

乙基葡萄糖苷的催化合成与分离

涂茂兵, 魏东芝

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 生物化学研究所, 上海 200237)

摘要: 在搅拌釜式间歇反应器中研究了在磺酸型阳离子交换树脂催化下葡萄糖和乙醇的非均相催化反应. 实验考察了催化剂种类、粒度、搅拌转速、用量和反应温度对转化率的影响. 初步确定了催化反应条件: 温度 78°C, 搅拌转速 300 r/min, 树脂粒度 50~80 目, 树脂:葡萄糖为 1:1, 反应 20 h 转化率可达 89%. 另外, 建立了利用吸附树脂分离乙基葡萄糖苷的新方法.

关键词: 乙基葡萄糖苷; 离子交换树脂; 固体催化剂; 分离

中图分类号: O643.13 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)02-0162-05

1 前言

乙基葡萄糖苷是米酒中的一种重要成份, 可单独作为食品添加剂. Hayashi^[1]报道了在食品和饮料中添加 0.01%~10% 的乙基葡萄糖苷可明显提高和改善其风味, 加入 0.5% β -D-乙基葡萄糖苷的鲜汤具有丰富、平衡、宜人爽口的风味. Yoshikawa^[2]在调味剂中加入 5% 的乙基葡萄糖苷可有效削弱沙丁鱼的鱼腥味. Horikoshi^[3]研究认为乙基葡萄糖苷可用于皮肤治疗, 能明显降低紫外照射造成的损伤. 而烷基糖苷作为非离子型表面活性剂已众所周知, 此类表面活性剂具有无毒、无刺激、生物可降解等优良特性, 因此在国外受到越来越多的关注. 目前, 乙基葡萄糖苷的合成主要有 3 种方法: (1) 离子交换树脂催化合成^[4], (2) 葡萄糖苷酶法合成^[2], (3) 高频磁场催化合成^[5]. 离子交换树脂催化合成法的特点是反应速度快、转化率高, 但同时存在两种差向异构体; 酶法合成则反应条件温和、专一性好, 但转化率不高, 且反应时间较长; 高频磁场催化合成则可控制异构体形成比例, 转化率高达 100%, 但操作条件要求高, 需在 2.45 GHz 的高频磁场下反应. 国外仅有文献报道可用大孔离子交换催化剂 Amberlyst 15 来催化合成乙基葡萄糖苷, 但对此催化合成反应并无深入研究. 本文首次对 732# 型阳离子交换树脂催化合成乙基葡萄糖苷的反应进行了较为系统的研究, 结果表明 732# 阳离子交换树脂作为催化剂催化此反应, 其转化率已达到文献报道^[4]的数值, 而反应时间要比文献报道短.

2 材料与方法

材料: 葡萄糖、无水乙醇为 AR 级, 催化剂采用上海华震公司生产的 732#, HD-8, JK008 等磺酸型阳离子交换树脂. 树脂使用前需进行预处理和活化. 具体步骤为: (1) 清洗: 用 70~80°C 热水浸洗 3~5 次. (2) 活化: 将清洗后的树脂装柱, 用 1 mol/L 的 HCl 缓慢流过树脂, 流速为每小时 1.5 倍床层体积, 用量为树脂体积的 2~3 倍, 再用去离子水清洗至出水 pH 值为 5 左右.

分离用树脂 C301, D301, 732# 也由上海华震公司提供. 732# 为强酸性阳离子树脂, C301 为强碱性阴离子树脂, D301 为弱碱性阴离子树脂. 树脂预处理和活化方法基本同上, 只是 C301 和 D301 清洗时应用 50~60°C 热水, 活化时改用 1 mol/L 的 NaOH 溶液.

HPLC 检测: 反应结果采用岛津 SCL-10Avp 系统检测, 色谱柱为 $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ Lichrosorb 柱, 检测器 RID-10A, 流动相: 乙腈:水 = 75:25, 检测温度为 30°C , 流速 0.8 ml/min, 进样量为 10 μl .

NMR 检测: 检测仪器为德国 Bruker AM 500 spectrometer, $^1\text{H-NMR}$ 以 D_2O 为溶剂, $^{13}\text{C-NMR}$ 以 CDCl_3 为溶剂.

树脂静态吸附容量与分离因数的测定: 准确称取 4.0 g 树脂于三角瓶中, 加入 20 ml 一定浓度的乙基葡萄糖苷和葡萄糖的混合溶液, 于 30°C 恒温振荡至平衡, 用 HPLC 分别测定吸附前后溶液中乙基葡萄糖苷和葡萄糖的浓度. 按以下公式计算树脂的静态吸附容量 Q 和分离因数 α :

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{W}, \quad \alpha = \frac{C_{2s}C_{1m}}{C_{2m}C_{1s}}$$

式中 C_0 为起始浓度, C_e 为平衡浓度, V 为溶液体积, W 为树脂质量, C_{1s} 为树脂相中糖苷的浓度, C_{2s} 为树脂相中葡萄糖的浓度, C_{1m} 为溶液相中糖苷的浓度, C_{2m} 为溶液相中葡萄糖的浓度.

乙基葡萄糖苷的分离: 树脂 C301 经预处理和转型后装柱. 柱高径比 70:1.4, 洗脱液为乙醇与水, 流速 0.15 ml/min, BS-100A 型自动收集器收集.

反应装置与步骤: 反应器为 250 ml 三口烧瓶, 中间口安装搅拌器, 侧口分别连接冷凝管和温度计. 每次先加入底物, 并预热到 78°C 后, 再加入催化剂, 每隔一定时间取样, HPLC 检测葡萄糖和乙基葡萄糖苷的浓度变化. 反应结束过滤除去树脂, 活性炭脱色后, 减压旋转蒸发去除过量乙醇, 得淡黄色浆状粘液. 此混合物经层析柱分离可得纯品乙基葡萄糖苷.

3 结果与讨论

3.1 催化剂种类对转化率的影响

自从 Fischer 发明了转糖苷方法, 后继学者逐渐将其改进, Cadotte^[6]采用磺酸型阳离子树脂作催化剂合成甲基葡萄糖苷, 转化率为 40%~50% 左右. 本实验选用 3 种磺酸型树脂 732#, HD-8, JK008 作催化剂来催化合成乙基葡萄糖苷, 观察其对于葡萄糖转化率的影响, 结果见图 1(操作条件: 温度 70°C , 时间 24 h, 转速 300 r/min, 粒度 20~40 目). 由图可知 732#树脂作为催化剂, 催化反应转化率最高, 且很快即可达到平衡, 约为 20 h, 而其它两种均需 24 h 以上, 且树脂 HD-8, JK008 在 70°C 都明显发生裂解, 而 732#几乎不裂解, 因此后续实验只选用 732#阳离子树脂.

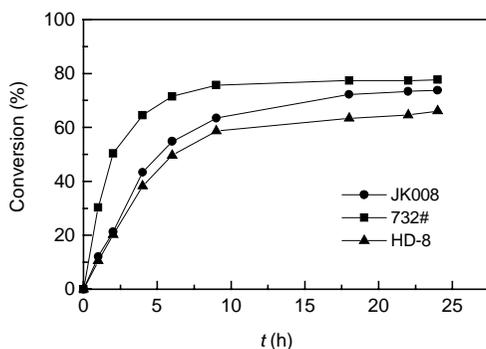


图 1 树脂种类对转化率的影响

Fig.1 Effect of various resins on conversion

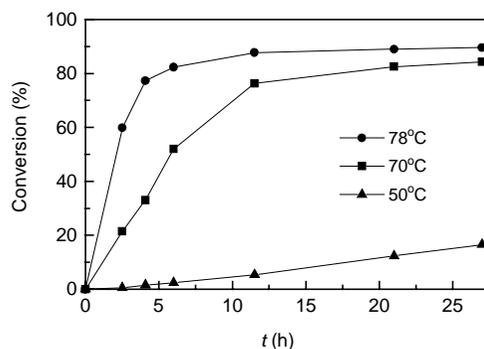


图 2 温度对转化率的影响

Fig.2 Effect of temperature on conversion

3.2 反应温度对转化率的影响

粒度 50~80 目的 732# 树脂 10 g, 葡萄糖 5 g, 转速 300 r/min, 反应温度维持在 78°C 左右, 在充分搅拌情况下, 20 h 即达平衡, 转化率可达 89%, 如图 2 所示. 温度的提高可加快反应速率, 但温度过高可引起产物颜色加深, 树脂裂解, 而且反应温度高于乙醇沸点 78°C, 条件不易控制. 而温度较低的缺点是降低了底物的溶解度. 葡萄糖难溶于无水乙醇(78°C 时溶解度为 6.77 mg/ml, 测定方法见文献[8]), 葡萄糖在此反应体系中是边反应边溶解的.

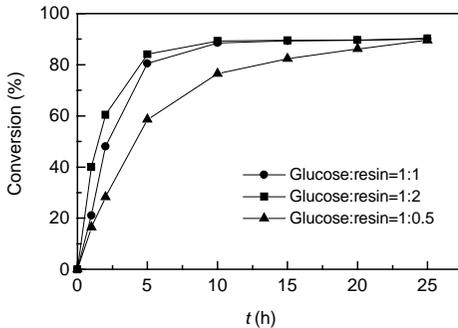


图 3 催化剂用量对转化率的影响

Fig.3 Effect of catalyst resin 732# loading

3.3 催化剂用量对转化率的影响

在温度 78°C、转速 300 r/min 条件下, 无水乙醇为 100 ml, 葡萄糖为 5 g, 仅改变催化剂树脂量, 观察反应过程转化率的变化, 结果见图 3. 从图中可以看出, 反应速率随催化剂用量的增加而提高. 但在催化剂与葡萄糖之比大于 1 之后, 到达平衡所需时间并无明显减少. 为节约起见, 对于乙基葡萄糖苷的合成来说, 两者之比为 1 即可.

3.4 搅拌转速对转化率的影响

在保持其它条件不变的情况下, 仅改变搅拌转速观察葡萄糖转化率与时间的关系, 结果表明, 在转速为 300 r/min 以上时, 转化率与搅拌转速的增加无关, 反应已不受外部传质的限制.

3.5 树脂的循环使用

新鲜的树脂作为催化剂参与反应后, 将第一次反应混合物过滤得树脂重新处理、活化(活化条件与新鲜树脂相同)重复使用, 观察其对于转化率的影响, 结果显示转化率无明显改变, 说明催化剂可重复使用.

3.6 乙基葡萄糖苷的分离

乙基葡萄糖苷和葡萄糖因含有较多的羟基而具有许多相似的特性, 且都易溶于水, 给两者的分离造成很大的困难. Adelhorst 等^[4]曾用面包酵母来消耗乙基葡萄糖苷合成反应中的剩余葡萄糖, 从而达到产物与葡萄糖的分离. 然而此方法存在一缺点, 即因酵母菌在消耗葡萄糖的同时会产生新的代谢产物. 这些代谢产物各种各样, 且很难分离, 这样势必影响乙基葡萄糖苷的纯度. Ca^{2+} 型离子交换树脂早已用于葡萄糖与果糖的分离, 但实验表明其对乙基葡萄糖苷并不适用, 故考虑用其它类型的树脂. 乙基葡萄糖苷与葡萄糖在 C-1 位上是不同的, 葡萄糖在此位为一羟基, 而糖苷则通过氧原子连接一乙基, 为此考虑利用吸附树脂与糖苷及糖作用力的不同而分离两种物质. 树脂的吸附取决于分子偶极矩所产生的范德华力, 功能基团不同, 吸附的作用力也不同.

3.6.1 树脂的筛选

选择 3 种树脂 C301, D301 和 732#, 分别测定其对乙基葡萄糖苷和葡萄糖的吸附容量和分离因数, 具体结果见表 1. 从表中可看出, 树脂 C301 对葡萄糖有较大的吸附容量, 对两种组份的分离因数也较大, 适合于乙基葡萄糖苷的分离. 从分离因数还可看出, C301 对葡萄糖有较大的亲和力, 而糖苷可先被洗脱下来.

3.6.2 乙基葡萄糖苷的分离

将树脂 C301 装柱, 再上样洗脱, 洗脱液以部分收集器收集, 上样量 2.0 ml, 洗脱液为乙醇和

水(乙醇:水 = 5:95), 流速 0.9 ml/min, 洗脱曲线见图 4. 为便于观察分离度特提高了样品中的葡萄糖浓度(乙基葡萄糖苷为 2.0 mol/L, 葡萄糖为 1.4 mol/L).

表 1 不同树脂的静态吸附容量和分离因数
Table 1 Static adsorption capability and separation factors of different resins

Resin	Adsorption capability (mmol/g)		Separation factor α
	Ethyl-glucoside	Glucose	
C301	0.0074	0.0400	20.46
D301	0.0105	0.0079	1.08
732 #	0.0043	0.0092	3.64

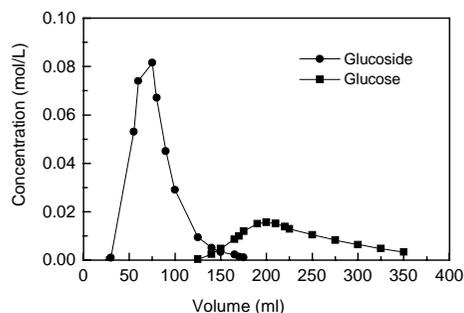


图 4 糖苷与糖的洗脱曲线
Fig.4 Elution curve of glucoside and glucose

根据公式 $R=(t_{R2}-t_{R1})/[1/2(w_{b1}+w_{b2})]$ 计算得分离度 R 为 0.88, 式中 t_R 为组份保留时间, w_b 为基线峰宽. 根据公式

$$E = \frac{1}{C_{s0}V} \int_{v_{10}}^{v_1} C_s(v) dv$$

计算洗脱率, 式中 C_{s0} 为上样浓度, V 为上样体积, $C_s(v)$ 为洗脱过程中的组份浓度, v 为洗脱液的体积. v_{10} 和 v_1 分别为组份 1 的起、止洗脱体积, 由洗脱曲线经计算机积分计算可得乙基葡萄糖苷和葡萄糖的洗脱率:

$$E_{\text{glucoside}} = \frac{3.67/1000}{2.0 \times 2.0/1000} = 0.92, \quad E_{\text{glucose}} = \frac{1.937/1000}{1.40 \times 2.0/1000} = 0.692.$$

由分离度和洗脱率可知乙基葡萄糖苷和葡萄糖基本可完全分开, 且乙基葡萄糖苷可有效回收.

3.7 乙基葡萄糖苷 NMR 分析

将前面分离得到的乙基葡萄糖苷浓缩干燥, 可得纯品(纯度为 100%), 用于 NMR 分析及 HPLC 作标准品. NMR 的分析结果见表 2.

表 2 乙基葡萄糖苷的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$
Table 2 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ of ethyl-glucoside(compared with literature^{[41])} ($\delta, \times 10^{-6}$)

Literature	$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$				$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$							
	1.22 (t, 3H)	4.91 (d, 1H ₁)	4.45 (d, 1H ₁)	3.23-3.96 (m, 8H)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCH ₂	CH ₃
	1.22	4.91	4.45	3.24~3.96								
Ethyl- β -D-glucoside	102.8	74.0	76.8	70.5	76.7	61.7	67.1	15.18				
Literature	102.8	74.1	76.8	70.6	76.8	61.7	67.1	15.2				
Ethyl- α -D-glucoside	98.7	72.5	74.1	70.5	72.1	61.4	64.7	15.0				
Literature	98.8	72.6	74.1	70.6	72.2	61.5	64.8	15.0				

离子交换树脂催化合成的乙基葡萄糖苷有 α 和 β 两种差向异构体, 根据 H₁ 位的积分强度计算出两者的比例为 2:1, 由碳谱中 C-1 位的积分强度计算出两种差向异构体的比例与氢谱一致.

4 结论

(1) 筛选出适合乙基葡萄糖苷催化合成的离子交换树脂, 初步确定出催化合成的反应条件: 温度 78°C, 转速为 300 r/min, 树脂:葡萄糖为 1:1.

(2) 树脂 C301 可用于乙基葡萄糖苷与葡萄糖的分离.

(3) 利用 NMR 分析鉴定出催化合成的 α -乙基葡萄糖苷为 β -乙基葡萄糖苷的 2 倍.

参考文献:

- [1] Hayashi Izumi, Ikemoto Takeshi [P]. JP Pat.: 07250644, 1995-10-03.
- [2] Yoshikawa Kenji, Miyamoto Hirofumi [P]. JP Pat.: 04112766, 1992-04-14.
- [3] Horikoshi Toshio, Haratake Akinori. Effects of Ethyl- α -D-glucoside Identified in Sake on Skin Treatment [J]. Nippon Keshohin Gijyutsusha kaishi, 1998, 32(1): 10-16.
- [4] Kim Aderlhorst, Fredrik Bjorkling. Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-Acylglucopyranosides [J]. Synthesis, 1990, 2: 112-115.
- [5] Ondruschka Bernd, Nuechter Matthias [P]. Ger Pat.: 19732085, 1998-12-17.
- [6] Cadotte J E, Smith F. A New Synthesis of Glycoside [J]. J. Am. Chem. Soc., 1952, 74: 1501-1505.
- [7] Marjorlein Woudenbergh-van Oosterom. Regioselective Acylation of Disaccharides in Tert-butyl Alcohol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49: 328-333.

Catalytic Synthesis and Separation of Ethyl-glucoside

TU Mao-bing, WEI Dong-zhi

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST , Biochemistry Institute, Shanghai 200237, China)

Abstract: Research was undertaken to produce ethyl-glucoside by catalysis of ion exchange resin in heterogeneous systems and to determine effects of catalyst type, size, stirring speed and temperature on conversion. 89% of conversion was obtained under the conditions: temperature 78°C, ratio of resin to glucose 1:1, reaction time 20 h. The effective separation of glucoside from glucose was achieved by column chromatography.

Key words: ethyl-glucoside ; ion exchange resin ; solid catalyst ; separation