



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106061987 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 01

(21) 申请号 201580009075.9

(22) 申请日 2015.02.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106061987 A

(43) 申请公布日 2016.10.26

(30) 优先权数据
61/941,018 2014.02.18 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.17(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/016269 2015.02.18(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/126876 EN 2015.08.27(73) 专利权人 麦克内尔营养有限公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S·J·卡泰尼 J·纳维亚

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
专利代理师 项丹 乐洪咏(51) Int. Cl.
C07H 15/24 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

A23L 27/30 (2016.01)

A23L 2/60 (2006.01)

A23G 3/40 (2006.01)

A23G 4/08 (2006.01)

A23C 9/156 (2006.01)

A23K 20/163 (2016.01)

A21D 2/18 (2006.01)

A21D 13/062 (2017.01)

(56) 对比文件

CN 101366496 A, 2009.02.18

WO 2009/140394 A1, 2009.11.19

US 2006/0142555 A1, 2006.06.29

US 2013/071339 A1, 2013.03.21

US 2011/0183056 A1, 2011.07.28

G.I.Kovylyeva et al..Glycosides from
Stevia rebaudiana.《Chemistry of Natural
Compounds》.2007,第43卷(第1期),81-85.Masaya Ohta et al..Characterization
of Novel Steviol Glycosides from Leaves
of Stevia rebaudiana Morita.

《J.Appl.Glycosci》.2010,第57卷199-209.

审查员 张英姝

权利要求书1页 说明书17页 附图6页

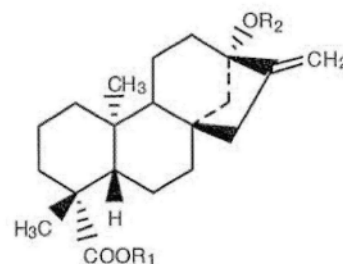
(54) 发明名称

甜菊糖苷的分离、离析和表征方法

(57) 摘要

本发明公开了一种对两种或更多种来源于甜菊植物提取物的甜菊糖苷的组合进行分离、离析和表征的综合性方法以及这些甜菊糖苷在甜味组合物中的用途。对两种或更多种来源于甜菊的甜菊糖苷的组合进行表征。两种或更多种甜菊糖苷的组合可用作食品、饮料、化妆品和药物中的增甜剂、风味增强剂和甜味剂。本发明还公开了一种对两种或更多种甜菊糖苷的组合进行离析的方法。

在标出的位置(R1和R2)糖基化的甜菊糖苷苷元结构



1. 一种制备甜菊糖苷组合物的方法,其包括:

- a) 用热水在95℃下对甜菊干燥叶子进行2小时的提取以制备粗提取物,
- b) 在低于40℃的温度下在真空中对该提取物进行浓缩,并利用离心来使其澄清,将其倒出,冷却,并用冻干法进行干燥以得到干燥粗提取物;和
- c) 在制备级的反相柱上使用如下所示的水-乙醇梯度分馏提取物:

时间 (分钟)	% 水	% 乙醇
0	100	0
10	100	0
38.2	0	100
44.1	0	100
44.1	50	50
50	50	50

其中,所述甜菊糖苷组合物包含23%的莱鲍迪甙D,21%的莱鲍迪甙N和M,1.4%的未表征的甜菊糖苷,2%的莱鲍迪甙A和16%的其它已知的甜菊糖苷。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所得组合物还包含莱鲍迪甙I和O中的一种或多种。

甜菊糖苷的分离、离析和表征方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年2月18提交的美国临时申请系列号61/941018的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种对来源于甜菊植物提取物的甜菊糖苷进行分离、离析和表征的综合性方法以及这些甜菊糖苷在甜味组合物中的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 现今,糖替代物正受到越来越多的关注,因为人们意识到许多疾病与高糖食品和饮料的消费有关。然而,例如甘素、环己基氨基磺酸钠和糖精的许多人造甜味剂因对其安全性的担忧而在一些国家被禁或受限。因此,天然来源的无热量甜味剂正变得越来越受欢迎。

[0006] 甜菊是一种原产于南美某些地区的菊目(菊科)多年生灌木。这种植物的叶子含有10%~20%的二萜苷,其甜度大约是糖的150倍~450倍。这些叶子在巴拉圭和巴西作为传统已使用了数百年来增加当地茶叶和药品的甜度。

[0007] 典型的做法是在一年中温暖的时段种植植物,然后在其开花前收割。David J. Midmore和Andrew H. Rank在《一种替代进口化学甜味剂的新兴乡村产业—甜菊—》“A new rural industry-Stevia-to replace imported chemical sweeteners”,《对乡村产业研发公司的调查报告》“A report for the Rural Industries Research and Development Corporation”,2002年8月;RIRDC网络公开号W02/022,RIRDC项目号UCQ-16A)中报告了能够在例如巴西、巴拉圭、印度或印度尼西亚的温暖气候中生长的复种作物。“笼统地报告了商业产量数字,例如1600kg~2000kg干叶/公顷/年。实验性的产量表明具有在一年中进行多次收割的体系能够给出更高的产量。”该产量是指干燥植物的质量,并未最恰当地表示为每年每公顷的甜菊糖苷量。借由改进的解析方法和为了改善每公顷甜菊糖苷产量而选择的植物的良好农艺开发,以及通过使植物在给定地理区域中的成熟与交错收割相协调,能够实现每个收割季节的收割期后的甜菊糖苷的改善。

[0008] Midmore和Rank继续报告道:“通常的程序是收割整个绿色作物并将其输送至干燥设备:阳光干燥或(人造)干燥窑。在低湿度下,切碎了的植物的薄层阳光干燥会进行得很快(9小时~10小时),将植物含水量从大约80%降至10%[116]。窑干燥可能需要两天的时间[37]。快速干燥可能提供‘更好品质的’干燥叶子。如果切碎了的植物材料未被快速干燥,则叶子的品质会因氧化而变差,甜菊苷含量在三天后减损为原来的三分之一[116]。人工干燥过程中的高温也会导致含量的减损。绿色的干燥叶子的颜色是令人满意的并且代表着良好的品质”。我们已经通过交错收割和定期对潮湿(即新鲜未干燥)的未经过任何干燥处理的叶子进行提取处理实现了对该做法的改进。该改进提供了双重好处:降低干燥过程中糖苷损失以及通过排除对干燥器的需要而节约了处理成本。

[0009] 据报告,干燥的甜菊叶子大约含有5%~9%的水分、10%~20%的蛋白质、35%~62%的碳水化合物、3%~5%的脂肪(主要是棕榈酸、亚麻酸和亚油酸)、7%~13%的灰质

和若干种挥发性组分,包括斯巴醇、 β -蒎烯、 β -石竹烯和石竹烯氧化物。甜菊还是草酸的一种丰富来源(参见 Wölwer-Rieck 的《(伯托尼)甜菊的叶子,其成分和对成分的解析:综述》“The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analysis Thereof: A Review”, *J. Agric. Chem.* 2012, 60, 886 ~ 895)。如果这些成分未被除去或降至足够低的水平,则它们会影响甜味剂的风味。结果是对单一的高纯度甜菊甜味剂的离析必须进行大量加工,包括用各种树脂的处理、使用有机溶剂的分离和进行结晶,以使产品具有合适的味道和质量。

[0010] 现存超过230种具有明显增甜性质的甜菊品种。这种植物已在从其原生的亚热带至寒冷的高纬度的范围广泛的条件下成功种植。甜菊糖苷的组成可通过定向育种来改变。鉴于原生的植物品种具有甜菊苷作为主要的甜菊糖苷,已为了提高莱鲍迪甙A的含量而选择现代品种,所述莱鲍迪甙A被认为是一种比甜菊苷品质更好的甜味剂。甜菊会生成许多其它甜菊糖苷,这些甜菊糖苷还具有以下特征:在一些情况中具有比许多其它天然形成的高效能甜味剂更高甜度的甜味和感官性质。甜菊糖苷不会在人的消化系统中被代谢成能量,且可在任何添加糖的场合下用于在不增加热量的条件下使食物变甜。它们适合糖尿病患者和低热量饮食。

[0011] 上述糖苷具有相同的苷元斯替维醇,而区别在于C₁₃和C₁₉位(分别为图1中的R2和R1)处糖残基的数量和类型。甜菊叶能够积聚不超过10%~20%(基于干重)的甜菊糖苷。天然甜菊叶中的大部分糖苷是莱鲍迪甙A(2%~10%)、甜菊苷(2%~10%)和莱鲍迪甙C(1%~2%)。例如莱鲍迪甙B、D、E和F、甜菊双苷和甜茶苷的其它糖苷也以低水平(低于1%)存在。最近,Ohta等在*J. Appl. Glycosci.* (2010) 57:199~209中报告了另一些糖苷。

[0012] 人们对两种最主要的糖苷—甜菊苷和莱鲍迪甙A进行了广泛地研究并将其表征为适合作为商业高甜度甜味剂。例如,对碳酸饮料的稳定性研究证实了它们具有热稳定性和pH稳定性。Chang S.S.等(1983)的《碳酸饮料中甜菊苷和莱鲍迪甙A的稳定性研究》“Stability studies of Stevioside and Rebaudioside A in carbonated beverages”(*J. Agric. Food Chem.* 31:409~412)。即使在高纯度的状态下,这些甜菊糖苷仍然具有不希望的味道属性,例如苦味、甜味残留、甘草风味等。妨碍甜菊甜味剂成功商业化的主要阻碍之一就是这些不希望的味道属性。事实表明,随着甜菊糖苷浓度的上升,这些风味香调变得更加明显(Prakash等(2008)《一种天然的无热量甜味剂—**Rebiana**[®]的进展》“Development of **Rebiana**[®], a natural, non-caloric sweetener”, *Food Chem. Toxicol.*, 46, S75~S82)。

[0013] 莱鲍迪甙A展现出最低的涩味、最低的苦味和最低的回味残留,因而相比于已知的甜菊糖苷具有令人喜爱的感官属性((Tanaka O.等(1987)《天然甜味剂味道的改善》“Improvement of taste of natural sweeteners”*Pure Appl. Chem.* 69:675~683; Phillips K.C.(1989)《甜菊:开发新甜味剂的步骤》“*Stevia: steps in developing a new sweetener*”,载于Grenby T.H.等主编的《甜味剂的发展》“*Developments in sweeteners*”,第3卷,Elsevier Applied Science, London., 1~43)。

[0014] Wang在美国公开申请号2013347140中公开了一种培育莱鲍迪甙A含量高的甜菊植物的方法。

[0015] 美国专利号PP23164和PP23728公开了名为AKH L1和AKH L4的甜菊品种。这些品种

具有高含量的莱鲍迪甙。

[0016] 例如美国专利号4361697、4082858、4892938、5972120、5962678、7838044和7862845描述了使用水或有机溶剂对来源于甜菊植物的甜味糖苷进行提取和纯化的方法。

[0017] Dobberstein和Ahmed(美国专利号4361697)和Morita等(美国专利号4082858)公开了用于甜菊糖苷的硅胶色谱法。Giovenatto(美国专利号4892938)使用氢氧化钙使甜菊甜味剂的粗提取物澄清,再进行过滤或离心。用强酸性离子交换树脂并随后再用弱碱性离子交换树脂对该沉淀物进行处理,进行过滤和干燥。Magomet等(美国专利号7862845)还指出了通过用钙盐对粗提取物进行处理、过滤粗浆料并随后从甲醇-水混合物中使莱鲍迪甙结晶来对甜菊糖苷进行部分纯化。Abelyan等(美国专利号7838044)指出了在存在果胶酶的条件下从(伯托尼)甜菊中提取甜味糖苷,并且通过使提取物与环糊精、膨润土和离子交换树脂接触、随后从乙醇中结晶和重结晶来进行纯化。Kutowy等(美国专利号5972120)公开了一种方法:在垂直提取柱中从(伯托尼)甜菊中提取甜味化合物,随后利用作为预处理步骤的微滤通过过滤来进行纯化以使提取物澄清,然后进行超滤,随后再进行纳滤。Payzant等(美国专利号5962678)使用两根离子交换柱除去提取自甜菊的甜味糖苷中的杂质,使用甲醇对来源于第二柱的甜味糖苷进行洗脱,并且对溶液进行冷却以使甜菊苷结晶。滤液被进一步浓缩和冷却以使莱鲍迪甙A结晶出来。

[0018] 美国专利号4612942公开了包括莱鲍迪甙D在内的二萜苷以及它们在食品、医药组合物、口腔卫生组合物、咀嚼组合物和烟草组合物中的用途。

[0019] 已经确定的是,当新的糖残基在C₁₃和C₁₉位处与初始分子相连时,这些不希望的性质中的一些可通过对甜菊糖苷进行分子间转糖反应来缓解或消除。这些化合物味道的品质和效能会随这些位置上糖残基的数量而变化。表1例示了甜味的品质和甜度是如何随糖苷数量和位置而变化的。葡萄糖基(表中以“Gluc”或“G”表示)通过 β -糖苷键相连。支链淀粉酶、异麦芽糖酶(Lobov S.V.等(1911)《甜味甜菊苷衍生物的酶生产:利用葡萄糖苷酶的转糖苷作用》“Enzymatic production of sweet stevioside derivatives: transglycosylation by glucosidases”,Agric.Biol.Chem.55:2959~2965)、 β -半乳糖苷酶(Kitahata S.等(1989)《利用各种 β -半乳糖苷酶的转糖苷作用生产甜茶苷衍生物》“Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase”,Agric.Biol.Chem.53:2923~2928)和葡聚糖蔗糖酶(Yamamoto K.等(1994)《利用葡聚糖葡聚糖酶的 α -1,6-转糖苷作用有效生产葡萄糖基-甜菊苷》“Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase”,Biosci.Biotech.Biochem.58:1657~1661)分别与支链淀粉、麦芽糖、乳糖和部分水解的淀粉一起被用作转糖酶,作为糖苷残基的提供者通过 α 连接的葡萄糖单元线性地延长了甜菊糖苷上的糖部分。

[0020] 甜菊糖苷的转糖苷作用还可通过利用嗜热脂肪芽孢杆菌得到的环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)来进行(美国专利号4219571和7807206)。结果是形成了聚合度不超过10的 α -1,4-葡萄糖基衍生物。

[0021] 事实表明,葡萄糖基衍生物的味道特征和甜度在很大程度上取决于附加的葡萄糖基衍生物的数量,即 α -1,4-葡萄糖基链的聚合度。 α -1,4-葡萄糖残基数量的增加改善了味道品质,但同时降低了甜味水平。(Tanaka,1987)

[0022] 还应当注意的是,许多具有葡萄糖基的甜菊产品含有不超过20%的残余糊精,这些残余糊精不具有明显的功能性质,但降低了产品中甜菊糖苷的含量,进而降低了甜度。

[0023] 因此,需要开发一种简单而高效的制备高纯度甜菊糖苷的方法。

[0024] 无锡金博甜菊国际贸易有限公司在中国公开申请号CN103012516中公开了甜菊糖苷的制备方法,其包括在水中浸泡甜菊叶的步骤;进行粗滤和超滤以得到超滤溶液的步骤;将超滤溶液通入纳米微保护柱的步骤;以及至少两个在纳米微保护柱中进行醇解的步骤。

[0025] 辽宁千千生物科技有限公司在中国公开申请号CN102127129中公开了一种甜菊提取物的制备方法,其包括对甜菊叶进行机械破碎的步骤;过滤甜菊叶的步骤;超声提取的步骤;絮凝步骤;吸附步骤;利用乙醇洗脱的解析步骤;脱盐脱色步骤;浓缩步骤;以及喷雾干燥步骤。

[0026] 宁波绿之健药业有限公司在中国公开申请号CN102406113中公开了一种莱鲍迪甙A/莱鲍迪甙D复配物的制备方法,其包括用水提取粉碎后的甜菊叶;使滤液通过大孔树脂柱的步骤;以及用醇类溶剂进行洗脱并使用HPLC色谱分析检测莱鲍迪甙A/莱鲍迪甙D含量的步骤。

[0027] E.P.C Plant Pharmaceutical Technology Co.,Ltd在美国公开申请号20130071537中公开了基于甜菊的甜味剂组合物,其包含莱鲍迪甙B的一种盐的形式。

[0028] Cargill, Incorporated在美国公开申请号20140243514中公开了一种富集组合物的制备方法,该富集组合物包含莱鲍迪甙B、莱鲍迪甙D或它们的混合物中的至少一种,该方法包括使用大孔中性多孔树脂。

[0029] Cargill, Incorporated在美国公开申请号20130309389中公开了一种含有特定量的莱鲍迪甙D和莱鲍迪甙B的组合物。

[0030] LGL Life Tech Corporation在美国公开申请号20140004248中公开了一种天然甜味剂组合物的制造方法,该组合物包含甜菊双苷提取物、莱鲍迪甙B提取物和莱鲍迪甙D提取物中的至少一种,该方法包括使用具有特定参数的多孔吸附柱。Markosyan在美国公开申请号20130071339中公开了高纯度甜菊糖苷、特别是莱鲍迪甙D的制备方法。

[0031] Markosyan在美国公开申请号20150017284中公开了含有至少75%的莱鲍迪甙M的莱鲍迪甙M和莱鲍迪甙D晶体组合物。

[0032] Markosyan在美国公开申请号20130071339中公开了一种甜菊糖苷的提纯方法,其包括使用依序相连的填充有能够吸附甜菊糖苷的吸附剂树脂的柱。

[0033] PureCircle Sdn Bhd在美国专利号8299224中公开了一种来源于甜菊提取物的莱鲍迪甙D的提纯方法,其包括提供甜菊的提取物;将提取物溶于有机溶剂的第一水溶液中以形成甜菊糖苷的第一混合物,其中,有机溶剂选自甲醇、乙醇、1-丙醇、异丙醇以及它们的化合物,且有机溶剂为75体积%~99体积%;在第一混合物中引起结晶;过滤该混合物以得到第一沉淀和第一滤液;将第一沉淀溶于有机溶剂的第二水溶液中以形成第二混合物,其中,有机溶剂选自甲醇、乙醇、1-丙醇、异丙醇以及它们的混合物,且有机溶剂为70体积%~80体积%;在第二混合物中引起结晶;过滤该混合物以得到第二沉淀和第二滤液;将第二沉淀溶于有机溶剂的第三水溶液中以形成第三混合物,其中,有机溶剂选自甲醇、乙醇、1-丙醇、异丙醇以及它们的混合物,且有机溶剂为10体积%~80体积%;在第三混合物中引起结晶;过滤该混合物以得到第三沉淀和第三滤液;通过干燥第三沉淀来生产经过纯化的莱鲍迪甙

D。

[0034] 伊比西北京植物药物技术有限公司(EPC Beijing Natural Products Co.Ltd)在美国公开申请号20140335253、20140335254、20140335264和20140335265中公开了含有增加量的经过纯化的莱鲍迪甙D的非天然莱鲍迪甙D组合物,其中,向组合物中加入增加量的经过纯化的莱鲍迪甙D作为经过纯化的莱鲍迪甙D。

[0035] Tate&Lyle Ingredients Americas LLC在美国公开申请号20120269954中公开了一种包含莱鲍迪甙B的甜菊提取物。

[0036] Lee等在美国公开申请号20110256588中公开了一种生产莱鲍迪甙A的方法,其通过对伯托尼甜菊叶生成莱鲍迪甙A时所产生的副产物进行循环来得到高收率。

[0037] Morita等在美国公开申请号20110183056中公开了经过离析的具有该文献中所公开的结构甜菊糖苷。该文献公开了具有以下结构的甜菊糖苷可使甜菊甜味剂的味道产生微妙的改善,即该结构中存在比甜菊苷或莱鲍迪甙A上更多的糖苷基。

[0038] PureCircle Sdn Bhd在美国专利号8520527中公开了一种甜菊食品配料的生产方法,其包括将甜菊生物物质浸泡在水中以除去可溶性成分的步骤;在碱性溶液中培育不溶于水的甜菊生物物质以生成浆料的步骤;以及其它加工步骤以得到含有微晶纤维素的甜菊食品配料。

[0039] Concentrate Manufacturing Company of Ireland在美国专利号8337928中公开了一种包含至少一种甜菊糖苷甜味剂和茴香酸的饮料产品。

[0040] PureCircle USA在美国专利号8318459和8257948中公开了一种方法,其利用淀粉作为葡萄糖残基来源来制造高纯度的具有葡萄糖基的甜菊组合物。

[0041] PureCircle Sdn Bhd在美国专利号8299224中公开了一种来源于甜菊提取物的莱鲍迪甙D的纯化方法。

[0042] Concentrate Manufacturing Company of Ireland在美国专利号8277862中公开了一种包含莱鲍迪甙A、赤藓糖醇和酸性成分的饮料产品。

[0043] Concentrate Manufacturing Company of Ireland在美国专利号8277862中公开了一种包含甜菊糖苷和酸性成分的饮料产品。

[0044] PepsiCo, Inc.在美国专利号7964232中公开了甜菊糖苷异构体,其中,式I的外环双键被移至五元环内的内环位置处。

[0045] Vineland Research and Innovation Centre在美国专利号7927851中公开了一种植物或植物细胞中的甜菊糖苷的制造方法,其包括:a)选择生成内贝壳杉烯酸的植物或植物细胞;b)使具有对具有内贝壳杉烯酸13-氢化酶活性的多肽进行编码的第一核苷酸序列和至少一种对一种或多种葡萄糖基转移酶进行编码的其它核苷酸序列的植物或植物细胞转化,来对甜菊或具有葡萄糖基的甜菊中加入葡萄糖分子进行催化;以及c)对细胞中的具有内贝壳杉烯酸13-氢化酶的多肽和所述一种或多种葡萄糖基转移酶进行表达,以将内贝壳杉烯酸转化为一种或多种甜菊糖苷。

[0046] Ohta等在《对来源于森田甜菊叶的新型甜菊糖苷的表征》“Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana morita*”(J.Appl.Glycosci.,57,199~209(2010))中公开了提取自森田甜菊叶的甜菊糖苷的结构,所述森田甜菊通过对伯托尼甜菊进行选择 and 育种来生产。

[0047] Zimmerman在《具有结构方案的已知和新型甜菊糖苷的串联质谱碎片图谱》“Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals”(Rapid Commun.Mass.Spectrom.2011,25,1575~1582)中公开了使用串联质谱来识别12种过去未知的甜菊糖苷。

[0048] Brandle等(2002)《植物的分子生物学》“Plant Molecular Biology”50:613~622;Richman等(1999)《植物学杂志》“The Plant Journal”19(4),411~421和Richman等(2005)《植物学杂志》41,55~67公开了用于甜菊的生产和甜菊向各种甜菊糖苷转化的代谢途径。

[0049] 从原始提取物离析和纯化甜菊糖苷的现有方法并未单独或共同展示对残余溶液的进一步处理或对微量化合物进行纯化的方法。因此,仍然需要用于对甜菊植物所产生的提取物进行综合性处理的高效且经济的方法。

[0050] 发明概述

[0051] 本发明涉及一种对两种或更多种来源于甜菊植物的微量甜菊糖苷(具体是那些天然含量小于1%干燥叶子重量的甜菊糖苷)进行分离、离析、表征和使用的综合性方法。

[0052] 根据一种实施方式,提供了一种对两种或更多种来源于甜菊提取物的甜菊糖苷的组合进行分离、离析和表征的高效方法,从而使浪费降到最少。

[0053] 两种或更多种甜菊糖苷的组合单独地或者与其它甜味剂和/或其它配料相结合地适合用作例如饮料、糖果、面包、饼干、口香糖、药物等可食用和可咀嚼组合物中的无热量甜味剂。

[0054] 根据一种实施方式,本方法包括:

[0055] 1.使用对两种或更多种微量甜菊糖苷的组合(含量小于5%干燥叶子重量)进行识别和定量的色谱法作为指导育种计划的方法,以使现今未作为甜味剂商业使用的该规定甜菊糖苷组的产物最优化;

[0056] 2.提取方法,其包括对甜菊叶(新鲜叶子或为了保存而干燥的叶子)进行分步提取,以使对两种或更多种分子量大于大约900g/摩尔的微量甜菊糖苷的回收最优化,并且使对于后续加工步骤的需求最小化;

[0057] 3.使用色谱法对两种或更多种分子量大于大约900g/摩尔的甜菊糖苷的组合、优选为莱鲍迪甙D、I、O、M和/或N进行离析,它们各自都基于干燥叶子重量以小于5%的水平存在;

[0058] 4.一种避免在甜菊糖苷D、I、O、M和/或N的离析中需要进行结晶的方法,其包括使用两种或更多种溶剂在恒定温度下或利用洗脱溶剂在温度梯度下进行梯度洗脱;

[0059] 5.两种或更多种甜菊糖苷的组合、优选为莱鲍迪甙D、I、O、M和/或N作为甜味剂的用途,它们各自都基于干燥叶子重量以小于5%的水平存在;

[0060] 6.可单独使用两种或更多种甜菊糖苷或将它们与更多种主要的甜菊糖苷组合起来使用,所述主要的甜菊糖苷包括但不限于莱鲍迪甙A、莱鲍迪甙B、莱鲍迪甙D,且所述两种或更多种甜菊糖苷的量小于主要的甜菊糖苷的大约25%、小于主要的甜菊糖苷的大约15%、小于主要的甜菊糖苷的大约10%、小于主要的甜菊糖苷的大约5%。摘自Ohta等(2010)的表9提供了来源于森田甜菊和伯托尼甜菊的叶子的甜菊糖苷的相对量。

[0061] 例如Outotec公司(芬兰,埃斯波)的SepTor技术的连续逆流离子交换和吸附是一

种可用于除去污染物的技术。连续色谱法与常规的(单柱或多柱)固体固定相色谱法的不同之处在于连续色谱法中所使用的多柱就像单柱那样工作,但在柱之间具有多个进料位置和排出位置以允许用于混合物和洗脱溶剂的进料位置和用于更快或更慢地洗脱混合物中的成分的洗脱位置逐步推进。这种运行模式使得各个组件柱区段在洗脱剂组成或流速方面能够自主运行。Johan Samuelsson在《连续色谱法的模拟》“Simulation of continuous chromatographic processes”中,以及Niklas Andersson在《连续制备色谱法的模拟:对MCSGP的个案研究》“Simulation of continuous preparative chromatography: A case study in MCSGP”(2009)中对为了在多柱(MC)系统中使用溶剂梯度(SG)而进行的连续分离方法的模拟进行了描述。“制备”(P)涉及在比用于分析目的时更大的规模、直至商业生产规模上对分离产生影响。连续色谱分离在糖上的应用在甜菜糖精制工业上得到了良好的发展,Bubnik和共同作者们在《连续色谱分离在糖加工中的应用》“Application of continuous chromatographic separation in sugar processing”(Journal of Food Engineering 61 (2004) 509 ~ 513)中对此进行了描述。连续分离方法的应用必须根据所进行的分离类型而定制。例如,用于离析高纯度莱鲍迪甙A的分离策略会与用于形成其它甜菊糖苷的定制混合物的系统操作有所不同。迄今为止,连续分离方法尚未被应用于包含选自莱鲍迪甙A、D、I、O、M和N中的至少两种甜菊糖苷的定制甜菊糖苷的离析中。

[0062] 连续色谱法的另一个重要区别在于利用将要被分离的材料持续存留,该材料驻留在多柱系统中并且在系统中不断循环。采用这种存留能够通过调整各个成分的存留量来有利地辅助分离,从而得到所需的组成。例如,如果进料混合物具有低含量的所需成分组(例如3% ~ 5%的莱鲍迪甙A、D、I、O、M和N)而以莱鲍迪甙A为主要部分(>20%),则最初可这样操作柱:在允许量较少的成分存留在柱中的同时,重点对主要成分进行洗脱。这会允许进料中量较少的成分比其它成分更好地溶解于柱的填充物中,这使得能够进行对富含所需(较少量)组分的物料流的洗脱。

[0063] 对各个柱进行独立操作的能力对于涉及两种或更多种分离系统进料(例如待处理的进料、洗脱剂A、洗脱剂B)和两种或更多种洗脱物流速各异的洗脱物(例如产物1、产物2、产物3等)的分离而言是至关重要的。柱的流量平衡按照下式计算:

$$[0064] \quad F_{\text{进(前柱)}} + F_{\text{进(进料)}} = F_{\text{出(产物)}} + F_{\text{出(至下一个柱)}}$$

[0065] 其中, $F_{\text{进(进料)}}$ 可以是待处理的进料或洗脱溶剂,而 $F_{\text{出(产物)}}$ 是洗脱产物。

[0066] 模拟移动床

[0067] 在制造中,模拟移动床(SMB)工艺是一种用于实施色谱分离的经过高度工程改造的工艺。其用于将一个化合物或一类化合物与一个或更多个其它化合物分离,以在比使用简单的(批料)色谱法更低的成本下,提供大量经过纯化或富集的材料。其无法提供任何不能通过简单的柱纯化进行的分离或纯化。该方法相当复杂。该方法带给色谱法纯化的一个益处在于其允许在低得多的成本下大量生产高纯度的材料。成本的降低是由以下原因导致的:使用更少量的色谱法分离介质固定相、连续的高速产出以及减少的溶剂和能量需求。这种改善的经济表现是由阀-柱排布带来的,所述阀-柱排布用于无限延长固定相并允许本方法具有很高的溶质负载。

[0068] 在生产用色谱法的常规移动床技术中,进料和分析物回收是同时且连续进行的,但因为连续式移动床具有实际困难而提出了模拟移动床技术。在模拟移动床技术中,并非

使反应床移动,而是使进料口、溶剂或洗脱剂的入口和所需产物的出口以及不希望的产物的出口的位置随着固体颗粒的连续流动和液体沿着与固体颗粒相反方向的连续流动而不断移动,这使其给人以移动床的印象。

[0069] 连续色谱法分离的另一种形式是环状色谱法。在一篇已公开的综述中, Frank Hilbrig和Ruth Freitag(《连续环状色谱法》“Continuous annular chromatography”, Journal of Chromatography B, 790 (2003) 1~15) 报告道:“数十年前人们就已经知道连续环状色谱(CAC)的原理了。CAC是一种连续式的色谱法模式,其适用于分离多成分混合物和双成分混合物。在CAC中,流动相和固定相以交叉流的方式移动,这允许将典型的一维间歇式柱分离转化为连续的二维分离。除了线性梯度洗脱以外,现今,所有色谱法模式都被用于CAC中。”在更早的时候, Bart和共同作者们(《果糖、甘露醇和山梨醇的连续色谱法分离》“Continuous chromatographic separation of fructose, mannitol and sorbitol”)就将该方法用于单糖的分离,但是该方法尚未被用于分离甜菊糖苷。

[0070] 附图简要说明

[0071] 图1显示了甜菊糖苷的苷元结构,其中标出了糖基化的位置(R1和R2)。

[0072] 图2显示了甜菊糖苷的体系。

[0073] 图3的图表显示了如何通过甜菊糖苷的分子大小来预测主观的味道品质和甜味。

[0074] 图4显示了所感兴趣的甜菊糖苷的质谱图。

[0075] 图5显示了所感兴趣的甜菊糖苷的质谱图。

[0076] 图6显示了根据本发明可使用的提取和纯化步骤。

[0077] 图7显示了根据本发明的模拟移动床色谱法的使用。

[0078] 参考下文的附图、详述和实施例能够更全面地理解本发明。

[0079] 发明详述

[0080] 申请人相信,本领域的技术人员可以根据本说明书的描述,利用本发明至其全部的范围。以下的具体实施方式应理解为仅仅是示例,并不在任何方面限定余下的公开内容。

[0081] 除非另有限定,在此使用的所有技术和科学术语的含义均与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相一致。同时,本文提到的所有出版物、专利申请、专利或其它参考文献均通过引用而被纳入本申请。如本文所用,所有的百分比除有特殊说明之外都指重量百分比。此外,本文中提及的所有范围指包括两个端点间的值的任意组合。

[0082] 定义

[0083] 术语“风味香调”是指经由鼻子吸入后(鼻后嗅觉),经验丰富者的味觉或嗅觉通常所感知到的微妙的感官体验。

[0084] 术语“斯替维醇”是指二萜类化合物:羟基-内贝壳杉-16-烯-13-醇-19羧酸,其是以术语“内贝壳杉烯酸”表示的化合物内贝壳杉-16-烯-19羧酸的羟基化形式。

[0085] 术语“甜菊糖苷”是指包括但不限于甜菊苷、莱鲍迪甙A、莱鲍迪甙B、莱鲍迪甙C、莱鲍迪甙D、莱鲍迪甙E、莱鲍迪甙F、莱鲍迪甙I、莱鲍迪甙M、莱鲍迪甙N、莱鲍迪甙O、杜克甙、甜茶苷、甜菊单苷、甜菊双苷和19-O- β -吡喃葡萄糖基-斯替维醇的斯替维醇苷元的任何糖苷。

[0086] 合成甜味剂的例子包括三氯蔗糖、乙酰磺胺酸钾、阿司巴甜、阿力甜、糖精、新橙皮苷二氢查尔酮合成衍生物、甜蜜素、纽甜、甘素、 β -4-硝基苯胺天门冬氨酸钠(suosan)、N-[N-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)丙基]-L- α -天门冬氨酰]-L-苯基丙氨酸1-甲酯(糖精)、N-

[N-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-3-甲基丁基]-L- α -天门冬氨酸]-L-苯基丙氨酸1-甲酯、N-[N-[3-(3-甲氧基-4-羟苯基)丙基]-L- α -天门冬氨酸]-L-苯丙氨酸1-甲酯、以及它们的盐等。

[0087] 天然的高甜度甜味剂的例子包括甜菊苷、莱鲍迪甙A、莱鲍迪甙B、莱鲍迪甙C、莱鲍迪甙E、莱鲍迪甙F、甜菊双苷、杜克甙A、甜茶苷、一些罗汉果甙(例如罗汉果甙V)、甜蛋白、新橙皮苷二氢查尔酮(NHDC)、甘草酸及其盐、奇异果甜蛋白、紫苏糖、皮尔南甘素(pernandulcin)、无患子倍半萜甙、白元参甙、糙苏甙-I、二甲基-六氢茛-二羧酸、相思子三萜甙、巴西甘草甜素、肉质雪胆皂苷、青钱柳甙、蝶卡苷(pterocaryoside)、聚波朵苷A、巴西木素、赫尔南甘素、叶甜素、菝葜苷、根皮甙、三叶苷、黄烷酮醇、3-乙酸二氢槲皮素、新落新妇苷、顺式肉桂醛、莫那甜及其盐、修蕨精A(selligueain A)、苏木精、应乐果甜蛋白、欧亚水龙骨甜素、蝶卡苷A、蝶卡苷B、马槟榔甜蛋白、潘塔亨、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、新库灵(neoculin)、绿原酸、洋蓟酸、赛门苷以及其它物质。

[0088] 合适的“具有热稳定性和高甜度的甜味剂”包括化合物或化合物的混合物,按照英国专利号1543167中所描述测试方法进行测量,它们的甜味比蔗糖至少甜五倍,该文献通过引入纳入本文。通常,这些甜味剂于大约40℃下加热大约1小时后基本上不含降解产物。这些合适的甜味剂的例子包括但不限于三氯蔗糖、纽甜、糖精、安赛蜜-K、甜蜜素、新橙皮甙DC、甜菊糖苷、索马甜、甜蛋白、阿斯巴甜以及它们的混合物。

[0089] 甜菊是一种来源于甜菊植物的无热量的天然甜味剂。这种植物能够形成许多被统称为甜菊糖苷的甜味化合物,使得甜菊糖苷比蔗糖甜不超过300倍。这些糖苷可利用水和本领域技术人员所熟知的其它溶剂从植物中提取。它们对热稳定,pH稳定,不会发酵并且不会引起血糖反应。

[0090] 甜菊苷(有时被称为13-[(2-O- β -D-吡喃葡萄糖基)- α -D-吡喃葡萄糖基)氧基]-贝壳杉-16-烯-18羧酸 β -D-吡喃葡萄糖基酯)和莱鲍迪甙A是从甜菊(也被称为泽兰属甜叶菊(*Eupatorium rebaudianum*))叶中提取和精制的二萜衍生斯替维醇的示例性糖苷。这些糖苷是高甜度的甜味剂,其甜度是蔗糖的大约100倍~大约500倍,但具有一丝金属味和苦味。它们可被广泛用于低热量或热量减少型食品和饮料中。

[0091] 还可从甜菊中提取出其它甜味糖苷。它们具有各种甜度。如本文所用,“甜菊提取物”是指提取自甜菊植物的甜味糖苷。

[0092] 在甜菊提取物中发现的糖苷中,莱鲍迪甙A通常被认为具有最少的回味。这种被许多人描述为苦味和类似甘草味的回味存在于目前所有的甜菊增甜产品中。这种配方通常需要大量稀释或遮味技术。

[0093] 类似于所有含有高甜度甜味剂的甜味剂组合物,通常向含有甜菊的甜味剂组合物提供膨胀剂以帮助测量和配送,以供用户应用。那些已公开或使用的膨胀剂包括低聚果糖(FOS)及其它纤维、麦芽糖糊精和赤藓糖醇。赤藓糖醇尤其受欢迎,因为其能够减轻一些苦味。

[0094] Catani等在美国专利申请号20120201952和20120201940中公开了一种天然甜味组合物的制造方法,其包括对包含至少一种基于植物的天然高甜度甜味化合物的粗混合物进行汽提,以及对粗混合物进行过滤。

[0095] Catani等在美国申请系列号20100285201中公开了一种协同增效甜味剂组合物,

其包含三氯蔗糖和经过纯化的甜菊提取物,其中,经过纯化的甜菊提取物包含莱鲍迪甙和杜克甙。

[0096] Catani等在美国专利申请号20090017185中公开了一种热量减少的甜味剂组合物,其由甜菊提取物和单糖组成。该文献公开了相对于所有的甜菊糖苷,甜菊提取物可具有大约80重量%~大约99.5重量%的莱鲍迪甙A,且单糖可以是蔗糖、果糖或葡萄糖。

[0097] Catani在美国专利申请号20090004355中公开了一种包含赤藓糖醇和甜菊提取物的甜味剂组合物。

[0098] 本发明提供一种对两种或更多种来源于甜菊植物提取物的甜味糖苷进行分离、离析和表征的方法,所述甜菊植物提取物具有大约966g/摩尔~大约1436g/摩尔范围内的分子量,且具有少于甜菊糖苷的25%的莱鲍迪甙A,更优选具有少于甜菊糖苷的15%的莱鲍迪甙A,更优选具有少于甜菊糖苷的10%的莱鲍迪甙A,更优选具有少于甜菊糖苷的5%的莱鲍迪甙A。

[0099] 本发明的益处将通过在下文中给出的详细描述而变得更加显而易见。然而,应当理解的是,以下详述和具体实施例以及本发明优选实施方式仅仅是用于举例说明,本领域技术人员通过阅读所述详述,可以显而易见地得知本发明精神和范围之内的各种变化和改良。

[0100] 在存在于甜菊中的甜味糖苷中,只有甜菊苷、莱鲍迪甙A和莱鲍迪甙C能够在适中的成本下获得<80%的纯度而在高成本下获得>80%的纯度。商业产品的最高纯度通常超过97%。在下文中,术语“高纯度”是指包含基于干重至少大约90%~大约100%的甜菊糖苷的甜菊糖苷组合物。在市场上没有商业量的高纯度莱鲍迪甙B或莱鲍迪甙D这两种在甜味品质和甜度上与莱鲍迪甙A相当的甜菊成分。莱鲍迪甙E和F(也是味道好的甜味剂)能够以分析纯少量购得。分子质量相当于或大于莱鲍迪甙D的天然产生的甜菊糖苷还没有被用于商业用途。本发明致力于定义这种分子质量大的成分的组合物,以及得到这种组合物的低成本方法,通过将它们全部用作甜味剂来弥补这些成分在甜菊中的低浓度。

[0101] 需要一种对两种或更多种来源于分子量大于大约900g/摩尔的甜菊提取物的甜味糖苷进行分离、离析和/或表征的高效且经济的方法。为商业用途而开发的单一甜菊糖苷在味道品质和甜味经时变化上存在局限。Grant E. DuBois和Indra Prakash在(Annu. Rev. Food Sci. Technol. (2012), 3: 353~380)《无热量甜味剂、甜味调节剂和甜味剂增强剂》“Non-Caloric Sweeteners, Sweetness Modulators, and Sweetener Enhancer”)中对离析出的天然形成的和人造的甜味剂的特征和局限进行了描述。本发明避开对单一甜味成分进行离析的思路,着眼于对两种或更多种来源于甜菊的分子的组合进行分离、离析和/或表征。

实施例

[0102] 已知的甜菊糖苷可基于糖(糖苷)取代的方式来整理。这允许对其它缺失或尚未识别的可能存在的甜菊糖苷进行预测,尽管这些物质以很低的量存在于各种制备中。甜菊糖苷的体系示于图2。

[0103] 发现甜菊糖苷的甜味品质和甜度与甜菊苷元上糖基化的程度有关。接下来的图3显示了如何通过分子大小来预测主观的味道品质和甜味,尽管存在例外,例如莱鲍迪甙B。

该化合物可作为在定义甜味品质和甜度的过程中,R2处具有特定糖苷结构(甚至在R1处未进行糖基化的场合下)的重要性的例子。

[0104] 甜味品质和甜度还受到葡萄糖以外的单糖的存在的影响。因此,相比于只被葡萄糖单糖取代的甜菊糖苷(例如甜菊苷或莱鲍迪甙A),分子中(例如在杜克甙A或莱鲍迪甙C中)存在相同数量的鼠李糖(Rh)会导致甜度和品质降低。

[0105] 表1.与甜味相关的甜菊糖苷的糖基化方式。

甜菊糖苷	R1	R2	#葡萄糖 (G)	#鼠李糖 (Rh)	分子量	甜度	甜味品质
斯替维醇					318		
甜菊单苷		G-	1		480	40	-3
甜菊双苷		G-2G-	2		642	40	-3
甜茶苷	G-	G-	2		642	115	-2
[0106] 杜克甙-A	G-	Rh2-G-	2	1	788	70	-2
甜菊苷	G-	G2-G-	3		804	145	0
莱鲍迪甙 B		G2-(G3)-G-	3		804	300	3
莱鲍迪甙-C	G-	Rh2-(G3)-G-	3	1	950	200	-1
莱鲍迪甙-E	G2-G-	G2-G-	4		966	200	1
莱鲍迪甙-A	G-	G3-(G2)-G-	4		966	250	2
莱鲍迪甙-D	G2-G-	G2-(G3)G-	5		1128	300	3

[0107] 注:甜味品质和甜度数据摘自Osamu Tanaka的《天然甜味剂味道的改善》(Pure& Appl.Chem.1997,69(4),675~683)。应当理解的是,甜度是相对于相等重量的蔗糖而言的。甜味品质是主观的相对排名。

[0108] 甜菊糖苷之间的差异不仅在于分子结构,还在于它们的味道性质。发现甜菊苷通常比蔗糖甜大约110~大约270倍,莱鲍迪甙A比蔗糖甜大约150~大约320倍,而莱鲍迪甙C比蔗糖甜大约40~大约60倍。杜克甙A比蔗糖甜大约30倍。已知甜度会随着载体介质的温度和粘度发生某些改变。

[0109] 尽管一些甜菊糖苷是已知的,但尚未对其甜味品质和甜度进行评价。而且,尽管使用了许多方法来离析和开发作为甜味剂的单一甜菊糖苷,但现有的知识无法对甜菊糖苷混合物、尤其是除了天然形成的以外的部分的甜味特征进行预测,或者当与无论是有热量还是无热量的具有高甜度的其它甜味剂或与相当于例如葡萄糖、果糖或蔗糖的单糖和二糖的其它甜味剂组合时对其味道特征进行预测。

[0110] 解析方法

[0111] 甜菊糖苷的常规解析方法需要两个溶剂梯度以将甜菊糖苷与其它无甜味的植物提取成分分离。所以,利用洗脱剂中折射率的变化检测器无法使用。通常,使用紫外线(UV)检测器来检测含有弱UV发色团的甜菊糖苷。该方法在检测粗提取物时具有局限,因为具有更强发色团的成分的存在会阻碍对感兴趣的组分的检测,这是因为在所选择的波长下具有较高的摩尔消光系数的成分会比具有较低消光系数的成分(尽管它们基于质量的浓度更高)显示得更加明显,这会产生弱得多的信号。基于质量的检测中的折射率的其它替代方法包括蒸发光散射(ELS)和带电气溶胶检测。THERMO Scientific(《利用具备UV和ELS检测器的HPLC对甜菊糖苷进行测定》“Determination of Steviol Glycosides by HPLC with UV and ELS Detections”,Application Note 241(2012))指出了ELS在测量桌面甜味剂配方中的莱鲍迪甙A和甜菊苷的含量方面是如何优于UV检测的。然而,根据我们的经验,ELS在存在另一种紧接着洗脱的主要成分的情况下对次要成分的浓度的测量时具有局限。

H.Y.Eom等(J.Chromatogr.A 1217 (2010) 4347 ~ 4354)指出利用CAD对衍生自银柴胡(伞形科植物)根的皂苷的检测比利用ELS的检测更加灵敏。我们发现使用带电气溶胶检测器(ESA®,Inc.,切姆斯福德,MA)能够允许对甜菊粗提取物中的甜菊糖苷进行良好的定量,该制备物富含蛋白质和其它具有强UV吸收的植物成分,且还存在大量多糖或其它甜菊糖苷,这些物质会使检测器“失明”,从而降低感兴趣的成分的水平。

[0112] 确定一种有效的检测器只是用于对粗制备物中感兴趣的成分进行有效定量的系统的一部分。该系统的另一部分是确定溶剂体系(流动相)和固体载体(固定相)以完成分离。成功开发出一套合适的流动相和固定相的组合是试错的经验过程,而并非可预测地通过演绎得到。我们利用各种梯度系统试验了流动相系统以发现一种能够用于分离感兴趣的甜菊糖苷的溶剂梯度,从而使其能够被质谱识别,并且能够通过CAD定量。一个例子如下所示。可对梯度进行调整,以允许在例如接近莱鲍迪甙D的特定峰区域附近具有更大的分辨率。

[0113] 用于解析的色谱法:

[0114] 固定相:Phenomenex Kinetex C-18,150×4.6,2.6μm;柱温:55℃;进样量为10μL。

[0115] 流动相(MPA和MPB;流速:0.35mL/分钟):

[0116] MPA:0.1%的溶于水中的甲酸

[0117] MPB:0.1%的溶于乙腈中的甲酸

[0118] 表2

[0119]

时间(分钟)	%A	%B
0	95	5
5	95	5
30	70	30
45	30	70
55	30	70
55.1	95	5
60	95	5

[0120] 表3

[0121]	参考识别	RT ¹ (分钟)	分子量
	莱鲍迪甙 D	35.920	1128
	莱鲍迪甙 A	39.544	966
	甜菊苷	39.704	804
	莱鲍迪甙 F	40.207	936
	莱鲍迪甙 C	40.468	950
	莱鲍迪甙 A	40.745	788
	甜茶苷	41.474	642
	莱鲍迪甙 B	42.027	804
	甜菊双苷	42.368	642
	斯替维醇	50.012	318
	异斯替维醇	52.427	318

¹RT—保留时间。

[0122] 再来参见图4。

[0123] 众所周知,可改变梯度以使分离加速(使用80%的MPA、20%的MPB时为0~2分钟;使用80%~0%的MPA、20%~100%的MPB时为2~35分钟;

[0124] 使用80%的MPA、20%的MPB时为35.01~40分钟,流速为0.35mL/分钟;进样量:5μL),以允许质谱对甜菊糖苷进行识别。图5中提供了一个例子。表4

[0125]	峰识别	RT (分钟)	分子量
	莱鲍迪甙 D	14.08	1128
	莱鲍迪甙 N	14.33	1274
	莱鲍迪甙 M	14.42	1290
	新型甜菊糖苷 (可能是莱鲍迪甙 O)	14.75	未检测
	莱鲍迪甙 I	15.97	1128
	莱鲍迪甙 A	16.29	966
	甜菊苷	16.43	804

[0126] 农业开发用解析方法的整合

[0127] 我们开发了一种基于甜菊糖苷含量的使对甜菊植物的特定育种的选择最优化的策略。历史上广为人知的是,天然甜菊主要含有甜菊苷作为主要的甜菊糖苷,但是选择性育种有利于发展出以莱鲍迪甙A作为主要成分的后代。我们已应用我们的新型解析来对育种进行鉴别,该育种还倾向于包含莱鲍迪甙D或其它分子量(Mol.Wt.)等于或大于莱鲍迪甙A(分子量为966g/摩尔)的所需甜菊糖苷,特别是莱鲍迪甙I、O、M、N,以及在后续新育种中可能发现的其它物质。

[0128] 在不结晶的条件下对所需的甜菊糖苷进行分离

[0129] 我们将从对甜菊糖苷的解析分离上获得的思路进一步发展成一种新的方法,其无需通过结晶来对单一成分(通常为莱鲍迪甙A)进行离析和纯化。我们还开发了一种溶剂体系,其使用食品级乙醇(酒精)和水来分离感兴趣的甜菊糖苷而无需进行结晶。

[0130] 实施例:

[0131] 用热水 (3L) 在 95℃ 下对 208.6g 的干燥叶子进行 2 小时的提取以制备粗提取物。在低于 40℃ 的温度下在真空中对该提取物进行浓缩, 并且利用离心来使其澄清, 将其倒出, 冷却, 并用冻干法进行干燥以得到 76.5g 的干燥粗提取物。在制备级的反相柱 (RediSep C18, 360g) 上使用如下所示的水-乙醇梯度将该粗提取物的一部分 (100g, 大约含有 1.7g 的固体) 直接分离。

[0132] 表5

时间 (分钟)	% 水	% 乙醇
0	100	0
10	100	0
38.2	0	100
44.1	0	100
44.1	50	50
50	50	50

[0134] 利用 25 ~ 30 分钟范围内的莱鲍迪甙 A 和 D 真实样品事先标注洗脱点, 并且在广泛覆盖该范围的有规律的间隔处采集分离物, 基于 HPLC 组分进行汇集和干燥。总共回收了 628mg 的甜菊糖苷。18mg 的该回收的试样中包含大约 23 % 的莱鲍迪甙 D、21 % 的莱鲍迪甙 N 和 M、1.4 % 的未表征的甜菊糖苷、2 % 的莱鲍迪甙 A 和大约 16 % 的其它已知的甜菊糖苷。固体具有灰白色至米黄色的外观, 且具有纯正的甜味。该产物适合用作甜味剂而无需进行进一步的加工或纯化。

[0135] 实施例:

[0136] 用热水 (3L) 在 95℃ 下对 208.6g 的干燥叶子进行 2 小时的提取以制备粗提取物。在低于 40℃ 的温度下在真空中对该提取物进行浓缩, 并且利用离心来使其澄清, 将其倒出, 冷却, 并用冻干法进行干燥以得到 76.5g 的干燥粗提取物。在制备级的反相柱 (RediSep C18, 360g) 上使用如下所示的水-乙醇梯度将该粗提取物的一部分 (100g, 大约含有 1.7g 的固体) 直接分离。

[0137] 表6

时间 (分钟)	% 水	% 乙醇
0	100	0
10	100	0
38.2	0	100
44.1	0	100
44.1	50	50
50	50	50

[0139] 表7

	时间 (分钟)	质量 (mg)	组成(利用 HPLC/CAD)	试样外观	味道(通过 2 组独立的评价)
[0140]	22.8~23.6	78	无甜菊糖苷成分	浅米黄色固体	苦味 (不甜)
	23.6~25	18	主要为莱鲍迪甙 D、N、M	中等棕色固体	纯正的甜味
	26~31.5	610	莱鲍迪甙 A 和更小的甜菊糖苷	浅黄色固体	“经典”的莱鲍迪甙 A 的味道, 即带苦味的甜味

[0141] 利用大约25~30分钟范围内的莱鲍迪甙A和D真实样品事先标注洗脱点,并且在广泛覆盖该范围的有规律的间隔处采集分离物,基于HPLC组分进行汇集和干燥。总共回收了628mg的甜菊糖苷。18mg的该回收的试样中包含大约23%的莱鲍迪甙D、21%的莱鲍迪甙N和M、1.4%的未表征的甜菊糖苷、2%的莱鲍迪甙A和大约16%的少量若干种其它已知的甜菊糖苷。固体具有灰白色至浅棕色的外观,且具有纯正的甜味。该产物适合用作甜味剂而无需进行进一步的加工或纯化。

[0142] 根据本发明得到的甜菊糖苷可作为高甜度天然甜味剂结合入食物、饮料、药物组合物、化妆品、口香糖、桌面产品、谷类、乳制品、牙膏和其它口腔组合物等中。上文所示的实施例展示了可使用的有代表性的部分。

[0143] 另外,甜菊糖苷不仅可用作饮料、食品和其它专供人消费的产品的甜味剂,还可用于特性改善的动物饲料中。

[0144] 在食品、饮料、药物、化妆品、桌面产品、口香糖的制造过程中,可使用例如混合、捏合、溶解、酸洗、渗透、穿流、喷洒、雾化、灌输的常规方法和其它方法。

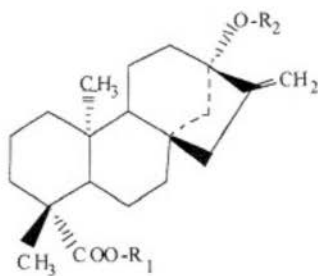
[0145] 本发明中所得到的甜味剂可以干燥或液体形式使用。其可在对食品进行热处理之前或之后加入。甜味剂的量取决于使用目的。其可单独添加或与其它化合物组合添加。

[0146] 表8-显示了存在于伯托尼甜菊叶中的甜菊苷和甜菊糖苷的化学结构。

美国专利

2012年10月30日 第1页, 共11页

US 8,299,224 B2

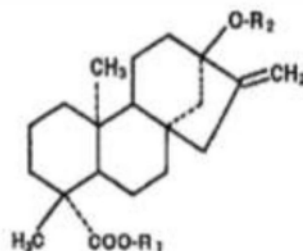


[0147]

化合物名称	R ₁ (C-19)	R ₂ (C-13)
1. 斯替维醇	H	H
2. 甜菊单苷	H	β -Glc
3. 甜茶苷	β -Glc	β -Glc
4. 甜菊双苷	H	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1)
5. 甜菊苷	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1)
6. 莱鲍迪甙A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1) β -Glc(3 \Rightarrow 1)
7. 莱鲍迪甙B	H	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1) β -Glc(3 \Rightarrow 1)
8. 莱鲍迪甙C (杜克甙B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \Rightarrow 1) β -Glc(3 \Rightarrow 1)
9. 莱鲍迪甙D	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1) β -Glc(3 \Rightarrow 1)
10. 莱鲍迪甙E	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \Rightarrow 1)
11. 莱鲍迪甙F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \Rightarrow 1) β -Glc(3 \Rightarrow 1)
12. 杜克甙A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \Rightarrow 1)

[0148] 表9

[0149] 提出的结构以及它们来源于森田甜菊叶和伯托尼甜菊叶的甜菊糖苷的相对百分比。



[0150]

甜菊糖苷	R ₁	R ₂	森田 (%) ¹	伯托尼 (%) ¹
SG1 (甜菊单苷)	H-	Glcβ1-	1.7	1.7
SG2 (甜菊双苷)	H-	Glcβ1-2Glcβ1-	1.0	5.0
SG3 (甜茶苷)	Glcβ1-	Glcβ1-	0.8	ND ³
SG4 (杜克甙 B) ⁴	H-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.6	0.8
SG5 (杜克甙 A)	Glcβ1-	Rhaα1-2Glcβ1-	0.3	2.6
SG6 (莱鲍迪甙 B)	H-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	2.5	2.0
SG7 (莱鲍迪甙 G) ⁴	Glcβ1-	Glcβ1-3Glcβ1-	1.1	0.8
SG8 (甜菊苷)	Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-	9.2	49.8
SG9 (莱鲍迪甙 C)	Glcβ1-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	7.5	6.8
SG10 (莱鲍迪甙 F)	Glcβ1-	Xylβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1.9	1.4
SG11 (莱鲍迪甙 A)	Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	61.6	21.5
SG12 (莱鲍迪甙 I) ⁴	Glcβ1-3Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.1	ND ³
SG13 (莱鲍迪甙 E)	Glcβ1-2Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-	0.3	0.9
SG14 (莱鲍迪甙 H) ⁴	Glcβ1-	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.5	ND ³
SG15 (莱鲍迪甙 L) ⁴	Glcβ1-	Glcβ1-6Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.3	ND ³
SG16-I (莱鲍迪甙 K) ⁴	Glcβ1-2Glcβ1-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.3	ND ³
SG16-II (莱鲍迪甙 J) ⁴	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.5	0.1
SG17 (莱鲍迪甙 M) ⁴	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1.0	ND ³
SG18 (莱鲍迪甙 D)	Glcβ1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	2.1	0.4
SG19 (莱鲍迪甙 N) ⁴	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1.4	<0.1
SG20 (莱鲍迪甙 O) ⁴	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	0.6	ND ³

[0151] *摘自Ohta等(2010)。¹相对量以总峰面积的百分比表示,总峰面积是利用Amide-SO/HPLC、基于它们在210nm处的UV吸收测得的。SG16-I与SG16-II的比例分别通过产物离子在m/z 787和803处的相对强度得到,相对强度通过作为前体离子[M-H]⁻在m/z 1111处的ESI-MS/MS解析中60V的CID电压得到。²这些结构是基于HPLC的流动和ESI-MS和MS/MS解析的结果提出的。³未检测。⁴名字在该研究中提出。

在标出的位置 (R1和R2) 糖基化的甜菊糖苷元结构

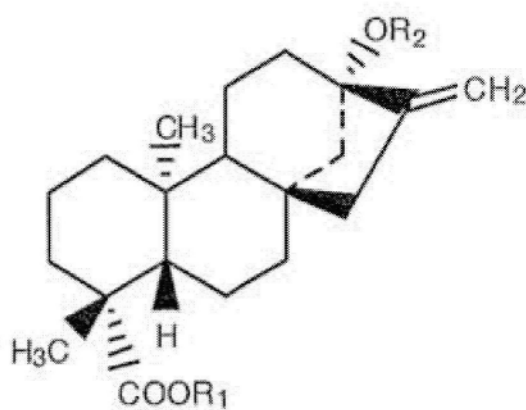


图1

甜菊糖苷分子量与甜度和甜味品质的相关性。

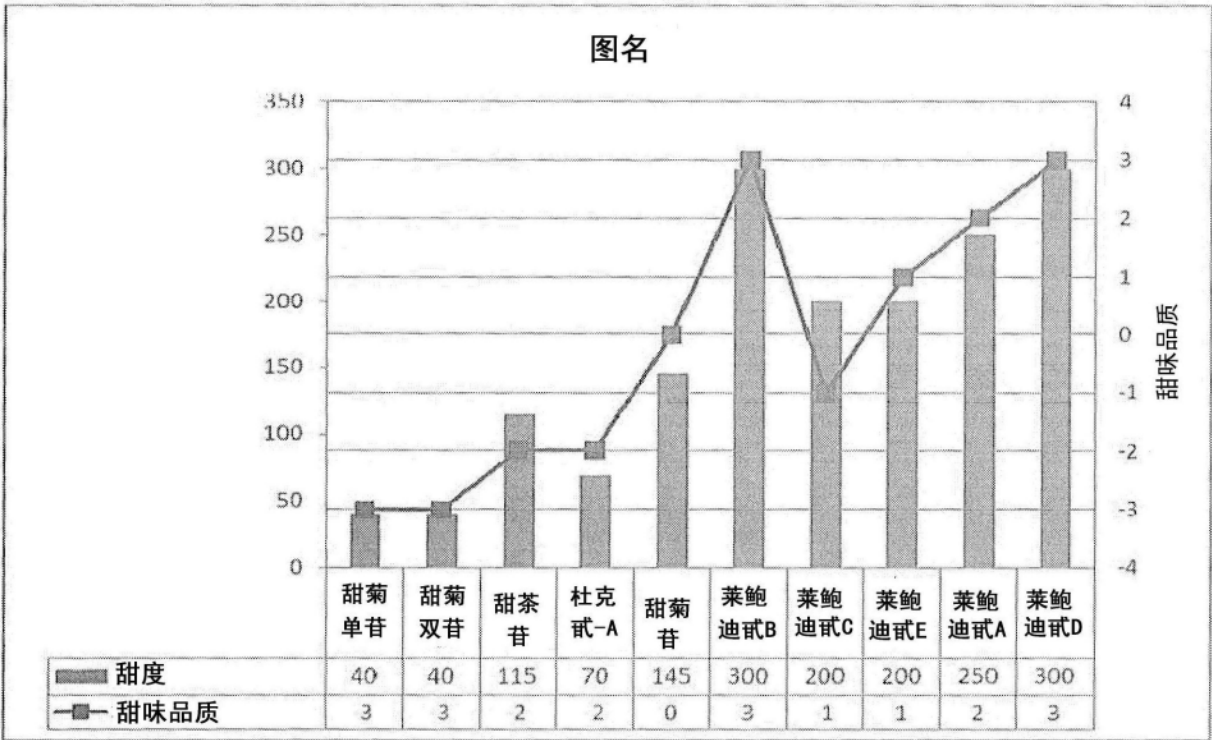


图3

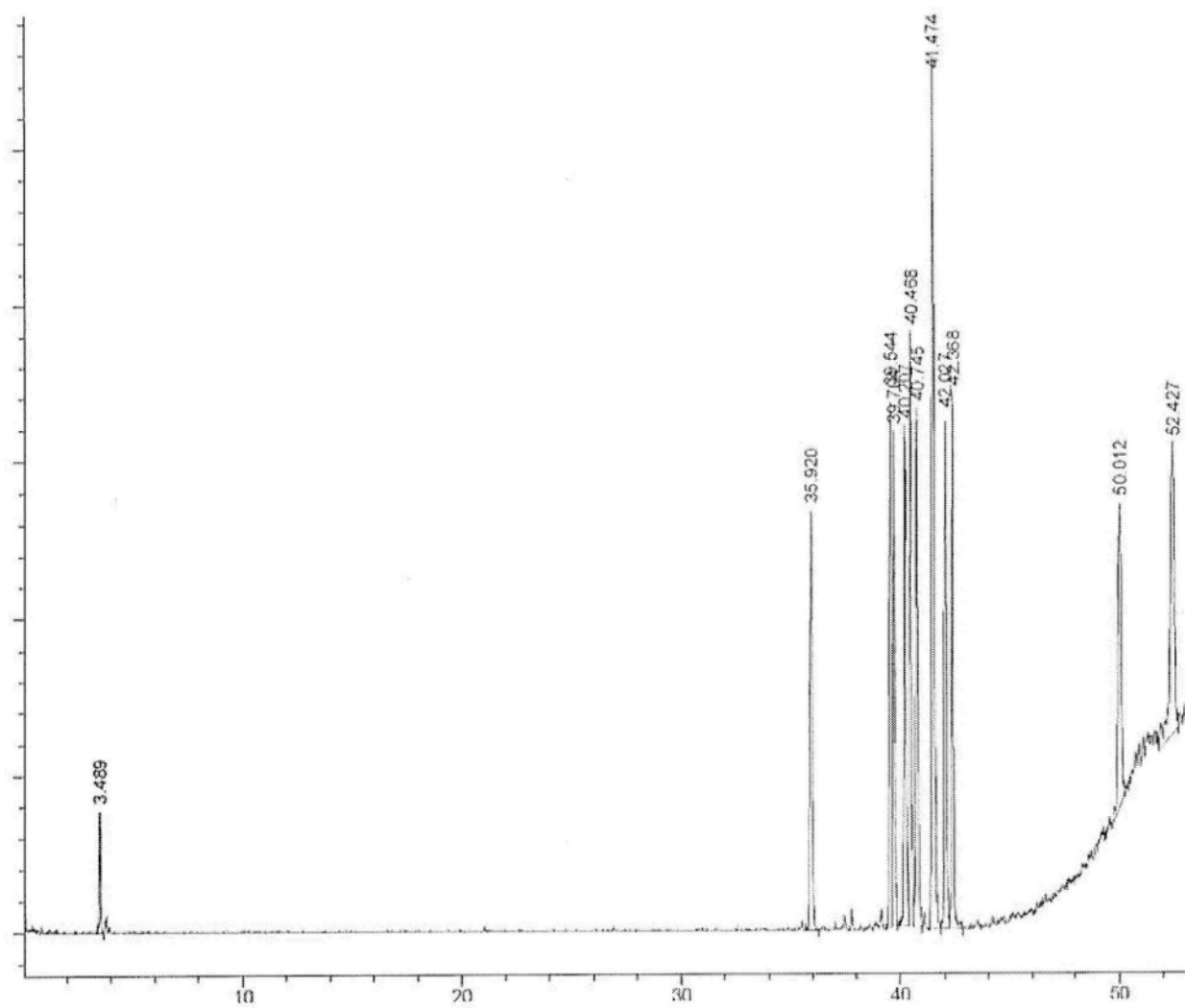


图4

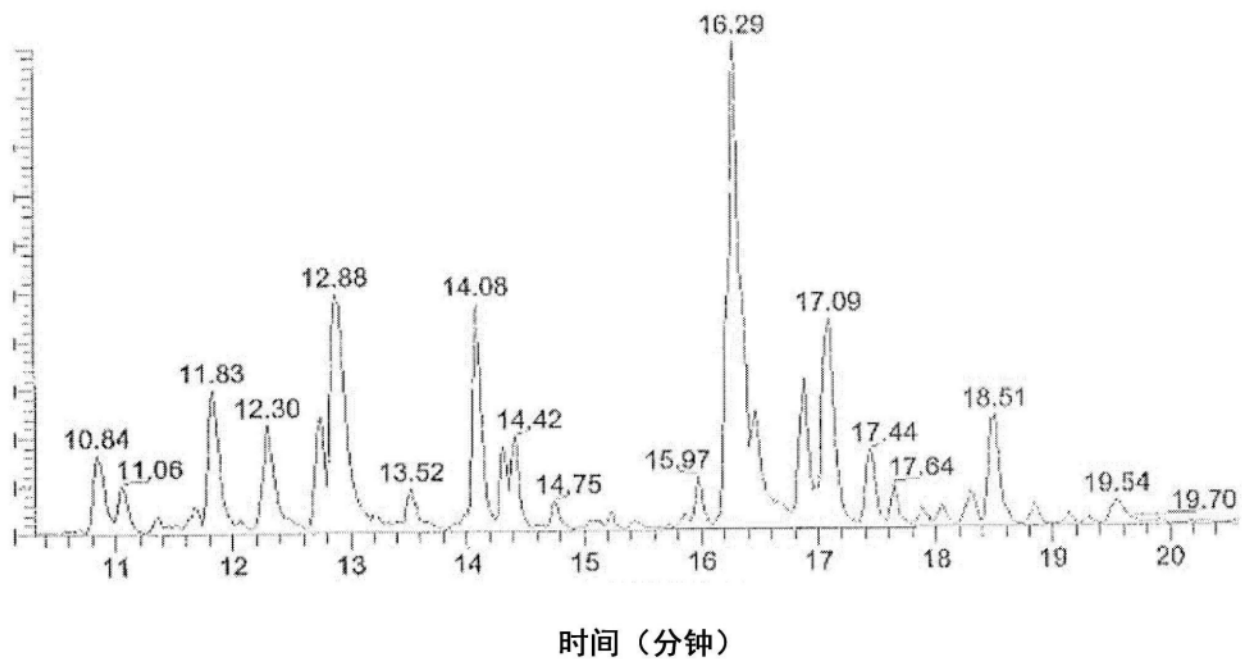


图5

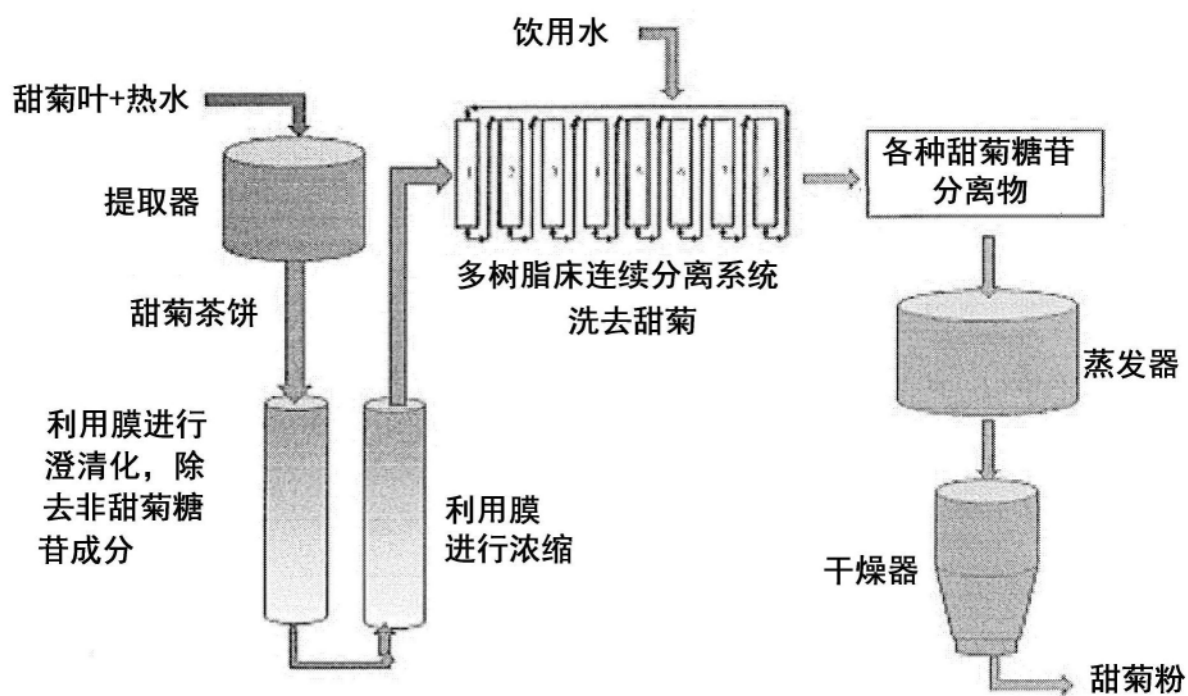


图6

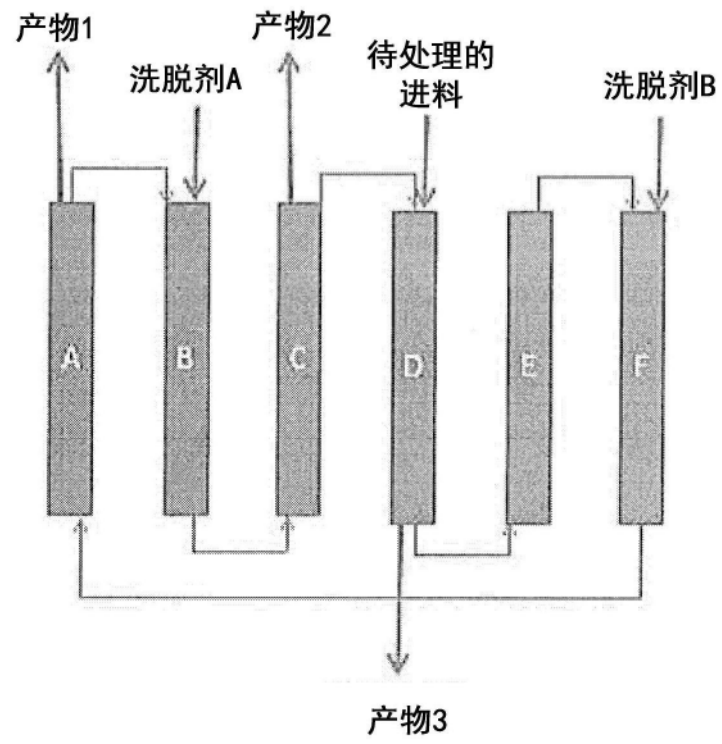


图7