

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÀNH NEEM

Nguyễn Thị Bạch Lê
Trần Kim Qui

ABSTRACT

Neem branch (Azadirachta indica A.Juss) were collected in Ninh Phuoc district, Ninh Thuan province in February. We have extracted and determined structures of 5 pure compounds. There are steroids (2), ester of acid gallic and aliphatic alcohols (2). Liquid extract of Neem branch exerted anti-microbial.

TÓM TẮT

Cành neem được thu hái ở huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận vào tháng 2 năm 2006. Chúng tôi đã cô lập và xác định được 5 hợp chất tinh khiết từ cành neem, gồm có 2 steroid, 1 ester của acid gallic và 2 alcol béo. Dịch trích cành neem được thử hoạt tính sinh học tại phòng thí nghiệm vi sinh.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây neem có tên khoa học là *Azadirachta indica* A.Juss, từ lâu đã nổi tiếng khắp thế giới về khả năng ứng dụng rộng rãi của nó trong ngành thuốc diệt côn trùng và trong lĩnh vực làm thuốc trị bệnh cho người. Người ta ví neem như một tặng vật mà thiên nhiên ưu ái dành cho những vùng đất có khí hậu khắc nghiệt. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã và đang khảo sát những đặc tính quý báu của cây neem. Hiện nay một số cơ quan và tổ chức trong nước đã nghiên cứu sơ bộ thành phần hóa học của lá neem và một số ứng dụng của nó.

Nhiều công trình nghiên cứu đã xác minh neem có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, giảm đau, chống viêm, trị các bệnh ngoài da... Neem còn có tác dụng hạ đường huyết và hạ sốt. Trong nông nghiệp, đã có một số sản phẩm thương mại của neem như: thuốc bảo vệ thực vật Vineem 150EC có khả năng diệt trừ bọ trĩ, sâu xanh, sâu đỏ trên cây nho và hoa màu; bột lá neem được pha trộn với các loại phân bón nhằm tăng độ phì cho đất...

Do những đặc tính hấp dẫn của cây neem như thế, và cùng với những công trình

nghiên cứu về lá neem, rễ neem, và để có cái nhìn toàn diện hơn về cây neem, chúng tôi tiến hành khảo sát thành phần hóa học trên cành neem và thử tác dụng sinh học của cành neem.

II. ĐỐI TƯỢNG & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Cành neem được thu hái vào tháng 2 năm 2006 tại huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận, sau đó đem sấy khô ở 60°C đến trọng lượng không đổi, thu được 6,5kg cành neem khô.

2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

6,5 kg cành neem khô được nghiền nhỏ, đun hoàn lưu với metanol trong 3h, tiến hành 3 lần, đem lọc thu được dịch trích. Dịch trích này sau khi cô quay thu hồi dung môi ở áp suất kém thu được thu được cao thô metanol.

Lấy cao thô metanol đem hòa tan với nước và lần lượt chiết với các dung môi eter dầu hỏa, cloroform và butanol. Sau đó, thu hồi dung môi các dịch trích này, ta thu được các loại cao tương ứng.

Cao cloroform (35,37g) đem tiến hành sắc ký cột trên silica gel pha thường với hệ dung môi giải ly cloroform: metanol với tỷ lệ phân cực tăng dần, thu được 14 phân đoạn.

Sắc ký lớp mỏng trên 14 phân đoạn này, thấy phân đoạn số 12 cho vết tròn, tương đối rõ. Tiếp tục sắc ký cột phân đoạn 12 này, thu được một chất, ký hiệu là L1.

Sau đó, tiến hành sắc ký cột nhiều lần trên những phân đoạn cho vết rõ trên sắc ký lớp mỏng ta thu được các chất ký hiệu là L2, L5, L7, L8.

Thử nghiệm dịch trích cao cloroform trên các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, được thực hiện tại phòng thí nghiệm Vi khuẩn, khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur TP.HCM.

III. KẾT QUẢ & BIỆN LUẬN

2.1. Chất L1

Chất L1 thu được ở phân đoạn 12 là một chất rắn, màu trắng, hình vảy, tan trong hệ dung môi cloroform: metanol (1:1)

Sắc ký lớp mỏng hợp chất L1, giải ly bằng hệ dung môi cloroform: metanol (8:2), thuộc thử hiện hình là acid sulfuric đậm đặc, sấy bằng ở 120°C, cho một vết duy nhất màu tím có giá trị $R_f = 0,2$.

Dựa vào kết quả các mũ phổ đặc trưng: L1 có $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện mũ 5,34 ppm, cho thấy L1 có chứa 1 proton ở dạng ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}<$), điều này phù hợp với kết quả phổ $^{13}\text{C-NMR}$ thông qua hai số liệu 140,00ppm ($>\text{C}=\text{}$) và 121,81ppm ($=\underline{\text{C}}\text{H}-$). Mặt khác, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn có mũ đặc trưng của hợp chất glycosid, đó là 100,80ppm ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-$) và trên phổ $^1\text{H-NMR}$ có mũ 4,30ppm thể hiện proton ở vị trí H-1 của glucose ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-$)

Dựa vào các dữ kiện nói trên, thấy L1 chỉ có thể là β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosid.

Vị trí carbon	Loại carbon	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)		Phổ DEPT-NMR của hợp chất L1
		Hợp chất L1	β -sitosterol	
1	-CH ₂ -	36,95	37,1	Mũi âm
2	-CH ₂ -	29,23	31,5	Mũi âm
3	>CH-	76,36	71,5	Mũi dương
4	-CH ₂ -	39,45	42,1	Mũi âm
5	=C<	140,00	140,1	Biến mất
6	=CH-	121,81	121,1	Mũi dương
7	-CH ₂ -	31,60	31,8	Mũi âm
8	>CH-	31,60	31,8	Mũi dương
9	>CH-	49,79	50,1	Mũi dương
10	-C-	36,40	36,3	Biến mất
11	-CH ₂ -	20,74	21,0	Mũi âm
12	-CH ₂ -	39,45	39,6	Mũi âm
13	-C-	42,00	42,1	Biến mất
14	>CH-	56,74	56,5	Mũi dương

15	-CH ₂ -	23,96	24,2	Mũi âm
16	-CH ₂ -	27,92	28,1	Mũi âm
17	>CH-	55,73	55,8	Mũi dương
18	-CH ₃	13,68	11,2	Mũi dương
19	-CH ₃	19,39	19,3	Mũi dương
20	>CH-	35,83	36,0	Mũi dương
21	-CH ₃	18,60	18,7	Mũi dương
22	-CH ₂ -	33,82	33,8	Mũi âm
23	-CH ₂ -	26,15	26,0	Mũi âm
24	>CH-	45,54	45,6	Mũi dương
25	>CH-	29,36	29,0	Mũi dương
26	-CH ₃	18,94	19,0	Mũi dương
27	-CH ₃	20,74	19,7	Mũi dương
28	-CH ₂ -	23,40	23,0	Mũi âm
29	-CH ₃	11,48	11,9	Mũi dương
			<i>D-Glucose</i>	<i>D-Galactose</i>
1'	>CH-	100,81	101,2	106,2
2'	>CH-	78,81	78,5	77,1
3'	>CH-	75,54	75,3	75,0
4'	>CH-	69,88	69,4	73,1
5'	>CH-	73,25	72,1	70,4
6'	-CH ₂ -	61,51	62,1	62,6

Bảng 1 : Kết quả so sánh phổ ¹³C-NMR kết hợp với ¹³⁵DEPT-NMR của hợp chất L1 với β-Sitosterol, D-Glucose và D-Galactose

2.2. Chất L2

Hợp chất L2 là tinh thể hình kim, màu trắng, tan trong cloroform. Sắc ký lớp mỏng, giải ly bằng cloroform, hiện hình bằng acid sulfuric, cho một vết tròn rõ, màu tím.

L2 có phổ ¹H-NMR xuất hiện mũi 5,3ppm cho thấy L2 có chứa 1 proton ở dạng (-CH=C<), điều này phù hợp với kết quả phổ ¹³C-NMR thông qua hai số liệu 140,74ppm (>C=) và 121,70ppm (=CH-). Ngoài ra, phổ ¹³C-NMR cho thấy L2 có 29C đặc trưng của khung stigmastan.

Dựa vào các dữ kiện trên, thấy L2 chính là β-sitosterol.

2.3. Chất L5

L5 thu được từ phân đoạn 8 của cao cloroform, là chất bột vô định hình màu

vàng, tan trong cloroform. Sắc ký lớp mỏng trên L5, giải ly với hệ dung môi cloroform:metanol (95:5), hiện hình bằng thuốc thử acid sulfuric, thu được một vết tròn màu nâu.

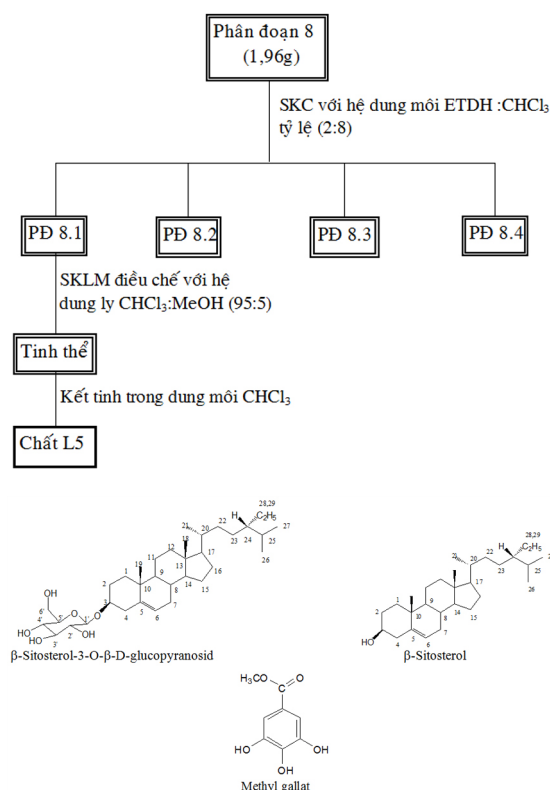
Phổ ¹H-NMR xuất hiện hai proton ở vị trí 5,85 ppm là hai proton của nhân thơm, và nhân thơm trí hoán ở vị trí 3,4,5. Điều này phù hợp với phổ ¹³C-NMR cho 2 carbon của nhân thơm 107,44ppm (C-2 và C-6) là 2 carbon còn mang proton, 3 carbon của nhân thơm mang nhóm -OH: 157,36ppm (C-3 và C-5); 134,16ppm (C-4) và một carbon của nhân thơm gắn trực tiếp với nhóm C=O là 120,32 ppm (C-1). Ngoài ra, trên phổ ¹H-NMR còn có 3 proton ở vị trí 3,82ppm (3H,s, -OCH₃) tương ứng với 1 tín hiệu trên phổ ¹³C-NMR là 56,48 ppm (1C, -OCH₃). Hơn nữa, trên phổ ¹³C-NMR

Vị trí carbon	Loại carbon	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)	
		Hợp chất L5	Acid gallic
1	-C-	120,32	123,88
2	-CH=	107,44	111,35
3	-C-OH	157,36	147,44
4	-C-OH	134,16	131,18
5	-C-OH	157,36	147,44
6	-CH=	107,44	111,35
7	C=O	186,85	167,37

Bảng 2 : Bảng so sánh phổ $^{13}\text{C-NMR}$ với hợp chất acid gallic chuẩn

còn có một tín hiệu ở 186,85ppm tương ứng với C của ester -COO-.

Dựa vào các dữ kiện trên, chúng tôi nhận thấy L5 có cấu trúc gần giống với ester của acid gallic.



Sơ đồ 1: Sơ đồ cô lập hợp chất L5

2.4. Kết quả kháng vi khuẩn của cao cloroform

Dịch trích cao cloroform được thử nghiệm trên các chủng vi khuẩn sau : Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholera,

Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis.

Kết quả thể hiện như bảng 3.

Nhận thấy, hoạt tính kháng khuẩn của cành neem hầu như rất yếu so với hoạt tính kháng khuẩn trên lá neem đã mô tả trong tài liệu (2).

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát thành phần hóa học của cành neem và bước đầu đã cô lập 5 hợp chất tinh khiết gồm có 2 hợp chất sterol, một ester của acid gallic, và 2 alcol béo. Dịch trích của cao cloroform của cành neem đã thử nghiệm hoạt tính sinh học, và nhận thấy chúng có tính kháng các dòng vi khuẩn yếu hơn các hoạt tính thử trên dịch trích của lá neem.

STT	Yêu cầu thử nghiệm	Kết quả	Đơn vị	Phương pháp thử nghiệm	Giới hạn
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<10	Cfu/g	Số 3347/QĐ-BYT	
2	<i>Vibrio cholera</i>	Âm tính	/25g	IP HCM V02:2006	
3	<i>Escherichia coli</i>	<0,3	MPN/g	NF V08-020:1994	
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	<10	Cfu/g	NF V08-057-1:1994	
5	<i>Bacillus subtilis</i>	<10	Cfu/g		

Bảng 3

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Phan Đứ Bình (2001), Tạp chí thuốc và sức khỏe, 187, Tr 30-31.

[2] Kausik Biswas, Ishita C., Ranajit K. (2002), "Biological actives and medicinal properties of neem *Azadirachta indica*", Current Science, Vol 82, No 11.

[3] Washington D.C Natural Research Council (1992), "Neem, a tree for solving global problems" National Acedemic press.