

Chương 1. TỔNG QUAN ĐỀ TÀI

1.1. GIỚI THIỆU TINH DẦU SẢ JAVA

1.1.1. Giới thiệu sả Java

Sả Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) là loài thực vật thuộc chi sả (*Cymbopogon*).

Chi sả là một chi chứa khoảng 55 loài trong họ *Poaceae*.



Hình 1.1. Sả Java - *Cymbopogon winterianus* Jowitt

Sả Java thuộc nhóm cây có mùi hương, đây là loại cây nhiệt đới sống lâu năm. Cây thường xanh, có chòm sợi với nhiều thân mọc thẳng phát sinh từ một thân rễ ngắn. Thân cao tới 2,5 mét, hình tròn, mịn và bóng. Lá có hình dạng thuôn dài, bề mặt có lông nhám và có xu hướng rũ xuống 3/4 phần lá. Thân cây có màu hồng tím hoặc đỏ thẫm. Rễ mọc khỏe, ăn sâu xuống đất khoảng từ 25-30 cm. Các chồi non mọc ra từ nách lá và hình thành cây con được gọi là các tép sả, nhiều tép tạo thành bụi sả (Ravindran, 2017). Cây có nguồn gốc từ đảo Java của Indonesia, hiện đang phân bố tại các tỉnh Tuyên Quang, Ninh Bình, Hà Tĩnh, vùng núi Tây Nguyên của Việt Nam (Singh & Kumar, 2017a).

Các quốc gia trên thế giới ứng dụng sả Java vào trong y học cổ truyền và được xem như một nguồn dược liệu quý nhờ các hoạt tính sinh học của chúng (Sharma et al., 2019a; Simic et al., 2008; Ram S Verma et al., 2020).

1.1.2. Giới thiệu về tinh dầu sả Java

Java Citronella essential oil là một hỗn hợp chứa nhiều hoạt chất dễ bay hơi và có mùi thơm đặc trưng được chiết xuất bằng chưng cất hơi nước từ cây sả Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Wany et al., 2014).



Hình 1.2. Tinh dầu sả Java

Được cấu tạo chủ yếu bởi các monoterpenes ($\pm 80\%$). Citronellal, Citronellol và Geraniol là những terpenoid chính được tìm thấy trong tinh dầu sả Java và là chất nền để tổng hợp các chất hữu cơ như nước hoa (Ram S Verma et al., 2020). Citronellal được sử dụng trong tổng hợp hóa học nhiều hợp chất khác nhau, đặc biệt là hydroxycitronellal, là chất điều hương quan trọng, làm cho nước hoa có mùi hoa tự nhiên (Beneti et al., 2011; Sharma et al., 2019b). Geraniol là hợp chất không màu, mùi dễ chịu giống hương thơm của hoa hồng, là một trong những thành phần trong nước hoa và cũng là một chất tạo hương vị của nhiều loại thực phẩm. Citronellol là thành phần phổ biến trong ngành nước hoa và các loại thuốc chống côn trùng (Katsukawa et al., 2011; Sedikelo et al., 2022; Sharma et al., 2019b).

Tinh dầu sả Java được đánh giá theo TCVN 11426:2016 (ISO 3848:2016) (Singh, Kumar, et al., 2017).

Trong tinh dầu sả Java gồm các hợp chất đặc trưng như: Citronellal (2,2–55,4%), Geraniol (14,2–53,0%), Citronellol (8,2–16,4%), D-Limonene (0,2–5,0%), Elemol (0,8–8,2%), Citronellyl Acetate (0,3–1,7%), Geranyl Acetate (0,6–2,3%), β -Elemene (0,2–1,4%), Germacrene D (0,1–1,7%), δ -Cadinene (0,2–1,3%) (Ram S. Verma et al., 2020).

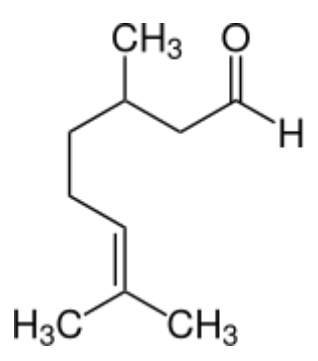
1.2. GIỚI THIỆU VỀ HOẠT CHẤT CITRONELLAL, CITRONELLOL VÀ GERANIOL.

Citronellal (3,7-dimethyl-6-octenal) là một monoterpene, chủ yếu được hình thành bởi quá trình trao đổi chất thứ cấp của thực vật. Nó thường được phân tách như một hỗn hợp bằng cách chưng cất hơi nước hoặc chiết xuất dung môi từ dầu của *Corymbia citriodora* Hill và Johnson và cây sả Java (Singh & Kumar, 2017b).

Danh pháp IUPAC: 3,7-Dimethyloct-6-enal

Số CAS: 106-23-0

Bảng 1.1. Các thông số hóa lý và cấu tạo của Citronellal

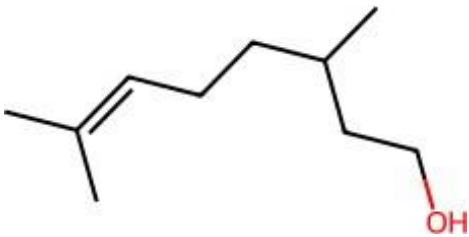
Thông số hóa lý		Công thức cấu tạo
Công thức phân tử	C ₁₀ H ₁₈ O	
Khối lượng phân tử	154,25 g/mol	
Khối lượng riêng	0,855 g/cm ³	
Nhiệt độ sôi	201-207°C	
Nhiệt hóa hơi tiêu chuẩn	44,2 kJ/mol	

Citronellol là một monoterpene rượu monoterpene được tìm thấy trong tinh dầu của thực vật thuộc chi *Cymbopogon* (Santos *et al.*, 2019).

Danh pháp IUPAC: 3,7-Dimethyloct-6-en-1-ol

Số CAS: 106-22-9

Bảng 1.2. Các thông số hóa lý và cấu tạo của Citronellol

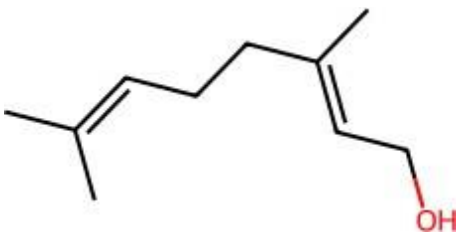
	Thông số hóa lý	Công thức cấu tạo
Công thức phân tử	C ₁₀ H ₂₀ O	
Khối lượng phân tử	156,27 g/mol	
Khối lượng riêng	0,855 g/cm ³	
Nhiệt độ sôi	225°C	
Nhiệt hóa hơi tiêu chuẩn	63,50 kJ/mol	

Geraniol là một loại rượu monoterpene có mùi thơm dễ chịu giống như hoa hồng, được biết đến là thành phần quan trọng trong nhiều loại tinh dầu và được sử dụng thương mại như một chất nền tổng hợp hương thơm trong mỹ phẩm và các sản phẩm gia dụng (Mączka *et al.*, 2020).

Danh pháp IUPAC: (2E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-ol

Số CAS: 106-24-1

Bảng 1.3. Các thông số hóa lý và cấu tạo của Geraniol

	Thông số hóa lý	Công thức cấu tạo
Công thức phân tử	C ₁₀ H ₁₈ O	
Khối lượng phân tử	154,25 g/mol	
Khối lượng riêng	0,889 g/cm ³	
Nhiệt độ sôi	230°C	
Nhiệt hóa hơi tiêu chuẩn	54,61 kJ/mol	

1.3. PHƯƠNG PHÁP CHUNG CẤT PHÂN ĐOẠN CHÂN KHÔNG

Phương pháp chưng cất này được biết đến và sử dụng rộng rãi để tách các thành phần dễ bay hơi trong hỗn hợp lỏng. Trong ngành công nghiệp dầu khí, công nghệ chưng cất chân không phân đoạn là phương pháp đã được sử dụng rất lâu đời (Parra *et al.*, 2010). Quá trình được thực hiện trong điều kiện chân không bằng cách đun nóng hỗn hợp các chất có nhiệt độ sôi khác nhau, trong đó các chất có nhiệt độ sôi thấp nhất

sẽ được phân tách trước, cho đến cuối cùng là chất có nhiệt độ sôi cao nhất. Trong quá trình phân tách, pha hơi được làm giàu bởi thành phần dễ bay hơi nhất khi nó lên đến đỉnh cột. Phương pháp này dựa trên sự khác biệt về độ bay hơi của các thành phần trong hỗn hợp, trong đó quá trình truyền khối xảy ra thông qua sự tiếp xúc giữa pha hơi và pha lỏng ở cùng nhiệt độ và áp suất, quá trình bay hơi và ngưng tụ xảy ra đồng thời và liên tục. Kết quả làm gia tăng nồng độ của thành phần dễ bay hơi hơn trong pha hơi và thành phần ít bay hơi hơn trong pha lỏng. Chỉ sau khi hầu hết chất lỏng dễ bay hơi hơn đã được tách khỏi hỗn hợp, chất lỏng ít bay hơi hơn sẽ trải qua quá trình bay hơi và ngưng tụ (Beneti et al., 2011; W. P. Silvestre et al., 2016).

Phương pháp này dựa trên sự khác biệt về độ bay hơi của các hợp chất và phụ thuộc vào tính chất vật lý và hóa học của các cấu tử cũng như áp suất và nhiệt độ của quá trình chưng cất. Hiệu suất quá trình phân tách cũng phụ thuộc vào các quá trình truyền nhiệt, truyền khối giữa các pha lỏng và hơi của hỗn hợp. Do đó, loại đệm, đường kính và chiều cao của cột chưng cất ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả (Wankat, 2006). Tinh dầu là sự pha trộn của terpen và các hợp chất dễ bay hơi khác. Hầu hết các terpen không ổn định nhiệt, phân hủy hoặc oxy hóa ở nhiệt độ cao hoặc khi có ánh sáng hoặc oxy. Do đó, quy trình chưng cất thường được thực hiện ở áp suất chân không để giảm nhiệt độ hóa hơi của hỗn hợp dễ bay hơi. Việc sử dụng áp suất chân không làm giảm nhiệt độ sôi của các hợp chất vì độ bay hơi tăng lên khi áp suất giảm, quá trình này thúc đẩy sự phân tách. Khi thực hiện ở áp suất chân không cũng làm chậm các phản ứng phân hủy các hợp chất nhạy cảm với nhiệt độ do giảm nhiệt độ sôi so với khi làm việc ở áp suất khí quyển. Gần đây với nhu cầu ngày càng cao của con người và sản xuất, việc sử dụng công nghệ này càng được chú trọng hơn để phục vụ cho nhu cầu này.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

1.4.1. Tình hình trong nước

ThS. Nguyễn Thị Ngọc Lan, ThS. Nguyễn Quốc Duy Khoa Kỹ thuật Thực phẩm và Môi trường của Đại học Nguyễn Tất Thành, nghiên cứu chưng cất tinh dầu sả Java nhập từ huyện Lâm Hà bằng phương pháp chưng cất trực tiếp và so sánh chúng với tinh dầu sả Java được chưng cất từ nguồn nguyên liệu khác. Kết luận cho thấy, các chất chính trong tinh dầu sả ở Lâm Hà đều có giá trị đạt chuẩn ISO 3848:2016 và cao hơn tinh dầu sả Java chưng cất từ nguồn nguyên liệu nơi khác (Lan et al., 2020).

Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Trọng Phúc Nguyên vào năm 2022 đã tiến hành nâng cao hàm lượng hoạt chất Citronellal từ hai loại tinh dầu cây bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora*) và cây sả Java (*Cymbopogon winterianus*) bằng phương pháp phân đoạn chân không sâu. Kết quả phân tích GC–MS của các phân đoạn thể hiện tại phân đoạn F2 của từng loại tinh dầu thu được hàm lượng với độ thu hồi Citronellal cao là 87,51% và 91,58% (Nguyễn *et al.*, 2022).

ThS. Phạm Hoàng Danh, ThS. Nguyễn Đình Phúc Khoa Kỹ thuật Thực phẩm và Môi trường tại trường ĐH Nguyễn Tất Thành, ở nhiệt độ sôi khác nhau tinh dầu trầm gió thô được phân thành nhiều phân đoạn bằng việc sử dụng phương pháp chưng cất phân đoạn chân không. Kết quả thu được bốn phân đoạn Trầm gió rất khác nhau về mặt cảm quan. Hàm lượng và độ thu hồi eucalyptol ở bày này lần lượt là 74,8 và 96,4%. Eucalyptol thu được lớn hơn nhiều so với giá trị tối thiểu (40%), được quy định trong quy chuẩn kỹ thuật địa phương đối với tinh dầu Trầm ở Huế (QCĐP 1:2017/TT-H) (Danh *et al.*, 2022).

Năm 2021, nhóm nghiên cứu của Thạc sĩ Đỗ Đình Nhật đã thực hiện khảo sát tối ưu ảnh hưởng của các thông số quá trình lên phương pháp chưng cất phân đoạn chân không tinh dầu sả chanh (*Cymbopogon citratus*), bao gồm áp suất chân không, loại cột chưng cất và năng lượng được cung cấp cho toàn hệ thống. Kết quả thể hiện ở điều kiện tối ưu gồm cột 400 mm, áp suất 15 mmHg và 165 W năng lượng đầu vào, quá trình sẽ thu được 5 phân đoạn với hàm lượng hoạt chất Citral cao nhất (chiếm 95%) ở phân đoạn F4, F5 với độ thu hồi lên đến 80% (Dinh Nhat Do *et al.*, 2021).

1.4.2. Tình hình ngoài nước

Nhóm nghiên cứu của Milojevic cùng cộng sự (2010) (Milojević *et al.*, 2010) báo cáo các mô hình chưng cất phân đoạn tinh dầu ở cây bách xù (*Juniperus communis* L.). Kết quả đã tách được một số thành phần chủ yếu của tinh dầu gồm α -pinen, sabinene và myrcene (65% tinh dầu).

Silvestre và cộng sự (2016) (Wendel P Silvestre *et al.*, 2016), tiến hành nghiên cứu phân đoạn tinh dầu quýt xanh (*Citrus deliciosa* Tenore). Các kết quả thu được chứng minh rằng chưng cất phân đoạn chân không có khả năng tách các tecpen hydrocacbon (thu hồi ở đỉnh cột) khỏi các tecpen có chức năng hóa học khác (rượu, andehit, xeton, v.v.) vẫn còn ở dưới cùng. Một số hợp chất vi lượng trong tinh dầu quýt xanh, chẳng hạn như metyl-N-metyl anthranilate (phần khối lượng 0,006g trong

tinh dầu thô) và alpha sinensal (phần khối lượng 0,004g trong tinh dầu thô), nồng độ của chúng tăng hơn mười lần sau khi phân tách. Phần khối lượng của hợp chất chính của tinh dầu, D-Limonene, đã giảm từ 0,707 g trong dầu thô xuống 0,218 g ở đáy cột. Không có bằng chứng về sự biến tính vì nhiệt độ trong các sản phẩm của quá trình tách.

Năm 2017, một nhóm nghiên cứu đứng đầu là Pauletti (*Perini et al., 2017*) với việc áp dụng công nghệ phân tách này để tách các hoạt chất trong tinh dầu cam. Kết quả, trong nguyên liệu thô, hàm lượng Linalool, một hoạt chất công dụng điều trị cảm cúm tốt, tăng từ 0,37% lên 4,22% ở phân khúc dưới đáy tháp. Cùng với phương pháp này nhưng ở một số nghiên cứu khác, hoạt chất D-limonen được phân tách với độ tinh khiết 96,7% với áp suất 100 mmHg ở 25-26°C (*Amanzadeh et al., 2006*).

Phương pháp chưng cất chân không phân đoạn có hoàn lưu cũng được ứng dụng để phân tách và tinh chế tinh dầu sả Java (*Eden et al., 2018*). Với việc áp dụng công nghệ phân tách này, áp suất được điều chỉnh là -76 cmHg với tỉ lệ hoàn lưu là 5:1. Trong hỗn hợp ban đầu, các hoạt chất chính có trong tinh dầu sả Java như Citronellal, Citronellol và Geraniol hàm lượng được xác định lần lượt là 21,59%, 7,45% và 34,27%. Sau khi chưng cất và tinh chế dưới áp suất chân không thu được Citronellal với độ tinh khiết là 75,67% và rhodinol còn lại bao gồm thành phần Citronellol và Geraniol với độ tinh khiết lần lượt là 19,33% và 34,31%. Tinh chế rhodinol thu được Citronellol và Geraniol với độ tinh khiết lần lượt là 80,65% và 76,63%.

Nhóm nghiên cứu của Silvestre và cộng sự (2019) (*Silvestre et al., 2019*) cũng đã tiến hành nghiên cứu quá trình phân đoạn tinh dầu hương thảo bằng phương pháp chưng cất phân đoạn chân không. Các tecpen nhẹ đã bị loại bỏ ở trên đỉnh cột, trong khi các thành phần chứa oxy vẫn ở dưới cùng. Những chứng minh trên cho thấy, phương pháp này có khả năng mở rộng và hiệu suất tốt trong việc tinh chế và chiết tách các chế phẩm mang dược tính trong tinh dầu.

Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

Tinh dầu sả Java có nguồn gốc từ huyện Mường La, tỉnh Sơn La. Đây là vùng nguyên liệu sả Java quy mô lớn của Việt Nam. Tinh dầu sả Java được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước, được cung cấp bởi công ty TNHH KHKT Suwina, TP HCM.



Hình 2.1. Tinh dầu sả Java thô

2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

Bảng 2.1. Hóa chất sử dụng

Tên hóa chất	Công thức phân tử	Xuất xứ
Gốc tự do ABTS ^{•+} 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	Đức
Gốc tự do DPPH [•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Đức
Bột Agar		Việt Nam
Ethanol 96%	C_2H_5OH	Mỹ
Acid ascorbic 99%	AAE	Trung Quốc
Trolox 97%	TE	Trung Quốc
Methanol $\geq 99,9\%$ (HPLC)	CH_3OH	Đức
Mueller Hinton Broth	MHB	Ấn Độ
Nước cất 2 lần	H_2O	Việt Nam

Potassium Persulfate

 $K_2S_2O_8$

Đức

Sulfuric acid

 H_2SO_4

Đức

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

Tên dụng cụ, thiết bị	Xuất xứ	Hình ảnh minh họa
Hệ thống chưng cất phân đoạn chân không	Trung Quốc	
Máy đo quang phổ UV-VIS (UV 1800 SHIMADZU)	Nhật Bản	
MicroPipette tự động đơn kênh	Trung Quốc	
Becher 50-100-250mL	Trung Quốc	
Bình định mức	Đức	

Bình đo tỉ trọng

Trung Quốc



Cân phân tích 4 số
Ohaus-PX224E

Trung Quốc



Cuvette thủy tinh

Trung Quốc



Máy đo độ nhớt DV2T
cảm ứng màn hình

Mỹ



Tủ sấy Memmert
UN110-Dung tích 108L

Đức



Đĩa petri

Đức



Đĩa 96 giếng

Việt Nam

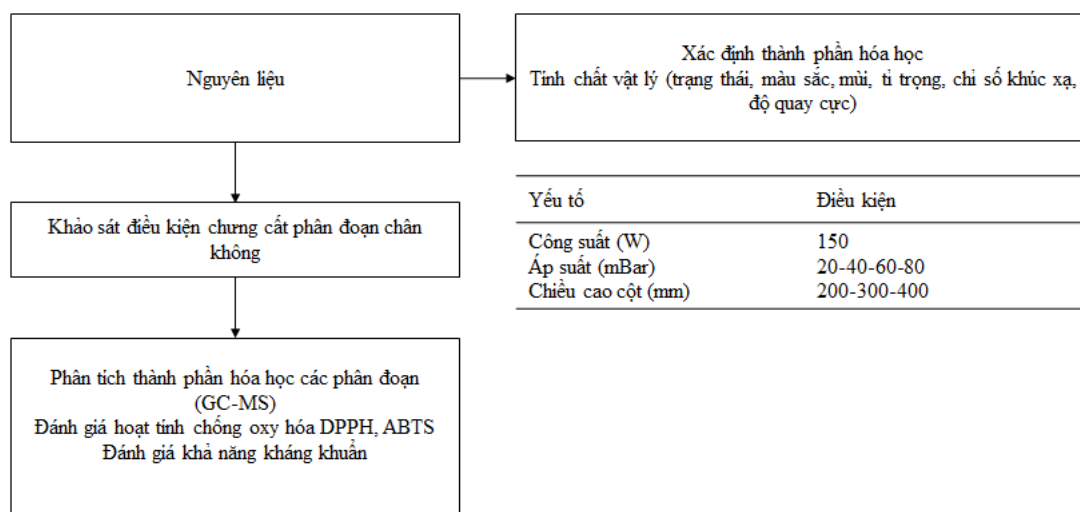


Bảng 2.3. Thông số cột chưng cất phân đoạn

Loại cột	Số mâm	Chiều cao (mm)	Đường kính ngoài (mm)	Khoảng cách mâm (mm)
Cột vigreux 1	9	200	29	25
Cột vigreux 2	9	300	29	37,5
Cột vigreux 3	14	400	29	30

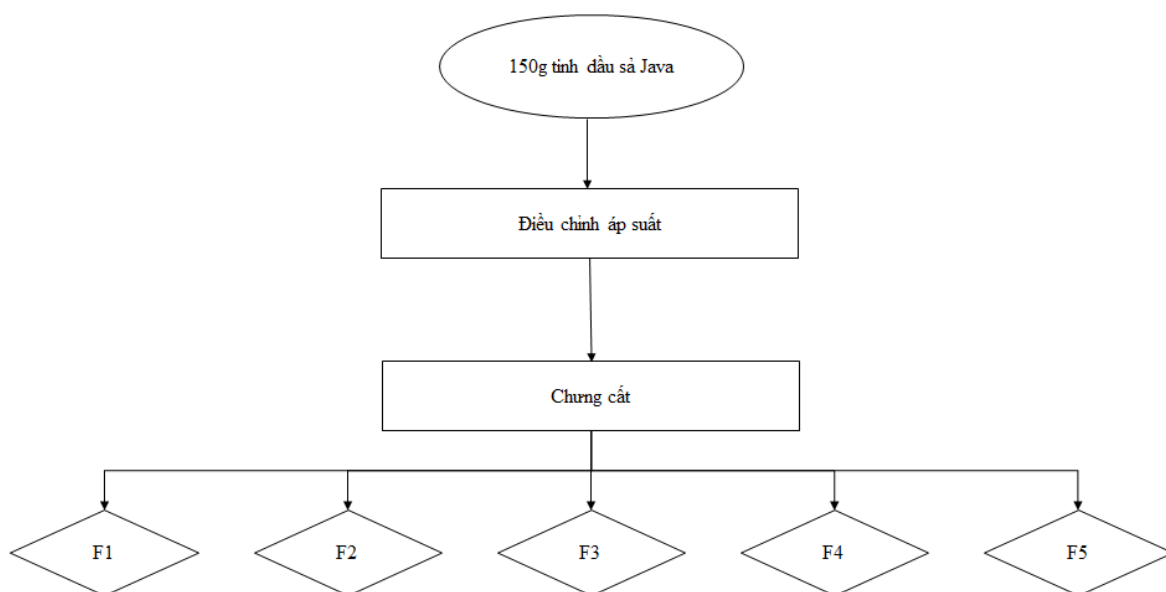
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.2 Sơ đồ nghiên cứu

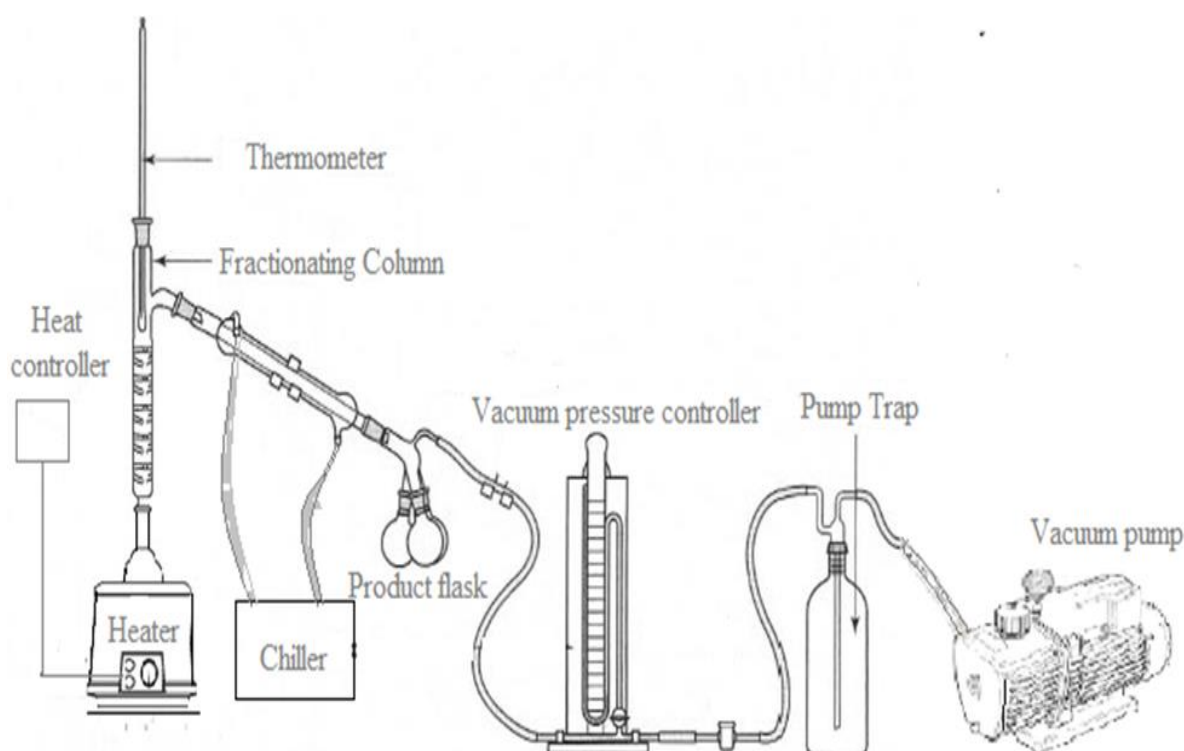
2.3.2. Quy trình công nghệ



Hình 2.3. Quy trình chưng cất phân đoạn tinh dầu sả Java

Thuyết minh quy trình:

Thí nghiệm phân đoạn được thực hiện dưới quy mô pilot bằng hệ thống thiết bị chưng cất phân đoạn chân không được thể hiện ở hình 2.4. Đầu tiên, 150 g tinh dầu sả Java thô được cân và cho vào bình cầu hai cổ 250 mL của Đức có bổ sung một ít đá bọt. Đá bọt đóng vai trò tạo mầm sôi, tránh hiện tượng nguyên liệu bị sôi cục bộ trong quá trình chưng cất. Lắp hệ thống như hình 2.4. Kiểm tra đầu nối của bơm chân không với hệ thống, đảm bảo hệ hoàn toàn kín khi vận hành thiết bị chưng cất. Bật hệ thống bơm chân không, điều chỉnh các thông số khảo sát gồm áp suất, công suất bếp phù hợp với yêu cầu mỗi thí nghiệm. Các phân đoạn được phân tách theo nhiệt độ bằng cách xoay bạch tuộc 4 cổ để thay đổi vị trí các bình nhận ứng với 4 phân đoạn khác nhau dựa vào các khoảng nhiệt độ đỉnh khác nhau. Thời gian thu hồi phân đoạn đầu tiên được tính từ giọt lỏng đầu tiên ngưng tụ ở phân đoạn 1. Sau khi kết thúc thí nghiệm, tháo thiết bị theo quy tắc lắp trước-tháo sau, sau đó đem cân mỗi phân đoạn và lưu mẫu để xác định thành phần hóa học và xác định hoạt tính sinh học.



Hình 2.4. Hệ thống chưng cất phân đoạn quy mô phòng thí nghiệm

2.3.3. Xây dựng giản đồ mô tả mối quan hệ giữa nhiệt độ sôi và áp suất của các cấu tử chính trong tinh dầu sả Java

Quá trình mô phỏng được thực hiện bằng phần mềm thương mại ASPEN PLUS V14. Trong nghiên cứu này, 11 thành phần đơn chất có hàm lượng cao nhất trong tinh dầu sả Java (thu được từ kết quả đo GC-MS) được sử dụng trong mô phỏng để đặc trưng cho tinh dầu sả Java. Trong 11 thành phần này, có 8 thành phần gồm Citronellal, Citronellol, Geraniol, Citronellyl Acetate, Geranyl Acetate, β -Elemene, δ -Cadinene, δ -D-Limonene có sẵn trong cơ sở dữ liệu của phần mềm Aspen Plus V14, ba thành phần gồm Germacrene-D, α -Elemol và α -Cadinol không có sẵn trong cơ sở dữ liệu của phần mềm. Ba thành phần này được giả định và nhập vào phần mềm bằng cách sử dụng cấu trúc hóa học, khối lượng phân tử, nhiệt độ sôi, tỉ trọng, enthalpy, năng lượng Gibbs của chúng, thu được từ các cơ sở dữ liệu có sẵn khác nhau, bao gồm NIST, Pubchem và ChemSpider. Dữ liệu thuộc tính vật lý cho các thành phần bị thiếu trong cơ sở dữ liệu Aspen Plus được ước tính bằng tương quan dữ liệu có sẵn từ thư viện National Institute of Standards and Technology (NIST) trong Aspen, và các thuộc tính bị thiếu được ước tính trong Aspen Plus bằng phương pháp đóng góp nhóm.

Phương pháp nhiệt động lực học được chọn cho mô phỏng này là UNIFAC, nó cung cấp các ước tính chính xác trong các mô phỏng liên quan đến chiết xuất, phân

tách tinh dầu. Áp suất hơi (P_i^{sat}) của các chất tinh khiết là một trong những thông số đặc tính quan trọng trong việc thiết kế quy trình kỹ thuật hóa học. Mặc dù đã có các tài liệu chứa một cơ sở dữ liệu thực nghiệm đủ lớn cho hầu hết các hợp chất thông thường, tuy nhiên các dữ liệu cho thành phần tinh dầu vẫn còn rất ít, do đặc điểm chuỗi dài và các nhóm chức cụ thể. Điều này cho thấy sự cần thiết của các phương pháp dự đoán để liên hệ áp suất hơi như một hàm của nhiệt độ đối với các hợp chất này.

Trong nghiên cứu này áp suất hơi của cấu tử nguyên chất D-Limonene, Germacrene D, α -Elemol và α -Cadinol $P_j^{s(i)}$ được tính toán bởi phương trình Antoine mở rộng:

$$\ln_{pi}^{*,l} = C_{1i} + \frac{C_{2i}}{T + C_{3i}} + C_{4i}T + C_{5i} \ln T + C_{6i}T^{C_{7i}}; C_{8i} \leq T \leq C_{9i} \quad (1)$$

Áp suất hơi của cấu tử nguyên chất Citronellal, Citronellol, Geraniol, Citronellyl Acetate, Geranyl Acetate, β -Elemene, δ -Cadinene được tính toán bởi phương trình WAGNER 25:

$$\ln_{pi}^{*,l} = \ln p_{ci} + \frac{C_{1i}(1-T_{ri}) + C_{2i}(1-T_{ri})^{1.5} + C_{3i}(1-T_{ri})^{2.5} + C_{4i}(1-T_{ri})^5}{T_{ri}}; T_{lower} \leq T \leq T_{upper} \quad (2)$$

Với:

$$T_{ri} = \frac{T}{T_{ci}} \quad (3)$$

Các hệ số khác nhau cho mọi thành phần đơn chất, được sử dụng từ cơ sở dữ liệu Aspen Plus hoặc tính toán sử dụng phương pháp ước tính các tính chất vật lý của các thành phần thuần túy bằng cách kết hợp lý thuyết về các trạng thái tương ứng với phương pháp đóng góp nhóm. Tính năng của phương pháp này, được gọi là CSGC (Corresponding-States with Group Contribution)(Li et al., 1994).

2.4. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ

2.4.1. Xác định tính chất hóa lý và thành phần hóa học của tinh dầu sả Java

- Xác định tính chất cảm quan theo tiêu chuẩn TCVN 8460-2010:
 - Tỷ trọng được xác định theo tiêu chuẩn TCVN 8444-2010;
 - Góc quay cực được xác định theo tiêu chuẩn TCVN 8446-2010;
 - Chỉ số khúc xạ được xác định theo tiêu chuẩn TCVN 8445-2010;

- Thành phần các chất có trong tinh dầu sả Java được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS).

2.4.2. Độ thu hồi hoạt chất trong phân đoạn

Độ thu hồi của hoạt chất trong mỗi phân đoạn được tính theo công thức sau:

$$(\%) \text{Thu hồi hoạt chất} = \left(\frac{m_{\text{phân đoạn}} \times \%_{\text{hợp chất trong PD}}}{m_{\text{mẫu thô}} \times \%_{\text{hợp chất trong mẫu tinh dầu thô}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

2.4.3. Đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH[•]

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

Dung dịch DPPH gốc được chuẩn bị bằng cách dùng 0.024 gram DPPH hòa tan với dung môi methanol trong bình định mức 100 mL, bảo quản môi trường kín trong 24 giờ và nhiệt độ 4 °C. Dung dịch DPPH gốc được mang đi hiệu chỉnh với dung môi methanol dưới bước sóng UV–VIS cực đại 515 nm đến khi đạt độ hấp thu $1,10 \pm 0,02$ Abs của máy.

Để xác định hoạt tính khử gốc tự do DPPH[•] của mẫu tinh dầu, 2,85 mL thuốc thử DPPH đã hiệu chỉnh được bổ sung vào 0,15 mL dung dịch mẫu tinh dầu đã pha loãng 100 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ 30 phút trong bóng tối và đo quang phổ hấp thu UV–VIS đo ở bước sóng cực đại 515 nm. Mẫu blank dùng để đối chứng bao gồm 2,85 mL thuốc thử DPPH và 0,15 mL methanol. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH[•] (mg AAE/mL) được tính theo công thức của (Kamkar et al., 2010):

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

Dung dịch chuẩn gốc ascorbic acid nồng độ 1000 ppm được chuẩn bị bằng cách định mức 0,01 gram ascorbic acid đến 10 mL bằng methanol. Pha loãng chất chuẩn ở các nồng độ 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm. Tiến hành phản ứng với thuốc thử DPPH, sau đó đo UV–VIS ở bước sóng cực đại 515 nm, dựng đường chuẩn ở dạng hồi quy tuyến tính $y=ax+b$ từ nồng độ và kết quả đo UV–VIS.

2.4.4. Đánh giá hoạt tính chống gốc tự do ABTS^{•+}

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

Dung dịch ABTS gốc được chuẩn bị bằng cách dùng nước cất định mức đến 25 mL lần lượt 0,1015 gram ABTS và 0,0176 gram K₂S₂O₈. Kế tiếp, trộn cả hai dung

dịch này với nhau và bảo quản trong điều kiện tối, kín trong 16 giờ và nhiệt độ 4 °C. Dung dịch DPPH gốc được mang đi hiệu chỉnh với dung môi methanol dưới bước sóng UV–VIS cực đại 734 nm đến khi đạt độ hấp thu $1,10 \pm 0,02$ Abs của máy.

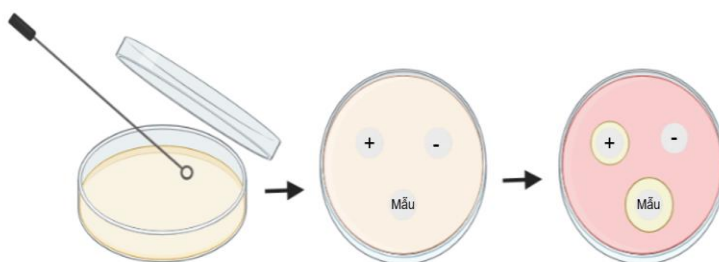
Để xác định hoạt tính chống gốc tự do ABTS^{•+}, 2,85 mL thuốc thử ABTS được bổ sung vào 0.15 mL dung dịch mẫu tinh dầu đã pha loãng 250 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ 30 phút trong bóng tối và độ hấp thu được đo ở bước sóng 734 nm bằng máy đo quang phổ UV–VIS. Mẫu blank dùng để đối chứng bao gồm 2,85 mL thuốc thử ABTS và 0,15 mL dung môi Methanol. Hoạt tính chống gốc tự do ABTS^{•+} (mg TE/mL) được tính theo công thức của (Abuelizz *et al.*, 2020) với một số kết hợp:

$$\text{Hoạt tính chống gốc tự do}_{ABTS} = \frac{\frac{(OD_{\text{blank}} - OD_{\text{mẫu}})}{OD_{\text{blank}}} \times 100 - b}{a} \times df \quad (6)$$

Dung dịch chuẩn gốc Trolox nồng độ 1000 ppm được chuẩn bị bằng cách định mức 0,01 gram Trolox đến 10 mL bằng methanol. Pha loãng chất chuẩn ở các nồng độ 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm. Tiến hành phản ứng với thuốc thử ABTS, sau đó đo UV–VIS ở bước sóng cực đại 734 nm, dựng đường chuẩn ở dạng hồi quy tuyến tính $y=ax+b$ từ nồng độ và kết quả đo UV–VIS.

2.4.5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu thô và các phân đoạn tinh dầu

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

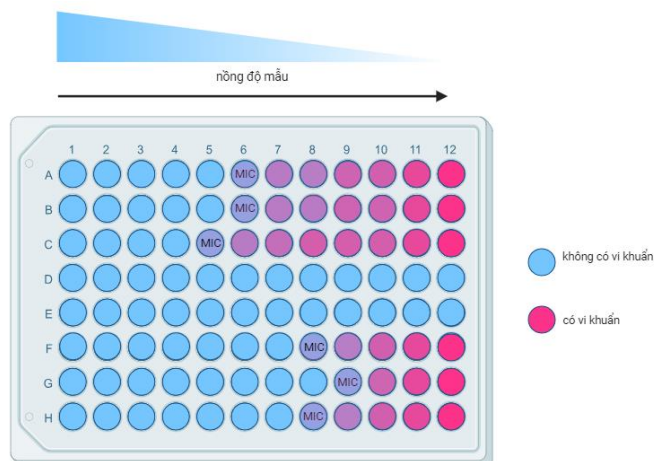


Hình 2.5. Quá trình đánh giá khả năng kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch còn được gọi là xét nghiệm Kirby-Bauer (Shoaib *et al.*, 2021). Mỗi đĩa thạch được đổ 20 mL môi trường MHA, tiếp đó 4 chủng vi khuẩn gồm *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619)12, *Escherichia coli* (ATCC 8739) và *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) có nồng độ 10^6 CFU 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 μL , sử dụng nước cất làm đối chứng âm, kháng sinh Ampicillin được sử dụng làm đối chứng dương có khối lượng 10 μg /giếng, 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). Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.4.5.2. Chỉ tiêu MIC (Minimum Inhibitory Concentration)



Hình 2.6. 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:nước cất (tỉ lệ 1:6) hoặc nước cất. Sau đó môi trường MHB và vi khuẩn được thêm vào với cùng thể tích là 50 μL . Dãy đối chứng dương được làm tương tự như trên nhưng thay thế vi khuẩn bằng 50 μL hỗn hợp Tween 80: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 μL 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). Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.4.6. Phân tích thống kê số liệu

Phần mềm Excel® 2010 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 VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU SẢ JAVA THÔ

Các tính chất của tinh dầu sả Java thô được xác định bao gồm có tính chất cảm quan, tỷ trọng, góc quay cực, chỉ số khúc xạ. Kết quả được hiển thị ở bảng 3.1

Bảng 3.1. Các tính chất của tinh dầu sả Java

Tính chất	Kết quả
Tính chất cảm quan	Dạng lỏng trong suốt, màu vàng, mùi thơm nồng sả đặc trưng
Tỷ trọng (20°C)	0,891±0,005
Góc quay cực (20°C)	-2,5°±0,5
Chỉ số khúc xạ (20°C)	1,468±0,003

Nhìn chung các tính chất của tinh dầu sả Java được sử dụng trong nghiên cứu đáp ứng Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 11426:2016 cũng như tiêu chuẩn ISO 3848:2016 về tinh dầu sả Java. Các tính chất này cũng tương tự như loại tinh dầu sả Java ở Indonesia theo nghiên cứu của W T Eden và cộng sự (*Eden et al., 2018*). Các số liệu trên cho thấy, các mẫu này thích hợp để sử dụng cho toàn bộ các thí nghiệm của đề tài.

Thành phần của tinh dầu sả Java được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Thành phần các cấu tử trong tinh dầu sả Java

STT	Thành phần hóa học	% khối lượng
1	D-Limonene	2,91
2	Linalool	0,96
3	Citronellal	32,76
4	Isopulegol	0,36
5	Citronellol	11,83
6	Neral	0,38
7	Geraniol	17,29
8	Geranial	0,35
9	Citronellyl acetate	4,28
10	Eugenol	1,32
11	Geranyl acetate	5,73
12	β -Elemene	3,82
13	γ -Amorphene	0,46
14	Germacrene D	3,09
15	α -Muurolene	1,4
16	δ -Cadinene	3,28
17	α -Elemol	3,91
18	Germacrene D-4-ol	0,77
19	γ -Eudesmol	0,71
20	α -Cadinol	2,09
21	Các thành phần khác	2,3
Tổng		100

Các hợp chất được hiển thị ở thời gian lưu khác nhau đã được tạo ra trên biểu đồ sắc ký. Trong số các peak này, có thể quan sát thấy tổng cộng 20 peak riêng biệt trong sắc ký đồ chiếm 97,7% tổng thành phần được xác định là D-Limonene, Linalool, Citronellal, Isopulegol, Citronellol, Neral, Geraniol, Geranial, Citronellyl acetate,

Eugenol, Geranyl acetate, β -Elemene, γ -Amorphene, Germacrene D, α -Muurolene, δ -Cadinene, α -Elemol, Germacrene D-4-ol, γ -Eudesmol và α -Cadinol. Các hợp chất vi lượng khác chiếm 2,3 %. Kết quả phân tích thu được cho thấy nồng độ cao của ba hợp chất chính quan trọng về mặt thương mại là Citronellal (32,76%), Geraniol (17,29%) và Citronellol (11,83%) chiếm 61,88% tổng số thành phần tinh dầu. Kết quả này có sự tương đồng với một số báo cáo khác về thành phần tinh dầu sả Java với tổng thành phần 3 hợp chất này trong tinh dầu sả Java nằm trong khoảng 60–75% (Cassel *et al.*, 2006; Songkro *et al.*, 2012). Kết quả phân tích này là cơ sở để tiến hành quá trình chưng cất phân đoạn để thu hồi các phân đoạn giàu 3 cấu tử Citronellal, Geraniol và Citronellol.

3.2. CÁC THÔNG SỐ VẬT LÝ, NHIỆT ĐỘNG CỦA CÁC THÀNH PHẦN CÓ TRONG TINH DẦU SẢ JAVA

Trong nghiên cứu này, 11 thành phần có hàm lượng lớn nhất trong tinh dầu sả Java (chiếm 91% thành phần tinh dầu sả Java theo kết quả phân tích GC-MS) đặc trưng cho tinh dầu sả Java được chọn để thực hiện quá trình mô phỏng. Trong 11 thành phần này, có 8 thành phần gồm Citronellal, Citronellol, Geraniol, Citronellyl Acetate, Geranyl Acetate, β -Elemene, δ -Cadinene, δ D-Limonene có sẵn trong cơ sở dữ liệu của phần mềm Aspen Plus V14, ba thành phần gồm Germacrene-D, α -Elemol và α -Cadinol không có sẵn trong cơ sở dữ liệu của phần mềm. Ba thành phần này được giả định và nhập vào phần mềm bằng cách sử dụng cấu trúc hóa học, khối lượng phân tử, nhiệt độ sôi, tỉ trọng, enthalpy, năng lượng Gibbs của chúng, thu được từ các cơ sở dữ liệu có sẵn khác nhau, bao gồm NIST, Pubchem và ChemSpider. Công thông số lý và nhiệt động của các thành phần trong tinh dầu có cơ sở dữ liệu và được tính toán qua mô phỏng Aspen Plus (M: khối lượng phân tử; t_B : nhiệt độ sôi ở áp suất khí quyển; v_B : thể tích mol lỏng tại t_B ; T_c : nhiệt độ tới hạn; p_c : áp suất tới hạn; v_c thể tích mol lỏng tại t_c ; ω : hệ số acentric; z_c : hệ số nén; SG: tỉ trọng) được thể hiện ở bảng sau:

Bảng 3.1. Các thông số vật lý, nhiệt động của các thành phần có trong tinh dầu (dữ liệu và tính toán)

Thô ng số	D- Limo nene	Citro nellal	Citro nellol	Gera niol	Citro nellyl Aceta te	Gera nyl Aceta te	β - Elem ene	Germ acrene D	δ - Cadi nene	α - Elem ol	α - Cadi nol
M, g/mol	136.2 37	154.2 52	156.2 68	154.2 52	198.3 05	196.2 90	204.3 56	204.3 56	204.3 56	222.3 71	222. 371
$t_B, ^\circ$ C	177.4 50	206.9 81	224.4 23	230.4 44	237.6 75	223.7 62	239.3 73	308.1 00	253.3 62	362.0 90	386. 790
v_B , cm ³ / mol	190.5 92	202.1 49	203.8 10	176.2 87	261.2 30	245.3 09	318.6 14	375.9 10	287.0 17	407.0 76	387. 376
T_C , K	379.8 50	387.8 50	400.8 50	413.8 50	407.8 50	395.8 50	438.8 50	563.9 17	447.8 50	637.1 59	671. 986
p_C , bar	28.20 0	23.91 9	23.09 7	26.78 7	18.58 3	19.73 6	18.29 4	19.42 4	19.38 4	19.33 8	20.6 99
v_C , cm ³ / mol	470.0 00	587.2 10	603.4 53	598.4 18	718.5 65	709.0 56	760.6 44	726.5 00	744.6 00	775.5 00	752. 500
ω	0.381	0.571	0.657	0.672	0.645	0.612	0.388	0.248	0.496	0.267	0.29 9
ZC	0.244	0.256	0.249	0.281	0.236	0.252	0.235	0.203	0.241	0.198	0.19 8
ΔG° f, cal/ mol	4837 9.192	336.3 21	- 7239. 610	1254 7.077	- 4561 4.789	- 2791 3.920	7336 8.921	36400 .130	4230 1.997	2677 7.025	2073 .183
SG, g/c m3	0.842	0.859	0.865	0.885	0.936	0.925	0.887	0.850	0.920	0.941	0.93 7

3.3. GIẢN ĐỒ MÔ TẢ MỐI QUAN HỆ GIỮA NHIỆT ĐỘ SÔI VÀ ÁP SUẤT CỦA CÁC CẤU TỬ CHÍNH TRONG TINH DẦU SẢ JAVA

Trong nghiên cứu này áp suất hơi của cấu tử nguyên chất D-Limonene, Germacrene D, α -Elemol và α -Cadinol theo nhiệt độ được tính toán bởi phương trình Antoine mở rộng và áp suất hơi của cấu tử nguyên chất Citronellal, Citronellol, Geraniol, Citronellyl Acetate, Geranyl Acetate, β -Elemene, δ -Cadinene theo nhiệt độ được tính toán bởi phương trình WAGNER 25 như đã trình bày ở phần trên. Quá trình tính toán, biểu diễn kết quả được thực hiện trên Aspen Plus V14, các hệ số khác nhau cho mọi thành phần đơn chất, được tính toán từ cơ sở dữ liệu Aspen Plus ứng với 2 phương trình trên được thể hiện ở Bảng 3.2 và Bảng 3.3 như sau:

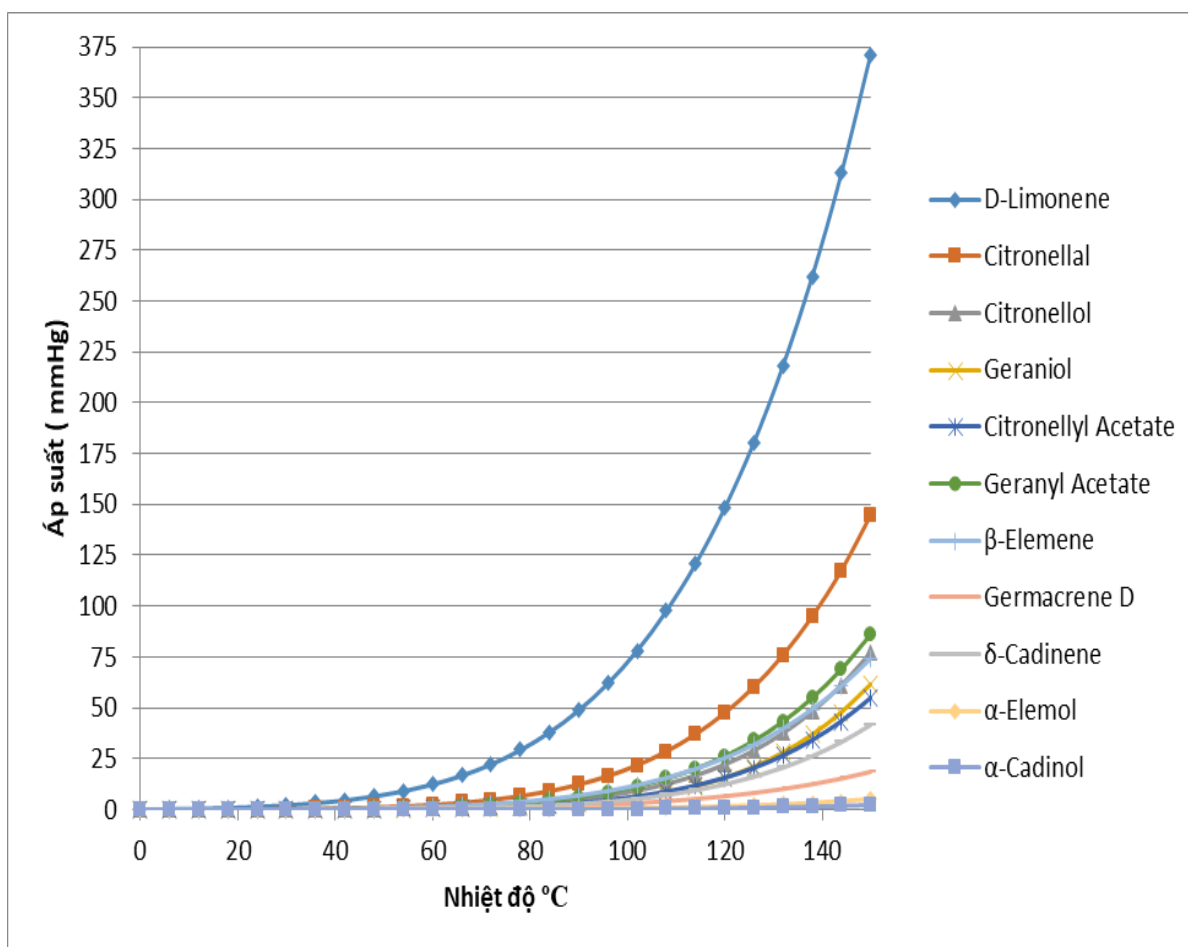
Bảng 3.2. Các hệ số phương trình tính áp suất hơi theo phương trình Antoine mở rộng

Hằng số	C _{1i}	C _{2i}	C _{3i}	C _{4i}	C _{5i}	C _{6i}	C _{7i}	C _{8i}	C _{9i}
D-Limonene	64.06	-8079.70	0	0	-7.56	8.39E-18	6	-74.35	379.85
Germacrene D	42.83	-8272.19	0	0	-4.50	7.98E-19	6	308.10	563.92
α -Elemol	45.08 76	-9253.58	0	0	-4.73	4.96E-19	6	362.09	637.16
α -Cadinol	48.50	-10053.9	0	0	-5.13	4.15E-19	6	386.79	671.99

Bảng 3.3. Các hệ số phương trình tính áp suất hơi theo phương trình WAGNER 25

Hằng số	C_{1i}	C_{2i}	C_{3i}	C_{4i}	$\ln p_{ci}$	T_{ci}	T_{lower}	T_{upper}
Citronellal	-8.24	0.25	-1.65	-7.51	3.17	387.85	-73.15	387.85
Citronellol	-9.62	3.21	-6.10	-4.60	3.14	400.85	-53.15	400.85
Geraniol	-18.00	25.64	-31.16	10.78	3.29	413.85	-33.15	413.85
Citronellyl Acetate	-9.49	3.03	-5.92	-4.47	2.92	407.85	-53.15	407.85
Geranyl Acetate	-9.30	2.89	-5.51	-4.42	2.98	395.85	-53.15	395.85
β -Elemene	-8.03	2.09	-3.34	-3.47	2.91	438.85	-53.15	438.85
δ -Cadinene	-8.63	2.45	-4.34	-3.97	2.96	447.85	-53.15	447.85

Kết quả tính toán mối quan hệ giữa nhiệt độ sôi theo áp suất hơi của các cấu tử trong tinh dầu sả Java được thể hiện ở hình 3.1. Chúng ta có thể đánh giá và dự đoán mô hình chưng cất phân đoạn tinh dầu sả Java từ kết quả mô phỏng này.



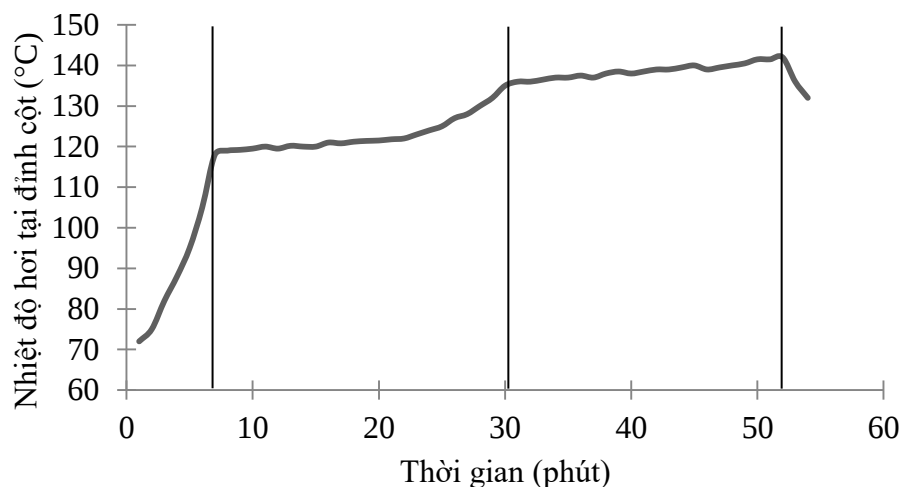
Hình 3.1. Đồ thị nhiệt độ / áp suất của các thành phần chính của tinh dầu sả Java (mô phỏng bằng Aspen Plus V14)

Ở áp suất khí quyển, nhiệt độ sôi của các thành phần chính trong tinh dầu sả như Citronellal, Citronellol, Geraniol lần lượt là 207, 227, 230°C. Ở nhiệt độ cao này, tinh dầu dễ bị phân hủy hoặc oxy hóa; do đó, quá trình chưng cất phải được thực hiện ở áp suất chân không để giảm nhiệt độ hóa hơi của hỗn hợp dễ bay hơi, tránh phân hủy các hợp chất không bền nhiệt trong tinh dầu sả Java. Hình 3.1 cho thấy thành phần dễ bay hơi nhất là D-Limonene, vì áp suất hơi cao hơn nhiều so với phần còn lại, đây là chất đầu tiên được thu hồi từ đỉnh cột trong quá trình chưng cất. Citronellal, thành phần chính của tinh dầu sả Java, có nhiệt độ sôi là 207°C ở áp suất khí quyển, đây là thành phần có độ bay hơi cao thứ 2 sau D-Limonene. Khi áp suất hơi tăng từ 5 lên 50 mmHg thì nhiệt độ sôi Citronellal sẽ tăng từ 75 lên 122°C. Biểu đồ còn cho thấy có sự phân tách khá rõ giữa cấu tử D- limonene, Citronella với các cấu tử còn lại. Từ đó, có thể thấy, trong quá trình chưng cất phân đoạn có thể tinh chế D- limonene và Citronellal với độ tinh khiết cao. Citronellol và Geraniol là các cấu tử có thể thu hồi ở đỉnh tháp, các cấu tử này có độ bay hơi khá giống với các thành phần khác trong tinh dầu sả nên quá trình phân tách sẽ gặp khó khăn, do đó định hướng sẽ thu hồi các phân đoạn giàu Citronellol và Geraniol, các phân đoạn này sau đó có thể được tinh chế để làm giàu 2 hoạt chất chính này. Việc ứng dụng mô phỏng để dự đoán quá trình chưng cất phân đoạn đã được thực hiện trong một số nghiên cứu trước đây và cho thấy mối liên hệ chặt chẽ với thực nghiệm (Ayunda et al., 2023; Dinh Nhat Do et al., 2021). Trong nghiên cứu này, kết quả mô phỏng cho thấy sự chênh lệch nhiệt độ sôi giữa D- limonene và Citronella với các cấu tử còn lại lớn nên việc tách tinh dầu sả Java thành các phân đoạn khác nhau có hàm lượng Citronella cao là khả thi. Bên cạnh đó, do nhiệt độ sôi của các thành phần trong tinh dầu sả Java cao nên quá trình chưng cất phân đoạn sẽ được thực hiện ở áp suất chân không cao nhằm hạn chế tối đa sự phân hủy nhiệt của tinh dầu.

3.4. GIẢN ĐỒ NHIỆT MÔ TẢ THAY ĐỔI NHIỆT ĐỘ SẢN PHẨM THEO GIAN CHƯNG CẤT

Trong thí nghiệm này, sự thay đổi nhiệt độ sản phẩm đỉnh theo thời gian được ghi nhận bắt đầu từ giọt lỏng đầu tiên ngưng tụ tại bình nhận. Nhiệt độ được ghi nhận liên tục sau mỗi 1 phút. Trong quá trình chưng cất, nhiệt độ pha hơi ở sản phẩm đỉnh tăng liên tục, quá trình thí nghiệm kết thúc khi nhiệt độ sản phẩm đỉnh giảm 10°C. Thí

nghiệm được tiến hành ở các điều kiện áp suất chân không 60 mbar, cột đĩa 300 mm, công suất bếp gia nhiệt 150 W.



Hình 3.2. Giảm đồ nhiệt độ của tinh dầu sả Java theo thời gian chưng cất

Giảm đồ nhiệt hình 3.2 cho thấy sự thay đổi nhiệt độ sản phẩm đỉnh theo thời gian có thể chia thành bốn giai đoạn. Giai đoạn 1 với khoảng nhiệt độ từ 72-118°C với khoảng thời gian chưng cất là 7 phút, giai đoạn 2 với khoảng nhiệt độ 119-122°C (15 phút), giai đoạn 3 với khoảng nhiệt độ 122-135°C (8 phút) và giai đoạn 4 với khoảng nhiệt độ 136-142°C (22 phút). Giảm đồ cho thấy có hai giai đoạn khoảng nhiệt độ sản phẩm đỉnh được duy trì ổn định là giai đoạn 2 (119-122°C) và giai đoạn 4 (136-142°C). Đối chiếu với khoảng nhiệt độ sản phẩm đỉnh theo áp suất chưng cất, giai đoạn 2 tương ứng với phân đoạn giàu Citronella và giai đoạn 4 tương ứng với phân đoạn giàu Citronellol và Geraniol. Giai đoạn đầu tiên nhiệt độ sản phẩm đỉnh tăng rất nhanh 72-118°C, trong thời gian ngắn tương ứng với sự có mặt của các cấu tử nhẹ trong tinh dầu sả Java như limonene và linalool, đây là cấu tử có độ bay hơi cao có mặt trong tinh dầu sả Java ban đầu với hàm lượng thấp, do đó thời gian thu hồi rất nhanh. Sự chuyển đổi giữa 2 giai đoạn nhiệt độ ổn định ở khoảng 122-135°C do sự chuyển đổi giữa các thành phần từ phân đoạn 2 đến phân đoạn 4. Xu hướng biến đổi nhiệt độ sản phẩm đỉnh theo thời gian trong nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Trọng Phúc Nguyên và cộng sự (Nguyễn Trọng Phúc Nguyên *et al.*, 2022). Dựa vào kết quả giảm đồ nhiệt, có thể phân chia quá trình này thành 4 phân đoạn khác nhau, trong đó phân đoạn 2 là phân đoạn giàu hàm lượng Citronella và phân đoạn 4 là phân đoạn giàu Citronellol và Geraniol. Trong các thí nghiệm tiếp theo, quá trình chưng cất sẽ thu nhận 4 phân đoạn khác nhau dựa vào sự

thay đổi của nhiệt độ sản phẩm đỉnh. Bốn phân đoạn này được thu hồi ở bốn bình nhận khác nhau.

3.5. ẢNH HƯỞNG CỦA ÁP SUẤT CHÂN KHÔNG ĐẾN QUÁ TRÌNH CHUNG CẤT PHÂN ĐOẠN TINH DẦU SẢ JAVA

Tinh dầu nói chung không ổn định nhiệt, bị phân hủy hoặc oxy hóa ở nhiệt độ cao. Do đó, quy trình chưng cất được thực hiện ở áp suất chân không để giảm nhiệt độ bay hơi của hỗn hợp dễ bay hơi, tránh sự phân hủy các hợp chất không bền nhiệt trong tinh dầu. Trong thí nghiệm này, bốn mức áp suất chân không khác nhau là 20, 40, 60 và 80 mbar đã được khảo sát. Các thí nghiệm được thực hiện ở cột đĩa 300mm và công suất bếp gia nhiệt 150 W. Kết quả khảo sát ở bảng 3.4 chỉ ra rằng việc giảm áp suất hệ thống chưng cất làm giảm thời gian chưng cất, áp suất vận hành thấp hơn làm tăng độ bay hơi của hỗn hợp chất lỏng, do đó đẩy nhanh quá trình chưng cất. Ở mức áp suất thấp nhất (20 mbar), tổng thời gian để phân đoạn các hợp chất là 36 phút, trong khi ở áp suất 40 mbar là 45 phút, ở áp suất 60 mbar là 52 phút và ở áp suất 80 mbar là 63 phút. Khoảng nhiệt độ sản phẩm đỉnh trong quá trình chưng cất tăng khi tăng áp suất chưng cất. Ở các mức áp suất 60 mbar và 80 mbar, nhiệt độ điểm sôi trong các phân đoạn dao động lần lượt từ 72-142°C và 76-148°C. Tại 2 mức áp suất này, nhiệt độ ở các phân đoạn cuối tăng cao và quan sát ở đáy bình chưng có hiện tượng đổi màu, điều này có thể được giải thích khi nhiệt độ tăng lên cao, một số hợp chất tinh dầu có thể bị phân hủy và biến tính dẫn đến chất lượng tinh dầu không ổn định. Ở các mức áp suất 20 mbar và 40 mbar, khoảng nhiệt độ thu hồi các phân đoạn tương ứng là 60-118°C và 65-130°C. Tại 2 mức áp suất này, nhiệt độ thu hồi các phân đoạn tương đối thấp, thời gian thu hồi nhanh và không có hiện tượng phân hủy nhiệt ở đáy bình chưng, có thể cho ra các phân đoạn tinh dầu đạt chất lượng. Bên cạnh đó, thời gian chưng cất ngắn làm cho sự thất thoát tinh dầu trong quá trình chưng cất cũng thấp hơn ở hai mức áp suất 60 mbar và 80 mbar.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của áp suất đến thời gian chưng cất

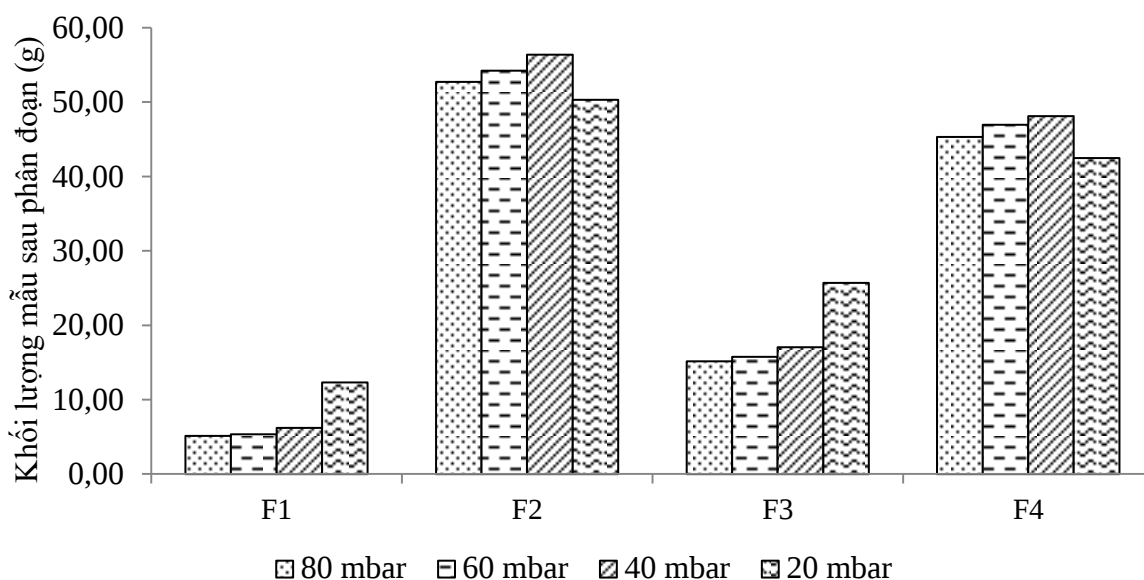
Áp suất (mBar)	80	60	40	20
Thời gian (phút)	63	52	45	36
Khoảng nhiệt độ (°C)	76-148	72-142	65-130	60-118
Tổng khối lượng các phân đoạn (gam)	140	142,2	146	146

Cũng trong thí nghiệm này bốn phân đoạn được thu hồi ở bốn bình nhận dựa vào sự thay đổi nhiệt độ sản phẩm đỉnh theo xu hướng giảm độ nhiệt độ theo thời gian được khảo sát ở trên, cụ thể được thể hiện ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Nhiệt độ các phân đoạn sản phẩm đỉnh ứng với áp suất khảo sát

Áp suất (mBar)	80	60	40	20
Phân đoạn 1 (F1) (°C)	76-124	72-118	65-108	60-94
Phân đoạn 2 (F2) (°C)	125-127	119-122	109-112	94-96
Phân đoạn 3 (F3) (°C)	128-144	122-135	113-125	97-109
Phân đoạn 4 (F4) (°C)	144-148	136-142	126-130	110-118

Khối lượng các phân đoạn F1, F2, F3, F4 tương ứng với các mức áp suất khảo sát khác nhau được thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.3. Khối lượng phân đoạn thu được theo các ASCK khác nhau

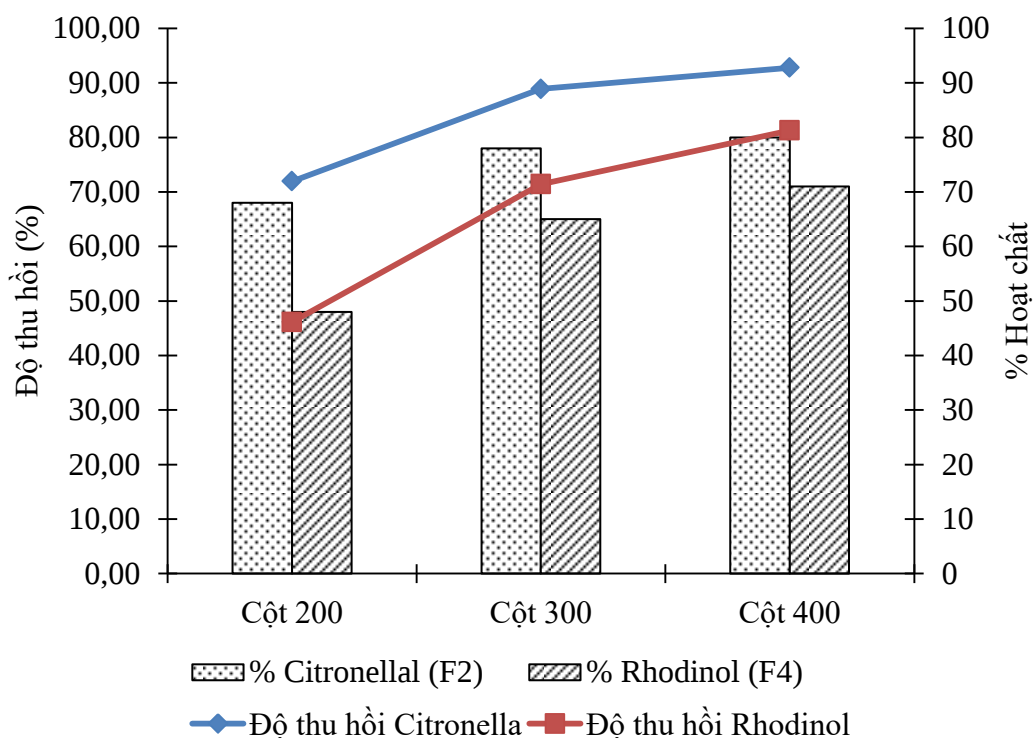
Dựa vào đồ thị 3.3 cho thấy rằng, tại ASCK ở 20 mbar, khối lượng thu hồi ở phân đoạn F1 và F3 cao hơn so với các mức áp suất còn lại, điều này có thể được giải thích, khi áp suất quá thấp, độ bay hơi của các cấu tử tăng lên, dẫn đến các hợp chất có xu hướng bị lôi cuốn theo trong quá trình chưng cất, làm giảm hiệu quả phân tách. Với mục tiêu thu hồi phân đoạn giàu citronella (F2) và phân đoạn giàu hỗn hợp citronellol và geraniol (F4) nên tại áp suất 20 mbar có thể làm giảm độ thu hồi các hợp chất mục tiêu. Rõ ràng, áp suất chân không ảnh hưởng đến thời gian chưng cất phân đoạn cũng như hiệu suất thu hồi các phân đoạn mục tiêu. Điều này đã được quan sát thấy ở một số nghiên cứu như nghiên cứu của Beneti và cộng sự, nghiên cứu ảnh hưởng của áp suất chân không đến việc phân tách tinh dầu sả cam, cho thấy thời gian chưng cất thấp

hơn có thể có lợi, ngoài năng suất cao hơn, các hợp chất của tinh dầu tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian ngắn hơn, do đó làm giảm khả năng phân hủy nhiệt và đã chỉ ra rằng áp suất tối ưu để phân đoạn tinh dầu sả là 5 mbar và tinh dầu cam là 10 mbar (Beneti et al., 2011). Trong khi đó nghiên cứu của tác giả Đỗ Đình Nhật và cộng sự cho thấy áp suất 50 mbar là phù hợp để phân đoạn tinh dầu sả chanh (Dinh Nhat Do et al., 2021). Từ các phân tích trên, có thể thấy trong nghiên cứu này mức áp suất 40 mbar là phù hợp để thực hiện quá trình chưng cất phân đoạn tinh dầu sả Java, vừa đảm bảo không có hiện tượng quá nhiệt, tinh dầu bị phân hủy vì nhiệt, vừa đảm bảo thu hồi tốt các phân đoạn mục tiêu. Trong các khảo sát tiếp theo, áp suất 40 mbar được chọn để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng khác.

3.6. ẢNH HƯỞNG CỦA CỘT CHƯNG CẤT ĐẾN QUÁ TRÌNH CHƯNG CẤT PHÂN ĐOẠN TINH DẦU SẢ JAVA

Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của chiều cao cột phân đoạn chân không đến thời gian phân đoạn, hàm lượng và khả năng thu hồi Citronella trong phân đoạn F2 và Rhodinol (hỗn hợp Citronellol và Geraniol) trong phân đoạn F4 đã được xem xét. Cột đĩa của nghiên cứu này được làm bằng thủy tinh với các chiều cao khác nhau 200, 300 và 400 mm. Thí nghiệm được thực hiện ở áp suất chân không 40 mbar, công suất bếp gia nhiệt 150 W. Kết quả khảo sát cho thấy cột phân đoạn càng cao thì thời gian chưng cất phân đoạn càng dài. Cụ thể, đối với các cột có chiều cao 200 mm, 300 mm và 400 mm, tổng thời gian phân đoạn lần lượt là 40, 45 và 51 phút. Hàm lượng và độ thu hồi ở các phân đoạn khác nhau đối với các loại cột khác nhau được thể hiện trên Hình 3.4. Đối với cột có chiều cao 200 mm, mặc dù thời gian phân tách ngắn hơn nhưng mức độ phân tách là kém nhất, dẫn đến hàm lượng Citronella ở phân đoạn F2 (68,1%), và hàm lượng Rhodinol ở phân đoạn F4 (48,2%) là nhỏ nhất trong 3 loại cột. Đối với cột 300 và 400 mm, khả năng phân tách tốt hơn và hàm lượng Citronella ở phân đoạn F2 lần lượt là 78,1% và 80,2 %, xu hướng tương tự cũng được quan sát ở hàm lượng Rhodinol thu được ở phân đoạn F4 lần lượt là 65% và 71% . Nhìn chung, cột phân tách càng cao, khả năng phân tách càng tốt, bên cạnh hàm lượng các hoạt chất chính trong các phân đoạn mục tiêu càng tăng khi tăng chiều cao cột thì độ thu hồi cũng tăng theo xu hướng đó. Độ thu hồi citronella ở phân đoạn F2 đạt giá trị cao nhất là 92,8% với hàm lượng citronella đạt 80,2 % và độ thu hồi Rhodinol ở phân đoạn F4 đạt giá trị cao nhất là 81,3% với hàm lượng 71,2% khi sử dụng cột chưng cất 400 mm. Kết quả

này phù hợp với nghiên cứu của Cahyani và cộng sự đánh giá ảnh hưởng của chiều cao cột phân đoạn chân không đối với thành phần phân đoạn của tinh dầu sả. Nhóm nghiên cứu kết luận rằng chiều cao cột phân đoạn càng cao thì khả năng phân tách càng tốt và độ tinh khiết của các thành phần chính của dầu sả (Citronellal, Geraniol và Citronellol) thu được càng cao (Cahyani et al., 2019).

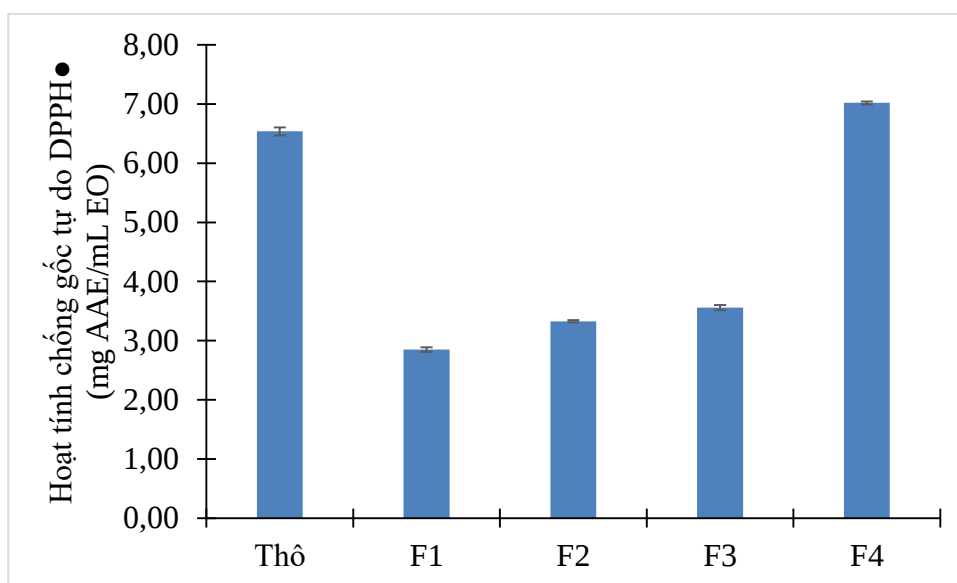


Hình 3.4. Hàm lượng và độ thu hồi Citronella ở phân đoạn F2 và Rhodinol ở phân đoạn F4 khi sử dụng các cột chưng cất khác nhau (200 mm, 300 mm và 400 mm)

3.7. HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA DPPH CỦA TINH DẦU THÔ VÀ CÁC PHÂN ĐOẠN TINH DẦU

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH[•] (Blois, 1958) góp phần xác định khả năng loại bỏ gốc tự do của mẫu tinh dầu. Dựa trên cơ chế ghép cặp giữa điện tử tự do tồn tại trong phân tử DPPH và nguyên tử hydro từ các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu tinh dầu. Các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu làm giảm màu sắc tím của gốc tự do DPPH[•] trong dung dịch thành màu vàng của diphenylpicrylhydrazine và được đo độ hấp thụ quang phổ khả kiến dưới bước sóng 515 nm. Giá trị hoạt tính chống gốc tự do được biểu thị bằng mg đương lượng ascorbic acid trên một mL tinh dầu (mg AAE/mL EO). Các mẫu được chuẩn bị cho phân tích gồm:

tinh dầu nguyên liệu thô, các mẫu phân đoạn F1; F2; F3 và F4. Kết quả được trình bày qua hình 3.5.



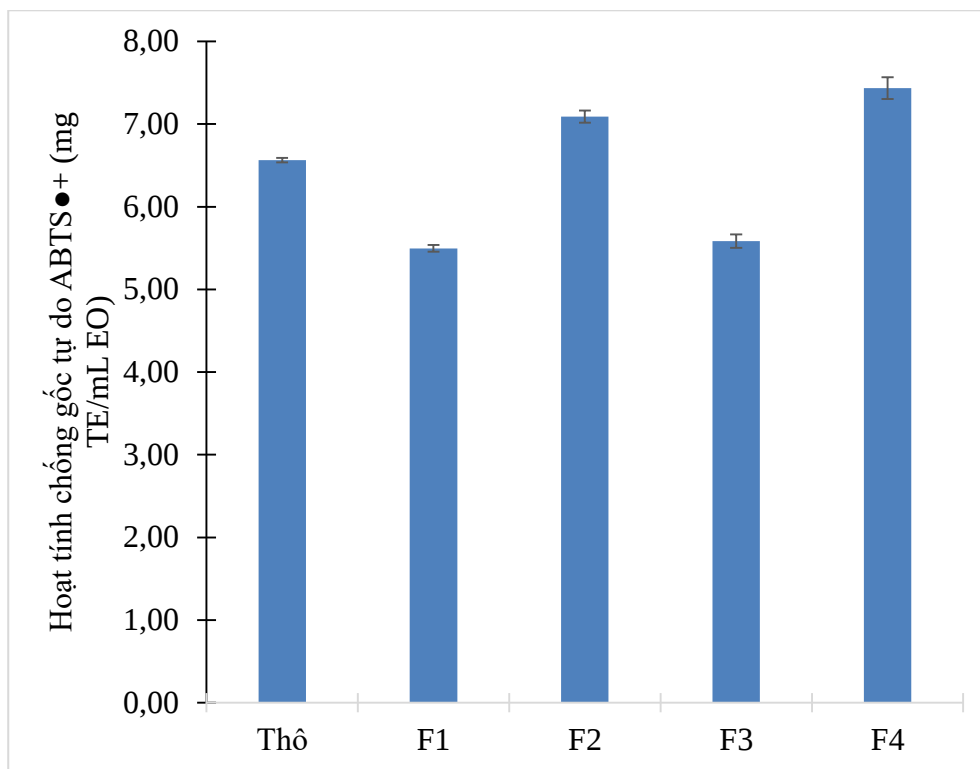
Hình 3.5. Hoạt tính chống gốc tự do DPPH[•] (mg AAE/mL EO)

Hình 3.5 cho thấy hoạt tính chống oxy hóa dựa trên khả năng khử gốc tự do DPPH của tinh dầu sả Java thô và 4 phân đoạn sau khi thực hiện phương pháp phân đoạn. Các phân đoạn này được khảo sát có giá trị thay đổi từ $2,8500 \pm 0,0378$ đến $7,0186 \pm 0,0254$ mg AAE/mL EO ($p < 0.05$), và sắp xếp theo thứ tự tăng dần như sau: Phân đoạn F1 ($2,8500 \pm 0,0378$ mg AAE/mL EO) < phân đoạn F2 ($3,3277 \pm 0,0186$ mg AAE/mL EO) < phân đoạn F3 ($3,5589 \pm 0,0417$ mg AAE/mL EO) < tinh dầu thô ($6,5373 \pm 0,0657$ mg AAE/mL EO) < phân đoạn F4 ($7,0186 \pm 0,0254$ mg AAE/mL EO). Phân đoạn 1 và phân đoạn 2 có các hợp chất dễ bay hơi nhất có trong tinh dầu sả Java với thành phần chính gồm D-limonene và Citronella cho thấy khả năng kháng oxi hóa thấp nhất, thấp hơn so với tinh dầu thô ban đầu. Phân đoạn F3 với các thành phần khó bay hơi nhất có trong tinh dầu cũng cho thấy khả năng kháng oxi hóa thấp hơn so với tinh dầu thô. Khả năng kháng oxi hóa tốt thể hiện ở F4, có thể liên quan đến sự có mặt của Citronellol và Geraniol trong các phân đoạn này.

3.8. HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA ABTS CỦA TINH DẦU THÔ VÀ CÁC PHÂN ĐOẠN TINH DẦU

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do ABTS^{•+} (Re et al., 1999) góp phần xác định khả năng loại bỏ gốc tự do của tinh dầu với cơ chế tương tự phương pháp DPPH[•], nhưng khác ở điểm bản chất của ABTS không phải là gốc tự do, phải cần sự hỗ trợ của một tác nhân oxy hóa mạnh là K₂S₂O₈ để tạo thành gốc tự do

ABTS^{•+}. Các hợp chất chống oxy hóa trong mẫu làm giảm màu xanh dương đen của ABTS^{•+} trong dung dịch thành màu xanh ngọc của ABTS và được đo độ hấp thụ quang phổ khả kiến dưới bước sóng 734 nm. Giá trị hoạt tính chống gốc tự do được biểu thị bằng mg đương lượng Trolox trên một mL tinh dầu (mg TE/mL EO). Các mẫu được chuẩn bị cho phân tích giống với phương pháp DPPH. Kết quả theo hình 3.6.



Hình 3.6. Hoạt tính chống gốc tự do ABTS^{•+} (mg TE/mL EO)

Kết quả hình 3.6 cho thấy hoạt tính chống oxy hóa dựa vào khả năng khử gốc tự do ABTS của tinh dầu sả Java thô và 4 phân đoạn. Các phân đoạn tinh dầu khảo sát có giá trị thay đổi từ $5,4955 \pm 0,0405$ đến $7,4343 \pm 0,1317$ mg TE/mL EO ($p < 0.05$), và sắp xếp tăng dần như sau: Phân đoạn F1 ($5,4955 \pm 0,0405$ mg TE/mL EO) < phân đoạn F3 ($5,5843 \pm 0,0814$ mg TE/mL EO) < tinh dầu thô ($6,5631 \pm 0,0270$ mg TE/mL EO) < phân đoạn F2 ($7,0901 \pm 0,0719$ mg TE/mL EO) < phân đoạn F4 ($7,4343 \pm 0,1317$ mg TE/mL EO). Phân đoạn F1 có các hợp chất dễ bay hơi nhất có trong tinh dầu sả Java với thành phần chính gồm D-limonene và Citronella có khả năng kháng oxy hóa thấp nhất, thấp hơn so với tinh dầu thô ban đầu. Phân đoạn F3 với các thành phần đa dạng từ Citronellal đến Geraniol cũng có khả năng kháng oxy hóa thấp hơn so với tinh dầu thô. Khả năng kháng oxy hóa tốt thể hiện ở phân đoạn F4, có thể liên quan đến sự có mặt của Citronellol và Geraniol trong các phân đoạn này.

3.9. KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU THÔ VÀ CÁC PHÂN ĐOẠN

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu sả Java và các phân đoạn (F1, F2, F3, F4) được thử nghiệm thông qua phương pháp khuếch tán đĩa thạch và chỉ tiêu xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Kết quả thể hiện ở bảng 3.5 cho thấy các mẫu đều có tác dụng kháng khuẩn đối với cả 2 chủng gram dương (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) và 2 chủng gram âm (*E. coli*, *V. parahaemolyticus*). Đường kính ức chế của các phân đoạn được thể hiện theo thứ tự F2>F4>Thô>F1>F3. Nhìn chung phân đoạn F4, có hàm lượng hỗn hợp Rhodinol chiếm 71.2% nên nó có khả năng kháng khuẩn tốt hơn so với các phân đoạn F1, thô và F3. Phân đoạn F2, có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất điều này có thể là do sự hiện diện của 80.2% Citronellal. Đối với phân đoạn đáy, phần này ít bay hơi nhất cho thấy tác dụng kháng khuẩn thấp hơn so với tinh dầu thô và các phân đoạn còn lại. Vì vậy, nghiên cứu này đã chứng minh khả năng làm tăng các hợp chất có lợi trong tinh dầu thô để tăng cường sự biểu hiện hoạt động kháng khuẩn. Ở các phân đoạn, các thành phần trong chúng cũng khác nhau nên dẫn đến khả năng kháng khuẩn của các phân đoạn cũng thay đổi, điều này cũng đã được báo cáo trong các bài viết trước đây (D. N. Do et al.).

Bảng 3.5. Kết quả kháng khuẩn của phương pháp khuếch tán đĩa thạch

	Phạm vi ức chế vi khuẩn (mm)					
	<i>Ampicillin</i>	Thô	F1	F2	F3	F4
<i>S. aureus</i>	19,60	13,21	12,15	15,49	11,81	13,65
<i>S. pneumoniae</i>	17,27	12,58	12,05	14,03	10,84	13,76
<i>E. coli</i>	15,15	11,19	10,53	13,27	7,90	11,98
<i>V. parahaemolyticus</i>	20	14,68	12,27	15,48	11,36	14,94

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 các phân đoạn sả Java và tinh dầu sả thô kết quả đánh giá MIC được thể hiện ở Bảng 3.6. Ở đây cho thấy phân đoạn F2 và F4 chính là hai phân đoạn có nồng độ kháng khuẩn thấp nhất chứng tỏ khả năng kháng khuẩn của tinh dầu sả được cải thiện ở hai phân đoạn này, điều này cũng tương ứng với kết quả khuếch tán đĩa phía trên. Bên cạnh đó có một số đặc tính hóa lý có thể ảnh hưởng đến

khả năng kháng khuẩn của tinh dầu sả Java và các phân đoạn của nó như: nồng độ các chất có trong mẫu, tốc độ bay hơi,... Trong tinh dầu sả Java có chứa các thành phần như Citronellal, hỗn hợp Rholionl có thể phá hủy cấu trúc Peptidoglycan hoặc ức chế sự tổng hợp của nó, từ đó làm tổn thương thành tế bào và làm biến dạng hoặc tiêu diệt vi khuẩn (*Ju et al., 2022*).

Bảng 3.6. Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu và các phân đoạn

	Nồng độ ức chế tối thiểu vi khuẩn ($\mu\text{L/mL}$)				
	Thô	F1	F2	F3	F4
<i>S. aureus</i>	31,25	31,25	15,625	62,5	15,625
<i>S. pneumoiae</i>	31,25	62,5	15,625	62,5	31,25
<i>E. coli</i>	31,25	31,25	15,625	31,25	15,625
<i>V. parahaemolytiais</i>	15,625	31,25	15,625	31,25	31,25

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Sau khi tiến hành nghiên cứu, đề tài đã đạt được một số kết quả như sau:

– Chung cất phân đoạn chân không có thể là một quá trình hiệu quả để nâng cấp tinh dầu sả Java, đạt được các phân đoạn với tính chất khác biệt với tinh dầu thô ban đầu, từ đó có thể có mở rộng tiềm năng ứng dụng. Trong nghiên cứu này, hàm lượng Citronellal tăng từ 32,76% từ tinh dầu thô đến 80,2% ở phân đoạn F2. Hàm lượng Rhodinol (hỗn hợp Citronellol và Genariol) từ 29,12 % ở tinh dầu thô đến 71,2% ở phân đoạn F4;

– Các thành phần chính của tinh dầu sả Java gồm có Citronellal thu hồi ở phân đoạn F2, Citronellol và Genariol chủ yếu thu hồi ở phân đoạn F4;

– Áp suất chân không và loại cột chưng cất ảnh hưởng đáng kể đến quá trình chưng cất phân đoạn chân không tinh dầu sả Java. Trong nghiên cứu này, áp suất chân không 40 mbar và chiều cao cột đĩa 400 mm cho thấy khả năng phân đoạn để thu hồi các phân đoạn giàu Citronellal và Rhodinol (hỗn hợp Citronellol và Genariol) tốt nhất với độ thu hồi citronella ở phân đoạn F2 đạt giá trị cao nhất là 92,8% với hàm lượng citronella đạt 80,2% và độ thu hồi Rhodinol ở phân đoạn F4 đạt giá trị cao nhất là 81,3% với hàm lượng 71,2%;

– Các phân đoạn tinh dầu sả Java khác nhau cho thấy khả năng kháng oxy hóa khác nhau. Phân đoạn 4 với thành phần chính gồm Citronellol và Genariol cho thấy khả năng kháng oxi hóa cao nhất trong cả hai phương pháp DPPH ($7,0186 \pm 0,0254$ mg AAE/mL EO) và ABTS ($7,4343 \pm 0,1317$ mg TE/mL EO);

– Các phân đoạn tinh dầu sả Java đều thể hiện đặc tính kháng khuẩn tốt, khả năng ức chế vi khuẩn của các phân đoạn tinh dầu khác nhau tùy vào loại vi khuẩn khảo sát.

2. KIẾN NGHỊ

Triển khai nghiên cứu chưng cất phân đoạn chân không tinh dầu sả Java ở quy mô pilot và có thể phát triển ứng dụng ở quy mô công nghiệp.

Triển khai nghiên cứu các hoạt tính sinh học chuyên sâu và các ứng dụng của các phân đoạn tinh dầu Java vào các sản phẩm mỹ phẩm và dược phẩm.