

Tối ưu hóa quy trình chiết xuất tinh dầu hương nhu tía (*Ocimum tenuiflorum* L.) và định lượng eugenol trong tinh dầu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV - Vis

Nguyễn Thị Như Ngọc^{*}, Phạm Hoàng Long và Phan Nguyễn Thu Xuân
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Trong quy trình chiết xuất tinh dầu từ cây hương nhu tía (*Ocimum tenuiflorum* L.) đòi hỏi sự tinh tế và chính xác để đạt được hiệu suất và chất lượng tốt nhất nên cần đưa ra những điều kiện tối ưu để chiết được tinh dầu. Có nhiều phương pháp định lượng hợp chất eugenol ở Việt Nam và trên thế giới, riêng định lượng bằng phương pháp đo quang phổ UV - Vis chưa được thực hiện. Vì vậy việc tối ưu hóa điều kiện chiết xuất tinh dầu hương nhu tía và thẩm định quy trình định lượng eugenol trong hương nhu tía bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-VIS là thiết thực. **Kết quả:** Tinh dầu Hương nhu có thể được chiết xuất trong điều kiện lý tưởng bằng cách chưng cất ngay bằng 1000 mL dung dịch NaCl 3%, tương đương với 200g lá tươi hương nhu tía trong thời gian 3 giờ. Theo khuyến nghị của ICH để định lượng eugenol trong Hương nhu tía đã đạt các yêu cầu: độ tuyến tính trong khoảng nồng độ 2.25 - 50 $\mu\text{g/mL}$, tính đặc hiệu, độ chính xác với tỷ lệ thu hồi 98.0 - 101.7%, độ chính xác với $\text{RSD}\% = 1.2\%$, giới hạn phát hiện (LOD) là 2.009 $\mu\text{g/mL}$ và giới hạn định lượng (LOQ) là 6.088 $\mu\text{g/mL}$ và kết quả mẫu thử và mẫu chuẩn được đo quang tại bước sóng cực đại 281 nm. **Kết luận:** Thiết lập được quy trình chiết xuất tinh dầu hương nhu tía và xây dựng, thẩm định được phương pháp định lượng eugenol trong Hương nhu tía bằng quang phổ UV-Vis với ưu điểm nhanh và đơn giản.

Từ khóa: Hương nhu tía *Ocimum tenuiflorum* L., khảo sát chiết xuất tinh dầu, eugenol, quang phổ UV - Vis

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hương nhu tía, thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae) có tên khoa học là *Ocimum sanctum* L. hay *Ocimum tenuiflorum* L. và thường được gọi tên quen thuộc là é tía hay é rừng [1]. Hương nhu tía còn được gọi là Tulsi ở Ấn Độ, có nguồn gốc và phổ biến rộng rãi ở châu Á cũng như châu Phi và châu Úc. Ở Việt Nam, cây thường thấy thấy từ Bắc Giang, Hòa Bình, Ninh Thuận, An Giang, Thành phố Hồ Chí Minh, Kiên Giang, Đồng Tháp [2].

Hương nhu tía được sử dụng để điều trị một số bệnh như cảm lạnh thông thường, đau đầu, rối loạn dạ dày, viêm, bệnh tim, ngộ độc và sốt rét cũng như sự khó chịu về tâm sinh lý, hen suyễn và viêm kết mạc... Tinh dầu hương nhu tía còn có khả năng ngăn mối mọt, kháng chế muối. Ngoài ra, các sản phẩm làm đẹp như dưỡng da, dưỡng tóc cũng được sản xuất từ Hương nhu tía [3].

Nhằm xây xác định được quy trình chiết xuất hiệu quả tinh dầu Hương nhu tía để đáp ứng như cầu sử dụng và kiểm tra chất lượng tinh dầu theo thành

phần hóa học chính. Do vậy, "Tối ưu hóa quy trình chiết xuất tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum tenuiflorum* L.) và định lượng eugenol trong tinh dầu bằng phương pháp quang phổ UV-Vis." là vấn đề thiết thực.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng: Quy trình chiết xuất tinh dầu hương nhu tía và phương pháp định lượng eugenol trong tinh dầu hương nhu tía bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV - VIS, nguyên liệu hương nhu tía tươi được thu hái trong khoảng thời gian từ tháng 01/2024 đến tháng 03/2024 tại Vườn dược liệu Tấn Phát, Thủ Đức - TPHCM, cây từ 3 - 5 tháng tuổi đang bắt đầu ra hoa; vườn thuốc nam Organic ở Kiên Giang, cây trung bình 3 tháng tuổi; Vườn dược liệu Phương Nam, Đồng Tháp, cây 3 - 5 tháng tuổi đang bắt đầu ra hoa; Vườn bảo tồn cây thuốc của Trung Tâm Sâm và Dược Liệu

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Ngọc

Email: ngocnguyen.17032001@gmail.com

TPHCM, cây được khoảng 4 tháng tuổi, đang bắt đầu ra hoa, cây được định danh bởi KS. Cao Ngọc Giang thuộc phòng Tài Nguyên và Phát triển Dược Liệu - Trung Tâm Sâm và Dược liệu Tp.HCM. Cây được thu hái về được xác định độ ẩm dược liệu tươi là 87.5% và độ ẩm dược liệu khô là 12.6%.

2.2. Hóa chất, trang thiết bị

Chất chuẩn: Chất chuẩn eugenol (>98%, HPLC), Sultan Chemists, USA, Cat. # 10502

Hóa chất: NaCl rắn, Na₂SO₄, methanol: tinh khiết hóa học; nước cất.

Trang thiết bị: Máy quang phổ hai chum tia UV-Vis Shimadzu UV - 1800; cốc đo mẫu (cuvet) thạch anh có quang trình 10 mm. Cân điện tử 300 g, cân phân tích có độ chính xác 0.01 mg, bộ chưng cất tinh dầu định lượng, có hồi lưu Clevenger dùng cho tinh dầu, bình cầu 2000 mL, bếp đun bình cầu 2000 mL, cốc thủy tinh, đĩa thủy tinh, ống đong,...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu chiết xuất

Sau khi hái về, lá hương nhu tía được tiến hành rửa sạch thái nhỏ khoảng 1 cm.

Dùng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự kết hợp với dung dịch NaCl để chiết xuất tinh dầu từ lá hương nhu tía. Thiết bị chưng cất tinh dầu: Bộ chưng cất tinh dầu Clevenger 2000 mL, bếp đun bình cầu 2000 mL. Tinh dầu sau khi chiết xuất được làm khan bằng dung dịch Na₂SO₄, bảo quản trong lọ nâu và nhiệt độ 0 - 5°C.

a. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g)

Cân khoảng 200 g lá tươi hương nhu tía đã xử lý cho vào bình cầu, thêm vào đó lượng dung dịch NaCl 3% tỷ lệ nguyên liệu lần lượt là 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 (mL/g). Sau đó tiến hành chưng cất hỗn hợp trong

vòng 2 giờ. Đọc thể tích tinh dầu trên ống ngưng tụ và so sánh thể tích ở những lần thay đổi. Tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của thể tích tinh dầu hương nhu tía theo tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

b. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên hiệu suất chưng cất

Lấy 200 g lá tươi hương nhu tía đã xử lý cho vào bình cầu, thêm vào đó dung dịch NaCl với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu được chọn ở thí nghiệm này là 5:1. Nồng độ NaCl thay đổi lần lượt: 1%, 3%, 5%, 7%. Tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước trong khoảng thời gian 2 giờ. Khảo sát sự phụ thuộc của hàm lượng tinh dầu hương nhu tía theo nồng độ NaCl.

c. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất lên hiệu suất chưng cất tinh dầu

Lấy khoảng 200 g lá tươi hương nhu tía đã xử lý cho vào bình cầu, thêm vào đó lượng dung dịch NaCl 3% với thời gian chưng cất được chọn ở thí nghiệm này là 5:1 (mL/g). Để xác định thời gian chưng cất, tiến hành chưng cất trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ. Tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của thể tích tinh dầu hương nhu tía theo thời gian chưng cất.

2.3.2. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol trong hương nhu tía bằng quang phổ UV-Vis

a. Chuẩn bị mẫu

- **Mẫu chuẩn:** Cân 30 mg pha vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng methanol thu được chuẩn gốc là 3000 µg/mL. Tiếp tục hút 3 mL dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 10 mL, định mức bằng methanol thu được chuẩn thứ cấp có nồng độ 900 µg/mL. Từ chuẩn 900 µg/mL pha dãy chuẩn làm việc với nồng độ từ 2.25 - 50 µg/mL, pha chuẩn như Bảng 1.

Bảng 1. Dãy chuẩn làm việc

STT	Thể tích hút (µL)	Bình định mức (mL)	Nồng độ (µg/mL)
1	50	20	2.25
2	50	10	4.5
3	100	10	9
4	200	10	18
5	555	20	25
6	400	10	36
7	555	10	50

- **Mẫu thử:** Cân 100 mg tinh dầu cho vào bình định mức 20 mL, định mức bằng methanol. Hút 100 µL

cho vào bình định mức 20 mL, định mức bằng methanol. Lọc qua giấy lọc Whatman. Tiến hành

đo độ hấp thụ quang phổ UV - Vis.

- **Mẫu trắng:** Methanol

a. Thẩm định quy trình định lượng

Ghi nhận các thông số: bước sóng hấp thu cực đại của chuẩn và mẫu, độ hấp thụ cực đại, phổ UV. Từ các kết quả khảo sát, xây dựng quy trình định lượng eugenol trong tinh dầu hương nhu tía bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV - Vis thông qua các tiêu chí: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác và độ đúng theo hướng dẫn của ICH[4].

- **Tính tương thích hệ thống:** Tiến hành 6 lần đo độ hấp thụ mẫu chuẩn eugenol nồng độ 25 µg/mL. Ghi lại độ hấp thụ và phổ UV - Vis. Yêu cầu: Giá trị RSD (%) < 2%.

- **Tính đặc hiệu:** Quét phổ mẫu chuẩn, mẫu thử. Yêu cầu: Phổ hấp thụ của các mẫu thử cho hình dạng phổ, có cùng bước sóng tại các đỉnh hấp thụ với mẫu chuẩn.

- **Tính tuyến tính:** Pha chất chuẩn eugenol thành 7 mức nồng độ khác nhau như bảng 1. Đo độ hấp thụ ở bước sóng đã khảo sát. Vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa độ hấp thụ theo nồng độ. Sử dụng phần mềm MS Excel 2010 xác định phương trình hồi quy và hệ số tương quan. Đánh giá: phương pháp đạt tính tuyến tính khi R² ≥ 0.995.

- **Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):** Sử dụng công cụ Data Analysis/Regression trong MS Excel xác định độ lệch chuẩn của độ hấp thụ, độ dốc của đường chuẩn S.

+ **Giới hạn phát hiện:**

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{S}$$

+ **Giới hạn định lượng:**

$$LOD = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

- **Độ chính xác:** Chuẩn bị pha 6 mẫu thử có nồng độ eugenol trong khoảng tuyến tính, đo độ hấp thụ và tính nồng độ eugenol trong mẫu thử. Đánh giá: phương pháp đạt độ chính xác khi kết quả 6 lần định lượng eugenol toàn phần cho giá trị RSD không quá 2%.

- **Độ đúng:** Xác định hàm lượng eugenol của mẫu thử nằm trong giới hạn định lượng. Thêm vào mẫu thử một lượng chất chuẩn eugenol có hàm lượng bằng 80%, 100% và 120% hàm lượng eugenol có trong mẫu thử, sao cho tổng nồng độ eugenol nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Mỗi mức thực hiện 3 lần, đo độ hấp thụ ở bước sóng đã khảo sát, xác định tỉ lệ phục hồi. Đánh giá: đạt độ đúng nếu RSD (%) < 2% và tỉ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ nằm trong giới hạn 95 - 105%.

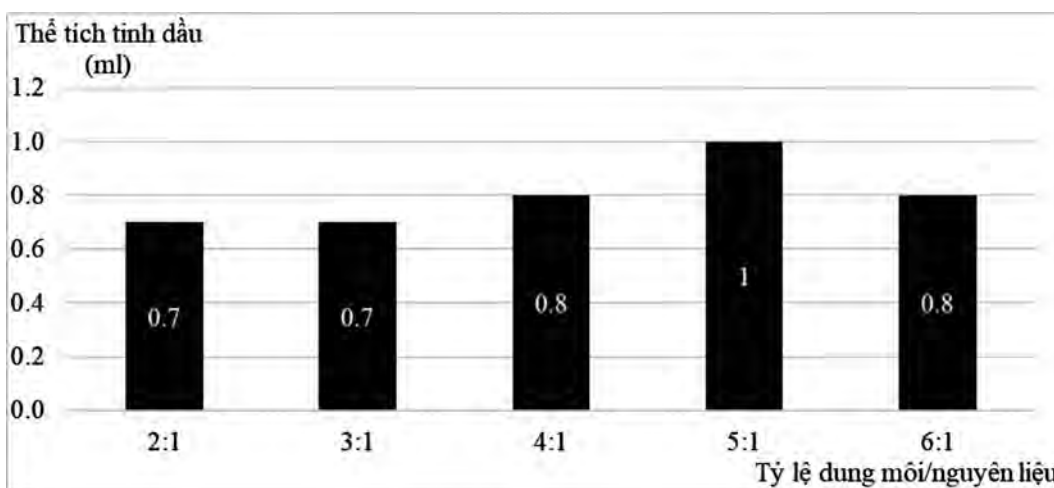
a. Xác định hàm lượng eugenol: Eugenol trong các mẫu tinh dầu đã chiết sau quá trình khảo sát điều kiện chiết tối ưu.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu chiết xuất

Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng tinh dầu chiết xuất được thể hiện ở Hình 1



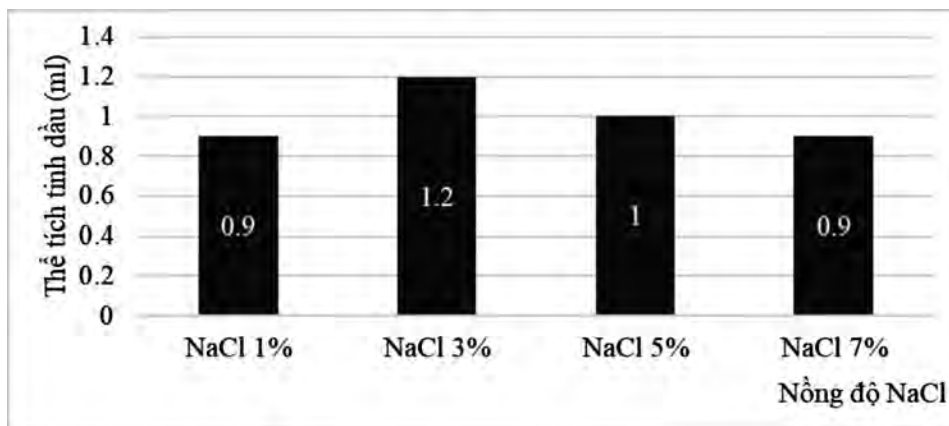
Hình 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi và dược liệu lên hiệu suất chưng cất tinh dầu

Nhận xét: tinh dầu thu được tăng theo tỷ lệ dung môi/nguyên liệu lá hương nhu. Khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 2:1, 3:1 ta sẽ thu được 0.7 mL tinh dầu, ta tăng lượng dung môi lên 4:1 thì lượng tinh dầu cũng tăng lên được 0.8 mL, nếu tiếp tục tăng lên 5:1 ta sẽ thu được 1mL tinh dầu. Tuy nhiên nếu ta tiếp tục tăng tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu lên thì lượng tinh dầu thu được sẽ giảm. Do vậy, quá trình đạt hiệu quả tối ưu nhất ở tỷ lệ 5:1. Khi tiến hành gia nhiệt hỗn hợp nguyên liệu và nước, nước sẽ có tác dụng thấm thấu qua màng tế bào và xâm nhập vào bên trong các tế bào chứa tinh dầu làm chúng trương phồng lên và tới lúc nào đó khi sức chịu đựng

của màng không đủ, nó sẽ bị phá vỡ và giải phóng tinh dầu ra ngoài và bị lôi cuốn theo hơi nước. Nếu hàm lượng nước quá thấp sẽ không có đủ nước để hòa tan toàn bộ chất keo trên màng tế bào, điều này sẽ làm chậm tốc độ hơi nước xâm nhập và khuếch tán tinh dầu. Kết quả là sẽ có rất ít tinh dầu được chiết xuất. Các hạt phân cực trong tinh dầu sẽ hòa tan trong nước khi tỷ lệ nước và nguyên liệu quá cao sẽ dẫn đến thất thoát tinh dầu thu được.

Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl lên hiệu suất chưng cất tinh dầu

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến thể tích tinh dầu chiết xuất được thể hiện ở Hình 2.



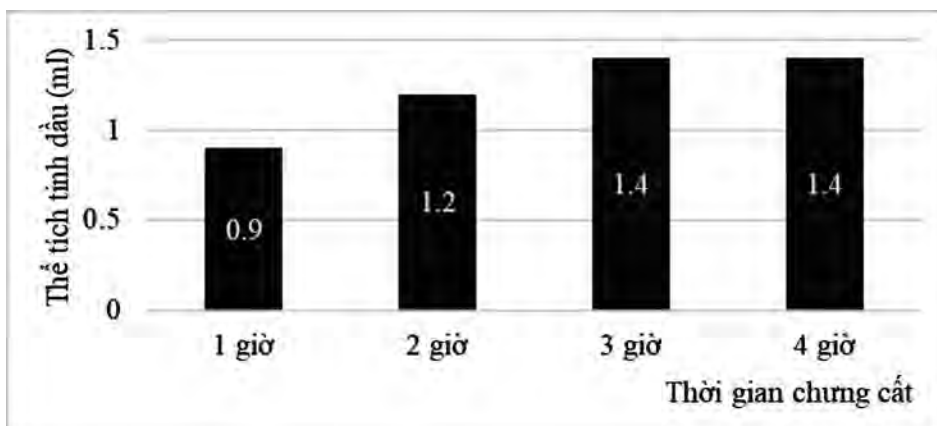
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch natri clorua lên hiệu suất chưng cất tinh dầu

Khi nồng độ muối tăng từ 1% đến 3% thì hàm lượng tinh dầu tăng lên, khi nồng độ muối tăng trên 3% thì hàm lượng tinh dầu giảm xuống. Rút ngắn thời gian chưng cất đạt được bằng cách thêm NaCl vào quy trình, điều này làm tăng lượng nước có thể xâm nhập vào tế bào và tăng khả năng khuếch tán của tinh dầu ra ngoài. Tuy nhiên, việc thêm NaCl làm cho dung dịch có tính phân cực hơn, làm giảm lực tương tác giữa nước và các thành phần tinh dầu. Nhờ đó, trong suốt quá trình chưng cất, tinh dầu sẽ bay hơi dễ dàng [5, 6]. Hơn nữa, việc thêm NaCl với nồng độ cao hơn,

khiến tinh dầu nổi lên cao hơn. Tuy nhiên, ít tinh dầu được tạo ra sau khi chưng cất ở nồng độ cao hơn 3% dung dịch NaCl. Do tế bào chất co lại ở nồng độ NaCl cao nên việc vận chuyển tinh dầu bị cản trở [7]. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ muối 3% mang lại hàm lượng tinh dầu chiết xuất tối đa.

Ảnh hưởng của thời gian chưng cất

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian chưng cất đến hàm lượng tinh dầu chiết xuất được thể hiện ở Hình 3.



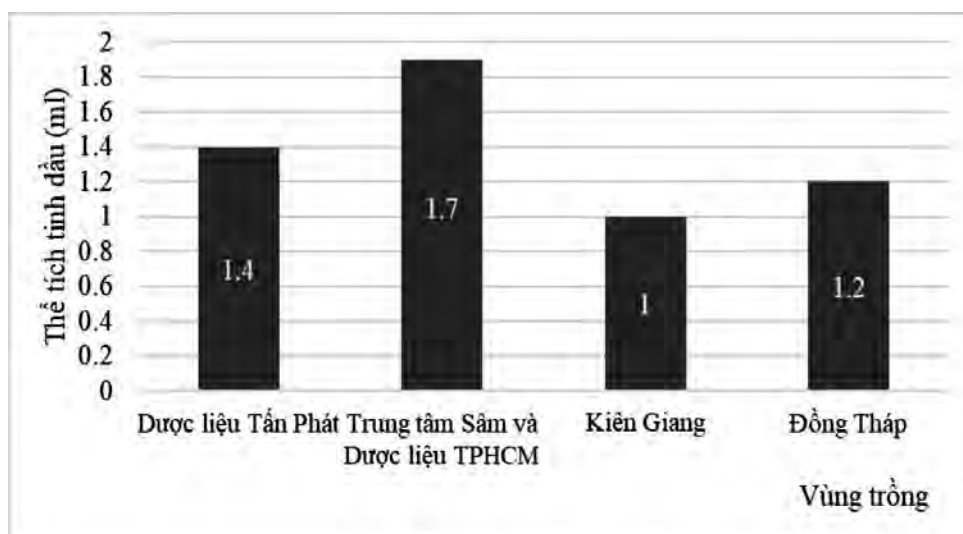
Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất lên hiệu suất chưng cất tinh dầu

Đồ thị Hình 3 cho thấy hàm lượng tinh dầu tăng từ khi mới chưng cất cho đến 3 giờ. Sau khi chưng cất được 3 giờ thì lượng tinh dầu không thay đổi. Điều này cho thấy với thời gian chưng cất nhỏ hơn 3 giờ thì chưa đủ để trích ly hết tinh dầu. Với thời gian chưng cất từ 3 giờ đến 4 giờ thì tinh dầu trong mẫu đã được trích ly hết nên lượng tinh dầu thu được là không đổi theo thời gian. Do đó để tiết kiệm năng lượng cũng như thời gian thì thời gian chưng cất thích hợp nhất cho 200 g hương nhu tía là 3 giờ.

3.2. Khảo sát địa điểm thu hái

Khi thiết lập được điều kiện tốt nhất để chiết xuất

tinh dầu hương nhu là chưng cất ngay với 1000 mL dung dịch NaCl 3%, tương đương 200 g hương nhu, theo phân tích các thông số ảnh hưởng đến nồng độ tinh dầu chiết xuất. Để thu được 1.4 mL tinh dầu, quá trình chưng cất mất 3 giờ. Tiếp tục khảo sát nơi thu hái cây với các địa điểm như Dược liệu Tấn Phát, Trung tâm Sâm và Dược liệu TPHCM, Kiên Giang, Đồng Tháp. Tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của hàm lượng tinh dầu hương nhu tía theo thời gian chưng cất. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian chưng cất đến hàm lượng tinh dầu chiết xuất được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Thể hiện lượng tinh dầu thu được dựa vào địa điểm thu hái

Qua kết quả khảo sát nhận thấy thể tích tinh dầu từ lá Hương nhu tía thu được tại mẫu Trung Tâm Sâm và Dược liệu cho là nhiều nhất, tiếp đến là Dược liệu Tấn Phát và giảm dần đến Đồng Tháp và Kiên Giang.

3.3. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol trong hương nhu tía bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Tính tương thích hệ thống: tiến hành đo 6 lần dung dịch mẫu chuẩn eugenol có nồng độ 25 µg/mL vào hệ thống đo quang. Kết quả thể hiện ở Bảng 2:

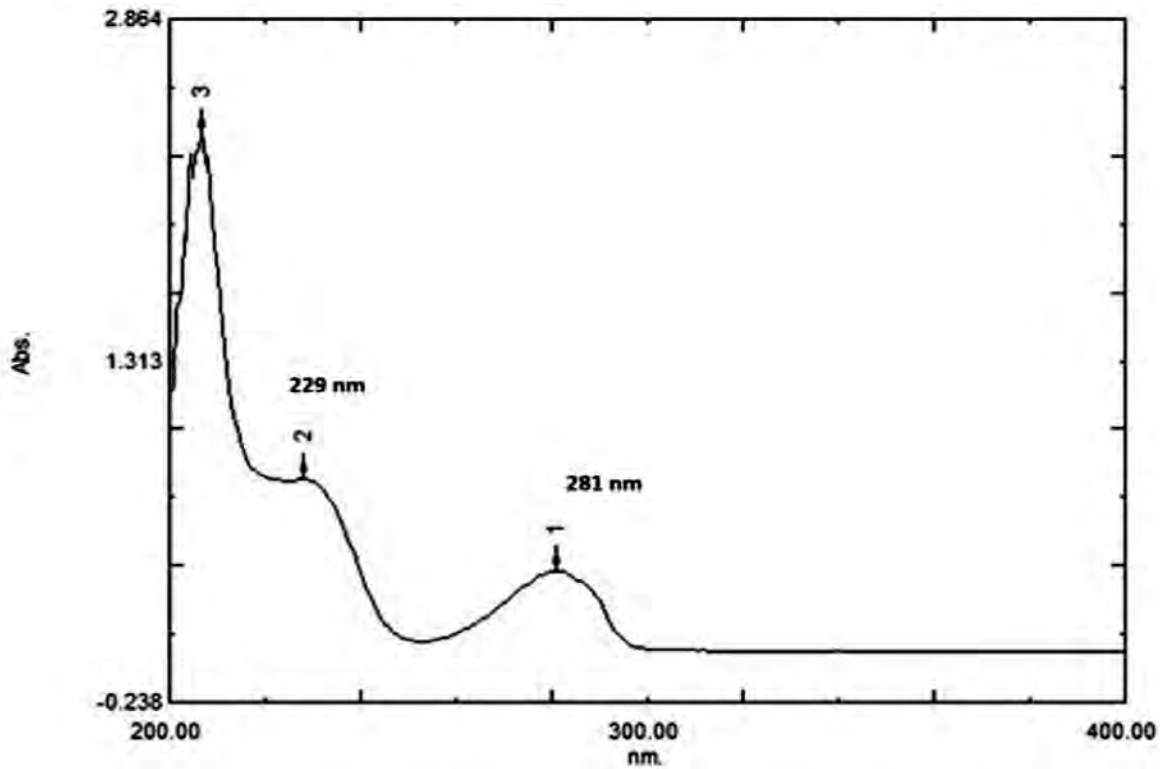
Bảng 2. Kết quả tính tương thích hệ thống

Số lần đo	Độ hấp thu
1	0.386
2	0.385
3	0.385
4	0.387
5	0.386
6	0.386
Trung bình (TB)	0.386
RSD (%)	0.20

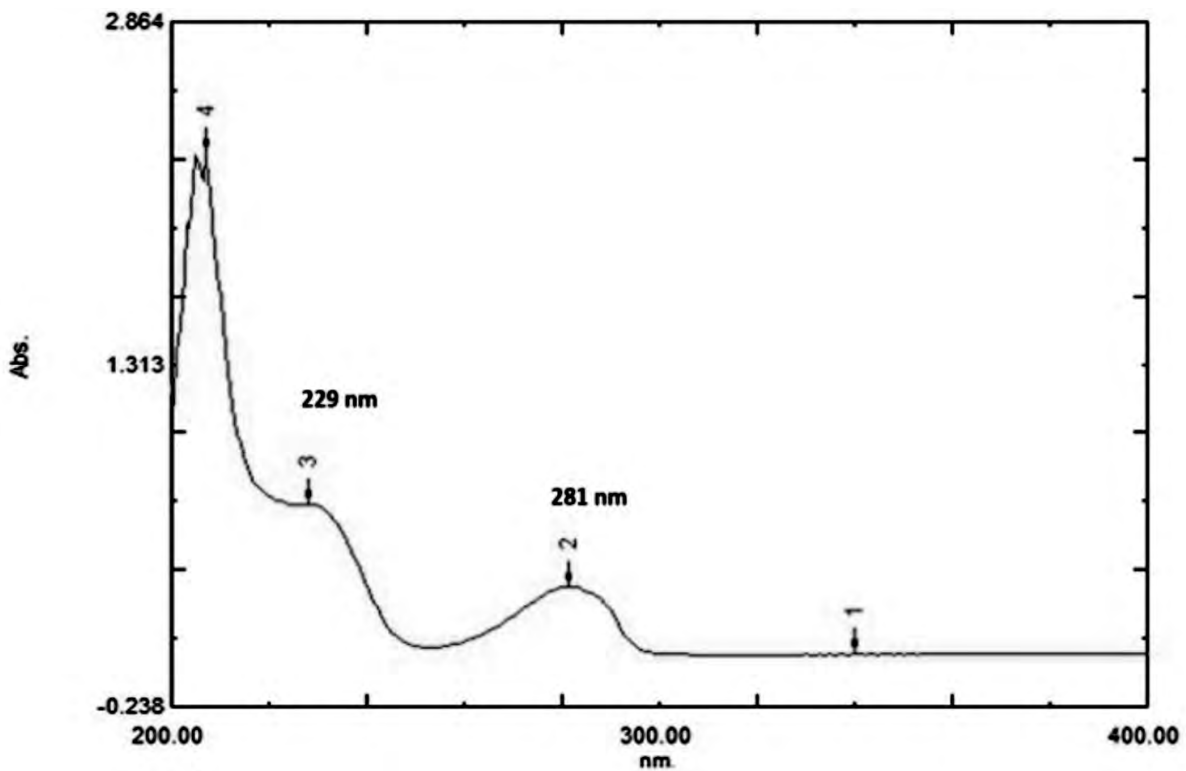
Nhận xét: Hệ thống quang phổ UV - Vis có độ lặp lại tốt với RSD (%) = 0.20% < 2.0%

Kết luận: quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

Độ đặc hiệu: Tiến hành tiêm các mẫu thử, chuẩn vào hệ thống đo quang theo điều kiện đã nêu trên:



Hình 5. Phổ đồ mẫu chuẩn eugenol



Hình 6. Phổ đồ mẫu thử eugenol

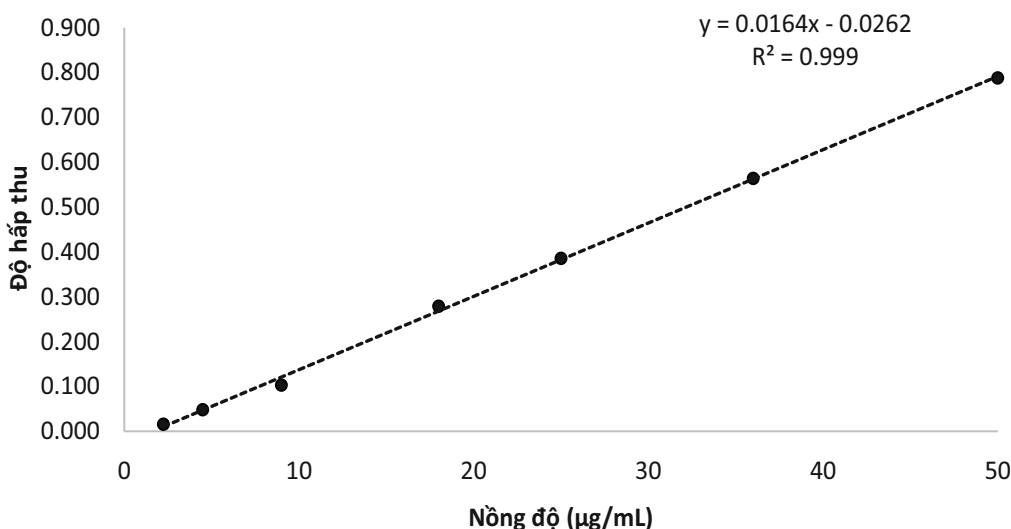
Nhận xét: Dung dịch thử có hình dạng phổ đồ và cho các đỉnh hấp thụ tại các bước sóng μ_{max} tương ứng với hình dạng phổ đồ và cho các đỉnh hấp thụ tại các bước sóng μ_{max} dung dịch chuẩn. Phương pháp đạt độ đặc hiệu. Ở đây sẽ chọn bước sóng 281 nm để làm bước sóng μ_{max} để đo độ hấp thụ của các

dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn eugenol.

Tính tuyến tính: Pha một dãy các dung dịch chuẩn như bảng 1 có nồng độ từ 2.25 - 50 $\mu\text{g/mL}$. Tiến hành đo quang ở bước sóng 281nm. Kết quả được thể hiện ở Bảng:

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Dung dịch	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ (µg/mL)	2.25	4.5	9	18	25	36	50
Độ hấp thu	0.016	0.048	0.103	0.279	0.386	0.564	0.788
Phương trình hồi quy: $y = 0.0164x - 0.0262$							
Hệ số tương quan: $R^2 = 0.9990$							



Hình 7. Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu eugenol

Kết luận: có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu eugenol trong khoảng nồng độ từ 2.25 - 50 µg/mL. Hệ số tương quan: $R^2 = 0.9990 > 0.995$. Phương pháp đảm bảo được tính tuyến tính.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): phương trình hồi quy: $y = 0.0164x - 0.0262$. Sử dụng công cụ Data Analysis/Regression trong MS Excel ta có:
Độ lệch chuẩn của diện tích pic là: $= 0.009958702$

Độ dốc của đường chuẩn là: $S = 0.016357126$

a. Giới hạn phát hiện:

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{S} = 2.009 \text{ µg/mL.}$$

b. Giới hạn định lượng:

$$LOD = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 6.088 \text{ µg/mL.}$$

Độ lặp lại: độ lặp lại của phương pháp được xác định trên 6 mẫu thử khác nhau: kết quả thu được ở Bảng 4:

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Lượng cân tinh dầu (g)	Độ hấp thu	Nồng độ eugenol (µg/mL)	Hàm lượng eugenol trong tinh dầu (%)
1	99.7	0.265	17.76	71.24
2	101.7	0.278	18.55	72.95
3	100.6	0.277	18.49	73.51
4	102.1	0.281	18.73	73.39
5	101.7	0.279	18.61	73.19
6	101.3	0.281	18.73	73.97
Trung bình				73%
RSD (%)				1.2%

Kết quả cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt $RSD(\%) = 1.2\% < 2\%$, đáp ứng yêu cầu định lượng.

Độ đúng: Sử dụng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu, với hàm lượng eugenol trong mẫu tinh dầu trên là 73%:

Bảng 5. Kết quả độ đúng

Mức độ (%)	Khối lượng cân tinh dầu (mg)	Hàm lượng tinh eugenol (mg)	Khối lượng chất chuẩn thêm vào (mg)	Độ hấp thu	Nồng độ eugenol ($\mu\text{g/mL}$) theo đường chuẩn	Hàm lượng tinh eugenol tổng (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ lệ phục hồi (%) Trung bình
80	101.7	74.241	59.4	0.521	33.37	133.46	99.7	99.6
	100.6	73.438	58.8	0.519	33.24	132.98	101.3	
	100.7	73.511	58.7	0.511	32.76	131.02	98.0	
100	101.3	73.949	73.9	0.585	37.27	149.07	101.7	100.5
	99.9	72.927	72.9	0.569	36.29	145.17	99.1	
	99.5	72.635	72.7	0.572	36.48	145.90	100.8	
120	99.8	72.854	87.4	0.633	40.20	160.78	100.6	100.1
	101.3	73.949	88.7	0.639	40.56	162.24	99.5	
	102.8	75.044	90.1	0.651	41.29	165.17	100.0	

Nhận xét: Tỷ lệ phục hồi ở cả 3 nồng độ nằm trong khoảng 98.0 - 101.7%, nằm trong giới hạn cho phép trong thẩm định độ đúng của phương pháp (95-105%).

Định lượng các mẫu tinh dầu đã thu nhận được sau quá trình chiết xuất thu được bằng kết quả sau:

Bảng 6. Kết quả hàm lượng eugenol thu được

Mẫu tinh dầu	Khối lượng cân tinh dầu (mg)	Độ hấp thu	Nồng độ eugenol ($\mu\text{g/mL}$) theo đường chuẩn	Hàm lượng tinh eugenol (%)	Hàm lượng eugenol trung bình (%)
Dược liệu Tấn Phát	98.7	0.262	17.57	71.22	71.6
	101.7	0.274	18.30	72.00	
Trung Tâm Sâm và Dược liệu	100.6	0.277	18.49	73.51	73.4
	112.1	0.311	20.56	73.37	
Kiên Giang	101.7	0.259	17.39	68.40	68.3
	101.3	0.257	17.27	68.19	
Đồng Tháp	100.4	0.261	17.51	69.77	70.3
	99.12	0.262	17.57	70.92	

Nhận xét: Mẫu tinh dầu ở Dược liệu Tấn Phát, Trung Tâm Sâm và Dược liệu, Kiên Giang và Đồng Tháp cho ra hàm lượng eugenol lần lượt là 71.6, 73.4, 68.3 và 70.3%. Trong đó đối với tinh dầu Hương nhu tía ở Trung Tâm Sâm và Dược liệu cho ra hàm lượng eugenol cao nhất.

4. BÀN LUẬN

Qua các kết quả so sánh sơ bộ, cho thấy dược liệu hương nhu tía đang được trồng và bảo tồn tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp.HCM có lượng tinh dầu với hàm lượng eugenol cao 71.6% khi so sánh với một vài nghiên cứu trước đây, cụ thể là hàm lượng eugenol trong tinh dầu hương nhu tía ở Bình Định - Việt Nam được chiết bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước thu được 0.61% tinh dầu trong lá

tươi và phân tích bằng phương pháp GC-MS cho kết quả hàm lượng eugenol là 71.21% [8]. Kết quả trong nghiên cứu này sử dụng trang thiết bị đơn giản hơn, phương pháp phân tích tốn ít chi phí hơn GC/MS nhưng vẫn thu được kết quả cao.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp phân tích hoàn chỉnh, tối ưu được điều kiện chiết tinh dầu hương nhu tía bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước: tiến hành chưng cất ngay với 1000 mL dung dịch NaCl nồng độ 3% ứng với 200 g hương nhu tía, thời gian chưng cất là 3 giờ. Thẩm định quy trình định lượng eugenol trong hương nhu tía theo ICH với các chỉ tiêu về tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính đạt

trong khoảng nồng độ 2.25 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, độ đúng với % tỷ lệ phục hồi 98.0 - 101.7%, độ chính xác có $\text{RSD}\% = 1.2\%$, giới hạn phát hiện (LOD) là 2.009 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và giới hạn định lượng (LOQ) là 6.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kết quả mẫu thử và mẫu chuẩn được đo quang tại bước sóng cực đại 281 nm. Do đó có thể tham khảo quy trình định lượng eugenol trong các mẫu tinh dầu khác. Hiện nay để kiểm nghiệm hoạt chất trong dược liệu có nhiều phương pháp phổ biến như: HPLC, GC... có thể cung cấp chính xác kết

quả định tính và định lượng, nhưng các phương pháp này cần thiết bị hiện đại, chi phí thực hiện cao, tốn thời gian và yêu cầu người vận hành có chuyên môn cao. Với phương pháp quang phổ hấp thụ UV - Vis nhanh chóng và tiện lợi, tốn ít chi phí hơn phương pháp sắc ký, đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol trong tinh dầu hương nhu tía, góp phần vào công tác kiểm tra nhanh chất lượng nguồn nguyên liệu đầu vào của dược liệu này với độ tin cậy cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 829-831, 1995.
- [2] Viện Dược Liệu, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2*, tái bản lần thứ nhất, tập 2, tr. 1206, Nxb Khoa học và kỹ thuật, tr.1206, 2006.
- [3] Alessandra Piras, Maria Jose Gonçalves, Jorge Alves, Danilo Falconieri, Silvia Porcedda và Andrea Maxia, "Ocimum tenuiflorum L., and Ocimum basilicum L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils", *Industrial Crops and Products*, Volume 113, p, 89 - 97, 2018.
- [4] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2R1". In *International conference on harmonization*, Geneva, 2005.
- [5] Nguyễn Năng Vinh, *Kỹ thuật khai thác và sơ chế tinh dầu*, Nxb Nông nghiệp, 1977.
- [6] Đỗ Tất Lợi, *Tinh dầu Việt Nam*, Nxb Y học, 1985.
- [7] Vũ Văn Vụ, Vũ Thanh Tâm, Hoàng Minh Tâm, *Sinh lý học thực vật*, Nxb Giáo dục, 1999.
- [8]. V. T. T. Tuyền, N. T. M. Biên, "Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh của tinh dầu hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) ở Bình Định", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Quy Nhơn*, pp. 83-90, 2019.

Optimizing the process for extracting *ocimum tenuiflorum* L. Essential oil and quantitative eugenol in essential oils using UV - Vis absorption spectroscopy

Nguyen Thi Nhu Ngoc, Pham Hoang Long and Phan Nguyen Thu Xuan

ABSTRACT

In process of extracting essential oil from Ocimum tenuiflorum L. requires sophistication and precision to achieve the best performance and quality, so it is necessary to introduce create optimal conditions for extracting essential oils. There are many methods to quantify eugenol in Vietnam and around the world, but quantification by UV - Vis spectroscopy has not been done. Therefore, optimizing the extraction conditions of Ocimum tenuiflorum L. essential oil and validating the process of quantifying eugenol using UV-VIS absorption spectroscopy is practical. Results: Tulsi essential oil can be extracted under ideal conditions by distilling immediately with 1000 mL of 3% NaCl solution, equivalent to 200 g of fresh tulsi leaves for 3 hours. According to ICH recommendations for quantifying eugenol in Tulsi, it has met the following requirements: linearity in the concentration range of 2.25 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, specificity, accuracy with a recovery rate of 98.0 - 101.7 %, precision with $\text{RSD}\% = 1.2\%$, limit of detection (LOD) of 2.009 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and limit of quantification (LOQ) of 6.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and test and sample results The standard is

measured photometrically at a maximum wavelength of 281 nm. Conclusion: Establishing the process for Extracting Tulsi Essential Oil and developing a simple, rapid UV-Vis Spectroscopy Method for quantifying eugenol.

Keywords: *Ocimum tenuiflorum L, investigation of essential oil extraction, eugenol, UV - Vis spectrum*

Received: 02/04/2024

Revised: 04/07/2024

Accepted for publication: 16/07/2024