

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.019

阳小宇, 陈志良, 郝再彬. 大孔树脂对甜菊糖的纯化[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 525-529

Yang XY, Chen ZL, Hao ZB. Purification of stevioside ST and RA by macroporous resin[J]. *Guihaia*, 2014, 34(4): 525-529

## 大孔树脂对甜菊糖的纯化

阳小宇<sup>1</sup>, 陈志良<sup>2</sup>, 郝再彬<sup>2\*</sup>

(1. 湖南化工职业技术学院, 湖南 株洲 412004; 2. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 通过静态吸附比较三种大孔树脂对甜菊糖中莱鲍迪甙 A(RA)和甜菊甙(ST)的吸附和解吸能力, 利用高效液相色谱对结果进行检测, 从中筛选出对 RA 和 ST 吸附效果最佳的 LX-68M 树脂。纯化工艺为 30 °C 下, LX-68M 树脂对 RA 和 ST 在 6 h 后达到吸附饱和, 吸附量分别为干树脂 RA 85.00 mg/g 和 ST 121.50 mg/g。动态洗脱结果表明: 以 55% 的乙醇为洗脱液, 在 2 BV/h 的洗脱速度下, 经 LX-68M 树脂处理后的甜菊糖溶液纯度由 75.5% 提高到 77.8%。表明 LX-68M 树脂对于甜叶菊糖苷工业生产的应用前景较好。

**关键词:** 大孔树脂; 莱鲍迪甙 A; 甜菊甙; 分离纯化; 高效液相色谱

**中图分类号:** TQ461 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)04-0525-05

## Purification of stevioside ST and RA by macroporous resin

YANG Xiao-Yu<sup>1</sup>, CHEN Zhi-Liang<sup>2</sup>, HAO Zai-Bin<sup>2\*</sup>

(1. Hunan Chemical Industry Professional and Technology College, Zhuzhou 414002, China; 2. Chemical and Biological Engineering College, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The adsorption and desorption capacities of three kinds of macroporous resins for RA and ST contained in stevioside were investigated through static adsorption experiment. The adsorption and desorption capacities was quantified using high performance liquid chromatography (HPLC), and the results indicated that the LX-68M had the best adsorption and desorption capacities. Under 30 °C, the absorption equilibrium of LX-68M resin was achieved for RA (85.0 mg/g dry resin) and ST (121.5 mg/g dry resin) after 6 h, respectively. The dynamic desorption was carried out under 2 BV/h eluting employing 55% (V%) ethanol/water as eluent, and the results showed that the purity of stevia glycosides increased from 75.5% to 77.8%. On the basis of these findings, it was believed that the LX-68M resin had industrial application promise for stevia glycosides.

**Key words:** macroporous resin; rebaudioside A; stevioside; purification; HPLC

甜叶菊又名甜菊、糖草, 原产地是南美地区, 目前在我国的江苏、福建、山东等地有种植, 是目前已知甜度较高的糖料植物之一(滕祥金等, 2007; 张志等, 2009), 已从甜叶菊中发现的甜味成分有 8 种, 即甜菊甙(ST)、莱鲍迪甙 A(RA)、B、C、D、E、杜尔可甙 A 和斯替维伯甙总称为甜菊糖, 其中甜菊甙、莱鲍迪甙 A 是甜菊糖中的主要成分。其中 RA 的甜

度最高, 约为蔗糖的 450 倍, ST 的甜度约为蔗糖的 300 倍, 是一种无毒、天然的有机甜味剂, 它具有热量低、甜度高、口感佳, 稳定性好等优点, 因此甜菊糖将会是一种很有潜力的甜味替代品(胡献丽等, 2005; 丁宁等, 2005)。此外甜菊糖还具有清热、利尿、调节胃酸的功效, 对高血压、糖尿病、动脉硬化、龋齿等患者也有一定的辅助疗效。人体在代谢甜菊

收稿日期: 2013-09-21 修回日期: 2013-10-13

基金项目: 湖南省高等学校科研项目(11C0465); 湖南省科技厅项目(2012SK3180)。

作者简介: 阳小宇(1964-), 女, 硕士, 高级实验师, 从事功能材料制备与应用, (E-mail)chengzhiliang0411@163.com。

\*通讯作者: 郝再彬, 教授, 博士生导师, 主要从事生物活性物质的开发与利用, (E-mail)hao1173042@163.com。

糖的过程中不需要胰岛素的参与,对于糖尿病患者来说甜菊糖将会是一种非常受欢迎的甜味替代品(王一凡等,1997;Aehle *et al.*,2004)。

大孔树脂分离技术是20世纪60年代末发展起来的一种新型分离纯化技术之一(罗艳玲等,2005;王瑞,2008;胡静等,2008;刘金磊等,2012),大孔树脂具有物理、化学性质稳定、比表面积大、吸附和交换容量大、速度快、选择性好、吸附条件温和、再生处理方便、强度高等优点,是甜菊糖分离纯化中的一种常用方法,因此大孔树脂对甜菊糖的分离纯化在甜菊糖的商业开发上得到了广泛认可(Bouzid *et al.*,2005;杨丹等,2005;刘超等,2007)。目前主要的研究工作集中于寻找更好的大孔树脂以提高对甜菊糖的分离纯化效率。本文考查了三种最新的大孔树脂对甜菊糖中RA和ST这两种主要成分的吸附和解吸特性,从中筛选出吸附和解吸综合性能较好的大孔树脂,并利用高效液相色谱对分离纯化结果进行表征,结果表明大孔树脂LX-68M对甜菊糖有较大的吸附容量和较好的解吸性能,同时该大孔树脂还能一定程度的提高甜菊糖的纯度,有在工业上应用的前景。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

大孔树脂:LXA-8、LX-22、LX-68M由西安蓝晓科技有限公司提供。甜菊糖:纯度为(RA 32.3%,ST 43.2%)由奥星甜菊制品有限公司提供。标准品:纯度为(ST 99.0%,RA 98.3%)由日本和光纯药工业株式会社提供。

### 1.2 仪器与设备

岛津高效液相色谱仪LC-20A,SPD-20A紫外检测器(岛津仪器有限公司);DBS-100电脑全自动部分收集器;HL-2B恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);HX-1回旋振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂);玻璃层析柱 $\varnothing 1.0\text{ cm}\times 30.0\text{ cm}$ (北京慧德易科技有限责任公司)。

## 2 实验部分

### 2.1 检测方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 $5\ \mu\text{m}$ 氨基柱;流动相为乙腈/水(V/V=80/20);流速为 $1.2\text{ mL/min}$ ;柱温

为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ ;SPD-20A紫外检测波长为 $210\text{ nm}$ 。

2.1.2 标准曲线的绘制 将甜菊甙(ST)和莱鲍迪甙A(RA)标准样品置于 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥箱中恒温 $2\text{ h}$ ,分别称取4份RA和ST $2.10$ 、 $1.50$ 、 $0.90$ 、 $0.30\text{ mg}$ 分别混合,用80/20(V/V)的乙腈/水溶解配成 $1\text{ mL}$ 溶液。分别测定不同浓度的标准溶液的峰面积,以峰面积对浓度(mg/mL)作图,得到ST和RA的回归方程式如下:

$$\text{RA: } y = 2058696.000x + 8863.800, R^2 = 0.9994$$

$$\text{ST: } y = 2558892.500x + 84044.750, R^2 = 0.9991$$

### 2.2 大孔树脂的预处理

大孔树脂均用无水乙醇浸泡 $24\text{ h}$ 后,用水充分冲洗,用4% HCl处理 $4\text{ h}$ ,用水洗至中性;再用4% NaOH浸泡 $4\text{ h}$ ,用水洗至中性;用4% HCl处理 $4\text{ h}$ ,用水洗至中性后浸泡在无水乙醇中或直接使用。

### 2.3 树脂的静态吸附

取预处理后的三种树脂各 $1.000\text{ g}$ ,分别加入 $25\text{ mL}$   $15.00\text{ mg/mL}$ 甜叶菊糖溶液 $25\text{ mL}$ ,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下中速振荡 $24\text{ h}$ 后测定上清液中各组分含量,分别计算吸附量。

### 2.4 树脂的静态洗脱

取吸附饱和后的三种树脂过滤去除上清液,用去离子水洗去残留的甜菊糖溶液,然后分别加入55%乙醇 $25\text{ mL}$ (陈天红等,1998), $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下摇床中速振荡 $24\text{ h}$ ,测定洗脱液中各组分的含量,计算洗脱量和洗脱率。

### 2.5 温度对树脂吸附的影响

取LX-68M树脂 $1.000\text{ g}$ 放入 $25\text{ mL}$ 浓度为 $15.00\text{ mg/mL}$ 甜菊糖溶液中,在 $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 4个温度下绘制静态吸附曲线,比较四个温度下树脂的吸附量和吸附速度。

### 2.7 吸附动力学实验

取LX-68M树脂 $1.000\text{ g}$ 放入 $25\text{ mL}$ 浓度为 $15.00\text{ mg/mL}$ 的甜菊糖溶液中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下中速振荡吸附,在吸附 $1$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $12$ 、 $24\text{ h}$ 后取上清液测定含量,绘制吸附动力学曲线。

### 2.8 静态解吸曲线制作

取体积分数为55%的乙醇 $25\text{ mL}$ 加到 $1.000\text{ g}$ 已经吸附饱和的LX-68M树脂中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡解吸,在吸附 $1$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $12$ 、 $24\text{ h}$ 后取解吸液测定含量,绘制静态解吸曲线。

### 2.9 动态吸附和动态解吸

先取浓度为 $15.00\text{ mg/mL}$ 的甜菊糖溶液以速

度 2BV/h 上样,然后用 55%乙醇以 2BV/h 的流速进行洗脱,分段收集,每 1BV 一管,绘制泄露曲线以及解吸曲线。

### 3 结果与分析

#### 3.1 三种树脂吸附性能的比较

树脂的吸附量是评价树脂性能的一项重要指标,通过比较 LX-68M 等 3 种大孔树脂对甜菊糖溶液的静态吸附和静态解吸效果来评价三种树脂的性能,通过 HPLC 检测三种树脂在相同条件下对原糖液中两种主要成分 RA 和 ST 的吸附和解吸情况,结果见表 1 所示。

表 1 不同大孔树脂对甜菊糖的静态吸附和静态解吸能力  
Table 1 Static adsorption capacity and static desorption capacity of stevioside of different macroporous resins

树脂种类 Type of macroporous resins	吸附量 (mg/g) Adsorption		解吸量 (mg/g) Desorption		解吸率 (%) Desorption rate	
	RA	ST	RA	ST	RA	ST
LX-68M	85.0	121.5	75.0	117.0	88	96
LX-22	83.7	118.5	70.5	109.0	84	92
LXA-8	61.7	88.5	55.5	82.3	89	93

从表 1 看出,在所选的 3 种新型树脂中,LX-68M 对甜菊糖中两种主要成分 RA 和 ST 的吸附性能和解吸性能明显优于另外两种树脂。每 1 mg 干树脂对 RA 和 ST 的吸附量分别达 85 mg 和 121.5 mg,解吸率分别达 88% 和 96%。因此后续试验均选择 LX-68M 进行。由表 1 还发现 55% 的乙醇对 ST 的洗脱率明显大于 RA,且在三种树脂中都有这种趋势。这可能是由于 RA 和 ST 的分子结构不同所导致。静态吸附结果表明,树脂 LX-68M 对 RA 和 ST 的吸附不具有选择性。

#### 3.2 不同温度对树脂吸附量的影响

大孔树脂对甜菊糖的吸附属于物理吸附,有很多因素会对大孔树脂的吸附性能产生影响,其中温度是非常重要的一个因素。为了考察温度对甜菊糖吸附的影响,研究了 LX-68M 在 20、25、30、35 °C 4 个不同温度下对 RA 和 ST 吸附量和吸附速度的影响,结果如图 1,2 所示。

图 1,2 显示,较高或较低的温度都不利于树脂的吸附。最适温度是 30 °C,在此温度下,最大吸附量 ST 为 125.00 mg/g(干树脂),而 RA 为 91.00 mg/g(干树脂)。从图 1,2 中还可发现,相对其他三个温度,在 30 °C 时树脂 LX-68M 不仅具有较大的吸

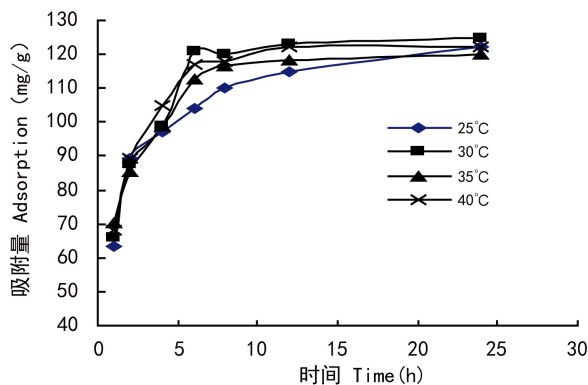


图 1 不同温度对 ST 吸附的影响  
Fig. 1 Effects of different temperatures on the adsorption for ST

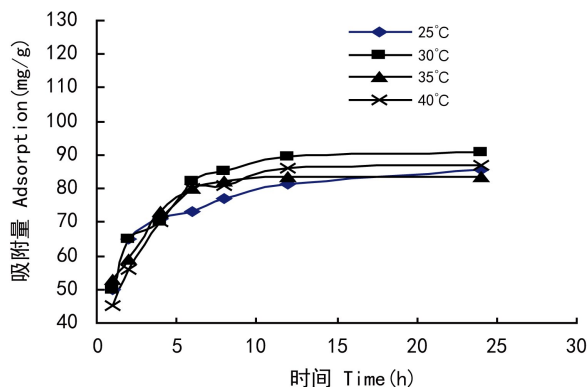


图 2 不同温度对 RA 吸附的影响  
Fig. 2 Effects of different temperatures on the adsorption for RA

附量,而且其吸附时间也是最短的,对 RA 和 ST 的吸附都能较快达到平衡,其中 ST 比 RA 达到吸附平衡的时间稍短。在较低温度下虽具有较大的吸附量,但达到吸附饱和的时间变长,而高温虽能更快的达到吸附平衡,但饱和吸附量减少。因此后继实验均选用在 30 °C 下操作。

#### 3.3 吸附动力学

吸附速度是树脂吸附性能的重要参考指标。30 °C 时 LX-68M 树脂对甜菊糖的静态吸附动力学曲线见图 3。

图 3 显示,0~6 h 内 LX-68M 树脂对甜菊糖中 RA 和 ST 的吸附量随时间增加而增大,之后吸附量趋于稳定,说明吸附 6 h 后基本达到饱和,可见 LX-68M 树脂对甜菊糖的吸附属快速吸附平衡。图 3 还显示 LX-68M 树脂对甜菊糖中的 RA 和 ST 的吸附不是同时达到吸附平衡的,说明 LX-68M 树脂对

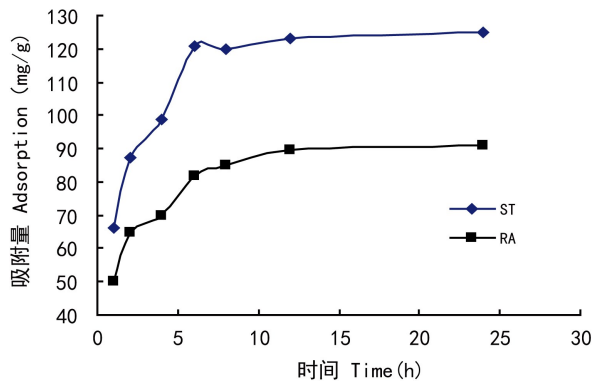


图 3 30 °C 时 RA 和 ST 静态吸附动力学曲线

Fig. 3 Static adsorption kinetic curve for RA and ST

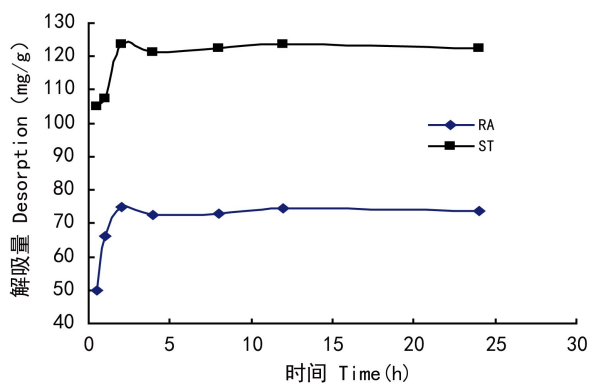


图 4 甜菊糖静态解吸曲线

Fig. 4 Static desorption kinetic curve of stevioside

甜菊糖中 RA 和 ST 的吸附速度具有一定差异,这对甜菊糖中 RA 和 ST 的分离可起到一定帮助。

### 3.4 解吸动力学

在 30 °C 时 55% 的乙醇对甜叶菊糖的解吸曲线见图 4。从图 4 可以看出,经 LX-68M 吸附的甜菊糖,在 55% 乙醇的洗脱下,2 h 时基本解吸完全,而且 55% 乙醇对 RA 和 ST 的洗脱没有选择性,RA 和 ST 几乎同时达到洗脱终点。

### 3.5 动态吸附与动态解吸

泄露曲线的定义是当流出液质量浓度  $\rho_f$  (mg/mL) 达到其上样液 10% 时即认为树脂吸附已经达到饱和。以  $\rho_f$  对流出液体积 (V) 作图 (图 5)。

静态吸附可以反映树脂吸附能力大小,但动态吸附的结果更加接近于工业生产的操作。

从图 5 可以看出,RA 在第 6BV 时基本到达泄漏点,而 ST 的泄漏点则稍微后移一点,大约在第 6.5BV,这个和前面得出的结论 LX-68M 树脂对甜叶菊糖中的 RA 和 ST 没有选择性基本相吻合。造

成 RA 比 ST 更快到达泄漏点的原因可能是当树脂的高度增加时,LX-68M 树脂会表现出对 RA 和 ST 的弱选择性,或是因为 RA 和 ST 吸附速度的不同导致 RA 比 ST 的泄漏点提前。

55% 乙醇对已吸附饱和的树脂以 2 BV/h 速度洗脱曲线见图 6。

由图 6 可知,甜菊糖在第 7BV 洗脱液时基本完全洗脱,但 55% 的乙醇对 RA 和 ST 的分离效果不理想,RA 和 ST 几乎同时被洗脱下来,如果想获得较高浓度的单一组分还需要改变洗脱剂的浓度。

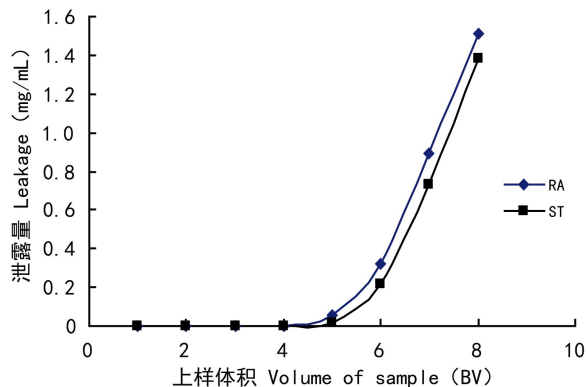


图 5 甜菊糖动态吸附曲线

Fig. 5 Dynamic adsorption curve of stevioside

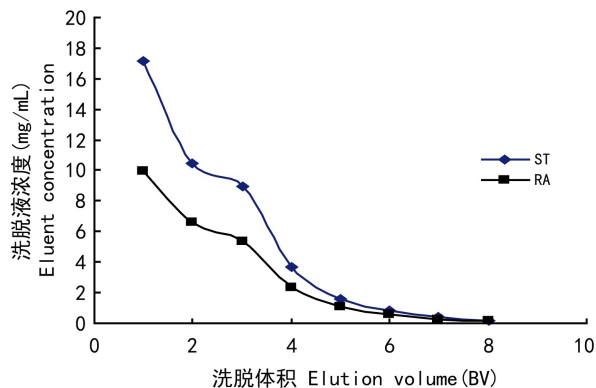


图 6 甜菊糖动态洗脱曲线

Fig. 6 Dynamic desorption curve of stevioside

按照上述优化的上柱条件,将 15 mg/mL 的甜菊糖粗液,以 2 BV/h 的速度上样,上样量为达到泄漏点为止。树脂装柱量为 1:11 (直径:高度),用 55% 的乙醇以 2 BV/h 的速度洗脱。洗脱液用喷雾干燥的方式干燥,经过树脂处理后的甜菊糖的纯度由原来的 75.5% 提高到 77.8% (RA:32.4%;ST:



45.4%),纯度提高的主要是 ST,而 RA 提高不明显。

## 4 讨论与结论

本文系统地比较了三种最新的大孔树脂对甜菊糖的纯化能力,结果显示大孔树脂 LX-68M 的吸附性能和解吸性能都是最优的,它对甜菊糖中 RA 和 ST 的静态吸附容量分别达 85 和 121.5 mg/g 干树脂,其静态洗脱率达 92%。该大孔树脂不仅有很大的吸附容量和优异的洗脱率,而且还能一定程度的提高甜菊糖的纯度。大孔树脂 LX-68M 的吸附性能和洗脱性能在已经报道的树脂中都是较优异的(胡静等,2008;李娜等,2011;赵兴华等,2012)。可为甜叶菊的进一步研究提供参考。

### 参考文献:

Aehle E, Grandic SZ, Ralainirina R. 2004. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous pinach(*spinaciaoleracea*) extracts by an adsorption procedure[J]. *Food Chem*, (86): 579—585

Bouziid O, Navarro D, Roche M. 2005. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product[J]. *Proc Biochem*, (40): 1 855—1 862

Chen TH(陈天红), Zhang Y(张杨), Liu XH(刘晓航). 1998. Selective research of stevioside composition by high polymer adsorbent(高分子吸附剂对甜叶菊中各糖甙吸附选择性的研究)[J]. *Sci Chin(中国科学)*, **2**(28): 460—465

Ding N(丁宁), Hao ZB(郝再彬). 2005. Research and development of stevia glycosides(甜叶菊及其糖苷的研究与发展)[J]. *Shanghai J Agric Sci & Technol(上海农业科技)*, (4): 8—10

Hu J(胡静), Chen YR(陈育如), Wei X(魏霞) 2008. Separation of stevioside SS and RA by macroporous Resins D107 and D108(大孔树脂 D107 和 D108 对甜菊糖中 SS 和 R A 的分离研究)

[J]. *Food Res & Dev(食品研究与开发)*, **29**(6): 1—4

Hu XL(胡献丽), Dong WB(董文宾), Zheng D(郑丹). 2005. 甜菊及甜菊糖研究进展[J]. *Food Res & Dev(食品研究与开发)*, **26**(1): 36—38

Liu C(刘超), Li LS(李来生), Xu LL(许丽丽). 2007. HPLC analysis of RA and ST in stevioside(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]. *Chin J Anal Lab(分析实验室)*, **26**(7): 23—26

Liu JL(刘金磊), Chen SC(陈思呈), Lu FL(卢凤来). 2012. 番茄化学成分的分离与鉴定[J]. *Guihaia(广西植物)*, **32**(3): 415—418

Li N(李娜), Chen Z(陈智), Tian JZ(田景振). 2011. Optimization of purification of stevioside by macroporous adsorption resins(优选大孔树脂纯化甜菊苷的研究)[J]. *Food & Drug(食品与药品)*, **13**(3): 107—110

Luo YL(罗艳玲), Ou SY(欧仕益). 2005. Application of macroporous resin in separation of active components in food industry(大孔树脂在食品活性成分分离中的应用)[J]. *Food & Mech(食品与机械)*, **21**(5): 177—179

Teng XJ(滕祥金), Yang D(杨丹). 2007. On assayed stevioside and rebaudioside A by TLC(薄板层析法分析甜叶菊糖苷)[J]. *Sug Crops Chin(中国糖科)*, (4): 24—26

Wang YF(王一凡), Ren D(任岱), Zhou FX(周凤贤). 1997. Research of stevia nutrients in food(甜菊糖食品中营养成分的研究)[J]. *China J Mod Med(中国现代医学杂志)*, **7**(3): 63—64

Wang R(王瑞). 2008. HPLC analysis of stevioside(法测定甜菊糖甙)[J]. *J Liaoning Univ(辽宁大学学报)*, **35**(4): 355—357

Yang D(杨丹), Hao ZB(郝再彬). 2005. Determination of stevioside by flow injection chemiluminescence(流动注射化学发光法测定甜叶菊糖苷)[J]. *Chem Eng(化学工程师)*, (4): 23—24

Zhao XH(赵兴华), Zhang QX(张全香), Yuan XW(苑晓威). 2012. Purification technology of steviol glycosides by macroporous adsorption resin(大孔吸附树脂纯化甜菊糖苷的工艺研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)*, **43**(10): 1 971—1 974

Zhang Z(张志), Teng XJ(滕祥金), Hao ZB(郝再彬). 2009. On assayed stevioside and rebaudioside A by TLC(薄板层析法分析甜叶菊糖苷)[J]. *Chin Cond(中国调味品)*, **34**(3): 94—96

( 上接第 435 页 Continue from page 435 )

Rasmussen HN. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of ycorrhiza[J]. *Physiol Plantarum*, **86**(1): 161—167

Sebastianraj J, Britto JS, Robinson PJ, et al. 2006. In vitro seed germination and plantlet regeneration of *Coelogyne mossiae* Rolfe [J]. *J Biol Res*, **5**: 79—84

Seeni S, Latha PG. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae)[J]. *Plant Cell Tiss Org*, **29**(3): 167—172

Song XM(宋晓明), Liu G(刘光), Li QF(万群芳). 2011. Study on artificial propagation of *Spiranthes sinensis* (兰科植物盘龙参的人工繁育技术研究)[J]. *Chin New Technol Prod(中国新技术新产品)*, **3**: 359—360

Thompson DI, Edwards TJ, Staden JV. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability in vitro: relationships, requirements and first-time reports[J]. *Plant Growth Regul*, **49**(2—3): 269—284

Zhang W(张伟), Jin CS(金传山), Zhou YW(周亚伟). 2010. Research advances on *Spiranthes sinensis* (盘龙参研究进展)[J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, **14**(7): 748—750

Zhou XL(周秀玲), Li JM(李家敏). 2012. Preliminary studies on shapes, germination and storage of *Spiranthes Sinensis* seeds(药用植物盘龙参种子形态、萌发及贮藏的初步研究)[J]. *Seed(种子)*, **31**(6): 79—82

Znaniacka J, Eojkowska E. 2004. Establishment of in vitro culture collection of endangered European orchids[J]. *Bull Bot Gard*, **13**: 69—73