

Xây dựng quy trình định lượng arbutin trong kem làm trắng da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Từ Minh Thành

Khoa Kỹ thuật Xét nghiệm Y học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
thanhtm@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Arbutin được xem như là tiêu chuẩn vàng trong lĩnh vực dược mỹ phẩm với cơ chế tác động an toàn nên được sử dụng nhiều trong các chế phẩm kem làm trắng da. Tuy nhiên chưa ghi nhận thấy các nghiên cứu về xây dựng quy trình định lượng arbutin ở Việt Nam nên nghiên cứu được tiến hành nhằm mục đích khảo sát các điều kiện sắc kí và xây dựng quy trình định lượng hoạt chất arbutin bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao với đầu dò dây diod quang. Hệ sắc kí được chọn với cột sắc kí LiChrospher® 100 RP-18 (25 cm × 4 mm × 5 μm); đầu dò PDA đặt trong dải bước sóng từ 190 – 800 nm, lấy sắc kí đồ ở 283 nm; pha động H₂O:ACN (80:20); tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 40 μL; không gia nhiệt cho cột. Quy trình định lượng được thẩm định đạt tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác; LOD và LOQ đạt yêu cầu theo Hướng dẫn nội dung và phương pháp của Hội nghị Hải hòa Quốc tế (International Conference on Harmonization – ICH). Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng arbutin và có thể ứng dụng để phân tích các loại kem làm trắng da có chứa arbutin trên thị trường.

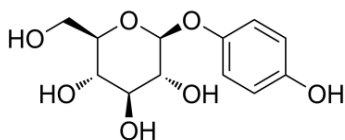
© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 18/10/2023
Được duyệt 10/11/2023
Công bố 29/12/2023

Từ khóa
arbutin,
kem làm trắng da,
sắc kí lỏng hiệu năng
cao (HPLC), đầu dò dây
diod quang (PDA), ICH

1 Đặt vấn đề

Arbutin (Hình 1) là một dạng của hydroquinon với một nhóm OH tự do và một nhóm OH được glycosyl hóa với một phân tử đường glucose. Arbutin có tác dụng trắng da nhờ vào hoạt tính ức chế tyrosinase, ngăn ngừa sự hình thành hắc tố da melanin. Trên thế giới, các nghiên cứu về arbutin đã xuất hiện từ rất sớm. Nghiên cứu định tính và định lượng hoạt chất arbutin cũng là một đề tài được nhiều nhà khoa học trên thế giới khai thác trong nhiều năm qua [1].



Hình 1 Công thức cấu tạo của arbutin

Với các nghiên cứu định lượng arbutin bằng quang phổ UV [2], định lượng hydroquinone bằng HPLC [3, 4], định lượng đồng thời arbutin và hydroquinon trong huyết tương chuột bằng phương pháp HPLC – DAD [5], định lượng arbutin và hydroquinon trong mỹ phẩm bằng quang phổ huỳnh quang [6, 7], có thể thấy trên thế giới đã có nghiên cứu định tính về arbutin trong các dược liệu hay sản phẩm dạng kem nhưng thường có sự kết hợp của nhiều hoạt chất tương tự nhau và ít có đề tài chỉ nghiên cứu chuyên sâu về arbutin. Hơn nữa, các nghiên cứu định lượng Arbutin bằng HPLC không nhiều.

Ở Việt Nam chưa thấy các nghiên cứu về định lượng arbutin mà chủ yếu là các nghiên cứu bào chế sản phẩm dưỡng da chứa arbutin gồm: Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế emugel alpha arbutin 1% [8]. Vì vậy,

nghiên cứu được thực hiện với mong muốn tìm ra điều kiện và xây dựng quy trình định lượng hoạt chất arbutin bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao thành công và mang lại hiệu quả ứng dụng trong thực tế.

2 Đối tượng – phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

2.1.1 Nguyên liệu

Kem dưỡng trắng da Cenlia 30 g, Việt Nam (số lô KB015, hạn sử dụng 09/11/2025), chuẩn arbutin (66468-50MG, Pcode 102577490, source BCCH2273, Sigma-Alrich), acetonitril (Merck), methanol (Merck).

2.1.2 Thiết bị

Hệ thống Arc HPLC – Waters gồm hệ thống bơm cao áp và bộ tiêm mẫu tự động, đầu dò mảng diode 2998 PDA, khoảng bước sóng 190 - 800 nm, đèn Deuterium, cột sắc kí LiChrospher® 100 RP-18 (25 cm × 4 mm × 5 µm) Hibar® RT 250-4, Merck, Đức; bể siêu âm Elma 12 lít S1000009936, Đức; Cân phân tích 4 chữ số Mettler-Toledo, model TLE204E, Thụy Sĩ; Máy li tâm đa năng HermLe Z306, Đức; Máy vortex Cole-Parmer (Stuart), Anh; Hệ thống lọc nước Cascada III.I, Mỹ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Tối ưu hoá điều kiện sắc kí

2.2.1.1 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.

Quy trình chuẩn bị mẫu: Cân chính xác 0,5 g kem vào ống falcon 15 mL. Hút chính xác 10 mL dung môi chiết cho vào falcon, vortex 5 phút rồi đánh siêu âm 15 phút. Sau đó, đem li tâm 20 phút với tốc độ 6.000 rpm. Hút phần dịch lớp trên sau vortex, tiến hành lọc thu lấy dịch trong. Loại bỏ 3 mL dịch lọc đầu và hút chính xác 1 mL dịch lọc chuyển vào bình định mức 10 mL, điền dung môi chiết đến vạch định mức.

Quy trình chuẩn bị chuẩn gốc arbutin: Cân chính xác 40 mg arbutin chuẩn cho vào bình định mức 20 mL, thêm dung môi chiết đến vạch định mức. Dung dịch này được sử dụng để pha loãng đến các nồng độ sử dụng trong xây dựng quy trình định lượng và thẩm định.

Khảo sát 3 hệ dung môi chiết MeOH:H₂O (50:50), ACN:H₂O (80:20) và ACN:H₂O (20:80).

2.2.1.2 Khảo sát điều kiện sắc kí

Một quy trình phân tích tốt khi chất cần phân tích được tách hoàn toàn ra khỏi các chất khác trong hỗn hợp nền

mẫu ban đầu và thời gian lưu phải phù hợp, không quá nhanh cũng không quá lâu. Do đó, các điều kiện sắc kí được khảo sát lần lượt để chọn ra điều kiện tối ưu giúp rửa giải arbutin ra khỏi các chất trong mẫu kem, có thời gian lưu phù hợp, số đĩa lí thuyết, diện tích peak lớn, hệ số kéo đuôi nhỏ, peak gọn và không bị doãn hay chồng chéo. Mẫu thử được sử dụng để khảo sát ở các điều kiện: pha động ACN:H₂O theo tỉ lệ 80:20, 50:50 và 20:80, thể tích tiêm 10, 20 và 40 µL, tốc độ dòng (0,3; 0,5; 0,7 và 1,0) mL/phút, cột sắc kí không gia nhiệt và có gia nhiệt 40 °C, cuối cùng chạy mẫu trong vòng 60 phút để chọn thời gian chạy mẫu cho một quy trình phân tích mẫu.

2.2.2 Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng
Quy trình định lượng arbutin được xem là phù hợp cho quy trình định lượng một mẫu thực tế khi quy trình đạt các yêu cầu thẩm định về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại theo Hướng dẫn nội dung và phương pháp của Hội nghị Hải hoà Quốc tế (International Conference on Harmonization – ICH).

2.2.2.1 Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc kí các loại mẫu sau đây theo quy trình phân tích: mẫu trắng là ACN:H₂O (80:20), mẫu chuẩn là dung dịch arbutin chuẩn 100 µg/mL, mẫu thử là mẫu kem Cenlia được chuẩn bị theo quy trình chuẩn bị mẫu, mẫu thử thêm chuẩn là mẫu kem Cenlia được chuẩn bị theo quy trình chuẩn bị mẫu và thêm arbutin chuẩn 100 µg/mL.

Ghi lại các sắc kí đồ. Xác định thời gian lưu của hoạt chất cần phân tích; độ tinh khiết của peak hoạt chất cần phân tích trong sắc kí đồ mẫu trắng/mẫu chuẩn; chồng phổ UV-Vis peak của chất cần phân tích trong sắc kí đồ mẫu thử với peak của mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn.

Yêu cầu: sắc kí đồ các dung dịch thử cho peak có thời gian lưu khác nhau không có ý nghĩa thống kê với peak của chất chuẩn trong sắc kí đồ các mẫu chuẩn. Trên sắc kí đồ của mẫu thử: peak của chất cần phân tích phải tách hoàn toàn khỏi các peak khác (nếu có trong nền mẫu). Sắc kí đồ của mẫu trắng không xuất hiện peak trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn. Nếu có đáp ứng peak phải ≤ 1,0% so với đáp ứng peak của mẫu chuẩn. Peak của chất cần phân tích trong sắc kí đồ dung dịch thử phải tinh khiết. Hệ số chồng phổ UV-Vis của peak hoạt chất cần phân tích thu được trong sắc kí đồ của dung dịch thử với peak

tương ứng trong sắc kí đồ dung dịch chuẩn xấp xỉ 1,0 ($\geq 0,99$).

2.2.2.2 Tương thích hệ thống

Tiến hành sắc kí với các dung dịch chuẩn arbutin 100 $\mu\text{g/mL}$ (6 lần tiêm), ghi lại các sắc kí đồ và xác định giá trị thời gian lưu, diện tích peak trung bình và các thông số khác của peak (độ phân giải, hệ số đối xứng, số đĩa lý thuyết...).

Yêu cầu: độ phân giải giữa peak liền kề với peak của chất cần phân tích phải $\geq 1,5$, giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích peak $\leq 2,0\%$ (với phép thử định lượng).

2.2.2.3 Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn arbutin (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 và 400) $\mu\text{g/mL}$, ghi lại các sắc kí đồ và xác định đáp ứng của peak. Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính $y = ax + b$, với trục x biểu diễn cho nồng độ arbutin, trục y biểu diễn cho diện tích peak. Xác định hệ số tương quan giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và đáp ứng peak thu được trên các sắc kí đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu.

Yêu cầu: hệ số tương quan $r \geq 0,997$ hay $R^2 \geq 0,995$.

2.2.2.4 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.

Độ chính xác trung gian: tiến hành như độ lặp lại nhưng khác ngày. Xác định giá trị trung bình và giá trị RSD (%) hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu mỗi ngày.

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.

2.2.2.5 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 tương ứng với các mức nồng độ của arbutin 80%, 100% và 120% vào mẫu thử. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện ít nhất 03 mẫu độc lập. Phân tích mẫu theo quy trình phân tích. Xác định hoạt chất thu hồi theo phương trình hồi quy tuyến tính.

Yêu cầu: tỉ lệ thu hồi của quy trình phân tích định lượng arbutin phải nằm trong khoảng 98,0% - 102,0% và RSD tỉ lệ thu hồi $\leq 2,0\%$ ở mỗi mức nồng độ.

2.2.2.6 Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng
Giá trị LOD, LOQ của quy trình định lượng arbutin được tính dựa vào đường tuyến tính và độ lệch chuẩn của đáp ứng theo quy tắc “3 σ ”:

$$\text{LOD} = 3,3 \times S_y/b$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_y/b$$

Trong đó: S_y là sai số chuẩn của phương trình hồi quy tuyến tính.

b là hệ số góc của phương trình hồi quy tuyến tính.

2.2.3 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 Excel để rút ra nhận xét kết luận. Một số công thức tính toán các giá trị thống kê như sau:

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:

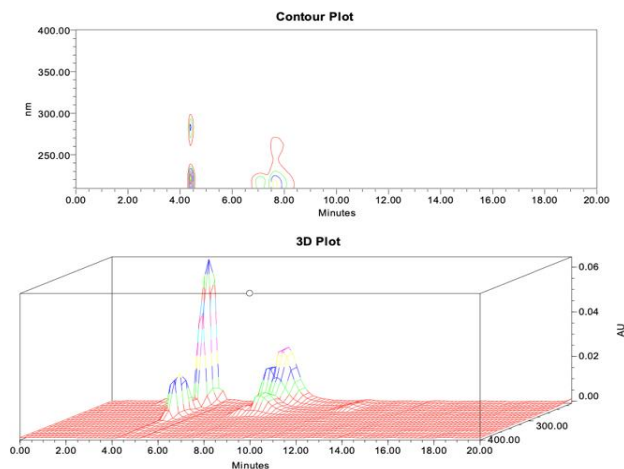
$$\text{RSD} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

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

3 Kết quả nghiên cứu

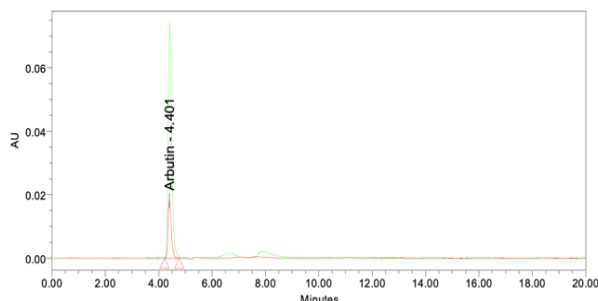
3.1 Tối ưu hóa điều kiện sắc kí

Chuẩn bị mẫu theo quy trình: cân chính xác 0,5 g kem vào ống falcon 15 mL. Hút chính xác 20 mL dung môi chiết cho vào falcon, vortex phân tán mẫu trong dung môi chiết rồi siêu âm 15 phút. Sau đó, đem li tâm 20 phút với tốc độ 6.000 rpm. Gạn phần dịch lỏng lọc qua giấy lọc, bỏ 5 mL dịch lọc đầu. Hút chính xác 1 mL dịch lọc cho vào bình định mức 20 mL, điền dung môi chiết đến vạch định mức được dung dịch thử sử dụng cho quy trình khảo sát. Tiến hành chạy sắc kí với các điều kiện pha động ACN:H₂O (20:80), ACN:H₂O (50:50) và ACN:H₂O (80:20), thể tích tiêm 10 μL , tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thời gian chạy sắc kí 20 phút.



Hình 2 Các sắc kí đồ của mẫu chiết với hệ dung môi ACN:H₂O (80:20)

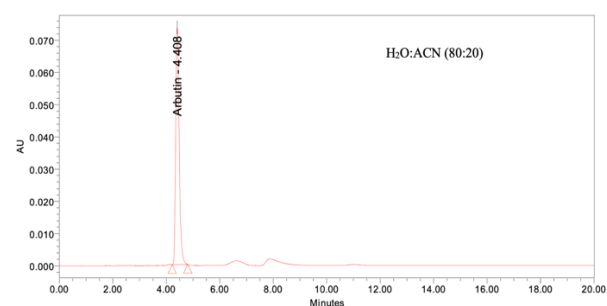
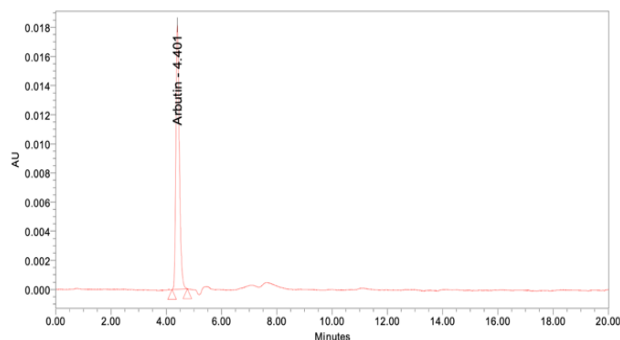
Trong các sắc kí đồ cùng hệ pha động ACN:H₂O (20:80), sắc kí đồ của mẫu được chiết bằng hệ dung môi ACN:H₂O (80:20) cho kết quả tối ưu, peak tinh gọn, không bị doãn, diện tích peak thu được lớn nhất, không chồng chéo với các peak khác (Hình 2). Tuy nhiên với quy trình chuẩn bị mẫu này, nồng độ arbutin khá loãng nên peak arbutin có diện tích dưới đường cong khá nhỏ. Một quy trình thay đổi độ pha loãng được sử dụng cho các giai đoạn tiếp theo: cân chính xác 0,5 g kem vào ống falcon 15 mL. Hút chính xác 10 mL cho vào falcon, vortex phân tán mẫu trong dung môi chiết rồi siêu âm 15 phút. Sau đó, đem li tâm 20 phút với tốc độ 6.000 rpm. Gạn phần dịch lỏng lọc qua giấy lọc, bỏ 3 mL dịch lọc đầu. Hút chính xác 1 mL dịch lọc cho vào bình định mức 10 mL, điền dung môi chiết đến vạch định mức được dung dịch thử sử dụng cho quy trình khảo sát.



Hình 3 Sắc kí đồ của dịch chiết mẫu theo 2 quy trình chiết với độ pha loãng khác nhau

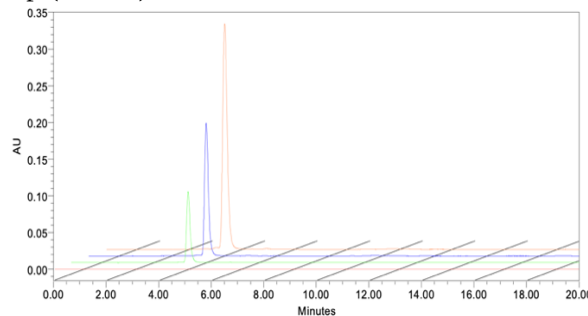
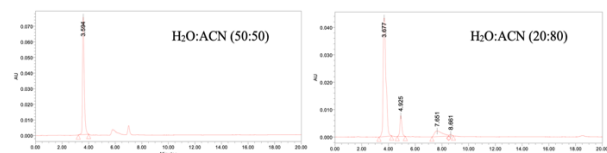
Kết quả thu được cho peak arbutin có diện tích peak phù hợp hơn, do đó, mẫu thử này được sử dụng để khảo sát hệ pha động (Hình 3).

Sắc kí đồ của mẫu thử với hệ dung môi H₂O:ACN (80:20) cho peak tinh gọn, tách hoàn toàn các peak khác, không có hiện tượng chồng chéo, kéo đuôi (Hình 4).



Hình 4 Sắc kí đồ chạy mẫu trên 3 tỉ lệ dung môi khác nhau của H₂O:ACN

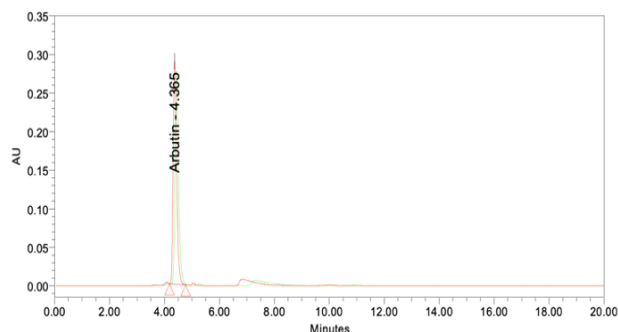
Tiếp tục chạy mẫu thử với pha động H₂O:ACN (80:20), khảo sát các thể tích tiêm (10, 20, 40) μ L. Peak arbutin của sắc kí đồ với thể tích tiêm 40 μ L tinh gọn, có hệ số kéo đuôi, chiều cao và diện tích dưới đường cong phù hợp (Hình 5).



Hình 5 Sắc kí đồ của các thể tích tiêm 10, 20 và 40 μ L

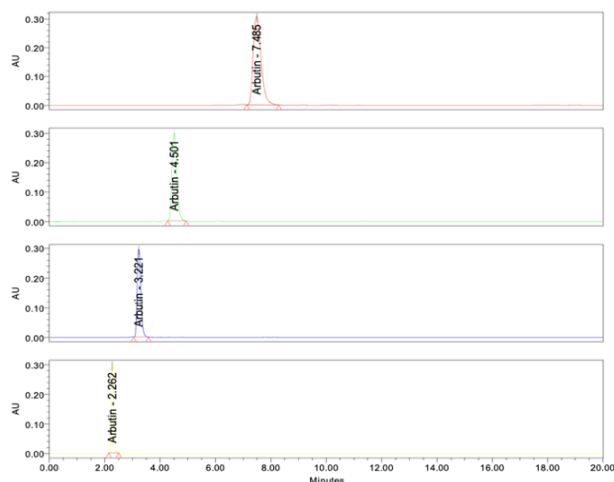
Qua khảo sát 2 điều kiện nhiệt độ cột không gia nhiệt và có gia nhiệt 40 $^{\circ}$ C, kết quả sắc kí đồ (Hình 6) khác nhau không đáng kể nên nghiên cứu sẽ tiến hành ở điều

kiện không gia nhiệt, tức điều kiện cột sẽ khoảng 26 - 28 °C chênh lệch phụ thuộc vào nhiệt độ phòng nhằm mục đích kéo dài tuổi thọ của cột sắc kí.



Hình 6 Sắc kí đồ tiến hành trên mẫu thử ở điều kiện nhiệt độ phòng (màu xanh lá) và gia nhiệt cột sắc kí đến 40 °C (màu đỏ)

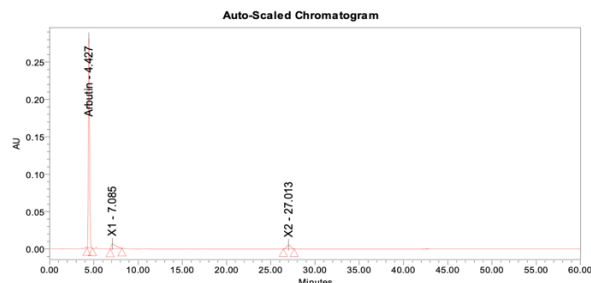
Tốc độ dòng được chọn là 0,5 mL/phút nhằm tăng hiệu quả rửa giải, giảm thời gian chạy mẫu so với tốc độ dòng 0,3 mL/phút và giảm tiêu tốn dung môi pha động, cho thời gian rửa giải phù hợp, không chồng peak so với các tốc độ 0,7 và 1,0 mL/phút (Hình 7).



Hình 7 Sắc kí của arbutin với hệ pha động

H₂O:ACN(80:20), thể tích tiêm 40 µL, không gia nhiệt cột với tốc độ dòng 0,3 mL/phút (a), 0,5 mL/phút (b), 0,7 mL/phút (c) và 1,0 mL/phút (d)

Sau khi đã chọn được các điều kiện sắc kí, tiến hành chạy trên mẫu thử trong 60 phút. Dựa và kết quả sắc kí đồ (Hình 8), peak cuối cùng xuất hiện ở phút thứ 27, do đó, có thể chọn thời gian chạy mẫu là 35 phút cho một mẫu thử để rửa giải hoàn toàn các chất khác không phải arbutin, tránh ảnh hưởng lần chạy mẫu sau.



Hình 8 Sắc kí của mẫu thử với các điều kiện khảo sát, tiến hành trong 60 phút

Sau quá trình lựa chọn, các điều kiện sắc kí được chọn lựa như sau:

- Cột sắc kí LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) hoặc cột có tính năng tương đương.
- Detector PDA đặt trong dải bước sóng từ 190 - 800 nm, lấy sắc kí đồ ở 283 nm.
- Pha động: H₂O:ACN (80:20).
- Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 40 µL.
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.

3.2 Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng

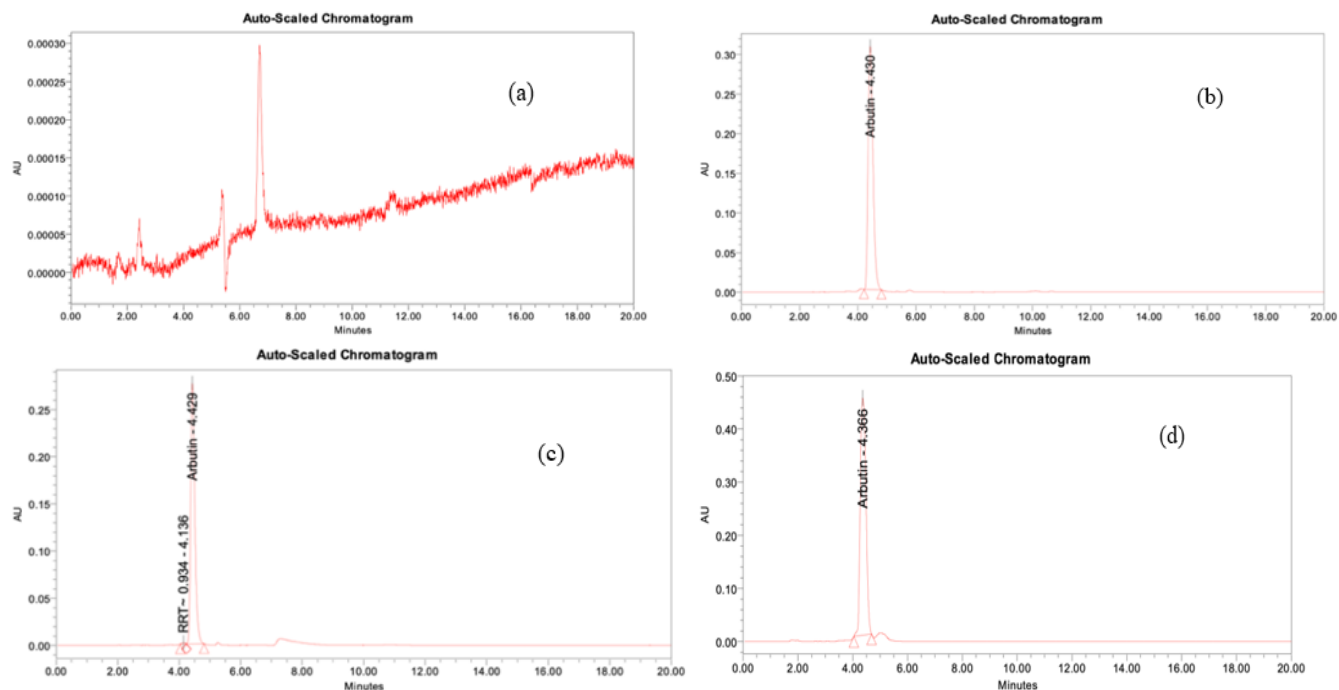
3.2.1 Độ đặc hiệu

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

- Mẫu trắng: dung môi chiết
- Mẫu chuẩn: arbutin chuẩn pha trong dung môi chiết đã được chọn, nồng độ khoảng 100 µg/mL.
- Mẫu thử: mẫu mỹ phẩm chuẩn bị theo quy trình chiết đã chọn.
- Mẫu thử thêm chuẩn: mẫu mỹ phẩm chuẩn bị theo quy trình chiết đã chọn, thêm chuẩn để được nồng độ arbutin chuẩn khoảng 100 µg/mL.

Kết quả ở Hình 9 cho thấy:

- Đối với mẫu trắng, không xuất hiện peak trên sắc kí đồ tại thời gian lưu của arbutin.
- Đối với mẫu chuẩn, trên sắc kí đồ chỉ xuất hiện một peak rõ ràng của arbutin tại thời gian lưu 4,43 phút.
- Đối với mẫu thử, sắc kí đồ cho peak tương ứng với peak arbutin trên sắc kí đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu, đồng thời peak arbutin được tách riêng khỏi các peak khác.
- Đối với mẫu thử thêm chuẩn, sắc kí đồ cho peak có cùng thời gian lưu với peak của arbutin trong mẫu thử và mẫu chuẩn đơn lẻ, với diện tích peak xấp xỉ diện tích peak của 2 mẫu đơn lẻ cộng lại.



Hình 9 Sắc kí đồ của mẫu trắng (a), chuẩn (b), thử (c) và thử thêm chuẩn (d) tiến hành ở điều kiện sắc kí khảo sát

3.2.2 Tương thích hệ thống

Bảng 1 Tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (mAU)
1	4,505	3.828.736
2	4,505	3.805.918
3	4,507	3.783.070
4	4,507	3.765.899
5	4,507	3.748.847
6	4,505	3.735.784
TB	4,506	3.778.042,3
SD	0,0011	35.093,4
RSD (%)	0,0243%	0,9%

Bảng 1 cho thấy cả thời gian lưu và diện tích peak đều có độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 2%, chứng tỏ điều kiện sắc kí lựa chọn đạt yêu cầu tính tương thích hệ thống của phép phân tích định tính và định lượng.

3.2.3. Khoảng tuyến tính

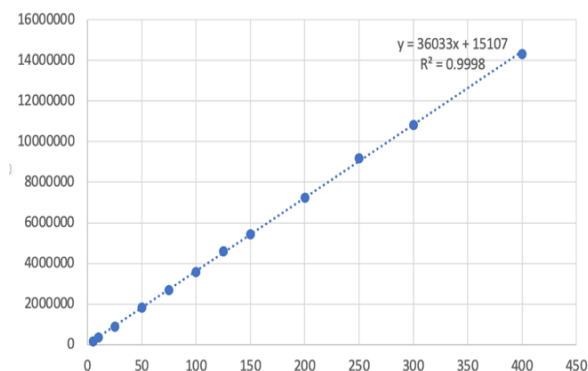
Để đánh giá khoảng tuyến tính, một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ arbutin chính xác thuộc khoảng 5 - 400 $\mu\text{g/mL}$ trong hỗn hợp ACN:H₂O (80:20) được chuẩn bị và lọc qua màng lọc 0,22 μm . Các dung dịch chuẩn này được lần lượt tiêm vào hệ thống.

HPLC sử dụng các điều kiện đã lựa chọn ở trên. Kết quả đáp ứng trên sắc kí đồ (thông qua diện tích peak) cho thấy phương pháp phân tích đã xây dựng cho đáp ứng tuyến tính tốt với arbutin trong khoảng nồng độ phân tích từ 5 đến 400 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 2).

Bảng 2 Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của arbutin

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích peak (mAU)
1	5	170.050
2	10	347.749
3	25	892.094
4	50	1.821.110
5	75	2.683.676
6	100	3.587.103
7	125	4.600.833
8	150	5.426.753
9	200	7.226.225
10	250	9.178.880
11	300	10.828.561
12	400	14.314.747

Phương trình hồi quy tuyến tính xác định được là $y = 36033x + 15107$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$.



Hình 10 Đường thẳng hồi quy tuyến tính của arbutin biểu diễn diện tích dưới đường cong (mAU) theo nồng độ arbutin ($\mu\text{g/mL}$).

3.2.4 Độ chính xác

Bảng 3 Độ lặp lại trong ngày của phương pháp định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia

Ngày 1	Lượng cân (g)	Diện tích peak (mAU)	Lượng arbutin tìm thấy (μg)
1	0,5029	2.641.563	72,8902
2	0,5043	2.669.531	73,6664
3	0,5044	2.654.369	73,2456
4	0,5016	2.663.520	73,4996
5	0,5013	2.652.435	73,1920
6	0,5020	2.658.119	73,3497
Trung bình		2.656.589,5	73,3073
RSD (%)		0,4%	0,37%

Bảng 4 Độ chính xác liên ngày của phương pháp định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia

Ngày 2	Lượng cân (g)	Diện tích peak (mAU)	Lượng arbutin tìm thấy (μg)
1	0,5006	2.610.823	72,0371
2	0,5008	2.615.650	72,1711
3	0,5057	2.637.756	72,7846
4	0,5033	2.644.301	72,9662
5	0,5059	2.645.964	73,0124
6	0,5069	2.653.443	73,2199
Trung bình		2.634.656,2	72,6986
RSD (%)		0,7%	0,66%

Độ chính xác (gồm độ lặp lại trong ngày và khác ngày) của cả phương pháp được đánh giá qua kết quả hàm lượng arbutin sau 6 lần phân tích độc lập của mỗi mẫu thử và đạt yêu cầu về độ chính xác, thể hiện qua RSD của độ lặp lại (Bảng 3) và độ chính xác liên ngày (Bảng 4) lần lượt là 0,37% và 0,66%.

3.2.5 Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách cho thêm chính xác một lượng chất chuẩn cần phân tích vào các mẫu thử (Bảng 5). Với phép thử định lượng, lượng chất chuẩn thêm vào mẫu thử là 80 μg , 100 μg và 120 μg . Tại mỗi mức nồng độ chuẩn thêm vào, thực hiện ít nhất 03 mẫu độc lập và tính tỉ lệ thu hồi của các mẫu này.

Kết quả thực nghiệm (Bảng 6) cho thấy phương pháp đạt yêu cầu thẩm định về độ đúng với tỉ lệ thu hồi tốt (từ 99,43% đến 101,98%).

Bảng 5 Lượng thêm vào và lượng tìm thấy trong thử nghiệm độ đúng của phương pháp định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia

STT	Lượng thêm vào (μg)	Diện tích peak (mAU)	Lượng tìm thấy (μg)
1	0	2.592.173	71,5196
2		2.594.205	71,5759
3		2.582.657	71,2555
4	80	5.528.348	153,0053
5		5.519.105	152,7488
6		5.541.078	153,3586
7	100	6.188.650	171,3302
8		6.165.933	170,6998
9		6.162.935	170,6166
10	120	6.874.723	190,3703
11		6.885.161	190,6600
12		6.944.803	192,3152

Bảng 6 Tỉ lệ thu hồi của phương pháp định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia

Lượng thêm vào (μg)	Giá trị trung bình (μg)	Lượng thu hồi (μg)	Tỉ lệ thu hồi (%)
0	71,4504		
80	153,0376	81,5872	101,98
100	170,8822	99,4318	99,43
120	191,1152	119,6649	99,72

3.2.6 Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng
Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp được xác định dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính đã xác định theo quy tắc “3 σ ”: $\text{LOD} = 3,3 \times S_y/b$ và $\text{LOQ} = 10 \times S_y/b$ với S_y là sai số chuẩn của y và b là hệ số góc của phương trình hồi quy tuyến tính.

Bảng 7 Phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan (r), LOD và LOQ

Phương trình hồi quy tuyến tính	r	S _y	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
y = 36033x + 15107	0,9998	69.238	6,3409	19,2150

Theo kết quả ở Bảng 7, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng arbutin của phương pháp lần lượt là 6,3409 µg/mL và 19,2150 µg/mL.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng arbutin trong mẫu kem làm trắng da Cenlia bằng phương pháp HPLC ở những điều kiện sau: hệ thống HPLC Arc Waters đầu dò 2998 PDA, cột LiChrospher® 100 RP-18 (25 cm × 4 mm × 5 µm) Hibar® RT 250-4, Merck, Đức; detector: PDA 283 nm; pha động: ACN:H₂O (20:80), v/v; thể tích tiêm 40 µL; tốc độ dòng 0,5 mL/phút; nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng. Phương pháp định lượng arbutin trong kem làm trắng da đã được thẩm định chặt chẽ về tính tương thích, độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng, LOD và LOQ. Phương pháp đã được thẩm định hoàn toàn phù hợp để định tính, định lượng arbutin trong các chế phẩm làm trắng da đang lưu hành trên thị trường.

Lời cảm ơn Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2023.0137/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. Migas, Piotr; Krauze-Baranowska, Mirosława (2015). The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, 13, 35-40.
2. B.N. Barsoom; A.M.E. Abdelsamad; N.M. Adib (2006). Indirect spectrophotometric determination of arbutin, whitening agent through oxidation by periodate and complexation with ferric chloride. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 64(4), 844-852.
3. Repert, S., Matthes, S., & Rozhon, W. (2022). Quantification of Arbutin in Cosmetics, Drugs and Food Supplements by Hydrophilic-Interaction Chromatography. *Molecules*, 27(17), 5673.
4. Rychlinska, I., & Nowak, S. (2012). Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), 109-113.
5. Gallo, F. R., Pagliuca, G., Multari, G., Panzini, G., D'amore, E., & Altieri, I. (2015). New high-performance liquid chromatography-DAD method for analytical determination of arbutin and hydroquinone in rat plasma. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(5), 530.
6. Liu, Y., Liu, D., & Xie, Z. (2022). Rapid and Specific Fluorescence Method for the Quantification of Arbutin in Cosmetics. *Analytical Letters*, 55(2), 318-326.
7. Zhu, L., Wu, H. L., Xie, L. X., Fang, H., Xiang, S. X., Hu, Y., ... & Yu, R. Q. (2016). A chemometrics-assisted excitation-emission matrix fluorescence method for simultaneous determination of arbutin and hydroquinone in cosmetic products. *Analytical Methods*, 8(24), 4941-4948.
8. Trần Thị Hải Yến, Khil Kosol, Lê Thị Thu Trang, Vũ Thị Thu Giang (2020). Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế emugel alpha arbutin 1%. *Tạp chí Dược học* 2020, số 528 (4), 52-57.

Quantitative determination of arbutin in whitening face cream by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Tu Minh Thanh

Faculty of Medical Laboratory Techniques, Nguyen Tat Thanh University

thanhtm@ntt.edu.vn

Abstract Arbutin is considered a crucial ingredient in cosmetic preparations thanks to its safe whitening mechanism. In Vietnam, studies aiming to develop a process for arbutin quantification have remained lacking. Hence, quantitative analysis of arbutin by chromatography with a photodiode array detector was carried out under chromatographic screening conditions and a procedure for quantification of arbutin in skin whitening cream was developed. The chromatography system performed with a LiChrospher® 100 RP-18 chromatography column (25 cm × 4 mm × 5 µm); PDA detector placed in the wavelength range from 190 – 800 nm, taking chromatogram at 283 nm; mobile phase H₂O:ACN (80:20); flow rate 0,5 mL/min, sample injection volume 40 µL; column temperature set at ambient room air. The quantification procedure validated the system compatibility, specificity, linearity, accuracy and precision, LOD and LOQ according to the Content and Methodology Guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH). In conclusion, the present study has successfully developed an Arbutin quantitative analysis which is suitable for analyzing commercialized whitening creams containing arbutin.

Keywords Arbutin, whitening cream, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Photodiode array detection (PDA), ICH