

李凡海,张秀省,王桂清,等. 不同方法提取的北细辛精油指纹图谱分析及杀虫活性比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):124-126.

# 不同方法提取的北细辛精油指纹图谱分析及杀虫活性比较

李凡海<sup>1</sup>, 张秀省<sup>1</sup>, 王桂清<sup>1</sup>, 姬兰柱<sup>2</sup>, 刘 艳<sup>2</sup>

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252059; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110016)

**摘要:**采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法、微波萃取法和水蒸气蒸馏法提取北细辛精油;以黏虫 2 龄幼虫、小菜蛾 3 龄幼虫和淡色库蚊 3 龄幼虫作为供试昆虫,通过 GC-MS 指纹图谱分析,对 3 种方法提取的精油进行杀虫活性比较。结果表明:北细辛精油组成成分复杂(超过 27 种),超临界 CO<sub>2</sub> 法是细辛精油提取的一种较为理想的方法,其萃取率高达 2.27%,且品质较好(呈棕黄色),活性较高,对 3 种试虫的 LC<sub>50</sub> 分别为 1216.6、884.0、25.05 mg/L。

**关键词:**北细辛;精油;GC-MS;杀虫活性

**中图分类号:**S482.3+9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0124-03

细辛为马兜铃科多年生草本植物,属于重要的中草药,有北细辛[*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag.], 汉城细辛(*A. sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai) 和华细辛(*A. sieboldii* Miq.)。北细辛别称万病草、细参、烟袋锅花、东北细辛,一直供应全国及出口,在国际市场上享有盛名<sup>[1]</sup>。细辛的药用部位为根及根茎,其主要有效成分为挥发油,即细辛精油<sup>[2]</sup>。现代药理学研究结果表明,细辛作用广泛,有抗菌、解热、催眠、镇静、镇痛、局部麻醉、提高机体新陈代谢等功效<sup>[3]</sup>。近年来,细辛在农业生产上的价值也逐步显现出来,很多研究表明,植物精油对昆虫可以表现出不同程度的引诱、拒食、驱避、抑制生长发育及直接的毒杀作用,具有良好的杀虫抑菌活性<sup>[4-5]</sup>。虽然前人对北细辛精油指纹图谱已经有一定的认识,但对不同方法提取的北细辛精油的杀虫活性未见报道。本研究采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法、水蒸气蒸馏法和微波萃取法分别提取北细辛精油,经过 GC-MS 分析,对 3 种方法提取的精油成分进行鉴定,在此基础上选取黏虫[*Mythimna seperata* (Walker)] 2 龄幼虫、小菜蛾[*Plutella xylostella* (Linnaeus)] 3 龄幼虫和淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*) 3 龄幼虫,作为供试昆虫,并比较了三者的杀虫活性,旨在为细辛作为植物源杀虫剂的开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试植物样品 试验样品为北细辛根,购买于同仁堂药房,将其进一步阴干、粉碎后过 380 μm 孔径筛。

收稿日期:2014-01-20

基金项目:山东省自然科学基金联合专项(编号:ZR2012CL17);辽宁省科技计划(编号:2012214001);辽宁省沈阳市科技计划(编号:F11-264-1-22);聊城大学重点建设项目(编号:13KZ0801)。

作者简介:李凡海(1988—),男,山东聊城人,硕士研究生,主要从事植物源农药研究。E-mail:weixiaodexiawang@126.com。

通信作者:王桂清,博士,教授,主要从事植物保护的教学与科研工作。Tel: (0635) 8239528; E-mail: wangguiqing@lcu.edu.cn。

1.1.2 试验昆虫 黏虫 2 龄幼虫、小菜蛾 3 龄幼虫和淡色库蚊 3 龄幼虫均由沈阳化工研究院新药生物测定研究室提供。

1.1.3 仪器与其他材料 HP6890/5973 型气-质-计算机联用机,美国 Hewlett-Packard 公司;TC-SFE-42-5-120S 设备,沈阳天诚超临界萃取有限公司;RE52CS 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。CO<sub>2</sub> 为食品级,石油醚(60~90℃)、正己烷等均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 精油提取方法 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法:准确称取样品 1.85 kg,装入 5 L 的萃取罐内,超临界 CO<sub>2</sub> 萃取压力 20 MPa,萃取温度 40℃,流量 20 kg/h;解析釜 I 压力 6~7 MPa,温度 45℃;解析釜 II 压力 5~6 MPa,35℃,萃取时间为 60 min;每 20 min 收集提取物称量,计算萃取率,密封后置于 4℃冰箱中保存备用。

水蒸气蒸馏法:将 90 g 样品装入挥发油提取器中,加水蒸馏 6 h,收集精油,称重并计算萃取率。

微波萃取法:准确称取样品 5 g,装入烧瓶中,加入 15 mL 正己烷,在辐射时间 200 s、微波功率 600 W 的条件下进行微波萃取,每份样品重复提取 3 次;用 15 mL 正己烷洗涤烧瓶的残渣,将滤液集中于三角瓶中。经减压蒸馏回收正己烷,用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥样品,24 h 后称重,计算萃取率。

1.2.2 测定条件 气象色谱条件:石英毛细管柱 HP-5MS, 50 m×0.25 mm×0.25 μm;程序升温:在 60 s 内以 8℃/min 速度升至 120℃,再以 2℃/min 速度升至 150℃,最后以 10℃/min 速度升至 280℃;载气:He;柱流量:0.9 mL/min;进样量:1 μL;进样口温度:250℃;接口温度:230℃;柱压:80 kPa;分流比:10:1。

质谱条件:离子源为 EI;电离电压:70 eV;离子源温度:230℃;质谱范围:50~500 amu;质量范围:50~500 amu;扫描周期:1 s。

1.2.3 杀虫活性测定方法 叶碟法:测定北细辛精油对小菜蛾和黏虫幼虫的活性。挑选长势良好、无药的甘蓝(小菜蛾)或玉米嫩叶(黏虫),用湿布擦干净,再将甘蓝嫩叶用打孔器打成直径 2 cm 的叶碟,将玉米嫩叶剪成 5 cm 长的叶段,放到

直径 6 cm、铺有滤纸的培养皿中,1 皿 1 个叶碟,编号。用喷雾器将细辛精油药液(浓度分别为 3 000、2 500、2 000、1 500、1 000 mg/L)喷在叶碟上,正反面喷均匀,用药量约 0.5 mL,自然凉干。然后各接入 10 头供试小菜蛾幼虫和黏虫,3 次重复,于 24 h 调查试虫的死亡率,计算  $LC_{50}$ 。以喷含吐温-80 的蒸馏水为对照。

浸渍法:测定北细辛精油对淡色库蚊幼虫的杀伤作用。先将 24 孔培养板编号,分别在孔中加入 1.60、1.65、1.70、1.75、1.80 mL 带有 20 条左右蚊幼虫的水,再加入 0.40、0.35、0.30、0.25、0.20 mL 的 200 mg/L 母液,使终体积为 2 mL,终浓度为 40、35、30、25、20 mg/L。在温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 60%~80%、光照条件(日/夜=16 h/8 h)下培养 24 h,检查结果,计算  $LC_{50}$ 。振动培养板,并用镊子轻触蚊幼虫身体,以沉入孔底部不动者为死亡。每个样品重复 3 次,每次均以 2% 乙醇浸渍蚊幼虫作为空白对照。

2 结果与分析

2.1 北细辛精油的性状比较

采用超临界  $\text{CO}_2$  萃取法、微波萃取法和水蒸气蒸馏法萃取得到的北细辛精油含量和性状见表 1。由表 1 可以看出,超临界  $\text{CO}_2$  萃取和水蒸气蒸馏提取的北细辛精油在外观性状上优于微波萃取的精油;超临界  $\text{CO}_2$  萃取率高(2.27%),品质较好(棕黄色),适合萃取植物挥发油。

表 1 不同提取方法对萃取率的影响

提取方法	精油外观性状	提取时间	样品质量(g)	精油质量(g)	萃取率(%)
超临界 $\text{CO}_2$ 萃取	棕黄色	60 min	1 850	42.000	2.270
水蒸气蒸馏	淡黄褐色	6 h	90	1.422	1.580
微波萃取	淡黄绿色	200 s	60	1.268	2.113

2.2 北细辛精油的指纹图谱分析

将 3 种方法得到的北细辛精油用乙酸乙酯溶解,进行 GC-MS 鉴定,其指纹图谱见图 1 至图 3,结合峰面积归一法分析可知,超临界  $\text{CO}_2$  萃取得到的北细辛精油中能够确定峰值的超过 35 种;微波萃取得到的北细辛精油中能够确定峰值的只有 27 种;水蒸气蒸馏得到的北细辛精油中能够确定峰值的有 28 种。超临界  $\text{CO}_2$  萃取得到的北细辛精油组成成分最多,而微波萃取得到的精油组成成分相对较少。如果把次要的小峰也算入的话,北细辛精油的组成成分将超过 40 种。比较 3 种方法提取的北细辛精油可知,它们有着共同的组成,尤其是超临界  $\text{CO}_2$  萃取和微波萃取方法,两者相同成分较多,而水蒸气蒸馏提取的北细辛精油特异性组成成分较多。

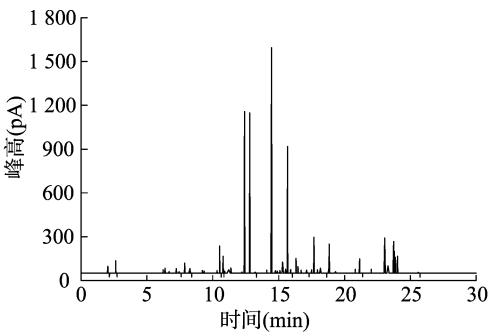


图1 北细辛精油指纹图谱(超临界 $\text{CO}_2$ 萃取)

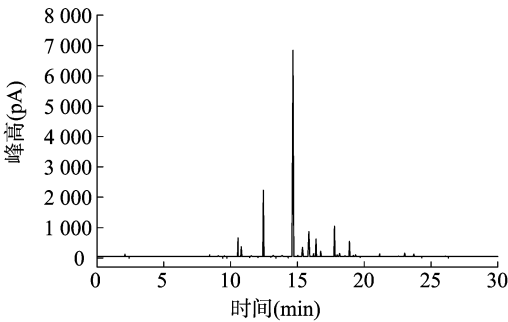


图2 北细辛精油指纹图谱(水蒸气蒸馏)

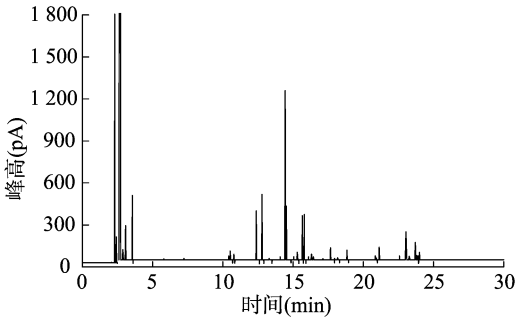


图3 北细辛精油指纹图谱(微波萃取)

2.3 不同方法萃取的北细辛精油杀虫活性比较

分别采用叶碟法、浸渍法测定 3 种方法提取的北细辛精油对黏虫、小菜蛾、淡色库蚊幼虫的杀虫活性,结果见表 2。由表 2 可以看出,超临界  $\text{CO}_2$  法提取的精油杀虫活性最好,对黏虫、小菜蛾、淡色库蚊幼虫的  $LC_{50}$  分别为 1 647.1、1 407.7、25.05 mg/L;杀虫活性最差的为微波萃取法,对 3 种试虫的  $LC_{50}$  分别为 2 286.1、2 067.1、28.09 mg/L,水蒸气蒸馏法提取的精油杀虫活性居中,  $LC_{50}$  分别为 2 151.2、1 549.8、26.61 mg/L。

表 2 北细辛精油杀虫活性比较

试虫	提取方法	直线回归方程	相关系数	$LC_{50}$ (mg/L)
黏虫	超临界 $\text{CO}_2$ 萃取	$y = 10.852x - 29.91$	0.949 3	1 647.10
	水蒸气蒸馏	$y = 10.236x - 29.11$	0.985 6	2 151.20
	微波萃取	$y = 9.804 - 27.93$	0.991 6	2 286.10
小菜蛾	超临界 $\text{CO}_2$ 萃取	$y = 9.999x - 26.48$	0.871 2	1 407.70
	水蒸气蒸馏	$y = 9.991x - 26.88$	0.941 3	1 549.80
	微波萃取	$y = 6.451x - 16.390$	0.983 5	2 067.10
淡色库蚊	超临界 $\text{CO}_2$ 萃取	$y = 12.056x - 11.86$	0.970 6	25.05
	水蒸气蒸馏	$y = 11.789x - 11.80$	0.995 8	26.61
	微波萃取	$y = 10.651x - 10.43$	0.996 0	28.09

### 3 结论与讨论

#### 3.1 不同方法提取的北细辛精油组成成分

采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取、微波萃取和水蒸气蒸馏 3 种方法提取北细辛精油,对 3 种方法比较后发现,超临界 CO<sub>2</sub> 萃取率高达 2.27%,品质较好,适合萃取植物挥发油;从指纹图谱可以看出,北细辛精油是由多种成分组成的混合物,超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法得到的精油成分最多,能够标定峰值的有 35 种,水蒸气蒸馏法得到的精油有 28 种,微波萃取法得到的精油有 27 种;如果把次要的小峰也算入的话,北细辛精油的组成成分将超过 40 种。

近年来,国内多位研究者也致力于细辛精油指纹图谱和成分的研究。杜成智等研究产地对北细辛挥发油成分的影响发现,不同产地栽培的北细辛挥发性成分存在差别,活性成分的积累与环境有一定的相关性<sup>[6-7]</sup>。陈建伟等研究了提取方法对北细辛挥发油成分的影响,均发现提取方法不同,北细辛挥发油组成成分不同<sup>[8-10]</sup>;陈建伟等从北细辛 SFE 萃取物中鉴定出 7 种化学成分,从细辛挥发油中鉴定出 19 种化学成分<sup>[8]</sup>。杨厚玲等在超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的北细辛挥发油中共鉴定出 69 种化合物,在水蒸气蒸馏法提取的挥发油中共鉴定出 59 种化合物<sup>[9]</sup>。曾虹燕等通过 GC-MS 分析可知,水蒸气蒸馏法鉴定出 20 种成分,超临界萃取法鉴定出 39 种成分,微波萃取法鉴定出 38 种成分<sup>[10]</sup>。与以上研究相比,本研究没有对北细辛精油具体成分的含量、分子式等进行鉴定,因此还有待于进一步研究。

#### 3.2 不同方法提取的北细辛精油杀虫活性

3 种方法提取的北细辛精油的杀虫活性不同,其中超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的精油生物活性最强,水蒸气蒸馏得到的精油效果次之,微波萃取的精油杀虫活性最弱。

学者们也对细辛精油或从细辛中提取到的成分进行了杀虫活性测定。王桂清等研究结果证明,北细辛精油对淡色库蚊幼虫有较强的毒杀作用,对其成虫有较好的熏蒸作用<sup>[11]</sup>;Perumalsamy 等发现,细辛对淡色库蚊的成蚊与幼蚊具有杀灭作用<sup>[12-13]</sup>;张静等的研究证明,细辛醚对家蝇、淡色库蚊和部分农业害虫有明显的杀虫效果,细辛醚对昆虫的致毒症状与神经毒剂类似<sup>[14-15]</sup>;刘树民等研究结果显示,北细辛挥发油对栖北散白蚁具有较好的驱避作用、熏蒸活性和触杀效果<sup>[16-17]</sup>;韩俊艳等研究结果表明,北细辛挥发油在 8 μg/mL 时对二斑叶螨的熏蒸毒性最强,24、48 h 的螨死亡率分别为 72.6%、100%<sup>[18]</sup>。Perumalsamy 等研究发现,北细辛根提取物,尤其是细辛脂素(-)-asarinin 和墙草碱值得进一步研究,有望开发为杀蚁剂,并且这 2 种化合物对已有抗药性蚊子种群有控制作用<sup>[13]</sup>。本研究结果也表明,3 种方法提取到的北细辛精油均具有一定的杀虫活性,作为植物源杀虫剂有一定的研究前景。

本研究结果证明,超临界 CO<sub>2</sub> 法是细辛精油提取的一种

较为理想的方法,其萃取率高,品质较好,活性强,同时不存在有机溶剂残留所带来的一系列问题。但鉴于细辛精油的组成成分较为复杂,要获得其中活性较强的化合物,研究其杀虫活性及作用机理还有待于更深层次的研究。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:159.
- [2] 吴艳蓉,贾凌云,高福坤,等. 不同产地和采收期辽细辛挥发油的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(5):285-288.
- [3] 王家葵,张瑞贤. 神农本草经[M]. 北京:北京科学技术出版社,2002:1209-1210.
- [4] 王巨媛,翟胜. 植物精油应用进展及开发前景展望[J]. 江苏农业科学,2010(4):1-3.
- [5] 刘学文,徐汉虹,鞠荣,等. 植物精油在农药领域中的研究进展[J]. 香料香精化妆品,2004(2):36-39.
- [6] 杜成智,陈玉萍,覃洁萍,等. 不同产地细辛挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):57-59.
- [7] 刘东吉,刘春生. 不同产地栽培辽细辛的挥发油研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):79-82.
- [8] 陈建伟,武露凌,李祥,等. 北细辛超临界萃取物挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(2):195-198.
- [9] 杨厚玲,邱琴,陈婷婷,等. 不同方法提取的北细辛挥发油的气质联用成分分析[J]. 中国药学杂志,2007,42(13):1031-1033.
- [10] 曾虹燕,金永钟,包罗涛,等. 不同方法提取的辽细辛挥发油指纹图谱分析[J]. 测试技术学报,2004,18(3):232-236.
- [11] 王桂清,姬兰柱,张弘. 辽细辛精油对淡色库蚊的杀伤作用[J]. 中国生物防治,2008,24(2):112-115.
- [12] Perumalsamy H, Kim N J, Ahn Y J. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: culicidae) [J]. Journal of Medical Entomology, 2009, 46(6):1420-1423.
- [13] Perumalsamy H, Chang K S, Park C, et al. Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(18):10001-10006.
- [14] 张静,冯岗,马志卿,等. 细辛醚对粘虫幼虫的毒力及几种重要酶系的影响[J]. 昆虫学报,2007,50(6):574-577.
- [15] 张静,冯岗,马志卿,等. 细辛醚对 6 种农业害虫的杀虫活性[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(4):166-170.
- [16] 刘树民,罗明媚,杜心懿,等. 细辛挥发油对栖北散白蚁毒效作用[J]. 中药材,2006,29(6):539-541.
- [17] 尹红,杜心懿,刘树民,等. 细辛醇提物对栖北散白蚁的毒效及含量测定研究[J]. 中华卫生杀虫药械,2007,13(4):263-266.
- [18] 韩俊艳,王军,韩雪,等. 北细辛挥发油对二斑叶螨的毒性及其酶的影响[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(4):525-528.