

茶叶中主要化学成分的质谱分析

李东芹¹, 余广彪²

(1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; 2. 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽农业大学, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的] 建立茶叶中茶多酚、生物碱及茶氨酸的质谱分析方法。[方法] 采用 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇、水梯度洗脱 20 min 进行色谱分离; 在质谱正离子模式下, 用多反应监测离子对(MRM)模式进行定量分析。[结果] 可在 20 min 内同时定量 9 种茶多酚、生物碱和茶氨酸。[结论] 该方法灵敏、准确、选择性高, 适应于茶叶中茶多酚、生物碱和茶氨酸的快速定量分析。

关键词 茶叶; 茶多酚; 生物碱; 茶氨酸; 液相色谱-串联质谱

中图分类号 TS207.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)08-0195-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.051



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Mass Spectrometric Analysis of Main Chemical Components in Tea

LI Dong-qin¹, SHE Guang-biao² (1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 2. State Key Lab of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a mass spectrometric analysis method for tea polyphenols, alkaloids and theanine in tea. [Method] The column was separated by a Shim-pack VP-ODS (150 L×2.0 mm, 5 μm) column and eluted with methanol and water for 20 min. [Result] Quantitative analysis was performed using the multiple reactions monitoring (MRM) mode in mass spectrometry positive ion mode. [Result] The method could quantitate 9 kinds of theanine, tea polyphenols and Alkaloids in 20 min. [Conclusion] The method is rapid, accurate and selective, it can be used to quantitate theanine, tea polyphenols and alkaloids rapidly in tea.

Key words Tea; Tea polyphenols; Alkaloids; Theanine; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

茶叶中含有非常丰富的营养成分和药效成分, 是人们日常生活中最常饮用的“健康饮料”。茶叶中含有 300 多种对人体有益的化学成分, 包括氨基酸、茶多酚、生物碱、维生素等^[1]。茶叶中氨基酸的主要成分为茶氨酸和谷氨酸; 茶叶药效功能的主要成分为茶多酚, 约占茶叶干重的 18%~36%, 而茶多酚又以儿茶素类为主^[2]。儿茶素类主要组成成分为表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(EGC)、没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。茶多酚具有抗氧化、抗血栓、抑制细菌、提高人体免疫力等功效^[3], 已有的科学研究证明茶多酚对老年痴呆、糖尿病和乳腺癌具有防治和抑制作用^[4-6]。前人的研究主要集中在液相色谱分析方法^[7-9]或者某一类化合物的研究^[10-13], 液相色谱-串联质谱分析方法应用的比较少^[14-15]。笔者利用液相色谱质谱高灵敏、高选择性的分析特点, 建立同时定量茶叶中主要化学成分的分析方法, 可为茶叶品质分析或药用价值开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试材。安吉白茶、铁观音和紫娟茶叶鲜样于 2017 年 5 月采自安徽农业大学郭河品种茶园, 采摘部位为一芽二叶。华农绿针为华中农业大学生产的商业成品绿茶; 贡品大红袍为福建省武夷山市慧苑岩茶科学技术研究所研制的半发酵乌龙茶, 市面采购; 松峰茶为湖北省赤壁市羊楼洞茶叶有限公司生产的绿茶, 市面采购。

1.1.2 仪器。日本岛津 LC-20AD 液相色谱仪, 岛津 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱; 美国 AB Sciex

公司 API 4000 Qtrap 串联三重四级杆线性离子阱质谱仪; Millipore 超纯水仪(Millipore 公司); 万分之一天平(梅特勒公司); 蠕动泵(Hamilton 公司)。

1.1.3 试剂。乙腈(Merk, 色谱纯); 超纯水; 乙酸(色谱纯); 1 mL 医用注射器; 0.22 μm 过滤头(有机相, 津腾牌); 谷氨酰胺、谷氨酸、茶氨酸、表儿茶素(EC)、没食子儿茶素(EGC)、儿茶素没食子酸酯(EGC)、没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、可可碱及咖啡碱均为西格玛公司色谱纯试剂, 由安徽农业大学茶食学院赵剑教授提供。

1.2 样品处理方法

1.2.1 茶叶鲜样。精确称取 0.035 g 茶叶鲜样干粉, 加 5 mL 80% 的甲醇水溶液, 冰浴超声提取 30 min, 然后离心取上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 稀释 100 倍后进样分析。

1.2.2 商品茶叶。精确称取 0.15 g 商品茶叶, 加 50 mL 沸水浸泡 40 min, 然后离心取上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 稀释 10 倍后进样分析。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件。岛津 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱, 样品室温度为室温; 流动相: A 为 0.1% 的乙酸水溶液(V/V), B 为 0.1% 的乙酸的甲醇溶液(V/V); 流速为 0.25 mL/min。梯度洗脱条件为: 0~4.0 min, 10% 的 B; 4.1~10.0 min B 从 10% 升至 100%, 10.0~15 min 为 100% 的 B, 15.01~20.00 min 为 10% 的 B。柱温箱温度为 40 °C, 进样量为 10 μL。

1.3.2 质谱条件。采用电喷雾(ESI)离子源, 在正离子电离模式下选用多反应监测(MRM)离子对扫描模式进行定量分析。电喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 500 °C; 离子源辅助气 GS1/GS2 气流均为 50 L/h。

基金项目 国家自然科学基金项目(31670294)。

作者简介 李东芹(1978—), 女, 湖北武汉人, 实验师, 硕士, 从事色谱、质谱分析与试验技术研究。

收稿日期 2018-12-05

2 结果与分析

2.1 化合物质谱参数优化 将各化合物标准品用甲醇水配制成 100 μg/L 左右的溶液。用针泵注射器以 10 μL/min 的速度直接进到质谱仪。先用质谱 Q1 全扫描模式,在分子量 100~500 Da 扫描确定化合物的 Q1 母离子,同样电压下比较正负离子模式下母离子的强度,确定正离子电离模式信号较高,然后再优化 DP 电压。再在子离子扫描模式下,对 Q1 母离子进行打碎,优化碎裂能量(CE),使各子离子碎片和母离子信号强度比例最优。从化合物的二级质谱碎片中(图 1),选取信号强度最高的子离子作为 Q3,与母离子 Q1 组成定量分析的特征离子对 MRM 进行定量分析,各化合物 MRM 离子对参数及选择离子流色谱图见图 2 和表 1。

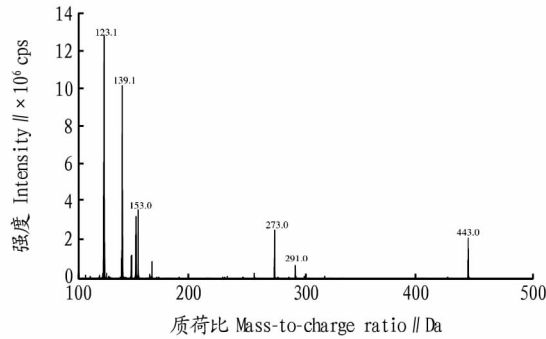


图 1 儿茶素没食子酸酯(EGC)的子离子扫描质谱图
Fig.1 Ion scan mass spectrum of ECG

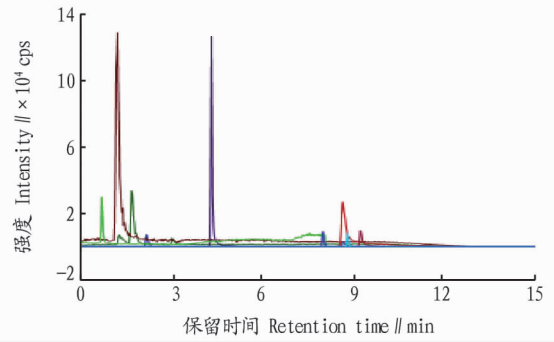


图 2 9 种化合物的 MRM 离子流色谱图
Fig.2 MRM ion chromatogram of 9 compounds

2.2 标准曲线方程和检出限 分别称取各化合物标准品 2.5 mg,用 80%甲醇/水(V/V)定容为 100 mL 的混合母液。继续用水溶液稀释成 250、125、62.5、31.25、15.6 μg/L 的梯度标准溶液。在“1.3”试验条件下上机分析,以各化合物的浓度为横坐标 *x*、相应峰面积为 *y* 绘制标准曲线,得到各物质的标准曲线方程(表 1)。

2.3 回收率试验 因茶叶样品中的儿茶素在热水浸提过程中有相互转化,因此做加标回收试验没有太大的意义^[10]。

2.4 茶叶样品定量分析 将安吉白茶、铁观音和紫仙 3 种茶叶鲜样粉末分别称取 2 份,按“1.2.1”方法处理后上机分析,得到各化合物含量见表 2。分别称取市售商品茶叶华农绿针、贡品大红袍、松峰茶 2 份,按“1.2.2”方法处理后上机分

表 1 各化合物的线性方程和质谱参数

Table 1 Linear equations and mass spectrometry parameters of each compound

化合物 Compound	线性方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient (<i>r</i>)	Q1 母离子 Q1 parent ion(<i>m/z</i>)	Q3 子离子 (<i>m/z</i>) Q3 daughter ion	DP 解簇电压 DP de-clustering voltage//V	Ce 碰撞能量 Ce collision energy//eV	LOD 检出限 LOD detection limit//μg/L	RSD %
谷酰胺 Gln	$y = 136\ 000x + 651\ 000$	0.997 9	147.0	84.2	31.5	22	3.0	2.14
谷氨酸 Glu	$y = 667\ 000x + 260\ 000$	0.997 3	148.1	84.0	40	25	0.5	1.51
茶氨酸 Theanine	$y = 62\ 900x + 295\ 000$	0.999 9	175.1	84.2	58	24	1.0	1.08
没食子儿茶素 EGC	$y = 19\ 500x + 40\ 000$	0.996 0	307.3	139.3	99	20	1.0	5.84
没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG	$y = 173\ 000x - 144\ 000$	0.998 8	459.4	289.2	61	10	1.0	3.61
表儿茶素 EC	$y = 15\ 300x + 232\ 000$	0.992 0	291.4	139.1	70	18	0.5	4.48
儿茶素没食子酸酯 ECG	$y = 32\ 800x + 178\ 000$	0.995 1	443.0	123.2	68	18	0.5	3.82
咖啡碱 Caffeine	$y = 34\ 800x + 136\ 000$	0.999 5	195.0	137.9	60	27	1.0	2.1
可可碱 Theobromine	$y = 3\ 390x + 85\ 500$	0.991 0	181.2	121.0	36	13	0.5	2.07

注:*y* 为化合物峰面积;*x* 为化合物浓度(ng/mL)

Note:*y* is the peak area of the compound; *x* is the concentration of the compound (ng/mL)

表 2 茶叶鲜样中各化合物的含量

Table 2 Contents of each compound in fresh tea samples

茶叶鲜样 Fresh tea samples	谷酰胺 Gln	谷氨酸 Glu	茶氨酸 Theanine	表没食子儿茶素 EGC	没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG	表儿茶素 EPIC	表儿茶素没食子酸酯 ECG	咖啡碱 Caffeine	可可碱 Theobromine
安吉白茶 Angi White Tea	106.3	377	539	958	2 680	745	1 134	807	41.0
铁观音 Tieguanyin	283.0	780	1 023	611	3 840	1 066	2 940	770	37.2
紫仙 Purple fairy	243.0	417	697	684	2 400	476	680	830	17.1

析,得到各化合物含量见表 3。

从表 2 可看出,同一品种茶叶中各化合物含量有显著差异;不同茶叶品种之间各化合物含量差别比较大,基本规律是 EGCG 含量最高,ECG 或茶氨酸其次。从表 3 和表 2 数据

对比发现,商品茶中各化合物的含量除了可可碱都远低于新鲜茶叶,应该是商品茶不同配方和加工过程中损失造成的。无论是新鲜茶叶还是商品茶叶,都未检测到茶叶碱,可能是因为本身含量太低及前处理损失导致未能检出。

表 3 商品茶茶汤中各化合物的含量

Table 3 Contents of each compound in commercial tea soup

茶叶鲜样 Fresh tea samples	谷酰胺 Gln	谷氨酸 Glu	茶氨酸 Theanine	表没食子 儿茶素 EGC	没食子儿茶 素没食子 酸酯 EGCG	表儿茶 素 EPIC	表儿茶 素没食子 酸酯 ECG	咖啡碱 Caffeine	可可碱 Theobro mine
华农绿针 Huanong Green Needle	86.46	92.22	764.10	355.99	15.93	246.02	492.22	319	48.9
松峰茶 Songfeng tea	79.44	27.43	943.38	131.98	15.03	130.95	518.24	361	45.9
贡品大红袍 Gongpin Dahongpao	#	#	29.75	186.99	8.60	56.16	150.52	304	43.3

注:#表示含量较低,超出定量曲线范围

Note:# indicates low content,beyond the scope of the quantitative curve

3 结论与讨论

该研究建立的多种茶多酚、茶氨酸和生物碱的质谱检测方法,可在 20 min 内定量出茶叶中 9 种主要化合物的含量。该方法与常用的高效液相色谱方法相比,灵敏度和选择性有显著提高;质谱检测的高选择性有效降低了基质干扰,提高了测定结果的准确度;每个化合物 MRM 离子对都有单独的检测通道,即使 2 种化合物保留时间完全一样也不会影响其峰面积定量。该方法可适用于茶叶研究中茶多酚、生物碱和茶氨酸的快速定量分析。

参考文献

- [1] 宛晓春.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003:32-34.
- [2] 杨成对,张经华,宋莉晖,等.四种茶中茶多酚成分分析[J].食品科学,2009,30(18):307-309.
- [3] 范海涛,刘庄,张照康,等.一种毛尖茶叶多糖 MTP06 的提取分离及其活性测定[J].茶叶科学,2016,36(5):531-536.
- [4] 魏然,徐平,应乐,等.茶多酚对阿尔茨海默病的防治功能与机理研究进展[J].茶叶科学,2016,36(1):1-10.

- [5] 高媛圆,毛立民,徐平,等.茶多酚防治 2 型糖尿病的分子机理研究进展[J].茶叶科学,2015,35(3):239-247.
- [6] 乔如颖,李明,郑新强,等.茶叶及其儿茶素类对乳腺癌的抑制作用[J].茶叶科学,2016,36(6):557-566.
- [7] 郭颖,陈琦,黄峻榕,等.超高效液相色谱法测定茶叶中没食子酸、咖啡碱和儿茶素含量[J].食品科技,2015,40(11):296-300.
- [8] 曾秋梅,梁杏秋,王晓琴,等.RP-HPLC-DAD 法测定茶叶籽油酚类化合物[J].中国粮油学报,2017,32(4):141-146.
- [9] 戴军,王洪新,陈尚卫,等.茶叶及茶多酚中儿茶素的高效液相色谱分析方法研究[J].色谱,2001,19(5):398-402.
- [10] 郭颖,黄峻榕,陈琦,等.茶叶中儿茶素类测定方法的优化[J].食品科学,2016,37(6):137-141.
- [11] 金钰,周有祥,胡定金,等.湖北不同地区绿茶中儿茶素与咖啡因含量比较[J].湖北农业科学,2017,56(23):4588-4590.
- [12] 董占波,许金伟,张星海,等.平阳早香茶与平阳黄汤主要品质成分分析[J].广州化工,2017,45(21):109-111.
- [13] 黄正安.饮品茶类化学成分与药理作用的研究进展[J].现代医学与健康研究,2017,1(6):151-152.
- [14] 王虹,康海宁,陈军辉,等.HPLC-APCI-MS 法测定茶叶中的茶氨酸[J].茶叶科学,2008,28(6):20-26.
- [15] 赖国银,王俐娟,卢鹤,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱定性研究茶叶籽中的酚类化合物[J].色谱,2017,35(5):502-508.

(上接第 194 页)

- [6] DEYAMA T, IKAWA T, NISHIBE S. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. II. Isolation and structures of three new lignan glycosides[J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9):3651-3657.
- [7] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. III. Isolation and structure of a new lignan glycoside[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(2):523-527.
- [8] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. V. Isolation of dihydroxydehydrodiconiferyl alcohol isomers and phenolic compounds[J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(3):1785-1789.

- [9] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. IV. Isolation of a new sesquiterpene glycoside and iridoids[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(12):4933-4938.
- [10] NAKAMURA T, NAKAZAWA Y, ONIZUKA S, et al. Twelve phenolics from leaves of *Eucommia ulmoides*[J]. Nat Med, 1998, 52(3):460-465.
- [11] 杜庆鑫,魏艳秀,刘攀峰,等.杜仲雄花主要活性成分含量的多样性[J].林业科学,2017,53(2):35-43.
- [12] 黄勤婉,王瑾,苏娟,等.双波长 HPLC 法同时测定杜仲雄花中 3 种成分的含量[J].中国药房,2011,22(27):2565-2567.
- [13] 李钦,杜红岩,杜兰英,等. HPLC 法测定杜仲雄花和杜仲雄花茶中京尼平昔酸、绿原酸和京尼平昔[J].中草药,2009,40(1):71-72,143.