

超声波用于强化有机溶剂提取印楝素

王秋芬^{1,2}, 宋湛谦¹, 赵淑英^{1,2}, 高宏¹

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 江苏南京 210042;

2. 济南大学化学化工学院, 山东济南 250022)

WANG Q F

摘要: 研究了用超声波强化有机溶剂提取印楝素的工艺过程, 分别考察溶剂、料液比、超声波作用时间、超声波功率对提取率的影响。实验发现, 较理想的提取条件为: 13.3 g 印楝种仁粉, 料液比 1:2, 超声波功率 200 W; 超声波作用时间与溶剂有关, 甲醇 15 min、乙醇 20 min、乙酸乙酯 10 min; 3 种溶剂较佳提取率分别为 0.378 6%、0.365 8%、0.246 2%。提取样品利用高效液相色谱仪采用外标法测定提取物中印楝素的含量。实验结果表明, 超声波强化提取与搅拌提取相比, 不仅缩短了提取时间, 而且提取率有所提高。

关键词: 印楝素; 超声波

中图分类号: Q 947.753.1; TQ 028.96 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2004)01-0025-04

ULTRASONIC-ASSISTED PROCESS(UAP) FOR SOLVENT
EXTRACTION OF AZADIRACHTIN FROM NEEM SEEDWANG Qiu-fen^{1,2}, SONG Zhan-qian¹, ZHAO Shu-ying^{1,2}, GAO Hong¹

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF, Nanjing 210042, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jinan University, Jinan 250022, China)

Abstract: The use of ultrasonic-assisted process(UAP) was investigated for solvent extraction of azadirachtin from neem seed under different operating conditions. Influences of ultrasonic power, solvent, ratio of material to liquid and ultrasonic treatment time on the yield of azadirachtin were studied. Optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were; ratio of material to liquid 1:2(w/v) and ultrasonic power 200 W for 13.3 g seed powder. It was found that extraction yield of azadirachtin and ultrasonic time were different with different solvents(methanol as solvent, ultrasonic time 15 min, yield of azadirachtin 0.378 6%; ethanol as solvent, ultrasonic time 20 min, yield of azadirachtin 0.365 8%; ethyl acetate as solvent, ultrasonic time 10 min, yield of azadirachtin 0.246 2%). Content of azadirachtin in extract was estimated with HPLC technique. Results showed that UAP technique not only enhances the extraction yield of azadirachtin from neem seed but also has the advantage of high efficiency, compared to that of conventional solvent extraction method.

Key words: azadirachtin; ultrasonic wave

印楝(*Azadirachta indica* A. Juss.)为楝科楝属植物。国内外大量研究表明^[1]印楝中含有 300 多种活性成分, 其中杀虫活性最高的是印楝素^[2-3]。印楝素是从印楝植株中分离得到的柠檬素类化合物, 以

收稿日期: 2003-06-17

基金项目: 中国林科院资源昆虫培育与利用重点实验室资助项目(无项目编号)

作者简介: 王秋芬(1966-), 女, 山东临邑人, 副教授, 博士生, 从事天然产物的提取与应用研究。

种仁含量较丰富。它对多种害虫表现出强烈拒食和抑制生长发育作用,而对人、畜无害,是害虫的天敌,也较安全,并且在自然界易降解,不污染环境,有利于生态平衡,因而得到广泛的研究⁴⁻⁵。

从印楝植物中提取印楝素工艺已有许多报道,按其工艺方法可分为溶剂提取和超临界流体萃取⁵⁻⁹,但超声技术应用于印楝种仁提取印楝素工艺未见报道。超声波提取是目前国内外正在研究开发的一种辅助溶剂提取技术,从植物中提取,其首要条件是被提取物能够快速、高效地进入提取介质,提取过程需要将细胞破碎。而采用机械方法难以将细胞有效破碎,造成被提取物在提取介质中扩散缓慢,提取时间增加,提取效率低。超声波提取的作用机理¹⁰为:超声波振动可产生并传递强大能量,在介质中产生很多小空穴,这些小空穴瞬间闭合,闭合时可产生3 000 MPa以上的瞬间压力,强大的空化作用使细胞壁破碎,大量内容物逸出,故它以提取速度快、效率高的特点受到广泛关注。本研究的目的是采用超声技术,利用专利⁶中较理想的有机溶剂作提取剂,希望能改进印楝素的提取工艺。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所)、旋转蒸发仪(上海亚荣仪器厂)、电子分析天平(上海天平仪器厂)、高效液相色谱仪(日本岛津)、红外压片机、小型植物粉碎机、磁力搅拌器;印楝种仁(云南产),所有试剂均为试剂级。

1.2 实验方法

1.2.1 实验原料的预处理 印楝种子去皮得种仁,筛选未发霉的种仁,小型植物粉碎机粉碎后,用红外压片机压榨去油,过20目筛,制成印楝种仁粉,储于低温干燥器中备用。

1.2.2 搅拌提取 称取13.3 g印楝种仁粉(去皮印楝种仁20 g粉碎,压榨去油得13.3 g印楝种仁粉),置于广口瓶中,加入一定体积有机溶剂,控制温度,磁力搅拌提取4 h,过滤,滤饼加入新的溶剂重复搅拌提取,如此重复4次,合并滤液。

1.2.3 超声波强化提取 将超声波探头插入装有13.3 g印楝种仁粉和一定体积有机溶剂的广口瓶中,广口瓶置于冰水浴中(以防止印楝素分解,因超声波提取时细胞粉碎仪放热),在一定功率条件下,超声波作用1 min,间歇1 min,进行超声波提取,达到设定时间后过滤,滤饼加入新的溶剂重复超声波提取,如此重复4次,合并滤液。

1.2.4 提取液的后处理 将提取液在不超过40℃时旋转蒸发除去有机溶剂,在搅拌条件下加入印楝种仁粉3倍体积的石油醚后,静置3 h,过滤,用少量石油醚洗涤滤饼2~3次,滤饼用适量乙酸乙酯充分溶解,过滤,滤渣用乙酸乙酯洗涤,得乙酸乙酯溶液,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得浅褐色粉末状产品。称重,测定含量(以去皮印楝种仁为基准计算提取率)。

1.2.5 定量分析方法 文献报道测定印楝素的方法较多¹¹⁻¹³,但以HPLC方法较理想,本研究采用外标法进行测定。测定条件:柱型C18(ϕ 4 mm \times 250 mm),室温,流动相:甲醇:水为65:35(体积比),流速1.0 mL/min,检测波长216 nm,进样体积4 μ L,保留时间5.9 min。

准确称取质量分数为95%的印楝素标准品,用甲醇定容,质量浓度为100 μ g/mL,于0℃下存放。准确称取样品,用流动相溶解定容配成溶液,用外标法对样品进行含量测定。

2 结果与讨论

2.1 超声波细胞粉碎仪提取印楝素

2.1.1 料液比与提取率的关系 在超声波功率为300 W、提取时间10 min,提取温度一定的情况下,考察料液比对印楝素提取率的影响,结果见表1。

由表1看出,3种溶剂对印楝素的提取率有较大的影响,随着甲醇、乙醇、乙酸乙酯极性的减小,印楝素的提取率下降。可能是由于甲醇的极性较强,对印楝种仁中的各种极性成分溶解能力较强,使印楝素能较完全地从种仁中扩散到溶剂中。但实验发现,乙酸乙酯作溶剂虽提取率相对较低,但是它对印楝

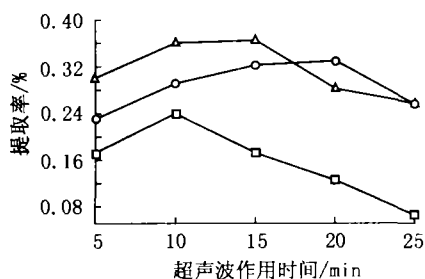
素提取选择性较好,提取物后处理很容易,产品的含量较高。溶剂的量对印楝素的提取率有较大的影响,料液比越小,提取率越高,这可能是由于印楝素浓度越小,越易分解所致。

2.1.2 超声波作用时间对印楝素提取率的影响

在超声波功率为 300 W、料液比 1:2、提取温度一定的条件下,改变超声波作用时间,考察其对不同溶剂印楝素提取率的影响,结果见图 1。

由图 1 看出,超声波作用时间对印楝素提取率的影响与溶剂类型有关,对乙酸乙酯作提取剂,最佳的超声波作用时间为 10 min 左右,随着时间的延长,提取率明显降低。甲醇作溶剂的提取率在 15 min 以前随时间的延长提取率提高,15 min 以后提取率降低,甲醇最佳的超声波作用时间为 15 min 左右。而乙醇最佳的超声波作用时间为 20 min 左右。这是由于不同的溶剂对印楝种仁的渗透能力不同,超声波作用时间过短提取不完全,时间过长则造成印楝素分解,导致提取率下降。

2.1.3 超声波功率对印楝素提取率的影响 采用料液比为 1:2,提取温度一定,超声波作用时间为乙酸乙酯 10 min、乙醇 20 min、甲醇 15 min,按实验 1.2.3 节考察不同的超声波功率对印楝素提取率的影响,结果见图 2。



—△—甲醇 MeOH; —○—乙醇 EtOH; —□—乙酸乙酯 acetic ether

图 1 超声波作用时间对印楝素提取率的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic time on extraction yield of azadirachtin by ultrasonic-assisted process

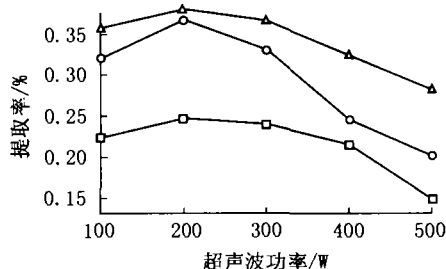


图 2 超声波功率对印楝素提取率的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic power on extraction yield of azadirachtin by ultrasonic-assisted process

由图 2 发现,功率对印楝素的提取有一定影响,功率小不利于提取;功率太大造成印楝素的分解,使提取率下降,200 W 左右较有利于印楝素的提取。

2.1.4 搅拌提取结果 为考察超声波与搅拌对提取率的影响,作者选择搅拌提取的较佳条件进行对比,即料液比 1:2,提取温度为 20 ℃,搅拌时间 4 h × 4 次(有关搅拌提取实验将另文发表),结果见表 2。

表 2 不同溶剂搅拌提取去油种仁与超声波提取印楝素的得率对比

Table 2 Comparison of azadirachtin yield from de-oiled neem seed with different extraction method

实验号 test No.	溶剂 solvents	提取方法 extraction method	料液比 material:liquid	温度/℃ temp.	时间 time	提取率/% yield
1	乙酸乙酯 acetic ether	搅拌 stirring	1:2	20	4 h × 4 次	0.1667
2	乙酸乙酯 acetic ether	超声波提取 UAE(200 W)	1:2	0	10 min × 4 次	0.2462
3	乙醇 EtOH	搅拌 stirring	1:2	20	4 h × 4 次	0.2783
4	乙醇 EtOH	超声波提取 UAE(200 W)	1:2	0	20 min × 4 次	0.3652
5	甲醇 MeOH	搅拌 stirring	1:2	20	4 h × 4 次	0.2941
6	甲醇 MeOH	超声波提取 UAE(200 W)	1:2	0	15 min × 4 次	0.3786

由表 2 可看出,用超声波提取可缩短提取时间,提高提取率。

3 结论

通过以上实验发现,在超声波强化条件下印楝素的提取率受多种因素影响,如料液比、超声波作用时间、超声波功率及溶剂类型等,3种溶剂以甲醇为最佳,乙醇高于乙酸乙酯;料液比选1:2较好。在印楝种仁粉用量为13.3g条件下,超声波功率以200W较好;超声波提取最佳时间分别为:甲醇15min、乙醇20min、乙酸乙酯10min,在最佳条件下各种溶剂的提取率分别是:甲醇0.3786%、乙醇0.3658%、乙酸乙酯0.2462%。另外还发现乙酸乙酯作提取剂提取印楝素,虽然提取率相对较低,但后处理简单,且产品含量相对较高;与搅拌提取法相比不仅缩短了提取时间,而且提取率有所提高。

参考文献:

- [1] KUMAR R, SRINIVAS M, YAKKUNDI S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 451-455.
- [2] SHMUTTERER H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree [J]. *Annu Rev Entomol*, 1990, 35(5): 271-297.
- [3] GOVIDACHARI T R, NARASIMHAN N S, SURESH G, et al. Structure-related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids [J]. *J Chem Ecol*, 1995, 21(6): 1585-1600.
- [4] BILTON J N, BROUGHTON H B, JONES P S, et al. An X-ray crystallographic, Mass spectrographic and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1987, 43(12): 2805-2815.
- [5] 张业光, 张兴, 赵喜欢. 引种印度国产种子的印楝素含量及杀虫活性初步研究 [J]. *华南农业大学学报*, 1992, 13(1): 14-19.
- [6] BRUSHETT D J, POLLARD D J, O'SHEA M J. Azadirachtin extraction process [P]. US Patent; 6 312 738, 2001-11-06.
- [7] ROLAND M T, BIOUIN J J. Co-extraction of azadirachtin and neem oil [P]. US Patent; 5 503 837, 1996-04-02.
- [8] AMBROSINO P, FRESA R, FOGLIANO V, et al. Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and GC/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(11): 5252-5256.
- [9] 赵淑英, 宋湛谦, 高宏, 等. 微波辅助法提取印楝素的研究 [J]. *林产化学与工业*, 2003, 23(4): 47-50.
- [10] 孙波, 彭密军, 杨晓燕. 超声波提取杜仲叶的工艺研究 [J]. *林产化学与工业*, 1999, 19(3): 67-70.
- [11] SUNDARAM K M S, CURRY J. High performance liquid chromatographic method for the analysis of azadirachtin in two commercial formulations and neem oil [J]. *J Environ Sci Health*, 1993, B28(1): 221-241.
- [12] AZAM M, RENGASAMY S, PARMAR B S. Estimation of azadirachtin-A content of emulsifiable and solution concentrates of neem [J]. *J AOAC Int*, 1995, 78: 893-896.
- [13] YAMASAKI R B, KLOCKE J, LEE S M, et al. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1986, 356(1): 220-226.

本刊信息

为了配合2004年9月在上海召开的国际“PCA年会”,以及缓解稿源积压、稿件周转期过长的矛盾,现初步决定于2004年6~7月间编辑出版《林产化学与工业》增刊1期,将相对集中刊发有关松香松节油专业的文章,并兼顾制浆造纸以及森林资源利用方面的文章。增刊的要求、出版格式与正刊相同,美国《EI》收录。目前一切准备工作正在进行之中。欢迎广大作者、读者及时关注。

因南京市电话升级,由原来的7位升为8位数,本刊编辑部的电话在原来的号码前加“8”,即为(025)85482493。特此告知。