新型含吡啶基树脂对甜菊糖中莱鲍迪甙 A 的富集与分离*

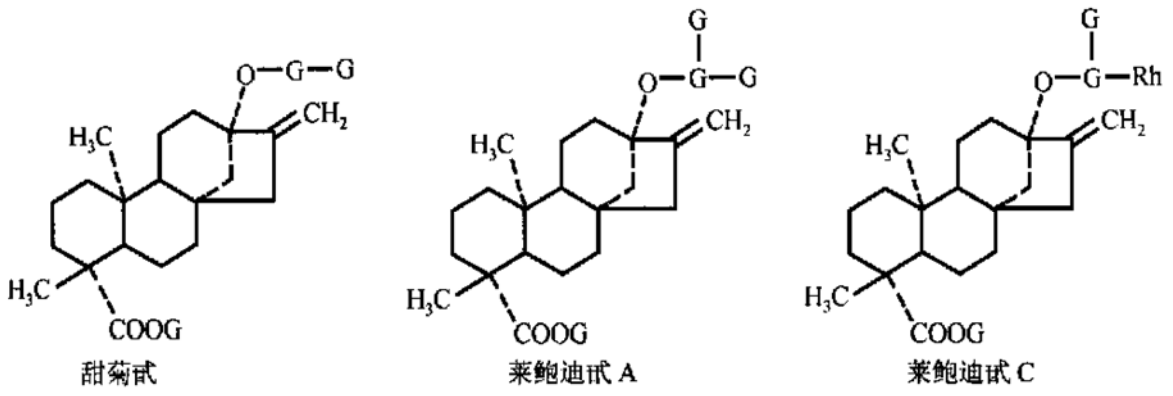
陈天红 张 杨 刘晓航 史作清 孙君坦 何炳林
(南开大学高分子化学研究所, 吸附分离高分子材料国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 研究了含吡啶功能基大孔吸附树脂对甜菊糖的吸附量与吸附选择性作用. 分析了树脂极性及不同骨架结构对吸附选择性的影响. 并分别通过甲醇或乙醇的选择性洗脱及树脂动态吸附分离两种方法研究树脂对甜菊糖中莱鲍迪甙 A 的富集作用. 结果表明, 树脂动态分离法可以有效地从高甜菊甙甜菊糖中分离富集出高莱鲍迪甙 A 产品, 该方法具有一定的工业应用前景.

关键词 吸附树脂 甜菊糖 莱鲍迪甙 A 分离

近年来, 由于食糖过量给人类健康带来诸多危害, 科学工作者们正不断致力于开发新型高甜度、非营养型的甜味代糖品. 甜菊糖是从甜叶菊(stevia rebaudiana bertoni)叶片中提取出来的一种天然甜味剂, 它以其高甜度、低热量、安全无毒等特点逐渐受到人们的青睐, 并已取代了一些人工合成的甜味剂如甜蜜素、仙客来等, 广泛为糖尿病、肥胖症患者及中老年人们所食用[1].

在甜菊糖已知的 8 种糖甙中, 呈味品质最好的组分是相对含量较高的莱鲍迪甙 A(RA). 而甜菊甙(SS), 特别是莱鲍迪甙 C(RC)都具有一定的不良余味及后苦味道, 严重影响着甜菊叶糖的味质[2]. 因此开发高 RA 甙低 RC 甙的甜菊糖产品是近年来甜菊糖生产工业的研究热点[3~5]. 从目前国际国内大面积种植的甜叶菊品种分析来看[6], 绝大多数甜菊叶中相对含量占前三位的糖甙顺序都为 SS, RA, RC, 其分子结构式如下:



G:葡萄糖基 Rh:鼠李糖基

SS 甙的含量约为 RA 甙的 2 倍左右. 由于 SS 和 RA 具有极为相近的分子结构和极性, 很

1998-02-10 收稿, 1998-10-21 收修改稿
* 国家教育委员会高等学校博士后基金(批准号: 98665504)和吸附分离高分子材料国家重点实验室基金资助项目

难用常规手段将其分离. 如何从高 SS 甙甜菊叶中提取分离味质更好的高 RA 甙甜菊糖是这一研究领域的难点. 在前文[7]研究中我们发现一些带有特殊极性功能基的大孔吸附树脂对甜菊糖 3 种糖甙的吸附表现出一定的选择性, 并运用树脂选择性吸附与层析分离相结合的方法, 通过简单的分离手段成功地从高 SS 甙甜菊糖中富集并分离出 RA 甙. 进一步研究发现, 在树脂的骨架结构适宜时, 含吡啶功能基的大孔吸附树脂对 SS 与 RA 甙具有更高的吸附选择性. 本文系统研究了该类树脂对甜菊糖各组分的选择性吸附作用及其对莱鲍迪甙 A 的富集与分离.

1 实验

1.1 树脂的合成

文献[8]的制备方法使苯乙烯、二乙烯基苯与第三单体进行悬浮共聚, 控制树脂粒度为 60~ 100 目, 并将制备出的树脂分别用 5% 的 HCl 和 1 mol/ L 的 NaOH 水溶液进行活化, 用水洗涤至中性后备用.

1.2 树脂的骨架结构表征

树脂的比表面积(S)及平均孔径(r)的测定方法参见文献[9].

1.3 树脂对甜菊糖各组分静态吸附选择性的测定

精确称取 0.2 g 干树脂放入 50 mL 锥形瓶中, 加入 4 mg/ mL 的甜菊糖水溶液 30 mL, 于 20 ℃恒温摇动至吸附平衡. 然后滤出吸附残液, 用上海第三分析仪器厂 UV-754 型紫外可见分光光度仪测定残液中总糖甙浓度, 计算树脂吸附量. 再用 Waters-510 型高效液相色谱仪(HPLC)测定吸附选择性, 0.5 μ NH_2 基色谱柱, 流动相为乙腈-水(75∶25 体积比), 流速 1.2 mL/ min, 室温测定, 紫外检测波长 210 nm.

1.4 树脂法动态富集分离莱鲍迪甙 A

1.4.1 选择性洗脱法富集 RA 量取一定体积的湿树脂, 装入内径为 0.8~ 1.0 cm 的交换柱中. 使甜菊糖水溶液以一定流速流经树脂床. 待树脂吸附达到饱和后, 先用 2~ 3 个床体积的蒸馏水洗涤树脂, 然后分别用不同浓度的甲醇或乙醇溶液进行洗脱, 等体积接收洗脱液, 稀释后用紫外分光光度法测定浓度, 再用 HPLC 检测洗脱液中 RA 与 SS 的相对含量.

1.4.2 树脂色层法富集 RA 量取一定体积的湿树脂, 装入内径为 0.8~ 1.0 cm 的交换柱中. 使甜菊糖水溶液以一定流速流经树脂床. 待树脂吸附达到泄漏点后, 自泄漏点起等体积接收流出液, 并用 HPLC 进行监测, 直至流出液中 RA/ SS 的比值与原溶液基本相等时停止接收. 树脂可用乙醇再生并反复使用.

2 结果与讨论

2.1 树脂的极性与骨架结构对吸附选择性的影响

我们[7]发现, 在具有相似骨架结构的吸附剂中, 含吡啶功能基的树脂对甜菊糖各糖甙表现出较高的吸附选择性, 因此进一步研究了这类树脂在不同极性及骨架结构情况下的吸附选择性作用(见表 1).

由表 1 可见, 树脂的吸附量与吸附残液中 RA/ SS 的比值随树脂极性的增强而显著下降. 因此可以推测, 这种吸附并非主要来自于化学相互作用, 而是受物理相互作用的影响, 即吸附

表 1　不同极性及骨架结构树脂对吸附量与吸附选择性的影响[a)]

编号	极性基团含量 /mmol•g^{-1}	比表面积 /m^2•g^{-1}	平均孔径 /nm	吸附量 /mg•g^{-1}	残液中 RA/SS
0	0	523.2	2.19	404.2	0.72
1	0.19	474.8	4.09	427.4	0.80
2	0.29	481.2	6.23	431.8	0.78
3	0.29	484.5	4.91	460.3	0.82
4	0.29	523.4	3.94	474.3	0.84
5	0.29	540.3	2.36	456.0	0.82
6	0.48	453.6	8.42	412.9	0.74
7	0.95	382.0	10.68	381.4	0.73
8	1.90	299.5	12.22	318.3	0.71

a) 原糖浓度：4 mg/mL，RA/SS= 0.67

质分子 RA 与 SS 在溶液中的极性及溶解度差异使得它们在吸附剂表面的富集能力有所不同. 但完全没有极性的苯乙烯-二乙烯苯吸附剂的吸附量与吸附选择性也显著低于含有少量极性基团的吸附剂. 一般来讲, 单纯物理吸附的吸附量是随吸附剂比表面积的增大而增大的, 而含少量极性基团的树脂具有比苯乙烯型树脂低得多的比表面积, 却表现出更高的吸附量与吸附选择性. 这说明少量吡啶基的存在对树脂的性能具有不可忽视的作用. 一方面, 极性功能基的存在使大孔树脂在成球过程中较早出现相分离, 由于静电排斥作用使大分子在堆积过程中的平均孔径尺寸有所增加, 因而更有利于吸附质分子进入树脂的孔道而被吸附. 另一方面, 吡啶的极性很强, 少量存在于树脂中有利于改善树脂的亲水性, 吡啶的裸 N 原子易于与水分子或吸附质分子上的羟基形成氢键作用, 从而使吸附质分子更容易向树脂表面扩散, 加快了吸附速率. 此外, 从吸附选择性角度分析, 一般吸附量较大的树脂选择性也较好, 但在吸附量相近的情况下, 选择设计适中的树脂孔径尺寸, 使吸附质中的 SS 分子可随意进出而 RA 分子则不易扩散进孔道内部, 也有利于提高树脂的选择性. 总之, 对于极性适中, 比表面积在 500 m^2/g 左右的吸附剂, 其平均孔径在 4.0 nm 左右时对甜菊糖中 SS 与 RA 的吸附选择性最好.

2.2　树脂的选择性洗脱研究

由静态吸附研究结果可知, 树脂对于 RA 和 SS 中极性和溶解度都相对较小的 SS 甙表现较高的吸附作用力. 因此设计选择具有一定极性的洗脱溶剂, 有可能使极性较强, 与吸附剂作用力较弱的 RA 分子优先被洗脱下来, 在洗脱液中实现对 RA 的富集. 图 1 和图 2 分别是使用不同浓度甲醇、乙醇水溶液的洗脱曲线, 其洗脱率及洗脱选择性结果列于表 2.

乙醇的极性较弱, 洗脱能力较强, 相同浓度下乙醇的洗脱率显著高于甲醇. 但是由于乙醇对 SS 与 RA 的溶解性都很好, 因此它的洗脱选择性不高, 即使在较稀的洗脱液中, 其 RA/SS 值也低于甲醇洗脱液, 这可能与乙醇较强的溶剂化能力有关. SS 在甲醇中的溶解度较小, 因此由表 2 可见, 甲醇洗脱液中 RA 与 SS 的比值比原糖有所提高, 其中当甲醇浓度在 50% 时, 洗脱液中的 RA/SS 可比原糖提高约 40% 以上. 但是总体来说, 通过醇的选择性洗脱法富集分离 RA 的能力十分有限. 这可能是由于醇的加入减小了溶剂体系的表面张力, 降低了溶剂与树脂之间的界面能, 使树脂对于吸附质的整体吸附能力都显著下降, 因而得不到理想的选择性结果.

2.3　动态吸附分离法富集 RA 的研究

将一定体积吸附选择性较高的 4 号树脂装入交换柱中, 使甜菊糖水溶液以适宜的流速流经树脂床, 于是在床体内的每一层树脂上都会发生树脂对吸附质分子的选择性吸附作用, 使静

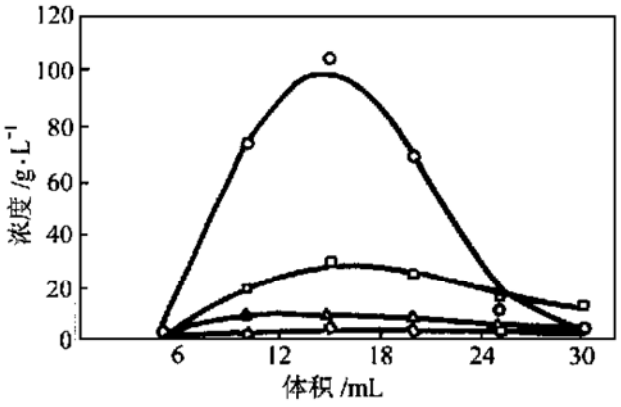


图 1 不同甲醇浓度的洗脱曲线

◇——10%, △——30%, □——50%, ○——80%

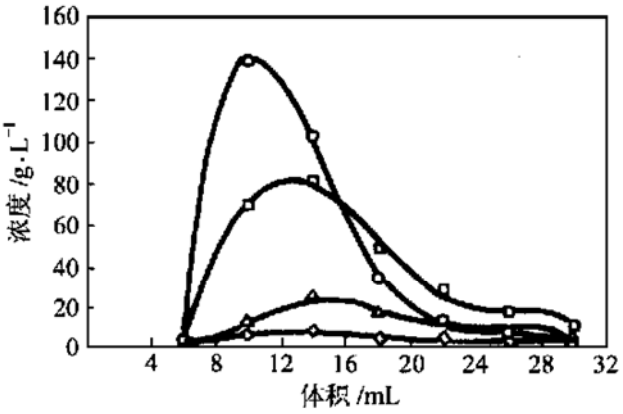


图 2 不同乙醇浓度的洗脱曲线

◇——10%, △——30%, □——50%, ○——70%

态吸附的弱选择性作用在树脂床体内的每一阶段被逐级放大. 因此, 流动相中 RA 与 SS 的比值在流动过程中不断被提高. 不仅如此, 上层流动相中高 SS 含量水溶液在流经已吸附饱和的树脂时, 溶液中高浓度的 SS 还可能与已被吸附在树脂表面的 RA 分子进行交换吸附与分配作用, 使 RA 分子游离, 而 SS 分子被吸附到原 RA 分子所占据的位点. 这种吸附质分子通过浓度及其与树脂间相互作用力差异在吸附剂与溶液之间的分配作用又进一步提高了树脂的吸附选择性. 当树脂吸附达泄漏点后, 初始泄漏液中 RA/SS 值可比原糖提高 4 倍以上(如图 3 所示), 而且 RC 的含量也有显著下降. 这种富集分离方法与色谱分离具有相似的机理, 但可处理甜菊糖容量却显著大于 HPLC 法(见表 3) .

表 2 不同浓度甲醇或乙醇的洗脱选择性和洗脱率[a)]

洗脱液	醇浓度/ %	洗脱选择性 RA/SS	洗脱率/ %
甲醇	10	0. 98	7. 0
	30	1. 03	24. 9
	50	1. 37	48. 8
	80	0. 86	96. 1
乙醇	10	0. 86	9. 6
	30	0. 88	29. 8
	50	0. 79	85. 2
	70	0. 77	98. 8

a) 原糖中 RA/SS= 0. 75

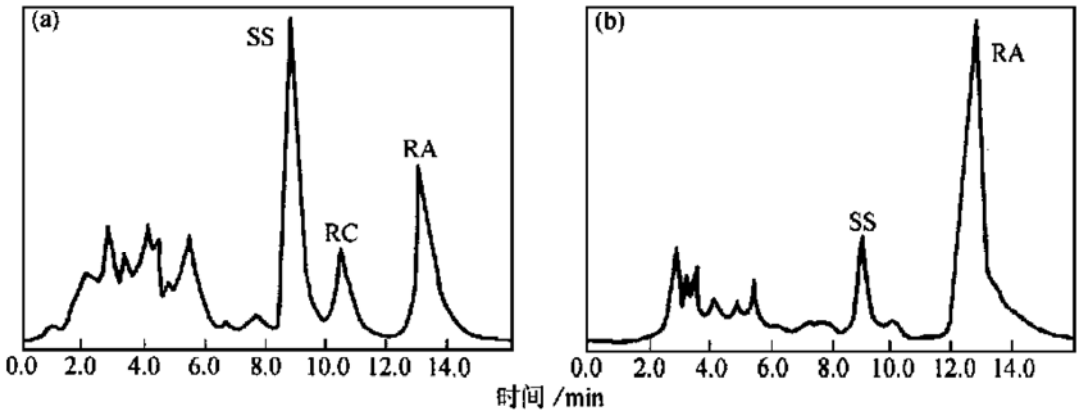


图 3 甜菊糖溶液的 HPLC 谱图

(a) 原溶液, (b) 动态分离后的泄漏液

表 3　树脂对甜菊糖中 RA 的富集作用[a)]

	RA/SS	RA/(SS+ RA+ RC)	RC/(SS+ RA+ RC)
原糖液	0.75	0.38	0.12
泄漏液体积[b)]/mL			
320~ 340	3.94	0.80	0.01
340~ 380	2.58	0.70	0.02
380~ 420	1.44	0.57	0.04
420~ 460	0.93	0.45	0.07
460~ 500	0.83	0.42	0.08
500~ 540	0.80	0.41	0.09

a) 10 mL 树脂, 使 4 mg/mL 甜菊糖溶液以 1 BV/h 的流速流经树脂床, 1 BV= 1 床体积

b) 320 mL 以后开始泄漏

图 4 和图 5 分别给出不同流速和甜菊糖水溶液浓度对动态分离富集的影响结果. 当浓度一定时, 动态分离的 RA/SS 值下降速度随流速的加快而趋于平缓, 且初始 RA/SS 值也随流速

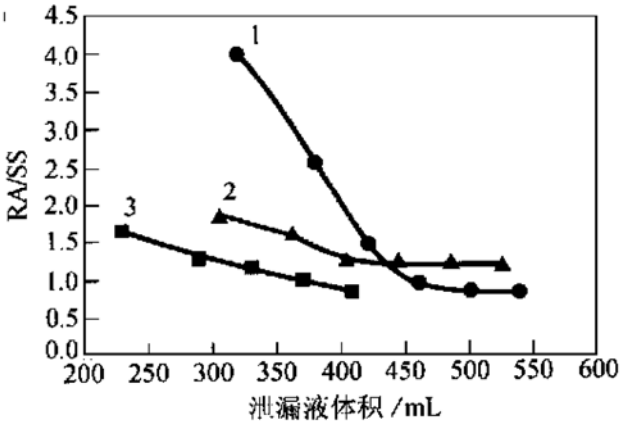


图 4　不同流速对富集结果的影响

1——1 BV/h, 2——2 BV/h, 3——4 BV/h

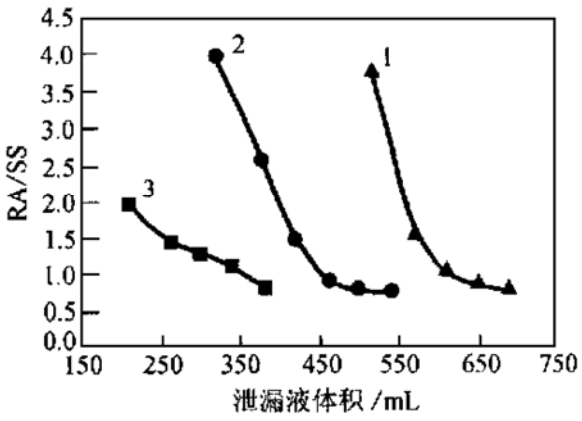


图 5　不同甜菊糖浓度对富集结果的影响

1——2 g/L, 2——4 g/L, 3——8 g/L

的加快而减小. 可见, 减慢流速有利于提高分离效果. 浓度对分离的影响存在一最佳范围. 浓度太高时, 由于一定体积树脂的选择性吸附能力有限, 因此分离富集效果不好; 而浓度太低时, 由于树脂的吸附量高, 对流动相中吸附质的吸附率大于 90%, 因此相对降低了选择性. 而且由于流动相浓度小, 树脂与流动相之间对吸附质的吸附分配作用也不显著. 由稀溶液的泄漏曲线可见, 尽管初始泄漏液中 RA/SS 值较高, 但其下降速度很快, 可处理容量也较小. 只有当流动相浓度在 4 mg/mL 左右时才可得到较为理想的富集效果.

此外, 交换柱的长径比对于分离富集的效果也有显著影响(如图 6 所示). 由于这种动态分离与柱层析作用机理基本相近, 因此延长分离柱的长度有利于提高分离富集的效果. 对于本实验所用的含吡啶基树脂, 分离柱长径比增加一倍, 可使树脂对 RA 的富集效果(以 RA/SS 值表示) 也提高约 1 倍以上.

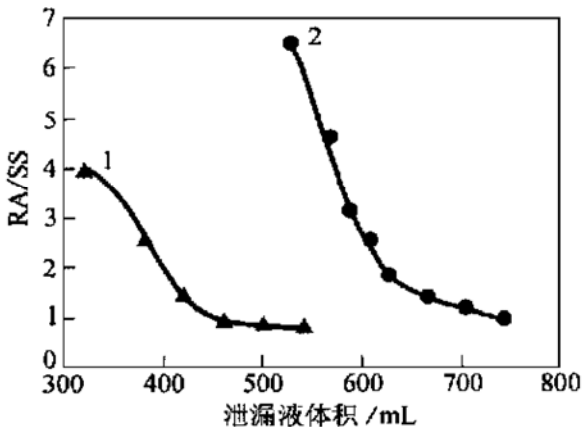


图 6　不同柱长径比对富集效果的影响

1——10 mL 树脂, 2——20 mL 树脂

参 考 文 献

1 Hanson J R, de Oliveira B H. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. Natural Product Reports, 1993, 10(3): 301~ 309

2 张 杨, 陈天红, 孙君坦, 等. 甜菊糖的组分分离与味质改进研究进展. 化学通报, 1998, 6: 11~ 16

3 Morita T, Nishimura M, Ishikawa H. Manufacture of a sweetener difficult to dissolve in water from stevia extract. JP Patent, 07, 177, 802, 1995

4 舒世珍. 中国甜菊栽培及应用技术. 北京: 农业出版社, 1994. 249

5 张亚雄, 胡为民, 胡 滨. 甜菊糖中 A_3 甙分离方法初探. 湖北化工, 1997, 2: 43~ 44

6 Makapugay H C, Nanayakkara N P D, Kinghorn A D. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the Stevia rebaudiana sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. J Chromatography, 1984, 283: 390~ 395

7 陈天红, 张 杨, 刘晓航, 等. 高分子吸附剂对甜叶菊中各糖甙的吸附选择性研究. 中国科学, B 辑, 1998, 28(5): 460~ 465

8 何炳林, 陈天红, 张 杨, 等. 中国专利, CN98104776.9, 1998

9 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂. 上海: 上海科技教育出版社, 1995. 104~ 107, 109, 111~ 112