



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106982860 A

(43)申请公布日 2017.07.28

(21)申请号 201710311692.5

(22)申请日 2017.05.05

(71)申请人 东北林业大学

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和
兴路26号

(72)发明人 张国财 林连男 张国珍 王瑞琦
张晓波 杨璟 邹传山 王婷玉
曾健勇 赵博

(51)Int.Cl.

A01N 63/04(2006.01)

A01P 7/04(2006.01)

B01D 3/08(2006.01)

B01D 11/02(2006.01)

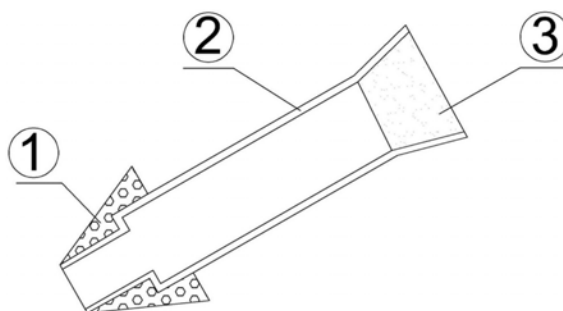
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取方法

(57)摘要

本发明提供一种中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取方法。在料液比1:80(g/mL)、提取温度40℃、乙醇浓度60%、超声时间80min的条件下对中华散尾鬼笔杀虫活性物质进行超声提取,杀虫活性物质的提取率可达31.2%;同时,本发明通过用一种提取中华散尾鬼笔活性物质的转接管,可将离心管作为容器连接到旋转蒸发仪上处理样品,从而满足对中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取要求,所述转接管包括磨砂口、管壁、硅胶塞。所述转接管通过连接1.5mL-50mL不同规格的离心管,可以处理100 μL-30mL的样品。同时可以减少样品在容器间的转移次数,从而减少样品损失和误差,提高实验结果的精确性。



1. 中华散尾鬼笔活性物质的提取方法,其特征在于具体方法如下:采集中华散尾鬼笔子实体,置于烘箱中45℃烘干至恒重。烘干后将子实体放入研钵中,倒入液氮,研磨成粉末,过80目筛,将过筛后的粉末置于干燥器中放置24h干燥。精确称取0.1g中华散尾鬼笔干粉装入10mL离心管内,再向离心管中加入8mL 60%乙醇溶液,将离心管插入浮板,再将浮板放入功率为600w的超声波发生器中,将超声波发生器中的水温加热至40℃,超声提取80min,然后将离心管放入离心机中,5000r/min离心10min,小心地将上清液倒入另一个10mL离心管内,将所述转接管的磨砂口(3)上涂抹凡士林,接在旋转蒸发仪上,将10mL离心管口套在硅胶塞(1)上稍用力使其固定,打开真空泵使负压达到0.09Mpa,将旋转蒸发仪配套的水浴锅水温调整到45℃,打开旋转蒸发仪将离心管中的液体旋干,得到中华散尾鬼笔提取物。将旋干后的离心管放入干燥器中24h,得到中华散尾鬼笔提取物。

2. 根据权利要求1所述的中华散尾鬼笔活性物质提取方法,中华散尾鬼笔提取物的提取率为31.2%。

3. 根据权利要求1所述的中华散尾鬼笔活性物质,其特征在于:对舞毒蛾幼虫具有杀虫活性,通脱提取物处理有的舞毒蛾幼虫校正死亡率为63.35%。

4. 根据权利要求1所述的一种用于中华散尾鬼笔活性物质提取的旋转蒸发仪转接管,包括磨砂口(3)、管壁(2)、硅胶塞(1),其特征在于:所述磨砂口用于与旋转蒸发仪相连实现密封;所述管壁尖端逐渐变细,管壁尖端外侧为中空圆台形硅胶塞(1)。

5. 根据权利要求1所述的一种用于中华散尾鬼笔活性物质提取的旋转蒸发仪转接管,其特征在于:所述的磨砂口规格为19/24或24/29或29/32,所述的管壁(2)直径为20mm,所述的管壁尖端直径为8mm,所述的硅胶塞(1)上底面直径为10mm,下底面直径为32mm,能将1.5mL-50mL不同规格的离心管直接套在所述硅胶塞上,使离心管起到传统的旋转烧瓶的作用。

中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取方法,尤其是涉及一种利用旋转蒸发仪转接管提取中华散尾鬼笔杀虫活性物质的方法。

背景技术

[0002] 中华散尾鬼笔(*Lysurus mokusins*),隶属于真菌界,担子菌亚门(*Basidiomycotina*)、腹菌纲(*Gasteromycetes*)、鬼笔目(*Phallales*)、笼头菌科(*Clathraceae*)、散尾鬼笔属(*Lysurus*)真菌,又称棱柱散尾鬼笔、五棱鬼笔。其中含有杀虫的活性物质,但目前并没有用于中华散尾鬼笔杀虫物质的提取方法和提取工艺。

[0003] 在试验中用有机溶剂对中华散尾鬼笔杀虫活性物质提取时,受限于子实体质量较少,每组实验的反应体系往往在10mL以内。在实验的过程中,现有的提取方法提取率低,且试验材料的用量较大不能满足实验要求。目前浓缩提取液的常用方法有三种:冷冻干燥法、氮气吹干法、旋转蒸发法。

[0004] 冷冻干燥法又称升华干燥。此方法利用冰晶升华的原理,在高度真空的环境下,将已冻结了的物料中的水分直接从冰升华为蒸汽。但此方法不应能用于含有挥发性有机溶剂的试验,而在中华散尾鬼笔活性物质提取的过程中,需要应用有机溶剂作为提取溶剂。

[0005] 氮气吹干法是在氮吹仪中,将氮气吹入样品的表面使溶剂蒸发,进行样品浓缩的方法。但其蒸发速度慢、效率低。在对中华散尾鬼笔杀虫活性物质进行浓缩的过程中,用时大约需要24小时。

[0006] 旋转蒸发法其原理为在真空条件下,恒温加热,使旋转瓶恒速旋转,物料在瓶壁形成大面积薄膜,高效蒸发。溶媒蒸气经高效玻璃冷凝器冷却,回收于收集瓶中,大大提高蒸发效率。特别适用对高温容易分解变性的生物制品的浓缩提纯。但最小的蒸馏烧瓶容积为10mL,加之此方中法样品要在不同容器中转移,在对中华散尾鬼笔杀虫活性物质进行浓缩的过程中,会造成样品的损失,增大试验误差,影响实验结果。同时,在计算中华散尾鬼笔杀虫活性物质提取率的时候,由于蒸馏烧瓶的材质为玻璃,自重较大,对提取率计算的结果影响较大。

发明内容

[0007] 为了解决上述问题,本发明提供了一种提取中华散尾鬼笔杀虫活性物质的方法,在料液比1:80(g/mL)、提取温度40℃、乙醇浓度60%、超声时间80min的条件下对五棱散尾鬼笔杀虫活性物质进行超声提取,杀虫活性物质的提取率可达31.2%;同时,本发明通过用一种提取中华散尾鬼笔活杀虫性物质的转接管,可将离心管作为容器连接到旋转蒸发仪上处理样品,从而满足对中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取要求。

[0008] 本发明的技术方案是:

[0009] 采集中华散尾鬼笔子实体,置于烘箱中45℃烘干至恒重。烘干后将子实体放入研钵中,倒入液氮,研磨成粉末,过80目筛,将过筛后的粉末置于干燥器中放置24h干燥。精确

称取0.1g中华散尾鬼笔干粉装入10mL离心管内,再向离心管中加入8mL 60%乙醇溶液,将离心管插入浮板,再将浮板放入功率为600w的超声波发生器中,将超声波发生器中的水温加热至40℃,超声提取80min,然后将离心管放入离心机中,5000r/min离心10min,小心地将上清液倒入另一个10mL离心管内(倒入之前对离心管进行称重),将所述转接管的磨砂口(3)上涂抹凡士林,接在旋转蒸发仪上,将10mL离心管口套在硅胶塞(1)上稍用力使其固定,打开真空泵使负压达到0.09Mpa,将旋转蒸发仪配套的水浴锅水温调整到45℃,打开旋转蒸发仪将离心管中的液体旋干,得到中华散尾鬼笔提取物。将旋干后的离心管放入干燥器中24h,之后对其称重,计算中华散尾鬼笔提取物的质量和提取率,实验重复5次,合并提取物,加入5mL 5%吐温-80溶解提取物备用。提取率计算公式如下:

$$[0010] \quad \text{提取率}(\%) = \frac{\text{提取物质量}}{\text{干粉质量}} \times 100\%$$

[0011] 计算后得到中华散尾鬼笔提取物的提取率为31.2%。

[0012] 提取物杀虫活性的验证:

[0013] 挑选大小一致的舞毒蛾3龄幼虫为供试昆虫,饥饿处理10h。在培养杯中加入适量舞毒蛾饲料。

[0014] 将舞毒蛾幼虫和饲料放在白纸上,并用常量喷雾器喷洒用5%吐温-80溶解的提取物,喷洒量以白纸刚好全部阴湿为准。喷完药后将虫体和饲料自然晾干,对照组喷洒5%吐温-80溶液,每个培养杯中放入30头幼虫,在温度25℃、RH75%、光照16L/8D条件下培养7d。

[0015] 每天清理培养杯,记录舞毒蛾死亡数量。根据下列公式计算舞毒蛾幼虫的校正死亡率。

$$[0016] \quad \text{校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%$$

[0017] 统计对照组、处理组舞毒蛾3龄幼虫的死亡情况,分别计算出舞毒蛾幼虫的校正死亡率,处理组的校正死亡率为63.35%。结果证明,通过本发明提供的提取方法得到的中华散尾鬼笔活性物质,对舞毒蛾幼虫具有杀虫活性。

[0018] 本发明具有的优点和积极效果是:

[0019] 1. 本发明提供了对中华散尾鬼笔活性物质的提取方法,提取率为31.2%。

[0020] 2. 本发明提供的提取方法得到的中华散尾鬼笔活性物质,对舞毒蛾幼虫具有杀虫活性,通过提取物处理后的舞毒蛾幼虫校正死亡率为63.35%。

[0021] 3. 本发明所述转接管的尾端为玻璃磨砂口(3),可以与旋转蒸发仪相连实现密封;中段为玻璃管壁(2),所述管壁直径20mm,所述管壁尖端逐渐变细,直径为8mm;所述管壁尖端外侧为中空圆台形硅胶塞(1),所述硅胶塞上底面直径为10mm,下底面直径为32mm,离心管可以直接套在所述硅胶塞上。

[0022] 4. 本发明通过连接1.5mL-50mL不同规格的离心管,可以处理0.1mL-30mL的样品。

[0023] 5. 应用本发明可以减少样品在容器间的转移次数,从而减少样品损失量和实验的误差,提高实验结果的精确性。

[0024] 6. 在计算提取率的实验中,首先要称量蒸馏烧瓶的质量,然后再称量装有提取物蒸馏烧瓶的质量,本发明利用离心管旋干试验样品,离心管的质量远小于蒸馏烧瓶的质量,因此在称量提取物质量时误差更小,使得实验结果更加精确。

附图说明

[0025] 图1为一种用于中华散尾鬼笔杀虫活性物质提取的旋转蒸发仪转接管的剖面图，图中1、硅胶塞；2、玻璃管壁；3、磨砂口。

[0026] 图2为一种用于中华散尾鬼笔杀虫活性物质提取的旋转蒸发仪转接管的外观示意图。

具体实施方式

[0027] 1. 杀虫活性物质提取率的计算

[0028] 中华散尾鬼笔杀虫活性物质的提取。采集中华散尾鬼笔子实体，置于烘箱中45℃烘干至恒重。烘干后将子实体放入研钵中，倒入液氮，研磨成粉末，过80目筛，将过筛后的粉末置于干燥器中放置24h干燥。精确称取0.1g中华散尾鬼笔干粉装入10mL离心管内，再向离心管中加入8mL 60%乙醇溶液，将离心管插入浮板，再将浮板放入功率为600w的超声波发生器中，将超声波发生器中的水温加热至40℃，超声提取80min，然后将离心管放入离心机中，5000r/min离心10min，小心地将上清液倒入另一个10mL离心管内（倒入之前对离心管进行称重），将所述转接管的磨砂口（3）上涂抹凡士林，接在旋转蒸发仪上，将10mL离心管口套在硅胶塞（1）上稍用力使其固定，打开真空泵使负压达到0.09Mpa，将旋转蒸发仪配套的水浴锅水温调整到45℃，打开旋转蒸发仪将离心管中的液体旋干，得到中华散尾鬼笔提取物。将旋干后的离心管放入干燥器中24h，之后对其称重，计算中华散尾鬼笔提取物的质量和提取率，实验重复5次，合并提取物，加入5mL 5%吐温-80溶解提取物备用。提取率计算公式如下：

[0029] 提取率计算公式如下：

$$[0030] \quad \text{提取率}(\%) = \frac{\text{提取物质量}}{\text{干粉质量}} \times 100\%$$

[0031] 计算后得到中华散尾鬼笔提取物的提取率为31.2%，见表1。

[0032] 表1中华散尾鬼笔提取率结果

[0033]

处理	提取质量(g)	提取率(%)
1	0.0315	31.5
2	0.0314	31.4
3	0.0309	30.9
4	0.0310	31.0
5	0.0312	31.2
平均	0.0312	31.2

[0034] 2. 不同处理方式误差的计算

[0035] 对10mL离心管和50mL蒸馏烧瓶进行称重，得空容器质量。精确称取中华散尾鬼笔干粉0.1g若干份，分别放入10mL离心管和50mL蒸馏烧瓶中，再次进行称重，得装样后质量，设置3组重复，根据下列公式计算容器对结果的相对误差，结果见表2。

[0036] 相对误差 (%) = $\frac{|\text{装样后质量} - \text{空容器质量} - 0.1|}{0.1} \times 100\%$

[0037] 表2不同容器对中华散尾鬼笔干粉称量结果的相对误差

[0038]

编号	离心管组			蒸馏烧瓶组		
	空容器质量 (g)	装样后质量 (g)	相对误差 (%)	空容器质量 (g)	装样后质量 (g)	相对误差 (%)
1	3.918	4.016	2	45.689	45.793	4
2	3.860	3.958	2	45.729	45.832	3
3	3.911	4.010	1	45.864	45.967	3
平均			1.667			3.333

[0039] 结果显示,用离心管作为容器的相对误差为1.667%;用蒸馏烧瓶作为容器的相对误差为3.333%,后者的误差是前者的两倍。

[0040] 3. 提取物杀虫活性的验证

[0041] 挑选大小一致的舞毒蛾3龄幼虫为供试昆虫,饥饿处理10h。在培养杯中加入适量舞毒蛾饲料。将舞毒蛾幼虫和饲料放在白纸上,并用常量喷雾器喷洒用5%吐温-80溶解的提取物,喷洒量以白纸刚好全部阴湿为准。喷完药后将虫体和饲料自然晾干,对照组喷洒5%吐温-80溶液,每个培养杯中放入30头幼虫,在温度25℃、RH75%、光照16L/8D条件下培养7d。

[0042] 每天清理培养杯,记录舞毒蛾死亡数量。根据下列公式计算舞毒蛾幼虫的校正死亡率。

[0043] 校正死亡率 (%) = $\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%$

[0044] 统计对照组、处理组舞毒蛾3龄幼虫的死亡情况见表3,分别计算出舞毒蛾幼虫的校正死亡率,处理组的校正死亡率为63.35%。结果证明,通过本发明提供的提取方法得到的中华散尾鬼笔杀虫活性物质,对舞毒蛾幼虫具有杀虫活性。

[0045] 表3中华散尾鬼笔粗提物对舞毒蛾幼虫的杀虫活性

[0046]

处理	重复 1		重复 2		重复 3		校正死亡率 (%)
	试验虫数 (头)	死亡虫数 (头)	试验虫数 (头)	死亡虫数 (头)	试验虫数 (头)	死亡虫数 (头)	
处理组	30	18	30	20	30	17	63.35
对照组	30	0	30	1	30	2	-

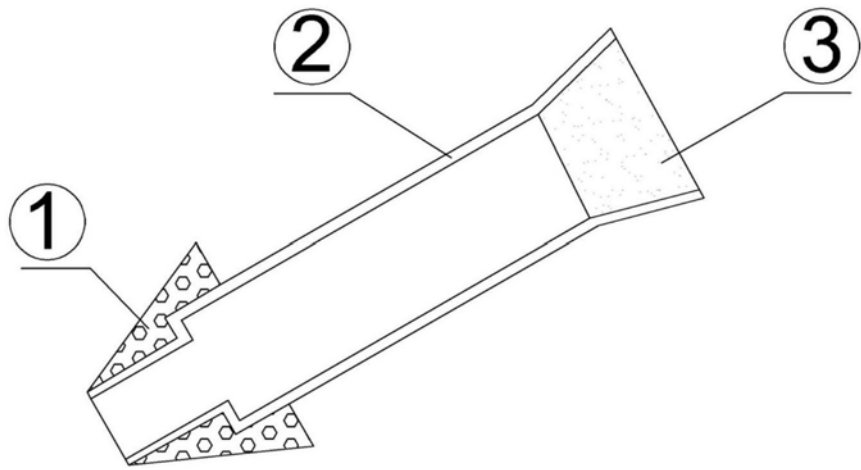


图1

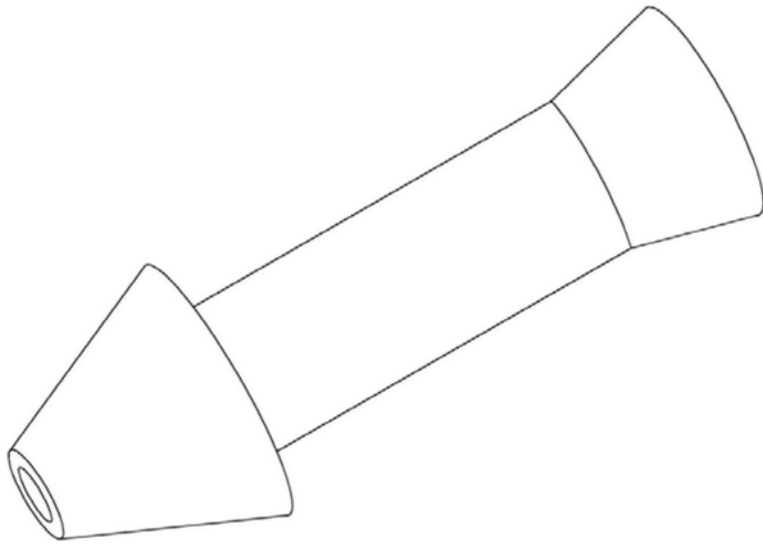


图2