

正交设计-紫外分光光度法测定青蒿中的青蒿素^①

魏增云 陈金娥^a 王迎进^a 张海容^{②a}

(山西省忻州职业技术学院基础部 山西省忻州市开发区学院路 1 号 034000)

^a(山西省忻州师范学院生化分析技术研究所 山西省忻州市和平西街 10 号 034000)

摘要 以干青蒿叶为原料, 考察石油醚萃取青蒿素的工艺条件, 如温度、时间、溶剂量及超声功率等因素, 正交法确定了最佳萃取工艺条件为温度 40℃, 超声功率 90W, 时间 20min (两次), 液固比 120:1 (mL·g⁻¹)。紫外分光光度法直接测定不同产地青蒿中青蒿素的含量, 结果表明: 用超声波强化石油醚萃取青蒿素与常规浸泡法石油醚萃取比较, 用超声波可以大大缩短萃取时间, 提高了萃取率。

关键词 正交设计; 青蒿素; 萃取; 超声波; 紫外分光光度法

中图分类号: O657.32; TQ461

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-1297-05

1 引言

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。到目前提取和测定青蒿素的方法有^[1-8]: 浸泡法、微波辅助萃取法、超临界二氧化碳法、加热搅拌法、超声波强化石油醚萃取法; 检测青蒿素的方法有: 碘量法、柱层析重量法、薄层层析扫描法、高效液相色谱法、气相色谱法及薄层层析-紫外分光光度法。本文用正交法确定了超声波萃取青蒿素的优化条件, 尝试直接用紫外分光光度法测定青蒿素的含量, 方法具有简便、迅速、灵敏度高等特点。通过测定不同产地青蒿素的含量, 为进一步提高青蒿素资源的利用率提供了依据。

2 实验部分

2.1 实验原料

5 种青蒿素来源: 忻州本地 1(芦野), 忻州本地 2(曹张), 忻州本地 3(外地种子, 温室种植), 外地 1(湖南), 外地 2(北京)。洗净晒干, 在烘箱中 50℃ 烘干, 用食用粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 装瓶待用。

2.2 主要试剂与仪器

青蒿素标准品 (AR, 美国 Sigma 公司); 甲醇、石油醚、甲苯 (分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 氢氧化钠 (分析纯, 天津市北辰方正试剂厂)。

UV-2550 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); KQ-100DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

① 山西省留学回国人员科技活动项目 (山西省人力资源与社会保障厅, 201097-10)

② 联系人, 手机: (0) 13453005076; E-mail: hairong1015@163.com

作者简介: 魏增云 (1975-), 男, 山西省繁峙县人, 讲师, 本科, 主要研究方向为天然植物分离及分析。

收稿日期: 2010-09-14; 接受日期: 2010-10-13

2.3 实验方法

样品处理及测定: 准确称取 0.5g 青蒿样品, 用石油醚作萃取剂进行萃取, 萃取结束时, 过滤, 将不同的萃取液分别全部转移至 100mL 容量瓶中, 并用萃取剂定容。取 5 支 10mL 的比色管, 分别转移不同青蒿素萃取液 2mL, 以 0.2% NaOH 乙醇溶液定容, 在 $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温 30min, 同时超声振荡 15min, 迅速用冷水冷至室温, 静置后, 弃去上层有机层, 在最大吸收波长 291nm 处测定不同产地的青蒿素萃取液的吸光度值, 并计算青蒿素的含量。

2.4 校准曲线

准确称取青蒿素标准品 0.1g 置小烧杯中用 95% 乙醇溶解, 转移至 100mL 容量瓶, 95% 乙醇稀释至刻度。分别吸取 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9mL 分别置于 10 只 50mL 容量瓶中, 并按顺序加入 95% 乙醇 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1mL, 各以 0.2% NaOH 溶液定容, 摇匀, 置 $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴中反应 30min, 流水冷却至室温。以试剂空白作参比, 置石英比色皿中, 在最大吸收波长处测得紫外吸光度值 A , 线性回归方程 $A = 0.0428C + 0.0739$ (C ——青蒿素的浓度, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 相关系数为 0.999。

2.5 单因素实验与正交优化设计

分别对超声时间、超声功率、温度及溶剂量等因素进行了考察。正交法确定超声波萃取青蒿素工艺条件: 选取了温度、时间、超声波功率、液固比这 4 个因素, 运用正交法确定超声波萃取青蒿素的优化条件(见表 1)。

表 1 超声波萃取青蒿素正交设计 $L_9(3^4)$

水平	温度($^\circ\text{C}$)	功率(W)	液固比(mL/g)	时间(min)
1	40	70	60 : 1	5
2	45	80	80 : 1	15
3	50	90	120 : 1	20

3 结果及讨论

3.1 青蒿素标准品的紫外吸收

青蒿素标准品的紫外吸收图谱见图 1, 由图 1 知, 青蒿素的最大吸收波长为 290nm。

3.2 萃取剂的选择

选取甲醇、乙醇、丙酮、甲苯、乙醚、石油醚作萃取剂萃取青蒿素, 在紫外范围 200—400nm 内扫描吸收波长, 并计算青蒿素的含量。结果表明: 选取石油醚作萃取剂, 波形规则, 干扰情况少, 萃取率优于其他溶剂。重要的是除了石油醚, 其他溶剂在经过一系列步骤后, 静置, 不分层, 因此选用石油醚作萃取剂。

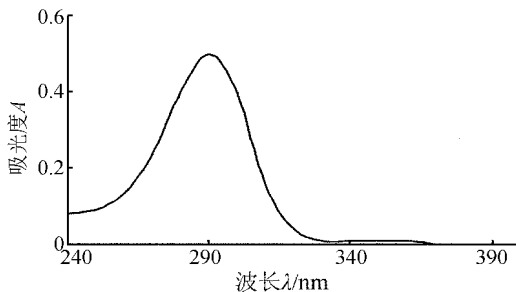


图 1 青蒿素标准品的紫外吸收

3.3 单因素实验

3.3.1 超声波强度对萃取率的影响

准确称取 0.5g 青蒿样品 5 份, 分别放入 5 个三角烧瓶中, 在温度 25°C , 液固比 80 : 1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$), 超声功率分别为 50、60、70、80、90W 的条件下超声萃取 15min, 然后静置 10 分, 再超声 15min, 结果见图 2。由图 2 知, 在功率 90W 的条件下青蒿素萃取率最高, 故选择超声功率 90W。

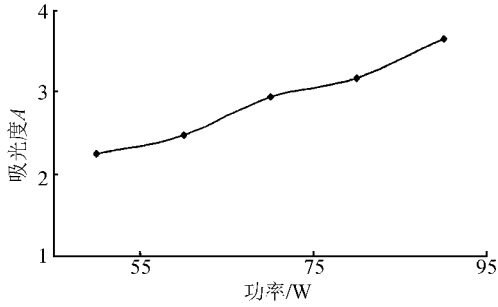


图 2 超声功率的影响

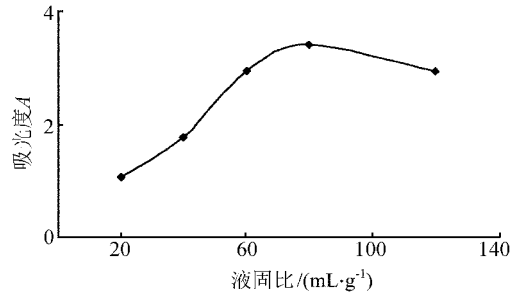


图 3 液固比的影响

3.3.2 液固比的影响

准确称取 0.5g 青蒿样品 5 份, 分别放入 5 个三角烧瓶中, 在温度 25℃, 超声功率 90W, 液固比 (mL/g) 分别为 20:1、40:1、60:1、80:1、120:1 (mL·g⁻¹) 的条件下超声 15min, 然后静置 10min, 再超声 15min, 结果见图 3。由图 3 知, 在液固比为 80:1 的条件下青蒿素萃取率最高, 故选择液固比为 80:1 (mL·g⁻¹)。

3.3.3 超声时间影响

准确称取 0.5g 青蒿样品 5 份, 分别放入 5 个三角烧瓶中, 在已获得的优化条件下, 即功率为 90W, 液固比为 80:1 (mL·g⁻¹), 分别超声萃取 5, 10, 15, 20, 25min 两次, 结果见图 4。在超声时间为 20min 两次的条件下青蒿素萃取率最高, 故选择超声时间为 20min 两次。

3.3.4 温度的影响

准确称取 0.5g 青蒿样品 7 份, 分别放入 7 个三角烧瓶中, 按上述选定的优化条件, 分别在温度为 30、35、40、45、50、55、60℃ 的条件下超声, 结果见图 5。由图 5 知, 在超声温度为 50℃ 时, 青蒿素萃取率最高, 故选择超声 50℃。

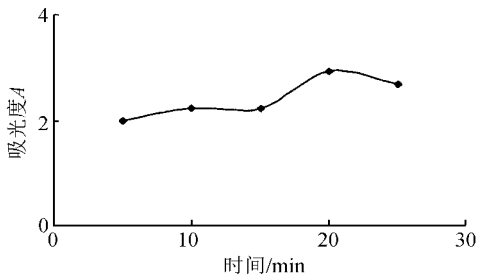


图 4 超声时间影响

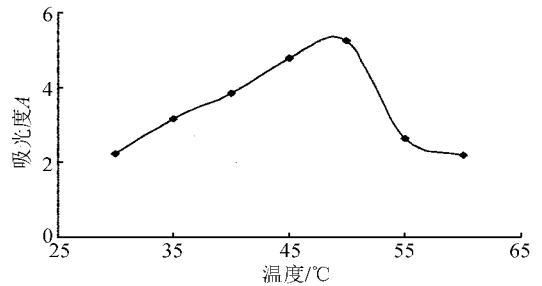


图 5 温度的影响

3.4 正交试验

在单因素实验的基础上, 按表 1 影响因子及水平进行实验, 测定结果见表 2。

由极差分析可得各影响因素影响力的大小顺序为: 温度 > 液固比 > 功率 > 时间, 即温度对青蒿素的萃取影响最大, 液固比次之, 时间最小, 由极差分析可得正交试验的最优条件为: 温度 40℃, 液固比 120:1 (mL·g⁻¹), 超声功率 90W, 时间 20min (两次)。

3.5 超声萃取法与浸提法比较

在超声萃取的优化条件下和上述提到的浸提法, 分别萃取了多个不同产地青蒿素样品, 结果见

表 3。由表 3 可知, (1) 浸提法和超声法萃取不同产地的青蒿素, 超声萃取法的青蒿素的含量明显高于浸提法的含量, (2) 人工种植的青蒿中青蒿素的含量较野生青蒿中青蒿素的含量高, 因此生长条件对青蒿素的含量有一定的影响。

表 2 正交试验结果

水平	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	功率 (W)	时间 (min)	液固比 (mL/g)	浓度 $\times 10^3$ (mg/mL)
1	40	70	5	60:1	1.077
2	40	80	15	80:1	2.245
3	40	90	20	120:1	3.881
4	45	70	15	120:1	1.077
5	45	80	20	60:1	0.844
6	45	90	5	80:1	1.311
7	50	70	20	80:1	1.311
8	50	80	5	120:1	1.544
9	50	90	15	60:1	1.077
$K_1 \times 10^3$	2.401	1.155	1.311	0.999	
$K_2 \times 10^3$	1.077	1.545	1.466	1.622	
$K_3 \times 10^3$	1.311	2.09	2.012	2.167	
$R \times 10^3$	1.324	0.0935	0.0701	1.168	

表 3 不同产地青蒿素中的青蒿素含量

(%)

产地	含量	
	超声萃取	浸提法
忻州 1	0.55	0.29
忻州 2	0.48	0.18
忻州 3	1.00	0.32
外地 1	0.29	0.09
外地 2	0.34	0.11

4 结论

利用超声波强化石油醚萃取青蒿素与常规浸泡法比较, 超声波萃取青蒿素是一种较为简便、快速、节省能源的萃取方法; 这是因为超声波萃取主要是利用超声波破碎细胞(空化作用)和强化传质(机械作用), 且节省能量, 为进一步工业化开发和利用青蒿素这一自然资源提供了一定的参考依据。

参考文献

- [1] 梁成钦, 苏小建, 李俊等. 超声波萃取-薄层扫描快速测定青蒿中青蒿素含量的研究[J]. 大众科技, 2004, (8): 27-28.
- [2] 张积强, 陈强, 刘宗怀等. 青蒿中青蒿素含量的测定[J]. 陕西化工, 1996, (3): 34-35.
- [3] 张积强, 陈强. 青蒿素的提取、分离和测定[J]. 宝鸡文理学院学报, 1999, 19(1): 47-48.
- [4] 郝金玉, 韩伟, 施超欧. 黄花蒿中青蒿素的微波辅助萃取[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(8): 358-359.
- [5] 赵兵, 王玉春, 吴江. 超声波用于强化石油醚提取青蒿素[J]. 化工冶金, 2000, (21): 310-313.
- [6] 张海容, 张娜. 超声萃取-紫外分光光度法测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 414-416.
- [7] 邓素兰, 茶继宏, 毛丽梅. 青蒿中青蒿素的提取分离研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(5): 31-34.

[8] 李伟, 石崇荣. 青蒿素研究进展[J]. 中国药房, 2003, 14(2): 118—119.

Determination of Artemisinin in *Artemisia Annuua L.* by UV Spectrophotometry with Orthogonal Design

WEI Zeng-Yun CHEN Jin-E^a WANG Ying-Jin^a ZHANG Hai-Rong^a

(College of Xinzhou Occupation Technology, Xinzhou, Shanxi 034000, P. R. China)

^a(Institute of Biochemical Analysis, Xinzhou Teacher's University, Xinzhou, Shanxi 034000, P. R. China)

Abstract The technology conditions, such as temperature, time of extraction, amount of solvents and supersonic power, for extraction artemisinin by petroleum ether were investigated with dry leaves of *Artemisia annua L.* as raw material. The optimal extraction conditions were determined by orthogonal design as follow: temperature of 40°C, extraction time of 20min for twice, the ratio of liquid to solid of 120 : 1(mL · g⁻¹) and supersonic power of 90W. The contents of artemisinin in *Artemisia annua L.* from different areas were detected by UV spectrophotometry. Compared to usual extraction method by solvent of petroleum ether, the supersonic intensifying petroleum ether method for extraction artemisinin has short extracting time and improves the extraction yield.

Key words Orthogonal Design; Artemisinin; Extraction; Ultrasonic Wave; UV Spectrophotometry

这真是令人啼笑皆非
——由重大发明写成的论文被判为“没有发表价值”

欢迎作者将被他刊拒绝的佳作再投本刊

在物理学的科技成就中, 激光可算是仅次于核能的 1 项重大发明创造。第 1 台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼(见本刊《邮票上的科学家——佼佼者之路》一书中之 M4)发明的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文, 理由是: 这是微波激光物理方面的文章, 对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着, 梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志, 这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来, 梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训, 本刊收到的论文, 即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突, 只要是言之有理, 也给予发表。因为“仁者见之谓之仁, 智者见之谓之智”(《周易·系辞上》), 不同人从不同角度看问题, 难免不同。我们欢迎作者将被他刊判为“没有发表价值”的佳作, 再投本刊。

繁荣学术交流事业, 需要“宽容”精神!

光谱实验室编辑部