

大孔吸附树脂纯化甜菊糖苷的工艺研究

赵兴华, 张全香, 苑晓威, 皮国沛*

沧州宝恩吸附材料科技有限公司, 河北 沧州 061000

摘要: 目的 筛选出对甜菊糖苷纯化性能较好的大孔吸附树脂, 优化树脂吸附、解吸工艺。方法 采用静、动态吸附、解吸的方法对 5 种树脂进行筛选; 对吸附液 pH 值、吸附流量、树脂用量、解吸剂流量及用量等工艺参数进行优化, 并考察工艺稳定性。结果 所选大孔树脂中, HPD-T01 树脂对甜菊糖苷的纯化效果较好, 其纯化甜菊糖苷的最优工艺条件为甜叶菊提取物与干树脂质量比为 1:1, 上柱液质量浓度为提取物 10 g/L 时, pH 值为 7, 吸附流量为 0.1 BV/min; 以 70%乙醇为解吸剂, 用量为 4 BV, 解吸流量为 0.04 BV/min。结论 HPD-T01 树脂对甜菊糖苷纯化效果最佳, 操作工艺简单, 具有工业化生产应用价值。

关键词: 甜菊糖苷; 大孔吸附树脂; 吸附-解吸; 工艺优化; HPD-T01 树脂

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1971-04

Purification technology of steviol glycosides by macroporous adsorption resin

ZHAO Xing-hua, ZHANG Quan-xiang, YUAN Xiao-wei, PI Guo-pei

Cangzhou Bon Adsorbing Material Technology Co., Ltd., Cangzhou 061000, China

Key words: steviol glycosides; macroporous adsorption resin; adsorption-desorption; technology optimization; HPD-T01 resin

甜叶菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni, 又称甜菊、甜草、糖草, 为菊科植物, 原产于南美地区。中国于 20 世纪 70 年代开始引种栽培成功。甜菊糖苷(甜菊总苷, steviol glycosides)^[1], 俗称甜菊糖, 是从甜叶菊叶片中提取得到的一类高甜度、低热量的天然甜味剂^[2]。甜菊糖苷具有热量低、甜度高、味质好、耐高温、稳定性好等特点^[3]。目前, 在国内外许多国家(地区)被广泛应用于糖果、饮料、食品、医药等行业, 被誉为“最佳天然甜味剂”, 是继甘蔗、甜菜糖之后, 又一种具有开发价值和健康推崇的天然蔗糖替代品, 被国际上誉为“第 3 糖源”^[4-5]。甜菊糖苷主要含有甜菊苷(stevioside, STV)、莱鲍迪苷 A(rebaudioside A, RA)、莱鲍迪苷 C(rebaudioside C, RC)、双糖苷、杜克苷等^[6-7]。高纯度的甜菊糖苷为白色结晶, 甜度为蔗糖的 150~250 倍, 甜味纯正, 其中 RA 的甜度最高, 为蔗糖的 350~450 倍, 口感最接近于蔗糖。

大孔吸附树脂分离技术是 20 世纪 60 年代末发展起来的分离技术之一^[8-9]。大孔吸附树脂物理化学

性质稳定, 比表面积大, 选择性好, 吸附条件温和, 再生处理方便, 强度高, 使用寿命长, 已在工业上得到了广泛应用^[10-11]。本实验采用大孔吸附树脂法对甜菊糖苷进行富集, 以期建立具工业化前景的甜菊糖苷纯化工艺。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), R-52AA 旋转蒸发仪、SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂), 电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂), 各型号玻璃色谱柱。

甜叶菊提取物(批号 20111204, 按 STV、RA、RC 计算甜菊糖苷质量分数为 42.9%)及 STV(批号 20110804)、RA(批号 20110910)、RC(批号 20110911)对照品由鞍山中兴生物科技有限公司提供, 质量分数均≥98%。

大孔吸附树脂: HZ818 购自华东理工大学华震科技贸易公司, RS-8 由西安朴天生物科技有限公司提供, AB-8、HPD-T01、HPD-M 为本公司(沧州宝恩吸附材料科技有限公司)自制。

收稿日期: 2012-01-05

*通讯作者: 皮国沛 Tel: (0317)3096766 E-mail: lemontecristo@163.com

网络出版时间: 2012-09-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120907.1019.004.html>

2 方法与结果

2.1 分析方法

2.1.1 对照品溶液的配制 分别精确称定 STV、RA、RC 对照品适量,以 80%乙腈水溶液溶解,得 STV、RA、RC 质量浓度分别为 508.6、582.8、631.2 mg/L 对照品溶液。检测前以 0.45 μ m 滤膜滤过。

2.1.2 供试品溶液的制备 固体供试品精确称取适量,以 80%乙腈水溶液溶解。液体供试品以 80%乙腈水溶液稀释至线性范围内进行检测。检测前溶液均以 0.45 μ m 滤膜滤过。

2.1.3 色谱条件^[12] 色谱柱为 Thermo NH₂ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水 (80:20), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 体积流量 1.2 mL/min, 进样量 20 μ L, 检测波长 210 nm。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0 mL, 以 80%乙腈水溶液定容于 10 mL 量瓶中, 依“2.1.3”项所述色谱条件分别进行检测。以 STV、RA、RC 质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归。结果 STV 线性范围为 10.2~254.3 mg/L, 回归方程为 $Y=13\,914.7X+317.7$, $r=0.999\,9$; RA 线性范围为 11.7~145.7 mg/L, 回归方程为 $Y=12\,057.8X-981.0$, $r=0.999\,8$; RC 线性范围为 6.3~

157.8 mg/L, 回归方程为 $Y=15\,121.2X+513.7$, $r=0.999\,9$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μ L, 依“2.1.3”项所述条件连续进样 8 次, 分别计算峰面积的 RSD。结果 STV、RA、RC 的 RSD 分别为 0.74%、0.52%、0.83%。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 依“2.1.3”项所述条件, 分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定, 计算峰面积的 RSD。结果 STV、RA、RC 的 RSD 分别为 2.04%、1.98%、2.24%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 回收率测定 取已测定的供试品, 加入一定量对照品溶液, 制备供试品溶液依“2.1.3”项所述条件进行检测, 计算回收率。结果 STV、RA、RC 平均回收率分别为 98.32%、97.98%、98.61%, RSD 分别为 1.5%、1.7%、1.3% ($n=5$)。

2.1.8 混合对照品溶液的制备及甜叶菊提取物检测 精密吸取 STV、RA、RC 对照品溶液各 4、2、1 mL, 置于同一 10 mL 量瓶内, 以 80%乙腈水溶液定容至刻度, 得混合对照品溶液。称取甜叶菊提取物 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 以 80%乙腈水溶液定容至刻度, 得甜叶菊提取物溶液。依“2.1.3”项所述条件进行检测, HPLC 谱图见图 1。

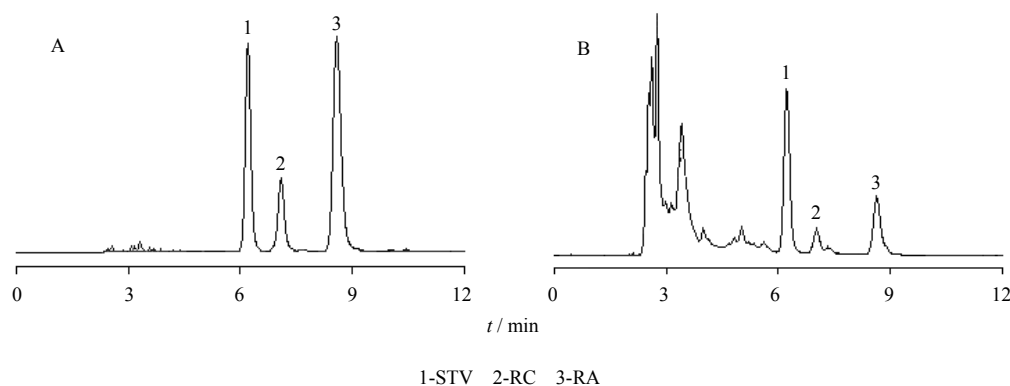


图1 混合对照品 (A) 与甜叶菊提取物溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *S. rebaudiana* extract solution (B)

2.2 吸附溶液的配制

称取甜叶菊提取物, 以蒸馏水配制成质量浓度为 10 g/L 的溶液。HPLC 检测, 其中甜菊糖苷 (以 STV、RA、RC 计) 质量浓度为 4.3 mg/mL。

2.3 树脂的筛选

2.3.1 树脂的预处理 树脂首先以 95%乙醇洗涤, 倾去上层溶液, 以 95%乙醇浸泡过夜。树脂装柱,

以 95%乙醇洗至流出液加水不浑浊, 再以蒸馏水洗至流出液无醇味。

2.3.2 静态吸附 精密称取经预处理后的大孔吸附树脂 1.0 g, 分别加入 50 mL 吸附溶液, 室温振荡 24 h 后, 测定吸附后溶液中甜菊糖苷质量浓度, 计算树脂吸附量。结果 AB-8、RS-8、HZ818、HPD-T01、HPD-M 树脂的吸附量分别为 130.7、139.0、165.3、

192.0、171.2 mg/g 湿树脂。在所选的 5 种树脂中, HPD-T01 树脂吸附量最大, HZ818、HPD-M 树脂次之, 选择这 3 种树脂进行静态解吸试验, 考察其静态解吸性能。

2.3.3 静态解吸 经静态吸附试验的树脂, 以蒸馏水洗涤至洗涤液 Molish 反应为阴性。置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 分别加入 50%、70%、90%乙醇 50 mL, 室温下振荡 2 h。树脂滤出, 再以相同体积、相应解吸剂室温振荡解吸 2 次。合并各解吸液, 测定洗脱液中甜菊糖苷的量, 结果见表 1。HPD-M 树

脂所得解吸物中甜菊糖苷的最大量仅为 65.1%, 低于 HZ818 和 HPD-T01 树脂的 68.8%和 72.0%。选择产物中甜菊糖苷的量较高的 HZ818 树脂和 HPD-T01 树脂进行动态吸附-解吸试验。

解吸率=解析物中甜菊糖苷质量/被吸附甜菊糖苷质量

由表 1 结果可知, 90%乙醇对甜菊糖苷的解吸率更高, 解吸能力较 70%乙醇强。但由于其对杂质也有较强的解吸能力, 所得产物中甜菊糖苷的质量分数较 70%乙醇所得产物没有提高, 甚至降低。因此, 选择 70%乙醇为解吸溶剂。

表 1 不同洗脱液对甜菊糖苷的洗脱性能

Table 1 Elution ability of different eluents on steviol glycosides

树脂种类	50%乙醇		70%乙醇		90%乙醇	
	解吸率 / %	总苷 / %	解吸率 / %	总苷 / %	解吸率 / %	总苷 / %
HZ818	47.1	57.7	78.9	68.5	83.2	68.8
HPD-T01	56.3	58.2	81.4	72.0	82.7	71.0
HPD-M	46.0	54.3	76.2	65.1	77.9	64.9

2.3.4 对甜菊糖苷的动态吸附-解吸试验 称取预处理后的 HPD-T01 树脂和 HZ818 树脂, 装入玻璃色谱柱中, 控制相同体积流量为 0.03 BV/min, 使吸附溶液流经树脂床, 流出液 Molish 反应为阳性后, 停止上样, 计算树脂的吸附量。以 2 BV 蒸馏水洗涤, 然后以 70%乙醇解吸, 体积流量均为 0.03 BV/min, 直至解吸液 Molish 反应为阴性。HPLC 检测洗脱液中甜菊糖苷的量。结果表明, HPD-T01 树脂吸附量为 204.8 mg/g 湿树脂, HZ818 树脂的吸附量为 191.3 mg/g 湿树脂。HPD-T01 树脂产物中甜菊糖苷质量分数为 71.8%, 高于 HZ818 树脂的 67.0%。在所选大孔树脂中, HPD-T01 树脂对甜菊糖苷的纯化效果最好, 因此选择 HPD-T01 树脂作为纯化甜菊糖苷的树脂。

2.4 HPD-T01 树脂纯化甜菊糖苷工艺条件的优化

2.4.1 吸附溶液 pH 值对吸附量的影响 精密称取预处理后的 HPD-T01 树脂 1.0 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中。将依“2.2”项制备的吸附溶液 pH 值调整至 5、6、7 (原液)、8、10, 分别移取 50 mL 加入锥形瓶中, 室温振荡 24 h 后, 测定吸附后溶液中甜菊糖苷的质量浓度, 计算树脂吸附量。结果吸附量分别为 191.2、189.7、192.0、172.3、139.8 mg/g 湿树脂。吸附溶液 pH 值在 5~7, 树脂吸附量波动很小。当 pH 值继续升高, 吸附量明显减小。考虑到操作工艺的简便性, 使用未调整 pH 值的吸附溶

液上样。

2.4.2 吸附流量的考察 取 3 根规格相同的玻璃色谱柱 ($\Phi=20$ mm), 装入等量的 HPD-T01 树脂, 通入吸附溶液, 控制流量。当流出液 Molish 反应为阳性后, 停止上样。不同流量 (0.05、0.1、0.2 BV/min) 下, 树脂对甜菊糖苷的吸附能力分别为 207.0、203.3、180.6 mg/g 湿树脂。流量为 0.05、0.1 BV/min 时, 吸附能力无显著差异, 因此考虑时间成本, 确定吸附流量为 0.1 BV/min。

2.4.3 吸附树脂用量的考察 取吸附溶液, 按甜叶菊提取物与干树脂质量比为 1:0.5、1:1、1:2、1:4 分别上样, 吸附流量为 0.1 BV/min, 以 70%乙醇解吸, 直至解吸液 Molish 反应为阴性。HPLC 检测解吸物中甜菊糖苷的量。结果吸附量分别为 207.4、204.1、100.3、50.1 mg/g 湿树脂, 甜菊糖苷质量分数分别为 67.3%、72.2%、71.0%、70.0%。甜叶菊提取物与干树脂质量比为 1:1 时, 甜菊糖苷的质量分数最高。由此确定甜叶菊提取物与干树脂质量比例为 1:1。

2.4.4 解吸剂流量及用量的考察 取 3 根规格相同的玻璃色谱柱 ($\Phi=20$ mm), 装入等量 HPD-T01 树脂, 以 0.1 BV/min 流量通入, 以蒸馏水洗至流出液 Molish 反应为阴性。以 70%乙醇水溶液解吸, 流量分别控制为 0.02、0.04、0.06 BV/min。按床体积分部收集流出液, 检测其中甜菊糖苷的量, 计算解

吸率。以解吸率对洗脱剂体积作图, 所得解吸曲线见图 2。流量为 0.02、0.04 BV/min 时, 4 BV 70% 乙醇解吸率分别为 94.2% 和 92.0%。解吸流量为 0.06 BV/min 时, 需用 6 BV 才可达到相同解吸率。考虑时间因素, 确定最优解吸条件为 4 BV 70% 乙醇, 流量为 0.04 BV/min。

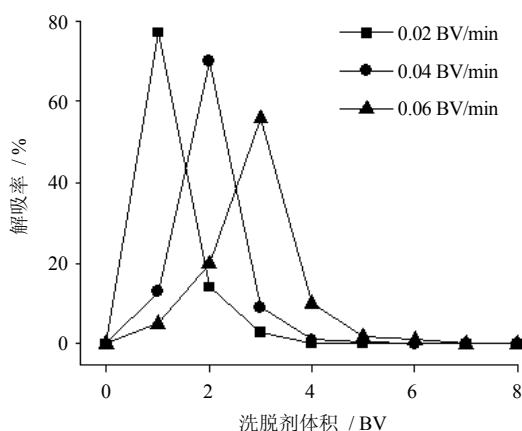


图 2 不同体积流量 70%乙醇动态解吸曲线

Fig. 2 Dynamic desorption curves of 70% ethanol with different flow rate

2.5 最优工艺稳定性试验

实验表明最优工艺条件为吸附溶液质量浓度为提取物 10 g/L 时, 甜叶菊提取物与干树脂质量比为 1:1, 吸附溶液 pH 值为 7, 吸附流量为 0.1 BV/min; 以 70% 乙醇为解吸剂, 用量为 4 BV, 解吸流量为 0.04 BV/min。

采用最优工艺条件进行平行试验 3 次。所得结果见表 2, 树脂 HPD-T01 对甜菊糖苷的纯化性能具有良好稳定性。

得率 = 所得产物质量 / 上柱吸附溶液中溶解甜叶菊提取物质量

表 2 工艺稳定性试验结果

Table 2 Stability test of technology

编号	解吸率 / %	产物质量 / mg	得率 / %	总苷 / %
1	92.50	264.2	55.1	72.0
2	92.30	261.1	54.8	72.2
3	91.80	263.6	54.8	71.8

3 讨论

本实验对 5 种不同树脂对甜菊糖苷的纯化能力进行了研究, 其中 HPD-T01 树脂对甜菊糖苷具有最好的纯化效果。针对 HPD-T01 树脂进行了吸附、解吸工艺条件的优化, 于本研所得最适条件下, HPD-T01 树脂对甜菊糖苷的吸附量为 205.4 mg/g 湿树脂, 解吸率为 92.2%, 产品中甜菊糖苷质量分数为 72.0%。该工艺简单、稳定, 纯化效果好, 具有工业化生产应用价值, 值得深入研究。

参考文献

- [1] 王飞生, 叶荣飞, 闵建. 甜菊糖苷的特性及应用 [J]. 中国调味品, 2009, 34(10): 91-95.
- [2] 李洪飞, 张丽萍. 甜菊糖甙提取方法的研究进展 [J]. 农产食品科技, 2010, 4(4): 59-62.
- [3] 杨扬, 陈社云, 陈凯, 等. 甜菊糖提取工艺进展及发展前景 [J]. 中国食品添加剂, 2010(5): 194-199.
- [4] 杨远志, 李发财, 据争艳, 等. 甜菊糖的应用现状及发展前景 [J]. 发酵科技通讯, 2011, 40(1): 40-44.
- [5] 陈振斌, 邸多隆, 刘永峰, 等. 甜菊糖大孔吸附树脂吸附分离工艺条件的正交设计优化 [J]. 应用化工, 2011, 40(6): 945-948.
- [6] 黄应森. 中国甜菊和甜菊糖甙的分型研究 [J]. 中国糖料, 1999(4): 26-29.
- [7] 赵永良, 崔媛, 刘景彬, 等. 高效液相色谱法测定甜菊糖苷中莱鲍迪苷 A [J]. 食品科技, 2009, 34(9): 294-296.
- [8] Aehle E, Raynaud-Le Grandic S, Ralainirina R, et al. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure [J]. Food Chem, 2004, 86(4): 579-585.
- [9] 张桥, 沈娟, 赵玮武, 等. 凌霄花中洋丁香苷的制备 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2465-2467.
- [10] 罗艳玲, 欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中的应用 [J]. 食品与机械, 2005, 21(5): 177-179.
- [11] 胡静, 陈育如, 魏霞, 等. 大孔树脂 D107 和 D108 对甜菊糖中 SS 和 RA 的分离研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(6): 1-4.
- [12] 刘超, 李来生, 许丽丽, 等. 高效液相色谱法测定甜叶菊糖中的甜菊苷和莱鲍迪苷 A [J]. 分析实验室, 2007(26): 23-26.