

玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷键合态香料前体的合成及结构表征

雷声¹, 杨锡洪^{2,3}, 解万翠^{3,4}, 张玲¹, 程东伟³, 刘晓敏¹, 张天栋¹, 高倩³

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南昆明 650231)(2. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东青岛, 266042)(3. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)(4. 青岛科技大学化工学院, 山东青岛, 266042)

摘要: 为探索提高香气质、增强底香厚实性的方法, 以及进一步探索糖苷类香料前体作为香原料用于高温食品加香的可行性, 基于天然等同结构的单萜烯醇糖苷键合态香料前体, 对其性质进行深入研究。本文遵循立体选择性合成方法, 首先选择具有典型正甜及花香韵的香料玫瑰醇为主要原料, 与溴代五乙酰糖进行糖苷化反应, 采用改进的 Koenigs-Knorr 法, 合成玫瑰醇- β -D-五乙酰基吡喃葡萄糖苷, 然后在碱性条件下进行脱乙酰化反应, 得到玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷键合态香料前体, 粗品经制备液相色谱进行分离纯化得到目标产物, 以 FT-IR、¹H NMR 和 LC-MS 等进行表征, 确定为天然等同结构。最后采用 RP-HPLC 测定其含量为 99.46%。研究结果为单萜烯醇- β -D-吡喃葡萄糖苷键合态香料前体的立体合成提供重要数据, 为探讨糖苷类香料前体的性质及在耐高温食品中的应用研究提供香原料。

关键词: 玫瑰醇; 糖苷; 合成; 结构表征; 香料前体

文章编号: 1673-9078(2015)10-163-167

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.028

Synthesis and Structural Characterization of Rhodinol- β -D-glucosidically bound Flavor Precursors linkage

LEI Sheng¹, YANG Xi-hong^{2,3}, XIE Wan-cui^{3,4}, ZHANG Ling¹, CHENG Dong-wei³, LIU Xiao-min¹, ZHANG Tian-dong¹, GAO Qian³

(1. Technology Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd, Kunming 650231, China) (2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China) (3. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China) (4. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: To determine a method for improving the aroma quality and strengthening the undertone, and to explore the possibility of using glycosidic flavor precursors as raw materials in thermo-flavoring, a natural identical flavor precursor in monoterpenol glycosidically bound form was synthesized and the corresponding properties were studied. For stereoselective synthesis, rhodinol with typical pure-sweet and floral notes was chosen as the main raw material to carry out the glycosylation reaction with tetra-O-acetate- α -D-glucopyranosyl bromide. Rhodinol- β -D-glucoside pentaacetate was obtained by using the modified Koenigs-Knorr reaction, and the deacetylation reaction in alkaline conditions was conducted to yield a flavor precursor with a rhodinol- β -D-glucosidic linkage. The target product was obtained after the crude products were separated and purified by preparative liquid chromatography, and its natural identical structure was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Finally, the content was determined to be 99.46% by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The results provide important data for the stereoselective synthesis of flavor precursors with a monoterpenol- β -D-glucopyranosidic linkage as well as a method to prepare flavoring raw materials for the study of properties of glycosidic flavor precursors and their application in high-temperature-resistant foods.

Key words: rhodinol; glycoside; synthesis; structural characterization; flavor precursor

收稿日期: 2015-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21275035); 云南中烟工业有限责任公司技术中心科技项目(HYHH2013HX03); 云南中烟工业有限责任公司科技项目(2013CP02); 作者简介: 雷声(1982-), 男, 博士, 研究方向为卷烟产品开发; 通讯作者: 解万翠(1969-), 女, 博士, 教授

香精香料作为添加剂,广泛应用于食品、日化、医药、卷烟等配料中,且以其高附加值,推动着香料行业的快速发展。但是,由于香料物质大部分为分子量较小、沸点较低、挥发性较强的化合物,在高温加工过程中损失严重,导致释香不均匀,甚至在储存期间就因挥发而失去香味。因此,香精香料的不耐高温和长效难,一直是香料工业中亟待解决的重要问题[1~2]。

玫瑰醇(Rhodinol),化学名3,7-二甲基-6-辛烯醇,又称 ι -香茅醇,分子式 $C_{10}H_{20}O$,分子量156.26。具有典型的花香、玫瑰香等感官特征,作为玫瑰香型香精的主香剂,也用于调配很多水果及焙烤食品香精[3],是一种重要的单萜醇类香料。香韵是指香精应用时表现出来的香气格调,如正甜香和花香韵,香气丰富而悬浮,能够显著提高香气质,增强底香厚实感,应用于加香,可赋予清新、明亮和漂浮的香气,以及温和的气息和香气层次感。玫瑰醇是此类香型常用的香原料,在调香中发挥重要的作用,但挥发性强、留香时间不长。

糖苷键合态香料前体为植物生长过程中形成的次级代谢产物,在植物成熟期间,非挥发性的糖苷通过内源 β -糖苷酶的水解作用分解释放香气成分,是重要的香气来源[4~5]。此外,酶法、加热、辐射、光照、化学法等方式都能促进糖苷分解释放出香气配基[6~7]。以单萜烯醇(如香叶醇、玫瑰醇等)为配体的糖苷广泛存在于茶叶、水果、花朵、烟草等植物中,是目前发现最多、含量最高、对香气形成影响最显著的一类糖苷香料前体,因此又被称为潜香化合物[8~9]。

研究糖苷类香料前体物质的释香机理,将有可能开发新的香料来源;但是,此类物质在天然植物中含量较低,提取难度大;同时,由于它们具有异构性质,合成的难度相对也较大,如何寻找有效的制备方法,仍然是制约此类物质应用的瓶颈[10~12]。本文基于立体选择性合成,选择玫瑰醇为主要原料,合成天然等同结构的玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷键合态香料前体,然后进行分离纯化和结构表征。旨在为单萜烯醇- β -D-吡喃葡萄糖苷键合态香料前体的合成提供重要数据,并为将来的耐高温应用研究提供样品。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料

玫瑰醇,分析纯,购自Sigma(上海)公司;三氟乙酸、二氯甲烷、碳酸银、氢氧化钠、氨水等试剂

均为分析纯,HPLC所用试剂均为色谱纯,购自广州化学试剂公司。超纯水由Millipore过滤器自制。

1.1.2 仪器及条件

红外光谱(IR)测定: Nicolet-5DX型FT-IR红外光谱仪,采用KBr压片法。氢核磁共振(1H NMR)测定: Varian 400M核磁共振仪,氘代氯仿溶剂。

液相色谱串联质谱(LC-MS)鉴定: Agilent公司,LC 1200和MS 6110; LC流动相: A相为1.50 mL/4 L三氟乙酸水溶液、B相为0.75 mL/4 L三氟乙酸乙腈溶液,梯度洗脱: B相在0.9 min内从乙腈浓度从10%到80%,然后保持80% 0.6 min,流速1.2 mL/min; 色谱柱: Xtimate C18 2.1 \times 30 mm, 3 μ m,柱温50 $^{\circ}C$, MS离子源: ESI。

HPLC纯化制备: SHIMADZU LC-8A液相色谱系统,色谱柱为Phenomenex Synergi, 10 μ m, 250 \times 50 mm,流动相A: H_2O , B: CH_3CN ,梯度洗脱, B从15%到55%,保持25 min。

RP-HPLC含量检测: SHIMADZU LC10AD液相色谱系统;流动相: A相2.75 mL/4 L三氟乙酸水溶液和B相2.50 mL/4 L三氟乙酸乙腈溶液,梯度洗脱, B相在0~6 min从10%~80%,保持80%浓度2 min,流速1.2 mL/min; 色谱柱为 Xtimate C18 2.1 \times 30 mm, 3 μ m; 柱温40 $^{\circ}C$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄糖衍生物中间体的合成

中间体1,2,3,4,6-五乙酰- β -D-葡萄糖(A: β -D-glucose pentaacetate, CAS No: 604-69-3)和2,3,4,6-O-四乙酰基- α -D-溴代葡萄糖(B: tetra-O-acetate- α -D-glucopyranosyl bromide, CAS No: 572-09-8)的制备遵循文献方法[13]。

1.2.2 目标糖苷的合成

本文采用改进的Koenigs-Knorr糖苷化反应[14],以担持剂 SiO_2 复合重金属盐 $AgCO_3$ 作为催化剂,发生 SN_2 亲核取代反应,最后生成糖苷。按照图1所示合成路线进行反应。

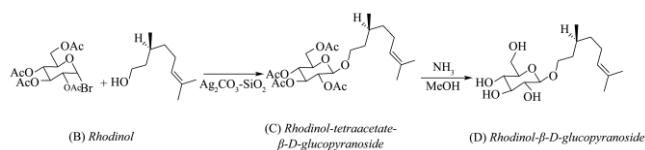


图1 玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷的合成路线

Fig1. The synthesis scheme of Rhodinol- β -D-glucopyranoside

取250 mL三口瓶,加入100 mL二氯甲烷、10 mmol 2,3,4,6-O-四乙酰基- α -D-溴代葡萄糖(B)、12 mmol 玫瑰醇,室温搅拌10 min,立即加入实验室新

制备的 $\text{AgCO}_3\text{-SiO}_2$ 催化剂, 40 °C 加热回流 4 h 后, 冷却至室温, 过滤并减压蒸去溶剂, 得淡黄色糖浆, 为玫瑰醇- β -D-五乙酰基吡喃葡萄糖苷(C)粗品。

取上述 C 的糖浆状粗品加入 100 mL 甲醇, 于 -5~0 °C 条件下通入经粒状 NaOH 干燥的氨气, 待溶液澄清后, 继续通气 30 min, 置于冰箱中过夜, 所得混合物用于液相色谱制备。

1.2.3 高效液相制备色谱纯化

将上述 1.2.2 步得到的反应混合液浓缩后, 采用制备液相色谱进一步纯化, 得到高纯度的目标糖苷化合物。最后得玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷(D)的白色晶体, 进行含量测定及结构表征。

2 结果与讨论

2.1 中间体 A 和 B 的 IR 鉴定

遵循 β -D-吡喃葡萄糖苷的立体选择性合成原则, 需要先对葡萄糖进行乙酰化保护, 生成五乙酰葡萄糖(A); 随后进行 C-1 位溴代, 在吡喃(呋喃)环上引入溴原子, 生成四乙酰溴代葡萄糖(B), 可以显著增加糖基的活性; 作为糖基供体, 是糖苷合成的重要中间体, 两种中间体的结构采取红光谱进行初步鉴定, IR 图谱如图 2 所示。

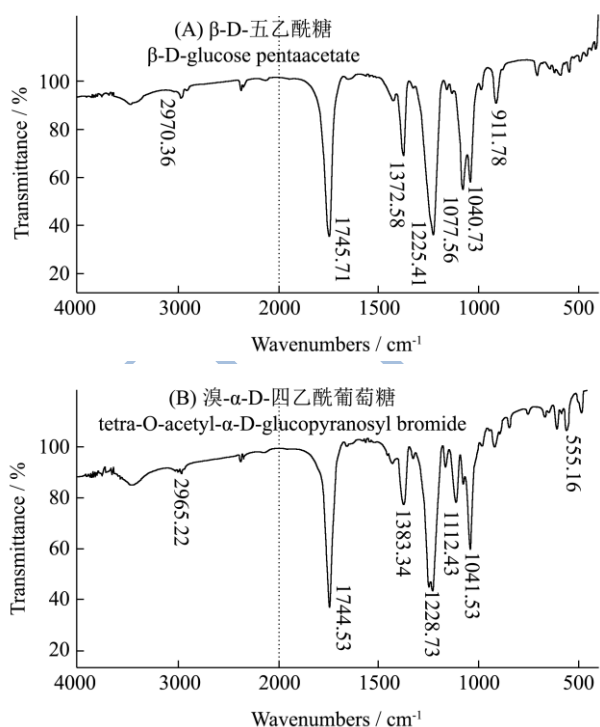


图 2 β -D-五乙酰葡萄糖(A)和溴- α -D-四乙酰葡萄糖(B)的红外光谱图

Fig. 2 IR spectrum of β -D- glucose pentaacetate(A) and tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromide(B)

图 2 中主要红外谱峰的归属见表 1。

表 1 中间体 A 和 B 的主要红外谱峰归属结果

Table 1 Acription of the peaks in IR spectrum of compound A and B

B	
谱峰位置/ cm^{-1}	红外光谱归属
555.16	C-Br 键的伸缩振动特征吸收峰
911.78	$\text{C}_1\text{-H}$ 振动吸收峰, β -构型吡喃糖苷键的特征峰
1040.73, 1077.56/	C-O 键及 C-O-C 键的伸缩振动特征吸收峰
1041.40, 1112.43	
1372.58/1383.34	甲基 $\delta_{\text{C(H)}}$ 的特征吸收
1745.71/1744.53	羰基的 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收引起的强峰
1225.41/1228.73	$\nu_{\text{C=O}}$ 不对称伸缩振动引起的强峰
2970.36/2965.22	甲基的 $\nu_{\text{C-H}}$ 吸收峰

A 样品经红外检测显示原有葡萄糖的羟基峰消失, 且出现强的羰基吸收峰, 表明乙酰化反应完全, 葡萄糖的羟基全部被乙酰基取代, 样品 B 经红外检测则显示出碳溴 555.16 cm^{-1} 的特征吸收。

2.2 玫瑰醇- β -D-四乙酰基吡喃葡萄糖苷的 ^1H NMR 鉴定

经改进的 Koenigs-knorr 法反应, 首先得到玫瑰醇- β -D-四乙酰基吡喃葡萄糖苷(C), 为了确证本合成反应的立体选择性, 需要对 C 进行 ^1H NMR 表征。

C 的 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3)归属如下: 5.18 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$, 1H), 5.13 - 5.04 (m, 2H), 4.97 (dd, $J = 8.2, 9.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.48 (d, $J = 7.90 \text{ Hz}$, 1H), 4.14 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H), 3.88 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.72 - 3.62 (m, 1H), 3.56 - 3.46 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 - 1.85 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.56 - 1.47 (m, 2H), 1.45 - 1.24 (m, 2H), 1.14 (ddd, $J = 2.2, 5.8, 7.7 \text{ Hz}$, 1H), 0.87 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H)。

从上述 ^1H NMR 数据中, 可以找到 β -糖苷键的归属, 化学位移 δ 为 4.48, 对应的耦合常数 J 为 7.90 Hz, 符合 β -型糖苷键 7.0~10.0 Hz, α -型糖苷键 2.5~3.5 Hz 的规律; 将其他基团进行归属, 均对应于乙酰基糖苷的官能团共振吸收, 证明样品 C 为 β -型糖苷, 因此可以进行脱乙酰化反应, 制备得目标糖苷化合物, 纯化后经 HPLC 测定, 归一法定量得玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷(D)的含量为 99.46%。

2.3 玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷(D)的立体结构表征

前期利用液相色谱制备技术获得了高纯度的玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷样品 D, 由于没有对照品, 因此,

将综合红外光谱(FI-IR)、核磁共振波谱(^1H NMR)和液相色谱质谱(LC-MS)联用等多种分析技术对合成的糖苷化合物进行结构表征。

2.3.1 FI-IR 表征

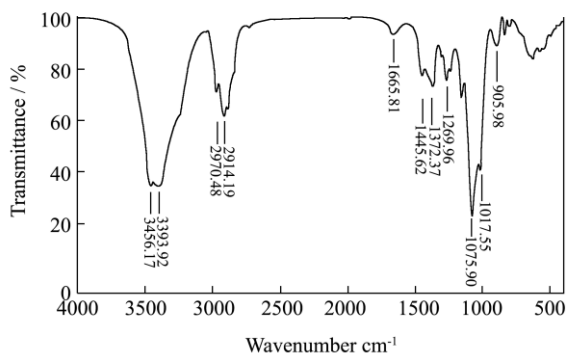


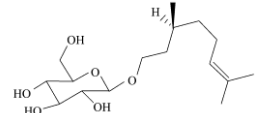
图3 玫瑰醇- β -D-葡萄糖苷的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrum of rhodinol- β -D-glucopyranoside

FT-IR 是测定分子结构的有力工具之一,能够鉴别分子结构中所含有的特征官能团和化学键的类型,并可识别同分异构体,应用范围广、可靠性高。D 的

表2 玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷的 ^1H NMR 和 LC-MS 特征

Table 2 Specific data of ^1H NMR and LC-MS of rhodinol- β -D-glucopyranoside

化合物名称及结构	^1H NMR 特征	LC-MS 特征离子
玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷 	5.08 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.85 (br. s., 3H), 3.67-3.49 (m, 3H), 3.40 - 3.27 (m, 2H), 1.97 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.66 - 1.63 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.56 - 1.41 (m, 2H), 1.39 - 1.27 (m, 1H), 1.22 - 1.10 (m, 1H), 0.89 (d, J = 6.4 Hz, 3H)	157.2, 336.2, 341.2, 342.1 (EM:318.2)

^1H NMR 通过测定化合物的化学位移、偶合常数和共振峰面积之比来表达不同官能团相对位置以及与各官能团中所含氢原子个数之比。从样品 D 的 ^1H NMR 可知,在 $\delta 4.30$ 附近出现双重峰,偶合常数 $J_{1c-2a} = 7.8\text{Hz}$,证明玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷为 β -型糖苷。

ESI 是典型的软电离方式,解离后主要的分子离子出现在一级质谱,由于含有高浓度的盐,易形成 $(\text{M} + \text{NH}_4)^+$,降低 $(\text{M} + \text{H})^+$,分析所得到的 LC-MS 中最强峰 $m/z 336.2$ 是 $(\text{M} + \text{NH}_4)^+$,该离子对应于分子量为 318.2,与玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷的分子相符;另外产生了归属于 O-糖苷键断裂的特征离子 $m/z 157.2$,确证为玫瑰醇正离子^[28]。

3 结论

3.1 本论文选择正甜香型的单萜烯醇香原料玫瑰醇,合成了玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷香料前体。综合 FT-IR、 ^1H NMR、LC-MS 等数据进行结构表征,证明其为天然等同结构^[15]。

3.2 IR 鉴定了玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷中的 OH、C-O-C、C=C、 CH_3 、 CH_2 等官能团的特征吸收,同时

FT-IR 光谱见图 3。

如图 3 所示, 3356.17 cm^{-1} 和 3393.92 cm^{-1} 是分子内氢键的伸缩振动 $\nu_{\text{O-H}}$ 产生的吸收峰,葡萄糖基部分的多-OH 基形成氢键缔合后, O^-H^+ 键拉长,偶极矩增大,因此表现为强而宽的峰。IR 中无羰基的特征吸收,原有玫瑰醇- β -D-五乙酰基吡喃葡萄糖苷中的羰基完全被羟基取代,证明脱乙酰化进行完全。 2970.48 cm^{-1} 、 2914.19 cm^{-1} 为玫瑰醇香料配基中甲基、亚甲基的 $\nu_{\text{C-H}}$ 吸收峰; 1665.81 cm^{-1} 为玫瑰醇中 C=C 的伸缩振动的特征吸收 $\nu_{\text{C=C}}$; 1445.62 cm^{-1} 、 1372.37 cm^{-1} 为甲基 $\delta_{\text{s(C-H)}}$ 的特征吸收; 1017.55 cm^{-1} 和 1075.90 cm^{-1} 是 C-O-C 不对称伸缩振动引起的较强吸收峰; 905.98 cm^{-1} 为归属于 β -型糖苷的特殊吸收^[15]。

2.3.2 ^1H NMR 和 LC-MS 表征

得到 FT-IR 数据之后,进一步对样品 D 进行了 ^1H NMR 和 LC-MS 的结构表征,得到的实验数据列于表 2。

发现了可归属于 β -型糖苷的特殊吸收,为 905.98 cm^{-1} 。

(2) 利用 LC-MS 串联质谱提供的分子离子及碎片离子,在糖苷的结构鉴定中发挥了重要的作用。(3) ^1H NMR 的鉴定,根据异头物的 C1' -H 偶合常数 $J_{1c-2a} = 7-10\text{Hz}$ 的规律,进一步确定糖苷的立体构型,同时 ^1H NMR 给出了玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷分子结构各碳原子上氢的个数,对结构鉴定起决定性作用。

3.3 分析玫瑰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷的结构及结构表征数据,FT-IR、 ^1H NMR 和 LC-MS 从不同的角度全面、准确的表征了糖苷的立体化学结构。研究结果为糖苷类香料前体的合成及结构表征提供借鉴,为天然等同结构的糖复合物的制备及性质研究提供方法。

参考文献

- [1] 舒宏福.食用香料中的长效和耐高温香料[J].香料香精化妆品,2005,1:22-28
SHU Hong-fu. The flavor materials being resistant to high temperature and having a long-lasting effect and odor [J]. Flavor Fragrance Cosmetics, 2005, 1: 22-28
- [2] W C Xie, X H Yang, C H Zhang, et al. Investigation on

- pyrolysis behavior and decomposition compounds of three synthesized glycosidically bond flavor precursors [J]. *Thermochimica Acta*, 2012, 532: 2-9
- [3] I Szucs, M Escobar, B Grodzinski. 4.21-emerging roles for plant terpenoids [M]. *Comprehensive Biotechnology* (second edition) 2011
- [4] R Noguero-Pato, C González-Barreiro, B Cancho-Grande, et al. Simal-Gándara. Aroma potential of Brancellao grapes from different cluster positions [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(1): 112-124
- [5] 宛晓春, 汤坚, 丁宵霖. 山楂中游离态和键和态风味化合物 [J]. *食品与发酵工业*, 1998, 24(2): 20-26
WAN Xiao-chun, TANG Jian, DING Xiao-lin. Free and glucosidically bound volatile flavour compounds in hawberry [J]. *Food and Fermentation Industries*, 1998, 24(2): 20-26
- [6] 章平毅, 陆惠秀, 金其璋. 葡萄糖苷的热解研究 [J]. *香精香料化妆品*, 2002, 3: 5-7
ZHANG Ping-yi, LU Hui-xiu, JIN Qi-zhang. Study on the pyrolysis of glucopyranosides [J]. *Flavor Fragrance Cosmetics*, 2002, 3: 5-7
- [7] K Kishor Kumar, A Arul AnanthaKumar, R Ahmad. Effect of gamma- radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*) [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122: 841-845
- [8] A Gamero, P Manzanares, A Querol, et al. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 92-97
- [9] M Rosario Salinas, Kortes Serrano de la Hoz, Amaya Zalacain, et al. Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification [J]. *Talanta*, 2012, 89: 396-400
- [10] Montgomery E M, Richtmyer N K, Hunson C S. The preparation and rearrangement of Phenyl glycosides [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, 64: 690-694
- [11] Toshima K, Tatsuta K. Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural products synthesis [J]. *Chem. Rev.*, 1993, 93 (4): 1503-1531
- [12] Josip Mastelić, Igor Jerković, Marijana Vinković, et al. Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds their chromatographic and spectroscopic properties [J]. *Croatica Chemica Acta*, 2004, 77(3): 491-500
- [13] 解万翠, 杨锡洪, 夏咏梅, 等. 色谱法监测 β -D-吡喃葡萄糖苷的合成 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 106-108
XIE Wan-cui, YANG Xi-hong, XIA Yong-mei. Chromatography technology for monitoring the synthesis of β -D-Glucopyranosides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(1): 106-108
- [14] 杨锡洪, 解万翠, 王维民, 等. 顺-3-己烯基- β -D-吡喃葡萄糖苷的合成、纯化与表征 [J]. *江苏大学学报*, 2007, 28(5): 438-441
YANG Xi-hong, XIE Wan-cui, WANG Wei-min, et al. Synthesis purification and characterization of Z-3-hexenyl- β -D-glucopyranoside [J]. *Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition)*, 2007, 28(5): 438-441
- [15] 解万翠. 糖苷香料前体的合成及其应用研究 [D]. 江南大学博士学位论文, 2006
XIE Wan-cui. Study on synthesis and application of glycosidic flavor precursor [D]. Ph.D Thesis of Jiangnan university, 2006