

英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶中嘌呤生物碱和茶多酚的 HPLC-DAD-MS/MS 分析

卢嘉丽¹, 王冬梅¹, 苗爱清², 杨得坡¹, 陈建萍³

(1 中山大学药学院, 广东 广州 510080 2 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东 英德 513000
3. 香港大学中医药学院, 香港)

摘要: 采用 HPLC-DAD-MS/MS 技术对英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树的芽叶进行了分析, 鉴定出了 2 种嘌呤生物碱, 7 种儿茶素类化合物以及 2 种非儿茶素类茶多酚。对这 3 个茶树品种的嘌呤生物碱和儿茶素类成分质量分数进行比较分析, 结果表明三者的儿茶素类总质量分数均大于 20%, 其中英红 1 号和祁门红茶品种在儿茶素类成分的组成上较为接近, EGCG 质量分数均为最高; 而英红 9 号质量分数最高的是 ECG。

关键词: 嘌呤生物碱; 茶多酚; 儿茶素; 液质联用; 英红 1 号; 英红 9 号; 祁门

中图分类号: Q58 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 01-0072-04

HPLC-DAD-MS/MS Analysis of Purine Alkaloids and Tea Polyphenols in Young Leaves of Yinghong 1, Yinghong 9 and Qimen Cultivars

LU Jiali¹, WANG Dongmei¹, MIAO Aiqing², YANG Depo¹, CHEN Jianping³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Tea Research Institute, Agricultural Science Academy of Guangdong Province, Yingde 513000, China;

3. School of Chinese Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract Using the HPLC-DAD-MS/MS method, two purine alkaloids, seven catechins, and two non-catechin type of polyphenols were identified in young leaves of Yinghong 1, Yinghong 9 and Qimen cultivars mainly made for black tea. According to the quantitative results, the contents of catechins in the leaves of Yinghong 1 and Qimen are similar, while Yinghong 9 is quite different, with ECG higher than EGCG.

Key words purine alkaloids, tea polyphenols, catechins, HPLC-DAD-MS/MS, Yinghong 1, Yinghong 9, Qimen

嘌呤生物碱和茶多酚是茶 *Camellia sinensis* 叶中的主要活性成分, 嘌呤生物碱主要是咖啡碱, 一般占茶叶干质量的 2%~4%; 茶多酚则包括儿茶素类 (黄烷醇类)、黄酮及黄酮醇类、花青素类及酚酸化合物等几大类, 质量分数高达茶叶干质量的 18%~36%^[1], 其中儿茶素类约为茶多酚总量的 70%~80%。高效液相色谱法 (HPLC) 是茶多酚分离分析最常用的方法之一, 但由于儿茶素类化合

物结构相似, 使用二级管阵列检测器 (DAD) 并不能准确有效地鉴定出各个成分, 若连接质谱 (MS) 则能提供丰富的结构信息。英红 1 号、英红 9 号是广东省农科院茶叶研究所培育的适制红茶的大叶种优良茶树品种, 祁门红茶为小叶种红茶品种, 以其高香形秀享誉国内外。本文选取这 3 个红茶品种作为研究对象, 采用 HPLC-DAD-MS/MS 技术对其芽叶中的嘌呤生物碱和茶多酚进行了定性和

*收稿日期: 2008-03-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (06025366)

作者简介: 卢嘉丽 (1982 生), 女, 研究生; 通讯作者: 王冬梅; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

定量分析, 从而比较这 3 个茶树品种在相同生长环境下芽叶中化学成分的组成特征。

1 材料与方法

1.1 材料

英红 1 号、英红 9 号和祁门红茶的芽叶均采自广东省农业科学院茶叶研究所茶园, 按一芽三叶采摘后隔水蒸青 5 min, 80 °C 烘干, 粉碎过 40 目筛, 置于干燥器中贮存备用。

2 种嘌呤生物碱对照品咖啡碱 (CAF) 和可可碱 (TB) 购自 Sigma 公司; 8 种儿茶素对照品 (-) - 没食子儿茶素 (GC)、(-) - 表没食子儿茶素 (EGC)、(+)-儿茶素 (C)、(-) 表儿茶素 (EC)、(-) 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、(-) 没食子儿茶素没食子酸酯 (GCG)、(-) 表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、(-) - 儿茶素没食子酸酯 (CG) 购自 Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan), 纯度均大于 98%。超纯水 (Millipore, USA), 乙腈为色谱纯溶剂 (TEDA, USA), 甲酸为市售国产分析纯试剂。

1.2 HPLC-DAD-MS/MS 分析条件

Waters 600E 高效液相色谱仪, 配备 Waters 600E 四元梯度输送泵系统, Waters 717plus 自动进样器, Waters 2996 光电二极管阵列检测器。Thermo Finnigan TSQ Quantum 液相色谱-质谱联用仪, Surveyor 光电二极管阵列检测器, Surveyor 自动进样器, ESI/APCI 离子源。

液相色谱条件: 色谱柱 Phenomenex Gemini C18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), 保护柱 Phenomenex C18 (4 × 3.0 mm i.d., 5 μm); 流动相为乙腈 (A) 和 ϕ=1% 甲酸水溶液 (B), A:B 的组成比从 4:96 (0 min) 线形上升为 25:75 (60 min); 进样量: 10 μL; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温; DAD 扫描波长范围: 200~700 nm。

质谱条件: ESI 离子化, 正负离子同时检测; 离子化电压: 4 kV; 喷雾电压: 3.5 kV; 鞘气压力: 35 A dx; 辅助气压力: 11 A dx; 毛细管温度: 350 °C; 毛细管电压: 35 V; m/z 扫描范围: 150~1500 amu; MS² 碰撞能量: 35 eV。

1.3 供试品溶液、对照品溶液的配制及标准曲线的制定

取 0.5 g 茶样, 精密加入 50 mL 乙腈水 (1:1, 体积比), 室温下超声提取 20 min, 0.2 μm 微孔滤膜过滤后备用。

精密称取对照品适量, 用水溶解后定容, 得到对照品混合溶液中 TB、GC、EGC、CAF、C、EC、EGCG、GCG、ECG 的质量浓度分别为 0.04、0.04、1.02、0.53、0.05、0.48、3.05、0.04、0.46 mg/mL; 将上述混合溶液继续稀释 1.25、2.5、5、10、20 倍, 得到 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 每个质量浓度分别进样 3 次, 以质量浓度 (X) 为横坐标, 平均峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程、相关系数及线性范围见表 1, 结果表明各化合物在测定范围内呈良好的线性关系。对此测定方法进行方法学考察, 精密度、稳定性和重复性均在合格范围, 各成分的平均加样回收率在 97.11%~105.36% 之间, RSD 不大于 3.11%。

表 1 嘌呤生物碱和儿茶素类化合物定量分析的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of determination of purine alkaloids and catechins

化合物	回归方程	相关系数 R^2	线性范围 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
TB	$Y = 27.739X + 31.297$	0.999 2	1.30~41.6
GC	$Y = 1.859.5X + 18.716$	0.999 7	2.0~40.0
EGC	$Y = 1.861.8X + 50.072$	0.999 8	51.0~1.020
CAF	$Y = 26.717X + 120.715$	0.999 5	26.5~530
C	$Y = 7.120.6X + 4.044.4$	0.999 2	2.51~50.2
EC	$Y = 7.319.8X + 225.311$	0.999 8	24.2~485
EGCG	$Y = 13.013X + 2.000.000$	0.999 8	152.3~3.046
GCG	$Y = 15.620X + 1.832.8$	0.999 9	2.03~40.6
ECG	$Y = 17.438X + 221.582$	0.999 8	23.0~460

2 结果

2.1 英红 9 号芽叶中嘌呤生物碱和茶多酚的定性分析

以英红 9 号为例, HPLC 色谱图 (275 nm) 和正、负离子总离子流色谱图, 儿茶素混合对照品的 HPLC 色谱图 (275 nm) 如图 1 所示。通过与对照品的保留时间、紫外吸收光谱以及质谱信息进行比较, 并参考相关文献 [2-5], 鉴定出 11 个化合物, 列于表 2 中, 包括 2 种嘌呤生物碱可可碱和咖啡碱, 7 种儿茶素类化合物 GC、EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG。此外, 还鉴定出 5 没食子酰奎宁酸酯 (5-galloylquinic acid) 和山柰酚-3-芸香糖苷 (kaempferol-3-rutinoside) 2 种非儿茶素类茶多酚。

表 2 英红 9 号芽叶中多酚类化合物和嘌呤生物碱的保留时间、紫外吸收及质谱特征

Table 2 Retention time, UV absorption, and MS spectral data of phenolic compounds and purine alkaloids identified in the young leaves of Yinghong 9

峰号 ¹⁾	R _t /min	化合物	m/z		λ/nm
			[M - H] ⁻	M S ²	
1	10.1	5-没食子酰奎宁酸酯	343	191, 169	240, 275
2	14.9	可可碱 (TB)	181 ²⁾		240, 270
3	16.8	(-)-没食子儿茶素 (GC)	305	219, 137, 125	245, 270
4	26.0	(-)-表没食子儿茶素 (EGC)	305	219, 137, 125	245, 270
5	27.0	咖啡碱 (CAF)	195 ²⁾		240, 270
6	28.2	(+)-儿茶素 (C)	289	203, 159, 123	245, 275
7	35.7	(-)-表儿茶素 (EC)	289	203, 159, 123	245, 275
8	37.4	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)	457	305, 193, 169, 125	240, 275
9	41.7	(-)-没食子儿茶素没食子酸酯 (GCG)	457	305, 193, 169, 125	240, 275
10	49.0	(-)-表儿茶素没食子酸酯 (ECG)	441	289, 245, 169, 125	240, 275
11	55.3	山柰酚-3-芸香糖苷	593	285	240, 265, 345

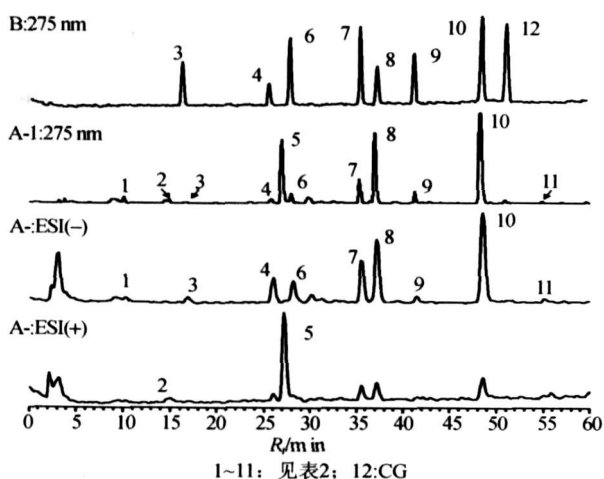
1) 峰号和保留时间与图 1 中的色谱峰号一致, 2) [M + H]⁺

图 1 英红 9 号芽叶 (A-1~ A-3) 和儿茶素混合对照品 (B) 的 HPLC-UV-MS 色谱图

Fig 1 HPLC-UV-MS TIC chromatograms of the young leaves of Yinghong 9 (A-1~ A-3) and the reference mixtures of catechins (B)

2.2 英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶中嘌呤生物碱和儿茶素类成分质量分数的比较

英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶的 HPLC 色谱图 (275 nm) 见图 2。2 个嘌呤生物碱和 7 个儿茶素类化合物的定量结果列于表 3。英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶中的嘌呤生物碱质量分数基本相近, 可可碱约为 0.2%, 咖啡碱约为 3%。这 3 个茶树品种的儿茶素类总量均大于 20%, 但相同儿茶素类化合物在不同品种之间的质量分数却

有较大差异, 其中英红 1 号和祁门比较接近, EGCG 质量分数最高, 分别为 14.53%、10.64%。英红 9 号的儿茶素类成分组成比例较特殊, 质量分数最高的不是 EGCG (4.68%), 而是 ECG (8.65%); 而且 C (1.55%)、EC (3.4%) 的质量分数也远远高于英红 1 号和祁门。

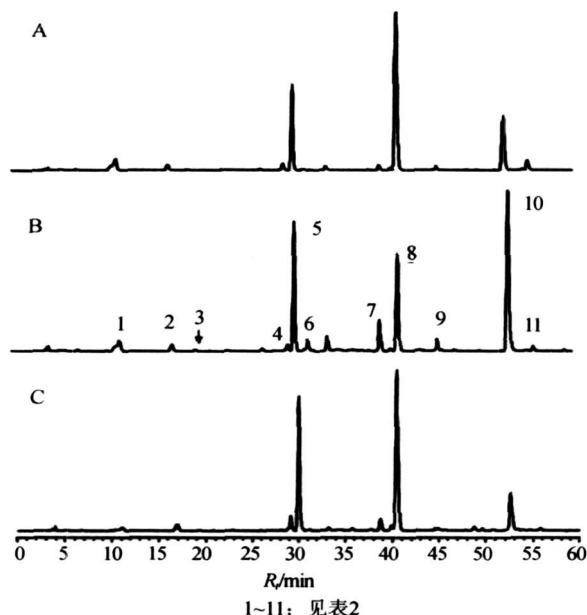


图 2 英红 1 号 (A)、英红 9 号 (B) 和祁门茶树 (C) 芽叶的 HPLC 色谱图 (275 nm)

Fig 2 HPLC chromatograms (275 nm) of young leaves of Yinghong 1 (A), Yinghong 9 (B) and Qimen (C)

表 3 英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶中嘌呤生物碱和儿茶素类化合物的质量分数 ($n=3$)

Table 3 Contents of purine alkaloids and catechins in young leaves of Yinghong 1, Yinghong 9 and Qimen ($n=3$)

化合物 (峰号)	$w/(mg\ g^{-1})$		
	英红 1 号	英红 9 号	祁门
TB(2)	2.14 ± 0.07	1.84 ± 0.01	2.08 ± 0.03
GC(3)	3.67 ± 0.10	2.94 ± 0.12	1.88 ± 0.04
EGC(4)	36.22 ± 2.36	20.73 ± 0.64	55.23 ± 1.33
CAF(5)	31.36 ± 1.02	30.97 ± 0.56	35.69 ± 1.10
C(6)	3.57 ± 0.09	15.53 ± 0.25	2.12 ± 0.06
EC(7)	6.36 ± 0.13	34.01 ± 1.34	11.83 ± 0.58
EGCG(8)	145.27 ± 3.89	46.75 ± 1.25	106.36 ± 2.73
GCG(9)	3.47 ± 0.02	6.86 ± 0.36	2.26 ± 0.01
ECG(10)	39.61 ± 1.85	86.46 ± 2.41	20.93 ± 0.37
Total catechins	238.17 ± 8.44	213.28 ± 6.37	200.61 ± 5.12

3 讨论

通过 HPLC-DAD-MS/MS 分析, 在英红 1 号、英红 9 号和祁门茶树芽叶中准确地鉴定出了 2 种嘌呤生物碱, 7 种儿茶素类化合物以及 2 种非儿茶素类茶多酚。英红 1 号是由阿萨姆种子经单株选育而成的无性系品种, 英红 9 号是在云南大叶种有性后代中经单株选育而成的无性系品种, 两者均是广东省农科院茶叶研究所选育而成的高产优质大叶红茶品种; 祁门红茶品种原产地为安徽省祁门县。这 3 个红茶茶树品种虽然在同一个茶园环境下种植生长, 但是芽叶中儿茶素类成分的质量分数和组成仍然反映出这 3 个品种的生化特性差异。英红 1 号和英红 9 号是大叶种 *C. sinensis* var *assamica*, 由于叶面积大, 接受光照多, 利于糖代谢, 转化成多酚类也丰富^[1], 因此儿茶素类总质量分数均比小叶种 *C. sinensis* var *sinensis* 的祁门红茶品种较高。一般来说, 茶叶中儿茶素类化合物的组成中以 EGCG 质量分数最高, 远高于其它儿茶素类化合物, 其次是 ECG 和 EGC, 但在云南大叶种中 ECG 的质量分数却高于 EGCG, 而且 EC 的质量分数也高于 EGC^[6-7]。茶叶中儿茶素的生物合成首先形成的是 EC 和 C 等非酯型儿茶素, 再经过羟基化或没食子酰基化, 才形成了没食子儿茶素和儿茶素没食子酸酯^[1]。被认为保持了原始特性的云南大叶种

因此含有较多的 EC、C 和 ECG。本研究中英红 9 号的儿茶素类成分的组成也充分反映了云南大叶种的这一特性。

参考文献:

- [1] 杨贤强, 王岳飞, 陈留记, 等. 茶多酚化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
YANG Xianqiang, WANG Yuefei, CHEN Liuji et al. Chemistry of tea polyphenols[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2003.
- [2] ZHU Xiaolan, CHEN Bo, MA Ming et al. Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multidimensional information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004, 34: 695-704.
- [3] M KETOVA P, SCHRAM K H, WHITNEY J et al. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins: Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea [J]. Journal of Mass Spectrometry 2000, 35: 860-869.
- [4] RIO D D, STEWART A J, MULLEN W, et al. HPLC-MS/MS analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004, 52: 2807-2815.
- [5] PELILLO M, BONOLIM, BIGUZZI B, et al. An investigation in the use of HPLC with UV and MS/electrospray detection for the quantification of tea catechins [J]. Food Chemistry 2004, 87: 465-470.
- [6] SA IJO R, KATO M, TAKETA Y. Compositions and contents of catechins in various kinds of fresh tea leaves—comparisons between Assam variety and China variety [M]. In Food Flavors and Chemistry, 274. The Royal Society of Chemistry, 2001: 183-196.
- [7] 徐仲溪, 刘仲华, 王坤波, 等. 绿茶多酚和儿茶素提取与原料品质关系的研究 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 3(3): 257-260.
XU Zhongxi, LIU Zhonghua, WANG Kunbo et al. On relationship between green tea polyphenols and catechins and green tea raw materials [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2004, 3(3): 257-260.