

TINH DẦU LÁ TRÀU PIPER BETLE L. VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Đến toà soạn 6 – 7 – 2015

Huỳnh Kỳ Trân, Trần Nguyễn Ngọc Châu, Hà Mỹ Thuận,

Nguyễn Khoa Nam, Đỗ Việt Hà

Viện Phát triển Công nghệ và Đào tạo

Trần Thị Ngọc Thanh, Phạm Thị Ánh

Công ty DVKHCN Eurofins Sắc Ký Hải Đăng

Chu Phạm Ngọc Sơn

Hội Hóa học TP Hồ Chí Minh

SUMMARY

The main phenolic components of Hocmon betel leaf essential oil were unequivocally identified as chavibetol 1, chavibetol acetate 2 and 4-allylpyrocatechol diacetate 3. The phenolic composition of the essential oil and also oil content obtained by hydrodistillation were found to vary with the time of leaf collection. Best quality and highest yield of oil with high phenolic content was collected during the rainy season. During the dry season in South Vietnam, particularly in April and May, partial enzymatic hydrolysis of APC diacetate 3, the main phenolic constituent, takes place in the leaves and gives water soluble, non-hydrodistilled 4-allylpyrocatechol 4 (APC). Only a small portion of APC was enzymatically methylated to give chavibetol 1, thus leading to a decrease in oil content and its phenolic components. Anti bacterial and antifungal activities were found with betel oil rich in phenolic content. Viral activity against Enterovirus 71 was discovered for the first time.

Keywords: *Hocmon betel leaf essential oil, variation of oil content and phenolic components with time of collection, antibacterial, antifungal and antiviral activities.*

1. MỞ ĐẦU

Một số nước Á châu có truyền thống nhai trầu có vị nồng cay với cau và vôi chét nhằm mục tiêu làm chắc răng và làm thơm miệng. Tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng oxy hóa, chữa lành vết

thương của tinh dầu trầu cũng đã được biết [1,2,3,4]. Các đặc trưng thuận lợi ấy là do các cấu tử phenolic, thành phần chính trong tinh dầu trầu. Thành phần này thay đổi theo địa lý, theo tháng thu hoạch, cách xử lý lá trước chưng cất (Bảng 1):

Bảng 1. Thành phần phenolic của các loại tinh dầu lá trà

Nước	Hiệu Suất (%)	Chavibetol (%)	Eugenol (%)	Safrole (%)	Isoeugenol (%)	Eugenol acetate (%)	Chavibetol acetate (%)	APC diacetate (%)	Tài liệu
Nepal	0,1 ^a	80,5	0,4				11,7	6,2	1
Sri lanca	1,05 ^b		11,93	48,69			12,55	11,34	5
Philippin	0,92 ^b	53,10	0,42	0,11		8,3	15,5	0,71	6
Malaysia	1,5 ^b	69				8,3		0,2	7
Dài Loan			36,2		3,2		16,9	5,4	8
Viet nam	0,8 ^c				19,82	19,94		42,2	9
Việt nam	0,41 ^d				26,09			64,82	10
Việt nam	0,25 ^e		4,83		29,32				10

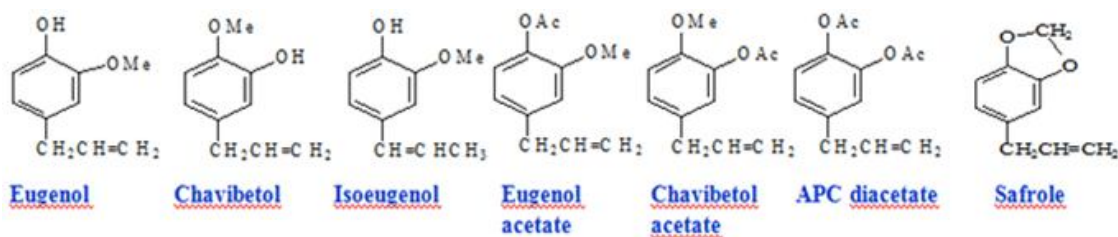
^a Lá tươi

^b Lá phơi khô ở nhiệt độ phòng, hiệu suất theo lá khô

^c Lá tươi chưng cất trong nước 10% NaCl

^d Lá tươi chưng cất sử dụng vì sóng có nước

^e Lá tươi, chưng cất bằng lôi cuốn hơi nước



Sử dụng chuẩn và kỹ thuật GC-MS, chúng tôi xác định các cấu tử phenolic của tinh dầu lá trà Bà diêm-Hóc môn được GS Võ văn Chi nhận danh là *Piper betle* L. Thông qua một số phản ứng hóa học kết hợp với nhận danh bằng kỹ thuật GC-MS và một số chuẩn, chúng tôi xác định chính xác các cấu tử phenolic chính của tinh dầu trà là chavibetol **1**, chavibetol acetate **2**, 4-

allylpyrocatechol diacetate **3** (APC diacetate). Eugenol chỉ có dưới dạng vết (< 0,1%). [11]. Tại Hội nghị Hóa học quốc tế Asian Chemical Congress lần thứ 14 năm 2011 tổ chức ở Bangkok [12], lần đầu tiên trên thế giới, chúng tôi thông báo có sự chuyển đổi APC diacetate **3** thành chavibetol **1** dưới tác dụng enzym có trong lá trà khi so sánh thành phần phenolic của

tinh dầu lá trà trong hai trường hợp: chưng cất với nước muối bão hòa và nước không

muối (Bảng 2):

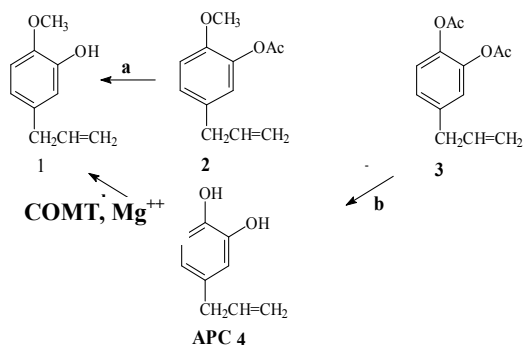
Bảng 2. Thành phần phenolic trong tinh dầu khi chưng cất trong nước không muối và muối bão hòa

Thí nghiệm	Lá thu hái 5/ 1/2011	Tinh dầu (mg)	1 (% diện tích GC-MS)	2 (% diện tích GC-MS)	3 (% diện tích GC-MS)	Tổng phenolic (%)
1	Lá (300g) xay nhuyễn trong 900 ml nước, ngâm 1 giờ, chưng cất 3 giờ	282	26,19	13,06	3,18	42,43
2	Lá (300g)) xay nhuyễn trong 900 ml nước muối bão hòa, ngâm 1 giờ, chưng cất 3 giờ	875	5,66	21,98	60,55	88,19

Trong nước không muối:

- **Hàm lượng tinh dầu giảm đáng kể**
- **Hàm lượng chất APC diacetate giảm rất mạnh trong khi hàm lượng chavibetol tăng cũng khá mạnh**
- **Hàm lượng chavibetol acetate giảm nhưng không thật nhiều**
- **Tổng phenolic giảm mạnh**

Cơ chế có sự tham gia enzym được đề xuất để giải thích sự chuyển đổi nêu trên (Hình 1)



Hình 1. Cơ chế của sự chuyển đổi đã nêu ở trên

Trong khi một phần nhỏ của 2 bị thủy phân enzym cho trực tiếp 1 (cơ chế a), sự hình thành phần lớn 1 được giải thích thông qua sự thủy phân enzym cho 4-allylpyrocatechol 4 (APC), tiếp nối bằng sự methyl hóa chọn lọc một phần hợp chất 4 này dưới tác dụng của enzym *Catechol-O-methyl transferase* (COMT) (cơ chế b). Phần APC không bị methyl hóa, tan trong nước, không lôi cuốn theo hơi nước, do đó, thành phần 3 và hàm lượng tinh dầu giảm đáng kể khi chưng cất tinh dầu từ lá trà trong nước không muối. Những phản ứng minh chứng sự chuyển đổi 2 và 3 qua 1 dưới tác dụng enzym đã được chúng tôi thông báo trong hội nghị quốc tế về hóa học Việt Nam-Malaysia tháng 11 năm 2004 và hội nghị Analytica Vietnam tháng 4/2015 [13,14]. Enzym COMT đã được biết có trong một số nguồn thực vật nhưng lần đầu

tiên được chúng tôi phát hiện trong lá trà, sự methyl hóa chọn lọc cũng đã được nghiên cứu khá kỹ do sự tấn công ái nhân của một nhóm OH phenolic của dẫn xuất catechol lên nhóm $\text{CH}_3\text{-S}$ thiếu điện tử của S-Adenosyl-L-methionine (SAM hay ADOMET) [15,16,17]. Tỷ lệ meta/para đối với nhóm thế tùy thuộc bản chất nhóm thế và tính ái nhân của nhóm OH. Nhìn chung nhóm thế không phân cực ưu đãi sự methyl hóa ở para. Trong trường hợp APC diacetate, sự methyl hóa rất chọn lọc ở OH para đối với nhóm allyl là nhờ nhóm allyl không phân cực và tính ái nhân của OH para được tăng thêm do hiệu ứng siêu liên hợp [13, 14].

Về hoạt tính sinh học của tinh dầu lá trà, nhiều kết quả đã công bố cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, khử trùng là do sự hiện diện các phenolic trong tinh dầu trà [1,2,3]. Nghiên cứu sơ bộ của chúng tôi trước đây cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxy hóa tăng theo thành phần phenolic của tinh dầu lá trà. Do đó, vấn đề cốt lõi là xác định những điều kiện thí nghiệm để đạt được tinh dầu có hàm lượng và tổng phenolic cao nhằm tăng hoạt tính sinh học và nâng cao giá trị sử dụng tinh dầu lá trà.

Rõ ràng muốn đạt được các tiêu chí đó, cần phải ngăn chặn sự chuyển đổi gốc enzym của APC diacetate qua chavibetol 1 [13] . Trái lại, muốn có nhiều chavibetol 1, phải tìm cách tăng hoạt enzyme COMT [14].

Báo cáo này điếm qua các điều kiện thực nghiệm nhằm đạt được hàm lượng tinh dầu

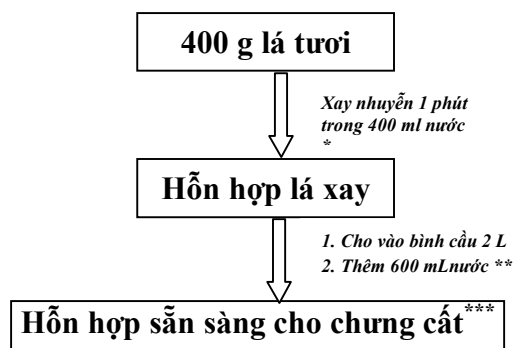
nhiều với tổng phenolic cao [13], sau đó khảo sát sự biến đổi hàm lượng tinh dầu và thành phần phenolic theo tháng thu hoạch và cuối cùng là hoạt tính khử khuẩn, nấm và đặc biệt khả năng bắt hoạt virus Tay Chân Miệng *Enterovirus 71* của tinh dầu.

2. PHƯƠNG PHÁP VÀ NGUYÊN LIỆU

Ba nhân tố được quan tâm là: nồng độ muối NaCl trong nước dùng để chưng cất tinh dầu từ lá trà, nhiệt độ bắt đầu tiến hành chưng cất và thời gian chưng cất... Bằng phương pháp “thử và sai”, chúng tôi xác định thời gian chưng cất tinh dầu trong phòng thí nghiệm là 3 giờ trong trường hợp chưng cất với nước bão hòa muối; trong những trường hợp khác, chúng tôi chưng cất trong 2 giờ xong bão hòa muối và chưng cất tiếp một giờ để đảm bảo lấy được trọn vẹn tinh dầu. Nồng độ muối được chọn là 0% - 36% (bão hòa muối), nhiệt độ bắt đầu chưng cất là từ 30°C đến 70°C vì ở khoảng 70°C, thông thường hoạt động enzym giảm nhiều.

2.1. Quy trình chưng cất tinh dầu lá trà:

Lá trà tươi hái lúc 6 - 7 giờ sáng tại vườn trà, được đưa ngay về phòng thí nghiệm chưng cất theo quy trình dưới đây:



***nước có hàm lượng muối thích hợp,
nhiệt độ phòng**

**** nước có hàm lượng muối thích hợp
và ở nhiệt độ thích hợp**

***** hỗn hợp cuối cùng ở 30⁰C, 50⁰C,
70⁰C với nồng độ muối 0% - 36%**

Tốc độ gia nhiệt được điều chỉnh sao cho thời gian từ lúc nạp mẫu đến lúc tinh dầu bắt đầu chưng cất khoảng 20 phút.

2.2. Phương pháp định lượng thành phần phenolic của tinh dầu và APC

- Thành phần tương đối của các cấu tử của tinh dầu được xác định bằng kỹ thuật GC-MS-EI, vận hành theo chế độ Scan, với cột DB-5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m và được áp dụng trong xác định điều kiện thực nghiệm tối ưu để đạt hàm lượng tinh dầu cao với tổng phenolic cao nhất.

- Định lượng chính xác các cấu tử phenolic chavibetol **1**, chavibetol acetate **2**, APC diacetate **3**, APC **4** bằng kỹ thuật GC-MS-EI-SIM đã được mô tả trong các báo cáo trước [13,14].

2.3. Thử hoạt tính sinh học

2.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn và nấm

Được thực hiện tại Công ty Dịch vụ Khoa học-Công nghệ Sắc Ký Hải Đăng theo Dược điển Việt nam IV:

- Nồng độ vi khuẩn: 108 CFU/mL, nồng độ thử nghiệm: từ tinh dầu nguyên chất C₀, pha loãng thành C₀/2, C₀/4, C₀/8, C₀/16... đo vòng kháng khuẩn tính theo mm.

- Đường kính đục lỗ: 6mm. Giá trị 6mm của vòng kháng khuẩn tương ứng với trường hợp không ức chế rõ vi khuẩn và nấm.

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường Thạch Muller-Hinton

- Chủng vi khuẩn thử nghiệm:

Staphylococcus aureus ATCC25923,
Escherichia coli ATCC25922, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC11778, *Candida albicans* ATCC10231,

Pseudomonasaeruginosa ATCC10145.

2.3.2. Hoạt tính trung hòa Enterovirus 71

Được thực hiện tại viện Pasteur Tp.HCM

➤ *Phương tiện:*

- Virus *Enterovirus 71* (EV 71) được phân lập, định danh và nuôi cấy tại khoa Vi sinh Miễn dịch – Viện Pasteur TP.HCM.

- Tế bào sarcoma cơ vân (Rhabdomyosarcoma-A, RD-A).

- Môi trường nuôi cấy tế bào RD-A: Môi trường tăng trưởng EMEM (Eagles Minimal Essential Medium) 10%; Môi trường duy trì E'MEM (môi trường EMEM cải tiến) 2%.

- Dụng cụ: Tủ ấm CO₂, kính hiển vi đảo ngược, bảng 96 và 192 giếng vô khuẩn, micropipet.

Cách thực hiện:

Các bước sau đây được thực hiện:

- Khảo sát và xác định nồng độ tinh dầu trầu không độc đối với tế bào Rhabdomyosarcoma RD-A bằng cách pha loãng dung dịch tinh dầu trầu 15000 ppm ở các nồng độ loãng dần: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024. Nồng độ không độc đối với tế bào RD-A được xác định là 1/512 nồng độ nguyên thủy. Nồng độ này được cho tác dụng với virus EV 71 nhằm mục đích trung hòa virus nếu được.

- Xác định hiệu giá CCID₅₀ (Cell Culture Infective Dose 50%) cho biết nồng độ virus

có hiệu ứng CPE (cytopathic effect), gây độc 50% tế bào RD-A.

- Cho tác dụng trước với virus EV 71 tinh dầu trầu có nồng độ pha loãng 512 lần đã nêu trên (*nồng độ không gây độc đối với tế bào RD-A*) để trung hòa bớt virus mà mục tiêu là làm giảm nồng độ virus tác dụng với RD-A, sau đó cho hỗn hợp tinh dầu trộn với virus đã ủ trong 1 giờ xâm nhiễm vào tế bào RD-A. Xác định lại CCID50 của virus sau khi có tác dụng tinh dầu trầu và so sánh với CCID50 của virus chưa trung hòa bằng tinh dầu lá trầu. Nếu CCID50 mới nhỏ hơn CCID50 trước thì tinh dầu lá trầu có tác dụng trung hòa virus.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Điềm qua một số kết quả đã đạt được trước đây của nhóm nghiên cứu.

Dưới đây là tóm tắt một số thí nghiệm minh chứng sự chuyển đổi đã nêu trên có sự tham gia của enzym trong lá trầu [13,14].

3.1.1. Các phản ứng chuyển đổi nêu trên hoàn toàn không xảy ra khi cho tinh dầu vào nước khử ion ở pH= 6,8 và chưng cất lôi cuốn hơi nước mà không có sự hiện diện của lá trầu.

3.1.2. Do Mg^{++} cần thiết cho enzym hoạt động, sự chuyển đổi từ APC diacetate cho chavibetol **1** được thấy tăng khi cho thêm $MgCl_2.6H_2O$ vào nước chưng cất không muối, lưu ý trong lá trầu, nồng độ Mg^{++} có sẵn là 1100 mg/kg lá tươi.

Sấy khô lá đến khối lượng không đổi ở 40°C - 50°C kết hợp với thêm vào nước $MgCl_2.6H_2O$ trước khi chưng cất làm tăng hàm lượng chavibetol có thể trên 60% [14].

3.1.3. Phản ứng metyl hóa APC cho thêm chavibetol **1** cũng thấy xảy ra khi chưng cất tinh dầu từ lá trầu trong nước có sẵn APC tự do.

3.1.4. Tối ưu hóa điều kiện thực nghiệm để đạt hàm lượng tinh dầu lớn có tổng phenolic cao. Thời điểm thực hiện các thí nghiệm là vào mùa mưa tháng 8/2014 - 10/2014. Từ một số thí nghiệm chưng cất tinh dầu được thực hiện với nước có hàm lượng muối 0%, 18%, 36% và ở những nhiệt độ 30°C, 50°C và 70°C, các số liệu được xử lý thống kê với *STATGRAPHICS Centurion XVI.II* [13].

Kết quả tính toán cho phép rút ra kết luận như sau:

➤ *Nhiệt độ bắt đầu chưng cất ít có ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu và tổng phenolic, do đó về mặt kỹ thuật có thể thực hiện quy trình chưng cất với nhiệt độ ban đầu là nhiệt độ phòng.*

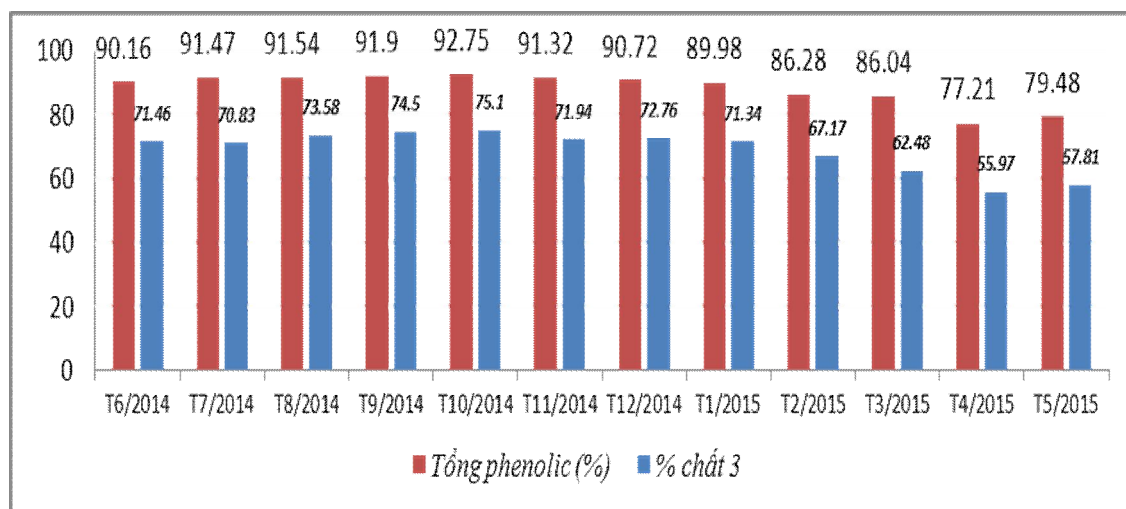
➤ *Nồng độ muối là yếu tố quyết định. Như vậy, muốn tinh dầu trầu đạt được các tiêu chí đã nêu, nên tiến hành chưng cất lá tươi trong nước muối bão hòa, nhiệt độ bắt đầu tiến hành chưng cất là nhiệt độ phòng. Muối có tác dụng làm thay đổi cấu trúc của enzym khiến enzym không còn hoạt động tốt nữa.*

3.2. Sự thay đổi thành phần phenolic theo tháng trong năm

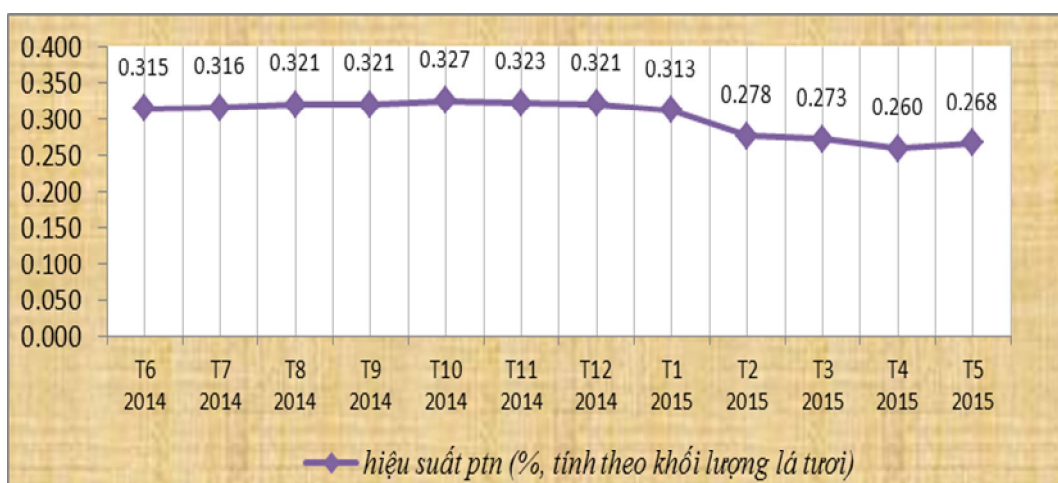
Các nghiên cứu cho thấy hàm lượng tinh dầu và thành phần phenolic thay đổi tùy theo tháng thu hoạch trong năm. Tất cả các thí nghiệm chưng cất tinh dầu bằng lôi cuốn theo hơi nước trong phòng thí nghiệm đều được thực hiện với nước muối bão hòa vào ngày 15 của mỗi tháng. Kết quả được ghi trong *bảng 3, hình 2 và 3*:

Bảng 3. Hàm lượng tinh dầu và thành phần phenolic theo tháng thu hoạch

	T6 2014	T7 2014	T8 2014	T9 2014	T10 2014	T11 2014	T12 2014	T1 2015	T2 2015	T3 2015	T4 2015	T5 2015
Chavibetol 1 (%)	4,29	3,16	2,49	2,22	2,22	2,39	0,96	2,59	3,37	4,82	6,41	5,91
Chavibetol Acetate 2 (%)	14,41	17,48	15,47	15,18	15,43	16,99	17	16,05	15,74	18,74	14,83	15,76
APC diacetate 3 (%)	71,46	70,83	73,58	74,50	75,1	71,94	72,76	71,34	67,17	62,48	55,97	57,81
Tổng phenolic (%)	90,16	91,47	91,54	91,9	92,75	91,32	90,72	89,98	86,28	86,04	77,21	79,48
Hàm lượng tinh dầu (gr)	1,261	1,265	1,283	1,282	1,306	1,292	1,285	1,251	1,110	1,090	1,040	1,070
Hiệu suất theo lá tươi (%)	0,315	0,316	0,321	0,321	0,327	0,323	0,321	0,313	0,278	0,273	0,260	0,268



Hình 2. Biến đổi tổng phenolic và APC diacetate theo tháng thu hoạch lá trà trong năm



Hình 3. Biến đổi hàm lượng tinh dầu theo tháng thu hoạch

Kết quả cho thấy hàm lượng tinh dầu và tổng phenolic giảm khá rõ trong mùa nắng đặc biệt là hai tháng nóng nhiều là tháng 4 và tháng 5 ở miền Nam. Trong khi đó chavibetol không thay đổi đáng kể. Như vậy có thể hiểu là APC diacetate bị thủy phân một phần cho APC nhưng phản ứng O-metyl hóa không xảy ra đáng kể. So sánh thành phần phenolic của tinh dầu lá trầu và APC trong nước sau chưng cất tháng

7/2014 và tháng 4/2015 có thể thấy được sự kiện này. Bỏ rơi sự thay đổi rất nhỏ của chất **2**, có thể thấy sự giảm APC diacetate chỉ cho 11,17 mg chavibetol **1** tương ứng với 15,94 mg APC diacetate, phần còn lại của **3** là 237,64 mg chuyển thành 152,33 mg APC phù hợp với thực nghiệm 149,62 mg. Ngoài ra, tổng phenolic giảm 253,58 – 11,17 = 242,41 mg cũng phù hợp với sự giảm của hàm lượng tinh dầu là 230 mg.

Bảng 4. Sự chuyển đổi thành phần phenolic và giảm hàm lượng tinh dầu vào mùa nắng

	Tinh dầu (mg)	1, mg (% diện tích GC-MS)	2, mg (% diện tích GC-MS)	3, mg (% diện tích GC-MS)	APC (mg)	3 giảm (mg)	1 tăng (mg)	3 cho 1 (mg)	3 cho 4 (mg)	4 nhận từ 3, tính được (mg)	4 nhận từ 3, thực nghiệm (mg)
Tháng 7 2014	1270	37,07 (3,16)	138,6 (17,10)	1016,26 (68,37)	367,68	253,58	11,17	15,94	237,64	152,33	149,62
Tháng 4 2015	1040	48,24 (6,41)	136,78 (14,83)	762,68 (55,97)	517,3						

3.3. Hoạt tính sinh học của tinh dầu trầu theo hàm lượng tổng phenolic.

3.3.1. Hoạt tính ức chế vi khuẩn và nấm mốc

Ba loại tinh dầu có thành phần phenolic khác nhau được đem thử hoạt tính kháng khuẩn và nấm:

Bảng 5. Thành phần phenolic của 3 mẫu tinh dầu lá trà

Thành phần phenolic	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 3
Chavibetol 1 (%)	28,55	6,95	2,46
Chavibetol acetate 2 (%)	17,54	21,72	16,57
APC diacetate 3 (%)	11,38	45,34	74,07
Tổng hàm lượng phenolic (%)	57,47	74,01	93,10

Mẫu 1: Tinh dầu lá trà chưng cất với nước không muối

Mẫu 2: Tinh dầu lá trà chưng cất với dung dịch 18% muối NaCl

Mẫu 3: Tinh dầu lá trà chưng cất với nước bão hòa muối

Hoạt tính kháng khuẩn được ước lượng bằng cách đo vòng kháng khuẩn với những dung dịch pha loãng dần. Kết quả được ghi trong bảng 6. Với mẫu tinh dầu 3, thành phần phenolic lớn nhất, khả năng ức chế

khuẩn, nấm mốc được thấy mạnh nhất. Đặc biệt là mẫu tinh dầu với thành phần phenolic trên 90% ức chế mạnh *Pseudomonas aeruginosa* tương đối khó trị nhất.

Bảng 6. Tính kháng khuẩn và nấm của tinh dầu trà

Vi khuẩn thử nghiệm	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
Mẫu tinh dầu lá trà chưng cất với nước không muối (Mẫu 1)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7	6	6	6
<i>Escherichia coli</i>	12	9	6	6	6
<i>Candida albicans</i>	8	6	6	6	6
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	11	6	6	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	6	6	6	6
Mẫu tinh dầu lá trà chưng cất với dung dịch 18% muối (Mẫu 2)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	15	15	13	11
<i>Escherichia coli</i>	15	13	10	6	6
<i>Candida albicans</i>	15	14	10	6	6
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	12	11	8	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	12	9	6	6
Mẫu tinh dầu lá trà chưng cất với dung dịch muối bão hòa (Mẫu 3)	C_0	$C_0/2$	$C_0/4$	$C_0/8$	$C_0/16$
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	15	15	14	13
<i>Escherichia coli</i>	18	18	16	16	15
<i>Candida albicans</i>	17	16	15	15	13
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	16	16	15	14	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	18	16	14	12

3.3.2. Hoạt tính trung hòa Enterovirus 71

Đây là lần đầu tiên trên thế giới tinh dầu lá trà được phát hiện có hoạt tính trung hòa

EV 71. Thử nghiệm hoạt tính này được thực hiện tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh.

Bảng 7. Kết quả thử hoạt tính trung hòa virus *Enterovirus 71*

Các chỉ số	Tinh dầu
Tổng hàm lượng phenolic (%)	85
Nồng độ mẫu ban đầu (ppm)	15000
(hệ số pha loãng không độc với tế bào từ mẫu tinh dầu ban đầu)	1/512
Nồng độ tinh dầu khi trung hòa virus (ppm)	29
CCID50 sử dụng trong phản ứng trung hòa	10^{5,8}
CCID50 sau lần thử nghiệm 1	10 ^{5,3}
CCID50 sau lần thử nghiệm 2	10 ^{5,2}
CCID50 sau lần thử nghiệm 3	10 ^{5,4}
CCID50 sau khi trung hòa virus với tinh dầu lá trầu sau 3 lần thử nghiệm	10^{5,3}

Kết quả thử nghiệm cho thấy tinh dầu lá trầu có khả năng trung hòa *Enterovirus 71*, CCID50 giảm từ 10^{5,8} xuống còn trung bình 10^{5,3}, khả năng gây độc 50% của tế bào giảm khi có tác dụng của tinh dầu trầu, vậy **mẫu tinh dầu trầu có hoạt tính trung hòa *Enterovirus 71*.**

4. KẾT LUẬN

1. Lần đầu tiên trên thế giới, đã phát hiện hệ thống enzym trong lá trầu có thể làm thay đổi thành phần phenolic trong tinh dầu lá trầu trong quá trình chưng cất dầu bằng lôi cuốn theo hơi nước.

2. Trong nước không muối, enzym hoạt động tốt chuyển một phần nhỏ chavibetol acetate thành chavibetol thông qua thủy phân trực tiếp bằng enzym, một hàm lượng lớn APC diacetate bị thủy phân enzym cho APC, tan trong nước, không lôi cuốn bằng hơi nước, một phần APC bị metyl hóa tiếp theo ở OH para cho chavibetol, hệ quả là hàm lượng tinh dầu giảm và tổng phenolic trong tinh dầu cũng giảm đáng kể.

3. Muối bão hòa chặn đứng phản ứng có nguồn gốc enzym nêu trên, do đó tinh dầu

chưng cất được có hàm lượng cao và tổng phenolic cũng đạt cao.

4. Tinh dầu lá trầu trong mùa nắng vừa ít hơn, vừa có chất lượng kém hơn so với trường hợp mùa mưa. Hàm lượng tinh dầu và thành phần phenolic giảm vào mùa nắng, có thể enzym thủy phân hoạt động mạnh ở nhiệt độ mùa nóng (36°C - 37°C) thủy phân một phần APC diacetate trong lá tươi trong khi enzym COMT hoạt động kém, hệ quả là trong nước muối bão hòa hàm lượng APC được thấy nhiều hơn so với trường hợp chưng cất trong mùa mưa.

5. Tinh dầu trầu với tổng phenolic càng cao thì hoạt

tính kháng khuẩn, nắm càng mạnh.

6. Lần đầu tiên trong nước và trên thế giới, khả năng trung hòa *Enterovirus 71* của tinh dầu lá trầu giàu thành phần phenolic được phát hiện và đang được sử dụng để chế tinh dầu lá trầu thành thuốc hỗ trợ trị bệnh Tay Chân Miệng cho trẻ con.

Lời cảm ơn: Các tác giả rất cảm ơn Ủy Ban Nhân Dân TP Hồ Chí Minh và Sở Khoa học và Công nghệ TP đã hỗ trợ kinh phí cho thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Satyal P., Setzer W.N. (2012), Chemical composition and biological activities of Nepalese Piper betle L. *International Journal of Professional Holistic Aromatherapy*, **1**(2), 23-26.
2. Rekha V.P.B., Kollipara M., Srinivasa Gupta B.R.S.S., Bharath Y., Pulicherla K. K. (2014), A Review on Piper betle L. : Nature's Promising Medicinal Reservoir, *American Journal of Ethnomedicine*, **1**(5), 276-289.
3. Evans P. H., Bowers W. S., Funk, E. J.(1984), Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of Piper betle (Piperaceae), *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1254-1256.
4. Dwivedi V., Tripathi S. (2014), Review study on potential activity of Piper betle L., *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **3**(4), 93-98.
5. Arambewela L., Alagiawanna S. (2006), *Srilankan Medicinal Plant Monographs and Analysis*, vol 9 Piper betle, pp 17-18, National Science Foundation.
6. Rimando A. M., Han. B. H., Park J. H., Cantoria M. C. (1986), Studies of the constituents of Philippines Ptper betle leaves, *Arch. Pharm. Res.*, **9**(2), 93-97.
7. Jantan I. B., Ahmad A. R., Ahmad A. S., Mohd Ali N. A. (19(4), A comparative study of the essential oils of five Piper Species from Peninsular Malaysia, *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, 339-342.
8. Li-Ching M.R. and Jiau-Ching H. (2009), The antimicrobial mosquito larvicidal activity, antioxidant ptoperty and tyrosinase inhibition of Piper betle, *J. Chinese Chem. Soc.*, **56**, 653-658.
9. Nguyễn Thị Lý, Trần Thị Hồng Vân, 2007 Extracting essential oils and carotenoids from *Piper betle* L.(Piperaceae)., *Hội nghị Khoa học Công nghệ lần 9*, Đại học Bách khoa TP HCM.
10. Bùi Ngọc Minh Phượng, Nguyễn Thương Lệnh, Lê Ngọc Thạch, Trần Hữu Anh và Lưu Thanh Thủy, (2004) Ảnh hưởng của sự chiếu xạ vi sóng trên thành phần hóa học của tinh dầu lá trầu (*Piper betle*L.), *Tạp Chí Hóa học*. **42**, .139-144.
11. Huynh ky Tran, Tran Nguyen ngoc Chau, Nguyen Khoa Nam, Pham Thi Anh, Nguyen Xich Lien, Chu Pham Ngoc Son (2011), Investigation on the composition of Vietnam` *Piper betle* L. leaf essential oil, *The 2nd Analytica Viet Nam Conference 2011, Conference Proceeding*, pp. 193-197. April 7-8, Ho Chi Minh City, Viet Nam.
12. Huynh ky Tran, Tran Nguyen ngoc Chau, Ha My Thuan, Pham thi Anh, Nguyen XichLien, Chu Pham Ngoc Son (2011), Transformation of 4-allylpyrocatechol diacetate into chavibetol inVietnam *Piper betle* L. leaves, *14th Asian Chemical Congress-14ACC Proceedings*, Paper OR-G5-06, pp. 220-227, September 5-8, Bangkok City, Thailand.
13. Huynh ky Tran, Tran Nguyen ngoc Chau, Ha my Thuan, Nguyen khoa Nam, Do viet Ha, Nguyen Xich Lien, Pham thi Anh, Chu Pham Ngoc Son, (2014) Improving the yield of Hocmon betel leaf essential oil with high content of phenolic compounds by appropriate leaf treatment before hydrodistillation, *Vietnam-Malaysia International Chemical Congress*, 7- 9 November, Hanoi, Vietnam.

(Xem tiếp trang 95)