

茶叶中30种茶多酚的定量检测——LC-MS/MS法

Simultaneous Quantification of 30 polyphenols in Tea by LC-MS/MS

陈西², 贺光云¹, 侯雪¹, 刘冰洁², 郭立海²

Chen xi², He guangyun¹, Hou xue¹, Liu bingjie², Guo lihai²

¹四川省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所; ²SCIEX中国

¹Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Sichuan Academy of Agricultural Sciences;

²SCIEX China

Key word: Tea; Polyphenol; Triple Quad

前言

茶多酚是茶叶中多羟基酚类物质的总称, 包括儿茶素类(黄烷醇类)、花色苷类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类等, 其中儿茶素占茶多酚总量的65~80%^[1]。作为茶叶中的主要功能成分, 茶多酚占茶叶干重的25~35%^[2]。据报道, 此类化合物具有抗氧化、免疫调节、降血脂等多种保健和药理功能。另外, 茶多酚对茶叶的口感和色泽也会有一定的影响^[3]。制作工艺、产地、采收季节等都对茶汤中茶多酚的成分及含量有影响^[4]。因此, 茶多酚的种类和含量是评价茶叶质量的重要指标, 有必要建立一个高通量的检测方法, 帮助保障茶叶品质以及促进茶产业规范健康地发展。

本文基于SCIEX Triple Quad™液质联用系统建立了30种茶多酚的定量检测方法。由于部分多酚类存在同分异构体, 仅靠离子对无法对其进行定性, 需要通过保留时间进行分离, 该方案兼顾了灵敏度以及异构体色谱分离的需求。一针进样, 可实现针对7组17个异构体的色谱分离, 满足茶叶质量评价的要求。

本方案技术特点和优势:

1、高通量

一针进样, 同时测定茶叶中30种多酚的含量。

2、适用范围广

该方法在绿茶、红茶、黑茶三种基质中均进行了验证, 可推广并适用于市面上常见的多种茶叶的品质研究。

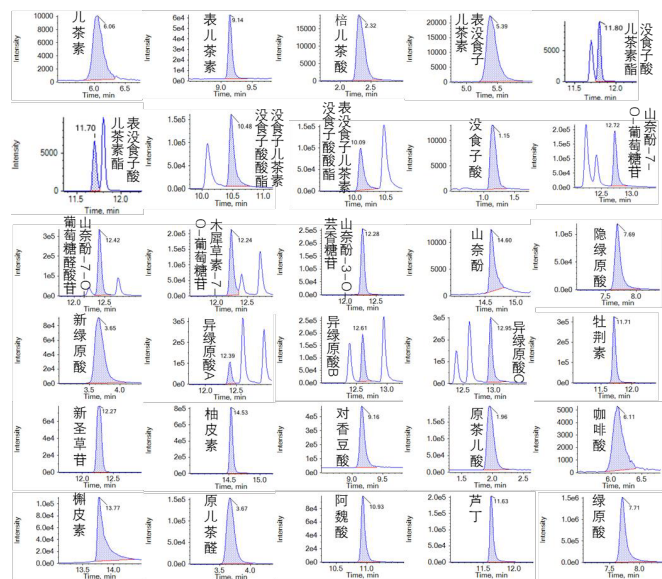


图1. 30种多酚的提取离子流色谱图

3、同分异构体的分离

天然产物中存在大量同分异构体, 本方法的色谱条件利用已有标准品进行优化, 可有效分离鉴定7组共17个同分异构体, 帮助更准确地对茶叶中多酚进行分析和研究。

实验方法

1. 液相条件:

色谱柱: Phenomenex Kinetex Biphenyl, 2.6 μ m, 2.1 mm \times 100 mm;

流动相: A相: 0.1%甲酸水 B相: 甲醇-乙腈 (3:7)

流速: 0.4 mL/min;

色谱柱温度: 40°C;

洗脱程序:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.0	97	3
4.0	97	3
6.0	95	5
10.0	80	20
15.0	50	50
16.0	40	60
16.1	5	95
18.0	5	95
18.1	97	3
20.0	97	3

2. 质谱方法:

离子源: ESI源, 负离子模式

气帘气 CUR: 30 psi 碰撞气 CAD: 8

雾化气 GS1: 50 psi 辅助气 GS2: 55 psi

IS电压: -4500 V 源温度 TEM: 500°C

各化合物离子对参数见附表1.

3. 样品制备

茶叶均匀磨碎, 称取约0.2 g, 置10 mL离心管中, 加入经70°C水浴预热的70%甲醇水溶液5 mL, 用玻璃棒充分搅拌均匀湿润, 立即移入70°C水浴, 浸提10 min (隔5 min搅拌一次); 冷却至室温, 在3500 r/min转速下离心10 min; 上清液转移至10 mL容量瓶。残渣用70%甲醇水溶液5 mL按以上操作重复提取一次; 合并提取液, 定容至10 mL, 用0.22 μ m膜过滤后待测, 或过滤后用50%的甲醇水溶液 (含0.1%甲酸) 稀释后待测。

结果与讨论

1. 线性范围

各化合物根据定量限不同, 分别考察了不同化合物的线性关系 (见表1), 相关性系数r均 > 0.996, 满足样品的检测需求。

表1. 30种茶多酚的线性回归方程及相关性系数

序号	中文名称	线性回归方程	相关系数(r)
1	儿茶素	$y = 3747.26921x - 1462.84235$	0.99986
2	表儿茶素	$y = 8886.37194x + 514.69305$	0.99954
3	槲儿茶酸	$y = 6113.24625x - 1924.27354$	0.99965
4	(-)-表没食子儿茶素	$y = 9049.96132x - 1312.03643$	0.99815
5	(-)-没食子酸儿茶素酯	$y = 24929.60005x + 3941.83522$	0.99970
6	表儿茶素没食子酸酯	$y = 27707.97255x + 3444.42963$	0.99946
7	没食子儿茶素没食子酸酯	$y = 29439.93771x - 5030.90360$	0.99680
8	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯	$y = 21213.46692x - 8731.88067$	0.99930
9	没食子酸	$y = 3040.28926x - 787.46853$	0.99990
11	山奈酚-7-O-葡萄糖苷	$y = 25984.21768x + 946.75252$	0.99878
12	山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷	$y = 4.43416e4x - 532.07389$	0.99980
13	山奈酚-3-O-芸香糖苷	$y = 3.28440e4x - 242.48143$	0.99979
14	山奈酚	$y = 2387.33433x - 422.81279$	0.99720
15	隐绿原酸	$y = 25529.71866x - 393.25964$	0.99951
16	新绿原酸	$y = 3.18084e4x - 1881.94645$	0.99970
17	绿原酸	$y = 3.49538e5x - 3913.57992$	0.99974
18	异绿原酸A	$y = 12550.19857x + 1223.19852$	0.99995
19	异绿原酸B	$y = 23842.21512x + 1587.03163$	0.99997
20	异绿原酸C	$y = 4.03313e4x + 2998.51915$	0.99979
21	牡荆素	$y = 3.91840e4x + 915.77441$	0.99995
23	新圣草苷	$y = 14199.18811x - 74.43557$	0.99989
24	柚皮素	$y = 9.05410e4x + 6275.12697$	0.99980
25	对香豆酸	$y = 8.34045e4x - 56.57342$	0.99994
26	原儿茶酸	$y = 4.90853e4x + 780.80400$	0.99995
27	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	$y = 29061.66808x + 3032.82642$	0.99830
28	咖啡酸	$y = 2117.93319x - 322.45104$	0.99980
29	槲皮素	$y = 3.35399e4x - 16129.96686$	0.99925
30	原儿茶醛	$y = 4.39387e4x - 68.30148$	0.99819
31	阿魏酸	$y = 15283.44727x - 845.01253$	0.99990
32	芦丁	$y = 26176.79362x + 359.32709$	0.99829

2. 回收率

分别在绿茶、红茶和黑茶样品中添加低、中、高三个浓度的标品溶液，通过扣除茶叶样品中的本底值来计算各化合物的回收率，如图2所示，各化合物平均回收率均在80.1%~121.6%之间。

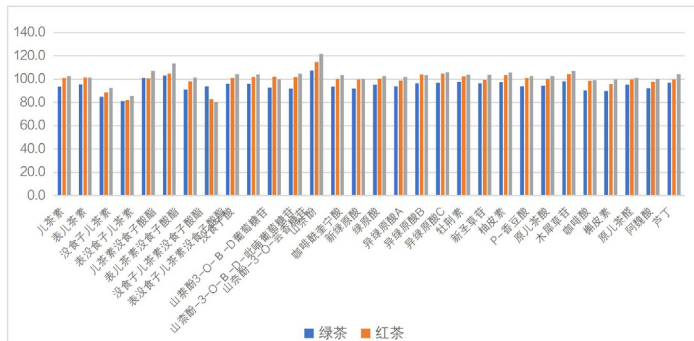


图2. 30种多酚化合物在3种基质中的平均回收率

3. 精密度

利用回收率实验的中等加标浓度样品连续进样6次考察方法的重复性，各化合物在不同基质中连续进样6针的RSD均在0.38%~6.11%之间（表2）。

3. 总结

本方案基于SCIEX TripleQuad™质谱系统建立了茶叶中30种茶多酚的筛查定量方法，一针进样，可同时区分其中7组异构体，具有高通量、高灵敏度、高稳定性的特点。经验证，可用于绿茶、红茶和黑茶中的茶多酚含量测定，并可以为茶叶品质评价提供参考。

参考文献

- [1] 常艳艳,蒋秋燕. 茶多酚的药用价值[J]. 食品与药品,2007,9(8): 72-74.
- [2] Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2011. The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. J. Med. Plants Res. 5 (11), 2110–2124.
- [3] Zhang, L., Cao, Q.Q., Granato, D., Xu, Y.Q., Ho, C.T., 2020. Association between chemistry and taste of tea: a review. Trends Food Sci. Technol. 101, 139–149.
- [4] Zhuang, J.H., Dai, X.L., et al., Evaluation of astringent taste of green tea through mass spectrometrybased targeted metabolic profiling of polyphenols. Food Chem.

表2. 30种化合物在不同基质中重复性考察结果 (n=6)

NO.	化合物	绿茶	红茶	黑茶
1	儿茶素	1.43	1.45	1.37
2	表儿茶素	1.61	1.59	1.44
3	没食子儿茶素	2.14	2.17	0.98
4	表没食子儿茶素	1.90	2.09	2.60
5	儿茶素没食子酸酯	6.11	2.45	3.49
6	表儿茶素没食子酸酯	4.12	5.63	2.72
7	没食子儿茶素没食子酸酯	0.99	3.53	2.03
8	表没食子儿茶素没食子酸酯	3.09	3.14	5.29
9	没食子酸	1.56	1.20	1.48
10	山萘酚3-O-B-D葡萄糖苷	1.60	1.96	1.48
11	山萘酚-3-O-B-D-吡喃葡萄糖苷	4.13	3.35	1.83
12	山萘酚-3-O-芸香糖苷	4.18	2.91	3.33
13	山萘酚	5.48	4.84	5.66
14	咖啡酰奎宁酸	0.41	1.45	1.47
15	新绿原酸	1.1	0.82	1.13
16	绿原酸	1.23	0.92	0.98
17	异绿原酸A	1.93	3.08	2.90
18	异绿原酸B	2.72	1.99	2.28
19	异绿原酸C	1.60	2.68	2.58
20	牡荆素	1.16	1.13	1.19
21	新圣草苷	1.21	2.00	3.54
22	柚皮素	1.43	1.19	0.94
23	P-香豆酸	0.73	0.72	1.20
24	原儿茶酸	0.95	1.01	1.28
25	木犀草苷	2.63	3.18	1.30
26	咖啡酸	1.99	1.14	1.23
27	槲皮素	2.77	1.43	3.01
28	原儿茶醛	0.69	0.75	0.54
29	阿魏酸	1.13	0.38	1.35
30	芦丁	0.80	3.39	3.21

附表1

序号	中文名称	英文名称	Rt (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (eV)
1	儿茶素	(±)-catechin (C)	6.08	289.0	203.0 245.0*	-60 -60	-29 -22
2	表儿茶素	(-)-epicatechin (EC)	9.15	288.9	245.0 123.0*	-30 -90	-23 -25
3	槲儿茶酸	(-)-Gallocatechin (GC)	2.35	305.0	125.0 137.0*	-80 -80	-27 -28
4	(-)-表没食子儿茶素	(-)-epigallocatechin (EGC)	5.42	305.0	125.0 137.0*	-80 -80	-27 -28
5	(-)-没食子酸儿茶素酯	(-)-catechin gallate (CG)	11.80	441.3	169.0 289.0*	-60 -60	-24 -23
6	表儿茶素没食子酸酯	(-)-epicatechin gallate (ECG)	11.70	441.3	169.0 289.0*	-60 -60	-24 -23
7	没食子儿茶素没食子酸酯	(-)-gallocatechin gallate (GCG)	10.48	457.2	169.1 125.2*	-80 -80	-20 -54
8	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯	(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)	10.10	457.2	169.1 125.2*	-80 -80	-20 -54
9	没食子酸	gallic acid	1.15	169.0	79.0 125.0*	-80 -80	-21 -35
10	山奈酚-7-O-葡萄糖苷	kaempferol-3-O-β-D-glucoside	12.73	447.1	285.0 151.0*	-140 -140	-32 -42
11	山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷	kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	12.43	447.1	284.0 255.2*	-140 -140	-35 -50
12	山奈酚-3-O-芸香糖苷	kaempferol-3-O-rutinoside	12.29	593.1	285.0 284.0*	-120 -120	-45 -50
13	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	luteolin-7-O-β-D-glucoside	12.25	447.2	285.0 133.0*	-170 -170	-34 -72
14	山奈酚	kaempferol	14.61	285.0	239.0 187.0*	-100 -100	-40 -40

序号	中文名称	英文名称	Rt (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (eV)
15	隐绿原酸	caffeoylquinic acid	7.71	353.1	173.0 179.1*	-40 -40	-21 -22
16	新绿原酸	neochlorogenic acid	3.68	353.1	191.2 179.0*	-40 -40	-24 -24
17	绿原酸	Chlorogenic acid	7.74	353.1	190.9 127.0	-40 -40	-25 -50
18	异绿原酸A	isochlorogenic acid A	12.40	515.3	353.0 191.1*	-60 -60	-22 -39
19	异绿原酸B	isochlorogenic acid B	12.61	515.3	353.2 173.1*	-90 -90	-26 -35
20	异绿原酸C	isochlorogenic acid C	12.95	515.3	353.2 173.1*	-70 -70	-24 -35
21	牡荆素	vitexin	11.72	431.2	311.3 283.0*	-135 -135	-30 -44
22	新圣草昔	neoeriocitrin	12.29	595.2	459.2 151.1*	-170 -170	-38 -50
23	柚皮素	naringenin	14.54	271.0	151.0 119.0*	-50 -50	-26 -33
24	对香豆酸	trans-p-coumaric acid	9.18	163.0	119.0 93.0*	-15 -15	-16 -33
25	原茶儿酸	protocatechuic acid	1.97	152.9	108.8 91.2*	-30 -30	-20 -32
26	咖啡酸	caffeic acid	6.13	179.0	134.0 107.0*	-25 -25	-21 -30
27	槲皮素	quercetin	13.78	301.0	151.0 179.0*	-90 -90	-30 -25
28	原儿茶醛	3,4-dihydroxy-benzaldehyde	3.69	137.1	108.1 92.0*	-65 -65	-30 -31
29	阿魏酸	ferulic acid	10.94	193.0	133.8 177.8*	-40 -40	-19 -18
30	芦丁	rutin	11.64	609.1	300.0 271.0*	-80 -80	-47 -70

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32495-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)