

# 超声波-双水相萃取印楝素工艺的研究

王佳静<sup>1</sup>, 王曼<sup>1</sup>, 栾龙<sup>2</sup>, 孙润广<sup>1</sup>

(1. 陕西师范大学物理学与信息技术学院, 陕西西安 710062; 2. 南京大渊生物技术工程有限责任公司, 江苏南京 211800)

**摘要:** 采用超声波耦合乙醇-硫酸钠双水相提取印楝素, 将超声功率密度, 超声时间, 超声辐射方式作为其影响因素, 并分别进行单因素实验和正交实验对其进行研究, 最终确定了超声波双水相提取印楝素的最佳工艺。最佳工艺条件为: 功率密度为 2.4 w/cm<sup>2</sup>, 时间为 30 min, 辐射方式为 7s/10s。并且影响印楝素超声提取率的主次因素为功率密度>辐射方式>超声时间, 最优条件下印楝素的提取率为 0.3200%。

**关键词:** 超声波; 印楝素; 双水相

中图分类号: Q62

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2015)-01-0043-04

DOI 编码: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2015.01.008

## The study of ultrasound-aqueous two-phase extraction process of azadirachtin

WANG Jia-jing<sup>1</sup>, WANG Man<sup>1</sup>, LUAN Long<sup>2</sup>, SUN Run-guang<sup>1</sup>

(1. College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China;  
2. Nanjing Potomac Bio-Technology Co, Ltd, Nanjing 211800, Jiangsu, China)

**Abstract:** In this paper, the method of ultrasonic assisted double water phase is used to extract azadirachtin. In order to obtain the best technology of extracting azadirachtin, many influence factors are studied, such as ultrasonic power density, action time and the way of radiation method. Meanwhile, the single factor and orthogonal experiments are performed separately to investigate the extraction of azadirachtin. Finally, the optimum conditions of extracting azadirachtin is gained when the ultrasonic power density, action time and radiation mode are 2.4w/cm<sup>2</sup>, 30min and 7s/10s respectively. The influence degrees from strong to weak are in order caused by ultrasonic power density, radiation mode and ultrasonic action time. The extracted yield of azadirachtin reaches 0.3200% under optimal conditions.

**Key words:** ultrasonic; azadirachtin; aqueous two-phase

## 0 引言

当前, 人们更加重视从天然植物资源中提取植物源农药<sup>[1,2]</sup>。该农药在自然生态环境中广泛存在, 资源丰富, 绝大多数植物源农药具有低毒性, 不会破坏生态环境, 而且残留少, 选择性强, 对天敌影响小。虫害和病菌对该农药难以产生抗药性, 使用寿命长<sup>[3]</sup>。有的植物源农药把害虫或病菌杀死后, 其遗体残骸上的病菌还可以再浸染拓展到同类靶标生物上, 增加害虫或病菌死亡的数量和区域, 降低使用成本<sup>[4]</sup>。由此, 使用植物源农药具有十分重要的现实意义。

印楝素作为一种高效的生物农药, 几乎对所有

植物害虫都具有驱杀效果, 是对人类安全性极高的天然农药。目前, 超声波提取印楝素的方法已有很多报道<sup>[5-7]</sup>, 但大多都局限在超声波总功率的层面上, 这样印楝素提取率就受容器大小的影响比较大, 为工业生产带来很大的麻烦。本文从超声功率密度的角度出发, 避免了超声容器的大小对印楝素提取的影响。

双水相是由一种或两种高分子化合物与一种盐类在水中所形成的互不相溶的两相体系, 根据被分离物在两相中的分配不同, 从而实现分离。本文采用乙醇与盐形成双水相进行萃取<sup>[8]</sup>, 与传统的油-水溶剂萃取相比, 双水相萃取具有活性损失小、分离步骤少、操作条件温和, 不存在有机溶剂残留问题等优点, 避免了使用有毒、易燃的有机溶剂的问题。本文将超声的提取与双水相萃取相结合, 从超声功率密度、超声时间、超声辐射方式三个因素进行研究, 分别进行了单因素实验和正交实验, 最终确定最佳超声参数, 为今后印楝素的工业生产奠定了技术支撑。

收稿日期: 2013-11-15; 修回日期: 2014-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10874108)、陕西省自然科学基金基础研究计划(SJ08A16)资助项目。

作者简介: 王佳静(1988-), 男, 陕西省咸阳市人, 硕士研究生, 研究方向为超声提取天然产物化学。

通讯作者: 孙润广, E-mail: sunrunguang@snnu.edu.cn

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料和仪器

材料: 印楝素种仁(南京九康生物科技发展有限公司提供), 石油醚, 乙醇, 硫酸钠, 乙腈(分析纯级)。

仪器: FZ102 型植物用粉碎机(天津泰斯特有限公司), JY98-III 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物技术有限公司), Huihong-3118A 超声波功率(声强)测量仪(富阳市辉煌超声设备有限公司), RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), FD-1A 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器公司), Waters1525 高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器。

### 1.2 试验方法

将印楝种仁粉碎, 然后用石油醚按 1:5 进行脱脂三次, 获得印楝饼, 用 75% 乙醇按料液比 1:3 进行超声提取三次, 整个提取过程处于冰水浴中, 防止超声时溶液温度过高导致印楝素分解。将提取液进行双水相分相, 取醇相进行浓缩后冷冻干燥, 获得印楝素粗品, 高效液相检测其含量。

### 1.3 双水相的配置

本实验采用乙醇-硫酸钠双水相, 其中水溶性有机溶剂为乙醇, 成相的盐为硫酸钠, 硫酸钠溶液按盐:水=60:100 进行配置, 用乙醇提取液和硫酸钠溶液按 1:1 进行混合获得双水相。

### 1.4 检测方法

运用高效液相进行检测<sup>[9,10]</sup>, 检测条件为色谱柱: C18, ODS—35  $\mu\text{m}$  250 $\times$ 4.6 mm; 流动相: 乙腈: 水=40:60; 流速: 1 ml/min; 检测波长: 218 nm; 进样量: 20  $\mu\text{l}$ ; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.5 超声波提取印楝素单因素实验

#### 1.5.1 超声功率密度单因素实验

分别取脱脂后的印楝饼 20 g, 超声波频率为 25 kHz, 料液比为 1:3, 超声时间 30 min, 辐射方式为 6 s/10 s, 超声功率密度大小分别为 1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 进行超声提取, 计算提取率, 确定最佳超声功率密度。

#### 1.5.2 超声时间的单因素实验

分别取脱脂后的印楝饼 20 g, 超声波频率为 25 kHz, 料液比为 1:3, 超声功率密度为 2.4  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 辐射方式为 6 s/10 s, 超声时间分别为 15、30、45、60、90、120 min, 进行超声提取, 计算提取率, 确

定最佳超声时间。

#### 1.5.3 超声辐射方式单因素实验

分别取脱脂后的印楝饼 20 g, 超声波频率为 25 kHz, 料液比为 1:3, 超声功率密度为 2.4  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 超声时间为 30 min, 辐射方式分别为 5 s/10 s, 6 s/10 s, 7 s/10 s, 8 s/10 s, 9 s/10 s, 10 s/10 s, 进行超声提取, 计算提取率, 确定最佳超声辐射方式。

### 1.6 超声提取印楝素正交实验设计

根据单因素试验, 对影响印楝素超声提取的主要因素: 超声功率密度、超声时间、超声辐射方式, 按照  $L_9(3^4)$  正交表进行正交实验设计, 正交试验因素水平见表 1, 确定最佳超声提取工艺。

表 1 超声提取印楝素的正交试验因素  
Table 1 Orthogonal test factors for ultrasonic extraction of azadirachtin

水平	A 超声功率密度/ $(\text{W}/\text{cm}^2)$	B 超声时间/ $\text{min}$	C 超声辐射方式
1	2.2	20	5 s/10 s
2	2.4	30	7 s/10 s
3	2.6	40	9 s/10 s

### 1.7 传统搅拌对比试验

传统搅拌提取方法为: 分别取脱脂后的印楝饼 20 g, 用 75% 乙醇按料液比 1:3 进行搅拌辅助提取三次, 提取时间分别为 30、45、60、75、90、105、120 min 进行搅拌提取。检测提取率, 确定搅拌提取最佳时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 超声功率密度对印楝素提取的影响

由图 1 可知, 超声功率密度为 2.4  $\text{W}/\text{cm}^2$  时, 印楝素的提取率明显高于其他功率密度下的提取

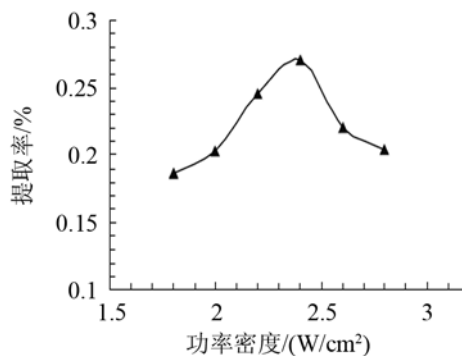


图 1 超声功率密度对印楝素提取率的影响  
Fig.1 The effect of ultrasonic power density on the extraction rate of azadirachtin

率，当超声功率密度小于  $2.4 \text{ W/cm}^2$  时，提取率随着超声功率密度的增加而升高，当超过  $2.4 \text{ W/cm}^2$  时，提取率开始下降，因此超声功率密度不宜过大，最佳的超声功率密度为  $2.4 \text{ W/cm}^2$ 。

### 2.1.2 超声时间对印楝素提取率的影响

由图 2 可知，当超声时间在 30 min 时，印楝素的提取率最高，在 30 min 之前随着超声时间的延长提取率逐渐升高，但在 30 min 后随着时间的延续提取率逐渐降低，可能是超声时间过长，溶液局部温度上升使得部分印楝素分解，因此最佳的超声提取时间为 30 min。

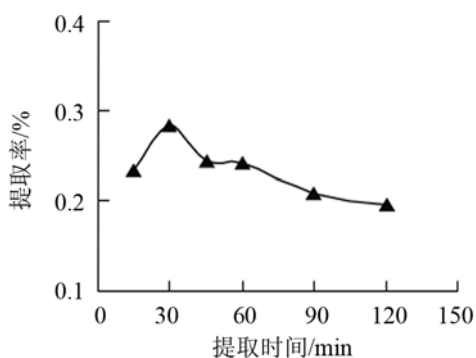


图 2 超声时间对印楝素提取率的影响

Fig.2 The effect of ultrasonic action time on the extraction rate of azadirachtin

### 2.1.3 超声辐射方式对印楝素提取率的影响

由图 3 可知，当超声波辐射方式为 7 s/10 s 的时候，提取率最高，在辐射方式为 7 s/10 s 之前随着辐射方式的改变提取率逐渐升高，在 7 s/10 s 之后随着辐射方式的改变提取率逐渐降低，因此最佳的超声辐射方式为 7 s/10 s。

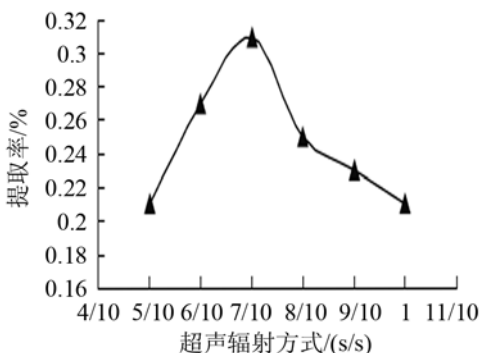


图 3 超声辐射方式对印楝素提取率的影响

Fig.3 The effect of ultrasonic radiation mode on the extraction rate of azadirachtin

## 2.2 超声正交实验结果与分析

正交试验结果显示， $I_2 A > I_1 A > I_3 A$ ， $I_2 B > I_3 B > I_1 B$ ， $I_2 C > I_1 C > I_3 C$ 。因此，A、B、C

三个因素中最佳水平是  $A_2$ ， $B_2$ ， $C_2$ ，由表 2 显示极差大小为  $A > C > B$ ，故 A、B、C 的主次因素为超声功率密度>辐射方式>超声时间。选择的最佳提取工艺为  $A_2 B_2 C_2$ ，即超声功率密度为  $2.4 \text{ W/cm}^2$ ，超声时间为 30 min，超声辐射方式为 7s/10s。此条件下进行超声正交验证试验，其提取率为 0.3200%，高于传统的搅拌提取法，达到了超声辅助提取的目的。

表 2 超声提取印楝素结果与分析

Table 2 Results and analysis of ultrasonic extraction of azadirachtin

试验号	A	B	C	印楝素提取率/%
1	1	1	1	0.1792
2	1	2	2	0.2015
3	1	3	3	0.1734
4	2	1	3	0.2067
5	2	2	1	0.2116
6	2	3	2	0.1983
7	3	1	2	0.1652
8	3	2	3	0.1814
9	3	3	1	0.2028
$I_1$	0.185	0.184	0.186	
$I_2$	0.206	0.198	0.204	
$I_3$	0.183	0.192	0.183	
SS	0.023	0.014	0.021	

## 2.3 传统搅拌提取实验结果

由图 4 可知，当搅拌时间为 90 min 时提取率达到最大，提取率为 0.230%。

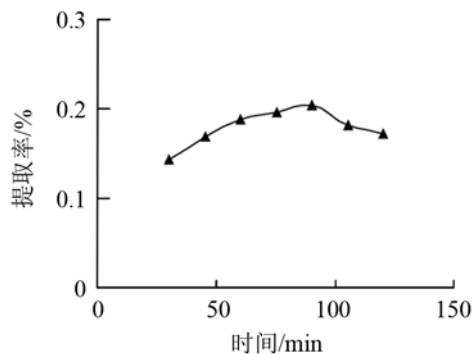


图 4 搅拌时间对印楝素提取率的影响

Fig.4 The effect of stirring time on the extraction rate of azadirachtin

## 3 结论

采用超声波双水相提取印楝素，能够有效地提高印楝素的提取率，本文从超声功率密度以及其他单因素试验出发进行实验，最终得到了最佳的超声波提取工艺，即超声功率密度为  $2.4 \text{ W/cm}^2$ ，超声时间为 30 min，超声辐射方式为 7 s/10 s，印楝素的最大提取率为 0.3200%，比传统的搅拌提取节约了时间，提高了产率，并且双水相的使用，避免了在

使用有机溶剂进行萃取的过程所造成的污染。更重要的是本文采用超声功率密度,不再使用传统的超声功率这一笼统的因素,避免了超声容器带来的影响,为今后的工业生产带来了更大的便利。

### 参 考 文 献

- [1] 袁文金, 马德英, 郭冬雪, 等. 我国植物源农药研究进展[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(6): 892-897.  
YUAN Wenjin, MA Deying, GUO Dongxue, et al. Research progress of botanical pesticides in China[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2007, 44(6): 892-897.
- [2] 刁治民, 张静, 马寿福. 植物源农药的研究进展和发展前景[J]. 青海草业, 2007, 16(3): 27-32.  
DIAO Yimin, ZHANG Jing, MA Shoufu. The research progress of botanical pesticides and development prospects[J]. Qinghai Prataculture, 2007, 16(3): 27-32.
- [3] 王万能. 植物源农药的开发研究[J]. 重庆三峡学院学报, 2005, 3(21): 81-82.  
WANG Wanneng. The research and development of plant pesticide[J]. Journal of Chongqing Three-Gorges University, 2005, 3(21): 81-82.
- [4] 陈小军, 杨益众, 张志祥, 等. 印楝素及印楝杀虫剂的安全性评价研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(6): 1478-1484.  
CHEN Xiaojun, YANG Yizhong, ZHANG Zhixiang, et al. Progress on safety evaluation of azadirachtin and neem insecticide[J]. Ecology and Environmental Sciences. 2010; 19(6): 1478-1484.
- [5] 王秋芬, 宋湛谦, 赵淑英, 等. 超声波辅助溶剂萃取印楝素条件优化[J]. 农药, 2004, 43(8): 351-353.  
WANG Qiufen, SONG Zhanqian, ZHAO Shuying, et al. The optimal ultrasonic-assisted extraction azadirachtin process from neem seed with solvent[J]. Chinese Journal of Pesticides, 2004, 43(8): 351-353.
- [6] 王有琼, 李晓升, 孙龙, 等. 印楝素的快速提取法研究[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(5): 13-15.  
WANG Youqiong, LI Xiaosheng, Sun Long, et al. Study on rapid extraction of azadirachtin[J]. Agrochemicals, 2005, 39(5): 13-15.
- [7] 王中元, 陈玉明, 袁利伟, 等. 印楝素强化浸提试验研究[J]. 农产品加工学刊, 2007(1): 68-70.  
WANG Zhongyuan, CHEN Yuming, YUAN Liwei, et al. Experimental study on the neem extricated by technique of reinforcement[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(1): 68-70.
- [8] 刘琳, 董悦生, 修志龙. 微波辅助双水相提取盾叶薯蓣中的皂苷成分[J]. 过程工程学报, 2009, 9(6): 1147-1152.  
LIU Lin, DONG Yuesheng, XIU Zhilong. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of steroidal saponins in dioscorea zingiberensis[J]. The Chinese Journal of Process Engineering. 2009, 9(6): 1147-1152.
- [9] 叶敏, 武永昆, 林军, 等. 悬浮剂中印楝素的高效液相色谱分析方法[J]. 农药, 2006, 45(11): 761-762.  
YE Min, WU Yongkun, LIN Jun, et al. Determination of azadirachtin in suspension concentrates[J]. Agrochemicals, 2006, 45(11): 761-762.
- [10] 宗乾收, 林军, 武永昆, 等. 印楝种仁中印楝素含量的快速液相色谱分析[J]. 农药, 2003, 42(4): 23-24.  
ZONG Qianshou, LIN Jun, WU Yongkun, et al. Quantitative analysis of azadirachtin content of neem seeds by HPLC[J]. Agrochemicals, 2003, 42(4): 23-24.