

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG UNG THƯ CỦA TINH DẦU SẢ JAVA (CITRONELLE ESSENTIAL OIL) TRỒNG TẠI HUYỆN HẠ HÒA TỈNH PHÚ THỌ

STUDY ON THE CHEMICAL COMPONENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CITRONELLA ESSENTIAL OIL IN HA HOA, PHU THO

Hoàng Thị Kim Vân¹, Nguyễn Thị Lan Anh¹, Đàm Thị Thanh Hương¹, Mạc Đình Thiết¹,
Trần Thị Hiệp¹, Lương Viết Cường¹, Trần Thị Hoa¹, Nguyễn Thị Kim Thoa¹, Nguyễn Thị
Kim Dung¹, Đỗ Hữu Nghị², Đinh Thị Thu Thủy²

¹Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì, Phú Thọ

²Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

Đến Tòa soạn: 20/10/2020

SUMMARY

In this work, the essential oil of citronella collected in Ha Hoa district, Phu Tho province was extracted by steam distillation. The chemical constituents of essential oil were analyzed by the GC-MS method. The cytotoxic activity of citronella oil was tested on cell lines of lung cancer (A549) and liver cancer (Hep3B). The obtained results showed that the major components in essential oil were citronellal 25.18%; citronellol 14.56%; geraniol 17.37% and elemol 10.15%, which have cytotoxic activity for A549 lung cancer and Hep3B liver cancer with values of 69.18 $\mu\text{g/mL}$ and 53.67 $\mu\text{g/mL}$ respectively.

Từ khóa: Dầu sả, chưng cất hơi nước, citronellal, geraniol.

1. GIỚI THIỆU

Sả Java hay còn gọi là sả đỏ hay sả xòe, tên khoa học là *Cymbopogon winterianus* [1], Sả Java mọc thành bụi, thân có thể cao đến 2m, lá thuôn dài, gốc sả có màu hồng tím hay đỏ tím, chùy hoa gồm nhiều chùm hoa mọc thẳng đứng. Tinh dầu sả Java (citronella essential oil) là một loại tinh dầu thiên nhiên được chiết xuất từ cây sả Java có tên khoa học là *Cymbopogon winterianus*. Loại cây này có nguồn gốc từ đảo Java của Indonesia và được trồng nhiều tại Việt Nam, Ấn Độ, Thái Lan, Trung Quốc,... Cây phân bố ở vùng miền núi các tỉnh Phú Thọ, Tuyên Quang. Tinh dầu sả Java có tính kháng khuẩn, kháng viêm hiệu quả, giúp ức chế sự phát triển và tiêu diệt vi khuẩn. Nó

giúp điều trị các bệnh nhiễm trùng, viêm nhiễm ở vết thương cũng như trong đại tràng, niệu đạo, bàng quang, dạ dày, ruột, đường tiểu, tuyến tiền liệt và thận [3,4], làm tăng tiết mồ hôi loại bỏ chất độc hiệu quả, chống lại sự nhiễm nấm ở vùng tai, mũi và cổ họng. Hương sả Java có tác dụng khử mùi rất tốt, đánh bay những mùi khó chịu trên cơ thể, răng miệng và căn phòng bạn, giúp đuổi muỗi, côn trùng,...

Sả Java có nguồn gốc từ Nam Ấn Độ được trồng để sản xuất tinh dầu với tên thương phẩm là citronella oil, thành phần chính của tinh dầu là geraniol (85 - 90%), citronella (35 - 40%).

Hiện nay, trên địa bàn huyện Hạ Hòa, tỉnh Phú Thọ, cây sả Java là một trong các

cây được mang lại lợi ích kinh tế lớn do chất lượng của tinh dầu sả Java đã có thương hiệu trên thị trường. Chính vì vậy chúng tôi nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính chống ung thư của tinh dầu sả Java trồng tại huyện Hạ Hòa, tỉnh Phú Thọ.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu lá sả Java được thu hái tại Hạ Hòa, Phú Thọ. Lá sả sau khi được thu hái, cắt nhỏ khoảng 6 - 8 cm, rửa sạch.

Các hóa chất sử dụng như Na₂SO₄, NaCl (loại PA).

2.2. Chứng cất

Nguyên liệu đã cắt nhỏ được cho vào thiết bị chưng cất lôi cuốn hơi nước, đun sôi đều, vừa phải, chưng cất trong thời gian 150 phút. Sau đó, tinh dầu được tách nước và làm khan bằng muối Na₂SO₄ khan, lưu giữ ở 0-5°C cho đến khi sử dụng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tinh dầu sả Java được xác định thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) tại phòng Phân tích hóa học, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở điều kiện: cột mao dẫn silica; chiều dài 30 m, đường kính trong 320 µm; pha tĩnh Poly(dimethyl xiloxan); độ dày màng 0,25 µm; nhiệt độ lò 70°C trong 10 phút, sau đó nâng đến nhiệt độ của quá trình từ 70°C đến 220°C với tốc độ 2°C/phút; nhiệt độ bơm 250°C; nhiệt độ detector 250°C; detector khối phổ; khí mang hidro; thể tích bơm 0,2 µl; tốc độ dòng khí mang 0,3 ml/phút.

Hoạt tính gây độc tế bào được nghiên cứu trên 2 dòng tế bào ung thư gồm ung thư phổi người A549 và ung thư gan người Hep3B.

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] được Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ (NCI) đánh giá là phương pháp quy chuẩn và hiệu quả cho sàng lọc nhanh các chất có hoạt tính gây độc hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào. Nguyên tắc của phương pháp là gián tiếp xác định hoạt tính của chất thử qua khả năng ức chế enzyme oxidoreductase phụ

thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme trong tế bào này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT thành dạng formazan không hoà tan, có màu tím, qua đó có thể phản ánh tương quan số lượng các tế bào đang phát triển khi đo ở bước sóng λ = 540/720nm.

Dòng tế bào:

Các dòng tế bào cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection, USA; và CLS (Cell Lines Service GmbH, CHLB Đức được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện Hàn lâm KHCNVN):

Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma - TB ung thư gan)

A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cells - TB ung thư phổi)

Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO₂ 5% trong môi trường phù hợp: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, CHLB Đức) có bổ sung L-glutamine 2mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 5-10%. Dịch tế bào sau đó được nhỏ lên phiến vi lượng 96 giếng (1.5 x 10⁵ tế bào/giếng), ủ với các mẫu thử ở dải nồng độ từ 100 → 6,25 µg/mL đối với mẫu cao chiết hoặc 50 → 1µg/mL (µM) đối với chất tinh sạch, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Ellipticine hoặc Paclitaxel (Taxol) trong DMSO được dùng làm chất chuẩn dương tính (+). Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) và đo mật độ quang ở λ = 540/720nm trên thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ).

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD}_{[\text{mẫu}]} / \text{OD}_{[\text{đối chứng (-)}]})] \times 100\%$$

Độ lệch chuẩn được tính theo công thức:

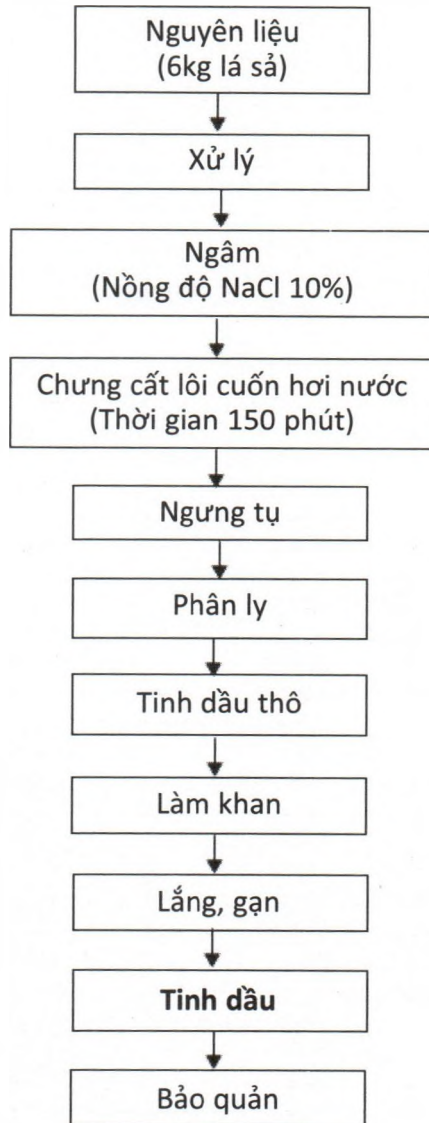
$$\sigma = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2) / (n - 1)}$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính (% ức chế $\geq 50\%$) được xác định giá trị IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$ hoặc μM) là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế 50% sự sống sót của tế bào, sử dụng

phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quy trình chưng cất tinh dầu sả Java



Hình 1. Quy trình chưng cất tinh dầu sả Java

Quy trình chưng cất tinh dầu sả Java được thực hiện theo mục 2.2 và sơ đồ Hình 1. Thêm Na_2SO_4 khan vào bình chứa tinh dầu thô, vừa thêm vừa khuấy đều cho đến khi quan sát thấy các tinh thể muối Na_2SO_4 bắt đầu rời ra, sau đó lắng gạn và thu tinh dầu. Sản phẩm tinh dầu được cho vào các bình chứa hay lọ sẫm màu, đậy kín, bảo

quản trong tối ở $0-5^\circ\text{C}$ cho đến khi sử dụng.

3.2. Kết quả xác định thành phần hóa học bằng GC/MS

Bằng phương pháp sắc kí khí khối phổ (GC-MS) đã xác định được thành phần hóa học của tinh dầu. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Thành phần hóa học của tinh dầu sả Java Hạ Hòa, Phú Thọ

TT	Thời gian	Chỉ số Thời gian lưu (RI)	Độ tương đồng với phổ thư viện (hit %)	Tên hóa học	Hàm lượng (%)
1	13,36	1034	92	Limonene	1,59
2	15,66	1101	49	Linalool	0,43
3	17,49	1153	49	Isopulegol	0,49
4	17,60	1156	88	Citronellal	25,18
5	17,91	1165	14	iso-Isopulegol	0,22
6	20,15	1230	93	Citronellol	14,56
7	20,21	1231	23	Nerol	0,22
8	20,69	1245	29	Neral	0,19
9	21,10	1257	94	Geraniol	17,37
10	21,67	1274	89	Geranial	0,36
11	24,35	1354	89	Citronellyl acetate	2,92
12	24,69	1364	94	Eugenol	0,73
13	25,35	1384	79	Geranyl acetate	1,67
14	25,87	1400	93	(-)- β -Bourbonene	0,28
15	25,98	1403	90	Cis(-)- β -Elemene	5,70
16	27,03	1437	90	E-Caryophyllene (=)- β -Caryophyllene	0,19
17	28,11	1471	96	(-)- α -Humulene	0,22
18	28,71	1490	69	(-)- γ -Muurolene	0,37
19	28,95	1498	94	D-Germacrene	2,41
20	29,14	1504	31	(-)- β -Selinene	0,13
21	29,31	1510	88	trans-Muurola-4(14),5-diene	0,16

22	29,42	1513	49	(-)- α -Muurolene	0,99
23	29,90	1530	87	(-)- γ -Cadinene	0,94
24	30,11	1537	92	(-)- δ -Cadinene	3,24
25	30,58	1553	39	(-)- α -Cadinene	0,21
26	30,91	1563	86	Elemol	10,15
27	31,80	1593	91	Scapanol	1,55
28	33,41	1650	53	(-)- γ -Eudesmol	1,15
29	33,62	1657	94	(-)- α -epi-Cadinol (=Tau-Cadinol)	1,07
30	33,77	1663	43	(-)- α -Muurolol (=Cadinol(-)- γ)	0,20
31	33,99	1671	0	(-)- β -Eudesmol	0,95
32	34,03	1672	0	unknown (161, 222, RI 1672)	1,30
33	34,08	1674	0	(-)- α -Eudesmol	0,95
34	35,57	1728	26	E,E-Farnesol	0,52
Tổng					98,58

Từ Bảng 3.1 cho thấy trong tinh dầu sả Java có 34 chất với hàm lượng khác nhau. Trong đó, citronellal chiếm 25,18%; citronellol chiếm 14,56%; geraniol 17,37%, elemol là 10,15%. Chất có giá trị ở đây là citronellal, được chuyển thành các sản phẩm khác, đặc biệt là hydroxycitronelal, là chất điều hương quan trọng, làm cho nước hoa có mùi hoa tự nhiên (mùi hoa hồng hoặc hoa muguet). Như vậy, tinh dầu sả Java huyện Hạ Hòa tỉnh Phú Thọ có thành phần citronellol chiếm 14,56%; elemol là 10,15% cao

hơn so với TCVN 11426:2016, ISO 3848:2016 [5].

3.3. Hoạt tính sinh học chống ung thư

Hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư: ung thư phổi người A549 và ung thư gan người Hep3B, nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy không tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.2 và 3.3.

Bảng 3.2. Giá trị IC_{50} của các mẫu có hoạt tính trên dòng tế bào A549

TT	Ký hiệu mẫu	Tế bào A549	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%) IC_{50}	
1	Paclitaxel	1.62 ± 0.05	58,42 nM
2	HVÂN 03	$90,51 \pm 1,8$	69,18 $\mu\text{g/mL}$

Bảng 3.3. Giá trị IC_{50} của các mẫu có hoạt tính trên dòng tế bào Hep3B

TT	Ký hiệu mẫu	Tế bào Hep - G2	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC_{50} nM
1	Paclitaxel		47,40 nM
2	HVÂN 03	$97,26 \pm 0,3$	53,67 $\mu\text{g/mL}$

Bảng 3.2 và 3.3 cho thấy tinh dầu sả Java trồng tại huyện Hạ Hòa tỉnh Phú Thọ có hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 và ung thư gan Hep3B với giá trị IC_{50} lần lượt là 69,18 $\mu\text{g/mL}$ và 53,67 $\mu\text{g/mL}$. Có khả năng ức chế tốt trên các dòng ung thư phổi và ung thư gan

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu và tách chiết tinh dầu sả Java từ nguyên liệu lá sả Java ở Hạ Hòa, Phú Thọ thu được thành phần hóa học chính của tinh dầu là Citronellal chiếm 25,18%; Citronellol chiếm 14,56%; Geraniol 17,37%, Elemol là 10,15%. Tinh dầu sả Java đều có hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào ung thư phổi người A549 và ung thư gan người Hep3B.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đán, Ngô Ngọc Khuyến (1999), "Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc", NXB Y học Hà Nội.
2. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2007), "Hóa học phân tích", phần 2: Các phương pháp phân tích công cụ, NXB Khoa học kỹ thuật.
3. Đỗ Tất Lợi (1992), Những cây thuốc và vị thuốc, NXB Khoa học kỹ thuật Hà Nội.
4. Lê Ngọc Thạch (2003), Tinh dầu, NXB ĐHQG Hà Nội.
5. TCVN 11426:2016 ,ISO 3848:2016.