

科教融合推动本硕贯通实验课程的建设 ——以黄花蒿中青蒿素的提取、分离与鉴定实验为例

胡水, 李厚金*, 臧真明, 李莲云, 赖璐

中山大学化学学院, 广州 510006

摘要: 科学仪器在科学研究和实验教学中发挥着重要作用, 推动着科技创新。本文将青蒿素提取与鉴定实验加以改进, 作为本硕贯通实验项目。实验过程中引入并应用现代仪器原理提取黄花蒿中的有效成分, 测定青蒿素含量, 纯化青蒿素, 分析青蒿素结构。将天然产品的提取、分析、分离和鉴定结合起来, 提高了学生学习兴趣, 学习了天然产物的前沿实验技术, 培养了创新意识, 训练了科研思维。

关键词: 科教融合; 本硕贯通; 天然产物实验

中图分类号: G64; O6

Integration of Science and Education Promotes the Construction of Undergraduate-to-Master's Integration Experimental Courses: A Case Study on the Extraction, Separation and Identification of Artemisinin from *Artemisia annua*

Shui Hu, Houjin Li*, Zhenming Zang, Lianyun Li, Rong Lai

School of Chemistry, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China.

Abstract: Scientific instruments play a crucial role in both scientific research and experimental teaching, driving technological innovation. This paper presents an optimized experiment on the extraction, isolation and identification of artemisinin, designed as a seamless undergraduate-to-master's level experimental project. The process incorporates the use of modern instrument principles to extract active compounds from *Artemisia annua*, measure the content of artemisinin, purify it, and analyze its structure. It provides students with hands-on experience in advanced experimental techniques related to natural products, fosters their innovation and scientific research ability.

Key Words: Integration of science and education; Undergraduate-to-master's integration; Natural products experiment

教育部怀进鹏部长在“加快建设教育强国, 办好人民满意的教育”新闻发布会上指出, 要启动高等教育综合改革战略工程, 在提高人才培养质量、造就拔尖创新人才上先行先试, 实施好基础学科拔尖人才培养、卓越工程师和卓越医师培养等重大项目^[1]。传统的基础实验教学项目相对独立, 缺少与科研工作相似的连续、完整的实验流程, 不利于学生自主学习能力、创新思维能力的培养。且由于实验场地与教学经费的限制, 引入大型科学仪器存在困难, 大型科学仪器人均台套数不足, 学生缺少全部动手操作仪器的机会。本硕贯通的培养模式可以为学生提供更丰富的资源、更优质的

收稿: 2023-10-16; 录用: 2023-11-29; 网络发表: 2023-12-14

*通讯作者, Email: ceslhj@mail.sysu.edu.cn

基金资助: 中山大学2023年度校级教学质量工程项目; 广东省本科高校教学质量与教学改革工程项目(广东省课程教研室)

平台以及更宝贵的机遇,国家与学校对强基班本硕贯通模式提供大力支持,实验课程采用5-6人小班授课,为以上问题提供了有效的解决方法。

天然产物在生物医药、保健品、食品、化妆品等行业具有重要应用前景,最近20年来,天然产物领域的研究内容和研究技术发展非常迅速^[2]。目前各高校开展的传统的天然产物实验内容主要有:从茶叶中提取咖啡因、绿色植物色素的提取及色谱分离等,涉及的主要实验操作技术有:回流提取、索氏提取、普通蒸馏、水蒸气蒸馏、旋转蒸发、升华、柱色谱、薄层色谱等^[3]。显然,目前的天然产物实验教学内容与实际科研和应用脱节,无法满足卓越人才培养的需求,开发出新的、跟得上时代的天然产物实验具有重要的现实意义。

实验课程为课程思政提供具有实践性的内容,让学生更加深刻地体会课程思政传递的价值观念,同时也更容易地将其融入进日常学习与生活中。我国科学家屠呦呦凭借发现青蒿素,改变青蒿素传统提取工艺的成就,创制新型抗疟药青蒿素和双氢青蒿素,挽救了全球数百万人的生命,成为我国首位诺贝尔生理学或医学奖获得者^[4]。将青蒿素引入课堂,更可以体会先辈的不易,青蒿素(图1)可作为重要的课程思政载体^[5],基于此我们在课程中引入了青蒿素系列实验。本文利用快速溶剂萃取仪对黄花蒿中的成分进行提取,并以高效液相色谱仪计算青蒿素提取率,采用循环制备液相色谱仪对提取液进行分离提纯,将最终分离得到的青蒿素样品进行核磁共振波谱及质谱分析。本实验融入了多种现代天然产物实验技术,具有明显的“两性一度”(高阶性、创新性、挑战度),适合作为本硕贯通实验课程。通过应用这些现代仪器,学生加强了对科学原理的理解,获得了使用先进科学工具的实践经验。此外,这种理论与实践相结合的教学方式还缩小了课堂教学中的抽象概念与实际应用之间的差距,培养了学生对科学知识相关性的深刻理解。

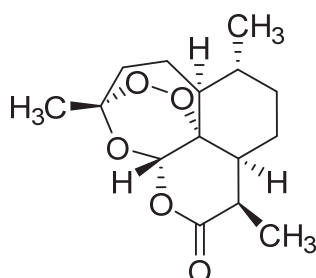


图1 青蒿素结构式

1 实验目的

- (1) 了解青蒿素的来源、结构、性质、以及药用价值;
- (2) 了解天然产物的提取、分离、纯化与结构鉴定的现代实验技术与方法;
- (3) 掌握高效液相色谱仪、循环制备液相色谱仪的分离原理,并运用该色谱技术从黄花蒿中分离纯化制备青蒿素;
- (4) 掌握高效液相色谱质谱联用仪、核磁共振波谱仪的原理,并对青蒿素的结构进行解析。

2 实验原理

青蒿素是一种无色针状晶体,不溶于水,受热、受潮易分解。青蒿素及其衍生物可以高效快速地清除疟原虫,治愈率可以达到80%以上,是目前疟疾治疗中具有良好效果的药物之一,而且毒性低,几乎所有恶性疟流行国家都在使用^[6]。青蒿素是从黄花蒿(*Artemisia annua*)里提取出来的,黄花蒿是双子叶蒿属一年生草本植物,它的生存环境简单,适应能力极强,在世界很多地方都有分布。黄花蒿中除了含青蒿素,还有双氢青蒿素、青蒿甲素、青蒿乙素、青蒿丙素(图2)以及精油、香豆素等,其中青蒿素含量为0.25%-3%之间,且不同部位含量不同,种子及叶片含量较为丰富^[7,8]。

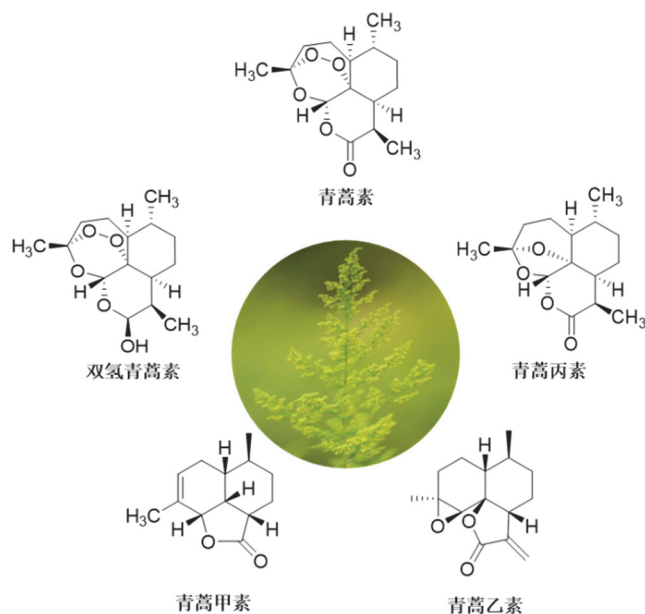


图2 黄花蒿中青蒿素及其衍生物的化学结构式

快速溶剂萃取法(Accelerated Solvent Extraction, 简称ASE)是一种在高温高压条件下利用有机溶剂提取化合物的固液萃取技术。由于青蒿素的水溶性较差,且由于结构中过氧键的存在,高温易断裂,所以溶剂选择有机溶剂且提取温度不宜过高。快速溶剂萃取法凭借缩短操作时间,减少溶剂用量,提高分析精度和降低制备成本等优势^[9],逐渐替代回流法、索氏提取法及超声波辅助法等传统方法^[10-12]。循环制备液相色谱是通过阀门切换使溶质色谱吸收带在单根色谱柱内循环流动从而实现延长“等效柱长”的技术(图3),常见于天然产物的分离。

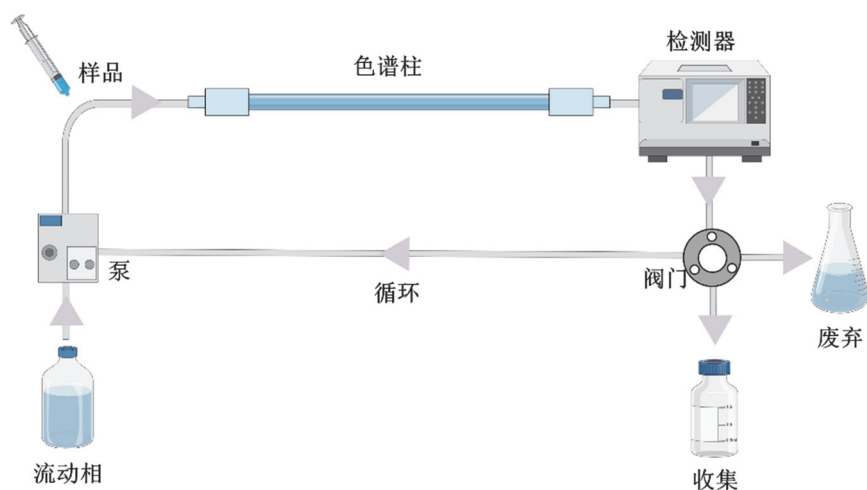


图3 循环制备液相色谱仪原理图

3 仪器与试剂

仪器: 电子分析天平(ME204E, METTLER TOLEDO公司, 美国)、快速溶剂萃取系统(ASE350, Thermo Fisher Scientific公司, 美国)、高效液相色谱仪(UltiMate3000, Thermo Fisher Scientific公司, 美国)、高效液相色谱质谱联用仪(ISQEC, Thermo Fisher Scientific公司, 美国)、循环制备液相色谱

仪(LaboACE LC-7080, JAI公司, 日本)、旋转蒸发仪(Hei-VAP Core ML G3, Heidolph公司, 德国)、核磁共振波谱仪(AVANCE III HD 400 MHz, Bruker公司, 德国)、水纯化系统(Milli-Q Direct8, Millipore SAS公司, 法国)。

试剂: 市售黄花蒿(产地河南)、氮气(99.99%)、石油醚(60–90 °C, 化学纯)、乙腈(色谱纯)、青蒿素(> 98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、氘代氯仿(美国CIL公司)。

4 实验部分

4.1 青蒿素的提取

分别选取乙酸乙酯、无水乙醇和石油醚3种溶剂进行提取, 对提取液进行对比发现乙酸乙酯和无水乙醇作为提取剂时, 提取液中有大量的色素存在, 影响下一步的分离提取, 因此, 结合文献^[13,14]与安全因素, 实验条件确定为34 mL萃取池中加入4 g黄花蒿粉末, 1 g硅藻土搅拌均匀, 以石油醚作为提取剂, 萃取池温度为120 °C, 压力为10.34 MPa, 重复提取次数为3次为教学开展的最佳条件。提取时间分别为10、15、20、25、30 min, 测量不同条件下青蒿素提取量并确定最优提取时间。

4.2 青蒿素的含量测定

将上述提取液 35 °C 旋转蒸发至干, 溶于乙腈过滤后定容至 50 mL, 经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为待测样品进行液相色谱测试, 测试条件: 液相色谱柱为 CAPCELL PAK C18, 250 × 4.6 mm, 柱温 25 °C, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL, 检测波长为 215 nm, 流动相为乙腈: 水 = 60:40 (体积比)。另分别称取青蒿素标样 0、5、10、15、20、25 mg, 稀释并定容至 50 mL, 分别进行液相色谱测试, 以溶液浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标进行线性拟合, 计算不同条件下青蒿素提取率, 得到最优条件。

4.3 青蒿素的纯化与鉴定

对最优条件下的提取物进行旋转蒸发浓缩, 所得产物加入约10 mL乙腈溶解、过滤, 以乙腈: 水 = 90:10 (体积比)作为流动相进行循环制备液相色谱纯化, 经过4次循环, 使青蒿素与其他杂质的色谱峰相分离, 最后得到青蒿素溶液, 旋转蒸发得到白色针状晶体8.7 mg。将所得样品溶于氘代氯仿中, 进行核磁共振波谱测试, 并进行质谱测试。实验流程如图4所示。

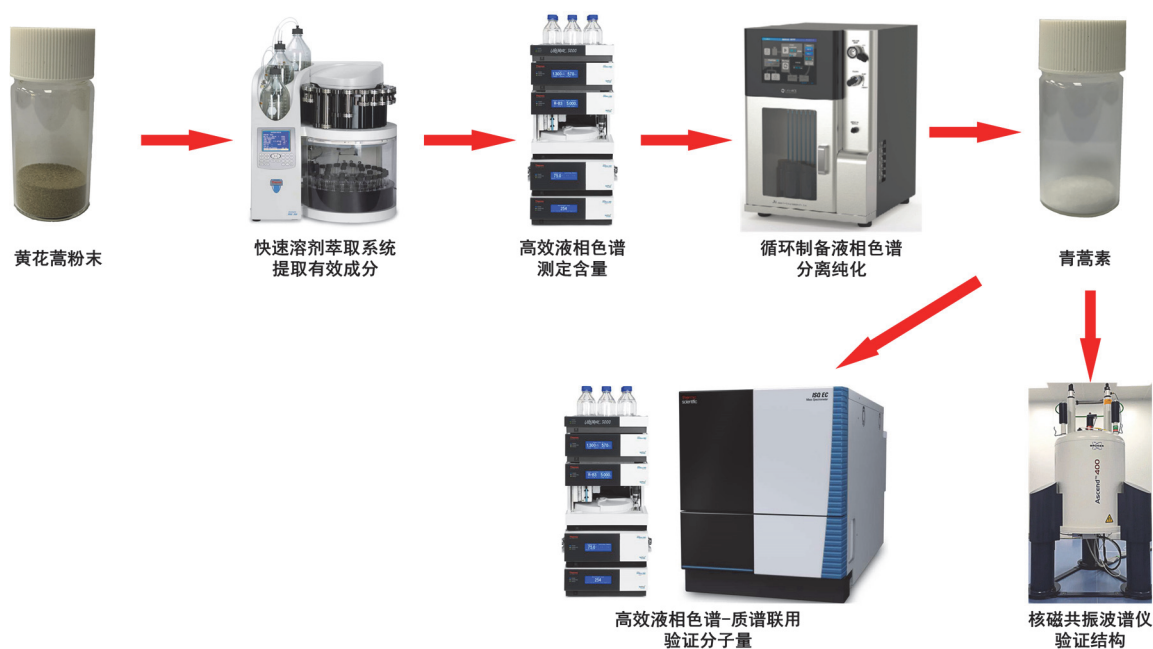


图4 实验方案流程图

5 结果与讨论

以石油醚作为提取剂,不同提取时间所得到青蒿素的含量如表1所示,可以得出时间为20 min时,得到的青蒿素含量最高。青蒿素浓度与峰面积关系详见表2,通过拟合计算可得到两者间关系式为 $Y=39.9X-0.0462$, $R^2=0.9999$,青蒿素保留时间 $t=22.72$ min (图5),计算得到最佳提取时间得到的青蒿素浓度为 $0.22\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,质量为10.88 mg,提取率约为2.7%。

表1 萃取时间对青蒿素提取的影响

溶剂	温度/ $^{\circ}\text{C}$	压力/MPa	重复次数	静态萃取时间/min	青蒿素峰面积/(mAU·min)
石油醚	120	10.34	3	10	7.5831
				15	8.2037
				20	8.6396
				25	7.7315
				30	5.2555

表2 青蒿素溶液浓度与高效液相色谱峰面积关系

质量/mg	体积/mL	浓度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	青蒿素峰面积/(mAU·min)
0	50	0	0
5	50	0.1	3.9556
10	50	0.2	7.8891
15	50	0.3	11.8465
20	50	0.4	15.9253
25	50	0.5	19.9569

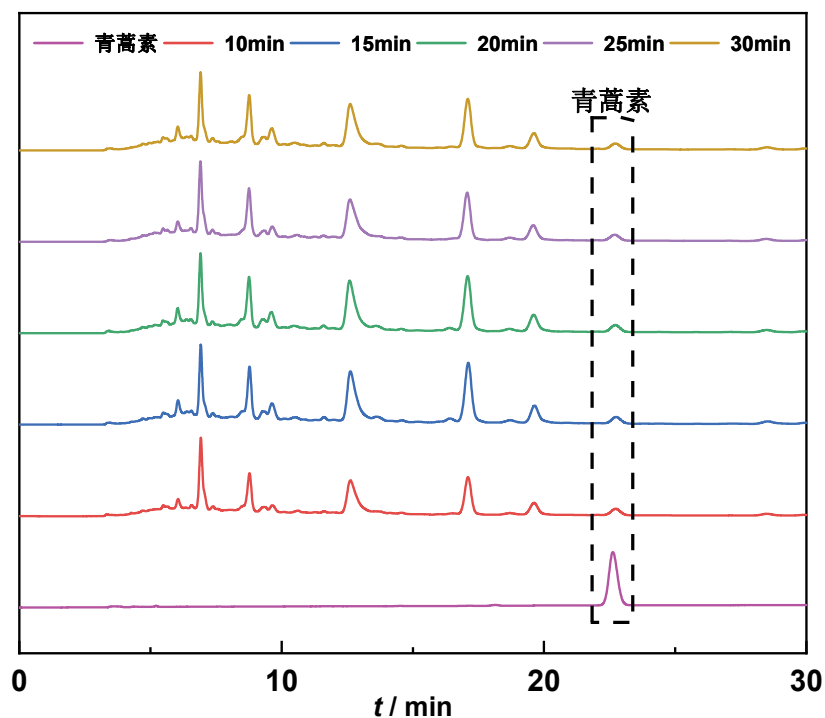


图5 不同条件下青蒿素提取液的高效液相色谱图

对上述提取时间为20 min的提取物以乙腈:水 = 90:10 (体积比)的比例溶解过滤后,经过循环制备色谱纯化,如图6所示,提前确定目标产物保留时间为35 min左右,对确定为杂质的组分进行废弃,避免多次循环后对目标产物有干扰,经过4次循环,目标产物与其他杂质的色谱峰完全分开后进行收集,旋转蒸发得到白色固体8.7 mg。

将所得产品溶于0.5 mL氘代氯仿中进行核磁共振波谱测试(图7,图8)。青蒿素的核磁共振碳谱与氢谱数据及其对应关系如表3所示,与文献^[15]中核磁数据对比,实验所得产品的碳谱数据与文献中报道相一致。将产品溶于乙腈并进行液相色谱-质谱联用测试,ESI-MS: 283 [M + H]⁺, 265 [M + H - H₂O]⁺, 255 [M + H - CO]⁺, 237 [M + H - HCOOH]⁺ (图9),也证实所得的产品为青蒿素。

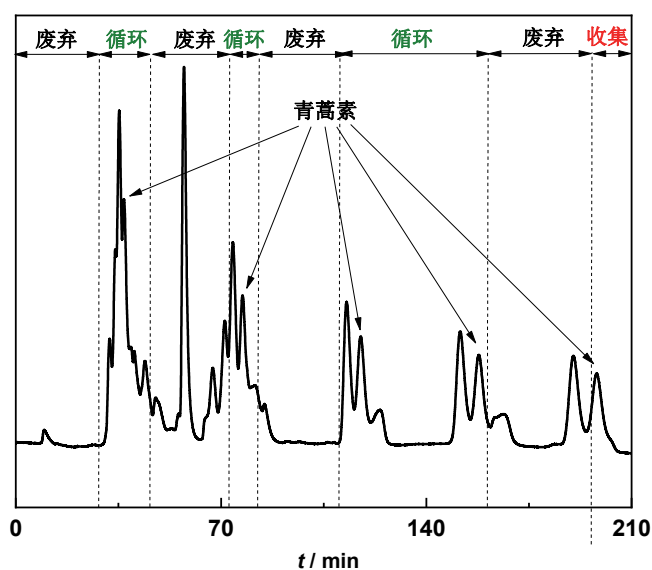


图6 提取液经4次循环的制备色谱图

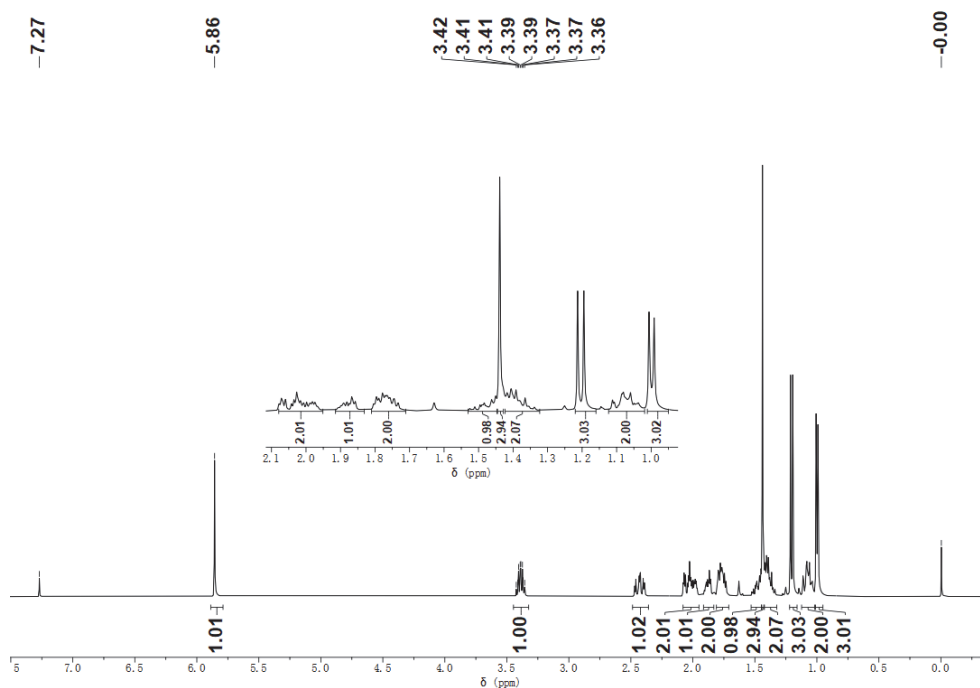


图7 青蒿素的核磁共振氢谱图(400 MHz, CDCl₃)

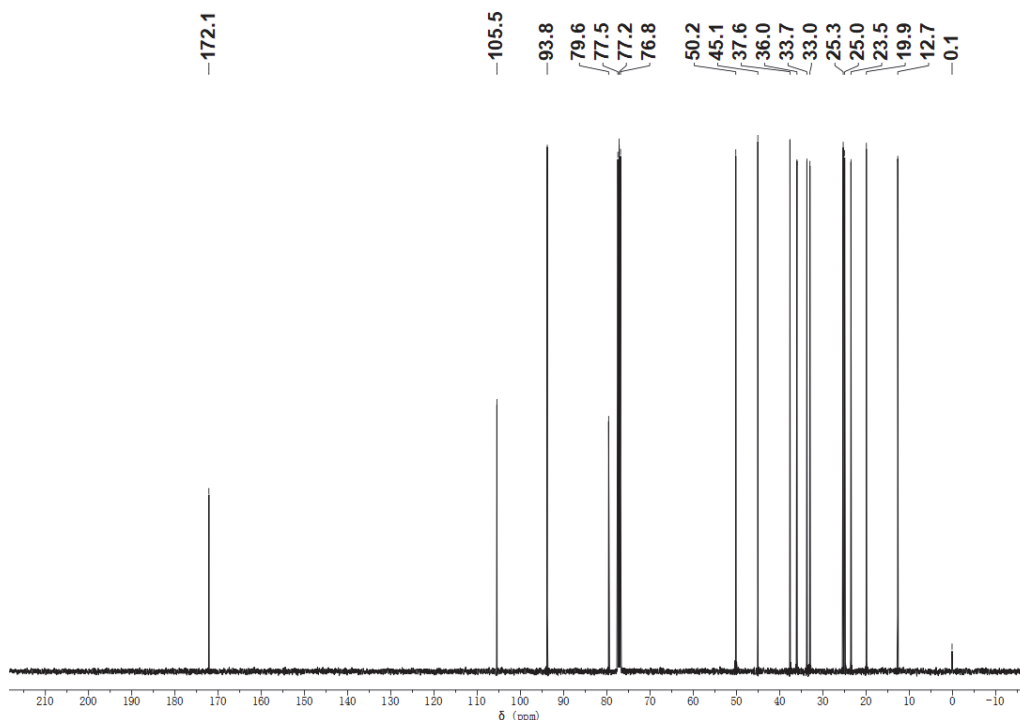


图8 青蒿素的核磁共振碳谱图(100 MHz, CDCl₃)

表3 青蒿素的核磁共振氢谱与碳谱数据分析

编号	δ_c	δ_H 峰形及耦合常数/Hz	编号	δ_c	δ_H 峰形及耦合常数/Hz
1	50.2	1.37–1.41, m	9	33.7	1.73–1.77, 1.77–1.81, m
2	25.0	1.45–1.53, 1.96–2.02, m	10	37.6	1.45–1.53, m
3	36.0	2.03–2.09, 2.38–2.48, m	11	33.0	3.39, dq, $J = (7.3, 5.3)$
4	105.5	–	12	172.1	–
5	93.8	5.86, s	13	25.3	1.20, d, $J = 7.3$
6	79.6	–	14	19.9	1.00, d, $J = 5.9$
7	45.1	1.86–1.91, m	15	12.7	1.44, s
8	23.5	1.07–1.12, 1.85–1.92, m			

¹H NMR, 400 MHz; ¹³C NMR, 100 MHz; δ , CDCl₃

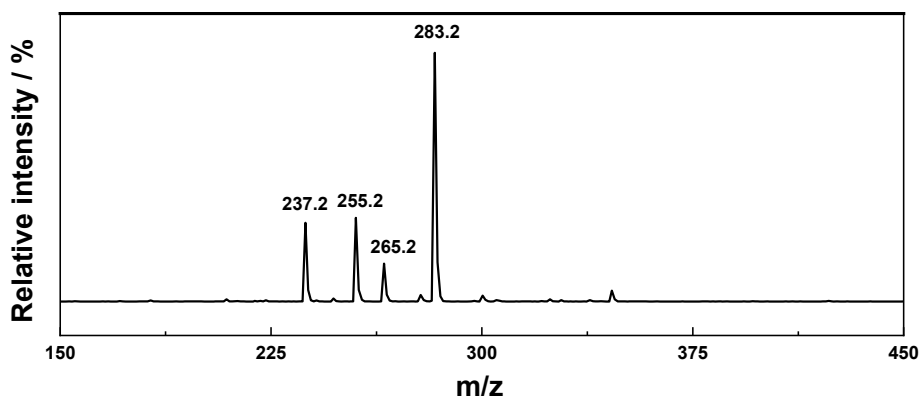


图9 青蒿素的质谱图

本实验为科教融合的综合探究实验,可作为本硕博贯通实验课程的内容之一,开设学期为大四学年第一学期,开课对象为强基班及其他有兴趣选课的同学,5-6人为一组。本实验设置为12学时,其中课前讲解1学时,青蒿素提取3学时,青蒿素含量测定2学时,青蒿素分离纯化4学时,结构表征1.5学时,思考与讨论0.5学时。各学校也可以根据实验条件,对其中的部分实验内容适当删减或补充,适当调整实验时长。

本实验有一定的挑战性,但参与实验的学生普遍感到好奇,认为实验探究过程非常有趣。通过与老师交流,实验中遇到的问题都能得到解决,不断反思,总结经验,自身能力也会在这一过程中得到提升。参与本实验的同学们纷纷表示,通过此次实验,学习了天然产物的前沿实验技术,培养了创新意识,训练了科研思维。

6 结语

本文采用快速溶剂萃取法对黄花蒿中的青蒿素进行提取,并用高效液相色谱仪对提取率进行计算,得到2.7%的提取率。采用循环制备液相色谱仪对提取液进行分离,从4 g黄花蒿粉末中得到青蒿素8.7 mg,收率为2.2%。对分离得到的青蒿素进行核磁共振波谱及质谱的测试,与标准谱图对比,结构与分子量均相符,证明成功提取得到青蒿素。

与传统天然产物实验相比,本实验含有多种科学仪器,实验技术先进,实验流程完整,既提高了学生的实验兴趣,开阔了科研视野,又培养学生动手操作能力,以及综合分析问题、解决问题的能力。

参 考 文 献

- [1] 国务院新闻办发布会介绍“加快建设教育强国 办好人民满意的教育”有关情况. [2023-07-21]. https://www.gov.cn/lianbo/fabu/202307/content_6890351.htm
- [2] 刘湘,汪秋安. 天然产物化学. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2022: 1-10.
- [3] 李厚金, 邱立勤, 曾锋, 曹日晖, 刘高峰, 赖榕, 朱可佳, 郑赛利, 陈六平. 大学化学, **2019**, *34* (9), 37.
- [4] 徐芷媛, 李茉涵, 张恒, 赵晓霞, 张艳斌, 赵军龙. 大学化学, **2020**, *35* (7), 67.
- [5] 潘玉珍, 王秀云, 宿艳, 田福平, 徐铁齐, 姜文凤. 大学化学, **2021**, *36* (3), 2011013.
- [6] Tu, Y. *Nat. Med.* **2011**, *17* (10), 4.
- [7] Quennoz, M.; Bastian, C.; Simonnet, X.; Grogg, A. F. *Chimia* **2010**, *64* (10), 755.
- [8] 刘静明, 倪慕云, 樊菊芬, 屠呦呦, 吴照华, 吴毓林, 周维善. 化学学报, **1979**, *37* (2), 129.
- [9] Shen, J. C.; Shao, X. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383* (6), 1003.
- [10] Cao, J.; Yang, M.; Cao, F. L.; Wang, J. H.; Su, E. Z. *Acs Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5* (4), 3270.
- [11] Hao, J. Y.; Han, W.; Huang, S. D.; Xue, B. Y.; Deng, X. *Sep. Purif. Technol.* **2002**, *28* (3), 191.
- [12] Tian, N.; Li, J.; Liu, S. Q.; Huang, J. N.; Li, X.; Liu, Z. H. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26* (6), 708.
- [13] 周毅峰, 石开明, 艾训儒, 邹芙蓉, 丁莉. 中药材, **2008**, *31* (2), 296.
- [14] Christen, P.; Veuthey, J. L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8* (15), 1827.
- [15] 黄敬坚, Nicholls, K. M.; 陈朝环, 汪猷. 化学学报, **1987**, No. 45, 305.