

XÁC ĐỊNH CÁC CẤU TỬ HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA TINH DẦU CÂY KINH GIỚI DÀY HÀ GIANG (*ELSHOLTZIA WINITIANA* CRAIB)

Hoàng Đình Hòa¹, Nguyễn Văn Lợi^{2*}

¹Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, ²Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Đã xác định được tỉ trọng của tinh dầu ở 20°C: 0,875; chỉ số axit (mg KOH/g): 0,643 và chỉ số este (mg KOH/g): 0,721. Tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang được tách chiết bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và được làm khan bằng Na₂SO₄. Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được 41 cấu tử trong tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang, trong đó có 19 cấu tử hydrocacbon (nhóm monotепен: 35,24%, nhóm sesquiterpen: 8,84%) và 22 cấu tử là dẫn xuất của hydrocacbon (nhóm andehit: 19,10%, nhóm ancol: 16,13%, nhóm este: 13,91% và nhóm oxi: 4,61%). Sử dụng phương pháp DPPH đã xác định được khả năng quét gốc tự do của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang là 40,28 ± 0,25%, đồng thời bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch đã xác định được khả năng kháng khuẩn của tinh dầu này trên các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và *Bacillus cereus*.

Từ khóa: Cây kinh giới dày Hà Giang, cấu tử, chỉ số hóa lý, hoạt tính sinh học, tinh dầu.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây kinh giới dày Hà Giang (*Elsholtzia winitiana* Craib), có nhiều ở các tỉnh Hà Giang, Bắc Giang, Lạng Sơn, Gia Lai, Lâm Đồng... Y học dân tộc ở một số nước như Trung Quốc, Việt Nam, Lào,... dùng cây kinh giới dày để chữa cảm cúm. Trong cây có nhiều tinh dầu có mùi thơm đặc trưng và hấp dẫn, là nguồn nguyên liệu quan trọng trong các ngành thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm [3]. Tuy nhiên, đến thời điểm này ở nước ta vẫn rất ít các công trình nghiên cứu về các cấu tử trong tinh dầu và hoạt tính sinh học của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm góp phần cung cấp thêm các thông tin về các cấu tử, hoạt tính sinh học của tinh dầu cây kinh giới dày, làm cơ sở cho việc khai thác, sử dụng cây kinh giới dày trong sản xuất hương liệu thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu

Cây kinh giới dày Hà Giang, thu mua tại xã Đông Thành, huyện Bắc Quang, tỉnh Hà

Giang. Nguyên liệu được sơ chế sạch sẽ, cắt thái nhỏ và thu nhận tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và được làm khan bằng Na₂SO₄.

Chủng vi sinh vật thí nghiệm: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* và *Bacillus cereus* do Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học cung cấp.

Vật liệu đối chứng: Vitamin C hay còn gọi là axit ascorbic, có nhiều trong rau quả, là chất chống oxy hóa và có vai trò trong việc chống lão hóa da. Vitamin C không màu hoặc hơi vàng và dễ tan trong nước.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng tinh dầu

Cân 100 g cây kinh giới dày Hà Giang đã được nghiền nhỏ và đong 500 ml nước cất, cho vào bình cầu 1000 ml rồi đem chưng cất tinh dầu theo phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước bằng bộ xác định hàm lượng tinh dầu Clevenger ($d < 1$) với sinh hàn hồi lưu [2]. Hàm lượng tinh dầu có trong nguyên liệu được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{V.d.10^4}{m.(100-w)}$$

* Tel 0986592378, Email: loichebren@yahoo.com

Trong đó: X = Hàm lượng tinh dầu có trong nguyên liệu (%), m = Khối lượng nguyên liệu đem chưng cất (g), d = Tỉ trọng của tinh dầu, V = Thể tích tinh dầu thu được ở dụng cụ đo (ml), w = Độ ẩm nguyên liệu (%).

Xác định chỉ số hóa lý của tinh dầu

Tỉ trọng của tinh dầu được xác định theo TCVN 8444: 2010, góc quay cực theo TCVN 8446: 2010, chỉ số khúc xạ theo TCVN 8445:2010, chỉ số axit theo TCVN 8450: 2010, chỉ số este theo TCVN 8451: 2010 [1].

Xác định các cấu tử của tinh dầu

Các cấu tử của tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang được xác định theo phương pháp GS-MS bằng máy sắc ký khí GC6890-MS5898, cột mao quản HT-5MS, với chương trình thực hiện như sau: Nhiệt độ cột 80 – 160 °C, tốc độ tăng nhiệt 2 °C/phút, giữ ở 5 phút và 160 – 220 °C tốc độ tăng nhiệt 6 °C/phút, giữ ở 5 phút. Điều kiện MS: ion hóa mẫu ở thể ion hóa 70ev, nhiệt độ duy trì 240 °C, khí mang là heli tốc độ 0,5 ml/phút, tốc độ chia dòng 1:50 [6], [9].

Xác định khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu

Xác định khả năng quét gốc tự do DPPH, dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra gốc tự do bền trong dung dịch ethanol bão hòa, được tính bằng công thức % DPPH = [(A₀ - (A - A_b))/A₀] × 100, trong đó A₀ là mẫu kiểm chứng, A là mẫu thí nghiệm, A_b là mẫu trắng. Mẫu thí nghiệm gồm có 0,1 ml tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang, 2 ml ethyl acetat, 1,9 ml methanol và 1 ml DPPH. Hỗn hợp sau khi phối trộn được lắc nhẹ và để yên trong bóng tối ở nhiệt độ phòng 30 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm [6], [7], [10].

Xác định khả năng kháng khuẩn của tinh dầu

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Môi trường canh thang thường (g/l): Cao thịt (3,0), cao nấm men (5,0), pepton (10,0), muối ăn,

(5,0), pha trong 1000 ml nước, pH= 6,5- 6,8. Môi trường MPA xốp sau khi thanh trùng, làm nguội 45- 48 °C, bổ sung vi sinh vật kiểm chứng với tỉ lệ 150 µl dịch chủng trong 30 ml môi trường MPA xốp, lắc đều và đổ vào đĩa petri với chiều dày thạch là 5 mm. Dùng khoan nút đục lỗ trên đĩa (φ= 5 mm). Dùng micropipet nhỏ vào mỗi lỗ 80 µl mẫu tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang (nồng độ 50 mg/ml), sau đó đặt các đĩa đã nhỏ mẫu vào tủ lạnh ở 4 °C, để trong vòng 3 giờ chờ khuếch tán dịch. Tiếp theo chuyển đĩa vào tủ nuôi 32 °C với thời gian 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức: D- d = BK (mm), với D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d: đường kính lỗ khoan thạch (mm) [4], [8], [11].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hàm lượng tinh dầu và các chỉ số hóa lý của tinh dầu

Để xác định hàm lượng tinh dầu trong cây kinh giới dây Hà Giang, chưng cất 100 g nguyên liệu và 500 ml nước cất, đến khi thể tích không đổi với thời gian chưng cất là 10 giờ thì thu được hàm lượng tinh dầu là 0,9 ml. Sử dụng bộ Tiêu chuẩn Quốc gia về tinh dầu-phương pháp thử, công bố năm 2010. Xác định được các chỉ số hóa lý của tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang. Kết quả trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Chỉ số hóa lý của tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang

TT	Chỉ số hóa lý	Kết quả
1	Tỉ trọng ở 20°C	0,875
2	Góc quay cực α _D	85° 40'
3	Chỉ số khúc xạ n _D ²⁰	1,452
4	Chỉ số axit (mg KOH/g)	0,643
5	Chỉ số este (mg KOH/g)	0,721

Kết quả nghiên cứu trong bảng 1 cho thấy Tỉ trọng của tinh dầu là 0,875. Tinh dầu cây kinh giới dây Hà Giang có màu vàng nhạt và trong suốt. Đã xác định được chỉ số khúc xạ của tinh dầu là 1,452, chỉ số này nhỏ hơn 1,47 điều đó cho thấy trong tinh dầu có chứa nhiều thành phần có chứa liên kết đôi.

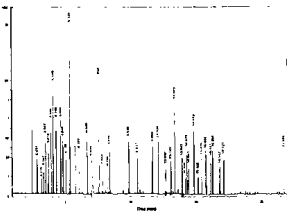
Các cấu tử của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

Bảng 2. Các cấu tử trong tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

TT	Tên các cấu tử	Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng (%)
1	α -pinene	2,573	4,62
2	camphene	2,971	1,75
3	β -pinene	3,316	0,54
4	octanal	3,427	0,82
5	δ -3-carene	3,567	2,76
6	myrcene	3,618	2,07
7	α -terpinene	3,822	4,63
8	limonene	4,148	6,57
9	linalool	4,389	4,61
10	octanol	4,632	4,65
11	linalyl acetate	4,865	3,06
12	nonanal	5,126	1,79
13	citral	5,337	11,25
14	thujene	5,824	1,87
15	geranyl acetate	6,127	2,02
16	α -citronellol	6,849	2,24
17	α -terpineol	7,117	1,63
18	neryl acetate	7,652	7,02
19	β -citronellol	7,843	1,03
20	γ -terpinene	8,236	0,97
21	p-cymene	8,378	1,24
22	terpinolene	9,925	1,32
23	β -cubebene	10,517	1,14
24	decanal	11,853	1,27
25	dodecanal	12,128	1,36
26	terpinen-4-ol	12,857	1,02
27	trans-nerolidol	13,127	1,08
28	sabinene	13,323	5,76
29	geranial	13,942	1,29
30	α -phellandrene	14,145	0,74
31	α -farnesene	14,379	1,12
32	farnesol	14,541	1,06
33	δ -cadinene	14,872	2,75
34	nerol	15,232	0,76
35	tridecanal	15,476	1,32
36	cis-geraniol	15,638	1,49
37	trans-geraniol	16,127	1,17
38	α -humulene	16,239	1,23
39	β -bisabolene	16,787	1,07
40	perillyl acetate	17,127	1,81
41	valencene	23,359	1,93
Tổng hidrocarbon			44,08
monotecpen			35,24
sesquitecpen			8,84
Tổng dẫn xuất của hidrocarbon			53,75
andehit			19,10
ancol			16,13
este			13,91
oxi			4,61
Tổng cộng:			97,83

Ghi chú: Tỷ lệ (%) tính theo diện tích pic sắc ký

Các cấu tử của cây kinh giới dày Hà Giang được xác định bằng phương pháp GC-MS, kết quả thu được trình bày ở bảng 2.



Hình 1. Sắc ký đồ tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được 41 cấu tử trong tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang, trong đó có 19 cấu tử thuộc nhóm hidrocarbon, chiếm 44,08%, như limonene: 6,57%, sabinene: 5,76%, α -terpinene: 4,63%, α -pinene: 4,62%, δ -3-carene: 2,76%, myrcene: 2,07% là những cấu tử chiếm tỉ lệ lớn. Trong 19 cấu tử thuộc nhóm hidrocarbon, thì nhóm monotecpen: 35,24% và nhóm sesquitecpen: 8,84%. Kết quả nghiên cứu trong bảng 2 cho thấy có 22 cấu tử là dẫn xuất của hidrocarbon chiếm 53,75%, trong đó có một số cấu tử chiếm tỉ lệ lớn như: citral: 11,25%, neryl acetate: 7,02%, octanol: 4,65%, linalool: 4,61%, linalyl acetate: 3,06%, α -citronellol: 2,24%... Trong 53,75% các cấu tử thuộc dẫn xuất của hidrocarbon trong tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang, thì nhóm andehit: 19,10%, nhóm ancol: 16,13%, nhóm este: 13,91% và nhóm oxi: 4,61%. Như vậy các cấu tử thuộc dẫn xuất của hidrocarbon chiếm tỉ lệ lớn trong tinh dầu. Đây chính là các cấu tử này có vai trò quan trọng trong việc tạo mùi thơm cho tinh dầu. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của nghiên cứu thành phần hóa học trong tinh dầu của loài *Elsholtzia* trồng ở Việt Nam của Lê Văn Hạc và cs (1995) [5].

Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang được thực hiện tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm- Trường Đại học Bách khoa Hà Nội. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng quét gốc tự do DPPH của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

TT	Mẫu thí nghiệm	Thể tích (ml)	% quét gốc tự do DPPH
1	Tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang	0,1	40,28 ± 0,25
2	Vitamin C	0,1	39,06 ± 0,35

Kết quả nghiên cứu trong bảng 3, cho thấy tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang có khả năng quét gốc tự do DPPH là 40,28 ± 0,25%, cao hơn so vitamin C.

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang trên các chủng vi sinh vật kiểm chứng được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang

TT	Chủng vi sinh vật kiểm chứng	Đường kính vòng kháng khuẩn D-d (mm)	
		Vitamin C	Tinh dầu
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17,35 ± 0,85	18,52 ± 1,53
2	<i>Escherichia coli</i>	16,05 ± 1,25	16,75 ± 0,38
3	<i>Salmonella typhi</i>	15,92 ± 1,25	16,32 ± 1,45
4	<i>Bacillus cereus</i>	15,05 ± 0,95	15,85 ± 0,82

Kết quả nghiên cứu trong bảng 4 cho thấy tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang có khả năng kháng khuẩn mạnh, trên các chủng vi sinh vật kiểm chứng. So sánh 4 chủng vi sinh vật kiểm chứng thì năng kháng mạnh nhất là *Staphylococcus aureus*, sau đó là *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và thấp nhất *Bacillus*

cereus. So với vitamin C thì khả năng kháng khuẩn của tinh dầu này thấp hơn.

KẾT LUẬN

Đã xác định được tỉ trọng của tinh dầu ở 20°C: 0,875; góc quay cực α_D^{20} : 85° 40'; chỉ số khúc xạ n_D^{20} : 1,452; chỉ số axit (mg KOH/g): 0,643 và chỉ số este (mg KOH/g): 0,721. Bằng phương pháp GC-MS đã xác định được 41 cấu tử trong tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang, trong đó có 19 cấu tử thuộc nhóm hydrocarbon, chiếm 44,08% và 22 cấu tử là dẫn xuất của hydrocarbon, chiếm 53,75%. Đã xác định được khả năng quét gốc tự do DPPH: 40,28 ± 0,25% và khả năng kháng khuẩn trên 4 chủng vi sinh vật kiểm chứng với đường kính vòng kháng khuẩn là: *Staphylococcus aureus*: 18,52 ± 1,53 mm, *Escherichia coli*: 16,75 ± 0,38 mm, *Salmonella typhi*: 16,32 ± 1,45 mm và *Bacillus cereus*: 15,85 ± 0,82 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ tiêu chuẩn Việt Nam về tinh dầu (2010).
2. Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Quang Tùng, Phùng Tôn Quyền (2015), "Nghiên cứu quy trình công nghệ tách chiết tinh dầu lá trà Thái Nguyên (*Melaleuca cajuputi* Pwll)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội* 31, tr. 53- 58.
3. Lê Đình Mỡi, Lưu Đàm Cư, Trần Minh Hợi, Trần Huy Thái, Ninh Khắc Bản (2002), *Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam- Tập II*. Nxb Nông nghiệp.
4. Friedman M., Henika P R. and Mandrell R. E. (2002), "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric*", *Journal of Food Protection* 65, pp. 1545 - 1560.
5. Hác L.V, Dung N.V, Mõi LD, Cu L.D (1995), "Chemical study on *Elsholtzia blanda* Benth from Vietnam", *Peper presented at 13th International Congress of Flavour, Fragrances and Essential Oil*, 15-19 October. Istanbul, Turkey 1, pp. 67- 72.
6. Loi N. V., Tu N. V., Hoa D. H. (2015), "Study on constituents, physico-chemical indicators and biological activity of Bac Giang Liquidambar Formosana Hance leaves oil", *Journal of Science*

and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology, 53(4B), pp. 81- 87.

7. Matook S. M. and Fumio H. (2006), "Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues", *Food Chemistry* 94, pp. 529 - 534.

8. Meena M. R. and Sethi (1994), "Antimicrobial activity of essential oils from spices", *Journal of Food Science and Technology* 31, pp. 68- 70.

9. Minh Tu N. T., Thanh L. X., Unc A., Ukeda U. and Sawamura M. (2002), "Volatile constituents

of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils", *Flavour and Fragrance Journal* 17, pp. 169-174.

10. Molyneux P. (2004), "The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *Songklanakarc Journal of Science Technology* 26, pp. 211-219.

11. Perez C., Pauli M. and Bazevque (1990), "An antibiotic assay by the agar well diffusion method", *Acta Biologica et Medicina Experimentalis* 15, pp. 113 - 115.

SUMMARY

CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HA GIANG ELSHOLTZIA WINITIANA CRAIB OIL

Hoang Dinh Hoa¹, Nguyen Van Loi^{2*}

¹Ha Noi University of Science and Technology

²Hanoi University of Industry

The oil of *Elsholtzia winitiana* craib was obtained by steam distillation and dried with Na₂SO₄. Physico-chemical properties of the oils were analyzed and determined: density 0.875 at 20°C; acid index 0.643 (mgKOH/g) and esters index 0.721 (mg KOH/g). By GC-MS method, 41 constituents were identified from the Ha Giang *Elsholtzia winitiana* craib oil, including 19 hydrocarbons (monoterpenes: 35.24%, sesquiterpenes: 8.84%) and 22 oxygenated constituents (aldehydes: 19.10%, alcohols: 16.13%, esters 13.91% and oxygen: 4.61%). By DPPH methods, Antioxidant activity was determined as 40.28 ± 0.25%. By agar diffusion method, Antimicrobial activity of Ha Giang *Elsholtzia winitiana* craib oil has been identified against: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus*.

Keywords: Biological activity, constituents, Ha Giang *Elsholtzia winitiana* craib, oil, physico-chemical indices

Ngày nhận bài: 14/9/2017; Ngày phản biện: 20/9/2017; Ngày duyệt đăng: 27/4/2017

* Tel: 0986592378, Email: loichebien@yahoo.com