

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU LÁ HỒI THU HÁI TẠI HUYỆN TRÀ LĨNH, TỈNH CAO BẰNG

Đến tòa soạn 17-05-2022

Đinh Thúy Vân*, Mai Thanh Nga
Đại học Sư Phạm- Đại Học Thái Nguyên
Email: vandt@tnue.edu.vn

SUMARY

STUDYING THE CHEMICAL COMPOSITION, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF ILLICIUM VERUM PLANT COLLECTED IN TRA LINH DISTRICT, CAO BANG PROVINCE

Illicium verum Hook. f. (Illiciaceae) is an aromatic evergreen tree bearing purple-red flowers and anise-scented star-shaped fruit. It grows almost exclusively in southern China and Vietnam. Its fruit (star anise) is an important traditional Chinese medicine as well as a commonly used spice. Traditionally, the essential oil of star anise is used topically for rheumatism and as an antiseptic. As a famous spice, star anise was first introduced into Europe in the seventeenth century, and gets its distinctive licorice taste from a chemical compound called anethole. Modern pharmacology studies demonstrated that its crude extracts and active compounds possess wide pharmacological actions, especially in antimicrobial, antioxidant, insecticidal, analgesic, sedative and convulsive activities. In addition, it is the major source of shikimic acid, a primary ingredient in the anti-flu drug (Tamiflu). The essential oil is extracted from leaves of *Illicium verum* plant collected in Tra Linh district, Cao Bang province by steam distillation method. The essential oil was analyzed by GC and GC/MS. And then, it was tested on antimicrobial activity. It inhibited to *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. At the first time, the chemical composition of *Illicium verum* in Tra Linh district, Cao Bang province has been studied.

Key words: Essential oil, *Illicium verum*, Antibacterial, shikimic acid, star anise, Tamiflu.

1. MỞ ĐẦU

Theo Đỗ Tất Lợi hồi hay đại hồi hương, bát giác hồi hương có tên khoa học là *Illicium verum* Hook. F. Thuộc họ Hồi Illiciaceae. Là một loại thảo dược quan trọng trong y học cổ truyền cũng như nhiều nền văn hóa ẩm thực lâu đời. Tinh dầu của Đại hồi có mùi rất thơm, vị ngọt, tính ôn. Về mặt y học, Đại hồi có tác dụng sát trùng, giúp tiêu hóa, lợi sữa, giảm đau, giảm co bóp trong đau dạ dày [1]. Dịch trích từ *Illicium verum* sử dụng làm thuốc dạ dày, lợi tiểu, được sử dụng như dược phẩm

chức năng [4]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới gần đây cho thấy tinh dầu hồi chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc tính chống oxy hóa, chống phân hủy và kháng khuẩn. Acid shikimic chiết xuất từ *Illicium verum* là một trong những thành phần chính trong thuốc kháng virus Tamiflu, dùng để chống lại cúm gia cầm, có chứa chất kháng khuẩn [5], [9], chống oxy hóa [6] và có tiềm năng chống ung thư [8] Với các đặc điểm đó, trong tương lai gần thảo dược đại hồi và tinh dầu hồi trở thành thực phẩm bổ sung và thành phần thô trong cả

hai ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm.

Hôi (*Illicium verum*) là cây kinh tế truyền thống được trồng từ lâu ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam (Lạng Sơn, Cao Bằng, Quảng Ninh) Ở Việt Nam, diện tích trồng Hôi tăng lên khá nhanh trong những năm gần đây; chỉ riêng tỉnh Lạng Sơn diện tích Hôi đã lên tới trên 24.000 ha. Còn tại Cao Bằng hồi được trồng chủ yếu tại huyện Trà Lĩnh, bộ phận được dùng của cây hồi chủ yếu vẫn là quả dùng trong lĩnh vực thực phẩm. Tinh dầu hồi có nhiều tiềm năng trong lĩnh vực y học. Tuy nhiên, hiện nay tại Việt Nam các nghiên cứu về tinh dầu trong lĩnh vực này còn rất hạn chế, chưa có một nghiên cứu nào về tinh dầu (quả, thân, lá) hồi được trồng và thu hái tại Cao Bằng. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân tích thành phần hóa học của tinh dầu hồi để bước đầu có những đánh giá về tiềm năng, cung cấp dữ liệu về sự ảnh hưởng địa chất đến thành phần tinh dầu hồi được trồng và thu hái tại Cao Bằng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Chuẩn bị nguyên liệu

Lá hồi tươi được thu thập tại huyện Trà Lĩnh, tỉnh Cao Bằng. Nguyên liệu được thu hái từ 7-8 giờ sáng, yêu cầu lá không bị dập, không héo úa, sâu bệnh. Nguyên liệu được rửa sạch và tráng lại bằng nước cất, sau đó cho vào dụng cụ chưng cất lôi cuốn hơi nước.

2.2. Ly trích tinh dầu hồi

Tinh dầu lá hồi (thu thập vào mùa khô và mùa mưa) được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp.

+ Cân 100g nguyên liệu lá hồi tươi, đập dập và cắt nhỏ với 100-200ml nước cất

+ Bổ sung nước cất đến tỉ lệ nguyên liệu: nước là 1:6, sử dụng bộ cất tinh dầu nhẹ 1000 ml để tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp trong thời gian thích hợp với từng loại nguyên liệu để thu tinh dầu. Thời gian chiết tách được tính từ khi bắt đầu có giọt dầu ngưng tụ đầu tiên.

Chưng cất trong khoảng 2 giờ cho tới khi thể tích tinh dầu không tăng nữa. Ngừng cất, sau 10 phút đọc thể tích tinh dầu trong ống cất để

xác định hàm lượng tinh dầu (ml/100g) Tinh dầu thô được xử lý lọc và làm khan bằng Na_2SO_4 khan. Tinh dầu được bảo quản trong lọ thủy tinh tối màu ở nhiệt độ 6°C (trong ngăn mát tủ lạnh) để tiến hành các thử nghiệm.

2.3. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu

Mẫu tinh dầu lá hồi được phân tích bằng thiết bị sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS của khoa Hóa học trường Đại học Khoa học Tự nhiên-Đại học Quốc gia Hà Nội: Agilent, GC 7890A - MS 5975C. Cột HP5 (30m; 0,25mm; 0,25µm). Sử dụng khí mang là He. Nhiệt độ buồng bơm mẫu là 250°C, nhiệt độ đầu dò 280°C. Tỉ lệ chia dòng 1:20, mẫu được pha loãng trong hexane, thể tích tiêm 1µl. Chương trình nhiệt: nhiệt độ đầu 90°C, tăng 8°C/phút đến 280°C, giữ 5 phút, sử dụng thư viện phổ NIST 2011 của máy để định danh các cấu tử trong mẫu tinh dầu.

2.4. Thử hoạt tính kháng khuẩn trên đĩa thạch

Các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus* (Tụ cầu vàng) gây bệnh ngoài da; *Pseudomonas aeruginosa* (Trực khuẩn mủ xanh); *Escherichia coli* do Phòng thí nghiệm vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên cung cấp được bảo quản trong điều kiện lạnh sâu.

Xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu bằng phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn Phương pháp thử hoạt tính ức chế vi khuẩn là phương pháp của Hadacek et al. (2000).

Chuẩn bị dịch vi khuẩn

+ Cây ria tạo khuẩn lạc trên môi trường thạch LB, vi khuẩn được tồn trữ trong ống thạch nghiêng và bảo quản lạnh ở 4°C. Từ ống tồn trữ, chọn 1 khuẩn lạc đưa vào ống nghiệm chứa 2ml môi trường LB, nuôi lắc ở 37°C trong 14- 16h.

+ Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường LB được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 625nm.

Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách cấy trải 200 µL dịch khuẩn, nồng độ tương đương $4-5.10^8$ CFU/ml lên bề mặt đĩa petri có chứa môi trường LB đặc, để khô và đục 5 giếng,

đường kính khoảng 6 mm sao cho mỗi giếng cách nhau khoảng 2-3 cm.

Chuẩn bị tinh dầu

Chuẩn bị dịch chiết tinh dầu bằng cách hòa 100, 50, 25 μ L tinh dầu trong dung dịch DMSO 2% (DMSO 2%, Tween 80 0,2% H₂O 97,8%).

Bổ sung 100 μ L dịch chiết thử vào các giếng thạch trên đĩa petri và giữ các đĩa thí nghiệm trong 1 tiếng ở nhiệt độ 4°C, tới khi dịch chiết từ các giếng khuếch tán ra môi trường nuôi cấy vi khuẩn;

Sau đó, đặt các đĩa vào tủ ẩm 28°C trong 14 - 16h.

Hoạt tính ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức: BK (mm) = D-d; trong đó D = đường kính vòng vô khuẩn và d = đường kính lỗ khoan thạch. Đối chứng âm là DMSO 2%, sử dụng 0,2% chất nhũ hóa là Tween 80 trong nước cất.

Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

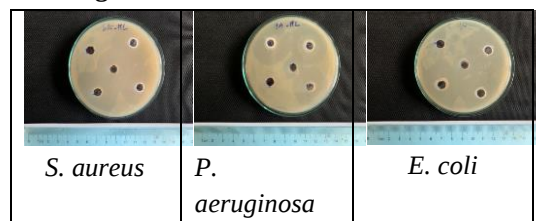
3.1. Kết quả khảo sát thành phần hóa học tinh dầu lá hồi Cao Bằng

Tinh dầu hồi thu được có màu vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng, thành phần hóa học của tinh dầu lá hồi được trình bày trong **bảng 1**.

Từ **bảng 1** cho thấy tinh dầu lá hồi thu hái tại Cao Bằng chứa khoảng 21 cấu tử. Trong đó *Trans*-Anethole chiếm hàm lượng cao nhất 70,1%; sau đó là Estragole chiếm 12.37 %; α -Pinene chiếm 7.26 %; 4-methoxy Benzaldehyde chiếm 2,55%. Kết quả này so sánh với tinh dầu hồi được ly trích từ quả thu hái tại Lạng Sơn cho thấy: Hàm lượng *Trans*-Anethole thu được từ lá hồi Cao Bằng khá cao so với hàm lượng trong quả (83,34%) [3]. Điều này cho thấy lá hồi cũng là nguồn nguyên liệu cung cấp *Trans*-Anethole dồi dào và dễ tái tạo. Đồng thời đây cũng là những kết quả quan trọng làm cơ sở đánh giá và so sánh chất lượng tinh dầu hồi thu hái tại Cao Bằng với các vùng miền khác, so sánh chất lượng tinh dầu được ly trích từ ba bộ phận thân, lá và quả.

3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu lá hồi

Kết quả thử hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn: *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *E. Coli* được thể hiện trên **bảng 2**:



Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn

VK	Kháng sinh	100 μ L giếng 1	50 μ L giếng 2	25 μ L giếng 3
SA	3,0	3,8	3,4	3,2
PA	1,2	3,8	3,0	2,8
E.coli	1,6	3,6	3,4	2,8

Chú thích: 1: 100 mg/mL; 2: 50 mg/mL; 3: 25 mg/mL; KS: Amp 100 mg/mL; 4: Đối chứng âm. Từ đường kính vòng kháng khuẩn cho thấy tất cả các nồng độ khảo sát của tinh dầu lá hồi đều có khả năng kháng khuẩn. Tuy nhiên khả năng này phụ thuộc vào nồng độ của tinh dầu. Khả năng kháng 3 chủng vi khuẩn của tinh dầu lá hồi được đánh giá là tốt hơn thuốc kháng sinh ampicillin đang được sử dụng (nồng độ 100 mg/mL). Tác dụng kháng tốt nhất là đối với chủng *Staphylococcus aureus* (tụ cầu vàng) gây bệnh ngoài da, nồng độ kháng tốt nhất đối với cả 3 chủng khuẩn là 100 mg/mL. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu hồi được giải thích bằng hàm lượng các chất có khả năng kháng khuẩn cao có mặt trong thành phần như: *Trans*-Anethole (70,1%), Estragole (12.37 %), α -Pinene (7.26 %), 4-methoxy Benzaldehyde (2,55%)...Đây là những hoạt chất mà trong nhiều nghiên cứu trước chỉ ra là có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tốt [10].

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, trên cơ sở các kết quả phân tích thành phần tinh dầu lá hồi thu hái tại huyện Bảo Lạc, tỉnh Cao Bằng cho thấy: Tinh dầu lá hồi thu được có một số đặc tính sau: trong suốt, màu vàng nhạt, có mùi thơm đặc trưng của quả Đại hồi.

Tinh dầu lá hồi chứa khoảng 21 cấu tử trong đó Trans-Anethole chiếm hàm lượng cao nhất 70,1%.

Tinh dầu thu được có khả năng kháng được 3 chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli* tốt hơn thuốc kháng sinh ampicillin hiện đang dùng. Tác dụng kháng tốt nhất là đối với chủng *Staphylococcus aureus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu đánh giá thành phần hóa học và hoạt tính sinh học tinh dầu hồi thu hái tại Trà Lĩnh- Cao Bằng và Bình Gia- Lạng Sơn” Mã số CS.2021.22 do Đại học Sư Phạm- Đại học Thái Nguyên quản lí.

Bảng 1. Thành phần hóa học tinh dầu lá hồi thu hái tại huyện Trà Lĩnh, tỉnh Cao Bằng

TT	Hợp chất	CTHH	%	Thời gian lưu
1	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	7.26	8,241
2	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₆	0.36	9,451
3	β -Pinene Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	C ₁₀ H ₁₆	0.38	9,547
4	α -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	0.29	9,989
5	α -Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	1.00	10,4
6	3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	0.15	10,585
7	1-methyl-4-(1-methylethyl)- 1,3-Cyclohexadiene	C ₁₀ H ₁₆	0.12	10,783
8	<i>p</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.26	11,034
9	D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1.40	11,172
10	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.49	11,25
11	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	0.18	12,101
12	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.93	13,351
13	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.35	15.7
14	Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.2	16.096
15	Estragole	C ₁₀ H ₁₂ O	12.37	16.362
16	Cis-anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	0.92	17.93
17	4-methoxy Benzaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	2.55	18.136
18	Trans-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	70,1	19.042
19	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.18	20.899
20	2-(formyloxy)-1-phenyl- Ethanone	C ₉ H ₈ O ₃	0.23	21.255
21	Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	0.31	21.685

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiên, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị

Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, Viện Dược liệu, Cây thuốc và động vật làm thuốc - Tập 1. Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2006.

2. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, xuất bản lần thứ XII, Nhà xuất bản Y học, Tr 524-525, 2004.
3. Nguyễn Thị Thảo, Đỗ Xuân Trường, Nghiên cứu thực nghiệm tinh chế tinh dầu hồi trên tháp chưng luyện chân không gián đoạn, *tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, tập 63 (11), tr 34-39, 2021.
4. Lee, S.W; Li, G; Lee, K.S; Jung, J.S; Xu, M.L; Seo, C.S; Chang, H.W; Kim, S.K; Song, D.K; Son, J.K, Preventive agents against sepsis and new phenylpropanoid glucosides from the fruits of *Illicium verum*, *Planta Medica*, vol 69, pp 861-864, 2003.
5. Singh, G; Maurya, S; de Lampasona, M.P.;Catalan, C, Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol 86, pp 111-121, 2006.
6. Padmashree, A; Roopa, N; Semwal, A.D; Sharma, G.K; Agathian, G; Bawa, A.S, Star anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. *Food Chemistry*, vol 104, pp 59-66, 2007.
7. Chempakam, B; Balaji, S, Star Anise. In Chemistry of spices. *United Kingdom: CAB International*, pp 319-330, 2008.
8. Shu, X; Liu, X.M; Fu, C.L; Liang, Q.X, Extraction, characterization and antitumor effect of the polysaccharides from star anise *Illicium verum* (Hook f), *Journal of Medicinal Plants Research*, vol 4, pp 2666-2673, 2010.
9. Yang, J.F; Yang, C.H; Chang, H.W; Yang, C.S; Wang, S.M; Hsieh, M.C; Chuang, L.Y, Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Medicinal Food*, 13: 1254-1262, 2010.
10. Jayanta Kumar Patra, Gitishree Das, Sankhadip Bose, Sabyasachi Banerjee, Chethala N. Vishnuprasad, Maria del Pilar Rodriguez-Torres, Han-Seung Shin, Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance, *John Wiley & Sons, Ltd*, pp 1–20, 2020.