



## NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TINH DẦU TRÀM TRÀ (*Melaleuca alternifolia*) TRONG SẢN XUẤT NƯỚC SÚC MIỆNG

Dương Mộng Hòa, Võ Hoàng Duy và Nguyễn Thị Diệp Chi

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 16/05/2016

Ngày chấp nhận: 29/08/2016

### Title:

Study on extraction, chemical component investigation and initial application of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil in mouthwash production

### Từ khóa:

Tinh dầu Tràm trà, *Melaleuca alternifolia*, Terpinen-4-ol, GC-MS, Nước súc miệng

### Keywords:

Tea tree oil, *Melaleuca alternifolia*, Terpinen-4-ol, GC-MS, Mouthwash

### ABSTRACT

From leaves and terminal branches of *Melaleuca alternifolia* grown in Tien Giang province, the *Melaleuca alternifolia* oil - Tea Tree oil (TTO) was extracted by steam distillation method. Extraction process parameters were studied including distillation time and temperature and material preservation time. Chemical ingredients of TTO were identified by modern analytical method GC-MS. Collected TTO was used as the main antibacterial ingredient in mouthwash product. The results showed that, the prime conditions for distillation were at 100°C and within 100 minutes. The average distillation productivity of TTO was 4.91% (wt/wt) with the main components including Terpinen-4-ol (36%),  $\gamma$ -Terpinene (17.8%) and 1,8-Cineole (10%) which reached the ISO 4730:2004 standard. The obtained mouthwash product possessed the same antibiotic activity as commercial product against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. These results contributed to find a new application of TTO which would increase its economic value in Viet Nam.

### TÓM TẮT

Từ lá và thân non của cây Tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) trồng tại tỉnh Tiền Giang, tinh dầu Tràm trà (TTO) được chiết xuất bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Quy trình chiết xuất được khảo sát theo thời gian, nhiệt độ chưng cất và thời gian lưu trữ nguyên liệu. Thành phần hóa học và hàm lượng các hoạt chất trong tinh dầu đã được xác định bằng phương pháp phân tích hiện đại GC-MS. Tinh dầu sau chưng cất được sử dụng làm thành phần sát khuẩn chính trong sản phẩm nước súc miệng. Kết quả cho thấy, nhiệt độ và thời gian tối ưu để chưng cất tinh dầu là ở 100°C, trong 100 phút, hiệu suất chưng cất trung bình đạt 4,91% (wt/wt). Các thành phần chính trong tinh dầu gồm Terpinen-4-ol (36%),  $\gamma$ -Terpinene (17,8%), 1,8-Cineole (10%), các thành phần này đều đạt tiêu chuẩn ISO 4730:2004. Sản phẩm nước súc miệng thu được có khả năng kháng khuẩn trên các chủng *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* tương đương với nước súc miệng thương mại. Kết quả này góp phần tạo hướng ứng dụng mới cho tinh dầu Tràm trà, qua đó giúp tăng giá trị cây Tràm trà ở Việt Nam.

Trích dẫn: Dương Mộng Hòa, Võ Hoàng Duy và Nguyễn Thị Diệp Chi, 2016. Nghiên cứu chiết xuất, khảo sát thành phần hóa học và bước đầu ứng dụng tinh dầu tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) trong sản xuất nước súc miệng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45a: 90-96.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Bệnh viện Răng Hàm Mặt Trung ương vào năm 2013, trên 90% dân số Việt Nam có vấn đề về sức khỏe răng miệng (Quang Tây, 2013). Tổ chức y tế thế giới WHO đã xếp sâu răng trong nhóm 3 bệnh có nguy cơ hàng đầu ảnh hưởng đến sức khỏe, chỉ sau tim mạch và ung thư. Từ các đánh giá trên cho thấy sâu răng và các bệnh răng miệng là một vấn đề sức khỏe đáng được quan tâm. Trong giai đoạn hiện nay, sản phẩm nước súc miệng có nguồn gốc từ tinh dầu tự nhiên ngày càng được ưa chuộng. Trên thị trường, phần lớn các sản phẩm nước súc miệng nhập từ nước ngoài với giá thành cao và là nước súc miệng tổng hợp. Nước súc miệng được sản xuất từ các nguyên liệu tổng hợp có mùi gắt, vị cay nồng, độ cồn cao và chứa các kháng sinh tổng hợp, điều này đang gây lo lắng cho người sử dụng. Chính vì thế, việc nghiên cứu chiết xuất và ứng dụng tinh dầu Tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) trong sản xuất nước súc miệng là một việc cần thiết ở nước ta hiện nay, nhằm tạo ra một sản phẩm từ thiên nhiên an toàn và hiệu quả; đồng thời, nâng cao giá trị cho loại tinh dầu Tràm trà, góp phần cải thiện cuộc sống cho người dân địa phương trồng cây Tràm trà.

Cây Tràm trà (*Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel.) thuộc họ Sim (*Myrtaceae*), có nguồn gốc từ Australia (Cheel, E., 1924). Tinh dầu của loài cây này chứa các thành phần chính gồm Terpinen-4-ol ( $\geq 30\%$ ),  $\gamma$ -Terpinene (10 – 28%),  $\alpha$ -Terpinene (5 – 13%), 1,8-Cineole ( $\leq 15\%$ ) (Brophy, J. J. *et al*, 1989) từ lâu đã được nghiên cứu và sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới cho mục đích trị liệu và làm đẹp. Bên cạnh đó, TTO đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên các chủng *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (MIC 0,04%) và đặc biệt trên các vi khuẩn gây hại răng miệng như *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* (Beylier, M.F., 1979, Walsh, L.J. and Longstaff, J., 1987).

## 2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Nguyên liệu

Lá và cành non cây Tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) được thu tại xưởng sản xuất thực nghiệm tinh dầu Tràm trà, xã Mỹ Phước, huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang vào tháng 6/2015. Khối lượng nguyên liệu: 20 kg.

### 2.2 Phương tiện

Các hóa chất dung môi: diethyl ether, sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Trung Quốc), Nước cất 2 lần.

– Sắc ký khí ghép đầu dò khối phổ (GC-MS) được thực hiện trên máy GC/MS Thermo, phần mềm Thermo Xcalibur, thư viện phổ NIST MS Search 2.0 cột phân tích DB-5 (0.32mm x 30m x 0.25), khí mang Heli tại Khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ.

– Nhiệt độ tiêm mẫu: 240°C. Máy khối phổ ISQ (EI). Chương trình Nhiệt Độ: nhiệt độ đầu: 50°C giữ 1 phút, đoạn 1: tăng 2°C/phút tới 70°C giữ 1 phút, đoạn 2: tăng 5°C/ phút tới 150°C giữ 2 phút, đoạn 3: tăng 10°C/phút tới 230°C giữ 1 phút.

– Chủng vi sinh vật thử nghiệm: Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923) và *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 11632), các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: Luria-Bertani (LB).

## 2.3 Phương pháp

### 2.3.1 Khảo sát hiệu suất chiết xuất tinh dầu theo thời gian, nhiệt độ chưng cất và thời gian lưu trữ nguyên liệu

Khảo sát hiệu suất chiết xuất tinh dầu theo thời gian chưng cất ở các khoảng thời gian 80, 100 và 120 phút, gia nhiệt 100°C.

Khảo sát hiệu suất chiết xuất tinh dầu theo nhiệt độ chưng cất ở các nhiệt độ 100°C, 110°C, 120°C trong thời gian 100 phút.

Khảo sát hiệu suất chiết xuất tinh dầu theo thời gian lưu trữ nguyên liệu với những khoảng thời gian lưu trữ 7 ngày, 15 ngày và 30 ngày. Tiến hành chưng cất trong thời gian 100 phút ở nhiệt độ 100°C.

Các nghiệm thức được tiến hành trên 50 g nguyên liệu. Tinh dầu sau khi chiết được thu bằng cách chiết lỏng-lỏng với diethyl ether, loại dung môi, làm khan nước bằng sodium sulfate. Hiệu suất chưng cất tinh dầu ( $H$ ) được tính theo công thức:

$$H(\%) = \frac{m}{50 \times \left(1 - \frac{w}{100}\right)} \times 100$$

Trong đó:

$m$  là khối lượng tinh dầu thu được, tính bằng gam

$w$  là độ ẩm của nguyên liệu, tính bằng phần trăm (%)

Độ ẩm được liệu được tiến hành xác định theo phương pháp được quy định tại phụ lục 9.6 của Dược điển Việt Nam IV (ĐDVN IV):

Tiến hành sấy cốc sứ (bi đựng mẫu thử) trong 30 phút tại 105°C±2°C, sau đó cân khối lượng cốc sứ. Cho vào cốc sứ đã sấy khoảng 3 g mẫu nguyên liệu Trà trà, dàn đều lớp nguyên liệu trong cốc. Sấy cốc chứa mẫu tại 60°C±2°C cho đến khi khối lượng không đổi (chênh lệch khối lượng lần sấy trước và lần sấy sau cách nhau 1 giờ không quá 0,5 mg), ghi nhận khối lượng cốc sứ sau khi sấy. Tiến hành thí nghiệm trên với số nghiệm thức là 3, tính toán lấy giá trị trung bình.

Độ ẩm nguyên liệu được xác định theo công thức:

$$w(\%) = \frac{m - (m_1 - m_0)}{m} \times 100$$

Trong đó:

w là độ ẩm của nguyên liệu, tính bằng phần trăm (%);

m<sub>1</sub> là khối lượng cốc và mẫu sau khi sấy, tính bằng gam (g);

m<sub>0</sub> là khối lượng cốc sứ ban đầu, tính bằng gam (g);

m là khối lượng nguyên liệu ban đầu, tính bằng gam (g).

### 2.3.2 Khảo sát và so sánh thành phần hóa học của tinh dầu Trà trà

Để khảo sát sự thay đổi về thành phần và hàm lượng của tinh dầu Trà trà (*Melaleuca alternifolia*) khi được trồng di thực ở nước ta, đồng thời nhằm đảm bảo độ tinh khiết của kết quả phân tích các thành phần hóa học, tinh dầu thu được ở điều kiện tối ưu (100°C, 100 phút) sẽ được khảo sát thành phần bằng phương pháp GC-MS và so sánh với kết quả phân tích GC-MS của sản phẩm thương mại được phân phối bởi Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Tinh dầu Thiên nhiên Ý Lang và tài liệu đã công bố (Johns, M. R. *et al.*, 1992).

### 2.3.3 Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm nước súc miệng từ tinh dầu Trà trà và so sánh với nước súc miệng thương mại (Listerine)

Nước súc miệng từ tinh dầu Trà trà có công thức được thể hiện trong Bảng 1.

Hoạt tính kháng khuẩn trên *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 11632) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923) của mẫu

nước súc miệng từ đề tài (Ký hiệu S) và nước súc miệng Listerine – Thái Lan (Ký hiệu C) được khảo sát bằng phương pháp pha loãng trong thạch (agar dilution) (Wiegand *et al.*, 2008).

Đối chứng:

Đối chứng âm (Ký hiệu NC): Môi trường nuôi cấy không trộn nước súc miệng.

Đối chứng dương (Ký hiệu C): Môi trường nuôi cấy có bổ sung nước súc miệng Listerine – Thái Lan.

**Bảng 1: Thành phần phối trộn nước súc miệng từ tinh dầu Trà trà**

Thành phần	Hàm lượng
Acid benzoic	0,1 g
Ethanol	2 ml
Glycerol	2 g
Menthol	0,14 g
Sodium benzoate	0,1 g
Sodium lauryl sulfate (SLS)	0,75 g
Sodium saccharin	0,003 g
Poloxamer 188	0,75 g
Sorbitol	2 g
Tinh dầu Trà trà	0,25 g
Brilliant blue FCF 0,05%	0,2 ml
Nước cất	vừa đủ 100 mL

Tiến hành thí nghiệm

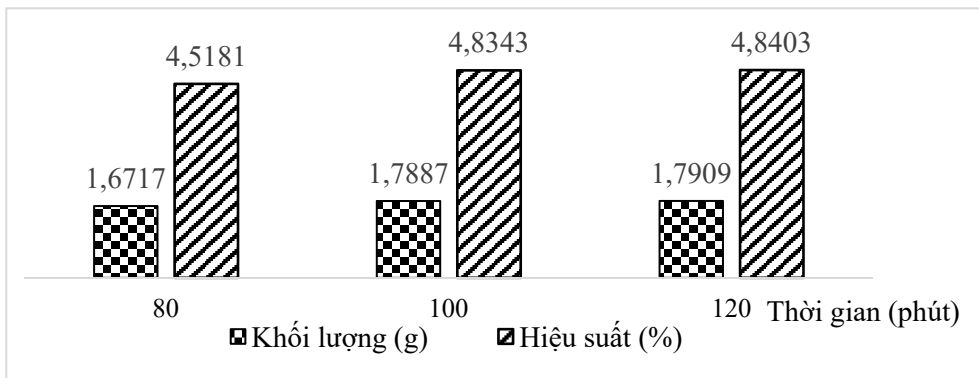
Các chủng vi khuẩn kiểm định được hoạt hóa và pha loãng theo tiêu chuẩn McFarland 0.5 rồi tiến hành thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy LB được bổ sung 5% nước súc miệng thương mại hoặc nước súc miệng điều chế.

Chủng vi khuẩn được chủng lên các đĩa thạch có bổ sung nước súc miệng bằng phương pháp nhỏ giọt (Vincent, J. M., 1970), sau đó ủ trong tủ ẩm ở 37°C trong 24 giờ cho vi khuẩn phát triển. Sau 24 giờ, theo dõi sự phát triển của vi khuẩn trên đĩa thạch, ghi nhận kết quả.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả chiết xuất tinh dầu theo thời gian chưng cất

Từ kết quả cho thấy khi chưng cất trong 80 phút thì tinh dầu từ nguyên liệu chưa được chiết kiệt, ngược lại khi chưng cất trong 120 phút lượng tinh dầu tăng lên đạt 0,01%, không đáng kể so với hiệu suất chưng cất trong 100 phút, tuy nhiên phải tiêu tốn thêm 20% thời gian chiết và chi phí điện năng trong quá trình chiết. Do đó, thời gian chưng cất phù hợp là 100 phút.

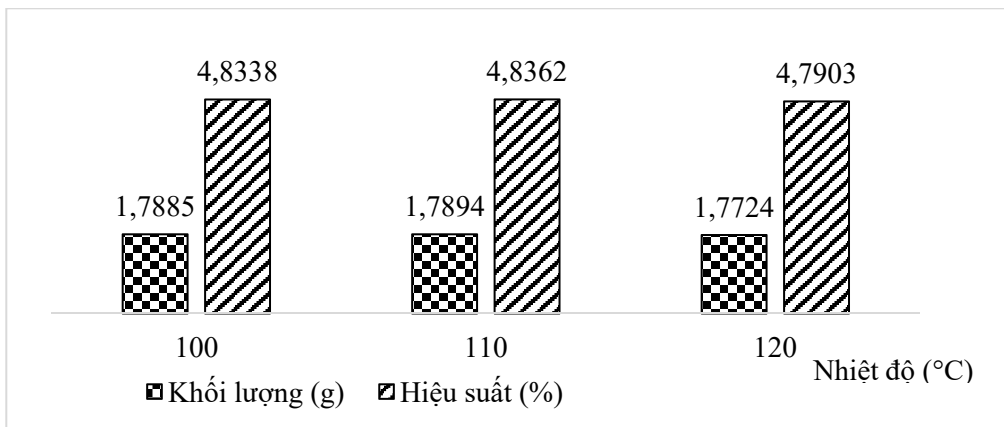


Hình 1: Kết quả khảo sát hiệu suất chưng cất tinh dầu theo thời gian chưng cất

**3.2 Kết quả chiết xuất tinh dầu theo nhiệt độ chưng cất**

Kết quả cho thấy lượng tinh dầu chưng cất được không bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ chưng

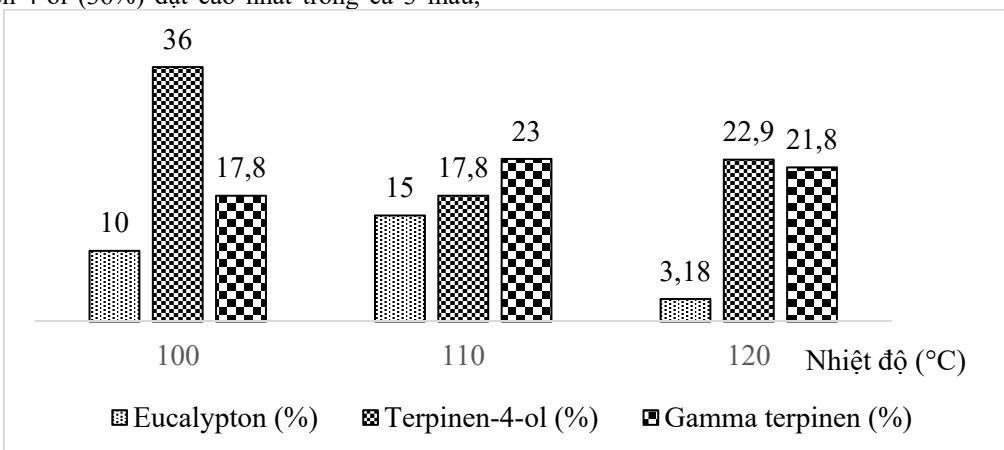
cất. Để khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến chất lượng tinh dầu, thành phần hóa học của tinh dầu Trà xanh chưng cất mỗi nhiệt độ đã được xác định bằng sắc ký khí ghép đầu khối phổ - GC-MS.



Hình 2: Kết quả khảo sát hiệu suất chưng cất tinh dầu theo nhiệt độ chưng cất

Từ kết quả phân tích GC-MS cho thấy, các thành phần chính trong tinh dầu có sự thay đổi theo nhiệt độ. Với mẫu chiết ở 100°C hàm lượng terpinen-4-ol (36%) đạt cao nhất trong cả 3 mẫu,

hai mẫu còn lại ở 110°C, 120°C vẫn có terpinen-4-ol trong thành phần nhưng chứa hàm lượng ít hơn lần lượt là 17,8% và 22,9%. Từ đó, nhiệt độ phù hợp để chưng cất tinh dầu Trà xanh là 100°C.

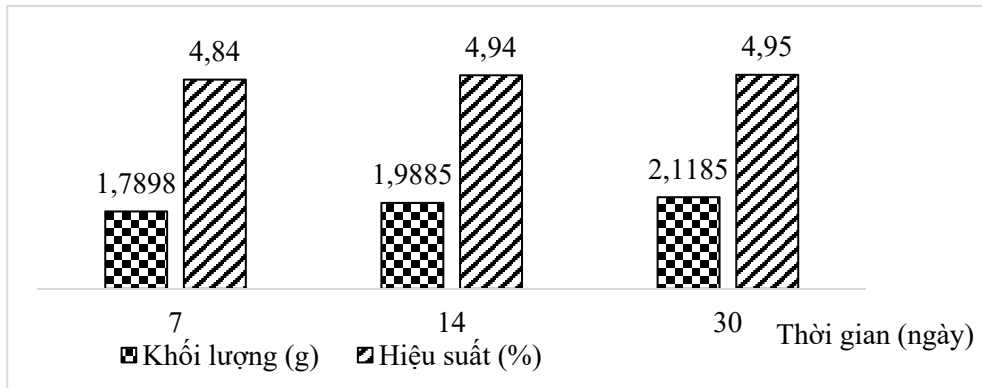


Hình 3: Kết quả khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu được chưng cất ở các nhiệt độ khác nhau

### 3.3 Kết quả khảo sát hiệu suất chiết xuất tinh dầu theo thời gian lưu trữ nguyên liệu

Từ kết quả cho thấy, hiệu suất chiết trung bình của tinh dầu là  $4,91 \pm 0,06$ . Hiệu suất chiết này sẽ

thay đổi không đáng kể theo thời gian lưu giữ nguyên liệu. Từ đó rút ra kết luận, nguyên liệu được bảo quản lâu khoảng 1 tháng sau khi thu hái vẫn không ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất chiết.



Hình 4: Kết quả khảo sát hiệu suất chưng cất tinh dầu theo thời gian lưu trữ

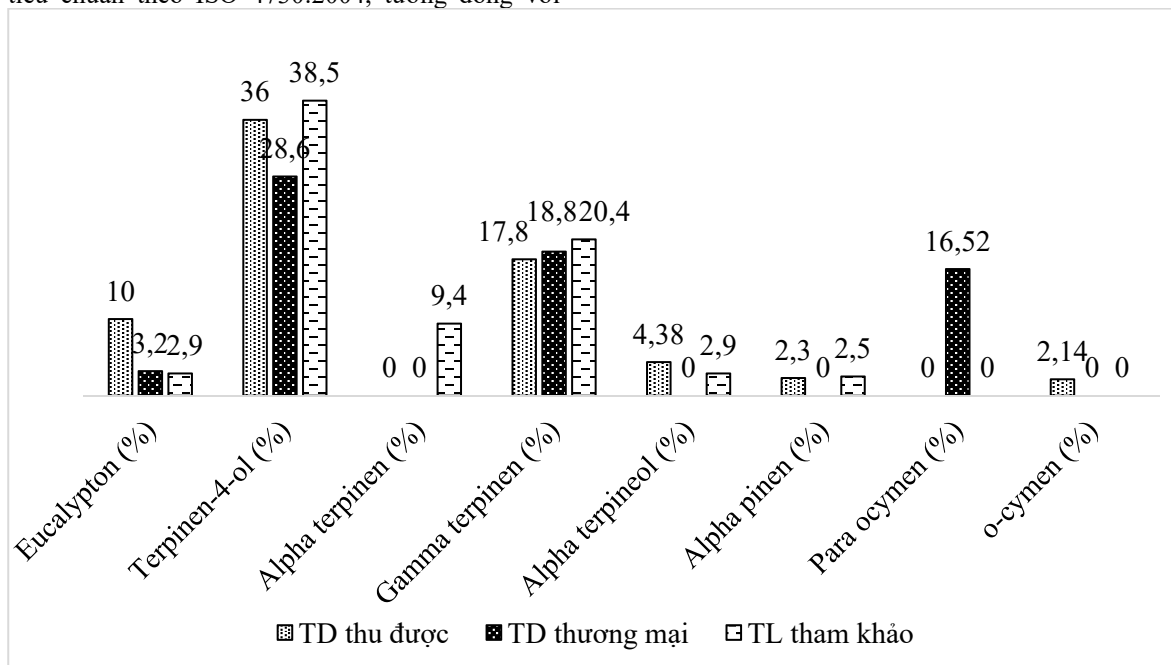
Bảng 2: Độ ẩm nguyên liệu trong quá trình bảo quản

Thời gian bảo quản	7 ngày	14 ngày	30 ngày
Độ ẩm	26,0%	19,5%	14,4%

### 3.4 Kết quả so sánh thành phần hóa học của tinh dầu Tràm trà

Từ kết quả cho thấy tinh dầu Tràm trà trong nghiên cứu này có hàm lượng các hoạt chất chính như Eucalyptol 10%, Terpinen-4-ol 36% đều đạt tiêu chuẩn theo ISO 4730:2004, tương đồng với

thành phần của sản phẩm thương mại được phân phối bởi Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Tinh dầu Thiên nhiên Y Lang và tài liệu tham khảo (Brophy, J. J. *et al.*, 1989). Do đó, tinh dầu thu được có tiềm năng ứng dụng vào các lĩnh vực sản xuất thương mại.



Hình 5: Kết quả so sánh thành phần và hàm lượng tinh dầu (TD) với các tài liệu (TL) đã công bố

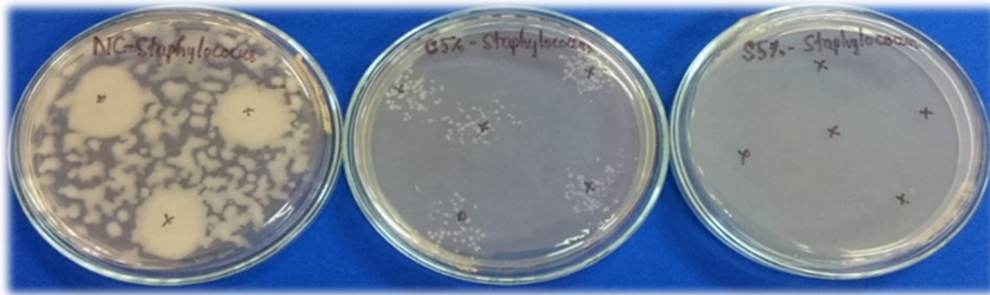
**3.5 Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm nước súc miệng (NSM) từ tinh dầu Tràm trà**

Tại nồng độ 5%, vi khuẩn *Staphylococcus aureus* vẫn phát triển trên môi trường có bổ sung nước súc miệng thương mại (C5%) nhưng không phát triển trên môi trường bổ sung nước súc miệng điều chế (S5%).

Kết quả cho thấy, vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn

không phát triển tạo thành khuẩn lạc. Cả hai mẫu nước súc miệng thương mại và điều chế đều ức chế mạnh sự phát triển của dòng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* tại nồng độ nước súc miệng 5%.

Qua hai kết quả trên, nước súc miệng từ tinh dầu Tràm trà thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên hai chủng *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* tương đương với nước súc miệng thương mại.

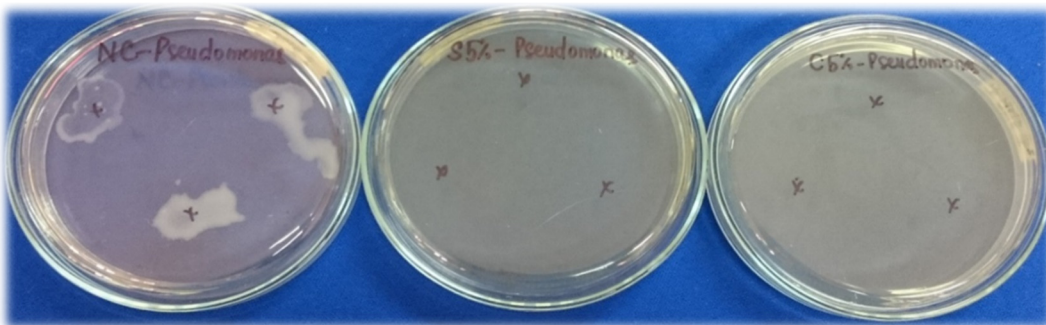


Đối chứng âm

NSM Thương mại (5%)

NSM Tràm trà (5%)

**Hình 6: Kết quả khảo sát hoạt tính của sản phẩm nước súc miệng trên chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus***



Đối chứng âm

NSM Thương mại (5%)

NSM Tràm trà (5%)

**Hình 7: Kết quả khảo sát hoạt tính của sản phẩm nước súc miệng trên chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa***

**4 KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã khảo sát được điều kiện tối ưu để chưng cất tinh dầu là ở nhiệt độ 100°C và thời gian 100 phút.

Hiệu suất chưng cất của tinh dầu Tràm trà trung bình là 4,91% và hiệu suất này thay đổi không đáng kể theo thời gian lưu trữ nguyên liệu.

Kết quả GC/MS cho thấy các thành phần chính trong tinh dầu là Terpinen-4-ol (36,0%),  $\gamma$ -Terpinene (17,8%), Eucalyptol (10,0%), hàm

lượng các thành phần này đều đạt tiêu chuẩn của ISO 4730:2004.

Nước súc miệng từ tinh dầu Tràm trà biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn trên hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* tương đương so với sản phẩm thương mại, kết quả này bước đầu mở ra một hướng đi mới cho các sản phẩm từ tinh dầu Tràm trà nói riêng cây Tràm trà nói chung, từ đó nâng cao đời sống người nông dân trên những vùng canh tác cây Tràm trà.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beylier, M.F., 1979. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfumer and Flavourist*. 4: 23-25.
- Brophy, J. J., Davies, N. W., Southwell, I. A., Stiff, I. A. and Williams, L. R., 1989. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J. Agric. Food Chem.* 37: 1330–1335.
- Cheel, E., 1924. Notes on *Melaleuca*, with descriptions of two new species and new variety. *Journal and proceedings of the Royal Society of New South Wales*. 58: 195.
- Hội đồng Dược điển, 2009. Dược điển Việt Nam IV. Nhà xuất bản Y học. Phụ lục 9.6, phụ lục 9.8, phụ lục 12.11, phụ lục 9.4.8, chuyên luận Tràm (Cành lá).
- Johns, M.R., Johns, J.E. and Rudolph, V., 1992. Steam Distillation of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil. *J. Sri. Food Agric.* 58: 49-53.
- Q Huynh, T D Phan, V Q Q Thieu, S T Tran and S H Do, 2012. Extraction and refining of essential oil from Australian tea tree, *Melaleuca alterforonia*, and the antimicrobial activity in cosmetic products. *Journal of Physics: Conference Series*. 352: 012053.
- Quang Tây, 2013. Phòng ngừa sâu răng cho bé, ngày truy cập 29/10/2015. Địa chỉ: <http://benhvienranghammat.vn/suc-khoe-rang-mieng/tre-em/phong-ngua-sau-rang-cho-be.aspx>.
- Rodney, J., Sahari, J. and Mohd Kamal Mohd Shah, 2015. Review: Tea Tree (*Melaleuca Alternifolia*) As A New Material For Biocomposites. *Journal of Applied Science and Agriculture*. 10(3): 21-39.
- Vincent, J. M., 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). XI u. 164 S. 10 Abb. 17 Tab. 7 Taf. Oxford-Edinburgh. Blackwell Scientific Publ. 45s.
- Walsh, L.J. and Longstaff, J., 1987. The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. *Periodontology*. 8: 11 – 15.
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3: 163 – 175.