

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

1.1 TỔNG QUAN VỀ CÁC LOẠI TINH DẦU KHÁNG KHUẨN

1.1.1 Tinh dầu bạc hà

Tên khoa học của bạc hà là *Mentha arvensis* L., cây thuộc họ hoa môi và tên khoa học là *Lamiaceae* (Liang et al., 2012). Cây bạc hà là loại cây thân thảo sống lâu năm, thân mọc thẳng hoặc mọc bò và chia thành nhiều nhánh nhỏ. Thân màu xanh đậm hoặc tím nhạt, có nhiều lông ngắn. Cây có mùi thơm nhẹ, dễ chịu và vị hơi cay, mát. Lá mọc đối, mảnh, kích thước từ 3 đến 5 cm, mép có răng cưa và có lông ở mặt trên và mặt dưới. Các cánh hoa nhỏ và mọc cùng nhau tạo thành các vòng ở nách lá. Hoa có màu tím, trắng và hồng nhạt. Toàn cây có mùi thơm. Quả nhỏ và có 4 hạt. Cây nở hoa từ tháng 7 đến tháng 10 hàng năm. Cây bạc hà thân thảo bao gồm chi *Mentha* L. thuộc họ *Lamiaceae* và được chia thành 42 loài, 15 giống lai và hàng trăm phân loài và giống cây trồng.

Trong tinh dầu bạc hà có thành phần chính là menthol, menthone, neomenthol và iso-menthone có hoạt tính sinh học với tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, diệt khuẩn và điều hòa miễn dịch, ... ứng dụng trong sản xuất viên ngậm, kem đánh răng, thuốc giảm đau, thuốc cảm và nước hoa.

1.1.2 Tinh dầu trà trà

Cây trà trà (*Melaleuca alternifolia*) thuộc họ Sim (*Myrtaceae*), có nguồn gốc từ Australia. Tinh dầu là các hợp chất phức tạp dễ bay hơi được chiết xuất từ rễ, cành, nhánh, lá, hoa, quả, chồi và hạt, được dự trữ trong tuyến, khoang, ống, biểu bì và các tế bào. Các ứng dụng của tinh dầu trà trà bởi đặc tính diệt côn trùng, kháng nấm, kháng vi-rút, kháng khuẩn, chống viêm, kháng vi sinh vật (Yasin et al., 2021).

Tinh dầu trà trà có màu trong suốt đến hơi vàng, có tác dụng làm mát và mùi nồng như long não. Trong tinh dầu trà trà chứa 100 các chất học khác nhau, chủ yếu là monoterpene (terpinen-4-ol, 1,8-cineole, α -pinene, terpinolene, p-cymene, γ -terpinene) và sesquiterpenes với các rượu tương ứng (alcohol terpinol, monoterpenes, ...) (Nogueira et al., 2014).

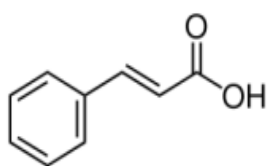
Thành phần chính của tinh dầu trà trà là terpinen-4-ol thể hiện đặc tính kháng khuẩn và chống viêm mạnh, trong khi 1,8-cineole là một chất gây dị ứng không mong muốn trong tinh dầu trà trà.

Các tính chất đặc trưng của tinh dầu trà là hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng vi-rút, hoạt tính kháng nấm, hoạt tính chống độc tố, hoạt tính chống khối u, ứng dụng da liễu, điều trị mụn trứng cá, điều trị viêm da tiết bã, làm lành vết thương, điều trị viêm nướu mãn tính (Pazyar et al., 2013).

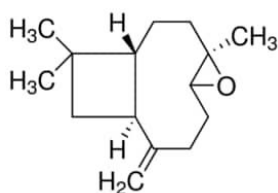
1.2.3 Tinh dầu quế

Quế có tên khoa học là *Cinnamomum* bao gồm 56 – 250 loài (Zhang et al., 2015). Cây quế thuộc họ long não *Lauraceae*, cây cao 10 – 15 m (Pithawala & Jain, 2012), đường kính 45 – 50 cm, thân thẳng, tròn, vỏ quế có màu xám nâu. Những bông hoa được sắp xếp trong chùy, có màu xanh lục và có mùi đặc trưng. Quả của cây là loại quả mọng, màu tím, dài 1 cm chứa một hạt. Vị cay của quế là do một loại tinh dầu thơm chiếm 0,5 đến 1%, tinh dầu bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố chẳng hạn như mùa hoặc tháng sinh trưởng (A1 - Qin et al., 2006). Nó hoạt động như một chất chống nấm, chống vi khuẩn và chống vi trùng mạnh.

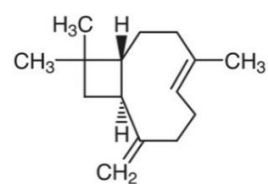
Các hợp chất có trong tinh dầu quế nhựa, cinnamic acid, cinnamaldehyde và cinnamate. Tinh dầu có trans-cinnamaldehyde, caryophyllene oxide, L-borneol, L-bornyl acetate, eugenol, bcaryophyllene, eneralidol và cinnamyl acetate đã được báo cáo bởi Tung và cộng sự. Một số thành phần khác là terpinolene, α -terpineol, α -cubebene và α -thujene. Vị cay nồng và mùi hương của quế đến từ cinnamaldehyde và do sự hấp thụ oxy khi nó già đi; nó tối màu và phát triển các hợp chất nhựa (Tung YT, Chua MT, Wang SY, 2008).



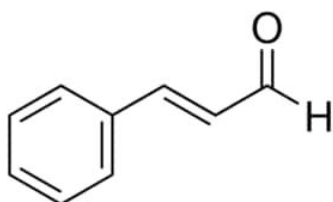
Cinamal acid



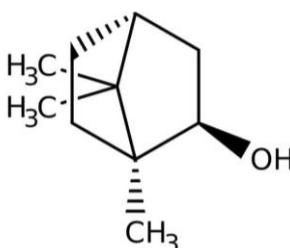
Caryophyllene oxide



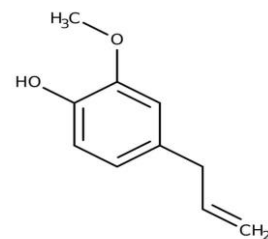
b-Caryophyllene



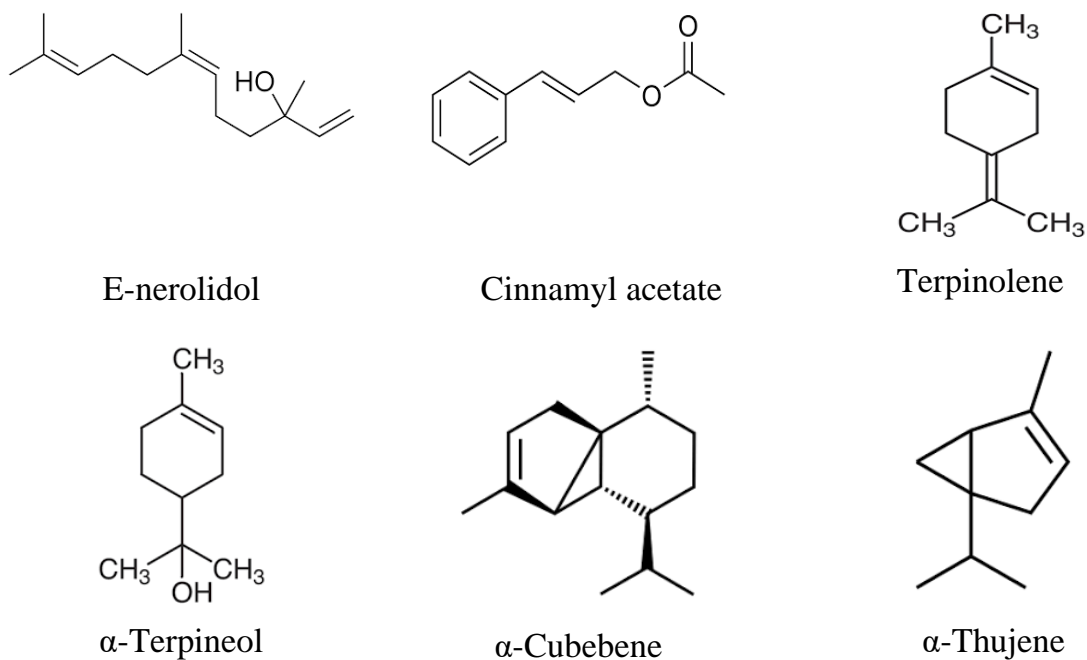
Cinnamaldehyde



L-borneol



Eugenol



Hình 1.1. Công thức hoá học của các hợp chất trong tinh dầu quế

Thành phần chính là cinnamaldehyde có tính kháng khuẩn mạnh *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*. Hoạt tính kháng khuẩn của quế đã được chứng minh ở bài báo (El Atki et al., 2019).

1.2.4 Tinh dầu sả java

Tinh dầu sả java (sả đỏ hay sả xòe) là loại cỏ thơm thuộc họ *Poaceae*, tên khoa học là *Cymbopogon winterianus*, nó được trồng ở một số vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới của Châu Á, Châu Phi và Châu Mỹ (Srivastava et al., 2013).

Nó là một loại cỏ sống lâu năm có phiến lá hẹp. Chùy dài 15 – 30 cm và hẹp với các cụm hoa hình chùm không phân nhánh, dài 8 – 10 mm với các lông dài và mềm xung quanh. Lá dài không có cuống, bẹt, có cánh phẳng và lõm ở mặt sau (Harrington & Pratchett, 2009). Nó được phân nhánh ở trên và một chùy ngoài cùng đã úa vàng được hình thành. Ở phần gốc, thân có đường kính lên tới 10 mm và rắn chắc với các đốt sáng mịn màu đen. Các lá dài và hẹp, rộng 0.5 đến 1.6 cm, dài 1 m với phiến giống như dải ruy băng ở đầu màu xanh lục nhạt, với gân giữa màu trắng và đường khía phía trên rộng hơn 9 mm thu hẹp về gốc. Đỉnh của lá có dạng sợi và nhẵn bên dưới với các mép sần sùi và nhẵn, ngoại trừ mặt trên của bẹ lá (Kaur et al., 2021). Tất cả các bộ phận trên cây sả đều chứa tinh dầu, nhưng lá chiếm hàm lượng tinh dầu tối đa và từ các bộ phận khác có chất lượng kém hơn. Do đó, chỉ nên thu hoạch lá của nó để chiết xuất tinh dầu (Srivastava et al., 2013).

Thành phần có trong tinh dầu sả bao gồm citronellal, geraniol và citronello (Jaroenkit et al., 2011) và các thành phần khác như citronellyl axetat, L-limonene, ellemol và các rượu sesquiterpene khác. Nó bao gồm các thành phần monoterpene như citral, citronello, citronellal, linalool, elemol, 1,8- cineole, limonene, geraniol, b-carophyllene, methyl heptenone, geranyl axetat và geranyl formate.

Tinh dầu sả java có tác dụng sinh học và y học, hương liệu thực phẩm, nước hoa và mỹ phẩm, ...

1.2.5 Tinh dầu hương thảo

Tinh dầu hương thảo (*Rosmarinus officinalis*) thuộc họ *Labiatae*, bao gồm một số chi, chẳng hạn như *Salvia*, *Lavandula* và *Thymus*. Cây hương thảo là loại cây bụi lâu năm mọc hoang hoặc được trồng trọt. Nó có các sợi lông tuyến phát ra tinh dầu thơm dễ bay hơi (chủ yếu là monoterpene) để đáp ứng với điều kiện hạn hán ở khí hậu Địa Trung Hải (González-Minero et al., 2020).

Camphor và 1,8-cineole là hai chất chính dễ bị bay hơi trong tinh dầu hương thảo. Các thành phần như: α -pinene, camphene, β -pinene, β -myricene, limonene, cineole...(Mohammed et al., 2020)

Các dẫn xuất của loại cây này sử dụng cho mỹ phẩm, một ứng dụng đã được công nhận và đánh giá cao từ thời Ai Cập cổ đại. Hương thảo bắt nguồn Địa Trung Hải đã được phân phối khắp các khu vực khác nhau trên thế giới. Nó có nhiều đặc tính chữa bệnh và chiết xuất của nó đã được sử dụng (chủ yếu bằng đường uống) trong y học dân gian.

1.2.6 Tinh dầu trà gió

Trà gió có tên khoa học là *Melaleuca quinquenervia*, thuộc chi *Melaleuca* L., họ *Myrtaceae*, chi trà chứa hàng trăm loài riêng lẻ. Trong lá và các thành phần khác của cây, tồn tại rất nhiều thành phần dầu và các hợp chất dễ bay hơi. Hàm lượng tinh dầu tương đối thấp hơn trong mùa mưa so với mùa khô. Indonesia (370 tấn) và Việt Nam (100 tấn) là những nước sản xuất chính loại dầu này.(Nguyen & Hoang, 2019).

Thành phần chính là 1,8-cineole, terpineol, α -pinene, 6-pinene và limonene. Trong những thành phần này có hoạt tính sinh học khác nhau như các hoạt tính kháng khuẩn, chống viêm và kháng nấm. Đặc biệt, 1,8-cineole mang lại tác dụng dược lý cho tinh dầu trà. Việc áp dụng loại dầu này phổ biến trong y học cổ truyền Đông Nam Á như một

phương tiện để giảm đau và đẩy lùi côn trùng. Lá và thân của một số loại trà là nguồn tinh dầu có mùi thơm mạnh và dùng làm thuốc (Nguyen & Hoang, 2019).

1.2.7 Tinh dầu tiêu đen

Hạt tiêu đen (*Piper nigrum* L.) thuộc họ hồ tiêu (*Piperaceae*) thường được gọi là hạt tiêu “vua gia vị”. Hạt tiêu đen là gia vị được sử dụng trên toàn thế giới và có nguồn gốc từ miền Nam Ấn Độ. Cái tên "hạt tiêu" có nguồn gốc từ tiếng Phạn "Pipali". Các quốc gia sản xuất hạt tiêu đen là Ấn Độ, Malaysia, Indonesia, Trung Quốc, Thái Lan, Sri Lanka, Việt Nam, Brazil và Madagasca (Damanhour, 2014). Tiêu đen là cây thân leo lâu năm, phát triển tốt trong bóng râm, sống bám vào các cây thân gỗ hoặc cột, có thể cao đến 10 m hoặc hơn thế. Lá đơn, mọc xen kẽ với nhau, với cuống lá có rãnh dài từ 2 đến 5 cm, chiều dài và chiều rộng của lá thay đổi từ 8 – 20 cm.

Thành phần chính trong tinh dầu tiêu đen là piperin, β -caryophyllene, tiếp theo là limonene, sabinene, α -pinene, β -bisabolene, α -copaene, α -cadinol, α -thujene, α -humulene.

Các sản phẩm từ tinh tiêu đen có thành phần mang hoạt tính sinh học như phenolics, flavonoid, tecpen, sterol. Các thành phần này đã được đánh giá về khả năng sinh học và kháng khuẩn của chúng. Trong y học cổ truyền, hạt tiêu đen được báo cáo là một chất hỗ trợ tiêu hóa để tăng cảm giác ngon miệng, giải ho, giải cảm, khó thở ở họng, sốt không liên tục, kiết lỵ, đau bụng, giun và được sử dụng như một thuốc chống viêm và hạ sốt. Mùi thơm và vị cay của hạt tiêu đen chủ yếu là do piperine và dầu dễ bay hơi. Có lợi ích trị liệu khác gồm chống tiểu cầu, hạ huyết áp, chống ung thư, oxy hoá, giảm đau, trầm cảm và tiêu chảy (Ashokkumar et al., 2021).

1.2.8 Tinh dầu bạch đàn

Bạch đàn là một loại cây xanh thân gỗ, cao hoặc cây bụi, thuộc họ *Myrtaceae*. Mặc dù nó có nguồn gốc từ Úc và Tasmania. Chi bạch đàn chứa khoảng 700 loài; trong số đó, hơn 300 loại chứa dầu dễ bay hơi trong lá của chúng. Hoa ở dạng nụ được bao phủ bởi một lớp phủ giống như chiếc cốc. Lớp phủ này không bị bung ra như một cái nắp trong khi hoa nở. Quả có hình dạng như chiếc cốc và chứa nhiều hạt. Tinh dầu bạch đàn được chiết xuất từ lá tươi bằng cách chưng cất hơi nước (Kesharwani et al., 2018).

Trong tinh dầu bạch đàn chủ yếu là monoterpen chứa oxy, monoterpen và sesquiterpen chứa oxy. Trong số này có 1,8-eucalyptus (72.71%), α -terpined (2.54%), terpiene-4-ol (0.34%) và linalool (0.24%) là các monoterpene chính (Song et al., 2009).

Ứng dụng của tinh dầu bạch đàn là làm sạch không khí, chống dị ứng, chống nấm, chống nhiễm trùng...

1.2 TỔNG QUAN VỀ NHŨ TƯƠNG NANO

Nhũ tương nano là nhũ tương có kích thước dưới micron với dạng giọt, có đường kính thường nằm trong khoảng 20 – 200 nm (Solans & Solé, 2012). Mặc dù phạm vi kích thước không thể được thiết lập chính xác vì không có sự thay đổi tính chất hóa lý của nhũ tương khi đi từ phạm vi micromet đến nanomet. Cấu trúc nhũ tương nano có thể được tùy chỉnh để đáp ứng nhu cầu tùy vào lĩnh vực khác nhau. Có ba loại nhũ tương nano: O/W, W/O và hai pha liên tục. Hệ thu được khi pha dầu và pha nước được phân tách bằng lớp CHĐBM. Nhũ tương nano bao gồm ba phần chính: dầu, CHĐBM và nước. Hai pha không thể trộn lẫn trong hệ nhũ tương nano, chúng được phân tách bằng sức căng bề mặt do CHĐBM gây ra (Mustafa & Hussein, 2020).

Năng lượng đầu vào và sự hình thành nhũ tương nano thường đạt được bằng cách sử dụng các thiết bị cơ học (ví dụ: máy đồng hóa áp suất cao, siêu âm) có thể tạo ra các lực phá vỡ cường độ cao. Trong các phương pháp này, năng lượng đầu vào càng cao thì kích thước giọt càng nhỏ. Chỉ một lượng nhỏ (thấp nhất là 0,1%) năng lượng cung cấp là sử dụng để nhũ hóa và phần còn lại bị tiêu tan dưới dạng nhiệt (Tadros, 2004). Do đó, các phương pháp năng lượng cao không hiệu quả về chi phí để sản xuất nhũ tương nano. Ngược lại, các phương pháp năng lượng thấp tận dụng nội năng của hệ để nhũ hóa. Kích thước hạt không phụ thuộc vào năng lượng bên ngoài vì nó phụ thuộc vào tính chất hóa lý của hệ. Hơn nữa, thiết bị đơn giản là cần thiết và quá trình nhũ hóa có thể được thực hiện trong điều kiện ổn định với nồng độ cao và thời gian hợp lý (Guha et al., n.d.).

1.2.1 Một số phương pháp điều chế hệ nhũ tương nano

Phương pháp năng lượng cao:

- Đồng hóa tốc độ cao
- Đồng hóa áp suất cao

Phương pháp năng lượng thấp:

- Đảo pha theo nhiệt độ

- Đảo pha theo thành phần
- Tự xảy

1.2.2 Phương pháp đảo pha theo nhiệt độ

Quá trình điều chế hệ nhũ tương nano bằng phương pháp đảo pha theo nhiệt độ (PIT) gồm 2 pha chính: nhũ tương O/W và nhũ tương W/O. Các nghiên cứu chỉ ra rằng CHĐBM sử dụng để bao bọc hệ dầu lại bằng đặc trưng về tính ưa dầu và ưa nước của chúng (Tadros, 2004).

Phương pháp nhiệt độ đảo pha bao gồm việc phá vỡ mạng lưới vi nhũ tương bằng cách đảo pha nhanh tại nhiệt độ đảo pha rồi làm lạnh nhanh hoặc pha loãng nước đột ngột. Giai đoạn này được coi là không thể đảo ngược vì nó tạo ra nhũ tương giọt dầu ổn định về mặt động học hoặc nhũ tương nano O/W. Trong thực tế, quá trình này là sự ổn định của loại không gian, ngăn chặn sự bám dính của các giọt nhỏ có thể dẫn đến kết tụ. (Komaiko & McClements, 2014).

Nhũ hóa bằng phương pháp năng lượng thấp có thể tận dụng tối đa các đặc tính hóa học bên trong để điều chế các nhũ tương nano với năng lượng đầu vào thấp (Yu et al., 2012). Nhũ tương nano được điều chế bằng phương pháp đảo pha do có sự thay đổi độ cong tự phát của chất nhũ hóa và sự chuyển pha trong quá trình tạo nhũ. Sự thay đổi độ cong này có được bằng cách duy trì nhiệt độ hoặc thành phần không đổi (K. Tong et al., 2016).

1.3 TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN TRÊN NÓN BẢO HIỂM

Nón bảo hiểm xe máy là phương tiện tiềm tàng để truyền vi khuẩn và nấm gây bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng. Mục đích chính trong nghiên cứu của Sapkota và cộng sự là khám phá sự đa dạng của vi khuẩn có liên quan đến nón bảo hiểm xe máy và xác định tính kháng khuẩn của nano thảo mộc trên các chủng vi khuẩn. Tổng cộng có 130 chiếc nón bảo hiểm xe máy được đội bởi đội ngũ giảng viên đã được đưa vào nghiên cứu. Kết quả trong tổng số 130 nón bảo hiểm xe máy được phân tích, có 392 vi khuẩn và 346 loại nấm thuộc bảy chi khác nhau (Sapkota et al., 2020).

Bảng 1.1. Các loại vi khuẩn trên nón bảo hiểm

STT	Tên vi khuẩn	Tổng trường hợp (%)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	89 (22.7)
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	77 (19.6)
3	<i>E. coli</i>	54 (13)

4	<i>Bacillus spp.</i>	44 (11.2)
5	<i>Klebsiella spp.</i>	33 (8.4)
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	38 (9.7)
7	<i>Salmonella spp.</i>	19 (4.8)
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19(4.8)
9	<i>Micrococcus spp.</i>	19(4.8)
	Tổng	392

Vi khuẩn chiếm ưu thế nhất là gram dương thường được gọi tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*), chiếm 22,7% tổng số vi khuẩn tìm thấy trên nón bảo hiểm. Là vi khuẩn gây bệnh trên da và máu nhưng thường không gây bệnh ở người khỏe mạnh. *S. aureus* chỉ xâm nhập vào mô và máu ở vết thương hở (Taylor & Unakal, 2017).

Vi khuẩn *Escherichia coli* chiếm 13.8% trong tổng số các loại vi khuẩn có trên nón bảo hiểm. *Escherichia coli* là vi khuẩn gram âm thuộc họ *Enterobacteriaceae*, có thể xâm chiếm ruột người một cách vô hại hoặc gây nhiễm trùng đường ruột hoặc ngoài ruột, bao gồm cả bệnh xâm lấn nghiêm trọng như nhiễm khuẩn huyết và nhiễm trùng huyết. *E. coli* là nguyên nhân phổ biến nhất gây nhiễm khuẩn huyết ở các nước có thu nhập cao, vượt xa các mầm bệnh gây nhiễm khuẩn huyết hàng đầu khác như *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus pneumoniae* (Bonten et al., 2021).

Vì vậy, người sử dụng nón bảo hiểm nên có biện pháp vệ sinh tốt và thường xuyên làm sạch nón bảo hiểm bằng các dung dịch xịt khuẩn để tránh nguy cơ nhiễm vi sinh vật và giảm các rủi ro liên quan (Sapkota et al., 2020).

1.4 TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.4.1 Tình hình trong nước

Một nghiên cứu của tác giả Lý Thị Minh Hiền với hai phương pháp điều chế nano tinh dầu tiêu đen là nhiệt độ đảo pha và điểm đảo pha. Kết quả cho thấy rằng phương pháp điểm đảo pha phù hợp để tạo hệ nhũ tương hơn và ổn định thành phần trong 6 tháng. Hơn nữa, hệ nhũ khả năng ức chế trên hai vi khuẩn là *Escherichia coli* và *Salmonella enterica*. Tác dụng ức chế được tiến hành bằng MIC và MBC đã được xác định bởi mẫu thịt được chuẩn bị. (Tp et al., n.d.).

Ngày nay các hệ nhũ tương nano được nghiên cứu ngày càng nhiều, tác giả Quốc Thông và cộng sự, tạo hệ nano tinh dầu gấc và curcumin sử dụng CHĐBM là Lecithin

và Tween 80 (đồng hoá tốc ở độ cao kết hợp siêu âm). Kết quả cho thấy tỉ lệ Lecithin và Tween 80 là 2:8 được chọn và cho kích thước hạt là 138 nm (Quoc thong, n.d.).

Ở nghiên cứu của tác giả Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, tinh dầu tiêu đen được dùng để tạo hệ nhũ bằng phương pháp đồng hóa hóa ở tốc độ cao. Mẫu thịt gà và heo được chuẩn bị sẽ nhúng trong hệ nhũ. Kết quả thu được, mẫu nano tinh dầu tiêu đen lưu trữ trong 9 ngày ở nhiệt độ 10 °C và làm giảm mật độ vi sinh vật hiếu khí nhỏ hơn 10⁶ CFU/g. Ngược lại, các mẫu không nhúng được nhúng hệ nhũ chỉ có thể được lưu trữ trong 3 ngày trong điều kiện giống nhau (Hiền et al., 2020).

Vi khuẩn kháng kháng sinh ngày nay ngày càng nhiều trong đó được kể đến là *S. aureus*. Nghiên cứu của tác giả Trích vào năm 2019 đã sử dụng tinh dầu trầm trà (*Melaleuca alternifolia*) để thử nghiệm tính kháng khuẩn lên *S. aureus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Ban đầu, trích tinh dầu trầm trà có hiệu suất đạt 4.62 %. Kết quả cho thấy trầm trà đạt đường kính 27.3 mm (Trích et al., 2019).

1.4.2 Tình hình ngoài nước

Tác giả Catherine đã sử dụng eugenol và menthol ức chế vi khuẩn. Cả hai hợp chất này đều có MIC là 0.25%. Thử nghiệm trên các thực phẩm như bắp cải, lúa mạch và đu đủ trong quá trình bảo quản. Kết quả của phương pháp này cho thấy menthol có MIC là 0.1%, eugenol có MIC là 0.2% (*S. aureus*) (Catherine, A. A. et al., 2012).

Năm 2015, phương pháp đồng hoá tốc độ cao kết hợp với đồng hoá siêu âm để tạo nhũ tương nano paclitaxel. nghiên cứu một loại paclitaxel thay thế, sinh khả dụng hơn, dung nạp tốt hơn để tiêm tĩnh mạch so với công thức Taxol1 có bán trên thị trường (Li et al., 2015).

Khác với phương pháp sử dụng năng lượng cao ở trên thì tác giả Nicolas Anton và đồng tác giả lại sử dụng phương pháp năng lượng thấp – phương pháp nhiệt độ đảo pha (PIT). Họ sử dụng chất nhũ hóa không ion là Soluton HS 15, nước và dầu. Khảo sát nhiệt độ đảo pha trên 80 °C và sau đó được làm lạnh nhanh (Anton et al., 2007).

Tác giả Hasan Barzegar và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo hệ nano tinh dầu bạc hà. Thử nghiệm sử dụng Tween 80 làm chất nhũ hoá và khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy, nhiệt độ pha hữu cơ, thời gian bảo quản trong 90 ngày và các yếu tố khác. Kết quả thu được kích thước giọt là 50 nm (Barzegar et al., 2018).

Vào năm 2017, tác giả Simge Tutku Yildirim và cộng sự đã tạo ra các nhũ tương nano tinh dầu quế bằng cách sử dụng phương pháp nhũ hóa tự phát và so sánh nó với

hai phương pháp năng lượng cao. Phương pháp khuếch tán đĩa đã được đánh giá với vi khuẩn *E. coli*. Tween 80 được sử dụng làm CHĐBM, cho kích thước hạt trung bình khoảng 100 nm đối với thành phần pha dầu 6:4 (dầu dừa:quế) (Yildirim et al., 2017).

Trong nghiên cứu hiện tại, nhũ tương nano dầu đinh hương. Các giọt nhũ tương có kích thước xấp xỉ 225,8 nm và có dạng hình cầu. Kết quả MIC tối thiểu trong khoảng từ 0,31 đến 5 mg/mL (Shehabeldine et al., 2023).

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGUYÊN CỨU

2.1 NGUYÊN LIỆU

Tinh dầu quế, trà, sả java, trà gió, bạc hà, bạch đàn, tiêu đen và hương thảo được mua tại công ty TNHH Sản xuất Thương mại Mộc Mây (Số 8, Hiệp Bình Chánh, Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh). Nguyên liệu được bảo quản ở nhiệt độ phòng và để ở nơi tránh ánh sáng trực tiếp.

2.2 DỤNG CỤ, THIẾT BỊ, HOÁ CHẤT

2.2.1 Dụng cụ

- Đĩa petri
- Cốc
- Pipet
- Micropipet
- Ống bóp, ống nhỏ giọt
- Bình tia
- Nhiệt kế
- Tăm bông, que cấy
- Thước
- Đèn cồn, bật lửa
- Ống nghiệm, giá đỡ ống nghiệm
- Cuvet
- Bình xịt cồn
- Đầu côn
- Nhíp kẹp
- Giếng giấy (6 mm)





2.2.2 Hoá chất

- Tween 20, 40, 60 và 80 (độ tinh khiết 99%, Trung Quốc)
- Chỉ thị resazurin 0.001 g/mL: cân 0.05 g resazurin rồi định mức lên 50 mL bằng nước cất.
- Môi trường MHB (Muller Hinton Borth): cân 21 g MHB, hòa tan trong 1000 mL nước cất.

- Môi trường MHA (Muller Hintor Agar): cân 21 g MHB (Ấn Độ) và 20 g thạch agar (Việt Nam), đong 1000 mL nước cất.
- Môi trường PCA (Plate Count Agar): cân 17.5 g PCA và 1000 mL nước cất.
- Kháng sinh ciprofloxacin 0.2 mg/mL: nghiền mịn viên kháng sinh ciproxacin 500 mg, hòa tan và định mức lên 500 mL. Lúc này kháng sinh có nồng độ 1 mg/mL. Hút 10 mL kháng sinh 1 mg/mL dùng bình định mức lên 50 mL.
- Vi khuẩn *Escherichia coli*
- Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

2.2.3 Thiết bị

Bảng 2.1. Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên thiết bị	Mã thiết bị	Xuất xứ	Hình ảnh
1	Máy đo kích thước hạt	Winner 802 0001	Trung Quốc	
2	Máy ly tâm 12 chỗ tube 5 ml	PLC05	Đài Loan	
3	Cân 4 số		Trung Quốc	
4	Tủ an toàn sinh học cấp 2	HR40-IIA2	Trung Quốc	
5	Bể rửa siêu âm		Trung Quốc	

6 Nồi hấp tiệt trùng LK HAC060 Hàn Quốc
LAB 60 lít



7 Máy khuấy từ 85-2 Trung Quốc

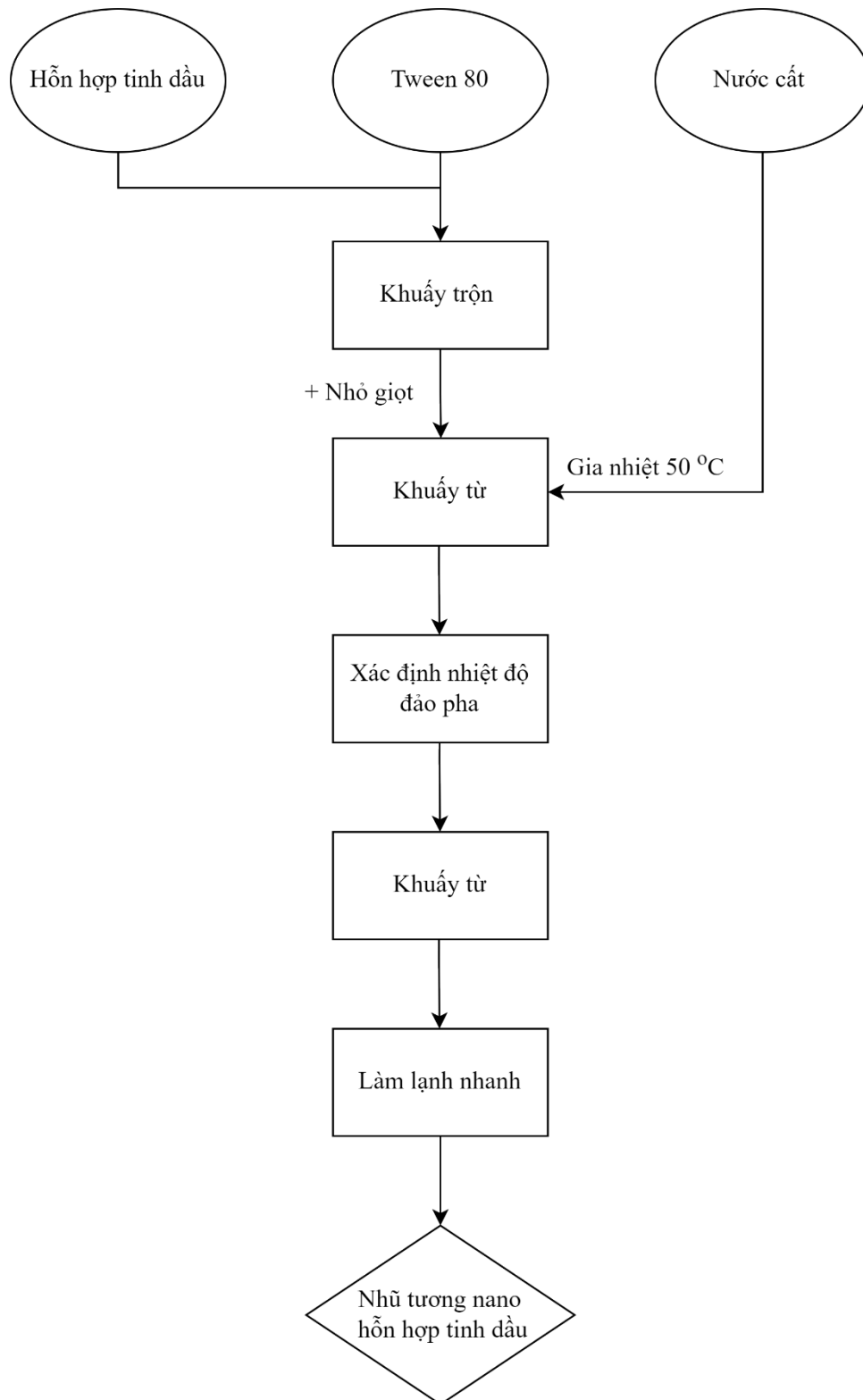


8 Máy đếm khuẩn lạc FTCC-10



2.3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1 Quy trình công nghệ

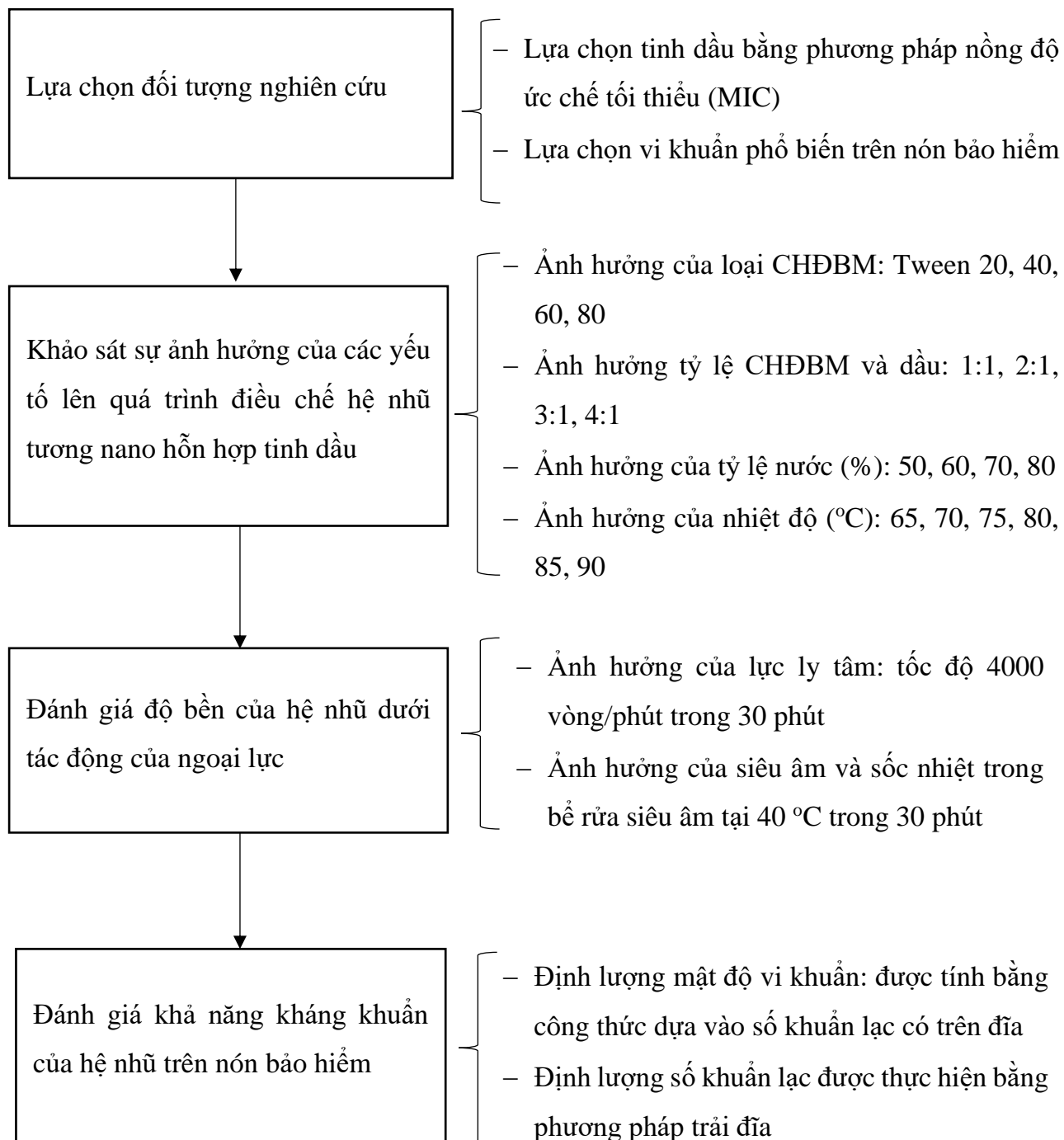


Hình 2.1. Sơ đồ quy trình tạo hệ nhũ tương nano bằng phương pháp PIT

2.2.3 Thuyết minh quy trình

Hệ nhũ tương nano hỗn hợp tinh dầu được điều chế bằng phương pháp đảo pha theo nhiệt độ (PIT). Năm loại tinh dầu được hút bằng micropipet theo tỷ lệ xác định (1:1:1:1:1) và trộn với CHĐBM theo tỷ lệ 2:1 (dầu:CHĐBM) rồi khuấy từ trong 15 phút. Trong đó tinh dầu và CHĐBM chiếm 30% và nước là 70% của hệ nhũ, sao cho tổng thể tích là 50 mL. Sau đó gia nhiệt pha nước lên 50 °C và khuấy liên tục. Nhỏ từ từ pha dầu (gồm CHĐBM và tinh dầu) vào nước với tốc độ 2 mL/phút. Gia nhiệt từ 65 đến 90 °C và ghi nhận nhiệt độ đảo pha. Khi hệ đạt đến điểm đảo pha, độ đục của mẫu giảm dần và trở nên trong suốt. Giữ hệ tại nhiệt độ đó trong 1 giờ. Sau đó, làm lạnh nhanh bằng chậu nước đá ở 5°C trong 15 phút. Các mẫu sau khi điều chế được giữ ổn định trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng rồi mới tiến hành phân tích.

2.3.2 Sơ đồ nghiên cứu



2.3.3 Bố trí thí nghiệm

Bảng 2.2. Bố trí thí nghiệm đơn biến

STT	Yếu tố	X1	X2	X3	X4
1	CHĐBM (X1)	Tween 20,40, 60, 80	2:1	80	75
2	SOR (X2)	*	4:1, 3:1, 2:1, 1:1	80	75
3	Tỉ lệ nước (X3) (%)	*	**	50, 60, 70, 80	75
4	Nhiệt độ đảo pha (X4) (°C)	*	**	***	65, 70, 75, 80, 85, 90

Hàm mục tiêu: Kích thước hạt và đường kính ức chế vi khuẩn.

2.4 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.4.1 Phân tích kích thước hạt và chỉ số phân tán

Kích thước hạt trung bình và sự phân bố kích thước hạt được xác định trên máy đo kích thước hạt Winner 802-0001 ở 25 °C trong môi trường nước bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

2.4.2 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của các loại tinh dầu

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các loại tinh dầu được xác định bằng phương pháp pha loãng 96 giếng. Các loại tinh dầu được pha loãng trong hỗn hợp Tween 80 và nước cất (1:6). Mật độ vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm pha loãng ở 10^5 - 10^6 CFU/mL.

Tất cả các giếng đều dùng 100 μ L dung dịch Tween 80 để pha loãng, riêng giếng đầu tiên không nhỏ Tween 80. Bắt đầu nhỏ 100 μ L tinh dầu vào giếng thứ nhất và giếng thứ hai và hút 100 μ L từ giếng thứ 2 qua giếng thứ 3 để pha loãng và tiến hành tương tự cho tới hết. Tinh dầu pha loãng có nồng độ 500, 250, 125, 62.5, ... mg/mL. Tiếp theo, nhỏ 50 μ L môi trường và 50 μ L vi khuẩn. Hàng đối chứng sẽ thay 50 μ L vi khuẩn bằng 50 μ L Tween 80. Sau 24 giờ, nhỏ 50 μ L chỉ thị resazurin vào các giếng. Quan sát sự thay đổi màu sắc trong các giếng. Giếng chuyển sang hồng giếng ở nồng độ đó không còn khả năng ức chế vi khuẩn.

2.4.3 Xác định đường kính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Đầu tiên, môi trường MHA, MHB và dụng cụ cấy được hấp tiệt trùng ở 121 °C. Tiến hành cấy vi khuẩn bằng cách đổ môi trường nóng vào đĩa petri rồi để nguội. Sau đó, hút 100 μ L vi khuẩn lên đĩa petri, cấy đều lên đĩa. Ủ ấm tại 37 °C trong 24 giờ để kích hoạt vi khuẩn.

Sau 24 giờ, đĩa vi khuẩn MHA đã kích hoạt được cấy truyền trong ống nghiệm. Dùng que cấy lấy 1 ít khuẩn lạc bỏ vào ống nghiệm có chứa 5 mL môi trường MHB, ủ ấm ở 37 °C trong 24 giờ.

Hệ nhũ tương nano được đánh giá về khả năng kháng hai chủng vi khuẩn gram âm (*E. coli*) và gram dương (*S. aureus*) ở nồng độ 1×10^8 CFU/mL. Đổ môi trường

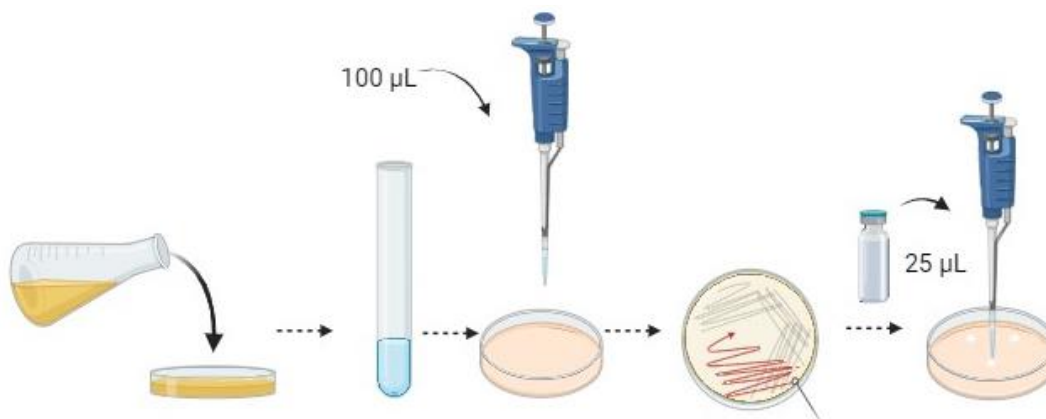
MHA nóng vào đĩa petri để tránh khuếch tán các sản phẩm thử nghiệm. Sau đó, vi khuẩn được nhỏ lên đĩa 100 μL và dùng tăm bông vô trùng để phân bố đều. Đợi cho dịch khuẩn khô trong 15 phút. Đặt giếng lọc có đường kính 6 mm đã vô trùng lên đĩa thạch. Dùng 3 giếng lọc và nhỏ 25 μL mẫu lên. Mẫu đầu tiên dùng nước muối để làm đối chứng âm. Mẫu thứ hai sử dụng kháng sinh ciprofloxacin 0.2 mg/mL làm đối chứng dương. Mẫu còn lại nhỏ hệ nhũ đã được điều chế lên. Đĩa thạch MHA bảo quản ở điều kiện hiếu khí (ở 37°C, 24 giờ). Đánh giá kết quả bằng cách đo đường kính của vùng không có vi khuẩn phát triển, kể cả đường kính giếng lọc và được tính bằng công thức:

$$\text{Đường kính vùng ức chế (mm)} = D - d.$$

Trong đó:

D: đường kính vòng kháng khuẩn đo được (mm)

d: đường kính khoanh giấy ($d = 6 \text{ mm}$).



Hình 2.2. Quy trình các bước thực hiện phương pháp khuếch tán đĩa

2.4.4 Định lượng tổng vi sinh vật hiếu khí trên nón bảo hiểm

Để xác định hiệu quả của hệ nhũ sử dụng phương pháp định lượng tổng vi sinh vật hiếu khí trước và sau khi xịt hệ nhũ lên nón bảo hiểm. Dùng tăm bông vô trùng (đã được làm ẩm bằng nước cất vô trùng) xoay bên trong bề mặt nón để lấy mẫu trước khi xịt. Dùng 2 mL dung dịch diệt khuẩn xịt lên nón bảo hiểm và đợi 5 phút cho khô. Dùng tăm bông vô trùng để lấy mẫu lần nữa (mẫu sau khi xịt). Các tăm bông được ngâm trong 5 mL nước muối để làm mẫu gốc, sau đó pha loãng thành các nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Hút 100 μL dịch khuẩn trong ống nghiệm, rồi trải lên đĩa thạch PCA và ủ hiếu khí trong 24 giờ ở 37°C. Ngày hôm sau, tổng số khuẩn lạc phát triển sẽ được đếm với máy đếm khuẩn lạc và ghi nhận kết quả.

Số khuẩn lạc có trong 1 g/mL mẫu được tính theo công thức:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$$

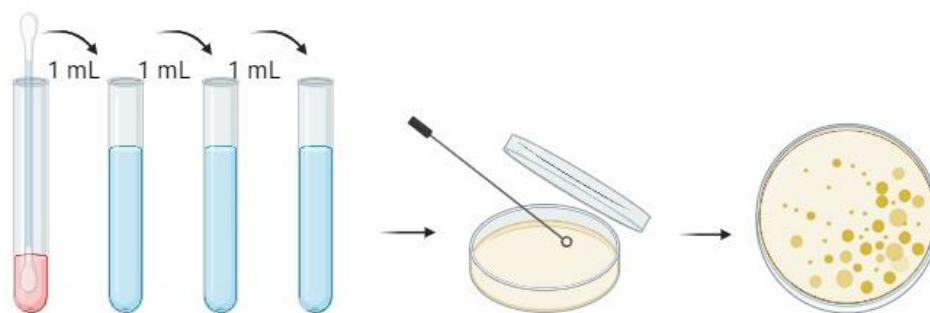
Trong đó:

ΣC : tổng số khuẩn lạc được đếm trên các đĩa

n_1 : số đĩa được pha loãng ở nồng độ đầu (2 đĩa)

n_2 : số đĩa được pha loãng ở nồng độ sau (2 đĩa)

d : hệ số pha loãng.



Hình 2.3. Các bước tiến hành phương pháp trải đĩa

2.4.5 Đánh giá độ bền của hệ nhũ dưới tác động của ngoại lực

Hệ nhũ được đánh giá độ bền dưới tác động của ngoại lực được đánh giá bằng phương pháp ly tâm, siêu âm và sốc nhiệt. Phương pháp ly tâm được tiến hành ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 30 phút. Phương pháp siêu âm và sốc nhiệt được thực hiện trong bể siêu âm ở nhiệt độ 40 °C trong 30 phút. Sau khi tác động ngoại lực, dùng pipet hút mẫu ở giữa ống nghiệm để phân tích kích thước hạt và chỉ số phân tán.

2.5 THU THẬP VÀ XỬ LÝ SỐ LIỆU

- Mỗi thí nghiệm được thực hiện hai lần để có ý nghĩa về mặt thống kê. Kích thước hạt của mỗi mẫu được đo hai lần, đường kính kháng khuẩn được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình.
- Các biểu đồ và độ lệch chuẩn được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.
- Phân tích sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng kiểm định Turkey's-b được thực hiện trên phần mềm IBM SPSS 20.0.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU CỦA CÁC LOẠI TINH DẦU

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được thực hiện với 8 loại tinh dầu (quế, trà, sả java, bạc hà, hương thảo, tiêu đen, bạch đàn và trà gió) trên 2 chủng vi khuẩn đại diện (*S. aureus* và *E. coli*) bằng phương pháp pha loãng. Kết quả MIC được thể hiện trên bảng 3.1.

Bảng 3.1. MIC của mẫu tinh dầu đối với 2 vi khuẩn đại diện

STT	Tinh dầu	<i>S. aureus</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>E. coli</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
1	Quế	0.0153 ± 0.00	0.0305 ± 0.00
2	Trà trà	7.8125 ± 0.00	7.8125 ± 0.00
3	Sả java	31.250 ± 0.00	31.250 ± 0.00
4	Trà gió	15.625 ± 0.00	31.250 ± 0.00
5	Bạch đàn	62.500 ± 0.00	62.500 ± 0.00
6	Bạc hà	62.500 ± 0.00	250.00 ± 0.00
7	Tiêu	187.50 ± 88.38	500.00 ± 0.00
8	Hương thảo	500.00 ± 0.00	–

Khả năng ức chế ở bảng 3.1 cho thấy vi khuẩn gram (+) mạnh hơn gram (-) của các các loại tinh dầu. Vi khuẩn gram (+) có thành tế bào mỏng hơn gram (-), khả năng khuếch tán của tinh dầu kém hơn, vì vậy mà vi khuẩn gram (-) kháng tốt hơn đối với hợp chất kháng khuẩn trong tinh dầu (N. T. A. Tong et al., 2020). Bảng 3.1 còn chỉ ra rằng tinh dầu quế có MIC thấp nhất trong các loại tinh dầu khảo sát. Điều đó cho thấy tinh dầu quế có hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn các tinh dầu còn lại. Tinh dầu quế có MIC trên *S. aureus* và *E. coli* lần lượt là 0.0153 và 0.0305 $\mu\text{L}/\text{mL}$, nghĩa là tinh dầu quế nhạy cảm cao với vi khuẩn *S. aureus* hơn là *E. coli*. Nghiên cứu của Yong li và cộng sự cũng cho kết quả tương tự (Li et al., 2015). Hoạt tính kháng khuẩn cao được quan sát thấy trong tinh dầu quế được cho là do khả năng kháng khuẩn chính của hợp chất trans-cinnamaldehyde có trong tinh dầu quế (El Atki et al., 2019).

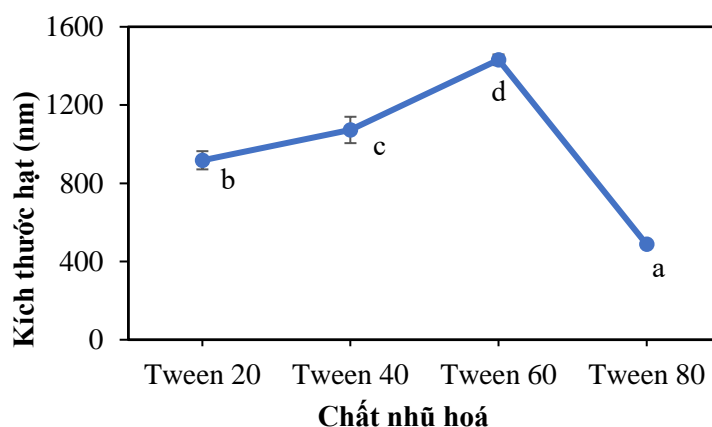
Tinh dầu trà và sả java kháng tốt với 2 vi khuẩn trên. Vì có MIC nhỏ hơn nên tinh dầu trà có hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn sả java và chỉ đứng sau quế. Khác với tinh dầu quế có tính nhạy cảm với *S. aureus* hơn *E. coli* thì tinh dầu trà

và sả java có tính nhạy cảm gần như nhau với 2 vi khuẩn trên. Trong tinh dầu trà có hợp chất kháng khuẩn tốt là eucalyptol và terpineol (Trích et al., 2019). Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu sả java là do sự hiện diện của các thành phần elemol (9.1%), citronellol (10.4%), citronellal (16.9%) và nerol (8%) (Trindade et al., 2015). Tinh dầu trà gió và bạch đàn cũng kháng tốt 2 vi khuẩn đại diện. Thành phần chính trong 2 loại tinh dầu này là 1,8-cineole và α -pinene có tính kháng khuẩn mạnh. Tuy nhiên, tính kháng khuẩn của tinh dầu trà gió cao hơn trên cả *S. aureus* và *E. coli*. Do đó, chọn tinh dầu trà gió để tạo hệ nhũ tương sẽ phù hợp hơn.

Mặc dù, bạc hà có MIC thấp hơn bạch đàn, tuy nhiên tinh dầu bạc hà vẫn được lựa chọn vì mùi thơm dễ chịu và làm mát da đầu. Tinh dầu hương thảo và tiêu đen kháng yếu hơn các loại tinh dầu được khảo sát. Trong đó, hương thảo không kháng được *E. coli* và kháng yếu hơn tinh dầu tiêu. Việc lựa chọn 2 loại tinh dầu này làm nhũ tương nano sẽ không phù hợp.

Từ những phân tích trên, 5 loại tinh dầu được lựa chọn để tạo hệ nhũ tương nano ứng dụng làm dung dịch diệt khuẩn nón bảo hiểm là bạc hà, quế, sả java, trà trà và trà gió.

3.2 ẢNH HƯỞNG CỦA LOẠI CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT



Hình 3.1. Kích thước hạt của các mẫu sử dụng các chất nhũ hoá khác nhau



Hình 3.2. Độ bền của hệ nhũ sử dụng các loại CHĐBM khác nhau

Hình 3.1 và 3.2 đã thể hiện độ bền và kích thước hạt của hệ nhũ sử dụng các loại CHĐBM khác nhau. Quan sát ở mẫu Tween 20 và 40 thì mẫu bị tách lớp, hệ không đồng nhất và kích thước hạt đạt 917.62 và 1072.595 nm (Phụ lục A1 và A2). Quan sát mẫu Tween 60, trên bề mặt mẫu bị tách một lớp màu trắng đục và kích thước hạt đạt 1431.235 nm (Phụ lục A3). Tween 80 cho mẫu trong nhất, hệ đồng nhất và không tách lớp, kích thước hạt 488.01 nm (Phụ lục A4). Ta thấy rằng kích thước hạt của mẫu sử dụng Tween 80 là nhỏ nhất và tạo hệ nhũ ổn định hơn.

Chỉ số HLB để đánh giá hằng số cân bằng giữa tính ưa nước và ưa dầu của chất nhũ hoá. Tween 20, 40, 60 và 80 có chỉ số HLB lần lượt là: 16.7, 15.6, 14.9 và 15. Giá trị HLB càng thấp thì chất hoạt động bề mặt càng ưa dầu hoặc hòa tan trong dầu, trong khi giá trị HLB càng cao thì CHĐBM càng hòa tan trong nước hoặc ưa nước (Ibrahim et al., 2019). Tween 60 và 80 có nhóm phân cực tương đương nhau, nhưng lại khác nhau về hình dạng phân tử. Trong các đoạn phân tử kỵ nước của Tween 60 đã bão hoà và do đó khá gần nhau. Trong khi đó, các phân đoạn kỵ nước của Tween 80 không bão hoà và do đó bị xoắn nhiều hơn, ảnh hưởng đến việc bao bọc CHĐBM trên bề mặt phân cách dầu – nước. Điều đó dẫn đến xu hướng hình thành các hạt mixen được tạo một cách tự nhiên giữa pha hữu cơ và pha nước. Chất nhũ hoá Tween 80 có thông số bao bọc và độ cong tối ưu thúc đẩy kích thước hạt mixen nhỏ hơn trong hệ nhũ tương nano (Asyikin et al., 2019).

Bảng 3.2. Đường kính vùng ức chế của mẫu sử dụng các CHĐBM khác nhau

Chất nhũ hoá	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Mẫu	Đối chứng (+)	Mẫu	Đối chứng (+)
Tween 20	8.17 ± 0.24 ^a	29.83 ± 0.24	8.50 ± 0.24 ^a	33.00 ± 0.47

Tween 40	8.17 ± 0.247^a	29.83 ± 0.24	8.83 ± 1.18^a	33.67 ± 1.41
Tween 60	8.00 ± 0.00^a	29.83 ± 0.12	9.17 ± 0.24^a	33.00 ± 0.94
Tween 80	8.83 ± 0.71^a	28.83 ± 0.71	8.83 ± 0.24^a	35.67 ± 0.00

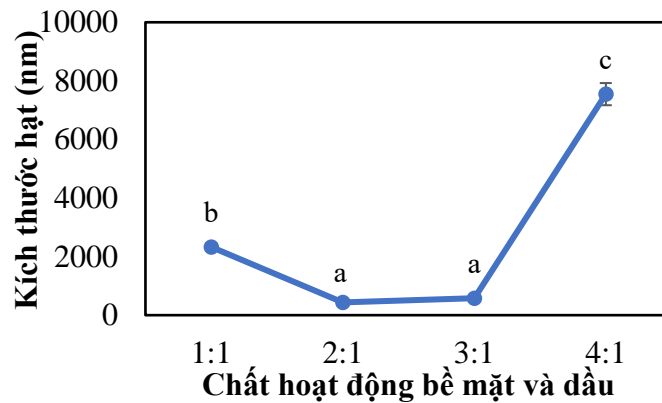
Đối chứng dương: kháng sinh Ciprofloxacin, đối chứng âm: nước muối sinh lý

Bảng 3.2 trình bày hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ ở và sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức được thể hiện trong phụ lục E1. Kết quả từ SPSS cho thấy đường kính ức chế các mẫu sử dụng các CHĐBM khác nhau không có sự khác biệt trên cùng một loại vi khuẩn. Trong đó, vùng ức chế của vi khuẩn *S. aureus* cho đường kính lớn hơn là *E. coli*. Đường kính kháng khuẩn của các mẫu không có sự khác biệt là do thử nghiệm cố định lượng tinh dầu có trong hệ. Có thể kết luận rằng tính kháng khuẩn của hệ nhũ không phụ thuộc vào chất nhũ hoá. Tween được sử dụng rộng rãi trong dược phẩm và thực phẩm là do khả năng nhũ hoá cao, nồng độ sử dụng và độc tính tương đối thấp. Ngoài ra, chúng thường không hoặc ít tương tác với các hoạt chất khác (Ibrahim et al., 2019). Ở nghiên cứu này, sử dụng Tween 80 là phù hợp để tạo hệ nhũ tương hỗn hợp tinh dầu.

Hoạt tính kháng khuẩn của hệ nhũ tương được trình bày ở Bảng 3.2. Sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức được trình bày ở Phụ lục E1. Kết quả SPSS cho thấy không có sự khác biệt về đường kính vòng kháng khuẩn của các mẫu sử dụng các chất nhũ hóa khác nhau đối với cùng một loại vi khuẩn. Mẫu nhũ tương mặc dù có đặc tính kháng khuẩn tốt nhưng yếu hơn so với mẫu đối chứng dương tính. Không có sự khác biệt về đường kính kháng khuẩn của các mẫu do hàm lượng tinh dầu được thử nghiệm. Có thể kết luận rằng đặc tính kháng khuẩn của nhũ tương không phụ thuộc vào chất nhũ hóa. Một yếu tố ảnh hưởng đến khả năng ức chế vi khuẩn là hàm lượng tinh dầu trong hệ nhũ tương.

Ở một nghiên cứu khác của tác giả Ubonrat Siripatravan và cộng sự, hệ nhũ tương nano tinh dầu quế được tạo ra bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha cũng sử dụng chất nhũ hoá là Tween 80 (Yildirim et al., 2017).

3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ CHẤT HOẠT ĐỘNG VỀ MẶT VÀ DẦU



Hình 3.3 Kích thước hạt của các mẫu ở các SOR khác nhau



Hình 3.4. Độ trong của mẫu ở các SOR khác nhau

Kích thước hạt và độ trong của hệ nhũ ở các tỷ lệ chất hoạt động bề mặt và dầu khác nhau được thể hiện ở hình 3.3 và 3.4. Mẫu SOR 1:1 cho kích thước lớn đạt 2327.06 nm (Phụ lục B1), hệ nhũ có dấu hiệu bị tách một lớp trắng trên bề mặt (hình 3.4). Ở các mẫu SOR 2:1 và 3:1 kích thước hạt giảm xuống còn 436.2 nm và 578.87 nm (Phụ lục B2 và B3). Tác giả Jennifer Komako đã chỉ ra rằng lượng chất nhũ hoá cao là cần thiết để tạo kích thước giọt nhỏ. Nếu lượng CHĐBM không đủ, lớp bảo vệ sẽ không hình thành, các hạt sẽ va chạm với nhau và các giọt dầu sẽ bị kết tụ (Komaiko & McClements, 2015). Yêu cầu về lượng CHĐBM thích hợp để thu được kích thước hạt nhỏ phụ thuộc vào trạng thái pha của CHĐBM – dầu – nước. Lượng CHĐBM cao gây ra sự hỗn loạn về ái lực đối với pha nước và các giọt nhỏ hơn sẽ được hình thành (Rao & McClements, 2011). Mẫu (Phụ lục B4). Việc tăng kích thước hạt SOR 4:1 trong nhất nhưng kích thước hạt lại lớn nhất 7546.21 nm ở tỷ lệ 4:1 là do nồng độ CHĐBM cao làm tăng độ nhớt, ngăn ngừa tính lưu động và sự chuyển động dễ dàng của pha hữu cơ về phía pha nước. Do đó, kích thước hạt ở SOR 4:1 lớn hơn những SOR còn lại. Điều này đúng với nghiên cứu tạo nano tinh dầu bạc hà của Hasan Barzegar và cộng sự (Barzegar et al., 2018).

Bảng 3.3. Đường kính vùng ức chế của các mẫu ở các SOR khác nhau

SOR	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Mẫu	Đối chứng (+)	Mẫu	Đối chứng (+)
1:1	11.50 ± 0.71 ^b	33.17 ± 0.24	11.83 ± 1.70 ^c	34.67 ± 0.94
2:1	8.83 ± 0.24 ^{a, b}	33.00 ± 0.47	9.50 ± 0.71 ^b	35.17 ± 0.24
3:1	7.17 ± 0.24 ^a	33.33 ± 0.47	8.17 ± 0.71 ^b	34.67 ± 0.94
4:1	6.00 ± 1.41 ^a	34.00 ± 0.47	6.50 ± 0.71 ^a	34.50 ± 0.71

Đối chứng dương: kháng sinh Ciprofloxacin, đối chứng âm: nước muối sinh lý

Mặc dù SOR 2:1 và 3:1 có kích thước hạt nhỏ, tuy nhiên hệ nhũ phải có tính kháng khuẩn tốt để đáp ứng cho ứng dụng diệt khuẩn trên nón bảo hiểm. Bảng 3.3 thể hiện đường kính vùng ức chế vi khuẩn của các mẫu ở các SOR khác nhau. Ở SOR 1:1 cho đường kính vùng ức chế lớn nhất đối với vi khuẩn *E. coli* và giảm dần ở các SOR còn lại. Mặc dù SOR 1:1 có đường kính kháng khuẩn lớn nhưng so với đối chứng dương thì vẫn yếu hơn. Nồng độ tinh dầu sử dụng trong thử nghiệm tương ứng là 15%, 10%, 7.5% và 6%. Hàm lượng tinh dầu trong hệ càng lớn tỉ lệ thuận với đường kính vòng kháng khuẩn. Mẫu SOR 1:1 (15% tinh dầu) cho hệ không ổn định, kích thước hạt lớn và đường kính vùng ức chế *E. coli* lớn nhất. Điều này đúng với nghiên cứu của tác giả Simge Tutku Yildiri khi tạo hệ nhũ nano tinh dầu quế bằng phương pháp năng lượng thấp (Yildirim et al., 2017).

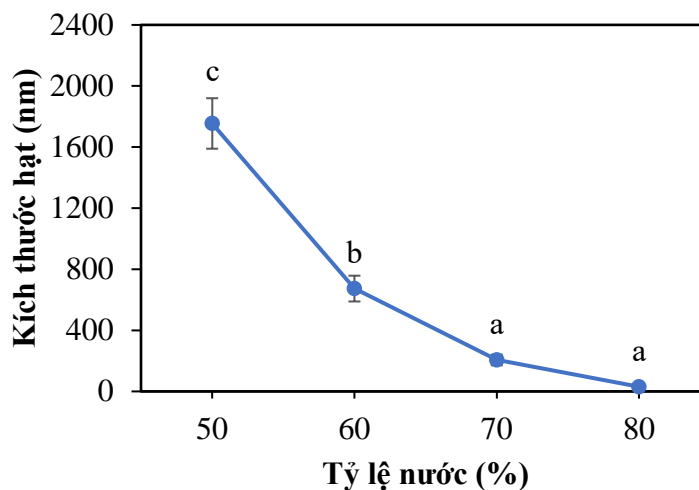
Sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức được thể hiện trong phụ lục B2 và E2. Kích thước hạt ở SOR 2:1 và 3:1 không có sự khác biệt, nhưng SOR 2:1 lại có đường kính vùng ức chế lớn hơn. SOR 2:1 thỏa mãn được cả hai chỉ tiêu là kích thước giọt nhỏ và tính kháng khuẩn cao. Kết quả chỉ ra rằng SOR 2:1 là tỷ lệ phù hợp cho các thử nghiệm tiếp theo.

Trong một nghiên cứu khác của Lý Thị Minh Hiền, hệ nano dầu hạt tiêu đen được tạo ra bằng phương pháp đảo pha dựa trên nhiệt độ sử dụng SOR 2:1. Hai phương pháp xử lý tối ưu với tinh dầu tiêu đen ở nồng độ 10% và 12,5% (Tp et al., n.d.).

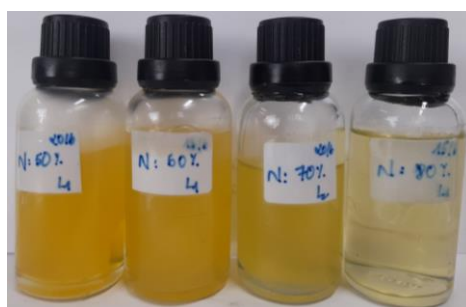
3.4 ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ NƯỚC

Tỷ lệ nước được xem là yếu tố ảnh hưởng lớn đến kích thước giọt cũng như vùng ức chế vi khuẩn. Hình 3.5 và 3.6 thể hiện tác động của hàm lượng nước đến kích thước hạt và độ trong của mẫu. Kết quả cho thấy kích thước hạt có xu hướng giảm dần

(1754.67 nm, 673.485 nm, 206.025 nm và 30.66 nm) phụ lục C và độ trong của mẫu tăng dần theo tỷ lệ nước. Bảng 3.4 thể hiện vòng kháng khuẩn của mẫu ở các tỷ lệ nước khác nhau. Đường kính vùng ức chế vi khuẩn cũng có xu hướng giảm dần trên cả hai vi khuẩn giống như kích thước hạt



Hình 3.5. Kích thước hạt của mẫu ở các tỷ lệ nước khác nhau



Hình 3.6 Độ trong của hệ nhũ ở các tỷ lệ nước khác nhau

Bảng 3.4. Đường kính kháng khuẩn của mẫu ở các tỷ lệ nước khác nhau

Tỷ lệ nước (%)	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Mẫu	Đối chứng (+)	Mẫu	Đối chứng (+)
50	17.00 ± 0.00 ^c	31.50 ± 0.71	18.5 ± 0.71 ^c	34.83 ± 0.71
60	12.17 ± 0.47 ^b	31.33 ± 1.89	12.65 ± 0.47 ^b	35.17 ± 0.24
70	9.17 ± 0.24 ^a	31.50 ± 0.71	9.50 ± 0.24 ^a	34.67 ± 0.94
80	8.00 ± 0.47 ^a	31.00 ± 1.41	8.17 ± 0.24 ^a	33.50 ± 0.71

Đối chứng dương: kháng sinh Ciprofloxacin, đối chứng âm: nước muối sinh lý

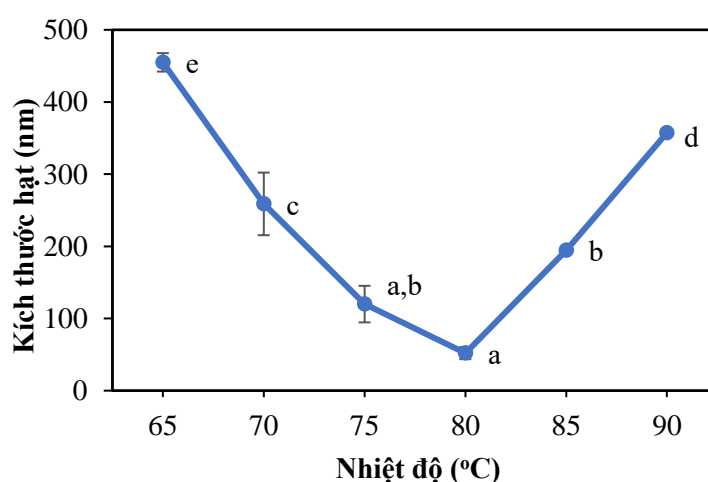
Kích thước hạt lớn trong mẫu 50% nước là do lượng nước ít và lượng CHĐBM nhiều làm cho mẫu có độ nhớt cao. Việc tăng lượng nước trong hệ làm cho độ nhớt giảm và từ đó dễ dàng hình thành các giọt nhỏ. Để lý giải cho hiện tượng này, tác giả

Jennifer Komaiko và Daivid Julian McClements khi nghiên cứu về phương pháp điểm đảo pha nếu có độ nhớt cao sẽ làm quá trình chuyển động của phân tử chậm đi và ức chế các giọt siêu mịn (Komaiko & McClements, 2014).

Phân tích SPSS tại phụ lục D3 và E3 cho thấy rằng kích thước hạt và đường kính kháng khuẩn của mẫu 70% và 80% nước đều không có sự khác biệt đáng kể nào. Mặc dù mẫu 50% và 60% nước có tính kháng khuẩn hơn hai mẫu còn lại, nhưng mẫu bị đặc do lượng nước trong hệ ít. Do đó, hệ nhũ khi xịt lên nón bảo hiểm bị nhớt và lâu khô. Mẫu 80% nước sẽ phù hợp về tính kinh tế cũng như tính kháng khuẩn và kích thước hạt nhỏ (30.66 nm). Vì vậy, hệ nhũ tương với tỷ lệ nước là 80% sẽ được chọn cho các thử nghiệm sau.

Tác giả Simge Tutku Yildirim và cộng sự cũng lựa chọn tỷ lệ nước 80%, tinh dầu 10% và chất nhũ hoá 10% để tạo hệ nhũ tương nano tinh dầu quế và dầu dừa bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha (Yildirim et al., 2017)

3.5 ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ



Hình 3.7. Kích thước hạt của các mẫu ở các nhiệt độ khác nhau

Kích thước hạt của hệ nhũ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. Hình 3.7 thể hiện sự tác động của nhiệt độ lên kích thước hạt của các mẫu. Ở nhiệt độ từ 65 đến 80 °C có kích thước giọt giảm dần (454.915, 258.77, 119.295 và 51.975 nm) tại phụ lục D. Ở nhiệt độ lớn hơn 80 °C kích thước hạt có dấu hiệu tăng lên (194.35 và 357.28 nm). Để giải thích cho điều này, khi nhiệt độ ở mức dưới nhiệt độ đảo pha (65, 70 và 75 °C) độ cong tối ưu tại lớp đơn CHĐBM tạo điều kiện cho sự hình thành các giọt dầu. Sức căng bề mặt lúc đó tăng lên và CHĐBM có ái lực mạnh hơn với pha nước. Khi nhiệt độ giảm

xuống dưới PIT, độ cong tối ưu của CHĐBM tạo điều kiện cho sự hình thành các giọt dầu, sức căng bề mặt tăng lên và chất hoạt động bề mặt có ái lực mạnh hơn nhiều đối với pha nước. Kết quả là các giọt dầu nhỏ phân tán trong nước được hình thành một cách tự nhiên khi hệ được làm lạnh nhanh. Vì vậy, kích thước hạt của hệ tại nhiệt độ 65 °C là lớn nhất. Tại nhiệt độ đảo pha (80 °C), lớp đơn CHĐBM có độ cong tối ưu gần bằng một, sức căng bề mặt thấp và CHĐBM có ái lực bằng nhau đối với cả pha dầu và nước. Hệ nhũ tương không liên tục được hình thành có chứa các hạt cấu trúc nhỏ có tác dụng không tán xạ ánh sáng mạnh (Chuesiang et al., 2018). Nguồn gốc của sự ổn định nhũ tương nano ở nhiệt độ 80 °C có thể là do sự mất nước dần dần của nhóm chất nhũ hoá không ion ở nhiệt độ cao. Sự mất nước của nhóm đầu (first group) làm thay đổi độ cong tối ưu của lớp đơn CHĐBM và thay đổi độ hoà tan của CHĐBM trong pha dầu và pha nước. Các CHĐBM không ion như Tween 80 rất dễ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, vì vậy hệ nhũ ở nhiệt độ 75 và 80 °C có kích thước hạt nhỏ hơn các nhiệt độ khác (Komaiko & McClements, 2014). So sánh kích thước hạt trung bình ở 75 và 80 °C bằng SPSS cho thấy không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $p < 0.05$. Khi hệ nhũ ở nhiệt độ quá cao (85 °C và 90 °C) kích thước hạt lại tăng lên là do nhiệt độ lớn hơn PIT sẽ phá vỡ sự ổn định của hệ thông qua việc phá vỡ liên kết hydro với pha nước và các CHĐBM trở nên kỵ nước hơn (Kumar et al., 2015).

Bảng 3.5. Đường kính vòng kháng khuẩn của hệ nhũ ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Mẫu	Đối chứng (+)	Mẫu	Đối chứng (+)
65	7.20 ± 0.71 ^{b, c}	34.3 ± 1.41	7.80 ± 0.71 ^{b, c}	34.3 ± 0.94
70	8.00 ± 0.47 ^c	33.7 ± 0.94	9.65 ± 0.94 ^c	33.7 ± 2.36
75	8.35 ± 0.47 ^c	32.7 ± 1.41	9.65 ± 0.94 ^c	32.7 ± 0.71
80	6.50 ± 0.24 ^{a, b, c}	32.2 ± 0.71	6.70 ± 0.00 ^{a, b}	33.2 ± 0.47
85	5.50 ± 0.00 ^{a, b}	31.8 ± 0.71	7.00 ± 0.24 ^{a, b}	29.2 ± 0.24
90	4.90 ± 0.24 ^a	31.5 ± 0.71	5.50 ± 0.47 ^a	28.7 ± 0.47

Đối chứng dương: kháng sinh Ciprofloxacin, đối chứng âm: nước muối sinh lý

Bảng 3.5 thể hiện đường kính kháng khuẩn của hệ nhũ tương trên hai vi khuẩn đại diện ở các nhiệt độ khác nhau. Ở nhiệt độ 75 °C có đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất trên cả *S. aureus* và *E. coli*. Trong quá trình điều chế hệ nhũ, khi nhiệt độ càng

cao lượng tinh dầu bị thất thoát càng lớn. Do đó, đường kính kháng khuẩn có xu hướng giảm dần theo nhiệt độ. Phân tích sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức được thể hiện ở phụ lục E4 và D4. Nhìn chung, khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* ở các mẫu 65, 70 và 75 °C không có sự khác biệt. Ở các mẫu có nhiệt độ 80, 85 và 90 °C cũng cho kết quả tương tự. Để đáp ứng hai hàm mục là kích thước hạt nhỏ và đường kính kháng khuẩn lớn thì 80 °C là nhiệt độ được chọn trong thử nghiệm này.

Trong nghiên cứu của Lý Thị Minh Hiền về hệ nhũ tương nano tinh dầu tiêu đen được điều chế bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha, tác giả đã chọn 75°C là nhiệt độ tốt nhất cho thử nghiệm. Tuy nhiên hệ nhũ tương ở 80 °C cũng cho kích thước hạt nhỏ, nhưng vì mong muốn giảm thiểu tiêu hao năng lượng nên tác giả đã chọn 75 °C. Ngoài ra nghiên cứu này, còn sử dụng Tween 80, SOR 2.25 để tạo hệ nhũ.

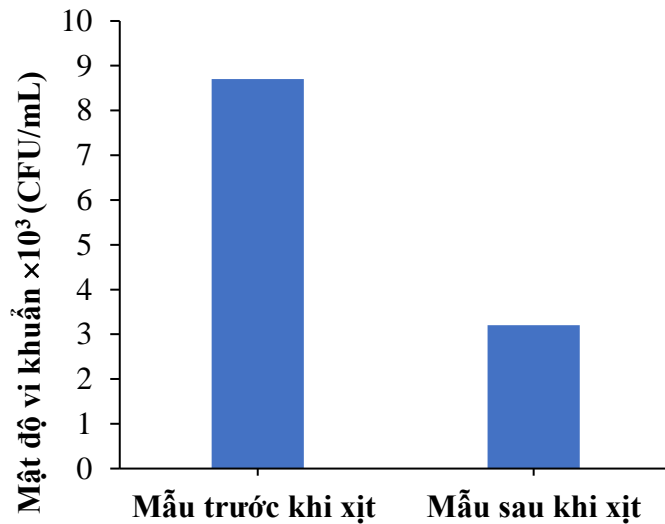
Tác giả Jin Feng và cộng sự đã nghiên cứu về đặc điểm chính của quá trình hình thành nhũ tương nano bằng phương pháp đảo pha theo nhiệt độ. Tác giả cũng đã chọn nhiệt độ 76.2 °C để tạo hệ nhũ (Feng et al., 2020).

3.6 ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA HỆ NHỮ TRÊN NÓN BẢO HIỂM

Bảng 3.6. Số khuẩn lạc của mẫu lấy trên nón bảo hiểm trước và sau khi xịt hệ nhũ

	Số khuẩn lạc	
Hệ số pha loãng	10^{-2}	10^{-3}
Mẫu trước khi xịt	69.00 ± 14.14	50.00 ± 3.54
Mẫu sau khi xịt	27.50 ± 11.31	7.50 ± 0.71

Mẫu tiêu ưu được đánh giá khả năng kháng khuẩn qua sự khác biệt về số khuẩn lạc trước và sau khi xịt hệ nhũ (bảng 3.6). Kết quả cho thấy mẫu trước khi xịt có số khuẩn lạc lớn hơn rất nhiều so với mẫu sau khi xịt. Cụ thể là số khuẩn lạc giảm khoảng 2.5 lần ở tỷ lệ pha loãng 10^{-2} và khoảng 6.7 ở tỷ lệ pha loãng 10^{-3} .

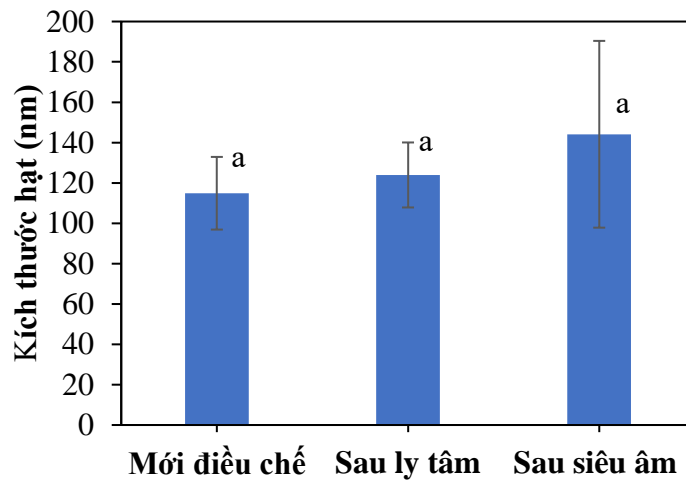


Hình 3.8. Mật độ vi khuẩn của mẫu trước và sau khi xịt hệ nhũ

Sự khác biệt về mật độ vi khuẩn của mẫu nón bảo hiểm trước và sau khi xịt dung dịch diệt khuẩn được thể hiện ở hình 3.8. Mật độ vi khuẩn trước khi xịt hệ nhũ là 7.8×10^3 CFU/mL và sau khi xịt giảm xuống còn 3.2×10^3 CFU/mL (gấp 2.4 lần). Có thể thấy rằng, dung dịch diệt khuẩn được điều chế từ hỗn hợp các loại tinh dầu có hiệu quả kháng khuẩn trên nón bảo hiểm.

Một nghiên cứu của tác giả SK Jasmine Shahina và cộng sự cho thấy số khuẩn lạc trước và sau khi sử dụng xịt khử trùng Ustraa (bao gồm butan, isobutane, propan, isopropanol) lên nón bảo hiểm là 167 và 91 khuẩn lạc (giảm 1.8 lần). Kết quả nano hỗn hợp tinh dầu khi xịt lên nón bảo hiểm cũng mang hiệu quả tương tự như dung dịch khử trùng Ustraa (Shahina et al., 2022).

3.7 ĐÁNH GIÁ ĐỘ BỀN CỦA HỆ NHŨ DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA NGOẠI LỰC



Hình 3.9. Kích thước hạt của mẫu mới điều chế, sau ly tâm và sau siêu âm

Mẫu mới điều chế, sau ly tâm và sau siêu âm có kích thước hạt thể hiện ở hình 3.9. Một mẫu được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút. Một mẫu khác được siêu âm ở nhiệt độ 40 °C trong 30 phút. Kích thước trung bình của các hạt trong ba mẫu khi phân tích SPSS không khác biệt đáng kể (114.85, 123.94 và 144.12 nm) ở mức ý nghĩa $p < 0.05$ (Phụ lục G1 – G3). Kích thước không thay đổi chứng tỏ mẫu ổn định, không có sự kết tụ lại của các giọt làm tăng kích thước hạt. Quan sát mẫu sau khi ly tâm và siêu âm, hệ nhũ không có dấu hiệu bị tách lớp. Mẫu bị tác động bởi sóng siêu âm có hiện tượng nóng lên nên hơi đục nhẹ, nhưng sau vài phút hệ trở lại bình thường. Từ đó, thấy rằng tác động của ngoại lực không nhiều hệ nhũ bị ảnh hưởng. Hệ nhũ được đánh giá thêm thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng qua quan sát sau hai tháng vẫn không có dấu hiệu bị tách lớp.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Trong nghiên cứu này, hệ nhũ tương nano hỗn hợp tinh dầu (quế, trà, bạc hà, trà gió, sả java) được điều chế bằng phương pháp nhiệt độ đảo pha sử dụng năng lượng thấp. Điều kiện tối ưu để điều chế hệ nhũ là CHĐBM, SOR, tỷ lệ nước và nhiệt độ. Hàm mục tiêu là kích thước hạt và đường kính vòng kháng khuẩn trên hai vi khuẩn đại diện được lựa chọn là *S. aureus* và *E. coli*. Giá trị khảo sát được lựa chọn phải đáp ứng cả hai tiêu chí là kích thước hạt nhỏ và đường kính vòng kháng khuẩn lớn.

Kết quả cho thấy nhũ tương nano được tạo ra với Tween 80 ở SOR 2:1, hàm lượng nước 80% và nhiệt độ đảo pha 80 °C cho kích thước hạt là 51.975 ± 8.294 nm. Khả năng kháng khuẩn sau khi đánh giá thu được trên *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là 6.50 ± 0.24 và 6.70 ± 0.00 mm. Hệ nhũ sau khi điều chế cũng được đánh giá độ bền dưới tác động của lực ly tâm, sóng siêu âm và sốc nhiệt. Kết quả cho thấy mẫu ổn định và kích thước hạt gần như không thay đổi.

Hệ nhũ cũng được đánh giá khả năng kháng khuẩn trên nón bảo hiểm bằng phương pháp định lượng tổng vi khuẩn hiếu khí. Kết quả thu được mật độ vi khuẩn trên nón bảo hiểm trước và sau khi xịt dung dịch diệt khuẩn là 7.8×10^3 và 3.2×10^3 CFU/mL (gấp 2.4 lần). Nhìn chung, dung dịch diệt khuẩn nón bảo hiểm được điều chế từ nhũ tương nano hỗn hợp tinh dầu có hiệu quả cao đối với các loại vi khuẩn hiếu khí có trên nón bảo hiểm.

2. Kiến nghị

Hệ nhũ tương nano hỗn hợp tinh dầu nên được khảo sát thêm các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt và chỉ số phân tán như: tốc độ khuấy, tốc độ nhỏ giọt, tỷ lệ giữa các loại tinh dầu.

Hệ nhũ cần phân tích và đánh giá thêm độ thâm thấu trên da của sản phẩm, chụp SEM để quan sát được hình ảnh và sự phân bố của các hạt.

Về tính kháng khuẩn có thể đánh giá trên nhiều loại vi khuẩn khác như vi khuẩn *Bacillus spp*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, ...