Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science | مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة و التطبيقية
No. 2 Vol. 25 Year 2012 | 2012 السنة 25 المجلد 2 العدد

Isolation and Identification of Azadirachtin from fruits of *Melia azedarach* L. (Meliaceae)

N. S. Mehdi, H. F. Al-Rubeae* and M. A. Ali

Department of Biology, College of Education, Ibn Al-Haitham, University of Baghdad.

*** Ministry of Science and Technology.**

Received in : 28 September 2010 Accepted in :11January 2012

Abstract

Azadirachtin is a naturally occurring substance that belongs to an organic molecule class which is called tetranortriterpenoids. It is on of the most powerful plant derived insecticides known, its structure is similar to insect hormones called ecdysoncs (Molting Hormone), which control the process of metamorphosis. Azadirachtin has been isolated from fruits of *Melia azedarach* L. The structure of this compound was determined by spectral studies (IR spectra and GC Mass spectra) and denitrified by then layer chromotochraphy (TLC).

Key Word: Azadirachtin, fruits, Meliaceae .

Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science | مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة و التطبيقية
No. 2 Vol. 25 Year 2012 | العدد 2 المجلد 25 السنة 2012

عزل وتشخيص مركب الازدراختين من ثمار نبات السبحبح

Melia azedarach L. (Meliaceae)

نوال صادق مهدي ، حسين فاضل الربيعي *، محمد علي عبد المنعم

قسم علوم الحياة، كلية التربية–ابن الهيثم، جامعة بغداد

*** وزارة العلوم والتكنولوجيا**

الخلاصة

الازدراختين مركب عضوي طبيعي يعود الى مجموعة من المركبات تسمى Tetranorterpenoid وهو من اقوى المركبات العضوية ذي الاصل النباتي تركيبه الكيميائي يشابه هرمونات الحشرات المسماة الاكداسيون (هرمونات الانسلاخ) التي تسيطر على عمليات التشكل فيها ، تم عزل هذا المركب من ثمار نبات السبحبح .*Melia azedarach* L. وقد اثبتت الدراسات الطيفية (قياس طيف الاشعة الحمراء وقياس طيف الكتلة) عزل هذا المركب وتم تنقيته والكشف عنه بطريقة كروماتوغرافيا الصفائح الرقيقة.

الكلمات المفتاحية: السبحبح، ازدراختين، عائلة Meliaceae.

المقدمة

ان البحث عن مبيدات حشرية مشتقة من النباتات استند الى اساس كونها ذات ضرر اقل في النظام البيئي، وقد تم خلال العقدين الاخرين عزل حوالي (10000) مركب كيميائي نباتي منها (1005) مركبات نباتية ذي تأثير سمي في الحشرات و (348) مركباً ذا تأثير مثبط للتغذية و (279) مركباً ذا تأثير طارد و (31) مركباً ذا تأثير مثبط للنمو وخمسة مركبات تسبب العقم في الحشرات [1].

ان هذه المركبات متنوعة ومعقدة التركيب الكيميائي وقد اختلف العلماء في تصنيفها فمنهم من صنفها تبعاً للتركيب الكيميائي، ومنهم من صنفها تبعاً لمصدر تكونها خلال عمليات الايض الحيوي ومن اهم المركبات القلويدات والفينولات والكلايكوسيدات والتربينات [2].

من المركبات الكيمياوية المهمة التي تعود لمجموعة التربينات ما يعرف بالستيرويدات النباتية وهي مركبات حلقية معقدة التركيب تشبه في تركيبها الكيمياوي هرمون الانسلاخ (Ecdyson) في الحشرات ومن المركبات المهمة التابعة لهذه المجموعة ما يعرف بالـ Limonoid وهي مركبات خماسية الحلقة تتواجد في بعض العوائل النباتية منها Rutaceae والـ Simarobaceae والـ Meliaceae. تتميز هذه المركبات بطعمها المر وبفعاليتها الفسلجية العالية في الافات الحشرية وباتت تشكل وسيلة دفاع مهمة ضد هجوم الحشرات والاحياء الاخرى [3]. ومن اهم المركبات التي تعود الى مجموعة الـ Limonoid هذا مركب الازدراختين الذي امكن عزله من انواع من العائلة الزنزلختية Meliaceae مثل النيم والسبحبح [4,5]، ان الخصائص القاتلة للحشرات التي يتميز بها هذا المركب لاحظها اول مرة العالم Heinrich Schmutterer عام

1959 عندما اجتاح الجراد المهاجر السودان ،اذ يتبين ان اشجار النيم لم تتأثر بذلك وقد وجد أن له فعالية شديدة ضد العديد من الافات الحشرية المخزنية والمن والجراد والحشرات الماصة للدم ذي الاهمية الطبية [6,7].

وقد عرف تركيبه الكيميائي ($C_{35}H_{44}O_{16}$) من قبل العالم (Zanno *et al.*, 1975) [8]. وهو مركب رباعي الحلقة يعود الى مجموعة التربينات الثلاثية وقد وجد ان لهذا المركب تأثيراً مانعاً للتغذية ووضع البيض ومعوق لنمو وتطور الحشرات.

وقد اجريت الكثير من البحوث العلمية والتجارب الحقلية حول استعمال هذا المركب في السيطرة على مختلف الافات الزراعية ولاسيما الحشرات نباتية التغذية من رتبتي حرشفية الاجنحة وعمدية الاجنحة، كما شخصت فعاليته الشديدة تجاه العديد من الحشرات ذي الاهمية الطبية، كما عرفت فعاليته الشديدة تجاه انواع اخرى من الاحياء منها الديدان والفطريات والابتدائيات وغيرها [9,10,11]، كذلك استعمل هذا المركب في علاج مرض السكر [12] ومرض الملاريا والروماتزم وامراض اخرى [13] كما وجد ان هذا المركب يمنع نمو الخلايا السرطانية [14]. تمكنت بعض الدول مثل الولايات المتحدة والمانيا والهند من انتاج تحضيرات تجارية يدخل في تركيبها هذا المركب لغرض استعمالها كمبيدات حشرية [7].

يهدف هذا البحث الى عزل وتشخيص مركب الازدراختين من ثمار نبات السبحبح *Melia azedarach* L. المستزرع في العراق والتابع لعائلة Meliaceae.

المواد وطرائق العمل

1. جمع ثمار النبات

جمعت ثمار نبات السبحبح *M. azedarach* من مواقع متفرقة من محافظة بغداد، تم تشخيص النبات من المعشب الوطني العراقي في ابي غريب. نظفت الثمار من الاتربة وجففت في مكان دافيء ومضلل، بعدها طحنت بمطحنة كهربائية (60-50) mesh، وضع مسحوق الثمار في قنينة زجاجية نظيفة ومعقمة.

2. عزل مركب الازدراختين

اتبعت طريقة (Yamasaki *et al.*, 1986) [5] في فصل مركب الازدراختين التي تتلخص بالاتي:

وضع (300) غم من مسحوق ثمار السبحبح في بيكر نظيف، اضيف اليه (750) سم^3 من مذيب ن- هكسان مع التحريك المستمر لساعات عديدة بأستعمال الخلاط المغناطيسي وبدرجة حرارة الغرفة، ترك ليبرد وازيل الراشح، اعيد استخلاص مسحوق الثمار مرة ثانية بأستخدام (750) سم^3 من مذيب الميثانول وازيل الراشح، كرر الاستخلاص بالميثانول مرة اخرى ثم ترك ليركد وازيل الراشح، جمع راشح الميثانول وعزل المذيب بوساطة جهاز المبخر الدوار ليعطي مستخلص (بشكل قطران) برتقالي اللون (28) غم، اذيب المستخلص الاخير في (300) سم^3 ميثانول واضيف اليه (300) سم^3 ماء مقطر مع التحريك بلطف ثم اضيف (300) سم^3 من مذيب ن-هكسان و (300) سم^3 من مذيب ثنائي كلورو الميثان وجمعت في قمع الفصل، اذ تميزت الى طبقتين عزلت الطبقة السفلى (مذيب ثنائي كلورو الميثان) ثم تبخير المذيب بجهاز المبخر الدوار ليخلف مادة صلبة برتقالية اللون تمثل مادة الازدراختين الخام.

3. تنقية مركب الازدراختين

اتبعت طريقة كروموتوغرافيا الصفائح الرقيقة TLC(Thin Layer Chromatography) وفيها استعمل الوعاء الخاص وكان ارتفاعه (30) سم ذو غطاء زجاجي، استخدم مزيج (ن-هكسان:ايزوبروبانول) بنسبة (11:9) على التوالي لغرض الروغان [5]، اما الصفائح المستخدمة فكانت صفائح لدائنية بابعاد (20x20) سم مغطاة بطبقة سمكها (0.250) ملم من مادة Silica Gel 60HF245 والمجهزة من شركة Marck نشطت في فرن حراري بدرجة (100) °م مدة (3) دقائق. اذيب (0.1) غم من مركب الازدراختين الذي تم فصله في (2) سم^3 من كحول الايثانول ورج جيدا لحين الذوبان، وضعت قطرات صغيرة من المحلول الكحولي السابق بوساطة انابيب شعرية وتركت لتجف على شكل بقع صغيرة وكانت المسافة بين بقعة واخرى (2) سم وتركت مسافة (2) سم عند حافتي الصفيحة. وضعت الصفيحة داخل الوعاء الزجاجي الخاص على ان يكون مستوى المحلول تحت موضع بقع محلول المركب، غطي الوعاء باحكام وترك تحت ظروف المختبر وتم مراقبة وصول حافة المذيب ما قبل نهاية حافة الصحيفة بقليل، اخرجت الصحيفة وتركت لتجف وعرضت للاشعة فوق البنفسجية لتحديد موقع البقع حسب الـ R_f (Mobility Relative to Front).

تم الكشف عن مركب الازدراختين باستعمال الكاشف الخاص والمحضر من اضافة (3) غم من مادة الفانيلين الى (1.5) سم^3 من حامض الكبريتيك المركز واضيف اليهما (100) سم^3 من الكحول الاثيلي ورج جيدا لحين الذوبان، اذ رشت صفائح الـ TLC بالكاشف.

ظهرت بقع مركب الازدراختين بلون بني محمر تحول الى الاخضر.

4.الدراسات الطيفية لمركب الازدراختين

أ- التحليل الطيفي بالاشعة تحت الحمراء IR (Infra Red Spectroscopy): اجري تحليل طيف الاشعة تحت الحمراء بأستخدام جهاز مطياف تحت الحمراء نوع Pye-Unicam SP_3 Infra Red Spectroscopy (England) وذلك بعمل نموذج للمادة في قرص من مادة بروميد البوتاسيوم (KBr).

ب- قياس طيف الكتلة Mass GC: قيس طيف الكتلة للمركب (الازدراختين) المعزول بجهاز GC-Ms نوع Schimadzu Specterometer QP1000A بأستخدام قطب الادخال المباشر (Direct Inlet Probe) ومدى طيف كتلي (M/z= 1-1000).

النتائج والمناقشة

1- فصل وتنقية مركب الازدراختين

تم الحصول على (1.2) غم لكل (300) غم من مسحوق ثمار السبحبح وتعد هذه الكمية قليلة بالمقارنة مع ماذكره (Yamasaki *et al.*, 1986) [5] عند فصل مركب الازدراختين من لب البذور المعزولة من ثمار النيم (*Azederachta indica*) التابع لنفس عائلة السبحبح وهي العائلة الزنزلختية (Meliaceae)، وهذا يدل على ان ثمار النيم قد تتضمن كمية اكبر من المركب من ثمار نبات السبحبح من الصعب جدا فصلها من الثمار لذلك جرى طحن الثمار كاملة وليس البذور كما في المصدر.

وعند اجراء عملية تنقية المركب بطريقة الـ TLC بأستخادم المذيب (ن- هكسان-ايزوبوبانول) بنسبة (11:9) على التوالي، ظهرت بقع مذنبة للمركب تلونت بلون بني محمر تحول للاخضر وهذا يتطابق مع [5] عند رشها بالكاشف الخاص وهذا يؤيد فصل المركبات المذكور، وعند قياس الـ R_f للبقعة وجد انها (0.56) وهذا يتطابق مع (Morgan and Thornton, 1973) [15].

2- الدراسات الطيفية لمركب الازدراختين

اظهر طيف الاشعة تحت الحمراء لانموذج المركب المفصول من ثمار السبحبح القمم الواضحة في الشكل (1) حيث اذ القمة العريضة عند (3460) cm^{-1} تعزى الى اهتزاز امتطاطي Stretching Vibration لمجاميع O-H. اما الحزمة القوية عند (1740) cm^{-1} فتنتج عن الاهتزاز الامتطاطي لمجاميع الكاربوتيل C=O ويلاحظ في الشكل (1) حزما ضعيفة ايضا عند (1650) cm^{-1} و(1620) cm^{-1} التي تمثل الاهتزازات المرنة لمجاميع C=C وان هذه القمم تشابه كثيرا طيف الاشعة تحت الحمراء لمركب الازدراختين القياسي [16].

يظهر الشكل (2) قياسات طيف الكتلة لانموذج مادة الازراختين المعزول، ان نمط التكسر (Fragmentation Pattern) يشابه كثيراً نمط التكسر لطيف الكتلة لنموذج الازدراختين 23,22 ثنائي الهايدروازدراختين 22,23 Dihydroazadirachtin ذي الصيغة الجزيئية $C_{35}H_{46}O_{16}$ [16] والوزن الجزيئي له (722.71) $g.mol^{-1}$ [17].

المصادر

1. Grange, M. S.; Ahmed, W. C. and Mitchell, T. W. Plant species reportedly possessing pest control properties. Ann. EWC/VH Database. Resource System Institute, Est. West. Center, Honolulu, Hawaii, USA.

2. الشماع، علي عبد الحسين (1989) العقاقير وكيمياء النباتات الطبية. بيت الحكمة للطباعة والنشر، جامعة بغداد: 397 صفحة.

3. Harborne, J. B. (1973). Phytochemical methods, Aguide modern techniques of plant analysis. Halsted Press. John Wiley and Sons, New York: 278 pp.

4. Al-Sharook, Z. M.; Balan, K.; Jiang, Y. and Rembold (1991). Insect growth inhibitors from two tropical Meliaceae effect of crude seed extracts on mosquito larvae. J. Appl. Entomol., 111: 425-430.

5. Yamasaki, R. B.; Kloke, J. A.; Lee, S. M. Stone, G. A. and Darlington, M. V. (1986). Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using chromatography and high-performance liquid chromatography.J. Chromatog., 356: 220-226.

6. Veich, G. E.; Boyer, A. and Ley, S. V. (2008). The azadirachtin story. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 47: 9402-9429.

7. Parmar, B. S. and Singh, R. P. (ed.) (1993). Neem in Agriculture, Indian agricultural Research Institute. New Delhi, 110012: 85 pp.

8. Zanno, P. R.; Mura, I. and Nakanishi, K. (1975). Structure of the insect phagorepellent, azadirachtin, application of PRFT/ CWD carbon-13. Nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc., 97: 1975-1977.

9. Akhter, Y.; Yeoung, Y. R. and Isman, M. B. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuiel caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*, Phytochem. Rev., 7: 77-88.

10. Mulla, M. S. and Su, T. (1999). Activity and biological effects of neem product against arthropods of medical and veterinary importance. J. Am. Mosq. Control Assoc., 15: 133-152.

11. Rembold, H. (1989). Azadirachtins: their structure and mode of action. In: Insectreides of plant origin, ACS Symp-Ser. 387 (eds-Arnason, J.T.; Philogene, B. J. R. and Morand , P.): 150-163 pp. American Chemical Society, Washington, DC.

12. Khosla, P.; Bhanwra, S.; Singh, J.; Seth, S. and Srivastava, R. K. (2001). Astudy of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in nonmaland alloxan diabetic rabbits. Indian J. Physiol. & Pharm., 44: 69-74.

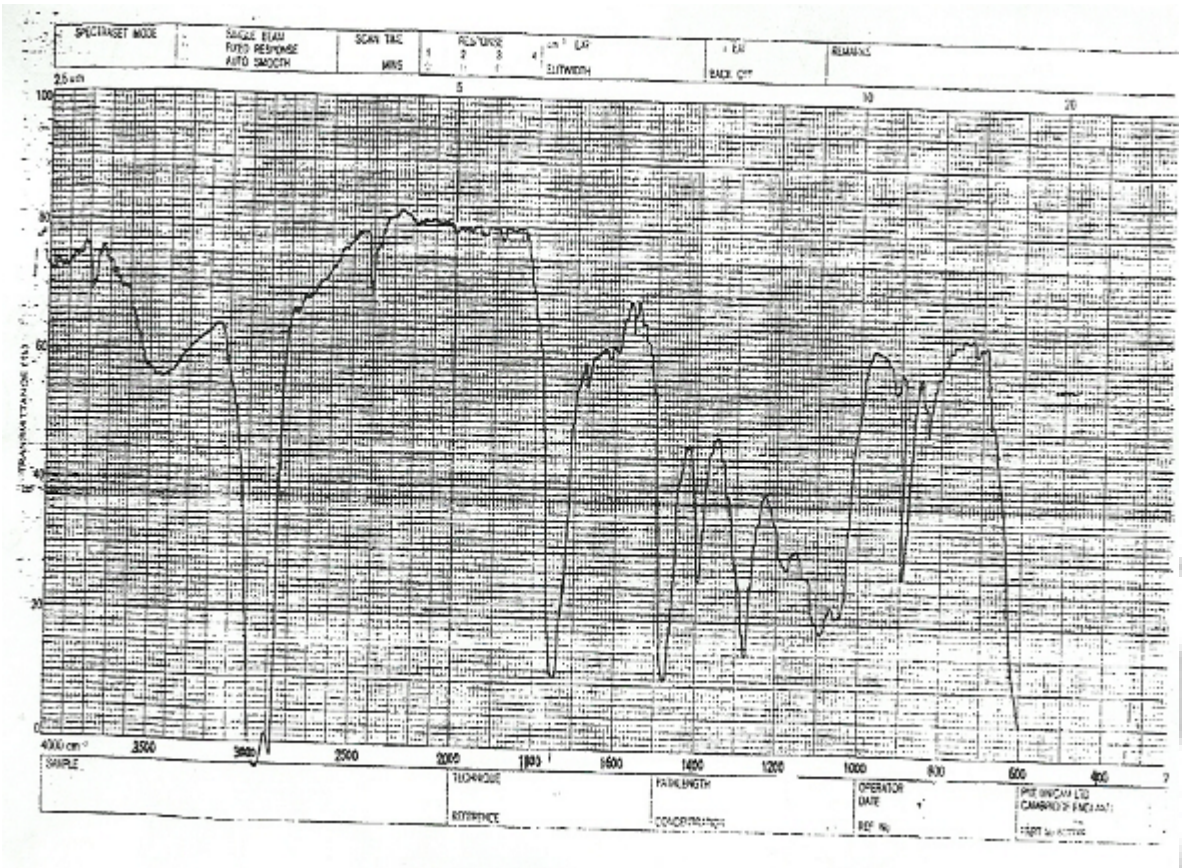
13. Toh, M.; Babajan, B.; Ragavendra, P. B.; Sureshkumar, C. and Manna, S. K. (2011). Azadirachtin interacts with retinoic acid receptors and inhibits retinoic acid mediated biological responses. J. Biol. Chem., 286: 4690-4702.

14. Priyadvaini, R. V.; Murugan, R. S.; Sripriya, P., Karunagaran, D. and Nagini, S. (2010). The neem limonoids azadirachtin and nimbloide induce cell cycle arrest and minochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (Hela) cell. Free Radic. Res., 44:624-634.

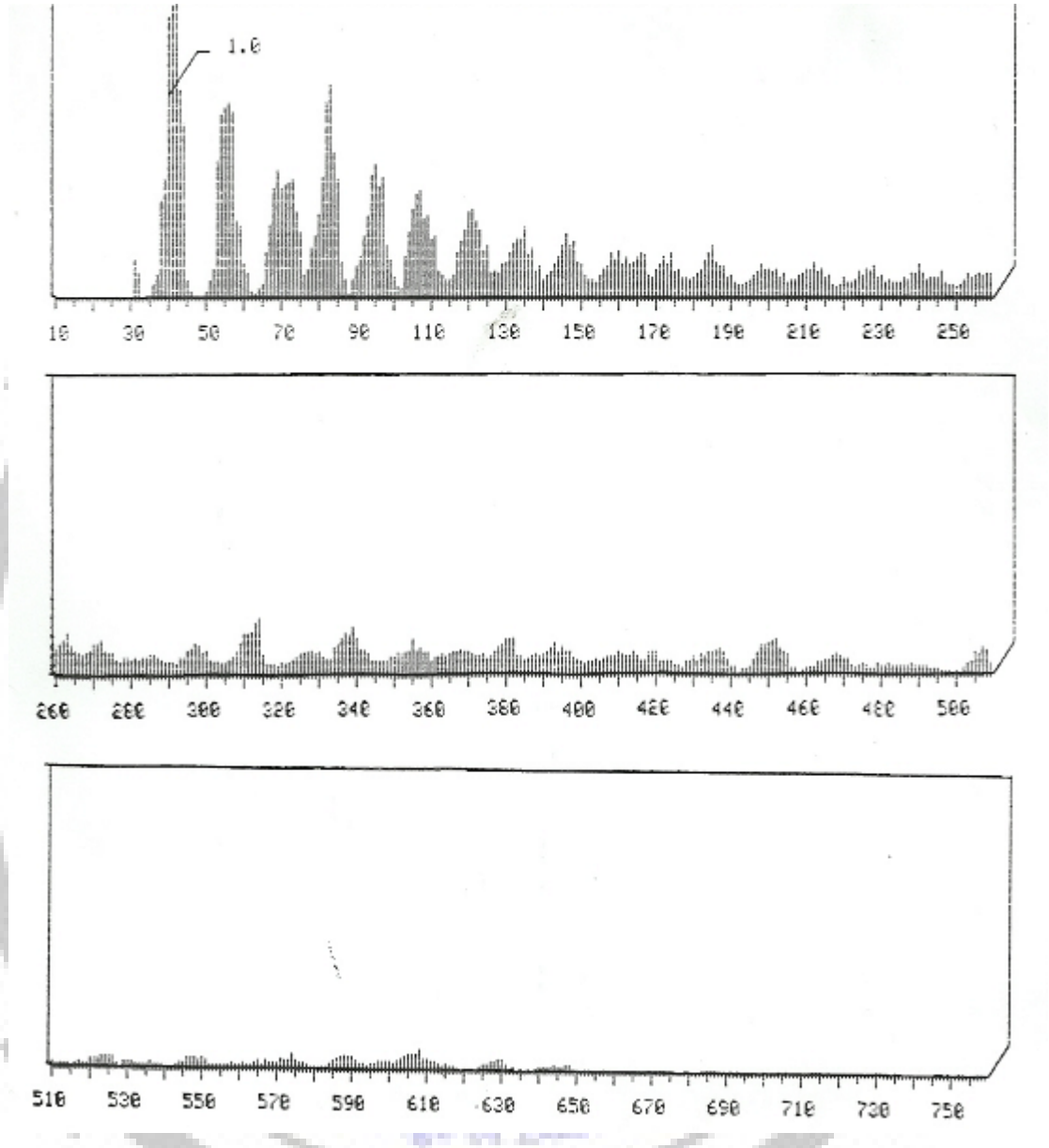
15. Morgan, E. D. and Thornton, M. D. (1073). Azadirachtin in the fruit of *Melia azedarach* L., Phytochem., 12: 391-392.

16. Butterworth, J. H. and Morgan, E. D. (1971). Investigation of the locust feeding inhibition of the seed of the neem tree *Azadirachta indica* insect. Physiol., 17: 969-977.

17. NIST (1998). National institute of standards technology, Mass Spectrometry Database center IA, USA.



شكل(1): طيف الاشعة تحت الحمراء لمركب الازدراختين المعزول من ثمار السبحبح *M. azedarach* L.



شكل (2): طيف الكتلة لمركب الازدراختين المعزول من ثمار السبحبح *M. azedarach* L.