

AZADIRACTIN - HOẠT CHẤT GÂY NGÁN ĂN MẠNH ĐỐI VỚI SÂU KHOANG ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ HẠT NEEM (AZADIRACTHA INDICA HỌ MELIACEAE) DI THỰC VÀO VIỆT NAM

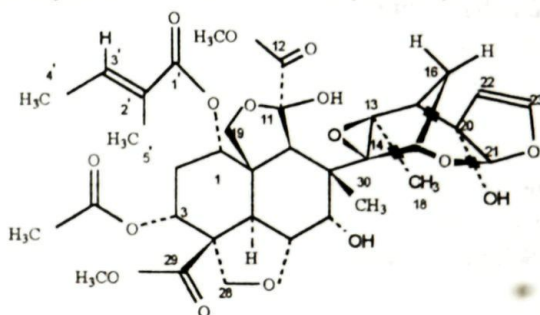
¹Dương Anh Tuấn, ¹Nguyễn Minh Phương,
¹Dương Ngọc Tú, ¹Lưu Tham Muu, ¹Nguyễn Văn Giáp, ²Nguyễn Duy Trang
1: Phòng Hoá Bảo vệ Thực vật - Viện Hoá Học - Trung tâm KHTN & CNQG
2: Viện Bảo vệ Thực vật, Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn

Abstracts: *Azadirachta indica* (Meliaceae) has been removed and cultivated to the South of Vietnam. From the seed of this plant, an active component - azadirachtin - was isolated. Its structure was determined by the spectral methods. Azadirachtin was tested and showed highly antifeedant activity against *Spodoptera litura* in laboratory.

I. MỞ ĐẦU

Cây neem còn gọi là cây sầu đâu [1] (*azadirachta indica*, họ Meliaceae) có xuất xứ từ Ấn độ, nhưng nay cây này được phân bố rộng khắp châu Á, châu Phi, châu Úc, trung và nam Mỹ [2]. Mọi bộ phận của cây đều đắng nhưng hạt là đắng nhất. Từ rất lâu cây neem đã được sử dụng làm thuốc trừ sâu ở nhiều nước trên thế giới như Ấn độ, Trung Quốc và Nhật Bản. Ngoài ra cây neem còn được dùng làm thuốc chống sốt rét, trị exzema. Dầu hạt còn dùng trị giun và xoa trị thấp khớp, ghẻ và các bệnh ngoài da [3]. Tuy nhiên tác dụng trừ sâu của neem là lớn nhất. Nông dân ấn độ dùng lá và quả để bảo vệ mùa màng, dùng lá khô trộn lẫn với hạt để chống sâu mọt.

Những năm gần đây, các nhà khoa học đã xác định những hợp chất chính của "chất đắng" là tetranortriterpenoid, công thức phân tử $C_{35}H_{44}O_{16}$ (limonoid) trong đó hoạt chất quan trọng nhất, có hoạt tính mạnh nhất là azadirachtin (Hình 1).



Azadirachtin

Theo các nhà khoa học, hợp chất này có tác dụng trừ sâu mạnh vì chúng vừa có độc tính diệt trừ (S.A Rudwandki, 1980 [4]) vừa gây ngán ăn (H.Rembold, 1980 [5]), vừa có tác dụng làm bất lực và ức chế sinh trưởng (F.A Masous), 1983 [6]. Từ 1980, đã có 8 hội nghị quốc gia và quốc tế ở CHLB Đức, Ấn độ, Philippin, Kenya và Úc khẳng định giá trị của cây neem [6].

Gần đây do nhận thấy được những giá trị lớn về Bảo vệ thực vật (BVTV), cây neem đã được di thực vào nước ta và trồng ở Ninh Thuận và Bình Thuận. Hiện nay chúng ta đã gieo trồng được khoảng vài chục héc ta và cây đã cho quả.

Ở nước ta, cho tới nay chưa có công trình nào nghiên cứu về hoá thực vật, về khả năng sử dụng của cây neem Ấn độ di thực này để làm thuốc bảo vệ thực vật. Để tiến tới khẳng định giá trị cây neem tại Việt Nam và ứng dụng của nó vào việc tạo chế phẩm trừ sâu thảo mộc phục vụ nông nghiệp, nhóm nghiên cứu chúng tôi tiến hành nghiên cứu chiết xuất các hoạt chất từ hạt neem và thăm dò thử tác dụng gây ngán ăn và diệt trừ sâu hại của nó.

II. Kết quả và thảo luận

A. Phương pháp chiết xuất và xác định cấu trúc.

Hạt neem sau khi sấy khô, nghiền nhỏ, được chiết siêu âm bằng n-hexan để thu dầu. Sau đó chiết tiếp bằng methanol. Cất loại methanol, hoà tan lại trong ethyl axetat và nước, cất loại ethyl axetat thu được một cặn rắn màu vàng nâu, giàu azadirachtin. Cặn này được tách nhiều lần bằng sắc ký cột nhanh (flash chromatography) trên silicagel (Merck) với các hệ dung môi rửa giải là n-hexan và ethyl axetat với hàm lượng ethyl axetat tăng dần cũng như hệ dung môi n-hexan/ acetone, thu được một hoạt chất tinh khiết, có độ sạch là 92%, phân tích theo HPLC.

Hợp chất này được so sánh bằng hai phương pháp: TLC và HPLC với azadirachtin chuẩn của hãng Sigma, CHLB Đức, có độ tinh khiết là 95%. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng Silicagel 60, F₂₅₄ của hãng Merck, với thuốc hiện là vanilin/ H₂SO₄. Kết quả cho một vết đồng nhất màu nâu với R_f: 0,47 (n-hexan: acetone = 6:4).

Điểm chảy: 150° – 155°C (n-hexan/acetone) (Tài liệu: 154° – 158°C).

Phân tích bằng phương pháp HPLC, cột ngược pha Hypersil BDS, so sánh hoạt chất đã phân lập với azadirachtin trong cùng một điều kiện: pha động MeOH:H₂O = 75:25 [v/v], detector ở 217 nm, tỷ lệ dòng 1,0 ml/phút thì thấy 2 hợp chất trên trùng khít nhau và có cùng thời gian lưu bằng 1,37 phút. Hai phương pháp trên gợi ý chất đã phân lập là azadirachtin.

Trong phổ IR xuất hiện một giải hấp phụ tại $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3448 cm⁻¹ cho thấy trong phân tử có nhóm OH. Tại 1737 cm⁻¹ có 1 giải hấp thụ mạnh của nhóm cacbonyl este. Kết hợp với giải hấp thụ tại 1268 cm⁻¹ gợi ý có nhóm axetat, giải hấp thụ tại 875 cm⁻¹ có vòng furan.

-Kết quả đo phổ ¹H- và ¹³C-NMR được thể hiện đầy đủ trong bảng I. Phổ DEPT cho thấy trong phân tử có 7 nhóm methyl, 4 nhóm methylen, 12 nhóm methin và 12 cacbon bậc 4. Trong bảng I, bốn cacbon đầu tiên với các tín hiệu δ từ 173.7 đến 166.6 là những cacbonyl este ở các vị trí 29, 12, Ac và 1'. Hai nhóm methoxy của 2 nhóm este cho các singulet trong phổ ¹H-NMR tại δ_{H} 3.79 và 3.68. Tại δ_{H} 1.78 (δ_{C} : 14.6) với hằng số tương tác J=6.75 cho thấy có một duplet của nhóm methyl và tại δ_{H} 6.92 có một quatet với J = 6.75 là tín hiệu của một proton olefinic (δ_{C} : 137.9). Trong phổ hai chiều HH-COSY nhìn rõ tín hiệu chéo của 2 proton này, chứng tỏ chúng tương tác với nhau. Đó là H-3' và 3H-4' của [tigloyl] este (xem công thức).

Trong đó tín hiệu δ_{C} : 170.0 với δ_{H} : 1.94 của nhóm methyl là của nhóm axetat ở vị trí 3. Điều này trùng hợp với đỉnh 1268 cm⁻¹ trong phổ IR.

Độ chuyển dịch hoá học δ_{C} của C-2' và C-3' cũng như của C-22 và C-23 (147.5-107.7) mang tính sp² của nối đôi. Hai duplet tại trường thấp δ_{H} 6,46 với J = 2,82 (δ_{C} = 147,5 và δ_{H} 5,05 (J = 2,82) (δ_{C} = 107,7) là hai proton olefin. Tương tác nhỏ của chúng (2.82) chứng tỏ hai proton này thuộc dị vòng.

Chúng có tương tác chéo trong phổ HH-COSY. Đó là vòng dihydrofuran của phần dihydrofuran acetal (fura [2,3b] pyran) của phân tử.

Trong bảng I những nguyên tử cacbon có số thứ tự từ 10 (δ_{C} : 104,5) cho tới 22 (δ_{C} : 53,1) đều liên kết với một nguyên tử oxy. Tín hiệu của các proton đính với những nguyên tử cacbon mang oxy đó đều xuất hiện ở trường thấp (δ_{H} : 4.74 – 3,61) (xem bảng I). Trong đó có 2 cặp duplet tại δ_{H} 4.15/3.64 (J=9.67) với δ_{C} : 69,5) cũng như δ_{H} 4.09/3.76 (J=9.40) với δ_{C} =73.4 có hiệu ứng mái nhà. Hiệu ứng này cùng với hằng số tương tác cao geminal cho thấy đó là 2 nhóm CH₂O trong hai vòng tetrahydrofuran gắn ở vị trí 4,6 và 9,10 của vòng A-B.

Bảng I: Số liệu NMR của azadirachtin đo trong CDCl₃

		⁽¹³ C) ^δ _{in} [δ] [ppm]	⁽¹³ C) ^δ _{iso} [ppm]	Vị trí	δ _{H in} [δ] [ppm]	δ _{H iso} [ppm]	J _{αα} (Hz)
1	C	173.4	173.7	29			
2	C	171.8	172.1	12			
3	C	169.6	170.0	C(=O)OCH ₃			
4	C	166.2	166.6	1'			
5	CH	147.0	147.5	23	6.43	6.46d	2.82
6	CH	137.6	137.9	3'	6.92	6.92q	6.75
7	C	128.6	129.0	2'			
8	CH	108.7	109.1	21	5.63	5.64s	
9	CH	107.4	107.7	22	5.02	5.05d	2.82
10	C	104.2	104.5	11			
11	C	86.	84.0	20			
12	CH	76.4	76.8	15	4.64	4.66d	3.28
13	CH	74.3	74.8	7	4.71	4.74	
14	CH	73.8	74.1	6	4.58	4.60dd	12.53/2.56
15	CH ₂	72.9	73.4	28	4.04/3.75	4.09/3.76d	9.40
16	CH	70.5	70.9	1	4.74	4.76	
17	C	70.0	70.3	14			
18	CH ₂	69.0	69.5	19	4.13/3.61	4.15d/3.64d	9.67
19	C	68.5	68.9	13			
20	CH	66.9	67.3	3	5.48	5.50s	
21	CH ₃	53.2	53.5	C(=O)OCH ₃	3.78	3.79s	
22	CH ₃	52.7	53.1	C(=O)OCH ₃	3.66	3.68s	
23	C	52.4	52.9	4			
24	C	50.1	50.5	10			
25	CH	48.5	49.0	17	2.36	2.37d	5.26
26	C	45.4	45.8	8			
27	CH	44.6	45.1	9	3.22	3.33	
28	CH	37.0	37.4	5	3.35	3.35	
29	CH ₂	29.7	30.1	2	2.32/2.22	2.32/2.25	
30	CH ₂	25.0	25.4	16	1.68/1.30	1.68/1.29m	
31	CH ₃	21.3	21.7	30	1.72	1.77s	
32	CH ₃	20.8	21.2	CH ₃ CO ₂	1.93	1.94s	
33	CH ₃	18.3	18.7	18	1.98	2.01s	
34	CH ₃	14.3	14.6	4'	1.77	1.78d	6.75
35	CH ₃	11.9	12.3	5'	1.83	1.85s	
	7-OH				3.09	2.85	
	11-OH				5.06	5.01s	
	20-OH				2.99	2.79s	

Các tín hiệu singlet trong phổ ¹H-NMR tại δ_H: 5.01; 2.85 và 2.79 là của 3 nhóm OH tại các vị trí 11, 7 và 20. Điều này cũng phù hợp với đỉnh 3448 cm⁻¹ trong phổ IR.

Các tương tác trực tiếp giữa cacbon và hydro trong các nhóm methin, methylen và methyl thể hiện đầy đủ trong phổ HMQC.

So sánh tất cả những dữ kiện đó, đặc biệt là phổ ¹H và ¹³C-NMR với tài liệu [8], cho phép kết luận chất lấy ra là azadirachtin với độ sạch là 92%. Sự đồng nhất này còn được khẳng định thêm bằng phương pháp HPLC.

Cho tới nay azadirachtin vẫn là chất trừ sâu thiên nhiên quan trọng nhất, được sử dụng rộng rãi ở Ấn Độ, Mỹ và các nước khác trên thế giới.

Về quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học Nugroho và cộng sự [9] đã chỉ ra rằng các nhóm OH trong phân tử đóng vai trò quan trọng vì chúng có thể lập cầu hydro với các receptor tự nhiên. Nếu axetyl hoá các nhóm OH thì hoạt tính sinh học giảm sút đáng kể.

B.Thử nghiệm tác dụng sinh học:

1.Phương pháp: Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp "chọn" của Caasi T.M. (1983) và "không chọn" của Mendel M.J. (1991). Đối tượng thử là sâu khoang (*Spodoptera litura*), một loại côn trùng ăn tạp hại rau.

Chúng tôi dùng một ống đồng tròn mỏng để đột lá su hào hoặc lá cải thành từng miếng có hình tròn đồng đều, có diện tích 2cm^2 . Dùng Micropipette hút $100\mu\text{l}$ dung dịch axeton có chứa lượng azadirachtin pha ở nồng độ 0,1% và 0,05%, rồi nhỏ đều lên bề mặt từng miếng lá đã chuẩn bị. Đối chứng chỉ nhỏ $100\mu\text{l}$ axeton không có azadirachtin. Tất cả các miếng lá đã xử lý đều được để axeton bay hơi hết rồi mới đặt vào hộp petri.

Mỗi nhắc lại được đặt 5 miếng lá có xử lý thuốc và 5 miếng lá đối chứng đặt xen kẽ nhau trong cùng một hộp petri. Dưới đáy tất cả các hộp petri đã được đặt sẵn một tờ giấy lọc vừa bằng đáy hộp có thấm nước (độ ẩm 100%) để giữ cho các miếng lá không bị khô héo. Sau đó mỗi hộp petri được thả 5 sâu non tuổi 4 vào giữa hộp để sâu tự tìm lấy thức ăn. Nhiệt độ trong phòng thí nghiệm: 25°C . Đối chứng đặt 10 miếng lá chỉ xử lý axeton.

Tiến hành theo dõi thí nghiệm sau 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 giờ và sau 24 giờ thì kết thúc thí nghiệm.

Các chỉ tiêu cần theo dõi sau đây:

- Trọng lượng của từng miếng lá (cân điện tử độ chính xác 1.10^{-4}) trước khi xử lý thuốc và sau khi thả sâu 24 giờ để tính chỉ số gây ngán ăn

Trọng lượng lá thí nghiệm sau 24 giờ (A)

- Tính % gây ngán ăn =
$$\frac{\text{Trọng lượng lá thí nghiệm sau 24 giờ (A)}}{\text{Trọng lượng lá đối chứng sau 24 giờ (B)}} \times 100$$

- Chỉ số ngán ăn (CSNA) =
$$100 - \frac{A}{B} \times 100$$

2.Kết quả thử nghiệm: Hoạt tính ngán ăn của azadirachtin đối với sâu khoang trong phòng thí nghiệm như sau:

-Azadirachtin ở liều lượng $15,6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ đạt chỉ số ngán ăn (CSNA) từ 80,365 đến 97,764, Chỉ số ngán ăn trung bình là 87,015.

-Azadirachtin ở liều lượng $7,89\mu\text{g}/\text{cm}^2$ đạt chỉ số ngán ăn từ 41,844 đến 96,477; Chỉ số ngán ăn trung bình đạt 71,540.

Số liệu trên cho thấy liều lượng giảm thì chỉ số ngán ăn cũng giảm.

IV.Phần Thực nghiệm

Phổ ^1H , ^{13}C và 2D-NMR được đo trên máy Bruker 400 và 100 MHz tại Viện nghiên cứu Tibotec, Vương quốc Bỉ. Tetramethylsilan (TMS) được dùng làm chất chuẩn trong phép đo ^1H -NMR. Độ chuyển dịch hoá học được tính theo ppm (δ) so với TMS, dung môi dùng là CDCl_3 , hằng số tương tác tính bằng Hz.

Phổ hồng ngoại FTIR được ghi dưới dạng màng mỏng KBr trên máy Zeiss-Zweistrahl Spectrometer IR-75, CHLB Đức tại Viện Hoá Học, Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia. Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC được đo trên máy LC-10A, hãng Shimadzu (Nhật Bản). Điểm nóng chảy đo trên máy HMK, Dresden, CHLB Đức.

Sắc ký bản mỏng phân tích được tiến hành trên bản mỏng nhôm silicagel Merck 60 F_{254} tráng sẵn, độ dày 0,2mm. Silicagel cỡ hạt 0.04 - 0.06mm được dùng cho sắc ký cột nhanh (Flash chromatography).

Xử lý mẫu thực vật và phương pháp chiết:

Hạt neem (được trồng ở Ninh Thuận và Bình Thuận) được TS. Nguyễn Duy Trang, Viện Bảo vệ thực vật cung cấp. Hạt được sấy khô ở 40°C - 45°C, sau đó được nghiền bằng máy nghiền có kích thước lỗ sàng 0,1 - 0,2mm.

200g bột neem đem chiết siêu âm ở nhiệt độ phòng bằng n-hexan trong 30 phút để loại dầu. Quá trình lặp lại 5-6 lần để loại kiệt dầu. cất loại n-hexan ở áp suất giảm thu 37,5g dầu $\approx$ 18,7%. Tiếp tục chiết bột neem bằng methanol như trên, cất loại dung môi thu được cặn sền sệt. Cặn này được phân bố với ethyl axetat và nước, tỷ lệ 2:1 để loại phần phân cực. Quá trình được lặp lại nhiều lần. Gộp các tương ethyl axetat, cất loại dung môi dưới áp suất thấp, thu được 2,8 g cặn rắn, vàng nhạt, hiệu suất $\approx$ 1,4%. Sau đó, 2,8g cặn ethyl axetat được tách trên sắc ký cột nhanh với silicagel cỡ hạt 0,04 - 0,06mm với hệ rửa giải n-hexan/ethyl axetat gradient và n-hexan/axeton (tỷ lệ 7:3), thu được 109mg azadizachtin, hiệu suất = 0,054%.

đ.n.c.150° - 155°C (n-Hexan/Aceton); Rf: 0,47 (n-Hexan:Aceton /6:4)

Phổ IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 3448 (OH), 2955 (CH₂, CH₃) 1737 (este), 1439, 1374, 1266 (axetat) 1048, 875 (furan)

HPLC: Cột Hypersil BDS C-18, Detector 217mm. Tỷ lệ dòng: 1ml/phút.

Thời gian lưu 1,32 phút, trùng khít chất chuẩn của hãng Sigma, CHLB Đức, độ sạch 92%. ¹H - và ¹³C NMR: xem bảng I.

V. Kết Luận

1. Đã phân lập được hợp chất azadirachtin từ hạt cây neem ăn Độ di thực vào Việt Nam và so sánh với azadirachtin chuẩn. Đã xác định được cấu trúc thông qua phân tích phổ và so sánh với tài liệu.

2. Kết quả thử hoạt tính ngán ăn của azadirachtin trong phòng thí nghiệm rất cao. Chỉ số ngán ăn trung bình (CSNA TB) đạt 71,54, ở liều lượng 7,89 μ g/cm². Và CSNA TB đạt 87 ở liều 15,6 μ g/cm².

3. Cây neem mới được nhập trồng ở nước ta (Ninh Thuận, Bình Thuận) qua nghiên cứu cho thấy có chứa azadirachtin có hoạt tính ngán ăn cao, tương đương với các nước có truyền thống trồng cây này. Đây là một cây quý có nhiều ích lợi: cải tạo đất, là nguồn thuốc trừ sâu thảo mộc quý của thế giới và nước ta. Cần đẩy mạnh nghiên cứu thêm về hoá học và tác dụng diệt sâu hại của cây neem di thực vào nước ta nhằm phục vụ việc phòng chống sâu bệnh và bảo vệ môi trường.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài. Các tác giả cảm ơn TS. Luc Van Puyvelde, Viện nghiên cứu Tibotec, Vương quốc Bỉ về các phổ NMR.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ, cây cỏ Việt Nam, II/487/1992
2. J.T.Arnason, Philgene & Morand, insecticides of Plant Origin, American Chemical Society, Symposium Toronto, Canada 6/1988
3. Võ Văn Chi, Từ điển Cây thuốc Việt Nam, 1035, (1996).
4. H.Schmutterer and K.R.S Ascher... Natural pesticides from the neem tree and other tropical Plants, Prcc. 1^a, Rottanch 1980, pp.21-32
5. G.B Marini-Bettolo-Natural products and the protection of Plants, proceedings of a study week at the pontifical academy of sciences October 18-23, 1976, PP.185-198.
6. Proceedings of the second international Neem conference - Natural pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A.juss) and other tropical Plants, FR Germany 25-28 May, 1993..
7. T.R Govimdachari and G.Gopalakrishnan, Phytochemistry, Vol.45, N°2, pp397-399, 1997.
8. S.V.Ley, K.Doherty, G.Massiot, J.M.Nuzillard, Tetrahedron V.50, N°42 pp.12267-12280, 1994
9. B.W.Nugroho, R.A.Edrada, B.Gussregen, V.Wray, L.Witteand P.Proksch Phytochemistry, Vol 44, N°8, pp.145561, 1997.