

MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA TINH DẦU CHÙA DÙ THU HÁI TẠI HUYỆN SİN HỒ, TỈNH LAI CHÂU

Hoàng Lê Sơn¹, Nguyễn Thị Hà Ly², Nguyễn Trà My², Phạm Ngọc Khánh²,
Nguyễn Văn Hiếu², Nguyễn Minh Khởi^{1,2}, Đỗ Thị Hà², Lê Thành Nghi^{2,*}

¹Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội;

²Viện Dược liệu.

*Email: thanhnghi.vdl@gmail.com

(Nhận bài ngày 04 tháng 5 năm 2024)

Tóm tắt

Mẫu chùa dù (*Elsholtzia penduliflora* W.W. Smith), dùng cho khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu, được thu hái tại xã Tả Phìn, huyện Sìn Hồ (Lai Châu). Các thử nghiệm *in vitro* về tác dụng sinh học của tinh dầu chùa dù trên một số mô hình thực nghiệm cũng lần đầu tiên được khảo sát. Trong đó, tác dụng chống oxy hóa *in vitro* theo khả năng dọn gốc tự do đối với DPPH và ABTS (ở nồng độ 100 µg/mL) cho thấy tỷ lệ tương ứng là 25,15% và 52,75%. Tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu chùa dù được quan sát thấy trên dòng trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* tại nồng độ 100 µg/mL. Đáng quan tâm hơn, lần đầu tiên tinh dầu chùa dù cho thấy tác dụng lên hệ thần kinh trung ương thể hiện qua các hoạt tính ức chế các enzym MAO-B (trên TLC) và AChE ($IC_{50} = 0,59 \pm 0,09$ µg/mL). Các kết quả này một phần cho thấy triển vọng của tinh dầu chùa dù trong việc cải thiện triệu chứng trầm cảm và trong hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer. Bên cạnh đó, thành phần hóa học của tinh dầu chùa dù theo phương pháp GC-MS cho thấy hàm lượng cao nhất là eucalyptol (77,13%), kế đến có *o*-cymen (5,05%), cumen (3,45%) và β -pinen (2,52%). Đáng lưu ý, điều kiện sơ chế mẫu đã ảnh hưởng một phần đến hàm lượng tinh dầu, biến đổi từ 0,96% - 1,56%, thu được tùy theo điều kiện sơ chế mẫu.

Từ khóa: Chùa dù, *Elsholtzia penduliflora*, Tinh dầu, Acetylcholinesterase, Monoamin oxidase, DPPH, ABTS, Kháng khuẩn.

Summary

Some Biological Activities of Essential Oil from *Elsholtzia penduliflora* W.W. Smith Collected in Sin Ho District, Lai Chau Province

The study was carried out on the *Elsholtzia penduliflora* W.W. Smith (*E. penduliflora*) sample collected in Ta Phin commune, Sin Ho district, Lai Chau province. The *in vitro* tests of the biological activity of the essential oils, such as antioxidant, antibacterial, acetylcholinesterase, and monoamine oxidase inhibitions, were investigated for the first time. Firstly, the *in vitro* antioxidant activity of the essential oil, according to the free radical scavenging ability for DPPH and ABTS at a concentration of 100 µg/ml, showed the rate of 25.15% and 52.75%, respectively. Successively, the antibacterial effect of *E. penduliflora* essential oil was observed on *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 100 µg/mL. More interestingly and for the first time, *E. penduliflora* essential oil showed effects on the central nervous system via the inhibition of MAO (on TLC) and AChE ($IC_{50} = 0.59 \pm 0.09$ µg/mL) enzymes. These results partly show the promise of the essential oil of *E. penduliflora* in improving symptoms of depression and in supporting the treatment of Alzheimer's disease. Besides, the chemical composition of essential oil by GC-MS methodology showed the highest content of eucalyptol (77.13%) then followed by major components such as *o*-cymene (5.05%), cumene (3.45%), and β -pinene (2.52%). Notably, sample processing conditions affected the essential oil content from 0.96% to 1.56%, depending on the humidity grade of the research sample.

Keywords: *Elsholtzia penduliflora*, Essential oil, Acetylcholinesterase inhibitor, Monoamine oxidase inhibitor, Antibacterial, Antioxidant.

1. Đặt vấn đề

Bài thuốc tắm người Dao Khâu (huyện Sìn Hồ - Lai Châu) là một trong những sản phẩm đặc trưng của vùng Tây Bắc, đã được khoa học thừa nhận đem lại sức khỏe cho con người trong điều trị các bệnh xương khớp, lưu thông khí huyết, giúp giải độc tố và phục hồi sức khỏe nhanh, giúp phụ nữ sau sinh cải thiện sức khỏe thể chất và tinh thần [1],[2]. Trong đó, cây chùa dù (chi Kinh giới *Elsholtzia* - họ Bạc hà) chứa nhiều tinh dầu và là vị chính của các bài thuốc.

Chi Kinh giới được biết đến với hàm lượng tinh dầu cao và được sử dụng trong dân gian để điều trị viêm da, thấp khớp và viêm khớp, sát trùng, giảm đau, chữa cảm cúm, viêm dạ dày, viêm ruột, lỵ và ăn uống không tiêu [3]. Trong y học dân gian, chùa dù chủ yếu được dùng làm thuốc chữa cảm cúm, ho sốt và các chứng viêm [4]. Chùa dù là cây bản địa ở Nam Trung Quốc và Bắc Việt Nam, được du nhập về Thái Lan. Ở

nước ta, chùa dù phân bố ở độ cao trên 1000 m, thường 1450 m - 1600 m như Lào Cai (Mường Khương, Bắc Hà, Sa Pa), Hà Giang (Đồng Văn, Quản Bạ), Lai Châu (Sìn Hồ), Nghệ An (Huổi Dạng, Mường Lống) [5].

Số liệu nghiên cứu về hóa học và dược lý của chùa dù hiện còn rất hạn chế, đặc biệt là liên quan đến tác dụng của hợp phần tinh dầu [6],[7]. Tuy đã có một số nghiên cứu về tinh dầu chùa dù, nhưng kết quả đang dừng lại ở hàm lượng và thành phần hóa học tinh dầu theo GC-MS với sự phân bố chính là eucalyptol (57,7%-71,7%) tùy thuộc khu vực phân bố [8],[9],[10],[11], mà chưa có các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của tinh dầu chùa dù.

Nhìn chung, phương thuốc cổ đại thường chứa tinh dầu do có hoạt tính sinh học đa dạng như: kháng khuẩn, kháng virus, chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau và tác dụng hướng thần [12]. Về tác dụng của tinh dầu lên hệ thần kinh,

có trên 70 nghiên cứu điển hình minh chứng về tác dụng chống stress, giải lo âu, an thần, cải thiện trí nhớ [13]. Bên cạnh đó, chi Kinh giới với hàm lượng tinh dầu cao, được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, kháng virus, kháng khuẩn [14] và chống viêm tốt [15],[16],[17]. Tinh dầu chi Kinh giới [18] và eucalyptol cũng được minh chứng về tác dụng mạnh lên hệ thần kinh trung ương và giảm đau rõ rệt [19].

Tuy nhiên, các tác dụng sinh học của tinh dầu chưa đủ trên thực nghiệm như hoạt tính chống oxy hóa, kháng vi sinh vật hay một số ảnh hưởng lên hệ thần kinh trung ương như giảm căng thẳng hay chống trầm cảm, cải thiện trí nhớ còn chưa được quan tâm nghiên cứu. Bên cạnh đó, chúng tôi quan tâm đến loài chưa đủ phân bố ở huyện Sơn Hồ tỉnh Lai Châu vì đây là một trong những thành phần chính trong các bài thuốc tắm của người Dao Khâu, Sơn Hồ.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu thực vật và tinh dầu

Mẫu chưa đủ: Phần trên mặt đất cây chưa đủ được thu tại xã Tả Phìn (huyện Sơn Hồ, tỉnh Lai Châu) vào tháng 7/2021 bởi TS. Phạm Ngọc Khánh (Trung Tâm nghiên cứu dược liệu Sa Pa - Viện Dược liệu). Tên khoa học được giám định là *Elsholtzia penduliflora* W.W. Smith bởi ThS. Nguyễn Văn Hiếu, Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Tiêu bản mẫu mang mã số DV120721 được lưu tại Trung tâm TNDL - Viện Dược liệu. Mẫu sau khi thu hái được loại bỏ tạp chất, cắt nhỏ 1-2 cm (mẫu EP) và phơi sấy trong điều kiện khô ráo, thoáng gió để thu được các mẫu có độ ẩm khác nhau nhưng cùng nguồn gốc. Mẫu EP1 (độ ẩm 54,7%) thu được từ mẫu EP, sau khi phơi khô trong bóng râm ở điều kiện khô ráo, thoáng gió trong 4 ngày. Mẫu EP2 (độ ẩm 22,1%) thu được từ mẫu EP khi phơi trong bóng râm ở điều kiện khô ráo, thoáng gió trong 7 ngày. Mẫu EP3 (độ ẩm 12,8%) thu được từ mẫu EP2 khi sấy thêm ở 40°C (khoảng 15 h-16 h). Các mẫu EP1, EP2 và EP3 được đánh giá sơ bộ hàm lượng và thành phần tinh dầu để theo dõi sự thay đổi của chúng trong khi phơi và sấy mẫu EP. Mẫu sau khi sấy khô (EP3) được lưu giữ trong túi nilon kín, bảo quản nơi khô ráo và tránh ánh nắng.

Tinh dầu: Các mẫu được chưng cất lấy tinh dầu trong 4 giờ theo phương pháp cất lôi cuốn với hơi nước để có các mẫu tinh dầu EP1, EP2, EP3 tương ứng. Các tinh dầu thu được được làm khô bằng natri sulfat khan, được bảo quản trong lọ kín tránh ánh sáng ở 4 - 6°C trước khi sử dụng cho phân tích trên GC-MS. Mẫu tinh dầu EP3 được sử dụng sau đó cho các thử nghiệm hoạt tính sinh học.

Hàm lượng tinh dầu (H, %) được tính theo công thức (1):

$$H(\%) = \frac{V \cdot 100}{m \cdot (100 - X)} \cdot 100\% \quad (1)$$

Trong đó: H - Hàm lượng tinh dầu (%);

V - Thể tích tinh dầu (mL)

m - Khối lượng mẫu (g);

X - Độ ẩm mẫu (%)

Nguyên vật liệu và phương pháp

Dung môi: n-hexan (Merck), acetone (Merck), ethanol (Merck) và DMSO (Acros).

Hóa chất: quercetin ($\geq 95\%$, Sigma), acid ascorbic ($\geq 99\%$, Sigma), $K_2S_2O_8$ ($\geq 99\%$, Sigma), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) ($> 98\%$), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ($\geq 95\%$, Sigma), serotonin hydroclorid, benzylamin, ampliflu red, superoxid dismutase bò, đệm Tris-HCl, scopolamin, imipramin, acid 5,5-dithiobis[2-nitrobenzoic], cơ chất acetylthiocholin iodid, kháng sinh tham chiếu (gentamycin, doxycyclin, nystatin), môi trường nuôi cấy (sabourand-2% dextrose broth (SDB) và saboraaud 4% dextrose agar (SDA), tryptic soy agar (TSA) Merck.

Các chủng vi sinh vật kiểm định:

Vi khuẩn Gr(-) (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027); Vi khuẩn Gr(+) (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538); Nấm sợi (*Aspergillus niger* ATCC 9763, *Fusarium oxysporum* ATCC 48112); Nấm men (*Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 16404.)

Enzym: monoamin oxidase A người, monoamin oxidase B người; acetylcholinesterase.

Phương pháp GC-MS: Tinh dầu được định tính trên GC-MS QP2020 Plus (Shimadzu) với cột mao quản SH - Rxi - 5Sil MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Helium (Messer, Đức) được dùng làm khí mang với tốc độ dòng 1,67 mL/phút. Nguồn ion giao diện: 250°C; phổ khối ion hóa năng lượng, 70 eV, ion hóa điện tử thu được trên dải khối lượng 50-350 m/z. Nhiệt độ đầu phun: 250°C; thể tích bơm 1,0 μ L mẫu (1% (v/v) trong n-hexan (Merck) với tỷ lệ chia dòng 1:20. Chương trình nhiệt độ để phân tích tinh dầu được bắt đầu từ 60°C (giữ trong 2 phút), sau đó tăng lên 120°C (tốc độ 3°C/phút) và giữ ở 120°C trong 3 phút, sau đó tăng lên 180°C (tốc độ 5°C/phút), trước khi giữ ở 180°C trong 2 phút. Sau đó, nhiệt độ được tăng từ 180°C lên 240°C trong vòng 6 phút và giữ ở nhiệt độ này trong 4 phút. Việc xác định hợp chất dựa trên việc so sánh phổ khối lượng của từng chất với phổ từ thư viện NIST 14.

Phương pháp sàng lọc tác dụng với ABTS:

Nguyên tắc: ABTS* là gốc tự do bền phát huỳnh quang xanh, có bước sóng hấp thụ đặc trưng là 734 nm. Khi thêm một chất có tính

chống oxy hóa, ABTS* sẽ bị khử về dạng không màu nên độ hấp thụ bước sóng đặc trưng giảm theo mô tả bởi Radulović [20].

Mẫu thử: Tinh dầu EP3 được chuẩn bị ở nồng độ 1000 µg/mL trong DMSO.

Mẫu đối chứng dương: Được chuẩn bị từ quercetin và DMSO để được dung dịch gốc 1000 µg/mL và được pha thành các dung dịch làm việc với các nồng độ 100, 50, 25, 12,5 và 6,25 µg/mL.

Dung dịch ABTS*: Gốc tự do ABTS* được tạo bằng cách ủ dung dịch ABTS 7 mM với dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM tỷ lệ 1:1 (v/v) trong đệm muối phosphat trong tối từ 14 - 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó điều chỉnh giá trị cường độ hấp thụ của dung dịch ABTS* về giá trị $0,70 \pm 0,05$ bằng nước cất. Dùng ngay sau khi pha và được đựng trong bình tối màu. Phản ứng được tiến hành bằng cách thêm 100 µL tinh dầu ở các nồng độ khác nhau vào 3 mL dung dịch ABTS*. Dung dịch được ủ tối 30 phút ở 25°C, sau đó được đo quang trên máy Elisa ở bước sóng $\lambda = 734$ nm.

Thực hành phép thử: Hút chính xác 5 µL dung dịch mẫu thử ở nồng độ 1000 µg/mL của các mẫu cần khảo sát vào khay đĩa 96 giếng. Thêm đồng loạt 195 µL dung dịch ABTS*. Để trong bóng tối trong khoảng 06 phút, ở nhiệt độ phòng. Dung dịch sau đó được đem đo quang ở máy đo quang Elisa ở bước sóng $\lambda = 734$ nm. Lặp lại $n = 3$ lần với mỗi mẫu để lấy giá trị trung bình.

Hoạt tính chống oxy hóa I (%) được xác định bởi công thức (2):

$$I(\%) = \frac{(Atr - At)}{(Atr - Ab)} \cdot 100\% \quad (2)$$

Trong đó: At - Mật độ đo quang của mẫu thử

Ab - Mật độ đo quang của mẫu đối chứng âm

Atr - Mật độ đo quang của mẫu trắng

Phương pháp sàng lọc tác dụng với DPPH:

Nguyên tắc: DPPH là gốc tự do được dùng để khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của đối tượng nghiên cứu qua phản ứng làm mất màu DPPH, theo mô tả bởi Radulović [20].

Mẫu thử: Chuẩn bị từ tinh dầu EP3 và DMSO để có dung dịch gốc 1000 µg/mL, sau đó được pha loãng để có các dung dịch nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL.

Mẫu đối chứng dương: Chuẩn bị từ acid ascorbic và DMSO để có dung dịch gốc 1000 µg/mL, sau đó được pha loãng để có các dung dịch nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL.

Dung dịch DPPH: Dung dịch DPPH 150 µM được chuẩn bị từ DPPH và ethanol trong bình định mức tối màu và được sử dụng ngay sau khi pha.

Thực hành phép thử: Hút mẫu nghiên cứu đã pha ở các nồng độ vào đĩa 96. Thêm dung dịch DPPH vào các giếng đã có sẵn mẫu nghiên cứu (tỉ lệ 1:1). Mẫu trắng chỉ có 100 µL nước và 100

µL DPPH. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Xác định độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng tại bước sóng 517 nm trên máy đo quang Elisa. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bởi công thức (2). Lặp lại thí nghiệm với các mẫu có 5 nồng độ khác nhau cần khảo sát để tìm ra IC₅₀ mỗi mẫu. Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin ở dãy nồng độ khảo sát 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL. Chứng âm sử dụng là dung môi sử dụng. IC₅₀ được xác định bằng cách vẽ đồ thị phần trăm ức chế so với nồng độ của tinh dầu.

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật

Phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng được sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua độ đục của môi trường nuôi cấy. Các giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (50% Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế 50%), MIC (Minimum Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế tối thiểu), MBC (Minimum Bactericidal Concentration: nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) và MFC (Minimum Fungicidal Concentration: nồng độ diệt nấm tối thiểu) [21].

Cách tiến hành:

+ *Pha loãng mẫu thử*: Mẫu tinh dầu được pha loãng 2 bước trong DMSO 100% và nước muối sinh lý thành một dãy 5 nồng độ (200, 100, 50, 25,5, 12,5 µg/mL).

+ *Chuẩn bị mẫu đối chứng*: Kháng sinh doxycyclin cho các chủng vi khuẩn Gram dương với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,001-0,500 µg/mL; giá trị MIC trong khoảng 0,004-1,200 µg/mL. Kháng sinh Gentamycin cho các chủng vi khuẩn Gram âm với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,025-15,75 µg/mL; với giá trị MIC trong khoảng 0,05-19,5 µg/mL.

Kháng nấm Nystatin cho chủng nấm Candida với giá trị IC₅₀ trong khoảng 2-2,5 µg/ml; với giá trị MIC trong khoảng 2,8-5,0 µg/mL.

+ *Thử hoạt tính*: Vi sinh vật kiểm định được lưu giữ ở -80°C. Trước khi thí nghiệm, vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa bằng môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ vi khuẩn đạt $5 \cdot 10^5$ CFU/mL; nồng độ nấm đạt 10^3 CFU/mL. Lấy 10 µL dung dịch mẫu thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190 µL dung dịch vi khuẩn và nấm đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở 37°C/ 16-24 giờ. Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 625nm.

+ *Xử lý kết quả*: Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Giá trị MBC/MFC được xác định bằng cách cấy dung dịch tại giếng đã xác

định có giá trị MIC lên đĩa thạch và không có vi sinh vật kiểm định nào mọc trở lại sau 24 giờ. IC₅₀ được

xác định thông qua giá trị % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$IC_{50} = HighConc - \frac{(HighInh\% - 50) \times (HighConc - LowConc)}{HighInh\% - LowInh\%} \quad (3)$$

Trong đó: HighConc/LowConc: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; HighInh%/LowInh%: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp.

Tỷ lệ ức chế được tính theo công thức (4)

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(OD_{chứng(+)} - OD_{mẫu thử}) \times 100\%}{OD_{chứng(+)} - OD_{chứng(-)}} \quad (4)$$

Phương pháp sàng lọc in vitro hoạt tính ức chế AChE

Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* được xác định theo Ellman [22]. Tỷ lệ ức chế AChE được tính bằng cách so sánh độ hấp thụ của mẫu (mẫu xét nghiệm chứa tinh dầu + enzym + cơ chất + DTNB) với mẫu đối chứng enzym (xét nghiệm chứa đệm + enzym + cơ chất + DTNB). Các giá trị tương ứng với độ hấp thụ của mẫu đối chứng enzym cho thấy tiêu chí hoạt động tối đa của enzym được sử dụng trong các thí nghiệm, tức là khả năng enzym hoạt động tối đa để hình thành sản phẩm từ cơ chất, hoạt động của enzym khi đó được coi là 100%. Trong xét nghiệm này, mẫu tinh dầu chùa dù EP3 được pha trong MeOH với nồng độ 10 mg/mL và được pha loãng thêm với dung dịch đệm phosphat 0,1 M pH 8,0 để có được các mẫu với dãy nồng độ khác nhau, từ 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/mL. Hoạt tính AChE được xác định trong dung dịch 25 µL AChE (0,25 U/mL) trong đĩa vi thể đáy phẳng 96 giếng. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 125 µL dung dịch DTNB 3 mM, 25 µL dung dịch cơ chất acetylthiocholin iodua (ATCI) 2,4 mM và 50 µL dung dịch đệm photphat 0,1 M (pH 8,0). Độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 412 nm được đo bằng máy đọc đĩa vi thể sau khi ủ trong 24 phút ở 25°C. Tất cả các thử nghiệm đều được thực hiện ba lần. Kết quả được biểu thị bằng giá trị trung bình ± S.E.M. của các thí nghiệm. IC₅₀ được xác định bằng cách vẽ đồ thị phần trăm ức chế so với nồng độ của tinh dầu. Tỷ lệ ức chế I (%) với AChE được tính bằng công thức (3) sau đây:

$$I(\%) = \frac{(Ac - Abs) - (As - Abs)}{(Ac - Abs)} \cdot 100\% \quad (4)$$

Trong khi đó: Ac- Độ hấp thụ của chất đối chứng (có enzym)

Abs - Độ hấp thụ của mẫu đối chứng Blank (không có enzym)

As - Độ hấp thụ của mẫu (có enzym)

Abs - Độ hấp thụ của mẫu trắng (không có enzym)

Phương pháp sàng lọc in vitro hoạt tính ức chế các enzym MAO

Phương pháp sàng lọc bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) khả năng ức chế enzym MAO của tinh dầu dựa trên kỹ thuật của Jang và cs. [23]. Mẫu tinh dầu chùa dù EP3 được sử dụng để sàng lọc khả năng ức chế enzym MAO-B. Quy trình thực hiện: Tinh dầu được pha vào ethanol với nồng độ khoảng 100 µg/mL. Chấm với thể tích thay đổi từ 1-10 µL trên cùng bản mỏng TLC dưới dạng spot. Enzym được phun vào bản mỏng TLC, ủ trong 15 phút tại nhiệt độ 37°C. Sau đó, bản mỏng sẽ được phun dung dịch chứa 10 mg MTT, 10 mg tryptophan và 1 mg natri sulphat trong 5 mL Na₂HPO₃ 0,1 M tại pH 7,4. Tiếp tục ủ trong 30 phút tại nhiệt độ 37°C. Ethanol được sử dụng làm chứng âm. Các vùng ức chế MAO xuất hiện dưới bước sóng quan sát 366 nm. Các mẫu có tác dụng sẽ xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC bằng cách pha loãng trong ethanol từ nồng độ ban đầu đến khi không hiện vết trên mô hình TLC.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Hàm lượng và thành phần hóa học tinh dầu theo GC-MS

Hàm lượng tinh dầu thu được của các mẫu chùa dù EP1, EP2, EP3 được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng tinh dầu mẫu chùa dù thu hái tại Sìn Hồ, Lai Châu

TT	Mẫu	Khối lượng (g)	Độ ẩm mẫu (%)	Thể tích (ml)	Hàm lượng (%)
1	EP1	30,07	54,7	0,20	1,56
2	EP2	30,04	22,1	0,30	1,28
3	EP3	35,80	12,8	0,30	0,96

Thành phần hóa học thu được của các mẫu tinh dầu chùa dù khảo sát theo phương pháp GC-MS được trình bày trong Bảng 2.

Về thành phần hóa học tinh dầu chùa dù có một số nghiên cứu trước đó theo GC-MS với sự khác nhau về địa điểm thu mẫu. Cụ thể, nghiên cứu đầu tiên là của Yang và cs. trên loài chùa dù Trung Quốc năm 1990 cho thấy hàm lượng 1,8-cineol khá cao (71,7%); các hợp chất quan trọng khác như β-pinen (7,3%), α-pinen (3,9%), sabinen (2,8%) và limonen (2,4%) [9]. Tiếp đó năm 2007, Casanova và cs. công bố hàm lượng 1,8-cineol tương đối cao trên 02 mẫu chùa dù tại Lào Cai và chiếm lần lượt là 62,7% và 65,5%.

Các thành phần chính khác tương ứng có γ -terpinen (5,8%; 5,3%), β -pinen (5,6%; 5,8%), sabinen (3,2%; 3,3%) và *p*-cymen (3,1%; 3,8%) [10]. Năm 2020, Hoàng Thị Diệu Hương và cs. công bố thành phần 03 mẫu tinh dầu chùa dù (02 mẫu tại Lào Cai, 01 mẫu tại Lai Châu), đã cho thấy một số thông tin thú vị. Với 02 mẫu chùa dù thu hái ở Lào Cai cho thấy 1,8-cineol là thành phần chính, chiếm 57,73% (mẫu ở Sa Pa) và 67,87% (mẫu ở Bát Xát). Kết quả này khá tương đồng hàm lượng 1,8-cineol so với trong công bố của Casanova. Các thành phần chính quan trọng khác có cumen (7,29% và 4,09%), α -guaian (2,26% và 2,67%), β -pinen (2,21% và 3,77%) và *o*-cymen (6,62% và 3,62%). Tuy nhiên, với mẫu chùa dù thu tại Lai Châu (thị trấn Sìn Hồ) lại cho thấy thành phần 1,8-cineol trong tinh dầu chiếm tới 74,42% [11], cho thấy sự tương đương so với mẫu chùa dù nguồn gốc từ Trung Quốc với 71,7% 1,8-cineol [9] và mẫu EP3 trong nghiên cứu này (thu hái tại xã Tả Phìn - Lai Châu) với 77,13% 1,8-cineol cùng với các thành phần chính quan trọng khác *o*-cymen (5,05%), cumen (3,45%), β -pinen (2,52%) và γ -guaian (1,90%).

Bảng 2. Thành phần hóa học các mẫu tinh dầu chùa dù theo GC-MS

TT	Thành phần hóa học tinh dầu	Hàm lượng (%)		
		EP1	EP2	EP3
1	Cumen	-	-	3,45
2	α -Pinen	3,52	3,28	1,71
3	Camphen	7,41	7,11	-
4	1,3,8-Menthatrien	10,85	10,26	-
5	β -Pinen	-	-	2,52
6	β -Myrcen	1,74	1,92	-
7	α -phellandren	1,61	1,29	0,63
8	3-Caren	0,25	-	0,72
9	α -Terpinen	2,24	1,53	-
10	<i>o</i> -Cymen	-	-	5,05
11	1,8-Cineol	46,72	54,22	77,13
12	4-Thujanol	0,59	1,06	-
13	γ -Terpinen	2,22	3,86	0,74
14	Linalool	-	0,21	-
15	Camphor	0,43	0,16	-
16	Terpinen-4-ol	0,49	0,2	1,79
17	Thymoquinon	0,35	0,3	-
18	Thymol	0,79	0,35	1,65
19	β -Elemen	1,43	0,48	-
20	β -Copaen	2,25	1,39	-
21	β -Eudesmen	0,38	-	-
22	Carvacrol acetat	1,25	0,22	-
23	α -Guaian	2,23	1,18	1,90
24	α -Humulen	1,14	0,53	-
25	α -Elemen	1,24	0,73	-
26	Germacren-D	-	-	-
27	α -Bulnesen	3,36	1,9	-
28	γ -Elemen	1,51	0,73	-
29	Spathulenol	-	-	1,04

TT	Thành phần hóa học tinh dầu	Hàm lượng (%)		
		EP1	EP2	EP3
30	Caryophyllen	1,78	0,68	-
31	Humulen	1,14	0,53	-
Tổng (%)		96,92	94,12	98,33

Bên cạnh đó, trong khi khảo sát ngẫu nhiên, kết quả phân tích thành phần hóa học các mẫu tinh dầu chùa dù cho thấy sự khác nhau về hàm lượng và tỷ lệ các hợp chất thay đổi theo độ ẩm mẫu nghiên cứu. Với mẫu chùa dù được phơi 4 ngày trong bóng râm, độ ẩm của mẫu khi đó đạt 54,7%. Hàm lượng tinh dầu thu được từ mẫu này cũng cao hơn và đạt 1,56%. Trong tinh dầu chùa dù khi đó, chứa các hợp phần dễ bay hơi như: α -pinen, camphen, 1,3,8-menthatrien, β -pinen, β -myrcen, α -phellandren, guaian. Tuy nhiên, với mẫu được phơi mẫu trong bóng râm 7 ngày, độ ẩm mẫu khi đó đạt 22,1%. Hàm lượng tinh dầu thu được 1,28% (đã giảm đi khoảng 17,9%). Hàm lượng các hợp phần dễ bay hơi như: α -pinen, camphen, 1,3,8-menthatrien, β -pinen, β -myrcen, α -phellandren cũng giảm trong mẫu này khi độ ẩm giảm. Trong khi đó, đối với mẫu được phơi se trong bóng râm từ 7 ngày, sau đó sấy khô trong tủ sấy ở 40°C khoảng 15-16 h đến khi đạt độ ẩm 12,8% thì hàm lượng tinh dầu giảm rõ rệt, chỉ còn 0,96% (đã giảm đi khoảng 38,5%). Bên cạnh đó, thành phần hợp chất dễ bay hơi cũng theo đó giảm đi trong quá trình sấy mẫu. Có lẽ có sự mất đi của thành phần dễ bay hơi của tinh dầu trong quá trình phơi hay sấy khô. Với các mẫu sấy trong bóng râm, hàm lượng tinh dầu cao (1,28-1,56%) trong khi tỷ lệ 1,8-cineol trong tinh dầu tương ứng lại thấp hơn (54,22%-46,72%). Trong khi đó, thành phần hóa học chính các mẫu sấy qua tủ sấy cho thấy 1,8-cineol chiếm tỷ lệ lớn hơn trong tinh dầu (77,13%) nhưng hàm lượng tinh dầu lại thu về về mức ổn định hơn, chỉ còn 0,96%. Điều này có thể giải thích một phần do các hợp phần dễ bay hơi đã giảm bớt trong quá trình phơi, sấy, dẫn tới hiện tượng “cô đặc” 1,8-cineol hơn trong tinh dầu thu được sau khi phơi hoặc sấy khô. Đây cũng chính là lý do chúng tôi lựa chọn tinh dầu thu được từ mẫu được liệu khô EP3 cho các nghiên cứu thử nghiệm sinh học. Khi đó, tinh dầu sẽ cho thành phần ổn định hơn nên các tác dụng thu được từ thử nghiệm sinh học sẽ đáng tin cậy hơn. Thêm nữa, tinh dầu khi đó chứa hàm lượng 1,8-cineol cao hơn và được kỳ vọng sẽ có tác dụng tốt hơn các mẫu tinh dầu có hàm lượng chất này thấp hơn.

Tuy vậy, tinh dầu của các loài chùa dù nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở định tính thành phần hóa học theo GC-MS. Các nghiên cứu về tác dụng sinh học như tính chất chống oxy hóa, kháng virus, kháng vi sinh vật và ảnh hưởng lên hệ thần kinh chưa được nghiên cứu khai thác.

3.2. Tác dụng chống oxy hóa của tinh dầu chùa dù

Kết quả sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu chùa dù theo phương thức dọn gốc tự do với ABTS và với DPPH lần lượt cho tỷ lệ là 52,75% và 25,15% ở mức nồng độ 100 µg/mL. Khi thử nghiệm với DPPH, khả năng dọn gốc tự do đạt 25,15% tại nồng độ 100 µg/mL đã cho thấy $IC_{50} > 100$ µg/mL. Trong khi với ABTS, tỷ lệ dọn gốc tự do đạt 52,75% giúp xác định giá trị $IC_{50} = 70,13 \pm 12,97$ µg/mL.

Các kết quả thực nghiệm cho thấy, tinh dầu chùa dù có tác dụng chống oxy hoá tương đối và thể hiện rõ hơn trong phép thử với ABTS khi so sánh với phương pháp thử với DPPH.

3.3. Tác dụng kháng khuẩn

Tác dụng kháng khuẩn của mẫu tinh dầu chùa dù được thử nghiệm trên các chủng vi sinh vật kiểm định gồm: *Bacillus subtilis*- là trực khuẩn

Gram dương, sinh bào tử, thường không gây bệnh; *Staphylococcus aureus* - cầu khuẩn Gram dương, gây mủ các vết thương, vết bỏng, gây viêm họng, nhiễm trùng có mủ trên da và các cơ quan nội tạng; *Escherichia coli* - vi khuẩn Gram âm, gây một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, viêm lý trực khuẩn; *Pseudomonas aeruginosa* - vi khuẩn Gram âm, trực khuẩn mủ xanh, gây nhiễm trùng huyết, các nhiễm trùng ở da và niêm mạc, gây viêm đường tiết niệu, viêm màng não, màng trong tim, viêm ruột; *Aspergillus niger*-nấm mốc, có thể gây viêm phổi nấm, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng đường tiêu hóa đặc biệt trên người suy giảm miễn dịch, *Fusarium oxysporum* - nấm mốc, thường là nguyên nhân gây lở loét, *Saccharomyces cerevisiae*-nấm men, *Candida albicans* - nấm men, thường gây bệnh tưa lưỡi ở trẻ em và các bệnh phụ khoa.

Bảng 3. Tác dụng kháng khuẩn và nấm của tinh dầu chùa dù

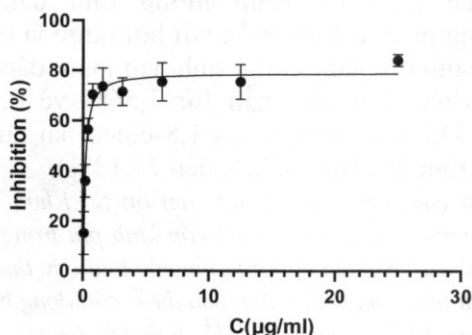
Mẫu	Giá trị	Nồng độ ức chế vi sinh vật (µg/mL)							
		Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Tinh dầu	IC_{50}	> 200	43	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
EP3	MIC	> 200	100	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

Trong các thử nghiệm sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm trên các dòng vi khuẩn và nấm mốc, nấm men, tinh dầu chùa dù EP3 cho thấy tác dụng tốt trên trực khuẩn mủ xanh *P. aeruginosa* ở nồng độ ức chế tối thiểu MIC 100 µg/mL. Giá trị IC_{50} tính được tương ứng là $43,0 \pm 5,5$ µg/mL. Với các chủng vi khuẩn và nấm khác, tinh dầu chùa dù không cho thấy tác dụng ức chế ở các nồng độ khảo sát.

3.4. Tác dụng của tinh dầu chùa dù lên hệ thần kinh trung ương

3.4.1. Khả năng ức chế AChE của tinh dầu chùa dù:

Kết quả sàng lọc tác dụng ức chế AChE của tinh dầu chùa dù được trình bày trong Hình 3. Trên đồ thị biểu diễn mối liên hệ giữa nồng độ tinh dầu và sự ức chế AChE. Giá trị IC_{50} xác định được là $0,59 \pm 0,09$ µg/mL.

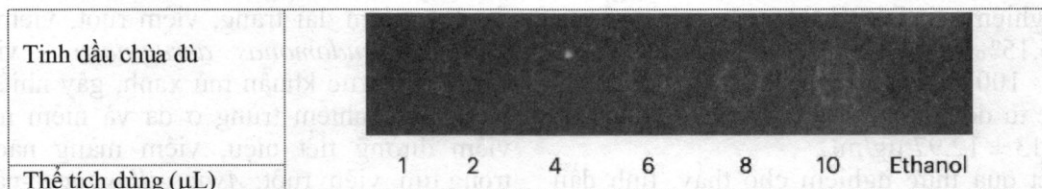


Hình 3. Tỷ lệ ức chế AChE theo nồng độ tinh dầu chùa dù

Alzheimer là một bệnh lý thoái hóa thần kinh chưa được làm rõ về cơ chế bệnh sinh, tuy nhiên giả thuyết hợp lý liên quan đến sự thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin (ACh) trong não. Trong khi đó, AChE là enzym làm suy giảm nồng độ ACh do thủy phân ACh thành cholin và acetat. Vì thế, một số chất ức chế AChE đã được chứng minh có tác dụng cải thiện bệnh Alzheimer như Donepezil, Rivastigmin, Galantamin. Do đó, tác dụng ức chế AChE hiện vẫn là một đích quan trọng cho sàng lọc các (nhóm) hoạt chất hỗ trợ điều trị Alzheimer [24].

Nhiều tinh dầu có tác dụng ức chế AChE sử dụng trong hỗ trợ điều trị Alzheimer được nghiên cứu [25], cùng với đó nhiều tinh dầu có nguồn gốc Việt Nam cũng được khảo sát [26]. Tuy nhiên chưa có công bố nào về hoạt tính ức chế AChE của tinh dầu từ các loài thuộc chi *Elsholtzia* nói chung và loài chùa dù nói riêng. Tác dụng của 1,8-cineol (hợp chất chính trong tinh dầu chùa dù) đã được nghiên cứu trong điều trị Alzheimer thông qua việc ức chế AChE [27], đặc biệt là trong giai đoạn đầu của bệnh [28]. Tuy nhiên, trong khi khảo sát trên cùng tác dụng phòng chống bệnh Alzheimer, hợp phần giàu 1,8-cineol cho thấy kết quả tốt hơn so với dạng đơn chất tinh khiết [29]. Kết quả này được cho rằng có thể do tác dụng hiệp đồng giữa các thành phần có trong tinh dầu.

Kết quả sàng lọc thực nghiệm trên đây của nhiệm vụ này đã cho thấy hoạt tính ức chế AChE rất tốt của tinh dầu chùa dù, với thành phần chính là 1,8-cineol (77,13%). Đồng thời cho thấy triển vọng của tinh dầu chùa dù trong việc hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer.



Hình 4. Sàng lọc khả năng ức chế MAO của tinh dầu chùa dù trên TLC

Xét theo các nghiên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng gần đây đã cho thấy các đáp ứng dược lý khác nhau của tinh dầu trong hệ thần kinh dẫn đến tác dụng giải lo âu, chống trầm cảm, an thần và chống co giật. Trên thực tế, nhiều mô hình thực nghiệm trên động vật đã minh chứng cho việc tham gia của tinh dầu vào phương thức hoạt động của nhiều hệ thống dẫn truyền thần kinh, dẫn đến những tác động sinh lý có thể đo lường được trong não. Ngoài ra, một số thử nghiệm lâm sàng đã chứng minh ảnh hưởng của tinh dầu đến các thông số sinh lý như huyết áp, nhịp tim, nhịp hô hấp, thành phần sóng não và nồng độ cortisol trong huyết thanh đồng thời cùng với các tác động tâm lý. Tuy ngày càng có nhiều bằng chứng về tác dụng có thể đo lường được của tinh dầu đối với não động vật, nhưng vẫn cần nhiều nghiên cứu lâm sàng hơn để xác nhận ảnh hưởng của chúng đối với hệ thần kinh trung ương trên cơ thể người. Việc này giúp phát triển các loại thuốc làm từ tinh dầu để điều trị các bệnh về tâm thần như trầm cảm, lo lắng và suy giảm trí nhớ [30],[31]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về cơ chế tác dụng của tinh dầu lên hệ thần kinh trung ương cũng như mối liên quan giữa hệ thần kinh trung ương với hệ hô hấp cũng được đề xuất, bàn luận [32].

Các chất ức chế MAO có chức năng ngăn chặn sự oxy hóa MAO nhằm tránh sự phá vỡ các chất dẫn truyền thần kinh từ não như norepinephrin, serotonin, dopamin và tyramin. Việc này đã hạn chế sự phân hủy các chất dẫn truyền thần kinh này, giúp làm tăng nồng độ của chúng và cho phép chúng tiếp tục tác động đến các tế bào bị ảnh hưởng bởi trầm cảm [33]. Về khía cạnh ức chế enzyme MAO bởi tinh dầu, có rất ít các nghiên cứu được công bố [34],[35]. Còn về tác dụng ức chế MAO của tinh dầu chùa dù thì chưa có nghiên cứu nào được công bố. Kết quả chúng tôi thu được cho thấy tinh dầu chùa dù có thể hiện khả năng ức chế enzyme MAO-B và có xu hướng hỗ trợ tác dụng

3.4.2. Kết quả về tác dụng ức chế MAO của tinh dầu trên mô hình TLC:

Các vùng ức chế MAO xuất hiện dưới bước sóng quan sát 366 nm. Kết quả được trình bày trong hình dưới đây.

chống trầm cảm. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu về các đơn chất được cho là có tiềm năng điều chỉnh hoạt động của MAO và cũng có trong tinh dầu chùa dù như *o*-cymen và γ -terpinen [36], hay 1,8-cineol và α -pinen [37]. Do đó, các kết quả này gợi ý một phần triển vọng chống trầm cảm của tinh dầu chùa dù.

4. Kết luận

Tác dụng sinh học *in vitro* của tinh dầu chùa dù thu hái tại Sìn Hồ (Lai Châu) lần đầu tiên được công bố. Kết quả sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa cho thấy tinh dầu chùa dù mức hoạt động tương đối tốt trên hai mô hình với ABTS và DPPH. Với ABTS và mức nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, tác dụng thu dọn gốc tự do đạt 52,75% ($\text{IC}_{50} = 70,13 \pm 12,97 \mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên tác dụng này chỉ đạt tỷ lệ 25,15% với DPPH ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Về tác dụng hướng thần, tinh dầu chùa dù cho thấy khả năng ức chế tốt enzyme AChE với $\text{IC}_{50} = 0,59 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$. Trong khi đó, các kết quả thực nghiệm trên các enzyme dòng MAO theo phương pháp TLC cho thấy tinh dầu chùa dù có khuynh hướng ức chế tốt MAO-B. Ngoài ra, tinh dầu thể hiện tác dụng kháng khuẩn trên trực khuẩn mủ xanh ở nồng độ MIC = 100 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả định tính trên GC-MS, thành phần hóa học chính của tinh dầu là 1,8-cineol (77,13%). Ngoài ra có *o*-cymen (5,05%), cumen (3,45%) và β -pinen (2,52%). Hàm lượng tinh dầu theo phương pháp cất lôi cuốn với hơi nước là 0,96%. Bên cạnh đó, hàm lượng tinh dầu giảm dần trong quá trình phơi sấy mẫu (từ 1,56% về 0,96%), trong khi tỷ lệ hàm lượng 1,8-cineol lại tăng lên trong tinh dầu (từ 46,72% đến 77,13%).

Lời cảm ơn: Trân trọng cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Lai Châu đã cấp kinh phí trong khuôn khổ Đề tài "Nghiên cứu bảo tồn các loài cây thuốc tím và phát triển sản phẩm tẩm thảo dược của đồng bào dân tộc Dao Khâu, huyện Sìn Hồ, tỉnh Lai Châu", mã số 436/DTYDLC.05/20.

1. Ninh Thị Phíp, Nguyễn Tất Cảnh, Trần Văn Ôn (2009), Đánh giá đa dạng nguồn gen cây thuốc tằm của người Dao đỏ tại Sa Pa (Lào Cai), *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7(4), 434-442.
2. Viện Dược liệu (2020-2024), *Báo cáo kết quả Đề tài: "Nghiên cứu bảo tồn các loài cây thuốc tằm và phát triển sản phẩm tằm thảo dược của đồng bào dân tộc Dao Khâu huyện Sơn Hồ, tỉnh Lai Châu"*. Mã số "436/ĐTYDLC.05/20".
3. National Institute of Materia Medica (1999), In *Selected Medicinal Plants in Vietnam, Vol. 1, Science and Technology Publishing House, Hanoi*, 319-324.
4. Zhang Q. Z., Pu C. X., Sun J. (2008), *Pharmaceutical study on herba Elsholtzia penduliflora*, *Yunnan journal of Traditional Chinese Medicine and Material Medica*, 9, p20-23.
5. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (Tập 1)*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Hoang T. D. H., Le T. K. V., Do T. H. (2022), Triterpene glycosides from the aerial parts of *Elsholtzia penduliflora* W. W. Smith and their cytotoxic activity, *Fitoterapia*, 162, Art. no. 105264, doi: 10.1016/j.fitote.2022.105264.
7. Zhang L., Yang L., Li R. T., Yu F., Zhong J. (2022), A new prenylated 3-benzoxepin derivative with anti-influenza A virus activity from *Elsholtzia penduliflora*, *Natural Product Research*, 36(3), 719-725.
8. Adams (1995), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Illinois, USA, 5-115.
9. Zhou W., Zhu G., Yang S. (1990), Essential oils of *Elsholtzia penduliflora*, *Chinese Pharmaceutical journal*, 25(2), 79-80.
10. Lesueur D., Bighelli A., Tam N. T., Than N. V., Dung T. K., Casanova J. (2007), Combined analysis by GC (RI), GC/MS and ^{13}C NMR spectroscopy of *Elsholtzia blanda*, *E. penduliflora* and *E. winitiana* essential oils, *Natural Product Communications*, 2(8), 857-861.
11. Hoàng Thị Diệu Hương, Lê Thị Kim Vân, Nguyễn Văn Chính, Đỗ Thị Hà (2021), Thành phần hóa học của tinh dầu và phân đoạn n-hexan phân trên mặt đất chùa dù, *Tạp chí Dược liệu*, 26(6), 282-287.
12. Baser H. C. K., Buchbauer G. (2010), *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, CRC Press, by Taylor and Francis Group, LLC.
13. Dobetsberger C. and Buchbauer G. (2011), Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review, *Flavour Fragrance Journal*, 26, 300-316.
14. Guo Z., Liu Z., Wang X., Liu W., Jiang R., Cheng R., She G. (2012), Elsholtzia: phytochemistry and biological activities, *Chemistry Central Journal*, 6(1), 147.
15. Korolyuk E. A., König W., Tkachev A. V. (2002), Composition of essential oil of *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl. from the Novosibirsk region -Russia, *Khimiya Rastitel'no go Syr'ya*, 1C, 31-36.
16. Dung N. X., Hac L. V., Hai L. H., Leclercq A. (1996), Composition of the essential oils from the aerial parts of *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland. from Vietnam, *Journal of Essential Oil Research*, 8, 107-109.
17. Liu A. L., Lee S. M. Y., Wang Y. T., Du G. H. (2007), Elsholtzia: review traditional uses, chemistry and pharmacology, *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 16, 73-78.
18. De Figueiredo F. R. S. D. N., Monteiro A. B., De Menezes, Sales V. D. S., Nascimento E. D., Rodrigues C. K. D. S., Primo A. J. B., Cruz L. D., Amaro E. D. N., Delmondes G. D. A., J. Nóbrega L. D. O. S., Lopesa M. J., Costa J. G. M. D., Feliped C. F. B., Kerntopf M. R. (2019), Effects of the Hyptis martiusii Benth. leaf essential oil and 1,8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice, *Food and Chemical Toxicology*, 133, Art. no. 110802, doi: 10.1016/j.fct.2019.110802.
19. Pisoschi A. M., Pop A., Cimpeanu C., Predoi G. (2016), Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Art. no. 9130976, doi: 10.1155/2016/9130976.
20. Radulović N. S., Randjelović N., Stojanović M., Blagojević D., Stojanović-Radić Z. Z., Ilić I. R., Djordjević V. B. (2013), Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of Artemisia annua L. volatiles, *Food and Chemical Toxicology*, 58, 37-49.
21. Ania O., Arranz J. C. E., Beaven M., Renato R., Yordania M. G., Miladis I. C., Maury G. L., Macedo M. B., Cos, Tavares J. F., Silva M. S. D. (2017), Bioassay-guided-in vitro study of the antimicrobial and cytotoxic properties of the leaves from *Excoecaria lucida* Sw., *Pharmacognosy Research*, 9(4), 396-400.
22. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. (J.R.), Featherstone R. M. (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
23. Liang J. B., Yang Z. D., Shu Z. M., Yu C. C. (2014), A rapid thin-layer chromatography bioautographic method for detecting the monoamine oxidase inhibitors in plants, *Natural Products Research*, 28(17), p1318-1321.
24. Wanda J. K., John J. S., Neal R. C. (1999), Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease, *Annals of Pharmacotherapy*, 33(4), 441.
25. Phrompittayarat W., Hongratanaworakit T., Tadtong S., Sareedenchai V., Ingkaninan K. (2014), *Survey of acetylcholinesterase inhibitory activity in essential oil derived from aromatic plants*, *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 4(1), 1-5.
26. Hung N. H., Quan M., Satyal, Dai D. N., Hoa V. V., Huy N. G., Giang L. D., Ha N. T., Huong L. T., Hien V. T., Setzer W. N. (2022), Acetylcholinesterase inhibitory activities of essential oils from Vietnamese traditional medicinal plants, *Molecules* 27, 7092.
27. An F., Bai Y., Xuan X., Bian M., Zhang G., Wei C. (2022), 1,8-Cineole ameliorates advanced glycation end products-induced Alzheimer's disease-like pathology in vitro and in vivo, *Molecules*, 27(12), 3913.
28. Kaufmann D., Dogra A.K., Wink M. (2011), *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1368.
29. Paul K., Ganguly U., Chakrabarti S., Bhattacharjee (2020), *NeuroMolecular Medicine*, 22, 150.
30. Lizarraga-Valderrama L. R. (2021), Effects of essential oils on central nervous system: Focus on mental health, *Phytotherapy Research*, 35, 657-679.
31. Sattayakhom A., Wichit S., Koomhin (2023), The effects of essential oils on the nervous system: A scoping review, *Molecules*, 28, Art. no. 3771, doi:10.3390/molecules28093771.
32. Fung T. K. H., Lau B. W. M., Ngai S. C., Tsang H. W. H. (2021), Therapeutic effect and mechanisms of essential oils in mood disorders: Interaction between the nervous and respiratory systems, *International Journal of Molecular Sciences* 22, Art. no. 4844, doi: 10.3390/ijms22094844.
33. Baker G. B., Coutts R. T., McKenna K. F., Sherry-McKenna R. L. (1992), Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review, *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 17(5), 206-14.
34. Klein-Júnior L. C., Recalde-Gil M. A., Passos C. D. S., Bitencourt F. G. D., Salton J., Danielli L. J., Bordignon S. A. D. L., Henriques A. T. (2016), The Monoamine oxidase inhibitory activity of essential oils obtained from peperomia Ruiz. & Pav. (Piperaceae) species and their chemical composition, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1762-1768.
35. Klein-Junior L. C., Passosa C. D. S., Souza T. J. T. D., Bitencourt F. G. D., Salton J., Bordignon S. A. D. L., Henriques A. T. (2016), The monoamine oxidase inhibitory activity of essential oils obtained from *Eryngium* species and their chemical composition, *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1071-1076.
36. Fukumoto S., Sawasaki E., Okuyama S., Miyake Y., Yokogoshi H. (2006), Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices, *Nutritional neuroscience*, 9, 73-80.
37. Catalano R., Procopio F., Chavarria D., Benfeito S., Alcaro S., Borges F., Ortuso F. (2022), Molecular modeling and experimental evaluation of non-chiral components of bergamot essential oil with inhibitory activity against human monoamine oxidases, *Molecules* 27, 2467, doi: 10.3390/molecules27082467.