

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, CHỈ SỐ HÓA LÝ VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA TINH DẦU QUẢ PHẬT THỦ VIỆT NAM

Nguyễn Văn Lợi^{1*}, Nguyễn Thị Minh Tú², Hoàng Đình Hòa²

¹Trung tâm Nghiên cứu phát triển và Chuyển giao công nghệ, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Đến Tòa soạn 24-10-2014; Chấp nhận đăng 13-2-2015

Abstract

The Hoai Duc Buddha's fruit oil is obtained by alluring steam distillation and dried with Na_2SO_4 . By using the GC-MS method, 40 chemical components were identified in the Hoai Duc Buddha's fruit oil, from which hydrocarbons accounted for 38.29 % (monoterpene: 29.27 %, sesquiterpene: 8.32 %) and oxygenated components accounted for 60.04% (aldehyde: 21.01 %, alcohol: 21.34 %, ester: 12.55 %, oxide: 2.80 %, acid: 2.34 %). That has been identified the density in 20 °C is 0.835, acid index is 0.655 (mg KOH/g) and esters index is 0.726 (mg KOH/g). The DPPH methods having antioxidant activity have identified oil 41.16±0.23 % with the Hoai Duc Buddha's fruit oil. Besides using agar diffusion method identifying antimicrobial activity of three oils on microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus*.

Keywords. Oil, chemical components, biological activity.

1. MỞ ĐẦU

Quả Phật thủ có tên khoa học là *Citrus medica* L.vr. *sarcodactylis* Sw, có mùi thơm đặc trưng và có tính ôn hòa. Quả Phật thủ dùng làm thuốc điều hòa khí, bồi bổ dạ dày, có công hiệu giảm đau, làm dễ tiêu, tan đờm, giảm ho, điều trị nôn và giã rượu... Ngoài ra, hoa Phật thủ cũng là vị thuốc Đông y rất tốt, tính ấm, vị hơi đắng, có tác dụng điều trị nôn và giảm ho [1]. Bên cạnh việc sử dụng trong y học thì hiện nay trong dân gian người ta còn sử dụng Phật thủ để ngâm rượu, sử dụng để nấu nước gội đầu và sử dụng quả Phật thủ để thờ cúng trong dịp lễ tết. Tinh dầu quả Phật thủ có mùi thơm dễ chịu và hài hòa [1]. Tuy nhiên hiện nay ở nước ta có rất ít công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu này. Do đó bài báo "Nghiên cứu thành phần hóa học, chỉ số hóa lý và hoạt tính sinh học của tinh dầu quả Phật thủ Việt Nam" góp phần cung cấp thêm các thông tin về tinh dầu quả Phật thủ, làm cơ sở cho việc ứng dụng tinh dầu vào lĩnh vực thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quả Phật thủ được thu mua tại huyện Hoài Đức -

Hà Nội, sau đó thu hồi tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và được làm khan bằng Na_2SO_4 .

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu hồi tinh dầu

Quả Phật thủ sau khi thu hoạch, rửa sạch, cắt thái, xay nhỏ, đưa vào bình cầu và chưng cất với tỷ lệ nước/nguyên liệu là 3/1 (ml/g), thời gian chưng cất là 180 phút, bằng bộ chưng cất tinh dầu Clevenger ($d < 1$). Sau khi thu được tinh dầu thô, tinh dầu này được làm khan bằng Na_2SO_4 và thu được tinh dầu tinh khiết.

Hiệu suất thu hồi tinh dầu được tính theo công thức:

$$H_{\%} = \frac{\text{Lượng tinh dầu thu được}}{\text{Hàm lượng tinh dầu trong nguyên liệu}} \cdot 100\%$$

2.2.2. Phương pháp xác định thành phần hóa học của tinh dầu

Các thành phần hóa học của tinh dầu được xác định theo phương pháp GS-MS trên máy GC-MS Model: Autostem GC-XL/Turbo Mass Gold tại Khoa Hóa học - Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, với chương trình thực hiện như sau: Nhiệt độ cột 80-

150 °C, tốc độ tăng nhiệt 3 °C/phút, giữ ở 5 phút và 150-220 °C tốc độ tăng nhiệt 8 °C/phút, giữ ở 5 phút. Điều kiện MS: ion hóa mẫu ở thể ion hóa 70 ev, nhiệt độ duy trì 250 °C, khí mang là heli tốc độ 0,5 ml/phút, tốc độ chia dòng 1:50 [2, 3].

2.2.3. Phương pháp xác định chỉ số hóa lý của tinh dầu

a. Xác định độ trong, màu sắc và mùi vị của tinh dầu theo TCVN 8460:2010

Sử dụng ống nghiệm thủy tinh trong suốt có đường kính 20-25 mm, dung tích 30 ml, cân kỹ thuật, ống hút, giấy thấm và đường kính trắng [4].

b. Xác định tỷ trọng của tinh dầu theo TCVN 8444:2010

Tỷ trọng của tinh dầu là tỷ số giữa khối lượng của một thể tích xác định của tinh dầu ở 20°C với khối lượng của cùng một thể tích nước cất cũng ở 20°C. Tỷ trọng của tinh dầu quả phạt thủ được xác định theo tiêu chuẩn TCVN 8444:2010 [4].

c. Xác định góc quay cực theo TCVN 8446:2010

Khả năng phân cực của mỗi loại tinh dầu khác nhau và tùy thuộc vào thành phần hóa học của tinh dầu, độ dài sóng của ánh sáng chiếu qua, nhiệt độ lúc đo và được biểu thị bằng năng suất quay cực, ký hiệu là α . Dụng cụ và thiết bị gồm: Phân cực kế với độ chính xác $\pm 0,030$ và được hiệu chỉnh để cho giá trị 00 và 1100 với nước cất. Nguồn sáng đèn natri hoặc thiết bị cho ánh sáng có bước sóng $589,3 \pm 0,3$ nm. Ống đo hình trụ dài $100 \pm 0,5$ mm [4].

d. Xác định chỉ số khúc xạ theo TCVN 8445:2010

Chỉ số khúc xạ được xác định ở 20 °C, theo phương pháp đo góc tới hạn bằng khúc xạ kế kiểu Abbe có đèn natri [4].

e. Xác định chỉ số axit theo TCVN 8450:2010

Chỉ số axit được xác định theo công thức sau:
Chỉ số axit [4].

$$X_A = \frac{5,61.V}{m}$$

Với X_A : chỉ số axit. V: thể tích kali hydroxit 0,1N đã dùng để chuẩn độ (ml). m: khối lượng mẫu thử (g). 5,61: lượng kali hydroxit có trong etanol (mg).

f. Xác định chỉ số este theo TCVN 8451:2010

Chỉ số este được tính theo công thức sau:
Chỉ số este [4].

$$X_B = \frac{28,05 \times (V - V_1)}{m}$$

Với X_B : chỉ số este, V: lượng dung dịch axit sunfuric 0,5 N đã dùng để chuẩn độ mẫu trắng (ml), V_1 : lượng dung dịch axit sunfuric 0,5 N đã dùng để chuẩn độ mẫu thử (ml), m: khối lượng mẫu (g), 28,05: lượng dung dịch kali hydroxit 0,5 N.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học của tinh dầu

a. Phương pháp xác định khả năng quét gốc tự do DPPH

Xác định khả năng quét gốc tự do DPPH, dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra gốc tự do bên trong dung dịch ethanol bão hòa, được tính bằng công thức % DPPH = $[(A_0 - (A - A_b)) / A_0] \times 100$ %, trong đó A_0 là mẫu kiểm chứng, A là mẫu thí nghiệm, A_b là mẫu trắng. Mẫu thí nghiệm gồm có 0,1 ml tinh dầu quả phạt thủ, 2 ml etyl axetat, 1,9 ml metanol và 1 ml DPPH. Hỗn hợp sau khi phối trộn được lắc nhẹ và để yên trong bóng tối ở nhiệt độ phòng 30 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm [2, 5-7].

b. Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch, dựa vào hiệu số D-d (cm), với D: đường kính vòng kháng khuẩn (cm), d: đường kính lỗ khoan (cm) [8, 9].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu suất thu hồi tinh dầu quả phạt thủ

Sau khi chưng cất với tỷ lệ nước/nguyên liệu là 3/1 (ml/g), thời gian là 180 phút và được làm khan bằng Na_2SO_4 , chúng tôi thu được tinh dầu quả phạt thủ với hiệu suất thu hồi chiếm 82,27 %.

3.2. Thành phần hóa học tinh dầu quả phạt thủ

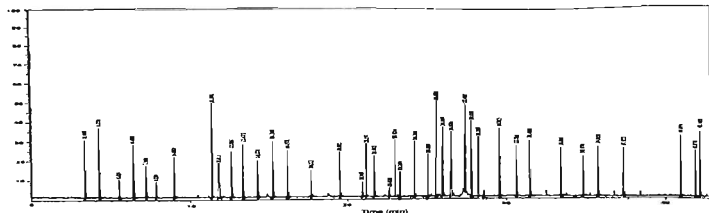
Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được 40 thành phần hóa học trong tinh dầu quả phạt thủ. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được 40 thành phần hóa học của tinh dầu quả phạt thủ, trong đó có 14 thành phần thuộc nhóm hydrocarbon không chứa oxy, chiếm 38,29 %, như *l*-limonene: 5,57 %, sabinene: 4,52 %, myrcene: 4,05 %, α -phellandrene: 3,04 %, *p*-cymene: 2,54 %, δ -cadinene: 2,41 % là những thành phần chiếm tỷ lệ lớn. Trong 14 thành phần thuộc nhóm hydrocarbon không chứa oxy, thì nhóm monoterpene: 29,97 % và nhóm sesquiterpene:

Bảng 1: Thành phần hóa học của tinh dầu quả phật thủ

| TT | Tên thành phần hóa học | Thời gian lưu (phút) | Tỷ lệ (%) |
|----|-------------------------------|----------------------|-----------|
| 1 | α -pinene | 3,418 | 2,18 |
| 2 | myrcene | 4,276 | 4,05 |
| 3 | octanal | 5,625 | 1,04 |
| 4 | citronellal | 6,432 | 3,02 |
| 5 | α -terpinene | 7,168 | 1,66 |
| 6 | <i>cis</i> -linalool oxide | 8,128 | 0,97 |
| 7 | <i>trans</i> -linalool oxide | 9,003 | 1,83 |
| 8 | <i>l</i> -limonene | 11,395 | 5,57 |
| 9 | linalool | 11,811 | 1,32 |
| 10 | octanol | 12,726 | 1,95 |
| 11 | linalyl acetate | 13,433 | 2,46 |
| 12 | nonanal | 14,278 | 1,79 |
| 13 | octyl acetate | 15,189 | 2,28 |
| 14 | thujene | 16,172 | 2,07 |
| 15 | geranyl acetate | 19,272 | 1,51 |
| 16 | α -citronellol | 20,072 | 2,04 |
| 17 | α -terpineol | 20,942 | 0,93 |
| 18 | neryl acetate | 21,197 | 3,09 |
| 19 | β -citronellol | 21,693 | 1,98 |
| 20 | γ -terpinene | 22,632 | 0,81 |
| 21 | <i>p</i> -cymene | 23,034 | 2,54 |
| 22 | terpinolene | 23,295 | 1,12 |
| 23 | nonanoic acid | 24,189 | 2,34 |
| 24 | decanal | 25,083 | 1,93 |
| 25 | dodecanal | 25,608 | 4,56 |
| 26 | perilla alcohol | 26,007 | 3,32 |
| 27 | <i>trans</i> -nerolidol | 26,528 | 3,38 |
| 28 | sabinene | 27,422 | 4,52 |
| 29 | geranial | 27,818 | 4,29 |
| 30 | α -phellandrene | 28,258 | 3,04 |
| 31 | α -farnesene | 29,713 | 3,12 |
| 32 | farnesol | 30,726 | 2,26 |
| 33 | δ -cadinene | 31,452 | 2,41 |
| 34 | cumin aldehyde | 33,566 | 2,06 |
| 35 | tridecanal | 34,871 | 2,32 |
| 36 | <i>cis</i> -geraniol | 35,812 | 2,09 |
| 37 | <i>trans</i> -geraniol | 37,327 | 2,07 |
| 38 | α -humulene | 41,079 | 3,03 |
| 39 | β -bisabolene | 42,878 | 2,17 |
| 40 | perillyl acetate | 42,933 | 3,21 |
| | monoterpene | | 29,97 |
| | sesquiterpene | | 8,32 |
| | andehit | | 21,01 |
| | ancol | | 21,34 |
| | este | | 12,55 |
| | oxi | | 2,80 |
| | axit | | 2,34 |
| | Tổng hidrocarbon có oxi | | 60,04 |
| | Tổng hidrocarbon không có oxi | | 38,29 |
| | Tổng cộng | | 98,33 |

Tỷ lệ (%): Tính theo diện tích pic sắc ký.



Hình 1: Sắc ký đồ tinh dầu vỏ quả phật thủ

8,32 %. Kết quả nghiên cứu trong bảng 1 cho thấy có 26 thành phần thuộc nhóm hydrocarbon có chứa oxi chiếm 60,04 %, trong đó có một số thành phần chiếm tỷ lệ lớn như: dodecanal: 4,56 %, geranial: 4,29 %, *trans*-nerolidol: 3,38 %, perilla alcohol: 3,32 %, neryl acetate: 3,09 %, citronellal: 3,02 %, linalyl acetate: 2,46 %... Trong 60,04 % các thành phần hydrocarbon có chứa oxi trong tinh dầu quả phật thủ, thì nhóm andehit: 21,01 %, nhóm ancol: 21,34 %, nhóm este: 12,55 %, nhóm oxi: 2,80 %, nhóm axit: 2,34 %.

3.3. Chỉ số hóa lý của tinh dầu quả phật thủ

Sử dụng bộ Tiêu chuẩn Quốc gia về tinh dầu- phương pháp thử, công bố năm 2010. Chúng tôi đã xác định được các chỉ số hóa lý của tinh dầu quả phật thủ. Kết quả trình bày ở bảng 2 như sau:

Bảng 2: Chỉ số hóa lý của tinh dầu quả phật thủ

| TT | Chỉ số hóa lý | Kết quả |
|----|------------------------------|------------|
| 1 | Độ trong của tinh dầu | Trong suốt |
| 2 | Màu sắc của tinh dầu | Không màu |
| 3 | Mùi của tinh dầu | Thơm |
| 4 | Vị của tinh dầu | Hơi đắng |
| 5 | Tỷ trọng ở 20°C | 0,835 |
| 6 | Góc quay cực α_D^{20} | 85° 35' |
| 7 | Chỉ số khúc xạ n_D^{20} | 1,463 |
| 8 | Chỉ số axit (mg KOH/g) | 0,655 |
| 9 | Chỉ số este (mg KOH/g) | 0,726 |

Kết quả nghiên cứu trong bảng 2 cho thấy tỷ trọng của tinh dầu là 0,835, điều đó chứng tỏ loại tinh dầu này nhẹ hơn nước và thường nổi trên mặt nước. Tinh dầu quả phật thủ thường trong suốt và không màu, có mùi thơm dễ chịu, có vị hơi đắng. Đã xác định được chỉ số khúc xạ của tinh dầu là 1,463,

chỉ số này nhỏ hơn 1,47 điều đó cho thấy trong tinh dầu có chứa nhiều thành phần có chứa liên kết đôi.

3.4. Một số hoạt tính sinh học của tinh dầu quả phật thủ

3.4.1. Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu quả phật thủ

Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu quả phật thủ được thực hiện tại phòng thí nghiệm Bộ môn Quản lý chất lượng, Bộ môn Vi sinh- Hóa sinh- Sinh học phân tử- Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu quả phật thủ

| T | Mẫu thí nghiệm | Thể tích (ml) | % quét gốc DPPH |
|---|-----------------------|---------------|-----------------|
| 1 | Tinh dầu quả phật thủ | 0,1 | 41,16±0,23 |
| 4 | Vitamin C | 0,1 | 39,08±0,41 |

Kết quả nghiên cứu trong bảng 3, cho thấy tinh dầu quả phật thủ có khả năng quét gốc tự do cao hơn vitamin C.

3.4.2. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu quả phật thủ

Xác định khả năng kháng khuẩn của tinh dầu quả phật thủ, trên các chủng vi sinh vật kiểm chứng như sau: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu thực hiện ở nồng độ pha loãng 10^5 CFU/ml, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 4 bước đầu cho thấy tinh dầu quả phật thủ có khả năng kháng khuẩn trên các chủng vi sinh vật kiểm chứng. So sánh 4

chúng vi sinh vật kiểm chứng thì năng kháng lớn nhất là *Salmonella typhi*, sau đó là *Bacillus cereus* và *Escherichia coli*.

Bảng 4: Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu quả Phật thủ

| TT | Chủng vi sinh vật kiểm chứng | Đường kính vòng kháng khuẩn D-d (cm) | |
|----|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | | Vitamin C | Tinh dầu quả Phật thủ |
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,8 | 2,6 |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> | 2,1 | 2,8 |
| 3 | <i>Salmonella typhi</i> | 1,9 | 3,1 |
| 4 | <i>Bacillus cereus</i> | 2,6 | 2,9 |

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra một số kết luận: Đã xác định được điều kiện chưng cất tinh dầu quả Phật thủ với tỷ lệ nước/nguyên liệu: 3/1 (ml/g), thời gian 180 phút và hiệu suất thu hồi tinh dầu: 82,27 %. Đồng thời xác định được 40 thành phần hóa học trong tinh dầu quả Phật thủ, trong đó có 14 thành phần hydrocarbon không chứa oxi, chiếm 38,29 % và 26 thành phần hydrocarbon có chứa oxi, chiếm 60,04 %. Đã xác định được các chỉ số hóa lý của tinh dầu quả Phật thủ (tỷ trọng ở 20 °C: 0,835; góc quay cực α_D^{20} : 85° 35'; chỉ số khúc xạ n_D^{20} : 1,463; chỉ số axit: 0,655 mg KOH/g; chỉ số este: 0,726 mg KOH/g. Bên cạnh đó cũng đã xác định một số hoạt tính sinh học của tinh dầu quả Phật thủ (khả năng quét gốc tự do DPPH: 41,16±0,23 % và khả năng kháng khuẩn trên 4 chủng vi sinh vật:

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* và *Salmonella typhi*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb. Y học (2001).
2. Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Thị Minh Tú, Hoàng Đình Hòa. *Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của các thành phần tạo hương trong tinh dầu vỏ quả bưởi và vỏ quả cam của Việt Nam*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 51(2), 153-162 (2013).
3. Minh Tu N.T, Thanh L.X, Une A, Ukeda U and Sawamura M. *Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils*. Flavour and Fragrance Journal, 17, 169-174 (2002).
4. Tuyển tập Tiêu chuẩn Quốc gia về tinh dầu-phương pháp thử (2010), 37- 42
5. Molyneux P. *The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarc Journal of Science Technology, 26, 211-219 (2004).
6. Matook S M, Fumio H. *Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (Citrus grandis Osbeck) fruit tissues*, Food Chemistry, 94, 529-534 (2006).
7. Meena M. R. and Sethi V. *Antimicrobial activity of essential oils from spices*, Journal of Food science and Technology, 31, 68-70 (1994).
8. Friedman M., Henika P. R. and Mandrell R.E. *Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella enteric*, Journal of Food Protection, 65, 1545-1560 (2002).
9. Perez C, Pauli M and Bazevque P. *An antibiotic assay by the agar well diffusion method*, Acta Biologica et Medicina Experimentalis, 15, 113-115 (1990).

Liên hệ: Nguyễn Văn Lợi

Trung tâm Nghiên cứu phát triển và Chuyển giao công nghệ

Đại học Công nghiệp Hà Nội.

Đường 32, Minh Khai, Bắc Từ Liêm, Hà Nội

E-mail: loichebien@yahoo.com

Điện thoại: 09886592378.