(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110719738 B
(45)授权公告日 2023.06.09

(21)申请号 201880036461.0
(22)申请日 2018.05.31
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110719738 A
(43)申请公布日 2020.01.21
(30)优先权数据
62/514,482 2017.06.02 US
62/549,242 2017.08.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/064324 2018.05.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/220103 EN 2018.12.06

(73)专利权人 奇华顿股份有限公司
地址 瑞士韦尔涅
(72)发明人 施锋 J·奥吉利 U·科尔斯
袁玮
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 王贵杰

(51)Int.Cl.
A23L 27/30(2006.01)
A23L 27/00(2006.01)
C07J 17/00(2006.01)
审查员 樊海涛

权利要求书2页 说明书46页 附图9页

(54)发明名称

组合物

(57)摘要

包含至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂的甜度改良组合物,和包含该甜度改良组合物和至少一种其它甜味剂的增甜的组合物;所述增甜的组合物和甜度改良组合物的用途;制备所述增甜的组合物和甜度改良组合物的方法,其中所述高强度甜味剂选自斯替维醇糖苷和/或罗汉果苷,所述低效力甜味剂选自纤维二糖、阿洛酮糖、环己基氨基磺酸盐和/或11-O-罗汉果苷V。

CN 110719738 B

1.甜度改良组合物,包含:

一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂,其选自罗汉果苷III、罗汉果苷IIIx、罗汉果苷IV、赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷V及其混合物;和

低效力甜味剂,其选择为11-O-罗汉果苷V;

其中所述一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂和低效力甜味剂是从天然来源分离的,或是化学合成的或是通过生物技术方法生产的;

其中与在甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的相应甜度特征相比,该甜度改良组合物改善增甜的组合物的一种或多种甜度特征;

其中该甜度改良组合物将增甜的组合物的甜度增加至超过单独的甜度改良组合物的甜度;

其中所述一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂与所述低效力甜味剂的比值在2:1至12:1的范围,并且其中该甜度改良组合物以具有小于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度或低于甜度识别阈值的量在增甜的组合物中使用;并且

其中所述增甜的组合物包含至少一种甜味剂,其以具有等于或大于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在。

2.权利要求1的甜度改良组合物,其中该甜度改良组合物将增甜的组合物的甜度增加等于或大于1.25%蔗糖当量值。

3.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中所述高强度罗汉果苷甜味剂与所述低效力甜味剂的比值在5:1至12:1或6:1至10:1的范围。

4.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中所述一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂选自罗汉果苷III、罗汉果苷IIIx、罗汉果苷IV、赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷V。

5.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中所述高强度罗汉果苷甜味剂和所述低效力甜味剂之一或两者为天然的。

6.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中与在甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的逗留不去的甜味相比,该甜度改良组合物减弱增甜的组合物的逗留不去的甜味。

7.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中与在甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的相应苦味和/或涩味相比,该甜度改良组合物减弱增甜的组合物的苦味和/或涩味。

8.权利要求1或2的甜度改良组合物,其中该甜度改良组合物以具有小于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的量在增甜的组合物中使用。

9.增甜的组合物,包含:

至少一种甜味剂,其以具有等于或大于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在;和

权利要求1-8任一项的甜度改良组合物。

10.权利要求9的增甜的组合物,其中该甜度改良组合物以具有小于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在于组合物中。

11.权利要求9或10的增甜的组合物,其中所述甜度改良组合物的一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂存在于增甜的组合物中,其总量等于或大于15ppm且任选地等于或小于50ppm。

12.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述甜度改良组合物的一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量在15ppm至30ppm的范围。

13.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述甜度改良组合物的所述低效力甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量等于或大于2ppm且任选地等于或小于12ppm。

14.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述甜度改良组合物的所述低效力甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量在2ppm至10ppm的范围。

15.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述至少一种甜味剂为营养性甜味剂或非营养性甜味剂。

16.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述至少一种甜味剂选自蔗糖、高果糖玉米糖浆、丁磺氨钾、天冬甜素、斯替维醇糖苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷G、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷N、莱鲍迪苷O、杜克苷A、杜克苷B、覆盆子苷和柚苷二氢查耳酮，和三氯蔗糖。

17.权利要求16的增甜的组合物，其中所述斯替维醇糖苷为甜菊苷。

18.权利要求9或10的增甜的组合物，其中与甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的相应一种或多种甜度特征相比，增甜的组合物的一种或多种甜度特征得到改善。

19.权利要求9或10的增甜的组合物，其中增甜的组合物的逗留不去的甜味低于甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的逗留不去的甜味。

20.权利要求9或10的增甜的组合物，其中增甜的组合物的苦味和/或涩味低于甜度改良组合物中不存在所述低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的苦味和/或涩味。

21.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述增甜的组合物为湿/液体汤、脱水和烹饪食品、膳食溶液产品、配餐产品或乳制品。

22.权利要求9或10的增甜的组合物，其中所述增甜的组合物为饮料、牛奶、干酪或酸奶。

23.11-O-罗汉果苷V作为低效力甜味剂并改善增甜的组合物的一种或多种甜度特征的用途，所述增甜的组合物包含一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂，该高强度罗汉果苷甜味剂选自罗汉果苷III、罗汉果苷IIIx、罗汉果苷IV、赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷V及其混合物，其中所述低效力甜味剂和所述高强度罗汉果苷甜味剂的总量具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，并且其中所述一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂和低效力甜味剂是从天然来源分离的，或是化学合成的或是通过生物技术方法生产的。

24.权利要求23的用途，其中所述一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量在15ppm至30ppm的范围。

25.权利要求23或24的用途，其中所述低效力甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量等于或大于2ppm且任选地等于或小于12ppm。

26.权利要求23或24的用途，其中所述低效力甜味剂存在于增甜的组合物中，其总量在2ppm至10ppm的范围。

27.权利要求23或24的用途，其中所述低效力甜味剂和一种或多种高强度罗汉果苷甜味剂将增甜的组合物的甜度增加超过1.25％(w/v)蔗糖当量值。

组合物

技术领域

[0001] 本发明一般涉及一种或多种低效力甜味剂在改善一种或多种高强度甜味剂的一种或多种甜度特征中的用途。因此，本发明还涉及包含至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂的混合物的组合物。本发明进一步涉及至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂的组合与至少一种其它甜味剂组合使用时作为甜度改良剂的用途，和/或作为甜味剂的用途。本发明进一步涉及一种或多种罗汉果苷作为甜度增强剂在增甜的组合物中的用途和所述增甜的组合物。本发明进一步涉及制备本文公开的甜味剂和组合物的方法。

[0002] 背景

[0003] 可食用产品中的甜味通常是期望的特性，可食用产品是指预期通过口腔永久性摄入或暂时吐出而摄取的产品。传统上，通过添加一种或多种甜味剂，特别是低效力、营养性甜味剂例如蔗糖(食糖)，果糖，葡萄糖，木糖，阿拉伯糖，鼠李糖，糖醇例如赤藓糖醇，木糖醇，甘露糖醇，山梨醇和肌醇以及糖浆例如高果糖玉米糖浆和淀粉糖浆来提供甜味。这些递送相当大的甜味，而没有任何不期望的余味。然而，期望使用减少量的这些甜味剂以降低可食用产品的热值。因此，期望提供替代的甜味剂，其可以降低可食用产品的热值，同时维持相同或相似的甜味。

[0004] 高强度甜味剂(HIS)已用于此目的。高强度甜味剂可以是天然的，也可以是人造的，并且具有可以是蔗糖的数百倍的甜度，因此理论上可以替代组合物中大量的糖。高强度甜味剂的实例包括三氯蔗糖，糖精，天冬甜素，丁磺氨钾(AceK)，纽甜，爱德万甜(Advantame)，斯替维醇糖苷，包括甜菊苷(stevioside)、莱鲍迪苷(rebaudioside)A、莱鲍迪苷D或斯替维醇糖苷混合物制品，其中以莱鲍迪苷A和/或甜菊苷为主要组分。但是，这些物质通常具有以下缺点：它们会给可食用产品带来不期望的异味，典型地为苦味、金属味或甘草味，或不期望的逗留不去的甜味。

[0005] 因此，期望提供替代的和/或改进的甜度改良组合物和增甜的组合物以解决这些问题中的一个或多个。

[0006] 概述

[0007] 根据本发明的第一个方面，提供了一种甜度改良组合物，其包含：

[0008] 一种或多种选自斯替维醇(steviol)糖苷和/或罗汉果苷的高强度甜味剂；和

[0009] 一种或多种选自纤维二糖、阿洛酮糖(psicose)、环己基氨基磺酸盐(cyclamate)和/或11-O-罗汉果苷V的低强度甜味剂；

[0010] 其中所述甜度改良组合物将增甜的组合物的甜度增加超过单独的甜度改良组合物的甜度；和/或

[0011] 其中所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值在约2:1至约12:1的范围。

[0012] 根据本发明的第二个方面，提供了增甜的组合物，其包含：

[0013] 至少一种甜味剂，其以具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在；和

[0014] 根据本发明任意方面或实施方案的甜度改良组合物。

[0015] 根据本发明的第三个方面，提供了选自纤维二糖、阿洛酮糖、环己基氨基磺酸盐和/或11-O-罗汉果苷V的一种或多种低效力甜味剂在改善增甜的组合物的一种或多种甜度特征中的用途，所述增甜的组合物包含选自斯替维醇糖苷和/或罗汉果苷的一种或多种高强度甜味剂，其中所使用的一种或多种低效力甜味剂和一种或多种高效力甜味剂的总浓度具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0016] 根据本发明的第四个方面，提供了用于增强增甜的组合物的甜度的方法，该方法包括提供包含至少一种甜味剂的基础组合物并且添加选自斯替维醇糖苷和/或罗汉果苷的一种或多种高强度甜味剂和选自纤维二糖、阿洛酮糖、环己基氨基磺酸盐和/或11-O-罗汉果苷V的一种或多种低效力甜味剂，所述至少一种甜味剂的存在量等于或高于其甜度识别阈值和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，其中所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值在约2:1至约12:1的范围；和/或其中添加一种或多种高强度甜味剂，其总量等于或大于约15ppm且任选地等于或小于约50ppm，和其中添加一种或多种低效力甜味剂，其总量等于或大于约2ppm且任选地等于或小于约12ppm；和/或其中所添加的一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的总浓度具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0017] 根据本发明的第五个方面，提供了一种制备根据本发明的任意方面或实施方案的甜度改良组合物的方法，该方法包括合并一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂。

[0018] 根据本发明的第六个方面，提供了一种制备根据本发明的任意方面或实施方案的增甜的组合物的方法，该方法包括合并基础组合物、一种或多种高强度甜味剂、一种或多种低强度甜味剂和至少一种其它甜味剂。

[0019] 根据本发明的第七个方面，提供了一种增甜的组合物，其包含至少一种甜味剂和一种或多种甜度增强剂，所述至少一种甜味剂的存在量具有等于或大于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，所述一种或多种甜度增强剂选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷。

[0020] 根据本发明的第八个方面，提供了罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种在增强增甜的组合物的甜度中的用途。因此，在另一个方面，提供了一种增强增甜的组合物的甜度的方法，该方法包括提供基础组合物，并添加至少一种甜味剂和一种或多种甜度增强剂，所述一种或多种甜度增强剂选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷。

[0021] 根据本发明的第九个方面，提供了一种制备根据本发明的任意方面或实施方案的增甜的组合物的方法，该方法包括合并基础组合物、一种或多种甜度增强剂和至少一种其它甜味剂，所述一种或多种甜度增强剂选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷。

[0022] 根据本发明的第十个方面，提供了一种增甜的组合物，其包含一种或多种罗汉果苷。例如，所述一种或多种罗汉果苷可以作为甜度增强剂存在，并因此以具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在。然后，增甜的组合物将进一步包含至少一种甜味剂，其存在量具有等于或大于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0023] 根据本发明的第十一个方面，提供了一种或多种罗汉果苷在增强增甜的组合物的甜度中的用途。因此，提供了一种增强增甜的组合物的甜度的方法，该方法包括提供基础组合物并添加至少一种甜味剂和一种或多种罗汉果苷。

[0024] 根据本发明的第十二个方面，提供了一种制备根据本发明的任意方面或实施方案的增甜的组合物的方法，该方法包括合并基础组合物、一种或多种罗汉果苷和至少一种其它甜味剂。

[0025] 在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂可以包括或为罗汉果苷V和/或所述一种或多种低效力甜味剂可以包括或为11-O-罗汉果苷V。

[0026] 在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值为约2:1至约12:1。在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值为约5:1至约12:1。在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值可以为约6:1至约10:1。

[0027] 在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂可以以约15ppm至约30ppm的总量存在，和/或所述一种或多种低效力甜味剂可以以约2ppm至约10ppm的总量存在。在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂可以以约22ppm至约28ppm的总量存在，和/或所述一种或多种低效力甜味剂可以以约2ppm至约5ppm的总量存在。

[0028] 在本发明的第七至第十二个方面的某些实施方案中，所述一种或多种罗汉果苷或一种或多种甜度增强剂可以以约15ppm至约50ppm的量存在。在某些实施方案中，所述一种或多种罗汉果苷或一种或多种甜度增强剂可以约15ppm至约35ppm的量存在。

[0029] 在本发明的任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低效力甜味剂的组合单独可以具有小于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。特别地，增甜的组合物中的所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低强度甜味剂的浓度可以具有小于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0030] 在本发明第七至第十二个方面的某些实施方案中，所述一种或多种罗汉果苷或一种或多种甜度增强剂可具有小于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的总甜度。在某些实施方案中，所述一种或多种甜度增强剂将增甜的组合物的甜度增加超过单独的一种或多种甜度增强剂的总甜度。

[0031] 在本发明的任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低效力甜味剂的组合可以使增甜的组合物的甜度增加超过单独的组合的甜度。在本发明任意方面的某些实施方案中，所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低效力甜味剂的组合可以使组合物的甜度增加等于或大于约1.25％(w/v)蔗糖当量值。

[0032] 在本发明任意方面的某些实施方案中，与在完全不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的逗留不去的甜味相比，所述一种或多种低效力甜味剂减弱了包含所述一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的逗留不去的甜味。

[0033] 在本发明任意方面的某些实施方案中，与在完全不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物的苦味和/或涩味相比，所述一种或多种低效力甜味剂减弱了包含所述一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的苦味和/或涩味。

[0034] 使用的甜味剂的一种或多种(例如所有)可以是天然的或合成的(人造的)。例如，甜味剂的一种或多种可以通过生物学方法或通过酶法或通过合成方法制备。

[0035] 本发明任何方面的某些实施方案可以提供以下优点中的一个或多个：

[0036] • 组合物中增加的甜味；

[0037] • 包含至少一种甜味剂的组合物中增强的甜味；

[0038] • 得到期望的甜味所需的热量甜味剂的用量减少；

[0039] • 使甜味更类似于糖(蔗糖)的一种或多种甜度特征改善；

[0040] • 逗留不去的甜味减弱(例如甜味保持的时间长度减少和/或甜味强度更快速地降低)；

[0041] • 苦味和/或涩味和/或甘草味和/或金属味减弱；

[0042] • 甜味印象改善(例如甜味的最大强度增加和/或检测到的甜味的时间长度减少)(例如逗留不去的甜味减少)。

[0043] 相对于本发明的所述方面的任何特定的一个或多个提供的细节、实例和优选项将在本文中进一步描述，并且同样适用于本发明的所有方面。除非本文另外指出，否则与上下文明显矛盾，本文所描述的实施方案、实施例和优选方案在其所有可能的变型中的任意组合均被本发明涵盖。

[0044] 附图简述

[0045] 图1显示罗汉果提取物(下表1的提取物2)的色谱图。

[0046] 图2显示罗汉果苷1-6的化学结构；

[0047] 图3显示商品罗汉果提取物的LC-MS分析；

[0048] 图4显示使用不同混合时间(d9)的异-罗汉果苷VI的异核单量子相干性-全相关光谱法(HSQC-TOCSY)(hsqcgpmlph)。A:10ms混合时间。B:30ms混合时间。C:60ms混合时间。D:100ms混合时间。由于Glc II的H-1和Glc III的H-6a重叠，所以本文未分析Glc II的HSQC-COSY相关强度；

[0049] 图5显示使用不同混合时间的异-罗汉果苷VI吡喃葡萄糖基的HSQC-TOCSY(hsqcgpmlph)峰强度定量。(*对于100ms混合时间，HSQC-TOCSY上出现的C-3和C-5信号显示重叠。因此，直方图中使用C-3和C-5的总积分)；

[0050] 图6显示阐明罗汉果苷糖链的策略(*如果调整HSQC-TOCSY的峰强度，则显示在某些混合时间下的C-2至C-6的编号可能适度改变。通过观察不同混合时间实验中C-2至C-6的增加强度，仍然可以测定连接顺序。**迄今为止罗汉果苷吡喃葡萄糖基的C-3上不存在天然糖基化。吡喃葡萄糖基上的C-3糖基化可以导致从δ76低场位移(downshift)至δ81并且易于通过HSQC-TOCSY实验测定)。可以将图6的步骤顺序概括如下：

[0051] 在步骤1中，异核多键相关光谱法(HMBC)用于测定糖的异头(anormeric)C-1和H-1。从连接至糖苷配基的糖开始。在步骤2中，使用具有100ms混合时间的HSQC-TOCSY测定C-2至C-6的完整基团。HSQC-COSY或HSQC-TOCSY(d9＝10ms)指定为C-2。HSQC-TOCSY(d9＝30ms)指定为C-3。HSQC-TOCSY(d9＝60ms)指定为C-4。HSQC-TOCSY(d9＝100ms)指定为C-5和C-6。在步骤3中，如果观察到C-2从～δ75低场位移至～δ81、C-4从～δ71低场位移至～δ81或C-6从～δ62低场位移至～69，则检查这些位置上HMBC的糖基化。

[0052] ＊＊

[0053] 如果C-2从～δ75低场位移至～δ81、C-4从～δ71低场位移至～δ81或C-6从～δ62低场位移至～69，则检查这些位置上HMBC的糖基化。

[0054] ＊＊

[0055] 图7显示具有化学式$C_{66}H_{112}O_{34}$和1448.70精确质量的异-罗汉果苷VI的化学结构。将该化学结构命名为式I;和

[0056] 图8显示具有化学式$C_{60}H_{102}O_{29}$和1286.65精确质量的11-表-罗汉果苷V的化学结构。将该化学结构命名为式II。

[0057] 详细描述

[0058] 本发明基于令人惊讶的发现,即一种或多种高强度甜味剂(例如罗汉果苷V)和一种或多种低效力甜味剂(例如11-O-罗汉果苷V)的组合可以与至少一种其它甜味剂(例如蔗糖)以协同方式起作用以获得具有大于单个甜味剂的甜度之和的甜度的组合物。本发明进一步基于令人惊讶的发现,即一种或多种低效力甜味剂可以抵消一种或多种高效力甜味剂的一种或多种负面甜度特征。例如,与使用单独的一种或多种高强度甜味剂相比,一种或多种高强度甜味剂(例如罗汉果苷V)和一种或多种低效力甜味剂(例如11-O-罗汉果苷V)的组合可在增甜的组合物(即包含至少一种其它甜味剂例如蔗糖的组合物,所述至少一种其它甜味剂的用量高于其甜度识别阈值和/或等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值)中提供改善的甜度特征。因此,例如,该甜度特征可以接近蔗糖的甜度特征。

[0059] 因此,本文提供了包含本文所公开的一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的不同组合物,特别是包含至少一种甜味剂和一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的增甜的组合物,所述至少一种甜味剂的用量高于其甜度识别阈值和/或等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值。所述增甜的组合物也可以称为可食用组合物。本文还提供了本文所公开的一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的多种用途以及制备本文所公开的各种组合物的方法。

[0060] 本发明进一步基于令人惊讶的发现,即罗汉果苷例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷可以用作甜度增强剂(即,可以增加增甜的组合物的甜度超过单独的甜度增强剂的甜度)。

[0061] 因此,本文提供了各种组合物,特别是增甜的组合物,其包含罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种。

[0062] 组合物

[0063] 本文提供了各种组合物,其包含至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂。本文还提供了包含一种或多种罗汉果苷例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种的组合物。在某些实施方案中,所述组合物为可食用组合物。

[0064] 在某些实施方案中,本发明提供了一种甜度改良组合物,其包含以下组分、基本上由以下组分组成或由以下组分组成:至少一种选自斯替维醇糖苷和/或罗汉果苷的高强度甜味剂和至少一种选自纤维二糖、阿洛酮糖、环己基氨基磺酸盐和/或11-O-罗汉果苷V的低效力甜味剂。在某些实施方案中,甜度改良组合物包含包含以下组分、基本上由以下组分组成或由以下组分组成:一种高强度甜味剂和一种低效力甜味剂。例如,甜度改良组合物可以是浓缩物,其可以例如在增甜的(例如可食用的)组合物中稀释以赋予可食用组合物期望的甜度。术语“增甜的组合物”是指包含至少一种甜味剂的组合物,所述至少一种甜味剂的存在量超过其甜度识别阈值和/或具有等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0065] 在某些实施方案中,提供了一种增甜的组合物(例如可食用组合物),其包含一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种。在某些实施方案

中,提供了一种增甜的组合物(例如可食用组合物),其包含至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂。所述高强度甜味剂和低效力甜味剂的组合可以称作甜度改良组合物。所述一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种在本文中也可以称作甜度改良组合物。因此,在某些实施方案中,提供了一种增甜的组合物,其包含至少一种甜味剂和甜度改良组合物,所述至少一种甜味剂的存在量高于其甜度识别阈值和/或具有等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度,所述甜度改良组合物包含、基本上由以下组分组成或由以下组分组成:至少一种高强度甜味剂和至少一种低效力甜味剂。例如,所述增甜的组合物可以是可食用组合物。

[0066] 当用于特定的甜度改良组合物时,术语“增强”是指当甜度改良组合物与至少一种其它甜味剂组合使用时的协同增甜作用。所述甜度改良组合物增加增甜的组合物的甜度超过单独的甜度改良组合物的甜味。换句话说,包含至少一种甜味剂和至少一种甜度改良组合物的组合物的甜度大于该组合物中所有甜味剂的甜度之和。本文所述的甜度改良组合物以没有可检测的甜味或没有被识别为甜味(低于其甜度识别阈值)的用量在增甜的(例如可食用)组合物中使用。典型地,具有小于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的甜度改良组合物被FEMA(香料和提取物制造者协会(Flavor&Extract Manufacturers Association))接受为“本质上不是甜味”。甜度改良剂也可以称为甜度增强剂。

[0067] 包含本文所公开的甜度改良组合物和至少一种甜味剂(其用量高于其甜度识别阈值和/或其用量具有等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度)的增甜的组合物可以具有比不存在甜度改良组合物情况下增甜的组合物的甜度大等于或大于约1.0%(w/v)蔗糖当量值的甜度。例如,增甜的组合物可以具有比不存在甜度改良组合物情况下增甜的组合物的甜度大等于或大于约1.1%(w/v)或等于或大于约1.15%(w/v)或等于或大于约1.2%(w/v)或等于或大于约1.25%(w/v)蔗糖当量值的甜度。换句话说,甜度改良组合物可以使增甜的组合物的甜度增加等于或大于约1%(w/v)或等于或大于约1.1%(w/v)或等于或大于1.15%(w/v)或等于或大于约1.2%(w/v)或等于或大于约1.25%(w/v)蔗糖当量值。对比的组合物与所述组合物相同,除了不包括所述甜度改良组合物之外。

[0068] 术语“蔗糖当量值”是指包含至少一种非蔗糖甜味剂的组合物与参比蔗糖溶液相比的甜度的当量。典型地,对品尝小组成员进行培训,以检测包含1%-15%蔗糖(w/v)的参比蔗糖溶液的甜度。然后可以在一系列稀释度下品尝其它非蔗糖甜味剂,以确定与给定的蔗糖参比物一样甜(即等甜)的非蔗糖甜味剂的浓度。术语“等甜”是指具有相等甜度的组合物。典型地,给定组合物的甜度参照蔗糖溶液测量。参见″A Systematic Study of Concentration-Response Relationships of Sweeteners,″G.E.DuBois,D.E.Walters,S.S.Schiffman,Z.S.Warwick,B.J.Booth,S.D.Pecore,K.Gibes,B.T.Carr,和L.M.Brands,在Sweeteners:Discovery,Molecular Design and Chemoreception中,D.E.Walters,F.T.Orthoefer和G.E.DuBois,Eds.,American Chemical Society,Washington,DC(1991),pp261-276。

[0069] 例如,所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低效力甜味剂的组合(例如,甜度改良组合物)可以具有小于约1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度。例如,所述高强度甜味剂和所述低效力甜味剂的组合(例如甜度改良组合物)可具有等于或小于约1.45%(w/v)蔗糖当量值或等于或小于约1.4%(w/v)蔗糖当量值或等于或小于约1.35%(w/v)蔗糖当量

值或等于或小于约1.3％(w/v)蔗糖当量值的甜度。例如，所述高强度甜味剂和所述低效力甜味剂的组合(例如，甜度改良组合物)可以具有等于或大于约1％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.1％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.15％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.2％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.25％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.3％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0070] 例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种甜度增强剂可以具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种甜度增强剂可以具有等于或小于约1.45％(w/v)蔗糖当量值或等于或小于约1.4％(w/v)蔗糖当量值或等于或小于约1.35％(w/v)蔗糖当量值或等于或小于约1.3％(w/v)蔗糖当量值的甜度。例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种甜度增强剂可以具有等于或大于约1％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.1％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.15％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.2％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.25％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.3％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0071] 用于本文公开的组合物中的每种甜味剂和甜度增强剂可以是天然的或合成的(人工的)甜味剂。非天然存在的(即合成的)罗汉果苷的实例在WO2017/075257中公开，其内容通过引用并入本文。术语“天然甜味剂”是指从自然界获得的甜味剂，包括可能经过酶处理(例如糖基化)以形成自然界中未发现的化合物的混合物(不包括经过酶处理的纯化化合物)。例如，具有与天然存在的罗汉果醇(mogrol)糖苷分布不同(例如增强的)的罗汉果醇糖苷分布的改性提取物可以归类为天然的。例如，糖基化的斯替维醇糖苷和/或糖基化的罗汉果苷的混合物可以被归类为天然的。本文公开的组合物中使用的每种甜味剂可以是食物来源的。“食物来源的”产品是指在典型的烹饪条件下例如使用与烹饪方法所用温度相似的温度制备的产品。在某些实施方案中，在本文公开的组合物中使用的高强度甜味剂和低效力甜味剂(例如在本文公开的甜度改良组合物中)都是天然甜味剂。在某些实施方案中，本文公开的组合物中使用的所有甜味剂都是天然的。

[0072] 本文公开的甜味剂可以以纯的或纯化的形式使用，并且可以化学合成、通过生物技术方法(例如发酵)生产或从天然来源(例如植物来源，包括但不限于水果，甘蔗，糖用甜菜)分离。

[0073] 例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以为至少80wt％纯。例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以为至少约85wt％或至少约90wt％或至少约95wt％或至少约98wt％或至少约99wt％纯。例如，所述一种或多种罗汉果苷，例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以为至多100wt％或至多99wt％纯。

[0074] 术语“高强度甜味剂”是指具有的甜度为蔗糖甜度的至少100倍的化合物。在某些实施方案中，高强度甜味剂具有的甜度为蔗糖甜度的至少约120或至少约140或至少约150或至少约160或至少约180或至少约200或至少约220或至少约240或至少约250或至少约260或至少约280或至少约300或至少约320或至少约340或至少约350或至少约360或至少约380或至少约400或至少约420或至少约440或至少约450倍。例如，高强度甜味剂可以具有至多为蔗糖甜度的1000倍的甜度。尽管高强度甜味剂具有为蔗糖甜度的至少100倍的甜度，但是

在其用于本文所述的甜度改良组合物的上下文中,它们将以不具有任何可检测到的甜味或不被识别为甜味的用量用于增甜的组合物中(提供小于1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度的量,FEMA认为其“本质上不是甜味”)。

[0075] 例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以是一种或多种斯替维醇糖苷和/或一种或多种罗汉果苷。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以是斯替维醇糖苷和罗汉果苷的混合物。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以是一种或多种斯替维醇糖苷。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以是一种或多种罗汉果苷。在某些实施方案中,罗汉果苷在甜度增强和异味减少方面(例如减弱味道后逗留不去的甜味)可能比斯替维醇糖苷更好。

[0076] 例如,所述高强度甜味剂可以为一种或多种斯替维醇糖苷。斯替维醇糖苷实例包括,例如甜菊苷(CAS:57817-89-7)、莱鲍迪苷A(CAS:58543-16-1)、莱鲍迪苷B(CAS:58543-17-2)、莱鲍迪苷C(CAS:63550-99-2)、莱鲍迪苷D(CAS:63279-13-0)、莱鲍迪苷E(CAS:63279-14-1)、莱鲍迪苷F(CAS:438045-89-7)、莱鲍迪苷G(CAS:127345-21-5)、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷I(CAS:1220616-34-1)、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷M(CAS:1220616-44-3)、莱鲍迪苷N(CAS:1220616-46-5)、莱鲍迪苷O(CAS:1220616-48-7)、杜克苷A(CAS:64432-06-0)、杜克苷B(CAS:63550-99-2)、覆盆子苷(CAS:64849-39-4)和柚苷二氢查耳酮(CAS:18916-17-1)。

[0077] 例如,所述高强度甜味剂可以为一种或多种罗汉果苷。在某些实施方案中,所述高强度甜味剂可以为本文列出的罗汉果苷的一种或多种。在某些实施方案中,所述高强度甜味剂可以为罗汉果苷IV、赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷V的一种或多种(包括其全部异构体)。例如,所述高强度甜味剂可以为罗汉果苷IV、赛门苷和罗汉果苷V的混合物(包括其全部异构体)。例如,所述一种或多种罗汉果苷可以得自或可获自罗汉果果实提取物。

[0078] 术语“低效力甜味剂”是指具有的甜度小于蔗糖甜度的100倍的化合物。在某些实施方案中,所述低效力甜味剂具有的甜度为蔗糖甜度的至多约95倍或至多约90倍或至多约85倍。

[0079] 所述一种或多种低效力甜味剂选自纤维二糖、阿洛酮糖、环己基氨基磺酸盐和/或11-O-罗汉果苷V(CAS:126105-11-1)的一种或多种。例如,所述一种或多种低强度甜味剂可以为纤维二糖、阿洛酮糖和11-O-罗汉果苷V的一种或多种。

[0080] 在某些实施方案中,所述一种或多种高强度甜味剂包括或为高强度罗汉果苷。在某些实施方案中,所述一种或多种低效力甜味剂包括或为低效力罗汉果苷。在某些实施方案中,所述一种或多种高强度甜味剂包括或为高强度罗汉果苷,而所述一种或多种低效力甜味剂包括或为低效力罗汉果苷。

[0081] 在某些实施方案中,所述一种或多种高强度甜味剂包括罗汉果苷V。在某些实施方案中,所述一种或多种低效力甜味剂包括或为11-O-罗汉果苷V。在某些实施方案中,所述一种或多种高强度甜味剂包括或为罗汉果苷V,而所述一种或多种低效力甜味剂包括或为11-O-罗汉果苷V。

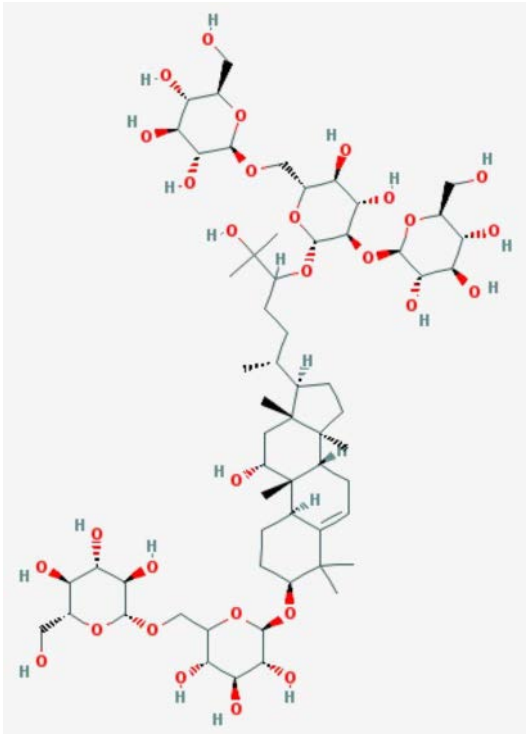
[0082] 罗汉果苷为一组三萜糖苷,并且可从果实罗汉果(Siraitia grosvenorii)中获得,罗汉果也称为光罗汉果(arhat fruit)或长寿果(longevity fruit)或生果(swingle fruit)。罗汉果苷占新鲜果实的约1%。通过提取,可以获得粉末形式的提取物,该粉末形式含有至多80%的罗汉果苷。罗汉果苷提取物包含罗汉果黄素II、罗汉果黄素I、11-O-罗汉果

苷II(I)、11-O-罗汉果苷II(II)、11-O-罗汉果苷II(III)、罗汉果苷II(I)、罗汉果苷II(II)、罗汉果苷II(III)、11-脱羟基-罗汉果苷III、11-O-罗汉果苷III、罗汉果苷III(I)、罗汉果苷III(II)、罗汉果苷IV(I)(赛门苷)、罗汉果苷IV(II)、罗汉果苷IV(III)、罗汉果苷IV(IV)、脱氧罗汉果苷V(I)、脱氧罗汉果苷V(II)、11-O-罗汉果苷V(I)、罗汉果苷V异构体、罗汉果苷V、异-罗汉果苷V、7-O-罗汉果苷V、11-O-罗汉果苷VI、罗汉果苷VI(I)、罗汉果苷VI(II)、罗汉果苷VI(III)(新罗汉果苷)和罗汉果苷VI(IV)。罗汉果苷V的确切量可以根据果实的成熟度和/或所用提取方法的不同而改变。

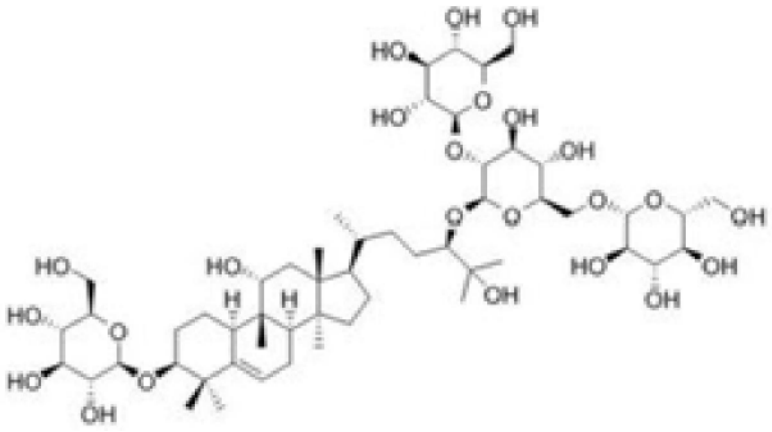
[0083] 罗汉果苷包括自然界中存在的罗汉果苷和自然界中不存在的罗汉果苷。罗汉果苷的实例包括,例如,罗汉果黄素II、罗汉果黄素I、11-O-罗汉果苷II(I)、11-O-罗汉果苷II(II)、11-O-罗汉果苷II(III)、罗汉果苷II(I)、罗汉果苷II(II)、罗汉果苷II(III)、11-脱羟基-罗汉果苷III、11-O-罗汉果苷III、罗汉果苷III(I)、罗汉果苷III(II)、罗汉果苷IIIe、罗汉果苷IIIx、罗汉果苷IV(I)(赛门苷)、罗汉果苷IV(II)、罗汉果苷IV(III)、罗汉果苷IV(IV)、脱氧罗汉果苷V(I)、脱氧罗汉果苷V(II)、11-O-罗汉果苷V(I)、罗汉果苷V异构体、罗汉果苷V、异-罗汉果苷V、7-O-罗汉果苷V、11-O-罗汉果苷VI、罗汉果苷VI(I)、罗汉果苷VI(II)、罗汉果苷VI(III)(新罗汉果苷)和罗汉果苷VI(IV)。例如,这些罗汉果苷可以得自或可获自罗汉果提取物。

[0084] 罗汉果苷V(CAS:88901-36-4)为葫芦烷衍生物的糖苷,并且具有化学式$C_{60}H_{102}O_{29}$,且化学结构如下所示。罗汉果苷V可以在某些植物提取物中找到,例如来自果实罗汉果(Siraitia grosvenorii)的提取物。已发现纯罗汉果苷V具有的甜度是蔗糖甜度的至少400倍。

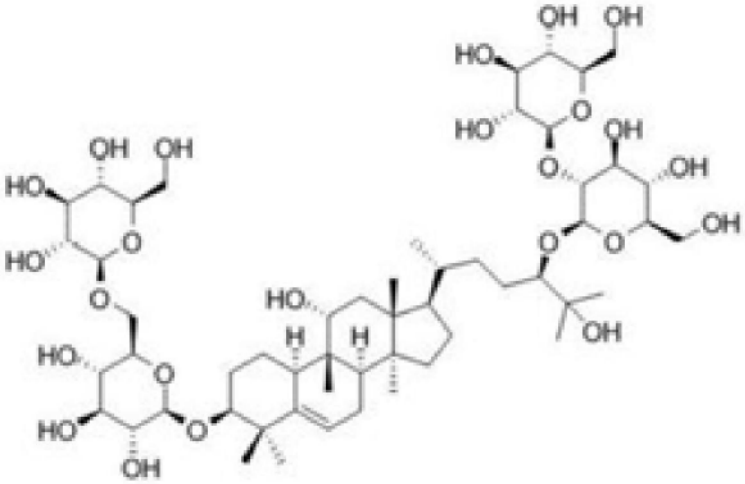
[0085]



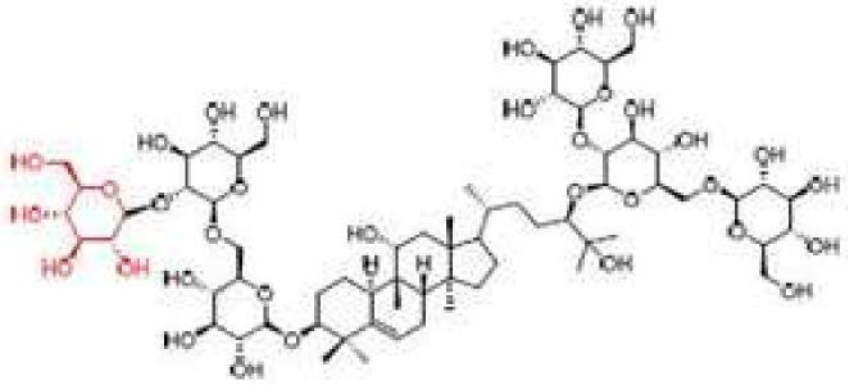
[0086] 赛门苷(CAS:126105-12-2)是在罗汉果(Siraitia grosvenorii)的果实中发现的葫芦烷并且具有以下化学结构。

[0087] 

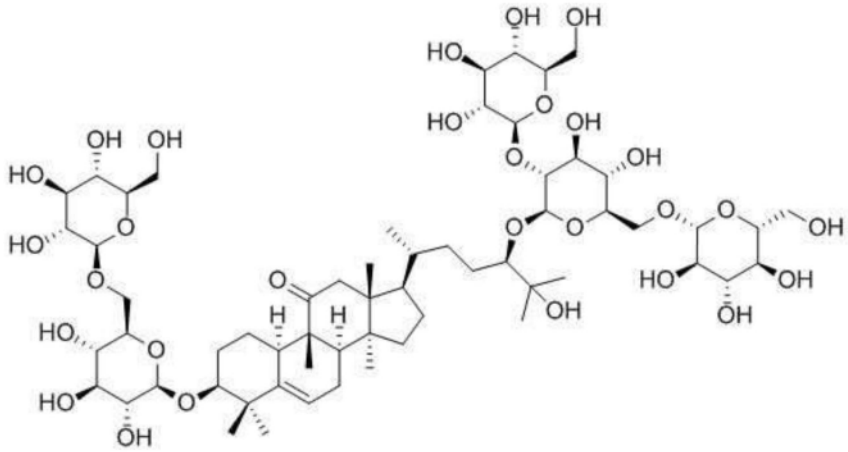
[0088] 罗汉果苷IV(CAS:89590-95-4)是在罗汉果(Siraitia grosvenorii)的果实中发现的三萜葡萄糖苷并且具有以下化学结构。

[0089] 

[0090] 新罗汉果苷(CAS:189307-15-1)也是在罗汉果(Siraitia grosvenorii)的果实中发现的葫芦烷糖苷并且具有以下化学结构。

[0091] 

[0092] 11-O-罗汉果苷V(CAS:126105-11-1)源自罗汉果苷V并且具有以下化学结构。在植物提取物例如来自果实罗汉果(Siraitia grosvenorii)的提取物中也发现了它。已发现11-O-罗汉果苷V具有的甜度为蔗糖甜度的约84倍。

[0093] 

[0094] 所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值等于或大于约2:1。例如,所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值可以等于或大于约2.5:1或等于或大于约3:1或等于或大于约3.5:1或等于或大于约4:1或等于或大于约4.5:1或等于或大于约5:1或等于或大于约5.5:1或等于或大于约6:1或等于或大于约6.5:1或等于或大于约7:1或等于或大于约7.5:1或等于或大于约8:1。所述高强度甜味剂与所述低效力甜味剂的比值等于或小于约12:1。例如,所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值可以等于或小于约11.5:1或等于或小于约11:1或等于或小于约10.5:1或等于或小于约10:1或等于或小于约9.5:1或等于或小于约9:1或等于或小于约8.5:1。例如,所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值可以在约5:1至约11:1或约6:1至约10:1或约6.5:1至约9.5:1或约7:1至约9:1或约7.5:1至约8.5:1的范围。

[0095] 在某些实施方案中,所述一种或多种高强度甜味剂与所述一种或多种低效力甜味剂的比值为约2:1至约12:1或约4:1至约12:1或约5:1至约12:1或约6:1至约10:1或约7:1至约9:1。该比值可以是重量或体积比。该比值仅适用于甜度改良组合物中的高强度甜味剂和低效力甜味剂(高强度和低效力甜味剂用于增甜的组合物,其用量小于甜度识别阈值或具有小于1.5%(w/v)蔗糖当量值)。

[0096] 所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量等于或大于约15ppm。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量等于或大于约16ppm或等于或大于约17ppm或等于或大于约18ppm或等于或大于约19ppm或等于或大于约20ppm或等于或大于约21ppm或等于或大于约22ppm或等于或大于约23ppm或等于或大于约24ppm或等于或大于约25ppm。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量等于或小于约50ppm或等于或小于约48ppm或等于或小于约46ppm或等于或小于约45ppm或等于或小于约44ppm或等于或小于约42ppm或等于或小于约40ppm或等于或小于约38ppm或等于或小于约36ppm或等于或小于约35ppm或等于或小于约34ppm或等于或小于约32ppm或等于或小于约30ppm。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量在约15ppm至约50ppm或约15ppm至约45ppm或约15ppm至约40ppm或约15ppm至约35ppm或约15ppm至约30ppm的范围。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量在约15ppm至约30ppm或约20ppm至约30ppm或约22ppm至约28ppm或约23ppm至约27ppm或约24ppm至约26ppm的范围。例如,所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物中,其总量为约

20ppm或约25ppm。例如，该组合物可以为增甜的组合物，其包含至少一种甜味剂，所述至少一种甜味剂甜味剂的用量具有高于其甜度识别阈值和/或等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。

[0097] 所述一种或多种低效力甜味剂可以存在于组合物中，其总量等于或大于约2ppm。例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以存在于组合物中，其总量等于或大于约3ppm。例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以存在于组合物中，其总量等于或小于约12ppm或等于或小于约11ppm或等于或小于约10ppm或等于或小于约9ppm或等于或小于约8ppm或等于或小于约7ppm或等于或小于约6ppm或等于或小于约5ppm。例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以存在于组合物中，其总量在约2ppm至约12ppm或约2ppm至约10ppm或约2ppm至约5ppm的范围，例如，总量为约3ppm。例如，该组合物可以包含除了本文公开的所述高强度甜味剂和所述低效力甜味剂的组合(例如甜度改良组合物)之外的至少一种甜味剂。

[0098] 例如，该浓度范围可以特别适合于液体组合物例如饮料或不包含任何蛋白质或脂肪的组合物。在具有基料例如牛奶和酸奶的组合物中或确实包含蛋白质和脂肪的其它组合物中，可以使用较高浓度的所述一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂。例如，可以使用比用于液体组合物或不包含任何蛋白质或脂肪的组合物的浓度高约1.5倍的浓度。例如，可以使用比用于液体组合物或不包含任何蛋白质或脂肪的组合物的浓度高约1.5倍至约3倍的浓度。

[0099] 因此，例如，所述一种或多种高强度甜味剂可以存在于组合物(例如具有基料例如牛奶或酸奶的组合物或包含蛋白质和/或脂肪的其它组合物)中，其总量在约20ppm至约75ppm，例如约22ppm至约74ppm或约24ppm至约72ppm或约25ppm至约70ppm或约26ppm至约68ppm或约28ppm至约66ppm或约30ppm至约65ppm或约30ppm至约60ppm或约30ppm至约55ppm或约30ppm至约50ppm或约30ppm至约45ppm的范围。

[0100] 因此，例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以存在于组合物(例如具有基料例如牛奶或酸奶的组合物或包含蛋白质和/或脂肪的其它组合物)中，其总量在在约3ppm至约20ppm或约4ppm至约18ppm或约4ppm至约16ppm或约5ppm至约15ppm或约6ppm至约15ppm的范围。

[0101] 在某些实施方案中，增甜的组合物包含至少一种甜味剂和甜度改良组合物，所述至少一种甜味剂的用量具有高于其甜度识别阈值和/或等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，所述甜度改良组合物由15ppm至约50ppm的本文所述的一种或多种高强度甜味剂和2ppm至12ppm的本文所述的一种或多种低效力甜味剂组成。在某些实施方案中，可食用组合物包含至少一种甜味剂和甜度改良组合物，所述甜度改良组合物由15ppm至约30ppm的本文所述的一种或多种高强度甜味剂和本文所述的2ppm至10ppm的一种或多种低效力甜味剂甜味剂组成。在某些实施方案中，可食用组合物包含至少一种甜味剂和甜度改良组合物，所述甜度改良组合物由20ppm至约30ppm的本文所述的一种或多种高强度甜味剂和2ppm至10ppm的本文所述的一种或多种低效力甜味剂组成。在某些实施方案中，可食用组合物包含至少一种甜味剂和甜度改良组合物，所述甜度改良组合物由22ppm至约28ppm的一种或多种本文所述的高强度甜味剂和2ppm至5ppm的本文所述的一种或多种低效力甜味剂组成。在某些实施方案中，所述高强度甜味剂为罗汉果苷V。在某些实施方案中，所述低效力甜味剂为11-O-罗汉果苷V。

[0102] 例如,所述一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以存在于增甜的组合物中,其总量等于或大于约15ppm。例如,所述一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷(siameonside)和新罗汉果苷的一种或多种可以存在于增甜的组合物中,其总量等于或大于约16ppm或等于或大于约17ppm或等于或大于约18ppm或等于或大于约19ppm或等于或大于约20ppm或等于或大于约21ppm或等于或大于约22ppm或等于或大于约23ppm或等于或大于约24ppm或等于或大于约25ppm。例如,所述一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以存在于增甜的组合物中,其总量等于或小于约50ppm,例如等于或小于约45ppm,例如等于或小于约40ppm,例如等于或小于约35ppm。例如,所述一种或多种罗汉果苷,例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以存在于增甜的组合物中,其总量在约15ppm至约50ppm或约15ppm至约45ppm或约15ppm至约40ppm或约15ppm至约35ppm或约20ppm至约35ppm或约20ppm至约30ppm的范围。

[0103] 术语“ppm”是指按重量计的百万分之份数,例如每千克含有化合物的产品中该化合物例如罗汉果苷V(按毫克计)的重量(即mg/Kg),或每升含有化合物的产品中该化合物(例如本公开的口服可食用/可食用产品)例如罗汉果苷V(按毫克计)的重量(即mg/L),或按体积计的百万分之份数,例如每升含有化合物的产品中该化合物例如罗汉果苷V(按毫升计)的体积(即ml/L)。

[0104] 例如,本文所述的甜度改良组合物可以包含较高浓度的高强度和低强度甜味剂,然后在增甜的组合物中稀释以获得本文所述的浓度。

[0105] 增甜的组合物包含至少一种甜味剂,其用量等于或大于其甜度识别阈值和/或其用量具有等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值的甜度。术语“甜度识别阈值”是指化合物的最低已知浓度,该浓度可被人的味觉感知为甜味。FEMA将等于或大于约1.5%(w/v)蔗糖当量值接受为“本质上为甜味”。

[0106] 所述至少一种甜味剂可以是营养性的或非营养性的。营养性甜味剂可为含有它们的食品增添热值,而非营养性甜味剂的热量非常低,或者根本不含热量。天冬甜素是唯一批准的营养性高强度甜味剂,其在等量的糖中含有超过2%的卡路里,而非营养性甜味剂在等量的糖中含有少于2%的卡路里。

[0107] 例如,所述至少一种甜味剂可以选自蔗糖、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、塔格糖、阿洛酮糖(cellobiose)、海藻糖、异麦芽酮糖(isomaltulose)、丁磺氨钾(AceK)、天冬甜素、斯替维醇糖苷、三氯蔗糖、高果糖玉米糖浆、淀粉糖浆、糖精、三氯蔗糖、纽甜、爱德万甜、罗汉果提取物、新橙皮苷、二氢查耳酮、柚苷二氢查耳酮、新橙皮苷二氢查耳酮、覆盆子苷、莱鲍迪苷A、甜菊苷、甜叶菊、三叶苷(trilobtain)和糖醇例如赤藓醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨醇和肌醇的一种或多种。例如,在WO2016/038617中公开了可用于增甜的组合物中的甜味剂的实例,其内容通过引用并入本文。

[0108] 例如,所述至少一种甜味剂可以选自蔗糖、高果糖玉米糖浆、丁磺氨钾(AceK)、天冬甜素、斯替维醇糖苷和/或三氯蔗糖的一种或多种。

[0109] 如何使用足量的甜味剂来增甜消费品在本领域中是众所周知的。根据消费品的不同,可以通过添加如本文公开的甜度改良组合物来减少甜味剂的量。例如,可以实现约1°至约4°白利糖度或以上的减少。

[0110] 例如,以等于或大于其甜度识别阈值的量和/或具有等于或大于约1.5%(w/v)蔗

糖当量值的甜度的量存在的所述至少一种其它甜味剂可用于增甜的组合物中，其量等于或大于约0.01％(w/v)。例如，所述至少一种其它甜味剂可以以等于或大于约0.1％(w/v)或等于或大于约0.5％(w/v)或等于或大于约1％(w/v)或等于或大于约2％(w/v)的量用于增甜的组合物中。例如，所述至少一种其它甜味剂可以以等于或小于约20％(w/v)或等于或小于约15％(w/v)或等于或小于约10％(w/v)或等于或小于约8％(w/v)或等于或小于约6％(w/v)或等于或小于约5％(w/v)的量用于可食用组合物中。

[0111] 以等于或大于其甜度识别阈值的量和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在的所述至少一种其它甜味剂可用于本文公开的增甜的组合物(例如可食用组合物)中，其量与约2％(w/v)至约15％(w/v)蔗糖等甜。

[0112] 在某些实施方案中，本文提供了一种甜度改良组合物，该增甜的组合物由罗汉果苷V和11-O-罗汉果苷V组成，其比值在约2:1至约12:1，例如约6:1至约10:1的范围。例如，该甜度改良组合物可用作可食用组合物中的甜度增强剂或改良剂。例如，可食用组合物可以包含至少一种其它甜味剂，例如蔗糖。例如，罗汉果苷V可以在约15ppm至约30ppm或约20ppm至约30ppm(例如约20ppm或约25ppm)范围内的量用于可食用组合物中。11-O-罗汉果苷V可以约2ppm至约12ppm或约2ppm至约10ppm(例如约8.5ppm或约3ppm)范围内的量用于可食用组合物中。例如，所述至少一种其它甜味剂在可食用组合物中的存在量与约2％(w/v)至约15％(w/v)蔗糖等甜。

[0113] 所述组合物可以是任意适合的形式，例如，固体(例如粉末，颗粒，片剂)或溶液(例如水溶液)或乳剂或悬浮液形式。例如，所述组合物可以进一步包含稀释剂或填充剂，例如膳食纤维。

[0114] 如本文公开的可食用组合物包括，例如如下：

[0115] -湿/液体汤，无论浓度或容器如何，包括冷冻汤。为了该定义的目的，汤是指由肉，禽，鱼，蔬菜，谷物，水果和其它成分制成的食品，在液体中煮熟，其中可能包括一些或所有这些成分的可见片状物。它可以为澄清的(作为肉汤)或浓稠的(作为杂烩)，平滑，浓汤或稠汤(chunky)，即食的，半浓缩或浓缩的，并且可以作为膳食的第一道菜或主菜或餐间点心热食用或冷食用(像饮料一样啜饮)。汤可用作制备其它餐食组分的成分，且范围可以从肉汤(清炖汤)到酱汁(干酪或基于干酪的汤)。

[0116] -脱水和烹饪食品，包括烹饪辅助产品，例如：粉末，颗粒，糊状物，浓缩液体产品，包括浓缩的肉汤，肉汁和压制的块、片或粉末或颗粒形式的肉汁样产品，它们分别作为成品或作为产品、调味料和配方混合物中的组分销售(与技术无关)。

[0117] -膳食溶液产品(meal solution product)，例如：脱水和冷冻干汤，包括脱水汤粉混合物，脱水速溶汤粉，脱水即煮汤，现成菜肴的脱水或环境制品，膳食和单份主菜，包括面食，土豆和米饭菜肴。

[0118] -配餐产品(meal embellishment product)，例如：调味品，腌料，色拉调味汁，色拉配料，蘸料，拌粉，面拖混合料，储存稳定的糊状食品，烤肉用调味料，液体配方混合物，浓缩物，酱料或酱料混合物，包括用于沙拉的配方混合物，以成品或作为产品中的成分(无论是脱水的，液体的还是冷冻的)销售。

[0119] -饮料，包括饮料混合物和浓缩物，包括但不限于可饮用的酒精和非酒精饮料和干粉饮料，碳酸和非碳酸饮料，例如苏打水，水果或蔬菜汁，酒精和非酒精饮料。

[0120] -糖果产品，例如蛋糕，饼干，派，糖果，口香糖，明胶，冰淇淋，冰冻果子露，布丁，果酱，果冻，色拉调味汁和其它调味品，谷类食品和其它早餐食品，水果罐头和水果酱等。

[0121] -乳制品，例如牛奶，干酪，酸奶。

[0122] -药物组合物，例如，可以为糖浆，乳剂，悬浮液，溶液或其它液体形式。

[0123] -牙齿组合物，包括，例如，口腔清新剂，漱口剂，口腔清洗剂，牙膏，牙齿抛光剂，洁齿剂，口腔喷雾剂和牙线。

[0124] -食用凝胶组合物。

[0125] 本文公开的组合物可以进一步包含基础组合物。例如，本文公开的可食用组合物可进一步包含可食用基础组合物。这是指组合物所需的所有成分，除了所述高强度甜味剂和所述低效力甜味剂的组合(例如，甜度改良组合物)之外。例如，基础组合物可以为增甜的基础组合物，其包含至少一种其它甜味剂，所述至少一种其它甜味剂以等于或大于其甜度识别阈值的量和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在。根据组合物的性质和用途的不同，它们在性质和比例方面自然会改变，但是它们在本领域中是众所周知的，并且可以以本领域公认的比例使用。因此，用于每种可以预期的目的这种基础组合物的制品在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0126] 基础组合物中的成分可包括但不限于消结块剂，消泡剂，抗氧化剂，粘合剂，着色剂，稀释剂，崩解剂，乳化剂，封装剂或制剂，酶，脂肪，香味增强剂，矫味剂，树胶，润滑剂，多糖，防腐剂，蛋白质，增溶剂，溶剂，稳定剂，糖衍生物，表面活性剂，增甜剂，维生素，蜡等。可以使用的溶剂是本领域技术人员已知的，并且包括例如乙醇，乙二醇，丙二醇，甘油和三醋精。封装剂和树胶包括麦芽糖糊精，阿拉伯树胶，藻酸盐，明胶，改性淀粉和多糖。

[0127] 例如，用于调味剂或香料的添加剂、赋形剂、载体、稀释剂或溶剂的实例可以在如下文献中找到:“Perfume and Flavour Materials of Natural Origin”,S.Arctander,Ed.,Elizabeth,N.J.,1960;in″Perfume and Flavour Chemicals″,S.Arctander,Ed.,第I&II卷,Allured Publishing Corporation,Carol Stream,USA,1994;“Flavourings”,E.Ziegler和H.Ziegler(ed.),Wiley-VCH Weinheim,1998;和“CTFA Cosmetic Ingredient Handbook”,J.M.Nikitakis(ed.),第1版,The Cosmetic,Toiletry and Fragrance Association,Inc.,Washington,1988。

[0128] 所述一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的组合(例如，甜度改良组合物)或所述一种或多种选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的甜度增强剂的比例将取决于组合物的性质以及期望的甜度的程度和特征。本领域技术人员仅通过简单的非创造性的实验就可以容易地确定每种情况下的适当比例。本文所公开的量和比例仅是示例性的，并且调味专家可以通过在该范围之外工作来寻求特定的效果，并且应仅将其视为指示性的。

[0129] 本文公开的组合物的pH可以为不对甜味剂共混物的味道产生不利影响的任意pH。例如，该pH可以在约1.8至约8或约2至约5的范围。本领域技术人员能够根据组合物pH的不同鉴定每种甜味剂使用的适合浓度。

[0130] 例如，与单独地使用所述一种或多种高强度甜味剂相比，所述一种或多种低效力甜味剂与所述一种或多种高强度甜味剂的应用可以改善增甜的组合物中的一种或多种甜度特征。因此，例如，与不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物相比，

本文公开的增甜的组合物可以具有一种或多种改善的甜度特征。例如，与使用不同的甜度增强剂例如罗汉果提取物替代罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种相比，所述一种或多种选自罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的甜度增强剂的应用可以改善增甜的组合物的一种或多种甜度特征。

[0131] 例如，与不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物相比，或者与包含不同甜度增强剂的增甜的组合物相比，本文公开的增甜的组合物可以具有与蔗糖更相似的一种或多种甜度特征。

[0132] 例如，与不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物相比，或者与包含不同甜度增强剂的增甜的组合物相比，本文公开的增甜的组合物具有减弱的逗留不去的甜味。

[0133] 例如，与不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物相比，或者与包含不同甜度增强剂的增甜的组合物相比，本文公开的增甜的组合物具有减弱的苦味和/或涩味和/或金属味和/或甘草味。

[0134] 例如，与不存在所述一种或多种低效力甜味剂的情况下增甜的组合物相比，或者与包含不同甜度增强剂的增甜的组合物相比，本文公开的增甜的组合物具有增强的甜味印象。

[0135] 对比的增甜的组合物是相同的，除了它不包括一种或多种低效力甜味剂中的任何一种之外；或是相同的，除了它包含不同的甜度增强剂来替代所述一种或多种罗汉果苷，例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种之外。

[0136] 用途

[0137] 本文提供了一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂的组合在增强包含至少一种其它甜味剂的组合物的甜度中的用途，所述至少一种其它甜味剂以等于或大于其甜度识别阈值的量和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在。所述一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低强度甜味剂的组合具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度。所述一种或多种高强度甜味剂、一种或多种低效力甜味剂和至少一种其它甜味剂的组合可以为根据本文公开的任何实施方案。

[0138] 本文提供了一种或多种罗汉果苷例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种的用途，其增强包含至少一种其它甜味剂的组合物的甜度，所述至少一种其它甜味剂以等于或大于其甜度识别阈值的量和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量存在。

[0139] 因此，提供了用于增强增甜的组合物的甜度的方法，该方法包括提供基础组合物，其包含至少一种甜味剂，所述至少一种甜味剂甜味剂的用量具有高于其甜度识别阈值的甜度和/或具有等于或大于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，并添加至少一种低效力甜味剂、至少一种高强度甜味剂；或添加一种或多种罗汉果苷，例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种。可以以任意顺序添加最终组合物的每种组分以获得期望的最终组合物。例如，该方法可以包括混合所述组分。

[0140] 例如，所述一种或多种高强度甜味剂和/或所述一种或多种高强度甜味剂和所述一种或多种低效力甜味剂的组合(例如甜度改良组合物)和/或所述一种或多种罗汉果苷例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以使增甜的组合物的甜度增加等于或

大于约1.0％(w/v)蔗糖当量值。例如，所述高强度甜味剂和/或所述高强度甜味剂和所述低效力甜味剂的组合和/或的组合一种或多种罗汉果苷例如罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷的一种或多种可以使增甜的组合物的甜度增加等于或大于约1.1％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.15％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.2％(w/v)蔗糖当量值或等于或大于约1.25％(w/v)蔗糖当量值。例如，该组合物可以为包含至少一种其它甜味剂的组合物。

[0141] 本文还提供了一种或多种低效力甜味剂改善包含一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的一种或多种甜度特征的用途。所述一种或多种高强度甜味剂和一种或多种低效力甜味剂以具有小于约1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度的量使用。

[0142] 因此，提供了一种用于改善增甜的组合物的一种或多种甜度特征的方法，该增甜的组合物包含一种或多种高强度甜味剂，其用量具有小于1.5％(w/v)蔗糖当量值的甜度，该方法包括提供包含一种或多种高强度甜味剂的组合物，并添加一种或多种低效力甜味剂。可以以任何顺序添加最终组合物的每种组分以获得期望的最终组合物。例如，该方法可以包括混合所述组分。

[0143] 例如，包含高强度甜味剂的增甜的组合物的一种或多种甜度特征的改善可以提供与蔗糖的甜度特征更相似的甜度特征。

[0144] 甜度特征可以指风味特征(味道特征)，其指的是给定化合物的风味强度和感知属性。甜味的示例性风味属性是甜味强度，苦味，黑甘草味等。

[0145] 甜度特征可以指时间特征(temporal profile)，其是指甜味的感知随时间的变化。每种甜味剂均表现出特征性的出现时间(AT)和消失时间(ET)。与碳水化合物甜味剂相比，大多数高效力甜味剂显示出延长的ET(逗留时间)。通常，检测到的蔗糖当量值峰值达到最大响应水平，然后随时间逐渐减小。逐渐减小的时间越长，则检测到的化合物的甜味逗留时间越持久。

[0146] 在某些实施方案中，所述一种或多种低效力甜味剂可用于减弱包含一种或多种高强度甜味剂的增甜组合物的逗留不去的甜味。换句话说，低效力甜味剂可用于减少包含一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的消失时间(ET)。这涉及在最初摄入或吐出组合物后甜味在口腔中的不期望的逗留时间。例如，逗留不去的甜味可以是指甜味在最初被检测到后甜味保留的时间长度，最初被检测到后甜味的强度降低或减退的速度如何以及最初被检测到后甜味的强度。例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以减少最初检测到后甜味保留的时间长度和/或增加最初被检测到后甜味降低的速度和/或降低最初被检测到后甜味的强度。

[0147] 在某些实施方案中，所述一种或多种低效力甜味剂可用于减弱包含所述一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的苦味和/或涩味和/或金属味和/或甘草味。术语“甘草”是指化合物的甜味。

[0148] 在某些实施方案中，所述一种或多种低效力甜味剂可用于增强包含所述一种或多种高强度甜味剂的增甜的组合物的甜味影响。甜味影响与最初检测到甜味之前花费的时间期限以及最初检测到甜味的强度相关。例如，所述一种或多种低效力甜味剂可以减少最初检测到甜味之前的时间期限和/或增加最初检测到甜味时的强度。

[0149] 本文所述的甜度和其它甜度特征可以由受过训练的专家的品尝小组来评价，例如，如以下实施例中所述。

[0150] 制备方法

[0151] 本文进一步提供了制备本文公开的组合物的方法。所述组合物可以为根据本文公开的任何实施方案。

[0152] 该方法可以包括以期望的比例组合期望的组成的每种组分，并任选地将所述组分混合在一起。所述组分可以以任何适合的顺序合并和混合。

[0153] 本领域技术人员将根据组合物的性质以及所期望的甜度的程度和特征的不同确定制备组合物的适合方法(例如，组合或混合各组分的适合的顺序)。例如，该方法可以包括提供期望的基础组合物并向其中添加甜味剂。

[0154] 本文公开的每种甜味剂可以通过合成方法或通过生物(例如酶)方法或发酵方法制备，或者可以从天然来源例如植物或果实中分离。

[0155] 例如，该方法可以包括使至少一种罗汉果醇前体底物与罗汉果苷路径酶(pathway enzyme)接触。该酶可以例如存在于细胞裂解物中，或者可以存在于宿主细胞(例如重组宿主细胞)中。例如，该酶可以为UGT酶(UDP-葡糖醛酸基转移酶)。

[0156] 例如，可以通过WO2013/076577或WO2014/086842中公开的生物合成路径制备罗汉果苷，其内容通过引用并入本文。

[0157] 例如，可以通过Itkin等人，“The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from Siraitia grosvenorii”，PNAS，2016年11月7日，E7619-E7628和WO2016/038617中公开的生物合成路径制备罗汉果苷V，其内容通过引用并入本文。

[0158] 例如，罗汉果苷化合物可以通过修饰(例如重新分配糖苷含量)另一种罗汉果苷化合物来制备。例如，可以通过使用WO2014/150127中公开的酸或酶重新分配另一种罗汉果苷的糖苷含量来制备罗汉果苷化合物，其内容通过引用并入本文。

[0159] 例如，该方法可以包括从植物或果实的天然来源中提取一种或多种甜味剂化合物。例如，这之后可以是纯化步骤，以产生高强度甜味剂、低强度甜味剂或甜味剂的混合物(例如高强度甜味剂的混合物，例如罗汉果苷的混合物)。例如，该提取物可以具有相对较高含量的罗汉果苷V和/或11-O-罗汉果苷V(例如至少约30wt％或至少约40wt％)。例如，这可以通过快速色谱法进行分馏。可以从罗汉果(Siraitia grosvenorii)果实中获得一种或多种罗汉果苷化合物(例如罗汉果苷V)。

[0160] 当使用发酵方法制备目标产物(例如目标罗汉果苷产物)时，可以使用适当的溶剂(例如庚烷)从含水发酵反应介质中提取目标，然后进行分馏。每个级分的化学组成可以通过GC/MS(气相色谱质谱法)定量测量。可以将级分共混以生成期望的罗汉果苷化合物(例如罗汉果苷V和11-O-罗汉果苷V)，以用于调味剂或其它用途。

[0161] 可以通过直接与参比罗汉果苷调味品(例如，从商品供应商处获得的现有天然调味品商业产品)进行比较来验证最终共混产品的可接受性。

实施例

[0162] 实施例1

[0163] 方法

[0164] 分析得自Blue California(Tomas，Rancho Santa Margarita，California)(提取

物4)、Azile LCC(Rolling Hills Est,California)(提取物1和2)和Chr.Olesen Group(Gentofte,Denmark)(提取物3)的罗汉果果实提取物以鉴定提取物中存在的化合物。

[0165] 通过将16.52μg样品溶解在25.0mL溶剂(乙腈/水20/80v/v)中来制备提取物的样品溶液。从该溶液中将100μL转移到HPLC样品瓶中,然后添加900μL溶剂(66.1ppm溶液)。从样品溶液中将10μL转移到HPLC样品瓶中,然后添加990μL溶剂(6.61ppm溶液)。在LC-MS上两次注入66.1和6.61ppm溶液。

[0166] 通过将9.22mg罗汉果苷V(得自AAPIN chemicals Ltd.,Oxfordshire,UK的98.5%罗汉果苷V)溶于10.0mL溶剂(乙腈/水20/80v/v)中制备罗汉果苷V的校准溶液(参比)。将该储备溶液存储在冰箱中,并用于制备不同浓度(0.11ppm、0.34ppm、1.02ppm、3.07ppm和9.22ppm)的罗汉果苷V溶液。也将这些溶液在LC-MS上注射两次。

[0167] 在40℃将每种溶液2μL注射在Acquity C18 BEH 1.7μm 150x2.1mm柱(Waters,Milford,Massachusetts,United States)上。使用乙腈和0.1%甲酸的水溶液的混合物洗脱化合物,从20%乙腈开始,直至50%乙腈,持续14分钟。使梯度在1分钟内恢复到初始值,并稳定5分钟。在整个运行过程中,将流量设置为400μL。

[0168] 使用液相色谱质谱法(LC/MS)检测洗脱的化合物。质谱仪在ESI负模下运行,测量范围为150-2000Amu,分辨率为70000。气体流速分别为夹套(sheath)60、辅助(aux)20和吹扫(sweep)3。将毛细管温度和辅助气体加热器温度分别设置为380℃和400℃。

[0169] 使用以下公式计算提取物中每种组分的%,并针对上述不同浓度的校准罗汉果苷V(参考)溶液的曲线进行校准。

[0170] $$比值 = \frac{面积 * V * d}{斜率 * SW} * 100$$

[0171] 比值=%组分

[0172] 面积=样品中的组分面积(来自2次注射的平均面积)

[0173] V=以升计的样品溶剂体积

[0174] d=样品稀释(从样品溶液至小瓶)

[0175] 斜率=来自具有b(截距)=0的罗汉果苷V校准曲线的斜率

[0176] SW=以mg计的样品重量

[0177] 结果

[0178] 图1显示罗汉果提取物(下表1的提取物2)的色谱图。

[0179] 表1显示4种不同的罗汉果提取物的组成。罗汉果苷V为全部4种提取物中具有最高浓度的罗汉果苷(在提取物1中约45wt%)。

[0180] 表 1.

保留时间(Rt)(分钟)	名称	提取物 1 中的浓度(wt%)	提取物 2 中的浓度(wt%)	提取物 3 中的浓度(wt%)	提取物 4 中的浓度(wt%)
1.99	罗汉果黄素 II	0.64	0.44	0.00	0.45
1.52	罗汉果黄素 I	1.38	0.84	0.00	0.62
7.44	11-O-罗汉果苷 II (I)	0.01	0.02	0.03	0.03
8.54	11-O-罗汉果苷 II (II)	0.01	0.01	0.01	0.01
9.51	11-O-罗汉果苷 II (III)	0.03	0.01	0.04	0.02
7.21	罗汉果苷 II (I)	0.04	0.08	0.11	0.14
8.43	罗汉果苷 II (II)	0.06	0.06	0.05	0.05
9.43	罗汉果苷 II (III)	0.51	0.20	0.53	0.27
9.24	11-脱羟基-罗汉果苷 III	0.04	0.02	0.03	0.01
5.97	11-O-罗汉果苷 III	0.22	0.11	0.19	0.09
6.20	罗汉果苷 III (I)	1.61	0.92	1.42	0.71
7.88	罗汉果苷 III (II)	0.29	0.24	0.27	0.28
5.13	赛门苷	1.84	1.81	2.95	2.20
5.30	罗汉果苷 IV (II)	0.42	0.50	0.51	0.88
5.67	罗汉果苷 IV (III)	2.18	1.91	3.19	2.31

[0181]

6.05	罗汉果苷 IV (IV)	0.09	0.08	0.14	0.10	
6.58	脱氧罗汉果苷 V (I)	1.30	1.42	1.54	1.36	
7.43	脱氧罗汉果苷 V (II)	0.38	0.38	0.39	0.32	
4.13	11-O-罗汉果苷 V (I)	4.99	4.70	4.89	4.97	
3.87	罗汉果苷 V 异构体	0.54	0.58	0.60	0.56	
4.54	罗汉果苷 V	45.42	43.88	43.94	41.67	
4.89	异-罗汉果苷 V	2.20	2.10	2.05	1.74	
2.08	7-O-罗汉果苷 V	0.19	0.15	0.15	0.18	
3.23	11-O-罗汉果苷 VI	0.33	0.27	0.26	0.25	
3.72	罗汉果苷 VI (I)	0.80	0.66	0.83	0.64	
3.93	罗汉果苷 VI (II)	0.66	0.52	0.40	0.43	
4.22	罗汉果苷 VI (III) (新罗汉果苷)	1.19	0.96	0.88	0.74	
4.67	罗汉果苷 VI (IV)	0.19	0.16	0.14	0.45	
	总计	67.58	63.04	65.57	61.50	

[0182] 实施例2

[0183] 方法

[0184] 通过反相(C-18)快速色谱法分级分离得自Azile LCC(Rolling Hills Est，California)的罗汉果果实提取物(上述实施例1的提取物)，其包含约68wt％的罗汉果苷。

[0185] 使用甲醇(MeOH)在水中的混合物洗脱化合物，从30％MeOH开始，然后是30-80％MeOH线性梯度，然后最终用80％MeOH冲洗柱。在整个分离过程中，以30ml/min的流速导入溶剂。用设置在210nm的UV检测器和日冕光散射检测器显示洗脱的化合物。使用上述实施例1中描述的方程计算提取物中每种组分的％。

[0186] 根据下表2将收集的级分合并，然后冷冻干燥成粉末。将相当于下表2中给出的各种合并级分的粉末以各种浓度溶解在5％的蔗糖上。由三名专家小组成员(经过培训的调味师)将这些样品的味道与5％蔗糖的对照进行比较。因此，确定了在5％蔗糖中显示的每个级分或级分池的甜度增强效果。

[0187] 结果

[0188] 结果如下表所示。将完整提取物采集成22个级分。级分1-10不包罗汉果苷V。

[0189] 表2.

[0190]

级分# (合并的)	罗汉果苷 V 含量(%)	级分的剂量 水平(ppm)	味道评价 (在 5%的蔗糖上)
1(试管 1-7)	0	15	该组中有些含糖味，多数也有发酵异味
2(试管 8-12)	0	15	
3(试管 13-16)	0	15	
4 (试管 17-20)	0	15	该部分中有一些涩味
5 (试管 21-24)	0	15	
6 (试管 25-28)	0	15	受到抑制的甜味
7 (试管 29-32)	0	15	苦味，金属味，发酵异味
8 (试管 33-34)	0	15	无增强

[0191]

9 (试管 35-36)	0	15	发酵，典型的白狗味，涩味，煮熟的延迟的甜味
10 (试管 37)	0	15	
11 (试管 38)	1.15	45	更甜，有些口感，有些前味
12 (试管 39)	15.9	45	增强效果略高，异味减少
13 (试管 40)	64.5	30	更甜，甘草味道更高，发酵的脏味更少，涩味稍高
14 (试管 41-42)	100	25	非常逗留不去的，非常甘草味，脏甜味，麻木感，明显甜味，口干
15 (试管 43-44)	97	25	强烈发酵脏味，较高甜味，麻木感延迟明显，强烈甘草味，逗留不去，金属味
16 (试管 45-46)	70.3	25	涩味，一些增强，大部分甘草味逗留不去
17 (试管 47)	18.7	45	
18 (试管 48)	4.6	45	
19 (试管 49)	1.95	45	负面的味道，典型的发酵的逗留不去的
20 (试管 50-51)	1.56	5	
21 (试管 52-54)	0	5	
22 (试管 55-最终)	0		

[0192] 级分1-10和19-22具有异味，这是罗汉果果实的特征，没有甜度增强影响。

[0193] 在主要包含罗汉果苷的级分12-17中观察到更好的甜度增强效果。当这些级分几乎都含有纯罗汉果苷V时，逗留不去的、脏发酵味更明显，例如级分14和15。因此，纯罗汉果苷V具有固有的逗留不去的异味。

[0194] 级分12是最纯净的甜味，但由于罗汉果苷V的百分比较小，因此前期甜味较低。级分13具有更好的甜味品质，但涩味略高。11-O-罗汉果苷V和罗汉果苷V是这两个级分中的两种主要罗汉果苷，但比值不同(F12罗汉果苷V:11-O-罗汉果苷V为4:9，且F13罗汉果苷V:11-O-罗汉果苷V为13:3)。

[0195] 罗汉果苷V非常甜，被鉴定比蔗糖甜425倍，而11-O-罗汉果苷V被评为比蔗糖甜84倍。

[0196] 实施例3

[0197] 方法

[0198] 将得自Azile LCC(Rolling Hills Est,California)的包含约68wt％罗汉果苷的罗汉果果实提取物(上述实施例1的提取物1)分级分离，并通过上述与实施例1相关的色谱

法测定每种级分的组成。

[0199] 将每个级分与5％蔗糖溶液混合，然后由三个专家小组成员(经过训练的调味师)将这些样品的味道与5％蔗糖的对照进行比较。

[0200] 结果

[0201] 表3显示提取物的级分11至20的化学组成。

[0202] 表 3.

保留时间(Rt)(分钟)	名称	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
1.99	罗汉果黄素 II	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
1.52	罗汉果黄素 I	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
7.44	11-O-罗汉果苷 II (I)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8.54	11-O-罗汉果苷 II (II)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01
9.51	11-O-罗汉果苷 II (III)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7.21	罗汉果苷 II (I)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8.43	罗汉果苷 II (II)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.10	0.06
9.43	罗汉果苷 II (III)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.03	0.03	0.04
9.24	11-脱羟基-罗汉果苷 III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5.97	11-O-罗汉果苷 III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.46	4.87	8.66	5.65
6.20	罗汉果苷 III (I)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.08	1.52	14.8	82.6
7.88	罗汉果苷 III (II)	0.04	0.06	0.04	0.02	0.02	0.03	0.05	0.05	0.04	0.12
5.13	罗汉果苷 IV (I)	0.01	0.01	0.05	0.63	4.27	17.5	21.2	5.99	1.03	0.25
5.30	罗汉果苷 IV (II)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.08	1.86	12.0	12.7	5.87	1.08
5.67	罗汉果苷 IV (III)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.00	19.2	64.3	86.7	36.6

[0203]

6.05	罗汉果苷 IV (IV)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	1.32	2.54	2.39
6.58	脱氧罗汉果苷 V (I)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.05	3.75
7.43	脱氧罗汉果苷 V (II)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
4.13	11-O-罗汉果苷 V (I)	22.1	35.5	14.2	1.97	0.22	0.17	0.19	0.13	0.11	0.10
3.87	罗汉果苷 V 异构体	5.54	4.68	1.14	0.11	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
4.54	罗汉果苷 V	1.14	15.9	64.5	104	97.5	70.8	18.7	4.59	1.95	1.56
4.89	异-罗汉果苷 V	0.03	0.18	1.24	3.88	6.86	9.19	3.38	0.70	0.14	0.11
2.08	7-O-罗汉果苷 V	0.02	0.00	0.04	0.04	0.06	0.05	0.02	0.01	0.00	0.00
3.23	11-O-罗汉果苷 VI	0.88	0.12	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.72	罗汉果苷 VI (I)	9.58	4.90	0.56	0.09	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
3.93	罗汉果苷 VI (II)	0.65	2.45	2.37	0.00	0.17	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01
4.22	罗汉果苷 VI (III) (新罗汉果苷)	0.80	3.96	4.77	2.01	0.00	0.15	0.07	0.04	0.03	0.03
4.67	罗汉果苷 VI (IV)	0.00	0.01	0.07	0.25	0.55	1.03	0.56	0.12	0.02	0.01
	总计	40.8	67.9	89.0	112.6	109.8	100.9	76.0	96.6	122.2	134.5

[0204] 表4显示级分12至15的品尝结果。该结果与实施例2中获得的结果相似。

[0205] 表4.

[0206]

级分	等甜水平 (ppm)	等甜品尝 注释	5%蔗糖品尝 注释
F12	45	最接近罗汉果提取物，较少的总体异味	增强略高，较少的异味，这是所有样品中最纯净的甜味，比罗汉果提取物的前期甜味少，除了较低的前期甜味印象之外，甜味品质良好。 与罗汉果提取物相比，其它级分具有不同的异味，但甜味品质却相当。 基本上，麻木/刺激作用比典型地在罗汉果提取物中的“湿狗”发酵作用更强
F13	30	极为接近的甜度，逗留不去	更甜，甘草味道更高，更少的脏发酵味，涩味稍高
F14	25	略微更甜，很可能会与罗汉果提取物的甜味等甜，比罗汉果提取物最终的脏味少	与罗汉果提取物相比，非常逗留不去，非常甘草味，肮甜味，甜味的总体质量较低，麻木感，明显甜味，口干，刺激性，逗留不去级分14和15具有明显的麻木感，烧灼感，这负面地影响甜味的效力和品质
F15	25	极为接近的特性，较少的异味	强烈的发酵脏味，较高的甜味，麻木感，延迟明显，强烈甘草味，逗留不去，金属味

[0207] 实施例4

[0208] 使用带有Phenomenex Luna C18(2)柱(5μm,210X 21.4mm)的Agilent 1100制备型HPLC系统从罗汉果的提取物中分离罗汉果苷V和11-O-罗汉果苷V,并且合并形成不同浓度的溶液。

[0209] 将这些溶液与含有5%(w/v)蔗糖和0.03%(w/v)柠檬酸的溶液合并,制成测试样品,并由五位专家的对甜味敏感的评估小组(经过训练的调味师)进行评价。

[0210] 结果如下表5中所示。

[0211] 表5.

[0212]

罗汉果苷含量	罗汉果苷V浓度(ppm)	11-O-罗汉果苷V浓度(ppm)	味道评价
罗汉果苷V	20	0	较少的甜味，较少的前味，发霉味，类似基料的味道
罗汉果苷V	25	0	良好影响，强烈逗留不去，金属味，木质味
罗汉果苷V	30	0	甜味逗留不去，涩味，适度甘草味，前味
11-O-罗汉果苷V	0	45	逗留不去，金属味，纯净成品，与罗汉果苷V不一样甜
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	20	3	甜味，肉桂味，逗留不去，木质味，果实甜味
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	20	5	轻度逗留不去，低甜味影响，涩味
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	20	8.5	逗留不去，略带果味，有口感，饱满感，果实甜味
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	25	3	优选的，像糖一样的影响，增加甜度
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	25	5	中等影响，苦味成品
罗汉果苷V+11-O-罗汉果苷V	25	8.5	更甜，略干，略微逗留不去，略带果味，最纯净，有口感
罗汉果提取物	45(罗汉果提取物总剂量水平)		纯净的影响，有些逗留不去，低甜味印象

[0213] 令人惊讶地发现，与单独的罗汉果苷V相比，将11-O-罗汉果苷V与罗汉果苷V共混改善甜味品质。与单独的罗汉果苷V相比，在罗汉果苷V之上的11-O-罗汉果苷V有助于减少甜味逗留时间(减弱后来的甜味)和减少涩味和苦味余味。因此，11-O-罗汉果苷V使甜味比单独的罗汉果苷V更类似于糖(即有助于提供更接近糖的时间特征)。这使得可以使用更高浓度的罗汉果苷V获得更高的甜度，同时消除了与使用更高浓度的这种甜味剂相关的缺点(例如，逗留不去，苦味和涩味余味)。鉴于罗汉果苷V是最有效的罗汉果苷甜味剂，而11-O-罗汉果苷V的效力低得多，这是令人惊讶的。

[0214] 实施例5

[0215] 对甜味敏感的小组将甜味剂混合物(“混合物1”)的溶液相对于一定浓度范围内的蔗糖溶液的甜度进行排名，以确定蔗糖当量值。混合物1是实施例2的级分11至18的组合，并

且包含8.16wt％11-O-罗汉果苷V和61.6wt％罗汉果苷V。

[0216] 结果如下表6中所示。

[0217] 表6.

[0218]

小组成员	35ppm 混合物 1	25ppm 混合物 1	30ppm 混合物 1	1% 蔗糖	1.5% 蔗糖
1	3	2	1	4	5
2	1	2	5	3	4
3	1	2	3	4	5
4	2	3	1	4	5
5	1	3	4	2	5
6	2	5	1	3	4
7	3	2	5	1	4
8	3	2	1	4	5
9	3	1	2	4	5
10	3	2	1	4	5
总计	22	24	24	33	47

[0219] 数据表明,混合物1具有小于1％蔗糖当量值的甜度(由七个小组成员确定),这被FEMA视为“本质上不是甜味”。因此,混合物1适用于指定浓度的甜度改良剂或共混物,因为在这些水平上没有任何可检测到的甜味。

[0220] 选择具有接近1％(35ppm)的等甜阈值的混合物1的浓度,并将其添加到5％(w/v)蔗糖溶液中。然后将该溶液相对于5、6、6.5和7％(w/v)蔗糖溶液进行排序。对45ppm的罗汉果提取物重复该过程。确定每种溶液的平均得分。结果如下表7中所示。

[0221] 表7.

[0222]

甜味剂	平均得分
混合物1(35ppm)	6.5
罗汉果提取物(45ppm)	6.4

[0223] 令人惊讶地发现,混合物1和罗汉果提取物起甜度增强剂的作用,因为加入了它们的5％(w/v)蔗糖溶液的甜度增加大于单独的甜味剂的甜度。

[0224] 由三人组成的专家小组(经过训练的调味师)在含有5％蔗糖和0.03％柠檬酸的溶液中测试了不同浓度的混合物1的味道。将该味道与实施例2中使用的罗汉果提取物(得自Azile LCC(Rolling Hills Est,California)(上述实施例1的提取物1)并且含有约68wt％罗汉果苷)(与5％蔗糖和0.03％柠檬酸溶液合并)进行比较。结果如表8中所示。

[0225] 表8.

[0226]

样品	小组成员 1	小组成员 2	小组成员 3
罗汉果提取物 (45ppm)	更甜，圆润，稍逗留不去	良好影响，低沉重感 (baggage)	最圆润的甜度特征
混合物 1 (35ppm)	逗留不去，甜味	最甜，逗留不去	维生素味道，氧化的味道，总体最甜

[0227]

混合物 1 (30ppm)	更甜	甜味较低，最少的沉重感	纯净甜味
混合物 1 (25ppm)	甜味略低	逗留不去，纯净，甜味最低	纯净甜味

[0228] 总之，混合物1提供了比罗汉果提取物更好的甜味品质(较少的沉重感，更甜)。

[0229] 实施例6

[0230] 一个对甜味敏感的小组将不同甜味剂(罗汉果苷V、罗汉果苷IV、赛门苷、新罗汉果苷、11-O-罗汉果苷V)的溶液的甜度相对于一定浓度范围内的蔗糖溶液进行排序，以确定蔗糖当量值。使用带有Phenomenex Luna C18(2)柱(5μm，210X 21.4mm)的Agilent 1100制备型HPLC系统获得甜味剂。结果如表9至13中所示。

[0231] 表9.

[0232]

小组成员	0.5% 蔗糖	20ppm 罗汉果苷 V	1% 蔗糖	25ppm 罗汉果苷 V	1.5% 蔗糖
1	3	1	4	2	5
2	1	3	2	4	5
3	1	2	4	3	5
4	1	2	4	3	5
5	1	2	3	4	5
6	1	3	2	5	4
总计	8	13	19	21	29

[0233] 表10.

[0234]

小组成员	25ppm 罗汉果苷 IV	蔗糖 0.5%	30ppm 罗汉果苷 IV	蔗糖 1%	蔗糖 1.5%
1	3	1	4	2	5
2	2	3	1	4	5

[0235]

3	1	2	3	4	5
4	2	4	3	1	5
5	2	1	3	4	5
6	1	2	3	4	5
7	2	1	3	4	5
总计	13	14	20	23	35

[0236] 表11.

[0237]

小组 成员	蔗糖 0.5%	赛门苷 20ppm	赛门苷 25ppm	蔗糖 1%	蔗糖 1.5%
1	1	4	3	2	5
2	1	3	2	4	5
3	2	1	3	4	5
4	1	4	2	3	5
5	1	2	4	3	5
6	1	3	2	4	5
7	1	2	3	4	5
总计	8	19	19	24	35

[0238] 表12.

[0239]

小组 成员	蔗糖 0.5%	蔗糖 1%	罗汉果苷 V (25ppm) + 11-O-罗汉果苷 V (3ppm)	蔗糖 1.5%
1	1	2	3	4
2	3	2	1	4
3	1	3	2	4
4	1	2	4	3
5	1	2	3	4
6	1	3	2	4
7	1	3	2	4

[0240]

总计	9	17	17	27

[0241] 表13.

[0242]

小组成员	0.5%蔗糖	25ppm新罗汉果苷	30ppm新罗汉果苷	1%蔗糖	1.5%蔗糖
1	1	4	2	3	5
2	3	1	2	4	5
3	2	1	3	4	5
4	1	2	4	3	5
5	3	1	5	2	4
6	1	2	4	3	5
7	2	1	3	4	5
8	1	2	3	4	5
9	1	2	3	4	5
总计	15	16	29	31	44

[0243] 数据表明,罗汉果苷V(25ppm)、罗汉果苷IV(30ppm)、赛门苷(25ppm)、罗汉果苷V(25ppm)与11-O-罗汉果苷V(3ppm)和新罗汉果苷(30ppm)组合均具有低于1.5%蔗糖当量值的甜度(由七个小组成员确定),这被FEMA视为“本质上不是甜味”。因此,这些化合物和混合物在指定浓度下可用作甜度改良剂,因为它们在这些水平上没有任何可检测到的甜味。

[0244] 选择具有接近1%的等甜阈值的测试甜味剂浓度,并添加到5%(w/v)蔗糖溶液中。然后将这些溶液相对于5、6、6.5和7%(w/v)蔗糖溶液进行排序。确定每种溶液的平均得分。结果如下表14中所示。

[0245] 表14.

[0246]

甜味剂	平均得分
罗汉果苷 V (25ppm)	6.2
罗汉果苷 IV (30ppm)	6.2

[0247]

赛门苷 (25ppm)	6.4
新罗汉果苷(30ppm)	6.35

[0248] 令人惊讶地发现,罗汉果苷V、赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷V起到甜度增强剂的作用,因为添加了它们的5%(w/v)蔗糖溶液的甜度增加大于单独的甜味剂的甜度。

[0249] 由三人组成的专家小组(经过训练的调味师)在包含5%蔗糖和0.03%柠檬酸的溶液中测试了这些甜味剂的味道。将该味道与实施例2中使用的罗汉果提取物)(上述实施例1的提取物1)并且含有68wt%罗汉果苷)进行比较。当添加到5%蔗糖和0.03%柠檬酸中时,罗汉果苷IV、赛门苷和新罗汉果苷在甜味品质方面均优于罗汉果提取物。这3种化合物提供了类似糖的味道,并具有较少的逗留不去的甜味。将赛门苷描述为“具有更甜的整体感,更甜,更圆润,略带前味和更持久的甜味”。将罗汉果苷IV描述为“具有良好和与罗汉果苷V相

似的甜味”。将新罗汉果苷描述为具有“甜味，但略带苦味余味”。罗汉果苷V的结果如表15中所示。

[0250] 表15.

[0251]

样品	描述
罗汉果提取物 (45ppm)	涩味，更丰满的甜味，强度较低，中度甜味，逗留不去的余味，更甜，果味
80%罗汉果苷 V (20ppm)	更涩，更酸，余味更多，缺少前味的饱满感，平坦，最接近慢板(Largo)，略带酸味
80%罗汉果苷 V (25ppm)	最甜，酸味，比#2 略强烈，总体更甜，比慢板更甜美，逗留不去

[0252] 通常，品尝者一致认为80％罗汉果苷V与罗汉果提取物不具有相同的丰满圆润的甜度特征。当应用于糖/酸/水溶液时，80％罗汉果苷V的品尝味道更酸。

[0253] 实施例7

[0254] 方法

[0255] 使用带有Phenomenex Luna C18(2)柱(5μm，210X 21.4mm)的Agilent 1100制备型HPLC系统得到罗汉果苷V、赛门苷、罗汉果苷IV和新罗汉果苷。

[0256] 将罗汉果苷V、赛门苷、罗汉果苷IV和新罗汉果苷各自添加到包含5％蔗糖和0.03％柠檬酸的溶液中，浓度分别为25ppm(罗汉果苷V)、25ppm(赛门苷)、30ppm(罗汉果苷IV)和30ppm(新罗汉果苷)。

[0257] 由七人组成的专家小组品尝了这些测试溶液。对于甜味的各个方面(前期甜味，总体甜味，逗留不去的甜味，涩味，挥发性异味)，与基础溶液(5％蔗糖和0.03％柠檬酸的溶液)相比，每个小组成员都对测试溶液进行了评分。

[0258] 得分为0表示味道方面相同，1表示稍高，2表示较高，3表示高得多，-1表示略低，-2表示较低，-3表示低得多。计算每种味道方面每种测试溶液的平均得分。结果如下表16中所示。

[0259] 表16.

[0260]

	罗汉果苷V	赛门苷	罗汉果苷IV	新罗汉果苷
总体甜味	1	1.8	0.4	1.4
前期甜味	0.8	1.4	0.4	1
逗留不去的甜味	0.4	0.6	0	0.4
涩味	0	0.4	0	0
挥发性异味	0	0.2	0	0

[0261] 实施例8

[0262] 如上所述，与罗汉果苷V相比，在5％蔗糖和0.03％柠檬酸上的赛门苷、新罗汉果苷和罗汉果苷IV均具有类似或更好的甜味品质。因此，如表17所示，评价了11-0-罗汉果苷V与这些罗汉果苷的每一种的味道。

[0263] 表17.

[0264]

罗汉果苷含量	赛门苷 浓度(ppm)	11-O 罗汉果苷 V 浓度(ppm)
赛门苷	25	0
赛门苷 + 11-O 罗汉果苷 V	25	3
赛门苷 + 11-O-罗汉果苷 V	25	5
赛门苷 + 11-O-罗汉果苷 V	25	8.5
	罗汉果苷 IV 浓度(ppm)	11-O 罗汉果苷 V 浓度 (ppm)
罗汉果苷 IV	30	0
罗汉果苷 IV+ 11-O-罗汉果苷 V	30	3
罗汉果苷 IV + 11-O-罗汉果苷 V	30	5
罗汉果苷 IV +11-O-罗汉果苷 V	30	8.5
	新罗汉果苷 浓度(ppm)	11-O-罗汉果苷 V 浓度(ppm)
新罗汉果苷	30	0
新罗汉果苷+11-O 罗汉果苷 V	30	3
新罗汉果苷+11-O-罗汉果苷 V	30	5
新罗汉果苷+11-O-罗汉果苷 V	30	8.5

[0265] 实施例9

[0266] 如表18中所示,评价了在各种牛奶或酸奶基料中添加和不添加11-O-罗汉果苷V的罗汉果苷V的味道。还评价了牛奶和酸奶中罗汉果苷V的等甜阈值。

[0267] 牛奶基料(2%脂肪)包括2%脂肪奶和5%蔗糖。脱脂酸奶基料包括普通的脱脂酸奶和5%蔗糖。全脂酸奶基料包括普通的全脂酸奶和5%蔗糖。由于脂肪、蛋白质和其它成分,较高的剂量水平用于牛奶和酸奶组合物。罗汉果提取物以75ppm用于这些应用。

[0268] 表18.

[0269]

罗汉果苷含量	罗汉果苷 浓度(ppm)	11-O 罗汉果苷 V 浓度(ppm)
罗汉果苷 V	40	0
罗汉果苷 V + 11-O 罗汉果苷 V	40	5
罗汉果苷 V + 11-O-罗汉果苷 V	40	10
罗汉果苷 V + 11-O-罗汉果苷 V	40	15

[0270] 实施例10

[0271] 来自罗汉果的新的次要葫芦烷糖苷的鉴定。

[0272] 引言

[0273] 罗汉果(Siraitia grosvenorii)(Swingle)C.Jeffrey ex Lu et Z.Y.Zhang是中国南部和泰国北部特有的葫芦科(Cucurbitaceae)多年生草本植物。罗汉果的果实,通常被称为“罗汉果”,在许多国家作为传统中药用于治疗呼吸道感染,支气管炎,胃炎,便秘等。现代药理研究已证实罗汉果提取物或其组分具有多种生物活性,例如抗菌,抗微生物,抗糖尿病,抗癌和免疫刺激作用[1]。罗汉果在中国已被用作食品和饮料中的甜味剂。目前,它是全世界最知名的天然高强度甜味剂之一。自从发现葫芦烷糖苷罗汉果苷V作为罗汉果的甜味成分以来,迄今已报道来自罗汉果的40多种葫芦烷三萜类化合物[1-4]。食品和调味品行业的研究人员一直在积极发现中并添加入罗汉果苷池更多新化合物,以发现具有更好甜味性能的新罗汉果苷[5-7]。具有已知更好的甜味性能的已知天然甜味剂类别下的新分子已成为食品和调味品行业的抢手货。莱鲍迪苷M(也称为莱鲍迪苷X)的商业化就是一个很好的例子。即使其为2010年发现的来自甜叶菊的次要天然产物(小于0.1%),由于植物生物学、分子生物学和酶工程技术的发展降低了成本,莱鲍迪苷M也迅速进入了商业化阶段[8,9]。2013年、2014年和2017年,莱鲍迪苷M从美国FDA收到了关于其一般公认安全(GRAS)状态的无异议书(GRN第473、512和667号)[10-12]。

[0274] 我们一直在进行调查,以寻求通过使用商品罗汉果提取物的最佳性能的罗汉果苷或它们的组合[13]。在本文中,我们报道了来自罗汉果的两个新的次要葫芦烷糖苷,并强调了我们基于具有不同混合时间的HSQC-TOCSY实验的新的寡糖阐明策略。

[0275] 材料和方法

[0276] 通用实验方法

[0277] 用Rudolph Autopol IV旋光仪测量旋光度。将NMR光谱在Bruker DRX Avance 300或500光谱仪上记录。化学位移以δ(ppm)给出,表示残留溶剂峰。低压色谱法是使用Biotage Flash System SP1进行。制备型HPLC使用配备Phenomenex Lunar C18(2)柱(5μm,210x 21.4mm)或TSKgel Amide-80(5μm,300x 21.5mm)(Tosoh Bioscience LLC)的Agilent 1100制备型HPLC系统进行。在配备有ESA Corona CAD检测器的Agilent 1100分析型HPLC系统上进行分析型HPLC。使用偶联Waters 2795分离模块的Waters Q-Tof微型质谱仪进行LC-MS分析。

[0278] 植物材料

[0279] 罗汉果提取物(商品名Swingle,～60%罗汉果苷)购自Blue California Co.,Ltd。

[0280] 探测仪器

[0281] 色谱条件:使用Waters Acquity H UPLC进行色谱。在25C使用1.0×100mm,Acquity UPLC HSS T3柱(Waters)进行分离,其中粒径为1.8mm,其配备0.2mm预过滤器。溶剂A为水且溶剂B为乙腈,两种溶剂均包含0.1%甲酸。将注射体积设定至10μl。色谱流速为200μl/min。使用如下线性梯度从LC柱上洗脱样品(曲线编号6):0-40min:90%A-30%A;40-45min:30-10%A;45-50min:10%A;50-51min 10%-90%A,51-55min 90%A用于再平衡。

[0282] 质谱

[0283] U-HPLC系统与混合四极杆正交飞行时间(TOF)质谱仪(SYNAPT G2 HDMS,Waters MS Technologies,Manchester,UK)耦合。质谱仪以正电喷雾电离模式(ESI^+)操作。优化了

样品锥孔电压40，毛细管电压0.7kv，源温度40℃，脱溶剂温度450℃，脱溶剂气体流速800L/h和锥孔气体流速50L/h。亮氨酸脑啡肽用作m/z 556.2771的锁定质量[M+H]⁻。甲酸钠溶液用于外部仪器校准。

[0284] 纯化

[0285] 将3g罗汉果提取物溶于15mL水中，并加载到预先平衡的C-18Snap柱上(KP-C18-HS，120g，132mL柱体积)。使用的梯度体系(A：水；B：甲醇)为：30％2CV，30％～80％10CV，80％～100％2CV，100％2CV。流速为30mL/min。每管收集级分27mL。将总计12g罗汉果的四个加料分级分离。通过分析型HPLC分析所有级分，以定位具有目标罗汉果苷的级分(等度流动相：水中24％乙腈。柱：Luna C18 5μm 4.6×150mm)。将具有异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V的级分36-38合并以蒸发溶剂。对级分36-38的进一步制备型HPLC纯化得到异-罗汉果苷VI(1，22mg)和11-表-罗汉果苷V(2，17mg)(24％乙腈水溶液，10mL/min，保留时间分别为13.1min和14.3min)。11-氧代-罗汉果苷V(4)和新罗汉果苷(3)主要存在于39-40的闪蒸级分中，其中11-氧代-罗汉果苷V为主要组分。在反相C-18制备型HPLC上，新罗汉果苷作为11-氧代-罗汉果苷的尾肩出现(在水中的24％乙腈，10mL/min，保留时间分别为17.0min和18.0min)。收集峰前得到105mg化合物11-氧代-罗汉果苷V(4)。通过在TSKgel Amide-80上进行制备型HPLC(65％乙腈水溶液，20mL/min，rt15.5min)进一步纯化肩位的新罗汉果苷(3，15mg)。

[0286] 异-罗汉果苷VI(1)：白色无定形粉末；$[\alpha]^{20}_{D}$-8.2(c 0.12，MeOH)；对于^{1}H NMR和^{13}C光谱数据，参见表1；-HRESIMS：m/z 1449.7075[M+H]⁻(计算值$C_{66}H_{113}O_{34}$，1447.7113，Δ2.6ppm)。

[0287] 表-罗汉果苷V(2)：白色无定形粉末；$[\alpha]^{20}_{D}$+4.5(c 0.13，MeOH)；对于^{1}H NMR和^{13}C光谱数据，参见表1；HRESIMS：m/z1287.6558[M+H]⁻(计算值$C_{60}H_{103}O_{29}$，1287.6585，Δ2.1ppm)。

[0288] 糖的酸水解和绝对构型的测定

[0289] 将化合物1(1.2mg)或2(1.8mg)在1mL 1M HCl中于80℃培育3小时。水解后，用EtOAc(1mL×3)萃取溶液。通过吹入氮气并冷冻干燥蒸发剩余的水溶液。残留物中糖的绝对构型通过其O-甲硅烷基化衍生物的GC-MS分析并与D-葡萄糖和L-葡萄糖标准品的衍生物进行比较来确定。简言之，将糖残基，D-葡萄糖(2mg)或L-葡萄糖(2mg)溶于吡啶(0.5mL)。将在吡啶(0.5mL)中的0.1M L-半胱氨酸甲酯盐酸盐(Aldrich，Milwaukee，WI)加入溶液中。将混合物在60℃下保持2小时，并通过吹入氮气干燥。向残余物中加入1-三甲基甲硅烷基咪唑(Fluka，Buchs，Switzerland)(0.5mL)，并在60℃下培育1小时。通过加入正己烷和水(各1.0mL)分配该混合物。在以下条件下通过GC-MS分析正己烷萃取物：毛细管柱HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm，Agilent)；柱温以5℃/min的速度从180到230℃；注射温度250℃；载体，氦气；分离比20:1。显示D-葡萄糖和L-葡萄糖的O-甲硅烷基化衍生物的保留时间分别为16.02和16.39min。通过比较保留时间和共色谱，将酸水解1和2后的糖残基确定为D-葡萄糖。

[0290] 用$NaBH_4$还原11-氧代罗汉果苷V

[0291] 将25mg 11-氧代-罗汉果苷V(4)溶于50％二噁烷，并添加20mg $NaBH_4$并在50℃下加热3天。通过HPLC定期分析反应混合物以监测反应进程。反应后，将混合物用乙酸酸化，并通过吹入氮气浓缩至干。将残余物重新溶解在水中，并通过预先平衡的C-18SPE柱。浓缩来

自SPE柱的甲醇洗脱液。然后通过半制备型HPLC分离残余物。通过LC-MS分析和分析型HPLC上的共色谱法，两种还原产物具有与分离的罗汉果苷V和11-表-罗汉果苷V相同的保留时间和分子量。1-D和2-D NMR数据还证实了两种还原产物的结构为罗汉果苷V和11-表-罗汉果苷V。

[0292] 结果和讨论

[0293] 异-罗汉果苷VI(1)和11-表-罗汉果苷V(2)的分离和阐明

[0294] 在通过LC-MS研究含有60％罗汉果苷的商品罗汉果提取物的过程中，提取物中的几种含有6或5个糖部分的罗汉果苷引起了我们的注意(图2和3)。由于几乎没有关于罗汉果苷V和VI异构体的甜味性质的报道，我们决定纯化和鉴定这些异构体以进行评价。根据通用Corona检测器，将提取物中1、2、3和4的浓度分别估计为0.8％、0.5％、0.6％、4.9％。在快速色谱系统上分级分离，然后进行制备型HPLC纯化后，纯化了四种目标罗汉果苷1-4，并确定为异-罗汉果苷VI(1)、11-表-罗汉果苷V(2)、新罗汉果苷(3)、11-氧代-罗汉果苷V(4)。

[0295] 通过其HR-ESI-MS光谱数据([M-H]$^-$ m/z，1447.6957，计算值$C_{66}H_{111}O_{34}$，1447.6957)推导1的分子式为$C_{66}H_{112}O_{34}$。1的NMR光谱数据启示六糖三萜皂苷的结构：66个碳中的30个分配给三萜糖苷配基，而66个碳中的36个分配给六个己糖部分。1的^{13}C和^1H NMR谱图显示了七个单重峰叔甲基、一个二重峰仲甲基和一个烯烃次甲基的信号(表19)，这启示典型的(24R)-葫芦-5-烯-3β,11α,24,25-四醇罗汉果醇糖苷配基。通过对其^1H、^{13}C和2D(COSY，TOCSY，HSQC和NOESY)NMR数据进行深入分析，并与罗汉果苷V标准品的NMR数据进行比较，进一步证实了1的罗汉果醇糖苷配基。

[0296] 表19.异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V的^1H NMR和^{13}C NMR光谱数据(吡啶-d_5/D_2O 10:1中的^1H 300MHz和^{13}C 75MHz)

[0297]

	异-罗汉果苷 VI		11-表-罗汉果苷 V	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	1.93，2.86	26.9	1.68，1.93	24.8
2	2.20，2.38	29.5	1.92，2.42	29.6
3	3.65 (brs，7.5)	87.6	3.68 (brs，7.8)	87.5
4	-	42.4	-	42.1
5	-	144.5	-	143.2
6	5.45 (d，4.8)	118.5	5.47 (d，6.6)	119.4
7	1.65，2.27	24.6	1.64，2.22	26.1
8	1.59	43.6	1.99	40.9
9	-	40.2	-	40.3

[0298]

10	2.80 (brd，13)	36.7	2.09	40.1
11	4.15	77.8	4.05	72.5
12	2.12	40.8	1.99，2.15	39.4
13	-	47.5	-	46.0
14	-	49.8	-	50.0
15	1.03，1.10	34.7	1.16	35.5
16	1.40，2.05	28.6	1.40，2.10	28.6
17	1.72	51.0	1.65	51.7
18	0.86 s	17.1	1.29 s	18.3
19	1.28 s	26.3	1.25 s	23.2
20	1.46	36.5	1.56	36.8
21	1.04 (d，6.2)	19.2	1.13 (d，5.9)	19.3
22	1.67，1.83	33.4	1.69，1.95	33.6
23	1.53，1.84	29.5	1.56，1.85	29.5
24	3.71 (d，8.2)	92.3	3.71 (d，8.6)	92.6
25	-	72.9	-	73.0
26	1.29 s	26.9	1.30 s	27.2
27	1.41 s	24.6	1.44 s	24.9
28	1.14 s	27.8	1.03 s	28.4
29	1.45 s	26.2	1.46 s	26.5
30	0.88 s	19.5	0.81 s	18.4

[0299]

	异-罗汉果苷 VI		11-表-罗汉果苷 V	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
Glc-I				
1	4.73 (d，7.9)	106.8	4.77 (d，7.9)	106.6
2	3.86	75.1	3.89	75
3	4.11	77.8	4.18	77.6

[0300]

4	3.99	71.4	3.93	71.1
5	4.01	77.2	4	76.9
6	4.26，4.69	70.1	4.26，4.73	69.7
Glc-II				
1	5.10 (d，7.8)	105.1	5.10 (d，7.8)	104.8
2	3.99	75.0	3.99	74.7
3	4.22	77.8	4.15	77.7
4	3.96	71.5	3.9	71.4
5	4.11	78.0	4.16	78.0
6	4.26，4.47	62.5	4.26，4.47	62.3
Glc-III				
1	4.85 (d，7.5)	103.6591	4.85 (d，7.5)	103.5
2	4.12	81.6	4.22	80.9
3	4.21	78.3	4.23	78.3
4	3.93	71.4	3.99	70.9
5	4.01	76.4	4.02	76.1
6	3.92，4.81	70.0	3.90，4.80	69.7
Glc-IV				
1	4.78 (d，7.5)	104.6	4.78 (d，7.5)	104.3
2	3.95	74.5	3.99	74.9
3	4.18	77.7	4.21	77.7
4	3.87	71.2	3.91	71
5	4.00	78.2	4.13	77.8
6	4.26，4.47	62.4	4.26，4.47	62.1
Glc-V				
1	5.43 (d，7.8)	104.7	5.50 (d，7.8)	104.5
2	4.05	75.4	4	75.4
3	4.14	76.4	4.15	77.9

[0301]

4	4.14	82.0	3.92	72.0
5	3.86	76.5	4.02	78.0
6	4.25，4.42	62.6	4.25，4.52	62.9
Glc-VI				
1	5.03 (d，7.7)	104.8		
2	3.99	74.6		
3	4.16	77.7		
4	3.94	71.3		
5	4.07	77.9		
6	4.37，4.44	62.3		

[0302] 1的水溶性酸水解产物的GC-MS分析表明，D-葡萄糖是1的结构中唯一的单糖。HSQC光谱清楚地显示了6个葡糖基的异头交叉峰：Glc-I(δ_C 106.8和δ_H 4.73)，Glc-II(δ_C 105.1和δ_H 5.10)，Glc-III(δ_C103.7和δ_H 4.85)，Glc-IV(δ_C 104.6和δ_H 4.78)，Glc-V(δ_C 104.7和δ_H5.43)，Glc-VI(δ_C 104.8和δ_H 5.03)。从它们的异头质子偶合常数$^3J_{H1,H2}$确定所有六个吡喃葡萄糖基的立体化学是β构型。通过使用100ms的混合时间的HSQC-TOCSY实验(hsqcgpmlph)，可将吡喃葡糖基碳信号分为6组(图4)。寡糖的阐明从葫芦烷糖苷配基的C-3处连接的吡喃葡萄糖基开始。根据其异头质子(δ_H 4.73，d，J＝7.9Hz)与糖苷配基C-3(δ_C 87.6)的HMBC相关性和Glc-I H-1和糖苷配基H-3的NOESY相关性，确定Glc-1与糖苷配基C-3的连接。由HSQC-TOCSY确定的Glc-1的^{13}C信号(δ_C 75.1，77.8，71.4，77.2，70.1)在δ_C 62附近错过了一个典型的C-6碳信号。Glc-I C-6(δ_C 70.1)的低场位移表明在该位置糖基化。通过比较HSQC-TOCSY光谱(hsqcgpmlph)与从10、30、60和100ms增加的混合时间，可以观察到磁化传递从C-2逐渐扩展到C-6(图4)。如图4所示，HSQC-TOCSY在10ms混合时间下显示了吡喃葡萄糖基H-1和C-2的相关性。在30ms的混合时间下，除了H-1和C-2相关性之外，还出现了H-1和C-3的相关性。在60ms以下，由HSQC-TOCSY相关性指示的碳链延伸至C-4。在100ms内可以观察到H-1与C-2到C-6的完全HSQC-TOCSY相关性。因此，可以明确分配C-2至C-6的信号。通过异头Glc-II H-1(δ_H5.10，d，J＝7.8Hz)与Glc-I C-6(δ_C 70.1)的HMBC相关性建立了Glc-II与Glc-1的连接。Glc-II(δ_C 75.0，77.8，71.5，78.0，62.5)的^{13}C信号启示在Glc-II上没有糖基化。作为结果，糖苷配基C-3上的糖链被提供为3-O-(β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基。

[0303] 异头质子(δ_H 4.85，d，J＝7.5Hz)与糖苷配基碳信号(δ_C 92.3)的HMBC相关性表明Glc-III H-1与糖苷配基C-24的连接。Glc-III(δ_C81.6，78.3，71.4，76.4，70.0)的^{13}C模式启示C-2和C-6糖基化位移。对具有10、30、60和100ms混合时间的HSQC-TOCSY的分析导致了C-2和C-6低场位移的顺序分配和确认。从其H-1(δ_H 4.78，d，J＝7.5Hz)HMBC与Glc-III(δ_C 70.0)的C-6的相关性确定Glc-IV与Glc-III的C-6连接。Glc-IV是规则的末端吡喃葡萄糖基，没有任何取代(δ_C 74.5，77.7，71.2，78.2，62.4)。通过异头Glc-V H-1(δ_H5.43，d，J＝7.8Hz)与Glc-III C-2(δ_C 81.6)的HMBC相关性，建立了Glc-V与Glc-III的C-2的连接。Glc-

V H-1(δ_H 5.43)的相对低场位移与在先具有类似结构的报道一致。在Glc-V信号组中(δ_C 104.7,75.4,76.4,82.0,76.5,62.6)通常在δ_C 70-71处C-4的^{13}C化学位移丢失,这启示C-4处存在糖基化。通过以10、30、60和100ms的混合时间观察来自HSQC-TOCSY的C-2至C-6分程传递,可以清楚地将δ_C 82.0分配给Glc-V的C-4(图4)。Glc-V(δ_C 82.0)的C-4和Glc-VI(δ_H 5.03,d,J=7.7Hz)的H-1之间的HMBC交叉峰进一步证实了Glc-VI在此位置与Glc-V连接。Glc-VI是末端的吡喃葡萄糖基,没有进一步的糖分支。根据上述证据,将异-罗汉果苷(1)的结构指定为3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-罗汉果醇-24-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)]-β-D-吡喃葡萄糖基。

[0304] 根据其HR-ESI-MS数据([M-H]$^-$m/z,1285.6429),将化合物2的分子式指定为$C_{60}H_{102}O_{29}$。2的寡糖部分的NMR数据与罗汉果苷V的NMR数据重叠。包括HSQC、HMBC、NOESY、COSY和HSQC-TOCSY在内的详细2-D NMR实验证实,2具有与罗汉果苷V相同的糖部分。然后将注意力转向糖苷配基NMR数据。C-11与H_3-19之间的HMBC相关性揭示出,与罗汉果苷V(δ_C 77.8)相比,C-11(δ_C 72.5)有明显的高场位移。通过2-D NMR实验对糖苷配基数据的进一步分配显示,与罗汉果苷V(表19)的数据相比时,C-8、C-10和C-12上发生了主要的^{13}C化学位移变化。这启示在C-11处是β-OH而不是α-OH。通过H-8与H_3-18,19;H-10与H_3-28,H_3-30;H-11与H_3-30;H-17与H_3-30之间的NOE相关性进一步建立2的β-OH立体结构。在先报道了一种天然的11-β-OH葫芦烷和一种半合成的11-β-OH葫芦烷[14,15]。化合物2糖苷配基的^{13}C NMR数据与在吡啶-d_6中记录的半合成11-β-OH葫芦烷糖苷的数据非常匹配[14]。Matsuda等人在甲醇-d_4中获得了天然11-β-OH葫芦烷的^{13}C NMR数据,并且在C-11、C-8、C-10和C-12的化学位移方面差异很大[15]。为进一步证实2的11-β-OH结构,可通过将11-氧代-罗汉果苷V(4)化学还原为罗汉果苷V的11-β-OH和11-α-OH异构体进行2的半合成。通过LC-MS、HPLC共色谱法和NMR数据分析,确定半合成的11-表-罗汉果苷V与分离的11-表-罗汉果苷V相同。因此,将11-表-罗汉果苷V(2)的结构阐明为3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-11β-OH-罗汉果醇-24-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)]-β-D-吡喃葡萄糖基。根据我们的知识,这是天然的具有11-β羟基的罗汉果苷的首次报道。

[0305] 具有不同混合时间的用于寡糖链阐明的HSQC-TOCSY。

[0306] Gheysen等人研究了具有不同混合时间的TOCSY实验,得出100ms作为区分D-葡萄糖、D-半乳糖和D-甘露糖的最佳自旋锁定时间的结论[16]。通过他们的结果,我们注意到自旋锁定时间可能会显著影响D-葡萄糖H-1的磁化传递效率。随着自旋锁定时间的增加,H-1与H-2到H-6之间的相关性逐渐扩展到H-6。从他们的研究中得到启示,我们推断通过增加HSQC-TOCSY的自旋锁定时间,我们应当能够观察到随着磁化传递链的延伸葡萄糖H-1与C-2到C-6的相关性逐渐从C-2扩展到C-6。具有旋转锁定时间增加的HSQC-TOCSY应告知碳序列信息,这对于寡糖的阐明和分配非常有用。图4显示了异-罗汉果苷VI的HSQC-TOCSY(hsqcgpmlph),混合时间为10、30、60和100ms。图4中的交叉峰通过其积分进行量化,并在图5中进行比较。在某些情况下,峰强度(由积分表示)可能表示其与H-1的距离。例如,在30ms混合时间实验下,所有C-3峰均明显弱于C-2峰。但是,在60ms下,C-3峰变得比C-2峰大。为确保正确阐明,应通过所有具有不同混合时间的HSQC-TOCSY光谱的概览来确定碳序列,而不仅是通过一个混合时间下的峰强度来确定。

[0307] 传统上，皂苷的NMR阐明和糖链分配从与糖苷配基连接的糖开始。通过HMBC或NOESY，可以鉴定分辨率良好的异头H-1和C-1。然后，通过COSY相关性和匹配的$^{3}J(H,H)$偶合常数，可以分配单糖的质子信号。由于大的偶合常数(>7Hz)通常表示轴向-中纬线或中纬线-中纬线的C-H键两个相邻的轴向C-H键和小的偶合常数(<4Hz)，因此可以确定单糖的类型。NOE相关性对于确认轴向-轴向、轴向-中纬线或中纬线-中纬线关系的立体化学是有用的。糖的碳信号(C-2至C-6)根据HSQC或HMQC进行分配。HSQC/HMQC确定的碳信号化学位移是确认单糖类型的非常重要的信息，因为不同类型单糖的C-1至C-6化学位移的模式是特征性且一致的。通过观察碳化学位移的变化，可以鉴定糖链上的糖基化位置，并通过HMBC相关性进一步确认。总之，阐明皂苷糖的传统方式在于:HMBC→C-1，H-1→COSY→H-2至H-6→HSQC/HMQC→C-2至C-6，然后通过偶合常数分析和NOESY实验辅助和证实。

[0308] ^{1}H-^{1}H TOCSY(全相关光谱，也称为HOHAHA-Homonuclear Hartmann Hahn)实验可能对将复杂的糖质子信号分成几组很有帮助。在TOCSY自旋锁定过程中，从异头物H-1到呋喃糖或吡喃糖环末端的磁化转移将取决于居间$^{3}J(H,H)$标量偶合常数的幅度。具有较大偶合常数(>7Hz)的相邻轴向-轴向质子可实现磁化的快速传递，而具有较小偶合常数(<4Hz)的轴向-中纬线或中纬线-中纬线将显著地降低传递效率。因此，TOCSY实验不仅可以将质子信号分组为自旋系统，而且还可以提供糖的立体化学信息。例如，我们应当能够在正确的混合时间下看到葡萄糖从H-1到H-6的磁化传递。对于半乳糖，即使混合时间为200ms，在H-4上也没有磁化传递。

[0309] 然而，对于含有五或六组吡喃葡萄糖基信号的罗汉果苷而言，使用COSY和TOCSY将H-1连接至H-6可能会非常棘手。罗汉果苷吡喃葡萄糖基的质子信号具有非常相似的化学位移，并且在δ_{H} 3.8-4.5的较小范围内显得拥挤。通过如此分辨差的质子信号难以使COSY连接清晰。吡喃葡萄糖基碳信号也非常接近，HSQC的交叉峰彼此重叠，这使得阐明和分配变得更加困难。

[0310] 在先，HSQC-TOCSY已通过将每个自旋系统中的碳信号分组在一起而应用于皂苷的结构阐明和分配中[17,18]。通过我们的研究，我们首次证明了可以通过在HSQC-TOCSY实验中应用不同的混合时间来识别吡喃葡萄糖基碳基团内的信号序列。

[0311] 图6概括了基于HSQC-TOCSY的新方法，以阐明罗汉果苷的吡喃葡萄糖基寡糖链，如下所示:在步骤1中，使用异核多键相关光谱(HMBC)确定糖的异头C-1和H-1。从糖连接到糖苷配基开始。在步骤2中，使用HSQC-TOCSY与混合时间为100ms，以确定整个C-2至C-6组。HSQC-COSY或HSQC-TOCSY(d9＝10ms)来分配C-2。HSQC-TOCSY(d9＝30ms)分配C-3。HSQC-TOCSY(d9＝60ms)分配C-4。HSQC-TOCSY(d9＝100ms)分配C-5和C-6。在步骤3中，如果观察到C-2从～δ75低场位移至～δ81，C-4从～δ71低场位移至～δ81或C-6从～δ62低场位移至～69，则检查HMBC在这些位置的糖基化。*如果C-2从～δ75低场位移至～δ81，C-4从～δ71低场位移至～δ81或C-6从～δ62低场位移至～69，则检查HMBC在这些位置的糖基化**。1-D NMR数据例如^{1}H偶合常数和^{13}C碳信号模式以及2-D NMR实验例如NOESY、HMBC、TOCSY、COSY和HSQC可以辅助该过程并确认结果。基于HSQC-TOCSY的新策略可为任何新的或已知的罗汉果苷的吡喃葡萄糖基链的阐明和分配提供一种简单、快速且明确的方式。该策略还可以适用于其它单糖和寡糖的阐明和分配。

[0312] 新罗汉果苷和罗汉果苷VI的结构

[0313] 通过深入的1-D和2-D NMR分析以及与文献数据的比较[19]，确定化合物3为新罗汉果苷。对于3的寡糖链阐明，通过具有10、30、60、100ms不同混合时间的HSQC-TOCSY和TOCSY实验分配了信号。六个糖的连接通过它们的NOESY和HMBC相关性进行。糖苷配基的C-3上的寡糖链可以清楚地指定为β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基。糖苷配基的C-24上的吡喃葡萄糖基与β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)和β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)分支。

[0314] 新罗汉果苷首先从罗汉果中发现，并由Si等人描述[19]。在Scifinder中搜索新罗汉果苷返回了CAS编号189307-15-1。但是，即使Scifinder引用的文献是Si等人在1996年发表的文章，Scifinder还是给出了新罗汉果苷结构的错误结构。189307-15-1的不正确结构被指定为Scifinder中的3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)]-β-D-吡喃葡萄糖基-罗汉果醇-24-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)]-β-D-吡喃葡萄糖基(图2中6的结构)。Si等人的新罗汉果苷报告是用中文撰写的，并于1996年在中文期刊上发表。这一文章的可达性和误解可能导致Scifinder中结构错误。

[0315] 在Scifinder中，新罗汉果苷和罗汉果苷VI具有相同的CAS编号189307-15-1和相同的结构。Takemoto等人首先报道了来自罗汉果的罗汉果苷VI[2]。但其仅提及分子式为$C_{66}H_{112}O_{34}$的纯罗汉果苷，未确定结构[2]。Prakash等人在2011年发表的文章中报道了作为已知化合物的罗汉果苷VI的结构和NMR数据[6]。在他们的文章中，罗汉果苷VI的结构在图2中被指定为6的结构。Prakash提到罗汉果苷VI的结构解析通过NMR分析并与文献值进行比较进行。但是，没有给出引用文献值。

[0316] 对于已知化合物，将NMR数据与文献数据进行比较可能对确定结构有用。然而，罗汉果苷NMR数据的复杂性使得难以主要通过将NMR数据与文献数据进行比较来确定结构。在不同的报告中，已知罗汉果苷的^{1}H NMR数据显示，由于所用的NMR溶剂不同(吡啶和D_2O的比值可能引起信号偏移)或简单的不正确的分配而引起的变化。

[0317] 尽管^{13}C NMR数据非常一致并且具有比^{1}H NMR数据更好的分辨率，但是已知罗汉果苷的寡糖链的结构确定不能直接依赖于将^{13}C NMR数据与文献数据进行比较。考虑到新罗汉果苷的情况，如果Glu-VI吡喃葡萄糖基-(1→2)在Glu-I，Glu-II，Glu-III，Glu-IV或GluV上分支，则五个异构体可能具有类似的^{13}C NMR数据。应谨慎地进行深入的2-D NMR分析，然后明确地确定罗汉果苷的寡糖链，而不是将^{13}C NMR数据与文献数据进行比较。

[0318] 实施例11

[0319] 异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V的甜味强度

[0320] 方法

[0321] 将10mg异-罗汉果苷VI(图7)溶于31mL水制成100ppm异-罗汉果苷VI溶液。11-表-罗汉果苷V的工作溶液(图8)为374ppm(在25mL水中的9.34mg 11-表-罗汉果苷V)。制备一系列蔗糖标准溶液(0.50、0.75、1.00、1.25、1.50％)作为甜度参比物。

[0322] 结果

[0323] 四个对甜味敏感的小组成员分别评价了100ppm异-罗汉果苷VI和374ppm 11-表-罗汉果苷V和蔗糖标准品，并要求给出相对于蔗糖的甜味当量浓度。每种化合物的平均甜味当量浓度用于计算等甜效力。将异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V的等甜效力分别确定为蔗糖甜度的91倍和35倍(100ppm异-罗汉果苷VI的甜味当量相当于0.91％蔗糖；374ppm 11-

表-罗汉果苷V甜味当量相当于1.31％蔗糖)。

[0324] 实施例12

[0325] 方法

[0326] 如实施例10中所述获得异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V。将异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V各自以25ppm的浓度添加到含有5％蔗糖和0.03％柠檬酸的溶液中。由七个人组成的专家小组品尝了这些测试溶液。对于甜味的各个方面(总体甜味,前期甜味,逗留不去的甜味,涩味,挥发性异味),与基础溶液(5％蔗糖和0.03％柠檬酸的溶液)相比,每个小组成员都对测试溶液进行了评分。得分为0表示味觉相同,1表示略高,2表示较高,3表示高得多,-1表示略低,-2表示较低,-3表示低得多。

[0327] 结果

[0328] 计算每种测试溶液的每种味道方面的平均得分。结果如下表20中所示。

[0329] 表20

[0330]

	异-罗汉果苷 VI	表-罗汉果苷 V
总体甜味	0.2	0.17
前期甜味	0.2	0.33
逗留不去的甜味	0.2	0
涩味	0	0
挥发性异味	0	0
注释	轻度酸味	较高的前期甜味可抵消略低的回味，从而得到总体上具有较高的甜度

[0331] 从罗汉果(Siraitia grosvenorii(Swingle)C.Jeffrey ex Lu et Z.Y.Zhang)的商品提取物中纯化了两种新的次要葫芦烷糖苷以及已知的11-氧代-罗汉果苷和新罗汉果苷。通过深入的NMR和LC-MS分析以及化学合成,将两种新化合物异-罗汉果苷VI(1)和11-表-罗汉果苷V(2)的结构分别阐明为3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-罗汉果醇-24-O-(β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)]-β-D-吡喃葡萄糖基和3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-11β-OH-罗汉果醇-24-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)]-β-D-吡喃葡萄糖基。将异-罗汉果苷VI和11-表-罗汉果苷V的甜味效力分别阐明为蔗糖甜度的91倍和35倍(100ppm异-罗汉果苷VI的甜味当量相当于0.91％蔗糖;374ppm 11-表-罗汉果苷V的甜味当量相当于1.31％蔗糖)。通过我们对带有五个或六个吡喃葡萄糖基的新的和已知的罗汉果苷的鉴定观察过程,开发了一种新的吡喃葡萄糖基糖链阐明和分配策略。该策略基于具有不同混合时间的特征是对吡喃葡萄糖基寡糖链的快速和明确的阐明和分配的HSQC-TOCSY实验。通过我们深入的NMR光谱分析证实新罗汉果苷结构后,对在先关于新罗汉果苷和罗汉果苷VI结构的混淆进行了审查和澄清。

[0332] 上述内容广泛地描述了本发明的某些实施方案,但不限于此。对于本领域技术人员而言显而易见的变化和变型旨在落入由待批权利要求书中和其由所限定的本发明的范围内。

[0333] 参考文献

[0334] 1.Chun,L.;Li-Mei,L.;Feng,S.;Zhi-Min,W.;Hai-Ru,H.;Li,D.JIANG,T.-L.Chemistry and pharmacology of Siraitia grosvenorii:A review.Chinese journal of natural medicines,2014,12,89-102.

[0335] 2.Takemoto,T.;Arihara,S.;Nakajima,T.Okuhira,M.Studies on the constituents of Fructus Momordicae.I.On the sweet principle.Yakugaku Zasshi,1983,103,1151-4.

[0336] 3.Takemoto,T.;Arihara,S.;Nakajima,T.Okuhira,M.Studies on the constituents of Fructus Momordicae.III.Structure of mogrosides.Yakugaku zasshi:Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,1983,103,1167-1173.

[0337] 4.Takemoto,T.;Arihara,S.;Nakajima,T.Okuhira,M.Studies on the constituents of Fructus momordicae.II.Structure of sapogenin.Yakugaku zasshi:Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,1983,103,1155.

[0338] 5.Chaturvedula,V.S.P.Meneni,S.R.A New Cucurbitane Glycoside from Siraitia grosvenorii.Nat Prod Commun,2015,10,1521-3.

[0339] 6.Chaturvedula,V.S.P.Prakash,I.Cucurbitane Glycosides from Siraitia grosvenorii.J.Carbohydr.Chem.,2011,30,16-26.

[0340] 7.Patron,A.;Manam,R.;Colquitt,J.;Servant,N.;Noriega,C.E.;Hammaker,J.R.Gonsalves,N.High intensity sweeteners.Patent WO2017075257A2,May 4,2017.

[0341] 8.Prakash,I.;Markosyan,A.Bunders,C.Development of next generation stevia sweetener:rebaudioside M.Foods,2014,3,162-175.

[0342] 9.Ohta,M.;Sasa,S.;Inoue,A.;Tamai,T.;Fujita,I.;Morita,K.Matsuura,F.Characterization of novel steviol glycosides from leaves of Stevia rebaudiana Morita.Journal of Applied Glycoscience(Japan),2010.

[0343] 10.U.S.Food and Drug Administration.https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set＝GRASNotices&id＝512.(accessed May 25,2017).

[0344] 11.U.S.Food and Drug Administration.https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set＝grasnotices&id＝667.(accessed May 25,2017).

[0345] 12.U.S.Food and Drug Administration.https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set＝GRASNotices&id＝473.(accessed May 25,2017).

[0346] 13.Jia,Z.Yang,X.,Novel Sweetener ISO-Mogroside V.2008,Europe Patent EP2188300 B1.

[0347] 14.Kasai,R.;Matsumoto,K.;Nie,R.-L.;Morita,T.;Awazu,A.;Zhou,J.Tanaka,O.Sweet and bitter cucurbitane glycosides from Hemsleya carnosiflora.Phytochemistry,1987,26,1371-1376.

[0348] 15.Matsuda,H.;Nakashima,S.;Abdel-Halim,O.B.;Morikawa,T.Yoshikawa,M.Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an egyptian natural medicine,Bryonia cretica:structures of new triterpene glycosides,bryoniaosides A and B.Chemical and pharmaceutical

bulletin,2010,58,747-751.

[0349] 16.Gheysen,K.;Mihai,C.;Conrath,K.Martins,J.C.Rapididentification of common hexapyranose monosaccharide units by a simple TOCSY matching approach.Chemistry-A European Journal,2008,14,8869-8878.

[0350] 17.Tabatadze,N.;Elias,R.;Faure,R.;Gerkens,P.;De Pauw-Gillet,M.C.;Kemertelidze,E.;Chea,A.Ollivier,E.Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of Cephalaria gigantea.Chemical and pharmaceutical bulletin,2007,55,102-105.

[0351] 18.Mshvildadze,V.;Elias,R.;Faure,R.;Rondeau,D.;Debrauwer,L.;Dekanosidze,G.;Kemertelidze,E.Balansard,G.Triterpenoid saponins from leaves of Hedera pastuchowii.Chemical and pharmaceutical bulletin,2004,52,1411-1415.

[0352] 19.Si,J.;Chen,D.;Chang,Q.Shen,L.Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of Siraitia grosvenorii.Zhiwu Xuebao,1996,38,489-494.

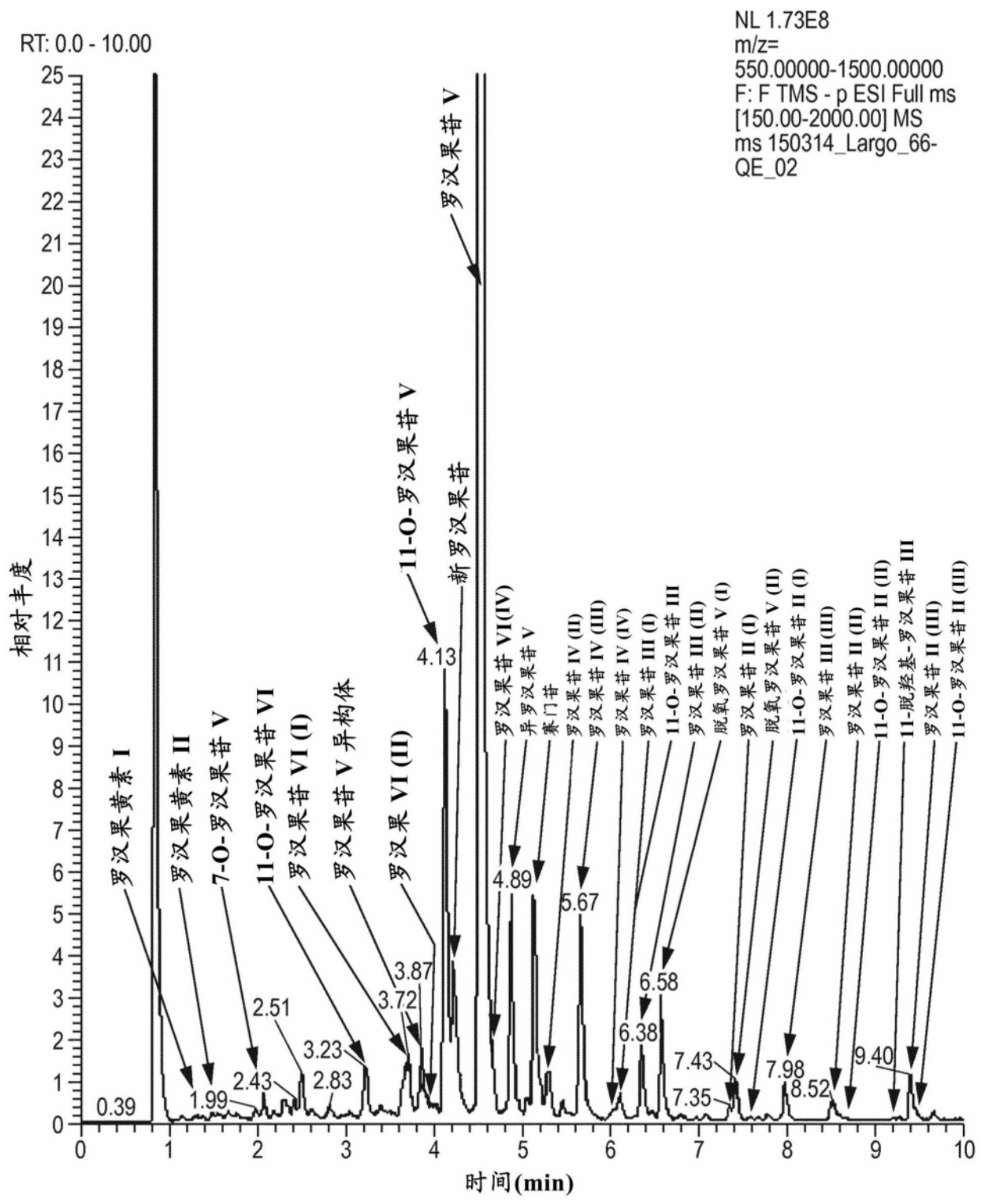
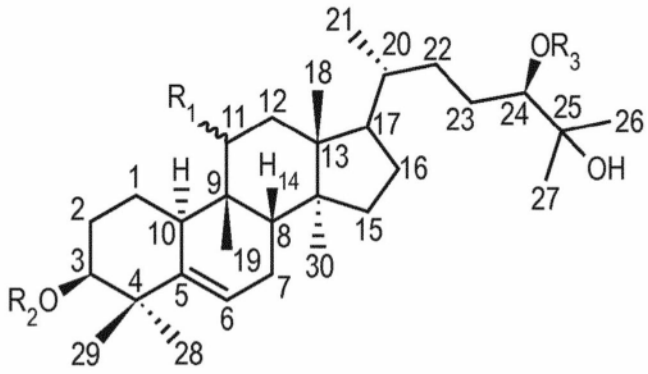

RT: 0.0 - 10.00
NL 1.73E8
m/z=
550.00000-1500.00000
F: F TMS - p ESI Full ms
[150.00-2000.00] MS
ms 150314_Largo_66-
QE_02
相对丰度
时间(min)
罗汉果黄素 I
罗汉果黄素 II
7-O-罗汉果苷 V
11-O-罗汉果苷 VI
罗汉果苷 VI (I)
罗汉果苷 V 异构体
罗汉果 VI (II)
11-O-罗汉果苷 V
新罗汉果苷
罗汉果苷 V
罗汉果苷 VI(IV)
异罗汉果苷 V
赛门苷
罗汉果苷 IV (II)
罗汉果苷 IV (III)
罗汉果苷 IV (IV)
罗汉果苷 III (I)
11-O-罗汉果苷 III
罗汉果苷 III (II)
脱氧罗汉果苷 V (I)
罗汉果苷 II (I)
脱氧罗汉果苷 V (II)
11-O-罗汉果苷 II (I)
罗汉果苷 III (III)
罗汉果苷 II (II)
11-O-罗汉果苷 II (II)
11-脱羟基-罗汉果苷 III
罗汉果苷 II (III)
11-O-罗汉果苷 II (III)
0.39
1.99
2.43
2.51
2.83
3.23
3.72
3.87
4.13
4.89
5.67
6.38
6.58
7.35
7.43
7.98
8.52
9.40

图1



	R_1	R_2	R_3
异-罗汉果苷 VI (1)	—α-OH	—Glc_I 6 Glc_{II}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V 4 Glc_{VI}
表-罗汉果苷 V (2)	—β-OH	—Glc_I 6 Glc_{II}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V
新罗汉果苷 (3)	—α-OH	—Glc_I 6 Glc_{II} 2 Glc_{VI}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V
11-氧代-罗汉果苷 V (4)	=O	—Glc_I 6 Glc_{II}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V
罗汉果苷 V (5)	—α-OH	—Glc_I 6 Glc_{II}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V
罗汉果苷 **VI** (6)	—α-OH	—Glc_I 6 Glc_{II} 2 Glc_{VI}	—Glc_{III} 6 Glc_{IV} 2 Glc_V

图2

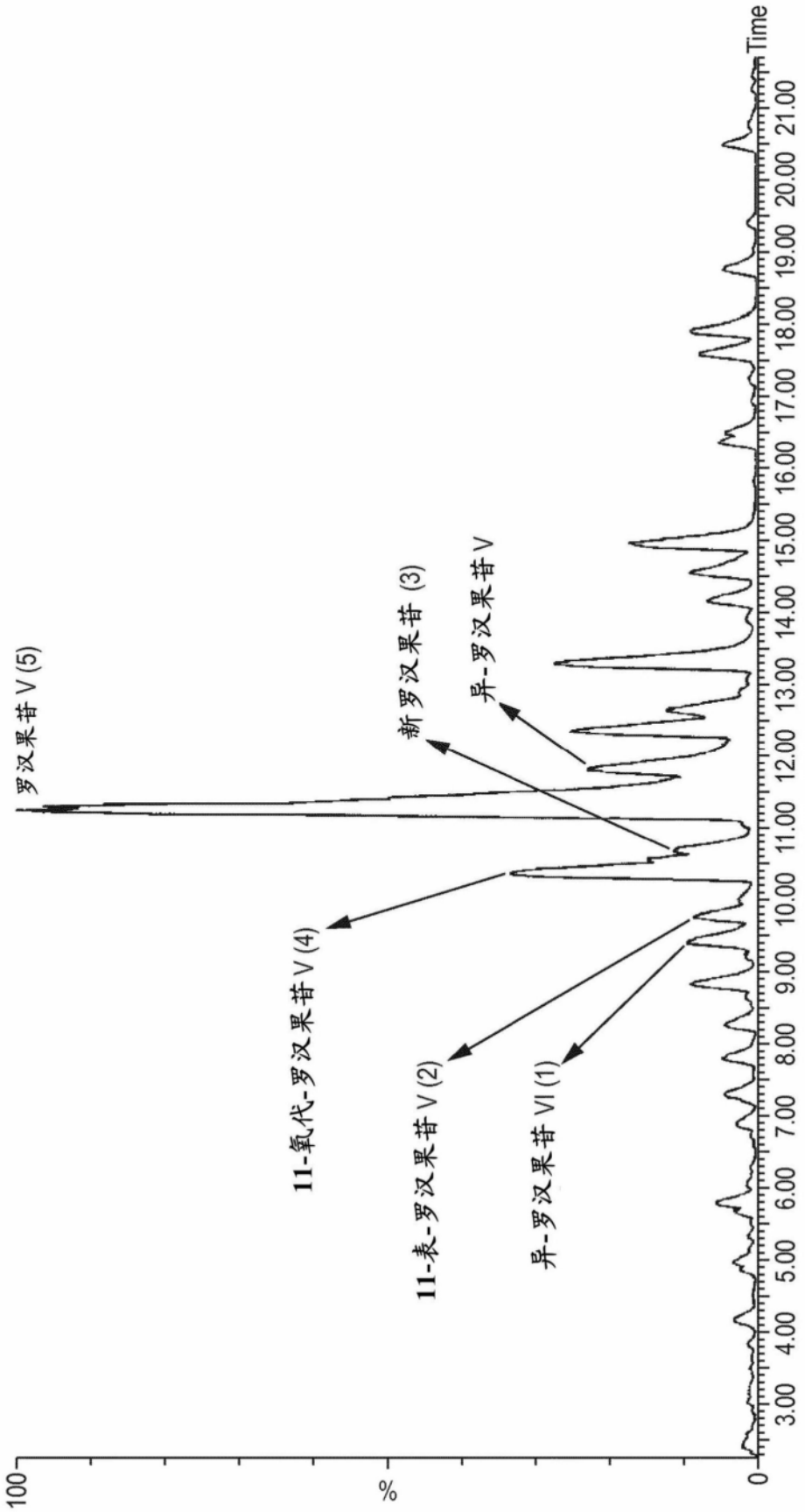

罗汉果苷 V (5)
新罗汉果苷 (3)
异-罗汉果苷 V
11-氧代-罗汉果苷 V (4)
11-表-罗汉果苷 V (2)
异-罗汉果苷 VI (1)
100
%
0
Time
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00

图3(a)

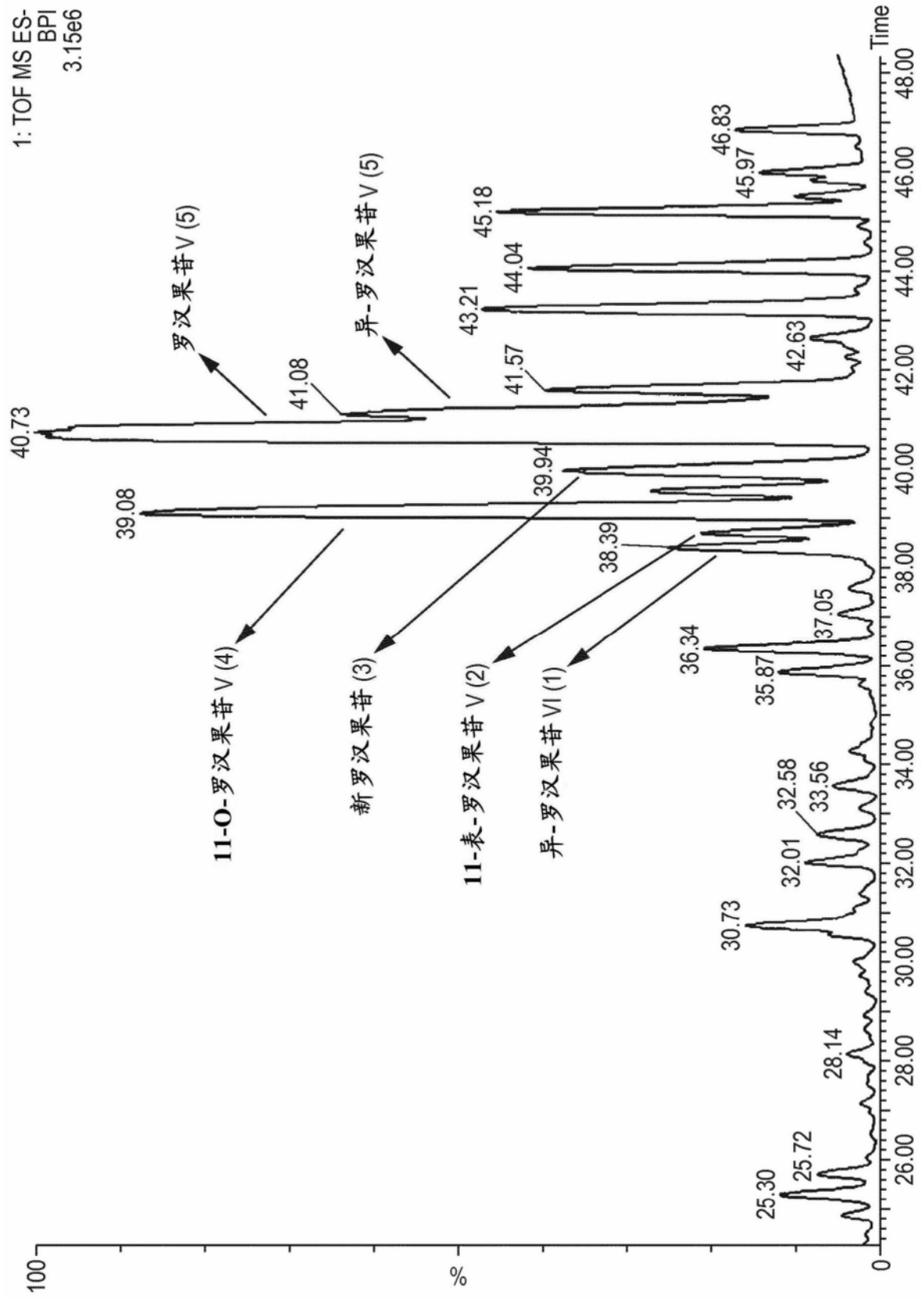

1: TOF MS ES-
BPI
3.15e6
罗汉果苷V (5)
异-罗汉果苷V (5)
11-O-罗汉果苷V (4)
新罗汉果苷 (3)
11-表-罗汉果苷V (2)
异-罗汉果苷VI (1)
40.73
41.08
39.08
39.94
38.39
46.83
45.97
45.18
44.04
43.21
42.63
41.57
37.05
36.34
35.87
32.58
33.56
32.01
30.73
28.14
25.72
25.30
Time
48.00
46.00
44.00
42.00
40.00
38.00
36.00
34.00
32.00
30.00
28.00
26.00
100
%
0

图3(b)

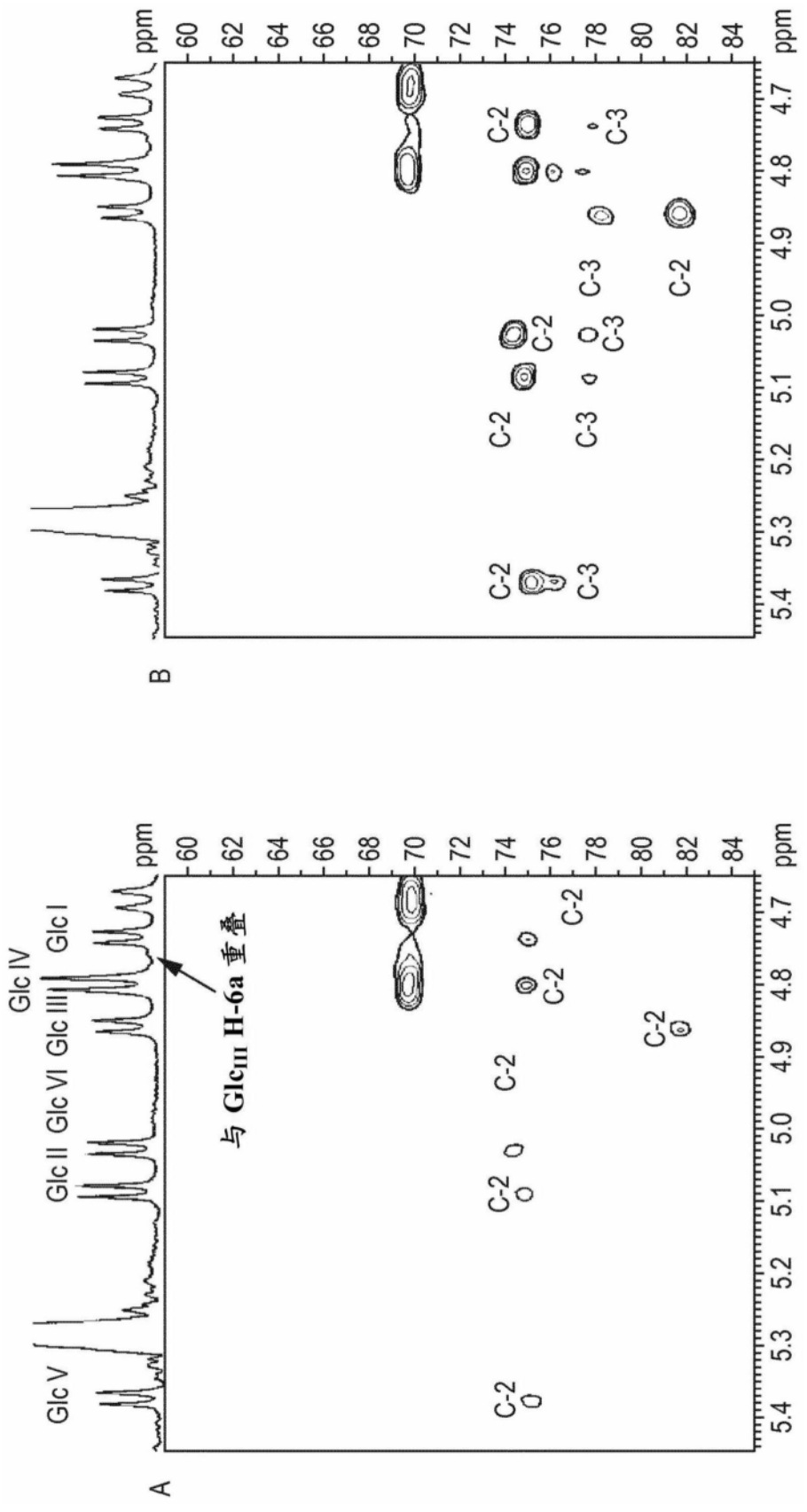

A
B
ppm
Glc V
Glc IV
Glc II
Glc VI
Glc III
Glc I
与 Glc III H-6a 重叠
C-2
C-3

图4

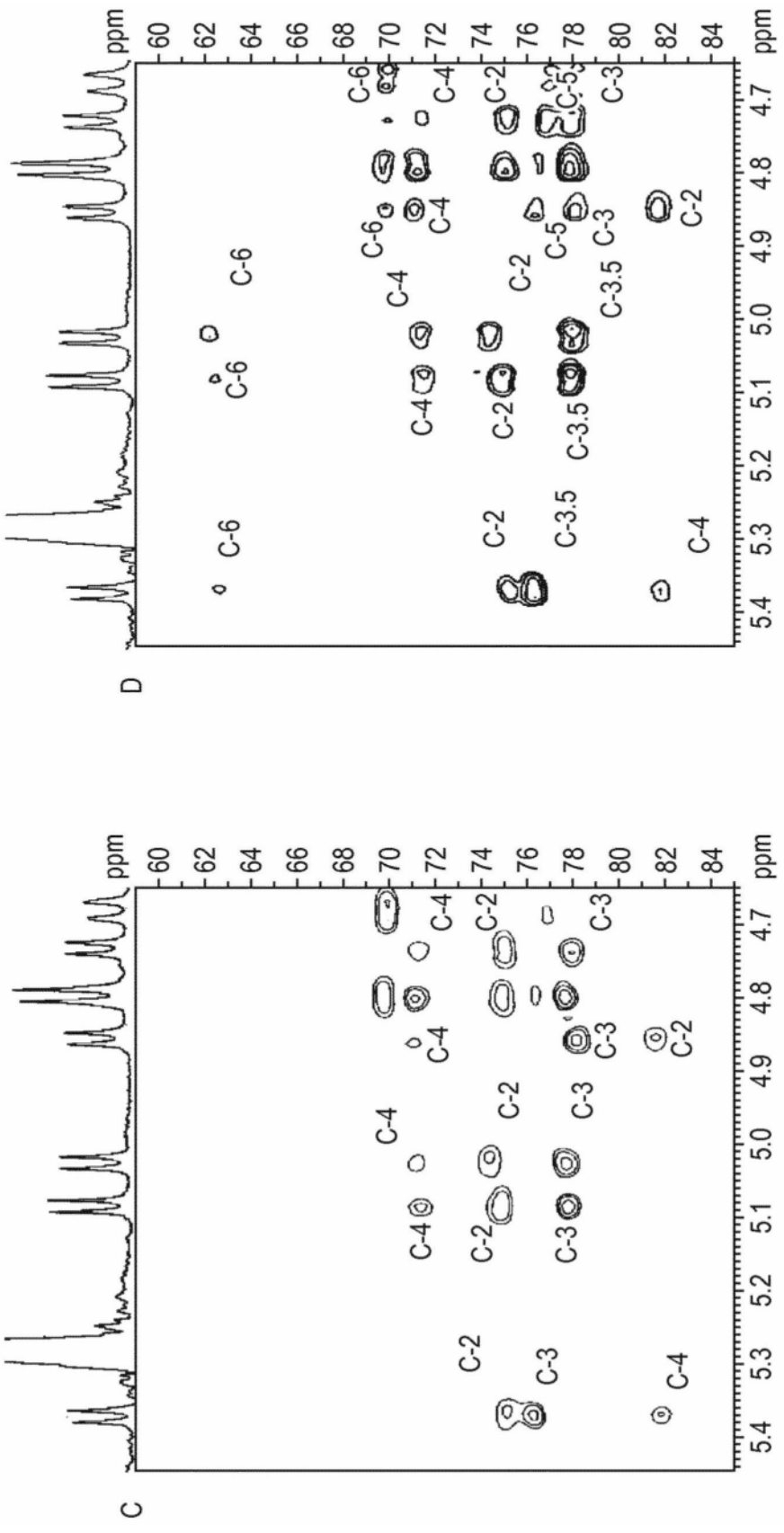

D
C
ppm
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
4.9
4.8
4.7
C-6
C-4
C-2
C-3
C-5
C-3.5

图4(接续)

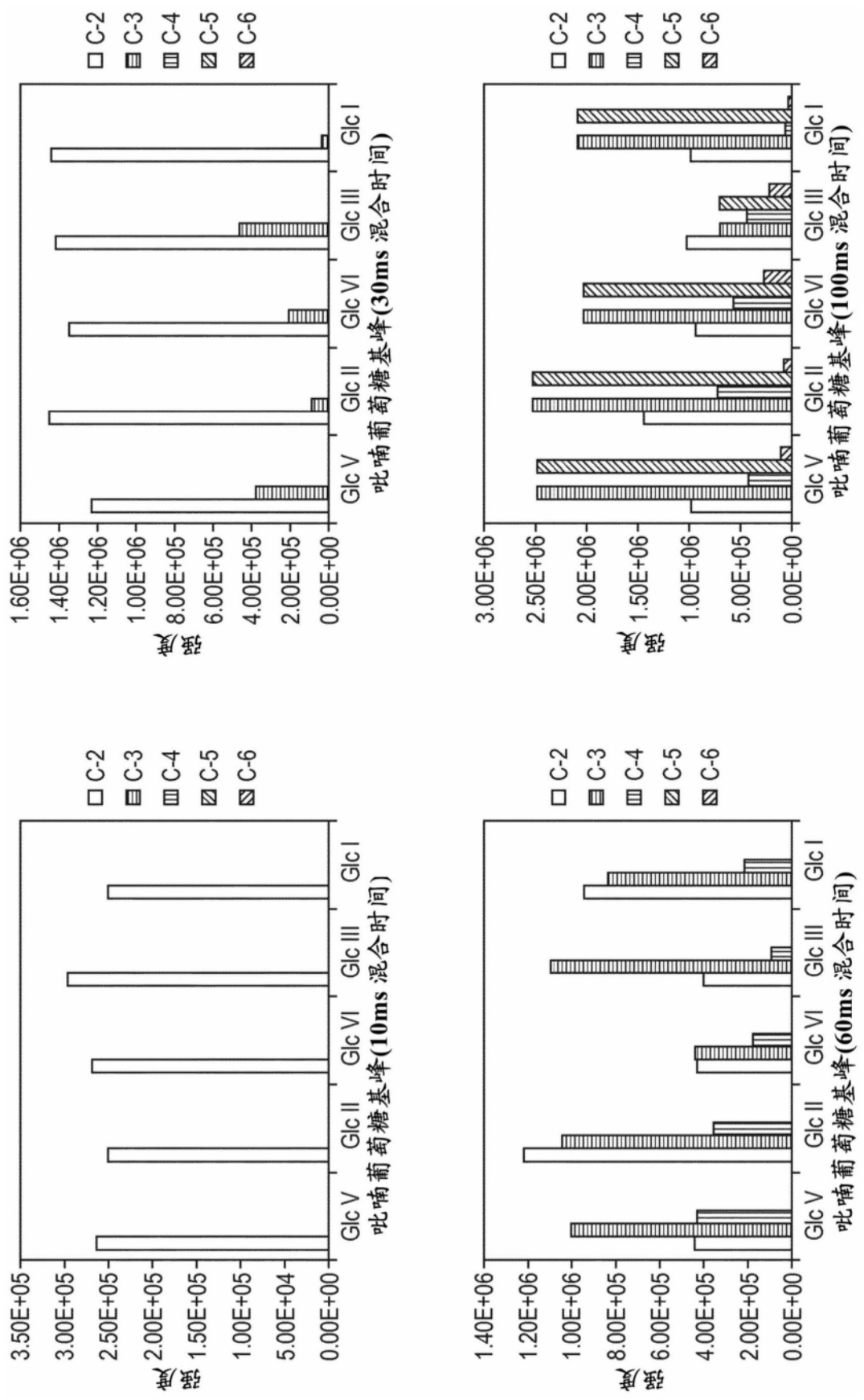

C-2
C-3
C-4
C-5
C-6
Glc V
Glc II
Glc VI
Glc III
Glc I
强度
吡喃葡萄糖基峰(30ms 混合时间)
吡喃葡萄糖基峰(100ms 混合时间)
吡喃葡萄糖基峰(10ms 混合时间)
吡喃葡萄糖基峰(60ms 混合时间)

图5(a-d)

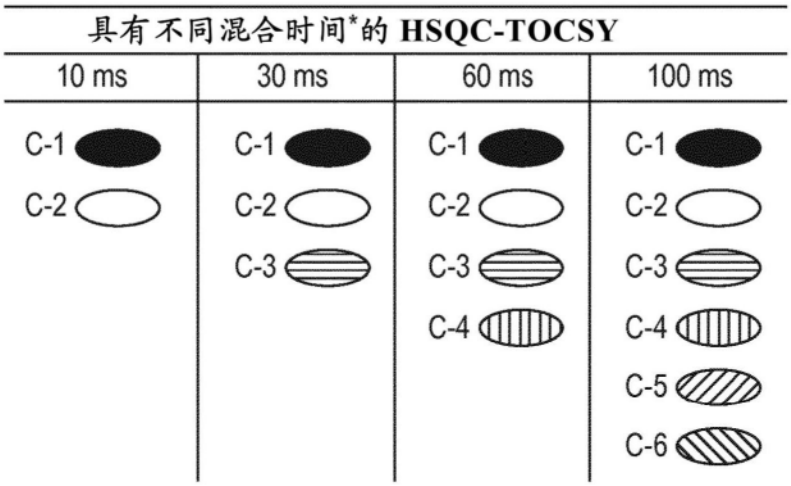

具有不同混合时间*的 HSQC-TOCSY
10 ms
30 ms
60 ms
100 ms
C-1
C-2
C-3
C-4
C-5
C-6

图6

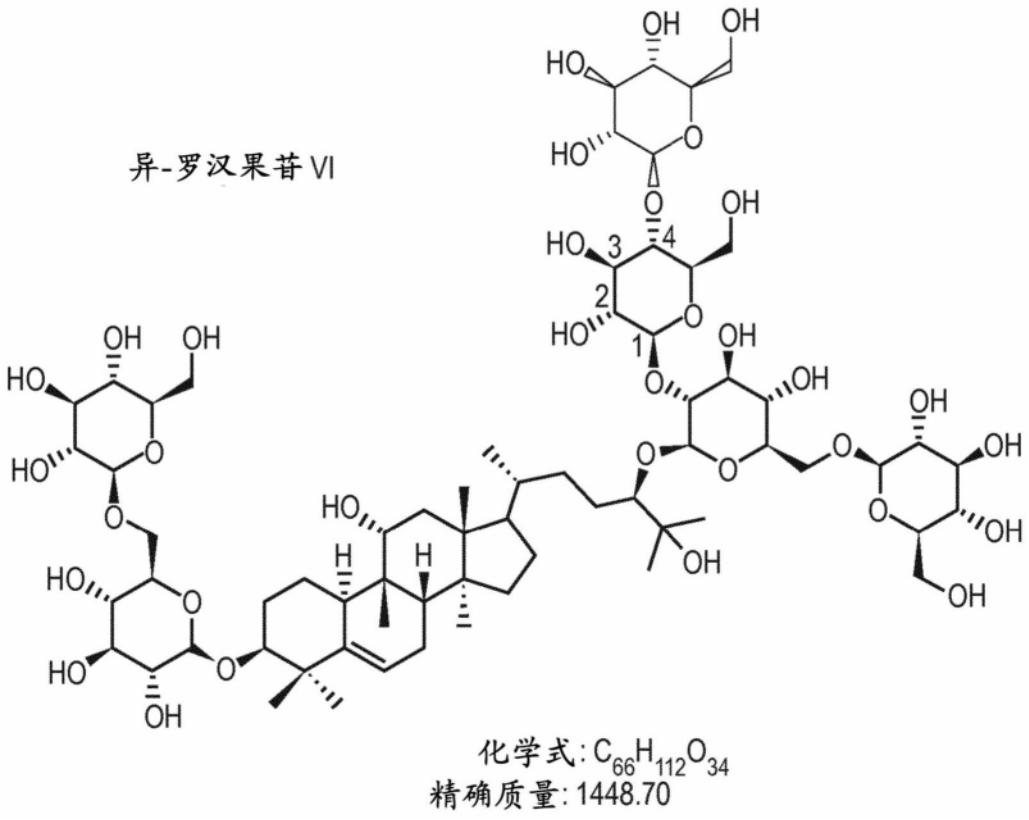

异-罗汉果苷 VI
化学式: $C_{66}H_{112}O_{34}$
精确质量: 1448.70

图7

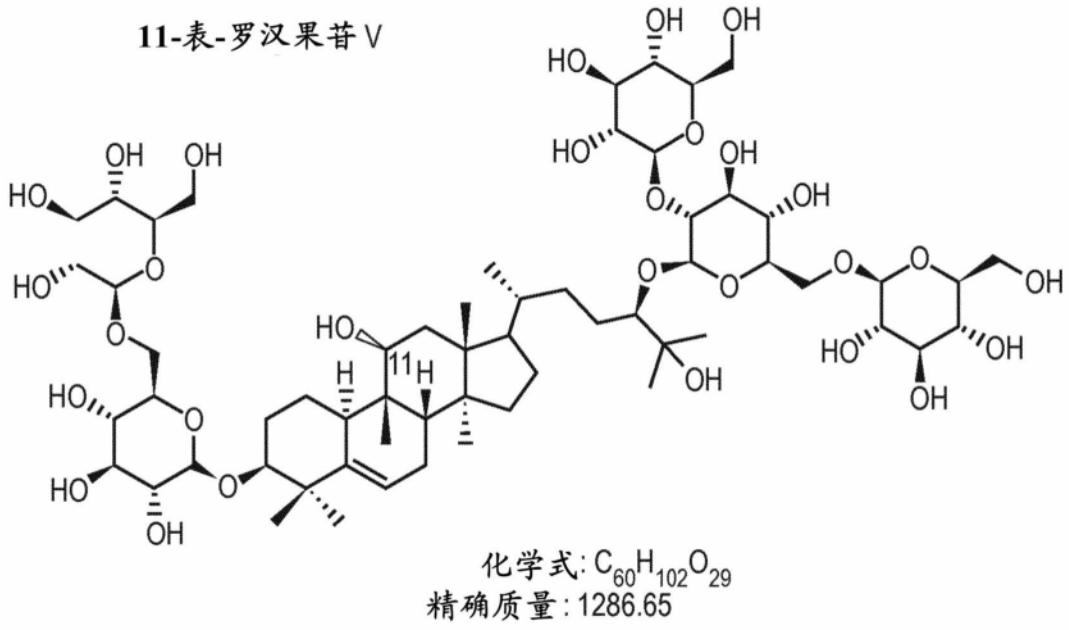


图8