

# “恩七叶甜”绞股蓝甜味物质分子结构初步研究

郑小江<sup>1,2</sup>, 刘金龙<sup>1,2</sup>, 毛先发<sup>2</sup>

(1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000;

2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

**摘 要:** 从“恩七叶甜”中提取出的甜味物质有宜人的清凉甜味, 提取率达 9.3%。其为非糖类物质, 热量低, 可预防肥胖症、糖尿病、心血管病及龋齿; 它又是一种新的天然甜味剂, 可大量用于医药、保健饮食品工业产品中。本实验提取及检测方法是: “恩七叶甜”干叶粉末乙醚脱脂→95% 乙醇浸泡超声波破碎→热浸提→离心过滤→ZTC 除杂→离心→浓缩→甲醇溶解丙酮沉淀→沉淀物用去离子水溶解水饱和正丁醇萃取→水相浓缩→过硅胶柱→过 Sephadex G-10 纯化冷冻干燥→液质质谱检测。经分析甜味物质有两个组分, 一个分子量为 274; 另一个分子量为 170, 分子式为  $C_{11}H_{10}N_2$ , 这两种都是新的甜味物质, 值得进一步研究。

**关键词:** “恩七叶甜”绞股蓝; 甜味物质; 分子量; 分子结构

## A Preliminary Study of Molecular Structure of Sweet Substances from “Enqiyetian” Variety of *Gynostemma pentaphyllum*

ZHENG Xiao-jiang<sup>1,2</sup>, LIU Jin-long<sup>1,2</sup>, MAO Xian-fa<sup>2</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Biological Resource Conservation and Utilization, Enshi 445000, China;

2. School of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

**Abstract:** Sweet substances, which give a pleasant, cool, sweet taste when eaten, were extracted from “Enqiyetian”, a new variety of *Gynostemma Pentaphyllum* with a yield up to 9.3%. Due to non-carbohydrate and low heat, they have wide medical applications in prevention of obesity, diabetes, cardiovascular diseases and dental caries. Apart from this, they also can be used as a new natural sweetener. The optimal procedure for extraction and purification of sweet substances developed in this study was based on the following steps: defatting of dried powder of “Enqiyetian” leaves as the raw material with ether, ultrasonic cell disruption in 95% ethanol, hot water extraction, centrifugation, impurity removal using ZTC+1, centrifugation, concentration, dissolution in methanol and then precipitation with acetone, redissolution in deionized and then extraction with water-saturated n-butanol, rotary evaporation of the aqueous phase, separation of sweet substances using silica gel column, purification of sweet substances using Sephadex G-10 column, freeze-drying, and LC-MS analysis. The final product was showed to consist of two compounds sharing with the same molecular formula of  $C_{11}H_{10}N_2$  and the molecular weight of one was 274 and another of 170. Our findings suggested the potential of these sweet substances as a novel sweet material.

**Key words:** “Enqiyetian” variety of *Gynostemma pentaphyllum*; sweet substances; molecular weight; molecular structure

中图分类号: O636.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)21-0046-04

全世界每年消费的食糖在 1.2 亿 t 以上, 但随着患肥胖症、糖尿病及心血管病的人数日益增多, 人们越来越希望食品中所使用的蔗糖被无热值或低热值的甜味剂代替<sup>[1]</sup>。随着消费者对食品质量要求的不断提高, 研究一种既能表现糖的 4 种特有功效, 又不提供热量, 既不需要胰岛素代谢, 又不导致龋齿的甜味剂, 已成为

业界的热门课题, 从而促成了保健性甜味剂的诞生和发展。目前, 合成的和提取的天然甜味剂已有多面市, 如合成的阿斯巴甜在全世界 100 多个国家超过 600 多种产品中使用, 形成了年销售额为 100 亿美金的市场并还在每年大幅度增加<sup>[2-3]</sup>, 但存在影响人体健康的隐患, 给了天然非糖甜味剂很大发展空间; 但都带有后味存在不

收稿日期: 2009-05-16

基金项目: 湖北省高校产学研资助项目(CXY2009B); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室资助项目(2007022; 2007021)

作者简介: 郑小江(1958—), 男, 教授, 本科, 研究方向为生物资源保护与利用。E-mail: hbzxj123@126.com

足的缺点<sup>[4-8]</sup>, 并存在原料种植受局限性、原料种植与农作物争地、生产周期长、生产成本低、产品价格高等问题。

绞股蓝新品种“恩七叶甜”味清甜<sup>[9]</sup>, 2008年获得湖北省科技进步二等奖, 从中提取的甜味物质克服了目前市场上所有甜味素后味差的缺点并甜味达到蔗糖300倍、含量达到9.3%, 是生产饮料的理想甜味素, 具有很高的开发价值, 但未见关于它的分子水平研究<sup>[10-14]</sup>, 本实验着重研究“恩七叶甜”中甜味物质的分子结构。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

“恩七叶甜”绞股蓝干叶由生物资源保护与利用湖北省重点实验室、湖北民族学院生物科学与技术学院建立的甜味绞股蓝生产基地提供。

超纯水、ZTC1+1除杂剂、葡聚糖凝胶Sephadex G-10、硅胶G、可溶性淀粉; 甲醇(色谱纯) 美国Waters公司; 茛三酮、甲醇、丙酮、正丁醇、乙醚、95%乙醇、无水乙醇等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

恒温水浴锅 江苏省医疗器械厂; TG328A型电子析天平 上海分析天平厂; DY89-1型电动玻璃匀浆机、JY96-II型超声波细胞破碎仪、DL-720L超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; DHL-A恒流泵、DBS-100电脑全自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; RE-52A型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; FD-1-55冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; HN202-2AS不锈钢电热恒温干燥箱 南通沪南科学仪器有限公司; API4000型三级四级串联液相色谱-质谱仪 美国应用生物公司; 低速大容量离心机; 40~60目铜制分子筛; 组织捣碎机; 层析板; 电炉; 层析柱。

### 1.3 甜味物质提取工艺流程

“恩七叶甜”绞股蓝干叶粉末→乙醚浸泡(脱脂)→25%的乙醇浸泡→超声波破碎机破碎  
↓  
ZTC1+1除杂(除蛋白质、氨基酸、鞣质等)→离心过滤  
↓  
离心过滤→旋转蒸发器浓缩→甲醇溶解丙酮沉淀(1:10)(除去黄酮)  
↓  
备用纯化←水相浓缩成浸膏←水饱和正丁醇萃取(除去皂苷)←沉淀用去离子水溶解

### 1.4 甜味物质的提取方法与步骤

将甜味绞股蓝鲜叶烘干经组织捣碎机捣碎, 过60目筛, 电子分析天平称取其干粉50g放入400ml烧杯, 按干粉:乙醚为1:8(g/ml)密封浸泡30min, 回收乙醚, 再按绞股蓝干粉:95%乙醇1:8(g/ml)密封浸泡1h, 置超声波破碎机内破碎两次(强度在120Hz左右, 每次15min); 破碎后材料放入恒温水浴锅中70℃热浸提1.5h, 每0.5h用

滤布滤出液体, 滤渣再加等量除离子水浸泡, 滤液合并用离心机离心除杂; 上清液用ZTC1+1除杂剂除杂: 将液体放入恒温水浴锅, 温度升到80℃, 加B型除杂剂(用量为整个液体体积的4%), 保持温度80℃进行除杂2h, 每0.5h用匀浆机搅拌一次; 结束后将温度降到60℃加A型除杂剂(用量为整个液体体积的2%), 搅拌后升温保持80℃, 除杂1h, 用滤布滤掉杂质, 重复两次。合并滤液, 离心除杂, 上清液用旋转蒸发器浓缩到半膏状, 然后按半膏状1g加入3ml 95%乙醇, 充分沉降多糖, 上清液回收乙醇浓缩。向浓缩物中加入10ml甲醇充分溶解, 按1ml甲醇溶解物加入10ml丙酮, 回收沉淀物, 重复4次, 直至不再产生白色沉淀, 用水饱和和正丁醇溶液溶解沉淀, 再加入等体积的超纯水, 在分液漏斗中萃取分离, 留水相, 用旋转蒸发器将水相浓缩成浸膏状, 再次加入10ml甲醇充分溶解, 按1ml甲醇溶解物加入10ml丙酮, 回收沉淀物, 重复4次, 直至不再产生白色沉淀, 用水饱和和正丁醇溶液溶解, 加入等体积的超纯水萃取3次, 回收水相浓缩成浸膏, 待分离纯化。

### 1.5 甜味物质的分离纯化

#### 1.5.1 薄层色谱

本实验选用薄层层析硅胶G进行层析分离。主要检测提取物中有无氨基酸和甜味物质的极性。

薄层板的制备<sup>[15]</sup>: 称取可溶性淀粉1.0g, 加纯化水40ml, 在电炉上加热沸腾, 然后称取活化的硅胶G(108℃, 处理1h)14g加入, 用玻璃棒搅匀, 铺板, 置室温下干燥。

点样: 取毛细管1支, 吸取水相浓缩液, 距板一端1.5cm处, 进行点样, 随加将其吹干。

展开: 选用上行法, 用20%的乙醇作为展开剂, 将做好的薄层板放入层析缸中, 盖好盖。当展开剂上行到距板另一端1.5cm时, 取出薄层板。

显色: 取毛细管1支吸取茛三酮溶液适量, 沿样品上行的方向依次滴加, 然后放入80℃烘箱中加热显色。

#### 1.5.2 硅胶柱

本实验选用200目的硅胶作吸附剂。目的是根据甜味物质的极性将其从粗提物中精制出来。

硅胶活化温度为108℃, 时间1h。然后用丙酮浸泡1d, 隔2h搅拌一次, 回收丙酮, 再用20%的乙醇洗脱液淋洗硅胶数次, 除去丙酮后进行湿法装柱。选一个长100cm, 内径3.5cm的玻璃柱, 垂直固定; 将烧杯中的硅胶悬浮液倾入柱中, 待液面到柱的中间时, 打开柱的出口, 硅胶缓慢沉淀, 上面继续加硅胶悬浮液, 待沉积面离柱顶端15cm处停止装柱。再用3~5BV的超纯水在恒定压力下流过硅胶柱, 排除柱内空气。

待超纯水流至距柱床表面约2mm时关闭出口, 以层析允许最小体积的样品, 用滴管慢慢加入柱内, 打开出口, 使样品渗入硅胶内。当样品将完全渗入时,

将待分离纯化浸膏用少量无水乙醇溶解成浓溶液,用滴管加入硅胶柱,待基本渗入硅胶后,加20%乙醇按0.02ml/min洗脱。

### 1.5.3 凝胶柱

选用葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 作为吸附剂。目的是根据分子量大小不同在其中走的速度不同将其极性相同而分子大小不同的单体物质分离。

#### 1.5.3.1 凝胶的处理

称取10g Sephadex G-10 干胶,加到约100ml超纯水中,在沸水浴中溶胀1h,将水倒出,加入超纯水洗涤。洗涤过程中,浮选3~5次,除去小颗粒和碎片,用超纯化水泡着待用。

#### 1.5.3.2 装柱

选用1cm×35cm的层析柱,用超纯水洗净后,将层析柱垂直装好,装填待用凝胶。然后从层析柱上口加入20%的乙醇洗脱液清洗凝胶排除柱内空气,结束时保持,保持凝胶界面有洗脱液,将硅胶柱层析分离物用洗脱液混成匀浆装柱保持流速0.2ml/min,分离<sup>[15]</sup>。

### 1.6 甜味物质的分子结构检测

质谱条件:应用 Waters Quattro Premier 串联四极杆液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)仪,样品用电喷雾离子源离子化,气帘气137.9MPa;雾化气172.4MPa;辅助气174.2MPa;TEM离子源温度450℃;电喷雾电压4500V;CAD碰撞气5V;去簇电压70V;射入电压11V。

色谱条件:色谱柱:Zorbax ODS-C<sub>18</sub>(2.1mm×150mm)柱,色谱分离条件:甲醇-水(30:70);紫外检测器,波长254nm<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 绞股蓝甜味素粗精制物中含有氨基酸成分

用提取的高纯甜味物质做硅胶G薄层分离,跑在前沿的斑点用茚三酮定性显紫红色为氨基酸类物质,跑在后面的斑点用茚三酮定性不显色。证明样品中含有氨基酸成分,结果见图1。下一步需要证明它是否是氨基酸甜味物质。

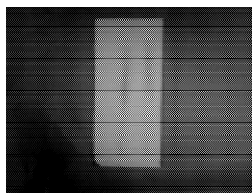


图1 薄层色谱层析效果图

Fig.1 TLC profile of purified sweet extract from "Enqiyetian"

### 2.2 色谱检测结果

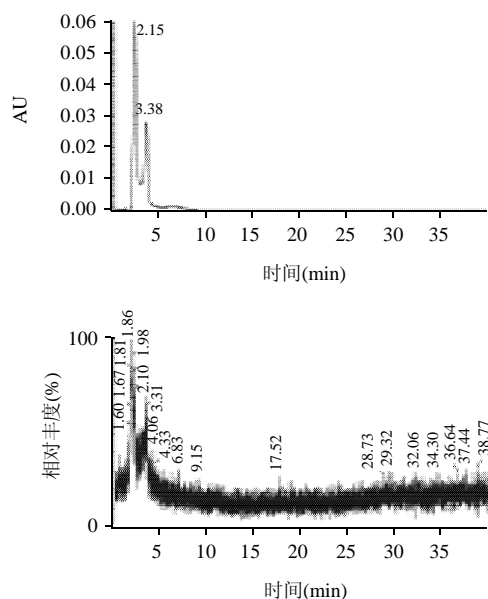


图2 绞股蓝甜味物质液质联用图谱

Fig.2 GC and MS chromatograms of purified sweet extract from "Enqiyetian"

由图2可见,提取的高纯绞股蓝甜味物质,有两个主要组分。两个主要组分并且显示出极性大,极性相近的理化性质,将这两个主要组分分离成单体有一定困难。

### 2.3 绞股蓝高纯甜味素组分1的分子鉴定

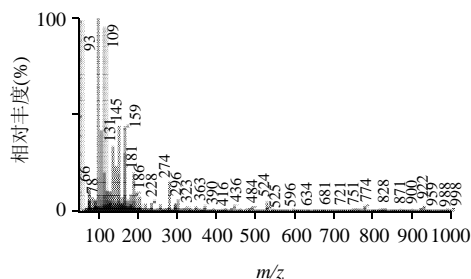


图3 组分1的质谱图

Fig.3 Mass spectrum of fraction 1 of purified sweet extract from "Enqiyetian"

从图3来看,根据分子离子峰的判断,质荷比为274的峰为组分1的分子离子峰,故组分1的分子量为274,根据丢失的碎片质量( $\Delta m$ )为14、15、16,确定组分中含有C、H、O、N四种元素。

### 2.4 绞股蓝高纯甜味素组分2的分子鉴定

见图4,判定质荷比为170的峰为组分2的分子离子峰,故组分2的分子量为170,根据丢失的碎片质量( $\Delta m$ )为14、25,确定组分中含有C、H、N三种元素。同位素峰的丰度比(M+1)/M%为17.10。从Beynon表中查得分子量为170的分子式共有37个,见表1。根

表1 部分 Beynon 表(M=170部分)  
Table1 Partial Beynon table (M=170)

分子式	M+1	M+2	分子式	M+1	M+2	分子式	M+1	M+2	分子式	M+1	M+2
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7.50	1.05	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O	9.35	0.59	C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	10.97	0.75	C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	11.33	0.98
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.87	0.87	C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O	10.24	0.68	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	11.35	0.59	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	11.70	0.83
C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8.25	0.70	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O	10.08	0.66	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	10.07	1.06	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub>	12.08	0.67
C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	8.23	1.10	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.71	0.82	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>	10.44	0.89	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	11.17	0.97
C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	8.60	0.93	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	9.34	0.99	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	10.82	0.73	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO	11.55	0.81
C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8.98	0.76	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	8.96	1.16	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub>	11.19	0.57	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>	11.92	0.65
C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub>	10.46	0.50	C <sub>9</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.60	0.91	C <sub>10</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10.96	1.14	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	12.06	1.06
C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> NO	12.44	0.91	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> N	12.65	0.74	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	13.17	1.00	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N	13.54	0.85
C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	12.81	0.75	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	13.38	0.83	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub>	14.27	0.94	C <sub>14</sub> H <sub>2</sub>	15.16	1.07
C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	12.28	0.89									

据氮律, 分子中有偶数个 N, 没有 O 元素, 化物的数据与表中 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub> 的数据最接近, 因此可以确定该化合物的分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>。

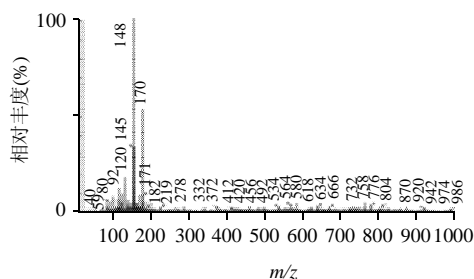


图4 组分2的质谱图

Fig.4 Mass spectrum of fraction 2 of purified sweet extract from "Enqiyetian"

### 3 结论与讨论

3.1 从液质质谱的研究证明绞股蓝新品种“恩七叶甜”所含甜味素有2种物质, 其中一个物质的分子量为274, 确定组分中含有C、H、O、N四种元素, 因暂无M=274的Beynon表, 无法确定分子量为274的分子式。可选择酰化技术使用带数据库的气质质谱仪测定后确定其分子式; 另一个组分的分子量为170, 分子式为C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>。可进一步研究将这两种物质提取分离成单体结晶, 配合使用红外仪、紫外仪、元素分析仪、核磁共振研究获得它们的分子结构。

3.2 ZTC1+1除杂剂结合试剂萃取可得高纯度的甜味素。本研究在除杂时, 为了提高除杂效果, 使用了两次ZTC1+1除杂剂并在加A液时将温度控制在60℃, 除杂的效果可达90%以上; 然后结合试剂萃取, 提高纯度。在用甲醇溶液溶解浓缩浸膏时, 要充分使成半透明状, 再倒入丙酮溶液中, 沉淀效果较好。

3.3 提纯的绞股蓝新品种“恩七叶甜”甜味素是蔗糖

甜度的2000倍, 粗提的甜度是蔗糖甜度的300倍, 提取率达到9.3%。有工业提取价值。它在水中溶解性极好, 口感清甜, 回味舒适并浓郁的香味, 它低热能防止肥胖症、糖尿病、最理想甜味剂。它适合与高秆作物和经济林间套作, 不影响作物和经济林的产量, 生产成本低, 是理想的纯天然甜味剂原料, 在市场上有较强的竞争力。将其加入饮料中其口感变得清凉爽口, 醇和味美。在凉果、蜜饯和其他食品中使用能有效突出产品风味, 令其味道甘甜绵长, 倍添鲜美。是理想的生产保健饮食品需要的纯天然甜味剂。

### 参考文献:

- [1] 伊尚武, 张文彬, 姜淑芬, 等. 甜味剂的发展及其对我国传统制糖业的影响[J]. 中国糖料, 2004(2): 51-55.
- [2] 胡晓倩. 植物体内非糖类甜味剂的开发与利用[J]. 国土与自然资源研究, 2005(4): 87-88.
- [3] 王旭峰. 甜味剂: 新世纪的宠儿[J]. 生活与健康, 2006(1): 10-13.
- [4] 齐峰, 邢宇, 孙伟. 甜味剂的现状及发展趋势[J]. 化学工程师, 2005(6): 46-47.
- [5] 刘展, 单杨, 李向红. 新型甜味剂的应用及前景[J]. 中国食物与营养, 2004, 4(6): 21-23.
- [6] 方永亮, 郑珩, 余江河. 功能性甜味剂L-阿拉伯糖的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(1): 8-12.
- [7] 詹永, 杨勇. 功能性甜味剂在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2006, 4(6): 147-148.
- [8] 张莉莉, 赵美法. 甜味剂工业现状与发展[J]. 化工中间体, 2004(6): 7-14.
- [9] 贺晓生. 阿巴斯甜甜得危险[J]. 饮食科学, 2008(12): 15-15.
- [10] 刘金龙, 郑小江, 赵玲. 绞股蓝新品种“恩七叶甜”[J]. 园艺学, 2007, 34(5): 1340.
- [11] 李金青, 杨洪军. 绞股蓝的药理作用研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(7): 189-190.
- [12] 沈宏伟, 肖彦春, 车仁国, 等. 绞股蓝化学成分研究的现状[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1561-1564.
- [13] 刘金龙, 郑小江, 田国政. “恩七叶蜜”绞股蓝皂苷元分离鉴定研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 525-527.
- [14] 刘金龙, 孙东发. 甜味剂绞股蓝芳香物质分离鉴定研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 503-505.
- [15] 刘金龙, 孙东发. 绞股蓝甜味物质分离鉴定研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 480-48.
- [16] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 134-200; 486-502.
- [17] 刘志广. 仪器分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 108-109; 373.