

青蒿素的提取工艺优化研究

张 颖^{1,2}

(1. 攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000; 2. 干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室, 四川 攀枝花 617000)

摘 要:以干青蒿叶粉末为原料,以青蒿素提取量为考察指标,采用有机溶剂提取法,以料液比、温度、时间为考察因素,在单因素试验基础上进行了3因素3水平正交实验,研究提取青蒿素的最佳工艺条件。结果表明:青蒿素的最佳提取条件为料液比1:20 g/mL,提取温度50℃,提取时间2.5 h,青蒿素提取量达5.27 mg/g。

关键词:青蒿素;正交实验;提取率;最佳工艺

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0122-04

青蒿素(artemisinin, QHS)是20世纪70年代首次从黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中分离出来的一种新型倍半萜内酯^[1],可增强免疫等药理活性,对恶性疟、脑型疟有特效,是我国科学家自主研究开发并在国际上注册的为数不多的一类新药之一,被世界卫生组织评价为治疗恶性疟疾唯一真正有效的药物^[2]。当前国内外青蒿素的提取分离的方法主要有水蒸汽蒸馏法、有机溶剂提取法、超亚临界流体萃取法、微波辅助萃取法^[3-5]。其中,有机溶剂法提取因其在资金、能源、提取率、中试放大等各方面的原因,在工业生产中应用较多。青蒿素的含量测定主要采用双波长薄层扫描法、紫外分光光度法、柱前衍生-RP-HPLC法、高效液相色谱测定法等^[6]。紫外分光光度法相比其它方法,虽然精确度不高,但常用于小规模试验。综合经济原则,该试验尝试采用有机溶剂提取法,利用单因素试验和正交实验确定提取青蒿叶中青蒿素的最佳工艺。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试干青蒿叶末(产地福建)购于一心堂药店,将青蒿叶末置于40℃条件下烘烤2 h后取出,用破碎机粉碎后经60目过筛,储于干燥器中备用。

青蒿素标准品 A0114(Purity≥99% UV),购于成都曼思特生物科技有限公司;氢氧化钠,石油醚(30~60℃),95%乙醇,产自成都市科龙化工试剂厂。

JYL-350 九阳料理机;SHZ-(Ⅲ)型循环水式真空泵

(巩义市英峪予华仪器厂);H01-2 数显磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);UV3200 紫外分光光度计(上海托莫斯科学仪器有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂);60MAQM-100 型纯水仪(上海和泰仪器有限公司);CP324S 型分析天平(常州诺基仪器有限公司);HH-8 数显恒温循环水浴锅(深圳市赛泰克生物科技有限公司);02-2AB 电热恒温干燥箱(北京中兴伟业一起有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线建立 准确称取青蒿素标准品 20 mg,用 95%乙醇定容至 200 mL。分别吸取 0、2、4、6、8、10 mL 溶液,加入 95%乙醇至 10 mL,再以 0.2%NaOH 溶液定容至 50 mL。置 50℃水浴中反应 30 min,冷却至室温,在最大吸收波长即 287 nm 处测吸光度,每组测定 3 次。以吸光度(y)为纵坐标,青蒿素浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,并求回归方程。

1.2.2 有机溶剂提取法的基本工艺 称取一定质量的青蒿叶末样品,加入石油醚进行搅拌。将提取液冷却至室温,抽滤,将滤渣进行 2 次提取(与第 1 次提取条件相同),提取结束后将 2 次得到滤液合并,减压浓缩。将滤液转入分液漏斗,加入 2%NaOH 溶液洗去碱溶性部分,弃去下层碱液后,以蒸馏水洗涤至中性后在旋转蒸发器中浓缩,过滤得浸膏。用 95%乙醇将粗晶体加热溶解,加入 2.5%活性炭,在沸水浴中处理 5~10 min,趁热过滤,得二次浸膏,用 95%乙醇定容于 50 mL 容量瓶中制成样品溶液待测。

1.2.3 提取工艺单因素试验 料液比对青蒿素提取量的影响:称取青蒿叶末样品 4 g,提取温度为 50℃,提取时间为 3 h,搅拌速度 800 r/min,分别在 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 条件下提取 2 次,每组试验平行 3 次,测定青蒿素提取量。提取温度对青蒿素提取量

作者简介:张颖(1981-),女,重庆永川人,硕士,讲师,现主要从事生物分离与细胞工程等教学与科研工作。E-mail: zemn@sina.com.

基金项目:攀枝花学院创新资助项目(2012YB03)。

收稿日期:2014-01-17

的影响:称取青蒿叶样品 4 g,料液比为 1:20 g/mL,提取时间 3 h,搅拌速度 800 r/min,分别在 30、40、50、60、70℃ 温度下提取 2 次,测定青蒿素提取量。提取时间对青蒿素提取量的影响:称取青蒿叶样品 4 g,提取温度为 90℃,料液比 1:20 g/mL,搅拌速度 800 r/min,分别在 1、2、3、4、5 h 下提取提取 2 次,测定青蒿素提取量。

1.2.4 正交实验 在单因素试验的基础上,以料液比、提取温度、提取时间为考察因素,采用 3 因素 3 水平的正交实验设计,3 次重复,以青蒿素提取量为考察指标,对青蒿素的提取工艺条件进行优化。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factor		
	A 料液比 Material-liquid ratio/g · mL ⁻¹	B 提取时间 Extraction time/h	C 提取温度 Extraction temperature/℃
1	1:15	2.0	45
2	1:20	2.5	50
3	1:25	3.0	55

1.2.5 样品溶液的测定及提取量的计算 吸取样液 2 mL,加入 95%乙醇至 10 mL,以加 0.2%NaOH 溶液定容至 50 mL。置 50℃ 水浴中反应 30 min,冷却至室温,在最大吸收波长即 287 nm 处测吸光度,每组测定 3 次。青蒿素提取量(M)计算公式: $M=C \times V_s \times n/W_0$;青蒿素产率(N)计算公式为: $N=C \times V_s \times n/W_0 \times 10^{-3} \times 100\%$,式中, C =溶液中青蒿素的含量(mg/mL); V_s =待测样品溶液体积; n =稀释倍数; W_0 =原料用量。

1.2.6 可行性分析 从正交实验得到最优试验组,进行 5 次重复试验,计算出此样品中青蒿素的含量,与目前生产相结合,分析是否具有扩大生产的可行性。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制

取吸光度(y)对青蒿素浓度(x)进行线性回归,绘制标准曲线,得到回归方程 $y = 53.036x - 0.0139$,相关系数为 0.9995(图 1)。

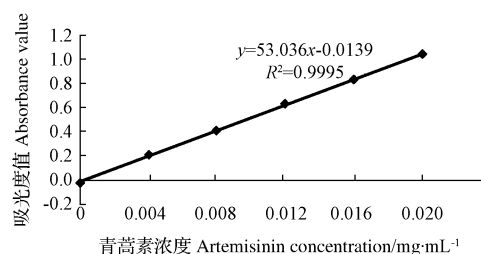


图 1 青蒿素标准曲线线性图

Fig. 1 Standed curve of artemisinin

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比对青蒿素提取量的影响 由图 2 可知,随着料液比的增大,青蒿素提取量呈上升趋势,料液比

在 1:5~1:20 g/mL 范围内提取量变化较大,当料液比达到 1:20 g/mL 以后,结果趋于平稳。在天然化合物提取过程中,溶剂逐渐由细胞壁渗透到细胞内溶解有效成分,造成细胞内外浓度差,于是细胞内的物质不断向外扩散,溶剂又不断渗透到组织细胞中,直至细胞内外溶液达到动态平衡^[7]。在一定料液范围内,青蒿叶原料对有机溶剂的吸收达到饱和状态。料液比太低,反应液不饱和,原料不能充分吸收提取剂,不利于青蒿素的溶出。料液比太高会增加提取成本和影响后续工艺中的浓缩分离。因此,选择 1:20 g/mL 左右为适合的液料比条件。

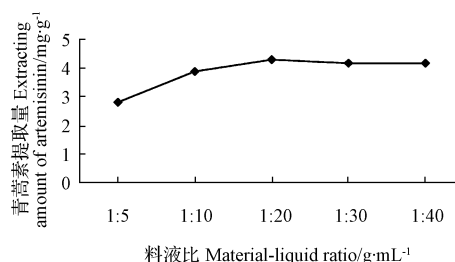


图 2 料液比对青蒿素提取量的影响

Fig. 2 The effect of ratio of material to liquid on extracting amount of artemisinin

2.2.2 提取温度对青蒿素提取量的影响 提取温度从 30℃ 升高到 50℃ 时,青蒿素提取量逐渐增加,超过 50℃ 则呈降低的趋势(图 3)。若温度过低,溶剂的渗透能力和溶解能力差,青蒿素不能有效溶出;温度过高虽对细胞的破坏作用增大,但也会导致青蒿素结构的破坏,而且在实际生产中,过高的温度会增加能耗和成本的投入。所以,提取温度选择 50℃ 左右效果较好。

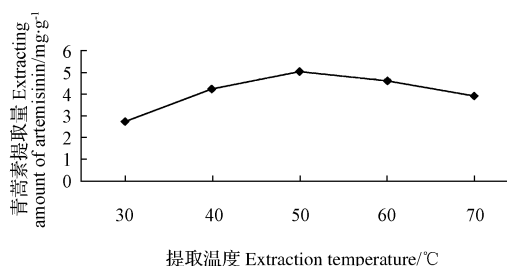


图 3 提取温度对青蒿素提取量的影响

Fig. 3 The effect of extraction temperature on extracting amount of artemisinin

2.2.3 提取时间对青蒿素提取量的影响 随着提取时间的增加,青蒿素的提取量逐渐增加(图 4),搅拌时间增加溶液易达到饱和,到 3 h 后趋于稳定。提取时间太短不利于原料与溶剂充分混合,从而降低提取量。故提取时间选择 2~3 h。

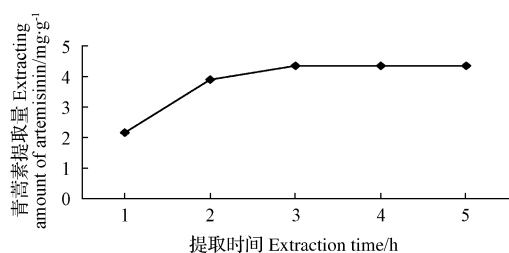


图4 提取时间对青蒿素提取量的影响

Fig. 4 The effect of extraction time on extracting amount of artemisinin

表2

正交实验结果

Table 2

Results of orthogonal experiments

试验号 Number	A 料液比 Material-liquid ratio/g · mL ⁻¹	B 提取时间 Extraction time/h	C 提取温度 Extraction temperature/℃	平均吸光值 Mean absorbance	青蒿素提取量 Extracting amount of artemisinin/mg · g ⁻¹	青蒿素产率 Productivity of artemisinin/%
1	1:15	2.0	45	0.527	3.18	0.318
2	1:15	2.5	50	0.755	4.52	0.452
3	1:15	3.0	55	0.610	3.67	0.367
4	1:20	2.0	50	0.872	5.21	0.521
5	1:20	2.5	55	0.793	4.74	0.474
6	1:20	3.0	45	0.707	4.24	0.424
7	1:25	2.0	55	0.675	4.05	0.405
8	1:25	2.5	45	0.744	4.46	0.446
9	1:25	3.0	50	0.838	5.01	0.501
K1	3.790	4.147	3.960			
K2	4.730	4.573	4.913			
K3	4.507	4.307	4.153			
R	0.940	0.426	0.953			

表3

方差分析

Table 3

Variance analysis

因素 Factor	离均差平方和 Quadratic sum	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	F 临界值 Critical value of F	显著性 Significance
A	1.447	2	28.373	19.000	显著
B	0.279	2	5.471	19.000	
C	1.524	2	29.882	19.000	显著
误差	0.05				

其中 $F(\alpha=0.05)$

2.4 验证试验

综合试验结果并考虑实际应用成本等因素,料液比和提取温度条件分别选择 1:20 g/mL 和 50℃,提取时间选择均值中较大的 2 个水平,即 A₂B₂C₂ 和 A₂B₃C₂ 2 组工艺条件,每组重复 3 次,通过提取青蒿素进行验证。由表 4 得出,青蒿素提取的最佳工艺条件为料液比 1:20 g/mL,提取温度 50℃,提取时间 2.5 h,青蒿素提取量达 5.27 mg/g,青蒿素产率达 0.527%。

表4

工艺比较

Table 4

Comparison of process

试验工艺组 Test group	平均吸光值 Mean absorbance	青蒿素提取量 Extracting amount of artemisinin/mg · g ⁻¹	青蒿素产率 Productivity of artemisinin/%
A ₂ B ₂ C ₂	0.883	5.27	0.527
A ₂ B ₃ C ₂	0.863	5.15	0.515

3 结论与讨论

该研究结果表明,在料液比为 1:20 g/mL,提取温

2.3 正交实验结果

由表 2 可知,3 个因素对青蒿素提取量的影响效果分别为温度>料液比>时间。由 K 值比较可以看出,50℃、料液比 1:20 g/mL、2.5 h 条件较佳。表 3 方差分析显示,料液比因素和温度因素的 F 值都大于临界值,说明在显著性水平 $\alpha=0.05$ 上具有统计学意义,料液比和温度对青蒿素提取量的影响显著。时间的 F 值小于临界值,说明在 $\alpha=0.05$ 水平上对青蒿素提取量的影响不显著。

度 50℃,提取时间 2.5 h 的工艺条件条件下,利用紫外-可见分光光度法换算得出,青蒿叶末中青蒿素的提取量可达 5.27 mg/g,青蒿素产率达 0.527%。由于选用的石油醚沸点在 30~60℃之间,该试验采用封闭式回流搅拌提取装置。将冷凝管上口封住,下面采用磁力加热搅拌器进行搅拌提取,使原料中的产品能够充分提取出来。得到的浸膏呈黄色,并有针状结晶掺杂其中,溶解后在乙醇中呈淡黄色,用活性炭处理后颜色变浅,后续的纯化工艺有待进一步研究。该研究仅选取了 3 个常见因素作正交优选。考虑到青蒿素提取的影响因素复杂,除了料液比、提取时间、提取温度 3 个因素外,还有提取次数、搅拌速率、原料粒度等^[8-10]。今后有必要进一步研究提取工艺中的其它因素的影响效果。

参考文献

- [1] 孔建强,王伟,程克棣,等. 青蒿素的合成生物学研究进展[J]. 药学学报,2013,48(2):193-205.
- [2] 王满元. 青蒿素类药物的发展历史[J]. 自然杂志,2012,34(1):44-47.
- [3] 卢义钦. 青蒿素的发现与研究进展[J]. 生命科学研究,2012,16(3):260-265.
- [4] 梅林,石开云. 青蒿素国内研究进展[J]. 激光杂志,2008,29(2):95-96.
- [5] 凌立新,张国芬,姚晨. 青蒿素提取工艺研究[J]. 亚太传统医药,2009,5(2):37-38.
- [6] 张桦,王剑文. 青蒿素检测方法的研究近况[J]. 抗感染药学,2008,5(4):201-204.
- [7] 阙毓铭,黄泰康. 中药化学实验操作技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.

彝药猪鬃草中总黄酮提取工艺研究

杨申明^{1,2}, 王振吉^{1,2}, 沈继森¹

(1. 楚雄师范学院 化学与生命科学学院, 云南 楚雄 675000; 2. 云南省高校应用生物学重点实验室, 云南 楚雄 675000)

摘要:以猪鬃草为试材, 采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2$ 比色法测定了猪鬃草总黄酮的含量, 研究不同提取方法对总黄酮提取率的影响, 并通过单因素试验和正交实验, 以猪鬃草总黄酮提取率为指示, 探讨了乙醇体积分数、料液比、提取功率、提取时间对提取率的影响, 以优化猪鬃草总黄酮的提取工艺。结果表明: 采用微波法提取猪鬃草中总黄酮提取率大、操作简单、准确度较高、回收率好, 可作猪鬃草总黄酮含量提取方法; 最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 60%、料液比 1:40 g/mL、提取功率 1 000 W、提取时间 30 s; 在该条件下测得猪鬃草中总黄酮提取率为 4.817%, 平均加样回收率为 99.48%, $\text{RSD}=0.23\%$ ($n=5$)。

关键词:猪鬃草; 总黄酮; 微波法提取; 正交实验

中图分类号:S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0125-05

黄酮类化合物(flavonoids)是一类存在于自然界的、具有 2-苯基色原酮(flavone)结构的化合物, 是药用植物

中的主要活性成分之一^[1]。它具有保护心血管系统、抗菌及抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、清除自由基、镇痛、保肝等多种功效^[2], 特别是具有抗自由基及抗癌、防癌的作用, 因此, 生物类黄酮在医药、食品等领域具有广阔的应用前景^[3]。因此, 黄酮的提取制备技术具有重要的经济和实用价值。

猪鬃草(*Adiantum capillus-veneris* L.) 属铁线蕨科铁线蕨属植物, 又名铁线蕨、铁线草、水猪毛七、猪毛七、石中珠、乌脚芒、铁丝草等, 全草入药^[4]。主要分布于我国云南、四川、陕西、甘肃、山西、河北等地。猪鬃草性味淡、凉, 具有清热解毒, 利尿消肿等功效; 可用于治疗感冒发热、咳嗽咯血、肝炎、肠炎、痢疾、尿路感染、急性肾

第一作者简介:杨申明(1976-), 男, 云南双柏人, 本科, 实验师, 现主要从事天然有机物化学等研究工作。

责任作者:王振吉(1983-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事天然有机物化学等研究工作。E-mail: wangzj@cxtc.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300370); 云南省应用基础计划资助项目(2011FZ186); 云南省应用基础计划项目青年资助项目(2012FD049); 云南省重点建设学科, 楚雄师范学院重点建设学科基金资助项目(05YJJSXK03); 云南省高校科技创新团队支持计划资助项目(IRTSTYN); 楚雄师范学院基金资助项目(10YJYB02)。

收稿日期:2014-01-20

[8] 梁晓媛, 李隆云, 白志川. 青蒿中青蒿素提取工艺研究进展[J]. 重庆理工大学学报(自然科学), 2013, 27(2): 32-38.

[9] 周毅峰, 石开明, 艾训儒, 等. 快速溶剂萃取法提取青蒿素条件研究

[J]. 中药材, 2008, 31(2): 296-298.

[10] 张玲, 杜小英, 姜锦花. 蒿素提取分离工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(6): 57-58.

Study on Optimization of the Extraction of Artemisinin

ZHANG Ying^{1,2}

(1. College of Biological and Chemistry Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000; 2. Key Laboratory of Dry-hot Valley Characteristic Bio-Resources Development at University of Sichuan Province, Panzhihua, Sichuan 617000)

Abstract: Taking dry leaves of *Artemisia annua* L. as material and extracted yield of artemisinin as investigate indicator, artemisinin was extracted from dry leaves of *Artemisia annua* L. by using organic solvent methods. Material liquid ratio, extracting temperature and time were selected as experimental factors, orthogonal experiment was carried out on the basis of single factor experiments, in order to study the optimal extraction conditions of artemisinin. The results showed that the optimal conditions for artemisinin extraction were material-liquid ratio 1:20 g/mL, extraction temperature 50°C and extraction time 2.5 h, extracting amount of artemisinin was up to 5.27 mg/g.

Key words: artemisinin; orthogonal experiments; extraction rate; optimal process