

Chương 1. TỔNG QUAN ĐỀ TÀI

1.1. TỔNG QUAN VỀ TRÀM NĂM GÂN



Hình 1.1. Thân cây, giải phẫu hoa và hoa Tràm năm gân

Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) thường được gọi là cây Tràm lá rộng hay niaouli, là một loại cây có kích thước trung bình thuộc họ Đào Kim nương. Có nguồn gốc từ Úc được du nhập về Việt Nam từ những năm 1990.

Đây là một cây thân gỗ cao 8-15 m. Vỏ màu xám, nâu hoặc trắng, lúc đầu có nhiều lớp, bóng, khi trưởng thành vỏ cứng lại, trở thành nhiều lớp xù xì, thân có nhiều nhánh nhỏ hơi rủ xuống. Lá hình mác giống lá tre hoặc lá rộng, dài 7-8 cm và rộng 2 cm. Hoa có màu trắng, kem hoặc xanh lục vàng, mọc thành chùm trên ngọn cây, dài 3-7 cm, ở đầu cành và nở ngược. Hoa hình trụ, có 8 đến 20 chùm hoa, mỗi chùm gồm 3 hoa. Quả tròn và mọc dọc theo cành, đường kính từ 2 đến 2.8 mm.

1.1.1. Nguồn gốc

Tràm năm gân được phát hiện và tìm thấy đầu tiên từ bờ biển phía đông nước Úc, đặc biệt là Queensland và New South Wales. Chúng được nhập khẩu vào các quốc gia ven biển Thái Bình Dương như Papua New Guinea, Irian Jaya và New Caledonia của Indonesia. Ở Úc và Papua New Guinea, loài này mọc và phát triển mạnh ở vùng đất thấp thường có độ cao không quá 100 m so với mực nước biển và vĩ độ 8-34° phía nam. Loại cây này có thể phát triển ở những vùng có lượng mưa hàng năm từ 400-650 mm. Khu vực Papua New Guinea, cây tràm thường mọc trên đất phù sa giàu chất hữu cơ. Vào mùa mưa, các vùng đất này thường bị ngập sâu trên 1m. Vùng New Caledonia, tràm được tìm thấy trên nhiều nơi như miền Trung, sườn núi và đỉnh núi cao. Loại này sinh sống ở hầu hết các loại đất, đặc biệt là đất sét phù sa giàu chất hữu cơ nhưng hiếm gặp ở đất hình thành từ đá (Shakeel, 2021).

1.1.2. Phân bố tại Việt Nam

Hiện nay, Tràm năm gân được nhập giống và trồng tại Việt Nam từ đầu những năm 1990 bởi GS. TS. Lê Đình Khả, sau đó được phân phối và nhân giống phát triển tại các tỉnh miền núi và các tỉnh Hà Nội, Thanh Hóa, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Đồng Tháp, Long An,... theo các đề án phát triển kinh tế của từng khu vực. Mục đích của việc phân phối, nhân giống cây Tràm năm gân nhằm chủ động trong nguồn cung ứng nguyên liệu để chiết xuất 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. Tràm năm gân có hàm lượng tinh dầu trong lá khá cao, chỉ sau Tràm trà với sản lượng tinh dầu thu được từ 1.3-2.4 phần trăm về mặt khối lượng, hàm lượng 1,8-Cineol đạt 0.2-65% (Nguyen et al., 2022)

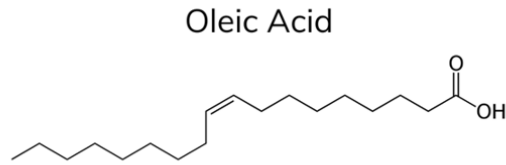
1.1.3. Đặc điểm và hoạt tính của tinh dầu Tràm năm gân

Tràm năm gân bao gồm các hydrocacbon terpen chủ yếu là monoterpen, sesquiterpen và các rượu liên quan của chúng. Tinh dầu của nó được biết đến với các đặc tính chống viêm và kháng khuẩn (Sailer et al., 1998) có các hợp chất hóa học như 1,8-cineole, α -terpineol, terpinen-4-ol, limonene, vividiflorol, cineol thành phần của nó chủ yếu là các hợp chất terpene (Brophy et al., 1989), được biết là có tác dụng làm mất sự ổn định vỏ tế bào của vi sinh vật gây ra hiện tượng ly giải màng tế bào. Vì vậy, trong số tất cả các hoạt động liên quan đến tinh dầu, hoạt động kháng khuẩn được công nhận nhiều nhất.

1.2. ACID OLEIC

Acid oleic là một acid béo có công thức $C_{18}H_{34}O_2$ không bão hòa dễ dàng được tìm thấy trong các loại dầu và chất béo khác nhau như dầu hạt nho, dầu ô liu, mỡ bò, mỡ gia cầm,... Nó còn được gọi là acid béo omega 9 do có một liên kết đôi nằm ở vị trí carbon thứ 9. Acid oleic là chất lỏng không màu có khối lượng phân tử 282,5 g/mol và nhiệt độ nóng chảy thấp 13,4°C.

Acid oleic còn được công nhận về khả năng điều chỉnh vết thương, chống oxy hóa và chống viêm đối với nhiều bệnh ngoài da và khả năng điều chỉnh nội môi của da (Lin, 2017). Điều này đã giúp nó trở thành thành phần chính trong nhiều dạng bào chế dược phẩm bôi ngoài da trị các bệnh như u nhú trên da, bệnh vẩy nến (Martin-Ezquerria G, 2007) và trong các sản phẩm Mỹ phẩm để làm chất bôi trơn có tác dụng làm mềm da và tăng khả năng thẩm thấu dược chất vào da (Bassant Atef, 2022).



Hình 1.2. Công thức phân tử của acid oleic

1.3. TỔNG QUAN NHỮ TƯƠNG NANO

Nhũ tương được định nghĩa là sự phân tán của hai chất lỏng không tan vào nhau, với các giọt hình cầu tạo thành pha phân tán, trong khi chất lỏng bao quanh nó tạo pha liên tục. Các giọt nước phân tán trong dầu được gọi là nhũ tương nước phân tán trong dầu (W/O) và được sử dụng để phân phối các hợp chất ưa nước. Nhũ tương thô có kích thước hạt ở đường kính > 200 nm và không ổn định về mặt nhiệt độ. Các giọt nước phân tán trong dầu được gọi là nhũ tương dầu phân tán trong nước (O/W) hệ thống nhũ tương này có thể được sử dụng để phân phối các hoạt chất kỵ nước. Hệ vi nhũ tương gồm các hạt có kích thước < 100 nm và ổn định về mặt nhiệt độ. Tuy nhiên, sự ổn định của chúng bị ảnh hưởng bởi những thay đổi nhỏ trong điều kiện môi trường như thành phần và nhiệt độ. Hệ nano nhũ tương có dạng giọt kích thước tương tự như vi nhũ tương từ < 200 nm và đôi khi có trường hợp < 100 nm (Ashaolu, 2021). Tương tự như nhũ tương thông thường, hệ nano nhũ tương không bền về mặt nhiệt độ khi có sự phân tách pha xảy ra theo thời gian. Kích thước giọt nhỏ của nhũ tương nano ngoài việc xác định tính chất quang học và sự ổn định, cũng ảnh hưởng đến tính lưu biến và khả năng phân phối hoạt chất của nó. Do đó, nhũ tương nano phù hợp hơn so với vi nhũ tương cho các ứng dụng khác nhau (Singh et al., 2022).

Hệ nhũ tương có nhiều giọt lỏng làm tăng diện tích bề mặt, cần một lượng lớn năng lượng để tạo thêm bề mặt. Do đó, sự hình thành nhũ tương nano không tự phát và cần năng lượng đầu vào. Nhũ tương nano có thể được điều chế bằng phương pháp năng lượng cao hoặc năng lượng thấp. Kích thước của nó phụ thuộc theo các thành phần, điều kiện hoạt động và phương pháp chế tạo. Quá trình nhũ hóa liên quan đến việc chia nhỏ các giọt thành những giọt nhỏ hơn, hấp thụ các chất hoạt động bề mặt và va chạm giữa các giọt. Động học hấp phụ cũng ảnh hưởng đến độ ổn định và kích thước giọt của nhũ tương nano. Các phương pháp năng lượng cao, liên quan đến việc sử dụng các thiết bị cơ học làm gián đoạn pha dầu để nó tương tác với pha nước và tạo thành các giọt dầu

nhỏ hơn. Sử dụng các đặc tính hóa lý của hệ thống (chất nhũ hóa) để tạo ra nhũ tương gần như tự phát đó là phương pháp năng lượng thấp (Singh et al., 2022).

Bảng 1.1. Các tính chất đặc trưng của ba loại nhũ tương

Tính chất	Nhũ tương thô	Vi nhũ tương	Nhũ tương nano
Kích thước	1-100 μ M	10-100 nm	< 200 nm
Động bền nhiệt động học	Không bền	Bền	Không bền
Độ bền động học	Bền	Không bền	Bền
Tính chất qunag học	Đục	Trong suốt	Trong suốt/mờ
Độ phân tán	Cao (>40%)	Thấp (<10%)	Thấp (<10-20 %)
Phương pháp chế tạo	Phương pháp năng lượng thấp và năng lượng cao	Phương pháp năng lượng thấp	Phương pháp năng lượng thấp và năng lượng cao
Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH	Bền đối với sự thay đổi nhiệt độ và pH	Ảnh hưởng bởi sự thay đổi của thành phần, nhiệt độ và pH	Bền đối với sự thay đổi nhiệt độ và pH

1.3.1. Phương pháp tạo hệ nano năng lượng thấp

Phương pháp này liên quan đến việc chuẩn bị nhũ tương nano thông qua quá trình nhũ hóa tự phát mà không cần sử dụng bất kỳ thiết bị hoặc năng lượng nào. Phương pháp này sử dụng các chuyển pha diễn ra trong quá trình nhũ hóa và chủ yếu tận dụng các đặc tính hóa lý của hệ thống để tạo ra nhũ tương nano tự phát. Sự thay đổi độ cong tự phát của chất hoạt động bề mặt trong quá trình nhũ hóa đã được công nhận là yếu tố chính cho sự hình thành nhũ tương nano, có thể đạt được bằng các thay đổi nhiệt độ hoặc bằng cách thay đổi thành phần của nước hay thành phần dầu hoặc bằng cách thay đổi điều kiện môi trường.

1.3.1.1. Phương pháp đảo pha nhiệt độ

Chế tạo hệ nhũ tương nano bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (Phase inversion temperature – PIT) cần phải pha loãng dần pha dầu trong pha nước và ngược lại. Độ hòa tan tương đối của chất hoạt động bề mặt không ion trong cả pha dầu và nước theo hàm số của nhiệt độ là lợi thế lớn nhất khi sử dụng nó làm chất nhũ hóa thông thường để điều chế nhũ tương nano. Ở nhiệt độ thấp hơn, các nhóm đầu của chất hoạt động bề mặt không ion có xu hướng ngậm nước nhiều hơn và kết quả là chúng có xu hướng hòa tan nhiều hơn trong pha dầu của nhũ tương. Khi nhiệt độ tăng, các nhóm đầu bị mất

nước dần dần và độ hòa tan ở trong nước của chúng giảm và chuyển dần sang pha dầu. Ở nhiệt độ của thể được gọi là nhiệt độ đảo pha, độ hòa tan của chất hoạt động bề mặt trong cả pha dầu và pha nước trở nên bằng nhau. Ở nhiệt độ này người ta có thể thấy sự biến dạng của nhũ tương nano thành pha dầu, nước và pha riêng biệt của chất hoạt động bề mặt. Cuối cùng, các pha dầu và nước tự biến đổi thành cấu trúc tinh thể lỏng. Sự hình thành và xuất hiện pha thứ ba này ở nhiệt độ đảo pha là rất quan trọng và là yếu tố quyết định đối với sự hình thành nhũ tương nano (Singh et al., 2022).

Độ hòa tan tương đối của chất hoạt động bề mặt không ion trong cả pha dầu và nước theo hàm số của nhiệt độ là lợi thế lớn nhất khi sử dụng nó làm chất nhũ hóa để điều chế nhũ tương. Ở nhiệt độ thấp hơn, các nhóm đầu của chất hoạt động bề mặt không ion có xu hướng ngậm nước nhiều hơn và kết quả là chúng có xu hướng hòa tan nhiều hơn trong pha dầu của nhũ tương. Khi nhiệt độ tăng, các nhóm bị mất nước dần và độ hòa tan của chúng ở trong nước bắt đầu giảm dần và bắt đầu chuyển dần sang pha dầu. Ở nhiệt độ cụ thể được gọi là “nhiệt độ đảo pha”, độ hòa tan của chất hoạt động bề mặt trong cả pha dầu và nước trở nên bằng nhau. Ở nhiệt độ này người ta có thể thấy sự biến dạng của NE thành pha dầu, pha nước và pha riêng biệt của chất hoạt động bề mặt. Cuối cùng, các pha dầu và nước tự biến đổi thành cấu trúc tinh thể lỏng. Sự hình thành và xuất hiện pha thứ ba này ở nhiệt độ đảo pha rất quan trọng là yếu tố quyết định quan trọng đến sự hình thành NE.

Sự biến dạng của nhũ tương nano ở nhiệt độ đảo pha là do sức căng bề mặt cực thấp của các giọt trong đó tham số đóng gói là thống nhất ($p=1$) và độ cong tối ưu của chất hoạt động bề mặt bằng 0. Nhiệt độ tăng nhẹ do nhiệt độ đảo pha làm chi các phân tử chất hoạt động bề mặt bị máy nước nhiều hơn ($p > 1$) và hòa tan tốt trong pha dầu do đó hình thành nhũ tương W/O hoặc O/W. Khi hệ thống được làm lạnh xuống dưới nhiệt độ đảo pha, các phân tử trở nên hòa tan hơn trong pha nước do đó thúc đẩy sự hình thành nhũ tương nano O/W hoặc W/O (Jintapattanakit, 2018).

1.3.1.2. Phương pháp điểm đảo pha

Phương pháp điểm đảo pha (Emulsion inversion point – EIP) là một phương pháp năng lượng thấp có liên quan đến sự đảo ngược pha không giống như phương pháp nhiệt độ đảo pha trong đó có sự đảo ngược pha chuyển tiếp và được thực hiện ở nhiệt độ cố định (Roohinejad et al., 2018). Sự đảo ngược pha gây ra sự chuyển đổi nhũ tương nano O/W hoặc W/O thành W/O hay O/W. Trong EIP có tỷ lệ dầu/nước cao được hình thành

bằng cách sử dụng một chất hoạt động bề mặt cụ thể và sau đó thêm nước dần dần bằng cách khuấy liên tục. Theo quy trình này, hàm lượng nước trong nhũ tương đạt đến điểm tới hạn mà vượt qua mức đó thì nồng độ của các giọt nước trong hệ thống trở nên cao đến mức chúng bắt đầu đóng gói chặt chẽ lại với nhau và dẫn đến sự đảo ngược bản chất của nhũ tương từ W/O sang O/W. Nói chung, chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong EIP phải có khả năng ổn định và chúng được giới hạn ở một số chất hoạt động bề mặt phân tử nhỏ. Kích thước của các hạt hình thành phụ thuộc vào tốc độ khuấy và tốc độ thêm nước (Singh et al., 2022).

Thông thường để tạo thành hệ nhũ nano O/W, hỗn hợp dầu và chất nhũ hóa phù hợp được chuẩn bị trước. Sau đó, pha nước được thêm từ từ vào hỗn hợp trên và quá trình khuấy liên tục được thực hiện để tạo sự phân tán tốt trong hệ. Trong quá trình thực hiện có sự chuyển trạng thái của hệ. Ban đầu hỗn hợp tạo thành là hệ nhũ tương W/O khi hàm lượng nước rất thấp. Sau đó chuyển sang các hệ có cấu trúc pha phức tạp và cuối cùng là hệ O/W ổn định với kích thước giọt nanomet.

1.4. CÁC VI KHUẨN TRÊN DA VÀ HỆ HÔ HẤP

Da là một môi trường sống lý tưởng của rất nhiều loại vi khuẩn, nấm hay các loại kí sinh trùng khác nhau, chúng tồn tại ở tất cả mọi nơi từ da đầu, mặt, tay chân. Khi gặp điều kiện thuận lợi như vết thương ngoài da, hệ miễn dịch suy giảm,... chúng sẽ bắt đầu tấn công da và gây hại cho cơ thể con người. Các bệnh như viêm phổi, tiêu chảy, viêm da,... là các loại bệnh phổ biến do vi khuẩn sinh sống trên da con người gây ra. Vi khuẩn thường sống trên da như: tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, vi khuẩn gây mụn *Propionibacterium acnes*, liên cầu khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, hay nấm *Esophageal candidiasis*,...

Staphylococcus aureus còn được gọi là tụ cầu vàng nó là một trong những nguyên nhân gây bệnh và tử vong thường gặp nhất trên toàn thế giới do các tác nhân truyền nhiễm, thường được tìm thấy ở da, khoang mũi và đường hô hấp. *S. aureus* gây ra nhiều loại bệnh khác nhau, từ nhiễm trùng da nặng vừa phải đến viêm phổi và nhiễm trùng máu gây tử vong. Điều trị nhiễm trùng *S. aureus* rất phức tạp do nó có thể kháng thuốc kháng sinh và hiện chưa có vắc-xin hiệu quả. Mối lo ngại nhiều nhất và ngày càng tăng là đối với số lượng độc tố cực kỳ cao mà *S. aureus* tạo ra và cách chúng tác động đến các vết thương hở và xâm nhập vào cơ thể con người (Cheung et al., 2021)

Streptococcus pneumoniae hay phế cầu khuẩn là nguyên nhân hàng đầu gây viêm tai giữa, viêm phổi, nhiễm khuẩn máu và viêm màng não. *S. pneumoniae* là một mầm bệnh được tìm thấy ở mũi và họng của con người, chúng xâm chiếm vòm họng và lây lan giữa người bệnh và người khỏe mạnh vì nó có khả năng lây nhiễm từ các vật thể bằng dịch tiết niêm mạc nếu vi khuẩn sống trong màng sinh học. Bệnh do vi khuẩn *S. pneumoniae* xâm nhập xảy ra do sự lây lan của vi khuẩn từ vòm họng đến các bộ phận khác của cơ thể, bao gồm phổi, máu và não. *S. pneumoniae* được tiên thấy ở người lớn khỏe mạnh là từ 5 – 10% đối với trẻ em khỏe mạnh là từ 20 – 40%. Trẻ sơ sinh, người già và những người bị suy giảm miễn dịch có nguy cơ mắc các bệnh do vi khuẩn *S. pneumoniae* gây ra hơn so với những người khỏe mạnh. Tổ chức y tế thế giới WHO đã ước tính rằng bệnh phế cầu toàn cầu do vi khuẩn *S. pneumoniae* gây ra đã giết hơn 300.000 trẻ em dưới 5 tuổi trên toàn thế giới vào mỗi năm (Loughran et al., 2019)

Candida là một sinh vật nấm men xâm chiếm biểu mô bề mặt của ống tiêu hóa và hệ thống đường tiết niệu sinh dục của con người khỏe mạnh như hệ thực vật bình thường. Khi hệ miễn dịch toàn thân bị suy giảm, nấm candida có thể phát triển quá mức dẫn đến các bệnh về nấm *Candida*. Hơn 15 loại nấm candida khác nhau có thể gây bệnh và các mầm bệnh phổ biến nhất là *Albicans candida*, *Glabrata candida*, *Tropicalis candida*,... Nhiễm nấm *candida* niêm mạc và những bệnh liên quan đến hậu họng, thực quản và âm đạo là những bệnh phổ biến nhất hiện nay. Thông thường, nấm *candida* là loài cộng sinh ở thực quản nên đây thường là nguyên nhân phổ biến của viêm thực quản do nấm *candida* gây ra. Khi cơ chế bảo vệ của cơ thể bị suy yếu, nó tạo điều kiện thuận lợi cho nấm *candida* sinh sôi nảy nở trong niêm mạc thực quản và tạo thành các mảng kết dính (Mohamed et al., 2019).

Escherichia coli hay được gọi là trực khuẩn lỵ phân bố rộng rãi là loài kỵ khí sống trong ruột già của con người và động vật máu nóng. Mặc dù hầu hết các chủng E. coli sống vô hại trong ruột kết và hiếm khi gây bệnh ở người khỏe mạnh nhưng đôi khi nó cũng gây bệnh về đường ruột và ngoài đường ruột như tiêu chảy, đau bụng, sốt hoặc ngộ độc thức ăn,... ở người bị suy giảm miễn dịch hay cả người khỏe mạnh. Bệnh tiêu chảy là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng đối với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ vì nó có thể gây tử vong nếu trường hợp trở nặng. Đa phần các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình ở Châu Phi, Châu Á, Châu Mỹ Latinh là những khu vực bị ảnh hưởng nặng nề nhất bởi

bệnh tiêu chảy xảy ra thường xuyên hơn với tỷ lệ tử vong chủ yếu do điều kiện sống (vệ sinh môi trường kém, bị nhiễm khuẩn khi có vết thương hở,...) (Gomes et al., 2016)

1.5. NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.5.1. Nghiên cứu trong nước

Nhũ tương nano tinh dầu Tràm được điều chế bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha được TS. Xuân Tiến Lê và các cộng sự nghiên cứu vào năm 2022. Trong bài nghiên cứu này hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm được tạo từ 10% tinh dầu và 10% chất hoạt động bề mặt là Tween 80 với nước cho thấy mẫu có độ ổn định lênh đến 120 ngày (Le et al., 2022).

Trong bài nghiên cứu tiến sĩ của cô Lý Thị Minh Hiền được công bố vào năm 2022, cô sử dụng hai phương pháp năng lượng thấp là nhiệt độ đảo pha và điểm đảo pha. Mục đích tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu ứng dụng trong việc bảo quản thực phẩm. Bài nghiên cứu cho thấy phương pháp điểm đảo pha là phương pháp tạo hệ nani ổn định hơn về đặc tính hóa lý khi lưu mẫu trong 4 tuần và khả năng mang tinh dầu có thể đạt đến 70% cao hơn rất nhiều so với phương pháp nhiệt độ đảo pha (Hiền, 2021)

1.5.2. Nghiên cứu ngoài nước

Acid oleic được biết đến rộng rãi với các đặc tính tăng cường xâm nhập qua da trong việc cải thiện tác dụng điều trị bôi thoa qua da của nhiều loại thuốc như Celecoxib, Flurbiprofen, Adapalene,... Để điều trị các bệnh về da khác nhau như mụn trứng cá, bạch biến, ung thư da, khối u ác tính, sẹo lồi và sẹo phì đại. Năm 2022 Basant Atef đưa ra nghiên cứu tiềm năng của acid oleic trong việc vận chuyển thuốc qua da thông qua trung gian là công nghệ nano. Việc sử dụng acid oleic trong việc chế tạo nhũ tương nano cho việc bôi trên da, mang lại lợi thế cho các loại thuốc hòa tan kém bằng cách tăng cường hiệu suất dược phẩm sinh học, cải thiện tính thẩm qua da, giảm tác dụng và tăng tính ổn định (Atef et al., 2022)

Tinh dầu, chẳng hạn như các chế phẩm được phân lập từ tinh dầu quế, là chất kháng khuẩn tự nhiên hiệu quả, nhưng việc sử dụng chúng bị hạn chế do độ hòa tan trong nước thấp. Trong bài nghiên cứu này, phương pháp PIT được sử dụng để điều chế nhũ tương nano tinh dầu quế. Hỗn hợp gồm tinh dầu quế và chất hoạt động bề mặt Tween 80 cùng với nước được đun nóng trên PIT của hệ nano. Sau đó, hỗn hợp được làm lạnh nhanh chóng bằng cách khuấy liên tục, dẫn đến sự hình thành tự phát của các giọt dầu nhỏ. Việc tăng nồng độ chất hoạt động bề mặt làm giảm đáng kể đường kính

giọt trung bình của nhũ tương nano nhưng không làm thay đổi hình thái hạt của chúng (Chuesiang et al., 2018).

Sudarajan Balasubramani cho rằng nhũ tương nano là một ứng cử viên đầy hứa hẹn để cải thiện chất lượng của tinh dầu tự nhiên hướng tới các ứng dụng kháng khuẩn và diệt côn trùng. Chế phẩm nhũ tương nano của Tinh dầu lá *Vitex negundo L.* được tạo ra bằng phương pháp điểm đảo pha, với mục tiêu nghiên cứu về ứng dụng diệt côn trùng. Đánh giá khả năng diệt ấu trùng muỗi từ 2 đến 3 tuần tuổi được quan sát trong thời gian phơi nhiễm 12 giờ và 24 giờ. Kết quả cho thấy hệ nhũ tương nano có khả năng diệt ấu trùng muỗi tốt hơn tinh dầu *V. negundo*. Với lớp màng nano bao bọc các hạt tinh dầu mà khả năng tương thích sinh học được cải thiện, điều này mở ra ứng dụng mới trong ngành y sinh bao gồm phân phối thuốc cũng như việc kiểm soát ấu trùng muỗi gây bệnh (Balasubramani et al., 2017).

Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU







2.1. NGUYÊN LIỆU






Tinh dầu được sử dụng trong nghiên cứu này là cặn tinh dầu Tràm năm gân được cung cấp từ Hợp tác xã dược liệu Trường Sơn, huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị. Cặn tinh dầu Tràm năm gân là phụ phẩm của quá trình phân đoạn tinh dầu Tràm năm gân.

2.2. DỤNG CỤ, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Dụng cụ

Bảng 2.1. Dụng cụ sử dụng trong thực nghiệm

STT	Dụng cụ	Hình ảnh
1	Cá từ	
5	Cuvet	
6	Bình tia	
8	Đĩa petri	
9	Đĩa 96 giếng	
10	Bình trung tính	

12	ống nghiệm thủy tinh có nắp	
13	Tăm bông	
14	Đầu col	
15	Micropipet	
17	Bình tỷ trọng	




2.2.2. Hóa chất




- Tween 20 số CAS: 9005-64-5 thuộc công ty Guangzhou Jiahua Chemical Co.,Ltd của Trung Quốc;
- Tween 40 số CAS: 9005-66-7 thuộc công ty Guangzhou Jiahua Chemical Co.,Ltd của Trung Quốc;
- Span 20 số CAS: 1338-39-2 thuộc công ty Guangzhou Jiahua Chemical Co.,Ltd của Trung Quốc;
- Tween 80 số CAS: 9005-65-6 thuộc công ty Sigmaaldrich của Đức;
- Acid oleic được mua từ công ty Sigma-aldrich của Đức;
- Nước cất hai lần;
- Ethanol Trung Quốc;
- Methanol được mua từ công ty Sigma-aldrich của Đức;

- Kháng sinh Ampicillin có nồng độ 0,4 mg/mL: theo như CLSL-2022 cân 4 gram Ampicillin định mức bằng nước cất lên 10 mL (Việt Nam);
- Chỉ thị Resazurin có nồng độ 0,001 g/mL: cân 0,1 gram chỉ thị Resazurin định mức 100 mL bằng nước cất, bảo quản bằng cách cấp đông;
- Môi trường MHA (Muller Hinton Agar): cân 21 gram môi trường MHB (Muller Hinton Borth, Ấn Độ) và 20 gram bột Agar (Việt Nam), hòa tan với 1000 mL nước cất và được đem đi hấp tiệt trùng ở 121°C;
- Môi trường MHB (Muller Hinton Borth): cân 21 gram MHB hòa tan với 1000 mL nước cất và đem hấp tiệt trùng ở 121°C;
- Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- Vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619;
- Nấm *Candida albicans* ATCC 10231;
- Vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 8739.

2.2.3. Thiết bị

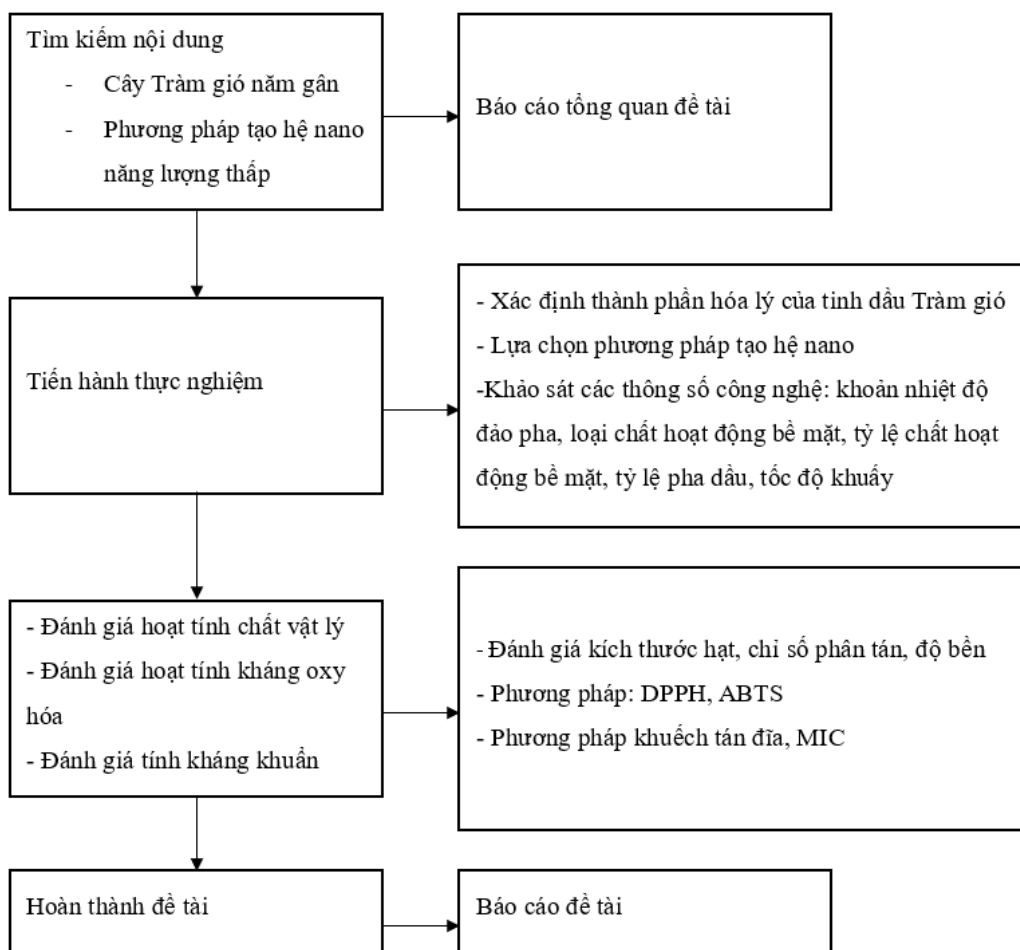
Bảng 2.2. Thiết bị sử dụng trong thực nghiệm

STT	Tên thiết bị	Mã thiết bị	Xuất xứ	Hình ảnh
1	Máy khuấy từ	85-2	Trung Quốc	
2	Máy đo kích thước hạt	Winner 802	Trung Quốc	
3	Tủ an toàn sinh học cấp 2	HR40-IIA2	Trung Quốc	

4	Nồi hấp tiệt trùng 60 L	HAC060	Hàn Quốc	
5	Máy đo độ nhớt Brookfield	VNext Rheometer	Mỹ	
6	Máy ly tâm 12 chỗ tube 5 mL	PLCO5	Đài Loan	

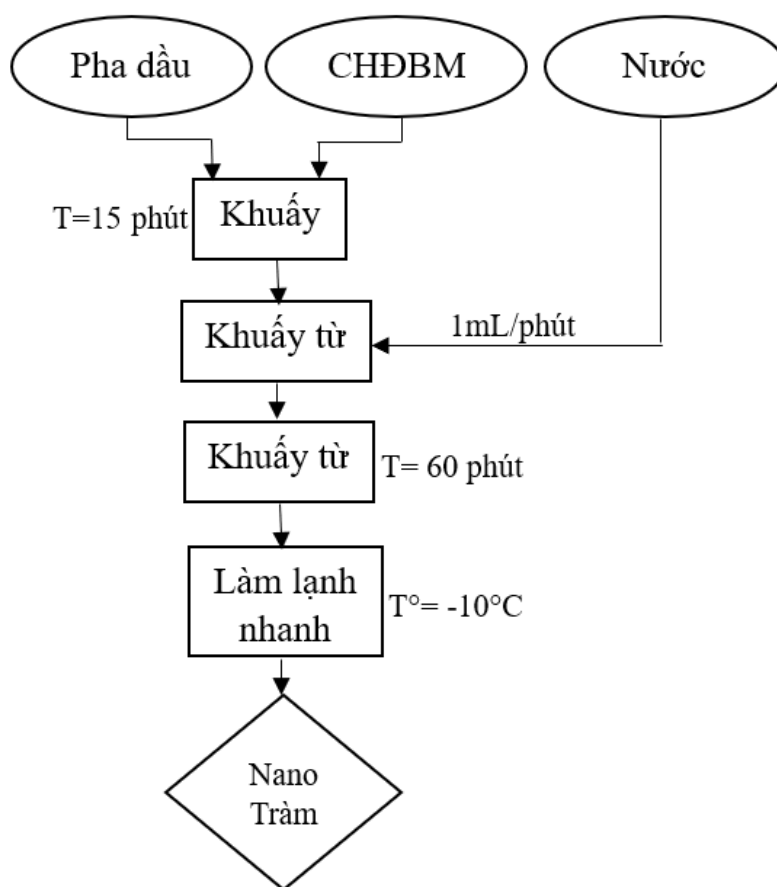
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

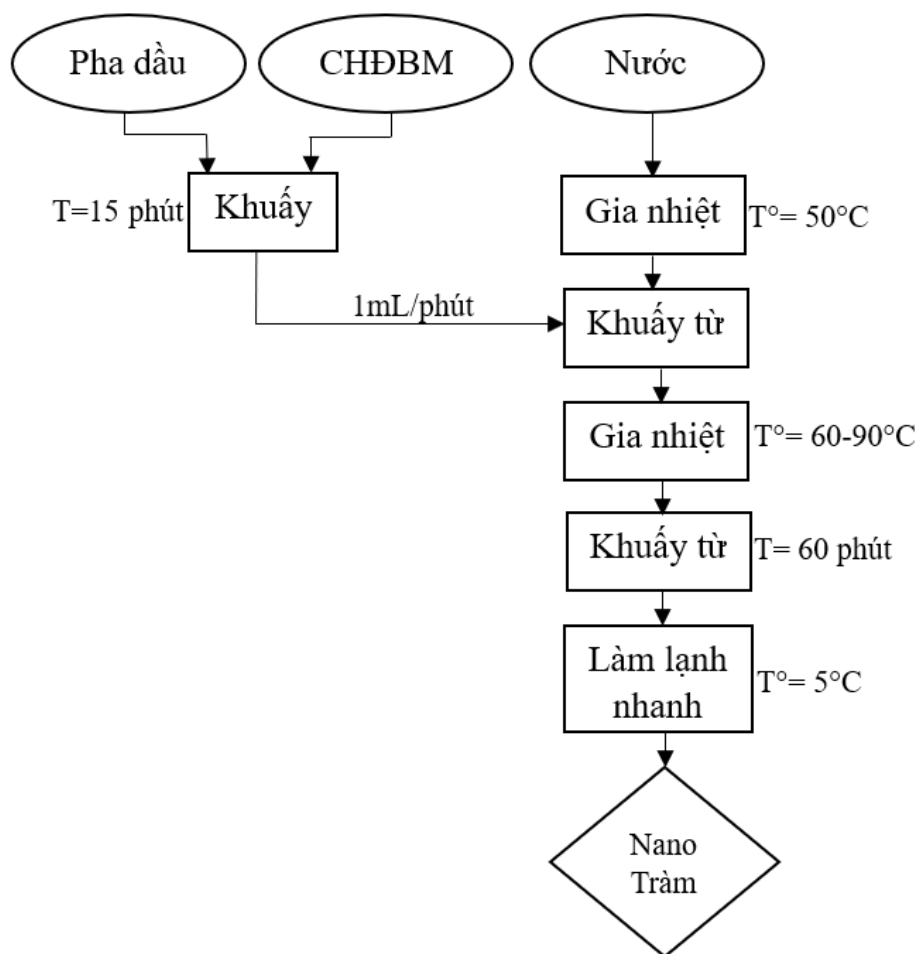
2.3.2. Quy trình công nghệ tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm gió bằng phương pháp điểm đảo pha



Hình 2.2. Quy trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm bằng phương pháp EIP

Thuyết minh quy trình: dựa theo phương pháp(Singh et al., 2022), với một số sửa đổi để phù hợp đề tài. Một lượng tinh dầu và chất hoạt động bề mặt định lượng trước khuấy trộn trong 15 phút. Sau đó nước cất được cho vào với tốc độ 1 mL/phút sao cho tổng hệ là 100%. Trong quá trình bổ sung nước hệ thay đổi qua nhiều trạng thái phụ thuộc vào hàm lượng nước được thêm vào hệ. Đầu tiên, hàm lượng nước thấp hệ tồn tại ở trạng thái nhũ tương W/O có màu vàng trong suốt. Khi hàm lượng nước tăng dần hệ chuyển sang màu trắng sữa và độ nhớt tăng dần. Đến khi hàm lượng nước phù hợp, toàn bộ hệ chuyển sang dạng gel và có màu vàng trong suốt. Hàm lượng nước đủ lớn, hệ hoàn toàn đồng nhất ở trạng thái nhũ tương nano với đặc điểm có màu vàng nhẹ. Sau đó, tiếp tục khuấy trong vòng 60 phút và làm lạnh nhanh ở nhiệt độ -10°C .

2.3.3. Quy trình công nghệ tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha



Hình 2.3. Quy trình tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm gió bằng phương pháp PIT

Thuyết minh quy trình: dựa theo phương pháp (Singh et al., 2022) với một số sửa đổi để phù hợp đề tài. Trong hỗn hợp pha dầu bao gồm tinh dầu, chất hoạt động bề mặt và acid oleic (nếu có) với các tỷ lệ phù hợp, đồng nhất hỗn hợp bằng máy khuấy từ với tốc độ 800 vòng/phút trong 15 phút. Trong khi chờ hỗn hợp đồng nhất, pha nước được đun cách thủy đến 50°C. Sau đó, cho từ từ hỗn hợp pha dầu đồng nhất vào pha nước đã được chuẩn bị với tốc độ 1 mL/phút và khuấy đều. Tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ khoảng 60-90°C, tốc độ gia nhiệt 2°C/phút. Khi hỗn hợp đạt đến nhiệt độ đảo pha thì trở nên trong suốt. Gia nhiệt cho đến khi nhiệt độ trong hỗn hợp cao hơn điểm đảo pha từ 3-5°C. Sau đó tiếp tục khuấy trong 60 phút rồi làm lạnh nhanh ở 2°C ta thu được hệ nano tinh dầu Tràm.

2.3.4. Bộ trí thí nghiệm

2.3.4.1. Xác định tính chất hóa lý phân đoạn cận của tinh dầu Tràm năm gân

- Xác định tỷ trọng: bình tỷ trọng;
- Xác định màu: đánh giá cảm quan;
- Xác định chỉ số khúc xạ: được mang đi phân tích;
- Xác định góc quay cực: mẫu được mang đi phân tích;
- Xác định độ nhớt: Độ nhớt của tinh dầu Tràm năm gân được xác định bằng máy đo độ nhớt Brookfield VNext Rheometer. Sau đó chọn đầu dò phù hợp với mẫu tinh dầu tràm, ở đây sử dụng đầu dò số 61, tiến hành đặt tên và chọn nhiệt độ ở 30°C, đặt tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Chờ máy đo và xuất kết quả.

2.3.4.2. Xác định thành phần hóa học phân đoạn cận của tinh dầu Tràm năm gân

- Pha loãng tinh dầu với hexan tỉ lệ 1: 100
- Hệ thống sắc ký khí-khối phổ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) được sử dụng để phân tích các thành phần có trong tinh dầu tràm là máy sắc ký khí Trace 1300 Thermo Scientific kết hợp với khối phổ TSQ 9000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ). Các chất phân tích được tách trong cột mao quản silica nung chảy không phân cực TG-5ms được phủ bằng methyl silicon (30 m × 0,25 mm i.d.), độ dày màng 0,25 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) từ Agilent.
- Quá trình quét MS (1 lần quét/ giây) 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 chảy 1,2 mL/ phút theo tỷ lệ phân chia dòng 1: 100
- Nhiệt độ lò cột được lập trình như sau:
 - (i) từ 60 đến 240 °C tốc độ 3,0 °C/phút
 - (ii) từ 240 – 270°C tốc độ 5,0 °C/phút và giữ trong 2 phút.
- Nhiệt độ injector 250 °C
- Hầu hết các hợp chất có trong tinh dầu được xác định bằng khối phổ của chúng (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 các diện tích pic tương đối

(%) được tính toán để định lượng các thành phần tinh dầu. Các phân tích sắc ký được thực hiện trong ba lần.

2.3.4.3. *Khảo sát, lựa chọn phương pháp tạo hệ nano*

Ở phần này sẽ có hai phương pháp được khảo sát để chọn ra phương pháp tối ưu để tiến hành các khảo sát tiếp theo của thí nghiệm. Phần này có ba yếu tố được lựa chọn để thực hiện khảo sát phương pháp. Tween 80 được sử dụng làm chất nhũ hóa cho hai yếu tố ở tỷ lệ thành phần là 10% tinh dầu, 20% chất nhũ hóa và 10% tinh dầu, 10% chất nhũ hóa, ở yếu tố thứ 3 sử dụng Tween 20 và tỷ lệ thành phần là 10% tinh dầu, 20% chất nhũ hóa, tốc độ khuấy được giữ nguyên ở cả 3 yếu tố là 800 vòng/phút. Các mẫu vật sau khi được tạo sẽ để ổn định trong 24 giờ, sau đó sẽ được đem đi phân tích để so sánh.

2.3.4.4. *Khảo sát nhiệt độ*

Sau khi lựa chọn được phương pháp phù hợp cho thí nghiệm, thì tiến hành khảo sát khoảng nhiệt độ đảo pha (60°C, 70°C, 80°C, 90°C). Các thông số cố định ở phần này bao gồm tỷ lệ tinh dầu 10%, chất hoạt động bề mặt là 20%, nước cất hai lần và tốc độ khuấy 800 vòng/phút. Các mẫu sẽ được để ổn định trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành các đánh giá để so sánh chọn ra nhiệt độ tối ưu.

2.3.4.5. *Khảo sát loại chất hoạt động bề mặt*

Sau khi lựa chọn được nhiệt độ phù hợp cho thí nghiệm, thì tiến hành khảo sát loại chất hoạt động bề mặt (Tween 20, Tween 40, Span 20, Tween 80). Các thông số cố định ở phần này gồm tỷ lệ tinh dầu 10%, chất hoạt động bề mặt là 20% và nước cất hai lần với tốc độ khuấy là 800 vòng/phút. Các mẫu sẽ được để ổn định trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành các đánh giá để so sánh chọn ra loại chất hoạt động bề mặt tối ưu.

2.3.4.6. *Khảo sát tỷ lệ chất hoạt động bề mặt*

Thí nghiệm được tiến hành dựa trên với thành phần tinh dầu 10%, tỷ lệ của chất hoạt động bề mặt được khảo sát là 10%, 15%, 20% và 25% với tốc độ khuấy là 800 vòng/phút. Các mẫu vật sẽ được để ổn định ở nhiệt độ phòng sau 24 giờ, sau đó tiến hành các đánh giá để so sánh chọn ra tỷ lệ tốt nhất.

2.3.4.7. *Khảo sát tốc độ khuấy*

Sau khi lựa chọn được các thành phần tối ưu của hệ. Tiến hành khảo sát tốc độ khuấy ở các điều mức 600– 800–1000– 1200 vòng/phút. Tiến hành chọn ra tốc độ tốt nhất để tiếp tục tiến hành khảo sát.

2.3.4.8. *Khảo sát tỷ lệ thành phần pha dầu*

Sau khi chọn ra tỷ lệ thành phần tối ưu của hệ, tiến hành khảo sát tỷ lệ thành phần pha dầu. Pha dầu trong khảo sát này sẽ được phối thêm acid oleic với tỷ lệ tinh dầu-acid oleic là 9-1, 8-2, 7-3 và 6-4. Tiến hành chọn ra mẫu tốt nhất để tiếp tục tiến hành đánh giá.

2.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.4.1.1. *Hình thái hạt*

Mẫu tối ưu được gửi chụp SEM.

2.4.1.2. *Phân tích kích thước hạt và chỉ số phân tán*

Kích thước hạt là yếu tố quan trọng để đánh giá trạng thái hệ nhũ tương, kích thước hạt và chỉ số phân tán được thực hiện trên máy Winner 802 phòng phân tích thuộc khoa Kỹ thuật Thực phẩm và Môi trường

Phương pháp đo kích thước hạt được tiến hành đo ở nhiệt độ phòng. Đầu tiên bật công tắc khởi động máy, đợi máy ổn định trong 15 phút rồi cắm USB và dây cáp liên kết máy và máy tính. Mẫu được cho vào cuvet và lau sạch 4 mặt, đặt tên mẫu, chọn Delay Unit Time phù hợp, thời gian đo mẫu là 6 phút, nhiệt độ đo là 25°C. Cuối cùng ấn Run để cho máy tiến hành đo kích thước hạt và chờ máy xuất kết quả.

2.4.1.3. *Đánh giá độ bền của hệ nhũ tương nano dưới tác động của ngoại lực*

Ly tâm là một phương pháp phổ biến giúp thúc đẩy quá trình tách pha trong hệ để dự đoán và so sánh độ bền của hệ. Tốc độ ly tâm được áp dụng từ 4000 vòng/phút trong 30 phút (Li et al., 2018).

2.4.1.4. *Đánh giá độ bền hệ nhũ tương nano dưới tác dụng của điều kiện và thời gian bảo quản*

Mẫu tốt nhất sẽ được lưu để tiến hành xác định độ ổn định của hệ nhũ tương nano bằng cách bảo quản ở nhiệt độ 5°C và nhiệt độ phòng. Mẫu sẽ được đánh giá theo các khoản thời gian ngày đầu tiên, 7 ngày, 15 ngày, 30 ngày và 60 ngày.

2.5. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HỆ NANO TINH DẦU TRÀM

2.5.1. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa

2.5.1.1. Phương pháp đo DPPH

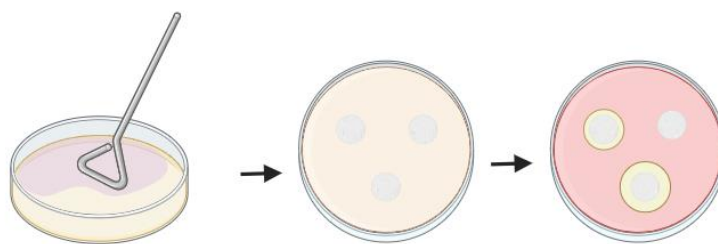
Khả năng kháng oxy hóa của nano tinh dầu Tràm năm gân được thực hiện theo phương pháp DPPH như mô tả trong tài liệu (Nguyen Quoc Duy, 2022) với một số sửa đổi phù hợp đề tài. Tóm lại, để chuẩn bị DPPH gốc cân 0.006 gram DPPH được hòa tan trong 25 mL methanol và ủ ở 4°C trong 24 giờ. Thuốc thử được pha bằng cách trộn dung dịch DPPH đã pha với methanol sao cho độ hấp thụ của hỗn hợp đạt $1,10 \pm 0,02$ ở bước sóng 515 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis, 1 mL mẫu được pha loãng 100 ml bằng methanol. Để xác định hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu, mỗi ống nghiệm được thêm vào 2.85 mL thuốc thử DPPH và 0.15 mL mẫu đã pha loãng. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong bóng tối trong 30 phút và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 515 nm trên mẫu trắng gồm methanol và DPPH đã hiệu chuẩn.

2.5.1.2. Phương pháp đo ABTS

Khả năng quét gốc tự do của nano tinh dầu Tràm năm gân được thực hiện theo phương pháp ABTS như mô tả trong tài liệu (Nguyen Quoc Duy, 2022). Chuẩn bị dung dịch ABTS gốc, cân 0.0176 gram $K_2S_2O_8$ pha loãng bằng 25 mL nước cất trộn chung với 0.1015 gram BTS pha loãng bằng nước cất theo tỷ lệ 1:1, sau đó ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 4 °C. Thuốc thử được pha bằng ABTS gốc với methanol sao cho độ hấp thụ đạt 1.10 ± 0.02 ở bước sóng 734 nm, mẫu được pha loãng 250 lần. Để xác định tính quét gốc tự do ABTS, mỗi ống nghiệm cho vào 2.85 mL thuốc thử cùng với 0.15 mL mẫu, ủ trong bóng tối sau 30 phút đem đo.

2.5.2. Đánh giá tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương nano

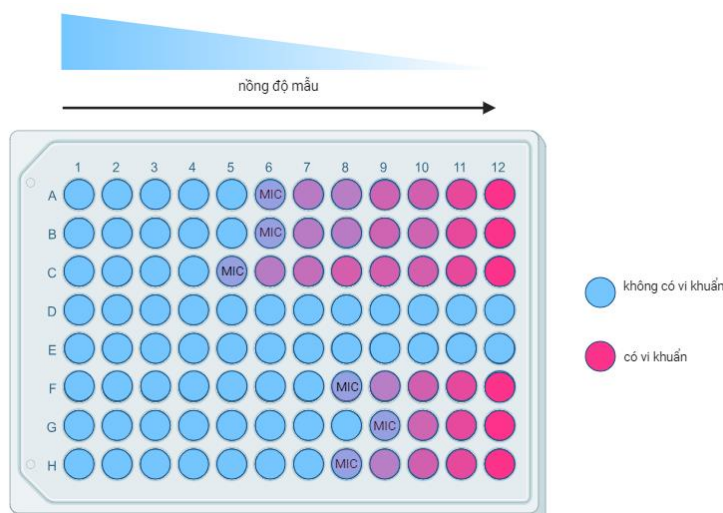
2.5.2.1. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Agar Diffusion Test)



Hình 2.4. Quá trình đánh giá khả năng kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch để xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với thuốc kháng sinh, còn được gọi là xét nghiệm Kirby-Bauer (Shoab et al., 2021). Mỗi đĩa thạch được đổ 20 mL môi trường MHA tiếp đó cho lần lượt từng chủng vi khuẩn vào mỗi đĩa gồm có 4 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (+), *Streptococcus pneumoniae* (+) và *Esophageal candidiasis*, *Escherichia coli* (-) có nồng độ 10^6 CFU/mL được bơm 100 μ L và trang đều trên bề mặt đĩa thạch. Các giếng giấy lọc có đường kính 6 mm dày 0.5 mm được đặt vào đĩa thạch mỗi giếng được bơm cùng một thể tích là 25 μ L, sử dụng nước cất làm đối chứng âm, kháng sinh Ampicillin được sử dụng làm đối chứng dương có nồng độ 0.4 mg/mL, cuối cùng là mẫu thử nghiệm. Kết quả được đánh giá bằng cách đo đường kính ức chế sự phát triển của vi khuẩn trên đĩa thạch trừ đi đường kính của đối chứng âm (Yang et al., 2021)

2.5.2.2. Chỉ tiêu về nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration)



Hình 2.5. Kết quả chỉ tiêu MIC

MIC (Minimum Inhibitory Concentration) là chỉ tiêu xác định nồng độ tối thiểu mà mẫu thử có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (Terwee et al., 2021). Mẫu thử nghiệm được pha loãng bằng phương pháp vi pha loãng dãy 2 lần bằng hỗn hợp Tween 80 và nước cất (tỷ lệ 1:6) hoặc nước cất. Sau đó môi trường MHB và vi khuẩn được thêm vào với cùng thể tích là 50 μ L. Dãy đối chứng dương được làm tương tự như trên nhưng thay thế vi khuẩn bằng 50 μ L hỗn hợp Tween 80 và nước hoặc nước cất, hàng đối chứng âm không có mẫu thử nhưng có vi khuẩn. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó chỉ thị Resazurin có nồng độ 0.001 g/mL có màu xanh dương đậm được thêm vào với thể tích 20 μ L để hiển thị kết quả. Khi hàng mẫu chuyển sang màu

hồng thì chứng tỏ có vi khuẩn còn sống và ngược lại khi hàng mẫu không chuyển màu thì mẫu đã kháng được vi khuẩn (Nguyen et al., 2023).

2.6. 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® Excel® 2021 và IBM SPSS Statistics 27.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Mỹ) sử dụng các kỹ thuật thống kê cơ bản.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. TÍNH CHẤT HÓA LÝ PHÂN ĐOẠN CẶN TINH DẦU TRÀM NĂM GÂN



Hình 3.1. Phần cặn tinh dầu Tràm năm gân

Các tính chất của phần cặn tinh dầu Tràm năm gân thô được xác định bao gồm có tính chất cảm quan, tỷ trọng, góc quay cực, chỉ số khúc xạ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1

Bảng 3.1. Các tính chất của phần cặn tinh dầu Tràm năm gân

Tính chất	Kết quả	Phương pháp đánh giá
Tính chất cảm quan	Dạng lỏng trong suốt, màu xanh hơi ngả vàng, mùi thơm nồng Tràm đặc trưng	Đánh giá cảm quan
Tỷ trọng	0.925 ± 0.005	Đo bình tỷ trọng
Góc quay cực	-3 ± 0.5	
Chỉ số khúc xạ	1.466 ± 0.003	
Độ nhớt	12.76 ± 0.6 (cP)	Đo máy đo độ nhớt Brookfield

Các tính chất của tinh dầu Tràm năm gân được sử dụng trong nghiên cứu đáp ứng được đo các chỉ số cơ bản. Kết quả cho thấy mẫu tinh dầu này phù hợp để sử dụng cho toàn bộ các khảo sát của đề tài.

Để đánh giá thành phần hóa học phần cặn của tinh dầu Tràm năm gân trong nghiên cứu này, mẫu tinh dầu đã được đem đi phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký khí GC-MS. Thành phần hóa học được thể hiện ở bảng 3.1. Tổng có 15 chất chính được tìm thấy trong mẫu tinh dầu làm nguyên liệu.

Chất chính được tìm thấy là α -Terpienol với hàm lượng 36.04% chiếm phần lớn khối lượng trong tinh dầu so với các chất khác. Các hợp chất khác có hàm lượng trung bình từ 5-8% chiếm 5 chất như Caryophyllene, Eucalyptol, Humulene, Guaiac axetat, Linalool. Còn lại là những hợp chất được tìm thấy với hàm lượng thấp từ 2-4%.

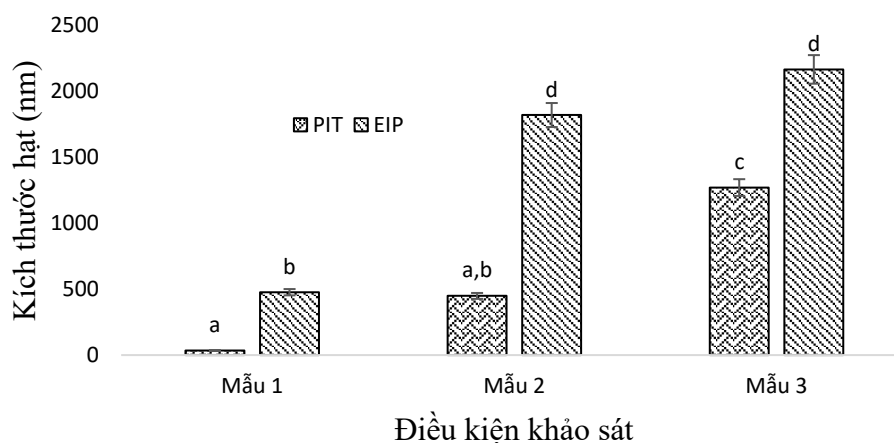
Tham khảo một số nghiên cứu về nguyên liệu là tinh dầu Tràm có nguồn gốc khác nhau cho thấy có sự khác biệt về số lượng và nồng độ các chất có trong Tinh dầu Tràm năm gân. Ví dụ như trong nghiên cứu của (Ciccio Alberti, 2021) đã chỉ ra rằng có tới 88 hợp chất xác định được tìm thấy trong tinh dầu Tràm hay trong nghiên cứu của (Chao et al., 2017) lại cho thấy có 22 hợp chất được xác định là có trong thành phần tinh dầu Tràm năm gân. Các thành phần chính như 1,8-cineole, α -pinene và một số thành phần khác không còn được tìm thấy trong phân đoạn cận của tinh dầu Tràm năm gân được sử dụng trong bài nghiên cứu này khi so sánh với các bài nghiên cứu trước đây (Siddique et al., 2018), (Chao et al., 2017).

Bảng 3.2. Thành phần hóa học phần gốc tinh dầu Tràm năm gân

STT	Hợp chất	Thành phần (%)
1	α -Terpineol	36.04
2	Caryophyllene	8.107
3	Guaiac axetat	7.244
4	Eucalyptol	5.779
5	Linalool	5.752
6	Humulene	5.121
7	β -Selinene	4.415
8	β -Eudesmol	4.383
9	τ -Gurjenene	4.124
10	α -Selinene	4.056
11	2-Naphtalenmetanol	3.398
12	Terpinen-4-ol	3.345
13	α -Gurjunene	2.755
14	α -Amorphene	2.533
15	δ -Cadinene	2.295
Tổng		99.347

3.2. LỰA CHỌN PHƯƠNG PHÁP CHẾ TẠO HỆ NANO TINH DẦU TRÀM

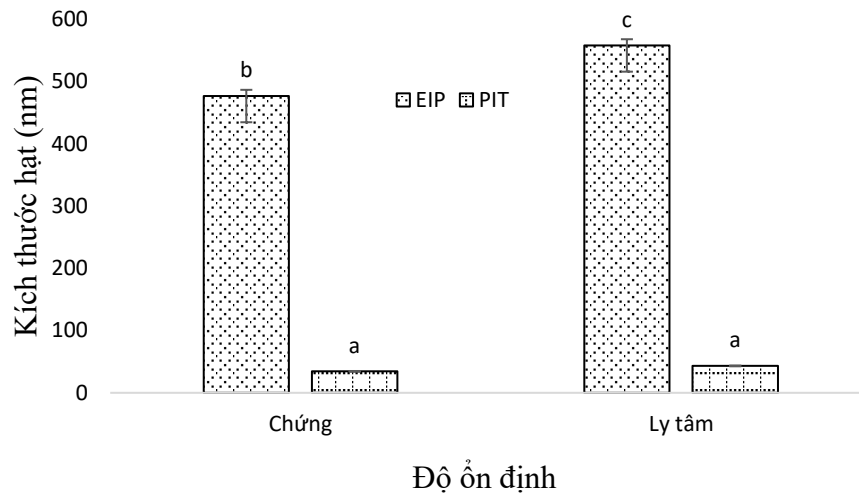
Trong phần này các các hệ nano được chọn cho thí nghiệm gồm mẫu 1 (10% tinh dầu, 20% Tween 80), mẫu 2 (10% tinh dầu, 10% Tween 80) và mẫu 3 (10% tinh dầu, 20% Tween 20) được dùng để so sánh hai phương pháp điêm đảo pha và nhiệt độ đảo pha.



Hình 3.2. Biểu đồ khảo sát phương pháp tạo hệ nano

Qua hình 3.2 ta cũng có thể nhìn thấy rõ khả năng tạo hệ nhũ tương nano của hai phương pháp. Đối với phương pháp EIP và PIT đầu tiên các mẫu sẽ được đánh giá trực quan về cảm quan và sự tách pha sau khi hệ nhũ tương được ổn định. Thử nghiệm này cho thấy đối với phương pháp EIP Tween 80 tất cả hệ là trong suốt và có màu vàng nhạt của chất hoạt động bề mặt, nhưng với Tween 20 hệ lại có màu đục, bị tách pha sau khi được ổn định qua 24 giờ và kích thước hạt cũng to hơn. Điều này cũng tương ứng đối với phương pháp PIT khi hệ được tạo bởi Tween 80 lại trong hơn và không có hiện tượng tách pha so với Tween 20. Bên cạnh đó đối với tỷ lệ thành phần là 10% tinh dầu và 10% chất nhũ hóa về mặt quang học thì mẫu được tạo bằng phương pháp PIT có màu trắng sữa còn mẫu tạo bằng phương pháp EIP lại cho thấy mẫu chỉ hơi mờ đục.

Khi phân tích kích thước hạt thì sự khác biệt về kích thước hạt và chỉ số phân tán được thể hiện rõ hơn ở cả hai phương pháp kết quả được thể hiện như hình 3.2. Không chỉ kích thước hạt ở phương pháp PIT nhỏ hơn rất nhiều so với phương pháp EIP mà chỉ số phân tán cũng nhỏ hơn rất nhiều. Để đánh giá trực quan hơn thì mẫu 1 sẽ được chọn để đánh giá về độ bền bằng phương pháp ly tâm, vì đây là mẫu có hình thức và kích thước hạt tốt nhất ở cả hai phương pháp.



Hình 3.3. Biểu đồ thể hiện độ ổn định của hai phương pháp PIT và EIP

Sau khi ly tâm hình thái các mẫu được đánh giá bằng cảm quan trong khi mẫu PIT không xuất hiện hiện tượng tách lớp thì với mẫu EIP lại xuất hiện lớp màng trắng sữa mỏng trên bề mặt. Các mẫu được đem đi đánh giá kích thước hạt, kết quả cho thấy ở các mẫu đều có sự thay đổi điều này được thể hiện ở hình 3.3. Tiếp tục phân tích SPSS cho thấy sự thay đổi kích thước hạt ở phương pháp PIT là không đáng kể so với mẫu ở phương pháp EIP. Điều này cho thấy sự mất ổn định khi tác động ngoại lực lên hệ nano được tạo từ phương pháp EIP.

Vì thế ở khảo sát này phương pháp PIT sẽ được lựa chọn để tiếp tục thực hiện các khảo sát ảnh hưởng tiếp theo. Bởi vì dựa trên kích thước hạt, độ phân tán và độ ổn định của hệ qua tác động của ngoại lực thì có thể thấy được rằng phương pháp PIT phù hợp với mục tiêu của đề tài hơn.

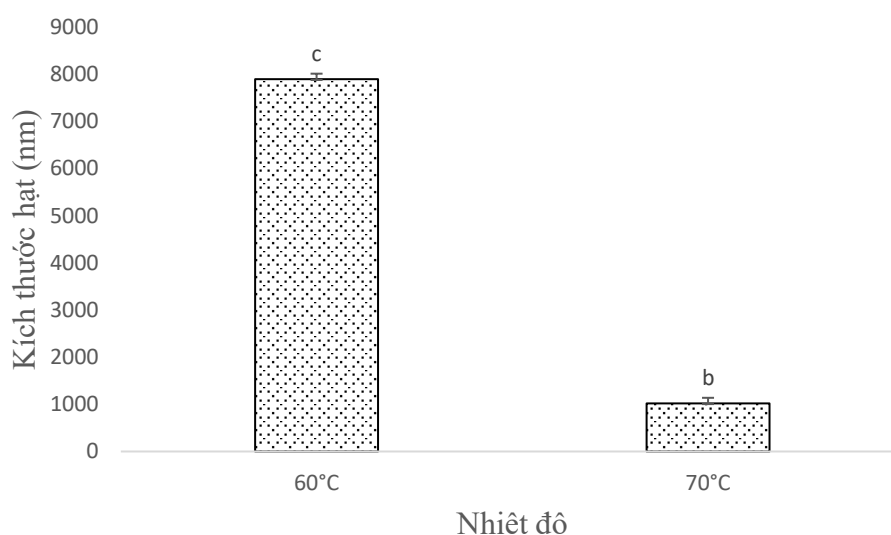
3.3. KHẢO SÁT THÔNG SỐ CÔNG NGHỆ ĐẾN HỆ NANO TINH DẦU TRÀM GIÓ

3.3.1. Xác định điểm đảo pha đến hệ nano tinh dầu TràM

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành hệ nano bằng phương pháp PIT. Nhiệt độ tại đó các tính chất thay đổi mạnh mẽ là PIT hệ sẽ chuyển từ đục sáng trong. Để tìm được nhiệt độ gia nhiệt phù hợp hơn cho hệ nhũ tương nano tinh dầu TràM được khảo sát nhiệt độ ở các mốc 60°C, 70°C, 80°C và 90°C.

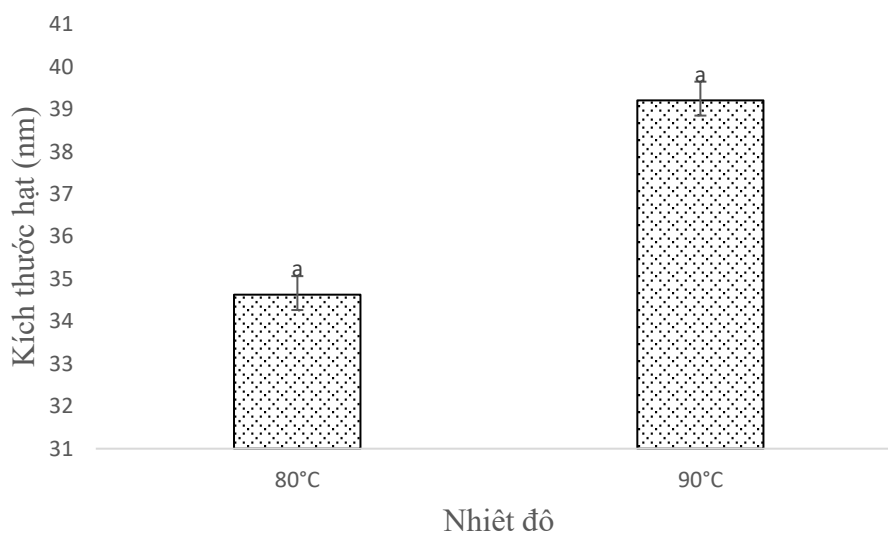
Việc khảo sát nhiệt độ thông qua phương pháp đo kích thước hạt cũng đã được thực hiện trong các nghiên cứu sau (Le et al., 2022), (Barzegar, 2018). Phương pháp PIT được giới thiệu bởi (Shinoda et al., 1968), về việc sử dụng khả năng của chất hoạt

động bề mặt không ion mà mức độ ưa nước làm thay đổi độ cong của chúng phụ thuộc và nhiệt độ. Như nhiệt độ tăng lên, nó chuyển sang dạng ưa dầu do sự mất nước càng tăng của nhóm đầu ưa nước lúc này chất nhũ hóa tan nhiều hơn trong pha dầu so với pha nước. Tuy nhiên, trước khi thay đổi từ đặc tính ưa nước sang đặc tính ưa dầu, nó đạt đến một điểm gọi là điểm đảo pha hoặc nhiệt độ cân bằng ưa nước-ky nước, tại đó nó không thể hiện cả hai tính chất này. Ở nhiệt độ thấp, các nhóm đầu nhũ hóa có hàm lượng hydrat hóa cao và có độ cong tự phát lớn tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành nhũ tương O/W. Ở nhiệt độ tới hạn là nhiệt độ HLB, các nhóm đầu chất hoạt động bề mặt bị mất nước một phần và độ cong tự nhiên bằng 0. Nó tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình thành pha vi nhũ tương đơn lớp hoặc hai lớp phẳng chứa lượng pha nước và pha dầu dư. Ở nhiệt độ cao (PIT < T từ 15 đến 20°C), các nhóm đầu cực của chất hoạt động bề mặt bị mất nước nhiều và độ cong tự phát trở nên âm thuận lợi cho sự hình thành nhũ tương nano. (Jintapattanakit, 2018).



Hình 3.4. Biểu đồ ảnh hưởng của 60°C và 70°C lên hệ nano tinh dầu Tràm

Khi hệ ở nhiệt độ 60°C và 70°C, hệ tạo thành có màu đục như sữa và bị tách lớp sau khi ổn định 24 giờ. Bên cạnh đó kích thước hạt và chỉ số phân tán ở cả hai nhiệt độ này cũng rất lớn. Ở 60°C kích thước hạt lên đến 7896.1 ± 116.43 nm và chỉ số phân tán là 0.87. Có thể thấy do nhiệt độ ở khảo sát này chưa đủ nên kích thước hạt vẫn còn lớn. Hệ nano ở nhiệt độ 70°C cũng cho thấy kích thước hạt lớn 1021.92 ± 16.9 nm và chỉ số phân tán 0.5054.



Hình 3.5. Biểu đồ ảnh hưởng của 80°C và 90°C lên hệ nano tinh dầu Tràm

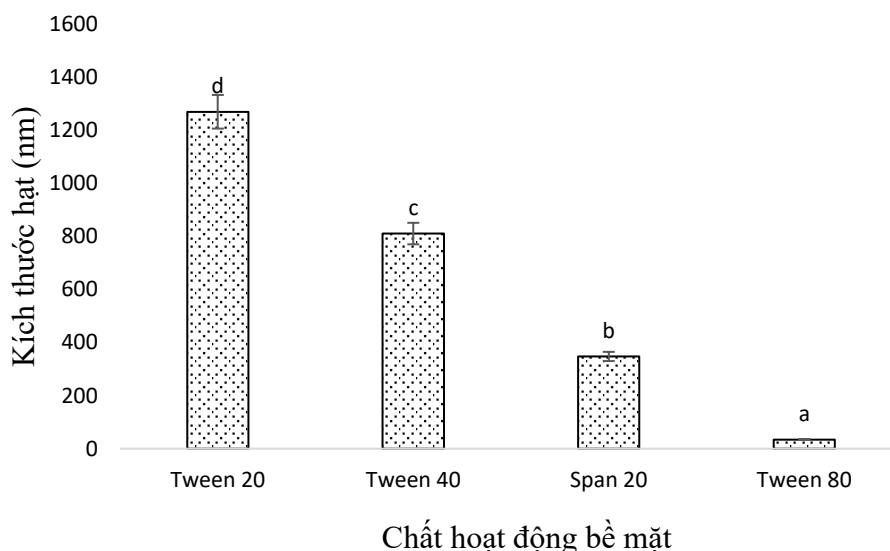
Nhưng ở nhiệt độ 80°C, trong quá trình gia nhiệt đến 77°C hệ đảo pha và trở nên trong suốt từ đó chứng minh rằng ở nhiệt độ 77°C chính là điểm đảo pha của hệ. Các mẫu ở nhiệt độ này đều đạt trạng thái trong suốt khi mới tạo thành. Điều này cho thấy trong điều kiện thí nghiệm, nhiệt độ 80°C tạo hệ nhũ tương nano hiệu quả hơn khi ở nhiệt độ 60-70°C. Ngoài ra các mẫu được điều chế ở nhiệt độ này đều cho kích thước rất bé 34.63 ± 0.434 nm, chỉ số phân tán PdI cũng nhỏ nhất khi ở 0.3395.

Để đánh giá toàn diện hơn, nhiệt độ gia nhiệt được tiếp tục tăng lên 90°C. Ở nhiệt độ cao, độ nhớt hệ giảm tạo điều kiện cho quá trình khuấy đồng đều hơn. Tuy nhiên gia nhiệt ở nhiệt độ cao trong thời gian dài có thể thất thoát các hợp chất có hoạt tính do bay hơi, đồng thời ở nhiệt độ cao có thể làm giảm tốc độ làm lạnh dẫn đến giảm sự đồng nhất của hệ tạo thành. Mặc dù kích thước hạt được điều chế cũng rất nhỏ 39.215 ± 0.36 nm, nhưng chỉ số phân tán PdI lớn hơn ở nhiệt độ 80°C đến 0.116.

Vì thế ở khảo sát này nhiệt độ 80°C được lựa chọn để tiếp tục các khảo sát tiếp theo.

3.3.2. Ảnh hưởng của loại chất hoạt động bề mặt đến hệ nano tinh dầu Tràm

Các chất Tween sử dụng có chỉ số HLB khác nhau do có sự khác biệt về cấu trúc phân tử nước, cụ thể là chuỗi acid béo. Sự khác biệt này có thể ảnh hưởng đến quá trình sắp xếp chất nhũ hóa trên bề mặt giọt và từ đó thay đổi tính chất của hệ nano tạo thành. Ở thí nghiệm này, bốn loại chất nhũ hóa Span 20, Tween 20, Tween 40, Tween 80 được sử dụng trong quá trình tạo thành hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm gió.



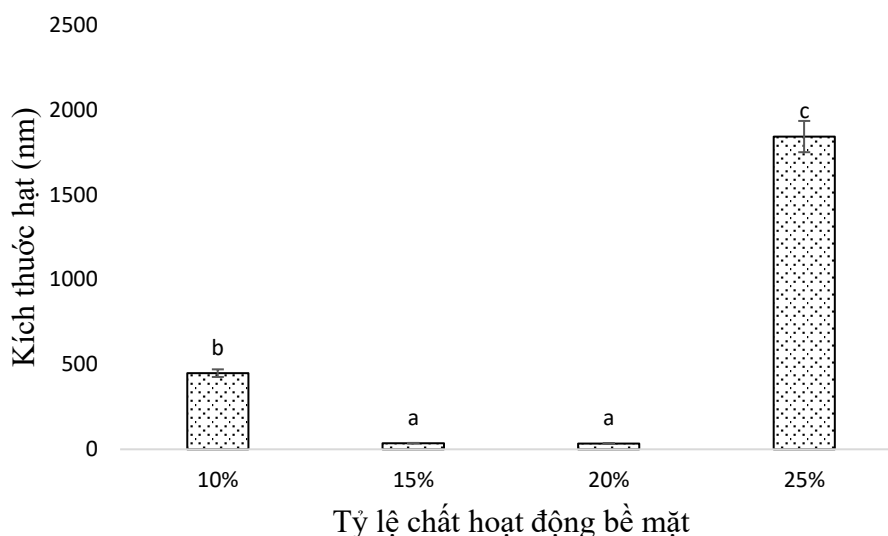
Hình 3.6. Biểu đồ ảnh hưởng loại chất hoạt động bề mặt

Ảnh hưởng của loại chất hoạt động bề mặt đến kích thước hạt của hệ nhũ tương nano được thể hiện như hình 3.5. Kích thước giọt nhỏ nhất được quan sát thấy khi điều chế hệ nhũ tương nano bằng Tween 80 ($d=34.63$ nm), kích thước của hệ được tạo từ Span 20 ($d=347.935$), Tween 40 ($d=811.58$) và Tween 20 ($d=1271.09$). Kết quả cho thấy tất cả đều có thể tạo thành hệ nhũ tương nano trong điều kiện thí nghiệm, nhưng loại chất hoạt động bề mặt cũng có ảnh hưởng lớn đến kích thước hạt và độ phân tán. So sánh số HLB ở các Tween khác nhau cho thấy Tween 80 và Tween 40 có chỉ số HLB gần nhau nhất so với Tween 20 và Span 20 (15.0, 15.6 và 16.7, 8.6). Có vẻ như trong quá trình tạo ra hệ nhũ tương nano ngoài chỉ số HLB còn có một số thông số khác có thể ảnh hưởng đến kích thước và độ phân tán của hạt trong hệ (McClements et al., 2011). Do sự hiện diện của nhóm đuôi chưa bão hòa, Tween 80 có thông số bao bọc cao hơn Tween 20, Tween 40 dẫn đến các giọt nhỏ hơn và vì đây là hệ nhũ tương O/W nên Span 20 là chất hoạt động bề mặt không phù hợp với yêu cầu đề tài. Kết quả này cho thấy, Tween 80 là chất hoạt động phù hợp nhất cho phương pháp này.

3.3.3. Ảnh hưởng tỷ lệ chất hoạt độ bề mặt lên hệ nano tinh dầu Tràm

CHĐBM được sử dụng để ổn định hệ nhũ tương nano bằng cách bảo vệ sự ổn định vật lý của chúng và ngăn ngừa suy giảm các hoạt tính sinh học. Ảnh hưởng của nồng độ CHĐBM đến các đặc tính hóa lý của nhũ tương nano tinh dầu Tràm (Chuacharoen et al., 2019). Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất hoạt động bề mặt đến kích thước của nhũ tương nano, các nồng độ chất hoạt động bề mặt được thay đổi (10%, 15%, 20%,

25%), trong khi vẫn giữ nguyên hàm lượng tinh dầu 10% không đổi, phần còn lại là nước cất hai lần.



Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần đến hệ nano tinh dầu Tràm

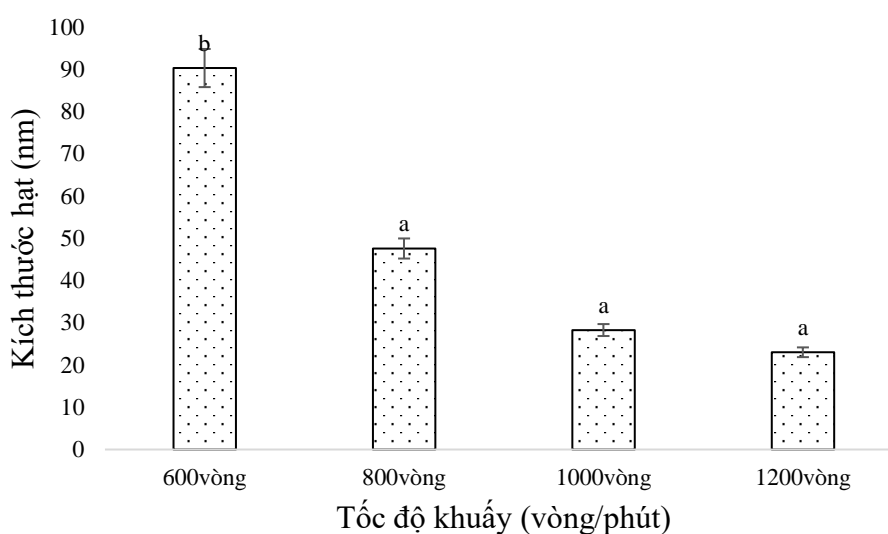
Khi nồng độ CHĐBM thấp, khả năng nhũ hóa trong lớp phân cách O/W không đủ để bao phủ hoàn toàn bề mặt giọt dầu, sự kết tụ các giọt dầu xảy ra và kích thước của các giọt sẽ tăng. Tăng chất hoạt động bề mặt sự tập trung sẽ mang lại kết quả tốt hơn khi lượng CHĐBM đủ để bao phủ tốt lượng dầu trong hệ. Kết quả được thể hiện ở hình 3.6. Lượng CHĐBM tăng quá cao hệ sẽ bị dư dẫn đến độ nhớt trong hệ cao làm cho kích thước hạt tăng.

Ở nồng độ 10%, mặc dù kích thước vẫn được xem là hệ nhũ tương nano nhưng hệ thống ở trạng thái không trong suốt và có màu như sữa. Khi ở mức 15-20%, hệ trở nên trong suốt về mặt quang học. Nhưng khi ở nồng độ 25% mặc dù theo quang học là hệ trong suốt nhưng độ phân tán và kích thước hạt trở nên to hơn theo lý thuyết thì ở kích thước này không được xem là hệ nano. Trong phần này, hệ nhũ tương nano với nồng độ Tween 80 là 15% được lựa chọn để tiếp tục các khảo sát phía sau.

3.3.4. Ảnh hưởng tốc độ khuấy lên hệ nano tinh dầu Tràm

Phương pháp PIT không yêu cầu quá cao về thiết bị đồng nhất chuyên dụng, chẳng hạn như thiết bị áp suất cao, thiết bị vi lỏng hoặc thiết bị siêu âm,... Tuy nhiên, nó vẫn cần khuấy trong quá trình đồng nhất hệ vì thế tốc độ khuấy cũng là một yếu tố có thể ảnh hưởng đến kích thước hạt của hệ nano. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy được khảo sát với hệ gồm 8% tinh dầu, 2% acid oleic và 15% chất nhũ hóa. Khi các pha hữu cơ được thêm từng giọt vào pha nước, tốc độ khuếch tán của các thành phần hòa tan và pha nước

chậm và kích thước giọt tương đối lớn nếu không có sự tác động từ bên ngoài. Lực phá vỡ mạnh cần thiết cho sự chuyển động nhanh chóng của các thành phần có thể hòa tan trong nước, phá vỡ các giọt nước và tạo thành nhũ tương nano. Do đó, tốc độ khuấy sẽ ảnh hưởng đến kích thước giọt khi nhũ tương được điều chế bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha. Kích thước giảm dần khi tăng tốc độ khuấy như hình 3.7. Hệ nano tinh dầu Tràm được tạo ra ở tốc độ 1200 vòng/phút có đường kính giọt nhỏ nhất ($d=23.025$ nm) so với hệ nano được tạo ra ở tốc độ 600 vòng/phút. Vì thế mẫu được tạo ở tốc độ khuấy là 1200 vòng/phút làm mẫu tối ưu.

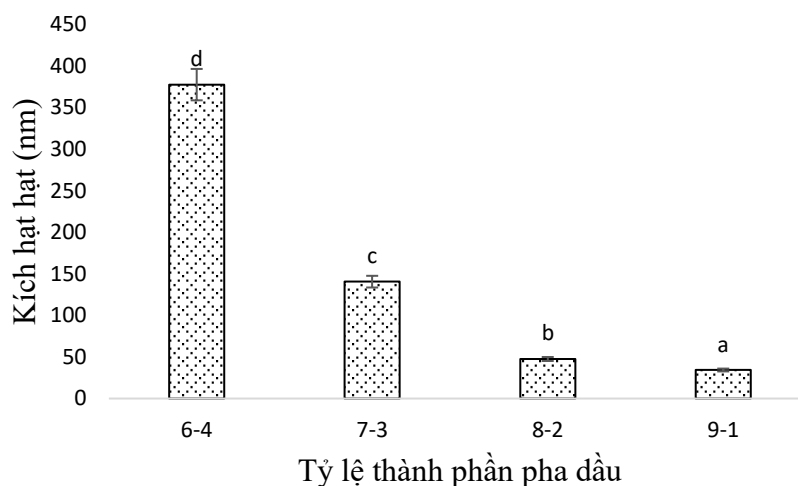


Hình 3.8. Ảnh hưởng tốc độ khuấy

Các nghiên cứu trước đây cũng đưa ra các báo cáo rằng kích thước giọt trung bình của nhũ tương nano được tạo ra bằng phương pháp năng lượng thấp giảm khi tăng tốc độ khuấy (Guttoff et al., 2015; Zhang et al., 2022)

3.3.5. Ảnh hưởng tỷ lệ thành phần pha dầu lên hệ nano tinh dầu Tràm

Cấu trúc pha dầu có ảnh hưởng thiết yếu đến việc tạo hệ nhũ tương nano. Trong bài thí nghiệm này, nồng độ pha dầu được giữ cố định ở mức 10%, trong đó tỷ lệ các thành phần giữa tinh dầu Tràm và acid oleic được thay đổi nhằm khảo sát khả năng tạo ra hệ nano của chúng.

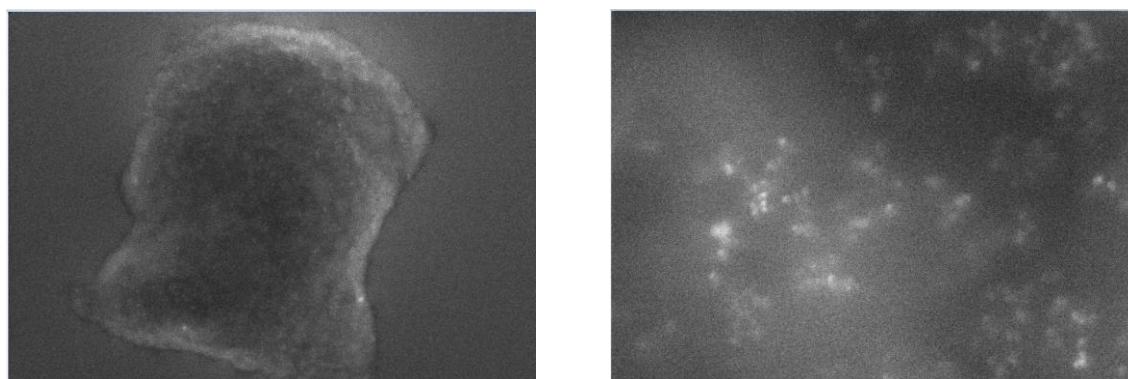


Hình 3.9. Biểu đồ tỷ lệ thành phần trong pha dầu

Tỷ lệ tinh dầu Tràm/acid oleic thấp nhất là 9-1 sau đó tăng dần lên 8-2, 7-3 và 6-4. Hình 3.8 thể hiện ảnh hưởng tỷ lệ thành phần trong pha dầu đến kích thước hạt. Theo quan sát có thể thấy được nhũ tương nano có thể được tạo ra với cả bốn tỷ lệ khác nhau. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy trong hệ thống nhũ tương nano tinh dầu, các giọt nhỏ có xu hướng kết tụ lại thành những giọt lớn hơn do hiệu ứng Ostwald. Để giải quyết vấn đề này, một loại dầu không tan trong nước như acid oleic để ức chế hiện tượng này. Điều này giải thích tại sao hệ thống nhũ tương nano tinh dầu được thêm vào acid oleic ở mức chấp nhận có thể được hình thành độ ổn định cao. Trong nghiên cứu này, hệ chứa hàm lượng tinh dầu Tràm cao (9-1 và 8-2) có kích thước hạt và độ phân tán nhỏ hơn.

Vì thế mẫu 8-2 sẽ được chọn để làm mẫu tốt nhất vì tỷ lệ tinh dầu Tràm không quá ít và tỷ lệ acid oleic cũng đủ để giữ lại các khả năng chính của tinh dầu Tràm. Sau khi đã chọn ra được các yếu tố tối ưu nhất của hệ nano này thì mẫu sẽ được tiến hành lưu mẫu ở 5°C và nhiệt độ phòng được đo độ ổn định sau 30 ngày.

3.4. HÌNH THÁI HẠT



Hình 3.10. Hình thái qua SEM của hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm

Hình thái học đóng một vai trò thiết yếu trong hoạt động của một hệ nhũ tương nano. Ví dụ, trong các ứng dụng y tế hình thái của hệ nhũ tương nano ảnh hưởng đến tỷ lệ bề mặt của chúng và có thể ảnh hưởng đến sự phân bố thuốc trong máu, thời gian lưu và hiệu quả tác dụng đến mục tiêu cần tác động (Aguilar-Pérez et al., 2021). Hình ảnh SEM cho thấy giọt nhũ không có cấu trúc hình cầu mà có hình dạng bo tròn với kích thước không đồng nhất. Theo kết quả phân tích kích thước hạt trung bình của mẫu là 23.025 ± 0.5162 nm. Tuy nhiên với hình chụp từ kính hiển vi điện tử, kích thước giọt trung bình của mẫu được dao động nằm trong khoảng 100 nm, điều này cho thấy sự mất ổn định của mẫu trong quá trình bảo quản đợi phân tích hình thái.

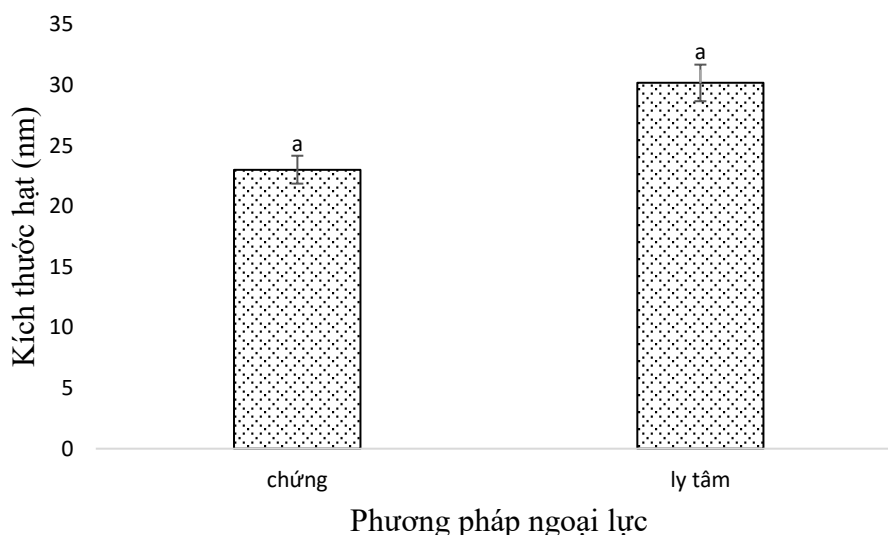
3.5. ĐÁNH GIÁ ĐỘ BỀN CỦA HỆ NHỮ TƯƠNG NANO TINH DẦU TRÀM

Một yêu cầu quan trọng của hệ nano tinh dầu ứng dụng trong Dược-Mỹ phẩm là chúng phải ổn định về mặt vật lý trong suốt thời gian sử dụng. Nhũ tương nano thường không ổn định về mặt nhiệt động và kết tụ trong quá trình bảo quản có thể dẫn đến sự tách pha. Do đó, hệ nano tinh dầu Tràem cần phải ổn định trong điều kiện môi trường xung quanh trong quá trình sản xuất, bảo quản, vận chuyển và ứng dụng.

Các phương pháp đánh giá độ ổn định có thể dựa trên việc quan sát hệ thống nhũ tương trong một khoảng thời gian xác định (phương pháp lão hóa nhũ tương), đánh giá nhanh độ bền của hệ nhũ tương bằng tác động của của ngoại lực (phương pháp ly tâm và siêu âm) (Gawin-Mikołajewicz et al., 2021)

3.5.1. Độ bền hệ nhũ tương dưới tác động của ngoại lực

Phương pháp ly tâm và siêu âm để tác dụng lực gia tốc và sóng siêu âm lên mẫu làm tách pha bởi trọng lực của những phân tử trong pha phân tán. Trong quá trình ly tâm nếu hệ không bền sẽ dẫn đến quá trình kết tụ thành hạt có kích thước lớn, dẫn đến việc các hạt lớn hơn sẽ lắng xuống đáy, còn các hạt nhỏ hơn sẽ nằm phía trên ống ly tâm. Sóng siêu âm tác động lên hệ, tạo nên hiện tượng tách pha nếu hệ không ổn định.



Hình 3.11. Kết quả ảnh hưởng tác động ngoại lực

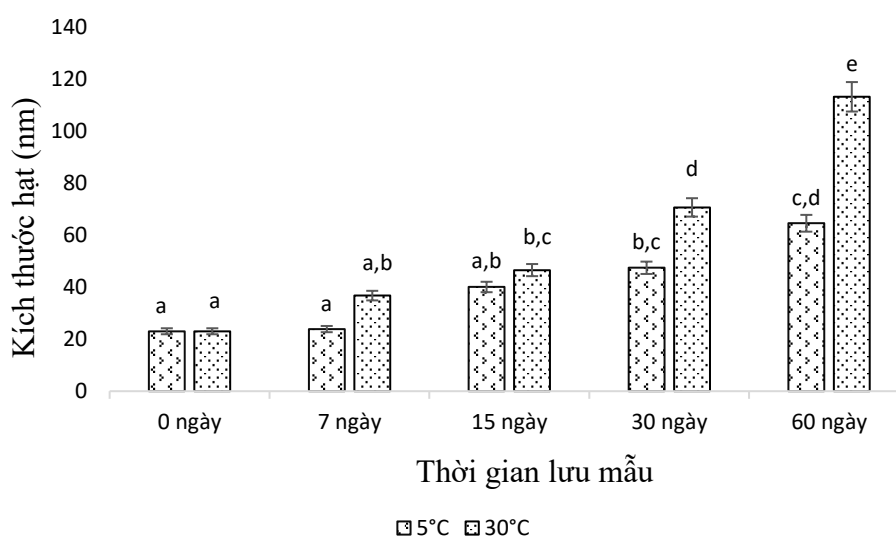
Kết quả được thể hiện như Hình 3.10 hệ nano tinh dầu Tràm được khảo sát bởi yếu tố ly tâm đều ổn định trạng thái khi ly tâm 4 000 vòng/phút trong thời gian 30 phút siêu âm ở 15 phút. Kết quả cho thấy không có hiện tượng tạo bọt hoặc tách pha với sự thay đổi không đáng kể về độ quang học và kích thước hạt thay đổi không đáng kể. Vì vậy có thể kết luận rằng, dưới tác dụng của lực ly tâm và siêu âm, độ ổn định của hệ nano tinh dầu Tràm không bị thay đổi và nhũ tương được đánh giá là ổn định về mặt động học do sự phân tán hoàn hảo và kích thước hạt tối thiểu đạt được bằng cách sử dụng phương pháp PIT.

3.5.2. Độ bền của hệ nano tinh dầu Tràm dưới tác động của thời gian và điều kiện bảo quản

Trong phần này độ ổn định của hệ nano tinh dầu Tràm được khảo sát thông qua hai điều kiện bảo quản là 5°C và 30°C, thông qua các mốc thời gian sau khi hệ nano được ổn định, 7 ngày, 15 ngày, 30 ngày và 60 ngày của hệ nano tinh dầu Tràm. Trong thí nghiệm cho thấy hệ nano Tinh dầu tràm chứa 10% tinh dầu và 15% chất nhũ hóa trong suốt về mặt quang học và có kích thước giọt rất nhỏ. Kết quả cho thấy có sự khác biệt rất lớn về sự ổn định vật lý của hệ nano tinh dầu Tràm trong khoảng thời gian lưu mẫu ở cả hai trường hợp.

Hình 3.11 cho thấy sự khác biệt bởi ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến độ ổn định của hệ nano tinh dầu Tràm. Trường hợp đầu tiên mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong khoảng thời gian 60 ngày cho thấy độ ổn định của hệ khi kích thước hạt thay đổi rất ít (34-65 nm) và nhũ thương nano trong suốt trong quá trình bảo quản. Trường

hợp thứ hai mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng (30°C) trong khoảng thời gian 60 ngày cho thấy kích thước hạt tăng rất nhanh và sau 15 ngày hệ nano tinh dầu Tràm bắt đầu chuyển dần sang đục.



Hình 3.12. Độ bền của hệ nano tinh dầu Tràm qua điều kiện bảo quản

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản và thời gian bảo quản đến độ ổn định của nhũ tương nano thể hiện rất rõ qua quá trình lưu mẫu. Ở điều kiện lưu mẫu 30°C kích thước giọt tăng đáng kể có thể là do tốc độ kết tụ các giọt làm tăng lên trong phạm vi nhiệt độ ngay dưới PIT. Nhiệt độ bảo quản càng gần nhiệt độ PIT thì hệ nhũ tương càng kém ổn định, nên nhiệt độ bảo quản tốt nhất là 5°C.

3.6. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA HỆ NANO TINH DẦU TRÀM

Rất nhiều hệ nano tinh dầu từ thiên nhiên được nghiên cứu cho thấy nó có tác dụng loại bỏ các gốc tự do gây tổn hại cho cơ thể và giảm nguy cơ mắc nhiều bệnh bắt nguồn từ stress oxy hóa. Để đo lường tác dụng của nano tinh dầu Tràm và xác định ứng dụng tiềm năng của nó trong ngành công nghiệp Dược-Mỹ phẩm, ở đây có hai phương pháp được sử dụng là 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) và 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS).

Bảng 3.3. Khả năng kháng oxy hóa của tinh dầu Tràm và nano tinh dầu Tràm

Phương pháp	Mẫu	
	Tinh dầu Tràm	Nano tinh dầu Tràm
DPPH (mg AAE/mL)	11.37 ± 0.5	9.79 ± 1.6
ABTS (mg TE/mL)	14.77 ± 1.6	11.64 ± 1.4

Hoạt tính kháng oxy hóa được đánh giá bằng phương pháp đo quang màu sử dụng gốc tự do DPPH, đặc trưng là ổn định do sự tái định vị electron tự do trên phần mở rộng của phân tử, do đó nó không bị Dimer hóa, như trường hợp của các gốc tự do khác (Sousa et al., 2007). Phương pháp ABTS đo lường khả năng của các chất chống oxy hóa cung cấp hydro để loại bỏ cation gốc ABTS (Re et al., 1999). Mặc dù gốc ABTS⁺⁺ không ổn định như gốc DPPH nhưng tính đơn giản và tốc độ của phương pháp này được coi là một cách nhanh chóng để ước tính hoạt tính oxy hóa ở nghiên cứu này kết quả được hiển thị ở Bảng 3.3. Theo kết quả tính được của tinh dầu ở hai phương pháp DPPH và ABTS lần lượt là 11.37 ± 0.5 mg AAE/mL và 14.77 ± 1.6 mg TE/mL chứng tỏ khả năng ức chế gốc tự do cao hơn là nano tinh dầu Tràm là 9.79 ± 1.6 mg AAE/L và 11.64 ± 1.4 mg TE/L. Mặc dù khả năng kháng oxy hóa của hệ nano tinh dầu Tràm là thấp hơn so với tinh dầu nguyên liệu. Nhưng ta cũng có thể thấy rằng chỉ có 8% tinh dầu trong tổng hệ nano. Vì vậy, nghiên cứu này đã chứng minh khả năng tạo hệ nano tinh dầu Tràm có khả năng duy trì và thậm chí tăng cường sự biểu hiện của hoạt động kháng oxy hóa.

3.7. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA HỆ NANO TINH DẦU TRÀM

Bảng 3.4. Kết quả kháng khuẩn của phương pháp khuếch tán đĩa thạch

	Phạm vi ức chế vi khuẩn (mm)		
	Ampicillin	Tinh dầu Tràm	Nano tinh dầu Tràm
<i>S. aureus</i>	13.33	13	11
<i>S. pneumoiae</i>	13.67	14	11
<i>E. coli</i>	13.33	13.3	10.33
<i>C. albicans</i>	13.67	12.67	10.67

Đặc tính kháng khuẩn của hệ nano tinh dầu Tràm được phân tích bằng hai phương pháp phân tích: phương pháp khuếch tán đĩa thạch, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được đánh giá trên bốn loại vi khuẩn là *S. aureus*, *S. pneumoiae*, *E. coli*, *C. albicans*. Tất cả các phân tích, đánh giá vi sinh được thực hiện trên hệ nhũ tương nano tinh dầu Tràm chứa 8% tinh dầu Tràm và 2% acid oleic và phần tinh dầu Tràm làm nguyên liệu điều chế nano. Kết quả của phương pháp khuếch tán đĩa thạch được trình bày trong bảng 3.6 cho thấy rằng khi sử dụng nước cất làm đối chứng âm thì nó hoàn toàn không có khả năng kháng khuẩn. Tinh dầu Tràm và nano tinh dầu Tràm thể hiện rất tốt khả năng kháng khuẩn của mình so với đối chứng dương Ampicillin bởi các hoạt tính kháng khuẩn của

nó, mặc dù khả năng kháng khuẩn của nó thấp hơn đối chứng dương. Hoạt tính kháng khuẩn của nano tinh dầu Tràm thấp hơn tinh dầu Tràm, nhưng có một lưu ý ở đây là hệ nano này chỉ sử dụng có 8% tinh dầu trong tổng hệ. Do đó, trên thực tế hàm lượng tinh dầu trong hệ nano thấp hơn rất nhiều so với tinh dầu gốc và việc này cho thấy hàm lượng ức chế vi khuẩn được tăng lên so với tinh dầu gốc.

Bảng 3.5. Nồng độ ức chế tối thiểu của nano tinh dầu Tràm

Nồng độ ức chế tối thiểu vi khuẩn ($\mu\text{L/mL}$)		
	Tinh dầu Tràm	Nano tinh dầu Tràm
<i>S. aureus</i>	15.625	31.25
<i>S. pneumoiae</i>	15.625	31.25
<i>E. coli</i>	15.625	31.25
<i>C. albicans</i>	15.625	31.25

Ngoài ra, khả năng ức chế tối thiểu được đo bằng chỉ tiêu MIC cho thấy sự cải thiện về đặc tính kháng khuẩn của hệ nano tinh dầu Tràm. Tuy nhiên, với hàm lượng tinh dầu là 8% trong hệ nano có thể xem là thấp để cải thiện khả năng ức chế vi khuẩn so với tinh dầu Tràm. Bên cạnh đó có một số đặc tính hóa lý có thể ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của nano tinh dầu Tràm. Chúng bao gồm kích thước hạt, tính chất và nồng độ của tinh dầu trong hệ nano. Theo Francesco Donsi kích thước hạt của nhũ tương nano là liên quan chặt chẽ đến đặc tính kháng khuẩn của hệ nano vì các giọt nhỏ hơn có thể vận chuyển các hoạt chất sinh học qua màng vi khuẩn dễ dàng hơn (Donsi et al., 2012).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hai phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT) và điểm đảo pha (EIP) được sử dụng để điều chế nano tinh dầu Tràm. Ảnh hưởng của loại chất hoạt động bề mặt, tỷ lệ chất hoạt động bề mặt, thành phần pha dầu và tốc độ khuấy đến quá trình tạo hệ nano tinh dầu được khảo sát. Kết quả cho thấy phương pháp PIT là phương pháp phù hợp để tạo hệ nano nhũ tương tinh dầu Tràm đạt kích thước 23.205 ± 0.5162 nm với thành phần hệ gồm có 8% tinh dầu Tràm, 2% acid oleic, 15% Tween 80 và nước. Hệ nano được chế tạo cho thấy sự ổn định với kích thước gia tăng không đáng kể sau 60 ngày bảo quản. Các mẫu nano tinh dầu Tràm được thử nghiệm khả năng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn gây bệnh trên da và hô hấp gồm *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli* và *C. albicans* cho thấy khả năng kháng khuẩn mạnh. Kết quả này có thể đóng góp cho việc nâng cao tiềm năng ứng dụng của tinh dầu Tràm trong Dược- Mỹ phẩm.

2. KIẾN NGHỊ

Với mục tiêu của đề tài và qua thời gian thực hiện nghiên cứu, tôi nhận thấy còn nhiều khảo sát và ứng dụng cần được khai thác. Để tiếp tục hoàn thiện và mở rộng đề tài, tôi muốn kiến nghị khảo sát thêm một số nội dung như sau:

- Nghiên cứu mở rộng ứng dụng của hệ nano tinh dầu Tràm.
- Nghiên cứu tăng phần trăm tinh dầu Tràm trong hệ nano.
- Làm mới loại chất hoạt động bề mặt được sử dụng.
- Nghiên cứu phương pháp mới tạo hệ nano tinh dầu Tràm.
- Tăng thời gian kiểm tra độ ổn định của hệ nhũ tương nano sau 90-120 ngày lưu mẫu.