

# 星点设计-效应面法优化大花八角莽草酸提取工艺

张 丽, 刘 欣, 方振峰\*, 张 涛, 朱子豪, 阮 博

(江汉大学 医学院药理学系, 湖北 武汉 430056)

**摘要:** **目的** 探索获取回流提取大花八角中莽草酸的最佳工艺条件。 **方法** 以莽草酸得率为指标, 采用效应面法(response surface methodology, RSM)中的星点设计(central composite design, CCD)对大花八角中莽草酸的回流提取工艺进行优化, 建立各因素与响应值之间的数学模型。 **结果** 确定最佳提取工艺条件为在甲醇溶剂分数 25%、液料比 15:1 (mL/g) 的条件下, 浸泡 12 h, 在温度 70 °C 条件下, 提取 1 次, 每次 1.5 h。该条件下大花八角莽草酸提取量为 92.546 6 mg/g, 提取率实测值与预测值偏差小于 1%。 **结论** 星点设计-效应面法优选大花八角中莽草酸的提取工艺, 方法简单, 可靠, 预测性好。

**关键词:** 大花八角; 莽草酸; 星点设计; 效应面法; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-0143(2017)04-0335-08

DOI: 10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2017.04.008

## Optimization of Extraction Process for Shikimic Acid from *Illicium Macranthum* A. C. Smith with Central Composite Design and Response Surface Method

ZHANG Li, LIU Xin, FANG Zhengfeng\*, ZHANG Tao, ZHU Zihao, RUAN Bo

(Department of Pharmacy, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

**Abstract:** **Objective** To study the optimal extraction conditions of shikimic acid from *Illicium macranthum* A. C. Smith. **Methods** With the yield of shikimic acid as index, the central composite design (CCD) experiment and the response surface methodology (RSM) were conducted to build a model between the factors and response value to optimize reflux extraction process. **Results** The optimum conditions were methanol concentration 25%, liquid-to-material 15:1 (mL/g), soaking for 12 h, temperature 70 °C, extracting 1 time, each time 1.5 h. Under these conditions, the extraction capacity of shikimic acid was 92.546 6 mg/g, bias between observed value and predicted values was less than 1%. **Conclusion** Optimum extraction process for shikimic acid from *Illicium Macranthum* with central composite design and response surface method is simple, reliable and highly predictive.

**Keywords:** *Illicium macranthum* A. C. Smith; shikimic acid; central composite design (CCD); response surface method (RSM); extraction process

莽草酸是高等植物和微生物中广泛存在的一种有机酸,也是许多药物合成的关键中间体。研究表明莽草酸及其衍生物具有抗炎、镇痛、抗菌、抗肿瘤、防止血栓形成及抑制禽流感等作用<sup>[1-3]</sup>。近年来,

收稿日期: 2017-05-17

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划项目(B2016292); 江汉大学高层次人才科研启动项目(06000034); 江汉大学学生科研创新基金(301004210001)

作者简介: 张 丽(1989—), 女, 硕士生, 研究方向: 天然产物活性成分及中药质量。

\*通讯作者: 方振锋(1980—), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 天然产物活性成分。E-mail: zhenfengfang@163.com

莽草酸作为目前为止国际上唯一能对抗禽流感的药物——达菲的合成原料,被人们关注<sup>[4]</sup>。目前,莽草酸的植物来源主要是木兰科植物八角茴香的果实<sup>[5]</sup>,但八角茴香年产量低,寻找新的莽草酸含量较高的植物来源具有重要的现实意义。

大花八角(*Illicium macranthum* A. C. Smith)是八角科(Illiciaceae)八角属(*Illicium*)植物,主要分布在中国云南等地,具有行气止痛等功效<sup>[6]</sup>。大花八角中莽草酸的提取工艺鲜见报道。前期,本课题组对大花八角中莽草酸的提取和含量进行了研究<sup>[7]</sup>,发现其含量较高,具有进一步研究的价值。在此基础上,本项目以甲醇为提取溶剂,通过单因素实验,采用星点设计(central composite design, CCD)-效应面法(response surface methodology, RSM)<sup>[8-9]</sup>对大花八角中莽草酸的回流提取工艺进行优化,为寻求高得率的莽草酸药用植物资源,进一步开发大花八角的应用价值提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

岛津SPD-16型高效液相色谱仪(岛津仪器(苏州)有限公司);UVmini-1240型紫外仪(岛津仪器(苏州)有限公司);ME104E型分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司);AUW120D型电子天平(日本岛津公司);W2-180SP型旋转蒸发仪恒温水浴锅(上海申生科技有限公司);SHB循环式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);雷麦粉碎机(广州雷麦机械设备有限公司);SB-120DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

### 1.2 试剂

莽草酸对照品(上海源叶生物科技有限公司, HPLC测定, 归一化法计算其纯度 $\geq 99\%$ , 批号KJ0627CA14), 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为国产分析纯, 购自国药集团。

大花八角果皮样品采集于云南屏边, 经江汉大学医学院药理学系张涛教授鉴定为八角科八角属植物*Illicium macranthum* A. C. Smith, 经粉碎, 过40目筛备用。

## 2 莽草酸含量测定的方法与结果

### 2.1 色谱条件及系统适用性

色谱柱: YMC-Pack ODS-A (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 0.1%磷酸水溶液: 乙腈 = 97:3; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 检测波长: 213 nm; 进样量: 20  $\mu$ L。在上述条件下, 莽草酸能与样品中其他成分达到分离, 分离度大于1.5, 理论板数以莽草酸峰计算不小于4 000, 最低检测限为0.020 mg/mL。

### 2.2 线性关系考察

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取莽草酸对照品10.03 mg, 置于50 mL容量瓶中, 加入超纯水超声溶解并稀释至刻度, 得浓度为0.200 2 mg/mL的对照品储备液。

2.2.2 标准溶液的制备 精密吸取浓度为0.200 2 mg/mL的对照品储备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置于10 mL容量瓶中, 以超纯水定容至10.0 mL, 摇匀并超声, 分别得到浓度为20.02、40.04、60.06、80.08、100.10、120.12 mg/mL的标准品溶液。按上述色谱条件分别进样20  $\mu$ L, 测定色谱峰面积, 以峰面积为纵坐标, 对照品的含量为横坐标, 进行线性回归:  $Y = 10^{-5}x - 1.0946$ ,  $r = 0.9998$ , 表明大花八角莽草酸在20.02 ~ 120.12 mg/mL浓度范围内呈良好的线性关系。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别称取同一批大花八角果皮粉末(过40目筛)约1 g, 置于100 mL磨口圆底烧瓶中, 加50 mL甲醇浸泡12 h, 于70  $^{\circ}$ C条件下回流提取1 h, 过滤, 将滤液置于旋转蒸发仪中浓缩, 得到大花八角果皮浸膏, 再用超纯水溶解定容至50 mL, 并超声提取; 在50 mL容量瓶中取一定量的溶液过0.45  $\mu$ m微孔滤膜, 取续滤液作为测定莽草酸含量的供试品溶液。

### 2.3 含量测定

分别精密吸取莽草酸对照品溶液、大花八角供试品溶液20  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图1。

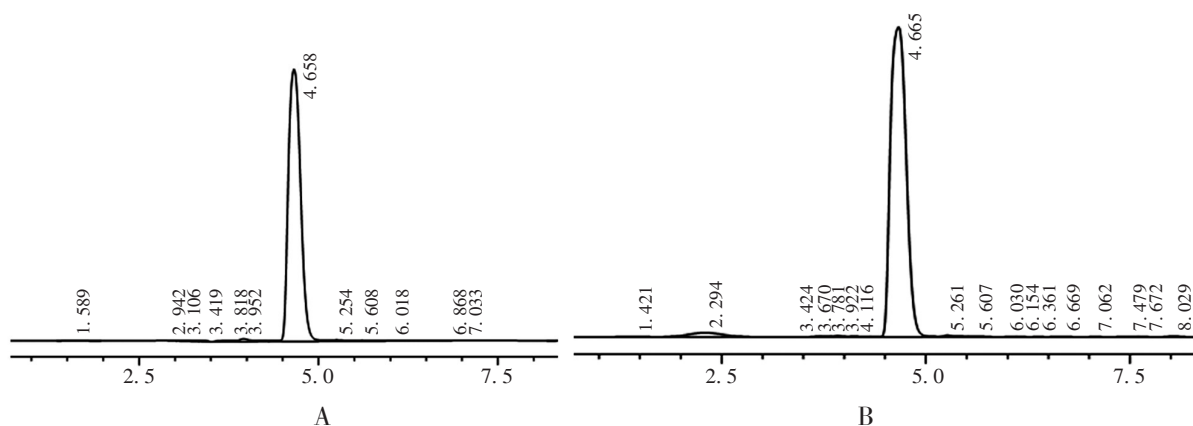


图1 莽草酸标准品(A)及大花八角供试品(B)HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograph of standard sample of shikimic acid and test samples from *Illicium Macranthum* A.C. Smith

## 2.4 精密度试验

精密吸取莽草酸标准品溶液(80.08 mg/mL)20 mL,按上述色谱条件重复进样6次,测定峰面积积分值;计算峰面积的 *RSD* 值为0.8%,可见精密度良好。

## 2.5 重复性试验

取同一批供试品溶液按选定色谱条件和上述“2.3”项测定方法,连续测定6次;计算峰面积的 *RSD* 值为1.39%,表明该方法具有较好的可重复性。

## 2.6 稳定性试验

精密称取同一批大花八角干燥粉末(过40目筛)1 g,按“2.2.3”项方法制备供试品溶液,按上述色谱条件于0、1、3、5、12、24 h分别进样20 mL,测定峰面积积分值,计算莽草酸含量的 *RSD* 值1.56%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.7 加样回收率

精密量取莽草酸已知浓度为0.18 mg/mL的供试品溶液9份各1 mL置于10.0 mL容量瓶,分别按莽草酸含量的80%、100%、120%加入标准品于容量瓶中,并用超纯水稀释至刻度,摇匀,超声,取续滤液,按上述色谱条件进样20 mL测定峰面积积分值;计算加样回收率分别是:100.10%、101.50%、100.40%、103.80%、104.10%、102.99%、104.90%、104.60%、102.30%,莽草酸加样回收率的 *RSD* 值为1.57%,符合分析要求。

## 2.8 检测限和定量限试验

对莽草酸已知浓度为20.02 mg/mL的标准品溶液不断稀释,在标准品峰与噪音峰信号的强度约等于3的条件下,测得的莽草酸检测限浓度为0.02 mg/mL;在标准品峰与噪音峰信号的强度约等于10的条件下,测得的莽草酸定量限浓度为0.04 mg/mL。

# 3 星点设计-效应面法优化大花八角莽草酸提取工艺试验

准确称取大花八角干燥粉末(过40目筛)1.0 g于100 mL圆底烧瓶中,加入一定溶剂分数的甲醇溶液,浸泡12 h后回流提取1 h,过滤,将滤液浓缩至浸膏,用超纯水溶解稀释定容至50 mL,作为储备液,精确量取1.0 mL储备液于10 mL容量瓶中,用超纯水定容至10 mL作为待测液,经超声处理后,用0.45 mm微孔滤膜过滤得到续滤液,按“2.3”项方法进行操作,测定莽草酸含量。

## 3.1 单因素试验及结果

3.1.1 温度的选择 准确称取干燥的大花八角粉末1.0 g,按料液比1:20的比例加入溶剂分数为80%的甲醇溶液,浸泡12 h后,分别在40、55、70、85、100 °C条件下,回流提取1 h,测定不同温度条件下莽草酸含量,如图2所示。提取温度在40~100 °C范围,莽草酸含量随温度逐渐上升,因此,选取提取温度100 °C为极大值,40 °C为极小值。

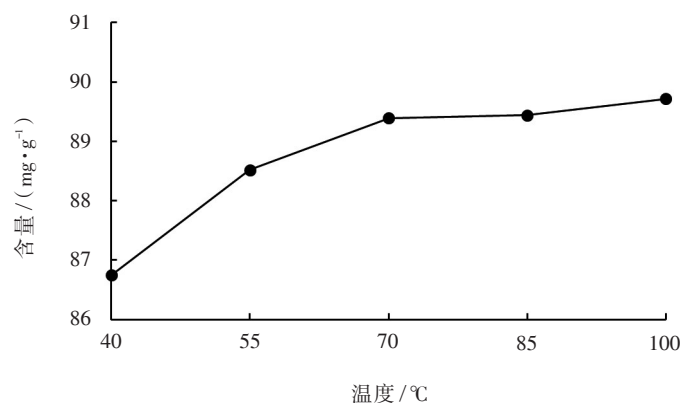


图2 提取温度对莽草酸的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on shikimic acid

3.1.2 甲醇溶剂分数的选择 准确称取干燥的大花八角粉末 1.0 g, 按料液比 1:20 的比例分别加入 0%、30%、50%、80%、100% 的甲醇溶液, 浸泡 12 h 后, 在 85 °C 条件下回流提取 1 h, 测定不同甲醇溶剂分数条件下莽草酸含量, 如图 3 所示。当甲醇溶剂分数在 0% ~ 100% 时, 莽草酸含量在纯水时最高, 然后下降, 在甲醇溶剂分数 50% 为最低, 随后逐渐升高。因此, 选取甲醇溶剂分数 0%, 即纯水为极大值, 50% 作为极小值。

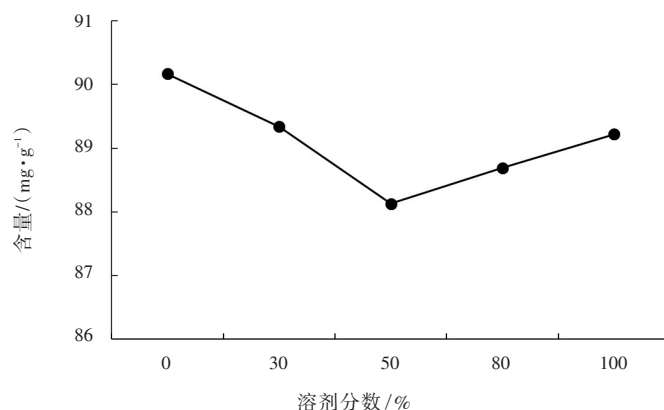


图3 甲醇溶剂分数对莽草酸的影响

Fig. 3 Effect of methanol concentration on shikimic acid

3.1.3 液料比的选择 准确称取干燥的大花八角粉末 1.0 g, 分别按液料比 5:1、10:1、20:1、25:1、30:1 的比例加入溶剂分数为 80% 的甲醇溶液, 浸泡 12 h 后, 在 85 °C 条件下回流提取 1 h, 测定不同液料比条件下莽草酸含量, 如图 4 所示。当液料比在 5:1 ~ 30:1 时, 莽草酸含量逐渐升高, 在 25:1 后上升缓慢, 趋于平缓。考虑到实际情况, 选取液料比 25:1 为极大值, 5:1 作为极小值。

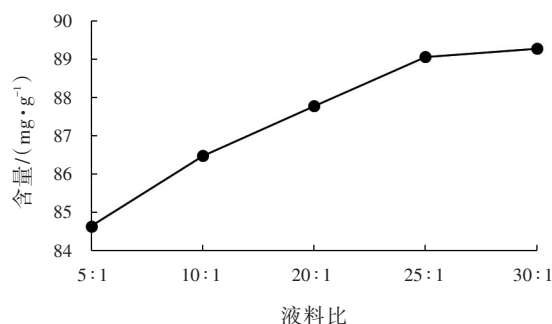


图4 液料比对莽草酸的影响

Fig. 4 Effect of liquid-to-material ratio on shikimic acid

3.2 星点设计-效应面法试验设计

3.2.1 星点设计法优化提取条件 在单因素实验的基础上,以莽草酸含量为响应值,温度、甲醇溶剂分数、料液比为自变量,根据各因素的最优实验范围,按星点设计方法设计实验,共20组,分别标号为1~20。根据星点设计的原理,每因素设5水平,用代码值  $-a$ 、 $-1$ 、 $0$ 、 $1$ 、 $a$  表示(三因素星点设计的  $a = 1.682$ ),表1和表2中的代码值代表实际操作物理量。

分别取大花八角干燥粉末20份,每份1.0 g,精密称取,每份平行3次,于100 mL圆底烧瓶中,按表2中实验条件加入相应溶剂分数、液料比的甲醇溶液浸泡12 h,在各对应实验温度下回流提取1 h,将提取液浓缩得到大花八角浸膏,再用超纯水稀释溶解定容至50 mL作为储备液,摇匀超声,精密量取1.0 mL储备液于10 mL容量瓶中,用超纯水稀释定容至10 mL,作为待测液,经超声处理后,用0.45 mm微孔滤膜过滤得到续滤液,按“2.3”项方法进行操作,分别测定莽草酸含量,结果见表2。

表1 星点设计因素与水平  
Tab. 1 Factors and levels of central composite design

水平	因素		
	X1 (温度/℃)	X2 (溶剂分数/%)	X3 (液料比)
-1.682	40.00	0	5.00:1
-1	52.16	10.13	9.05:1
0	70.00	25.00	15.00:1
1	87.84	39.87	20.95:1
1.682	100.00	50.00	25.00:1

表2 星点试验设计与结果  
Tab. 2 Arrangements and results of central composite design

实验号	X1	X2	X3	莽草酸得率/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	87.067
2	-1	-1	1	92.887
3	-1	1	-1	91.919
4	-1	1	1	92.766
5	1	-1	-1	88.044
6	1	-1	1	92.134
7	1	1	-1	89.180
8	1	1	1	90.538
9	-1.682	0	0	91.823
10	1.682	0	0	90.077
11	0	-1.682	0	89.824
12	0	1.682	0	90.994
13	0	0	-1.682	86.470
14	0	0	1.682	93.286
15	0	0	0	92.304
16	0	0	0	92.523
17	0	0	0	92.478
18	0	0	0	92.180
19	0	0	0	92.870
20	0	0	0	92.980



3.2.2 模型拟合及方差分析 以莽草酸含量为因变量,通过 SAS9.2 专业统计分析软件包分别对各因素的多元线性回归和二项式拟合,得到莽草酸含量与提取温度( A )、溶剂分数( B )、液料比( C )的二次回归拟合模型。多元线性回归方程:

Coded Levels ( -1, 1 ):

$$Y = 92.54664 - 0.562311A + 0.456819B + 1.726468C - 0.507697A^2 - 0.648875AB - 0.152375AC - 0.69897B^2 - 0.963125BC - 0.886708C^2。$$

Uncoded Levels:

$Y = 64.33507 + 0.27449A + 0.52328B + 1.414183C - 0.001595A^2 - 0.002446AB - 0.001435AC - 0.003161B^2 - 0.010886BC - 0.025046C^2。$ 根据结果分析,多元线性回归方程相关系数  $R^2 = 0.9702$ ,且实验模型  $P < 0.0001$ ,表明模型拟合度较好。通过表3的方差分析结果,可知失拟项  $P$  值为  $0.0827$ ,大于  $0.05$ ,表明回归方程失拟项检验不显著,模型拟合良好,该模型能较好地反映莽草酸含量与提取溶剂甲醇溶剂分数、提取温度和液料比之间的关系。甲醇溶剂分数时间、提取温度、液料比一次项和二次项均达到显著或极显著水平,交互项按显著性影响从大到小排序依次为  $BC$ 、 $AB$ ,其中  $AC$  不显著。

表3 回归模型方差分析结果  
Tab. 3 Results of variance analysis of regression model

source	DF	SS	MS	F	Pr>F	显著性
A	1	4.318214	4.318214	18.15648	0.0017	**
B	1	2.849961	2.849961	11.98302	0.0061	**
C	1	40.70684	40.70684	171.15710	<0.0001	***
A <sup>2</sup>	1	3.714589	3.714589	15.61846	0.0027	**
AB	1	3.368310	3.368310	14.162490	0.0037	**
AC	1	0.185745	0.185745	0.780989	0.3976	
B <sup>2</sup>	1	7.040754	7.040754	29.603750	0.0003	**
BC	1	7.420878	7.420878	31.202030	0.0002	**
C <sup>2</sup>	1	11.330860	11.330860	47.642030	<0.0001	***
Model	9	77.562360	8.618040	36.235650	<0.0001	***
(Linear)	3	47.874950	15.958320	67.098780	<0.0001	***
(Quadratic)	3	18.712470	6.237491	26.226330	<0.0001	***
(Cross Product)	3	10.974930	3.658311	15.381840	0.0004	**
Error	10	2.378332	0.237833			
(Lack of fit)	5	1.887907	0.377581	3.849534	0.0827	
(Pure Error)	5	0.490425	0.098085			
Total	19	79.940690				

注:\*\*:  $P < 0.01$ ;显著差异;\*\*\*:  $P < 0.001$ ;极显著差异。

3.2.3 效应面优化和预测 根据莽草酸含量的二次回归拟合模型,采用 SAS9.2 软件绘制莽草酸含量与各变量间的三维效应曲面图和等高线图(见图5~图7),通过这些不仅可以直观地反映各因素交互作用对响应值的影响,还可以确定最佳提取条件。当提取温度在  $40 \sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,甲醇溶剂分数在  $0\% \sim 48\%$ ,液料比在  $6 \sim 24$  倍范围内时,根据该实验模型的效应面图可确定莽草酸的最佳提取工艺为:提取温度为  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,甲醇溶剂分数为  $25\%$ ,液料比为  $15:1$ ,在此条件下莽草酸的含量为  $92.5466\text{ mg/g}$ 。

3.2.4 大花八角莽草酸工艺优化的验证与放大试验 (1)验证试验:在最佳提取条件下,重复3次试验,计算大花八角莽草酸含量,与模型拟合结果进行对比,计算预测值与实际值之间的误差,结果见表4。

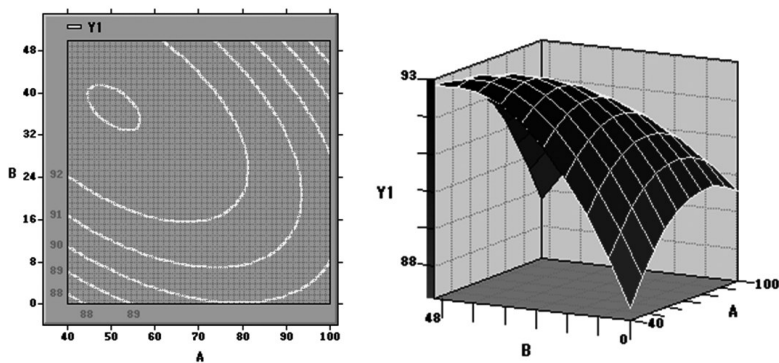


图5 提取温度和甲醇溶剂分数对莽草酸含量影响的等高线和三维效应面图(液料比为15:1)

Fig. 5 Three-dimensional response surface graphs and contour plot of effects of extraction temperature and methanol concentration on shikimic acid content (liquid-to-material ratio 15:1)

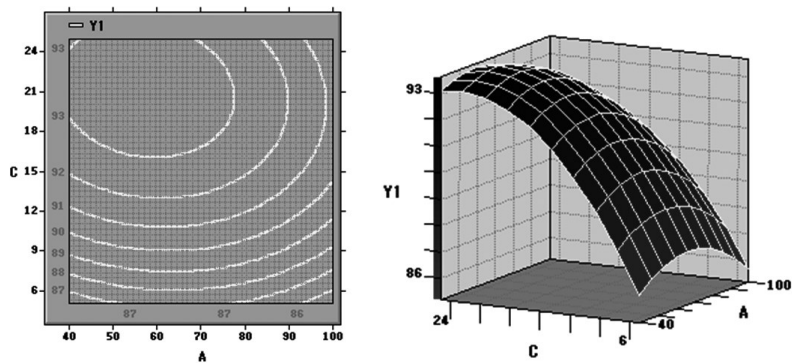


图6 提取温度和液料比对莽草酸含量影响的等高线和三维效应面图(甲醇溶剂分数为25%)

Fig. 6 Three-dimensional response surface graphs and contour plot of effects of extraction temperature and liquid-to-material ratio on shikimic acid content (methanol concentration 25%)

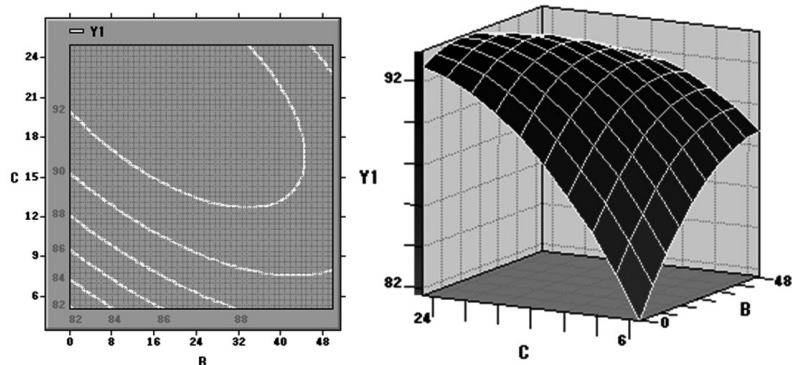


图7 甲醇溶剂分数和液料比对莽草酸含量影响的等高线和三维效应面图(提取温度为70 °C)

Fig. 7 Three-dimensional response surface graphs and contour plot of effects of methanol concentration and liquid-to-material ratio on shikimic acid content (extraction temperature 70 °C)

表4 验证试验				
Tab. 4 Verification test				
(n=3)				
莽草酸含量	预测值/(mg·g <sup>-1</sup> )	实测值/(mg·g <sup>-1</sup> )	误差/%	平均误差/%
Y	92.546 6	92.205 1	0.37	0.95
		91.728 7	0.88	
		91.049 2	1.60	

(2)工艺放大实验:为进一步考察优化工艺条件的稳定性,将样品量分别放大20倍、50倍,并按最佳工艺条件提取,测定莽草酸的含量,实验结果见表5。结果表明预测值与实测值差异不大,在误差允许范围内,所以放大实验在最佳提取条件下也能较好地反应优化结果,为莽草酸的工业生产奠定一定的基础。

表5 工艺放大实验结果  
Tab. 5 Experimental results of technology enlargement (n=3)

放大倍数	实测值/(mg·g <sup>-1</sup> )	误差/%	平均误差/%
20倍	91.2587	1.39	0.96
	91.6672	0.95	
	91.5327	1.10	
50倍	91.9368	0.66	
	91.7438	0.87	
	91.7963	0.81	

#### 4 讨论

目前,莽草酸的来源有植物来源、化学合成以及微生物合成几个不同途径。虽然化学合成方法在产率或纯度方面有一定优势,但是其化学废弃物处理、原料来源有限等缺点使其不能得到广泛应用。微生物合成法有一定优势,但是其生成的副产物脱氢莽草酸不易处理,影响莽草酸的纯度。因此,目前植物资源仍是莽草酸的主要来源。八角茴香中莽草酸产量较高,但是其生长周期较长,在全世界分布不广泛,因此,寻找优质的植物资源来源是很有必要的。

本研究主要对大花八角中莽草酸的提取工艺进行了研究,考察了提取温度、甲醇溶剂分数、料液比3个因素对莽草酸提取率的影响,在此基础上,采用星点设计-效应面法对提取工艺进行优化,并通过验证实验及放大实验,确证最佳提取工艺条件为温度70℃,甲醇溶剂分数25%,液料比15:1(mL/g)。本方法提取工艺简单、合理,溶剂成本较低,提取率高,为大花八角中莽草酸成分的工业提取奠定基础,也提供了莽草酸一个新的可能植物资源来源。

#### 参考文献(References)

- [1] 占弋丰,张小林,欧阳红霞.莽草酸的应用与制取方法研究进展[J].化学中间体,2012,9(5):1-5.
- [2] 孙海军,要辉,邹晶晶,等.响应曲面法优化马尾松中莽草酸的超声提取工艺[J].氨基酸和生物资源,2016,38(3):40-44.
- [3] 林军,胡海峰,胡又佳,等.莽草酸及其代谢产物在医药工业中的应用[J].药物生物技术,2011,18(5):461-465.
- [4] 余凡,葛亚龙,杨恒拓,等.八角茴香中莽草酸的提取分离工艺及生理活性的研究进展[J].中国调味品,2014,39(1):32-36,70.
- [5] 王祖磊,朱祥瑞.八角茴香及其提取物莽草酸的应用进展[J].科技通报,2010,26(4):531-532.
- [6] 马海娟.大花八角果皮活性成分的研究[D].北京:北京中医药大学,2009.
- [7] 熊煜,刘星,余志立,等.大花八角中莽草酸的提取及含量测定[J].广东化工,2016,43(20):40-41.
- [8] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455-457.
- [9] 史亚军,吴品江,魏萍. Plackett-Burman 设计与星点设计-效应面法优化山楂总黄酮磷脂复合物制备工艺[J].中药材,2010,33(3):437-441.

(责任编辑:范建凤)