

[研究·设计]

DOI:10.3969/j.issn.1005-2895.2015.05.001

高纯度莱鲍迪甙 A 的结晶制备工艺

沈建, 范刚, 杨健

(浙江大学化工机械研究所, 浙江杭州 310027)

摘要:针对现有结晶法制备甜菊糖中存在的结晶步骤复杂、回收率低、结晶周期长等问题,提出了二次结晶法从甜菊糖粗品中提取高纯度 RA 的新工艺。同时研究了提取溶剂、固液比、结晶温度、结晶时间等对结晶效果的影响,优化了现有结晶工艺,简化了结晶步骤。实验表明,结晶法制备高纯度 RA 的最佳工艺为:一次结晶提取溶剂为无水甲醇(质量分数 >99%),固液比为 1:5 g/mL,溶解温度为 50 ℃,结晶时间为 2 h;二次结晶提取剂为 86%~88% 的乙醇溶液,固液比 1:4 g/mL,溶解温度为 50 ℃,结晶时间为 16~24 h。两次结晶 RA 总得率为 70.9%,通过本结晶工艺,可制得 RA 的质量分数为 97.51% 的甜菊糖产品。

关键词:甜菊糖;莱鲍迪甙 A;结晶;纯化

中图分类号:TQ026.5

文献标志码:A

文章编号:1005-2895(2015)05-0001-05

Crystallization Preparation Technology on High Purity Rebaudioside A from Steviol Glycosides

SHEN Jian, FAN Gang, YANG Jian

(Institute of Process Equipment, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: A new separation process of high purity RA from Stevia sugar raw material was proposed by using the two cooling crystallization to solve the problems of the complex crystallization steps, low recovery rate and long period of crystallization existing in crystallization of stevioside. The effects of key operations, including solvents, solid-to-liquid ratio, crystallization temperature, crystallization time on the purity of products were studied to optimize the crystallization condition. It indicates that, the best process of preparing high purity RA is as follows. The first extraction solvent is anhydrous ethanol (mass fraction >99%), solid-to-liquid ratio of 1:5 g/mL, water-bath temperature of 50 ℃, and crystallization time of 2 hours. The second extraction solvent is of 86%~88% ethanol, solid-to-liquid ratio of 1:4 g/mL, water-bath temperature of 50 ℃, and crystallization time of 16~24 hours. The yield of RA is 70.9% by the two cooling crystallization. Under such conditions, the Stevia products in which the mass fraction of RA is more than 97% were obtained.

Key words: Stevia glycoside; Rebaudioside A; crystallization; purification

甜菊糖是从菊科草本植物甜叶菊中提取而来的一种甜味剂,原产地为南美洲。甜菊糖因甜度高、热量低的特性,已广泛应用于食品、化妆品、医药等领域^[1-4]。甜菊糖不参加人体代谢,其甜度是蔗糖的 250~300 倍^[5],具有降血压、血糖和调节免疫等功能^[6-7],适合糖尿病、苯丙酮尿症患者和肥胖人群使用。目前已发现在甜菊糖中存在的糖苷种类超过 30 种^[8],而其中最

主要的 2 种糖苷为甜菊糖甙(STV)和莱鲍迪甙 A(RA)。STV 口感较蔗糖差,且有较大的后苦味^[9-10],RA 口感接近蔗糖,无不良余味^[11],因而是更为理想的甜味剂。目前,RA 的质量分数为 80% 的甜菊糖市价比一般混合型甜菊糖高 4~5 倍,而 RA 质量分数(纯度)大于 97% 的甜菊糖市价达几十万元/吨,提取分离 RA 含量高的产品是近年来国内外研究的热点。

收稿日期:2015-04-30;修回日期:2015-05-29

基金项目:国家自然科学基金(NO. 51375444)

作者简介:沈建(1991),男,浙江杭州人,硕士,主要研究方向为多元分流式结晶系统。E-mail:zdsj1991@163.com

张凌云^[12]、何海芬^[13]等人采用大孔树脂法制备莱鲍迪甙 A,此法能有效提纯分离甜菊糖各组分,但处理量小,所获得 RA 质量分数(纯度)和产率偏低,不适用于工业化生产。李培^[14]、张扬^[15]、刘杰^[16]等人采用结晶法^[17]纯化甜菊糖,其设备简单,处理量大,适合于工业化生产,但存在结晶步骤复杂、回收率低、结晶周期长、所获得 RA 质量分数(纯度)较低等问题。

针对以上问题,本文通过测定 RA 在甲醇-水和乙醇-水溶液中的溶解度曲线,提出了结晶法制备高纯度 RA 的新工艺。探讨了固液比、结晶温度、结晶时间等因素对结晶效果的影响,优化了现有结晶工艺,简化了结晶步骤,改善了回收率低和结晶周期长等问题,为工业中制备 97% RA 的甜菊糖产品,发挥甜菊糖更大的经济效益提供科学依据。

1 实验

1.1 实验材料与仪器

甜菊糖:山东某制药有限公司提供(RA 质量分数约为 50%,总苷质量分数约为 89%)。

实验试剂:甲醇(某集团化学试剂有限公司,质量分数 > 99.5%);乙醇(某集团化学试剂有限公司,质量分数 > 99.7%);乙腈(天津某精细化学品有限公司,特级色谱纯);去离子水(广州某有限公司)。

仪器:梅特勒 AL-204 电子天平,Waters-515 高效液相色谱仪。

1.2 实验室小试装置

本实验采用两次结晶法,其实验室小试装置示意图如图 1 所示。 T_1 为一次结晶提取剂存储罐, T_2 为二次结晶提取剂存储罐, T_3 为二次结晶产物存储罐。 J_1 为一次结晶搅拌罐, J_2 为二次结晶搅拌罐, $S_1, S_2, \dots, S_9$ 为电磁阀。甜菊糖原料与一次结晶提取剂按一定固液比进入 J_1 ,搅拌混合,夹套水浴加热后静置结晶,固液分离得一次结晶晶体。所得一次结晶晶体,与二次结晶提取剂按一定固液比混合进入 J_2 进行二次结晶。

1.3 甜菊糖组分测定

甜菊糖组分测定采用高效液相色谱法,检测波长为 210 nm;色谱柱为 Inertsil NH_2 柱(4.6 mm × 250 mm,粒径 5 μm);流动相为乙腈:水 = 80:20(V:V);流速为 1.2 mL/min;进样量为 20 μL ^[18]。通过 HPLC 法测定甜菊糖中各糖苷所占的峰面积,用归一法换算出 RA 的质量分数 P ,并按照下式计算 RA 结晶得率 D :

$$D_1 = P_1 \times M_1 / (P_0 \times M_0),$$

$$D_2 = P_2 \times M_2 / (P_1 \times M_1),$$

$$D = P_2 \times M_2 / (P_0 \times M_0)。$$

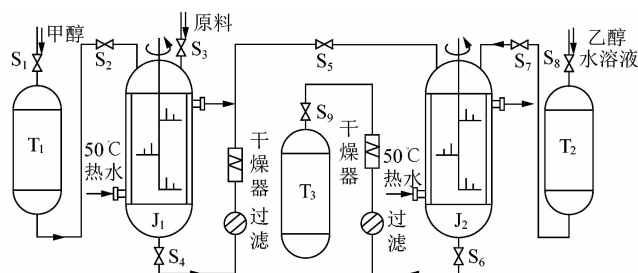


图 1 实验室冷却结晶装置

Figure 1 Schematic experimental apparatus for cooling crystallization

式中: D 为 2 次结晶总得率/%; D_1 为 RA 一次结晶得率/%; D_2 为 RA 二次结晶得率/%; P_1 为一次结晶晶体中 RA 的质量分数/%; M_1 为一次结晶晶体质量/g; P_0 为甜菊糖原料中 RA 的质量分数/%; M_0 为甜菊糖原料质量/g; P_2 为二次结晶晶体中 RA 的质量分数/%; M_2 为二次结晶晶体质量/g。

1.4 RA 溶解度曲线的测定

根据文献资料可知,目前工业生产中主要采用甲醇和乙醇溶液作为提取剂,因此通过测定 RA 在甲醇溶液和乙醇溶液中的溶解度曲线,分析其溶解度变化规律,可以为之后结晶方案的确定和结晶工艺条件的优化提供数据支撑。

开启恒温水浴锅,水温升至设定温度,往 J_1 中通入一定量溶剂,然后加入足量的 RA,调节搅拌速度,搅拌一段时间,以确保体系达到固液平衡,恒温静置,取上层清液测 RA 浓度。在一定温度区间内,每隔 5℃ 测样,即可得 RA 在甲醇和乙醇溶液中的溶解度曲线。

1.5 结晶纯化条件的优化

本文采用二次结晶法,在上节中已根据文献资料初步确定提取剂为甲醇和乙醇溶液。通过结晶实验研究固液比、结晶温度、结晶时间对一次、二次结晶效果的影响,最终确定最佳的结晶工艺路线,制备 RA 的质量分数大于 97% 的甜菊糖产品。

1.5.1 一次结晶提取剂的确定

准确称取干燥后的甜菊糖粗品 1 g,共 5 份,与不同配比的甲醇、乙醇溶液按固液比 1:5 g/mL 混合,分别送入一次结晶罐 J_1 中,50℃ 水浴加热,启动电机,搅拌 10 min 后,停止水浴加热,于常温下静置 1 h,晶体析出,离心过滤,一次结晶晶体用乙醇(质量分数 > 99%)洗涤 2 遍,干燥,称量并检测,确定最佳提取剂。

1.5.2 固液比的确定

准确称取干燥后的甜菊糖粗品 1 g,共 5 份,分别与无水甲醇按固液比 1:4、1:5、1:6、1:8 和 1:10 g/mL

混合,送入一次结晶罐 J_1 中,50℃水浴加热,启动电机,搅拌10 min后,停止水浴加热,于常温下静置1 h,晶体析出,离心过滤,一次结晶晶体用乙醇(质量分数>99%)洗涤2遍,干燥,称量并检测,确定最佳固液比。

1.5.3 水浴温度的确定

准确称取干燥后的甜菊糖粗品1 g,共5份,与无水甲醇按固液比1:5 g/mL混合,分别送入一次结晶罐 J_1 中,启动电机,分别在水浴温度为30,40,50,60和70℃下搅拌10 min后,停止水浴加热,于常温下静置结晶1 h,晶体析出,离心过滤,一次结晶晶体用乙醇(质量分数>99%)洗涤2遍,干燥,称量并检测,确定最佳水浴温度。

1.5.4 结晶时间的确定

准确称取干燥后的甜菊糖粗品1 g,共5份,与无水甲醇按固液比1:5 g/mL混合,分别送入一次结晶罐 J_1 中,启动电机,在50℃水浴温度下,搅拌10 min后,停止水浴加热,分别于常温下静置结晶0.5,1.0,2.0,4.0和6.0 h,晶体析出,离心过滤,一次结晶晶体用乙醇(质量分数>99%)洗涤2遍,干燥,称量并检测,确定最佳结晶时间。

1.5.5 二次结晶提取剂的确定

准确称取干燥后的一次结晶晶体1 g,共7份,分别与不同配比的乙醇溶液(其中水的体积分数分别为6.0%,8.0%,10.0%,12.0%,14.0%,17.5%和20.0%)按固液比1:4 g/mL混合,送入二次结晶罐 J_2 中,启动电机,在50℃水浴温度下,搅拌10~30 min后,停止水浴加热,于常温下静置结晶16~24 h,晶体析出,离心过滤,一次结晶晶体用乙醇(质量分数>99%)洗涤2遍,干燥,称量并检测,确定最佳的乙醇溶液配比。

2 结果与讨论

2.1 RA在甲醇、乙醇溶液中的溶解性

RA在不同甲醇、乙醇溶液中的溶解度曲线如图2所示。从图2可看出,RA在无水甲醇和无水乙醇中的溶解度均很小,且相同温度下,RA在甲醇中的溶解度大于乙醇中的溶解度。随着溶液中水的体积分数的增加,溶剂的极性提高,RA在甲醇溶液和乙醇溶液中的溶解度均逐渐增加。并且,RA在甲醇、乙醇溶液中的溶解度随温度的升高逐渐增加。因此,在结晶实验中,可根据原料中RA的质量分数,调整溶液中水的体积分数来控制合适的固液比,并通过升温溶解,降温结晶的方法,使高纯度RA晶体析出,达到纯化的目的。

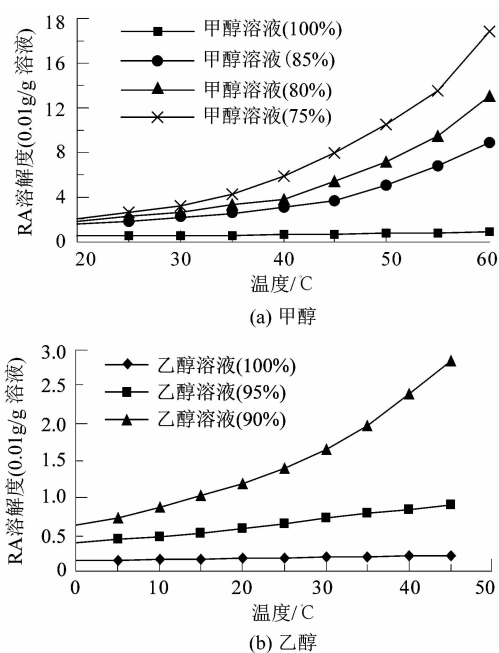


图2 RA在甲醇、乙醇溶液中的溶解度曲线

Figure 2 Solubility curve of RA in different solution

2.2 一次结晶纯化条件的优化

2.2.1 不同配比的提取剂对一次结晶的影响

本文最终选用甲醇和乙醇作为提取剂。其不同配比对一次结晶效果影响的实验结果如图3(a)所示。从图中可知,溶液中乙醇体积分数逐渐升高,RA质量分数(纯度)逐渐提高,但不明显;另外,结晶晶体质量和RA得率逐渐下降,因此可知,增加乙醇体积分数有利于提高RA质量分数(纯度),但是不利于晶体析出,因此综合考虑,一次结晶提取剂选用无水甲醇。

2.2.2 固液比对一次结晶的影响

固液比对一次结晶效果影响的实验结果如图3(b)所示。在图中,样品序号1,2,3,4和5分别对应固液比1:4,1:5,1:6,1:8和1:10 g/mL。固液比较小时,溶液黏度过大,不利于晶体结晶析出,而当固液比过大时,溶液变稀,通过降温结晶,较难使体系达到饱和状态,因此晶体析出同样困难。本实验条件下,当固液比小于1:5 g/mL时,结晶晶体质量和RA得率均随着固液比的增加而上升,当固液比大于1:5 g/mL时,结晶晶体质量和RA得率均逐渐下降,而在整个过程中,析出晶体中RA质量分数(纯度)变化较小,因此综合考虑,一次结晶固液比为1:5 g/mL时,结晶效果最好。

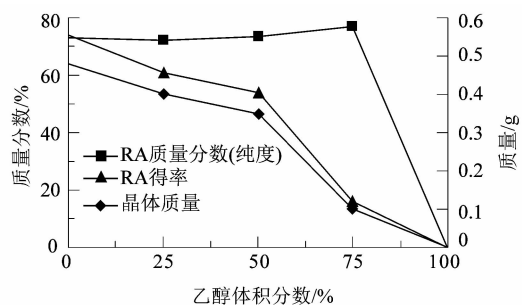
2.2.3 水浴温度对一次结晶的影响

水浴温度对一次结晶效果影响的实验结果如图3(c)所示。从图中可知,当水浴温度从30℃逐渐上升到50℃时,结晶晶体质量和得率逐渐增加;水浴温度

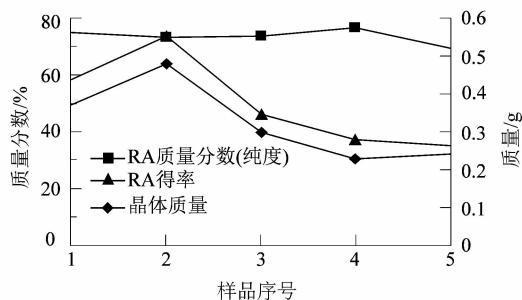
从 50 ℃ 到 70 ℃ 时,结晶晶体质量和得率趋于平稳,而整个过程中,RA 质量分数(纯度)几乎不变,均在 70% 以上。由此可知,升高水浴温度有利于结晶析出,考虑经济性,一次结晶水浴温度取 50 ℃ 较为合适。

2.2.4 结晶时间对一次结晶的影响

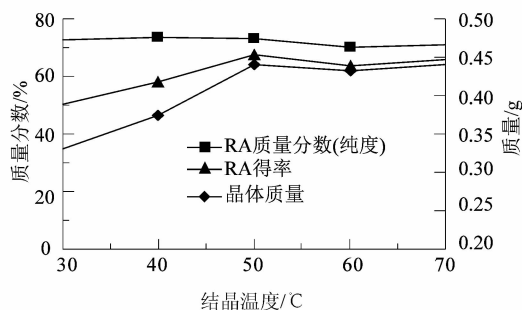
结晶时间对一次结晶效果影响的实验结果如图 3



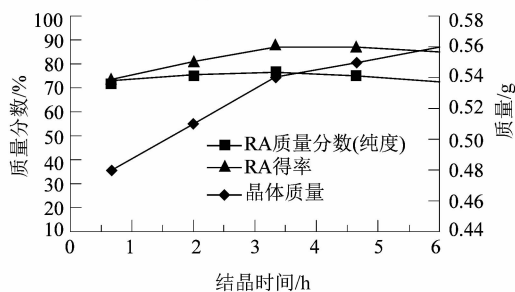
(a) 结晶因素1



(b) 结晶因素2



(c) 结晶因素3



(d) 结晶因素4

图 3 不同结晶因素对结晶结果的影响

Figure 3 Influence of different factors on crystallization effect

(d) 所示。从本实验看,一次结晶时间从 0.5 h 到 2.0 h,RA 质量分数(纯度)、结晶晶体质量、得率均逐渐升高,2 h 到 4 h,三者逐渐趋于稳定;而 4 h 之后,晶体继续析出,而 RA 质量分数(纯度)和得率却有所下降。可能原因是结晶时间过长,溶液中的 STV 也逐渐析出,同时抑制 RA 析出,从而导致一次结晶晶体不纯,得率下降。因此,一次结晶时间定为 2 h 较为合适。

2.3 乙醇溶液中水的体积分数对二次结晶的影响

乙醇溶液中不同水的体积分数对二次结晶效果影响的实验结果如图 4 所示。本实验中,随着乙醇溶液中水的体积分数的增加,RA 质量分数(纯度)逐渐升高,最高达 99% 以上,而 RA 得率和结晶晶体质量总体趋势为逐渐下降,综合考虑 RA 质量分数(纯度)和 RA 得率,取二次结晶乙醇溶液中水的体积分数在 12% ~ 14% 之间。

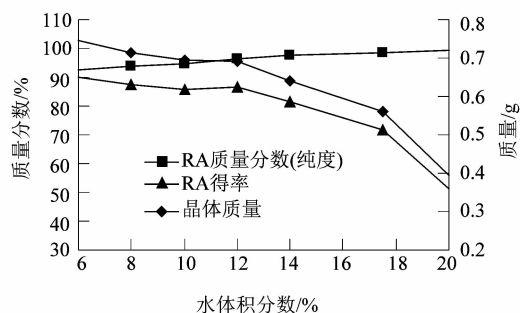


图 4 乙醇溶液中水的体积分数对二次结晶的影响

Figure 4 Influence of water content of ethanol solution on secondary crystallization effect

2.4 结晶产物 HPLC 检测结果

甜菊糖原料、一次和二次结晶产物经 HPLC 检测后,其相关检测数据如表 1 所示。

表 1 结晶产物的 HPLC 检测结果

Table 1 HPLC test results of crystallization products

项目	RA 质量 分数/%	STV 质量 分数/%	RC 质量 分数/%	结晶晶体 质量/g	得率/%
甜菊糖原料	47.60	26.88	14.590	1.000	/
一次结晶晶体	76.71	14.36	8.450	0.540	87.0
二次结晶晶体	97.51	1.91	0.267	0.641	81.5

其中,RC 为莱鲍迪甙 C,甜菊糖中另一种糖苷成分。甜菊糖原料中 RA 质量分数为 47.6%,经一次结晶后,RA 质量分数达 76.71%,一次结晶得率 D_1 为 87%;二次结晶产物中 RA 质量分数达 97.51%,其得率 D_2 为 81.5%。本文通过 2 次结晶,制备得到 RA 质量分数 > 97% 的甜菊糖产品,2 次结晶总得率 D 为 70.9%。2 次结晶产物的 HPLC 检测图谱如图 5 所示。

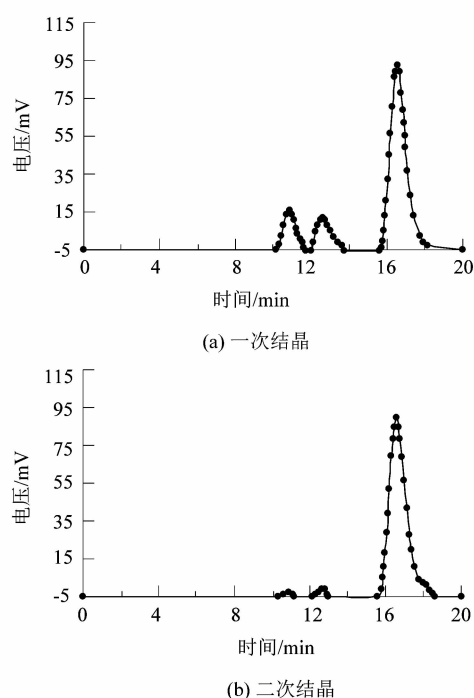


图5 一次、二次结晶产物 HPLC 检测谱图

Figure 5 HPLC testing spectra of primary and secondary crystallization products

3 结论

本文测定了不同温度下莱鲍迪甙 A(RA) 在甲醇-水和乙醇-水溶液中的溶解度,发现温度和溶液中水的体积分数对 RA 的溶解度影响显著,提出了两次降温结晶法从甜菊糖粗品中提取高纯度 RA 的工艺路线。同时对影响结晶工艺的主要因素进行了系统研究,最终确定优化后的工艺路线为:甜菊糖粗品与无水甲醇按固液比 1:5 g/mL 混合,50 ℃ 水浴加热,搅拌溶解 10 min 后,静置结晶 2 h,晶体析出;离心过滤后的晶体,用乙醇洗涤 2 次,干燥,称量;取一次结晶晶体,与乙醇水溶液(水的体积分数为 12% ~ 14%)按固液比 1:4 g/mL 混合,50 ℃ 水浴加热,搅拌溶解 10 ~ 30 min,于常温下静置结晶 16 ~ 24 h,晶体析出;离心过滤,用乙醇洗涤 2 次,干燥,称量。在优化工艺下制备的甜菊糖晶体,RA 质量分数(纯度)达 97.51%;2 次结晶,RA 总得率为 70.9%。

参考文献:

[1] HANSEN H J. Künftiger einsatz von steviolglykosiden: ergebnisse einer umfrage in der deutschen getränkeindustrie[J]. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2010, 5(2): 237 -

239.

- [2] KIENLE U. Stevia rebaudiana[M]. Berlin: Spurbuch Verlag, 2011.
- [3] KROYER G. Stevioside and stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients[J]. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2010, 5(2): 225 - 229.
- [4] CARAKOSTAS M C, CURRY L L, BOILEAU A C, et al. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(Sup. 7): 1 - 10.
- [5] CRAMMER B, IKAN R. Sweet glycosides from the stevia plant[J]. Chemistry in Britain, 1986, 22(10): 915 - 917.
- [6] GEUNS J M. Stevioside[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 913 - 921.
- [7] MAKI K C, CURRY L L, REEVES M S, et al. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(Sup. 7): 47 - 53.
- [8] Wölwer-Rieck U. The leaves of stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 886 - 895.
- [9] BRANDLE J E, STARRATT A N, GIJZEN M. Stevia rebaudiana: its agricultural, biological, and chemical properties[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1998, 78(4): 527 - 536.
- [10] SCHIFFMAN S S, SATTELY-MILLER E A, GRAHAM B G, et al. Effect of temperature, pH, and ions on sweet taste[J]. Physiology & Behavior, 2000, 68(4): 469 - 481.
- [11] ABELYAN V A, BALAYAN A M, GHOCHIKYAN V T, et al. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004, 40(2): 129 - 134.
- [12] 张凌云, 徐环昕, 刘坐镇, 等. 莱鲍迪甙 A 的制备色谱法分离纯化研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 216 - 218.
- [13] 何海芬, 阎杰, 陈颂怡. 甜菊糖苷的柱色谱法纯化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(9): 121 - 124.
- [14] 李培, 杨瑞金, 华霄, 等. 重结晶法分离甜菊糖的工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 160 - 163.
- [15] 张杨, 陈天红. 重结晶法分离精制莱鲍迪甙 A 的研究[J]. 离子交换与吸附, 1998, 14(6): 515 - 520.
- [16] 刘杰. 甜菊糖苷中莱鲍迪 A 苷的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [17] 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.
- [18] HEARN L K, SUBEDI P P. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(2): 165 - 168.