

NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA TINH DẦU QUẢ MẮC KHÉN (*ZANTHOXYLUM RHETSA*)

HOÀNG BÍCH LOAN ⁽¹⁾, LƯU ANH VĂN ⁽²⁾, NGUYỄN TRƯỜNG GIANG ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mắc Khén (*Zanthoxylum rhetsa*) từ lâu đã được sử dụng trong ẩm thực và y học cổ truyền Thái Lan. Tại Việt Nam, quả Mắc Khén rất quan trọng trong ẩm thực Tây Bắc bởi hầu hết các món ăn của đồng bào dân tộc Thái ở Tây Bắc đều sử dụng quả Mắc Khén làm gia vị. Ngoài ra, quả Mắc Khén còn được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền để giúp giảm đầy bụng, khó tiêu, kích thích hệ tiêu hóa, giảm ho, chống viêm, chống co thắt và giảm đau nhức xương khớp với các thành phần hóa học chính được biết đến như phenolic, flavonoid, alkaloid, terpenoid, glycosid và tinh dầu [1, 3].

Ứng dụng tinh dầu, hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên, thân thiện với môi trường và an toàn với người sử dụng là xu hướng phát triển của xã hội hiện nay. Nhằm khảo sát hoạt tính sinh học và tiềm năng ứng dụng, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xác định thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa cũng như hoạt tính kháng một số vi khuẩn gây bệnh của tinh dầu Mắc Khén, trồng tại huyện Quan Sơn, tỉnh Thanh Hóa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả Mắc khén (*Zanthoxylum rhetsa*) được thu mua ở xã Quan Thủy, huyện Quan Sơn, tỉnh Thanh Hóa (độ ẩm $\cong 11\%$), bảo quản trong túi zip ở nhiệt độ thường.

Các chủng vi khuẩn kiểm định sử dụng được lấy trong bộ sưu tập giống phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, trường Đại Học Bách khoa Hà Nội gồm: *Bacillus cereus* ATCC 13061 (Gram dương); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

Một số môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi sinh vật: Môi trường hoạt hóa: Môi trường LB (Cao nấm men 5g/L; pepton 10g/L; NaCl 10g/L). Môi trường giữ giống trong ống thạch nghiêng: Môi trường LA (Cao nấm men 5g/L; pepton 10g/L; NaCl 10g/L; 2% agar).

Một số hóa chất thông dụng khác như: Vitamin C (L-ascorbic acid, Sigma); DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma); methanol (99,9%, Sigma); gentamicin (80mg/2ml, Việt Nam); DMSO (dimethyl sulfoxide 99,9%, Trung Quốc); tween 80 (Sigma).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết tinh dầu

Tinh dầu quả Mắc Khén được trích ly bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp [2]. Đồng thời khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian chưng cất, thể tích nước và kích thước nguyên liệu đến hàm lượng tinh dầu thu được. Tất cả các mẫu khảo sát đều thực hiện với cùng khối lượng là 30g nguyên liệu.

Xác định thành phần hóa học chính của tinh dầu quả Mắc Khén

Thành phần hóa học của tinh dầu quả Mắc Khén được phân tích dựa trên phương pháp sắc ký khí (GC) với các điều kiện: khí mang Heli; tốc độ dòng khí 1ml/ phút; thể tích tiêm 1 μ L; Nhiệt độ cột được lập trình từ 70°C, giữ trong 3 phút, sau đó tăng dần 3°C/phút đến 188°C. Sau đó tăng dần 20°C/phút đến 280°C và giữ ở 280°C trong 3 phút [4].

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu

Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu quả Mắc Khén được thực hiện theo phương pháp DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl): tinh dầu được pha thành các nồng độ 10, 20, 30, 50 mg/mL trong methanol. Lượng mẫu sử dụng vào phản ứng là 1 mL và 2 mL DPPH 0,2mM. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong tối, sau đó đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH được xác định thông qua chỉ số IC₅₀ [4].

Xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Mắc Khén

Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu quả Mắc Khén được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Nhỏ 100 μ L dịch vi khuẩn kiểm định (đã nuôi qua đêm) vào đĩa petri chứa môi trường LA (Cao nấm men 5g/L; peptone 10g/L; NaCl 10g/L; 2% agar), trải đều. Tiến hành đặt đĩa giấy lên trên đĩa thạch, sau đó cho 10 μ L tinh dầu Mắc Khén vào các đĩa giấy trên đĩa petri, ủ ở 4-8 °C trong 2 giờ cho các dung dịch mẫu từ các khoanh giấy khuếch tán trên mặt thạch; đem ủ trong tủ ẩm 30°C trong 20-24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo công thức: D - d (mm), trong đó D: đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d: đường kính đĩa giấy (mm) [5]. Đối chứng được sử dụng là kháng sinh *Gentamicin* 500 μ g/ml. Đồng thời, xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) và nồng độ tối thiểu diệt khuẩn (MBC) của tinh dầu quả Mắc Khén bằng phương pháp pha loãng dần trong môi trường lỏng.

Phương pháp xử lý số liệu: kết quả được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016, sai số cho phép nhỏ hơn 0,05, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

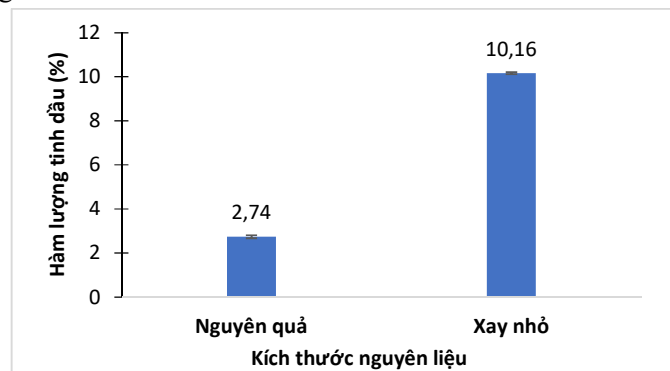
3.1. Tính chất vật lý của tinh dầu

Tinh dầu Mắc Khén thu được trong suốt, màu vàng sáng không bị vẩn đục có mùi thơm dễ chịu đặc trưng, vị đắng nhẹ, cay, khối lượng riêng 0,85g/ml. Tinh dầu quả Mắc Khén không tan trong nước, tan trong alcol và một số dung môi hữu cơ khác.

3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly tinh dầu

3.2.1. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu

Khảo sát 2 kích thước nguyên liệu ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu thu được sau trích ly là quả nguyên và xay nhỏ (0,5 -1mm). Cố định các yếu tố nhiệt độ (100°C), thời gian chiết 90 phút, tỷ lệ nguyên liệu : nước là 1 : 10. Kết quả được trình bày trong hình 1.

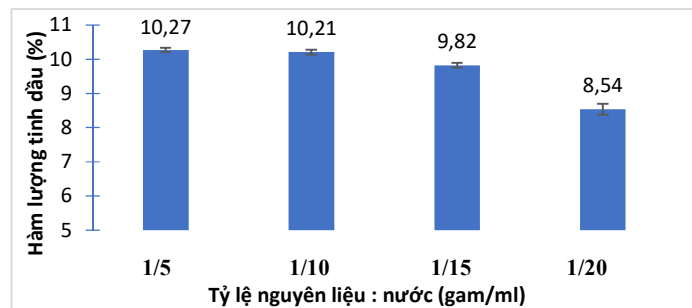


Hình 1. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu đến khả năng chiết tinh dầu quả Mắc Khén

Với cùng điều kiện khảo sát thì nguyên liệu có kích thước càng nhỏ thì diện tích bề mặt càng lớn nên lượng tinh dầu được lôi cuốn theo hơi nước càng nhiều. Vì vậy kích thước tối ưu để trích ly tinh dầu quả Mắc Khén là xay nhỏ khoảng 0,5-1mm.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu : nước

Sau khi lựa chọn được kích thước nguyên liệu là xay nhỏ (0,5 - 1mm), tiến hành khảo sát các tỷ lệ nguyên liệu: nước ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu thu được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước lần lượt là 1: 5; 1: 10; 1: 15; 1:20, kết quả thể hiện hình 2.

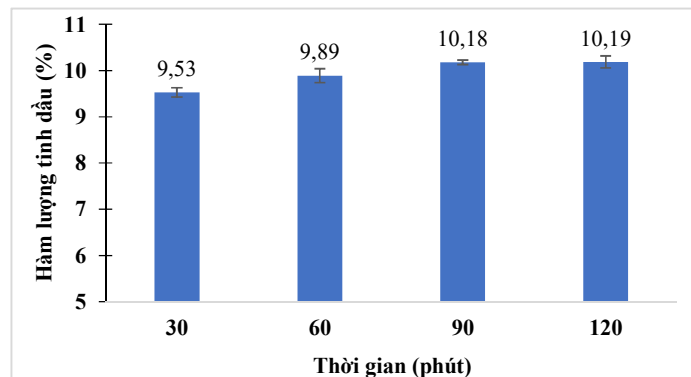


Hình 2. Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu: nước đến khả năng trích ly tinh dầu quả Mắc khén

Tỷ lệ nguyên liệu: nước ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất thu tinh dầu. Hàm lượng tinh dầu thu được cao nhất ở tỷ lệ 1: 5 và thấp nhất ở tỷ lệ 1: 20. Ở tỷ lệ 1: 5 và 1: 10 hàm lượng tinh dầu thu được chênh lệch nhau không đáng kể (10,27% và 10,21%), tuy nhiên chất lượng tinh dầu ở tỷ lệ 1: 10 tốt hơn 1: 5 do lượng nước ở tỷ lệ 1:5 không đủ, nguyên liệu bám trên thành thiết bị bị cháy kết dẫn đến chất lượng tinh dầu thấp. Do đó, tỷ lệ nguyên liệu : nước là 1 : 10 được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất

Sau khi tối ưu được 2 yếu tố trên là kích thước nguyên liệu xay nhỏ (0,5 - 1mm), với tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:10, quá trình chưng cất tiếp tục được khảo sát trong khoảng thời gian 30 phút - 120 phút. Sau khi trích ly, so sánh lượng tinh dầu thu được ở những thời gian khác nhau, từ đó chọn mức thời gian để chưng cất thu được lượng tinh dầu lớn nhất. Kết quả thu được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất đến khả năng trích ly tinh dầu quả Mắc khén

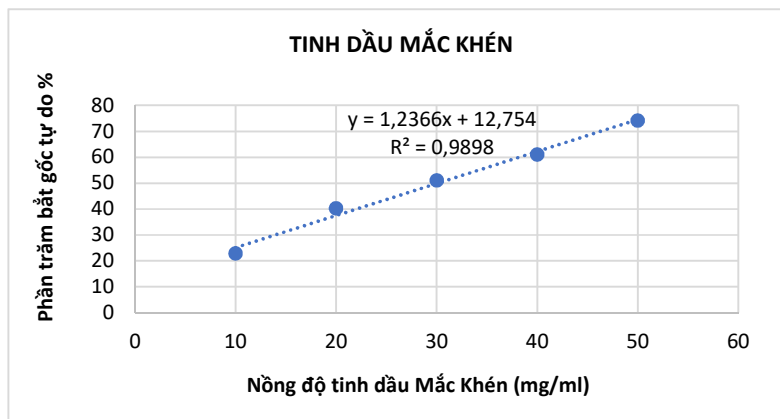
Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng tinh dầu thu được cao nhất ở 120 phút (10,18%) và thấp nhất ở 30 phút (9,53%). Thời gian chưng cất ở 120 phút cho chất lượng tinh dầu không tốt bằng thời gian chưng cất ở 90 phút do nguyên liệu bị thiếu nước dẫn đến cháy khét. Thời gian chưng cất có vai trò quyết định lượng tinh dầu thu hồi được. Nếu chưng cất trong thời gian quá ngắn thì lượng tinh dầu trích ly chưa hết hoàn toàn. Ngược lại, khi chưng cất quá thời gian tối ưu thì vừa tốn thời gian mà lượng tinh dầu thu được không tăng lên, đồng thời chất lượng tinh dầu thu được cũng bị giảm đi đáng kể do nguyên liệu bị cháy khét làm mất mùi thơm tự nhiên.

Như vậy qua khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly tinh dầu Mắc Khén bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đã chọn được điều kiện trích ly tối ưu thu nhận tinh dầu (hàm lượng 10,18% theo khối lượng quả Mắc Khén có độ ẩm 11%) là khi mẫu được xay nhỏ (0,5-1mm), tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:10 ở nhiệt độ 100 °C, chưng cất trong thời gian 90 phút.

Sau khi trích ly tinh dầu quả Mắc Khén ở các điều kiện được lựa chọn, hàm lượng tinh dầu thu được là 10,18% (v/w) cao hơn so với nghiên cứu của *M.T.Joy* và *công sự* ở Ấn Độ là 5,1% (v/w) [6]. Nhưng thấp hơn nghiên cứu của *Sewan Theeramunkong* và *Maleeruk Utsintong* với hàm lượng tinh dầu quả Mắc khén khô thu được ở phía Bắc tỉnh Nan, phía Nam tỉnh Nan, Phayao và Chiang Rai tại Thái Lan lần lượt là: 14,17%; 15,33%; 13,17%; 13,83% (v/w) [7]. Sự khác biệt này là do tinh dầu quả Mắc khén phụ thuộc vào các yếu tố đa dạng như khí hậu, loại đất trồng, thời điểm thu hoạch, phương pháp thu hoạch và bảo quản. Cùng một nguyên liệu nhưng mọc từ các vùng khác nhau và được thu hoạch vào các thời điểm khác nhau có ảnh hưởng đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu thu được [8].

3.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu Mắc Khén

Tiến hành khảo sát khả năng quét gốc tự do trên DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) của tinh dầu Mắc Khén, kết quả thu được tại hình 4.



Hình 4. Sự ức chế gốc tự do của tinh dầu quả Mắc Khén

Từ phương trình tính được hoạt tính kháng gốc tự do của tinh dầu Mắc Khén với giá trị IC_{50} là 30,12 mg/mL. Nghiên cứu này có kết quả phù hợp với nghiên cứu của Nalin Wongkattiya và cộng sự ở Thái Lan (2018) với giá trị IC_{50} là 25 mg/mL [2].

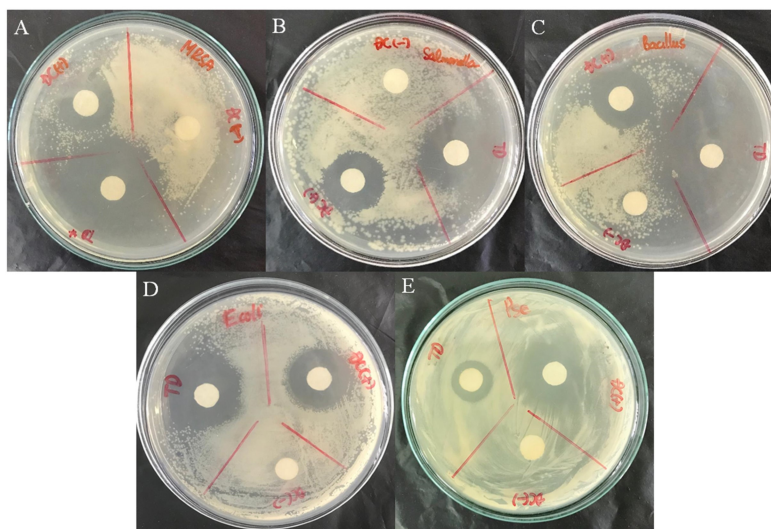
3.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Mắc Khén

Tiến hành nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Mắc Khén với 5 chủng vi khuẩn kiểm định: *Bacillus cereus* ATCC 13061 (Gram dương); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Kết quả được ghi nhận trong bảng 1

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Mắc khén trên các chủng vi sinh vật kiểm định

Vi khuẩn	Vùng ức chế (mm)		
	KC Gentamicin	Tinh dầu (D)	D - d
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	23	39,33± 0,94	31,33
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	23	25,67± 0,47	17,67
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22	26,00 ± 0,82	18,00
MRSA ATCC 33591	20	32,33 ± 1,24	24,33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	27	14,67 ± 0,47	6,67

Từ bảng 1 nhận thấy vùng ức chế (mm) của tinh dầu là tương đối cao. Vùng ức chế cao nhất được thấy ở 2 chủng vi khuẩn Gram dương là *Bacillus cereus* ATCC 13061 (39,33 mm) và *MRSA* ATCC 33591 (32,33mm); kế tiếp là 2 chủng vi khuẩn Gram âm *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (25,67mm) và *Escherichia coli* ATCC 25922 (26,00mm); vùng ức chế thấp nhất được thấy ở *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (14,67 mm).



Hình 5. Khả năng kháng các chủng vi khuẩn kiểm định của tinh dầu quả Mắc khén
Trong đó A: *MRSA* ATCC 33591; B: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028;
C: *Bacillus cereus* ATCC 13061; D: *Escherichia coli* ATCC 25922;
E: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; ĐC(+) và ĐC(-): đối chứng dương và đối chứng âm, TC : tinh dầu.

Nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) và nồng độ tối thiểu diệt khuẩn (MBC) của tinh dầu quả Mắc khén đối với 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp pha loãng và bằng phương pháp trải đĩa [9]. Kết quả được ghi nhận trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định giá trị MIC và MBC của tinh dầu quả Mắc khén đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm

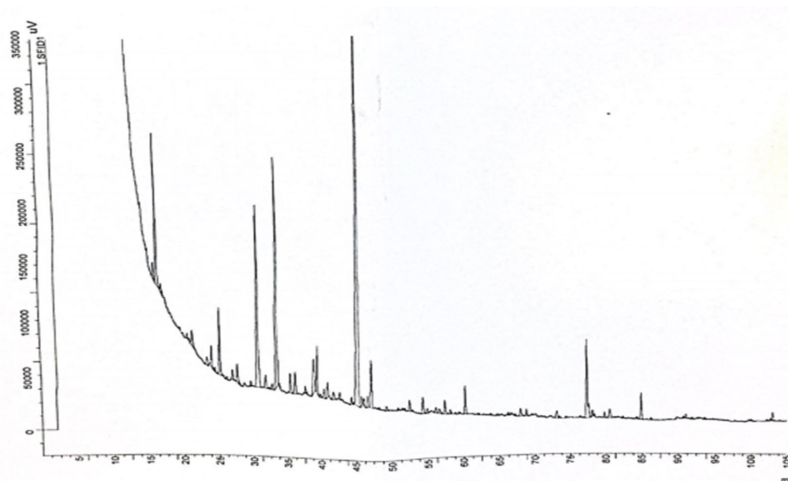
Vi khuẩn	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	31,25	31,25
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	62,50	125,00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62,50	125,00
<i>MRSA</i> ATCC 33591	31,25	62,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	125,00	250,00

Từ bảng 2 cho thấy rằng tinh dầu quả Mắc khén thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt chống lại tất cả các vi sinh vật được thử nghiệm. Vi khuẩn Gram dương nhạy cảm với tinh dầu hơn vi khuẩn Gram âm

Như vậy, kết quả khảo sát của 5 chủng vi khuẩn cho thấy rằng tinh dầu Mắc khén có khả năng ức chế tốt với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Đặc biệt, những chủng vi khuẩn này là những vi khuẩn điển hình của hệ vi sinh vật đường ruột, gây bệnh trong thực phẩm. Từ đây có thể thấy tiềm năng ứng dụng của tinh dầu quả Mắc Khén làm nguyên liệu trong ngành thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, đặc biệt thích hợp cho việc sản xuất các loại nước rửa tay diệt khuẩn.

3.5. Thành phần hóa học của tinh dầu quả Mắc Khén

Bằng phương pháp sắc ký khí (GC) các thành phần hóa học trong tinh dầu được xác định và ghi nhận trong hình 6



Hình 6. Sắc ký đồ phân tích thành phần tinh dầu quả Mắc khén

Từ sắc ký đồ hình 6, nhận thấy có 92 pic tương đương với 92 hợp chất khác nhau có mặt trong tinh dầu quả Mắc khén. Trong đó, cho 10 pic có diện tích lớn tương ứng với 10 hợp chất chiếm hàm lượng cao nhất trong tinh dầu quả Mắc khén với thời gian lưu lần lượt là 10,040; 13,130; 24,540; 26,798; 36,276; 61,578; 84,255; 89,976; 92,524; 94,589 (phút).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tìm ra điều kiện thích hợp để trích ly tinh dầu quả Mắc Khén: mẫu được xay nhỏ (0,5-1mm), tỉ lệ thể tích nguyên liệu với nước cất là 1:10, nhiệt độ chưng cất 100 °C trong thời gian 90 phút. Với điều kiện đó, hàm lượng tinh dầu thu được là 10,18% (v/w). Bước đầu xác định được thành phần hóa học của tinh dầu Mắc Khén thu hái ở xã Quan Thủy, huyện Quan Sơn, tỉnh Thanh Hóa gồm 10 hợp chất chính chiếm 98,04% tổng diện tích pic của sắc đồ. Tinh dầu Mắc Khén có hoạt tính chống oxy hóa in vitro tương đối, với giá trị IC_{50} là 30,12 mg/mL và có khả năng kháng các loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Đức Thịnh, *Nghiên cứu đặc điểm phân bố và tái sinh rừng tự nhiên cây Mắc khén (Zanthoxylum rhetsa (Roxb.) DC) tại huyện Thuận Châu tỉnh Sơn La*, Luận văn thạc sĩ khoa học Lâm Nghiệp, Trường Đại học Lâm Nghiệp, 2012.
2. Phạm Thanh Kỳ, *Dược liệu học*, tập II, Nhà xuất bản Y học, 2018.
3. Thipthaviphone Soulinho, Nguyễn Viết Thân, Vũ Mạnh Hùng, Nguyễn Thị Bích Thu. *Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng lợi mật của cao quả mắc khén (Zanthoxylum rhetsa DC.)*, Tạp chí Dược học, 2010, **411**(50):28-32.
4. N. Wongkatiya, C. Akekawatchai, P. Sanguansermisri, L. H. Fraser, C. Pratoomsoot, and D. Sanguansermisri, *Chemical compositions and biological properties of essential oils from Zanthoxylum rhetsa (Roxb.) DC and Zanthoxylum limonella alston*, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines, 2018, **15**(2):12-18.
5. M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*, J. Pharm. Anal., 2016, **6**(2):71-79.
6. M. T. Joy, J. Verghese, J. A. Retamar, E. C. J. Talenti, C. A. N. Catalán, and E. G. Gros, *Essential oil of Zanthoxylum rhetsa*, Flavour and Fragrance Journal, 1986, **1**(4):165-168.
7. M. U. Sewan Theeramunkong, *Comparison between volatile oil from fresh and dried fruits of Zanthoxylum rhetsa (Roxb.) DC. and cytotoxicity activity evaluation*, Pharmacognosy Journal, 2018, **10**(5):827-832.
8. P. P. Thidararat Duangyod, Wisanu Maneerat & Rawiwan Charoensub, *Quality evaluation of Zanthoxylum rhetsa fruits and seeds - a Thai traditional medicine*, Indian Journal of Traditional Knowledge, 2020, **19**(2):335-340.
9. M. M. Gakuubi, J. M. Wagacha, S. F. Dossaji, and W. Wanzala, *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of tagetes minuta (Asteraceae) against selected plant pathogenic bacteria*, International Journal of Microbiology, 2016, **2016**:1-9.

SUMMARY

STUDY ON EXTRACTION AND EVALUATION OF ESSENTIAL OILS FROM MAC KHEN FRUIT (ZANTHOXYLUM RHETSA)

The objective of the study was to analyze the chemical composition and evaluate the antibacterial and antioxidant capacity of Mac Khen essential oil. Mac Khen fruit is collected from Quan Thuy commune, Quan Son district, Thanh Hoa province, then the essential oil is extracted by steam distillation. The chemical composition of essential oils was determined by gas chromatography. Investigation of antioxidant capacity of essential oils by using DPPH free radical method and

antibacterial ability by diffusion method on agar plates, using 5 strains of test microorganisms: *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, MRSA ATCC 33591, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The optimum extraction conditions for essential oils were found with content 10.18% (v/w), chemical composition of the obtained essential oils included 10 main substances. Mac Khen essential oil has antioxidant capacity with an IC_{50} value of 30.12 mg/mL. Besides, essential oil also has shown the ability to inhibit the growth of both Gram (-) and Gram (+) bacteria.

Keywords: *Mac Khen essential oil, extract, antibacterial activity, antioxidant activity, Zanthoxylum rhetsa, tinh dầu Mắc Kén, chiết tách, hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa.*

Nhận bài ngày 12 tháng 9 năm 2022

Phản biện xong ngày 15 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 21 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ *Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội*

⁽²⁾ *Viện Nghiên cứu quân nhu, Cục Quân nhu*

Liên hệ: Nguyễn Trường Giang

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Số 1 Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Email: giang.nguyentruong1@hust.edu.vn