



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102216313 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980139481. 1

A23L 1/22(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 10. 02

G01N 33/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-258617 2008. 10. 03 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/067585 2009. 10. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02010/038911 EN 2010. 04. 08

(71) 申请人 守田化学工业株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 守田丰重 藤田功 松浦史登

太田雅也

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 马崇德 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07H 15/256(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 10 页

按照条约第19条修改的权利要求书 1 页

按照条约第19条修改的声明或说明 1 页

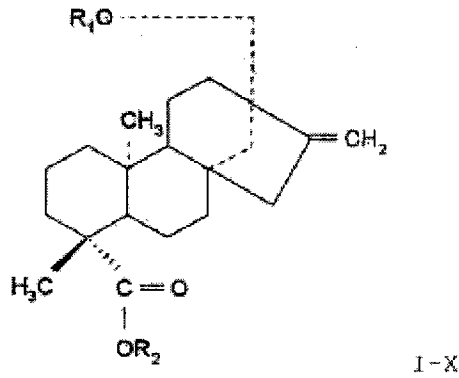
(54) 发明名称

新的甜菊醇糖苷

(57) 摘要

提供了新的甜菊甜味组分。通过分析甜菊提取物和 / 或晶体中所含新甜菊醇糖苷的组分, 不仅可便利地进行甜味剂的品质控制, 而且由于可鉴别所述甜味剂的原料还可便利地判断来源指示的正确性或是否侵权。

1. 式 I-X 的甜菊醇糖苷：



其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 是氢原子或下表中定义的糖链；

编号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
I	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	H
II	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
III	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IV	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
V	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
	$\beta\text{-glc}(6\rightarrow1)$	
VI	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$
VII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$
VIII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IX	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
X	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$

2. 一种得自菊科多年生植物甜菊 (Stevia Rebaudiana Bertoni) 的提取物,其包含作为主要成分的莱鲍迪昔 A。

3. 一种由权利要求 2 的提取物生产高纯莱鲍迪昔 A 的方法。

4. 一种生产食品的方法,其特征在于加入等于或小于 1% 量的权利要求 2 所述的提取物。

5. 一种生产食品的方法,其特征在于加入等于或小于 1% 量的通过权利要求 3 所述方法获得的高纯莱鲍迪昔 A。

6. 一种使用甜菊醇糖苷 X 确认甜叶菊品种的方法。

7. 甜菊醇糖苷 I-X 的分析方法。

## 新的甜菊醇糖苷

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的甜菊醇糖苷,一种含有莱鲍迪苷 A 和所述新的甜菊醇糖苷的甜味剂,所述新的甜菊醇糖苷包含于含有高含量的莱鲍迪苷 A 的各种甜菊 (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) 中,一种生产食品、医药品、非医药品和化妆品的方法,验证甜菊品种和所述新的甜菊醇糖苷的分析方法。

### 背景技术

[0002] 甜叶菊是原产地为南美巴拉圭的菊科多年生植物,学名是甜菊 (*Stevia Rebaudiana Bertoni*)。甜叶菊含有甜度是蔗糖的 300 倍或更高的甜味成分,因此,为提取该甜味成分作为天然甜味剂使用而对其进行栽培。

[0003] 甜叶菊的甜味成分已知的有甜菊苷 ( $C_{38}H_{60}O_{18}$ )、莱鲍迪苷 A ( $C_{44}H_{70}O_{23}$ )、莱鲍迪苷 C、D 和 E、杜尔可苷 A 等。通常栽培的甜菊品种中,上述甜味成分中甜菊苷 (以下称 ST) 为主要成分,莱鲍迪苷 A (以下称 RA) 的含量为大约 40% 重量,莱鲍迪苷 C 的含量比这稍少。但根据品种的不同,也有例如以莱鲍迪苷 C 为主要成分的各种品种。

[0004] 由于 ST 具有蔗糖 300 倍的甜度,因此其在食品工业中作为天然甜味剂被广泛地使用。其甜味与蔗糖较类似,但已知相比于 RA 在口中残留有苦味这样的令人不快的味道。与此相比,RA 具有良好的甜味性质,具有的甜度是 ST 的 1.3-1.5 倍,因此通常优选含有高含量 RA 而非 ST 的甜叶菊甜味剂。本发明人通过对常规品种反复选择性杂交进行植物培植,仅得到 ST 含量比 RA 少很多的甜叶菊品种,研发了来自这些品种的甜味剂 (例如参见专利文献 1)。

[0005] 但是,在苦味、涩味和平滑感等用舌头感知的味道中,平滑感非常微妙。这种微妙的平滑感并不仅取决于 ST 与 RA 的比例。当把葡萄糖加入甜叶菊所含的各种甜味成分的化学结构中时,平滑感有所改善,并且已经开发了改善平滑感和浓味的方法,其是通过向甜菊的甜味成分结构上加入葡萄糖 (专利文献 2 和 3)。

[0006] 因此,即使含量小,分析甜叶菊中含有的未知成分也是非常重要的,特别是为了掌握那些结构上加入葡萄糖而非 ST 的成分,并且尤其重要的是,通过味道—品质对照考查对在结构上引入葡萄糖的成分进行仔细的检测。

[0007] 同时,由于味道品质受到原料植物本身所含甜味成分的影响,为了研发优良的甜叶菊品种并利用它们,重要的是要彻底地掌握这些甜味成分。从现在开始,原料植物品种改良可能将变得非常流行,但通过坚持不懈地精确确定已研发植物中所含的甜味成分将可能详细地掌握品种改良的结果。

[0008] 另一方面,本发明人研发了一种通过使用基因确定新研发的植物体的品种的方法 (专利文献 4 和 5),但实际上没有根据从这些原料植物中提取和制备的甜味剂和利用它们制得的产品精确确定原料植物的方法。

[0009] [专利文献 1] 日本特开 JP2002-262822 号公报

[0010] [专利文献 2] 日本特开 (Patent publication) JP1957-18779 号公报

- [0011] [ 专利文献 3] 日本特开 JP1997-107913 号公报  
[0012] [ 专利文献 4] 日本特开 JP2003-009878 号公报  
[0013] [ 专利文献 5] 专利合作条约国际专利公报 PCT W006/093229

## 发明内容

[0014] 解决的技术问题

[0015] 已经分析和标准化了甜叶菊甜味剂的五种成分 (ST、RA、莱鲍迪苷 A、杜尔可昔 A 和甜菊醇双糖苷 (Biaside)), 但对于其它未知成分却一无所知。此外, 因为没有确定的分析方法, 所以即使对已知的甜味成分也无法确认它们的存在。但是, 随着意识到这些成分对精美味道的影响的重要性, 最近已经设定了对 7 种甜菊醇糖苷成分的 JECFA 标准, 确认了甜叶菊中含有的甜味剂并澄清了未知的成分。

[0016] 本发明的目的是定义甜叶菊品种中所含少量甜味剂的结构并确认它们对甜叶菊甜味剂的味道的影响。

[0017] 另外, 其它目的是根据甜叶菊甜味剂和使用它的产品, 提供精确确定甜叶菊植物 (其作为原料) 的方法。

[0018] 本发明人已经研究了甜叶菊品种中所含的新甜菊醇糖苷, 其主要成分是 RA, 并且发现了对味道品质有微妙影响的所述新甜菊醇糖苷的 10 种成分。此后, 他们通过发现品种间这些成分的含量体积存在差异, 并且某些成分仅在特定的以 RA 为其主要成分的甜菊品种中存在, 以及随后通过确认可能使用该发现作为来源于这类植物的甜味剂的标记完成了本发明。

[0019] 发明效果

[0020] 本发明的甜菊醇糖苷具有比 ST 或 RA 加入了更多葡萄糖的结构, 由此提供了具有极好的浓厚味道的甜菊甜味剂。

[0021] 此外, 可通过确认提取物或晶体中甜菊醇糖苷 X 来推测原料植物的来源, 并通过分析最终产物能够判断原料植物是否与例如专利等等权利相对立。

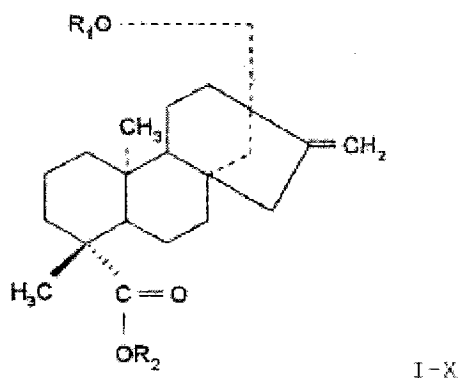
[0022] ( 本发明的最佳实施方案 )

[0023] 在本发明中提及的以 RA 为其主要成分的甜叶菊品种是一种含有 RA 比 ST 多的品种, 并且表述于专利申请 JP2001-200944 和 JP2007-506004 中 ; 从干燥叶片中获得的提取物的 RA 含量比 ST 多并且也含有莱鲍迪苷 D(R-D), 甜菊醇糖苷 III、V、VI、VII 和 X, 这使得可通过含有结构上加入了比 ST 和 / 或 RA 更多葡萄糖的成分而获得具有浓厚味道的优异的甜味剂。

[0024] 此外, 可能通过重结晶有效地获得含有痕量 ST 和甜菊醇糖苷 X 的高纯 RA 甜味剂。

[0025] 本发明的第一实施方式是式 I-X 的甜菊醇糖苷 :

[0026]



[0027] 其中  $R_1$  和  $R_2$  是氢原子或下表中定义的糖链；

[0028]

编号 (甜菊醇糖苷)	$R_1$	$R_2$
I (杜尔可昔 B)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	H
II (莱鲍迪昔 G)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
III (莱鲍迪昔 I)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IV (莱鲍迪昔 H)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
V (莱鲍迪昔 L)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ } $\beta\text{-glc}(6\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
VI (莱鲍迪昔 K)	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$
VII (莱鲍迪昔 J)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$
VIII (莱鲍迪昔 M)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IX (莱鲍迪昔 N)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
X (莱鲍迪昔 O)	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$

[0029]

[0030] 式中代号为如下糖：

[0031] glc :D- 吡喃葡萄糖基 (glucopyranosyl)

[0032] rha :L- 吡喃鼠李糖基 (rhamnopyranosyl)

[0033] xyl :吡喃木糖基 (xylopyranosyl)

[0034] 本发明的第二个实施方式是含有甜菊醇糖苷 X (莱鲍迪昔 O) 的提取物,其是用水或含水溶剂提取菊科植物甜菊的植物体、或其干燥叶片而获得,其主要成分是莱鲍迪昔 A。

[0035] 本发明的第三个实施方式是通过重结晶上述实施方式的提取物,获得含有甜菊醇

糖苷 X ( 莱鲍迪苷 O ) 的高纯莱鲍迪苷 A 的方法。

[0036] 本发明的第四个实施方式是一种生产食品的方法,其中以食品量的 1% 或小于 1% 的量将上述第二实施方式的提取物加入食品中。

[0037] 本发明的第五个实施方式是一种生产食品的方法,其中以与食品量的 1% 或小于 1% 的量将上述第三实施方式所得的高纯莱鲍迪苷 A 加入食品中。

[0038] 在从主要成分是 ST 的原料品种获得的提取物中,不含有甜菊醇糖苷 X,但从主要成分是 RA 的原料品种获得的提取物含有糖苷 X。这可通过主要成分是 ST 还是 RA 来判断原料品种。也即是,如果在主要成分是 RA 的提取物(该提取物是通过结晶从主要成分是 ST 的原料品种获得的提取物来除去 ST 而制得的)中或将其重结晶而得的高纯度产品中不含有糖苷 X,从而可确认原料品种。本发明的第六个实施方式是通过甜菊醇糖苷 X 确认甜叶菊品种的方法。

[0039] 本发明的第七个实施方式是利用高效液相色谱(以下称 HPLC)分析甜菊糖苷 I-X 的方法。

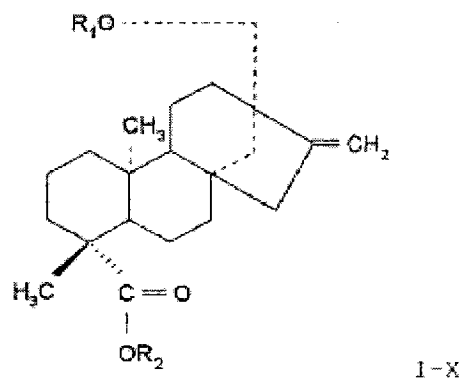
[0040] 为了完成这些目标,本发明人大量研究了主要成分是 RA 的品种以及申请 JP2001-200944 和 JP2007-506004 的品种中包含的甜味成分,并发现了新的甜味成分和鉴定了它们的化学结构。此外,本发明人确认了这些成分可用作甜味剂,完成了分析方法以及通过这些品种确认品种的方法。

[0041] 通过用水或含水溶剂提取实施例 1 所示的主要成分是 RA 的品种(以下称为品种 A)以及申请 JP2001-200944 的干燥叶片(以下称为品种 B)和 2007-506004 的干燥叶片(以下称为品种 C)来实现对新成分的确证。

[0042] 此后,将提取溶液直接浓缩,或者必要时,用离子交换树脂或阳离子交换树脂、或活性炭除去离子杂质。可将所述甜味成分吸收于吸收树脂中,随后用亲水性溶剂洗脱,必要时浓缩并干燥洗脱液,用离子交换树脂或阳离子交换树脂、或活性炭再次处理洗脱液,并可对由此得到的提取物或通过常规技术中合适的纯化方法例如脱色而得到提取物进行确证。

[0043] 利用实施例 5 的高效液相色谱质谱(HPLC-MS)设备分离并分析了由下文实施例 1(1)获得的提取物 RA-C 的新甜醇菊糖苷,并且确定了各糖苷结构 I-X:

[0044]



[0045] 其中  $R_1$  和  $R_2$  分别是氢原子和上述糖链。

[0046] 甜菊醇糖苷 I ( 杜尔可苷 B ) 是分子量为 788 的结构的糖苷,其由图 1 中大约 13 分钟的 HPLC 色谱保留时间(以下称 R. T.)而确定。

[0047] 甜菊醇糖苷 II ( 莱鲍迪苷 G ) 是分子量为 804 的结构的糖苷,其由图 1 中大约 15

分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0048] 甜菊醇糖苷 III (莱鲍迪苷 I) 是分子量为 1112 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 28 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0049] 甜菊醇糖苷 IV (莱鲍迪苷 H) 是分子量为 1128 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 29 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0050] 甜菊醇糖苷 V (莱鲍迪苷 L) 是分子量为 1112 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 34 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0051] 甜菊醇糖苷 VI (莱鲍迪苷 K) 是分子量为 1112 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 34 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0052] 甜菊醇糖苷 VII (莱鲍迪苷 J) 是分子量为 1128 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 34 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0053] 甜菊醇糖苷 VIII (莱鲍迪苷 M) 是分子量为 1290 的结构的糖苷, 其由与莱鲍迪苷 D 在图 1 中大约 34 分钟的 HPLC 的 R. T. 完全相同 (duplicating) 而确定。

[0054] 甜菊醇糖苷 IX (莱鲍迪苷 N) 是分子量为 1274 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 43 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0055] 甜菊醇糖苷 X (莱鲍迪苷 O) 是分子量为 1436 的结构的糖苷, 其由图 1 中大约 51 分钟的 HPLC 的 R. T. 而确定。

[0056] 但是, 任何本领域普通技术人员可理解的是使用梯度洗脱的分析方法中上述 R. T. 是可变的。

[0057] 如上所述, 提供了通过最终产品中是否存在甜菊醇糖苷 X 来鉴定原料品种的重要信息。

[0058] 同时, 即使这些新甜菊醇糖苷被用作甜味剂, 仍可通过 HPLC 对它们进行确认, 因此利用 HPLC 分析可容易地彻底控制品质和味道。

[0059] 所得提取物和晶体可用作糖果、果冻、粉末饮料、方便面、果酱、冷冻水果、口香糖、日本甜点、健康食品、巧克力、台面 (tabletop) 甜味剂、油炸甜品、佳肴 (delicacies)、水煮食物、发酵乳酸饮料、咖啡饮料、可可饮料、茶饮料、甜露酒、葡萄酒、果汁冻、谷物、含膳食纤维的食物、调味汁、酱油、豆酱、醋、调味品、蛋黄酱、调味酱、咖哩粉、汤、米制甜点、霰饼、面包、饼干、脆饼、煎饼粉、罐头水果、罐头蔬菜、肉制品、用煮沸的鱼酱制成的产品、盐制食品、腌渍品、组合调味品、高档食品、化妆品等中的甜味剂, 导致卡路里降低、蔗糖减少、熔点降低、改善甜味品质和隐蔽效应, 以及其它, 还可添加到其它天然和人工甜味剂和溶剂中。

## 实施例

[0060] 实施例 1 制备 RA 提取物

[0061] (1) 提取

[0062] 取 100g 来自主要成分是 RA 的品种 A、B 或 C 的干燥叶片, 用 20 倍重量的水提取数次, 直到不能尝到甜味。将提取物通过填充了 300ml 吸收树脂 (Diaion HP-20) 的柱, 并且让该提取物的甜味成分吸附于树脂中。用水对树脂进行充分地洗涤, 并用 900ml 甲醇洗脱甜味成分。将洗脱液通过填充了 200ml 离子交换树脂 (Diaion WA-30) 的柱, 向洗脱液中加入 10g 活性炭并搅拌。过滤该混合物, 浓缩滤液并干燥残留物, 分别得到 13.0g RA-A 提取

物,其主要成分是淡黄色莱鲍迪苷A(ST 35.4%,RA 41.7%和RC 9.8%),11.5g RA-B提取物(ST 19.5%,RA 58.1%和RC 8.8%)以及12g RA-C提取物(ST5.4%,RA 72.3%和RC 8.1%)。

[0063] (2)RA重结晶

[0064] 在加热的情况下,将各自5g的上述RA-B提取物和RA-C提取物溶解于10倍重量的90%甲醇中,并将其在4℃静置6天。分离所得晶体,用冷甲醇洗涤并减压干燥,分别得到3.9g白RA-B晶体(ST 0.2%,RA 95.0%和RC 0.2%)和4.5gRA-C晶体(ST 0.2%,RA 95.6%和RC 0.1%)。

[0065] 实施例2制备ST提取物

[0066] 出于比较的目的,对主要成分是ST的品种进行了相同的工序,得到11.3gST提取物(ST 51.9%,RA 23.7%和RC 7.4%)。

[0067] 实施例3 RA-A母液、ST母液

[0068] 在加热的情况下,将各自10g的上述RA-A提取物和ST提取物溶解于10倍重量的90%甲醇中,并将其在4℃静置6天。分离所得晶体,用冷的98%甲醇洗涤并减压干燥,分别得到2.1g RA-ST晶体(其是甜菊苷的白色晶体),和3.8gST-ST晶体。

[0069] 分别浓缩并干燥主要成分是RA的8.8g RA-A母液(ST 15.7%,RA 43.8%和RC 6.9%)和6.1gST母液(ST 20.0%,RA 37.1%和RC 11.2%),得到母液的粉末,其主要成分分别是浅黄色的RA。

[0070] 实施例4 RA-A晶体、ST-RA晶体

[0071] 在加热的情况下,将实施例3各自的母液粉末溶解于10倍重量的90%甲醇中,并在4℃静置6天。分离所得晶体,用冷的98%甲醇洗涤并减压干燥,分别得到2.2g白色RA-A晶体(ST 1.6%,RA 90.4%和RC 1.4%)和1.2gST-RA晶体(ST 1.6%,RA 96.9%和RC 1.4%)。

[0072] 实施例5甜菊醇糖苷的结构确定

[0073] 如下所述,使用HPLC进行分析。使用Shimazu LC-10Advp HPLC,TSKgel Amide-80(4.6x250mm Tosoh)柱分离各个提取物所包含的甜菊醇糖苷。使用乙腈-水作为溶剂和梯度洗脱剂,其中乙腈:水的比例在60分钟内由82:18变至66:34。流速为0.65ml/分钟,柱温为40℃,紫外吸收210nm处进行检测。

[0074] 使用装配了电喷雾离子化(ESI)质谱计的Waters' Alliance HPLC系统2695和Waters' Quattro micro(三重四极质谱)进行分子量的测定。对于HPLC,使用TSKgel Amide-80(2.0x250mm Tosoh)柱,乙腈-水作为溶剂和梯度洗脱剂,其中乙腈:水的比例在60分钟内由82:18变至66:34。流速为0.2ml/分钟,柱温为40℃。氮气用作去溶剂化气体,氩气用作碰撞气体。关于毛细管电压,在负离子模式甜菊醇糖苷分析中为15.0kV,在正离子模式ABEE-寡糖分析中为13.5kV。MS/MS分析时,10V至80V的电压作为锥电压和碰撞电压。源温度和去溶剂化温度分别为100℃和400℃,锥气体和去溶剂化气体的流量分别为50l/小时和900l/小时。

[0075] 关于各个提取物和晶体的HPLC分析结果图示在图1-10中。

[0076] 图2-10所示的各个色谱峰的分析结果显示在下表1-9中。

[0077] [表1]-晶体RA-A



[0078]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	4.857	6932	486			0.2192	Stev mono
	2	8.817	1467	107				
	3	9.603	2029	124			0.0642	Rubuso
	4	10.244	3630	214				
	5	11.065	12106	605				
	6	14.763	14947	397			0.4726	Rebau B
	7	16.782	58617	2320			1.8535	Stev
	8	18.901	35984	1440			1.1379	Rebau C
	9	19.984	23401	820			0.7400	Rebau F
	10	23.334	2971977	97370			93.9772	Rebau A
	11	28.648	4872	191			0.1541	Rebau E+III+IV
	12	34.608	5912	174			0.1869	V+VI+VII
	13	35.531	28131	892	V		0.8895	Rebau D+VIII
	14	37.222	5390	185				
	15	42.731	6943	222			0.2195	IX
	16	51.166	2700	88			0.0854	X
	TOT		3185038	105635			100.0000	

[0079] [表 2]-晶体 RA-B

[0080]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.098	1307	246				
	2	2.309	675	139	V			
	3	2.833	7713	1426				
	4	4.775	3286	244				
	5	13.518	91704	3965			2.8021	I
	6	14.834	14854	462			0.4539	Rebau B
	7	16.077	1125	54				
	8	16.8	747	88				
	9	17.034	9460	352	V		0.2891	Stev
	10	18.601	2647	110				
	11	19.157	7685	314	V		0.2348	Rebau C
	12	20.268	20421	652			0.6240	Rebau F
	13	23.663	3106124	102260			94.9097	Rebau A
	14	27.533	2882	95				
	15	29.043	5444	210			0.1663	III + Rebau E+IV
	16	31.461	2828	91			0.0864	
	17	35.959	8128	282			0.2484	Rebau D+ V +VI+VII
	18	37.696	6165	183				
	19	43.225	4259	120			0.1301	IX
	20	51.644	1807	53			0.0552	X
	TOT		3299261	111346			100.0000	

[0081] [表 3]-晶体 RA-C

[0082]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.335	15257	2745				
	2	3.398	2074	247				
	3	4.436	3292	209				
	4	9.657	51969	2355			1.6822	Rubuso
	5	14.351	4502	107			0.1457	Rebau B
	6	16.175	5072	189			0.1642	Stev
	7	18.192	2634	88			0.0853	Rebau C
	8	19.366	13008	474			0.4211	Rebau F
	9	22.682	3002254	98794			97.1825	Rebau A
	10	34.744	4564	160			0.1477	V+VI +Rebau D+VII+VIII
	11	36.455	3018	96			0.0977	
	12	41.927	1880	67			0.0609	IX
	13	50.485	393	17			0.0127	X
	TOT		3109917	105548			100.0000	

[0083] [表 4]-提取物 RA-A

[0084]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.646	12581	1924				
	2	3.602	1786	313				
	3	3.715	5140	389	V			
	4	4.411	36010	2058	V			
	5	4.64	18976	2043	V			
	6	4.904	94086	5839	V		1.3702	Stev mono
	7	5.683	42933	1608	V			
	8	6.108	9264	666	V			
	9	6.642	30742	778	V			
	10	7.192	23108	906	V			
	11	7.736	52867	2210	V		0.7699	Stev bio
	12	8.292	22402	750	V			
	13	8.831	44958	2378	V			
	14	9.615	104428	4765	V		1.5208	Rubuso
	15	10.262	92646	4531	V			
	16	10.917	33787	1420	V			
	17	12.778	63372	2978			0.9229	Dulco A
	18	13.466	12776	658	V		0.1861	I
	19	14.821	47594	1672			0.6931	Rebau B
	20	16.812	2795705	107308			40.7133	Stev
	21	18.95	683621	23300	V		9.9554	Rebau C
	22	20.017	130330	3792	V		1.8980	Rebau F
	23	22.017	4444	192				
	24	23.385	2759980	90911			40.1931	Rebau A
	25	26.082	15240	516				
	26	28.592	5443	144			0.0793	
	27	29.425	6048	234	V		0.0881	III + Rebau E
	28	30.066	29426	961	V		0.4285	IV
	29	33.96	10732	419			0.1563	V+VI+VII
	30	35.559	51215	1667			0.7458	Rebau D+VIII
	31	42.755	15644	462			0.2278	IX
	32	51.175	3535	108			0.0515	X
	TOT		7260819	267900			100.0000	

[0085] [表 5]-提取物 RA-B

[0086]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.136	1244	231				
	2	2.862	8119	1484				
	3	4.411	37288	2536				
	4	4.634	25374	2584	V			
	5	4.889	113717	7669	V		3.2793	Stev mono
	6	5.766	57184	1940	V			
	7	6.666	16138	503	V			
	8	7.319	34921	927	V		0.3964	Stev bio
	9	7.917	13888	628	V			
	10	8.533	19410	741	V			
	11	8.887	44852	2585	V			
	12	9.35	16370	1111	V		0.4751	Rubuso
	13	9.71	81099	3752	V			
	14	10.339	81250	3739	V			
	15	12.183	4543	172				
	16	12.941	26992	1213	V		0.5187	Dulco A
	17	13.658	35796	1693	V		0.7239	I
	18	15.012	62182	2088			0.8928	II
	19	17.039	1579831	61299			26.2115	Stev
	20	19.212	630967	21477	V		9.1836	Rebau C
	21	20.303	129387	3817	V		1.6322	Rebau F
	22	23.721	3953586	128495	S		54.9446	Rebau A
	23	26.44	11802	359	T			
	24	29.088	9888	346				
	25	29.817	9663	299	V			
	26	30.449	17347	602	V		0.2574	Rebau E+III+IV
	27	32.984	10425	255				
	28	34.415	15693	537				
	29	35.159	18016	574	V		0.2454	V+VI+VII
	30	36.025	68454	2067	V		0.8839	Rebau D+VIII
	31	37.749	4538	157				
	32	43.275	20100	626			0.2677	IX
	33	51.757	7320	205			0.0877	X
	TOT		7167384	256711			100.0000	

[0087] [表6]-提取物 RA-C

[0088]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.183	616	134				
	2	2.597	10175	1537				
	3	3.437	1414	323				
	4	4.46	13740	1017				
	5	4.642	6308	820	V			
	6	4.906	54449	4098	V		0.8853	Stev mono
	7	5.721	9947	485	V			
	8	6.06	3281	277	V			
	9	8.264	25348	701				
	10	8.844	16133	1093	V			
	11	9.66	34116	1479				
	12	10.275	34888	1821	V		0.5673	Rubuso
	13	10.799	10225	529	V			
	14	11.829	144125	5701				
	15	12.826	9263	377	V		0.1506	Dulco A
	16	14.874	129304	2644			2.1024	Rebau B
	17	16.871	437696	17109	V		7.1167	Stev
	18	19.001	472663	16510			7.6852	Rebau C
	19	20.078	99978	2988	V		1.6256	Rebau F
	20	23.439	4700591	156131			76.4290	Rebau A
	21	26.161	6575	216				
	22	28.759	19933	692				
	23	29.523	16030	496	V		0.2606	Rebau E
	24	30.192	4314	195	V		0.0701	III+IV
	25	32.915	22341	361			0.0000	
	26	34.044	20210	662	V		0.3286	V
	27	34.784	37467	1171	V		0.6092	VI+VII
	28	35.637	82080	2479	V		1.3346	Rebau D+VIII
	29	42.833	32965	977			0.5360	IX
	30	51.265	18371	536			0.2987	X
	TOT		6474546	223559			100.0000	

[0089] [表 7]-提取物 ST

[0090]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.626	7139	1183				
	2	3.325	824	127				
	3	3.683	3069	423	V			
	4	3.836	9867	1104	V			
	5	4.1	20804	2418	V			
	6	4.432	158950	6323	V			
	7	4.898	244425	14003	V		3.2613	Stev mono
	8	5.679	171018	7277	V			
	9	6.067	36443	2486	V			
	10	6.567	84143	3356	V			
	11	6.833	59479	3255	V			
	12	7.702	364999	10439	V		4.8701	Stev bio
	13	8.831	50633	2395	V			
	14	9.622	121367	5308	V		1.6194	Rubuso
	15	10.283	61202	2776	V			
	16	10.651	82679	3615	V			
	17	12.789	172505	7512			2.3017	Dulco A
	18	13.476	39377	1734	V		0.5254	I
	19	14.117	9126	325	V			
	20	14.843	56080	1517	V		0.7483	Rebau B
	21	15.883	18828	574	V		0.2512	II
	22	16.837	4190811	160109	SV		65.9165	Stev
	23	18.317	837	72	T			
	24	18.961	471940	16634	V		6.2969	Rebau C
	25	20.03	96159	2847	V		1.2830	Rebau F
	26	22.021	11777	430				
	27	23.407	1635704	52768	SV		21.8246	Rebau A
	28	26.087	18075	573	T			
	29	30.114	37321	1256			0.4980	Rebau E+III+IV
	30	34.028	11847	362			0.1581	V+VI+VII
	31	35.633	28790	851	V		0.3841	Rebau D+VIII
	32	42.867	4616	125			0.0616	IX
	TOT		8280834	314177			100.0000	

[0091] [表 8]-晶体 ST-ST

[0092]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2.64	20368	3347				
	2	3.342	792	150				
	3	8.16	199715	8553				
	4	9.579	28792	1602			0.7198	Rubuso
	5	13.436	6892	362			0.1723	I
	6	16.763	3809949	146224	S		95.2514	Stev
	7	19.017	1413	63	T		0.0953	Rebau C
	8	21.883	3078	108			0.0770	Rebau F
	9	23.323	138456	4564	V		3.4615	Rebau A
	10	26.007	6455	215				
	11	30.02	11309	367			0.2827	Rebau E+III+IV
	TOT		4227219	165565			100.0000	

[0093] [表 9]-晶体 ST-RA

[0094]

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
I	1	2.567	11398	2039				
	2	3.19	846	174				
	3	11.629	43279	1893				
	4	14.703	13970	400			0.4290	Rebau B
	5	15.927	1715	79				
	6	16.885	7321	220			0.2248	Stev
	7	18.961	4537	192			0.1393	Rebau C
	8	20.055	9706	413			0.2981	Rebau F
	9	23.428	3204919	106088			98.4203	Rebau A
	10	28.744	5579	170			0.1713	Rebau E+III+IV
	11	33.32	4707	121			0.1445	V+VI+VII
	12	35.603	4198	146			0.1289	Rebau D+VIII
	13	42.8	1422	45			0.0437	IX
	TOT		3313597	111980			100.0000	

[0095] 上述表格中使用的缩写如下：

[0096] PKNO :峰号

[0097] T :时间 (分钟)

[0098] A :峰面积

[0099] H :峰高

[0100] CONC :浓度 (%)

[0101] N :糖苷的名称

[0102] TOT :总计

[0103] Stev mono :甜菊醇单糖苷

[0104] Stev bio :甜菊醇双糖苷

[0105] Rebuso :甜茶苷

[0106] Rebau :莱鲍迪苷

[0107] Stev :甜菊苷

[0108] Dulco :杜尔可苷

[0109] 根据 210nm 处紫外吸收光谱的总面积计算浓度,并且为了测量所含的体积有必要校正分子量。谱图中的 I-X 表示新颖的甜菊醇糖苷 I-X。

[0110] 实施例 6 味道品质的评价

[0111] 由 10 名熟悉甜叶菊感觉测试的人员对各种提取物的 0.05% 水溶液和晶体的 0.03% 水溶液进行评估。在下表 10 中显示了平均的评估结果：

[0112] 评价 5 :优异, 4 :良好, 3 :普通, 2 :坏, 1 :最差

[0113] [表 10]

[0114]

感觉测试品	1)	2)	3)	4)	5)	6)
RA-A 提取物	4.1	3.8	4.1	4.9	3.4	3.8
RA-A 晶体	5.0	4.9	4.9	3.2	4.9	4.9
RA-B 提取物	4.2	3.8	4.1	4.9	3.5	3.7

RA-B 晶体	5.0	5.0	4.9	3.5	4.9	4.9
RA-C 提取物	4.2	4.0	4.5	4.8	3.5	3.8
RA-C 晶体	5.0	5.0	5.0	3.8	5.0	5.0
ST 提取物	1.2	1.3	1.2	4.0	2.0	2.0
ST-RA 晶体	4.8	4.6	4.6	3.0	4.8	4.3

[0115] 1) 甜味品质

[0116] 2) 口中残留味道

[0117] 3) 涩味

[0118] 4) 精美的味道

[0119] 5) 清爽的感觉

[0120] 6) 流出的甜味

[0121] 相比于三种 RA 晶体,含有甜菊醇糖苷 II-X(莱鲍迪苷 G 至 O) 的三种 RA 提取物具有优异的精美味道,但 RA 晶体在其它评估方面表现优异。除了精美的味道评估项外,ST 提取物劣于 ST-RA 晶体。由该结果验证了新的甜菊醇糖苷 II-X 影响精美的味道。

[0122] 实施例 7 品种鉴定

[0123] 根据各个提取物和 / 或晶体的 HPLC 分析,从含有 RA 作为主要成分的品种(以下称品种 RA) 获得的提取物包含更多的莱鲍迪苷 D,以及相比于从含有 ST 作为主要成分的品种(以下称品种 ST) 获得的提取物其还包括甜菊醇糖苷 X(莱鲍迪苷 O)。还发现甜菊醇糖苷 X 还包括在由 RA 品种提取物纯化而得的 RA 晶体中(虽然是痕量)。

[0124] 另一方面,从 ST 品种获得的提取物中不含有甜菊醇糖苷 X。自然地,未在从 ST 品种获得的 ST-RA 晶体中发现甜菊醇糖苷 X。由此可确认如果确认存在甜菊醇糖苷 X,则该提取物或晶体得自 RA 品种。

[0125] 实施例 8 甜菊醇糖苷的分析方法

[0126] 根据实施例 5 所述的 HPLC 条件,可确认各个甜菊醇糖苷 I-X。原则上,可通过 HPLC 分析图表的 R. T. 确认甜菊醇糖苷的存在,但各个甜菊醇糖苷 I-X 可在制备性分离各个糖苷后通过分子量测定而被确认。

[0127] 实施例 9 台面糖

[0128] 1) 通过混合 1g RA-A 晶体和 99g 粉末糖而制得台面糖。

[0129] 2) 通过混合 1g RA-B 晶体和 99g 赤藓醇而制得台面糖。

[0130] 3) 通过混合 1g RA-C 晶体和 99g 高果糖含量玉米糖浆而制得台面糖。

[0131] 实施例 10 糖果

[0132] 将 0.3g RA-C 提取物、100g 帕拉金糖醇和适当体积的香料制成糖果。

[0133] 实施例 11 牛奶果冻

[0134] 由 15g 糖、0.08g RA-B 提取物、250g 牛奶、5g 明胶和适当体积的牛奶香料制成牛奶果冻。

[0135] 实施例 12 运动饮料

[0136] 由 0.075% 的 RA-B 晶体、0.11% 的乳酸钙、0.045% 的柠檬酸、0.03% 的柠檬酸三钠、0.015% 的氯化镁、0.0055% 的谷氨酸和 99.72% 的水制成运动饮料。

[0137] 实施例 13 碳酸饮料

[0138] 碳酸饮料通过如下步骤制备：加入 0.012% 的 RA-B 晶体、8.4% 的果糖、0.6% 的柠檬酸、0.12% 的精氨酸、0.1% 的肌醇、0.0025% 的咖啡因、0.0034% 的泛酸钙、0.003% 的烟酰胺、0.002% 的维生素 B6、0.00009% 的维生素 B2、0.000002% 的维生素 B12、适当体积的香料和水以调节到总成分为 100%，然后引入二氧化碳气体。

[0139] 工业实用性

[0140] 通过 HPLC 分析本发明提供的新甜菊醇糖苷，可制造甜味剂和具有一定甜度、品质和精美味道的其它食品。另外本发明还可以推测原料的品种，并且有助于判断来源指示的正确性、甜菊品种的栽培区域、或者是否侵权。

[0141] 附图简述

[0142] 图 1 显示了提取物 RA-C 的 HPLC 分析图表。

[0143] 图 2 显示了晶体 RA-A 的 HPLC 分析图表。

[0144] 图 3 显示了晶体 RA-B 的 HPLC 分析图表。

[0145] 图 4 显示了晶体 RA-C 的 HPLC 分析图表。

[0146] 图 5 显示了提取物 RA-A 的 HPLC 分析图表。

[0147] 图 6 显示了提取物 RA-B 的 HPLC 分析图表。

[0148] 图 7 显示了提取物 RA-C 的 HPLC 分析图表。

[0149] 图 8 显示了提取物 ST 的 HPLC 分析图表。

[0150] 图 9 显示了晶体 ST-ST 的 HPLC 分析图表。

[0151] 图 10 显示了晶体 ST-RA 的 HPLC 分析图表。



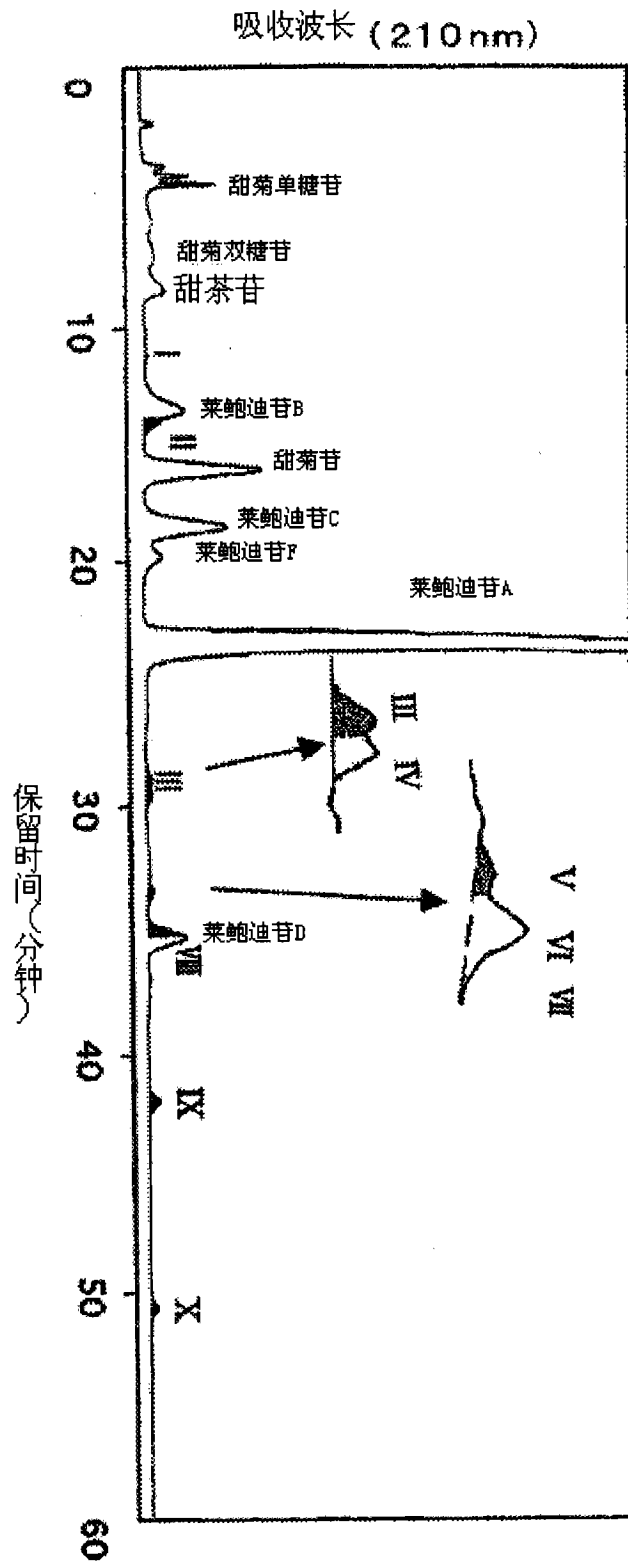


图 1

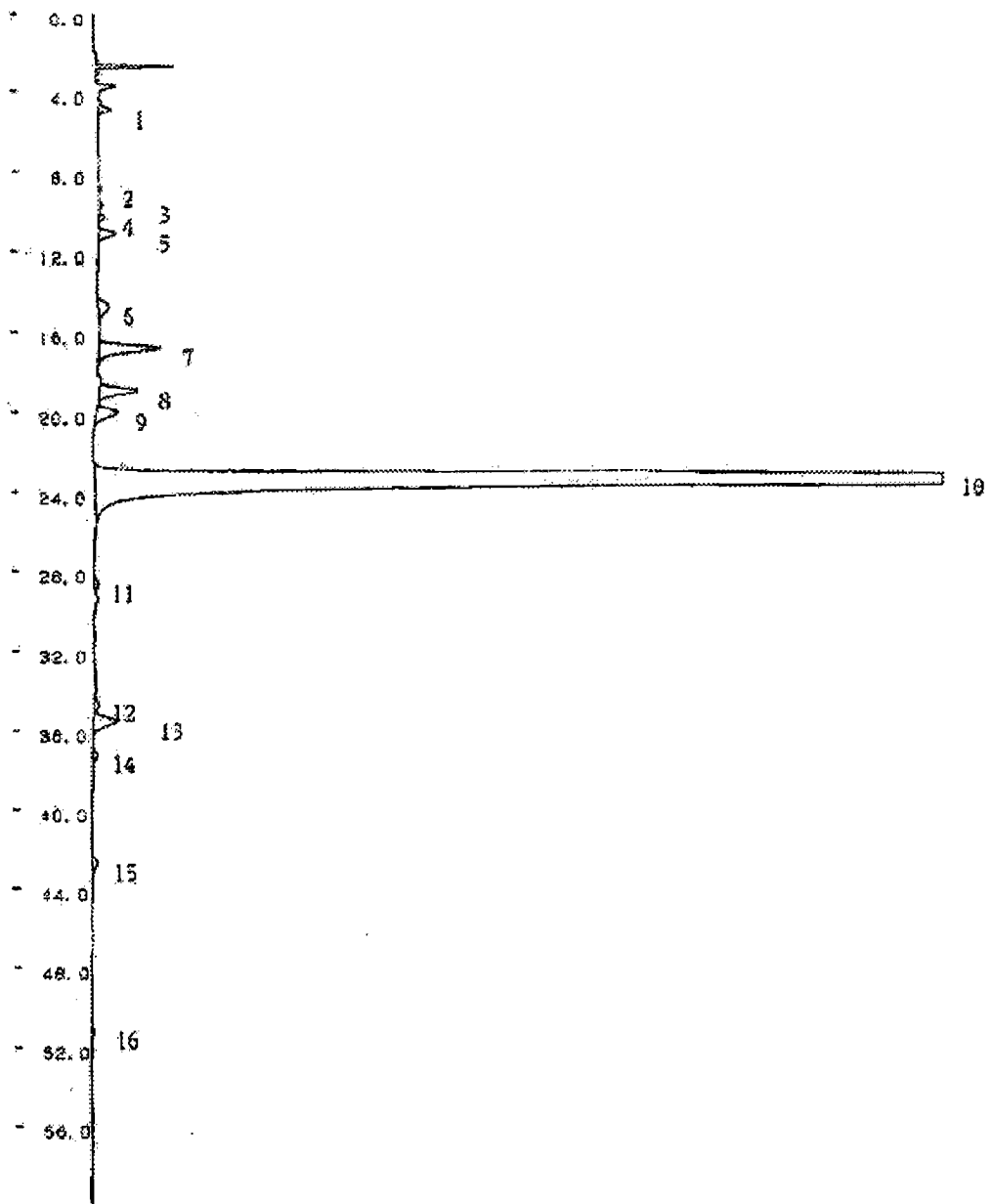


图 2

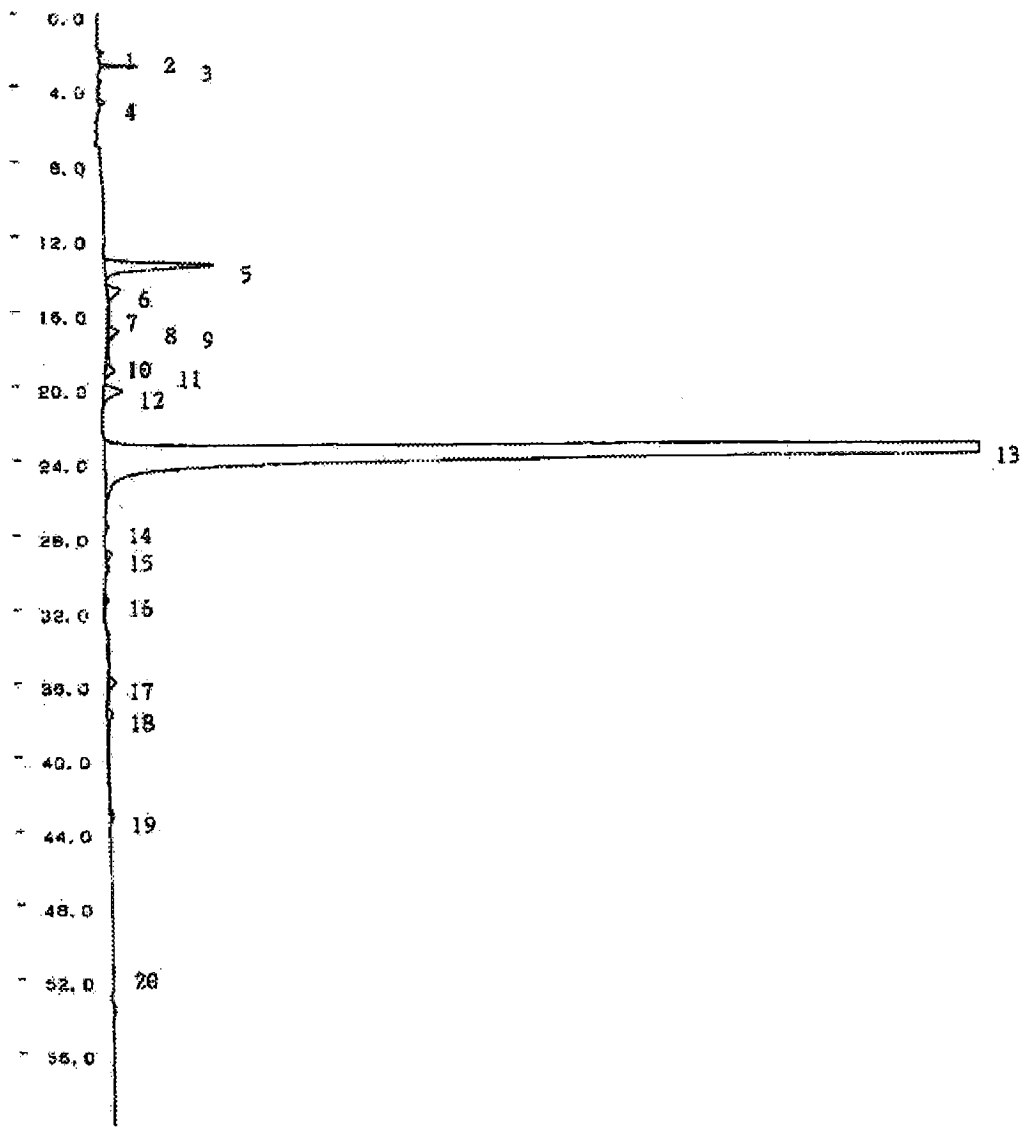


图 3

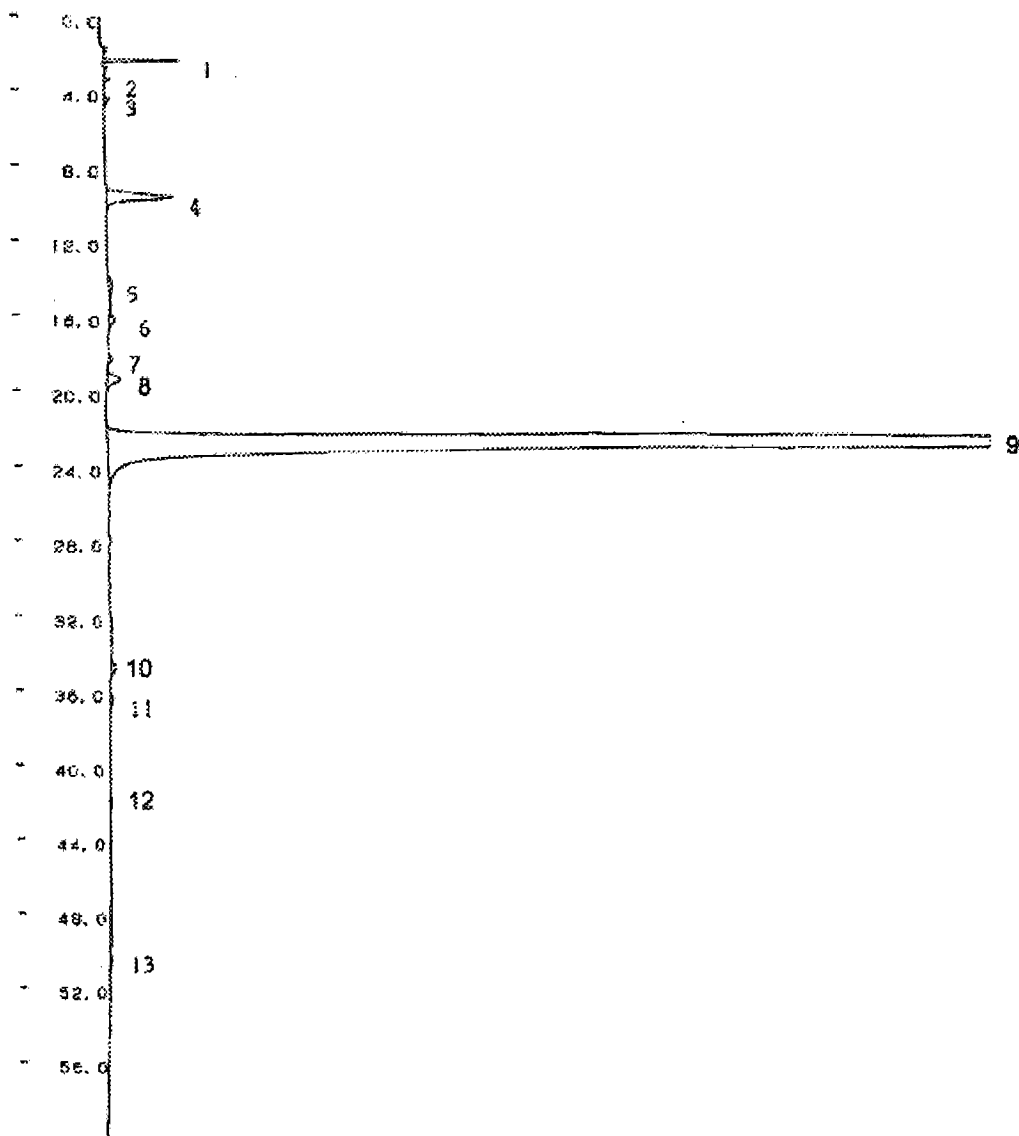


图 4

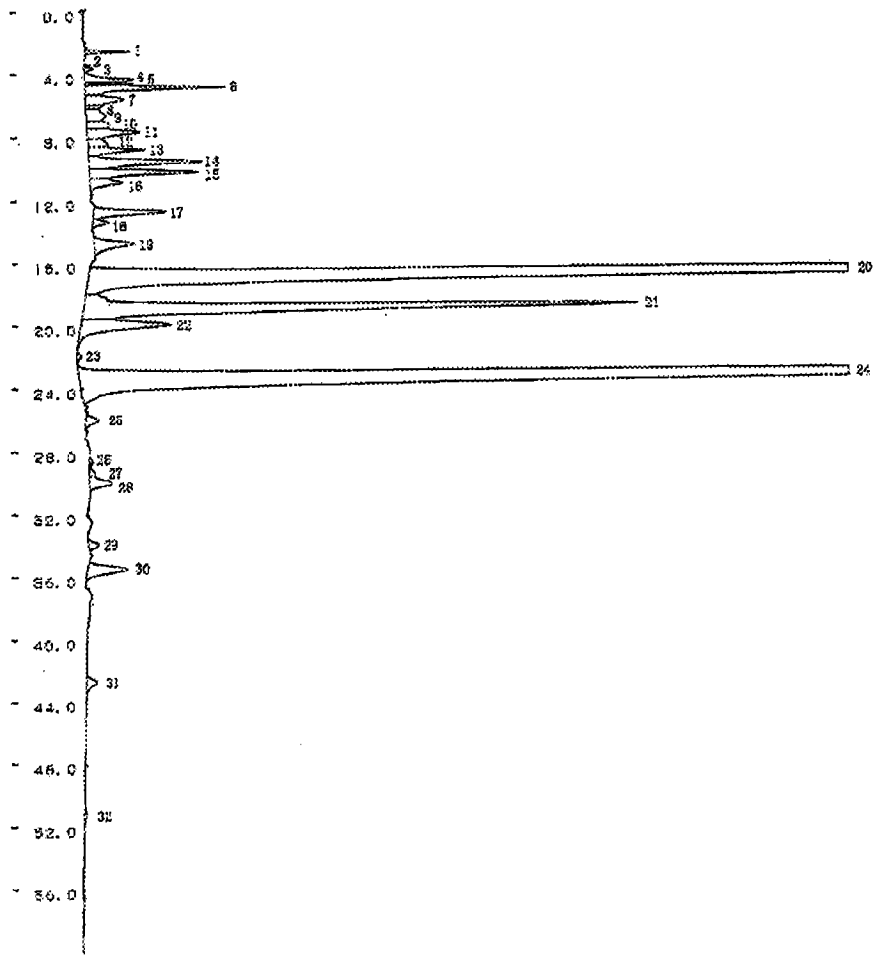


图 5

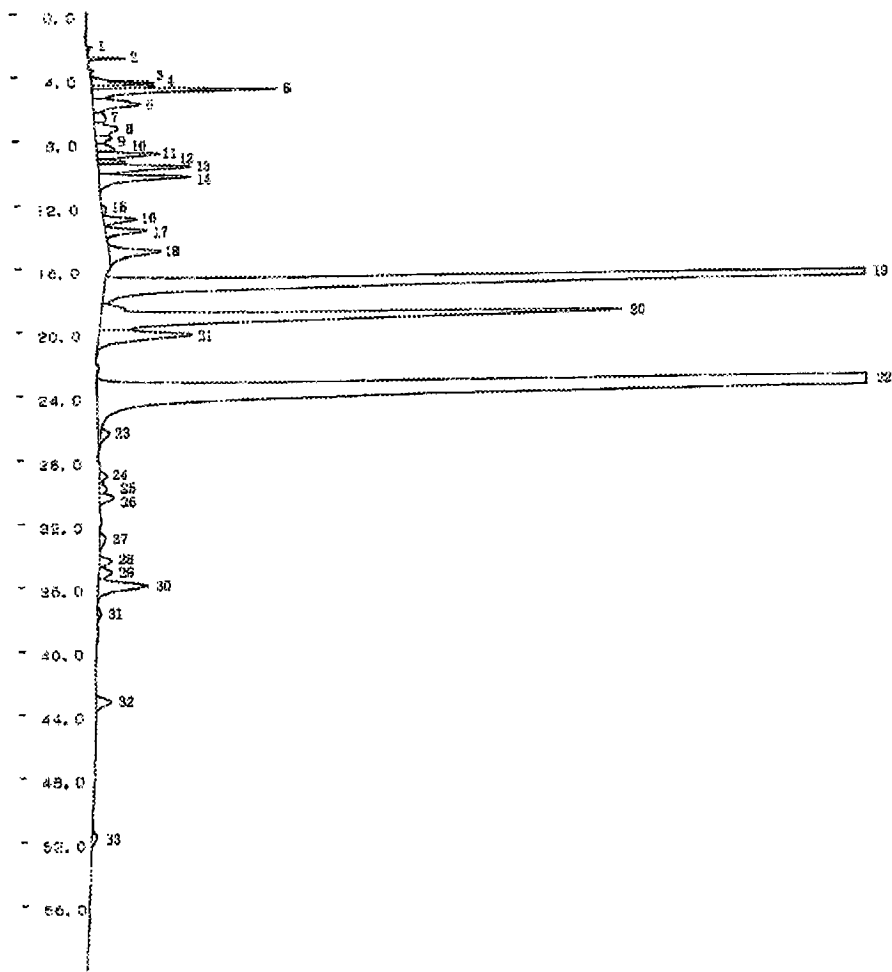


图 6

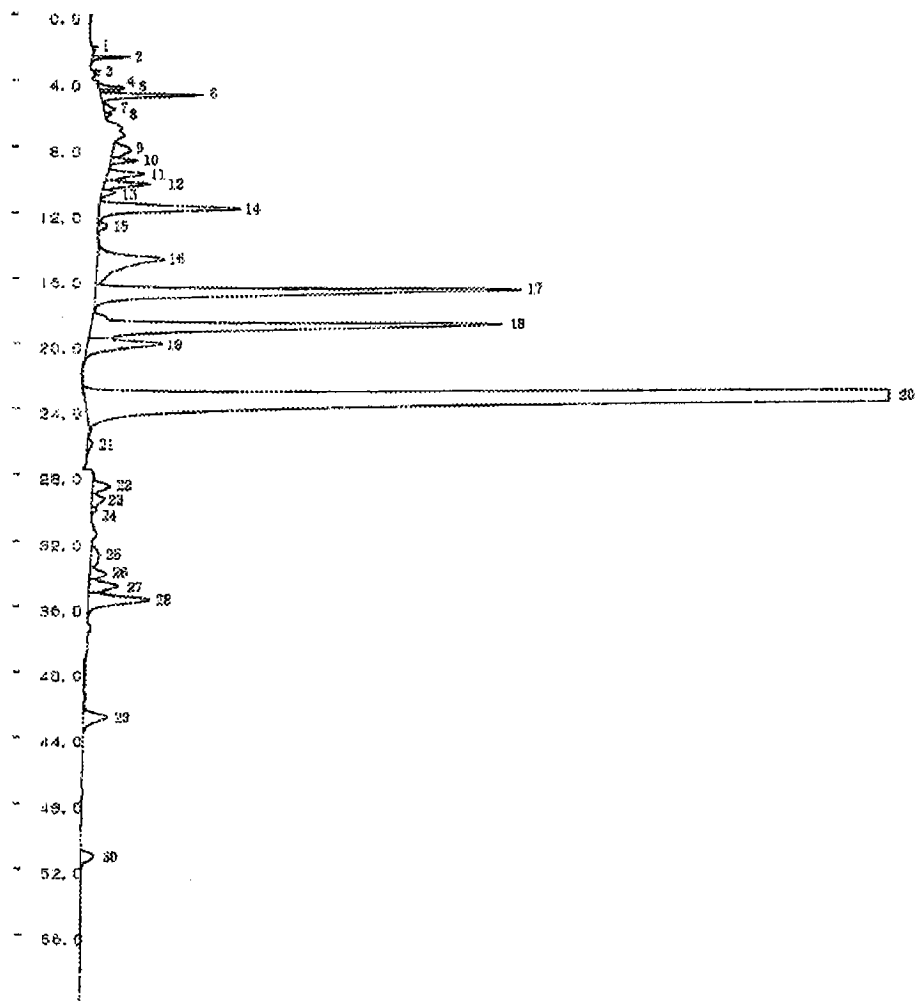


图 7

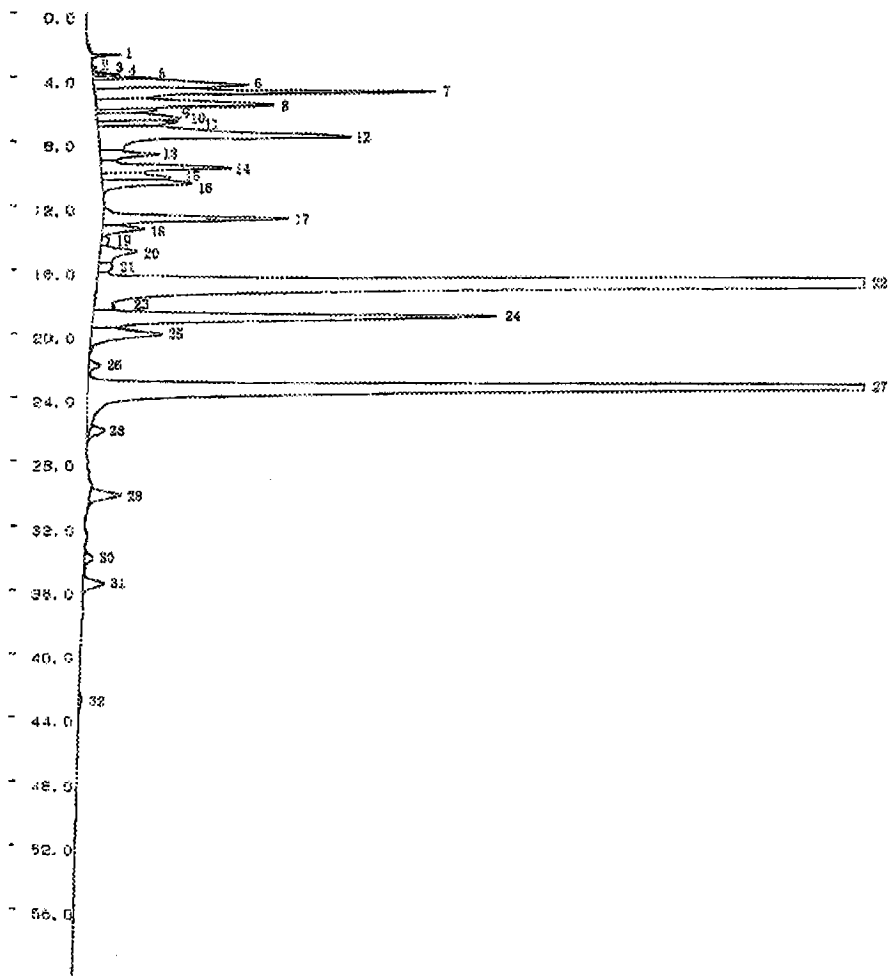


图 8



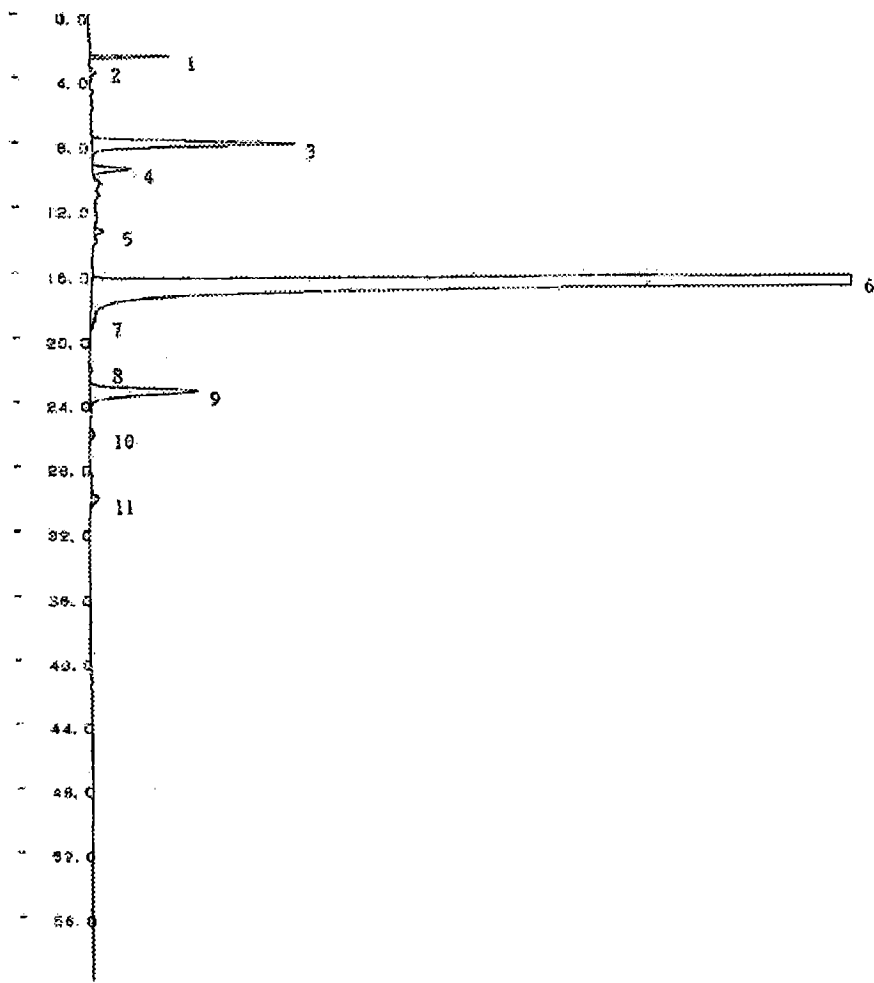


图 9

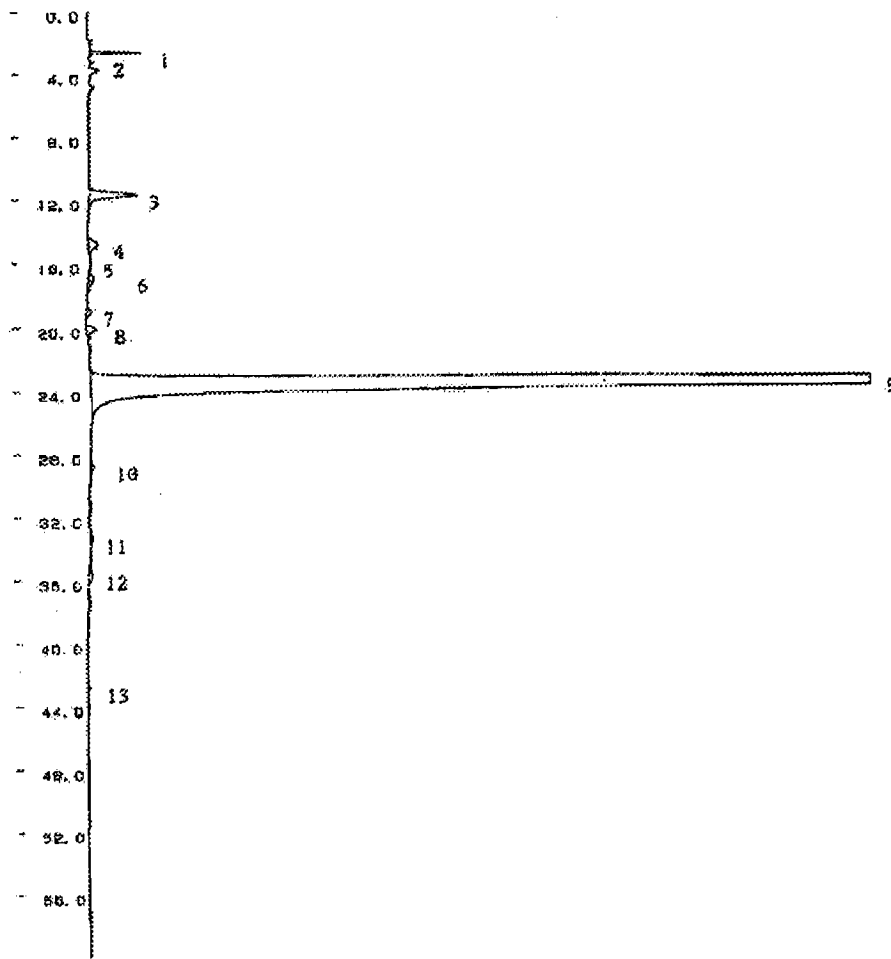
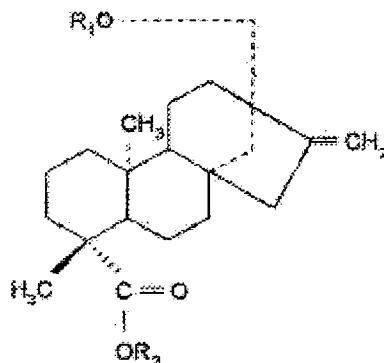


图 10

1. 式 I-X 的甜菊醇糖苷：



其中  $R_1$  和  $R_2$  是氢原子或下表中定义的糖链；

编号	$R_1$	$R_2$
I	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	H
III	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IV	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
V	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc}$
VI	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$
VII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$
VIII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
IX	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$
X	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow1)$

2. 一种得自菊科多年生植物甜菊 (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) 的提取物,其包含作为主要成分的莱鲍迪苷 A,以及包含根据权利要求 1 的甜菊醇糖苷 X。

3. 一种由权利要求 2 的提取物生产高纯莱鲍迪苷 A 的方法。

4. 一种生产食品的方法,其特征在于加入等于或小于 1% 量的权利要求 2 所述的提取物。

5. 一种生产食品的方法,其特征在于加入等于或小于 1% 量的通过权利要求 3 所述方法获得的高纯莱鲍迪苷 A。

6. 一种使用甜菊醇糖苷 X 确认甜叶菊品种的方法。

7. 甜菊醇糖苷 I-X 的分析方法。

[0001] 根据 PCT19(1) 的陈述

[0002] 在权利要求 1 中,删去了表格中式 II 的甜菊醇糖苷。

[0003] 基于引用的 D1 中公开了式 II 的甜菊醇糖苷,权利要求 1 的新颖性被否认。我们删去了权利要求 1 中的糖苷 II。

[0004] 在权利要求 2 中,插入了“ ,以及包含根据权利要求 1 的甜菊醇糖苷 X”。

[0005] 在原始说明书的第 1 页第 1 段,描述了通过提取甜菊获得了包含甜菊醇糖苷 X 的提取物,其中莱鲍迪苷 A 是一种主要成分。因此所述修改没有引入新的主题。

[0006] 权利要求 3-7 未作修改。