

胡芦巴超临界 CO₂ 萃取物的萃取条件优化及其对谷蠹的触杀活性

唐国文¹, 杨长举^{1,*}, 薛东¹, 谢令德², 陈慧玲³

(1. 华中农业大学城市有害生物防治研究所, 武汉 430070; 2. 武汉工业学院, 武汉 430023;

3. 湖北省林业科学研究院, 武汉 430079)

摘要: 对胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 中杀虫活性成分进行超临界 CO₂ 萃取分离, 并以主要储粮害虫谷蠹 *Rhyzopertha dominica* Fabricius 为对象, 对其触杀活性进行研究。采用正交试验设计, 以萃取液中活性成分的得率、毒力为考察指标, 对杀虫活性成分的提取条件进行优化。结果表明: 最佳萃取工艺为萃取压力 25 MPa, 萃取温度 55℃, 夹带剂为 95% 乙醇, 固液比为 200 g:30 mL。萃取压力和夹带剂体积对试验指标有非常显著的影响, 萃取温度和夹带剂浓度的影响较小。优化后的萃取方案可达到 5.96% 的得率。萃取产物对谷蠹的触杀试验结果显示, 优化后的超临界 CO₂ 萃取工艺对胡芦巴中的杀虫物质具有良好的选择性, 得到的萃取物对谷蠹处理 10 天后的致死浓度为 65.03 μg/cm², 触杀活性明显增加。

关键词: 胡芦巴; 超临界流体萃取; 正交试验; 谷蠹; 触杀活性

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)04-0355-06

Extract from *Trigonella foenum-graecum* L. by the optimized SFE-CO₂ extraction method and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* Fabricius

TANG Guo-Wen¹, YANG Chang-Ju^{1,*}, XUE Dong¹, XIE Ling-De², CHEN Hui-Ling³ (1. Institute of City Pest Control, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 3. Hubei Forest Science Academy, Wuhan 430079, China)

Abstract: Extraction of insecticide constituents from *Trigonella foenum-graecum* L. by supercritical fluid CO₂ extraction (SFE-CO₂) method was optimized and the contact toxicity of extracts to *Rhyzopertha dominica* Fabricius were assayed. The extraction method was optimized with orthogonal design experiments. Contact toxicity and efficiency of extraction were used as value standards. The results showed that the optimal extraction was achieved at 55℃ under 25 MPa of pressure, the modifier was 95% alcohol, and the rate between seeds powder and modifier was 200 g:30 mL. Extraction pressure and modifier volume showed significant effect to extraction procedure, while extraction temperature and modifier concentration showed less effect. The extracts loaded on filter paper showed toxicity to adult *R. dominica*. An extraction rate of 5.96% was achieved at the optimal condition, and the toxicity was increased obviously with the LC₅₀ value of 65.03 μg/cm² for *R. dominica* treated on filter paper for 3 days and then cultured normally for one week. The results indicated that the extracts have high insecticide activity on *R. dominica*.

Key words: *Trigonella foenum-graecum*; supercritical fluid extraction; orthogonal experiment; *Rhyzopertha dominica*; contact toxicity

胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 作为一种常用中药主要分布在地中海东岸、中东、伊朗高原及喜

马拉雅地区, 我国南北各地均有栽培(江苏新医学院, 1994; 中华人民共和国卫生部药典委员会,

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA523B03-02)

作者简介: 唐国文, 女, 1972年9月生, 湖北钟祥人, 博士研究生, 研究方向为城市害虫生物防治, E-mail: guowen03@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: changjuyang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-09-01; 接受日期 Accepted: 2006-11-06

1995)。其化学成分主要有皂甙,其次是黄酮和生物碱,另外还有香豆素,以及氨基酸、多糖、酶等(Pierre *et al.*, 1995; Claude *et al.*, 1996; Dirk *et al.*, 1999; Oncina *et al.*, 2000)。全草有特殊香气,可用来防虫灭菌(Secoy and Smith, 1983),从葫芦巴种子得到的精油对仓库害虫有驱避作用(Afifi *et al.*, 1988)。目前我国对葫芦巴的利用集中在医药、工业、食品等方面,作为生物农药的开发利用尚未见报道;而国外关于葫芦巴用于害虫防治的研究仅有零星报道,如 Jerome 等(1997)曾报道了葫芦巴种子粗提物及植物粉末对大豆象 *Tribolium castaneum* (Herbst) 和赤拟谷盗 *Acanthoscelides obtectus* (Say) 的毒杀作用及其对大豆象的种群抑制作用。我们利用超临界 CO_2 萃取(SFE- CO_2)工艺对中药材葫芦巴中的杀虫活性物质进行了提取研究。为优化提取工艺,本研究以触杀活性和得率作为试验指标,首次采用正交试验法对葫芦巴种子粉末进行了 CO_2 超临界萃取,夹带剂为乙醇,获得了较高得率及有效成分含量高的萃取物,在室内测试了萃取物对主要仓库害虫谷蠹 *Rhyzopertha dominica* Fabricius 的触杀毒力,以期明确其对谷蠹的杀虫活性,为葫芦巴提取物应用于储粮害虫的防治提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和药品

HA231-50-025 型超临界流体萃取仪(江苏华安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); SHZ-IX III 型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); AL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); SPS2001F 型电子天平(江苏常州梅特勒-托利多称量设备系统有限公司)。葫芦巴种子购自湖北蕪州中药材市场。

1.2 试虫采集与饲养

谷蠹以碎小麦为饲料,饲料含水量调节为 $13.5\% \pm 0.5\%$ 。养虫室温度(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 以羽化 2~3 周的大小一致的成虫供试。虫源为华中农业大学植物科技学院城市有害生物防治研究所提供。

1.3 正交试验设计

经预试验确认影响超临界 CO_2 萃取葫芦巴有效杀虫成分的主要因素包括萃取压力、萃取温度、萃取时间、乙醇浓度、体积等。本试验采用正交试验设计方法,选择以萃取压力、温度、夹带剂乙醇的浓度

和体积为试验因素。葫芦巴种子清洗干燥后经粉碎机粉碎,过 40 目筛作为样品备用。

1.4 触杀毒力测定方法

采用滤纸药膜法。在直径为 9 cm 培养皿底盘上放入面积为 70.8 cm^2 的圆形滤纸,将除去溶剂后的萃取物以 8 种不同剂量($\mu\text{g}/\text{mL}$)制成丙酮稀释液,在滤纸上滴入稀释液 1 mL,使药液均匀的展布在滤纸上,作成滤纸药膜系列,待溶剂挥发后,在滤纸药膜上放置内径为 6 cm,高 5 cm 的玻璃环,下端涂上聚四氟乙烯防止试虫上爬,玻璃环顶端盖一钢丝网。设不施药的培养皿作对照(滤纸滴入纯丙酮 1 mL 作为空白对照),每处理设 3 个重复。在每皿接入谷蠹成虫各 30 头,将培养皿放在恒温养虫室内的养虫架上,处理 24 h、48 h、72 h 后检查死亡率。当试虫在药膜上爬行 72 h 后,将试虫转入盛有 20 g 小麦饲料的指形管内,用白布扎住管口,置于养虫室内饲养 7 天后,检查触杀效果。用毛笔尖触及试虫以触角无反应者为死亡标准。用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度(LC_{50})、 LC_{50} 的 95% 置信限、相对毒力等。本试验中药剂浓度($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)为滤纸单位面积萃取物的沉积量。

相对毒力 = 最大 LC_{50} / 各药剂的 LC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

正交试验以萃取压力、温度、乙醇浓度和体积为试验因素,取三水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平如表 1 所示。

萃取时间为 1 h,分离压力 I 7.5 MPa,分离温度 I 50°C ; 分离压力 II 5.6 MPa,分离温度 II 40°C ; 分离压力 III 5.4 MPa,分离温度 III 38°C 。

称取 1.8 kg 葫芦巴种子,粉碎,过 40 目筛,每次取 200 g,置于萃取釜中,根据选定的 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,测定提取物的重量,结果如表 2 所示。

2.2 正交试验结果分析

对得率的极差分析结果表明,在试验条件范围内,各试验因素对葫芦巴中杀虫物质得率的影响程度依次为萃取压力 > 乙醇浓度 > 萃取温度 > 乙醇体积,确定最佳萃取条件是萃取压力 25 MPa,萃取温度 45°C ,乙醇体积 20 mL,乙醇浓度 60%,但极差分析不能反映试验因素对结果是否有显著性影响,为此以夹带剂体积为误差项,进行方差分析,结果如表 3 所示。

表 1 超临界 CO₂ 萃取胡芦巴杀虫成分因素水平表Table 1 Factors and levels of the SFE-CO₂ extraction of insecticide constituents from *Trigonella foenum-graecum*

水平 Level	萃取压力 Extraction pressure (MPa)	萃取温度 Extraction temperature (°C)	乙醇体积 Alcohol volume (mL)	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)
1	20	45	20	60
2	25	50	30	75
3	30	55	40	95

表 2 超临界 CO₂ 萃取胡芦巴杀虫成分试验结果及极差分析Table 2 Results and intuitionistic analysis of the SFE-CO₂ extraction of *Trigonella foenum-graecum*

萃取物编号 Extract no.	萃取压力 Extraction pressure (MPa)	萃取温度 Extraction temperature (°C)	乙醇体积 Alcohol volume (mL)	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	有效物质重 Weight of extract (g)	得率 Extraction efficiency (%)
1	20	45	20	60	9.94	4.97
2	20	50	30	75	7.38	3.69
3	20	55	40	95	6.2	3.10
4	25	45	30	95	11.18	5.59
5	25	50	40	60	12.36	6.18
6	25	55	20	75	11.15	5.58
7	30	45	40	75	11.13	5.57
8	30	50	20	95	10.89	5.45
9	30	55	30	60	11.52	5.76
K ₁	3.92	5.38	5.33	5.64		
K ₂	5.78	5.11	5.01	4.95		
K ₃	5.59	4.81	4.95	4.71		
R	1.86	0.56	0.38	0.92		

表 3 的方差分析结果表明,萃取压力对胡芦巴中活性物质的超临界萃取率有显著性影响($P <$

0.05),萃取温度和乙醇浓度对萃取结果影响不显著,乙醇体积对萃取结果的影响可忽略不计。

表 3 胡芦巴活性物质正交萃取试验萃取率方差分析结果

Table 3 Error analysis of the SFE-CO₂ extraction of insecticide constituents from *Trigonella foenum-graecum*

变异来源 Difference source	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Freedom degree	均方 Mean square	F 比值 F ratio	显著性 Significance
萃取压力(MPa) Extraction pressure	6.3082	2	3.1541	24.8984	0.0386
萃取温度(°C) Extraction temperature	0.4763	2	0.2381	1.8799	0.3472
乙醇体积(mL) Alcohol volume	0.2534	2	0.1267		
乙醇浓度(%) Alcohol concentration	1.3831	2	0.6915	5.4591	0.1548
总和 Total	8.4209				

2.3 胡芦巴超临界 CO₂ 萃取物对谷蠹的触杀毒力

分别用正交试验得到的 9 种萃取物对谷蠹进行了室内触杀毒力测定,用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度(LC₅₀)、LC₅₀ 的 95% 置信限、相对毒力、10 天各萃取物的致死中浓度 LC₅₀ 的极差分析等。结果见表 4。9 种萃取物对谷蠹均有触杀作用,24 h 的致死中浓度为 102.49 ~ 146.97 μg/cm²; 10 天的致死中浓度为 70.03 ~ 101.03 μg/cm²。其中 4 号萃取物和 9 号萃取物的触杀毒力最高,第 10 天相对

毒力分别为 2.09 和 2.10,平均相对毒力为 1.72 和 1.74,而 5 号和 7 号萃取物的触杀毒力相对较小,平均相对毒力分别为 1.20 和 1.28,7 号萃取物在 24 h 的相对毒力最小,致死中浓度为 146.97 μg/cm²,10 天后的致死中浓度为 91.48 μg/cm²,低于 5 号萃取物在 10 天后的致死中浓度 101.03 μg/cm²,因而它的平均毒力要高于 5 号萃取物。可见不同条件下萃取时对胡芦巴活性物质的触杀毒力有较大影响,杀虫活性物质的后效也有所不同。考虑到植物农药的杀虫

作用常常有着缓效性,在用药后的若干天后,试虫的死亡情况更能反应萃取物的生物活性,因而对第 10 天各萃取物的致死中浓度 LC_{50} 进行极差分析(表 4)和方差分析(表 5)。经回归和相关分析,处理浓度与触杀作用效果的相关性达到显著水平。

表 5 的方差分析结果表明,乙醇体积对葫芦巴

中活性物质的超临界萃取物的触杀活性有显著影响 ($P < 0.05$),萃取压力和萃取温度对萃取结果影响不显著,乙醇浓度对萃取结果的影响可忽略不计。据此确定最佳萃取条件是萃取压力 20 MPa,萃取温度 55℃,乙醇体积 30 mL,乙醇浓度 95%。

表 4 葫芦巴超临界 CO_2 萃取物对谷蠹的触杀毒力和极差分析结果

Table 4 Contact toxicity of extracts from *Trigonella foenum-graecum* by SFE- CO_2 to *Rhyzopertha dominica* and intuitionistic analysis of 10 d's LC_{50}

时间 Duration	萃取物编号 Extract no.	毒力回归方程 Regression equation	$SE(b)$	LC_{50} ($\mu g/cm^2$)	LC_{50} 的 95% 置信限 95% confident limit ($\mu g/cm^2$)	相对毒力 Relative toxicity
24 h	1	$y = -3.83 + 4.19x$	0.3145	128.61	118.08 - 140.56	1.14
	2	$y = -6.60 + 5.71x$	0.4783	107.31	98.98 - 115.57	1.37
	3	$y = -5.96 + 5.36x$	0.4323	111.19	79.75 - 145.95	1.32
	4	$y = -3.54 + 4.21x$	0.3223	106.33	73.21 - 142.95	1.38
	5	$y = -6.96 + 5.52x$	0.4402	146.12	135.41 - 159.26	1.01
	6	$y = -7.24 + 5.88x$	0.4910	120.34	78.00 - 183.48	1.22
	7	$y = -6.74 + 5.42x$	0.4290	146.97	103.42 - 307.14	1.00
	8	$y = -5.37 + 4.95x$	0.3821	124.23	85.65 - 189.44	1.18
	9	$y = -2.79 + 3.87x$	0.2989	102.49	93.85 - 244.19	1.43
10 d	1	$y = -7.49 + 6.66x$	0.6319	74.90	65.77 - 82.52	1.96
	2	$y = -11.67 + 8.89x$	0.9538	75.12	65.09 - 82.95	1.96
	3	$y = -12.66 + 9.18x$	0.9817	83.68	74.49 - 90.90	1.76
	4	$y = -5.96 + 5.93x$	0.5639	70.49	60.89 - 78.53	2.09
	5	$y = -7.72 + 6.34x$	0.5642	101.03	92.98 - 108.59	1.45
	6	$y = -9.47 + 7.54x$	0.7389	82.93	73.96 - 90.34	1.77
	7	$y = -11.54 + 8.43x$	0.8654	91.48	83.11 - 98.39	1.61
	8	$y = -12.51 + 9.09x$	0.9638	84.31	75.42 - 91.35	1.74
	9	$y = -7.47 + 6.76x$	0.6599	70.03	60.31 - 78.02	2.10
K_1	77.90	78.96	80.71	81.99		
K_2	84.82	86.82	71.88	83.18		
K_3	81.94	78.88	92.06	79.49		
R	6.92	7.94	20.18	3.68		

表 5 葫芦巴正交萃取试验第 10 天触杀活性方差分析结果

Table 5 Error analysis of the 10 d's contact toxicity of insecticide constituents from *Trigonella foenum-graecum* extracted by SFE- CO_2

变异来源 Difference source	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Freedom degree	均方 Mean square	F 比值 F ratio	显著性 Significance
萃取压力 (MPa) Extraction pressure	72.4746	2	36.2373	3.4109	0.2267
萃取温度 (℃) Extraction temperature	124.8191	2	62.4096	5.8745	0.1454
乙醇体积 (mL) Alcohol volume	614.2159	2	307.108	28.9075	0.0334
乙醇浓度 (%) Alcohol concentration	21.2476	2	10.6238		
总和 Total	832.7572				

2.4 正交试验的验证试验

由于选取的衡量指标不同,最优工艺条件也有所不同。因为本试验最终希望得到触杀活性高的生物活性成分,因而确定以触杀活性为主要衡量指标。而在以触杀活性为试验指标时,夹带剂乙醇的体积

及萃取温度为主要因素,最佳萃取条件是乙醇体积为 30 mL,萃取温度为 55℃,萃取压力为次要因素,可视试验条件任取一值;在以萃取率为试验指标时,萃取压力为首要因素,对萃取率的影响排在首位。理论上,当萃取率最高时的萃取压力应为 25

MPa。权衡各试验条件对试验指标的影响程度,将最优化工工艺条件定为萃取压力 25 MPa,萃取温度 55℃,乙醇体积 30 mL,乙醇浓度 95%。

取 15 kg 粉碎的胡芦巴按最优化工工艺条件进行验证试验,仍以活性物质的萃取量和触杀活性为试验指标进行考察,得到萃取物为 893.4 g,则得率为 5.96%,与正交试验方案中的最高值基本持平,说明

优化对得率而言是成功的。超临界 CO₂ 萃取物对谷蠹触杀活性试验结果见表 6。

经回归分析,优化后的超临界 CO₂ 萃取工艺得到的萃取物对谷蠹的触杀活性在处理 24 h 和 10 天的 LC₅₀ 分别为 102.63 μg/cm² 和 65.03 μg/cm²,相对毒力分别为 1.43 和 2.26,明显高于优化前的萃取方案。

表 6 胡芦巴超临界 CO₂ 萃取物对谷蠹的触杀作用

Table 6 Contact toxicity of extracts from *Trigonella foenum-graecum* by the optimized SFE-CO₂ method to *Rhyzopertha dominica*

时间 Duration	毒力回归方程 Regression equation	SE(b)	LC ₅₀ (μg/cm ²)	LC ₅₀ 的 95% 置信限 95% confident limit (μg/cm ²)	相对毒力 Relative toxicity
24 h	$y = -1.26 + 3.12x$	0.2600	102.63	93.52 - 114.12	1.43
48 h	$y = -1.23 + 3.19x$	0.2474	90.05	81.53 - 101.38	1.63
72 h	$u = -1.86 + 3.65x$	0.2681	75.74	60.03 - 105.38	1.94
10 d	$y = -1.19 + 3.41x$	0.2636	65.03	52.59 - 82.34	2.26

3 讨论

对植物粗提物的制备常采用冷浸、温浸、回流提取等方法,但这些传统方法都存在着有机溶剂残留、有效物质的含量偏低以及提取率不高等缺陷。而超临界萃取技术是近年发展起来的用于天然产物提取的一项新技术,具有提取温度低、有效成分含量高、洁净无溶剂残留、天然有效物质不受损害等优点 (Gamiz-Gracia and Luque de Castro, 2000; Diaz-Maroto *et al.*, 2002),因此成为一门新型的化工分离技术,在食品、香料、中药等领域有着较好的应用前景。

虽然超临界 CO₂ 萃取在很多方面与传统溶剂萃取相比有着巨大的优越性,但 SFE-CO₂ 为非极性溶剂,蛋白质、多糖、离子化合物和聚合物等强极性 or 水溶性物质不溶于超临界 CO₂,因而较难提取,或得率较低(张镜澄,2000; Lang and Chien, 2001)。应用夹带剂可以增加超临界 CO₂ 流体的溶解度,扩大其在天然产物有效成分萃取方面的应用,以提高对中药有效成分的提取率(侯玉翠等,2002; 王晓玲等,2002; Pourmortazavi *et al.*, 2003; Menaker *et al.*, 2004)。基于此,本实验首次采用超临界流体萃取技术对胡芦巴中的杀虫活性物质进行了萃取,用正交试验法对影响萃取的因素进行研究,优选出最佳萃取工艺条件。

通过对胡芦巴种子超临界 CO₂ 萃取研究,以萃取率和对主要储粮害虫谷蠹的触杀活性为衡量指标,优化出萃取中药胡芦巴有效杀虫成分的最佳工

艺条件为:萃取压力为 25 MPa,萃取温度为 55℃,乙醇体积为 30 mL,乙醇浓度为 95%。至于萃取时间可据试验定为 1 h,分离压力 I 7.5 MPa,分离温度 I 50℃,分离压力 II 5.6 MPa,分离温度 II 40℃,分离压力 III 5.4 MPa,分离温度 III 38℃。正交试验方差分析结果表明萃取压力、萃取剂体积等因素对萃取率和触杀作用分别有显著的影响,分离温度和萃取剂乙醇浓度的影响较小。在最佳工艺条件下得率为 5.96%,与正交试验方案中的最高值基本持平,说明优化对得率而言是成功的。优化后的超临界 CO₂ 萃取工艺得到的萃取物相对毒力明显提高,对谷蠹的触杀活性在 24 h 和 10 天相对毒力分别为 1.43 和 2.26,LC₅₀ 分别为 102.63 μg/cm² 和 65.03 μg/cm²,说明本研究得到的超临界 CO₂ 萃取条件能够有效地萃取出胡芦巴种子中的杀虫活性物质。

胡芦巴的超临界 CO₂ 萃取表现出对活性物质良好的选择性,在对萃取产物进行触杀活性筛选时,发现不同条件下的萃取物对谷蠹的触杀活性有所不同。可以预期,通过对超临界萃取条件的优化,可从胡芦巴中筛选出杀虫效果最好的组分,为开发生物农药提供理论依据。

参考文献 (References)

- Afifi F, Hekal A, Salem M, 1988. Fenugreek seed extracts as protectants of wheat grains against certain stored product insects. *Ann. Agr. Sci. Cairo*, 33: 1 331 - 1 341.
- Claude C, Alain R, Maryse T, Yves S, 1996. Effect of tridemorph and fenpropimorph on sterol composition in fenugreek. *Phytochemistry*, 41 (2): 423 - 431.

- Diaz-Maroto MC, Perez-Coello MS, Cabezudo MD, 2002. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction. *J. Chromat. A*, 947: 23–29.
- Dirk LMA, van der Krol AR, Vreugdenhil D, Hillhorst HWM, Bewley JD, 1999. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Phys. Biochem.*, 37(1): 41–50.
- Gamiz-Gracia L, Luque de Castro MD, 2000. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51: 1179–1185.
- Hou YC, Zhang YM, Liu KW, Che K, 2002. Progress of supercritical fluid technology. *Journal of Chemical Industry & Engineering*, 19(5): 384–389. [侯玉翠, 张毅民, 刘克文, 车凯, 2002. 超临界流体技术的研究进展. *化学工业与工程*, 19(5): 384–389]
- Jerome P, Maria J, Catherine R, 1997. Effects of material and extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. against the stored product pests *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Acanthoscelides obtectus* (Say). *J. Stor. Prod. Res.*, 33(3): 209–217.
- Jiangsu New Medical College, 1994. Dictionary of Traditional Chinese Medicine. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1542 pp. [江苏新医学院, 1994. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社. 1542页]
- Lang QY, Chien MW, 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies: A practical review. *Talanta*, 53: 771–782.
- Menaker A, Kravets M, Koel M, 2004. Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *Compt. Rendus. Chem.*, 7: 629–633.
- Oncina R, Botia JM, Del JA, Ortuno A, 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chem.*, 70: 489–492.
- Pharmacopoeia Committee in Health Ministry of the People's Republic of China, 1995. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press. 203 pp. [中华人民共和国卫生部药典委员会, 1995. 中华人民共和国药典. 广州: 广东科技出版社. 203页]
- Pierre R, Yves D, Dominique M, Olivier M, Yves G, Gabriel R, Gerard R, 1995. Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids*, 60: 674–680.
- Pourmortazavi S, Sefidkon F, Hosseini S, 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from *Perovskia atriplicifolia* Benth. *J. Agr. Food Chem.*, 51: 5414–5419.
- Secoy D, Smith A, 1983. Use of plants in control of agricultural and domestic pest. *Econ. Botany*, 37: 28–57.
- Wang XL, Yang BL, Zhang ZT, 2002. Application of new separations technique in herb medicine. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 21(2): 131–135. [王晓玲, 杨伯伦, 张尊听, 2002. 新型分离技术在天然有机物提取及纯化中的应用. *化工进展*, 21(2): 131–135]
- Zhang JC, 2000. Supercritical Fluid Extraction. Beijing: Chemical Industry Press. [张镜澄, 2000. 超临界流体萃取. 北京: 化学工业出版社]

(责任编辑: 黄玲巧)