

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CITRONELLAL TRONG TINH DẦU BẠCH ĐÀN CHANH BẰNG PHƯƠNG PHÁP GC-FID

(*Eucalyptus citriodora* Hook)

Nguyễn Thị Tuyết Nhi*, Huỳnh Thị Ngọc Nhung,

Nguyễn Ngọc Thế Trân, Lâm Thanh Hùng

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: ntt nhi10a@gmail.com

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tinh dầu bạch đàn chanh giàu citronellal thường được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp như thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Việc kiểm soát chất lượng tinh dầu, đặc biệt là loại dược dụng, là điều kiện cần thiết để đảm bảo tính an toàn và hiệu quả của tinh dầu.

Mục tiêu nghiên cứu: Chiết xuất tinh dầu bạch đàn chanh bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước. Xây dựng quy trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh chiết được bằng phương pháp sắc ký khí. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tinh dầu từ lá bạch đàn chanh được thu hái ở Long An vào tháng 5 năm 2019, khảo sát qui trình chiết tối ưu. Xây dựng quy trình định lượng citronellal bằng phương pháp sắc ký khí (GC, Gas Chromatography). **Kết quả:** Khảo sát các điều kiện chiết để đạt được thể tích và tính chất tinh dầu tối ưu: độ ẩm 16,3%, tỉ lệ nước/dược liệu là 6:1 (mL:g), nồng độ NaCl 2%, thời gian cất 1 giờ, tốc độ cất 2 mL/phút. Điều kiện sắc ký tối ưu: cột Agilent HP5 (kích thước 0,32 mm × 0,25 μm × 30 m), nhiệt độ tiêm mẫu: 250°C, tỉ lệ chia dòng: 1:10, nhiệt độ detector 280°C, thể tích tiêm mẫu 1 μL, khí mang: nitrogen, tốc độ dòng: 3 mL/phút. Chương trình nhiệt độ lò: 40°C (2 phút) tăng đến 100°C với tốc độ 10°C/phút, giữ khoảng 1 phút, đến 104°C tốc độ 2°C/phút, giữ khoảng 2 phút, đến 106°C tốc độ 2°C/phút, giữ khoảng 2 phút, đến 110°C tốc độ 40°C/phút, không giữ, đến 200°C tốc độ 40°C/phút và giữ trong 1 phút. Khoảng nồng độ tuyến tính 100-280 μg/mL, phương trình hồi qui $y = 0,6589x + 21,015$ với $R^2 = 0,9982$. **Kết luận:** Đã xác định được điều kiện tối ưu chiết xuất tinh dầu lá bạch đàn chanh đồng thời xây dựng và thẩm định qui trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh bằng phương pháp GC-FID.

Từ khóa: citronellal, bạch đàn chanh, GC-FID.

ABSTRACT

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CITRONELLAL IN ESSENTIAL OIL OF *Eucalyptus citriodora* Hook BY GC-FID

Nguyen Thi Tuyet Nhi*, Huynh Thi Ngọc Nhung,

Nguyen Ngọc Thế Trân, Lam Thanh Hùng

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Essential oil from *Eucalyptus citriodora* Hook is commonly used in food, cosmetic and pharmaceutical industry. Quality control of essential oils, especially pharmaceutical grade, is necessary to ensure the safety and effectiveness of pharmaceutical products containing essential oils. **Objectives:** Essential oil was isolated by steam distillation and quantitative determination of citronellal was carried out by using a validated GC with FID detector. **Materials and methods:** Essential oil was obtained by steam distillation of the *E. citriodora* leaves collected from Long An on May, 2019. Different gas chromatographic conditions were investigated in order to obtain an optimal condition for citronellal determination. **Results:** Optimal parameters for essential oil extraction are: moisture content of *E. citriodora* leaves of 16.3%, water-leave ratio of 6:1 (mL:g), NaCl concentration of 2%, distillation time of 1 h, distillation rate of 2 mL/min. A method for quantitative determination of citronellal in essential oil was developed on Agilent 7890B gas chromatograph coupled to an FID detector; fused silica capillary HP-5 column (0.32 mm x 0.25 μm x 30 m); inlet temperature of 250°C; split ratio of 1:10; detector temperature: 280°C; inject

volume: 1 μ l; carrier gas: nitrogen; flow rate of 3 mL/min; oven temperature program: 40°C (2 min) to 100°C at the rate of 100°C/min, hold for 1 min, to 104°C at the rate of 2°C/min, hold for 2 min, to 106°C at the rate of 2°C/min, hold for 2 min, to 110°C at the rate of 40°C/min, not hold, to 200°C at the rate 40°C/min and finally hold for 1 min; linearity range from 100 to 280 μ g/mL ($y = 0.6589x + 21.015$, $R^2 = 0.9982$). **Conclusion:** The optimal condition for extracting essential oil from the leaves of *Eucalyptus* was developed. The validated GC-FID method enables a reliable quantitative determination of citronellal in *E. citriodora* essential oil.

Key words: Citronellal, *Eucalyptus citriodora* Hook, GC-FID.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora* Hook) thường được tìm thấy ở những vùng có khí hậu ôn đới và nhiệt đới, là một loại cây rừng quan trọng để lấy gỗ và sản xuất mật ong [3], [5]. Hơn nữa, tinh dầu trong lá bạch đàn chanh có khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa có thể ứng dụng để phát triển các loại thuốc mới [7]. Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học có tác dụng dược lý đáng chú ý của tinh dầu như: kháng khuẩn, kháng nấm, chống côn trùng, thuốc diệt cỏ [4], [6], [8]. Tại Việt Nam, nhu cầu về sử dụng cũng như sản xuất tinh dầu ngày càng tăng, tuy nhiên vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về phương pháp định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh. Việc xây dựng được quy trình định lượng thành phần chính trong tinh dầu bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora* Hook) như citronellal bằng sắc ký khí (GC) kết hợp đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) là rất cần thiết để kiểm tra hàm lượng citronellal trong tinh dầu, góp phần nâng cao tiêu chuẩn kiểm định chất lượng tinh dầu phục vụ ngành công nghiệp dược cũng như cung cấp những dẫn liệu khoa học nhằm phát triển các khả năng ứng dụng khác.

Mục tiêu nghiên cứu: Chiết xuất tinh dầu bạch đàn chanh bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước. Xây dựng quy trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh chiết được bằng phương pháp sắc ký khí.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Tinh dầu bạch đàn chanh được chiết xuất từ lá cây bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora*) được thu hái ở Long An vào tháng 5 năm 2019.

2.2 Trang thiết bị

Bộ chưng cất tinh dầu, máy sắc ký khí Agilent GC 7890B ghép đầu dò FID.

2.3 Địa điểm nghiên cứu

Phòng nghiên cứu bộ môn Bào chế - Công nghiệp Dược, Khoa Dược, trường Đại học Y dược Cần Thơ.

Phòng sắc ký khí bộ môn Dược Liệu, Khoa Dược, trường Đại học Y dược Cần Thơ.

2.4 Dung môi hóa chất

Ethyl acetat (Bruker, Mỹ), isopropanol (Merck, Đức) và chuẩn citronellal (Sigma-Aldrich) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Toluen (Xylong, Trung Quốc), natri clorid (Xylong, Trung Quốc).

2.5 Phương pháp nghiên cứu

2.5.1 Chiết xuất tinh dầu

Chiết xuất tinh dầu từ lá bạch đàn chanh bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước.

Khảo sát quy trình chiết tối ưu: khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ nước, nhiệt độ, thời gian, tốc độ chiết đến thể tích và tính chất tinh dầu bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước.

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất ưu bằng phần mềm BC Pharsoft.

2.5.2 Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng tinh dầu chiết được bằng sắc ký khí (GC) ghép với đầu dò FID.

Khảo sát các điều kiện sắc ký dự kiến, tiến hành thay đổi các thông số nồng độ định lượng, chương trình nhiệt, tỉ lệ chia dòng để được điều kiện sắc ký thích hợp.

Thẩm định quy trình định lượng bao gồm các tiêu chí: tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD, Limit of detection) và giới hạn định lượng (LOQ, Limit of Quantitation) theo hướng dẫn của AOAC.

2.5.2.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 0,5 g tinh dầu bạch đàn chanh cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung vừa đủ ethylacetat, lắc đều. Hút chính xác 0,2 mL dung dịch vừa pha cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung vừa đủ ethylacetat, lắc đều.

2.5.2.2 Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác khoảng 0,5 g citronellal chuẩn cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung vừa đủ ethylacetat, lắc đều. Hút chính xác 0,2 mL dung dịch vừa pha cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung vừa đủ ethylacetat, lắc đều.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Kết quả khảo sát điều kiện chiết xuất tinh dầu

Khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố đến thể tích tinh dầu thu được. Xác định được tác động của 3 yếu tố là độ ẩm dược liệu, thời gian chưng cất và tốc độ cất.

Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến tính chất cảm quan tinh dầu thu được. Xác định được tác động của 4 yếu tố là độ ẩm dược liệu, thời gian chưng cất, tỉ lệ nước/dược liệu, tốc độ cất.

Tiến hành các thực nghiệm theo thiết kế nghiên cứu và xác định được điều kiện chưng cất tối ưu, với độ ẩm dược liệu 16,3%, thời gian chưng cất 1 giờ, tỷ lệ nước/dược liệu 6:1, tốc độ chưng cất 2 mL/phút và nồng độ NaCl là 2%.

Tiến hành kiểm chứng công thức tối ưu, thu được tinh dầu với thể tích là 0,546 ml, có mùi thơm phù hợp với kết quả dự đoán của phần mềm BC Pharsoft.

3.2 Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh bằng GC-FID

3.2.1 Xây dựng quy trình

Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện thích hợp cho phân tích citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh như sau:

Cột phân tích: cột Agilent HP5 (kích thước 0,32 mm x 0,25 μ m x 30 m)

Nhiệt độ tiêm mẫu: 250°C, tỉ lệ chia dòng là 1:10.

Detector ion hóa ngọn lửa: nhiệt độ detector 280°C, thể tích tiêm mẫu 1 μ L, tốc độ dòng khí H₂ 80 mL/phút, dòng không khí 400 mL/phút, dòng khí hỗ trợ 45 mL/phút.

Tốc độ dòng: 3 mL/phút.

Thời gian phân tích: 19,4 phút.

Bảng 1. Điều kiện sắc ký tối ưu định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh.

Khảo sát tính tương tính hệ thống: pha dung dịch chuẩn citronellal và dung dịch thử tinh dầu bạch đàn chanh có nồng độ là 200 μ g/mL.

STT	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ tăng nhiệt độ (°C/phút)	Thời gian lưu (phút)	Thời gian phân tích (phút)
1	40		2	2
2	100	10	1	9
3	104	2	2	13
4	106	2	2	16
5	110	40	0	16,1
6	120	40	1	19,4

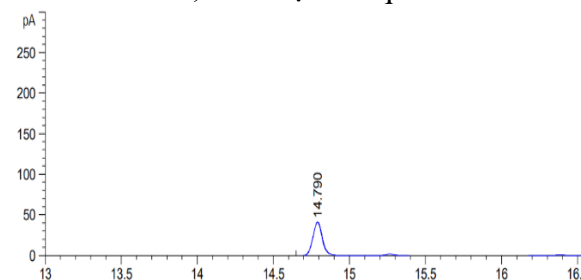
Bảng 2. Kết quả khảo sát tương thích hệ thống (n=6)

Mẫu	Giá trị thống kê	t _R	S	k'	A _s	N	R _s
Chuẩn	X _{tb}	14,8	228,9	6,6	1,1	308620	21,42
	SD	0,001	1,2	0	0,02	5524	0,01
	RSD	0,06	0,5	0	1,8	1,8	0,02
Thử	X _{tb}	14,8	151,4	6,6	1,0	314969	17,5
	SD	0,001	0,60	0	0,02	4323,4	0,01
	RSD	0,001	0,39	0	1,92	1,4	0,05

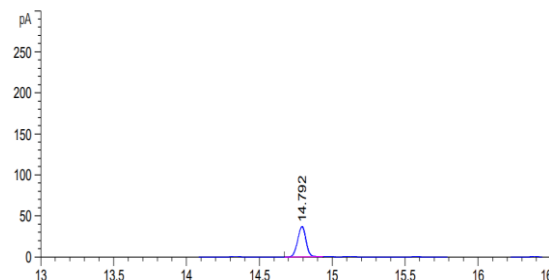
Nhận xét: RSD của các thông số sắc ký t_R, S, k', A_s, N, R_s của mẫu thử và mẫu chuẩn đều nhỏ hơn 2% sau 6 lần tiêm liên tiếp. Quy trình đạt tính tương thích hệ thống nên điều kiện sắc ký thích hợp để tiến hành thẩm định.

3.2.2 Thẩm định phương pháp

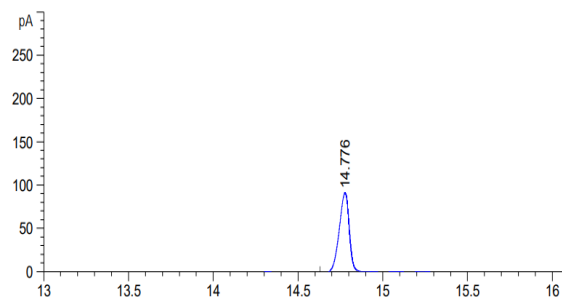
Tính đặc hiệu: khảo sát trên các mẫu: mẫu dung môi, mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn, thu được kết quả như sau:



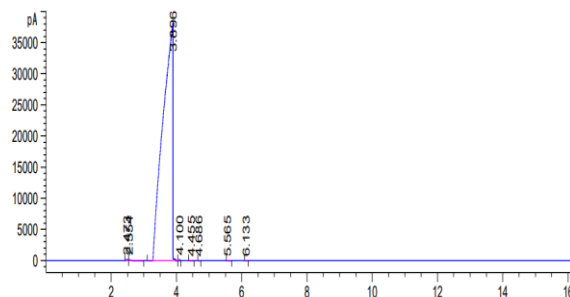
Hình 1: Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Hình 2: Sắc ký đồ mẫu thử



Hình 3: Sắc ký đồ thử thêm chuẩn



Hình 4: Sắc ký đồ dung môi

Đỉnh citronellal của mẫu thử có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của đỉnh citronellal có trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ dung môi không có đỉnh có thời gian lưu

tương đương với thời gian lưu của đỉnh trong mẫu chuẩn. Đỉnh cần khảo sát của mẫu thử thêm chuẩn có sự tăng lên về chiều cao và diện tích của đỉnh citronellal, có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của đỉnh citronellal trong mẫu chuẩn.

Khoảng tuyến tính, miền giá trị, LOD, LOQ:

Bảng 3. Khoảng tuyến tính, miền giá trị, LOD, LOQ của citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh.

Khoảng nồng độ tuyến tính	100-280 (µg/mL)
Đường tuyến tính	$y=0,6589x + 21,015$
R²	R ² = 0,9982
LOD	3,2 (µg/mL)
LOQ	9,86 (µg/mL)

Độ chính xác:

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ chính xác citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh

STT	Nồng độ citronellal ngày 1 (µg/mL), n=6	Nồng độ citronellal ngày 2 (µg/mL), n=6	Nồng độ citronellal ngày 3 (µg/mL), n=6
Xử lý kết quả	X _{tb} = 125,6 µg/mL SD= 0,2 RSD= 0,4 %	X _{tb} = 125,8 µg/mL SD= 0,3 RSD= 0,4 %	X _{tb} = 125,4 µg/mL SD= 0,7 RSD= 1,2%

Nhận xét: Giá trị RSD của hàm lượng citronellal ngày 1, ngày 2, ngày 3 lần lượt là: 0,4%, 0,4%, 1,2%. Các giá trị này ≤ 2%, nên đạt độ lặp lại theo hướng dẫn của AOAC.

Độ đúng:

Bảng 5. Kết quả định lượng nồng độ citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh (n=6)

STT	Nồng độ citronellal (µg/mL)	Xử lý kết quả
1	125,6	X _{tb} = 125,4 µg/mL SD= 0,64 RSD= 0,51%
2	125,0	
3	124,9	
4	125,1	
5	125,2	
6	126,6	

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh

Mẫu	Nồng độ citronellal trong mẫu (µg/mL)	Lượng chuẩn citronellal thêm vào (µg/mL)	Lượng chuẩn citronellal tìm lại (µg/mL)	Tỉ lệ hồi phục (%)
80% (n=3)	125,4	152	277,3	99,9
	125,4	152	277,6	100,1
	125,4	152	278,1	100,4
100% (n=3)	125,4	190	317,1	100,9
	125,4	190	315,6	100,1
	125,4	190	314,2	99,3
120% (n=3)	125,4	228	352,0	99,4
	125,4	228	352,1	99,4
	125,4	228	350,8	98,9

Nhận xét: Độ đúng được thực hiện ở 3 nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ tiến hành trên 3 mẫu thử. Chuẩn bị mẫu thử có nồng độ 200 µg/mL thì nồng độ citronellal có trong

mẫu thử trung bình là 125,4 µg/mL (bảng 5), mẫu thử thêm chuẩn: lần lượt cho thêm vào 3 mẫu thử lượng chuẩn với 3 mức 80%, 100%, 120% so với hàm lượng citronellal trong mẫu thử. Tỷ lệ hồi phục của citronellal 99,3-100,9%, tỷ lệ hồi phục trung bình của citronellal là 99,8%. Tỷ lệ hồi phục nằm trong khoảng giới hạn cho phép, vậy quy trình đạt độ đúng.

IV. BÀN LUẬN

Với điều kiện chiết tinh dầu từ lá bạch đàn chanh tối ưu tìm được, tinh dầu thu được có tính chất cảm quan tốt, không màu, mùi thơm nồng. Hàm lượng tinh dầu trong lá bạch đàn chanh là 1,6%, cao hơn so với các nghiên cứu trong và ngoài nước [1], [9]. Nguyên nhân là do sự khác nhau về điều kiện chiết xuất.

Hàm lượng citronellal trong nghiên cứu chiếm 61,9% tinh dầu toàn phần. Kết quả này cao hơn so với hàm lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh từ Ấn Độ khi chiết cùng một phương pháp [9]. Sự khác nhau về hàm lượng citronellal trong một loài có thể do giai đoạn phát triển của cây, dinh dưỡng, loại đất, các yếu tố môi trường, nhiệt độ, khí hậu và thời gian thu thập mẫu [2].

Quy trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh sử dụng dung môi phổ biến, xử lý mẫu đơn giản, thời gian phân tích ngắn (19,4 phút) so với nghiên cứu trước đây [10].

V. KẾT LUẬN

Đã tìm được điều kiện chiết xuất tối ưu tinh dầu bạch đàn chanh từ lá để đạt được thể tích và tính chất tinh dầu tối ưu: độ ẩm 16,3%, tỉ lệ nước/được liệu 6:1 (mL:g), nồng độ NaCl 2%, thời gian cất 1 giờ, tốc độ cất 2 mL/phút.

Đã xây dựng qui trình định lượng citronellal trong tinh dầu bạch đàn chanh bằng phương pháp GC-FID với chương trình nhiệt độ lò: 40°C đến 120°C trong khoảng thời gian phân tích 19,4 phút, thời gian lưu của citronellal là 14,8 phút. Hơn nữa, phương pháp đã được thẩm định đạt về độ đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác. Khoảng nồng độ tuyến tính là 100-280 µg/mL với phương trình hồi qui $y = 0,6589x + 21,015$, với $R^2 = 0,9982$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Ngọc Dũng (2016), *Nghiên cứu chiết xuất tinh dầu từ lá cây bạch đàn bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước*, trường đại học Bà Rịa -Vũng Tàu.
2. Adilson Vidal Costa, Patricia Fontes Pinheiro, Vagner Tebaldi de Queiroz, Vando Miossi Rondelli, Andre Kulitz Marins, Wilson Rodrigues Valbon, Dirceu Pratissoli (2015), Chemical composition of essential oil from Eucalyptus citriodora leaves and insecticidal activity against Myzus persicae and Frankliniella schultzei, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), pp.374–381.
3. Chippendale, George M. (1988), Myrtaceae–Eucalyptus - Angophora, *Flora of Australia*, 19, pp.106-107.
4. H Tolba, H Moghrani, A Benelmouffok, D Kellou, R Maachi (2015), Essential oil of algerian Eucalyptus citriodora: Chemical composition, antifungal activity, *Journal de Mycologie Médicale*, 25(4), pp.128-133.
5. K.D.Hill & L.A.S.Johnson (1995), Lemon-scented gum, Spotted gum, *Telopea*, 6(2-3), pp.388.
6. Lin SQ & Zhou ZL & Yin WQ (2016), Three new polyphenolic acids from the leaves of Eucalyptus citriodora with antivirus activity, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 64(11), pp.1641-1646.

7. Miguel et al. (2018), Antibacterial, antioxidant, and antiproliferative activities of corymbia citriodora and the essential oils of eight eucalyptus species, *Medicines*, 5(3), pp.61.
8. Singh H.P, Kaur S., Negi K., Kumari S., Batish V.S.D.R., Kohli R.K. (2012), Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus citriodora (lemon-scented eucalyptus, Myrtaceae) and its major constituents, *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), pp.237-241.
9. S. Luqman, G. R. Dwivedi, M. P. Darokar, A. Kalra 1, S. P. S. Khanuja (2008), Antimicrobial activity of Eucalyptus citriodora essential oil, *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 2, pp.69-75.
10. Sue Clarke (2008), *Essential Chemistry for Aromatherapy*, 2nd edition.

(Ngày nhận bài: 16/3/2020 - Ngày duyệt đăng: 6/8/2020)
