

甜叶菊化学成分及其甜度的研究

杨全花 陈 光 任红梅 王 戈 喻长远*
(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 以工业化的提取分离工艺从甜叶菊干叶中分离提纯得到了甜菊糖苷粗品; 利用正相硅胶层析柱以及葡聚糖凝胶、十八烷基硅烷键合硅胶、聚苯乙烯树脂等反相层析柱, 分离纯化甜菊糖苷粗品得到 5 个化合物; 再利用薄层层析色谱、质谱、核磁共振等分析手段对所得各单体进行了结构鉴定。结果表明分离得的 5 种化合物分别为 6-羟基-11-(β -D-吡喃葡萄糖基)-2-十二酮(6-hydroxy-11-(β -D-glucopyranosyl)-2-cyclododecanone, I)、莱鲍迪 A 苷(rebaudioside A, II)、莱鲍迪 B 苷(rebaudioside B, III)、莱鲍迪 M 苷(rebaudioside M, IV) 和葡萄糖(glucose, V), 其中单体 I 为新的化合物。利用甜度定量预测模型对化合物 I、II、III、IV 进行甜度分析, 其甜度分别为蔗糖的 113.6、225.0、325.0、29.4 倍。

关键词: 甜叶菊; 化学成分; 核磁共振; 甜度

中图分类号: R284.1

引 言

甜叶菊(*Stevia rebaudiana*) 是原产于南美洲巴拉圭的一种菊科植物。甜菊糖苷是从甜叶菊中提取分离得到的一系列四环二萜类化合物, 甜度高(约为蔗糖甜度的 250~300 倍^[1]), 而热量仅为蔗糖的 1/300^[2], 目前已经被很多国家用来作为一种健康的甜味添加剂。甜菊糖苷类化合物还具有抗高血压、抗血糖、抗肿瘤、抗腹泻以及提高人体免疫力等临床疗效^[3]。

近年来, 甜叶菊的成分研究备受关注, 分离得到的成分主要有挥发油、甾醇、二萜类、三萜类、黄酮类、香豆素类等^[4]。甜叶菊有效成分种类多样, 约有 50 多种, 新的有效化合物也陆续被发现, 如取代基为 α -鼠李糖- β -D 葡萄糖基^[5] 的新化合物, 取代基为 β -D 木糖- β -D 葡萄糖基, 二萜母体上 C₁₅~C₁₆ 位含有双键的新化合物^[6] 等。目前高效液相色谱法^[7] 是定量分析甜叶菊中各成分的有效手段, 并且理化性质方面研究主要集中在有效成分中甜菊苷、莱鲍迪 A~F 苷、杜尔可 A 苷的甜度、熔点、折光指数上^[8]。随着甜菊糖苷作为健康食品药品添加剂的广阔市场及其重要的临床医学价值, 提高产品纯

度, 明确有效成分的种类和理化性质, 特别是产品中少量杂质成分的分析成为甜菊糖苷研究的关键性问题, 而这方面的研究鲜有报道。

本文针对现有的甜叶菊分离提取工艺(水提→过滤沉降→大孔树脂吸附→离子交换树脂得到的甜菊糖苷粗品), 利用多种柱层析色谱对甜叶菊粗品中有效成分及杂质成分进行分离; 并且利用质谱(MS)、核磁共振(NMR)等方法确定分离得到的各成分结构, 以及利用甜度定量预测模型^[9] 预测各化合物的甜度, 研究造成甜菊糖苷粗品轻微苦味的原因; 同时通过研究杂质成分及其含量, 分析甜菊苷产品的品质。

1 实验部分

1.1 原料、试剂和仪器

甜叶菊原材料来自湖南南浔圣涛植物科技有限公司。

三氯甲烷、甲醇, 分析纯, 北京化工厂; ZCX-II 型柱层析硅胶, 粗孔 200~300 目, 青岛海洋化工厂分厂; GF254 型薄层层析硅胶, 青岛海洋化工有限公司。

AV400 和 AV600 型超导液体核磁共振仪, 德国 Bruker; 葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20) 填料, 通用电气医疗集团; 十八烷基硅烷键合硅胶(ODS-A) 填料, 日本维美希公司; 聚苯乙烯树脂(MCI-GEL) 填料, 日本三菱集团; 大孔吸附树脂 AB-8(D101, 860021),

收稿日期: 2011-12-14

第一作者: 女, 1986 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn

HPD-400 ,DM130) 、离子交换树脂 AB-8 ,西安蓝晓科技有限公司。

1.2 甜叶菊的提取分离

称取干甜叶菊叶 5.0 kg ,依次加入 50 L、40 L 的去离子水常温下循环浸泡 2 次 过滤 滤渣再用 60 ~ 80 °C 的去离子水搅拌下浸泡 2 h 提取液合并浓缩。浓缩液用 60 ~ 80 目筛网过滤 ,与适量 2.5 g/mL CaCl₂ 溶液搅拌溶解 ,得到 pH 为 9 ~ 10 的沉降液 过滤 ,得到黄棕色滤液。滤液用大孔树脂梯度洗脱: 水洗→30% (体积分数) 乙醇水洗→70% 乙醇水洗→乙醇洗 4 个梯度的洗脱液分别浓缩。用 5% 的活性炭脱色 ,阳离子树脂和阴离子树脂脱盐 ,干燥 ,即得到粗品。

称取粗品 500 g ,首先用正相硅胶柱洗脱 ,洗脱剂为氯仿-甲醇混合液 ,以体积比 10:1、5:1、2:1、1:1、0:1 依次洗脱; 根据洗脱下来产品的性质 ,再利用 Sephadex LH-20 ,ODS-A 以及 MCI-GEL 等反相层析柱反复洗脱 ,洗脱剂为甲醇-水。

2 结果与讨论

2.1 化合物的结构鉴定

2.1.1 新化合物 I

化合物 I 为白色粉末(甲醇) ,薄层层析色谱(TLC) 10% 硫酸乙醇喷洒 ,烘烤显粉红色。溶于甲醇和氯仿 ,易溶于水 ,在甜叶菊各类化合物中极性偏小。ESI-MS m/z : 377.5 [M-H]⁻ ,379.4 [M+H]⁺ ; 在¹³C-NMR(400 MHz ,吡啶) 给出了 18 个碳信号峰; DEPT135(600 MHz ,吡啶) 给出 8 个仲碳信号峰; ¹H-NMR(400 MHz ,吡啶) 给出 29 个氢信号峰 ,其中 2 个甲基质子信号 δ : 1.36(d , J = 6.0 Hz ,3H) ,2.03(s ,3H) ; 在较高场处有 6 个亚甲基质子信号 δ : 1.53(m ,2H) ,1.61 ~ 1.65(m ,8H) ,1.85(m ,2H) ,可知该化合物有对称性较强的烷烃碳链; ¹³C-NMR 谱中 δ : 208.1 ,结合 DEPT135 谱该处不出峰 ,为酮羰基碳信号; δ : 62.6 ~ 103.8 中有 6 个碳信号 ,结合酸水解检出 β -葡萄糖 ,可知该化合物为糖苷。综上所述 ,该化合物的分子量为 378; 分子式为 C₁₈H₃₄O₈。

在¹H-¹H 耦合相关(COSY) (600 MHz ,吡啶) 谱中 δ 1.36(d , J = 6.0 Hz ,3H) 的甲基质子与 δ 4.10(m ,1H) 有相关 ,结合¹³C-NMR 谱 ,得到 C₁₀ ~ C₁₁ 的片段; δ 2.03(s ,3H) 没有与其他的质子有相关 ,得到 C₁ ~ C₂ 片段; δ 1.85(m ,2H) 与 δ 2.37(t , J = 6.4

Hz ,2H) 的质子有相关 ,结合¹H-NMR 谱中 δ 2.37 的裂分情况 ,可得到 C₁ ~ C₄ 片段。在碳氢远程相关(HMBC) (600 MHz ,吡啶) 谱中 δ 2.03 的甲基质子 , δ 1.85、2.37 的亚甲基质子 ,均与 δ 208.1(C-2) 的酮羰基碳有远程相关 ,证实了 C₁ ~ C₄ 片段; δ 3.95 的次甲基质子与 δ 24.1(C-5) 、38.2(C-7) 的碳有远程相关 ,碳氢直接相关(HMQC) (600 MHz ,吡啶) 谱中 δ 3.95(m ,1H) 与 δ 71.6(C-6) 直接相关 ,均出现在较低场 ,说明 C₆ 连着羟基(—OH) ,得到 C₅ ~ C₇ 片段; δ 1.36 的甲基质子 δ 4.94 的次甲基质子均与 δ 75.1(C-11) 的碳有远程相关 ,在 HMQC 中 δ 4.94(d , J = 7.6 Hz ,1H) 与 δ 103.8(C-1') 直接相关 ,可知 β -D-吡喃葡萄糖基连在 C₁₁ 上 ,即得到 C₉ ~ C₁₁ 片段。 δ 4.10 的次甲基质子与 δ 103.8(C-1') 的碳有远程相关; δ 4.49 的次甲基质子与 δ 78.1(C-2') 的碳有远程相关; δ 4.40 的次甲基质子与 δ 62.6(C-6') 的碳有远程相关 ,HMBC 与 HMQC 相结合 ,可知其为葡萄糖的信号。在 HMQC 谱中 ,化合物 I 其余碳氢信号均得到了归属 ,¹H-NMR、¹³C-NMR 数据如表 1。

根据以上分析得到该化合物的化学结构如图 1 ,命名为 6-羟基-11(β -D-吡喃葡萄糖基) -2-十二酮 ,是第 1 次分离出来的新化合物。

2.1.2 已知化合物

化合物 II 在甲醇水溶液为半球状白色颗粒或透明圆片 ,TLC 碘显色为黄色 ,10% 硫酸乙醇烘烤显粉红色; 熔点为 242 ~ 244 °C; ¹³C-NMR(100 MHz ,吡啶) δ : 15.8(C-20) ,19.6(C-2) ,20.9(C-11) ,22.4(C-6) ,28.6(C-18) ,37.2(C-3) ,38.7(C-12) ,40.1(C-10) ,41.0(C-1) ,41.1(C-7) ,42.8(C-8) ,44.2(C-4) ,44.7(C-14) ,48.0(C-15) ,54.2(C-9) ,57.6(C-5) ,86.8(C-13) ,105.0(C-17) ,154.4(C-16) ,177.3(C-19) 为四环二萜骨架上的基本信号; 62.3(C-6''') ,62.6(C-6''') ,62.9(C-6'') ,63.1(C-6') ,70.9(C-4'') ,71.2(C-4') ,71.8(C-4''') ,72.1(C-3''') ,74.1(C-3''') ,75.5(C-3''') ,76.5(C-2''') ,77.6(C-2''') ,78.4(C-5'') ,78.5(C-5''') ,78.7(C-3'') ,78.8(C-5''') ,79.2(C-5') ,79.5(C-2') ,81.0(C-2'') ,88.1(C-3'') ,96.0(C-1') ,98.4(C-1'') ,105.0(C-1'') ,105.0(C-1''') 为 C₁₃ 和 C₁₉ 上的糖取代基。实验结果与文献[10]报道的莱鲍迪 A 苷基本一致 ,故鉴定该化合物为莱鲍迪 A 苷 ,结构式如图 2 所示。

表 1 化合物 I 的 NMR 数据
Table 1 NMR data of compound I

C 序号	δ		$^1\text{H}-^1\text{H}$ 耦合相关	C—H 远程耦合相关
	C	H		
1	29.3	2.03	s 3H	—
2	208.1	—	—	(C ₂ , H ₁) (C ₂ , H ₃)
3	43.3	2.37	t, 2H; (H ₃ , H ₄) $J=6.4$ Hz	(C ₃ , H ₄) (C ₃ , H ₁)
4	36.8	1.85	m 2H	(C ₄ , H ₃)
5	24.1	1.63	m 2H	(C ₅ , H ₄)
6	71.6	3.95	m 1H	(C ₆ , H ₅) (C ₆ , H ₇)
7	38.2	1.61	m 2H	(C ₇ , H ₈)
8	25.6	1.63	m 2H	(C ₈ , H ₉)
9	21.7	1.53	m 2H	(C ₉ , H ₁₀)
10	37.8	1.65	m 2H	(C ₁₀ , H ₉)
11	75.1	4.10	m 1H	(C ₁₁ , H ₁)
12	21.6	1.36	d 3H; (H ₁₁ , H ₁₂) $J=6.0$ Hz	(C ₁₂ , H ₁₁)
1'	103.8	4.94	d 1H; (H ₁ , H ₂) $J=7.6$ Hz	(C _{1'} , H ₂) (C _{1'} , H ₁₁)
2'	78.1	4.03	t 1H; (H ₂ , H ₃) $J=7.6$ Hz	(C _{2'} , H ₁)
3'	75.8	4.55	dd 1H; (H ₂ , H ₃) $J=2.4$ Hz (H ₃ , H ₄) $J=12.0$ Hz	(C _{3'} , H ₄) (C _{3'} , H ₆)
4'	70.3	3.78	m 1H	(C _{4'} , H ₃)
5'	78.3	4.40	q 1H; (H ₄ , H ₅) $J=5.2$ Hz	(C _{5'} , H ₆)
6'	62.6	4.24	d 2H; (H ₅ , H ₆) $J=9.2$ Hz	(C _{6'} , H ₅)

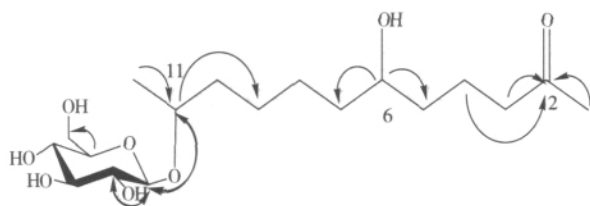


图 1 化合物 I 的 COSY 和 HMBC 相关示意图

Fig. 1 Key COSY and HMBC correlations of compound I

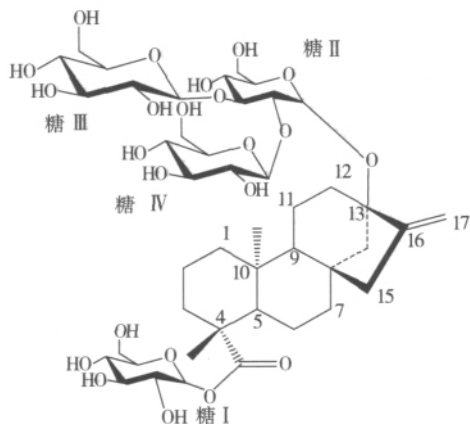


图 2 莱鲍迪 A 苷的结构式

Fig. 2 The structure of rebaudioside A

化合物 III 在甲醇里为白色粉末或无色针状结晶, TLC 碘显色为黄色, 10% 硫酸乙醇烘烤显淡红色; 根据其 ^{13}C -NMR (100 MHz, 吡啶) δ : 16.4 (C-

20) 20.1 (C-2) 20.9 (C-11) 22.9 (C-6) 29.7 (C-18) 38.1 (C-12) 39.0 (C-3) 40.1 (C-10) 41.3 (C-1) 42.1 (C-7) 42.7 (C-8) 44.2 (C-4) 44.9 (C-14) 48.2 (C-15) 54.4 (C-9) 57.3 (C-5) 87.0 (C-13) 105.2 (C-17) 154.2 (C-16) 180.5 (C-19) 为四环二萜骨架上的基本信号, 其中 180.5 表明 C₁₉ 为游离的羧酸; 62.6 (C-6''), 62.7 (C-6'), 63.5 (C-6'''), 70.2 (C-4''), 71.9 (C-4'), 72.6 (C-4'''), 75.6 (C-2''), 76.7 (C-1''), 77.9 (C''-5) 78.4 (C''-3) 78.7 (C-5'), 78.9 (C-2'''), 78.9 (C-5'''), 81.0 (C-2'), 88.5 (C-3') 98.3 (C-1') 104.8 (C-1''), 105.1 (C-1''') 为糖取代基的基本信号。以上实验数据与文献 [11-12] 报道的莱鲍迪 B 苷基本一致, 且根据其理化性质得知, 该化合物为莱鲍迪 B 苷, 结构式如图 3 所示。

化合物 IV 甲醇溶液结晶为白色松散性粉末, TLC 碘显色为黄色, 10% 硫酸乙醇烘烤显淡红色。 ^{13}C -NMR (100 MHz, 吡啶) δ : 16.1 (C-20) 19.3 (C-2) 19.8 (C-11) 21.5 (C-6) 29.3 (C-18) 37.1 (C-12) 37.1 (C-3) 39.0 (C-10) 39.9 (C-1) 41.5 (C-7) 43.6 (C-4, C-14) 46.9 (C-15) 53.2 (C-9) 56.7 (C-5) 85.9 (C-13) 104.0 (C-17) 153.3 (C-16) 175.1 (C-19) 为四环二萜骨架上的基本信号, 92.9 (C-1') 为 C₁₉ 上糖端基碳的信号, 97.1 (C-1''')

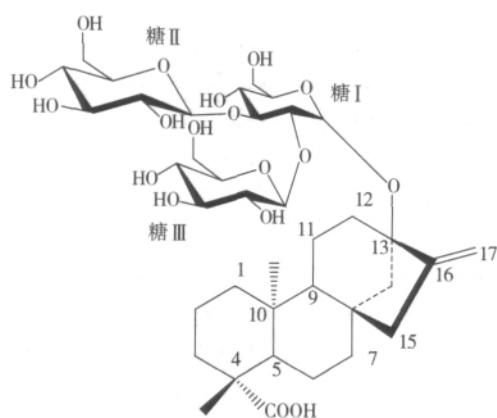


图 3 莱鲍迪 B 苷的结构式

Fig. 3 The structure of rebaudioside B

为 C_{13} 上糖端基碳的信号, 103.8 ($C-1''$), 104.0 ($C-1'''$, $C-1''''$, $C-1'''''$) 等为取代基上糖的信号。以上实验数据与文献 [11] 报道的莱鲍迪 M 苷基本一致, 故鉴定该化合物为莱鲍迪 M 苷, 结构式如图 4 所示。

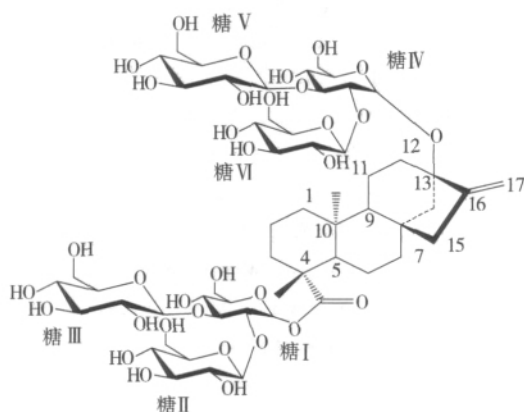


图 4 莱鲍迪 M 苷的结构式

Fig. 4 The structure of rebaudioside M

化合物 V 常温下易溶于水, 微溶于甲醇和氯仿, 纯净的单体为无色晶体或白色颗粒状粉末。TLC 10% 硫酸乙醇喷洒, 烘烤时先显红色, 随着温度的升高很快变成棕黑色。熔点为 $80 \sim 90^\circ\text{C}$; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, 吡啶) δ : 66.2 ($C-6$), 73.4 ($C-2$), 73.6 ($C-5$), 75.3 ($C-4$), 78.1 ($C-3$), 104.0 ($C-1$)。MS 分析得到 $[M-H]^-$ 为 m/z 181.2, 而葡萄糖的分子量为 180; 该化合物与葡萄糖标准品 TLC 对照, 显示 R_f 值及斑点颜色相一致。由此可以推测该化合物为葡萄糖。

2.2 化合物甜度分析

甜菊糖苷虽然具有高糖度、低热量的优点, 但其有效成份甜度不一, 部分成份口服后具有苦涩感, 这严重影响了产品的品质。本文研究得到的有效成分

是莱鲍迪 A 苷、莱鲍迪 B 苷、莱鲍迪 M 苷, 以及新化合物 I, 利用甜度定量预测模型, 得到各化合物的甜度如表 2。

表 2 甜菊糖苷各化合物的甜度

Table 2 The sweetness of related compounds in *Stevia rebaudiana*

化合物序号	甜度*	化合物序号	甜度*
I	113.6	III	325.0
II	225.0	IV	29.4

* 相对蔗糖甜度的倍数

甜菊糖苷基本结构 C_{13} 上取代基的变化对甜味很敏感, C_{19} 上的取代基对甜味的程度有很大的关系 [13]。本文研究的产品, 有效成分主要为莱鲍迪 A 苷、B 苷以及 M 苷, 经测定其质量约占产品的 60%, 杂质成分主要是葡萄糖, 质量分数约为 35%, 其余成分约为 5%。其中, 莱鲍迪 A 苷味觉纯正, 与蔗糖相当; 莱鲍迪 B 苷具有后苦感 [14], 是本实验样品苦味感的主要来源; 葡萄糖在人体内容易消化吸收, 对产品品质影响较大。化合物 I 的结构简单, 易于合成或从天然产物中提取分离, 而且甜度是蔗糖的 113.6 倍, 如果其口感纯正, 将会给甜味添加剂产业带来巨大的影响。

3 结束语

甜叶菊有效成分种类丰富, 植物体内含量高, 加上有效成分是高甜度, 在人体内是不被消化吸收的非营养物质, 这为糖尿病患者、肥胖人群提供了良好的甜味添加剂。因此, 通过设计分离纯化工艺, 提高产品有效成分的纯度, 特别是味觉纯正, 甜度较高等有效成分的含量, 把握产品杂质成分的性质, 为以后更深入研究甜菊糖苷的大规模生产提供理论依据。本文研究得到的新化合物 I, 模拟测试显示其具有相当高的甜度, 但其他理化性质还没有完全了解, 待对其性质进行深入研究之后, 或许具有非常重要的临床应用意义。

参考文献:

- [1] Chatsudhipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2009, 121: 41-54.
- [2] 陈雪英, 李页瑞, 陈勇, 等. 近红外光谱法定量测定甜菊糖苷的研究 [J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 195-199.

- Chen X Y , Li Y R , Chen Y , et al. Study of method for quantitative determination of steviol glycoside by near infrared spectroscopy [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology , 2009 , 9(5) : 195–199. (in Chinese)
- [3] Brahmachari G , Mandal L C , Roy R , et al. Stevioside and related compounds—molecules of pharmaceutical promise: a critical overview [J]. Arch Pharm Chem Life Sci , 2011 , 1: 5–19.
- [4] McGarvey B D , Attygalle A B , Starratt A N , et al. New non-glycosidic diterpenes from the leaves of *Stevia rebaudiana* [J]. Journal of Natural Products , 2003 , 66(10) : 1395–1398.
- [5] Chaturvedula V S P , Prakash I. A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana* [J]. Molecules , 2011 , 16: 2937–2943.
- [6] Chaturvedula V S P , Clo J F , Rhea J , et al. Minor diterpenoid glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana* [J]. Phytochemistry Letters , 2011 , 4: 209–212.
- [7] 吴岩, 杨长志, 刘永, 等. 高效液相色谱法测定甜叶菊粗糖苷中甜菊苷的含量 [J]. 食品工业科技, 2007 , 28(7) : 213–215.
Wu Y , Yang C Z , Liu Y , et al. Determination of crude stevia glycosides stevioside by HPLC [J]. Science and Technology of Food Industry , 2007 , 28(7) : 213–215. (in Chinese)
- [8] 孙传范, 李进伟. 甜菊糖苷研究进展 [J]. 食品科学, 2010 , 31(9) : 338–340.
Sun C F , Li J W. Research progress on steviosides [J]. Food Science , 2010 , 31(9) : 338–340. (in Chinese)
- [9] Yang X Y , Chong Y , Yan A X , et al. In-silico prediction of sweetness of sugars and sweeteners [J]. Food Chemistry , 2011 , 128: 653–658.
- [10] Steinmetz W E , Lin A. NMR studies of the conformation of the natural sweetener rebaudioside A [J]. Carbohydrate Research , 2009 , 344: 2533–2538.
- [11] Pieri V , Belancic A , Morales S , et al. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ^1H NMR spectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 2011 , 59: 4378–4384.
- [12] Ohta M , Sasa S , Inoue A , et al. Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* morita [J]. The Japanese Society of Applied Glycoscience , 2010 , 57: 199–209.
- [13] 徐仲伟. 甜菊糖苷的提取精制新工艺及酶法改性新研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2009.
Xu Z W. Extraction , Refining of stevioside and its enzymatic modification [D]. Guangzhou: South China University of Technology , 2009. (in Chinese)
- [14] 李玉强, 邵佩霞, 王永华, 等. β -呋喃果糖苷酶的生产及对甜菊苷和莱鲍迪 A 苷的酶法改性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009 , 35(3) : 23–27.
Li Y Q , Shao P X , Wang Y H , et al. Production of β -fructofuranosidase and optimization of enzymatic modification process for stevioside and rebaudioside A [J]. Food and Fermentation Industries , 2009 , 35(3) : 23–27. (in Chinese)

Analysis of the Chemical constituents of *Stevia rebaudiana* and its sweetness

YANG QuanHua CHEN Guang REN HongMei WANG Ge YU ChangYuan

(College of Life Science and Technology , Beijing University of Chemical Technology , Beijing 100029 , China)

Abstract: Extraction and separation of the products from *Stevia rebaudiana* obtained through an industrial process afforded five purified compounds using silica gel column chromatography , reversed-phase Sephadex LH-20 , ODS-A and MCI-GEL chromatography. Identification of by TLC , MS and NMR showed that the five purified compounds were 6-hydroxy-11-(β -D-glucopyranosyl)-2-cyclododecanone (I) , rebaudioside A (II) , rebaudioside B (III) , rebaudioside M (IV) , and glucose (V) . The monomer I was a new compound. In silico prediction software was used to predict the sweetness of compounds I , II , III and IV. Their sweetness values were predicted to be 113.6 , 225.0 , 325.0 , and 29.4 times larger than sugar , respectively.

Key words: *Stevia rebaudiana*; chemical composition; NMR; sweetness