

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用法 同时测定茶叶中茶多酚、咖啡碱及茶氨酸 含量

LCMSMS-569

摘要：本应用建立了茶叶中茶多酚、咖啡碱及茶氨酸含量测定的方法。在优化后的色谱及质谱条件下，采用正、负离子模式同时扫描，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：8 种组分在相应的浓度范围内线性良好，所得校准曲线相关系数在 0.996 以上，各校准点准确度在 85.52%~107.87% 之间，所有组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06% ~ 0.25% 和 1.05% ~ 6.56% 之间，加标回收率在 73.37~101.6% 之间。

关键词：茶叶 茶多酚 咖啡碱 茶氨酸 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用法

茶叶内含物质丰富，主要的营养成分是茶多酚、咖啡碱、茶氨酸及脂多糖等。尤以茶多酚的含量最高，约 18% ~ 36%，而茶多酚的主要成分是儿茶素类，占总量的 70% 以上，茶多酚是茶叶中具有生物活性的重要成分，它不仅是良好的天然抗氧化剂，也是影响茶叶苦涩味的主要成分之一。茶叶鲜味主要取决于茶叶中的游离氨基酸，茶叶中游离氨基酸总量为 1%~2%，其中茶氨酸占游离氨基酸总量的 50% 以上，茶氨酸具有镇静、降血压、提高记忆力和增强人体免疫力的作用。此外，茶叶中含有多种嘌呤碱，其中主要成分是咖啡碱，

含量约 2% ~ 5%，咖啡碱属兴奋剂，在一定浓度范围内，对人体有强心、利尿、解毒等生理和保健作用。

本文采用岛津三重四极杆液质联用仪建立了儿茶素 (C)、表儿茶素 (EC)、没食子酸 (GA)、表没食子儿茶素 (EGC)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、茶氨酸 (L-The) 和咖啡碱 (CAF) 同时测定的方法，本方法灵敏度高、重现性好，适用于茶叶中茶多酚、咖啡碱及茶氨酸的快速检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。配置信息如下：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40C

输液泵：LC-40B X3

脱气机：DGU-405

工作站：Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

1.2.1 液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2.0 μm; P/N: 227-30001-04, SGLC)

流速：0.3 mL/min

进样量：2 μL

柱温：35°C

流动相：A 相 - 水 (含 0.05% 甲酸)，B 相 - 甲醇 (含 0.05% 甲酸)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	B.Conc	30
2.80	Pumps	B.Conc	80
3.90	Pumps	B.Conc	80
4.00	Pumps	B.Conc	30
6.50	Controller	Stop	

1.2.2 质谱条件

分析仪器：LCMS-8050	接口温度：300°C
离子源：ESI (+/-)	DL 温度：200°C
雾化气流速：3.0 L/min	加热模块温度：400°C
干燥气流速：10.0 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
加热气流速：10.0 L/min	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

名称	离子模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
C	+	291.2	139.1*	-16	-19	-24
			123.1	-20	-22	-50
EC	+	291.2	139.2*	-20	-16	-28
			123.1	-20	-27	-20
EGC	+	307.0	139.2*	-22	-19	-24
			163.0	-22	-23	-28
ECG	+	443.0	139.1*	-34	-29	-50
			123.1	-22	-23	-22
EGCG	+	459.1	139.1*	-14	-25	-24
			151.1	-14	-16	-28
CAF	+	194.9	138.2*	-14	-35	-24
			110.1	-14	-35	-18
L-The	+	174.9	84.1*	-12	-40	-32
			130.2	-12	-30	-22
GA	-	169.0	125.1*	20	17	14
			79.0	20	23	30

注：* 表示定量离子对

1.3 混合标准溶液的制备

精密称取 C、EC、EGC、ECG、EGCG、CAF、L-The 和 GA 各 10 mg，加入 50% 甲醇 - 水溶液 10 mL，配成浓度均为 1 mg/mL 的储备液，分别取适量 1 mg/mL 的储备液混合，然后采用 30% 甲醇 - 水（含 0.1% 甲酸）逐级稀释，配制成不同浓度标准系列溶液（见表 3）。

表 3 混合标准溶液中各组分浓度 (ng/mL)

目标物	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7	Conc.8
C	2	4	8	16	40	80	160	400
EC	10	20	40	80	200	400	800	2000
EGC	9	18	36	72	180	360	720	1800
ECG	10	20	40	80	200	400	800	2000
EGCG	25	50	100	200	500	1000	2000	5000
CAF	25	50	100	200	500	1000	2000	5000
L-The	10	20	40	80	200	400	800	2000
GA	25	50	100	200	500	1000	2000	5000

■ 样品前处理

称取 0.2 g 样品于 15 mL 的离心管中, 加入 70% 甲醇 - 水溶液 (70°C 水浴锅中事先预热 5 min) 5 mL, 摇匀, 立即移入 70°C 水浴锅中, 浸提 10 min, 冷却至室温, 转入离心机中, 3500 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液转移于 10 mL 的容量瓶中, 残渣重复以上操作。合并以上提取液用 70% 甲醇 - 水溶液定容, 摇匀, 取提取液 10 μ L, 采用 30% 甲醇 - 水 (含 0.1% 甲酸) 定容至 3 mL, 混匀, 进样分析。

■ 结果与讨论

3.1 MRM 色谱图

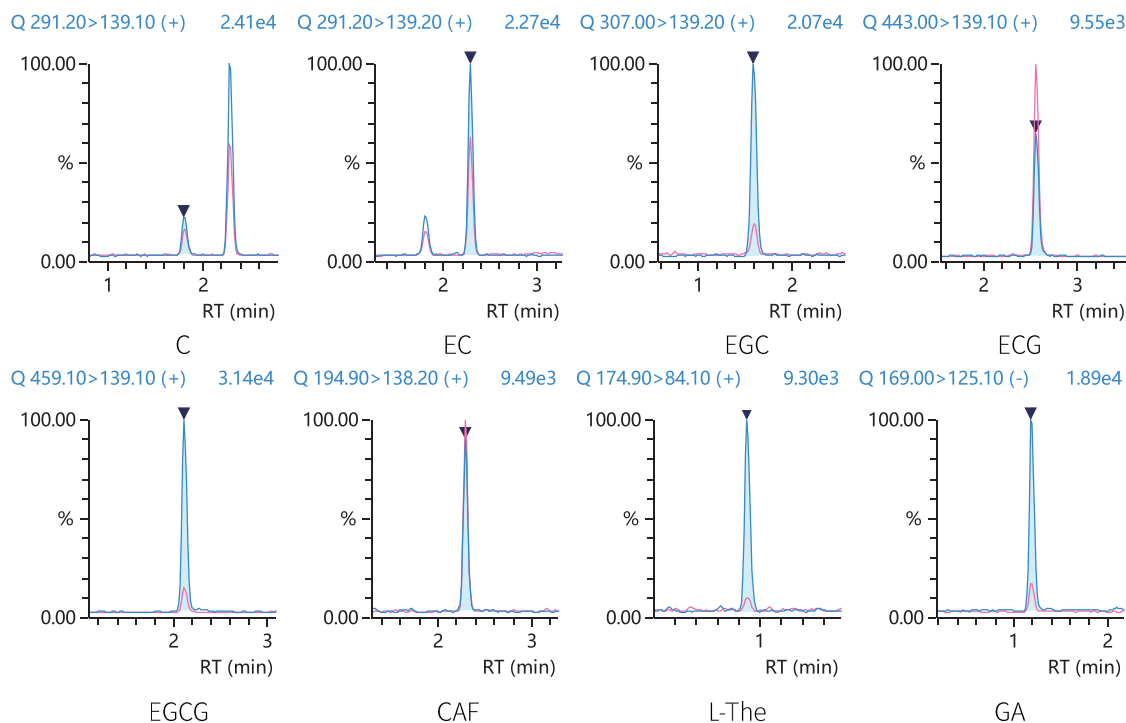


图 1 标准溶液定量下限 MRM 色谱图

3.2 标准曲线及线性范围

将含有 8 种组分的混合标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以定量离子峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，如图 2 所示。所得校准曲线相关系数均大于 0.996，准确度在 85.52-107.87% 之间，线性方程及相关系数见表 4。

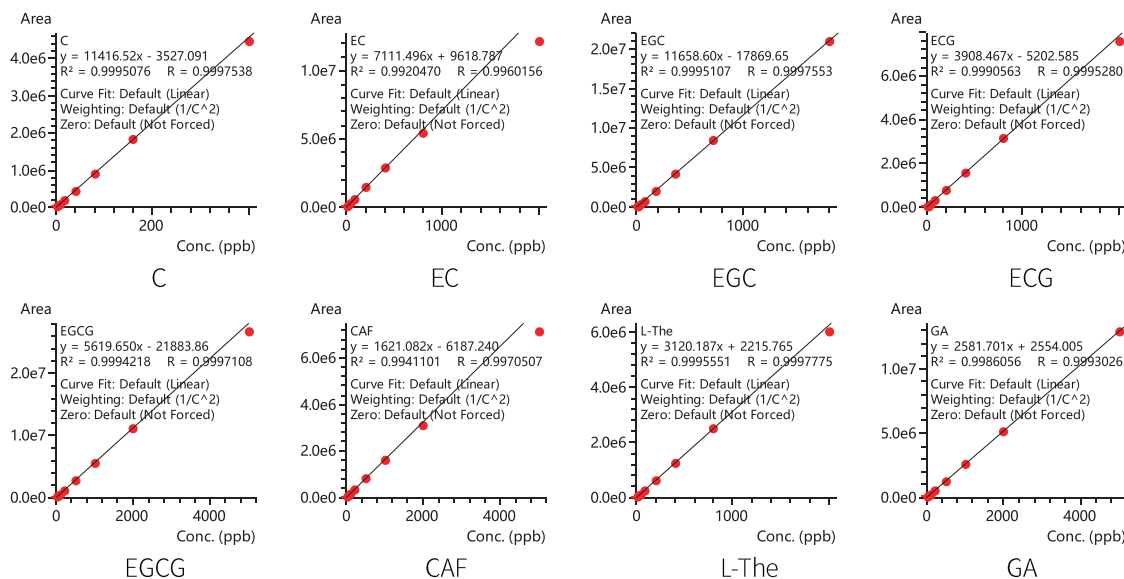


图 2 标准曲线

表 4 线性关系及相关系数

目标物	标准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度 %
C	$Y = 11416.520X - 3527.091$	0.9997	2~400	97.96~102.93
EC	$Y = 7111.496X + 9618.787$	0.9960	10~2000	85.52~107.87
EGC	$Y = 11658.600X - 17869.650$	0.9997	9~1800	95.74~102.16
ECG	$Y = 3908.467X - 5202.585$	0.9995	10~2000	94.93~102.16
EGCG	$Y = 5619.650X - 21883.860$	0.9997	25~5000	95.40~102.11
CAF	$Y = 1621.082X - 6187.240$	0.9970	25~5000	88.08~106.58
L-The	$Y = 3120.187X + 2215.765$	0.9997	10~2000	96.39~102.38
GA	$Y = 2581.701X + 2554.005$	0.9993	25~5000	93.00~103.26

3.3 检出限及定量限

采用浓度为 2 ng/mL 的混合标准溶液进样，考察检出限和定量限。Labsolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。检出限及定量限结果见表 5。

表 5 检出限及定量限结果

目标物	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
C	0.12	0.40
EC	0.20	0.67
EGC	0.10	0.33
ECG	0.12	0.40
EGCG	0.04	0.13
CAF	0.20	0.67
L-The	0.40	1.33
GA	0.75	2.50

3.4 精密度结果

采用定量下限的混合标准溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性。结果如表 6 所示，8 种组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06% ~ 0.25% 和 1.05% ~ 6.56% 之间，显示仪器精密度良好。

表 6 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
C	2	0.25	5.67
EC	10	0.06	4.67
EGC	9	0.17	1.05
ECG	10	0.09	2.30
EGCG	25	0.09	2.95
CAF	25	0.08	6.56
L-The	10	0.18	2.66
GA	25	0.14	1.97

3.5 加标回收率

分别精密称取已知 8 种组分含量的市售普洱茶茶叶样品 6 份，每份 0.2 g，再加入一定量的茶多酚、咖啡碱及茶氨酸对照品储备液，按照“样品前处理”方法处理后制备供试品溶液，上机分析，按以下方式考察回收率。

$$\text{回收率}\% = \frac{C_{\text{实测}} - C_{\text{样品}}}{C_{\text{添加}}} \times 100\%$$

其中：

$C_{\text{实测}}$ 为实际测试浓度

$C_{\text{样品}}$ 为样品浓度

$C_{\text{添加}}$ 为添加浓度

添加浓度及加标回收率具体结果如表 7 所示，结果显示：8 种组分的加标回收率在 73.37~101.6% 之间。

表 7 加标回收率结果

目标物	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
C	300	89.95	2.41
EC	1050	73.37	2.75
EGC	450	101.6	1.03
ECG	450	101.2	3.73
EGCG	450	99.31	3.95
CAF	27000	80.52	1.84
L-The	150	99.31	6.31
GA	1200	100.7	2.59

3.6 样品测定结果

分别取市售绿茶、红茶和普洱茶样品各 0.2 g，每批次 6 样品，按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定，绿茶、红茶和普洱茶样品中不同组分的含量测定结果回算值见表 8。

表 8 样品测定结果 (mg/kg)

目标物	绿茶		红茶		普洱茶	
	平均值	RSD%	平均值	RSD%	平均值	RSD%
C	1046	0.70	62.42	4.84	319.9	1.69
EC	7864	0.53	299.1	1.40	1016	0.81
EGC	22466	0.41	182.1	1.85	560.9	1.66
ECG	20358	0.88	2659	0.46	536.5	1.38
EGCG	63356	0.40	1339	0.74	479.7	0.76
CAF	28948	0.59	35281	0.54	24482	0.76
L-The	11446	1.17	5078	1.16	152.5	7.18
GA	674.4	1.34	2861	2.00	1105	2.14

■ 结论

本应用建立了采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定茶叶中茶多酚、咖啡碱及茶氨酸的方法，采用岛津 Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分离，正、负离子模式同时进行扫描，扫描速度快。本方法分析时间短、回收率高、重复性好，可为茶叶中营养物质的测定提供参考。

岛津应用云

