

超临界 CO₂ 萃取印楝种子中印楝素的研究杨 军¹, 余德顺¹, 莫彬彬¹, 田弋夫¹, 刘 毅¹, 吴成奎², 解培惠²

(1. 中国科学院 地球化学研究所 超临界流体技术研究中心, 贵州 贵阳 550002; 2. 成都绿金生物科技有限责任公司, 四川 成都 610016)

摘要:应用超临界 CO₂ 萃取技术从印楝种子中萃取印楝素, 研究了萃取温度、压力和夹带剂对印楝素萃取效果的影响。当萃取温度为 35 ℃、压力为 15 MPa、甲醇用量为 CO₂ 体积的 3% 时, 可将印楝种子中 90% 以上的印楝素 A 萃取出来, 所得产品印楝素 A 的质量分数为 20.3%。

关键词:印楝; 印楝素; 超临界 CO₂ 萃取

中图分类号: O629.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2003)09-0513-03

Extraction of Azadirachtin from Neem Seeds by Supercritical CO₂YANG Jun¹, YU De-shun¹, MO Bin-bin¹, TIAN Yi-fu¹, LIU Yi¹, WU Cheng-kui², XIE Pei-hui²

(1. Research Center for Supercritical Fluid Technique, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Chengdu Green Gold Organisms Science & Technology LTD., Chengdu 610016, Sichuan, China)

Abstract: Recovery of azadirachtin from neem seeds by extraction with supercritical CO₂ was influenced by the change of temperature, pressure and entrainer. The best extraction conditions were temperature 35 ℃, pressure 15 MPa and 3% methanol in CO₂. Under these conditions, 90% (w/w) of azadirachtin A in neem seeds can be removed. The product contains 20.3% (w/w) azadirachtin A.

Key words: neem; azadirachtin; supercritical CO₂ extraction

印楝素 (azadirachtin) 是柠檬素类 (limonoid) 化合物, 属四环三萜类物质, 共有 11 种异构体及其衍生物: 印楝素 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K^[1], 其中印楝素 A 在印楝素中质量分数约为 80%, 在印楝种核中质量分数为 0.1% ~ 0.6%。

印楝素对 200 多种昆虫 (包括几乎所有的重要农林、仓储、卫生害虫) 具有其他植物源杀虫剂无法比拟的高生物活性, 其主要作用为: (1) 强烈的拒食作用; (2) 有效地扰乱昆虫的胚后发育; (3) 有效的绝育作用; (4) 在不干扰昆虫蜕皮的剂量下处理昆虫, 使其适应性降低^[2]。

自 1968 年 Butterworth & Morgan 发现印楝素以来, 印楝素已成为世界上公认的活性最强的拒食剂, 它在昆虫生长调节作用方面的生物活性最稳定, 表现出很好的剂量与效应关系, 因而被认为是最适合于商品化开发的植物杀虫资源^[3]。英国、德国和意

大利学者先后开展了印楝素的超临界流体萃取研究^[4-7], 该法能较好地分离提取印楝素和低极性活性物质, 但这些研究主要集中于印楝素样品的分析检测研究, 有关超临界流体萃取印楝素的工艺研究较少。作者应用超临界 CO₂ 萃取技术, 研究了萃取温度、压力和夹带剂等工艺参数对从印楝种子中萃取印楝素的影响, 进一步优化了超临界 CO₂ 萃取印楝素工艺条件。

1 实验

1.1 材料与仪器

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。先通过超临界 CO₂ 脱除印楝种子中的印楝油, 再将印楝残渣粉碎成 40 目粉末。印楝素 A 标准品: SIGMA 产品, w(印楝素 A) ≥ 95%。

4 L 超临界 CO₂ 萃取装置 (自行研制); 日本岛

收稿日期: 2003-04-02

作者简介: 杨 军 (1972-), 男, 贵州松桃人, 中国科学院地球化学研究所助理研究员, 硕士, 主要从事生物资源开发利用及超临界流体技术研究, 电话: 0851-5895814, E-mail: yjsfe@sina.com。

津 LC-6A 高效液相色谱仪。

1.2 超临界 CO₂ 萃取

采用正交设计方案,选择最佳工艺条件。以甲醇为夹带剂,以产品印楝素 A 的质量分数为考核指标,以影响印楝素萃取的温度、压力和甲醇用量 $[V(\text{甲醇})/V(\text{CO}_2)]$ 设计了三因素三水平 L₉(3⁴) 正交实验表,见表 1。

表 1 三因素三水平 L₉(3⁴) 正交实验表

水平	A	B	C
	$\theta/^\circ\text{C}$	p/MPa	$\varphi(\text{甲醇})/\%$
1	35	15	3
2	40	20	4
3	45	25	5

取印楝残渣粉 200 g 置于 4 L 超临界 CO₂ 萃取器,设定萃取时间为 2 h,CO₂ 流量为 20 L/h,解析压力为 5 MPa,解析温度为 50 ℃。当达到预定温压条件,启动夹带剂泵,定量打入甲醇,萃取过程中从解析器收集萃取液,实验结束后减压回收甲醇,得墨绿色浸膏。

1.3 溶剂法萃取

取印楝残渣粉 200 g,分别加入甲醇、乙醇、异丙醇各 600 mL 浸提 24 h,重复 3 次,减压回收溶剂,得黄绿色浸膏。

1.4 高效液相色谱分析

采用 SUPELCOSIL™ LC-18 (2.5 cm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱,以 V(甲醇):V(水) = 50:50 为流动相,UV 扫描检测,波长 214 nm,通过标准品对照,确定样品中印楝素 A 的质量分数。

2 结果与讨论

2.1 超临界 CO₂ 萃取结果

用正交实验对超临界 CO₂ 萃取印楝素工艺参数的优化见表 2、3。

表 2 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	$w(\text{印楝素 A})/\%$
1	1	1	1	1	20.30
2	1	2	2	2	11.80
3	1	3	3	3	10.60
4	2	1	2	3	15.90
5	2	2	3	1	11.70
6	2	3	1	2	11.10
7	3	1	3	2	12.10
8	3	2	1	3	11.70
9	3	3	2	1	9.95
K_1	42.70	48.30	43.10	41.95	
K_2	38.70	35.20	37.65	35.00	$CT^2/9 = 1473.28$
K_3	33.75	31.65	34.40	38.20	
R	8.95	16.65	8.70	6.95	

由表 2 极差 R 值可知,三因素对印楝素萃取效果的影响主次为 B > A > C,以压力影响最大。方差分析结果表明,A、B、C 三因素均无显著性差异($P > 0.05$),最佳萃取工艺条件为 A₁B₁C₁ 即萃取温度为 35 ℃,压力为 15 MPa,甲醇用量为 CO₂ 体积的 3%。

表 3 超临界 CO₂ 萃取印楝素条件方差分析

方差来源	SS	DF	MS	F	P
A	13.40	2	6.70	1.66	>0.05
B	51.27	2	25.64	6.35	>0.05
C	12.88	2	6.44	1.59	>0.05
D	8.07	2	4.04	误差	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.2 与溶剂法的比较

通过超临界 CO₂ 萃取法和溶剂法对印楝素萃取效果的对比,超临界 CO₂ 萃取印楝素结果明显优于溶剂法,见表 4。

表 4 印楝素萃取方法的比较

	方法			
	超临界 CO ₂ 萃取	甲醇萃取	乙醇萃取	异丙醇萃取
$w(\text{印楝素 A})/\%$	20.30	9.20	9.40	2.75
印楝素 A 收率/%	92.19	64.43	53.68	30.27

3 结论

Rembold Heinz 以印楝种子为原料,在萃取温度 40 ℃、压力 40 MPa、异丙醇用量为 CO₂ 体积的 10% 条件下萃取印楝素 4 h,所得产品印楝素 A 的质量分数为 10%;再以印楝素 A 质量分数为 10% 的产品为原料,在萃取温度 40 ℃、压力 30 MPa、异丙醇用量为 CO₂ 体积的 4.6% 条件下萃取印楝素 2 h,所得产品印楝素 A 的质量分数为 21.9%^[6]。作者以印楝种子为原料,在萃取温度 35 ℃、压力 15 MPa、甲醇用量为 CO₂ 体积的 3% 条件下萃取印楝素 2 h,可将印楝种子中 90% 以上的印楝素 A 萃取出来,所得产品印楝素 A 的质量分数为 20.3%,符合实际生产的需要。

采用超临界 CO₂ 萃取印楝素具有工艺简单、比溶剂法提取效率高等优点,而且所用的 CO₂ 性质稳定、安全、易于操作、不污染环境,符合环保型生物农药工业化生产的发展方向。

参考文献:

- [1] 彭黎旭,冯信平,吴莉宇. 印楝杀虫活性物质的结构分析和分离提取方法[J]. 热带农业科学,2001,94(6):78-83.
- [2] 李晓东,赵善欢. 印楝素对昆虫的毒理作用机制[J]. 华南农业学报,1995,17(1):118-122.
- [3] 荣晓东,徐汉虹,赵善欢. 植物性杀虫剂印楝的研究进展[J]. 农药学报,2000,(2):9-14. (下转第 518 页)

3 结论

(1) 使用 $w(\text{SnCl}_2) = 0.5\%$ 的氯化亚锡为催化剂, D, L -LA 和 GA 在 $165\text{ }^\circ\text{C}$ 、 70 Pa 下直接熔融聚合 10 h , 可以获得 $[\eta]$ 为 0.2382 dL/g 的 PLGA, 高于文献[8]报道的直接熔融聚合 PLGA $[\eta]$ 的最大值 0.0814 dL/g 。沈正荣等用乙丙交酯开环聚合二步法合成 PLGA, 所得聚合物 $[\eta]$ 为 0.259 dL/g 时, GPC 测定其重均相对分子质量为 4.07 万, 数均相对分子质量 1.72 万^[20]。

(2) 以无毒的人体营养添加剂硫酸锌、醋酸锌、乳酸锌、乳酸钙、牛磺酸等为催化剂, 发现硬脂酸锌、乙酸锌的效果较好, 可以获得 $[\eta]$ 为 $0.2068 \sim 0.2150\text{ dL/g}$ 的 PLGA; 使用乳酸锌时, PLGA 的 $[\eta]$ 为 0.1507 dL/g ; 使用牛磺酸催化的效果最差, PLGA 的 $[\eta]$ 仅为 0.1036 dL/g 。

(3) 将重要的补锌剂、金属 Lewis 酸型催化剂乳酸锌, 与人体营养添加剂、质子酸型催化剂牛磺酸复合, 同样条件下应用于直接熔融聚合法合成 PLGA, 未见明显的协同效果, 但获得的 PLGA 的 $[\eta]$ 高于单一使用牛磺酸时的效果。

(4) 和交酯开环聚合二步法, LA 与 GA 直接溶液聚合法相比, LA 与 GA 直接熔融聚合法合成 PLGA 的工艺简单, 有利于其大量合成, 可更方便地得到有实用价值的产品, 尤其是无毒催化剂催化合成研究, 有利于拓展 PLGA 在药物缓释领域中的应用。

参考文献:

- [1] 陈 莉, 赵保中, 杜锡光. 聚羟基乙酸及其共聚物研究进展[J]. 化工新型材料, 2002, 30(3): 11-15.
- [2] 赵耀明, 黄俊豪, 陈军武, 等. 生物降解医用材料——聚乙丙交酯的研究[J]. 合成纤维工业, 1997, 20(4): 1-4.
- [3] 吴 颖, 郭士明, 唐 闻. 生物降解聚酯——聚乙丙交酯的合成研究及应用[J]. 化工新型材料, 2000, 28(1): 22-24.
- [4] Dong C-M, Qiu K-Y, Gu Z-W, et al. Synthesis of ploy(D, L -lactic acid-alt-glycolic acid) from D, L -3-methylglycolide[J]. J Polym Sci A: Polym Chem, 2000, 38(23): 4179-4184.
- [5] Ajioka M, Enomoto K, Yamaguchi A. Basic properties of polylactic acid produced by the direct condensation polymerization of lactic

acid[J]. Bull Chem Soc Jpn, 1995, 68: 2125-2131.

- [6] 赵耀明, 张 军, 麦杭珍. 直接聚合法合成聚乳酸的研究[J]. 合成纤维, 2001, 30(3): 3-5.
- [7] Ajioka M, Suizu C, Higuchi C, et al. Aliphatic polyesters and their copolymers synthesized through direct condensation polymerization[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59: 137-143.
- [8] Wang N, Wu X S, Lujan-Upton H, et al. Synthesis and characterization of lactic/glycolic acid oligomers[J]. Polymeric Materials Science and Engineering, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials Science and Engineering, 1997, 76: 373-374.
- [9] 汪朝阳, 赵耀明, 麦杭珍, 等. 熔融聚合法直接合成聚乳酸的研究[J]. 合成纤维, 2002, 31(2): 11-13.
- [10] 汪朝阳, 赵耀明, 王 浚, 等. 无毒催化剂催化合成外消旋聚乳酸及其在药物缓释微球中的应用[J]. 功能高分子学报, 2002, 15(4): 377-382.
- [11] 赵耀明, 黄俊豪, 陈军武, 等. 生物降解材料——聚乙交酯医用纤维的研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1994, 22(6): 71-79.
- [12] 汪朝阳. 高分子材料合成与应用中的绿色战略[J]. 化工时刊, 2002, 16(4): 7-10.
- [13] 唐有根, 蒋金芝, 王要武. 乳酸锌的合成与结构表征[J]. 化学世界, 1997, (11): 586-589.
- [14] 麦杭珍, 汪朝阳, 严 冰, 等. 乳酸直接聚合的热力学、动力学研究[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(5): 534-536.
- [15] Kricheldorf H R. Syntheses and application of polylactides[J]. Chemphere, 2001, 43: 49-54.
- [16] 陈坤才, 吕钱江, 方岩雄, 等. 牛磺酸的性质、应用和生产[J]. 广州化工, 2000, 28(4): 49-50.
- [17] Moon S I, Lee C W, Miyamoto M, et al. Melt polycondensation of L -lactic acid with $\text{Sn}(\text{II})$ catalysts activated by various proton acids; a direct manufacturing route to high weight poly(L -lactic acid) [J]. Polym Sci, Part A: Polym Chem, 2000, 38(9): 1673-1679.
- [18] Wang N, Wu X S. Stabilization of aspirin by using a lactic/glycolic acid oligomer[J]. Polymer Preprints, 1997, 38(2): 568-569.
- [19] Li J K, Wang N, Wu X S. Novel approach to stabilization of protein drugs in poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres[J]. Polymer Preprints, 1997, 38(2): 604-605.
- [20] 沈正荣, 朱家慧, 马 臻. 乙醇酸和 DL -乳酸交替共聚物的合成和表征[J]. 功能高分子学报, 1995, 8(4): 489-493.
- [21] 宋谋道, 余艺华, 张邦华, 等. 乳酸、羟基乙酸均聚物及共聚物的合成与结构表征[J]. 离子交换与吸附, 1995, 11(3): 245-252.

(上接第 514 页)

- [4] Huang H P, Morgan D E. Analysis of azadirachtin by supercritical fluid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1990, 519: 137-143.
- [5] Shaun J, Morgan D E. Supercritical fluid extraction of oil and triterpenoids from neem seeds[J]. Phytochemical Analysis, 1997, (8): 228-232.

- [6] Rembold Heinz. Extraction of substances from components of the neem tree[P]. DE: 19 601 482, 1997-07-24.
- [7] 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 LC/MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 5252-5256.