

CHIẾT XUẤT, TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AZADIRACHTIN TRONG HẠT XOAN CHỊU HẠN (*Azadirachta indica* A. Juss)

Vũ Văn Độ, Nguyễn Tiến Thắng
Viện Sinh học Nhiệt đới Tp. HCM

(Bài nhận ngày 05 tháng 10 năm 2004, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 03 tháng 12 năm 2004)

TÓM TẮT: Quy trình chiết xuất và tinh sạch azadirachtin từ nhân hạt xoan chịu hạn 4 năm tuổi trồng tại Ninh Thuận gồm 2 giai đoạn. Trước hết tiến hành chiết thô azadirachtin trong methanol và tách mỡ bằng n-hexan. Cặn thu được sau khi cô quay chân không được tinh sạch tiếp bằng sắc ký cột lỏng cao áp. Kết quả chụp phổ hồng ngoại IR và tinh sạch trên cột HPLC cho thấy azadirachtin nhận được có độ tinh sạch là 95%.

Hàm lượng azadirachtin được xác định trên cột Hypercil BDS-C₁₈, 5 μ m, 125 x 4 mm, pha ngược thổi bằng MeOH/H₂O với tốc độ thổi cột 0,5ml/phút, đo độ hấp phụ của azadirachtin ở bước sóng $\lambda=217$ nm. Hàm lượng azadirachtin chiết bằng ethanol và methanol tương ứng là 3472,48 mg/kg và 3879,20 mg/kg nhân hạt xoan chịu hạn.

Từ khóa: Azadirachtin, xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. Juss), HPLC, phổ IR.

MỞ ĐẦU

Một trong những chất chính có tác động xua đuổi sâu bọ ở cây xoan chịu hạn Ấn Độ (*Azadirachta indica* A. Juss) là azadirachtin. Nó có tác động xua đuổi và gây ngán ăn đối với nhiều loại côn trùng gây bệnh cũng như một số loại tuyến trùng, sâu hại. Ngoài ra azadirachtin còn có tác động ức chế côn trùng phát triển và sinh sản thông qua việc kiểm soát và làm thay đổi sự biến thái bình thường của côn trùng (2, 3).

Azadirachtin tập trung nhiều nhất ở hạt xoan chịu hạn. Trung bình 1 kg nhân (ở những cây đã trên 5 năm tuổi) chứa từ 2 g đến 4 g azadirachtin. Hàm lượng azadirachtin trong nhân hạt xoan chịu hạn biến động tùy thuộc vào nguồn gốc, xuất xứ, điều kiện canh tác, khí hậu và thời điểm thu hoạch quả (3,4,5).

Việc chiết tách, tinh sạch và xác định hàm lượng azadirachtin trong hạt xoan chịu hạn là cơ sở để nghiên cứu tác dụng đa dạng của nó lên sâu bọ gây hại và khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố ngoại cảnh đến hàm lượng azadirachtin trong hạt xoan chịu hạn.

Vì mục đích trên các tác giả đã tiến hành nghiên cứu chiết xuất, tinh sạch và xác định hàm lượng azadirachtin trong hạt cây xoan chịu hạn trồng tại Ninh Thuận, một nguồn nguyên liệu quý để sản xuất thuốc trừ sâu thảo mộc và cải tạo môi trường những vùng đất khô cằn ở Việt nam.

PHƯƠNG PHÁP

Hạt xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. Juss) thu được từ cây xoan 4 năm tuổi trồng ở Ninh Thuận được sử dụng làm nguyên liệu để chiết xuất, tinh sạch và xác định hàm lượng azadirachtin. Thu hoạch quả xoan chịu hạn tốt nhất khi nó mới chuyển sang màu vàng hay vàng xanh, lúc này hàm lượng azadirachtin cao nhất. Nếu để quả đã chín rụng xuống đất mới thu hoạch thì hàm lượng azadirachtin sẽ bị giảm (3,4). Chiết xuất, tinh sạch azadirachtin bằng sắc ký cột (flash chromatography) với chất nhồi là silicagel 60 (0.040 - 0.063 μ m) của hãng Merck với hai loại cột có kích thước: ϕ 29 mm x 50 cm; ϕ 15 mm x 50 cm. Các tiểu phần chứa azadirachtin thu được qua chạy cột được phát hiện bằng sắc ký bản mỏng với chất phun hiện màu: 1g vanillin pha trong 100 ml axit sulfuric đậm đặc, vết azadirachtin có màu nâu. Hàm lượng azadirachtin được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC).

KẾT QUẢ

1. Chiết xuất, tinh sạch azadirachtin từ nhân hạt xoan chịu hạn bằng sắc ký cột

1.1 Chiết thô bằng dung môi và loại mỡ

Cân 250 g nhân hạt xoan chịu hạn đã tách vỏ, nghiền và rây qua rây 0,5 mm để thu bột nhân xoan chịu hạn.

a. *Chiết với dung môi n-hexan để loại mỡ*: Ngâm kiệt bột nhân xoan chịu hạn bằng cách lắc trong n-hexan 6 lần với lượng dung môi và thời gian ngâm như sau: lần 1,2 và 3 ngâm, lắc trong 500 ml n-hexan trong 3 giờ, lần 4 và 5 ngâm, lắc trong 300 ml n-hexan trong 2 giờ và lần cuối ngâm, lắc trong 200 ml n-hexan trong 1 giờ (1).

b. *Chiết với methanol*: Bã sau khi chiết với n-hexan được chiết tiếp với methanol theo quy trình sau: lần 1 và 2 ngâm, lắc trong 500 ml methanol trong 3 giờ, lần 3 và 4 ngâm, lắc trong 300 ml methanol trong 2 giờ và lần cuối ngâm, lắc trong 200 ml methanol trong 1 giờ.

Gộp các phần dịch chiết methanol và cô quay trong chân không ở 40° C còn khoảng 50 ml dịch màu vàng. Chiết tiếp với n-hexan để loại dầu béo trong mẫu. Sau đó gộp với dịch chiết n-hexan ban đầu, cô tiếp thu được 89,5 g dầu (35,8%).

Thêm 20 ml nước cất vào cặn methanol thu được và chiết 5 lần với 50 ml ethylacetat (EtOAc), làm khan dịch chiết bằng Na₂SO₄. Loại EtOAc trong chân không ở 40°C, thu được 4,6 g chất rắn màu vàng sậm (1,84%).

1.2 Tinh sạch trên sắc ký cột

Nhồi 120 g silicagel 60 (0.040-0.063 μm) của hãng Merck vào cột φ 29 mm, dài 50 cm. Hòa tan 4,6 g mẫu thu được ở trên với khoảng 5ml EtOAc, thêm 3-5 g silicagel, loại dung môi và đưa vào cột. Dung môi thổi mẫu theo thứ tự tỷ lệ EtOAc / n-hexan tăng từ 0 đến 100%.

Lấy mỗi phân đoạn khoảng 100 ml. Tiến hành sắc ký bản mỏng để nhận dạng chất trên giấy F254 của hãng Merck. Vết azadirachtin hiện màu nâu trong thuốc hiện hình. Hỗn hợp dung môi chạy sắc ký bản mỏng theo tỷ lệ: n-hexan/acetone = 3/2, vết azadirachtin có giá trị R_f là 0,16, ở tỷ lệ n-hexan/acetone = 1/1, vết azadirachtin có giá trị R_f là 0,32.

Thu azadirachtin từ phân đoạn 16 đến 27, gom lại, cô quay chân không thu được 1,6 g và đưa tiếp vào cột 2 với kích thước φ 15 mm x 50 cm tương ứng với lượng silicagel nhồi cột là 100 g. Rửa thổi cột bằng 1.800 ml hỗn hợp dung môi ether petroleum/acetone, tỷ lệ 3/2, thu mỗi phân đoạn 20 ml. Azadirachtin có mặt trong phân đoạn từ 16 đến 38. Gom dịch và tiến hành cô quay chân không, thu được 843,20 mg azadirachtin, đạt hiệu suất chiết tách 0,33% tương ứng với 3372,80 mg/kg nhân hạt xoan chịu hạn.

2. Phân tích azadirachtin trên phổ IR và HPLC

Phân tích trên phổ HPLC bằng cách cho chạy sắc ký trên cột Hypercil BDS C₁₈ với pha động MeOH/H₂O, detector đo ở 217 nm với tốc độ dòng 0,6 ml/ phút. Thời gian lưu là 1,274 phút. Độ sạch của azadirachtin đạt gần 95% (Hình 1).

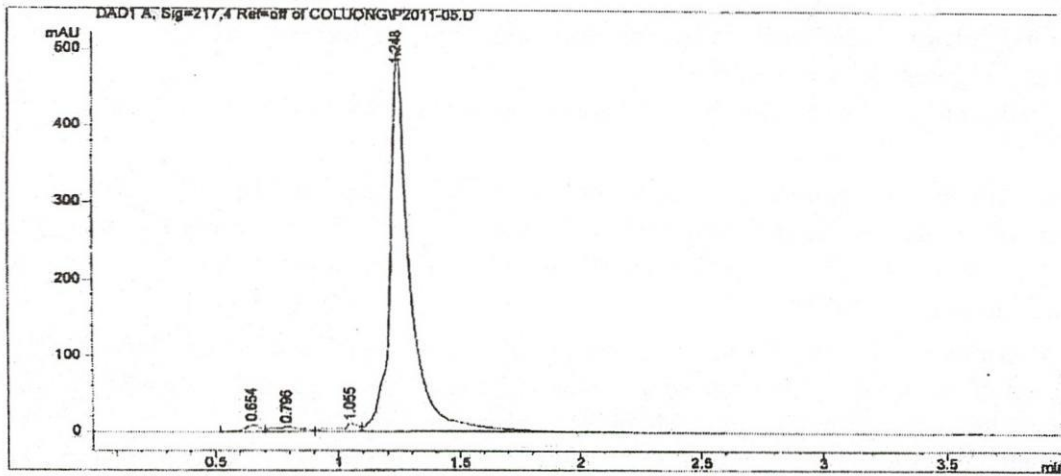
Phổ IR: VKBr max (cm⁻¹):

+ **Azadirachtin chuẩn:** 3442(OH), 2958(CH₂,CH₃), 1738(ester), 1439,1377,1269 (acetat), 1046(vòng furan) - (Hình 2).

+ **Azadirachtin chiết được:** 3454(OH), 2958(CH₂,CH₃), 1739(ester), 1441,1377,1268 (acetat), 1046(furan) - (Hình 3).

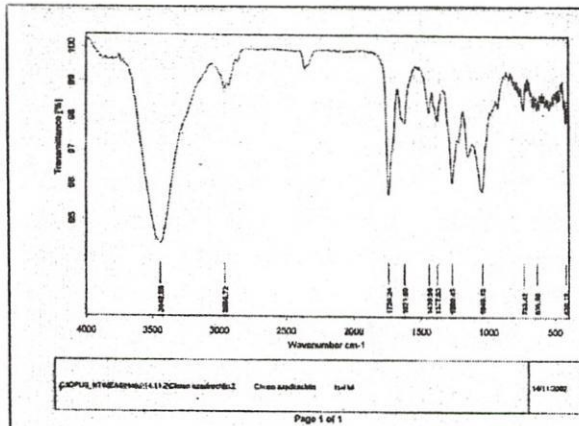
Qua phân tích phổ IR có thể kết luận chất chiết từ hạt xoan chịu hạn là azadirachtin với hàm lượng 0,33% trong hạt đã tách vỏ.

Phân tích Azadirachtin

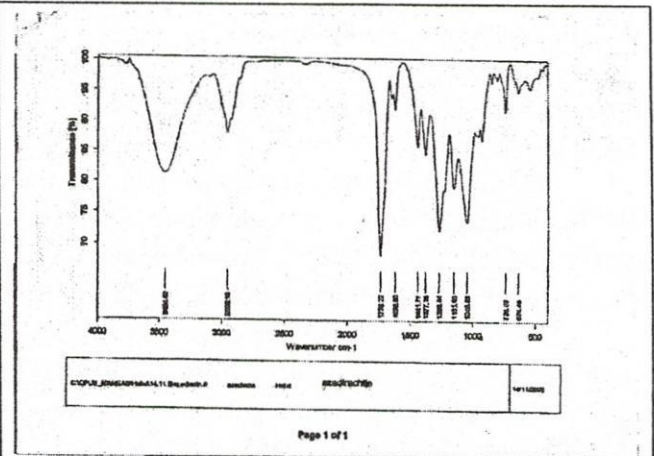


Area Percent Report

Hình 1. Xác định độ tinh sạch azadirachtin trên HPLC



Hình 2. Sắc ký đồ phổ hồng ngoại của azadirachtin chuẩn (hãng Sigma)



Hình 3. Sắc ký đồ phổ hồng ngoại của azadirachtin chiết xuất từ nhân hạt xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. juss) trồng tại Ninh Thuận, Việt Nam.

3. Định lượng azadirachtin trên HPLC

Tiến hành định lượng azadirachtin trên máy sắc kí lỏng hiệu xuất cao (HPLC) Hewlett Packard 1090, series 1-liquid chromatography với các thông số sau:

- Nhựa Hypercil DBS-C₁₈, 5 μm, kích thước cột 4 mm x 125mm
- Lượng mẫu bơm vào cột: 0,5 μl.
- Detector: λ = 217 nm.
- Tốc độ rửa cột: 0,5 ml/ phút
- Dung môi rửa cột: MeOH/H₂O - 80/ 20.

So sánh với đồ thị nồng độ chuẩn azadirachtin của hãng Sigma.

4. Quy trình chiết nhanh mẫu để phân tích azadirachtin trên HPLC

Mẫu được chiết nhanh bằng ethanol hoặc methanol theo các bước sau: Trộn 20 g bột nhân hạt xoan chịu hạn trong 200ml ethanol hoặc methanol, lắc 30 phút trên máy lắc. Sau đó lọc qua hút chân không, bã còn lại được chiết tiếp 5 lần với lượng dung môi như trên. Các phần dịch chiết được gom

lại và cô quay chân không cho đến khô kiệt. Cặn được loại mỡ bằng n-hexan trên phễu chiết, khoảng từ 3 đến 5 lần, mỗi lần với 100 ml n-hexan và cô tiếp trên bếp cách thủy. Cân trọng lượng và hòa cặn với methanol, lọc qua lọc 0,45 μm . Dịch lọc được dùng để định lượng azadirachtin trên HPLC. Kết quả nhận được như sau:

- Hàm lượng azadirachtin tách bằng ethanol là 3472,48 mg/kg nhân hạt
- Hàm lượng azadirachtin tách bằng methanol là 3879,20mg/kg nhân hạt

Phương pháp tách nhanh azadirachtin bằng methanol cho kết quả cao hơn 10,5% so với tách bằng ethanol là phù hợp với các kết quả nghiên cứu đã công bố ở nước ngoài. Methanol được cho là dung môi chiết xuất azadirachtin tốt nhất. Hàm lượng azadirachtin có trong nhân hạt xoan chịu hạn trồng ở Ninh Thuận còn thấp, có thể là do hạt xoan chịu hạn còn non, mới khoảng 4 năm tuổi. Theo kết quả nghiên cứu của Viện nghiên cứu thực vật Ấn Độ, tuổi khai thác hạt nên bắt đầu từ cây 5 năm tuổi trở lên để đạt được năng suất và chất lượng ổn định (khoảng 3500-4500 mg/kg nhân hạt). Thời gian bảo quản mẫu cũng được cho là một yếu tố có ảnh hưởng đến hàm lượng azadirachtin có trong nhân hạt xoan chịu hạn.

KẾT LUẬN

1. Đã chiết tách và tinh sạch azadirachtin từ nhân hạt xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. Juss), thu được azadirachtin với hiệu suất chiết xuất là 0,33% và độ tinh sạch là 95%.
2. Đã hoàn chỉnh phương pháp xác định hàm lượng azadirachtin trên hệ sắc kí lỏng hiệu suất cao (HPLC).

EXTRACTION, PURIFICATION AND DETERMINATION AZADIRACHTIN CONTENT IN NEEM SEED KERNEL (*Azadirachta indica* A. Juss)

Vu Van Do, Nguyen Tien Thang
Institute of Tropical Biology

ABSTRACT: The extraction and purification of azadirachtin from 4 years old neem seed kernel planted at Ninh Thuan province consists of two steps. The first one was the crude extraction azadirachtin with methanol and isolation lipid by n-hexan. The residue was concentrated with rotary vacuum evaporator and purified on flash column chromatography. The results on IR and high performace liquid chromatography (HPLC) showed that the compound received was azadirachtin with 95% purity.

Azadirachtin contents was determined on Hypercil BDS- C18, 5 μm , 125 x 4 mm, column, reversed phase, eluting with MeOH/ H₂O, flow rate: 0,5 ml/minute, detected at $\lambda = 217$ nm. The results received as follow: Azadirachtin contents extracted with ethanol and methanol were: 3472,48 mg/kg and 3879,20mg/kg neem seed, respectively.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Dương Anh Tuấn và cộng sự (2001). Azadirachtin - hoạt chất gây ngán ăn mạnh đối với sâu khoang được phân lập từ hạt neem (*Azadirachta indica* họ meliaceae) di thực vào Việt Nam. *Tuyển tập Hội nghị khoa học và công nghệ hoá hữu cơ toàn quốc lần thứ 2*.
- [2]. Nguyễn Tiến Thắng và cộng sự (2003). Nghiên cứu và phát triển cây xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. juss) tại Việt Nam. Báo cáo nghiệm thu đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ cấp nhà nước theo nghị định thư.

- [3]. IR. Dennis Dearth (1992). *Neem, a tree for solving global problems*. National Academy press, Washington, D.C..
- [4]. H.P.M. Gunasena, B. Marambe (1998). *Neem in Srilanka, a monograph*. A Publication of University of Peradeniya, Oxford Forestry Institute(UK) Forestry Research Link.
- [5]. Otmar Schaaf, Andrew P. Jarvis, S, Andrew van de Esch, Germina Giagnacovo and Neil J. Oldham (2000). Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica* A.Juss) by high- performance liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol 886(1-2), pp 89-97.