

• 研究简报 •

砂地柏果实油杀虫成分松油烯-4-醇 的超临界流体萃取

李广泽¹, 陈燕¹, 闫海燕¹, 陈安良^{1,2*}, 张兴^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用超临界流体萃取-气相色谱法,以砂地柏 *Sabina vulgaris* Ant 果实油主要杀虫活性成分松油烯-4-醇的萃取率为评价指标,提出了砂地柏果实油中松油烯-4-醇的超临界流体萃取较优工艺条件为:萃取物料粒径 0.85 mm (20目),静态萃取 10 min,萃取温度 45℃,压力 34.47 MPa 流体 CO₂总流量 30 mL/g。采用该法对砂地柏果实油中松油烯-4-醇的萃取率达 2.72 mg/g 明显高于水蒸气蒸馏法(萃取率为 2.00 mg/g),并具有快速、简便、精确、无毒、经济等优点。

关键词:砂地柏精油; 松油烯-4-醇; 超临界流体萃取; 气相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)02-0187-04

Studies on the Supercritical Fluid Extraction Technique of Terpenen-4-ol the Main Insecticidal Ingredient of the Essential Oil from the Berries of *Sabina vulgaris*

LI Guang-ze¹, CHEN Yan¹, YAN Hai-yan¹, CHEN An-liang^{1,2*}, ZHANG Xing^{1,2}

(1. Biorational Pesticide R & D Center, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract With the extraction efficiency of terpenen-4-ol as estimated index, the technology conditions of extracting terpenen-4-ol from the berries of *Sabina vulgaris* were investigated by supercritical fluid extraction (SFE) and gas chromatography (GC). The rational conditions were the size of sample 0.85 mm, static extraction 10 min before dynamic extraction, temperature 45℃, pressure 34.47 MPa, flow rate 30 mL/g. SFE extraction rate of terpenen-4-ol was 2.72 mg/g under this condition apparently higher than steam-distillation extraction rate 2.00 mg/g. The investigated SFE conditions are suitable to extract, separate and analyse terpenen-4-ol from botanical material. Moreover, SFE technology has the merits of high efficiency, accuracy, innocuity, economy and convenient.

Key words essential oil of *Sabina vulgaris*; terpenen-4-ol; supercritical fluid extraction; gas chromatography

收稿日期: 2006-01-09 修回日期: 2006-05-08

作者简介: 李广泽 (1977-), 男, 甘肃宁县人, 在读博士, 讲师; * 通讯作者: 陈安良 (1963-), 陕西西乡人, 副教授, 主要从事农药化学与植物化学保护教学与研究工作。联系电话: 029-87091884 E-mail: liguangze@126.com; chenalan@sohu.com

基金项目: 国家西部开发重大项目 (2004BA901A14); 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) 项目 (2001AA246016)

砂地柏 *Sabina vulgaris* Ant 果实精油对多种昆虫表现出较强的熏蒸杀虫活性、拒食活性、种群形成抑制活性^[1-3],其主要杀虫活性成分为松油烯-4-醇,占精油总重的 22.3%^[4],是该精油中含量最高的化合物。松油烯-4-醇是一种自然资源十分丰富的天然产物,对昆虫具有较强的熏蒸毒杀、引诱、忌避活性,同时也具有较强的抑菌活性,在日用化学品、医药及食品行业等方面也有广泛的应用^[5]。研究表明,该化合物可能作用于昆虫 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶,熏蒸杀虫活性高^[6,7],且环境安全性好^[8],在农药领域具有较大的研究和开发潜力。

二氧化碳是超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction, SFE) 最常用的溶媒,超临界 CO_2 萃取被认为是目前最理想的植物精油萃取技术之一,在香精油工业中已得到广泛应用^[9]。砂地柏精油中多是一些热敏性、低沸点的萜烯类化合物^[4],如松油烯-4-醇的沸点为 88°C ,热稳定性差^[5],采用常规的水蒸气蒸馏和溶剂萃取法提取可能会造成热敏性、低沸点成分的变构、分解或挥发散失;而 SFE 法可在较低的温度下进行,具有传质速度快、萃取效率高、无毒、经济、操作简便、选择性可调等优点^[10]。鉴于此,作者以松油烯-4-醇萃取率为评价指标,采用 SFE-GC 分析方法,对砂地柏果实精油的超临界流体萃取技术进行研究,并将其与传统提取法进行比较、分析,探讨其优缺点及产业化的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

ISCOTM 2-10型超临界流体萃取仪,Agilent 4890 型气相色谱仪。

松油烯-4-醇标准品,纯度 > 97%;水杨酸甲酯标准品,纯度 > 97% (购自北京百灵威公司)。

砂地柏果实,2003 年 11 月采自陕北榆林, 60°C 下烘干、粉碎,分别过 10、20、30 和 40 目实验标准筛 (不锈钢材质,河南新乡市康达新机械有限公司),分别得到粒径为 2.00、0.85、0.60 和 0.42 mm 的萃取物料。

1.2 萃取效果的评价指标、测定和计算方法

以松油烯-4-醇萃取率 (所得松油烯-4-醇质量占物料质量的比值) 为萃取效果的评价指标,萃取物中松油烯-4-醇含量的测定采用 GC 内标法^[11]: 毛细管色谱柱 [0.53 mm (i.d.) $\times$ 15.0 m, 0.25 μm 质量分数为 5% 的 phenylpoly]; FID, 检测器温度

260°C ; 汽化温度 250°C ; 柱温 $45^\circ\text{C} \sim 200^\circ\text{C}$, 程序升温: $45^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ ($2^\circ\text{C}/\text{min}$), $80^\circ\text{C} \sim 200^\circ\text{C}$ ($10^\circ\text{C}/\text{min}$); 柱前压, N_2 : 0.29 MPa H_2 : 0.15 MPa 空气: 0.26 MPa, 以水杨酸甲酯为内标物,线性方程: $y = 1.413x + 0.093$ $R = 0.999$; 添加回收率: 98.61% $\sim$ 100.17%; $\text{RSD} = 0.38\%$, $n = 5$ 。

1.2.1 物料粒度对萃取效果的影响 试验分别设萃取物料粒度为 2.00、0.85、0.60、0.42 mm (10、20、30、40 目) 4 个处理,每个处理设 3 次重复。在萃取温度为 50°C 、压力为 34.47 MPa 条件下将上述各样品 1.0 g 静态萃取 20 min (静态萃取用 CO_2 19.5 $\sim$ 20.0 mL),然后在相同的温度和压力条件下用 30 mL CO_2 动态萃取,流速控制在 1.0 mL/min 左右。萃取物用二氯甲烷接收、定容至 10 mL,限流管温度为 65°C 。

1.2.2 静态萃取时间对萃取效果的影响 根据 1.2.1 节的研究结果,选用合适粒径的萃取物料,每次上样 1.0 g。采用先静态、后动态的萃取方式,设静态萃取时间分别为: 0.5、10、15 和 20 min 5 个处理,每个处理设 3 次重复。萃取温度、压力、 CO_2 流量和流速等条件及萃取物接收、定容和测定方法同 1.2.1 节。

1.2.3 动态萃取正交试验 根据物料粒度及静态萃取时间对萃取效果影响的研究结果,选用合适的物料粒度及静态萃取时间。采用 3 因素 5 水平 (表 1) 的正交试验法,研究动态萃取中压力、温度和 CO_2 流量 3 个工艺条件对萃取效果的影响。上样量 1.0 g CO_2 流速控制在 1.0 mL/min 限流管设定温度比萃取仓温度高 15°C 。萃取物接收、定容和测定方法同 1.2.1 节。

Table 1 Orthogonal experiment design of dynamic extraction conditions

Levels	Temperature/ $^\circ\text{C}$	Pressure/MPa	Flux of CO_2 /(mL/g)
1	25	20.68	10
2	35	27.58	20
3	45	34.47	30
4	55	41.37	40
5	65	48.26	50

1.3 常规水蒸气蒸馏法提取

称取植物样品 100 g 投入到 500 mL 蒸馏瓶中,采用水蒸气蒸馏法,蒸馏瓶温度约 120°C , 8 h 后馏出液中无油状物后停止蒸馏。用乙醚萃取水相中的油状物,浓缩蒸除溶剂即得砂地柏精油。

2 结果与讨论

2 1 物料粒度对萃取效果的影响

从表 2可以看出: 在所选定的粒度范围内, 松油烯-4醇萃取率随物料粒度的减小而升高, 但当粒径小于 0. 85 mm 时, 萃取率增加并不显著。砂地柏浆果富含油脂, 不易干燥、粉碎。综合考虑各种因素, 作者认为 SFE 萃取物料粒度以 0. 85 mm 较为适宜。

Table 2 Influence of sample size on extraction efficiency

Sample size/mm	Terpenen-4-ol extraction efficiency/(mg/g)
2. 00	1. 52±0. 04 A
0. 85	2. 05±0. 06 B
0. 60	2. 25±0. 20 B
0. 42	2. 11±0. 10 B

Note: Different capital letters in same column indicate significant differences under P> 1%. The same as in the following tables

2 2 静态萃取时间对萃取效果的影响

从表 3可以看出: 随静态萃取时间的延长, 松油烯-4醇萃取率呈增加趋势, 当静态萃取时间超过 10 min 时, 萃取率变化不再明显。大多数 SFE 研究与应用都采用了先静态、后动态的萃取方式, 合适的静态萃取时间有利于提高萃取率、节省溶剂。本研究确定静态萃取时间为 10 min 较为适宜。

Table 3 Influence of static time on extraction efficiency

Time of static extraction/min	Terpenen-4-ol extraction efficiency/(mg/g)
0	1. 04±0. 08 A
5	1. 61±0. 08 B
10	2. 15±0. 09 C
15	2. 24±0. 15 C
20	2. 13±0. 19 C

2 3 动态萃取条件对萃取效果的影响

动态萃取条件对松油烯-4醇萃取率影响的正交试验结果及其方差分析结果分别列于表 4和表 5。从表 4可以看出: 随萃取条件的改变, 松油烯-4醇萃取率变化明显, 最高可达 2. 90 mg/g, 最低为 0. 50 mg/g。从极值分析可以看出, 温度、CO₂ 流量和压力 3 个因素中, 影响松油烯-4醇萃取率的主次关系为: 温度> CO₂ 流量> 压力。方差分析结

果(表 5)与直观分析结果(表 4)一致。方差分析还表明: 3 因素对松油烯-4醇萃取率均有显著影响, 其中, 温度对萃取率有极显著影响, 是影响萃取效果的最主要因素。通过对上述试验及方差分析结果进行分析, 在萃取效率无显著差异情况下, 应选取更低温度、压力和更少 CO₂ 流量, 因此最终确定动态萃取较优工艺条件为: 温度 45℃, 压力 34. 47 MPa, CO₂ 流量 30 mL/g。

Table 4 Orthogonal experiment result of extraction efficiency under different dynamic conditions

No.	Temperature (A)	Pressure (B)	Flux of CO ₂ (C)	Terpenen-4-ol extraction efficiency/(mg/g)
1	1	1	1	1. 45
2	1	2	2	1. 85
3	1	3	3	2. 04
4	1	4	4	2. 11
5	1	5	5	1. 96
6	2	1	3	2. 00
7	2	2	4	2. 23
8	2	3	5	2. 44
9	2	4	1	1. 90
10	2	5	2	2. 32
11	3	1	5	2. 01
12	3	2	1	1. 88
13	3	3	2	2. 22
14	3	4	3	2. 74
15	3	5	4	2. 90
16	4	1	2	0. 89
17	4	2	3	1. 00
18	4	3	4	1. 11
19	4	4	5	1. 25
20	4	5	1	0. 56
21	5	1	4	0. 50
22	5	2	5	0. 67
23	5	3	1	0. 56
24	5	4	2	0. 88
25	5	5	3	0. 92
K ₁	1. 88	1. 37	1. 27	T= 40. 42 μ= 1. 62
K ₂	2. 18	1. 53	1. 63	
K ₃	2. 35	1. 68	1. 74	
K ₄	0. 97	1. 77	1. 77	
K ₅	0. 71	1. 73	1. 67	
R	1. 64	0. 40	0. 50	

Note: K₁, K₂, K₃, K₄, K₅ are the sum of related levels. R is the difference between the maximum and minimum among K₁, K₂, K₃, K₄, K₅.

2 4 SFE 法与水蒸气蒸馏法的比较

结果见表 6。可以看出, SFE 法对松油烯-4醇的萃取效果显著好于水蒸气蒸馏法。

Table 5 Analysis of orthogonal experiment
variance of dynamic extraction

Variance source	df	SS	MS	F	Significance
Pressure(A)	10.87	4	2.72	100.10	**
Temperature(B)	0.55	4	0.14	5.06	*
Flux of CO ₂ (C)	0.81	4	0.20	7.474	**
Error	0.33	12	0.03		
Total variance	12.56				

Note: * $\alpha=0.05$, ** $\alpha=0.01$.

Table 6 Compare SFE with steam-distillation
method

Extraction methods	Extraction rate of terpenen-4-ol /(mg/g)
Steam-distillation	2.00±0.13 A
SFE	2.72±0.08 B

3 小结

以 CO₂ 为流体,采用 SFE-GC 法研究确定砂地柏果实油中松油烯-4醇的 SFE 较优工艺条件为:萃取物料粒径 0.85 mm,静态萃取时间 10 min,动态萃取温度 45℃,压力 34~47 MPa,CO₂ 流量 30 mL/g.

采用 SFE 法对砂地柏果实精油中松油烯-4醇的萃取率达 2.72 mg/g,明显高于水蒸气蒸馏法(萃取率为 2.00 mg/g)。两者相比,SFE 在较低的温度下进行,整个过程不涉及萃取、蒸除溶剂等操作,过程简单,这可能是该法萃取率高的主要原因。同时,SFE 法还具有精确、无毒、经济、选择性可调等优点。

参考文献:

[1] ZHANG Xing(张兴), FENG Jun-tao(冯俊涛), CHEN An-liang(陈安良), et al. 砂地柏杀虫作用研究概况 [J]. J Northwest Sci-Tech Univ Agric For(Nat Sci Ed) [西北农林科

技大学学报(自然科学版)], 2002, 30(4): 130-134

[2] GAO Cong-fen(高聪芬), ZHANG Xing(张兴). 砂地柏精油的熏蒸杀虫活性初探 [J]. J Nanjing Agric Univ(南京农业大学学报), 1997, 20(3): 50-53

[3] HOU Hua-m in(侯华民), FENG Jun-tao(冯俊涛), CHEN An-liang(陈安良), et al. 植物精油对几种害虫的毒杀活性 [J]. Nat Prod R & D(天然产物研究与开发), 2002, 14(6): 27-30

[4] WEI Hong-m ei(魏红梅). Study on Fumigant Insecticidal Action and Activity Component of Essential Oil from Several Plants(几种植物精油的熏蒸杀虫作用及其活性成分研究) [D]. Yangling Shaanxi(陕西杨凌): Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2000.

[5] CHEN Gen-qiang(陈根强), FENG Jun-tao(冯俊涛), CHEN An-liang(陈安良), et al. 植物精油组分松油烯-4醇研究进展 [J]. J Northwest Sci-Tech Univ Agric For(Nat Sci Ed) [西北农林科技大学学报(自然科学版)], 2004, 32(8): 130-134.

[6] MA Zhi-qing(马志卿), ZHANG Xing(张兴). 松油烯-4醇对粘虫幼虫的生物活性 [J]. Acta Entom Sinica(昆虫学报), 2004, 47(3): 329-333.

[7] MA Zhi-qing(马志卿), FENG Jun-tao(冯俊涛), JIANG Zhi-li(江志利), et al. 松油烯-4醇对家蝇超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及过氧化物酶的影响 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2004, 6(2): 53-56

[8] Bessette S.M., Beigler M. A. Ecologically-safe insecticides and acaricides [P]. USA: WO 9854971 A1, 1998-12-10.

[9] Larry T. T. Supercritical Fluid Extraction [M]. New York: A Wiley-Interscience Publication, 1996.

[10] LI ling(李玲), CHEN Zhi-qiang(陈志强), LIX iu-hu(李修禄). 超临界流体萃取法在中药材质量控制中的应用 [J]. Acta Pharm Sinica(药学学报), 1995, 30(2): 133-137.

[11] ZHANG Bao-hua(张保华). Development on the Synergistic Compound Insecticidal Aerosol of the Essential Oil from the Berries of Sabina vulgaris Ant(砂地柏精油增效气雾剂研制) [D]. Yangling Shaanxi Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2004.

(Ed. JIN SH)