

文章编号: 1001-411X(2001)04-0029-04

非洲山毛豆叶片中鱼藤酮的提取方法

黄继光, 徐汉虹, 周利娟, 刘新清, 江定心

(华南农业大学昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 用索氏、冷浸和振荡抽提 3 种方法和 6 种不同的溶剂对非洲山毛豆叶片进行了提取研究, 并用 HPLC 测定了提取物和植物叶片干粉中鱼藤酮的含量。结果表明, 用氯仿振荡抽提紫花品种叶片得到的粗提物中鱼藤酮的含量最高, w 为 9.70%; 丙酮索氏抽提紫花品种叶片所求得的植物干粉中鱼藤酮的含量最高, w 为 0.72%。中等极性溶剂如氯仿、苯、乙酸乙酯、丙酮等对鱼藤酮的提取率较高, 建议实验室内提取溶剂用氯仿或丙酮, 工厂化生产时用苯较好。

关键词: 非洲山毛豆; 提取; 鱼藤酮含量

中图分类号: S482.39

文献标识码: A

非洲山毛豆(*Tephrosia vogelii* Hook f.)是属于豆科灰叶属的一种有效杀虫植物, 其主要活性成分为鱼藤酮及其类似物^[1~4]。植株的叶片、茎秆、豆荚、根、种子等部位都含有活性成分, 其中叶片中鱼藤酮类似物的含量最高, w 可达 4.25%^[4~9]。以前人们用比色法^[7], 测定的是提取物中鱼藤酮及其类似物的总量, 结果的准确度不高。为准确测定鱼藤酮这一主要有效成分在非洲山毛豆中的含量, 本文用不同提取方法和不同溶剂对非洲山毛豆叶片干粉进行提取, 并用高效液相色谱(HPLC)法对叶片和提取物中的鱼藤酮含量进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料

非洲山毛豆紫花和白花品种叶片采于华南农业大学昆虫毒理研究室杀虫植物标本园内, 烘干(45~50℃), 粉碎。鱼藤酮纯品(w 为 97%), 由 Sigma 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 用石油醚、氯仿、苯、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等 6 种极性不同的有机溶剂按下列方法进行提取(所有溶剂均为分析纯)。每处理重复 3 次。

(1)索氏抽提法: 分别称取紫花和白花品种的植物干粉 20 g, 用滤纸包好放入索氏提取器中提取, 回流至溶剂为无色时停止。将提取液浓缩, 得粗提物。

(2)冷浸法: 称取 20 g 干粉, 加入 400 mL 的有机溶剂置于避光暗处(24~25℃)浸提 48 h, 过滤出溶剂, 再加入 200 mL 溶剂浸提 24 h, 过滤。用 100 mL 溶剂冲洗滤渣, 合并 3 次的滤液, 浓缩得浸提粗提物。

(3)振荡提取法: 称取 20 g 干粉, 加入 400 mL 的溶剂置于恒温摇床上振荡抽提 48 h, 以下步骤同冷浸法。

1.2.2 提取物的配制 根据提取率准确称取一定量的粗提物, 用丙酮定容至每 mL 含 1 g 植物干粉, 逐级稀释 100 倍, 即 0.01 g/mL, 密封待测。

1.3 鱼藤酮的定性和定量测定

用美国惠普公司生产的 1100 型 HPLC 配置: 四元梯度泵、紫外可见光检测器、手动进样器、惠普化学工作站、ODS 柱(5 μ m, 125 mm×4 mm)。测定条件: 流动相为甲醇:水=69:31($v:v$); 流速 0.8 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 299 nm; 柱温室温; 检测灵敏度 AUFS=0.001。

1.3.1 定性 根据标样的出峰时间(保留时间)进行定性。

1.3.2 定量 根据已知浓度标样鱼藤酮的吸收峰面积和样品鱼藤酮吸收峰面积与它们各自的含量成正比的关系测定试样中鱼藤酮的含量, 计算公式如下:

$$C_{\text{样}} = \frac{S_{\text{样}} \times C_{\text{标}}}{S_{\text{标}}}$$

$S_{\text{标}}$ 和 $S_{\text{样}}$ 分别表示标样和样品的吸收峰面积;
 $C_{\text{标}}$ 和 $C_{\text{样}}$ 分别表示标样和样品的浓度。

粗提物中的鱼藤酮含量 = $\frac{\text{干粉中的鱼藤酮含量}}{\text{提取率}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

用不同溶剂和不同方法提取非洲山毛豆不同品种叶片后所测定的结果见表 1~6。

收稿日期: 2001-03-19

作者简介: 黄继光(1976-), 男, 现为华南农业大学在读硕士研究生。

基金项目: 高等学校骨干教师资助项目[教技司(2000)65 号]; 中华农业科教基金人才基金资助项目(93-03-B-06)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在索氏、冷浸和振荡提取中,紫花品种叶片干粉中鱼藤酮含量最高的依次是丙酮、氯仿、丙酮作提取溶剂, w 分别为 0.72%、0.63%、0.68%;白花品种叶片干粉中鱼藤酮含量最高的依次是苯、丙酮和丙酮 3 种溶剂, w 分别是 0.57%、0.48%、0.43%,其中振荡提取中白花品种丙酮和乙酸乙酯提取计算求出的植物干粉中的鱼藤酮含量相同。

在索氏提取和冷浸法提取中,紫花和白花品种提取物中鱼藤酮含量最高的都是苯和石油醚提取

物, w 分别是 8.01%、6.34%和 6.73%、4.74%。石油醚提取物中鱼藤酮含量虽然比较高,但是它的提取率较低, w 分别只有 5.41%和 4.58%,可能是因为提取出来的杂质较少,而使提取物中鱼藤酮的含量增高的缘故。而振荡抽提中,紫花和白花品种提取物中鱼藤酮含量最高的分别是氯仿提取物和丙酮提取物,含量分别为 9.70%和 6.43%。

表 1 索氏抽提紫花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 1 Results of rotenone in leaves of purple variety extracted by Soxhlet extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/%	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w (干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w (粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	10.52	3.415	0.34b	3.25
苯 benzene	8.24	6.619	0.66a	8.01
氯仿 chloroform	10.27	5.406	0.54a	5.26
乙酸乙酯 ethyl acetate	7.30	5.559	0.56a	7.68
丙酮 acetone	9.06	7.184	0.72a	7.95
甲醇 methanol	20.13	2.994	0.30b	1.49

1) 表中同列数据后字母相同者,表示在 5%水平上无显著差异(DMRT)

表 2 冷浸抽提紫花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 2 Results of rotenone in leaves of purple variety extracted by cold extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/%	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w (干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w (粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	5.41	3.431	0.34b	6.34
苯 benzene	10.38	6.026	0.60a	5.78
氯仿 chloroform	11.65	6.302	0.63a	5.41
乙酸乙酯 ethyl acetate	13.50	4.391	0.44 ab	3.26
丙酮 acetone	13.53	5.557	0.56a	4.18
甲醇 methanol	26.87	1.187	0.12c	0.46

1) 表中同列数据后字母相同者,表示在 5%水平上无显著差异(DMRT)

表 3 振荡抽提紫花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 3 Results of rotenone in leaves of purple variety extracted by vibrating extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/%	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w (干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w (粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	8.68	3.654	0.37b	4.21
苯 benzene	6.38	5.388	0.54a	8.44
氯仿 chloroform	6.40	6.207	0.62a	9.70
乙酸乙酯 ethyl acetate	6.60	5.752	0.58a	8.72
丙酮 acetone	7.74	6.826	0.68a	8.82
甲醇 methanol	24.13	3.295	0.33b	1.37

1) 表中同列数据后字母相同者,表示在 5%水平上无显著差异(DMRT)

表 4 索氏抽提白花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 4 Results of rotenone in leaves of white variety extracted by Soxhlet extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/ %	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w(干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w(粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	9. 62	3. 078	0. 31b	3. 20
苯 benzene	8. 47	5. 732	0. 57a	6. 73
氯仿 chlorofom	10. 99	5. 345	0. 53a	4. 82
乙酸乙酯 ethyl acetate	8. 44	5. 379	0. 54a	6. 40
丙酮 acetone	8. 60	5. 297	0. 53a	6. 16
甲醇 methanol	19. 05	2. 817	0. 28b	1. 47

1) 表中同列数据后字母相同者, 表示在 5% 水平上无显著差异(DMRT)

表 5 冷浸抽提白花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 5 Results of rotenone in leaves of white variety extracted by cold extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/ %	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w(干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w(粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	4. 58	2. 169	0. 22b	4. 74
苯 benzene	9. 25	3. 673	0. 37ab	4. 00
氯仿 chlorofom	9. 79	4. 178	0. 42a	4. 29
乙酸乙酯 ethyl acetate	14. 43	4. 159	0. 42a	2. 91
丙酮 acetone	12. 09	4. 786	0. 48a	3. 97
甲醇 methanol	25. 02	1. 107	0. 11c	0. 44

1) 表中同列数据后字母相同者, 表示在 5% 水平上无显著差异(DMRT)

表 6 振荡抽提白花品种叶片的结果¹⁾

Tab. 6 Results of rotenone in leaves of white variety extracted by vibrating extraction

溶 剂 solvents	提取率 extraction rate/ %	ρ (样品中鱼藤酮 rotenone in sample) / (g·mL ⁻¹)	w(干粉中的鱼藤 酮 rotenone in dry powder)/ %	w(粗提物中的鱼藤 酮 rotenone in crude extracts)/ %
石油醚 petroleum ether	8. 04	1. 733	0. 17c	2. 16
苯 benzene	6. 80	4. 001	0. 40a	5. 88
氯仿 chlorofom	8. 36	3. 790	0. 38a	4. 53
乙酸乙酯 ethyl acetate	6. 86	4. 269	0. 43a	6. 22
丙酮 acetone	6. 72	4. 318	0. 43a	6. 43
甲醇 methanol	23. 04	3. 079	0. 31b	1. 34

1) 表中同列数据后字母相同者, 表示在 5% 水平上无显著差异(DMRT)

无论用不同的提取方法, 还是用不同极性的提取溶剂, 紫花品种叶片干粉中的鱼藤酮含量均比相应的白花品种高, 粗提取物中鱼藤酮含量亦如此。6 种不同极性的有机溶剂中, 无论用哪一种提取方法, 都是甲醇的提取率最高, 最高时达 26. 87%(表 2), 比其他几种溶剂高很多, 这与它的强极性有关。

3 结论与讨论

用氯仿、苯、丙酮、乙酸乙酯 4 种中等极性的有机溶剂, 无论采取哪种提取方法, 它们的提取效果差

异不显著。4 种溶剂互有高低, 并且提取效果都比较好, 说明它们提取非洲山毛豆中的鱼藤酮都比较合适。非极性的石油醚和强极性的甲醇对鱼藤酮的提取率都不高, 与上述 4 种中等极性溶剂存在显著差异。从另外一方面考虑, 鱼藤酮在氯仿、苯、丙酮和乙酸乙酯中的溶解度较大, 而在石油醚和甲醇中的溶解度较小, 这与它们的提取效果有一定的关系。可见, 不同的溶剂在提取鱼藤酮时, 其提取能力与鱼藤酮在此种溶剂中的溶解度有关。但是并不是溶剂对鱼藤酮的溶解度越大, 其提取效果就越好。当鱼藤酮

在某种溶剂中有一定的溶解度, 在一定量的体积时就足够可以将样品中鱼藤酮完全提取出来. 如果溶剂对鱼藤酮的溶解度进一步提高, 但是其提取能力却变化不明显, 即它们的提取效果相差不明显. 这正是氯仿、苯、丙酮和乙酸乙酯的提取效果相差不显著的原因, 虽然鱼藤酮在氯仿中的溶解度高达 33.0 g, 而在另外 3 种溶剂中的溶解度均在 10 g 以下.

3 种不同的提取方法相比, 它们各有优缺点. 提取少量样品, 用索氏提取较好, 所需时间较短, 并且可以提取得很完全, 但不能提取对热不稳定的样品; 冷浸法可以提取大批量样品, 不需要其他的仪器设备, 方法简便, 但对有效成分的提取率不高, 并且耗时; 振荡提取的提取率比较高, 提取时间也较短, 可以提取对热不稳定的样品, 但是需要振荡仪, 处理大量样品时不方便. 对不同的需要可以采取不同的提取方法, 如果需要提取大量样品, 用冷浸法多次提取比较合适; 如果要快速提取的话, 则用振荡提取和索氏提取都可以, 可以根据实际条件加以选择. 对提取溶剂的选取, 从成本、毒性、回收的难易程度等方面考虑, 建议工厂化生产时用苯做溶剂较好, 因为苯的成本较低, 在实验室内可用氯仿或丙酮做溶剂, 它们对鱼藤酮的溶解度较大, 并且丙酮的毒性较小.

目前, 在植物性杀虫剂的研究中, 所用的提取方法一般都是索氏、冷浸等比较传统的提取方法. 这些

方法存在一些不足之处, 如需要耗费大量有机溶剂, 易引起人员中毒等. 当今新兴流行的超临界流体萃取和微波萃取在提取样品中有快速、提取杂质少等优点而被广泛应用, 它们具备许多常规方法没有的优点. 用这些方法来提取非洲山毛豆样品, 其结果怎样, 值得进一步研究.

参考文献:

[1] 张业光 徐汉虹 黄继光, 等. 非洲山毛豆的主要杀虫活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(6): 6—12.
[2] 张业光. 非洲山毛豆提取物对菜青虫生物活性及其有效成分研究[D]. 广州: 华南农业大学, 1990.
[3] 徐汉虹, 黄继光. 鱼藤酮的研究进展[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 138—143.
[4] IRVINE J E, FREYRE R H. Varietal difference in the rotenone and rotenoid content of *Tephrosia vogelii*[J]. Agron J, 1959, 51: 664—665.
[5] 徐汉虹, 张业光, 黄继光, 等. 非洲山毛豆提取物及鱼藤酮对菜粉蝶幼虫和蛹体壁的影响[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 27—30.
[6] 张业光, 徐汉虹, 黄继光, 等. 非洲山毛豆对几种鳞翅目害虫的拒食作用[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(4): 26—29.
[7] GROSS C R, SMITH M. Colorimetric method for determination of rotenone[J]. J Assoc Offic Agri Chemists, 1934, 17: 336—339.

Extracting Methods of Rotenone in Leaves of *Tephrosia vogelii* Hook f.

HUANG Ji—guang, XU Han—hong, ZHOU Li—juan, LIU Xin—qing, JIANG Ding—xin
(Lab. of Insect Toxicology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China)

Abstract: Three kinds of extracting methods and six kinds of solvents were applied to extract the leaves of *Tephrosia vogelii* Hook f., the content of rotenone in the extracts and dry powder of leaves were detected by HPLC. It showed that the content of rotenone in the crude extracts extracted by chloroform with vibrating extraction from purple variety was the highest to 9.70%, and the respond content of rotenone in dry powder of leaves of *T. vogelii* extracted by acetone with Soxhlet from purple variety was the highest to 0.72%. Moderate polarity solvents such as chloroform, benzene, acetone and ethyl acetate were proper to extract rotenone, while chloroform or acetone used in laboratory and benzene used in factory were appropriate.

Key words: *Tephrosia vogelii* Hook f.; extract; rotenone

【责任编辑 周志红】