

文章编号: 1673-1689(2006)05-0072-05

## 薄荷醇糖苷的合成、纯化与表征

解万翠<sup>1,2</sup>, 顾小红<sup>1</sup>, 罗昌荣<sup>2</sup>, 王光雨<sup>2</sup>, 汤坚<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036 2. 华宝食用香精香料(上海)有限公司, 上海 201821)

**摘要:** 为了开发热稳定的、致凉型香原料, 采用改进的 Koenigs-knorr 法立体选择性的合成了薄荷醇-β-D-葡萄糖苷(Menthyl-β-D-Glycoside, MGLY); 以反相液相色谱法(RP-HPLC)检测并确定最优反应条件。采用硅胶低压柱层析梯度洗脱分离制备样品, 产物纯度达到 99.2%, 综合 IR、LC/MS/MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 进行结构鉴定, 确证制备的产物为薄荷醇糖苷。

**关键词:** 香料前体; 薄荷醇糖苷; 合成; 纯化; 表征

中图分类号: TS 264.3

文献标识码: A

## The Synthesis, Purity and Characterization of a Cool Flavor Precursor of Menthyl-β-D-Glycoside

XIE Wan-cui<sup>1,2</sup>, GU Xiao-hong<sup>1</sup>, LUO Chang-rong<sup>2</sup>, WANG Guang-yu<sup>2</sup>, TANG Jian<sup>\*1</sup>

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China 2. Huabao food flavor & fragrance Co. Ltd, Shanghai 201821, China)

**Abstract:** A novel aroma material, menthyl-β-D-glycoside (MGLY) was stereo-selective synthesis by the modified Koenigs-knorr method. In this study, an optimal reaction conditions was achieved based on the results from Reverse phase HPLC (RP-HPLC). And a high purity (99.2%) MGLY was isolated by low pressure silica gel chromatography. The material was then characterized by infrared spectroscopy (IR), liquid chromatograph/mass spectrograph/mass spectrograph (LC/MS/MS), <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR, all results indicated that the material was MGLY.

**Key words:** flavor precursor; menthyl-glycoside; synthesis; purify; characterization

薄荷醇,以其特有的薄荷风味给人以清新、凉爽的感觉,作为一种重要的香原料,广泛应用于医药、烟草、日用化工、食品配料中。但因其挥发性较强,高温条件下不稳定,导致留香时间短,在一定程度上限制了它的使用效果<sup>[1]</sup>。薄荷醇-β-D-葡萄糖苷,天然存在于植物中<sup>[2]</sup>,其天然结构鉴定、香气释放机理已有文献报道<sup>[3]</sup>。薄荷醇糖苷本身没有香

气,用酶或加热等方法可以促使其释放香味成分,适合作为新型的、热稳定型香原料。由于天然存在的糖苷含量很低,提取成本昂贵,化学合成法成为工业化生产的首选。作者采用改进的 Koenigs-knorr 法<sup>[5]</sup>提高反应收率,色谱法检测、分离制备样品,并利用 IR、LC/MS/MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 等检测技术对产物的结构进行了鉴定,旨在为糖苷类化合物的

收稿日期: 2005-11-08; 修回日期: 2006-01-04.

作者简介: 解万翠(1969-),女,山东临沂人,食品科学与工程博士研究生; \*为责任作者。

万方数据

合成、纯化、结构鉴定提供有益的参考。

## 1 材料与方法

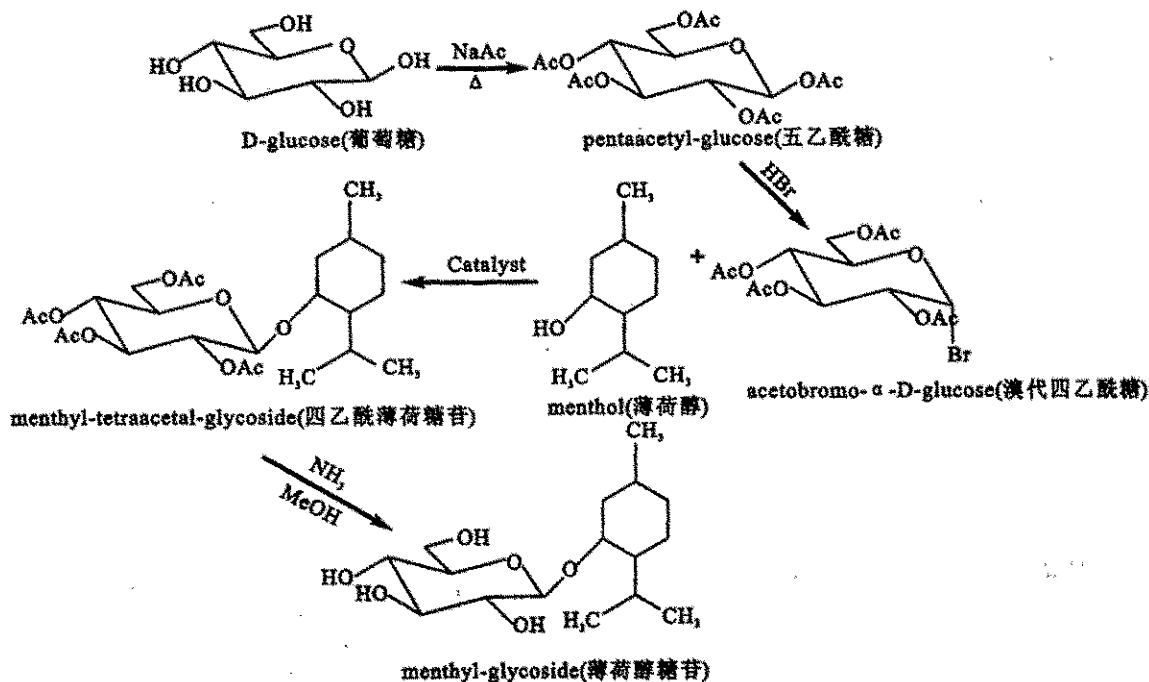
### 1.1 主要仪器

液相色谱仪:HP1100型,Agilent公司产品;红外光谱仪:Nicolet-5DX型,Nicolet公司产品;质谱

仪:API 3000液相色谱串联质谱联用仪系统,Turbo Spray离子源,四极杆质量分析器,脉冲计数探测器,美国应用生物系统公司产品;核磁共振由上海有机化学研究所检测中心完成。

### 1.2 薄荷醇糖苷的合成

薄荷醇糖苷的合成规程<sup>[5]</sup>如下:



改进的苷化反应为:在装有搅拌器的250 mL三口瓶中,加入4.11 g 溴代四乙酰糖(10 mmol),1.85 g 薄荷醇(12 mmol),100 mL 二氯甲烷,室温搅拌10 min后,加入实验室新制备加担持剂的银盐催化剂,加热回流,HPLC监测反应进度。4 h后,冷却至室温,滤去不溶物,减压蒸发除去溶剂,得淡黄色糖浆,然后加入100 mL 甲醇,控制体系温度在 $-5 \sim 0^\circ\text{C}$ ,通入经粒状NaOH干燥的氨气,约30 min后,溶液澄清,继续通氨气30 min,置于冰箱中过夜后,硅胶柱层析分离,得薄荷醇糖苷。

### 1.3 薄荷醇糖苷的分离与纯化

硅胶吸附色谱柱为实验室自装,玻璃柱( $D$  6 cm  $\times$  100 cm),下部采用3#砂芯过滤器,填料选择青岛海洋化工厂生产的300目硅胶G,采取湿法装柱,洗脱液选择V(乙酸乙酯):V(无水乙醇)=(30:1,25:1,20:1,15:1,10:1)梯度洗脱;用100 mL试剂瓶收集洗脱液,RP-HPLC检测后,将目标产物混和、浓缩即可。

万方数据

### 1.4 RP-HPLC 条件

Agilent HP1100液相色谱系统(蒸发光散射检测器,On-line色谱工作站);色谱柱:Waters symmetry C18柱( $D$  4.6 mm  $\times$  150 mm,  $5 \mu\text{m}$ );流动相:乙腈/水梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;柱温 $25^\circ\text{C}$ 。超纯水由Millipore过滤器自制,RP-HPLC所用试剂为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

## 2 结果与讨论

### 2.1 合成条件的优化

研究了催化剂、溶剂、反应时间等因素对反应的影响(见表1)。催化剂的活性对反应收率的影响最为突出,选择加入担持剂制备的银盐,催化活性最高,其次,确定了在溶剂二氯甲烷的回流温度、反应时间4 h为最优实验条件。收率达到42%,取得了较好的效果。

表1 优化合成条件与收率的提高

Tab.1 Optimizing the synthesis condition and improving yield

影响因素	原有条件	优化后条件	收率/%	收率提高/%
溶剂	①丙酮/②乙醚/③甲苯	④二氯甲烷	①32/②34/③37/④42	10
催化剂	①购买/②新制备银盐	③新制备并加担持剂的银盐	①12/②26/③42	30
反应时间	①4 h②6 h	①4 h	①42②42	-

## 2.2 分离纯化及纯度测定

因反应混合物中的组分较多,所以采取分级洗脱,以提高分离效率。通过优化洗脱液条件,分步收集,可以得到纯度不同的产物,经筛选得目标产物 MGLY。MGLY 没有市售对照品,因此定量分析采用自身对照法,纯度分析采取面积归一化法。在乙腈、水梯度洗脱流动相条件下,RP-HPLC 测得保留时间 9.853 min,纯度约 99.2%(见图 1)

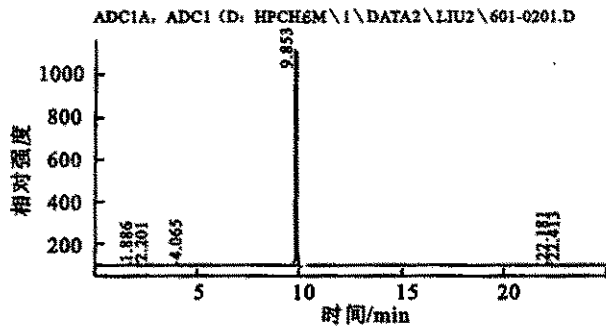
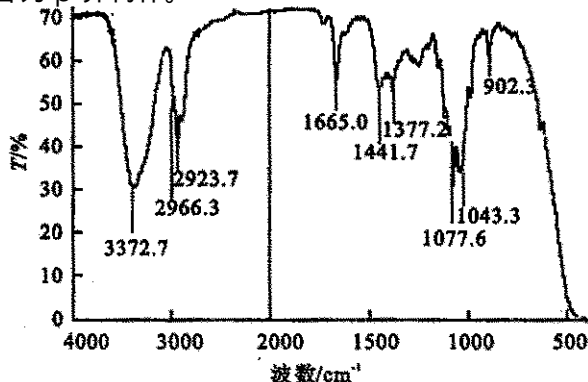


图1 MGLY的RP-HPLC图谱

Fig.1 RP-HPLC spectra of MGLY

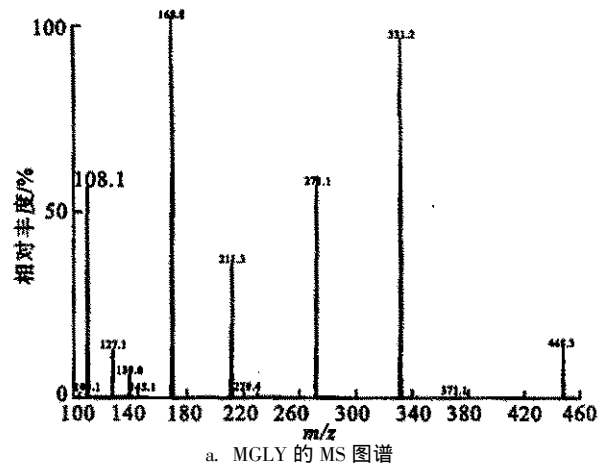
## 2.3 红外光谱(IR)及其解析

FT-IR 广泛用于验证糖苷化反应的产物,薄荷醇糖苷的红外光谱见图 2,图中 3372 cm<sup>-1</sup>附近的宽峰是由糖苷中糖基部分缔合的 OH<sup>-</sup> 伸缩振动产生的吸收峰,2950~2860 cm<sup>-1</sup>为单萜烯醇中甲基、亚甲基的吸收,并且发现了可归属于 C<sub>1</sub>-H 面外剪式振动所引起的特殊吸收 902.3 cm<sup>-1</sup>, $\alpha$ -型异构体则应出现在 840 cm<sup>-1</sup>附近,因此,FT-IR 初步证明该糖苷为  $\beta$ -异构体。

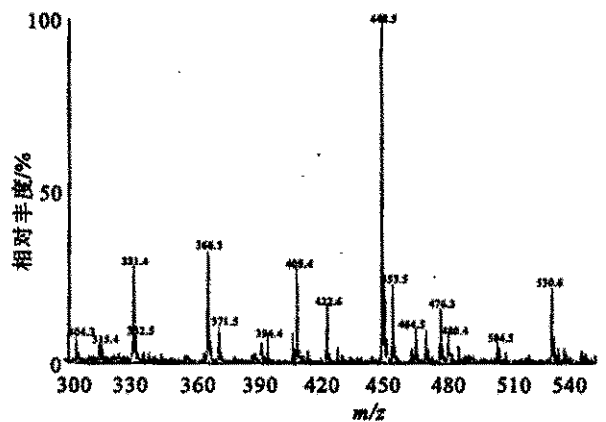
图2 薄荷醇糖苷的红外图谱  
Fig.2 FT-IR spectra of menthyl-glycoside

## 2.4 质谱及其解析

薄荷醇糖苷由于分子中羟基较多,极性较大,不易挥发,直接进行电子撞击质谱分析,没有得到满意的结果,将其制备成稳定性高和易挥发的四乙酸酯衍生物后,再进行分析,同时测得了 MS(MS1)、MS/MS(MS2)数据,如图 3 a、b。



a. MGLY的MS图谱



b. MGLY的MS/MS图谱

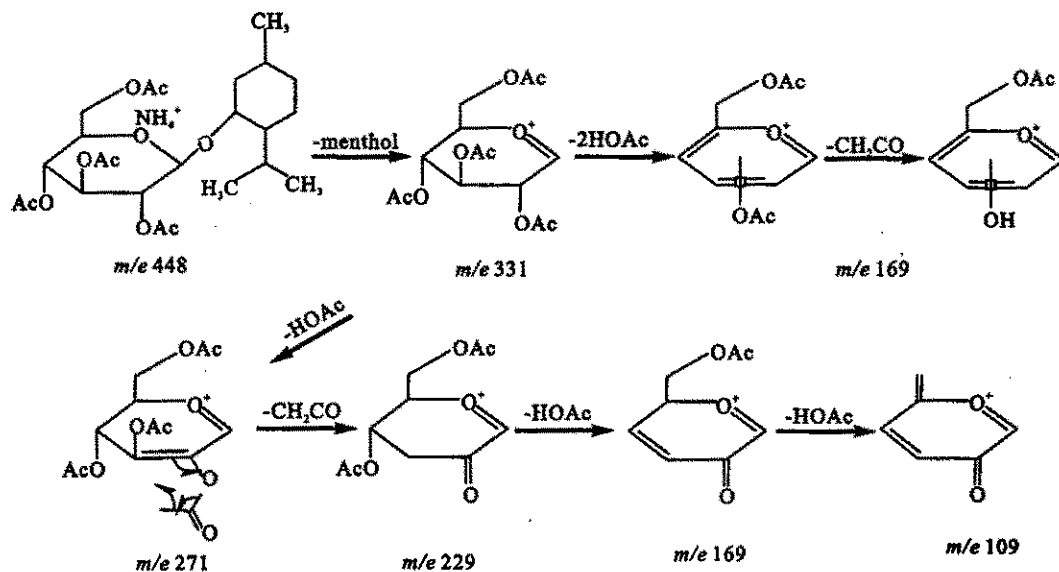
图3 薄荷醇糖苷的MS和MS/MS图谱

Fig.3 MS and MS/MS spectra of menthyl-glycoside

MS 中最强峰  $m/e$  504 是  $(M + NH_4^+)^+$ , 该离子对应于相对分子质量为 486, 与全乙酰化的薄荷醇糖苷相符, 另外产生了归属于 O-糖苷键断裂的特征离子  $m/e$  331, 通过 MS 可以初步确定化合物的相对分子质量和骨架结构。MS/MS 则给出更多目标分子离子裂分后的碎片离子信息, MS/MS 中  $m/e$  331

为失去薄荷醇配基后生成的离子,强度最大为基峰  $m/e$  331 继续裂解,连续失去一分子乙酸、两分子乙酸、一分子乙烯酮、三分子乙酸等,分别得离子

$m/e$  271、 $m/e$  211、 $m/e$  169、 $m/e$  109 等离子,综合 MS 和 MS/MS 进行归属后,可归纳如下的质谱裂解途径。



## 2.5 核磁共振 $^1H$ -NMR 和 $^{13}C$ -NMR 谱图全归属

薄荷醇糖苷的 $^1H$  NMR 中,在  $\delta$  4.35 附近出现双重峰,耦合常数  $J_{1,2} = 7.8$  Hz,这是葡萄糖环上的  $C_1$ -H 的化学位移,它受两个杂原子的去屏蔽作用,化学位移明显移向低场,根据  $\beta$ -型  $J_{1a-2a} = 7.0 \sim$

10.0 Hz  $\alpha$ -型  $J_{1a-2a} = 2.5 \sim 3.5$  Hz 的规律,也证明它为  $\beta$ -型糖苷,其核磁共振 $^1H$ -NMR 和 $^{13}C$ -NMR 谱图全归属见表 2。

表 2 薄荷醇糖苷的 NMR 数据

Tab. 2 NMR data of the menthyl-O-β-D-glucopyranosides

$^1H$ -NMR $\delta$ (in $CDCl_3$ )	$^{13}C$ -NMR $\delta$ (in $CDCl_3$ )
0.76(3H, 10- $CH_3$ ), 0.88(3H, 9- $CH_3$ ), 0.92(3H, 8- $CH_3$ ),	16.17(10-C), 21.74(9-C), 22.93(8-C), 25.59(7-C)
1.24-2.25(9H, 2, 4, 5- $CH_2$ , 3, 6, 7-CH)	32.22(5-C), 34.98(4-C), 41.52(6-C), 48.32(2-C),
3.27(1H, 1-CH), 3.31(1H, Glu-4'-CH), 3.43(1H, Glu-3'-CH)	62.3(1-C), 70.38( Glu-6'), 73.81( Glu-4'), 76.04( Glu-3'),
3.52(1H, Glu-5'-CH), 3.57(1H, Glu-2'-CH),	77.12( Glu-5'), 79.31( Glu-2'), 101.26( Glu-1')
3.81(2H, Glu-6'- $CH_2$ ), 4.35(1H, Glu-1'-H)	

## 3 结论

为了开发热稳定型香原料,以葡萄糖为原料,经官能团保护、定向基团活化,以新制备的担持银盐作催化剂,采用改进的 Koenigs-knorr 法立体选择性的合成了薄荷醇-β-D-葡萄糖苷(MGLY);反相

液相色谱法(RP-HPLC)检测并确定了最优反应条件,硅胶低压柱层析用于在梯度洗脱条件下分离制备大量样品,合成收率为 42%,纯度达到 99.2%。最后采用 IR、LC/MS/MS、 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR 等技术确证了合成产物是薄荷醇-β-D-葡萄糖苷。由此,对糖苷化合物的合成、纯化、鉴定作了较为系统的研究,达到了较为理想的实验结果。

## 参考文献：

- [ 1 ] Isao Sakata , Hajime Iwamura. Synthesis and properties of menthyl glycosides[ J ]. **Agric Biol Chem** ,1979 43( 2 ) :307 - 312.
- [ 2 ] Lihua Jiang , Hiroshi Kojima. Isolation of some glycosides as aroma precursor in young leaves of Japanese pepper( *Xanthoxylum piperitum* DC ) [ J ]. **J Agric Food Chem** ,2001 49 :5888 - 5894.
- [ 3 ] Crouzet J , Chassagne D. Naturally Occurring Glycosides[ M ]. **London :Chichester** ,1999.
- [ 4 ] Josip Mastelic , Igor Jerkovic. Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. their chromatographic and spectroscopic properties[ J ]. **Croatica Chemica ACTA CCACAA** ,2004 ,77( 3 ) :491 - 500.

( 责任编辑 朱明 )

( 上接第 71 页 )

- [ 4 ] 李小定 , 吴谋成 , 曾晓波 , 等. 灰树花糖肽 PGF-1 对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [ J ]. 华中农业大学学报 ,2002 21 ( 2 ) : 261 - 263.
- [ 5 ] 李小定 , 欧阳天贽 , 荣建华 , 等. 灰树花糖肽 PGF-2 的理化性质及化学结构的初步表征 [ J ]. 菌物学报 ,2005 24 ( 2 ) 245 - 250.
- [ 6 ] 杜巍 , 袁静 , 李元瑞 , 等. 灰树花菌丝体糖肽 G. F. -2 理化性质及生物活性的研究 [ J ]. 菌物系统 ,2003 22 ( 2 ) :289 - 195.
- [ 7 ] Lee B C , Bae J T , Pyo H B. et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* [ J ]. **Enzyme and Microbial Technology** ,2003 ,32 :574 - 581.
- [ 8 ] Cui F J , Yin L , Xu Z H , et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology [ J ]. **Bioresource Technology** ,2006 ( 2 ) 227 - 230.
- [ 9 ] 张维杰. 糖复合物生化研究技术( 第二版 ) [ M ]. 杭州 : 浙江大学出版社 ,1999.
- [ 10 ] Lee J C , Lee K Y , Son Y O , et al. Plant-originated glycoprotein , G-120 , inhibits the growth of MCF-7 cells and induces their apoptosis[ J ]. **Food and Chemical Toxicology** ,2005 ,43 :961 - 968.
- [ 11 ] Li G , Kim D H , Kim T D , et al. protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells [ J ]. **Cancer Letter** ,2004 ,216 :175 - 181.
- [ 12 ] Zhang M , Chen H X , Huang J , et al. Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells : Inhibition of proliferation and induction of apoptosis [ J ]. **Life Sciences** ,2005 ,76 :2115 - 2124.
- [ 13 ] Takako S H , Nobukazu K , Shigeki S , et al. Protein-bound polysaccharide K induced apoptosis of the human Burkitt lymphoma cell line. Namalwa [ J ]. **Biomedicine & Pharmacotherapy** ,2004 ,58 :226 - 230.
- [ 14 ] Jin Y , Zhang L N , Zhang M , et al. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media[ J ]. **Carbohydrate Research** ,2003 ,338 :1517 - 1521.

( 责任编辑 朱明 )