



Original Article

# Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for the Quantification of Citral and Formulation of Insect Repellent Cream from Lemongrass Oil

Nguyen Thi Thanh Binh<sup>\*</sup>, Bui Thanh Tung, Nguyen Thi Mai, Nguyen Thi Hue

<sup>1</sup>VNU School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi,  
144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 22 November 2019

Revised 16 January 2020; Accepted 20 March 2020

**Abstract:** Lemongrass oil derived from some species of grass in the family of Poaceae (particularly, *Cymbopogon citratus*) possesses a highly effective insect repellent potential. In Vietnam, this product is widely commercially available but its quality is not strictly controlled. From a formulator's perspective, lemongrass essential oil is not suitable for direct application on the skin because of a high concentration of citral, a major chemical constituent of this oil, which may cause local irritation. In addition, this compound is volatile, resulting in a short repellent effect. Contributing to solve these problems, a high-performance liquid chromatography with diode array detection was developed for the simultaneous quantification of neral and geranial, two geometric isomers of citral. This method was used to examine the quality of some lemongrass oil samples in order to choose material for the preparation of insect repellent cream. This experimental research demonstrates that the stability of the lemongrass oil cream containing 6% of citral was significantly improved when using  $\beta$ -cyclodextrin, a cyclic oligosaccharide capable of protecting substances by capturing them in a blunted-cone shaped structure. The obtained product shows insect repellent effect against the banded sugar ant (*Camponotus consobrinus*). The effect did not change after a six-month storage in conventional conditions.

**Keywords:** Citral, high performance liquid chromatography, quantification, insect repellent cream, lemongrass oil.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: binhnguyen@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4193>



# Xây dựng quy trình định lượng Citral bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép bộ phận phát hiện đa sóng và bào chế kem chống côn trùng từ tinh dầu sả chanh

Nguyễn Thị Thanh Bình\*, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thị Mai, Nguyễn Thị Huệ

*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 22 tháng 11 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 17 tháng 01 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 3 năm 2020

**Tóm tắt:** Tinh dầu sả chanh được chiết xuất từ một số loài thuộc họ Poaceae (đặc biệt là *Cymbopogon citratus*) có tác dụng chống côn trùng rất hiệu quả. Tại Việt Nam, sản phẩm này được bán rộng rãi trên thị trường nhưng chất lượng lại chưa được kiểm soát chặt chẽ. Dưới góc độ của bào chế học, tinh dầu sả chanh không thể sử dụng trực tiếp trên da vì citral, thành phần hóa học chính của nó, có thể gây kích ứng tại chỗ. Hoạt chất này lại dễ bay hơi nên khó duy trì được tác dụng. Chính vì vậy cần đưa tinh dầu sả chanh vào một dạng bào chế thích hợp. Góp phần giải quyết các vấn đề này, nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng đồng thời hai đồng phân hình học của citral là neral và geranial bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép bộ phận phát hiện đa sóng. Phương pháp này đã được ứng dụng để định lượng citral trong một số mẫu tinh dầu sả chanh, từ đó lựa chọn nguyên liệu bào chế kem chứa tương đương 6% citral. Bằng thực nghiệm đã chứng tỏ độ ổn định của sản phẩm được cải thiện đáng kể khi sử dụng  $\beta$ -cyclodextrin, một oligosaccharide dạng vòng có khả năng bảo vệ hoạt chất bằng cách bao chúng trong cấu trúc không gian dạng nón cụt. Thử nghiệm sinh học trên loài kiến *Camponotus consobrinus* cho thấy sản phẩm có tác dụng xua đuổi côn trùng, hiệu quả không thay đổi sau thời gian bảo quản 6 tháng ở điều kiện thường.

**Từ khóa:** Citral, sắc ký lỏng hiệu năng cao, định lượng, kem chống côn trùng, tinh dầu sả chanh.

## 1. Đặt vấn đề

Việt Nam với điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, là môi trường thuận lợi cho nhiều loài côn trùng sinh sống và phát triển, trong đó có không ít loài gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức

khỏe con người. Côn trùng đốt, cắn, giải phóng độc tố và để lại những tổn thương trên cơ thể, gây dị ứng, ngứa ngáy, bỏng rát,... Không chỉ vậy, một số loài còn mang ký sinh trùng, là vật chủ trung gian truyền nhiều bệnh nguy hiểm cho con người, điển hình là muỗi *Aedes* - trung gian

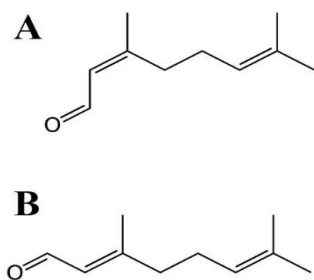
\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: binhnguyen@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4193>

truyền bệnh sốt xuất huyết. Từ thực tế đó, nhu cầu ngăn chặn và tiêu diệt côn trùng là rất lớn và tất yếu. Các sản phẩm chống côn trùng sử dụng trên người hiện nay tuy đa dạng về hình thức và thành phần nhưng chủ yếu được sản xuất từ các hóa chất tổng hợp như DEET, IR3535,... tiềm ẩn độc tính và nguy cơ gây dị ứng [1]. Hầu hết các sản phẩm này đều không phù hợp với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

Trong tự nhiên có nhiều loại tinh dầu cho hiệu quả xua đuổi côn trùng khá tốt như tinh dầu sả chanh, tinh dầu trầm, tinh dầu bạch đàn,... Tinh dầu sả chanh được chiết xuất từ ba loài khác nhau là *Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus*, và *C. pendulus*, có thành phần chính là citral (Hình 1) với hàm lượng từ 65 - 85% gồm hai đồng phân hình học là neral (dạng *cis*) và geranial (dạng *trans*). Hoạt chất này giúp tạo nên mùi đặc trưng và gây ra tác dụng chống côn trùng của sả chanh



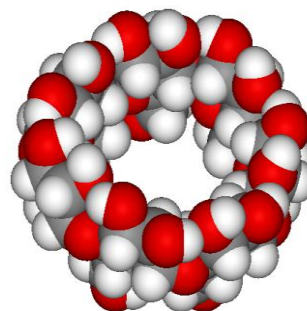
Hình 1. Cấu trúc hóa học hai đồng phân của citral: neral (A) và geranial (B).

Nhiều nghiên cứu về độc tính đã chỉ ra rằng nồng độ citral từ 1-8% không gây kích ứng sau 48 giờ, tuy nhiên, việc sử dụng citral ở nồng độ 8% trong 21 ngày có thể gây ra các kích ứng cận biên [3]. Chính vì vậy, hàm lượng citral trong sản phẩm không nên vượt quá 8%. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu đã cho thấy sản phẩm chứa 7,6% [5] hoặc 8-10% [1] tinh dầu sả chanh cho tác dụng chống côn trùng tốt. Mặc dù trong các công bố này, hàm lượng citral trong sản phẩm bào chế không được xác định cụ thể, nhưng căn cứ vào hàm lượng citral trung bình trong tinh dầu sả chanh có thể xác định được sản phẩm chứa khoảng 6% citral là phù hợp.

Các yếu tố kể trên đã giúp chúng tôi xác định được mục tiêu nghiên cứu là xây dựng quy trình

[2]. Tuy vậy, tinh dầu sả chanh không thích hợp để sử dụng trực tiếp trên da bởi hàm lượng citral cao có thể gây kích ứng tại chỗ [3], mặt khác, citral rất dễ bay hơi nên khó duy trì tác dụng. Trên thị trường hiện nay, tinh dầu sả chanh được bào chế chủ yếu dưới dạng foam và dạng xịt, hàm lượng citral cũng như tác dụng chống côn trùng của các sản phẩm này hiếm khi được chỉ rõ.

Bào chế tinh dầu sả chanh dưới dạng kem, sử dụng  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), một oligosaccharide dạng vòng có khả năng tạo phức với hoạt chất và bao chúng trong cấu trúc không gian dạng nón cụt (Hình 2), có thể là giải pháp giúp cải thiện độ ổn định của sản phẩm.  $\beta$ -CD đã và đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm với vai trò bảo vệ dược chất, gia tăng khả năng hòa tan, dẫn truyền thuốc qua các màng sinh học, che dấu mùi, vị,... [4].



Hình 2. Cấu trúc không gian của  $\beta$ -CD.

định lượng đồng thời hai đồng phân của citral trong tinh dầu sả chanh bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) ghép bộ phận phát hiện đa sóng (DAD), từ đó lựa chọn nguyên liệu để bào chế kem chống côn trùng chứa tương đương 6% citral, sử dụng  $\beta$ -CD để gia tăng độ ổn định của sản phẩm.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Chất chuẩn citral (độ tinh khiết 96%, tỷ lệ neral: geranial là 50: 50), chất chuẩn geraniol (độ tinh khiết 98%), methanol (MeOH), acetonitrile

(ACN) đạt tiêu chuẩn HPLC, kali hydroxit (KOH) tinh khiết phân tích được mua từ nhà sản xuất Merck KGaA, Đức.  $\beta$ -CD (Roquette, Pháp) đạt tiêu chuẩn FDA Hoa Kỳ được tài trợ bởi công ty Brentag Việt Nam. Cetyl alcohol, lanolin, dầu paraffin, stearic acid, glycerin được dụng xuất xứ Trung Quốc. Nước được tinh chế bằng thiết bị Thermo Scientific GenPure UV-TOC đạt điện trở suất 18,2 M  $\Omega$ .m. Các mẫu tinh dầu sả chanh khảo sát có xuất xứ từ Singapore (Caroline - mẫu A) và Việt Nam (Julyhouse - mẫu B; Ngọc Tuyết - mẫu C, NuCare - mẫu D).

## 2.2. Thiết bị

Các thiết bị nghiên cứu chính được sử dụng là hệ thống HPLC Model Ultimate 3000 – Dionex, Thermo Scientific Hoa Kỳ ghép bộ phận phát hiện DAD - 3000 Dionex; sử dụng cột silica gel pha đảo Eclipse XDB – C18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m). Xử lý tín hiệu bằng máy vi tính với hệ điều hành Microsoft Windows 7 trang bị phần mềm điều khiển Chromeleon Dionex phiên bản 7.1.2.1478. Một số thiết bị khác được sử dụng là máy đồng nhất hóa Homogeniser, WiseTis HG-15A; máy đo pH spear, Thermo Scientific Eutech, Singapore.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Định lượng citral

Citral được định lượng bằng phương pháp HPLC-DAD, quy trình phân tích được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH) [6]. Các yếu tố được thẩm định gồm: tính tuyến tính, khoảng định lượng, tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và hiệu suất chiết.

Phương pháp xử lý mẫu định lượng:

- Xác định hàm lượng citral trong tinh dầu sả chanh: Cân chính xác khoảng 0,123 mg tinh dầu cho vào bình định mức 10 ml, thêm ACN đến vạch, siêu âm 1 phút. Pha loãng dung dịch trên trong pha động theo tỷ lệ thích hợp để thu được

dung dịch có nồng độ ước tính nằm trong khoảng định lượng. Lọc dung dịch này qua màng PTFE 0,45  $\mu$ m rồi tiêm vào hệ thống sắc ký.

- Xác định hàm lượng citral trong sản phẩm bào chế: Cân chính xác khoảng 0,25 g sản phẩm cho vào bình định mức 50 ml, thêm pha động đến vạch, siêu âm 10 phút. Pha loãng dịch lọc 5 lần trong cùng dung môi, lọc qua màng PTFE 0,45  $\mu$ m rồi tiêm vào hệ thống sắc ký.

Tất cả các mẫu đều được phân tích 3 lần, lấy giá trị trung bình. Xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

### 2.3.2. Bào chế kem chứa tinh dầu sả chanh

Công thức bào chế cơ bản được tham khảo từ tài liệu [7], tỷ lệ giữa các tá dược tạo kem được điều chỉnh để thu được sản phẩm có thể chất và pH phù hợp. Kem chứa phức hợp tinh dầu sả chanh/ $\beta$ -CD (M1) được bào chế với lượng 20 g theo quy trình sau: hỗn hợp  $\beta$ -CD trong nước cất (tỷ lệ 3: 5) được khuấy với tốc độ 100 vòng/phút và đun nóng ở 55°C trong 10 phút. Thêm từ từ tinh dầu sả chanh vào, để nhiệt độ hỗn hợp giảm dần xuống 25°C. Tiếp tục khuấy với tốc độ 250 vòng/phút trong 4 giờ, thu được phức hợp tinh dầu sả chanh/ $\beta$ -CD. Pha dầu gồm cetyl alcohol, lanolin, acid stearic và dầu paraffin được đun nóng đến khoảng 70°C. Pha nước gồm glycerin, KOH và nước cất được đun nóng đến khoảng 75°C rồi phối hợp vào pha dầu dưới tốc độ khuấy 1500 vòng/phút để tạo nhũ tương dầu trong nước. Khi nhiệt độ hỗn hợp còn khoảng 55°C thì đun nóng phức hợp tinh dầu sả chanh/ $\beta$ -CD đến cùng nhiệt độ rồi thêm vào. Tiếp tục khuấy đến khi nguội về nhiệt độ phòng rồi đồng nhất hóa ở tốc độ 3900 vòng/phút trong thời gian 5 phút.

Mẫu đối chiếu không chứa  $\beta$ -CD (M2) được bào chế theo quy trình tương tự, bỏ qua bước tạo phức hợp tinh dầu sả chanh/ $\beta$ -CD. Các mẫu trắng của M1 và M2 ký hiệu lần lượt là T1 và T2 được bào chế theo quy trình tương tự như mẫu thử, thay tinh dầu sả chanh bằng một lượng nước cất tương đương.

Đánh giá cảm quan và xác định pH của sản phẩm bào chế theo phương pháp được mô tả trong phụ lục 6.2, Dược điển Việt Nam V [8].

2.3.3. Đánh giá độ ổn định của sản phẩm

Sản phẩm bào chế được bảo quản ở điều kiện thường, tránh ánh sáng trực tiếp, theo dõi sự thay đổi của hàm lượng citral và những biến đổi về cảm quan theo thời gian trong vòng 6 tháng.

2.3.4. Đánh giá tác dụng chống côn trùng

Tác dụng chống côn trùng được sơ bộ đánh giá trên loài kiến đường *Camponotus consobrinus* [9]. Cắt đôi một tờ giấy lọc đường kính 9 cm thành hai nửa bằng nhau, một nửa bôi 0,5 ml mẫu thử, nửa còn lại bôi một lượng tương đương mẫu trắng. Dùng băng dính dán vào mặt sau để ghép 2 nửa thành hình tròn ban đầu và đặt vào đĩa petri. Thả 25 cá thể kiến vào khu vực trung tâm, dùng màng nylon trong suốt có đục một số lỗ bằng đầu kim bịt kín miệng đĩa để kiến không chui ra ngoài. Quan sát và đếm tổng số lượng kiến ở mỗi nửa giấy lọc sau mỗi 15 phút trong vòng 6 giờ.

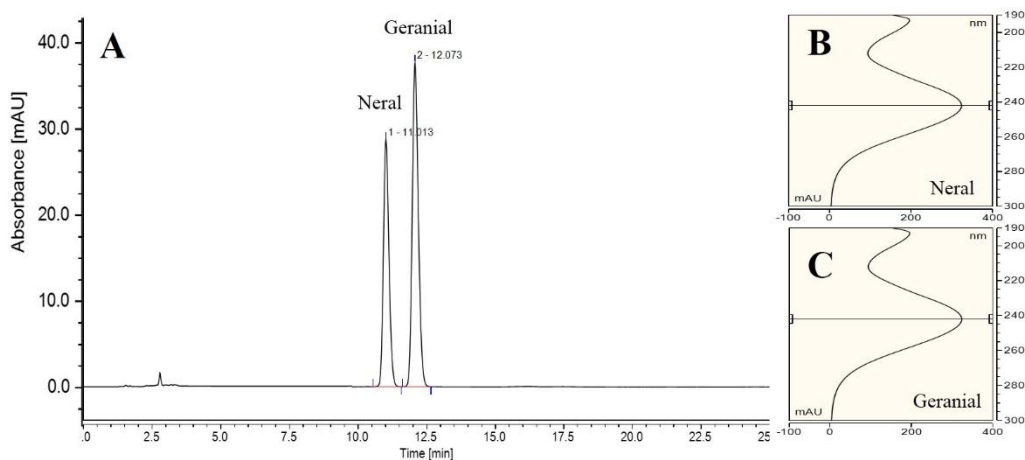
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Xây dựng quy trình định lượng citral bằng HPLC-DAD

3.1.1. Xác định điều kiện sắc ký

Tiến hành sắc ký dung dịch citral chuẩn nồng độ 25 µg/ml trong ACN, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl, thời gian sắc ký 25 phút. Cài đặt bước sóng phát hiện là 233 nm [8] đồng thời quét phổ hấp thụ trong khoảng 190-300 nm để tìm bước sóng hấp thụ cực đại. Khảo sát một số pha động được mô tả trong tài liệu [10, 11] để xác định pha động cho các pic neral và geranial có độ phân tách tốt, cân xứng, tỷ lệ diện tích pic trên nồng độ và chiều cao pic trên nồng độ lớn nhất.

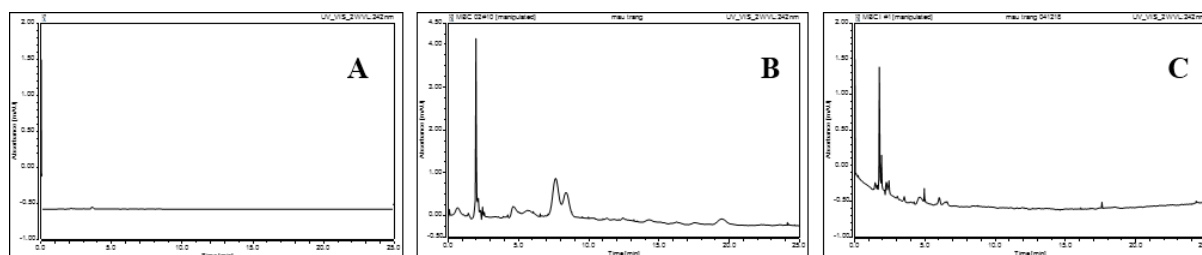
Bằng thực nghiệm đã xác định được hệ pha động tối ưu là hỗn hợp H<sub>2</sub>O: ACN: MeOH với tỷ lệ 43: 47: 10 (tt/tt/tt), bước sóng phát hiện đối với cả 2 đồng phân neral và geranial là 242 nm. Sắc ký đồ và thông số của các pic thể hiện trong Hình 3 và Bảng 1.



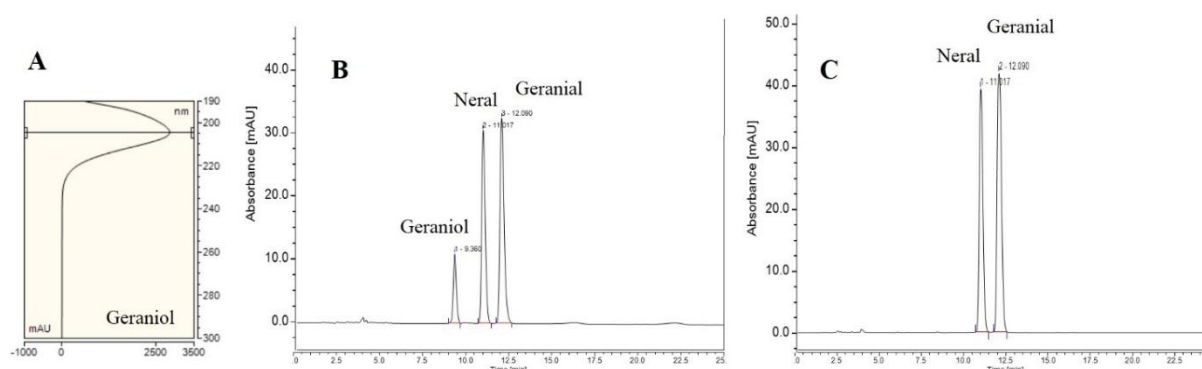
Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch citral chuẩn nồng độ 25 µg/ml tại điều kiện tối ưu (A), phổ hấp thụ của neral (B) và geranial (C).

Bảng 1. Thông số các pic ở điều kiện tối ưu

Tên pic	Thời gian lưu (phút)	Hệ số kéo đuôi	Độ tương xứng phổ hấp thụ	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải
Neral	11,060	1,06	999	14217	2,73
Geranial	12,123	1,1	999	14059	



Hình 4. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (A), mẫu trắng T1 (B) và mẫu trắng T2 (C) tại bước sóng 242 nm.



Hình 5. Phổ hấp thụ của geraniol (A); sắc ký đồ của dung dịch chứa 20  $\mu\text{g/ml}$  citral và 5  $\mu\text{g/ml}$  geraniol tại các bước sóng phát hiện 205 nm (B) và 242 nm (C).

### 3.1.2. Thẩm định tính đặc hiệu

Trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu và của các mẫu trắng T1, T2 ở bước sóng phát hiện 242 nm không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với neral và geranial (Hình 4).

Khả năng phân tách của citral với tạp chất geraniol được xác định như sau: Tiến hành sắc ký dung dịch geraniol 5  $\mu\text{g/ml}$  trong ACN, quét phổ hấp thụ của dung dịch trong khoảng 190-300 nm tìm được bước sóng hấp thụ cực đại là 205 nm (Hình 5A). Sắc ký dung dịch chứa đồng thời 20  $\mu\text{g/ml}$  citral và 5  $\mu\text{g/ml}$  geraniol trong ACN với các bước sóng phát hiện 205 nm (Hình 5B) và 242 nm (Hình 5C).

Kết quả cho thấy tạp chất geraniol không hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 242 nm. Ở 205 nm, geraniol cho pic có thời gian lưu 9,360 phút, tách hoàn toàn khỏi các pic neral và geranial. Độ phân giải giữa pic geraniol và pic neral là 4,78, các pic đều có độ tinh khiết cao.

Các kết quả trên cho phép khẳng định tính đặc hiệu của quy trình phân tích.

### 3.1.3. Thẩm định tính tuyến tính và miền giá trị

Chuẩn bị dung dịch citral có nồng độ 10.000  $\mu\text{g/ml}$  trong ACN. Pha loãng dung dịch này trong dung môi  $\text{H}_2\text{O}$ : ACN: MeOH (43: 47: 10; tt/tt/tt) để thu được dãy 5 dung dịch có nồng độ citral lần lượt là 100, 80, 60, 40, 10  $\mu\text{g/ml}$ . Khi đó nồng độ của neral hay geranial lần lượt là 50, 40, 30, 20, 5  $\mu\text{g/ml}$ . Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, phân tích mối tương quan giữa diện tích pic y (mAu.min) và nồng độ dung dịch ( $\mu\text{g/ml}$ ). Kết quả thu được như sau:

- Phương trình hồi quy đối với đồng phân neral là  $y = 0,3619x - 0,7782$ , bình phương hệ số tuyến tính  $R^2 = 0,9989$  và độ lệch chuẩn  $S = 0,369823$ . Qua trắc nghiệm Fischer, phương trình được chứng minh là tương thích ( $P_{\text{hồi quy}} = 1,56\text{E-}05 < 0,05$ ). Qua trắc nghiệm Student, hệ số a có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P = 1,56\text{E-}05 < 0,05$ ), hệ số b có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P = 0,042565 < 0,05$ ).

- Phương trình hồi quy đối với đồng phân geranial là  $y = 0,5153x - 0,838$ , bình phương hệ số tuyến tính  $R^2 = 0,9996$  và độ lệch chuẩn

$S = 0,420443$ . Qua trắc nghiệm Fischer, phương trình được chứng minh là tương thích ( $P_{\text{hồi quy}} = 2,92E-06 < 0,05$ ). Qua trắc nghiệm Student, hệ số a có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P = 2,92E-06 < 0,05$ ), hệ số b có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P = 0,020517 < 0,05$ ).

Như vậy, trong khoảng nồng độ được khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch. Độ lệch của các giá trị thực nghiệm với giá trị hồi quy nhỏ chứng tỏ khoảng tin cậy của phương trình hồi quy hẹp.

#### 3.1.4. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

LOD và LOQ được xác định bằng phương pháp pha loãng dung dịch chuẩn. LOD là nồng độ thấp nhất cho pic có chiều cao gấp 2-3 lần đường nền ở tất cả 3 lần sắc ký. LOQ là nồng độ cho pic có chiều cao gấp 10 lần đường nền ở tất cả 3 lần sắc ký. Đã xác định được LOD và LOQ của neral lần lượt là 0,10 và 0,33  $\mu\text{g/ml}$ ; LOD và LOQ của geranial lần lượt là 0,30 và 1,00  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 3.1.5. Thẩm định độ đúng

Độ đúng của quy trình được thẩm định bằng cách đánh giá tỷ lệ phục hồi của dãy dung dịch chuẩn trong khoảng tuyến tính đã phân tích. Tỷ lệ phục hồi được tính bằng tỷ lệ phần trăm giữa nồng độ xác định được từ thực nghiệm so với nồng độ dung dịch chuẩn. Kết quả thu được cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng với các

giá trị của độ phục hồi đều nằm trong khoảng  $100 \pm 2\%$ .

#### 3.1.6. Thẩm định độ chính xác

Độ lặp lại: tiến hành phân tích 3 mẫu có nồng độ 100, 60 và 10  $\mu\text{g/ml}$ , mỗi mẫu 3 lần trong cùng một ngày. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) giữa các lần đo đối với neral đều nhỏ hơn 2,34%, đối với geranial đều nhỏ hơn 2,48%.

Độ chính xác trung gian: tiến hành phân tích 3 mẫu có nồng độ 100, 60 và 10  $\mu\text{g/ml}$ , mỗi mẫu 3 lần trong 3 ngày khác nhau. Kết quả cho thấy giá trị RSD đối với neral đều nhỏ hơn 2,85%; đối với geranial đều nhỏ hơn 2,96%.

Như vậy phương pháp đảm bảo độ chính xác theo AOAC [12] với RSD của độ lặp lại và độ chính xác trung gian đối với cả hai đồng phân đều nhỏ hơn 3%.

#### 3.1.7. Hiệu suất chiết

Hiệu suất chiết được xác định dựa trên đáp ứng của mẫu thử tự tạo chứa 6% citral được tạo thành từ 0,0150 g citral chuẩn và 0,2350 g mẫu trắng (T1 hoặc T2). Xử lý mẫu này theo quy trình dùng để “Xác định hàm lượng citral trong sản phẩm bào chế” được mô tả trong mục 2.3.1. thu được dung dịch có nồng độ citral lý thuyết là 60  $\mu\text{g/ml}$  rồi tiêm vào hệ thống sắc ký. Kết quả thu được (Bảng 2) cho thấy hiệu suất chiết của phương pháp đối với cả hai trường hợp sử dụng và không sử dụng  $\beta$ -CD đều xấp xỉ 100%.

Bảng 2. Hiệu suất chiết của phương pháp

Mẫu	AUC (mAu*min)		Nồng độ citral ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hiệu suất chiết (%)
	Neral	Geranial		
Có $\beta$ -CD	9,7246	15,1274	60,0041	100,01
Không có $\beta$ -CD	9,7160	15,1123	59,9360	99,89

### 3.2. Bào chế kem chống côn trùng từ tinh dầu sả chanh

Áp dụng quy trình đã được thẩm định ở trên để xác định hàm lượng citral trong bốn mẫu tinh dầu sả chanh A-D. Kết quả thực nghiệm trình bày trong Bảng 3 cho thấy mẫu D có hàm lượng

citral toàn phần cao nhất, đạt 79,98%. Mẫu này được chọn làm nguyên liệu cho các nghiên cứu bào chế tiếp theo.

Tiến hành bào chế kem chứa phức hợp tinh dầu sả chanh/ $\beta$ -CD (M1), mẫu trắng của M1 (T1), mẫu đối chiếu chứa tinh dầu sả chanh, không chứa  $\beta$ -CD (M2) và mẫu trắng của M2

(T2) theo phương pháp được mô tả ở mục 2.3.2. Để đạt hàm lượng citral 6%, lượng tinh dầu sả chanh sử dụng trong công thức bào chế 20 g kem

là 1,5 g (7,5%). Công thức bào chế của các mẫu M1 và M2 được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 3. Hàm lượng citral trong một số mẫu tinh dầu sả chanh

Mẫu	Geranial (%)	Neral (%)	Citral (%)
A	24,85	21,54	46,39
B	37,35	35,96	73,31
C	37,56	37,38	74,94
D	40,06	39,92	79,98

Bảng 4. Công thức bào chế 20 g kem M1 và M2

STT	Tên thành phần	M1		M2	
		Tỷ lệ (%)	Khối lượng (g)	Tỷ lệ (%)	Khối lượng (g)
1	Tinh dầu sả chanh	7,5	1,5	7,5	1,5
2	$\beta$ -CD	15	3	0	0
3	Cetyl alcohol	0,9	0,18	1,8	0,36
4	Lanolin	0,45	0,09	0,9	0,18
5	Acid stearic	6,75	1,35	13,5	2,7
6	Dầu paraffin	0,9	0,18	1,8	0,36
7	Glycerin	4,5	0,9 g	9	1,8
8	KOH	0,05	0,01	0,2	0,04
9	Nước cất	vđ 100	vđ 20	vđ 100	vđ 20

Các mẫu kem thu được đều có thể chất mềm, mịn, tạo một lớp mỏng khi thoa lên da, có mùi thơm nhẹ của tinh dầu sả chanh. Mẫu M1 sử dụng  $\beta$ -CD có màu trắng đục, pH = 6,9, hàm lượng citral là 6,05%. Mẫu M2 không sử dụng  $\beta$ -CD có màu trắng ngà, pH = 6,7, hàm lượng citral là 6,09%.

### 3.3. Theo dõi độ ổn định của sản phẩm

Trong 6 tháng bảo quản ở điều kiện thường, không ghi nhận bất kỳ sự thay đổi nào về thể chất ở mẫu kem M1 chứa  $\beta$ -CD. Trong khi đó thể chất của mẫu M2 không sử dụng  $\beta$ -CD trở nên đặc hơn đồng thời ngả dần sang màu vàng.

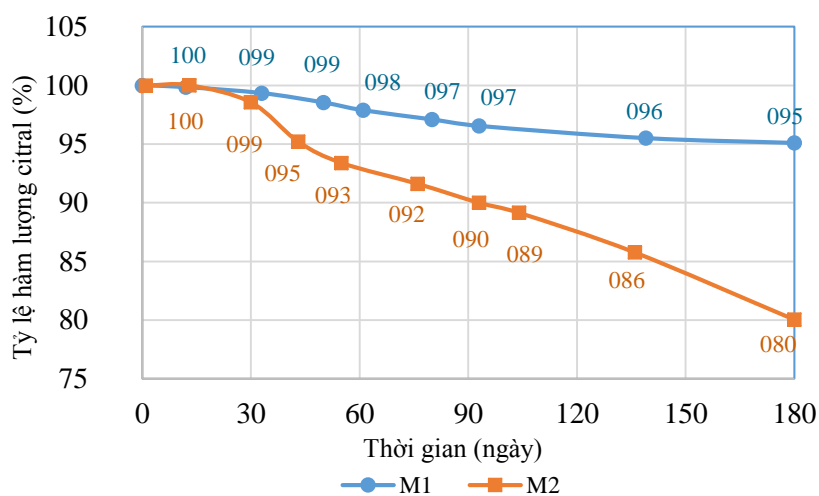
Hàm lượng citral ở cả hai mẫu đều giảm dần theo thời gian (Hình 5), tuy nhiên tốc độ giảm ở mẫu M1 diễn ra chậm hơn. Sau 6 tháng, mẫu M1 giữ được 95% hàm lượng citral so với ban đầu, trong khi đó mẫu M2 chỉ còn khoảng 80%. Điều

này đã chứng tỏ việc sử dụng  $\beta$ -CD làm gia tăng đáng kể độ ổn định của sản phẩm.

### 3.4. Đánh giá khả năng chống côn trùng của sản phẩm

Tiến hành đánh giá sơ bộ khả năng chống côn trùng của sản phẩm bào chế theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.3. Kết quả thu được cho thấy các mẫu kem chứa tinh dầu sả chanh M1 và M2 đều có tác dụng xua đuổi rõ rệt đối với loài kiến *Camponotus consobrinus*. Khi được thả vào khu vực trung tâm của đĩa petri, toàn bộ kiến đều di chuyển về vùng giấy lọc được bôi mẫu trắng. Trong suốt thời gian thử nghiệm, không có cá thể nào di chuyển đến vùng được bôi kem chứa tinh dầu sả chanh. Hiệu quả chống kiến vẫn đảm bảo sau thời gian bảo quản 6 tháng, chưa ghi nhận sự khác biệt giữa hai mẫu kem có sử dụng và không sử dụng  $\beta$ -CD.





Hình 5. Tỷ lệ phần trăm citral trong các mẫu kem theo thời gian so với hàm lượng ban đầu.

#### 4. Bàn luận

Tinh dầu sả chanh và các sản phẩm chống côn trùng từ loại tinh dầu này rất phổ biến trên thị trường, tuy vậy chất lượng của chúng lại chưa được kiểm soát một cách chặt chẽ. Góp phần giải quyết vấn đề đó, chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng citral, hoạt chất chính của tinh dầu sả chanh bằng phương pháp HPLC – DAD. So với một số phương pháp đã được công bố như đo phổ cận hồng ngoại [13], đo màu [14],... phương pháp được xây dựng có nhiều ưu điểm như độ chính xác, độ nhạy, tính đặc hiệu cao, có khả năng kiểm tra độ tinh khiết của pic. Trong điều kiện phân tích, neral và geranial có độ phân tách tốt, từ đó cho phép định lượng đồng thời cả hai đồng phân này. Áp dụng quy trình được thẩm định, chúng tôi đã xác định được hàm lượng citral trong bốn mẫu tinh dầu sả chanh, từ đó lựa chọn được nguyên liệu cho nghiên cứu bào chế.

Trong quá trình bào chế, để đảm bảo hiệu quả tạo phức, tỷ lệ mol  $\beta$ -CD: citral khởi đầu nên là 1:1. Tuy nhiên việc sử dụng một lượng lớn chất rắn khiến cho thể chất sản phẩm trở nên quá đặc. Để phù hợp với dạng bào chế, chúng tôi đã sử dụng tỷ lệ mol  $\beta$ -CD: citral là 1:3. Thực nghiệm đã chứng tỏ tỷ lệ này đủ để duy trì thể chất kem và 95% hàm lượng citral sau 6 tháng. Có thể giải thích khả năng cải thiện độ ổn định của sản phẩm là do  $\beta$ -CD bao bọc các phân tử citral và các phân tử nước trong cấu trúc không

gian hình nón cụt của mình, làm giảm sự bay hơi của các chất này, từ đó giảm thất thoát hoạt chất và giữ vững thể chất của kem. Hoạt tính chống côn trùng của các sản phẩm bào chế đã được chứng minh trên loài kiến *Camponotus consobrinus*. Trong các thử nghiệm sinh học được tiến hành chưa thấy  $\beta$ -CD ảnh hưởng đến tác dụng chống côn trùng của sản phẩm.

#### 5. Kết luận

Như vậy nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng đồng thời 2 đồng phân neral và geranial của citral trong tinh dầu sả chanh và trong sản phẩm bào chế theo hướng dẫn của ICH. Trong khoảng nồng độ 5-50  $\mu$ g/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ chất khảo sát. Phương pháp đảm bảo độ đúng, độ chính xác, tính đặc hiệu, đồng thời có hiệu suất chiết cao và ổn định. Phương pháp được thẩm định là cơ sở quan trọng cho việc tiêu chuẩn hóa nguyên liệu và kiểm soát chất lượng sản phẩm bào chế. Bằng thực nghiệm đã chứng tỏ sử dụng  $\beta$ -CD là một giải pháp hiệu quả nhằm làm gia tăng độ ổn định của sản phẩm. Sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thường, sản phẩm vẫn giữ được 95% lượng hoạt chất so với ban đầu đồng thời không có sự thay đổi nào về thể chất. Thử nghiệm sinh học bước đầu cho thấy kem từ tinh dầu sả chanh chứa tương đương 6% citral có

tác dụng chống côn trùng. Từ các kết quả khả quan đó, sản phẩm bào chế sẽ tiếp tục được theo dõi độ ổn định trong thời gian dài hơn và đánh giá tác dụng trên các loài côn trùng khác.

### Tài liệu tham khảo

- [1] H.O. Lawal, G.O. Adewuyi, A.B. Fawehinmi, A.O. Adeogun, S.O. Etatuvie, Bioassay of herbal mosquito repellent formulated from the essential oil of plants, *Journal of Natural Products* 5 (2012) 109-115.  
[http://journalofnaturalproducts.com/Volume5/15\\_Res\\_paper-14.pdf](http://journalofnaturalproducts.com/Volume5/15_Res_paper-14.pdf).
- [2] New York State Integrated Pest Management Program, Lemongrass oil profile active ingredient eligible for minimum risk pesticide use. <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/56130/lemongrass-oil-MRP-NYSIPM.pdf>, 2019 (accessed 5 November 2019).
- [3] Organisation for Economic Co-operation and Development, Citral CAS N<sup>o</sup>:5392-40-5. <https://hpvchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=0ea83202-3f4f-4355-be4f-27ff02e19cb9>, 2001 (accessed 5 November 2019).
- [4] R. Arun, K.C.K. Ashok, V.V.N.S.S. Sravanthi, Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review, *Scientia Pharmaceutica* 76 (2008) 567-598. <http://dx.doi.org/10.3797/scipharm.0808-05>.
- [5] O.I. Adeniran, E. Fabiyi, A cream formulation of an effective mosquito repellent: a topical product from lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) Stapf, *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2 (2012) 322-327.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/13bf/993de8f77462335ebc07365adb38e56e706f.pdf>.
- [6] P. Borman, D. Elder, Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, in: A. Teasdale, D. Elder, R.W. Nims (Eds), *ICH quality guidelines: an implementation guide*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2018, pp. 127-166.
- [7] S. Agrawal, N. Haldankar, A. Jadhav, Formulation of natural mosquito repellent, *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology* 4 (2018) 11-17.  
<https://www.ijariit.com/manuscripts/v4i1/V4I1-1143.pdf>.
- [8] Vietnamese pharmacopoeia commission, Vietnamese pharmacopoeia V part 2, Medical Publishing House Co., Ltd, Ha Noi, 2018 (in Vietnamese).
- [9] M.A.B. Edris, A.S.Y. Mamat, M.S. Aslam, M.S. Ahmad, Insect repellent properties of *Melaleuca alternifolia*, *Recent Advances in Biology and Medicine* 2 (2016) 57-61.  
<http://dx.doi.org/10.18639/RABM.2016.02.293742>.
- [10] R. Gaonkara, S. Yallappab, B.L. Dhananjayac, G. Hegde, Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography for citral analysis from essential oils, *Journal of Chromatography B*. 1036 (2016) 50-56.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.001>.
- [11] D. Miron, F. Battisti, C.S.T. Caten, P. Mayorga, E.E.S. Schapoval, Spectrophotometric simultaneous determination of citral isomers in cyclodextrin complexes with partial least squares supported approach, *Current Pharmaceutical Analysis* 8 (2012) 401-408.  
<http://dx.doi.org/10.2174/157341212803341735>.
- [12] L. Huber, Validation and qualification in analytical laboratories, Informa Healthcare USA Inc., New York, 2007.
- [13] N.D. Wilson, M.S. Ivanova, R.A. Watt, A.C. Moffat, The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54 (2002) 1257-1263.  
<http://dx.doi.org/10.1211/002235702320402107>.
- [14] N. Dudai, O. Larkov, E. Lewinsohn, Simple colorimetric measurement of citral in lemon scented essential oils using Schiff's reagent, *Future for Medicinal and Aromatic Plants*, 26 (2004) 499-504.  
<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.629.64>.