

ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN CHÍNH VÀ PHÂN TÍCH CỤM ĐỂ ĐÁNH GIÁ SỰ BIẾN ĐỔI THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU TRÀM TRÀ THEO MÙA

Võ Thuý Vi^{1,*}, Trương Thị Huyền²

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

²Trường Đại học Quốc lập Thành Công, Sài Gòn

*Email: vivt@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/6/2022; Ngày chấp nhận đăng: 30/9/2022

TÓM TẮT

Trà trà có tên khoa học là *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, thuộc họ Đào Kim Nương (Myrtaceae), có nguồn gốc từ châu Úc, có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và kháng virus cao. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá sự biến đổi hiệu suất và thành phần hóa học theo mùa của tinh dầu trà suốt 12 tháng. Tinh dầu được chiết từ lá trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước với sự hiện diện của chất hoạt động bề mặt (650 ppm). Hàm lượng tinh dầu trong 12 tháng khảo sát dao động từ 4,24 % tới 6,61%. Các thành phần hữu cơ của tinh dầu trà được xác định bởi GC-FID và GC-MS và với việc áp dụng phân tích đa biến: phân tích thành phần chính (PCA) và phân tích cụm (cluster analysis). Các hợp chất chính được tìm thấy là α -pinene (2,0-2,5%), 1,8-cineole (3,2-5,5%), α -terpinene (8,3-12,1%), *p*-cymene (1,8-4,3%), limonene (1,0-1,4%), γ -terpinene (16,1-21,4%), terpinolene (2,1 -3,5%), terpinen-4-ol (40,6-49,6%) và α -terpineol (3,1-6,6%). Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng tinh dầu cao vào các tháng mùa hè với lượng mưa cao trong khi thành phần các hợp chất chính trong tinh dầu gần như thay đổi không đáng kể theo mùa. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trà tinh khiết và một số thành phần chính cũng được ghi nhận.

Từ khóa: Tinh dầu trà, *Melaleuca alternifolia*, chưng cất lôi cuốn hơi nước, phân tích thành phần chính, hoạt tính kháng khuẩn.

1. GIỚI THIỆU

Tinh dầu trà (TTO), loại tinh dầu dễ bay hơi chiết xuất từ cây trà, được trồng phổ biến ở nhiều nước như Úc, Trung quốc, Brazil, Nam Phi, Thailand, Malaysia [1]. TTO được sử dụng như một loại thuốc thảo dược truyền thống, đặc biệt là để kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus và chống viêm trong các ứng dụng ngoài da [2,3]. Các công dụng phổ biến là dùng trong điều trị mụn trứng cá, bệnh liên quan đến da, nấm *Candida* và thậm chí ngăn ngừa các bệnh do muỗi truyền [4,5]. Ngoài ra, các sản phẩm chứa TTO như vi nhũ tương, màng polymer đã được tổng hợp để dẫn truyền các hoạt tính sinh học của TTO tốt hơn [6-7]. Có hơn 100 hợp chất được tìm thấy trong tinh dầu trà, chủ yếu là các monoterpene và dẫn xuất alcohol của chúng. Terpinen-4-ol là thành phần quan trọng nhất của TTO có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [2,3]. Ngược lại, 1,8- cineole là một hợp chất không mong muốn do kích ứng da khi tiếp xúc với liều lượng cao. Do đó, để đảm bảo chất lượng tinh dầu, Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế ISO 4730 quy định rõ thành phần chất lượng của TTO [8]. Bởi vì các công dụng hữu ích của tinh dầu trà trong y, dược nên đã có nhiều nghiên cứu về chiết tinh dầu trà trước đây, sử dụng các phương pháp chiết như chiết xuất CO₂ siêu tới hạn (SFE) [9],

chiết với dung môi ethanol [10], chưng cất lôi cuốn hơi nước [11]. Tuy nhiên hiệu suất thu được không cao với lượng tinh dầu khoảng 0,25 g/mL scCO₂ [9] hoặc từ 1-3% g/lá khô [10]. Trong nghiên cứu này, TTO được chiết xuất từ lá cây trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước với sự hỗ trợ của chất hoạt động bề mặt alkyl polyglucoside. Tinh dầu có thể trải qua sự thay đổi về chất lượng và định lượng trong một số giai đoạn của đời sống sinh dưỡng của thực vật vì hoạt động trao đổi chất của nó có mối liên hệ hóa học với môi trường sống. Chất lượng tinh dầu cũng có thể bị thay đổi do những thay đổi của môi trường như nhiệt độ, độ ẩm tương đối, lượng mưa, bức xạ mặt trời, ... xảy ra trong ngày hoặc một khoảng thời gian theo mùa nhất định [12, 13]. Nghiên cứu hiện tại nhằm mục đích đánh giá hàm lượng tinh dầu và sự biến đổi thành phần hoá học của tinh dầu trà tại Đài Loan trong suốt một năm. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu cũng được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hoá chất

Lá và cành của cây trà, *Melaleuca alternifolia*, được thu hái từ một trang trại ở thành phố Đài Nam, Đài Loan. Một loại chất hoạt động bề mặt không ion alkyl polyglycoside (APG), Triton CG-110 (số CAS 68515-73-1), được chế tạo bởi Dow Chemical Company và được cung cấp từ Sigma-Aldrich. Theo nhà sản xuất, nồng độ micelle tới hạn (CMC) của Triton CG-110 ở 25 °C là 1748 ppm. Chuẩn của chín hợp chất được liệt kê trong Bảng 1 được mua từ Alfa Aesar and Sigma Aldrich. Nước khử ion từ hệ thống siêu lọc Millipore Milli-Q có điện trở suất lớn hơn 18,2 MΩcm đã được sử dụng trong quá trình chuẩn bị mẫu.

2.2. Nguyên liệu thực vật và dữ liệu khí hậu

Đối với nghiên cứu theo mùa, lá và cành mỏng của trà được thu thập hàng tháng, từ tháng 7 năm 2018 đến tháng 6 năm 2019, vào lúc 8 giờ sáng mỗi ngày. Các yếu tố khí hậu như độ ẩm không khí tương đối, nhiệt độ, và lượng mưa được thu thập hàng tháng từ trang web của khí tượng của Chính phủ Đài Loan.

2.3. Chưng cất lôi cuốn hơi nước

Lá và cành của cây trà, được để khô trong không khí ở 25 °C trong mười ngày. Loại bỏ cành, chỉ dùng lá để chiết TTO bởi vì cành cây được biết là chứa rất ít dầu [5]. 10 g lá được đặt vào bình cầu đáy tròn chứa 250 mL dung dịch Triton CG-110 650 ppm, sau đó được lắp lên hệ thống Clevenger và tiến hành chưng cất tại nhiệt độ 165 °C trong 128 phút. Nồng độ chất hoạt động bề mặt trong chất lỏng chiết và tỷ lệ chất lỏng / chất rắn được sử dụng trong quá trình chiết được xác định từ các lần chạy sơ bộ của cùng một hệ thống.

2.4. Phân tích thành phần hoá học

Thành phần hoá học của tinh dầu trà chiết xuất bằng phương pháp chưng cất được định tính với GC-TOF-MS và định lượng với GC-FID.

Thiết bị GC-TOF-MS bao gồm Agilent GC 6890N và đầu dò TOF (hệ thống Pegasus III TOF-MS). Cột tách (DB-35MS Ultra Inert, 30 mm × 25 μm × 0,25 μm) đã được sử dụng. Chương trình nhiệt độ cột trong GC này được lập trình như sau: ở 100 °C trong phút đầu tiên, sau đó tăng lên 310 °C với tốc độ 8 °C/phút, và cuối cùng duy trì ở 310 °C trong 10 phút. Tốc độ dòng của heli làm khí mang trong GC-TOF-MS được giữ ở 1 mL/phút. Các thông số hoạt động của khối phổ kế là (1) chế độ tác động của điện tử (EI) ở 70 eV và (2) nhiệt độ của nguồn ion ở 230 °C.

Máy sắc ký khí (Model GC-2014, Shimadzu, Nhật Bản) cùng với máy dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) được sử dụng để định lượng chín thành phần chính của tinh dầu trà. Cột mao quản HP-5 (30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm) được sử dụng làm cột tách. Các mẫu dầu được pha loãng với ethanol 100 (w / w) được tự động tiêm vào GC-FID với tỷ lệ chia dòng (1: 100). Nitrogen có độ tinh khiết cao ở tốc độ dòng 1 mL/phút được sử dụng làm khí mang. Chương trình nhiệt độ của GC-FID này được thiết lập để tăng từ 70 °C đến 95 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút, sau đó tăng lên 105 °C ở 1 °C/phút, và cuối cùng là 300 °C với tốc độ gia nhiệt là 25 °C/phút. n-decane được dùng làm chất nội chuẩn. Các dung dịch chuẩn được sử dụng với nồng độ từ 20-500 mg/L.

2.5. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu

Hoạt tính kháng khuẩn của TTO, và một số hợp chất chính đã được thử nghiệm với vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* (ATCC 21351) và Gram âm *Escherichia coli* (ATCC 23501) bằng phương pháp khuếch tán đĩa giấy trên môi trường thạch [14, 15]. Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani (LB), giữ ổn định nhiệt tại 37 °C trong bể nước lắc với tốc độ 150 vòng / phút và mật độ vi khuẩn ban đầu được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Đĩa thạch LB được chuẩn bị bằng cách đổ 10 mL môi trường thạch LB vào đĩa petri vô trùng. Sau đó, 100 μL huyền phù vi khuẩn (10^8 CFU / mL) được trải lên mỗi đĩa thạch. Đĩa giấy vô trùng (6 mm) chứa 10 μL mẫu được đặt ngay trên bề mặt của đĩa thạch LB. Các đĩa được ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Đường kính của vùng ức chế bao gồm cả đường kính của đĩa giấy được đo bằng thước với sai số ± 0,5 mm.

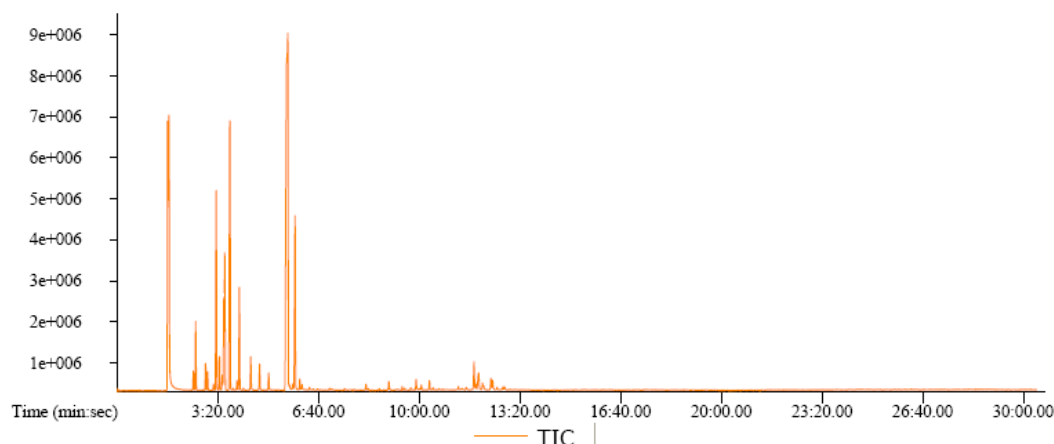
2.6. Thống kê

Phân tích thành phần chính (PCA) đã được áp dụng để xác minh mối tương quan trong thành phần của các mẫu dầu được thu thập (phần mềm Minitab 17, Minitab Inc., State College, PA, USA). Phân tích cụm (cluster analysis), xem xét khoảng cách Euclide và liên kết hoàn chỉnh, được sử dụng để xác minh tính giống nhau của các mẫu dầu, dựa trên sự phân bố của các thành phần được chọn trong phân tích PCA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích thành phần hữu cơ của tinh dầu trà

Sắc ký đồ GC-MS được thể hiện trong Hình 1, cho thấy có 29 hợp chất hữu cơ được tìm thấy trong tinh dầu trà. Theo kết quả GC- MS với tham chiếu trong thư viện NIST, các hợp chất như α-pinene, 1,8-cineole, α-terpinene, p-cymene, limonene, γ-terpinene, terpinolene, terpinen-4-ol và α-terpineol cho hàm lượng lớn hơn 1%. Ngoài ra, các thành phần khác như sabinene, phellandrene, cymol, eucalyptol, mentha-2-en-1-ol, aromandendrenem viriflorene, cadinene, globulol, cubenol, eudesmol, viridflorol chiếm hàm lượng bé hơn 1%. Trong nghiên cứu này, Triton CG-110 đã được sử dụng để hỗ trợ việc chiết xuất TTO bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Tuy nhiên, không có dấu vết nào của Triton CG-110 được tìm thấy trong TTO [16]. Điều này có thể là do nhiệt độ sôi của Triton CG-110 cao so với các thành phần riêng lẻ trong TTO. Do đó, chất hoạt động bề mặt này sẽ ít bay hơi hơn tinh dầu và đã không chuyển sang pha hơi trong quá trình chưng cất, pha hơi sau đó được ngưng tụ thành tinh dầu.

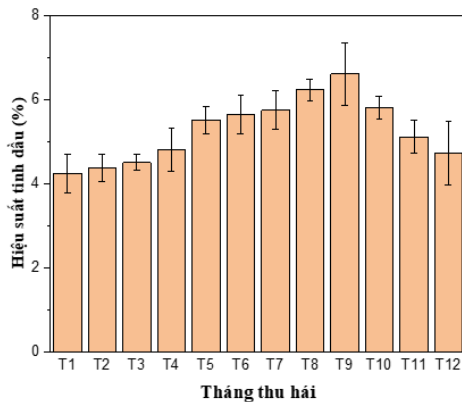


Hình 1. Sắc ký đồ GC-MS của mẫu tinh dầu trà

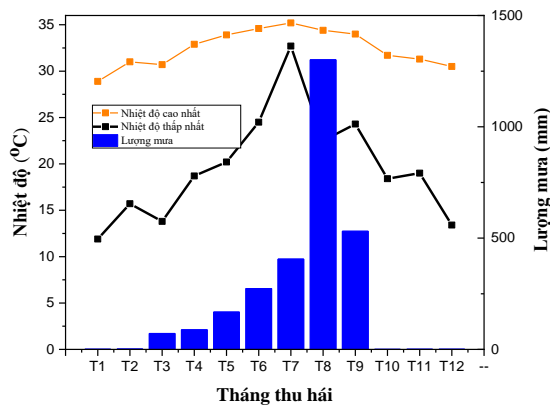
Nhìn chung, trong thời gian khảo sát từ tháng 7/2018 tới tháng 6/2019, hàm lượng tinh dầu thu được là từ 4.24% tới 6.61% (Hình 2). Hàm lượng tinh dầu thu được cao nhất vào tháng 9 và thấp nhất vào tháng 1. Điều này là do lượng mưa cao trong các tháng 8, 9 và lượng mưa thấp trong các tháng 1, 12 (Hình 3). Trong sự hiện diện của chất hoạt động bề mặt, hàm lượng tinh dầu thu được tăng 10% và kết quả hiệu suất tinh dầu thu được trong 12 tháng khảo sát cao hơn so với các nghiên cứu trước đây [10, 11, 17]. Để định lượng chính xác hàm lượng của chín hợp chất chính của TTO, một chất nội chuẩn (*n*-decane), đã được sử dụng. Thành phần các hợp chất hữu cơ được tìm thấy trong các mẫu tinh dầu được liệt kê trong Bảng 1. Thành phần phần trăm của chín hợp chất chiếm từ 87,5% tới 98%. Theo quy định của ISO 4730: 2017 hàm lượng của terpinen-4-ol phải trong khoảng 35%-48%, α -terpineol từ 2%-5%. Hàm lượng của terpinen-4-ol tìm thấy từ mẫu dầu trong các tháng từ 42,6% - 49,6%. Các tháng 1, 6, 11 cho hàm lượng terpinen-4-ol vượt quá chuẩn cho phép. Ngoài ra, hàm lượng α -terpineol cũng ghi nhận vượt quá chuẩn cho phép trong các tháng 2, 4, 5, 11. Chất lượng tinh dầu trong các mẫu thu hái từ các tháng 3,7, 8, 9, 10, 12 phù hợp tiêu chuẩn ISO 4730: 2017.

Bảng 1. Thành phần tinh dầu trà trong các mẫu lá trà thu hái từ tháng 7/2018 tới 6/2019

TT	Hợp chất	ISO 4730 %	% GC theo tháng thu hái											
			Một T1	Hai T2	Ba T3	Tư T4	Năm T5	Sáu T6	Bảy T7	Tám T8	Chín T9	Mười T10	Mười một T11	Mười hai T12
1	α -pinene	1,00-4	2,0	2,4	2,5	2,1	2,3	2,3	2,2	2,4	2,5	2,4	2,2	2,5
2	α -terpinene	6,0-12	8,3	10,5	12,1	9,1	8,9	9,6	9,4	9,0	8,6	8,6	10,3	9,7
3	p-cymene	0,5-8	3,3	2,2	1,8	3,6	3,3	3,9	2,3	4,3	2,3	1,3	2,5	3,3
4	Limonene	0,5-1,5	1,3	1,0	1,4	1,4	1,2	1,3	1,0	1,4	1,3	0,6	1,1	1,3
5	1,8-cineole	Vết-10	4,8	3,9	4,3	3,2	4,3	4,6	5,1	4,2	3,6	3,7	5,5	5,3
6	γ -terpinene	14-28	17,3	17,3	16,9	18,9	18,5	19,0	17,7	19,0	16,1	21,4	19,2	19,0
7	Terpinolene	1,5-5	2,7	2,1	2,8	3,0	3,0	3,2	3,0	3,3	2,6	3,5	3,2	3,0
8	Terpinen-4-ol	35-48	48,3*	44,4	46,0	42,6	40,6	49,6*	44,8	45,5	47,4	45,5	48,8*	41,5
9	α -terpineol	2,0-5,0	4,8	6,6*	3,1	5,3*	5,3*	4,9	4,7	4,9	4,7	4,6	5,1*	4,9
10	Hợp chất khác		7,1	9,6	9,2	10,8	12,5	1,5	9,9	5,9	10,9	8,5	2,0	9,4
11	Tổng cộng		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	10,0	100,0	100,0



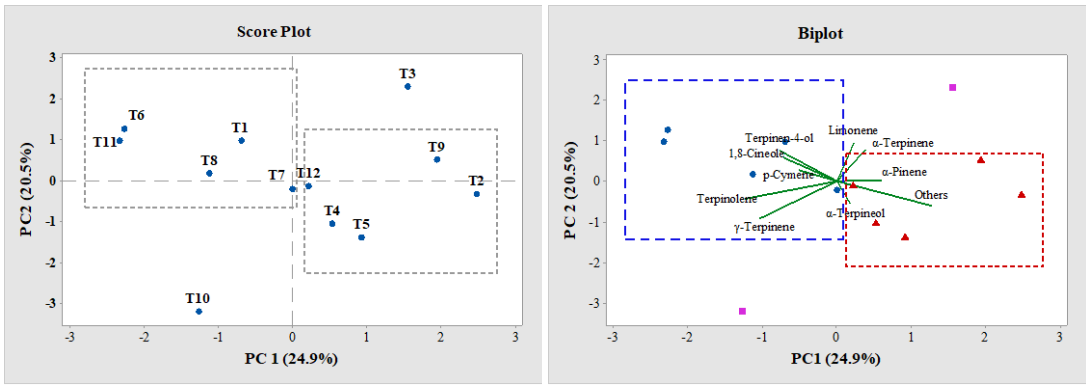
Hình 2. Hiệu suất chiết tinh dầu trầm trong các tháng từ tháng 7/2018 tới 6/2019



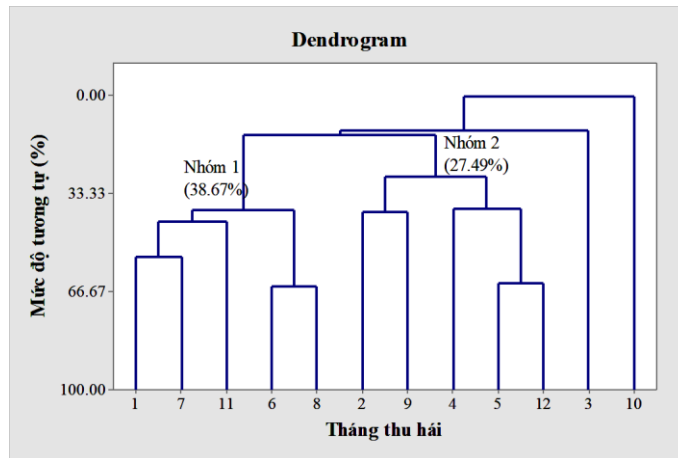
Hình 3. Lượng mưa và nhiệt độ trong các tháng từ tháng 7/2018 tới 6/2019 tại Đài Loan

3.2. Sự thay đổi trong thành phần dầu

Phân tích đa biến của PCA (principal component analysis, phân tích thành phần chính) (Hình 4) và phân tích cụm (Hình 5) được áp dụng cho chín hợp chất chính và các hợp chất khác để đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường như nhiệt độ, lượng mưa tại địa điểm thu hái tới thực vật. Các thành phần chính (PC1 và PC2) có phần trăm phương sai tương ứng là 24,9% và 20,5%, và tổng giá trị là 45,4% trong phân tích PCA. Phân tích cụm, xem xét các khoảng cách Euclid và các liên kết hoàn chỉnh, đã xác nhận sự hình thành của bốn nhóm riêng biệt, như được quan sát trong Hình 5. Nhóm 1 liên quan đến các mẫu tinh dầu thu được trong các tháng 1, 6, 7, 8, 11 với mức độ tương tự là 38,67%, được đặc trưng bởi hàm lượng 1,8-cineole, *p*-cymene, γ -terpinene, terpinolene và terpinen-4-ol. Nhóm 2 liên quan đến các mẫu tinh dầu thu được trong các tháng 2, 9, 4, 5, 12 với mức độ tương tự là 27,49%, được đặc trưng bởi hàm lượng α -pinene, α -terpinene, limonene, α -terpineol và các hợp chất khác. Trong khi đó, nhóm 3 liên quan mẫu dầu thu được trong tháng 3 (độ tương tự 12,02%) đặc trưng bởi α -terpinene và nhóm 4 là mẫu dầu tháng 10 với mức độ tương tự 0,01% đặc trưng bởi γ -terpinene. Kết quả phân tích cụm cho thấy mặc dù hiệu suất chiết tinh dầu chịu ảnh hưởng của lượng mưa với hiệu suất tinh dầu thu được cao trong các tháng mùa mưa, nhưng thành phần các hợp chất trong tinh dầu hầu như không thay đổi và sự phân nhóm trong các mẫu dầu dựa theo thành phần hữu cơ cũng được sắp xếp ngẫu nhiên không theo mùa. Điều này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Van Vurren về sự biến đổi thành phần hữu cơ của các mẫu tinh dầu trầm theo tháng. Nghiên cứu này đã chứng minh sự thay đổi không đáng kể thành phần tinh dầu theo tháng ở các mẫu tinh dầu trầm trà *L. petersonii*, *L. scoparium* và *K. ericoides* [18].



Hình 4. Biểu đồ score plot và Biplot đánh giá thành phần hữu cơ trong các mẫu tinh dầu quan sát



Hình 5. Biểu đồ phân tích cụm (cluster analysis)

3.3. Kết quả khả năng kháng khuẩn của tinh dầu trầm và một số hợp chất chính

Trong Bảng 2, hoạt tính kháng khuẩn của mẫu TTO thu được trong tháng 9, chuẩn terpinen-4-ol, γ -terpinene và α -terpinene đã được kiểm tra thông qua việc xác định đường kính kháng khuẩn bằng phương pháp đĩa. Như trong các báo cáo trước đây, mức độ ức chế của tinh dầu phụ thuộc vào thành phần hóa học của chúng bao gồm nhóm terpene (monoterpene, sesquiterpene và diterpene) và nhóm các hợp chất terpene oxy hóa (oxygenated terpenoid). Kết quả Bảng 2 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trầm được ghi nhận chủ yếu đều đến từ thành phần chính Terpinen-4-ol. Đường kính kháng khuẩn *S. aureus* của TTO, chuẩn terpinen-4-ol lần lượt là 19,7 mm và 21,7 mm. Đường kính kháng khuẩn *E. coli* của TTO, chuẩn terpinen-4-ol lần lượt là 21,7 mm và 22,3 mm. Vòng tròn kháng khuẩn đã không xuất hiện trong các mẫu γ -terpinene, α -terpinene với đường kính đo được bằng với đường kính của giấy lọc (6 mm). Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn được giải thích bằng cơ chế phá hủy màng tế bào. Khi vi khuẩn được tiếp xúc với tinh dầu, tính lưu động và tính thấm của màng tế bào của chúng được tăng lên. Điều này dẫn đến ức chế quá trình hô hấp, làm thay đổi sự vận chuyển của các ion và làm rối loạn các protein màng.

Bảng 2. Đường kính kháng khuẩn của tinh dầu trầm TTO, chuẩn terpinen-4-ol, γ -terpinene và α -terpinene.

Vi khuẩn	Đường kính kháng khuẩn (mm)			
	TTO	Terpinen-4-ol	γ -terpinene	α -terpinene
<i>S. aureus</i>	19,7 ± 2,1	21,7 ± 0,9	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0
<i>E. coli</i>	21,7 ± 1,2	22,3 ± 2,9	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy hàm lượng tinh dầu trầm thu được trong 12 tháng khảo sát từ 4,24 % tới 6,61% và chịu ảnh hưởng của lượng mưa với hàm lượng cao nhất thu được vào tháng 9 và thấp nhất vào tháng 1. Sự biến động trong thành phần hữu cơ giữa các mẫu tinh dầu không đáng kể. Kết quả phân tích cụm đánh giá mức độ tương tự nhau của 12 mẫu tinh dầu cho thấy có 4 nhóm mẫu dầu với thành phần gần nhau. Nhóm 1 liên quan đến các mẫu tinh dầu thu được trong các tháng 1, 6, 7, 8, 11 với mức độ tương tự là 38,67%, trong khi nhóm 2 liên quan đến các mẫu tinh dầu thu được trong các tháng 2, 9, 4, 5, 12 với mức độ tương tự là 27,49%. Ngoài ra, mẫu tinh dầu trầm được ghi nhận có khả năng kháng khuẩn cao với sự đóng góp chính của terpinen-4-ol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nabi M., Rasul M., Rahman S., Dowell A., Ristovski A., and Brown R. - Study of performance, combustion and emission characteristics of a common rail diesel engine with tea tree oil-diglyme blends. *Energy* **180** (2019) 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.05.070>
2. Lam N.S., Long X., Su X.Z., and Lu F. - *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130** (2020) 110624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110624>
3. Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. - *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a Review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Review*. **19** (2006) 50-62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>
4. Das S., Lee S.H., Chow P.S., and Macbeath C. - Microemulsion composed of combination of skin beneficial oils as vehicle: Development of resveratrol-loaded microemulsion based formulations for skin care applications. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **194** (2020) 111161. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111161>
5. Lee C.J., Chen L.W., Chen L.G., Chang T.L., Huang C.W., Huang M.C., and Wang C.C. - Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis* **21** (2013) 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.007>
6. Lins R.F., Lustri W.R., Minharro S., Alonso A., and de Sousa Neto D. - On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **497** (2021) 271-79. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.024>

7. Vo T.V., Chou Y.Y., and Chen B.H. - Preparation of microemulsion from an alkyl polyglycoside surfactant and tea tree oil. *Molecules* **26** (2021) 1971. <https://doi.org/10.3390/molecules26071971>
8. International Organization for Standardization, ISO 4730:2017 Essential oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). <https://www.iso.org/standard/69082.html> (02/2017)
9. Wong V., Wyllie S. G., Cornwell C. P., and Tronson D. - Supercritical fluid extraction (SFE) of monoterpenes from the leaves of *Melaleuca alternifolia* (tea tree). *Molecules* **6** (2001) 92-103. <https://doi.org/10.3390/60100092>
10. Baker G.R., Lowe R.F., and Southwell I.A. - Comparison of oil recovered from tea tree leaf by ethanol extraction and steam distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (2000) 4041-4043. <https://doi.org/10.1021/jf0004356>
11. Huynh Q., Phan T., Thieu V., Tran S., and Do S. - Extraction and refining of essential oil from Australian tea tree, *Melaleuca alterfornia*, and the antimicrobial activity in cosmetic products. *Journal of Physics: Conference Series* **352** (2012) 012053: IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/352/1/012053>
12. Ng F., Basri N., Wu W., Thong A., Thong G., Chew W., Dharmawan J. - Characterization of volatile compounds in Ylang-Ylang essential oils from Comoros and Madagascar by gas chromatography and principal component analysis. *Flavour and Fragrance Journal* **36** (1) (2021) 159-166. <https://doi.org/10.1002/ffj.3625>
13. de Figueiredo, M. - Chemical composition and oil concentration of tea tree leaf oil grown in South Africa during a one-year vegetative cycle. *Journal of Essential Oil Research* **18** (2006) 52-53. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.12067120>
14. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. - Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6** (2016) 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
15. Sakkas H., Economou V., Gousia P., Bozidis P., Sakkas V.A., Petsio S., Mpekoulis G., Iliia A., and Papadopoulou C. - Antibacterial Efficacy of commercially available essential oils tested against drug-resistant Gram-positive pathogens, *Applied Sciences* **8** (2018) 2201-2210. <https://doi.org/10.3390/app8112201>
16. Vo T.V, Truong T.H., Chen B.H. - Surfactant-assisted extraction of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil by hydrodistillation and its application in microemulsion, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **97** (12) (2022) 3419-3429. <https://doi.org/10.1002/jctb.7202>
17. Yasin M., Younis A., Ramzan F., Javed T., Shabbir R., Noushahi H.A., Skalicky M., Ondrisik P., Brestic M., Hassan S., and Sabagh A.E.L. - Extraction of essential oil from river tea tree (*Melaleuca bracteata* F. Muell.): Antioxidant and antimicrobial properties. *Sustainability* **13** (2021) 4827-4836. <https://doi.org/10.3390/su13094827>
18. Vuuren F.V., Dcorat Y., Kamatiu G.P.P., and Viljoen A.M. - Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. *South African Journal of Botany* **92** (2004) 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.01.005>

ABSTRACT

PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS AND CLUSTER ANALYSIS TO EVALUATE THE SEASONAL VARIATION IN THE CHEMICAL COMPOSITION OF TEA TREE OIL

Vo Thuy Vi^{1*}, Truong Thi Huyen²

¹*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

²*National Cheng Kung University, Taiwan*

*Email: vivt@hufi.edu.vn

The tea tree, scientifically known as *Melaleuca alterfolia* (Maiden & Betche) Cheel, is native to Australia and has strong antibacterial, antifungal, and antiviral properties. The purpose of this study was to evaluate the influence of seasonal variation on the yield and chemical composition of tea tree oil over a 12-month period. Tea tree oil was extracted by the hydrodistillation method in the support of a surfactant solution (650 ppm). During the survey period, the essential oil content ranged from 4.24% to 6.61%. The constituents of TTO were determined using GC-FID and GC-MS, as well as multivariate analysis: principal component analysis (PCA) and cluster analysis. Nine main components in TTO were α -pinene (2.0-2.5%), 1,8-cineole (3.2-5.5%), α -terpinene (8.3-12.1%), *p*-cymene (1.8-4.3%), limonene (1.0-1.4%), γ -terpinene (16.1-21.4%), terpinolene (2.1-3.5%), terpinen-4-ol (40.6-49.6%), and α -terpineol (3.1-6.6%). The results of the analysis showed that the essential oil content was highest during the summer months when there was a lot of rain, while the composition of the main compounds in the essential oil changed almost insignificantly depending on the season. Furthermore, the antibacterial activity of pure tea tree oil and a few main components was evaluated.

Keywords: Tea tree essential oil, *Melaleuca alternifolia*, hydrodistillation, principal component analysis, cluster analysis, antibacterial activity.