

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98104776.9

[45]授权公告日 2002年1月23日

[11]授权公告号 CN 1078217C

[22]申请日 1998.2.18 [24]颁证日 2002.1.23

[21]申请号 98104776.9

[73]专利权人 南开大学

地址 300071 天津市卫津路94号

[72]发明人 何炳林 陈天红 张杨 史作清

[56]参考文献

JP52-062300	1977. 5. 23	A23L1/22
JP59-042041	1984. 3. 8	B01D53/54
JP6-192283	1994. 7. 12	C07H1/08
JP6-192283	1994. 7. 12	C07H1/08
JP62-146599	1987. 6. 30	C12P19/56
JP62-146599	1977. 5. 23	A23L1/22
SU 859384	1981. 9. 1	C08F212/36
US4361697	1982. 11. 30	C07H1/08
US4448899	1984. 5. 15	B01D53/54
US5112610	1992. 5. 12	A61K35/78

审查员 仲惟兵

[74]专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事务所
代理人 谭海安

权利要求书1页 说明书6页 附图页数3页

[54]发明名称 吸附树脂法从甜菊糖中富集、分离莱鲍迪甙A

[57]摘要

甜菊糖是从甜叶菊叶子中提取出来的一种天然甜味剂,它主要由8种已知糖甙组成,其中A甙的甜度最高,大于蔗糖的300倍,而且味质也最好。利用树脂吸附的弱选择性特点分离甜菊糖A甙的研究目前尚未见国内外有关文献和专利报导。

本发明设计合成了系列具有高选择性大孔吸附树脂,首次尝试了利用大孔吸附树脂选择性吸附的作用分离高A甙含量的甜菊糖产品,再经重结晶可得到纯度大于90%的A甙产品。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种用于分离富集莱鲍迪甙 A 的大孔吸附树脂,其特征在于它是用下列方法合成:于三口瓶中将工业二乙烯苯 50-100 克、4-乙烯基吡啶 1-15 克,过氧化苯甲酰 0.5-1.5 克,混合均匀,加入总重量为 50-300 克的混合致孔剂烷基苯与液体石蜡,其中烷基苯与石蜡的重量比为 1:1-10:1;加入 NaCl 水溶液,使水油相体积比控制在 3:1-5:1,并加入 0.5-1.0% 的聚乙烯醇做为表面活性剂;开动搅拌,控制搅拌速度,使小球粒径分布在 80-200 目之间;以 5°C/10min 的速度匀速缓慢升温至 80°C,恒温反应 2 小时,继续升温至 90°C,恒温反应 4 小时;最后升温至 95-100°C 煮球 2 小时,使聚合完全;所得树脂用水充分洗涤,凉干后分别用乙醇、石油醚各抽提 8 小时,室温下减压干燥备用;

称取一定量的树脂用适量乙醇溶胀过夜,然后逐渐过渡到水相;准确量取 20ml 湿树脂并将其转入内径为 0.8-1.0cm 树脂柱中,以 1BV/h 流速使 20-30ml 稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,然后水洗至中性;再以 1BV/h 的流速使 20-30ml 1N 的 NaOH 溶液缓慢流过树脂床,水洗至中性备用。

2. 一种以树脂法分离富集莱鲍迪甙 A 的方法,其特征在于在权利要求 1 所述的大孔吸附树脂床中,以 1BV/h 的流速缓慢流过浓度为 4mg/ml 的甜菊糖水溶液,此时树脂对甜菊糖分子产生选择性吸附作用,检测流出液,380ml 开始泄漏,自泄漏点起每 20ml 为一组分等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至 500ml 后流出液中 A 甙含量小于 S 甙,合并流出液,浓缩至干燥,得到高 A 甙含量甜菊糖 200mg,树脂可用 70%乙醇再生,用水洗净后可反复使用。

说明书

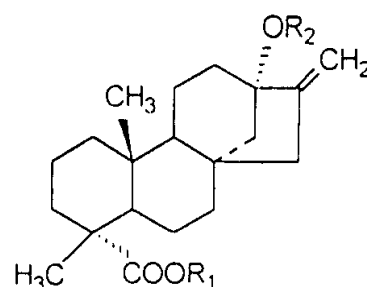
吸附树脂法从甜菊糖中富集、分离莱鲍迪甙 A

本发明属大孔吸附树脂的合成及其应用。

甜菊糖是从甜叶子中提取出来的一种高甜度、低热值、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。其名称和化学结构如表 1 所示^[1]。(1.Hansib J.R., De Oliveira B.H., Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides, Natural Product Reports, 1993, 301-309)

表 1 甜叶菊总糖甙中各组份结构及相对于叶含量

名称	R ₁	R ₂	含量(%)
1.甜菊甙	-G	-G-G	6.0~8.0
2.莱鲍迪甙 A	-G	-G-G	2.0~3.0
3.莱鲍迪甙 B	-H	-G-G G	《 1.0
4.莱鲍迪甙 C	-G	-G-Rh G	~ 1.0
5.莱鲍迪甙 D	-G-G	-G-G G	《 1.0
6.莱鲍迪甙 E	-G-G	-G-G	《 1.0
7.斯替维伯甙	-H	-G-G	《 1.0
8.杜尔可甙 A	-G	-G-Rh	0.4~0.6

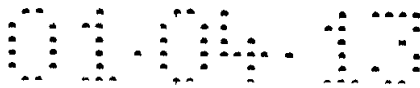


G 葡萄糖基 Rh-鼠李糖基

其中甜菊甙(Stevioside)、莱鲍迪甙 A(Rebaudioside A)和莱鲍迪甙 C(Rebaudioside c)在总糖中的相对含量较高,也是影响甜菊糖味质的主要成份。S 甙的甜度是蔗糖的 270-280 倍,但它呈味速度慢,带有一定的不良余味。(甙的甜度不到蔗糖的 50 倍,且有较强的后苦味及不良余味。C 甙的甜度不到蔗糖的 50 倍,且有较强的后苦味及不良余味。A 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。提取分离高 A 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 A 甙产品。迄今为止,有关甜菊糖各组份分离报导的主要手段有:高效液相色谱法(HPLC)^[2-5][2.Dobberstein R.H., Almed M.S., Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from Stevia rebaudiana plants. US 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. II 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]、薄层色谱法(TLC)^[6-7][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): 2981-2988]、滴液逆流色谱法^[8][8. Kinghorn A.D., Nanayakkara N.P.D., Soejarto D.D. et al., Potential sweetening agents of plant origin. I Purification of Stevia rebaudiana sweet constituents by droplet countercurrent chromatography. J. Chromatogr., 1982, 237(3): 478-483]、毛细管电泳法^[9-10][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): 1703-1719; 10. Mauri P., Catalano G., Gardana C., Pietta P., Analysis of Stevia glycosides by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 1996, 17(2): 367-371]、超临界萃取法^[11-12][11. Kienle Udo, Process for the preparation of a natural sweetening agent from Stevia rebaudiana and its use. EP 335,265, 1989; 12. Tan S., Shibuta Y., Tanaka O., Isolation of sweetener from Stevia rebaudiana JP 63,177,764, 1988]等,但这些方法的可处理量小,都不适合开发工业化生产。近两年来,日本出现了从一种特殊的高 A 甙含量的甜菊叶中通过重结晶法提取分离 A 甙的报导^[13-14][13. Morita T., Nishimura M., Ishikawa H., Manufacture of a sweetener difficult to dissolve in water from Stevia extract. JP 07,177,802, 1995; 14. Katanami T., Kitatsume M., Prep. of Stevia sweetener. JP 07,143,860, 1995],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, A 甙含量大于 80% 的甜菊糖产品成本高于普通甜菊糖的 4-5 倍。

利用树脂吸附的弱选择性特点分离甜菊糖的研究目前尚未见国内外有关文献和专利报导。本发明的目的是设计合成了系列具有高选择性大孔吸附树脂,首次尝试了利用大孔吸附树脂选择性吸附的作用通过简单可行,易于工业化的手段从高 S 甙甜菊糖中分离出富集 A 甙



的甜菊糖产品,再经进一步纯化,得到纯度大于 90%的 A 甙产品。

本发明的内容主要有树脂的设计合成;树脂法分离富集 A 甙工艺,以及 A 甙的进一步纯化。树脂的合成方法如下:于三口瓶中将工业二乙烯苯 50-100 克、4-乙烯基吡啶 1-15 克,过氧化苯甲酰 0.5-1.5 克,混合均匀,加入总重量为 50-300 克的混合致孔剂烷基苯与液体石蜡,其中烷基苯与石蜡的重量比为 1:1-10:1;加入 NaCl 水溶液,使水油相体积比控制在 3:1-5:1,并加入 0.5-1.0%的聚乙烯醇做为表面活性剂;开动搅拌,控制搅拌速度,使小球粒径分布在 80-200 目之间;以 5°C/10min 的速度匀速缓慢升温至 80°C,恒温反应 2 小时,继续升温至 90°C,恒温反应 4 小时;最后升温至 95-100°C 煮球 2 小时,使聚合完全;所得树脂用水充分洗涤,凉干后分别用乙醇、石油醚各抽提 8 小时,室温下减压干燥备用。

树脂法分离富集 A 甙包括树脂的活化及 A 甙的富集,树脂的活化方法如下:称取一定量的树脂用适量乙醇溶胀过夜,然后逐渐过渡到水相。准确量取一定体积的湿树脂并将其转入内径为 0.8-1.0cm 树脂柱中,以 1BV/h (BV,床体积;h,小时)的流速使 20-30ml 5%的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,水洗至中性备用。

A 甙的富集可用下列两个方法:其中一个方法是配制一定浓度的甜菊糖水溶液,使其以一定流速缓慢流过树脂床。此时树脂对甜菊糖分子产生吸附与选择性吸附作用。检测流出液,自泄漏点起每 10ml 或 20ml 为一组份等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至流出液中 A 甙含量小于 S 甙。合并流出液浓缩至干燥,所得甜菊糖中 A 甙含量高于 S 甙。另一个富集 A 甙的方法是将高 S 甙甜菊糖用甲醇重结晶,结晶母液浓缩至干燥。然后将母液糖配成一定浓度的水溶液,使其以一定流速缓慢流过树脂床。检测流出液,自泄漏点起每 10ml 或 20ml 为一组份等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至流出液中的杂质含量与原母液接近为止。合并流出液,浓缩至干燥,所得甜菊糖中 A 甙含量高于 S 甙,并且杂质含量低于原母液。

A 甙的进一步纯化方法:将用树脂法处理得到的高 A 甙含量的甜菊糖产品,用含水量为 0-50%的甲醇进行重结晶。

通过上述方法得到的高 A 甙含量甜菊糖产品,用含水量为 0-50%的甲醇进行重结晶,通过控制重结晶条件可以得到 A 甙含量大于 90%的结晶产品熔点为 227-229°C。

实例 1

于三口瓶中将工业二乙烯苯 95 克、4-乙烯基吡啶 5 克和过氧化苯甲酰 1 克,混合均匀后加入混合致孔剂烷基苯与液体石蜡,总重量为 200 克,其中烷基苯与石蜡的重量比为 2:1。加入 NaCl 水溶液,使水油相体积比控制在 5:1,并加入 0.5%的聚乙烯醇作表面活性剂。开动

搅拌,控制搅拌速度,使小球粒径分布在 80~200 目之间。以 5℃/10min 的速度匀速缓慢升温至 80℃,恒温反应 2 小时。继续升温至 90℃,恒温反应 4 小时。最后升温至 95~100℃煮球 2 小时,使聚合完全。所得树脂用热水充分洗涤,凉干后分别用乙醇、石油醚各抽提 8 小时,室温下减压干燥备用。

称取一定量的树脂用适量乙醇溶胀过夜,然后逐渐过渡到水相。准确量取 20ml 湿树脂并将其转入内径为 0.8~1.0cm 树脂柱中,以 1BV/h 的流速使 20~30ml5% 的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,然后水洗至中性。再以 1BV/h 的流速使 20~30ml1N 的 NaOH 溶液缓慢流过树脂床,水洗至中性备用。

配制 4mg/ml 的甜菊糖水溶液,使其以 1BV/h 的流速缓慢流过树脂床。此时树脂对甜菊糖分子产生选择性吸附作用。检测流出液,流出液达 380ml 开始泄漏,自泄漏点起每 20ml 为一组分,等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至 500ml 后流出液中 A 甙含量小于 S 甙。合并流出液,浓缩至干燥,得到高 A 甙含量甜菊糖约 200mg,其中 A 甙与 S 甙的含量比约为(2.8~1.0):1。树脂可用 70% 乙醇再生,用水洗净后可反复使用。图 1 给出原糖液与流出液的 HPLC 谱图。

实例 2

于三口瓶中将工业二乙烯苯 97 克,4-乙基吡啶 3 克和 1 克过氧化苯甲酰混合均匀、加入混合致孔剂烷基苯与液体石蜡,总重量为 200 克,其中烷基苯与石蜡的重量比为 5:1,以 NaCl 水溶液做为分散剂、水油相体积比控制在 5:1,并加入 0.5% 的聚乙烯醇做为表面活性剂。开动搅拌,控制搅拌速度,使小球粒径分布在 80~200 目之间。以 5℃/10min 的速度匀速缓慢升温至 80℃,恒温反应 2 小时。继续升温 90℃,恒温反应 4 小时。最后升温至 90~100℃煮球 2 小时、使聚合完全。所得树脂用热水充分洗涤,凉干后分别用乙醇、石油醚各抽提 8 小时,室温下减压干燥备用。

称取一定量的树脂用适用乙醇溶胀过夜,然后逐渐过渡到水相。准确量取 10ml 湿树脂并将其转入内径为 0.8~1.0cm 树脂柱中,以 1BV/h 的流速使 20~30ml5% 的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,然后水洗至中性。再以 1BV/h 的流速使 20~30ml5% 的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,然后水洗至中性备用。

称取 20 克甜菊糖,用 250ml 甲醇溶解,于 3~5℃冷却结晶 48 小时。过滤,并将母液浓缩至干燥。将母液糖配制成 4mg/ml 的甜菊糖水溶液,

使其以 1BV/h 的流速缓慢流过树脂床。此时,树脂对甜菊糖及其杂质分子产生选择性吸附作用。检测流出液,达 185ml 后开始泄漏,自泄漏点起每 20ml 为一组份等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,445ml 以后流出液中的杂质含量开始显著增高,并且 A 甙与 S 甙的比值也基本接近母液糖。停止收集,合并流出液,浓缩至干燥,得到高 A 甙含量甜菊糖约 610mg,其中 A 甙与 S 甙的含量比约为(8.1~1.7):1。图 2 给出母液糖与流出液糖的 HPLC 谱图。

实例 3

于三口瓶中将工业二乙烯苯 50 克、4-乙烯基吡啶 10 克和过氧化苯甲酰 0.8 克混合均匀,加入混合致孔剂烷基苯与液体石蜡,总重量为 60 克,其中烷基苯与石蜡的重量比为 1:1,加入 NaCl 水溶液,使水油相体积比控制在 4:1,并加入 0.8% 的聚乙烯醇做为表面活性剂。开动搅拌,控制搅拌速度,使小球粒径分布在 80~200 目之间。以 5℃/10min 的速度匀速缓慢升温至 80℃,恒温反应 2 小时。继续升温 90℃,恒温反应 4 小时。最后升温至 90~100℃煮球 2 小时,使聚合完全。所得树脂用热水充分洗涤,凉干后分别用乙醇、石油醚各抽提 8 小时,室温下减压干燥备用。

称取一定量的树脂,用适量乙醇溶胀过夜,然后逐渐过渡到水相,准确量取 10ml 湿树脂并将其转入内径为 0.8~1.0cm 树脂柱中,以 1BV/h 的流速使 20~30ml 5% 的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,然后水洗至中性。再以 1BV/h 的流速使 20~30ml 1N 的稀 HCl 溶液缓慢流过树脂床,并水洗至中性备用。

配制 4mg/ml 的甜菊糖水溶液,使其以 1BV/h 的流速缓慢流过树脂床。此时,树脂对甜菊糖分子产生选择性吸附作用。检测流出液,120ml 开始泄漏,自泄漏点起每 10ml 等体积接收流出液,并用 HPLC 进行监测,直至 245ml 以后流出液中 A 甙与 S 甙基本相等。合并流出液,浓缩至干燥,得到高 A 甙含量甜菊糖约 135mg。

实例 4

准确称取 5 克用树脂法处理得到的高 A 甙含量甜菊糖产品,用含水量为 10% 的甲醇溶液加热溶解,过滤,冷却至 3~5℃ 进行重结晶,可以得到 A 甙含量约为 91—93% 的结晶产品约 2~2.5 克,熔点为 219~221℃。

图 3 给出 A 甙的 HPLC 谱图。

图 1 甜菊糖溶液分离前后的 HPLC 谱图,其中 a 为原溶液,b 为动态分离后的流出液。

图 2 母液甜菊糖溶液分离前后的 HPLC 谱图,其中 a 为母液糖(4mg/ml),b 为树脂分离后的流出液。

图 3 重结晶后莱胞迪忒 A 的 HPLC 谱图。

说明书附图

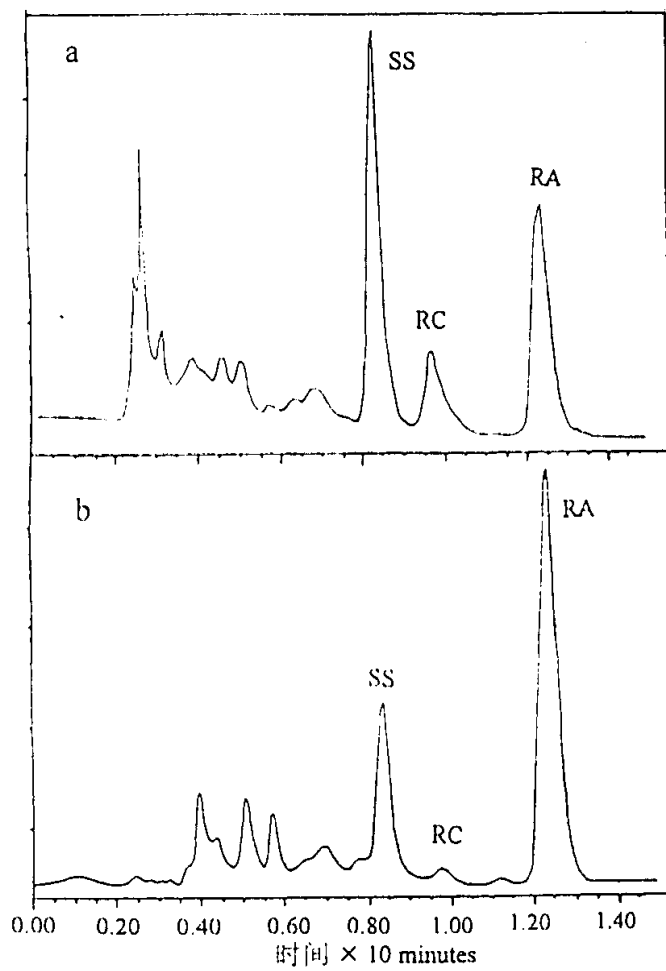


图 1

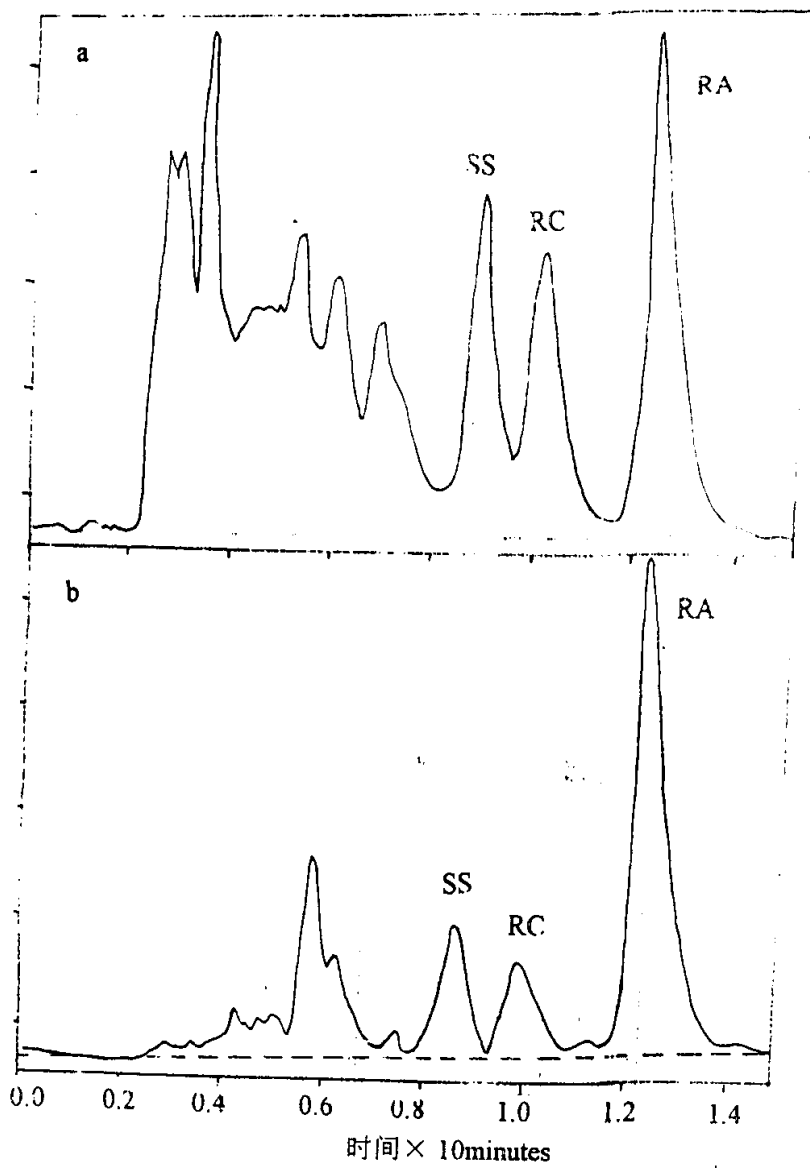
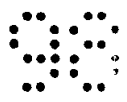


图 2

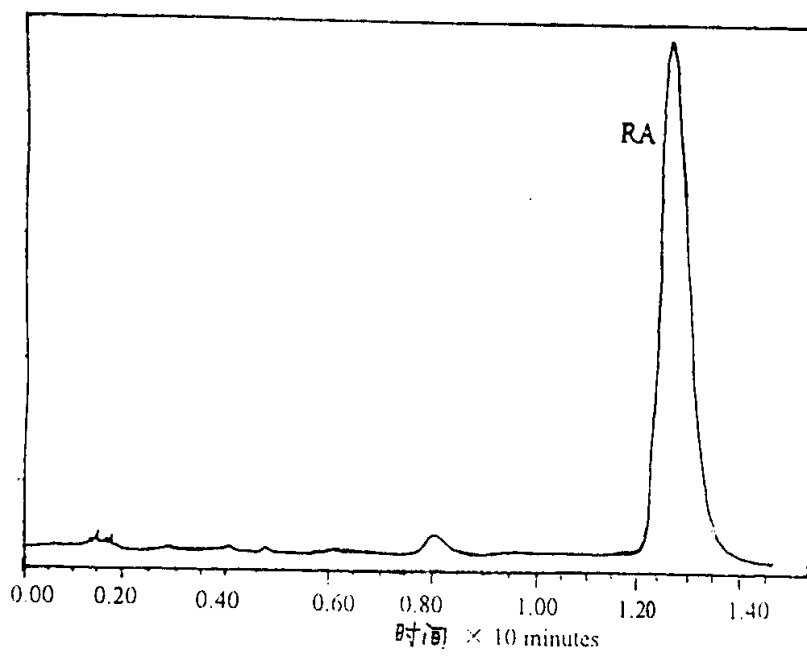


图 3