

CHIẾT TÁCH, TINH SẠCH VÀ KHẢO SÁT TÁC DỤNG ĐỐI KHÁNG VI SINH VẬT CỦA SALANIN TỪ NHÂN HẠT CÂY XOAN ẤN ĐỘ (*Azadirachta indica* A. juss) TRỒNG TẠI VIỆT NAM

VŨ VĂN ĐỘ, NGUYỄN TIẾN THẮNG, NGUYỄN THỊ MINH, NGUYỄN NGỌC HẠNH

I. MỞ ĐẦU

Cây xoan Ấn Độ còn gọi là cây neem (*Azadirachta indica* A. juss) họ Meliaceae được sử dụng làm thuốc trừ sâu rất có hiệu quả ở nhiều nơi trên thế giới [6, 8, 10]. Hiện nay các nhà khoa học đã phân lập hơn 60 chất limonoid có khả năng gây ngán ăn và xua đuổi côn trùng từ hạt và lá neem [1, 2, 3, 8, 9, 11]. Ở nước ta, cây neem đang được trồng nhiều ở các tỉnh Nam Trung Bộ như Ninh Thuận, Bình Thuận để phủ xanh vùng đất cát cồn và cải tạo đất bị hoang hóa nhờ khả năng chịu hạn cao của cây.

Gần đây chúng tôi đã báo cáo kết quả phân lập azadirachtin, một limonoid chính của nhân hạt neem trồng tại Ninh Thuận [12]. Trong bài này, chúng tôi trình bày phương pháp phân lập và xác định cấu trúc salanin, khảo sát hoạt tính gây độc tế bào và khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của salanin.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

Hạt neem (*Azadirachta indica* A. juss) được thu tại khu rừng neem trồng tại huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận vào tháng 7 năm 2003, từ những cây 4 - 5 năm tuổi.

2. Phương pháp và thiết bị

- Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy VECTOR 22, dùng viên nén KBr.
- Phổ khối lượng được đo trên thiết bị 1100 series LC/ MSD Trap, Agilent.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz. Độ dịch chuyển hóa học được tính theo δ ppm so với TMS, hằng số tương tác (J) tính bằng Hz.
- Phân tích sắc kí lớp mỏng trên bản nhôm Silicagel Merck 60 F₂₅₄ tráng sẵn có độ dày 0,2 mm.
- Sắc kí cột sử dụng silicagel Merck cỡ hạt 0,04 mm - 0,063 mm.
- Sắc kí lỏng cao áp (HPLC) sử dụng đầu dò DAD, cột Bondapak, C₁₈, 3,9 × 300 mm.
- Điểm nóng chảy được đo trên máy Electrothermal IA 9000 series, dùng mao quản không hiệu chỉnh.
- Tác động đối kháng vi sinh vật và gây độc tế bào được thử tại phòng thí nghiệm thử hoạt tính sinh học - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Chiết tách và phân lập salanin

Hạt neem thu được, sau khi loại bỏ hết vỏ và phần thịt quả, được sấy đến khô ở 50°C. 5 kg nhân hạt đem li trích với ete dầu hỏa (40 - 60°C) bằng bộ chiết Soxhlet. Sau khi loại dung môi ete dầu hỏa, thu được 970 g cặn dầu sệt, màu vàng nâu. Hỗn hợp dầu được tiếp tục hòa tan trong methanol (MeOH). Loại dung môi methanol, thu được 230 g cặn sệt màu vàng sậm. Cặn tan trong methanol cho chạy sắc kí cột nhanh với hệ dung môi là ete dầu hỏa và chloroform với độ phân cực tăng dần. Kiểm tra các phân đoạn thu được sau sắc kí cột bằng sắc kí bản mỏng để gom các phân đoạn có R_f giống nhau.

Tiếp tục sắc kí cột lần 2 với các phân đoạn giàu salanin thu được ở trên, chúng tôi thu được 120 mg tinh thể hình lăng trụ không màu, kí hiệu MS.

Bảng 1. Phổ ^1H - NMR và ^{13}C - NMR của chất MS trong dung môi CDCl_3 , δppm

Vị trí	δ_{H} [500 MHz, J(Hz)]	δ_{C} (125 MHz)
1	4,96 t, j = 3	71,37
2	2,31 m	27,62
3	4,78 t, j = 3	71,37
4		42,75
5	2,81 d, j = 12,5	39,46
6	3,99 dd, j = 3; 12	72,65
7	4,18 d, j = 3	85,72
8		49,12
9	2,75 dd, j = 4; 8	39,98
10		40,65
11	2,22 m	30,72
12		172,80
13		134,89
14		146,60
15	5,44 m	87,93
16a	2,13 d, j = 12	41,43
16b	2,25 d, j = 12	
17	3,64 d, j = 3,5	49,46
18	1,67 s	13,14
19	0,98 s	15,14
20		127,13
21	7,32 t, j = 1,5	142,94
22	6,29 m	110,63

23	7,26	138,83
28a 28b	$\left. \begin{matrix} 3,69 \\ 3,59 \end{matrix} \right\} d, j = 3$	77,70
29	1,22 s	19,63
30	1,30 s	16,93
OCH ₃	3,26 s	51,49
1'		170,40
2'		129,09
3'		137,24
4'	1,82 d, j = 1	14,35
		41,43
5'	1,94 s	11,92
6'	1,94 s	20,87

2. Xác định cấu trúc

MS có các đặc tính sau:

- Điểm nóng chảy: $M_p = 156^{\circ}\text{C}$ (Hexan - Ete etilic)
- Phổ hồng ngoại: $V_{\max} (\text{cm}^{-1})$: 2953, 1727, 1701, 1650, 1483, 1264, 1141, 1054.
- Phổ khối lượng: 619 $[\text{M} + \text{Na}]^{+}$.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H - NMR và ^{13}C - NMR được đo trong dung môi CDCl_3 và độ dịch chuyển hóa học δ_{ppm} được trình bày ở bảng 1.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều ^1H - ^1H - COSY và HMBC được trình bày ở bảng 2, hình 1 và hình 2.

Bảng 2. Sự tương tác ^1H - ^1H - COSY và HMBC của chất MS

Vị trí	COSY	HMBC
1	$\text{H}_1 - \text{H}_2$	$\text{C}_{10}, \text{C}_9$
2	$\text{H}_2 - \text{H}_1 ; \text{H}_2 - \text{H}_3$	C_5
3	$\text{H}_3 - \text{H}_2$	
4		
5	$\text{H}_5 - \text{H}_6$	$\text{C}_{19}, \text{C}_{29}, \text{C}_{10}, \text{C}_4, \text{C}_1, \text{C}_3, \text{C}_7$
6	$\text{H}_6 - \text{H}_5 ; \text{H}_6 - \text{H}_7$	
7	$\text{H}_7 - \text{H}_6$	
8		
9	$\text{H}_9 - \text{H}_{11}$	

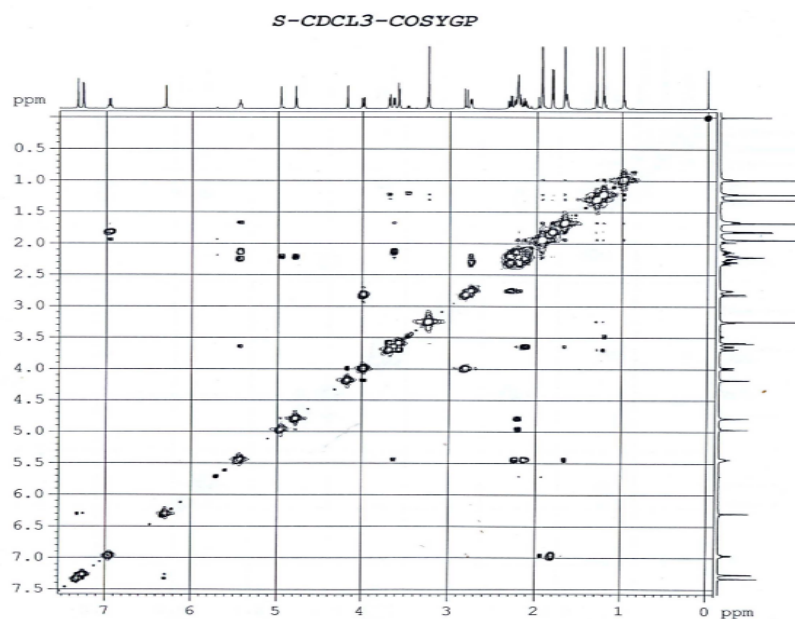
10		
11	$H_{11} - H_9$	C_{12}
12		
13		
14		
15	$H_{15} - H_{16a} ; H_{15} - H_{16b}$	
16a	$H_{16} - H_{15}$	C_{20}
16b	$H_{16} - H_{17}$	
17	$H_{17} - H_{16}$	$C_{20}, C_{13}, C_{23}, C_{14}, C_{15}, C_2, C_8$
18		C_8

Kết quả nhận được cho thấy:

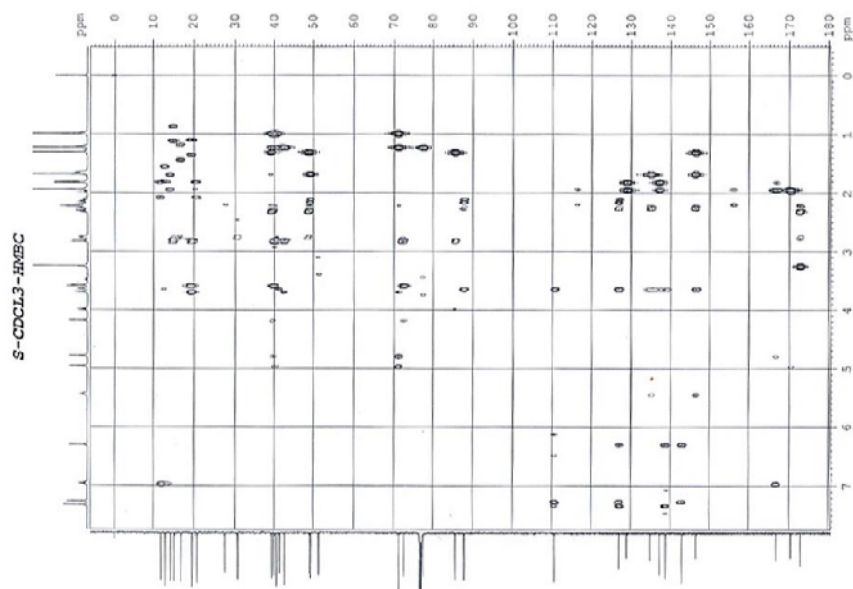
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H - NMR cho thấy các proton của vòng furan có δ ppm là 7,32; 6,29 và 7,26 tương ứng với vị trí H-21, H-22 và H-23, một nhóm CH_3 - có mũi đôi ở vị trí 4' (bảng 1).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều COSY cho thấy rõ sự tương tác của $H_1 - H_2$, $H_2 - H_3$, $H_5 - H_6...$ (hình 1 và bảng 2).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HMBC cho thấy có sự tương tác xa của H_1 với $C_9 - C_{10}$, đặc biệt ở vị trí H_5 tương tác với carbon ở vị trí 19, 29, 10, 4, 1, 3 và 7 (hình 2 và bảng 2).

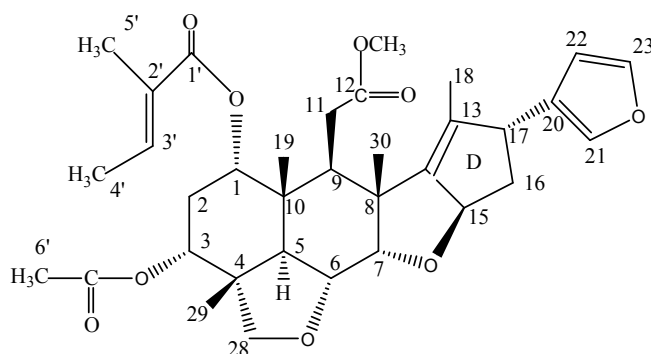


Hình 1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều $^1H - ^1H$ - COSY của MS



Hình 2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HMBC của MS

Dựa vào phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều và so sánh với các tài liệu đã công bố [4, 6], chất MS được xác định chính là salanin có cấu trúc như sau:



Đây là lần đầu tiên, salanin được khảo sát cấu trúc bằng phổ ^1H - ^1H - COSY và phổ HMBC.

3. Xác định khả năng gây độc tế bào người

Khả năng gây độc tế bào được thử nghiệm theo phương pháp hiện đang được tiến hành tại viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ. Các dòng tế bào ung thư người: Hep - G2 (ung thư gan), F1 (ung thư màng tử cung), RD (ung thư màng tim).

Tế bào ung thư được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn và được sử dụng thử với các chất thử đã được chuẩn bị sẵn ở các nồng độ khác nhau trên phiên vi lượng 96 giếng, phiên thử nghiệm bao gồm: tế bào, môi trường nuôi cấy và chất thử, được ủ ở 37°C để tế bào tiếp tục phát triển. Sau đó tế bào được lấy ra cố định, rửa, nhuộm và hòa lại bằng dung dịch chuẩn, đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 - 540 nm. Kết quả thử nghiệm độc tính tế bào của chất MS biểu hiện bằng số tế bào sống sót (%), được ghi nhận ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng gây độc tế bào của MS

STT	Kí hiệu mẫu	Số tế bào sống sót (%)		
		Hep-G2	F1	RD
1	DMSO*	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
2	Chứng (+)**	1,5 ± 0,09	1,05 ± 0,6	2,5 ± 0,02
3	MS	101,8 ± 1,1	102,8 ± 2,5	68,7 ± 1,5

* DMSO [Dimethyl sulfoxide, (CH₃)₂SO]: Dung dịch không, dùng làm đối chứng trắng trong thí nghiệm; ** Chứng(+): Sử dụng thuốc trị ung thư đặc hiệu.

Các kết quả nhận được ở trên cho thấy MS không gây độc đối với 3 dòng tế bào F1, RD và Hep-G2.

4. Xác định tính đối kháng vi sinh vật

Hoạt tính đối kháng vi sinh vật được thực hiện theo 2 bước:

Bước 1: Thử định tính theo phương pháp khuếch tán trên thạch, sử dụng khoanh giấy lọc tẩm chất thử theo nồng độ tiêu chuẩn.

Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm đại diện các nhóm sau:

- Vi khuẩn Gr (-): *E. coli*, *P. aeruginosa*.
- Vi khuẩn Gr (+): *B. subtilis*, *S. aureus*.
- Nấm mốc: *Asp. niger*, *F. oxysporum*.
- Nấm men: *C. albicans*, *S. cerevisiae*.

Bước 2: Các mẫu cho hoạt tính dương ở bước 1 sẽ được tiến hành thử tiếp bước 2 để tính ra nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) theo phương pháp của Vanden Bergher và Vlietlink (1994) tiến hành trên phiến vi lượng 96 giếng.

Kháng sinh kiểm định bao gồm: Ampicilin, Tetracycline, Nystatin.

+ Mẫu thô có giá trị: MIC ≤ 200 µg/ ml, được coi là dương tính kháng vi sinh vật.

+ Mẫu tinh có giá trị: MIC ≤ 50 µg/ ml, được coi là dương tính kháng vi sinh vật.

Kết quả xác định hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định của MS được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định của MS

Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (µg/ ml)							
	Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
MS	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>Asp. oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	(-)	(-)	25	(-)	12,5	25	12,5	25

Kết quả nhận được cho thấy MS có hoạt tính đối kháng 5 vi sinh vật kiểm định, đặc biệt kháng mạnh *A. niger* và *C. albicans*.

IV. KẾT LUẬN

Từ nhân hạt neem trồng tại Ninh Thuận chúng tôi đã phân lập salanin ở dạng tinh khiết và khảo sát cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại, đặc biệt là phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều COSY và HMBC của salanin được công bố lần đầu tiên ở Việt Nam. Salanin được khảo sát hoạt tính gây độc tế bào người và hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định. Kết quả cho thấy salanin không có tác dụng gây độc tế bào người nhưng lại có hoạt tính kháng 5 vi sinh vật kiểm định, đặc biệt kháng mạnh đối với *A. niger* và *C. albicans*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bina S. Siddiqui and Munawwer Rasheed - Three new triterpenoids from *Azadirachta indica*, Helvetica Chimica Acta **84** (2001) 1962-1968.
2. Bina S. Siddiqui, Syed Tariq Ali, Munawwer Rasheed and Muhammad Nadeem Kardar - Chemical constituents of the flowers of *Azadirachta indica*, Helvetica Chimica Acta **86** (2003) 2787-2796.
3. S. P. Basak and D. P. Chakraborty - Chemical investigation of *Azadirachta indica* leaves, Journal of the Indian Chemical Society **45** (1968) 466-467.
4. R. Bryan Yamasaki, Thomas G. Ritland, Marka, Barnby, and James. A. Kloc - Isolation and purification of salanin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves, (1988) 277-283.
5. De Silva, L. B., W. Stocklin and T. A. Geissman - The isolation of salanin from *Melia dubia*. Phytochemistry **8** (1969) 1817-1819.
6. H. S. Garg and D. S. Bhakuni - Salanoide, a meliacin from *Azadirachta indica* seed (neem oil), Journal of Ethnopharmacology **23** (1981) 39-51.
7. R. Henderson, R. Mc Crindle, A. Melera, and K. H. Overton - Tetranortriterpenoids - I. The constitution and stereochemistry of salanin, Tetrahedron **24** (1967) 1525-1528.
8. M. Jacobson - Review of neem research in the United States, In : Locke, J. C. and Lawson, R. H (Eds.), Proceeding of a workshop on neem potential in pest management, 1990.
9. W. Krans, M. Bokel, A. Klenk, and H. Pohnl - The structure of azadirachtin and 22, 23 - dihydro - 23 - β - methocyazadirachtin, Tetrahedron letters (1985) 6435-6438.
10. H. Schmuttere, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Ann. Rev. Entomol. **35** 271-290.
11. S. Siddiqui, T. Mahmood, B. S. Siddiqui, and S. Faizi - Isolation of triterpenoid from *Azadirachta indica*. Phytochemistry **25** (1986) 2183-2185.
12. Vũ Văn Độ, Nguyễn Tiến Thắng - Chiết xuất, tinh sạch và xác định hàm lượng của azadirachtin trong hạt neem, Tạp chí Sinh học **27** (2) (2005) 57-60.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND INVESTIGATION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SALANIN FROM NEEM SEED KERNEL (*Azadirachta indica* A. juss) OF THE NEEM TREE PLANTED IN NINH THUAN PROVINCE, VIET NAM

From the seed of the neem tree (*Azadirachta indica* A. juss), collected from Ninh Thuan province. For the first time, Salanin have been isolated, characterized and determined molecular structure by spectroscopic analysis such as IR, MA, ^1H - NMR, ^{13}C - NMR, COSY, HMBC. Salanin showed antimicrobial activity against *B. subtilis*, *Asp. niger*, *F. oxysporum*, *C. albicans* and *S. cerevisiae*. But, it was harmless for human cells.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 9 tháng 4 năm 2005

Vũ Văn Độ, Nguyễn Tiến Thắng,

Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Ngọc Hạnh,

Viện Công nghệ hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.