

# Chương 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

## 1.1. TỔNG QUAN VỀ TINH DẦU TRÀM NĂM GÂN (*Malaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake)

### 1.1.1. Cây tràm Năm gân

1.1.1.1. Phân loại sinh học, danh pháp khoa học

**Phân loại khoa học:**

**Giới:** Plantae

*Không phân hạng:* Tracheophytes, Angiosperms, Eudicots, Rosids

**Bộ:** Myrtales

**Họ:** Myrtaceae

**Chi:** *Melaleuca*

**Loài:** *M. quinquenervia*

**Danh pháp khoa học hai phần:** *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake

**Tên tiếng Anh:** Five-veined paperbark, Broad-leaved paperbark, Niaouli

**Tên tiếng Việt:** Tràm Năm gân, Tràm lá rộng, Tràm Úc

1.1.1.2. Đặc điểm hình thái của tràm Năm gân

Tràm Năm gân (tràm Úc, tràm lá rộng) là loài thực vật thuộc họ Đào Kim nương, Stanley Thatcher Blake đã tiến hành mô tả loài thực vật này vào năm 1968 (Blake, 1968). Cây thuộc loại thân gỗ cỡ nhỏ, thời gian sinh trưởng ngắn – chỉ từ 6 tháng nuôi trồng. Đặc điểm nhận biết đặc trưng của loài này như sau:

– Trung bình chiều cao cây khoảng 8–15 m, chiều cao tối đa của cây là 25 m. Vỏ cây có màu trắng bạc hoặc nâu gồm nhiều mảng mỏng trắng xốp đan xen lẫn nhau, ban đầu bề ngoài vỏ cây bóng mượt và mềm, đến khi trưởng thành bắt đầu có độ cứng sau đó tạo thành nhiều lớp sần sùi.

– Lá cây có hình dạng phiến thon của lá tre hoặc dạng tán lá rộng từ 5–12 m, chiều dài của lá rơi vào khoảng 4–14 cm, độ rộng từ 7,5–60 mm đồng thời có xu hướng thon dần ở hai đầu lá. Các lá được sắp xếp theo trật tự xen kẽ, mặt lá tương đối phẳng, trên bề mặt lá có các lông, màu xanh xỉn hoặc xám.

– Hoa tràm thường nở ở cuối cành và phát triển về phía sau, thông thường hoa có màu trắng, màu kem hoặc xanh lục vàng dài khoảng 2–3mm và rụng khi hoa già. Nhụy hoa màu trắng, có khoảng 5–10 nhụy và xếp xung quanh hoa khoảng 5 bó thành hình chùm, nở theo từng cụm có 8 cho đến 20 chùm hoa, mỗi chùm thường mọc

3 hoa. Quả nang hình trụ rộng 2–2,8 mm và dài khoảng 40 mm và mọc thành từng chùm dọc theo cành cây, mỗi viên nang đều chứa nhiều hạt giống tràm nhỏ (*Boland et al., 2006*). Hoa đóng vai trò là nguồn cung cấp mật hoa phong phú cho các loài sinh vật như dơi ăn quả, côn trùng (*Lepschi, 1993*) và chim chim chằng hạn như loài vẹt Lorikeet (*Trichoglossus chlorolepidotus*) (*Elliot et al., 1990*), dơi đầu xám và dơi đầu đỏ (*Eby, 1995*).



a)



b)



c)



d)

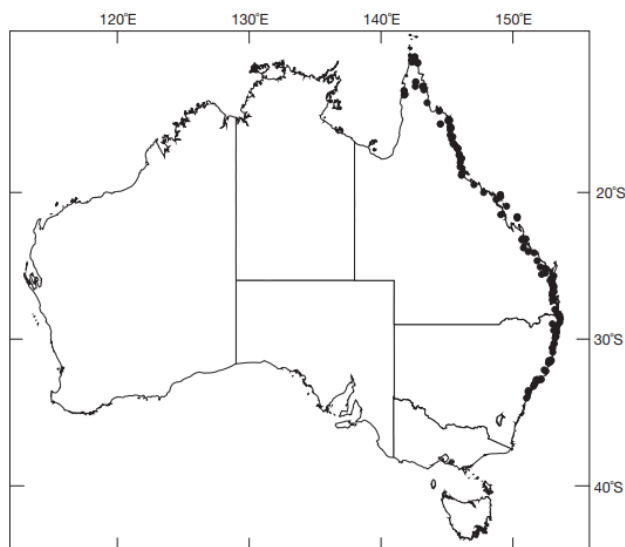
**Hình 1.1. Các bộ phận của tràm Năm gân**

**a) Hoa tràm; b) Nhánh tràm; c) Quả tràm; d) Thân cây tràm**

#### *1.1.1.3. Nguồn gốc và điều kiện sinh trưởng của tràm Năm gân*

Tràm Năm gân có nguồn gốc từ bang Queensland và New South Wales thuộc các vùng ven biển phía đông nước Úc, sau đó được nhập vào Papua New Guinea – một quốc gia ở ven bờ Thái Bình Dương, New Caledonia và Irian Jaya. Loài này sinh trưởng tốt ở vùng địa lý thấp ở Papua New Guinea, độ cao giữa mặt đất trồng so với mặt nước biển không quá 90 m, vĩ độ 7–34° nam, đồng thời cây phát triển tốt ở khu vực có lượng mưa 350–700 mm/năm. Đồng thời, tràm Năm gân phát triển tập trung tại khu vực đồng bằng đất sét phù sa giàu chất hữu cơ. Vào giai đoạn mùa mưa, những khu vực này thường có xu hướng bị ngập lụt với độ sâu từ 1 m trở lên. Ở New

Caledonia, cây xuất hiện chủ yếu trên những khu vực trung du, sườn đồi và ở các đỉnh núi cao. Loài này phát triển tốt ở đa số các điều kiện đất nhưng ít khi được tìm thấy tại các loại đất được tạo thành trên nền đá (*Boland et al., 2006*).



**Hình 1.2. Bản đồ phân bố của tràm Năm gân tại Úc**

#### *1.1.1.4. Phân bố cây tràm Năm gân tại Việt Nam*

Hiện nay, tràm Năm gân được nhập giống về Việt Nam và tiến hành nhân giống, canh tác từ những năm 1990 bởi Giáo sư Tiến sĩ Lê Đình Khả, sau đó được phân phối và nhân giống phát triển tại các tỉnh Hà Nội, Hà Tĩnh, Thanh Hóa, Quảng Bình, Đồng Tháp, Long An,... theo các đề án phát triển kinh tế của khu vực. Mục đích của việc phân phối, nhân giống cây tràm Năm gân nhằm chủ động trong việc cung ứng nguyên liệu để thu tinh dầu và nâng cao hiệu suất cũng như hàm lượng của các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng từ cây tràm.

#### **1.1.2. Tinh dầu tràm Năm gân**

##### *1.1.2.1. Thành phần trong tinh dầu tràm Năm gân*

Tinh dầu tràm Năm gân được (*Ireland et al., 2002*) chia theo 2 kiểu hóa học là Chemotype 1 và Chemotype 2 có khác nhau về mặt thành phần có mặt trong tinh dầu, điều này được tác giả nhận định là do sự khác nhau về điều kiện thổ nhưỡng khác nhau giữa các vùng. Cụ thể là Chemotype 1, thành phần đặc trưng chính chủ yếu là *E-Nerolidol* (từ 74 đến 95%) và *Linalool* (từ 14 đến 30%) và được phát hiện tại thành phố Sydney, dọc theo phía Bắc bờ biển đông của bang New South Wales và tập trung nhiều ở gần thành phố Maryborough, bang Queensland, nước Úc. Trong khi đó, Chemotype 2 tập trung chứa *1,8-Cineole* (từ 10 đến 75%), *Viridiflorol* (từ 13 đến

66%),  $\alpha$ -Terpineol (từ 0,5 đến 14%) và  $\beta$ -Caryophyllene (từ 0,5 đến 28%) với tỷ lệ và thứ tự khác nhau trong tinh dầu lá trà Năm gân và sự phân bố của loài này từ Sydney đến Papua New Guinea và New Caledonia. Điều đặc biệt tại Chemotype 2 có khả năng mở rộng liên tục về thành phần tinh dầu mà không hình thành thêm bất kỳ sự phân chia giống loài mới rời rạc như Chemotype 1.

Đánh giá dữ liệu ban đầu cho thấy sự có mặt của hai kiểu hóa học chính. Trong hai kiểu hóa học này có khác biệt khá rõ rệt của các thành phần riêng lẻ và được nhận xét như sau:

– Kiểu hóa học 1 chứa *E*-Nerolidol với hàm lượng lớn trong tinh dầu, có thể có hoặc không có Linalool.

– Kiểu hóa học 2 chủ yếu chứa 1,8-Cineole, Viridiflorol và  $\alpha$ -Terpineol, với tỷ lệ cao nhất là 1,8-Cineole hoặc Viridiflorol. Tại Việt Nam, cây trà Năm gân thuộc Chemotype 2 được Giáo sư Tiến sĩ Lê Đình Khả nhập giống nuôi trồng và phát triển từ Papua New Guinea và New Caledonia, thành phần kinh tế chủ yếu được thu nhận là hoạt chất 1,8-Cineole và Viridiflorol.

#### 1.1.2.2. Hoạt tính sinh học của tinh dầu trà Năm gân

##### **Hoạt tính chống oxy hóa**

Tinh dầu *M. quinquenervia* được thu nhận bằng phương pháp chưng cất hơi nước (Siddique et al., 2018) thể hiện khả năng chống oxy hóa tốt bằng cách trung hòa gốc tự do thông qua phản ứng liên hợp điện tử tự do DPPH<sup>•</sup> và hoạt tính khử sắt Fe<sup>3+</sup> (FRAP), sử dụng Butylated Hydroxytoluene (BHT<sup>•+</sup>) làm đối chứng dương. Các giá trị phân tích cho thấy tinh dầu có khả năng chống gốc tự do và khử sắt chênh lệch khoảng 1,05% so với đối chứng BHT, đồng thời giá trị IC<sub>50</sub> của tinh dầu là 44,5 ± 0,44 mg/mL, tốt hơn đến 6,74% so với đối chứng BHT 41,05 ± 0,50 mg/mL.

##### **Hoạt tính kháng khuẩn**

(Siddique et al., 2018) đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trà Năm gân trên 7 chủng khuẩn *B. spizizenii*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* và 6 chủng nấm *A. niger*, *A. flavus*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata*, *Penicillium digitatum* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, MIC, MBC và MFC. Các kết quả từ nghiên cứu cho thấy 250  $\mu$ g/mL tinh dầu trà Năm gân có khả năng kháng khuẩn *B. spizizenii* tốt với IZ = 46 ± 00 mm trong khi *S. aureus* bị kháng yếu nhất với IZ = 12,00 ± 00 mm, khả năng kháng nấm

của tinh dầu rất tốt điển hình là giống *P. digitatum* và *F. solani* bị ức chế tốt nhất ( $IZ = 46,00 \pm 00$  mm); kết quả MIC, MBC, MFC cho thấy bắt đầu từ nồng độ 8  $\mu\text{g/mL}$  tinh dầu trở lên có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm.

### **Hoạt tính chống viêm**

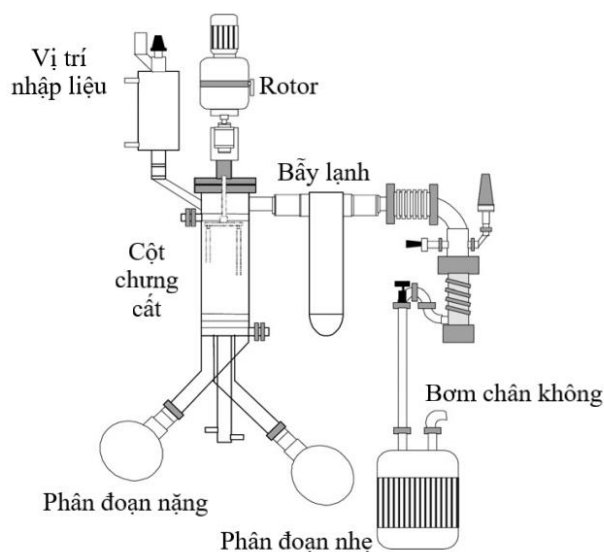
Nghiên cứu khả năng chống viêm tại chỗ của tinh dầu trầm Năm gân trên chuột bạch do (Acha et al., 2019) cho thấy tốc độ phát triển của tế bào phù nề được kiểm soát đáng kể. Đồng thời đặc tính hạ sốt, giảm đau của tinh dầu tại liều lượng 1800 mg/kg có hoạt tính tốt hơn so với liều 50 mg/kg Lysin acetylsalicylate.

### **Hoạt tính diệt muỗi**

Ba loài muỗi *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* và *Culex quinquefasciatus* cùng các ấu trùng của chúng đã được (Leyva et al., 2016) lựa chọn để phân tích mức độ ức chế muỗi của tinh dầu trầm Năm gân theo phương pháp chuẩn của WHO. Thử nghiệm tinh dầu 50 đến 100 mg/L cho thấy khả năng tiêu diệt muỗi vừa phải, chỉ số  $LC_{50}$  tương ứng với *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* và *Culex quinquefasciatus* lần lượt là 0,0047%, 0,0049% và 0,0021%.

## **1.2. PHƯƠNG PHÁP CHUNG CÁT PHÂN TỬ**

Chung cất là một trong những quá trình phân tách vật lý liên quan đến hỗn hợp hai hoặc nhiều cấu tử lỏng có nhiệt độ sôi khác nhau. Trong những năm qua, một phương pháp chung cất mới được phát triển đặc biệt để phân tách các cấu tử dễ bị biến tính bởi nhiệt độ hoặc có nhiệt độ sôi cao trong hỗn hợp lỏng đó là “**chung cất phân tử**”, còn được gọi là “**chung cất con đường ngắn**” (Lin et al., 2009; Stichlmair et al., 2021).



**Hình 1.3. Sơ đồ thiết bị chung cất phân tử**

Thiết bị chưng cất này được thiết kế với khoảng cách bay hơi nhỏ khoảng vài centimetres giữa bề mặt bộ phận hóa hơi đến bề mặt bộ phận sinh hàn (ngưng tụ), đồng thời hệ thống hoạt động ở áp suất chân không rất cao (nhỏ hơn 1 mbar).

Trong chưng cất phân tử, nguyên liệu được phủ đều thành một lớp màng mỏng trên bề mặt hóa hơi để đảm bảo quá trình gia nhiệt được đồng đều và tăng hiệu quả của quá trình chưng cất. Sau khoảng thời gian gia nhiệt ngắn, các hợp chất có khối lượng nhẹ và dễ bay hơi di chuyển đến bề mặt bộ phận ngưng tụ, khoảng cách giữa hai bề mặt rất ngắn (từ 1–2 cm) để tránh sự quay lại của các hợp chất về bề mặt bay hơi, khi khoảng cách giữa 2 bộ phận gần bằng với đường đi tự do trung bình của các phân tử bay hơi (the mean free path of evaporated molecules), thì khái niệm chưng cất phân tử được sử dụng (*Mahrous et al., 2022*).

Thuật ngữ được tập trung đầu tiên trong chưng cất phân tử là đường đi phân tử trung bình ( $\beta$ ), là khoảng cách mà một phân tử có thể di chuyển trước khi va chạm với một phân tử khác và có thể được xác định từ lý thuyết khí động học được đưa ra bởi phương trình sau:

$$\beta = \frac{k_b T}{\sqrt{2} \pi \sigma^2 P} \quad (1)$$

Trong đó:

$\beta$ : đường đi phân tử trung bình (m);

T: nhiệt độ (K);

P: áp suất (Pa)

$k_b$ : là hằng số Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K)

$\sigma$ : đường kính phân tử (m)

Kể từ khi được phát triển và ứng dụng trên thị trường quốc tế, chưng cất phân tử đã thu hút sự chú ý ngày càng tăng trong các ngành công nghiệp, hóa dầu, hóa hữu cơ, dược phẩm và mỹ phẩm bởi phương pháp này cho hiệu suất phân tách và tinh chế tốt hơn so với các kỹ thuật phân tách thông thường (*Ketenoglu et al., 2015*). Ngoài việc thu hồi các hợp chất có giá trị kinh tế, chưng cất phân tử có thể được sử dụng để loại bỏ một số độc chất có thể hiện diện tự nhiên trong nguyên liệu hoặc có thể hình thành trong quá trình tạo thành. Phương pháp này mang lại ưu điểm vượt trội so với các phương pháp tinh chế khác thông qua việc không sử dụng dung môi hữu cơ, tác nhân xúc tác hóa học trong quá trình chưng cất, từ đó loại bỏ được những mối nguy độc tính khi ứng dụng trong các sản phẩm dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm. Đồng thời có

thể ứng dụng cho các chất có trọng lượng phân tử và áp suất hơi khác nhau, đặc biệt giảm thiểu hao hụt sản phẩm do biến tính nhiệt độ đối với các chất như vitamins, dược phẩm... Chung cất phân tử được coi là công nghệ phân tách an toàn nhất để tinh chế các phân tử không ổn định về nhiệt và các hợp chất liên quan với độ bay hơi thấp và nhiệt độ sôi cao (*Wang et al., 2009*).

Ba đặc điểm chính của chung cất phân tử là:

- (i) Khoảng cách ngắn giữa bề mặt hóa hơi và bề mặt ngưng tụ (*Ibrahim et al., 2001*);
- (ii) Độ chân không rất cao;
- (iii) Thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và bề mặt hóa hơi ngắn (*Stichlmair et al., 2021*).

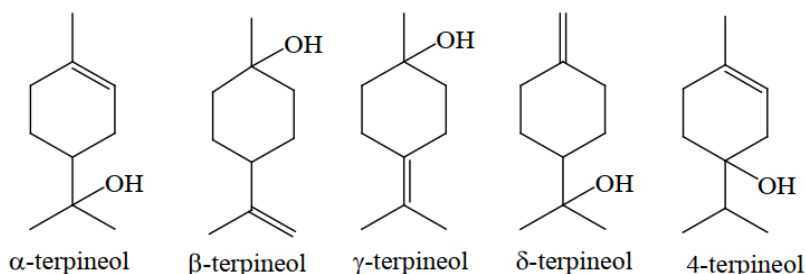
Trong quá trình vận hành chung cất phân tử, các yếu tố cần được khảo sát sự ảnh hưởng đến hệ thống chung cất rất đa dạng, gồm có: Các yếu tố liên quan đến nguyên liệu như nhiệt độ nhập liệu, thành phần, độ nhớt; Các yếu tố liên quan đến thiết bị chung cất như kiểu và thiết kế của quá trình bay hơi, diện tích bề mặt gia nhiệt và khoảng cách giữa bề mặt hóa hơi và bề mặt ngưng tụ; Các yếu tố liên quan đến điều kiện vận hành như lưu lượng nguyên liệu đầu vào, nhiệt độ bề mặt hóa hơi bay hơi, nhiệt độ bề mặt ngưng tụ, áp suất vận hành và tốc độ con lăn hoặc roto. Những điều kiện này ảnh hưởng đến tỷ lệ của sản phẩm chung cất (phần nặng và phần nhẹ), thành phần của phần nhẹ, và thành phần của phần nặng (*Ito et al., 2006*).

Việc tối ưu hóa các thông số vận hành của quá trình chung cất phân tử phụ thuộc rất nhiều vào bản chất hóa học của nguyên liệu và mục đích của quá trình chung cất. Có nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình, sự cân bằng giữa chi phí hoạt động, độ tinh khiết của hợp chất và sản lượng phải được tìm kiếm cẩn thận thông qua tối ưu hóa quy trình và các thử nghiệm xác định điều kiện tối ưu để tách và thu hồi các phân tử mục tiêu (*Lin et al., 2009; Stichlmair et al., 2021*).

### **1.3. HOẠT CHẤT $\alpha$ -TERPINEOL**

$\alpha$ -Terpineol là một hợp chất rượu monoterpenoid đơn vòng không bão hòa bậc ba có mặt trong các loài thực vật. Cấu trúc của hợp chất này được định danh vào những năm 1880 bởi Tiemann, Wagner, Semmler và Wallach và vài năm sau các phản ứng tổng hợp của hợp chất này lần đầu được mô tả (*Sell et al., 2006*). 5 đồng phân thuộc họ Terpeneols phổ biến trong các nguyên liệu thiên nhiên bao gồm  $\alpha$ -,  $\beta$ -,

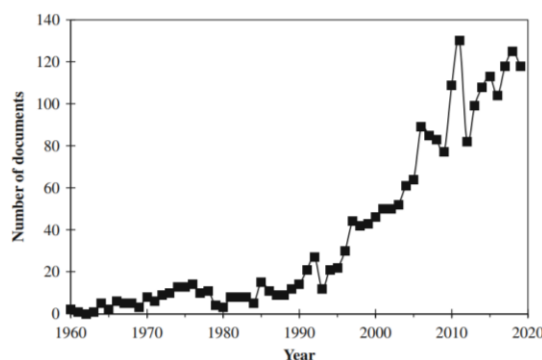
$\gamma$ -,  $\delta$ - và Terpeneol-4-ol được trình bày trong hình 1.4. Trong đó Terpeneol-4-ol và  $\alpha$ -Terpeneol phổ biến nhất và được tìm thấy trong các nguồn nguyên liệu tự nhiên (Surburg et al., 2016) và có thể thu hợp chất bằng phương pháp chưng cất phân đoạn hơn 150 loại tinh dầu (Burdock, 2010). Ngược lại, đồng phân  $\beta$ -,  $\gamma$ - và  $\delta$ -Terpeneol không được tìm thấy rộng rãi trong tự nhiên.



**Hình 1.4. Các đồng phân thuộc họ Terpineols**

Trong tự nhiên,  $\alpha$ -Terpeneol được tìm thấy trong hơn 100 loài thực vật (hoa, thảo mộc, lá, quả, tinh dầu và các loại khác). Terpinyl acetate, một dạng ester của chất này cũng được tìm thấy trong các loại tinh dầu thực vật khác nhau như cây bách (*Cupressus sempervirens*), bạch đậu khấu (*Elettaria cardamomum*), tinh dầu trà (*Melaleuca alternifolia*), tinh dầu thông (*Pinus sylvestris*), ...

Từ lâu,  $\alpha$ -Terpeneol đã được ứng dụng vào các ngành công nghiệp mùi hương trong thực phẩm và được ứng dụng vào dòng sản phẩm nước hoa trên thị trường (Khaleel et al., 2018), nhưng những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu báo cáo các đặc tính sinh học có thể kể đến như đặc tính chống oxy hóa (Brand et al., 2001), chống viêm (Oliveira et al., 2012), chống co giật (Sousa, Damião P. de et al., 2009), chống ung thư (điển hình là tế bào NF- $\kappa$ B) (Hassan et al., 2010) và đặc biệt là kháng khuẩn (Li, L. et al., 2014). Với những đặc tính sinh học đã nêu, các phương pháp tổng hợp sinh học mới để sản xuất  $\alpha$ -Terpeneol với sản lượng hàng trăm gam mỗi lít (bao gồm cả sản phẩm đồng phân đối quang) đã dẫn đến tiềm năng mới cho các định hướng nghiên cứu và phát triển trong quy mô phòng thí nghiệm và thực nghiệm (Bicas et al., 2008; Molina et al., 2019). Nhờ đó, số lượng tài liệu được tìm kiếm bởi từ khóa “alpha-terpeneol” trong Scopus không ngừng tăng lên trong 40 năm trở lại đây, đặc biệt là trong 20 năm trở lại đây, kết quả được trình bày bởi hình 1.6.



**Hình 1.5. Số lượng tài liệu được tìm kiếm dưới từ khóa “alpha-terpineol” trên Scopus từ giữa năm 1960 đến 2019**

**Bảng 1.1. Tính chất vật lý và hóa học của hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol (Api et al., 2017; Bhatia et al., 2008; Efsa Panel on Food Contact Materials et al., 2010; Li, J. et al., 1998)**

<b>Tên gọi</b>							
$\alpha$ -Terpineol	3-Cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-; 1- <i>p</i> -menthen-8-ol; <i>p</i> -menth-1-en-8-ol; 2-(4-Methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol; 1-Methyl-4-isopropyl-1-cyclohexen-8-ol; $\alpha$ -Terpilenol; Terpeneol schlechthin						
<b>Thông tin định danh</b>							
	Số CAS	Số EINECS	Số CoE	Số FEMA	Số FL	Số JECFA	
$\alpha$ -Terpineol	98-55-5	202-680-6	62	3045	02.014	366	
<b>Tính chất</b>							
Công thức	Khối lượng phân tử			Tỉ trọng	0,93	XLogP3-	
$C_{10}H_{18}O$	từ 154.25 g/mol						AA 1.8
	Điểm nóng chảy	Điểm cháy	Điểm sôi	Độ hòa tan trong nước (25°C)	Log P (o/w)	Góc quay cực	Chỉ số khúc xạ
$\alpha$ -Terpineol	35–41°C	88,33°C	217–219°C	710 mg/L	2,67	–103° đến +111.6°	1.474–1.486 tại 20°C

**CẢM QUAN:** Chất lỏng không màu và nhớt.

## 1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC VÀ NGOÀI NƯỚC

### 1.4.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

Từ năm 2008 đến năm 2012, Giáo sư Tiến sĩ Lê Đình Khả đã tiến hành khảo nghiệm trên các giống trà Năm gân nhằm mục đích thu nhận các giống cây trội, kết quả cho thấy các giống Q15 (West Malam PNG), Q16 (Balimo – Wasua Road PNG) và Q23 (Casino NSW) là có giá trị kinh tế. Sau đó đến năm 2013 đến 2016, Giáo sư đã

nhân giống vô tính các giống này ở Thạnh Hóa (Long An), Phú Lộc (Thừa Thiên – Huế) và Ba Vì (Hà Nội). Báo cáo về tinh dầu của loài này được Giáo sư công bố vào năm 2017 (*Lê Đình Khả et al., 2017*) cho thấy lượng tinh dầu được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đạt từ 1,53 đến 2,61%. Về mặt thành phần được đánh giá bởi phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC–MS) cho thấy tỉ lệ 1,8–Cineole cao hơn 60%, tỉ lệ Limonene dưới 5% thuộc về giống Q23.127 (tại 3 nơi), Q23.21, Q23.315, Q15.38 (tại 2 nơi) và Q16.427 tại Ba Vì. Trong khi đó, các dòng trà Gió của Việt Nam cùng thời gian trồng đều sinh trưởng chậm, hàm lượng tinh dầu chỉ đạt khoảng 0,63%, tỉ lệ 1,8–Cineole đạt khoảng 29,82%. Đồng thời kết luận được trà Năm gân có hàm lượng tinh dầu trong lá khá cao, chỉ sau trà Trà với sản lượng tinh dầu thu được từ 1,3–2,4% về mặt khối lượng, hàm lượng 1,8–Cineol đạt 0,2–65% và hơn nữa.

Dựa trên các dữ liệu nghiên cứu trước đây tại Việt Nam cho thấy:

– Thứ nhất, chưa có nghiên cứu nào sử dụng phương pháp chưng cất phân tử ứng dụng vào phân đoạn tinh chế các hoạt chất từ nguồn nguyên liệu tinh dầu.

– Thứ hai, các phân đoạn tinh dầu sau khi kết thúc quá trình tinh chế chỉ thu nhận các phân đoạn nhẹ (thu tại đỉnh) có giá trị và loại bỏ các phân đoạn nặng (thu tại đáy). Trong khi các phân đoạn nặng vẫn có thể được xử lý nâng cao hàm lượng và tinh chế các hoạt chất có hoạt tính sinh học có giá trị còn sót lại.

#### **1.4.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước**

Một số loại tinh dầu được thu nhận bằng các phương pháp truyền thống như chưng cất hơi nước, chưng cất hỗ trợ vi sóng, chiết xuất dung môi hay ép lạnh thường có màu sẫm và chứa nhiều màu sắc của sắc tố diệp lục, sáp, Pectine và Lipid. Do đó, các công đoạn xử lý phân đoạn tinh dầu thô là công việc rất quan trọng trước khi ứng dụng các loại tinh dầu này vào lĩnh vực sản xuất công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Một số nghiên cứu đã sử dụng phương pháp chưng cất phân tử để tinh chế các loại tinh dầu đã được báo cáo:

Năm 2009, Zuo–Gang cùng các cộng sự đã sử dụng kỹ thuật chưng cất phân tử để phân tách các hợp chất acid và nước khỏi dầu sinh học. Máy được vận hành dưới một số thông số quá trình như nhiệt độ 50 °C, áp suất 60 Pa, lưu lượng 1 mL/phút. Sử dụng phương pháp phân tích thành phần GC–MS cho thấy có một phân đoạn giàu hợp

chất acid, và các phân đoạn khác có liên quan đến dầu sinh học tinh chế (với nồng độ các carboxylic acid thấp khoảng 0,96–2,2%) (Guo *et al.*, 2009).

Tovar và cộng sự vào năm 2011 đã tiến hành nghiên cứu nâng cao hàm lượng Citral có mặt trong tinh dầu sả chanh bằng phương pháp chưng cất phân tử quy mô phòng thí nghiệm. Các giá trị được khảo sát trong nghiên cứu bao gồm nhiệt độ bề mặt hóa hơi từ 60 đến 120 °C, tốc độ nhập liệu hệ thống từ 1,5 đến 4,5 mL.min<sup>-1</sup> đồng thời cố định tốc độ roto 1450 vòng/phút, áp suất 5 Pa. Kết quả cho thấy hàm lượng Citral của sản phẩm chưng cất tăng gấp 2,1 lần đơn vị mg<sub>citral</sub>.mL<sup>-1</sup> so với tinh dầu thô. Tỷ trọng, độ nhớt và giá trị acid béo tự do (cụ thể là Oleic acid) lần lượt là 0,901 g.cm<sup>-3</sup>, 2,069 mPa.s<sup>-1</sup> và 1,26%, đáp ứng tiêu chí chất lượng dầu và tránh được hiện tượng biến tính thành phần do nhiệt độ (Tovar *et al.*, 2011).

Trong một nghiên cứu khác (Xiong *et al.*, 2013) đã sử dụng phương pháp này để loại bỏ khoảng 99% ba loại Phthalate có khả năng gây ung thư có mặt trong tinh dầu cam ngọt cụ thể là Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) giảm 99,62%, Dibutyl phthalate (DBP) giảm 99,51% và Diisobutyl phthalate (DIBP) giảm 99,37%.

Vào năm 2014, Olmedo đã tiến hành chưng cất phân tử hai lần với hai áp suất 73 mbar và 75 mbar, cố định nhiệt độ hóa hơi 25 °C và lưu lượng 1,18 mL/phút với mục đích làm giàu các hợp chất chống oxy hóa và khảo sát hàm lượng phenol có trong tinh dầu Kinh giới cay (*Origanum vulgare* L.) và các phân đoạn của tinh dầu này. Kết quả GC-MS cho thấy  $\gamma$ -Terpinene, Terpinen-4-ol, Carvacrol, và  $\alpha$ -Phellandrene, là các thành phần chính trong phân đoạn nặng ở hàm lượng 23,5%, 23,2% và 11% tương ứng. Trật tự sắp xếp giá trị ức chế gốc tự do DPPH cho thấy tinh dầu gốc có giá trị cao nhất ( $84,1 \pm 1,14$  mg/mL) sau đó đến các phân đoạn nặng và nhẹ. Mức cao nhất của phenol thuộc về phân đoạn nặng lần 2 ( $13,1 \pm 0,07$  mg/g) hơn các phân đoạn nhẹ (Olmedo *et al.*, 2014).

Li và cộng sự vào năm 2017 đã sử dụng kỹ thuật chưng cất phân tử để phân tách các thành phần hiện diện trong tinh dầu húng quế tây (*Ocimum basilicum* L.). Ở nhiệt độ bay hơi 40 °C, áp suất 80 Pa, tốc độ nhập liệu 2 mL/phút, tốc độ trục quay màng là 200 vòng/phút, một phần nhẹ chứa chủ yếu là sesquiterpenes ( $\alpha$ -Cadinol 16,2% và  $\alpha$ -Bergamoten 11,9%) được thu hồi và cho thấy đặc tính chống viêm trên tế bào Raw 264.7. Đồng thời quá trình này thu được các phân đoạn cất có khả năng kháng oxy hóa DPPH ( $IC_{50} = 1,092 \pm 0,066$  mg/mL) và ABTS ( $IC_{50} = 0,707 \pm 0,042$  mg/mL). Trong

khi đó, phân đoạn nhẹ đã thể hiện rõ rệt sự ức chế việc sản sinh cytokine (TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6) và biểu hiện gen của chúng bên trong tế bào Raw 264.7 do LPS gây ra và ức chế tín hiệu NO, iNOS trong thí nghiệm in vitro khi so sánh với tinh dầu thô. Phân tích định tính và định lượng dưới kỹ thuật GC-MS cho thấy, phần nặng chứa Estragole (17%), Methyleugenol (11,3%) và Acid Linoleic (11,4%) (Li, H. et al., 2017).

Tinh dầu hương thảo (*Rosmarinus officinalis* L.) đã được tiến hành khảo sát các điều kiện áp suất thấp tương ứng với từng phân đoạn bởi máy chưng cất màng rơi DCC4. Các kết quả định tính và định lượng thành phần bằng phương pháp GC-MS-FID cho thấy hàm lượng các nhóm chất thành phần như oxygenated monoterpenes (56,53% lên 61,28%), sesquiterpene hydrocarbon (2,60% lên 10,82%), oxygenated sesquiterpenes (0,95% lên 3,68%) và diterpene hydrocarbons (1,72% lên 7,00%). Đồng thời giá trị IC<sub>50</sub> của phân đoạn chưng thứ ba giàu hàm lượng 1,8-Cineole, Camphor và  $\alpha$ -Pinene là cao nhất với  $29,17 \pm 0,22 \mu\text{L.mL}^{-1}$  (Mezza et al., 2018).

Các phân đoạn tinh dầu hoa hồng *Rosa damascene*, *Rosa centifolia*, *Rosa pomponia* và *Rosa chinensis* Jacq “Crimson Glory” H. T. đã được Yi và các cộng sự khảo sát sự khác biệt về thành phần dưới tác động của chưng cất phân tử tại điều kiện áp suất 50 Pa, nhiệt độ hóa hơi bề mặt 70 °C. Kết quả thu được hiệu suất quá trình chưng cất phân đoạn chưng của các loại tinh dầu RDEO, RCEO, RPEO và CGEO lần lượt là 61,6%, 66,9%, 65,7% và 19,8%, đồng thời tại phân đoạn cất là 32,6%, 26,3%, 28,7% và 76,5%. Các phân đoạn có giá trị IC<sub>50</sub> dao động từ 0,735 đến 0,948 và 0,0653 đến 0,0707 mg/mL đối với các gốc tự do DPPH, ABTS tương ứng. Kích thước của vòng kháng khuẩn trên 4 loài vi khuẩn *S. aureus*, *B. subtilis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* trong khoảng 6,93–32 mm và nồng độ ức chế tối thiểu (MICs) từ 0,625 đến 1,25 mg/mL đối với vi khuẩn và 6,25 đến 12,5 mg/mL đối với các chủng nấm *A. niger*, *R. nigricans*, *B. pringsheimii* (Yi et al., 2019).

Quá trình phân đoạn tinh dầu Quảng Hoắc hương (*Pogostemon cablin* Benth) đã được Dantas và các cộng sự tối ưu hóa điều kiện vận hành trên thiết bị chưng cất phân tử vào năm 2020 để thu được các phân đoạn có hàm lượng Patchoulol cao. Điều kiện vận hành tối ưu là nhiệt độ bề mặt hóa hơi 85 °C, áp suất 0,1 mbar, tốc độ khuấy 600 vòng/phút. Bằng phương pháp đánh giá GC-MS cho thấy, hàm lượng Patchoulol có mặt trong tinh dầu gốc từ 13,75% được nâng cao đến 66,08% tại phân đoạn tối ưu, đồng thời độ thu hồi của toàn bộ quá trình lên đến 74,22% (Dantas et al., 2020).

(Deng et al., 2020) đã thực hiện quá trình loại bỏ tạp chất khỏi tinh dầu bưởi ép lạnh bằng phương pháp chưng cất phân tử điều kiện nhiệt độ hóa hơi bề mặt 55 °C và áp suất 6,0 Torr. Kết quả GC-MS cho thấy sản phẩm thu được tại phân đoạn nhẹ có chứa 24 hợp chất chiếm 99,74% tổng hàm lượng tinh dầu, trong đó đặc trưng là hàm lượng Limonene (93,33%),  $\beta$ -Myrcene (2,1%) và  $\alpha$ -Pinene (0,76%).

Phương pháp chưng cất phân tử thu tinh dầu cây ngải diệp (*Artemisia argyi* Level. et Vant) được so sánh với chưng cất hơi nước với nguyên liệu là cao chiết bởi Zhong và các cộng sự vào năm 2021. Các thí nghiệm cho thấy điều kiện vận hành thiết bị chưng cất phân tử ở nhiệt độ 100 °C, áp suất 20 Pa thu được hàm lượng Eucalyptol (16,11%) cao hơn chưng cất hơi nước (10,88%) đồng thời xác định hàm lượng thành phần bằng GC-MS (Zhong et al., 2021).

Tinh dầu thô được chuẩn bị bằng phương pháp ép lạnh của bốn loại trái cây thuộc họ Citrus bao gồm cam ngọt (*C. sinensis* L.), bưởi (*C. paradisi* Mac.), quýt (*C. deliciosa* Ten.), chanh (*C. limon* [L.] Burm.) được tinh sạch bằng công nghệ chưng cất phân tử tại áp suất  $6 \times 10^{-3}$  mbar và nhiệt độ 65 °C bởi Yang và các cộng sự vào năm 2021. Kết quả phân tích thành phần các phân đoạn được đo bằng GC-MS-FID cho thấy tại phân đoạn chưng tồn tại nhiều các hợp chất dễ bay hơi như D-Limonene,  $\beta$ -Myrcene, (+)- $\alpha$ -Pinene, và  $\gamma$ -Terpinene, phân đoạn cất tồn tại nhiều các hợp chất như Decanal, Geraniol, Hedycaryol,  $\alpha$ -Citral, ... (Yang et al., 2021).

Nguyên liệu cao chiết CO<sub>2</sub> siêu tới hạn của cây *Lavandula angustifolia* đã được khảo sát trên thiết bị chưng cất phân tử tại các chế độ vận hành. Kết quả cho thấy tỉ lệ hồi lưu tại phân đoạn chưng cùng chiều hướng với nhiệt độ quá trình chưng cất tại áp suất 1 Pa (Dębczak et al., 2022).

Jacobo vào năm 2022 đã tiến hành chưng cất phân tử trên nguyên liệu tinh dầu *Laurus nobilis* L. tại điều kiện áp suất 200 mbar, nhiệt độ hóa hơi 26 °C. Kết quả cho thấy hàm lượng 1,8-Cineole tại phân đoạn chưng tăng 10,06% so với tinh dầu ban đầu (Jacobo et al., 2022).

García-Fajardo cùng nhóm nghiên cứu đã so sánh hiệu suất phân tách giữa chưng cất phân tử và chưng cất phân đoạn hơi nước trên tinh dầu cam ngọt chứa hàm lượng D-Limonene cao, đây là hợp chất nhạy với nhiệt độ, tác nhân ánh sáng và nước. Phương pháp GC-MS dùng để đánh giá hàm lượng các chất có trong phân đoạn của D-Limonene. Bằng chưng cất phân tử, kết quả thể hiện hàm lượng tại phân đoạn

chung chiếm 86,779% và phân đoạn cát hàm lượng đạt 47,964% (*García-Fajardo et al., 2023*).

## Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN LIỆU

Cận tinh dầu trầm Năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) được cung cấp từ Hợp tác xã Dược liệu Trường Sơn, huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị.



Hình 2.1. Cận tinh dầu trầm Năm gân (*Melaleuca quinquenervia*)

### 2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ


#### 2.2.1. Hóa chất

Bảng 2.1. Hóa chất sử dụng

Tên hóa chất	Công thức phân tử	Xuất xứ
Ascorbic acid 99%	$C_6H_8O_6$	Đức
Ethanol 96%	$C_2H_5OH$	Trung Quốc
Gốc tự do ABTS <sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	Đức
Gốc tự do DPPH <sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Đức
Methanol $\geq 99,9\%$	$CH_3OH$	Đức
Nước cất 2 lần	$H_2O$	Việt Nam
Potassium persulfate	$K_2S_2O_8$	Đức
Sulfuric acid	$H_2SO_4$	Đức
Trolox 97%	$C_{14}H_{18}O_4$	Đức
$\alpha$ -Terpineol $> 90\%$	$C_{10}H_{18}O$	Mỹ

### 2.2.2. Dụng cụ và thiết bị

**Bảng 2.2. Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm**

Tên dụng cụ, thiết bị	Xuất xứ	Hình ảnh minh họa
Becher 50–100–250 mL	Trung Quốc	
Bình định mức	Đức	
Bình đo tỷ trọng	Trung Quốc	
Cân phân tích 4 số Ohaus – PX224E	Trung Quốc	
Cuvet thủy tinh	Trung Quốc	
Hệ thống Thiết bị chưng cất phân đoạn con đường ngắn (AYAN–F60)	Trung Quốc	

---

Máy đo độ nhớt DV2T  
cảm ứng màn hình

Mỹ



Máy đo quang phổ UV-  
VIS Shimadzu UV-1800

Nhật Bản



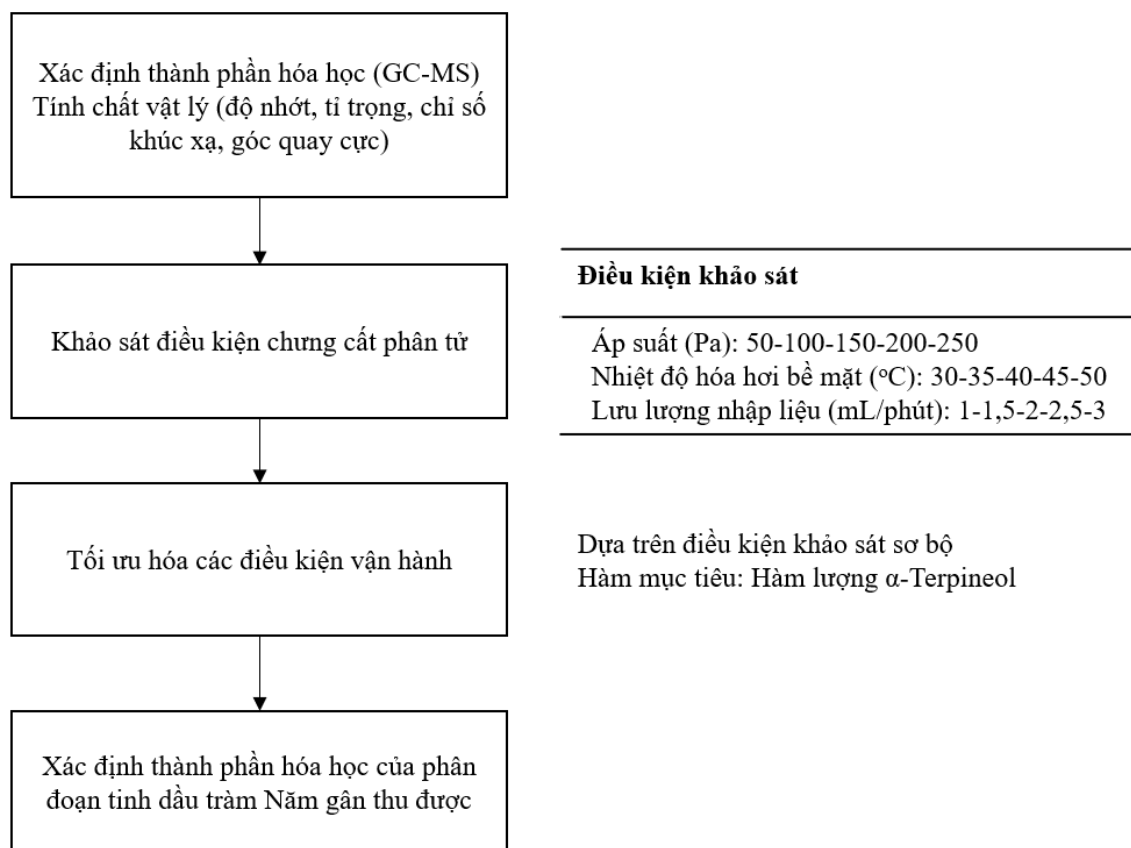
Tủ Sấy Memmert UN110  
– Dung tích 108 Lít

Đức



## 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu phân đoạn tinh dầu

### 2.3.2. Quy trình thí nghiệm

Quá trình chưng cất phân tử được thực hiện dưới quy mô phòng thí nghiệm bằng hệ thống thiết bị chưng cất phân tử AYAN-F60 (Trung Quốc). Đầu tiên, 100 gram nguyên liệu tinh dầu thô được cung cấp cho bình nhập liệu của hệ thống chưng cất phân tử. Lắp các bình cầu và kiểm tra đầu nối của bơm chân không với hệ thống, đảm bảo hệ hoàn toàn kín khi vận hành thiết bị chưng cất. Bật hệ thống bơm chân không, cố định các thông số như nhiệt độ bề mặt ngưng tụ 2 °C, tốc độ khuấy 235 vòng/phút, đồng thời khảo sát các thông số gồm áp suất (Pa), nhiệt độ bề mặt hóa hơi (°C), lưu lượng dòng nhập liệu (mL/phút). Kết thúc quá trình chưng cất, tháo các bình cầu, rửa sạch và sấy khô. Các phân đoạn chưng và cất tại các lần thí nghiệm được mang đi cân khối lượng, lưu mẫu tinh dầu vào vial 1,5 mL để phân tích thành phần bằng kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) cho phân đoạn nhẹ với mục tiêu là hàm lượng của hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol. Sau đó tiến hành tối ưu hóa các thông số vận hành hệ thống bởi phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Cuối cùng, đánh giá khả năng chống gốc tự do

DPPH• và ABTS•+ của phân đoạn mẫu tối ưu so với tinh dầu gốc và đối chứng  $\alpha$ -Terpineol > 90%.

### **2.3.3. Bố trí thí nghiệm**

#### **2.3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của áp suất**

Tiến hành khảo sát áp suất trên hệ thống chưng cất phân tử với các áp suất lần lượt là 50–100–150–200–250 Pa.

Cố định các thông số hệ thống như:

- Nhiệt độ bề mặt hóa hơi: 30 °C;
- Nhiệt độ ngưng tụ: 2 °C;
- Lưu lượng: 2 mL/phút;
- Tốc độ khuấy: 235 vòng/phút.

Chọn kết quả áp suất có hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất để tiến hành khảo sát tiếp theo.

#### **2.3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ bề mặt hóa hơi**

Tiến hành khảo sát nhiệt độ bề mặt hóa hơi trên hệ thống chưng cất phân tử với các nhiệt độ lần lượt là 30–35–40–45–50 °C.

Cố định các thông số hệ thống như:

- Áp suất được lấy từ kết quả khảo sát của mục 2.3.2.1;
- Nhiệt độ bề mặt ngưng tụ: 2 °C;
- Lưu lượng: 2 mL/phút;
- Tốc độ khuấy: 235 vòng/phút.

Chọn kết quả nhiệt độ bề mặt hóa hơi có hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất để tiến hành khảo sát tiếp theo.

#### **2.3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của lưu lượng**

Tiến hành khảo sát lưu lượng trên hệ thống chưng cất phân tử với các mức lần lượt là 1–1,5–2–2,5–3 mL/phút.

Cố định các thông số hệ thống như:

- Áp suất phân đoạn được lấy từ kết quả của mục 2.3.2.1;
- Nhiệt độ bề mặt hóa hơi được lấy từ kết quả của mục 2.3.2.2;
- Nhiệt độ bề mặt ngưng tụ: 2 °C;
- Tốc độ khuấy: 235 vòng/phút.

Chọn kết quả lưu lượng có hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất để tiến hành tổng hợp phân tích số liệu.

#### **2.3.4. Tối ưu hóa thông số vận hành chưng cất phân tử bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)**

So với việc sử dụng phương pháp khảo sát luân phiên từng biến, phương pháp tối ưu hóa bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) cho phép đánh giá trực quan mức độ tương tác giữa các yếu tố khảo sát với một hoặc nhiều hàm mục tiêu. Sử dụng phần mềm Design Expert phiên bản 13.0 (Stat-Ease Inc., Minnesota, USA) để tiến hành tối ưu hóa các thông số chưng cất (áp suất, nhiệt độ bề mặt hóa hơi, lưu lượng) nhằm thu được hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn hơn 70%. Các thí nghiệm thực nghiệm được thiết kế bởi thiết kế phức hợp trung tâm (Central Composite Design – CCD) với 3 yếu tố và 3 mức khảo sát tương ứng. Các yếu tố này được xem là các biến độc lập:  $X_1$  – Áp suất (Pa);  $X_2$  – Nhiệt độ bề mặt hóa hơi ( $^{\circ}\text{C}$ );  $X_3$  – Lưu lượng (mL/phút). Các mức độ khảo sát của mỗi biến được xác định từ kết quả của các thí nghiệm sơ bộ. Mô hình thiết kế cấu trúc trung tâm thiết lập 17 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm lặp lại tại điểm trung tâm. Dữ liệu thực nghiệm phù hợp và được đưa vào mô hình đa thức bậc hai, biểu thị theo hàm mục tiêu là biến đáp ứng  $Y$  – Hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol (%) dưới dạng hàm số của các biến độc lập được biểu diễn như sau:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{33} X_3^2 \quad (2)$$

Trong đó:

$Y$  là Hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol;

$\alpha_0$ : là hằng số

$X_1, X_2, X_3$ : các mức độ của biến độc lập

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_{23}, \alpha_{11}, \alpha_{22}, \alpha_{33}$ : các hệ số tuyến tính, hệ số tương tác và hệ số bậc hai được xác định bởi phần mềm Design Expert

Thiết kế thí nghiệm thực nghiệm và phân tích dữ liệu được thực hiện bởi phân tích phương sai (ANOVA) tại  $p < 0,05$ , khi đó biểu đồ không gian 3 chiều và biểu đồ bề mặt được tạo lập bởi mode software.

Mô hình có ý nghĩa về mặt thống kê khi: Giá trị  $p$  của mô hình nhỏ hơn 0,05 ở độ tin cậy 95%; Mức độ phù hợp (AP) được sử dụng để thiết lập cho thiết kế không gian

ba chiều phải lớn hơn 4,0; Giá trị phản ánh độ rời rạc của các dữ liệu (LOF) cao hơn 0,05; Hệ số tương quan  $R^2$  từ 0,75 trở lên (Long Giang et al., 2017).

**Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa bề mặt bởi thiết kế phức có tâm – CCD**

Nghiệm thức	Yếu tố khảo sát			Nghiệm thức	Yếu tố khảo sát		
	X <sub>1</sub> : Áp suất (Pa)	X <sub>2</sub> : Nhiệt độ hóa hơi (°C)	X <sub>3</sub> : Lưu lượng (mL/phút)		X <sub>1</sub> : Áp suất (Pa)	X <sub>2</sub> : Nhiệt độ hóa hơi (°C)	X <sub>3</sub> : Lưu lượng (mL/phút)
1	150	30	1	10	284	35	1,5
2	250	30	1	11	200	26,59	1,5
3	150	40	1	12	200	43,40	1,5
4	250	40	1	13	200	35	0,66
5	150	30	2	14	200	35	2,34
6	250	30	2	15	200	35	1,5
7	150	40	2	16	200	35	1,5
8	250	40	2	17	200	35	1,5
9	116	35	1,5				

## 2.4. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ

### 2.4.1. Đánh giá tính chất vật lý của các phân đoạn tinh dầu

**Bảng 2.4. Chỉ tiêu vật lý**

Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn đánh giá
Độ nhớt	Máy đo độ nhớt DV2T
Tỷ trọng của tinh dầu	TCVN 8444–2010
Chỉ số khúc xạ	TCVN 8445–2010
Góc quay cực	TCVN 8446–2010
Tính chất cảm quan	TCVN 8460–2010

### 2.4.2. Xác định thành phần hóa học của các phân đoạn tinh dầu trầm Năm gân bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC–MS)

Tinh dầu thô và các phân đoạn sản phẩm được tiến hành phân tích thành phần bằng kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ (GC–MS). Hệ thống phân tích sắc ký ghép khối phổ của công ty Thermo Fisher Scientific, Waltham, Hoa Kỳ được sử dụng để phân tích các thành phần có trong các phân đoạn tinh dầu trầm Năm gân là máy sắc ký khí Thermo Scientific™ TRACE™ 1300GC kết hợp với khối phổ TSQ™ 9000. Các chất phân tích được tách trong cột mao quản Silica nung chảy không phân cực TG–

5ms được phủ bằng Methyl Silicone (30 m x 0,25 mm i.d.), độ dày màng 0,25  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) từ Agilent. Quá trình quét khối phổ (MS) (1 lần quét  $\text{s}^{-1}$ ) được thực hiện trong phạm vi khối lượng 50–550 amu với sự ion hóa tác động điện tử ở 70 eV. Heli được sử dụng làm khí mang ở tốc độ dòng 1,2  $\text{mL}\cdot\text{phút}^{-1}$  theo tỷ lệ phân chia dòng 1:100 (0,2  $\mu\text{L}$ ). Nhiệt độ injector 250  $^{\circ}\text{C}$ . Nhiệt độ lò cột được lập trình như sau:

- Gia nhiệt từ 60  $^{\circ}\text{C}$  lên 240  $^{\circ}\text{C}$  với tốc độ 3,0  $^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ ,
- Gia nhiệt từ 240  $^{\circ}\text{C}$  đến 270  $^{\circ}\text{C}$  với tốc độ 5,0  $^{\circ}\text{C}/\text{phút}$  và giữ trong 2 phút.

Hầu hết các hợp chất có trong cặn tinh dầu tràm Năm gân được xác định bằng kết quả khối phổ của chúng (thông qua bộ sưu tập thư viện NIST 2.2) và so sánh với thư viện phổ Adams như một nguồn tham khảo. Các diện tích pic riêng lẻ được ghi lại và phần trăm diện tích peak tương đối được tính toán để định lượng các thành phần tinh dầu. Các phân tích sắc ký được thực hiện trong ba lần.

#### 2.4.3. Độ thu hồi hoạt chất $\alpha$ -Terpineol tại phân đoạn nhẹ

Độ thu hồi của hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol tại phân đoạn nhẹ được xác định bởi thành phần phần trăm hợp chất giữa phân đoạn nhẹ và nguyên liệu tinh dầu thô. Giá trị này được trình bày theo công thức của (Dantas *et al.*, 2020):

$$\% \text{Độ thu hồi}_{\alpha\text{-Terpineol}} = \frac{\%_{\alpha\text{-Terpineol}} \times m_{\text{phân đoạn}}}{\%_{\alpha\text{-Terpineol}} \times m_{\text{nguyên liệu}}} \times 100 \quad (3)$$

#### 2.4.4. Đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH $\bullet$

Phương pháp đánh giá hoạt tính khử gốc tự do DPPH $\bullet$  lần đầu tiên được thuyết minh bởi (Blois, 1958) với một số sửa đổi của (Marinova *et al.*, 2011).

Dung dịch DPPH gốc được chuẩn bị bằng cách dùng 0,024 gram DPPH định mức 100 mL bằng dung môi Methanol, bảo quản môi trường kín trong 24 giờ và nhiệt độ 4  $^{\circ}\text{C}$ . Dung dịch DPPH gốc được mang đi hiệu chỉnh với dung môi Methanol bằng máy đo quang phổ UV-VIS dưới bước sóng cực đại 515 nm đến khi đạt độ hấp thụ  $1,10 \pm 0,02$  Abs của máy.

Để xác định hoạt tính khử gốc tự do DPPH $\bullet$  của tinh dầu, 2,85 mL thuốc thử DPPH đã hiệu chỉnh được bổ sung vào 0,15 mL dung dịch tinh dầu đã pha loãng 100 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ 30 phút dưới điều kiện thiếu sáng và đo quang phổ hấp thụ UV-VIS đo ở bước sóng cực đại 515 nm. Mẫu blank dùng để đối chứng bao gồm 2,85 mL thuốc thử DPPH và 0,15 Methanol. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH $\bullet$  được tính

dựa vào đường chuẩn Ascorbic acid và được trình bày dưới đơn vị milligram đương lượng Ascorbic acid trên 1 milligram tinh dầu (mg AAE/mg EO).

$$\text{Hoạt tính chống gốc tự do DPPH} = \frac{(\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}) \times 100 - b}{a} \times df \quad (4)$$

#### 2.4.5.Đánh giá hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup>

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> được mô tả lần đầu bởi (Re et al., 1999) với một vài sự hiệu chỉnh đến từ (Zheng et al., 2016).

Dung dịch ABTS gốc được chuẩn bị bằng cách dùng nước cất định mức đến 25 mL lần lượt 0,1015 gram ABTS và 0,0176 gram K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Kế tiếp, trộn cả hai dung dịch này với nhau và bảo quản trong điều kiện tối, kín trong 16 giờ và nhiệt độ 4 °C. Dung dịch DPPH gốc được mang đi hiệu chỉnh với dung môi Methanol bằng máy đo quang phổ UV-VIS dưới bước sóng cực đại 734 nm đến khi đạt độ hấp thụ 1,10 ± 0,02 Abs của máy.

Để xác định hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup>, 2,85 mL thuốc thử ABTS được bổ sung vào 0,15 mL dung dịch mẫu tinh dầu đã pha loãng 250 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ 30 phút dưới điều kiện thiếu sáng và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 734 nm bằng máy đo quang phổ UV–VIS. Mẫu blank dùng để đối chứng bao gồm 2,85 mL thuốc thử ABTS và 0,15 mL dung môi Methanol. Hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> được tính toán dựa vào đường chuẩn Trolox và được trình bày dưới đơn vị milligram đương lượng Trolox trên 1 milligram tinh dầu (mg TE/mg EO).

$$\text{Hoạt tính chống gốc tự do ABTS} = \frac{(\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}) \times 100 - b}{a} \times df \quad (5)$$

#### 2.4.6. Phân tích thống kê số liệu

Dữ liệu khảo sát thực nghiệm và các chỉ số phân tích hóa lý của các mẫu tinh dầu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2021 MSO (phiên bản 2308 Build 16.0.16731.20052 và IBM SPSS Statistics 27.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Mỹ) sử dụng các kỹ thuật thống kê cơ bản. Mối tương quan Pearson và phân tích phương sai một chiều (One–way ANOVA) đã được dùng để xác định sự khác biệt giữa các mẫu và thử nghiệm. Phương pháp Tukey’s Multiple Range test đã được áp dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình ở mức 5%. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần.

## Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU NGUYÊN LIỆU

Bảng 3.1 dưới đây trình bày các kết quả tính chất hóa lý của tinh dầu nguyên liệu.

**Bảng 3.1. Tính chất vật lý của tinh dầu thô**

Chỉ tiêu	Kết quả
Cảm quan	Dạng lỏng trong suốt, màu xanh lục sẫm, mùi thơm nhẹ đặc trưng của trầm
Tỉ trọng (20 °C)	0,9250 ± 0,005 g/cm <sup>3</sup>
Chỉ số khúc xạ ( $n_D^{20}$ )	1,4684 ± 0,0037
Góc quay cực (20 °C)	-0°74 ± 0,5000
Độ nhớt (20 °C)	12,76 ± 0,60 cP

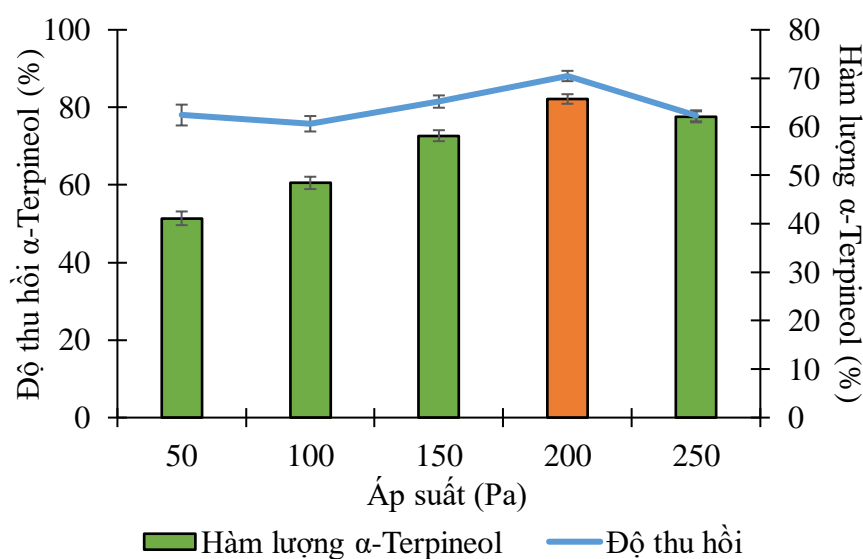
Kết quả thành phần tinh dầu cận trầm Năm gân được phân tích và xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) và được trình bày trong bảng 3.2.

**Bảng 3.2. Kết quả phân tích thành phần tinh dầu thô bởi GC-MS**

STT	Tên hợp chất	Phần trăm khối lượng	STT	Tên hợp chất	Phần trăm khối lượng
1	Eucalyptol	5,78	9	$\beta$ -Selinene	4,42
2	Linalool	5,75	10	$\alpha$ -Selinene	4,06
3	Terpinen-4-ol	3,24	11	$\sigma$ -Cadinene	2,95
4	$\alpha$ -Terpineol	<b>36,04</b>	12	Guaiyl acetate	7,24
5	Caryophyllene	8,11	13	$\tau$ -Gurjunene	4,12
6	Humulene	5,12	14	7-epi- $\beta$ -Eudesmol	4,38
7	$\alpha$ -Gurjenene	2,72	15	7-epi- $\alpha$ -Eudesmol	3,40
8	(-)- $\alpha$ -Amorphene	2,51		<b>Tổng</b>	<b>99,84</b>

## 3.2. KHẢO SÁT SƠ BỘ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ

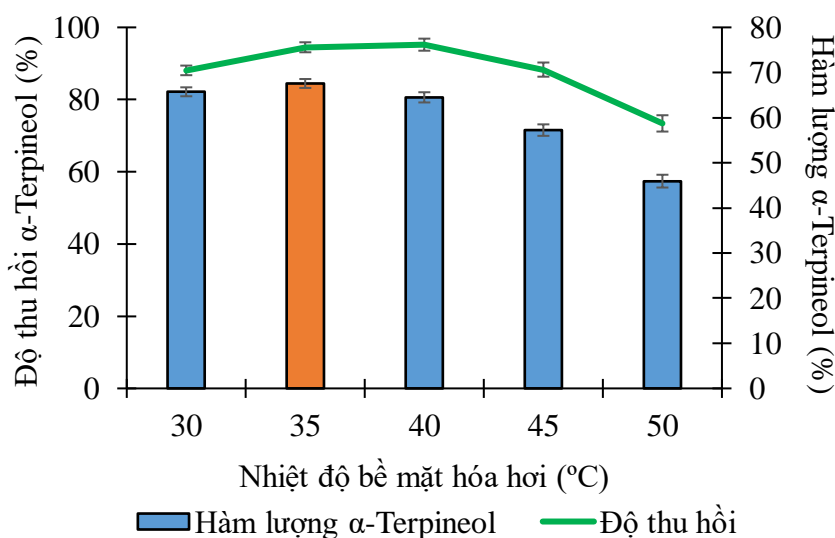
### 3.2.1. Ảnh hưởng của áp suất



**Hình 3.1. Ảnh hưởng của áp suất đến hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol**

Việc nâng cao hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol được tiến hành dưới áp suất chung cất từ 50 Pa đến 250 Pa, những sự thay đổi khác nhau đã diễn ra trong hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phân đoạn nhẹ được thể hiện trong Hình 3.1. Hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phần nhẹ tăng đều khi áp suất chung cất tăng mạnh từ 150 Pa lên 200 Pa, và sau đó giảm từ 250 Pa. Bởi vì đường đi trung bình tự do của phân tử  $\alpha$ -Terpineol giảm mạnh khi áp suất chung cất tăng, do đó, ngày càng có nhiều phân tử không thể đến được bề mặt ngưng tụ. Khi áp suất chung cất tăng lên 100–200 Pa, dần dần các cấu tử nặng hơn (Caryophyllene, Humulene, Guaiyl acetate,  $\delta$ -Cadinene) với trọng lượng phân tử lớn hơn so với  $\alpha$ -Terpineol không thể đến được bình ngưng. Vì vậy,  $\alpha$ -Terpineol bắt đầu trở thành thành phần chính trong phần nhẹ. Bên cạnh đó, khi áp suất chung cất tăng, hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phần nặng tăng liên tục và ngược lại đối với phần nhẹ. Khối lượng phân tử càng lớn thì sự số lượng cấu tử tại phần nhẹ giảm càng lớn. Do đó, hiệu suất thu hồi phần nhẹ giảm, và tỷ lệ phân tách giảm khi tăng áp suất chung cất. Trong điều kiện tăng áp, việc chấp nhận mất hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol không làm tăng độ tinh khiết của phân đoạn. Kết quả này tương tự với nghiên cứu chiết xuất Octacosanol từ sáp cám gạo của (Chen *et al.*, 2007). Để lựa chọn thông số hệ thống cho các khảo sát tiếp theo, cố định điều kiện áp suất 200 Pa (hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất ở 65,73%) là hoàn toàn phù hợp để vận hành thiết bị.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ bề mặt hóa hơi

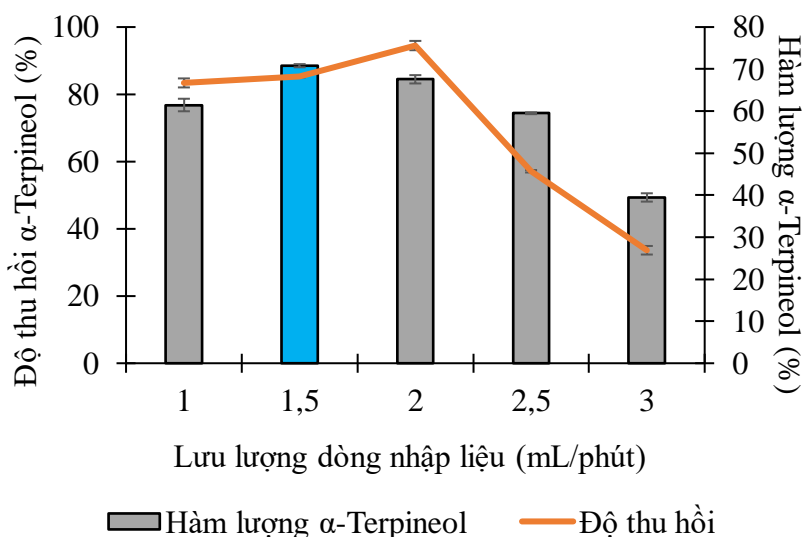


**Hình 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ bề mặt hóa hơi đến hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol**

Biểu đồ trình bày sự ảnh hưởng của nhiệt độ bề mặt hóa hơi trong khoảng 30 đến 50°C lên hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phân đoạn nhẹ được thể hiện trong hình 3.2. Với sự gia tăng nhiệt độ, hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol giảm và hàm lượng các chất khác tăng lên trong phân đoạn nhẹ. Điều này xảy ra do khi nhiệt độ chung cất tăng, áp suất hơi tăng nhanh; đồng thời, đường đi tự do trung bình của phân tử trở nên dài, tạo ra các sự va chạm liên tục giữa các phân tử tại vùng không gian giữa bề mặt hóa hơi và bề mặt ngưng tụ (Lutišan et al., 1995; Lutišan et al., 2002). Do đó, các hợp chất nặng hơn với khối lượng phân tử lớn hơn, chẳng hạn như Caryophyllene, Humulene, Guaiyl acetate,  $\delta$ -Cadinene có thể đến phần nhẹ khi tăng nhiệt độ. Bởi vì đường đi phân tử trung bình của phân tử  $\alpha$ -Terpineol gần với một trong các phân tử còn lại trong điều kiện nhất định, do đó, có nhiều phân tử nặng hơn tập trung nhiều tại phần nhẹ hơn là  $\alpha$ -Terpineol. Vì vậy, hàm lượng các hợp chất có khối lượng lớn gia tăng đáng kể trong phần nhẹ. Mặt khác, 35 °C trở thành một điểm mang tính bước ngoặt cho những thay đổi về hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phân đoạn nhẹ. Ở nhiệt độ dưới 35 C, hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phần nhẹ giảm nhẹ trong khi hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phần nặng có xu hướng tăng lên. Điều này chứng minh rằng  $\alpha$ -Terpineol chỉ có thể bay hơi đến bình ngưng, nhưng các cấu tử có trọng lượng phân tử lớn hơn so với  $\alpha$ -Terpineol không thể đến được phần nhẹ và được thu thập trong phần nặng. Với sự gia tăng nhiệt độ, một vài phân tử ở các phân đoạn nặng hơn bắt đầu có đủ năng lượng để thoát ra khỏi bề mặt hóa hơi và được ngưng tụ tại phần nhẹ, nhưng một vài phân tử nhẹ hơn di chuyển ngẫu nhiên hơn trong khe hở và không thu hồi tại phần nhẹ và phần nặng (hao

hạt). Khi nhiệt độ trên 45 °C, gần như không thể thu  $\alpha$ -Ter tại phần nhẹ và hiệu quả phân tách không đạt yêu cầu. Kết quả này có xu hướng dữ liệu gần tương tự với nghiên cứu tinh chế hợp chất Citral trong phân đoạn nhẹ từ nguồn tinh dầu sả chanh của (Tovar *et al.*, 2011). Để lựa chọn thông số hệ thống cho các khảo sát tiếp theo, cố định điều kiện nhiệt độ 35 °C (hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất ở 67,57%) là hoàn toàn phù hợp để vận hành thiết bị.

### 3.2.3. Ảnh hưởng của lưu lượng



**Hình 3.3. Ảnh hưởng của lưu lượng đến hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol**

Biểu đồ trình bày trong hình 3.3 cho thấy sự ảnh hưởng của lưu lượng tinh dầu từ 1 mL/phút đến 3 mL/phút lên hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol trong phân đoạn nhẹ. Kết quả thể hiện việc lưu lượng càng lớn sẽ làm giảm mạnh kết quả thành phần và độ thu hồi của hoạt chất tại phân đoạn nhẹ. Điều này là do khi hệ thống được nhập liệu liên tục ở lưu lượng cao, tốc độ màng khuấy trục không đáp ứng kịp để dàn trải đều và giữ nguyên liệu trên diện tích bề mặt hóa hơi. Đồng thời, nguyên liệu không đủ thời gian tiếp xúc với nhiệt độ để tiến hành gia nhiệt. Bên cạnh đó, lưu lượng thấp nhất ở 1 mL/phút sẽ làm hàm lượng các hoạt chất có xu hướng giảm đi trong khi độ thu hồi ở mức tầm cao vì thời gian phân tách các hợp chất có khối lượng diễn ra dài hơn. Tại điều kiện này số lượng các hợp chất bay hơi gia tăng đáng kể làm cho thành phần hoạt chất mục tiêu có trong phân đoạn này bị giảm hơn so với mức cao hơn là 1,5 mL/phút. Xu hướng kết quả này tương tự với nghiên cứu khảo sát tối ưu lưu lượng nguyên liệu để phân tách Monoglycerides của (Fregolente *et al.*, 2005). Lựa chọn thông số 1,5 mL/phút là điểm tối ưu của thí nghiệm, tại đó hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol lớn nhất là

70,80% với độ thu hồi lên đến hơn 85% là hoàn toàn đạt được mục tiêu đã đề ra của nghiên cứu.

### 3.3.TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN CHUNG CÁT BỞI PHƯƠNG PHÁP TỐI ƯU HÓA BỀ MẶT (RSM)

#### 3.3.1. Đánh giá mức độ phù hợp giữa mô hình và thực nghiệm

Qua các thí nghiệm khảo sát trên đã thu hẹp vùng ảnh hưởng của các thông số công nghệ, từ đó giới hạn vùng khảo sát để tìm điểm tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Để thiết kế và kiểm định tính tương thích của mô hình, phương pháp phân tích phương sai ANOVA đã được sử dụng và trình bày tại phụ lục A3.

Xét theo các mức đã nêu tại mục 2.3.3., mô hình bậc hai tại nghiên cứu đạt được cả bốn mức lần lượt là  $P < 0,05$ ;  $AP = 15,1260$ ;  $LOF = 7,62$ ;  $R^2 = 0,9605$ . Cho thấy mô hình hoàn toàn có ý nghĩa về bề mặt thống kê. Mức độ chuẩn xác của mô hình hồi quy phụ thuộc vào một số phản hồi ảnh hưởng đến mô hình gồm hệ số tương quan  $R^2$ ,  $R^2$  hiệu chỉnh, giá trị ý nghĩa p và mức độ phù hợp của biến độc lập. Từ kết quả ở phụ lục A3, sau khi loại bỏ các yếu tố không phù hợp cho hàm mục tiêu với độ tin cậy từ 95%, các điều kiện thực nghiệm thể hiện mối liên hệ giữa giá trị hàm mục tiêu và các giá trị biến độc lập được viết lại dưới dạng của phương trình bậc hai theo phương trình (4) như sau:

Phương trình theo mã hóa:

$$Y = 70,67 + 1,41X_1 + 0,8816X_2 - 1,59X_1X_2 + 1,87X_1X_3 + 0,9037X_2X_3 - 2,77X_1^2 - 1,24X_2^2 - 0,8433X_3^2 \quad (6)$$

Phương trình thực tế:

$$Y = -54,90834 + 0,581792X_1 + 4,37494X_2 - 0,006355X_1X_2 + 0,074850X_1X_3 + 0,361500X_2X_3 - 0,001109X_1^2 - 0,049570X_2^2 - 3,37304X_3^2 \quad (7)$$

Trong khoảng khảo sát, phương trình (6) và (7) thể hiện việc giá trị Y chịu sự ảnh hưởng bậc nhất của yếu tố  $X_1$ ,  $X_2$ ; bậc hai ba yếu tố  $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$  và chịu ảnh hưởng đồng thời của ba cặp yếu tố  $(X_1X_2)$ ,  $(X_1X_3)$  và  $(X_2X_3)$ . Kết quả phân tích này khẳng định quá trình nâng cao hàm lượng hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol đều chịu ảnh hưởng của cả ba yếu tố này tương tự với phần khảo sát luân phiên từng biến ở trên. Do đó việc dùng ba biến độc lập là áp suất chân không, nhiệt độ bề mặt hóa hơi và lưu lượng nhập liệu để tối ưu điều kiện nâng cao hoạt chất là hoàn toàn có ý nghĩa.

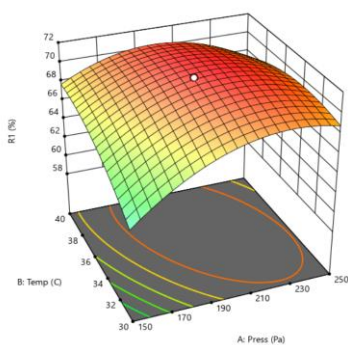
Kiểm định F và giá trị  $p < 0,0001$  cho thấy tính tương thích giữa mô hình và thực nghiệm là gần nhau, chính vì vậy càng khẳng định tính ứng dụng thực tiễn với độ tin cậy cao. Hệ số  $R^2$  của hàm mục tiêu Y là 0,9605 cho thấy 96,05% sự thay đổi về hàm lượng là do ảnh hưởng tương tác qua lại giữa các biến độc lập và 3,95% sự thay đổi là do các yếu tố ngoài luồng chưa xác định được gây nên (dự đoán do sai số ngẫu nhiên). Càng nhiều biến thì giá trị  $R^2$  càng tăng, nên dựa vào  $R^2$  có thể dẫn đến sai lệch, vì vậy sử dụng  $R^2$  hiệu chỉnh. Trong nghiên cứu này, giá trị  $R^2$  hiệu chỉnh đều là 0,9098. Điều này cho thấy mô hình có sự tương thích tương đối chặt chẽ với thực nghiệm.

**Bảng 3.3. Hệ số tương quan từ mô hình**

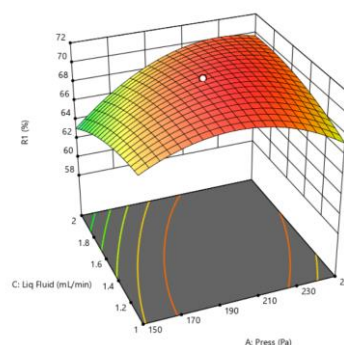
Hàm mục tiêu	Phương sai	$R^2$	$R^2$ hiệu chỉnh	C,V, %
Hàm lượng $\alpha$ -Terpineol	1,05	0,9605	0,9098	1,57

### 3.3.2. Phân tích tối ưu hóa thông qua mô hình 3D bề mặt đáp ứng

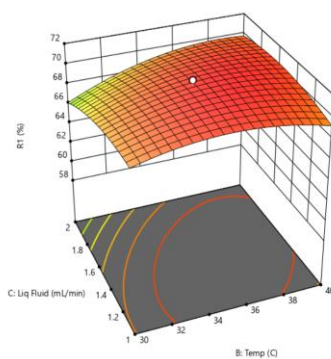
Các mô hình đáp ứng bề mặt giúp dự đoán sơ bộ các giá trị lân cận làm cho hàm mục tiêu đạt mức độ tối ưu. Nhìn chung, các cặp yếu tố như áp suất–nhiệt độ bề mặt hóa hơi, áp suất–lưu lượng nhập liệu, nhiệt độ bề mặt hóa hơi–lưu lượng nhập liệu ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng hoạt chất. Hình 3.4 cho thấy khi tăng áp suất từ 150 đến 200 Pa giá trị hàm lượng có xu hướng gia tăng nhưng càng nâng cao áp suất thì giá trị có xu hướng giảm. Lưu lượng càng tăng cao từ 2 mL/phút sẽ làm cho hàm lượng hoạt chất thu hồi bắt đầu giảm mạnh. Kết quả này tương tự với kết quả của các khảo sát luân phiên từng biến như đường đi phân tử trung bình, sự tương tác giữa các hợp chất dưới điều kiện áp suất sâu và sự phân bố đồng nhất hay không đồng nhất của nguyên liệu trên bề mặt hóa hơi của hệ thống. (Chen et al., 2007; Manohar et al., 2009; Martins et al., 2012).



(a) Áp suất–Nhiệt độ bề mặt hóa hơi



(b) Áp suất–Lưu lượng nhập liệu

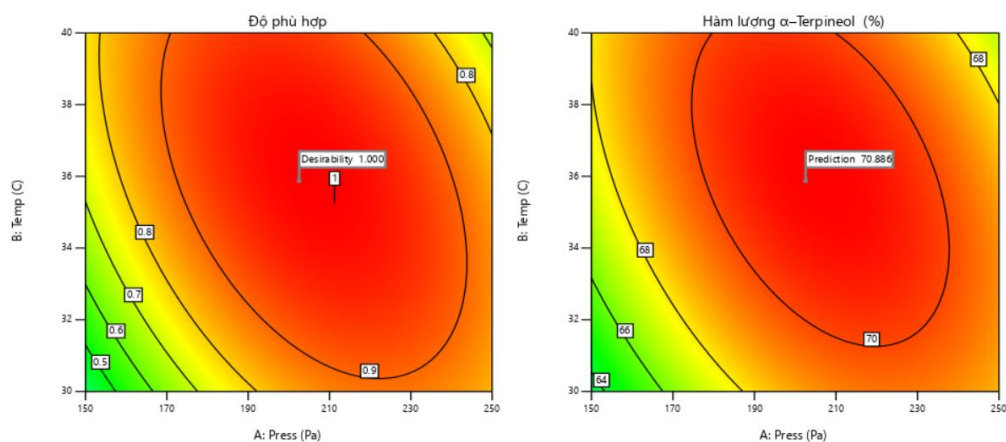


(c) Nhiệt độ–Lưu lượng nhập liệu

Hình 3.4. Mô hình 3D về ảnh hưởng của các cặp yếu tố đến hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol

### 3.3.3. Xác định điều kiện vận hành tối ưu

Từ các phản hồi trong hình 3.4 và hình 3.5 bên dưới, ứng dụng đã đề xuất điều kiện tối ưu cho việc nâng cao thành phần hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol như sau: áp suất 205,95 Pa, nhiệt độ bề mặt hóa hơi 35,32 °C, lưu lượng 1,34 mL/phút với kết quả hàm mục tiêu dự đoán là 77,72%. Tiến hành kiểm chứng hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol ở điều kiện tối ưu đề xuất, thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được trình bày ở bảng 3.4. Kết quả thí nghiệm gần bằng với giá trị dự đoán của mô hình và sai số so với mô hình không nhiều.



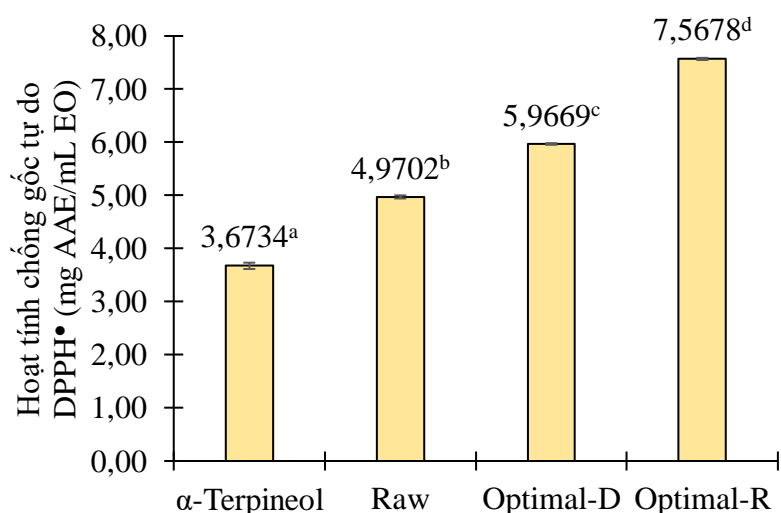
Hình 3.5. Đồ thị 2D thể hiện ảnh hưởng của áp suất và nhiệt độ bề mặt hóa hơi đến hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol tại lưu lượng 1,34 (mL/phút)

Bảng 3.4. Kiểm tra điều kiện phản hồi của điểm tối ưu

	Kết quả phân tích	Giá trị dự đoán	Phần trăm sai số
Hàm lượng $\alpha$ - Terpineol	70,97		0,14
	70,25	70,87	0,87
	70,13		1,04

### 3.4. KẾT QUẢ HOẠT TÍNH CHỐNG GỐC TỰ DO DPPH<sup>•</sup>

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH<sup>•</sup> (Blois, 1958) góp phần xác định khả năng loại bỏ gốc tự do của mẫu tinh dầu. Dựa trên cơ chế ghép cặp giữa điện tử tự do tồn tại trong phân tử DPPH và nguyên tử hydro từ các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu tinh dầu. Các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu làm giảm màu sắc tím của gốc tự do DPPH<sup>•</sup> trong dung dịch thành màu vàng của diphenylpicrylhydrazine. Giá trị hoạt tính chống gốc tự do được biểu thị bằng mg đương lượng Ascorbic acid trên một mL tinh dầu (mg AAE/mL EO). Các mẫu được chuẩn bị cho phân tích gồm: hai phân đoạn nhẹ – nặng của tinh dầu tối ưu (Optimal-D và Optimal-R), tinh dầu nguyên liệu thô và mẫu  $\alpha$ -Terpineol tinh khiết sử dụng làm mẫu đối chứng. Kết quả được trình bày qua hình 3.6.



**Hình 3.6. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH<sup>•</sup> (mg AAE/mL EO)**

Hoạt tính kháng oxy hóa bằng cách chống gốc tự do DPPH<sup>•</sup> của phân đoạn tối ưu (Optimal-D và R) được so sánh với tinh dầu thô và đối chứng  $\alpha$ -Terpineol có giá trị dao động từ 5,9669 đến 7,5678 mg AAE/g EO. Phân tích dữ liệu thống kê cho thấy hoạt tính chống gốc tự do DPPH<sup>•</sup> giữa các mẫu đánh giá được so sánh theo thứ tự giảm dần như sau: Mẫu Optimal-R ( $7,5678 \pm 0,02^d$  mg AAE/mL EO) > Optimal-D ( $5,9669 \pm 0,0154^c$  mg AAE/mL EO) > tinh dầu thô ( $4,9702 \pm 0,0296^b$  mg AAE/mL EO) > đối chứng  $\alpha$ -Terpineol ( $3,6734 \pm 0,0597^a$  mg AAE/mL EO). Trong đó mẫu Optimal-R có hoạt tính kháng oxy hóa DPPH cao nhất, cụ thể là cao gấp 1,26 lần so với mẫu Optimal-D, 1,52 lần tinh dầu thô, 2,06 lần so với mẫu thấp nhất là đối chứng  $\alpha$ -Terpineol 90%. Nguyên nhân sự khác nhau về hoạt tính khử gốc tự do DPPH giữa các mẫu tinh dầu được lý giải bởi sự hiện diện của các hoạt chất mang đặc tính sinh

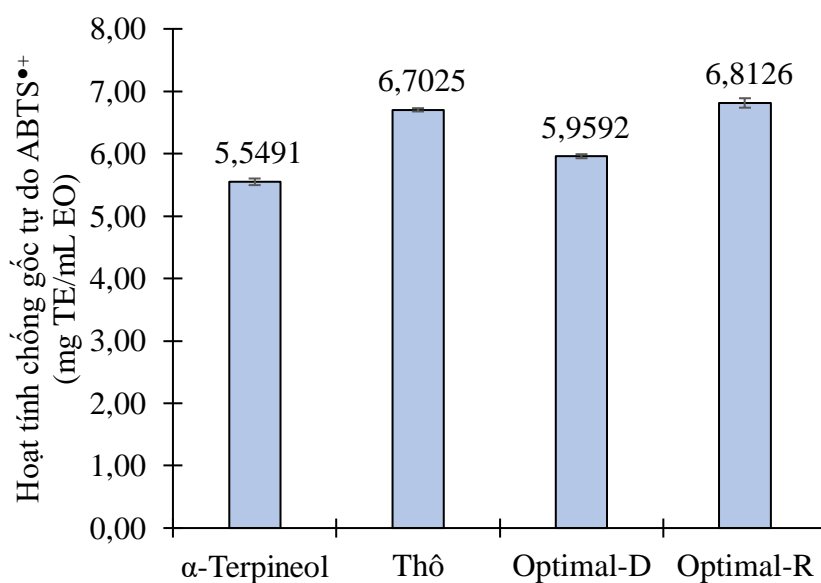
học có khối lượng nặng hơn như  $\sigma$ -Cadinene, Humulene, 7-*epi*- $\alpha$ -Eudesmol, 7-*epi*- $\beta$ -Eudesmol và một lượng nhỏ hợp chất dễ bay hơi đã bị lôi cuốn vào phân đoạn nặng trong suốt quá trình phân tách. Phân đoạn Optimal-R chứa ít  $\alpha$ -Terpineol nhưng khả năng kháng oxy hóa lại cao hơn phân đoạn Optimal-D, điều này chứng tỏ trong thành phần tinh dầu Optimal-R không chỉ có  $\alpha$ -Terpineol có khả năng kháng oxy hóa mà còn có nhiều hợp chất khác có khả năng kháng oxy hóa tạo ra tính chất cộng hưởng làm gia tăng hoạt tính này. Tuy phân đoạn Optimal-D có khả năng kháng oxy hóa ít hơn phân đoạn Optimal-R, nhưng ngược lại mức độ hương cao tạo cảm giác nhẹ nhàng thư thái hơn phần nặng rất nhiều, bên cạnh đó theo (Li, L. et al., 2014) thì các phân đoạn nhẹ chứa hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol có khả năng kháng khuẩn rất cao đồng thời khả năng kháng oxy hóa của Optimal-D cao hơn chất chuẩn  $\alpha$ -Terpineol 90%. So sánh với nghiên cứu của (Valková et al., 2022), tinh dầu trầm Năm gân gốc có mức kháng oxy hóa  $162,0 \pm 0,0154 \mu\text{g TE/mL EO}$ , điều này cho thấy các phân đoạn tại nghiên cứu hoàn toàn có tính ứng dụng cao của tinh dầu này vào các sản phẩm mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm.

### 3.5. KẾT QUẢ HOẠT TÍNH CHỐNG GỐC TỰ DO ABTS<sup>•+</sup>

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> (Re et al., 1999) góp phần xác định khả năng loại bỏ gốc tự do của tinh dầu với cơ chế tương tự phương pháp DPPH<sup>•</sup>, nhưng khác ở điểm bản chất của ABTS không phải là gốc tự do, phải cần sự hỗ trợ của một tác nhân oxy hóa mạnh là K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> để tạo thành gốc tự do ABTS<sup>•+</sup>. Các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu làm giảm màu xanh dương đen của ABTS<sup>•+</sup> trong dung dịch thành màu xanh ngọc của ABTS. Giá trị hoạt tính chống gốc tự do được biểu thị bằng mg đương lượng Trolox trên một mL tinh dầu (mg TE/mL EO). Các mẫu được chuẩn bị cho phân tích giống với phương pháp DPPH. Kết quả được trình bày theo hình 3.7.

Kết quả cho thấy hoạt tính chống gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> của phân đoạn tinh dầu tối ưu có giá trị dao động từ 5,9592 đến 6,8126 mg TE/mL EO, Phân tích thống kê cho thấy hoạt tính loại bỏ gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> giữa các mẫu được so sánh theo thứ tự giảm dần như sau: Mẫu Optimal-R ( $6,8126 \pm 0,0760^d$  mg TE/mL EO) > tinh dầu thô ( $6,7025 \pm 0,0263^c$  mg TE/g EO) > Optimal-D ( $5,9592 \pm 0,0322^b$  mg TE/g EO) > đối chứng  $\alpha$ -Terpineol ( $5,5491 \pm 0,0531^a$  mg TE/g EO). Trong đó mẫu Optimal-R vẫn là mẫu có hoạt tính chống gốc tự do ABTS tốt nhất, cụ thể là cao gấp 1,14 lần mẫu Optimal-D

và 1,23 lần mẫu thấp nhất là đối chứng  $\alpha$ -Terpineol. Điều này được lý giải tương tự kết quả DPPH, nhưng sự chênh lệch không nhiều này là do hợp chất ABTS tương đối bền trong hợp chất do được  $K_2S_2O_8$  hỗ trợ chuyển hóa. Song song đó, kết quả cũng cho thấy các phân đoạn sau phân tách có hiệu năng chống gốc tự do ABTS $\bullet^+$  gần bằng so với tinh dầu thô ban đầu. So với kết quả nghiên cứu trên tinh dầu trà chanh của (Zhao et al., 2008), kết quả ABTS là  $1,5 \times 10^{-3}$  mL VitE/mL EO thấp hơn so với nghiên cứu này. Kết quả này cho thấy các phân đoạn tại nghiên cứu hoàn toàn có tính ứng dụng trong việc chống các gốc tự do tương tự ABTS $\bullet^+$ .



**Hình 3.7. Hoạt tính chống gốc tự do ABTS $\bullet^+$  (mg TE/mL EO)**

Các kết quả trên chứng minh việc có thể sử dụng phân đoạn nhẹ vào các sản phẩm thực, dược và mỹ phẩm do mức độ chống gốc tự do tốt và tính ứng dụng mùi hương của chúng (Sousa, Damião Pergentino de et al., 2007; Zhou et al., 2014) nhằm đảm bảo sự an toàn về liều lượng trong việc sử dụng hoạt chất thiên nhiên của con người và tăng giá trị kinh tế, tính ứng dụng của phương pháp này cũng như các phân đoạn.

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## 1. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, cặn tinh dầu trầm Năm gân được tiến hành phân đoạn bằng phương pháp chưng cất phân tử nhằm nâng cao hàm lượng hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol trong tinh dầu. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân đoạn tinh dầu được khảo sát bao gồm áp suất (Pa), nhiệt độ bề mặt hóa hơi ( $^{\circ}\text{C}$ ) và lưu lượng nhập liệu (mL/phút), sau đó tối ưu hóa các yếu tố công nghệ bởi phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) để thu được phân đoạn có hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol cao nhất. Các phân đoạn cùng với mẫu tinh dầu thô và mẫu đối chứng được đánh giá khả năng chống gốc tự do bằng phương pháp DPPH và ABTS.

Kết quả khảo sát cho thấy:

1. Áp suất chân không vận hành, nhiệt độ bề mặt hóa hơi ( $^{\circ}\text{C}$ ) và lưu lượng nhập liệu (mL/phút) đều có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình phân đoạn cặn tinh dầu trầm Năm gân.

2. Áp suất chân không khoảng 150–250 Pa, nhiệt độ bề mặt hóa hơi khoảng 30–40  $^{\circ}\text{C}$ , lưu lượng nhập liệu khoảng 1–2 mL/phút là phù hợp để thu được các phân đoạn tinh dầu với hàm lượng  $\alpha$ -Terpineol cao.

3. Kết quả tối ưu hóa bề mặt đáp ứng đề xuất thông số vận hành tối ưu bao gồm áp suất 205,95 Pa, nhiệt độ bề mặt hóa hơi 35,32  $^{\circ}\text{C}$ , lưu lượng tinh dầu 1,34 mL/phút ứng với điều kiện này phần trăm hoạt chất  $\alpha$ -Terpineol đạt cao nhất là 70,97% với độ thu hồi hoạt chất lên đến 70,8%.

4. Kết quả hoạt tính chống gốc tự do trên DPPH $\bullet$  cho thấy phân đoạn nhẹ ( $5,9669 \pm 0,0154^c$  mg AAE/mL EO) chống lại các gốc tự do cao hơn hẳn so với tinh dầu nguyên liệu và đối chứng  $\alpha$ -Terpineol do có sự hiện diện của các hoạt chất sinh học khác. Ngược lại, trên gốc tự do ABTS $\bullet^+$  phân đoạn nhẹ ( $5,9592 \pm 0,0322^b$  mg TE/mL EO) có hoạt tính thấp hơn so với tinh dầu nguyên liệu và gần bằng với đối chứng  $\alpha$ -Terpineol.

5. Kết quả trong nghiên cứu cho thấy chưng cất phân tử phù hợp cho việc phân tách và làm giàu hợp chất có giá trị cao trong tinh dầu trong khi các công nghệ khác không thực hiện được.

## **2. KIẾN NGHỊ**

Ứng dụng hệ thống vào quy mô Pilot với các điều kiện tối ưu.

Đánh giá thêm hoạt tính sinh học thông qua chỉ tiêu FRAP, khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng tế bào ung thư của các phân đoạn tinh dầu trà Năm gân.