

文章编号:1001-6880(2016)10-1652-05

青蒿母液中二氢青蒿酸的提取工艺优化

余泽民,王江南,何达海,丁克毅*

西南民族大学化学与环境工程学院,成都 610041

摘要:对从青蒿母液中提取二氢青蒿酸(DHAA)的工艺进行了优化。以从母液中得到的浸膏总量(提取率)和其中二氢青蒿酸的含量为考察指标,先通过单因素实验对萃取溶剂的种类和浓度、萃取温度,碱液的种类和浓度等因素进行预试,再采用 $L_9(3^4)$ 正交实验进行系统地考察,以获取最优提取工艺。结果表明:从青蒿母液中提取二氢青蒿酸时,采用乙醇为溶剂时得到的浸膏总量明显高于采用丙酮为溶剂时的浸膏总量;其最佳工艺条件为:萃取溶剂为80% (V/V)的乙醇,萃取温度50 °C,采用为1% (w/w) 氢氧化钠溶液作为水萃液。在此工艺条件下,母液中二氢青蒿酸的提取率可以达到70%以上,所得样品纯度经HPLC检测可以达到98%。

关键词:青蒿;二氢青蒿酸;青蒿素;浸提母液;工艺优化

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.029

Optimization of Extraction Process for Dihydroartemisinic Acid from the Remainder of Artemisinin Extract

YU Ze-min, WANG Jiang-nan, HE Da-hai, DING Ke-yi*

College of Chemistry & Environment Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: The extraction process of dihydroartemisinic acid (DHAA) from the remainder of Artemisinin extract was optimized. Taking the yield of extract and the purity of dihydroartemisinic acid in the extract as indexes, the influencing factors such as the types and concentrations of extraction solvents, extraction temperature, the types and concentrations of alkali liquor for increasing the solution pH were investigated, a $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was applied to explore the optimal process. The results indicated that, the mass of extract obtained by ethanol as solvent was obviously greater than that of acetone as solvent. The optimal process parameters were as follows: applying 80% (V/V) ethanol as solvent and the extraction temperature at 50 °C; applying 1% (w/w) sodium hydroxide solution as alkali liquor. Under these conditions, more than 70% dihydroartemisinic acid in the remainder of Artemisinin extract was recovered, the purity of the product reached 98% analyzed by HPLC analysis.

Key words: *Artemisia annua* L.; dihydroartemisinic acid; artemisinin; extraction remainder; process optimization

青蒿素(Artemisinin)主要是从黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中提取的一种具有倍半萜内酯环的过氧化物,是治疗疟疾的特效药^[1,2],在非洲、东南亚及南亚等地区有广阔的市场前景。但由于青蒿药材的收购、存储及青蒿素的提取环节较多,且不同采集地和不同采集期的青蒿品质有很大差别^[3,4];同时,青蒿素作为植物提取物,不可避免地受到药材资源的制约。因此,对青蒿原料药材中有效成分的充分利用,意义重大。这就要求对青蒿药材中青蒿素的提取率尽可能高;另一方面也要对药材中的青蒿素类

似物进行充分利用。

从青蒿植物中提取青蒿素后,其残余液中的溶剂乙醚经过回收后,得到一类粘稠的膏状副产物,行业内称为青蒿母液。每生产1 kg 青蒿素,会产生5~10 kg 青蒿母液;如果得不到有效利用,会造成环境污染。由于青蒿母液具有天然植物的芳香气味,有企业将其售给蜡烛生产厂作为添加剂使用,但总体来说效益不高,市场需求量也不大。因此,对青蒿母液的有效利用,在业内还是一个没有解决的问题。

青蒿母液中除色素、挥发油、植物蜡、脂类等成分外,还含有较多的二氢青蒿酸(DHAA,结构式如图1所示)。经研究证实:二氢青蒿酸是青蒿素的重要合成前体^[5-7],这二种萜类化合物之间的可能生源关系为:二氢青蒿酸→青蒿素^[8-11]。随着以二氢

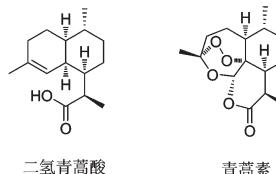
收稿日期:2016-03-04 接受日期:2016-05-31

基金项目:中央高校(西南民族大学)基本科研业务费专项资金项目(2014MZDQ05);西南民族大学研究生创新科研重点项目(CX2015SZ050)

* 通讯作者 Tel:86-013880999317;E-mail:keyiding2000@aliyun.com

青蒿酸为原料人工合成青蒿素^[12,13]方面的突破(图2),存在于青蒿母液中未得到有效利用的二氢青蒿酸也备受关注。因此对青蒿母液中二氢青蒿酸的提取,不仅可以变废为宝,而且还可以提高企业的利润、在一定程度上降低青蒿素的价格。

重庆科瑞南海制药有限责任公司年产青蒿素70吨左右,是国内最大的青蒿素生产企业之一。该公司的研究人员在前期已经对从青蒿母液中提取二氢青蒿酸做了一些研究工作,摸索出了一套工艺,使二氢青蒿酸的提取率达到了40%^[14]。然而,从技术经济性角度考虑,40%的提取率并不能为企业增效。本课题组受重庆科瑞南海制药有限责任公司委托,以该公司的青蒿母液为原料,拟在原有工艺基础上,通过工艺优化,得到二氢青蒿酸提取率达到70%、适宜于大生产的定型工艺,以期达到提高企业经济效益之目的。



二氢青蒿酸

青蒿素

图1 二氢青蒿酸和青蒿素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of dihydroartemisinic acid and artemisinin

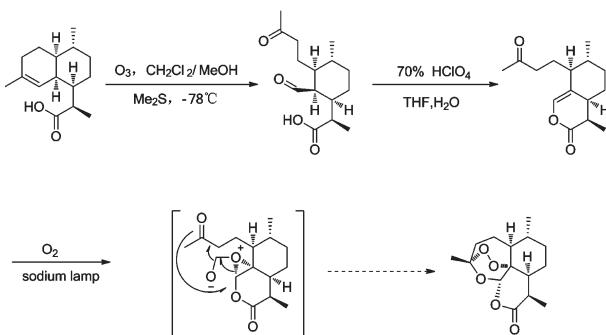


图2 以二氢青蒿酸前体合成青蒿素的工艺路线

Fig. 2 Synthetic route of artemisinin from dihydroartemisinic

1 仪器与材料

高效液相色谱分析仪(美国沃特世公司 Waters 2695/2996, 2996 PDA 检测器, Empower 化学工作站), 旋转蒸发仪(申光 SGW-1 自动旋光仪), pH 计(S-3C 精密 pH 计)。

二氢青蒿酸对照品、青蒿母液均由重庆科瑞南

海制药有限责任公司提供,后者储存温度低于60 °C时为粘稠的膏状物,高于60 °C时为液态。甲醇、乙腈、水均为色谱纯,磷酸为分析纯;常规试剂均从成都试剂厂购买。

2 实验方法

2.1 青蒿母液中二氢青蒿酸的含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Gemini 5u C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈:0.2% 磷酸(65:35);流速1 mL/min;检测波长220 nm;柱温30 °C;进样量20 μL。

2.1.2 溶液配制

对照品贮备液:精密称取二氢青蒿酸10 mg,用甲醇溶解,置10 mL容量瓶中定容,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液即得1 mg/mL的二氢青蒿酸的对照品贮备液。

供试品溶液:精密称取青蒿母液2 mg,用甲醇溶解,置100 mL容量瓶中定容,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液即得0.02 mg/mL的供试品溶液。

2.1.3 二氢青蒿酸标准曲线的配制

精密吸取二氢青蒿酸对照品贮备液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mL, 分别置于10 mL容量瓶中, 用甲醇定容, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 取滤液, 分别进样, 按照2.1.1的色谱条件进行HPLC分析。

2.1.4 青蒿母液中二氢青蒿酸含量的测定

将2.1.2中所配制的待测溶液按照2.1.1的色谱条件进样分析,仪器通过面积归一法根据色谱峰中二氢青蒿酸的峰面积自动给出青蒿母液中二氢青蒿酸的百分含量。

2.2 从青蒿母液中提取二氢青蒿酸的单因素预试

2.2.1 萃取溶剂及浓度的筛选

从青蒿母液中回收二氢青蒿酸时,必须先用有机溶剂进行溶解(固-液萃取)。在筛选溶剂时,每次取青蒿母液20 g,置于250 mL烧杯中,分别以100 mL 70%、80%、90% 的乙醇溶液(V/V), 和40%、60%、80% 的丙酮溶液(V/V)为溶剂进行萃取(35 °C, 30 min × 2),合并2次萃取液,浓缩成浸膏。

浸膏再用乙酸乙酯50 mL复溶解后,每份样品先用50 mL 1% 氢氧化钠溶液(W/W)萃取,然后用18% 盐酸(W/W)调pH至6.0,再用50 mL乙酸乙酯萃取。将萃取后的乙酸乙酯溶液浓缩,得到目标产物DHAA粗品并计算提取率:提取率 = DHAA粗品质量/(青蒿母液质量×母液中DHAA的百分含量)。

粗品再用乙腈进行结晶和重结晶操作,得到白色、针状的 DHAA 晶体,用 HPLC 测其纯度。

2.2.2 萃取所用碱液及浓度的选择

取母液 20 g, 置于 500 mL 烧杯中, 加入 80% 乙醇 200 mL 萃取(35 °C, 30 min × 2), 合并 2 次萃取液, 浓缩成浸膏。用乙酸乙酯 100 mL 溶解后等分为 2 份, 重复上述试验 4 次, 得到 8 等份的溶于乙酸乙酯的浸膏样品。每份样品先用 10 mL 不同浓度的碳酸钠溶液和氢氧化钠溶液萃取, 然后用 18% 盐酸调 pH 至 6.0, 再用 10 mL 乙酸乙酯萃取。将萃取后的乙酸乙酯溶液浓缩得到 DHAA 粗品后并称重并计算提取率。将粗品用乙腈进行结晶和重结晶操作, 最后用 HPLC 测其纯度。

2.2.3 固-液萃取温度的筛选

分别在 30、50、70 °C 下, 以 80% 的乙醇溶液为溶剂, 1% 的氢氧化钠溶液做萃取碱液, 按照 2.2.1 的操作方法, 对萃取温度进行筛选。

2.3 正交实验设计

根据预实验结果, 以浸膏的量和二氢青蒿酸的

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels for orthogonal experiments

因素 Factor	水平 Levels		
	1	2	3
A (%)	70	80	90
B (°C)	30	50	70
C (%)	0.5	0.75	1

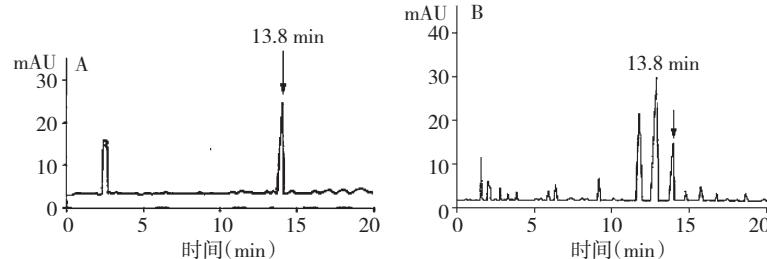


图 3 二氢青蒿酸对照品(A)和青蒿母液(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of DHAA standard (A) and Artemisinin extract (B)

3.3 预试实验

采用原工艺时, 二氢青蒿酸的收率只有 40% 左右。通过预试实验分析, 我们发现原提取工艺中活性炭脱色这道工序造成了目标产物过多的损失。因此在优化工艺时我们首先摒弃了原工艺中的活性炭脱色工序, 因此也大大提高了浸膏的得率。

氢氧化钠的碱性强于碳酸钠, 改用氢氧化钠提

含量为考核指标, 以乙醇浓度(A), 乙醇萃取温度(B)和氢氧化钠溶液浓度(C)为考察对象, 用 L₉(3⁴)正交实验(因素、水平见表 1)优选最佳提取工艺。

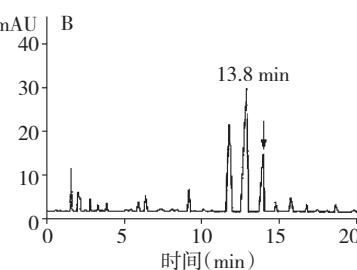
3 结果与讨论

3.1 二氢青蒿酸标准曲线及回归方程

本实验过程中, 目标产物二氢青蒿酸的分析浓度范围为 0.05 ~ 0.30 mg/mL。因此, 按照 2.1.3 的方法, 分别用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mL 二氢青蒿酸对照品贮备液进样分析, 以二氢青蒿酸浓度 c 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $A = 2278.1 c + 32.679 (R^2 = 0.9995)$, 线性关系良好。

3.2 青蒿母液中二氢青蒿酸含量测定

本课题所用母液是车间生产青蒿素后得到的废液, 为了比较不同工艺所得到目标产物——二氢青蒿酸的收率, 有必要考察二氢青蒿酸的具体含量并对原料中的二氢青蒿酸进行含量测定。按照 2.1.4 的方法测定二氢青蒿酸的含量时, 青蒿母液 HPLC 谱图(图 3B)中二氢青蒿酸的保留时间与二氢青蒿酸对照品 HPLC 谱图(图 3A)保留时间一致, 均为 13.8 min。仪器按照面积归一法自动给出青蒿母液中二氢青蒿酸含量, 取 3 次试验平均值, 得到重庆科瑞南海制药有限责任公司提供的本批次青蒿母液中二氢青蒿酸的含量为 9%。



取目标产物能最大程度地将母液中的二氢青蒿酸中和而进入水层, 但碱性太强会使得其它有机酸也被中和而引入不必要的杂质, 甚至是破坏目标化合物的结构, 得不偿失。因此, 我们用氢氧化钠溶液代替碳酸钠溶液, 并将氢氧化钠溶液浓度作为影响目标产物收率和纯度的一个重要因素进行考察。

3.4 溶剂的种类和浓度对二氢青蒿酸收率的影响

按照 2.2.1 的方法,采用不同种类和浓度的有机溶剂作为萃取介质的实验结果见表 2。

表 2 不同种类和浓度的溶剂所得浸膏重量及二氢青蒿酸含量

Table 2 Yield of extract and purity of dihydroartemisinic acid by different solvent

溶剂及浓度 Solvent and conc.	浸膏重 Yield (mg)	二氢青蒿酸含量 Purity (%)
70% Ethanol	725	72.78
80% Ethanol	858	83.45
90% Ethanol	819	70.84
40% Acetone	-	萃取溶剂无法溶解原料 Not dissolve in acetone
60% Acetone	603	52.18
80% Acetone	727	64.34

从表 2 可以看出,采用 80% 的乙醇溶液,所得

表 3 不同碱液萃取所得浸膏重量及二氢青蒿酸含量

Table 3 Extraction yield and purity of dihydroartemisinic acid by different alkali liquor

不同浓度的碱液 Conc. of alkali liquor	浸膏重 Yield (mg)	二氢青蒿酸含量 Purity (%)
0.5% Na ₂ CO ₃ aq.	197	32.34
1.0% Na ₂ CO ₃ aq.	203	41.53
1.5% Na ₂ CO ₃ aq.	205	42.06
2.0% Na ₂ CO ₃ aq.	214	44.17
0.5% NaOH aq.	199	33.67
1.0% NaOH aq.	262	81.29
1.5% NaOH aq.	216	71.56
2.0% NaOH aq.	220	73.82

浸膏的量最大,浸膏中二氢青蒿酸含量也最高。

3.5 萃取所用碱液及浓度的选择

从乙酸乙酯相中萃取二氢青蒿素时,加入碱液的目的是使目标产物形成盐而增加其在水相中的溶解度并除去其它杂质。按照 2.2.2 的方法,采用不同种类和浓度的碱液作为萃取介质,实验结果见表 2。

从表 3 可以看出,采用 1% 氢氧化钠溶液,所得浸膏的量最大,浸膏中二氢青蒿酸含量也最高。

3.6 萃取操作的温度对二氢青蒿酸收率的影响

按照 2.2.3 的方法,在不同萃取操作温度下的实验结果见表 3。

表 4 不同萃取温度下所得浸膏重及含量

Table 4 Extraction yield and purity of dihydroartemisinic acid at different extraction temperature

温度 Temperature	浸膏重 Yield (mg)	二氢青蒿酸含量 Purity (%)
30 °C	731	94
50 °C	874	92
70 °C	1052	67

从表 4 可以看出,虽然在 30 °C 下萃取所得浸膏中二氢青蒿酸的纯度(含量)较高,但浸膏的总量(提取率)不及 50 °C 时萃取;70 °C 提取率高,但纯度很差,且能源消耗会更多。因此,从提取效率、粗产品纯度和能源消耗三方面考虑,从母液中提取粗产品是以 50 °C 作为操作温度为宜。

3.7 正交实验的结果分析

按照 2.3 所述的正交实验方案进行实验,结果见表 5。

表 5 正交实验方案及结果

Table 5 The results of orthogonal experiment

No.	A Conc. of ethanol (%)	B T (°C)	C Conc. of NaOH (%)	Control	Mass of extract (mg)	Purity of DHAA (%)	Mass of DHAA (mg)
1	1(70)	1(30)	1(0.5)	1	687	53.05	364.45
2	1	2(50)	2(0.75)	2	735	62.18	457.02
3	1	3(70)	3(1)	3	842	49.37	415.69
4	2(80)	1	2	3	723	71.56	517.37
5	2	2	3	1	879	72.27	635.25
6	2	3	1	2	712	58.63	417.44
7	3(90)	1	3	2	664	64.21	426.35
8	3	2	1	3	586	59.57	349.08

No.	A Conc. of ethanol (%)	B T (°C)	C Conc. of NaOH (%)	Control	Mass of extract (mg)	Purity of DHAA (%)	Mass of DHAA (mg)
9	3	3	2	1	693	57.32	397.22
D(X)	0.7047	0.4574	0.2063				
Factors				A > B > C			
Optimal process				A ₂ B ₂ C ₃			

根据方差分析结果可知,乙醇浓度(因素A)对提取工艺的影响最显著,各因素作用依次为A>B>C,最佳因素水平组合为A₂B₂C₃,即乙醇浓度80%,乙醇萃取温度50℃,氢氧化钠溶液浓度1%,与单因素实验结果吻合。

在最优工艺条件下,二氢青蒿酸的提取率为72.27%;提取所得二氢青蒿酸按照2.1.1所述色谱条件进行HPLC分析,由面积归一法给出的含量达到98%。

3.8 优化的工艺流程图

综合上述工作,可以将优化前后的提取工艺(图4)用下图明晰地表示出来。

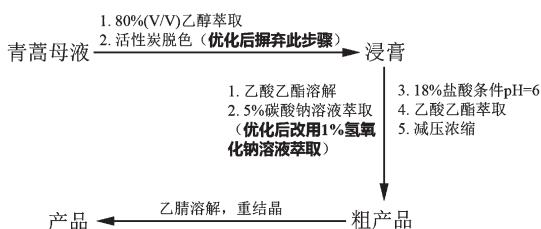


图4 优化前后的提取二氢青蒿酸的工艺

Fig. 4 The process flow for isolating dihydroartemisinic from artemisinin extract

采用上图所示的优化工艺,青蒿母液中二氢青蒿酸的提取率可达到72.27%以上,接近原工艺的2倍。此外,我们舍弃了活性炭脱色操作,在一定程度上简化了工艺,且成本较原工艺降低,具备较好的技术经济性,适用于车间的放大生产。

参考文献

- Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature*, 2004, 430:900-904.
- Misra LN, Ahmad A, Thakur RS, et al. Crystal structure of artemisinic acid: A possible biogenetic precursor of antimalarial artemisinin from *Artemisia annua*. *J Nat Prod*, 1993, 56:215-219.
- Xu DH(徐定华), Zhang XR(张晓蓉), Chen GX(陈功)

锡). Variation of content of artemisic acid in different growth stages of *Artemisia annua*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35:1914-1917.

- Wang MY(王满元), Zhang D(张东), Li ZX(李朝霞). Targeted separation and determination of arteannuin acid in *Artemisia annua* growing in Beijing. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2014, 20:48-51.
- Lévesque F, Seeberger PH. Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51:1706-1709.
- Fu YH(付彦辉), Zhong J(钟俊), Luo SQ(罗素琴), et al. Progress in the chemical synthesis of artemisinin. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2014, 49:795-805.
- Ro DK, Eric M, Paradise EM, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440:940-943.
- Sun JQ(孙建强), Wang W(王伟), Cheng KD(程克棣), et al. Research progresses in synthetic biology of artemisinin. *Acta Pharma Sin* (药学学报), 2013, 48:193-205.
- Zhang WB(张万斌), Liu DL(刘德龙), Yuan QJ(袁乾家). A preparing process of artemisinin from artemisinic acid (P. R. China), 10271-877. 3. 2012-10-10.
- Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semisynthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496:528-532.
- Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109:111-118.
- Acton N, Roth RJ. On the conversion of dihydroartemisinic acid into artemisinin. *J Org Chem*, 1992, 57:3610-3614.
- Kong J, Yang Y, Wang W, et al. Artemisinic acid: A promising molecule potentially suitable for the semi-synthesis of artemisinin. *RSC Adv*, 2013, 3:7622-7641.
- Sun DH(孙东红), Shang GH(尚光华). Extraction process of artemisic acid and dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* Mutterlauge. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2015, 46:149-151.