

CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ NIAZIRIN TỪ LÁ CHÙM NGÂY (*MORINGA OLEIFERA*) ĐỂ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

Đến tòa soạn 24-01-2024

Trần Văn Hiện^{1,2}, Nguyễn Thị Hồng Anh¹, Nguyễn Thị Luyên¹, Nguyễn Thị Thu Minh¹, Đỗ Hoàng Giang^{1*}, Nguyễn Tiến Đạt^{1,2}

¹ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST), 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

² Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: dhgiang@ctctt.vast.vn

SUMMARY

EXTRACTION, ISOLATION AND PURIFICATION OF NIAZIRIN FROM MORINGA OLEIFERA LEAVES TO ESTABLISH STANDARD

Niazirin was separated from the extract of *Moringa oleifera* leaf through column chromatography. Semi-preparative HPLC was employed for the purification of this compound. Spectroscopic techniques, including NMR and ESI-MS, identified the structure. The purity of the compound was estimated to be 98.35% based on HPLC.

Keywords: Niazirin, *Moringa oleifera*, purified materials.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chùm ngây (*Moringa oleifera*) là loài thực vật có xuất xứ từ Ấn Độ, thuộc họ chùm ngây (Moringaceae), có những tên gọi khác như cây dùi trống hoặc cải ngựa [1]. Loài cây này phần lớn phân bố tại một số tỉnh thuộc khu vực phía Nam nước ta. Loài cây này được sử dụng làm cây thuốc và thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, hạt chùm ngây được ứng dụng trong xử lý và làm sạch nước [1].

Các công trình công bố chỉ ra chùm ngây thể hiện nhiều hoạt tính như: kháng khuẩn, kháng nấm [2-3]; chống ung thư, hạ đường huyết, chống co thắt [3]; bảo vệ gan [4]; chống oxy hóa [3-5]; kháng viêm, giảm đau [3,6]; chống loét [7]; giảm cholesterol [8]; cải thiện triệu chứng bệnh đái tháo đường [3,9]; giảm hen suyễn [10]; tăng cường lợi khuẩn cho hệ vi sinh đường ruột [11]. Thêm vào đó, các công bố khoa học về thành phần hóa học của chùm ngây cho thấy loài này chứa các hợp chất

thiocarbamate, polysaccharide, proanthocyanidin flavonoid, glucosinolate, isothiocyanate, tannin, quinine, alkaloid, steroid, glycoside, anthocyanin, cinnamate,...[1-3,11]. Trong đó, hợp chất niazirin thuộc nhóm chất nitril glycoside thể hiện nhiều hoạt tính như hạ huyết áp [11-12]; hoạt tính chống oxy hóa mạnh, được đánh giá là chất có tiềm năng trong ngăn ngừa xơ vữa động mạch do biến chứng của bệnh tiểu đường [13]. Niazirin còn được nghiên cứu có hoạt tính chống ung thư, kháng khuẩn [14]; giảm mỡ máu, chống viêm nhiễm, cải thiện rối loạn chuyển hóa carbohydrate và lipid [11,15]; hỗ trợ điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu [11].

Nhằm đánh giá chất lượng nguồn nguyên liệu chùm ngây, xây dựng tiêu chuẩn đánh giá chất lượng dựa trên hàm lượng các thành phần đặc trưng của dược liệu này là cần thiết. Các nghiên cứu trong nước về chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ cây chùm ngây như Niazirin, đa phần dừng lại ở việc công bố, chưa có nhiều nghiên cứu quy

trình phân lập và tinh sạch Niazirin từ chùm ngây để thiết lập chất chuẩn. Vì vậy, nghiên cứu được triển khai với mục tiêu thiết lập quy trình phân lập và tinh chế hợp chất Niazirin từ lá chùm ngây, bước đầu cung cấp nguồn nguyên liệu có độ tinh khiết cao cho nghiên cứu thiết lập chất chuẩn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu

Lá chùm ngây (*Moringa oleifera*) được thu mẫu tại Quảng Ninh vào tháng 7 năm 2022. Mẫu được giám định tên khoa học bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, VAST. Mẫu tiêu bản (CR2207009) được lưu tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao, VAST. Mẫu được rửa sạch, sấy khô và nghiền nhỏ thành dạng bột.

2.2. Thiết bị và hóa chất

Thiết bị - dụng cụ: Máy đo cộng hưởng từ hạt nhân (Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer), phổ khối lượng đo trên hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ 1100 series LC-MSD-Trap-SL (ESI-MS) (Agilent Technologies), hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC–DAD (Thermo Scientific Ultimate 3000), cột HPLC C₁₈ Thermo BDS Hypersil Thermo (250 x 4,6 mm; 5 µm), bộ cất chân không (Buchi V-300 Pro), bể rung siêu âm (Daihan Scientific). Cột sắc ký bán điều chế YMC-Pack ODS-A AA12S05-2520WWT (250 x 10 mm, 5 µm). Đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm, 365 nm và một số dụng cụ thí nghiệm khác.

Hóa chất: Các dung môi, hóa chất dùng cho phân tích HPLC: acetonitrile (ACN, Fisher), methanol (Fisher), nước (Fisher), acetic acid (Merck), trifluoroacetic acid (TFA, Merck). Dung môi, hóa chất dùng cho phân lập: dichloromethane, methanol, ethylacetate, *n*-hexane, acetone kỹ thuật. Silica gel 230-400 mesh (Merck), bột sắc ký pha đảo (RP-18, YMC), diaion HP-20, sephadex LH-20, bản mỏng sắc ký tráng silica gel 60 F₂₅₄ (bản nhôm), bản mỏng sắc ký pha đảo RP-18 F₂₅₄ (Merck), sulfuric acid 10%.

Chất chuẩn: Niazirin độ sạch ≥ 98% (Sigma-Aldrich).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập hợp chất Niazirin từ lá chùm ngây

Bột lá chùm ngây được chiết với methanol tạo cao chiết tổng, chiết phân bố lỏng – lỏng tạo cao chiết các phân đoạn; phân lập bằng các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, sắc ký bán điều chế hoặc sắc ký điều chế. Soi đèn UV, phun thuốc thử hiện màu đặc hiệu H₂SO₄ 10% lên bản mỏng để phát hiện các vết trên bản mỏng.

2.3.2. Xác định cấu trúc hợp chất phân lập được

Các phương pháp đo hiện đại như phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR, ¹³C-NMR; phổ khối ESI-MS được ứng dụng để xác định cấu trúc hóa học của hợp chất.

2.3.3. Xây dựng đường chuẩn định lượng Niazirin và xác định độ tinh khiết của hợp chất Niazirin phân lập được

Xây dựng đường chuẩn Niazirin: Dung dịch chuẩn gốc Niazirin nồng độ 1 mg/mL được pha trong methanol. Dãy dung dịch chuẩn xây dựng đường chuẩn có nồng độ sau: 15, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL. Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định dựa trên mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của chất chuẩn.

Phân tích các dung dịch chuẩn và xác định độ sạch hợp chất Niazirin phân lập được trên hệ thống HPLC theo điều kiện sắc ký như sau: Cột sắc ký C₁₈ Thermo BDS Hypersil (250 x 4,6 mm; 5 µm); pha động: gradient ACN (0,1% acetic acid) – nước (0,1% acetic acid) tỉ lệ 20:80 đến 50:50 trong 20 phút, 100% ACN (0,1% acetic acid) trong 10 phút; tốc độ dòng 1 mL/phút; thể tích tiêm 2 µL; nhiệt độ cột 40°C, nhiệt độ buồng đựng mẫu 15°C; detector DAD 220nm (Hình 3).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tinh chế hợp chất Niazirin từ lá chùm ngây

3.1.1. Tạo cao chiết tổng và cao chiết các phân đoạn

Tạo cao chiết tổng: Lá chùm ngây sấy khô, nghiền nhỏ (3,4 kg) được ngâm chiết siêu âm với dung môi methanol ở nhiệt độ 40°C (10 L/lần x 3 lần). Cao chiết tổng methanol 400 g thu được sau khi cô quay.

Tạo cao chiết các phân đoạn: Cao chiết methanol được hòa trong 2 L nước cất và chiết phân lớp lần lượt với dung môi *n*-hexane (2 L/lần x 3 lần) và ethyl acetate (2 L/lần x 3 lần). Sau quá trình cô quay, thu được cao phân đoạn *n*-hexane (61 g), cao phân đoạn ethyl acetate (33 g).

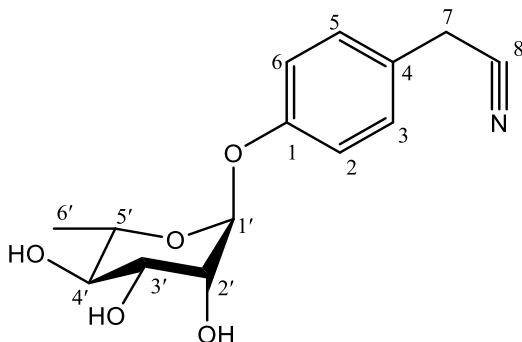
Dịch nước được xử lý trên cột diaion HP-20, triển khai gradient hệ dung môi từ 0% methanol đến 100% methanol thu được 2 phân đoạn methanol 25% MOW2 (23 g) và phân đoạn methanol 100% MOW3 (17 g).

3.1.2. Phân lập hợp chất

Phân đoạn MOW2 được phân lập trên cột sắc ký silica gel triển khai với hệ dung môi từ dichloromethane/methanol 20/1 (v/v) đến 100% methanol thu được 5 phân đoạn MOW2.1 → MOW2.5. Áp dụng kỹ thuật sắc ký cột silica gel để phân tách phân đoạn MOW2.2 (2,8 g) với hệ dung môi dichloromethane/methanol/nước tỉ lệ 5/1/0,1 (v/v/v) thu được hợp chất dạng bột màu trắng (532 mg).

3.1.3. Tinh chế hợp chất bằng sắc ký điều chế

Đánh giá độ tinh khiết của hợp chất phân lập được trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với điều kiện sắc ký nêu trong phương pháp nghiên cứu, cho kết quả độ sạch chỉ đạt 90,5% chưa đáp ứng yêu cầu chất chuẩn phân tích. Hợp chất được tinh chế lại bằng phương pháp sắc ký cột điều chế



Hình 1. Cấu trúc hợp chất Niairine

3.3. Xây dựng đường chuẩn định lượng Niairine và xác định độ tinh khiết của hợp chất Niairine phân lập được

Phương trình đường chuẩn định lượng Niairine có dạng $y = 0,1155x - 0,5795$, với hệ số tương quan

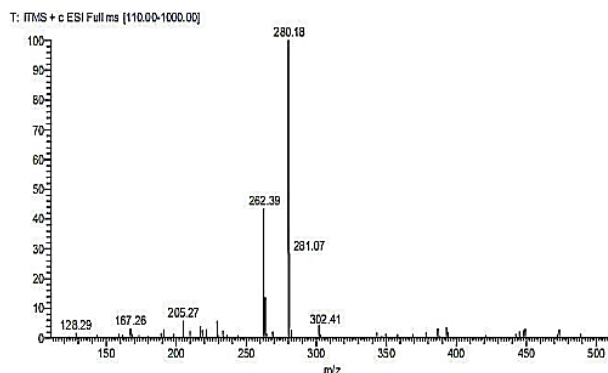
HPLC với điều kiện sắc ký: cột sắc ký điều chế YMC-Pack ODS-A AA12SO5-2520WT (250x20mm, 5 μ m, 12nm), chương trình dung môi methanol-nước (0,1% TFA) tăng dần theo tỉ lệ từ 30 đến 80% methanol trong 60 phút, tốc độ dòng 4mL/min, thể tích tiêm mẫu 100 μ L, nhiệt độ cột 40°C. Cột điều chế được rửa bằng 100% methanol trong 20 phút và ổn định ở tỉ lệ methanol:nước 30:70 trong 20 phút trước và sau khi tiến hành sắc ký điều chế. Sau tinh chế bằng sắc ký điều chế, thu được 503 mg hợp chất Niairine tinh sạch.

3.2. Xác định cấu trúc chất phân lập được

Các số liệu phổ

Chất dạng bột màu trắng, ESI-MS m/z 280,18 $[M+H]^+$ (Hình 2). Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 7,31 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3, H-5); 7,10 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6); 5,45 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-1'); 4,02 (1H, dd, $J = 3,5; 2,0$ Hz, H-2'); 3,87 (1H, dd, $J = 9,5; 3,5$ Hz, H-3'); 3,84 (2H, s, H-7); 3,69 (1H, m, H-5'); 3,50 (1H, t, $J = 9,5$ Hz, H-4'); 1,24 (d, $J = 6,2$ Hz, H-6'). Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 157,4 (C-1); 130,3 (C-3, C-5); 125,8 (C-4); 119,8 (C-8); 118,1 (C-2, C-6); 99,9 (C-1'); 73,8 (C-4'); 72,2 (C-3'); 72,0 (C-2'); 70,7 (C-5'); 22,74 (C-7); 18,0 (C-6').

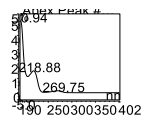
Từ những dữ liệu phổ, kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo của hợp chất Niairine đã công bố, cho phép khẳng định hợp chất phân lập được chính là Niairine [16] (Hình 1).



Hình 2. Phổ ESI-MS của Niairine, $[M+H]^+$ m/z 280,18

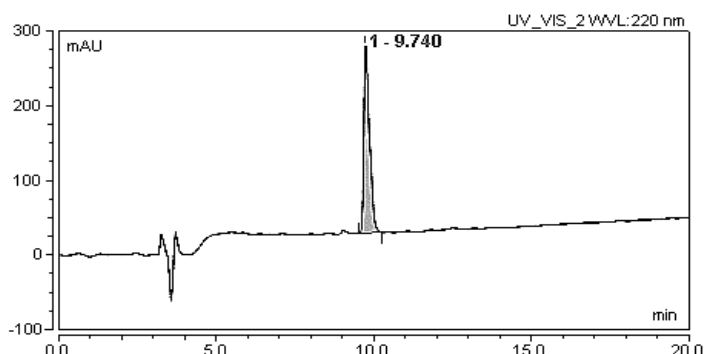
hệ số phương R^2 là 0,9998 cho thấy phương trình định lượng có độ tuyến tính cao. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 1,224 và 3,709 μ g/mL.

Đánh giá độ sạch của hợp chất Niazirin thu được sau khi tinh chế bằng sắc ký điều chế cho kết quả



Hình 3. Phổ UV hợp chất Niazirin

độ tinh khiết đạt 98,35% đáp ứng yêu cầu chất chuẩn phân tích (Hình 4).



Hình 4. Sắc ký đồ UV 220 nm của hợp chất Niazirin phân lập từ lá chùm ngây

4. KẾT LUẬN

Hợp chất Niazirin phân lập được từ lá chùm ngây, tinh chế bằng sắc ký bán điều chế và phân tích độ sạch bằng HPLC. Hợp chất thu được có độ tinh khiết cao 98,35%, đạt yêu cầu thiết lập chất chuẩn phân tích. Kết quả này đóng góp xây dựng tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng dược liệu và các chế phẩm từ chùm ngây.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia trong khuôn khổ của nhiệm vụ khoa học và công nghệ tiềm năng với mã số nhiệm vụ 03/2020/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Alhassan Y. J., Sanchi I. D., Dorh L. E., Sunday J. A., (2022). Review of the Nutritive, Medicinal and General Economic Potentials of *Moringa Oleifera*. *Cross Current International Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, **4(1)**, 1-8.
- [2] Kekuda T.R.P., Mallikarjun N., Swathi D., Nayana K.V., Aiyar M.B., Rohini T.R., (2010). Antibacterial and Antifungal efficacy of steam distillate of *Moringa oleifera* Lam.. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2(1)**, 34-37.
- [3] Birendra K.P., Hemant kumar J. D., Bina G., (2017). Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Pharmacopuncture*, **20(3)**, 194-200.

- [4] Bharali R., Tabassum J., Azad M. R. H., (2003). Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam. on hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **4(2)**, 131-139.

- [5] Sreelatha S., Padma P.R., (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, **64(4)**, 303-11.

- [6] Sulaiman M. R., Zakaria Z. A., Bujarimin A. S., Somchit M. N., Israf D. A., Moin S, (2008). Evaluation of *Moringa oleifera* aqueous extract for antinociceptive and anti - Inflammatory activities in animal models. *Pharmaceutical Biology*, **46(12)**, 838-845.

- [7] Das D., Dash D., Mandal T., Kishore A., Bairy K. L., (2011). Protective effects of *Moringa oleifera* on experimentally induced gastric ulcers in rats. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, **2(2)**, 50-55.

- [8] Jain P. G., Patil S. D., Haswani N. G., Girase M. V., Suran S. J., (2010). Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **20(6)**, 969-973.

- [9] Ndong M., Uehara M., Katsumata S., Suzuki K., (2007). Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in

gotokakizaki and wistar rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **40**, 229-233.

[10] Agrawal B., Mehta A., (2008). Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: a clinical study. *The Indian Journal of Pharmacology*, **40(1)**, 28–31.

[11] Mishra G., Singh P., Verma R., Kumar S., Srivastav S., Jha K. K., (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: an overview. *Der Pharmacia Lettre*, **3(2)**, 141-164.

[12] Vergara-Jimenez M., Almatrafi M. M., Fernandez M. L., (2017). Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, **6(4)**, 91.

[13] Wang F., Bao Y., Shen Xi., Zengin G., Lyu Y., Xiao J., Weng Z., (2019). Niazirin from *Moringa oleifera* Lam. attenuates high glucose-induced

oxidative stress through PKC ζ /Nox4 pathway. *Phytomedicine*, **86**, 153066.

[14] Maurya A., Gupta S., Srivastava S. K., (2011). Preparative isolation of bioactive nitrile glycoside “Niazirin” from the fruits of *Moringa oleifera* using fast centrifugal partition chromatography. *Separation Science and Technology*, **46(7)**, 1195-1199.

[15] Bao Y., Xiao J., Weng Z., Lu X., Shen X., Wang F., (2020). A phenolic glycoside from *Moringa oleifera* Lam. improves the carbohydrate and lipid metabolisms through AMPK in db/db mice. *Food chemistry*, **311**, 125948.

[16] Shaheen F., Bina S. S., Rubeena S., Salimuzzaman S., Khalid A., (1994). Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *Journal of Natural Product*, **57(9)**, 1256-1261.