

Chương 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ HOA HỒNG DAMASK (*ROSA DAMASCENA* MILL.)

1.1.1. Chi Rosa

Chi Rosa là một loại cây bụi có hoa thơm thuộc họ *Rosacea*, đây là loài có thành phần hương đặc biệt, có giá trị cao nên được chọn dùng để sản xuất nước hoa, tinh dầu... Chi Rosa có nguồn gốc ở vùng ôn đới và nhiệt đới, với khoảng hơn 200 loài và 18 000 giống phân bố nhiều nơi trên thế giới trong đó có Châu Á và một số ít tập trung ở bắc bán cầu (Bắc Mỹ, Châu Âu và Tây Bắc Châu Phi) (Shabbir *et al.*, 2020).

1.1.2. Loài cây hoa hồng Damask (*R. Damasace*)

Cây hoa Hồng Damask (*R. Damasace*) thuộc:

Giới (Thực vật): *Plantae*

Phân giới (Thực vật có phôi): *Embryophyta*

Ngành (Thực vật có mạch): *Tracheophyta*

Lớp (Song tử diệp): *Dicotyledoneae*

Phân lớp (Thực vật hạt kín): *Angiosperms*

Loài (Hoa hồng): *Rosidae*

Họ (Hoa hồng): *Rosaceae*

Chi (Hoa hồng leo, bụi): *Rosa*

Bộ (Hoa hồng): *Rosales*

1.1.3. Mô tả

Trong họ hoa hồng (*Rosaceae*), đại diện nổi bật hơn hết là *R. Damascena*, là giống hoa hồng leo hay bụi, còn gọi là chi Rosa. Chúng có đặc điểm sinh sống cùng nhau tạo thành bụi rễ bám chặt, có gai cong, nhỏ. Cây có chiều cao lên đến hơn 2,2 m và đường kính là 7 cm. Hoa chính là điểm nhấn đặc trưng với nhiều màu và chủ yếu là: hồng, hồng đậm và đỏ nhạt. Mỗi cành có từ 17 đến 25 bông hoa mọc theo nhóm, khối lượng dao động từ 2,09 g đến 3,44 g. Đường kính của cả bụi cây dao động từ khoảng 53-118 cm. Cây sẽ ra hoa vào khoảng đầu tháng 6, tháng 7 và duy trì đến đầu tháng 8 sẽ kết thúc vụ hoa (Mirzaei *et al.*, 2016).



Hình 1.1. Hình ảnh hoa hồng Damask

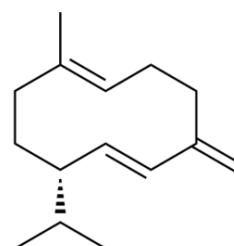
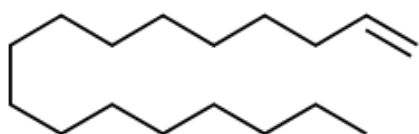
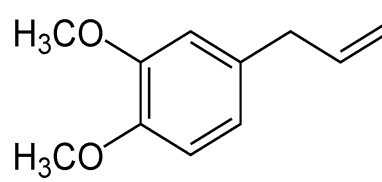
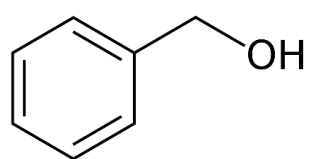
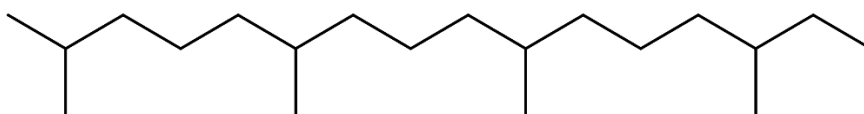
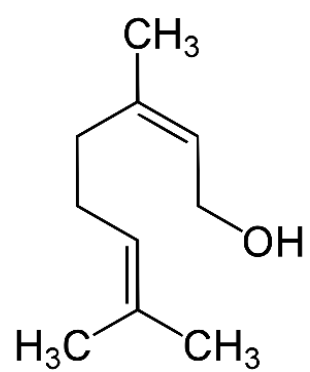
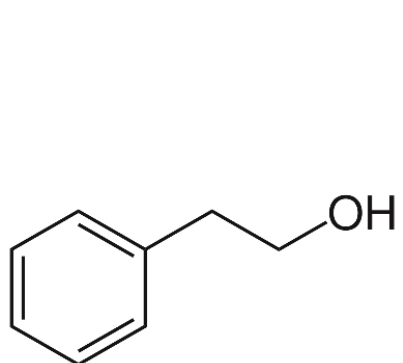
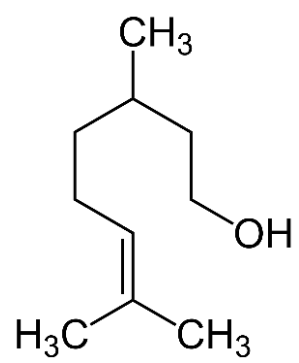
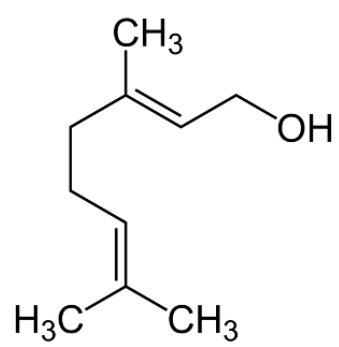
1.1.4. Phân bố

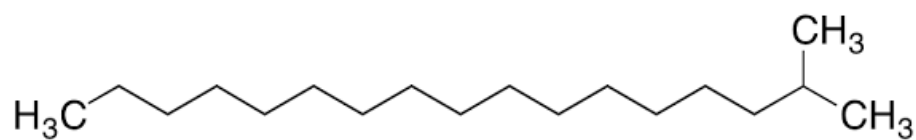
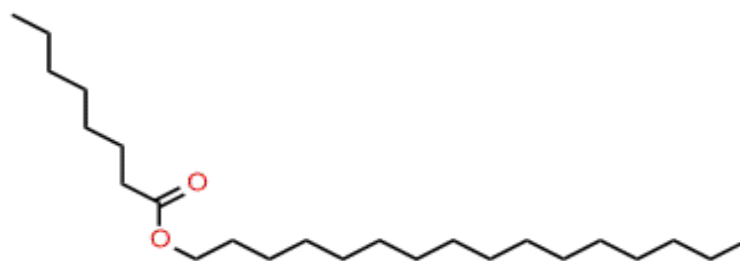
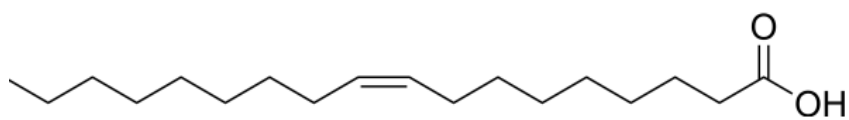
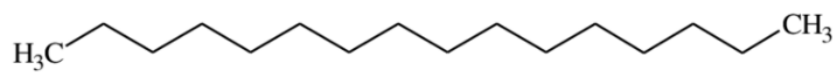
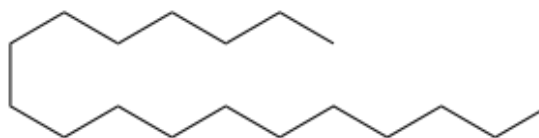
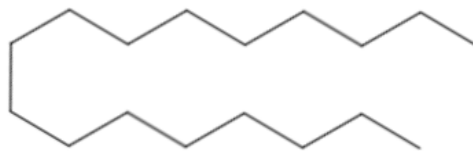
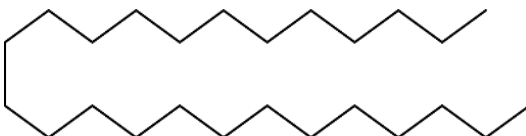
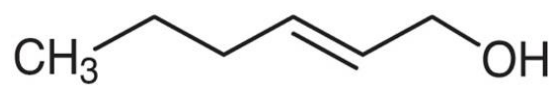
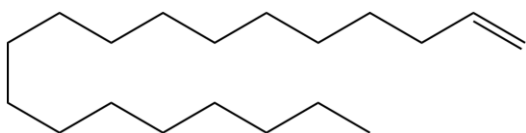
Ngày nay ở khắp mọi nơi, hoa hồng Damask (*R. Damascena*) là giống hoa hồng được xem là nữ hoàng trong những loại hoa hồng, loại này được phân bố nhiều ở Châu Á và một số ít tập trung ở bắc bán cầu (Bắc Mỹ, Châu Âu và Tây Bắc Châu Phi) và một số nước như: Ấn Độ, Thổ Nhĩ Kỳ, Bulgari, Syria, USA, Pháp, Anh ... (Shabbir *et al.*, 2020).

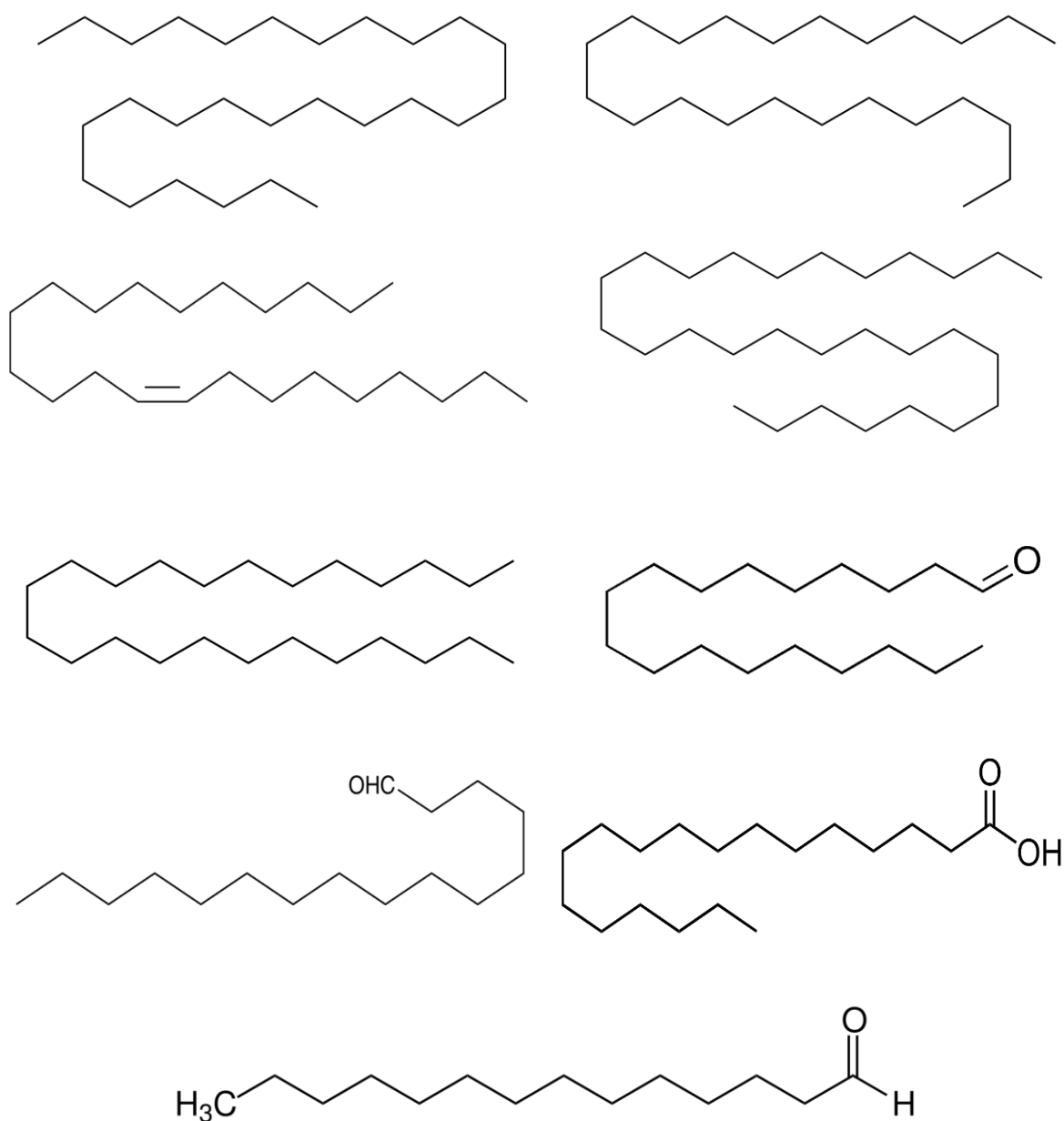
Ở Việt Nam, loại hoa Hồng Damask được tìm thấy đầu tiên ở Sapa với độ cao là 1600 m. Nhận thấy loài hoa có mùi hương “quý tộc” đặc trưng, lại mang trong mình rất nhiều tiềm năng về tính chất hóa lý, sinh học, dược liệu, mỹ phẩm... Thế nên, ngoài Sapa hoa hồng Damask còn được nhân giống nhiều ở một vài nơi có khí hậu mát mẻ và trong lành ở miền Đông Tây Nguyên như: Lâm Đồng (Đà Lạt), Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai và Kon Tum ... và các tỉnh phía Tây Bắc như: Lai Châu, Lào Cai, Sơn La và Điện Biên.

1.1.5. Thành phần hợp chất có trong hoa hồng damask

Trong hoa hồng Damask có rất nhiều chất cấu tạo nên từng tầng hương riêng biệt, nhiều thành phần quan trọng tạo nên khả năng chống lại một số vi khuẩn và đặc tính hóa lý ưu việt, trong đó nổi bật và có hàm lượng cao ở các hợp chất sau (Alborzi *et al.*, 2022).







Hình 1.2. Các hợp chất có trong hoa hồng Damask

1.1.6. Hoạt tính sinh học

Nhiều thực nghiệm cho thấy hoa hồng *R. Damask* không chỉ để làm cảnh mà còn có thể ứng dụng vào lĩnh vực mỹ phẩm, ứng dụng vào các sản phẩm mỹ phẩm thiên nhiên và một số đặc tính dược lý quan trọng khác (Mahboubi, 2016). Hoa hồng Damask có khả năng ức chế vi khuẩn, đặc tính hoa lý vượt trội (Kumar *et al.*, 2009; Ulusoy *et al.*, 2009). Đặc biệt, nó còn được biết đến với đặc tính dược lý ưu việt, với khả năng kháng viêm, giảm đau, nhuận tràng đã được chứng minh (Boskabady *et al.*, 2011; Demirel, 2022).

1.2. PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT

1.2.1. Phương pháp ngâm dầm

Phương pháp ngâm dầm là một trong những phương pháp chiết xuất thông thường được sử dụng phổ biến nhất hiện nay. Quá trình chiết xuất được tiến hành ngâm 1 lượng nguyên liệu cùng dung môi trong khoảng thời gian nhất định. Dịch chiết thu được cho ra khỏi bể. Dụng cụ ngâm được sử dụng bằng các bể thủy tinh, sành, sứ... (Shikov *et al.*, 2022)

1.2.2. Phương pháp soxhlet

Phương pháp soxhlet được biết đến là một trong những phương pháp chiết xuất cùng dung môi nóng, lượng dung môi được đun hoàn lưu và xả tràn trong khoảng thời gian nhất định. Trong suốt quá trình chiết diễn ra cần 1 khoảng thời gian nhất định để dung môi lôi cuốn hết các chất của nguyên liệu. Quá trình chiết sẽ dừng khi nhận thấy nguyên liệu chiết đã hoàn toàn mất màu (Alara *et al.*, 2018).

1.3. CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.3.1. Các công trình nghiên cứu trong nước

Hiện tại có rất ít công trình đi sâu nghiên cứu về các cao chiết xuất từ hoa hồng *R. Damask*. Các đề tài thường nghiên cứu về tinh dầu và hydrosol thu được từ hoa hồng. Tuy nhiên về hiệu suất và các hoạt tính hóa lý và kháng khuẩn của cao chiết lại vượt trội. Vì vậy, đề tài của em chính là nghiên cứu khẳng định lại tính ưu việt của cao chiết từ hoa hồng Damask.

1.3.2. Các công trình nghiên cứu ngoài nước

Hoa hồng Rosa Damask quan tâm khá nhiều vì màu sắc bắt mắt, hương thơm cuốn hút được các thương hiệu lớn đánh giá cao và ứng dụng và các sản phẩm mỹ phẩm mang tính thương mại cao như cao chiết hoa hồng và tinh chất hoa hồng.

Năm 2022, bà Seyedeh Shadi Alborzi đã tiến hành công trình nghiên cứu ảnh hưởng của hai dung môi hữu cơ hexane và ethyl acetate và ba loại rượu metanol, ethanol, 2-propanol đến hiệu suất, chất lượng của cao chiết hoa hồng và hoa hồng tuyệt đối từ cánh hoa *Rosa damascena* Mill sấy khô trong không khí. Việc chiết xuất cao chiết hoa hồng từ cánh hoa hồng khô được thực hiện ở 30°C bằng hexane hoặc ethyl acetate, sau đó cao chiết hoa hồng được sản xuất được kết hợp với rượu và hỗn hợp này được đặt ở -18°C trong 48 giờ để tạo ra hoa hồng tuyệt đối. Kết quả thu được, sản lượng tối đa của tinh chất hoa hồng đạt được nếu quá trình chiết xuất được thực hiện bằng etyl axetat để

chiết xuất cao chiết hoa hồng và etanol để chiết xuất tinh chất hoa hồng. Tuy nhiên, việc sử dụng cặp hexan và metanol đã dẫn đến đạt được hương hoa hồng tuyệt đối với giá trị mùi cao nhất. Các thành phần quan trọng nhất được phát hiện trong dịch chiết là các thành phần có mùi thơm có giá trị cao như rượu phenyl ethyl, citronellol, geraniol, nerol và farneso (Alborzi *et al.*, 2022).

Từ năm 2016, Mohaddese Madboubi đã tiến hành thực nghiệm các chỉ tiêu nghiên cứu về cao hoa hồng, hydrosol chiết xuất từ dung môi Ethanol như: tổng hàm lượng Polyphenolic, kháng khuẩn, chống oxy hóa, ức chế lại một vài loại virus gây bệnh HIV các tính chất dược lý đặc trưng. Công trình đã cho kết quả tốt với các ứng dụng chữa bệnh trong y học ngày nay. Các đặc tính kháng khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. violaceum* và *E. carotovora*, chống oxy hóa, một số tính chất dược lý, mất trí nhớ, kháng lại Virus HIV. Ngoài ra nó còn là vị thuốc quý để giảm đau, chống viêm, và chống trầm cảm. Citronellol và geraniol là thành phần chính của tinh dầu *R. Damascena* có tính dược lý (Mahboubi, 2016).

Từ năm 2020, Louay Labban, Nasser Thallaj nghiên cứu thực nghiệm các chỉ tiêu nghiên cứu về hoa hồng Damask: một số đặc tính hóa lý và dược lý, bao gồm các đặc tính chống lại vi khuẩn, chống oxy hóa, chống ho, làm dịu mát cho da, trị đái tháo đường, chống HIV. Các chức năng chữa bệnh của hoa hồng Damask một phần là do sự phong phú của hợp chất Phenolic. Phenolic sở hữu một loạt các hoạt động dược lý, chẳng hạn như chất chống lại oxy hóa, kháng viêm, và chống các bệnh liên quan đến trầm cảm. Tinh dầu thu được bằng chưng cất hơi nước, hydrosol chiết suất từ dung môi ethanol của hoa hồng Damask. Kết quả cho thấy rằng sản phẩm chính của Damask Rose là tinh dầu, hydrosol, cao chiết, tinh chất hoa hồng đã được chứng minh rằng các sản phẩm trên có nhiều tác dụng tốt. *R. Damascena* ảnh hưởng đến chức năng hô hấp. Tác dụng của *R. Damask* đối với các chức năng tim mạch và một vài tác dụng được liệt kê: tác dụng dược lý thần kinh. tác dụng chống HIV, tác dụng hạ đường huyết. *R. Damask* được sử dụng trong điều trị vùng bụng và ngực đau, sức khỏe tim mạch, tiêu hóa và ngăn ngừa viêm nhiễm. Sử dụng tinh dầu hoa hồng Damask trong liệu pháp hơi có thể hữu ích cho một số dị ứng, đau đầu và đau nửa đầu. Các thành phần dễ bay hơi được chứng minh bằng GC/MS (Boskabady *et al.*, 2011).

Từ năm 2016, Mahboubi đã tiến hành thực nghiệm các chỉ tiêu nghiên cứu hoa hồng Damask về TPC, khả năng kháng vi khuẩn, chống lại một vài loại virus của tinh

dầu và hoa hồng tuyệt đối *R. Damask*. Kết quả cho thấy rằng *Rosa Damascena* có nhiều hoạt tính dược lý, sinh học, hạ đường huyết, chống viêm, giảm đau, chống oxy hóa và kháng khuẩn. Thành phần của tinh dầu *R. Damascena* chịu trách nhiệm về hoạt động dược lý là Geraniol và Citronellol. Việc sử dụng nó đã được chấp nhận rộng rãi trong hệ thống thuốc truyền thống để quản lý nhiều bệnh của con người ở các dạng bào chế khác nhau. Các thành phần được xác định bằng phương pháp GC/MS và GC–FID (Mahboubi, 2016).

1.4. GIỚI THIỆU VỀ CÁC LOẠI VI KHUẨN

1.4.1. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus hay còn được gọi là vi khuẩn tụ cầu vàng, là một loại vi khuẩn mang gram dương. Là vi khuẩn hay mầm thường sống nhờ ở da, khoang mũi và đường hô hấp. Đồng thời, *S. aureus* là một trong những mầm bệnh nguy hiểm có thể lây nhiễm cao. Là nguyên nhân chủ yếu gây ra nhiễm trùng máu, nhiễm trùng da và mô mềm (SSTI), nhiễm trùng huyết, viêm tủy xương, viêm phúc mạc, viêm vú và viêm nội tâm mạc. Là một trong những vi khuẩn có số ca tử vong cao nhất, ước tính đến năm 2019 (Kwiecinski *et al.*, 2020; Tătaru *et al.*, 2023).

1.4.2. Vi khuẩn *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*)

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) được biết đến là một trực khuẩn mang gram âm, chúng thuộc họ *Enterobacteriaceae*, chúng có hình que, xung quanh thân có những tua roi rất mảnh, tồn tại chủ yếu ở đường ruột, thận. Là vi khuẩn cơ hội, gây ra các bệnh nguy hiểm đáng quan tâm. Các loài *Proteus* là loại vi khuẩn trực tiếp gây ra nhiễm trùng đường tiết niệu (UTI), viêm nội tâm mạc,... Ở phụ nữ gây ra bệnh viêm bàng quang, ở nam giới gây ra bệnh viêm tuyến tiền liệt, viêm tinh hoàn, và các bệnh liên quan đến thận (Bux *et al.*, 2022; E *et al.*, 2023).

1.4.3. Vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)

S. pneu hay còn biết đến là một trong những loại vi khuẩn mang Gram dương, chúng sống ghép thành từng cặp hoặc ghép nối thành một chuỗi dài. Chúng là một loại khuẩn có thể tấn công mạnh vào vòm họng, phế quản, màng não và đặc biệt là phổi. Chính vì những đặc điểm về nơi kí sinh cũng như khả năng gây bệnh, nó thường tập trung gây bệnh cho người có hệ miễn dịch yếu và chưa phát triển. Những căn bệnh chúng gây ra vô cùng nặng nề, có thể tử vong về lâu về dài, chẳng hạn như: viêm tai, mũi, họng, có thể làm nhiễm khuẩn huyết. Tỷ lệ mang vi khuẩn ở người lớn khỏe mạnh là

dưới 10%, trong khi tỷ lệ này ở trẻ em và người già là từ 27% đến 65% (L. Li *et al.*, 2023; Zomuansangi *et al.*, 2023).

1.4.4. Vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli là vi khuẩn hay trực khuẩn gram âm. *E. coli* là sinh vật hiếu khí, tồn tại nhiều nhất trong ruột già. Các loại khuẩn có cùng họ gây ra bệnh tiêu chảy và có thể gây bệnh nhiễm trùng khi tấn công vào cơ thể. Hầu hết các trường hợp chủng *E. coli* gây bệnh colibacillosis ở gia cầm, viêm vú ở bò sữa, viêm não trẻ sơ sinh ở trẻ em. Ngoài ra nó có thể gây ra các bệnh nghiêm trọng như viêm nhiễm, đau bụng, tiêu chảy, hội chứng tán huyết urê có thể thậm chí tử vong, đặc biệt ở người có hệ miễn dịch kém (Bai *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2023).

Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Hoa tươi

Hoa hồng tươi được thu hoạch vào tháng 4, tháng 5 và tháng 6 vào những buổi sáng sớm tại vườn The Seed Graden (huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam). Lúc này cây hoa hồng đã đạt 2 – 4 năm tuổi. Sau đó, hoa được giữ lạnh và vận chuyển đến Phòng Thí nghiệm của khoa Kỹ thuật Thực phẩm & Môi trường – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

Những bông hoa sẽ được lựa chọn kỹ, bông hoa được chọn có mùi hương đậm đà, màu hồng tươi, cánh cứng và không bị dập. Bông hoa tươi sẽ được lật để lấy cánh và loại bỏ đài hoa và nhị hoa. Sau đó, đem cánh hoa đã nhặt lựa đem rửa lại với nước sạch. Tất cả quá trình xử lý nguyên liệu hoa hồng đều làm trong môi trường máy lạnh để đảm bảo nhiệt độ bảo quản hoa tốt nhất trong quá trình xử lý. Độ ẩm của hoa tươi trước khi chiết xuất được xác định bởi cân sấy ẩm (MB45, Ohaus, Mỹ). Xác định được độ ẩm của hoa là 66,96%.

2.1.2. Hoa khô

Hoa hồng khô được thu hái từ những bông hoa tươi và xử lý sấy lạnh ở 55 °C trong 12 giờ bằng máy sấy lạnh 50 kg LHRD015-X. Sau đó, hoa khô được bảo quản bằng túi zip (PE) chuyển đến Khoa Kỹ Thuật Thực Phẩm & Môi Trường (Đại Học Nguyễn Tất Thành). Hoa khô được nhận và kiểm tra độ ẩm, tiến hành bọc giấy bạc từng lớp và cho vào tủ đông sâu (Haier) và bảo quản ở -59,7 °C. Độ ẩm của bột hoa hồng trước khi chiết xuất được xác định bởi cân sấy ẩm (MB45, Ohaus, Mỹ). Xác định được độ ẩm của bột là 5,08%.



(a)



(b)



(c)

Hình 2.1. Nguyên liệu hoa hồng Damask

(a) Hoa hồng Damask

(b) Cánh hoa tươi

(c) Cánh hoa khô

2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

Bảng 2.1. Bảng tổng hợp hóa chất

Tên hóa chất	Hãng	Xuất xứ
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Himedia	Ấn Độ
Cồn	ChemLab	Việt Nam
DPPH	Merck	Đức
Folin	Merck	Đức
Methanol	Merck	Đức

Tên hóa chất	Hãng	Xuất xứ
Na ₂ CO ₃	Xilong	Trung Quốc
NaNO ₂	Xilong	Trung Quốc
NaOH	Himedia	Ấn Độ
n-Hexane	Xilong	Trung Quốc
Nước cất	Hóa Nam	Việt Nam
Quecertin	Himedia	Ấn Độ
MHA	Himedia	Ấn Độ
MHB	Himedia	Ấn Độ
LG	Asahi kasei	Nhật
DG	Sumitomo Chemical	Nhật
EDTA	Lautan Luas	Indonesia
EHGP	Lautan Luas	Indonesia
P.P.7	Lautan Luas	Indonesia
HA	Merck	Đức
TEA	Himedia	Ấn Độ
Sles	Merck	Đức
Na ₂ SO ₄	Xilong	Trung Quốc
Glucose D	Himedia	Ấn Độ
Cacbomer	Merck	Đức

2.2.2. Dụng cụ

Bảng 2.2. Bảng tổng hợp dụng cụ

Tên dụng cụ	Xuất xứ
Bình cầu 500mL	Đức
Bình Duran 500 mL	Đức
Bình định mức thủy tinh	Trung Quốc
Bộ soxhlet 250 mL	Đức
Cốc thủy tinh	Trung Quốc
Cuvet thạch anh	Mỹ
Đĩa 96 giếng	Đức
Đĩa Petri	Đức
Giấy lọc (20-25 μ m)	Việt Nam
Muỗng inox	Việt Nam
Ống đong	Trung Quốc
Phễu chiết	Đức

2.2.3. Thiết bị



- Tên: Máy cô quay chân không Hei-VAP Value
- Hãng: Heidolph
- Xuất xứ: Đức

Hình 2.2. Máy cô quay chân không Hei-VAP Value



- Tên: Hệ thống chiết Soxhlet
- Hãng: Duran
- Xuất xứ: Đức

Hình 2.3. Hệ thống chiết Soxhlet



- Tên: Bể cách thủy 12 lít – WB – 18 - 6
- Hãng: STECH INTERNATIONAL
- Xuất xứ: Trung Quốc

Hình 2.4. Bể cách thủy 12 lít – WB – 18 - 6



- Tên: Máy ly tâm 12 chỗ tube 5mL
- Hãng: Gemmy – Đài Loan
- Xuất xứ: Đài Loan

Hình 2.5. Máy ly tâm 12 chỗ tube 5mL



- Tên: Bể siêu âm
- Hãng: Ultrasonic Cleaner
- Xuất xứ: Trung Quốc

Hình 2.6. Bể siêu âm



- Tên: Cân sấy ẩm
- Hãng: OHAUS
- Xuất xứ: Mỹ

Hình 2.7. Cân sấy ẩm

✚ Các thiết bị khác:



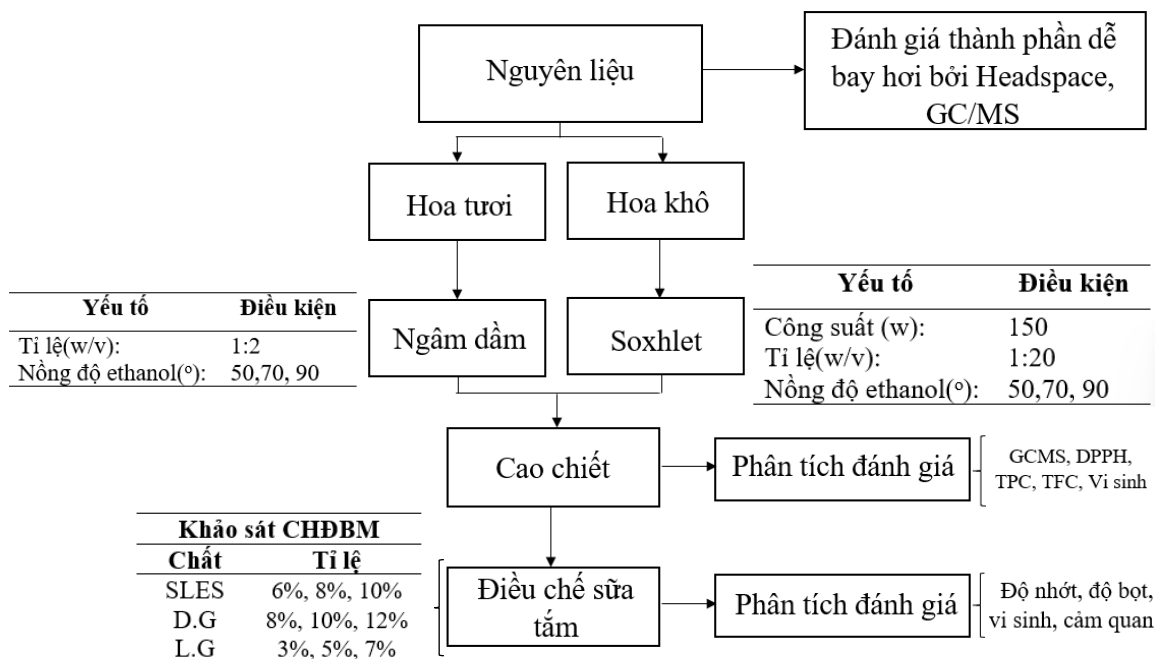
Hình 2.8. Bếp lưới gia nhiệt



Hình 2.9. Cân phân tích 4 số

2.3. QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU

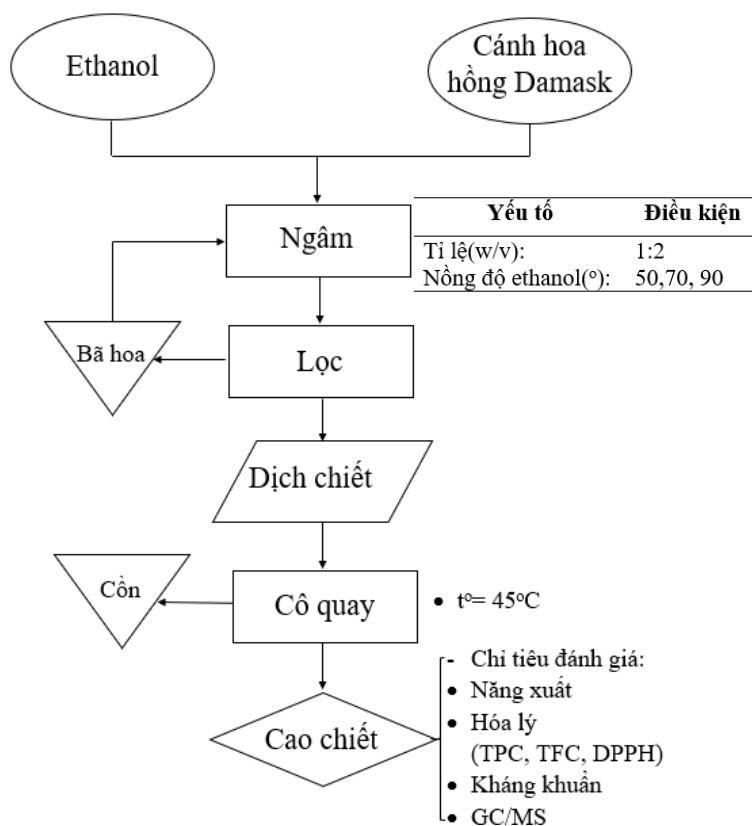
2.3.1. Kế hoạch thực hiện



Hình 2.10. Kế hoạch thực hiện

2.3.2. Quy trình công nghệ chiết xuất

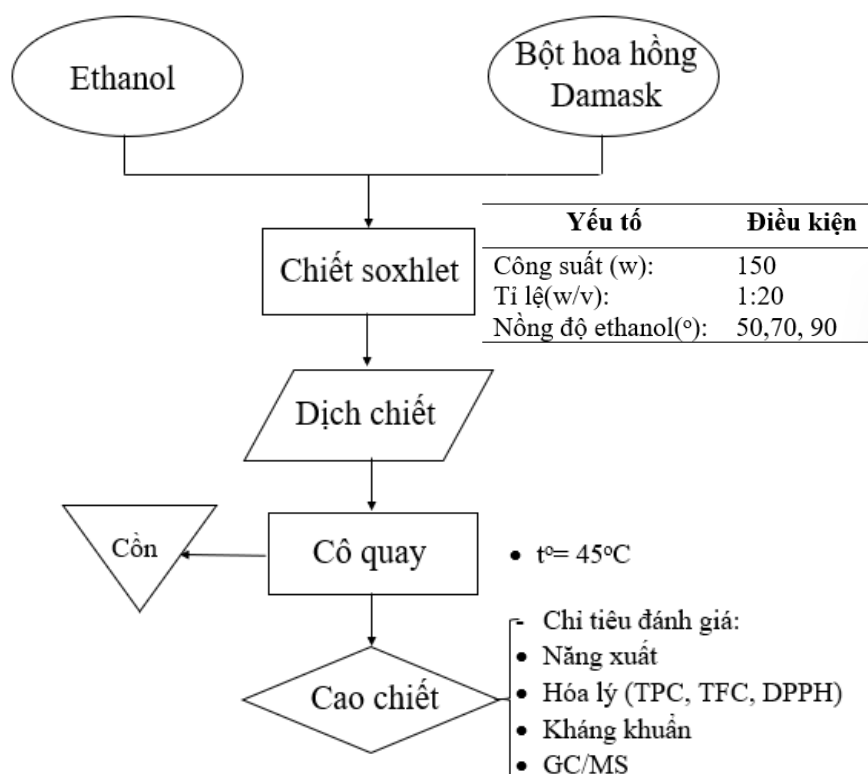
2.3.2.1. Chiết xuất cao từ hoa hồng tươi bằng phương pháp ngâm dầm



Hình 2.11. Sơ đồ quy trình chiết xuất bằng phương pháp ngâm dầm

Phương pháp ngâm dầm: 1000 g cánh hoa tươi cho vào lọ thủy tinh 10 lít có nắp. Tiếp tục cho trực tiếp 2000 mL ethanol với các nồng độ như sau: 50°, 70°, 90°. Hỗn hợp sẽ được ngâm trong 24 giờ, tiếp tục tiến hành lọc hỗn hợp, thu dịch chiết. Cao hoa hồng thu được bằng cách loại bỏ dung môi khỏi dịch chiết bằng thiết bị cô quay chân không. Bên cạnh đó, phần bã cánh hoa hồng sẽ tiếp tục được ngâm, lọc, cô quay, thu cao chiết. Quy trình tiến hành thực hiện lại cho đến khi hầu như không có lượng cao thu được từ dịch chiết. Các cao này sẽ được gom lại để định lượng và được gọi là concrete.

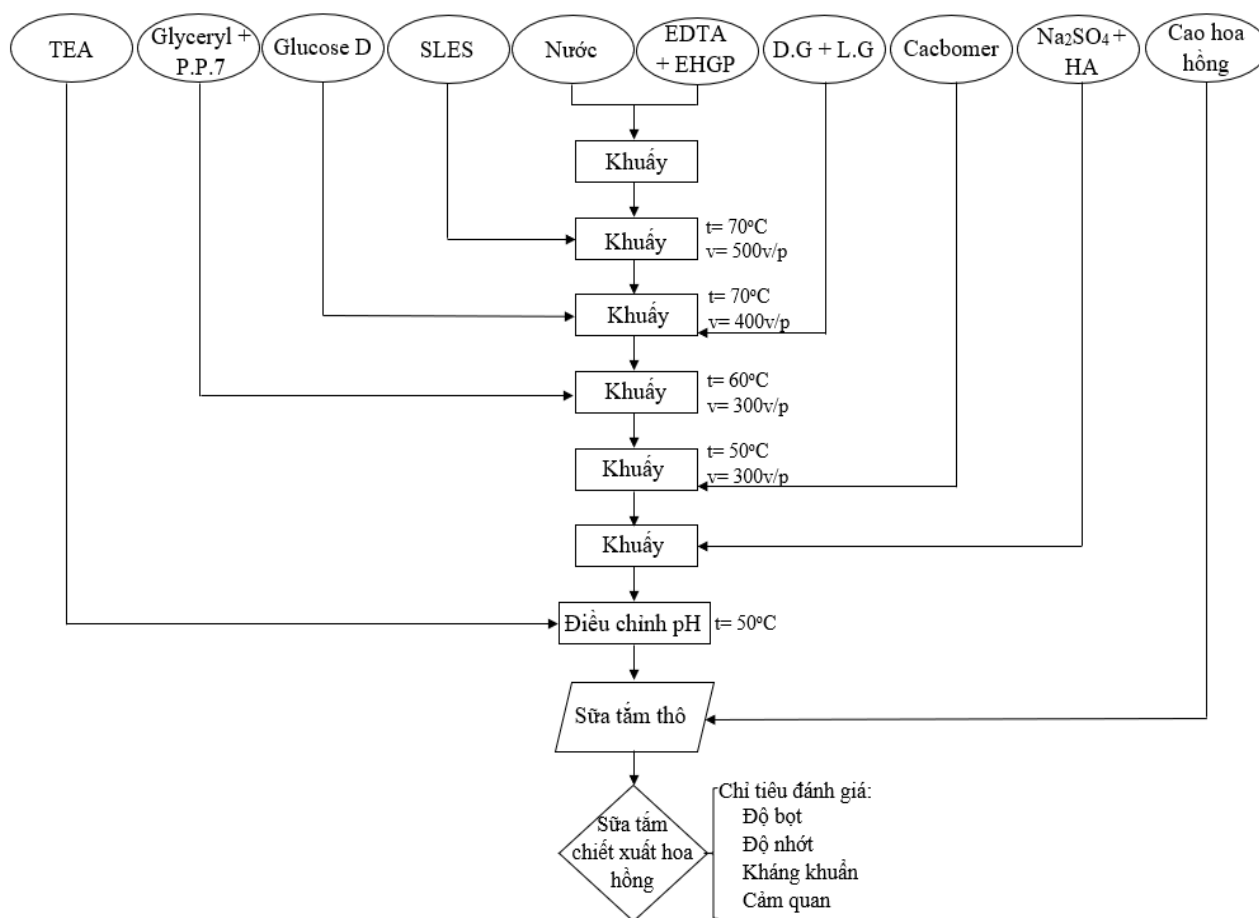
2.3.2.2. Chiết xuất cao từ hoa khô bằng phương pháp soxhlet



Hình 2.12. Sơ đồ quy trình chiết xuất bằng phương pháp Soxhlet

Thuyết minh quy trình: 110 g bột hoa hồng khô được cân và chia nhỏ vào túi lọc, cột chặt mỗi túi 10 g và cho vào hệ thống chiết soxhlet 250 mL của Đức. Dung môi được sử dụng là ethanol với các nồng độ khác nhau: 50°, 70° và 90°. Tỉ lệ giữa nguyên liệu và dung môi là 1:20. Trong suốt quá trình soxhlet cần bọc lớp cách nhiệt để đảm bảo không bị mất nhiệt trong quá trình hồi lưu. Sau khoảng thời gian đun liên tục để chiết kiệt hoàn toàn các hợp chất có trong bột hoa, để dung dịch nguội hoàn toàn, đem lọc lại để đảm bảo sạch cặn và tiến hành cô quay chân không ở 45 °C để loại bỏ hoàn toàn dung môi và thu được cao chiết hoa hồng (Alara *et al.*, 2018).

2.3.3. Quy trình sản xuất sữa tắm



Hình 2.13. Quy trình điều chế sữa tắm

Thuyết minh quy trình: Sau khi EDTA được vào hòa tan vào nước, tiếp tục cho SLES đến khi tan hoàn toàn. Sau đó, cho lần lượt đến hết D.G và L.G vào hỗn hợp. Glyceryl và P.P.7 đã được phối trộn trước được cho vào. Tiếp theo, cho Cacbomer và Glucose D. Các chất Na_2SO_4 , EHGD và HA được cho vào lần lượt, khuấy bằng tay đến khi tan hoàn toàn. TEA được cho vào và điều chỉnh pH về 6,5 thu được sữa tắm thô. Để thu được sữa tắm chiết xuất hoa hồng thêm cao hoa hồng, sản phẩm hoàn chỉnh sẽ được đem đánh giá các chỉ tiêu về độ bọt, độ nhớt, kháng khuẩn và đánh giá cảm quan. Dưới đây là bảng 2.3, thể hiện thành phần và hàm lượng (%) từng chất có trong sản phẩm sữa tắm. Ba chất hoạt động bề mặt (SLES, D.G, L.G) được khảo sát trong 11 mẫu thí nghiệm theo từng hàm lượng khác nhau, và tổng 3 chất trong mẫu đáp ứng đủ 23% tổng hàm lượng theo bảng 2.4.

Bảng 2.3. Bảng thành phần sữa tắm

Tên chất	Hàm lượng (%)	Tên chất	Hàm lượng (%)
Water	55,45	Glucose D	5,00
EDTA	0,25	Cacbomer	2,00
EHGP	0,40	P.P.7	0,75
Glyceryl	12,0	SLES	Khảo sát
HA	0,25	D.G	Khảo sát
Na ₂ SO ₄	0,75	L.G	Khảo sát
TEA	0,15		

Tổng 23%

Bảng 2.4. Bảng khảo sát tỉ lệ 3 CHĐBM

Khảo sát CHĐBM	
Chất	Tỉ lệ
SLES	6%, 8%, 10%
D.G	8%, 10%, 12%
L.G	3%, 5%, 7%

2.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ

2.4.1. Xác định hiệu suất khối lượng cao chiết

Hiệu suất cao chiết được tính dựa trên tổng khối lượng cao thu nhận được trên toàn bộ khối lượng nguyên liệu (Adam *et al.*, 2019).

Công thức sau:

Khối lượng nguyên liệu khô = Khối lượng nguyên liệu ban đầu × (1 – Độ ẩm)

Khối lượng cao khô = Khối lượng cao × (1 – Độ ẩm)

Hiệu suất (%) = $\frac{\text{Khối lượng cao khô}}{\text{khối lượng nguyên liệu khô}} \times 100$

2.4.2. Đánh giá các chỉ tiêu hóa lý của cao chiết

2.4.2.1. Xác định khả năng kháng oxy hoá bằng phương pháp DPPH

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết được đánh giá thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH dựa trên sự thay đổi màu của dung dịch DPPH (0,6 mM) được pha trong methanol (Brand-Williams *et al.*, 1995). DPPH được pha loãng bởi dung môi methanol thu được thuốc thử gốc và lưu giữ lạnh ở nhiệt độ 4 °C trong 24 giờ. Sau đó, dung môi

Methanol được tiếp tục sử dụng để hiệu chỉnh dung dịch DPPH gốc, để dung dịch DPPH có mức hấp thụ 1,10 tại bước sóng 515 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Để xác định hoạt tính khử gốc tự do DPPH, 0,15 mL dung dịch cao chiết (cao chiết đã pha loãng) phản ứng với 2,85 mL dung dịch DPPH đã hiệu chỉnh. Phản ứng được thực hiện ở điều kiện bóng tối trong 30 phút. Độ hấp thụ của dung dịch mẫu sau phản ứng được đo. Mẫu trắng của phép đo được chuẩn bị bằng cách thay 0,15 mL mẫu bằng Methanol. Hoạt tính chống oxy hóa được tính dựa vào đường chuẩn Ascorbic acid và được biểu diễn bằng đơn vị milligram đương lượng Ascorbic acid trên 1 gam nguyên liệu khô (mg AAE/g).

2.4.2.2. *Xác định tổng hàm lượng phenolic*

Tổng hàm lượng poly phenolic được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu (mô tả theo tiêu chuẩn ISO 14502-1: 2005) và được hiệu chỉnh bởi (Kaur *et al.*, 2015). 0,6 mL dung dịch mẫu (cao chiết pha loãng) được cho vào ống nghiệm và trộn đều với 1,5 mL thuốc thử Folin – Ciocalteu pha loãng 10 lần và 1,2 mL Sodium carbonate 7,5%. Hỗn hợp dung dịch được ủ trong bóng tối với thời gian 60 phút. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 765 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Mẫu nước cất cũng được làm mẫu đối chứng. Tổng hàm lượng Phenolic được tính toán dựa vào đường chuẩn gallic acid và được thể hiện dưới đơn vị milligram đương lượng Gallic acid trên 1 gam nguyên liệu khô (mg GAE/g).

2.4.2.3. *Xác định tổng hàm lượng Flavonoid*

Phương pháp so màu nhôm chloride (AlCl_3) (Tanongsaks Sassa-deepaeng *et al.*, 2019) được sử dụng trong phương pháp này để xác định tổng hàm lượng flavonoid (TFC) được xác định như sau. 0,5 mL dung dịch mẫu (cao chiết đã pha loãng) pha với 0,15 mL NaNO_2 5%, ủ tối trong 6 phút ở nhiệt độ môi trường. Tiếp theo, 0,3 mL $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10% được thêm vào, ủ tối 5 phút ở nhiệt độ môi trường. Cuối cùng, 1 mL NaOH 4% và 2 mL nước cất được cho vào, lắc đều và đo độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm bởi thiết bị quang phổ UV-Vis. Tổng hàm lượng Flavonoid được tính toán dựa vào đường chuẩn Quercetin và được thể hiện dưới đơn vị milligram đương lượng Quercetin trên 1 gam nguyên liệu khô (mg QE/g DW).

2.4.3. **Đánh giá sản phẩm**

2.4.3.1. *Xác định độ nhớt*

Trong phương pháp kiểm tra chỉ tiêu độ nhớt, máy đo độ nhớt NDJ – 9S (Biuged, Trung Quốc) đã được sử dụng. Phép đo được thực hiện vào lúc mẫu ở nhiệt độ 22,3 °C

bằng bộ kim số 4 với tốc độ quay của trục chính là 60 vòng/phút. Giá trị độ nhót được trình bày biểu thị các giá trị trung bình cộng thu được từ năm phép đo độc lập (Bujak *et al.*, 2020).

2.4.3.2. Xác định độ ổn định bọt

Phương pháp đo độ ổn định bọt dựa trên tiêu chuẩn Ba Lan PN-ISO 696:1994P (Surface active agents-Measurement of foaming power-Modified Ross-Miles method). Quy trình được thực hiện bằng cách lấy 2,5 g mẫu đem hòa tan cùng 250 mL nước, thu được dung dịch mẫu, sau đó lấy 200 mL dung dịch mẫu đã pha cho vào phễu chiết và phần còn lại cho vào ống đong 500 mL, mở van để dung dịch mẫu rơi từ độ cao 450 mm xuống ống đong chứa sẵn dung dịch mẫu (độ cao tính từ điểm rơi đến điểm tiếp xúc của dịch mẫu). Kết quả cuối cùng được ghi nhận là giá trị trung bình cộng của năm phép đo độc lập (Bujak *et al.*, 2020). Độ ổn định bọt được xác định theo công thức:

Độ ổn định bọt:

$$x = \frac{V_{10}}{V_1} \times 100\%$$

Trong đó:

x : là độ ổn định bọt

V₁ : là thể tích bọt được đo sau 1 phút

V₁₀ : thể tích bọt được đo sau 10 phút

2.4.3.3. Đánh giá cảm quan

Phương pháp đánh giá cảm quan được thực hiện như sau: xác định và chọn ngẫu nhiên 20 đối tượng có độ tuổi từ 20 đến 40 có các vấn đề về da như: mụn lưng, da không đều màu, tối màu. Sản phẩm được dùng trong thời gian 30 ngày. Sau đó tiến hành đánh giá cảm quan với 9 chỉ tiêu về: mùi hương, màu sắc, độ sạch, độ bọt, độ nhót, dưỡng ẩm, trắng da, trị mụn và kích ứng với 5 mức độ đánh giá khác nhau. Dựa trên các chỉ tiêu và độ hài lòng mà sản phẩm đem lại, người dùng sẽ đánh giá vào phiếu đánh giá được nhận sau 30 ngày sử dụng để đánh giá đúng nhất về sản phẩm. Kết quả sẽ được tổng hợp và chuyển về phần trăm mức độ hài lòng dựa trên 100% là thước đo chuẩn.

Bảng 2.5. Đánh giá mức độ hài lòng khi sử dụng sản phẩm

Điểm	Mức độ hài lòng
1 điểm	Hoàn toàn không thích
2 điểm	Không thích
3 điểm	Bình thường

4 điểm	Thích
5 điểm	Hoàn toàn không thích

2.5. XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN

2.5.1. Xác định khả năng đối kháng vi khuẩn bởi phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Hoạt tính kháng lại một số loại vi khuẩn được xác định bởi phương pháp Kirby-Bauer đã được điều chỉnh (Terwee *et al.*, 2021) hay còn gọi là phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Bốn chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn. 20 mL môi trường MHA (Mueller–Hinton agar) được đổ vào mỗi đĩa. Tiếp theo, 100 μ L môi trường nuôi cấy chứa vi khuẩn với nồng độ 10^6 CFU/mL được thêm vào và trang đều trên bề mặt đĩa thạch. Mỗi đĩa, 3 miếng giếng giấy được phân bố. Mỗi giếng có đường kính 6 mm và độ dày với độ dày 0,5 mm. Sau đó, trên mỗi đĩa, 25 μ L mỗi loại dung dịch khác nhau lần lượt bơm vào 3 giếng giấy khác nhau: dung dịch mẫu, đối chứng dương, đối chứng âm. Đối chứng âm là nước, đối chứng dương là kháng sinh Ampicillin (0,1 mg/mL). Sau 24 giờ, phạm vi ức chế của vi khuẩn sẽ được tính bằng cách lấy đường kính ức chế sự phát triển vi khuẩn do dung dịch mẫu tạo nên trừ đi đường kính tạo nên do đối chứng âm.

2.5.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ tối thiểu của dung dịch mẫu có khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn được gọi là MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Giá trị MIC của dung dịch mẫu được đánh giá bởi phương pháp vi pha loãng (Shoaib *et al.*, 2021). Phương pháp xác định MIC được thực hiện trong giá đĩa 96 giếng. Mỗi giếng chứa 50 μ L MHB, 50 μ L môi trường chứa vi khuẩn và 100 μ L dung dịch mẫu. Dung dịch mẫu với nồng độ ban đầu là 10 mg/ mL sau đó sẽ được pha loãng bằng nước với các nồng độ 5 mg/ mL, 2,5 mL, 1,25mL, 0,625 mL. Mỗi giếng sẽ chứa dung dịch mẫu với nồng độ khác nhau. Đối với đĩa sử dụng làm đối chứng dương thay mẫu bằng nước cất. Các giá đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, 20 μ L chỉ thị Resazurin (0,001 g/mL) màu xanh dương đậm được thêm vào. Khi hàng mẫu chuyển sang màu hồng thì chứng tỏ còn tồn tại vi khuẩn sống và ngược lại nếu hàng mẫu không chuyển màu thì mẫu đã kháng được vi khuẩn.

2.6. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.6.1. Phương pháp phân tích headspace GC-MS

Thiết bị Headspace HS-20 (Shimadzu, Nhật Bản). Mẫu được cho vào vial 20 mL, sau đó, mẫu đưa được đưa vào buồng ủ ở 90 °C, thời gian cân bằng 15 phút. Nhiệt độ tiêm mẫu (sample line temp) là 150 °C và nhiệt độ chuyển mẫu (transfer line temp) là 150 °C. Áp suất khí nén 50 kPa. Sau đó, dòng khí sẽ được chuyển tiếp sang chương trình chạy GC-MS.

2.6.2. Phương pháp phân tích GC-MS

Sắc ký khí GC-2030 (Shimadzu, Nhật Bản) được ghép với GCMS-QP2020 (Shimadzu, Nhật Bản). Một cột mao quản Rxi-5MS (dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày phim: 0,25 μ m, Shimadzu, Nhật Bản) đã được sử dụng để phân tích. Nhiệt độ đầu cột: 40 °C giữ trong 2 phút, tăng lên 140 °C với tốc độ 20 °C /phút và giữ trong 2 phút, tăng lên 280 °C với tốc độ 4 °C /phút và giữ trong 2 phút. Nhiệt độ buồng ion là 250 °C. Khí He được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng là 1,78 mL/phút. Chia dòng với tỉ lệ 1:10 (split) và áp suất đầu cột: 100 Kpa.

2.7. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các kết quả được xử lý thông qua phần mềm SPSS 22 (SPSS Inc. Chicago, U.S.A) sử dụng những kỹ thuật thống kê cơ bản. Phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa các chế độ xử lý mẫu và Tukey's Multiple Range test được áp dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa 5%. Tất cả thí nghiệm và phân tích trong nghiên cứu được thực hiện 3 lần.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ĐÁNH GIÁ CÁC THÀNH PHẦN DỄ BAY HƠI CỦA NGUYÊN LIỆU

Thành phần các chất dễ bay hơi chính của nguyên liệu hoa tươi và hoa khô được đánh giá bởi phương pháp headspace GC-MS được thể hiện ở bảng 3.1. Giá trị hương của hoa hồng Damask được tạo bởi thành phần chính là phenylethyl alcohol (Alborzi *et al.*, 2022). Hàm lượng chất này chiếm 77,22% đối với hoa tươi và 54,69% đối với hoa khô. Kết quả phân tích cho thấy thành phần dễ bay hơi trong hoa tươi là 42 chất trong khi đó hoa khô là 39 chất. Một số chất có trong kết quả phân tích hoa tươi nhưng lại không có trong hoa khô vì trong quá trình sấy các chất này đã bay hơi vì nhiệt độ. Bên cạnh đó, một số chất trong hoa khô lại không có trong hoa tươi vì khi hoa tươi sẽ chứa hàm lượng các chất nhẹ nhiều hơn nên phần trăm hàm lượng các chất này rất ít nên không xuất hiện khi phân tích. Sau khi sấy, các chất dễ bay hơi ở hương đầu sẽ giảm hoặc mất đi nên hàm lượng của các chất nền này sẽ tăng lên. Hoa khô xuất hiện thêm một thành phần hương quan trọng: 3-Hexen-1-ol, acetate, (Z)- (17,04%) được mệnh danh là nốt “hương xanh” mà hoa tươi không có (X. Li *et al.*, 2013). Chính vì vậy, hoa tươi và hoa khô có mùi đặc trưng và độ ngọt khác biệt.

Bảng 3.1. Bảng Thành phần dễ bay hơi trong hoa tươi và hoa khô

Thành phần	Hàm lượng (%)	
	Hoa tươi	Hoa khô
Phenylethyl Alcohol	77,22	54,69
Acetic acid	2,78	6,77
Chloroform	1,8	0,39
Pentanal	1,59	0,19
Nonacosane	1,39	1,01
9-Eicosene, (E)-	0,96	2,86
Bornylene	0,96	2,86
Tridecane	0,76	0,02
Phenethyl acetate	1,23	7,82
1-Hexanol	0,7	0,03
Benzyl alcohol	0,54	0,09
2-Ethylhexanol	0,53	0,07
Ethyl Acetate	0,35	0,27
Hexanal	0,33	0,02
Nonanal 1	0,31	0,03
Hyacinthin	0,3	0,27
Butyrolactone	0,12	0,02
Dodecane	0,02	0,03
(E)-2-Hexenal	1,56	-

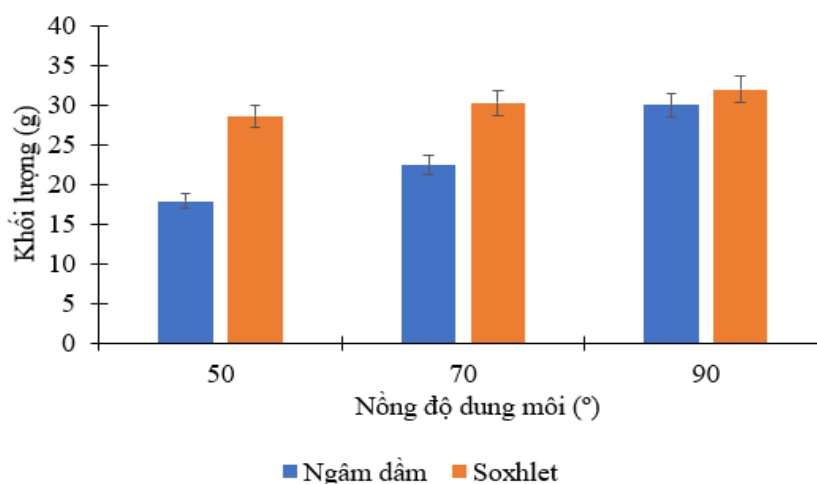
Thành phần	Hàm lượng (%)	
	Hoa tươi	Hoa khô
Eicosane	1,51	-
Cis-hex-2-en-1-ol	0,51	-
Furfural	0,44	-
cis-3-Hexenyl acetate	0,41	-
cis-3-Hexenyl acetate	0,41	-
1-Penten-3-ol	0,32	-
2-Methylbutanal	0,31	-
Decane, 2,3,5,8-tetramethyl-	0,3	-
L-(-)-Menthol	0,22	-
Benzaldehyde	0,2	-
Decanal	0,17	-
Acetoin	0,16	-
2-Phenyl-2-propanol	0,16	-
Trans-(+)-carveol	0,15	-
3-Methylbutanal	0,13	-
2-Phenylethyl formate	0,13	-
Pentadecane, 8-heptyl-	0,13	-
cis-13,16-Docosadienoic acid	0,11	-
Valeric acid	0,11	-
3-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-	-	17,04
3-Hexen-1-ol, (Z)-	-	2,3
Heneicosane	-	1,79
Germacrene D	-	0,45
Dihydro-.beta.-ionol	-	0,35
Sec-Butanol	-	0,27
Acetic acid, butyl ester	-	0,27
1-Oxaspiro[4.5]dec-6-ene, 2,6,10,10-Tetramethyl-	-	0,19
Iso butyl alcohol	-	0,16
n-Amyl acetate	-	0,14
2-Hexen-1-ol, (E)-	-	0,12
1-Butanol	-	0,11
1-Hexyl acetate	-	0,8
<i>α</i> -Pinene	-	0,09
Malonic acid	-	0,08
<i>α</i> -Farnesene	-	0,07
<i>δ</i> -cadinene	-	0,07
1-Docosanol	-	0,07
1-Pentanol	-	0,05
3-Cyclohexen-1-ol, acetate	-	0,05

3.2. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CAO CHIẾT

3.2.1. Đánh giá hàm lượng cao chiết

1 kg cánh hoa hồng tươi sau khi sấy sẽ thu được 110 g cánh hoa hồng khô. Cánh hoa hồng tươi sẽ được chiết xuất bởi phương pháp ngâm dầm và cánh hoa hồng khô sẽ được chiết xuất bởi phương pháp soxhlet. Hình 3.1 thể hiện ảnh hưởng của dung môi ethanol (50°, 70°, 90°), nguyên liệu và phương pháp chiết đến lượng cao thu nhận.

Nồng độ ethanol càng cao sẽ thu được lượng cao càng nhiều. Khi chiết xuất với ethanol 90°, khối lượng cao thu được là nhiều nhất: 31,99 g với Soxhlet; 29,79 g với ngâm dầm. Khi nồng độ ethanol tăng, độ phân cực của dung dịch giảm. Do đó, khối lượng cao thu được thấp nhất ở ethanol 50°: 17,91 g đối với phương pháp ngâm dầm và 28,58g đối với phương pháp soxhlet. Các thành phần trong cánh hoa chứa nhiều sáp và paraffin, các hợp chất lipid, các thành phần tinh dầu nên đối với dung môi càng chứa nhiều nước thì độ hòa tan của các chất trong và trên cánh hoa sẽ bị giảm (X. Li *et al.*, 2013).



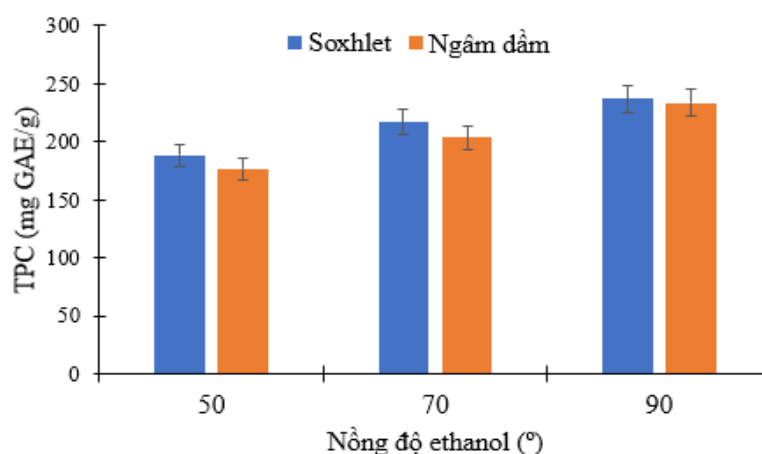
Hình 3.1. Khối lượng cao chiết từ hai phương pháp ngâm dầm và soxhlet

Nguyên liệu tươi sau khi sấy, dưới tác dụng nhiệt, một số thành phần trong nguyên liệu sẽ thất thoát. Thêm vào đó, phương pháp ngâm dầm được xem là một phương pháp trích kiệt. Kết hợp giữa hai yếu tố, nguyên liệu tươi ngâm dầm theo lý thuyết phải thu được lượng cao nhiều hơn. Tuy nhiên, trong khảo sát này, kết quả cho thấy nguyên liệu khô chiết xuất bởi phương pháp soxhlet lại cho khối lượng cao nhiều hơn. Điều này có thể giải thích là dưới tác dụng nhiệt giúp các chất có trong cánh hoa hòa tan tốt vào trong dung môi hơn. Sự khác biệt này giảm dần khi tăng nồng độ cồn. Điều này phù hợp, như đã lý giải ở trên, ethanol 90° đã có khả năng hòa tan tốt, nên ảnh hưởng của nhiệt đến chiết suất không đáng kể (Baydar *et al.*, 2013).

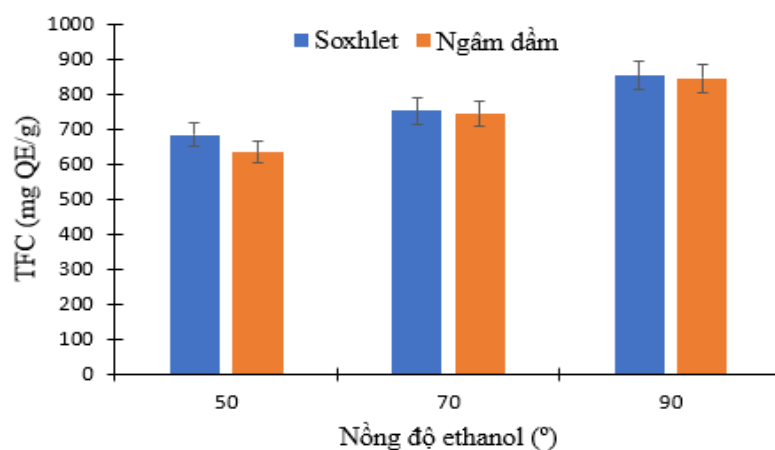
3.2.2. Đánh giá chỉ tiêu hóa lý

3.2.2.1. Xác định hàm lượng TPC và TFC

Hàm lượng TFC và TPC chịu sự tác động của các thông số chiết xuất được thể hiện ở hình 3.2 và 3.3. Tổng hàm lượng TPC và TFC ở cả hai phương pháp chiết đều thu được cao nhất với cao chiết 90° với TPC, TFC lần lượt là: 236,667 mg GAE/g, 844,444 mg QE/g ứng với phương pháp ngâm dầm, 233,1318 mg GAE/g, 853,4722 mg QE/g ứng với phương pháp soxhlet. Và thấp nhất tại cao chiết 50° với TPC, TFC lần lượt là: 188,5019 mg GAE/g, 634,0278 mg QE/g ứng với phương pháp ngâm dầm, 176,3958 mg GAE/g, 683,3333 mg QE/g ứng với phương pháp soxhlet. Các hợp chất polyphenolic và flavonoid là hai nhóm chất ảnh hưởng cũng như quyết định đến khả năng kháng oxy hóa (Gong *et al.*, 2012).



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nguyên liệu và phương pháp chiết đến hàm lượng TFC

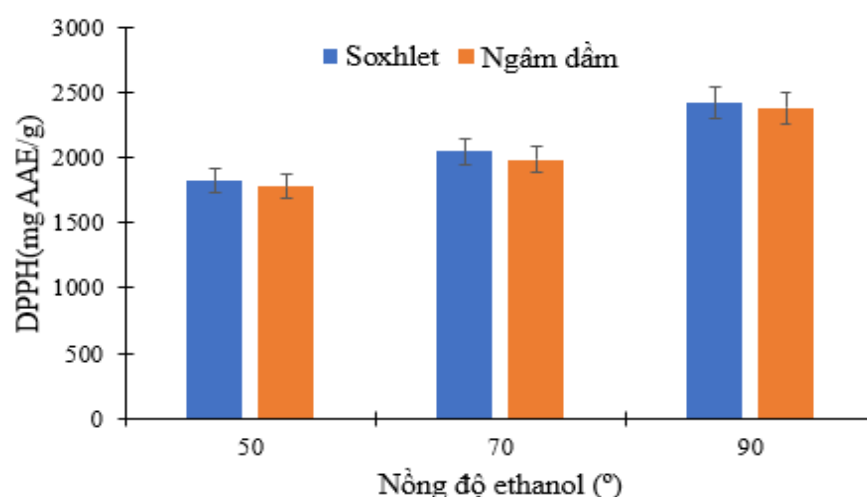


Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nguyên liệu và phương pháp chiết đến hàm lượng TFC

(Yang *et al.*, 2017) đã nghiên cứu về trà hoa hồng, như là một loại nước uống có khả năng kháng oxy hóa. Trong nghiên cứu, tác giả cũng đã chứng minh nước nóng không chiết xuất hoàn toàn các hợp chất chống oxy hóa hiện diện trong cánh hoa hồng. Vì điều này, khi chiết các hoạt chất có hoạt tính được khuyến nghị là nên sử dụng dung môi hữu cơ. Thêm vào đó, (Baydar *et al.*, 2013) cũng đã chứng minh rằng nồng độ ethanol càng lớn thì hiệu suất chiết xuất càng cao do sự thay đổi độ phân cực của dung môi. Vì vậy, khi chiết xuất cùng ethanol 90° thì TPC, TFC sẽ cho giá trị cao nhất ở cả 2 phương pháp. Yếu tố dùng nhiệt khi chiết xuất cũng giúp cho việc thu được hàm lượng các chất cao hơn là khi chiết lạnh (Baydar *et al.*, 2013). Chính vì vậy, phương pháp soxhlet sẽ cho hiệu suất cao hơn.

3.2.2.2. Xác định khả năng kháng oxy hóa DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa của phenolic và flavonoid diễn ra theo nhiều cơ chế, trong đó có cơ chế bắt gốc tự do (Balasundram *et al.*, 2006). Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết sẽ có mối tương quan với hàm lượng TFC và TPC. Lượng TFC và TPC tăng thì khả năng kháng oxy hóa tăng. Trong đó, TPC đóng vai trò ảnh hưởng chính (Custódio *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2012). Kết quả cho thấy, điều kiện chiết xuất sẽ ảnh hưởng đến khả năng kháng oxy hóa tương tự như hiệu suất thu nhận TPC và TFC. Nhận định này phù hợp với nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết soxhlet ảnh hưởng đến TPC, TFC và DPPH của trích dẫn.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nguyên liệu và phương pháp chiết đến hàm lượng DPPH

Trong hình 3.4 đã biểu diễn các giá trị DPPH của 3 nồng độ từ 2 phương pháp ngâm đậm và soxhlet. Phương pháp ngâm đậm cho khả năng kháng oxy hóa (DPPH) ở

3 nồng độ dung môi 50°, 70° và 90° lần lượt là: 1779,27, 1981,95, 2382,1 ± 0,05 mg AAE/g. Phương pháp ngâm dầm cho khả năng kháng oxy hóa (DPPH) ở 3 nồng độ dung môi 50°, 70° và 90° lần lượt là: 1818,7, 2046,23, 2416,62 ± 0,05 mg AAE/g. Kết quả cho thấy, cao chiết 50° thể hiện chống oxy hóa thấp nhất từ 2 phương pháp là: 1779,27 mg AAE/g với phương pháp ngâm dầm, 1818,7 mg AAE/g với phương pháp soxhlet, và cao chiết 90° cho giá trị kháng oxy hóa cao nhất ở 2382,1 mg AAE/g với phương pháp ngâm dầm. Các cao chiết thu nhận được từ phương pháp ngâm dầm và soxhlet thể hiện sự tăng dần giá trị kháng oxy hóa của cao chiết, nồng độ dung môi chiết xuất càng cao thì khả năng kháng oxy hóa càng mạnh (Liu *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2017)

3.2.3. Đánh giá thành phần dễ bay hơi

3.2.3.1. Cao chiết thu nhận từ phương pháp ngâm dầm

Thành phần cấu tử dễ bay hơi trong cao chiết với ethanol 50°, 70°, 90° lần lượt là: 28, 20 và 16 chất được thể hiện ở phụ lục B1, B2, B3. Nồng độ ethanol càng cao thì số lượng thành phần cấu tử chất dễ bay hơi thu được càng ít. Hàm lượng chất chính Phenylethyl alcohol tăng từ 41,74% đến 72,68% khi tăng nồng độ ethanol. Với giá trị 72,68% hợp chất Phenylethyl alcohol thu được so với các nghiên cứu về hoa hồng trên thế giới, giá trị này tương đối cao. Thành phần dễ bay hơi chính đối với giống hoa hồng Damask thu nhận tại Đà Lạt là phenylethyl alcohol, acetic acid, furfural, formic acid (bảng 3.4). Ngoài phenylethyl alcohol, các hợp chất quan trọng trong cao chiết được nghiên cứu bởi (Kurkcuoglu *et al.*, 2003): Heneicosane, nonadecane, 1-nonadecene cũng có trong cao chiết.

Bảng 3.2. Các thành phần cấu tử dễ bay hơi của cao chiết thu nhận từ phương pháp ngâm dầm

STT	Tên chất	Nồng độ Ethanol		
		50°	70°	90°
		Hàm lượng (%)		
1	Phenylethyl Alcohol	41,74	56,44	72,68
2	Acetic acid	17,79	25,55	18,67
3	Furfural	29,17	12,17	5,58
4	Formic acid	2,8	2,19	0,86
5	Butyrolactone	0,24	0,7	0,39
6	Benzeneacetaldehyde	1,09	0,39	0,32

3.2.3.2. Cao chiết thu nhận từ phương pháp Soxhlet

Đối với phương pháp soxhlet, nồng độ ethanol càng cao thì thành phần cấu tử dễ bay hơi càng nhiều. Cao chiết thu được với ethanol 50° chứa 34 chất, ethanol 70° là 35

chất, ethanol 90° là 45 chất (phụ lục B4, B5, B6). Các hợp chất dễ bay hơi trong thành phần cao chiết được thể hiện trong bảng 3.5 Thành phần chính phenyl ethyl ancol thu được cao nhất khi chiết với cồn 90° là 74,14%, thấp nhất là ethanol 50° với 26,33%. Đối với cao chiết thu từ phương pháp soxhlet, mùi hương sẽ mang tính chất ngọt hơn do hàm lượng của hợp chất furfural tăng lên đáng kể. Ngoài phenylethyl alcohol, các hợp chất quan trọng trong cao chiết được nghiên cứu bởi (Kurkcuoglu *et al.*, 2003): Heneicosane, nonadecane, 1-nonadecene cũng có trong cao chiết. Nonadecane chỉ xuất hiện ở 70° và 90°. Hai hợp chất, Heicosane và 1-Nonadecene xuất trong tất cả các cao chiết và nhiều nhất là trong cao 50°.

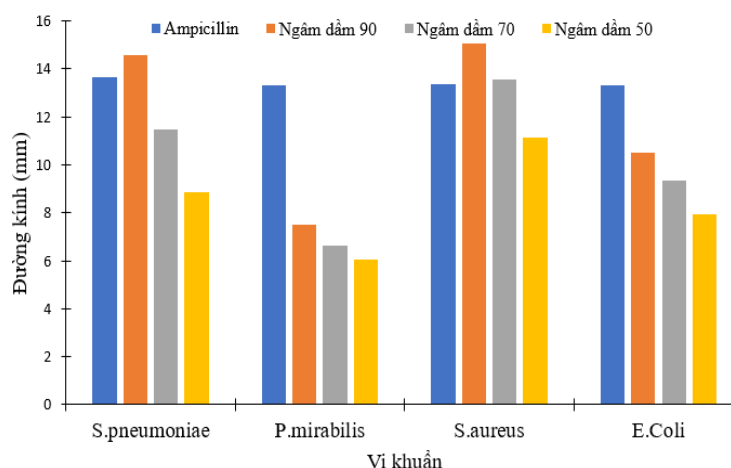
Bảng 3.3. Các thành phần cấu tử dễ bay hơi của cao chiết thu nhận từ phương pháp Soxhlet

STT	Tên chất	Nồng độ Ethanol		
		50°	70°	90°
		Hàm lượng (%)		
1	Phenylethyl Alcohol	26,33	29,49	74,14
2	Furfural	40,07	47,74	13,81
3	Acetic acid	5,22	3,18	2,79
4	Formic acid	4,93	4,76	1,95
5	Urethane			0,82
6	Nonadecane		0,79	0,62
7	Heneicosane	2,32	0,51	0,58
8	1-Nonadecene	1,71	0,61	0,47

3.2.4. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

3.2.4.1. Xác định khả năng đối kháng vi khuẩn của cao chiết

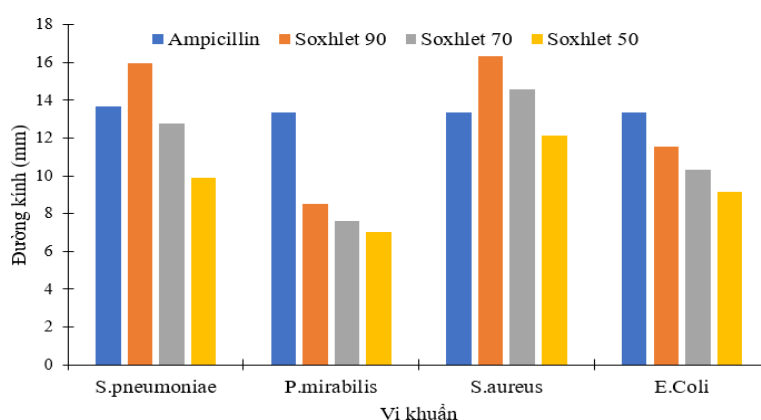
Trong hình 3.5 đã thể hiện khả năng đối kháng vi khuẩn của các cao chiết 50°, 70°, 90° so với chất đối chứng là Ampicillin.



Hình 3.5. Khả năng đối kháng vi khuẩn của cao chiết ngâm dầm

Đối với tất cả 4 loại vi khuẩn thì cao chiết 90° có khả năng đối kháng cao nhất lần lượt là: 15,05 mm với *S.areus* so với mẫu đối chứng là 13,67 mm, 14,57 mm với *S.pneu* so với mẫu đối chứng là 13,35 mm, phạm vi đối kháng vi khuẩn của cao chiết đều cao hơn chất đối chứng. Cao chiết 50° có phạm vi đối kháng thấp nhất ở nhất ở loại khuẩn sau: 6,03 mm với *P.mirabillis* so với mẫu đối chứng là 13,33 mm. Nhìn chung, kết quả cho thấy khả năng đối kháng vi khuẩn của cao chiết ngâm dầm có xu hướng tăng dần phạm vi ức chế theo nồng độ dung môi chiết xuất. Nồng độ dung môi càng cao khả năng đối kháng vi khuẩn càng mạnh.

Khả năng đối kháng vi khuẩn của các cao chiết soxhlet 50°, 70°, 90° so với chất đối chứng là Ampicillin được thể hiện trong bảng 3.6



Hình 3.6. Khả năng đối kháng vi khuẩn của cao chiết soxhlet

Đối với tất cả 4 loại vi khuẩn thì cao chiết 90° có khả năng đối kháng cao nhất lần lượt là: 16,35 mm với *S.areus*, 15,97 mm với *S.pneu*, 11,53 mm với *E.coli*, 8,53 mm với *P.mirabillis*. Cao chiết 50° có khả năng đối kháng thấp nhất ở 4 loại khuẩn sau: 12,15 mm với *S.areus*, 9,87 mm với *S.pneu*, 9,13 mm với *E.coli*, 7,03 mm với *P.mirabillis*. Nhìn chung, kết quả cho thấy khả năng đối kháng vi khuẩn của cao chiết soxhlet có xu hướng tăng phạm vi ức chế theo nồng độ dung môi chiết xuất. Nồng độ dung môi càng cao khả năng đối kháng vi khuẩn càng mạnh.

3.2.4.2. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết hoa hồng Damask

Cao 90° có hàm lượng phenylethyl alcohol nhiều nhất. Điều này cũng có thể giải vì sao cao 90° lại có khả năng kháng khuẩn cao nhất. Thuộc tính kháng khuẩn của các alcohol đã được biết đến từ rất lâu (Ulusoy *et al.*, 2009). Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết còn được quyết định bởi các hợp chất và sự hiện diện của chất chuyển hóa thứ cấp (như phenolics, flavonoid và tinh dầu ...). Mà theo kết quả phân tích đánh giá trên, cao 90° đều có hàm lượng các chất này cao nhất, cao 50° là thấp nhất.

(Baydar *et al.*, 2013) cũng đã chứng minh khả năng kháng khuẩn của cao chiết dung dịch ethanol. Các vi khuẩn gram dương sẽ bị ức chế ở mức nồng độ tối thiểu thấp hơn các vi khuẩn gram âm. Vì lớp màng của vi khuẩn gram âm bao gồm phospholipids and lipopolysaccharides, đóng vai trò quan trọng chống lại các hoạt chất kháng khuẩn.

Theo nghiên cứu của (Ulusoy *et al.*, 2009), nồng độ ức chế tối thiểu của cao hoa hồng đối với vi khuẩn từ 20mg/mL trở lên, trong khi nồng độ ức chế tối thiểu của tất cả các cao chiết thu được từ hoa hồng Damask (Lâm Đồng, Việt Nam) là từ 10mg/mL trở xuống. Điều đó chứng tỏ tất cả các cao chiết đều có khả năng ức chế vi khuẩn mạnh mẽ.

Bảng 3.4. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết

Vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) mg/mL					
	Phương pháp Ngâm đậm			Phương pháp soxhlet		
	Ethanol 50°	Ethanol 70°	Ethanol 90°	Ethanol 50°	Ethanol 70°	Ethanol 90°
<i>S.pneumoniae</i>	2.5	2.5	5	2.5	1.25	1.25
<i>S.aureus</i>	0.625	0.625	0.312	0.312	0.156	0.156
<i>E.coli</i>	10	5	2.5	5	2.5	1.25
<i>P.mirabilis</i>	10	10	10	10	10	10

Nồng độ ức chế tối thiểu được thể hiện trong trong bảng 3.4. Tất cả các cao chiết đều có khả năng ức chế mạnh mẽ đối với con *S.aureus* và *S.pneumoniae*, cao nhất là cao chiết ethanol 70°, 90° thu được bởi phương pháp soxhlet, chỉ với nồng độ 1,25 và 0,156 mg/mL. Đối ,với vi khuẩn *Ecoli*, cao chiết thu được từ phương pháp soxhlet bởi dung môi ethanol 90° có khả năng ức chế mạnh nhất ở 1,25 mg/mL.

3.3. KHẢO SÁT VÀ ĐÁNH GIÁ SẢN PHẨM

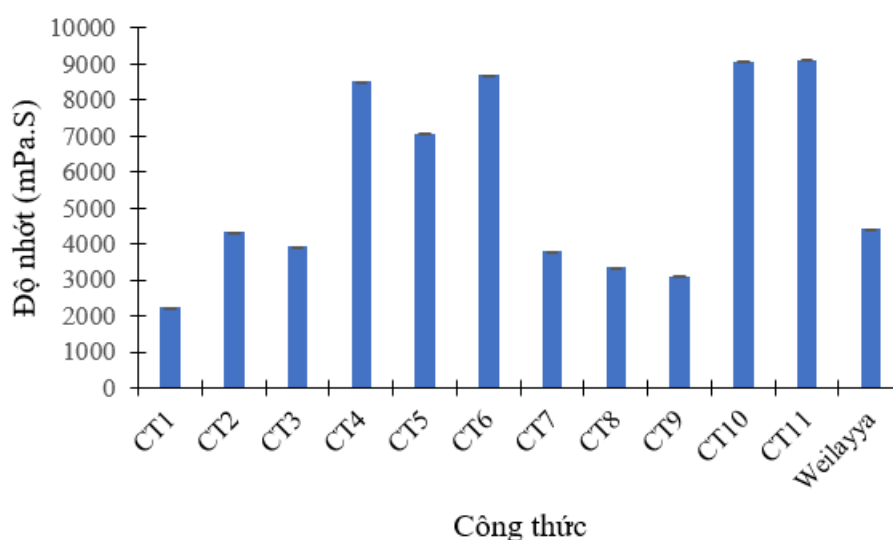
11 công thức sản phẩm khảo sát được thiết lập theo sự thay đổi hàm lượng của 3 chất hoạt động bề mặt đóng vai trò tạo bọt và ổn định bọt. Mỗi chất hoạt động sẽ có giá trị khác nhau về độ nhớt, khả năng tạo bọt, mức độ lớn của bọt, độ ổn định bọt và khả năng làm sạch cũng như khả năng kích ứng da khác nhau.

Bảng 3.5. Khảo sát 3 CHĐBM

STT	Hàm lượng %			STT	Hàm lượng %		
	SLES	D.G	L.G		SLES	D.G	L.G
1	6	10	7	7	4	12	7
2	8	10	5	8	12	8	3
3	10	10	3	9	6	8	9
4	8	8	7	10	10	12	1
5	8	12	3	11	10	8	5
6	6	12	5				

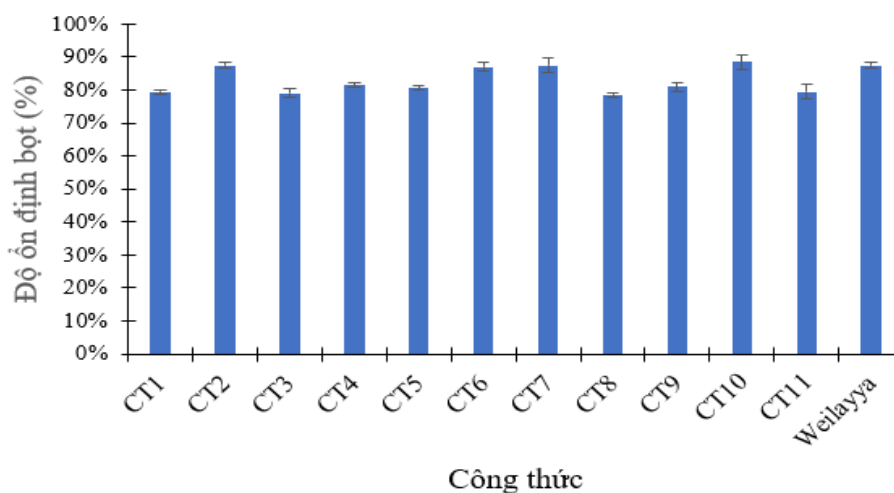
3.3.1. Độ nhớt

Hình 3.7 thể hiện mức độ đặc lỏng của sản phẩm thay đổi theo sự thay đổi hàm lượng của ba chất tạo bọt. Trong suốt quá trình phối trộn và kết quả đo độ nhớt cho thấy, các chất tạo bọt có tác dụng lẫn nhau, không tác động riêng lẻ đến độ nhớt của sản phẩm. Lúc đầu khi cho SLES vào độ nhớt thay đổi không đáng kể, nhưng khi cho lần lượt hai chất tạo đặc tiếp theo, độ nhớt của sản phẩm thay đổi rất lớn. Có một số sản phẩm quá đặc làm cho chất tạo đặc cacbomer không trơ nở hết khả năng của chúng, dẫn đến kết cấu sản phẩm không đồng nhất. Các sản phẩm có độ nhớt cao và không đồng nhất là CT 4, CT 5, CT 6, CT 10, CT 11 với giá trị 7 000 mPa.S đến gần 10 000 mPa.S. CT 2 được chọn là công thức tối ưu vì mức độ đồng nhất và độ nhớt của sản phẩm (4 320 mPa.S) gần với độ nhớt của sản phẩm đối chứng Weilayya (4 420 mPa.S).



Hình 3.7. Độ nhớt của các công thức

3.3.2. Độ ổn định bọt

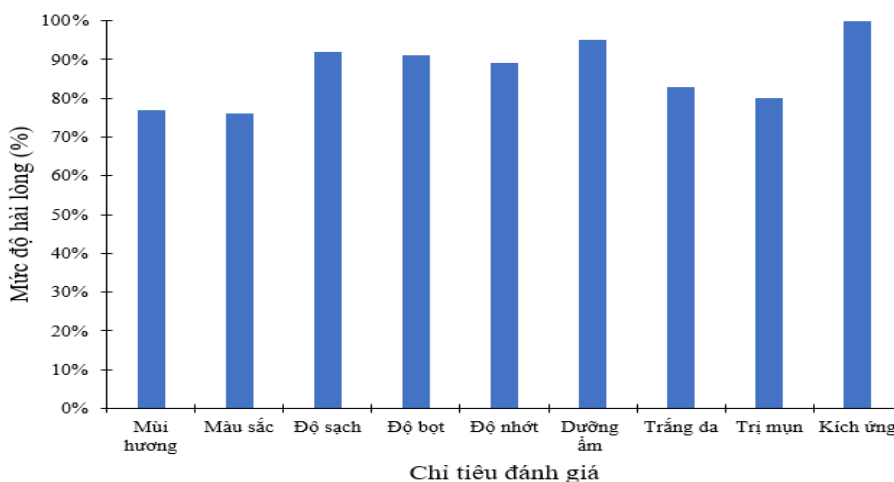


Hình 3.8. Độ ổn định bọt

Độ ổn định bọt của sản phẩm sau 10 phút được thể hiện trong hình 3.8. Mẫu cao nhất là CT10 với 90%, và mẫu thấp nhất là CT3 và CT8 với 78%. So với mẫu đối chứng là Weillayya có độ bọt là 88% thì mẫu có độ bọt tương đương là mẫu CT2 với 88%. CT2 được chọn để để phối cao chiết hoa hồng tạo ra sản phẩm sữa tắm thành phẩm.

3.4. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM HOÀN THIÊN

3.4.1. Đánh giá cảm quan



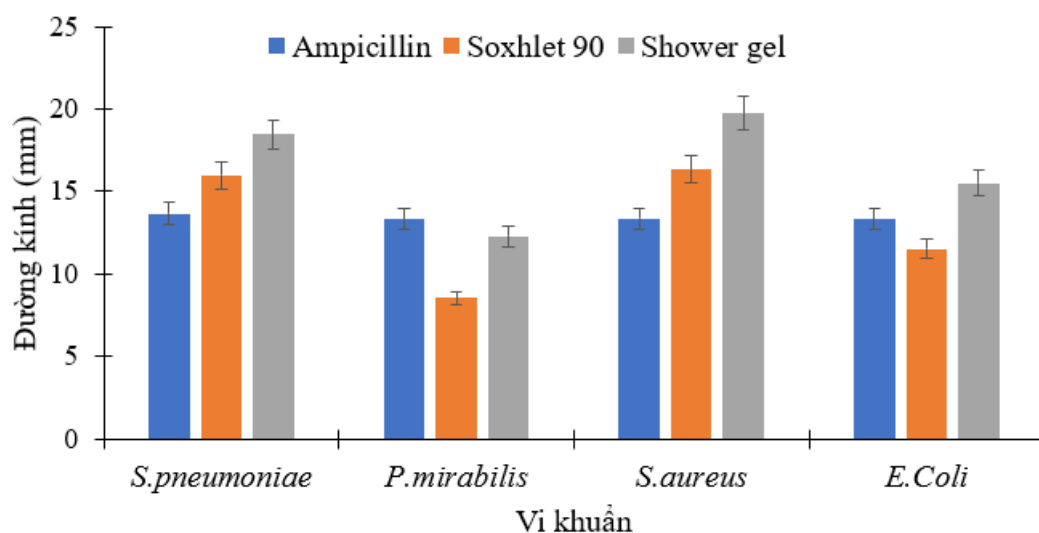
Hình 3.9. Kết quả đánh giá cảm quan

Trong hình 3.9 đã trình bày kết quả trung bình của 9 chỉ tiêu từ 20 người đánh giá. Kết quả cho thấy rằng trong 9 chỉ tiêu đã đánh giá thì sản phẩm đã đáp ứng hoàn toàn các chỉ tiêu trên 70%. Trong đó có 4 chỉ tiêu cao nhất đáp ứng từ 90% trở lên là độ bọt, độ sạch, dưỡng ẩm và kích ứng lần lượt là: 91%, 92% và 95%, nổi bật hơn hết là khả năng kích ứng của sản phẩm đạt 100% tuyệt đối từ 20 người đã đánh giá. Có 3 chỉ tiêu đánh ứng được từ 80% đến 89% là các chỉ tiêu sau: trị mụn 80%, trắng da 83% và độ nhớt là 89%. Trong đó có 2 chỉ tiêu có số điểm đánh giá thấp nhất là màu sắc và khả năng lưu mùi hương lần lượt là: 76% và 77%. Là một sản phẩm chiết xuất từ thiên nhiên không tránh khỏi việc màu sắc bị biến đổi và mùi hương sẽ không lưu lại trên da khi vừa tắm xong. Sản phẩm cần được nghiên cứu thêm về công nghệ cũng như thêm các hợp chất có khả năng lưu mùi.

3.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Cao chiết hoa hồng sẽ được phối vào CT2 với nồng độ là 10 mg/mL. Sản phẩm sau khi thành phẩm sẽ được đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn dựa trên đường kính ức chế. Kết quả ức chế vi khuẩn của sữa tắm được so sánh với chất kháng sinh Ampicillin.

Hình 3.10 so sánh khả năng đối kháng vi khuẩn của sản phẩm thành phẩm với cao soxhlet 90°, chất kháng sinh Ampicillin. Đường kính ức chế của sữa tắm cao hơn so với cao chiết thông thường bởi vì trong thành phần sữa tắm chứa các CHĐBM có khả năng diệt khuẩn. Sản phẩm thể hiện khả năng kháng khuẩn nổi trội với 2 chủng vi khuẩn *S.aureus* và *S.pneumoniae*.



Hình 3.10. Đường kính ức chế của sữa tắm đối với vi khuẩn

Hàm lượng tối thiểu của sản phẩm có khả năng ức chế vi khuẩn được thể hiện ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Nồng độ ức chế tối thiểu của sữa tắm

Mẫu	Vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (mg/mL)			
		<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.mirabillis</i>
Cao soxhlet 90°		1,25	0,156	1,25	10
Mẫu sữa tắm		0,625	0,156	0,625	5

Kết quả cho thấy có sự tương đồng với phạm vi ức chế vi khuẩn của sản phẩm trên. Với hàm lượng 0,156 mg/mL, sản phẩm đã có khả năng ức chế chủng *S.aureus*. Với chủng *E.coli* và *Spneumoniae* sẽ được ức chế ở nồng độ đều là: 0,625 mg/mL. Với kết quả của bảng 3.6 cho thấy sữa tắm hoàn toàn có khả năng ức chế vi khuẩn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Hoa hồng Damask được thu hái vào rạng sáng tại vườn The Seed Graden (huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam). Trong nghiên cứu này chất lượng của cao chiết hoa hồng thu nhận được từ hoa tươi áp dụng phương pháp ngâm dầm, hoa khô áp dụng phương pháp soxhlet với các nồng độ ethanol khác nhau. Chất lượng hoa được đánh giá thành phần dễ bay hơi bằng phương pháp headspace/GC-MS. Chất lượng cao chiết được đánh giá bởi một số chỉ tiêu như: hiệu suất, khả năng chống oxy hóa, khả năng kháng khuẩn, tổng hàm lượng tổng polyphenol, hàm lượng tổng flavonoid và các thành phần cấu tử dễ bay hơi GC-MS, hoạt tính sinh học. Ngoài ra, sản phẩm sữa tắm điều chế từ 11 công thức được đánh giá: độ ổn định bọt, độ nhớt, cảm quan và kháng khuẩn. Theo kết quả cho thấy, hiệu suất cao đạt được giá trị cao khi chiết xuất với cồn 90°. Khi đó, khả năng kháng oxy hóa mạnh đạt được cao chiết xuất với ethanol 90°: 2416,62 mg AAE/g với phương pháp ngâm dầm. Tổng hàm lượng polyphenol đạt giá trị cao nhất từ cồn 90°: 236,667 mg GAE/g đối với phương pháp ngâm dầm. Và tổng hàm lượng và flavonoid cũng đạt giá trị cao nhất thu nhận được từ cao 90° từ phương pháp soxhlet: 853,4722 mg QE/g. Kết quả thể hiện sự khác biệt về các thông số hóa lý từ thu được từ nguyên liệu tươi và không không đáng kể. Thành phần cấu tử dễ bay hơi, được phân tích bởi GC-MS cho thấy cao chiết ethanol 90° cho hàm lượng chất phenylethyl ancolol đạt giá trị cao, đối với cả phương pháp ngâm dầm và soxhlet lần lượt là: 72,68%, 74,14%. Tất cả các cao chiết ở cả hai phương pháp đều cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus*, đặc biệt là cao chiết ethanol 50° thu được từ phương pháp soxhlet với nồng độ ức chế tối thiểu là 0,165 mg/mL. Sản phẩm sữa tắm có độ nhớt cao nhất là CT10, sản phẩm có độ ổn định bọt cao nhất là CT2 là. Sữa tắm cho thấy khả năng kháng khuẩn ở tất cả các vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn *S.aureus* ở 0,156 mg/mL.

2. KIẾN NGHỊ

Cao chiết hoa hồng ngày càng được quan tâm và ứng dụng vào các sản phẩm mỹ phẩm. Chính vì vậy nó cần được nghiên cứu sâu hơn: Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn, đánh giá khả năng làm trắng da, khảo sát các quy trình và các công thức tạo sản phẩm từ cao chiết hoa hồng.