

TỔNG HỢP NANO NHŨ TƯƠNG TỪ TINH DẦU VỎ CAM SÀNH ỨNG DỤNG LÀM VẬT LIỆU KHÁNG KHUẨN

ĐOÀN VĂN ĐẠT^{1*}, PHẠM HOÀNG ÁI LÊ¹, NGUYỄN PHÁT HẢI¹,
NGUYỄN THỊ HUYỀN AN¹, NGUYỄN THỊ THANH HẢI¹, NGUYỄN VĂN CUỜNG¹,
PHẠM TẤN VIỆT², NGUYỄN THỊ LAN HƯƠNG²

¹ Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM

² Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM

doanvandat@juh.edu.vn

Tóm tắt. Nano nhũ tương (nanoemulsion) trên nền tinh dầu trích ly từ vỏ quả cam sành đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp rung siêu âm kết hợp khuấy cơ học. Thành phần hóa học trong mẫu tinh dầu cam được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS). Phân bố kích thước hạt nano nhũ tương được khảo sát bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS). Các yếu tố kỹ thuật tổng hợp ảnh hưởng đến kích thước hạt nano nhũ tương cũng được khảo sát một cách chi tiết, như tỷ lệ hỗn hợp các chất hoạt động bề mặt gồm Tween 80 và Span 80, thể tích tinh dầu cam và ảnh hưởng của thể tích nước. Các mẫu nano nhũ tương cũng được khảo sát khả năng kháng khuẩn *E. coli* bằng phương pháp phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, được các mẫu nano nhũ tương tổng hợp được có kích thước nano trong khoảng từ 60 - 120 nm và khi kết hợp với nano bạc mẫu nano nhũ tương có khả năng kháng khuẩn *E. coli* vượt trội hơn so với nano nhũ tương từ tinh dầu cam tinh khiết.

Từ khóa: tinh dầu cam, sắc ký khí ghép khối phổ, phương pháp tán xạ ánh sáng động học, nano nhũ tương, chất nhũ hóa, ứng dụng kháng khuẩn.

SYNTHESIS OF KING ORANGE PEEL ESSENTIAL OIL-IN-WATER NANOEMULSIONS FOR ANTIBACTERIAL APPLICATION

Abstract. Nanoemulsion based on orange essential oil extracted from King orange peels was successfully synthesized by ultrasonic vibration combined with mechanical stirring. The chemical composition of the orange essential oil sample was determined by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) method. Particle size distribution of nanoemulsion was investigated by Dynamic Light Scattering (DLS) method. The most important technical factors affecting the size of nanoemulsion such as ratio of two types of emulsifiers including Tween 80 and Span 80, the volume of orange essential oil and the effect of water volume were also investigated in detail. Nanoemulsion samples were also tested for the resistance to *E. coli* by disc diffusion method. The study results showed that the obtained emulsion particles were nanosized in the range from 60 to 120 nm and after combining with nanosilver, the resulted nanoemulsion was capable of resisting *E. coli* superior to nanoemulsion based on pure orange essential oils.

Keywords: orange peel essential oil, GC-MS, DLS, nanoemulsion, antibacterial application.

1 GIỚI THIỆU

Tinh dầu là hỗn hợp các chất thơm được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp nước hoa, dược phẩm, thực phẩm, dẫn truyền thuốc, và kháng khuẩn [1-4]. Tinh dầu là hỗn hợp của hơn 200 hợp chất khác nhau, các hợp chất này chủ yếu được hình thành từ hydrocarbon monoterpene, sesquiterpene và các dẫn xuất oxy hóa của chúng như este, rượu, aldehyde aliphatic và xeton [5].

Cam sành (King Orange) có tên khoa học là *Citrus reticulata* × *sinensis*, thuộc họ Rutaceae, là loại quả cao cấp, có giá trị dinh dưỡng và giá trị sử dụng cao, chứa rất nhiều chất chống oxy hóa rất tốt cho sức khỏe, đặc biệt chứa nhiều thành phần vitamin C, giúp tăng đề kháng cho con người và được rất nhiều người ưa chuộng. Bên cạnh đó các sản phẩm phụ của nó cũng mang lại nhiều công dụng như làm hương

liệu trong thực phẩm, mỹ phẩm và dược liệu trong y học, đặc biệt là tinh dầu. Tinh dầu cam có thể được chiết xuất từ lá hoa và vỏ quả, trong đó vỏ quả là chiếm lượng lớn tinh dầu. Thành phần chính tạo mùi thơm đặc trưng của tinh dầu cam là D- Limonene (90%) [6]. Tinh dầu cam có một hương thơm dịu ngọt, mang lại cảm giác sảng khoái, dễ chịu làm cho tâm trạng của con người phấn chấn và vui vẻ. Tinh dầu cam hỗ trợ điều trị bệnh khó tiêu, trị ho, cảm cúm hiệu quả; giảm đau nhức vùng cơ bắp mệt mỏi, giúp loại bỏ bã nhờn trên da, điều trị mụn, điều trị nám, mang lại làn da sáng và khỏe đẹp. Tinh dầu cam còn có tính kháng khuẩn tự nhiên, vì thế chúng được sử dụng để giúp bảo quản các loại thực phẩm, giúp đảm bảo an toàn, sạch sẽ. Tinh dầu cam còn được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển cũng như tiêu diệt loại vi khuẩn *E. coli*, đây là một loại vi khuẩn rất nguy hiểm, nó thường gây các bệnh suy thận và có thể dẫn đến tử vong. Bên cạnh đó thì công dụng của tinh dầu vỏ cam còn được đề cập sự lây lan và phát triển của loại vi khuẩn *Salmonella*, bởi có chứa các chất kháng khuẩn mạnh mẽ, đặc biệt là Tecpen. Nhóm tác giả Zaixiang Lou và các cộng sự năm 2017 đã báo cáo công trình nghiên cứu kháng khuẩn, kháng vi nấm của tinh dầu từ họ cam chanh. Công trình nghiên cứu chỉ ra rằng tinh dầu từ họ cam chanh có thể ức chế sự phát triển vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli* [7].

Những năm gần đây, với sự phát triển vượt bậc của công nghệ nano, các nhà nghiên cứu đang dành mối quan tâm to lớn cho việc chuyển hóa tinh dầu trích ly từ thực vật sang dạng nano (nanoemulsion - nano nhũ tương). Nano nhũ tương (có đường kính hạt trong khoảng 20-500 nm) là một hệ bền về mặt nhiệt động, bao gồm dầu, nước và các chất hoạt động bề mặt đóng vai trò nhũ hóa [8-11]. Nhóm tác giả Mohammad Hasan Shahavi và các cộng sự năm 2016 báo cáo phương pháp tối ưu dùng sóng siêu âm trong tổng hợp tinh dầu nano đình hương. Phương pháp này đã cho hạt nano tinh dầu có kích thước nhỏ hơn 50 nm, phân bố ổn định bền vững trong môi trường nước [12]. Cũng trong năm 2016, nhóm tác giả Sheng Jang Zhang và các cộng sự đã báo cáo phương pháp tổng hợp tinh dầu đình hương và tinh dầu quế dạng nano với kích thước hạt 8,69 nm ứng dụng hiệu quả trong việc kháng vi sinh vật: *Escherichia Coli*, *Bacillus Subtilis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus Aureus* [13]. Nhóm tác giả Tahir Mehmood và cộng sự năm 2017 đã báo cáo phương pháp tối ưu tổng hợp tinh dầu oliu dạng nano, phương pháp này cho ra hạt nano tinh dầu có kích thước hạt 151,68 nm [14]. Nhóm tác giả Balagopal Amrutha năm 2017 đã báo cáo phương pháp tổng hợp nano tinh dầu từ cây thì là (*Cuminum Cynium*) và cây hồ tiêu (*Piper Nirgrum*) sử dụng sóng siêu âm ứng dụng để ức chế hoạt động của vi khuẩn *E. coli* và *S. enteria* [15]. Năm 2018, Yuan Li và cộng sự đã kết hợp tinh dầu cam chanh với chiosan tạo ra microcapsules sử dụng nhiều chất hoạt động bề mặt khác nhau bằng phương pháp nhũ tương ion gel cho ra hạt có kích thước lớn hơn 289,3 nm [16]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào các phương pháp sản xuất tinh dầu hiệu quả, đặc tính sinh học và hóa học của các loại tinh dầu chiết suất từ thiên nhiên, cũng như việc chuyển tinh dầu này sang dạng nanoemulsion, còn nanoemulsion được hỗ trợ bởi các hạt nano kim loại, ví dụ như nano bạc cho các ứng dụng kháng khuẩn chưa được báo cáo rộng rãi. Trong khi đó, nano bạc là vật liệu có diện tích bề mặt riêng rất lớn, có những đặc tính độc đáo sau: tính khử khuẩn, chống nấm, khử mùi; không có hại cho sức khỏe con người với liều lượng tương đối cao; có khả năng phân tán ổn định trong các loại dung môi khác nhau; độ bền hóa học cao, không bị biến đổi dưới tác dụng của ánh sáng và các tác nhân oxy hóa khử thông thường [17].

Nanoemulsions thường được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp nhũ tương năng lượng cao, chẳng hạn như đồng nhất áp lực cao, khuấy tán vi lỏng, và siêu âm cường độ cao [18]. Phương pháp siêu âm với mức tiêu thụ năng lượng và chất ổn định ít hơn, cho kích thước hạt nhỏ hơn, độ phân tán cao hơn là những ưu điểm chính của kỹ thuật này so với các phương pháp khác [19]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là tổng hợp nanoemulsion từ tinh dầu cam trích ly từ vỏ quả cam sành, sau đó kết hợp với nano bạc bằng phương pháp rung siêu âm và khảo sát hoạt tính sinh học của nó trong ứng dụng làm chất kháng khuẩn.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Hóa chất được dùng cho quá trình tổng hợp gồm trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$), tween 80 ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$, $\geq 99\%$), span 80 ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$, $\geq 99\%$), sodium sulphate (Na_2SO_4 , $\geq 99\%$) và sodium chloride (NaCl , $\geq 99,1\%$) được đặt từ công ty hóa chất Shanghai Shenglong Chemical Co. Vỏ cam tươi được thu

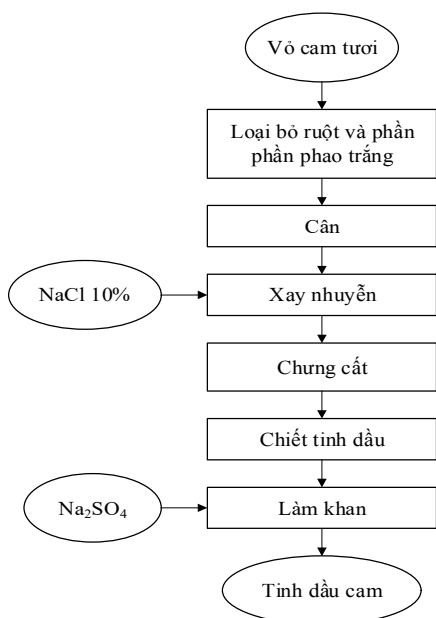
thập là của giống cam sành (King orange - *Citrus reticulata* × *sinensis*) trồng ở miền nam Việt Nam. Nước cất hai lần được sử dụng làm dung môi và chuẩn bị tất cả các dung dịch cần thiết.

2.2 Trích ly tinh dầu cam

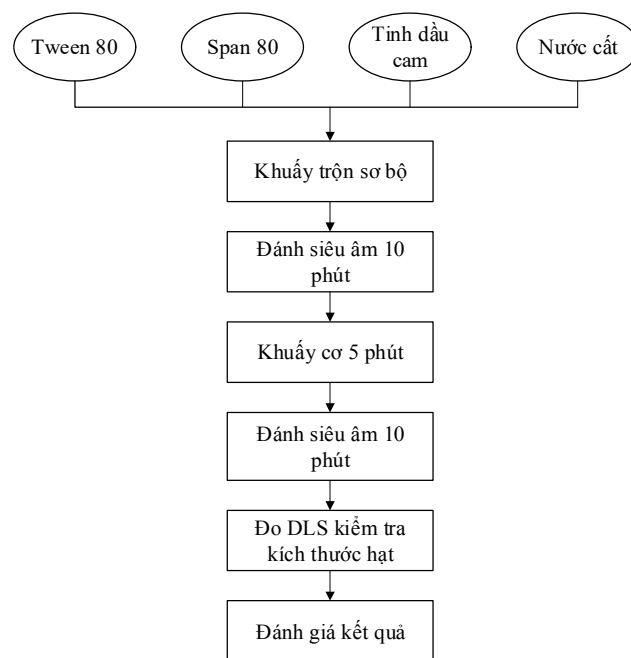
Tinh dầu cam được trích ly từ vỏ quả cam sành bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp theo quy trình mô tả trong hình 1. Phương pháp này sử dụng thiết bị vận hành đơn giản, dễ áp dụng với quy mô nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.

2.3 Tổng hợp nano nhũ tương tinh dầu cam

Các hạt nanoemulsion trên nền tinh dầu cam được tổng hợp bằng phương pháp rung siêu âm kết hợp với khuấy cơ học. Trong phương pháp này chất hoạt động bề mặt Tween 80 và Span 80 được chọn làm chất nhũ hóa cho hệ nhũ tương và quá trình phân tán tạo hệ nhũ tương được mô tả theo qui trình ở hình 2.



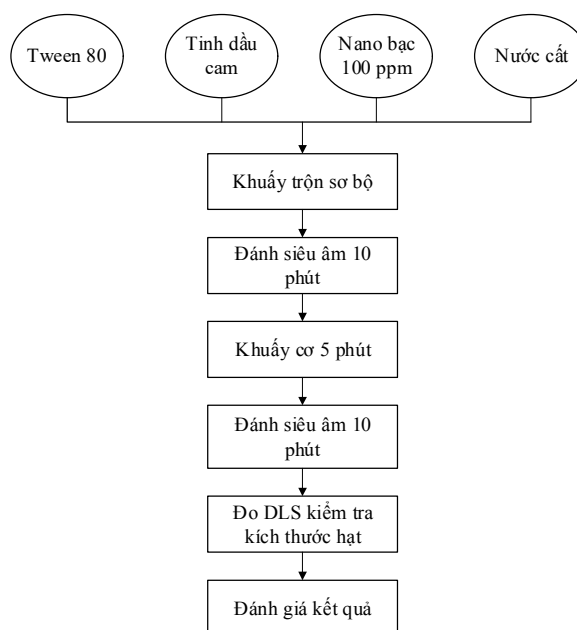
Hình 1: Sơ đồ quy trình trích ly tinh dầu cam



Hình 2: Sơ đồ quy trình tổng hợp nano nhũ tương tinh dầu cam

2.4 Tổng hợp nano nhũ tương từ tinh dầu cam kết hợp nano bạc

Nano nhũ tương từ tinh dầu cam kết hợp nano bạc được tổng hợp theo quy trình hình 3. Tinh dầu cam được nhũ hóa bằng hỗn hợp Tween 80 và Span 80 với tỉ lệ thích hợp, sử dụng dung dịch nano bạc như một môi trường phân tán. Sau đó, hỗn hợp được rung siêu âm 10 phút, rồi khuấy cơ 5 phút với tốc độ 1200 vòng/phút, tiếp tục cho hỗn hợp rung siêu âm trong 10 phút nữa sẽ thu được hệ nano nhũ tương của tinh dầu trong dung dịch nano bạc.



Hình 3: Quy trình tổng hợp nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp với nano Bạc

2.5 Phương pháp phân tích nano tinh dầu

Phương pháp GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) đã được sử dụng để phân tích định tính và định lượng các thành phần chứa trong tinh dầu cam. Phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS - Dynamic Light Scattering) đã được sử dụng để xác định phân bố kích thước hạt. Phân bố kích thước được thực hiện trên thiết bị đo Horiba SZ-100 tại viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn Lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam tại TP. Hồ Chí Minh.

2.6 Phương pháp nghiên cứu khả năng kháng khuẩn

Phương pháp thử nghiệm khả năng kháng khuẩn là áp dụng kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán. Quy trình thử nghiệm: cho vi khuẩn vào đĩa petri có chứa môi trường thạch LB (Luria Bertani), sau đó dàn đều vi khuẩn ra hết bề mặt thạch. Đĩa giấy 6mm vô trùng đặt lên bề mặt thạch và thấm mẫu thử nghiệm lên, cho một mẫu kháng sinh (đối chứng dương) lên bề mặt thạch. Bọc kín đĩa petri bằng giấy vô trùng, để ở điều kiện thường trong vòng 1 – 2 ngày. Quan sát các vòng kháng khuẩn xung quang đĩa giấy và đánh giá kết quả.

Mẫu nano tinh dầu, nano tinh dầu kết hợp với nano Bạc được xác định khả năng kháng khuẩn tại viện sinh học và thực phẩm – Trường Đại học Công nghiệp TP HCM.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả GC-MS tinh dầu Cam

Thành phần trong tinh dầu cam được phân tích bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ, nhiệt độ làm bay hơi tinh dầu trước khi đi vào phân tích ở hai nhiệt độ khác nhau là 320°C và 600°C.

Bảng 1. Thành phần tinh dầu cam bay hơi nhiệt độ 320 oC và 600 oC.

Hợp chất	Hàm lượng cấu tử (%)		
	320 °C	600 °C	30 ngày
α -Pinene	0,54	0,55	-
β -Myricene	0,24	0,32	-
(+)-Limonene	75,79	56,88	4,66
Limonene oxide	8,88	17,76	-

Hợp chất	Hàm lượng cấu tử (%)		
	320 °C	600 °C	30 ngày
Cis-Carveol	4,17	16,64	3,05
Carvone	6,42	-	4,68
Cis-Carvone oxide	-	0,44	-
Octanal	-	-	2,43
Decanal	-	-	7,73
Dodecanal	-	-	2,81
α -Terpineol	-	-	2,60
δ -Cadinene	-	-	1,23
α -Octadecene	-	-	2,42
Nonadecene	-	-	11,56
Nonadecane	-	-	2,43
Methyloleate	-	-	0,66
Tricosane	-	-	8,18
Eicosane	-	-	11,39
Eicosanoic acid	-	-	4,97
p-aminobezoic acid	-	-	0,72
Docosanoic acid	-	-	6,80
Cyclooctyne	-	0,75	-
Cyclopentenone	0,32	-	-
3-Octyne	-	0,23	-
1,4-Pentadiene	0,24	-	-
1,2-Cyclononadiene	0,61	0,12	-
1,9-Decadiyne	1,85	-	-
9-Octylicosane	-	-	1,36
2-Cyclopenten-1-one	-	0,43	-
E-p-Mentha-2,8-dienol	0,94	-	4,15
(Z)-9-Octadecenamide	-	-	4,94
Spiro[4.5]dec-6-ene	-	0,27	-
Cis-Decahydro-1-naphthol	-	1,56	-
1,5-Dimethyltricyclo[3.3.0.0(2,6)]octane	-	4,04	-
Glutaric acid, di(2,5-difluorobenzyl)ester	-	-	7,34
1H-Indene, 5-butyl-6-hexyloctahydro-	-	-	1,22
1-Naphthoic Acid Methyl Ester	-	-	2,64
Tổng	100	99,99	99,97

Bảng 2. Thành phần tinh dầu cam bay hơi ở nhiệt độ 600oC

Hợp chất	Hàm lượng cấu tử (%)		
	10 ngày	20 ngày	30 ngày
α -Pinene	0,45	-	-
Propene	-	0,16	-
Ocimene	0,55	0,59	-
(+)-Limonene	61,64	63,43	25,94
p-xylene	-	0,17	-
Cis-Carveol	4,54	4,41	-
Carvone	5,46	5,23	-
Citronellene	-	0,23	-
Carhydrine	3,67	-	-
Hexadenol	0,34	-	-
Pentanal	-	-	4,33
Octanal	-	-	7,58
Decanal	-	-	14,10
Dodecanal	-	-	3,66
α -Terpineol	-	-	7,20

Hợp chất	Hàm lượng cấu tử (%)		
	10 ngày	20 ngày	30 ngày
δ -Cadinene	-	-	2,15
Heptacosane	-	-	2,06
Tricosane	-	-	2,61
Eicosane	-	-	6,81
Alloocimene	0,67	0,43	-
Limonene oxide	17,00	17,83	-
1,2-Pentadien	1,97	2,20	-
1,3-Pentadiene	-	-	3,68
1,9-Decadiyne	0,41	3,16	-
1,2-Dimethylenecyclobutane	-	0,17	-
1,2-Dimethyl-1,4-cyclohexadiene	-	0,15	-
2,5-Dihylcyclohexa-1,4-diene	-	0,18	-
2-Methyl-2vinyloxirane	0,39	-	-
Tricyclo[5.1.1.0(2,6)]none	0,76	-	-
Bicyclo[4.2.0]oct-7-ene	2,13	1,65	-
Hexacosanoic acid	-	-	1,84
9-Octylicosane	-	-	1,83
p-Mentha-3,8-diene	-	-	2,07
17-n-Hexadeyl Tetratriacontane	-	-	5,11
1,1'-Bicyclopentyl, 2-hexadecyl-	-	-	1,17
α -Lioneic acid 2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl ester	-	-	7,83
Tổng	99,98	99,99	99,97

Tất cả bảng tổng hợp ở trên ta thấy thành phần D – Limonene và Limonene Oxide chiếm phần trăm cao nhất và có ở tất cả các bảng. Từ đó rút ra kết luận là D – Limonene là thành phần chính trong tinh dầu Cam. D – Limonene là chất có khả năng chống lại oxy hóa mạnh mẽ, hoạt tính của nó có khả năng ức chế phòng chống ung thư. Thành phần Decyclicaldehyd tạo nên mùi thơm.

Dưới ảnh hưởng của nhiệt độ, ánh sáng, không khí, độ ẩm, tinh dầu dễ bị oxy hóa biến thành Aldehyde, và Aldehyde chuyển hóa thành Acid. Chính vì lý do trên ta nhận thấy trong bảng thành phần 20 và 30 ngày có sự xuất hiện của các hợp chất nhóm chức Aldehyde và Acid.

3.2 Tỷ lệ các yếu tố chất hoạt động bề mặt, tinh dầu và nước ảnh hưởng đến kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu cam

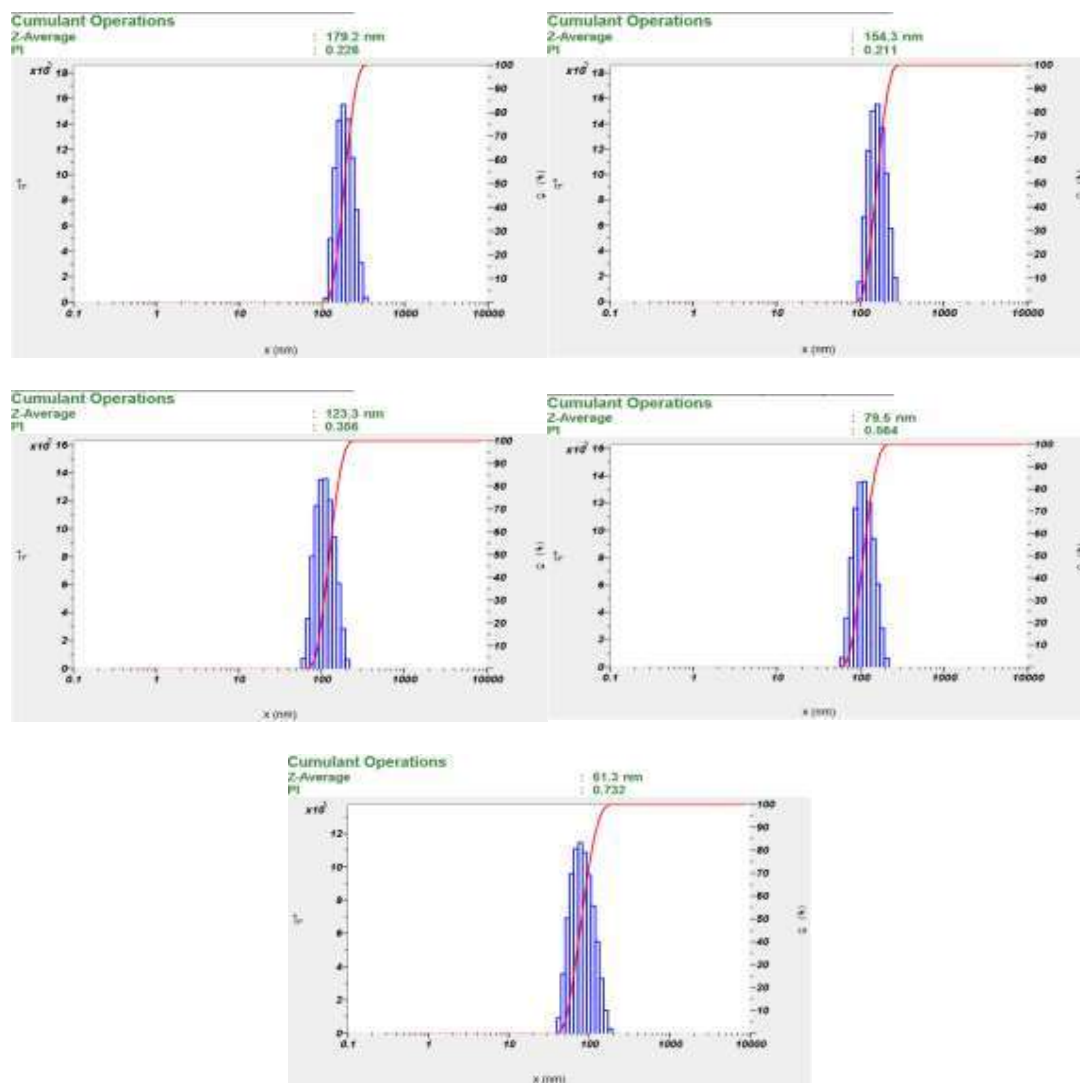
Tất cả các mẫu thử nghiệm đều được rung siêu âm 10 phút tiếp tục được đánh bằng máy khuấy cơ 10 phút với tốc độ 1200 vòng/phút và cuối cùng là rung siêu âm thêm 10 phút.

Bảng 3: Bảng kết quả khảo sát kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu cam trong 25 mL nước

25 mL nước cất						
Tinh dầu, mL Tween/Span mL:mL	0,5		1,0		1,5	
	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm
0 – 1	A1	166,4	B1	179,2	C1	269,3
0,25 – 0,75	A2	302,0	B2	154,3	C2	361,1
0,5 – 0,5	A3	157,5	B3	123,2	C3	294,7
0,75 – 0,25	A4	116,3	B4	79,5	C4	143,9
1 – 0	A5	6996,9	B5	61,3	C5	855,2

Bảng 3 cho ta thấy kích thước trung bình hạt nhũ tương trong cùng điều kiện thể tích nước là 25 mL và thể tích tinh dầu thay đổi lần lượt là 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL, tương ứng với tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0. Đối với khảo sát thể tích nước là 25 mL trong quá trình tổng hợp cho ra kết quả tốt nhất khi thể tích tinh dầu là 1 mL và kích thước hạt giảm dần theo tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5;

0,75 – 0,25; 1 – 0. Và khi tỷ lệ Tween tăng dần ở các mẫu có thể tích tinh dầu 1 mL cho ra kích thước nhỏ nhất là 61,3 nm. Tuy nhiên nhìn chung về kích thước hạt của các mẫu có hệ chất hoạt động bề mặt cho ra kết quả nằm trong khoảng nano, ngoại trừ mẫu A5 và C5. Như vậy, có thể rút ra kết luận đối với mẫu có thể tích nước là 25 mL, rằng khi thể tích chất nhũ hóa lớn hơn thể tích tinh dầu thì tỉ lệ bằng nhau giữa Tween/Span sẽ cho mẫu nano nhũ tương có kích thước tối ưu; Khi thể tích chất nhũ hóa bằng thể tích tinh dầu thì tỉ lệ vượt trội của Tween so với Span sẽ cho mẫu nano nhũ tương có kích thước nhỏ hơn; Khi thể tích chất nhũ hóa nhỏ hơn thể tích tinh dầu thì sự có mặt của Span sẽ giúp quá trình nhũ hóa diễn ra dễ dàng hơn.



Hình 4: Phổ kích thước hạt của các mẫu nano nhũ tương tinh dầu Cam có kích thước giảm dần từ B1 – B5



Hình 5: Mẫu nano tinh dầu tổng hợp được

Kết quả hình ảnh cho ta thấy kích thước nano tuân theo quy luật giảm dần trong điều kiện 25 mL nước cất và 1 mL tinh dầu Cam (Hình 4, 5).

Bảng 4: Bảng kết quả khảo sát kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu cam trong 50 mL nước

50 mL nước cất						
Tinh dầu, mL Tween/Span, mL:mL	0,5		1,0		1,5	
	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm
0 – 1	A6	106,0	B6	78,4	C6	47,6
0,25 – 0,75	A7	195,4	B7	94,7	C7	78,7
0,5 – 0,5	A8	125,9	B8	85,4	C8	100,1
0,75 – 0,25	A9	1077,1	B9	106,1	C9	108,6
1 – 0	A10	283,8	B10	66,2	C10	104,4

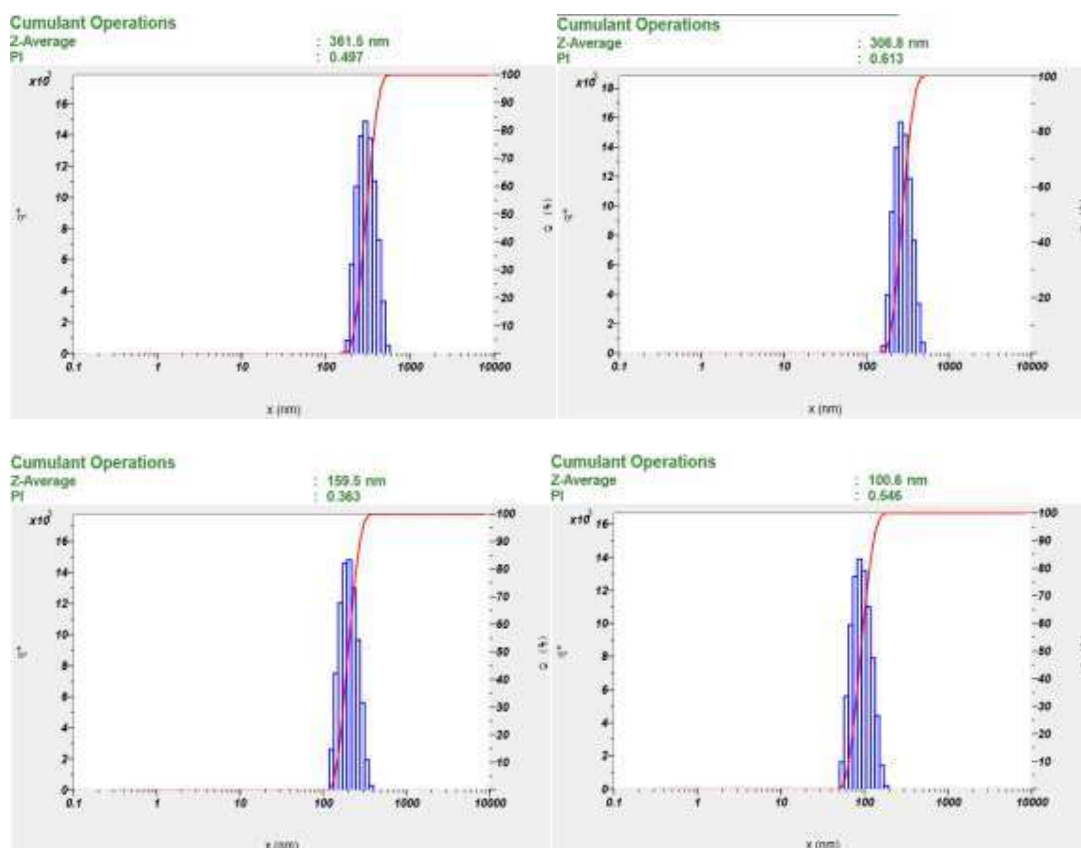
Bảng 4 cho ta thấy kích thước trung bình hạt nhũ tương trong cùng điều kiện thể tích nước là 50 mL và thể tích tinh dầu thay đổi lần lượt là 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL, tương ứng với tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0.

Đối với khảo sát thể tích nước là 50 mL trong quá trình tổng hợp cho ra kết quả ở tốt nhất khi thể tích tinh dầu là 1 mL và 1,5 mL và theo tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0 thì tại thể tích tinh dầu là 1,5 mL cho ra kích thước hạt có xu hướng tăng dần, còn tại thể tích tinh dầu bằng 1 mL thì không cho ra quy luật thay đổi rõ ràng. Và khi tỷ lệ Tween tăng dần ở các mẫu có thể tích tinh dầu 1 mL cho ra kích thước lớn nhất là 108,6 nm. Tuy nhiên nhìn chung về kích thước hạt của các mẫu có cho ra kết quả nằm trong khoảng nano và kích thước hạt nhỏ nhất là 47,6 nm.

Bảng 5: Bảng kết quả khảo sát kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu cam trong 75 mL nước

75 mL nước cất						
Tinh dầu, mL Tween/Span, mL:mL	0,5		1,0		1,5	
	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm
0,25 – 0,75	A12	481,5	B12	249,7	C12	306,8
0,5 – 0,5	A13	736,5	B13	258,5	C13	159,6
0,75 – 0,25	A14	5222	B14	184,6	C14	100,6
1 – 0	A15	1809,0	B15	246,0	C15	-

Bảng 5 cho ta thấy kích thước trung bình hạt nhũ tương trong cùng điều kiện thể tích nước là 50 mL và thể tích tinh dầu thay đổi lần lượt là 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL, trong khi tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0. Đối với khảo sát thể tích nước là 75 mL trong quá trình tổng hợp cho ra kết quả ở tốt nhất khi thể tích tinh dầu là 1 mL và 1,5 mL (Hình 6). Theo tỷ lệ chất hoạt động bề mặt Tween tăng dần thì tại thể tích tinh dầu là 1,5 mL cho ra kích thước hạt có xu hướng giảm dần, còn tại thể tích tinh dầu bằng 1 mL thì kích thước hạt cũng có xu hướng giảm dần nhưng có khác ở hai điểm cuối lại theo hướng tăng. Mẫu C15 có kích thước trung bình của hạt nằm ngoài giới hạn đo của máy.



Hình 6: Phổ kích thước hạt của các mẫu nano nhũ tương tinh dầu Cam có kích thước giảm dần từ C11 – C14

Bảng 6: Bảng kết quả khảo sát kích thước hạt nano nhũ tương tinh dầu cam ở 100 mL nước

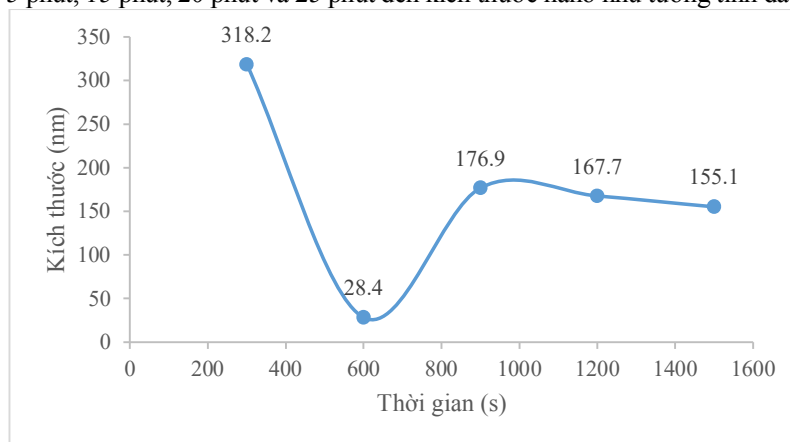
100 mL nước cất						
Tinh dầu, mL Tween/Span, mL:M L	0,5		1,0		1,5	
	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm	Ký hiệu mẫu	Kích thước, nm
0,25 – 0,75	A17	266,7	B17	301,5	C17	311,5
0,5 – 0,5	A18	179,2	B18	28,4	C18	260,5
0,75 – 0,25	A19	660,0	B19	1416,4	C19	129,8
1 – 0	A20	5865,3	B20	6812,1	C20	131,1

Bảng 6 cho ta thấy kích thước trung bình hạt nhũ tương trong cùng điều kiện thể tích nước là 100 mL và thể tích tinh dầu thay đổi lần lượt là 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL, trong khi tỷ lệ các chất hoạt động bề mặt

Tween/Span thay đổi từ 0 – 1; 0,25 – 0,75; 0,5 – 0,5; 0,75 – 0,25; 1 – 0. Với khảo sát thể tích nước là 100 mL trong quá trình tổng hợp cho ra kết quả ở tốt nhất khi thể tích tinh dầu là 1,5 mL và theo tỷ lệ chất hoạt động bề mặt Tween tăng dần thì tại thể tích tinh dầu là 1,5 mL cho ra kích thước hạt có xu hướng giảm dần. Tại thể tích tinh dầu bằng 0,5 mL và 1 mL thu được mẫu nano nhũ tương có kích thước hạt nano nhỏ nhất, tương ứng là 179,2 và 28,4 nm (mẫu A18 và B18).

3.3 Sự ảnh hưởng của thời gian khuấy cơ học đến kích thước nano nhũ tương tinh dầu cam

Khảo sát ở trên tìm ra mẫu cho kích thước nano tối ưu nhất là mẫu B18 có kích thước 28,4 nm ở điều kiện 100 mL nước cất, tỷ lệ Tween/Span 0,5 – 0,5 và 1,5 mL tinh dầu Cam bằng phương pháp rung siêu âm kết hợp khuấy cơ học trong 10 phút với tốc độ 1200 vòng/phút. Thí nghiệm này khảo sát ảnh hưởng thời gian khuấy lần lượt là 5 phút, 15 phút, 20 phút và 25 phút đến kích thước nano nhũ tương tinh dầu cam.

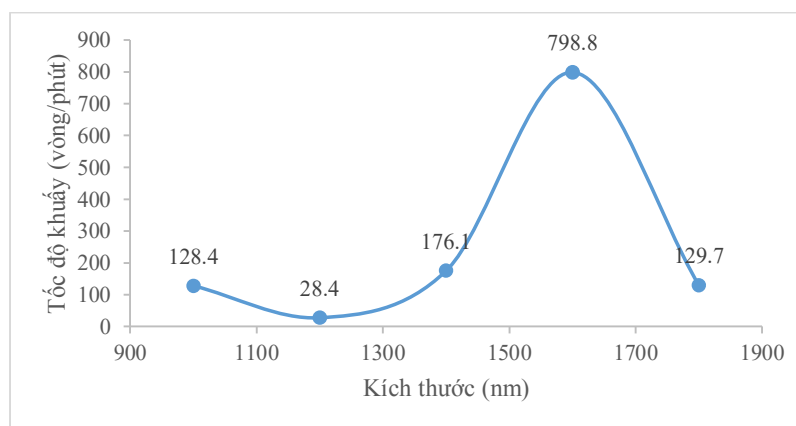


Hình 7: Kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian khuấy cơ học lên kích thước hạt

Kết quả khảo sát cho thấy thời gian 10 phút (600s) là khoảng thời gian tối ưu cho ra mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam với kích thước hạt trung bình 28,4 nm.

3.4 Sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến kích thước nano nhũ tương tinh dầu cam

Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến kích thước nano nhũ tương tinh dầu cam được thực hiện trên mẫu B18 ở điều kiện 100 mL nước cất, tỷ lệ Tween/Span 0,5 – 0,5 và 1,5 mL tinh dầu Cam ta với tốc độ khuấy lần lượt là 1000 vòng/phút, 1200 vòng/phút, 1400 vòng/phút, 1600 vòng/phút, 1800 vòng/phút trong 10 phút.



Hình 8: Kết quả khảo sát tốc độ khuấy

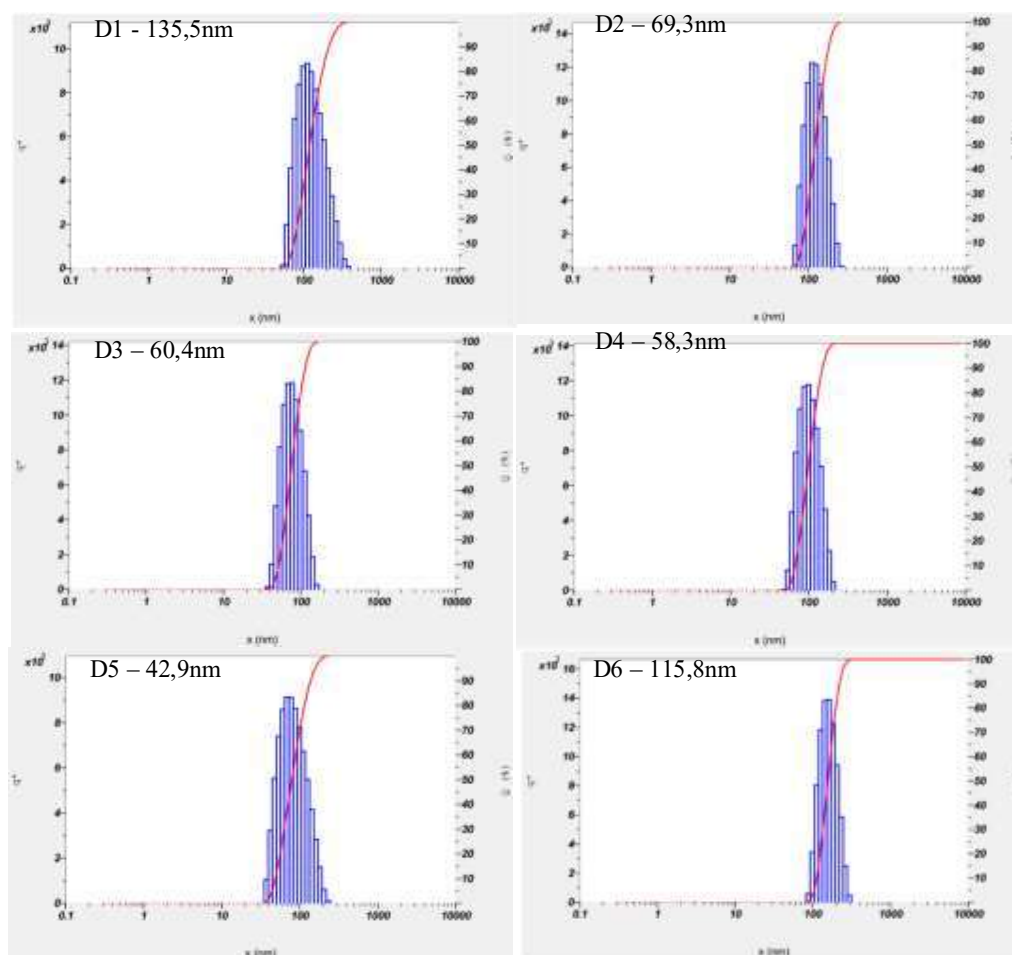
Kết quả khảo sát cho thấy tốc độ khuấy 1200 vòng/phút là tốc độ khuấy tối ưu cho ra mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam với kích thước hạt trung bình 28,4 nm.

3.5 Kết quả khảo sát sự kết hợp giữa nano nhũ tương tinh dầu cam và nano bạc 50ppm

Nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp với nano Bạc được tổng hợp theo quy trình 3 mục 2.4. Kết quả DLS của các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp nano Bạc được biểu diễn trong Bảng 7 và hình 9.

Bảng 7. Kết quả DLS của các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp nano bạc

Mẫu	Tween 80 (mL)	Tinh dầu cam (mL)	Dung dịch nano bạc 100ppm (mL)	H ₂ O (mL)	Kích thước hạt (nm)
D1	0,75	0,5	25	23,75	135,5
D2	1,5	1	25	22,5	69,3
D3	2,25	1,5	25	21,25	60,4
D4	3	2	25	20	58,3
D5	3,75	2,5	25	18,75	42,9
D6	4,5	3	25	17,5	115,8
NB: nano bạc	-	-	25	25	42,7



DLS của các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp nano bạc

Kết quả DLS cho thấy phương pháp nhũ tương hóa tinh dầu cam kết hợp với nano bạc có thể tổng hợp được hệ nano nhũ tương có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 42 – 136 nm. Từ kết quả đo DLS ta thấy kích thước hạt của các mẫu từ D1 đến D5 giảm dần, trong đó D5 là mẫu có kích thước hạt nhỏ nhất (42,9 nm) và tới D6 thì kích thước hạt lại tăng (Hình 9). Như vậy có thể kết luận rằng với thể tích tinh dầu 2,5mL và chất ổn định Tween có thể được nhũ hóa tốt nhất trong 50mL dung dịch nano bạc để tổng hợp dung dịch nano nhũ tương kết hợp nano bạc.

3.6 Phân tích khả năng kháng khuẩn của nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp với nano bạc

Các mẫu thử nghiệm P1, P2, P3, P4, P5, P6 là các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam với các hàm lượng tinh dầu cam khác nhau, mẫu D1, D2, D3, D4, D5, D6 là các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp với nano bạc 50 ppm, mẫu TDC là mẫu tinh dầu cam nguyên chất, mẫu NB là mẫu Nano bạc 50ppm. Ở thí nghiệm này, vi khuẩn *Escherichia coli* (*E.coli*) đã được sử dụng để khảo sát khả năng kháng khuẩn của các mẫu bằng phương pháp khuếch tán giếng trên đĩa thạch với mẫu kháng sinh đối chứng là ampicillin.

Bảng 8. Mẫu thử nghiệm kháng khuẩn

Mẫu	Thành phần, mL			DLS (nm)
	Tinh dầu cam	H ₂ O	Nano bạc 100ppm	
	1	-	-	-
P1	0,5	50	-	-
P2	1	50	-	-
P3	1,5	50	-	-
P4	2	50	-	-
P5	2,5	50	-	-
P6	3	50	-	-
NB	-	25	25	42,7
D1	0,5	23,75	25	135,5
D2	1	22,5	25	69,3
D3	1,5	21,25	25	60,4
D4	2	20	25	58,3
D5	2,5	18,75	25	42,9
D6	3	17,5	25	115,8



Hình 10: Đĩa thử nghiệm kháng khuẩn *E.coli*

Ở đĩa vi khuẩn *E.coli*, các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam kết hợp nano bạc có vòng kháng khuẩn gần như bằng nhau, và lớn hơn so với các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam khi không có sự hỗ trợ của

các hạt nano bạc (Hình 10). Các mẫu nano nhũ tương tinh dầu cam đều có khả năng kháng vi khuẩn *E.coli*, tuy nhiên, đường kính vòng kháng khuẩn rất nhỏ và khi tăng hàm lượng tinh dầu lên (giữ im nồng độ nano bạc) thì đường kính vòng kháng khuẩn hầu như không thay đổi. Như vậy, ta có thể kết luận rằng, nano nhũ tương từ tinh dầu cam có khả năng kháng khuẩn thấp và tính kháng khuẩn được cải thiện rõ rệt khi có thêm sự hỗ trợ của nano bạc.

4 KẾT LUẬN

Các hạt nano nhũ tương từ tinh dầu vỏ cam kết hợp với nano bạc đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp rung siêu âm được hỗ trợ bằng khuấy cơ học, sử dụng Tween 80 và Span 80 như một chất nhũ hóa hiệu quả. Các mẫu nhũ tương hầu hết có kích thước nano với đường kính động học trong khoảng 60 – 120 nm. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, các yếu tố kỹ thuật như tỉ lệ dầu/nước, tỉ lệ chất nhũ hóa, tốc độ khuấy và thời gian khuấy có sự ảnh hưởng rõ rệt lên kích thước hạt trung bình. So với các mẫu nhũ tương từ tinh dầu vỏ cam, mẫu nano nhũ tương kết hợp với nano bạc thể hiện tính kháng khuẩn *E.coli* vượt trội hơn. Kết quả nghiên cứu cho thấy nano nhũ tương từ tinh dầu vỏ cam sành kết hợp với nano bạc có thể trở thành vật liệu triển vọng ứng dụng trong các lĩnh vực thực phẩm, mỹ phẩm và kháng khuẩn.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được hỗ trợ tài chính bởi đề tài nghiên cứu khoa học mã số 184.HH05 do trường Đại học Công nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh tài trợ theo hợp đồng số 39/HĐ-ĐHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Amaral and K. Bhargava, Essential oil nanoemulsions and food applications, Adv. Food Technol. Nutr. Sci. Open J., vol. 1, pp. 84-87, 2015.
- [2] P. Anand, V. Vellingiri, R. Durairajan and N. Paramasivam, Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against Salmonella Typhimurium, Food Bioscience, vol. 28, pp. 57-65, 2019.
- [3] D. S. Hélder, P. Joana, A. C. Pinheiro, F. Donsi, A. T. Serra, C. M. M. Duarte, G. Ferrari, M. A. Cerqueira and A.A. Vicente, Evaluating the behaviour of curcumin nanoemulsions and multilayer nanoemulsions during dynamic in vitro digestion, Journal of Functional Foods, vol. 48, pp. 605-613, 2018.
- [4] H. B. Eral Gupta, T. A. Hatton and P. Doyle, Nanoemulsions: Formation, Properties And Applications, Soft Matter, vol. 11, pp. 1-17, 2016.
- [5] M.M. Ahmad, Salim - ur - Rehman, F.M. Anjum and E.E. Bajwa, Comparative Physical Examination Of Various Citrus Peel Essential Oils, International Journal of Agriculture and Biology, vol. 8, pp. 186-190, 2006.
- [6] Y. Li, C. Wu, T. Wu, L. Wang, S. Chen, T. Ding and Y. Hu, Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers, Journal of Food Engineering, vol. 217, pp. 108-114, 2018.
- [7] Z. Lou, J. Chen, F. Yu, H. Wang, X. Kou, C. Ma and S. Zhu, The Antioxidant, Antibacterial, Antibiofilm Activity Of Essential Oil From Citrus Medica L. Var. Sarcodactylis and Its Nanoemulsion, LWT - Food Science and Technology, vol. 80, pp. 371-377, 2017.
- [8] H. V. Mojdeh, R. Hassan, A. Aliahmadi and A. Ardalan, Chapter 13 – Nanoemulsions: A Novel Antimicrobial Delivery System, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Nano- and Microscale Drug Delivery Systems. Elsevier, 2017.
- [9] O. C. Aneta and S. H. Beata, Chapter 7 - The Use of Nanotechnology in Modern Pharmacotherapy, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing. Elsevier, 2017.
- [10] D. S. Bernardi, T. A. Pereira, N. R. Maciel, J. Bortoloto, G. S. Viera, G. C. Oliveira and P. A. Rocha-Filho, Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments, J. Nanobiotechnology 9 (2011) 1-9.

- [11] S. A. Chime, F. C. Kenechukwu and A.A. Attama, Application of Nanotechnology in Drug Delivery. IntechOpen, 2014.
- [12] H. S. Mohammad, M. Hosseini, M. Jahanshahi, R. L. Meyer and G. N. Darzi, Clove oil nanoemulsion as an effective antibacterial agent: Taguchi optimization method, Desalination and Water Treatment, vol. 57, pp. 18379-18390, 2016.
- [13] S. Zhang, M. Zhang, Z. Fang and Y. Liu, Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions, LWT - Food Science and Technology, vol.75, pp. 1-7, 2016.
14. T. Mehmood, A. Ahmad, A. Ahmed, and Z. Ahmed, Optimization of olive oil based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach, Food Chemistry, 229 (2017) 790-796.
- [15] B. Amrutha, K. Sundar, and P. H. Shetty, Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic E. coli and Salmonella spp. from fresh fruits and vegetables, Lebensmittel-Wissenschaft Technologie, vol. 79, pp. 152-159, 2017.
- [16] Y. Li, C. Wu, T. Wu, L. Wang, S. Chen, T. Ding and Y. Hu, Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers, Journal of Food Engineering, vol. 217, pp.108-114, 2018.
- [17] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani and S.D. Delekar, Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review, Materials Science and Engineering: C, vol. 97, pp. 954-965, 2019.
- [18] P. H. Li and B. H. Chiang, Process optimization and stability of D-limonene-inwater nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology, Ultrasonics Sonochemistry, vol. 19, pp. 192-197, 2012.
- [19] S. Kentish, T. J. Wooster, M. Ashokkumar, S. Balachandran, R. Mawson and L. Simons, The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation, Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 9, pp. 170-175, 2008.

Ngày nhận bài: 02/07/2019

Ngày chấp nhận đăng: 01/10/2019