

## KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG CỦA BA HOẠT CHẤT SINH HỌC CHÍNH TRONG DẦU HẠT NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) TRỒNG TẠI VIỆT NAM

VŨ VĂN ĐỘ, NGUYỄN TIẾN THẮNG, NGÔ KẾ SƯƠNG

*Viện Sinh học nhiệt đới*

Một trong những giải pháp xây dựng nền nông nghiệp sinh thái bền vững là giảm áp lực sử dụng thuốc hoá học, tăng cường sử dụng các loại chế phẩm bảo vệ thực vật sinh học thân hữu với môi trường, vừa có tác dụng phòng trừ sâu hại vừa bảo đảm năng suất, phẩm chất của cây trồng và không gây ô nhiễm môi trường. Một trong những chế phẩm này là dầu neem được chiết xuất từ hạt cây neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) còn có tên gọi là xoan ấn độ và xoan chịu hạn (tên địa phương).

Ở Việt Nam, trong mấy năm gần đây, đã có một số nghiên cứu sử dụng dầu neem phòng trừ sâu hại, như sử dụng dầu neem để phòng trừ bọ hà khoai lang (*Cyclas formicarius* F.) có hiệu quả ở nồng độ phun 15 ppm [4]. Còn ở nồng độ xử lý 200 ppm cho thấy dầu neem làm giảm sự ký sinh, sự sinh sản của bọ hà đối với khoai lang và có tác dụng xua đuổi bọ hà đến ký sinh [5]. Dương Anh Tuấn và cs. (2002) đã cho thấy các phân đoạn dầu neem thu được trong phòng thí nghiệm có hoạt tính gây ngán ăn cao đối với sâu khoang, chỉ số gây ngán ăn đạt đến 87% khi xử lý ở nồng độ 1% [1, 2].

Hoạt chất chính trong nhân của hạt neem là azadirachtin cũng đã được chiết tách, tinh sạch với độ sạch đạt 92% [2]. Hầu như chưa có tác giả nào xác định hàm lượng của các hoạt chất sinh học azadirachtin, salanin, nimbin trong nhân của hạt neem, cũng như trong dầu và bánh dầu của hạt neem trồng tại Việt Nam.

Hiện nay, riêng tỉnh Ninh Thuận, đã có gần 400 ha cây neem trồng tập trung đã cho quả (trong tổng số 1.718 ha đã trồng), ước tính đạt 5-10 tấn quả/ha; đây là nguồn nguyên liệu để sản xuất thuốc bảo vệ thực vật có giá trị.

Bước đầu đã tiến hành khảo sát quy trình ép dầu neem và xác định hàm lượng của 3 hoạt chất có hoạt tính sinh học trong dầu làm cơ sở

để xây dựng quy trình sản xuất thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) từ dầu neem ở quy mô pilot.

Để tăng hiệu lực tác động của dầu neem, chúng tôi tiến hành phối trộn dầu ép từ hạt neem 4-5 tuổi trồng tại Ninh Thuận với bột Bt và khảo sát hiệu lực gây chết của chế phẩm này trên sâu xanh và sâu tơ.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Quả neem được thu hái từ cây neem 4-5 năm tuổi trồng tại tỉnh Ninh Thuận, làm sạch vỏ và thịt hạt, sau đó phơi khô hạt trong bóng râm hoặc sấy khô ở nhiệt độ 50°C. Hạt được tách vỏ lấy nhân hạt để ép dầu.

#### 2. Thiết bị và hóa chất

Máy ép dầu thực vật KOMET Model D 85-1G (Đức); máy sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC); máy sắc ký khí (GC); máy trộn; máy cô quay chân không; dung môi metanol và etanol.

#### 3. Phương pháp nghiên cứu

##### a. Phương pháp ép lạnh

Sử dụng máy ép dầu chuyên dụng KOMET-Đức để ép dầu từ nhân hạt neem ở nhiệt độ khống chế từ 35°C đến 45°C.

##### b. Phương pháp xác định hàm lượng của các hoạt chất sinh học trong dầu và bánh dầu neem trên HPLC

##### - Xử lý mẫu:

Cân 20 g hạt neem, nghiền nhỏ thành bột mịn và chiết rút với 200 ml metanol (MeOH) từ 1,5-2,0 giờ, lặp lại quy trình này 5 lần. Các dịch chiết được gom lại, cô trên máy cô quay

chân không ở 50°C còn 10 ml. Lọc dịch cô qua màng lọc 0,45µm và xác định hàm lượng của hoạt chất trong dịch lọc trên HPLC.

- Định lượng các hoạt chất azadirachtin, salanin và nimbin trên HPLC:

Tiến hành định lượng azadirachtin, salanin và nimbin trên máy sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC) Hewlett Packard 1090; series1-liquid chromatography với các thông số sau:

- Cột phân tích: Bondapak C<sub>18</sub>, 125 Å, 10µm; 3,9 mm x 300 mm.

- Cột bảo vệ: Bondapak TM C<sub>18</sub>, 125 Å, 10 µm; 3,9 mm x 20 mm.

- Lượng mẫu bơm vào cột: 5 µl.

- Detectơ DAD: λ = 220 nm.

- Tốc độ rửa cột: 0,5 ml/phút.

- Dung môi rửa cột: axêtonitril: H<sub>2</sub>O (55: 45).

- Chất chuẩn: nimbin và salanin (Trifolio-GmbH, Đức), azadirachtin (hãng Sigma).

- Định lượng thành phần và hàm lượng của các axit béo trong dầu neem bằng sắc ký khí.

Dầu neem thu được, được lọc kỹ qua 2-3 lớp vải lọc mouslin và được đem phân tích thành phần axit béo trên máy sắc ký khí Hewlett Packard HP 6890. series, GC system (Plus +).

### c. Phương pháp phối trộn tạo sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật sinh học có nguồn gốc từ dầu neem

Bước đầu đã tạo chế phẩm chứa dầu neem và bột Bt.

Dầu neem đã được chứng minh là có khả năng phòng trừ nhiều loại sâu hại thuộc nhiều bộ côn trùng khác nhau [10], không gây nhờn thuốc. Song, tác dụng lại chậm và kéo dài và dễ bị phân huỷ do tác động của nhiệt độ cao và ánh sáng.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) là một vi khuẩn có mặt trong tự nhiên, có khả năng kiểm soát sâu hại cao. Bào tử và protein tinh thể (gọi là nội độc tố) của vi khuẩn Bt gây chứng tê liệt đường ruột ở một số bộ côn trùng, làm chúng chết do mất khả năng ăn. Ngoài ra, vi khuẩn Bt còn gây

nhiều quá trình phiên mã RNA, quá trình tạo ATP và gây mất cân bằng tính bán thấm của màng tế bào côn trùng [7, 8].

Trong thực tế, thuốc trừ sâu sinh học nói chung và dầu neem nói riêng chưa được sử dụng rộng rãi là do hiệu lực tác dụng chậm hơn so với thuốc trừ sâu hóa học. Để tăng hiệu lực tác động của dầu neem, chúng tôi tiến hành phối trộn bột Bt, tạo chế phẩm thuốc bảo vệ thực vật dầu neem với Bt.

Hai nguyên liệu gốc để tạo chế phẩm là dầu neem đã làm giàu azadirachtin (chứa 1.600 mg/lít dầu) và bột Bt, ở dạng bột do Trung Quốc sản xuất (có mật độ bào tử 3,2 x 10<sup>9</sup> bào tử/mg). Phối trộn hai nguyên liệu trên để tạo thành 15 công thức, trong đó có những công thức chỉ chứa dầu neem, hoặc chỉ có bột Bt với các nồng độ phối chế khác nhau nhằm tìm ra công thức phối trộn có hiệu quả diệt sâu cao. Sâu xanh và sâu tơ lứa tuổi 2 được nuôi bằng thức ăn nhân tạo, được cung cấp bởi tổ Công nghệ sinh học động vật-Viện Sinh học nhiệt đới.

### d. Thử nghiệm hiệu quả diệt sâu xanh và sâu tơ của thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc từ dầu neem

Thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm dầu neem và Bt trong việc phòng trừ hai loại sâu gây bệnh ở cây trồng là sâu xanh (*Heliothis armigera*) và sâu tơ (*Plutella xylostella*) [6]. Số liệu thí nghiệm được phân tích ANOVA-1 yếu tố và trắc nghiệm LSD-test [3].

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

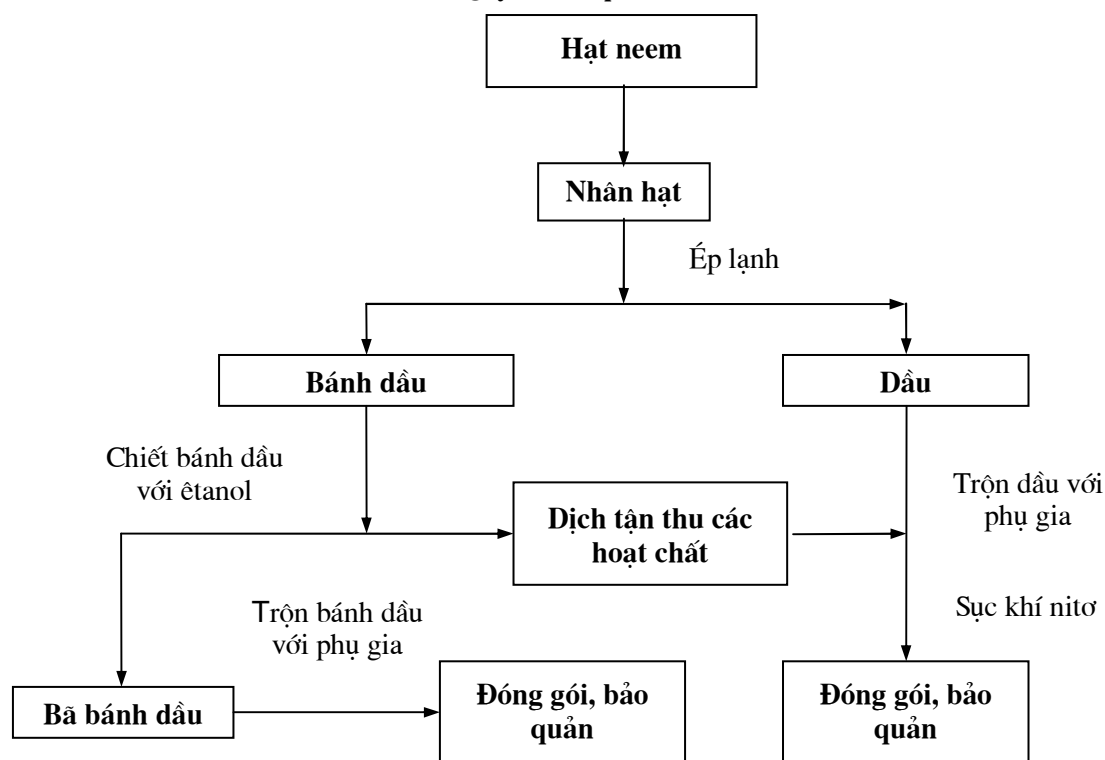
### 1. Quy trình ép dầu neem

Qua bốn đợt ép nhân hạt neem bằng máy ép dầu KOMET (Đức), với mỗi đợt ép từ 1,5 đến 19,25 kg nhân, chúng tôi nhận được kết quả sau: tỷ lệ dầu ép đạt từ 29,68% đến 39,4% (tb: 32,6%), bánh dầu từ 60,6% đến 70,32%, (tb: 67,4%). Tỷ lệ dầu ép trung bình 32,6% và lượng bánh dầu trung bình thu được 67,4% là phù hợp với các số liệu đã được thông báo [9]. Sự dao động của tỷ lệ dầu và bánh dầu qua các lần ép là do ảnh hưởng của chất lượng hạt (hạt mới hoặc hạt cũ) và ẩm độ của hạt. Tỷ lệ hao hụt qua 4 lần ép thử nghiệm là không đáng kể.

Kết quả ép dầu neem bằng máy KOMET

Lần ép	Lượng nhân hạt ép (kg)	Lượng dầu thu được (kg)	Lượng bánh dầu (kg)	Nhiệt độ dầu ép
Lần ép I	7,1	2,8 (39,4%)	4,3 (60,6%)	40°C
Lần ép II	8,0	2,7 (33,75%)	5,3 (66,25%)	40°C
Lần ép III	19,25	5,7 (29,68)	13,5 (70,32%)	40°C
Lần ép IV	1,5	0,45 (31%)	1,0 (69%)	40°C
<b>Tổng cộng:</b>	<b>35,85</b>	<b>11,65 (32,6%)</b>	<b>24,1 (67,4%)</b>	

## Quy trình ép dầu neem.



Bánh dầu thu được sau khi ép, được chiết từ 3 đến 5 lần với cồn (1kg bã/2l cồn 96° mỗi lần) được gom lại và cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C đến thể tích xác định. Dịch chiết từ bánh dầu được trộn với dầu đã lọc và bổ sung các phụ gia khác theo tỷ lệ thích hợp và đóng trong lọ nhựa có bọc màng để bảo quản. Bánh dầu được đóng gói bảo quản làm nguyên liệu để sản xuất phân bón sinh học.

## 2. Hàm lượng của các hoạt chất sinh học trong dầu và bánh dầu neem

Trong dầu và bánh dầu neem, đều có mặt cả ba hoạt chất sinh học azadirachtin, nimbin và salanin. Nhưng hàm lượng của hoạt chất chính azadirachtin nằm chủ yếu trong bánh dầu, nhiều hơn 6 lần trong dầu ép; hàm lượng của nimbin có trong bánh dầu và dầu ép tương đương nhau còn hàm lượng của salanin trong dầu lại lớn hơn

hàm lượng salanin có trong bánh dầu 1,3 lần. Qua khảo sát sơ bộ, chúng tôi nhận thấy có thể

thu được phần lớn hoạt chất azadirachtin có trong bánh dầu bằng dung môi thích hợp là cồn 96°.

Bảng 2

**Hàm lượng của các hoạt chất sinh học chính trong dầu và bánh dầu neem**

TT	Thành phần hoạt chất chính	Hàm lượng (%)	
		Bánh dầu neem	Dầu neem
1	Azadirachtin	0,350	0,055
2	Nimbin	0,012	0,019
3	Salanin	0,058	0,073

### 3. Thành phần và hàm lượng của các axit béo trong dầu neem

Qua ba đợt phân tích thành phần và hàm lượng của các axit béo trong dầu neem thu trong 3 năm (2002, 2003, 2004), chúng tôi nhận thấy: trong dầu neem có chứa một phổ rộng các axit béo no và không no, với hàm lượng dao động lớn, trong đó hàm lượng axit lauric (C12) là ít nhất (năm 2004: 0,12%; năm 2002 và 2003:

không phát hiện); hàm lượng của axit olêic (C18<sup>=</sup>) là lớn nhất, chiếm từ 43,62 đến 48,09%. Các kết quả phân tích này phù hợp với kết quả của Kumar và cs. (1996) [11]. Dầu neem có hiệu quả gây ngán ăn và xua đuổi côn trùng và chính dầu neem cũng còn có tác dụng làm bền hoạt chất chính azadirachtin [10, 11]. Như vậy, có thể dùng dầu neem làm nguyên liệu để sản xuất thuốc bảo vệ thực vật sinh học.

Bảng 3

**Thành phần và hàm lượng của các axit béo trong dầu neem**

TT	Thành phần axit béo	Hàm lượng (%)		
		Năm 2002	Năm 2003	Năm 2004
1	Axit lauric (C12)			0,120
2	Axit myristic (C14)	0,220	vết	-
3	Axit palmitic (C16)	15,37	15,00	16,51
4	Axit palmitoleic (C16 <sup>=</sup> )	0,100	0,090	-
5	Axit stearic (C18)	17,80	17,96	20,56
6	Axit olêic (C18 <sup>=</sup> )	48,09	47,96	43,62
7	Axit linoleic (C18 <sup>2=</sup> )	16,51	17,03	17,28
8	Axit linolenic (C18 <sup>3=</sup> )	0,500	0,500	0,500
9	Axit arachidic (C20)	1,420	1,470	1,400

### 4. Thử nghiệm hoạt lực của chế phẩm thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc từ dầu neem trên sâu xanh và sâu tơ

So sánh hiệu quả diệt sâu của 15 công thức phối chế giữa dầu neem và bột Bt cho thấy các chế phẩm phối trộn giữa dầu neem và bột Bt có hiệu lực diệt sâu xanh và sâu tơ cao hơn so với các chế phẩm chỉ chứa dầu neem hoặc bột Bt.

Với sâu xanh, ở nồng độ xử lý 5%, chế phẩm dầu neem và Bt đã có tác dụng diệt sâu xanh 100% sau 3 ngày xử lý. Với sâu tơ, chỉ sau 2

ngày phun thuốc, đã đạt được tỷ lệ diệt 100%, với nồng độ xử lý 2,5%.

### III. KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình ép dầu neem ở nhiệt độ thấp bằng máy ép dầu KOMET.

2. Đã xác định được 3 hoạt chất sinh học chính: azadirachtin, nimbin và salanin trong dầu và bánh dầu từ nhân hạt neem trồng tại Việt Nam; trong đó hàm lượng của azadirachtin trong bánh dầu cao hơn 6 lần trong dầu neem.

3. Đã xác định được thành phần và hàm lượng của các axit béo trong dầu neem.

4. Dầu neem và chế phẩm dầu neem phối trộn với bột Bt đều có tác dụng diệt sâu xanh và sâu tơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dương Anh Tuấn** và cs., 2002: Kết quả khảo nghiệm thuốc trừ sâu từ gốc thực vật trên sâu hại rau ở ngoại thành Hà Nội. Hội nghị côn trùng học toàn quốc lần 4: 489-494. Hà Nội.
2. **Dương Anh Tuấn**, 2002: Azadirachtin và các phân đoạn dầu neem trong hạt cây neem (*Azadirachta indica*) họ *Meliaceae* di thực vào Việt Nam có hoạt tính gây ngán ăn mạnh đối với sâu khoang. Hội nghị côn trùng học toàn quốc lần 4: 504-506. Hà Nội.
3. **Nguyễn Ngọc Kiểng**, 2000: Các phương pháp thí nghiệm trong nghiên cứu khoa học. Trường đại học Nông-lâm, Tp. Hồ Chí Minh.
4. **Nguyễn Thị Quỳnh** và cs., 2001: Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học công nghệ (1999-2000). Viện Sinh học Nhiệt đới: 137-140. Nxb. Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh.
5. **Nguyễn Thị Phương Thảo** và cs., 2001: Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học công nghệ (1999-2000). Viện Sinh học Nhiệt đới: 141-147. Nxb. Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh.
6. **Trần Đình Phả**, 1999: Nghiên cứu công nghệ nuôi nhân hàng loạt một số loại côn trùng họ ngài đêm, bộ cánh vẩy (*Lepidoptera: Noctuidae*) bằng thức ăn nhân tạo trong phòng thí nghiệm. Luận án tiến sỹ nông nghiệp: 169. Viện KH & KT NN Việt Nam, Hà Nội.
7. **Cooksey K. E.**, 1971: The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and mode of action. In: Microbial control of insects and mites: 247-274. Burges H. D. and Hussey N. W. (eds). Academic Press Inc. (London) Ltd.
8. **Falcon L. A.**, 1971: Use of bacteria for microbial control. In: Microbial control of insects and mites: 67-95. Burges H. D. and Hussey N. W. (eds). Academic Press Inc. (London) Ltd.
9. **Randhawa N. S., Parmar B. S.**, 1996: Neem. New Age International (P) limited, Publishers, New Dehli.
10. **Zebits C. P. W.**, 1995: Oil crop. In: The neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and others Meliaceae plants: 390-392 Weinhen-NewYork-Basel-Cambridge-Tokyo.
11. **Kumar J. and Parmar B. S.**, 1996: Journ. Agric. Food Chem., 44 (8): 2137-2143.

## INVESTIGATION OF THE CONTENTS OF THREE MAIN BIO-ACTIVE SUBSTANCES IN THE SEED OIL OF THE NEEM TREES PLANTED IN NINH THUAN PROVINCE, VIETNAM.

VU VAN DO, NGUYEN TIEN THANG, NGO KE SUONG

### SUMMARY

By the cold pressing method of the neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels at 40°C, we have received 32.6% neem oil and 67.4% neem cake. The results of the analysis on high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) showed that there were three main bio-active substances: azadirachtin, salanin and nimbin in the neem oil and neem cake; the azadirachtin contents in the neem cake were 6 times higher than that in the neem oil. The neem oil consisted of 9 saturated and unsaturated fatty acids; among them, the oleic acid (C18<sup>ω</sup>) contents were the highest (43%-48%) and the lauric acid (C12) contents were the lowest (trace-0.12%).

The 15 pesticides formulations from the neem oil and neem oil with Bt were made and tested on *Heliothis armigera* and *Plutella xylostella*. The results showed that the neem oil itself and neem oil with Bt all affected to kill actively the insects.

Ngày nhận bài: 10-8-2003