

超临界 CO₂ 流体萃取印楝种子中印楝素的研究

江定心, 徐汉虹, 杨晓云, 黄继光

(农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 建立了用超临界流体从印楝种子中萃取印楝素的方法. 用正交试验优化设计选择萃取条件, 最佳萃取条件为: 温度 35 ℃, 压力 30 MPa, 夹带剂用量每克印楝种子干粉 1.5 mL 甲醇. 提取率明显优于溶剂法.

关键词: 超临界 CO₂ 流体萃取; 印楝种子; 印楝素

中图分类号: TQ 453.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 01-0070-03

Extraction of azadirachtin from neem seeds by supercritical CO₂

JIANG Ding-xin, XU Han-hong, YANG Xiao-yun, HUANG Ji-guang

(The Key Lab of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Lab of Insect Toxicology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The extraction of azadirachtin from neem seeds with supercritical CO₂ fluid was studied. The optimal conditions were obtained with orthogonal arrays, which were 35 ℃, 30 MPa and 1.5 mL methanol per gram neem seed dry powder. The results indicated that the yield of azadirachtin extracted by supercritical CO₂ fluid extraction was higher than that by solvent significantly.

Key words: supercritical CO₂ fluid extraction; neem seeds; azadirachtin

印楝素 (azadirachtin) 是第一个从印楝 *Azadirachta indica* 种子中分离出来的、目前世界公认的活性最强的植物源昆虫拒食剂^[1], 对害虫具有显著的拒食和生长发育抑制作用. 印楝素主要存在于印楝种子中, 印楝种子中含印楝素可达 0.1% ~ 0.9% (w)^[1]. 为了从印楝种子中充分提取印楝素, 本文研究了用正交试验优化设计选择超临界流体从印楝种子中提取印楝素的最佳萃取条件.

1 材料与方法

1.1 材料

印楝种子产自缅甸, 由成都绿金生物科技有限责任公司提供, 粉碎. 印楝素纯品 (w 为 95%), 美国 Sigma 公司.

1.2 超临界 CO₂ 流体装置

1 L 超临界 CO₂ 流体装置: 华南理工大学汉维新

型分离技术开发中心.

1.3 高效液相色谱仪

1100 型高效液相色谱仪: 美国惠普公司.

1.4 试验方法

1.4.1 超临界 CO₂ 流体萃取印楝素方法 采用正交试验优化设计, 预先确定温度、压力和夹带剂用量, 向超临界萃取罐中加入一定量的印楝种子干粉, 夹带剂提前 12 h 左右加入印楝种子干粉中, 并混合均匀. 当达到预定条件后, 开始计时, 萃取 2.5 h. 每处理重复 3 次, 测量结果为 3 次重复的平均值.

1.4.2 常温冷浸提取印楝素方法 称取 20 g 印楝种子干粉于三角瓶中, 加入 80 mL 甲醇, 浸提 48 h, 大约每 6 h 震荡 1 次, 减压浓缩, 再加入 80 mL 甲醇, 冷浸 48 h, 减压浓缩, 如此 3 次, 合并 3 次的提取物, 称质量备用. 每处理重复 3 次, 测量结果为 3 次重复的平均值.

收稿日期: 2003-12-11

作者简介: 江定心 (1976-), 男, 博士研究生. 通讯作者: 徐汉虹 (1961-), 男, 教授, 博士;

E-mail: hxxu@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20377015); 广州市农业局招标项目 (GK0302103); 广州市科技攻关引导项目 (2003Z3-E0201)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1. 4. 3 印楝素含量的定量分析方法 参考何道航^[2] 的高效液相色谱法, 色谱条件为: 流动相: $V_{\text{(乙腈)}}:V_{\text{(水)}}=28:72$; 紫外检测器检测波长: 217 nm; 色谱柱: C₁₈柱; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L.

2 结果与分析

2. 1 超临界 CO₂ 流体萃取结果

根据印楝素的特性, 以甲醇作为夹带剂, 选定 3 个不同的压力 (10、20、30 MPa), 3 个不同的温度 (35、45、55 $^{\circ}$ C) 和 3 个不同的夹带剂用量 (100、200、300 mL), 以影响印楝素萃取的 3 个因素变量 (温度、压力和夹带剂用量) 设计 3 因素 3 水平正交试验优

化设计, 以每克印楝种子可提取的印楝素质量作为考核指标, 超临界 CO₂ 流体萃取印楝素工艺参数的正交试验优化因素水平见表 1, 正交试验优化设计方案^[3] 和试验结果见表 2, 方差分析结果见表 3.

表 1 影响印楝素萃取的因素水平表

| Tab. 1 Factor level affecting the extraction rate of azadirachtin | | | |
|---|----------------------|----------------|--------------------------------|
| 水平 | $t/^{\circ}\text{C}$ | p/MPa | $V(\text{夹带剂}^{1)})/\text{mL}$ |
| level | A | B | C |
| 1 | 35 | 10 | 100 |
| 2 | 45 | 20 | 200 |
| 3 | 55 | 30 | 300 |

1) 夹带剂: 甲醇

表 2 正交试验优化设计试验方案和结果¹⁾

| 试验号 number | 因素 factor | | | | $w(\text{印楝素 azadirachtin})$ $/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ |
|---------------|----------------|-------------|---------------------------|----------|--|
| | 温度 temperature | 压力 pressure | 夹带剂 ²⁾ solvent | 误差 error | |
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2.653 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3.097 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3.436 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2.132 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2.866 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2.819 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2.201 |
| 8 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2.413 |
| 9 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2.294 |
| K_1 | 9.186 | 6.986 | 7.766 | 7.813 | $T=23.91$ |
| K_2 | 7.817 | 8.376 | 7.642 | 8.117 | |
| K_3 | 6.908 | 8.549 | 8.503 | 7.981 | |
| k_1 | 3.062 | 2.329 | 2.589 | 2.604 | |
| k_2 | 2.606 | 2.792 | 2.547 | 2.706 | |
| k_3 | 2.303 | 2.850 | 2.834 | 2.663 | |
| 极差 range | 0.759 | 0.521 | 0.287 | 0.102 | |

1) 印楝种子干粉 200 g; 2) 夹带剂: 甲醇

表 3 超临界 CO₂ 流体萃取印楝素条件方差分析

| Tab. 3 Variance analyse of the condition of extraction azadirachtin by supercritical fluid | | | | | |
|--|-------|-------|-------|--------------------|------------------|
| 方差来源 | 离均差 | 自由度 | 均方 | F | $F_{0.05}(2, 2)$ |
| variance | 平方和 | ν | MS | | |
| source | SS | | | | |
| A | 0.884 | 2 | 0.442 | 38.43 [*] | 19 |
| B | 0.497 | 2 | 0.249 | 21.61 [*] | |
| C | 0.152 | 2 | 0.076 | 6.61 | |
| D | 0.023 | 2 | 0.012 | | |

采用正交试验优化设计所得的试验结果统计分析, 由表 3 结果可知, 温度、压力和夹带剂用量 3 个因素对印楝素萃取效果的影响为温度> 压力> 夹带剂用量. 在最佳工艺条件 A₁B₃C₃ 即温度 35 $^{\circ}$ C, 压力 30 MPa, 夹带剂用量每克印楝种子干粉 1.5 mL 甲醇时, 从每克印楝种子中可提取的印楝素的质量最高为 3.436 mg.

2. 2 超临界 CO₂ 流体萃取与冷浸法萃取印楝素的结果比较

2 种方法对印楝种子的提取率、提取物中印楝素

的含量和从每克印楝种子中提取的印楝素的质量 3 个方面的差异进行了比较, 结果见表 4.

表 4 超临界 CO₂ 流体与冷浸法萃取印楝素的结果比较

| Tab. 4 Compare to the results by supercritical fluid extraction and by solvent | | | |
|--|--------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 方法 | 提取率 | w(印楝素 ¹⁾ | w(印楝素 ²⁾ azadirachtin) |
| method | extraction rate/ % | azadirachtin)/(%) | /(mg·g ⁻¹) |
| 超临界流体 supercritical fluid extraction | 5. 723 | 6. 004 | 3. 436A |
| 冷浸 solvent extraction | 18. 610 | 1. 318 | 2. 453B |

1) 提取物中的印楝素; 2)印楝种子中提取出的印楝素; 同列数据后具不同字母者表示在 1% 水平差异显著 (DM RT 法)

从表 4 可以看出, 超临界 CO₂ 流体从印楝种子中萃取印楝素比冷浸法具有明显的优势. 超临界 CO₂ 流体萃取印楝素的提取物中印楝素的质量分数为 6. 004%, 而常温冷浸法的提取物中印楝素的质量分数为 1. 318%, 每克印楝种子用超临界 CO₂ 流体可提取 3. 436 mg 的印楝素, 而常温冷浸法只能提取到 2. 453 mg, 前者比后者高出 28. 61%.

3 讨论与结论

温度对超临界 CO₂ 流体萃取印楝素的影响在 3 个条件中是最显著的. 可能是由于印楝素是热敏物质, 并且超临界中的压力远远大于常压, 因而在温度和高压力的共同作用下, 提取物中印楝素对热更不稳定, 从而使每克印楝种子中提取到的印楝素随着温度的升高而下降. 压力对超临界 CO₂ 流体萃取印楝素的影响也达到显著水平, 随着压力的升高, 本文得出的结论是更有利于印楝素的萃取, 这与杨军等^[4]报道的随着压力的升高, 其他杂质也一同大量萃出, 从而造成提取物中印楝素含量和回收率明显下降的结论相佐, 这可能是所采用的评价标准(杨军^[4]等的评价标准为提取物中印楝素含量和回收率之和)不同有关. 但本研究得出的结论认为可以通过进一步处理除去萃取物中的杂质, 所以不会降低萃取物中的印楝素含量. 夹带剂用量对超临界 CO₂ 流体萃取印楝素的影响不显著. 由于印楝素在甲醇中溶解度很大, 所以超临界 CO₂ 流体萃取只需少量夹

带剂在高压状态下即可迅速富集有效成分, 因此夹带剂用量对从每克印楝种子干粉中提取到的印楝素的质量的影响是不显著的.

通过比较可知, 甲醇常温冷浸从印楝种子中提取印楝素是不完全的, 所以用甲醇在常温下冷浸印楝种子提取印楝素是印楝素资源的一种浪费.

超临界 CO₂ 流体萃取的效果也受到多种因素的影响, 如萃取时间、CO₂ 的流量、原料的颗粒大小、水分含量、组分极性等. 分离某种物质要进行反复探索性试验, 才能获得最优的萃取条件, 这也是技术的关键和难点所在. 所以, 随着超临界流体萃取技术的日益完善和广泛使用, 可望利用超临界流体萃取技术从印楝种子中提取高含量印楝素提取物, 为工业化利用超临界流体萃取技术从印楝种子中萃取印楝素提供理论依据.

参考文献:

[1] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M] . 北京: 中国农业出版社, 2004. 175—185.

[2] 何道航, 徐汉虹, 张志祥, 等. 0. 3% 印楝素乳油的高效液相色谱分析[J] . 农药, 2001, 40(9): 18.

[3] 郑明东, 刘炼杰, 余亮, 等. 化工数据建模与试验优化设计[M] . 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2001. 93—116.

[4] 杨军, 余德顺, 莫彬彬, 等. 超临界 CO₂ 萃取印楝种子中印楝素的研究[J] . 精细化工, 2003, 20(9): 513—514. 518.

【责任编辑 李晓丹】