

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN VI BAO ĐẾN ĐẶC TÍNH VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA NANO NHŨ TƯƠNG TINH DẦU CHANH (*Citrus limonia* Osbeck) SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỂM ĐẢO PHA

Ngô Kim Ngân^{1,2,3}, Phan Ngọc Hòa², Nguyễn Thị Lan Phi^{1,2*}

¹Trường Đại học Bách Khoa TP. HCM

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn

*Email: lanphi@hcmut.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/6/2025; Ngày nhận bài sửa: 23/7/2025; Ngày chấp nhận đăng: 30/7/2025

TÓM TẮT

Công nghệ vi bao nano được sử dụng để khắc phục nhược điểm về khả năng phân tán và độ ổn định của tinh dầu chanh khi ứng dụng vào thực phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát một số yếu tố công nghệ (tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa, tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu, tốc độ khuấy, tỷ lệ chất nhũ hoá) nhằm tạo ra hệ nano nhũ tương tinh dầu vỏ chanh (*Citrus limonia* Osbeck) có kích thước hạt nhỏ và hoạt tính kháng oxy hoá cao. Tinh dầu vỏ chanh sử dụng trong nghiên cứu này có chứa 134 hợp chất dễ bay hơi, với 25 hợp chất có nồng độ lớn hơn 0,5%. Kết quả cho thấy điều kiện để tạo được mẫu nano nhũ tương tinh dầu tốt nhất với kích thước hạt $76,8 \pm 1,2$ nm, chỉ số PDI $0,316 \pm 0,003$, và thế zeta $-50,8 \pm 1,7$ mV, với tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4, tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ 10%, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1:1, tốc độ khuấy 1200 rpm, tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin 8:2. Mẫu nano nhũ tương tinh dầu thể hiện khả năng kháng oxy hoá tương đương với mẫu tinh dầu nguyên chất xác định theo phương pháp DPPH lần lượt có IC₅₀ là $33,51 \pm 1,11$ và $32,63 \pm 0,02$ mg/mL và theo phương pháp ABTS lần lượt có IC₅₀ là $29,00 \pm 0,36$ và $45,67 \pm 0,58$ mg/mL. Kết quả cho thấy hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh có tiềm năng ứng dụng vào thực phẩm với vai trò là chất phụ gia có nguồn gốc tự nhiên.

Từ khóa: *Citrus limonia* Osbeck, nano nhũ tương tinh dầu, hoạt tính kháng oxy hóa, phương pháp điểm đảo pha.

1. MỞ ĐẦU

Cuộc sống ngày càng phát triển thì vấn đề sức khỏe ngày càng được quan tâm, thể hiện qua hành động hướng đến lối sống lành mạnh, sử dụng thực phẩm và dược phẩm có nguồn gốc tự nhiên. Một trong số những hướng nghiên cứu về hợp chất có hoạt tính sinh học trong thực vật đang được quan tâm là các thành phần hợp chất dễ bay hơi, thường tồn tại ở dạng tinh dầu [1]. Thành phần chủ yếu của tinh dầu là các hợp chất tạo mùi và dễ bay hơi, bao gồm terpene, acid, alcohol, ester, aldehyde, ketone epoxyde, sulfide, amine, ... Các thành phần này được chứng minh có khả năng kháng oxy hoá tốt, đồng thời có khả năng kháng khuẩn Gram âm và Gram dương cũng như kháng nấm, nhờ đó có tiềm năng ứng dụng làm chất bảo quản tự nhiên trong công nghệ thực phẩm, đặc biệt là sản phẩm thịt, trái cây [2]. Đối với quả chanh nói riêng và trái cây chi *Citrus* nói chung, lớp vỏ ngoài (flavedo) chứa nhiều tuyến tinh dầu. Trong tinh dầu vỏ quả chanh, thành phần các hợp chất tự nhiên được tìm thấy có thể lên đến hơn 200 hợp chất, tùy vào từng giống chanh, hơn 85% trong số đó là các hợp chất dễ bay hơi. Các thành phần chiếm phần lớn bao gồm limonene, β -pinene, γ -terpinene, α -terpineol, α -pinene, α -terpineolene, thể hiện hoạt tính kháng oxy hoá và kháng khuẩn cao [3]. Tại Việt Nam, cây chanh có sản lượng lớn và phân bố khá rộng, các giống chanh cũng đa dạng. Trong đó, giống chanh truyền thống có hạt là một trong những giống phổ biến nhất. Do đó, việc lựa chọn chanh (*Citrus limonia* Osbeck) làm nguyên liệu để thu nhận tinh dầu có ý nghĩa thực tiễn trong nghiên cứu ứng dụng vào công nghiệp thực phẩm.

Thành phần hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu chủ yếu là các hợp chất kỵ nước, do đó khó phân tán trong môi trường nước khi ứng dụng vào thực phẩm. Ngoài ra, các thành phần của tinh dầu nhạy cảm với điều kiện của môi trường như không khí, ánh sáng, nhiệt độ, ... nên khó bảo toàn được hoạt tính trong quá trình chế biến và bảo quản. Để khắc phục những vấn đề này, cần có kỹ thuật để bao bọc các tinh dầu để giúp chúng phân tán tốt hơn, đồng thời bảo vệ các hoạt chất, đảm bảo hoạt tính của tinh dầu khi ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Một trong những kỹ thuật phổ biến là tạo hệ nhũ tương nano dầu trong nước đối với tinh dầu chanh cũng như các loại tinh dầu khác [4]. Hiện nay, công nghệ nano là công nghệ hiện đại đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, hoá học, dược phẩm, ... Công nghệ nano có thể tạo ra hệ nhũ tương tinh dầu với các giọt có kích thước nanomet cùng với nhiều đặc tính giúp bảo vệ thành phần tinh dầu khi ứng dụng vào công nghiệp thực phẩm [4]. Sự tạo thành hệ nhũ tương nano dầu trong nước được thực hiện bằng cách bao bọc tinh dầu trong lớp màng tạo thành từ chất nhũ hoá và phân tán pha dầu này vào pha nước. Công nghệ nano giúp hệ phân tán tốt hơn trong môi trường nước, bền nhiệt hơn, bảo vệ được các hợp chất có hoạt tính sinh học trong tinh dầu, đảm bảo hiệu quả hoạt động của tinh dầu trong thực phẩm [4]. Cũng nhờ vào kích thước hạt nhỏ, hệ nano nhũ tương tinh dầu dễ dàng tác động ở lớp ngoài của màng tế bào vi sinh vật, từ đó tăng khả năng kháng vi sinh vật khi ứng dụng làm chất bảo quản thực phẩm [5]. Hiện nay có nhiều phương pháp được sử dụng để vi bao tinh dầu, trong đó phương pháp điểm đảo pha (EIP - Emulsion Inversion Point) là kỹ thuật tạo hệ nhũ tương bằng cách đảo ngược pha chuyển tiếp, bao gồm chuyển từ hệ nhũ tương nước trong dầu (W/O) sang dầu trong nước (O/W) và ngược lại [6]. Để tạo hệ nhũ tương O/W, trong quá trình thực hiện chuyển pha, pha liên tục (thường là nước) được thêm dần vào pha phân tán (chứa tinh dầu và chất nhũ hoá) và khuấy liên tục. Hệ nhũ tương sẽ trải qua sự thay đổi cấu trúc khi lượng nước tăng dần trong hệ. Ban đầu, khi nước vừa được thêm vào hỗn hợp tinh dầu và chất nhũ hoá sẽ hình thành hệ nhũ tương nước trong dầu (W/O), lượng nước tăng dần sẽ tạo thành hệ nhũ tương dầu/nước/dầu (O/W/O), cuối cùng là đảo pha tạo thành hệ dầu trong nước (O/W). Quá trình này diễn ra do sự kết hợp của những giọt nước. Ban đầu giọt nước phân tán trong pha dầu, khi các giọt nước kết hợp lại, tăng kích thước và bao lấy giọt pha dầu nhưng thành phần pha dầu vẫn nhiều hơn pha nước, tạo thành hệ O/W/O. Cuối cùng, khi lượng nước tiếp tục tăng sẽ dẫn đến sự đảo pha hoàn toàn, khi đó sẽ hình thành các giọt pha phân tán nằm trong pha liên tục (hệ nhũ tương O/W) [6]. Phương pháp điểm đảo pha thuộc nhóm kỹ thuật năng lượng thấp, so với kỹ thuật năng lượng cao thì có ưu điểm ít tiêu tốn năng lượng, ít tổn kém, quy trình thực hiện đơn giản, dễ phát triển lên quy mô công nghiệp [6]. Nhìn chung các nghiên cứu về hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh và một số nguyên liệu thuộc chi *Citrus* chủ yếu sử dụng kỹ thuật năng lượng cao và chất nhũ hoá là Tween 80 hoặc Tween 20 [7, 8]. Tuy nhiên, để tăng chất lượng và hoạt tính của hệ nano nhũ tương tinh dầu thì cần phải nghiên cứu tăng hàm lượng tinh dầu trong hệ nano nhũ tương, đồng thời giảm lượng chất nhũ hoá tổng hợp sử dụng để tăng tính an toàn khi ứng dụng nano nhũ tương tinh dầu vào thực phẩm. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này đặt mục tiêu khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nano hoá tinh dầu vỏ chanh sử dụng phương pháp điểm đảo pha (EIP) nhằm tạo ra hệ nhũ tương có kích thước hạt nhỏ, hiệu suất vi bao cao và có khả năng bảo toàn các hoạt tính sinh học của tinh dầu vỏ chanh. Kết quả này có thể được sử dụng làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn như quá trình tối ưu hoá điều kiện nano hoá tinh dầu vỏ chanh hoặc ứng dụng hệ nhũ tương nano tinh dầu vỏ chanh trong chế biến và bảo quản thực phẩm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

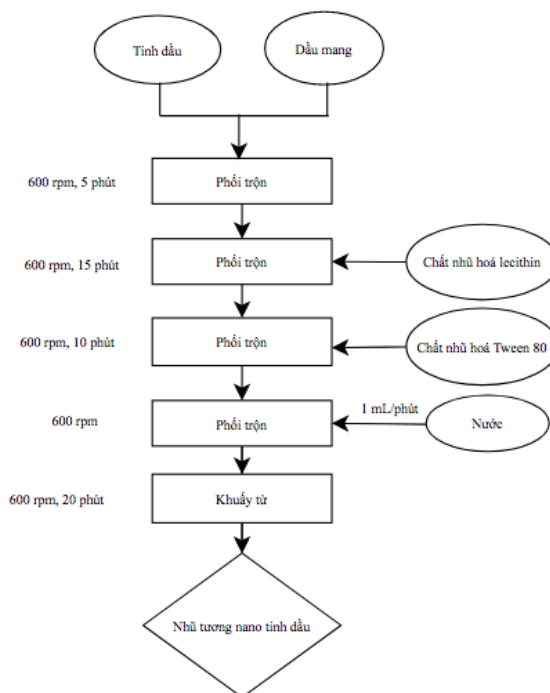
Chanh được sử dụng trong nghiên cứu là giống chanh ta (*Citrus limonia* Osbeck), được thu mua từ nhà vườn ở tỉnh Tiền Giang. Chanh được thu hái và thực hiện chung cất bằng hệ thống chung cất lôi cuốn hơi nước tại phòng thí nghiệm. Chanh sau khi lấy về được loại bỏ trái bị dập, chín vàng, sau đó rửa sạch với nước để loại bỏ bụi bẩn, tạp chất dính trên vỏ. Phần vỏ được tách khỏi trái, lấy phần vỏ xanh mỏng, tránh cắt quá sâu để hạn chế phần vỏ trắng và thịt quả, do tinh dầu chủ yếu nằm ở phần vỏ xanh. Vỏ chanh sau đó được xay nhỏ bằng máy xay trong thời gian 15 giây trước khi chung cất để tăng hiệu quả giải phóng tinh dầu. Sau khi xay nhỏ, vỏ chanh được cho vào hệ thống chung cất lôi cuốn hơi nước trong 105 phút (thời gian được tính từ lúc xuất hiện giọt tinh dầu đầu tiên đi ra khỏi hệ thống). Sau khi chung cất, tinh dầu được thu nhận và làm khan bằng muối Na_2SO_4 , bảo quản trong lọ tối màu ở 4 °C cho đến khi sử dụng.

Dầu dừa sử dụng trong nghiên cứu là dầu dừa ép lạnh nguyên chất của thương hiệu Vietcoco, được sử dụng trực tiếp mà không cần thêm bước tiền xử lý.

Hoá chất được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm chất nhũ hoá để tạo hệ nano nhũ tương tinh dầu và một số hoá chất để đo các tính chất của hệ nhũ tương là các hóa chất phổ biến sử dụng trong phòng thí nghiệm. Hoá chất DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS ((2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid))), $K_2S_2O_8$ (potassium sulphate) của công ty Sigma Aldrich (Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp vi bao nano tinh dầu

Hệ nhũ tương nano tinh dầu chanh được tạo thành với phương pháp điểm đảo pha (EIP), quy trình thực hiện dựa theo nghiên cứu của Komaiko và cộng sự [9]. Tinh dầu và dầu dừa được cân cho vào cốc thủy tinh theo tỉ lệ đã chọn, sau đó khuấy trộn bằng máy khuấy từ với tốc độ 600 rpm trong thời gian 5 phút. Với hệ nhũ chỉ có chất nhũ hoá Tween 80, chất nhũ hoá được thêm vào hỗn hợp dầu và khuấy trộn với tốc độ 600 rpm trong 10 phút. Với hệ nhũ tương sử dụng hỗn hợp chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin, lecithin được thêm vào hỗn hợp dầu trước, khuấy trộn 15 phút đến khi bột lecithin tan hoàn toàn, sau đó mới cho tiếp Tween 80 vào, khuấy trộn 10 phút. Sau đó nước cất được thêm vào với lưu lượng 1 mL/phút bằng ống nhỏ giọt, trong quá trình thêm nước vẫn giữ hỗn hợp được khuấy từ với tốc độ 600 rpm. Sau khi cho hết nước cất vào hệ nhũ, tiếp tục khuấy trộn với tốc độ 600 rpm trong 20 phút để ổn định hệ nhũ tương (Hình 1). Tổng khối lượng cho mỗi lần tạo hệ nhũ tương nano là 15 g. Tất cả tỷ lệ phối trộn nguyên liệu trong hệ đều được xác định theo khối lượng (w/w). Hệ nhũ tương nano tinh dầu sau đó được cho vào lọ thủy tinh, đậy kín nắp, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C trong suốt quá trình thí nghiệm.



Hình 1. Sơ đồ quy trình tạo mẫu nano nhũ tương tinh dầu

Nghiên cứu thực hiện khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa, tỷ lệ pha dầu trong hệ nhũ tương, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu, tốc độ khuấy, tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin đến kích thước hạt, chỉ số đa phân tán, và thế zeta của hệ nano nhũ tương. Các yếu tố ảnh hưởng được đánh giá độc lập, ở mỗi yếu tố xác định được điều kiện tốt nhất, sau đó giữ cố định điều kiện đó cho các thí nghiệm sau.

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tinh dầu và dầu mang

Dầu mang được sử dụng trong thí nghiệm là dầu dừa ép lạnh nguyên chất. Thí nghiệm khảo sát 5 mức tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa gồm: 2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 8:2 và 10:0 (w/w). Các yếu tố được giữ cố định bao gồm loại chất nhũ hoá Tween 80, tỷ lệ pha dầu trong hệ là 5%, tỷ lệ pha dầu và chất nhũ hoá là 2:1 (Bảng 1).

Bảng 1. Thiết kế thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tinh dầu và dầu mang

Tỷ lệ tinh dầu và dầu mang (w/w)	Tinh dầu (% w)	Dầu dừa (% w)	Tween 80 (% w)	Nước cất (% w)
2:8	1	4	10	85
4:6	2	3		
5:5	2,5	2,5		
6:4	3	2		
8:2	4	1		
10:0	5	0		

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nhũ tương

Thí nghiệm khảo sát 3 mức tỷ lệ của pha dầu trong tổng hệ nhũ tương: 5%, 7,5%, 10% và 12,5%. Các yếu tố được giữ cố định bao gồm loại chất nhũ hoá Tween 80, tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa là 6:4, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu là 2:1 (Bảng 2).

Bảng 2. Thiết kế thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nhũ tương

Tỷ lệ pha dầu trong hệ (% w)	Tinh dầu (% w)	Dầu dừa (% w)	Tween 80 (% w)	Nước cất (% w)
5	3	2	10	85
7,5	4,5	3	15	77,5
10	6	4	20	70
12,5	7,5	5	25	62,5

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu

Thí nghiệm khảo sát 3 mức tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu: 1:1, 1,5:1 và 2:1. Các yếu tố được giữ cố định bao gồm loại chất nhũ hoá Tween 80, tỷ lệ pha dầu trong hệ là 10%, tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa là 6:4 (Bảng 3).

Bảng 3. Thiết kế thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu

Tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu (w/w)	Tinh dầu (% w)	Dầu dừa (% w)	Tween 80 (% w)	Nước cất (% w)
1:1	6	4	10	80
1,5:1			15	75
2:1			20	70

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Thí nghiệm khảo sát năm mức tốc độ khuấy: 600, 800, 1000, 1200, và 1400 rpm. Các yếu tố được giữ cố định bao gồm loại chất nhũ hoá Tween 80, tỷ lệ pha dầu trong hệ là 10%, tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa là 6:4, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu là 1:1, tỷ lệ pha nước là 80%.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin

Bảng 4. Thiết kế thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ Tween 80 và lecithin

Tween 80 (% w)	Lecithin (% w)	Tinh dầu (% w)	Dầu dừa (% w)	Nước cất (% w)
10	0	6	4	80
9	1			
8	2			
7	3			
6	4			
5	5			

Thí nghiệm khảo sát tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin với 6 mức tỷ lệ (% w): 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 và 5:5 để tạo hỗn hợp chất nhũ hoá khác nhau. Các yếu tố được giữ cố định bao gồm tỷ lệ tinh

dầu và dầu dừa là 6:4 (w/w), tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu là 1:1 (w/w), tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nhũ tương là 10% (Bảng 4).

2.3. Xác định thành phần hoá học của tinh dầu

Thành phần hoá học của tinh dầu được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ tứ cực (GC-MS/MS) với hệ thống thiết bị phân tích sắc ký khí (Shimadzu AOC-20i plus, GCMS-TQ8040NX), cột mao quản (TG-WAXMS, kích thước 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), khí mang heli. Điều kiện thực hiện được cài đặt như sau: nhiệt độ cột 70 °C, chế độ tiêm có chia dòng, tỷ lệ chia dòng 1:100, chương trình nhiệt độ 70 °C giữ trong 2 phút, tăng lên 120 °C với tốc độ tăng nhiệt 2 °C/phút, sau đó tăng lên 230 °C với tốc độ tăng nhiệt 5 °C/phút và giữ trong 15 phút. Nhiệt độ nguồn ion ở mức 250 °C và nhiệt độ giao diện là 250 °C. Các hợp chất sau khi đi ra khỏi cột được định danh dựa theo cơ sở dữ liệu tham khảo từ Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ Quốc gia Hoa Kỳ.

2.4. Xác định kích thước hạt, chỉ số đa phân tán, chỉ số zeta

Tính chất đặc trưng của hệ nhũ tương nano tinh dầu bao gồm kích thước hạt, chỉ số đa phân tán, và thế zeta được xác định bằng máy đo quang phổ tán xạ ánh sáng động (Horiba SZ-100, HORIBA Scientific) [10]. Mẫu được đo ở điều kiện 25 °C, góc tán xạ 90° và 173°. Trước khi đo, mẫu được pha loãng 50 lần với nước cất để tránh hiện tượng tán xạ thứ cấp.

2.5. Xác định hiệu suất vi bao

Hiệu suất vi bao được xác định theo phương pháp của Zhao và cộng sự [11]. Hỗn hợp gồm tinh dầu chanh và dầu dừa theo tỷ lệ xác định được pha với dung dịch hexane, sau đó đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở dãy bước sóng 200 - 320 nm bằng máy đo quang phổ (Jasco - V730, Nhật Bản) để xác định độ hấp thụ tối đa của hỗn hợp. Dãy nồng độ của tinh dầu và dầu dừa ở tỷ lệ xác định được pha loãng với hexane theo mức 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 và 12 mg/mL để dựng đường chuẩn. Với mẫu nano tinh dầu, 1 g mẫu được pha với 5 mL hexane, sau đó ly tâm với tốc độ 3000 rpm trong 15 phút, thu lấy phần dung dịch trên bề mặt để đo độ hấp thụ, xác định được lượng dầu tự do chưa được vi bao. Hiệu suất vi bao được xác định bằng cách so sánh lượng tinh dầu được vi bao với lượng tinh dầu được sử dụng trong công thức tạo hệ nhũ tương nano. Công thức xác định hiệu suất vi bao (%) như sau:

$$\text{Hiệu suất vi bao (\%)} = \frac{\text{Tổng lượng dầu sử dụng} - \text{Lượng dầu tự do trên bề mặt}}{\text{Tổng lượng dầu sử dụng}} \times 100\%$$

2.6. Xác định hoạt tính kháng oxy hoá

2.6.1. Phương pháp DPPH

Phương pháp đo hoạt tính kháng oxy hoá dựa vào DPPH được thực hiện theo Misharina [12]. Một dãy nồng độ tinh dầu của mẫu được pha loãng ở mức 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 và 100 mg/mL để dựng đường chuẩn. Với mẫu cần phân tích, 2 mL mẫu được cho vào 2 mL dung dịch DPPH 0,1 mM (pha trong ethanol tuyệt đối). Mẫu đối chứng bao gồm 2 mL dung dịch DPPH 0,1 mM và 2 mL ethanol tuyệt đối. Hỗn hợp sau đó được ủ 30 phút trong bóng tối và đo độ hấp thụ OD ở bước sóng 517 nm bằng máy đo quang phổ (Jasco - V730, Nhật Bản). Khả năng bắt gốc tự do (RSA%) được xác định theo công thức:

$$\text{RSA (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}}{\text{OD}_{\text{đối chứng}}} \times 100\%$$

Sau khi xây dựng được đường chuẩn, mẫu sẽ được xác định giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% lượng gốc tự do DPPH).

2.6.2. Phương pháp ABTS

Phương pháp đo hoạt tính kháng oxy hoá dựa vào ABTS được thực hiện theo Liang và cộng sự [13]. Dung dịch ABTS 7 mM (pha trong nước cất) được pha với dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM (pha trong nước cất) theo tỉ lệ 1:1, sau đó ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 12-16 giờ. Sau khi ủ, dung dịch ABTS* được pha loãng với ethanol tuyệt đối sao cho độ hấp thụ có giá trị 0,70 ± 0,02 ở bước sóng 734 nm. Một dãy nồng độ tinh dầu của mẫu được pha loãng ở mức 10, 20, 30, 40, 50 và 60 mg/mL để dựng đường chuẩn. Với mẫu cần phân tích, 0,3 mL mẫu được cho vào 3 mL dung dịch ABTS. Mẫu đối chứng bao gồm 3 mL dung dịch ABTS và 0,3 mL ethanol tuyệt đối. Hỗn hợp sau đó được ủ 6 phút trong bóng tối và đo độ hấp thụ OD ở bước sóng 734 nm bằng máy đo quang phổ (Jasco - V730, Nhật Bản). Khả năng bắt gốc tự do (RSA%) được xác định theo công thức:

$$RSA (\%) = \frac{OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu}}}{OD_{\text{đối chứng}}} \times 100\%$$

Sau khi xây dựng được đường chuẩn, mẫu sẽ được xác định giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% lượng gốc tự do ABTS*). Chất đối chứng dương là Trolox, được pha thành dãy nồng độ 10, 15, 20, 25, 30, 35 và 40 µg/mL để dựng đường chuẩn theo quy trình tương tự.

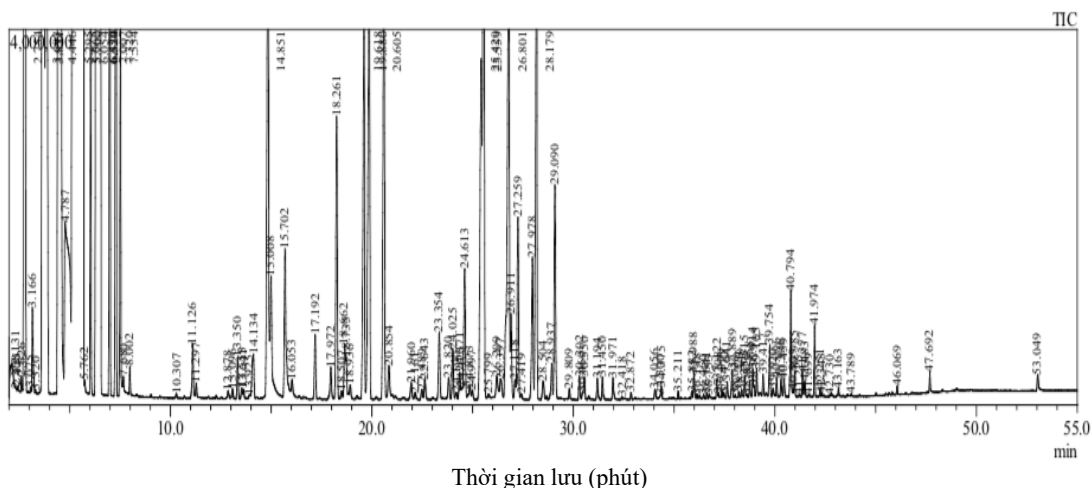
2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả thí nghiệm trong nghiên cứu đều được lặp lại ba lần, kết quả được thể hiện ở dạng kết quả trung bình ± độ lệch chuẩn. Kết quả tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, và vẽ đồ thị được thực hiện với phần mềm Microsoft Excel. Kết quả được xử lý ANOVA để xác định sự khác biệt có nghĩa với độ tin cậy 95% (p ≤ 0,05), sử dụng phần mềm SPSS Statistics version 20.0 (SPSS Inc., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần các hợp chất dễ bay hơi có trong tinh dầu

Sắc ký đồ của tinh dầu chanh khi phân tích các thành phần hợp chất dễ bay hơi bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS được thể hiện ở Hình 2. Kết quả phân tích cho thấy có 134 hợp chất được xác định trong thành phần tinh dầu vỏ chanh. Các hợp chất được xác định dựa trên thời gian lưu và khối phổ, tham chiếu với cơ sở dữ liệu từ Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ Quốc gia.



Bảng 5. Thành phần các hợp chất dễ bay hơi chủ yếu trong tinh dầu vỏ chanh

STT	Hợp chất	Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng (%)	Phân nhóm
1	α -pinene	2,754	4,25	Monoterpene hydrocarbon
2	β -pinene	3,693	7,43	
3	α -sabinene	3,831	3,50	
4	β -myrcene	4,446	5,95	
5	α -terpinene	4,787	1,76	
6	D-limonene	5,662	34,95	
7	sabinene hydrate	5,700	1,42	
8	<i>trans</i> - β -ocimene	6,054	0,65	Monoterpene hydrocarbon
9	γ -terpinene	6,479	12,56	
10	β -ocimene	6,554	0,72	
11	o-cymene	7,007	1,69	
12	(+)-4-carene	7,320	2,16	
13	octanal	7,534	0,76	Aldehyde
14	citronellal	14,851	1,80	Monoterpene aldehyde
15	decanal	15,702	0,55	Aldehyde
16	linalool	18,261	0,83	Terpene alcohol
17	<i>cis</i> - α -bergamotene	19,618	1,26	Sesquiterpene hydrocarbon
18	caryophyllene	19,880	1,73	Sesquiterpene hydrocarbon
19	terpinen-4-ol	20,605	1,43	Oxygenated monoterpene
20	β -copaen-4 α -ol	25,429	1,31	Terpene alcohol
21	α -terpineol	25,559	2,12	Terpene alcohol
22	β -bisabolene	26,801	2,12	Sesquiterpene hydrocarbon
23	α -citral	27,259	0,57	Monoterpene aldehyde
24	α -famesene	28,179	1,46	Sesquiterpene hydrocarbon
25	citronellol	29,090	0,62	Terpene alcohol

* Kết quả chỉ mang tính định lượng sơ bộ, chưa phản ánh biến động tự nhiên trong tinh dầu *Citrus limonia*

3.2. Điều kiện tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tinh dầu và dầu mang

Trong nghiên cứu này, dầu dừa được sử dụng làm dầu mang, có vai trò hoà tan tinh dầu chanh và làm chất ức chế quá trình kết tụ Ostwald (Ostwald ripening) trong hệ nhũ tương. Hiện tượng kết tụ Ostwald xảy ra do sự di chuyển của tinh dầu từ các giọt nhỏ (nơi có áp suất Laplace cao hơn) đến gần vào các giọt lớn hơn (nơi có áp suất Laplace thấp hơn), sau đó hợp giọt lại làm hình thành các giọt lớn, hệ quả là làm tăng kích thước hạt, thậm chí xuất hiện sự tách lớp của hệ nhũ tương nano [15]. Ngoài ra dầu mang còn giúp tăng độ nhớt của hệ, từ đó làm chậm tốc độ di chuyển của các giọt trong pha phân tán kết tụ và hợp giọt với nhau. Dầu dừa được sử dụng kết hợp với tinh dầu ở các tỷ lệ là 0:10, 2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 8:2. Kết quả về kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), và thế zeta được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa

Tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa (w/w)	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)
2:8	189,73 \pm 8,81 ^a	0,440 \pm 0,040 ^b	-27,7 \pm 1,85 ^c
4:6	137,40 \pm 3,72 ^b	0,414 \pm 0,035 ^b	-35,7 \pm 1,51 ^b
5:5	45,67 \pm 1,97 ^c	0,430 \pm 0,027 ^b	-42,2 \pm 1,71 ^a
6:4	23,93 \pm 0,25 ^c	0,220 \pm 0,016 ^c	-44,1 \pm 1,04 ^a
8:2	32,40 \pm 0,78 ^d	0,584 \pm 0,028 ^a	-37,4 \pm 1,4 ^b
10:0	Tách lớp		

* Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả khảo sát cho thấy kích thước hạt có xu hướng giảm dần khi tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa tăng từ mức 2:8 đến mức 6:4, sau đó tiếp tục tăng lên khi tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa tăng lên mức 8:2. Ở ba mức tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa là 5:5, 6:4, và 8:2 kích thước hạt hình thành nhỏ hơn 100 nm ($45,67 \pm 1,97$ nm, $23,93 \pm 0,25$ nm, và $32,4 \pm 0,78$ nm), các mẫu còn lại cho kích thước hạt lớn hơn 130 nm. Mẫu nhũ tương nano tinh dầu với tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4 cho kích thước hạt nhỏ nhất ($23,93 \pm 0,25$ nm).

Với chỉ số PDI, xu hướng cũng tương tự kích thước hạt, tuy nhiên ở mức tỷ lệ tinh dầu: dầu dừa 2:8, 4:6, 5:5 có kết quả không thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê. Ở mức tỷ lệ tinh dầu: dầu dừa 6:4, chỉ số PDI đạt mức nhỏ nhất ($0,22 \pm 0,016$), sau đó tăng lên $0,58 \pm 0,028$ khi mức tỷ lệ tinh dầu: dầu dừa ở mức 8:2. Điều này cho thấy mức tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa cũng có ảnh hưởng đến chỉ số PDI. Xu hướng này có thể được giải thích là do sự có mặt của dầu dừa đã giúp hoà tan phần tinh dầu, giúp tinh dầu phân tán ổn định trong hệ nhũ tương, ngăn hiện tượng kết tụ Ostwald, từ đó giúp giảm kích thước hạt. Tuy nhiên, dầu dừa hay bất kỳ loại dầu mang nào cũng cần được sử dụng với tỷ lệ phù hợp, phụ thuộc vào tính chất của tinh dầu và dầu mang [16].

Giá trị thế zeta cho thấy độ lớn của điện tích ở lớp bao xung quanh của giọt pha phân tán, thể hiện khả năng tạo lực đẩy tĩnh điện giữa các giọt, do đó có thể được sử dụng để đánh giá tính ổn định của hệ nhũ tương nano tinh dầu theo thời gian. Với giá trị thế zeta lớn, điện tích giữa các giọt có thể tạo lực đẩy tĩnh điện lớn hơn lực hút tĩnh điện trong hệ nhũ tương nano, nhờ đó các giọt được giữ khoảng cách không quá gần nhau, tránh hiện tượng kết tụ hoặc hợp giọt. Kết quả khảo sát cho thấy thế zeta của mẫu nhũ tương nano tinh dầu với tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa là 2:8 có giá trị âm thấp nhất ($-27,73 \pm 1,85$ mV), trong khi đó với các mức tỷ lệ 4:6, 5:5, 6:4 và 8:2, thế zeta có giá trị âm lớn hơn -30 mV, cho thấy các mẫu nhũ tương có độ ổn định tương đối tốt. Mẫu nhũ tương có tỷ lệ tinh dầu: dầu dừa 5:5 và 6:4 cho giá trị thế zeta tốt nhất và có sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê so với ba mẫu còn lại ($-42,2 \pm 1,71$ mV và $-44,1 \pm 1,04$ mV). Hai mẫu nhũ tương với tỷ lệ tinh dầu: dầu dừa 5:5 và 6:4 cho giá trị thế zeta không có sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê, tuy nhiên mẫu nhũ tương với tỷ lệ 6:4 cho kích thước hạt và chỉ số đa phân tán nhỏ hơn, do đó tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4 phù hợp hơn đối với hệ nhũ tương nano tinh dầu chanh. Do đó, mẫu nhũ tương nano với tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4 được giữ cố định và sử dụng để tiếp tục khảo sát các yếu tố tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nhũ tương

Trong thí nghiệm này, Tween 80 được sử dụng làm chất nhũ hoá, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 2:1, pha dầu (gồm tinh dầu chanh và dầu dừa với tỷ lệ 6:4) được thay đổi ở 4 mức tỷ lệ 5%, 7,5%, 10% và 12,5%. Kết quả kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), và thế zeta được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nano

Tỷ lệ pha dầu (%)	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)
5,0	$23,93 \pm 0,25^c$	$0,220 \pm 0,016^c$	$-44,1 \pm 1,04^b$
7,5	$29,33 \pm 0,47^b$	$0,362 \pm 0,011^b$	$-51,0 \pm 0,76^a$
10,0	$23,00 \pm 0,10^c$	$0,141 \pm 0,007^d$	$-36,3 \pm 0,87^d$
12,5	$42,73 \pm 2,06^a$	$0,441 \pm 0,021^a$	$-40,1 \pm 1,47^c$

* Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy ở cả 4 mẫu với các mức tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nano khác nhau đều tạo thành hệ nano đạt kích thước dưới 50 nm. Khi tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ nano tăng từ 5% lên 7,5% thì kích thước hạt tăng từ $23,93 \pm 0,25$ nm lên $29,33 \pm 0,47$ nm. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ pha dầu lên 10% thì kích thước hạt lại giảm xuống $23,00 \pm 0,10$ nm, sau đó lại tăng lên $42,73 \pm 2,06$ nm khi tỷ lệ pha dầu tăng lên 12,5%. Như vậy, ở tỷ lệ pha dầu 5% và 10%, hệ nhũ tương có kích thước hạt nhỏ nhất, và giữa hai tỷ lệ này cũng không có sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê. Chỉ số PDI cũng có xu hướng tương tự kích thước hạt. Chỉ số PDI tăng từ $0,224 \pm 0,016$ lên $0,362 \pm 0,011$ khi tỷ lệ pha dầu tăng từ 5% lên 7,5%, sau đó giảm xuống $0,141 \pm 0,007$ khi tỷ lệ pha dầu tăng lên 10%. Khi tỷ lệ pha dầu tăng lên 12,5%, chỉ số PDI tăng lên $0,441 \pm 0,021$. Ở mẫu nhũ tương với tỷ lệ pha dầu 5% và 10%, chỉ số PDI ở mức thấp, cho thấy kích thước hạt có khoảng phân bố hẹp, trong khi với mẫu nhũ tương với tỷ lệ pha dầu 7,5% và 12,5%, kích thước hạt có khoảng phân bố tương đối rộng.

Với thế zeta, cả 4 mẫu nhũ tương nano có tỷ lệ pha dầu 5%, 7,5%, 10%, 12,5% có giá trị âm lớn hơn -30 mV (lần lượt là $-44,1 \pm 1,04$ mV, $-51,0 \pm 0,76$ mV, $-36 \pm 0,87$ mV, $-40,1 \pm 1,47$ mV), cho thấy

hệ có độ bền cao. Với mẫu nhũ tương có tỷ lệ pha dầu 10%, giá trị thế zeta ở mức âm thấp nhất, tuy nhiên, giá trị thế zeta này vẫn đảm bảo hệ có độ bền tốt. Nghiên cứu trước đây cho thấy nồng độ pha dầu trong hệ nhũ tương tăng lên có thể dẫn đến sự giảm giá trị thế zeta do mật độ các giọt dầu cao có thể che lấp lẫn nhau, làm ảnh hưởng đến khả năng các chất nhũ hoá hấp phụ lên bề mặt của giọt [17]. Với mục đích tăng tối đa lượng tinh dầu có trong hệ nhũ tương, mẫu nhũ tương nano với tỷ lệ pha dầu 10% được lựa chọn là mức tỷ lệ phù hợp nhất, tương đương với hàm lượng tinh dầu chanh có trong hệ là 6%. Do đó, mức tỷ lệ pha dầu 10% được lựa chọn giữ cố định để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu

Trong thí nghiệm này, Tween 80 được sử dụng làm chất nhũ hoá trong quy trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu chanh. Pha dầu được giữ cố định ở mức 10%, chất nhũ hoá được thay đổi với tỷ lệ 1:1, 1,5:1 và 2:1 so với pha dầu. Kết quả cho thấy hệ nhũ tương tinh dầu chanh với hàm lượng chất nhũ hoá bằng hàm lượng dầu có trạng thái trắng đục. Khi lượng chất nhũ hoá tăng lên gấp 1,5 lần lượng dầu, hệ bắt đầu trong mờ. Khi tiếp tục tăng lượng chất nhũ hoá lên gấp 2 lần lượng dầu, hệ mới đạt trạng thái trong mờ. Nhìn chung cả 3 mẫu đều có trạng thái ổn định, không có hiện tượng tách lớp. Kết quả xác định kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), và thế zeta được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu

Tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu (w/w)	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)
1:1	135,57 ± 1,51 ^a	0,292 ± 0,052 ^b	-38,0 ± 0,90 ^{ab}
1,5:1	99,47 ± 0,47 ^b	0,362 ± 0,011 ^a	-39,4 ± 2,06 ^a
2:1	23,00 ± 0,10 ^c	0,141 ± 0,007 ^c	-36,3 ± 0,87 ^b

* Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả khảo sát cho thấy kích thước hạt có xu hướng giảm dần từ 135,57 ± 1,51 nm xuống 23,00 ± 0,10 nm khi lượng chất nhũ hoá tăng từ tỷ lệ 1:1 lên 2:1 so với pha dầu. Chỉ số PDI của mẫu nhũ tương với tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 2:1 thấp hơn mẫu với tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1:1, tuy nhiên cả hai mẫu đều có giá trị < 0,3, cho thấy kích thước hạt có khoảng phân bố hẹp. Trong khi đó, chỉ số PDI của mẫu nhũ tương với tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1,5:1 có chỉ số PDI lên đến 0,362 ± 0,011, cho thấy mẫu nhũ tương có khoảng phân bố kích thước hạt tương đối rộng. Kết quả cho thấy tỷ lệ chất nhũ hoá có ảnh hưởng đến khả năng tạo hệ nhũ tương nano. Chất nhũ hoá có vai trò hấp phụ lên bề mặt liên pha, bao phủ các giọt dầu làm giảm sức căng bề mặt của hai pha, giúp các giọt dầu phân tán tốt hơn trong hệ nhũ tương. Chất nhũ hoá có thể ngăn chặn hiện tượng kết tụ và hợp giọt làm ảnh hưởng đến tính ổn định và độ bền của hệ nhũ tương [18]. Lượng chất nhũ hoá cần phải đạt mức độ nhất định so với lượng dầu có trong hệ để có thể thực hiện tốt vai trò nhũ hoá. Lượng chất nhũ hoá quá ít sẽ không đủ để bao phủ các giọt dầu, cũng như không đủ để làm giảm sức căng bề mặt, từ đó hệ nhũ tương hình thành sẽ có kích thước hạt lớn. Tuy nhiên, nếu lượng chất nhũ hoá quá nhiều có thể dễ xảy ra hiện tượng các phân tử chất nhũ hoá tụ lại với nhau, làm giảm khả năng bao phủ của chất nhũ hoá lên các giọt dầu [10].

Với thế zeta, cả 3 mẫu đều cho kết quả độ âm lớn hơn -30 mV, chứng tỏ mẫu có khả năng đẩy tĩnh điện giữa các hạt ở mức tốt, hệ có thể giữ độ bền theo thời gian. Trong đó, mẫu nhũ tương với tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 2:1 cho kết quả thế zeta thấp hơn hai mẫu còn lại (-36,3 ± 0,87 mV so với -38,0 ± 0,91 mV và -39,4 ± 2,06 mV), tuy nhiên giữa mẫu với tỷ lệ 2:1 và tỷ lệ 1:1 cũng như mẫu với tỷ lệ 1:1 và mẫu 1,5:1 không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Mặc dù các chỉ tiêu chất lượng của mẫu ở tỷ lệ 1:1 không tốt bằng mẫu nhũ tương nano với tỷ lệ 2:1 nhưng lại giảm được 50% lượng chất nhũ hoá tổng hợp sử dụng, nhờ đó tăng tính an toàn cho mẫu nano nhũ tương khi ứng dụng vào thực phẩm. Do đó, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1:1 được giữ cố định để khảo sát các yếu tố tiếp theo.

3.2.4. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Trong thí nghiệm này, Tween 80 được sử dụng làm chất nhũ hoá trong quy trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu chanh. Pha dầu được giữ cố định ở mức 10%, tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1:1. Tốc độ khuấy được thay đổi trong khoảng 600 - 1400 rpm. Kết quả xác định kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), và thế zeta được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Tốc độ khuấy (rpm)	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)
600	135,57 ± 1,51 ^a	0,292 ± 0,05 ^{ab}	-38,0 ± 0,91 ^a
800	129,50 ± 1,13 ^b	0,326 ± 0,01 ^a	-37,2 ± 0,28 ^a
1000	128,35 ± 1,63 ^b	0,245 ± 0,04 ^c	-36,3 ± 0,78 ^a
1200	121,25 ± 0,21 ^c	0,275 ± 0,01 ^b	-38,5 ± 2,00 ^a
1400	120,40 ± 1,13 ^c	0,274 ± 0,02 ^b	-38,1 ± 0,92 ^a

* Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$).

Theo kết quả đạt được, kích thước hạt có xu hướng giảm từ 135,57 ± 1,51 nm xuống 120,40 ± 1,13 nm khi tốc độ khuấy tăng từ 600 rpm lên 1400 rpm. Khi tốc độ khuấy tăng từ 600 rpm lên 800 rpm, kích thước hạt giảm từ 135,57 ± 1,51 nm xuống 129,5 ± 1,13 nm. Khi tiếp tục tăng tốc độ khuấy lên 1000 rpm, kích thước hạt giảm nhẹ, tuy nhiên kết quả không có sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê. Khi tốc độ khuấy tăng lên 1200 rpm, kích thước hạt giảm xuống 121,25 ± 0,21 nm và không có sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê so với mẫu ở tốc độ khuấy 1400 rpm. Với chỉ số đa phân tán, khi thay đổi tốc độ khuấy từ 600 rpm lên 1400 rpm, chỉ số PDI giảm từ 0,292 ± 0,05 xuống 0,274 ± 0,02, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Nhìn chung, sự thay đổi tốc độ khuấy không làm ảnh hưởng nhiều đến chỉ số PDI của mẫu nano nhũ tương. Chỉ số PDI của đa số các mẫu đều ở mức thấp hơn 0,3 (trừ mẫu ở tốc độ khuấy 800 rpm) cho thấy mẫu có khoảng phân bố kích thước hạt hẹp.

Quá trình khuấy giúp đồng nhất các thành phần trong hệ nano nhũ tương, phân tán pha dầu và chất nhũ hoá vào pha nước. Tốc độ khuấy quá thấp có thể dẫn đến sự đồng nhất mẫu không hoàn toàn, có sự phân tách giữa pha dầu và pha nước, hoặc hiện tượng chất nhũ hoá bị vón, dính lên thành cốc chứa mẫu và dụng cụ khuấy. Ngược lại, tốc độ khuấy quá cao có thể làm thành phần tinh dầu bị văng lên thành của cốc chứa mẫu, gây thất thoát tinh dầu, ảnh hưởng đến chất lượng của hệ nano nhũ tương tạo thành. Ngoài ra, khuấy ở tốc độ quá cao còn có thể làm tăng nhiệt độ của mẫu, tiêu tốn nhiều năng lượng. Tốc độ khuấy vừa đủ có thể tạo ra hệ nano nhũ tương có kích thước như mong muốn, nếu tiếp tục tăng tốc độ khuấy có thể dẫn đến hiện tượng hợp giọt do các giọt mới tạo thành bị khuấy trộn mạnh, tăng khả năng va chạm và kết lại với nhau. Trong quá trình tạo hệ nhũ tương, chất nhũ hoá cũng cần một khoảng thời gian để có thể phân tán, bao bọc, và ổn định hệ nhũ tương. Khi tốc độ khuấy tăng dần đến các giọt bị kết tụ và hợp giọt trước khi được chất nhũ hoá bao bọc, từ đó hệ nhũ tương có thể kém bền và bị tách lớp. Do đó việc khảo sát và lựa chọn tốc độ khuấy phù hợp là vô cùng cần thiết để đảm bảo quy trình có thể tạo ra mẫu nano nhũ tương đạt kích thước hạt nhỏ, phân tán đồng đều, đồng thời đảm bảo hạn chế thất thoát trong quá trình tạo nano. Nghiên cứu của Akram và cộng sự [19] về quy trình tạo nano nhũ tương bằng phương pháp năng lượng thấp cho thấy việc tăng tốc độ khuấy từ 100 - 500 rpm đã làm giảm kích thước hạt từ 270 nm xuống 210 nm, chỉ số PDI từ 0,35 xuống 0,1. Khi tiếp tục tăng tốc độ khuấy lên 700 rpm thì kích thước hạt bị tăng trở lại, chỉ số PDI không có sự thay đổi đáng kể. Một nghiên cứu khác được thực hiện với mẫu nano tinh dầu bạc hà tạo thành bằng phương pháp năng lượng thấp, khi tăng tốc độ khuấy từ 500 rpm lên 900 rpm thì kích thước hạt giảm từ 112 nm xuống 41 nm, tuy nhiên thời gian khuấy trong thí nghiệm của nghiên cứu này lên đến 3 giờ [20].

Kết quả cho thấy thế zeta dao động trong khoảng từ -36,3 ± 0,78 mV đến -38,1 ± 0,92 mV và không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê khi tốc độ khuấy thay đổi từ 600 rpm đến 1400 rpm. Giá trị thế zeta của các mẫu cũng ở giá trị âm lớn hơn -30 mV cho thấy các mẫu nano có lực đẩy tĩnh điện tốt, có thể giữ độ ổn định của hệ. Từ kết quả của nghiên cứu có thể thấy kích thước hạt bị ảnh hưởng nhiều bởi tốc độ khuấy trong quá trình tạo hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh, trong khi thế zeta gần như không bị ảnh hưởng. Thí nghiệm cho thấy tốc độ khuấy ở mức 1200 rpm là phù hợp và được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

3.2.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin

Trong thí nghiệm này, hỗn hợp Tween 80 và lecithin được sử dụng làm chất nhũ hoá trong quy trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu chanh. Pha dầu được giữ cố định ở mức 10%, tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6/4, tỷ lệ chất nhũ hoá và pha dầu 1/1, tốc độ khuấy 1200 rpm. Tỷ lệ Tween 80 và lecithin được thay đổi theo mức 10:0 đến 5:5. Kết quả xác định kích thước hạt, chỉ số đa phân tán (PDI), và thế zeta được trình bày trong Bảng 10. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi chất nhũ hoá chỉ có Tween 80 (tỷ lệ Tween 80 và lecithin 10:0), kích thước hạt có giá trị 121,25 ± 0,21 nm. Khi tỷ lệ này thay đổi ở mức

9:1, kích thước hạt giảm xuống $116,4 \pm 0,57$ nm, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Khi tỷ lệ Tween 80 và lecithin thay đổi sang mức 8:2, kích thước hạt giảm xuống mức thấp nhất, đạt giá trị $76,79 \pm 1,25$ nm. Khi tiếp tục giảm lượng Tween 80 và tăng lượng lecithin (tương ứng mức tỷ lệ 7:3, 6:4, 5:5), kích thước hạt tăng lên $181,7 \pm 3,82$ nm, $194,9 \pm 3,39$ nm, và $210,95 \pm 6,01$ nm.

Bảng 10. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ Tween 80 và lecithin

Tỷ lệ Tween 80 và lecithin (w/w)	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)	Chỉ số HLB
10:0	$121,25 \pm 0,21^d$	$0,275 \pm 0,001^c$	$-38,5 \pm 2,00^d$	15
9:1	$116,40 \pm 0,57^d$	$0,279 \pm 0,003^c$	$-47,3 \pm 0,40^c$	14,2 - 14,3
8:2	$76,79 \pm 1,25^e$	$0,316 \pm 0,003^{bc}$	$-50,8 \pm 1,75^c$	13,4 - 13,6
7:3	$181,7 \pm 3,82^c$	$0,361 \pm 0,018^{bc}$	$-56,3 \pm 1,61^b$	12,6 - 12,9
6:4	$194,9 \pm 3,39^b$	$0,381 \pm 0,052^b$	$-62,4 \pm 2,15^a$	11,8 - 12,2
5:5	$210,95 \pm 6,01^a$	$0,447 \pm 0,027^a$	$-66,3 \pm 0,28^a$	11 - 11,5

*Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$).

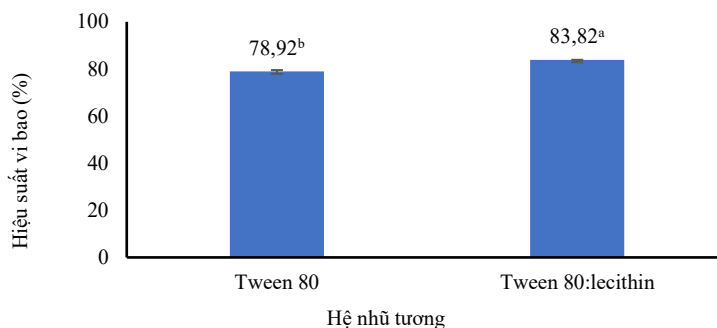
Chỉ số PDI có xu hướng tăng dần từ $0,275 \pm 0,001$ đến $0,447 \pm 0,027$ khi tỷ lệ Tween 80 và lecithin thay đổi từ 10:0 đến 5:5. Mẫu nano nhũ tương ở tỷ lệ 10:0 và 9:1 có chỉ số PDI thấp hơn 0,3, cho thấy mẫu có khoảng phân bố kích thước hạt hẹp. Trong khi đó, 4 mẫu còn lại cho giá trị chỉ số PDI cao hơn 0,3, thể hiện khoảng phân bố kích thước tương đối rộng. Như vậy, quá trình phối trộn Tween 80 và lecithin đã làm thay đổi chỉ số HLB của hỗn hợp chất nhũ hoá. Chỉ số HLB có giá trị từ 0-20, cho biết tỷ lệ thành phần nhóm ưa nước và nhóm kỵ nước có trong chất nhũ hoá. Chất nhũ hoá có chỉ số HLB từ 8-18 sẽ thích hợp dùng cho hệ nhũ tương dầu/nước (O/W), trong khi chất nhũ hoá có chỉ số HLB thấp hơn 8 sẽ thích hợp dùng cho hệ nhũ tương nước/dầu (W/O). Tween 80 có chỉ số HLB là 15, lecithin đậu nành có chỉ số HLB nằm trong khoảng 7-8. Khi kết hợp theo tỷ lệ Tween 80 và lecithin 10:0 đến 5:5, chỉ số HLB của hệ chất nhũ hoá sẽ thay đổi trong khoảng 11-11,5 đến 15. Mỗi hệ nhũ tương sẽ cần chất nhũ hoá với chỉ số HLB khác nhau để đảm bảo hoạt động của chất nhũ hoá đạt mức tốt nhất. Theo một số nghiên cứu, chất nhũ hoá có chỉ số HLB khoảng 12-13 thường cho hệ nhũ tương dầu/nước (O/W) có độ bền tốt nhất [21]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ Tween 80 và lecithin là 8:2 cho kết quả về kích thước hạt nhỏ nhất, chỉ số PDI ở mức trung bình. Ở tỷ lệ này, chỉ số HLB của hỗn hợp chất nhũ hoá nằm trong khoảng 13,4 - 13,6.

Với hệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin, khi lượng Tween 80 giảm và lượng lecithin tăng thì độ âm của thế zeta cũng tăng dần từ $-38,5 \pm 2,00$ mV lên $-66,3 \pm 0,28$ mV. Ở mức tỷ lệ 9:1 và 8:2, sự thay đổi giá trị thế zeta không có ý nghĩa về mặt thống kê. Như vậy, việc sử dụng kết hợp Tween 80 với lecithin đã làm giảm 20% lượng chất nhũ hoá tổng hợp sử dụng, từ đó tăng tính an toàn cho mẫu nano nhũ tương. Thêm vào đó, lecithin cũng là hợp chất tốt cho sức khoẻ của người sử dụng. Kết quả thí nghiệm chứng minh rằng sử dụng kết hợp Tween 80 và lecithin là hoàn toàn khả thi, có tiềm năng ứng dụng trong quy trình tạo hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh.

3.3. Hiệu suất vi bao của hệ nano nhũ tương tinh dầu

Hiệu suất vi bao của hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh sử dụng chất nhũ hoá Tween 80 hoặc sử dụng kết hợp hệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin với tỷ lệ 8:2 được xác định để đánh giá khả năng bao bọc tinh dầu của hệ nano (Hình 3). Hỗn hợp tinh dầu chanh và dầu dừa ở tỷ lệ 6:4 được pha loãng với hexane và xác định độ hấp thụ tối đa. Theo kết quả thí nghiệm, độ hấp thụ tối đa của mẫu được thể hiện ở bước sóng 259 nm.

Hiệu suất vi bao của các hệ nano nhũ tương tinh dầu trong nghiên cứu này đạt mức $78,92 \pm 0,59\%$ và $83,82 \pm 0,06\%$, tương ứng với việc sử dụng chất nhũ hoá Tween 80 và hệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin ở tỷ lệ 8:2. Trong nghiên cứu của Madhi và cộng sự, hiệu suất vi bao tinh dầu quýt trong hệ nano nhũ tương sử dụng các chất nhũ hoá khác nhau nằm trong khoảng từ $36,29 \pm 2,90$ đến $92,08 \pm 6,45\%$ [22]. Một nghiên cứu khác với tinh dầu sả cho thấy hiệu suất vi bao của hệ nhũ tương nano tinh dầu đạt 41 - 60% khi sử dụng chất nhũ hoá Tween 20/80 và sodium dodecyl sulphate [23]. Nghiên cứu của Hassanzadeh và cộng sự thực hiện với mẫu nano nhũ tương chứa 10% tinh dầu tỏi có hiệu suất vi bao $86,33 \pm 1,25\%$ [24].



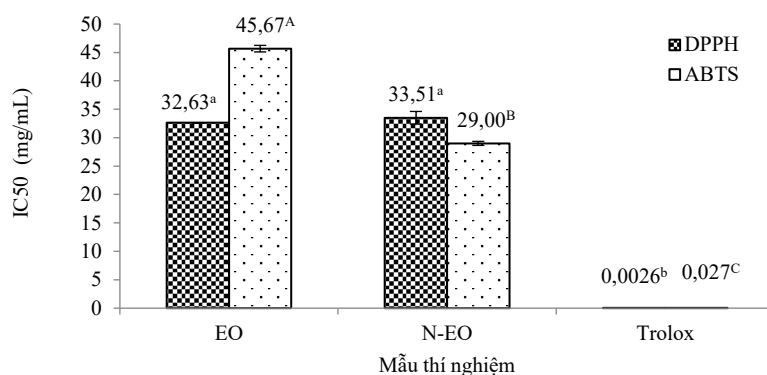
Hình 3. Hiệu suất vi bao của hệ nano nhũ tương tinh dầu chanh sử dụng chất nhũ hoá Tween 80 và hệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin với tỷ lệ 8:2.

*Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Hiệu suất vi bao có sự khác biệt giữa các nghiên cứu do thông số này có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau như bản chất của các thành phần trong hệ nano nhũ tương, tính chất của chất nhũ hoá, phương pháp tạo nano nhũ tương, điều kiện về tỷ lệ thành phần, thông số kỹ thuật,... Nhìn chung, hiệu suất vi bao của phương pháp điểm đảo pha ở nghiên cứu này nằm ở mức cao, có thể đảm bảo lượng tinh dầu được bao bọc trong hệ đạt mức cao đối với hệ nhũ tương nano có tỷ lệ pha dầu trong thành phần cao và được tạo thành bằng phương pháp năng lượng thấp.

3.4. Hoạt tính kháng oxy hoá của hệ nhũ tương nano tinh dầu

Mẫu nano nhũ tương tinh dầu chanh ở điều kiện tỷ lệ tinh dầu và dầu mang 6:4, tỷ lệ pha dầu 10%, tỷ lệ pha dầu và chất nhũ hoá 1:1, tốc độ khuấy 1200 rpm, tỷ lệ chất nhũ hoá Tween 80 và lecithin 8:2 được chọn là mẫu tốt nhất với kích thước hạt $76,79 \pm 1,25$ nm, chỉ số PDI $0,316 \pm 0,003$, và thế zeta $-50,8 \pm 1,75$ mV. Mẫu nano nhũ tương ở điều kiện này được xác định hoạt tính kháng oxy hoá theo các phương pháp DPPH và ABTS. Kết quả thể hiện hoạt tính kháng oxy hoá của mẫu tinh dầu và mẫu nano nhũ tương tinh dầu được thể hiện ở Hình 4. Đối với gốc tự do DPPH, mẫu tinh dầu chanh (EO) và nano nhũ tương tinh dầu chanh (N-EO) cho kết quả IC_{50} lần lượt là $32,63 \pm 0,02$ mg/mL và $33,51 \pm 1,11$ mg/mL, và sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Điều này cho thấy tinh dầu nằm trong hệ nhũ tương nano vẫn giữ nguyên được hoạt tính kháng oxy hoá so với mẫu tinh dầu nguyên chất. Chất đối chứng Trolox có giá trị IC_{50} là $0,0026 \pm 0,00003$ mg/mL, giá trị IC_{50} càng thấp chứng tỏ khả năng kháng oxy hoá của mẫu càng tốt. Đối với gốc ABTS*, mẫu tinh dầu chanh cho kết quả IC_{50} là $45,67 \pm 0,58$ mg/mL, trong khi đó mẫu nano nhũ tương tinh dầu cho kết quả IC_{50} là $29,00 \pm 0,36$ mg/mL. Kết quả này cho thấy mẫu nano nhũ tương tinh dầu có hoạt tính kháng oxy hoá tốt hơn. Điều này có thể được giải thích do ABTS là gốc tan trong nước nên dễ tương tác với hệ nano nhũ tương tinh dầu hơn so với tinh dầu nguyên chất. Chất đối chứng Trolox có giá trị IC_{50} là $0,027 \pm 0,0005$ mg/mL, cao gấp 10 lần giá trị IC_{50} ở phương pháp DPPH, cho thấy Trolox thể hiện hoạt tính kháng gốc tự do DPPH tốt hơn nhiều so với ABTS*. Như vậy, sau khi tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu, khả năng kháng gốc tự do DPPH của hệ không có sự thay đổi đáng kể, trong khi khả năng kháng gốc ABTS* được tăng lên. Điều này cho thấy rằng hệ nano nhũ tương tinh dầu có thể bảo vệ tốt phần tinh dầu nằm trong hệ, do đó giữ nguyên được khả năng kháng oxy hoá của tinh dầu. Xu hướng tương tự được thể hiện qua nghiên cứu của Liu và cộng sự (2022) với tinh dầu chanh, kết quả cho thấy mẫu nano nhũ tương tinh dầu có khả năng kháng oxy hoá cao gấp 6,59 lần mẫu tinh dầu ở phương pháp DPPH, trong khi với phương pháp ABTS, mẫu tinh dầu và nano nhũ tương tinh dầu không có sự khác biệt về khả năng kháng oxy hoá [14]. Nghiên cứu của Lou và cộng sự (2017) cho thấy mẫu tinh dầu chanh yên có hoạt tính kháng oxy hoá thấp hơn 1,63 lần so với mẫu nano nhũ tương tinh dầu [25]. Kích thước hạt giảm có thể góp phần làm tăng diện tích tiếp xúc giữa tinh dầu với các gốc tự do, từ đó cải thiện khả năng bắt gốc tự do, đảm bảo hoạt tính kháng oxy hoá của hệ nano nhũ tương tinh dầu. Tinh dầu nằm trong hệ nano nhũ tương được bảo vệ tốt hơn, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường như không khí, ánh sáng,... nên không bị suy giảm hoạt tính kháng oxy hoá. Bên cạnh đó, trong thành phần của hệ nhũ tương nano ở nghiên cứu này còn có chứa dầu dừa và chất nhũ hoá lecithin, đây cũng là hợp chất được cho là có khả năng kháng oxy hoá [26].



Hình 4. Hoạt tính kháng oxy hoá của tinh dầu chanh (EO) và nano nhũ tương tinh dầu (N-EO) xác định theo các phương pháp DPPH và ABTS.

* Số liệu theo sau bởi các ký tự a, b, c, A, B, C khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

4. KẾT LUẬN

Mẫu tinh dầu vỏ chanh (*Citrus limonia* Osbeck) có chứa 134 hợp chất dễ bay hơi, với 62 hợp chất có hàm lượng bằng hoặc lớn hơn 0,05% và 25 hợp chất có hàm lượng lớn hơn 0,5%. Nghiên cứu đã khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu vỏ chanh (*Citrus limonia* Osbeck) bằng phương pháp điểm đảo pha đến các đặc tính vật lý và khả năng kháng oxy hóa. Kết quả cho thấy các yếu tố như tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa, tỷ lệ pha dầu, tỷ lệ chất nhũ hóa và tốc độ khuấy đều ảnh hưởng đáng kể đến kích thước hạt, chỉ số phân bố kích thước (PDI) và thế zeta của hệ nano. Hệ nano nhũ tương có tỷ lệ tinh dầu và dầu dừa 6:4, tỷ lệ pha dầu trong tổng hệ 10%, tỷ lệ chất nhũ hóa và pha dầu 1:1, tốc độ khuấy là 1200 rpm, tỷ lệ chất nhũ hóa Tween 80 và lecithin 8:2 tạo ra kích thước hạt trung bình 76,79 nm, chỉ số PDI $0,316 \pm 0,003$, và thế zeta $-50,8 \pm 1,75$ mV, hiệu suất vi bao đạt 83,82%. Hoạt tính kháng oxy hóa của hệ được đánh giá qua chỉ số IC_{50} trong hai phương pháp DPPH và ABTS. Kết quả cho thấy hệ nano nhũ tương tinh dầu duy trì được hoạt tính so với tinh dầu nguyên chất (IC_{50} DPPH gần tương đương), và có cải thiện đáng kể trong hệ ABTS cho thấy khả năng bắt gốc tự do hiệu quả hơn trong môi trường nước. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa đánh giá độ ổn định theo thời gian và khảo sát khả năng ứng dụng trong mô hình thực phẩm thực tế. Các khảo sát tiếp theo cần tập trung vào đánh giá độ bền hệ, khả năng kháng khuẩn và thử nghiệm trên sản phẩm thực phẩm nhằm xác lập tiềm năng ứng dụng của hệ nano nhũ tương này như một chất bảo quản có nguồn gốc tự nhiên.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh (VNU-HCM) cho đề tài mã số B2023-20-11.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Da Silva, W. M. F., Kringel, D. H., De Souza, E. J. D., Da Rosa Zavareze, E., & Dias, A. R. G. - Basil essential oil: methods of extraction, chemical composition, biological activities, and food applications. *Food and Bioprocess Technology* **15** (1) (2022) 1-27. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02690-3>
2. Seibert, J. B., Rodrigues, I. V., Carneiro, S. P. et al. - Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. *Flavour and Fragrance Journal* **34** (1) (2019) 5-14. <https://doi.org/10.1002/ffj.3472>
3. Jain, N., Sharma, M. - Evaluation of *Citrus lemon* Essential Oil for its Chemical and Biological Properties Against Fungi Causing Dermatophytic Infection in Human Beings. *Analytical Chemistry Letters* **7** (3) (2017) 402-409. <https://doi.org/10.1080/22297928.2017.1349620>
4. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. - Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **10** (3-4) (2005) 102-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
5. Perlatti, B., Souza Bergo, P. L. D., Fernandes Da Silva, M. F. D. G., Batista, J., & Rossi, M. - Polymeric nanoparticle-based insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals in

- Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies, S. Trdan, Ed., InTech, 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/53355>
6. Thakur, R. K., Villette, C., Aubry, J. M., & Delaplace, G. - Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **315** (1-3) (2008) 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.08.017>
 7. Yazgan, H., Ozogul, Y., & Kuley, E. - Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **306** (2019) 108266. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108266>
 8. Liew, S.N., Utra, U., Alias, A.K., Tan, T.B., Tan, C.P., & Yussof, N.S. - Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. *LWT* **128** (2020) 109388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109388>
 9. Komaiko, J. S., & McClements, D. J. - Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15** (2) (2016) 331-352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>
 10. Asadinezhad, S., Khodaiyan, F., Salami, M., Hosseini, H., & Ghanbarzadeh, B. - Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. *Journal of Food Measurement and Characterization* **13** (4) (2019) 2501-2509. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>
 11. Zhao, S., Wang, Z., Wang, X., Kong, B., Liu, Q., Xia, X., & Liu, H. - Characterization of nanoemulsions stabilized with different emulsifiers and their encapsulation efficiency for oregano essential oil: Tween 80, soybean protein isolate, tea saponin, and soy lecithin. *Foods* **12** (17) (2023) 3183. <https://doi.org/10.3390/foods12173183>
 12. Misharina, T.A. - Antiradical properties of essential oils and extracts from coriander, cardamom, white, red, and black peppers. *Applied Biochemistry and Microbiology* **52** (1) (2016) 79-86. <https://doi.org/10.1134/S0003683816010087>
 13. Liang, D., Feng, B., Li, N., Su, L., Wang, Z., Kong, F., & Bi, Y. - Preparation, characterization, and biological activity of Cinnamomum cassia essential oil nano-emulsion. *Ultrasonics Sonochemistry* **86** (2022) 106009. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106009>
 14. Liu, T., Gao, Z., Zhong, W., Fu, F., Li, G., Guo, J., & Shan, Y. - Preparation, Characterization, and Antioxidant Activity of Nanoemulsions Incorporating Lemon Essential Oil. *Antioxidants* **11** (4) (2022) 650. <https://doi.org/10.3390/antiox11040650>
 15. McClements, D.J., & Rao, J. - Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51** (4) (2011) 285-330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
 16. Saberi, A.H., Fang, Y., & McClements, D.J. - Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* **391** (202) 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.069>
 17. Onaizi, S. A. - Characteristics and pH-responsiveness of SDBS-stabilized crude oil/water nanoemulsions. *Nanomaterials* **12** (10) (2022) 1673. <https://doi.org/10.3390/nano12101673>
 18. Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. - Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* **18** (41) (2006) R635-R666. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>
 19. Akram, S., Anton, N., Omran, Z., & Vandamme, T. - Water-in-oil nano-emulsions prepared by spontaneous emulsification: New insights on the formulation process. *Pharmaceutics* **13** (7) (2021) 1030. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071030>
 20. Barzegar, H., Mehrnia, M. A., Naschi, B., & Alipour, M. - Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size. *Flavour and Fragrance Journal* **33** (5) (2018) 351-356. <https://doi.org/10.1002/ffj.3455>
 21. Rahaman, S. M., Bhattarai, A., Kumar, D., Singh, B., & Saha, B. - Application of biosurfactants as emulsifiers in the processing of food products with diverse utilization in the baked goods in

- Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector, Elsevier, 2023, 203-237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824283-4.00021-6>
22. Mahdi, A. A., Al-Maqtari, Q. A., Mohammed, J. K., Al-Ansi, W., Aqeel, S. M., Cui, H., & Lin, L. - Nanoencapsulation of mandarin essential oil: Fabrication, characterization, and storage stability. *Foods* **11** (2022) 54. <https://doi.org/10.3390/foods11010054>
 23. Agnish, S., Sharma, A. D., & Kaur, I. - Nanoemulsions (O/W) containing *Cymbopogon pendulus* essential oil: Development, characterization, stability study, and evaluation of in vitro anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-diabetic activities. *BioNanoScience* **12** (2) (2022) 540-554. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00964-4>
 24. Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Hassanzadeh, R., & Ghanbarzadeh, B. - Garlic essential oil-based nanoemulsion carrier: Release and stability kinetics of volatile components. *Food Science and Nutrition* **10** (5) (2022) 1613-1625. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2784>
 25. Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. - The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT* **80** (2017) 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>
 26. Ghani, N. A. A., Channip, A., Chok Hwee Hwa, P., Ja'afar, F., Yasin, H. M., & Usman, A. - Physicochemical properties, antioxidant capacities, and metal contents of virgin coconut oil produced by wet and dry processes. *Food Science and Nutrition* **6** (5) 1298-1306. <https://doi.org/10.1002/fsn3.671>

ABSTRACT

EFFECT OF ENCAPSULATION CONDITIONS ON CHARACTERISTICS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF NANO EMULSIONS OF LIME ESSENTIAL OIL (*Citrus limonia* Osbeck) USING THE EMULSION INVERSION POINT METHOD

Ngô Kim Ngân^{1,2,3}, Phan Ngọc Hòa², Nguyễn Thị Lan Phi^{1,2*}

¹*Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT)*

²*Vietnam National University in Ho Chi Minh City*

³*Sai Gon Technology University*

*Email: lanphi@hcmut.edu.vn

Nano-encapsulation technology was employed to address the challenges of dispersibility and stability associated with lime (*Citrus limonia* Osbeck) essential oil when used in food applications. The objective of this study was to investigate several technological factors (the ratio of essential oil to coconut oil, the ratio of the oil phase in the total system mass, the ration of emulsifier to oil phase, stirring speed, and emulsifier concentration) to create a nano emulsion system of lime peel essential oil with small particle size and high antioxidant capacity, which can be applied in food processing as a natural additive. The lime peel essential oil used in this study contained 134 volatile compounds, with 25 compounds present at concentrations greater than 0.5%. The results indicate that the optimal conditions for fabricating a high-quality nano emulsion with a particle size of 76.8 ± 1.2 nm, a PDI index of 0.316 ± 0.003 , and a zeta potential of -50.8 ± 1.7 mV were as follows: an essential oil-to-coconut oil ratio of 6:4, an oil phase ratio of 10%, an emulsifier-to-oil phase ratio of 1:1, a stirring speed of 1200 rpm, and an emulsifier ratio of Tween 80 and lecithin of 8:2. The lime essential oil nano emulsion exhibited antioxidant capacity comparable to that of pure essential oil. Based on the DPPH method, the IC₅₀ values were 33.51 ± 1.11 mg/mL for the nano-emulsion and 32.63 ± 0.02 mg/mL for pure essential oil. According to the ABTS method, the IC₅₀ values were 29.00 ± 0.36 mg/mL for the nanoemulsion and 45.67 ± 0.58 mg/mL for pure essential oil. The results showed that the lime essential oil nanoemulsion had the potential to be used as a natural additive in food.

Keywords: *Citrus limonia* Osbeck, essential oil nanoemulsion, antioxidant capacity, emulsion inversion point method.