

# 八角莽草酸不同纯化方法的比较研究

舒馨\*, 刘雄民, 赵凤妹

广西大学 化学化工学院, 南宁 530004

**摘要:** 利用重结晶、醇沉和柱层析等方法对八角莽草酸进行提取纯化, 并比较了不同方法的纯化结果。结果表明: 乙醇沉淀法的纯化效果明显, 醇沉后进行硅胶柱或大孔树脂柱层析分离纯化莽草酸的效果都大为提高, 纯度都达到 82% 以上。利用一种新的洗脱体系-乙酸乙酯和甲醇的混合溶剂, 用于硅胶柱层析法纯化莽草酸, 能将莽草酸与其近似物很好地分离, 纯度达到 94.6%, 纯化的效果优于大孔树脂柱。最终确定了高效提取纯化莽草酸的工艺流程: 微波提取——醇沉法初步纯化——柱层析法进一步纯化。

**关键词:** 莽草酸; 纯化; 醇沉法; 柱层析法

中图分类号: O652

文献标识码: A

## Comparative Study on Different Purification Methods of Shikimic Acid from *Illicium verum* Hook. f.

SHU Xin\*, LIU Xiong-min, ZHAO Feng-mei

College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

**Abstract:** In this study, different methods, including recrystallization, ethanol precipitation and column chromatography, for the purification of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. f. (star anise) were explored and compared. The results showed that ethanol precipitation method had good purification effect. After the step of ethanol precipitation, the purities of shikimic acid were greatly improved and reached to >82% after further purification using silica gel or macroporous resin column chromatography. A new elution system using in silica gel column chromatography was established, which contained ethyl acetate and methanol solution. Under the new elution system, silica gel column chromatography successfully separated shikimic acid and its structurally-similar compounds. The purity of the purified shikimic acid was 94.6%, showing a better purification effect than that of macroporous resin. Finally, a high efficient process for the extraction and purification of shikimic acid was obtained as follows: microwave extraction-preliminary purification with ethanol precipitation-further purification with column chromatography.

**Key words:** shikimic acid; purification; ethanol precipitation; column chromatography

莽草酸 (shikimic acid) 是生产磷酸奥司他韦 (商品名: 达菲) 的关键原料, 近年来流感大暴发使莽草酸的需求量不断增加。莽草酸分子结构中有三个羟基、一个羧基、一个双键。自从 1885 年莽草酸首次从日本芒草的果实中被分离得到, 人们不断研究新的方法从各种植物中提取莽草酸<sup>[1]</sup>。提取方法包括浸提法<sup>[2]</sup>、索氏提取<sup>[3,4]</sup>、超声波辅助提取<sup>[5]</sup>及微波辅助提取<sup>[6]</sup>等, 已有的报道分离纯化莽草酸多用硅胶柱层析。

莽草酸广泛存在于各种植物中, 其中以八角科

植物八角茴香中莽草酸的含量最高。八角茴香, 主要分布在中国的广西、云南、广东等省, 福建南部和台湾有少量栽培, 越南也有一定产量, 是中国南亚热带特有的“药食同源”的珍贵经济树种。目前提取莽草酸是八角最重要和最具经济价值的应用之一。虽然人们对八角中莽草酸的提取和应用研究很重视, 研究成果颇多, 但由于八角果实基体复杂, 含有大量的多糖和挥发油, 且莽草酸极性较强, 造成提取分离纯化工作不易, 工业生产流程长、设备要求高、操作较复杂、成本相对较高。因此研究八角中莽草酸的提取与纯化方法具有重要实用意义, 有利于提高八角的综合利用率。本文全面地比较了多种莽草酸纯化方法并进行了改进, 确定了高效提取纯化莽草酸的工艺流程。

# 1 实验部分

## 1.1 仪器与试剂

原料:八角,产地广西,广西大学精细化工研究所鉴定为木兰科植物八角的干燥果实。

高效液相色谱仪(HPLC):配备 LC-20AT 泵、SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司)、Agilent 1100 柱温箱(美国安捷伦公司)、Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 天津天和公司);傅立叶变换红外光谱仪 FTIR-8400S(日本岛津公司);旋转蒸发器 RE-52A(上海亚荣生化仪器厂);集热式恒温磁力加热搅拌器 DF-101B(巩义市英峪予华仪器厂)。

莽草酸(标准品, Alfa Aesar A Johnson Matthey Company);乙腈(色谱纯, Fisher Scientific);硅胶(层析用, 青岛海洋化工厂分厂);大孔吸附树脂(层析用, 天津南开大学化工厂)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 莽草酸粗提物的制备

将干燥八角果实粉碎,过 60 目筛,烘干,制得干燥八角粉。称取 100 g 八角粉末,以水为溶剂(料液比 1:25),微波功率 800 W,提取 3 次,每次 10 min,温度为 90 ~ 100 °C。油水分离器分离、收集挥发油(挥发油的提取率为 7%)。所得水溶液抽滤,离心,取上层清液,减压浓缩,干燥,即得莽草酸粗提物。

### 1.2.2 莽草酸的纯化

#### 1.2.2.1 重结晶法

称取适量莽草酸粗提物,于 50 °C 乙酸乙酯中浸泡 10 min,过滤,重复两次。残留物用丙酮回流提取 5 min,重复两次,过滤。滤后的固体用甲醇-丙酮重结晶两次,即得莽草酸重结晶纯化物。

#### 1.2.2.2 醇沉法

取适量 1.2.1 制得的莽草酸水提液,加入 3 倍体积的无水乙醇,沉淀,置于冰箱过夜。离心,去除醇沉物沉淀,清液旋蒸浓缩,所得溶液为醇沉液。醇沉液减压浓缩,干燥,即得莽草酸醇沉纯化物。

#### 1.2.2.3 硅胶柱层析法

用 100 ~ 200 目硅胶 30 g,湿法装填 Φ 1.1 cm × 30 cm 常压玻璃层析柱。上样液为 3 mL 莽草酸醇沉液。采用不同配比的乙酸乙酯和甲醇溶剂体系(1:0、10:3、1:1、0:1)进行分段洗脱,最后用去离子水洗脱。流速控制为 0.5 mL/min,用自动收集器分段收集洗脱液,10 min/管,每种洗脱体系接 10 管,每管溶液分别进行 UV 检测,测定 213 nm 时的吸光度值。最后根据洗脱曲线收集莽草酸洗脱液并合并,减压浓缩,干燥,即得莽草酸硅胶柱纯化物,纯化物经 HPLC 分析,计算莽草酸的纯度。

#### 1.2.2.4 AB-8 大孔树脂柱层析法

AB-8 大孔树脂预处理后装柱(Φ 1.1 cm × 30 cm 常压玻璃层析柱),上样液为 3 mL 莽草酸醇沉液。用 50% 的乙醇进行洗脱,控制流速为 1 mL/min,5 min/管。将收集到的洗脱液分别进行 UV 检测,测定 213 nm 时的吸光度值。最后根据洗脱曲线收集莽草酸洗脱液并合并,减压浓缩,干燥,即得莽草酸大孔树脂纯化物,经 HPLC 分析,计算莽草酸的纯度。

### 1.2.3 红外光谱分析

取干燥莽草酸粗提物 20 μg,与 KBr 研磨混合后压片,采用 SHIMADZU FTIR-8400S 傅立叶变换红外光谱仪扫描测定。

### 1.2.4 莽草酸含量的 HPLC 测定

莽草酸含量采用 HPLC 法测定<sup>[7,8]</sup>。本实验采用的色谱条件如下:流动相:乙腈 ~ 1% 磷酸溶液(96:4);流速:0.80 mL/min;测定波长:213 nm;柱温:30 °C;进样量:5 μL。

# 2 结果与讨论

## 2.1 HPLC 测定结果

将莽草酸粗提物、重结晶纯化物、醇沉纯化物、硅胶柱纯化物、大孔树脂纯化物等样品液分别进行 HPLC 分析,得到各样品中莽草酸的纯度与提取率,结果见表 1。

表 1 纯化结果的比较

Table 1 Comparison of different purification results

组别 Items	洗脱时间 Elution time(min)	莽草酸含量 Shikimic acid content (mg/mL)	莽草酸纯度 Shikimic acid purity(%)	提取率 Extraction yield(%)
粗提物 Crude shikimic acid	-	0.468	39.7	13.1
重结晶纯化物 Recrystallization	-	0.510	42.5	4.0

醇沉纯化物 Ethanol precipitation	-	0.526	51.8	12.1
硅胶柱纯化物 Silica gel purification	300	0.770	94.6	4.7
大孔树脂纯化物 Macroporous resin purification	60	0.510	82.3	4.9

## 2.2 重结晶的纯化结果

溶剂提取所得的八角莽草酸粗提物中含有多种物质,除莽草酸外,还有糖等多种水溶性物质,因此粗提物中莽草酸的纯度较低,有必要对其进行纯化。传统的纯化方法有重结晶法<sup>[9]</sup>。实验中重结晶法提纯莽草酸的纯度为42.5%,提取率为4.0%,纯度不高,纯化效果不理想。

## 2.3 醇沉法的纯化结果

现有文献中,未发现利用醇沉法纯化八角莽草酸的报道。本实验采用75%的乙醇,沉降后能除去大部分多糖。醇沉纯化后,莽草酸的纯度由39.7%提高至51.8%,单醇沉一步就把莽草酸的纯度提高了12.1%,对莽草酸的纯化起了很大的作用,纯度高于重结晶法。同时提取率大为提高,达到12.1%,约是重结晶法的3倍。

## 2.4 硅胶柱层析法的纯化结果

使用硅胶柱层析法纯化莽草酸,文献报道的洗脱体系有氯仿-丙酮、石油醚-乙酸乙酯等。本实验建立了一种新的洗脱体系-乙酸乙酯和甲醇的混合溶剂,以醇沉后的溶液作为上样液,洗脱曲线如图1所示。洗脱体系的极性由弱至强递增。从洗脱曲线可以看出,样品液被分为三段组分洗脱下来。Ⅰ:从第3管开始,出现第一段组分,第4、5管达到最高值,第10管后基本洗脱完毕,推测为莽草酸近似物, HPLC保留时间约为3.40 min。Ⅱ:第15管至第19管,洗脱出第二段组分,推测为另一莽草酸近似物, HPLC保留时间约为3.24 min;Ⅲ:第20管至第30管,第三段组分被洗脱完全,为莽草酸, HPLC保留时间为2.99 min。图2为硅胶柱层析法纯化前后 HPLC 色谱图。从图2(B)可知,经硅胶柱层析法纯

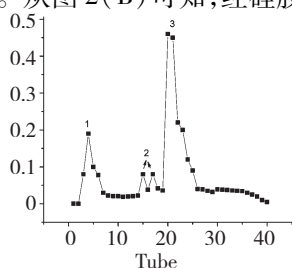


图1 硅胶柱层析的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of silica gel column chromatography

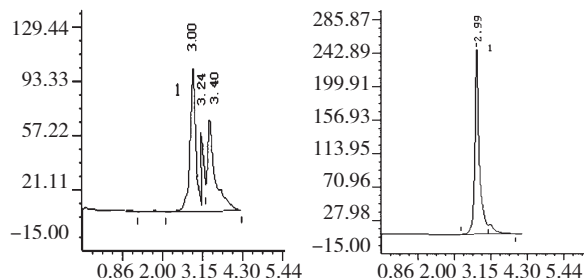


图2 硅胶柱纯化前(A)及纯化后(B)莽草酸的 HPLC 图  
Fig. 2 HPLC chromatograms of sample extracts before (A) and after (B) purification using silica gel column  
1:莽草酸;1:shikimic acid

化后,纯化物中基本只有莽草酸一个峰,莽草酸纯度达到94.6%。

## 2.5 大孔树脂柱层析法的纯化结果

乙醇具有安全、无毒、无残留等优点,故实验选用50%乙醇为解吸液。以醇沉后的溶液作为上样液,大孔树脂柱层析法纯化醇沉液的洗脱曲线如图3所示。从图3可知,从第2管莽草酸开始被洗脱,直至第12管基本洗脱完毕。HPLC 色谱图见图4。从图中可明显看出洗脱液中含有与莽草酸性相近的近似物,保留时间3.50 min。因此大孔树脂无法将莽草酸与其近似物分离,但可以将其其它大部分杂质分离,大孔树脂纯化物经 HPLC 测定,莽草酸纯度达到82.3%。而且采用50%乙醇洗脱时,整个洗脱过程较快,约60 min,仅需要使用约50 mL(第2管开始至第12管)的洗脱液就能基本将莽草酸洗脱完全,有利于下一步的浓缩。

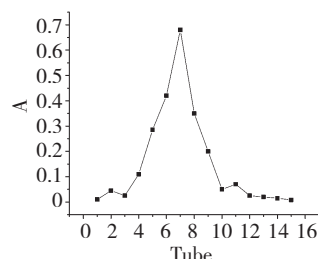


图3 大孔树脂柱层析的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of macroporous resin column chromatography

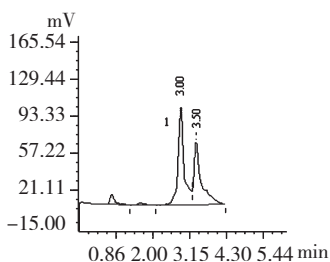


图4 大孔树脂纯化莽草酸的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatogram of sample extract after purification using macroporous resin column

1: 莽草酸; 1: shikimic acid

## 2.6 不同纯化方法的结果比较

比较不同纯化步骤后所得到的莽草酸,其结果显示:重结晶作为传统的纯化方法,纯化能力有限;醇沉法纯化效果明显,提取率大为提高;经过硅胶柱一次洗脱后,样品液被分为三段组分洗脱下来,莽草酸能与其近似物很好地分离,纯化后莽草酸的纯度达到 94.6%;大孔树脂柱一次洗脱后,莽草酸未能与其近似物分离,纯化后莽草酸的纯度达到 82.3%。因此得到以下结论:硅胶柱纯化的效果优于大孔树脂柱;但硅胶柱的洗脱时间较长,为大孔树脂的 5 倍。人们可以根据对纯度与速度的不同要求,选择不同的纯化方式。

## 2.7 红外光谱分析结果

纯化的莽草酸提取物红外光谱如图 5 所示。谱图分析:(1)3398.8  $\text{cm}^{-1}$ ,谱带宽而强,为缔合态 OH 伸缩振动;(2)2941.1  $\text{cm}^{-1}$ ,芳环上的 C-H 伸缩振动;(3)1741.7  $\text{cm}^{-1}$ ,羧酸的 C=O 键伸缩振动;(4)1634.9  $\text{cm}^{-1}$ ,C=C 伸缩振动;(5)1101.1  $\text{cm}^{-1}$ ,羧酸的 C-O 键的伸缩振动。提取物和文献<sup>[6]</sup>中所说的莽草酸对照品的特征峰吻合,谱图基本一致,综合 HPLC 测定结果,可认为二者同一。

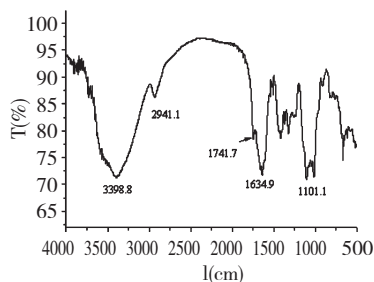


图5 莽草酸提取物的 IR 图

Fig. 5 IR spectrum of purified shikimic acid

## 3 结论

本实验比较和改进了八角莽草酸的提取纯化方法,确定了高效提取纯化莽草酸的工艺流程:微波提取——醇沉法初步纯化——柱层析法进一步纯化。醇沉法用于八角莽草酸的纯化少有见报道,效果明显,提取率高,对莽草酸的提取纯化起了很大的作用。同时建立了一种新的洗脱体系-乙酸乙酯和甲醇的混合溶剂,用于硅胶柱层析法纯化莽草酸,能将莽草酸与其近似物很好地分离,纯化效果优于大孔树脂柱。本文的研究结果对纯化利用八角莽草酸有一定的指导意义。

## 参考文献

- 1 Liza BE, Margaret LS, Ashley M. Liquidambar styraciflua: a renewable source of shikimic acid. *Tetrahedron Lett*, 2008, 49:2503-2505.
- 2 He XH(何新华), Liu L(刘玲), Liu XG(刘兴国), et al. Research on the extraction and purification of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. F. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:914-917.
- 3 Lin HL(林海禄), Peng XJ(彭雪娇), Luo MB(罗明标), et al. Research on ultrasonic wave extraction of shikimic acid in *Illicium verum* Hook. f. *Food Sci Technol*(食品科技), 2007(4):76-78.
- 4 Liu YY(刘永友), Liao XF(廖晓峰), Yu R(于荣). Research on reflux extraction of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. f. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2008, 29(5):88-93.
- 5 Zhang ZX(张志信), Li HC(李洪潮), Hu GH(胡国海), et al. 云南野生八角茴香中莽草酸含量测定. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20:1135-1136.
- 6 Lin HL(林海禄), Zhu XP(朱霞萍), Peng XJ(彭雪娇), et al. Extraction and characterization of shikimic acid from *Illicium verum* Hook. f. *Food Sci*(食品科学), 2008, 29:121-123.
- 7 Andreia PO, Jose AP, Paula BA. Organic acids composition of cydonia oblonga Miller leaf. *Food Chem*, 2008, 111:393-399.
- 8 Bharathi A, Wang YH, Troy J. Determination of shikimic acid in fruits of *Illicium* species and various other plantsamples by LC-UV and LC-ESI-MS. *Chromatographia*, 2009, 69:307-314.
- 9 Sui RH. Separation of sikimic acid from pine needles. *Chem Eng Technol*, 2008, 31:469-473.