时 10-DAB, baccatin III 的含量也相应上升。通过动力学分析,确定花生四烯酸在紫杉醇生物合成途径上的作用位点在 10-DAB 之前

如果在细胞培养的对数后期加入三种作用位点不同的诱导子,分别提高紫杉醇合成途径上三个阶段的反应速度,从而解除紫杉醇合成途径的多重限速步骤,提高紫杉醇合成代谢途径的代谢通量,结合释放与反应分离偶合技术,就可以大幅度提高紫杉醇产量

参考文献

- 1 Choi H K, *et al.* WO 96/3410
- 2 Ciddi V, *et al.* Biotechnology Letters, 1995, 17(12): 1343
- 3 Fett-Neto G, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44: 205
- 4 Hirasuna J, *et al.* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 95
- 5 元英进,等. 中国稀土学报, 1998, 16: 56
- 6 Moon W J, *et al.* Biotechnology Techniques, 1998, 12(1): 79
- 7 Choi D, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: 2329
- 8 Mirjalili N, *et al.* Biotechnol Prog, 1996, 12: 110
- 9 Ketchum R E B, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(1): 97

(1999-09-08收稿)

青蒿素提取条件研究[△]

中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室(北京 100080)

赵兵* 王玉春 吴江** 闭静秀 欧阳藩

摘要 以干青蒿叶末为原料,分别用乙醚、氯仿、正己烷、石油醚(30℃~60℃)搅拌提取青蒿素,结果表明石油醚是较适宜的提取介质。对石油醚提取青蒿素的工艺条件,如温度、时间、溶剂量及搅拌速度等进行了较系统研究,确定了较佳的工艺操作条件。

关键词 青蒿素 青蒿 提取工艺

Studies on the Extraction Processes of Artemisinin

State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences (Beijing 100080) Zhao Bing, Wang Yuchun, Wu Jiang, Bi Jingxiu and Ouyang Fan

Abstract Powdered dry leaves of *Artemisia annua* L. were extracted with ether, chloroform, n-hexane and petroleum ether (30℃~60℃) under stirring. Results showed that petroleum ether was the best solvent of choice. The major conditions for the extraction, such as temperature, duration of extraction, amount of solvents used and the rotational velocity of stirring were studied to arrive at an optimal extraction condition.

Key words artemisinin *Artemisia annua* L. extraction processes

青蒿 *Artemisia annua* L. 中含有多种药用成分,它们具有抗菌、抗寄生虫、解热以及促进免疫等作用,且毒性极低,无副作用。青蒿素是含有过氧基团的倍半萜内酯,对脑型及抗氯喹恶性疟疾有特殊疗效。我国及世界各国科学家在青蒿素化学结构的基础上开发出一系列衍生物,其药效大大提高^[1-3]。

青蒿中药用成分提取方法主要有:水蒸气蒸馏法^[4,5],有机溶剂提取法^[6-8],超临界流体提取^[9,10]等。目前青蒿药用成分提取收率低是造成资源浪费

的重要原因。大规模生产中,挥发油主要采用水蒸气蒸馏提取,减压蒸馏分离;非挥发性成分主要采用有机溶剂提取,柱层析及重结晶分离。尽管进行了一些其它提取分离方法研究,如超临界萃取,但由于存在投资大等问题未能用于大规模生产^[11]。

青蒿药用成分多为胞内产物^[12],提取时有效成分从胞内释放,扩散进入提取介质的快慢是影响过程提取率和操作成本的主要因素。如果在提取设备

* Address: Zhao Bing, State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing

赵兵,男,博士,生化工程专业,副研究员,主要从事植物天然产物、海藻多糖等提取新技术及工艺设备研究;此外还进行了大规模植物细胞、组织及器官培养、代谢调控生产天然药物研究。现负责海洋“八六三”有关海藻多糖提取新技术研究项目(819-Q-15),进行国家“九·五”攻关重点项目“植物细胞大规模培养生产青蒿素”(96-C02-03-02)研究,申请专利 10 项,已获专利权 5 项,在国内外发表学术论文 50 余篇。

** 北京轻工业学院九八届毕业生

△ 国家“九·五”科技攻关项目(96-C02-03-02)

设计中采用生化反应工程原理提高传质性能,仍有可能在改进现有设备及工艺的基础上大大提高回收率以及经济效益

1 原料、设备及分析方法

1.1 实验原料:四川西阳干青蒿叶末,将经过筛选的青蒿叶置于烘箱中 40℃烘烤 3 h后取出,用瓷乳钵研磨至粉状,过筛,制成青蒿叶粉,储于干燥器中备用

1.2 主要试剂:青蒿素标准品为 Sigma Chemical Co., 2℃储存。试剂均为 A R

1.3 仪器分析:紫外分光光度法^[13], Beckman DU 7500紫外-可见分光光度计。

2 实验及标准曲线测定

2.1 冷浸提取:准确称取青蒿样品 1 g置纸筒中,置于反应器中,加入石油醚浸泡,每 24 h更换一次溶剂,提取至溶剂无色。

2.2 搅拌提取:称取青蒿样品 1 g,置于反应器中,加入一定量体积的溶剂,设定并保持温度恒定,进行搅拌提取

2.3 样液处理:提取结束时,将提取液冷却至室温后,抽滤,滤液置于分液漏斗中,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。经水洗后的提取液置于圆底烧瓶中 55℃减压蒸馏,得到含青蒿素的浸膏,再以 95%乙醇溶解浸膏,并定容于 50 mL容量瓶中备测

2.4 标准曲线的制备:精确称取 80℃干燥至恒重的青蒿素标准品 10 mg置 100 mL容量瓶中,用 95%乙醇稀释至刻度。分别吸取 0, 2, 4, 6, 8, 10 mL于 50 mL容量瓶中,以 95%乙醇补充至 10 mL,补加 0.2% NaOH溶液至刻度,置 (50± 1)℃水浴中反应 30 min,流水冷却至室温。在 292 nm处测吸光值。标准曲线的线性回归相关系数为 0.999 青蒿素

浓度 C可按式计算:

$$C = 1.05138 \times A + 0.0105983 \text{ (mg / 50 mL)}$$

2.5 样品溶液的测定:吸取样液 2 mL于 20 mL容量瓶中,补充 95%乙醇至 4 mL后,加入 0.2% NaOH溶液至刻度。50℃水浴中反应 30 min后取出,流水冷却至室温。292 nm处测吸收峰。青蒿素提取量 M及提取回收率 E的计算式如下:

$$M = C \div 50 \times V \times n \div W_0 \text{ (mg / g)}$$

$$E = M \div M_0 \times 100\%$$

其中: V_s= 20 mL,被测样品体积; n= 25,稀释倍数; W₀= 1 g,原料用量; A吸光度; M青蒿素提取量, mg / g; M₀原料青蒿素含量, mg / g

3 实验结果及讨论

3.1 实验条件的选择:实验分别对提取介质、原料粒度以及原料中青蒿素含量进行了研究。

3.1.1 溶剂选择:不同溶液对青蒿中青蒿素以及其它成分的溶解度不同,本组实验分别以 60 mL乙醚、氯仿、正己烷、石油醚(30℃~ 60℃)为溶剂,在 50℃水浴下搅拌提取 2 h,紫外吸收谱图测定结果如表 1所示。从表观上看,氯仿和乙醚的吸光度均较高;石油醚、正己烷的吸光度则较小。从四种溶剂提取产物的紫外吸收图谱可以明显看出乙醚和氯仿在波长 200~ 240 nm之间有很强的杂质峰。其中氯仿提取产物中杂质峰最强,乙醚次之,此两种溶剂的杂质峰远远大于石油醚。正己烷虽然杂质峰较弱,但提取率较石油醚低。考虑到乙醚及氯仿的挥发性、刺激性气味和正己烷回收温度较高,超过了 60℃,而青蒿素在温度超过 60℃以后则过氧桥结构被很快破坏,完全失去药效,所以 4种溶剂中石油醚为较适宜的溶剂。

3.1.2 原料粒度的影响:据研究认为^[12]青蒿素主

表 1 不同溶剂提取物紫外扫描结果

溶剂	波长 nm 吸收峰值				
氯仿	205 / 0.5878	211 / 0.8057	217 / 0.8053	231 / 0.7789	292 / 0.7365
正己烷	202 / 0.2706	209 / 0.2354	216 / 0.2058	235 / 0.2090	292 / 0.4240
石油醚	211 / 0.3669	218 / 0.3520	225 / 0.3481	292 / 0.5161	
乙醚	202 / 0.7777	208 / 0.5002	214 / 0.4754	220 / 0.4822	292 / 0.6570

要存在于植物细胞的腺体中,属于胞内次级代谢产物。提取介质首先从原料颗粒外部扩散进入颗粒内部和细胞内溶解青蒿素,由于内外青蒿素浓度差异,青蒿素再扩散进入主体溶液,因而原料颗粒大小对提取效率存在影响。不同粒度对提取影响结果如表 2所示。显然粒度超过 60目以后,粒度影响逐渐不明显。因为过细的原料不仅增加原料预处理成本,而

且还会给后续的液-固分离带来困难,实验操作过程中选 60目为宜。

3.1.3 原料青蒿素含量测定:采用索氏提取法,对原料进行平行测定,结果如表 3所示

3.2 搅拌提取的单因素实验:实验中分别对提取时间、温度、溶剂量及搅拌速度等因素的影响进行了研究。下述讨论中若无特别说明原料粒度为 60目,提

表 2 原料粒度的影响

粒度 (目)	10	20	40	60	100
提取量 M (mg/g)	3.55	4.36	5.69	5.82	5.97
提取收率 E(%)	48.6	59.6	77.8	79.6	81.7

表 3 原料青蒿素含量测定

提取时间 (h)	12	24	48	平均
M ₀ (mg/g)	7.23	7.32	7.38	7.31

取时间均为 2 h,提取温度均为 50℃,溶剂量为 60 mL,搅拌速度为 800 r/min

3.2.1 提取时间对提取率的影响:不同提取时间结果如表 4所示。提取开始随时间的延长,提取率显著

表 4 提取时间的影响

提取时间 (min)	15	30	60	120	180	240
提取量 M(mg/g)	2.28	3.51	5.24	5.99	5.84	5.70
提取收率 E(%)	31.2	48.0	71.7	81.9	79.9	78.0

上升,提取时间在 2h达到最高。此后,时间增加,提取率无显著增加。这可能是由于青蒿素中具有对热不稳定的过氧基团,而长时间的加热搅拌可能会导致青蒿素的缓慢分解。

3.2.2 温度对提取率的影响:分别以不同温度提取 2 h,提取结果如表 5 可见温度上升到一定高度时,

表 5 温度的影响

温度 (℃)	30	35	40	45	50	55	60
提取量 M(mg/g)	1.91	2.65	3.56	5.06	5.87	4.85	3.57
提取收率 E(%)	26.1	36.3	48.7	69.2	80.3	66.4	48.8

提取率开始下降,原因是由于高温导致青蒿素的分

表 8 不同溶剂提取物紫外扫描结果

提取方法	波长 nm 吸收峰值			
对照品	204/0.039	217/0.0399		292/0.2805
搅拌提取	202/0.3183	208/0.3088	220/0.3211	292/0.500
搅拌提取	202/0.3183	208/0.3088	220/0.3211	292/0.500
索氏提取	204/0.7358	210/0.7154	216/0.6483	220/0.6166 226/0.6147 292/0.6462
渗滤	211/1.1364	215/1.1550	224/1.1352	226/1.1085 286/0.6340 292/0.6115

青蒿素在提取溶剂中的传质速率,大大缩短了提取时间,减少其他成分溶出的机会。不同方法得到的提取产物紫外吸收光谱中杂质峰的数量及强弱可以作为判别提取方法的标准之一。

4 结语

对乙醚、氯仿、正己烷、石油醚(30℃~60℃)为溶剂搅拌提取青蒿素研究表明,石油醚是青蒿素提取较适宜的溶剂。对石油醚提取青蒿素的工艺条件进行了较系统研究,较适宜的提取条件为原料粒度 60 目,提取时间 2 h,提取温度 50℃,溶剂量 60 mL(1 g 原料),搅拌速度 800 r/min。本实验结果可为改进现有青蒿素石油醚提取工艺提供一些依据。

解,提取温度控制在 50℃比较适宜。

3.2.3 溶剂量对提取率的影响:分别加入不同体积石油醚 50℃提取 2 h,结果如表 6所示。经过预实验证明,每 1 g 青蒿粉样提取过程中可吸收 12 mL 溶剂左右。在实际分离提取过程中,提取残渣中的溶剂需采用压滤等方法进一步回收。显然,在溶剂量从 20 mL 增加到 60 mL 时,提取回收率增加很快,超过 60 mL 以后则变化很慢。

表 6 溶剂量的影响

溶剂量 (mL)	20	40	60	80	120	160
提取量 M (mg/g)	3.27	4.28	5.87	5.89	5.90	5.91
提取收率 E(%)	44.7	58.6	80.3	80.6	80.7	80.9

3.2.4 搅拌速度对提取率的影响:以不同搅拌速度提取 2 h,得到结果如表 7 所示。

表 7 搅拌速度的影响

提取时间 (min)	0	200	400	600	800	1000
提取量 M (mg/g)	0.91	2.76	4.28	5.07	5.92	6.03
提取收率 E(%)	12.5	37.8	58.6	69.4	81.0	82.5

显然,搅拌速度对提取率有显著影响,实验条件下搅拌速度以 800 r/min 为宜。在实验操作中应从经济性综合考虑选择合适的搅拌速度。

3.3 不同方法提取产物比较:表 8 对不同提取方法得到提取产物紫外扫描结果进行了比较。同标准样品比较,搅拌提取较索氏提取、室温冷浸提取产品含杂质量少。这主要是由于强烈的搅拌有效地增加了

参考文献

- 赵兵,等. 中药材, 1998, 21(12): 639
- 王存志,等. 中草药, 1996, 27(4): 253
- 刘鸿鸣,等. 药学报, 1981, 16(1): 65
- 屠呦呦,等. 药学报, 1981, 16(5): 366
- 彭洪,等. 中药材, 1996, 19(9): 458
- Vonwiller S C, et al. Planta Med, 1993, 59: 562
- Klayman D L, et al. J of Nat Prod, 1984, 47(4): 715
- Singh A, et al. Planta Med, 1988, 54: 474
- 葛发欢,等. 中药材, 1994, 17(8): 31
- 葛发欢,等. 中药材, 1995, 18(6): 316
- 赵兵,等. 中草药, 1998, 29(11): 784
- 赵兵,等. 广西植物, 1999, 19(2): 154
- 沈旋坤,等. 药物分析杂志, 1983, 3(1): 24

(1999-09-12收稿)