

肾叶天胡荽精油的超临界 CO₂ 萃取、 成分分析及杀虫活性初探

胡艳莲, 叶舟^①, 陈伟, 龙川, 李会霞

(福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 采用正交实验设计, 对肾叶天胡荽 (*Hydrocotyle wilfordi* Maxim.) 精油超临界 CO₂ 萃取条件进行了优化, 并用 GC-MS 分析技术对精油的化学成分进行了鉴定, 初步探讨了肾叶天胡荽精油对小菜蛾 2 龄幼虫的触杀活性。结果表明, 肾叶天胡荽精油超临界 CO₂ 萃取的最佳条件为萃取压力 35 MPa、萃取温度 50 °C、解析压力 5 MPa、解析温度 40 °C、萃取时间 75 min、CO₂ 流量 34~36 L·h⁻¹, 精油得率最高可达 5.32%。从精油中共鉴定出 19 种成分, 总相对含量达到 89.266%, 主要成分为邻苯二甲酸二辛酯 (64.302%)。用超临界 CO₂ 萃取技术提取的肾叶天胡荽精油对小菜蛾 2 龄幼虫有一定的触杀作用, 20 g·L⁻¹ 精油对小菜蛾 2 龄幼虫的 24 h 校正死亡率高达 90.00%。

关键词: 肾叶天胡荽; 精油; 超临界 CO₂ 萃取技术; 气相色谱-质谱分析; 杀虫活性

中图分类号: S482.3⁺9; Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)04-0027-04

Supercritical CO₂ extraction and component analysis of essential oil from *Hydrocotyle wilfordi* and preliminary study of its insecticidal activity HU Yan-lian, YE Zhou^①, CHEN Wei, LONG Chuan, LI Hui-xia (College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(4): 27-30

Abstract: The optimal conditions of supercritical CO₂ extraction for essential oil from *Hydrocotyle wilfordi* Maxim. were selected by orthogonal test design, and the chemical components in the essential oil were identified by GC-MS. The contact toxicity of the essential oil against the 2nd instar larvae of *Plutella xylostella* L. was studied preliminarily. The optimal conditions of supercritical CO₂ extraction are as follows: extraction pressure 35 MPa, extraction temperature 50 °C, separation pressure 5 MPa, separation temperature 40 °C, extraction time 75 min and CO₂ flow 34-36 L·h⁻¹. And the highest extraction rate of the essential oil reaches 5.32%. Nineteen components in the essential oil have been identified, which account for 89.266% of the total relative content of the essential oil. The major component is bis (2-ethylhexyl)-phthalate (64.302%). The essential oil of *H. wilfordi* has a certain contact toxicity against the 2nd instar larvae of *P. xylostella*, and the corrected mortality of the larvae treated with 20 g·L⁻¹ essential oil for 24 h reaches 90.00%.

Key words: *Hydrocotyle wilfordi* Maxim.; essential oil; supercritical CO₂ extraction technology; GC-MS; insecticidal activity

伞形科 (Umbelliferae) 天胡荽属 (*Hydrocotyle* L.) 植物中有许多种类具有药用价值。如天胡荽 (*H. sibthorpoioides* Lam.) 全草具有清热利湿、解毒消肿的功效^[1-3]; 现代医学和临床研究证明, 天胡荽具有多种生物活性, 在医学上应用广泛^[4]。与天胡荽同属的肾叶天胡荽 (*H. wilfordi* Maxim.) 也可入药, 具有清热解毒、利湿的功效^[1], 在江西民间与天胡荽混用^[5], 捣烂的肾叶天胡荽全草还可用于毒鱼。相关

的研究结果表明, 天胡荽全草含有挥发油并具有一定的抑菌活性^[6], 而有关肾叶天胡荽精油的相关研究尚未见报道。

收稿日期: 2008-05-30

基金项目: 国家林业局林业新品种新技术中间试验计划项目 [(2006)29 号]; 福建省科技计划项目 (2001J033)

作者简介: 胡艳莲 (1983—), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 主要从事植物生物化学领域中生物农药方面的研究。

^①通讯作者 E-mail: yezhou1182@126.com

超临界 CO₂ 萃取技术可防止“热敏性”化合物的氧化和逸散,且能萃取出高沸点、低挥发度、易热解的成分,特别适合植物精油的提取分离,广泛应用于化学、食品、石油、医药及香料等领域^[7-9]。作者曾用水蒸气蒸馏法提取出肾叶天胡荽精油并进行了杀虫活性测定,发现肾叶天胡荽精油对大豆蚜虫和白蚁均有较好的毒杀活性(另文发表),但水蒸气蒸馏法存在提取温度过高、耗时长、活性成分易丧失及得率低等缺点。为了提高肾叶天胡荽精油的得率与品质,作者采用超临界 CO₂ 萃取技术对精油的提取条件进行了优化,并利用 GC-MS 方法对其化学成分进行了鉴定,初步探讨其杀虫活性,以期对肾叶天胡荽精油提取技术的优化提供理论基础,并为肾叶天胡荽的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试肾叶天胡荽全草于 2006 年 5 月采自江西井冈山,全草置于 40 ℃ 鼓风干燥箱中处理 8 h,烘干后粉碎并过 60 目筛,于阴凉干燥处保存备用。

实验用小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 来源于福建农林大学生物防治研究所网室,在室内用新鲜甘蓝叶进行继代饲养,随机挑选健康一致的 2 龄幼虫用于实验。

实验用主要仪器有 HA 221-40-11 超临界 CO₂ 萃取装置(1 L+10 L)(江苏南通华安超临界萃取有限公司)和气相色谱-质谱联用仪(GC-MS, Saturn 2100, CP3900, 美国 Varian 公司出品)。

1.2 方法

1.2.1 超临界 CO₂ 萃取的正交实验设计 在解析压力(6 MPa)和 CO₂ 流量(34~36 L·h⁻¹)不变的条件,设计 4 因素 3 水平的正交实验。其中,萃取压力(A)设定为 30、35 和 40 MPa 3 个水平;萃取温度(B)设定为 40 ℃、45 ℃ 和 50 ℃ 3 个水平;解析温度(C)设定为 35 ℃、40 ℃ 和 45 ℃ 3 个水平;萃取时间(D)设定为 65、75 和 85 min 3 个水平。

称取全草干粉 200 g,置于 1 L 萃取釜中,密封,加压至 5 MPa 后排净冷空气;分别对萃取釜和解析釜进行加热,达到各自设定的温度后,加压至设定的萃取压力并调节 CO₂ 流量至 34~36 L·h⁻¹;当萃取釜达到设定压力、解析釜压力达到 6 MPa 时,关闭

CO₂ 钢瓶,循环萃取至设定的萃取时间后减压至常压,将萃取物收集于棕色玻璃瓶中备用。每处理重复 3 次,分别计算精油的得率。

1.2.2 精油成分的 GC-MS 分析 气相色谱条件:色谱柱为 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm)弹性石英毛细管柱;柱温采取程序升温法,起始温度 80 ℃ 并保持 3 min,以 6 ℃·min⁻¹ 升温至 150 ℃ 并保持 2 min,再以 3 ℃·min⁻¹ 升温至 220 ℃ 并保持 4 min,最后以 8 ℃·min⁻¹ 升温至 280 ℃ 并保持 3 min;气化室温度 250 ℃;载气为高纯氮气;载气流量 1.0 mL·min⁻¹;柱前压 7.61 psi;进样量 1 μL(用乙醚将精油稀释);分流比 20:1。

质谱条件:电子轰击(EI)离子源;离子源温度 230 ℃;四极杆温度 150 ℃;电子能量 70 eV;发射电流 34.6 μA;倍增器电压 1 388 V;接口温度 280 ℃;溶剂延迟 4 min;质量扫描范围 30~650 amu。

1.2.3 对小菜蛾触杀活性的测定方法 参照陈万义的点滴法^[10]并略加改进。用丙酮将精油依次稀释至 20.00、10.00、5.00、2.50 和 1.25 g·L⁻¹,用微量点滴器分别吸取 1 μL 上述精油稀释液点滴在小菜蛾 2 龄幼虫的前胸背板上,将处理后的试虫放入培养皿中,以新鲜甘蓝叶喂食。对照组则用 1 μL 丙酮点滴试虫。每一处理组和对照组均为 10 头试虫,各重复 3 次,24 h 后观察统计试虫的死亡率。

1.3 数据处理

采用 DPS 软件对正交实验数据进行极差分析,并采用 LSD 法对校正死亡率进行多重比较。采用 NIST 98 和 Wiley 7 数据库对各成分的质谱数据进行检索,用峰面积归一化法确定各成分的相对含量。小菜蛾校正死亡率 = [(处理组死亡率 - 对照组死亡率)/(1 - 对照组死亡率)] × 100%。

2 结果和分析

2.1 超临界 CO₂ 萃取的正交实验结果

采用正交实验设计对肾叶天胡荽精油超临界 CO₂ 萃取过程中萃取压力、萃取温度、解析温度和萃取时间进行优化,结果见表 1。在上述 4 个因素中,对肾叶天胡荽精油萃取率影响最大的是萃取压力,其次为萃取时间和萃取温度,解析温度对萃取率的影响最小。根据极差分析结果,筛选出肾叶天胡荽精油超临界 CO₂ 萃取过程中最佳萃取条件组合为

A2B3C2D2,即在解析压力和 CO₂ 流量不变的条件下,采用萃取压力 35 MPa、萃取温度 50 ℃、解析温度 40 ℃和萃取时间 75 min 的萃取条件可以使肾叶天胡荽精油的得率最高。

表1 肾叶天胡荽精油超临界 CO₂ 萃取的正交实验结果
Table 1 The results of orthogonal experiment of essential oil extracted from *Hydrocotyle wilfordi* Maxim. by supercritical CO₂ extraction technology

编号 No.	因素和水平 ¹⁾ Factor and level ¹⁾				萃取率/% Extraction rate
	A	B	C	D	
1	30	40	35	65	1.76
2	30	45	40	75	2.99
3	30	50	45	85	1.79
4	35	40	40	85	3.60
5	35	45	45	65	3.68
6	35	50	35	75	5.32
7	40	40	45	75	3.16
8	40	45	35	85	2.12
9	40	50	40	65	3.87
k ₁	2.18	2.84	3.07	3.10	
k ₂	4.20	2.93	3.49	3.82	
k ₃	3.05	3.66	2.88	2.50	
R	2.02	0.82	0.61	1.32	

¹⁾ A: 萃取压力 Extraction pressure (MPa); B: 萃取温度 Extraction temperature (℃); C: 解析温度 Separation temperature (℃); D: 萃取时间 Extraction time (min).

表2 肾叶天胡荽精油的化学成分
Table 2 Chemical components of essential oil from *Hydrocotyle wilfordi* Maxim.

编号 No.	保留时间/min Retention time	化学成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对分子质量 MW	相对含量/% Relative content
1	11.591	1-tridecanol	C ₁₃ H ₂₈ O	200	0.550
2	12.663	4,6,6-trimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-one	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.290
3	13.303	2,3,4-trimethyl-2-pentene	C ₈ H ₁₆	112	2.304
4	14.043	copaene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.014
5	14.397	2-hexyl-decanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242	0.469
6	16.462	tetratriacontane	C ₃₄ H ₇₀	478	0.756
7	16.873	2-hexadecyloxy-ethanol	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	286	0.900
8	17.203	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206	2.072
9	19.626	decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-cycloprop[E] azulen-4-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.478
10	19.852	2-octadecyloxy-ethanol	C ₂₀ H ₄₂ O ₂	314	1.937
11	20.484	cedrol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.384
12	21.278	pentatriacontane	C ₃₅ H ₇₂	492	1.032
13	23.016	hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	506	2.280
14	23.364	(dodecyloxy) methyl-oxirane	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	0.638
15	26.232	1-hentetracontanol	C ₄₁ H ₈₄ O	592	0.605
16	27.378	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	0.671
17	28.263	1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl octyl ester	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334	0.801
18	45.159	2,2'-methylene-bis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl]-phenol	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340	7.783
19	48.152	bis(2-ethylhexyl)-phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	64.302

2.2 肾叶天胡荽精油成分的 GC-MS 分析结果

利用上述超临界 CO₂ 萃取条件从肾叶天胡荽全草中提取出精油并用 GC-MS 分析技术鉴定其中的化学成分,结果见表2。从肾叶天胡荽精油中共鉴定出 19 种化学成分,占总精油成分相对含量的 89.266%。其中,邻苯二甲酸二辛酯的含量最高,相对含量达到 64.302%,此外,2,2'-亚甲基双[6-(1,1-二甲基乙基)-4-甲基]-苯酚(7.783%)、2,3,4-三甲基-2-戊烯(2.304%)、2,4-双(1,1-二甲基乙基)-苯酚(2.072%)和三十六烷(2.280%)的相对含量也较高,均在 2% 以上。

2.3 肾叶天胡荽精油对小菜蛾的触杀活性

肾叶天胡荽精油对小菜蛾 2 龄幼虫的触杀活性见表3。由表3可见,不同浓度精油均对小菜蛾有一定的触杀活性,且小菜蛾的校正死亡率随精油浓度的增加不断提高;各处理组间小菜蛾的校正死亡率均有显著差异;处理 24 h 后,20.00 g·L⁻¹ 浓度处理组小菜蛾的校正死亡率达到 90.00%。实验中还观察到在点药液时小菜蛾有剧烈挣扎的现象,与对照组相比,处理组小菜蛾 2 龄幼虫死亡体的点药液处呈黄褐色,有的幼虫头部甚至呈黑色,身体呈现出不同程度的扭曲缢缩现象。

表3 肾叶天胡荽精油对小菜蛾2龄幼虫(24 h)的触杀活性($\bar{X} \pm SD$)¹⁾Table 3 Contact toxicity (24 h) of essential oil from *Hydrocotyle wilfordi* Maxim. against the 2nd instar larvae of *Plutella xylostella* L. ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

浓度/g · L ⁻¹ Concentration	校正死亡率/% Corrected mortality
20.00	90.00 ± 1.000Aa
10.00	63.33 ± 2.082ABb
5.00	46.67 ± 1.155BCbe
2.50	23.33 ± 0.577CDed
1.25	6.67 ± 0.577Dd

¹⁾ 同列中不同的大写和小写字母分别表示在1%和5%水平上的差异显著性。Different capitals and small letters in the same column indicate the significant difference at 1% and 5% levels, respectively.

3 结论和讨论

通过正交实验,对肾叶天胡荽全草挥发油超临界CO₂萃取条件进行了筛选和优化,研究表明,用超临界CO₂萃取技术提取肾叶天胡荽精油的最佳提取工艺条件为:萃取压力35 MPa、萃取温度50℃、解析压力5 MPa、解析温度40℃、萃取时间75 min、CO₂流量34~36 L·h⁻¹。肾叶天胡荽精油得率最高可达5.32%,最低为1.76%,均明显高于用水蒸气蒸馏法提取的精油得率(0.51%,另文报道),其主要原因可能是由于水蒸气蒸馏法时间长、温度高,致使热敏成分分解,从而导致最终收集的成分不完全^[11]。超临界CO₂萃取技术操作过程耗时短、效率高、温度低、系统密闭,可避免对热不稳定及易氧化成分的破坏,是植物精油提取的有效方法之一,目前已被应用于多种植物精油的提取分离^[8-9]。因此,超临界CO₂萃取技术完全可以应用于肾叶天胡荽精油的提取和分离。

用超临界CO₂萃取技术提取的肾叶天胡荽全草精油中含量较高的化学成分有邻苯二甲酸二辛酯(64.302%)、2,2'-亚甲基-双[6-(1,1-二甲基乙基)-4-甲基]-苯酚(7.783%)和2,3,4-三甲基-2-戊烯(2.304%)等,另外,还含有烯醇类及长链烷烃类等成分以及一部分弱挥发性成分。而作者用水蒸气蒸馏法提取出的肾叶天胡荽精油主要由萜类及烯醇类化合物组成,其中相对含量较高的成分有雪松醇(45.669%)、3,7,7-三甲基-[1S]环[4,

1,0]庚-3-烯(19.344%)以及石竹烯氧化物(10.505%)等,与用超临界CO₂萃取技术提取的肾叶天胡荽精油成分差异极大。因此,针对肾叶天胡荽精油的得率和化学组成,其超临界CO₂萃取条件还有待进一步优化。

用超临界CO₂萃取技术提取的肾叶天胡荽精油对小菜蛾2龄幼虫具有一定的触杀活性,且触杀活性的高低与精油的浓度呈正相关。由于精油本身具有挥发性强的特点,因此,可利用剂型加工技术将其制成缓释剂并应用于蔬菜种植中,以解决绿色蔬菜上农药残留量超标的问题并能延缓害虫的抗药性。用超临界CO₂萃取技术提取的肾叶天胡荽精油中相对含量最高的成分是邻苯二甲酸二辛酯,这一成分是化工领域中用途较广的增塑剂,目前对其毒性尚没有明确的认识,因而,肾叶天胡荽精油的杀虫活性是否与其中高含量的邻苯二甲酸二辛酯有关,还有待于进一步的研究探索。

参考文献:

- [1] 中华本草编委会. 中华本草(第五册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 968-970.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 168.
- [3] 中国长江三峡植物大全编撰委员会. 中国长江三峡植物大全(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 900-902.
- [4] 陈 瑶, 郑汉臣, 秦路平. 伞形科天胡荽亚科植物化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2004, 19(2): 51-55.
- [5] 曹 萍, 褚小兰, 范崔生. 江西金钱草的性状与显微鉴别[J]. 中药材, 27(7): 481-484.
- [6] 穆淑珍, 汪 冶, 郝小江. 黔产天胡荽挥发油化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 215-217.
- [7] 王 旭. 超临界CO₂萃取工艺的研究[J]. 辽宁化工, 2000, 29(4): 191-193.
- [8] 梁呈元, 李维林, 夏 冰, 等. 薄荷油超临界CO₂萃取条件的优化和筛选[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 38-41.
- [9] 曾虹燕, 蒋丽娟, 施风姿. 超临界CO₂萃取鱼腥草的挥发油成分[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 10-13.
- [10] 陈万义, 王龙根, 李钟华. 新农药的研发——方法·进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 116.
- [11] 周长新, 李新华. 藜本内酯的稳定性与溶剂化效应的关系[J]. 药学报, 2001, 36(10): 793-795.