

TRÍCH LY VÀ KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA TINH DẦU LÁ VỎI RỪNG (*Cleistocalyx operculatus* L.) THU HÁI Ở KHU VỰC TỈNH QUẢNG TRỊ

Lê Hải Đường¹, Nguyễn Thị Hồng Nhung¹, Bùi Gia Linh¹,

Nguyễn Minh Thuận¹, Nguyễn Thị Thanh Ngân²,

Lữ Thị Mộng Thy², Trần Nguyễn An Sa^{2*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: satna@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 19/9/2022; Ngày chấp nhận đăng: 14/7/2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định các điều kiện thích hợp trong quy trình trích ly tinh dầu trong lá vối thu hái ở Quảng Trị, sử dụng bộ định lượng tinh dầu theo Dược điển Việt Nam V. Kết quả phân tích phương sai đơn yếu tố cho thấy các yếu tố khảo sát như nồng độ NaCl, thể tích dung dịch NaCl, thời gian trích ly ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly tinh dầu. Lượng tinh dầu thu được cao nhất (0,289%) khi thực hiện trích ly với các thông số tối ưu như sau: khối lượng nguyên liệu là 300 g, nồng độ nước muối NaCl là 2%, thể tích nước muối 900 mL, bình cất 2 lít, thời gian trích ly 120 phút. Theo kết quả phân tích GC/MS, thành phần chính của tinh dầu lá vối chứa trans- β -ocimene (35,962%); β -ocimene (10,935%); β -myrcene (26,367%); α -Pinene (10,365%); (-)- β -Pinene (1,598%); caryophyllene (6,491%); isocaryophyllene (0,196%); caryophyllene oxide (1,484%); humulene (1,16%); humulenol-II (0,187%). Hiệu quả loại bỏ gốc tự do của tinh dầu lá vối (phương pháp DPPH) được xác định thông qua khả năng kháng oxy hóa của tinh dầu lá vối, IC₅₀ = 280,43 (ppm) thấp hơn 42,7 lần so với acid ascorbic IC₅₀ = 6,51 (ppm).

Từ khóa: *Cleistocalyx operculatus* L., hoạt tính kháng oxy hoá (DPPH), GC/MS, tinh dầu.

1. MỞ ĐẦU

Cây vối có tên khoa học là *Cleistocalyx operculatus* L., thuộc họ Sim (Myrtaceae), là loại cây mọc nhiều ở vùng nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây vối mọc hoang và được trồng nhiều ở miền Bắc, lá vối trong dân gian được sử dụng trị các bệnh như tăng huyết áp, tiêu chảy, phòng ngừa bệnh gout... Theo tài liệu nghiên cứu của Giáo sư Đỗ Tất Lợi, lá và nụ vối có chất kháng sinh thực vật, diệt được nhiều mầm vi khuẩn gây bệnh [1]. Theo các nghiên cứu đã công bố, lá vối chứa các nhóm hợp chất hữu cơ flavonoid, polyphenol, tinh dầu, triterpenoid tự do, hợp chất polyuronic, acid hữu cơ và carotenoid [2, 3]. Đặc biệt, acid maslinic phân lập từ lá cây vối có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase [4]. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy dịch chiết methanol từ lá vối có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Streptococcus mutans* GS-5 (*S.mutans*), *Staphylococcus epidermidis* 847, *Staphylococcus haemolyticus* 535 [3, 5].

Đối với tinh dầu từ lá vòi, theo kết quả phân tích thành phần hóa học của tinh dầu lá *Cleistocalyx operculatus* được thu thập ở Makwanpur, Hetauda, Nepal vào tháng 8 năm 2014, với 100 g lá (chung cất bằng cách sử dụng thiết bị Likens-Nickerson, chiết xuất liên tục sử dụng cloroform trong 4 giờ) thu nhận 0,4 mL tinh dầu màu vàng, kết quả phân tích bằng phương pháp GC/MS thu được các thành phần chính myrcene (69,70%), (*E*)- β -ocimene (12,24%), (*Z*)- β -ocimene (4,79%), Linalool (4,08%), *p*-cymene (2,71%), (*E*)-nerolidol (1,57%), β -phellandrene (1,20%), (*E*)-caryophyllene (1,11%), γ -terpinene (0,82%), α -phellandrene (0,69%), α -thujene (0,53%), terpinolene (0,26%), caryophyllen oxid (0,23%), (*Z*)-asarone (0,05%) [6]. Ở Việt Nam, cũng đã có nhiều kết quả nghiên cứu về thành phần tinh dầu trong lá vòi đã được công bố với các thành phần chính như: (*Z*)- β -ocimene (32,1%); myrcene (24,6%); β -caryophyllene (14,5%); (*E*)- β -ocimene (9,4%); α -pinene (3,7%); β -pinene (0,6%); limonene (0,3%); α -humulene (2,7%); caryophyllene oxid (2,9%) (lá vòi thu hái ở Vinh - Nghệ An) [7]. Kết quả phân tích thành phần lá vòi thu mua ở Gò Vấp, Thành phố Hồ Chí Minh [8] và thu hoạch ở Đông Giang, tỉnh Quảng Nam [9] đều có thành phần tương tự như lá vòi ở Vinh đều chứa caryophyllene oxid. Tuy nhiên lá vòi ở Gò Vấp sau khi chưng cất 100 °C trong 4 giờ với dung dịch NaCl 15%, sử dụng thiết bị Clevenger đã thu nhận được 1,5 mL tinh dầu trong nước với thêm 12 hợp chất khác bao gồm 6-camphenol; isopinocarveol; *p*-cymen-8-ol; (-)-myrtenol; I-verbenone; *cis*-carveol; ethaneperoxoic acid; 1-cyano-4,4-dimethyl-1-phenylpentyl ethaneperoxoate; 2-(4a,8-dimethyl-2,3,4,4a, 5,6-hexa hydronaphthalen-2-yl) propan-1-; (-)-globulol; (+)-carotol; và longipinocarvone [8]. Kết quả phân tích GC/MS, thành phần tinh dầu trong lá vòi ở Quảng Nam khi chưng cất lôi cuốn hơi nước thu được 42 cấu tử, bên cạnh caryophyllene oxide (0,19%), còn thu được các cấu tử chính bao gồm junipene (58,32%), α -humulene (11,07%), α -amorphene (7,47%), δ -cadinene (4,13%), (+)-aromadendrene (4,73%), α -selinene (2,81%), alloaromadendrene (2,59%), β -ionone (0,73%), bicyclogermacrene (1,49%), isoterpinolene (1,16%), α -gurjunene (0,64%), γ -gurjunene (0,39%), torreyol (0,19%), α -copaene (0,15%), (-)- β -pinene (0,08%), *cis*- α -bisabolene (0,06%) [9]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiều hợp chất trong tinh dầu lá vòi có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống viêm [9].

Mặc dù đã có nhiều công trình nghiên cứu về lá vòi ở Việt Nam và trên thế giới, tuy nhiên các nghiên cứu chỉ tập trung phân tích thành phần hóa học trong tinh dầu, chưa có công bố cụ thể về quy trình trích ly tinh dầu lá vòi đặc biệt là lá vòi rừng. Ngoài ra, các kết quả phân tích cũng cho thấy có sự khác nhau về thành phần hóa học của tinh dầu lá vòi ở các vị trí thu hái khác nhau. Do đó, mục tiêu nghiên cứu trong báo cáo là xác định các điều kiện thích hợp trong quy trình trích ly tinh dầu từ lá vòi rừng thu hái ở huyện Cam Lộ - tỉnh Quảng Trị, đồng thời phân tích các chỉ số hoá lý (chỉ số acid, iod, tỉ trọng), hoạt tính sinh học và thành phần hóa học (GC/MS) trong tinh dầu.

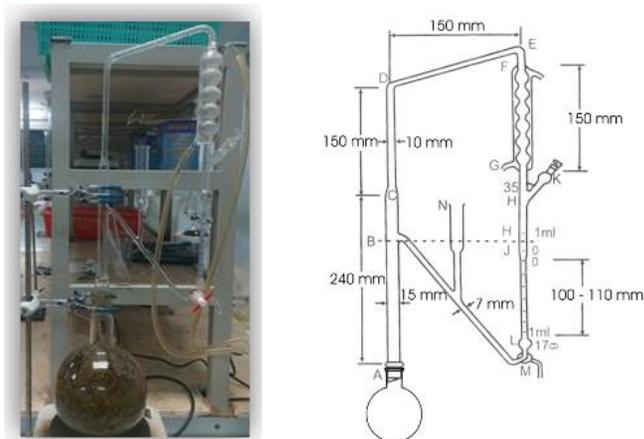
2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị

Máy quang phổ 2 chùm tia Jasco - double beam spectrophotometer model V530, với cell đo có chiều dài đường truyền 1 cm.

Máy sắc ký khí ghép khối phổ GC/MS-Quadrupole 7890A Agilent Technologies, cột HP-5MS, (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, 30 m \times 0,250 mm \times 0,25 μ m; thông số MS: chế độ phân tích EI+, nhiệt độ transferline: 280 °C, nhiệt độ source: 230 °C; năng lượng ion hóa: 70 eV; chế độ quét phổ: (40-500) m/z.

Bộ chưng cất định lượng tinh dầu trong dược liệu (Theo Dược điển Việt Nam V) [10].



Hình 1. Bộ chưng cất tinh dầu theo quy định của Dược điển Việt Nam V

2.2. Nguyên liệu và hóa chất

2.2.1. Nguyên liệu

Lá vối dùng trong thí nghiệm được thu hái ở khu vực rừng tự nhiên (huyện Cam Lộ - Quảng Trị) vào khoảng tháng 3/2022. Lá vối thu hái tươi, không bị nấm mốc, đạt độ trưởng thành và không bị sâu bệnh. Lá vối được rửa sạch, loại bỏ tạp chất và bảo quản ở nhiệt độ 4-8 °C dùng trong suốt quá trình thí nghiệm.



Hình 2. Lá vối tươi

2.2.2. Hóa chất

Hóa chất sử dụng cho nghiên cứu là loại tinh khiết hóa học và tinh khiết dành cho phân tích: aceton (Fisher, 99,8%); ethyl acetat (Fisher, 99,5%); natri clorua (Trung Quốc, 99,5%); natri sulfat (Trung Quốc, 99,9%); methanol (Trung Quốc, 99,5%); acid clohydric (Trung Quốc, 36% - 38%); DPPH (Merck, 99%); acid ascorbic (Merck, 99%); diethyl ete (Việt Nam, 99,5%); Thuốc thử Wijs (Merck).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp trích ly tinh dầu bằng bộ dụng cụ định lượng tinh dầu theo quy định của Dược điển Việt Nam V

Nguyên liệu lá vối được xử lý sơ bộ (làm sạch, loại bỏ lá hư), cân và cắt nhỏ cho vào bình cầu 2 lít, 1 mL xylen được thêm vào ống thu tinh dầu. Tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước sử dụng hệ thống định lượng tinh dầu trong dược liệu (Hình 1). Tinh dầu và hơi nước sau khi qua hệ thống ngưng tụ được thu ở lớp trên của bộ hứng tinh dầu. Hàm lượng tinh dầu

thu được tính theo công thức (1), tinh dầu được làm khan nước bằng natri sunfat và bảo quản trong lọ màu nâu ở nhiệt độ < 5 °C.

$$\text{Hàm lượng tinh dầu (mL/100 g)} = \frac{V_{\text{tinh dầu (mL)}}}{m_{\text{là với}} \times \left(\frac{100 - (\%)\text{Độ ẩm}}{100}\right)} \times 100 \quad (1)$$

2.3.2. Phân tích các chỉ số đặc trưng của tinh dầu

2.3.2.1. Xác định tỉ trọng tinh dầu

Tỉ trọng (trọng lượng riêng) là tỉ lệ khối lượng của một thể tích nhất định của tinh dầu và khối lượng của cùng một thể tích nước được lấy ở cùng nhiệt độ [11] và được tính toán theo công thức (2).

$$D_{20} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \quad (2)$$

m_0 : Khối lượng tính bằng gam của bình tỉ trọng, m_1 : Khối lượng tính bằng gam của bình tỉ trọng chứa đầy nước cất, m_2 : Khối lượng tính bằng gam của bình tỉ trọng chứa đầy tinh dầu.

2.3.2.2. Xác định chỉ số acid

Chỉ số acid (I_a) là số mg KOH cần thiết để trung hòa lượng acid tự do có trong 1 gam tinh dầu [11] và được tính toán theo công thức (3).

$$I_a = \frac{V \times C \times 56,11}{m} \quad (\text{mgKOH/g}) \quad (3)$$

V: Thể tích (mL) dung dịch KOH tiêu tốn cho quá trình chuẩn độ, C: Nồng độ (mol/L) dung dịch KOH, m: khối lượng mẫu (g).

Quy trình: cân chính xác khoảng 0,1 g tinh dầu, thêm 50 mL hỗn hợp đồng thể tích ethanol 96% và eter đã được trung hòa trước bằng dung dịch KOH 0,1 M trong ethanol, dùng 0,5 mL dung dịch phenolphthalein làm chỉ thị, lắc đều cho tinh dầu tan hoàn toàn, chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,1 M đến khi xuất hiện màu hồng bền vững trong 15 giây [11].

2.3.2.3. Xác định chỉ số iod

Chỉ số iod là số g iod kết hợp với 100 g tinh dầu trong những điều kiện quy định. Chỉ số iod được tính theo công thức (4).

$$I_a = \frac{\left[(V_0 - V) \times C \times \frac{M_{I_2}}{2} \right]}{1000} \times \frac{100}{m} \quad (\text{gI}_2/100\text{g}) \quad (4)$$

V, V_0 : lần lượt là thể tích (mL) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ chuẩn mẫu thật và trắng; C là nồng độ đương lượng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; m – khối lượng mẫu.

Quy trình: cân chính xác khoảng 0,1 g tinh dầu cho vào erlen nhám, thêm 15 mL CCl_4 , 25 mL thuốc thử Wijs, giữ tối khoảng 2 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thêm 15 mL KI 10% và 100 mL nước cất. Chuẩn độ dung dịch thu được bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N đến khi dung dịch có màu vàng nhạt, thêm 0,5 mL dung dịch hồ tinh bột và tiếp tục chuẩn độ chậm cho đến khi dung dịch mất màu. Tiến hành song song một mẫu trắng với 10 mL CCl_4 và 20 mL thuốc thử Wijs [12].

2.3.3. Phương pháp khử gốc tự do DPPH

Phương pháp khử gốc tự do DPPH được phát minh bởi Blois (1958), DPPH là một gốc tự do bền, dung dịch có màu tím, bước sóng cực đại hấp thụ tại 517 nm. Các chất có khả năng

kháng oxy hóa sẽ phản ứng với DPPH, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng sẽ nhạt dần. IC₅₀ được định nghĩa là nồng độ của mẫu mà tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do, là một giá trị dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hay yếu của mẫu cần khảo sát, mẫu có hoạt tính càng cao thì IC₅₀ sẽ càng thấp [13, 14]. Phương pháp khử gốc tự do DPPH được thực hiện như sau: 100 µL tinh dầu đã hoà tan trong methanol được thêm vào 2,0 mL DPPH (0,5 mmol/L) trong methanol, để yên 20 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Phần trăm khả năng khử gốc tự do được tính theo công thức (5).

$$(\%) \text{ chống oxy hoá} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (5)$$

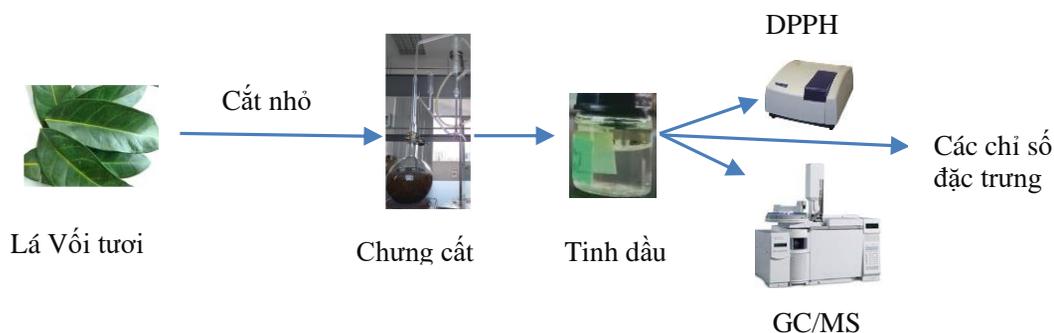
Trong đó: A_c, A_s lần lượt là độ hấp thụ quang của mẫu chuẩn và mẫu thử.

2.3.4. Phân tích thành phần hóa học trong tinh dầu bằng phương pháp GC/MS

Để tránh quá tải cột sắc ký và đầu dò MS, tinh dầu cần pha loãng tỉ lệ (50:1) trong n – hexan, tỉ lệ chia dòng trong injector là (20:1). Điều kiện thực hiện GC và MS như 2.1.

2.4. Bố trí thí nghiệm

Các bước thí nghiệm được bố trí như Hình 3, các yếu tố được khảo sát bằng phương pháp đơn yếu tố, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các yếu tố khảo sát bao gồm: nồng độ dung dịch NaCl, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (w/v), thời gian chưng cất. Hàm lượng tinh dầu trung bình giữa các thí nghiệm được so sánh với nhau thông qua phần mềm SPSS với khoảng tin cậy 95%.



Hình 3. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá chất lượng nguyên liệu

Lá vối sau khi xử lý sơ bộ được xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy ở 105 °C đến khối lượng không đổi theo TCVN 8949:2011 [15], kết quả độ ẩm trong lá vối tương đối lớn (77,76± 0,25)%, độ ẩm là thông số để xác định hàm lượng tinh dầu (tính trên 100 g lá vối đã trừ ẩm)

3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình trích ly tinh dầu

3.2.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl

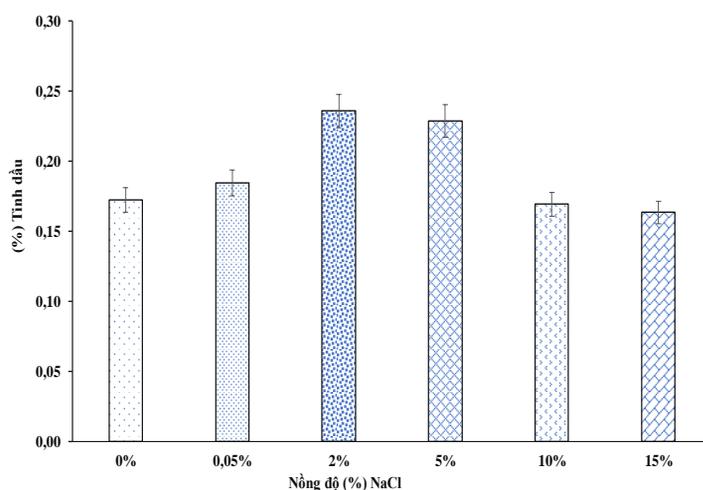
Theo các nghiên cứu đã công bố, NaCl thường được thêm vào trong quy trình chưng cất tinh dầu nhằm tăng khả năng thẩm thấu, tăng độ phân cực của nước, làm quá trình tách tinh dầu khỏi nước được dễ dàng hơn [16, 17]. Thí nghiệm được bố trí theo mô hình đơn biến, cố định thời gian trích ly là 180 phút (quan sát thực tế, lượng tinh dầu trong ống thu tinh dầu không tăng), khối lượng nguyên liệu là 300 g, thể tích nước muối NaCl là 900 mL, bình cất 2 lít.

Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hàm lượng tinh dầu (\pm SD) trong lá vối được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 4.

Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hàm lượng tinh dầu (tính trong 100 g lá đã loại ẩm)

Thí nghiệm	Nồng độ NaCl (%)	Hàm lượng tinh dầu (%)
1	0	0,172 ^a \pm 0,017
2	0,05	0,184 ^a \pm 0,015
3	2,0	0,236 ^b \pm 0,029
4	5,0	0,229 ^b \pm 0,020
5	10,0	0,169 ^a \pm 0,018
6	15,0	0,163 ^a \pm 0,016

a, b, c, d, e trong cùng cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%



Hình 4. Kết quả so sánh hàm lượng tinh dầu (thay đổi nồng độ NaCl)

Kết quả phân tích phương sai 1 yếu tố đánh giá ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hàm lượng tinh dầu cho thấy ảnh hưởng của nồng độ muối đến hàm lượng tinh dầu là có nghĩa với $F = 7,806 > F_{crit} = 3,106$. Kết quả so sánh giá trị trung bình hàm lượng tinh dầu khi thay đổi nồng độ NaCl cho thấy hiệu suất trích ly ở thí nghiệm 3, 4 không khác nhau có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%, nhưng khác có ý nghĩa thống kê và cao hơn so với các thí nghiệm 1, 2, 5, 6 (Bảng 1). Điều này có thể được giải thích do NaCl có khả năng làm tăng khả năng thẩm thấu của nước vào tế bào, làm tăng độ phân cực của dung dịch, nhờ đó làm giảm lực tương tác giữa các cấu tử tinh dầu kém phân cực với nước. Nồng độ muối thấp không đủ để phá vỡ lớp nhũ tương làm giảm khả năng hòa tan một số cấu tử không phân cực. Khi hàm lượng muối quá cao, môi trường bên ngoài có nồng độ chất tan cao hơn bên trong tế bào, nước từ tế bào sẽ đi ra ngoài, các lớp bên ngoài chứa dầu co lại, ngăn cản sự thoát dầu ra ngoài. Theo kết quả nghiên cứu, dung dịch NaCl có nồng độ phù hợp trong khoảng 2-5%, hàm lượng NaCl này tương đồng với kết quả đã công bố về trích ly tinh dầu lá ngũ trảo (*Vitex negundo* Linn.) [16]. Để tiết kiệm lượng hóa chất, nồng độ muối được chọn là 2% cho các thí nghiệm tiếp theo.

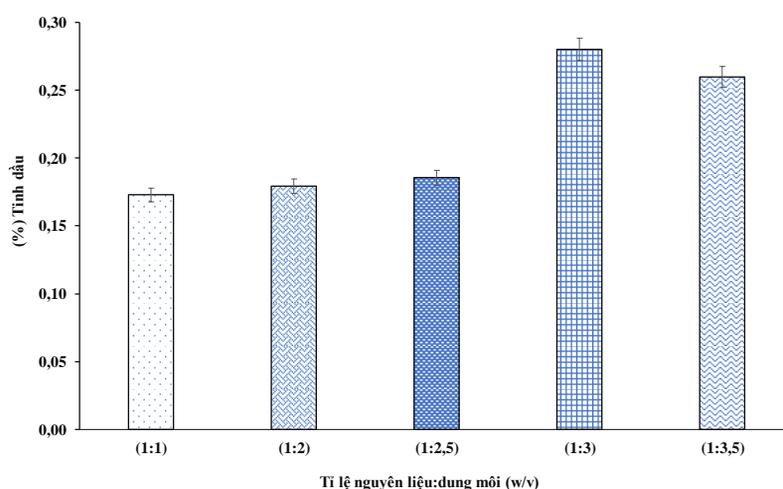
3.2.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (w/v)

Thí nghiệm được bố trí theo mô hình đơn biến, cố định thời gian trích ly là 180 phút, khối lượng nguyên liệu là 300 g, nồng độ nước muối tối ưu ở thí nghiệm 3.2.1. là 2% NaCl. Kết quả ảnh hưởng của thể tích nước muối NaCl hay tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (w/v) đến hàm lượng tinh dầu (\pm SD) trong lá vòi được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu:dung môi (w/v) đến hàm lượng tinh dầu

Thí nghiệm	Tỉ lệ nguyên liệu:dung môi (w/v)	Hiệu suất trích ly (%)
7	1:1	0,173 ^a \pm 0,019
8	1:2	0,179 ^a \pm 0,006
9	1:2,5	0,185 ^a \pm 0,005
10	1:3	0,280 ^b \pm 0,018
11	1:3,5	0,260 ^{a,b} \pm 0,019

a, b, c, d, e trong cùng cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%



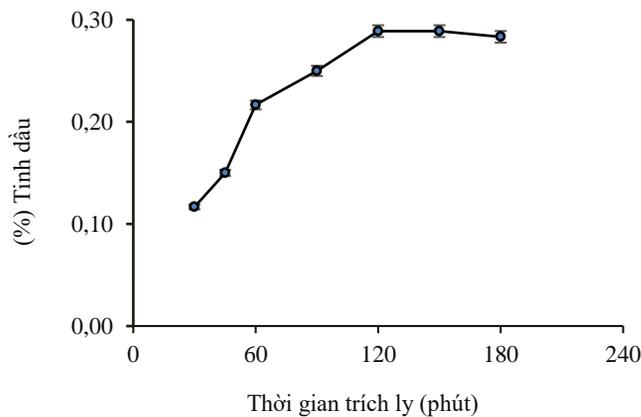
Hình 5. Kết quả so sánh hàm lượng tinh dầu (thay đổi tỉ lệ nguyên liệu/dung môi)

Kết quả phân tích phương sai 1 yếu tố đánh giá ảnh hưởng của thể tích NaCl đến hàm lượng tinh dầu cho thấy ảnh hưởng của thể tích nước muối đến hiệu suất trích ly là có nghĩa với $F = 35,187 > F_{crit} = 3,478$. Kết quả so sánh giá trị trung bình hàm lượng tinh dầu khi thay đổi thể tích nước muối hay tỉ lệ nguyên liệu/dung môi cho thấy giá trị (%)H ở thí nghiệm 10 khác có ý nghĩa thống kê và cao hơn so với các thí nghiệm 7, 8, 9 với khoảng tin cậy 95%. Điều này có thể được giải thích do nước tác động lên màng tế bào, làm màng tế bào giãn nở, phình lên và vỡ ra giúp giải phóng tinh dầu. Khi lượng nước quá thấp, thí nghiệm 7 và 8, lượng nước không đủ để ngập nguyên liệu, ở thí nghiệm 9, lượng nước đủ ngập nguyên liệu nhưng không đủ để thâm thấu qua màng tế bào vào túi tinh dầu, khả năng phân tán tinh dầu vào nước kém, lượng nước hóa hơi không đủ để lôi kéo tinh dầu. Để tiết kiệm lượng hóa chất, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi được chọn là (1:3) tương ứng 300 g lá và 900 mL dung dịch NaCl 2% cho các thí nghiệm tiếp theo. Tỉ lệ này có lượng dung môi (nước muối) cao hơn so với quy trình trích ly tinh dầu từ lá chúc và lá ngũ trảo [16, 17].

3.2.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian chưng cất

Thí nghiệm được bố trí theo mô hình đơn biến, cố định các biến đã tối ưu như: khối lượng nguyên liệu (300 g), nồng độ nước muối NaCl (2%), thể tích nước muối 900 mL, bình cất 2 lít, biến khảo sát là thời gian chưng cất. Kết quả thực nghiệm khi theo dõi thể tích tinh dầu trên ống hứng định lượng, lượng tinh dầu tăng dần theo thời gian (Hình 6).

Kết quả phân tích phương sai 1 yếu tố đánh giá ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng tinh dầu cho thấy ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng tinh dầu là có nghĩa với $F = 65,745 > F_{\text{crit}} = 1,882$. Kết quả so sánh giá trị trung bình hàm lượng tinh dầu khi thay đổi thời gian trích ly cho thấy hàm lượng tinh dầu ở các khoảng thời gian 120, 150, 180 phút không khác nhau (khoảng tin cậy 95%). Kết quả này cho thấy thời gian chưng cất khoảng 120 phút là phù hợp, nếu khi chưng cất quá dài, vượt thời gian tối ưu, làm tốn kém thời gian và năng lượng, đồng thời ảnh hưởng chất lượng tinh dầu.



Hình 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian trích ly

3.2.4. Nhận xét chung và đề xuất quy trình trích ly tinh dầu

Kết quả phân tích phương sai đơn yếu tố cho thấy các yếu tố khảo sát như nồng độ NaCl, thể tích dung dịch muối NaCl, thời gian trích ly đều ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu. Dựa vào các kết quả khảo sát, quy trình trích ly tinh dầu trong lá vối được đề xuất với các thông số tối ưu như sau: khối lượng nguyên liệu là 300 g, nồng độ nước muối NaCl là 2%, thể tích nước muối 900mL, bình cất 2 lít, thời gian trích ly 120 phút. So sánh với các tài liệu tham khảo [6, 8, 16-17], quy trình thu được có dung dịch NaCl với nồng độ thấp hơn và thời gian chưng cất ngắn hơn. Hàm lượng tinh dầu trong lá vối rừng thu hái ở khu vực Quảng Trị khi chưng cất với các điều kiện tối ưu thu được trong khoảng 0,289% (v/w), thấp hơn tinh dầu thu được từ lá vối ở Nepal (0,4% (v/w)) [6]. So với các lá cây có tinh dầu khác, lượng tinh dầu trong lá vối ở Quảng Trị cao hơn so với lá ngũ trảo [16].

3.3. Đánh giá chất lượng tinh dầu lá vối

3.3.1. Đánh giá cảm quan và tỉ trọng của tinh dầu lá vối

Tinh dầu lá vối thu được ở trạng thái lỏng, trong suốt, màu vàng nhạt, mùi thơm dễ chịu, vị đắng. Kết quả xác định tỉ trọng của tinh dầu lá vối theo phương trình 2 và quy trình như mục 2.3.2.1 thu được $d_{20}^{20} = 0,987 \pm 0,001$. So với các tinh dầu từ lá cây khác thì tinh dầu lá vối có tỉ trọng cao hơn tỉ trọng của tinh dầu thu nhận từ lá tía tô ($d_{20}^{20} = 0,941$) [18], tinh dầu lá bạc hà ($d_{20}^{20} = 0,890-0,922$) nhưng thấp hơn tinh dầu hương nhu trắng ($d_{20}^{20} = 1,030-1,050$) [19].



Hình 7. Tinh dầu lá vòi thu được trong thực nghiệm

3.3.2. Phân tích các chỉ số đặc trưng của tinh dầu

Các chỉ số acid và iod là những chỉ số quan trọng để đánh giá chất lượng của tinh dầu, kết quả phân tích các chỉ số acid, iod của tinh dầu lá vòi theo quy trình như mục 2.3.2. được trình bày ở Bảng 3 cho thấy tinh dầu lá vòi có chỉ số acid cao hơn so với tinh dầu lá tía tô (*Perilla frutescens* var. *Frutescens* - Đông Anh, Hà Nội) [18]; thấp hơn so với tinh dầu quả sa nhân ké (*Amomum xanthioides* - Huế) [20]. Ngoài ra, chỉ số iod đánh giá tỉ lệ không no trong tinh dầu, chỉ số iod của lá vòi cao hơn quả sa nhân ké cho thấy tinh dầu lá vòi có khả năng chống oxy hóa tốt hơn tinh dầu quả sa nhân ké.

Bảng 3. Kết quả phân tích các chỉ số acid, iod của tinh dầu lá vòi

Stt	Tên chỉ tiêu	Tinh dầu lá vòi	Tinh dầu quả sa nhân [20]	Tinh dầu lá tía tô [18]
1	Chỉ số acid (mgKOH/g)	1,609 ± 0,059	12,74 ± 0,36	0,94
2	Chỉ số iod (gI ₂ /100g)	127,9 ± 8,2	24,89 ± 0,35	

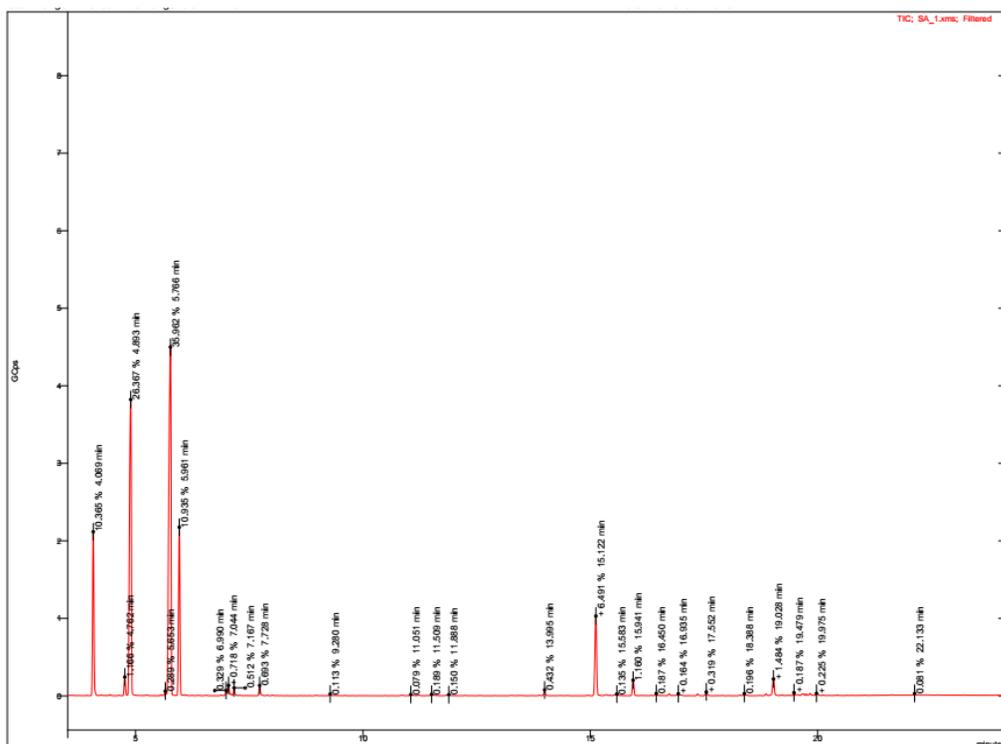
3.4. Thành phần hóa học của tinh dầu

Kết quả phân tích thành phần hóa học trong tinh dầu lá vòi rừng ở Quảng Trị (dung môi n-hexan, GC/MS) ở Bảng 4 và Hình 8 cho thấy thành phần hóa học trong tinh dầu lá vòi Quảng Trị tương đồng tinh dầu Nepal [6] với monoterpen chiếm ưu thế, đây là nhóm hợp chất hữu cơ có tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus [21]. Ngoài ra, thành phần và tỉ lệ phần trăm các chất trong nhóm monoterpen của tinh dầu lá vòi ở Quảng Trị tương đồng với kết quả phân tích tinh dầu lá vòi ở Vinh với thành phần chính là β -ocimene (46,9%); myrcene (24,6%). Bên cạnh đó, trong tinh dầu lá vòi ở Quảng Trị cũng có các thành phần caryophyllene và caryophyllene oxide tương tự như các lá vòi khác ở Việt Nam, nhưng hàm lượng thấp hơn.

Bảng 4. Thành phần hóa học trong tinh dầu lá vòi ở Quảng Trị (n-hexan, GC/MS)

STT	Thời gian lưu (phút)	Tên chất	Hàm lượng (%)
1	5,766	trans- β -Ocimene	35,962
2	5,961	β -Ocimene	10,935
3	4,893	β -Myrcene	26,367
4	4,069	α -Pinene	10,365
5	4,762	(-)- β -Pinene	1,166
6	13,995	(-)- β -Pinene	0,432
7	15,122	Caryophyllene	6,491
8	18,388	Isocaryophyllene	0,196

STT	Thời gian lưu (phút)	Tên chất	Hàm lượng (%)
9	19,028	Caryophyllene oxide	1,484
10	15,941	Humulene	1,16
11	19,479	Humulenol-II	0,187
12	7,044	Bergamiol	0,718
13	5,653	D-Limonene	0,289
14	6,99	Rosefuran	0,329
15	17,36	γ -Cadinene	0,132
16	17,552	δ -Cadinene	0,319
17	9,28	α -Terpineol	0,113



Hình 8. Sắc ký đồ phân tích thành phần hóa học trong tinh dầu lá Vối (n-hexan, GC/MS)

3.5. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá của tinh dầu lá vối

Hiệu quả loại bỏ gốc tự do hay khả năng kháng oxy hoá của tinh dầu lá vối được xác định thông qua IC_{50} , khả năng kháng oxy hóa của tinh dầu lá vối $IC_{50} = 280,43$ ($\mu\text{g/mL}$) thấp hơn 42,7 lần so với acid ascorbic $IC_{50} = 6,51$ ($\mu\text{g/mL}$) ở cùng điều kiện phân tích. Tuy nhiên so với các loại lá có tinh dầu khác thì cao hơn so với tinh dầu lá húng chanh (3762 ($\mu\text{g/mL}$)) [22] nhưng thấp hơn tinh dầu lá hương thảo (75,7 $\mu\text{g/mL}$) [23]. Điều này cho thấy tinh dầu lá vối có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn tinh dầu lá húng chanh nhưng kém hơn so với tinh dầu lá hương thảo.

4. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích phương sai đơn yếu tố cho thấy các yếu tố khảo sát như nồng độ NaCl, thể tích dung dịch NaCl, thời gian trích ly đều ảnh hưởng đến lượng tinh dầu thu được. Quy

trình đề xuất với các thông số tối ưu như sau: khối lượng nguyên liệu là 300 g, nồng độ nước muối NaCl là 2%, thể tích nước muối 900 mL, bình cất 2 lít, thời gian trích ly 120 phút. Hàm lượng tinh dầu trong lá vòi rừng thu hái ở khu vực Quảng Trị trong khoảng 0,289%. Theo kết quả phân tích GC/MS, thành phần chính của tinh dầu lá vòi chứa trans- β -ocimene (35,962%); β -ocimene (10,935%); β -Myrcene (26,367%); α -Pinene (10,365%); (-)- β -Pinene (1,598%); caryophyllene (6,491%); isocaryophyllene (0,196%); caryophyllene oxide (1,484%), humulene (1,16%); humulenol-II (0,187%). Hiệu quả loại bỏ gốc tự do của tinh dầu lá vòi (phương pháp DPPH) được xác định thông qua IC₅₀, khả năng kháng oxy hoá của tinh dầu lá vòi IC₅₀ = 280,43 (μ g/mL) thấp hơn 42,7 lần so với acid ascorbic IC₅₀ = 6,51 (μ g/mL).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Nguyễn Tất Thành bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 2022.01.08/HĐ-KHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học (2000) 423.
2. Lý Hồng Hương Hà, Trần Thị Thu Hằng, Võ Thị Bích Ngọc - Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa của lá vòi (*Cleistocalyx operculatus* Roxb.), *Myrtaceae*, Tạp chí Y Dược học Cần Thơ **41** (2021) 209-216.
3. Nguyen Thi Ngoc Tuyet, Nguyen Minh Anh, Le Thi Kim Phung - Extraction and bioactivity evaluation of the extracts from *Cleistocalyx operculatus* L. leaves, Vietnam Journal of Science and Technology **58** (6A) (2020) 52-62.
4. Trương Thị Tố Chinh, Phan Minh Giang - Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của lá vòi Việt Nam (*Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. Et Perry), Tạp chí Hóa Học **54** (3) (2016) 331-337.
5. Phuong Thi Mai Nguyen, Nadin Schultze, Christin Boger, Zeyad Alresley, Albert Bolhuis, Ulrike Lindequist - Anticaries and antimicrobial activities of methanolic extract from leaves of *Cleistocalyx operculatus* L., Asian Pac, J Trop Biomed **7** (1) (2017) 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.009>
6. Noura S. Dosoky, Suraj K. Pokharel, William N. Setzer - Leaf essential oil composition, antimicrobial and cytotoxic activities of *Cleistocalyx operculatus* from Hetauda, Nepal, American Journal of Essential oils and Natural products **2** (5) (2015) 34-37.
7. Nguyen Xuan Dung, Hoang Van Luu, Ta Thi Khoi, Piet A. Leclercq - GC and GC/MS analysis of the leaf oil of *Cleistocalyx operculatus* Roxb. Merr. et Perry (Syn. *Eugenia operculata* Roxb.; *Syzygium mervosum* DC.), Journal of Essential Oil Research **6** (1994) 661-662.
8. Gia-Buu Tran, Nghia-Thu Tram Le, Sao-Mai Dam - Potential use of essential oil isolated from *Cleistocalyx operculatus* leaves as a topical dermatological agent for treatment of burn wound, Dermatology Research and Practice (2018) <https://doi.org/10.1155/2018/2730169>
9. Giang Thị Kim Liên, Đào Hùng Cường - Một số nghiên cứu về thành phần hóa học của tinh dầu vòi và dịch chiết n-hexane của lá và nụ cây vòi thu hái ở tỉnh Quảng Nam, Việt Nam, Tạp chí khoa học và công nghệ đại học Đà Nẵng **9** (118) (2017) - Quyển 1, 104-108.
10. Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V, NXB Y học Hà Nội, 2017.

11. S. Boukeria, K. Kadi, R. Kalleb, A. Benbott, D. Bendjedou, A. Yahia - Phytochemical and physicochemical characterization of *Allium sativum* L. and *Allium cepa* L. essential oils, *J. Mater. Environ. Sci.* **7** (7) (2016) 2362-2368.
12. Aguebor-Ogie Nogiomwan Bobby, Nwosu Favour Ihuoma, Edokhume Peter - Evaluation of saponification value, iodine value, peroxide value and free fatty acid level of essential oil of cayenne pepper (*Capsicum annum*), *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology* **5** (2) (2020) 14-16.
13. Blois M.S. - Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181** (4617) (1958) 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
14. Nguyễn Văn Khanh, Đỗ Thị Nhài, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thanh Hải - Nghiên cứu chiết xuất và đánh giá tác dụng chống oxy hóa của tinh dầu tỏi từ củ tỏi (*Allium sativum* L.), *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences* **36** (3) (2020) 49-56.
15. TCVN 8949:2011(ISO 665:2000), Hạt có dầu - xác định độ ẩm và hàm lượng chất bay hơi.
16. Nguyễn Thị Anh Thư, Nguyễn Cẩm Lại, Mai Thị Thùy Lam, Thái Bảo Trân, Huỳnh Thị Mai Trân, Nguyễn Thị Mỹ Thảo - Nghiên cứu chiết xuất và khảo sát tính kháng khuẩn của tinh dầu lá ngũ tráo (*Vitex negundo* Linn.), *Tạp chí Công Thương* **6** (2022) 312-317.
17. Đặng Huỳnh Giao, Nguyễn Huỳnh Thu Thảo, Lê Thị Ái Ni, Lê Thị Tuyết Nhi, Lương Huỳnh Vũ Thanh, Cao Lưu Ngọc Hạnh, Ngô Trương Ngọc Mai - Nghiên cứu chung cất tinh dầu chích (*Citrus hystrix* DC.) và ứng dụng phối chế xà phòng diệt khuẩn, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **58** (2A) (2022) 1-10. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.031>
18. Nguyễn Thị Hoàng Lan, Bùi Quang Thuật, Lê Danh Tuyên, Ngô Thị Huyền Trang, Đỗ Thị Trang - Nghiên cứu công nghệ trích ly tinh dầu từ lá tía tô, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* **12** (3) (2014) 404-411.
19. Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V, NXB Y học Hà Nội (2017) 1398.
20. Nguyễn Ngọc Lê, Nguyễn Thị Tân, Trần Nhật Minh, Hồ Việt Đức, Nguyễn Thị Hoài - Tính chất lý hóa và thành phần hóa học tinh dầu sa nhân ké (*Amomum Xanthiodes*) ở A Lưới - Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế* **8** (4) (2018) 96-101.
21. Agata Koziol, Agnieszka Stryjewska, Tadeusz Librowski, Kinga Salat, Magdalena Gawel, Andrzej Moniczewski, Stanisław Lochyński - An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **14** (2014) 1156-1168.
22. Nguyễn Thị Ngọc Huyền, Mai Huỳnh Cang, Nghiên cứu chiết xuất tinh dầu và hoạt tính kháng oxy hoá của tinh dầu húng chanh (*Plectranthus amboinicus*), *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp* **1** (2018) 52-60.
23. Nguyễn Ngọc Yên, Bùi Nguyễn Anh Thư, Nguyễn Minh Kha - Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxy hóa của tinh dầu cây hương thảo (*Rosmarinus Officinalis* L.), *Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô* **6** (2019) 190-201.

ABSTRACT

EXTRACT AND SURVEY OF THE CHEMICAL COMPOSITION, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF LEAVES OF *Cleistocalyx operculatus* L. IN QUANG TRI PROVINCE

Le Hai Duong¹, Tran My Duyen¹, Bui Gia Linh¹, Nguyen Minh Thuan¹,
Nguyen Thi Thanh Ngan², Lu Thi Mong Thy², Tran Nguyen An Sa^{2*},

¹*Nguyen Tat Thanh University*

²*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

*Email: satna@hufi.edu.vn

This study was carried out to determine the appropriate conditions in the extraction process of essential oil from *Cleistocalyx operculatus* L. leaves collected in Quang Tri, using an essential oil quantifier according to the Vietnam Pharmacopoeia V. Results single-factor analysis of variance showed that the investigated factors such as NaCl concentration, the volume of NaCl solution, and extraction time affect the extraction efficiency of essential oils. The highest amount of essential oil was obtained (0.289%) when extracting with optimal parameters as follows: weight of raw material 300 g, the concentration of NaCl 2%, the volume of NaCl 2% solution 900 mL, distillation flask 2 liters, extraction time 120 minutes. According to the results of GC/MS analysis, the main components of the essential oil of *Cleistocalyx operculatus* L. leaves contain trans- β -ocimene (35.962%); β -ocimene (10.935%); β -myrcene (26.367%); α -Pinene (10.365%); (-)- β -Pinene (1.598%); caryophyllene (6.491%); isocaryophyllene (0.196%); caryophyllene oxide (1.484%); humulene (1.16%); humulenol-II (0.187%). The free radical scavenging effecting of essential oil of *Cleistocalyx operculatus* L. leaves (DPPH method) determined through IC₅₀, the antioxidant capacity of essential oil of *Cleistocalyx operculatus* L. leaves IC₅₀ = 280.43 (ppm) that is 42.7 times lower than that of ascorbic acid (IC₅₀ = 6.51 (ppm)).

Keywords: Antioxidant activity (DPPH), *Cleistocalyx operculatus* L, essential oil, GC/MS.