

均匀设计和回归法优化苦楝素提取工艺研究

秦琳¹, 苏印泉^{1*}, 张强¹, 李秀红¹, 薛刚¹, 玉泉幸一郎²

(1. 西北农林科技大学 林学院 陕西 杨陵 712100; 2. 九州大学 日本国 812-8581)

摘要:运用均匀设计和回归分析方法优化植物源农药苦楝素的提取工艺。采用溶剂浸提法从苦楝果实中提取苦楝素,考察提取工艺中石油醚去酯、乙醇回流提取(95℃)和乙酸乙酯萃取过程对苦楝素提取率的影响。经优化筛选,得到苦楝素最优提取工艺为:石油醚浸提的液料比 1:24(g:mL),时间 20 min,无水乙醇回流提取的液料比 1:34(g:mL),时间 390 min,125 mL 乙酸乙酯萃取 100 min,提取率达 0.721 3%。

关键词:均匀设计;回归分析;苦楝素;提取工艺

中图分类号:S789.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)01-0137-05

Extraction of Toosendanin with Uniform Design and Regression Analysis

QIN Lin¹, SU Yin-quan^{1*}, ZHANG Qiang¹, LI Xiu-hong¹, XUE Gang¹, GYOKUSEN Koichiro²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Kyushu University 812-8581, Japan)

Abstract: Uniform design and regression analysis were adopted to optimize the extraction process of toosendanin, a kind of vegetal pesticide by using petroleum ether to remove lipids and ethanol to extract target constituents from the fruit of chinaberry. The optimal conditions were as follows. In the procedure of removing lipids, the ratio of petroleum ether to fruit material was 1:24 (g:mL) with a refluxing time of 20 min. In the extraction procedure, the ratio of absolute ethanol to the defatted fruit residue was 1:34 (g:mL) with the refluxing time of 390 min. After ethanol was removed, the extract was further extracted by ethyl acetate for 100 min, the yield of toosendanin reached 0.721 3%, indicating that uniform design and regression analysis were appropriate to determine the control parameters for the multi-factor and multi-level experiment.

Key words: uniform design; regression analysis; toosendanin; extraction process

苦楝素是一种呋喃三萜类化合物,分子式为 $C_{30}H_{38}O_{11}$ ^[1],主要存在于楝科植物川楝(*Melia toosendan*)和苦楝(*Melia azedarach*)的树皮、根皮和果实中。作为植物性农药,苦楝素能够杀灭多种农业害虫^[2-4],且对环境安全无污染^[5-6],在农作物、果树的虫害防治方面具有广泛的应用前景^[7]。目前,国内外对苦楝素提取工艺的研究已有许多报道^[8-11],主要采用苦楝根皮为原材料,其中试验方法大多采用正交设计,通过极差分析得到最优提取条件,苦楝素提取率约为 0.8%。但若对较多的参数变量进行全面考察,即针对多因素多水平试验,均匀

设计则更为适合^[12]。本文采用均匀设计法,以苦楝果实为原材料,系统的研究了溶剂浸提苦楝素这一过程中涉及到的影响因素,通过回归分析以及对预测值实测后的结果,寻求参数各水平的变化规律和苦楝素最佳提取工艺条件,为苦楝果实的开发利用积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

材料。苦楝成熟果实(2009 年 11 月中旬,采自陕西省杨陵区西北农林科技大学南校区)。将采集

的苦楝果实拭净,放入 40 ℃烘箱干燥至恒重,冷却后机械粉碎,过 40 目筛,备用。

试剂。分析纯石油醚(沸程 60~90 ℃)、乙酸乙酯、无水乙醇、无水甲醇、氯化钠、浓硫酸、对-二甲氨基苯甲醛(西安化学试剂厂)等。

1.2 设备

722 型光栅分光光度计(上海精密仪器科学有限公司)、SENCO R 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)、SHB-B95 型循环水式多用途真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、DK-98-1 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)、梅特勒 AB204-S 型精密电子天平、DHG-9240A 型烘箱(上海精宏实验设备有限公司)、FW177 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 提取工艺流程 石油醚去酯:取 10 g 原材料粉末置于三角瓶中,加入一定量石油醚脱脂,过滤去掉液态石油醚相,留取残渣;乙醇回流提取:取苦楝果实粉末残渣,自然风干,放入 50 mL 索氏提取器中,加

入一定量无水乙醇回流提取(95℃,沸石 2~3 块);乙酸乙酯萃取:取乙醇相减压蒸发至 15 mL 加入等体积的饱和食盐水,并加入乙酸乙酯萃取,取乙酸乙酯相于旋转蒸发仪减压蒸干,得到苦楝素粗提物。

1.3.2 实验优化设计 根据文献^[11]和预试验,选择石油醚浸提的用量(x_1 , mL)和时间(x_2 , min)、乙醇回流提取的用量(x_3 , mL)和时间(x_4 , min)、乙酸乙酯萃取的用量(x_5 , mL)和时间(x_6 , min)等 6 个因子,每因子 8 个水平(表 1)。选用均匀设计表 U_{16}^* (16^{12})安排试验(表 2)。

表 1 因子水平表

Table 1 Table of factors and levels

因子	水平							
	1	2	3	4	5	6	7	8
x_1	80	120	160	200	240	280	320	360
x_2	20	120	220	320	420	520	620	720
x_3	80	120	160	200	240	280	320	360
x_4	20	120	220	320	420	520	620	720
x_5	40	60	80	100	120	140	160	180
x_6	20	40	60	80	100	120	140	160

表 2 均匀设计 U_{16}^* (16^{12}) 实验设计与实施方案

Table 2 Test scheme of table U_{16}^* (16^{12}) by uniform design

试验号	实验设计(水平)						实施方案					
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6
1	1	2	3	5	7	8	80	120	160	420	160	160
2	1	4	6	2	6	7	80	320	280	120	140	140
3	2	6	1	7	4	6	120	520	80	620	100	120
4	2	8	4	3	3	5	120	720	200	220	80	100
5	3	2	7	8	1	4	160	120	320	720	40	80
6	3	4	1	5	8	3	160	320	80	420	180	60
7	4	6	4	1	7	2	200	520	200	20	160	40
8	4	8	7	6	5	1	200	720	320	520	120	20
9	5	1	2	3	4	8	240	20	120	220	100	160
10	5	3	5	8	2	7	240	220	240	720	60	140
11	6	5	8	4	1	6	280	420	360	320	40	120
12	6	7	2	1	8	5	280	620	120	20	180	100
13	7	1	5	6	6	4	320	20	240	520	140	80
14	7	3	8	2	5	3	320	220	360	120	120	60
15	8	5	3	7	3	2	360	420	160	620	80	40
16	8	7	6	4	2	1	360	620	280	320	60	20

1.3.3 苦楝素提取率测定方法 苦楝素的定量分析采用对二甲氨基苯甲醛/硫酸显色法^[9]。将 0.745 g 的对二甲氨基苯甲醛溶解于 10% 稀硫酸溶液中,定容至 100 mL,得显色液。用甲醇将苦楝素粗品定容至 50 mL,加入 1 mL 显色剂,放置 30 min 后,用分光光度计于 512 nm 处测定吸光度。根据吸光度计算苦楝素的提取率:

$$y=\frac{1.92\times a\times 50\times 10^{-3}}{w}\times 100\%$$

式中:y—苦楝素的提取率,%;a—吸光度;w—试样质量(绝干试样),单位:g。

2 结果与分析

2.1 实验结果

16 组实验中苦楝果实提取物的吸光度测定,结果如表 3 所示。

2.2 回归分析

使用统计软件 SAS8.0 对实验结果进行回归分析,表明二次回归模型较为合理,回归模型拟合度 $R^2=0.980\ 2$ 。

说明本实验所选的六个自变量对于因变量(吸光度)有真实的回归关系,是影响苦楝素提取的主要

因素。所选用的均匀设计所获得的模型能够较好的反应实际情况,是有效的。

表 3 实验结果

Table 3 Test data by uniform design

x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	a	$y/\%$
80	120	160	420	160	160	0.366	0.351 3
80	320	280	120	140	140	0.496	0.476 1
120	520	80	620	100	120	0.155	0.148 8
120	720	200	220	80	100	0.442	0.424 3
160	120	320	720	40	80	0.382	0.366 7
160	320	80	420	180	60	0.142	0.136 3
200	520	200	20	160	40	0.408	0.391 7
200	720	320	520	120	20	0.638	0.612 5
240	20	120	220	100	160	0.356	0.341 7
240	220	240	720	60	140	0.348	0.334 1
280	420	360	320	40	120	0.325	0.312 0
280	620	120	20	180	100	0.252	0.241 9
320	20	240	520	140	80	0.604	0.579 8
320	220	360	120	120	60	0.685	0.657 6
360	420	160	620	80	40	0.386	0.370 5
360	620	280	320	60	20	0.467	0.448 3

进一步采用 SAS8.0 软件中的 reg 过程作逐步回归(系统默认显著性水平为 0.1),剔除回归模型中不显著因子,得到优化原的回归方程为:

$$y = -0.090\,983 + 0.002\,980x_1 + 0.003\,940x_3 + 0.000\,396x_4 + 0.008\,840x_5 - 0.000\,006\,19x_1^2 - 0.000\,005\,82x_3^2 - 0.000\,000\,50x_4^2 - 0.000\,044\,27x_5^2 + 0.000\,023\,98x_5x_6 - 0.000\,015\,50x_6^2$$

优化所得回归方程(1)中,石油醚浸提时间(x_2)

表 4 验证结果

Table 4 Results of verifying test

试验号	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	实测值/%	理论值/%	偏差/%
1	240	20	340	390	125	100	0.741	0.751 4	6.97
2	240	20	340	390	125	100	0.737	0.751 4	9.67
3	240	20	340	390	125	100	0.745	0.751 4	4.28

石油醚浸提用量(x_1):

$$y = -0.090\,983 + 0.002\,980x_1 - 0.000\,006\,19x_1^2$$

乙醇浸提用量(x_3):

$$y = -0.090\,983 + 0.003\,940x_3 - 0.000\,005\,82x_3^2$$

乙醇浸提时间(x_4):

$$y = -0.090\,983 + 0.000\,395x_4 - 0.000\,000\,50x_4^2$$

乙酸乙酯萃取用量(x_5):

$$y = -0.090\,983 + 0.008\,840x_5 - 0.000\,044\,27x_5^2$$

乙酸乙酯萃取时间(x_6):

$$y = -0.090\,983 - 0.000\,015\,50x_6^2$$

回归模型中 5 个因子在不同水平变化,对试验指标吸光度所产生的影响(图 1)。随着各自水平的增大,5 个因子对苦楝素的提取率均呈现出先增大

作为不显著因子被剔除,而石油醚浸提用量(x_1)作为显著因子被保留,由此可以推测出石油醚去酯的时间虽在整个苦楝素提取过程中并非关键因子,不能起到决定性作用,但去酯后的原材料更易于提取苦楝素,即石油醚去酯有利于乙醇回流浸提、乙酸乙酯萃取的进行。

经过回归检验,表明所得回归模型(1)可以很好的反映苦楝素提取过程中所研究的因子,在试验范围内对苦楝素提取率的影响。根据回归方程,再使用优化大师 Lingo 软件进优化,可以得到最优的苦楝素提取条件为:石油醚浸提的用量 $x_1=240.710\,8$ mL、时间 $x_2=20.000\,0$ min,乙醇提取的用量 $x_3=338.488\,0$ mL、时间 $x_4=391.773\,5$ min,乙酸乙酯萃取的用量 $x_5=126.303\,2$ mL、时间 $x_6=97.701\,7$ min。此时,根据所得回归方程可以得到提取物的依据吸光度计算的若楝的提取率为 0.751 4。

根据所得到的苦楝素提取最佳工艺,按照试验处理流程,进行验证试验,重复三次。验证试验结果见表 4。三组实测值与方程(1)的预测值之间相对平均偏差均小于 10%,说明该回归较好的反应了实际情况,对实际生产具有指导意义。

2.3 回归模型的因素分析

2.3.1 单因素分析 为更加直观和深入的探究工艺中所涉及的各个因素,分别将回归方程(1)中五个因子中的任意四个因子设定于 0 水平,得到各因素的一元二次回归模型,如下:

后减小的趋势。在自然取值范围内,五条影响曲线均为开口向下的抛物线,说明存在某一最适条件使得吸光度达到最大值,即 5 个变量因子均存在使苦楝素提取率达到最大值的水平。

石油醚和乙酸乙酯的用量对指标的影响曲线,在较低水平即呈现出明显的峰值,而乙醇的用量对指标影响曲线则呈现出较为缓和的增大趋势,因此认为在试验范围内,石油醚和乙酸乙酯用量应取适中水平,乙醇的用量应取较高水平。乙醇提取时间对指标影响曲线走势平缓,而乙酸乙酯萃取时间对指标影响曲线则呈现出急剧的下降趋势,因此认为乙醇回流提取时间应取适中水平,乙酸乙酯萃取时间应取较低水平。导致该结果的原因可能是长时间

的溶剂浸泡导致苦楝素快速降解,从而使得提取率降低;乙酸乙酯萃取时间过长,出现乳化现象,因而降低了苦楝素提取率。

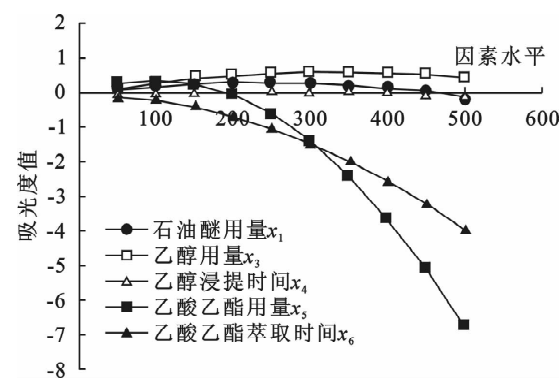


图 1 试验中各单因素对指标的效应

Fig. 1 Single factor on the extraction yield

2.3.2 双因素分析 分别将回归模型中石油醚用量及乙醇、乙酸乙酯二种溶剂中任意一种的用量和时间设定于 0 水平,得到另一溶剂的容量和时间的二元二次方程,如下:

(1) 乙醇提取的用量(x_3)和时间(x_4)对指标(y)的影响

$$y = -0.090\,983 + 0.003\,940x_3 + 0.000\,396x_4 - 0.000\,005\,82x_3^2 - 0.000\,000\,50x_4^2 \quad (7)$$

根据该模型(7)绘制乙醇浸提的用量(x_3)和时间(x_4)对试验指标的曲面图和等值线图 2。依此分析,可知乙醇回流提取的用量(x_3)和时间(x_4)的交互作用对苦楝素提取率的影响:当试验中其它因子固定时,随着乙醇萃取用量的增加,苦楝素提取率逐渐变大,但增加到一定程度时又逐步减少,而随着乙酸乙酯萃取时间的增加,苦楝素提取率逐渐降低。此外,乙酸乙酯萃取用量对苦楝素提取率的影响较大,而乙酸乙酯萃取时间对苦楝素提取率的影响不如萃取用量明显,这与回归方程显著因子分析表所示一致。因此认为,乙醇回流提取的用量应取适中值,而萃取的时间应取较低值。

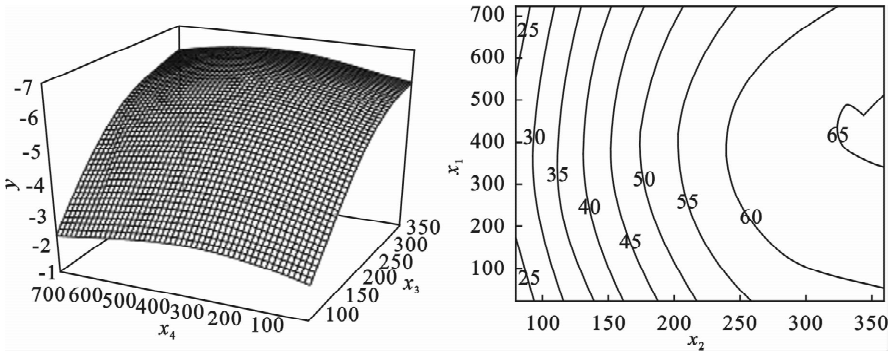


图 2 乙醇回流提取的用量和时间对苦楝素提取率影响的双因素曲线

Fig. 2 Curves of the volume and extraction time of ethanol on the index value

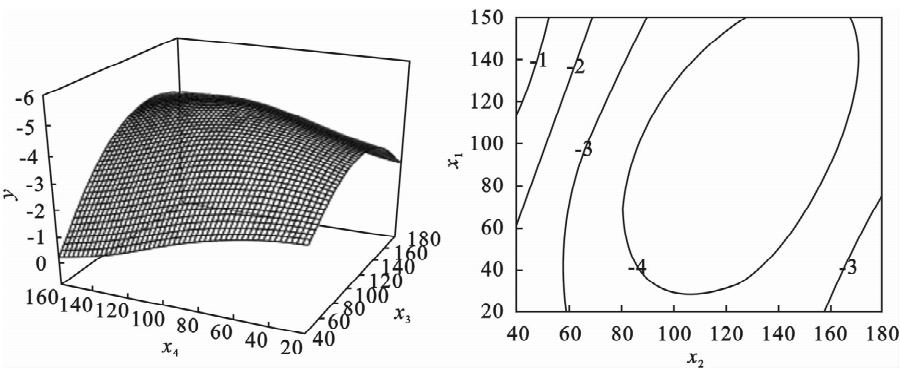


图 3 乙酸乙酯萃取的用量和时间对苦楝素提取率影响的双因素曲线

Fig. 3 Effects of the volume and extraction time of ethyl acetate on the extracts yield

交互作用对苦楝素提取率的影响:当实验中其它因子固定时,随着乙醇用量的增加,苦楝素提取率逐渐变大,随着水平的增大增加趋势减缓,而随着乙醇时间的增加,苦楝素提取率逐渐变大,但增加到一定程度时又逐步减少。此外,乙醇回流浸提的用量对苦楝素提取率的影响较大,而乙醇浸提时间对苦楝素提取率的影响不如用量明显,这与回归方程显著因子分析表所示一致。因此认为,试验中乙醇回流提取的用量应取较高值而提取的时间应取适中值。

(2) 乙酸乙酯提取的用量(x_5)和时间(x_6)对指标(y)的影响

$$y = -0.090\,983 + 0.008\,840x_5 - 0.000\,044\,27x_5^2 + 0.000\,023\,98x_5x_6 - 0.000\,015\,50x_6^2 \quad (8)$$

根据模型(8)绘制乙醇浸提的用量(x_5)和时间(x_6)对试验指标的曲面图和等值线图 3。依此分析,可知乙酸乙酯萃取的用量(x_5)和时间(x_6)的交互作用对苦楝素提取率的影响:当试验中其它因子固定时,随着乙酸乙酯萃取用量的增加,苦楝素提取率逐渐变大,但增加到一定程度时又逐步减少,而随着乙酸乙酯萃取时间的增加,苦楝素提取率逐渐降低。此外,乙酸乙酯萃取用量对苦楝素提取率的影响较大,而乙酸乙酯萃取时间对苦楝素提取率的影响不如萃取用量明显,这与回归方程显著因子分析表所示一致。因此认为,乙醇回流提取的用量应取适中值,而萃取的时间应取较低值。

3 结 论

在实验室条件下,采用溶剂法从苦楝果实中提取苦楝素,用均匀实验设计考察了提取工艺中石油醚去酯、乙醇回流提取和乙酸乙酯萃取过程对提取效率的影响。结果表明,苦楝素的最优提取条件为:石油醚浸提的液料比 1 : 24(g : mL),时间 20 min,无水乙醇回流提取(95℃)的液料比 1 : 34(g : mL),时间 390 min,125 mL 乙酸乙酯萃取 100 min,提取率达 0.721 3%。

苦楝素作为优良的植物源农药,按照传统提取工艺多采用苦楝根皮为原材料,提取率达到 0.8%^[10]左右。但根皮资源少,且对资源破坏性大,而本实验以苦楝果实为材料,开辟了不破坏资源的永续利用,且其中苦楝素含量可观,可达 0.721 3%;提取工艺中石油醚脱脂步骤所得到的苦楝籽油副产品,可用于生物柴油的制取^[14],为今后苦楝果实作为绿色原料的多层次、大规模生产实践提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 钟炽昌, 谢晶曦, 陈淑凤, 等. 苦楝素的化学结构[J]. 化学学报, 1975, 33(1): 35-47.
ZHONG C C, XIE J X, CHEN S F, *et al.* The structure of Chuanliansu[J]. Acta Chem Sin, 1975, 33(1): 35-47.

[2] 赵善欢, 张兴. 植物杀虫剂对水稻三化螟的拒食及内吸毒力试验[J]. 中国农业科学, 1982(2): 55-62.
ZHAO S H, ZHANG X. Experiments on the antifeedant and ataxemic properties of some botanical insecticides against the rice yellow stem borer[J]. Science Agriculture Sinica, 1982 (2): 55-62.

[3] 张兴, 赵善欢. 楝科植物对几种害虫的拒食和忌避作用[J]. 华南农学院学报, 1983, 34(3): 1-7.
ZHANG X, ZHAO S H. The antifeeding and repellent effects of Meliaceae plants to some insect pests[J]. Journal of South China Agricultural University, 1983, 34(3): 1-7.

[4] LEITE A C, MATOS A P, BATISTA-PEREIRA L G, *et al.* Activity of triterpenoids from *Cedrela fissilis* (Meliaceae) against Spodoptera frugiperda[J]. Biopesticides International, 2008, 1: 28-34.

[5] KOUL O, MULTANI J S, SINGH G, *et al.* Bioefficacy of toosendanin from *Melia dubia* (syn. *M-azedarach*) against gram. pod-borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner)[J]. Current science, 2002, 11: 1387-1391.

[6] 曾鑫年, 韩建勇, 魏西成. 植物杀虫剂对玉米螟赤眼蜂成蜂的急性毒性[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 90-91.
ZENG J N, HAN J Y, WEI X C. Acute toxicity of botanical insecticides to wasps of *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen [J]. Journal of South China Agricultural, 2002, 23(1): 90-91.

[7] 杨吉安, 马玉花, 苏印泉, 等. 苦楝研究现状及发展前景[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(1): 115-118.
YANG J A, MA Y H, SU Y Q, *et al.* Review and prospect of research and development in chinaberry tree[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(1):115-118.

[8] 姜萍, 安鑫南. 苦楝素提取方法的比较研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(4): 79-82.
JIANG P, AN X N. Comparative study on extraction methods of toosendanin[J]. Chemistry Industry of Forest Products, 2005, 25(4): 79-82.

[9] 洪燕珍, 王洪涛, 李军, 等. 苦楝果实中苦楝素的分离及鉴定[J]. 厦门大学学报, 2007, 46(3): 365-368.
HONG Y Z, WANG H T, LI J, *et al.* The extraction and identification of toosendanin from the fruit of *Melia azedarach* L. [J]. Journal of Xiamen University, 2007, 46(3): 365-368.

[10] 陈公德, 何日柳, 陈杰, 等. 生物酶解法提取苦楝素工艺过程的研究[J]. 应用化工, 2010, 39(1): 8-10.
CHEN G D, HE R L, CHEN J, *et al.* Study on extraction technology of toosendanin by enzymatic hydrolysis[J]. Applied Chemical Industry, 2010, 39(1): 8-10.

[11] 孙小娟, 路绪旺, 崔鹏. 溶剂回流法提取苦楝素的研究[J]. 应用化工, 2007, 36(6): 561-563.
SUN X J, LU X W, CUI P. Study on the solvent reflux extraction of toosendanin [J]. Applied Chemical Industry, 2007, 36(6): 561-563.

[12] 王小伟, 金则新, 柯世省, 等. 乌药光和特性日进程与其环境因子的相关分析[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(2): 5-10.
WANG X W, JIN Z X, KE S S, *et al.* Diurnal photosynthetic characteristics of *Lindera aggregata* and its correlation with environmental factors[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(2): 5-10.

[13] 董德元. 试验研究的数理统计方法[M]. 北京: 中国计量出版社, 1987.

[14] 李秀红, 苏印泉, 杨芳霞, 等. 苦楝籽油溶剂萃取降酸工艺对生物柴油质量的影响[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(2): 112-114.
LI X H, SU Y Q, YANG F X, *et al.* Solvent extraction to reduce acid value of the seed oil from *Melia azedarach* to make biodiesel[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(2): 112-114.