương pháp phân tích coi như phép thẩm định đánh giá các tạp chất (thường có nồng độ nhỏ trong mẫu). Tham khảo dự thảo hướng dẫn của ASEAN về đánh giá phương pháp phân tích mỹ phẩm [56], hướng dẫn của ICH [84], dược điển Mỹ (USP 34) [118], dược điển Anh BP 2010 [65], thông tư 22/TT-BYT [11], tài liệu đào tạo của VKNTTW [43] và của các chuyên gia [68], [90], [96] qui định về các chỉ số cần đánh giá:

- ❖ *Với qui trình phân tích định tính:* đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện.
- ❖ *Với qui trình phân tích xác định giới hạn tạp* (ví dụ: Hg, Pb, As): độ thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (theo ICH), USP yêu cầu thêm: độ đúng và khoảng xác định.
- ❖ *Với qui trình phân tích định lượng:* độ phù hợp của hệ thống sắc ký, tính đặc hiệu, độ chính xác, khoảng tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng ít nhất đạt được yêu cầu như các qui trình ASEAN đã đưa ra.

- *Tính thích hợp của hệ thống:* Tiến hành sắc ký với các dung dịch chuẩn, tự tạo hay mẫu thử (ít nhất 6 lần tiêm), ghi lại các sắc ký đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích pic trung bình và các thông số khác của pic (độ phân giải, hệ số đối xứng, số đĩa lý thuyết...). Yêu cầu:

- Độ phân giải giữa pic liền kề với pic của chất cần phân tích phải $\geq 1,5$.
- Số đĩa lý thuyết ≥ 2000 .
- Giá trị RSD của thời gian lưu $\leq 1,0\%$ và của diện tích pic phải $\leq 2,0\%$ (với phép thử định lượng). Trường hợp giá trị RSD $> 2\%$, phải có sự giải thích phù hợp.
- Các thông số khác của pic phải đáp ứng yêu cầu chung của phương pháp HPLC quy định trong Dược điển và quy định cụ thể trong quy trình phân tích thẩm định.

- *Độ đặc hiệu:*

Tiến hành sắc ký các loại mẫu sau đây theo quy trình phân tích:

- Mẫu trắng: Dung môi pha động/dung môi hòa tan mẫu hay pha loãng mẫu.
- Dung dịch mẫu nền: dung dịch mẫu mỹ phẩm không có chất cần phân tích.
- Dung dịch chuẩn: dung dịch chứa chất chuẩn cần phân tích được chuẩn bị theo qui trình.
- Dung dịch mẫu tự tạo: dung dịch mẫu mỹ phẩm (không có chất cần phân tích) đã được cho thêm chất chuẩn cần phân tích và được chuẩn bị theo qui trình.
- Dung dịch mẫu thử: Chuẩn bị theo qui trình.

Ghi lại các sắc ký đồ. Xác định thời gian lưu của hoạt chất cần phân tích; độ tinh khiết của pic hoạt chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu thử/mẫu tự tạo; chồng phổ UV-VIS của pic của chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu thử/tự tạo với pic của mẫu chuẩn. Yêu cầu:

- Sắc ký đồ các dung dịch thử cho pic có thời gian lưu khác nhau không có ý nghĩa thống kê với pic của chất chuẩn trong sắc ký đồ các mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ của mẫu thử/mẫu tự tạo: pic của chất cần phân tích phải tách hoàn toàn khỏi các pic khác (nếu có trong nền mẫu).
 - Sắc ký đồ của mẫu trắng, dung dịch mẫu nền không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn. Nếu có đáp ứng pic phải $\leq 1,0\%$ so với đáp ứng pic của mẫu chuẩn.
 - Pic của chất cần phân tích trong sắc ký đồ dung dịch thử phải tinh khiết. Hệ số chồng phổ UV-VIS của pic hoạt chất cần phân tích thu được trong sắc ký đồ của dung dịch thử/tự tạo với pic tương ứng trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn xấp xỉ 1,0 ($\geq 0,99$)
- *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn (5 dung dịch), ghi lại các sắc ký đồ và xác định đáp ứng của pic.

Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và đáp ứng pic thu được trên các sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Yêu cầu: Với phép thử định lượng:

- Hệ số tương quan (r) phải $\geq 0,997$ (hay $R^2 \geq 0,995$). Trường hợp $r < 0,997$ phải có sự giải thích phù hợp.
- hệ số y-intercept tại nồng độ 100% (Y): $Y \leq 5,0\%$ cho Hydroquinon (kem chứa Hydroquinon có hàm lượng tối đa cho phép $\leq 2\%$); $Y \leq 10\%$ cho các chất màu cấm, Tretinoin, các nguyên tố độc [118], [120] với:

$$Y = \frac{\text{Hệ số chấn}}{S \text{ pic ở nồng độ } 100\%} \times 100$$

- *Độ đúng*

Xác định độ đúng của phương pháp trên các mẫu tự tạo bằng cách: thêm chính xác một lượng chất chuẩn cần phân tích vào các mẫu mỹ phẩm không có chất cần phân tích.

- Cách 1: Chuẩn bị 03 loại mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn cần phân tích vào các mẫu không có chất cần phân tích. Với phép thử định lượng, lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với mức 100% của qui trình phân tích. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện ít nhất 03 mẫu độc lập.

Phân tích mẫu theo qui trình phân tích. Xác định hoạt chất thu hồi theo dung dịch chuẩn hoặc phương trình hồi quy tuyến tính.

- Cách 2: chuẩn bị và phân tích 6 mẫu thử độc lập với lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với mức nồng độ 100% của qui trình phân tích.

Xác định độ đúng của phương pháp theo công thức:

$$\text{Độ đúng hay tỷ lệ thu hồi (\%)} = \frac{\text{Lượng chất phân tích tìm lại}}{\text{Lượng chất chuẩn thêm vào}} \times 100$$

Tham khảo hướng dẫn của ICH, ASEAN và AOAC

Bảng 2.1. Giới hạn chấp nhận về độ đúng của phương pháp theo AOAC [48], [90].

Thành phần phân tích (%)	Tỷ lệ phân tích	Đơn vị	Giá trị chấp nhận (%)
100	1	100 %	98-102
≥ 10	10 ⁻¹	10 %	98-102
≥ 1	10 ⁻²	1%	97-103
≥ 0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40-120

Yêu cầu: Với phép thử định lượng:

Xác định tỷ lệ thu hồi (98,0-102,0%) cho qui trình phân tích định lượng Hydroquinon và RSD tỷ lệ thu hồi (≤ 2,0%) ở mỗi mức nồng độ [56], [65], [84], [118].

Xác định tỷ lệ thu hồi (80,0 – 110,0%) cho qui trình phân tích các chất màu cấm, Tretinoin và Hg (nồng độ chất phân tích nhỏ 100 ppb – 10 ppm) [48], [90].

Xác định tỷ lệ thu hồi (60,0-115,0%) cho qui trình phân tích bằng phương pháp AAS đối với Pb, Cd, As bằng kỹ thuật lò và kỹ thuật hydrid (nồng độ phân tích 10^{-8}) [48], [90].

Trường hợp nằm ngoài khoảng này, phải có sự giải thích phù hợp.

- Khoảng xác định

Được suy ra từ kết quả độ đúng (từ giá trị nhỏ nhất đến giá trị lớn nhất của độ đúng).

- Độ chính xác

- Độ lặp lại: Tiến hành định lượng 06 mẫu thử độc lập.

Xác định hàm lượng chất phân tích có trong các mẫu thử bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn hoặc phương trình hồi quy tuyến tính.

Độ lặp lại của phương pháp được xác định bằng giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng chất phân tích có trong các mẫu hay lượng chất tìm thấy trong các mẫu tự tạo. Yêu cầu: Tùy theo mục đích của phép thử mà có các giới hạn chấp nhận phù hợp. Với phép thử định lượng: Giá trị $RSD \leq 2,0\%$. Các trường hợp giá trị RSD trên 2%, cần phải có sự giải thích phù hợp.

Bảng 2.2. Giới hạn chấp nhận về độ chính xác của phương pháp theo AOAC [48], [90]

<i>Thành phần phân tích %</i>	<i>Tỷ lệ phân tích</i>	<i>Đơn vị</i>	<i>RSD (%)</i>
100	1	100 %	1,3
≥ 10	10^{-1}	10 %	2,7
≥ 1	10^{-2}	1 %	2,8
$\geq 0,1$	10^{-3}	0.1%	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm	7,3
0,0001	10^{-6}	1 ppm	11
0,00001	10^{-7}	100 ppb	15
0,000001	10^{-8}	10 ppb	21
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	30

- Độ chính xác trung gian: Tiến hành như độ lặp lại nhưng khác ngày/khác kiểm nghiệm viên/khác hệ thống HPLC.

Xác định giá trị trung bình và giá trị RSD (%) hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu do mỗi kiểm nghiệm viên phân tích/ mỗi ngày và giữa hai kiểm nghiệm viên/khác ngày.

Giá trị độ lệch chuẩn tương đối về độ chính xác của phương pháp được chấp nhận phụ thuộc vào nồng độ của chất phân tích trong mẫu phân tích: nồng độ càng nhỏ, cho phép giá trị RSD (%) càng lớn. Tham khảo hướng dẫn của AOAC.

Yêu cầu: các giới hạn chấp nhận phù hợp cho mẫu phân tích ở nồng độ nhỏ (100 ppm). Với phép thử định lượng: Giá trị RSD kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên/mỗi ngày ($n=6$) $\leq 3,0\%$ và của cả hai kiểm nghiệm viên/khác ngày ($n=12$) phải $\leq 5,0\%$.

- *Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng*

Có nhiều phương pháp xác định giá trị LOD, LOQ của phương pháp. Để xác định giá trị LOD của phương pháp HPLC có thể tiến hành theo cách dựa vào đường tuyến tính và độ lệch chuẩn của đáp ứng theo cách sau:

- Xác định giới hạn phát hiện:

Tiến hành phân tích các mẫu nền (không có chất phân tích). Xác định đáp ứng trung bình của mẫu nền tại khoảng thời gian tương ứng với thời gian lưu của pic chất cần phân tích. Kỹ thuật xác định đáp ứng của nhiều đường nền tuân thủ theo nguyên tắc chung của phương pháp HPLC.

Giá trị LOD của phương pháp được xác định theo công thức sau:

$$LOD = \frac{3,3 \times \delta}{a} (kl / tt)$$

trong đó: δ : Độ lệch chuẩn đáp ứng của mẫu nền (placebo)

a: Hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính ($y = ax + b$) giữa nồng độ - đáp ứng pic của chất cần phân tích.

- Xác định giới hạn định lượng: $LOQ = 3,3 \times LOD (kl / tt)$

2.4.2. Phương pháp AAS

Áp dụng định lượng thủy ngân (và các kim loại độc) trong kem và phấn bôi da mỹ phẩm.

2.4.2.1. Thiết lập qui trình phân tích thủy ngân:

Qui trình phải phù hợp với thiết bị hóa hơi lạnh sẵn có, phương pháp đo toàn lượng gián đoạn (khác với ASEAN thiết bị đo dòng liên tục) trong mỹ phẩm dạng kem bôi da (đặc biệt kem làm trắng da, kem trị nám, sữa rửa mặt, dầu gội đầu...) và phấn trang điểm (phấn má, phấn mắt).

Nghiên cứu thiết lập điều kiện cụ thể cho 2 giai đoạn chính của phương pháp phân tích thủy ngân bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hoá hơi lạnh gồm: Quy trình xử lý mẫu bằng kỹ thuật vô cơ hoá ướt trong thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng lò vi sóng và Quy trình đo thủy ngân bằng phương pháp hoá hơi lạnh.

❖ *Khảo sát, lựa chọn qui trình xử lý mẫu:*

Tiến hành khảo sát các yếu tố sau: tác nhân vô cơ hóa, lượng mẫu đem phân tích, lượng tác nhân sử dụng. Để có thể vô cơ hóa triệt để nền mẫu mỹ phẩm ở điều kiện phản ứng không quá mạnh, thích hợp với việc áp dụng trên thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng (tiến hành trong điều kiện kín hoàn toàn, quá trình vô cơ hóa mẫu phải không chế được về áp suất và nhiệt độ), cần khảo sát, lựa chọn các thông số của chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng với hai dạng nền mẫu kem và mẫu phấn.

❖ *Xác định các thông số làm việc của máy quang phổ:* bao gồm:

- Thông số của máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (vạch phổ đo, cường độ dòng làm việc của đèn cathod rỗng, độ rộng khe (slit width), thời gian lấy tín hiệu, chế độ đo...).
- Thông số hoạt động của bộ phân tích thủy ngân: Thiết bị phân tích thủy ngân chuyên dụng được thiết kế để đo thủy ngân bằng phương pháp gián đoạn. Yếu tố cần chú ý nhất trong hoạt động của thiết bị là tốc độ quay của bơm nhu động cần đảm bảo được 2 yêu cầu:

1) Khi thiết bị hoạt động ở chế độ tuần hoàn (CIRCULATE) bơm phải tạo ra được dòng lưu thông ổn định và liên tục của hơi thủy ngân trong vòng tuần hoàn của hệ thống để tín hiệu đo được ổn định.

2) Khi thiết bị hoạt động ở chế độ mở (OPEN), bơm phải tạo ra áp lực đủ lớn để đẩy được trọn vẹn hơi thủy ngân trong hệ thống vào bình thải trong thời gian hợp lý để quá trình phân tích không quá dài và không còn hơi thủy ngân đọng lại trong hệ thống gây sai số cho lần phân tích tiếp theo

❖ *Thao tác đo:*

Thực hiện với từng bình phản ứng theo hướng dẫn sử dụng của máy phân tích, thực hiện đo các dung dịch mẫu đường chuẩn trước rồi đo các mẫu thử.

2.4.2.2. Đánh giá qui trình phân tích:

- Các chỉ tiêu cần đánh giá: độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, khoảng xác định, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (tương tự như phần 2.3.1.2.).

❖ *Độ đặc hiệu:*

- Chuẩn bị dung dịch mẫu nền mỹ phẩm không có thủy ngân (mẫu placebo)
- Chuẩn bị dung dịch chuẩn thủy ngân có nồng độ thích hợp trong dung môi pha mẫu (mẫu chuẩn).

- Chuẩn bị dung dịch tự tạo (mẫu thử): Thêm một lượng chính xác dung dịch thủy ngân chuẩn có nồng độ 1000µg/ml vào mẫu mỹ phẩm nền, trộn đều.

Tiến hành xử lý mẫu theo qui trình, đo phổ hấp thụ nguyên tử của dung môi pha mẫu, các dung dịch mẫu placebo, mẫu chuẩn, mẫu thử theo quy trình phân tích.

Yêu cầu:

- Dung dịch thử, dung dịch chuẩn phải cho đỉnh hấp thụ cực đại tại 253,7nm (vạch hấp thụ cực đại của thủy ngân).
- Dung dịch mẫu placebo không được có hấp thụ tại bước sóng khảo sát. Nếu có thì ảnh hưởng của mẫu placebo phải nhỏ hơn 2,0% so với mẫu chuẩn ở nồng độ 100% của qui trình định lượng.

❖ *Tính thích hợp của hệ thống:*

Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn tại bước sóng khảo sát 6 lần. Tính giá trị RSD của độ hấp thụ. Yêu cầu: Giá trị $RSD \leq 2,0\%$.

❖ *Độ tuyến tính*

- Chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn, có nồng độ 50% đến 150% nồng độ định lượng. Có thể chuẩn bị các dung dịch của dãy chuẩn bằng cách pha loãng từ một dung dịch chuẩn gốc ban đầu với các hệ số pha loãng khác nhau hoặc từ các dung dịch chuẩn với lượng cân chất chuẩn khác nhau.
- Đo độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn tại bước sóng khảo sát.
- Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và độ hấp thụ thu được bằng phương pháp bình phương tối thiểu.

Yêu cầu: - Hệ số tương quan (r) phải $\geq 0,997$. Trường hợp $r < 0,997$ phải có sự giải thích phù hợp.

- y-intercept: $Y \leq 10\%$

$$\text{với } Y = \frac{\text{Hệ số chặn}}{\text{Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn ở nồng độ 100\%}} \times 100$$

❖ *Độ đúng*

- Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách xác định lượng thủy ngân chuẩn tìm lại được sau khi cho một lượng chính xác thủy ngân chuẩn vào nền mẫu mỹ phẩm đã biết không chứa thủy ngân (với mỹ phẩm dạng kem bôi da và dạng phấn bôi da), tiến hành xử lý mẫu và phân tích 6 lần độc lập.
- Phân tích mẫu theo qui trình phân tích. Xác định lượng chất thu hồi theo độ hấp thụ trung bình của dung dịch chuẩn hoặc phương trình hồi quy tuyến tính.
- Xác định độ đúng của phương pháp theo công thức tính tỷ lệ thu hồi:

$$\text{Tỷ lệ thu hồi (\%)} = (\text{Lượng hoạt chất thu hồi} / \text{Lượng hoạt chất thêm vào}) \times 100\%$$

Yêu cầu:

- Tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ: 80 – 110% (Định lượng)
- RSD tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ: $\leq 10\%$ (Định lượng)

Trường hợp nằm ngoài khoảng này, phải có sự giải thích phù hợp.

❖ *Khoảng xác định*

Được suy ra từ kết quả độ đúng (Từ giá trị nhỏ nhất đến giá trị lớn nhất của độ đúng).

❖ *Độ chính xác*

- Độ lặp lại:

Tiến hành thử theo quy trình phân tích 06 mẫu thử độc lập.

Xác định hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu thử theo độ hấp thụ trung bình của dung dịch chuẩn hoặc phương trình hồi quy tuyến tính.

Xác định giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất/lượng hoạt chất đã hòa tan trong các mẫu.

Yêu cầu: RSD: $\leq 10\%$ (Định lượng). Trường hợp nằm ngoài khoảng này, phải có sự giải thích phù hợp.

- Độ chính xác trung gian:

Tiến hành như độ lặp lại nhưng khác ngày, khác kiểm nghiệm viên.

Xác định giá trị trung bình và giá trị RSD (%) kết quả định lượng trong các mẫu do mỗi kiểm nghiệm viên phân tích (hoặc mỗi ngày phân tích) và giữa hai kiểm nghiệm viên (hoặc khác ngày phân tích).

Yêu cầu: Giá trị RSD (%) kết quả định lượng của mỗi kiểm nghiệm viên/cùng ngày ($n=6$) $\leq 10\%$ và của cả hai kiểm nghiệm viên/khác ngày ($n=12$) phải $\leq 11\%$.

2.4.3. Thẩm định tính khả thi của qui trình ASEAN

Thẩm định tính khả thi, chuyển giao phương pháp và biên soạn lại qui trình phân tích Tretinoin, chì, arsen theo qui trình ASEAN đã đưa ra gồm: Thẩm định độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, độ chính xác, khoảng tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng theo yêu cầu như các qui trình ASEAN đã đưa ra [44]

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu phân tích

Các kết quả thực nghiệm được xử lý và tính các giá trị thống kê trên Microsoft Excell để rút ra nhận xét kết luận. Một số công thức tính toán các giá trị thống kê như sau:

$$\text{Giá trị trung bình: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Phương sai :

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

Độ lệch chuẩn:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Độ lệch chuẩn tương đối :

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

trong đó: - x_i là kết quả của lần xác định thứ i
 - n là số lần xác định.

Chương III

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỘT SỐ HỢP CHẤT BỊ CẤM SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM

3.1.1. Metanil yellow

Đối tượng mẫu mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng với Metanil yellow (MY) là son môi, son móng.

3.1.1.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu:

Qua khảo sát chọn được dung môi chiết mẫu là hỗn hợp DMF và acid phosphoric (95:5).

❖ Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm:

Cân chính xác một lượng khoảng 2g mẫu mỹ phẩm vào cốc có mỏ 25ml, dùng thìa thủy tinh phân tán mẫu đều trong cốc, thêm khoảng 5 ml dung môi chiết mẫu, khuấy kỹ, chuyển dung dịch thu được vào bình gạn. Thêm khoảng 20 ml n-hexan vào bình gạn. Tráng lại cốc đựng mẫu bằng dung môi chiết mẫu 2 lần, mỗi lần 5 ml rồi chuyển vào bình gạn, lắc kỹ trong 5 phút, để lắng cho phân lớp, gạn lấy phần dung môi chiết mẫu (lớp dưới). Nếu lớp n-hexan còn lại trong bình gạn vẫn còn màu, thêm 4 ml dung môi chiết mẫu vào bình gạn để chiết lần 2, lắc, để lắng, gạn lấy phần dung môi chiết mẫu. Gộp dịch chiết, thêm dung môi chiết mẫu vừa đủ 20,0 ml, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, rồi lọc lại bằng màng lọc 0,45 μ m, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

❖ Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị một dung dịch chuẩn có nồng độ MY chính xác khoảng 0,4 μ g/ml trong hỗn hợp DMF-H₃PO₄ (95:5), lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

3.1.1.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Metanil yellow:

ASEAN đã ban hành phương pháp hòa hợp mã số ACM SIN 02 để phát hiện 3 loại chất màu cấm trong mỹ phẩm, trong đó có MY bằng các kỹ thuật TLC và HPLC. Quy trình phân tích bằng HPLC trong phương pháp hòa hợp này sử dụng pha động là hỗn hợp dung dịch tetrabutylammonium hydroxyd (TBA) 0,005M - nước (75:25), trong đó dung dịch tetrabutylammonium hydroxyd 0,005M được pha như sau: Lấy 65ml dung dịch tetrabutylammonium hydroxyd 20%, thêm nước vừa đủ thành 100ml rồi chuyển vào bình 250 ml, thêm 2,8 g kali hydroxyd, lắc để hòa tan. Điều chỉnh tới pH 7 bằng acid phosphoric. Dung dịch này là dung dịch TBA 0,5 M.

Lấy 10ml dung dịch TBA 0,5 M, thêm methanol tới vừa đủ 1000ml. Dung dịch trở lên đục, để lắng vài giờ, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Qua thực tế khảo sát ban đầu, hệ pha động này chuẩn bị khá khó khăn, đồng thời kém ổn định, có hiện tượng xuất hiện tủa trở lại ngay cả sau khi đã lọc (ASEAN

cũng không nêu rõ để thời gian bao nhiêu thì quá trình rửa mới hoàn toàn). Do đó cần tìm ra những điều kiện sắc ký ổn định, thuận tiện hơn cho quy trình phát hiện MY. Sau quá trình lựa chọn, các điều kiện sắc ký được chọn lựa như sau:

❖ *Điều kiện sắc ký:*

- Cột Apollo C18 (250x 4,6 mm; 5 μ m) hoặc cột có tính năng tương đương.
- Detector PDA đặt trong dải bước sóng từ 200-900 nm, lấy sắc đồ ở 424 nm.
- Pha động: methanol-dung dịch đệm pH 6,2 (55: 45).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l.
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.

Cách chuẩn bị dung dịch đệm pH 6,2: chuẩn bị dung dịch triethylamin 3mM trong nước, chỉnh pH về 6,2 bằng acid acetic 30%. Lọc bằng bộ lọc dung môi với màng lọc 0,45 μ m.

❖ *Tiến hành:*

Tiêm riêng dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Nếu dung dịch thử cho pic có thời gian lưu và phổ UV-VIS (200-800nm) tương ứng với pic MY thu được từ dung dịch chuẩn và dựa vào hệ số chồng phổ của các pic này (lớn hơn 0,99), có thể kết luận mẫu thử có chứa MY

3.1.1.3. *Thẩm định quy trình*

❖ *Tính thích hợp của hệ sắc ký:*

Bảng 3.1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký với Metanil yellow

STT	<i>Thời gian lưu</i> (phút)	<i>Diện tích pic</i> (mAU.s)
1	16,254	287423
2	16,359	294133
3	16,344	285211
4	16,267	290996
5	16,320	290911
6	16,254	290514
Trung bình	16,300	289865
RSD (%)	0,29	1,08

Kết quả cho thấy cả thời gian lưu và diện tích pic đều có độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 2%, số đĩa lý thuyết trung bình là 5468 với hệ số bất đối là 0,937, chứng tỏ điều kiện sắc ký lựa chọn đạt yêu cầu của phép phân tích định tính và định lượng.

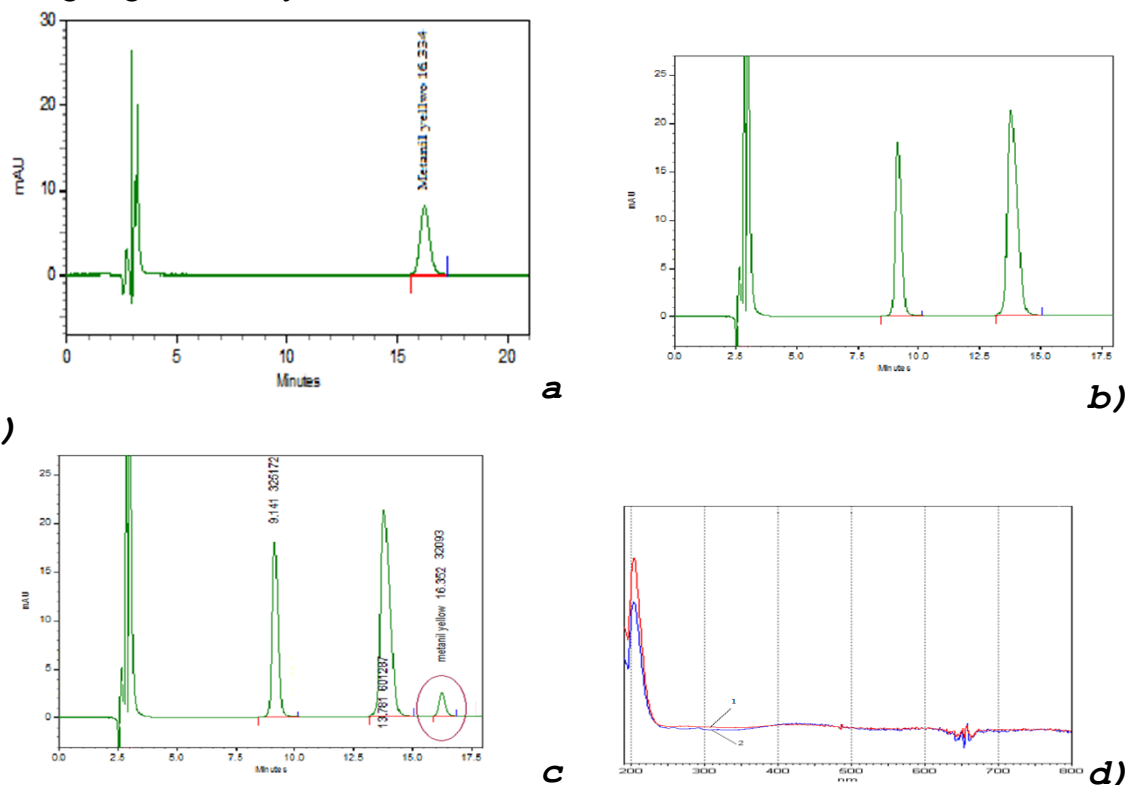
❖ *Độ đặc hiệu*

Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn, tiến hành phân tích các mẫu:

- *Mẫu trắng:* mẫu mỹ phẩm không chứa MY (mẫu MY01) được chuẩn bị theo quy trình xử lý mẫu đã chọn.

- *Mẫu tự tạo*: mẫu mỹ phẩm không chứa MY (mẫu MY01) được trộn thêm một lượng chính xác MY chuẩn và chuẩn bị theo quy trình xử lý mẫu đã chọn.
- *Mẫu chuẩn Metanil yellow*: có nồng độ MY khoảng 4 µg/ml.

Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, mẫu trắng và mẫu tự tạo, kết quả so sánh phổ UV-VIS giữa pic MY trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và pic có thời gian lưu tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu tự tạo được thể hiện ở hình 3.1.



Hình 3.1. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với Metanil yellow.

- a) dung dịch chuẩn MY, b) mẫu mỹ phẩm không chứa MY (MY01), c) mẫu tự tạo, d) So sánh phổ UV-VIS của pic MY trên (a) và pic có cùng thời gian lưu trên (c).

Kết quả cho thấy:

- Đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện một pic rõ ràng của MY tại thời gian lưu khoảng 16,3 phút.
- Đối với mẫu trắng, trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của MY.
- Đối với mẫu tự tạo, sắc ký đồ cho ta một pic tương ứng với pic của MY trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu và độ tương thích khi so sánh phổ UV-VIS (hệ số chồng phổ tại pic tương ứng là 0,9997), đồng thời pic MY được tách riêng khỏi các pic khác.

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính*

Để đánh giá khoảng tuyến tính, một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ MY chính xác thuộc khoảng 0,4-20,0 µg/ml trong hỗn hợp DMF-H₃PO₄ (95:5) được chuẩn bị và lọc qua màng lọc 0,45 µm. Các dung dịch chuẩn này được lần lượt tiêm vào hệ thống HPLC sử dụng các điều kiện đã lựa chọn ở trên. Kết quả đáp ứng trên sắc ký đồ (thông qua diện tích pic) cho thấy phương pháp phân tích đã xây dựng cho đáp ứng tuyến tính tốt với MY trong khoảng nồng độ phân tích từ 0,4 đến 20,0 µg/ml (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của Metanil yellow

STT	Nồng độ C (µg/ml)	Diện tích pic S (mAU.s)
1	0,4	25935
2	1	66750
3	2	129224
4	4	256215
5	8	489277
6	20	1189123

Phương trình hồi qui xác định được là: $S = 59116.C + 10639$ với hệ số tương quan r là 0,9999 và hệ số intercept tại nồng độ 100%: $Y = 4,15\%$

❖ *Độ chính xác*

Bảng 3.3. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của Metanil yellow trên mẫu tự tạo có nền sơn môi (MY01)

S T T	Ngày 1			Ngày 2		
	Lượng cân mẫu nền (g)	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (µg)	Lượng cân mẫu nền (g)	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (µg)
1	2,0164	30536	7,80	2,0221	31585	8,02
2	2,0072	31493	8,04	2,0432	31778	8,06
3	2,0010	31584	8,07	2,0090	31227	7,92
4	2,0112	31608	8,06	2,1021	31344	7,94
5	2,0340	31120	7,95	2,0922	31789	8,05
6	2,0150	31512	8,05	2,0502	31872	8,07
Trung bình			7,99			8,01
RSD (%)			1,31			0,8

Việc đánh giá độ chính xác của phương pháp được thực hiện trên 2 mẫu tự tạo, một mẫu dựa trên nền sơn môi (mẫu MY01: lượng MY cho vào ban đầu là 8,2µg), một mẫu trên nền sơn móng tay (mẫu MY02: lượng MY cho vào ban đầu là 8,0µg).

Mỗi mẫu tự tạo sẽ được chuẩn bị mẫu theo quy trình xử lý mẫu và phân tích theo điều kiện sắc ký đã chọn. Độ chính xác (gồm độ lặp lại trong ngày và khác ngày) của cả phương pháp sẽ được đánh giá qua kết quả hàm lượng MY thu được sau 6 lần phân tích độc lập của mỗi mẫu tự tạo.

Kết quả cụ thể được thể hiện trong các bảng 3.3 và 3.4.

Bảng 3.4. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của MY trên mẫu tự tạo có nền mẫu sơn móng tay (MY02)

S T T	Ngày 1			Ngày 2		
	Lượng mẫu nền (g)	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (μg)	Lượng mẫu nền (g)	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (μg)
1	2,0424	27255	6,84	2,0322	28729	7,06
2	2,0200	28042	7,04	2,0455	28990	7,12
3	2,0210	26989	6,77	2,0191	28535	7,01
4	2,0184	27338	6,86	2,1022	29021	7,13
5	2,0206	27287	6,85	2,1225	27585	6,78
6	2,0294	27555	6,92	2,0508	27995	6,88
Trung bình			6,88			7,00
RSD (%)			1,34			2,00

Kết quả lượng MY trung bình ($n=12$) tìm thấy trong mẫu tự tạo trên nền sơn môi MY01 là $8,00\mu\text{g}$ với RSD là 1,04% và trên nền sơn móng tay MY02 là $6,90\mu\text{g}$ với RSD là 1,50%.

❖ Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách so sánh lượng MY tìm lại được trong mẫu tự tạo so với lượng MY cho vào ban đầu ($8,2\mu\text{g}$ MY cho vào nền sơn môi MY01 và $8,0\mu\text{g}$ MY cho vào nền sơn móng tay MY02). Kết quả được tổng hợp tại bảng 3.5.

Kết quả thực nghiệm trên hai mẫu tự tạo cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, thể hiện qua giá trị RSD thấp sau 6 lần phân tích độc lập (1,31% với mẫu tự tạo trên nền sơn môi và 1,34% với mẫu tự tạo trên nền sơn móng tay). Về độ đúng, mẫu tự tạo trên nền sơn môi cho tỷ lệ thu hồi tốt hơn là 97,5% (từ 95,1% đến 98,4%). Tỷ lệ thu hồi trung bình trên mẫu tự tạo có nền sơn móng tay là 86,0% (dao động trong khoảng từ 84,8% đến 88,0%). Như vậy, trên cả hai loại nền mẫu mỹ phẩm, với lượng MY cho vào nền mẫu rất nhỏ (chỉ xấp xỉ $8\mu\text{g}$ tương ứng nồng độ $0,4\mu\text{g/ml}$), phương pháp

phân tích đã xây dựng thể hiện độ đúng tốt, phù hợp với mục đích của phương pháp là phát hiện MY có mặt trái phép trong sơn môi và sơn móng tay.

Bảng 3.5. Độ đúng của Metanil yellow trên 2 nền mẫu: sơn môi và sơn móng

S T T	Nền mẫu sơn môi (MY01)			Nền mẫu sơn móng (MY02)		
	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	S pic (mAU.s)	Lượng MY tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	30536	7,80	95,1	27255	6,84	85,5
2	31493	8,04	98,0	28042	7,04	88,0
3	31584	8,07	98,4	26989	6,77	84,6
4	31608	8,07	98,4	27338	6,86	85,8
5	31120	7,95	97,0	27287	6,85	85,6
6	31512	8,05	98,2	27555	6,92	86,5
Trung bình			97,5			86,0
RSD (%)			1,31			1,34

❖ *Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp được xác định qua thực nghiệm bằng cách phân tích các mẫu tự tạo trong nền mẫu mỹ phẩm có nồng độ MY chuẩn được thêm vào giảm dần. Kết quả thực nghiệm trên nền mẫu sơn móng tay MY02 cho thấy:

- Với nồng độ MY trong dung dịch mẫu thử tiêm sắc ký là 0,12µg/ml, pic MY trên sắc đồ cao hơn 3 lần so với nhiễu đường nền. Như vậy phương pháp có giới hạn phát hiện cho MY là 0,12 µg/ml (tương đương 1,2µg/g mẫu khi tiến hành xử lý mẫu theo qui trình).

- Với nồng độ MY trong dung dịch mẫu thử tiêm sắc ký là 0,4µg/ml, pic MY trên sắc đồ cao hơn 10 lần so với đường nền và tại nồng độ này độ chính xác, độ đúng của phương pháp vẫn đạt yêu cầu. Như vậy phương pháp có giới hạn định lượng cho MY là 0,4 µg/ml (tương đương 4,0 µg/g mẫu khi tiến hành xử lý mẫu theo qui trình).

Giới hạn phát hiện với Metanil yellow mà phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02 đưa ra là 3,0 µg/ml tính theo dung dịch chuẩn tiêm vào hệ thống sắc ký, như vậy qui trình này có giới hạn phát hiện thấp hơn tới 25 lần.

3.1.2. Rhodamin B

Đối tượng mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng với Rhodamin B (RB) là phấn mắt, phấn má, sơn móng, sơn nước, sơn thỏi.

Sử dụng 4 mẫu: phấn mắt Belove tím (được mã hóa là RB03), sơn móng Melia tím (được mã hóa là RB11), sơn nước Starshine 08 (được mã hóa là RB13), sơn thỏi

Essance RD201 (được mã hóa là RB15) được xác định sơ bộ là không chứa RB để làm nền mẫu trong thẩm định phương pháp và các nền mẫu được ký hiệu là N1 đến N4. Mẫu Lipgloss Zhoubang (được mã hóa là RB14) đã xác định sơ bộ là có hàm lượng RB khá lớn cũng được sử dụng trong thẩm định phương pháp.

3.1.2.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu

Thêm chính xác một lượng chuẩn RB vào nền mẫu N1 (đã xác định sơ bộ không chứa RB), trộn đều để được mẫu tự tạo có chứa RB với hàm lượng 20 μ g/g, lựa chọn các dung môi chiết mẫu cho thấy hỗn hợp acetonitril - nước (1:1) là dung môi chiết RB có nhiều ưu điểm hơn cả. Do vậy hỗn hợp này được chọn làm dung môi chiết mẫu.

❖ Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm

- Đối với các mẫu son và sơn móng: Cân chính xác một lượng khoảng 0,5g mẫu mỹ phẩm vào cốc có mỏ, dùng thìa thủy tinh phân tán mẫu đều trong cốc, dùng 15ml n-hexan chuyển dần toàn bộ lượng mẫu trong cốc (bao gồm cả tráng cốc) vào bình gạn. Thêm 25ml dung môi chiết mẫu vào bình gạn, lắc kỹ trong 30 phút, để lắng cho phân lớp, gạn lấy phần dung môi chiết mẫu (lớp dưới). Lọc qua giấy lọc, rồi lọc lại bằng màng lọc 0,45 μ m, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

- Đối với mẫu phấn mắt: Cân chính xác một lượng khoảng 0,5g mẫu mỹ phẩm vào bình nón nút mài dung tích 50ml, thêm 25,0 ml dung môi chiết mẫu lắc kỹ và chuyển vào ống ly tâm. Tiến hành ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc dịch ly tâm qua giấy lọc, lọc lại bằng màng lọc 0,45 μ m, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

❖ Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị một dung dịch RB chuẩn có nồng độ khoảng 1,2 μ g/ml trong dung môi chiết mẫu.

3.1.2.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Rhodamin B

❖ Điều kiện sắc ký:

Qua quá trình khảo sát đã chọn được điều kiện sắc ký tương đối phù hợp như sau:

- Pha tĩnh: cột Alltech, Grace RP18 (250x 4,6 mm; 5 μ m).
- Detector PDA: quét phổ UV-VIS từ 300-900 nm, lấy sắc ký đồ ở 550 nm.
- Pha động: ACN-THF-Dung dịch đệm pH 9,0 (2:3:5)
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 100 μ l.
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.

❖ Cách tiến hành:

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, quan sát thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Nếu sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có thời gian lưu và phổ UV-VIS giống với pic của RB trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn RB, hệ số chồng phổ tại pic này với pic MY lớn hơn 0,99 thì có thể kết luận mẫu thử có chứa RB.

3.1.2.3. Thẩm định phương pháp

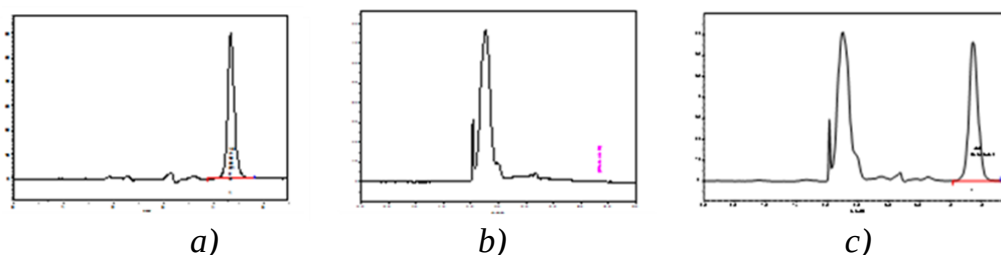
❖ Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu có nền mẫu khác nhau N1, N2, N3 và N4 với các điều kiện phân tích đã nêu. Các mẫu chuẩn và thử được chuẩn bị như sau:

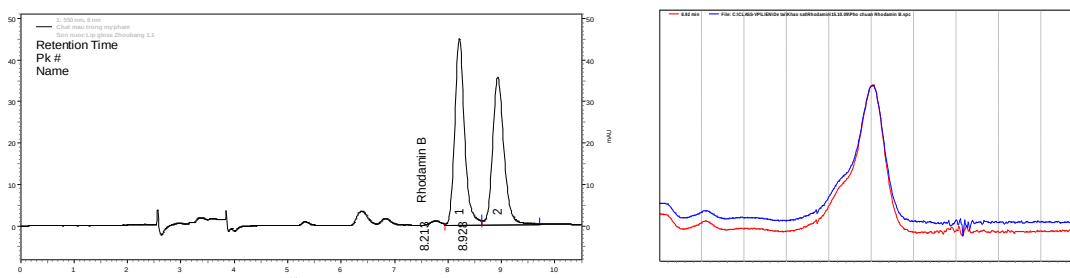
- Mẫu placebo: là các mẫu mỹ phẩm đã xác định sơ bộ là không chứa RB (nền N1, N2, N3 và N4) và được xử lý thích hợp theo từng dạng mẫu.
- Mẫu tự tạo: là các mẫu mỹ phẩm không chứa RB được trộn thêm một lượng chính xác RB chuẩn và xử lý phù hợp như đã nêu (thêm chuẩn RB vào các mẫu nền N1, N2, N3 và N4).
- Mẫu đã phát hiện có RB (mẫu RB14: Lipgloss Zhoubang).

Sắc ký đồ của các mẫu được chuẩn bị từ 4 nền mẫu như trên như ở hình 3.2:

- Đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện một pic rõ ràng của RB với thời gian lưu khoảng 8,9 phút (Hình 3.2.a).
- Đối với mẫu trắng, trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của RB (Hình 3.2.b).
- Đối với mẫu tự tạo, sắc ký đồ cho ta một pic tương ứng với pic của RB trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu, đồng thời được tách riêng khỏi các pic khác (Hình 3.2.c).



Hình 3.2. Sắc ký đồ của mẫu RB chuẩn (a), mẫu placebo với nền mẫu N2 (b) và mẫu tự tạo nền N2 có thêm chuẩn (c).



Hình 3.3. Sắc ký đồ mẫu RB14 và kết quả so sánh phổ UV-VIS của pic nghi ngờ với pic RB chuẩn.

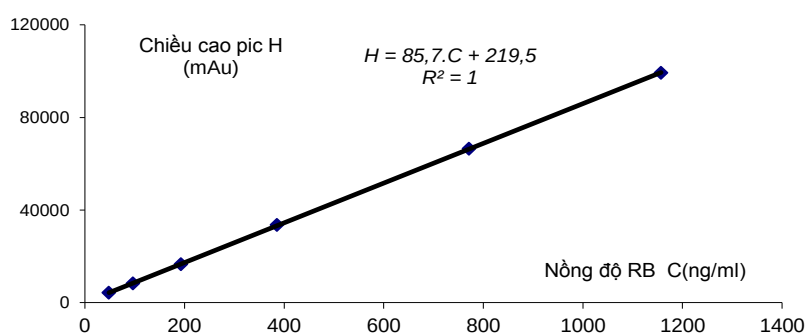
- Đối với mẫu phát hiện có RB (RB14), sắc ký đồ của dung dịch thử cho pic có cùng thời gian lưu với pic của dung dịch chuẩn RB và phổ UV-VIS trùng với phổ UV-VIS của dung dịch chuẩn RB, hệ số chồng phổ là 0,9949 (Hình 3.3).

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính*

Để đánh giá khoảng tuyến tính, một dãy dung dịch chuẩn RB trong dung môi chiết mẫu có nồng độ trong khoảng 0,048 -1,160µg/ml được chuẩn bị. Các dung dịch chuẩn này được lần lượt tiêm vào hệ thống HPLC với các điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả đáp ứng trên sắc ký đồ (thông qua chiều cao pic) cho thấy phương pháp phân tích đã xây dựng cho đáp ứng tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ phân tích của RB từ 50 đến 1150 ng/ml (Bảng 3.6). Phương trình đường chuẩn xác định được là: $H = 85712.C + 219,5$ với hệ số tương quan $r = 1$ và y-intercept là 1,32%.

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của RB

STT	Nồng độ RB C(ng/ml)	Chiều cao pic H (mAU)
1	48	4312
2	96	8343
3	193	16637
4	386	33582
5	771	66461
6	1157	99205



Hình 3.4. Sự phụ thuộc của chiều cao pic vào nồng độ RB

❖ *Độ chính xác*

Để tiến hành khảo sát độ chính xác, một lượng chính xác RB (2,0ml dung dịch RB chuẩn 8,7 µg/ml) được đưa vào các nền mẫu không có chất phân tích, trộn đều tạo mẫu tự tạo. Mẫu RB14 do khảo sát sơ bộ thấy có hàm lượng RB khá lớn nên không thêm chuẩn và được dùng đại diện luôn cho nền mẫu son nước (N3). Các mẫu được

tiến hành xử lý theo quy trình tương ứng và phân tích 6 lần độc lập theo điều kiện đã xác định.

Độ chính xác của phương pháp sẽ được đánh giá qua kết quả hàm lượng RB thu được sau 6 lần phân tích độc lập các mẫu RB14 và mẫu tự tạo trong cùng một ngày và khác ngày như ở bảng 3.7 và bảng 3.8.

Kết quả định lượng RB trung bình trên nền mẫu RB14 ($n = 12$) là $20,2 \mu\text{g/g}$ với RSD là 1,65% và lượng tìm lại RB trung bình trên nền mẫu N1 ($n = 12$) là $17,34 \mu\text{g}$ với RSD là 1,20%. Kết quả trên cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt cả trong từng ngày và khác ngày phân tích trên các nền mẫu đã khảo sát (RSD = 1,65% với mẫu son đã phát hiện được có chứa RB và 1,2% với nền mẫu tự tạo). Như vậy phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu để định tính, định lượng RB.

Bảng 3.7. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của RB trên nền mẫu RB14 (phát hiện có Rhodamin B)

S T T	Ngày 1			Ngày 2		
	Lượng mẫu nền (g)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng RB ($\mu\text{g/g}$)	Lượng mẫu nền (g)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng RB ($\mu\text{g/g}$)
1	0,5132	35847	19,80	0,5145	36002	19,90
2	0,5579	36049	19,91	0,5307	37348	20,64
3	0,5209	35377	19,54	0,5405	37055	20,48
4	0,5383	37092	20,49	0,5528	36502	20,18
5	0,5326	36886	20,37	0,5411	36543	20,20
6	0,5240	36155	19,97	0,5323	35990	19,89
Trung bình			20,1			20,22
RSD (%)			1,77			1,50

Bảng 3.8. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của RB trên nền mẫu N1

S T T	Ngày 1			Ngày 2		
	Lượng mẫu nền (g)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng RB tìm lại (μg)	Lượng mẫu nền (g)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng RB tìm lại (μg)
1	0,5105	63757	17,28	0,5012	63556	17,20
2	0,5227	62931	17,51	0,5255	61981	17,64
3	0,5112	63456	17,36	0,5300	62965	17,36
4	0,5224	62591	17,60	0,5123	63352	17,26
5	0,5307	64963	16,96	0,5234	63405	17,24
6	0,5290	64351	17,12	0,5139	62224	17,57
Trung bình			17,31			17,38
RSD (%)			1,38			1,06

❖ Độ đúng

Để tiến hành khảo sát độ đúng, các mẫu nền N1, N2 và N4, sẽ được lần lượt thêm 3 lượng chính xác khác nhau (1,0ml, 2,0ml và 3,0ml dung dịch RB chuẩn có

nồng độ 4,35 µg/ml) vào nền mẫu trước khi được tiến hành xử lý mẫu theo quy trình tương ứng. Phân tích các mẫu thử theo điều kiện đã xác định.

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách so sánh lượng RB tìm lại được trong mẫu tự tạo so với lượng RB cho vào các nền mẫu N1, N2 và N4 (Bảng 3.9).

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ đúng trên các nền mẫu có thêm chất chuẩn và mẫu có chứa RB

TT	Mẫu mỹ phẩm sử dụng (Nền mẫu)	Tỷ lệ tìm lại (%)	RSD (%)
1	RB03 (N1)	99,7	1,99
2	RB11 (N2)	86,8	1,17
3	RB15 (N4)	99,2	1,85
4	RB14	-	1,65

Kết quả thực nghiệm trên 3 mẫu thêm chuẩn và mẫu RB14 cho thấy, phương pháp có độ lặp lại khá cao, thể hiện qua giá trị RSD thu được sau 6 lần phân tích độ lặp khá nhỏ (1,17 - 1,99%). Phương pháp cũng cho độ đúng tương đối tốt, thể hiện qua tỷ lệ tìm lại đạt được khoảng 86,0 - 99,8%. Như vậy, trên tất cả các loại nền mẫu mỹ phẩm nghiên cứu, phương pháp phân tích xây dựng đã thể hiện độ đặc hiệu và độ đúng tốt, phù hợp với mục đích của phương pháp là phát hiện RB có mặt trái phép trong phấn mắt, son móng và son môi.

❖ Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp được xác định qua thực nghiệm bằng cách phân tích các mẫu tự tạo trong nền mẫu mỹ phẩm có nồng độ RB chuẩn được thêm vào giảm dần. Kết quả thực nghiệm cho thấy khi nồng độ RB trong dung dịch mẫu thử tiệm sát ký là 0,04 µg/ml, pic RB trên sắc đồ cao hơn 3 lần so với nhiễu đường nền. Như vậy phương pháp có LOD đối với RB là 0,04 µg/ml. Tương ứng với các quy trình xử lý mẫu đã nêu (lượng cân mẫu khoảng 0,5g, thể tích pha loãng 25ml) thì giới hạn phát hiện trên mẫu là khoảng 2,0 µg/g chế phẩm.

Kết quả kiểm tra lại trên các nền mẫu với lượng thêm vào mẫu để có được nồng độ RB ở giới hạn phát hiện, các mẫu đều cho pic RB phát hiện được.

3.1.3. Pigment red 53

Đối tượng nghiên cứu với Pigment red 53 (RR) là 20 mẫu mỹ phẩm (được ký hiệu PR01-PR20) gồm: 7 mẫu son nước, 7 mẫu son rắn và 6 mẫu phấn má.

Sử dụng 3 mẫu (được xác định sơ bộ không có PR) để xây dựng, thẩm định phương pháp là son nước Lipgloss 3D 06 Zhoubang (PR07), son thỏi Rose Lady 109

VOV Moisturizing coloring effect (PR10) và phấn má Color Song Blusher 04 VOV cosmetic Co Ltd., Korea (PR17).

3.1.3.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu

Sau khi khảo sát sơ bộ với một số dung môi hoà tan mẫu như: ethanol, acetonitril, aceton, cloroform, methanol, dicloromethan, dimethylsulfoxid, hỗn hợp dimethylsulfoxid - acid phosphoric (95:5), dimethylsulfoxid được chọn vì dung môi này hoà tan được hoạt chất cần phân tích và loại được nhiều thành phần khác trong các mẫu son và phấn má với qui trình xử lý mẫu đơn giản dễ thực hiện.

❖ Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm:

- Với đối tượng mẫu son nước, son rắn: cân chính xác khoảng 0,5 g chế phẩm vào cốc 50ml, thêm 1ml tetrahydrofuran, dùngũa thuỷ tinh khuấy kỹ cho tới khi chế phẩm phân tán hoàn toàn, thêm 10 ml dimethylsulfoxid khuấy kỹ, lắc siêu âm 10 phút, chuyển sang bình định mức 20 ml và thêm dimethylsulfoxid vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 5 ml dịch lọc đầu. Hút 5,0 ml dịch lọc vào bình định mức 25 ml. Thêm pha động vừa đủ đến vạch. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

- Với đối tượng mẫu phấn: cân chính xác khoảng 0,5 g chế phẩm vào bình định mức 20ml, thêm 15ml dimethylsulfoxid lắc siêu âm 10 phút, thêm dimethylsulfoxid vừa đủ đến vạch. Lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 5ml dịch lọc đầu. Hút 5,0ml dịch lọc vào bình định mức 25ml. Thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

❖ Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Dung dịch đối chiếu: Cân chính xác khoảng 50 mg chất chuẩn PR vào bình định mức 100 ml. Thêm 40 ml dimethylsulfoxid lắc siêu âm 10 phút, thêm dimethylsulfoxid vừa đủ đến vạch, lắc. Hút 2,0 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml, thêm dimethylsulfoxid vừa đủ đến vạch, lắc. Hút 3,0 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml, thêm 7 ml dimethylsulfoxid, và thêm pha động vừa đủ đến vạch. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm vào cột sắc ký.

3.1.3.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Pigment red 53 bằng HPLC

Triển khai thử nghiệm, điều kiện sắc ký được chọn như sau:

- Cột Apollo C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).
- Detector PDA quét phổ trong dải bước sóng từ 200 đến 800 nm, lấy sắc ký đồ ở bước sóng 490 nm.
- Pha động: methanol - đệm pH 6,2 (65 : 35), thay đổi tỷ lệ nếu cần.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

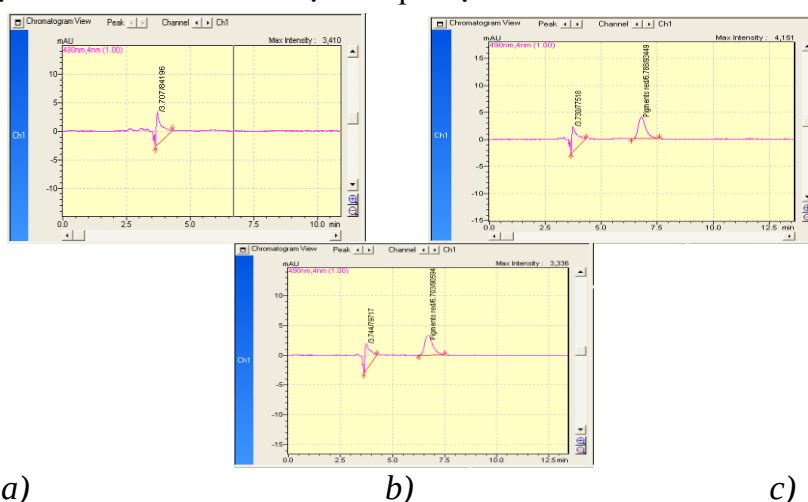
- Nhiệt độ cột: 30 °C.

Dung dịch đệm pH 6,2 được chuẩn bị bằng cách dùng acid acetic 30% thêm vào dung dịch triethylamin 3 mM trong nước để điều chỉnh về pH 6,2. Lọc bằng bộ lọc dung môi, màng lọc 0,45 μm .

3.1.3.3. Thẩm định phương pháp

❖ **Độ đặc hiệu** : Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn để phân tích các mẫu (được xử lý theo qui trình đã nêu) gồm:

- Mẫu trắng: mẫu mỹ phẩm không chứa PR (PR07).
- Mẫu tự tạo: mẫu mỹ phẩm không chứa PR (PR07) được trộn với một lượng chính xác PR chuẩn và xử lý theo qui trình để được dung dịch cuối cùng tiêm sắc ký có nồng độ 1,2 $\mu\text{g/ml}$.
- Mẫu dung dịch chuẩn PR: chuẩn bị như qui định nêu trên.



Hình 3.5. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), dung dịch chuẩn PR (b) và mẫu tự tạo (c)

Kết quả thu được như ở hình 3.5, cho thấy:

- Đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện một pic rõ ràng của PR.
- Đối với mẫu trắng, trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của PR.
- Đối với mẫu tự tạo, sắc ký đồ cho ta một pic tương ứng với pic của PR trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu, độ tương thích khi so sánh phổ UV-VIS, đồng thời được tách riêng khỏi các pic khác.
- Thời gian lưu t_R : Thời gian lưu của pic trong mẫu thử giống thời gian lưu của pic trong mẫu chuẩn (khoảng 7 phút).
- Phổ UV -VIS: Chồng phổ ở dải sóng từ 220-600 nm, phổ của dung dịch chuẩn và phổ của



dung dịch thử đạt bước sóng cực đại ở 490 nm và hệ số similarity là 0,9954 (Hình 3.6).

Hình 3.6. Kết quả so sánh phổ UV-VIS của pic PR trên mẫu chuẩn và mẫu tự tạo

Các kết quả trên cho thấy phương pháp đủ độ đặc hiệu để xác định PR.

❖ *Khoảng tuyến tính*

Để đánh giá khoảng tuyến tính, chúng tôi chuẩn bị một dãy 7 dung dịch PR chuẩn trong dimethylsulfoxid - pha động (20 : 80) có nồng độ như ở bảng 3.10. Tiến hành phân tích theo điều kiện sắc ký như mục 3.1.3.2. Kết quả thu được cho thấy trong khoảng nồng độ 1,2 – 7,7 µg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ PR. Phương trình đường chuẩn thu được là: $S = 54105,5.C - 2108,31$, với hệ số tương quan r là 0,9997 và y-intercept là 1,4%.

Bảng 3.10. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của Pigment red 53

Dung dịch	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ C (µg/ml)	1,157	1,542	2,314	2,892	3,856	5,784	7,712
Diện tích pic S(mAu.s)	56415	83537	120814	155739	211317	310885	413030

❖ *Độ lặp lại - Độ đúng:*

Việc đánh giá độ lặp lại và độ đúng được thực hiện đồng thời trên 3 mẫu tự tạo: trên nền son nước (PR07), trên nền son rắn (PR10), trên nền phấn má (PR17). Một lượng chính xác PR chuẩn được đưa vào nền mẫu mỹ phẩm. Mỗi mẫu tự tạo sẽ được tiến hành xử lý theo qui trình và phân tích theo điều kiện đã được chọn với 6 lần phân tích độc lập. Độ lặp lại của cả phương pháp được đánh giá qua kết quả hàm lượng PR các lần phân tích độc lập trong mẫu tự tạo. Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách so sánh lượng PR tìm lại được trong mẫu tự tạo so với lượng PR cho vào ban đầu. Kết quả được trình bày ở các bảng 3.11 đến bảng 3.13.

Kết quả thực nghiệm trên 3 loại mẫu tự tạo cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt qua 6 lần phân tích độc lập (đều có RSD thấp, dao động từ 0,65% đến 1,39%). Tỷ lệ thu hồi PR trên cả 3 loại nền mẫu đều cao (99,43% đến 101,09%). Như vậy, phương pháp phân tích xây dựng đã thể hiện độ lặp lại, độ đúng tốt, phù hợp với mục đích của phương pháp là phát hiện PR có mặt trái phép trong son và phấn má.

Bảng 3.11. Khảo sát độ đúng, độ lặp lại trên nền mẫu son nước (PR07) có thêm chuẩn

TT	Lượng mẫu nền (g)	Lượng PR thêm vào (µg)	Lượng PR tìm lại được (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5134	134,52	135,18	100,49

2	0,4997	134,52	136,28	101,31
3	0,5544	134,52	135,92	101,04
4	0,5769	134,52	132,96	98,84
5	0,4775	134,52	138,70	103,10
6	0,5011	134,52	136,86	101,75
Trung bình				101,09
RSD (%)				1,39

Bảng 3.12. Khảo sát độ đúng, độ lặp lại trên nền mẫu sơn rắn (PR10) có thêm chuẩn

TT	Lượng mẫu nền (g)	Lượng PR thêm vào (μg)	Lượng PR tìm lại được (μg)	Tỉ lệ thu hồi (%)
1	0,5553	67,26	66,72	99,20
2	0,4968	67,26	67,07	99,72
3	0,5517	112,10	110,29	98,38
4	0,4861	112,10	111,68	99,63
5	0,4776	224,20	223,29	99,59
6	0,4910	224,20	224,91	100,32
Trung bình				99,47
RSD (%)				0,65

Bảng 3.13. Khảo sát độ đúng - độ lặp lại với PR trên nền mẫu tự tạo

TT	Nền mẫu mỹ phẩm sử dụng	Đánh giá độ lặp lại qua RSD (%)	Đánh giá độ đúng qua tỷ lệ tìm lại (%)
1	PR07	1,39	101,09
2	PR10	0,65	99,47
3	PR17	0,97	99,43

❖ *Giới hạn phát hiện- Giới hạn định lượng*

Dung dịch mẫu tiêm sắc ký có nồng độ PR là 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cho đáp ứng pic của PR gấp 3 lần so với nhiễu đường nền. Nên giới hạn phát hiện PR của phương pháp xác định được là 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tương ứng với 80 $\mu\text{g}/\text{g}$ mẫu mỹ phẩm).

Dung dịch mẫu tiêm sắc ký có nồng độ PR là 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cho đáp ứng pic của PR gấp 10 lần so với nhiễu đường nền. Nên giới hạn định lượng với PR của phương pháp xác định được là 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tương ứng với 240 $\mu\text{g}/\text{g}$ mẫu mỹ phẩm).

3.1.4. Pigment orange 5

Đối tượng mẫu mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng với Pigment orange 5 (PO) là son môi, son móng.

3.1.4.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu:

Sau khi khảo sát một số dung môi chiết mẫu như: methanol, dicloromethan... chúng tôi thấy hỗn hợp dung môi N,N - dimethyl formamid và acid phosphoric (95:5) là hệ dung môi phù hợp vì hoà tan được hoạt chất cần phân tích (hiệu suất chiết cao) và loại được nhiều thành phần khác có trong các nền mẫu. Tuy nhiên, với mẫu son dạng thỏi, cần dùng dicloromethan để phân tán mẫu trước khi chiết bằng dung môi pha mẫu

Qui trình xử lý mẫu: cân chính xác khoảng 0,5 g chế phẩm vào cốc có mỏ 20 ml (thêm 2 ml dicloromethan với nền mẫu là son dạng thỏi), dùng thìa thuỷ tinh khuấy cho mẫu phân tán đều, thêm 10 ml DMPM, khuấy kỹ, lắc siêu âm khoảng 10 phút, chuyển vào bình định mức 20,0 ml. Tráng, rửa cốc rồi chuyển vào bình định mức, thêm vừa đủ tới vạch bằng DMPM. Lọc qua giấy lọc, lọc lại qua màng lọc 0,45 µm.

3.1.4.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Pigment orange 5

Để khắc phục những nhược điểm và khó khăn khi sử dụng phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02, cần tiến hành khảo sát, chọn lựa điều kiện sắc ký phù hợp hơn. Sau quá trình đánh giá sơ bộ điều kiện phân tích được chọn lựa như sau:

❖ *Điều kiện sắc ký:*

- Pha tĩnh: Cột Apollo C18 (250×4,6 mm; 5 µm).
- Pha động: Methanol – Dung dịch đệm pH 6,2 (85:15).
- Bước sóng lấy sắc đồ: 490 nm.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Nhiệt độ phân tích: 30°C

Dung dịch đệm pH 6,2 được chuẩn bị như sau: Pha dung dịch triethylamin 3mM trong nước, dùng acid acetic 30% chỉnh về pH 6,2. Lọc bằng bộ lọc dung môi với màng lọc 0,45 µm.

❖ *Tiến hành:*

Tiêm riêng biệt dung dịch thử, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký sử dụng các điều kiện ở trên. Tiến hành sắc ký khoảng 12-15 phút. Ghi lại sắc ký đồ.

So sánh thời gian lưu và xác định hệ số similarity của pic nghi ngờ là Pigment orange 5 thu được từ mẫu thử và phổ của pic Pigment orange 5 từ mẫu chuẩn để nhận diện các pic.

3.1.4.3. Thẩm định phương pháp

❖ *Đánh giá độ đặc hiệu:*

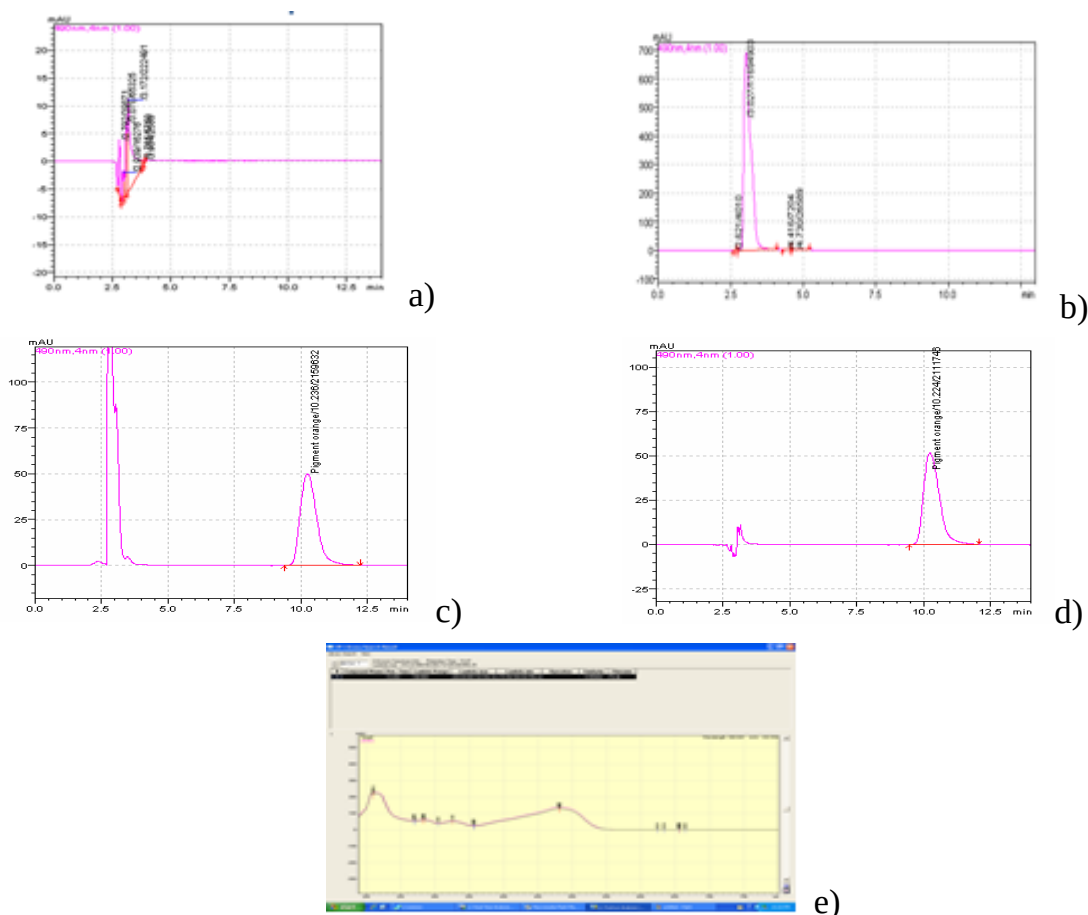
Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn, tiến hành phân tích các mẫu sau:

- Mẫu trắng: Mẫu mỹ phẩm không chứa PO được xử lý theo qui trình tương ứng và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn (PO01, PO02, PO03).

- Mẫu tự tạo: cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu thử không chứa PO, thêm một lượng chính xác chất chuẩn PO (Pha loãng dung dịch đối chiếu gốc với DMPM để thu được dung dịch đối chiếu có nồng độ khoảng 22 $\mu\text{g/ml}$, lấy 2 ml dung dịch này để thêm vào mẫu), xử lý mẫu và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu. Tiến hành trên 3 nền mẫu khác nhau.

- Mẫu chuẩn: Chuẩn bị dung dịch chuẩn có nồng độ 2,2 $\mu\text{g/ml}$.

Sắc ký đồ của các mẫu trên nền mẫu PO02 được trình bày ở hình 3.7.



Hình 3.7. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với PO

- a) SKĐ dung môi; b) SKĐ mẫu nền; c) SKĐ mẫu tự tạo cho thêm PO;
d) SKĐ mẫu chuẩn PO; e) Chồng phổ UV-VIS của pic PO của các mẫu c) và d)

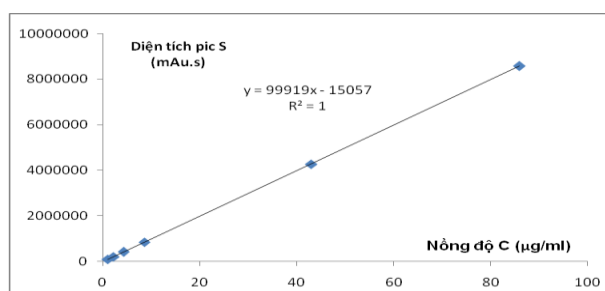
Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ mẫu chuẩn (3.7.d) xuất hiện rõ ràng một pic của PO (t_R khoảng 10,5 phút); trên sắc ký đồ mẫu trắng (3.7.a) không xuất hiện pic nào tương ứng với thời gian lưu của PO; trên sắc ký đồ mẫu tự tạo (3.7.c) xuất hiện rõ ràng

1 pic có thời gian lưu tương ứng của PO được tách riêng khỏi các pic khác trong nền mẫu. Khi so sánh phổ UV- VIS của pic này với pic thu được từ mẫu chuẩn, hệ số tương đương là 0,9953. Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu đối với PO.

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Bảng 3.14. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của Pigment orange 5

Dung dịch	1	2	3	4	5	6
Nồng độ C (µg/ml)	1,1	2,2	4,3	8,6	43	86
Diện tích pic S (mAu.s)	96578	207795	413252	842743	4277403	8580116



Hình 3.8. Sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ của Pigment orange 5

Phương trình hồi qui xác định được là: $S = 99919.C - 15057$ với hệ số tương quan $r = 1$ và hệ số y- intercept là 2,28%.

❖ *Đánh giá độ lặp lại:*

Bảng 3.15. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Mẫu	Lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Tỷ lệ tìm lại %
PO01	0,5255	207795	101,8
	0,5028	205065	100,5
	0,5195	205594	100,7
	0,5170	208336	102,1
	0,5206	202463	99,2
	0,5001	201802	98,9
	Trung bình		100,53
	RSD (%)		1,30
PO02	0,5002	209988	102,89
	0,5010	208353	102,09
	0,5040	204311	100,11
	0,5015	209130	102,47
	0,5090	204152	100,03
	0,5011	209379	102,59
	Trung bình		100,70
	RSD (%)		1,26
PO03	0,5017	202627	99,29
	0,5139	207019	101,44
	0,5030	205509	100,70
	0,5083	207399	101,62
	0,5002	199444	97,73
	0,5157	208162	101,99

	Trung bình	100,46
	RSD (%)	1,64

Tiến hành trên 3 mẫu tự tạo: cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu, thêm chính xác khoảng 43µg chất chuẩn PO (thêm 2,0 ml dung dịch chuẩn PO 21,5 µg/ml) vào mỗi mẫu thử, trộn đều các mẫu để làm mẫu tự tạo, xử lý mẫu và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Với mỗi nền mẫu (PO01, PO02, PO03) tiến hành phân tích 6 lần mẫu độc lập. Song song tiến hành sắc ký một dung dịch mẫu chuẩn (không có nền mẫu) có nồng độ PO xấp xỉ mẫu thử. Tính giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) từ kết quả hàm lượng PO tìm được trong mẫu tự tạo sau 6 lần phân tích (Bảng 3.15).

Độ lệch chuẩn tương đối sau 6 lần phân tích trên 3 nền mẫu khác nhau có RSD đều dưới 2%. Như vậy phương pháp phân tích có độ lặp lại tốt ở vùng giới hạn định lượng (2,1 µg/ml) với mẫu mỹ phẩm có nền phức tạp.

❖ **Độ đúng:**

Cân chính xác khoảng 0,5g mẫu thử không chứa PO cho mỗi mẫu, thêm một lượng chính xác chất chuẩn PO vào mẫu thử. Mỗi mẫu thử thêm 3 mức, mỗi mức tiến hành 3 mẫu. Xử lý mẫu theo qui trình phân tích ở mục 3.1.4.1., chạy sắc ký theo qui trình phân tích ở mục 3.1.4.2. Kết quả được thể hiện ở các bảng 3.16 đến 3.18

Bảng 3.16. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp trên nền mẫu PO02

STT	Khối lượng mẫu (g)	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5186	43	208336	43,8	102,1
2	0,5170	43	212463	44,6	104,1
3	0,5160	43	201802	42,6	98,9
4	0,5036	430	2255133	432,6	100,6
5	0,5069	430	2238279	429,2	99,8
6	0,5168	430	2252016	431,8	100,4
7	0,5095	1075	5513247	1096,6	102,0
8	0,5105	1075	5516812	1096,2	102,0
9	0,5141	1075	5537419	1100,8	102,4
Trung bình					101,3
RSD(%)					1,71

Bảng 3.17. Kết quả khả năng tìm lại của Pigment orange 5 trên mẫu PO01

STT	Khối lượng mẫu (g)	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5120	43	199130	42,0	97,6
2	0,5161	43	206152	43,4	101,0
3	0,5114	43	199379	42,1	97,7
4	0,5193	430	2150960	431,6	100,4
5	0,5116	430	2113558	424,4	98,7

6	0,5150	430	2159632	433,4	100,8
7	0,5111	1075	5412741	1096,0	102,0
8	0,5037	1075	5449971	1104,0	102,7
9	0,5132	1075	5425285	1098,6	102,2
Trung bình					100,3
RSD(%)					1,92

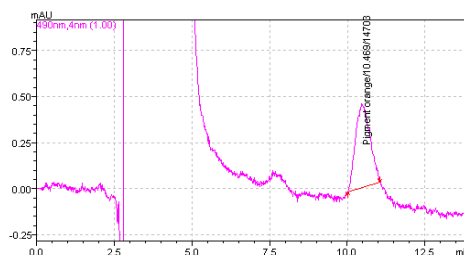
Bảng 3.18. Kết quả khả năng tìm lại của Pigment orange 5 trên mẫu PO03

STT	Khối lượng mẫu (gam)	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5083	43	202627	42,6	99,1
2	0,5065	43	207019	43,6	101,4
3	0,5017	43	205509	43,3	100,7
4	0,5012	430	2112331	434,3	101,0
5	0,5015	430	2099765	431,7	100,4
6	0,5026	430	2121137	436,0	101,4
7	0,5089	1075	5275556	1087,9	101,2
8	0,5093	1075	5348136	1103,0	102,6
9	0,5087	1075	5338031	1100,8	102,4
Trung bình					101,1
RSD (%)					1,04

Kết quả cho thấy khả năng tìm lại nằm trong khoảng từ 97,6- 104,1% với độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 2% (RSD từ 1,04 đến 1,92%) là phương pháp có độ đúng tốt đối với chất có hàm lượng nhỏ trong mẫu và ở ngay giới hạn định lượng.

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng(LOQ):*

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất mà tín hiệu của máy vẫn đáp ứng được (gấp 3 lần so với nhiễu đường nền) để xác định giới hạn phát hiện. Giới hạn phát hiện xác định được là 0,65 µg/ml tính theo nồng độ Pigment orange 5 trong dung dịch tiêm sắc ký (26 µg/g mẫu mỹ phẩm), so với công bố trong phương pháp hòa hợp ASEAN ACM SIN 02 là 16 µg/ml, giới hạn phát hiện của qui trình này thấp hơn gần 25 lần. Kết quả thể hiện ở hình 3.9.



Hình 3.9. Sắc ký đồ dung dịch ở giới hạn phát hiện 0,65 $\mu\text{g/ml}$ (26 $\mu\text{g/g}$ chế phẩm)

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất (tín hiệu máy cho đáp ứng gấp 10 lần so với nhiễu đường nền) mà xác định được Pigment orange 5 với độ lặp lại và độ đúng chấp nhận được để xác định giới hạn định lượng. Giới hạn định lượng thu được là 2,15 $\mu\text{g/ml}$ tính theo nồng độ Pigment orange 5 trong dung dịch tiêm sắc ký.

3.1.5. Crystal violet

Đối tượng mẫu mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng với Crystal violet (CV) là son môi, son móng, phấn mắt.

3.1.5.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu:

Qua khảo sát chọn được dung môi chiết mẫu: cho son môi và son móng là hỗn hợp acetonitril - tetrahydrofuran - dung dịch đệm amoniac pH 9,5-10,0 (2:3:5); cho phấn mắt là hỗn hợp acetonitril - dung dịch đệm amoniac pH 9,5-10,0 (2:5)

Dung dịch đệm amoniac pH 9,5-10,0 chuẩn bị theo Dược điển Việt nam IV.

❖ Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm

- Đối với mẫu son môi và son móng:

Cân chính xác một lượng khoảng 0,5 g mẫu mỹ phẩm vào cốc có mỏ 10ml, dùng thìa thủy tinh phân tán mẫu đều trong cốc, dùng 7,5 ml tetrahydrofuran, chuyển dần toàn bộ lượng mẫu trong cốc vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm 10 ml hỗn hợp acetonitril - dung dịch đệm amoniac pH 9,5-10,0 (2: 5), lắc kỹ, thêm hỗn hợp dung môi này vừa đủ đến vạch và chuyển vào ống ly tâm. Tiến hành ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc dịch ly tâm qua giấy lọc, rồi lọc lại bằng màng lọc 0,45 μm , lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

- Đối với mẫu phấn mắt:

Cân chính xác một lượng khoảng 0,5 g mẫu mỹ phẩm vào bình nón nút mài dung tích 50 ml, thêm 25,0 ml dung môi chiết mẫu, lắc kỹ và chuyển vào ống ly tâm. Tiến hành ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc dịch ly tâm qua giấy lọc, rồi lọc lại bằng màng lọc 0,45 μm , lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

❖ Dung dịch chuẩn:

Pha một dung dịch chuẩn Crystal violet trong dung môi chiết mẫu để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,8 µg/ml.

3.1.5.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Crystal violet

❖ Điều kiện sắc ký:

Qua quá trình khảo sát đã chọn lựa được các thông số của hệ thống sắc ký như sau:

- Cột Alltech RP18 (250x 4,6 mm; 5 µm) hoặc cột có tính năng tương đương.
- Detector PDA đặt trong dải bước sóng từ 300 - 900 nm, lấy sắc ký đồ ở 590 nm.
- Pha động: acetonitril - tetrahydrofuran - dung dịch đệm pH 9,0 (20:30:50).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 100 µl.
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.

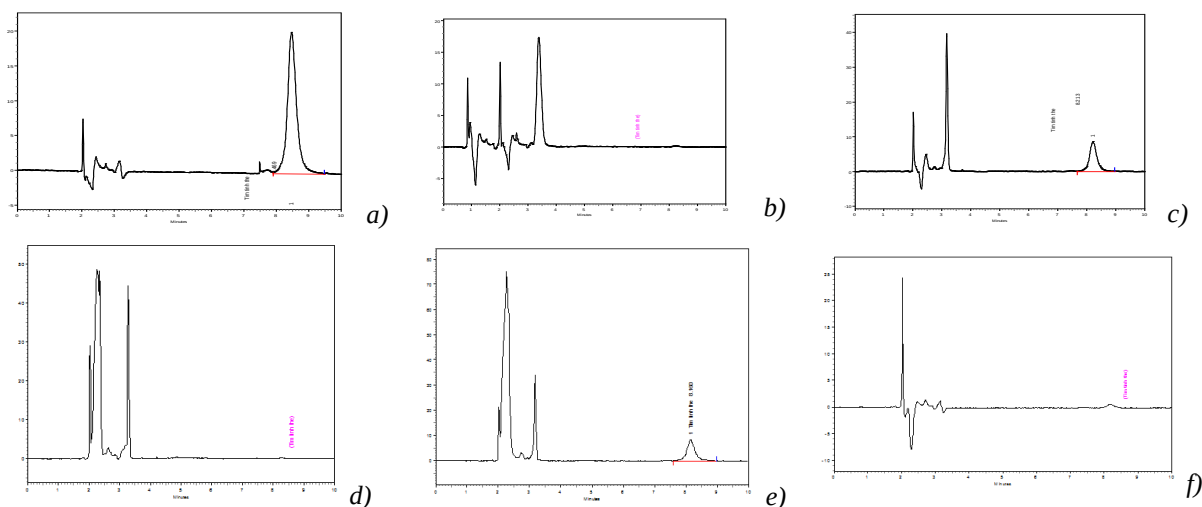
Dung dịch đệm pH 9,0 được chuẩn bị như sau: Cân 1,4 g acid citric và 6,8g tetrabutylammonium hydroxyd 40%, hòa tan trong 1 lít nước, điều chỉnh pH của dung dịch về 9,0 bằng dung dịch amoniac đậm đặc.

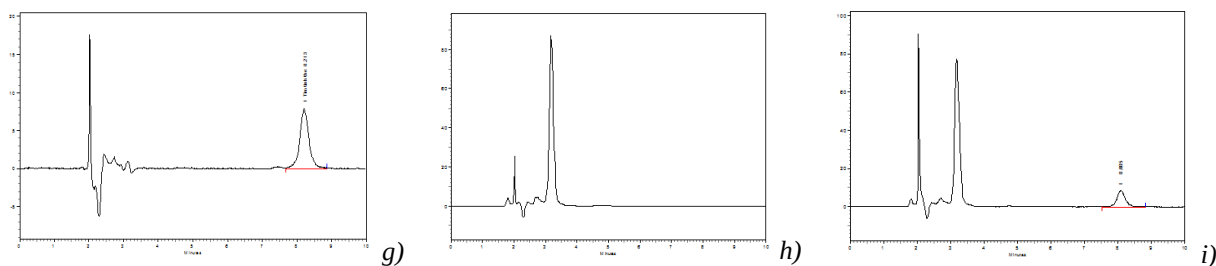
❖ Tiến hành:

Sắc ký mẫu thử và mẫu chuẩn trong điều kiện sắc ký đã lựa chọn. So sánh thời gian lưu và tính hệ số similarity của pic Crystal violet thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn Crystal violet.

3.1.5.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Sử dụng 4 mẫu mỹ phẩm được kiểm tra sơ bộ không chứa Crystal violet là son nước Starshine 08 (CV13, nền N1), son thỏi Essance RD201(CV15, nền N2), son móng Melia tím (CV11 nền N3) và phấn mắt Belove tím (CV03, nền N4) trong thẩm định phương pháp và các mẫu này được đặt tên là mẫu trắng.





Hình 3.10. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu với Crystal violet

Dung dịch chuẩn Crystal violet: a)

Mẫu sơn nước Starshine 08 (CV13): b) trắng (nền N1) và c) tự tạo

Mẫu Sơn thỏi Essance RD201(CV15): d) trắng (nền N2) và e) tự tạo;

Mẫu Sơn móng Melia tím (CV11): f) trắng (nền N3) và g) tự tạo;

Mẫu phấn mắt Belove tím (CV03): h) trắng (nền N4) và i) tự tạo.

❖ *Độ đặc hiệu:*

Sử dụng các điều kiện phân tích đã chọn, tiến hành phân tích các mẫu sau:

- Mẫu trắng: mẫu mỹ phẩm không chứa CV được chuẩn bị theo quy trình xử lý mẫu
- Mẫu tự tạo: mẫu mỹ phẩm không chứa CV được trộn thêm một lượng chính xác CV chuẩn và xử lý mẫu theo quy trình.
- Dung dịch chuẩn CV có nồng độ khoảng 0,8 µg/ml.

Các sắc ký đồ thu được như ở hình 3.10, cho thấy:

- Đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện một pic rõ ràng của CV với thời gian lưu khoảng 8,6 phút (Hình 3.10.a)
- Đối với mẫu trắng, trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của CV (Hình 3.10.b, 3.10.d, 3.10.f và 3.10.h).
- Đối với mẫu tự tạo, sắc ký đồ cho ta một pic tương ứng với pic của CV trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu (Hình 3.10.c, 3.10.e, 3.10.g và 3.10.i) và độ tương thích khi so sánh phổ UV-VIS, đồng thời được tách riêng khỏi các pic khác

❖ *Độ lặp lại và độ đúng:*

Để khảo sát độ lặp lại, các nền mẫu từ N1 đến N4, một lượng chính xác CV được đưa vào nền mẫu mỹ phẩm được tiến hành xử lý trực tiếp trên mẫu theo quy trình chuẩn bị mẫu và phân tích theo điều kiện sắc ký đã chọn trong 6 lần độc lập. Cụ thể là lấy chính xác 2,0 ml dung dịch CV chuẩn có nồng độ 4,24 µg/ml cho vào khoảng 0,5 g mỗi mẫu mỹ phẩm trước khi xử lý mẫu theo quy trình.

Để khảo sát độ đúng, lần lượt thêm 3 lượng chuẩn chính xác khác nhau vào các nền mẫu từ N1 đến N4, rồi tiến hành xử lý mẫu theo quy trình và phân tích theo điều kiện đã chọn. Cụ thể là thêm lần lượt 1,0ml; 2,0ml và 3,0ml dung dịch CV chuẩn 4,24 µg/ml vào khoảng 0,5 g mỗi mẫu mỹ phẩm trước khi xử lý mẫu theo quy trình.

Độ lặp lại của cả phương pháp sẽ được đánh giá qua kết quả hàm lượng CV thu được sau 6 lần phân tích độc lập mẫu tự tạo. Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách so sánh lượng CV tìm lại được trong mẫu tự tạo so với lượng CV cho vào ban đầu. Kết quả thực hiện trên 4 nền mẫu được thể hiện trong các bảng 3.19 đến 3.22.

Kết quả thực nghiệm trên cả 4 mẫu cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, thể hiện qua giá trị RSD thấp (0,73 - 2,03%) sau 6 lần phân tích độc lập: 1,65% (N1); 2,03% (N2); 1,77% (N3) và 0,73% (N4). Về độ đúng, cho tỷ lệ thu hồi tốt (94,0-101,3%): 101,3% (N1), 97,9% (N2), 94,0% (N3) và 100,7% (N4).

Như vậy, trên cả 4 loại nền mẫu mỹ phẩm, với lượng Crystal violet cho vào nền mẫu rất nhỏ (chỉ xấp xỉ 4 đến 14 µg), phương pháp phân tích xây dựng đã thể hiện độ đúng tốt, phù hợp với mục đích của phương pháp là phát hiện Crystal violet có mặt trái phép trong son môi và son móng.

Bảng 3.19. Kết quả khảo sát độ lặp lại -và độ đúng trên mẫu nền N1 (CV13)

TT	Lượng cân mẫu nền (g)	Lượng CV thêm vào (µg)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng CV tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5012	8,48	417713	8,54	100,7
2	0,5015	8,48	420824	8,61	101,5
3	0,5026	8,48	411298	8,41	99,2
4	0,5089	8,48	431515	8,83	104,1
5	0,5093	8,48	425111	8,70	102,5
6	0,5087	8,48	423294	8,66	102,1
RSD (%)				1,65	
7	0,5083	4,24	221047	4,29	101,3
8	0,5065	12,68	589401	12,55	99,0
Tỷ lệ thu hồi trung bình					101,3

Bảng 3.20. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền N2 (CV15)

TT	Lượng cân mẫu nền (g)	Lượng CV thêm vào (µg)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng CV tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5120	8,48	456770	8,66	102,1
2	0,5061	8,48	435376	8,25	97,3

3	0,5114	8,48	439664	8,33	98,2
4	0,5093	8,48	431299	8,17	96,3
5	0,5116	8,48	430854	8,16	98,2
6	0,5150	8,48	436681	8,27	97,6
RSD (%)				2,03	
7	0,5037	4,24	215376	4,02	94,8
8	0,5132	12,68	658913	12,54	98,9
Tỷ lệ thu hồi trung bình					97,9

Bảng 3.21. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền N3 (CV11)

TT	Lượng cân mẫu nền (g)	Lượng CV thêm vào (µg)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng CV tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5070	8,48	424487	8,04	94,8
2	0,5160	8,48	433236	8,21	96,8
3	0,5036	8,48	420015	7,95	93,8
4	0,5069	8,48	431778	8,18	96,5
5	0,5168	8,48	425690	8,06	95,1
6	0,5095	8,48	413345	7,83	92,3
RSD (%)				1,77	
7	0,5086	4,24	27981	3,82	90,2
8	0,5078	12,68	86614	11,75	92,7
Tỷ lệ thu hồi trung bình					94,0

Bảng 3.22. Kết quả khảo sát độ đúng-độ lặp lại trên mẫu tự tạo nền 4 (CV03)

TT	Lượng cân mẫu nền (g)	Lượng CV thêm vào (µg)	Chiều cao pic (mAU)	Lượng CV tìm lại (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5027	8,48	403439	8,51	100,3
2	0,5039	8,48	409215	8,63	101,8
3	0,5130	8,48	402160	8,48	100,0

4	0,5083	8,48	402064	8,48	100,0
5	0,5065	8,48	405118	8,54	100,7
6	0,5087	8,48	407563	8,60	101,4
RSD (%)				0,73	
7	0,5061	4,24	208450	4,20	99,1
8	0,5114	12,68	590519	12,95	102,1
Tỷ lệ thu hồi trung bình					100,7

❖ *Giới hạn phát hiện:*

Giới hạn phát hiện được xác định qua thực nghiệm bằng cách phân tích các mẫu tự tạo trong nền mẫu mỹ phẩm có nồng độ CV chuẩn được thêm vào giảm dần. Kết quả thực nghiệm cho thấy:

Với nồng độ CV trong dung dịch mẫu thử tiêm sắc ký là 0,04 µg/ml, pic CV trên sắc đồ cao hơn 3 lần so với đường nền. Như vậy phương pháp có giới hạn phát hiện đối với CV là 0,04 µg/ml (dung dịch cuối cùng tiêm vào hệ thống sắc ký). Đối với quy trình xử lý và chuẩn bị mẫu đã xác định (lượng cân mẫu khoảng 0,5 g, thể tích pha loãng 25 ml) thì giới hạn phát hiện trên mẫu là khoảng 2,0 µg/g chế phẩm.

Kết quả khảo sát trên các nền mẫu từ N1 đến N4, với lượng thêm vào mẫu để có được nồng độ ở giới hạn phát hiện, các mẫu đều cho pic Crystal violet phát hiện được.

3.1.6. Các chất Sudan

Đối tượng nghiên cứu về các hợp chất Sudan là các mẫu son (son gió và son môi dạng thỏi) được thu thập trên thị trường.

3.1.6.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu:

Sau khi khảo sát trên một số hệ dung môi hoà tan mẫu: dicloromethan - acetonitril (1:1), dicloromethan - cloroform - acetonitril (2:1:3), methanol - cloroform (1:1), methanol - ethyl acetat (1:1), hệ dung môi methanol - ethyl acetat (1:1) được nhận thấy là hệ mà nhóm chất Sudan tan rất tốt, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất nên được chọn làm dung môi hòa tan mẫu.

❖ *Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm:*

Cân chính xác khoảng 1 gam mẫu vào bình nút mài 50 ml, thêm khoảng 10 ml dung môi hoà tan, đậy nắp bình, đặt trên cách thủy 5-10 phút ở 60 °C, lắc siêu âm 15 phút, ly tâm với tốc độ 3000-4000 vòng/phút trong 10 phút, để lạnh trong nước đá 30 phút để tủa phần tá được, lọc phần dung dịch qua giấy lọc. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, lấy dịch trong để tiêm vào cột sắc ký.

❖ *Dung dịch đối chiếu:*

Các chất chuẩn Sudan I và II được hoà tan riêng biệt trong methanol, Sudan III

và IV được hoà tan riêng biệt trong ethyl acetat để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,1 mg/ml để làm dung dịch đối chiếu gốc. Từ dung dịch đối chiếu gốc, pha loãng theo tỷ lệ thích hợp với dung môi hoà tan mẫu để thu được dung dịch đối chiếu hỗn hợp có nồng độ từng Sudan khoảng 1µg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm sắc ký.

3.1.6.2. Lựa chọn điều kiện phân tích các Sudan:

Sau quá trình khảo sát trên hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu, các điều kiện phân tích được chọn lựa như sau:

- Cột Apollo C18 hay Phenomenex C18 (4,6 x 250 nm; 5µm).
- Bước sóng lấy sắc ký đồ: 488 nm
- Pha động: methanol - nước (93:7)
- Lựa chọn tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Lựa chọn thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

3.1.6.3. Đánh giá phương pháp

❖ Đánh giá độ thích hợp hệ thống:

Tiêm 6 lần dung dịch đối chiếu hỗn hợp có nồng độ từng Sudan khoảng 1µg/ml vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ, kết quả thể hiện ở bảng 3.23.

Bảng 3.23. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký phân tích các Sudan

	Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV
Thời gian lưu (phút)	6,272	9,229	11,777	20,196
	6,272	9,228	11,774	20,237
	6,271	9,228	11,777	20,193
	6,277	9,233	11,785	20,226
	6,277	9,234	11,780	20,210
	6,275	9,239	11,784	20,173
	6,274	9,232	11,780	20,206
Trung bình RSD (%)	0,04	0,05	0,04	0,12
Diện tích pic (mAU.s)	69239	60662	82473	64875
	68605	61282	82380	63954
	68935	60378	82382	62763
	68810	61969	82419	63686
	69756	61408	83235	61869
	68498	60851	83103	63657
	68974	61092	82665	63467
Trung bình RSD (%)	0,67	0,94	0,48	1,63

Kết quả cho thấy, hệ sắc ký ổn định, đạt yêu cầu phân tích đồng thời 4 chất Sudan: các chất tách hoàn toàn, RSD của thời gian lưu nhỏ hơn 1% và RSD của diện tích pic nhỏ hơn 2%, độ phân giải lần lượt là 6,28; 3,98 và 9,12 và hệ số đối xứng pic lần lượt là 1,05; 1,02; 1,04 và 1,05 (Thể hiện trong phần phụ lục 1).

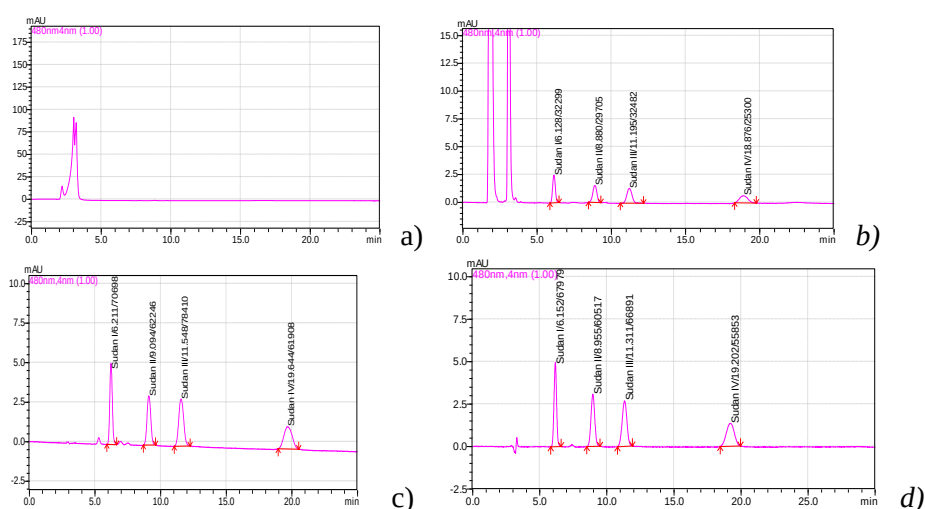
❖ Độ đặc hiệu:

Sử dụng các điều kiện phân tích đã chọn, tiến hành phân tích các mẫu sau:

- Mẫu trắng: dung môi pha mẫu
- Mẫu nền: mẫu mỹ phẩm không chứa Sudan được chuẩn bị theo quy trình xử lý mẫu
- Mẫu tự tạo: mẫu mỹ phẩm không chứa Sudan được trộn thêm một lượng chính xác các Sudan I, II, III, IV chuẩn và xử lý mẫu theo quy trình.
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp các Sudan I, II, III, IV có nồng độ khoảng 1 $\mu\text{g/ml}$.

Các sắc ký đồ thu được cho thấy:

- Đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ xuất hiện 4 pic được tách riêng biệt, rõ ràng của các Sudan I, II, III, IV.
- Đối với mẫu trắng: trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của các Sudan I, II, III, IV.
- Đối với mẫu nền mỹ phẩm: trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng với thời gian lưu của các Sudan I, II, III, IV.
- Đối với mẫu tự tạo, sắc ký đồ cho 4 pic tương ứng với các pic của các Sudan I, II, III, IV trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu và độ tương thích khi so sánh phổ UV-VIS, đồng thời được tách riêng khỏi các pic khác: Thời gian lưu của Sudan I; II; III và IV lần lượt là 6,2; 9,0; 11,3 và 19,2 phút. Kết quả thể hiện ở hình 3.11.



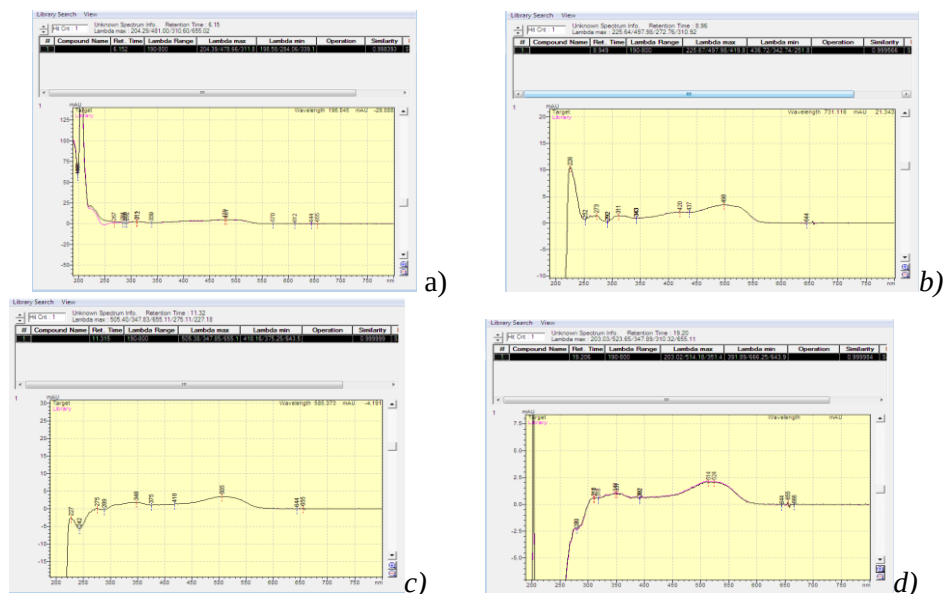
Hình 3.11. SKĐ của các dung dịch đánh giá độ đặc hiệu với Sudan

a) SKĐ dung dịch nền mẫu SD03,

b) SKĐ dung dịch tự tạo Sudan I, II, III, IV trên nền mẫu SD03

c) SKĐ dung dịch chuẩn của Sudan I, II, III, IV

d) SKĐ dung dịch thử tự tạo Sudan I, II, III, IV trên nền mẫu SD05.



Hình 3.12. Chồng phổ UV của các pic tương ứng trên SKD của dung dịch thử tự tạo và dung dịch chuẩn

a) Sudan I, b) Sudan II, c) Sudan III và d) Sudan IV

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu thể hiện rõ: mẫu nền không có pic nào có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của các pic Sudan, các pic Sudan trong mẫu tự tạo tách ra khỏi các pic trong nền mẫu, các pic này cũng tách hoàn toàn khỏi nhau và có thời gian lưu và phổ tương đương với các pic Sudan thu được từ dung dịch chuẩn (hệ số chồng phổ của các Sudan từ Sudan I đến Sudan IV lần lượt là: 0,9984; 0,9996; 0,9999 và 0,9999).

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Chuẩn bị các dãy dung dịch chuẩn như sau:

Sudan I: Pha dãy dung dịch chuẩn Sudan I có nồng độ từ 0,45 - 5,63 μ g/ml.

Sudan II: Pha dãy dung dịch chuẩn Sudan II có nồng độ từ 0,48 - 5,96 μ g/ml.

Sudan III: Pha dãy dung dịch chuẩn Sudan III có nồng độ từ 0,51 - 6,36 μ g/ml.

Sudan IV: Pha dãy dung dịch chuẩn Sudan IV có nồng độ từ 0,47 - 5,92 μ g/ml.

Tiến hành sắc ký theo điều kiện phân tích đã nêu trên và xử lý kết quả thể hiện ở bảng 3.24

Bảng 3.24. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của các Sudan

STT	Sudan I		Sudan II		Sudan III		Sudan IV	
	Nồng độ (μ g/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (μ g/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (μ g/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (μ g/ml)	S pic (mAU.s)
1	0,45	33742	0,48	30086	0,51	36510	0,47	28346
2	1,13	85944	1,19	76165	1,27	96956	1,18	80132
3	2,25	173395	2,39	154938	2,54	199321	2,37	164459
4	6,91	260154	3,58	238765	3,82	298971	3,55	250246

5	4,50	349719	4,77	321455	5,09	404581	4,74	337739
6	5,63	434611	5,96	399306	6,36	504327	5,92	427658
Phương trình hồi qui	$y = 77643x - 1266$		$y = 67777x - 3996$		$y = 80093x - 4710$		$y = 73066x - 7374$	
Hệ số tương quan r	1,0000		0,9999		1,0000		0,9999	
y-intercept (%)	1,47		5,2		4,9		9,2	

❖ *Độ lặp lại:*

Tiến hành trên 6 mẫu tự tạo độc lập

Dung dịch thử tự tạo: Cân chính xác khoảng 1g son không chứa Sudan I, II, III, IV vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ riêng từng Sudan khoảng 10 µg/ml, trộn đều. Thêm chính xác 9,0 ml dung môi pha mẫu, khuấy kỹ, đậy nắp bình, đặt trên cách thủy 5-10 phút ở 60 °C, lắc siêu âm 15 phút, ly tâm với tốc độ 3000-4000 vòng/phút trong 10 phút, làm lạnh trong nước đá 30 phút, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Kết quả thể hiện ở bảng 3.25 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt trên cả 2 nền mẫu khảo sát (RSD từ 0,59% đến 2,73%).

Bảng 3.25. Độ lặp lại của phương pháp trên các mẫu tự tạo có Sudan

Chất phân tích	Mẫu tự tạo trên nền mẫu SD03			Mẫu tự tạo trên nền mẫu SD05		
	Khối lượng mẫu nền (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (µg/g)	Khối lượng mẫu nền (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (µg/g)
Sudan I	1,0222	65542	0,8298	1,1441	67532	0,8549
	1,1545	65824	0,8333	1,1048	69014	0,8737
	1,0988	65286	0,8265	1,0236	67979	0,8606
	1,0743	65790	0,8329	1,0492	67984	0,8607
	1,1075	65479	0,8290	1,1377	68664	0,8693
	1,0541	66406	0,8407	1,1518	68512	0,8674
	Trung bình		0,8320	Trung bình		0,8666
	RSD (%)		0,59	RSD (%)		0,59
Sudan II	1,0222	60738	0,9165	1,1441	60773	0,9170
	1,1545	61949	0,9348	1,1048	61805	0,9326
	1,0988	61805	0,9326	1,0236	60517	0,9132
	1,0743	61888	0,9339	1,0492	60226	0,9088
	1,1075	61380	0,9262	1,1377	60042	0,9060
	1,0541	61890	0,9339	1,1518	59906	0,9040
	Trung bình		0,9297	Trung bình		0,9144
	RSD (%)		0,77	RSD (%)		1,20
Sudan III	1,0222	62110	0,8395	1,1441	66026	0,8924
	1,1545	62549	0,8454	1,1048	67683	0,9148
	1,0988	63314	0,8557	1,0236	66891	0,9041

	1,0743	63897	0,8636	1,0492	66555	0,8996
	1,1075	64531	0,8722	1,1377	67249	0,9089
	1,0541	63651	0,8603	1,1518	66555	0,8996
	Trung bình		0,8560	Trung bình		0,9067
	RSD (%)		1,41	RSD (%)		0,73
Sudan IV	1,0222	51108	0,8003	1,1441	56188	0,8798
	1,1545	53419	0,8365	1,1048	56887	0,8908
	1,0988	52296	0,8189	1,0236	55853	0,8746
	1,0743	52007	0,8144	1,0492	55404	0,8676
	1,1075	55206	0,8645	1,1377	54096	0,8471
	1,0541	52071	0,8154	1,1518	54369	0,8514
	Trung bình		0,8249	Trung bình		0,8621
	RSD (%)		2,73	RSD (%)		2,19

Bảng 3.26. Độ đúng phương pháp phân tích đồng thời 4 Sudan trên nền mẫu SD03

Hợp chất	Lượng mẫu nền (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng thêm vào (µg)	Lượng tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
Sudan I	1,1223	32299	4,5	4,3	96,07
	1,0633	31574	4,5	4,2	93,99
	1,0257	33565	4,5	4,5	99,69
	1,0879	66393	9,0	8,7	96,82
	1,0752	67515	9,0	8,9	98,43
	1,1109	68176	9,0	8,9	99,37
	1,1085	81760	10,8	10,7	99,01
	1,0528	78507	10,8	10,3	95,13
	1,0463	81734	10,8	10,7	98,98
	Trung bình				97,50
	RSD (%)				2,1
Sudan II	1,1223	29705	4,8	5,0	104,24
	1,0633	29330	4,8	4,9	103,08
	1,0257	30307	4,8	5,1	106,10
	1,0879	61504	9,5	9,7	101,30
	1,0752	62722	9,5	9,8	103,18
	1,1109	63518	9,5	10,0	104,42
	1,1085	76529	11,4	11,9	103,78
	1,0528	76024	11,4	11,8	103,13
	1,0463	76062	11,4	11,8	103,18
	Trung bình				103,60
	RSD (%)				1,25
Sudan III	1,1223	32482	5,1	4,6	91,27
	1,0633	34303	5,1	4,9	95,74

	1,0257	33734	5,1	4,8	94,34
	1,0879	65802	10,2	8,8	86,52
	1,0752	66934	10,2	8,9	87,90
	1,1109	68623	10,2	9,2	89,98
	1,1085	82051	12,2	10,8	88,71
	1,0528	80759	12,2	10,7	87,39
	1,0463	81786	12,2	10,8	88,44
	Trung bình				89,68
	RSD (%)				3,56
Sudan IV	1,1223	25300	4,7	4,5	94,38
	1,0633	25575	4,7	4,5	95,18
	1,0257	25624	4,7	4,5	95,32
	1,0879	58273	9,5	9,0	94,81
	1,0752	55044	9,5	8,5	90,15
	1,1109	54255	9,5	8,4	89,01
	1,1085	73848	11,4	11,1	97,54
	1,0528	75734	11,4	11,4	100,03
	1,0463	75340	11,4	11,3	99,55
	Trung bình				95,11
	RSD (%)				3,94

Bảng 3.27. Độ đúng phương pháp phân tích đồng thời 4 Sudan trên nền mẫu SD05

Hợp chất	Khối lượng mẫu nền (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng thêm vào (µg)	Lượng tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
Sudan I	1,0283	33964	4,50	4,54	100,83
	1,0455	33897	4,50	4,53	100,64
	1,0663	34412	4,50	4,60	102,11
	1,0741	68400	9,00	8,97	99,70
	1,0016	68269	9,00	8,96	99,51
	1,0188	67904	9,00	8,91	98,99
	1,1234	81760	10,80	10,69	99,01
	1,1012	82735	10,80	10,82	100,17
	1,0477	82939	10,80	10,85	100,42
	Trung bình				100,15
	RSD (%)				0,99
Sudan II	1,0283	29265	4,77	4,91	102,88
	1,0455	29501	4,77	4,94	103,61
	1,0663	29298	4,77	4,91	102,98
	1,0741	59955	9,54	9,44	98,90
	1,0016	60494	9,54	9,52	99,74
	1,0188	60410	9,54	9,50	99,61
	1,1234	76529	11,45	11,88	103,78
	1,1012	73494	11,45	11,43	99,87
	1,0477	73310	11,45	11,41	99,63
	Trung bình				101,22
	RSD (%)				2,0
Sudan	1,0283	32865	5,09	4,69	92,21
	1,0455	32287	5,09	4,62	90,79

III	1,0663	33253	5,09	4,74	93,16
	1,0741	67556	10,18	9,02	88,67
	1,0016	67183	10,18	8,98	88,21
	1,0188	67338	10,18	9,00	88,40
	1,1234	80817	12,21	10,68	87,45
	1,1012	81426	12,21	10,75	88,07
	1,0477	80812	12,21	10,68	87,44
	Trung bình				89,38
	RSD (%)				2,38
Sudan IV	1,0283	24186	4,74	4,32	91,17
	1,0455	24946	4,74	4,42	93,36
	1,0663	25756	4,74	4,53	95,70
	1,0741	54971	9,48	8,53	90,05
	1,0016	55388	9,48	8,59	90,65
	1,0188	57165	9,48	8,83	93,21
	1,1234	64657	11,37	9,86	86,70
	1,1012	68281	11,37	10,35	91,06
	1,0477	68360	11,4	10,4	91,15
	Trung bình				91,45
	RSD (%)				2,74

❖ *Độ đúng:*

Độ đúng được đánh giá trên 9 mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ được chuẩn bị như sau:

- *Mẫu mức 50%:* Cân chính xác khoảng 1g son không chứa Sudan I, II, III, IV vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp các Sudan có nồng độ khoảng 5 µg/ml, trộn đều.

- *Mẫu mức 100%:* Cân chính xác khoảng 1g son không chứa Sudan I, II, III, IV vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp các Sudan có nồng độ khoảng 10 µg/ml, trộn đều.

- *Mẫu mức 120%:* Cân chính xác khoảng 1g son không chứa Sudan I, II, III, IV vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp các Sudan có nồng độ khoảng 12 µg/ml, trộn đều.

Thêm tiếp chính xác 9,0 ml dung môi pha mẫu vào mỗi mẫu thử độ đúng nêu trên, khuấy kỹ, đậy nắp bình, đặt trên cách thủy 5-10 phút ở 60°C, lắc siêu âm 15 phút, ly tâm với tốc độ 3000-4000 vòng/phút trong 10 phút, làm lạnh trong nước đá 30 phút, lọc qua màng lọc 0,45µm. Ở mỗi nồng độ tiến hành 3 mẫu thử độc lập.

Tiến hành phân tích sắc ký với 9 mẫu tự tạo theo điều kiện đã nêu. Kết quả thu được thể hiện ở các bảng 3.26 và 3.27.

Kết quả cho thấy phương pháp có độ thu hồi cao kể cả ở các nồng độ phân tích nhỏ ($0,45\mu\text{g/ml}$) trên cả hai nền mẫu khảo sát. Cụ thể với Sudan I: từ 93,99% đến 102,11%; Sudan II: từ 98,90% đến 106,10%; Sudan III: từ 86,52% đến 95,74% và Sudan IV: từ 86,70% đến 100,03%.

❖ *Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng*

- Giới hạn phát hiện: Pha loãng dần dung dịch mẫu tự tạo có chứa Sudan I, II, III, IV đến nồng độ thấp nhất sao cho tín hiệu thu được cao gấp 3 lần so với nhiễu đường nền. Giới hạn phát hiện xác định được là:

Sudan I: $0,23\mu\text{g/ml}$

Sudan II: $0,24\mu\text{g/ml}$

Sudan III: $0,25\mu\text{g/ml}$

Sudan IV: $0,24\mu\text{g/ml}$

- Giới hạn định lượng: Pha loãng dần dung dịch mẫu tự tạo có chứa Sudan I, II, III, IV đến nồng độ thấp nhất sao cho tín hiệu thu được cao gấp 10 lần so với nhiễu đường nền. Giới hạn định lượng xác định được là:

Sudan I: $0,75\mu\text{g/ml}$

Sudan III: $0,77\mu\text{g/ml}$

Sudan II: $0,76\mu\text{g/ml}$

Sudan IV: $0,76\mu\text{g/ml}$.

3.1.7. Định tính, định lượng đồng thời 4 chất màu bị cấm (MY, PO, PR và RB)

Đối tượng nghiên cứu về các chất Metanil yellow (MY), Pigment orange 5 (PO), Pigment red 53 (PR) và Rhodamin B (RB) là các mẫu sơn (sơn nước, sơn gió, sơn môi dạng thỏi) được thu thập trên thị trường.

3.1.7.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu:

Dung môi pha mẫu là N-N dimethyl formamid- acid phosphoric (95 : 5)

❖ *Chuẩn bị mẫu thử từ mỹ phẩm:*

Cân chính xác khoảng $0,5\text{g}$ sơn vào cốc có mỏ dung tích 50 ml , thêm 10 ml n-hexan chuyển dần vào bình gạn, thêm 10 ml dung môi pha mẫu tráng rửa cốc, chuyển vào bình gạn. Lắc kỹ khoảng 15 phút , gạn phần dung môi pha mẫu (lớp dưới) vào bình định mức dung tích 20 ml . Thêm 10 ml hỗn hợp dung môi để tráng cốc, làm tương tự như trên, sau khi gạn lớp dưới vào bình định mức thêm dung môi pha mẫu đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc $0,45\mu\text{m}$.

❖ *Dung dịch đối chiếu:*

- Dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO: Cân, hòa tan riêng biệt các chất chuẩn MY, RB, PR, PO trong dung môi pha mẫu để được các dung dịch có nồng độ MY, RB, PR và PO lần lượt khoảng $40\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $200\mu\text{g/ml}$ và $200\mu\text{g/ml}$.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp: từ các dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO pha dung dịch chuẩn hỗn hợp MY, RB, PR, PO trong dung môi pha mẫu có nồng độ khoảng 4µg/ml với MY và RB, 10 µg/ml với PR và PO.

3.1.7.2. Lựa chọn điều kiện phân tích các chất màu:

❖ Pha động:

Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 02 định tính 3 chất màu MY, PO5, RB bằng HPLC có pha động là hỗn hợp: nước- dung dịch TBA 0,005M (25:75).

Dung dịch tetrabutylammonium hydroxyd 0,005M được chuẩn bị như sau: 65ml TBA 20%, thêm nước vừa đủ 100 ml, thêm 2,8 g kali hydroxyd vào hỗn hợp trên, khuấy kỹ cho tan, điều chỉnh đến pH 7,0 với acid phosphoric để được dung dịch TBA 0,5M. Thêm 10 ml dung dịch TBA 0,5M vào 1000 ml methanol, lắc đều, để yên vài giờ, lọc. Tuy nhiên, pha động này rất dễ bị tủa lại (kể cả sau khi lọc).

Kết quả khảo sát thực tế như sau:

Cách thứ nhất:

- Để yên 4 giờ ở nhiệt độ phòng: vẫn tủa thêm
- Để yên 8, 12, 24 giờ, thậm chí 6 ngày: vẫn tủa thêm
- Để yên 7 ngày ở nhiệt độ phòng, lọc: dung dịch trong, không tủa thêm

Cách thứ hai:

- Để yên trong tủ lạnh (14 -15 °C): 1 ngày, 2 ngày: vẫn tủa thêm
- Để yên trong tủ lạnh (14 -15 °C) 3 ngày (72 giờ), lọc: dung dịch trong, không tủa thêm

Với kết quả khảo sát này thu được dung dịch pha động trong, ổn định dùng cho quá trình chạy sắc ký.

❖ Điều kiện sắc ký:

- Cột Phenomenex C18 (4,6 x 250 nm; 5µm)
- Nhiệt độ cột phân tích: nhiệt độ phòng
- Pha động: nước- dung dịch TBA 0,005M (30:70)
- Tốc độ: 1ml/phút
- Vùng quét phổ: 275 – 760 nm
- Bước sóng lấy sắc ký đồ:
 - + 435 nm: Metanil yellow, Pigment red 53, Pigment orange 5
 - + 535 nm: Rhodamin B
- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

Dung dịch TBA 0,005M được chuẩn bị như sau: Chuẩn bị dung dịch TBA 0,5M như trên. Thêm 10 ml dung dịch TBA 0,5M vào 1000 ml methanol, lắc đều. Để yên 72 giờ trong tủ lạnh 14 -15 °C hoặc 7 ngày ở nhiệt độ phòng để tạo tủa hoàn toàn, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

❖ *Tiến hành:*

Tiêm riêng biệt dung dịch thử, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký lỏng. Sử dụng các điều kiện ở trên, tiến hành sắc ký khoảng 50 phút. Ghi lại sắc ký đồ, so sánh thời gian lưu và tính hệ số tương đồng (similarity) của các pic MY, RB, PR và PO thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

3.2.1.3. Thẩm định phương pháp phân tích:

❖ *Đánh giá độ thích hợp hệ thống:*

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp trong dung môi pha mẫu có nồng độ MY là 4,4µg/ml, RB là 4,6 µg/ml, PR là 10,6 µg/ml và PO là 10,4 µg/ml vào hệ thống sắc ký. Kết quả thu được như ở bảng 3.28 cho thấy:

Hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt, pic cân đối, với RSD của diện tích pic MY, RB, PR, PO lần lượt là 0,6%, 0,85%, 1,28% và 0,54% , RSD của thời gian lưu lần lượt là 0,75%, 0,72%, 0,85%, 0,78% đều nhỏ hơn 1% và hệ số phân giải của các pic lần lượt là 8,6, 7,6, 17,9 tại bước sóng 435 nm và 3,7, 7,6, 17,9 tại bước sóng 535 nm, đáp ứng yêu cầu xác định các chất màu MY, RB, PR, PO (Thể hiện trong phần phụ lục 1).

Bảng 3.28. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký với phát hiện đồng thời các chất màu

STT	Diện tích pic (mAU.s)			
	MY	RB	PR	PO
1	156978	159948	307808	382215
2	156417	158720	305848	382268
3	156807	162441	312117	381439
4	158256	160012	316059	382085
5	157740	159043	311120	384869
6	158868	160978	306231	386711
Trung bình	157511	160190	309864	383265
RSD%	0,60	0,85	1,28	0,54
Số đĩa lý thuyết	6184	2593	9655	9914
Hệ số bất đối T	1,460	1,117	1,649	1,594

❖ *Đánh giá độ đặc hiệu:*

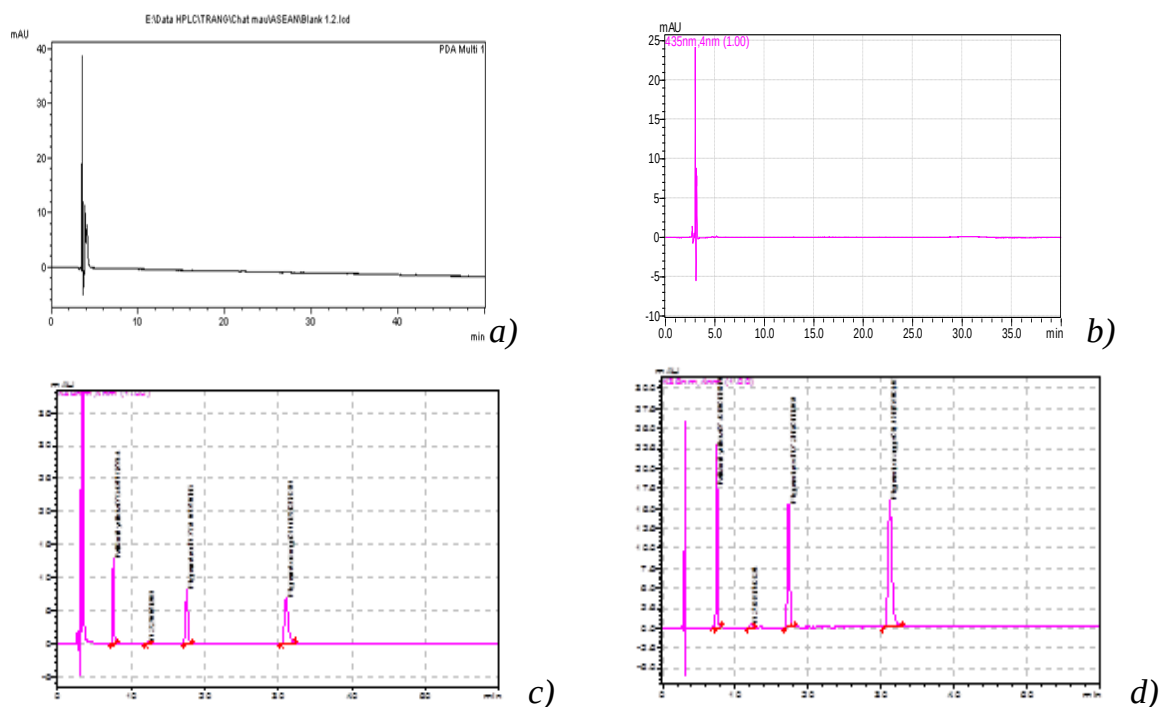
Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc: Cân các chất chuẩn tương ứng và hòa tan trong dung môi pha mẫu để có các dung dịch chuẩn gốc: Metanil yellow 86,4 µg/ml; Rhodamin B 81,6 µg/ml; Pigment red 53 234 µg/ml và Pigment orange 5 **182** µg/ml.

Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn để tiến hành phân tích các mẫu sau:

- *Mẫu trắng*: dung môi pha mẫu: N-N dimethyl formamid - acid phosphoric (95:5)
- *Mẫu nền*: Mẫu son không chứa các chất màu MY, RB, PR và PO được xử lý theo qui trình.
- *Mẫu tự tạo*: Cân chính xác khoảng 0,5 g son không chứa các chất MY, PR, PO, RB vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm 1 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR và PO. Trộn đều, chuyển dần vào bình gạn với 10 ml n-hexan, thêm 10 ml dung môi pha mẫu trắng rửa cốc, chuyển vào bình gạn, lắc kỹ khoảng 15 phút. Gạn phần dung môi pha mẫu (lớp dưới) vào bình định mức dung tích 20 ml. Thêm 10 ml hỗn hợp dung môi để tráng cốc, làm tương tự như trên, sau khi gạn lớp dưới vào bình định mức thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều lọc qua màng lọc 0,45 μ m.
- *Mẫu hỗn hợp chuẩn*: Pha dung dịch hỗn hợp chuẩn MY, PR, PO, RB trong dung môi pha mẫu để được dung dịch có nồng độ MY, RB, PR, PO lần lượt khoảng 4 μ g/ml, 4 μ g/ml, 24 μ g/ml, 20 μ g/ml,

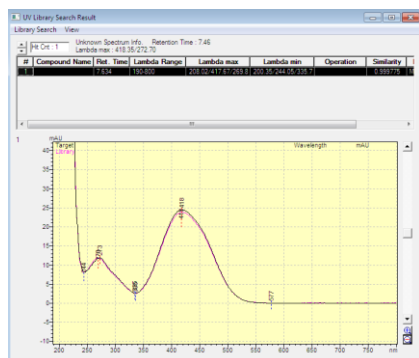
Kết quả: Tại bước sóng 435 nm (MY, PR và PO) như ở hình 3.13.

- Đối với mẫu chuẩn (Hình 3.13.d): Trên sắc ký đồ xuất hiện 3 pic tách biệt rõ ràng của MY, PR và PO với thời gian lưu khoảng 7,5 phút, 17,3 phút và 31,2 phút, pic RB rất nhỏ (thời gian lưu khoảng 12 phút)
- Với mẫu trắng: Trên sắc ký đồ không xuất hiện pic nào tương ứng với thời gian lưu của các pic MY, PR, PO và RB

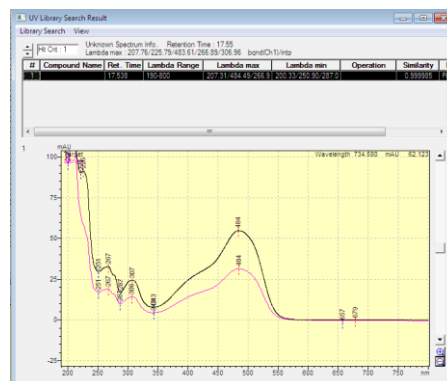


Hình 3.13. Sắc ký đồ của hỗn hợp một số chất màu lấy tại bước sóng 435 nm.

a) dung môi pha mẫu, b) mẫu nền, c) mẫu tự tạo và d) mẫu hỗn hợp chuẩn



a)

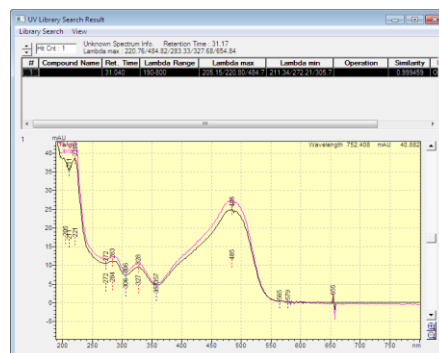


b)

Hình 3.14. Chồng phổ UV của các pic từ mẫu thử tự tạo và mẫu hỗn hợp chuẩn

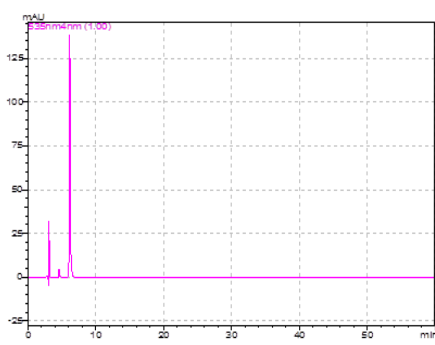
tại bước sóng 435 nm

a) MY, b) PR và c) PO

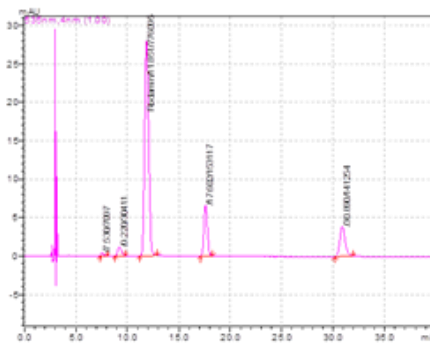


c)

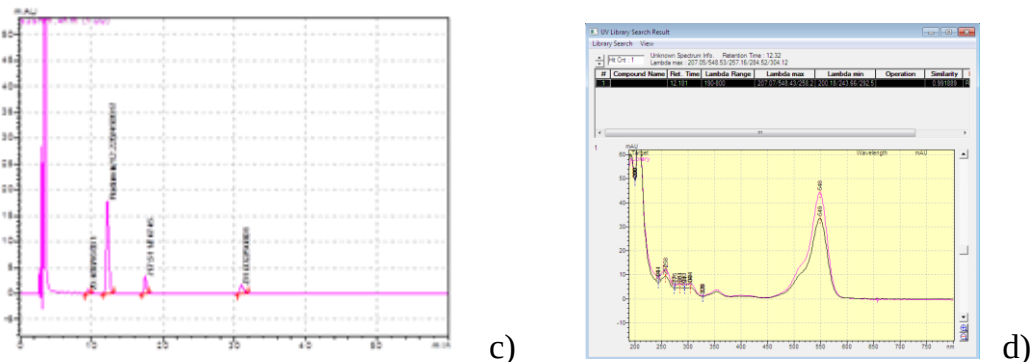
- Mẫu tự tạo: Trên sắc ký đồ xuất hiện 3 pic tách biệt rõ ràng có thời gian lưu tương ứng của MY, PR và PO với thời gian lưu khoảng 7,5 phút, 17,3 phút và 31,2 phút, pic RB rất nhỏ (khoảng 12 phút), các pic này cũng tách biệt với pic có trong nền mẫu (mẫu trắng). Khi so sánh phổ UV- VIS có độ tương thích tốt (hệ số similarity là 0,9997; 0,9999; 0,9995 và 0,9919), thể hiện ở hình 3.14.



a)



b)



Hình 3.15. Sắc ký đồ của hỗn hợp một số chất màu lấy tại bước sóng 535 nm.

a) mẫu trắng, b) mẫu hỗn hợp chuẩn, c) mẫu tự tạo
và d) chồng phổ UV của pic RB trong mẫu tự tạo và mẫu chuẩn của RB

Kết quả cho thấy, tại bước sóng 535 nm pic thu được từ mẫu tự tạo cho đáp ứng lớn nhất là pic RB (thời gian lưu khoảng 12 phút), được tách biệt rõ khỏi các pic khác (các pic chuẩn khác và pic trong nền mẫu), có độ tương thích cao (hệ số similarity là 0,9953) khi so sánh phổ UV- VIS với pic thu được từ mẫu chuẩn

❖ *Đánh giá độ tuyến tính:*

Pha các dãy dung dịch của các chất chuẩn MY, PR, PO, RB trong dung môi pha mẫu để được các dãy chuẩn như sau:

- *Metanil yellow*: Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 0,864 đến 10,368 µg/ml
- *Pigment red 53*: Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 2,34 đến 28,08 µg/ml,
- *Pigment orange 5*: Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 2,34 đến 28,08 µg/ml,
- *Rhodamin B*: Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 0,816 đến 9,792 µg/ml,

Tiến hành sắc ký, kết quả thu được thể hiện trong bảng 3.29.

Bảng 3.29. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của hỗn hợp các chất màu cam

STT	Metanil yellow		Rhodamin B		Pigment red 53		Pigment orange 5	
	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)
1	0,86	30748	0,82	75536	2,34	34985	2,04	52854
2	1,73	62407	1,63	152158	4,68	71328	4,08	111263
3	4,32	158323	4,08	386129	11,70	181858	10,20	300977
4	6,91	254161	6,53	619756	18,72	293610	16,32	482294
5	8,64	254161	8,16	773960	23,40	367429	20,40	608220
6	10,37	382929	9,79	930822	28,08	442756	24,48	739349
Phương trình hồi qui	$y = 37029x - 1528$		$y = 95291x - 2737$		$y = 15839x - 2733$		$y = 30511x - 11710$	

Hệ số tương quan r	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999
y-intercept (%)	0,97	0,71	1,50	3,89

❖ *Độ chính xác của phương pháp:*

Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.30.

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của kết quả 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo qui trình phân tích ở trên.

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của kết quả 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt ở 2 ngày khác nhau và hai kiểm nghiệm viên (KNV) khác nhau.

Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, độ lặp lại trong ngày có giá trị độ lệch chuẩn tương đối với MY, RB, PR, PO lần lượt là 0,18% và 0,26%; 0,15% và 0,27%; 0,28% và 0,45%; 0,97% và 1,10%; (với n = 6) và khác ngày là 0,35%; 0,55%; 1,00%; 0,27% (với n=12). Hàm lượng chất trung bình xác định được trong mẫu tự tạo (n = 12) với MY là 86,90 µg (RSD = 0,35%); với RB là 95,83 µg (RSD = 0,27%); với PR là 232,11 µg (RSD = 0,55%) và với PO là 171,28 µg (RSD = 1,02%).

Bảng 3.30. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp với các chất màu

	Ngày 1, KNV1			Ngày 2, KNV2		
	Lượng cân (g)	Diện tích pic(mAU.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng cân (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng tìm thấy (µg)
Với MY						
1	0,5002	159422	87,0	0,5172	158756	86,6
2	0,5102	159485	87,0	0,5176	157986	86,2
3	0,5089	159900	87,3	0,5208	159122	86,8
4	0,5016	159836	87,2	0,5062	158997	86,8
5	0,5108	159775	87,2	0,5177	158789	86,7
6	0,5128	159227	86,9	0,5116	159022	86,8
Trung bình (n = 6)			87,1			86,6
RSD (%) (n = 6)			0,17			0,26
Hàm lượng MY tìm thấy trung bình (n = 12): 86,90 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,35						
Với RB						
1	0,5002	452687	95,7	0,5128	451128	95,3
2	0,5102	454964	96,1	0,5169	452298	95,6
3	0,5089	454730	96,1	0,5172	454312	96,0

4	0,5016	454349	96,0	0,5211	452063	95,5
5	0,5108	454388	96,0	0,5153	453112	95,8
6	0,5128	454450	96,0	0,5119	454012	95,9
Trung bình			96,0			95,7
RSD (%)			0,15			0,27
Hàm lượng RB tìm thấy trung bình (n = 12): 95,83 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,27						
Với PR						
1	0,5002	180921	232,8	0,5109	180221	231,9
2	0,5102	180581	232,4	0,5216	179856	231,4
3	0,5089	182059	234,3	0,5143	178632	229,8
4	0,5016	181181	233,1	0,5197	180244	231,9
5	0,5108	181015	232,9	0,5226	180369	232,1
6	0,5128	180950	232,8	0,5074	178698	229,9
Trung bình			233,0			231,2
RSD (%)			0,28			0,45
Hàm lượng PR tìm thấy trung bình (n = 12): 232,11 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,55						
Với PO						
1	0,5002	249249	168,9	0,5202	255632	173,3
2	0,5102	252074	170,9	0,5146	253654	171,9
3	0,5089	256365	173,8	0,5134	250122	169,5
4	0,5016	253461	171,8	0,5121	252008	170,8
5	0,5108	254832	172,7	0,5067	254122	172,2
6	0,5128	253078	171,5	0,5212	248079	168,1
Trung bình (n = 6)			171,6			171,0
RSD (%) (n = 6)			0,97			1,10
Hàm lượng tìm thấy trung bình (n = 12): 171,28 µg ; RSD (%) (n = 12): 1,02						

❖ Độ đúng

Chuẩn bị 3 nhóm mẫu tự tạo ở 3 mức nồng độ khác nhau: mức thấp, mức trung bình và mức cao, mỗi nhóm 3 mẫu thử bằng cách thêm các dung dịch chất chuẩn gốc MY, PR, PO và RB vào nền mẫu mỹ phẩm không chứa các chất màu này, trộn đều. Cụ thể như sau:

- Mẫu tự tạo ở nồng độ thấp: Cân khoảng 0,5 g mẫu son không chứa các chất màu MY, PR, PO, RB vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 0,5 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO, trộn đều. Dùng 10 ml n-hexan chuyển vào bình gạn, lấy 10 ml dung môi pha mẫu tráng rửa cốc rồi chuyển vào bình gạn. Lắc bình gạn trong 5 phút, để lắng cho tách lớp, gạn lấy lớp dưới vào bình định mức 20 ml. Chiết thêm một lần nữa rồi thêm vừa đủ đến vạch bằng dung môi pha mẫu, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45µm được dung dịch mẫu tự tạo.

- Mẫu tự tạo ở nồng độ trung bình: Cân khoảng 0,5 g mẫu son không chứa các chất màu MY, PR, PO, RB vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,0 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO, trộn đều. Tiến hành tương tự mẫu tự tạo nồng độ thấp được dung dịch tự tạo có nồng độ trung bình.

- Mẫu tự tạo ở nồng độ cao: Cân khoảng 0,5 g mẫu son không chứa các chất màu MY, RB, PR, PO vào cốc có mô dung tích 50 ml, thêm chính xác 1,2 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO trộn đều. Tiến hành tương tự mẫu tự tạo nồng độ thấp được dung dịch tự tạo nồng độ cao.

Tiến hành sắc ký theo các điều kiện đã chọn, kết quả thu được thể hiện ở các bảng 3.31 và 3.32.

Bảng 3.31. Kết quả khảo sát độ đúng với MY và RB

STT	Lượng mẫu nền(g)	MY				RB			
		Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5122	79670	43,86	43,2	101,52	225800	47,97	48,8	98,29
2	0,5026	79430	43,73	43,2	101,22	226531	48,12	48,8	98,61
3	0,5039	79413	43,72	43,2	101,20	226211	48,05	48,8	98,47
4	0,5268	158750	86,57	86,4	100,20	451316	95,30	97,6	97,64
5	0,5344	158975	86,69	86,4	100,34	452377	95,52	97,6	97,87
6	0,5219	159211	86,82	86,4	100,48	452067	95,46	97,6	97,80
7	0,5279	190840	103,90	103,68	100,21	544060	114,76	117,12	97,99
8	0,5173	191586	104,30	103,68	100,60	544940	114,95	117,12	98,15
9	0,5211	191404	104,21	103,68	100,51	543837	114,72	117,12	97,95
		Trung bình			100,70	Trung bình			98,09
		RSD (%)			0,48	RSD (%)			0,33

Bảng 3.32. Kết quả khảo sát độ đúng với PR và PO

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	PR				PO			
		Diện tích pic (mA.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5122	90244	117,40	118,8	98,82	122719	88,12	91	96,83
2	0,5026	90164	117,30	118,8	98,74	119930	86,29	91	94,82
3	0,5039	90180	117,32	118,8	98,75	120806	86,86	91	95,46
4	0,5268	179194	229,72	237,6	96,68	252048	172,89	182	94,99
5	0,5344	179833	230,53	237,6	97,02	249332	171,11	182	94,02
6	0,5219	179913	230,63	237,6	97,07	254218	174,32	182	95,78
7	0,5279	217027	277,49	285,12	97,32	305214	207,74	218,4	95,12
8	0,5173	216906	277,34	285,12	97,27	304449	207,24	218,4	94,72
9	0,5211	217252	277,78	285,12	97,43	307581	209,30	218,4	95,66
		Trung bình			97,68	Trung bình			95,27
		RSD (%)			0,87	RSD (%)			0,83

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng tương đối tốt đối với nền mẫu mỹ phẩm phức tạp và giới hạn chất cảm nhỏ.

❖ *Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng*

Tiêm dung dịch nền mẫu vào hệ thống sắc ký, tiến hành 6 lần, tính độ lệch chuẩn của tín hiệu lớn nhất thu được xung quanh thời điểm thời gian lưu của các pic tương ứng, Giới hạn phát hiện được tính theo công thức:

$$LOD = 3,3 \times \delta/a$$

Bảng 3.33. Giới hạn phát hiện của MY, RB, PR và PO

STT	MY	PR	PO	RB
1	125	1102	227	111
2	644	218	242	149
3	556	225	131	61
4	623	271	115	58
5	207	115	165	99
6	144	122	113	96
Trung bình	383,2	342,2	165,5	95,7
δ	249,12	377,26	56,80	33,80
a	37029	15839	30511	95291
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,022	0,079	0,0061	0,0012
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0,073	0,259	0,0202	0,0040

3.2. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ MÀ BỊ CẤM HOẶC CÓ GIỚI HẠN SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM

3.2.1. Hydroquinon

Đối tượng mẫu mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng là kem bôi da.

3.2.1.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu

Sau khi khảo sát trên một số dung môi hoà tan mẫu: nước, methanol, methanol - nước (50:50), methanol - đệm phosphat pH 5,5 (50:50). Thực nghiệm cho thấy hỗn hợp methanol - đệm phosphat pH 5,5 (50:50) là hệ dung môi phù hợp nhất để chiết mẫu, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất và cho pic Hydroquinon cân đối.

Dung dịch đệm phosphat pH 5,5 được chuẩn bị như sau: cân 2,72g kali dihydrophosphat hòa tan vào 1000ml nước, điều chỉnh đến pH 5,5 bằng dung dịch kali hydrophosphat 50%.

❖ *Chuẩn bị mẫu từ mỹ phẩm:*

Cân chính xác khoảng 1g kem vào cốc có mỏ 50 ml, thêm 10 ml dung dịch chiết mẫu, khuấy kỹ chuyển vào bình gạn, thêm 10,0 ml n-hexan vào cốc, lắc rồi tráng cốc chuyển vào bình gạn, lắc kỹ khoảng 10 phút, để lắng cho phân lớp, gạn lấy phần dung dịch chiết mẫu (lớp dưới) vào bình định mức 20,0 ml. Thêm 10 ml dung dịch chiết mẫu vào cốc, lắc tráng cốc và cho vào bình gạn, lắc kỹ, để lắng cho phân lớp. Gộp dịch chiết, thêm dung dịch chiết mẫu vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua giấy lọc, lọc lại bằng màng lọc 0,45 μm được dung dịch để tiêm sắc ký.

❖ *Dung dịch đối chiếu:*

Cân chất chuẩn Hydroquinon, hoà tan trong dung dịch chiết mẫu tới nồng độ khoảng 0,1mg/ml để làm dung dịch đối chiếu gốc. Từ dung dịch đối chiếu gốc, pha loãng theo tỷ lệ thích hợp với dung dịch chiết mẫu để thu được dung dịch đối chiếu có nồng độ khoảng 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Dung dịch đối chiếu được lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiêm sắc ký.

3.2.1.2. Lựa chọn điều kiện phân tích Hydroquinon:

ASEAN đã ban hành phương pháp hòa hợp ACM INO 03 để phát hiện Hydroquinon sử dụng các điều kiện sắc ký:

- Cột C18 (250×4,6 mm; 5 μm)
- Nhiệt độ: nhiệt độ phòng
- Pha động: methanol - nước (55:45)
- Bước sóng lấy sắc ký đồ: 295 nm
- Thể tích tiêm: 20 μl .

Với các điều kiện sắc ký này và dung môi chiết mẫu là pha động, khi tiến hành khảo sát sơ bộ với dung dịch nền mẫu mỹ phẩm có thêm Hydroquinon, thời gian lưu của Hydroquinon chỉ là 4,1 phút, pic Hydroquinon không tách được hoàn toàn khỏi các thành phần của nền mẫu. Tiến hành điều chỉnh tỷ lệ thành phần pha động (tăng tỷ lệ nước lên đến 80%), pic Hydroquinon được rửa giải ra muộn hơn, pic hơi doãng, đặc biệt vẫn không tách riêng được khỏi pic có trong nền mẫu. Kết quả khảo sát này cho thấy điều kiện pha động trong phương pháp của ASEAN chưa phù hợp để phát hiện Hydroquinon trong nền mẫu mỹ phẩm đang nghiên cứu.

Tham khảo tài liệu và khảo sát thực nghiệm, điều kiện phân tích dưới đây đã được chọn lựa:

❖ *Điều kiện sắc ký:*

- Cột Apollo C8 (250×4,6 mm; 5 μm)
- Nhiệt độ phân tích: nhiệt độ phòng
- Pha động: methanol- dung dịch đệm phosphat pH 5,5 (5 : 95)
- Bước sóng lấy sắc ký đồ: 285 nm

- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

Dung môi chiết mẫu: methanol – dung dịch đệm phosphat pH 5,5 (50:50).

❖ *Tiến hành:*

Tiêm riêng biệt dung dịch thử, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký lỏng sử dụng các điều kiện ở trên. Tiến hành sắc ký khoảng 12-15 phút. Ghi lại sắc ký đồ, so sánh thời gian lưu và tính hệ số similarity của pic Hydroquinon thu được từ dung dịch thử và từ dung dịch chuẩn.

3.2.1.3. *Thẩm định phương pháp phân tích*

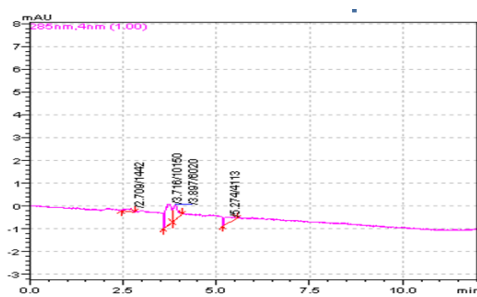
❖ *Đánh giá độ đặc hiệu:*

Sử dụng các điều kiện đã được chọn để tiến hành phân tích các mẫu sau:

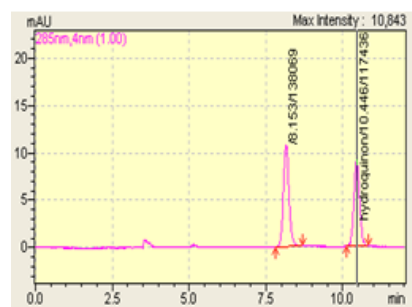
- *Mẫu trắng:* Mẫu kem không chứa Hydroquinon được xử lý theo qui trình.
- *Mẫu tự tạo:* Thêm dung dịch chuẩn gốc Hydroquinon vào nền mẫu kem không có Hydroquinon để thu được mẫu kem chứa khoảng 0,01% (kl/kl) Hydroquinon. Cân chính xác khoảng 1g mẫu xử lý theo qui trình. Tiến hành trên 3 nền mẫu khác nhau.
- *Mẫu chuẩn:* có nồng độ Hydroquinon khoảng 5,0 μ g/ml.

Các sắc ký đồ thu được như ở hình 3.16.

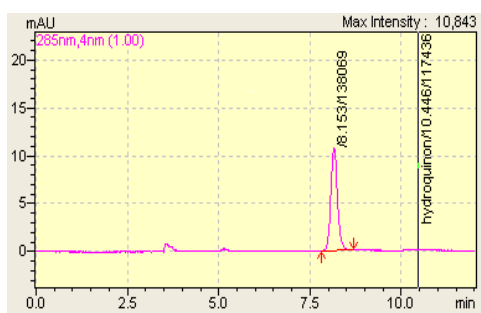
- Đối với mẫu chuẩn: Trên sắc ký đồ xuất hiện một pic rõ ràng của Hydroquinon với thời gian lưu khoảng 12,5 phút.
- Với mẫu trắng: Trên sắc ký đồ không xuất hiện pic nào tương ứng với thời gian lưu của Hydroquinon.
- Mẫu tự tạo: Trên sắc ký đồ xuất hiện một pic rõ ràng có thời gian lưu tương ứng của Hydroquinon, có độ tương thích (hệ số similarity là 0,9953) khi so sánh phổ UV- VIS, đồng thời được tách riêng khỏi các pic khác trong nền mẫu.



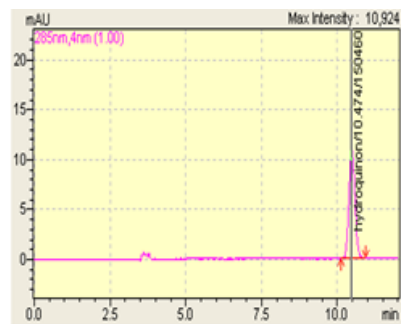
a)



b)



c)



d)

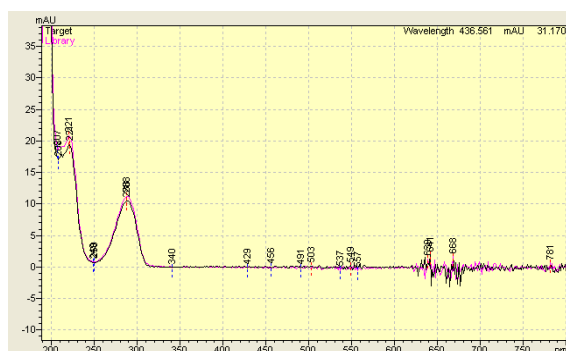
Hình 3.16. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu với Hydroquinon

a) dung môi,

b) dung dịch mẫu tự tạo,

c) dung dịch mẫu trắng

d) dung dịch mẫu chuẩn



Hình 3.17. Kết quả chồng phổ UV- VIS của pic Hydroquinon trên sắc ký đồ của dung dịch tự tạo và của dung dịch chuẩn.

❖ Khoảng nồng độ tuyến tính:

Pha một dãy 5 dung dịch Hydroquinon chuẩn trong methanol có nồng độ khoảng từ 3,0 µg/ml đến 102,0 µg/ml. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã được chọn. Kết quả được ghi ở bảng 3.34 cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ Hydroquinon với diện tích pic của chúng.

Bảng 3.34. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của Hydroquinon

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ C (µg/ml)	3,06	5,1	10,2	20,4	51,0
Diện tích pic S (mAU,s)	85089	144446	292359	596077	1478884

Phương trình hồi qui xác định được là $S = 28649.C + 3460$ với hệ số tương quan $r = 0,9999$, hệ số y-intercept $Y = 2,4\%$.

❖ Độ lặp lại:

Vì thực tế các mẫu khảo sát không có chứa Hydroquinon nên tiến hành chế mẫu tự tạo để xác định độ lặp lại.

Bảng 3.35. Khảo sát độ lặp lại của Hydroquinon trên một số nền mẫu

Nền mẫu	STT	Lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng tìm thấy (µg/g)
HQ01	1	1,0796	134300	93
	2	1,0054	124029	92
	3	1,1245	139794	93
	4	1,1678	143665	92
	5	1,1547	141082	91
	6	1,1327	140012	92
	Trung bình			92
	RSD (%)			0,82
HQ02	1	1,2587	158537	86
	2	1,2429	157483	86
	3	1,1156	141212	86
	4	1,1298	143305	86
	5	1,1143	142358	87
	6	1,1005	141572	87
	Trung bình			86
	RSD (%)			0,76
HQ03	1	1,1789	146847	82
	2	1,1415	141466	82
	3	1,1871	146376	82
	4	1,1698	145351	82
	5	1,1483	142627	82
	6	1,1529	144620	83
	Trung bình			82
	RSD (%)			0,56

Chế mẫu tự tạo bằng cách cho dung dịch chuẩn gốc Hydroquinon vào nền mẫu kem không có Hydroquinon để thu được kem chứa khoảng 0,01% Hydroquinon. Cân chính xác khoảng 1g mẫu tự tạo với 6 lần lấy mẫu khác nhau xử lý theo qui trình và tiến hành điều kiện sắc ký đã được chọn lựa. Tiến hành trên 3 nền mẫu khác nhau. Kết quả thu được với các nền mẫu được thể hiện ở bảng 3.35.

Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối xác định được qua 6 lần phân tích trên 3 nền mẫu khác nhau có đều có giá trị dưới 1%. Như vậy phương pháp phân tích có độ lặp lại tốt ở vùng giới hạn định lượng với mẫu mỹ phẩm có nền phức tạp.

❖ **Độ đúng:**

Cân chính xác khoảng 1g mẫu kem tự tạo có chứa khoảng 0,01% Hydroquinon, thêm một lượng chính xác chất chuẩn Hydroquinon (khoảng 6 µg), trộn đều, tiến hành xử lý mẫu theo qui trình và phân tích theo điều kiện đã chọn. Khả năng tìm lại của Hydroquinon trên các nền mẫu khác nhau được thể hiện ở bảng 3.36.

Bảng 3.36. Khả năng tìm lại của Hydroquinon trên một số nền mẫu

Nền mẫu	STT	Khối lượng mẫu (g)	Lượng chuẩn thêm vào (μg)	Lượng chuẩn tìm thấy (μg)	Diện tích pic thử (mAU.s)	Tỷ lệ thu hồi (%)
HQ01	1	1,0796	5,38	5,20	152270	96,7
	2	0,9954	4,96	4,91	143861	99
	3	1,1045	5,50	5,39	157952	98
	4	1,0778	5,34	5,06	148247	95,8
	5	1,0547	5,25	5,05	148034	96,2
	Trung bình					97,1
	RSD (%)					1,23
HQ02	1	1,0012	5,11	4,88	144612	95,5
	2	1,0010	5,11	4,84	143543	94,7
	3	1,0052	5,13	4,89	144984	95,3
	4	1,0093	5,15	4,88	144592	94,8
	5	1,0065	5,13	4,87	144433	94,9
	Trung bình					95,04
	RSD (%)					0,36
HQ03	1	1,0046	5,08	4,87	147164	95,9
	2	1,0033	5,08	4,78	144356	94,1
	3	1,0005	5,06	4,86	146847	96
	4	1,0158	5,14	4,82	145466	93,8
	5	1,0129	5,13	4,88	147319	95,1
	Trung bình					94,98
	RSD (%)					1,06

Kết quả thu được cho thấy khả năng tìm lại nằm trong khoảng từ 94,1- 99,0% và giá trị RSD từ 0,36% đến 1,23% là chấp nhận được với chất có hàm lượng nhỏ trong mẫu và ở gần giới hạn định lượng.

❖ *Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất mà tín hiệu của máy vẫn đáp ứng được (gấp 3 lần so với nhiễu đường nền) để xác định giới hạn phát hiện. LOD xác định được là 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất (tín hiệu máy cho đáp ứng gấp 10 lần so với nhiễu đường nền) mà xác định được Hydroquinon với độ lặp lại và độ đúng chấp nhận được để xác định giới hạn định lượng. LOQ xác định được là 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.2. Tretinoin

Đối tượng mẫu mỹ phẩm nghiên cứu áp dụng là kem bôi da.

3.2.2.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu: Theo phương pháp của ASEAN mã số ACM SIN 01

❖ *Dung dịch đối chiếu:*

Pha dung dịch chuẩn Tretinoin trong methanol có nồng độ khoảng 0,1 mg/ml để làm dung dịch chuẩn gốc. Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng với methanol để được dung dịch đối chiếu có nồng độ khoảng 3,0µg/ml. Dung dịch đối chiếu được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm sắc ký.

❖ *Chuẩn bị mẫu từ mỹ phẩm:*

Cân chính xác khoảng 2 g mẫu kem vào bình nút mài 50 ml, thêm chính xác 10,0ml methanol, đặt ấm trên cách thủy ở nhiệt độ 60 °C khoảng 5-10 phút. Lắc siêu âm 15 phút. Ly tâm 3000-4000 vòng/phút trong khoảng 10 phút, làm lạnh trong nước đá 30 phút đến 60 phút. Lọc phần dung dịch qua giấy lọc. Lọc qua màng lọc 0,45 µm được dung dịch trong để tiêm sắc ký.

3.2.2.2. Điều kiện sắc ký: Theo phương pháp của ASEAN mã số ACM SIN 01

Toàn bộ quá trình phân tích được tiến hành trên hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu SCL-10Avp. Sau khi đã thực hiện khảo sát, tối ưu hoá để tách được Tretinoin ra khỏi các tá dược, điều kiện tiến hành sắc ký đã được lựa chọn như sau:

- Cột Apollo C18 (4,6 x 250 mm; 5µm)
- 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 µl.

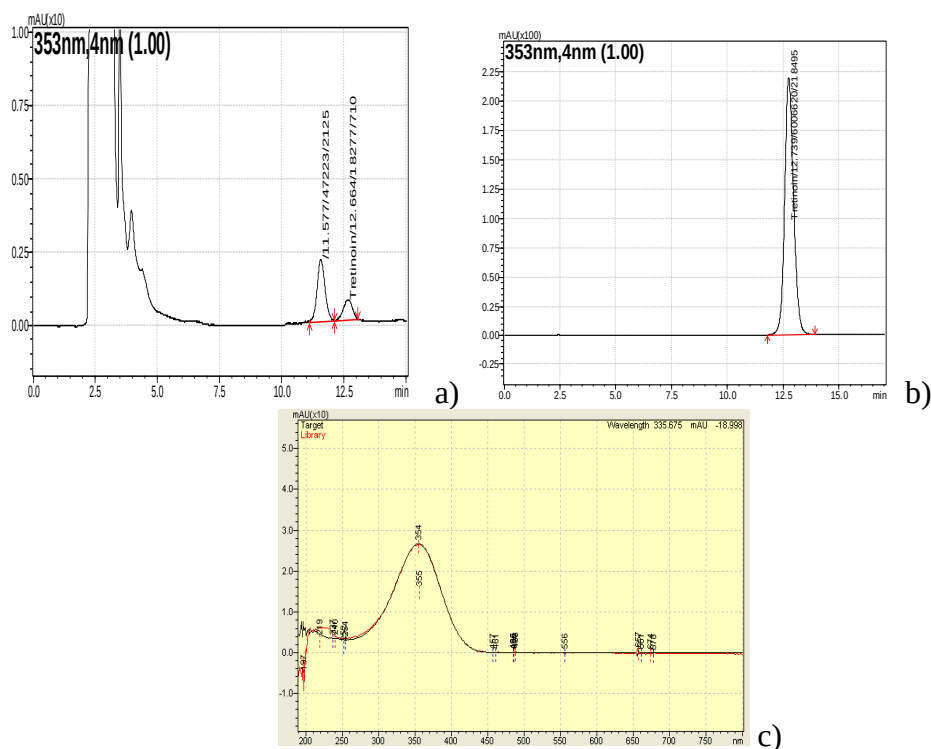
3.2.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích

❖ *Độ đặc hiệu:*

Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn để tiến hành phân tích các mẫu sau:

- *Mẫu trắng:* Mẫu kem không chứa Tretinoin được xử lý theo qui trình.
- *Mẫu tự tạo:* Thêm dung dịch chuẩn gốc Tretinoin vào nền mẫu kem không có Tretinoin để thu được mẫu kem chứa khoảng 0,002% Tretinoin. Cân chính xác khoảng 2 g mẫu xử lý theo qui trình.
- *Mẫu chuẩn:* có nồng độ Tretinoin khoảng 3,0 µg/ml.

Độ đặc hiệu được đánh giá dựa vào các thông số thời gian lưu và so sánh phổ UV-VIS của pic thu được từ dung dịch mẫu tự tạo và dung dịch chuẩn.



Hình 3.18. SKĐ đánh giá độ đặc hiệu với Tretinoin

a) dung dịch thử (tự tạo)

b) dung dịch chuẩn Tretinoin

c) chồng phổ UV-VIS của dung dịch thử và dung dịch chuẩn

Thời gian lưu của pic trong mẫu thử (tự tạo) giống thời gian lưu của pic trong mẫu chuẩn (khoảng 12,5 phút). Hơn nữa pic này đã được tách ra hoàn toàn khỏi các pic khác có trong nền mẫu. Chồng phổ ở dải sóng từ 220-400 nm: phổ của dung dịch chuẩn và phổ của dung dịch thử đạt bước sóng cực đại ở 354 nm và hệ số similarity là 0,9988. Kết quả được thể hiện ở hình 3.18.

❖ Khoảng nồng độ tuyến tính

Pha một dãy 5 dung dịch Tretinoin chuẩn trong methanol có nồng độ khoảng từ 3,0 µg/ml đến 64,0 µg/ml. Tiến hành sắc ký theo các điều kiện đã nêu trên. Kết quả ở bảng 3.37 cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic với nồng độ của Tretinoin. Phương trình hồi qui: $S = 168323.C - 13699$ với hệ số tương quan $r = 1$ và hệ số y-intercept $Y=1,03\%$.

Bảng 3.37. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của Tretinoin

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ C(µg/ml)	3,2	8,0	16,1	32,1	64,2
Diện tích pic S(mAu.s)	530427	1333001	2681691	5400123	10789251

❖ Độ lặp lại

Vì thực tế các mẫu khảo sát không có chứa Tretinoin nên tiến hành chế mẫu tự tạo để xác định độ lặp lại bằng cách cho dung dịch chuẩn gốc Tretinoin vào nền mẫu kem không có Tretinoin để thu được mẫu kem chứa khoảng 0,002% Tretinoin.

Cân chính xác khoảng 2g mẫu tự tạo với 6 lần cân khác nhau xử lý theo qui trình và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Kết quả thể hiện ở bảng 3.38.

Bảng 3.38. Khảo sát độ lặp lại của Tretinoin

	Lượng mẫu thử (g)	Hàm lượng Tretinoin ($\mu\text{g/g}$)
1	2,0114	16,5
2	2,0112	15,5
3	2,0205	15,9
4	2,0210	16,1
5	2,0215	16,2
6	2,0117	15,1
Trung bình		15,7
RSD (%)		3,17

Độ lệch chuẩn tương đối sau 6 lần phân tích là 3,17%. Như vậy phương pháp phân tích có độ lặp lại có thể chấp nhận được ở vùng giới hạn định lượng với mẫu mỹ phẩm có nền phức tạp.

❖ *Độ đúng*

Cân chính xác khoảng 2 g mẫu kem tự tạo có chứa khoảng 0,002% Tretinoin, thêm một lượng chính xác chất chuẩn Tretinoin (khoảng 6 μg). Trộn đều, tiến hành xử lý mẫu và sắc ký theo qui trình phân tích đã chọn. Kết quả thu được như ở bảng 3.39.

Bảng 3.39. Khảo sát khả năng tìm lại của Tretinoin

STT	Lượng cân mẫu thử (g)	Lượng có sẵn (μg)	Lượng thêm vào (μg)	Lượng thu hồi (μg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	1,8183	31,82	6,42	5,76	89,7
2	1,8217	31,88	6,42	5,82	90,7
3	1,7863	31,26	6,42	6,12	95,3
4	1,8080	31,64	6,42	5,94	92,5
5	1,8002	31,50	6,42	6,06	94,4

Kết quả cho thấy khả năng tìm lại nằm trong khoảng từ 89,7- 94,4% là chấp nhận được với chất có hàm lượng nhỏ trong mẫu và ở vùng gần giới hạn định lượng.

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)*

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất mà tín hiệu của máy vẫn đáp ứng được (gấp 3 lần so với nhiễu đường nền) để xác định giới hạn phát hiện. LOD xác định được là 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Pha loãng dần dung dịch thử và dung dịch chuẩn đến nồng độ thấp nhất (tín hiệu máy cho đáp ứng gấp 10 lần so với nhiễu đường nền) mà xác định được Tretinoin với độ lặp lại và độ đúng chấp nhận được để xác định giới hạn định lượng. LOQ xác định được là 3,3 µg/ml.

3.2.3. Các steroid

Glucocorticoid là nhóm chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm. Nhóm này gồm nhiều chất khác nhau, nếu kiểm tra riêng từng thành phần sẽ mất rất nhiều thời gian và công sức vì vậy cần nghiên cứu xây dựng một phương pháp cho phép phân tích được đồng thời 12 corticoid thông thường trong mỹ phẩm.

3.2.3.1. Xử lý và chuẩn bị mẫu

❖ *Dung dịch đối chiếu:*

Cân chính xác khoảng 25 mg từng chất chuẩn pha vào 25 ml methanol, rồi pha loãng tiếp bằng pha động để được các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 9 -12 µg/ml. Các dung dịch này được sử dụng để pha dãy chuẩn hoặc pha dung dịch hỗn hợp chuẩn.

❖ *Chuẩn bị mẫu từ mỹ phẩm:*

Cân khoảng 0,2 g chế phẩm, thêm 50 ml hỗn hợp dicloromethan - methanol (9:1), khuấy kỹ và đặt trên cách thủy ấm, làm nguội trong nước đá 1 h sau đó lọc qua giấy lọc và bốc hơi cách thủy tới khô. Hòa lại cần trong 25 ml acetonitril - methanol - nước (20:30:30). Mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm sắc ký.

3.2.3.2. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Toàn bộ quá trình phân tích được tiến hành trên hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao có trang bị detector PDA. Sau khi đã thực hiện khảo sát, tối ưu hoá để tách riêng các corticoid, điều kiện sắc ký đã được lựa chọn như sau:

- Cột Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm),
- Pha động: acetonitril - nước (48:52),
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút,
- Bước sóng phát hiện: 240 nm,
- Thể tích tiêm: 5 µl.

3.2.3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

❖ *Tính thích hợp của hệ thống sắc ký:*

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp trong pha động có nồng độ khoảng 10 µg/ml vào hệ thống sắc ký, kết quả thể hiện ở bảng 3.40.

Bảng 3.40. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

S	Tên pic	Thời gian lưu	Diện tích pic	Số đĩa	Hệ số	Độ
---	---------	---------------	---------------	--------	-------	----

T T		(phút)		(mAU.s)		lý thuyết	bất đối T	phân giải R _s
		Trung bình	RSD (%)	Trung bình	RSD (%)			
1	Prednison	4,19	0,15	32205	0,36	8041	1,42	-
2	Dexamethason	5,38	0,17	34776	0,51	9997	1,23	5,96
3	Triamcinolon acetonid	6,33	0,19	38421	0,37	11295	1,26	4,20
4	Flucinolol acetonid	6,87	0,23	42488	0,45	12016	1,23	2,20
5	Prednison acetat	7,82	0,23	43317	0,36	12957	1,23	3,64
6	Hydrocortison acetat	8,28	0,26	48867	0,84	13463	1,20	1,64
7	Cortison acetat	8,83	0,27	35218	0,75	13971	1,20	1,89
8	Dexamethason acetat	11,04	0,32	54520	0,37	14215	1,04	6,63
9	Betamethason valerat	17,41	0,26	80684	0,11	30962	1,17	16,74
10	Clobetason propionat	22,63	0,35	97432	0,24	23493	1,11	10,64
11	Mometason furoat	24,97	0,39	140097	0,51	20409	1,10	3,66
12	Betamethason propionat	26,47	0,41	164637	1,43	15161	1,12	1,93

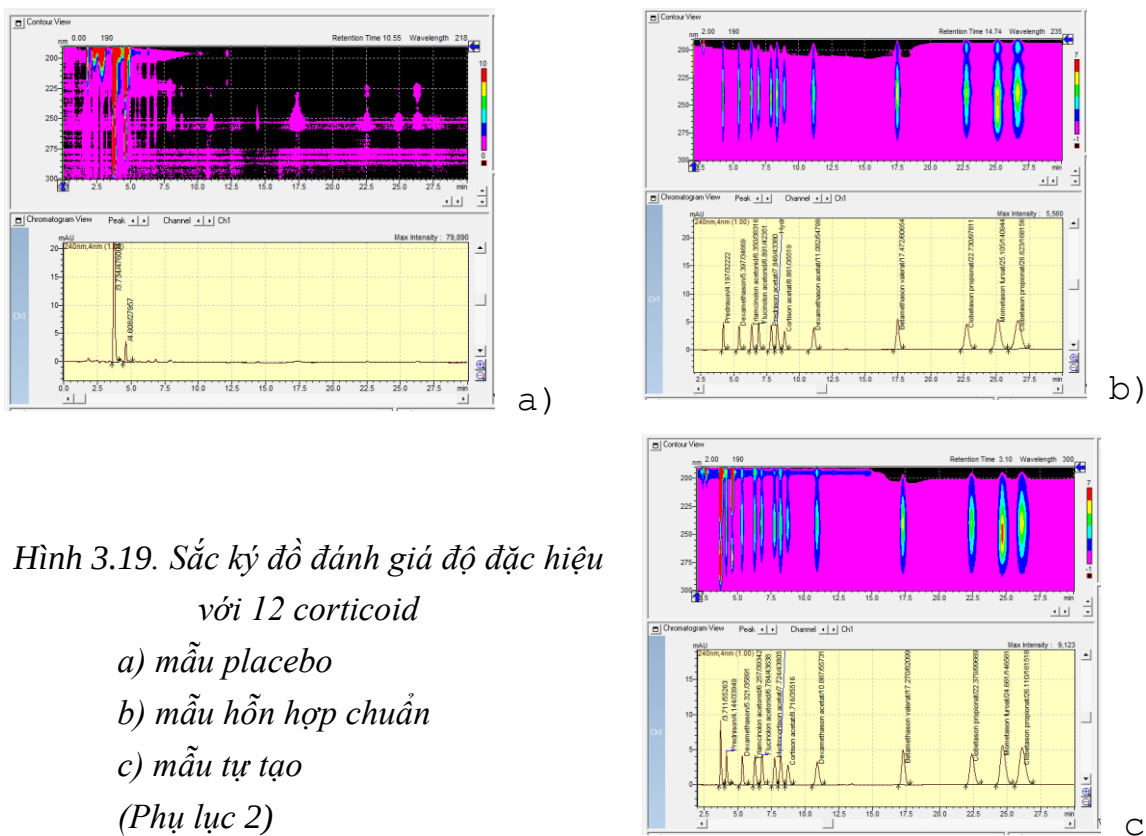
Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký có: Độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu dưới 0,4% và diện tích pic dưới 1,4 %; số đĩa lý thuyết trên 8000; hệ số bất đối dưới 1,4 và độ phân giải trên 1,6. Do vậy đáp ứng yêu cầu phân tích cho cả 12 hợp chất.

❖ *Độ đặc hiệu:*

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn các mẫu sau:

- Dung dịch mẫu placebo: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu kem dưỡng trắng da Impress IC white emulsion II (Kanebo, Nhật Bản) rồi xử lý như chuẩn bị một mẫu thử.
- Dung dịch thử, dung dịch chuẩn.

Kết quả thu được như ở hình 3.19, cho thấy: Trên sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu bất kỳ chất nào trong số 12 corticoid nghiên cứu. Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu tự tạo cho 12 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 12 pic chính thu được từ sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp chuẩn.



Hình 3.19. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu với 12 corticoid

a) mẫu placebo

b) mẫu hỗn hợp chuẩn

c) mẫu tự tạo

(Phụ lục 2)

Bảng 3.41. Kết quả xác định khoảng nồng độ tuyến tính của các corticoid

TT	Tên chất phân tích (Phương trình hồi qui)		1	2	3	4	5	Hệ số tương quan r
1	Prednison ($y=79401.x+818$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,2 16884	0,32 26044	0,4 32442	0,48 38962	0,6 48559	0,9998
2	Dexamethason ($y=59945.x+942$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,3 17301	0,48 27568	0,6 34745	0,72 42434	0,9 53076	0,9996
3	Triamcinolon acetamid ($y=37356.x+1389$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,5 20359	0,8 30908	1,0 38714	1,2 46146	1,5 57597	0,9997
4	Flucinolon acetamid ($y=41949.x+949$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,5 22387	0,8 34175	1 42558	1,2 51093	1,5 64281	0,9994
5	Prednison acetat ($y=48229.x+750$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,5 22677	0,8 34881	1 43475	1,2 52230	1,5 65227	0,9998
6	Hydrocortison acetat ($y=42663.x+1035$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,5 25191	0,8 38947	1,0 48804	1,2 58730	1,5 73224	0,9997
7	Cortison acetat ($y=43484.x+629$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,4 18204	0,64 28165	0,8 35328	0,96 42606	1,2 52781	0,9997
8	Dexamethason acetat ($y=54206.x+810$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	0,6 28289	0,96 43741	1,2 54805	1,44 65972	1,8 82276	0,9998
9	Betamethason valerat ($y=21644.x+3856$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	1,8 44272	2,88 64531	3,6 81282	4,32 97197	5,4 121592	0,9983
10	Clobetason propionat ($y=9534.x+949$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	2,2 50726	3,52 78688	4,4 98386	5,28 118244	6,6 146956	0,9994
11	Mometason furoat ($y=137515.x+4471$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	1,6 73326	2,56 115287	3,2 140770	3,84 169318	4,8 211231	0,9998
12	Betamethason propionat ($y=20274.x+2605$)	C ($\mu\text{g/ml}$) S(mAU.s)	4,0 84444	6,4 130868	8,0 165190	9,6 197586	12,0 245900	0,9998

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Pha một dãy dung dịch hỗn hợp 12 chuẩn trong pha động có nồng độ như trong bảng, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Xác định phương trình hồi qui và hệ số tương quan r. Kết quả thu được như ở bảng 3.41.

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ các chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan r đều rất gần 1.

❖ *Độ chính xác*

Độ chính xác được tiến hành thử nghiệm trên 6 mẫu tự tạo. Cân 0,2 g mẫu placebo thêm vào đó 4,0 ml dung dịch chuẩn gốc có nồng độ như trong bảng 3.42. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký, xử lý kết quả và tổng hợp vào bảng 3.42.

Bảng 3.42. Kết quả khảo sát độ chính xác của các corticoid

Tên chất phân tích	C _{dd gốc} (µg/ml)	Tỷ lệ tìm lại (%)							
		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
Prednison	2	102,0	102,5	103,2	102,5	101,1	101,7	102,2	0,7
Dexamethason	3	105,4	104,8	107,4	105,9	105,0	105,8	105,7	0,9
Triamcinolon acetonid	5	104,5	104,1	104,7	105,3	105,1	104,6	104,7	0,4
Flucinolol acetonid	5	104,7	105,3	105,1	106,2	106,8	105,3	105,5	0,7
Prednison acetat	5	103,1	102,0	103,3	103,2	102,4	102,6	102,7	0,5
Hydrocortison acetat	5	102,7	101,9	103,5	102,9	102,2	102,6	102,6	0,6
Cortison acetat	4	102,2	102,2	103,7	103,0	101,6	102,5	102,5	0,7
Dexamethason acetat	6	102,9	102,6	102,9	103,4	102,6	103,2	102,9	0,3
Betamethason valerat	18	102,4	101,9	102,4	103,2	101,7	102,6	102,4	0,5
Clobetason propionat	22	103,3	102,7	103,1	103,7	102,9	103,9	103,3	0,4
Mometason furoat	16	106,6	105,9	107,0	107,4	105,8	107,0	106,6	0,6
Betamethason propionat	40	100,1	99,3	100,4	100,9	98,7	99,8	99,9	0,8

❖ *Độ đúng*

Thêm chính xác một lượng chất chuẩn corticoid vào nền mẫu placebo, sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích nồng độ dung dịch cuối cùng đem sắc ký phải nằm trong khoảng 50 - 150% so với nồng độ định lượng. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau: mức 50% (A), mức 100% (B) và mức 150% (C); mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào diện tích pic của chất tương ứng trong dung dịch chuẩn hỗn hợp để tính ra lượng chất chuẩn tìm thấy. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.43.

Bảng 3.43. Kết quả khảo sát độ đúng của các corticoid

Chất phân tích	Tỷ lệ tìm lại (%)									
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	T. bình
Prednison	98,40	101,10	102,00	99,70	100,90	101,40	100,20	97,70	100,00	100,16
Dexamethason	100,70	99,60	99,40	103,30	105,00	104,10	104,00	101,30	103,40	102,31
Triamcinolon acetonid	98,90	101,50	102,20	101,60	104,10	102,90	102,70	99,90	102,30	101,79
Flucinolon acetonid	99,50	100,10	100,60	102,50	105,30	103,70	103,60	101,30	103,80	102,27
Prednison acetat	96,50	99,60	99,50	100,80	101,50	102,30	100,90	99,50	100,50	100,12
Hydrocortison acetat	97,80	100,10	99,70	100,80	102,10	102,40	100,70	99,60	100,80	100,44
Cortison acetat	96,30	99,40	98,90	100,50	102,00	101,90	100,60	99,40	100,90	99,99
Dexamethason acetat	97,00	98,80	99,50	101,70	101,70	102,60	102,20	99,60	101,70	100,53
Betamethason valerat	97,50	99,00	101,00	101,00	101,50	102,50	101,00	99,20	100,30	100,33
Clobetason propionat	95,80	99,00	99,80	101,30	102,30	103,00	102,00	100,30	101,00	100,50
Mometason furoat	96,20	100,10	100,20	104,10	105,50	106,60	102,40	100,60	101,80	101,94
Betamethason propionat	95,20	97,00	97,90	97,80	99,20	100,30	99,10	97,30	98,10	97,99

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)*

Tiến hành tương tự như các chất phân tích khác. Kết quả đã xác định được giá trị LOD và LOQ đối với từng corticoid như ở bảng 3.44.

Bảng 3.44. LOD và LOQ của các corticoid

STT	Tên chất phân tích	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	Prednison	0,1	0,3
2	Dexamethason	0,15	0,45
3	Triamcinolon acetonid	0,25	0,75
4	Flucinolon acetonid	0,25	0,75
5	Prednison acetat	0,25	0,75
6	Hydrocortison acetat	0,25	0,75
7	Cortison acetat	0,2	0,6
8	Dexamethason acetat	0,3	0,9
9	Betamethason valerat	0,9	2,7
10	Clobetason propionat	1,1	3,3
11	Mometason furoat	0,8	2,4
12	Betamethason propionat	2,0	6,0

3.3. KẾT QUẢ XÂY DỰNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH CÁC KIM LOẠI NẶNG

3.3.1. Thủy ngân

3.3.3.1. Xác định các điều kiện vô cơ hóa mẫu:

Để xây dựng quy trình xử lý mẫu phẩm trước khi phân tích thủy ngân, các yếu tố sau được tiến hành khảo sát:

- Tác nhân vô cơ hóa,
- Lượng mẫu đem phân tích,
- Lượng tác nhân oxy hóa sử dụng.

❖ *Xác định tác nhân và điều kiện vô cơ hóa mẫu:*

Thử nghiệm vô cơ hóa mẫu phân tích với nhiều tác nhân oxy hóa sử dụng đơn lẻ hoặc hỗn hợp, kết quả khảo sát cho thấy: Để vô cơ hóa triệt để nền mẫu mỹ phẩm ở điều kiện phản ứng không quá mạnh, thích hợp với việc áp dụng trên thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng (tiến hành trong điều kiện kín hoàn toàn, quá trình vô cơ hóa mẫu phải khống chế được về áp suất và nhiệt độ), các tác nhân vô cơ hóa được lựa chọn như sau:

- Với mỹ phẩm dạng kem bôi da sử dụng hỗn hợp acid nitric 65% và hydroperoxid 30%.

- Với mỹ phẩm dạng phấn bôi da sử dụng hỗn hợp acid nitric 65% và acid sulfuric 98%.

Quá trình vô cơ hóa gồm hai giai đoạn chính:

- *Giai đoạn 1:* Nâng dần nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng từ nhiệt độ phòng lên tới nhiệt độ xấp xỉ nhiệt độ sôi của acid nitric 65% (120 °C). Việc nâng nhiệt độ từ từ sẽ cho phép vô cơ hóa các thành phần hữu cơ dễ bị oxy hóa ở điều kiện nhẹ nhàng, tránh gây ra phản ứng đột ngột dẫn tới tăng vọt nhiệt độ, áp suất.

- *Giai đoạn 2:* Vô cơ hóa triệt để những thành phần hữu cơ còn lại, đồng thời chuyển toàn bộ thủy ngân có trong mẫu về dạng vô cơ trong điều kiện nhiệt độ cao và áp suất cao.

Sau khi vô cơ hóa mẫu trong thiết bị xử lý mẫu bằng lò vi sóng, thêm dung dịch kali permanganat 5% để ổn định toàn lượng thủy ngân có trong mẫu về dạng Hg^{2+} , sau đó lượng kali permanganat dư sẽ được loại bỏ bằng dung dịch hydroxylamin để chuẩn bị sẵn sàng cho quá trình khử hóa Hg^{2+} về Hg^0 ở dạng hơi để phân tích bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử.

Chương trình nhiệt độ cho thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng được xác lập như ở bảng 3.45.

Bảng 3.45 - Chương trình nhiệt độ cho thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng.

Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất giới hạn (bar)	Công suất giới hạn (W)	Chế độ gia nhiệt
15	$t_{\text{phòng}} - 120$	20	500	Gradient tuyến tính
10	120	20	1000	Duy trì nhiệt độ
10	120-150	30	1000	Gradient tuyến tính
5	150	30	1000	Duy trì nhiệt độ
10	150-180	30	1000	Gradient tuyến tính
5	180	30	1000	Duy trì nhiệt độ

❖ *Lượng mẫu phân tích:*

Khối lượng mỹ phẩm sử dụng cho mỗi lần phân tích quyết định lượng tác nhân

oxy hoá cần sử dụng khi vô cơ hoá mẫu. Vì vậy đây cũng là một yếu tố cần quan tâm đến. Khối lượng mẫu cần phải dùng cho mỗi lần phân tích phụ thuộc trực tiếp vào lượng thủy ngân có trong mẫu.

Thiết bị phân tích thủy ngân tại cơ sở cho phép xác định trong dải khối lượng thủy ngân từ 100 ng đến 1000 ng trong mẫu phân tích. Kết quả thực nghiệm thu được cho thấy trên các đối tượng mẫu mỹ phẩm đã phân tích, lượng mẫu tối ưu cần thiết cho một lần đo là khoảng 0,2 g mỹ phẩm. Do đó, trong các khảo sát tiếp theo lượng tác nhân vô cơ hoá được xây dựng cho trường hợp vô cơ hoá khoảng 0,2 g mỹ phẩm cho mỗi mẫu phân tích thủy ngân.

❖ *Lượng tác nhân vô cơ hoá sử dụng:*

- *Đối với mỹ phẩm dạng kem bôi da:*

Với lượng mẫu phân tích khoảng 0,2 g, với các hỗn hợp vô cơ hóa có tỷ lệ acid nitric và hydroperoxid khác nhau đã được thử nghiệm.

Những kết quả thực nghiệm thu được ở bảng 3.46, cho thấy sử dụng 3ml acid nitric 65% và 1 ml hydroperoxid 30% cho quá trình vô cơ hoá mẫu là thích hợp nhất cho các mẫu mỹ phẩm đem nghiên cứu.

Bảng 3.46. Các hỗn hợp đã thử nghiệm trong vô cơ hóa mẫu kem bôi da

Dung dịch acid nitric 65% (ml)	Dung dịch hydroperoxid 30% (ml)	Nhận xét
1	1	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
2	1	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
3	1	Phân huỷ hoàn toàn mỹ phẩm
5	1	Phân huỷ hoàn toàn mỹ phẩm nhưng lượng acid dư lớn,

- *Đối với mỹ phẩm dạng phấn bôi da:*

Với lượng mẫu phân tích khoảng 0,2 g, các hỗn hợp vô cơ hóa có tỷ lệ acid nitric và acid sulfuric khác nhau cũng đã được thử nghiệm.

Bảng 3.47. Các hỗn hợp đã thử nghiệm trong vô cơ hóa mẫu phấn bôi da

Dung dịch acid nitric 65% (ml)	Acid sulfuric 98% (ml)	Nhận xét
1	1	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
2	1	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
2	2	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
3	2	Không đủ phân huỷ hết mỹ phẩm
3	3	Phân huỷ hoàn toàn mỹ phẩm
4	4	Phân huỷ hoàn toàn mỹ phẩm nhưng lượng acid dư lớn,

Những kết quả thực nghiệm thu được như ở bảng 3.47, cho thấy sử dụng đồng thể tích 3 ml acid nitric 65% và 3 ml acid sulfuric 98% cho quá trình vô cơ hóa mẫu là thích hợp nhất, phù hợp với mỹ phẩm dạng phấn bôi da đem nghiên cứu đồng thời tiết kiệm hóa chất cho quá trình nghiên cứu.

3.2.2.2. Chuẩn bị mẫu đo:

❖ Chuẩn bị mẫu phân tích:

Từ các kết quả khảo sát trên, cách xử lý để chuẩn bị mẫu phân tích được đưa ra như sau:

Cân chính xác khoảng 0,2000 g mẫu mỹ phẩm cần xác định thủy ngân vào cốc teflon của thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng. Nếu lượng thủy ngân trong mẫu quá lớn có thể điều chỉnh giảm lượng cân mẫu xuống, nhưng lượng cân mẫu đem vô cơ hóa phải đảm bảo không dưới 50 mg.

Thêm vào từng cốc: 3 ml acid nitric 65%, 1 ml hydroperoxid 30% (đối với mỹ phẩm dạng kem bôi da) hoặc 3 ml acid nitric 65%, 3 ml acid sulfuric 98% (đối với mỹ phẩm dạng phấn bôi da).

Đậy kín cốc, cho vào trong thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng. Vận hành thiết bị sử dụng chương trình nhiệt độ, áp suất như ở bảng 3.45.

Sau khi quá trình vô cơ hóa kết thúc, để cho nhiệt độ, áp suất trong các cốc teflon trở về cân bằng với môi trường phòng thí nghiệm. Lấy cốc teflon ra khỏi thiết bị. Chuyển dung dịch trong cốc teflon vào cốc đo thủy ngân. Tráng cốc teflon bằng 20ml dung dịch acid sulfuric 5%, chuyển dịch tráng cốc sang cốc đo thủy ngân.

Cho thêm vào cốc đo thủy ngân nước trao đổi ion đến khoảng 100 ml. Thêm vào cốc từng giọt dung dịch kali permanganat 5% trong acid sulfuric 5% cho đến khi dung dịch trong cốc có màu hồng bền trong 15 phút.

- *Đối với mỹ phẩm dạng kem bôi da:* Trước khi tiến hành đo thủy ngân, thêm từng giọt dung dịch hydroxylamin 10% trong nước vào cốc đến khi mất màu hồng.

- *Đối với mỹ phẩm dạng phấn bôi da:* Loại bỏ lượng dư kali permanganat bằng dung dịch hydroxylamin 10% trong nước trao đổi ion đến khi mất màu hồng. Lọc dịch mẫu thu được qua giấy lọc vào bình nón (loại bỏ một số tạp chất không bị phân hủy hết trong quá trình vô cơ hóa). Bình nón và giấy lọc đã được xử lý bằng HNO_3 10% để loại hết kim loại trước khi lọc. Tráng cốc teflon bằng nước trao đổi ion, chuyển dịch tráng cốc lên phễu lọc. Sau khi lọc xong, chuyển dịch lọc vào cốc đo thủy ngân, tráng bình nón bằng dung dịch nước trao đổi ion. Đổ dịch tráng cốc vào cốc đo thủy ngân. Thêm nước trao đổi ion vào cốc đo thủy ngân cho đến khoảng 200 ml.

Nếu kết quả đo sơ bộ cho thấy hàm lượng thủy ngân trong mẫu thử cao hơn phạm vi của đường chuẩn (100-1000 ng), tiến hành pha loãng mẫu trước khi đo như sau:

- Chuyển toàn bộ dịch thu được trong cốc teflon sau khi vô cơ hóa vào bình định mức 50 ml, tráng cốc teflon bằng 20 ml dung dịch acid sulfuric 5%, chuyển dịch tráng cốc sang bình định mức, vừa đủ tới vạch bằng dung dịch acid sulfuric 5%, lắc đều.

- Hút chính xác một thể tích thích hợp của dung dịch này vào cốc đo thủy ngân (thể tích hút tùy thuộc vào kết quả xác định sơ bộ để đảm bảo lượng thủy ngân đo được nằm trong phạm vi đường chuẩn), thêm 20 ml dung dịch acid sulfuric 5%, 100ml nước trao đổi ion.

- Thêm vào cốc từng giọt dung dịch kali permanganat 5% trong acid sulfuric 5% cho đến khi dung dịch trong cốc có màu hồng bền trong 15 phút.

- Trước khi tiến hành đo thủy ngân, thêm từng giọt dung dịch hydroxylamin 10% trong nước vào cốc đến khi mất màu hồng.

❖ *Chuẩn bị dung dịch chuẩn:*

Pha loãng chính xác thủy ngân chuẩn 1000 µg/ml bằng nước trao đổi ion để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ thủy ngân 100 ppb.

Hút chính xác lần lượt 1 ml, 3 ml, 5 ml, 7 ml và 10 ml dung dịch chuẩn gốc vào năm cốc đo thủy ngân riêng biệt.

Thêm vào từng cốc 20ml dung dịch acid sulfuric 5% và 100ml nước trao đổi ion. Thêm từng giọt dung dịch kali permanganat 5% trong acid sulfuric 5% vào các cốc cho đến khi dung dịch trong cốc có màu hồng bền trong 15 phút.

Trước khi tiến hành đo thủy ngân, thêm từng giọt dung dịch hydroxylamin 10% trong nước vào cốc đến khi mất màu hồng.

Các dung dịch chuẩn dùng để xây dựng đường chuẩn được chuẩn bị như trên có lượng thủy ngân lần lượt là 100 ng, 300 ng, 500 ng, 700 ng và 1000 ng.

3.2.2.3. Xác định các thông số làm việc của máy quang phổ:

❖ *Thông số của máy quang phổ hấp thụ nguyên tử:*

Để thực hiện tất cả các phép đo thủy ngân thực hiện trong đề tài này, các điều kiện được ngầm định trong máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Hitachi Z-5000 được sử dụng. Những thông số này cho độ hấp thụ của thủy ngân cao và ổn định nên được giữ nguyên để sử dụng không thay đổi. Cụ thể như sau:

- Vạch phổ đo: 253,7 nm
- Cường độ dòng làm việc của đèn cathod rỗng: 7,5 mA
- Độ rộng khe (slit width): 1,3 nm
- Thời gian lấy tín hiệu: 20 giây
- Tốc độ bơm nhu động của thiết bị phân tích thủy ngân: 300 vòng/phút.

❖ *Thông số hoạt động của bộ phân tích thủy ngân:*

Thiết bị phân tích thủy ngân chuyên dụng được thiết kế để đo thủy ngân bằng phương pháp gián đoạn. Yếu tố cần chú ý nhất trong hoạt động của thiết bị này là tốc độ quay của bơm nhu động. Tốc độ này phải đảm bảo được hai yêu cầu:

- Khi thiết bị hoạt động ở chế độ tuần hoàn (CIRCULATE) bơm phải tạo ra được dòng lưu thông ổn định và liên tục của hơi thủy ngân trong vòng tuần hoàn của hệ thống để tín hiệu đo được ổn định.

- Khi thiết bị hoạt động ở chế độ mở (OPEN), bơm phải tạo ra áp lực đủ lớn để đẩy được trọn vẹn hơi thủy ngân trong hệ thống vào bình thải trong thời gian hợp lý để quá trình phân tích không quá dài và không còn hơi thủy ngân đọng lại trong hệ thống gây sai số cho lần phân tích tiếp theo.

Thực tế cho thấy đặt bơm hoạt động ở tốc độ 300 vòng/phút là hợp lý hơn cả, tốc độ nhỏ hơn sẽ không tạo được áp lực đủ lớn và ổn định, tín hiệu đo không đạt được mức tối ưu và kém ổn định. Ngược lại, tốc độ bơm lớn hơn sẽ tạo ra những thay đổi về áp suất và dẫn tới tín hiệu dao động không ổn định.

❖ *Thao tác đo:*

Chuyển dung dịch cần đo thủy ngân vào bình đo của bộ phân tích thủy ngân, thêm 10 ml dung dịch SnCl_2 10%, đậy ngay nắp bình đo lại lắc đều 10 giây.

Chuyển thiết bị về chế độ tuần hoàn (CIRCULATE), bật bơm nhu động. Khi tín hiệu hấp thụ cao nhất và ổn định tiến hành đo để ghi lại độ hấp thụ.

Sau khi thực hiện phép đo, chuyển sang chế độ mở (OPEN). Khi độ hấp thụ đo được trên máy quang phổ hấp thụ nguyên tử trở về 0 có nghĩa là hệ thống đã được làm sạch thủy ngân và có thể lặp lại quá trình đo trên một mẫu khác.

Thực hiện đo độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn thủy ngân trước để thiết lập đường chuẩn thực nghiệm. Sau đó đo độ hấp thụ của các dung dịch thử, dựa vào đường chuẩn thực nghiệm để tính ra lượng thủy ngân trong mẫu thử.

3.2.2.3. Thẩm định qui trình

❖ *Tính đặc hiệu*

Mẫu nền: là mẫu mỹ phẩm khảo sát được cân chính xác khoảng 0,2000 g.

Mẫu tự tạo: Cân chính xác khoảng 0,2000 g mẫu phân, thêm 3 ml dung dịch chuẩn thủy ngân 100 ppb, trộn đều.

Mẫu chuẩn: 3 ml dung dịch thủy ngân chuẩn trong nước trao đổi ion có nồng độ 100 ppb.

Tiến hành vô cơ hóa cả ba mẫu trên trong thiết bị vô cơ hóa trong lò vi sóng với các tác nhân và điều kiện vô cơ hóa đã xác định. Kết quả thu được cho thấy là chấp nhận được và được trình bày trong bảng 3.48.

Bảng 3.48. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu

Mẫu	Độ hấp thụ tại bước sóng 253,7 nm
Mẫu nền	0
Mẫu tự tạo	0,0420
Mẫu chuẩn	0,0398

❖ *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Mối quan hệ giữa lượng thủy ngân và độ hấp thụ được đánh giá trên các dung dịch thủy ngân chuẩn chứa tổng lượng thủy ngân từ 100 ng đến 1000 ng. Đo độ hấp thụ của 5 dung dịch chuẩn được chuẩn bị như theo điều kiện đã được chọn, kết quả được trình bày trong bảng 3.49.

Bảng 3.49. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của thủy ngân

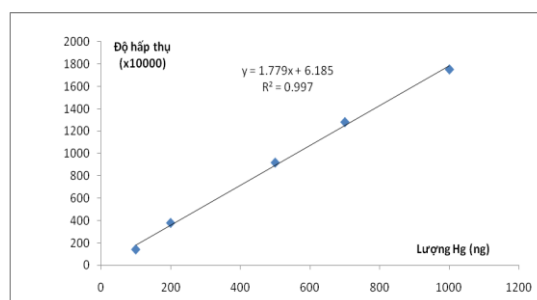
Lượng Hg chuẩn (ng)	Độ hấp thụ ($\times 10^4$)
100	144
200	381
500	920
700	1282
1000	1753

Phương trình hồi quy tuyến tính:

$$y = 1779.x + 6,185$$

với hệ số tương quan $r = 0,9987$.

Hình 3.20. Sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào tổng lượng thủy ngân



❖ *Độ lặp lại:*

Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp, tiến hành xác định hàm lượng thủy ngân trong cùng mẫu mỹ phẩm đã biết có chứa thủy ngân, sau 6 lần phân tích độc lập theo các điều kiện và cách tiến hành đã được xác định.

- *Đối với mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da:* Qua khảo sát sơ bộ xác định được mẫu HG02 có chứa thủy ngân.

- Trong mỗi lần phân tích, một lượng mẫu khoảng 0,1 g được vô cơ hóa trong thiết bị vô cơ hóa bằng vi sóng. Dung dịch thu được sau khi vô cơ hóa được định mức thành 50 ml dung dịch. Hút chính xác 10,0 ml của dung dịch này để đo thủy ngân. Kết quả được trình bày trong bảng 3.50.

Kết quả cho thấy sau 6 lần định lượng độc lập có RSD ở mức 5,8%. Mức lặp lại này là chấp nhận được với phương pháp phân tích dùng để kiểm tra phát hiện thủy

ngân trong mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da.

Bảng 3.50. Kết quả đánh giá độ lặp lại trên mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da

STT	Lượng cân mẫu (g)	Độ pha loãng D (lần)	Lượng Hg xác định được (ng)	Hàm lượng Hg trong mẫu (ppm)
1	0,1087	5	654,25	30,1
2	0,1012	5	670,80	33,1
3	0,1163	5	668,89	28,8
4	0,1127	5	653,62	29,0
5	0,1055	5	640,89	30,4
6	0,1103	5	626,89	28,4
Trung bình				29,9
RSD(%)				5,8

- Đối với mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da: Qua khảo sát sơ bộ xác định được mẫu HG02 có chứa thủy ngân.

Trong mỗi lần phân tích, một lượng mẫu khoảng 0,2 g được vô cơ hóa trong thiết bị vô cơ hóa bằng vi sóng. Dung dịch thu được sau khi vô cơ hóa được chuẩn bị và tiến hành đo thủy ngân. Kết quả được trình bày trong bảng 3.51.

Bảng 3.51. Kết quả đánh giá độ lặp lại trên mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da

STT	Lượng cân mẫu (g)	Lượng Hg xác định được (ng)	Hàm lượng Hg trong mẫu (ppm)
1	0,2023	187,76	0,93
2	0,2011	177,29	0,88
3	0,2019	182,34	0,90
4	0,1991	155,47	0,78
5	0,2037	191,57	0,94
6	0,2005	172,95	0,86
Trung bình			0,88
RSD(%)			6,4

Kết quả cho thấy sau 6 lần định lượng độc lập có RSD ở mức 6,4%. Mức lặp lại này là chấp nhận được với phương pháp phân tích dùng để kiểm tra phát hiện thủy ngân trong mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da.

❖ *Độ đúng:*

Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách xác định lượng thủy ngân chuẩn tìm lại được sau khi cho một lượng chính xác thủy ngân chuẩn vào nền mẫu mỹ phẩm đã biết không chứa thủy ngân (với mỹ phẩm dạng kem bôi da là mẫu HG01, với

mỹ phẩm dạng phấn bôi da là HG20), tiến hành xử lý mẫu và phân tích 6 lần độc lập. Kết quả được trình bày trong bảng 3.52 và bảng 3.53.

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ tìm lại trung bình là 102,26% (dao động từ 88,82% đến 116,55%). Kết quả này chấp nhận được với lượng thủy ngân cho vào nền mẫu rất nhỏ (ở cận dưới của khoảng tuyến tính và cũng là giới hạn định lượng của phương pháp).

Bảng 3.52. Kết quả đánh giá độ đúng trên mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da

STT	Lượng mẫu nền (g)	Lượng thủy ngân chuẩn thêm vào (ng)	Lượng thủy ngân chuẩn tìm lại được (ng)	Tỷ lệ tìm lại (%)
1	0,2021	100,0	95,17	95,17
2	0,2074	100,0	105,12	105,12
3	0,2117	100,0	97,64	97,64
4	0,2063	100,0	88,82	88,82
5	0,2203	100,0	110,27	110,27
6	0,2145	100,0	116,55	116,55
Trung bình				102,26
RSD (%)				10,05

Bảng 3.53. Kết quả đánh giá độ đúng trên mẫu mỹ phẩm dạng phấn bôi da

STT	Lượng mẫu nền (g)	Lượng thủy ngân chuẩn thêm vào (ng)	Lượng thủy ngân chuẩn tìm lại được (ng)	Tỷ lệ tìm lại (%)
1	0,2004	100,0	107,49	107,49
2	0,2012	100,0	101,26	101,26
3	0,2006	100,0	98,94	98,94
4	0,2023	100,0	92,43	92,43
5	0,2007	100,0	98,27	98,27
6	0,2011	100,0	105,75	105,75
Trung bình				100,69
RSD (%)				5,43

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ tìm lại trung bình là 100,69% (dao động từ 92,43% đến 107,49%). Kết quả này chấp nhận được với lượng thủy ngân cho vào nền mẫu rất nhỏ.

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):*

Thực nghiệm cho thấy lượng thủy ngân trong mẫu đo là 100 ng cho độ hấp thụ ổn định trong các điều kiện phân tích cao gấp 10 lần so với nhiễu nền thu được

từ mẫu trắng. Với tổng lượng thủy ngân trong mẫu là 30 ng cũng cho độ hấp thụ ổn định trong các điều kiện phân tích cao gấp 3 lần so với nhiều đường nền.

Từ các kết quả trên, giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp xác định được là 30 ng tính theo tổng lượng thủy ngân có trong phần mẫu đem phân tích. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp xác định được là 100 ng thủy ngân tính theo tổng lượng thủy ngân có trong phần mẫu đem phân tích.

Nếu tính theo lượng mẫu mỹ phẩm lấy đem phân tích là 0,2g thì LOD và LOQ tương ứng với hàm lượng thủy ngân trong mẫu lần lượt là 150 ppb và 500 ppb.

3.3.2. Chì (Pb)

3.3.2.1. Xử lý mẫu :

❖ Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu vào cốc teflon dung tích 100 ml, thêm 3 ml acid nitric 65%, 1 ml nước oxy già 30%, để yên 1 giờ. Lắp cốc teflon vào lò vi sóng rồi tiến hành vô cơ hóa theo chương trình trong bảng 3.54.

Bảng 3.54. Chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

Giai đoạn	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Công suất (W)	Áp suất (bar)
1	10	120	1000	20
2	5	120-150	1000	30
3	10	150	1000	30
4	10	150-200	1000	30
5	5	200	1000	30

Khi giai đoạn vô cơ hóa mẫu kết thúc, để nguội. Thêm 10 ml nước trao đổi ion vào cốc, lắc đều, lọc vào bình định mức 50 ml. Tráng rửa cốc phá mẫu, giấy lọc 2 lần, mỗi lần 10 ml nước trao đổi ion, gộp dịch rửa vào bình định mức trên, thêm vừa đủ đến vạch bằng nước trao đổi ion, lắc đều.

❖ Chuẩn bị các dung dịch chuẩn

Từ dung dịch chuẩn gốc chì có nồng độ 1000 mg/l, tiến hành pha loãng với nước trao đổi ion để được dung dịch chuẩn chì có nồng độ 500 ng/ml. Pha loãng dung dịch chuẩn chì nồng độ 500 ng/ml với dung dịch acid nitric 1 % để được các dung dịch chuẩn làm việc chì có các nồng độ lần lượt là 5, 10, 20, 30 và 40 ng/ml.

3.3.2.2. Qui trình phân tích

❖ Các thông số máy:

Loại đèn: Cathod rỗng chì

Cường độ đèn: 9 mA

Bước sóng: 283,3nm

Độ rộng khe sáng: 1,3 nm

Cuvet graphit: Tube A

Tốc độ khí mang (Argon) tại giai đoạn nguyên tử hoá: 30 ml/phút

Thể tích mẫu: 20 µl

Thể tích dung dịch nền: 10 µl.

Bảng 3.55. Chương trình nhiệt độ tối ưu để phân tích chì

<i>Giai đoạn</i>	<i>Nhiệt độ bắt đầu/ kết thúc (°C)</i>	<i>Thời gian tăng/duy trì nhiệt độ (giây)</i>	<i>Tốc độ dòng khí (ml/ phút)</i>
Làm khô	70/140	40/0	200
Tro hoá	400/550	10/20	200
Nguyên tử hoá	2000/2000	0/5	30
Làm sạch lò	2200/2200	0/4	200
Làm nguội lò	0/0	0/17	200

❖ *Cách tiến hành:*

Với các thông số đã được chọn, tiến hành đo độ hấp thụ của chì trong dung dịch chuẩn, dung dịch thử bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử, kỹ thuật nguyên tử hoá không ngọn lửa, sử dụng cuvet graphit (pha loãng dung dịch thử nếu cần sao cho nồng độ chì trong dung dịch thử phải nằm trong dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 5-40 ng/ml). Mẫu trắng là dung dịch acid nitric 1 %. Lập đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ chì trong dãy chuẩn. Tính toán nồng độ chì trong dung dịch thử dựa vào đường chuẩn.

3.3.2.3. Thẩm định qui trình :

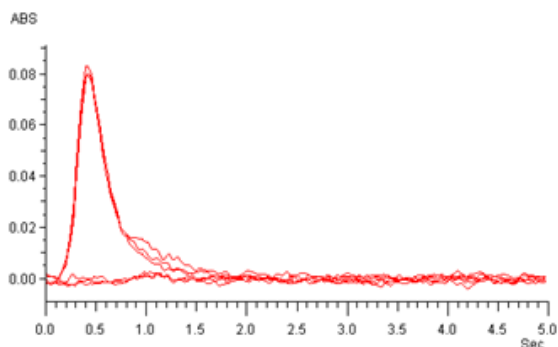
❖ *Tính đặc hiệu*

- Chuẩn bị các dung dịch thử: Cân khoảng 0,2 g mỗi mẫu PB01, PB02 và PB03 vào các cốc teflon, thêm các lượng thuốc thử rồi tiến hành xử lý mẫu và đo độ hấp thụ của chì.
- Chuẩn bị các dung dịch thử thêm chuẩn: Cân khoảng 0,2 g mỗi mẫu PB01, PB02 và PB03 vào các cốc teflon, thêm 1 ml dung dịch chì chuẩn 500 ng/ml, thêm các lượng thuốc thử rồi tiến hành xử lý mẫu như đã nêu.
- Dung dịch chuẩn chì 10 ng/ml: hút chính xác 1 ml dung dịch chuẩn chì nồng độ 500 ng/ml vào bình định mức 50 ml, thêm dung dịch acid nitric 1% vừa đủ đến vạch, lắc đều.
- Dung dịch mẫu trắng là dung dịch acid nitric 1%.

Tiến hành đo độ hấp thụ của các dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn, dung dịch mẫu trắng và dung dịch chuẩn chì 10 ng/ml, theo các thông số đã chọn.

Kết quả: dung dịch mẫu thử, mẫu trắng cho độ hấp thụ không đáng kể (nhỏ hơn 30% giới hạn định lượng). Mẫu thử thêm chuẩn và mẫu chuẩn chì cho độ hấp thụ lớn hơn 0,05 tại bước sóng đặc trưng của chì 283,3 nm (hình 3.21). Kết quả cho thấy

phương pháp có độ đặc hiệu cao (dung dịch thử thêm chuẩn cho hấp thụ cực đại ở bước sóng 283,3 nm không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu)



Hình 3.21. Độ hấp thụ của chì tại 283,3nm của các dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn và mẫu trắng.

❖ Khoảng nồng độ tuyến tính

Tiến hành pha các dung dịch chì chuẩn có các nồng độ lần lượt là 5, 10, 20, 30 và 40 ng/ml, đo độ hấp thụ của các dung dịch này theo các thông số đã chọn. Kết quả khảo sát được trình bày trong bảng 3.56.

Bảng 3.56. Khoảng tuyến tính của phương pháp

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ (ng/ml)	5	10	20	30	40
Độ hấp thụ	0,0385	0,0728	0,1337	0,1914	0,2469

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chì trong dung dịch chuẩn và độ hấp thụ. Phương trình hồi qui xác định được là: $y = 0,0059x + 0,0121$ với hệ số tương quan $r = 0,9995$ và hệ số y-intercept $Y = 9,1\%$

❖ Độ lặp lại, độ đúng

Qua khảo sát sơ bộ, cho thấy mẫu PB01, PB02 và PB03 không nhiễm chì, các mẫu PB04 và PB05 nhiễm chì. Chuẩn bị các mẫu để khảo sát như sau:

- *Độ lặp lại của phương pháp*: Tiến hành cân lặp lại 6 lần các mẫu từ PB01 đến PB05, với lượng cân khoảng từ 0,15 đến 0,2 g cho vào các cốc teflon. Thêm lần lượt 1 ml dung dịch chì chuẩn có nồng độ 500 ng/ml vào mỗi cốc chứa các mẫu PB01, PB02 và PB03, thêm các lượng thuốc thử vào tất cả các cốc và vô cơ hoá mẫu theo qui trình. Với mẫu PB04 và PB05 là những mẫu đã nhiễm chì nên đánh giá độ lặp lại của phương pháp bằng chính nền mẫu đó mà không cho thêm chuẩn vào nền mẫu để tạo mẫu tự tạo.

- *Độ đúng của phương pháp*: Tiến hành cân lặp lại 6 lần các mẫu từ PB01 đến PB05, với lượng cân khoảng từ 0,15 đến 0,2 g vào các cốc teflon, Thêm lần lượt vào mỗi cốc 1,0 ml dung dịch chì chuẩn có nồng độ 500 ng/ml, thêm các lượng thuốc thử và vô cơ hoá mẫu theo qui trình đã nêu trên.

Do độ hấp thụ của chì trong các dung dịch thu được theo thông số đã chọn, tính toán hàm lượng chì trong dung dịch thử dựa vào đường chuẩn. Kết quả độ lặp lại, độ đúng trên các mẫu được thể hiện ở các bảng 3.57 và bảng 3.58.

Bảng 3.57. Kết quả đánh giá độ lặp lại, độ đúng của phương pháp trên mẫu không chứa chì.

S T T	Lượng Pb thêm vào (ng/ml)	PB01			PB02			PB03		
		Lượng cân (g)	Lượng Pb tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Lượng cân (g)	Lượng Pb tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Lượng cân (g)	Lượng Pb tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	10	0,2097	9,668	96,7	0,2103	8,091	80,9	0,2056	10,132	101,3
2	10	0,2221	8,520	85,2	0,2056	8,597	86,0	0,2136	9,513	95,1
3	10	0,2015	8,503	85,0	0,2078	7,872	78,7	0,2077	8,792	87,9
4	10	0,2175	8,803	88,0	0,2017	8,411	84,1	0,2027	9,188	91,9
5	10	0,2248	9,421	94,2	0,2138	8,647	86,5	0,2045	9,752	97,5
6	10	0,2261	10,197	102,0	0,2211	10,536	101,5	0,2176	10,253	102,5
		Trung bình		91,9			86,3			96,1
		RSD (%)		7,51			9,31			5,81

Bảng 3.58. Kết quả độ lặp lại và độ đúng của phương pháp trên mẫu có chứa chì

S T T	Độ lặp lại		Độ đúng			
	Lượng mẫu thử (g)	Lượng chì tìm thấy (ng/ml)	Lượng mẫu thử (g)	Lượng Pb thêm vào (ng/ml)	Lượng Pb tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)
PB04						
1	0,1656	6,524	0,1530	10	7,846	78,5
2	0,1553	6,492	0,1554	10	8,935	89,4
3	0,1519	6,792	0,1566	10	8,716	87,2
4	0,1525	7,084	0,1537	10	9,335	93,4
5	0,1575	5,588	0,1579	10	8,252	82,5
6	0,1517	5,956	0,1515	10	8,663	86,6
	Trung bình	6,404		Trung bình		86,2
	RSD (%)	8,59		RSD (%)		6,07
PB05						
1	0,2102	9,660	0,2133	10	8,6247	86,3
2	0,2055	8,468	0,2056	10	8,1579	81,6
3	0,2078	8,612	0,2152	10	9,5143	95,1
4	0,2014	8,228	0,2081	10	10,2558	102,6
5	0,2204	8,940	0,2049	10	8,9524	89,5
6	0,2039	8,628	0,2035	10	8,3568	83,6
	Trung bình	8,756		Trung bình		89,8
	RSD (%)	5,71		RSD (%)		8,77

Kết quả cho thấy phương pháp thử có độ lặp lại, độ đúng chấp nhận được đối với tất cả các mẫu có nền mẫu phức tạp đã khảo sát (mẫu kem, son môi, dầu gội, phấn

má, sữa rửa mặt) và hàm lượng chì thấp. Độ lặp lại RSD (%) nhỏ hơn 9,5, khả năng thu hồi của các mẫu đã khảo sát nằm trong khoảng từ 86,2 % đến 96,1%.

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)*

LOD được xác định bằng cách đo lặp lại 10 lần trên mẫu trắng. Dựa vào độ lệch chuẩn S, hệ số góc của đường chuẩn ($a=0,0059$) tính LOD và LOQ theo các công thức sau: $LOD = 3 \times S/a$; $LOQ = 3,3 \times LOD$. Kết quả xác định được:

- LOD là 0,8 ng/ml (tương ứng 200 ng/g mẫu thử),
- LOQ là 2,6 ng/ml (tương ứng 660 ng/g mẫu thử).

3.3.3. Arsen (As)

3.3.3.1. Chuẩn bị mẫu thử nghiệm

❖ *Mẫu thử từ mỹ phẩm:*

Cân chính xác khoảng 0,15 đến 0,2 g mẫu vào cốc teflon dung tích 100 ml, thêm 3 ml acid nitric 65%, 1 ml nước oxy già 30%, để yên 1 giờ. Tiến hành vô cơ hóa trong lò vi sóng theo chương trình nhiệt độ, công suất và áp suất như bảng 3.59.

Bảng 3.59. Chương trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

<i>Giai đoạn</i>	<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Nhiệt độ (°C)</i>	<i>Công suất (W)</i>	<i>Áp suất (bar)</i>
1	10	120	1000	20
2	5	120-150	1000	30
3	10	150	1000	30
4	10	150-200	1000	30
5	5	200	1000	30

Khi quá trình vô cơ hóa mẫu kết thúc, để nguội, chuyển cốc phá mẫu ra khỏi lò vi sóng, mở nắp để khói trong cốc bay hết. Thêm 10 ml nước trao đổi ion vào cốc, lắc đều, lọc vào bình định mức 50 ml. Tráng rửa cốc phá mẫu, giấy lọc 2 lần, mỗi lần 10 ml nước trao đổi ion, gộp dịch rửa vào bình định mức trên, vừa đủ bằng nước trao đổi ion đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 10 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm 10 ml acid hydrocloric 37%, thêm 5 ml dung dịch kali iodid 20%, thêm vừa đủ bằng nước trao đổi ion đến vạch, lắc đều.

❖ *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:*

Từ dung dịch chuẩn gốc arsen có nồng độ 1000 mg/l, tiến hành pha loãng với dung dịch acid nitric 1% để được dung dịch chuẩn arsen có nồng độ 50 ng/ml. Pha loãng dung dịch chuẩn arsen nồng độ 50 ng/ml với dung dịch acid hydrocloric 4N để được các dung dịch chuẩn arsen làm việc có các nồng độ lần lượt là 1, 2, 4, 6 và 8ng/ml, thêm dung dịch kali iodid 20% vào dung dịch cuối với tỷ lệ 1/10.

❖ *Chuẩn bị mẫu trắng:*

Hút chính xác 5 ml dung dịch kali iodid 20% vào bình định mức 50 ml, thêm dung dịch acid hydrocloric 4N vừa đủ tới vạch, lắc đều.

3.3.3.2. Quy trình phân tích

❖ Các thông số máy:

Qua quá trình khảo sát, kết hợp tham khảo tài liệu thiết bị, các thông số tối ưu để phân tích arsen được chọn như sau:

Loại đèn: Cathod rỗng arsen

Cường độ đèn: 12 mA

Bước sóng: 193,7 nm

Độ rộng khe sáng: 0,4 nm

Tốc độ dẫn dung dịch natri borohydrid 0,5% (trong dung dịch NaOH 0,4%): 8ml/phút

Tốc độ dẫn dung dịch acid hydrochloric 4N: 8 ml/phút

Tốc độ dẫn mẫu 12 ml/phút

Tốc độ khí acetylen: 2,1 lít/phút

Áp suất không khí nén: 160 kPa

Tốc độ khí mang (Argon): 300 ml/phút.

❖ Cách tiến hành:

Trước khi tiến hành phân tích, để các dung dịch chuẩn, thử và trắng vào nước nóng tại 70 °C trong 30 phút, để nguội.

Với các thông số đã chọn, tiến hành đo mẫu trắng, autozero để đưa độ hấp thụ nền về 0, lần lượt đo độ hấp thụ arsen của các dung dịch chuẩn, dung dịch thử trên thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử, kỹ thuật hoá hơi hydrid (pha loãng dung dịch thử nếu cần sao cho nồng độ arsen trong dung dịch thử phải nằm trong dãy chuẩn). Lập đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ arsen trong dãy chuẩn. Tính toán nồng độ arsen trong dung dịch thử dựa vào đường chuẩn.

❖ Tính kết quả

Hàm lượng arsen trong mẫu (µg/g) được tính theo công thức sau:

$$m_{(\mu\text{g/g})} = \frac{C.D}{1000.p}$$

trong đó: C: Nồng độ arsen trong dung dịch thử (ng/ml)

p: Khối lượng mẫu thử đem xác định (g),

D: Hệ số pha loãng của dung dịch thử,

3.3.3. Đánh giá quy trình

❖ Độ đặc hiệu

Phương pháp phân tích quang phổ hấp thụ nguyên tử, sử dụng đèn cathod rỗng làm nguồn phát xạ có đặc điểm chỉ phát ra những tia phát xạ thuần khiết gồm một số vạch nhẩy đặc trưng cho nguyên tố cần phân tích, có bước sóng (tần suất) nhất định ứng đúng với tia bức xạ mà nguyên tử của nguyên tố cần phân tích có thể phát ra trong

quá trình phát xạ của nó. Vì vậy sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, trang bị đèn cathod rỗng arsen là đặc hiệu để phân tích arsen tại vạch phát xạ của arsen 193,7 nm.

❖ **Khoảng nồng độ tuyến tính**

Tiến hành pha các dung dịch arsen chuẩn có các nồng độ lần lượt là 1, 2, 4, 6 và 8 ng/ml như mục 3.3.3.2, đo độ hấp thụ của các dung dịch này theo các thông số đã chọn. Kết quả khảo sát được trình bày trong bảng 3.60.

Bảng 3.60. Khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng arsen

Dung dịch chuẩn	1	2	3	4	5
Nồng độ (ng/ml)	1	2	4	6	8
Độ hấp thụ	0,0107	0,0211	0,0400	0,0614	0,0774

Qua bảng 3.60 cho thấy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ arsen trong dung dịch chuẩn và độ hấp thụ. Phương trình hồi qui xác định được là: $y = 0,0096x + 0,0017$, với hệ số tương quan $r = 0,9990$.

❖ **Độ lặp lại, độ đúng**

Qua khảo sát sơ bộ, cho thấy mẫu kem dưỡng da AS01 và son môi AS02 không nhiễm arsen, mẫu phấn má AS03 bị nhiễm arsen.

- *Khảo sát độ lặp lại của phương pháp:* Tiến hành cân lặp lại 6 lần các mẫu từ AS01 đến AS03, với lượng cân khoảng từ 0,15 đến 0,2 g vào các cốc teflon. Thêm lần lượt vào mỗi cốc chứa các mẫu AS01 và AS02 1 ml dung dịch arsen chuẩn có nồng độ 1000 ng/ml, thêm các lượng thuốc thử vào tất cả các cốc và vô cơ hoá mẫu theo qui trình đã nêu. Với mẫu AS03 do đã nhiễm arsen nên đánh giá độ lặp lại của phương pháp trên chính nền mẫu đó mà không phải thêm chuẩn arsen vào nền mẫu.

- *Khảo sát độ đúng của phương pháp:* Tiến hành cân lặp lại 6 lần các mẫu từ AS01 đến AS03, với lượng cân khoảng từ 0,15 đến 0,2 g vào các cốc teflon. Thêm lần lượt vào mỗi cốc 1 ml dung dịch arsen chuẩn có nồng độ 1000 ng/ml, thêm các lượng thuốc thử và vô cơ hoá mẫu theo qui trình đã nêu.

Đo độ hấp thụ của arsen trong các dung dịch thu được theo các thông số đã chọn, tính toán hàm lượng arsen trong dung dịch thử dựa vào đường chuẩn. Kết quả độ lặp lại, độ đúng trên các mẫu được thể hiện ở bảng 3.61.

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại, độ đúng chấp nhận được đối với mẫu có nền mẫu phức tạp và hàm lượng arsen thấp. Độ lặp lại RSD (%) của phương pháp trên các mẫu khảo sát là đều dưới 6,2, khả năng thu hồi trên các mẫu đã khảo sát trong khoảng từ 80,3% đến 105,0%.

Bảng 3.61. Kết quả đánh giá độ lặp lại, độ đúng của phương pháp trên mẫu.

S T T	Lượng As thêm vào (ng/ml)	Kem dưỡng da AS01			Son môi AS 02			Phấn má AS 03		
		Lượng cân (g)	Lượng As tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Lượng cân (g)	Lượng As tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Lượng cân (g)	Lượng As tìm lại (ng/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	4	0,2097	3,669	91,7	0,2103	4,124	103,1	0,1530	3,478	87,0
2	4	0,2221	3,586	89,6	0,2056	3,815	95,4	0,1554	3,257	81,4
3	4	0,2015	3,793	94,8	0,2078	3,556	88,9	0,1566	3,510	87,7
4	4	0,2175	3,336	83,4	0,2017	4,202	105,0	0,1537	3,255	81,4
5	4	0,2248	3,824	95,6	0,2138	3,769	94,2	0,1579	3,210	80,3
6	4	0,2261	3,793	94,8	0,2211	3,826	95,6	0,1515	3,658	91,5
		Trung bình		91,9			97,0			84,9
		RSD (%)		5,07			6,17			5,31

❖ *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)*

LOD được xác định bằng cách đo lặp lại 10 lần trên mẫu trắng. Dựa vào độ lệch chuẩn S, hệ số góc của đường chuẩn (a) tính LOD và LOQ theo các công thức sau: $LOD = 3,3 \cdot \delta / a$ và $LOQ = 3,3 \cdot LOD$. Kết quả xác định được:

- LOD là 0,3 ng/ml (tương ứng 75 ng/g mỹ phẩm)
- LOQ là 0,99 ng/ml (tương ứng 247,5 ng/g mỹ phẩm)

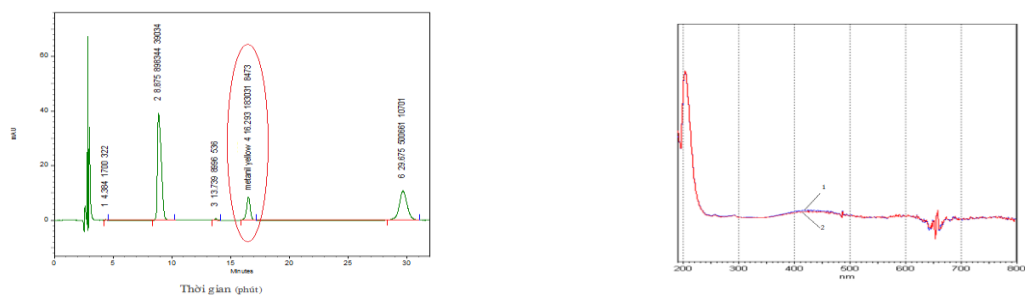
Pha các dung dịch arsen trong nền các mẫu khảo sát để có nồng độ arsen tại giá trị LOD và LOQ. Kết quả cho thấy giá trị LOD và LOQ như trên là phù hợp.

3.4. KẾT QUẢ KIỂM TRA MỘT SỐ HỢP CHẤT BỊ CẤM VÀ CÓ GIỚI HẠN SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM LƯU HÀNH TRÊN THỊ TRƯỜNG

3.4.1. Metanil yellow

Quy trình phân tích để phát hiện MY đã được áp dụng để kiểm tra 6 mẫu son môi và 8 mẫu sơn móng tay trên thị trường. Danh sách cụ thể các mẫu đã kiểm tra được liệt kê cụ thể trong bảng 3.62.

Kết quả đã phát hiện thấy 1 mẫu sơn móng tay không có nhãn mác, địa chỉ nhà sản xuất (mẫu MY07) cho pic có cùng thời gian lưu và phổ UV-VIS (với hệ số tương đồng khi so sánh phổ bằng 0,9913) như pic MY chuẩn. Những kết quả định tính trên cho phép kết luận mẫu chứa MY (hình 3.22). Tính toán định lượng cho thấy hàm lượng Metanil yellow trong mẫu là 28,33 µg/g.



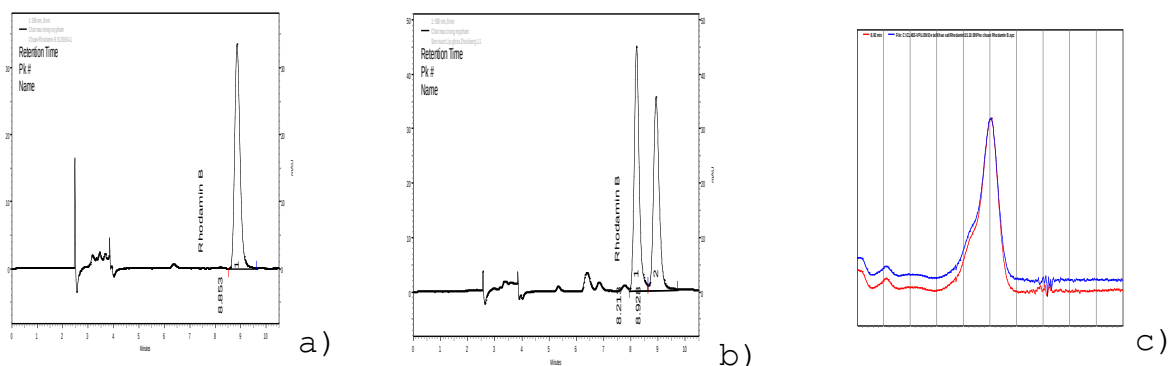
Hình 3.22. Sắc ký đồ và kết quả so sánh phổ UV-VIS khi phân tích với mẫu sơn móng tay không rõ nguồn gốc có chứa Metanil yellow.

Bảng 3.62. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Metanil yellow

Mã số	Tên mẫu	Kết quả phát hiện MY
MY01	Son nước Lip on Lip của hãng Rohto (Việt Nam): màu hồng tro,	-
MY02	Son môi Aqua lipstick của hãng Prorance (Hàn Quốc): màu vàng cam	-
MY03	Son môi Crystal của hãng Essance (Việt Nam): màu đỏ,	-
MY04	Son môi hai đầu E'zup của hãng Debon (Việt Nam): màu vàng cam	-
MY05	Son môi hai đầu Lipgloss (Trung Quốc): màu vàng cam	-
MY06	Son môi Rose Lady của hãng VOV: màu vàng cam	-
MY07	Son móng tay màu vàng không nhãn	+ (28,33µg/g)
MY08	Son móng tay màu cam không nhãn được gắn số 20	-
MY09	Son vẽ móng của hãng Zhi Yan (Đài Loan): màu vàng	-
MY10	Son vẽ móng của hãng Chen Xi (Đài Loan): màu vàng cam	-
MY 11	Son móng tay nhũ vàng không có nhãn	-
MY 12	Son vẽ móng của hãng Kiệt Thắng (Đài Loan): màu vàng	-
MY 13	Son móng tay màu vàng nhạt mang số 20 không nhãn mác	-
MY 14	Son môi (Đài Loan): màu đỏ	-

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

3.4.2. Rhodamin B



Hình 3.23. Kết quả phân tích mẫu sơn nước số RB14 có chứa Rhodamin B.
a) SKĐ của dd chuẩn Rhodamin B; b) SKĐ của mẫu RB14 và c) so sánh phổ UV-VIS,

Qui trình xây dựng đã được áp dụng để kiểm tra 7 mẫu son môi, 5 mẫu son móng, 5 mẫu phấn mắt và 1 mẫu phấn má mua trên thị trường. Trong 18 mẫu đã kiểm tra có 2 mẫu son móng (mẫu số RB09 và RB10) và 1 mẫu son nước (mẫu RB14) cho pic có thời gian lưu và phổ UV-VIS tương ứng với pic của chuẩn Rhodamin B, chứng tỏ 3 mẫu trên có Rhodamin B, trong đó kết quả định lượng trên mẫu RB14 cho hàm lượng Rhodamin B là 20,0 µg/g (Hình 3.23).

Bảng 3.63. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Rhodamin B

Mã số	Tên mẫu	Kết quả phát hiện RB
RB01	Phấn mắt Aolili	-
RB02	Phấn mắt Belove hồng	-
RB03	Phấn mắt Belove tím	-
RB04	Phấn mắt Celia tím	-
RB05	Phấn mắt VOV tím	-
RB06	Phấn má Ludanmei	-
RB07	Son móng Felina LaValse hồng	-
RB08	Son móng Melia hồng	-
RB09	Son móng không tên màu hồng tím	+
RB 10	Son móng Kiệt Thắng màu hồng tím	+
RB 11	Son móng Melia tím	-
RB 12	Son nước Starshine 01 màu hồng đậm	-
RB 13	Son nước Starshine 08 màu hồng cam	-
RB 14	Son nước Lipgloss Zhoubang	+ (20,0µg/g)
RB 15	Son thời Essance RD201	-
RB 16	Son thời Etudé	-
RB 17	Son thời MAC	-
RB 18	Son thời Rose Lady, VOV	-

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

3.4.3. Pigment red 53

Áp dụng phương pháp phát hiện Pigment red 53 vừa xây dựng để kiểm tra 14 mẫu son môi, 6 mẫu phấn má mua trên thị trường, Danh sách các mẫu được kiểm tra và kết quả thu được như ở bảng 3.64.

Trong 20 mẫu kiểm tra, đã phát hiện được 6 mẫu có chứa PR, trong số đó có 4 mẫu son (PR01, PR11, PR12 và PR14) và 2 mẫu phấn má (PR15 và PR20). Thời gian lưu của các pic nghi ngờ trùng với thời gian lưu của pic PR chuẩn. So phổ UV-VIS của các pic này với pic PR chuẩn đều thu được hệ số tương thích phổ (Similarity) rất cao. Tiến hành định lượng PR trong 6 mẫu này, Kết quả thu được như ở bảng 3.65.

Kết quả cho thấy hàm lượng PR trong các mẫu son là tương đối nhỏ nhưng tỷ lệ ở 2 mẫu phấn má là khá cao, Tuy số mẫu được kiểm tra chưa nhiều nhưng tỷ lệ có chứa PR đáng lo ngại (30%), Chứng tỏ nguy cơ lạm dụng PR trong mỹ phẩm là rất

cao. Do vậy cần mở rộng thêm việc kiểm tra PR trong mỹ phẩm để có kết luận chính xác hơn.

Bảng 3.64. Kết quả kiểm tra các mẫu mỹ phẩm để phát hiện Pigment red 53.

Mã số	Tên mẫu	Kết quả phát hiện PR
PR01	Son nước Star Shine 01 (Hàn Quốc)	+
PR02	Son nước Pielry diamond gloss 44 (Hàn Quốc)	-
PR03	Son nước Blooming gloss 51 Crystal Shimmering (Hàn Quốc)	-
PR04	Son nước P+ cos Professional (Hàn Quốc)	-
PR05	Son nước Ohui 06 (Hàn Quốc)	-
PR06	Son nước Bloom lipgloss 3D 11Zhoubang	-
PR07	Son nước Lipgloss 3D 06 Zhoubang	-
PR08	Son rắn Etude colorlipstick 04 Etude	-
PR09	Son rắn Nob'color No16201-35 (Pháp)	-
PR10	Son rắn Rose Lady 109 VOV Moisturizing coloring effect	-
PR11	Son rắn Lacvert Essance RD201 LG Vina Cosmetics Joint Venture Co	+
PR12	Son rắn Lustre 09 Make-uphân Cosmetics Toronto (Canada)	+
PR13	Son rắn MayberlineWater Shine Pune Lipcolon 06 (Mỹ)	-
PR14	Son rắn Lacvert EssanceRD225 LG Vina Cosmetics Joint Venture Co	+
PR15	Phấn má Make-up blue 016 VOV cosmetic Co, Ltd	+
PR16	Phấn má Etude 5	-
PR17	Phấn má Color Song Blusher 04 VOV cosmetic Co, Ltd (Hàn Quốc)	-
PR18	Phấn má Ludanmei No:D208 Ludanmei Cosmetics Co, Ltd	-
PR19	Phấn má Ludanmei No:B493 Ludanmei Cosmetics Co, Ltd	-
PR20	Phấn má Color Song Blusher 21 VOV cosmetic Co, Ltd (Hàn Quốc)	+

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

Bảng 3.65. Kết quả định lượng các mẫu phát hiện có Pigment Red 53

Mẫu	Lượng mẫu thử (g)	Hệ số tương thích phổ (Similarity)	Lượng PR có trong mẫu thử (mg)	Hàm lượng (%)
PR01	0,4992	0,9932	0,195	0,039
PR11	0,5416	0,9983	(0,085)	(0,016)
PR12	0,5546	0,9999	(0,097)	(0,018)
PR14	0,5000	0,9993	0,356	0,071
PR15	0,1013	0,9866	4,233	4,179
PR20	0,1002	0,9996	0,669	0,668

Ghi chú: Các giá trị trong ngoặc đơn là các giá trị ước lượng vì dưới LOQ

3.4.4. Pigment orange 5

Quy trình phân tích để phát hiện Pigment orange 5 đã được áp dụng để kiểm tra trên 13 mẫu son môi, 10 mẫu sơn móng mua trên thị trường. Kết quả kiểm tra trên 23 mẫu này không phát hiện thấy mẫu nào có Pigment orange 5.

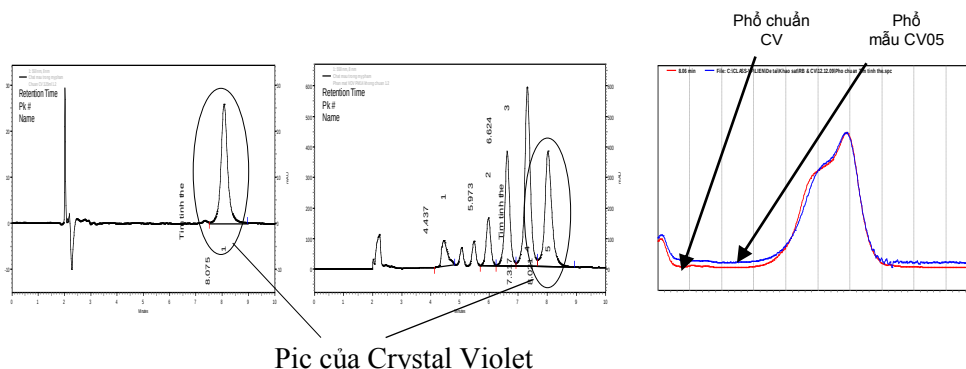
3.4.5. Crystal violet (Tím tinh thể)

Áp dụng để kiểm tra 7 mẫu son môi, 5 mẫu son móng, 5 mẫu phấn mắt và 1 mẫu phấn má mua trên thị trường. Danh sách cụ thể các mẫu đã kiểm tra được liệt kê cụ thể trong bảng 3.66 và hình 3.24 dưới đây

Bảng 3.66. Danh sách mẫu mỹ phẩm kiểm tra Crystal violet

Mã số	Tên mẫu	Kết quả phát hiện CV
CV01	Phấn mắt Aolili	–
CV02	Phấn mắt Belove hồng	–
CV03	Phấn mắt Belove tím	–
CV04	Phấn mắt Celia tím	–
CV05	Phấn mắt VOV tím	+
CV06	Phấn má Ludanmei	–
CV07	Sơn móng Felina LaValse hồng	–
CV08	Sơn móng Melia hồng	–
CV09	Sơn móng không tên màu hồng tím	–
CV10	Sơn móng Kiệt Thắng màu hồng tím	–
CV11	Sơn móng Melia tím	–
CV12	Sơn nước Starshine 01 màu hồng đậm	–
CV13	Sơn nước Starshine 08 màu hồng cam	–
CV14	Sơn nước Lipgloss Zhoubang	–
CV15	Sơn thỏi Essance RD201	–
CV16	Sơn thỏi Etudé	–
CV17	Sơn thỏi MAC	–
CV18	Sơn thỏi Rose Lady, VOV	–

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy



Hình 3.24. So sánh SKĐ và phổ UV-VIS giữa mẫu CV05 và dd chuẩn Crystal Violet

3.4.6. Sudan

Tiến hành kiểm tra các Sudan trên 25 mẫu son kết quả được tổng hợp ở bảng 3.67.

Bảng 3.67. Kết quả phân tích Sudan trong một số mẫu son

Mã số	Tên mẫu	Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV
SD01	M1 màu xanh	-	-	-	-
SD02	M2màu vàng đậm	+	-	-	-
SD03	M3 màu vàng nhạt	-	-	-	-
SD04	M4 màu đỏ	-	-	-	+
SD05	M5 màu tím nhạt	+	-	-	-
SD06	M6 màu đỏ	+	-	-	+
SD07	M7 màu xanh	+	-	-	+
SD08	M8 màu vàng	+	-	-	+
SD09	M9 màu tím nhạt	+	-	-	-
SD10	M10 màu hồng	+	-	-	-
SD11	M11 màu xanh	-	-	-	-
SD12	M12 màu hồng	-	-	-	-
SD13	M13 màu 010	-	-	-	-
SD14	M14 màu 020	-	-	-	-
SD15	M15 màu 032	-	-	-	-
SD16	M16 màu 45	-	-	-	-
SD17	M17 màu 53	-	-	-	-
SD18	M18 màu 76	+	-	-	-
SD19	M19 BR Blossom 116	-	-	-	-
SD20	M20 OR Rouge orange 311	-	-	-	-
SD21	M21 # 119 Brilliant Magnetic	-	-	-	-
SD22	M22 # 115 Brandy	-	-	-	-
SD23	M23 màu102	-	-	-	-
SD24	M24 màu 56	-	-	-	-
SD25	M25	-	-	-	-

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

Kết quả cho thấy:

- Các mẫu son gió có nhãn hiệu Lipbalm: Vỏ màu vàng đậm, vỏ màu tím có chứa Sudan I, mẫu có vỏ màu đỏ chứa Sudan IV.
- Các mẫu son gió có nhãn hiệu Hengfang: Các son có vỏ màu đỏ, vỏ màu xanh, vỏ màu vàng có chứa 2 Sudan cấm (I và IV), vỏ màu tím nhạt có chứa Sudan I.
- Một mẫu son gió có nhãn hiệu Shilulan: Vỏ màu hồng có chứa Sudan I.
- Đặc biệt có một mẫu son màu nhãn hiệu Hengfang có chứa Sudan I.

3.4.7. Kiểm tra đồng thời 4 chất màu bị cấm (MY, PR, PO và RB)

Kiểm tra trên 15 mẫu son thu mua từ chợ Đồng Xuân (12 mẫu son thời kỳ hiệu

là SR và 3 mẫu dạng gel ký hiệu là SN). Kết quả: Trong 15 mẫu kiểm tra, phát hiện được 3 mẫu có chất cấm Pigment red 53 (Bảng 3.68).

Bảng 3.68. Kết quả phân tích đồng thời các chất màu cấm MY, PR53, PO5, RB

<i>Mã số</i>	<i>Tên mẫu</i>	<i>MY</i>	<i>PR</i>	<i>PO</i>	<i>RB</i>
HM01	Liplip, venus, 1001 Iris pink VP22 Rohto, Mentholatum Co,Ltd (SR1)	-	-	-	-
HM02	Son dạng gel Water lip bloom pink BP01, Mentholatum Co, Ltd (SN1)	-	-	-	-
HM03	Miracle Apo H002 Pinky orange, Mentholatum Co, Ltd (SR2)	-	-	-	-
HM04	Liplip LN51 intensive Rouge IP 21 Crystal pink (SR3)	-	-	-	-
HM05	Lipice K001, Thái lan NSX:6/11/15, Hd: 06/11/15 (SR4)	-	-	-	-
HM06	Oxy perfect , Trung quốc (SR5)	-	-	-	-
HM07	Tiannuo, pink magic lip, Thái Lan (SR6)	-	-	-	-
HM08	Essance, không nhãn mác (SR 13)	-	-	-	-
HM09	Mac, chữ Trung quốc (SR 12)	-	-	-	-
HM10	Maybelline tím, (SR7)	-	+	-	-
HM11	Super Core lipstick (SR8)	-	+	-	-
HM12	Prielry Diamond gross (SN2)	-	-	-	-
HM13	L'oreal Lipgloss & Lipstick (SN3)	-	-	-	-
HM14	3D Lip gloss (SR 9)	-	-	-	-
HM15	Shishido PK 307 (SR10)	-	+	-	-

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

3.4.8. Hydroquinon

Quy trình thao tác chuẩn để phát hiện Hydroquinon đã được chúng tôi áp dụng để kiểm tra 10 mẫu kem bôi da mua trên thị trường. Kết quả không có mẫu nào có chứa Hydroquinon.

3.4.9. Tretinoin

Đã tiến hành kiểm tra trên 18 mẫu kem được mã số từ TR01 đến TR18, có 2 mẫu phát hiện có Tretinoin là TR04 và TR05.

Hai mẫu TR04 và TR05 ở 2 dạng đóng gói không có lô sản xuất, cùng hạn sử dụng, cùng nơi sản xuất (767 đường Trường Chinh, Kiến An, Hải Phòng) có chứa Tretinoin. Cách ký hiệu SDK của các mẫu kem trên đều khác với những mẫu khác: số viết trước ký hiệu QLD-CL trong khi các mẫu khác QLD-CL viết trước, số viết sau và không có tên nhà sản xuất chỉ có tên địa chỉ sản xuất.

3.4.10. Các glucocorticoid

Kiểm tra trên 11 mẫu kem mỹ phẩm, kết quả thể hiện ở bảng 3.69.

Mẫu GC01, GC05 và GC06 có pic có thời gian lưu tương ứng với pic clobetason dipropionat, chồng phổ với phổ chuẩn clobetason dipropionat cho hệ số chồng phổ xấp xỉ 1 (lần lượt là 0,9933; 0,9954; 0,9968).

Bảng 3.69. Kết quả phân tích đồng thời các glucocorticoid

Mã số	Tên mẫu	Số ĐKKN	Kết quả
GC01	Cream nám one today	43L381	+
GC02	Cream nám shui Jing bai	43L382	-
GC03	Kem dưỡng trắng da làm mờ vết thâm Hazelin	43L 383	-
GC04	Kem nám Cô Tiên (Day whitening & spot removing set)	43L384	-
GC05	Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today	43L390	+
GC06	Cream dưỡng trắng da mặt One Today	43L391	+
GC07	Kem mắt Whoo	43L398	-
GC08	Nước hoa hồng In Yang Balancer	43L397	-
GC09	Tinh chất dưỡng da Qi & Jin Essence	43L396	-
GC10	Sữa dưỡng da In Yang Lotion	43L395	-
GC11	Kem dưỡng da đêm Whoo	43L399	-

Ghi chú: (-) là không phát hiện được; (+) là phát hiện thấy

3.4.11. Thủy ngân

Quy trình thao tác chuẩn để phát hiện thủy ngân đã được chúng tôi áp dụng để kiểm tra 6 mẫu kem bôi da, 5 mẫu sữa rửa mặt và 3 mẫu dầu gội đầu, 17 mẫu phấn trang điểm mua trên thị trường. Danh sách các mẫu đã kiểm tra thấy có thủy ngân được tổng hợp trong bảng 3.70.

Bảng 3.70. Các mẫu mỹ phẩm kiểm tra thấy có chứa thủy ngân.

Mã số	Mẫu	Hàm lượng Hg (ppm)
HG02	Kem dưỡng trắng da toàn thân Tuyết Lan	29,96
HG03	Kem trắng da Avon Solution SPF 20	1,36
HG20	Pond's white beauty, Thái Lan	0,88
HG22	Essance silky, Việt Nam	0,64
HG23	Rejuarna 530, Nhật bản	0,58

3.4.12. Chì

Áp dụng phương pháp hòa hợp ASEAN để kiểm tra chì trong 35 mẫu mỹ phẩm có đến 32 mẫu có chứa chì tuy nhiên không có mẫu nào vượt quá giới hạn Pb theo qui định tại thông tư 06/2011/TT-BYT của Bộ Y tế (xem Phụ lục).

Chương IV

BÀN LUẬN

4.1. VỀ VIỆC TRIỂN KHAI CÁC PHƯƠNG PHÁP CỦA ASEAN

Trong số 6 phương pháp hòa hợp ASEAN về các chỉ tiêu hóa lý hiện có, có 5 phương pháp liên quan trực tiếp tới các đối tượng nghiên cứu của luận án:

- Xác định kim loại nặng (arsen, cadmium, chì và thủy ngân) trong mỹ phẩm (Mã số ACM THA 05) [50].
- Định tính Tretinoin trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC (Mã số ACM SIN 01) [51].
- Định tính, định lượng Hydroquinon trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC (Mã số ACM INO 03) [54].
- Định tính một số chất màu cấm trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC (Mã số ACM SIN 02) [52].
- Định tính hydrocortison acetat, dexamethason, betamethason, betamethason 17-valerat, và triamcinolon trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC (Mã số ACM MAL 07) [55].

Trong quá trình triển khai, chúng tôi đã áp dụng các phương pháp này trên đối tượng mẫu mỹ phẩm để đánh giá các đối tượng chất cấm tương ứng. Qua những kết quả thực nghiệm, chúng tôi có một số nhận xét sau:

❖ *Phương pháp ACM THA 05*: xác định kim loại nặng (arsen, cadmium, chì và thủy ngân) trong mỹ phẩm

Phương pháp ACM THA 05 áp dụng để xác định hàm lượng chì, arsen và cadmi trên thiết bị phân tích tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương là hoàn toàn phù hợp và khả thi. Quá trình thực nghiệm đã đưa ra các thông số cụ thể cho điều kiện phân tích các nguyên tố này: điều kiện vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng, các thông số của máy và điều kiện phân tích phù hợp.

Đã viết được 2 qui trình phân tích cụ thể cho 2 nguyên tố As, Pb là tài liệu chuyên môn phục vụ cho công tác kiểm tra chất lượng mỹ phẩm (Mã số tài liệu cho Pb: VKN/TQKT-MP/19; của As: VKN/TQKT-MP/21).

Đã áp dụng quy trình để kiểm tra chì trong 40 mẫu mỹ phẩm và kiểm tra arsen trong một số mẫu (không báo cáo trong luận án), chưa có mẫu nào vượt quá giới hạn qui định khá cao đối với chì (≤ 20 ppm) và arsen (≤ 5 ppm). Hơn nữa, với phương pháp hóa học theo các Dược điển vẫn cho độ nhạy ở 10 ppm (đối với tổng kim loại nặng) và ở 1ppm cho arsen. Vậy tại sao ASEAN lại chọn phương pháp AAS, một kỹ thuật có độ nhạy rất cao, thiết bị đắt tiền, điều kiện phòng thí nghiệm đạt độ sạch cao và cần phải có cán bộ được đào tạo. Phải chăng là do nền mẫu mỹ phẩm rất phong phú, phức tạp, khó xử lý, dùng vô cơ hóa bằng lò vi sóng mới thực hiện được hoàn toàn, bảo toàn được lượng chì và arsen, tránh nhiễm bẩn, phương pháp đo AAS đặc hiệu, độ nhạy rất cao (cỡ ppb) và chính xác. Kết quả thực nghiệm đã chỉ ra, có nhiều mẫu mỹ phẩm khi vô cơ hóa bằng đốt

trên bếp điện mất rất nhiều thời gian và dung dịch thu được vẫn có màu, khi làm phép thử so màu cho kết quả không chính xác, hơn nữa lại còn phụ thuộc vào đánh giá chủ quan của người làm phân tích. Vì vậy phương pháp AAS, kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit để phân tích chì và kỹ thuật hydrid để phân tích arsen cho kết quả chính xác và tin cậy, độ nhạy rất cao đã được chọn làm phương pháp hòa hợp chung của các nước ASEAN.

Riêng quy trình phân tích thủy ngân của phương pháp hòa hợp được xây dựng cho thiết bị đo dòng liên tục không sẵn có ở Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương nên một quy trình phân tích mới đã phải được tiến hành khảo sát, thiết lập.

❖ *Phương pháp ACM SIN 01*: định tính Tretinoin trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC được tiến hành thẩm định chuyển giao bằng các thiết bị HPLC tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cho thấy các thiết bị là phù hợp, kết quả phân tích tốt. Quy trình định tính, định lượng Tretinoin trong mỹ phẩm bằng HPLC đã được biên soạn thành quy trình thao tác chuẩn (SOP) và áp dụng để kiểm tra chất cấm này tại Viện (Mã số tài liệu VKN/TQKT-MP/09).

❖ *Phương pháp ACM INO 03*: định tính, định lượng Hydroquinon trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [54].

Khi triển khai phương pháp HPLC trên một số mẫu mỹ phẩm nghiên cứu, không tách được Hydroquinon ra khỏi pic có trong nền mẫu. Vì vậy một quy trình phân tích mới đã được nghiên cứu xây dựng và thẩm định nhằm tách hoàn toàn Hydroquinon ra khỏi các pic có trong nền mẫu. Tuy nhiên, quy trình của ASEAN vẫn có thể áp dụng được khi nền mẫu phân tích không bị ảnh hưởng.

❖ *Phương pháp ACM SIN 02*: định tính một số chất màu cấm trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [52].

Phương pháp này cho phép định tính đồng thời 3 chất màu cấm: MY, PO, RB là một lợi thế lớn, tuy nhiên quá trình triển khai phương pháp HPLC cho thấy pha động không ổn định, có hiện tượng tủa lại một cách từ từ (ngay cả khi đã lọc qua màng lọc 0,45 µm). Điều này rất nguy hại cho hệ thống sắc ký nếu không loại bỏ được, gây ra áp suất không ổn định trong quá trình phân tích và về lâu dài gây tắc cột. Vì vậy, các quy trình mới phân tích những chất màu này đã được nghiên cứu thiết lập. Trong thực tế rất hiếm gặp sự lạm dụng nhiều chất màu cấm trong cùng một sản phẩm nên những quy trình phân tích riêng lẻ vẫn có giá trị để kiểm tra sự có mặt của các chất màu bị cấm. Mặt khác, qua nghiên cứu các mẫu mỹ phẩm trên thực tế lại có thêm một chất màu mới xuất hiện với tỷ lệ khá cao. Kiểm tra phát hiện được chất màu này là Pigment Red 53 (PR) và một quy trình phân tích phát hiện và định lượng PR cũng đã được nghiên cứu xây dựng.

❖ *Phương pháp ACM MAL 07*: định tính hydrocortison acetat, dexamethason, betamethason, betamethason 17-valerat, và triamcinolon acetonid trong mỹ phẩm bằng TLC và HPLC [55].

Phương pháp này cho phép định tính đồng thời 5 chất thuộc nhóm chất bị cấm glucocorticoid một cách dễ dàng với các thiết bị TLC và HPLC thông thường. Tuy nhiên, với mong muốn có thể định tính, định lượng đồng thời nhiều hơn các chất thuộc nhóm glucocorticoid, một nghiên cứu đã được thực hiện nhằm phát hiện và định lượng đồng thời 12 chất steroid bằng HPLC.

4.2. VỀ CÁC QUI TRÌNH PHÂN TÍCH MỚI THIẾT LẬP

Quá trình nghiên cứu thiết lập các qui trình phân tích xác định các chất cấm và chất có giới hạn hàm lượng sử dụng trong mỹ phẩm luôn hướng tới hòa hợp về mặt kỹ thuật với toàn khối ASEAN, nên đề tài đã luôn bám sát các phương pháp hòa hợp sẵn có của ASEAN. Một số trường hợp, do chưa có phương pháp hòa hợp hay các điều kiện của phương pháp hòa hợp tỏ ra chưa phù hợp sau quá trình khảo sát sơ bộ, phải tiến hành thiết lập mới hoặc thay đổi các điều kiện phân tích cho phù hợp với đối tượng mẫu mỹ phẩm cần kiểm tra cũng như điều kiện trang thiết bị hiện có, đặc biệt kịp thời cho công tác kiểm tra chất cấm tại những thời điểm cần thiết theo yêu cầu của Bộ Y tế vì thực tế chưa có các qui trình phân tích sẵn có (như Sudan, Pigment red 53, Crystal violet...)

4.2.1. Về các qui trình phát hiện các chất màu cấm

Đối tượng mẫu áp dụng là mỹ phẩm dạng son (son thỏi dạng sáp, "son nước" dạng gel...), son móng và phấn trang điểm về các chất màu cấm như: MY, PO, PR, CV, các Sudan...

4.2.1.1. Các chất màu đã có phương pháp hòa hợp:

Phương pháp hòa hợp ACM SIN 02 đưa ra quy trình định tính đồng thời 3 chất màu cấm: Pigment orange 5 (PO), Metanil yellow (MY) và Rhodamin B (RB) bằng phương pháp TLC và HPLC. Tuy nhiên, tại thời điểm nghiên cứu triển khai (2009-2010), thực nghiệm cho thấy có hiện tượng tủa lại từ từ thành phần trong pha động kể cả sau khi đã lọc qua màng lọc 0,45 μm . Vì vậy, các qui trình nghiên cứu định tính, định lượng riêng từng chất màu với điều kiện phân tích mới đã được nghiên cứu với mục đích đáp ứng kịp thời cho công tác kiểm nghiệm đồng thời không chỉ phát hiện mà còn đánh giá được mức độ nhiễm các chất cấm này.

❖ Về quy trình xử lý mẫu mỹ phẩm:

Phương pháp hòa hợp sử dụng dung môi chiết mẫu là hỗn hợp DMF-acid phosphoric (95:5). Dung môi này cho kết quả xử lý mẫu rất tốt khi tiến hành phân tích MY và PO, do đó chúng tôi vẫn giữ nguyên trong quy trình phân tích hai chất màu này của mình. Riêng trường hợp RB, khi chiết mẫu bằng dung môi trên kết quả thu hồi không tốt nên đã phải khảo sát lại và chuyển sang dùng hỗn hợp acetonitril - nước (1:1) để chiết mẫu. Hệ dung môi này cho kết quả khá cao (tỷ lệ thu hồi từ 83,7% đến 109,7% tùy theo nền mẫu).

Hơn nữa, với các mẫu son thỏi (dạng sáp, thể chất rất quánh) thay vì chiết 2 pha lỏng - lỏng (n-hexan và dung môi chiết mẫu như ASEAN), dùng một lượng nhỏ

tetrahydrofuran hay dimethylformamid để phân tán mẫu rồi chiết cho kết quả tốt như phương pháp ASEAN nhưng cách làm đơn giản và nhanh hơn, không cần chuyển vào bình gạn và chờ phân lớp.

❖ *Về qui trình phân tích sắc ký:*

Đã khảo sát và lựa chọn được điều kiện sắc ký phù hợp để phân tích các chất cả định tính và định lượng. Định tính bằng xét thời gian lưu, độ tinh khiết pic và so sánh phổ (chồng phổ và tính hệ số tương đồng similary index) của pic nghi ngờ trong mẫu thử với pic thu được từ mẫu chuẩn. Định lượng bằng so sánh diện tích (hoặc chiều cao) pic thu được từ mẫu thử với pic thu được từ mẫu chuẩn.

❖ *Về cách đánh giá kết quả:*

Sử dụng detector PDA đọc phổ và đánh giá độ tinh khiết pic của những pic nghi ngờ có cùng thời gian lưu với pic chuẩn (ASEAN không nêu rõ mà chỉ nói đến thời gian lưu). Như vậy tính đặc hiệu của phương pháp càng được khẳng định.

❖ *Về đánh giá qui trình phân tích:*

Các qui trình đã được xây dựng và thẩm định các chỉ tiêu về độ thích hợp của hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, LOD và LOQ trên mẫu tự tạo với nền mẫu mỹ phẩm không có các chất cấm. Qua thẩm định bằng thực nghiệm, các quy trình phân tích này đều đáp ứng được yêu cầu khi kiểm tra chất màu cấm tương ứng. Hơn nữa, các quy trình thiết lập đều có giới hạn phát hiện tốt hơn so với công bố của phương pháp hòa hợp ACM SIN 02 với những đối tượng chất màu mà phương pháp này đưa ra giới hạn phát hiện (ví dụ với MY và PO giới hạn phát hiện nhỏ hơn 25 lần, với RB giới hạn phát hiện nhỏ hơn 1000 lần so với công bố của ASEAN).

4.2.1.2. Các chất màu chưa có phương pháp hòa hợp:

Chất màu Pigment red 53 (PR), Crystal violet (CV) và 4 chất thuộc nhóm Sudan chưa có phương pháp hòa hợp của ASEAN, do đó phải xây dựng hoàn toàn quy trình phân tích mới cho các chất màu này.

❖ *Về quy trình xử lý mẫu mỹ phẩm:*

Tùy theo từng chất mà lựa chọn dung môi chiết mẫu phù hợp, với các mẫu son thỏi (dạng sáp) hay son móng, dùng một lượng nhỏ tetrahydrofuran hay dimethylformamid vừa đủ phân tán mẫu rồi chiết cho kết quả tốt (tỷ lệ thu hồi đều cao trong quá trình thẩm định từ 83,7% đến 109,7%), cách làm đơn giản, tránh thất thoát do không phải qua nhiều bước xử lý.

Với Pigment red 53 là chất khó tan trong nước, dùng dimethylsulfoxid hòa tan và chiết được hoàn toàn chất này, nên mẫu sạch.

Với Crystal violet (CV), hỗn hợp acetonitril - dung dịch đệm amoniac pH 9,5 - 10,0 (2 : 5) là dung môi chiết mẫu tốt nhất đã lựa chọn được. Khi khảo sát đã thử với môi trường acid hay kiềm mạnh (NaOH 0,01M) đều cho pic không cân đối và không ổn định. Hơn nữa, dung môi chiết mẫu này có thành phần rất giống với pha động (ACN - THF -

đệm pH 9,0 (20 : 30 : 50)) nên pic sắc ký thu được cân đối, ổn định, cho kết quả lặp lại, độ đúng tốt là điều phù hợp. Đây cũng là một trong những nguyên tắc lựa chọn dung môi pha mẫu.

Với các Sudan, hệ dung môi methanol – ethyl acetat (1:1) là hệ mà nhóm chất Sudan tan rất tốt, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất, qui trình chiết đơn giản, dễ dàng. Hệ dung môi này có ethyl acetat nên không cần dùng chất THF để phân tán mẫu sơn dạng sáp hay sơn móng. Đây cũng là dung môi mà tác giả Nguyễn Văn Yên và cộng sự lựa chọn [46] (năm 2010, sau kết quả nghiên cứu của chúng tôi 3 năm) để hòa tan các sudan trong cần thu được sau khi chiết mẫu mỹ phẩm và thực phẩm bằng acetone sau đó tiêm vào hệ sắc ký.

❖ *Về điều kiện phân tích sắc ký:*

Trong quá trình kiểm tra các mẫu trên thị trường, phát hiện thấy một chất màu lạ xuất hiện với tần xuất khá cao và được xác định là Pigment red 53 (PR).

Để phân tích PR, chỉ cần thay đổi tỷ lệ thành phần pha động của điều kiện phân tích PO là hỗn hợp methanol-dung dịch đệm pH 6,2 từ tỷ lệ 85 : 15 thành 65 : 35. Kết quả này chỉ ra một thuận lợi cho người làm phân tích: gần như với cùng một điều kiện phân tích về cột sắc ký, nhiệt độ cột, pha động, tốc độ dòng, chỉ cần thay đổi tỷ lệ thành phần pha động và bước sóng lấy sắc ký đồ có thể định tính, định lượng được cả 3 chất màu: MY, PO và PR. Kết quả khảo sát cũng cho thấy dung môi gồm các thành phần thông dụng, dễ kiếm như: methanol và dung dịch đệm pH 6,2 (chuẩn bị dung dịch triethylamin 3mM trong nước, chỉnh pH về 6,2 bằng acid acetic 30%). Trong khi pha động của ASEAN chuẩn bị phức tạp, dùng chất tạo cặp ion TBA khá đắt tiền.

Với Crystal violet (CV): lựa chọn cột Alltech RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) hoặc cột C18 của Phenomenex ở nhiệt độ phòng, detector PDA đặt trong dải 300 - 900 nm (lấy sắc đồ ở 590 nm), pha động: là hỗn hợp của acetonitril – tetrahydrofuran – dung dịch đệm pH 9,0 (20 : 30 : 50), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 100 μ l. Điều kiện phân tích này cho thấy pha động có thành phần gần như là dung môi pha mẫu, pic thu được cân đối, có độ lặp lại và độ đúng cao, hệ sắc ký rất ổn định.

Qui trình phân tích đồng thời 4 chất Sudan với các điều kiện phân tích đơn giản, dễ thực hiện, dung môi hóa chất dễ kiếm là một lợi thế cho người làm phân tích, dễ dàng áp dụng ở các đơn vị có máy HPLC với detector PDA. Điều kiện phân tích bao gồm: cột C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex hoặc Apollo), pha động: methanol – nước (95 : 5), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút, thể tích tiêm: 20 μ l, điều kiện detector PDA: quét phổ trong dải 300-900 nm, lấy sắc đồ tại 488 nm. Năm 2010, tác giả Nguyễn Văn Yên và cộng sự [46] dùng HPLC pha đảo như trên nhưng detector UV để xác định Sudan trong thực phẩm và mỹ phẩm, việc lựa chọn detector PDA của luận án cho kết quả chính xác hơn. Thực tế có mẫu đã cho pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của một trong các Sudan nhưng phổ UV-VIS không giống, vì vậy không thể nói đó là Sudan. Với chương trình sắc ký như

trên, detector UV-VIS chỉ có tính sàng lọc ban đầu, cần phải đánh giá độ tinh khiết pic và chồng phổ để có kết luận chính xác.

❖ *Về đánh giá quy trình phân tích:*

Các quy trình phân tích này đã được thẩm định chặt chẽ và cho kết quả tốt về độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, LOD, LOQ (và độ ổn định của dung dịch các chất màu Sudan), đáp ứng được yêu cầu khi kiểm tra chất màu cấm tương ứng. Hơn nữa, các quy trình thiết lập phân tích 6 chất màu cấm chưa có phương pháp hòa hợp (PR, CV và 4 chất Sudan) đều có giới hạn phát hiện thấp: PR là 0,4 µg/ml (tương ứng 80 µg/g mẫu); CV là 0,04 µg/ml (tương ứng 2 µg/g mẫu), các Sudan (Sudan I là 0,23 µg/ml, Sudan II là 0,24 µg/ml, Sudan III là 0,25 µg/ml, Sudan IV là 0,24 µg/ml) cho phép phát hiện các chất bị cấm trong sơn, sơn móng, phấn trang điểm ở nồng độ rất nhỏ (ppm).

4.2.1.3. Về qui trình phân tích phát hiện và định lượng đồng thời 4 chất màu:

Qui trình này được cải tiến từ qui trình phân tích đồng thời MY, PO, RB của ASEAN và đã đưa thêm được PR phân tích đồng thời với 3 chất màu MY, PO và RB.

❖ *Về xử lý mẫu mỹ phẩm:*

Dùng phương pháp chiết lỏng-lỏng giữa dung môi pha mẫu với n-hexan như qui trình ASEAN đã đưa ra khi phát hiện 3 chất màu MY, PO và RB.

❖ *Về điều kiện phân tích sắc ký:*

Đây là qui trình phân tích dựa trên qui trình phân tích đồng thời MY, PO, RB của ASEAN, tuy nhiên, đã nghiên cứu cụ thể thời gian, cách thức để pha động tua hoàn toàn (để lạnh ở 14-15 °C trong 72 giờ trong khi ASEAN chỉ nêu để yên vài giờ) rồi lọc trước khi đưa vào hệ thống sắc ký, đảm bảo sự ổn định của toàn hệ thống trong quá trình sắc ký và không hại cột. Hơn nữa, đã đưa thêm được Pigment red 53 cùng được phân tích đồng thời với 3 chất màu trong qui trình của ASEAN.

❖ *Về đánh giá qui trình:*

Qui trình đã được đánh giá khá đầy đủ các chỉ tiêu về độ thích hợp hệ thống (các pic cân đối, tách rời hoàn toàn với R_s nhỏ nhất cũng bằng 2,2, số đĩa lý thuyết thấp nhất là 2592). Kết quả đã chỉ ra qui trình phân tích có độ lặp lại tốt cho cả 4 chất màu cấm (RSD của thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%, RSD của diện tích pic đều nhỏ hơn 2%), độ đúng cao (tỷ lệ thu hồi từ 94,0% đến 101,5%). LOD và LOQ thấp hơn ASEAN nhiều lần (MY là 100 lần, PR là 200 lần; PO là 2000 lần và RB là 0,003 µg/ml) nên phương pháp có độ nhạy tốt. Qui trình vừa để định tính (phát hiện) thông qua các chỉ số: độ tinh khiết pic, so sánh thời gian lưu và chồng phổ của pic nghi ngờ với pic của chất chuẩn. Qui trình cũng dùng để định lượng bằng cách so sánh diện tích pic của pic thu được từ mẫu thử với pic thu được từ mẫu chuẩn. Đây là một lợi thế lớn trong phân tích, ngoài việc phát hiện còn đánh giá được mức độ lạm dụng nguy hiểm, thể hiện sự thành công trong việc triển khai và cải tiến các qui trình sẵn có của ASEAN.

4.2.2. Về qui trình định tính, định lượng Hydroquinon

❖ Về xử lý mẫu:

Sau khi khảo sát trên một số dung môi hoà tan mẫu, chúng tôi đã lựa chọn được hỗn hợp methanol - đệm phosphat pH 5,5 (50 : 50) là dung môi tốt nhất để chiết mẫu, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất và cho pic Hydroquinon cân đối. Hơn nữa, đây chính là pha động trong chương trình sắc ký để phân tích Hydroquinon đã khảo sát và lựa chọn được. (Phương pháp hòa hợp ACM INO 03 [54] dùng ethanol 96% để chiết mẫu)

❖ Về điều kiện phân tích sắc ký:

Đã tiến hành khảo sát thực nghiệm các điều kiện sắc ký do phương pháp hòa hợp ACM INO 03 đưa ra. Tuy nhiên, kết quả thu được cho thấy với những đối tượng mẫu đã khảo sát sơ bộ, các điều kiện của phương pháp hòa hợp chưa đáp ứng được yêu cầu cho phép phát hiện chọn lọc Hydroquinon (do pic của chất này không tách được khỏi nền mẫu). Thực tế cho thấy, pha động của phương pháp hòa hợp ASEAN chỉ có ACN và nước (45 : 55) khả năng rửa giải, phân tách các chất hạn chế kể cả khi thay đổi các tỷ lệ khác nhau của 2 dung môi này. Do đó phải xây dựng mới hoàn toàn quy trình phân tích với các điều kiện sắc ký khác với phương pháp hòa hợp: thay pha động bằng một hỗn hợp của acetonitril và một dung dịch đệm phosphat pH 5,5 với tỷ lệ thích hợp. Chính dung dịch đệm này đã làm thay đổi rõ rệt tính phân cực của pha động, sự tương tác của chất phân tích với pha động, kết quả là pic Hydroquinon đã được tách hoàn toàn khỏi pic có trong nền mẫu kem bôi da mỹ phẩm. Tuy nhiên, với nền mẫu kem đơn giản, áp dụng quy trình phân tích của ASEAN sẽ cho kết quả tốt, thời gian phân tích nhanh hơn. Thực tế, Khoa Mỹ phẩm (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương) đã thu được kết quả tốt trong các chương trình thử nghiệm thành thạo phép thử “Xác định hàm lượng Hydroquinon trong kem bôi da” theo quy trình phân tích của ASEAN, trên mẫu của chương trình gửi tới không có các thành phần khác trong nền mẫu (không có pic khác ngoài Hydroquinon).

❖ Về đánh giá qui trình phân tích:

Những kết quả thẩm định (độ đặc hiệu cao, độ lặp lại, độ đúng tốt, LOD, LOQ thấp hơn so với phương pháp của ASEAN) đã cho thấy quy trình xây dựng mới thích hợp cho việc phát hiện, định lượng Hydroquinon trong đối tượng mỹ phẩm dạng kem bôi da ngay cả khi trong nền mẫu có chất có thể được rửa giải rất gần với Hydroquinon khi dùng chương trình sắc ký của phương pháp hòa hợp ASEAN.

4.2.3. Về qui trình định tính 12 chất steroid trong kem bôi da

❖ Về qui trình xử lý mẫu:

Phương pháp hòa hợp ASEAN, mã số ACM/MAL 07 [55] để định tính 5 chất thuộc nhóm steroid đã dùng methanol làm dung môi chiết các chất phân tích từ các mẫu kem bôi da. Tuy nhiên, qua khảo sát một số chất thuộc 12 steroid nghiên cứu cho pic không cân đối, một số nền mẫu có nhiều tạp khi phân tích sắc ký. Vì vậy, dung môi chiết

mẫu được khảo sát và hỗn hợp dung môi dicloromethan-methanol (9 : 1) đã được chọn để chiết mẫu bằng đặt trên cách thủy. Sau đó, thay vì ly tâm, chúng tôi đã để lạnh trong nước đá 1 giờ để tủa các tá được, lọc và bốc hơi trên cách thủy tới cạn rồi hòa tan cạn trong acetonitril - methanol - nước (20 : 30 : 30), lọc. Với cách xử lý mẫu này, các pic thu được rất cân đối, nên mẫu phân tích sạch (hầu như không thấy xuất hiện các pic phụ).

❖ *Về điều kiện sắc ký:*

Giữ nguyên cột sắc ký (ODS 250 x 4,6 mm, 5 μ m). Pha động được chuyển từ chế độ gradient dung môi sang đẳng dòng với ACN – nước (48 : 52) chạy. Nhằm bổ sung thêm khả năng phân tích các chất khác thuộc nhóm glucocorticoid, một qui trình định tính đồng thời 12 chất steroid trong đó có bao gồm 4 chất trong phương pháp hòa hợp của ASEAN đã được xây dựng.

❖ *Về đánh giá qui trình phân tích:*

Kết quả đánh giá về độ thích hợp của hệ thống (độ lặp lại của thời gian lưu, diện tích pic, hệ số phân giải R_s , số đĩa lý thuyết), độ đặc hiệu và độ ổn định của dung dịch đảm bảo yêu cầu để phân tích phát hiện đồng thời các chất này trong mỹ phẩm dạng kem bôi da. Thực tế cho thấy để định tính đồng thời 12 chất thuộc nhóm steroid, các điều kiện về thiết bị, cột sắc ký, pha động (đặc biệt tỷ lệ thành phần pha động) phải rất ổn định vì một số pic được rửa giải khá gần nhau. Qui trình phân tích chạy đẳng dòng đơn giản và có thể áp dụng được trên máy phân tích chỉ có một bơm, một kênh dung môi.

4.2.4. Về qui trình phân tích thủy ngân trong mỹ phẩm dạng kem và phấn bôi da

Các điều kiện xử lý mẫu quy định trong phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM THA 05 [50] cho kết quả tốt trên khảo sát thực nghiệm với các đối tượng nền mẫu kem bôi da, sữa rửa mặt và dầu gội đầu. Do đó đã áp dụng nguyên vẹn các điều kiện về tác nhân oxy hóa, lượng cân mẫu của phương pháp hòa hợp ASEAN khi xây dựng phương pháp kiểm tra thủy ngân trong mỹ phẩm dạng kem.

Với các mẫu phấn bôi da, đã khảo sát và lựa chọn được hỗn hợp acid sulfuric và acid nitric tỷ lệ 1:1, vô cơ hóa triệt để các nền mẫu phấn có chứa nhiều nguyên liệu từ khoáng vật. Bên cạnh đó, đã cụ thể hóa các thông số của thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng, cũng như bổ sung thêm một giai đoạn xử lý mẫu để phù hợp với điều kiện thiết bị của đơn vị nghiên cứu.

Quy trình phân tích thủy ngân của phương pháp hòa hợp được xây dựng cho thiết bị đo dòng liên tục (không sẵn có trong điều kiện của cơ sở nghiên cứu), do đó đã tiến hành khảo sát, thiết lập quy trình phân tích mới phù hợp với thiết bị đo gián đoạn tổng lượng thủy ngân. Kết quả thẩm định quy trình sau khi xây dựng cho thấy quy trình mới thiết lập đảm bảo về độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, có khoảng tuyến tính phù hợp với đối tượng áp dụng, đồng thời có giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu trong phương pháp hòa hợp ASEAN cũng như yêu cầu quản lý qui định tại Thông tư 06/2011/TT-BYT ngày 25/1/2011 của Bộ Y tế Việt Nam (Qui định giới hạn

thủy ngân trong mẫu mỹ phẩm cho phép là ≤ 1 ppm, trong khi phương pháp chúng tôi xây dựng có giới hạn phát hiện 30 ng, giới hạn định lượng là 100 ng thủy ngân trong mẫu phân tích tương ứng với 0,15 ppm và 0,5 ppm trong mẫu mỹ phẩm).

Tóm lại: Có thể thấy quá trình đánh giá trên thực nghiệm 5 phương pháp hòa hợp sẵn có của ASEAN liên quan tới 12 đối tượng chất cấm, chất cần kiểm soát hàm lượng mà đề tài nghiên cứu, đã cho thấy các phương pháp trên đã bộc lộ nhiều hạn chế, không thật sự khả thi trên thực tế với điều kiện trang thiết bị của đơn vị nghiên cứu. Trong 12 đối tượng chất cấm, chất cần kiểm soát hàm lượng mà đề tài nghiên cứu, có 3 đối tượng áp dụng được các phương pháp hòa hợp sẵn có của ASEAN, còn lại phải thiết lập các quy trình phân tích mới. Tuy nhiên, đã tận dụng được từ các phương pháp hòa hợp sẵn có một số điều kiện xử lý mẫu để phân tích thủy ngân, cũng như dung môi chiết mẫu để phát hiện Metanil yellow và Pigment orange 5. Ngoài ra, toàn bộ điều kiện xử lý mẫu cho các đối tượng nghiên cứu khác, cũng như toàn bộ các quy trình phân tích bằng AAS và HPLC, đều phải khảo sát, xây dựng mới cho phù hợp. Những quy trình mới thiết lập đã được thẩm định một cách chu đáo, đảm bảo về độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, đồng thời có giới hạn phát hiện thấp hơn so với giới hạn tương ứng đưa ra trong phương pháp hòa hợp của ASEAN (trong những trường hợp đã có giới hạn công bố trong phương pháp hòa hợp).

Những hạn chế của các phương pháp hòa hợp ASEAN đã bộc lộ qua khảo sát thực nghiệm, cũng như số lượng quá khiêm tốn của các phương pháp này so với danh sách các chất cấm và các chất bị giới hạn về nồng độ và hàm lượng sử dụng cho thấy việc tiếp tục nghiên cứu thiết lập các quy trình phân tích chuẩn để kiểm tra, phát hiện các chất cấm, chất cần kiểm soát hàm lượng trong mỹ phẩm cho hệ thống kiểm nghiệm mỹ phẩm tại Việt Nam là hết sức cấp bách. Tính thực tế, thời sự của yêu cầu này càng được khẳng định hơn thông qua kết quả kiểm tra sự có mặt của 12 đối tượng chất cấm, chất cần kiểm soát hàm lượng mà chúng tôi đã thực hiện.

4.3. TÓM TẮT NHỮNG ĐỔI MỚI TRONG TỪNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

4.3.1. Quy trình phân tích đồng thời 4 chất màu cấm trong son môi

❖ *Về điều kiện phân tích sắc ký:*

Đây là qui trình phân tích dựa trên qui trình phân tích đồng thời của ASEAN. Phương pháp ACM SIN 02 của ASEAN để phát hiện 3 chất màu cấm: MY, PO, RB sử dụng pha động: nước- dd TBA 0,005M (25 : 75). Thực nghiệm cho thấy: Pha động có tủa lại kể cả sau khi lọc. Thời gian để tủa trước khi lọc không được nêu rõ, chỉ nêu “để yên vài giờ” mà thực tế để 6 ngày vẫn còn tủa lại.

Vì vậy đã nghiên cứu cụ thể thời gian, cách thức để pha động tủa hoàn toàn (để lạnh ở 14-15 °C trong 72 giờ hoặc để yên ở nhiệt độ phòng 7 ngày) rồi lọc trước khi đưa vào hệ thống sắc ký, đảm bảo sự ổn định của toàn hệ thống trong quá trình sắc ký và không hại cột.

Đã đưa thêm Pigment red 53 cùng được phân tích đồng thời với 3 chất màu MY, PO và RB.

❖ *Về đánh giá qui trình:*

Qui trình đã được đánh giá khá đầy đủ các chỉ tiêu về độ thích hợp hệ thống (các pic cân đối, tách rời hoàn toàn với R_s nhỏ nhất cũng bằng 2,2, số đĩa lý thuyết thấp nhất là 2592). Kết quả đã chỉ ra qui trình phân tích có độ lặp lại tốt cho cả 4 chất màu cấm (RSD của thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%, RSD của diện tích pic đều nhỏ hơn 2%), độ đúng cao (tỷ lệ thu hồi từ 94,0% đến 101,5%).

LOD và LOQ thấp hơn ASEAN nhiều lần (MY là 100 lần, RB là 200 lần; PO là 2000 lần và PR là 0,003 $\mu\text{g/ml}$: Không có chất này trong quy trình của ASEAN) nên phương pháp có độ nhạy tốt.

Qui trình vừa đề định tính (phát hiện) thông qua các chỉ số: độ tinh khiết pic, so sánh thời gian lưu và chồng phổ của pic nghi ngờ với pic của chất chuẩn. Qui trình cũng có thể định lượng bằng cách so sánh diện tích pic của pic thu được từ mẫu thử với pic thu được từ mẫu chuẩn. Đây là một lợi thế lớn trong phân tích, ngoài việc phát hiện còn đánh giá được mức độ lạm dụng nguy hiểm, thể hiện sự thành công trong việc triển khai và cải tiến các qui trình sẵn có của ASEAN.

4.3.2. Quy trình phát hiện, định lượng đồng thời 4 chất Sudan

❖ *Về xử lý mẫu và điều kiện sắc ký:*

Sau khi khảo sát trên một số dung môi hoà tan mẫu, hỗn hợp methanol – ethyl acetat (1:1) đã được lựa chọn. Hệ dung môi methanol - ethyl acetat (1:1) là hệ mà nhóm chất Sudan tan rất tốt, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất, qui trình chiết đơn giản, dễ dàng. Hệ dung môi này có ethyl acetat nên không cần dùng chất THF để phân tán mẫu sơn dạng sáp hay sơn móng. Đây cũng là dung môi mà các tác giả [46] nghiên cứu 3 năm sau dùng lại (năm 2010) để hòa tan các sudan trong cặn thu được sau khi chiết mẫu mỹ phẩm và thực phẩm bằng acetone.

Qui trình phân tích đồng thời 4 chất Sudan với các điều kiện phân tích đơn giản, dễ thực hiện, dung môi hóa chất dễ kiếm là một lợi thế cho người làm phân tích, dễ dàng áp dụng ở các đơn vị có máy HPLC với detector PDA. Điều kiện phân tích bao gồm: cột C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) (Phenomenex hoặc Apollo), pha động: methanol - nước (95:5), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút, thể tích tiêm: 20 μl , điều kiện detector PDA: quét phổ trong dải 300-900 nm, lấy sắc đồ tại 488 nm.

❖ *Về đánh giá quy trình phân tích:*

- Quy trình phân tích này đã được thẩm định chặt chẽ và cho kết quả tốt về độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, LOD, LOQ và độ ổn định của dung dịch các chất màu Sudan

- Có giới hạn phát hiện thấp: Sudan I là 0,23 $\mu\text{g/ml}$, Sudan II là 0,24 $\mu\text{g/ml}$, Sudan III là 0,25 $\mu\text{g/ml}$, Sudan IV là 0,24 $\mu\text{g/ml}$ cho phép phát hiện các chất bị cấm trong sơn, sơn móng, phấn trang điểm ở nồng độ rất nhỏ (ppm).

4.3.3. Quy trình phát hiện đồng thời 12 chất steroid trong kem bôi da

❖ *Về qui trình xử lý mẫu và điều kiện sắc ký:*

Phương pháp hòa hợp ASEAN, mã số ACM/MAL 07 để định tính 5 chất thuộc nhóm steroid đã dùng methanol làm dung môi chiết các chất phân tích từ các mẫu kem bôi da. Tuy nhiên, qua khảo sát một số chất thuộc 12 steroid nghiên cứu cho pic không cân đối, một số nền mẫu có nhiều tạp khi phân tích sắc ký. Vì vậy, chúng tôi đã chọn hỗn hợp dung môi dicloromethan-methanol (9 : 1) để chiết mẫu phối hợp làm nóng bằng cách thủy. Tiếp theo, thay vì ly tâm, hỗn hợp được để lạnh trong nước đá 1 giờ để tủa các tá dược, lọc và bốc hơi trên cách thủy tới gần rồi hòa tan gần trong acetonitril - methanol - nước (20 : 30 : 30), lọc. Với cách xử lý mẫu này, các pic thu được rất cân đối, nền mẫu phân tích sạch (hầu như không thấy xuất hiện các pic phụ).

Giữ nguyên điều kiện về cột sắc ký của ASEAN (ODS 250 x 4,6 mm, 5 μ m). Pha động là ACN - nước (48:52) chế độ đẳng dòng thay cho gradient dung môi trong phương pháp ASEAN.

Nghiên cứu bổ sung thêm các chất khác thuộc nhóm glucocorticoid, đã xây dựng được qui trình định tính đồng thời 12 chất steroid trong đó có bao gồm 4 chất trong phương pháp của ASEAN.

❖ *Về đánh giá qui trình phân tích:*

Kết quả đánh giá về độ thích hợp của hệ thống (độ lặp lại của thời gian lưu, diện tích pic, hệ số phân giải R_s , số đĩa lý thuyết), độ đặc hiệu và độ ổn định của dung dịch đảm bảo yêu cầu để phân tích phát hiện đồng thời các chất này trong mỹ phẩm dạng kem bôi da. Thực tế cho thấy để định tính đồng thời 12 chất thuộc nhóm steroid, các điều kiện về thiết bị, cột sắc ký, pha động (đặc biệt tỷ lệ thành phần pha động) phải rất ổn định vì một số pic được rửa giải khá gần nhau. Qui trình phân tích chạy đẳng dòng đơn giản và có thể áp dụng được trên máy phân tích chỉ có một bơm, một kênh dung môi.

4.3.4. Quy trình phân tích thủy ngân trong mỹ phẩm dạng kem và phấn bôi da

Với các mẫu phấn bôi da, đã khảo sát và lựa chọn được hỗn hợp acid sulfuric và acid nitric tỷ lệ 1:1, vô cơ hóa triệt để các nền mẫu phấn có chứa nhiều nguyên liệu từ khoáng vật. Bên cạnh đó, đã cụ thể hóa các thông số của thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng, cũng như bổ sung thêm một giai đoạn xử lý mẫu (giai đoạn thêm dung dịch KMnO_4) để phù hợp với điều kiện thiết bị của đơn vị nghiên cứu.

Quy trình phân tích thủy ngân của phương pháp hòa hợp được xây dựng cho thiết bị đo dòng liên tục (không sẵn có trong điều kiện của cơ sở nghiên cứu), do đó đã tiến hành khảo sát, thiết lập quy trình phân tích mới phù hợp với thiết bị đo gián đoạn tổng lượng thủy ngân cho 2 đối tượng là kem và phấn bôi da.

Kết quả thẩm định quy trình sau khi xây dựng cho thấy quy trình mới thiết lập đảm bảo về độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, có khoảng tuyến tính phù hợp với đối tượng áp dụng, đồng thời có giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu trong phương pháp ASEAN cũng như yêu cầu quản lý qui định tại Thông tư 06/2011/TT-BYT ngày 25/1/2011 của Bộ Y tế Việt Nam (Giới hạn thủy ngân trong mẫu

mỹ phẩm cho phép là ≤ 1 ppm, trong khi phương pháp chúng tôi xây dựng có giới hạn phát hiện 30 ng, giới hạn định lượng là 100 ng thủy ngân trong mẫu phân tích tương ứng với 0,15 ppm và 0,5 ppm trong mẫu mỹ phẩm).

4.3.5. Về qui trình định tính, định lượng Hydroquinon

❖ *Về xử lý mẫu và điều kiện sắc ký:*

Khảo sát trên một số dung môi hoà tan mẫu cho thấy hỗn hợp methanol - đệm phosphat pH 5,5 (50 : 50) là dung môi tốt nhất để chiết mẫu, dung dịch mẫu thử sạch không bị lẫn nhiều tạp chất và cho pic Hydroquinon cân đối. Hơn nữa, đây chính là pha động trong chương trình sắc ký để phân tích Hydroquinon đã khảo sát và lựa chọn được. Phương pháp hòa hợp ACM INO 03 dùng ethanol 96% để chiết mẫu.

Áp dụng điều kiện sắc ký do phương pháp ACM INO 03 đưa ra với một số đối tượng mẫu trên thực tế, kết quả thu được chưa đáp ứng được yêu cầu cho việc phát hiện chọn lọc Hydroquinon do pic của chất này không tách được khỏi pic của chất chưa biết có sẵn trong nền mẫu. Thực tế cho thấy, pha động của phương pháp ASEAN chỉ có ACN và nước (45 : 55) nên khả năng rửa giải, phân tách các chất hạn chế kể cả khi thay đổi các tỷ lệ khác nhau của 2 dung môi này. Thay pha động bằng một hỗn hợp của acetonitril và dung dịch đệm phosphat pH 5,5 (50 : 50) đã giải quyết được yêu cầu. Sự có mặt của dung dịch đệm đã làm thay đổi rõ rệt tính phân cực của pha động, sự tương tác của chất phân tích với pha động, kết quả là pic Hydroquinon đã được tách hoàn toàn khỏi pic có trong nền mẫu kem bôi da mỹ phẩm.

Tuy nhiên, với nền mẫu kem đơn giản, áp dụng quy trình phân tích của ASEAN cũng vẫn cho kết quả tốt, thời gian phân tích nhanh hơn. Thực tế, Khoa Mỹ phẩm (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương) đã thu được kết quả tốt trong các chương trình thử nghiệm thành thạo phép thử “Xác định hàm lượng Hydroquinon trong kem bôi da” theo quy trình phân tích của ASEAN và quy trình phân tích này trên mẫu của chương trình gửi tới.

❖ *Về đánh giá qui trình phân tích:*

Những kết quả thẩm định về độ đặc hiệu cao, độ lặp lại, độ đúng tốt, LOD và LOQ (thấp hơn so với phương pháp của ASEAN) đã cho thấy quy trình xây dựng mới thích hợp cho việc phát hiện, định lượng Hydroquinon trong đối tượng mỹ phẩm dạng kem bôi da ngay cả khi trong nền mẫu có chất có thể được rửa giải rất gần với Hydroquinon mà khi dùng chương trình sắc ký của phương pháp hòa hợp ASEAN không tách được hoàn toàn.

4.3.6. Về 5 quy trình phân tích từng chất màu riêng biệt còn lại

❖ *Về xử lý mẫu:*

Lựa chọn dung môi chiết mẫu: chỉ có MY và PO là dùng hỗn hợp dung môi chiết giống phương pháp của ASEAN (Dimethylformamid - acid phosphoric (95:5)). Các chất màu còn lại phải khảo sát thực nghiệm để lựa chọn. Cụ thể với các chất màu như sau: RB là ACN - nước (1:1), PR là dimethylsulfoxid, CV là ACN - THF - dd đệm amoniac pH 9,5 -10,0 (2 : 3 : 5). Các dung môi chọn lựa được đều hòa tan tốt chất cần phân tích, dịch chiết mẫu thử sạch, pic thu được cân đối.

Với các mẫu sơn thỏi, sơn móng (dạng sáp, thể chất rất quánh), dùng một lượng nhỏ tetrahydrofuran hay dimethylformamid để phân tán mẫu rồi chiết thay cho chiết 2 pha lỏng - lỏng (n-hexan và dung môi chiết mẫu như ASEAN) cũng cho kết quả tương ứng nhưng cách làm đơn giản và nhanh hơn (vì không cần chuyển vào bình gạn và chờ phân lớp).

❖ *Về điều kiện sắc ký:*

Các qui trình để phân tích riêng MY, PO, PR đều dùng một loại cột sắc ký C18, cùng một thành phần pha động là hỗn hợp methanol - dd đệm pH 6,2, chỉ khác về tỷ lệ thành phần pha động và bước sóng lấy sắc ký đồ. Đây là một thuận lợi trong thực tế vì chỉ thay đổi nhỏ là có thể phân tích được cả 3 chất màu với cột sắc ký thông dụng, các dung môi dễ kiếm, cách chuẩn bị pha động đơn giản.

Tương tự, chỉ thay đổi về bước sóng phân tích có thể phân tích được 2 chất RB (550nm) và CV (590nm) với cùng pha động là hỗn hợp: ACN – THF - dd đệm pH 9,0 (2 : 3 : 5) bằng cột C18.

4.4. VỀ KHẢ NĂNG ÁP DỤNG CỦA CÁC QUI TRÌNH

Trong hơn 3 năm vừa xây dựng các qui trình, vừa áp dụng kiểm tra 12 chất và nhóm chất cấm hay bị giới hạn về hàm lượng sử dụng đã nghiên cứu, trên hơn 230 lượt mẫu mỹ phẩm đã được kiểm tra. Kết quả cho thấy trên nhiều nền mẫu mỹ phẩm khác nhau của 6 dạng sản phẩm nghiên cứu (sơn môi, phấn bôi da, phấn mắt, kem bôi da, dầu gội đầu, sữa rửa mặt), các chất cấm đã được phát hiện ngay cả khi ở nồng độ nhỏ. Các qui trình phân tích khá ổn định, có thể dùng các cột phân tích có cùng bản chất pha tĩnh, kích thước hạt của các hãng khác nhau và tiến hành phân tích ở nhiệt độ phòng (25 °C-30 °C).

Ngoài việc kiểm tra tính thích hợp của hệ thống, độ lặp lại trong mỗi lần phân tích, để khẳng định tính chắc chắn, có thể thêm lượng chuẩn đã biết vào nền mẫu nghi ngờ để phân tích đánh giá (như đánh giá độ đúng). Đây cũng là một yêu cầu trong kiểm tra đánh giá tính ổn định, khả thi của các qui trình phân tích theo tiêu chuẩn ISO 17025 (đánh giá thường xuyên).

Các qui trình phân tích HPLC đã xây dựng đều có các điều kiện xử lý mẫu, phân tích sắc ký không quá phức tạp, cột phân tích là loại phổ biến, dung môi thông dụng, không quá đắt, dễ dàng áp dụng được ở các cơ sở có máy phân tích HPLC. Tuy nhiên, đòi hỏi người làm phân tích phải được đào tạo về lý thuyết và thực hành về phương pháp HPLC, cách đọc kết quả...

Các qui trình phân tích AAS đòi hỏi thiết bị khá đắt tiền, dung môi hóa chất có độ tinh khiết rất cao, môi trường, dụng cụ phân tích đạt độ sạch cao, người làm phân tích cần được đào tạo công phu. Các điều kiện phân tích của hai qui trình phân tích As, Pb của ASEAN là phù hợp, nên luận án chỉ cụ thể hóa các thông số máy phân tích, hoàn toàn có thể áp dụng tại các cơ sở phân tích có máy AAS và thực hiện bởi cán bộ được đào tạo. Thực tế với giới hạn khá cao của chì và arsen (không quá 20 ppm và 5 ppm) theo qui định tại thông tư 06/2011/TT-BYT của Bộ Y tế, có thể làm bằng phương pháp hóa học, tuy

nhiên cần khảo sát lựa chọn điều kiện vô cơ hóa phù hợp để rút ngắn thời gian vô cơ hóa mẫu bằng phương pháp đốt và chỉ nên áp dụng phương pháp này mang tính sàng lọc, với những mẫu mà nền mẫu có màu sau khi vô cơ hóa, cần chuyển sang phương pháp AAS để đảm bảo có kết quả chính xác. Riêng với qui trình phân tích thủy ngân mới thiết lập hoàn toàn phù hợp và đáp ứng kịp thời cho công tác kiểm tra chất lượng hậu mại mỹ phẩm tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và các đơn vị có thiết bị AAS với bộ phân tích thủy ngân đo tổng lượng, gián đoạn.

4.5. VỀ TÌNH HÌNH NHIỄM CÁC CHẤT CẤM TRONG MỸ PHẨM

Trong hơn 230 lượt mẫu mỹ phẩm thuộc 6 nhóm sản phẩm khác nhau, có tới 30 lượt mẫu, chiếm 13,04% số lượt mẫu khảo sát, bị phát hiện có chứa một trong các chất kiểm tra.

Trong số 6 chất và nhóm chất màu cấm kiểm tra đã có 4 chất và nhóm chất màu cấm phát hiện được (trừ Hydroquinon và Pigment orange 5)

Phát hiện thấy 2 trong 3 chất và nhóm chất có tác dụng dược lý mà bị cấm, đặc biệt là nhóm steroid.

Trong số các nguyên tố độc kiểm tra (As, Pb, Hg), có nhiều mẫu bị nhiễm thủy ngân, đặc biệt có mẫu thủy ngân vượt quá giới hạn cho phép 30 lần.

Những kết quả này ít nhiều đã cho thấy sự bất cập trong việc kiểm soát các chỉ tiêu an toàn của mỹ phẩm cũng như các nguy cơ tiềm ẩn với sức khỏe người sử dụng từ các mặt hàng mỹ phẩm đang lưu hành.

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo với detector PDA để xác định các chất màu nhóm Sudan trong son môi với 25 mẫu son khác nhau phát hiện 9 mẫu có Sudan trong đó có 8 mẫu có chứa Sudan I, 4 mẫu có chứa Sudan IV và 3 mẫu có cả Sudan I và Sudan IV (năm 2007).

Trong 20 mẫu son và phấn (14 son môi và 6 phấn má) kiểm tra có 6 mẫu có chứa Pigment red 53 (4 son, 2 phấn) đặc biệt có mẫu hàm lượng lên đến trên 4%.

Trong 6 mẫu son môi và 8 mẫu son móng tay có 1 mẫu son móng tay có chứa Metanil yellow với hàm lượng 28,33 mg/g.

Trong 6 mẫu phấn, 5 mẫu son móng, 3 mẫu son nước, 4 mẫu son thỏi có 2 mẫu son móng và 1 mẫu son nước có chứa Rhodamin B, đặc biệt mẫu son nước hàm lượng lên đến 20 mg/g.

Trong các mẫu kem bôi da đã có tới 2 mẫu có chứa thủy ngân với hàm lượng 1,4 ppm và 29,9 ppm cao hơn mức cho phép (1ppm) từ 1,5-30 lần,

Cũng bằng sắc ký lỏng pha đảo với detector PDA để xác định Tretinoin trong kem bôi da áp dụng với 18 mẫu kem bôi da khảo sát có 2 mẫu có chứa Tretinoin.

Những kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy nguy cơ lạm dụng các chất cấm trong mỹ phẩm là rất tiềm tàng. Các chất bị cấm đã bị lạm dụng rất đa dạng.

Các con số trên mới chỉ là sơ bộ, cần làm thêm các kiểm nghiệm trên số lượng mẫu đủ lớn, diện lấy mẫu rộng hơn để có kết luận chính xác. Việc nghiên cứu được tiến hành kết hợp với mục đích kiểm tra chất lượng mỹ phẩm có tính chất thường xuyên.

4.6. VỀ NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN ÁN

4.6.1. Về xây dựng và thẩm định các quy trình phân tích

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam được thực hiện một cách có hệ thống để thiết lập các quy trình phân tích chuẩn cho việc kiểm tra 12 chất và nhóm chất bị cấm và cần kiểm soát giới hạn hàm lượng trong mỹ phẩm theo quy định của Hiệp định hòa hợp quản lý mỹ phẩm ASEAN. Những kết quả nghiên cứu của đề tài có ý nghĩa thực tiễn, tính thời sự cao. Các quy trình phân tích chuẩn được thiết lập từ kết quả của đề tài này đã được thẩm định chu đáo để chứng minh về sự phù hợp, độ tin cậy khi áp dụng phát hiện chất cấm trên mỹ phẩm, góp phần nâng cao khả năng kỹ thuật của hệ thống kiểm nghiệm giám sát chất lượng mỹ phẩm. Các quy trình phân tích chuẩn được thiết lập hướng tới hòa hợp về mặt kỹ thuật với toàn khối ASEAN, nên quá trình nghiên cứu đã luôn bám sát các phương pháp hòa hợp sẵn có của ASEAN. Trong một số trường hợp, do chưa có phương pháp hòa hợp hay các điều kiện của phương pháp hòa hợp tỏ ra chưa phù hợp sau quá trình khảo sát sơ bộ, tác giả đã phải tiến hành thiết lập mới hoặc thay đổi các điều kiện phân tích cho phù hợp với đối tượng mẫu mỹ phẩm cần kiểm tra cũng như điều kiện trang thiết bị hiện có.

Từ kết quả nghiên cứu thực nghiệm, đã xây dựng được 13 quy trình phân tích chuẩn, trong đó 10 quy trình mới thiết lập và 3 quy trình áp dụng, thẩm định lại của ASEAN. Đã ban hành chính thức 11 quy trình phân tích và đang xem xét ban hành tiếp 02 quy trình mới thẩm định và biên soạn (sản phẩm của đề tài) để áp dụng tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, phổ biến tới các trung tâm kiểm nghiệm Thuốc và mỹ phẩm của các tỉnh, thành. Các mã số tài liệu qui định được nêu ở phụ lục III, tài liệu được lưu giữ tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

4.6.2. Về đào tạo chuyên môn kỹ thuật

- Quá trình thực hiện đề tài đã giúp các kiểm nghiệm viên tham gia nâng cao năng lực chuyên môn, làm chủ các phương tiện kỹ thuật, trang thiết bị cần thiết để kiểm tra phát hiện các chất cấm trong mỹ phẩm.

- Những quy trình phân tích chuẩn được xây dựng là những tài liệu tham khảo quan trọng về mặt chuyên môn đã được xây dựng, thẩm định chặt chẽ trong điều kiện trang thiết bị của Việt Nam, bổ sung cho các phương pháp hòa hợp ASEAN đã công bố. Những quy trình này có thể áp dụng rộng rãi tại các trung tâm kiểm nghiệm mỹ phẩm thuộc hệ thống quản lý cũng như doanh nghiệp sản xuất, kinh doanh mỹ phẩm để góp phần kiểm tra mức độ an toàn của các sản phẩm mỹ phẩm. Năm 2012, đã đào tạo cho 76 học viên từ 30 trung tâm Kiểm nghiệm phía Bắc về kỹ thuật phát hiện các chất màu cấm,

phương pháp xác định giới hạn chì, arsen và năm 2013, đã đào tạo cho 30 học viên từ 16 trung tâm Kiểm nghiệm về quy trình phân tích các corticoid.

4.6.3. Về đánh giá thực trạng tình hình chất lượng mỹ phẩm

Đây là lần đầu tiên một khảo sát thực tế được tiến hành để đánh giá sự có mặt của nhiều đối tượng chất cấm (bao gồm: 6 chất màu và nhóm chất màu (Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5, Crystal violet và các Sudan), 3 chất có tác dụng dược lý bị cấm hay có giới hạn về hàm lượng sử dụng (Tretinoin, các steroid, Hydroquinon) và các kim loại nặng (As, Pb, Hg) với hơn 230 lượt mẫu mỹ phẩm thuộc 6 nhóm sản phẩm khác nhau (son, sơn móng, phấn, kem bôi da, sữa rửa mặt, và dầu gội đầu). Trong đó đã phát hiện được:

- 1 mẫu sơn móng có Metanil yellow.
- 9 mẫu son có Sudan
- 3 mẫu sơn móng có Rhodamin B.
- 7 mẫu son, 2 mẫu phấn má có Pigment red 53 (trên tổng số 35 mẫu kiểm tra),
- 1 mẫu phấn mắt có Crystal violet.
- 2 mẫu kem bôi da có hàm lượng thủy ngân vượt quá giới hạn cho phép theo phương pháp hòa hợp của ASEAN.
- 3 mẫu có corticoid (trong 15 mẫu kiểm tra).
- 2 mẫu có Tretinoin

Kết quả này cho thấy thực trạng chất lượng mỹ phẩm lưu hành trên thị trường Việt Nam, nhất là các chỉ tiêu an toàn, còn nhiều bất cập (tính trung bình mẫu có nhiễm chất cấm chiếm khoảng 13%, riêng nhóm các sản phẩm có màu như son, sơn móng, phấn trang điểm hay nhóm sản phẩm kem bôi da tỷ lệ nhiễm các chất màu cấm hay các corticoid khá cao (30%), cần được lưu tâm quản lý một cách sát sao hơn nữa để đảm bảo an toàn cho người sử dụng.

Chương V

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong quá trình thực nghiệm, để hướng tới hòa hợp trong toàn khối ASEAN, luận án luôn tiến hành bám sát các phương pháp hòa hợp ASEAN tương ứng sẵn có, giải quyết những vấn đề còn bất cập, tìm tòi, khảo sát để đưa ra các phương pháp mới hoặc phù hợp hơn. Luận án đã hoàn thành các mục tiêu đề ra và thu được các kết quả sau:

1. Đã thẩm định chuyên giao thành công 3 phương pháp hòa hợp của ASEAN để phát hiện và định lượng chì, arsen và Tretinoin. Kết quả đã đưa ra được các thông số phân tích cụ thể về điều kiện xử lý mẫu, thông số thiết bị phân tích. Kết quả cũng chỉ ra rằng các phương pháp hòa hợp này hoàn toàn phù hợp và triển khai được tại Việt Nam với các trang thiết bị sẵn có và các cán bộ được đào tạo về phương pháp phân tích HPLC và quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS.

2. Đã xây dựng được 10 quy trình phân tích, trong đó có 3 quy trình phân tích đồng thời và 7 quy trình phân tích từng chất riêng biệt, cụ thể như sau:

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng đồng thời 4 chất màu bị cấm (Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5) trong sơn môi và sơn móng bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng đồng thời 4 chất màu thuộc nhóm Sudan (Sudan I, II, III, IV) trong sơn môi và sơn móng bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện đồng thời 12 chất màu bị cấm thuộc nhóm steroid trong kem bôi da bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng chất màu Metanil yellow trong sơn môi, sơn móng bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng chất màu Rhodamin B trong sơn môi, sơn móng, phấn mắt, phấn má bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng chất màu Pigment red 53 trong sơn môi, sơn móng, phấn má bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng chất màu Pigment orange 5 trong sơn môi, sơn móng bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng chất màu Crystal violet trong sơn môi, sơn móng bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích để phát hiện, định lượng Hydroquinon trong kem bôi da bằng phương pháp HPLC với detector PDA.

- Quy trình phân tích phát hiện, định lượng thủy ngân trong kem bôi da, sữa rửa mặt, dầu gội đầu, phấn trang điểm bằng phương pháp AAS với kỹ thuật hóa hơi lạnh.

Những quy trình này đều đã được đánh giá về độ thích hợp hệ thống sắc ký, độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, định lượng, khoảng tuyến tính. Kết quả đánh

giá phương pháp cho thấy các phương pháp có độ đặc hiệu cao, độ lặp lại và độ đúng đạt yêu cầu, đảm bảo phù hợp với việc áp dụng kiểm tra chất cấm, chất cần kiểm soát hàm lượng trong mỹ phẩm ở mức nồng độ nhỏ.

Giới hạn phát hiện của các quy trình được thiết lập đều đáp ứng được yêu cầu về giới hạn phát hiện đưa ra trong các phương pháp hòa hợp hiện có của ASEAN. Một số phương pháp phân tích có độ nhạy tốt hơn so với phương pháp phân tích chất cấm tương ứng mà ASEAN đã đưa ra nhiều lần.

11/13 quy trình phân tích đã được thẩm định, phê duyệt và áp dụng thực tế để kiểm tra các chất cấm một cách kịp thời, phục vụ cho công tác quản lý chất lượng mỹ phẩm, 2 quy trình đang chờ phê duyệt.

3. Đã áp dụng các qui trình xây dựng được để kiểm tra 12 chất và nhóm chất tương ứng trên hơn 230 lượt mẫu mỹ phẩm, đã phát hiện thấy khoảng 13% số mỹ phẩm bị nhiễm các chất cấm hay có giới hạn về hàm lượng như: Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Crystal violet, các Sudan, thủy ngân, chì, một số corticoid. Đặc biệt có những mẫu mỹ phẩm có chứa thủy ngân và Pigment red 53 nhiều hơn giới hạn cho phép rất nhiều lần.

4. Đã góp phần vào công tác đào tạo kỹ thuật cho hệ thống kiểm nghiệm trong kiểm tra chất lượng mỹ phẩm.

KIẾN NGHỊ

- Cần chú trọng nâng cao năng lực cho hệ thống kiểm nghiệm (tăng cường trang thiết bị, dung môi, hóa chất, chất chuẩn...), nâng cao nhận thức cho các viên chức làm kiểm nghiệm mỹ phẩm và quản lý thị trường.

- Song song với triển khai các phương pháp hòa hợp đã được thẩm định cần triển khai nhiều phương pháp mới, đơn giản nhưng đủ độ tin cậy để có thể áp dụng được ở tất cả các Trung tâm kiểm nghiệm các tỉnh thành nhằm triển khai công tác kiểm tra giám sát chất lượng mỹ phẩm một cách kịp thời trên toàn quốc và đáp ứng yêu cầu kiểm nghiệm mỹ phẩm trong nước và khu vực, góp phần bổ sung các phương pháp hòa hợp khu vực (vì danh sách các chất bị cấm hay giới hạn hàm lượng trong mỹ phẩm là rất lớn).

- Cần thiết phải tăng cường kiểm tra giám sát hậu mại các nhóm chất cấm, chất có giới hạn về nồng độ, hàm lượng sử dụng trong mỹ phẩm đảm bảo an toàn cho người sử dụng, góp phần vào công tác quản lý chất lượng mỹ phẩm ngày càng đòi hỏi cao hơn và phù hợp với xu hướng hội nhập quốc tế.

- Bên cạnh đó mở rộng kênh để thu thập thông tin về phản ứng có hại của mỹ phẩm bên cạnh những phản ứng có hại của thuốc. Trên cơ sở đó bổ sung thêm các đối tượng chất cấm cần nghiên cứu. Trước mắt tập trung vào những hợp chất có nguy cơ bị lạm dụng cao.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Lê Thị Hường Hoa, Đỗ Thu Trang, Lê Đình Chi, Đoàn Cao Sơn (2012), “Xây dựng qui trình xác định chất màu cấm Pigment Orange 5 có mặt trái phép trong sơn môi và sơn móng bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc* số 1. 2012, 8-13.
2. Lê Thị Hường Hoa, Nguyễn Thị Hoàng Liên, Thái Nguyễn Hùng Thu, Trịnh Văn Lầu (2011), “Xây dựng phương pháp phát hiện chất màu Rhodamin B có mặt trái phép trong sơn môi, sơn móng và phấn mắt”, *Tạp chí Dược học*, 10/2011 (426), 23-27.
3. Nguyễn Văn Hà, Lê Thị Hường Hoa, Trịnh Văn Lầu (2011), “Xác định hàm lượng chì trong một số mẫu mỹ phẩm bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 4. 2011, 20-24.
4. Lê Đình Chi, Lê Thị Hường Hoa, Nghiêm Thị Ánh Minh, Vũ Tùng Lâm (2011), “Xây dựng phương pháp phát hiện màu Methanil yellow có mặt trái phép trong sơn môi và sơn móng bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 2. 2011, 9-14.
5. Đỗ Thu Trang, Lê Thị Hường Hoa, Doãn Huy Hùng, Thái Nguyễn Hùng Thu (2011), “Nghiên cứu xác định Hydroquinon trong kem bôi da mỹ phẩm bằng sắc ký lỏng pha đảo với detector diod array”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 1. 2011, 20-23.
6. Lê Thị Hường Hoa, Lê Đình Chi, Đỗ Thị Thanh Thủy, Thái Nguyễn Hùng Thu (2011), “Xây dựng phương pháp xác định thủy ngân trong một số mẫu mỹ phẩm dạng kem bôi da bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 1. 2011, 24-28.
7. Thái Nguyễn Hùng Thu, Hoàng Thanh Tâm, Lê Thị Hường Hoa, Nguyễn Thị Thủy Nguyên (2010), “Xây dựng phương pháp phát hiện chất màu bị cấm sử dụng Pigment red 53 trong sơn môi và phấn má”, *Tạp chí nghiên cứu Dược và thông tin thuốc*, số 1/2010, 8-13.
8. Đỗ Thu Trang, Lê Thị Hường Hoa (2008), “Nghiên cứu xác định chất bị cấm Tretinoin trong kem bôi da mỹ phẩm bằng sắc ký lỏng pha đảo với detector diod array”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, số 2. 2008, 15-18.
9. Đỗ Thu Trang, Lê Đình Chi, Lê Thị Hường Hoa, Bùi Thị Hòa (2007), “Xây dựng phương pháp xác định các chất màu nhóm Sudan trong sơn môi bằng sắc ký lỏng pha đảo với detector diod array”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc* số 2. 2007, 18-22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. ASEAN (2003), *Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm*, Bản dịch của Cục quản lý Dược, 2008
2. ASEAN (1995), *Phân tích đồng, chì và thủy ngân trong các chế phẩm thuốc đông dược*, Hội nghị chuyên gia các nước xem xét và thông qua các phương pháp phân tích không được diễn Đông Nam Á, Malaysia.
3. Trần Tử An (2007), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. Trần Tử An (2006), *Môi trường và độc chất môi trường*, Trường Đại học Dược Hà Nội, 138-141.
5. Trần Tử An, Trần Tích (2007), *Hóa phân tích, tập 1*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 19-25, 35-52.
6. Trần Tử An, Thái Nguyễn Hùng Thu (2007), *Hóa phân tích, tập 2*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 13-80, 249-275, 311-317.
7. Trần Mạnh Bình, Nguyễn Quang Đạt (2005), *Hóa học hữu cơ tập 1*, Trường Đại học Dược Hà Nội, 283-285.
8. Trần Mạnh Bình, Nguyễn Quang Đạt (2005), *Hóa hữu cơ, Tập 2*, Trường Đại học Dược Hà Nội, 138-139.
9. Bộ môn Hoá dược (1993), *Hóa dược : Alkaloid, kháng sinh, vitamin, steroid*, Nhà xuất bản Y học, 191-237.
10. Bộ Y tế, (Cục Quản lý dược Việt Nam), (2008), Công văn số 3307/QLD-MP về việc tiếp nhận Phiếu công bố sản phẩm mỹ phẩm theo qui định mới, ngày 14/4/2008
11. Bộ Y tế (2009), *Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích*, Phụ lục 7 – Thông tư 22/2009/TT-BYT Quy định về đăng ký thuốc.
12. Bộ Y tế (1996), *Quyết định số 2585/1996/QĐ-BYT ngày 28/12/1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc giao nhiệm vụ kiểm nghiệm, xác định chất lượng mỹ phẩm ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người*.
13. Bộ Y tế (2006), *Quyết định số 24/2006/QĐ-BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc triển khai, áp dụng và hướng dẫn thực hành các nguyên tắc, tiêu chuẩn “Thực hành tốt sản xuất mỹ phẩm” của Hiệp hội các nước Đông nam Á*.
14. Bộ Y tế (2011), *Thông tư 06/2011/TT-BYT, ngày 25 tháng 1 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế qui định về Quản lý mỹ phẩm*.
15. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Phụ lục 5, Các kỹ thuật sắc ký.
16. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Xác định giới hạn các tạp chất, Arsen, Phụ lục trang PL 174.
17. Nguyễn Thạc Cát, Từ Vọng Nghi, Đào Hữu Vinh (1985), *Cơ sở lý thuyết hóa học phân tích*, NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội, 187-199, 346-355.
18. Chính phủ (2004), *Nghị định số 179/2004/NĐ-CP của Chính phủ qui định quản lý nhà nước về chất lượng hàng hóa*, ngày 21/10/2004.

19. Nguyễn Thanh Hà, Phạm Khánh Phong Lan (2007), “Phân tích Arsen trong một số chế phẩm kem dưỡng da bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 1(2007), 18-21.
20. Trịnh Văn Lầu, Bùi Thị Hòa, Nguyễn Văn Hà, Lê Thị Hường Hoa (2000), *Phân tích một số nguyên tố độc (As, Pb, Cu) trong một số chế phẩm Đông dược bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử*, Đề tài khoa học công nghệ mã số KHYD-0235.
21. Lê Kim Long, Hoàng Nhuận (2001), *Tính chất lý hoá học của các chất vô cơ*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
22. Phạm Luận (1994), *Cơ sở lý thuyết của phương pháp phân tích phổ hấp thụ nguyên tử - Tài liệu dùng cho sinh viên cao học hoá phân tích*, Đại học KHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
23. Bùi Minh Lý, Ngô Quốc Bru (2002), "Sử dụng các chất cải tiến hoá học nâng cao độ nhạy và độ chính xác của phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử- lò graphit để phân tích Pb, Cd, Se và As", *Tạp chí phân tích Hoá, Lý, và Sinh học*, Tập 7 (số 2), 14-18.
24. Makoto Takagi, Trần Thị Ngọc Lan (dịch) (2010), *Các phương pháp phân tích trong hóa học*, Khoa Hóa, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 184-194.
25. Trần Thị Thanh Nga (2011), *Xác định Rhodamin B trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng detector UV*, Luận văn tốt nghiệp Khoa Hóa học, Trường đại học Khoa học tự nhiên
26. Hoàng Nhâm, Hoàng Ngọc Cang (2001), *Hoá vô cơ tập 2*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
27. Hoàng Nhâm (2003), *Hóa học vô cơ tập 3*, NXB Giáo dục, Hà Nội, tr.253-272.
28. Hoàng Thị Tuyết Nhung (2000), *Nghiên cứu định lượng một số nguyên tố độc (chì, đồng) trong tam thất bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử*, Luận văn tốt nghiệp thạc sỹ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
29. Lê Thành Phước, Phan Túy, Nguyễn Nhật Thị (2004), *Lý thuyết Hóa đại cương - vô cơ, quyển I*, Cấu tạo chất và nhiệt động học, Trường Đại học Dược Hà Nội, 80-85
30. Lê Thành Phước (2009), *Hóa đại cương – vô cơ tập 2*, NXB Y học, Hà Nội, 280-288.
31. Hồ Viết Quý (2009), *Các phương pháp phân tích công cụ trong hóa học hiện đại*, NXB đại học Sư phạm, Hà Nội, 203-217.
32. Hồ Viết Quý (2010), *Phân tích lý – hóa*, NXB Giáo dục, Hà Nội, 174-185
33. Lê Mậu Quyền (1999), *Hóa học vô cơ*, NXB khoa học và kỹ thuật, 286-293.
34. Hoàng Như Tổ (1970), *Độc chất học*, NXB Y học và Thể dục thể thao, 150-189.
35. Trịnh Thị Thanh (2004), *Sức khỏe môi trường*, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.
36. Phạm Văn Tình (1994), *Phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử - Những ưu thế, khả năng ứng dụng và hạn chế của nó trong thực tế phân tích ở nước ta hiện nay*, Bài giảng và báo cáo chuyên đề, Viện Hoá học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công Nghệ Quốc Gia (số1), 28-36.

37. Tổng cục Tiêu chuẩn và Đo lường, Trung tâm Thông tin (2003), *Tuyển tập các tiêu chuẩn về Hóa mỹ phẩm*.
38. Lê Trung (1997), *21 bệnh nghề nghiệp được bảo hiểm*, Viện Y học lao động và vệ sinh môi trường, 289-319.
39. TCVN 8670 : 2011, *Thực phẩm- xác định Rhodamin B bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*
40. UBTV Quốc hội (1999), *Pháp lệnh chất lượng hàng hóa số 18/1999/PL-UBTVQH 10, ngày 24/12/1999*.
41. Ngô Đức Vận (1999), *Hóa học vô cơ, tập 2: Các kim loại điển hình*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 185 – 190.
42. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2012), “*Các hướng dẫn hiệu chuẩn, kiểm tra thiết bị*” từ VKN/HDHC/20.01 đến VKN/HDHC/20.19, Tài liệu Viện dẫn STCL
43. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2007), *Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc*, Tài liệu đào tạo.
44. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2012), *Thẩm định/đánh giá phương pháp phân tích trong dược điển và TCCS (phương pháp chuyển giao)*, mã số: VKN/TT/19.27
45. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2008), *Quyết định số 14VKN/QĐ, ngày 20/01/2008 của Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm về việc thành lập Phòng kiểm nghiệm Mỹ phẩm*.
46. Nguyễn Văn Yên và Cs (2010), “Nghiên cứu phát hiện các chất sudan trong thực phẩm và mỹ phẩm bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Dược học*, 8/2010 (412), 11-16.

Tài liệu tiếng Anh

47. Amparo Salvador and Alberto Chisvert (2007), *Analysis of Cosmetic Products*, Imprint: Elsevier Science, 4-53, 141-185
48. AOAC (1998), *Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures*, Arlington, Va., USA
49. ASEAN (2008), *ASEAN Cosmetic Document*. 3rd Printed in Thailand by The Thai Cosmetic Manufacture Association
50. ASEAN (2006), *Determination of heavy metals (arsenic, cadmium, lead, and mercury) in cosmetic products* (ACM THA 05, 12/7/2006).
51. ASEAN (2005), *Identification of retinoic acid (tretinoin) in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM SIN 01, 2/12/2005).
52. ASEAN (2005), *Identification of prohibited colorants in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM SIN 02, 2/12/2005).
53. ASEAN (2005), *Identification and determination of 2-phenoxy ethanol, methyl, ethyl, propyl, and butyl 4-hydroxybenzoate in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM INO 04, 2/12/2005).
54. ASEAN (2005), *Identification and determination of hydroquinone in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM INO 03, 31/8/2005).

55. ASEAN (2005), *Identification of hydrocortisone acetate, dexamethasone, betamethasone, betamethasone 17-valerate and triamcinolone acetonide in cosmetic products by TLC and HPLC* (ACM MAL 07, 2/12/2005).
56. ASEAN (2013), ACTLC, *Draft of ASEAN Guideline on Analytical Method Validation: Inter-laboratory Study*
57. ASEAN (2013) , *Annexes of the ASEAN Cosmetic Directive Updated March 2013*. Annex II, Annex III, part1.
58. Andy Zhai (2012), *LC/MS/MS of Malachite Green and Crystal violet in fish with Agilent bond elute PCX and Poroshell 120*.
59. An Y et al (2007), *Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells*. *Mutat Res*. 2007 Mar 5;627(2):164-70. Epub 2006 Dec 22.
60. Antman Karen H. (2001). *The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy*. Introduction to a supplement to The Oncologist. 6 (Suppl 2), 1-2.
61. Das D, Chatterjee A, Mandal BK, Samanta G, Chakraborti D, Chanda B (1995), "Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world". *Analyst*. 1995 Mar;120(3):917-24..
62. Ahuja & N. Jespersen (2006), "Modern Instrumental Analysis 47 (Comprehensive Analytical Chemistry)", *Elsevier*, 28-51, 226-245.
63. *BP Volume 4* (2010), page A160-A165. Printed in the United Kingdom by The Stationery Office, N5977690 C34 8/2009
64. *BP 2010*, Limit test for Arsen, page A243. Printed in the United Kingdom by The Stationery Office, N5977690 C34 8/2009
65. *BP 2010, Validation of Analytical Procedures*. Supplementary Chapter III E. Printed in the United Kingdom by The Stationery Office, N5977690 C34 8/2009
66. Cheng-Hui Lin, Jeun-Yuan Sheu, Hsin-Lung Wu, Yeou-Lih Huang (2005), "Determination of Hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high- performance liquid chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 414- 419.
67. Claudia Desiderio, Luigia Ossicini and Salvatore Fanali (2000), "Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electro chromatography", *Journal of chromatography A*, Vol. 887, issue 1-2, 28 July 2000, 489- 496.
68. David M. Bliesner (2006), *Validating Chromatographic Methods*, Wiley-interscience, A John Wiley & Sons, inc., Publication
69. Dillon D., Combes R., Zeiger E. (1994), "Activation by caecal reduction of the azo dye D & C red no. 9 to a bacterial mutagen", *Mutagenesis*, 1994 Jul, 9(4), 295-299
70. Emsley, John (2001). *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford: Nhà in Đại học Oxford., 43, 513, 529
71. *European Pharmacopoeia Volume 1* (2010), is published the Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM), 36-38

72. Eszter Dési, Ágnes Kovács, Zoltán Palotai, Aniko Kende, "Analysis of dexamethasone and prednisolone residues in bovine milk using matrix solid phase dispersion-liquid chromatography with ultraviolet detection", *Microchemical Journal*, vol. 89, no. 1, pp. 77-81, 2008
73. Geertruida Sihombing (1978), "An Exploratory Study on Three Synthetic Colouring Matters Commonly Used as Food Colours in Jakarta", Badan Litbang Kesehatan, *website: <http://digilib.litbang.depkes.go.id>*.
74. Gagliardi, D. De Orsi, G. Cavazzutti, G. Multari, D. Tonelli, (1996) "HPLC determination of rhodamin B (CI.45170) in cosmetic products", *Chromatographia*, Vol.43, No.1/2, July 1996, 76-77
75. Goodman D.G., Ward J.M., Reichardt W.D. (1984), "Splenic fibrosis and sarcomas in F344 rats fed diets containing aniline hydrochloride, p-chloroaniline, azobenzene, o-toluidine hydrochloride, 4,4'-sulfonyl dianiline, or D & C red No. 9", *J. Natl. Cancer Inst*, 1984 Jul, 73(1), 265-273.
76. Hauser B., Deschner T., Boesch C., *Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine*, *Journal of Chromatography B*, Volume 862, Issues 1-2, 1 February 2008, Pages 100-112.
77. Heather Brannon, MD, former About.com Guide, *How to Use Tretinoin (Retin-A)* Updated July 02, 2008
78. Hitachi (1997), *Instruction Manual: "Mercury Analyzer Accessory" for Z-5000 series Atomic Absorption Spectrophotometer*, 1st Edition.
79. Hitachi Ltd. (1997), *Furnace Atomization Analysis Guide for Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrometry*, Japan.
80. Hosking J.W. , Snell N.B. , Sturman B.T. , Sills I.D. and Mullings L.R. (1978), *Practical Atomic Spectrometry*, School of applied Chemistry University of technology Perth Western Australia, page.9-70
81. Hseu Z-Y. (2004), "Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods", *Bioresourse, technology*, 95 (2004), 53-59
82. Yi-Hui Lin, Yi-Hsin Yang and Shou-Mei Wu (2007), "Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 279-282.
83. Hussein G. Daood, Peter A. Biacs (2005), "Simultaneous determination of Sudan dyes and carotenoids in red pepper and tomato products by HPLC", *J.Chromatogr.Sci* , 11/2005; 43(9), 461-465.
84. ICH Topic Q2B (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*
85. Inna K. Sakodinskaya, Claudia Desiderio, Annalisa Nardi and Salvatore Fanali (1992), "Micellar electrokinetic chromatographic study of hydroquinone and some of its ethers:

- Determination of hydroquinone in skin-toning cream”, *Journal of chromatography A*, volume 596, issue 1,3 april 1992, 95- 100.
86. Jame W Robinson (1970), *Atomic Absorption Spectrophotometry*, Marcel deker in Heawork.
 87. Jones H.R. (1971), *Mercury Pollution Control*, Noyes data corporation, New Yersey, USA, 45, 108-135.
 88. Julie Kowalski, *Simple HPLC Analysis for Sudan Dyes Monitor Sudan I, II, III, and IV in a Single, Isocratic Analysis*,
 89. Laxman P. Srivastava, Subhash K. Khanna and Giriraj B. Singh (1978), “Spectrophometric estimation of Metanil yellow in foodstuffs”, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 5, 119-124.
 90. Ludwig Huber, (2010), *Validation of Analytical Methods*. Printed by Agilent Technologies
 91. Maranhao T.A. et al (2005), "Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B* 60, 667-672.
 92. Mason R.W., Edwards L.R. (1989), “High-performance liquid chromatographic determination of rhodamin B in rabbit and human plasma”, *Journal Chromatography*, 491, 468-472
 93. Mathuros Ruchiawat, Ronald C. Shank (1996), *Enviromental Toxicology*, Churlabhorn Research Institute, 147-148, 269-278, 386-389.
 94. Martindale 34th Edition, *Chelating Agents Antidotes and Antagonists*.
 95. Michael J.K. (2007), *Basic & Clinical Handbook*, McGraw-Hill, 568-04.
 96. Michael E. Swartz (1997), *Analytical Method Development And Validation*, Marcel Dekker, INC Publication.
 97. Ming-Ren Fuh, Kan-Jung Chia (2002), ” Detemination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection”, *Talanta*, 56, 663-671.
 98. Mohamad Sleiman, Daniel Vidozo, Corine Ferronato, Jean-Marc Chovelon (2007), “Photocatalytic degradation of azo dye Metanil yellow: optimization and kinetic modeling using a chemometric approach”, *Applied catalysis B: Evironmental*, 77, 1-11.
 99. Nouredine Barka and CS (2008) “ Factors influencing the photocatalytic degradation of Rhodamin B by TiO₂-coated non-woven paper”, *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry* 195, 346-351
 100. Organization of Economic Co-operation and Development, Screening Information Data Set, “Barium bis [2-chloro-5-[(hydroxy-1-naphthyl)azo]toluene-4-sulphonate]”, www.chem.unep.ch, 1999 Mar 31.
 101. OECD Environment Directorate Environment, Health and Safety Division (2007), *The 2007 OCED list of high production volume chemicals*.

102. Peter Moller, Hakan Wallin, Lotte Risom, Lisbeth E. Knudsen, *DNA damage in isolated rat hepatocytes exposed to C.I. pigment orange 5 and C.I. pigment yellow 12 by the alkaline comet assay*, National Institute of Occupational Health, Copenhagen, Denmark.
103. Petit A., Cohen-Ludmann C., Clevenbergh P., Bergmann JF., Dubertret L., *Skin lightening and its complications among African people living in Paris*, Journal of the American Academy of Dermatology, Volume 55, Issue 5, November 2006, 873-878.
104. Petr botek, Jan Poustka and Jana Hažšlová (2007), "Determination of banned dyes in spices by liquid chromatography-Mass spectrometry", *Czech J. Food Sci*, Vol.25, No.1, 17-24
105. Lin W, Sun X, Zhao X, Xu W, Guo G (2012), "Simultaneous determination of 6 forbidden colorants in cosmetics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Se Pu.*, 2012 May;30(5):527-32.
106. O. Van den hauwe, F. Dumoulin, C. Elliott, C. Van Peteghem, Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a single dose administration using LC–MS/MS, *Journal of Chromatography B*, Volume 817, Issue 2, 25 March 2005, Pages 215-223.
107. Rastogi C., Barwick V.J. and Carter S.V. (2006), "Identification of organic colorants in cosmetics by HPLC - photodiode array detection", *Chromatographia*, 45 (1), 215-228.
108. Resolution ResAP (2008), *Ion requirements and criteria for the safety of tattoos and permanent make-up* (superseding Resolution ResAP (2003) 2 on tattoos and permanent make-up) (Adopted by the Committee of Ministers on 20 February 2008 at the 10-18th meeting of the Ministers' Deputies)
109. R. Hájková, P Solich , J. Dvůrák , J. Sicha, "Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 32, Issues 4-5, 8 August 2003, Pages 921-927.
110. Rui Li, Zhou Yi Guo, Zheng Fei Zhuang, Ke Xiong, Si Jin Chen, Song Hao Liu, Mar 1, (2012), *Quantitative Analysis of Crystal Violet by Raman Spectroscopy*
111. Sara Denman, Suzana Jameel, J.Hay & J.K. Sugden (1996), "Photostability of Crystal Violet", *Elsevier Scient Ltd., Dye and Pigment*, Vol. 30. No.1, page 7-72,
112. Shanta Ramchandani, Mukul Das, Anjulika Joshi and Subhash K. Khanna (1996)," Effect of oral and parenteral administration of Metanil yellow on some hepatic and intestinal biochemical parameters", *Journal of applied toxicology*, 17, 85-91.
113. Senior Chemist, R&D Europe ingrid.hayenga@sial.com, *New standards and deuterated standards for the reliable analysis of these carcinogenic compounds in foodstuffs*
114. Xia He, Gong Guoquan, Zhao Hui and Li Hu-Lin (1997), *Fluorometric dermination of As(III) with fluorescein*, *Microchemical Journal*, Vol 56, 327-331.

115. Stefanaki C, Stratigos A, Katsambas A (2005), "Topical retinoids in the treatment of photoaging". *J Cosmet Dermatol*, June 2005;4 (2): 130–134.
116. Stiborova M. et al. (2006), *Modulation of CYP1A1-mediated oxidation of carcinogenic azo dye Sudan I and its binding to DNA by cytochrome b5*. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Dec;27 Suppl 2:35-9.
117. USP 34/NF 29 (2011), *Heavy metals <231>, Lead <251>, Mercury <261>*. Printed in the United States by *United Book Press, Inc., Baltimore, MD*.
118. USP 34/ NF 29 (2011). *Validation of Compendial Procedure <1225>*. Printed in the United States by *United Book Press, Inc., Baltimore, MD*.
119. USP 34/ NF 29 (2011), *Tretinoin*. Printed in the United States by *United Book Press, Inc., Baltimore, MD*.
120. U.S. Pharmacopoeia Convention (2013), *Validation and Verification of Analytical Procedures* (Document of Training course in Ha Noi Viet Nam)
121. Wegenerl, J.C. Klammer, Govers. A.Th. Brinkman, (1987), "Determination of Organic Colorants in Cosmetic Products by High-Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 24 (1), 865-875
122. Westmoreland C., Gatehouse D. (1992), "D and C Red No. 9: genotoxic or non-genotoxic carcinogen?", *Mutat. Res*, 1992 Mar, 281(3), 163-167.
123. Wikipedia, the free encyclopedia, Rhodamine, Eye shadow.
124. Y.Zhang, Z.Zhang, Y.Sun, (2006), "Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated BrO⁻-luminol chemiluminescence detection", *J.Chromatogr. A*, 1129 (1), 34-40.
125. Zoe Grosser, Ph.D., Lee Davidowski, Ph.D., Laura Thompson, *The Determination of Metals in Cosmetics*, PerkinElmer, Inc. Shelton, CT 06484 USA.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

PHỤ LỤC 1. Sắc ký đồ và phổ đồ các chất màu bị cấm.

PHỤ LỤC 2. Sắc ký đồ và phổ đồ các chất có tác dụng
dược lý mà bị cấm hoặc có giới hạn hàm
lượng sử dụng.

PHỤ LỤC 3. Phổ đồ của các kim loại nặng.

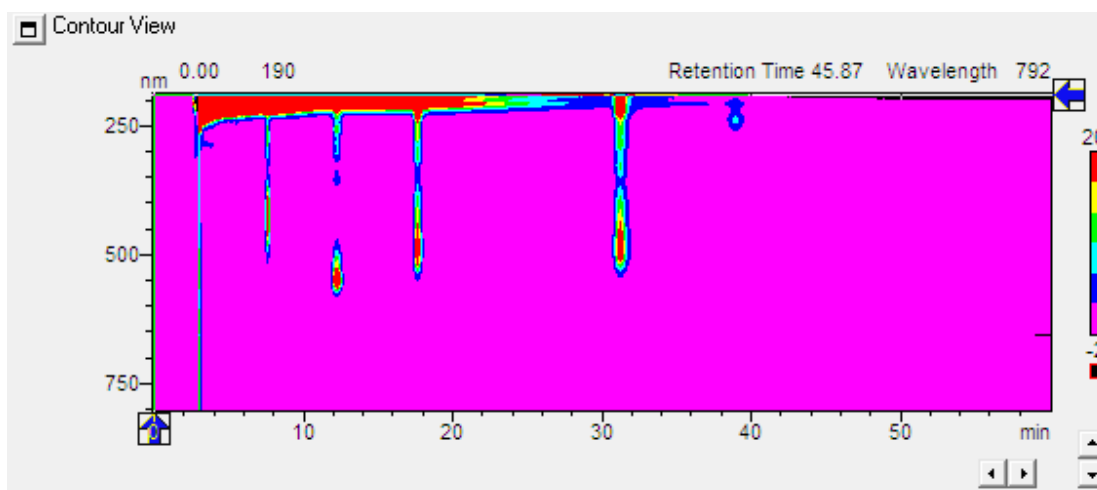
PHỤ LỤC 4. Kết quả kiểm tra hàm lượng chì trong
một số mỹ phẩm.

PHỤ LỤC 5. Danh mục các qui trình kỹ thuật.

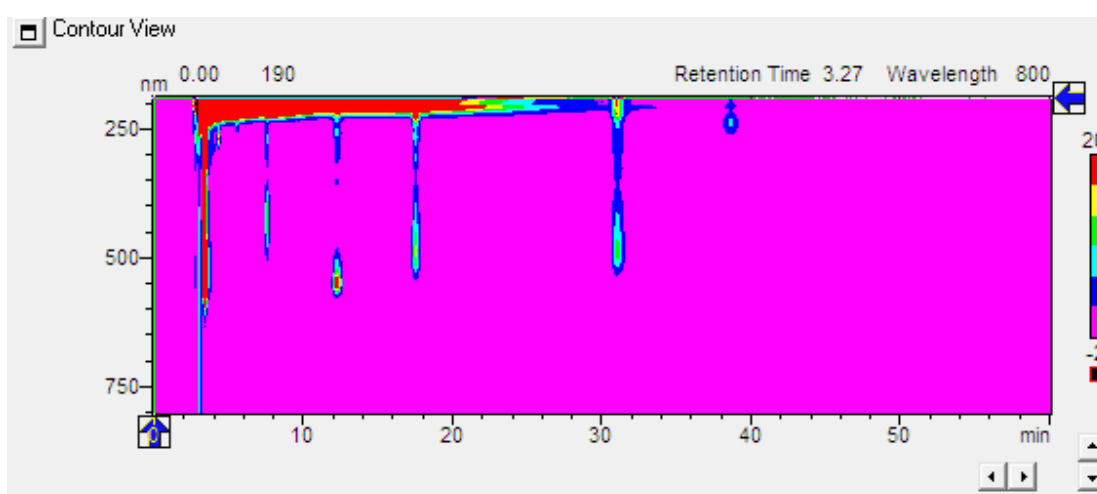
PHỤ LỤC 1

Sắc ký đồ và phổ đồ các chất màu bị cấm

PHỔ 3D CỦA HỖN HỢP 4 CHẤT MÀU METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53, PIGMENT ORANGE 5

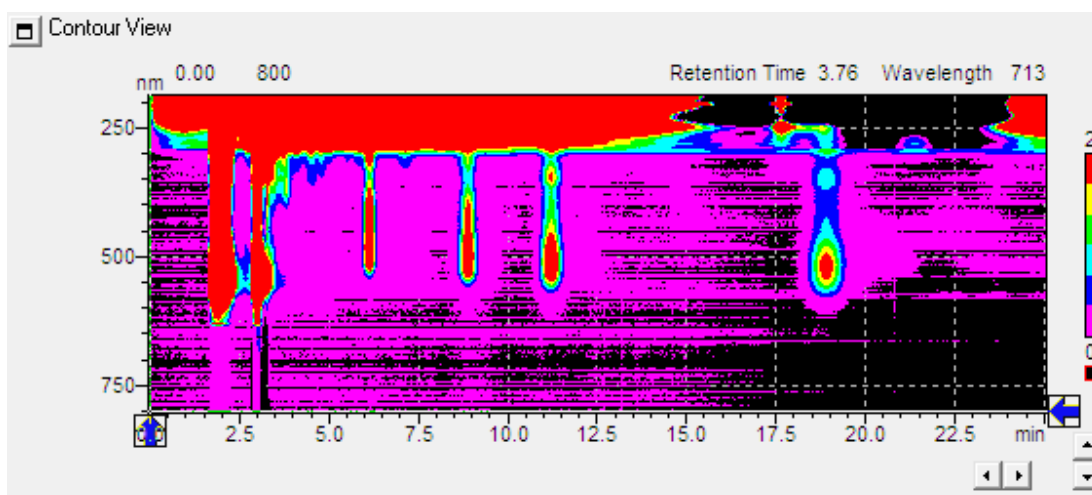


Phổ 3D của dung dịch chuẩn hỗn hợp Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5

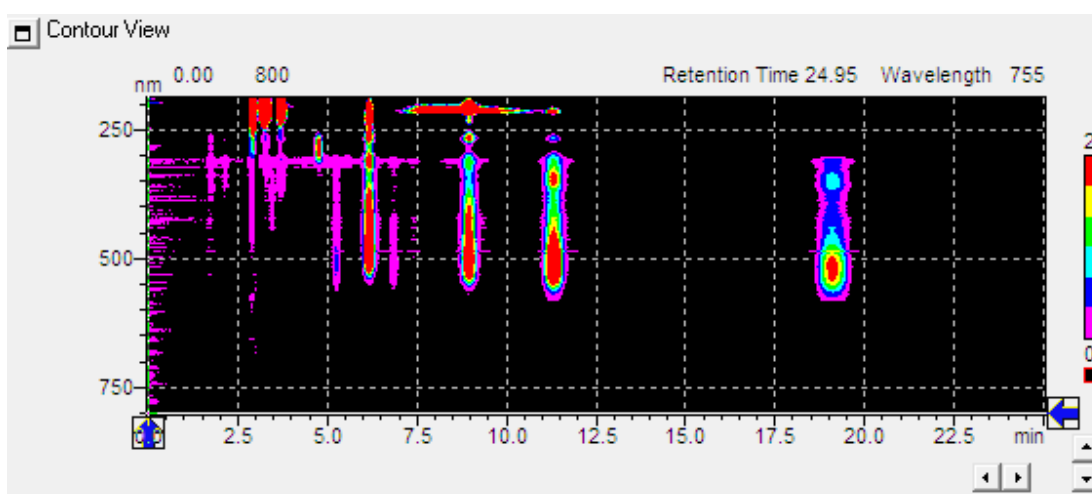


Phổ 3D của dung dịch thử tự tạo Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5

PHỔ 3D CỦA HỖN HỢP 4 CHẤT MÀU SUDAN I, SUDAN II, SUDAN III, SUDAN IV

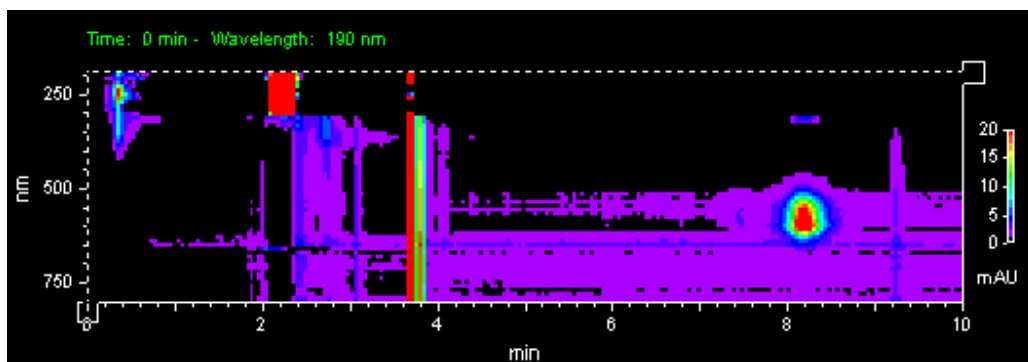


Phổ 3D của dung dịch thử tự tạo Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV

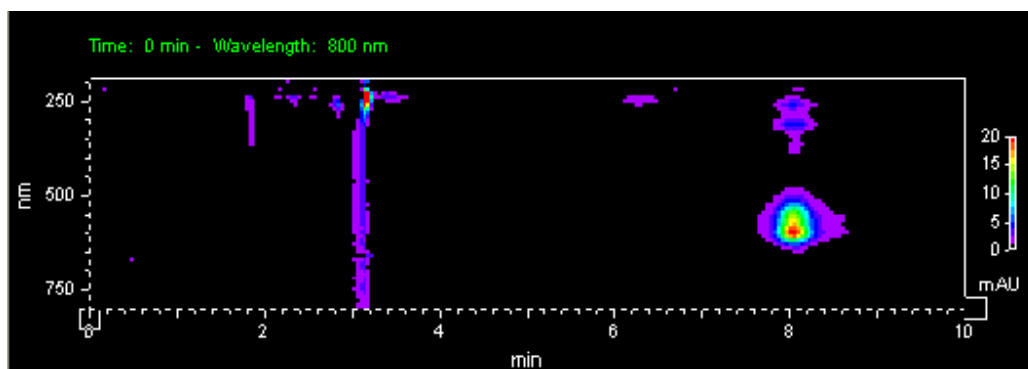


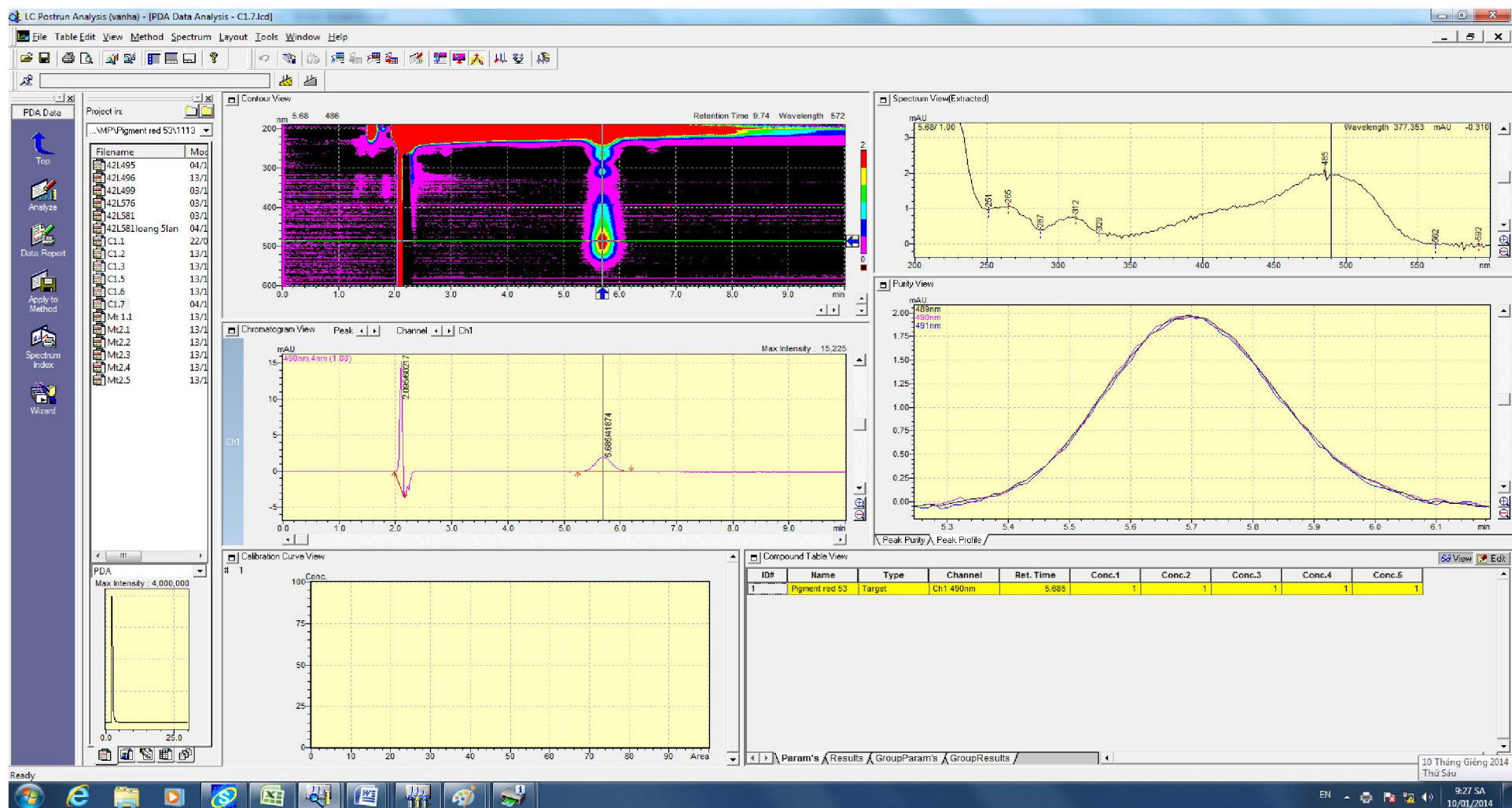
Phổ 3D của dung dịch chuẩn hỗn hợp Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV

PHỔ 3D CỦA CRYSTAL VIOLET

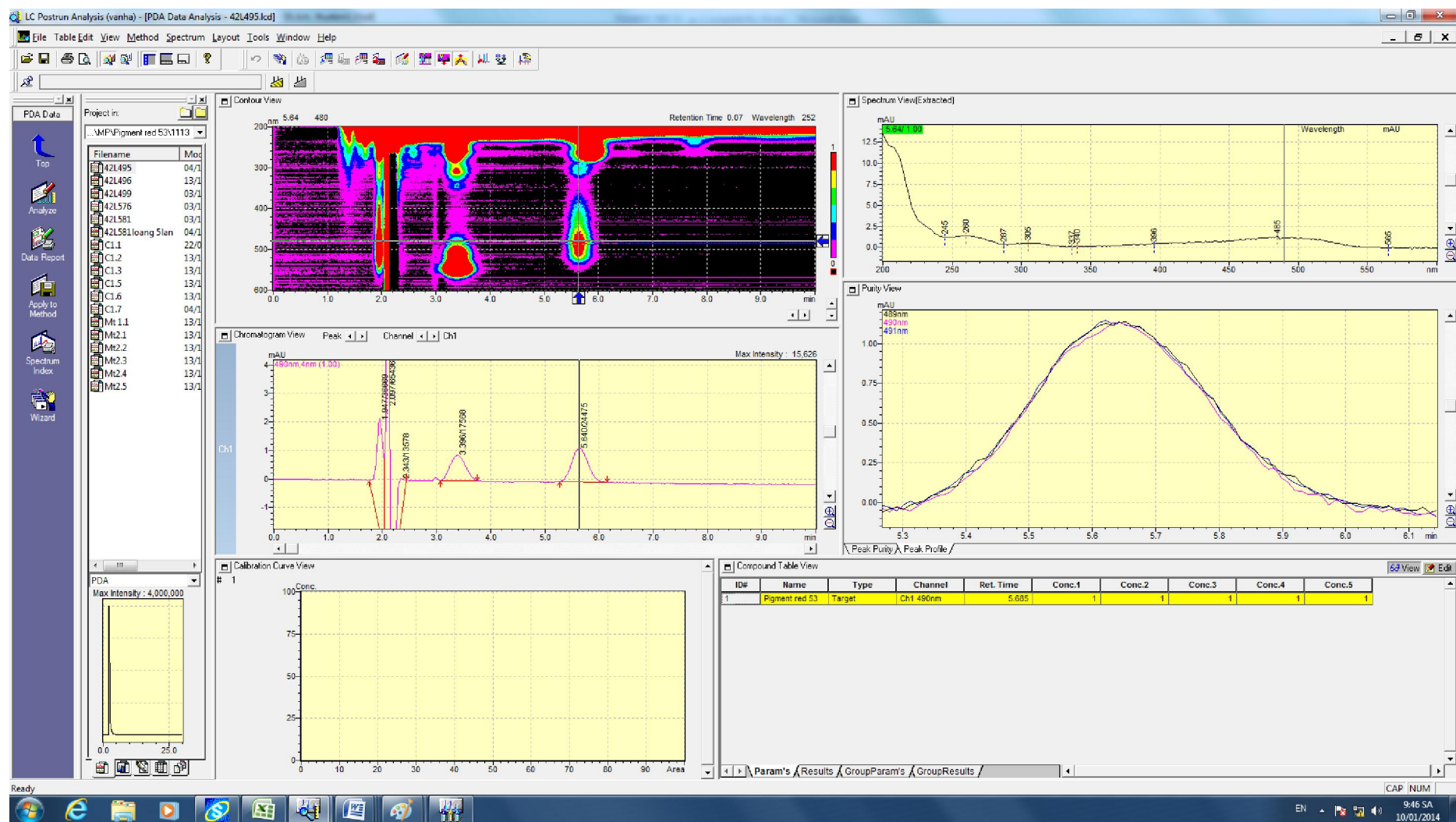


Phổ 3 D của dung dịch thử sơn móng Kiệt Thắng màu hồng

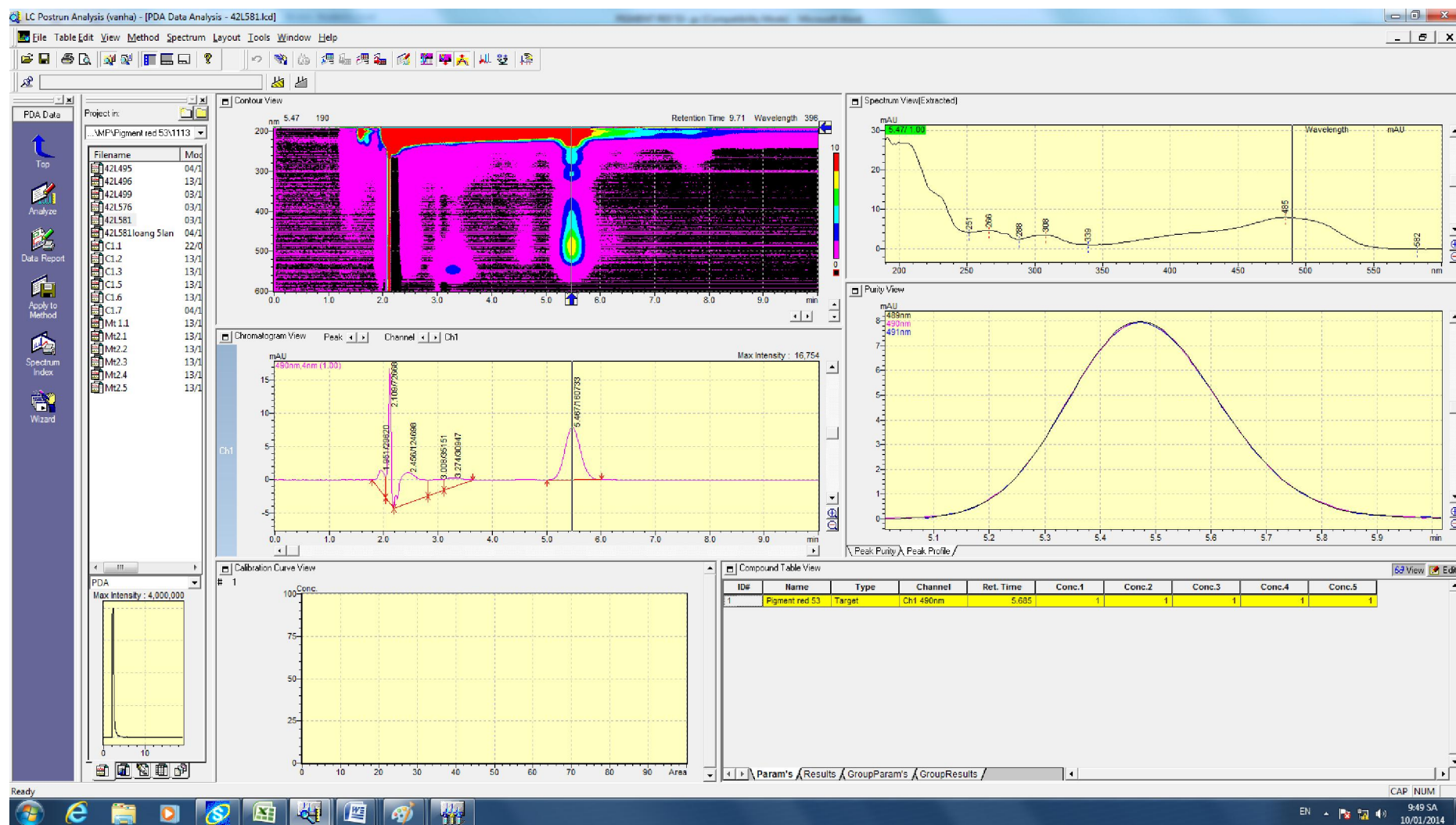




PIGMENT RED 53



MÃU 42L-495

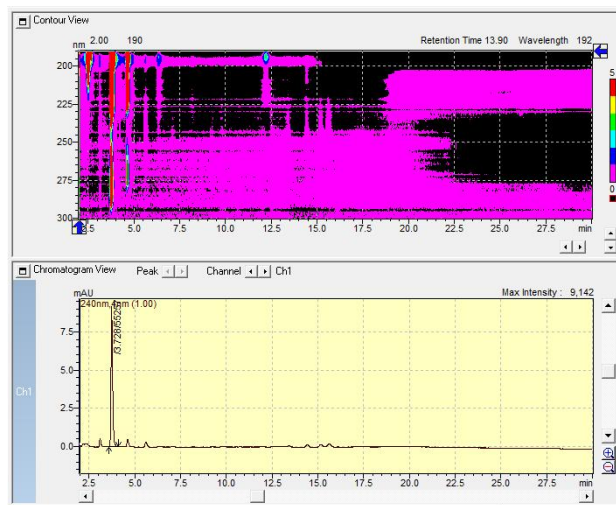


MÃU 42L-581

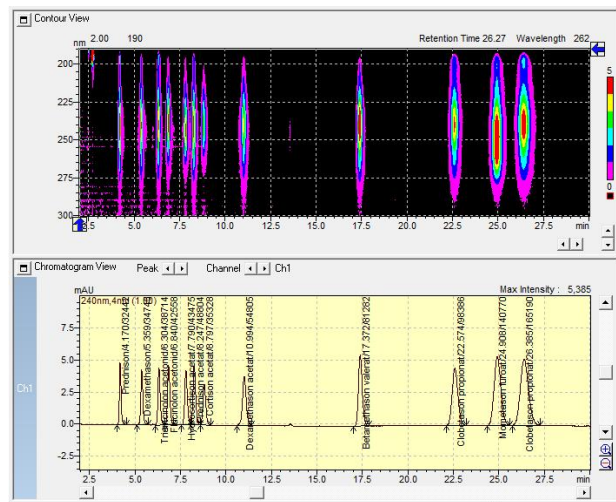
PHỤ LỤC 2

Sắc ký đồ và phổ đồ các chất có tác dụng dược lý mà bị
cấm hoặc có giới hạn hàm lượng sử dụng

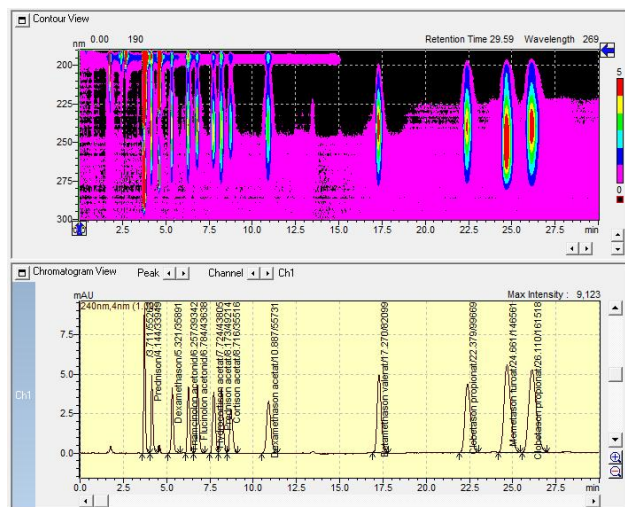
12 STERERIOD



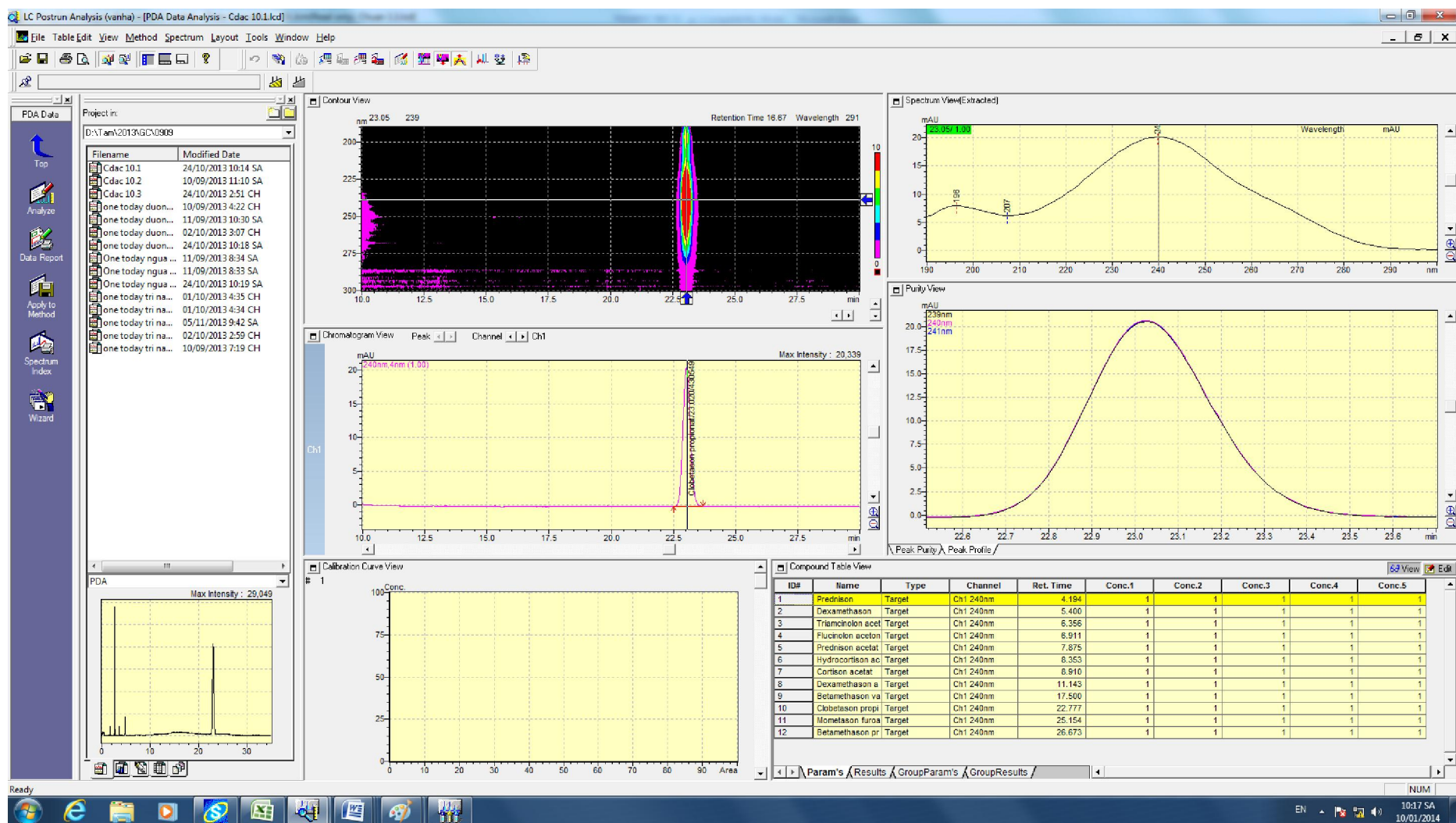
Phổ đồ mẫu Placebo



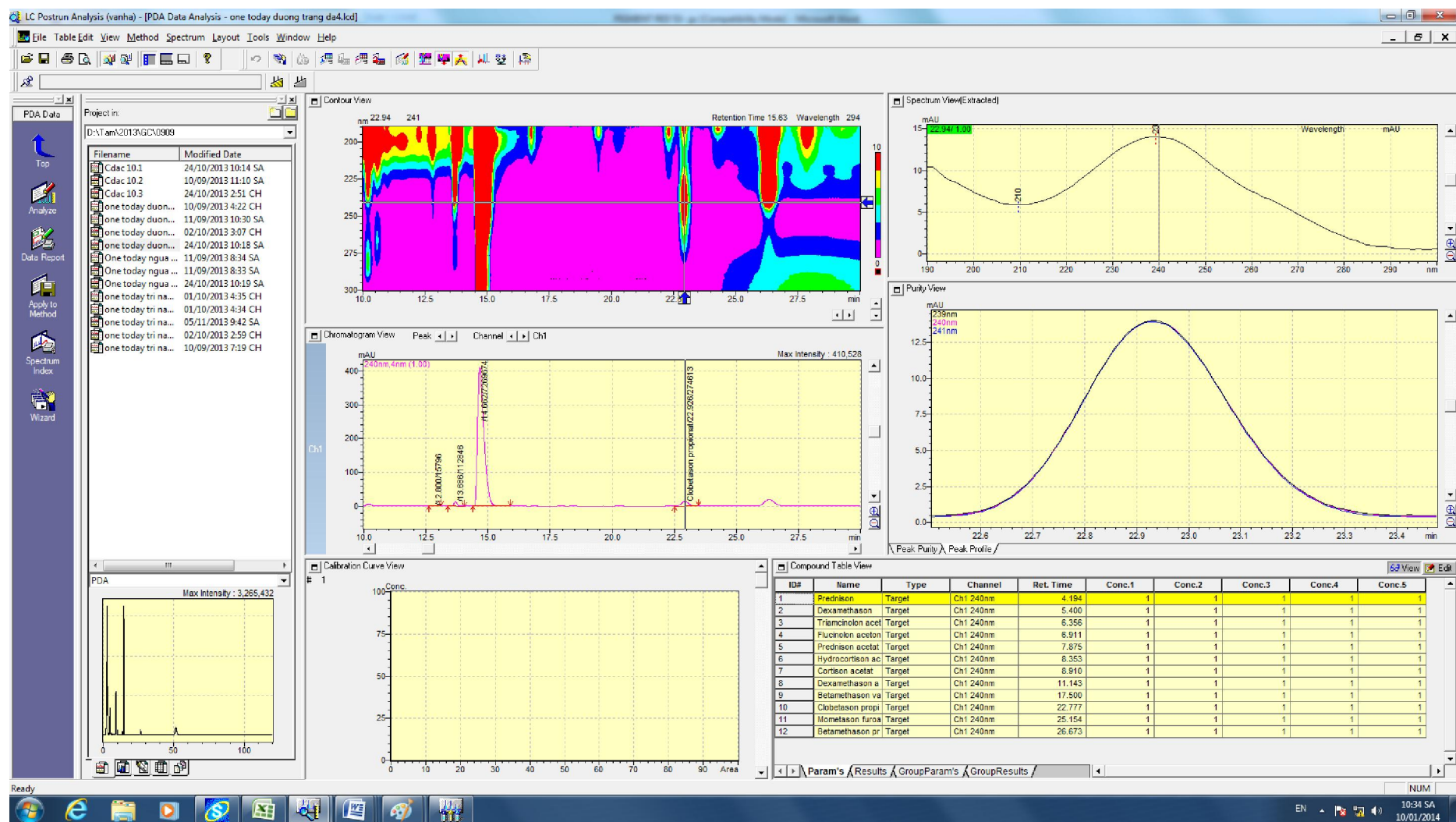
Phổ đồ mẫu chuẩn



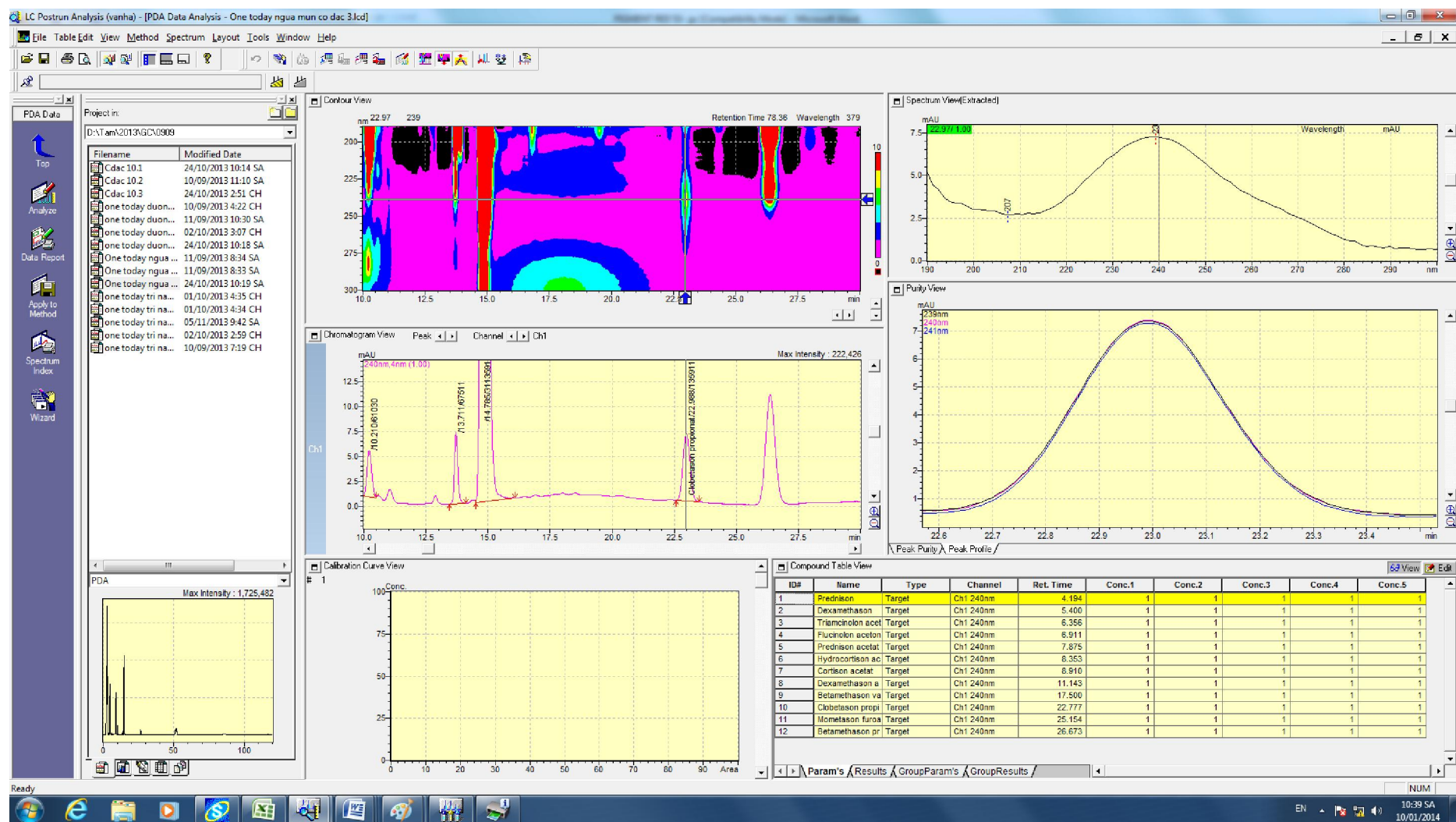
Phổ đồ mẫu tự tạo



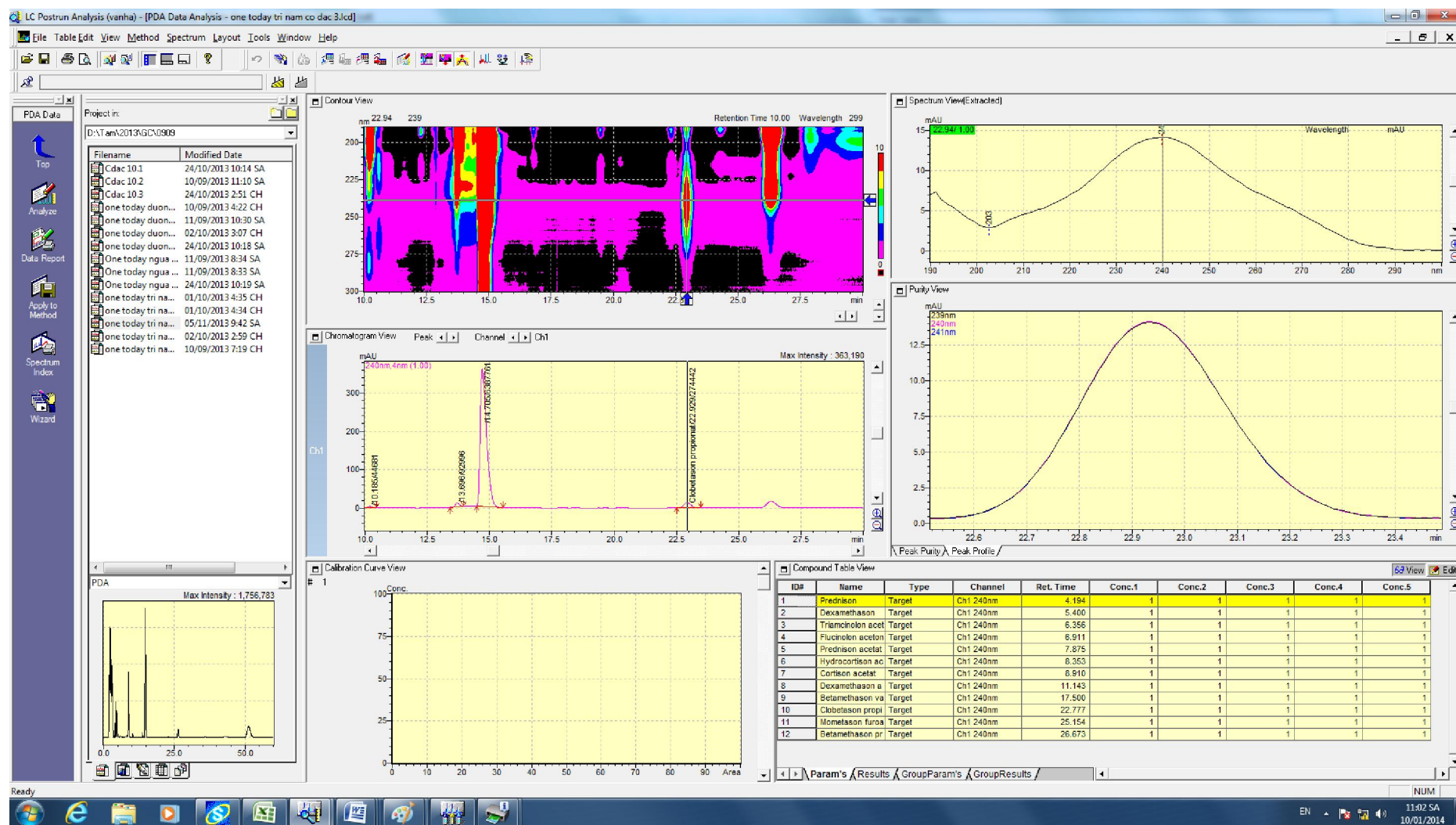
Chuẩn đặc Clobetason propionat



One today duong trang da

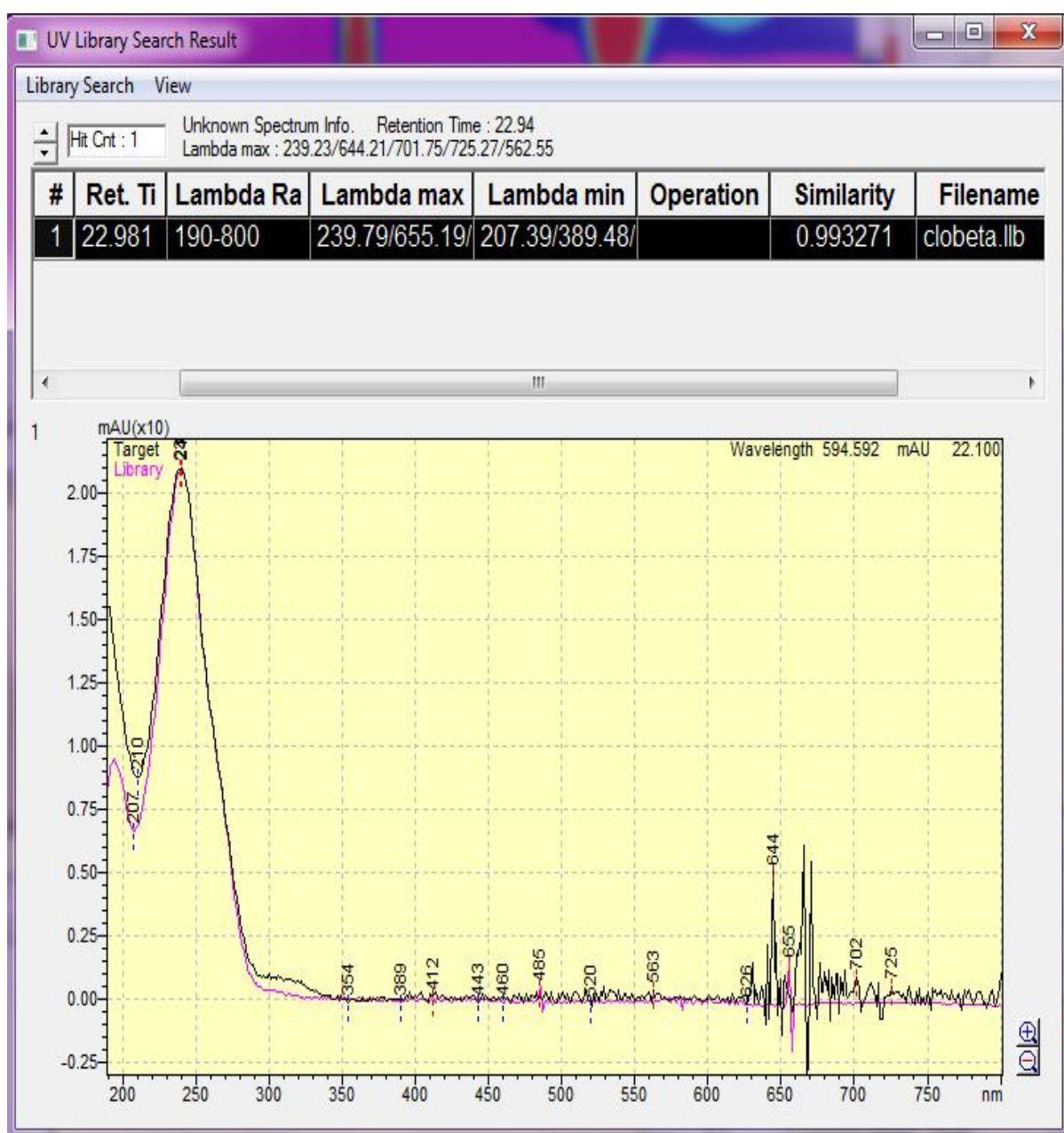


One today ngua mun

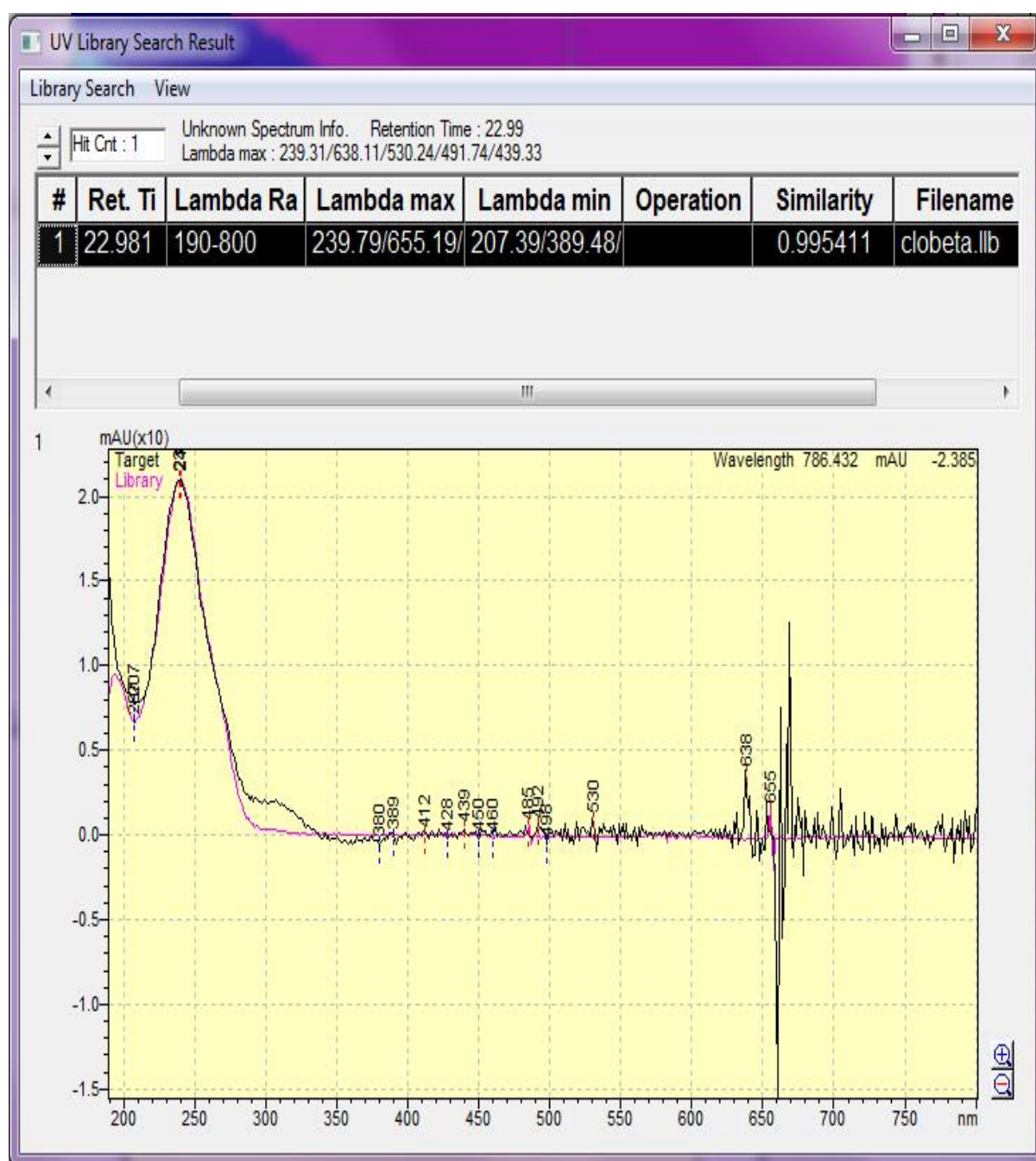


One today trị nám cô đặc

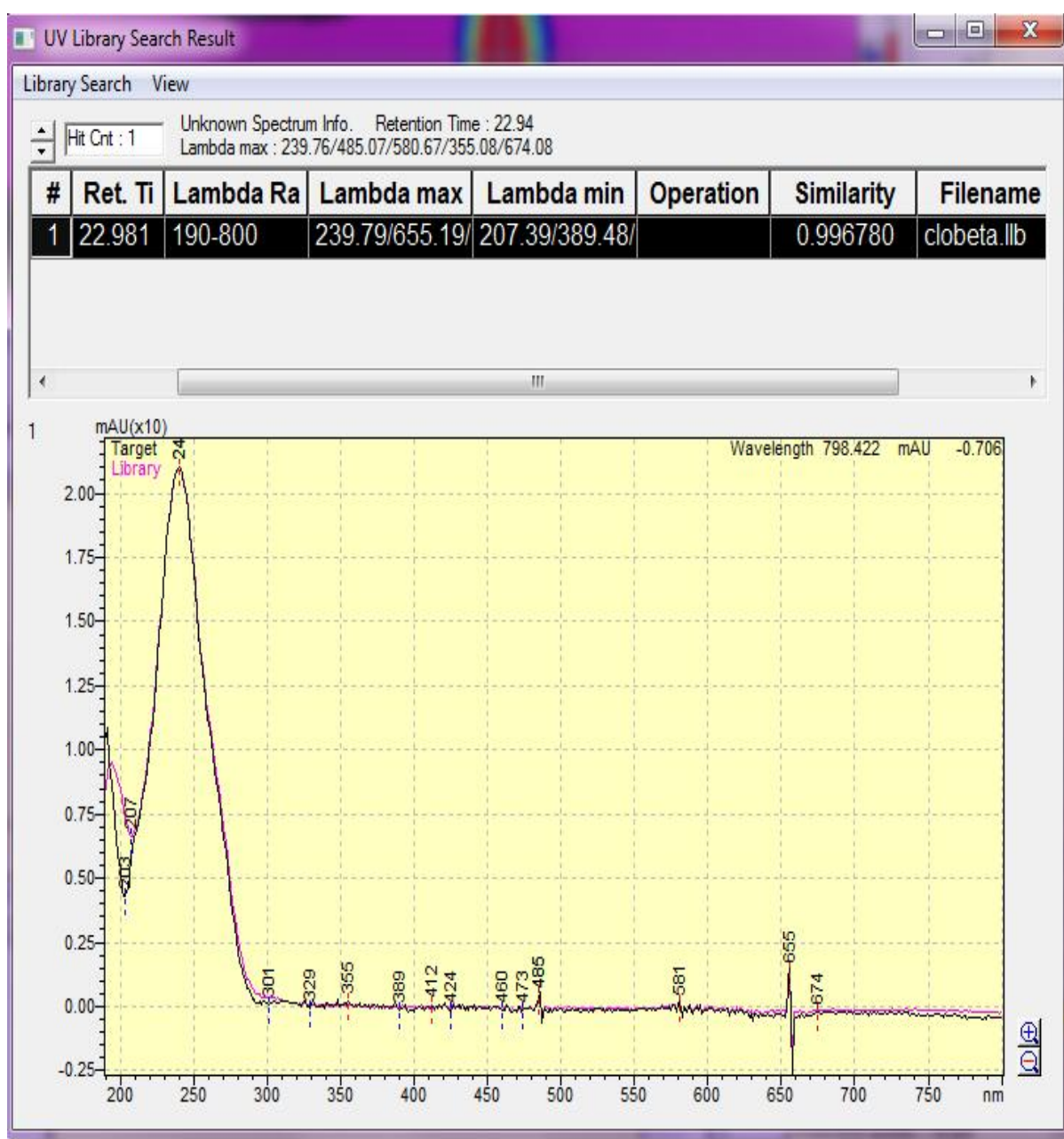
Chồng phổ pic nghi ngờ trong mẫu One today dương trạng da với chuẩn clobetason dipropionat



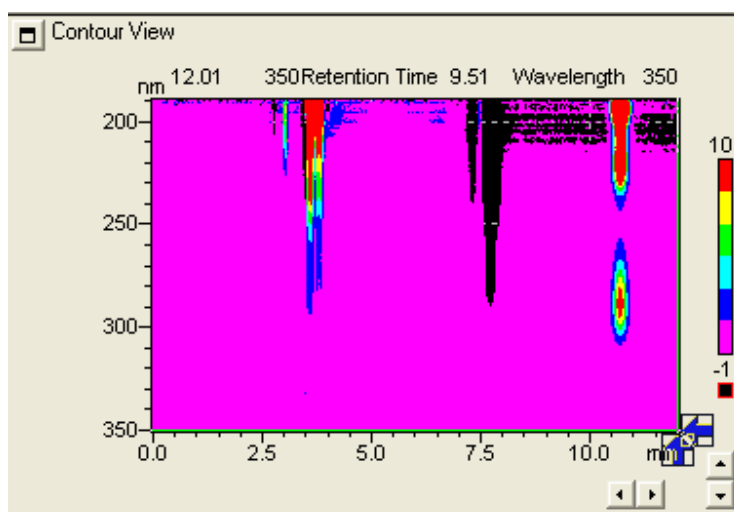
Chồng phổ pic nghi ngờ trong mẫu One today tri mun với chuẩn clobetason dipropionat



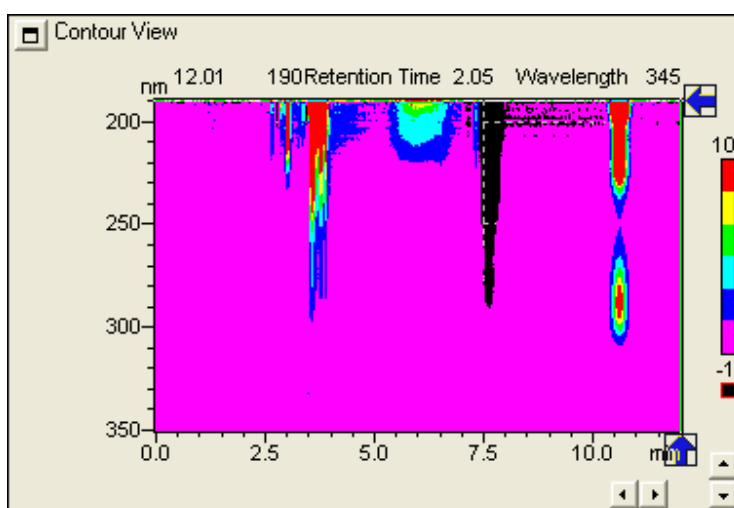
Chồng phổ pic nghi ngờ trong mẫu One today tri nám với chuẩn clobetason dipropionat



PHỔ 3D CỦA HYDROQUINON



Phổ 3D của dung dịch chuẩn Hydroquinon



Phổ 3D của dung dịch thử tự tạo Hydroquinon

PHỤ LỤC 4

Kết quả kiểm tra hàm lượng chì trong một số
mẫu mỹ phẩm

Kết quả kiểm tra hàm lượng chì trong một số mỹ phẩm

STT	Tên mẫu	Kết quả định lượng (ppm)
PB06	Son môi Maybeline Color sensational	1,0
PB07	Phấn Avon pressed powder	1,0
PB08	Phấn Lacvert Essance whitening two way cake	0,6
PB09	Phấn arocia whitening part II	2,8
PB10	Loreal Paris color riche nutri shine	3,8
PB11	Maybeline baby lip SPF 20 lip balm	2,6
PB12	Maybeline lip smooth color bloom	1,5
PB13	Maybeline water shiny diamond	3,6
PB14	Maybeline fruity jelly	1,5
PB15	Maybeline lip smooth color care refreshing tinted lip balm	4,5
PB16	Maybeline color sensational moisture extreme lip color	2,2
PB17	Phấn nền Givenchy Matissime	1,4
PB18	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 17	-
PB19	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 21	0,8
PB20	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 08	1,4
PB21	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 16	1,5
PB22	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 20	0,4
PB23	Son môi mềm mịn Givenchy Rouge Interdit 09	1,9
PB24	Phấn trang điểm Eveline 21	6,0
PB25	Phấn mắt 5 màu ánh kim cương WN-1	9,0
PB26	Son ánh kim cương dưỡng ẩm	-
PB27	Phấn má hồng chống dầu Clear Smooth	0,2
PB28	Dầu gội trị gàu Head & Shoulders	-
PB29	Dầu gội phục hồi tóc Total repair	1,2
PB30	Phấn trang điểm tất cả trong một Clear Smooth	3,1
PB31	Son móng Odbo	0,7
PB32	Son Shiseido	1,3
PB33	Lip Gloss	0,2
PB34	Phấn trang điểm sáng da 5 in 1	2,4
PB35	Phấn mắt Pochea	3,3
PB36	Son môi pink magie	0,3
PB37	Phấn mắt Rihao	1,6
PB38	Phấn trang điểm Pond's	1,0
PB39	Phấn trang điểm Pond's white beauty	3,8
PB40	Phấn phủ nén lovely	0,2

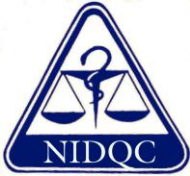
(-) là không phát hiện được

PHỤ LỤC 5

-Danh mục các quy trình kỹ thuật

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 1/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SON MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

MỤC ĐÍCH Mô tả quá trình các bước tiến hành để xác định đồng thời 4 chất màu bị cấm Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5 trong son môi bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector PDA.			
PHẠM VI ÁP DỤNG			
Được áp dụng trong Viện Kiểm nghiệm thuốc TW bởi những cán bộ đã được đào tạo		Được áp dụng để xác định đồng thời 4 chất màu bị cấm Metanil yellow, Rhodamin B, Pigment red 53, Pigment orange 5 trong son môi	
TÀI LIỆU THAM KHẢO 1. Đảm bảo chất lượng thuốc và một số phương pháp kiểm nghiệm thuốc. 2. Hiệp định hệ thống hòa hợp ASEAN trong quản lý mỹ phẩm. 3. Identification of prohibited colorants in cosmetic products by TLC and HPLC, phương pháp hoà hợp của ASEAN (mã số ACM SIN 02).			
NGƯỜI BIÊN SOẠN Trưởng khoa Ths. LÊ THỊ HƯỜNG HOA		Ngày:..... Ký tên:	
NGƯỜI THẨM XÉT Phó Viện trưởng TS. TRẦN VIỆT HÙNG		Ngày:..... Ký tên:	
NGƯỜI PHÊ DUYỆT Viện trưởng TS.ĐOÀN CAO SƠN		Ngày:..... Ký tên và đóng dấu:	
SỐ BẢN:	BẢN SỐ:	NGƯỜI GIỮ:	NGÀY NHẬN:

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 2/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của phương pháp:

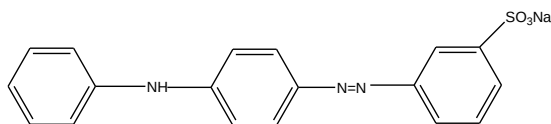
a) Metanil yellow (MY)

Tên khác: Tropaeolin G, Acid Yellow 36

Mã: CI 13065

Công thức phân tử: $C_{18}H_{14}N_3O_3SNa$.

Khối lượng phân tử: 375,391



Tên khoa học: 3-(4-Anilinophenylazo)benzenesulfonic acid sodium salt

b) Rhodamin B (RB)

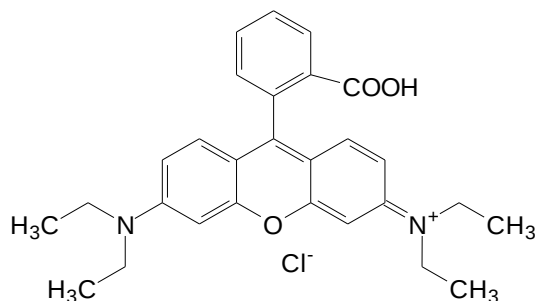
Tên khác: Rhodamine 610, CI pigment Violet 1, Basic Violet 10

Mã màu: CI 145170 [55]

Tên khoa học: [9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium chloride

Công thức phân tử: $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$

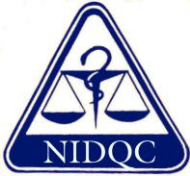
Khối lượng phân tử: 479,02 .



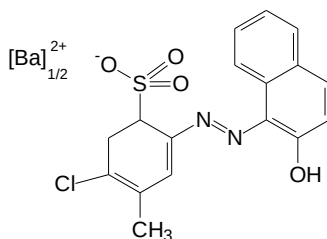
c) Pigment red 53 (PR53)

Tên khác: Pigment Red 53:1, Pigment Red SBK800, Bronze Red C-P

CAS No.: 5160-02-1

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 3/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

Mã màu CI: 15585



Tên khoa học: *barium bis [2 - chloro - 5 - [(hydroxy -1- naphthyl) azo] toluene - 4 - sulphonate]*

Công thức phân tử: $C_{34}H_{24}Cl_2N_4O_8S_2Ba$, có thể có dạng muối Natri

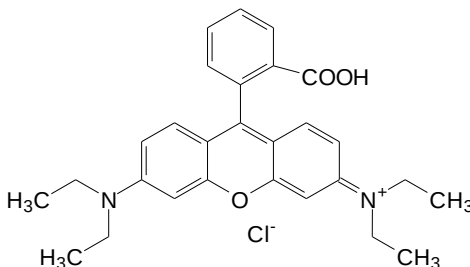
Khối lượng phân tử: 888,98.

d) Rhodamin B (RB)

Tên khác: Rhodamine 610, CI pigment Violet 1, Basic Violet 10

Mã màu: CI 145170 [55]

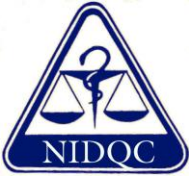
Tên khoa học: *[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium chloride*



Công thức phân tử: $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$

Khối lượng phân tử: 479,02 .

Nguyên lý của phương pháp: Các chất màu (MY, RB, PR53, PO5) được chiết ra khỏi nền mẫu bằng hỗn hợp dung môi N-N dimethyl formamid - acid phosphoric (95 : 5) bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng với n-hexan. Sau đó, các chất này được xác định bằng phương pháp HPLC với detector PDA trong dải phổ UV-VIS tại bước sóng 435nm cho MY,PR53, PO5

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 4/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SON MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

và 535 nm cho RB bằng cách so sánh với các pic thu được từ dung dịch các chất màu chuẩn tương ứng. Sự có mặt của chúng trong mẫu phân tích được khẳng định bằng so sánh thời gian lưu và phổ UV-VIS lấy tại đỉnh pic nghi ngờ trên sắc ký đồ của mẫu thử với pic chuẩn MY, PR53, PO5 và RB trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn

2. Thiết bị, thuốc thử, chất chuẩn:

2.1. Chất chuẩn:

- Chất đối chiếu: Metanil yellow (MY), hàm lượng: 100% (Merck).
- Chất đối chiếu : Rhodamin B (RB), hàm lượng : 100% (Merck).
- Chất đối chiếu: Pigment red 53 (PR), hàm lượng: 100% (Nhật bản).
- Chất đối chiếu: Pigment orange 5 (PO5), hàm lượng: 99,92%, độ ẩm: 0,5% (Hàn quốc).

2.2. Hóa chất, dung môi, thuốc thử

Tất cả các loại hóa chất, dung môi, thuốc thử đều đạt tiêu chuẩn chất lượng dùng cho phân tích, một số loại dung môi đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

- Dung môi pha mẫu: N,N-Dimethyl formamid-Acid phosphoric (95:5) (v/v) (DMPM).

2.3. Thiết bị

Các thiết bị được hiệu chuẩn đạt yêu cầu của phòng thí nghiệm theo ISO/IEC 17025

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu trang bị detector PDA với 5 modul
 - +Detector mảng diod: Model SPD-M10Avp.
 - +Module điều khiển: Model SCL-10Avp.
 - +Bộ loại khí (Degasser): DGU- 14A.
 - +Bộ trộn dung môi: FCV- 10Alvp.
- Máy đo pH 691 Metrohm.
- Cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,1 mg.
- Dụng cụ: các bình định mức, pipet chính xác, phễu lọc thủy tinh+Bơm: Model LC- 10Atvp.

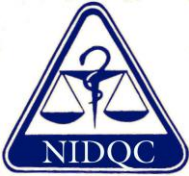
3. Đối tượng: Mẫu dùng trong nghiên cứu: Mẫu tự tạo dựa trên nền của các mẫu sau:

- Mẫu son nước Water lip bloom pink BP 01 (HM02), NSX: 21/2/2013 hạn dùng: 21/02/2016 Rohto (Việt Nam).
- Mẫu son thời Miracle Apo H002 Pinky orange (HM03), sản xuất tại Trung Quốc.

4. Quy trình thử:

4.1. Quy trình xử lý mẫu:

- *Dung dịch thử:* Cân chính xác khoảng 0,5g son vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm 10 ml n-Hexan chuyển dần vào bình gạn, thêm 10 ml dung môi pha mẫu trắng rửa cốc, chuyển vào bình gạn, lắc kỹ khoảng 15 phút, gạn phần dung môi pha mẫu (lớp dưới) vào bình định mức dung tích 20 ml,

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 5/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

thêm 8 ml hỗn hợp dung môi để tráng cốc, làm tương tự như trên, sau khi gạt lớp dưới vào bình định mức thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều lọc qua màng lọc 0,45µm.

4.2. Quy trình phân tích 4 chất màu bằng HPLC:

4.2. Điều kiện sắc ký:

- Cột phenomenex C18 (4,6 x 250 nm), 5µm
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Pha động: Nước- Tetra butyl amino hydroxyd 0,005M (70:30)
 - + Dung dịch Tetra butyl amino hydroxyd (TBA) 0,5M: 65 ml TBA hydroxyd 20% thêm nước vừa đủ 100 ml, hòa tan 2,8g kali hydroxyd vào hỗn hợp trên, điều chỉnh đến pH 7,0 với acid phosphoric để được dung dịch Tetra butyl amino hydroxyd 0,5M.
 - + Dung dịch Tetra butyl amino hydroxyd 0,005M: 10 ml Tetra butyl amino hydroxyd 0,5M trong 1000ml methanol. Để yên 1 tuần tạo tủa (hoặc để trong tủ lạnh 14⁰-15⁰C trong 72 giờ, lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm.
- Tốc độ: 1ml/phút
- Bước sóng: + Metanil yellow, Pigment red, Pigment orange: 435 nm
 + Rhodamin B: 535 nm
- Thể tích tiêm: 20 µl

4.3. Tiến hành:

Dung dịch chuẩn:

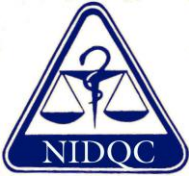
- *Dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO5:* Pha các dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO5 trong dung môi pha mẫu có nồng độ MY, RB, PR, PO5 lần lượt khoảng 40 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 200 µg/ml).

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp:* từ các dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR, PO5 pha dung dịch chuẩn hỗn hợp MY, RB, PR, PO5 trong dung môi pha mẫu có nồng độ MY khoảng 4µg/ml, RB: 4 µg/ml, PR: 10 µg/ml, PO5: 10 µg/ml.

Dung dịch thử: sử dụng dung dịch thu được sau khi xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở mục 4.1.

4.4. Đánh giá kết quả:

Tiêm riêng dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, quan sát thời gian lưu và phổ của pic thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn. Nếu pic của dung dịch thử có thời gian lưu giống với thời gian lưu của một hay các pic của dung dịch chuẩn hỗn hợp đồng thời dung dịch thử có phổ UV-VIS (300-800) trùng với phổ của pic tại thời gian lưu của

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 6/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

pic tương ứng thu được từ dung dịch chuẩn hỗn hợp thì có thể kết luận mẫu thử có chứa một hay các chất màu cấm nghiên cứu: MY, RB, PR53, PO5 (Hệ số chồng phổ $\geq 0,99$)

5. Yêu cầu về kỹ năng và đào tạo cần thiết khi áp dụng:

Kiểm nghiệm viên phải được đào tạo về phương pháp sắc ký lỏng cao áp, kỹ thuật chiết lỏng-lỏng. Về kỹ năng thực nghiệm, kiểm nghiệm viên phải sử dụng thành thạo thiết bị sắc ký lỏng cao áp trang bị detector PDA, thực hiện thuần thục, chính xác các thao tác trong quá trình xử lý mẫu.

6. Đánh giá quy trình:

6.1. Chọn dung môi pha mẫu: Dựa theo phương pháp phát hiện 3 chất màu cấm của ASEAN (mã số ACM SIN 02), dung môi pha mẫu là hỗn hợp N,N-Dimethyl formamid-Acid phosphoric (95:5) được lựa chọn vì hòa tan tốt cả 4 chất màu nghiên cứu (thêm PR 53 so với ASEAN).

6.2. Khảo sát lựa chọn pha động :

Phương pháp hòa hợp ASEAN mã số ACM SIN 02 định tính 3 chất màu MY, PO5, RB bằng HPLC có pha động là hỗn hợp: Nước- dung dịch Tetrabutylamino (TBA) hydroxyd 0,005M (25:75),

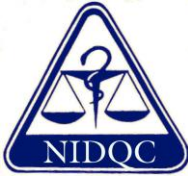
* Dung dịch Tetrabutylamino hydroxyd 0,005M được chuẩn bị như sau:

65 ml Tetra butyl amino hydroxyd 20%, thêm nước vừa đủ 100 ml, thêm 2,8g kali hydroxyd vào hỗn hợp trên, khuấy kỹ cho tan, điều chỉnh đến pH 7,0 với acid phosphoric (Dung dịch TBA hydroxyd 0,5M),

Hòa loãng 10 ml dung dịch TBA hydroxyd 0,5M tới 1000 ml bằng methanol, lắc đều, để yên vài giờ, lọc, Tuy nhiên, pha động này rất dễ bị tủa lại (kể cả sau khi lọc). Kết quả khảo sát thực tế như sau:

Cách thứ nhất:

- Để yên 4 giờ ở nhiệt độ phòng : vẫn tủa thêm
- Để yên 8, 12, 24... thậm trí 6 ngày: vẫn tủa thêm
- Để yên 7 ngày ở nhiệt độ phòng, lọc: dung dịch trong, không tủa thêm

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 7/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

Cách thứ hai:

- Để yên trong tủ lạnh (14^0 - 15^0 C): 1 ngày, 2 ngày: vẩn tủa thêm
- Để yên trong tủ lạnh (14^0 - 15^0 C) 3 ngày (72 giờ), lọc: dung dịch trong, không tủa thêm

Với kết quả khảo sát này thu được dung dịch pha động trong, ổn định dùng cho quá trình chạy sắc ký.

❖ *Điều kiện sắc ký:*

- Cột phenomenex C18 (4,6 x 250 nm), 5 μ m
- Nhiệt độ cột phân tích: nhiệt độ phòng
- Pha động: Nước- dung dịch Tetra butyl amino hydroxyd 0,005M (30:70)
- Tốc độ: 1ml/phút
- Bước sóng lấy sắc ký đồ:
 - + 435 nm: Metanil yellow, Pigment red 53, Pigment orange 5
 - + 535 nm: Rhodamin B
- Vùng phổ Diode: 275 – 760 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l

* Dung dịch Tetra butyl amino hydroxyd 0,005M được chuẩn bị như sau:

65 ml Tetra butyl amino hydroxyd 20%, thêm nước vừa đủ 100 ml, thêm 2,8g kali hydroxyd vào hỗn hợp trên, khuấy kỹ cho tan, điều chỉnh đến pH 7,0 với acid phosphoric (Dung dịch TBA 0,5M),

Thêm 10 ml dung dịch TBA 0,5M vào 1000 mL methanol, lắc đều, Để yên 72 giờ trong tủ lạnh 14 - 15^0 C hoặc 7 ngày ở nhiệt độ phòng để tạo tủa hoàn toàn, lọc qua màng lọc 0,45 μ m,

❖ *Tiến hành:*

Tiêm riêng biệt dung dịch thử, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký lỏng. Sử dụng các điều kiện ở trên, tiến hành sắc ký khoảng 50 phút. Ghi lại sắc ký đồ. So sánh thời gian lưu và

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 8/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

tính hệ số tương đồng (similarity) của các pic MY, RB, PR53 và PO5 thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn,

6.3 Thăm định phương pháp:

6.3.1. Đánh giá độ thích hợp hệ thống:

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp trong dung môi pha mẫu có nồng độ MY khoảng 4,4µg/ml, RB: 4,6 µg/ml, PR: 10,6 µg/ml, PO5: 10,4 µg/ml vào hệ thống sắc ký, kết quả thể hiện ở Bảng 1:

Bảng 1, Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Diện tích pic MY (mAU,s)	Diện tích pic RB (mAU,s)	Diện tích pic PR (mAU,s)	Diện tích pic PO5 (mAU,s)
1	156978	159948	307808	382215
2	156417	158720	305848	382268
3	156807	162441	312117	381439
4	158256	160012	316059	382085
5	157740	159043	311120	384869
6	158868	160978	306231	386711
TB	157511	160190,3	309863,8	383264,5
RSD	0,60 %	0,85 %	1,28%	0,54 %
Số đĩa lý thuyết TB	6184,152	2592,736	9654,969	9914,055
Hệ số kéo đuôi	1,460	1,117	1,649	1,594
Hệ số phân giải	0,0	3,816	7,612	17,960

Như vậy hệ thống sắc ký có độ phân tách tốt ($R_s > 3$), có độ lặp lại tốt, pic cân đối, với RSD của diện tích pic MY, RB, PR, PO5 lần lượt là 0,6%, 0,85%, 1,28% và 0,54% đều nhỏ hơn 2%, đáp ứng yêu cầu xác định các chất màu MY, RB, PR, PO5

6.3.2. Độ đặc hiệu:

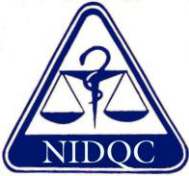
Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc: Cân các chất chuẩn tương ứng và hòa tan trong dung môi pha mẫu

Dung dịch chuẩn gốc Metanil yellow: 10,8 mg/50 ml → 10 ml/25 ml

Dung dịch chuẩn gốc Rhodamin B: 10,2 mg/50 ml → 10/25ml

Dung dịch chuẩn gốc Pigment red 53: 11,7 mg/50 ml

Dung dịch chuẩn gốc Pigment orange 5: 10,2 mg/50 ml

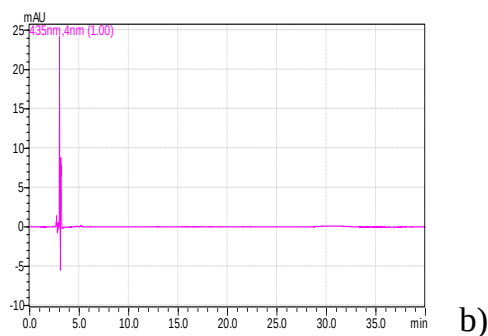
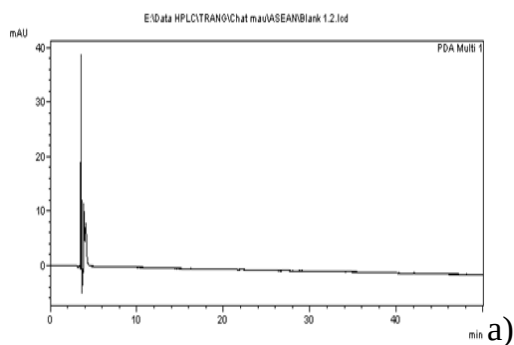
	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 9/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW

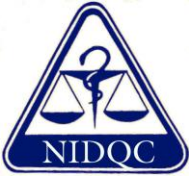
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SON MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA

Sử dụng các điều kiện phân tích đã được chọn để tiến hành phân tích các mẫu sau:

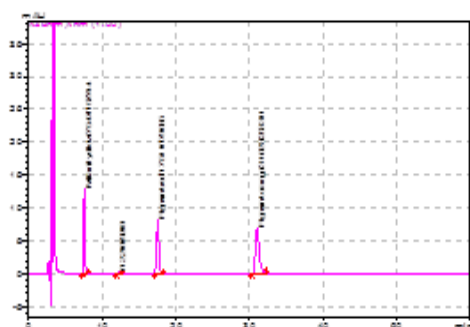
- *Mẫu trắng*: Dung môi pha mẫu: N-N dimethyl formamid-acid phosphoric (95 : 5)
- *Mẫu nền*: Mẫu son không chứa các chất màu MY, RB, PR53 và PO5, được xử lý theo qui trình
- *Mẫu tự tạo*: Cân chính xác khoảng 0,5 g son không chứa các chất MY, PR53, PO5, RB vào cốc có mỏ dung tích 50 ml, thêm 1 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc MY, RB, PR53, và PO5, trộn đều, chuyển dần vào bình gạn với 10 ml n-hexan, thêm 10 ml dung môi pha mẫu trắng rửa cốc, chuyển vào bình gạn, lắc kỹ khoảng 15 phút, gạn phần dung môi pha mẫu (lớp dưới) vào bình định mức dung tích 20 ml, thêm 8 ml hỗn hợp dung môi để tráng cốc, làm tương tự như trên, sau khi gạn lớp dưới vào bình định mức, thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều lọc qua màng lọc 0,45µm,,
- *Mẫu chuẩn hỗn hợp*: Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp MY, PR53, PO5, RB trong dung môi pha mẫu để được dung dịch có nồng độ MY, RB, PR53, PO5, lần lượt khoảng 4µg/ml, 4µg/ml, 24µg/ml, 20 µg/ml,

Kết quả: Tại bước sóng 435 nm (MY, PR và PO5) như ở Hình 1

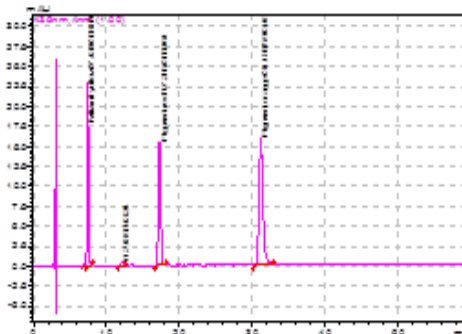


	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22 Trang: 10/ 16 Ban hành lần: Ngày ban hành:
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	Cơ quan ban hành: VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA



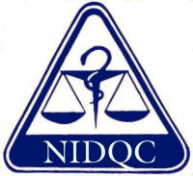
c)



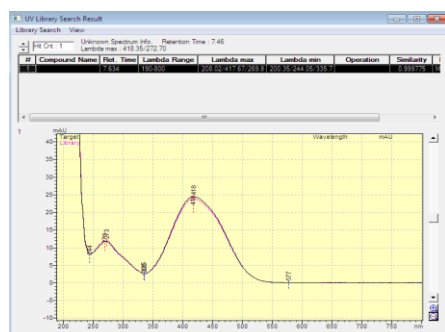
d).

Hình 1. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (a), của mẫu trắng (b), của mẫu tự tạo (c) và của mẫu chuẩn hỗn hợp (d) tại bước sóng 435 nm

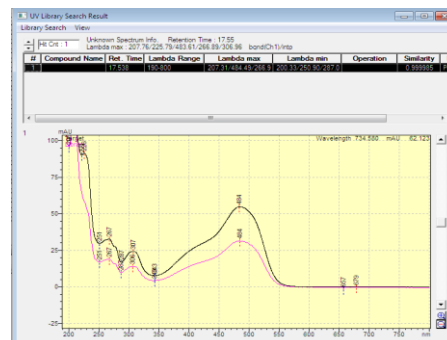
- Đối với mẫu chuẩn (d): Trên sắc ký đồ xuất hiện 3 pic tách biệt rõ ràng của MY, PR53, PO5 với thời gian lưu khoảng 7,5 phút, 17,3 phút và 31,2 phút, pic RB rất nhỏ (khoảng 12 phút)
- Với mẫu trắng: Trên sắc ký đồ không xuất hiện pic nào tương ứng với thời gian lưu của các pic MY, PR53, PO5 và RB
- Mẫu tự tạo: Trên sắc ký đồ xuất hiện 3 pic tách biệt rõ ràng có thời gian lưu tương ứng của MY, PR53, PO5 với thời gian lưu khoảng 7,5 phút, 17,3 phút và 31,2 phút, pic RB rất nhỏ (khoảng 12 phút), các pic này cũng tách biệt với pic có trong nền mẫu (mẫu trắng), có độ tinh khiết cao (đều lớn hơn 98%), có độ tương thích (hệ số similarity là 0,9997; 0,9999; 0,9995) khi so sánh phổ UV- VIS, thể hiện ở các hình 2, 3, 4.

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	Ký hiệu: <i>VKN/TQKT-MP/22</i> Trang: 11/ 16 Ban hành lần: Ngày ban hành: Cơ quan ban hành:
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW

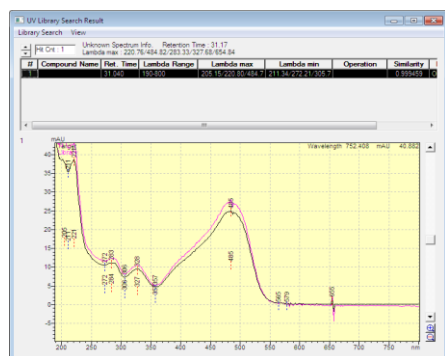
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA



a)

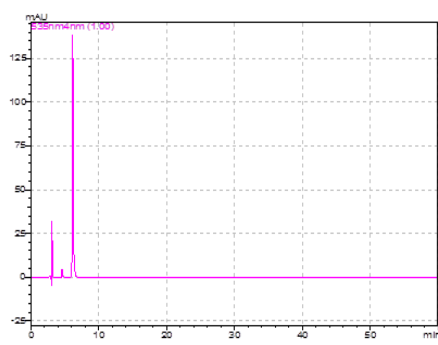


b)

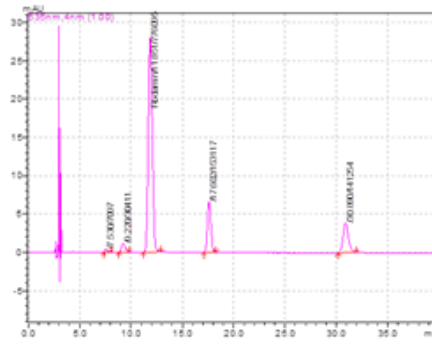


c)

Hình 2. Chồng phổ UV của pic từ mẫu thử tự tạo và mẫu chuẩn tại bước sóng 435 nm của: MY:a), PR53:b) và PO5: c)

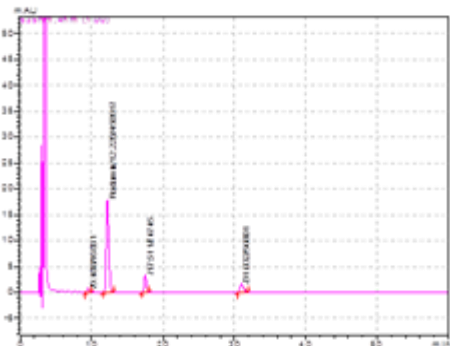


a)

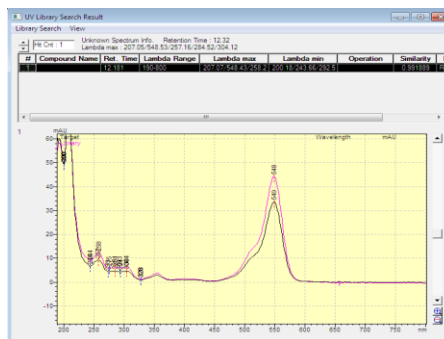


b)

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22 Trang: 12/ 16 Ban hành lần: Ngày ban hành:
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	Cơ quan ban hành: VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		



c)



d)

Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), của mẫu chuẩn hỗn hợp (b), của mẫu tự tạo (c) và chồng phổ UV của pic RB trong mẫu tự tạo và mẫu chuẩn (d) tại 535 nm của Rhodamin B

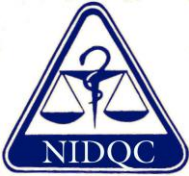
6.3.3. Khoảng tuyến tính:

Pha một dãy các dung dịch chuẩn trong dung dịch pha mẫu có nồng độ MY

từ: 0,8 – 10,4 µg/ml, RB từ: 0,8 – 9,8 µg/ml, PR từ: 2,3 – 28,1 µg/ml, PO% từ: 2,0 – 24,5 µg/ml tiến hành sắc ký theo điều kiện như trên. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 1. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của hỗn hợp các chất màu cấm

STT	Metanil yellow		Rhodamin B		Pigment red 53		Pigment orange 5	
	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	S pic (mAU.s)
1	0,86	30748	0,82	75536	2,34	34985	2,04	52854
2	1,73	62407	1,63	152158	4,68	71328	4,08	111263
3	4,32	158323	4,08	386129	11,70	181858	10,20	300977
4	6,91	254161	6,53	619756	18,72	293610	16,32	482294
5	8,64	254161	8,16	773960	23,40	367429	20,40	608220
6	10,37	382929	9,79	930822	28,08	442756	24,48	739349
Phương trình hồi qui	$y = 37029x - 1528$		$y = 95291x - 2737$		$y = 15839x - 2733$		$y = 30511x - 11710$	
Hệ số tương quan r	1,0000		1,0000		1,0000		0,9999	
y-intercept (%)	0,97		0,71		1,50		3,89	

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 13/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

Như vậy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ của MY, RB, PR53, PO5 trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan lần lượt là 1,0000; 1,0000; 0,9999; và 1,0000 với các giá trị y-intercept < 5%

3.4. Độ chính xác

❖ *Độ chính xác của phương pháp:*

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp với các chất màu

	Ngày 1, KNV1			Ngày 2, KNV2		
	<i>Lượng cân (g)</i>	<i>Diện tích pic(mAU.s)</i>	<i>Lượng tìm thấy (µg)</i>	<i>Lượng cân (g)</i>	<i>Diện tích pic (mAU.s)</i>	<i>Lượng tìm thấy (µg)</i>
Với MY						
1	0,5002	159422	87,0	0,5172	158756	86,6
2	0,5102	159485	87,0	0,5176	157986	86,2
3	0,5089	159900	87,3	0,5208	159122	86,8
4	0,5016	159836	87,2	0,5062	158997	86,8
5	0,5108	159775	87,2	0,5177	158789	86,7
6	0,5128	159227	86,9	0,5116	159022	86,8
Trung bình (n = 6)			87,1			86,6
RSD (%) (n = 6)			0,17			0,26
Hàm lượng MY tìm thấy trung bình (n = 12): 86,90 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,35						
Với RB						
1	0,5002	452687	95,7	0,5128	451128	95,3
2	0,5102	454964	96,1	0,5169	452298	95,6
3	0,5089	454730	96,1	0,5172	454312	96,0
4	0,5016	454349	96,0	0,5211	452063	95,5
5	0,5108	454388	96,0	0,5153	453112	95,8
6	0,5128	454450	96,0	0,5119	454012	95,9
Trung bình			96,0			95,7
RSD (%)			0,15			0,27
Hàm lượng RB tìm thấy trung bình (n = 12): 95,83 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,27						
Với PR						
1	0,5002	180921	232,8	0,5109	180221	231,9
2	0,5102	180581	232,4	0,5216	179856	231,4
3	0,5089	182059	234,3	0,5143	178632	229,8
4	0,5016	181181	233,1	0,5197	180244	231,9
5	0,5108	181015	232,9	0,5226	180369	232,1
6	0,5128	180950	232,8	0,5074	178698	229,9
Trung bình			233,0			231,2
RSD (%)			0,28			0,45

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	<i>Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22</i> <i>Trang: 14/ 16</i> <i>Ban hành lần:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	<i>Cơ quan ban hành:</i> VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SON MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA

Hàm lượng PR tìm thấy trung bình (n = 12): 232,11 µg ; RSD (%) (n = 12): 0,55						
Với PO						
1	0,5002	249249	168,9	0,5202	255632	173,3
2	0,5102	252074	170,9	0,5146	253654	171,9
3	0,5089	256365	173,8	0,5134	250122	169,5
4	0,5016	253461	171,8	0,5121	252008	170,8
5	0,5108	254832	172,7	0,5067	254122	172,2
6	0,5128	253078	171,5	0,5212	248079	168,1
Trung bình (n = 6)			171,6			171,0
RSD (%) (n = 6)			0,97			1,10
Hàm lượng tìm thấy trung bình (n = 12): 171,28 µg ; RSD (%) (n = 12): 1,02						

Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

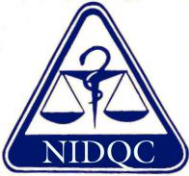
Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của kết quả 6 mẫu thử được phân tích riêng biệt theo qui trình phân tích ở trên.

Độ chính xác trung gian được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối của kết quả 12 mẫu thử được phân tích riêng biệt ở 2 ngày khác nhau và hai kiểm nghiệm viên (KNV) khác nhau.

Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao, độ lặp lại trong ngày có giá trị độ lệch chuẩn tương đối với MY, RB, PR, PO lần lượt là 0,18% và 0,26%; 0,15% và 0,27%; 0,28% và 0,45%; 0,97% và 1,10%; (với n = 6) và khác ngày là 0,35%; 0,55%; 1,00%; 0,27% (với n=12). Hàm lượng chất trung bình xác định được trong mẫu tự tạo (n = 12) với MY là 86,90 µg (RSD = 0,35%); với RB là 95,83 µg (RSD = 0,27%); với PR là 232,11 µg (RSD = 0,55%) và với PO là 171,28 µg (RSD = 1,02)

3.5.Độ đúng

Thêm chính xác một lượng chất chuẩn MY, PR53, PO5, RB vào nền mẫu son không chứa MY, PR53, PO5, RB, sao cho sau khi xử lý theo qui trình phân tích nồng độ dung dịch cuối cùng của MY, PR53, PO5, RB đem tiêm sắc ký phải nằm trong khoảng 50 - 120% so với nồng độ định lượng. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào đường chuẩn tuyến tính để tính ra lượng chất chuẩn tìm thấy. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3, Bảng 4.

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22 Trang: 15/ 16 Ban hành lần: Ngày ban hành:
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	Cơ quan ban hành: VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SƠN MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

Bảng 3.31. Kết quả khảo sát độ đúng với MY và RB

STT	Lượng mẫu nền(g)	MY				RB			
		Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5122	79670	43,86	43,2	101,52	225800	47,97	48,8	98,29
2	0,5026	79430	43,73	43,2	101,22	226531	48,12	48,8	98,61
3	0,5039	79413	43,72	43,2	101,20	226211	48,05	48,8	98,47
4	0,5268	158750	86,57	86,4	100,20	451316	95,30	97,6	97,64
5	0,5344	158975	86,69	86,4	100,34	452377	95,52	97,6	97,87
6	0,5219	159211	86,82	86,4	100,48	452067	95,46	97,6	97,80
7	0,5279	190840	103,90	103,68	100,21	544060	114,76	117,12	97,99
8	0,5173	191586	104,30	103,68	100,60	544940	114,95	117,12	98,15
9	0,5211	191404	104,21	103,68	100,51	543837	114,72	117,12	97,95
		Trung bình			100,70	Trung bình			98,09
		RSD (%)			0,48	RSD (%)			0,33

Bảng 3.32. Kết quả khảo sát độ đúng với PR và PO

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	PR				PO			
		Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Lượng thêm vào (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	0,5122	90244	117,40	118,8	98,82	122719	88,12	91	96,83
2	0,5026	90164	117,30	118,8	98,74	119930	86,29	91	94,82
3	0,5039	90180	117,32	118,8	98,75	120806	86,86	91	95,46
4	0,5268	179194	229,72	237,6	96,68	252048	172,89	182	94,99
5	0,5344	179833	230,53	237,6	97,02	249332	171,11	182	94,02
6	0,5219	179913	230,63	237,6	97,07	254218	174,32	182	95,78
7	0,5279	217027	277,49	285,12	97,32	305214	207,74	218,4	95,12
8	0,5173	216906	277,34	285,12	97,27	304449	207,24	218,4	94,72
9	0,5211	217252	277,78	285,12	97,43	307581	209,30	218,4	95,66
		Trung bình			97,68	Trung bình			95,27
		RSD (%)			0,87	RSD (%)			0,83

	BỘ Y TẾ VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/22 Trang: 16/ 16 Ban hành lần: Ngày ban hành:
	THƯỜNG QUY KỸ THUẬT	Cơ quan ban hành: VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TW
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4 CHẤT MÀU BỊ CẤM METANIL YELLOW, RHODAMIN B, PIGMENT RED 53 VÀ PIGMENT ORANGE 5 TRONG SON MÔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR PDA		

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng tương đối tốt đối với nền mẫu mỹ phẩm phức tạp và giới hạn chất cấm nhỏ.

3.6. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Tiêm dung dịch nền mẫu vào hệ thống sắc ký, tiến hành 6 lần, tính độ lệch chuẩn của tín hiệu lớn nhất thu được quanh thời điểm thời gian lưu của các pic tương ứng. $LOD = 3SD/a$

Stt	Metanil yellow	Pigment red	Pigment orange	Rodamin B
1	125	1102	227	111
2	644	218	242	149
3	556	225	131	61
4	623	271	115	58
5	207	115	165	99
6	144	122	113	96
TB	383.2	342.2	165.5	95.7
SD	249,1	377,3	56,8	33,8
a	37029	15839	30511	95291
LOD	0,022	0,079	0,0061	0,0012
LOQ	0,073	0,259	0,0202	0,0040

5. Kết luận

Phương pháp xác định đồng thời MY, PR53, PO5 và PO5 đã được thẩm định chặt chẽ về tính đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng, LOD, LOQ. Phương pháp đã được thẩm định hoàn toàn phù hợp để định tính, định lượng các chất cấm trong son môi đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU VIỆN DẪN

-Sổ tay chất lượng:

+Chương 04: Kiểm soát tài liệu VKN/STCL/04

+Chương 19: Phương pháp thử nghiệm, hiệu chuẩn và phê duyệt phương pháp VKN/STCL/19

-Thủ tục “Kiểm soát tài liệu”: VKN/TT/04.02

-Thủ tục “Nhận biết và truy tìm”: VKN/TT/03.01

-Thủ tục “Quản lý thiết bị thử nghiệm”: VKN/TT/20.19

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 1/9 Ban hành lần: 1 Ngày ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuốc TW
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA		

MỤC ĐÍCH Mô tả quá trình các bước tiến hành để định tính đồng thời 12 chất steroid trong các kem bôi da mỹ phẩm				
ph¹m vi .p đông S-íc .p đông trong Viễn Kiểm nghiệm bãi nh÷ng c,n bé ®· ®-íc ®µo t ¹ o phĩ hĩp.				Được áp dụng xác định 12 chất steroid trong kem bôi da mỹ phẩm
Tại liệu tham khảo: 1. Bui giêng ho, d-íc tếp II, tr-êng S ¹ i hắc d-íc Hụ néi 2. Viện Kiểm nghiệm Thuốc TỰ, S ¹ m b ¹ o chĩt l-ĩng thuốc vù mét sè ph-÷ng ph,p kióm nghiệm thuốc 3. Hiõp ®ĩnh hõ thèng hõp hĩp ASEAN trong quĩn lý mũ phĩm. 4. USP 34 5. ASEAN, Identification of hydrocortisone acetate, dexamethsone, betamethasone, triamcinolone acetonide and betamethasone valerate in cosmetics by TLC and HPLC				
Người biên soạn	Tr-êng khoa ThS. L^a thĩ h-êng hoa	Ngày: Ký t ^a n:		
Ng-êi thĩm xđt	Phĩ Viễn tr-êng : TS. TRẦN VIỆT HÙNG	Ngày: Ký t ^a n:		
Ng-êi ph ^a duyệt	Viễn tr-êng : TS. Sõn cao s-ñ	Ngày: Ký t ^a n vù ®ĩng dĩu:		
Sè b ¹ n:	b ¹ n sè:	Ng-êi gi÷:	Ngày nhĩn:	

	Bé Y TỐ Viện kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 2/9 Ban hành lần: 1 Ngày ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viện kiểm nghiệm thuốc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

néi dung

1. Nguyên lý của phương pháp

Các steroid được chiết ra khỏi nền mẫu mỹ phẩm bằng hỗn hợp dung môi dicloromethan – methanol (9 : 1), bốc hơi trên cách thủy tới khô. Hòa cần thu được trong hỗn hợp dung môi Acetonitril – methanol – nước (20:30:30). Sau đó, các steroid được phân tích bằng thiết bị HPLC trang bị detector PDA đặt tại bước sóng 240 nm. Sự có mặt các steroid có thể được khẳng định bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic nghi ngờ trên sắc ký đồ mẫu thử với các pic steroid tương ứng trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.

2. Thiết bị, thuốc thử và chất chuẩn

2.1 Chất chuẩn, hóa chất và thuốc thử:

- Các chất chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (10 chất chuẩn quốc gia và 2 chuẩn phòng thí nghiệm (PTN))

1. Prednison, SKS: WS.0107235; HL: 98,6%; ẩm: 0,15%
2. Dexamethason, SKS: 0197025, HL: 99,61%; ẩm: 0,13%
3. Triamcinolon acetamid, Số lô: M 191077a; HL: 99,11%; ẩm: 1,84%
4. Flucinolol acetamid, SKS: 0199049; HL: 97,2%; ẩm: 0,6%
5. Prednison acetat, SKS: 0102149; HL: 99,64%; ẩm: 0,06%
6. Hydrocortison acetat, SKS: 0198038; HL: 99,5%; ẩm: 0,1%
7. Cortison acetat, SKS: 0103092; HL: 100,01%; ẩm: 0,05%
8. Dexamethason acetat, SKS: 0200014; HL: 99,6%
9. Betamethason dipropionat, chuẩn phòng thí nghiệm, HL: 101,2%
10. Betamethason valerat, SKS: 0103125; HL: 100,43%; ẩm: 0,14%
11. Clobetasol propionat, SKS: 0103170; HL: 99,4%, ẩm: 0,12%
12. Mometasone furoat: chuẩn phòng thí nghiệm, HL: 100,0%

- Acetonitril HPLC (Merck)
- Dicloromethan tinh khiết phân tích (Merck)
- Methanol tinh khiết phân tích (Merck)
- Methanol HPLC (Merck)

2.2. Thiết bị và dụng cụ: (®- ®-ic hiều chuẩn theo chuẩn mục ISO/IEC 17025)

- Máy sắc ký lỏng Shimadzu với 5 module:
 - + Bơm: Model LC- 10Atvp
 - + Detector mảng diod: Mode SPD-M10Avp
 - + Module điều khiển: Model SCL-10Avp
 - + Degasser: loại DGU- 14A
 - + Bộ trộn dung môi: loại FCV- 10Alvp
- Cân phân tích chính xác tới 0,1 mg
- Máy lắc siêu âm
- Dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, cốc thủy tinh, đĩa thủy tinh
- Mẫu mỹ phẩm nghi ngờ để xây dựng, thẩm định phương pháp:
 - Kem dưỡng trắng da Impress IC của Kanebo, Nhật bản.
- Các mẫu để kiểm tra:
 - Cream nám one today 43L381

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 3/9 Ban hành lện: 1 Ngày ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuốc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

Cream nám shui Jing bai 43L382
 Kem dưỡng trắng da làm mờ vết thâm Hazelin 43L 383
 Kem nám Cô Tiên (Day whitening & spot removing set) 43L384
 Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today 43L390
 Cream dưỡng trắng da mặt One Today 43L391
 Kem mắt Whoo 43L398
 Nước hoa hồng In Yang Balancer 43L397
 Tinh chất dưỡng da Qi & Jin Essence 43L396
 Sữa dưỡng da In Yang Lotion 43L395
 Kem dưỡng da đêm Whoo 43L399

3. Quy tr×nh thö

3.1. Chuẩn bð mếu thö:

Cân khoảng 0,2 g chế phẩm, thêm 50ml hỗn hợp dicloromethan-methanol (9 :1), khuấy kỹ và đặt trên cách thủy âm 5-10 phút, lấy ra, để nguội trong nước đá 1 giờ, sau đó lọc qua giấy lọc đã thấm ướt bằng hỗn hợp dung môi dicloromethan-methanol (9 :1), bốc hơi dịch lọc trên cách thủy tới khô. Hòa lại cân trong 25ml Acetonitril - methanol - nước (20:30:30). Lọc qua màng lọc 0,45µm.

3.2. Chuẩn bð mếu chuẩn :

Cân chính xác khoảng 25mg từng chất chuẩn pha vào 25ml methanol, rồi pha loãng tiếp bằng pha động để được các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 9 - 12µg/ml. Các dung dịch này được sử dụng để pha dãy chuẩn hoặc pha dung dịch hỗn hợp chuẩn.

3.3. Quy tr×nh ph©n tÝch :

- Cột Phenomenex Luna C18, (250 x 4,6 mm), 5 µm lô 5550654
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Pha động: Acetonitril - nước (48:52)
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/ phút
- Bước sóng phát hiện: 240 nm
- Thể tích tiêm: 5 µl.

3.4. C, ch tiÕn h×nh:

Tiêm riêng biệt dung dịch thö, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký lỏng số đồng c, c @iêu kiÕn ã tr^n. TiÕn h×nh s¾c ký kho¶ng 30-35 phút. Ghi l¹i s¾c ký @ã.

3.5. C, ch @, nh gi, kÕt qu¶

- Dưa vào thời gian l-u: so sánh thời gian l-u của pic thu @-íc tở dung dịch thö vù pic thu @-íc tở dung dịch chuẩn.
- So sánh phổ UV-VIS của pic thu được từ dung dịch thử có thời gian lưu tương ứng với pic thu được từ dung dịch chuẩn và tính hệ số chồng phổ của các pic này.

4. Yªu cÇu vÒ kù n¨ng vù @µo t¹o cÇn thiÕt khi ,p ðo¶ng

	Bé Y TỐ Viện kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 4/9 Ban hành lần: 1 Ngày ban hành:
	th-êng quy kù thuËt	C- quan ban hành: Viện kiểm nghiệm thuốc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

Kiểm nghiệm viên phải ®-íc ®µo t-ìo v-ò ph--ng ph,p s¾c ký láng hi-ùu n-ìng cao vù s-ò dông th-ùnh th-ìo m,y s¾c ký láng hi-ùu n-ìng cao, bi-ët ®-óc và ph-ân t-ích ph-ổ.

5. S, nh gi, quy tr×nh

Do đặc thù của mẫu mỹ phẩm nếu có chứa chất cấm thường ở hàm lượng rất nhỏ nên chọn vùng giới hạn định lượng để đánh giá phương pháp bao gồm các nội dung: độ thích hợp của hệ thống sắc ký, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

5.1. Lựa ch-än dung môi

Sau khi khảo sát trên một số hệ dung môi hoà tan mẫu, hệ dung môi dicloromethan - methanol (9:1) được nhận thấy là hệ mà nhóm chất steroid tan rất tốt, dung dịch mẫu thử khá sạch không bị lẫn nhiều tạp chất. Sau đó, loại bỏ dung môi và hòa cần trong hỗn hợp Acetonitril - methanol - nước (20:30:30). Hỗn hợp dung môi này có thành phần gần với pha động, cho pic cân đối hơn nếu chỉ hòa tan cần trong methanol, vì vậy được chọn làm dung môi hòa tan cần để tạo dung dịch tiêm sắc ký.

5.2. Thêm ®-nh ph--ng ph,p

5.2.1. Đánh giá độ thích hợp hệ thống:

Tiêm 6 lần dung dịch đối chiếu hỗn hợp có nồng độ từng corticoid khoảng 10 µg/ml vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ, kết quả thể hiện ở bảng sau:

Bảng 1. Độ thích hợp của hệ thống sắc ký phân tích 12 chất steroid

S T T	Tên pic	Thời gian lưu (phút)		Diện tích pic (mAU.s)		Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối T	Độ phân giải R _s
		Trung bình	RSD (%)	Trung bình	RSD (%)			
1	Prednison	4,19	0,15	32205	0,36	8041	1,42	-
2	Dexamethason	5,38	0,17	34776	0,51	9997	1,23	5,96
3	Triamcinolon acetamid	6,33	0,19	38421	0,37	11295	1,26	4,20
4	Flucinolôn acetamid	6,87	0,23	42488	0,45	12016	1,23	2,20
5	Prednison acetat	7,82	0,23	43317	0,36	12957	1,23	3,64
6	Hydrocortison acetat	8,28	0,26	48867	0,84	13463	1,20	1,64
7	Cortison acetat	8,83	0,27	35218	0,75	13971	1,20	1,89
8	Dexamethason acetat	11,04	0,32	54520	0,37	14215	1,04	6,63
9	Betamethason valerat	17,41	0,26	80684	0,11	30962	1,17	16,74
10	Clobetason propionat	22,63	0,35	97432	0,24	23493	1,11	10,64
11	Mometason furoat	24,97	0,39	140097	0,51	20409	1,10	3,66

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuộc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 5/9 Ban hành lện: 1 Ngay ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuộc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

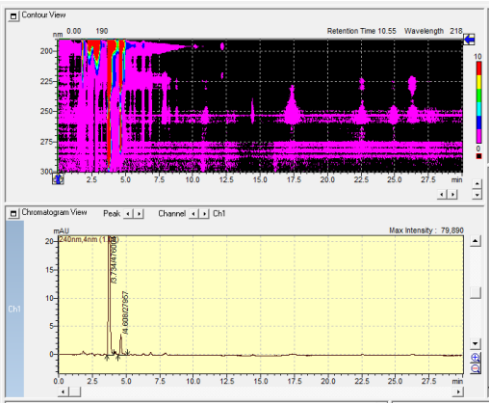
12	Betamethason propionat	26,47	0,41	164637	1,43	15161	1,12	1,93
----	------------------------	-------	------	--------	------	-------	------	------

Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký có: Độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu dưới 0,4% và diện tích pic dưới 1,4 %; số đĩa lý thuyết trên 8000; hệ số bất đối dưới 1,4 và độ phân giải trên 1,6. Do vậy đáp ứng yêu cầu phân tích cho cả 12 hợp chất.

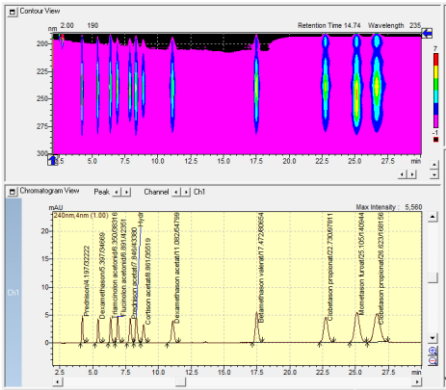
5.2.1. *Sé Æc hiöu:*

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn các mẫu sau:

- Dung dịch mẫu placebo: Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu kem dưỡng trắng da Impress IC white emulsion II (Kanebo, Nhật Bản) rồi xử lý như chuẩn bị một mẫu thử.
- Dung dịch mẫu tự tạo hoặc mẫu thử, dung dịch chuẩn được xử lý theo mục 3.1 và 3.2.



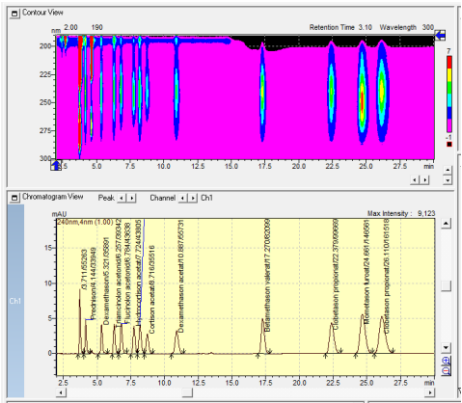
a)



b)

Hình 3.19. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu với 12 corticoid

- a) mẫu placebo
- b) mẫu hỗn hợp chuẩn
- c) mẫu tự tạo



c)

Kết quả thu được như ở hình 3.19, cho thấy: Trên sắc ký đồ mẫu placebo không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu bất kỳ chất nào trong số 12 corticoid nghiên cứu. Trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu tự tạo cho 12 pic có thời gian

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuộc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 6/9 Ban hành lện: 1 Ngay ban hành:
	th-êng quy kù thuËt	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuộc TW
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA		

lưu tương ứng với thời gian lưu của 12 pic chính thu được từ sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp chuẩn.

Thứ tự rửa giải: Prednison : 4,14 ph
 Dexamethason : 5,32
 Triamcinolon acetamid: 6,25
 Fluocinolon acetamid: 6,78
 Hydrocortison acetat: 7,72
 Prednison acetat: 7,84
 Cortison acetat: 8,71
 Dexamethason acetat: 10,88
 Betamethason valerat: 17,27
 Clobetason propionat: 22,37
 Mometason fuorat: 24,66
 Betamethason propionat: 26,11

5.2.2. Khảo sát khoảng tuyến tính

Bảng 2. Kết quả xác định khoảng nồng độ tuyến tính của các corticoid

TT	Tên chất phân tích (Phương trình hồi qui)		1	2	3	4	5	Hệ số tương quan r
1	Prednison ($y=79401.x+818$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,2 16884	0,32 26044	0,4 32442	0,48 38962	0,6 48559	0,9998
2	Dexamethason ($y=59945.x+942$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,3 17301	0,48 27568	0,6 34745	0,72 42434	0,9 53076	0,9996
3	Triamcinolon acetamid ($y=37356.x+1389$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,5 20359	0,8 30908	1,0 38714	1,2 46146	1,5 57597	0,9997
4	Flucinolol acetamid ($y=41949.x+949$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,5 22387	0,8 34175	1 42558	1,2 51093	1,5 64281	0,9994
5	Prednison acetat ($y=48229.x+750$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,5 22677	0,8 34881	1 43475	1,2 52230	1,5 65227	0,9998
6	Hydrocortison acetat ($y=42663.x+1035$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,5 25191	0,8 38947	1,0 48804	1,2 58730	1,5 73224	0,9997
7	Cortison acetat ($y=43484.x+629$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,4 18204	0,64 28165	0,8 35328	0,96 42606	1,2 52781	0,9997
8	Dexamethason acetat ($y=54206.x+810$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	0,6 28289	0,96 43741	1,2 54805	1,44 65972	1,8 82276	0,9998
9	Betamethason valerat ($y=21644.x+3856$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	1,8 44272	2,88 64531	3,6 81282	4,32 97197	5,4 121592	0,9983
10	Clobetason propionat ($y=9534.x+949$)	C (µg/ml) S(mAU.s)	2,2 50726	3,52 78688	4,4 98386	5,28 118244	6,6 146956	0,9994
11	Mometason furoat	C (µg/ml)	1,6	2,56	3,2	3,84	4,8	

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuộc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 7/9 Ban hành lện: 1 Ngay ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuộc TW
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA		

	(y=137515.x+4471)	S(mAU.s)	73326	115287	140770	169318	211231	0,9998
12	Betamethason propionat (y=20274.x+2605)	C (µg/ml) S(mAU.s)	4,0 84444	6,4 130868	8,0 165190	9,6 197586	12,0 245900	0,9998

5.2.3. Sê lặ lại:

Độ chính xác được tiến hành thử nghiệm trên 6 mẫu tự tạo. Cân 0,2g mẫu placebo thêm vào đó 4,0ml dung dịch chuẩn gốc có nồng độ như trong bảng 3. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký, xử lý kết quả và tổng hợp vào bảng 3.

Bảng 3. Độ lặ lại của phương pháp trên các mẫu tự tạo

Tên chất phân tích	C dd gốc (µg/ml)	Tỷ lệ tìm lại (%)							
		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
Prednison	2	102,0	102,5	103,2	102,5	101,1	101,7	102,2	0,7
Dexamethason	3	105,4	104,8	107,4	105,9	105,0	105,8	105,7	0,9
Triamcinolon acetonid	5	104,5	104,1	104,7	105,3	105,1	104,6	104,7	0,4
Flucnolon acetonid	5	104,7	105,3	105,1	106,2	106,8	105,3	105,5	0,7
Prednison acetat	5	103,1	102,0	103,3	103,2	102,4	102,6	102,7	0,5
Hydrocortison acetat	5	102,7	101,9	103,5	102,9	102,2	102,6	102,6	0,6
Cortison acetat	4	102,2	102,2	103,7	103,0	101,6	102,5	102,5	0,7
Dexamethason acetat	6	102,9	102,6	102,9	103,4	102,6	103,2	102,9	0,3
Betamethason valerat	18	102,4	101,9	102,4	103,2	101,7	102,6	102,4	0,5
Clobetason propionat	22	103,3	102,7	103,1	103,7	102,9	103,9	103,3	0,4
Mometason furoat	16	106,6	105,9	107,0	107,4	105,8	107,0	106,6	0,6
Betamethason propionat	40	100,1	99,3	100,4	100,9	98,7	99,8	99,9	0,8

5.2.4. Đánh giá độ đúng:

Thêm chính xác một lượng chất chuẩn corticoid vào nền mẫu placebo, sao cho sau khi xử lý theo quy trình phân tích nồng độ dung dịch cuối cùng đem sắc ký phải nằm trong khoảng 50 - 150% so với nồng độ định lượng. Tiến hành ở 3 mức nồng độ khác nhau: mức 50% (A), mức 100% (B) và mức 150% (C); mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Dựa vào diện tích pic của chất tương ứng trong dung dịch chuẩn hỗn hợp để tính ra lượng chất chuẩn tìm thấy. Kết quả được thể hiện ở bảng 4

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của các corticoid

Chất phân tích	Tỷ lệ tìm lại (%)									
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	T.bình
Prednison	98,40	101,10	102,00	99,70	100,90	101,40	100,20	97,70	100,00	100,16
Dexamethason	100,70	99,60	99,40	103,30	105,00	104,10	104,00	101,30	103,40	102,31
Triamcinolon acetonid	98,90	101,50	102,20	101,60	104,10	102,90	102,70	99,90	102,30	101,79

	Bé Y TỐ Viễn kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 8/9 Ban hành lện: 1 Ngay ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viễn kiểm nghiệm thuốc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

Flucinolon acetamid	99,50	100,10	100,60	102,50	105,30	103,70	103,60	101,30	103,80	102,27
Prednison acetat	96,50	99,60	99,50	100,80	101,50	102,30	100,90	99,50	100,50	100,12
Hydrocortison acetat	97,80	100,10	99,70	100,80	102,10	102,40	100,70	99,60	100,80	100,44
Cortison acetat	96,30	99,40	98,90	100,50	102,00	101,90	100,60	99,40	100,90	99,99
Dexamethason acetat	97,00	98,80	99,50	101,70	101,70	102,60	102,20	99,60	101,70	100,53
Betamethason valerat	97,50	99,00	101,00	101,00	101,50	102,50	101,00	99,20	100,30	100,33
Clobetason propionat	95,80	99,00	99,80	101,30	102,30	103,00	102,00	100,30	101,00	100,50
Mometason furoat	96,20	100,10	100,20	104,10	105,50	106,60	102,40	100,60	101,80	101,94
Betamethason propionat	95,20	97,00	97,90	97,80	99,20	100,30	99,10	97,30	98,10	97,99

5.2.5. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành tương tự như các chất phân tích khác. Kết quả đã xác định được giá trị LOD và LOQ đối với từng corticoid như ở bảng 3.44.

Bảng 3.44. LOD và LOQ của các corticoid

STT	Tên chất phân tích	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	Prednison	0,1	0,3
2	Dexamethason	0,15	0,45
3	Triamcinolon acetamid	0,25	0,75
4	Flucinolon acetamid	0,25	0,75
5	Prednison acetat	0,25	0,75
6	Hydrocortison acetat	0,25	0,75
7	Cortison acetat	0,2	0,6
8	Dexamethason acetat	0,3	0,9
9	Betamethason valerat	0,9	2,7
10	Clobetason propionat	1,1	3,3
11	Mometason furoat	0,8	2,4
12	Betamethason propionat	2,0	6,0

5.2.6. Áp dụng kiểm tra các mẫu kem

Kiểm tra trên 11 mẫu kem mỹ phẩm, kết quả thể hiện ở bảng 3.69.

Bảng 3.69. Kết quả phân tích đồng thời các glucocorticoid

Mã số	Tên mẫu	Số ĐKKN	Kết quả
GC01	Cream nám one today	43L381	+
GC02	Cream nám shui Jing bai 43L382		-
GC03	Kem dưỡng trắng da làm mờ vết thâm Hazelin	43L 383	-
GC04	Kem nám Cô Tiên (Day whitening & spot removing set)	43L384	-
GC05	Cream ngừa mụn 3 tác dụng One Today	43L390	+
GC06	Cream dưỡng trắng da mặt One Today	43L391	+

	Bé Y TỐ Viện kiểm nghiệm thuốc TW	Ký hiệu: VKN/TQKT-MP/23 Trang: 9/9 Ban hành lần: 1 Ngày ban hành:
	th-êng quy kù thuết	C- quan ban hành: Viện kiểm nghiệm thuốc TW

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 12 CHẤT STEROID CÓ MẶT TRÁI PHÉP TRONG KEM BÔI DA MỸ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR PDA

GC07	Kem mắt Whoo	43L398	-
GC08	Nước hoa hồng In Yang Balancer	43L397	-
GC09	Tinh chất dưỡng da Qi & Jin Essence	43L396	-
GC10	Sữa dưỡng da In Yang Lotion	43L395	-
GC11	Kem dưỡng da đêm Whoo	43L399	-

Mẫu GC01, GC05 và GC06 có pic có thời gian lưu tương ứng với pic clobetason dipropionat, chồng phổ với phổ chuẩn clobetason dipropionat cho hệ số chồng phổ xấp xỉ 1 (lần lượt là 0,9933; 0,9954; 0,9968).

6. KẾT LUẬN

- Đã lựa chọn ®-íc dung m«i và phương pháp xử lý mẫu cho phép chiết hoàn toàn cả 12 chất steroid khảo sát, nên mẫu sạch.

- Khi s, t vụ lựa chọn ®-íc ®iều kiện s¾c ký láng hiều n”ng cao phi híp vò cét, pha ®éng, detector, təc ®é dñng, thó tých tiãm mếu cho phép ph, t hiõn đặc hiệu với 12 chất steroid trong nền mẫu kem bôi da. Các pic các steroid tách riêng biệt, được rửa giải không quá sớm với giải h¹n ph, t hiõn nhá. Điều kiện sắc ký đơn giản, đẳng dòng, dễ thực hiện, tuy nhiên các pic khá gần nhau đòi hỏi chất lượng cột sắc ký phải có khả năng tách rất tốt (số đĩa lý thuyết >8000), hệ thống sắc ký rất ổn định.

- Ph–ng ph,p x©y dùng đã được đánh giá về độ thích hợp của hệ thống sắc ký, týnh ®Æc hiều, kho¶ng tuyõn týnh, ®é lÆp l¹i, ®é ®óng, giải h¹n ph, t hiõn và giới hạn định lượng của 12 chất thuộc nhóm steroid.

- Quy trình phân tích phù hợp để xác định sàng lọc các chất cấm steroid trong các mẫu kem bôi da. Khi phát hiện được pic nghi ngờ với chất tương ứng trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, nên chạy sắc ký riêng cho chất đó (có thể điều chỉnh tỷ lệ các thành phần trong pha động cho phù hợp).

TÀI LIỆU VIỆN DẪN

- Sổ tay chất lượng:

+ Chương 04: Kiểm soát tài liệu VKN/STCL/04

+ Chương 19: Phương pháp thử nghiệm, hiệu chuẩn và phê duyệt phương pháp VKN/STCL/19

- Thủ tục “Kiểm soát tài liệu”: VKN/TT/04.02

- Thủ tục “Nhận biết và truy tìm”: VKN/TT/03.01

- Thủ tục “Quản lý thiết bị thử nghiệm”: VKN/TT/20.19