KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU CỎ XẠ HƯƠNG

Nguyễn Hà Trung*, Nghiêm Ngọc Hoa, Phạm Kiên Cường

Tóm tắt: *Thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Xạ hương (Thymus vulgaris) được khảo sát. Tinh dầu Xạ hương được ly trích thành công bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đạt hiệu suất 1,60%. Bằng phương pháp phân tích sắc ký khí ghép khối phổ(GC-MS), thành phần hóa học chính trong tinh dầu lá Trầu không được xác định là hợp chất Thymol với hàm lượng 50,84%. Hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu được đánh giá bằng phương pháp pha loãng đa nồng độ để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy tinh dầu Xạ hương có khả năng ức chế sự tăng trưởng của 2 chủng vi sinh vật: Staphylococcus aureus và Escherichia với giá trị MIC lần lượt là 110 và 82,5 µg/mL.*

Từ khóa: Thymol; Xạ hương; Kháng khuẩn; Tinh dầu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ xạ hương là một loài thực vật có hoa trong họ Hoa môi, được sử dụng rộng rãi trong ẩm thực, dược liệu và trang trí. Tại Việt Nam cây được trồng chính tại Đà Lạt và Sa Pa. Thành phần cỏ xạ hương gồm 3 thành phần quan trọng là Thymol, Carvacrol và Eugenol. Thymol là một dẫn xuất monoterpene tự nhiên của cymene và carvacrol là đồng phân của nó [1].

Ngày nay, các loại tinh dầu nói chung và tinh dầu Xạ hương nói riêng, có chứa thymol, được sử dụng trong nhiều mục đích, ví dụ như chất sát trùng, chống viêm, chất bảo quản thực phẩm và cả hương liệu. Thymol đã được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là chất phụ gia thực phẩm (công bố số 21 CFR 172.515) và chất bảo quản thực phẩm (công bố số 21 CFR 175.105) được phép sử dụng. Thymol còn được sử dụng như chất khử trùng bề mặt, thuốc trừ sâu (thuốc trừ sâu, thuốc diệt nấm, thuốc diệt chuột, thuốc chống vi trùng, v.v.), chất chống oxy hóa, và thuốc thử phòng thí nghiệm, cũng như trong nước hoa [1]. Thymol, thường được kết hợp với glycerin, ethanol và các chất bay hơi khác, được sử dụng để làm nước súc miệng. Ví dụ, Listerine® chứa 0,06% thymol cùng với tinh dầu bạc hà, eucalyptol và methyl salicylate. Hầu hết các ứng dụng này đều có liên quan đến hiệu quả kháng khuẩn của thymol đối với nhiều loại vi khuẩn, nấm mốc, nấm và giun đường ruột, cũng như các hoạt tính chống oxy hóa của chúng.

Thymol và cỏ Xạ hương có phổ kháng khuẩn rộng, bao gồm vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khả năng kháng các loại vi khuẩn có mặt trong thực phẩm như *Salmonella, Escherichia, Pseudomonas, Listeria, Bacillusspecies* và một số mầm bệnh liên quan đến nhiễm trùng đường hô hấp, do đó thể hiện tiềm năng to lớn của thymol và tinh dầu xạ hương trong bảo quản thực phẩm [2].

Việc bảo quản thực phẩm thường liên quan đến các biện pháp làm chậm hoặc ngăn ngừa các thay đổi về vi sinh, hóa học và vật lý, gây ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan hoặc làm hỏng thực phẩm. Thực tế, sự hư hỏng thực phẩm do yếu tố vi sinh là quan trọng nhất và thường diễn ra đầu tiên so với các yếu tố khác. Mặt khác, xu hướng của người tiêu dùng là sử dụng các sản phẩm không có các chất hóa học. Do đó, các loại tinh dầu thu được từ cây gia vị như húng quế, quế, oregano, hương thảo, cây xô thơm và xạ hương được nghiên cứu ngày càng nhiều, bởi vì bên cạnh tính chất cảm quan của chúng, các hợp chất này còn thể hiện các hoạt tính chức năng có ích khác. Báo cáo này sẽ trình bày kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học và khả năng kháng vi khuẩn gram âm *E. coli* và gram dương *S. aureus* của tinh dầu cỏ xạ hương, từ đó ứng dụng vào bảo quản thực phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Cỏ xạ hương khô được thu mua từ cơ sở trồng thảo dược ở Đà Lạt, nguyên liệu được nghiền nhỏ bằng cối, chia ra các túi nhỏ 100g, bảo quản 4^{o}C cho đến khi sử dụng.

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Escherichia coli* ATCC 25922 được cung cấp từ phòng thí nghiệm vi sinh, Viện Công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2.2. Phương pháp trích ly tinh dầu [3]

Tinh dầu Xạ hương được ly trích từ 100g cỏ Xạ hương khô bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp, với bộ chưng cất tinh dầu Clevenger, sản phẩm thu được được làm khan bằng Na_2SO_4. Đồng thời khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian chưng cất, thể tích nước bổ sung và nhiệt độ được sử dụng trong quá trình chưng cất đến hàm lượng tinh dầu thu được. Hiệu suất thu nhận tinh dầu tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất thu nhận (\%)} = \frac{Khối\ lượng\ tinh\ dầu\ (g)}{Khối\ lượng\ nguyên\ liệu\ (g)} \times 100$$

2.3. Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu thu được [4]

Thành phần và hàm lượng các cấu tử có trong tinh dầu được phân tích bằng phương pháp Sắc kí khí-khối phổ (GC/MS), thực hiện trên hệ thống thiết bị sắc kí khí và phổ kí liên hợp GC/MS của hãng Agilent Technologies HP 6890N. Agilent Technologies HP 6890N ghép nối với Mass Selective Detector Agilent HP 5973 MSD. Cột HP-5MS có kích thước 0,25 µm x 30 m x 0,25 mm. Chương trình nhiệt độ với điều kiện 60°C/2 phút; tăng nhiệt độ 4°C/1 phút cho đến 220°C, sau đó lại tăng nhiệt độ 20°/phút cho đến 260°C; với He làm khí mang. Việc xác nhận các cấu tử được thực 42 hiện bằng cách so sánh các dữ kiện phổ MS của chúng với phổ chuẩn đã được công bố có trong thư viện Willey/Chemstation HP.

2.4. Xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp bằng phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn [5]

Chủng vi khuẩn được hoạt hóa trước ở 37^{o}C trong 24 giờ trong môi trường MHA. Đĩa giấy tiệt trùng đường kính 6mm tẩm 10 µl tinh dầu được đặt lên bề mặt thạch chứa sẵn huyền dịch vi khuẩn nồng độ 10^8 CFU/ml. Sau đó đem nuôi ở 37^{o}C trong 24 giờ. Kích thước vòng kháng khuẩn (D) chính là khoảng mà vi sinh vật không thể phát triển được. Kích thước vòng kháng khuẩn càng lớn thì khả năng kháng khuẩn của tinh dầu càng cao và ngược lại. Hoạt tính ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức:

$$BK = D - d\ (mm)$$

Trong đó: D = đường kính vòng vô khuẩn;

d = đường kính đĩa giấy tiệt trùng.

Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình.

Mẫu tinh dầu được pha loãng theo các thang nồng độ thấp dần, để tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)- là nồng độ mà ở đó vi sinh vật bị ức chế gần như hoàn toàn. Mẫu có MIC ≤ 200 µg/mL là có hoạt tính

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chưng cất tinh dầu

3.1.1. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian chưng cất đến hàm lượng tinh dầu thu

được trong 100g lá xạ hương khô, cố định các yếu tố nhiệt độ 100^{o}C, thể tích nước bổ sung là 200ml. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. *Kết quả khảo sát thời gian chưng cất tinh dầu xạ hương.*

Thời gian (giờ)	**2**	**2,5**	**3**	**3,5**	**4**	**5**
Hiệu suất tinh dầu (%)	0,4766	0,496	**0,768**	0,62	0,624	0,4534

Bảng 1 cho thấy hàm lượng tinh dầu thu được phụ thuộc vào thời gian chưng cất, hàm lượng tinh dầu tăng khi thời gian chưng cất tăng và với thời gian chưng cất là 3 giờ, hàm lượng gần như đạt cao nhất. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu tương tự, thời gian chưng cất tối ưu được các nhóm nghiên cứu chọn đều không vượt quá 3 giờ [6]. Mặt khác, khi chưng cất với thời gian lâu hơn thì lượng tinh dầu tuy thu được nhiều hơn nhưng không đáng kể. Vì vậy, để tiết kiệm thời gian, thời gian ly trích tinh dầu tối ưu được chọn là 3 giờ và cố định để tiếp tục khảo sát các yếu tố khác

3.1.2. Ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào

Khảo sát sự ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào đến hàm lượng tinh dầu ly trích từ 100 g lá xạ hương khô bằng cách tiến hành chưng cất tinh dầu lần lượt với những thể tích nước khác nhau, cố định các yếu tố còn lại. Mục đích nhằm xác định thể tích nước tối ưu cho quá trình chưng cất, tránh sử dụng lượng nước quá dư, không có lợi cho việc ly trích tinh dầu. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. *Kết quả khảo sát lượng nước bổ sung đến hàm lượng tinh dầu.*

Thể tích (ml)	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**
Hiệu suất tinh dầu (%)	0,562	0,751	1,017	**1,561**	0,634

Nước có tác dụng thẩm thấu vào các mô nguyên liệu, sau đó sẽ hòa tan, khuếch tán và lôi cuốn các hợp chất hữu cơ trong tinh dầu, có tác dụng phá vỡ hệ keo xung quanh tinh dầu, tạo điều kiện cho tinh dầu thoát ra ngoài dễ dàng hơn. Bảng 2 cho thấy rằng, quá trình chưng cất tinh dầu lá Xạ hương thì tỷ lệ dung môi khảo sát được tối ưu nằm ở tỷ lệ 2,5/1. Trong khoảng tỷ lệ dung môi này thì tinh dầu tạo ra trong suốt, ít tạo nhũ tương, mùi thơm tự nhiên. Ta có nhận xét tinh dầu thu được tăng theo tỷ lệ nước/ khối lượng lá. Quá trình đạt hiệu quả thu tinh dầu cao nhất ở tỷ lệ 2,5/1. Nếu thể tích nước quá ít sẽ làm tinh dầu khuếch tán không được tốt vào trong dung dịch làm cho thời gian chưng cất kéo dài và thời gian tiếp xúc nhiệt càng lâu thì tinh dầu ngả vàng chất lượng tinh dầu giảm xuống. Nếu lượng nước càng cao thì khả năng tạo nhũ tương của tinh dầu với nước càng cao, làm chất lượng tinh dầu sẽ giảm xuống do lượng nước càng nhiều thì thành phần phân cực tan nhiều vào trong nước, còn lại các thành phần không phân cực với tỷ lệ các hợp phần cao, cho nên khả năng tạo nhũ tương là rất cao, do đó, hiệu suất thu tinh dầu giảm mạnh khi tăng lượng nước lên 300ml.

3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chưng cất

Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ chưng cất đến hàm lượng tinh dầu ly trích từ 100 g lá xạ hương khô bằng cách tiến hành chưng cất tinh dầu lần lượt với các nhiệt độ khác nhau, cố định các yếu tố còn lại theo kết quả khảo sát của các thí nghiệm trước (thời gian 3 giờ, tỷ lệ nước/nguyên liệu là 2,5/1). Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. *Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chưng cất đến hàm lượng tinh dầu.*

Nhiệt độ (°C)	**80**	**85**	**90**	**95**	**100**
Hiệu suất tinh dầu (%)	0,048	0,061	0,095	0,152	**1,599**

Bảng 3 cho thấy ở các nhiệt độ thấp hơn 90^{o}C gần như không có tinh dầu thu được, khi tăng lên đến 95^{o}C thì tinh dầu bắt đầu cuồn cuốn theo hơi nước bay lên và ngưng tụ cùng

với hơi nước và khi đạt 100^{o}C là nhiệt độ sôi của nước, hơi nước bốc lên nhiều hơn, lôi cuốn thêm nhiều tinh dầu trong suốt thời gian chưng cất, cuối quá trình đạt được hiệu suất tinh dầu là 1,599 %. Như vậy, nhiệt độ chưng cất 100^{o}C là nhiệt độ thích hợp cho quá trinh chưng cất thu tinh dầu xạ hương.

Phân tích và tổng hợp những kết quả trên, điều kiện tối ưu để chưng cất tinh dầu xạ hương bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm được đề xuất như ở bảng 4.

Bảng 4. *Kết quả điều kiện thích hợp cho quá trìnhly trích tinh dầu cỏ Xạ hương bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước*

Khối lượng nguyên liệu (g)	Thời gian (giờ)	Thể tích nước (ml)	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng cao nhất (%)
100	180	250	100	1,60

3.2. Thành phần hóa học của tinh dầu

Bảng 5. *Thành phần hóa học chính của tinh dầu cỏ Xạ hương.*

STT	Thời gian lưu (phút)	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	10,13	Pinene<a->	0,16
2	13,04	Cymene <o->	37,59
3	13,16	Limonene	0,11
4	14,16	Terpinene <g->	9,78
5	**22,41**	**Thymol**	**50,84**
6	22,71	Carvacrol	0,20
		Tổng	**98,68**

Từ kết quả GC/MS cho thấy thành phần hóa học chính của tinh dầu cỏ Xạ hương thu nhận được bao gồm 6 hợp chất chiếm khoảng 98,68% thành phần tinh dầu. Trong đó, các hợp chất chính là Thymol (50,84%), Cymene (37,59%) và Terpinene (9,78%), kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Borugă O. và cộng sự (2014) [5]. Có thể thấy các cấu tử chiếm hàm lượng cao nhất trong tinh dầu đều là những dẫn xuất của phenol nên tinh dầu này có nhiệt độ sôi, tỷ trọng và chiết suất cao. Các dẫn xuất phenol có mặt trong tinh dầu có những tác dụng sinh học tốt như tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, độc tính tế bào [7],…

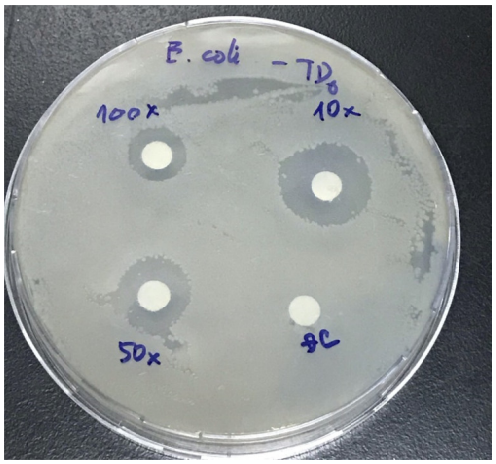
3.3. Hoạt tính kháng khuẩn

Từ tinh dầu nguyên chất ban đầu, pha loãng lần lượt các thang nồng độ thấp dần, từ đó xác định giá trị MIC. Kết quả thử nghiệm được trình bày trong bảng 6.

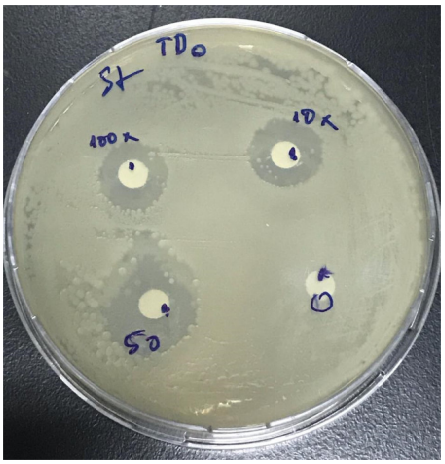
Bảng 6. *Kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Xạ hương.*

Độ pha loãng	1/10	1/50	1/100	1/150	1/200	1/250
Nồng độ thymol (µg/ml)	1650	330	165	110	82,5	66
S. aureus	-	-	-	-	-	+
E. coli	-	-	-	-	+	+

Dấu (-): Không có vi khuẩn mọc xung quang, vòng kháng khuẩn ≥ 10mm
Dấu (+): Có vi khuẩn mọc xung quanh, vòng kháng khuẩn ≤ 10 mm
Đường kính giấy = 6 mm



Hình 1. *Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu xạ hương với E. Coli.*



Hình 2. *Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu xạ hương với S. Aureus.*

Từ kết quả của bảng 6 có thể nhận thấy rằng, MIC của tinh dầu xạ hương đối với chủng vi khuẩn gram âm *E. coli* là 110 µg/ml và gram dương *S. aureus* là 82,5 µg/ml. Kết quả này cho thấy hoạt tính của tinh dầu xạ hương cao hơn so với tinh dầu lá tía tô khi tinh dầu này không có thấy hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. coli* [8]. Tương tự khi so sánh với tinh dầu Kinh giới, tinh dầu xạ hương cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn đối với âm *E. coli* (MIC 110 µg/ml < 2048 µg/ml) và cả với *S. aureus* (MIC 82,5 µg/ml < 2048 µg/ml).

Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu phụ thuộc vào thành phần hóa học của chúng. Rõ ràng, hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu Xạ hương được phân tích có liên quan đến sự hiện diện của các hợp chất phenolic (thymol) và terpene hydrocarbons (-terpinene) [9]. Cymene, thành phần chính thứ hai theo tỷ lệ phần trăm (37,59%), không cho thấy hiệu quả kháng khuẩn khi được sử dụng một mình [10]. Tuy nhiên nghiên cứu của tác giả Delgado B. và cộng sự (2004) đã chỉ ra tác dụng hiệp đồng của Cymene với Thymol trong hoạt tính kháng khuẩn, tương tự là tác dụng hiệp đồng của Thymol và Terpinene trong khả năng kháng *E. coli, S. aureus, B. cereus* cũng đã được Gallucci M.N. và cộng sự (2009) chứng minh [11, 12]. Điều này đã cho thấy tác dụng hiệp đồng của các thành phần hóa học liên quan đến hoạt tính sinh học của tinh dầu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu quá trình chưng cất tinh dầu từ cỏ Xạ hương bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm đã đề xuất điều kiện tối ưu về thời gian (180 phút), tỷ lệ bổ sung nước/nguyên liệu (2,5/1), nhiệt độ chưng cất (100^{o}C) với hiệu suất đạt được cao nhất là 1,60%. Áp dụng phương pháp phân tích hiện đại GC/MS cho thấy tinh dầu thu được từ cỏ Xạ hương có chứa thành phần chính là Thymol (50,84%), Cymene (37,59%) và Terpinene (9,78%) và một số thành phần khác. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học trong tinh dầu Xạ hương được so sánh với kết quả của một số nghiên cứu tương tự được thực hiện ở Rumani (Borugă O và cộng sự, 2014) nhận thấy có sự tương đồng về thành phần chiếm hàm lượng cao nhất đều là Thymol (50,84% và 47,59%), tuy nhiên có sự sai khác ở 2 thành phần có hàm lượng nhiều thứ 2, 3 là Cymene và Terpinene. Có sự khác nhau trên có thể là do sự khác nhau về khí hậu, thổ nhưỡng hoặc phương pháp thu tinh dầu.

Tinh dầu Xạ hương biểu hiện hoạt tính kháng vi khuẩn tốt với cả vi khuẩn Gram (+) như *S. aureus* và cả vi khuẩn Gram (-) như *E. coli*. Đây là cơ sở giúp ứng dụng tinh dầu Xạ hương như một chất kháng khuẩn tự nhiên, cho thấy tiềm năng to lớn trong việc ứng dụng vào bảo quản thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Salehi, B., et al., *"Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses"*. Vol. 32. 2018.

[2]. Laranjo, M., et al., *"Use of essential oils in food preservation"*. 2017.

[3]. *"Dược điển Việt Nam IV"*. 2009: NXB Hà Nội.

[4]. Wesolowska, A., M. Grzeszczuk, and D. Jadczak, *"Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils Isolated by Water-steam Distillation and Hydrodistillation from Garden Thyme (Thymus vulgaris L.)".* Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2016. **19**(4): p. 832-842.

[5]. Borugă, O., et al., *"Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity".* Journal of Medicine and Life, 2014. **7**(Spec Iss 3): p. 56-60.

[6]. Kuok Loong, N.G., P.F. Wahida, and C.H. Chong, *"Optimisation of extraction of thymol from plectranthus amboinicus leaves using response surface methodology"*. Vol. 9. 2014. 79-88.

[7]. Hayek, S., R. Gyawali, and S. Ibrahim, *"Antimicrobial Natural Products"*. Vol. 2. 2013.

[8]. Nguyễn Thị Hoàng Lan, *"Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu lá tía tô".* Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2015. **13**(2): p. 245-250.

[9]. Flores Santurio, D., et al., *"Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against Escherichia coli Strains"*. Vol. 42. 2014.

[10]. Dorman, H.J. and S.G. Deans, *"Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils".* J Appl Microbiol, 2000. **88**(2): p. 308-16.

[11]. Delgado, B., et al., *"Effect of thymol and cymene on Bacillus cereus vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions".* Food Microbiology, 2004. **21**(3): p. 327-334.

[12]. Gallucci, M.N., et al., *"Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus".* Flavour and Fragrance Journal, 2009. **24**(6): p. 348-354.

ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF THYMUS VULGARIS

Chemical composition and anti-microbialactivity of essential oil from leaves of Thymus vulgaris have been investigated. The highest yield of oil (1.60 %) of Thymus vulgaris leaves was successfully extracted by steam distillation. By using gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS), we have confirmed that the main component of Thymus vulgaris essential oil is Thymol, with content up to 50.84%. The in vitro anti-microbial activity was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. The results showed that the essential oil from Thyme leaves inhibited the growth of 2 microorganisms species: Staphylococcus aureus and Escherichia coli with the MIC values of 110 and 82,5 µg/mL, respectively.

Keywords: Thymol; Thymus vulgaris; Anti-microbial activity; Essential oil.

Nhận bài ngày 26 tháng 06 năm 2019
Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2019
Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 4 năm 2020

Địa chỉ: Viện Công nghệ mới/Viện Khoa học và công nghệ quân sự.
*Email: nghatrung@gmail.com.