

基于 UPLC-QTOF MS/MS 技术研究甜叶菊 绿原酸类成分的降解机制

吴娟娟^{1,2}, 王子璇¹, 连运河^{2,3}, 侯丽娟³, 牛志平³, 王文昌⁴, 吴迪¹

(1. 晨光生物科技集团邯郸有限公司, 河北 邯郸 056000; 2. 河北省植物资源综合利用重点实验室, 河北 邯郸 057250;

3. 晨光生物科技集团股份有限公司, 河北 邯郸 057250; 4. 河北晨光检测技术服务有限公司, 河北 邯郸 056000)

摘要: 本文以甜叶菊绿原酸为研究对象, 利用高效液相色谱检测样品中 3-咖啡酰奎宁酸(3-CQA)、4-咖啡酰奎宁酸(4-CQA)、5-咖啡酰奎宁酸(5-CQA)、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-diCQA)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-diCQA)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-diCQA)等 7 种绿原酸类成分的含量, 并利用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF MS/MS)法鉴定绿原酸在不同诱发条件下的降解产物及降解途径。结果表明, 样品中绿原酸总量在溶剂、光、热、pH 值等诱发条件下均呈下降趋势。通过分析降解产物, 甜叶菊绿原酸在溶剂中存放易发生烷基化反应, 在光照条件下易发生降解, 在高温环境中易发生脱水 and 烷基化, 在酸碱介质中易发生水解和构型转化。综上, 脱水、降解、水解和异构化是甜叶菊绿原酸受外界环境干扰时可能发生的 4 种损失途径。本研究不仅深化了对绿原酸理化性质的理解, 也为制定有效的保存策略, 确保绿原酸类成分在药品、保健品及化妆品等产品中的质量控制提供了科学依据和实践指导。

关键词: 超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF MS/MS); 甜叶菊; 绿原酸; 稳定性

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)01-0065-13

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0049

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0049

Exploration of Degradation Mechanism of Chlorogenic Acids in Stevia Based on UPLC-QTOF MS/MS

WU Juan-juan^{1,2}, WANG Zi-xuan¹, LIAN Yun-he^{2,3}, HOU Li-juan³,

NIU Zhi-ping³, WANG Wen-chang⁴, WU Di¹

(1. Chenguang Biotech Group Handan Co., Ltd., Handan 056000, China; 2. Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Plant Resources in Hebei Province, Handan 057250, China; 3. Chenguang Biotech Group Co., Ltd., Handan 057250, China; 4. Hebei Chenguang Detection Technology Service Co., Ltd., Handan 056000, China)

Abstract: Chlorogenic acids (caffeoylquinic acids, CQAs), as key bioactive components in numerous traditional herbal medicines, are highly acclaimed for their various biological activities and therapeutic benefits. Nonetheless, their stability and therapeutic utility are challenged by the propensity to degrade under various environmental stimuli, including exposure to light, temperature fluctuations, and changes in pH levels. This inherent instability may lead to substantial losses, compromising the potency and consistency of herbal formulations and their derivative products. Therefore, high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to assess the

content variation of seven chlorogenic acid derivatives, namely 3-caffeoylquinic acid (3-CQA), 4-caffeoylquinic acid (4-CQA), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), caffeic acid, 3,4-di-caffeoylquinic acid (3,4-diCQA), 3,5-di-caffeoylquinic acid (3,5-diCQA) and 4,5-di-caffeoylquinic acid (4,5-diCQA) in the stevia chlorogenic acid samples subjected to environmental stimuli. Furthermore, ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS/MS) was utilized to identify the degradation products of stevia chlorogenic acids under various induced conditions. Based on these degradation products, potential degradation pathways of stevia chlorogenic acids were inferred. The results indicated that stevia chlorogenic acids undergo degradation under induced conditions such as solvent exposure, light irradiation, high temperature, and varying pH levels, leading to a general decrease in total content of CQAs. The analysis of degradation products showed that both CQAs and diCQAs are prone to alkylate when stored in organic solvents such as alcohols and esters, resulting in alkylated chlorogenic acids. Under light exposure, they tend to degrade into caffeic acids. In high temperature environment, both dehydration and alkylation occur, producing dehydrated chlorogenic acids and further alkylated derivatives. In acidic or alkaline conditions, hydrolysis and structural transformations are common degradation pathways observed. In summary, dehydration, degradation, hydrolysis, and isomerization are four potential pathways of loss for stevia-derived chlorogenic acids subjected to environmental fluctuations. This study not only enhances the understanding of the stability mechanisms of chlorogenic acids, but also provides a scientific basis and practical guidance for formulating effective preservation strategy. This strategy is crucial for ensuring quality control of chlorogenic acid-containing products across various industries, including pharmaceuticals, health supplements, and cosmetics. By mitigating these degradation pathways, manufacturers can more effectively preserve the potency and efficacy of these compounds, thereby contributing to the overall quality and reliability of their products.

Key words: ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS/MS); Stevia; chlorogenic acids; stability

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.) 又名甜菊、甜茶, 是菊科多年生草本植物, 含有糖苷、黄酮和绿原酸等多种功能性成分^[1]。其中, 甜叶菊绿原酸是甜叶菊提取甜菊糖苷后的副产物, 可同富含绿原酸类物质的杜仲、金银花、绿咖啡豆等媲美, 可大幅填补饲用绿原酸的市场空白, 实现甜叶菊资源的综合利用^[2]。

绿原酸 (caffeoylquinic acids, CQA) 又称咖啡鞣酸, 是由咖啡酸与奎宁酸组成的缩酚酸^[3]。甜叶菊中绿原酸类成分种类繁多, 包含咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸、三咖啡酰奎宁酸、绿原酸甲酯、绿原酸酯等, 其中以咖啡酰奎宁酸和二咖啡酰奎宁酸为主。据报道, 咖啡酰奎宁酸具有抗氧化^[4]、抗癌^[5]和降压活性^[6]。二咖啡酰奎宁酸 (di-caffeoylquinic acids, diCQA) 结构类似于莱菔素, 具有保肝利胆的功效^[7]。此外, diCQA 还能够

显著降低血清层连蛋白 (LN)、透明质酸 (HA)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含量, 具有一定的抗肝纤维化及脂质过氧化作用^[8]。前期研究表明^[9], 绿原酸类成分极不稳定, 易受光照、温度、pH 值等外界因素的影响而导致其含量发生损失。但目前关于绿原酸类成分的降解途径和降解产物的研究还较少。

本工作将利用高效液相色谱 (HPLC) 检测样品中 7 种主要绿原酸类化合物含量的变化, 探究其在不同环境因素下的稳定性。此外, 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF MS/MS) 法鉴定样品中绿原酸类成分的结构变化, 推断可能的降解途径, 希望为绿原酸类化合物的理化性质研究提供科学依据, 以推动该类天然活性成分在医药、保健品及化妆品行业的高效利用与品质保障。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Xevo G2-XS QTOF 超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪、e2695 型高效液相色谱仪: 沃特世科技(上海)有限公司产品; 真空包装机: 北京吉奥德包装机械有限公司产品; 电热恒温鼓风干燥箱: 天津市华北实验仪器有限公司产品; pH 计: 上海三信仪表厂产品; 恒温水浴锅: 上海森信实验仪器有限公司产品; 电子分析天平(感量 0.000 01 g): 日本岛津公司产品。

1.2 材料与试剂

甜叶菊绿原酸产品(粉末, 总酸含量 45%): 晨光生物科技集团股份有限公司产品。其中, 3-咖啡酰奎宁酸(3-CQA)、4-咖啡酰奎宁酸(4-CQA)、5-咖啡酰奎宁酸(5-CQA)、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-diCQA)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-diCQA)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-diCQA)的含量分别为 0.2%、0.47%、2.4%、0.1%、1.6%、17%、23%, 各成分的化学结构式示于图 1。

乙腈、甲醇、甲酸: 均为质谱级, 美国 Thermo Fisher 公司产品; 乙酸乙酯、甲醇、乙醇: 均为分析纯, 天津市永大化学试剂开发中心产品; 超纯水: 由 Millipore 超纯水系统制备; 5-CQA、3-CQA、4-CQA、咖啡酸、3,4-diCQA、3,5-diCQA 及 4,5-diCQA 标准物质: 购自国家食品药品监督管理局(北京), 在本实验室进行定性鉴定后用于后续实验样品的定量测定。

1.3 实验条件

1.3.1 高效液相色谱条件 利用 HPLC 对不同环境放置前后样品中绿原酸类成分的含量进行测定^[9-11]。Phenomenex Kinetex C18 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 ℃; 检测波长 330 nm; 流动相: A 为 0.1%三氟乙酸水溶液, B 为乙腈; 洗脱程序: 0~10 min(5%~20%B), 10~13 min(20%B), 13~14 min(20%~40%B), 14~17 min(40%B), 17~18 min(40%~5%B), 18~20 min(5%B); 进样量 3 μL; 流速 1.5 mL/min。

1.3.2 UPLC-QTOF MS/MS 色谱条件 利用 UPLC-QTOF MS/MS 对不同环境放置前后样品中绿原酸类成分的降解产物进行定性分析。Waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温 40 ℃; 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为乙腈; 洗脱程序: 0~1 min(5%B), 1~3 min(5%~20%B), 3~8 min(20%~30%B), 8~18 min(30%~35%B), 18~20 min(35%B), 20~25 min(35%~65%B), 25~35 min(65%~100%B), 35~38.5 min(100%B), 38.5~39.5 min(100%~35%B), 39.5~40 min(35%~5%B), 40~42 min(5%B); 流速 0.2 mL/min; 进样量 5 μL。

1.3.3 UPLC-QTOF MS/MS 质谱条件 电喷雾电离(ESI)源, 质量扫描范围 m/z 100~2 000, 毛细管电压 2.5 kV(负离子模式), 样品锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 ℃, 脱溶剂气温度 300 ℃, 脱溶剂气流速 700 L/h。

1.4 实验方法

1.4.1 溶剂种类 精确称取 10.0 g 甜叶菊绿原

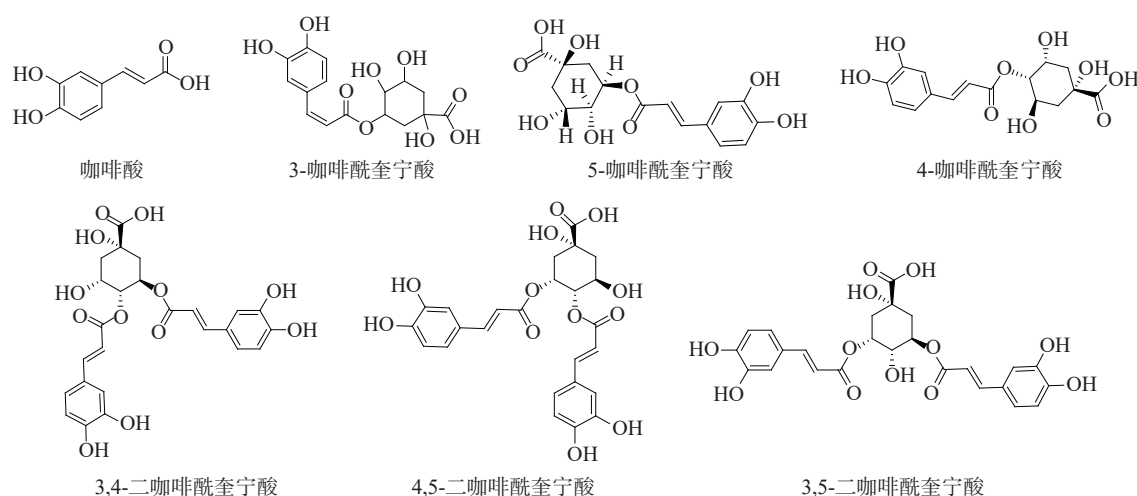


图 1 甜叶菊绿原酸类成分的结构式

Fig. 1 Chemical structures of stevia chlorogenic acids components

酸产品,用甲醇配制成 20 g/L 溶液。精密量取 100 mL 溶液于 2 个锥形瓶中,称重,1 份取样检测,另 1 份于 4 ℃ 避光放置 7 天后补重至初始质量并取样检测。乙醇和乙酸乙酯的处理步骤同甲醇。

1.4.2 溶残含量 精确称取 4 等份 10.0 g 甜叶菊绿原酸产品,滴加甲醇使样品中甲醇浓度分别为 0.05%、0.1%、0.5%和 1%,充分混匀后,于 4 ℃ 避光放置 10 天后取样检测。

1.4.3 温度 精确称取 3 等份 10.0 g 甜叶菊绿原酸产品于 3 个培养皿中,在 4、25、50 ℃ 避光放置 30 天后取样检测,并以放置前的绿原酸产品作为空白对照。

1.4.4 pH 值 精确称取 10.0 g 甜叶菊绿原酸产品,用水配制成 20 g/L 溶液,分别精密量取 100 mL 溶液于若干个锥形瓶中,调节 pH 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 后称重,25 ℃ 放置 7 天补重至初始质量并取样检测,以调节 pH 值前的样品作为空白对照。

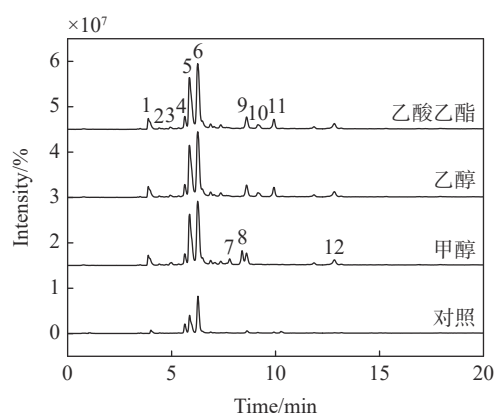
1.4.5 光照 精确称取 3 等份 10.0 g 甜叶菊绿原酸产品,将样品均匀平铺在透明袋中真空包装,并将 3 组样品置于实验室自然光下,分别在放置的 10、20、30 天取样检测,以放置前的产品作为空白对照。

2 结果与分析

2.1 不同条件下甜叶菊绿原酸的成分变化

2.1.1 溶剂种类对绿原酸成分的影响 绿原酸属于芳香族有机酸,易溶于有机溶剂,而在常温下水中的溶解度仅为 4%,根据相似相溶原理,常使用醇或酯从原料中萃取绿原酸类化合物。本实验探究了甜叶菊绿原酸在甲醇、乙醇和乙酸乙酯等溶剂中的成分变化情况,放置后均有新成分产生,结果示于图 2。经鉴定,样品在乙醇和乙酸乙酯溶剂中生成了乙基化-CQA 和乙基化-diCQA 新成分;在甲醇溶剂中生成了甲基化-CQA 和甲基化-diCQA 新成分。综上,甜叶菊绿原酸在甲醇、乙醇、乙酸乙酯等溶剂中放置后发生了烷基化反应,生成了烷基化产物,导致绿原酸含量损失,这表明选择对绿原酸稳定的溶剂是其长期存放的重要保证。

2.1.2 溶残含量对绿原酸成分的影响 绿原酸常用醇类或酯类溶剂进行萃取,制备过程中会涉及脱溶残环节。本实验通过向甜叶菊绿原酸产

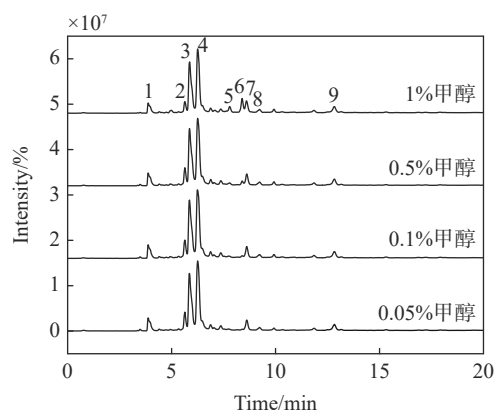


注: 1. 5-CQA; 2. 甲基化 5-CQA; 3. 乙基化 5-CQA; 4. 3,4-diCQA; 5. 3,5-diCQA; 6. 4,5-diCQA; 7. 甲基化 3,5-diCQA; 8. 甲基化 4,5-diCQA; 9. 3,4,5-三咖啡酰奎宁酸; 10. 乙基化 3,5-diCQA; 11. 乙基化 4,5-diCQA; 12. 三羟基-三甲氧基黄酮

图 2 甜叶菊绿原酸在不同溶剂中放置前后的质谱图
Fig. 2 Mass spectra of stevia chlorogenic acids before and after placement in different solvents

品中滴加甲醇使样品中甲醇浓度分别为 0.05%、0.1%、0.5%、1%,充分混匀后于 4 ℃ 避光放置 10 天,以模拟产品中溶残含量对其存储过程的影响,结果示于图 3。可见,随着样品中甲醇含量增加,放置后样品中甲基化绿原酸含量逐渐增加;当甲醇浓度低于 0.1%时,样品中未见甲基化绿原酸成分。因此,在后续的生产和存储过程中应监控溶剂残留量。

2.1.3 温度对绿原酸成分的影响 绿原酸在不同温度下的稳定性差异会影响其在产品中的保

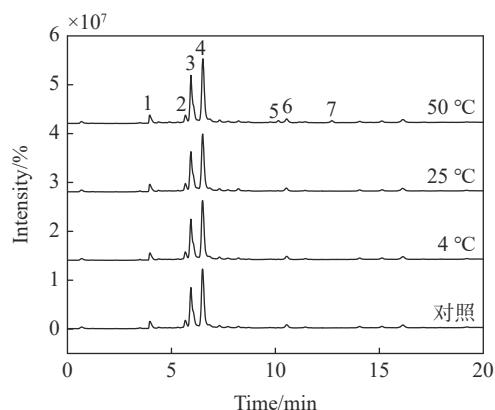


注: 1. 5-CQA; 2. 3,4-diCQA; 3. 3,5-diCQA; 4. 4,5-diCQA; 5. 甲基化 3,5-diCQA; 6. 甲基化 4,5-diCQA; 7. 3,4,5-三咖啡酰奎宁酸; 8. 脱水化-diCQA; 9. 三羟基-三甲氧基黄酮

图 3 甜叶菊绿原酸在不同溶残含量中放置前后的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of stevia chlorogenic acids before and after placement in different soluble residues

存期限和生物活性。甜叶菊绿原酸在高温环境放置后, 样品中出现了新成分, 示于图4。根据质谱裂解规律鉴定新成分为脱水化 diCQA 和乙基化 diCQA, 这表明甜叶菊绿原酸在高温环境存放会发生脱水反应, 有助于烷基化反应的进行。



注: 1. 5-CQA; 2. 3,4-diCQA; 3. 3,5-diCQA; 4. 4,5-diCQA; 5. 脱水化-diCQA; 6. 3,4,5-三咖啡酰奎宁酸; 7. 乙基化-diCQA

图4 甜叶菊绿原酸在不同温度放置前后的质谱图

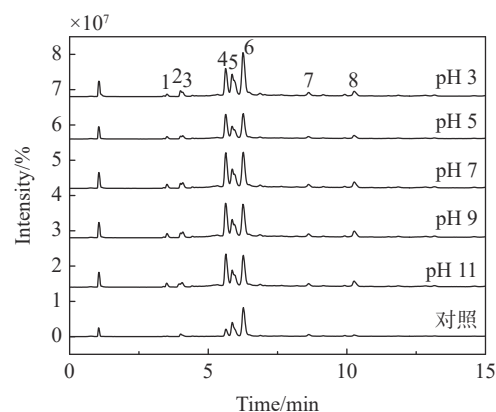
Fig. 4 Mass spectra of stevia chlorogenic acids before and after placement at different temperatures

2.1.4 pH 值对绿原酸成分的影响 绿原酸是一种多酚化合物, 其结构中含有多个酚羟基, 且含有酯键, 极易受溶液 pH 值的影响而发生断裂。放置在不同 pH 值水溶液中后, 样品中 3,4-diCQA 比例升高, 3,5-diCQA 比例降低, 推测甜叶菊绿原酸在酸碱环境中发生了构型转换, 示于图5。

2.1.5 光照对绿原酸成分的影响 绿原酸含有邻二酚羟基结构, 使其对光照较敏感, 易发生光降解反应。甜叶菊绿原酸在光照条件下存放未见新物质产生, 示于图6。

2.2 甜叶菊绿原酸在不同条件下的含量变化

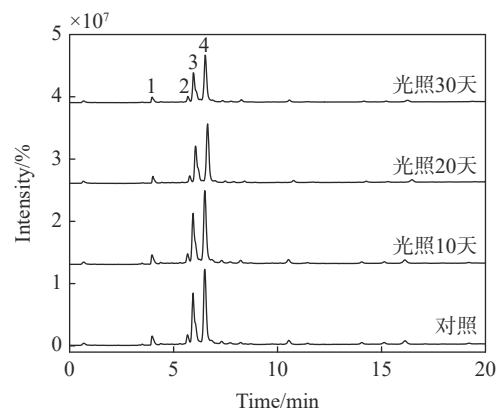
2.2.1 温度对绿原酸含量的影响 随着温度的升高, 甜叶菊绿原酸产品中总酸损失量逐渐增加, 结果列于表1。在 4 °C 放置, 总酸含量减少 0.09%; 在 50 °C 放置, 总酸含量减少 5.23%。另外, CQA 和 di-CQA 的含量均发生下降。在 50 °C 放置, 3 种 CQA 成分的总含量由 3.116 1% 降至 2.711%, 减少 0.405 1%; 3 种 diCQA 成分的总含量由 41.77% 降至 36.92%, 减少 4.85%。可知, CQA 和 diCQA 含量均降低, 但咖啡酸含量增加, 推断为甜叶菊绿原酸在高温环境中发生降解生成了咖啡酸。



注: 1. 3-CQA; 2. 5-CQA; 3. 4-CQA; 4. 3,4-diCQA; 5. 3,5-diCQA; 6. 4,5-diCQA; 7. 3,4,5-咖啡酰奎宁酸; 8. 莱包迪武 A

图5 甜叶菊绿原酸在不同 pH 水溶液中放置前后的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of stevia chlorogenic acids before and after placement in aqueous solutions with different pH values



注: 1. 5-CQA; 2. 3,4-diCQA; 3. 3,5-diCQA; 4. 4,5-diCQA

图6 甜叶菊绿原酸在光照前后的质谱图

Fig. 6 Mass spectra of stevia chlorogenic acids before and after light

2.2.2 pH 值对绿原酸含量的影响 甜叶菊绿原酸在不同 pH 值水溶液中放置后, 3,5-diCQA 和 4,5-diCQA 含量降低, 3,4-diCQA 含量升高, 结果列于表2。以在 pH 3 水溶液放置为例, 3,5-diCQA 含量由 11.67% 降至 4.974%, 降低约 6.7%; 4,5-diCQA 含量由 20.54% 降至 9.612%, 降低约 10.93%; 3,4-diCQA 含量由 3.34% 增至 5.41%, 降低约 2.1%, 该结果进一步证实样品中成分发生了构型转化。此外, 在 pH 5~9 的水溶液中, CQA 和咖啡酸含量增加, 推断甜叶菊中 diCQA 发生水解, 生成了绿原酸和咖啡酸。在 pH 3 和 pH 11 环境中, 总酸含量均显著降低, 表明绿原酸类成分在强酸强

表1 甜叶菊绿原酸在不同温度放置前后的含量

Table 1 Contents of stevia chlorogenic acids before and after placement at different temperatures

温度 Temperature/℃	总酸 Total acid/%	含量 Content/%						
		3-CQA	4-CQA	5-CQA	Caffeic acid	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA
50	39.76	0.1385	0.3925	2.18	0.1270	1.14	15.33	20.45
25	42.64	0.1944	0.4538	2.32	0.1024	1.48	16.28	21.81
4	44.90	0.2098	0.4759	2.40	0.1020	1.58	17.07	23.06
对照	44.99	0.2099	0.4762	2.43	0.1025	1.58	17.09	23.10

表2 甜叶菊绿原酸在不同 pH 值水溶液中放置前后的含量

Table 2 Contents of stevia chlorogenic acids before and after placement in aqueous solutions with different pH values

pH	总酸 Total acid/%	含量 Content/%						
		3-CQA	4-CQA	5-CQA	Caffeic acid	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA
3	22.95	0.828	0.756	1.26	0.1130	5.41	4.97	9.61
5	25.72	1.666	1.326	1.41	0.2080	8.03	5.28	7.80
7	27.35	1.625	1.389	1.54	0.1910	8.35	5.25	9.01
9	34.55	2.179	1.882	2.01	0.2540	10.70	6.42	11.10
11	17.71	1.315	1.064	1.12	0.1290	5.35	3.40	5.33
对照	38.26	0.300	0.430	1.74	0.1800	3.34	11.67	20.54

碱环境中均不稳定。综上,甜叶菊绿原酸在酸碱环境中可能发生构型转化和水解反应而导致其含量发生损失。

2.2.3 光照对绿原酸含量的影响 甜叶菊绿原酸产品中总绿原酸含量随光照时间的延长整体呈下降趋势,结果列于表3。在光照条件下放置30天,3种CQA成分的总含量由3.085 7%降低为2.968 2%,减少0.117 5%;3种diCQA成分的总含量由41.65%降低为39.51%,减少2.14%。可知,CQA和diCQA含量均降低,但咖啡酸含量增加,推测甜叶菊绿原酸在光催化条件下发生降解反应生成咖啡酸。

2.3 甜叶菊绿原酸在不同条件下的降解途径

2.3.1 绿原酸在不同溶剂中的降解途径 以3,5-diCQA为例,探究甜叶菊绿原酸在甲醇、乙醇、乙酸乙酯等常见溶剂中的降解途径,其可能的烷基化反应途径分别示于图7、8。在甲醇体系中,由于3,5-diCQA咖啡酰基上的羟基具有较强的亲核性以及所处空间位置的位阻较小,使其易与甲醇分子发生作用,引发亲核取代反应,形成甲基化3,5-diCQA。与之类似,在乙醇或乙酸乙酯体系中,乙醇或乙酸乙酯中的乙基同样能够与具有亲核性的羟基反应,通过亲核取代过程生成乙基化3,5-diCQA。据文献^[12]报道,绿原酸发生烷

表3 甜叶菊绿原酸在光照前后的含量

Table 3 Contents of stevia chlorogenic acids before and after light

光照 Light/day	总酸 Total acid/%	含量 Content/%						
		3-CQA	4-CQA	5-CQA	Caffeic acid	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA
30	42.64	0.1944	0.4538	2.32	0.1024	1.48	16.28	21.81
20	43.17	0.1947	0.4563	2.33	0.1028	1.50	16.43	22.16
10	43.91	0.1951	0.4592	2.35	0.1034	1.52	16.73	22.56
对照	44.89	0.2098	0.4759	2.40	0.1020	1.58	17.07	23.06

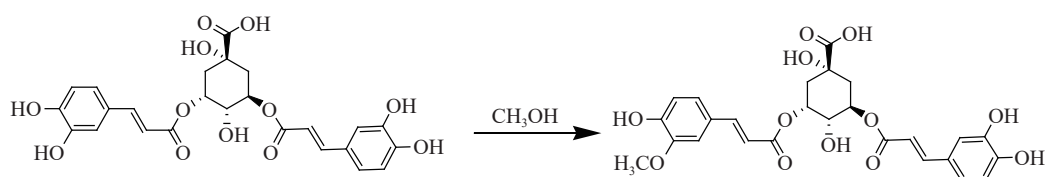


图7 3,5-diCQA 可能的甲基化反应途径

Fig. 7 Possible methylation pathway of 3,5-diCQA

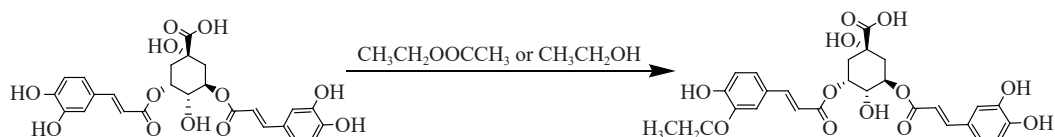


图8 3,5-diCQA 可能的乙基化反应途径

Fig. 8 Possible ethylation pathway of 3,5-diCQA

基化反应时会生成稳定的醚键,而常见的去甲基化试剂成本高、能耗大、反应条件苛刻,且去甲基化效果较差。

2.3.2 温度对绿原酸降解途径的影响 以 3,5-diCQA 为例,探究甜叶菊绿原酸在高温条件下的降解途径,其可能发生的降解过程示于图9。高温环境引发了分子内键能改变和能量重新分布,3,5-diCQA 分子中的酯键在高温应激下变得不稳定,发生断裂反应。随着酯键的断裂,咖啡酰基部分

从分子中脱离,最终形成具有特定结构的咖啡酸。3,5-diCQA 在高温环境可能发生的脱水过程示于图10。从化学角度分析,咖啡酰基上的2个羟基之间存在氢键,氢键作为较强的分子间作用力会使羟基之间的电子云密度增大,提高羟基的反应活性。而高温能够提供充足的能量打破羟基之间的氢键,促使羟基上的氢原子与相邻羟基的氧原子结合形成水分子并脱离,这一过程使3,5-diCQA 分子结构发生变化,最终形成脱水水 3,5-diCQA。

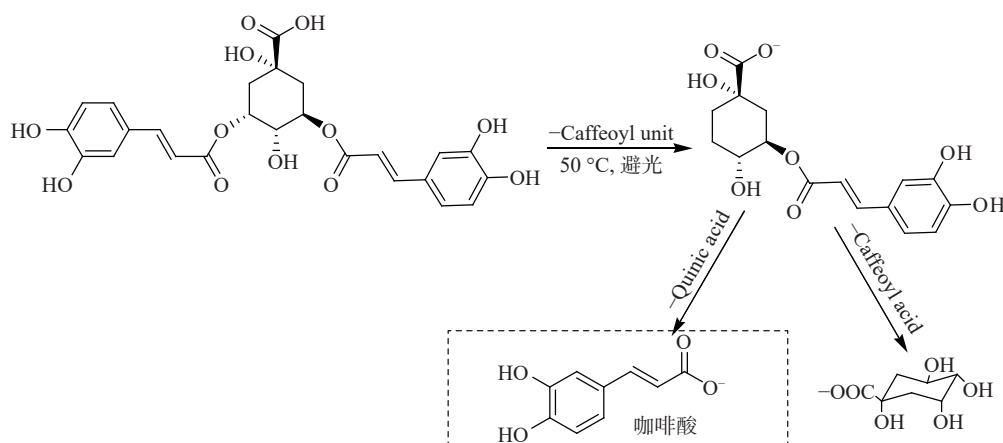


图9 3,5-diCQA 生成咖啡酸可能的降解途径

Fig. 9 Possible degradation pathway of 3,5-diCQA generated caffeic acid

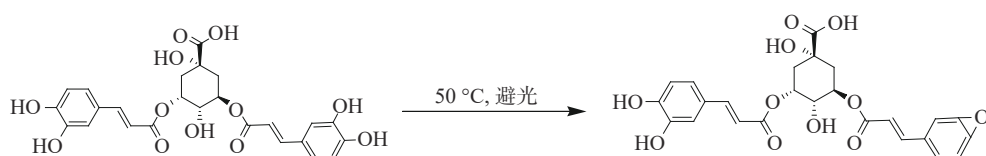


图10 3,5-diCQA 在高温条件下可能的脱水过程

Fig. 10 Possible dehydration process of 3,5-diCQA under high temperature

2.3.3 pH 值对绿原酸降解途径的影响 以 3,5-diCQA 为例,探究甜叶菊绿原酸在酸碱介质中的降解途径,其在酸性介质可能发生的构型转化过程示于图 11。首先,3,5-diCQA 奎宁酸环上的羟基发生质子化反应,转变为较稳定的氧正离子状态,使分子内的电荷分布不再均匀,减弱了原有酰基与特定碳原子的结合力,使酰基易脱离其初始连接的位置。随后,酰基从原来的碳原子断裂,经过 1 个过渡态,在另 1 个碳原子上重新形成酯键,最终完成酰基迁移,通过酰基迁移位置的不同可以形成 3,4-diCQA 和 4,5-diCQA^[13-14]。3,5-

diCQA 在酸碱介质可能发生的水解过程示于图 12。首先,在酸碱介质中,3,5-diCQA 中的酯键会受到水解作用,导致咖啡酰基与奎宁酸之间的连接断裂。在酸性介质中,氢离子会攻击酯键,使 3,5-diCQA 发生水解,1 分子咖啡酰基从奎宁酸分子上脱落,形成 CQA 和咖啡酸。在碱性介质中,氢氧根离子会与酯键发生反应导致酯键断裂,使 3,5-diCQA 发生水解,1 分子咖啡酰基从奎宁酸分子上脱落,形成 CQA 和咖啡酸。随后,产生的 CQA 继续发生水解,使另 1 分子咖啡酰基继续从奎宁酸分子上脱落,生成奎宁酸。随着时

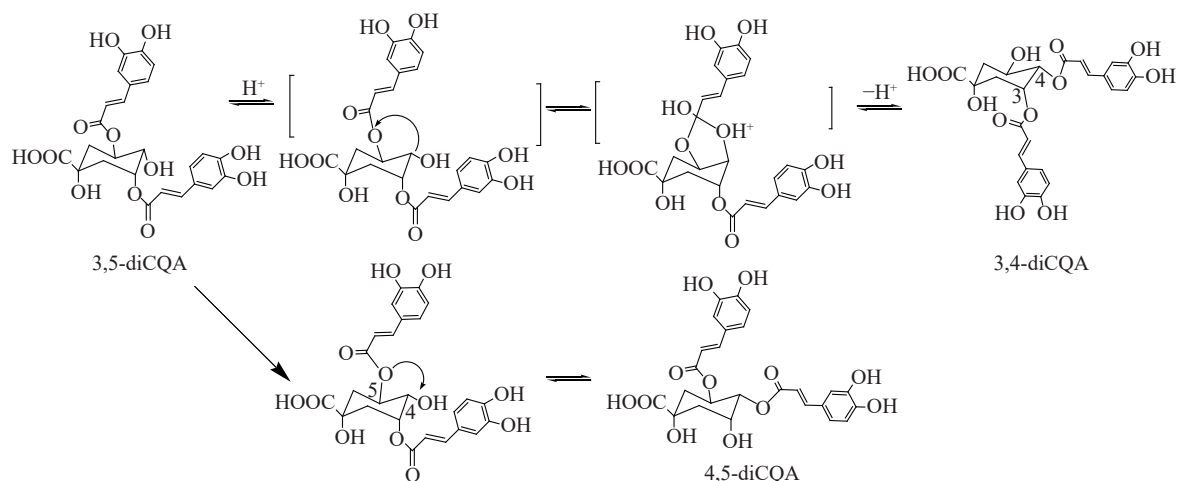


图 11 3 种 diCQA 之间可能的异构化机制

Fig. 11 Possible isomerization mechanisms among three diCQA

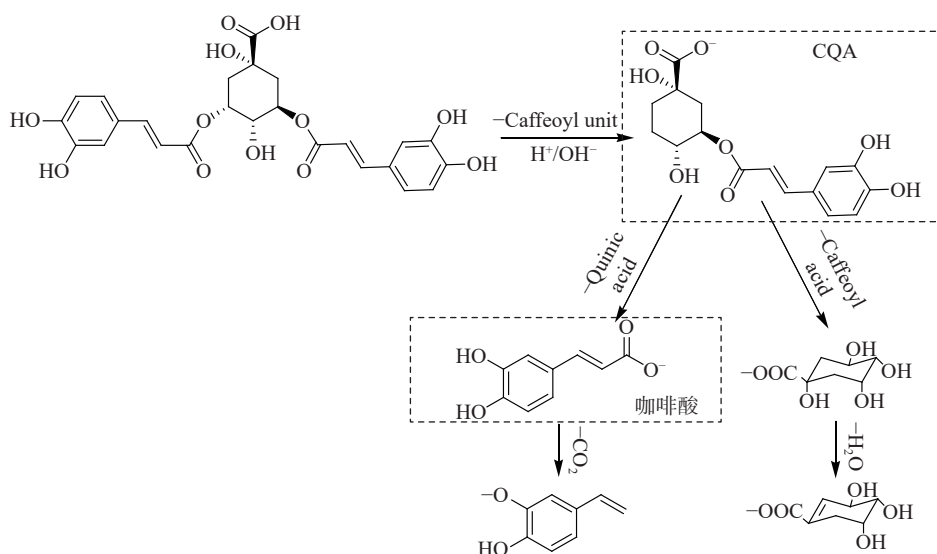


图 12 3,5-diCQA 可能的裂解途径

Fig. 12 Possible fragmentation pathways of 3,5-diCQA

间的延长, 奎宁酸会继续脱去 1 分子 H_2O 形成莽草酸, 咖啡酸脱去 1 分子 CO_2 形成 4-乙烯基儿茶酚。

综上所述, 脱水、降解、水解以及异构化是甜叶菊绿原酸在受到外界环境变化影响下可能发生的降解途径。以 3,5-diCQA 为例, 结合其降解条件和降解产物, 绘制出甜叶菊绿原酸类成分可能的降解途径, 示于图 13。

2.4 甜叶菊绿原酸降解产物的分析与鉴定

在 1.3.2 和 1.3.3 节条件下, 对不同条件下放置前后的甜叶菊绿原酸样品进行分离, 采集其在负离子模式下的基峰色谱图, 结合标准物质、文献和质谱数据库对绿原酸降解产物进行分析鉴定, 共鉴定 16 种化合物, 具体结果列于表 4。

2.4.1 烷基化绿原酸 以表 4 中化合物 9 和 10 为例, 详细阐述烷基化绿原酸的质谱裂解规律。diCQA 和甲基化 diCQA 在负离子模式下的质谱图示于图 14、15。化合物 9 和 10 的保留时间分别为 7.89、8.49 min, 2 种化合物在负离子模式下的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 529.156 5 比

diCQA 的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 515.125 3 增加了 $-\text{CH}_2$ 基团。其次, 在二级质谱中, 主要碎片离子有 m/z 367、179、161、135, 其中, m/z 367 表明化合物 9、10 失去了 1 个咖啡酰基团, m/z 179、161、135 与 diCQA 的质谱裂解碎片完全一致。综上, 推断化合物 9、10 为甲基化 diCQA。根据 3,5-diCQA 和 4,5-diCQA 的保留时间, 推断化合物 9 为甲基化 3,5-diCQA, 化合物 10 为甲基化 4,5-diCQA, 该结果与文献^[15]报道一致。同理, 鉴定化合物 4、5、13、14 分别为甲基化 5-CQA、乙基化 5-CQA、乙基化 3,5-diCQA、乙基化 4,5-diCQA。

2.4.2 脱水化绿原酸 以表 4 中化合物 11 为例, 详细阐述脱水化绿原酸的质谱裂解规律。脱水化 diCQA 在负离子模式下的质谱图示于图 16。化合物 11 的保留时间为 8.67 min, 负离子模式下的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 497.104 8 比 diCQA 的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 515.125 3 减少了 H_2O 基团。其次, 在二级质谱中, 主要碎片离子有 m/z 335、179、161、135, 其中, m/z 335 表明化合物 11 失去

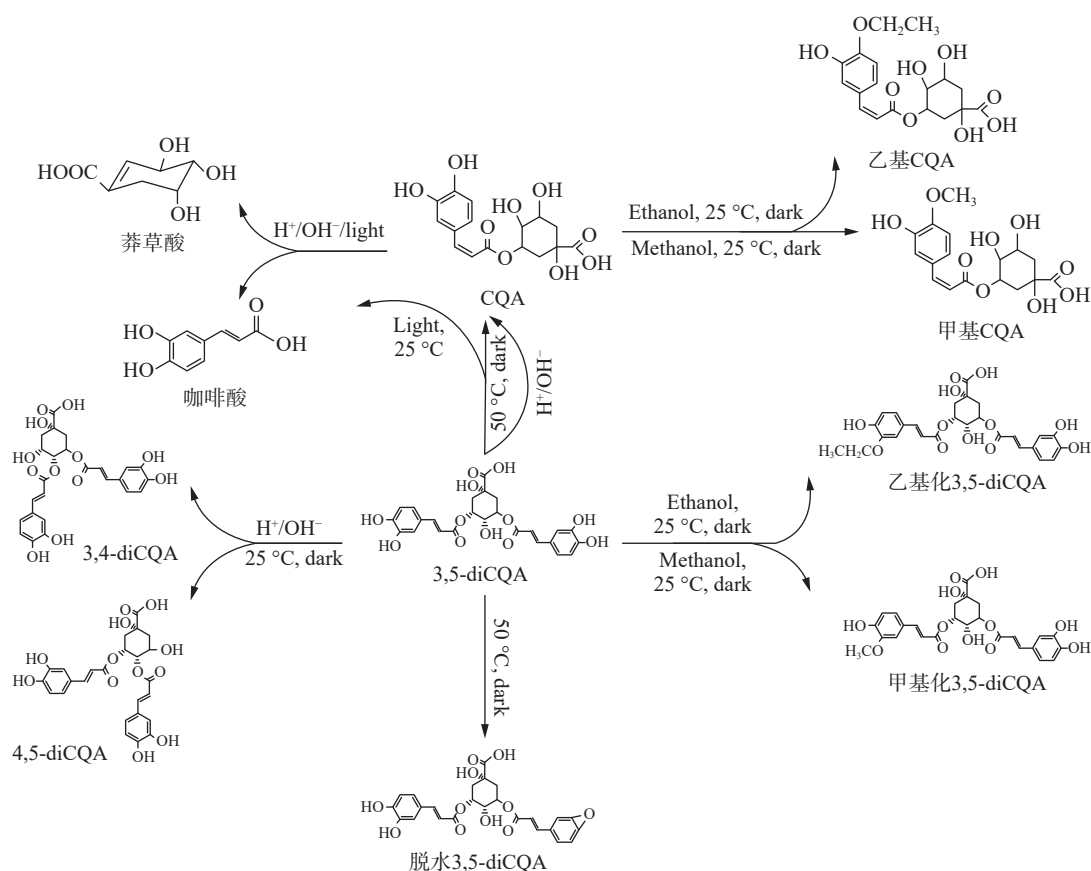


图 13 3,5-diCQA 在不同条件下可能的降解途径

Fig. 13 Possible degradation pathways of 3,5-diCQA under different conditions

表4 甜叶菊绿原酸在不同条件下的降解产物

Table 4 Degradation products of stevia chlorogenic acids under different conditions

序号 No.	保留时间 Retention time/min	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	分子式 Molecular formula	理论值 Theoretical value	相对误差 Relative error/ $\times 10^{-6}$	二级碎片离子 MS ² (<i>m/z</i>)	化合物 Compound	参考 Reference
1	3.62	353.0877	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0	191, 179, 173, 161, 135, 133	3-CQA	标准品
2	4.11	353.0877	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0	191, 179, 173, 161, 135, 133	5-CQA	标准品
3	4.18	353.0877	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0	191, 179, 173, 161, 135, 133	4-CQA	标准品
4	5.09	367.1193	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1035	43	353, 191, 161, 135, 133	甲基化5-CQA	[15]
5	5.20	381.1284	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	381.1255	8	353, 191, 161, 135, 133	乙基化5-CQA	[16]
6	5.72	515.1253	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	11	353, 335, 191, 179, 173, 161, 135	3,4-diCQA	标准品
7	5.96	515.1253	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	11	353, 335, 191, 179, 173, 161, 135	3,5-diCQA	标准品
8	6.35	515.1253	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	11	353, 335, 191, 179, 173, 161, 135	4,5-diCQA	标准品
9	7.89	529.1565	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529.1352	40	367, 179, 161, 135	甲基化3,5-diCQA	[16]
10	8.49	529.1565	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529.1352	40	367, 179, 161, 135	甲基化4,5-diCQA	[16]
11	8.67	497.1048	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₁	497.1089	8	335, 179, 161, 135, 133	脱水化diCQA	[16]
12	8.71	677.1780	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	677.1512	40	515, 353, 335, 179, 161, 135	3,4,5-三咖啡酰奎 宁酸	[17]
13	9.25	543.1783	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1573	38	381, 179, 161, 135	乙基化3,5-diCQA	[16]
14	10.02	543.1783	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1573	38	381, 179, 161, 135	乙基化4,5-diCQA	[16]
15	10.35	965.4637	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	965.4235	42	803, 641, 479, 317	莱包迪武A	[18]
16	12.93	359.0911	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.0772	39	344, 329, 314, 286	三羟基-三甲氧基 黄酮	[19]

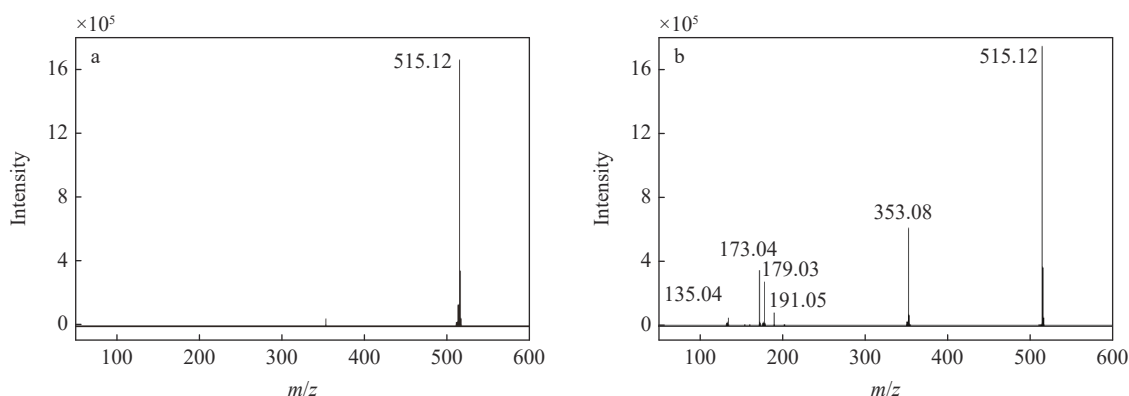


图14 3,5-diCQA在负离子模式下的一级(a)和二级(b)质谱图

Fig. 14 MS (a) and MS² (b) spectra of 3,5-diCQA under negative ion mode

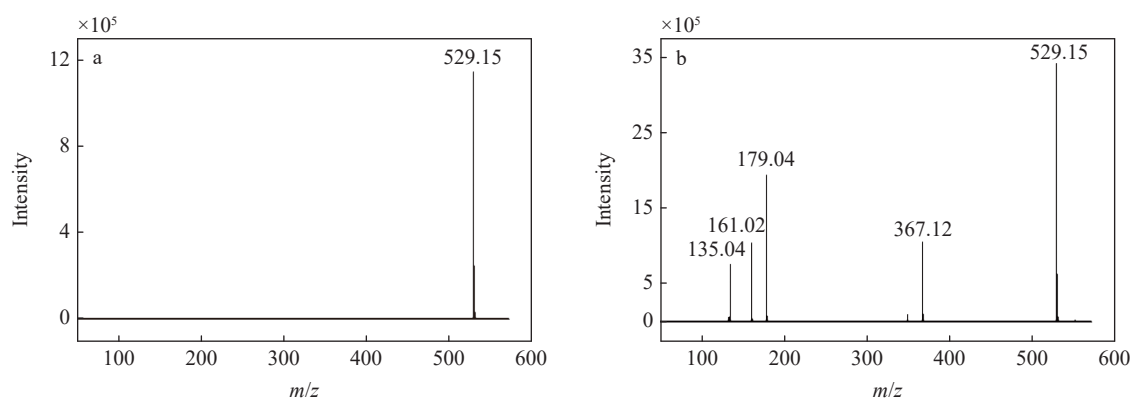


图 15 甲基化 3,5-diCQA 在负离子模式下的一级(a)和二级(b)质谱图

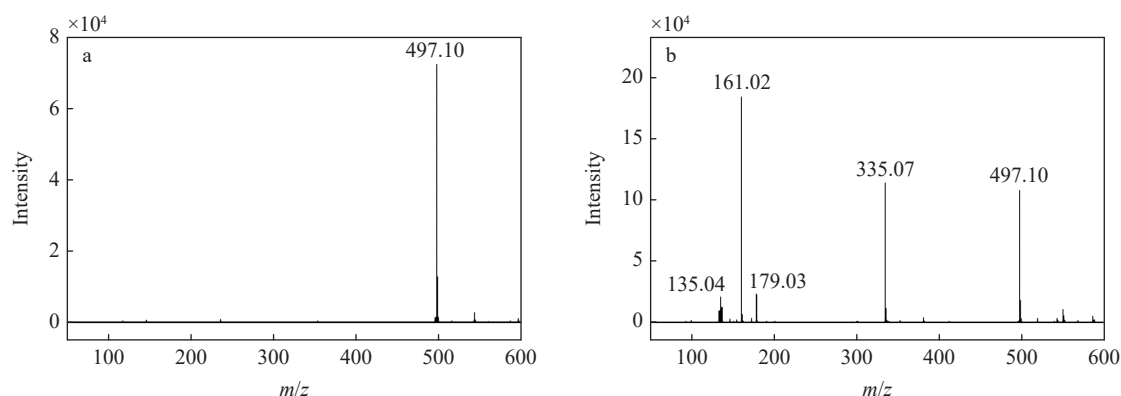
Fig. 15 MS (a) and MS² (b) spectra of methylated 3,5-diCQA under negative ion mode

图 16 脱水化 3,5-diCQA 在负离子模式下的一级(a)和二级(b)质谱图

Fig. 16 MS (a) and MS² (b) spectra of dehydrated 3,5-diCQA under negative ion mode

了 1 个咖啡酰基团, m/z 179、161、135 与 diCQA 的质谱裂解碎片完全一致。通过与文献^[16]对比,推断化合物 11 为脱水化 diCQA。

3 结论

本研究探讨了溶剂类型、温度、pH 值及光照条件 4 个外部因素对甜叶菊绿原酸稳定性的影响。首先,借助 HPLC 技术系统监测 7 种主要绿原酸组分的含量变化,进而利用 UPLC-QTOF MS/MS 技术鉴别甜叶菊绿原酸在放置期间产生的代谢产物,以深入理解其在不同条件下的降解过程。结果表明,在不同溶剂、光照、高温及 pH 值条件下,样品中总绿原酸含量均呈下降趋势。结合 UPLC-QTOF MS/MS 分析发现:溶剂环境促使绿原酸发生烷基化反应;光照加速降解过程;高温不仅加速了脱水反应,还加剧了烷基化反应;而 pH 值变化诱导了绿原酸的水解及构型转变。本文共确认了绿原酸 7 种不同的降解产

物,为理解绿原酸的降解机理提供了理论基础。脱水、降解、水解和异构化是甜叶菊绿原酸受外界环境变化影响时可能发生的降解途径。本研究加深了对绿原酸稳定性机制的认知,为制定更科学合理的绿原酸类物质储存标准提供了数据支持,对保障相关医药、保健品和化妆品中绿原酸类成分的有效性和稳定性具有重要意义。

参考文献:

- [1] 郭志龙, 马治华, 张虹, 陈任, 张自萍. 不同甜叶菊品种叶中绿原酸类成分的比较研究[J]. 广西植物, 2020, 40(5): 696-705.
GUO Zhilong, MA Zhihua, ZHANG Hong, CHEN Ren, ZHANG Ziping. Variation of chlorogenic acid components in leaves of various *Stevia rebaudiana* cultivars[J]. Guihaia, 2020, 40(5): 696-705(in Chinese).
- [2] 张珊, 肖蕴祺, 陈傲, 施寿荣. 甜叶菊绿原酸对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质、血浆生化指标和肠道组织形

- 态的影响[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(2): 946-955.
- ZHANG Shan, XIAO Yunqi, CHEN Ao, SHI Shourong. Effects of stevia chlorogenic acid on performance, egg quality, plasma biochemical indexes and intestinal morphology of laying hens during late laying period[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(2): 946-955 (in Chinese).
- [3] 向灿辉, 罗景, 王文君, 缪志雄, 杜仲叶绿原酸抗氧化稳定性研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(1): 224-227.
- XIANG Canhui, LUO Jing, WANG Wenjun, MIAO Zhixiong. The stability on the antioxidant capacity of chlorogenic acid extracted from *Eucommia ulmoides* olive leaves[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(1): 224-227(in Chinese).
- [4] 杨晓丽, 张君利, 王京峰, 李雪芹, 吕剑涛. 绿原酸抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 229-234.
- YANG Xiaoli, ZHANG Junli, WANG Jingfeng, LI Xueqin, LYU Jiantao. Research progress in anti-tumor and mechanism of chlorogenic acid[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 24(19): 229-234(in Chinese).
- [5] 王少甲, 尤飒飒. 甜叶菊功能性成分研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(20): 323-327.
- WANG Shaojia, YOU Sasa. Progress of functional components in *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(20): 323-327(in Chinese).
- [6] 李华丽, 袁君, 郁荣华, 朱红, 柴姝雯. HPLC 法测定甜叶菊中 6 个酚酸类成分含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(2): 219-223.
- LI Huali, YUAN Jun, YU Ronghua, ZHU Hong, CHAI Shuwen. Determination of six phenolic acids in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(2): 219-223(in Chinese).
- [7] 孙燕荣. 二咖啡酰奎宁酸抗实验性肝损伤及肝纤维化的研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2001.
- [8] 孙燕荣, 董俊兴, 吕秋军, 郭绍明, 张慧娟, 屠爱萍, 温利青, 吴曙光. 二咖啡酰奎宁酸抗肝纤维化及脂质过氧化作用的实验研究[J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(1): 39-42.
- SUN Yanrong, DONG Junxing, LYU Qiujuan, GUO Shaoming, ZHANG Huijuan, TU Aiping, WEN Liqing, WU Shuguang. Effects of dicaffeoylquinic acid against liver fibrosis and lipid peroxidation in rats: an experimental study[J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2002, 26(1): 39-42(in Chinese).
- [9] 李云聪, 王艳芳, 李佳, 高伟, 牛志平. 甜叶菊绿原酸类成分稳定性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(9): 73-78.
- LI Yuncong, WANG Yanfang, LI Jia, GAO Wei, NIU Zhiping. Study on the stability of chlorogenic acids in stevia[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(9): 73-78(in Chinese).
- [10] 张苹苹, 石文杰, 杨清山, 王立勋, 程远欣. 基于近红外漫反射光谱法所建的模型快速预测甜叶菊中甜菊糖苷、绿原酸及水分的含量[J]. *理化检验-化学分册*, 2022, 58(4): 458-464.
- ZHANG Pingping, SHI Wenjie, YANG Qingshan, WANG Lixun, CHENG Yuanxin. Rapid prediction of steviol glycosides, chlorogenic acids and moisture in stevia by models based on near infrared diffuse reflection spectrometry[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Chemical Analysis)*, 2022, 58(4): 458-464(in Chinese).
- [11] 徐美利, 李云聪, 徐亚超, 王艳芳, 田洪, 牛志平. 不同产地甜叶菊绿原酸类成分含量分析及质量评价[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(4): 6-11.
- XU Meili, LI Yuncong, XU Yachao, WANG Yanfang, TIAN Hong, NIU Zhiping. Analysis and quality evaluation of chlorogenic acids in stevia from different habitats[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(4): 6-11(in Chinese).
- [12] 余磊, 金学平, 李健雄, 徐超, 刘志雄. 芳基甲基醚去甲基化反应[J]. *广东化工*, 2015, 42(15): 154-156, 175.
- YU Lei, JIN Xueping, LI Jianxiong, XU Chao, LIU Zhixiong. Demethylation of aryl methyl ethers[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(15): 154-156, 175 (in Chinese).
- [13] DESHPANDE S, JAISWAL R, MATEI M F, KUHNERT N. Investigation of acyl migration in mono- and dicaffeoylquinic acids under aqueous basic, aqueous acidic, and dry roasting conditions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(37): 9 160-9 170.
- [14] LI Y, ZHANG C, DING G, HUANG W, WANG Z, BI Y, XIAO W. Investigating the thermal stability of six caffeoylquinic acids employing rapid-resolution liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 240(6): 1 225-1 234.
- [15] REN T, WANG Y, WANG C, ZHANG M, HUANG W, JIANG J, LI W, ZHANG J. Isolation and identification of human metabolites from a novel anti-tumor candidate drug 5-chlorogenic acid injection by HPLC-HRMS/MSⁿ

- and HPLC-SPE-NMR[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(30): 7 035-7 048.
- [16] XUE M, SHI H, ZHANG J, LIU Q Q, GUAN J, ZHANG J Y, MA Q. Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 948.
- [17] JAISWAL R, PATRAS M A, ERAVUCHIRA P J, KUHNERT N. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MSⁿ: identification of seven new classes of compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(15): 8 722-8 737.
- [18] PERERA W H, McCHESNEY J D. Approaches toward the separation, modification, identification and scale up purification of tetracyclic diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* (bertoni) bertoni[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1 915.
- [19] ELSHAMY S, ABDEL MOTAAL A, ABDEL-HALIM M, MEDHAT D, HANDOUSSA H. Potential neuroprotective activity of *Mentha longifolia* L. in aluminum chloride-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(4): 1 770.
- (收稿日期: 2024-04-09; 修回日期: 2024-05-07)