

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

---

**Đơn vị chủ trì: Trường Đại học Nguyễn Tất Thành**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NCKH**  
**DÀNH CHO CÁN BỘ - GIẢNG VIÊN 2020**

**Tên đề tài: ỨNG DỤNG KHOA HỌC CÔNG NGHỆ XÂY DỰNG  
QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT TINH DẦU TỪ NGUỒN NGUYÊN  
LIỆU VỎ (CHANH KHÔNG HẠT, CHANH CÓ HẠT, CHANH  
TRÚC) Ở QUY MÔ SẢN XUẤT PILOT**

Số hợp đồng: 2020. 01. 138 /HĐ-KHCN

Chủ nhiệm đề tài: KS. Trần Thị Kim Ngân

Đơn vị công tác: Viện Kỹ Thuật Công nghệ cao NTT

Thời gian thực hiện: 06 tháng (Từ tháng 01/2020 đến tháng 06/2020)

*TP. Hồ Chí Minh, ngày 01 tháng 12 năm 2020*

**Đơn vị chủ trì: Trường Đại học Nguyễn Tất Thành**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NCKH  
DÀNH CHO CÁN BỘ - GIẢNG VIÊN 2020**

**Tên đề tài: ỨNG DỤNG KHOA HỌC CÔNG NGHỆ XÂY DỰNG  
QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT TINH DẦU TỪ NGUỒN NGUYÊN  
LIỆU VỎ (CHANH KHÔNG HẠT, CHANH CÓ HẠT, CHANH  
TRÚC) Ở QUY MÔ SẢN XUẤT PILOT**

Số hợp đồng: 2020. 01. 138 /HĐ-KHCN

Chủ nhiệm đề tài: KS. Trần Thị Kim Ngân

Đơn vị công tác: Viện Kỹ Thuật Công nghệ cao NTT

Thời gian thực hiện: 06 tháng (Từ tháng 01/2020 đến tháng 06/2020)

Các thành viên phối hợp và cộng tác:

| <b>STT</b> | <b>Họ và tên</b>  | <b>Chuyên ngành</b> | <b>Cơ quan công tác</b> | <b>Ký tên</b> |
|------------|-------------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| 1          | Trần Thiện Hiền   | Hóa hữu cơ          | ĐH NTT                  |               |
| 2          | Ngô Thị Cẩm Quyên | Hóa dược            | ĐH NTT                  |               |
| 3          | Đào Tấn Phát      | Hóa dược            | ĐH NTT                  |               |

# MỤC LỤC

|   |      |
|---|------|
| DANH SÁCH HÌNH .....  | v    |
| DANH SÁCH BẢNG .....  | vii  |
| TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....  | viii |
| CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN.....   | 1    |
| 1.1. Tổng quan về tinh dầu.....   | 1    |
| 1.1.1. Đặc điểm cây chanh không hạt.....  | 1    |
| 1.1.2. Đặc điểm cây chanh có hạt.....   | 2    |
| 1.1.3. Đặc điểm cây chanh chúc.....   | 3    |
| 1.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu, luận giải mục tiêu và nội dung nghiên cứu.....   | 3    |
| 1.2.1. Ngoài nước .....   | 3    |
| 1.2.2. Trong nước .....   | 5    |
| 1.3. Luận giải về việc đặt ra mục tiêu và những nội dung, phạm vi/đối tượng cần nghiên cứu của đề tài .....                 | 7    |
| CHƯƠNG 2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU.....  | 11   |
| 2.1. Mục tiêu của đề tài:.....  | 11   |
| 2.2. Nguyên liệu và hóa chất.....   | 11   |
| 2.2.1. Nguyên liệu.....   | 11   |
| 2.2.2. Hóa chất .....   | 11   |
| 2.3. Nội dung nghiên cứu.....   | 11   |
| 2.3.1. Chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước trên quy mô pilot 11                               |      |
| 2.3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hóa của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) ..... | 14   |
| 2.3.3. Khảo sát yếu tố và điều kiện ảnh hưởng độ bền của các loại tinh dầu vỏ chanh.....                                    | 17   |
| Chương 3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.....   | 19   |
| 3.1. Chiết tách và phân tích thành phần hóa học vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot..... | 19   |
| 3.2. Đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc).....                   | 20   |
| 3.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc).....                     | 22   |
| 3.4. Điều kiện ảnh hưởng độ bền của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) .....                        | 25   |
| 3.4.1. Chanh có hạt .....   | 25   |
| 3.4.2. Chanh không hạt .....  | 28   |
| 3.4.3. Chanh chúc.....  | 32   |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 36 |
| 4.1. Kết luận.....                   | 36 |
| 4.2. Kiến nghị.....                  | 36 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO .....             | 37 |
| PHỤ LỤC.....                         | 44 |

## DANH SÁCH HÌNH

|  |    |
|--|----|
| Hình 1. 1 Quả chanh có hạt.....  | 2  |
| Hình 1. 2 Quả chanh không hạt .....  | 3  |
| Hình 1. 3 Quả chanh chóc.....  | 3  |
| Hình 2. 1 Sơ đồ chung cất tinh dầu.....  | 12 |
| Hình 2. 2 Thiết bị dự kiến chiết tách tinh dầu .....   | 13 |
| Hình 3. 1 Hiệu suất tinh dầu vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot.....   | 19 |
| Hình 3. 2 Biểu đồ biểu diễn khả năng bắt gốc tự do DPPH của các loại tinh dầu họ Citrus ở nồng độ 30 mg và vitamin C ở nồng độ 0.1 mg/ml.....  | 20 |
| Hình 3. 3 Biểu đồ biểu diễn khả năng bắt gốc tự do ABTS của các loại tinh dầu chanh ở nồng độ 30 mg và vitamin C ở nồng độ 0.1 mg/ml.....  | 21 |
| Hình 3. 4 Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh có hạt với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh có hạt; (C):Đối chứng âm tính H <sub>2</sub> O.....       | 23 |
| Hình 3. 5 Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh chóc với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh chóc; (C):Đối chứng âm tính H <sub>2</sub> O.....           | 23 |
| Hình 3. 6 Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh không hạt với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh không hạt; (C):Đối chứng âm tính H <sub>2</sub> O..... | 24 |
| Hình 3. 7 Sắc kí đồ của tinh dầu chanh có hạt.....   | 25 |
| Hình 3. 8 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau một tháng .....   | 27 |
| Hình 3. 9 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau hai tháng .....   | 27 |
| Hình 3. 10 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau ba tháng.....  | 27 |
| Hình 3. 11 Sắc kí đồ của tinh dầu chanh có hạt.....  | 28 |
| Hình 3. 12 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh không hạt sau một tháng..   | 30 |
| Hình 3. 13 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh không hạt sau ba tháng ....   | 30 |
| Hình 3. 14 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh không hạt sau ba tháng ....   | 31 |
| Hình 3. 15 Sắc kí đồ của tinh dầu chanh có hạt.....  | 32 |
| Hình 3. 16 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh chóc sau một tháng .....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| Hình 3. 17 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh chúc sau hai tháng..... | 34 |
| Hình 3. 18 Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh chúc sau ba tháng.....  | 35 |

## DANH SÁCH BẢNG

|  |    |
|--|----|
| Bảng 3. 1 Khả năng bắt gốc tự do DPPH .....                      | 20 |
| Bảng 3. 2 Khả năng bắt gốc tự do ABTS .....                      | 21 |
| Bảng 3. 3 Kết quả kháng khuẩn của 3 loại tinh dầu vỏ chanh ..... | 22 |
| Bảng 3. 4 Thành phần hóa học của tinh dầu chanh có hạt.....      | 25 |
| Bảng 3. 5 Thành phần hóa học của tinh dầu chanh không hạt.....   | 29 |
| Bảng 3. 6 Thành phần hóa học của tinh dầu chanh chóc .....       | 32 |

## TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### **Sản phẩm thực đạt được**

- Quy trình trích ly các loại tinh dầu vỏ chanh quy mô pilot
- Báo cáo đánh giá khả hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hóa của các loại tinh dầu vỏ chanh
- Bài báo khoa học

### **Sản phẩm đăng ký tại thuyết minh**

- Quy trình trích ly các loại tinh dầu vỏ chanh quy mô pilot
- Báo cáo đánh giá khả hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hóa của các loại tinh dầu vỏ chanh
- Bài báo khoa học



## MỞ ĐẦU

Vỏ các loài cây citrus: cam, chanh, bưởi... từ lâu đã được sử dụng để sản xuất tinh dầu ở các nước công nghiệp trên thới giới như Mỹ, Ý. Tinh dầu citrus có mùi thơm dễ chịu, hàm lượng limonen cao được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm và mỹ phẩm. Trong các nghiên cứu gần đây còn cho thấy limonen còn có tác dụng tán sỏi, phá khối u... Ngoài ra theo một vài nghiên cứu mới đây cho thấy thành phần của nước quả quất đã cô lại thành cao quất có chứa flavonoid, phytostereol, steroid, carotenoid... đặc biệt có chứa ankaloit được tính cao. Tinh dầu của cây ăn trái có mùi họ Citrus (họ cam chanh) có thành phần chính là D-limonene (chất có khả năng kháng khuẩn và chống oxi hóa cao) và các hợp chất khác nhau. Các đặc tính kháng khuẩn của tinh dầu đã được công nhận trong nhiều thế kỷ, với nhu cầu ngày càng tăng từ những thay đổi trong xu hướng tiêu dùng và tăng sự phân lập mầm bệnh kháng kháng sinh, cần phải tìm ra các chất diệt khuẩn dựa trên hóa chất. Tinh dầu từ các loại ăn trái có mùi họ Citrus chỉ để sử dụng trong thực phẩm mà còn được công nhận là an toàn và có tác dụng ức chế cả ở dạng dầu và hơi trực tiếp chống lại một loạt vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Nhóm các loại dầu này có thể cung cấp các chất chống khuẩn tự nhiên mà ngành công nghiệp thực phẩm yêu cầu phải đáp ứng cả các yêu cầu của nó và của người tiêu dùng. Việt Nam với điều kiện thiên nhiên nhiệt đới rất thuận lợi cho việc hình thành và phát triển các loại thực vật, trong đó các loại cây có chứa tinh dầu đang được khẳng định là dồi dào và độc đáo. Hiện tại, có một số cơ sở tại Việt Nam đã tiến hành chung cất lấy tinh dầu chanh và khi phân tích một số mẫu tinh dầu chanh trên thị trường cho thấy chất lượng tinh dầu chưa cao, một số thành phần chính trong tinh dầu có tỉ lệ thấp và không đạt một số tiêu chuẩn về tinh dầu theo quy định TCVN. Điều này hạn chế rất nhiều khả năng cung cấp tinh dầu chanh trên diện rộng hoặc làm nguyên liệu cho các cơ sở sản xuất mỹ phẩm, dược phẩm, hương liệu.

Chính vì thế, thu nhận tinh dầu từ vỏ quả và tìm được điều kiện bảo quản thích hợp để phát triển đa dạng các sản phẩm khác nhau và trích ly tinh dầu từ vỏ quả là giải pháp hiệu quả để tận dụng nguồn chanh thứ cấp có giá thành thấp, khó tiêu thụ tươi và chiếm tỷ trọng cao; đồng thời tạo ra sản phẩm có giá trị gia tăng cao, góp phần nâng cao giá trị kinh tế của cây chanh của địa phương, tạo thị trường ổn định cho nguyên liệu tiềm năng của tỉnh; từ đó xây dựng chuỗi liên kết sản xuất - tiêu thụ theo hướng bền vững, có đầu ra ổn định.

## CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

### 1.1. Tổng quan về tinh dầu

Tinh dầu gồm nhiều hợp chất dễ bay hơi ( chủ yếu là các terpen và các triterpenonit), có mùi đặc trưng tùy thuộc vào nguồn gốc cung cấp nguyên liệu tinh dầu. Hệ thực vật có tinh dầu khoảng 3000 loài, trong đó có 150- 200 loài có ý nghĩa công nghiệp.

Tinh dầu là hỗn hợp các chất hữu cơ tan lẫn vào nhau, có mùi đặc trưng. Ở nhiệt độ thường hầu hết tinh dầu ở thể lỏng, có khối lượng riêng bé hơn 1 (trừ một vài tinh dầu như quế, đinh hương...), không tan trong nước hoặc tan rất ít, nhưng lại hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ như ancol, ete, chất béo... Tinh dầu bay hơi với hơi nước, có vị cay và ngọt, nóng bỏng và có tính sát trùng mạnh.

Tinh dầu có hai loại: Nguyên chất và tinh dầu hỗn hợp.

Tinh dầu nguyên chất: Hoàn toàn không có độc tố không có chất bảo quản hóa học nên rất an toàn cho người sử dụng và mang lại kết quả nhanh khi điều trị. Tinh dầu xuất phát từ nhiều quốc gia.

Tinh dầu không nguyên chất được pha trộn với các loại tinh dầu khác nhau. Thành phần hóa học của tinh dầu gồm terpen và những dẫn xuất chứa oxi của terpen (như ancol, andehit, xeton, ete...). Mặc dù có nhiều cấu tử như vậy nhưng thường một vài cấu tử chính có giá trị và có mùi đặc trưng cho tinh dầu đó.

Phương pháp phổ biến để tách tinh dầu từ cây cỏ là chưng cất bằng lôi cuốn hơi nước. Nếu các chất trong tinh dầu bị phân hủy bằng chưng cất lôi cuốn hơi nước thì người ta sử dụng phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ (ví dụ như ete dầu hỏa, benzen...). Về mặt thực hành tinh dầu có thể xem như “một hỗn hợp thiên nhiên có mùi, phần lớn có nguồn gốc từ thực vật”, chỉ có một số ít nguồn gốc từ động vật. Tinh dầu được phân bố rộng trong hệ thực vật, đặc biệt tập trung một số họ như họ citrus, họ hoa tán, họ cúc, họ hoa môi, họ long não, họ sim, họ cam, họ gừng... Tinh dầu được chiết từ mọi bộ phận của cây như cánh hoa, lá, cành, rễ, vỏ trái, hạt, vỏ cây...

Tinh dầu chứa trong thực vật có thành phần không ổn định. Hàm lượng tinh dầu phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống, di truyền, đất trồng, phân bón, thời tiết, ánh sáng, thời điểm thu hoạch. Trong các bộ phận của cây hàm lượng tinh dầu cũng khác nhau. Cần phải hiểu biết như vậy để xác định thời gian thu hái cho hàm lượng tinh dầu nhiều nhất và chất lượng tốt nhất. Tinh dầu là sản phẩm cuối cùng của quá trình trao đổi chất và không được sử dụng trở lại cho hoạt động sống của cây.

#### 1.1.1. Đặc điểm cây chanh không hạt

Cây chúc - chanh Thái – Kaffir lime – hay còn gọi là chanh Kieffer, chanh Makrut, hoặc chanh Magrood, (Bai Ma-gkood, PewMa-gkrood) là một loài chanh bản địa của Lào, Campuchia, Thái Lan, Indonesia, Malaysia, Philippines và Việt Nam. Nó được sử dụng phổ biến trong ẩm thực Đông Nam Á, đặc biệt là trong ẩm thực Thái Lan. Lá của loại cây này là một gia vị đặc trưng làm nên một trong những tinh hoa của nền ẩm thực Thái - món Tom Yum nổi tiếng

toàn cầu. Chanh Thái – Chanh chúc là cây thân gỗ có độ cao từ nhỏ đến trung bình, cây trưởng thành có thể cao từ 2m đến 10m. Thân cây có gai ngang. Lá xoan xoan thuôn hay ngọn giáo, mép khía răng hay nguyên, chóp tròn hay lõm, có khi nhọn, màu xanh thẫm thùy kép, mọc đối, cuống lá có cánh rất rộng, có khi cũng to bằng phiến lá (tạo nên hình lá gần tương tự số 8 nên còn được gọi với tên "lá chanh số 8"), lá có tinh dầu, mùi thơm nồng. Toàn cây chanh chúc có tinh dầu rất thơm nên được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực từ ẩm thực, dược phẩm đến mỹ phẩm, trong đó bộ phận được sử dụng nhiều nhất trên cây là lá, và quả (với nước cốt, vỏ quả).



**Hình 1. 1** Quả chanh có hạt

### **1.1.2. Đặc điểm cây chanh có hạt**

Chanh Không Hạt (*Citrus latifolia*) được John T. Bearss lai tạo tại California, Mỹ vào năm 1895. Phân bố ở Việt Nam chủ yếu ở các tỉnh miền Nam. Cây cao từ 1 – 3 m, thường mọc xòe, tán rộng, thân có gai, lá hình trứng có mép răng cưa. Hoa chanh màu trắng ngả vàng, có gân màu tím nhạt, nở theo từng chùm. Quả chanh khi chín có màu xanh hoặc vàng, thịt quả có vị chua. Tép chanh mọc nước nằm xếp chồng lên nhau. Gần như tất cả các bộ phận của cây chanh đều mang một mùi thơm rất đặc trưng và khá đa dạng về chủng loại. Cây cho trái quanh năm, nên còn gọi là *chanh tứ quý* do loại chanh này cho ra trái quanh năm. Có thể cho năng suất quả 150 – 200 kg/năm/cây. Một ưu điểm nổi trội mà ít loại chanh nào có được. Chanh Không Hạt còn có sức kháng bệnh rất mạnh, nhất là không thấy bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh như các loại cây có múi khác. Cây dễ trồng và dễ chăm sóc. Tuy nhiên muốn đạt năng suất, chất lượng cao cần được cung cấp đầy đủ dinh dưỡng như những loại cây trồng khác.



**Hình 1. 2** Quả chanh không hạt

### **1.1.3. Đặc điểm cây chanh chúc**

Chanh có hạt (*Citrus aurantifolia*) Ở Việt Nam, điều kiện khí hậu đất đai rất thuận lợi cho việc phát triển các giống *Citrus*. Các loại chính yếu được trồng từ bắc vào nam trong các vườn cây ăn trái ở nông thôn các vùng Hà bắc, Hòa Bình, Hà Tây, Nghệ An, Hà Tĩnh, Nha Trang, Đồng Nai, Cần thơ. Quả chanh ta có kích thước nhỏ hơn, nhiều hạt hơn, hàm lượng axit cao hơn, mùi vị nồng hơn và vỏ mỏng hơn so với loại chanh không hạt (*Citrus latifolia*). Chanh ta được ưa chuộng vì mùi vị đặc trưng của nó so với các loại chanh khác - cụ thể là vị chua và đắng nồng hơn - và thường được dùng làm mứt cao cấp.



**Hình 1. 3** Quả chanh chúc

## **1.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu, luận giải mục tiêu và nội dung nghiên cứu**

### **1.2.1. Ngoài nước**

Chất thơm nói chung hay tinh dầu nói riêng đã gắn liền với cuộc sống và gắn liền với nền văn minh của nhân loại từ hàng nghìn năm nay. Tinh dầu vốn là những giọt rất nhỏ, tinh túy, cô đặc nhất của các loài thảo dược, đôi khi nó chỉ là những phân tử thơm được hình thành qua chức năng điều tiết trong các loại thân cây nó tạo nên sự hấp dẫn, quyến rũ, mang lại

sức sống, sự tươi tắn và tạo thêm sự phong phú cho cuộc sống. Nó là hỗn hợp các chất hữu cơ tan lẫn vào nhau, có mùi đặc trưng. Ở nhiệt độ thường tinh dầu hầu hết ở thể lỏng không tan trong nước hoặc tan rất ít, nhưng lại tan tốt trong dung môi hữu cơ như rượu ete, chất béo [1, 2]. Tinh dầu bay hơi với hơi nước, có vị cay và ngọt, nóng bỏng và có tính sát trùng mạnh. Tinh dầu được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp mỹ phẩm, đặc biệt là trong sản xuất các loại nước hoa khác nhau, sữa tắm, kem dưỡng tóc, dầu gội, và là thành phần của chất khử trùng và thuốc trừ sâu [3-5]. Các thành phần phenolic, hiện diện trong các loại tinh dầu, được biết là có hoạt tính kháng khuẩn và một số thường được công nhận là các chất an toàn; do đó, chúng được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn bản địa và các chất gây ô nhiễm [6]. Tinh dầu thực vật đã được sử dụng trong hàng ngàn năm để bảo quản thực phẩm, dược phẩm, thuốc thay thế và liệu pháp tự nhiên [7, 8]. Tinh dầu là hỗn hợp phức tạp của các hợp chất trọng lượng phân tử thấp được chiết xuất từ thực vật bằng cách chưng cất hơi nước và các dung môi khác nhau. Những chiết xuất của nó được hình thành bởi một sự kết hợp của hỗn hợp những hợp chất hóa học dễ bay hơi từ đơn giản đến phức tạp bao gồm các hợp chất nổi trội như terpene, aldehyde, alcohol và ketone. Đây là những hợp chất có nhiều trong thực vật.

Ở nhiệt độ thường, tinh dầu ở thể lỏng, trừ một số trường hợp như methol, camphor,... là ở thể rắn. Đa số tinh dầu không có màu hoặc có màu vàng nhạt, tinh dầu có vị cay và hắc, có một số tinh dầu nặng hơn nước như tinh dầu đinh hương, tinh dầu quế. Tỷ trọng thay đổi theo thành phần hóa học. Nếu tinh dầu có chứa thành phần chủ yếu là hydrocarbon terpenic thì tỷ trọng thấp, tinh dầu có hợp chất chứa oxy hoặc nhân thơm thì tỷ trọng cao hơn. Tinh dầu có chỉ số khúc xạ cao hay thấp tùy theo thành phần các chất chứa trong tinh dầu là no, không no hoặc có nhân thơm. Nếu tinh dầu có nhiều thành phần hay có nhiều đay nối đôi thì chỉ số khúc xạ cao.

Turek và Stintzing (2011b; 2012) cho thấy những thay đổi trong một số loại tinh dầu đã được thúc đẩy dưới tác động của ánh sáng, tuy nhiên, các loại dầu từ các loài thực vật khác nhau phản ứng khác nhau [9]. Dưới ảnh hưởng của ánh sáng, nhiệt độ, không khí, nước tinh dầu dễ bị oxy hóa và có thể bị nhựa hóa một phần. Độ ẩm đã được coi là một lý do có thể dẫn đến sự biến tính của tinh dầu [9]. Alcol trong tinh dầu bị oxy hóa thành aldehyd, aldehyd biến thành acid. Các hợp chất nối đôi dễ bị oxy hóa hoặc tham gia vào phản ứng cộng hợp. Các hợp chất ceton và aldehyd dễ bị aldol hóa tạo nhựa khi có sự hiện diện của kiềm. Nhiều thành phần có các nhóm chức khác nhau có thể tham gia các phản ứng, làm thay đổi tính chất của tinh dầu.

Trong một nghiên cứu khác, thành phần dễ bay hơi của vỏ *C. hystrix* ở Sri Lanka thu được bởi HS-SPME (Chiết xuất vi pha rắn Headspace) đã xác định tổng cộng 45 hợp chất. Các thành phần chính là Citronellal (12.267%),  $\alpha$ -pinene (9.244%), 3-Carene (18.310%), D-limonene (11,538%),  $\alpha$ -Cadinene (4.290%), Copaene (4.290%), linalool ( 4,020%), Caryophyllene (3,988%) và  $\gamma$ -Cadiene (3,544%), chiếm khoảng 71% tổng số hợp chất được phát hiện [10]. Các biến thể thuộc tính nội tại của *C. Hystrix* có thể chủ yếu là do các kỹ thuật chiết xuất khác nhau, điều kiện bảo quản, độ chín của quả hoặc các yếu tố môi trường và sự truyền khác nhau, giống cây trồng và các vùng khí hậu và địa lý khác nhau. Trong nghiên cứu của Jantan et al. (1996) đã tiến hành phân tích thành phần hóa học của các loại tinh dầu thuộc họ Citrus, được xác định trong vỏ của tinh dầu *C. hystrix* có thành phần chủ yếu là monoterpen (97,2%) trong đó

limonene (14,2%),  $\beta$ -pinene (39,3% %), terpinen-4-ol (8,9%) và citronellal (11,7%) là thành phần chính. Các monoterpen khác với số lượng đáng kể là: citronellol (3.0%),  $\alpha$ -terpineol (3.0%),  $\alpha$ -terpinene (2.4%),  $\alpha$ -pinene (2.0%) và linalool (1.9%). Mười bảy thành phần Sesquiterpenoid được xác định trong tinh dầu nhưng với số lượng nhỏ và chỉ chiếm 2,6% lượng tinh dầu [11]. Hongratanaworakit và Buchbauer (2007) đã sử dụng các nguyên liệu thô được thu thập từ Thái Lan, chiết xuất và phân tích tinh dầu *C. hystrix* chủ yếu bao gồm hydrocarbon monoterpen với  $\beta$ -pinene (30,73%) và Limonene (18,76%) là thành phần chính. Các thành phần nhỏ khác là  $\alpha$ -terpineol (8,35%), terpinene-4-ol (10,63%),  $\beta$ -terpinene (6,18%), terpinolene (5,09%) và  $\alpha$ -terpinene (5,09%) [12].

Trong khi đó, Loh et al. (2011) đã thử nghiệm trên lá của *C. hystrix*, các monoterpen oxy được tạo ra trong tinh dầu lá chanh Kaffir chứa khoảng 86,15% tổng lượng tinh dầu. Thành phần chính được đặc trưng bởi dầu lá chanh kaffir là  $\beta$ -citronellal, chiếm 66,85% tổng lượng dầu. Tiếp theo là linalool (3,90%), citronellol (1,76%) và  $\beta$ -citronellol (6,59%) [13]. Tương tự khi hàm lượng  $\beta$ -Citronellal chiếm 66,9% trong nghiên cứu của Othman et al (2016) [14]. Năm 2013, Norkaew et al đã sử dụng phương pháp chiết xuất carbon dioxide siêu tới hạn (SCDE) để chiết xuất tinh dầu, kết quả cho thấy các hợp chất chính thay đổi nhiều so với các phương pháp khác với  $\beta$ -Citronellal (1,33%),  $\beta$ -Citronellol (0,87%) và Nerolidol (2,0%) [15]. Cuối cùng, Haiyee et al. (2012) đã sử dụng phương pháp chiết chất lỏng có áp suất (PLE) để chiết, kết quả cho thấy  $\beta$ -Citronellal chiếm 25,87%,  $\beta$ -Citronellol 4,02%,  $\beta$ -Linalool 3,22%, Naphthalene 2,18%. Hàm lượng  $\beta$ -Citronellal trong nghiên cứu này cao hơn các nghiên cứu khác do tính chất của lò vi sóng, lò vi sóng có hiệu quả hơn đối với các hợp chất chứa oxy trong công thức phân tử, vì vậy hàm lượng  $\beta$ -Citronellal chiếm 81,427% [16].

Nghiên cứu 2006 Okonkwo và cộng sự đã thiết kế, xây dựng và chạy thử mô hình pilot để sản xuất các loại tinh dầu (0,864 l/h ) từ lá bạch đàn. Phân tích cho thấy tốc độ hơi nước đi qua lớp lá có thể lệch khỏi mối quan hệ tuyến tính với đường cong tùy thuộc vào khả năng tải. Một tỷ lệ sản xuất tinh dầu/lá  $3.0 \times 10^2$  ml/g đã thu được. Khi thiết kế một nhà máy thí điểm, bể chứa có kích thước 0,45 m diam và chiều dài 1,65 m [17].

Soto-Armenta (2017) Nghiên cứu về quy trình chưng cất hơi nước để lấy tinh dầu từ lá *Lippia graveolens* đã được đánh giá ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot. Các thông số được phân tích là lưu lượng hơi và độ xấp, ảnh hưởng của chúng đến năng suất chiết được xác định. Ảnh hưởng của dòng hơi được tìm thấy là một thông số quan trọng trong quá trình chưng cất hơi nước. Các chất chiết xuất thu được phân tích bởi GC-MS. Carvacrol, thymol và  $\beta$ -cymene tạo thành các thành phần chính của *L. graveolens* ở cả hai quy mô. Mô hình được thử nghiệm cho thấy phù hợp với dữ liệu thực nghiệm cho *L. graveolens*. Kết quả cho thấy năng suất lớn nhất (4,41%) thu được ở quy mô phòng thí nghiệm [19].

### 1.2.2. Trong nước

Hiện nay, tại nước ta có khá nhiều các đề tài nghiên cứu hay các luận văn tốt nghiệp, luận văn cao học trình bày về về nguồn gốc, các thành phần hóa học của cây họ Citrus cũng như các phương pháp chiết tách tinh dầu khác nhau. Cho đến nay, theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, các nghiên cứu trước đó hầu hết còn hạn chế tập trung vào yếu tố ảnh hưởng đến tính chất tinh

dầu ở các điều kiện khác nhau. Bên cạnh đó, chanh chóc cũng là nguồn nguyên liệu mới được phát hiện trở lại nên không có nhiều cứu đối với lại này, điều này cũng là nguyên nhân dẫn đến các công bố còn hạn chế trên dòng nguyên liệu này. Trần Thị Kim Ngân và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chiết tách tinh dầu từ vỏ chanh chóc bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước. Tinh dầu kaffir vôi (*Citrus hystrix* DC) trong nghiên cứu này cho các đặc tính hóa lý của nó và thành phần. Sản lượng tinh dầu đạt được 1,8%. Các thông số hóa lý bao gồm tỷ trọng trung bình (0,8587g/cm<sup>3</sup>), chỉ số este (4,203 mg KOH/g) và chỉ số axit (0,667 mgKOH/g). Tinh dầu chứa 20 thành phần chính trong đó thành phần chính là  $\beta$ -pinene (34,741%), sabinene (23,637%), D-limonene (19,08%), citronellal (8.181%) và  $\alpha$ -pinene (3.378%). Kết quả thu được cho thấy vỏ *Citrus hystrix* chứa lượng  $\alpha$ -pinene nhiều hơn trên một đơn vị thể tích tinh dầu. Kết quả cho thấy các thành phần hóa học khác nhau cũng như các tính chất hóa lý của tinh dầu bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường, phương pháp chiết xuất và mùa thu hoạch [19].

Đây là một trong những kết quả nghiên cứu thuộc đề tài cấp Bộ công Thương "Nghiên cứu xác định khả năng kháng một số nhóm vi sinh vật của tinh dầu Trúc (*Citrus hystrix*)" của Bùi Thanh Bình và cộng sự (2019). Bài báo trình bày kết quả khảo sát hàm lượng, các chỉ tiêu cảm quan, hóa lý và thành phần hóa học của tinh dầu vỏ trái và lá chóc (*Citrus hystrix*) trồng tại huyện Tri Tôn, An Giang được chiết tách bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Thành phần hóa học của tinh dầu được xác định bằng phương pháp GC-MS. Trong khi thành phần hóa học chính của tinh dầu vỏ là các hợp chất  $\beta$ -pinene (34,8 -36,6%), limonene (19,88-20,39%),  $\beta$ -phellandrene (22,70-24,12%), citronella (7,01-7,29%),  $\alpha$ -pinene (3,55 - 4,05%) và terpinene-4-ol (0,59-1,15%) thì thành phần hóa học chủ yếu của tinh dầu lá Trúc là Citronella (75,82-77,09%), Citronellol (13,03-15,50%) và Linalool (2,62-2,85%) [20].

Một số kết quả bước đầu về công nghệ chiết xuất và thành phần tinh dầu thu được từ vỏ chanh không hạt tại Việt Nam được công bố bởi nhóm nghiên cứu của trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh (Huỳnh Thị Kim Nguyệt và cộng sự, 2012; Lê Phạm Tấn Quốc và cộng sự, 2012). Đây là hai nghiên cứu nối tiếp nhau để xác định điều kiện chiết xuất tinh dầu vỏ chanh thích hợp bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước với quy mô phòng thí nghiệm (*Citrus latifolia*). Kết quả đã đề nghị sử dụng tỷ lệ nước và vỏ chanh là 6/1 (v/w), thời gian chưng cất 20 phút, hàm lượng tối ưu của tinh dầu thu được là 1 mL/50 g vỏ chanh tương đương 2% (w/w), với thành phần chính là limonene (56,62%),  $\gamma$ -Terpinene (13,2%),  $\beta$ -Pinene (11,51%) [21].

Trần Thiện Hiền và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chiết tách tinh dầu từ vỏ chanh ta (*Citrus aurantifolia*) bằng phương pháp chiết tách có sự hỗ trợ vi sóng, kết quả đã đề xuất một số thông số kỹ thuật của quy trình thu nhận tinh dầu là: vỏ chanh có kích thước 1 đến 2 mm, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:3 g/mL, thời gian chiết là 60 phút và công suất vi sóng 450 W; hiệu suất thu nhận tinh dầu đạt được là 2,4%. Kết quả GC-MS cho thấy D-Limonene là thành phần chính chiếm 71,898%, chiếm hàm lượng cao hơn so với báo cáo của các nghiên cứu trước đây [22].

Trong nghiên cứu 2018 của Đỗ Đình Nhật và cộng sự đã tiến hành quá trình chiết xuất tinh dầu gừng bằng phương pháp chưng cất nước ở qui mô pilot. Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu của qui trình chưng cất tinh dầu gừng đã được nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu

suất sản xuất và ứng dụng ở qui mô công nghiệp. Kết quả của nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi tinh dầu cao nhất là 0,4% (tính theo vật liệu tươi) khi nguyên liệu được chưng cất sau khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày được xử lý bằng ép đùn thời gian chưng cất là 150 phút tính từ giọt đầu tiên, tỉ lệ nguyên liệu nước là 1:2 (kg/l), nhiệt độ chưng cất là 130°C [23].

### **1.3. Luận giải về việc đặt ra mục tiêu và những nội dung, phạm vi/đối tượng cần nghiên cứu của đề tài**

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các nhà máy trong sản xuất dược phẩm ngày càng trở nên phổ biến. Các nghiên cứu khác nhau minh họa các hoạt động và hiệu quả của các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc. Tinh dầu, thu được từ các loài thực vật khác nhau đã được sử dụng và trong các ứng dụng thực tế và trong nhiều lĩnh vực sản xuất như hợp chất kháng khuẩn, thuốc và phụ gia thực phẩm [24-34]. Chanh thuộc họ Rutaceae được trồng chủ yếu ở các nước châu Á khác nhau như Việt Nam và Thái Lan [35]. Quả chanh có tiềm năng tuyệt vời trong nghiên cứu khoa học do sự hiện diện của một số lượng lớn các hợp chất hoạt tính sinh học có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa. Nghiên cứu trước đây cho thấy rằng có các hợp chất khác nhau thu được từ vỏ chanh *C. hystrix* tinh dầu như  $\alpha$ -pinene, myrcene, terpinolene, v.v, là một trong những thành phần quan trọng của chanh chúc, giúp ngăn ngừa các đặc tính gây ung thư và là chất chống ung thư [36, 37]. Quả chanh đóng một vai trò quan trọng trong các ứng dụng hương liệu và mỹ phẩm do các hoạt động kháng khuẩn của nó [38]. Chiết xuất trực tiếp với nước là một phương pháp chiết xuất phổ biến và phù hợp với hầu hết các vật liệu thực vật. Kỹ thuật này cũng không tốn kém và có tiềm năng thương mại hóa. Chất lượng của tinh dầu chanh chúc được ước tính dựa trên GC-MS [19]. Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã nhấn mạnh rằng tinh dầu có thể thu được từ lá chanh chúc, năng suất dầu được chiết xuất từ vỏ được chứng minh là cao hơn so với lá [39]. Mặt khác, khâu đánh giá độ bền tinh dầu khi sử dụng và ứng dụng trong các sản phẩm chưa được đề cập đến.

Trong những năm gần đây, những thực vật có chứa những hợp chất thơm hay những chiết xuất của chúng đã được chú ý và quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu cũng như người sử dụng bởi vì chúng có tác dụng sinh học liên quan đến an toàn sức khỏe và sự phát triển về thể chất cho người sử dụng. Những tính chất đó có được là do thành phần tinh dầu và thành phần chuyển hóa thứ cấp có trong thực vật. Tinh dầu được chiết xuất từ nhiều loại thực vật khác nhau không chỉ có riêng trong hoa mà còn cả các loại thảo dược, cây cối và cả một số loại nguyên liệu thực vật khác.

Trong công nghiệp, tinh dầu thường được chiết xuất từ lá cây tươi hoặc làm khô một phần bằng phương pháp chưng cất thủy phân là cách phổ biến nhất. Tinh dầu có thể được thu hồi từ thực vật bằng nhiều phương pháp chiết tách khác nhau, có thể chia thành hai loại là các phương pháp chiết tách truyền thống và các phương pháp chiết tách mới, hiện đại (Ali *et al.*, 2010). Các phương pháp truyền thống thường được sử dụng là chưng cất nước, chưng cất lôi cuốn hơi nước, chiết dung môi và phương pháp ép lạnh. Mỗi phương pháp có những ưu nhược điểm riêng. Các phương pháp chiết xuất mới, hiện đại ngày càng được phát triển để nâng cao hiệu suất thu hồi cũng như chất lượng tinh dầu. Các phương pháp mới này gồm có: Phương pháp chiết siêu tới hạn ( $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$ ); chiết kết hợp siêu âm, chiết kết hợp vi sóng (Gorinstein, 2004). Mặc dù có rất nhiều phương pháp chiết xuất tinh dầu mới ra đời, tuy nhiên, chiết xuất truyền thống như chưng cất (hydrodistillation) vẫn được sử dụng phổ biến đặc biệt là cho sản xuất quy



mô thương mại vì ưu điểm đơn giản, chi phí thấp.

Đã có nhiều nghiên cứu về khai thác dầu bằng phương pháp chưng cất để giải quyết vấn đề tách hiệu quả, thành phần và công dụng của tinh dầu (Lemes *et al.*, 2018). Trong quá trình chưng cất, nhiệt độ tăng làm tăng áp lực trong các cơ quan thực vật có chứa tinh dầu. Khi áp suất tăng lên trên một mức nhất định, các thành tế bào bị phá vỡ và tinh dầu được giải phóng. Một phần của tinh dầu được giải phóng từ bề mặt bên ngoài của các nguyên liệu thực vật, phần còn lại khuếch tán từ bên trong của nguyên liệu thực vật đến bề mặt bên ngoài của chúng. Sau đó, hơi nước mang đi tinh dầu từ bề mặt bên ngoài của các nguyên liệu thực vật. Cơ chế này là cơ sở để mô hình hóa động học của quá trình chưng cất tinh dầu.

Hiện nay, thảo mộc có chứa các hợp chất thơm và những chiết xuất được kiểm chứng về tính hiệu quả cũng như tính an toàn của chúng vào các ứng dụng về bảo quản trong lĩnh vực thực phẩm và mỹ phẩm. Tinh dầu từ họ Citrus có nhiều hoạt tính sinh học quý đã và đang được nhiều nhà khoa học và cơ sở sản xuất tập trung nghiên cứu về quy trình công nghệ, thành phần hoạt chất của tinh dầu. Năm 2005, Ana Cristina Atti-Santos và các cộng sự đã nghiên cứu chiết tách tinh dầu chanh giấy bằng phương pháp chưng cất trực tiếp và CO<sub>2</sub> siêu tới hạn. Hàm lượng citral trong tinh dầu sử dụng phương pháp chưng cất trực tiếp có tỷ lệ cao hơn phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn. Hiệu suất tinh dầu chanh thu được bằng phương pháp chưng cất trực tiếp là 5,45% w/w và phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn là 7,93% w/w. Trong đó, hàm lượng Limonene là thành phần chính chiếm 47.5% đối với phương pháp chưng cất trực tiếp và 48.9% với phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn (Ana *et al.*, 2005).

Gamarra *et al.* (2006) cũng đã tiến hành chiết tách tinh dầu chanh giấy (*Citrus aurantifolia*) thu được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước ở điều kiện bình thường (1,0 bar/25°C) trong thời gian 10 giờ. Tinh dầu sau khi thu được đã tiến hành phân tích GC-MS và xác định được khoảng 10 thành phần chính, là limonene (49,65704 mL/kg), p-cymene (1,56630 mL/kg), myrcene (1,26942 mL/kg) và bisabolene (2.29847 mL/kg) là các hợp chất quan trọng nhất. Hàm lượng aldehyd tăng đáng kể trong thời gian chưng cất. Sau 10 giờ chiết tách, tinh dầu đã xuất hiện hơn 3% hàm lượng aldehyd do phản ứng oxy hóa [40].

Năm 2012, Colecio-Juárez và các cộng sự đã tiến hành chiết tách tinh dầu quả chanh ngọt trong bốn giai đoạn trưởng thành khác nhau dựa vào màu sắc như: giai đoạn I (trái chanh có màu xanh đậm), giai đoạn II (trái chanh có màu xanh lục), giai đoạn III (trái chanh có màu xanh lục-vàng), và giai đoạn IV (trái chanh có màu vàng đậm). Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước được sử dụng và sau đó so sánh với phương pháp chiết xuất bằng dung môi hexane. Tổng cộng có 46 thành phần được tìm thấy trong tinh dầu quả chanh, trong đó nồng độ cao nhất của các hợp chất có mặt là các aldehyd như limonene, linalool, sabinene và bergamol có nhiều hơn so với các giống khác. Phương pháp trích ly tinh dầu chanh phù hợp là phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước, và nồng độ trong giai đoạn I và II cho hiệu suất thu tinh dầu cao nhất (0,65-1,46 mL/g), tuy nhiên hàm lượng từ thành phần chính là D-limonene là thấp chỉ chiếm 66,8%, nên tác giả đã chọn giai đoạn III phù hợp hơn về hiệu suất (0,59%) với hàm lượng d-limonene đạt 74,4%, bergamol với 8,23% và-pinene với 7,62% [41].

Năm 2014, Oladipupo và các cộng sự đã so sánh các thành phần hóa học có trong tinh

dầu chanh giấy và cam tại các vùng khác nhau của Lagos State, Nigeria. Sau khi vỏ chanh và cam được chiết tách trong điều kiện 2 giờ theo phương pháp chưng cất trực tiếp thu được tinh dầu và kiểm tra thành phần hóa học theo phương pháp GC-MS. Hợp chất chính của tinh dầu chanh *C. aurantifolia* từ vùng Ijanikin được đặc trưng bởi một lượng lớn oxit caryophyllene (32,2%), caryophylla-3(15),7(14)-dien-6-ol (30,0%),  $\alpha$ -pinene (7,9%) và 2,6-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol (7,3%); trong khi mẫu vùng Ikotun rất giàu limonene (44,7%) và geranial (38,2%). Tinh dầu của *C. reticulata* từ vùng Ijanikin có các hợp chất chính là pinocarvone (22,7%), trans-pinocarveol acetate (20,0%),  $\beta$ -thujone (12,8%) trong khi citronellal (38,1%), (Z)  $\beta$ -ocimene (25,9%), linalool (14,5%) và limonene (12,2%) là thành phần chính được xác định trong mẫu thu từ Ikotun [42].

Năm 2017, Razieh và Pejman cũng công bố trên tạp chí *Herba Polonica* về kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của các giai đoạn khác nhau lên hiệu suất và chất lượng của tinh dầu từ giống chanh Mexico với tên khoa học là *Citrus aurantifolia* (Christm.) được trồng tại Iran. Các loại tinh dầu từ vỏ của *C. aurantifolia* được thu thập trong ba giai đoạn phát triển. Giai đoạn I (vỏ xanh của quả chín vào tháng 7), giai đoạn II (màu vàng xanh vỏ của quả bán trưởng thành vào tháng 9) và giai đoạn III (vỏ màu vàng của quả trưởng thành vào tháng 11). Quy trình được thực hiện bằng cách sử dụng 80 g vỏ chanh được sấy khô và chiết tách tinh dầu bằng phương pháp thủy phân trong thời gian 3 giờ. Kết quả cho thấy hiệu suất thu tinh dầu (v/w%) lần lượt là 1,54%, 0,88% và 1,23% tương ứng với 3 giai đoạn phát triển của chanh. Tinh dầu thu được cao nhất ở giai đoạn I (1,54% v/w). Phân tích thành phần tinh dầu chỉ ra rằng limonene,  $\beta$ -pinene, geranial, neral và  $\gamma$ -terpinene là các hợp chất chính của tất cả các mẫu. Giai đoạn đầu tiên, tỷ lệ phần trăm cao nhất thuộc về limonene (39,38%), geranial (14,32%) và neral (11,01%). Mặt khác, tỷ lệ phần trăm cao nhất của  $\beta$ -pinene và  $\gamma$ -terpinene (lần lượt là 24,25% và 8,92%) được tìm thấy ở giai đoạn cuối. Từ kết quả này, Razieh và Pejman (2017) đã kết luận rằng thời gian thu hoạch có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng và lượng tinh dầu quả chanh [43].

Năm 2007, Ferhat và các cộng sự đã tiến hành so sánh 3 phương pháp chiết tách tinh dầu họ citrus (chanh ở vùng Eureka), bao gồm phương pháp chưng cất trực tiếp với nước, phương pháp chưng cất có sự hỗ trợ của vi sóng và phương pháp ép lạnh. Kết quả cho thấy trong phương pháp chưng cất có hỗ trợ của vi sóng, thời gian chiết xuất chỉ xảy ra trong 30 phút cho hiệu suất 0,24%; đối với phương pháp chưng cất trực tiếp với nước thì thời gian 3 giờ cho hiệu suất 0.21%; và hiệu suất 0.05% cho phương pháp ép lạnh. Tuy nhiên, khi kiểm tra thành phần hóa học của tinh dầu chanh thu được, phương pháp ép lạnh cho hàm lượng hợp chất chính là Limonen cao nhất (75,68%), trong khi limonene chỉ chiếm 69,65% khi sử dụng phương pháp chưng cất có hỗ trợ của vi sóng và 72,9% khi sử dụng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước [44].

Tại Việt Nam, giá trị của nguyên liệu chanh thay đổi với biên độ rất lớn theo từng thời điểm cụ thể do đó làm cho giá trị của sản phẩm này không ổn định và làm cho đời sống của người nông dân gặp nhiều khó khăn. Việc nâng cao giá trị kinh tế của các nông sản này được quan tâm, và sản xuất tinh dầu từ sản phẩm nông nghiệp này là một lựa chọn rất hứa hẹn, có thể nâng cao giá trị của các nông sản này. Các nghiên cứu về các phương pháp chiết xuất cũng như

tối ưu hóa các thông số công nghệ để thu hồi tinh dầu từ chanh chúc đã được thực hiện từ lâu. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu được thực hiện trong bình cầu, ở qui mô phòng thí nghiệm. Từ nghiên cứu ở qui mô phòng thí nghiệm đến việc áp dụng ở qui mô công nghiệp là một chặng đường dài. Sự khác biệt về qui mô sản xuất sẽ ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và chất lượng của các loại tinh dầu. Những nghiên cứu ở qui mô pilot là cần thiết để có thể dễ dàng áp dụng sản xuất trong thực tế. Do đó đề tài đã chọn và thực hiện nghiên cứu tinh dầu từ vỏ của các loại chanh ở qui mô pilot bằng phương pháp chưng cất. Nhìn chung, các kết quả đánh giá các phương pháp trích ly tinh dầu chanh cho thấy, đối với quy mô công nghiệp, phương pháp chưng cất với nước có tính khả thi cao, tuy nhiên, việc so sánh với phương pháp ép cũng cần được quan tâm, vì khi sử dụng phương pháp ép có ưu điểm là ngăn cản tác động của nhiệt độ cao đến một số hoạt chất trong tinh dầu, đồng thời, tùy vào mục đích sử dụng tinh dầu mà cần có sự đánh giá chi tiết thành phần hóa học của tinh dầu thu nhận được.

## CHƯƠNG 2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mục tiêu của đề tài:

Ứng dụng khoa học công nghệ xây dựng quy trình chiết suất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot:

- + Chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước trên quy mô pilot và phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc kí khí ghép phối phổ GC-MS.
- + Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của tinh dầu từ vỏ chanh
- + Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình bảo quản của các loại tinh dầu.

### 2.2. Nguyên liệu và hóa chất

#### 2.2.1. Nguyên liệu

Chanh không hạt được thu hái trực tiếp tại nhà vườn vào tháng 7 năm 2020 theo chỉ dẫn địa lý tại các vùng trồng phổ biến ở Hậu Giang (9 ° 45 ' 52,39 " N, 105 ° 38 ' 25,48 " E) và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Các mẫu chanh có hạt được sử dụng cho nghiên cứu này được thu thập tại vùng tỉnh Bến Tre (10°10'N, 106°30'E), nằm ở phía Tây Nam Việt Nam. Sau khi thu hái, chanh được rửa sạch để loại bỏ tạp chất, loại bỏ những quả bị dập, non, chọn những quả da nhẵn, căng mọng. Vỏ quả sau đó được tách ra và loại bỏ thịt. Vỏ sau khi xử lý sẽ được xay nhuyễn cho vào bình của thiết bị chiết.

Chanh chóc được thu hoạch và chọn lọc từ vùng biên giới tỉnh An Giang (tọa độ 10 ° 22'52 B 105 ° 25'12 D), nằm ở phía Tây Nam Việt Nam. Quả chín được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó, chanh được gọt vỏ, bỏ phần thịt và nghiền trong máy xay trong 10 giây để có kích thước xấp xỉ 0,5 mm (trung bình 1 kg chanh chóc bằng 0,5 kg vỏ).

#### 2.2.2. Hóa chất

- Nước cất
- Môi trường MHA
- Amoxicillin
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit) (ABTS)
- Vitamin C
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

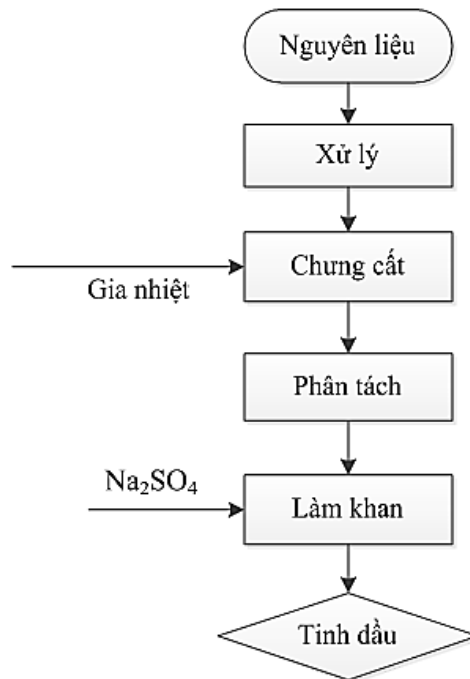
#### 2.3.1. Chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước trên quy mô pilot

Mục đích:

- Chiết xuất tinh dầu trên quy mô pilot
- Xác định thành phần hóa học của sản phẩm tinh dầu thu được từ vỏ chanh.

a. Phương pháp nghiên cứu:

❖ Phương pháp chưng cất trực tiếp với nước:



**Hình 2. 1** Sơ đồ chưng cất tinh dầu

Dựa vào hình 2.1, tiến hành lựa chọn các thiết bị dự kiến trong thí nghiệm này tương ứng với các giai đoạn (Hình 2.1) bao gồm:

- + Giai đoạn sơ chế nguyên liệu: máy xay công nghiệp
- + Giai đoạn chiết xuất: thiết bị chưng cất tinh dầu trực tiếp với nước.



Máy xay



Máy chưng cất tinh dầu

**Hình 2. 2** Thiết bị dự kiến chiết tách tinh dầu

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm thiết bị chưng cất có thể tích 50 lít gia nhiệt bằng dầu tải nhiệt năng suất nhập liệu từ 20-25 kg/m<sup>3</sup>. Thiết bị được làm bằng thép không gỉ và inox 304. Ngoài ra, thiết bị còn có hệ thống ngưng tụ bằng nước giải nhiệt, bộ phận thu hồi sản phẩm ngưng tụ, hệ thống cảm biến và điều khiển nhiệt độ đồng hồ áp suất. Thiết bị xử lý nguyên liệu gồm máy xay, năng suất 5 kg/phút.

❖ Phân tích GC-MS

Thành phần hóa học của tinh dầu được xác định bằng phân tích GC-MS sử dụng dụng cụ GC Agilent 6890 N kết hợp với cột HP5-MS và MS 5973 trơ. Áp lực của cột đầu là 9,3 psi. 25 tinh dầu tinh dầu được thêm vào với 1 ml n-hexan và khử nước bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tốc độ dòng không đổi ở mức 1 mL / phút. Nhiệt độ đầu phun là 250°C và tốc độ phân chia là 30. Chương trình nhiệt cho các mẫu: 50°C được giữ trong 2 phút tăng 2 °C/phút đến 80°C, tiếp tục tăng 5°C/phút đến 150°C, tiếp tục tăng 10°C / phút đến 200°C, tăng 20°C/ phút đến 300°C giữ trong 5 phút.

b. Sản phẩm dự kiến:

- Tinh dầu của vỏ chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc
- Sắc ký đồ và thành phần hóa học của các loại tinh dầu

c. Thời gian thực hiện: 2 tuần

d. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

Công việc 1: Chiết xuất tinh dầu trên quy mô pilot

Dựa vào kết quả thực nghiệm trên quy mô phòng thí nghiệm, tiến hành chưng cất tinh dầu ở quy mô pilot. Quy trình chưng cất tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) được thể hiện trong hình 2.1. Quả sau khi thu hoạch tiến hành xử lý sơ bộ, loại bỏ bụi bẩn, loại bỏ các nguyên liệu hư hỏng và tách riêng phần vỏ và thịt quả. 2kg nguyên liệu vỏ được xay nhỏ kích thước từ 1-3mm, cho vào bồn chứa, lượng nước được thêm vào phù hợp với từng thí nghiệm và cho vào hệ thống chưng cất với tỷ lệ 1:6 nguyên liệu/nước. Nhiệt độ chưng cất ở 150°C (bên trong thiết bị 100°C) và thời gian chưng cất được tính từ thời điểm giọt chất lỏng đầu tiên xuất hiện (sau 50 phút), cho đến khi lượng tinh dầu không đổi. Sau quá trình tách chiết tinh dầu ta thu được hỗn hợp gồm nước và tinh dầu sau khi đi qua thiết bị ngưng tụ để thu hồi tinh dầu. Tinh dầu thu được với một ít nước nên được làm khan bằng muối  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  để loại bỏ nước trong tinh dầu. Sau quá trình loại bỏ nước ta thu được tinh dầu tinh khiết.

Công việc 2: Gửi mẫu đo GC-MS

### **2.3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc)**

a. Mục đích: Khảo sát khả năng kháng khuẩn của các loại tinh dầu được chiết suất từ vỏ chanh, và phương pháp thu nhận gốc tự do DPPH, ABTS được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của một hợp chất.

b. Phương pháp nghiên cứu:

#### ❖ Hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch là phương pháp được sử dụng phổ biến trong các thí nghiệm, nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết dược liệu hiện nay phương pháp này được mô tả vào năm 1990 bởi Perez [45].

Cơ sở của phương pháp: Bơm mẫu thí nghiệm ở một nồng độ xác định vào giếng trên đĩa môi trường đã được trải sẵn vi sinh vật trên bề mặt, sau đó ủ đĩa để vi sinh tăng trưởng và phát triển, trong quá trình này dược liệu sẽ khuếch tán ra xung quanh giếng và ức chế sự tăng trưởng của vi sinh tạo nên vòng kháng khuẩn nếu mẫu thí nghiệm có tác dụng [46].

Trong quá trình khảo sát, kích thước của vòng kháng khuẩn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như nhiệt độ, thời gian, môi trường,.. Vì vậy cần phải cố định các yếu tố để đảm bảo kết quả là chính xác và khách quan, các yếu tố được cố định gồm: Môi trường Mueller Hinton Agar (MHA), thời gian ủ 16-18h ở nhiệt độ  $35 \pm 2$  °C, mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/ml [47].

#### ❖ Hoạt tính kháng oxy hóa

Sự oxy hóa là quá trình diễn ra trong cơ thể mà chủ yếu tại ty thể khi phân tử oxy được sử dụng để chuyển hóa tạo năng lượng ATP, trong đó electron được chuyển sang chất oxy hóa, kết quả của quá trình này tạo nên các gốc hoạt động như ROS, RNS,...[48].

Một phân tử hay nguyên tử mang một hoặc nhiều hơn một electron không bắt cặp trong orbital, những nguyên tử và phân tử này không bền vững có xu hướng lấy điện tử của một nguyên tử phân tử khác chúng được gọi là gốc tự do [49].

Gốc tự do được tạo ra thông qua các quá trình trong cơ thể mà chủ yếu là quá trình hô hấp. Ngoài ra, nó có thể được tạo ra bởi sự tác động của một số yếu tố bên ngoài như tia X, tia UV, các chất hóa học,... Có 3 kiểu gốc tự do điển hình là gốc oxy hóa oxy (ROS), gốc oxy hóa nitrogen (RNS) và gốc oxy hóa lưu huỳnh.

Chất kháng oxy hóa là những chất có khả năng tác động dẫn đến kìm hãm sự hình thành của gốc tự do, trung hòa các gốc tự do bằng cách oxy hóa chính nó. Có hai hệ thống kháng oxy hóa là hệ thống kháng oxy hóa nội tại và hệ thống kháng oxy hóa được bổ sung bên ngoài. Kháng oxy hóa bằng cách bổ sung: thông qua chế độ dinh dưỡng hàng ngày, bổ sung các thực phẩm chứa các chất chống oxy hóa, đây là một yếu tố quan trọng nhằm phần nào ngăn ngừa cũng như ngăn chặn quá trình oxy hóa diễn ra đồng thời cũng như hạn chế quá trình stress oxy hóa trong cơ thể. Một số chất cơ thể có khả năng tự tổng hợp nhưng không đủ đáp ứng cho nhu cầu sử dụng của cơ thể hoặc một phần các hợp chất cơ thể không thể tự tổng hợp được nên cần sự bổ sung từ bên ngoài.

➤ **Phương pháp bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

Phương pháp thu nhận gốc tự do DPPH được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của một hợp chất. Nguyên tắc của phương pháp này dựa vào gốc tự do ổn định điển hình trên phân tử DPPH\*, trong cấu trúc hóa học của phân tử DPPH tồn tại một electron tự do ở nguyên tử nitơ, gốc tự do này bền và ổn định đồng thời khi chất này tồn tại ở dạng gốc tự do hợp chất có màu tím đậm và dung dịch với dung môi ethanol có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng ánh sáng tím 517nm [50].

Đối với một đối tượng cần khảo sát về khả năng cho điện tử và kháng gốc tự oxy hóa tự do, khi thử với thuốc thử DPPH\*, DPPH\* sẽ có khuynh hướng nhận thêm một electron hoặc một nguyên tử hydro từ đối tượng cần kiểm tra để trở về trạng thái bền ban đầu. Khi đó màu tím đậm mất đi và chuyển sang màu vàng nhạt do sự tồn tại của gốc picryl trong phân tử. Thông qua sự giảm gốc oxy hóa tự do có thể gián tiếp xác định được khả năng kháng oxy hóa của đối tượng cần khảo sát nói chung và được liệu thử nghiệm nói riêng [49].

Trong thí nghiệm đánh giá khả năng bắt gốc DPPH\* mẫu đối chứng được sử dụng gồm dung môi pha loãng mẫu và dung dịch DPPH. Khi tiến hành xác định khả năng kháng oxy hóa của một chất cần phải có một đối tượng dùng làm chất chuẩn, thường được dùng là ascorbic axit (vitamin C).

Kết quả được tính dựa trên giá trị  $IC_{50}$ , giá trị  $IC_{50}$  được hiểu là hàm lượng mẫu trong 1ml dung dịch cần để làm giảm 50% DPPH so với ban đầu [51].

➤ **Phương pháp bắt gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit) (ABTS\*)**

Phương pháp này cũng là một trong những phương pháp xác định khả năng kháng oxy hóa của một chất hoặc hợp chất mang tính thường quy, phương pháp này được mô tả bởi Susannab L. Scott và cộng sự vào năm 1993 [52].

Cơ sở khoa học của phương pháp ABTS\* cũng tương tự như phương pháp sử dụng gốc tự do DPPH. Tuy nhiên sự khác biệt là ABTS được sử dụng thử cần phải được oxy hóa để tạo thành dạng ABTS8\* mang một electron tự do bởi potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ), ABTS ở dạng gốc tự do có màu xanh lam hoặc xanh lục có độ hấp thụ tối ưu ở bước sóng 734 nm, khi nhận thêm điện



tử electron trở về dạng ban đầu dẫn đến mất dần màu xanh, thông qua đó chúng ta có thể đánh giá được khả năng kháng oxy hóa của đối tượng cần kiểm chứng [53].

Cũng như phương pháp DPPH\* thì vitamin C cũng là chất sử dụng để làm chất đối chứng và các mẫu tinh dầu được pha loãng đến nồng độ xác định và tính giá trị giá trị %IC và mẫu đối chứng cũng gồm dung môi pha loãng và dung dịch ABTS\*.

c. Sản phẩm dự kiến:

– Kết quả được ghi nhận là đường kính vòng kháng khuẩn, vòng kháng khuẩn xuất hiện khi mẫu thử với các nồng độ khác nhau có khả năng ức chế sự phát triển của chủng vi sinh vật thử nghiệm.

– Kết quả được ghi nhận dựa trên giá trị %IC tại nồng độ pha loãng xác định .

d. Thời gian thực hiện: 1 tháng

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

❖ Hoạt chất kháng khuẩn

Quy trình thực hiện:

- Tất cả dụng cụ thí nghiệm và môi trường nuôi cấy được chuẩn bị và được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
- Hoạt hóa dịch khuẩn: Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy lắc trong 5ml môi trường Mueller Hinton Broth (MHB) trong khoảng thời gian từ 18 - 20 giờ ở nhiệt độ  $35 \pm 2$  °C. Sau đó được hiệu chỉnh đến giá trị Mc Farland 0.5 tương đương  $1 - 2.10^8$  bằng nước muối sinh lý NaCl 0.9%,
- Trải đĩa: 100 µl dịch canh khuẩn nồng độ  $10^8$  CFU/ml được bơm vào đĩa thạch MHA sau đó trải khuẩn đều lên bề mặt đĩa nuôi.
- Trong thí nghiệm này đường kính giếng được sử dụng là 6mm, ứng với 50 µl mẫu tinh dầu.
- Tinh dầu được sử dụng ở nồng độ 100%.
- Tetracyclin nồng độ 0.25 mg/ml được sử dụng làm chứng dương.
- Mức độ hoạt động được ghi nhận trong bốn cấp độ theo đường kính trong (D (mm)) của vùng ức chế, kết hợp đường kính của đĩa (6 mm):
  - +3 (hoạt động mạnh,  $D > 15$  mm)
  - +2 (hoạt động vừa phải,  $10 \text{ mm} \leq D \leq 14$  mm)
  - +1 (ít hoạt động,  $D \leq 9$  mm)
  - (-) (không hoạt động)
- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần
- ❖ Hoạt tính kháng oxy hóa
- Phương pháp bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Quy trình thực hiện:

Thử nghiệm chống oxi hóa DPPH\* được tiến hành theo phương pháp Bùi Thị Kim Lý và cộng sự với một vài sửa đổi [54]. Pha loãng tinh dầu đến khoảng nồng độ phù hợp, hút 1 ml tinh dầu mẫu đã pha loãng với methanol vào ống nghiệm. Mẫu đối chứng thay tinh dầu bằng methanol. Sau đó, hút thêm vào ống nghiệm 1,5 ml dung dịch DPPH\* 0.3 mM vào ống nghiệm và để trong bóng tối trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó đo độ hấp thụ quang học ở 517 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Vitamin C (acid ascorbic) được sử dụng làm chất chuẩn để so sánh. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH\* (IC %) được xác định dựa theo công thức:

$$IC (\%) = \frac{Abs_C - Abs_T}{Abs_C} \times 100 (1)$$

Trong đó:

Abs<sub>C</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng

Abs<sub>T</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu thử

- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần
- Phương pháp bắt gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit) (ABTS\*)

Quy trình thực hiện:

Dung dịch gốc tự do ABTS\* được chuẩn bị bằng cách cho 10ml dung dịch ABTS nồng độ 7,4 mM vào 10ml dung dịch K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> nồng độ 2,6 mM rồi ủ trong bóng tối trong 24 h, sau đó pha loãng bằng ethanol rồi điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm đến 1,1 ± 0,02. Pha loãng tinh dầu đến khoảng nồng độ phù hợp bằng methanol, hút 0,5ml tinh dầu đã pha loãng vào ống nghiệm. Mẫu đối chứng thay tinh dầu bằng methanol. Sau đó, hút thêm vào ống nghiệm 1,5 ml dung dịch ABTS\* (OD<sub>517 nm</sub> = 1,1 ± 0,02) vào ống nghiệm và để trong bóng tối trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở 734 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Vitamin C (acid ascorbic) được sử dụng làm chất để so sánh.

Hoạt tính khử gốc tự do ABTS\* (IC %) được xác định dựa theo công thức:

$$IC (\%) = \frac{Abs_C - Abs_T}{Abs_C} \times 100 (2)$$

Trong đó:

Abs<sub>C</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng

Abs<sub>T</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu thử

- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

### 2.3.3. Khảo sát yếu tố và điều kiện ảnh hưởng độ bền của các loại tinh dầu vỏ chanh

a. Mục đích:

- Xác định độ bền của thành phần hóa học của tinh dầu vỏ chanh sau thời gian bảo quản.
- So sánh sự thay đổi và biến tính giữa các loại tinh dầu trước và sau thời gian bảo quản.

b. Phương pháp nghiên cứu:

Để xác định ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến thành phần của tinh dầu trong quá

trình bảo quản, tinh dầu được phân tích ngay sau khi chiết xuất để hoạt động như một mẫu đối chứng. Các mẫu khác được chia đều và được lưu trữ trong lọ thủy tinh. Mỗi bộ các mẫu được lưu trữ ở bốn nhiệt độ và điều kiện ánh sáng khác nhau: giữ trực tiếp dưới ánh sáng ban ngày ở nhiệt độ phòng (25 °C), trong chai tối ở nhiệt độ phòng và tủ lạnh (4 °C) và tủ sấy (45 °C) trong 6 tháng liên tiếp. Phương pháp phân tích GC-MS được sử dụng để đánh giá sự thay đổi của các hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu, sau thời gian lưu trữ là 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng và 6 tháng.

c. Sản phẩm dự kiến: Sắc ký đồ và thành phần hóa học của tinh dầu lá và vỏ chanh sau thời gian bảo quản

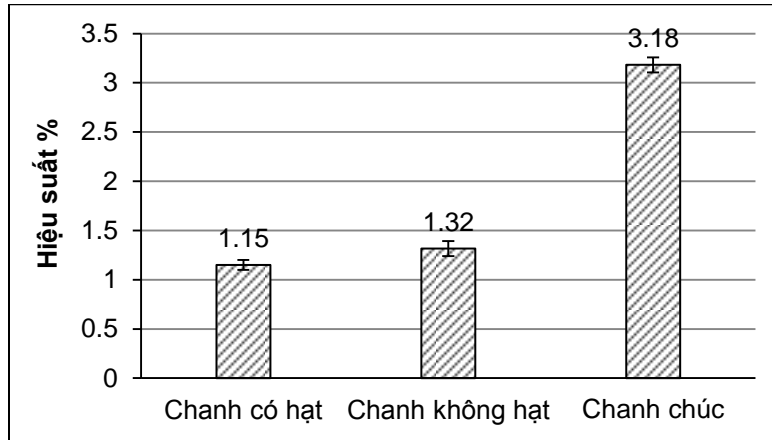
d. Thời gian thực hiện: 6 tháng (thời gian lưu trữ tinh dầu)

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

- Khảo sát các yếu tố: thời gian, nhiệt độ, ánh sáng (3 mẫu trong điều kiện)
  - + **Công việc 1:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện ánh sáng trực tiếp (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 2:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện trong tối (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 3:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện 4°C (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 4:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện 45°C (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
- Sau đó, đem mẫu xác định thành phần hóa học bằng phương pháp GC-MS.

### Chương 3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Chiết tách và phân tích thành phần hóa học vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot



**Hình 3. 1** Hiệu suất tinh dầu vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot

Dựa vào kết quả thực nghiệm trên quy mô phòng thí nghiệm, tiến hành chưng cất tinh dầu ở quy mô pilot. Quy trình chưng cất tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) được thể hiện trong hình 2.1. Quả sau khi thu hoạch tiến hành xử lý sơ bộ, loại bỏ bụi bẩn, loại bỏ các nguyên liệu hư hỏng và tách riêng phần vỏ và thịt quả. 2kg nguyên liệu vỏ được xay nhỏ kích thước từ 1-3mm, cho vào bồn chứa, lượng nước được thêm vào phù hợp với từng thí nghiệm và cho vào hệ thống chưng cất với tỷ lệ 1:6 nguyên liệu/nước. Nhiệt độ chưng cất ở 150°C (bên trong thiết bị 100°C) và thời gian chưng cất được tính từ thời điểm giọt chất lỏng đầu tiên xuất hiện (sau 50 phút), cho đến khi lượng tinh dầu không đổi. Kết quả trích ly tinh dầu từ các loại vỏ chanh được thể hiện qua biểu đồ hình 3.1. Dựa vào hình 3.1 cho thấy, hiệu suất thu được từ ba loại vỏ chanh có hạt (1.15 ml/g nguyên liệu tươi), chanh không hạt (1.32 ml/g nguyên liệu tươi) và chanh trúc (3.18 ml/g nguyên liệu tươi). Tinh dầu từ vỏ chanh trúc có hiệu suất gấp hai lần so với tinh dầu vỏ chanh có hạt và chanh không hạt. Sự khác nhau trong hàm lượng của tinh dầu giữa các loại chanh phụ thuộc vào đặc trưng riêng của từng nguyên liệu, điều kiện sinh trưởng, thổ nhưỡng và giai đoạn thu hái. Năm 2020 Ngô Thị Cẩm Quyên và cộng sự đã tiến hành ly trích tinh dầu vỏ chanh có hạt ở quy mô phòng thí nghiệm với hiệu suất 2,1%. Trong khi đó, Atti-Santos và nhóm cộng sự đã sử dụng thiết bị Clevenger chưng cất tinh dầu từ vỏ chanh không hạt tại phòng thí nghiệm, hàm lượng tinh dầu thu được đến 5,45% [55]. Mặt khác, *Citrus hystrix* được trồng ở Songkhla (Thái Lan) từ tháng 5 đến tháng 7 năm 2005, với hàm lượng 2,56% được thu hồi thông qua quá trình chưng cất hydro bởi Chanthaphon và cộng sự [56]. Năm 2006 Sreepian và cộng sự Năm 2006, Sreepian và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tinh dầu vỏ *Citrus hystrix* từ tỉnh Chiang Rai, nằm ở cực bắc của Thái Lan và được phân lập thông qua chưng cất hơi nước. Hiệu suất phần trăm của tinh dầu *C. hystrix* chiết xuất được là 2,5% (w/v).

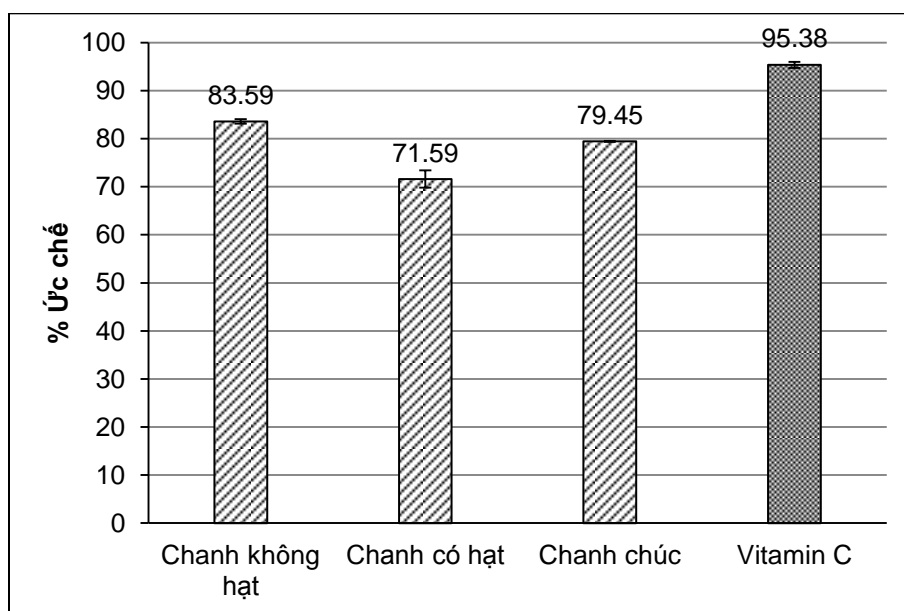
Tuy nhiên, mỗi loại nguyên liệu sẽ có những ưu nhược điểm khác nhau trong quá trình chiết suất. Quá trình chưng cất với nhiệt độ cao khi chiết xuất sẽ làm biến tính làm thay đổi thành phần hóa học của tinh dầu. Thời gian chưng cất phụ thuộc vào một số yếu tố như nguyên liệu thô, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ, kích thước mẫu... Thời gian chưng cất càng lâu thì

lượng tinh dầu càng cao. Tuy nhiên đến một khoảng thời gian nhất định lượng tinh dầu không tăng nữa, và nếu tiếp tục chưng cất có thể ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm, sản phẩm có khả năng bị biến tính và tiêu tốn một lượng năng lượng không cần thiết dẫn đến tăng chi phí. Do đó cần xác định thời gian chưng cất phù hợp. Khoảng thời gian chưng cất được tính từ giọt đầu tiên đến lượng tinh dầu thu được không thay đổi hoặc thay đổi không đáng kể.

### 3.2. Đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc)

**Bảng 3. 1** Khả năng bắt gốc tự do DPPH

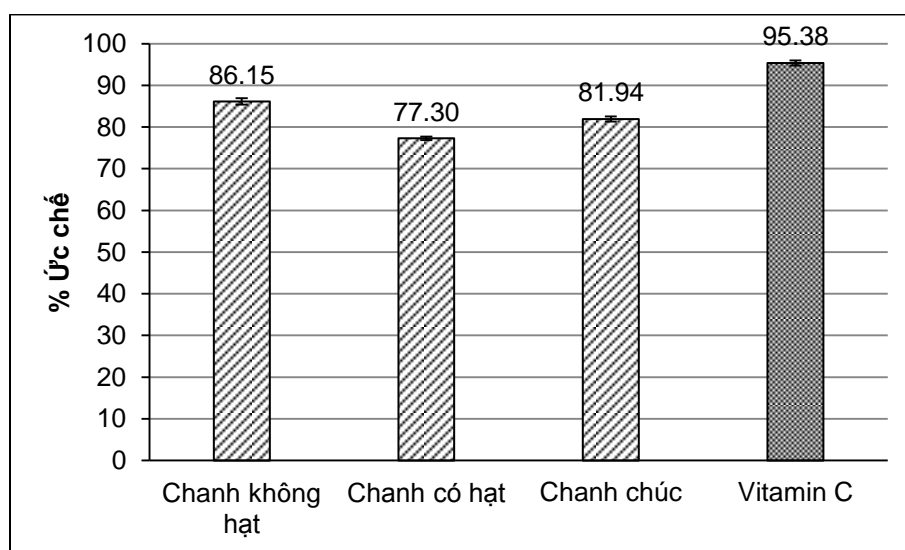
| STT | Tinh dầu        | Nồng độ (mg/ml) | % Ức Chế (%IC) |
|-----|-----------------|-----------------|----------------|
| 1   | Chanh không hạt | 30              | 83.59 ± 0.49   |
| 2   | Chanh có hạt    | 30              | 71.59 ± 1.81   |
| 3   | Chanh trúc      | 30              | 79.45 ± 0.12   |
| 4   | Vitamin C       | 1               | 95.38 ± 0.63   |



**Hình 3. 2** Biểu đồ biểu diễn khả năng bắt gốc tự do DPPH của các loại tinh dầu họ Citrus ở nồng độ 30 mg và vitamin C ở nồng độ 0.1 mg/ml

**Bảng 3. 2** Khả năng bắt gốc tự do ABTS

| STT | Tinh dầu        | Nồng độ<br>(mg/ml) | % Ức Chế<br>(%IC) |
|-----|-----------------|--------------------|-------------------|
| 1   | Chanh không hạt | 30                 | 86.15 ± 0.79      |
| 2   | Chanh có hạt    | 30                 | 77.30 ± 0.43      |
| 3   | Chanh chóc      | 30                 | 81.94 ± 0.63      |
| 4   | Vitamin C       | 1                  | 95.38 ± 0.63      |



**Hình 3. 3** Biểu đồ biểu diễn khả năng bắt gốc tự do ABTS của các loại tinh dầu chanh ở nồng độ 30 mg và vitamin C ở nồng độ 0.1 mg/ml

Việc quét các gốc tự do bằng các chất chống oxy hóa thường xảy ra thông qua hai cơ chế, liên quan đến việc chuyển nguyên tử hydro hoặc electron để chuyển gốc thành hợp chất bền. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành kiểm tra hiệu quả bắt gốc tự do DPPH và ABTS của tinh dầu vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh chóc).

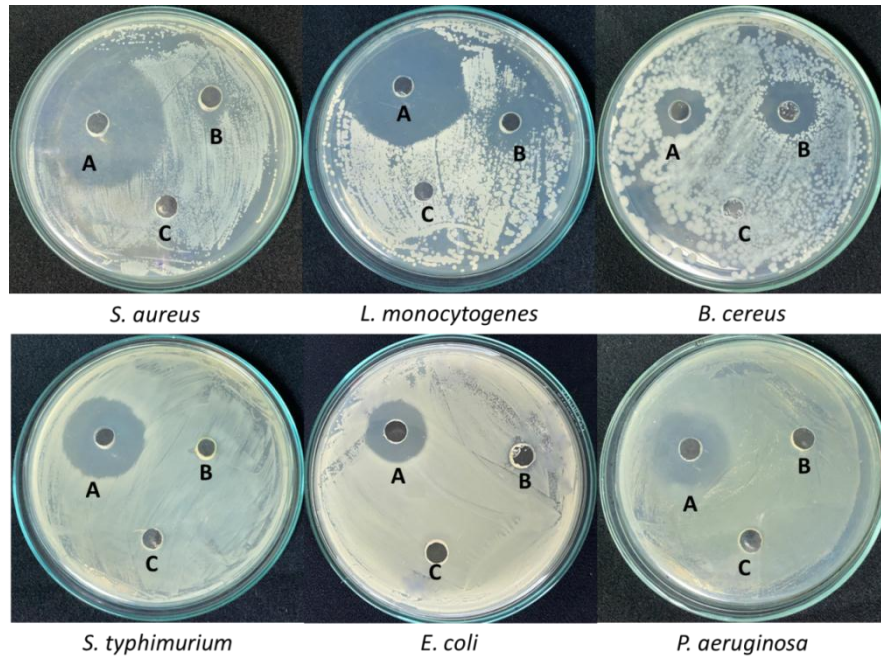
Các hoạt động loại bỏ gốc DPPH và ABTS được biểu thị bằng % ức chế được đưa ra trong bảng 3.2. Gốc DPPH là một hợp chất gốc tự do đã được sử dụng rộng rãi để kiểm tra khả năng loại bỏ gốc (Sakanaka et.al., 2005). Kết quả phân tích về khả năng kháng oxy hóa DPPH được thể hiện trong hình 1 và bảng 1. Cả 3 loại tinh dầu đều có hoạt tính chống oxy hóa tương đối cao được thể hiện qua hiệu quả bắt gốc tự do DPPH và ABTS với tinh dầu chanh không hạt cao nhất ( $83.59 \pm 0.49$  % và  $86.15 \pm 0.79$  %), tiếp theo chanh chóc ( $79.45 \pm 0.12$  và  $81.94 \pm 0.63$ ) và chanh có hạt ( $71.59 \pm 1.81$  và  $77.30 \pm 0.43$ ) yếu hơn so với các loại khác. Một số nghiên cứu đã khuyến nghị việc sử dụng các tinh dầu trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm như là chất chống oxy hóa tự nhiên vì sự kết hợp của các hoạt động chống oxy hóa đầy hứa hẹn của chúng và cấu hình độc chất tương đối an toàn. Năm 2000, Choi et al. đã thử nghiệm hoạt tính

chống oxy hóa của 31 loại tinh dầu từ trái cây họ cam quýt và thấy chúng là chất chống oxy hóa tương tự hoặc tốt hơn Trolox. Được khuyến khích bởi những nghiên cứu này và các nghiên cứu khác, một phương pháp thử nghiệm in vitro đơn giản và đáng tin cậy sử dụng các gốc tự do DPPH đã được sử dụng để khảo sát chất chống oxy hóa tiềm năng của tinh dầu được điều chế bởi lá chanh từ vùng Al-Sharqia. Hoạt động chống oxy hóa đáng kể của tinh dầu được thử nghiệm có thể liên quan đến sự hiện diện của monoterpen, đặc biệt là limonene và  $\gamma$ -terpinene, là những hợp chất chính của tinh dầu và đã được báo cáo là có hoạt tính chống oxy hóa tốt [57].

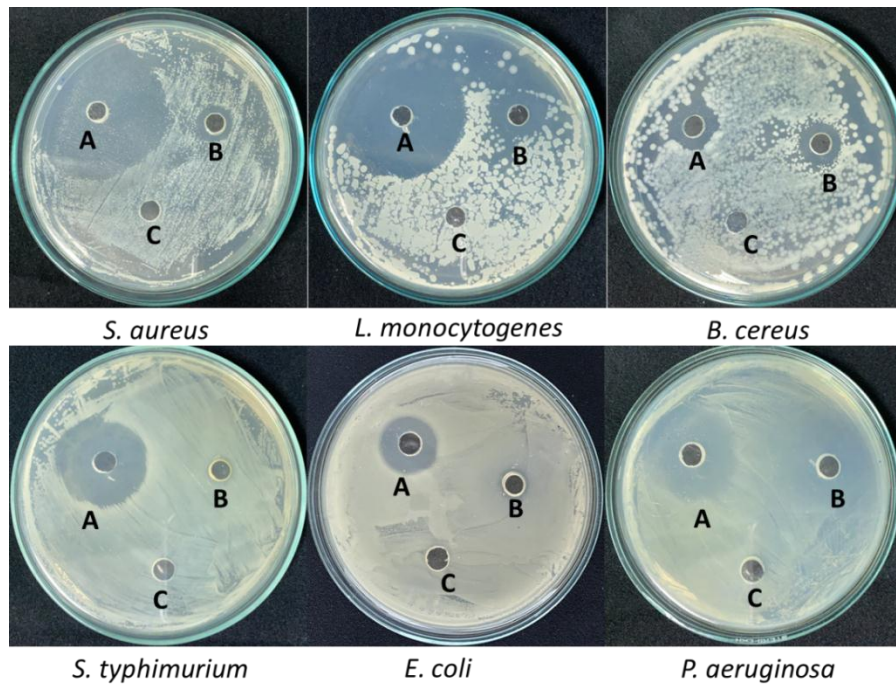
### 3.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc)

**Bảng 3. 3** Kết quả kháng khuẩn của 3 loại tinh dầu vỏ chanh

| STT | Chủng vi khuẩn                      | Chanh có hạt | Chanh không hạt | Chanh trúc | Amoxicillin 0,25 mg/ml |
|-----|-------------------------------------|--------------|-----------------|------------|------------------------|
| 1   | <i>S. aureus</i> NRRL B-313         | 10±0         | 14±0.57         | 12±0.57    | 41±1.66                |
| 2   | <i>L. monocytogenes</i> NRRL B-2354 | 18±0.6       | 18.6±0.6        | 17.3±0.33  | 39±0.33                |
| 3   | <i>B. cereus</i> ATCC 10876         | 13.3±0.88    | 14±0.88         | 12.6±0.33  | 11.6±0.66              |
| 4   | <i>S. typhimurium</i> YS1646        | -            | -               | -          | 27±0.57                |
| 5   | <i>E. coli</i> NRRL B-409           | -            | -               | -          | 15.3±0.33              |
| 6   | <i>P.aeruginosa</i> NRRL B-14781    | -            | -               | -          | 24.3±0.33              |

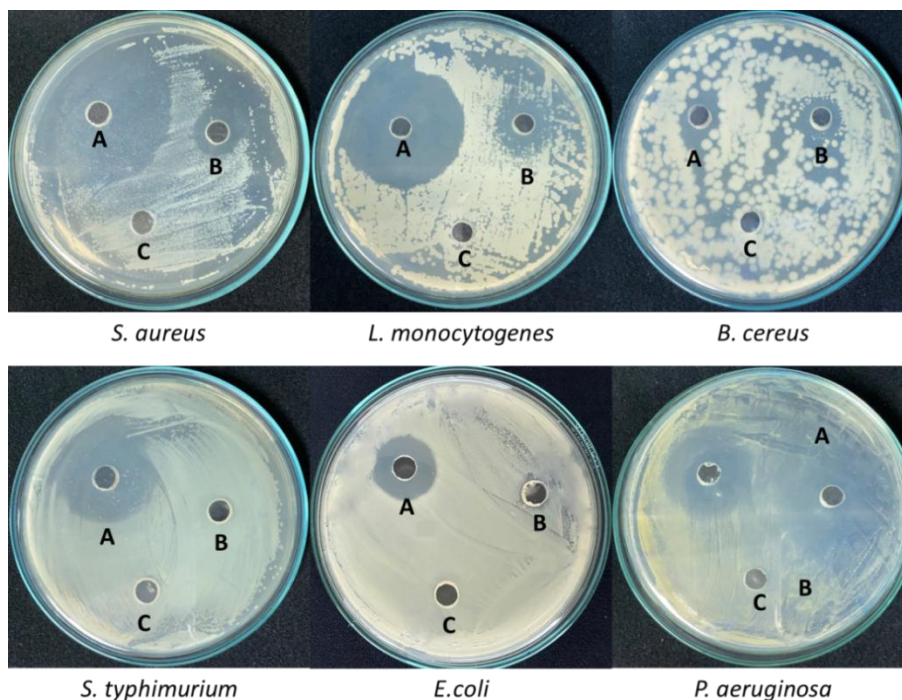


**Hình 3. 4** Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh có hạt với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh có hạt; (C):Đối chứng âm tính H<sub>2</sub>O.



**Hình 3. 5** Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh chóc với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh chóc; (C):Đối chứng âm tính H<sub>2</sub>O.





**Hình 3. 6** Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu chanh không hạt với sáu loại vi khuẩn được lựa chọn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch . (A): Đối chứng dương tính – Amoxicillin; (B): Tinh dầu chanh không hạt; (C):Đối chứng âm tính H<sub>2</sub>O.

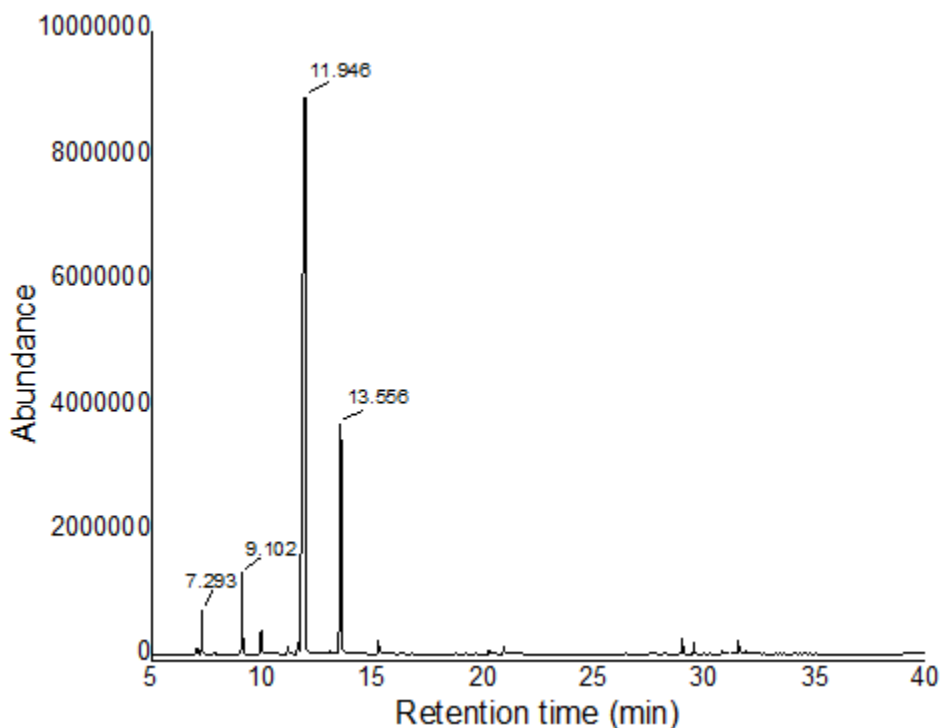
Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng khuẩn của các loại tinh dầu chanh đã được thử nghiệm chống lại một số vi khuẩn gram dương (*Bacillus Subilits*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*) và gram âm (*Escherichia coli*, *Samonella Typhimurium*, *Pseudomonas Aeruginosa*). Nồng độ của tinh dầu so với kháng sinh tiêu chuẩn (Amoxicillin), chúng cho thấy các hoạt động kháng khuẩn rõ rệt, được thể hiện qua các vùng ức chế của chúng (Hình 3.4, 5,6). Tuy nhiên, theo kết quả có thể đưa ra các nhận định như sau: Khả năng kháng khuẩn của hầu hết các loại tinh dầu chanh lên các chủng vi sinh vật gram dương tốt hơn so với các vi sinh vật gram âm. Kết quả thí nghiệm khuếch tán đĩa thạch cho thấy khả năng kháng một số chủng vi sinh vật thử nghiệm. Kết quả số liệu đường kính vòng kháng khuẩn được tổng hợp trong bảng 3.3. Cụ thể, tinh dầu chanh không hạt ( $14\pm0.57$ ,  $18.6\pm0.6$ ,  $14\pm0.88$ ), chanh có hạt ( $10\pm0$ ,  $18\pm0.6$ ,  $13.3\pm0.88$ ) và chanh chóc ( $12\pm0.57$ ,  $17.3\pm0.33$ ,  $12.6\pm0.33$ ) đều kháng lại 3 chủng vi khuẩn gram dương (*Staphylococcus Aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus Subilits*) tương ứng. Kết quả cho thấy tinh dầu họ Citrus hoạt động kháng khuẩn phổ rộng trên cả vi khuẩn gram dương có lẽ vì thành phần D- limonene. Hợp chất này đã được kiểm tra trước đây rằng, ngoài các tác dụng terpene phổ biến đối với các chủng Gram dương. Tất cả các mẫu đều cho thấy hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn gram dương với sự biến đổi của hoạt động kháng khuẩn tùy thuộc vào thành phần và hàm lượng của D-Limonene,  $\beta$ -Pinene và  $\gamma$ -terpineol trong tinh dầu [58].

Mặc khác, điều này có thể giải thích dựa trên cấu trúc khác nhau giữa tế bào vi sinh gram âm và gram dương, sự xuất hiện màng ngoài ở tế bào vi sinh gram âm cung cấp cho chúng một lớp bảo vệ tốt khỏi các bất lợi từ bên ngoài bao gồm các chất có tính kháng khuẩn. Cũng như các chất kháng sinh khác, các hợp chất kháng khuẩn cần xâm nhập vào trong tế bào để thực hiện được hoạt tính sinh học của mình và thường theo hai cách, thông qua màng lipid đối với các chất kỵ nước hay thông qua kênh thẩm thấu đối với các chất ưa nước. Ngoài ra, sự thay đổi trong chức năng của các phân tử porin trên màng ngoài cũng cho thấy sự giảm thẩm thấu đáng kể đối

với các chất kháng khuẩn tan trong nước ở vi khuẩn gram âm kháng kháng sinh [59]. Sự khác biệt này giữa nồng độ của tinh dầu và chất kháng sinh tiêu chuẩn có thể được giải thích là do các hoạt chất trong tinh dầu chỉ bao gồm một phần nhỏ tinh dầu được sử dụng. Do đó, nồng độ của các thành phần hoạt tính có thể thấp hơn nhiều so với kháng sinh tiêu chuẩn được sử dụng. Điều quan trọng cần lưu ý là, nếu các hoạt chất được phân lập và tinh chế, chúng sẽ có khả năng cho thấy các hoạt tính kháng khuẩn cao hơn các hoạt động được quan sát. Hoạt động của tinh dầu thay đổi theo nồng độ và loại vi khuẩn. Sự khác biệt về tính nhạy cảm của các sinh vật thử nghiệm đối với tinh dầu có thể do sự thay đổi tốc độ xâm nhập của các thành phần tinh dầu qua thành tế bào và cấu trúc màng tế bào. Hoạt tính kháng khuẩn này chống lại vi khuẩn và nấm cũng đã được chứng minh trong tinh dầu chiết xuất từ hạt loại chanh. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu có thể góp phần vào sự hiện diện của các hợp chất hoạt động, chẳng hạn như linalool,  $\alpha$ -pinen và  $\beta$ -pinen,  $\rho$ -cymene và  $\gamma$ -terpinene.

### 3.4. Điều kiện ảnh hưởng độ bền của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc)

#### 3.4.1. Chanh có hạt



**Hình 3. 7** Sắc kí đồ của tinh dầu chanh có hạt

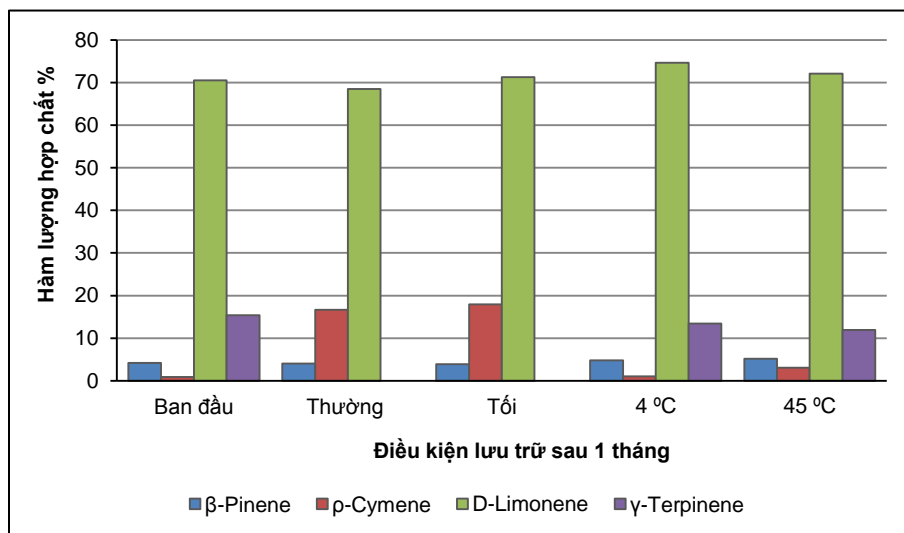
**Bảng 3. 4** Thành phần hóa học của tinh dầu chanh có hạt

| Peak | R.T.  | Name              | Pct Total |
|------|-------|-------------------|-----------|
| 1    | 7.063 | $\alpha$ -Thujene | 0.3       |
| 2    | 7.293 | $\alpha$ -Pinene  | 1.857     |
| 3    | 9.112 | $\beta$ -Pinene   | 4.225     |
| 4    | 9.97  | $\beta$ -Myrcene  | 1.502     |

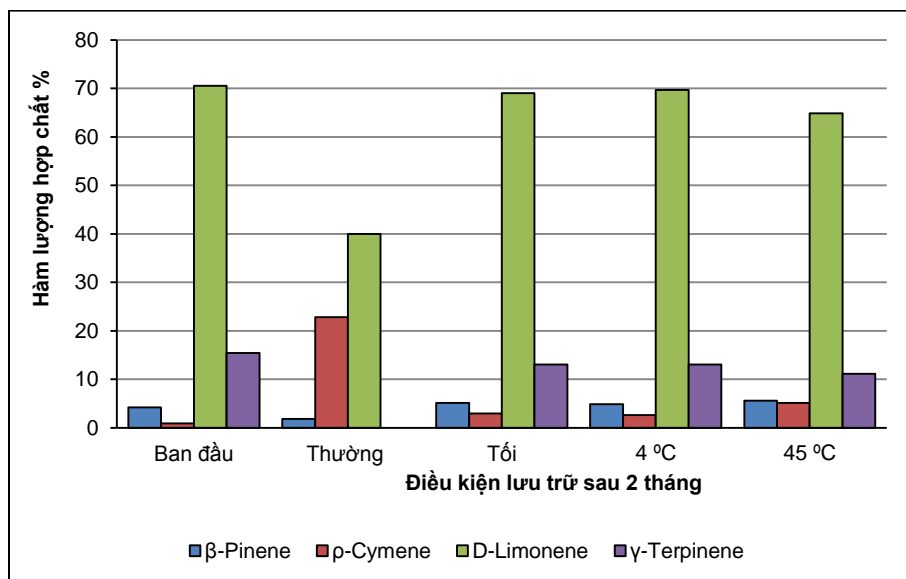
|    |        |                              |        |
|----|--------|------------------------------|--------|
| 5  | 11.172 | $\alpha$ -Terpinene          | 0.59   |
| 6  | 11.632 | $\beta$ -Cymene              | 0.869  |
| 7  | 11.946 | D-Limonene                   | 70.52  |
| 8  | 13.096 | $\beta$ -trans-Ocimene       | 0.311  |
| 9  | 13.556 | $\gamma$ -Terpinene          | 15.418 |
| 10 | 15.261 | Terpinolene                  | 1.078  |
| 11 | 20.27  | Terpinen-4-ol                | 0.386  |
| 12 | 20.928 | $\alpha$ -Terpineol          | 0.573  |
| 13 | 29.012 | Caryophyllene                | 0.689  |
| 14 | 29.503 | trans- $\alpha$ -Bergamotene | 0.511  |
| 15 | 30.789 | Germacrene D                 | 0.118  |
| 16 | 31.532 | $\beta$ -Bisabolene          | 0.853  |
| 17 | 31.887 | Cadina-3,9-diene             | 0.2    |

Dựa vào bảng 3.4, kết quả phân tích sắc kí khí khối phổ GC-MS của tinh dầu chanh có hạt đã xác định được 17 thành phần hóa học, trong đó D-limonene chiếm hàm lượng cao nhất (70.52%). Cùng với một số thành phần khác như  $\beta$ -Pinene (4.225%),  $p$ -Cymene (0.869%),  $\gamma$ -Terpinene (15.418%) có hàm lượng cũng tương đối cao trong tinh dầu. Ở quy mô phòng thí nghiệm, tinh dầu của *Citrus aurantifolia* (trang trại G. Corigliano, Bovalino, Italia), được chiết xuất bằng phương pháp thủy phân (Hydrodistillation), được phân tích bằng GC-MS bởi Spadaro và các cộng sự (2012). Các thành phần chính limonene (58,4%),  $\beta$ -pinen (15,4%),  $\gamma$ -terpinene (8,5%) và citral (4,4%) đã được chỉ ra.

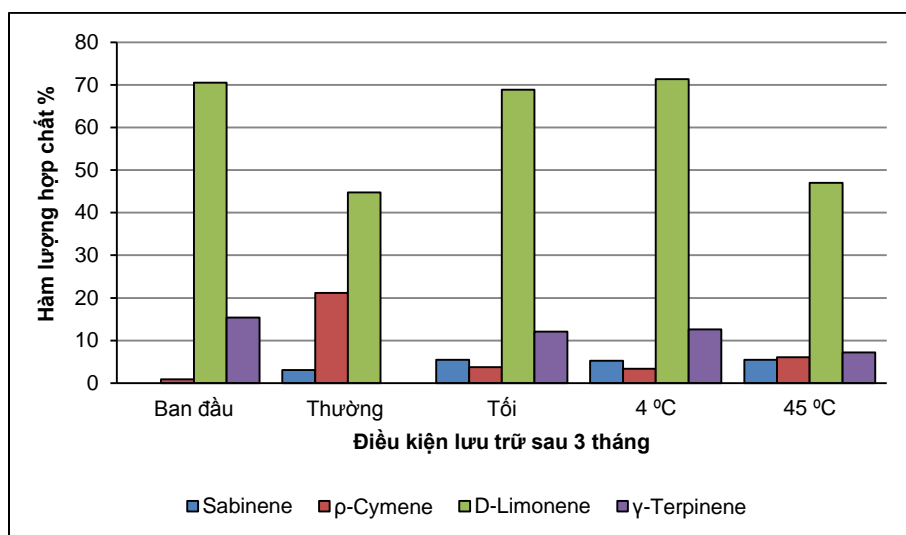
Asnaashari và nhóm nghiên cứu sử dụng nguồn nguyên liệu tinh dầu từ công ty Barij-Essence, Iran và phân tích GC-MS của tinh dầu *C. aurantifolia* đã dẫn đến việc xác định và định lượng khoảng 22 hợp chất chính, chiếm 88,85% tổng số thành phần. Limonene (28,27%) là thành phần chính, tiếp theo là  $\alpha$ -terpineol (19,61%),  $p$ -cymene (8,6%) và  $\beta$ -pinene (5,7%). Theo các nghiên cứu trước đây, khi nghiên cứu về các hoạt động của thành phần riêng lẻ trong tinh dầu họ *Citrus* là D-Limonene và  $\gamma$ -Terpinen là những chất có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm, ức chế tế bào ung thư cũng như tiềm năng kháng khuẩn mạnh [60, 61].



**Hình 3. 8** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau một tháng



**Hình 3. 9** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau hai tháng



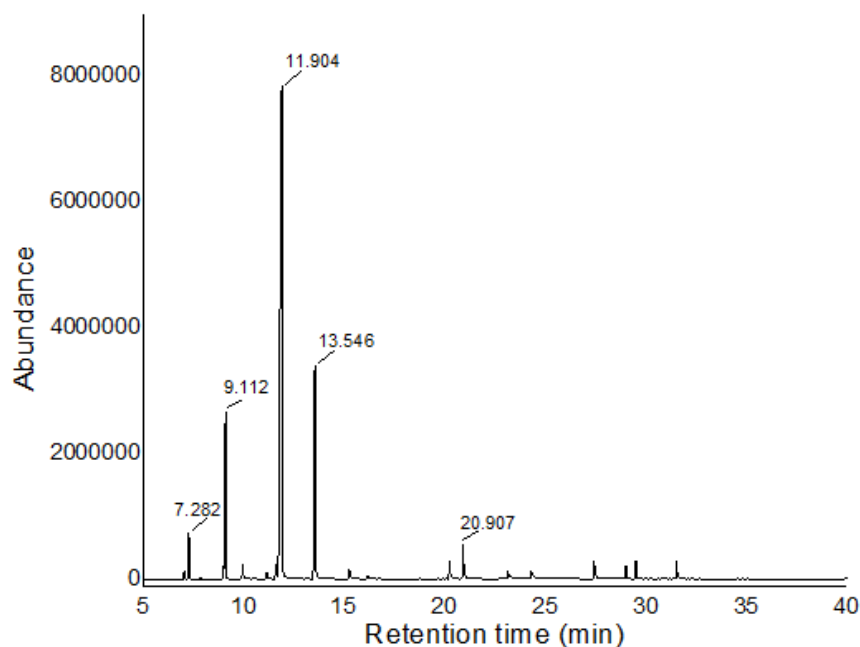
**Hình 3. 10** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh có hạt sau ba tháng

Dưới tác động của nhiệt độ, ánh sáng cũng như thời gian được coi là có tác dụng đẩy nhanh quá trình tự oxy hóa ảnh hưởng đến chất lượng của các loại tinh dầu trong suốt quá trình lưu trữ được thể hiện qua hình 3.8, 9 và 10. Tương ứng, tinh dầu chanh có hạt, được bảo quản trong bóng tối về cơ bản trải qua những thay đổi tương tự như khi bảo quản dưới ánh sáng, cụ thể là sự suy giảm  $\beta$ -pinene (4.086%), trong khi  $\gamma$ -terpinene không hiện diện trong tinh dầu và một số monoterpen cũng như sự gia tăng của  $\beta$ -cymene (17.958%) và D-limonene (71.264%) sau thời gian 1 tháng lưu trữ so với tinh dầu ban đầu trong điều kiện tối. Điều tương tự cũng đúng với tinh dầu khi lưu trữ tới tháng thứ 2 khi lượng  $\beta$ -pinene (1.817%), D-limonen (40.01) giảm ở

điều kiện thường cùng với sự gia tăng  $\beta$ -cymene (22.805%) đã được quan sát thấy. Có thể thấy rằng, những thay đổi về thành phần diễn ra nhanh hơn đáng kể khi có sự chiếu sáng. Đặc biệt là monoterpenes đã được chứng minh là phân hủy nhanh chóng dưới tác động của ánh sáng [62].

Nghiên cứu tương tự cũng báo cáo về các phản ứng biến đổi diễn ra trong quá trình bảo quản dưới điều kiện nhiệt độ 4°C và 45°C dẫn đến sự hình thành của một số thành phần phụ không xác định. Ở 4°C hàm lượng D-limonene (74.663%),  $\beta$ -pinen (4.806%) và  $\beta$ -Cymene (1.067%) đều có xu hướng tăng nhưng thành phần  $\gamma$ -Terpinene (13.473%) lại giảm sau tháng lưu trữ đầu tiên. Sự biến đổi của tinh dầu được thể hiện rõ nhất khi lưu trữ đến tháng thứ 2 và tháng thứ 3 ở các điều kiện khác nhau, kết quả phân tích đã cho thấy thành phần D-limonene và  $\gamma$ -Terpinene có xu hướng giảm mạnh trong khi  $\beta$ -pinene và  $\beta$ -Cymene đều tăng. Mặt khác, ở điều kiện tối các loại tinh dầu nên được bảo quản trong các hộp thủy tinh kín, tối ở nơi mát mẻ để đảm bảo chất lượng lâu dài. Theo các nghiên cứu trước đây về việc thay đổi thành phần của tinh dầu kinh giới trong quá trình bảo quản, trong những thay đổi đáng kể trong thành phần của tinh dầu đã được quan sát thấy khi lưu trữ trong hộp thủy tinh tối trong một năm và các đặc tính cảm quan của nó vẫn không bị ảnh hưởng. Trong khi đó lưu trữ nó trong hộp chứa ánh sáng gây ra để thay đổi thành phần của dầu, do biến đổi hóa học của terpenoids. Trong những thay đổi đáng kể về hàm lượng các chất trong bóng tối, có thể phụ thuộc vào cấu trúc và khả năng phản ứng của chúng. Quá trình oxy hóa các thành phần bền nhất của tinh dầu là quá trình chính [63]. Chỉ có vài nghiên cứu được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến tính ổn định của tinh dầu [63-65].

### 3.4.2. Chanh không hạt

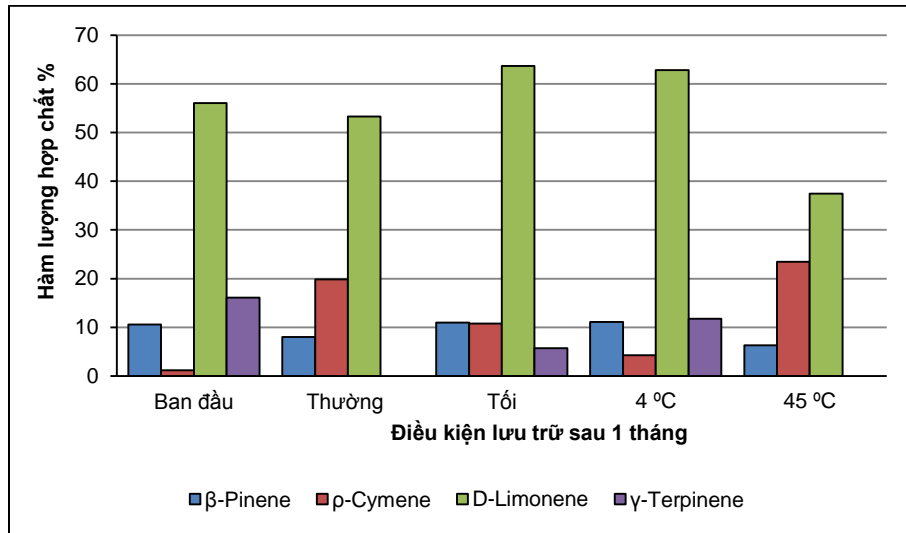


**Hình 3. 11** Sắc kí đồ của tinh dầu chanh không hạt

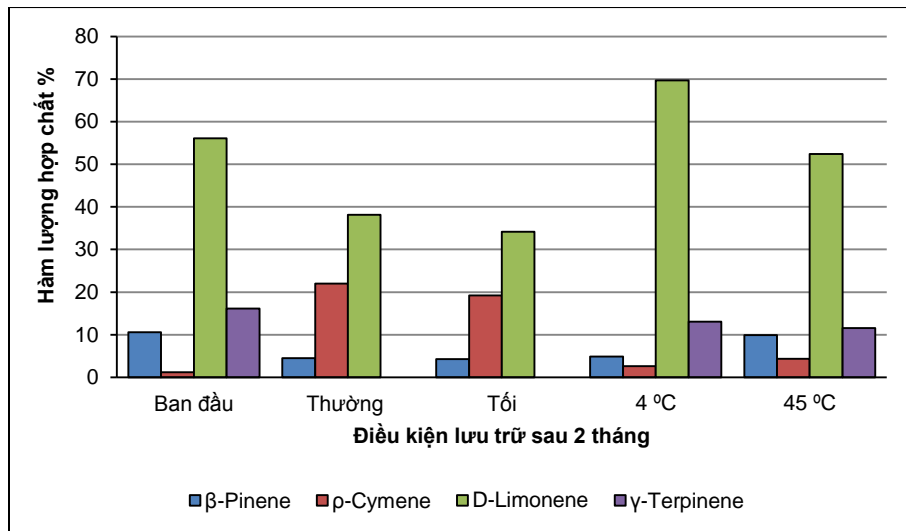
**Bảng 3. 5** Thành phần hóa học của tinh dầu chanh không hạt

| Peak | R.T.   | Name                         | Pct Total |
|------|--------|------------------------------|-----------|
| 1    | 7.063  | $\alpha$ -Thujene            | 0.467     |
| 2    | 7.282  | $\alpha$ -Pinene             | 2.206     |
| 3    | 7.878  | Camphene                     | 0.106     |
| 4    | 9.112  | $\beta$ -Pinene              | 10.581    |
| 5    | 9.959  | $\beta$ -Myrcene             | 1.207     |
| 6    | 11.162 | $\alpha$ -Terpinene          | 0.608     |
| 7    | 11.611 | $\beta$ -Cymene              | 1.138     |
| 8    | 11.894 | D-Limonene                   | 56.076    |
| 9    | 13.546 | $\gamma$ -Terpinene          | 16.108    |
| 10   | 15.261 | Terpinolene                  | 0.957     |
| 11   | 16.181 | Linalool                     | 0.341     |
| 12   | 20.238 | Terpinen-4-ol                | 1.379     |
| 13   | 20.907 | $\alpha$ -Terpineol          | 2.586     |
| 14   | 23.135 | $\beta$ -Citral              | 0.992     |
| 15   | 24.295 | $\alpha$ -Citral             | 1.174     |
| 16   | 27.433 | Nerol acetate                | 1.362     |
| 17   | 29.001 | Caryophyllene                | 0.65      |
| 18   | 29.503 | trans- $\alpha$ -Bergamotene | 0.992     |
| 19   | 31.521 | $\beta$ -Bisabolene          | 1.071     |

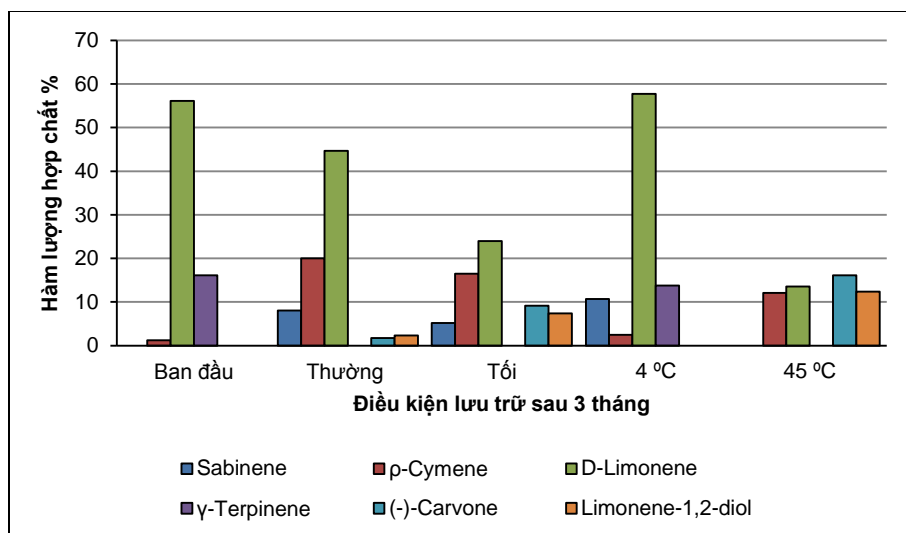
Kết quả phân tích tinh dầu chanh không hạt của quá trình chưng cất hydrodistillation được thể hiện trong bảng 3.5. Dựa vào bảng 3.5 cho thấy trong tinh dầu chanh có 19 chất chiếm từ 99% -100% . Thành phần chính trong tinh dầu là hydrocarbon monoterpene, chiếm hàm lượng cao như D-Limonene (56,076%),  $\beta$ -pinen (10.581%),  $\gamma$ -Terpinene (16,108%),  $\beta$ -Myrcene (1,207%) là hợp chất chính trong tinh dầu *C. latifolia*. Một số thành phần khác được xác định trong nghiên cứu này với hàm lượng <1%. Năm 2016, Nancy J. Ruiz-Pérez và các đồng nghiệp đã tiến hành nghiên cứu từ *C. latifolia* bằng cách sử dụng phương pháp chưng cất hydro. Các thành phần chính được xác định bởi GC-MS là D-limonene (51,64%),  $\beta$ -thujene (14,85%),  $\beta$ -pinene (12,79%) và  $\gamma$ -terpinene (12,8%) [66]. Mặc dù việc xác định thành phần định tính của *C. latifolia* tương tự như dữ liệu đã công bố trước đây [67], có một số khác biệt nhỏ về số lượng trong các biến thể trong điều kiện trồng trọt [68]. Trong khi đó, Pino et al. (2001) đã tiến hành phân tích một mẫu tinh dầu chanh từ Cuba để thu được các hợp chất chính như Limonene (55,6%),  $\gamma$ -terpinene (11,8%),  $\alpha$ -terpineol (6,6%), cis-p-terpineol (2,2 %) [69]. Tạp chí Nghiên cứu Tinh dầu (2002) cho thấy rằng tinh dầu được phân lập bằng cách thủy phân vỏ của quả *C. latifolia* được thu thập từ Ấn Độ. Limonene (49,2%),  $\beta$ -pinen (9,2%) và  $\alpha$ -terpinene (12,1%) là những thành phần chính trong tinh dầu vỏ của *C. latifolia* do Selavaraj et al. [70]. Raddatz-Mota và cộng sự. (2019) đã tiến hành chiết xuất bằng hơi nước và phân tích hóa học trên nguyên liệu là chanh từ Mexico, xác định các thành phần chính của tinh dầu chanh bằng cách phân tích hơn 90% các thành phần dễ bay hơi có mặt, cho thấy cấu trúc thơm tương tự nhau giữa các gốc được nghiên cứu . Các hợp chất hóa học chiếm ưu thế là  $\alpha$ - pinen (từ 11,7% đến 12,6%), limonene (từ 44,8% đến 47,6%) và  $\gamma$ -Terpinene (từ 10,5% đến 11,2%),  $\alpha$ -citral (từ 3,9% -4,4%) ) và  $\beta$ -citral (từ 3% -3,3%) [71].



**Hình 3. 12** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh khô hạt sau một tháng



**Hình 3. 13** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh khô hạt sau ba tháng

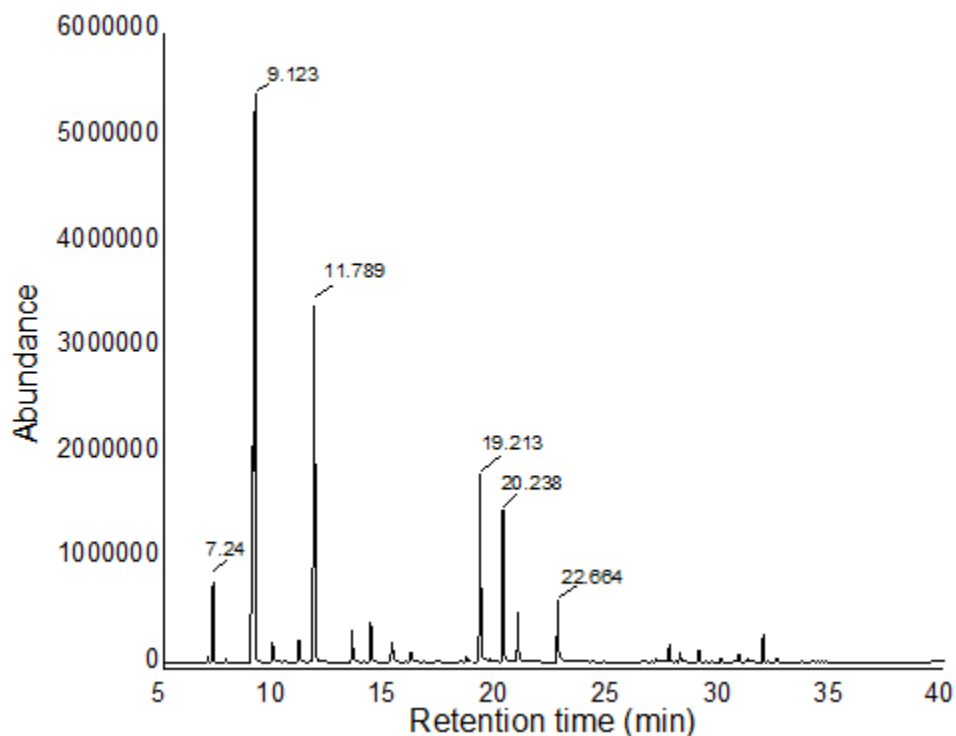


**Hình 3. 14** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh không hạt sau ba tháng

Quá trình oxy hóa tinh dầu tăng với nồng độ oxy hòa tan, do đó phụ thuộc phần lớn vào áp suất riêng phần của oxy trong không gian đầu cũng như nhiệt độ môi trường. Quá trình khuếch tán oxy vào mẫu diễn ra dần dần theo thời gian. Điều này cũng đúng đối với các hợp chất rửa giải muện có khối lượng phân tử cao hơn: các thay đổi xảy ra trong điều kiện lưu trữ khác nhau được thể hiện trong hình 3.12, 13 và 14 cho thấy cả xu hướng tăng và giảm đối với các hợp chất riêng lẻ. Điển hình như D-limonene ở điều kiện thường sau 2 tháng (38.179%) lưu trữ hàm lượng suy giảm mạnh, mặc dù có sự tăng nhẹ vào tháng thứ 3 (44.672%) nhưng vẫn giảm hơn rất nhiều so với ban đầu (56.076%). Xem xét các thông số phân tích khác nhau, tiết lộ rằng tính cách riêng biệt của các loại tinh dầu đáp ứng cả hai cách khác nhau và khác nhau phạm vi ánh sáng, nhiệt độ lưu trữ, cũng như sự sẵn có của oxy, phụ thuộc vào thành phần hóa học tương ứng. Sự thay đổi được thể hiện rõ nhất qua thành phần β-Cymene, hàm lượng tăng liên tục trong 4 điều kiện lưu trữ, đặc biệt ở điều kiện thường (19.822%, 22.007%, 19.9885%) và tối (10.793%, 19.222%, 16.4935) so với giai đoạn ban đầu (1.207%) tương ứng. Ngược lại, tinh dầu lưu trữ trong từ tháng 1 đến tháng thứ 3 dưới tác động của điều kiện nhiệt độ ở 4 °C thì hàm lượng D-limonen tăng mạnh (62.798%, 69.688%, 57.689%) tương ứng, so với 56.076% hàm lượng ban đầu. Điều này có thể dẫn đến thay đổi màu sắc, tăng độ nhớt hoặc hình thành mùi thơm khó chịu, thường sắc nét bởi sự thay đổi trong thành phần và tăng các hợp chất oxy hóa. Trong quá trình oxy hóa do tiếp xúc với không khí lâu dẫn đến các sản phẩm oxy hóa chính của D-limonene được xác định là (R)-(-)-carvone và hỗn hợp các đồng phân cis và trans của (+) - limonene oxide. Nhiệt độ môi trường ảnh hưởng rất lớn đến sự ổn định của tinh dầu trong một số khía cạnh. Do đó, cả quá trình tự oxy hóa cũng như phân hủy hydroperoxide đều có xu hướng tăng khi nhiệt độ tăng, thậm chí nhiều hơn vì nhiệt có thể góp phần vào sự hình thành ban đầu của các gốc tự do. Ngược lại, nhiệt độ thấp hơn có lợi cho khả năng hòa tan của oxy trong chất lỏng, do đó có thể ảnh hưởng tiêu cực đến sự ổn định của tinh dầu trong bối cảnh có sẵn oxy. Sự hình thành các hợp chất trung gian có thể là một lời giải thích hợp lý rằng các quá trình hóa học do quá trình bảo quản không phải lúc nào cũng tiến hành một chiều.



### 3.4.3. Chanh chúc



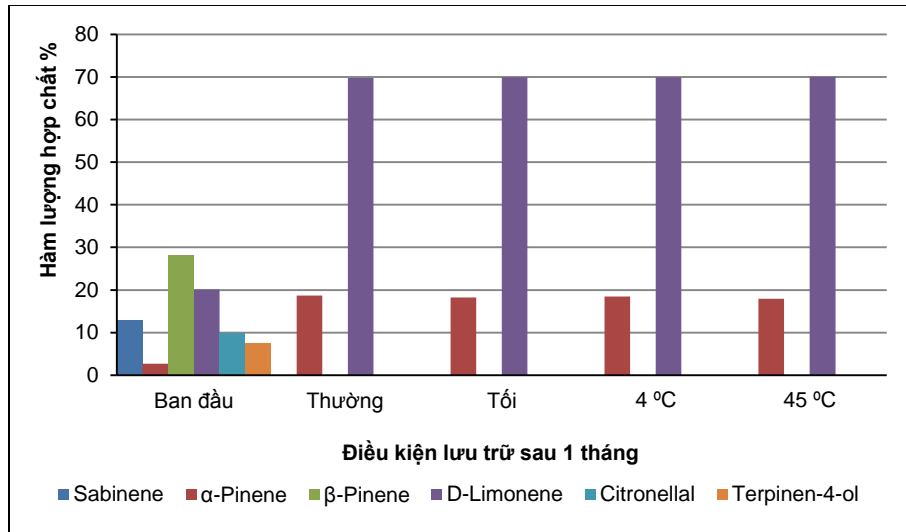
**Hình 3. 15** Sắc kí đồ của tinh dầu chanh có hạt

**Bảng 3. 6** Thành phần hóa học của tinh dầu chanh chúc

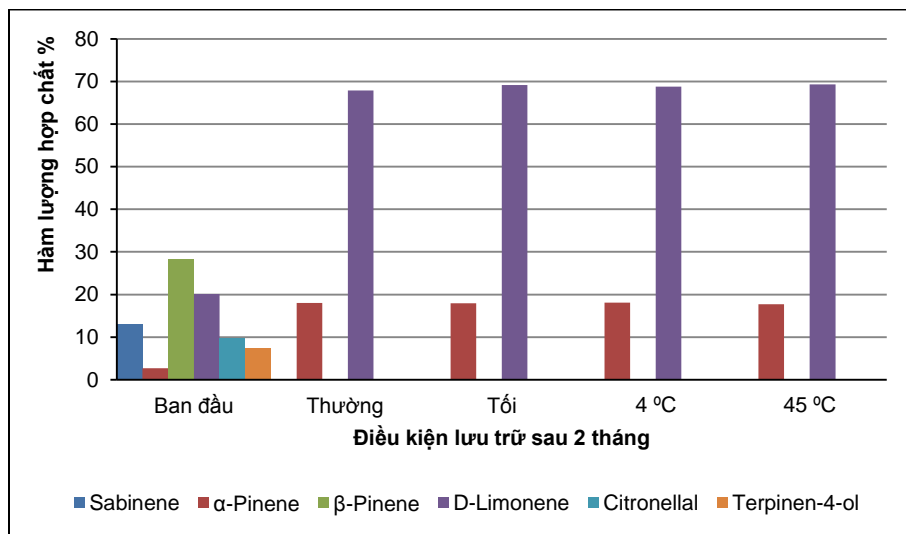
| Peak | R.T.   | Name                 | Pct Total |
|------|--------|----------------------|-----------|
| 1    | 7.021  | $\alpha$ -Thujene    | 0.207     |
| 2    | 7.24   | $\alpha$ -Pinene     | 2.699     |
| 3    | 7.826  | Camphene             | 0.172     |
| 4    | 9.018  | Sabinene             | 13.003    |
| 5    | 9.123  | $\beta$ -Pinene      | 28.221    |
| 6    | 9.907  | $\beta$ -Myrcene     | 1.031     |
| 7    | 11.099 | m-Cymene             | 1.199     |
| 8    | 11.789 | D-Limonene           | 20.121    |
| 9    | 13.473 | $\gamma$ -Terpinene  | 1.831     |
| 10   | 14.309 | cis-Linalool oxide   | 2.077     |
| 11   | 15.261 | trans-Linalool oxide | 1.462     |
| 12   | 16.108 | Linalool             | 0.682     |
| 13   | 17.258 | cis-2-p-Menthen-1-ol | 0.208     |
| 14   | 18.596 | Isopulegol           | 0.381     |
| 15   | 19.213 | Citronellal          | 9.777     |

|    |        |                                      |       |
|----|--------|--------------------------------------|-------|
| 16 | 19.632 | L-Borneol                            | 0.141 |
| 17 | 20.238 | Terpinen-4-ol                        | 7.464 |
| 18 | 20.887 | $\alpha$ -Terpineol                  | 2.551 |
| 19 | 22.675 | Citronellol                          | 3.125 |
| 20 | 27.098 | 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate | 0.272 |
| 21 | 27.673 | Copaene                              | 0.601 |
| 22 | 28.133 | $\beta$ -Cubebene                    | 0.348 |
| 23 | 28.196 | $\beta$ -Elemen                      | 0.224 |
| 24 | 29.001 | Caryophyllene                        | 0.46  |
| 25 | 29.995 | $\alpha$ -Caryophyllene              | 0.168 |
| 26 | 30.789 | Germacrene D                         | 0.352 |
| 27 | 31.208 | Elixene                              | 0.148 |
| 28 | 31.877 | $\delta$ -Cadinene                   | 0.894 |
| 29 | 32.483 | Elemol                               | 0.18  |

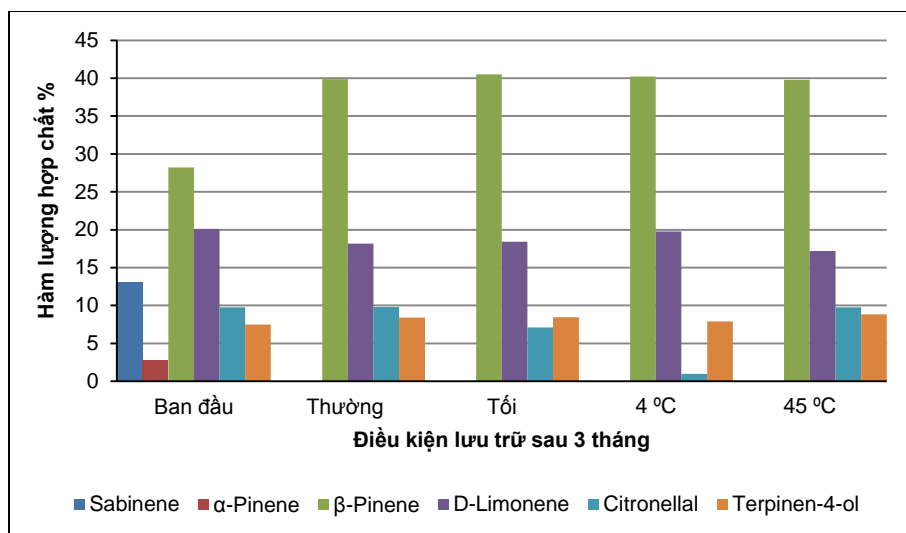
Bảng 3.6 liệt kê các chỉ số thời gian lưu, tên các hợp chất bay hơi và hàm lượng phần trăm của 29 thành phần đã xác định, chiếm khoảng 99,99% tổng số thành phần thu được từ vỏ của *C. hystrix* bằng phương pháp chưng cất. Các thành phần chính D-limonene (20,121%),  $\beta$ -pinen (28,221%) và Sabinene (13,003%) hydrocacbon monoterpene, trong khi citronellal (9,777%) và Terpinen-4-ol (7,464%) là thành phần của oxy monoterpene. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu khác, các hợp chất chính của tinh dầu vỏ *C. hystrix* ở vùng Pallepola, Sri Lanka được báo cáo bao gồm 3-Carene (18.310%), D-limonene (11.538%), Citronellal (12.267%),  $\alpha$ -Pinene (9.244%), Copaene (4.290%) và  $\alpha$ -Cadinene (4.290%), Caryophyllene (3.988%), Linalool (4.020%) và  $\gamma$ -Cadiene (3.544%), chiếm khoảng 71% tổng lượng các hợp chất được phát hiện [72]. Trong khi tinh dầu *C. hystrix* ở Banda Aceh ở tây bắc Indonesia cho thấy 30 hợp chất được xác định, bao gồm pin-pinen (23,03%), sabinene (13,37%), terpinene-4-ol (11,43%), limonene (10,59%) và sabinene (10,41%) [73]. Mặt khác, D-limonene (31,24%),  $\beta$ -pinen (13,81%), citronella (13,41%), terpinene-4-ol (8,28%), Citronellol (5,62%), Bicyclo [3,1.0] hexan , 4 -methylene-1-(1-methyletil) (7,18%),  $\gamma$ -Terpineol (3,63%) được chiết xuất từ dầu vỏ *C. hysstrix* thu thập từ Caringin Central Market, Bandung, Tây Java, Indonesia [74]. Chanthaphon và cộng sự đã thử nghiệm hai phương pháp chiết xuất etyl axetat và chưng cất bằng hydro để chiết xuất tinh dầu *C. hystrix*. Kết quả phân giải thành phần hóa học là hoàn toàn khác nhau, với chiết xuất etyl axetat là Limonene (31,64%),  $\beta$ -pinen (6,83%) và citronellal (25,99%), trong khi  $\beta$ -pinen (30,48%), citronellal (15,66%) và sabinene (22,75%) là thành phần chính của tinh dầu chưng cất [75]. Sự đa dạng của các hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu *C. hystrix* trong các đặc tính cấu thành của *C. hystrix* có thể chủ yếu là do các kỹ thuật khác nhau được sử dụng để chiết xuất. Ngoài ra, còn phụ thuộc vào điều kiện khí hậu, giai đoạn sinh trưởng của cây, thời gian thu hoạch [76]. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu *C. hystrix* được xác định bởi nhiều thành phần hoạt tính sinh học, mỗi thành phần có thể ảnh hưởng đến các nhóm vi sinh vật khác nhau. Hàm lượng khác nhau giữa các hợp chất là yếu tố quyết định giai thừa trong chất lượng của tinh dầu.



**Hình 3. 16** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu trữ mẫu đến tinh dầu chanh chúc sau một tháng



**Hình 3. 17** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu trữ mẫu đến tinh dầu chanh chúc sau hai tháng



**Hình 3. 18** Sự ảnh hưởng của điều kiện lưu mẫu đến tinh dầu chanh chúc sau ba tháng

Các đặc tính phân huỷ của các mẫu dầu chanh dưới các điều kiện tiêu chuẩn đã được đánh giá và nhận thấy rằng các mẫu của chúng tôi phù hợp với các xu hướng được báo cáo. Mẫu tinh dầu chanh chúc được giữ trong điều kiện thường, bóng tối, 4°C và 45°C và được phân tích bằng GC – MS sau 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng. Thành phần của tinh dầu và các mẫu đã lưu được thể hiện trong hình 3.16, 17 và 18. Các mẫu được bảo quản trong cả 4 điều kiện trong hai tháng cho thấy sự gia tăng đáng kể của α-Pinene (17.996%, 17.981%, 18.121% và 17.701%) và D-limonene (67.888%, 69.115%, 68.813% và 69.349%), trong khi một số thành phần Sabinene, β-Pinene, Citronellal và Terpinen-4-ol điều bị suy thoái trong giai đoạn này, những hợp chất được coi là những chất góp phần chính tạo nên hương vị chanh tươi. Các nghiên cứu thực nghiệm về tiềm năng nhạy cảm của limonene cho thấy các kết quả khác nhau. Trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phát hiện ra rằng khả năng nhạy cảm của D-limonene tăng lên khi tiếp xúc với không khí lâu. Nói chung, việc theo dõi các chất chiết xuất từ thực vật dễ bay hơi và thành phần tinh dầu đã chứng minh rằng tính ổn định mất đi khi thời gian bảo quản kéo dài cũng như sự tăng nhiệt độ từ 4 đến 45°C. Các hợp chất được hình thành thông qua các phản ứng kết thúc như polyme chỉ được tạo ra ở các giai đoạn oxy hóa sau đó và ở cuối của thời kỳ phản ứng, khi lượng oxy hoặc chất nền oxy hóa đã cạn kiệt. Điều này có thể dẫn đến thay đổi màu sắc, tăng độ nhớt hoặc hình thành mùi thơm khó chịu, thường sắc nét bởi sự thay đổi trong thành phần và tăng các hợp chất oxy hóa. Nhiệt độ môi trường ảnh hưởng rất lớn đến sự ổn định của tinh dầu trong một số khía cạnh. Vì vậy, không có gì ngạc nhiên khi các mẫu bảo quản trong giai đoạn cuối tháng thứ 3 trong một chai chứa một lượng không khí tối thiểu, cho thấy những thay đổi lớn hơn đáng kể với mất lượng lớn D-limonene, α-pinene, dẫn đến sự hình thành và gia tăng tương ứng của β-Pinene, Citronellal và Terpinen-4-ol.

## CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Qua nghiên cứu đề tài khảo sát thành phần hóa học từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh chóc) rút ra được các kết luận sau:

- Tiến hành ly trích được tinh dầu từ vỏ quả chanh bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước cổ điển ở quy mô pilot.
- Tinh dầu vỏ quả quýt thu được từ 3 loại chanh đều có màu vàng nhạt, vị cay, mang mùi thơm đặc trưng.
- Thành phần hóa học của tinh dầu chanh chủ yếu là các hydrocarbon terpenic với hoạt chất chính là D-Limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpineol, p-cymene và  $\beta$ -pinene, theo nghiên cứu ban đầu thì đây là thành phần hóa học có liên quan đến khả năng thể hiện hoạt tính của tinh dầu.
- Kết quả thử hoạt tính sinh học ba mẫu tinh dầu thu được từ các chanh khác nhau đều có khả năng kháng khuẩn với các chủng vi khuẩn là *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*, tuy nhiên mẫu tinh dầu thu được từ tinh dầu chanh không hạt có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn. Đồng thời, chanh không hạt cũng cho thấy hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với chanh có hạt và chanh chóc.
- Tiến hành khảo sát thành phần hóa học ngoài tinh dầu của vỏ ba loại chanh, trong điều kiện lưu trữ trực tiếp với ánh sáng, trong bóng tối, nhiệt độ 4°C và 45°C. Chỉ ra sự biến đổi về thành phần định tính và định lượng của mẫu tinh dầu. Tối ưu hóa quá trình lưu trữ ở 4°C và trong chai sẫm màu là ít biến đổi và có sự gia tăng nồng độ của các thành phần chính trong tinh dầu so với các điều kiện còn lại.

### 4.2. Kiến nghị

- Tinh dầu vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt và chanh chóc) có giá trị kinh tế cũng như giá trị sử dụng cao, tuy nhiên, ở nước ta, sản phẩm này chưa được ứng dụng sản xuất nhiều cũng như sử dụng nên cần triển khai nghiên cứu, ứng dụng tinh dầu vào các sản phẩm đời sống, làm tăng giá trị sử dụng của sản phẩm này.
- Tiếp tục nâng quy mô pilot lên khối lượng lớn hơn.
- Tiếp tục nghiên cứu phương pháp bảo quản tinh dầu họ citrus trong thời gian lưu trữ tiếp theo. Mở rộng nghiên cứu thêm về thành phần một số tinh dầu họ citrus khác.
- Cần nghiên cứu và kiểm tra thêm các giá trị MIC và MBC đối với khả năng kháng khuẩn của từng loại tinh dầu. Kết hợp nghiên cứu đa dạng kiểm tra khả năng kháng oxy hóa của tinh dầu trên các mô hình tế bào gây độc tính *in vitro* hoặc các mô hình *in vivo*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. S. Raut and S. M. Karuppaiyl, “A status review on the medicinal properties of essential oils,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 62, pp. 250–264, 2014.
- [2] F. Bakkali and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils – A review,” vol. 46, pp. 446–475, 2008.
- [3] S. Burt, “Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review,” vol. 94, pp. 223–253, 2004.
- [4] A. Ijaz, F. Anwar, S. Tufail, H. Sherazi, and R. Przybylski, “Food Chemistry Chemical composition , antioxidant and antimicrobial activities of basil ( *Ocimum basilicum* ) essential oils depends on seasonal variations,” vol. 108, pp. 986–995, 2008.
- [5] B. Teixeira *et al.*, “Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 43, pp. 587–595, 2013.
- [6] A. Singh, R. K. Singh, A. K. Bhunia, and N. Singh, “Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs,” vol. 36, pp. 787–794, 2003.
- [7] L. Gachkar, D. Yadegari, M. Bagher, and M. Taghizadeh, “Food Chemistry Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils,” vol. 102, pp. 898–904, 2007.
- [8] S. G. Deans, “Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*,” pp. 759–762, 1997.
- [9] C. Turek and F. C. Stintzing, “Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils,” pp. 3109–3123, 2011.
- [10] H. Hs and K. Mmsc, “Volatile profiling and bio-efficacy of *Citrus hystrix* fruit peel as a seed protectant against *Callosobruchus maculatus*,” *J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 6, no. 4, pp. 27–31, 2018.
- [11] I. Jantan, A. S. Ahmad, A. R. Ahmad, N. A. M. Ali, and N. Ayop, “Chemical composition of some citrus oils from Malaysia,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 627–632, 1996, doi: 10.1080/10412905.1996.9701030.
- [12] T. Hongratanaworakit and G. Buchbauer, “Chemical composition and stimulating effect of *Citrus hystrix* oil on humans,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 22, no. 5, pp. 443–449, Sep. 2007, doi: 10.1002/ffj.1820.
- [13] F. S. Loh, R. M. Awang, D. Omar, and M. Rahmani, “Insecticidal properties of citrus *hystrix* DC leaves essential oil against *spodoptera litura fabricius*,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 5, no. 16, pp. 3739–3744, 2011.
- [14] S. Md Othman, M. Hassan, L. Nahar, N. Basar, S. Jamil, and S. Sarker, “Essential Oils from the Malaysian Citrus (*Rutaceae*) Medicinal Plants,” *Medicines*, vol. 3, no. 2, p. 13, 2016, doi: 10.3390/medicines3020013.

- [15] O. Norkaew, K. Pitija, P. Pripdeevech, P. Sookwong, and S. Wongpornchai, "Supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of terpenoids in fresh kaffir lime leaf oil," *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 240–247, 2013.
- [16] Z. A. Haiyee and C. Winitkitcharoen, "EXTRACTION OF VOLATILE OIL FROM KAFFIR LIME LEAVES ( *Citrus hystrix* ) USING," *Int. J. Food, Nutr. Public Heal.*, vol. 5, pp. 201–210, 2012.
- [17] Okonkwo, E. M., et al. "Design of pilot plant for the production of essential oil from Eucalyptus leaves." (2006)
- [18] Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Acereto-Escoffié, P. O., Peraza-González, E. E., Reyes-Sosa, C. F., & Rocha-Uribe, J. A. (2017). Extraction Yield of Essential Oil from *Lippia graveolens* Leaves by Steam Distillation at Laboratory and Pilot Scales. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3), 610-621.
- [19] T. T. K. Ngan *et al.*, "Physico-chemical profile of essential oil of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) Grown in An Giang Province, Vietnam," *Asian J. Chem.*, vol. 31, no. 12, pp. 2855–2858, 2019, doi: 10.14233/ajchem.2019.22167.
- [20] Bùi Thanh Bình, và cộng sự "Nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu trúc (*Citrus Hystrix*)" *Tạp chí Khoa học và Công nghệ ngành Công Thương số 38*, 2019.
- [21] Quoc Le Pham Tan, Xinh Nguyen Thi Kieu, Nguyet Huynh Thi Kim and Xuyen Nguyen Thi Hong, 2012. Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*, *Emir. J. Food Agric.* 24 (1): 25-30
- [22] Thien Hien Tran, Van Tien Nguyen, Tan Phat Dao, Tri Duc Lam, Tran Quoc Toan, Trinh Duy Nguyen, Dai-Viet N. Vo, Tran Anh Vy, Le Minh Bui, 2019. New direction in research on extraction of *Citrus aurantifolia* (Lemon fruit) essential oil grown in Mekong Delta - Vietnam via microwave-assisted hydrodistillation, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 542, 012038
- [23] Đỗ Đình Nhật và Huỳnh Việt Thắng "Sản xuất tinh dầu gừng ở qui mô pilot bằng phương pháp chưng cất hydrodistillation" *Journal of Science and Technology – NTTU số 5*, 33-39, 2019.
- [24] T.T.K.Ngan, N.C. Huong, X.T. Le, P.Q. Long, T.Q. Toan, D.M. Hoang, V.T.Danh, L.N.Y. Trung, T.A. Trieu, Physico-Chemical Characteristics of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Grown in Lam Dong Province, Vietnam, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 31, No. 12 (2019), 2759-2762.
- [25] T.P.Dao, T.H. Tran, T.C.Q. Ngo, H.T.K. Linh, L.N.Y.Trung, V.T. Danh, T.T.L. Ngoc, N.D. Yen, P.M. Quan, and T.Q. Toan, Extraction of Essential Oils from Vietnam's Orange

- (Citrus sinensis) Peels by Hydrodistillation: Modeling and Process Optimization, Asian Journal of Chemistry; Vol. 31, No. 12 (2019), 2827-2833
- [26] N.T.C. Quyen, T.T.K.Ngan, T.P. Dao, P.N.Q. Anh, N.Q. Anh, N.T.N. Thi, T.T.L. Ngoc, L.T.H. Nhan, T.T. Truc, L.T.B. Phuong, Essential Oil Hydrodistillation Process from Vietnamese Calamondin (Citrus microcarpa) Peels and GC/MS Analysis of Essential Oils Components, Asian Journal of Chemistry; Vol. 31, No. 11 (2019), 2585-2588
- [27] T.T.K. Ngan, N.V. Muoi, P.M. Quan, M.H. Cang, Evaluation of Physical and Chemical Properties of Pomelo (Citrus grandis L.) Essential Oil using Steam Distillation Process, Asian Journal of Chemistry; Vol. 32, No. 6 (2020), 1433-1436
- [28] T.T.K. Ngan, T.Q. Toan, M.H. Cang, Evaluation of the Physical and Chemical Properties of Vietnamese Perilla frutescens L. Essential Oil, Asian Journal of Chemistry; Vol. 32, No. 6 (2020), 1463-1466
- [29] T.P. Dao, H.T. Do, Q.K. Le, N.V.G. Phap, L.G. Bach, N.V. Muoi, M.H. Cang, Kinetic Studies on Extraction of Essential Oil from Lemongrass Leaves (Cymbopogon citratus) by Steam Distillation Industrial Scale, Asian Journal of Chemistry; Vol. 32, No. 6 (2020), 1399-1403
- [30] T.P. Dao, H.T. Do, L.Q. Khoi, N.V.G. Phap, M.H. Cang, T.N. Pham, N.V. Muoi, Evaluation of Physico-Chemical Properties of Lemongrass (Cymbopogon citratus L.) Essential Oil Grown in Tien Giang Province, Vietnam, Asian Journal of Chemistry; Vol. 32, No. 5 (2020), 1248-1250
- [31] T.T. Hien, N.P.T. Nhan, D.T. Nguyen, V.T.T. Ho, L.G. Bach, Optimizing the Pomelo Oils Extraction Process by Microwave-Assisted Hydro-Distillation Using Soft Computing Approaches, Solid State Phenomena, 2018, Vol. 279, pp. 217-221.
- [32] T.H. Tran, L.K. Ha, D.C. Nguyen, T.P. Dao, L.T.H. Nhan, D.H. Nguyen, T.D. Nguyen, D.V.N. Vo, Q.T. Tran, L.G. Bach, The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (Piper nigrum L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam, Processes 2019, 7, 56; doi:10.3390/pr7020056
- [33] T.P. Dao, D.C. Nguyen, D.T. Nguyen, T.H. Tran, P.T.N. Nguyen, N.T.H. Le, X.T. Le, D.H. Nguyen, D.V.N. Vo, L.G. Bach, Extraction Process of Essential Oil from Plectranthus amboinicus Using Microwave-Assisted Hydrodistillation and Evaluation of It's Antibacterial Activity, Asian Journal of Chemistry; Vol. 31, No. 5 (2019), 977-981
- [34] T.H. Tran, P.T.N. Nguyen, T.N. Pham, D.C. Nguyen, T.P. Dao, D.T. Nguyen, N.D. Hai, D.V.N. Vo, X.T. Le, N.T.H. Le, L.G. Bach, Green technology to optimize the extraction process of turmeric (Curcuma longa L.) oils, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 479 (2019) 012002.
- [35] V. Srisukh, C. Tribuddharat, V. Nukoolkarn, and N. Bunyapraphatsara, "Antibacterial activity of essential oils from Citrus hystrix ( makrut lime ) against respiratory tract pathogens," *Sci. asia*, vol. 38, pp. 212–217, 2012, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.212.
- [36] R. A. Habsari, W. Warsito, and N. Noorhamdani, "Chemical Composition of Oil Fraction Kaffir Lime (Citrus hystrix DC) as Antibacterial Activity of E.coli," *J. Pure Appl. Chem.*



- Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 33–39, 2018, doi: 10.21776/ub.jpacr.2018.007.01.352.
- [37] A. Rattanamaneerusee, K. Thirapanmethee, Y. Nakamura, and M. T. Chomnawang, "Differentiation-inducing effect in human colon cancer cells of essential oils," *Pharm. Sci. Asia*, vol. 45, no. 3, pp. 154–160, 2018, doi: 10.29090/psa.2018.03.154.
- [38] S. Chanthaphon, S. Chanthachum, and T. Hongpattarakere, "Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. Against food-related microorganisms," *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, vol. 30, no. SUPPL. 1, pp. 125–131, 2008.
- [39] O. M. Nor, "Volatile aroma compounds in Citrus hystrix oil," *J. Trop. Agric. Fd. Sc.*, vol. 27, no. 2, pp. 225–229, 1999.
- [40] Gamarra. F. M. C., L. S. Sakanaka, E. B. Tambourgi and F. A. Cabral, 2006. Influence-t-on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolid*) oil by distillation process, Brazilian Journal of Chemical Engineering. 23 (1),147 – 151.
- [41] Colecio-Juárez. M.C., E. R.N. Rubria., E. B. A. José., M.N.G. Gloria., L. N. B. José, and J. I. Hugo Jiménez., 2012. Characterization of volatile compounds in the essential oil of sweet lime (*Citrus limetta* Risso). Chilean journal of agricultural research. 72(2):275-280.
- [42] Oladipupo A. Lawal, Isiaka A. Ogunwande, Moses S. Owolabi, Abdullatif O. Giwa-Ajeniya, Adeleke A. Kasali, Fausat A. Abudu, Adetayo A. Sanni and Andy R. Opoku, 2014. Comparative analysis of essential oils of *Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus reticulata* Blanco, from two different localities of Lagos State, Nigeria American Journal of Essential Oils and Natural Products. 2 (2), 08-12.
- [43] Razieh Ebadati Esfahani, Pejman Moradi, 2017. The effect of different development stages on the quantity and quality of the essential oil of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle in Iran, Herba Pol. 63(1), 32-42
- [44] Ferhat.M. A., B. J. Meklati., F. Chemat., 2007. Comparison of Different Isolation Methods of Essential Oil from Citrus Fruits: Cold Pressing, Hydrodistillation and Microwave 'Dry' Distillation. Flavour and Fragrance Journal 22(6):494 – 504.
- [45] E. J. Bottone, "Bacillus cereus, a volatile human pathogen," *Clin Microbiol Rev*, vol. 23, pp. 382-98, Apr 2010.
- [46] D. Karou, A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simporé, *et al.*, "Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*," *African journal of biotechnology*, vol. 5, pp. 195-200, 2006.

- [47] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *Journal of pharmaceutical analysis*, vol. 6, pp. 71-79, 2016.
- [48] L. A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *International journal of biomedical science : IJBS*, vol. 4, pp. 89-96, 2008.
- [49] P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," *Songklanakarin J. Sci. Technol*, vol. 26, pp. 211-219, 2004.
- [50] L. Leaves, "Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of ageratum conyzoides," *American Journal of Ethnomedicine*, vol. 1, pp. 244-249, 2014.
- [51] A. Bakar, M. Fadzelly, N. A. Ismail, A. Isha, M. Ling, and A. Lee, "Phytochemical composition and biological activities of selected wild berries (*Rubus moluccanus* L., *R. fraxinifolius* Poir., and *R. alpestris* Blume)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, 2016.
- [52] S. L. Scott, W. J. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson, "Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions," *The Journal of Physical chemistry*, vol. 97, pp. 6710-6714, 1993.
- [53] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free radical biology and medicine*, vol. 26, pp. 1231-1237, 1999.
- [54] L. Bui, Q. Nguyen, L. Dao, H. Nguyen, M. Lam, and C. Hoang, "Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Dialium cochinchinensis* Seed Extract," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, pp. 975-980, 2019.
- [55] Quyen NTT, Quyen NTN, Linh HTK, Ngoc TT Le, Anh HLT, Nguyen NHK, et al. Essential oil from lemon (*Citrus aurantifolia*) Grown in Ben Tre Province, Vietnam: Condition extraction, chemical composition and antibacterial properties. *Asian J Chem*. 2020;32(4):965–9.
- [56] Chanthaphon, Sumonrat, Suphitchaya Chanthachum, and Tipparat Hongpattarakere. "Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms." *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 30 (2008).
- [57] Karlberg, Ann-Therése, Kerstin Magnusson, and Ulrika Nilsson. "Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens." *Contact Dermatitis* 26.5 (1992): 332-340.

- [58] M. D. S. Costa, J. E. Rocha, F. F. Campina, A. R. P. Silva, R. P. Da Cruz, R. L. S. Pereira, *et al.*, "Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with  $\beta$ -cyclodextrin," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 128, pp. 158-161, 2019/02/01/ 2019.
- [59] A. H. Delcour, "Outer membrane permeability and antibiotic resistance," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1794, pp. 808-816, 2009.
- [60] A. Giweli, A. M. Džamić, M. Soković, M. S. Ristić, and P. D. Marin, "Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya," *Molecules*, vol. 17, pp. 4836-50, Apr 26 2012.
- [61] L. Yu, J. Yan, and Z. Sun, "D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways," *Mol Med Rep*, vol. 15, pp. 2339-2346, Apr 2017.
- [62] Misharina TA, Polshkov AN, Ruchkina EL, Medvedeva IB. 2003. Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. *Appl Biochem Microbiol* 39:311–6
- [63] T. A. Misharina and A. N. Polshkov, "Antioxidant properties of essential oils: Autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential oil from coriander," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 610–618, 2005.
- [64] F. Haddouchi, T. Chaouche, H. A. Lazouni, and Abdalhafid, and Benmansour, "Physicochemical study essential oils of *Thymus fontanesii* according to its conservation," *Der Pharma Chem.*, vol. 2, no. 4, pp. 404–410, 2011.
- [65] H. Nguyen, E. M. Campi, W. Roy Jackson, and A. F. Patti, "Effect of oxidative deterioration on flavour and aroma components of lemon oil," *Food Chem.*, vol. 112, no. 2, pp. 388–393, 2009.
- [66] N. J. Ruiz-Pérez et al., "Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* Essential Oils," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. September 2015, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1038/srep25371.
- [67] M. G. Chisholm, M. A. Wilson, and G. M. Gaskey, "Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle)," *Flavour Fragr. J.*, vol. 18, no. 2, pp. 106–115, 2003, doi: 10.1002/ffj.1172.
- [68] N. Yannovits-Argiriadis, V. Dourtoglou, D. Lyberopoulou, and V. Papageorgiou, "Essential oil variation in dwarf plants of *Pelargonium sp. capitatum*, induced by a new plant growth bioregulator," *Plant Growth Regul.*, vol. 11, no. 2, pp. 125–132, 1992, doi:

10.1007/BF00024065.

- [69] J. A. Pino and A. Rosado, "Comparative investigation of the distilled lime oils(*Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus latifolia* Tanaka) from Cuba," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 179–180, 2001, doi: 10.1080/10412905.2001.9699653.
- [70] Y. Selvaraj, M. B. N. V. Prasad, and G. Venkateshwarlu, "Profiles of essential oils of peel and leaf of a new citrus hybrid, *Citrus latifolia* Tanaka x *Citrus aurantifolia* Swingle," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 369–371, 2002, doi: 10.1080/10412905.2002.9699887.
- [71] D. Raddatz-Mota, O. Franco-Mora, J. A. Mendoza-Espinoza, L. L. Rodríguez-Verástegui, F. Díaz de León-Sánchez, and F. Rivera-Cabrera, "Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 257, no. March, p. 108716, 2019, doi: 10.1016/j.scienta.2019.108716.
- [72] Harshani H S and Karunaratne M M S C 2018 Volatile profiling and bio-efficacy of *Citrus hystrix* fruit peel as a seed protectant against *Callosobruchus maculatus* *J Entomol Zool Stud* 6 27-31
- [73] Zuhra C F, Lenny S and Nurtjahya K 2014 Comparison of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from the Leaf and Peel *Citrus hystrix*. *Proc Int Conf Nat Environ Sci* 67–72
- [74] Chanthaphon S, Chanthachum S and Hongpattarakere T 2008 Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. Against food-related microorganisms. *Songklanakarin J Sci Technol* 30 125–131
- [75] Aripin D, Julaeha E, Dardjan M and Cahyanto A 2015 Chemical composition of *Citrus* spp . and oral antimicrobial effect of *Citrus* spp . peels essential oils against *Streptococcus mutans* *Padjadjaran J Dent* 27 1–11
- [76] Lota M L, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J 2000 Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochem Syst Ecol* 28 61–78

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Thành phần hóa học của tinh dầu chanh có hạt Sau 1 tháng

| R.T.   | Name  | Sáng   | Tối    | 4      | 45     |
|--------|---|--------|--------|--------|--------|
| 7.052  | $\alpha$ -Thujene                                 | 0.228  |        | 0.283  | 0.292  |
| 7.272  | $\alpha$ -Pinene                                  | 1.682  | 1.179  | 1.493  | 1.852  |
| 9.081  | $\beta$ -Pinene                                   | 4.086  | 3.88   | 4.806  | 5.183  |
| 9.959  | $\beta$ -Myrcene                                  | 0.378  | 0.341  | 0.982  | 0.871  |
| 11.172 | $\alpha$ -Terpinene                               |        |        | 0.417  |        |
| 11.58  | $\rho$ -Cymene                                    | 16.69  | 17.958 | 1.067  | 3.083  |
| 11.831 | D-Limonene  | 68.517 | 71.264 | 74.663 | 72.078 |
| 13.535 | $\gamma$ -Terpinene                               |        |        | 13.473 | 11.922 |
| 18.001 | Limonene-1,2-epoxide(fr.1)                        | 0.737  | 0.634  |        |        |
| 18.157 | cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol                        | 0.389  |        |        |        |
| 18.262 | Limonene epoxide                                  | 1.062  | 0.922  |        |        |
| 20.259 | Terpinen-4-ol                                     | 0.613  | 0.338  | 0.521  | 0.785  |
| 20.929 | $\alpha$ -Terpineol                               | 0.7    | 0.369  | 0.454  | 0.778  |
| 21.148 | Myrtenol  | 0.299  | 0.22   |        |        |
| 22.236 | Carveol   | 0.56   |        |        |        |
| 25.571 | cis-p-Mentha-2,8-dien-1-o                         | 0.844  | 0.316  |        |        |
| 26     | Carveo  | 0.743  | 0.622  |        |        |
| 26.617 | 1,2-Cyclohexanediol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl) | 0.745  | 0.552  |        |        |
| 27.422 | cis-Carveol                                       | 0.501  | 0.394  |        |        |
| 29.503 | Caryophyllene                                     | 0.42   | 0.354  | 0.291  | 0.632  |
| 31.532 | $\beta$ -Bisabolene                               | 0.328  | 0.268  | 0.253  | 0.765  |
| 31.887 | Cadina-3,9-diene                                  |        |        | 0.19   | 0.408  |
| 33.205 | Caryophyllene oxide                               | 0.478  | 0.39   |        |        |

### Sau 2 tháng

| R.T.   | Name                | Thường | Tối    | 4       | 45     |
|--------|---------------------|--------|--------|---------|--------|
| 7.073  | $\alpha$ -Thujene   |        | 0.314  | 0.307   | 0.287  |
| 7.303  | $\alpha$ -Pinene    | 0.48   | 1.899  | 1.796   | 1.928  |
| 9.029  | Sabinene            |        | 0.182  | 0.282   | 0.274  |
| 9.112  | $\beta$ -Pinene     | 1.817  | 5.106  | 4.879   | 5.608  |
| 9.98   | $\beta$ -Myrcene    |        |        |         | 1.034  |
| 11.193 | $\alpha$ -Terpinene |        |        |         | 0.162  |
| 11.601 | $\rho$ -Cymene      | 22.805 | 2.962  | 2.597   | 5.131  |
| 11.81  | D-Limonene          | 40.01  | 68.996 | 699.688 | 64.871 |
| 11.915 | Eucalyptol          | 2.617  | 1.051  | 1.59    | 1.349  |
| 13.556 | $\gamma$ -Terpinene |        | 13.046 | 13.053  | 11.151 |
| 15.282 | Terpinolene         |        | 0.802  | 0.784   | 0.631  |

|        |  |       |       |       |       |
|--------|--|-------|-------|-------|-------|
| 18.168 | L-Pinocarveol  | 1.017 |       |       | 0.157 |
| 18.272 | Limonene oxide,<br>trans-                                | 2.967 |       |       |       |
| 20.27  | Terpinen-4-ol  |       | 0.793 | 0.702 | 1.161 |
| 20.813 | Terpinen-4-ol  | 0.631 |       |       |       |
| 20.949 | $\alpha$ -Terpineol                                      | 0.481 | 0.812 | 0.769 | 1.333 |
| 21.148 | Myrtenol   | 1.839 |       |       |       |
| 21.294 |  | 0.933 |       |       |       |
| 22.215 |  | 3.977 |       |       |       |
| 22.727 |  | 1.014 |       |       |       |
| 23.166 | (-)-Carvone  | 7.217 |       |       |       |
| 25.582 |  | 0.704 |       |       |       |
| 26.011 |  | 1.146 |       |       |       |
| 26.377 |  | 0.554 |       |       |       |
| 26.617 | 1,2-Cyclohexanediol,<br>1-methyl-4-(1-<br>methylethenyl) | 2.889 |       |       |       |
| 27.422 | cis-Carveol  | 1.524 |       |       |       |
| 27.694 | $\alpha$ -Copaene  |       | 0.172 | 0.138 | 0.302 |
| 27.914 |  | 0.515 |       |       |       |
| 28.656 |  | 1.781 |       |       |       |
| 29.012 | Caryophyllene  |       | 0.632 | 0.547 | 0.789 |
| 29.503 | trans- $\alpha$ -Bergamotene                             |       | 0.506 | 0.383 | 0.885 |
| 29.775 |  | 1.904 |       |       |       |
| 30.005 | Humulene   |       |       |       | 0.101 |
| 30.88  | Germacrene D   |       | 0.115 | 0.101 | 0.079 |
| 31.542 | $\beta$ -Bisabolene                                      |       | 0.729 | 0.484 | 1.547 |
| 31.887 | Cadina-3,9-diene   |       | 0.326 | 0.255 | 0.497 |
| 33.205 | Caryophyllene oxide                                      | 1.178 |       |       | 0.384 |
| 34.125 | $\gamma$ -Eudesmol                                       |       |       |       | 0.163 |
| 34.522 |  |       |       |       | 0.175 |

### Sau 3 tháng

| R.T.   | Name                | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| 7      | $\beta$ -Thujene    |        | 0.281  | 0.314  | 0.188  |
| 7.23   | $\alpha$ -Pinene    | 1.162  | 1.852  | 1.861  | 1.528  |
| 9.039  | Sabinene            | 3.06   | 5.444  | 5.252  | 5.486  |
| 9.896  | $\beta$ -Myrcene    |        | 0.946  | 1.173  | 0.694  |
| 11.099 | $\alpha$ -Terpinene |        | 0.241  | 0.301  |        |
| 11.507 | $\beta$ -Cymene     | 21.181 | 3.766  | 3.383  | 6.093  |
| 11.726 | D-Limonene          | 44.765 | 68.86  | 71.365 | 46.978 |
| 11.873 | Eucalyptol          |        |        |        | 1.426  |
| 13.441 | $\gamma$ -Terpinene |        | 12.122 | 12.622 | 7.202  |

|        |                                 |       |       |       |       |
|--------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 15.188 | Terpinolene                     |       | 0.701 | 0.729 | 0.48  |
| 16.076 | Linalool                        |       |       |       | 0.266 |
| 17.185 | 1R,4R-p-Mentha-2,8-dien-1-ol    |       |       |       | 0.243 |
| 17.906 | Limonene oxide, cis-            |       |       |       | 0.434 |
| 18.084 | trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol | 0.862 |       |       | 0.393 |
| 18.178 | Limonene oxide, trans-          |       |       |       | 0.28  |
| 18.576 | Isopulegol                      |       |       |       | 0.174 |
| 20.176 | Terpinen-4-ol                   |       | 1.077 | 0.675 | 2.456 |
| 20.677 | p-Cymen-8-ol                    |       |       |       | 0.235 |
| 20.74  |                                 | 0.763 |       |       | 0.235 |
| 20.876 | $\alpha$ -Terpineol             | 0.514 | 1.22  | 0.675 | 3.684 |
| 21.075 | Myrtenal                        | 1.699 |       |       | 0.193 |
| 21.232 |                                 | 0.521 |       |       |       |
| 22.141 | trans-Carveol                   | 4.928 |       |       | 0.243 |
| 22.654 |                                 | 1.463 |       |       |       |
| 23.103 | (-)-Carvone                     | 8.773 |       |       |       |
| 25.958 |                                 | 0.777 |       |       |       |
| 26.554 | 8-p-Menthadien-1,2-diol         | 3.517 |       |       |       |
| 27.631 | $\alpha$ -Copaene               |       | 0.241 | 0.129 | 0.541 |
| 28.593 | Germacrene D                    | 2.943 |       |       |       |
| 28.949 | Caryophyllene                   |       | 0.848 | 0.515 | 1.648 |
| 29.451 | $\alpha$ -Bergamotene           |       | 0.738 | 0.388 | 2.202 |
| 29.723 |                                 | 1.876 |       |       |       |
| 30.737 |                                 |       | 0.116 |       |       |
| 31.49  | $\beta$ -Bisabolene             |       | 0.916 | 0.372 | 5.588 |
| 31.835 | Cadina-3,9-diene                |       | 0.437 | 0.243 | 1.48  |
| 33.163 | Caryophyllene oxide             | 1.198 | 0.195 |       | 1.396 |
| 33.675 | Humulene-1,2-epoxide            |       |       |       | 0.21  |
| 33.853 | Junenol                         |       |       |       | 0.313 |
| 34.073 | $\gamma$ -Eudesmol              |       |       |       | 0.661 |
| 34.251 | $\alpha$ -epi-Cadinol           |       |       |       | 0.448 |
| 34.47  | $\alpha$ -Cadinol               |       |       |       | 1.123 |
| 34.972 | $\alpha$ -Bisabolol             |       |       |       | 0.529 |

**Phụ lục 2. Thành phần hóa học của tinh dầu chanh không hạt  
Sau 1 tháng**

| R.T.   | Name   | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|--|--------|--------|--------|--------|
| 7.041  | $\alpha$ -Phellandrene                         | 0.175  | 0.392  | 0.422  |        |
| 7.271  | $\alpha$ -Pinene                               | 1.5    | 2.074  | 2.096  | 1.265  |
| 9.028  | Sabinene                                       |        |        | 0.591  |        |
| 9.08   | $\beta$ -Pinene                                | 7.991  | 10.975 | 11.073 | 6.284  |
| 11.183 | $\alpha$ -Terpinene                            |        |        | 0.242  |        |
| 11.569 | $\beta$ -Myrcene                               | 19.822 | 10.793 | 4.253  | 23.438 |
| 11.81  | D-Limonene                                     | 53.28  | 63.658 | 62.798 | 37.483 |
| 13.525 | $\gamma$ -Terpinene                            |        | 5.734  | 11.768 |        |
| 15.282 | Terpinolene                                    |        |        | 0.527  |        |
| 17.969 | Limonene oxide                                 | 2.71   |        |        |        |
| 18.001 | unknown  |        |        |        | 2.329  |
| 18.157 | L-trans-Pinocarveol                            | 0.603  |        |        | 1.749  |
| 18.241 | p-Menth-8-ene, 1,2-epoxy-                      | 2.072  |        |        | 4.689  |
| 20.248 | Terpinen-4-ol                                  | 0.657  | 0.987  | 1.065  | 0.87   |
| 20.907 | $\alpha$ -Terpineol                            | 1.722  | 1.995  | 1.975  | 1.362  |
| 21.137 | Myrtenol                                       | 1.083  |        |        | 3.279  |
| 21.284 | (S)-(-)-(4-Isopropenyl-1-cyclohexenyl)methanol | 0.588  |        |        | 1.719  |
| 22.225 | (-)-cis-Carvyl Acetate                         | 0.088  |        |        | 1.74   |
| 23.197 | (S)-(+)-Carvon                                 | 0.785  |        | 0.383  | 3.666  |
| 25.571 | cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol                     | 0.515  |        |        |        |
| 26     | Carveol  | 0.912  |        |        |        |
| 26.366 | .cis-Carveol                                   | 0.298  |        |        |        |
| 26.638 | Limonene-1,2-epoxide                           | 0.228  |        |        | 1.589  |
| 27.432 | cis-Geraniol                                   | 2.214  | 1.016  | 0.811  | 11.778 |
| 27.903 | cis-Carveol                                    | 0.282  |        |        |        |
| 28.656 | 8-Hydroxylinalool                              |        |        |        | 1.278  |
| 29.012 | Caryophyllene                                  |        | 0.196  | 0.405  |        |
| 29.503 | $\alpha$ -Bergamotene                          | 0.738  | 0.899  | 0.753  | 1.717  |
| 31.521 | $\beta$ -Bisabolene                            | 0.633  | 0.806  | 0.839  |        |
| 33.205 | Caryophyllene oxide                            | 0.469  | 0.204  |        | 0.515  |
| 39.949 | Unknown  | 0.351  |        |        |        |
| 40.096 | Unknown  | 0.287  |        |        |        |
| 44.896 | Unknown  |        | 0.084  |        |        |
| 45.063 | Unknown  |        | 0.187  |        |        |



Sau 2 tháng

| R.T.   | Name                     | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 7.073  | $\beta$ -Thujene         |        |        | 0.307  | 0.443  |
| 7.303  | $\alpha$ -Pinene         | 0.646  | 0.765  | 1.796  | 2.162  |
| 9.028  | Sabinene                 | 0.245  | 0.15   | 0.282  |        |
| 9.102  | $\beta$ -Pinene          | 4.505  | 4.299  | 4.879  | 9.878  |
| 11.183 | $\alpha$ -Terpinene      |        |        | 0.379  | 0.273  |
| 11.601 | $\beta$ -Myrcene         | 22.007 | 19.222 | 2.597  | 4.369  |
| 11.81  | D-Limonene               | 38.179 | 34.135 | 69.688 | 52.405 |
| 11.967 | unknown                  |        |        | 1.59   |        |
| 13.546 | $\gamma$ -Terpinene      |        |        | 13.053 | 11.575 |
| 15.282 | Terpinolene              |        |        | 0.784  | 0.783  |
| 16.129 | Linalool                 |        |        |        | 0.595  |
| 18     | Limonene<br>oxide        | 1.574  | 0.59   |        |        |
| 18.178 | L-trans-<br>Pinocarveol  | 1.354  | 1.183  |        |        |
| 18.262 | Limonene<br>oxide, trans | 3.804  | 2.26   |        |        |
| 20.291 | Terpinen-4-ol            | 0.535  | 0.416  | 0.702  | 1.732  |
| 20.813 | Carveol                  | 0.567  | 0.415  |        | 3.087  |
| 20.928 | $\alpha$ -Terpineol      | 1.708  | 1.102  | 0.769  |        |
| 21.148 | Myrtenol                 | 2.535  | 1.737  |        |        |
| 21.294 |                          | 1.387  | 0.517  |        |        |
| 22.215 |                          | 1.595  | 1.747  |        |        |
| 22.33  |                          | 1.474  | 1.822  |        |        |
| 22.644 | cis-Geraniol             |        |        |        | 0.495  |
| 22.737 |                          | 0.856  | 1.182  |        |        |
| 23.177 | $\beta$ -Citral          | 2.939  | 4.365  |        | 1.319  |
| 24.254 | $\alpha$ -Citral         |        |        |        | 1.892  |
| 25.31  |                          | 0.437  | 1.142  |        |        |
| 25.477 |                          | 0.434  | 0.853  |        |        |
| 25.571 |                          | 0.881  | 1.189  |        |        |
| 26     |                          | 0.675  | 0.713  |        |        |
| 26.052 |                          | 0.663  | 0.702  |        |        |
| 26.366 |                          | 0.487  | 0.49   |        |        |
| 26.617 | Limonene-<br>1,2-diol    | 2.03   | 5.594  |        |        |
| 26.784 |                          | 0.75   | 3.42   |        |        |
| 27.433 | cis-Geraniol             | 3.339  | 3.327  |        | 2.242  |
| 27.694 |                          |        |        | 0.138  |        |
| 27.903 |                          | 0.59   | 1.145  |        |        |

|        |                                  |       |       |       |       |
|--------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 28.05  | cis-Geraniol                     |       |       |       | 0.121 |
| 28.207 | $\beta$ -Elemen                  |       |       |       | 0.125 |
| 28.667 |                                  | 0.798 | 1.405 |       |       |
| 29.012 | Caryophyllene                    |       |       | 0.547 | 0.704 |
| 29.503 | trans- $\alpha$ -<br>Bergamotene | 0.591 | 0.523 | 0.383 | 1.402 |
| 29.775 |                                  | 1.228 | 1.537 |       |       |
| 30.8   |                                  |       |       | 0.101 |       |
| 31.532 | $\beta$ -Bisabolene              | 0.376 | 0.434 | 0.484 | 1.784 |
| 31.887 |                                  |       |       | 0.255 |       |
| 33.205 | Caryophyllene<br>oxide           | 0.811 | 0.672 |       | 0.178 |
| 34.533 |                                  |       |       |       | 0.112 |
| 34.753 |                                  |       |       |       | 0.112 |
| 35.014 |                                  |       |       |       | 0.118 |

### Sau 3 tháng

| R.T.   | Name                         | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 7      | $\beta$ -Thujene             |        |        | 0.47   |        |
| 7.23   | $\alpha$ -Pinene             | 1.841  | 0.782  | 2.246  |        |
| 7.816  | Camphene                     |        |        | 0.108  |        |
| 9.039  | Sabinene                     | 8.025  | 5.177  | 10.659 |        |
| 9.896  | $\beta$ -Myrcene             |        |        | 1.094  |        |
| 11.089 | $\alpha$ -Terpinene          |        |        | 0.475  |        |
| 11.528 | $\beta$ -Cymene              | 19.988 | 16.493 | 2.506  | 12.091 |
| 11.758 | D-Limonene                   | 44.672 | 23.973 | 57.689 | 13.522 |
| 13.462 | $\gamma$ -Terpinene          |        |        | 13.762 |        |
| 15.177 | Terpinolene                  |        |        | 0.857  |        |
| 16.097 | Linalool                     |        |        | 0.282  |        |
| 17.227 | 1R,4R-p-Mentha-2,8-dien-1-ol | 0.335  | 0.875  |        |        |
| 17.938 | Limonene oxide, cis-         | 0.4    |        |        |        |
| 18.095 | L-trans-Pinocarveol          | 1.203  | 3.432  |        | 5.428  |
| 18.189 | Limonene oxide, trans-       | 1.309  |        |        |        |
| 19.423 | Pinocarpone                  | 0.255  | 0.793  |        | 1.038  |
| 20.207 | Terpinen-4-ol                | 0.863  | 0.805  |        |        |
| 20.74  | p-Cymen-8-ol                 | 0.32   | 2.146  | 1.298  | 1.722  |
| 20.855 | $\alpha$ -Terpineol          | 1.98   | 2.164  | 2.389  | 2.608  |
| 21.085 | Myrtenal                     | 1.57   | 3.95   |        | 2.581  |
| 21.232 | Myrtenol                     | 0.367  | 0.866  |        |        |
| 22.162 | trans-Carveol                | 0.971  | 3.097  |        | 5.019  |
| 22.277 |                              | 0.877  | 2.93   |        | 4.427  |
| 22.664 |                              | 0.757  |        |        |        |

|        |                       |       |       |       |        |
|--------|-----------------------|-------|-------|-------|--------|
| 23.124 | (-)-Carvone           | 1.754 | 9.148 |       | 16.143 |
| 25.414 |                       | 0.297 |       |       |        |
| 25.519 |                       | 0.806 |       |       |        |
| 25.958 | Myrtenol              | 1.031 |       |       |        |
| 26.324 |                       | 0.244 |       |       |        |
| 26.565 | Limonene-1,2-diol     | 2.313 | 7.375 |       | 12.394 |
| 27.391 |                       | 3.191 | 2.576 | 1.27  | 5.637  |
| 27.861 |                       | 0.337 |       |       |        |
| 28.614 | Caryophyllene         | 0.712 | 5.548 | 0.663 | 7.938  |
| 29.451 | $\alpha$ -Bergamotene | 1.052 | 0.659 |       |        |
| 29.723 |                       | 0.668 | 2.588 | 1.07  | 4.192  |
| 31.48  | $\beta$ -Bisabolene   | 0.968 | 0.463 | 1.258 |        |
| 33.163 | Caryophyllene oxide   | 0.894 | 1.253 |       | 2.949  |

### Phụ lục 3. Thành phần hóa học của tinh dầu chanh chúc

#### Sau 1 tháng

| R.T.   | Name                       | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 2.535  | 1-Butanol, 3-methyl-       | 0.234  |        | 0.217  | 0.225  |
| 7.01   | $\alpha$ -Thujene          |        | 0.11   |        |        |
| 7.261  | $\alpha$ -Pinene           | 18.676 | 18.231 | 18.471 | 17.946 |
| 7.815  | Camphene                   | 0.308  | 0.312  | 0.312  | 0.302  |
| 9.049  | $\beta$ -Pinene            | 0.414  | 0.425  | 0.416  | 0.412  |
| 10.451 | $\alpha$ -Phellandrene     | 0.423  | 0.567  | 0.604  | 0.574  |
| 11.569 | p-Cymene                   | 1.839  | 1.792  | 1.764  | 1.727  |
| 11.935 | D-Limonene                 | 69.798 | 69.895 | 69.892 | 70.074 |
| 13.483 | $\gamma$ -Terpinen         | 0.274  | 0.34   | 0.33   | 0.319  |
| 15.198 | p-Mentha-1,4(8)-diene      | 0.434  | 0.53   | 0.499  | 0.544  |
| 18.136 | L-pinocarveol              | 0.217  | 0.219  | 0.19   | 0.201  |
| 19.6   | Linderol                   | 0.206  | 0.203  | 0.19   | 0.2    |
| 20.228 | Terpinen-4-ol              | 0.318  | 0.33   | 0.299  | 0.303  |
| 20.887 | $\alpha$ -Terpineol        | 0.926  | 0.842  | 0.768  | 0.918  |
| 26.889 | $\alpha$ -Terpinyl acetate | 2.174  | 2.063  | 2.06   | 2.264  |
| 28.708 | $\alpha$ -Gurjunene        | 0.254  | 0.239  | 0.243  | 0.265  |
| 28.991 | Caryophyllene              | 0.145  | 0.137  | 0.138  | 0.156  |
| 29.566 | Aromandendrene             | 1.22   | 1.134  | 1.181  | 1.304  |
| 30.193 | Alloaromadendrene          | 0.562  | 0.52   | 0.54   | 0.598  |
| 31.176 | Cyclohexane                | 0.84   | 0.87   | 0.991  | 1.023  |
| 33.09  | (-)-Spathulenol            | 0.111  |        |        |        |
| 33.215 | (-)-Globulol               | 0.442  | 0.376  | 0.395  | 0.445  |
| 33.383 | Viridiflorol               | 0.184  | 0.165  | 0.175  | 0.198  |

Sau 2 tháng

| R.T.   | Name                       | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 2.535  | 1-Butanol, 3-methyl        | 0.227  | 0.201  | 0.217  | 0.2    |
| 7.021  | $\alpha$ -Thujene          | 0.116  |        | 0.111  |        |
| 7.282  | $\alpha$ -Pinene           | 17.996 | 17.981 | 18.121 | 17.701 |
| 7.826  | Camphene                   | 0.318  | 0.305  | 0.305  |        |
| 9.049  | $\beta$ -Pinene            | 0.437  | 0.421  | 0.421  | 0.41   |
| 10.451 | $\alpha$ -Phellandrene     | 0.649  | 0.581  | 0.583  | 0.385  |
| 11.59  | p-Cymene                   | 1.805  | 1.73   | 1.807  | 1.759  |
| 11.977 | D-Limonene                 | 67.888 | 69.15  | 68.813 | 69.349 |
| 12.448 | Z-Ocimene                  | 0.347  |        | 0.307  |        |
| 13.483 | $\gamma$ -Terpinen         | 0.374  | 0.331  | 0.331  | 0.258  |
| 15.198 | p-Mentha-1,4(8)-diene      | 0.603  | 0.471  | 0.524  | 0.42   |
| 16.693 | Fenchol                    | 0.193  |        |        |        |
| 18.136 | L-pinocarveol              | 0.255  | 0.211  | 0.211  | 0.233  |
| 19.6   | L-Borneol                  | 0.222  | 0.212  | 0.205  | 0.234  |
| 20.228 | Terpinen-4-ol              | 0.362  | 0.285  | 0.326  | 0.306  |
| 20.771 | p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol  | 0.178  |        |        | 0.151  |
| 20.887 | $\alpha$ -Terpineol        | 0.989  | 0.894  | 0.86   | 0.964  |
| 26.659 | 8-Hydroxyneomenthol        | 0.101  | 0.105  |        | 0.102  |
| 26.889 | $\alpha$ -Terpinyl acetate | 2.275  | 2.263  | 2.217  | 2.327  |
| 28.708 | $\alpha$ -Gurjunene        | 0.27   | 0.272  | 0.27   | 0.274  |
| 28.991 | Caryophyllene              | 0.158  | 0.151  | 0.157  | 0.152  |
| 29.367 | $\beta$ -Gurjunene         | 0.114  | 0.127  | 0.116  | 0.123  |
| 29.566 | Aromandendrene             | 1.306  | 1.365  | 1.356  | 1.418  |
| 29.691 | Naphthalene                | 0.07   | 0.079  | 0.074  | 0.083  |
| 30.204 | Alloaromadendrene          | 0.583  |        |        |        |
| 30.988 |                            | 0.11   | 0.103  |        | 0.104  |
| 31.176 | Cyclohexane                | 1.007  | 1.114  | 0.974  | 0.984  |
| 31.887 | Cadinene                   | 0.087  | 0.07   | 0.072  | 0.073  |
| 32.713 | Epiglobulol                | 0.095  | 0.094  | 0.084  | 0.093  |
| 32.87  | Palustrol                  | 0.07   | 0.083  | 0.075  | 0.081  |
| 33.09  | Spathulenol                | 0.082  | 0.078  | 0.083  | 0.143  |
| 33.215 | Globulol                   | 0.448  | 0.454  | 0.441  | 0.475  |
| 33.383 | Viridiflorol               | 0.195  | 0.201  | 0.192  | 0.2    |
| 33.592 |                            | 0.071  | 0.064  | 0.074  | 0.081  |

Sau 3 tháng

| R.T.   | Name                    | Thường | Tối    | 4      | 45     |
|--------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 7      | $\alpha$ -Thujene       | 0.194  | 0.199  | 0.219  | 0.193  |
| 7.219  | $\alpha$ -Pinene        | 2.619  | 2.683  | 2.82   | 2.564  |
| 7.805  | Camphene                | 0.166  | 0.172  | 0.178  | 0.168  |
| 9.112  | $\beta$ -Pinene         | 39.89  | 40.505 | 40.222 | 39.806 |
| 9.886  | $\beta$ -Myrcene        | 0.798  | 0.569  | 0.894  | 0.543  |
| 11.078 | $\alpha$ -Terpinene     | 0.693  | -      | 0.625  | 0.58   |
| 11.528 | o-Cymene                | 0.648  | 1.868  | 0.806  | 0.807  |
| 11.768 | D-Limonene              | 18.178 | 18.4   | 19.75  | 17.206 |
| 11.841 | Eucalyptol              | 0.305  | 0.467  | 0.346  | 0.387  |
| 13.441 | $\gamma$ -Terpinen      | 1.373  | 0.493  | 1.289  | 1.191  |
| 14.288 | cis-Linalool Oxide      | 2.371  | 2.444  | 2.184  | 2.542  |
| 15.188 | p-Mentha-1,4(8)-diene   | 0.261  | 0.112  | 0.269  | 0.221  |
| 15.24  | trans-Linalool oxide    | 1.323  | 1.312  | 1.166  | 1.401  |
| 16.076 | Linalool                | 0.873  | 0.912  | 0.795  | 0.911  |
| 17.227 | cis-2-p-Menthen-1-ol    | 0.252  | 0.276  | 0.236  | 0.265  |
| 18.314 | (E)-p-2-Menthen-1-ol    | 0.171  | 0.386  |        | 0.17   |
| 18.565 | Isopulegol              | 0.447  | 0.507  | 0.417  | 0.524  |
| 19.213 | Citronellal             | 9.81   | 7.076  | 0.9551 | 9.768  |
| 19.611 | L-Borneol               | 0.152  | 0.154  | 0.146  | 0.161  |
| 20.238 | Terpinen-4-ol           | 8.418  | 8.46   | 7.914  | 8.811  |
| 20.887 | $\alpha$ -Terpineol     | 3.048  | 2.95   | 2.827  | 3.273  |
| 21.064 | (E)-p-2-Menthen-1-ol    |        | 0.438  |        |        |
| 22.675 | Citronellol             | 3.789  | 3.846  | 3.498  | 3.994  |
| 26.418 | 8-Hydroxyneomenthol     |        |        |        | 0.296  |
| 27.077 | Citronellol acetate     | 0.458  | 0.57   | 0.385  | 0.481  |
| 27.673 | Copaene                 | 0.729  | 0.748  | 0.66   | 0.7    |
| 28.05  | Geraniol acetate        | 0.086  | 0.228  | 0.046  | 0.094  |
| 28.133 | $\beta$ -Cubebene       | 0.451  | 0.39   | 0.426  | 0.412  |
| 28.185 | $\beta$ -Elemene        | 0.205  | 0.149  | 0.187  | 0.241  |
| 28.991 | Caryophyllene           | 0.481  | 0.372  | 0.454  | 0.489  |
| 29.984 | $\alpha$ -Caryophyllene | 0.175  | 0.143  | 0.17   | 0.182  |
| 30.779 | Germacrene D            | 0.313  | -      | 0.293  | 0.249  |
| 31.197 | Cyclohexane             | 0.124  | 0.088  | 0.12   | 0.096  |
| 31.877 | Cadinene                | 0.998  | 0.814  | 0.913  | 1.049  |
| 32.483 | Elemol                  | 0.202  | 0.211  | 0.195  | 0.225  |
| 33.09  | Spathulenol             |        | 0.081  |        |        |
| 33.205 | Caryophyllene oxide     |        | 0.139  |        |        |
| 34.522 | $\alpha$ -Cadinol       |        | 0.094  |        |        |
| 38.778 |                         |        | 0.064  |        |        |

## Comparison of volatile compounds and antibacterial activity of *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, and *Citrus hystrix* shell essential oils by pilot extraction

Tran Thi Kim Ngan<sup>1</sup>, Ngo Thi Cam Quyen<sup>1</sup>, Tran Thien Hien<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### Abstract

Lemon peel essential oil has considerable potential to be used as a direct agent against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The three lemon peel species used in this study included *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, and *Citrus hystrix*. Essential oils were extracted on a pilot model and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Gram-positive bacteria (*Bacillus Sublilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Samonella Typhimurium*, *Pseudomonas Aeruginosa*) were used to counteract the antibacterial effects of the samples. The yield of hydrodistillation distilled essential oil is *C. aurantifolia* (1.15%), *C. latifolia* (1.32%), and *C. Hystrix* (3.18%). The essential oil contains the main ingredient D-Limonene. The highest antibacterial activity against *L. monocytogenes* is *Citrus latifolia* essential oil. The main chemical composition of essential oils are  $\beta$ -pinene, D-limonene,  $\gamma$ -terpinene, terpinolene,  $\alpha$ -terpineol, ... and the antimicrobial activity of the essential oil is affected by the variation of D-limonene. and  $\beta$ -pinene in essential oils.

### Introduction

The essential oil consists of many aromatic volatile compounds produced by secondary metabolism of the plant (mainly terpenes and triterpenes), with a characteristic odor depending on the source of the material. The chemical composition of essential oils includes terpenoids and oxygen-containing derivatives of terpenoids such as alcohols, aldehydes, ketones, esters, acids ... Although there are many constituents, there are usually only a few key constituents that have value. and create a distinctive fragrance for essential oils [1- 4]. Citrus essential oil has the main ingredient D-limonene (a substance with high antibacterial and antioxidant properties) and various compounds. The antimicrobial properties of essential oils have been recognized for centuries, with increasing demand from changes in consumption trends and increasing isolation of antibiotic-resistant pathogens, a need to find killer agents bacteria based on chemicals [5-8]. Commonly used traditional methods are water distillation, steam-enticing distillation, solvent extraction, and cold pressing. Each method has its own advantages and disadvantages. New and modern extraction methods are increasingly being developed to improve the yield and quality of essential oils. These new methods include the supercritical extraction method, ultrasonic combined extraction, and microwave combined extraction [9-11]. Although there are many new methods of extracting essential oils, traditional extracts such as hydrodistillation are still widely used especially for commercial-scale production because of their simplicity, low cost. Essential oils, especially lemon essential oils, have long been used extensively in aromatherapy and as an alternative to partial relief of pain relievers. Under such conditions, this study aimed to study the effects of three essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Citrus Hystrix*, and *Citrus latifolia* with the main ingredients in lemon essential oils as  $\beta$ -pinene, limonene,  $\gamma$ -terpinene, terpinolene,  $\alpha$ -terpineol, and citral, are very likely to be responsible for good antimicrobial activity, especially gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus cholermidis*) [12]. This group of essential oils can provide natural antimicrobials that the food industry requires to meet both its and consumer requirements. Vietnam with tropical natural

conditions is very favorable for the formation and development of plants, in which essential oil-containing plants are confirmed to be abundant and unique. Currently, there are a number of establishments in Vietnam that have distilled lemon essential oil, and when analyzing some lemon essential oil samples on the market, it showed that the quality of the essential oil was not high, some of the main ingredients in the essential oil, have a low percentage and do not meet some essential oil standards. This greatly limits the ability to supply lemon essential oil on a large scale or as a raw material for establishments manufacturing cosmetics, pharmaceuticals, aromas.

Therefore, obtaining essential oils from the peels and finding suitable storage conditions to develop a variety of different products, and extracting essential oils from the peel is an effective solution to utilize secondary sources of lemons at low cost, at the same time creating products with high value. Contributing to improving the economic value of the local lemon tree, creating a stable market for potential raw materials of the province: from there, building a chain of production-consumption in a sustainable direction with stable output.

## **Experimental**

### **Plant material**

*C. latifolia* are collected directly from home gardens in popular growing areas in Hau Giang. The *C. aurantifolia* samples used for this study were collected in the Ben Tre province. *C. Hystrix* are harvested and selected from the border area of An Giang province in the southwest of Vietnam. The raw materials are transported to the laboratory when harvested. After that, conducting preliminary treatment, lemons are washed to remove crushed fruits and impurities. The pods are then separated and the meat is removed. The shells after the treatment will be pureed to be approximately 0.5 mm in size and placed in the extraction device.

### **Hydro-distillation pilot procedure**

Fruit after harvest is pre-treated, put into storage tanks, the amount of water is added to suit each experiment, and put into the distillation system at the rate of 1: 6 material/water. The distillation temperature is 150°C (inside the 100°C unit) and the distillation time is calculated from the moment the first drop of liquid appears (after 50 minutes), until the quantity of the essential oil remains constant. After the extraction of essential oils, we obtain a mixture of water and essential oils after going through a condenser to recover the essential oil. The essential oil obtained with a little water should be anhydrous with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salt to remove the water in the oil. After the elimination process, we obtain pure essential oils.

### **Gas Chromatography – Mass Spectrometry**

The chemical composition of essential oils was determined by GC-MS analysis using GC Agilent 6890 N instrument combined with inert HP5-MS and MS 5973 columns. The pressure of the head column is 9.3 psi. Essential oil is added with 1 ml of n-hexane and dehydrated with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Constant flow rate at 1 mL/min. Nozzle temperature is 250 ° C and the dispensing rate is 30. Thermal program for samples: 50 ° C held for 2 minutes increments of 2 ° C / min to 80 ° C, further increments of 5 ° C / min to 150 ° C, continue to increase 10 ° C / min to 200 ° C, increase 20 ° C / min to 300 ° C hold for 5 minutes.

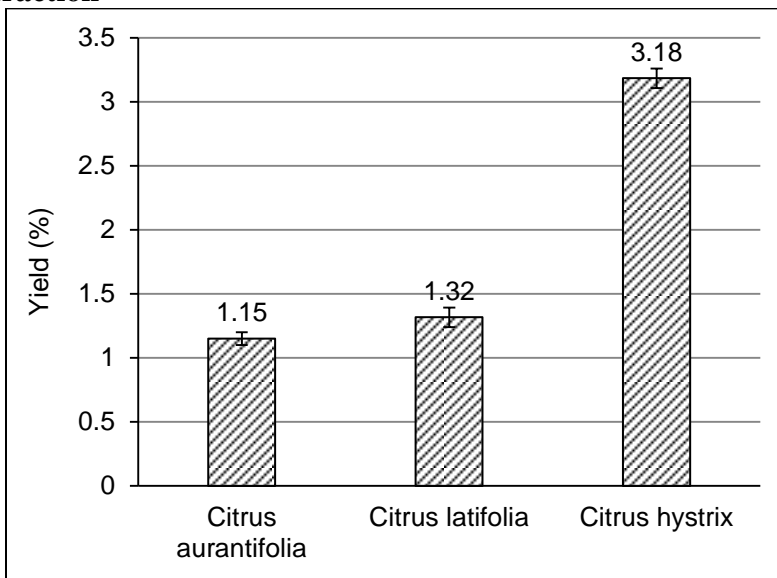
### **Antibacterial activity testing**

In this study, the antibacterial activity of lemon essential oils was tested against certain gram-positive bacteria (*Bacillus Sublilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Samonella Typhimurium*, *Pseudomonas Aeruginosa*). . All laboratory

equipment and culture media were prepared and autoclaved at 121°C for 15 minutes. The test strains were shaken in 5 ml of Mueller Hinton Broth medium (MHB) for 18-20 hours at 35 ± 2 °C. Then calibrated to Mc Farland 0.5 equal to 1 – 2.10<sup>8</sup> with 0.9% NaCl physiological saline. 100 µl of 10<sup>8</sup> CFU / ml concentration of bacteria broth is pumped into MHA agar plates and spread evenly on the surface of the culture dish. In this experiment, the well diameter used is 6mm, which corresponds to 50 µl of essential oil sample.

## Results and Discussion

### Essential oils extraction

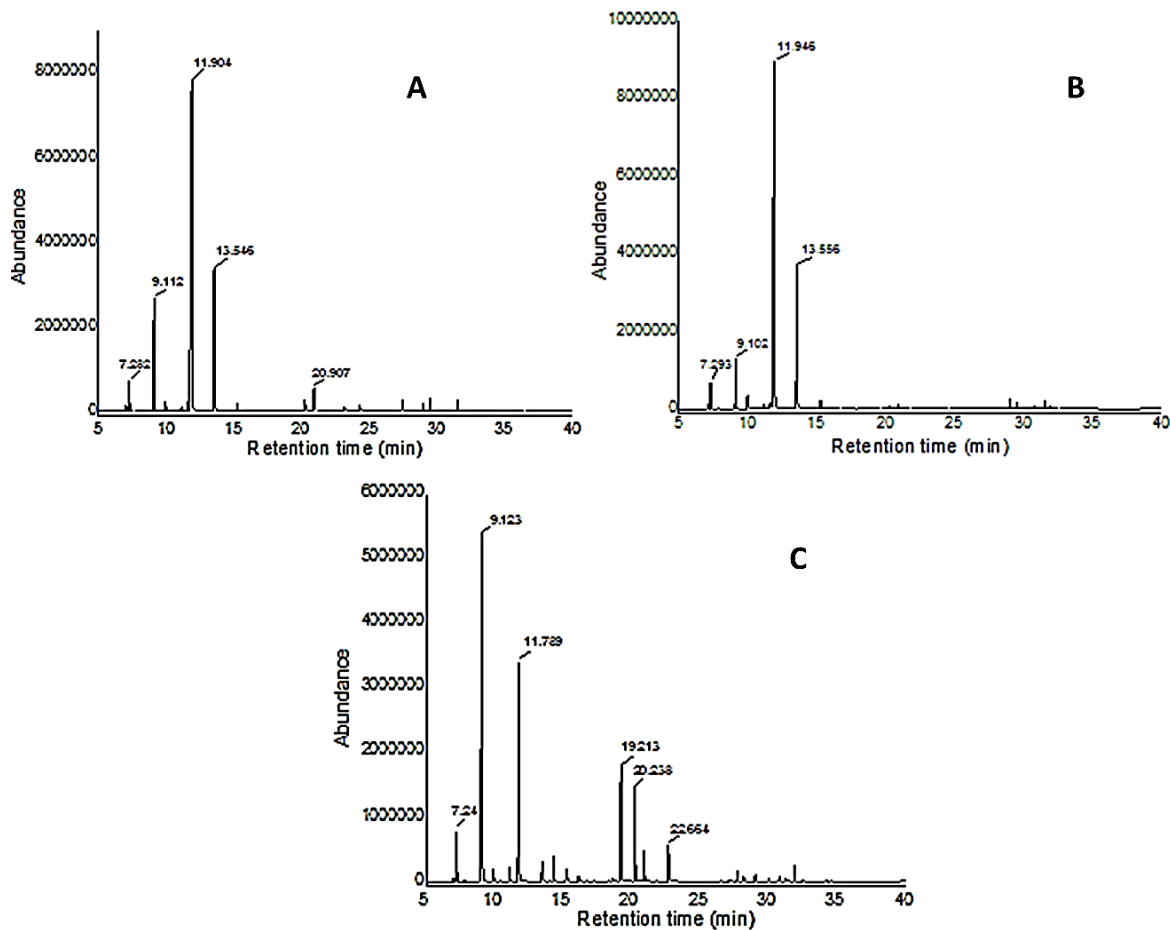


**Figure 1.** The efficiency of essential oils at the pilot production scale

The results of extracting essential oils from different types of lemon peel are shown in the graph in figure 3.1. Based on Figure 3.1 shows, the efficiency is obtained from three types of *C. aurantifolia* peel (1.15%), *C. latifolia* (1.32%), and *C. hystrix* (3.18%). *C. hystrix* peel essential oil is twice as effective as *C. aurantifolia* and *C. latifolia* peel oil. The differences in the essential oil content between lemons depend on the individual characteristics of the ingredients, growing conditions, soil, and harvesting stage. The year 2020 Quyen et al. extracted *C. aurantifolia* peel essential oil at a laboratory scale with an efficiency of 2.1%. Meanwhile, Atti-Santos and his team used a Clevenger device to distill essential oils from *C. latifolia* peels in the laboratory, with the essential oil content being 5.45% [13]. The team of Hongratanaworakit and Buchbauer from Srinakharinworit University extracted *C. hystrix* essential oil from fresh skin by hydrodistillation method on Clevenger device for 2 hours, yield 1.5% w / w. On the other hand, Chanthaphon et al. use *C. hystrix* source grown in Songkhla (Thailand) from May to July 2005 to extract essential oils, with 2.56% content recovered through the hydrodistillation process [14]. However, each material will have different advantages and disadvantages in the extraction process. Distillation time depends on a number of factors such as raw material, temperature, ingredient/solvent ratio, sample size,... The longer the distillation time, the higher the amount of essential oil. The process of distillation with high temperature when extracting will denature volatile compounds in essential oils. However, up to a certain time, the amount of essential oils does not increase anymore, and if further distillation can affect the quality of the product, the product is likely to be denatured and consume an unnecessary amount of energy equipment leads to increased costs.



## Chemical composition of lime peel essential oil



**Figure 2.** Essential oil chromatogram: a) *Citrus latifolia*, b) *C. aurantifolia*, c) *C. Hystrix*

**Table 1.** Chemical composition of essential oil

| Name                | C. Latifolia | C. Aurantifolia | C. Hystrix |
|---------------------|--------------|-----------------|------------|
| $\alpha$ -Thujene   | 0.467        | 0.3             | 0.207      |
| $\alpha$ -Pinene    | 2.206        | 1.857           | 2.699      |
| Camphene            | 0.106        |                 | 0.172      |
| Sabinene            |              |                 | 13.003     |
| $\beta$ -Pinene     | 10.581       | 4.225           | 28.221     |
| $\beta$ -Myrcene    | 1.207        | 1.502           | 1.301      |
| $\alpha$ -Terpinene | 0.608        | 0.59            |            |
| $\rho$ -Cymene      | 1.138        | 0.869           | 1.999      |
| D-Limonene          | 56.076       | 70.52           | 20.121     |
| $\gamma$ -Terpinene | 16.108       | 15.418          | 1.831      |

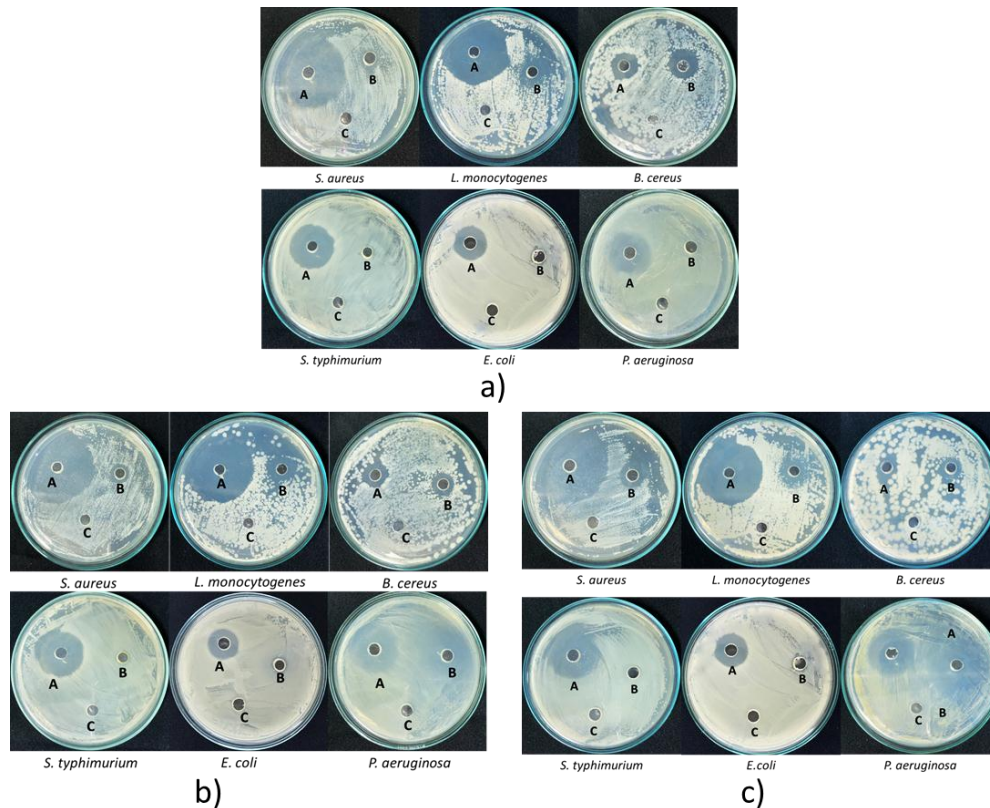
|                              |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| Terpinolene                  | 0.957 | 1.078 |       |
| Linalool                     | 0.341 |       | 0.682 |
| Citronellal                  |       |       | 9.777 |
| Terpinen-4-ol                | 1.379 | 0.386 | 7.464 |
| $\alpha$ -Terpineol          | 2.586 | 0.573 | 2.551 |
| Citronellol                  |       |       | 3.125 |
| $\beta$ -Citral              | 0.992 |       |       |
| $\alpha$ -Citral             | 1.174 |       |       |
| Nerol acetate                | 1.362 |       |       |
| Caryophyllene                | 0.65  | 0.689 | 0.46  |
| trans- $\alpha$ -Bergamotene | 0.992 | 0.511 |       |
| $\alpha$ -Caryophyllene      |       |       | 0.168 |
| Germacrene D                 |       |       | 0.352 |
| $\beta$ -Bisabolene          | 1.071 | 0.853 |       |
| $\delta$ -Cadinene           |       |       | 0.894 |

The percentage content and the name of the volatile compound obtained from the essential oils of the three shells (*Citrus latifolia*, *C. aurantifolia*, *C. Hystrix*) are shown in Table 1, via GC-MS analysis. Based on Table 1 and Figure 2, it can be seen that the components that account for high concentrations of the three essential oils are hydrocarbon monoterpene such as D-Limonene (56,076%, 70.52%, 20,121%),  $\beta$ -pinene (10,581%, 4,225 %, 28,221%),  $\gamma$ -Terpinene (16,108%, 15,418%, 1,831%) respectively. However, *C. Hystrix* essential oil contains a number of specific ingredients that account for relatively high levels of Sabinene (13,003%), Citronellal (9,777%), Citronellol (3,125%) compared to the other two essential oils. On a laboratory scale, essential oils of *Citrus aurantifolia* (farm G. Corigliano, Bovalino, Italy), were extracted by hydrodistillation, analyzed by GC-MS by Spadaro et al. ( 2012) [12]. The main components limonene (58.4%),  $\beta$ -pinene (15.4%),  $\gamma$ -terpinene (8.5%) and citral (4.4%) have been shown. Asnaashari and his team used essential oils from Barij-Essence, Iran, and GC-MS analysis of *C. aurantifolia* essential oil resulted in the identification and quantification of about 22 key compounds, accounting for 88, 85% of the total number of ingredients. Limonene (28.27%) is the main ingredient, followed by  $\alpha$ -terpineol (19.61%),  $p$ -cymene (8.6%) and  $\beta$ -pinene (5.7%) [15]. In 2001, Pino and Rosado experimented on samples of *Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus latifolia* Tanaka collected in Cuba. The results showed differences found in odor and taste in both essential oils,  $\gamma$ -terpinene (9.5% and 11.8%), Limonene (40.4% and 55.6%),  $\alpha$ -terpineol (12.7% and 6.6%) and terpinolene (8.7% and 5.2%) are the main ingredients, respectively [16]. With shell material *Citrus Hystrix* research group of Zuhra et al. extracted and analyzed essential oils obtained 30 compounds. Limonene (10.59%),  $\beta$ -pinene (23.03%), terpinene-4-ol (11.43%), sabinene (13.37%), and citronella (10.41%) seem to be the main compounds of essential oils obtained from the hydrodistillation [17]. As can be seen, the difference between the composition of distilled oil in the pilot-scale and in the laboratory. However, GC-MS analysis results give data consistent with previous work on lemon essential oils distilled in the laboratory, with equivalent amounts of D-limonene,  $\beta$ -pinene, terpinolene,  $\alpha$ -terpineol, citral, ...

## Antimicrobial Activity of essential oils

**Table 1.** Antibacterial results of 3 types of lemon peel essential oils

| Tested Bacteria                     | Citrus aurantifolia | Citrus latifolia | Citrus hystrix | Amoxicillin 0,25 mg/ml |
|-------------------------------------|---------------------|------------------|----------------|------------------------|
| <i>S. aureus</i> NRRL B-313         | 10±0                | 14±0.57          | 12±0.57        | 41±1.66                |
| <i>L. monocytogenes</i> NRRL B-2354 | 18±0.6              | 18.6±0.6         | 17.3±0.33      | 39±0.33                |
| <i>B. cereus</i> ATCC 10876         | 13.3±0.88           | 14±0.88          | 12.6±0.33      | 11.6±0.66              |
| <i>S. typhimurium</i> YS1646        | -                   | -                | -              | 27±0.57                |
| <i>E. coli</i> NRRL B-409           | -                   | -                | -              | 15.3±0.33              |
| <i>P.aeruginosa</i> NRRL B-14781    | -                   | -                | -              | 24.3±0.33              |



**Figure 3.** Antibacterial activity of lemon oil properties a) *C. aurantifolia*, b) *C. Hystrix*, c) *Citrus latifolia* with six bacteria (A): Positive control - Amoxicillin; (B): Seedless lemon essential oil; (C): The control was H<sub>2</sub>O negative.

In this study, the antibacterial activity of lemon essential oils was tested against certain gram-positive bacteria (*Bacillus Sublilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Samonella Typhimurium*, *Pseudomonas Aeruginosa*). Concentrations of essential oils compared with standard antibiotics (Amoxicillin), which show marked antibacterial activities, are manifested by their inhibitory regions (Figures 3. A, B, C).

However, according to the results, the following statements can be made: The antibacterial ability of most lemon essential oils on gram-positive microorganisms is better than that of gram-negative microorganisms. Experimental results on the diffusion of agar plates show resistance to

some tested strains of microorganisms. The results of antibacterial ring diameter data are summarized in Table 3.3. Specifically, seedless lemon essential oil ( $14 \pm 0.57$ ,  $18.6 \pm 0.6$ ,  $14 \pm 0.88$ ), seeded lemon ( $10 \pm 0$ ,  $18 \pm 0.6$ ,  $13.3 \pm 0.88$ ) and lemon ( $12 \pm 0.57$ ,  $17.3 \pm 0.33$ ,  $12.6 \pm 0.33$ ) were resistant to 3 strains of gram-positive bacteria (*Staphylococcus Aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus Subilitis*) respectively. Results showed that Citrus essential oil had broad-spectrum antibacterial activity on even gram-positive bacteria, probably because of its D-limonene component. All samples showed antibacterial activity against gram-positive bacteria with a variation of antimicrobial activity depending on the composition and content of D-Limonene,  $\beta$ -Pinene, and  $\gamma$ -terpineol in essential oils [18].

### **Conclusion**

Through research results extracted from the bark (*C. aurantifolia*, *C. Hystrix*, *C. latifolia*) on a pilot scale, it shows that kumquat peel oil obtained from 3 types of lemons are light yellow, spicy, gills characteristic fragrance. The yield obtained was *C. aurantifolia* (1.15%), *C. latifolia* (1.32%), and *C. Hystrix* (3.18%). The chemical composition of lemon essential oil is mainly terpene hydrocarbons with main active ingredients D-Limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpineol,  $\rho$ -cymene, and  $\beta$ -pinene. According to the research, this is the chemical composition related to the ability of essential oils to show activity. Results of biological activity test of three essential oil samples obtained from different lemons all have antibacterial properties against bacteria strains *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, but essential oil samples obtained from essential oil *C. Latifolia* has a higher antibacterial activity. At the same time, *C. latifolia* also showed higher antioxidant activity than *C. aurantifolia* and *C. Hystrix*.

### **Acknowledgements**

This research is funded by Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam.

### **References**

- [1] T. T. K. Ngan et al., "Physico-chemical profile of essential oil of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) Grown in An Giang Province, Vietnam," *Asian J. Chem.*, vol. 31, no. 12, pp. 2855–2858, 2019, doi: 10.14233/ajchem.2019.22167.
- [2] T. T. Hien, N. P. T. Nhan, N. D. Trinh, H. T. T. Van, and B. Giang, "Optimizing the Pomelo Oils Extraction Process by Microwave-Assisted Hydro-Distillation Using Soft Computing Approaches," *Solid State Phenom.*, vol. 279, pp. 217–221, 2018, doi: 10.4028/www.scientific.net/ssp.279.217.
- [3] T. H. Tran, P. T. N. Nguyen, V. T. T. Ho, T. H. N. Le, L. G. Bach, and T. D. Nguyen, "Using soft computing approaches for orange (*Citrus nobilis* Lour. var. *nobilis*) oils extraction process," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 479, p. 012015, 2019, doi: 10.1088/1757-899x/479/1/012015.
- [4] T. H. Tran et al., "Green technology to optimize the extraction process of turmeric (*Curcuma longa* L.) oils," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 479, p. 012002, 2019, doi: 10.1088/1757-899x/479/1/012002.
- [5] A. Sanei-Dehkordi, M. M. Sedaghat, H. Vatandoost, and M. R. Abai, "Chemical compositions of the peel essential oil of *Citrus aurantium* and its natural larvicidal activity against the malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in comparison with *Citrus paradisi*," *J. Arthropod. Borne. Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 577–585, 2016.
- [6] R. Costa, C. Bisignano, A. Filocamo, E. Grasso, F. Occhiuto, and F. Spadaro, "Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 26, no. 6, pp. 400–408, 2014, doi: 10.1080/10412905.2014.964428.

- [7] R. S. Lemes et al., "Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 90, no. 2, pp. 1285–1292, 2018, doi: 10.1590/0001-3765201820170847.
- [8] N. J. Ruiz-Pérez et al., "Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* Essential Oils," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. September 2015, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1038/srep25371.
- [9] Q. L. P. Tan, X. N. T. Kieu, N. H. T. Kim, and X. N. T. Hong, "Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*," *Emirates J. Food Agric.*, vol. 24, no. 1, pp. 25–30, 2012, doi: 10.9755/ejfa.v24i1.10595.
- [10] P. M. Jazet Dongmo, L. N. Tatsadjieu, E. Tchinda Sonwa, J. Kuate, P. H. Amvam Zollo, and C. Menut, "Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*," *African J. Agric. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 354–358, 2009.
- [11] A. C. Atti-Santos, M. Rossato, L. A. Serafini, E. Cassel, and P. Moyna, "Extraction of essential oils from lime (*Citrus latifolia tanaka*) by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 48, no. 1, pp. 155–160, 2005, doi: 10.1590/S1516-89132005000100020.
- [12] F. Spadaro, R. Costa, C. Circosta, and F. Occhiuto, "Volatile composition and biological activity of key lime citrus *aurantifolia* essential oil," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 7, no. 11, pp. 1523–1526, 2012, doi: 10.1177/1934578x1200701128.
- [13] Quyen NTT, Quyen NTN, Linh HTK, Ngoc TT Le, Anh HLT, Nguyen NHK, et al. Essential oil from lemon (*Citrus aurantifolia*) Grown in Ben Tre Province, Vietnam: Condition extraction, chemical composition and antibacterial properties. *Asian J Chem.* 2020;32(4):965–9.
- [14] Chanthaphon, Sumonrat, Suphitchaya Chanthachum, and Tipparat Hongpattarakere. "Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms." *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 30 (2008).
- [15] S. Asnaashari et al., "Essential Oil from *Citrus aurantifolia* prevents ketotifen-induced weight-gain in mice," *Phyther. Res.*, vol. 24, no. 12, pp. 1893–1897, 2010, doi: 10.1002/ptr.3227.
- [16] J. A. Pino and A. Rosado, "Comparative investigation of the distilled lime oils(*cifrus auranfifolia* swing le and *cifrus lafifolia tanaka*)from Cuba," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 179–180, 2001, doi: 10.1080/10412905.2001.9699653.
- [17] C. F. Zuhra, S. Lenny, and K. Nurtjahya, "Comparison of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from the Leaf and Peel *Citrus Hystrix*," *Proc. Int. Conf. Nat. Environ. Sci.*, pp. 67–72, 2014.
- [18] D. Aripin, E. Julaeha, M. Dardjan, and A. Cahyanto, "Chemical composition of *Citrus* spp . and oral antimicrobial effect of *Citrus* spp . peels essential oils against *Streptococcus mutans*," *Padjadjaran J. Dent.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–11, 2015.

**THUYẾT MINH**

**ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ NĂM 2020**

**MÃ SỐ ĐỀ TÀI: 2020. 01. 138**

**I. THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI**

**1. Tên đề tài (Tiếng Việt và Tiếng Anh)**

- Tiếng Việt: Ứng dụng khoa học công nghệ xây dựng quy trình chiết suất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot

- Tiếng Anh: Applying science and technology to build the process of extracting essential oil from the raw material of peels (Citrus latifolia, Citrus aurantifolia, Citrus Hystrix) at the pilot production scale

**2. Lĩnh vực nghiên cứu:**

- Kỹ thuật và công nghệ;                       Khoa học Xã hội nhân văn  
 Khoa học sức khỏe                               Kinh tế Tài chính

**3. Thời gian thực hiện:** 6 tháng (Từ tháng 7/2020 đến tháng 12/2020 )

**4. Kinh phí thực hiện (kinh phí Nhà trường):** 35.000.000 VNĐ

**5. Chủ nhiệm đề tài: Trần Thị Kim Ngân**

Ngày, tháng, năm sinh: 18/04/1996

Giới tính: Nữ

Đơn vị công tác: Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT

Chức vụ: Nghiên cứu viên

Địa chỉ liên lạc: 1/3 Phạm Thị Giây, Thới Tam Thôn, Hóc Môn, TP. Hồ Chí Minh

Điện thoại: 0765712086

Email: nganttk@ntt.edu.vn

**5. Các tổ chức và thành viên chính tham gia thực hiện đề tài (nếu có)**

**5.1. Tên cơ quan :** Đại học Nguyễn Tất Thành

Họ và tên thủ trưởng tổ chức: PGS. TS Nguyễn Mạnh Hùng

Địa chỉ: 300A Nguyễn Tất Thành, Phường 13, Quận 4, TP. Hồ Chí Minh

Điện thoại:

**5.2. Cán bộ giảng viên**

| TT | Họ và tên | Chuyên ngành | Đơn vị | Nội dung chính tham gia |
|----|-----------|--------------|--------|-------------------------|
|----|-----------|--------------|--------|-------------------------|



|   |                       |         |        |   |
|---|-----------------------|---------|--------|---|
| 1 | K.S Trần Thị Kim Ngân | Hóa học | ĐH NTT | Chủ nhiệm đề tài, phân tích và xây dựng quy trình công nghệ, viết thuyết minh, báo cáo tổng kết |
| 2 | K.S Trần Thiện Hiền   | Hóa học | ĐH NTT | Phối hợp thực hiện đề tài   |
| 3 | K.S Đào Tấn Phát      | Hóa học | ĐH NTT | Phối hợp thực hiện đề tài   |
| 4 | K.S Ngô Thị Cẩm Quyên | Hóa học | ĐH NTT | Phối hợp thực hiện đề tài   |

## II. MỤC TIÊU, NỘI DUNG NGHIÊN CỨU VÀ PHƯƠNG ÁN THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

### 6. Mục tiêu của đề tài (*Bám sát và cụ thể hoá định hướng mục tiêu theo đặt hàng*)

Ứng dụng khoa học công nghệ xây dựng quy trình chiết suất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot:

- + Chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước trên quy mô pilot và phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc kí khí ghép phối phổ GC-MS.
- + Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của tinh dầu từ vỏ chanh
- + Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình bảo quản của các loại tinh dầu.

### 7. Tình trạng đề tài

- Mới
- Kế tiếp hướng nghiên cứu của chính nhóm tác giả
- Kế tiếp nghiên cứu của người khác

### 8. Tổng quan tình hình nghiên cứu, luận giải mục tiêu và nội dung nghiên cứu

**8.1. Ngoài nước** (*Phân tích đánh giá được những công trình nghiên cứu có liên quan với những kết quả nghiên cứu mới nhất trong lĩnh vực nghiên cứu của đề tài; nêu được những bước tiến về trình độ KH&CN của những kết quả nghiên cứu đó*)

Chất thơm nói chung hay tinh dầu nói riêng đã gắn liền với cuộc sống và gắn liền với nền văn minh của nhân loại từ hàng nghìn năm nay. Tinh dầu vốn là những giọt rất nhỏ, tinh túy, cô đặc nhất của các loài thảo dược, đôi khi nó chỉ là những phân tử thơm được hình thành qua chức năng điều tiết trong các loại thân cây nó tạo nên sự hấp dẫn, quyến rũ, mang lại sức sống, sự tươi tắn và tạo thêm sự phong phú cho cuộc sống. Nó là hỗn hợp các chất hữu cơ tan lẫn vào nhau, có mùi đặc trưng. Ở nhiệt độ thường tinh dầu hầu hết ở thể lỏng không tan trong nước hoặc tan rất ít, nhưng lại tan tốt trong dung môi hữu cơ như rượu ete, chất béo [1, 2]. Tinh dầu bay hơi với hơi nước, có vị cay và ngọt, nóng bỏng và có tính sát trùng mạnh. Tinh dầu được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp mỹ phẩm, đặc biệt là trong sản xuất các loại nước hoa khác nhau, sữa tắm, kem dưỡng tóc, dầu gội, và là thành phần của chất khử trùng và thuốc trừ sâu [3 – 5]. Các thành phần phenolic, hiện diện trong các loại tinh dầu, được biết là có hoạt tính kháng khuẩn và một số thường được công nhận là các chất an toàn; do đó, chúng được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn bản địa và các chất gây ô nhiễm [6]. Tinh dầu



thực vật đã được sử dụng trong hàng ngàn năm để bảo quản thực phẩm, dược phẩm, thuốc thay thế và liệu pháp tự nhiên [8]. Tinh dầu là hỗn hợp phức tạp của các hợp chất trọng lượng phân tử thấp được chiết xuất từ thực vật bằng cách chưng cất hơi nước và các dung môi khác nhau. Những chiết xuất của nó được hình thành bởi một sự kết hợp của hỗn hợp những hợp chất hóa học dễ bay hơi từ đơn giản đến phức tạp bao gồm các hợp chất nổi trội như terpene, aldehyde, alcohol và ketone. Đây là những hợp chất có nhiều trong thực vật.

Ở nhiệt độ thường, tinh dầu ở thể lỏng, trừ một số trường hợp như methol, camphor,...là ở thể rắn. Đa số tinh dầu không có màu hoặc có màu vàng nhạt, tinh dầu có vị cay và hắc, có một số tinh dầu nặng hơn nước như tinh dầu đinh hương, tinh dầu quế. Tỷ trọng thay đổi theo thành phần hóa học. Nếu tinh dầu có chứa thành phần chủ yếu là hydrocarbon terpenic thì tỷ trọng thấp, tinh dầu có hợp chất chứa oxy hoặc nhân thơm thì tỷ trọng cao hơn. Tinh dầu có chỉ số khúc xạ cao hay thấp tùy theo thành phần các chất chứa trong tinh dầu là no, không no hoặc có nhân thơm. Nếu tinh dầu có nhiều thành phần hay có nhiều đay nối đôi thì chỉ số khúc xạ cao.

Turek và Stintzing (2011b; 2012) cho thấy những thay đổi trong một số loại tinh dầu đã được thúc đẩy dưới tác động của ánh sáng, tuy nhiên, các loại dầu từ các loài thực vật khác nhau phản ứng khác nhau [9]. Dưới ảnh hưởng của ánh sáng, nhiệt độ, không khí, nước tinh dầu dễ bị oxy hóa và có thể bị nhựa hóa một phần. Độ ẩm đã được coi là một lý do có thể dẫn đến sự biến tính của tinh dầu [9]. Alcol trong tinh dầu bị oxy hóa thành aldehyd, aldehyd biến thành acid. Các hợp chất nối đôi dễ bị oxy hóa hoặc tham gia vào phản ứng cộng hợp. Các hợp chất ceton và aldehyd dễ bị aldol hóa tạo nhựa khi có sự hiện diện của kiềm. Nhiều thành phần có các nhóm chức khác nhau có thể tham gia các phản ứng, làm thay đổi tính chất của tinh dầu.

Cây chóc - chanh Thái – Kaffir lime – hay còn gọi là chanh Kieffer, chanh Makrut, hoặc chanh Magrood, (Bai Ma-gkood, PewMa-gkrood) là một loài chanh bản địa của Lào, Campuchia, Thái Lan, Indonesia, Malaysia, Philippines và Việt Nam. Nó được sử dụng phổ biến trong ẩm thực Đông Nam Á, đặc biệt là trong ẩm thực Thái Lan. Lá của loại cây này là một gia vị đặc trưng làm nên một trong những tinh hoa của nền ẩm thực Thái - món Tom Yum nổi tiếng toàn cầu. Chanh Thái – Chanh chóc là cây thân gỗ có độ cao từ nhỏ đến trung bình, cây trưởng thành có thể cao từ 2m đến 10m. Thân cây có gai ngang. Lá xoan xoan thuôn hay ngọn giáo, mép khía răng hay nguyên, chóp tròn hay lõm, có khi nhọn, màu xanh thẫm thùy kép, mọc đối, cuống lá có cánh rất rộng, có khi cũng to bằng phiến lá (tạo nên hình lá gần tương tự số 8 nên còn được gọi với tên "lá chanh số 8"), lá có tinh dầu, mùi thơm nồng. Toàn cây chanh chóc có tinh dầu rất thơm nên được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực từ ẩm thực, dược phẩm đến mỹ phẩm, trong đó bộ phận được sử dụng nhiều nhất trên cây là lá, và quả (với nước cốt, vỏ quả).

Chanh Không Hạt (*Citrus latifolia*) được John T. Bearss lai tạo tại California, Mỹ vào năm 1895. Phân bố ở Việt Nam chủ yếu ở các tỉnh miền Nam. Cây cao từ 1 – 3 m, thường mọc xòe, tán rộng, thân có gai, lá hình trứng có mép răng cưa. Hoa chanh màu trắng ngà vàng, có gân màu tím nhạt, nở theo từng chùm. Quả chanh khi chín có màu xanh hoặc vàng, thịt quả có vị chua. Tép chanh mọc nước nằm xếp chồng lên nhau. Gần như



tất cả các bộ phận của cây chanh đều mang một mùi thơm rất đặc trưng và khá đa dạng về chủng loại. Cây cho trái quanh năm, nên còn gọi là *chanh tứ quý* do loại chanh này cho ra trái quanh năm. Có thể cho năng suất quả 150 – 200 kg/năm/cây. Một ưu điểm nổi trội mà ít loại chanh nào có được. Chanh Không Hạt còn có sức kháng bệnh rất mạnh, nhất là không thấy bị nhiễm bệnh vàng lá gân xanh như các loại cây có múi khác. Cây dễ trồng và dễ chăm sóc. Tuy nhiên muốn đạt năng suất, chất lượng cao cần được cung cấp đầy đủ dinh dưỡng như những loại cây trồng khác.

Chanh có hạt (*Citrus aurantifolia*) Ở Việt Nam, điều kiện khí hậu đất đai rất thuận lợi cho việc phát triển các giống *Citrus*. Các loại chính yếu được trồng từ bắc vào nam trong các vườn cây ăn trái ở nông thôn các vùng Hà Bắc, Hòa Bình, Hà Tây, Nghệ An, Hà Tĩnh, Nha Trang, Đồng Nai, Cần thơ. Quả chanh ta có kích thước nhỏ hơn, nhiều hạt hơn, hàm lượng axit cao hơn, mùi vị nồng hơn và vỏ mỏng hơn so với loại chanh không hạt (*Citrus latifolia*). Chanh ta được ưa chuộng vì mùi vị đặc trưng của nó so với các loại chanh khác - cụ thể là vị chua và đắng nồng hơn - và thường được dùng làm mứt cao cấp.

Trong một nghiên cứu khác, thành phần dễ bay hơi của vỏ *C. hystrix* ở Sri Lanka thu được bởi HS-SPME (Chiết xuất vi pha rắn Headspace) đã xác định tổng cộng 45 hợp chất. Các thành phần chính là Citronellal (12.267%),  $\alpha$ -pinene (9.244%), 3-Carene (18.310%), D-limonene (11,538%),  $\alpha$ -Cadinene (4.290%), Copaene (4.290%), linalool (4,020%), Caryophyllene (3,988%) và  $\gamma$ -Cadiene (3,544%), chiếm khoảng 71% tổng số hợp chất được phát hiện [10]. Các biến thể thuộc tính nội tại của *C. Hystrix* có thể chủ yếu là do các kỹ thuật chiết xuất khác nhau, điều kiện bảo quản, độ chín của quả hoặc các yếu tố môi trường và sự truyền khác nhau, giống cây trồng và các vùng khí hậu và địa lý khác nhau. Trong nghiên cứu của Jantan et al. (1996) đã tiến hành phân tích thành phần hóa học của các loại tinh dầu thuộc họ *Citrus*, được xác định trong vỏ của tinh dầu *C. hystrix* có thành phần chủ yếu là monoterpene (97,2%) trong đó limonene (14,2%),  $\beta$ -pinene (39,3%) %, terpinen-4-ol (8,9%) và citronellal (11,7%) là thành phần chính. Các monoterpene khác với số lượng đáng kể là: citronellol (3.0%),  $\alpha$ -terpineol (3.0%), -terpinene (2.4%),  $\alpha$ -pinene (2.0%) và linalool (1.9%). Mười bảy thành phần Sesquiterpenoid được xác định trong tinh dầu nhưng với số lượng nhỏ và chỉ chiếm 2,6% lượng tinh dầu [11]. Hongratanaworakit và Buchbauer (2007) đã sử dụng các nguyên liệu thô được thu thập từ Thái Lan, chiết xuất và phân tích tinh dầu *C. hystrix* chủ yếu bao gồm hydrocarbon monoterpene với  $\beta$ -pinene và Limonene (30,73%). (18,76%) là thành phần chính. Các thành phần nhỏ khác là  $\alpha$ -terpineol (8,35%), terpinene-4-ol (10,63%),  $\beta$ -terpinene (6,18%), terpinolene (5,09%) và  $\alpha$ -terpinene (5,09%) [12].

Trong khi đó, Loh et al. (2011) đã thử nghiệm trên lá của *C. hystrix*, các monoterpene oxy được tạo ra trong tinh dầu lá chanh Kaffir chứa khoảng 86,15% tổng lượng tinh dầu. Thành phần chính được đặc trưng bởi dầu lá chanh kaffir là  $\beta$ -citronellal, chiếm 66,85% tổng lượng dầu. Tiếp theo là linalool (3,90%), citronellol (1,76%) và citronellol (6,59%) [13]. Tương tự khi hàm lượng  $\beta$ -Citronellal chiếm 66,9% trong nghiên cứu của Othman et al (2016) [14]. Năm 2013, Norkaew et al đã sử dụng phương pháp chiết xuất carbon dioxide siêu tới hạn (SCDE) để chiết xuất tinh dầu, kết quả cho thấy các hợp chất chính thay đổi nhiều so với các phương pháp khác với  $\beta$ -Citronellal (1,33%),  $\beta$ -Citronellol. (0,87%) và Nerolidol (2,0%) [15]. Cuối cùng, Haiyee et al. (2012) đã sử dụng



phương pháp chiết chất lỏng có áp suất (PLE) để chiết, kết quả cho thấy  $\beta$ -Citronellal chiếm 25,87%,  $\beta$ -Citronellol 4,02%,  $\beta$ -Linalool 3,22%, Naphthalene 2,18%. Hàm lượng  $\beta$ -Citronellal trong nghiên cứu này cao hơn các nghiên cứu khác do tính chất của lò vi sóng, lò vi sóng có hiệu quả hơn đối với các hợp chất chứa oxy trong công thức phân tử, vì vậy hàm lượng  $\beta$ -Citronellal chiếm 81,427% [16].

Nghiên cứu 2006 Okonkwo và cộng sự đã thiết kế, xây dựng và chạy thử mô hình pilot để sản xuất các loại tinh dầu (0,864 l/h) từ lá bạch đàn. Phân tích cho thấy tốc độ hơi nước đi qua lớp lá có thể lệch khỏi mối quan hệ tuyến tính với đường cong tùy thuộc vào khả năng tải. Một tỷ lệ sản xuất tinh dầu/lá  $3.0 \times 10^2$  ml/g đã thu được. Khi thiết kế một nhà máy thí điểm, bể chứa có kích thước 0,45 m diam và chiều dài 1,65 m [17].

Soto-Armenta (2017) Nghiên cứu về quy trình chưng cất hơi nước để lấy tinh dầu từ lá *Lippia graveolens* đã được đánh giá ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot. Các thông số được phân tích là lưu lượng hơi và độ xốp, ảnh hưởng của chúng đến năng suất chiết được xác định. Ảnh hưởng của dòng hơi được tìm thấy là một thông số quan trọng trong quá trình chưng cất hơi nước. Các chất chiết xuất thu được phân tích bởi GC-MS. Carvacrol, thymol và  $\beta$ -cymene tạo thành các thành phần chính của *L. graveolens* ở cả hai quy mô. Mô hình được thử nghiệm cho thấy phù hợp với dữ liệu thực nghiệm cho *L. graveolens*. Kết quả cho thấy năng suất lớn nhất (4,41%) thu được ở quy mô phòng thí nghiệm [18].

**8.2. Trong nước** (*Phân tích, đánh giá tình hình nghiên cứu trong nước thuộc lĩnh vực nghiên cứu của đề tài, đặc biệt phải nêu cụ thể được những kết quả KH&CN liên quan đến đề tài mà các cán bộ tham gia đề tài đã thực hiện. Nếu có các đề tài cùng bản chất đã và đang được thực hiện ở cấp khác, nơi khác thì phải giải trình rõ các nội dung kỹ thuật liên quan đến đề tài này; Nếu phát hiện có đề tài đang tiến hành mà đề tài này có thể phối hợp nghiên cứu được thì cần ghi rõ Tên đề tài, Tên Chủ nhiệm đề tài và cơ quan chủ trì đề tài đó*)

Hiện nay, tại nước ta có khá nhiều các đề tài nghiên cứu hay các luận văn tốt nghiệp, luận văn cao học trình bày về về nguồn gốc, các thành phần hóa học của cây họ Citrus cũng như các phương pháp chiết tách tinh dầu khác nhau. Cho đến nay, theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, các nghiên cứu trước đó hầu hết còn hạn chế tập trung vào yếu tố ảnh hưởng đến tính chất tinh dầu ở các điều kiện khác nhau. Bên cạnh đó, chanh chúc cũng là nguồn nguyên liệu mới được phát hiện trở lại nên không có nhiều cứu đối với loại này, điều này cũng là nguyên nhân dẫn đến các công bố còn hạn chế trên dòng nguyên liệu này. Trần Thị Kim Ngân và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chiết tách tinh dầu từ vỏ chanh chúc bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước. Tinh dầu kaffir vôi (*Citrus hystrix* DC) trong nghiên cứu này cho các đặc tính hóa lý của nó và thành phần. Sản lượng tinh dầu đạt được 1,8%. Các thông số hóa lý bao gồm tỷ trọng trung bình (0,8587g/cm<sup>3</sup>), chỉ số este (4,203 mg KOH/g) và chỉ số axit (0,667 mgKOH/g). Tinh dầu chứa 20 thành phần chính trong đó thành phần chính là  $\beta$ -pinene (34,741%), sabinene (23,637%), D-limonene (19,08%), citronellal (8.181%) và  $\alpha$ -pinene (3.378%). Kết quả thu được cho thấy vỏ *Citrus hystrix* chứa lượng  $\alpha$ -pinene nhiều hơn trên một đơn vị thể tích tinh dầu. Kết quả cho thấy các thành phần hóa học khác nhau cũng như các tính chất hóa lý của tinh dầu bị ảnh hưởng



bởi điều kiện môi trường, phương pháp chiết xuất và mùa thu hoạch [19].

Đây là một trong những kết quả nghiên cứu thuộc đề tài cấp Bộ công Thương "Nghiên cứu xác định khả năng kháng một số nhóm vi sinh vật của tinh dầu Trúc (*Citrus hystrix*)" của Bùi Thanh Bình và cộng sự (2019). Bài báo trình bày kết quả khảo sát hàm lượng, các chỉ tiêu cảm quan, hóa lý và thành phần hóa học của tinh dầu vỏ trái và lá chích (*Citrus hystrix*) trồng tại huyện Tri Tôn, An Giang được chiết tách bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Thành phần hóa học của tinh dầu được xác định bằng phương pháp GC-MS. Trong khi thành phần hóa học chính của tinh dầu vỏ là các hợp chất  $\beta$ -pinene (34,8 -36,6%), limonene (19,88-20,39%),  $\beta$ -phellandrene (22,70-24,12%), citronella (7,01-7,29%),  $\alpha$ -pinene (3,55 - 4,05%) và terpinene-4-ol (0,59-1,15%) thì thành phần hóa học chủ yếu của tinh dầu lá Trúc là Citronella (75,82-77,09%), Citronellol (13,03-15,50%) và Linalool (2,62-2,85%) [20].

Một số kết quả bước đầu về công nghệ chiết xuất và thành phần tinh dầu thu được từ vỏ chanh không hạt tại Việt Nam được công bố bởi nhóm nghiên cứu của trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh (Huỳnh Thị Kim Nguyệt và cộng sự, 2012; Lê Phạm Tấn Quốc và cộng sự, 2012). Đây là hai nghiên cứu nối tiếp nhau để xác định điều kiện chiết xuất tinh dầu vỏ chanh thích hợp bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước với quy mô phòng thí nghiệm (*Citrus latifolia*). Kết quả đã đề nghị sử dụng tỷ lệ nước và vỏ chanh là 6/1 (v/w), thời gian chưng cất 20 phút, hàm lượng tối ưu của tinh dầu thu được là 1 mL/50 g vỏ chanh tương đương 2% (w/w), với thành phần chính là limonene (56,62%),  $\gamma$ -Terpinene (13,2%),  $\beta$ -Pinene (11,51%) [21].

Trần Thiện Hiền và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chiết tách tinh dầu từ vỏ chanh ta (*Citrus aurantifolia*) bằng phương pháp chiết tách có sự hỗ trợ vi sóng, kết quả đã đề xuất một số thông số kỹ thuật của quy trình thu nhận tinh dầu là: vỏ chanh có kích thước 1 đến 2 mm, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:3 g/mL, thời gian chiết là 60 phút và công suất vi sóng 450 W; hiệu suất thu nhận tinh dầu đạt được là 2,4%. Kết quả GC-MS cho thấy D-Limonene là thành phần chính chiếm 71,898%, chiếm hàm lượng cao hơn so với báo cáo của các nghiên cứu trước đây [22].

Trong nghiên cứu 2018 của Đỗ Đình Nhật và cộng sự đã tiến hành quá trình chiết xuất tinh dầu gừng bằng phương pháp chưng cất nước ở qui mô pilot. Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu của qui trình chưng cất tinh dầu gừng đã được nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất và ứng dụng ở qui mô công nghiệp. Kết quả của nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi tinh dầu cao nhất là 0,4% (tính theo vật liệu tươi) khi nguyên liệu được chưng cất sau khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày được xử lý bằng ép đùn thời gian chưng cất là 150 phút tính từ giọt đầu tiên, tỉ lệ nguyên liệu nước là 1:2 (kg/l), nhiệt độ chưng cất là 130°C [23].

**8.3. Luận giải về việc đặt ra mục tiêu và những nội dung, phạm vi/đối tượng cần nghiên cứu của đề tài** (Trên cơ sở đánh giá tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước, phân tích những công trình nghiên cứu có liên quan, những kết quả mới nhất trong lĩnh vực nghiên cứu đề tài, đánh giá những khác biệt về trình độ KH&CN trong nước và thế giới, những vấn đề đã được giải quyết, cần nêu rõ những vấn đề còn tồn tại, chỉ ra những hạn chế cụ thể, từ đó nêu được hướng giải quyết mới - luận giải và cụ thể hoá mục tiêu



*đặt ra của đề tài và những nội dung cần thực hiện trong đề tài để đạt được mục tiêu)*

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các nhà máy trong sản xuất dược phẩm ngày càng trở nên phổ biến. Các nghiên cứu khác nhau minh họa các hoạt động và hiệu quả của các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc. Tinh dầu, thu được từ các loài thực vật khác nhau đã được sử dụng và trong các ứng dụng thực tế và trong nhiều lĩnh vực sản xuất như hợp chất kháng khuẩn, thuốc và phụ gia thực phẩm [24-34]. Chanh thuộc họ Rutaceae được trồng chủ yếu ở các nước châu Á khác nhau như Việt Nam và Thái Lan [35]. Quả chanh có tiềm năng tuyệt vời trong nghiên cứu khoa học do sự hiện diện của một số lượng lớn các hợp chất hoạt tính sinh học có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa. Nghiên cứu trước đây cho thấy rằng có các hợp chất khác nhau thu được từ vỏ chanh kaffir tinh dầu như  $\alpha$ -pinene, myrcene, terpinolene, v.v, là một trong những thành phần quan trọng của chanh chúc, giúp ngăn ngừa các đặc tính gây ung thư và là chất chống ung thư [36, 37]. Quả chanh đóng một vai trò quan trọng trong các ứng dụng hương liệu và mỹ phẩm do các hoạt động kháng khuẩn của nó [38]. Chiết xuất trực tiếp với nước là một phương pháp chiết xuất phổ biến và phù hợp với hầu hết các vật liệu thực vật. Kỹ thuật này cũng không tốn kém và có tiềm năng thương mại hóa. Chất lượng của tinh dầu chanh chúc được ước tính dựa trên GC-MS [19]. Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã nhấn mạnh rằng tinh dầu có thể thu được từ lá chanh chúc, năng suất dầu được chiết xuất từ vỏ được chứng minh là cao hơn so với lá [39]. Mặt khác, khâu đánh giá độ bền tinh dầu khi sử dụng và ứng dụng trong các sản phẩm chưa được đề cập đến. Trong số các phương pháp phương pháp chung cất trực tiếp với nước (hydrodistillation) đã được sử dụng rộng rãi đặc biệt là cho sản xuất qui mô thương mại. Tại Việt Nam, giá trị của nguyên liệu chanh thay đổi với biên độ rất lớn theo từng thời điểm cụ thể do đó làm cho giá trị của sản phẩm này không ổn định và làm cho đời sống của người nông dân gặp nhiều khó khăn. Việc nâng cao giá trị kinh tế của các nông sản này được quan tâm, và sản xuất tinh dầu từ sản phẩm nông nghiệp này là một lựa chọn rất hứa hẹn, có thể nâng cao giá trị của các nông sản này. Các nghiên cứu về các phương pháp chiết xuất cũng như tối ưu hóa các thông số công nghệ để thu hồi tinh dầu từ chanh chúc đã được thực hiện từ lâu. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu được thực hiện trong bình cầu, ở qui mô phòng thí nghiệm. Từ nghiên cứu ở qui mô phòng thí nghiệm đến việc áp dụng ở qui mô công nghiệp là một chặng đường dài. Sự khác biệt về qui mô sản xuất sẽ ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và chất lượng của các loại tinh dầu. Những nghiên cứu ở qui mô pilot là cần thiết để có thể dễ dàng áp dụng sản xuất trong thực tế. Do đó đề tài đã chọn và thực hiện nghiên cứu tinh dầu từ vỏ của các loại chanh ở qui mô pilot bằng phương pháp chung cất.

**9. Tài liệu tham khảo** (*Tên công trình, tác giả, nơi và năm công bố, chỉ nêu những danh mục đã được trích dẫn để luận giải cho sự cần thiết nghiên cứu đề tài, liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu, tài liệu có liên quan đến đề tài đã trích dẫn khi đánh giá tổng quan*)

- [1] J. S. Raut and S. M. Karuppaiyl, "A status review on the medicinal properties of essential oils," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 62, pp. 250–264, 2014.
- [2] F. Bakkali and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils – A review," vol. 46, pp. 446–475, 2008.

- [3] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review," vol. 94, pp. 223–253, 2004.
- [4] A. Ijaz, F. Anwar, S. Tufail, H. Sherazi, and R. Przybylski, "Food Chemistry Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations," vol. 108, pp. 986–995, 2008.
- [5] B. Teixeira *et al.*, "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 43, pp. 587–595, 2013.
- [6] A. Singh, R. K. Singh, A. K. Bhunia, and N. Singh, "Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs," vol. 36, pp. 787–794, 2003.
- [7] L. Gachkar, D. Yadegari, M. Bagher, and M. Taghizadeh, "Food Chemistry Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils," vol. 102, pp. 898–904, 2007.
- [8] S. G. Deans, "Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*," pp. 759–762, 1997.
- [9] C. Turek and F. C. Stintzing, "Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils," pp. 3109–3123, 2011.
- [10] H. Hs and K. Mmsc, "Volatile profiling and bio-efficacy of *Citrus hystrix* fruit peel as a seed protectant against *Callosobruchus maculatus*," *J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 6, no. 4, pp. 27–31, 2018.
- [11] I. Jantan, A. S. Ahmad, A. R. Ahmad, N. A. M. Ali, and N. Ayop, "Chemical composition of some citrus oils from Malaysia," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 627–632, 1996, doi: 10.1080/10412905.1996.9701030.
- [12] T. Hongratanaworakit and G. Buchbauer, "Chemical composition and stimulating effect of *Citrus hystrix* oil on humans," *Flavour Fragr. J.*, vol. 22, no. 5, pp. 443–449, Sep. 2007, doi: 10.1002/ffj.1820.
- [13] F. S. Loh, R. M. Awang, D. Omar, and M. Rahmani, "Insecticidal properties of citrus *hystrix* DC leaves essential oil against *spodoptera litura fabricius*," *J. Med. Plants Res.*, vol. 5, no. 16, pp. 3739–3744, 2011.
- [14] S. Md Othman, M. Hassan, L. Nahar, N. Basar, S. Jamil, and S. Sarker, "Essential Oils from the Malaysian Citrus (*Rutaceae*) Medicinal Plants," *Medicines*, vol. 3, no. 2, p. 13, 2016, doi: 10.3390/medicines3020013.
- [15] O. Norkaew, K. Pitija, P. Pripdeevech, P. Sookwong, and S. Wongpornchai, "Supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of terpenoids in fresh kaffir lime leaf oil," *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 240–247, 2013.
- [16] Z. A. Haiyee and C. Winitkitcharoen, "EXTRACTION OF VOLATILE OIL FROM



KAFFIR LIME LEAVES ( *Citrus hystrix* ) USING,” *Int. J. Food, Nutr. Public Heal.*, vol. 5, pp. 201–210, 2012.

- [17] Okonkwo, E. M., et al. "Design of pilot plant for the production of essential oil from Eucalyptus leaves." (2006)
- [18] Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Acereto-Escoffié, P. O., Peraza-González, E. E., Reyes-Sosa, C. F., & Rocha-Uribe, J. A. (2017). Extraction Yield of Essential Oil from *Lippia graveolens* Leaves by Steam Distillation at Laboratory and Pilot Scales. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3), 610-621.
- [19] T. T. K. Ngan *et al.*, “Physico-chemical profile of essential oil of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) Grown in An Giang Province, Vietnam,” *Asian J. Chem.*, vol. 31, no. 12, pp. 2855–2858, 2019, doi: 10.14233/ajchem.2019.22167.
- [20] Bùi Thanh Bình, và cộng sự “Nghiên cứu thành phần hóa học của tinh dầu trúc (*Citrus Hystrix*)” *Tạp chí Khoa học và Công nghệ ngành Công Thương* số 38, 2019.
- [21] Quoc Le Pham Tan, Xinh Nguyen Thi Kieu, Nguyet Huynh Thi Kim and Xuyen Nguyen Thi Hong, 2012. Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*, Emir. J. Food Agric. 24 (1): 25-30
- [22] Thien Hien Tran, Van Tien Nguyen, Tan Phat Dao, Tri Duc Lam, Tran Quoc Toan, Trinh Duy Nguyen, Dai-Viet N. Vo, Tran Anh Vy, Le Minh Bui, 2019. New direction in research on extraction of *Citrus aurantifolia* (Lemon fruit) essential oil grown in Mekong Delta - Vietnam via microwave-assisted hydrodistillation, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 542, 012038
- [23] Đỗ Đình Nhật và Huỳnh Việt Thắng “Sản xuất tinh dầu gừng ở qui mô pilot bằng phương pháp chưng cất hydrodistillation” *Journal of Science and Technology – NTTU* số 5, 33-39, 2019.
- [24] T.T.K.Ngan, N.C. Huong, X.T. Le, P.Q. Long, T.Q. Toan, D.M. Hoang, V.T.Danh, L.N.Y. Trung, T.A. Trieu, Physico-Chemical Characteristics of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Grown in Lam Dong Province, Vietnam, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 31, No. 12 (2019), 2759-2762.
- [25] T.P.Dao, T.H. Tran, T.C.Q. Ngo, H.T.K. Linh, L.N.Y.Trung, V.T. Danh, T.T.L. Ngoc, N.D. Yen, P.M. Quan, and T.Q. Toan, Extraction of Essential Oils from Vietnam’s Orange (*Citrus sinensis*) Peels by Hydrodistillation: Modeling and Process Optimization, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 31, No. 12 (2019), 2827-2833
- [26] N.T.C. Quyen, T.T.K.Ngan, T.P. Dao, P.N.Q. Anh, N.Q. Anh, N.T.N. Thi, T.T.L. Ngoc, L.T.H. Nhan, T.T. Truc, L.T.B. Phuong, Essential Oil Hydrodistillation Process from Vietnamese Calamondin (*Citrus microcarpa*) Peels and GC/MS

- Analysis of Essential Oils Components, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 31, No. 11 (2019), 2585-2588
- [27] T.T.K. Ngan, N.V. Muoi, P.M. Quan, M.H. Cang, Evaluation of Physical and Chemical Properties of Pomelo (*Citrus grandis* L.) Essential Oil using Steam Distillation Process, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 32, No. 6 (2020), 1433-1436
- [28] T.T.K. Ngan, T.Q. Toan, M.H. Cang, Evaluation of the Physical and Chemical Properties of Vietnamese *Perilla frutescens* L. Essential Oil, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 32, No. 6 (2020), 1463-1466
- [29] T.P. Dao, H.T. Do, Q.K. Le, N.V.G. Phap, L.G. Bach, N.V. Muoi, M.H. Cang, Kinetic Studies on Extraction of Essential Oil from Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus*) by Steam Distillation Industrial Scale, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 32, No. 6 (2020), 1399-1403
- [30] T.P. Dao, H.T. Do, L.Q. Khoi, N.V.G. Phap, M.H. Cang, T.N. Pham, N.V. Muoi, Evaluation of Physico-Chemical Properties of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) Essential Oil Grown in Tien Giang Province, Vietnam, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 32, No. 5 (2020), 1248-1250
- [31] T.T. Hien, N.P.T. Nhan, D.T. Nguyen, V.T.T. Ho, L.G. Bach, Optimizing the Pomelo Oils Extraction Process by Microwave-Assisted Hydro-Distillation Using Soft Computing Approaches, *Solid State Phenomena*, 2018, Vol. 279, pp. 217-221.
- [32] T.H. Tran, L.K. Ha, D.C. Nguyen, T.P. Dao, L.T.H. Nhan, D.H. Nguyen, T.D. Nguyen, D.V.N. Vo, Q.T. Tran, L.G. Bach, The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam, *Processes* 2019, 7, 56; doi:10.3390/pr7020056
- [33] T.P. Dao, D.C. Nguyen, D.T. Nguyen, T.H. Tran, P.T.N. Nguyen, N.T.H. Le, X.T. Le, D.H. Nguyen, D.V.N. Vo, L.G. Bach, Extraction Process of Essential Oil from *Plectranthus amboinicus* Using Microwave-Assisted Hydrodistillation and Evaluation of It's Antibacterial Activity, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 31, No. 5 (2019), 977-981
- [34] T.H. Tran, P.T.N. Nguyen, T.N. Pham, D.C. Nguyen, T.P. Dao, D.T. Nguyen, N.D. Hai, D.V.N. Vo, X.T. Le, N.T.H. Le, L.G. Bach, Green technology to optimize the extraction process of turmeric (*Curcuma longa* L.) oils, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 479 (2019) 012002.
- [35] V. Srisukh, C. Tribuddharat, V. Nukoolkarn, and N. Bunyapraphatsara, "Antibacterial activity of essential oils from *Citrus hystrix* (makrut lime) against respiratory tract pathogens," *Sci. asia*, vol. 38, pp. 212-217, 2012, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.212.
- [36] R. A. Habsari, W. Warsito, and N. Noorhamdani, "Chemical Composition of Oil Fraction Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC) as Antibacterial Activity of *E.coli*," *J. Pure Appl. Chem. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 33-39, 2018, doi: 10.21776/ub.jpacr.2018.007.01.352.
- [37] A. Rattanamaneeerumee, K. Thirapanmethree, Y. Nakamura, and M. T.



- Chomnawang, "Differentiation-inducing effect in human colon cancer cells of essential oils," *Pharm. Sci. Asia*, vol. 45, no. 3, pp. 154–160, 2018, doi: 10.29090/psa.2018.03.154.
- [38] S. Chanthaphon, S. Chanthachum, and T. Hongpattarakere, "Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. Against food-related microorganisms," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 30, no. SUPPL. 1, pp. 125–131, 2008.
- [39] O. M. Nor, "Volatile aroma compounds in Citrus hystrix oil," *J. Trop. Agric. Fd. Sc.*, vol. 27, no. 2, pp. 225–229, 1999.
- [40] E. J. Bottone, "Bacillus cereus, a volatile human pathogen," *Clin Microbiol Rev.*, vol. 23, pp. 382-98, Apr 2010.
- [41] D. Karou, A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simpore, *et al.*, "Antibacterial activity of alkaloids from Sida acuta," *African journal of biotechnology*, vol. 5, pp. 195-200, 2006.
- [42] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *Journal of pharmaceutical analysis*, vol. 6, pp. 71-79, 2016.
- [43] L. A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *International journal of biomedical science : IJBS*, vol. 4, pp. 89-96, 2008.
- [44] P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 26, pp. 211-219, 2004.
- [45] L. Leaves, "Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of ageratum conyzoides," *American Journal of Ethnomedicine*, vol. 1, pp. 244-249, 2014.
- [46] A. Bakar, M. Fadzelly, N. A. Ismail, A. Isha, M. Ling, and A. Lee, "Phytochemical composition and biological activities of selected wild berries (Rubus moluccanus L., R. fraxinifolius Poir., and R. alpestris Blume)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, 2016.
- [47] S. L. Scott, W. J. Chen, A. Bakac, and J. H. Espenson, "Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions," *The Journal of Physical chemistry*, vol. 97, pp. 6710-6714, 1993.
- [48] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free radical biology and medicine*, vol. 26, pp. 1231-1237, 1999.



- [12] L. Dai, Q. Nguyen, L. Dao, H. Nguyen, M. Lam, and C. Hoang, "Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Dialium cochinchinensis* Seed Extract," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, pp. 975-980, 2019.

**10. Nội dung nghiên cứu khoa học, triển khai thực nghiệm và phương án thực hiện**  
**Đối tượng nghiên cứu**

**Nội dung nghiên cứu:**

**Phần A: Tổng quan, thuyết minh đề tài**

**Phần B: Nội dung nghiên cứu**

**Nội dung 1: Chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất trực tiếp với nước trên quy mô pilot và phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký khí ghép phối phổ GC-MS.**

a. Mục đích:

- Chiết xuất tinh dầu trên quy mô pilot
- Xác định thành phần hóa học của sản phẩm tinh dầu thu được từ vỏ chanh.

b. Phương pháp nghiên cứu:

❖ Phương pháp chưng cất trực tiếp với nước:

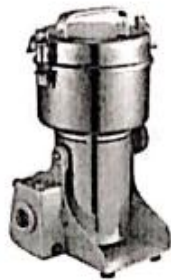


**Hình 1.** Sơ đồ chưng cất tinh dầu

Dựa vào hình 1, tiến hành lựa chọn các thiết bị dự kiến trong thí nghiệm này tương ứng với các giai đoạn (Hình 2) bao gồm:

+ Giai đoạn sơ chế nguyên liệu: máy xay công nghiệp

+ Giai đoạn chiết xuất: thiết bị chưng cất tinh dầu trực tiếp với nước.



Máy xay



Máy chưng cất tinh dầu

**Hình 2.** Thiết bị dự kiến chiết tách tinh dầu

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm thiết bị chưng cất có thể tích 50 lít gia nhiệt bằng dầu tải nhiệt năng suất nhập liệu từ 20-25 kg/m<sup>3</sup>. Thiết bị được làm bằng thép không gỉ và inox 304. Ngoài ra, thiết bị còn có hệ thống ngưng tụ bằng nước giải nhiệt, bộ phận thu hồi sản phẩm ngưng tụ, hệ thống cảm biến và điều khiển nhiệt độ đồng hồ áp suất. Thiết bị xử lý nguyên liệu gồm máy xay, năng suất 5 kg/phút.

#### ❖ Phân tích GC-MS

Thành phần hóa học của tinh dầu được xác định bằng phân tích GC-MS sử dụng dụng cụ GC Agilent 6890 N kết hợp với cột HP5-MS và MS 5973 trơ. Áp lực của cột dầu là 9,3 psi. 25 tinh dầu tinh dầu được thêm vào với 1 ml n-hexan và khử nước bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tốc độ dòng không đổi ở mức 1 mL / phút. Nhiệt độ đầu phun là 250°C và tốc độ phân chia là 30. Chương trình nhiệt cho các mẫu: 50°C được giữ trong 2 phút tăng 2 °C/phút đến 80°C, tiếp tục tăng 5°C/phút đến 150°C, tiếp tục tăng 10°C / phút đến 200°C, tăng 20°C/ phút đến 300°C giữ trong 5 phút.

#### c. Sản phẩm dự kiến:

- Tinh dầu của vỏ chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc
- Sắc ký đồ và thành phần hóa học của các loại tinh dầu

#### d. Thời gian thực hiện: 2 tuần

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

### Công việc 1: Chiết xuất tinh dầu trên quy mô pilot

Quy trình chưng cất tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) được thể hiện trong hình 1. Quả sau khi thu hoạch tiến hành xử lý sơ bộ, loại bỏ bụi bẩn, loại bỏ các nguyên liệu hư hỏng và tách riêng phần vỏ và thịt quả. Nguyên liệu vỏ được xay nhỏ, cho vào bồn chứa, lượng nước được thêm vào phù hợp với từng thí nghiệm và cho vào hệ thống chưng cất với tỷ lệ 1:3 nguyên liệu/nước. Nhiệt độ chưng cất ở 120°C và thời gian chưng cất được tính từ thời điểm giọt chất lỏng đầu tiên xuất hiện, cho đến khi lượng tinh dầu không đổi. Sau quá trình tách chiết tinh dầu ta thu được hỗn hợp gồm nước và tinh dầu sau khi đi qua thiết bị ngưng tụ để thu hồi tinh dầu. Tinh dầu thu được với một ít nước nên được làm khan bằng muối  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  để loại bỏ nước trong tinh dầu. Sau quá trình loại bỏ nước ta thu được tinh dầu tinh khiết.

- Giai đoạn 1: Sản xuất thử nghiệm với công suất 1kg nguyên liệu vỏ/mẻ
- Giai đoạn 2: Sản xuất thử nghiệm với công suất 2kg nguyên liệu vỏ/mẻ
- Giai đoạn 3: Sản xuất thử nghiệm với công suất 3kg nguyên liệu vỏ/mẻ
- Giai đoạn 4: Sản xuất thử nghiệm với công suất 5kg nguyên liệu vỏ/mẻ

### Công việc 2: Gửi mẫu đo GC-MS

**Nội dung 2: Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của tinh dầu từ vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc)**

a. Mục đích: Khảo sát khả năng kháng khuẩn của các loại tinh dầu được chiết suất từ vỏ chanh, và phương pháp thu nhận gốc tự do DPPH, ABTS được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của một hợp chất.

b. Phương pháp nghiên cứu:

#### ❖ Hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch là phương pháp được sử dụng phổ biến trong các thí nghiệm, nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết dược liệu hiện nay phương pháp này được mô tả vào năm 1990 bởi Perez [40].

Cơ sở của phương pháp: Bơm mẫu thí nghiệm ở một nồng độ xác định vào giếng trên đĩa môi trường đã được trải sẵn vi sinh vật trên bề mặt, sau đó ủ đĩa để vi sinh tăng trưởng và phát triển, trong quá trình này dược liệu sẽ khuếch tán ra xung quanh giếng và ức chế sự tăng trưởng của vi sinh tạo nên vòng kháng khuẩn nếu mẫu thí nghiệm có tác dụng [41].

Trong quá trình khảo sát, kích thước của vòng kháng khuẩn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như nhiệt độ, thời gian, môi trường... Vì vậy cần phải cố định các yếu tố để đảm bảo kết quả là chính xác và khách quan, các yếu tố được cố định gồm: Môi trường Mueller Hinton Agar (MHA), thời gian ủ 16-18h ở nhiệt độ  $35 \pm 2$  °C, mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/ml [42].



#### ❖ Hoạt tính kháng oxy hóa

Sự oxy hóa là quá trình diễn ra trong cơ thể mà chủ yếu tại ty thể khi phân tử oxy được sử dụng để chuyển hóa tạo năng lượng ATP, trong đó electron được chuyển sang chất oxy hóa, kết quả của quá trình này tạo nên các gốc hoạt động như ROS, RNS,...[43]. Một phân tử hay nguyên tử mang một hoặc nhiều hơn một electron không bắt cặp trong orbital, những nguyên tử và phân tử này không bền vững có xu hướng lấy điện tử của một nguyên tử phân tử khác chúng được gọi là gốc tự do [44]

Gốc tự do được tạo ra thông qua các quá trình trong cơ thể mà chủ yếu là quá trình hô hấp. Ngoài ra, nó có thể được tạo ra bởi sự tác động của một số yếu tố bên ngoài như tia X, tia UV, các chất hóa học,...Có 3 kiểu gốc tự do điển hình là gốc oxy hóa oxy (ROS), gốc oxy hóa nitrogen (RNS) và gốc oxy hóa lưu huỳnh.

Chất kháng oxy hóa là những chất có khả năng tác động dẫn đến kìm hãm sự hình thành của gốc tự do, trung hòa các gốc tự do bằng cách oxy hóa chính nó. Có hai hệ thống kháng oxy hóa là hệ thống kháng oxy hóa nội tại và hệ thống kháng oxy hóa được bổ sung bên ngoài. Kháng oxy hóa bằng cách bổ sung: thông qua chế độ dinh dưỡng hàng ngày, bổ sung các thực phẩm chứa các chất chống oxy hóa, đây là một yếu tố quan trọng nhằm phần nào ngăn ngừa cũng như ngăn chặn quá trình oxy hóa diễn ra đồng thời cũng như hạn chế quá trình stress oxy hóa trong cơ thể. Một số chất cơ thể có khả năng tự tổng hợp nhưng không đủ đáp ứng cho nhu cầu sử dụng của cơ thể hoặc một phần các hợp chất cơ thể không thể tự tổng hợp được nên cần sự bổ sung từ bên ngoài.

##### ➤ Phương pháp bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Phương pháp thu nhận gốc tự do DPPH được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của một hợp chất. Nguyên tắc của phương pháp này dựa vào gốc tự do ổn định điển hình trên phân tử DPPH\*, trong cấu trúc hóa học của phân tử DPPH tồn tại một electron tự do ở nguyên tử nitơ, gốc tự do này bền và ổn định đồng thời khi chất này tồn tại ở dạng gốc tự do hợp chất có màu tím đậm và dung dịch với dung môi ethanol có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng ánh sáng tím 517nm [45].

Đối với một đối tượng cần khảo sát về khả năng cho điện tử và kháng gốc tự do oxy hóa tự do, khi thử với thuốc thử DPPH\*, DPPH\* sẽ có khuynh hướng nhận thêm một electron hoặc một nguyên tử hydro từ đối tượng cần kiểm tra để trở về trạng thái bền ban đầu. Khi đó màu tím đậm mất đi và chuyển sang màu vàng nhạt do sự tồn tại của gốc picryl trong phân tử. Thông qua sự giảm gốc oxy hóa tự do có thể gián tiếp xác định được khả năng kháng oxy hóa của đối tượng cần khảo sát nói chung và được liệu thử nghiệm nói riêng [44].

Trong thí nghiệm đánh giá khả năng bắt gốc DPPH\* mẫu đối chứng được sử dụng gồm dung môi pha loãng mẫu và dung dịch DPPH. Khi tiến hành xác định khả năng kháng oxy hóa của một chất cần phải có một đối tượng dùng làm chất chuẩn, thường được dùng là ascorbic axit (vitamin C).

Kết quả được tính dựa trên giá trị  $IC_{50}$ , giá trị  $IC_{50}$  được hiểu là hàm lượng mẫu trong 1ml dung dịch cần để làm giảm 50% DPPH so với ban đầu [46].

➤ *Phương pháp bắt gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit) (ABTS\*)*

Phương pháp này cũng là một trong những phương pháp xác định khả năng kháng oxy hóa của một chất hoặc hợp chất mang tính thường quy, phương pháp này được mô tả bởi Susannab L. Scott và cộng sự vào năm 1993 [47].

Cơ sở khoa học của phương pháp ABTS\* cũng tương tự như phương pháp sử dụng gốc tự do DPPH. Tuy nhiên sự khác biệt là ABTS được sử dụng thử cần phải được oxy hóa để tạo thành dạng ABTS<sup>•+</sup> mang một electron tự do bởi potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ), ABTS ở dạng gốc tự do có màu xanh lam hoặc xanh lục có độ hấp thụ tối ưu ở bước sóng 734 nm, khi nhận thêm điện tử electron trở về dạng ban đầu dẫn đến mất dần màu xanh, thông qua đó chúng ta có thể đánh giá được khả năng kháng oxy hóa của đối tượng cần kiểm chứng [48].

Cũng như phương pháp DPPH\* thì vitamin C cũng là chất sử dụng để làm chất đối chứng và các mẫu tinh dầu được pha loãng đến nồng độ xác định và tính giá trị giá trị %IC và mẫu đối chứng cũng gồm dung môi pha loãng và dung dịch ABTS\*.

c. Sản phẩm dự kiến:

– Kết quả được ghi nhận là đường kính vòng kháng khuẩn, vòng kháng khuẩn xuất hiện khi mẫu thử với các nồng độ khác nhau có khả năng ức chế sự phát triển của chủng vi sinh vật thử nghiệm.

– Kết quả được ghi nhận dựa trên giá trị %IC tại nồng độ pha loãng xác định .

d. Thời gian thực hiện: 1 tháng

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

❖ Hoạt chất kháng khuẩn

Quy trình thực hiện:

- Tất cả dụng cụ thí nghiệm và môi trường nuôi cấy được chuẩn bị và được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
- Hoạt hóa dịch khuẩn: Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy lắc trong 5ml môi trường Mueller Hinton Broth (MHB) trong khoảng thời gian từ 18 - 20 giờ ở nhiệt độ  $35 \pm 2$  °C. Sau đó được hiệu chỉnh đến giá trị Mc Farland 0.5 tương đương  $1 - 2.10^8$  bằng nước muối sinh lý NaCl 0.9%,
- Trải đĩa: 100 µl dịch canh khuẩn nồng độ  $10^8$  CFU/ml được bơm vào đĩa thạch MHA sau đó trải khuẩn đều lên bề mặt đĩa nuôi.
- Trong thí nghiệm này đường kính giếng được sử dụng là 6mm, ứng với 50 µl mẫu tinh dầu.
- Tinh dầu được sử dụng ở nồng độ 100%.
- Tetracyclin nồng độ 0.25 mg/ml được sử dụng làm chứng dương.



- Mức độ hoạt động được ghi nhận trong bốn cấp độ theo đường kính trong (D (mm)) của vùng ức chế, kết hợp đường kính của đĩa (6 mm):
  - +3 (hoạt động mạnh,  $D > 15$  mm)
  - +2 (hoạt động vừa phải,  $10 \text{ mm} \leq D \leq 14$  mm)
  - +1 (ít hoạt động,  $D \leq 9$  mm)
  - (-) (không hoạt động)
- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần
- ❖ Hoạt tính kháng oxy hóa

➤ *Phương pháp bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*

Quy trình thực hiện:

Thử nghiệm chống oxy hóa DPPH\* được tiến hành theo phương pháp Bùi Thị Kim Lý và cộng sự với một vài sửa đổi [49]. Pha loãng tinh dầu đến khoảng nồng độ phù hợp, hút 1 ml tinh dầu mẫu đã pha loãng với methanol vào ống nghiệm. Mẫu đối chứng thay tinh dầu bằng methanol. Sau đó, hút thêm vào ống nghiệm 1,5 ml dung dịch DPPH\* 0.3 mM vào ống nghiệm và để trong bóng tối trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó đo độ hấp thụ quang học ở 517 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Vitamin C (acid ascorbic) được sử dụng làm chất chuẩn để so sánh.

Hoạt tính khử gốc tự do DPPH\* (IC %) được xác định dựa theo công thức:

$$IC (\%) = \frac{Abs_C - Abs_T}{Abs_C} \times 100$$

Trong đó:

Abs<sub>C</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng

Abs<sub>T</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu thử

- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

➤ *Phương pháp bắt gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit) (ABTS\*)*

Quy trình thực hiện:

Dung dịch gốc tự do ABTS\* được chuẩn bị bằng cách cho 10ml dung dịch ABTS nồng độ 7,4 mM vào 10ml dung dịch K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> nồng độ 2,6 mM rồi ủ trong bóng tối trong 24 h, sau đó pha loãng bằng ethanol rồi điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm đến  $1,1 \pm 0,02$ . Pha loãng tinh dầu đến khoảng nồng độ phù hợp bằng methanol, hút 0,5ml tinh dầu đã pha loãng vào ống nghiệm. Mẫu đối chứng thay tinh dầu bằng methanol. Sau đó, hút thêm vào ống nghiệm 1,5 ml dung dịch ABTS\* ( $OD_{517 \text{ nm}} = 1,1 \pm 0,02$ ) vào ống nghiệm và để trong bóng tối trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở 734 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Vitamin C (acid ascorbic) được sử dụng làm chất để so sánh.

Hoạt tính khử gốc tự do ABTS\* (IC %) được xác định dựa theo công thức:

$$IC (\%) = \frac{Abs_C - Abs_T}{Abs_C} \times 100$$

Trong đó:

Abs<sub>C</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng

- Abs<sub>7</sub>: Độ hấp thụ quang của mẫu thử
- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

**Nội dung 3: Khảo sát yếu tố và điều kiện ảnh hưởng độ bền của các loại tinh dầu vỏ chanh**

a. Mục đích:

- Xác định độ bền của thành phần hóa học của tinh dầu vỏ chanh sau thời gian bảo quản.
- So sánh sự thay đổi và biến tính giữa các loại tinh dầu trước và sau thời gian bảo quản.

b. Phương pháp nghiên cứu:

Để xác định ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến thành phần của tinh dầu trong quá trình bảo quản, tinh dầu được phân tích ngay sau khi chiết xuất để hoạt động như một mẫu đối chứng. Các mẫu khác được chia đều và được lưu trữ trong lọ thủy tinh. Mỗi bộ các mẫu được lưu trữ ở bốn nhiệt độ và điều kiện ánh sáng khác nhau: giữ trực tiếp dưới ánh sáng ban ngày ở nhiệt độ phòng (25 °C), trong chai tối ở nhiệt độ phòng và tủ lạnh (4 °C) và tủ sấy (45 °C) trong 6 tháng liên tiếp. Phương pháp phân tích GC-MS được sử dụng để đánh giá sự thay đổi của các hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu, sau thời gian lưu trữ là 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng và 6 tháng.

c. Sản phẩm dự kiến: Sắc ký đồ và thành phần hóa học của tinh dầu lá và vỏ chanh sau thời gian bảo quản

d. Thời gian thực hiện: 6 tháng (thời gian lưu trữ tinh dầu)

e. Các công việc thực hiện (*Cần nêu rõ các hoạt động bố trí thí nghiệm, chỉ tiêu khảo sát đánh giá*)

- Khảo sát các yếu tố: thời gian, nhiệt độ, ánh sáng (3 mẫu trong điều kiện)
  - + **Công việc 1:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện ánh sáng trực tiếp (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 2:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện trong tối (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 3:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện 4°C (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)
  - + **Công việc 4:** Đánh giá sự biến đổi của tinh dầu ở điều kiện 45°C (trong thời gian: ban đầu, 1 tháng, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng)



- Sau đó, đem mẫu xác định thành phần hóa học bằng phương pháp GC-MS.

#### **Phần C: Báo cáo tổng kết đề tài**

**11. Cách tiếp cận, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng** (*Luận cứ tiếp cận vấn đề nghiên cứu, thiết kế nghiên cứu, phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng gắn với từng nội dung chính của đề tài; so sánh với các phương pháp giải quyết tương tự khác và phân tích để làm rõ được tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo của đề tài*)

##### **11.1. Cách tiếp cận:**

- Thu thập tài liệu, khảo sát, đánh giá các thông tin về cây chanh chúc (*Citrus hystrix*); tổng quan các tinh dầu chanh trên thế giới và Việt Nam (qua tài liệu, internet, hội nghị khoa học và các tạp chí trong nước và quốc tế).
- Khảo sát, điều tra và phân tích các tài liệu, cơ sở dữ liệu và đánh giá hiện trạng nguồn nguyên liệu tinh dầu chanh chúc tại địa phương; khảo sát lựa chọn và phân tích tính chất đặc trưng của nguồn nguyên liệu khác nhau để đánh giá, lựa chọn đối tượng và lấy mẫu nghiên cứu và chuẩn hóa nguồn nguyên liệu. Đối tượng nguyên liệu quan tâm là tinh dầu được trích ly từ vỏ chanh.
- Nghiên cứu quy trình chiết xuất tinh dầu trên quy mô pilot.
- Khảo sát và đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Phân tích tài liệu và đề xuất phương pháp đánh giá khả năng kháng oxi hóa của tinh dầu qua thuốc thử DPPH và ABTS
- Nghiên cứu quy trình đánh giá và phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp GC-MS từ các tinh dầu chanh, tiến hành nghiên cứu và thí nghiệm xác định các điều kiện bảo quản, chế độ tối ưu nhằm xây dựng quy trình công nghệ mới phù hợp với điều kiện Việt Nam.

##### **11.2. Phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng:**

- Phương pháp kế thừa: Thu nhận thông tin, dữ liệu, các kết quả nghiên cứu đã được công bố, làm cơ sở để điều chỉnh, ứng dụng vào quá trình nghiên cứu thực nghiệm.
- Phương pháp thực nghiệm: Tiến hành triển khai các thí nghiệm thực tế theo từng nội dung, triển khai ở quy mô pilot và ứng dụng thực tế, đánh giá và điều chỉnh lại kết quả.
- Phương pháp phân tích đánh giá tính chất nguyên liệu:
  - Đánh giá cảm quan tinh dầu theo TCVN 8460:2010
  - Xác định thành phần hoá học bằng phương pháp phân tích bằng sắc ký khí phối khối (GC-MS)
  - Phương pháp đo đạc các chỉ tiêu: Sử dụng các dụng cụ, thiết bị tiên tiến, hiện đại, có độ chính xác, phù hợp với từng thông số.
- Phương pháp thu thập số liệu và xử lý thống kê: Tất cả các số liệu thu thập dựa trên kết quả lặp lại ít nhất 3 lần cho mỗi đơn vị thí nghiệm



### 11.3. Tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo:

Tinh dầu chanh có nhiều công dụng cho sức khỏe của con người và được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau, nhưng hiện nay việc ảnh hưởng của thời gian và điều kiện bảo quản tinh dầu là vấn đề đang được quan tâm. Quy trình đơn giản, thực hiện cùng lúc trên các hệ thiết bị để thu sản phẩm hoàn chỉnh, vì vậy các phương thức dễ dàng thực hiện và áp dụng. Do đó, nghiên cứu này sẽ mở ra hướng tiếp cận mới nhằm nâng cao hiệu quả bảo quản của các loại tinh dầu chanh đồng thời sẽ tạo động lực để nghiên cứu các đề tài về ứng dụng của tinh dầu.

### 12. Tiến độ thực hiện đề tài

| TT | Nội dung, công việc chủ yếu   | Kết quả phải đạt  | Thời gian       |
|----|---|---|-----------------|
| 1  | <b>Nội dung 1:</b> Nghiên cứu tài liệu, xây dựng thuyết minh đề cương Ứng dụng khoa học công nghệ xây dựng quy trình chiết suất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu vỏ (Chanh không hạt, Chanh có hạt, Chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot            | Báo cáo tổng quan   | 6/2020-7/2020   |
| 2  | <b>Nội dung 2:</b> Nghiên cứu ảnh hưởng điều kiện trích ly đến hiệu suất tinh dầu vỏ chanh  | Báo cáo kết quả hiệu suất tinh dầu trên quy mô pilot  | 7/2020-8/2020   |
| 3  | <b>Nội dung 3:</b> Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hóa của các loại tinh dầu chanh<br><br>Công việc 1: Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn<br><br>Công việc 2: Đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa (phương pháp bắt gốc tự do DPPH và ABTS) | Báo cáo kết quả kháng khuẩn và kháng oxi hóa của các tinh dầu vỏ chanh                            | 9/2020-10/2020  |
| 4  | <b>Nội dung 4:</b> Nghiên cứu điều kiện và quá trình bảo quản của các loại tinh dầu ở những điều kiện khác nhau.<br><br>Công việc 1: So sánh sự thay đổi và biến tính của các loại tinh dầu trước và sau thời gian bảo quản.                    | Báo cáo đánh giá thành phần hóa học của tinh dầu qua phương pháp đo GC-MS sau thời gian bảo quản. | 7/2020-12/2020  |
| 5  | <b>Nội dung 5:</b> Hoàn thiện hồ sơ và báo cáo tổng kết đề tài  | Hồ sơ hoàn thiện  | 11/2020-12/2020 |

### III. SẢN PHẨM KHOA HỌC CÔNG NGHỆ, HIỆU QUẢ CỦA ĐỀ TÀI

#### 13. Sản phẩm khoa học công nghệ của đề tài

| TT | Tên sản phẩm  | Đơn vị đo | Chất lượng sản phẩm   | Số lượng/quy mô |
|----|---|-----------|---|-----------------|
| 1  | Quy trình trích ly các loại tinh dầu vỏ chanh quy mô pilot                                      | Quy trình | Quy trình ổn định, các thông số phù hợp với điều kiện pilot | 01              |
| 2  | Báo cáo đánh giá khả năng hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của các loại tinh dầu vỏ chanh | Báo cáo   | Báo cáo chi tiết, cụ thể rõ ràng và độ chính xác cao        | 01              |
| 3  | Bài báo khoa học  | Bài báo   | Bài báo nộp Tạp chí khoa học quốc tế thuộc danh mục SCOPUS  | 01              |

#### 14. Phạm vi và địa chỉ (dự kiến) ứng dụng các kết quả của đề tài

Quy trình công nghệ hoàn chỉnh, đầy đủ các thông số kỹ thuật, vì vậy các phương thức đầu tư được tính toán để dễ dàng chuyển giao và áp dụng sản xuất nhanh tại các cơ sở tại địa phương, phù hợp với điều kiện của Việt Nam.

#### 15 Tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu

**15.1. Đối với lĩnh vực KH&CN có liên quan** (Nêu những dự kiến đóng góp vào các lĩnh vực khoa học công nghệ ở trong nước và quốc tế)

Xây dựng được phương pháp đánh giá thành phần hóa học và khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hóa của tinh dầu vỏ chanh. Xác định thời gian và điều kiện bảo quản tối ưu nhất của các loại tinh dầu. Là cơ sở thúc đẩy phát triển của ngành nông nghiệp trồng cây chanh và tạo ra nhiều sản phẩm ứng dụng đến các loại tinh dầu chanh của Việt Nam để giảm giá thành và nâng cao chất lượng sản phẩm.

**15.2. Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu**

Đề tài giúp giảng viên của đơn vị chủ trì và các thành viên của cơ sở triển khai ứng dụng thực hiện kết hợp với lý thuyết để đưa sản phẩm vào thực tế, giúp cho việc giảng dạy đạt hiệu quả cao hơn và thực tiễn hơn. Giúp cho sinh viên có kinh nghiệm trong định hướng thí nghiệm, thực nghiệm trong phòng thí nghiệm và cơ hội tham gia vào nghiên cứu khoa học.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày..... tháng .....năm 2020

KHOA/VIỆN/PHÒNG/TRUNG TÂM

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI



Trần Thị Kim Ngân

TS. HIỆU TRƯỞNG  
TRƯỜNG ĐH NGUYỄN TẤT THÀNH  
PHÓ HIỆU TRƯỞNG

TRƯỞNG PHÒNG  
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ



PGS.TS. Trần Chí Hồng



**HỢP ĐỒNG THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ**  
Số: 2020.01.138 /HD-KHCN

Căn cứ Quyết định số 196/QĐ-NTT ngày 22/6/2015 về việc ban hành Quy định quản lý đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ Cấp cơ sở Trường Đại học Nguyễn Tất Thành;

**CHÚNG TÔI GỒM:**

**1. Bên đặt hàng (Bên A): Trường ĐH Nguyễn Tất Thành**

Đại diện là : PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hùng Chức vụ: Hiệu trưởng  
Địa chỉ : 300A Nguyễn Tất Thành, P13, Quận 4, TP.Hồ Chí Minh  
Điện thoại : (028) 39411189 Fax: (028) 39404759

**2. Bên nhận đặt hàng (bên B):**

Đại diện là : Trần Thị Kim Ngân  
Đơn vị công tác : Nhân viên – Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT  
Địa chỉ : 300A Nguyễn Tất Thành, Phường 13, Quận 4, TP.HCM  
Điện thoại : 0765712086  
Số tài khoản : 6150205439041 Tên ngân hàng Agribank Chi nhánh Xuyên Á  
CMND : 321553078 MST: 8449407388

Cùng thoả thuận và thống nhất ký kết Hợp đồng thực hiện Đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở (sau đây gọi tắt là Hợp đồng) với các điều khoản sau:

**Điều 1. Đặt hàng và nhận đặt hàng thực hiện đề tài.**

Bên A đặt hàng và Bên B nhận đặt hàng thực hiện đề tài *“Ứng dụng khoa học công nghệ xây dựng quy trình chiết xuất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu vỏ (chanh không hạt, chanh có hạt, chanh trúc) ở quy mô sản xuất pilot”* theo các nội dung trong Thuyết minh đề tài đã được Hội đồng phê duyệt (sau đây gọi tắt là Thuyết minh).

Thuyết minh là bộ phận không tách rời của Hợp đồng.

**Điều 2. Thời gian thực hiện Hợp đồng**

Thời gian thực hiện đề tài là 06 tháng, từ tháng 07 năm 2020 đến tháng 12 năm 2020

**Điều 3. Kinh phí thực hiện đề tài**

1. Tổng kinh phí thực hiện đề tài là: 35.000.000 (Ba mươi lăm triệu đồng). (Số: 01 bài báo Scopus)

2. Tiến độ cấp kinh phí: Kinh phí được cấp làm 02 đợt:

Đợt 1: 50% tổng kinh phí, sau khi ký kết hợp đồng.

Đợt 2: 50% tổng kinh phí, sau khi báo cáo tổng kết của bên B được Hội đồng nghiệm thu đề tài thông qua.

Trong trường hợp bên B không thực hiện đầy đủ các công việc để nghiệm thu đề tài theo đúng thời hạn quy định; hoặc không thực hiện việc quyết toán theo yêu cầu của bên A thì bên A không có nghĩa vụ thanh toán kinh phí đợt 2 cho bên B.

3. Trong trường hợp kết quả nghiệm thu đề tài "Không đạt" thì bên B không được nhận khoản

kinh phí đợt 2; và bên A được quyền yêu cầu bên B chuyển giao toàn bộ kết quả nhiệm vụ.

#### **Điều 4. Gia hạn**

1. Đề tài được phép gia hạn 1 lần và tối đa là 6 tháng. Bên B gửi đề nghị gia hạn cho Bên A trước 1 tháng so với thời gian kết thúc đề tài.

2. Nếu sau khi gia hạn, đề tài vẫn không thể nghiệm thu thì Bên A sẽ thành lập Hội đồng để thanh lý đề tài.

#### **Điều 5. Quyền sở hữu trí tuệ và sở hữu tài sản, thiết bị**

1. Quyền sở hữu trí tuệ của sản phẩm, tài sản hình thành từ việc thực hiện đề tài này sẽ tuân theo quy định tại Luật Sở hữu trí tuệ số 50/2005/QH11 đã được sửa đổi bổ sung theo luật 36/2009/QH12 và luật số 42/2019/QH14. Chủ nhiệm đề tài muốn phổ biến, sử dụng kết quả nghiên cứu phải có sự thoả thuận bằng văn bản giữa hai Bên.

2. Các tài sản, thiết bị phục vụ cho việc thực hiện đề tài, được mua sắm bằng kinh phí do Bên A cấp, đều thuộc quyền sở hữu của Bên A.

3. Khi công bố bài báo/báo cáo, Ghi nhận sự tài trợ của Bên A trong các kết quả nghiên cứu của Đề tài được công bố, đăng tải cũng như trong các hoạt động khác liên quan đến Đề tài như sau:

+ Đối với các tài liệu tiếng Anh: "This research is funded by Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh city, Vietnam".

+ Đối với các tài liệu tiếng Việt: "Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam".

#### **Điều 6. Điều khoản chung**

1. Trong quá trình thực hiện Hợp đồng, nếu một trong hai bên có yêu cầu sửa đổi, bổ sung nội dung hoặc có căn cứ để chấm dứt thực hiện Hợp đồng thì phải thông báo cho bên kia ít nhất là 15 ngày làm việc.

2. Hai bên cam kết thực hiện đúng các quy định của Hợp đồng và có trách nhiệm hợp tác giải quyết các vướng mắc phát sinh trong quá trình thực hiện theo quy định pháp luật.

3. Luật áp dụng: Hợp đồng này được điều chỉnh và giải thích theo các quy định pháp luật của nước Cộng hòa Xã hội chủ nghĩa Việt Nam.

#### **Điều 7. Hiệu lực của Hợp đồng**

Hợp đồng này có hiệu lực từ ngày ký Hợp đồng này được lập thành 3 bản và có giá trị như nhau, Bên A giữ 2 bản, bên B giữ 1 bản.

**Đại diện Bên A**  
**HIỆU TRƯỞNG**  
  
**PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hùng**

**Đại diện Bên B**  
**CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI**

  
**Trần Thị Kim Ngân**