

# 八角茴香中莽草酸提取工艺的优化

张迎<sup>1</sup>, 刘军海<sup>1\*</sup>, 刘燕飞<sup>1</sup>, 李燕<sup>2</sup>, 柳仁民<sup>1</sup>

(1.聊城大学 化学化工学院, 山东 聊城 252059 2.聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059)

**摘要:**以水为溶剂,利用响应面法对八角茴香中莽草酸的提取工艺进行优化。在单因素试验的基础上,根据中心组合设计原理,采用三因素三水平的响应面分析法,依据回归分析确定最优提取工艺条件。选取提取时间、提取温度和料液比作为影响因子进行优化,结果表明,莽草酸的最佳工艺条件为提取时间 3.0 h,料液比 1:22(g/mL),提取温度 83 ℃,提取 3 次。在此条件下,一次提取率最高为 8.779%。

**关键词:**八角茴香;莽草酸;提取;响应面法分析

## Optimization of Extraction Conditions of Shikimic Acid from *Illicium Verum Hook.f* Via Response Surface Methodology

ZHANG Ying<sup>1</sup>, LIU Jun-hai<sup>1\*</sup>, LIU Yan-fei<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, LIU Ren-min<sup>1</sup>

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering,Liaocheng University, Liaocheng 252059, Shandong, China; 2.College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, Shandong, China)

**Abstract:** Response surface analysis methodology (RSM) was used to optimize the extraction process of shikimic acid from *illicium verum Hook.f* with water as solvent. Based on single-factor experiments, the optimum conditions for the extraction of Shikimic Acid were obtained via Box-Behnken center-united experiment design. Three independent variables, namely extracting time, solvent-solid ratio and extracting temperature, were selected as affecting factors during extraction. The results show that the optimum extraction conditions for shikimic acid were as follows: extraction time of 3.0 h, the ratio of material to solvent of 1:22 (g/mL), extraction temperature of 83 ℃ for three times. In this condition, the yield of Shikimic Acid was up to 8.779% at once.

**Key words:** *illicium yertum Hook.f*; Shikimic acid; extraction; response surface analysis methodology

莽草酸又称毒八角酸,学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸(3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid)结构式相对分子质量为 174.15。莽草酸为白色精细粉末,易溶于水,在 25 ℃下 100 mL 水中可溶解 18 g,难溶于苯、氯仿和石油醚。熔点为 191 ℃~192 ℃,旋光度为 -180°。莽草酸主要存在于八角茴香、马尾松、侧柏等天然植物中,尤以八角茴香中含量相对较多<sup>[1]</sup>。莽草酸具有镇痛、抗菌、抗血小板凝集、抗肿瘤、抗血栓形成和抗脑缺血等作用<sup>[2-5]</sup>。因此,提取莽草酸对开发和利用我国丰富的八角茴香资源具有十分重要的意义。

**作者简介:**张迎(1989—),女(汉),在读硕士研究生,研究方向:天然产物的研究与开发。

\*通信作者:刘军海(1963—),男,教授,博士,研究方向:天然产物的研究与开发。

响应面分析法(RSM)是利用合理的试验设计,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最佳工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法<sup>[6]</sup>。以水为溶剂利用响应面分析法优化八角茴香中的莽草酸提取最佳工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

#### 1.1.1 材料

八角茴香:产于广西,购于本地集贸市场。莽草酸对照品(98%)购于阿拉丁试剂有限公司,高碘酸(AR),高碘酸钠(AR),氢氧化钠(AR),亚硫酸钠(AR)。

#### 1.1.2 仪器

TU-1810 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪

器有限责任公司;数显恒温水浴锅 HH-6:国华电器有限公司;DKB-501A 型超级恒温水槽:上海精密实验设备有限公司;AR-1104 电子天平:奥克斯国际贸易上海有限公司;循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司;QE-200 高速中药粉碎机:武义县屹立工具有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 八角茴香莽草酸提取工艺流程

八角茴香→粉碎(过筛)→八角茴香粉末→提取回流→抽滤→滤液→测定吸光度

### 1.2.2 八角茴香莽草酸的提取方法

准确称取八角茴香粉末约 2.0 g, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入一定量的蒸馏水, 在实验条件下回流提取, 然后抽滤得滤液, 滤液用蒸馏水定容于 250 mL 容量瓶中, 精确量取 0.2 mL 溶液定容于 10 mL 容量瓶, 测定其吸光度。

### 1.2.3 分析测定方法<sup>[7]</sup>

#### 1.2.3.1 标准曲线的绘制

精密称取莽草酸对照品 34.80 mg, 置于 1000 mL 容量瓶, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度。准确移取 0.2 mmol/L 的莽草酸标准曲线 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 0.5% 的  $\text{HIO}_4$  水溶液和 0.5% 的  $\text{Na}_2\text{IO}_4$  水溶液各 1.25 mL 摇匀, 于 37 °C 放置 30 min 后冷却, 加入 0.056 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  和 1 mol/L 的 NaOH (体积比 2:3) 混合液定容至刻度。在室温下, 立即读取该溶液在 382 nm 处的吸光度值(A)。得到标准曲线的回归方程为:  $C=40.9836A-0.0574$ ,  $R^2=0.9995$ , 在 0~55.68  $\mu\text{g/mL}$  的范围内, 浓度(C)与吸光度(A)有良好的线性关系, 标准曲线如图 1 所示。

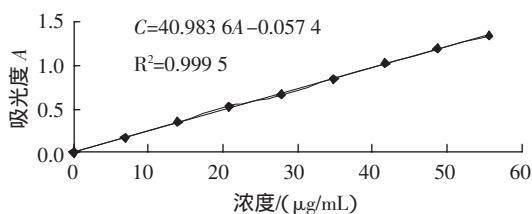


图 1 标准曲线

Fig.1 Standard curve

#### 1.2.3.2 莽草酸提取率的测定

取一定体积的八角茴香提取液置于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 0.5% 的  $\text{HIO}_4$  水溶液和 0.5% 的  $\text{Na}_2\text{IO}_4$  水溶液各 1.25 mL 摇匀, 于 37 °C 放置 30 min 后冷却, 加入 0.056 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  和 1 mol/L 的 NaOH (体积比 2:3) 混合液定容至刻度。在室温下, 立即读取该溶液在 382 nm 时的吸光度值, 从回归方程中计算提取液中

莽草酸的含量。提取率用下式计算:

$$\text{提取率}/\% = \frac{(40.9836A - 0.0574) \times \text{稀释倍数} \times \text{定容体积}(500\text{mL})}{\text{称取八角茴香粉末的质量} \times 10^6} \times 100$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取时间对提取率的影响

分别称取 20 目的八角茴香粉末约 2.0 g, 6 份。固定提取温度 80 °C, 料液比 1:20(g/mL), 分别提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 后, 提取 1 次, 结果如图 2 所示。

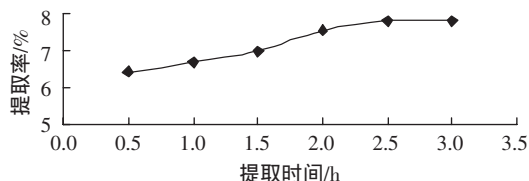


图 2 提取时间对莽草酸提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on extraction rate

从图 2 可以看出, 随着提取时间的增加, 莽草酸提取率不断提高, 但是当提取时间达到 2.5 h 后, 提取率基本上增加很少。所以在实际的提取过程中要考虑时间效率和成本因素, 提取时间取 2.5 h 左右为宜。

### 2.2 料液比对提取率的影响

分别称取 20 目的八角茴香粉末约 2.0 g, 5 份。固定提取温度 80 °C, 提取时间 1 h, 分别在料液比 1:8、1:14、1:20、1:26、1:32(g/mL) 下回流, 提取 1 次, 结果如图 3 所示。

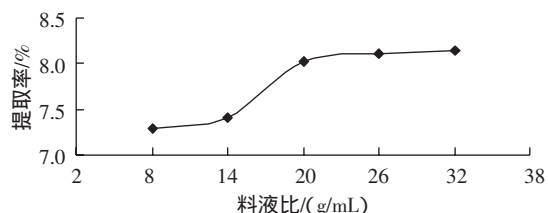


图 3 料液比对莽草酸的影响

Fig.3 Effect of the ratio of material to solvent on extraction rate

从图 3 可以看出, 料液比越大, 莽草酸的提取率越大。当料液比达到 1:20(g/mL) 时后, 提取率增加很少。料液比过小, 溶剂不能有效润湿样品, 影响莽草酸的提取; 料液比过高, 增加后续蒸发处理的困难, 操作成本增加。因此, 适宜的料液比取 1:20(g/mL) 左右为宜。

### 2.3 提取温度对提取率的影响

分别称取 20 目的八角茴香粉 2.0 g, 5 份, 固定料液比为 1:20(g/mL), 提取时间为 1 h, 提取温度分别在 50、60、70、80、90 °C 下提取, 提取 1 次, 结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出, 莽草酸的提取率随提取温度的

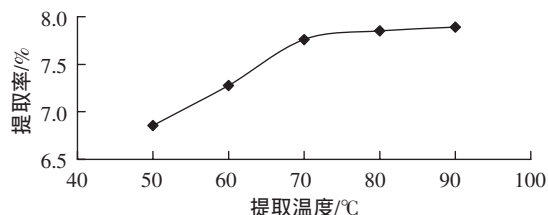


图4 温度对莽草酸提取率影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on extraction rate

升高而增大。但是当提取时间达到 70 °C 后,基本上提取率保持不变。所以在实际的提取过程中要考虑时间效率和操作成本因素,所以在实际的工业生产中采用 70 °C 左右为宜。

#### 2.4 原料粒度对提取率的影响

分别称取过 20 目、40 目、60 目筛的八角茴香粉末约 2.0 g,各 1 份,分别在提取温度 80 °C,提取时间为 1 h,料液比为 1:20(g/mL)下,提取 1 次,结果如图 5 所示。

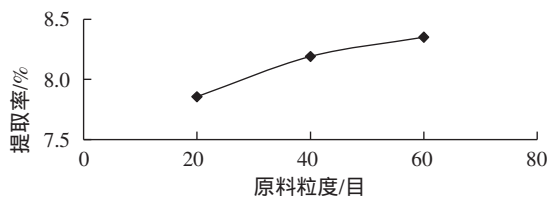


图5 原料粒度对莽草酸提取率的影响

Fig.5 Effect of particle size on extraction rate

从图 5 可以看出,原料粉碎得越细,莽草酸的提取率越高,但是,粒数过细,增加处理困难,采用 60 目左右的八角茴香粉末来提取莽草酸为宜。

#### 2.5 提取次数对提取率的影响

称取 60 目的八角茴香粉末约 2.0 g,1 份。在固定提取温度 80 °C,提取时间为 1 h,料液比为 1:20(g/mL)的情况下,分别提取 1、2、3、4、5 次,结果如表 1 所示。

表1 提取次数对比对莽草酸的影响

Table 1 Effect of extraction times on extraction rate

提取次数(i)	提取率/%	$Y_i / \sum_{i=1}^5 Y_i / \%$	$\sum_{i=1}^i Y_i / \sum_{i=1}^5 Y_i / \%$
1	6.647	82.29	82.29
2	0.704	8.72	91.02
3	0.386	4.78	95.8
4	0.304	3.76	99.56
5	0.037	0.46	100.0

注:Y 为提取率,i 为提取次数。

从表 1 可以看出,莽草酸的总提取率随着提取次数的增加而增大,经过 5 次提取已基本提取出来,3 次提取即可提出总量的 95%,考虑生产成本及效率等方面的因素,所以认为提取 3 次比较合适。

#### 2.6 实验方案设计与工艺优化

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理<sup>[6,8]</sup>,

采用响应面实验设计方法,选取提取时间、料液比、提取温度等 3 个影响莽草酸提取率的主要因素,设计三因素三水平的响应面分析。在固定原料粒度为 60 目,提取次数为 1 次的情况下,考察 3 个因素对莽草酸提取率的影响,试验因子水平编码表如表 2 所示。

表2 响应面分析因子及水平表

Table 2 Factors and levels of RSM

水平	X <sub>1</sub> 提取时间/h	X <sub>2</sub> 料液比/(g/mL)	X <sub>3</sub> 提取温度/°C
-1	1.0	1:14	70
0	2.0	1:20	80
1	3.0	1:26	90

对提取时间、料液比、提取温度作如下变换。

$$X_1 = (Z_1 - 2)/1, X_2 = (Z_2 - 20)/6, X_3 = (Z_3 - 80)/10$$

式中 Z<sub>1</sub>、Z<sub>2</sub>、Z<sub>3</sub> 分别表示提取时间、料液比、提取温度。在单因素试验基础上,以 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 为自变量,以莽草酸提取率(Y)为响应值,采用 SAS RSREG 程序进行响应面分析实验。实验设计与结果如表 3 所示。

表3 响应面分析方案及试验结果

Table 3 Program and experimental results of RSA

试验序号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	实际提取率/%	预测值/%	误差/%
1	-1	-1	0	6.503	6.671	0.168
2	-1	0	-1	7.088	6.639	-0.449
3	-1	0	1	7.991	8.140	0.149
4	-1	1	0	8.677	7.200	-1.477
5	0	-1	-1	6.647	6.702	0.055
6	0	-1	1	8.114	8.003	-0.111
7	0	1	1	7.704	8.347	0.643
8	1	-1	0	8.402	7.880	-0.522
9	1	0	-1	6.862	8.633	1.770
10	1	0	1	8.576	8.964	0.388
11	1	1	0	8.196	8.808	0.612
12	0	1	-1	8.740	7.816	-0.924
13	0	0	0	8.730	8.737	0.007
14	0	0	0	8.730	8.737	0.007
15	0	0	0	8.751	8.760	0.009

其中 1~12 是析因试验,13~15 是中心试验,用来估计试验误差。采用 SAS 8.0 软件处理上述试验设计所得响应面与等直线见图 6~图 8。

采用 SAS RSREG 程序对响应值与各因素进行回归拟合后,得到回归方程:

$$Y = 8.7370 + 0.7044X_1 + 0.3645X_2 + 0.4579X_3 - 0.3603X_1X_1 + 0.1003X_1X_2 - 0.2925X_1X_3 - 0.7370X_2X_2 - 0.1923X_2X_3 - 0.2833X_3X_3$$

回归分析结果见表 4,回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由 P 检验来判定,概率 P(P<F)的值越小,则相应变量的显著程度越高。

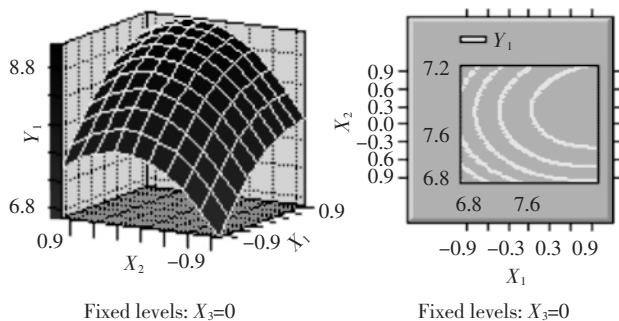


图6 提取时间( $X_1$ )和料液比( $X_2$ )对提取率影响的响应面与等值线  
Fig.6 Responsive surfaces and contours of  $Z=f(X_1, X_2)$

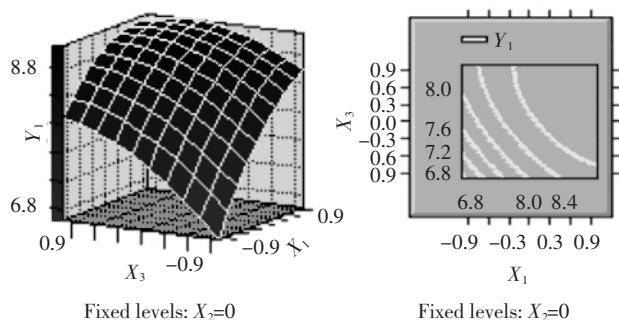


图7 提取时间( $X_1$ )和提取温度( $X_3$ )对提取率影响的响应面与等值线  
Fig.7 Responsive surfaces and contours of  $Z=f(X_1, X_3)$

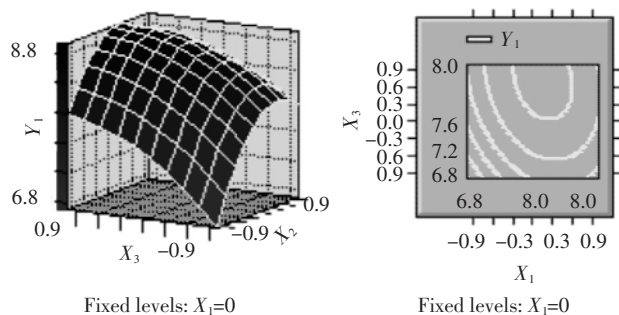


图8 料液比( $X_2$ )和提取温度( $X_3$ )对提取率影响的响应面与等值线  
Fig.8 Responsive surfaces and contours of  $Z=f(X_2, X_3)$

由表4可见,各因素中一次项 $X_1, X_2, X_3$ 和二次项 $X_2X_2$ 都是高度显著的,二次项 $X_1X_1, X_3X_3$ 和 $X_1X_3$ 显著,因此各具体实验因子对响应面的影响不是简单的线性关系。回归方程也是高度显著的,相关系数 $R^2=97.80\%$ ,说明响应值(提取率)的变化有97.80%来源于提取时间、料液比和提取温度3个变量。因此,回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程确定最佳工艺条件。对回归方程取一阶偏导数等于零,整理可得:

$$0.7205X_1 - 0.1003X_2 + 0.2925X_3 = 0.7044 \quad (1)$$

$$0.1003X_1 - 1.4740X_2 - 0.1923X_3 = -0.3645 \quad (2)$$

$$0.2925X_1 + 0.1923X_2 + 0.5665X_3 = 0.4579 \quad (3)$$

解联立方程组得: $X_1=0.9195, X_2=0.2783, X_3=0.2393$ 。

表4 莽草酸回归分析结果

Table 4 Results of regression analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P(Pr>F)	显著性
$X_1$	1	3.969153	3.969153	90.69873	0.000216	**
$X_2$	1	1.062882	1.062882	24.28781	0.004366	**
$X_3$	1	1.677196	1.677196	38.32544	0.001604	**
$X_1 \times X_1$	1	0.479188	0.479188	10.94988	0.021262	*
$X_1 \times X_2$	1	0.0402	0.0402	0.918612	0.381857	
$X_1 \times X_3$	1	0.342225	0.342225	7.82015	0.038153	*
$X_2 \times X_2$	1	2.005547	2.005547	45.82856	0.001069	**
$X_2 \times X_3$	1	0.14784	0.14784	3.378283	0.125468	
$X_3 \times X_3$	1	0.296236	0.296236	6.769258	0.048146	*
回归	9	9.744007	1.082667	24.73993	0.00126	**
误差	5	0.21881	0.043762			
总和	14	9.962817				

注:\*为显著( $P<0.05$ ),\*\*为高度显著( $P<0.01$ )。

代入前述的变换公式得到最佳提取时间为2.92h,料液比为1:21.67(g/mL),提取温度为82.39℃,为了操作的方便,将其修正为提取时间3.0h,料液比1:22(g/mL),提取温度为83℃,即八角茴香莽草酸提取工艺最佳工艺条件为:提取时间为3.0h、料液比为1:22(g/mL)、温度为83℃。该模型的 $R^2=0.9780$ ,此模型与实际试验拟合较好,试验失拟项小,因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。用此数学模型预测最佳条件下的提取率为8.873%。实验提取率与理论预测值结果见表3。

### 2.7 最优条件下验证

准确称3份八角茴香粉末,每份约2.0g,分别在最佳提取条件:提取时间3.0h、料液比为1:22(g/mL)、温度为83℃下提取1次,结果如表5所示。

表5 最佳条件的实验结果

Table 5 The experimental results in the optimum extraction conditions

实验次数	1	2	3	平均值
提取率/%	8.781	8.776	8.780	8.779

由表5可见,莽草酸在最佳条件下一次提取率为8.779%,由数学模型得到理论预测值为8.873%,实际提取率比理论预测值仅低了0.094%。因此,建立的二次回归模型能很好地预测莽草酸的提取率。

### 3 结论

通过中心组合试验设计和响应面分析法,能可靠地进行优化试验以及数据分析。应用这一方法对莽草酸提取的工艺条件进行优化,取得了较好的效果。在单因素试验基础上,通过中心组合试验,设计三因素三水平响应面分析法试验。最终得到二次回归方程, (下转第37页)



导率呈线性迅速升高,这表明树脂已趋向饱和,其脱盐能力大幅度降低,过柱后的菊粉提取液含盐量也不再符合要求,应停止脱盐。经组合 A 处理后,所收集的菊粉提取液电导率从初始的 5 050  $\mu\text{s}/\text{cm}$  降至 240  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ,根据生产经验,满足了菊粉成品灰分含量  $\leq 0.1\%$  的要求。组合 A 菊粉提取液处理量为 4 倍柱体积。试验中还发现组合 A 离子交换树脂具有良好脱色功能,过柱后提取液由原来的微黄色变为无色透明。

### 2.3 菊粉的吸附与洗脱

菊粉的吸附与洗脱 结果见表 4。

表 4 菊粉的吸附与洗脱

Table 4 The adsorption and elution of inulin in resin

树脂体 积/mL	洗脱用 水量/mL	洗脱液中菊粉 浓度/(mg/mL)	菊粉吸附量 (以树脂计)/(mg/mL)	洗脱液电导率/ ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )
120	80	27.2	18.1	1 125

在菊粉提取液进行脱盐时,部分菊粉会吸附在树脂上。从表 4 中可以发现,采用组合 A 进行脱盐时吸附在树脂上的菊粉达到 18.1 mg/mL(以湿树脂计)。这样损失量在实际的工业生产上是相当可观的,应予以回收。然而洗脱液中的菊粉含量很低(27.2 mg/mL),无论是采用纳滤还是采用真空浓缩进行回收,经济上都是不合算的。在实际生产中可将这部分稀糖液返回到提取罐中进行回收,同时也充分利用了水资源。从表 4 中还可以发现,在用水洗脱菊粉的同时,许多盐离子也被洗脱下来,造成菊粉洗脱液的电导率大幅度升高。

### 3 结论

经过初步筛选,从 16 种不同类型的树脂中筛选出脱盐性能较好的安徽皖东 D001-F、上海华震 HD-8、上海华震 D202、安徽皖东 D301 $\times$ 7、邢台民生 D301 和上海华震 D315。将初筛出的上述 6 种离子交换树脂按照阴 $\rightarrow$ 阳 $\rightarrow$ 阴的串联方式组成 4 种离子交换柱组合进行脱盐试验,确定组合 A 即上海华震 D202 $\rightarrow$ 安徽皖东 D001-F $\rightarrow$ 上海华震 D315 为菊粉提取液脱盐的最佳树脂组合。经组合 A 处理后,所收集的菊粉提取液电导率从初始的 5 050  $\mu\text{s}/\text{cm}$  降至 240  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ,满足了菊粉成品灰分含量  $\leq 0.1\%$  的要求。离子交换柱处理量为 4 倍柱体积。采用组合 A 进行脱盐时吸附在树脂上的菊粉达到 18.1 mg/mL(以湿树脂计),因而应回收洗脱液中的菊粉,以提高菊粉提取的收率。

### 参考文献:

- [1] 魏凌云,王建华,郑晓冬,等.菊粉研究的回顾与展望[J].食品与发酵工业,2005,31(7):81-85
- [2] 林榕,陈封怀,黄秀兰.中国植物志[M].北京:科学出版社,1979,75:358-359
- [3] 孙艳波,颜敏茹,徐亚麦.菊粉的生理功能及其在乳制品中的应用[J].中国乳品工业,2005,33(8):43-44
- [4] 郑辉杰,陈洵,邱进申,等.离子交换树脂对海藻糖乙醇提取液脱盐脱色的研究[J].河北工业大学学报,2008,37(5):37-43
- [5] 大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994:178-180

收稿日期 2011-10-09

(上接第 33 页)

确定出八角茴香莽草酸的最佳提取条件为:提取时间为 3.0 h,料液比是 1:22(g/mL),提取温度是 83  $^{\circ}\text{C}$ ,单因素实验确定其最佳提取次数为 3 次。在最佳提取工艺条件下的一次提取率为 8.779%,一次提取理论预测值为 8.873%。实际提取率比理论预测值仅低了 0.094%,因此该二次回归数学模型能准确的预测八角茴香中莽草酸的提取率。

### 参考文献:

- [1] 陈骁熠,袁利,王敏,等.马尾松、侧柏和八角茴香中的莽草酸含量分析[J].湖北农业科学,2009,48(5):1238-1240
- [2] Fang A Q, Demain A L, Wong G K. Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophyllin and nigericin [J].The journal of antibiotics,2000,53(2):158
- [3] 林洁,兰琪欣,韦应芳,等.八角茴香药用成分的提取及其镇痛作

用的实验研究[J].右江民族医学院学报,2008,30(2):195-196

- [4] Huang F, Xiu Q. Anti-platelet and anti-thrombotic effects of triacetyl shikimic acid in rats [J]. Journal of cardiovascular pharmacology, 2002, 39(2):262-270
- [5] Ma Yi, Xu Qiu-Ping, Sun Jian-Ning. Antagonistic effects of shikimic acid against focal cerebral ischemia injury in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1999, 20(8):696-700
- [6] 高洪霞,刘军海,于波涛.响应面分析法优化辣椒红色素提取工艺条件[J].食品研究与开发,2009,30(10):177-181
- [7] TH 克罗马蒂,ND 波尔格.莽草酸的检测方法:中国,00806428.8 [P]. 2002-05-29
- [8] 徐效圣,潘俨,傅力,等.响应面法优化水酶法提取核桃油的工艺条件[J].食品与机械,2010(2):92-96

收稿日期 2011-12-01