

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời camphor, menthol, eucalyptol trên chế phẩm viên nang mềm bằng GC-FID

Lê Nguyễn Ngọc Hân¹, Ngô Thị Minh Tâm², Bùi Tùng Hiệp¹, Nguyễn Thu Ánh^{2*}

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Viên nang mềm chứa camphor, menthol và eucalyptol được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh hô hấp. Tuy nhiên, các phương pháp định tính và định lượng đồng thời ba hoạt chất này còn hạn chế. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng, thẩm định được phương pháp định lượng đồng thời camphor, menthol và eucalyptol trong viên nang mềm bằng sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC - FID). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu được khảo sát trên hệ thống GC Agilent 6890N với đầu dò FID. Các thông số sắc ký được tối ưu nhằm đạt sự phân tách rõ ràng và thời gian hợp lý. **Kết quả:** Phương pháp cho thấy sự tách đỉnh sắc ký rõ ràng với thời gian lưu eucalyptol, camphor và menthol lần lượt là 8.78; 13.32 và 14.35 phút. Tổng thời gian phân tích khoảng 20 phút. RSD của thời gian lưu và diện tích đỉnh sắc ký < 1.0. Đường chuẩn tuyến tính với $R^2 \geq 0.999$. Giới hạn phát hiện (LOD) lần lượt là 0.74 mg/g; 1.37 mg/g; 0.62 mg/g, giới hạn định lượng (LOQ) là 2.5 mg/mg cho ba hoạt chất. Độ đúng đạt tỷ lệ thu hồi 95-105%, độ chính xác lặp lại và độ chính xác trung gian đều có %RSD < 2%. **Kết luận:** Phương pháp đã được áp dụng thành công trên chế phẩm viên nang mềm lưu hành, chứng minh tính khả thi và độ tin cậy trong kiểm nghiệm chất lượng.

Từ khóa: camphor, định lượng, eucalyptol, menthol

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tinh dầu đã phát triển song hành với nền văn minh nhân loại, từ việc sử dụng các loại cây cỏ thơm trong nghi lễ tôn giáo ở thời cổ đại đến ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp hiện đại như mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm [1]. Trong đại dịch COVID-19, tinh dầu càng được chú ý nhờ đặc tính kháng virus, kháng khuẩn và kháng viêm, góp phần hỗ trợ phòng và điều trị bệnh đường hô hấp. Các chế phẩm chứa tinh dầu, đặc biệt là viên nang mềm có thành phần camphor, menthol và eucalyptol, được sử dụng phổ biến trong điều trị cảm cúm, nghẹt mũi, viêm xoang, mang lại hiệu quả nhanh và tiện lợi cho người dùng. Tuy nhiên, do đặc tính dễ bay hơi, nhạy cảm với nhiệt và ánh sáng, các hoạt chất này có thể biến đổi trong quá trình sản xuất và bảo quản, ảnh hưởng đến chất lượng và độ ổn định của chế phẩm. Vì vậy, việc xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích có độ chính xác, độ lặp lại và tính

đặc hiệu cao để kiểm soát hàm lượng các hoạt chất này là hết sức cần thiết [2, 3]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng phương pháp sắc ký khí (GC) trong phân tích các thành phần tinh dầu [4, 5], tuy nhiên đa phần chỉ tập trung vào một hoặc hai hợp chất riêng lẻ, chưa có phương pháp đồng thời định lượng camphor, menthol và eucalyptol trong cùng một quy trình. Do đó, việc xây dựng một phương pháp GC-FID có khả năng định lượng đồng thời các hoạt chất một cách nhanh chóng, chính xác và có thể áp dụng trong kiểm nghiệm thường quy là hướng tiếp cận mang tính thực tiễn cao. Đề tài “Xây dựng quy trình định lượng đồng thời camphor, menthol, eucalyptol trong chế phẩm viên nang mềm bằng GC-FID” được thực hiện nhằm đáp ứng yêu cầu này, góp phần nâng cao hiệu quả kiểm nghiệm, kiểm soát chất lượng và chuẩn hóa quy trình phân tích các chế phẩm tinh dầu.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thu Ánh

Email: nguyenthuanh.ds09@gmail.com

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất chuẩn, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Chất chuẩn

Các chất chuẩn bao gồm camphor (SKS: C0220326.02, hàm lượng 96.5%), menthol (SKS: C0221325, hàm lượng 98.8%) và eucalyptol (SKS: QT2540523, hàm lượng 99.5%), được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương. Chất chuẩn nội là anisol (SKS: S6049852, hàm lượng 100%, nguồn gốc: Merck).

2.1.2. Dung môi

Dung môi sử dụng là n-hexan (97%, VWR Chemicals, lô: 220331A003).

2.1.3. Thiết bị, dụng cụ

Phân tích được thực hiện trên hệ thống GC Agilent 6890N trang bị đầu dò FID, cột mao quản DB-5 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m, J&W Scientific). Khí mang sử dụng là heli; thể tích tiêm mẫu 2 μ L; nhiệt độ đầu tiêm 200°C; nhiệt độ đầu dò 200°C.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên hai loại mẫu: Mẫu giả lập và mẫu placebo. Cả hai được thiết kế dựa trên công thức tham khảo của các chế phẩm thương mại viên nang xông EUCA - OPC và viên nang mềm EUGICA. Mẫu giả lập được chuẩn bị theo công thức mô phỏng chế phẩm viên nang mềm chứa tinh dầu đang lưu hành trên thị trường, với thành phần 10 g gồm: Camphor 0.6 g; menthol 0.6 g; eucalyptol 0.6 g; tinh dầu tần 0.5 g và dầu đậu nành vừa đủ 10 g. Mẫu placebo được pha tương tự nhưng không chứa các hoạt chất chính.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn nội được chuẩn bị bằng cách hòa tan 2 mL anisol trong 50 mL n-hexan, sau đó pha loãng tiếp 2 mL dung dịch này thành 50 mL bằng n-hexan. Dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (1 mg/mL) được pha từ hỗn hợp camphor, menthol và eucalyptol trong n-hexan, sau đó được siêu âm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C) với tần số 40 kHz và công suất khoảng 100 W để hòa tan hoàn toàn. Dung dịch chuẩn làm việc (0.025 mg/mL) được pha loãng từ dung dịch gốc bằng n-hexan, có bổ sung 2.5 mL dung dịch chuẩn nội trong 100 mL dung dịch. Mẫu thử được chuẩn bị

bằng cách cân chính xác 400 mg mẫu giả lập, thêm n-hexan đến 100 mL, siêu âm 15 phút ở 25°C (40 kHz, 100 W) để hòa tan hoàn toàn, sau đó lọc qua màng lọc 0.45 μ m trước khi tiêm vào hệ thống. Mẫu placebo và mẫu dung môi được xử lý tương tự nhưng không thêm dung dịch chuẩn nội.

Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Để lựa chọn điều kiện tối ưu cho quá trình phân tích, các thông số sắc ký được khảo sát bao gồm lưu lượng khí mang và chương trình nhiệt độ cột. Khí mang sử dụng là heli, với ba mức lưu lượng được khảo sát lần lượt là 0.5 mL/phút, 1.0 mL/phút và 1.5 mL/phút. Chương trình nhiệt được khảo sát theo ba mức nhiệt độ ban đầu (50°C, 60°C và 70°C) kết hợp với ba tốc độ tăng nhiệt (3°C/phút, 5°C/phút và 10°C/phút).

Xây dựng quy trình phân tích

Quy trình phân tích được xây dựng dựa trên các điều kiện sắc ký tối ưu đã khảo sát. Mẫu dung môi, mẫu nội chuẩn, dãy dung dịch chuẩn và mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình mô tả tại mục chuẩn bị mẫu. Các dung dịch được tiêm lần lượt vào hệ thống GC-FID để xây dựng đường chuẩn tuyến tính và xác định hàm lượng hoạt chất trong mẫu thử.

Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn ICH Q2(R1) về tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ đúng và độ chính xác. Tính phù hợp hệ thống được đánh giá bằng 6 lần tiêm liên tiếp dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 0.025 mg/mL, tính %RSD của thời gian lưu và tỷ số diện tích đỉnh sắc ký, với yêu cầu lần lượt là < 1% và < 2%. Tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách so sánh thời gian lưu trong sắc ký đồ của mẫu dung môi, mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu thử giả lập. Phương pháp đạt yêu cầu khi các đỉnh tương ứng trong dung dịch chuẩn và mẫu dung môi, mẫu placebo không xuất hiện đỉnh tại các vị trí này. Khoảng tuyến tính được thiết lập với 6 mức nồng độ trong khoảng 0.001 - 0.05 mg/mL. Đường hồi quy giữa nồng độ hoạt chất và tỷ lệ đáp ứng hoạt chất/nội chuẩn phải có hệ số tương quan (R^2) $\geq$ 0.99. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định theo phương pháp thống kê dựa trên hướng dẫn của

ICH, sử dụng công thức: $LOD = 3.3\sigma/S$; $LOQ = 10\sigma/S$, trong đó, σ là độ lệch chuẩn của tín hiệu và S là độ dốc của đường hồi quy tuyến tính giữa nồng độ hoạt chất và tỷ lệ đáp ứng hoạt chất/nội chuẩn. Để kiểm chứng giá trị LOD, 10 mẫu thử riêng biệt chứa eucalyptol, camphor và menthol ở nồng độ tương ứng với giá trị LOD ước tính được chuẩn bị và phân tích bằng phương pháp sắc ký. Phương pháp được xem là đạt yêu cầu khi có ít nhất 8 trong 10 mẫu cho tín hiệu phát hiện được của cả ba hoạt chất. Giá trị LOQ được xác định tương tự, dựa trên đường chuẩn tại vùng nồng độ gần giá trị LOQ ước tính. 7 mẫu thử độc lập được chuẩn bị tại nồng độ LOQ, tiến hành phân tích sắc ký và tính hàm lượng các hoạt chất thu được. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD, %) của hàm lượng eucalyptol, camphor và menthol từ 7 lần tiêm phải nằm trong giới hạn chấp nhận theo tiêu chí thẩm định phương pháp. Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua thử nghiệm thu hồi chuẩn tại ba mức nồng độ: LOQ, $1.5 \times LOQ$ và $2 \times LOQ$. Ở mỗi mức nồng độ, bảy mẫu thử độc lập (mẫu placebo thêm chuẩn) được chuẩn bị và phân tích bằng phương pháp sắc ký đã thiết lập. Giá trị phần trăm thu hồi được tính toán cho từng mẫu, và độ thu hồi trung bình của các hoạt chất nằm trong khoảng 95 - 105%, đáp ứng tiêu chí chấp nhận về độ đúng theo hướng dẫn ICH. Độ chính xác (repeatability) được đánh giá bằng cách chuẩn bị sáu mẫu thử độc lập chứa camphor, menthol và eucalyptol (tỷ

lệ 1:1:1) ở nồng độ 0.024 mg/mL, tương ứng 60 mg/g mẫu. Sáu mẫu được phân tích bằng phương pháp sắc ký đã thiết lập, ghi nhận diện tích đỉnh và tính toán hàm lượng của từng hoạt chất. Độ chính xác trung gian (intermediate precision) được xác định tương tự, do kiểm nghiệm viên khác thực hiện trong cùng điều kiện phân tích. Kết quả định lượng của sáu mẫu ở cả hai kiểm nghiệm viên cho giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD, %) $\leq 2.0\%$, đáp ứng tiêu chí chấp nhận theo hướng dẫn ICH [6 - 8].

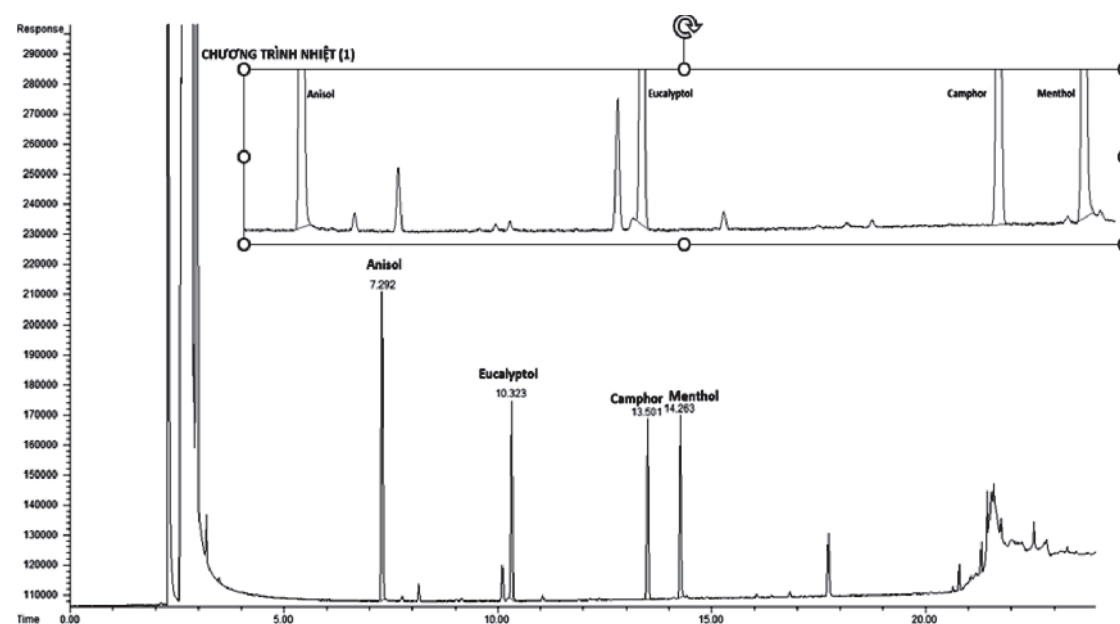
2.2.3. Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel. Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD), đồng thời xác định độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) để đánh giá độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp. Các kết quả được xem là chấp nhận được khi %RSD $\leq 2.0\%$ theo hướng dẫn của ICH Q2(R1).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

Xây dựng chương trình nhiệt độ với bước đầu tiên là thử nghiệm chương trình nhiệt độ tuyến tính đơn giản: Bắt đầu từ 50°C, kết thúc ở 200°C (thời gian giữ 3 phút) với độ tăng nhiệt độ 5°C/phút. Kết quả sắc ký cho thấy đỉnh sắc ký eucalyptol chưa tách hoàn toàn với đỉnh sắc ký phía trước và đỉnh sắc ký menthol vẫn còn bị dính chân (Thời gian phân tích: 24 phút).



Hình 1. Kết quả sắc ký của chương trình nhiệt (1)

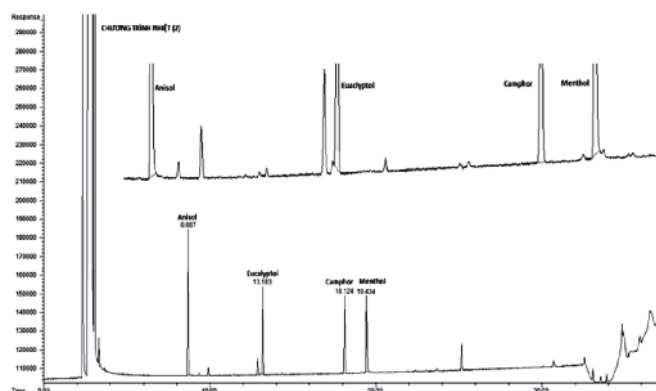
Tiến hành điều chỉnh tốc độ dòng (0.5 mL/phút và 1.5 mL/phút) nhưng kết quả tách vẫn chưa tốt. Ở tốc độ dòng 0.5 mL/phút đỉnh sắc ký eucalyptol vẫn chưa tách hoàn toàn khỏi đỉnh sắc ký liền trước. Ở mức tốc độ dòng 1.5 mL/phút đỉnh sắc ký eucalyptol vẫn chưa tách ra hoàn toàn.

Tiến hành thiết kế lại chu trình nhiệt (1) bằng cách giảm độ tăng nhiệt độ từ 5°C/phút xuống 3°C/phút.

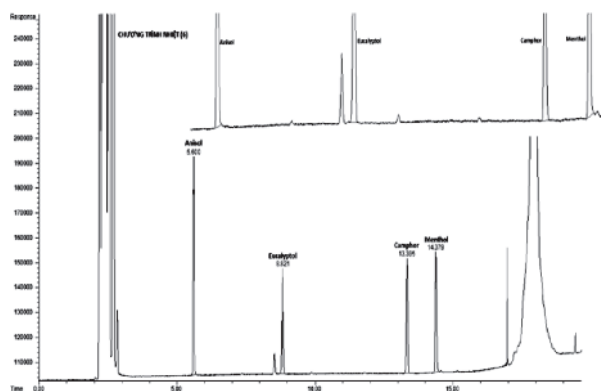
Kết quả tăng thời gian phân tích nhưng sự tách đỉnh sắc ký eucalyptol và menthol vẫn chưa được cải thiện. Để cải thiện thời gian phân tích và cải thiện việc tách đỉnh sắc ký sắc ký tiến hành khảo sát 2 mức nhiệt độ bắt đầu là 60°C và 70°C. Kết quả có cải thiện thời gian phân tích nhưng sự tách đỉnh sắc ký eucalyptol và đỉnh sắc ký menthol vẫn chưa tốt. Sự điều chỉnh chương trình nhiệt (1) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình nhiệt (2), (3), (4)

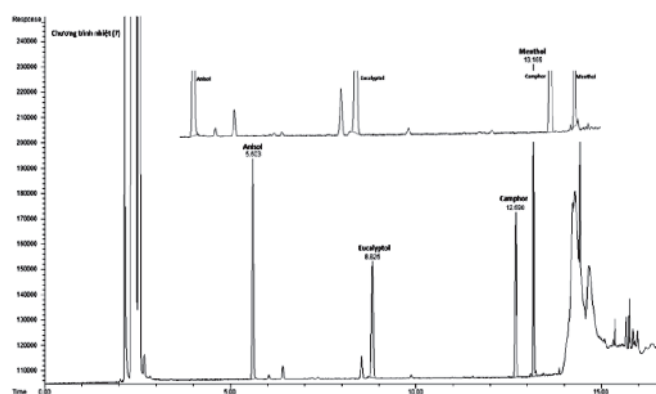
Chương trình nhiệt	Độ tăng nhiệt độ (°C/phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian giữ (phút)
Chương trình nhiệt (2)		50	0
	3	150	0
	50	200	3
Chương trình nhiệt (3)		60	0
	3	150	0
	50	200	3
Chương trình nhiệt (4)		70	0
	3	150	0
	50	200	3



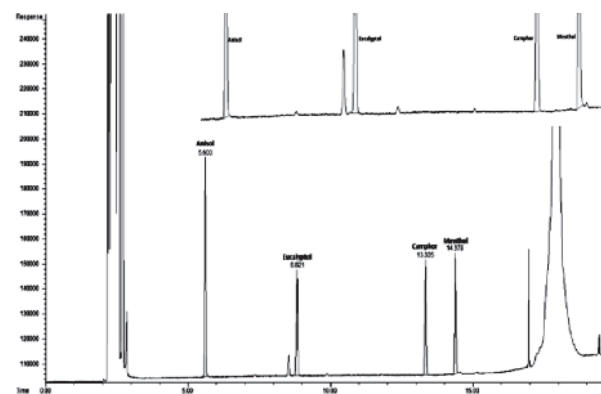
(A)



(B)



(C)



(D)

Hình 2. (A) chương trình nhiệt 2, (B) chương trình nhiệt 3, (C) chương trình nhiệt 4, (D) chương trình nhiệt được chọn

Tiến hành chia nhỏ chương trình nhiệt thành nhiều đoạn nhiệt độ để cải thiện độ phân giải giữa các chất cũng như thời gian phân tích. Thay vì sử dụng chương trình nhiệt: Bắt đầu ở 70°C, kết thúc ở 200°C, xây dựng chương trình nhiệt với các mốc nhiệt độ 70°C, 90°C, 120°C, 200°C được tính toán từ thời gian rửa giải của anisol, camphor, menthol, eucalyptol ở chương trình nhiệt tuyến tính đơn giản. Ở mỗi vùng nhiệt độ, có thể thiết lập các mức tăng nhiệt độ khác nhau để tối ưu

được độ phân giải cũng như thời gian phân tích. Chương trình nhiệt cuối cùng vừa thỏa mãn tách hoàn toàn các đỉnh sắc ký hoạt chất với thời gian phân tích lý tưởng (20 phút) với các thông số: Nhiệt độ bắt đầu ở mức 70°C, tăng đến 90°C (giữ 3 phút) với tốc độ dòng 3°C/phút, tiếp tục tăng đến 120°C với tốc độ dòng 5°C/phút và kết thúc ở 200°C (giữ 3 phút). Hình 2 mô tả kết quả sắc ký của chương trình nhiệt (2), (3), (4) và chương trình nhiệt được chọn.

3.2. Kết quả thẩm định

3.2.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng 2. Kết quả của tính phù hợp hệ thống

Lần tiêm		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
E	S	1,587,799	1,582,006	1,584,361	1,588,969	1,566,685	1,578,180	1,581,333	0.01
	t _R	8.828	8.828	8.830	8.830	8.831	8.830	8.83	0.01
C	S	1,539,860	1,532,769	1,532,686	1,535,422	1,515,936	1,525,073	1,530,291	0.01
	t _R	13.342	13.341	13.343	13.344	13.345	13.344	13.34	0.01
M	S	1,559,221	1,550,891	1,555,585	1,562,515	1,536,967	1,539,092	1,550,712	0.01
	t _R	14.385	14.384	14.387	14.387	14.388	14.387	14.39	0.01
A	S	2,278,841	2,275,307	2,280,398	2,285,627	2,266,505	2,273,964	2,276,774	0.003
	t _R	5.604	5.604	5.605	5.605	5.606	5.606	5.61	0.02
E/A		0.697	0.695	0.695	0.695	0.691	0.694	0.695	0.27
C/A		0.676	0.674	0.672	0.672	0.669	0.671	0.672	0.35
M/A		0.684	0.682	0.682	0.684	0.678	0.677	0.681	0.44

Ghi chú: C: Camphor; M: Menthol; E: Eucalyptol; A: Anisol; E/A: Tỷ số diện tích đỉnh sắc ký eucalyptol/anisol; C/A: Tỷ số diện tích đỉnh sắc ký camphor/anisol; M/A: Tỷ số diện tích đỉnh sắc ký menthol/anisol; S: Diện tích đỉnh sắc ký; t_R: Thời gian lưu

Giá trị RSD (%) của tỉ số diện tích đỉnh sắc ký eucalyptol/anisol, camphor/anisol, menthol/anisol đều < 2%, và RSD (%) của thời gian lưu các chất chuẩn đều < 1%. Theo yêu cầu của tiêu chuẩn kiểm nghiệm viên nang mềm chứa tinh dầu (Dược điển Việt Nam V, Phụ lục 6.2 và 5.10), các chỉ tiêu này phải nằm trong giới hạn RSD ≤ 2% để đảm bảo độ lặp lại và độ ổn định của hệ thống. Kết quả thu được đáp ứng tốt tiêu chí này, chứng tỏ hệ thống sắc ký có độ phù hợp cao và thích hợp để tiến hành định lượng camphor, menthol và eucalyptol trong chế phẩm viên nang mềm.

3.2.2. Tính đặc hiệu

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy các đỉnh sắc ký của

eucalyptol, camphor và menthol được tách biệt rõ ràng, không xuất hiện đỉnh nhiễu tại các thời gian lưu tương ứng trong mẫu dung môi và mẫu placebo. Thời gian lưu trung bình của các chất chuẩn eucalyptol, camphor và menthol lần lượt là khoảng 8.8; 13.3 và 14.4 phút, trong khi nội chuẩn anisol có thời gian lưu khoảng 5.6 phút. Các mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu thử đều cho các đỉnh sắc ký có thời gian lưu tương ứng với các đỉnh của chất chuẩn, chứng tỏ không có sự can nhiễu giữa các hoạt chất và nội chuẩn. Sự trùng khớp về thời gian lưu giữa mẫu thử và mẫu chuẩn cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu tốt, bảo đảm khả năng nhận dạng chính xác từng hoạt chất trong nền mẫu phức tạp.

Bảng 3. Thời gian lưu ghi nhận được trên các sắc ký đồ

Thời gian lưu trung bình (phút)	Anisol	Eucalytol	Camphor	Menthol
Dung môi	-	-	-	-

Thời gian lưu trung bình (phút)	Anisol	Eucalytol	Camphor	Menthol
Placebo	-	-	-	-
Chuẩn camphor	-	-	13.32	-
Chuẩn menthol	-	-	-	14.35
Chuẩn eucalyptol	-	8.8	-	-
Nội chuẩn anisol	5.61	-	-	-
Chuẩn hỗn hợp	5.61	8.83	13.34	14.39
Thử	5.60	8.82	13.33	14.38

3.2.3. Khoảng tuyến tính

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ (mg/mL)		0.001	0.003	0.005	0.01	0.025	0.05
Diện tích đỉnh sắc ký	E	67,165	187,642	321,457	627,282	1,539,730	3,064,049
		65,013	193,533	320,451	623,645	1,529,111	3,077,869
	C	66,283	192,756	338,773	619,695	1,560,734	3,113,204
		66,699	199,151	326,813	640,129	1,560,210	3,126,598
	M	60,150	190,341	329,467	645,799	1,585,424	3,141,669
		64,614	195,713	316,003	644,387	1,583,604	3,193,340
	A	2,316,725	2,291,671	2,307,073	2,243,815	2,218,098	2,214,628
		2,298,857	2,281,172	2,319,551	2,231,354	2,206,735	2,221,156
Tỉ lệ diện tích đỉnh sắc ký	E/A	0.029	0.082	0.139	0.280	0.694	1.384
		0.028	0.085	0.138	0.279	0.693	1.386
	C/A	0.029	0.084	0.147	0.276	0.704	1.406
		0.029	0.087	0.141	0.287	0.707	1.408
	M/A	0.026	0.083	0.143	0.288	0.715	1.419
		0.028	0.086	0.136	0.289	0.718	1.438
Trung bình	E/A	0.029	0.083	0.139	0.280	0.694	1.385
	C/A	0.029	0.086	0.144	0.282	0.705	1.407
	M/A	0.027	0.084	0.140	0.288	0.716	1.428

Kết quả cho thấy có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và tỉ số diện tích pic (hoạt chất/nội chuẩn) trong khoảng nồng độ khảo sát, với giá trị $R^2 > 0.99$. Phương trình hồi quy tuyến tính biểu thị mối tương quan giữa nồng độ camphor, menthol và eucalyptol với tỉ số diện tích pic tương ứng như sau: Eucalyptol có phương trình hồi quy $y = 27.68x$ với $R^2 = 0.9999$; camphor có phương trình $y = 28.11x$ với $R^2 = 0.9999$; và menthol có phương trình $y = 28.61x$ với $R^2 = 0.9999$. Điều này chứng tỏ

phương pháp phân tích đạt độ tuyến tính cao, đáp ứng yêu cầu thẩm định phương pháp theo hướng dẫn ICH Q2(R1).

3.2.4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện của camphor, menthol, eucalyptol lần lượt: 0.74 mg/g; 1.37 mg/g; 0.62 mg/g.

Giới hạn định lượng của camphor, menthol, eucalyptol là 2.5 mg/g.

Bảng 5. Kết quả phát hiện LOD trên nền mẫu thử

Mẫu thử	Eucalyptol	Camphor	Menthol	Anisol
1	14,329	22,494	36,057	2,289,701
2	21,622	34,127	43,249	2,280,407
3	16,495	30,589	52,613	2,469,959
4	26,283	26,195	48,619	2,239,531
5	15,463	29,401	42,022	2,281,958

Mẫu thử	Eucalyptol	Camphor	Menthol	Anisol
6	13,608	22,621	42,574	2,314,759
7	12,274	28,359	47,857	2,294,546
8	14,458	27,007	39,143	2,258,282
9	18,503	24,179	37,485	2,308,047
10	16,926	27,790	45,550	2,427,669

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy các đỉnh sắc ký của eucalyptol, camphor và menthol tại nồng độ LOD đều được phát hiện rõ ràng, không có nhiễu nền,

với tỷ lệ phát hiện đạt 100%. Điều này chứng tỏ phương pháp có độ nhạy cao, đáp ứng yêu cầu nhận biết các hoạt chất ở nồng độ rất thấp.

Bảng 6. Kết quả sắc ký lặp lại trên các mẫu thử có các chất ở nồng độ LOQ

Mẫu thử	E	C	M	A	E/A	C/A	M/A	Hàm lượng (mg/g)		
								E	C	M
1	59,490	67,367	60,766	2,369,582	0.025	0.028	0.026	2.31	2.49	2.24
	59,074	66,528	59,898	2,358,963	0.025	0.028	0.025			
2	54,606	65,145	55,006	2,330,218	0.023	0.028	0.024	2.32	2.46	2.11
	62,929	65,036	56,880	2,339,881	0.027	0.028	0.024			
3	62,657	65,786	56,463	2,389,408	0.026	0.028	0.024	2.37	2.50	2.26
	60,353	69,782	66,176	2,383,430	0.025	0.029	0.028			
4	53,897	62,097	62,852	2,319,356	0.023	0.027	0.027	2.31	2.43	2.26
	62,578	65,755	56,343	2,327,499	0.207	0.028	0.024			
5	65,530	75,461	70,722	2,509,564	0.026	0.030	0.028	2.43	2.60	2.49
	67,046	73,305	71,608	2,498,255	0.027	0.029	0.029			
6	54,697	63,433	50,588	2,340,279	0.023	0.027	0.022	2.23	2.45	2.14
	57,980	66,517	63,100	2,331,222	0.025	0.029	0.027			
7	62,416	74,154	65,980	2,411,864	0.026	0.031	0.027	2.34	2.65	2.35
	59,830	70,796	63,120	2,414,473	0.025	0.029	0.026			
Trung bình hàm lượng (mg/g)								2.33	2.51	2.27
RSD (%)								2.65	3.25	5.58

Ở mức LOQ (Bảng 6), 7 mẫu thử độc lập cho kết quả hàm lượng trung bình lần lượt là 2.33 mg/g (eucalyptol), 2.51 mg/g (camphor) và 2.27 mg/g (menthol), với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) lần lượt là 2.65%, 3.25% và 5.58%. Các giá trị RSD đều nhỏ hơn 11%, chứng tỏ độ lặp lại tốt và tính chính xác chấp nhận được của phương pháp tại mức

định lượng thấp nhất.

Như vậy, các giá trị LOD và LOQ xác định được phù hợp với tiêu chí chấp nhận theo ICH, khẳng định phương pháp phân tích bằng GC-FID có độ nhạy và độ chính xác đạt yêu cầu để định lượng đồng thời eucalyptol, camphor và menthol trong nền mẫu.

3.2.5. Độ đúng

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng

Chất phân tích	Lượng thêm chuẩn (mg/10g) (tb $\pm$ SD, n = 7)	Lượng tìm lại (mg/10g) (tb $\pm$ SD, n = 7)	Độ thu hồi (%)
Eucalyptol	24.88 $\pm$ 0.617	23.31 $\pm$ 0.617	95.90 - 97.57
	37.70 $\pm$ 0.299	34.12 $\pm$ 0.705	97.30 - 97.45
	50.29 $\pm$ 0.287	48.65 $\pm$ 0.691	95.08 - 97.88
Camphor	25.29 $\pm$ 0.261	25.12 $\pm$ 0.816	96.32 - 103.16
	37.82 $\pm$ 0.236	35.94 $\pm$ 0.707	95.26 - 97.86
	50.62 $\pm$ 0.185	49.65 $\pm$ 0.861	95.44 - 100.46

Chất phân tích	Lượng thêm chuẩn (mg/10g) (tb $\pm$ SD, n = 7)	Lượng tìm lại (mg/10g) (tb $\pm$ SD, n = 7)	Độ thu hồi (%)
Menthol	25.02 $\pm$ 0.257	22.65 $\pm$ 1.264	95.84 - 98.69
	38.02 $\pm$ 0.202	35.32 $\pm$ 0.795	96.43 - 96.50
	50.31 $\pm$ 0.182	51.74 $\pm$ 0.554	101.90 - 104.49

Kết quả ở Bảng 7 cho thấy tại ba mức nồng độ LOQ, $1.5 \times \text{LOQ}$ và $2 \times \text{LOQ}$, độ thu hồi của eucalyptol, camphor và menthol đều nằm trong khoảng 95.08 - 104.49%. Các giá trị thu hồi này đều nằm trong giới hạn cho phép 95 - 105%, phù hợp với tiêu chí chấp nhận theo hướng dẫn ICH Q2(R2).

Độ thu hồi ổn định ở cả ba mức nồng độ cho thấy phương pháp không bị ảnh hưởng đáng kể bởi nền mẫu, đồng thời chứng minh độ chính xác và độ tin

cậy cao trong phép định lượng ba hoạt chất trong chế phẩm. Sự chênh lệch nhỏ giữa lượng thêm chuẩn và lượng tìm lại (SD thấp, n = 7) cũng cho thấy phép thử có độ lặp lại tốt và không xuất hiện sai số hệ thống đáng kể. Như vậy, phương pháp phân tích được đánh giá đạt yêu cầu về độ đúng, có thể áp dụng cho kiểm nghiệm định lượng đồng thời eucalyptol, camphor và menthol trong các mẫu thử.

3.2.6. Độ chính xác, độ chính xác trung gian

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ chính xác, độ chính xác trung gian

Kiểm nghiệm viên 1									
		1	2	3	4	5	6	Trung bình	RSD (%)
Hàm lượng (mg/g)	Eucalyptol	55.73	56.17	56.04	56.47	56.44	57.01	56.31	0.78
	Camphor	56.30	56.75	56.77	57.00	57.01	57.64	56.91	0.77
	Menthol	55.61	55.59	55.55	56.07	55.87	56.69	55.90	0.78
Kiểm nghiệm viên 2									
Hàm lượng (mg/g)	Eucalyptol	55.86	56.18	56.04	56.35	56.49	56.97	56.32	0.69
	Camphor	56.47	56.59	56.97	56.89	57.37	57.40	56.55	0.67
	Menthol	55.06	55.26	55.26	55.43	56.05	58.25	56.95	0.87

Kết quả trình bày ở Bảng 8 cho thấy giá trị RSD (%) của eucalyptol, camphor và menthol trong phép thử độ chính xác (do kiểm nghiệm viên 1 thực hiện) lần lượt là 0.78%, 0.77% và 0.78%, đều nhỏ hơn 2.0%. Các giá trị này chứng minh rằng phương pháp có độ lặp lại tốt trong cùng điều kiện phân tích.

Đối với độ chính xác trung gian, các phép thử do kiểm nghiệm viên 2 thực hiện cho giá trị RSD (%) của eucalyptol, camphor và menthol lần lượt là 0.69%, 0.67% và 0.87%, đều nằm trong giới hạn chấp nhận (< 2.0%). Sự tương đồng giữa kết quả của hai kiểm nghiệm viên cho thấy phương pháp ổn định, đáng tin cậy và ít bị ảnh hưởng bởi yếu tố thao tác hoặc người thực hiện.

Như vậy, phương pháp phân tích đáp ứng tiêu chí về độ chính xác và độ chính xác trung gian theo hướng dẫn ICH Q2(R2), có thể áp dụng trong kiểm nghiệm thường quy.

4. BÀN LUẬN

Trong sắc ký khí, quá trình rửa giải các chất phân tích

chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như nhiệt độ, tốc độ khí mang, nồng độ chất phân tích và đặc tính của cột sắc ký. Trong nghiên cứu này, chương trình nhiệt và tốc độ khí mang được lựa chọn làm các biến số tối ưu chính vì chúng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả tách và hình dạng đỉnh sắc ký. Việc tăng tốc độ dòng khí có thể làm giảm thời gian lưu nhưng đồng thời cũng làm giảm độ phân giải giữa các đỉnh sắc ký. Do đó, các thông số như nhiệt độ ban đầu, thời gian giữ, tốc độ tăng nhiệt và nhiệt độ kết thúc của chương trình nhiệt đã được điều chỉnh hợp lý, giúp cân bằng giữa độ phân giải và thời gian phân tích.

Kết quả cho thấy hệ thống sắc ký có độ ổn định cao, với giá trị RSD (%) của tỷ số diện tích đỉnh sắc ký sau 6 lần tiêm nhỏ hơn 0.5%. Đường chuẩn tuyến tính được xây dựng với giới hạn định lượng (LOQ) thấp, đảm bảo độ nhạy và độ tin cậy của phương pháp. Việc sử dụng anisol làm chuẩn nội góp phần giảm thiểu sai số do thao tác và biến thiên tín hiệu giữa các lần tiêm, giúp tăng độ chính xác của phép đo. Độ đúng, độ chính xác lặp lại và độ chính xác trung

gian đều nằm trong giới hạn cho phép theo hướng dẫn của ICH Q2(R1), chứng tỏ phương pháp đạt độ tin cậy cao khi áp dụng trong kiểm nghiệm.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các công trình trước đó về định lượng camphor, menthol và eucalyptol bằng GC-FID [9, 10], trong đó giá trị RSD của tỷ số diện tích đỉnh sắc ký và thời gian lưu đều nhỏ hơn 2%, thể hiện độ lặp lại và độ ổn định tốt của hệ thống sắc ký. So với các phương pháp đã công bố trước đây, phương pháp trong nghiên cứu này cho độ phân giải tốt hơn giữa các đỉnh sắc ký camphor-menthol-eucalyptol, đồng thời rút ngắn tổng thời gian phân tích xuống còn khoảng 20 phút, góp phần nâng cao hiệu quả và tính thực tiễn của quy trình phân tích.

Ngoài ra, việc áp dụng chương trình nhiệt tuyến tính tối ưu cùng với chuẩn nội anisol giúp cải thiện đáng kể độ chính xác, giảm biến thiên tín hiệu và tăng độ tin cậy của kết quả định lượng. Phương pháp này có khả năng ứng dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm viên nang mềm chứa tinh dầu đang lưu hành trên thị trường, cũng như mở rộng cho các dạng chế phẩm khác có thành phần tương tự như dầu xoa, thuốc hít hoặc siro thảo dược.

Những kết quả đạt được không chỉ khẳng định tính phù hợp của phương pháp GC-FID trong phân tích tinh dầu mà còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc chuẩn hóa quy trình kiểm nghiệm định lượng các hoạt chất camphor, menthol và eucalyptol, tạo tiền đề cho xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và phát triển các sản phẩm dược từ tinh dầu trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.H.C. Baser and G. Buchbauer, Eds., *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2010.
- [2] N. T. L. Phương, N. V. Thúy, N. T. Anh và C. S. Đoàn, "Nghiên cứu định tính, định lượng đồng thời camphor và menthol trong thuốc bôi ngoài da Rhomatic extra gel bằng phương pháp GC," *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, tập 13, số 4, tr. 10-13, 2015.
- [3] Bộ Khoa học và Công nghệ, *TCVN 9652:2013 (ISO 7359:1985) - Tinh dầu - Phân tích bằng sắc ký trên cột nhồi - Phương pháp chung*, tr. 5-15, 2013.
- [4] P. K. Agnihotri and A. R. Wakode, "Development and validation of a gas chromatographic method for simultaneous determination of menthol and camphor in pharmaceutical dosage forms," *Journal*

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công phương pháp định lượng đồng thời camphor, menthol và eucalyptol trong chế phẩm viên nang mềm bằng sắc ký khí - đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID). Phương pháp đạt các yêu cầu thẩm định theo hướng dẫn ICH Q2(R1) với độ chính xác, độ lặp lại và độ đặc hiệu cao (RSD < 2%, độ hồi phục trong khoảng 98 - 102%).

Chương trình nhiệt tuyến tính được tối ưu giúp tách hoàn toàn các đỉnh sắc ký hoạt chất trong thời gian khoảng 20 phút, đảm bảo tính chọn lọc và độ tin cậy của kết quả. Phương pháp có thể được ứng dụng trong kiểm nghiệm thường quy các chế phẩm viên nang mềm chứa tinh dầu, cũng như mở rộng cho phân tích các sản phẩm dược thảo có thành phần tương tự.

Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc kiểm soát chất lượng tinh dầu trong dược phẩm, đồng thời hỗ trợ xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho các chế phẩm có chứa camphor, menthol và eucalyptol trên thị trường.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm TP.HCM và Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch đã hỗ trợ về cơ sở vật chất, trang thiết bị và các điều kiện cần thiết cũng như đã có những đóng góp quý báu trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện bài báo này.

of Chromatographic Science, vol. 48, no. 8, tr. 704-707, 2010. DOI: 10.1093/chromsci/48.8.704.

[5] P. Singh, N. Mishra and R. K. Soni, "Simultaneous estimation of eucalyptol, camphor and menthol in polyherbal cough syrup by gas chromatography," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76, no. 3, tr. 211-215, 2014.

[6] Bộ Y tế, *Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc: Phụ lục 8: Các phương pháp thẩm định*, 2014.

[7] C. S. Trần, *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2010.

[8] L. G. Webster, "Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements," trong *Official Methods of Analysis of AOAC*

International, 20th ed. AOAC International, tr. AF-1-AF-18, 2016.

[9] A. N. Mishra, S. P. Singh, and A. K. Tiwari, "Quantitative determination of menthol, camphor and eucalyptol in herbal formulations using GC-FID," *Int. J.*

Pharm. Sci. Res., vol. 11, no. 5, pp. 2345-2351, 2020.

[10] S. P. Chandran and R. K. Dubey, "Simultaneous estimation of camphor and menthol by gas chromatography in topical formulations," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 57, no. 2, pp. 167-173, 2019.

Simultaneous quantification of camphor, menthol and eucalyptol in soft capsule preparations by GC-FID

Le Nguyen Ngoc Han, Ngo Thi Minh Tam, Bui Tung Hiep, Nguyen Thu Anh

ABSTRACT

Background: Soft capsule formulations containing camphor, menthol, and eucalyptol are widely used for relieving common cold symptoms. However, simultaneous qualitative and quantitative methods for these three active ingredients remain limited and inconsistent, posing challenges for quality control. Therefore, establishing a reliable and accurate method is essential. Objectives: To develop and validate a gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) method for the simultaneous quantification of camphor, menthol, and eucalyptol in soft capsules. Material and methods: A simulated sample was used to investigate chromatographic conditions on Agilent 6890N gas chromatography system equipped with an FID detector. Analytical parameters were optimized to achieve clear separation, good stability, and reasonable analysis time. Results: The method showed clear chromatographic peak separation with retention times of 8.78, 13.32, and 14.35 minutes for eucalyptol, camphor, and menthol, respectively. The total analysis time was approximately 20 minutes. The RSD values of retention time and peak area were below 1.0%, meeting the system suitability criteria. The calibration curves were linear with correlation coefficients (R^2) ≥ 0.999 within the tested concentration range. The limits of detection (LOD) for camphor, menthol, and eucalyptol were 0.74 mg/g, 1.37 mg/g, and 0.62 mg/g, respectively, while the limit of quantification (LOQ) was 2.5 mg/g for all three compounds. Accuracy, expressed as recovery, ranged from 95% to 105%, and both repeatability and intermediate precision showed %RSD values below 2%. Conclusion: The developed GC-FID method was successfully applied to commercial soft capsule formulations, demonstrating its feasibility and reliability for routine quality control.

Keywords: camphor, quantitative, eucalyptol, menthol

Received: 26/08/2025

Revised: 30/09/2025

Accepted for publication: 01/12/2025