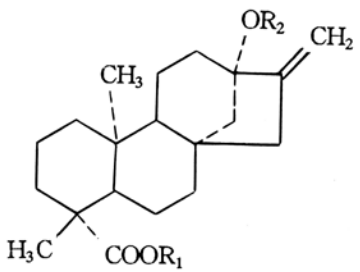
高分子吸附剂对甜叶菊中各糖甙吸附选择性的研究*

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,吸附分离功能高分子材料国家重点实验室,天津 300071)

摘要 设计并合成了一系列疏水性(包括非极性和不同极性)和亲水性大孔吸附树脂,研究它们对甜叶菊糖甙的吸附性能与吸附机理. 紫外光谱与 HPLC 研究表明,吸附剂的骨架结构和极性对总甙吸附量及其对甜菊甙和莱鲍迪甙 A 的吸附选择性有显著影响. 并利用树脂对不同极性糖甙吸附的弱选择性作用成功地分离出莱鲍迪甙 A 产品.

关键词 大孔吸附树脂 甜菊糖 吸附选择性 分离 莱鲍迪甙 A

甜菊糖是从甜菊叶中提取出来的一种高甜度、非糖、非营养型安全可靠的天然甜味剂,它主要由 8 种已知糖甙组成. 其基本化学结构如下图所示.



甜叶菊总糖甙中各组分名称及相对干叶含量列于表 1[1]. 其中甜菊甙(SS)、莱鲍迪甙 A(RA)和莱鲍迪甙 C(RC)在总糖中的相对含量较高,也是影响甜菊糖味质的主要成分. SS 甙的甜度是蔗糖的 270~280 倍,但它带有一定的不良余味. RC 甙的甜度不到蔗糖的 50 倍,且有较强的后苦味及不良余味. RA 甙的甜度最高,大于蔗糖的 300 倍,而且味质也最好,不含任何不良余味,是一种最为理想的天然甜味剂产品,提取分离高 RA 甙含量的甜菊糖产品是近年来国际、国内甜菊糖生产工业的研究热点. 然而,由于这几种糖甙具有相同的甙元,其结构与分子极性都非常相近,因此很难用常规手段将其分离,特别是分离高纯度、高品质的 RA 产品. 迄今为止,有关甜菊糖各组分分离报道的主要手段有:高效液相色谱法(HPLC)[2~5]、薄层色谱法(TLC)[6,7]、滴液逆流色谱法[8]、毛细管电泳法[9,10]、超临界萃取法[11,12]等,但这些

1997-10-09 收稿,1998-01-09 收修改稿
* 国家博士后基金、吸附分离功能高分子材料国家重点实验室基金资助项目

方法的可处理量小，都不适合开发工业化生产．近年来，日本出现了从一种特殊的高 RA 甙含量的甜菊叶中通过重结晶法提取分离 RA 的报道[13,14]，其产品已开始打入国际市场．但他们所选用的甜菊叶原料较难获得．利用树脂吸附的弱选择性特点分离甜菊糖的研究目前尚无人问津．本文在研究不同极性高分子吸附剂对甜菊糖的吸附机理与吸附选择性的同时，尝试了利用大孔吸附树脂选择性吸附的作用分离高 RA 含量的甜菊糖产品．

表 1　甜叶菊总糖甙中各组分结构及相对干叶含量[a)]

名称	R_1	R_2	含量/%
甜菊甙	-G	-G-G	6.0～8.0
莱鲍迪甙 A	-G	-G-G（G）	2.0～3.0
莱鲍迪甙 B	-H	-G-G（G）	≪1.0
莱鲍迪甙 C	-G	-G-Rh（G）	～1.0
莱鲍迪甙 D	-G-G	-G-G（G）	≪1.0
莱鲍迪甙 E	-G-G	-G-G	≪1.0
斯替维伯甙	-H	-G-G	≪1.0
杜尔可甙 A	-G	-G-Rh	0.4～0.6

a)表中 G 为葡萄糖基，Rh 为鼠李糖基

1　实验

1.1　树脂的合成

二乙烯苯与苯乙烯以及带有不同极性官能团的极性单体进行悬浮共聚，以甲苯和液蜡为混合致孔剂，氯化钠水溶液为悬浮剂，BPO 引发共聚合．参与共聚的极性单体有：甲基丙烯酸甲酯、乙酸乙烯酯、4-乙烯基吡啶、丙烯腈等．共聚产物得到 80～160 目白色大孔树脂，交联度大于 40%，经乙醇、石油醚抽提处理后，50℃以下减压干燥备用．

1.2　树脂的骨架结构表征

树脂的表观密度（ρ_a）由汞比重瓶法测定；骨架密度（即真密度 ρ_t）由正庚烷比重瓶法测定．比表面积（S）由 BET 法测定．孔体积（V）和孔度（ρ）由表观密度和骨架密度值计算；平均孔径（r）由孔体积和比表面积值计算[15]．

$$V = \frac{1}{\rho_a} - \frac{1}{\rho_t},\quad \rho = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_t},\quad r = \frac{2V}{S}.$$

1.3　树脂对甜菊糖吸附量与吸附选择性的测定

精确称取 0.2 g 干燥的大孔树脂置于 50 mL 锥形瓶中，加入 25 mL 4 mg/mL 的甜菊糖水溶液，于 25℃摇床上摇动 8 h 以上，然后滤出残液，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 型高效液相色谱仪测定吸附选择性，0.5 μm NH_2 基色谱柱，流动相为乙腈-水（体积比为 75∶25），流速 1.2 mL/min，室温测定，紫外检测波长 210 nm．

1.4 动态法分离富集莱鲍迪甙 A

量取 10 mL 湿树脂,装入内径为 1.0 cm 的交换柱中. 使 4 mg/mL 浓度的甜菊糖水溶液以一定流速流经树脂床. 自泄漏点起等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至流出液中的 RA/SS 比值与原液基本相等时停止接收. 树脂用 70% 的乙醇再生,然后再用水洗净后可反复使用.

2 结果与讨论

2.1 树脂的吸附量与骨架结构

用悬浮聚合法合成了系列大孔非极性树脂、含有不同极性功能基的大孔吸附树脂以及强亲水性吸附树脂,表 2 列出了它们对甜菊糖总甙的静态吸附性能.

表 2 不同性质的大孔吸附树脂对甜菊糖的静态吸附

树脂编号	极性基团	极性基团含量 /mmol·g^{-1}	吸附量 /mg·g^{-1}干树脂	吸附率/%
1	无	0	325.0	77.95
2	$-COOCH_3$	0.25	370.0	88.74
3	$-OCOCH_3$	0.58	278.8	66.56
4	$-OCOCH_3$	1.74	313.8	75.25
5	$-NH_2$	0.34	325.0	77.95
6	$-NH_2$	2.10	313.8	75.25
7	吡啶基 C_5H_4N-	0.48	359.4	86.18
8	吡啶基 C_5H_4N-	0.95	296.3	71.05
9	$-CN$	0.94	303.1	72.70
10	$-CN$	2.83	159.4	38.23
11	$-CONH_2$	>8.5	29.3	5.8
12	葡糖基 $C_6H_{11}O_5-$	>3.3	22.4	4.5

亲水性吸附剂如 11,12 号树脂对甜菊糖的吸附量很小,几乎没有什么吸附作用. 而非极性的大孔苯乙烯/二乙烯苯树脂对甜菊糖的吸附量很高. 带有少量甲基丙烯酸酯或吡啶功能基的弱极性树脂的吸附量高于完全非极性树脂,但随极性基团含量的增加,其吸附量又有所下降. 这说明甜菊糖中的各糖甙如 SS, RA, RC 在树脂上的富集主要是通过疏水性的甙元与树脂骨架之间的物理吸附作用. 少量极性基团的加入可以适当减小树脂在不同溶剂中的溶胀度变化,改善树脂的亲水性,加速吸附质向吸附剂的靠近过程,而最终的吸附作用还是以 van der Waals 力为主. 另外. 加入极性基团对树脂的骨架结构也有显著影响(如表 3 所示).

带有极性功能基的高交联度大孔吸附树脂,由于各极性基团之间有静电排斥作用以及在聚合成球过程中极性链节在致孔剂中溶解度的减小,致使平均孔径有所增大. 而且单体的极性越强,形成的孔道均匀性也越差,尤其会形成特大孔,结果使比表面积减小. 由于吸附质与吸附剂分子之间的作用力主要以 van der Waals 力作用为主,因此不需要树脂具有较高的极性,而希望保持较大的比表面积和适当的孔径,允许甜菊糖甙分子能够自由进出孔道并与树脂有充分的接触面积发生吸附作用. 由表 2、表 3 综合分析可见,对于带有少量甲基丙烯酸甲酯基、胺基和吡啶基的吸附树脂,其比表面积近于 500 m^2/g,平均干树脂孔径在 3~8 nm 左右时对甜菊糖总甙的吸附量最高,甚至高于高交联度的大孔非极性树脂.

表 3　不同性质大孔吸附树脂的骨架结构[a)]

树脂编号	骨架密度 /g·mL^{-1}	表观密度 /g·mL^{-1}	比表面积 /m^2·g^{-1}	孔体积 /mL·g^{-1}	孔度/%	平均孔径/nm
1	0.986	0.630	523.2	0.573	36.1	2.19
2	1.020	0.590	492.0	0.751	42.2	3.05
3	1.036	0.424	531.9	1.393	59.1	5.24
4	1.040	0.321	448.7	2.154	69.1	9.60
5	0.967	0.728	547.2	0.340	24.7	1.24
6	1.035	0.605	528.1	0.687	41.5	2.60
7	0.973	0.343	453.6	1.888	64.7	8.32
8	0.943	0.323	382.0	2.036	65.7	10.66
9	0.941	0.399	464.8	1.444	57.6	6.21
10	0.928	0.351	269.4	1.771	62.2	13.15

a)干态树脂结构，树脂编号同表 2

2.2　树脂的吸附选择性

表 4 反应了不同极性吸附树脂对甜菊糖中两种主要糖甙 RA 和 SS 的静态吸附选择性.

表 4　树脂对 RA 甙和 SS 甙的吸附选择性[a)]

树脂编号	极性基团含量 /mmol·g^{-1}	SS 吸附率/%	RA 吸附率/%	残液中 RA/SS
1	0	76.72	74.17	0.75
2	0.25	86.19	84.26	0.86
3	0.58	69.10	63.61	0.79
4	1.74	72.21	66.98	0.80
5	0.34	78.31	72.82	0.84
6	2.10	72.94	67.55	0.81
7	0.48	78.73	77.01	0.74
8	0.95	67.32	64.73	0.74
9	0.94	67.89	61.55	0.81
10	2.83	36.65	32.45	0.72

a)原糖浓度为 4 mg/mL，RA/SS=0.67

一般而言，物理吸附的选择性与专一性远远低于化学吸附作用. 但是不同极性的吸附质分子在吸附剂表面被吸附的过程中的确存在一定的选择性作用. 与 RA 相比，SS 甙在 13 位碳少了一个亲水的萄葡糖基，因此它的极性相对小于 RA 甙，在水中的溶解度也略低于 RA. 由表 4 可见，依据极性相近的原则，非极性树脂对 SS 的吸附率高于 RA，使残液中的 RA/SS 比值比原溶液提高了 10%. 少量极性基团的加入有利于提高这一吸附选择性作用，特别是 2，3 号弱极性树脂比非极性树脂的选择性有显著提高，其吸附残液中的 RA/SS 比值比原溶液提高了 25%以上. 由于少量极性功能基改善了树脂的亲水性，使树脂的孔道及其微孔的内表面都很容易被溶液浸润，吸附质分子 RA 和 SS 也就更容易接近吸附剂表面发生吸附作用. 不仅如此，溶液中的 RA 与 SS 分子在靠近吸附剂表面的同时，与已被吸附的吸附质之间通过极性选择作用还可能发生一定程度的吸附与交换吸附，即溶液中游离的极性较小的 SS 可能与已被吸附的高极性的 RA 发生吸附交换作用，使 SS 被吸附而 RA 游离，从而进一步提高了选择性.

2.3　树脂对 RA 的分离

简单的静态吸附使不同溶质分子在溶液与吸附剂之间分配系数的改变是十分有限的，但是如果将树脂选择性吸附的特点与柱层析作用相结合，通过动态吸附分离法将实现更好的分

离效果. 实验表明,利用大孔吸附树脂的选择性吸附与吸附交换作用,再结合动态柱层析效应可以从高 SS 含量的甜菊叶中提取分离出高 RA 含量的甜菊糖产品.

将选择性较高的 2 号树脂装入交换柱中,使甜菊糖水溶液以一定的流速流经树脂,在树脂柱中经过每一层树脂的选择性吸附与吸附交换作用之后,流出液中的 RA/SS 值显著高于原糖,而且 RC 的含量也相应有所减少(如图 1 所示). 这种通过大孔吸附树脂动态分离富集 RA 的方法是目前未见有国内外文献报道的. 它集树脂的吸附选择性与色谱的层析效应于一体,方法简便,易于开发工业化应用.

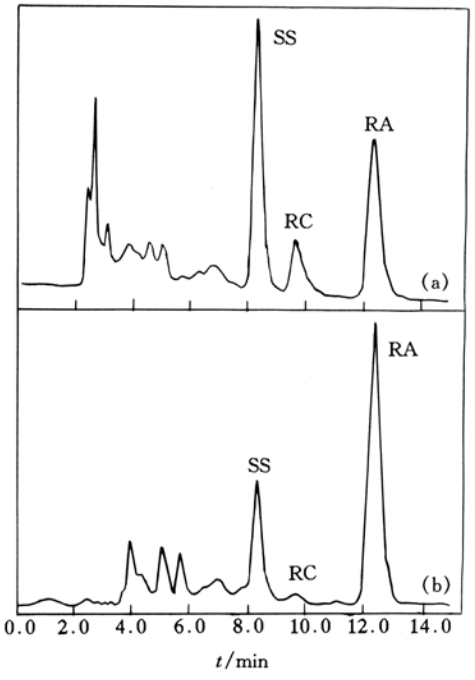


图 1 甜菊糖溶液的 HPLC 谱图

(a)原溶液,RA/SS=0.67,(b)动态分离后的流出液,RA/SS=1.99

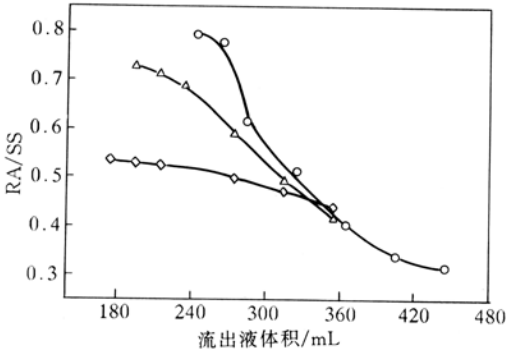


图 2 不同流速的动态分离曲线

○——10 mL/h, △——20 mL/h, ◇——40 mL/h, 树脂床体积为 10 mL,原糖液中,RA/SS=0.313

动态分离的初始 RA/SS 比值随流速的加快而减小(见图 2),且 RA/SS 的下降速度也随流速的加快而趋于平缓. 这说明当溶液流速较快时,游离的溶质分子与吸附剂表面被吸附分子之间来不及发生充分的吸附交换与分配作用,因而使树脂的选择性能力有所下降. 另外,增加树脂柱的长径比也有利于提高 RA 含量. 实验表明,树脂柱长径比增加一倍,可使流出液中初始 RA/SS 提高 4 倍以上. 此外,若将经过树脂处理的高 RA 含量甜菊糖再进行甲醇/水重结晶,通过调节水醇比,可以得到纯度高于 90% 的 RA 产品.

参 考 文 献

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

2 Dobberstein R H, Ahmed M S. Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from Stevia rebaudiana plants. US

Patent, 4 361 697, 1982

3 Ahmed M S, Dobberstein R H. Stevia rebaudiana. Ⅱ. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C. J Chromatogr, 1982, 236(2): 523～526

4 Ahmed M S, Dobberstein R H. Stevia rebaudiana. Ⅲ. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of rebaudioside B, D and E, dulcoside A and steviolbioside. J Chromatogr, 1982, 245(3): 373～376

5 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 Chromatogr, 1984, 283, 390～395

6 Metivier J, Viana A M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of Stevia rebaudiana Bert by two-dimensional thin layer chromatography. J Exp Bot, 1979, 30(117): 805～810

7 Sherma J, Norfolk E. Quantitative TLC determination of stevioside and rebaudioside A in beverages. J Liq Chromatogr, 1992, 15(17): 2 981～2 988

8 Kinghorn A D, Nanayakkara N P D, Soejarto D D, et al. Potential sweetening agents of plant orgin. Ⅰ. Purification of Stevia rebaudiana sweet constituents by droplet countercurrent chromatography. J Chromatogr, 1982, 237(3): 478～483

9 Liu J, Li S F Y. Separation and determination of Stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatogr. J Liq Chromatogr, 1995, 18(9): 1 703～1 719

10 Mauri P, Catalano G, Gardana C, et al. Analysis of Stevia glycosides by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 1996, 17(2): 367～371

11 Kienle U. Process for the perparation of a natural sweetening agent from Stevia rebaudiana and its use. EP Patent, 335 265, 1989

12 Tan S, Shibuta Y, Tanaka O. Isolation of sweetener from Stevia rebaudiana. JP Patent, 63 177 764, 1988

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

14 Katanami T, Kitatsume M. Prep of Stevia sweetener. JP Patent, 07 143 860, 1995

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