

超声强化溴化 1-乙基-3-甲基咪唑从黄花蒿中提取青蒿素

夏禹杰^{1,2}, 曾建立^{1,2}, 赵兵¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用超声强化[emim]Br(溴化 1-乙基-3-甲基咪唑)-水体系从黄花蒿粉末中提取青蒿素. 正交实验和单因素实验结果表明, 影响黄花蒿中青蒿素提取因素的显著性次序为液固比>提取时间>提取温度>超声波功率>占空比. 综合考虑单因素实验结果及成本, 得出优化工艺条件为黄花蒿原料粒度 0.38 mm, 液固比 50 mL/g, 提取时间 30 min, 提取温度 20℃, 超声波功率 600 W, 占空比 1.6 s/0.4 s. 在上述条件下青蒿素提取量为 4.37 mg/g, 提取率为 97%.

关键词: 青蒿素; 黄花蒿; 溴化 1-乙基-3-甲基咪唑; 超声强化提取

中图分类号: TQ033

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2008)04-0774-05

1 前言

青蒿素(Artemisinin)是从黄花蒿(*Artemisia annual* L.)中分离得到的抗疟有效单体, 是含有过氧基团的新型倍半萜内酯化合物^[1]. 目前提取青蒿素的主要方法是利用汽油、石油醚、6#溶剂油(主要成分为正己烷)等易燃、易爆、挥发性有机溶剂对黄花蒿进行反复浸提. 离子液体(Ionic liquid)是由有机阳离子和无机阴离子组成、室温下呈液态的盐类化合物, 其主要特点是几乎没有蒸汽压、热稳定性和化学稳定性好、无可燃性、能溶解大多数无机物、金属配合物、有机和高分子材料^[2,3]. 因此, 离子液体在替代传统易燃、易爆及挥发性有机溶剂方面具有潜力.

目前已有咪唑类离子液体溶解有机物和提取天然产物的报道. 李闲等^[4]考察了疏水性咪唑离子液体对酚类物质的溶解性, 结果表明该类离子液体溶解酚类物质与传统有机溶剂相当. Huddleston 等^[5]研究了芳香族化合物在几种咪唑离子液体中的溶解性, 证明离子液体有望代替挥发性有机溶剂. Gu 等^[6]利用亲水性氯化 1-甲基-3-丁基咪唑提取分离牛磺酸, 发现离子液体中阳离子对牛磺酸溶解性有较强影响, 咪唑环上取代基加长和引入羟基均不利于牛磺酸溶解. Phillips 等^[7]利用亲水的咪唑氯盐提取蚕丝纤维取得较好效果, 进一步推测是阴离子 Cl⁻容易与纤维素形成氢键而使其溶解.

为使用离子液体提取黄花蒿中的青蒿素, 并利用有机溶剂萃取富集青蒿素, 要求离子液体亲水并能与易溶解青蒿素的乙酸乙酯分相. 本工作筛选得到了满足上述条件的亲水性咪唑类离子液体—溴化 1-乙基-3-甲基咪唑[emim]Br. [emim]Br 已初步实现工业化生产, 且具

有以下特点: 可与水相互溶, 有利于与黄花蒿原料充分混合; 熔点在同类水溶性离子液体中较低, 利于生产操作; 能与乙酸乙酯分相, 可利用乙酸乙酯进行萃取富集青蒿素, 有利于实现青蒿素的初步纯化和离子液体的再生. 本工作首次将咪唑类离子液体[emim]Br 用于从黄花蒿粉末中提取青蒿素, 并对超声强化[emim]Br-水体系提取黄花蒿粉末中的青蒿素进行了系统研究.

2 实验

2.1 实验材料

黄花蒿原料(遵义山林植物化工有限公司提供), 青蒿素标准品(中国药品生物制品检定所, 纯度≥99%), [emim]Br(本实验采用一步法制备^[8]), 石油醚(30~60℃)、无水乙醇、氢氧化钠、冰醋酸均为分析纯.

2.2 实验设备

8002 型恒温水浴控制器(余姚明伟仪表厂), 120D 超声波发生器(北京弘祥隆生物技术开发有限公司), LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司).

2.3 实验装置

超声波强化提取装置如图 1 所示, 包括恒温控制系统、水浴、超声波换能器及超声波控制系统.

2.4 实验方法

2.4.1 [emim]Br-水体系组成预实验

[emim]Br 较粘稠, 为了使其与黄花蒿粉末充分混合, 加入与其互溶的水. 水本身不易挥发、不易燃且基本不溶解青蒿素, 水的加入没有改变[emim]Br 的特性, 只是改善了离子液体体系与黄花蒿粉末的混合效果. 表 1 显示了不同[emim]Br 与水的比例对其与黄花蒿粉末混

合效果的影响。在[emim]Br 与水体积比达到 1:4 时黄花蒿粉末可以与其达到较好的混合效果, 且不发生凝聚。所以选择[emim]Br 与水体积比为 1:4。

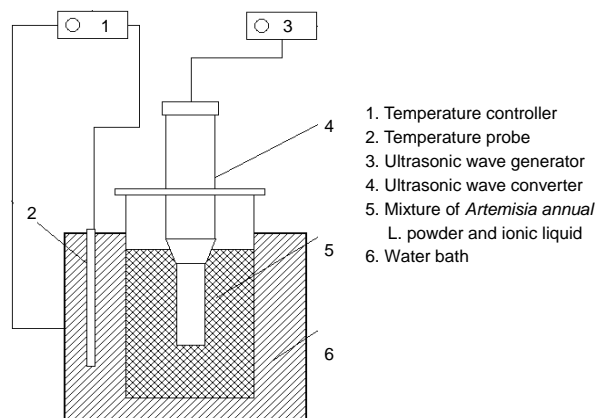


图 1 实验装置图

Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus

表 1 离子液体[emim]Br/水体积比与黄花蒿粉末混合效果

Table 1 The mixing effect of *Artemisia annua* L. powder in ionic liquid system with different volume ratios of [emim]Br to water

[emim]Br: water (φ)	Mixing phenomenon
1:1	<i>Artemisia annua</i> L. powder stayed at the surface of liquid phase and did not infiltrate into liquid phase.
1:2	<i>Artemisia annua</i> L. powder was partially mixed in liquid phase, and the coagulating phenomenon of powder particles was obvious.
1:3	<i>Artemisia annua</i> L. powder infiltrated into liquid phase, but was not well dispersed, the coagulating phenomenon of powder particles was obvious.
1:4	<i>Artemisia annua</i> L. powder was completely mixed in liquid phase and well dispersed, the coagulating phenomenon of powder particles was vanished.
1:5	<i>Artemisia annua</i> L. powder was well dispersed in liquid phase, the powder particles settled down, powder particles did not coagulate.

2.5.2 高效液相色谱条件

色谱柱: 迪马 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温[(25±1)°C], 流动相为甲醇-0.01 mol/L 醋酸钠/醋酸缓冲液(60:40, pH=5.9), 流速 0.5 mL/min, 检测波长 260 nm, 进样量 20 μL。

3 结果与讨论

3.1 原料含量

用石油醚 200 mL 对 2 g 黄花蒿粉末(40 目, 0.38 mm) 进行索氏提取 8 h. 提取液挥发去石油醚后, 再用乙醇溶解, 分析得到青蒿素提取量为 4.49 mg/g, 以此作为原料黄花蒿中青蒿素的含量。

3.2 正交实验

采用 L₁₆(4⁵) 正交表设计不同提取条件下的青蒿素提取实验。超声提取因素分别为超声提取时间、超声功率、提取温度、占空比(工作时间/间歇时间)和液固比,

2.4.2 离子液体-水体系提取黄花蒿粉末中青蒿素

黄花蒿粉末与[emim]Br-水(体积比 1:4)提取液置于 250 mL 烧杯中, 超声波换能器伸入混合液中, 并将整个烧杯置于恒温水浴中。选择不同条件提取黄花蒿中青蒿素, 提取结束后 4000 r/min 离心 5 min, 过滤, 测定滤液体积, 高效液相色谱检测滤液中青蒿素浓度。

2.5 分析方法

2.5.1 分析原理

青蒿素本身没有较强的紫外吸收峰, 但与 0.2% NaOH 溶液在 50 °C 恒温水浴下反应 30 min, 用醋酸调节 pH 至 5.58~6.04 的条件下可以生成在 260 nm 有强紫外吸收峰的物质(Q260)^[9-11], 利用 Q260 可以进行青蒿素定量分析。离子液体体系中青蒿素检测及索氏提取后青蒿素检测采用不同标准曲线, 前者利用外标法直接检测离子液体体系中青蒿素含量, 后者挥发石油醚后, 将提取物溶于甲醇或乙醇, 用外标法进行检测^[12,13]。

见表 2, 正交实验结果见表 3。

对正交实验进行直观分析和方差分析, 结果表明只有液固比影响显著, 其他因素影响不显著, 需进一步进行单因素实验。根据直观分析初步确定最优工艺组合为 A₃B₄C₄D₂E₄。通过方差分析可以确定影响离子液体体系中青蒿素提取量的显著性次序为液固比>提取时间>提取温度>超声波功率>占空比。

3.3 单因素实验

液固比是影响最终离子液体体系中青蒿素含量的最主要因素。从直观分析可以看出液固比越大, 提取出的青蒿素越多, 但成本也越大, 所以需要选择合适的液固比。综合青蒿素提取率与成本, 改变液固比, 其他因素采用正交优化组合 B₄C₄D₂E₄, 单因素实验结果如图 2 所示。液固比为 10~50 mL/g 阶段青蒿素提取率增加明显, 液固比为 50~70 mL/g 阶段青蒿素提取率增加较缓。从实际应用的角度考虑, 液固比为 50 mL/g 较理想。

表 2 正交实验因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments L₁₆(4⁵) of artemisinin extraction in [emim]Br-water system

Level	Extraction time, A (min)	Ultrasonic wave power, B (W)	Water-bath temperature, C (°C)	Duty ratio, D (s/s)	Liquid/solid, E (mL/g)
1	10	400	20	1.5/0.5	10
2	20	600	30	1.6/0.4	30
3	30	800	40	1.7/0.3	50
4	40	1000	50	1.8/0.2	70

表3 [emim]Br-水体系青蒿素提取率
Table 3 Extraction rate of artemisinin in [emim]Br-water system

No.	A	B	C	D	E	Extraction rate (%)
1	1	1	1	1	1	32.56
2	1	2	2	2	2	62.53
3	1	3	3	3	3	64.86
4	1	4	4	4	4	97.99
5	2	1	2	3	4	97.96
6	2	2	1	4	3	83.52
7	2	3	4	1	2	71.08
8	2	4	3	2	1	41.64
9	3	1	3	4	2	72.20
10	3	2	4	3	1	44.63
11	3	3	1	2	4	97.28
12	3	4	2	1	3	90.22
13	4	1	4	2	3	87.14
14	4	2	3	1	4	93.84
15	4	3	2	4	1	33.56
16	4	4	1	3	2	62.25

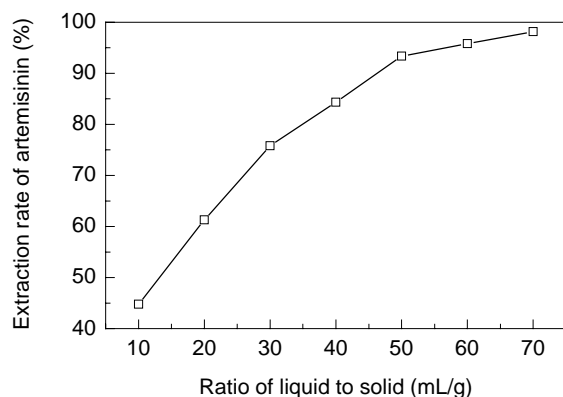


图2 液固比对青蒿素提取率的影响
Fig.2 Influence of ratio of liquid to solid on the extraction rate of artemisinin

超声提取时间单因素实验结果见图3. 提取时间10~30 min时, 青蒿素提取率随提取时间增加而增加; 30 min后, 提取率略微下降. 这是因为青蒿素为含过氧基团的倍半萜内酯, 过长的超声作用时间可能导致青蒿素过氧桥等结构断裂, 使青蒿素提取率下降.

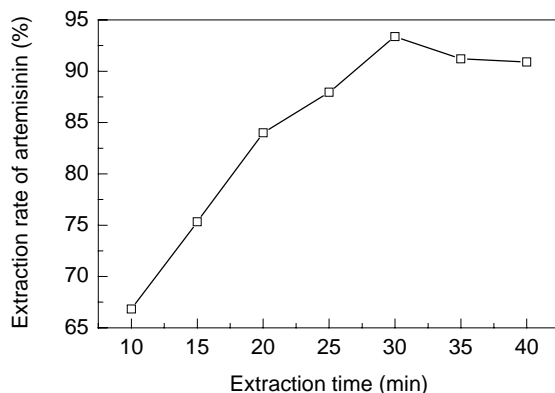


图3 提取时间对青蒿素提取率的影响
Fig.3 Influence of extraction time on the extraction rate

提取温度对青蒿素提取的影响见图4, 表明提取温度在20~50℃之间对提取率影响不明显. 考虑到青蒿素属于热敏物质, 在55℃以上时会发生分解^[14], 采用常温提取即可.

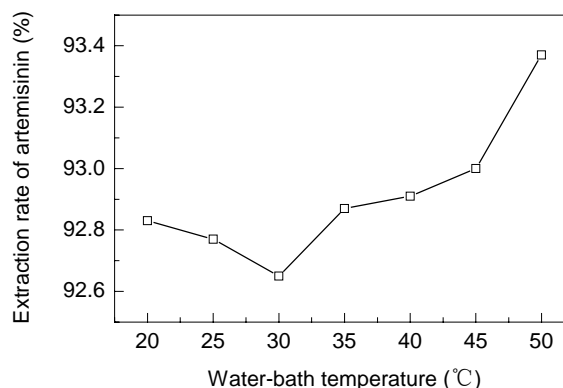


图4 提取温度对青蒿素提取率的影响
Fig.4 Influence of water-bath temperature on the extraction rate of artemisinin

超声波功率和占空比对青蒿素提取率的影响结果见图5, 6. 在超声波功率0~600 W的条件下, 超声波功率越大, 青蒿素提取率越高. 在实验条件下, 超声波功率为600 W较适宜. 占空比对青蒿素提取率的影响不明显, 实验条件下适宜的占空比为1.6 s/0.4 s.

在液固比50 mL/g、提取时间30 min、提取温度20℃、提取功率600 W、占空比1.6 s/0.4 s的条件下, 进一步考察了黄花蒿原料粒度对青蒿素提取率的影响, 结果如图7所示. 原料粒度在10~40目(1.7~0.38 mm)内, 随着粒度的减小, 青蒿素提取率快速增加, 超过40目(0.38 mm)后, 青蒿素提取率基本保持不变. 实验条件下, 适宜的原料粒度为40目(0.38 mm).

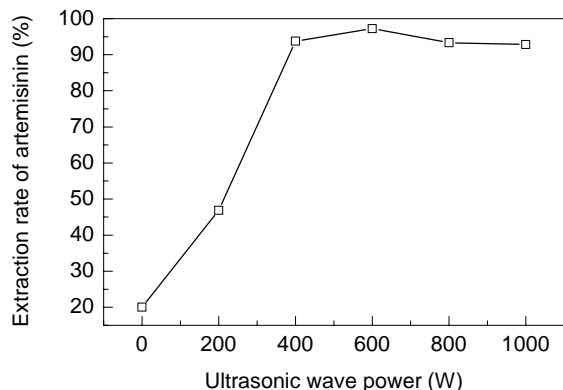


图5 超声波功率对青蒿素提取的影响

Fig.5 Influence of ultrasonic wave power on the extraction rate

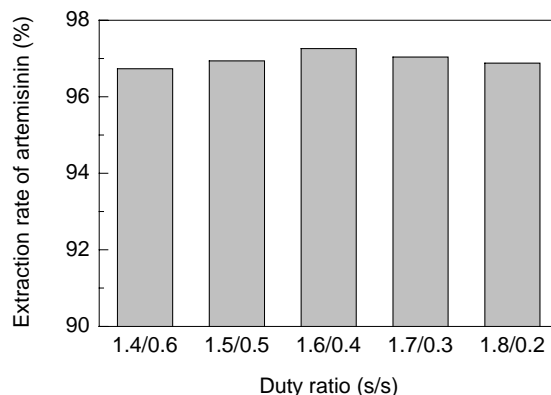


图6 占空比对青蒿素提取率的影响

Fig.6 Influence of duty ratio on the extraction rate

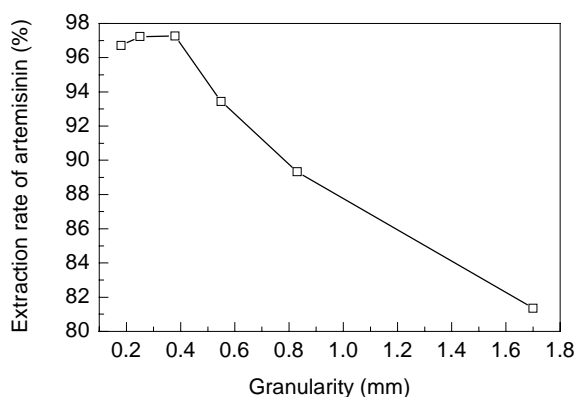


图7 黄花蒿粒度对青蒿素提取率的影响

Fig.7 Influence of *Artemisia annual* L. granularity on the extraction rate of artemisinin

由实验得到的优化工艺条件为: 黄花蒿粉末粒度 0.38 mm, 液固比 50 mL/g, 提取时间 30 min, 提取温度 20 °C, 提取功率 600 W, 占空比 1.6 s/0.4 s. 该条件下黄花蒿中青蒿素提取量为 4.37 mg/g, 提取率为 97%.

传统青蒿素超声提取使用石油醚为提取剂, 青蒿素提取率为 80%~90%^[15]. 与石油醚超声提取青蒿素相比, [emim]Br-水不能通过简单的蒸发溶剂实现溶剂的分离与回收, 需要用更易溶解青蒿素的溶剂萃取分离来实现青蒿素的富集分离与提取剂的再生, [emim]Br-水体系青蒿素提取率高, 无可燃性、挥发性, 对环境友好.

3.4 [emim]Br 超声强化提取青蒿素机理

咪唑类离子液体对许多大分子有机物和天然产物有一定的溶解性, 但随着阴阳离子的不同, 溶解性差异也较大. 咪唑环上取代基长度和特殊的结构对其溶解性产生较大影响, 取代基长度加长, 自身范德华力增加, 离子液体粘度增大, 不利于提取物溶解^[16]; 阴离子主要影响离子液体与水的互溶性, 目前研究表明卤族阴离子普遍具有亲水性, 而这方面的机理研究还有待深入. [emim]Br 属于水溶性粘度较低的咪唑类离子液体, 对倍

半萜内酯结构的青蒿素有溶解性, 而超声波的机械作用及空化作用^[17]能够促使青蒿素分子从破碎的黄花蒿细胞中快速传质到[emim]Br 提取液中.

4 结论

通过对超声强化[emim]Br-水体系提取黄花蒿中青蒿素的正交实验及相应单因素实验的研究, 得到以下结论:

(1) 影响黄花蒿中青蒿素提取的因素显著性次序为液固比>提取时间>提取温度>超声波功率>占空比.

(2) 在优化提取条件下(黄花蒿粉末粒度 0.38 mm, 液固比 50 mL/g, 提取时间 30 min, 提取温度 20 °C, 提取功率 600 W, 占空比 1.6 s/0.4 s), 原料中青蒿素提取率为 97%, 而传统石油醚超声提取法青蒿素提取率为 80%~90%.

参考文献:

- [1] Li Y. Experiences from Developing the New Antimalaria Drugs Artemisinin [J]. *Medicine abroad Plant Section*, 1999, 14(3): 102-107.
- [2] 邵媛, 邓宇. 离子液体的合成及其在萃取分离中的应用 [J]. *精细石油化工进展*, 2005, 6(11): 48-52.
- [3] Freire M G, Santos L M, Farnades A M, et al. An Overview of the Mutual Solubilities of Water-Imidazolium-based Ionic Liquids Systems [J]. *Fluid Phase Equilib.*, 2007, 261: 449-454.
- [4] 李闲, 张锁江, 张建敏, 等. 疏水性离子液体用于萃取酚类物质 [J]. *过程工程学报*, 2005, 5(2): 148-151.
- [5] Huddleston J G, Willauer H D, Rogers R D, et al. Room Temperature Ionic Liquids as Novel Media for 'Clean' Liquid-Liquid Extraction [J]. *Chem. Commun.*, 1998, 16: 1765-1766.
- [6] Gu Y L, Shi F, Yang H, et al. Leaching Separation of Taurine and Sodium Sulfate Solid Mixture Using Ionic Liquids [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2004, 35: 153-159.
- [7] Phillips D M, Drummy L F, Conrady D G, et al. Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids [J]. *Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(44): 14 350-14 351.
- [8] Nishida T, Tashiro Y, Yamamoto M. Physical and Electrochemical Properties of 1-Alkyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate for

- Electrolyte [J]. *J. Fluorine Chem.*, 2003, 120: 135–141.
- [9] Sahai P, Vishwakarma R A. HPLC–Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Antimalarial Drug Artemisinin [J]. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 3084–3087.
- [10] 赵世善, 曾美怡. 高效液相色谱法测定青蒿中的青蒿素 [J]. *药物分析杂志*, 1986, 6(1): 3–5.
- [11] 黄海滨, 岑家铭, 奉建芳. RP–HPLC 测定青蒿中青蒿素的含量 [J]. *广西大学学报*, 1994, 19(2): 194–196.
- [12] 惠玉虎, 何锦伟, 杨朝昆. HPLC–ELSD 法测定黄花蒿提取物中青蒿素 [J]. *中草药*, 2006, 37(7): 1020–1021.
- [13] Liu C Z, Zhao Y, Wang Y C. Artemisinin: Current State and Perspectives for Biotechnological Production of an Antimalarial Drug [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72: 11–20.
- [14] Liu C Z, Guo C, Wang Y C, et al. Comparison of Various Bioreactors on Growth and Artemisinin Biosynthesis of *Artemisia annual* L. Shoot Cultures [J]. *Process Biochem.*, 2003, 39: 45–49.
- [15] 赵兵, 王玉春, 吴江, 等. 超声波用于强化石油醚提取青蒿素 [J]. *化工冶金*, 2000, 21(3): 310–313.
- [16] 张锁江, 吕兴梅, 刘志平, 等. 离子液体—从基础研究到工业应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2006. 109–112.
- [17] 应崇福. 超声学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1990. 507–512.

Extraction of Artemisinin from *Artemisia annual* L. with 1-Ethyl-3-methylimidazolium Bromide Enhanced by Ultrasonic Wave

XIA Yu-jie^{1,2}, ZENG Jian-li^{1,2}, ZHAO Bing¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Extraction of artemisinin from *Artemisia annual* L. using ionic liquid [emim]Br (1-ethyl-3-methylimidazolium bromide)–water system enhanced by ultrasonic wave was investigated. Through orthogonal and single factor experiments, the results showed that the sequence of notability of artemisinin extraction factors was: liquid-to-solid ratio > extraction time > extraction temperature > ultrasonic wave power > duty ratio. Comprehensively considering single factor experiments and production cost, the optimum extraction conditions were obtained as *Artemisia annual* L. granularity at 0.38 mm, liquid-to-solid ratio 50 mL/g, extraction time 30 min, extraction temperature 20 °C, ultrasonic wave power 600 W and duty ratio 1.6 s/0.4 s. Under the above conditions, the extraction amount of artemisinin was 4.37 mg/g and the extraction rate 97%.

Key words: artemisinin; *Artemisia annual* L.; 1-ethyl-3-methylimidazolium bromide; ultrasonic wave enhanced extraction