

微波辅助法提取印楝素的研究^{*}



赵淑英^{1,2}, 宋湛谦^{1*}, 高 宏¹, 王秋芬^{1,2}

(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)

ZHAO S Y

摘 要: 介绍了一种有效利用微波辅助从印楝(*Azadirachta indica* A. Juss.) 种仁中提取印楝素的方法。通过考察辐射时间、溶剂、物料比以及辐射功率等因素对提取率的影响, 得出结论: 预处理过的印楝种仁粉末 6.65 g(相当于印楝种仁 10 g), 以甲醇做溶剂、微波功率 210 W、物料比 13(g/mL)、辐射时间为 3 min × 3 次, 提取率最高。与传统的磁搅拌法相比, 该方法不仅工艺简单, 而且可以提高产率, 缩短提取时间。用高压液相法定量地测定了所提取印楝素的含量, 其提取率可达 0.519%。

关键词: 微波辅助提取; 印楝; 印楝素

中图分类号: Q949.753.1; TQ028.96

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2003)04-0047-04

AN EFFECTIVE METHOD OF MICROWAVE-ASSISTED PROCESS(MAP) FOR EXTRACTION OF AZADIRACHTIN FROM KERNEL OF *AZADIRACHTA INDICA* A.

ZHAO Shu-ying^{1,2}, SONG Zhan-qian^{1*}, GAO Hong¹, WANG Qiu-fen^{1,2}

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

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

Abstract: An effective method of extracting azadirachtin from kernel of *Azadirachta indica* A. Juss. assisted by microwave was studied. Effects of radiation time, solvent, ratios of solvent and microwave power on the yield were systematically studied. The results indicate that the yield is highest using a suitable condition of CH₃OH as solvent, microwave power 210 W, ratios of solvent 13(g/mL) and radiation time 3 min × 3 times. Compared to the traditional extraction method using magnetic stirring, this method has the advantages of simple technology, improved yield and reduced extraction time. The yield of azadirachtin were measured by HPLC method to be 0.519% in 6.65 g pre-treated seed powder of *A. indica* (based on 10 g seed of *A. indica*).

Key words: microwave assisted extraction; *Azadirachta indica* A. Juss.; azadirachtin

印楝(*Azadirachta indica* A. Juss.) 为楝科植物, 被誉为“可解决全球问题之树”^[1]。印楝广泛种植于热带和亚热带, 我国云南已大面积种植。印楝中含有印楝素(azadirachtin) 等杀虫活性成分, 具有很强

* 收稿日期: 2003-06-25

基金项目: 中国林科院资源昆虫培育与利用重点实验室基金资助项目(无项目编号)

作者简介: 赵淑英(1965-), 女, 山东阳谷人, 高级实验师, 博士生, 主要从事天然产物的提取与应用的研究。

* 通信联系人

的拒食、抑制害虫生长、延缓昆虫产卵、抑制昆虫激素分泌、降低昆虫生育能力等生理活性,印楝制剂是比较完美的杀虫剂。此外,印楝素还有广泛的药用价值,如抗疟疾、退热、驱虫、抑制动物和人体内的真菌生长等^[2]。

印楝素的提取一般采用溶剂法^[3]和微波辅助法。溶剂法提取主要是用有机溶剂萃取产物中的有效成分。但溶剂法提取时间较长、工艺繁琐而且纯度较低。微波辅助法提取是一种利用高频电磁波直接与被分离物作用,导致样品基体内不同成分的反应差异使被提取物与基体快速分离的新方法,具有提取快、纯度高、效率高等优点,已被应用于植物农药的提取^[4-7]。

戴建民等^[8]曾经对微波辅助法从印楝种仁中提取印楝素进行了研究,认为提取率反而不如溶剂法在常/高温下回流提取的产率高。

作者重新对微波辅助法从印楝种仁中提取印楝素进行了研究,改进了提取工艺,其提取率可达到0.519%。通过考察辐射时间、溶剂、物料比以及辐射功率等因素对提取率的影响,得到了提取印楝素的实验最佳条件。与传统的磁搅拌法提取相比,该方法不仅工艺简单、而且可以提高产率,缩短提取时间。

1 原料设备及分析方法

1.1 原料

印楝种子(2002年8月,采摘于云南);印楝素标准品95.5%,购自Sigma Chemical Co.,样品在0℃以下保存;其它试剂皆为分析纯。

1.2 设备

Galanz 17 L 机械型微波炉;聚四氟乙烯消解罐;HPLC 色谱仪(日本岛津);小型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);CJJ-791 磁力加热搅拌器(江苏城西晓阳电子仪器厂);旋转蒸发仪(天津玻璃仪器厂 SHZD(III));电子分析天平(上海天平仪器厂);KQ3200E 医用超声波清洗器(昆山市超声仪器厂)。

1.3 印楝素的分析方法

印楝素的分析方法较多^[9-11],外标物 HPLC 法被认为是较准确的方法。准确称量印楝素的标准品用甲醇溶解,配成不同浓度的溶液,色谱条件: C18 柱,检测波长 217 nm,流动相为甲醇和水的混合物(体积比 6535),流速为 1 mL/min,测出其峰面积,标准曲线的线性回归相关系数为 0.999 3。在同一实验条件下,用外标法对样品进行含量测定,计算提取物中印楝素的含量。

2 实验步骤

2.1 实验原料的预处理

印楝种子去皮,100 g 印楝种仁用小型植物粉碎机粉碎成 20 目,经压片机榨油,得到 66.5 g 预处理过的印楝种仁粉末,备用。

2.2 印楝素的提取

2.2.1 磁搅拌提取 称取预处理过的印楝种仁粉末 6.65 g(相当于 10 g 印楝种仁,下同),置于 30 mL 的锥形瓶中,加入 20 mL 甲醇,室温下,磁力搅拌提取 5 h,过滤,滤饼加入新的甲醇,再重复提取 3 次,合并 4 次滤液。

2.2.2 微波辅助法提取 称取预处理过的印楝种仁粉末 6.65 g,置于聚四氟乙烯罐中,加入一定量的溶剂,将其放入盛有冰水的塑料烧杯中,冰封,然后将塑料烧杯放入微波炉中,在一定的功率下辐射提取一定的时间,过滤,如此重复 3 次,合并滤液。

2.3 提取液的处理

将提取液在低于 33℃时减压蒸干,抽真空 2 min,加入 20 mL 正己烷,摇匀后,静置 3 h,过滤,滤渣用 20 mL 乙酸乙酯溶解,同时用超声波处理 1 min 以助溶解,过滤,减压蒸馏除去溶剂得浅黄色粉末。称重,HPLC 分析,以含油种仁计算印楝素的提取率。

3 实验与结果

3.1 提取条件的确定

微波提取实验条件的选择主要包括提取时间、提取功率、提取溶剂及其物料比。

印楝素的结构式见图 1。

从图 1 可以看出, 印楝素是四环三萜类物质, 分子中含有酯基、环氧基和烯醚基等不稳定基团, 不仅在紫外光、阳光和高温下极易分解, 而且在提取过程中也能部分分解, 因此, 辐射时间过长或辐射功率过大都可能导致印楝素的分解, 从而导致提取率降低。

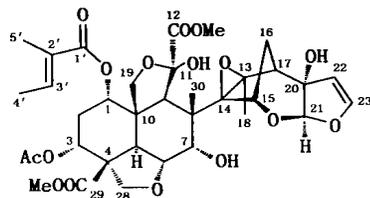


图 1 印楝素的化学结构图

3.1.1 辐射时间的影响 以 20 mL 甲醇为提取剂, 在辐射功率为 280 W 的条件下, 改变提取时间, 提取 6.65 g 预处理过的印楝种仁粉末, HPLC 分析结果见表 1。

由表 1 可见: 时间过短, 印楝素提取不完全; 时间过长, 温度升高, 印楝素部分热分解, 3 min × 3 次为最佳提取的辐射时间。

3.1.2 溶剂的影响 微波提取要求溶剂有一定的极性以吸收微波能, 进行内部加热, 在功率为 280 W, 辐射时间为 3 min × 3 次的条件下, 提取 6.65 g 预处理过的印楝种仁粉末, 20 mL 不同溶剂对印楝素提取率的影响结果见表 2。

由表 2 可见: 溶剂对印楝素的提取率随着甲醇和水的混合溶液、甲醇、乙醇、乙酸乙酯极性的减小而减小, 极性较强的溶剂, 对印楝种仁中的各个极性成分溶解能力较强, 使印楝素可以较完全地从种仁中扩散到溶剂中。虽然乙酸乙酯的提取率最低, 但对印楝素的选择性好, 因此产品的含量较高; MeOH-H₂O 系统提取率高, 但对印楝素的选择性差, 印楝素的含量低, 难处理; 所以甲醇是比较理想的溶剂。

3.1.3 物料比的影响 以甲醇为萃取剂, 在功率为 280 W, 辐射时间为 3 min × 3 次的条件下, 提取 6.65 g 预处理过的印楝种仁粉末, 溶剂用量对提取率的影响见表 3。

表 2 不同溶剂对印楝素提取率的影响

Table 2 Extraction yield of azadirachtin by different solvents

溶剂系统/体积比 solvent system / volume ratio	提取物 质量/g extracts mass	印楝素 含量/% content	印楝素提 取率/% yield
甲醇 MeOH	0.2286	21.9326	0.5014
乙醇 EtOH	0.1794	22.8204	0.4094
乙酸乙酯 EtOAc	0.1262	23.0614	0.2910
85% MeOH-H ₂ O	0.2784	18.1674	0.5058

表 3 溶剂用量对印楝素提取率的影响

Table 3 Extraction yield of azadirachtin by different ratios of solvent

固液比/(g mL ⁻¹) solid:liquid	提取物 质量/g extracts mass	印楝素 含量/% content	印楝素提 取率/% yield
12	0.2398	20.4627	0.4907
13	0.2286	21.9326	0.5014
14	0.2343	20.8553	0.4887
15	0.2304	20.4340	0.4708

由表 3 可见: 由于印楝素的含量较低, 提取时间短, 溶剂的用量对提取率的影响并不大, 物料比 12 基本上能提取完全。为操作方便, 选用物料比为 13 较合适。

3.1.4 辐射功率的影响 以 20 mL 甲醇为提取剂, 辐射时间为 3 min × 3 次, 辐射功率对提取率的影响见表 4。

表 1 不同辐射时间对印楝素提取率的影响

Table 1 Extraction yield of azadirachtin by different radiation times

辐射时 间/min time	辐射次数 times	提取物 质量/g extracts mass	印楝素 含量/% content	印楝素 提取率/% yield
1	3	0.2002	19.1659	0.3837
2	3	0.2284	19.3374	0.4417
3	3	0.2286	21.9326	0.5014
4	3	0.2178	19.7973	0.4312
5	3	0.2097	18.2207	0.3821
6	3	0.2252	16.5827	0.3734

由表4可见:微波功率对印楝素提取的影响很大,适当地提高功率,有利于印楝素的提取,但功率越大,温度越高,印楝素的热分解越严重,故210 W为最佳提取功率。

以上研究得出,微波辅助从6.65 g预处理过的印楝种仁粉末中提取印楝素的适宜条件:20 mL 甲醇,功率为210 W,辐射时间为3 min × 3次。

3.2 与同条件下磁搅拌溶剂提取的比较

取6.65 g预处理过的印楝种仁粉末,用20 mL 甲醇做溶剂,按实验步骤进行磁搅拌提取,实验结果见表5。

表5 微波法与磁搅拌对印楝素提取率的对比

Table 5 Extraction yield of azadirachtin by different methods

提取方式 methods	提取时间 time	次数 times	提取物质量/g extracts mass	印楝素含量/% content	印楝素提取率/% yield
微波法 radiation	3 min	3	0.2363	21.9654	0.5190
磁搅拌 magnetic stirring	5 h	3	0.2321	21.3380	0.4952

由表5可见:微波提取3 min,与溶剂磁搅拌提取5 h相当,微波提取时间虽然短,但提取率高。

4 结论

微波辅助法提取6.65 g预处理过的印楝种仁粉末(相当于10 g印楝种仁)中印楝素的适宜条件为:甲醇做提取溶剂,物料比13、微波功率210 W、辐射时间3 min × 3次,在此实验条件下,印楝素的提取率可达0.519%。与传统的溶剂提取法相比,微波辅助提取法具有提取率较高、提取速度快、能耗低、后续处理简单等一系列优点,适合印楝素的提取,在天然产物有效成分的提取中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] National Research Council. *Neem: A Tree For Solving Global Problems*[C]. Washington D C : National Academy Press, 1992.
- [2] 徐汉虹. 印楝在中国[A]. 中国印楝产业化发展国际研讨会论文集[C]. 中国:昆明,2001. 62-70.
- [3] MUNEEM M A, SRIHARI V, SUBRAMANYAM M, et al. Pesticidal dry powder formulation enriched in azadirachtin up to 88% an emulsifiable concentrate enriched up to 30% of azadirachtin and a process for preparing such formulation and concentrate from neem seed/ kernel. US Patent: 5 856 526, 1999- 01- 05.
- [4] 陈蒙, 袁东星, 许鹏翔. 微波法萃取辣椒中辣椒素的研究[J]. 食品科学, 1999, 10: 25-27.
- [5] 郝金玉, 黄若华, 王平艳, 等. 微波萃取除虫菊的研究[J]. 农药, 2001, 40(8): 15-16.
- [6] 韩伟, 郝金玉, 薛泊勇. 微波辅助提取青蒿素的研究[J]. 中成药, 2002, 24(2): 83-86.
- [7] 段蕊, 王蓓, 时海峽. 微波法提取银杏叶黄酮最佳工艺的研究[J]. 淮海工学院学报, 2001, 10(3): 46-48.
- [8] DAI J M, YAYLAYAN V A, RAGHAVAN G S V, et al. Influence of operating parameters on the use of the microwave-assisted process (MAP) for the extraction of azadirachtin-related limonoids from neem (*Azadirachta indica*) under atmospheric pressure conditions[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(10): 4 584- 4 588.
- [9] 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: 221-241.
- [10] 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.
- [11] 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: 220-226.

表4 不同功率对印楝素提取率的影响

Table 4 Extraction yield of azadirachtin by different power

辐射功率/W power	提取物质量/g extracts mass	印楝素含量/% content	印楝素提取率/% yield
140	0.2187	22.1119	0.4836
210	0.2363	21.9654	0.5190
280	0.2286	21.9326	0.5014
420	0.1846	20.4057	0.3767
560	0.1554	18.5896	0.2889