

文章编号:1001-6880(2014)10-1557-05

黄花蒿青蒿酸制备及其生物稳定性研究

徐定华^{1,2}, 唐雯熙^{1,2}, 张晓蓉^{1,2*}, 李杰², 刘继旋²¹吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室; ²吉首大学生物资源与环境科学学院,湖南吉首 416000

摘要:基于青蒿酸重要的药用和开发价值,采用溶剂法、吸附分离法从黄花蒿植物制备青蒿酸,采用光谱、质谱和熔点法表征青蒿酸晶体,采用 HPLC 法分析其生物稳定性。通过制备工艺获得纯度为 96% 的青蒿酸结晶,产率为 61.7%。4℃、室温、60℃以及自然光照条件下保存 30 d 青蒿酸具有较好的生物稳定性;植物体内外青蒿酸均能稳定保存一年,含量基本不变。紫外光照条件下青蒿酸易光解,6 h 后基本检测不出青蒿酸。通过制备工艺获得高纯度的青蒿酸结晶,青蒿酸对温度和自然光照较为稳定,在植物体内外均可保存一年。紫外光对青蒿酸具有较强的破坏作用。

关键词:黄花蒿;青蒿酸;制备工艺;生物稳定性

中图分类号:R284.6

文献标识码:A

Preparation of Artemisinic Acid from *Artemisia annua* L. and Its Biological Stability

XU Ding-hua^{1,2}, TANG Wen-xi^{1,2}, ZHANG Xiao-rong^{1,2*}, LI Jie², LIU Ji-xuan²¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization in Hunan Province, Jishou University;²College of Bio-resources and Environment Science, Jishou University, Jishou 416000, China

Abstract: In this paper, the preparation of artemisinic acid from *Artemisia annua* L. was investigated and its biological stability was explored. Liquid-liquid extraction method and adsorptive separation method were used to prepare artemisinic acid from *A. annua*, and spectroscopic, mass spectrometry and melting point method were adopted to characterize artemisinic acid crystals. The biological stability of artemisinic acid was analyzed using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Artemisinic acid crystal was successfully obtained by liquid-liquid extraction method and Adsorptive separation method, and the yield of product reached to 61.7% and the purity of product was higher than 96%. Artemisinic acid was very stable under the conditions of 4 °C, room temperature, 60°C and natural lighting for 30 d. Furthermore, it was stably preserved in plant for a year with its content maintained at the same level. The structure of product was badly destructed by UV light, and it was not detected after lighting for 6 h. In conclusion, high purity of artemisinic acid could be obtained by the developed preparation methods. It was more stable at the conditions of natural light and temperature, and the artemisinic acid could save one year *in vivo* and *in vitro*. However, UV light strongly destroy artemisinic acid.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinic acid; preparation technology; biological stability

青蒿酸是黄花蒿(*Artemisia annua* L.)植物中倍半萜类成分之一^[1-4],化学构象适宜,具有重要的药用和开发价值,我国资源丰富。研究表明青蒿酸具有较好的抗肿瘤活性,对人肝癌细胞 SMMC-7721、人白血细胞 K562、白血病 P388 等多种癌细胞具有杀伤作用^[5,6]。还可减少 C/EBP δ mRNA 的水平,抑

制 hAMSCs 的生脂分化^[7]。青蒿酸为青蒿素生物合成重要前体,有望低成本体外转化为青蒿素,近年来青蒿酸制备技术也随之发展,已有多种青蒿酸分离纯化工艺报道,如采用反相高效液相色谱法分离青蒿酸^[8],产物纯度大于 96%;采用皂化-硅胶柱层析法从青蒿酸提取母液制备青蒿酸^[9],纯度达 95%。也有报道通过单流程工艺制备较高纯度青蒿酸^[10]。国外有报道通过酵母转基因技术生物合成青蒿酸。虽然已有多种青蒿酸制备工艺报道,目前青蒿酸尚未实现工业化,一些关键技术还有待解决;有关青蒿

收稿日期:2014-06-16 接受日期:2014-07-28

基金项目:湖南省教育厅重点项目(12A114);湖南省科技计划项目(2014SK3023);湖南省高校科技成果产业化培育项目(13CY016);湖南省高校科技创新团队项目(2012-318)

* 通讯作者 E-mail: xrzhang0743@163.com

酸生物稳定性未见相关报道。青蒿酸分子含有一个羧基,4,5-位以及11-位碳双键易断裂,通过紫外光断裂11-位双键,插入一个甲基和2个氢,生成二氢青蒿酸,青蒿酸在光氧化条件下氧化其4,5-位双键,生成烯丙过氧氢,提供氯化氢条件,甲酯化生成青蒿酸甲酯,分子中双键使青蒿酸具有一定不稳定性^[11-13]。基于青蒿酸重要的开发利用价值,本文探究了溶剂法、吸附分离法制备青蒿酸,对产品进行了表征,分析了青蒿酸的生物稳定性,以期为青蒿酸的工业开发与利用提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)为野外采集,由吉首大学陈功锡教授鉴定。青蒿酸标准品(HPLC > 99%,批号120628,四川省维克奇生物科技有限公司)。

岛津高压液相色谱仪(LC-10AT,天津岛津液压有限公司),干燥箱(上海博讯实业有限公司),申光熔点仪(WRR,上海精科),紫外分光光度计(天津岛津液压有限公司),紫外灯(253.7 nm,30 W),高分辨质谱仪(MAT95XP,美国Thermo Finnigan公司),96孔细胞培养皿,甲醇(HPLC,上海国药),乙腈(HPLC,上海国药),其它试剂均为国产分析纯,实验用水均为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 青蒿酸制备工艺

将1000 g黄花蒿植物于60 °C干燥至恒重,粉碎,过40目筛,甲醇浸提24 h/次,3次,植物:甲醇=1:10、1:10、1:5(g/mL)。合并滤液,浓缩,浸膏乙醚溶解,并加入碱液24 h反应后,收集碱液层,浓HCl调pH=1,24 h反应,再加入乙醚,萃取,收集乙醚,浓缩,浸膏硅胶柱层析分离,收集青蒿酸流份,浓缩,乙酸乙酯溶解浸膏,-20 °C结晶,收集青蒿酸结晶,真空干燥,备用。

1.2.2 青蒿酸表征

1.2.2.1 青蒿酸溶液配制

精确称量青蒿酸标准品及青蒿酸样品各10 mg,色谱甲醇溶解,容量瓶定量至10 mL,母液浓度为1 mg/mL,备用。实验用青蒿酸标准品溶液及青蒿酸样品溶液均采用色谱甲醇稀释。

1.2.2.1 熔点测定

取5 mg青蒿酸晶体于50 °C干燥至恒重,研磨,

于熔点仪中测定其熔点,重复3次。

1.2.2.2 UV-vis 表征

青蒿酸甲醇溶液于比色皿扫描分析,波长范围200~450 nm扫描,以甲醇为空白对照,测定青蒿酸最大吸收峰。

1.2.2.3 TLC 分析

展层剂:石油醚-乙酸乙酯-丙酮(80:19:1,v/v/v);显色剂:香草醛-无水乙醇-浓硫酸(0.5 g:9 mL:1 mL);显色温度:100~110 °C;显色时间:5~10 min。

1.2.2.4 HPLC 检测

精密吸取青蒿酸样品溶液10 μL,注入液相色谱仪,紫外检测器测定峰面积。色谱柱条件:wondas II C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%乙酸水溶液(7:3,v/v);流速为1 mL/min;柱温为30 °C,紫外检测波长为203 nm。

青蒿酸浓度计算公式如下:

供试青蒿酸样品浓度 = 供试青蒿酸样品峰高/面积 ÷ 供试青蒿酸标准品峰高/面积 × 青蒿酸标准溶液浓度

1.2.2.5 质谱分析

青蒿酸溶解于乙醚溶液用于质谱检测分析。质谱检测条件为毛细管温度180 °C,喷雾电压5 kV,离子透镜补偿电压15 V,碰撞能量20%~42%,壳气为氮气,毛细管电压38 V,注射泵流速3 μL/min。

1.2.3 生物稳定性检测

光照条件:取三组供试青蒿酸样品溶液,第一组采用自然光照室温保存,第二组用锡箔纸包裹避光室温保存。第三组供试样品溶液分别以每孔300 μL加入96孔板,室温紫外灯下照射,光照距离20 cm,取样待检。

温度条件:取三组供试青蒿酸样品溶液,第一组4 °C条件下避光保存,第二组室温条件下避光保存,第三组60 °C条件下避光保存,取样待检。

保存时间:供试青蒿酸溶液,室温避光保存。植物样品为野外采集,自然阴干,室温避光贮藏,植物青蒿酸含量检测采用甲醇室温提取,1年保存时间。

HPLC法检测生物活性,青蒿酸标准品溶液及样品溶液浓度均为0.08 mg/mL。

2 结果与分析

2.1 青蒿酸制备工艺

黄花蒿青蒿酸制备工艺流程如图1所示。制备工艺设计了有机溶剂提取、反萃取-萃取粗分离、吸

附柱分离及结晶、真空干燥等 4 个操作单元制备。青蒿酸分子中含有一个羧基, 属于极性分子, 制备工艺选用极性较强的有机溶剂甲醇提取。青蒿酸呈弱酸性, 为弱电解质, 工艺采用 5% NaOH 皂化及浓 HCl 还原, 利用反萃取及乙醚萃取粗分离。通过硅胶柱吸附分离法以及石油醚结晶精制, 得到青蒿酸产品。通过该工艺产物得到青蒿酸结晶 350 mg, 制备工艺的产率为 61.7%, 青蒿酸制备工艺物料平衡

及产品收率总结于表 1。

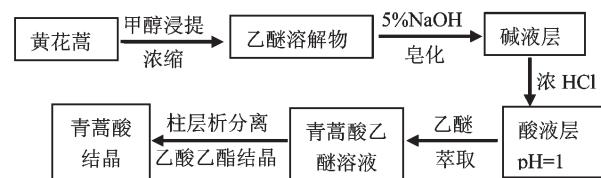


图 1 青蒿酸制备工艺流程图

Fig. 1 Preparation process of artemisinic acid

表 1 青蒿酸制备工艺物料平衡及产品收率

Table 1 Material balance and product yield of artemisinic acid by preparation process

名称 Name	物料 Material		产物 Product	
	重量 Weight(g)	得率 Yield (%)	重量 Weight (mg)	产率 Yield (%)
黄花蒿 <i>A. annua</i>	1000	-	-	-
甲醇提取浓缩物 Concentrate of methanol extract	174.5	17.5	567.0	-
乙醚萃取浓缩物 Concentrate of ether extract	35.0	3.5	474.5	83.7
柱层析浓缩物 Concentrate of column flow fractionation	1.6	0.016	370.5	64.3
青蒿酸结晶 Artemisinic acid crystal	-	-	350.0	61.7

2.2 青蒿酸表征

采用 HPLC 法对产物青蒿酸进行了纯度检测, 对青蒿酸晶体进行了 UV-vis、熔点、TLC、质谱表征,

结果如图 2 所示。产物青蒿酸纯度为 96% (图 2 A)。青蒿酸晶体透明, 小立方形 (图 2B 插图所示)。青蒿酸晶体甲醇溶解后, 紫外检测表明最大

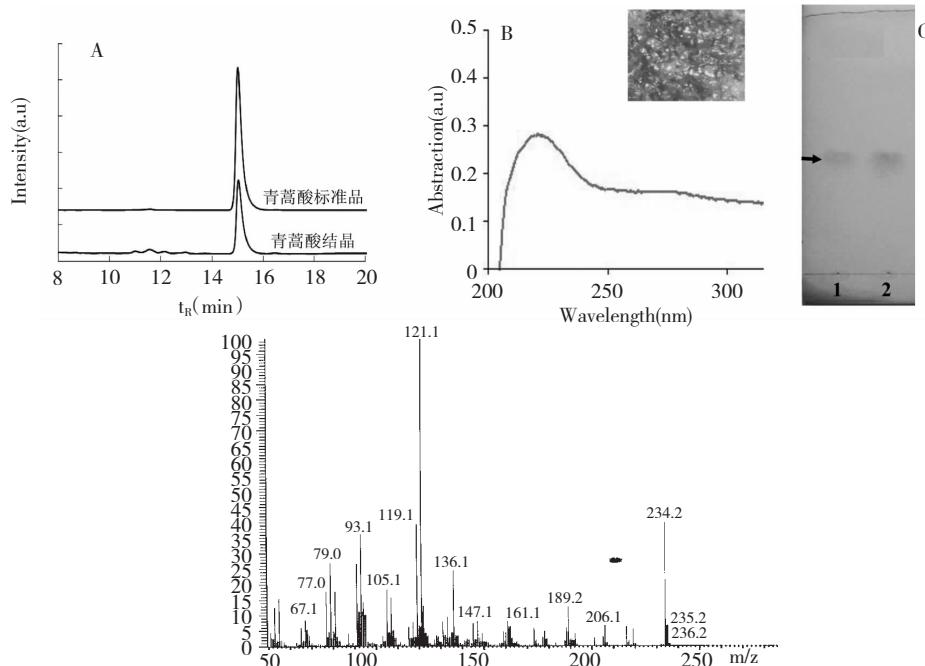


图 2 青蒿酸表征

Fig. 2 Characterization of artemisinic acid

注:A、B、C、D 分别为 HPLC、UV-vis、TLC 及 MS 分析;1,2 分别为 TLC 点样量 1 μL, 2 μL

Notes: A, B, C, D were HPLC chromatogram, UV-vis spectrum, TLC plot and mass spectrum, respectively; 1, 2 showed point samples of 1 μL and 2 μL.

吸收峰为 220 nm; 青蒿酸结晶熔点为 130(132 °C); TLC 检测表明青蒿酸的 R_f 值为 0.42(图 2 C 箭头所示); 质谱检测其质子峰为 [M]⁺ 234(图 2 D), 与文献报道一致^[1]。

2.3 青蒿酸生物稳定性分析

2.3.1 温度稳定性分析

青蒿酸具有适宜化学构象,不仅可生物转化为青蒿素,且具有重要的药用用途,保持其生物稳定性是其开发利用的前体。因此,探究了 4 °C、室温、60 °C 等温度条件下青蒿酸生物稳定性。采用 TLC 法、HPLC 法对 3 种温度条件下保存 0、12 h、2、5、15、30 d 的青蒿酸含量动态变化进行了定性定量分析。TLC 分析结果显示,4 °C、室温、60 °C 条件下保存 0、12 h、2、5、15、30 d 后青蒿酸斑点清晰可见, R_f 值均为 0.46(图略)。进一步采用 HPLC 法对不同温度条件下保存的青蒿酸含量进行定量检测,结果如图 3 A、B、C 所示。由检测结果可知,4 °C、室温、60 °C 条件下保存 0、12 h、2、5、15、30 d 青蒿酸 HPLC 检测保留时间均为 12.6 ± 0.2 min。根据公式计算可知,3 种条件下青蒿酸浓度基本保持不变,分别为 0.08、 0.08 ± 0.01 mg/mL 以及 0.075 ± 0.05 mg/mL, 可见青蒿酸在 4 ~ 60 °C 温度条件下具有较好的生物稳定性。

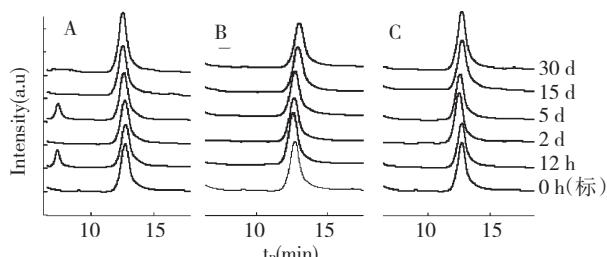


图 3 不同温度保存条件青蒿酸含量 HPLC 分析

Fig. 3 Content analysis of artemisinic acid preserved under different temperatures by HPLC

注:A、B、C 分别表示 4 °C、室温、60 °C。

Notes: A, B and C represented 4 °C, room temperature and 60 °C, respectively.

2.3.2 光稳定性分析

以避光条件为对照,研究了青蒿酸对紫外光及自然光的生物稳定性。TLC 分析结果显示,自然光照条件保存 0、12 h、2、5、15、30 d 青蒿酸斑点仍清晰可见,与避光保存青蒿酸标准品斑点显示一致。将青蒿酸进行紫外光照 0、2、4、6、8、10、12 h, TLC 检测发现青蒿酸斑点随着紫外照射时间延长,斑点逐渐

变小,颜色变淡,6 h 后青蒿酸斑点完全消失(图略)。进一步对自然光及紫外光处理的青蒿酸含量进行 HPLC 检测,结果如图 4 所示。由图 4 A 检测结果可见,自然光照条件下青蒿酸吸收峰与避光保存标准品吸收峰一致,含量稳定,检测浓度保持在 0.07 ~ 0.08 mg/mL。紫外光照处理后(图 4 B),青蒿酸含量随着紫外光照时间延长逐渐降低,紫外光照 2 h 后青蒿酸浓度降为 0.04 mg/mL,4 h 后降为 0.02 mg/mL,紫外光照 8 h 后青蒿酸几乎完全被光解。以上结果表明,自然光照条件下青蒿酸具有较好的稳定稳定性,青蒿酸对紫外光非常敏感。

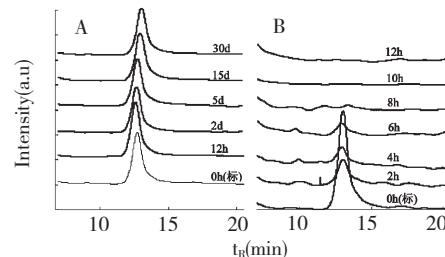


图 4 不同光照保存条件青蒿酸含量 HPLC 分析

Fig. 4 Content analysis of artemisinic acid preserved under different lights by HPLC

注:A 示自然光照;B 示紫外光照。

Notes: A and B represented natural light and UV light, respectively.

2.3.3 青蒿酸保存时间分析

室温避光贮藏条件下,对体外及植物体内保存的青蒿酸生物稳定性进行了分析。HPLC 检测结果如图 5 所示。由图 5A 检测结果显示,在体外保存 1 年后,青蒿酸吸收峰与标准品吸收峰一致,含量稳定,浓度保持在 0.07 ~ 0.08 mg/mL。由图 5B 检测

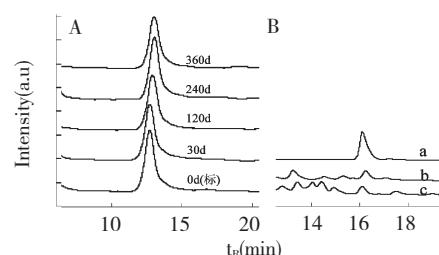


图 5 植物体内外保存青蒿酸含量 HPLC 分析

Fig. 5 Content analysis of artemisinic acid preserved in and out of plant by HPLC

注:A 示体外保存;B 示植物体保存;a 为青蒿酸标准品;b 为保存 1 年植物;c 为新鲜采集植物。

Notes: A, B represented out and in plant, respectively; a, b, c represented artemisinic acid standard, plant preserved for a year and fresh plant, respectively.

结果可知,植物体在自然条件下保存1年后,青蒿酸含量基本稳定,浓度约为1.5%~1.6%,生物稳定性良好。以上结果表明,植物体内外保存一年时间青蒿酸生物活性稳定良好。

3 讨论

青蒿酸具有重要的开发利用价值。本文探究了青蒿酸制备工艺,通过该工艺可高效制备青蒿酸产品,纯度达96%。产物青蒿酸紫外最大吸收峰为220 nm,熔点为130~132 °C,质谱[M]⁺234。生物稳定性分析表明,4~60 °C以及自然光照条件下,保存30 d青蒿酸生物稳定性的保持良好,含量保持0.08 mg/mL不变。但紫外光对青蒿酸具有极强的破坏作用,紫外照射6 h后青蒿酸基本检测不出,有报道青蒿酸在紫外条件下,4,5-位以及11-位碳双键断裂发生氧化反应^[8],该结果与文献相符。室温条件下,青蒿酸在植物体内外保存1年含量基本稳定,生物稳定性好。青蒿酸良好的生物稳定性为其开发利用提供了广阔前景。

参考文献

- 1 Deng DA (邓定安), Zhu DY (朱大元), Gao YL (高耀良), et al. Study on structure of artemisinic acid. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1981, 19: 1209-1211.
- 2 Deng DA (邓定安), Cai JC (蔡俊超). Derivatives of artemisic acid with antitumor activity. *Organ Chem* (有机化学), 1991, 5: 540-543.
- 3 Tu YY (屠呦呦), Zhu QC (朱启聪), Shen X (沈星). Study on chemical composition of shoot of *Artemisia annua* L. *Tradit Chin Med J* (中药通报), 1985, 10(9): 35-37.
- 4 Deng SJ (邓思娟), Li CY (李春远), Chen S (陈实), et al. Allelochemicals isolation and structure identification of *Artemisia annua* L. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 2008, 29(3): 42-46.

- 5 Sun WC (孙玮辰), Han JX (韩家娴), Yang WY (杨蔚怡), et al. Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and antemisic B *in vitro*. *Acta Pharmucol Sin* (中国药理学报), 1992, 13: 541-543.
- 6 Zhou SW (周生伟), Wang SY (王莎莉), Ya P (亚平). Inhibitory effects of artemisinic acid on proliferation of K562 cells *in vitro*. *J Chongqing Med Univ* (重庆医科大学学报), 2006, 31: 159-162.
- 7 Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the anti-malarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940-943.
- 8 Liu SQ (刘硕谦), Liu ZH (刘仲华), Tian N (田娜), et al. Phase high performance liquid chromatography separation and purification of artemisinin, dihydro artemisinin acid and artemisinic acid. CN201110038895.
- 9 Liu ZQ (刘志强). A kind method of extract artemisinic acid from artemisinin crystallization mother liquor. CN 102702220B.
- 10 Peng XD (彭学东), Zhang H (张海), Zhao JZ (赵金召), et al. A simple new process of extraction and purification artemisinin and artemisinin acid from *Artemisia annua* leaf. CN 103087075A.
- 11 Liu SQ (刘硕谦), Tian N (田娜), Li J (李娟), et al. Advances in studies on combinatorial biosynthesis of artemisinin. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 1425-1431.
- 12 Zeng QP (曾庆平), Pao F (鲍飞). Research achievements in the synthetic biology and metabolic engineering of artemisinin. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2011, 56: 2289-2297.
- 13 Kong JQ (孔建强), Wang W (王伟), Cheng KT (程克棣), et al. Research progresses in synthetic biology of artemisinin. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2013, 48: 193-205.