(日本化学会誌, 1981, (5), p.726~735)

© 1981 The Chemical Society of Japan

ステビア葉の甘味ジテルペン配糖体——レバウディオンド-A, -D, -E および関連配糖体の合成ならびに甘味と化学構造との関係——

(1980年10月30日受理)

笠井良次・金田 宣・田中 治*・山崎和男・坂本征則**

森本一義**・岡田茂孝***・北畑寿美雄***・古川秀子****

Stevia rebaudiana 葉の新強甘味配糖体, レバウディオンド-A [3], -D [5], -E [6] の合成を目的として, まず共通アグリコンであるステビオール [2] およびその 13-O-配糖体の 19-カルボキシル基のグルコシル化について検討した。このカルボキシル基に空間的に近い 13-位の官能基の存在のため通常のエステル配糖体合成法では良好な結果は得られなかったが, β -グルコシルエステル合成にはオルトエステル法が, β -グルコビオシルエステルの合成には対応するアセトプロモ糖を炭酸銀-セライト存在下反応させる方法が好収量で目的物を与えることを見いだした。

これらの方法を用いて, [1] を酵素加水分解ついでアルカリ加水分解して得られる [15] をベンジリデン誘導体としてからグルコシル化し, 好収量で [3] を得, また, [1] から得られる [18] のアセタートから [6] を, [3] から得られる [8] のアセタートから [5] を好収量で得ることができた。また, 酵素的糖転移反応を用いて [1] および [18] の糖部に 1,4- α -D-グルコースが転移した一連の配糖体をも合成した。

以上の多数の天然および合成配糖体ならびに *Stevia paniculata* 葉, *S. ovata* 葉から得られた paniculose I~V [27~31] について甘味と構造との関係を検討した。この系統の配糖体の甘味の発現には 19-位の COO-糖または COOH と 13-位の -O-糖または OH の両者の存在が必要であること, 16(17) の二重結合の存在も甘味の強さに大きな影響をもつこと, 今回の化合物のうちでは, 13-位に枝わかれ糖鎖をもつ [3], [5] の甘味がもっとも強くかつ良質であることなどが明らかにされた。

1 緒 言

ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) は南米パラグアイ原産のキク科多年生草本で, その葉が強い甘味を有するため現地ではマテ茶, コーヒー, 紅茶などの甘味料として古くから用いられてきた。その甘味成分の研究は今世紀当初から行なわれ, ステビオンド (stevioside) [1] と命名された強甘味物質が乾燥葉の 5~7% という高収量で結晶として単離された。[1] の構造は主として米国 NIH の Fletcher および Mosettig のグループにより明らかにされ, 真性アグリコンは 13-位に第三級ヒドロキシル基をもつカウレン酸 (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid) でステビオール (steviol) [2] と命名された¹⁾。

最近, 食品添加物の安全性が注目され, 人工甘味料についてもこのことが論議されている。また, 天然甘味料であるショ糖の過

剰摂取にともなう健康障害が保健衛生上の問題となっている。このような甘味料をめぐる問題が, 食品衛生上安全, 良質でかつ経済性の高い新しい甘味料の開発への関心をたかめる結果となり, このステビア葉についても新しい天然甘味料資源として注目されるようになった。現在わが国や東南アジア諸国でステビアの栽培生産が行なわれており, すでにわが国ではそのエキスが食品添加物として使用されている。

精製された [1] (若干苦味がある) よりも粗製の葉エキスの方が甘味の質の点ですぐれていることが以前から認められており, [1] 以外の甘味物質の存在が推察されていた。著者らは本葉から4種の新甘味配糖体を単離し, レバウディオンド (rebaudioside)-A [3]²⁾, -C [4]³⁾, -D [5]⁴⁾ および -E [6]⁴⁾ と命名した。

- 1) H. B. Wood, Jr., R. Allerton, H. W. Diehl, H. G. Fletcher, Jr., *J. Org. Chem.*, 20, 875(1955); E. Mosettig, U. Beglinger, F. Dolder, H. Lichiti, P. Quitt, J. A. Waters, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2305(1963); E. Vis, H. G. Fletcher, Jr., *ibid.*, 76, 4709(1956).
- 2) H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami, O. Tanaka, *Phytochemistry*, 15, 981(1976).

広島大学医学部総合薬学科, 734 広島市南区霞

** 広島県衛生研究所, 734 広島市南区宇品神田

*** 大阪市立工業研究所, 530 大阪市北区北扇町

**** 味の素株式会社中央研究所, 210 川崎市鈴木町

Scheme 1

それぞれの構造は新しい加水分解酵素の利用⁵⁾, ¹³C-NMR⁶⁾⁷⁾および電界脱離質量分析⁸⁾などの応用によって決定されたが、いずれも〔1〕と共通の真性アグリコン〔2〕の配糖体で、含量的には〔3〕が〔1〕について高く(2~6%程度),〔4〕がこれにつき、〔5〕,〔6〕は微量配糖体である。なお、北大、三橋らは本葉から甘味配糖体2種を得てズルコシド(dulcoside)-A〔7〕, -B⁹⁾と命名しているが、後者は、著者らの〔4〕と同一物である。また、著者らがさきに報告したレバウディオシド-B〔8〕はその後の検討から、抽出分離操作中〔3〕から生成した二次的産物で天然物ではないことが明らかになった。

上記新配糖体のうち〔3〕,〔5〕および〔6〕は甘味の強さ、質ともに〔1〕よりすぐれ、とくに〔3〕はその含量からいってもステビア葉エキスの甘味を論ずる上で重要な役割をもち、甘味料として注目されている。著者らは本植物葉からもっとも多量にかつ容易に得られる〔1〕の〔3〕,〔5〕,〔6〕への変換,〔1〕の関連配糖体の化学的あるいは酵素的合成およびカウレン(kaurene)型ジテルペン配糖体の甘味と化学構造との関係について研究して発表し¹⁰⁾¹¹⁾, また一部は速報³⁾⁴⁾として報告してきた。本報告は以上の合成および甘味の研究をとりまとめその後の知見と実験の詳細を加えた原報である。

2 結果および考察

2.1 ステビオール〔2〕およびその関連化合物のエステル型グリコシドの合成と¹³C-NMR

カウレン酸〔9〕のβ-D-グルコシルエステル〔10〕は常法にしたがい〔9〕の銀塩にα-アセトブロモグルコース〔11〕を反応させることにより容易に得られた。しかし、〔2〕を同条件でグルコシル化しても反応はほとんど進行せず、19-COOHに空間的に近い13-OHが19-COOHのグルコシル化に影響を与えていることが明らかにされた。

著者らは種々の反応条件を検討し、3,4,6-トリ-O-アセチル-α-D-グルコピラノース=1,2-(*l*-ブチルオルトアセタート)〔12〕を用いたオルトエステル法¹²⁾によって〔2〕のβ-D-グルコシルエステル〔13〕が60%の収率で得られることを見いだした。なお、小川らはトリブチルスタニルカルボキシラートの存在下、〔2〕と〔11〕を反応させ60%の収率で〔13〕を得たことを報告している¹³⁾。

グルコビオシルエステルの合成については、〔2〕にセロビオースおよびマルトースのオルトエステル体を反応させ、そのβ-セロビオシルエステル、β-マルトシルエステルの合成を試みたが、その収量はきわめて低かった。各種の条件を検討した結果、グルコビオシルエステルの合成には炭酸銀-セライト法¹⁴⁾が有効であることが明らかにされた。〔9〕は炭酸銀-セライト存在下α-アセトブロモソホロースと反応させるとそのβ-ソホロシルエステル〔14〕を85%の収率で与え、また、〔1〕の部分加水分解で得

- 笠井良次, 金田 宣, 田中 治, 神田博史, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 天然薬物の開発と応用シンポジウム(第1回), 1976年8月6日, 東京; 笠井良次, 金田 宣, 山崎和男, 田中 治, 坂本征則, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 古川秀子, 同シンポジウム(第2回), 1978年8月4日, 京都。
- 田中 治, 植物化学シンポジウム(第15回), 1979年1月27日, 東京; 田中 治, 遺伝, 33, (9), 32(1979)。
- K. Honma, A. Hamada, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 1165 (1976)。
- T. Ogawa, M. Nozaki, M. Matsui, *Carbohydr. Res.*, 60, C7(1978)。
- J. Hartenstein, G. Satzinger, *Ann. Chem., Justus Liebig's*, 1974, 1763。

3) I. Sakamoto, K. Yamasaki, O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 844(1977)。

4) I. Sakamoto, K. Yamasaki, O. Tanaka, *ibid.*, 25, 3437 (1977)。

5) 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治, 薬誌, 95, 1505 (1975)。

6) K. Yamasaki, H. Kohda, T. Kobayashi, R. Kasai, O. Tanaka, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 1005。

7) R. Kasai, M. Suzuo, J. Asakawa, O. Tanaka, *ibid.*, 1977, 175; R. Kasai, M. Okihara, J. Asakawa, K. Mizutani, O. Tanaka, *Tetrahedron*, 35, 1427(1979); K. Mizutani, R. Kasai, O. Tanaka, *Carbohydr. Res.*, 87, 19(1980); K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, H. Arita, Y. Tomita, *Tetrahedron Lett.*, 1977, 179; *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 3331(1978)。

8) I. Sakamoto, K. Morimoto, O. Tanaka, H.R. Schulten, to be published。

9) M. Kobayashi, S. Horikawa, I.H. Degrandi, J. Ueno, H. Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 16, 1405(1977)。

Scheme 2

られる 13-O-β-グルコシルステビオール [15] のアセタートに炭酸銀-セライト存在下 α-アセトブロモセロビオース, α-アセトブロモマルトースをそれぞれ反応させることにより [15] の β-セロビオシルエステル [16] および β-マルトシルエステル [17] をそれぞれ 40%, 50% の収率で得ることができた。

なお, 以上の反応において糖部の保護基であるアセチル基は, 酸化バリウム-メタノール溶液中で室温または 4°C 放置でエステル型配糖体結合を切ることなく加水分解することができた。

一般にアルコール類をアシル化するとカルビニル炭素シグナルは低磁場シフトすることが知られている。しかし, 今回合成されたエステル型配糖体の ¹³C-NMR においてそのアノマー炭素シグナルは, β-D-グルコースのそれ (ピリジン-d₅ 溶液中で δ 98.9) にくらべ δ 95.5~95.7 (ピリジン-d₅ 溶液中) とむしろ高磁場シフトしていることが認められた⁹⁾。なお, この異常シフトは本系統の配糖体に特徴的なだけでなく, 一般の脂肪酸のエステル型配糖体にも共通であることが最近明らかにされた¹⁵⁾。一方, 糖部の 2-位の炭素シグナルは一般則にしたがって高磁場シフトしており (Δδ 0.9~1.4 ppm), またソホロシルエステル [14] のエステル型グルコシル部のアノマー炭素シグナルは, その 2-位の -OH にさらにグルコシル基が結合しているため高磁場シフトし δ 93.4 (ピリジン-d₅ 溶液中) 付近に認められる。このデータは [5], [6] の構造決定に有効に利用された⁹⁾。

2.2 レバウディオシド-A [3], -D [5], -E [6] の合成

ステビア葉中にもっとも高含量で存在し, 容易に単離できる [1] をより強く良質の甘味をもつ [3], [5], [6] に変換することは以下に述べるようにして完成された。

[3] は [1] のソホロシル部にさらに 1 個の β-グルコースが結合した配糖体であるが, [1] の 11 個の -OH のうち 10 個を選択的に保護して残る 1 個の -OH をグルコシル化し [3] へ変換することはきわめて困難であるので, [1] を部分的に加水分解して [15] としたのち, グルコシル化して [3] へ変換することを計画した。[15] は以前 [1] をアルカリ加水分解して得られる

Scheme 3

ステビオールピオシド [18] をタカジアスターゼで部分加水分解して得られているが¹⁶⁾, [18] の水に対する溶解度が低いため規模の大きい実験には支障があった。今回 [18] にくらべて水に易溶な [1] のタカジアスターゼによる加水分解を検討した結果, そのソホロス部の末端グルコースのみが脱離した [19] がほとんど定量的に得られることを見いだした。[19] はアルカリ加水分解で定量的に [15] を与える。これをベンジリデン誘導体 [20] としてグルコース部の 4, 6-位の -OH を保護したのち, 前述の [12] を用いたオルトエステル法によって 3 分子の β-グルコースを導入し, 脱ベンジリデン, 脱アセチルして [3] を [1] から約 60% の収率で得ることができた¹⁷⁾。

[6] の合成は [1] のエステル配糖体部をアルカリ加水分解して得られる [18] のアセタートを, 上述のように炭酸銀-セライト存在下 α-アセトブロモソホロースでソホロシルエステルとし, 生成物を脱アセチル化することにより 97% の収率で行なわれ

15) K. Yoshimoto, Y. Itatani, K. Shibata, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 208(1980).

16) K. Yamasaki, H. Kohda, T. Kobayashi, N. Kaneda, R. Kasai, O. Tanaka, K. Nishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2895(1977).

17) N. Kaneda, R. Kasai, K. Yamasaki, O. Tanaka, *ibid.*, 25, 2466(1977).

Scheme 4

た⁴⁾。

[5]の合成は[3]をアルカリまたは粗ヘスベリジナーゼで加水分解して得られる[8]のアセタートを同様ソホシル化することによって91%の収率で行なわれた⁴⁾。

2.3 ステビオールビオシド[18]およびステビオシド[1]への酵素的糖転移反応

岡田らは土壌から得られた *Bacillus megaterium* の一菌株より高い糖転移効率をもつシクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを得た¹⁸⁾。本酵素はデンプンを供与体としてグルコース、キシロースなど(受容体)の4-位に α -グルコースを高収率で転移する活性を有する。

著者らはステビオール配糖体の甘味の改良と甘味と構造との相関研究の試料の合成の一環として、まず、[1]のアルカリ加水分解によって得られる[18]への本酵素系による糖転移反応を検討した。[18]、可溶性デンプン、本酵素をpH 6.0、40°Cで20時間反応、反応液を水飽和1-ブタノールで抽出して得た配糖体分画をカラムクロマトグラフィーで分離し、3種の生成物[21]、[22]、[23]をそれぞれ12、9および5%の収率で得た。それぞれの構造は、a) 完全メチル化体の質量分析における糖部のフラグメントイオンの解析 b) 完全メチル化体のメタノリシスによって生成する部分メチル化糖の同定 c) ¹³C-NMR および ¹H-NMR におけるアノマー炭素、水素シグナルの解析により検討し、[21]は[18]の末端糖の4-位に1個の α -グルコースが転移してできたもの、[22]は[21]の末端糖の4-位にさらに1個の α -グルコースが転移し、[23]は[22]の末端糖の4-位にさらに1個の α -グルコースが転移したものであることが確認された。

ついで本酵素系による[1]への糖転移を同様の条件下に検討した。[1]は[18]にくらべて水に対する溶解度が高いので反応はより円滑に進行した。反応混合物に α -アミラーゼを作用させ、糖転移が1箇所につき4個ないしはそれ以上起こった生成物を加水分解してから反応物をカラムクロマトグラフィーで分離し、[1]に α -グルコースが1分子転移した分画[24]、2分子転移した分画

[25]および3分子転移した分画[26]をそれぞれ30、32、20%の収率で得た。[1]の場合はソホロス部の末端グルコースとともにエステル型グルコシル部にも転移が起こることが予想され、事実、アルカリ加水分解により[24]は[18]、[21]を、[25]は[18]、[21]、[22]を、[26]は[18]、[21]、[22]、[23]を与えることから、[24]は[24-1]と[24-2]の混合物、[25]は[25-1]、[25-2]と[25-3]の混合物、[26]は[26-1]、[26-2]、[26-3]と[26-4]の混合物(構造式4参照)であると考えられたが、それ以上の分離はきわめて困難であったので、それぞれを混合物のまま甘味試験の試料とした。なお、[24-1]は[18]のアセタートに炭酸銀-セライト存在下 α -アセトブロモマルトースを反応させる方法で別途合成した。

2.4 甘味と化学構造との相関

以上2.1~2.3で得られた配糖体および著者らがさきに *Stevia paniculata*¹⁹⁾ および *Stevia ovata*¹⁹⁾ 葉から得た配糖体パニコシド(paniculose) I~V([27]~[31])についてショ糖との相対甘味度を検討した。

甘味試験は4名の専門パネラーによって検体の0.05% (w/v) 水溶液の甘味に相当するショ糖水溶液の濃度(B%(w/v))を求め、ショ糖との相対甘味度(B/0.05)を計算した。甘味の強いものについては、さらに0.1および0.025% (w/v)の濃度についても相対甘味度を求めた。

[2]のモノまたはジグルコシドについては、19-COOH または13-OHの一方のみに糖の結合した化合物[13]、[15]、[18]は水に対する溶解度が低く、かつ苦味が強いが、いずれも弱いながらも(ショ糖の50倍以下)甘味を示す。一方、[2]、[10]、[14]、[27]~[31]および[18]のメチルエステル[32]はまったく甘味を示さなかった。このことは本系統の配糖体の甘味発現には19-COOH または-COO-糖と13-OH または-O-糖の両者の存在が必須であることを示している。[18]に糖転移を行なった生成物[21]、[22]は水に対する溶解度が増し、相対甘味度も両者とも99倍と増加し、また苦味も少なくなった。13-O-グルコシル体[15]の19-COOHにグルコースが1個結合した[19]でも溶解度、相対甘味度(63倍)の増強および甘味の質の改善が

19) N. Kaneda, H. Kohda, K. Yamasaki, O. Tanaka, K. Nishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 2266(1978).

18) S. Kitahata, N. Tsuyama, S. Okada, *Agr. Biol. Chem.*, 38, 387(1974); S. Chiba, S. Okada, S. Kitahata, T. Shimomura, *ibid.*, 39, 2353(1975); S. Kitahata, S. Okada, T. Fukui, *ibid.*, 42, 2369(1978).

Scheme 5

Table 1 Relative sweetness of steviol glycosides to sucrose

Compounds	A		
	0.1	0.05	0.025
[19]	84	63	—
[34]	—	39	—
[16]	—	68	—
[21]	—	99	—
[22]	—	99	—
[24]	72	128	172
[24-1]	—	142	—
[25]	81	138	164
[26]	74	131	157
Stevioside [1]	89	149	143
[33]	—	43	—
Rebaudioside-A [3]	85	149	242
Rebaudioside-D [5]	89	163	221
Rebaudioside-E [6]	85	125	174

Relative sweetness = B/A

A : Concentration (w/v %) of aqueous solution of sample.

B : Concentration (w/v %) of aqueous solution of sucrose with the same sweetness as the sample solution.

認められたが、19-COOH のグルコースをさらに 1,4- α または 1,4- β に 1 個増加した化合物 [16], [17] では相対甘味度および甘味の質の改善はとくに認められなかった。

今回の研究で相対甘味度が 0.05% 濃度で 100 倍以上であったものは、13-OH に β -ソホロシルが、19-COOH に 1 個以上のグルコースが結合した配糖体である。[1] の 19-COO-グルコース部にさらにグルコース 1 個を結合させた [24-1], [6] や、糖転移で [1] の 19-COOH 部または 13-OH 部の糖鎖を直鎖状に増加した [24], [25], [26] では相対甘味度のそれ以上のいちじるしい増強は認められなかったが、水に対する溶解度および苦味

の消失などの呈味の改良は認められた。今回の配糖体でもっとも強く良質の甘味を示したものは 13-OH に枝わかれ糖をもつ [3], [5] で、とくに 19-COOH に β -ソホロシルを有する [5] は呈味質の点で一番すぐれていることが明らかにされた。

なお、[1] および [3] の 1 分子のグルコースがラムノースとなった [7] および [4] の甘味度はそれぞれ [1], [3] の 1/10 程度に低下することが三橋らにより認められている。また、最近神谷らは [1] のエステル糖部をグルコラムノシル、ガラクトラムノシルおよびグルコキノボシルに変化させた配糖体を合成し甘味の増強を報告している²⁰⁾。

本系統の配糖体の甘味の発現に 16(17) の二重結合の存在も重要な役割を示すことが認められた。すなわち、[1] および [19] を接触還元して得られたジヒドロ体 [33], [34] では甘味がいちじるしく低下した。また、予試験的研究ではあるが [1] の二重結合を酸化オスミウム(VIII)で酸化してジヒドロキシ誘導体とした化合物はまったく甘味を示さないことを認めている。

付記：本植物葉の粗エキスを、主甘味成分 [1] および [3]、また、本植物葉のエーテル可溶分画から得られたラブダン系ジテルペン 3 種²¹⁾について Ames 法による突然変異原性試験を行なったが、いずれも陰性であった²²⁾。

3 実験の部

NMR は JEOL JNM-PFT-100 NMR スペクトロメーターで ¹H-NMR は 100MHz, ¹³C-NMR は 25.15MHz でとくにことわりのないかぎりピリジン-*d*₅ 中 0.08~0.4mmol/ml の濃度で 25°C において測定した。FT-NMR 測定条件は、つぎのとおりである。

- 20) S. Kamiya, F. Konishi, S. Esaki, *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 1863(1979).
- 21) M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Miyama, O. Tanaka, *Phytochemistry*, **19**, 326(1978).
- 22) 根岸友恵, 早津彦哉, M. Sholichin, 田中 治, 日本薬学会中四国支部例会発表 (1980 年 7 月, 岡山).

Pulse flipping angle: 45°, Acquisition time: 0.4 s, Number of data point: 4096, Transient time: 2~3s, Number of transient: 600~10000

化学シフトはテトラメチルシランを内部標準とし δ ppm で標示した。質量分析は JEOL-01 SG-2 を用いすべて直接導入法で行なった。

3.1 カウレン酸 [9] の β -D-グルコシルエステル [10] の合成

[9] 200mg をメタノール 20ml に溶解し、フェノールフタレインを指示薬として 2% 水酸化カリウム-メタノール溶液で弱アルカリとしてから硝酸銀 240mg を水 5ml に溶解した溶液をかきまぜながら滴下、沈殿物を汙取し、メタノールで洗浄、乾燥する。この銀塩を無水エーテル中に懸濁し、[11] 230mg を加え、65 時間室温で遮光しかきまぜ反応させる。反応液を汙過し、汙液を濃縮乾固、残留物をメタノールに溶解、0.5N 酸化バリウム-メタノール溶液 2ml を加え一夜 4°C に放置、反応液を Dowex 50W で中和し、蒸発乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール (100:7)) で精製、メタノールから再結晶して [10] を mp 121~122°C, $[\alpha]_D^{20}$ -65.0° ($c=0.2$, メタノール) の無色針状晶として 67mg 得た。

IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1720

分析値 C 62.25%, H 8.77%

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 62.38%, H 8.86%

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 1.24 (3H, s), 1.32 (3H, s), 4.83 (2H, br.s), 6.12 (1H, d, $J=6.5\text{Hz}$, アノマープロトン)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 95.2 (アノマー炭素)

MS (TMSi エーテル) m/z : 752 (M^+), 451 (グルコース (TMSi) $_4^+$)。

3.2 ステビオール [2] の β -D-グルコシルエステル [13] の合成

[2] 30mg と [12] 100mg をクロロベンゼン 10ml に溶解し、30 分間加熱還流する。反応液を蒸発乾固し、残留物をメタノール 10ml に溶解し [10] の合成と同様に 0.5N 酸化バリウム-メタノール溶液で脱アセチルし、反応物の水飽和 1-ブタノール可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール (20:3)) で精製、メタノール-水から再結晶して [13] を mp 185~187°C, $[\alpha]_D^{20}$ -31.0° ($c=0.1$, メタノール) の無色針状晶として 25mg 得た。

IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1730

分析値 C 62.26%, H 8.80%

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 62.63%, H 8.49%

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 1.29 (3H $\times$ 2, s), 4.96 (1H, s), 5.42 (1H, s), 6.18 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, アノマープロトン)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 95.7 (アノマー炭素)

MS (TMSi エーテル) m/z : 840 (M^+), 451 (グルコース (TMSi) $_4^+$)。

3.3 炭酸銀-セライトの調製

硝酸銀 34g を蒸留水 200ml に溶解し、塩酸で処理し十分に水洗したセライト 30g を加え、マグネティックスターラーでよくかきまぜる。懸濁液が均質になったら、炭酸ナトリウム十水和

物 30g を蒸留水 300ml に溶かした溶液をかきまぜながら数分間かけて加える。加え終わったのち、さらに 10 分間かきまぜ、黄緑色の沈殿を汉取、それを汉液が中性になるまで十分水洗する。沈殿をロータリーエバポレーターで水浴上乾燥する。このようにして得られたものは 0.57g につき炭酸銀を約 1mmol 含有している。

3.4 カウレン酸 [9] の β -ソホロシルエステル [14] の合成
[9] 200mg を乾燥した 1,2-ジクロロエタン 20ml に溶解し、炭酸銀-セライト 600mg を加え、かきまぜながら 110°C まで加熱し、1,2-ジクロロエタンの一部を留去し水を除く。これに α -アセトプロモソホロース 500mg を加え、湿気をささげりながら還流下、2 時間かきまぜをつづける。冷後、反応液をセライト層に通し、汉液を減圧濃縮してシロップ状物質を得る。これに 0.5N 酸化バリウム-メタノール溶液 10ml を加え室温で 1 時間かきまぜる。反応後水を加え酢酸で中和、クロロホルムで抽出、さらに水層を水飽和 1-ブタノールで抽出する。ブタノール層を減圧乾固、残留物をメタノールから再結晶し、[14] を mp 214~216°C, $[\alpha]_D^{20}$ -58.4° ($c=0.39$, メタノール) の無色針状晶として 350mg 得た。

分析値 C 59.29%, H 8.10%

$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_{12} \cdot \text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 59.62%, H 8.07%

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 1.00 (3H, s), 1.36 (3H, s), 4.79 (2H, br.s), 5.43 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, アノマープロトン), 6.06 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, アノマープロトン), 6.06 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, アノマープロトン)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 93.5 (エステル型グルコースのアノマー炭素), 104.8 (末端グルコースのアノマー炭素)

3.5 13-O- β -D-グルコシルステビオール [15] の β -セロビオシルエステル [16] の合成

[15] をピリジン-無水酢酸で常法によりアセチル化して得たアセタート 500mg を乾燥した 1,2-ジクロロエタン 15ml 中、炭酸銀-セライト 1.5g 存在下、 α -アセトプロモセロビオース 1.0g と [14] の合成に準じて反応させる。冷後、反応液をセライト層に通し、汉液を減圧濃縮、残留物を [10] の合成と同様 0.5N 酸化バリウム-メタノール溶液で脱アセチルし、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール (4:1)) で精製し、メタノールから再結晶して [16] を mp 190~192°C, $[\alpha]_D^{20}$ -32.8° ($c=0.06$, メタノール) の無色針状晶として 250mg 得た。

分析値 C 52.12%, H 7.38%

$\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{18} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 52.04%, H 7.82%

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 1.20 (3H, s), 1.24 (3H, s), 5.02 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, アノマープロトン), 5.13 (1H, br.s), 5.18 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, アノマープロトン), 5.53 (1H, br.s), 6.01 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, アノマープロトン)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 95.3 (セロビオース部のエステル型アノマー炭素), 104.9 (セロビオース部の末端グルコースアノマー炭素), 99.4 (13-O-グルコース部のアノマー炭素)

3.6 13-O- β -D-グルコシルステビオール [15] の β -マルトシルエステル [17] の合成

[15] のアセタート 500mg を乾燥した 1,2-ジクロロエタン

15 ml 中、炭酸銀-セライト 1.5 g 存在下、 α -アセトブロモマルトース 1.0 g と [16] の合成と同様に反応、後処理して生成物をメタノールから再結晶して [17] を mp 217~220°C, $[\alpha]_D^{25} -4.5^\circ$ ($c=0.09$, メタノール) の無色針状晶として 300 mg 得た。

分析値 C 52.09%, H 7.92%

$C_{38}H_{60}O_{18} \cdot 4 H_2O$ としての

計算値 C 52.04%, H 7.82%

1H -NMR (80°C で測定) δ (ppm): 1.14 (3H, s), 1.36 (3H, s), 5.09 (1H, br. s), 5.14 (1H, d, $J=7.0$ Hz, アノマープロトン), 5.58 (1H, br. s), 5.75 (1H, d, $J=4.0$ Hz, アノマープロトン), 5.95 (1H, d, $J=7.0$ Hz, アノマープロトン)

^{13}C -NMR δ (ppm): 95.3 (マルトース部のエステル型アノマー炭素), 102.5 (マルトース部の末端グルコースのアノマー炭素), 99.3 (13-O-グルコース部のアノマー炭素)

3.7 ステビオシド [1] の酵素加水分解, [19] の生成

[1] 500 mg をタカジアスターゼ (三共製) 1.5 g とリン酸クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 100 ml 中 37°C で 80 時間反応させる。反応液を水で希釈し、1-ブタノールで抽出した。抽出液を濃縮乾固、残留物をメタノールから再結晶して [19] を mp 178~182°C, $[\alpha]_D^{20} -38.7^\circ$ ($c=0.8$, メタノール) の無色プリズム晶として 400 mg 得た。

分析値 C 56.46%, H 8.01%

$C_{32}H_{50}O_{13} \cdot 2 H_2O$ としての

計算値 C 56.62%, H 8.02%

1H -NMR (90°C で測定) δ (ppm): 1.23 (3H, s), 1.27 (3H, s), 5.02 (1H, br. s), 5.52 (1H, br. s), 5.06 (1H, d, $J=7.0$ Hz, アノマープロトン), 6.08 (1H, d, $J=7.0$ Hz, アノマープロトン)

^{13}C -NMR δ (ppm): 95.7 (エステル型グルコース部のアノマー炭素), 99.5 (13-O-グルコース部のアノマー炭素)

以上の結果から [1] の 13-O- β -ソホシル部の末端グルコースが加水分解されたものであることが明らかにされた。

3.8 レバウディオシド-A [3] の合成

[19] 1.0 g を 5% 水酸化ナトリウム-エタノール溶液 10 ml 中 3 時間加熱還流、常法で処理し、生成物をメタノールから再結晶して mp 250~254°C, $[\alpha]_D^{25} -55.5^\circ$ ($c=0.20$, メタノール) の無色針状晶として 750 mg の [15] を得、標品と TLC, 混融, ^{13}C -NMR の比較で同定した。

[15] 300 mg とベンズアルデヒド 3 ml を 98% ギ酸 3 ml 中室温で 15 分間反応させ、反応液を炭酸カリウム 6 g を含む水 10 ml 中に注入し、エーテル抽出、生成物をベンゼンあるいはメタノールから再結晶してベンジリデン誘導体 [20] を mp 167~170°C, $[\alpha]_D^{20} -54.4^\circ$ ($c=0.25$, メタノール) の無色針状晶として 300 mg 得た。

分析値 C 64.05%, H 8.09%

$C_{33}H_{44}O_8 \cdot 3 H_2O$ としての

計算値 C 63.64%, H 8.09%

1H -NMR (メタノール- d_4 溶液) δ (ppm): 0.94 (3H, s), 1.60 (3H, s), 4.57 (1H, br. s), 5.08 (1H, br. s), 5.48 (1H, s)

[20] 100 mg, [12] 1.0 g をクロロベンゼン 10 ml 中 1 時間加熱還流, [13] の合成と同様に後処理し、反応物を 0.5 N 酸化バリウム-メタノール溶液 2 ml に溶解して 5°C 一夜放置して脱

アセチル、反応液を Dowex 50 で脱イオン後濃縮、残留物を 30% 酢酸 3 ml に溶解、80°C で 15 分間加熱して脱ベンジリデン、減圧濃縮、残留物に水を加え、1-ブタノールで抽出、ブタノール層を濃縮、残留物をメタノールから再結晶して mp 242~244°C, $[\alpha]_D^{20} -19.5^\circ$ ($c=0.2$, メタノール) の無色針状晶 125 mg を得た。本品は標品と混融, TLC, ^{13}C -NMR および比旋光度の比較から [3] であることが確認された。

3.9 レバウディオシド-D [5] の合成

[8] をビリジン-無水酢酸で常法によりアセチル化して得たアセタート 600 mg を乾燥した 1,2-ジクロロエタン 15 ml 中、炭酸銀-セライト 1.5 g 存在下、 α -アセトブロモソホロースを [14] の合成と同様に反応させる。冷後、反応液をセライト層に通し、汙液を減圧濃縮してシロップ状物質を得る。これに 0.5 N 酸化バリウム-メタノール溶液 10 ml を加え室温で 1 時間かきまぜる。反応後水を加え、水飽和 1-ブタノールで抽出し、1-ブタノールを減圧留去、残留物を水から再結晶し無色針状晶 500 mg を得た。

分析値 C 50.74%, H 7.23%

$C_{50}H_{80}O_{28} \cdot 3 H_2O$ としての

計算値 C 50.76%, H 7.46%

本品は標品と TLC, ^{13}C -NMR および比旋光度の比較から [5] であることが確認された。

3.10 レバウディオシド-E [6] の合成

[18] をビリジン-無水酢酸で常法によりアセチル化して得たアセタート 500 mg を上記 [5] の合成と同様に反応、後処理し、1-ブタノール留去後の残留物をメタノールから再結晶し無色針状晶 500 mg を得た。

分析値 C 51.43%, H 7.37%

$C_{44}H_{70}O_{23}$ としての

計算値 C 51.75%, H 7.50%

本品は標品と TLC, ^{13}C -NMR および比旋光度の比較から [6] であることが確認された。

3.11 ステビオールピオシド [18] への酵素的糖転移

[18] 2.2 g, 可溶性デンプン 4.4 g, *Bacillus megaterium* strain No. 5 から得られたグルコシルトランスフェラーゼ (60 ユニット/ml) 8 ml を 0.01 mol/l アセタート緩衝液 (pH 6.0) 450 ml 中 40°C で 20 時間反応させる。反応液を 1-ブタノール抽出、1-ブタノール層を濃縮、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール-水 (17:8:2)) で分離した。[21], [22], [23] の 3 種の化合物を得、原料 [18] 1.0 g を回収した。[21] はエタノールから再結晶して mp 204~206°C, $[\alpha]_D^{25} +12.2^\circ$ ($c=0.11$, エタノール) の無色針状晶として 800 mg が得られた。

分析値 C 51.85%, H 7.72%

$C_{38}H_{60}O_{18} \cdot 4 H_2O$ としての

計算値 C 52.04%, H 7.82%

^{13}C -NMR δ (ppm): 97.6 (13-OH に結合した β -D-グルコースのアノマー炭素), 106.4 (β -ソホロース部のアノマー炭素), 102.8 (転移した α -グルコースのアノマー炭素)

[21] を箱守法²³⁾により完全メチル化したメチルエーテルをヘキサンから再結晶して無色針状晶 mp 163~165°C として得た。

23) S. Hakomori, *J. Biochem.*, (Tokyo), 55, 205 (1964).

その $^1\text{H-NMR}$ (クロロホルム- d 溶液) は δ 4.40 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 4.60 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 5.54 (1H, d, $J=4\text{Hz}$) に 3 個のアノマープロトンのシグナルを示し, 本品 5mg を 8% 塩酸-メタノール溶液 2ml 中 1 時間加熱還流してメタノリシスし, 反応液に炭酸銀を加えて, 沈殿を濾別, 濾液について GLC を行なったところ, メチル=2, 3, 6-トリ- O -メチルグルコピラノシド, メチル=3, 4, 6-トリ- O -メチルグルコピラノシドおよびメチル=2, 3, 4, 6-テトラ- O -メチルグルコピラノシドが標品との保持時間の比較により確認された。

GLC 条件——島津ガスクロマトグラフ GC-4A, 水素炎イオン化検出, カラム: 20% 1, 4-ブタンジオール=スクシナート, ガラスカラム: 3mm $\times$ 2m, カラム温度: 170°C, キャリヤガス: N_2 1kg/cm 2 .

本メチルエーテルは MS において m/z 627 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 595 (627- CH_3OH), 423 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 391 (423- CH_3OH), 219 (グルコース $(\text{CH}_2)_4^+$), 187 (219- CH_3OH) を示した。

[22] はエタノールから再結晶して mp 220~222°C, $[\alpha]_D^{25} +37.0^\circ$ ($c=0.13$, エタノール) の無色針状晶として 500mg 得られた。

分析値 C 49.77%, H 7.32%

$\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 49.99%, H 7.62%

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 97.7 (13-OH に結合した β -D-グルコースのアノマー炭素), 106.3 (β -ソホロース部のアノマー炭素), 103.0 (転移した α -グルコース 2 個分のアノマー炭素)

[22] を箱守法²³⁾で完全メチル化したメチルエーテルはシロップ状として得られたが, その $^1\text{H-NMR}$ (クロロホルム- d 溶液) は δ 4.44 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 4.63 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 5.50 (1H, d, $J=4\text{Hz}$), 5.61 (1H, d, $J=4\text{Hz}$) の 4 個のアノマープロトンのシグナルを示し, [21] のメチルエーテルと同条件でメタノリシスし, 生成物を GLC で分析し, [21] と同一の 3 種のメチル=グルコピラノシドのメチル化体を確認した。本メチルエーテルの MS は m/z 831 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 799 (831- CH_3OH), 627 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 595 (627- CH_3OH), 423 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 391 (423- CH_3OH), 219 (グルコース $(\text{CH}_2)_4^+$), 187 (219- CH_3OH) を示した。

[23] は $[\alpha]_D^{25} +70.0^\circ$ ($c=0.12$, メタノール) のシロップ状として 360mg 得られ結晶化して元素分析するにはいたらなかったが, その構造は下記データから構造式 4 に示すとおりであることが推定された。

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 97.5 (13-OH に結合した β -D-グルコースのアノマー炭素), 105.5 (β -ソホロース部のアノマー炭素), 102.5 (転移した α -グルコースの 3 個分のアノマー炭素)

[23] も箱守法²³⁾で完全メチル化体とした。その $^1\text{H-NMR}$ (クロロホルム- d 溶液) は δ 4.46 (1H $\times$ 2, d, $J=8\text{Hz}$) に 2 個分の β -アノマープロトンシグナルと 5.53 (1H $\times$ 2, d, $J=4\text{Hz}$), 5.62 (1H, d, $J=4\text{Hz}$) に 3 個分の α -アノマープロトンシグナルを示し, [21] のメチルエーテルと同条件でメタノリシスして生成物を GLC で分析すると, [21] と同一の 3 種のメチル=グ

ルコピラノシドのメチル化体を確認された。本メチルエーテルの MS は m/z 1035 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 1003 (1035- CH_3OH), 831 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 799 (831- CH_3OH), 627 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 595 (627- CH_3OH), 423 (グルコース $(\text{CH}_2)_4$ -グルコース $(\text{CH}_2)_3^+$), 391 (423- CH_3OH), 219 (グルコース $(\text{CH}_2)_4^+$), 187 (219- CH_3OH) を示した。

3.12 ステビオシド [I] への酵素的糖転移反応

[I] 2.5g, 可溶性デンプン 5.0g を 0.01mol/l 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 400ml 中 3.11 と同じ酵素 (50 ユニット/ml) 4ml とを 40°C で 24 時間反応させた。さらに反応液を 100°C, 10 分間加熱後, 大豆から得られた β -アミラーゼと安定剤としてシステインを加えて 40°C で 24 時間反応させ, 反応液を凍結乾燥後, 水-1-ブタノール系で振出, ブタノール層をとり, 水層はさらに 1-ブタノール抽出, ブタノール層を合わせ濃縮乾固する。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール-水 (20:6:1)) で分離し, [24] 750mg, [25] 800mg, [26] 550mg の 3 分画を得, [I] 200mg を回収した。[24], [25], [26] の各分画 90mg を 10% 水酸化カリウム-メタノール溶液 2ml で 1 時間加熱還流し常法で後処理し, 生成物の配糖体分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム-メタノール-水 (17:8:1)) で分画し, [24] から [18], [21] を, [25] からは [18], [21], [22] を, [26] から [18], [21], [22], [23] を得てそれぞれ標品と同定した。

3.13 ステビオールビオシド [18] の β -マルトシルエステル [24-I] の合成

[18] をピリジン-無水酢酸で常法によりアセチル化して得たアセタート 300mg に 1,2-ジクロロエタン 15ml 中炭酸銀-セライト 2g の存在下 α -アセトブROMALTOS 700mg を [16] の合成と同様に反応, 後処理し, 生成物をメタノールから再結晶して [24-I] を mp 196~199°C, $[\alpha]_D^{25} -7.6^\circ$ ($c=0.01$, メタノール) の無色針状晶として 50mg 得た。

分析値 C 51.56%, H 7.57%

$\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 51.75%, H 7.50%

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 1.77 (3H $\times$ 2, s), 5.04 (1H, br.s), 5.11 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, アノマープロトン), 5.25 (1H, d, $J=6.5\text{Hz}$, アノマープロトン), 5.68 (1H, br.s), 5.87 (1H, d, $J=3.5\text{Hz}$, アノマープロトン), 5.97 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, アノマープロトン)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm): 95.4 (マルトース部のエステル型アノマー炭素), 102.8 (マルトース部の末端グルコースのアノマー炭素), 97.9 (ソホロース部の 13- O -グルコースのアノマー炭素), 106.6 (ソホロース部の末端グルコースのアノマー炭素)

3.14 [18] のメチルエステル [32]

[18] 0.1g の無水メタノール溶液に過剰のジアゾメタンのエーテル溶液を加え 2 時間放置した。反応後過剰のジアゾメタンを酢酸で分解し, 溶媒を留去, 残留物をメタノール-水から再結晶し [32] を mp 170~175°C, $[\alpha]_D^{25} -46.8^\circ$ ($c=0.99$, ピリジン) の無色針状晶として 70mg 得た。

分析値 C 54.49%, H 7.92%

$C_{30}H_{62}O_{18} \cdot 2H_2O$ としての

計算値 C 54.78%, H 7.78%

^{13}C -NMR において δ 177.8 と 51.3 に $-COOCH_3$ のシグナルを示す以外は他のシグナルはすべて [18] と一致した。本化合物はまったく甘味を示さない。

3.15 [1] および [19] のジヒドロ体 [33], [34]

[1] 200mg をメタノール 5ml 中パラジウム-炭素 200mg の存在下 4 時間接触還元し、反応物をメタノール-水から再結晶して [33] を mp 186~189°C, $[\alpha]_D^{25} -26.2^\circ$ ($c=0.07$, メタノール) の無色針状晶として 185mg 得た。

分析値 C 52.67%, H 7.92%

$C_{38}H_{82}O_{18} \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ としての

計算値 C 52.46%, H 8.00%

1H - および ^{13}C -NMR において二重結合に起因するシグナルは認められなかった。

[19] 200mg をメタノール 5ml 中パラジウム-炭素 200mg の存在下 4 時間接触還元し、反応物をエタノールで再結晶して [34] を mp 173~176°C, $[\alpha]_D^{20} -48.0^\circ$ ($c=0.05$, メタノール) の無色針状晶として 180mg 得た。

分析値 C 56.52%, H 8.37%

$C_{32}H_{50}O_{13} \cdot 2H_2O$ としての

計算値 C 56.45%, H 8.29%

1H - および ^{13}C -NMR において二重結合に起因するシグナルは認められなかった。

本研究にあたり原料ステビア葉の供給を受けた国立衛生試験所薬用植物栽培試験場宮崎幸男、西 孝三郎の両博士に深謝いたします。また、本研究は文部省科学研究費補助金試験研究 (1), 昭和 52, 53 年度 (課題番号 287166) および 55 年度 (課題番号 587016) ならびに三島海雲記念財団昭和 54 年度学術奨励金の援助により行われた。関係各位に深謝いたします。

Special Articles on Biologically Active Substances

Sweet Diterpene-Glycosides of Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni —Synthesis and Structure-Sweetness Relationship of Rebaudiosides-A, -D, -E and Their Related Glycosides—

Ryoji KASAI, Norito KANEDA, Osamu TANAKA*, Kazuo YAMASAKI,
Ikunori SAKAMOTO**, Kazuyoshi MORIMOTO**, Shigetaka OKADA***,
Sumio KITAHATA*** and Hideko FURUKAWA****

*Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University, School
of Medicine; Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi 734 Japan*

** *Hiroshima Prefectural Institute of Public Health; Ujinakanda,
Minami-ku, Hiroshima-shi 734 Japan*

*** *Osaka Municipal Technical Research Institute; Kitaohgi-machi,
Kita-ku, Osaka-shi 530 Japan*

**** *Central Research Laboratories, Ajinomoto Co. Inc.; Suzuki-cho,
Kawasaki-shi 210 Japan*

New sweet glycosides, rebaudiosides-A [3], -C [4] (=dulcoside-B), -D [5], -E [6] and dulcoside-A [7] have been isolated from leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) along with a known major principle, stevioside [1]. For the purpose of synthesis of [3], [5] and [6] from [1], preparation of ester glycosides of 19-carboxyl group of steviol [2] (common aglycon of these glycosides) and its homologues was investigated. Ester glycosides of this type could not be obtained by the usual procedure used for preparation of β -glucosyl ester of *ent*-kaurenoic acid [9] owing to the steric interaction of the 13-hydroxyl group. Preparation of β -glucosyl ester of [2] was achieved by the orthoester procedure and by this procedure [3] was prepared from [1] through the benzylidene derivative [20] of 13-*O*- β -glucosylsteviol [15] which was obtained from [1] by the enzymic partial hydrolysis followed by the alkaline saponification.

The β -glucobiosyl esters such as β -sophorosyl, β -cellobiosyl and β -maltosyl esters were obtained by the condensation with the corresponding α -acetobromo sugar in the presence of silver carbonate on celite. By means of this procedure [5] and [6] were prepared respectively from [3] through [8] and from [1] through [18].

By the enzymic transglycosylation to [1] and [18], a series of α -glucosyl homologues, [21], [22] and [23] from [18]; [24] (a mixture of [24-1 and 2]), [25] (a mixture of

[25-1, 2 and 3]) and [26] (a mixture of [26-1, 2, 3 and 4]) from [1], were stereo- and regioselectively prepared. For all of these natural and synthetic glycosides and the glycosides of *ent*-kaurenoic acid derivatives isolated from *Stevia paniculata* and *S. ovata*; paniculoses-I, II, III, IV and V [27, 28, 29, 30 and 31], the structure-sweetness relationship was investigated. It was disclosed that both 19-COO-glycosyl or -COOH and 13-O-glycosyl or -OH groups are essential for the revelation of sweetness of the glycosides of this type. It was also demonstrated that [3] and [5] having a branched sugar moiety exhibit the sweetest taste among the glycosides studied. Hydrogenation of 16(17)-double bond led to a remarkable decrease of sweetness.