การหาปริมาณของพาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอางโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายในหนึ่งนาที

Determination of Parabens in Cosmetic Samples by Sub-Minute High-Performance Liquid Chromatography Method

สมศักดิ์ ศิริไชย* และ ขจัดภัย ทิพยผ่อง

Somsak Sirichai* and Khajadpai Thipyapong

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 22 May 2019

Revised : 17 June 2019

Accepted : 23 June 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการแยกและการวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเบน คือ เมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอางภายในหนึ่งนาทีด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดเป็นโฟโต้ไดโอดอาร์เรย์และใช้คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง ทำการชะแบบเกรเดียนด้วยอะซิโตไนไตรล์และน้ำ อัตราการไหล 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถแยกสารได้ภายใน 1 นาที กราฟของสารละลายมาตรฐานของพาราเบนมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.50-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยค่า R^2 มากกว่า 0.999 ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของพาราเบนพบอยู่ระหว่าง 0.12-0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.40-0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความแม่นในเทอมของร้อยละการได้กลับคืนของพาราเบนอยู่ในช่วง 97.2-102.6 ความเที่ยงภายในวันและความเที่ยงระหว่างวันของวิธีอยู่ระหว่างร้อยละ 1.11-1.50 และ 2.30-2.70 ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณของพาราเบนทั้งสี่ชนิดที่ใส่ในเครื่องสำอางในเวลาเดียวกัน

คำสำคัญ : โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, ภายในหนึ่งนาที, พาราเบน, เครื่องสำอาง

***Corresponding author. E-mail** : sirichai@go.buu.ac.th

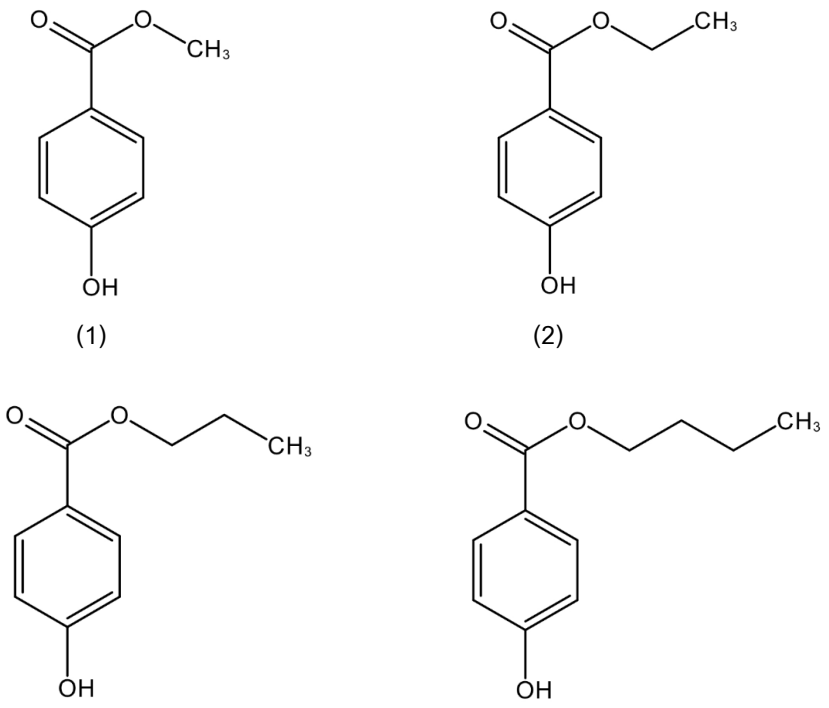
Abstract

This research was developed to a sub-minute separation method and simultaneous determination of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben in cosmetic samples by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector for simultaneous determination of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben in cosmetic samples. Parabens were separated on a Chromolith column using gradient elution with acetonitrile and water, the flow rate of 1.3 mL min^{-1} and detected at 254 nm. Under the optimal conditions, the separation was completed in less than 1 min. Calibration curves for standard solution of parabens were linear over the concentration range of 0.50-10.0 mg L^{-1} with R^2 greater than 0.999. The limits of detection and limits of quantification of parabens were found between 0.12-0.15 mg L^{-1}, and 0.40-0.45 mg L^{-1}, respectively. The accuracy in terms of percent recovery of parabens was in the range of 97.2-102.6. Repeatability and reproducibility of the method were in the range of 1.11-1.50% and 2.30-2.70%, respectively. The development method could be applied to the simultaneous determination of parabens in cosmetic samples.

Keywords: high-performance liquid chromatography, sub-minute, paraben, cosmetic

บทนำ

พาราเบน (paraben) หรือไฮดรอกซีเบนโซเอท (hydroxybenzoate) คือเอสเทอร์ของกรด 4-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (4-hydroxybenzoic acid) โดยพาราเบนแต่ละชนิดจะต่างกันที่กลุ่มของเอสเทอร์ซึ่งอาจเป็นหมู่เมทิล (methyl) เอทิล (ethyl) โพรพิล (propyl) หรือบิวทิล (butyl) พาราเบนมีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ (Rodford, 1997) ป้องกันการเกิดออกซิเดชันและการปนเปื้อนของแบคทีเรีย มีความเสถียรและไม่ระเหย (Gagliardi *et al*., 1997) ด้วยเหตุนี้ จึงมีการใช้สารกลุ่มนี้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โครงสร้างทางเคมีของพาราเบนที่ใช้กันทั่วไปแสดงดังภาพที่ 1 การเพิ่มขนาดของหมู่แอลคิลที่แทนที่ในหมู่เอสเทอร์ทำให้ความเป็นพิษของพาราเบนเพิ่มขึ้น ดังนั้น บิวทิลพาราเบนจึงมีความเป็นพิษมากกว่าเมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน และโพรพิลพาราเบน (Dobbins *et al*., 2009) นอกจากนี้ พาราเบนยังมีสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโทรเจนอย่างอ่อน ๆ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (Darbre *et al*., 2004) จากความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ จึงมีกฎหมายควบคุมปริมาณการใช้ โดยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ได้กำหนดให้มีการใช้สารกลุ่มพาราเบนในเครื่องสำอาง คือ 0.4% (คำนวณในรูปกรดเมื่อใช้เอสเทอร์ชนิดเดียว) และ 0.8% (คำนวณในรูปกรดเมื่อใช้เอสเทอร์หลายชนิด) (Notification of the Ministry of Health, 2017) ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อควบคุมและติดตามปริมาณการใช้ไม่ให้เกินปริมาณที่กฎหมายกำหนด



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (1) เมทิลพาราเบน (2) เอทิลพาราเบน (3) โพรพิลพาราเบน และ (4) บิวทิลพาราเบน

เทคนิคการแยกที่สามารถใช้ในการหาปริมาณของพาราเบนมีอยู่หลายเทคนิค เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography หรือ HPLC) ร่วมกับตัวตรวจวัดยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Youngvises *et al*., 2013; Gao *et al*. , 2011, 2012; Borremans *et al*., 2004) ตัวตรวจวัดเคมิลูมิเนสเซนซ์ (Zhang *et al*., 2005) ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Zgota-Grzeskowiak *et al*., 2016) แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography หรือ GC) (Wang & Zhou, 2013; Sánchez-Prado *et al*., 2011) แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส (capillary electrophoresis หรือ CE) (Cheng *et al*., 2012; Huang *et al*., 2006; Cruces-Blanco *et al*., 2001) อย่างไรก็ตาม ในการหาปริมาณของพาราเบนมีทั้งข้อดีและข้อด้อยขึ้นกับเทคนิคและตัวตรวจวัดที่เลือก เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงทั่วไปใช้เฟสคงที่ชนิด C_{18} ขนาด 5 ไมโครเมตร ภายใต้สภาวะการชะแบบไอโซเครติก (isocratic elution) ใช้เวลาในการวิเคราะห์โพรพิลพาราเบนประมาณ 10-20 นาที หรือใช้ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่มากเมื่อใช้คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (monolithic column) เทคนิคอัลตร้าโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ultra high-performance liquid chromatography หรือ UHPLC) แม้จะวิเคราะห์สารได้รวดเร็วแต่เครื่องมือค่อนข้างซับซ้อน แก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดแมสสเปกโทรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry หรือ GC-MS) เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ แต่ต้องใช้เวลาในการสังเคราะห์อนุพันธ์นานและใช้อุณหภูมิสูง

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการเพื่อพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่สามารถวิเคราะห์พาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอางได้ภายในหนึ่งนาที โดยใช้เฟสคงที่ชนิดรูพรุนสูงร่วมกับการชะไอโซเครติก (isocratic elution) และแบบเกรเดียน (gradient elution) และตัวตรวจวัดชนิดโฟโต้ไดโอดอาร์เรย์ ศึกษาความความน่าเชื่อถือของวิธี (validation method) ที่ได้พัฒนาขึ้นมา และประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณของพาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอาง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและสารละลาย

สารมาตรฐานของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้แก่ เมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และ บิวทิลพาราเบน (ความบริสุทธิ์มากกว่า 99%) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา อะซิโตไนไตรล์และเมทานอลเกรด HPLC จากบริษัทเมอร์ค ประเทศเยอรมัน น้ำปราศจาคไอออนจากเครื่อง Water purification system รุ่น EASYpure LF บริษัท Barnstead ประเทศเยอรมัน

สารละลายมาตรฐานเข้มข้น (standard stock solution) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์เตรียมในเมทานอล ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายมาตรฐานผสมของสารที่ต้องการวิเคราะห์เตรียมใหม่แต่ละวัน โดยการเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น

2. เครื่องมือ

การวิเคราะห์พาราเบนใช้เครื่อง HPLC รุ่น 1260 Infinity II ของบริษัทเอจิเลนต์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ระบบประกอบด้วยปั๊มชนิดระบบผสมตัวทำละลายได้สี่ชนิด (quaternary pump) ระบบไล่แก๊สแบบออนไลน์ (online degasser) และตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ การแยกสารเกิดขึ้นในคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (Chromolith Flash RP-18e) ขนาด 3 mm x 25 mm บริษัทเมอร์ค ประเทศเยอรมัน ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตรที่ฉีดเข้าคอลัมน์คือ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดคือ 254 นาโนเมตร การวิเคราะห์เชิงคุณภาพทำโดยการเปรียบเทียบช่วงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet spectra) และ รีเทนชั่นไทม์ (retention time) ของสารมาตรฐาน โปรแกรมที่ใช้สำหรับการประมวลผลของข้อมูล คือ OpenLab CDS ChemStation C.01.04

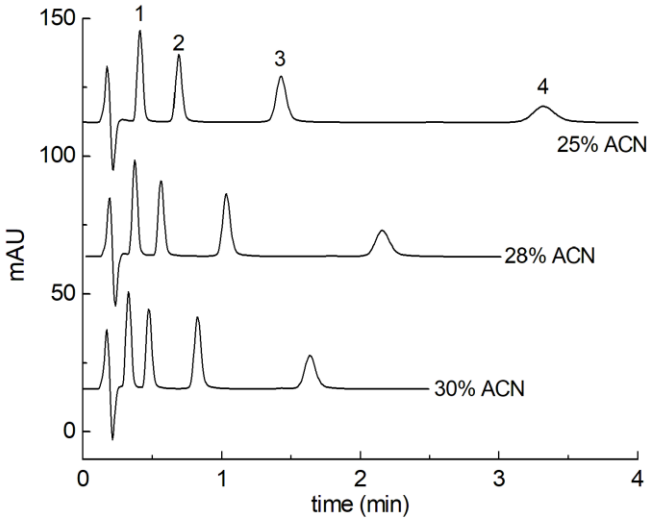
3. การเตรียมตัวอย่าง

เติมตัวทำละลาย (เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยปริมาตร) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างครีมทาหน้าและครีมทาผิว 0.50 กรัม เนื้อครีมมีสีขาวและข้น จากนั้นนำไปสั่นสะเทือนด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (sonication) 20 นาที เจือจางด้วยตัวทำละลายจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 10 นาที ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที และกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ผลการวิจัย

1. ศึกษาการแยกพาราเบนโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก

การทดลองเบื้องต้น เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสม 3 สภาวะในการแยกสารพาราเบน 4 ชนิด โดยใช้การชะแบบไอโซเครติก องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตไนไตรล์ (ACN) และน้ำ (H_2O) ที่อัตราส่วน ACN : H_2O เท่ากับ 25 : 75, 28 : 72 และ 30 : 70 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ คือ 1.30 มิลลิลิตรต่อนาที ผลของเปอร์เซ็นต์อะซิโตไนไตรล์ต่อโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมพาราเบนแสดงดังภาพที่ 2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพใช้วิธีการเทียบค่ารีเทนชั่นไทม์และเทคนิคการเติม (spiking technique)



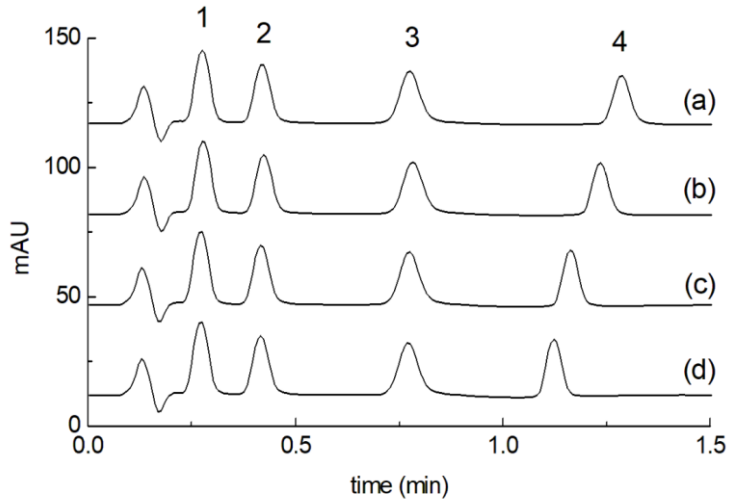
ภาพที่ 2 ผลของเปอร์เซ็นต์อะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยกพาราเบนทั้งสี่ชนิด พีก 1 คือเมทิลพาราเบน พีก 2 คือเอทิลพาราเบน พีก 3 คือโพรพิลพาราเบน และพีก 4 คือบิวทิลพาราเบน

2. ศึกษาการแยกพาราเบนโดยใช้การชะแบบเกรเดียน

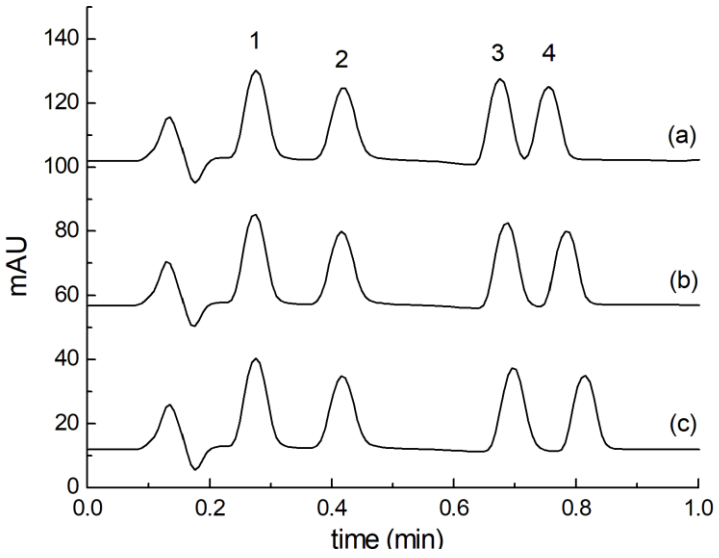
จากการวิเคราะห์พาราเบนทั้ง 4 ชนิดโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 2.5 นาที เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์ให้สั้นกว่านี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการใช้การชะแบบเกรเดียน สภาวะเกรเดียนที่ศึกษาแสดงดังตารางที่ 1 โครมาโทแกรมที่ได้จากการชะแบบเกรเดียนของสภาวะที่ 1 ถึง 4 แสดงดังภาพที่ 3 และโครมาโทแกรมที่ได้จากการชะแบบเกรเดียนของสภาวะที่ 5 ถึง 7 แสดงดังภาพที่ 4

ตารางที่ 1 สภาวะเกรเดียนสำหรับการแยกพาราเบนทั้ง 4 ชนิด

สภาวะที่	**%ACN เริ่มต้น**	**ช่วงเวลา (isocratic hold) (นาที)**	**เวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง %ACN (gradient time) (นาที)**	**%ACN สุดท้าย**
1	28	0 - 0.30	0.70	50
2	28	0 - 0.30	0.70	60
3	28	0 - 0.30	0.70	80
4	28	0 - 0.30	0.70	100
5	28	0	0.30	100
6	28	0	0.40	100
7	28	0	0.50	100



ภาพที่ 3 ผลของการชะแบบเกรเดียนต่อการแยกพาราเบน พีก 1 คือเมทิลพาราเบน พีก 2 คือเอทิลพาราเบน พีก 3 คือ โพรพิลพาราเบน และพีก 4 คือบิวทิลพาราเบน โดยใช้การชะแบบเกรเดียนสภาวะที่ 1 (a) สภาวะที่ 2 (b) สภาวะที่ 3 (c) และสภาวะที่ 4 (d)



ภาพที่ 4 ผลของการชะแบบเกรเดียนต่อการแยกพาราเบน พีก 1 คือเมทิลพาราเบน พีก 2 คือเอทิลพาราเบน พีก 3 คือโพรพิลพาราเบน และพีก 4 คือบิวทิลพาราเบน โดยใช้การชะแบบเกรเดียนสภาวะที่ 5 (a) สภาวะที่ 6 (b) สภาวะที่ 7 (c)

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การแยกพาราเบนโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก

จากโครมาโทแกรมในภาพที่ 2 เห็นได้ว่า การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์อะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ส่งผลต่อค่ารีเทนชั่นไทม์และค่าการแยก กล่าวคือ เมื่อเปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ทำให้ค่ารีเทนชั่นไทม์และค่าการแยกลดลง เนื่องจากการเพิ่มเปอร์เซ็นต์อะซิโตไนไตรล์เป็นการลดสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ พาราเบนแต่ละ

ชนิดเป็นสารประกอบมีขั้วแตกต่างกัน เมทิลพาราเบนเป็นสารแรกที่ถูกชะออกมา แสดงว่ามีสภาพขั้วสูงสุดในสารกลุ่มนี้ ตามด้วยเอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบน ตามลำดับ แสดงว่าจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น สภาพขั้วลดลง การวิเคราะห์จึงเป็นแบบที่เรียกว่า รีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี (reversed-phase chromatography) นอกจากนี้เห็นได้ว่า สภาพไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนสำหรับโพรพิลพาราเบนและบิวทิลพาราเบน เมื่อพิจารณาถึงการแยกความเร็วในการวิเคราะห์ สภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการวิเคราะห์พาราเบนภายใต้การชะแบบไอโซเครติก คือ อะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ 28% ภายในสภาวะที่เหมาะสมนี้ การวิเคราะห์พาราเบนที่ดีที่สุดสามารถทำได้ภายในเวลาประมาณ 2.5 นาที จากผลการทดลองเห็นได้ว่า การชะกลุ่มสารที่มีสภาพขั้วต่างกันมากโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนานสำหรับสารที่ถูกชะออกมาลำดับท้าย ๆ การแก้ไขปัญหานี้สามารถทำได้โดยการใช้การชะแบบเกรเดียน

2. การแยกพาราเบนโดยใช้การชะแบบเกรเดียน

การชะแบบเกรเดียนคือการลดสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่อง การเลือกเฟสเคลื่อนที่จะอาศัยหลักการละลายของสารที่มีสมบัติเหมือนกัน ภาพที่ 3 ซึ่งเป็นผลจากการชะพาราเบนทั้ง 4 ชนิดโดยใช้การชะแบบเกรเดียนในสภาวะที่ 1 ถึง 4 เกรเดียนทั้งสี่สภาวะเริ่มต้นด้วย %ACN ช่วงเวลาและเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง %ACN เท่ากัน แต่เปลี่ยนแปลง %ACN สุดท้าย จากโครมาโทแกรมเห็นได้ว่า การทำเกรเดียนสภาวะที่ 1 ถึง 4 ส่งผลต่อค่ารีเทนชั่นไทม์ของบิวทิลพาราเบน โดยยิ่งเพิ่ม %ACN ที่ขั้นสุดท้ายของการชะ ทำให้ค่ารีเทนชั่นไทม์ของบิวทิลพาราเบนลดลง แต่ไม่มีผลต่อรีเทนชั่นไทม์ของพาราเบนของอีก 3 ชนิด และพาราเบนทั้ง 4 ชนิดยังแยกกันอย่างสมบูรณ์

ภาพที่ 4 เป็นผลจากการชะพาราเบนทั้ง 4 ชนิดโดยใช้การชะแบบเกรเดียนในสภาวะที่ 5 ถึง 7 โดยค่า %ACN เริ่มต้นคือ 28% และค่า %ACN สุดท้ายคือ 100% และศึกษาเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง %ACN ที่ 0.3, 0.4 และ 0.5 นาที จากโครมาโทแกรมเห็นได้ว่า พีกของบิวทิลพาราเบนถูกชะออกมาภายใน 1 นาที แต่เวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง %ACN ที่ 0.3 และ 0.4 นาที พีกของโพรพิลและบิวทิลพาราเบนแยกกันไม่สมบูรณ์ ดังนั้น จากการศึกษาการแยกพาราเบนโดยใช้การชะแบบเกรเดียน สภาวะเกรเดียนที่ 7 เป็นสภาวะที่ดีที่สุด โดยภายใต้สภาวะนี้ การวิเคราะห์พาราเบนทั้ง 4 ชนิด สามารถทำได้ภายใน 1 นาที

3. การศึกษาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมา จึงได้ศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ตามมาตรฐาน ICH (ICH, 2005) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3.1 ความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดการตรวจวัด และขีดจำกัดการหาปริมาณ

ศึกษาโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบนเพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณพิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่สนใจที่ให้อัตราส่วนของสัญญาณของสารละลายมาตรฐานต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ตารางที่ 2 แสดงความเป็นเส้นตรง LOD และ LOQ ของพาราเบนทั้ง 4 ชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (เกรเดียนสภาวะที่ 7)

ตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรง LOD และ LOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

สาร	สมการเส้นตรง	R^2	LOD มิลลิกรัมต่อลิตร	LOQ มิลลิกรัมต่อลิตร
เมทิลพาราเบน	y = 84.0078x + 5.1331	0.9996	0.12	0.40
เอทิลพาราเบน	y = 62.8646x + 1.7353	0.9993	0.15	0.45
โพรพิลพาราเบน	y = 69.9387x + 1.2751	0.9998	0.15	0.45
บิวทิลพาราเบน	y = 63.6330x + 3.5705	0.9995	0.15	0.45

3.2 **ความเที่ยงของวิธี**

ความเที่ยงของวิธีคือความสามารถในการทำซ้ำแล้วได้ค่าใกล้เคียงค่าเดิม ในการศึกษาความเที่ยงของวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ สำหรับความเที่ยงภายในวัน ทำโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเบนที่ระดับ 3 ความเข้มข้นโดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวัน ทำโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของพาราเบนที่ระดับ 3 ความเข้มข้นโดยวิเคราะห์ซ้ำเป็นเวลา 5 วัน โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้งในแต่ละวัน ความเที่ยงของวิธีแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเที่ยงภายในวันและความเที่ยงระหว่างวัน (n = 5) ของวิธีที่เสนอที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

สารที่วิเคราะห์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	1.00	5.00	8.00
ความเที่ยงภายในวัน %R.S.D			
เมทิลพาราเบน	1.21	1.31	1.10
เอทิลพาราเบน	1.10	1.22	1.11
โพรพิลพาราเบน	1.33	1.21	1.20
บิวทิลพาราเบน	1.50	1.31	1.44
ความเที่ยงระหว่างวัน %R.S.D			
เมทิลพาราเบน	2.51	2.23	2.70
เอทิลพาราเบน	2.20	2.61	2.30
โพรพิลพาราเบน	2.52	2.30	2.11
บิวทิลพาราเบน	2.21	2.72	2.40

3.3 **ความแม่นของวิธี**

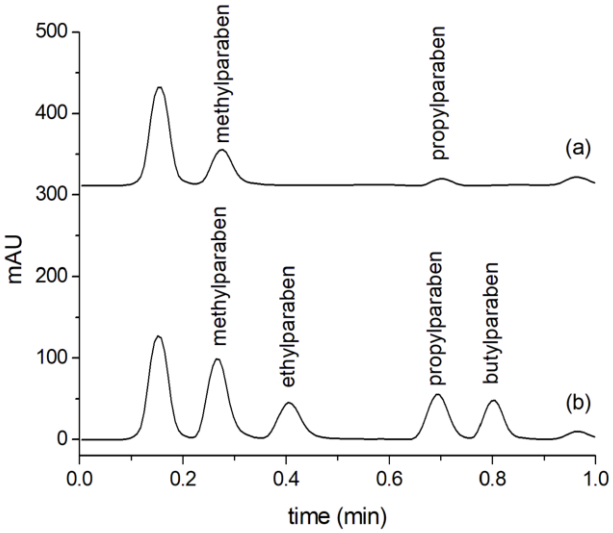
ความแม่นของวิธีแสดงได้ในเทอมของร้อยละการได้กลับคืน ทำโดยการเติมสารมาตรฐานผสมของพาราเบนที่ระดับ 3 ความเข้มข้นลงในตัวอย่างเครื่องสำอาง ค่าร้อยละการได้กลับคืนของวิธีแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความแม่นของวิธีที่เสนอที่ได้จากการวิเคราะห์สารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (*n* = 5)

สารที่วิเคราะห์	ร้อยละการได้กลับคืน		
	2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
เมทิลพาราเบน	97.8	99.8	102.6
เอทิลพาราเบน	98.6	100.4	99.8
โพรพิลพาราเบน	97.2	99.0	101.7
บิวทิลพาราเบน	98.1	97.6	100.9

4. การวิเคราะห์พาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอาง

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาภายในสภาวะที่เหมาะสมไปวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเบนในตัวอย่างครีม ปริมาณของพาราเบนคำนวณจากกราฟของสารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างของโครมาโทแกรมของตัวอย่างครีมและตัวอย่างครีมที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเบนแสดงดังภาพที่ 5 และปริมาณพาราเบนที่พบในตัวอย่างครีมแสดงในตารางที่ 5 จากตารางที่ 5 เห็นได้ว่าปริมาณร้อยละของพาราเบนผสมในตัวอย่างครีมที่นำมาศึกษาทั้งสี่ชนิดไม่เกินมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างครีม (a) และตัวอย่างครีมที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมพาราเบน ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (b)

ตารางที่ 5 ผลการหาปริมาณของเมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบน (n = 5) ในตัวอย่างครีม 4 ชนิด

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม)				ร้อยละ
	เมทิลพาราเบน	เอทิลพาราเบน	โพรพิลพาราเบน	บิวทิลพาราเบน	ของพาราเบนผสม
1	19.95 ± 0.31	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	30.41 ± 0.51	0.51
2	67.56 ± 0.89	162.15 ± 2.03	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0.23
3	42.50 ± 0.61	ตรวจไม่พบ	81.53 ± 0.97	ตรวจไม่พบ	0.12
4	67.32 ± 0.84	180.33 ± 1.92	45.09 ± 0.76	ตรวจไม่พบ	0.30

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของเมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบนในตัวอย่างเครื่องสำอางโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูงที่มีความยาวเพียง 25 มิลลิเมตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร การชะใช้แบบเกรเดียน และตรวจวัดด้วยไดโอดอาร์เรย์ วิธีที่พัฒนานี้ได้ตรวจสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การวิเคราะห์พาราเบนทั้งสี่ชนิดสามารถทำได้ภายใน 1 นาที วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เนื่องจากทำได้ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น LC-MS/MS

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่สนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Borremans, M., Van-Loco, J., Roos, P., & Goeyens, L. (2004). Validation of HPLC analysis of 2-phenoxyethanol, 1-phenoxypropan-2-ol, methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl 4-hydroxybenzoate (parabens) in cosmetic products, with emphasis on decision limit and detection capability. *Chromatographia*, *59*, 47–53.

Cheng, Y., Wang, C., Chen, Y., & Wu, S. (2012). Large volume sample stacking with EOF and sweeping in CE for determination of common preservatives in cosmetic products by chemometric experimental design. *Electrophoresis*, *33*, 1443–1448.

Cruces-Blanco, C., Segura-Carretero, A., Gálvez-Mata, L., & Fernández-Gutierrez, A. (2001). Simultaneous determination, by capillary zone electrophoresis, of multiple components of different industrial products. *Chromatographia*, *53*, 414– 418.

Darbre, P.D., Aljarrah. A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., & Pope, G.S. (2004). Concentrations of parabens in human breast tumors. *Journal of Applied Toxicology*, *24*, 5-13.

Dobbins, L.L., Usenko, S., Brain, R.A., & Brooks, B.W. (2009). Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using daphnia manga and pimephales promelas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*, 2744-2753.

ICH Harmonised Tripartite Guideline Q28 Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), November 2005.

Gao, W., Gray, N., Heaton, J., Smith, N.W., Jia, Y., Legido-Quigley, C. (2012). UV gradient combined with principal component analysis: Highly sensitive and specific high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams. *Journal Chromatography A*, *1228*, 324–328.

Gao, W., & Legido-Quigley, C. (2011). Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 4307–4311.

Gagliardi, L., de Orsi, D., Manna, L., & Toneli, D. (1997). Simultaneous determination of antioxidants and preservatives in cosmetics and pharmaceutical preparations by reversed phase HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*, *20*, 1797-1808.

Huang, H., Huang, I., & Lin, H.Y. (2006). Separation of parabens in capillary electrochromatography using poly(styrenedivinylbenzene-methacrylic acid) monolithic column. *Journal of Separation Science*, *29*, 2038–2048.

Notification of the Ministry of Health: Preservatives in Cosmetics Retrieved May 11, 2017, from https://www.thaicosmetic.org/documents/moph-announcement-preservative.pdf (in Thai)

Sánchez-Prado, L., Llompart, M., Lamas, J.P., García-Jares, & C., Lores, M. (2011). Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes. *Talanta*, *85*, 370–379.

Rodford, R. (1997). Safety evaluation of preservatives. *International Journal of Cosmetic Science*, *19*, 281-290.

Wang, P.G., & Zhou, W. (2013). Rapid determination of parabens in personal care products by stable isotope gas chromatography-tandem mass spectrometry with dynamic selected reaction monitoring. *Journal of Separation Science*, *36*, 1781–1787.

Youngvises , N., Chaida, T., Khonyoung , S., Kuppithayanant, N., Tiyapongpattana, W., Itharat, A., & Jakmunee, J. (2013). Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens. *Talanta*, *15*, 350–359.

Zgota-Grzeskowiak, A., Werner, J., Jeszka-Skowrona, M., & Czarczynska-Goslinska, B. (2016). Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Methods*, *8*, 3903-3909.

Zhang, Q., Lian, M., Liu, L., & Cui, H. (2005). High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and foods using chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, *537*, 31–39.