

Tinh dầu lá trầu hóc môn – Thành phần Phenolic và ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học

Huỳnh Kỳ Trân¹, Trần Nguyễn Ngọc Châu¹, Hà Mỹ Thuận¹, Nguyễn Khoa Nam¹,
Đỗ Việt Hà¹, Trần Thiện Khiêm¹, Phạm Thị Ánh², Chu Phạm Ngọc Sơn²

Các phenolic chính trong tinh dầu lá trầu Hóc Môn được chúng tôi nhận danh là chavibetol 1, chavibetol acetate 2, 4-allylpyrocatechol diacetate 3 (APC diacetate). Thành phần chavibetol và tổng phenolic gồm 3 chất 1, 2, 3 ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính kháng vi sinh vật, kháng oxi hóa và đặc biệt là khả năng trung hòa Enterovirus 71 (EV 71) gây bệnh Tay Chân Miệng (TCM) của tinh dầu được chúng tôi phát hiện lần đầu tiên vào năm 2012.

Cũng lần đầu tiên năm 2011 chúng tôi phát hiện khi chưng cất lá bằng lôi cuốn hơi nước trong nước không muối NaCl, có sự chuyển đổi của 3 và 2 qua 1 thông qua phản ứng có gốc enzym mà hệ quả là hàm lượng tinh dầu thu được đạt thấp và tổng phenolic trong tinh dầu cũng giảm quan trọng. Trong báo cáo này, chúng tôi nêu các điều kiện thực nghiệm cho phép đạt tinh dầu lá trầu với hiệu suất cao và có tổng phenolic lớn hoặc tinh dầu có hàm lượng chavibetol cao và đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật, đặc biệt khả năng trung hòa EV 71 của tinh dầu lá trầu theo tổng phenolic và hoạt tính kháng oxi hóa theo thành phần chavibetol.

Từ khóa: Tinh dầu lá trầu Hóc Môn, tổng phenolic, hoạt tính sinh học và kháng oxi hóa, trung hòa virus EV 71

Betel leaf essential oil – Phenolic content and influence on biological activities

Huỳnh Kỳ Trân¹, Trần Nguyễn Ngọc Châu¹, Hà Mỹ Thuận¹, Nguyễn Khoa Nam¹,
Đỗ Việt Hà¹, Trần Thiện Khiêm¹, Phạm Thị Ánh², Chu Phạm Ngọc Sơn²

The main phenolic constituents of Hoc Mon betel leaf essential oil were identified by us as chavibetol 1, chavibetol acetate 2 and 4-allylpyrocatechol diacetate 3 (APC diacetate). Chavibetol percentage as

well as total phenolic content including compounds 1, 2, 3 strongly influenced on the oil's microbial and antioxidant activities, particularly on its ability to neutralize EV 71 causing Hand, Foot and Mouth disease discovered for the first time by us in 2012.

Also for the first time in 2011, on hydrodistillation of betel leaves in unsalted water, we observed the conversion of 2 and 3 into 1 through enzymatic reactions leading to a drastic decrease of oil yield and of total phenolic content. In this communication, the experimental conditions allowing to obtain good oil yield and high phenolic content or oil with high chavibetol content were defined. Also antimicrobial activities, in particular the ability of EV 71 neutralization of betel oil in function of its total phenolic content and the antioxidant property in function of its chavibetol content were evaluated.

Key words: *Hoc Mon betel leaf essential oil, total phenolic content, biological and antioxidant activities, EV 71 neutralization.*

Tác giả:

1. Viện Phát triển Công nghệ và Đào tạo
2. Hội Y tế Công cộng TP.Hồ Chí Minh

1. Đặt vấn đề

Tinh dầu lá trầu Hóc Môn (*Piper betle* L.) được biết có tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxy hóa tốt [8,9]. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi phát hiện thêm tinh dầu lá trầu còn có khả năng trung hòa virus bệnh Tay Chân Miệng Enterovirus 71 (EV 71).

Các thành phần phenolic chính trong tinh dầu lá trầu được chúng tôi nhận danh là chavibetol 1, chavibetol acetate 2, 4-allylpyrocatechol diacetate 3 (APC diacetate) [3]. Nghiên cứu của chúng tôi trước đây cũng cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật tăng theo thành phần phenolic của tinh dầu lá trầu [4]. Do đó, cần xác định điều kiện thực nghiệm để thu được bằng chưng cất lôi cuốn hơi nước tinh dầu vừa có hàm lượng cao, vừa chứa tổng phenolic lớn.

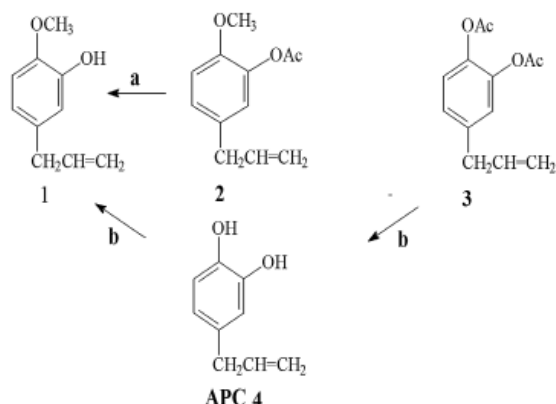
Trong quá trình nghiên cứu, lần đầu tiên, năm 2011 chúng tôi phát hiện có sự khác biệt quan trọng khi so sánh hiệu suất thu tinh dầu, thành phần các phenolic và tổng phenolic khi chưng cất lôi cuốn theo hơi nước trong nước không muối và bão hòa muối NaCl: hàm lượng tinh dầu, APC diacetate 3 và tổng phenolic giảm mạnh, chavibetol acetate 2 giảm ít và chavibetol 1 tăng đáng kể (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần phenolic khi chưng cất với nước không muối và bão hòa muối

Thí nghiệm	Lá thu hái 5/01/2011	Tinh dầu (mg)	1 (% diện tích GC-MS)	2 (% diện tích GC-MS)	3 (% diện tích GC-MS)	Tổng phenolic (%)
1	Lá (300g) xay nhuyễn trong 900 ml nước, ngâm 1 giờ, chưng cất 3 giờ	282	26,19	13,06	3,18	42,43
2	Lá (300g) xay nhuyễn trong 900 ml nước muối bão hòa, ngâm 1 giờ, chưng cất 3 giờ	875	5,66	21,98	60,55	88,19

Cơ chế phản ứng gốc enzym được đề nghị như sau và được xác nhận bằng một số thí nghiệm đã được trình bày trong báo cáo tại hội nghị quốc tế về Hóa học Việt Nam-Malaysia tháng 11 năm 2014 [5].

Chavibetol sinh ra do sự thủy phân trực tiếp của một phần nhỏ chất 2 và chủ yếu từ sự chuyển đổi của chất 3. Hợp chất 3 bị thủy phân nhiều cho chất trung gian 4-allylpyrocatechol 4 (APC), tan dễ trong nước, không lôi cuốn được theo hơi nước; một phần



của APC bị metyl hóa chọn lọc ở OH para đối với nhóm thế allyl cho chavibetol 1 dưới tác dụng của enzyme Catechol-O-Methyl transferase (COMT) có sự hiện diện của ion Mg^{++} và S-Adenosyl-L-methionine [2,10]. Do một phần đáng kể APC 4 còn lại trong nước chưng cất, hiệu suất thu tinh dầu đạt thấp, chất 3 và tổng phenolic trong tinh dầu cũng giảm quan trọng.

Trong báo cáo này, mục tiêu của chúng tôi là:

- Nêu lại rõ các điều kiện thực nghiệm đã báo cáo trong các hội nghị trước đây cho phép đạt tinh dầu lá trầu với hiệu suất cao và có tổng phenolic lớn hoặc tinh dầu có hàm lượng chavibetol cao [6,7].

- Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật, đặc biệt khả năng trung hòa EV 71 của tinh dầu lá trầu theo tổng phenolic và tính kháng oxi hóa theo thành phần chavibetol.

2. Phương pháp nghiên cứu

Trong chưng cất lá trầu bằng lôi cuốn hơi nước, 3 yếu tố quan trọng đã được chọn để khảo sát ảnh hưởng trên hiệu suất thu tinh dầu, thành phần của từng phenolic và tổng phenolic:

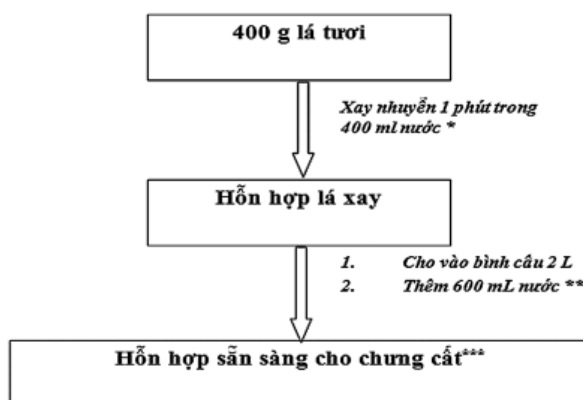
- Muối: Thí nghiệm trên cho thấy rõ ràng muối là một yếu tố tạo ảnh hưởng rất lớn, có thể làm thay đổi cấu trúc của enzyme khiến enzyme không còn hoạt động tốt nữa; do đó ảnh hưởng muối được khảo sát với nồng độ thay đổi từ 0 đến 36% (ứng với nước bão hòa muối).

- Nhiệt độ: Do enzyme có thể hoạt động tạo sự chuyển đổi bất lợi trong lúc gia nhiệt dụng cụ chưng cất từ nhiệt độ phòng đến nhiệt độ sôi của nước, do đó nhiệt độ bắt đầu tiến hành chưng cất được chọn từ 30°C đến 70°C, vì ở 70°C, hầu như enzyme thường không còn tác dụng nữa.

- Thời gian chưng cất: Bằng phương pháp “thử và sai”, đã xác định thời gian chưng cất tinh dầu trong phòng thí nghiệm là 3 giờ trong trường hợp chưng cất với nước bão hòa muối; trong những trường hợp khác, chúng tôi chưng cất trong 2 giờ xong bão hòa muối và chưng cất tiếp một giờ để đảm bảo lấy được trọn vẹn tinh dầu.

Lưu ý là để ổn định tinh dầu, thành phần APC diacetate 3 với 2 nhóm OH đều bị khóa phải có nhiều và hàm lượng chavibetol 1 có 1 OH phenol nên được giữ càng thấp càng tốt, điều này đồng nghĩa là phải khống chế được hoạt động của enzyme.

2.1. Quy trình chưng cất tinh dầu trong phòng thí nghiệm



* Nước có hàm lượng muối thích hợp và ở nhiệt độ phòng

** Nước có hàm lượng muối thích hợp và ở nhiệt độ thích hợp

*** Hỗn hợp cuối cùng ở 30°C, 50°C, 70°C với nồng độ muối từ 0% đến bão hòa (36%)

Tốc độ gia nhiệt được điều chỉnh sao cho thời gian từ lúc nạp mẫu đến lúc tinh dầu bắt đầu chưng cất khoảng 20 phút.

2.2. Phương pháp định lượng thành phần phenolic của tinh dầu và APC

- Thành phần tương đối của các cấu tử của tinh dầu được xác định bằng kỹ thuật GC-MS-EI-Scan, với cột DB-5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm .

- Định lượng chính xác các cấu tử phenolic 1, 2, 3 và 4 bằng kỹ thuật GC-MS-EI-SIM đã được mô tả trong các báo cáo trước [6,7].

2.3. Thử hoạt tính sinh học

2.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn và nấm

Được thực hiện tại Công ty Dịch vụ Khoa học-Công nghệ Sắc Ký Hải Đăng theo Dược điển Việt Nam IV:

- Nồng độ vi khuẩn: 108 CFU/mL, nồng độ thử nghiệm: từ tinh dầu nguyên chất C0, pha loãng thành Co/2, Co/4, Co/8, Co/16... đo vòng kháng khuẩn tính theo mm.

- Đường kính đục lỗ: 6mm. Vòng kháng khuẩn 6 mm tương ứng với trường hợp không ức chế rõ vi khuẩn và nấm.

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường Thạch Muller-Hinton

- Chủng vi khuẩn thử nghiệm: Staphylococcus aureus ATCC25923, Escherichia coli ATCC25922, Vibrio parahaemolyticus ATCC11778, Candida albicans ATCC10231, Pseudomonas aeruginosa ATCC10145.

2.3.2. Hoạt tính trung hòa Enterovirus EV 71

Được thực hiện tại viện Pasteur TP. HCM

Phương tiện:

- Virus Enterovirus 71 (EV71) được phân lập, định danh và nuôi cấy tại khoa Vi sinh Miễn dịch, Viện Pasteur TP. HCM.

- Tế bào sarcoma cơ vân (Rhabdomyosarcoma-A, RD-A).

- Môi trường nuôi cấy tế bào RD-A: Môi trường tăng trưởng EMEM (Eagles Minimal Essential Medium) 10%; Môi trường duy trì E'MEM (môi trường EMEM cải tiến) 2%.

- Dụng cụ: Tủ ấm CO₂, kính hiển vi đảo ngược, bảng 96 và 192 giếng vô khuẩn, micropipet.

Cách thực hiện:

- Xác định nồng độ tinh dầu trầu không độc đối với tế bào RD-A bằng cách pha loãng dung dịch tinh dầu trầu có nồng độ ban đầu Co ở các nồng độ loãng dần: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 Co. Chọn nồng độ đầu tiên không gây độc tế bào.

- Xác định hiệu giá CCID50 (Cell Culture Infective Dose 50%) cho biết nồng độ virus có hiệu ứng CPE (cytopathic effect), gây độc 50% tế bào RD-A trước khi cho trung hòa với dung dịch tinh dầu trầu.

- Cho tác dụng trước với virus EV 71 tinh dầu có nồng độ không gây độc tế bào RD-A đã nêu trên

nhằm trung hòa bớt virus tức làm giảm nồng độ virus tác dụng với RD-A, sau đó cho hỗn hợp tinh dầu trộn với virus đã ủ trong 1 giờ xâm nhiễm vào tế bào RD-A. Xác định lại CCID50 của virus. Nếu trị số CCID50 mới nhỏ hơn trị số CCID50 trước khi có tác dụng tinh dầu thì tinh dầu lá trầu có tác dụng trung hòa virus.

2.4. Hoạt tính kháng oxy hóa

Phương pháp kinh điển DPPH được áp dụng [1]. Các phép đo được thực hiện tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Điều kiện thực nghiệm để có hiệu suất thu tinh dầu cao với tổng phenolic lớn

Thời điểm thực hiện các thí nghiệm là các tháng mưa từ 8-10/2014. Từ một số thí nghiệm chưng cất tinh dầu được thực hiện với nước có hàm lượng muối 0%, 18%, 36% và ở những nhiệt độ 30°C, 50°C và 70°C, các số liệu có được đã được xử lý thống kê với phần mềm STATGRAPHICS Centurion XVI.II và đã được báo cáo trong hội nghị Hóa học Malaysia-Việt Nam [6].

Kết quả tính toán cho phép rút ra kết luận như sau:

- Nhiệt độ bắt đầu chưng cất ít có ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu và tổng phenolic, do đó về mặt kỹ thuật có thể thực hiện quy trình chưng cất với nhiệt độ ban đầu là nhiệt độ phòng.

- Nồng độ muối là yếu tố quyết định. Như vậy, muốn tinh dầu trầu đạt được các tiêu chí đã nêu, nên tiến hành chưng cất lá tươi trong nước muối bão hòa, nhiệt độ bắt đầu tiến hành chưng cất là nhiệt độ phòng. Muối có tác dụng làm thay đổi cấu trúc của enzym khiến enzym không còn hoạt động tốt nữa.

3.2. Các điều kiện thực nghiệm để tinh dầu có hàm lượng chavibetol cao

Kết quả đã được báo cáo ở Hội nghị Phân tích Analytica Vietnam 2015 [7]:

- Đơn giản là chưng cất tinh dầu với nước không muối. Chavibetol đạt được khoảng 28% - 29%.

- Có thể đạt hàm lượng chavibetol cao hơn nếu phơi lá ở nhiệt độ 40°C - 50°C và chưng cất với sự hiện diện của MgCl₂.6H₂O. Trong trường

hợp này, lá (500g) được phơi khô ở nhiệt độ phòng, 40°C, 50°C, xong xay nhuyễn trong 1L nước có hay không có thêm 5g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, ngâm 1 giờ ở nhiệt độ phòng, chưng cất 2 giờ, xong bão hòa muối và chưng cất thêm 1 giờ (Bảng 2):

Bảng 2. Biến đổi chavibetol theo cách xử lý lá

Cách xử lý lá	Hóc môn, TP Hồ Chí Minh			
	Hàm lượng tinh dầu (mg)	1, (% diện tích GC-MS)	2, (% diện tích GC-MS)	3, (% diện tích GC-MS)
Lá phơi ở nhiệt độ phòng	757	38,38	8,89	1,65
Lá phơi ở 40°C, không có $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	613	43,53	7,19	0,96
Lá phơi ở 40°C, có $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	644	45,49	8,45	2,18
Lá phơi ở 50°C, không có $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	637	50,11	3,67	1,36
Lá phơi ở 50°C, có $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	665	56,54	4,06	1,36

3.3. Hoạt tính sinh học của tinh dầu trầu theo hàm lượng tổng phenolic

3.3.1. Hoạt tính ức chế vi khuẩn và nấm mốc

Ba loại tinh dầu có thành phần phenolic khác nhau được đem thử hoạt tính kháng khuẩn và nấm (Bảng 3)

Bảng 3. Thành phần phenolic của 3 mẫu tinh dầu lá trầu

Thành phần phenolic	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Chavibetol 1 (%)	28,55	6,95	2,46
Chavibetol acetate 2 (%)	17,54	21,72	16,57
APC diacetate 3 (%)	11,38	45,34	74,07
Tổng hàm lượng phenolic (%)	57,47	74,01	93,10
Mẫu 1: Tinh dầu lá trầu chưng cất với nước không muối			
Mẫu 2: Tinh dầu lá trầu chưng cất với dung dịch 18% muối NaCl			
Mẫu 3: Tinh dầu lá trầu chưng cất với nước bão hòa muối			

Hoạt tính kháng khuẩn được ước lượng bằng cách đo vòng kháng khuẩn với những dung dịch pha loãng dần. Kết quả được ghi trong Bảng 4. Với mẫu tinh dầu 3, thành phần phenolic lớn nhất, khả năng ức chế khuẩn, nấm mốc được thấy mạnh nhất,

thậm chí mẫu còn có khả năng ức chế cả vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* tương đối khó trị.

Bảng 4. Tính kháng khuẩn và nấm của tinh dầu trầu

Vi khuẩn thử nghiệm	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
Mẫu tinh dầu lá trầu chưng cất với nước không muối (Mẫu 1)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7	6	6	6
<i>Escherichia coli</i>	12	9	6	6	6
<i>Candida albicans</i>	8	6	6	6	6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11	6	6	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	6	6	6	6
Mẫu tinh dầu lá trầu chưng cất với dung dịch 18% muối (Mẫu 2)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	15	15	13	11
<i>Escherichia coli</i>	15	13	10	6	6
<i>Candida albicans</i>	15	14	10	6	6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12	11	8	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	12	9	6	6
Mẫu tinh dầu lá trầu chưng cất với dung dịch muối bão hòa NaCl (Mẫu 3)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	15	15	14	13
<i>Escherichia coli</i>	18	18	16	16	15
<i>Candida albicans</i>	17	16	15	15	13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16	16	15	14	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	18	16	14	12

3.3.2. Hoạt tính trung hòa in vitro EV 71

Đây là lần đầu tiên trên thế giới tinh dầu lá trầu được phát hiện có hoạt tính trung hòa EV 71. Thử nghiệm hoạt tính này được thực hiện tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. Hai mẫu tinh dầu lá trầu với tổng phenolic 75% và 85% được thử nghiệm.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm hoạt tính trung hòa virus EV 71 của tinh dầu trầu

	Mẫu tinh dầu A	Mẫu tinh dầu B
Tổng phenolic (%)	75	85
Nồng độ tinh dầu ban đầu (ppm)	2000	15000
Hệ số pha loãng để tinh dầu không độc đối với tế bào RD-A	10	512
Nồng độ tinh dầu không gây độc tế bào RD-A (ppm)	200	29
Nồng độ virus CCID50/0,05 ml trước trung hòa với tinh dầu	106,5 = 3162278	105,8 = 630957
Nồng độ virus CCID50/0,05 ml sau trung hòa với tinh dầu trong 1 giờ	105,45 = 281838	105,3 = 199526

Kết quả cho thấy ở nồng độ khá loãng, tinh dầu lá trầu vẫn trung hòa được virus Tay Chân Miệng rất đáng kể. Tinh dầu lá trầu có nhiều triển vọng hỗ trợ trị bệnh Tay Chân Miệng.

3.4. Hoạt tính kháng oxi hóa của tinh dầu

Hoạt tính kháng oxi hóa được đo cho 3 mẫu tinh dầu mẫu 1, mẫu 2, mẫu 3 nêu trên theo phương pháp DPPH. Các trị số IC50 cho các mẫu tinh dầu lá trầu mẫu 1; mẫu 2 và mẫu 3 lần lượt là 16,59 g/mL; 36,44 g/mL và 38,40 g/mL (IC50 cho acid ascorbic là 5,5 µg/mL).

Mẫu 1 có hàm lượng chavibetol lớn (28,55%) cho kết quả IC50 về khả năng bắt gốc tự do vượt trội hơn hẳn so với mẫu 2 và 3, có hàm lượng chavibetol đều nhỏ (6,95% và 2,46%). Như vậy rõ ràng chavibetol với 1 nhóm OH phenol quyết định khả năng kháng oxi hóa của tinh dầu trầu. Điều đó cũng có nghĩa là tinh dầu trầu càng chứa ít chavibetol thì càng khó bị oxi hóa, tức càng ổn định trong lưu trữ.

4. Kết luận

Nghiên cứu cho phép kết luận như sau:

- Tinh dầu lá trầu có tổng phenolic càng cao thì càng có hoạt tính kháng vi sinh vật mạnh, đặc biệt có khả năng trung hòa virus Tay Chân Miệng EV 71.

- Tính kháng oxi hóa của tinh dầu tùy thuộc hàm lượng phenol tự do có trong tinh dầu.

- Một phương pháp để có hiệu suất chiết tinh dầu cao có tổng phenolic lớn là chưng cất lá trầu bằng lôi cuốn hơi nước trong dung dịch bão hòa muối NaCl, với nhiệt độ bắt đầu chưng cất là nhiệt độ phòng.

Lời cảm ơn

Các tác giả cảm ơn UBND thành phố và Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh và công ty trách nhiệm hữu hạn sản xuất mỹ phẩm Lan Hảo Thorakao đã hỗ trợ kinh phí cho thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

Tiếng Việt

1. Nguyễn Thị Diễm Hương, Phan Hồng Sơn, Bùi Đặng Thiên Hương, Hồ Thị Cẩm Hoài, Nguyễn Thị Thanh Mai (2012). Khảo sát hoạt tính sinh học và thành phần hóa học của cây văng sể (*Jasminum subtripplinerve* Blume, Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ, 15 (3), 37-44.

Tiếng Anh

2. Creveling C.R., Morris N., Shimizu H., Ong H. H., Daly J. (1972). Catechol O-methyltransferase IV. Factors Affecting m-and p-Methylation of Substituted Catechols, *Mol. Pharmacol.*, 8, 398-409.

3. Huynh ky Tran, Tran Nguyen ngoc Chau, Nguyen Khoa Nam, Pham Thi Anh, Nguyen Xich Lien, Chu Pham Ngoc Son (2011). Investigation on the composition of Vietnam` Piper betle L. leaf essential oil, The 2nd Analytica Viet Nam Conference 2011, Conference Proceeding, pp. 193-197. April 7-8, Ho Chi Minh City, Viet Nam.

4. Huynh ky Tran (2012). Investigations on the variation of the chemical composition of Hocmon betel leaf essential oil (Piper betle L.) during the year and according to the method of leaf pretreatment, PhD thesis presented at Mendeleev University, for the degree of Candidate of Engineering Sciences (PhD in Engineering) delivered by Higher Interacademic Attestation Commission, Russian Federation Moscow.

5. Huynh Ky Tran, Tran NguyenNgoc Chau, Ha My Thuan, Pham Thi Anh, Nguyen Xich Lien, Chu Pham Ngoc Son

(2011), Transformation of 4-allylpyrocatechol diacetate into chavibetol in Vietnam Piper betle L. leaves, 14th Asian Chemical Congress-14ACC Proceedings, Paper OR-G5-06, pp. 220-227, September 5-8, Bangkok City, Thailand.

6. Huynh Ky Tran, Tran Nguyen Ngoc Chau, Ha My Thuan, Nguyen Khoa Nam, Do Viet Ha, Nguyen Xich Lien, Pham Thi Anh, Chu Pham Ngoc Son (2014). Improving the yield of Hocmon betel leaf essential oil with high content of phenolic compounds by appropriate leaf treatment before hydrodistillation, Vietnam-Malaysia International Chemical Congress, 7-9 November 2014, Hanoi, Vietnam; also in Vietnam Journal of Chemistry (2015), 53(2e1), pp. 76-82.

7. Huynh Ky Tran, Tran Nguyen Ngoc Chau, Ha My Thuan, Nguyen Khoa Nam, Do Viet Ha, Nguyen Xich Lien, Pham Thi Anh, Chu Pham Ngoc Son (2015). Enzymatic transformation of 4-allylpyrocatechol diacetate into chavibetol in betel leaf essential oil in the presence of betel leaves (piper betle L.), The 4th Analytica Viet Nam Conference 2015, Conference Proceeding, pp. 270-278. April 15-16, Ho Chi Minh City, Viet Nam.

8. Rekha V.P.B., Kollipara M., Srinivasa Gupta B.R.S.S., Bharath Y., Pulicherla K. K. (2014). A Review on Piper betle L.: Nature's Promising Medicinal Reservoir, *American Journal of Ethnomedicine*, 1(5), 276-289.

9. Satyal P., Setzer W.N. (2012). Chemical composition and biological activities of Nepalese Piper betle L. *International Journal of Professional Holistic Aromatherapy*, 1 (2), 23-26.

10. Tsao D., Liu S., Dokholyan N. V. 2011). Regioselectivity of catechol O-methyltransferase confers enhancement of catalytic activity, *Chem. Phys. Lett.*, 506, 135-138 (2011).