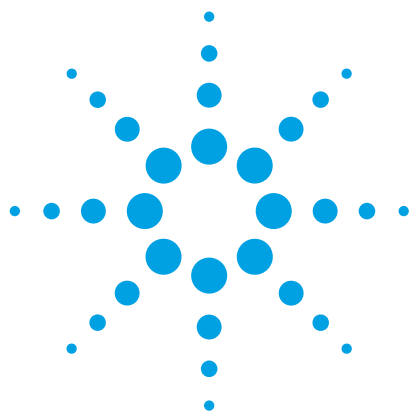




采用 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱和 LC/MS 快速分析茶叶

应用报告

食品和饮料

作者

Anne E. Mack and William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

分析了绿茶中常见的十种化合物（9 种儿茶酚和咖啡因），结果说明 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱具有相似的选择性。使用 LC/MS 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱，只需 1.4 分钟的梯度洗脱就可获得全部十种化合物的线性校正曲线。定量分析并比较了一些瓶装和泡茶样品。未过滤未稀释的绿茶泡茶样品表明在高压下脏样品可以在 Poroshell 120 色谱柱上进样超过 1500 次。

前言

多酚化合物能够降低患心脏病的风险，预防癌症，并能抵抗其他疾病。多酚化合物通常源自新鲜的茶叶或绿茶，其中儿茶酚含量很高。儿茶酚影响茶叶的颜色和味道，它是茶叶苦涩味的来源 [1]。在茶叶的儿茶酚中，表没食子儿茶酚没食子酸酯 (EGCG) 最引人注目，因为它是茶叶提取物中含量最高的多酚化合物 [2]。

所有的茶叶都采摘自茶树，不同的处理方法会产生不同的茶叶。茶叶收获后的发酵（氧化）量表示茶叶的种类。如果收获之后不迅速将其干燥，茶叶就会开始很快凋谢和氧化。在这个过程中，由于叶绿素分解，叶子变黑，并释放出单宁酸。控制加热和使叶绿素分解酶失活的时间就会使氧化过程停止。红茶是全部氧化的，乌龙茶是半氧化的，而绿茶是未氧化的 [3,4]。氧化过程降低了儿茶酚的含量，所以绿茶中儿茶酚抗氧化物的含量最高，而红茶中最少。



Agilent Technologies

在本应用报告中，将 Yoshida et al [5] 开发的使用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱的分析茶叶中儿茶酚的高效液相色谱法转换到一根规格相似的 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱上，结果表明二者具有相似的选择性。并对该方法进行了优化用于 LC/MS 分析。绘制了校正曲线，分析并比较了瓶装样品和泡茶样品。另外，使用未过滤未稀释的绿茶泡茶样品的测试了色谱柱寿命，说明 Agilent Poroshell 色谱柱中大的 2 μm 滤头在分析脏样品时的优势。

用高效液相色谱分析茶叶的方法并不是首创，但是这个方法表明 Agilent Poroshell 120 色谱柱在分析其他天然产物时的有效性。本文显示了 Agilent Poroshell 120 色谱柱可以分离 10 种价格便宜并易于取得的相关化合物，包括四对差向异构体。

实验部分

本研究使用安捷伦 1200 Series Rapid Resolution LC (RRLC) 系统，配置安捷伦 6410 三重四级杆质谱仪 (QQQ)：

- G1312B SL 型二元泵，流动相 A：不同的水溶液 (0.1% H_3PO_4 、0.2% HCOOH 、0.2% CH_3COOH 、0.02% CF_3COOH 、10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 3.6-5.6 和 10 mM HCOONH_4 pH 3-4.5)，流动相 B：乙腈。梯度为 t_0 时 B 的浓度为 10%，后升至 15%，然后再升至 27%。梯度时间变化取决于色谱柱规格和流速，见表 1
- G1367C SL 型自动液相进样器 (ALS)，进样量取决于所用具体的方法参数，见表 1
- G1316B SL 型柱温箱 (TCC)，温度控制在 40 $^{\circ}\text{C}$
- G6410A QQQ 质谱仪配备离子源：电喷雾 AP-ESI，干燥气温度和流量：350 $^{\circ}\text{C}$ ，10 L/min，雾化气压力：50 psi，毛细管电压： ± 3500 V，SIM 模式， m/z 值见图 1。在负离子模式监测儿茶酚，而在正离子模式检测咖啡因
- MassHunter 软件版本 B.02.01，B.02.00 和 B.03.01 分别用于采集数据，定性和定量分析

表 1. 用于儿茶酚分析的不同方法参数

	Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱 (部件号 883975-902)	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 4.6 $\times$ 50 mm, 1.8 μm 色谱柱 (部件号 827975-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 $\times$ 50 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 689975-902)	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 2.1 $\times$ 0 mm, 51.8 μm 色谱柱 (部件号 827700-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 689775-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 689775-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 689775-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 685775-902)
流速 (mL/min)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.25	1.50	0.83
流动相 A	0.1% H_3PO_4 水溶液	0.1% H_3PO_4 水溶液	0.1% H_3PO_4 水溶液	0.1% H_3PO_4 水溶液	不同添加剂水溶液	0.2% CH_3COOH 水溶液	0.2% CH_3COOH 水溶液	0.2% HCOOH 水溶液
流动相 B	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	0.2% HCOOH 乙腈
10% B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15% B	7.50	2.50	2.50	0.50	0.50	0.42	0.36	1.25
27% B	15.00	5.00	5.00	1.00	1.00	0.83	0.71	2.50
停止时间 (min)	15.00	5.00	5.00	1.40	1.40	1.20	0.95	4.00 (包括再次平衡时间)
后运行时间 (min)	10.00	3.00	3.00	1.00	1.00	0.80	0.60	n/a
全部循环时间 (min)	25.00	8.00	8.00	2.40	2.40	2.00	1.55	4.00
TCC 温度 ($^{\circ}\text{C}$)	40	40	40	40	40	40	40	40
进样量 (μL)	15.0	5.0	5.0	1.0	1.0 (LC/UV), 1.5 (LC/MS)	1.5	1.5	2.0
样品浓度 (mg/mL)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03 (LC/UV), 0.003 (LC/MS)	0.003	0.003	n/a
系统压力 (bar)	84	169	117	575	380 (LC/UV), 425 (LC/MS)	505	585	540

绿茶中的儿茶酚

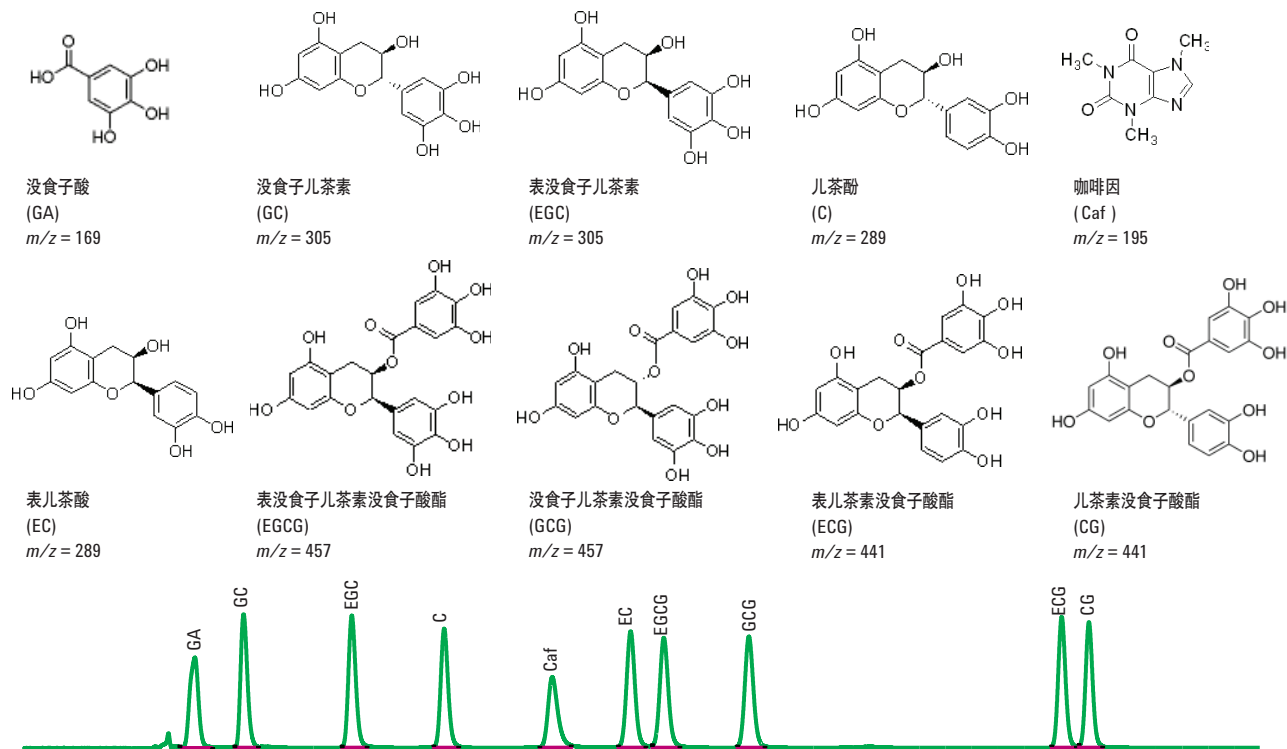


图 1. 使用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱以 H_3PO_4 作为流动相，分离目标化合物的洗脱次序（注意：在随后的色谱图中选择性会稍微有些变化，但是洗脱次序仍然不变）

本研究所用的六种安捷伦色谱柱：

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6×150 mm, $5 \mu m$ 色谱柱 部件号 883975-902
- Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 4.6×50 mm, $1.8 \mu m$ 色谱柱 部件号 827975-902
- Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6×50 mm, $2.7 \mu m$ 色谱柱 部件号 689975-902
- Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 2.1×50 mm, $1.8 \mu m$ 色谱柱 部件号 827700-902
- Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1×50 mm, $2.7 \mu m$ 色谱柱 部件号 689775-902
- Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1×100 mm, $2.7 \mu m$ 色谱柱 部件号 685775-902

图 1 所示为目标化合物在色谱图中的洗脱顺序。所有的分析物都是干粉状，购自 Sigma Aldrich 公司 (Bellefont, PA)。将没食子酸，表没食子儿茶酚，儿茶酚，咖啡因和表没食子儿茶素没食子酸酯标样分别溶于水，配制浓度为 1 mg/mL 的水溶液。将没

食子儿茶素，表儿茶酸，没食子儿茶素没食子酸酯，表儿茶素没食子酸酯和儿茶素没食子酸酯标样分别溶于乙腈/水 (1:1) 配制浓度为 0.5 mg/mL 的溶液。将 1 份 1 mg/mL 的标样和 2 份 0.5 mg/mL 的标样混合，之后每种分析物浓度为 0.03 mg/mL 。如果必要，将上述样品用水稀释。除了瓶装样品 A 是日本一个同事带来的之外，其他茶叶样品购自当地。用于定量研究的茶叶样品（瓶装和泡茶）用水稀释 10 倍，之后进样分析。用于色谱柱寿命测试的绿茶泡茶样品不稀释不过滤，直接进样。其他的，乙腈，磷酸，甲酸，乙酸，三氟乙酸，醋酸铵和甲酸铵购自 Sigma Aldrich 公司 (Bellefont, PA)。水为 $18 \text{ M-}\Omega$ Milli-Q (Bedford, MA) 制得的超纯水。

结果和讨论

将之前 T. Yoshida et al [5] 使用 Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 色谱柱在 15 分钟的时间内对儿茶酚进行分析的工作转移到 Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Throughput SB-C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱上 5 分钟内即可完成分析。此外, 本研究还与 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱进行了对比。图 2 表示使用较小填料尺寸填充的较短高效液相色谱柱能够节省分析时间, 并保持分离度不变。

将该方法进一步转换到一根 2.1 × 50 mm 的色谱柱上, 只需 1 分多钟即可完成分析。在相同分析时, 较小内径的色谱柱流速

更低, 这更适合质谱研究。Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱的选择性很相似, 因此能够很容易的转移, 如图 3 所示。对于 1.8 μm ZORBAX 色谱柱和 2.7 μm Poroshell 色谱柱系统的反压力明显不同。Poroshell 色谱柱中较大的表面多孔填料产生的压力比 ZORBAX 色谱柱中较小的全多孔填料的压力低很多。而与全多孔的亚 2 μm 颗粒相比, Poroshell 色谱柱中的颗粒能得到相似的性能, 这是由于穿过多孔外层的传质距离很短, 以及其具有较窄的粒径分布。在这种情况下, 根据压力的不同就可以选择是使用 400 还是 600 bar 仪器。

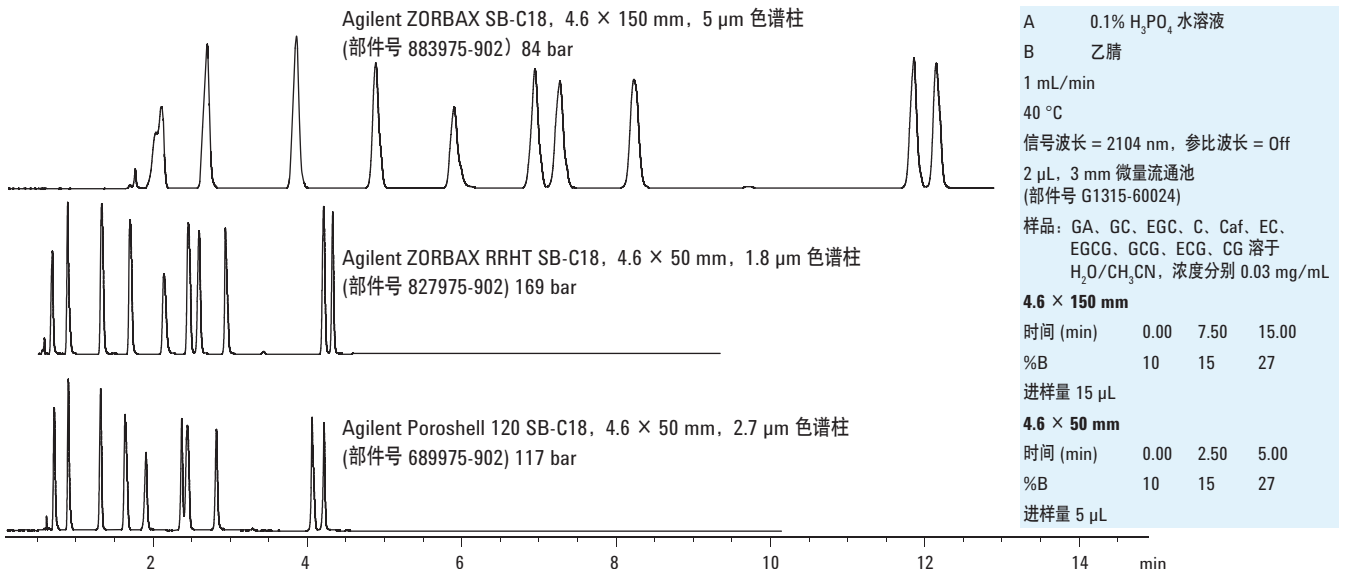


图 2. 将在 150 mm, 5 μm 色谱柱开发的分析儿茶酚的原始方法转移到 Agilent ZORBAX SB-C18, 50 mm, 1.8 μm 色谱柱上和 50 mm 表面多孔 Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.7 μm 色谱柱上

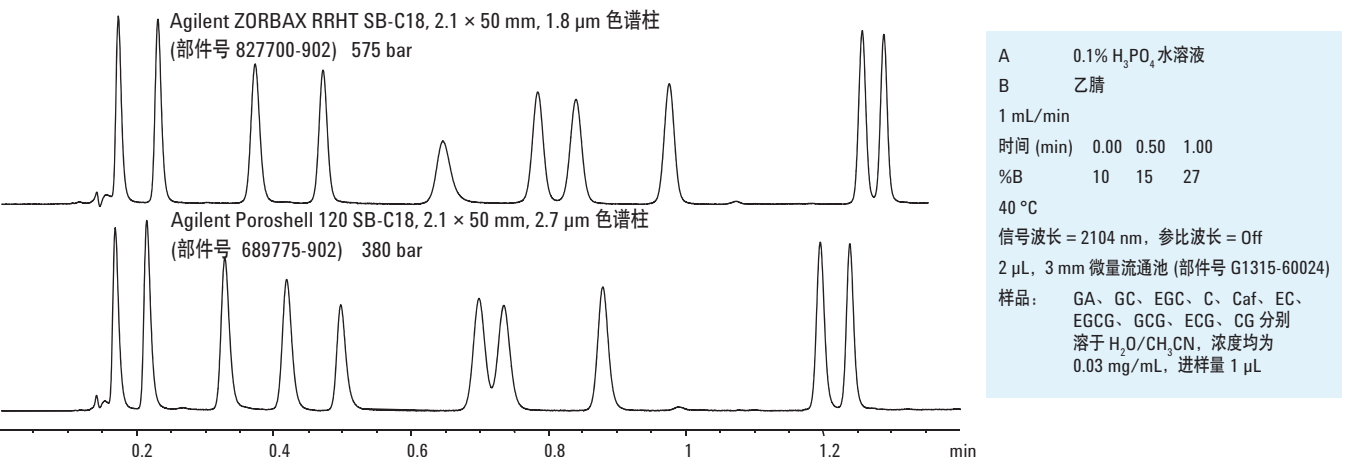


图 3. 将儿茶酚的分析方法转移到 2.1 mm 内径的色谱柱上用于 LC/MS 分析, 保持初始方法 (4.6 × 150 mm 色谱柱) 的流速 (1 mL/min), 并根据色谱柱体积比例改变梯度时间, 分析时间可以进一步缩短

2.1 mm 内径色谱柱流速较低, 适用于 LC/MS 分析。然而, 原来的磷酸流动相与 LC/MS 系统不兼容。图 4 显示对几种可用于质谱分析的流动相用于儿茶酚分析。除了图 4 所示的结果, 对 10 mM pH 3-4.5 的甲酸铵溶液也进行了筛选。所得到的色谱结果与乙酸铵的数据几乎相同。总得来说, 筛选过程中选择性仍然保持不变。因此, 流动相的优化选择是基于分析物的信号

强度。图 4 中所有的色谱图比例相同。使用铵盐和三氟乙酸流动相制备的缓冲液存在显著的离子抑制。最好的两个选择是甲酸和乙酸, 而乙酸对于所有的化合物产生的信号稍强。要注意的是, 由于正离子扫描受离子抑制的影响较小, 因而选择负离子扫描作为代表性的色谱图。然而, 咖啡因的正离子扫描仍然遵循同样的模式。

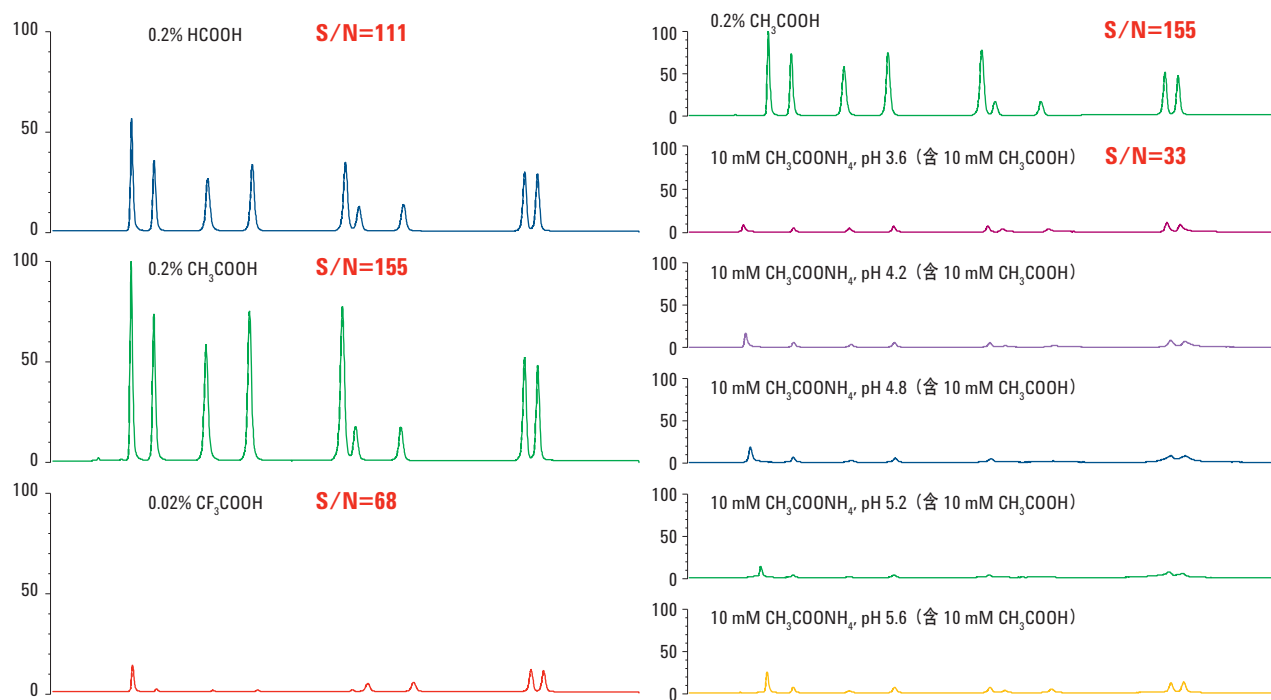


图 4. 对不同可用于质谱分析的流动相进行筛选以替换原 LC/UV 方法中的磷酸流动相 (注意: 咖啡因的正离子 SIM 色谱图没有给出, 因为与儿茶酚相比它受离子抑制的影响非常小)

图 5 中重叠 EIC 图显示由于 Agilent Poroshell 色谱柱产生的反压较低, 在 600 bar 压力下可实现更快的分析。原来在 150 mm 色谱柱上需要 15 分钟的方法, 在 50 mm Poroshell 120 色谱柱上不到 1 分钟就能完成, 而且还能保持原方法的选择性。比较图 3 和图 5 表明在相同的色谱柱 (Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm) 上运行相同的方法 (1 mL/min) 会产生完全不同的压力。压力的不同主要是由于连接高效液相色谱和质谱的转换管路又长内径又细, 0.12 mm。不用较大的转换管路内径, 是由于这样可能会使谱带变宽, 并会降低该快速分析方法的分度。

对十种目标化合物建立了校正曲线, 最少六点 (最多 10 点), 每个标样重复运行三次。表 2 列除了全部 10 种分析物的线性回归方程和相关系数。在色谱柱 (Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 50 mm) 上所有的曲线都有很好的线性, 最多到 10 ng。为了不超过校正标准的最高浓度, 所有茶叶样品进样前用水稀释十倍。在绿茶泡

茶样品中只有一种化合物 EGCG 在稀释之后仍超过了最高浓度, EGCG 的浓度用表 2 中的线性回归方程推算得到。

表 2. 用于儿茶酚和咖啡因的校正数据; 校正曲线最小六点, 所有标样重复运行三次

	线性回归方程	相关系数, R ²
没食子酸	y = 0.466 x	0.995
没食子儿茶素	y = 0.407 x	0.996
表没食子儿茶素	y = 0.355 x	0.996
儿茶酚	y = 0.601 x	0.996
咖啡因	y = 3.439 x	0.995
表儿茶酸	y = 0.638 x	0.995
表没食子儿茶素没食子酸酯	y = 0.153 x	0.998
没食子儿茶素没食子酸酯	y = 0.183 x	0.996
表儿茶素没食子酸酯	y = 0.396 x	0.998
儿茶素没食子酸酯	y = 0.371 x	0.996

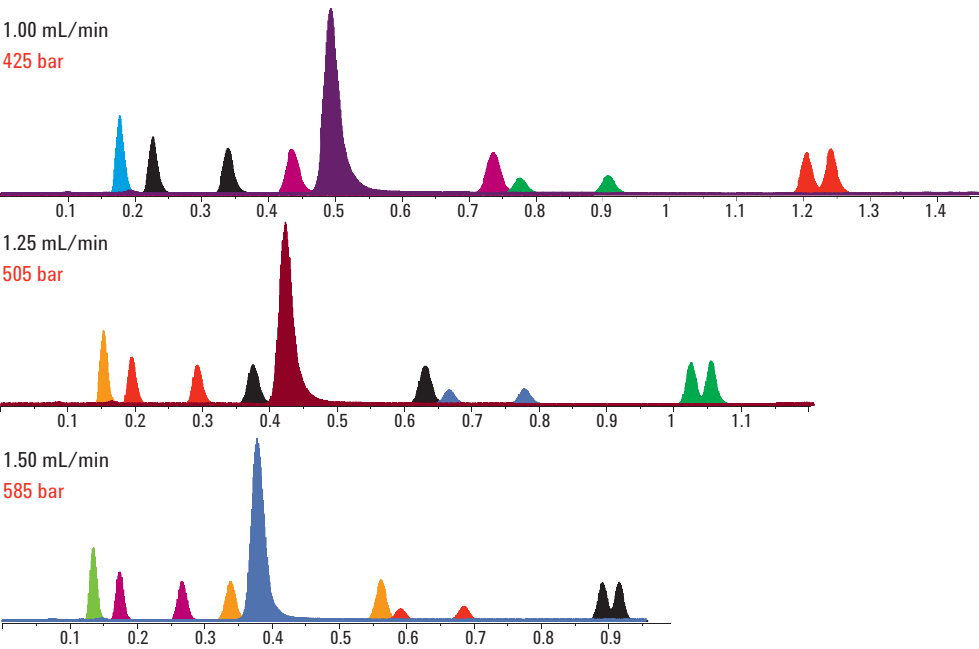


图 5. 增加流速并根据色谱柱体积改变梯度以进一步使咖啡因分析速度更高

A	0.2% CH ₃ COOH 水溶液		
B	乙腈		
40 °C			
色谱柱	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱		
离子源	350 °C, 10 L/min, 50 psi, -/+3500 V		
采集	SIM- (169, 305, 289, 457, 441), SIM+ (195)		
样品	GA、GC、EGC、C、Caf、EC、EGCG、GCG、ECG、CG 分别溶于 H ₂ O/CH ₃ CN, 浓度均为 0.003 mg/mL, 1.5 μL 进样量		
1.00 mL/min			
时间 (min)	0.00	0.50	1.00
%B	10	15	27
1.25 mL/min			
时间 (min)	0.00	0.42	0.83
%B	10	15	27
1.50 mL/min			
时间 (min)	0.00	0.36	0.71
%B	10	15	27

选择瓶装茶叶进行分析，茶叶样品的成分以及来源都列于表 3 中，定量分析结果见图 6 所示。茶叶样品 A 是一种日本茶，在室温未开启的情况下保存了 3 年左右。在样品 A 中只检测到了没食子酸和咖啡因。这可能是由于这种茶叶中原来有儿茶酚，但是随着时间的延长降解了。瓶装茶叶样品 B 和 D 是不同品牌的日本绿茶。二者都标注了相同的组分，使用本文的方法检测出的各种儿茶酚的含量大致相同。茶叶样品 C 也是一种绿茶，和茶叶样品 B、D 具有相同的组分，然而其产地是台湾。与两种日本茶相比，样品 C 中表儿茶素没食子酸酯和儿茶素没食子酸酯含量较多，其他八种成分较少。瓶装茶叶样品 E 和 F 是来自日本的混合茶叶，根据标签它们都有相同含量的绿茶。茶叶 E 标明其主要成分是大麦，因此，咖啡因和儿茶酚浓度明显低于其他茶叶样品。茶叶 F 是一种乌龙茶混合物，它的组成与绿茶稍微不同。与其他两种純粹的日本绿茶样品 B 和 D 相比，乌龙茶混合物含有更多的没食子酸和咖啡因，表儿茶素没食子酸酯和儿茶素没食子酸酯含量相似，其他儿茶酚化合物含量较少。

表 3. 瓶装茶叶样品的成分和来源国家

瓶装茶叶样品	来源国家/地区	成分
A	日本	未知
B	日本	纯净水，绿茶，抗坏血酸
C	台湾	矿泉水，绿茶，维生素 C，天然香料
D	日本	水，绿茶，抗坏血酸
E	日本	珍珠麦，糙米，发芽米，绿茶，大麦，鱼腥草，菊苣，藜麦，明日叶，维生素 C
F	日本	乌龙茶，puaru 茶，绿茶，红茶，菊苣，大豆，芝麻，维生素 C

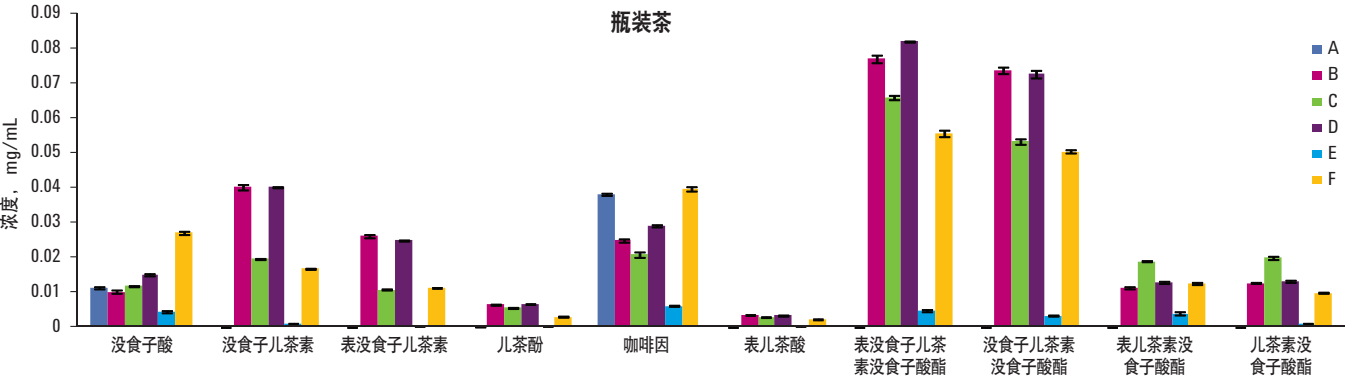


图 6. 六种瓶装茶叶样品：3 种绿茶（2 种来自日本 [B,D]，1 种来自台湾 [C]），1 种大麦茶叶混合物 (E)，1 种乌龙茶混合物 (F)，1 种未知 (A)

作为图 6 中的瓶装茶叶样品的比较,图 7 和图 8 分别代表新泡绿茶和红茶样品。如果茶包的浸泡时间为六到十分钟时,两种新泡茶样品能显示出大多数化合物的峰浓度。在这个优化浸泡时间之后,两种样品中的化合物开始降解。最显著的是表没食子儿茶素没食子酸酯,60 分钟以后降解至不到最高浓度的 50%。有意思的是表没食子儿茶素没食子酸酯在新泡绿茶样品中的浓度比瓶装绿茶样品高很多。

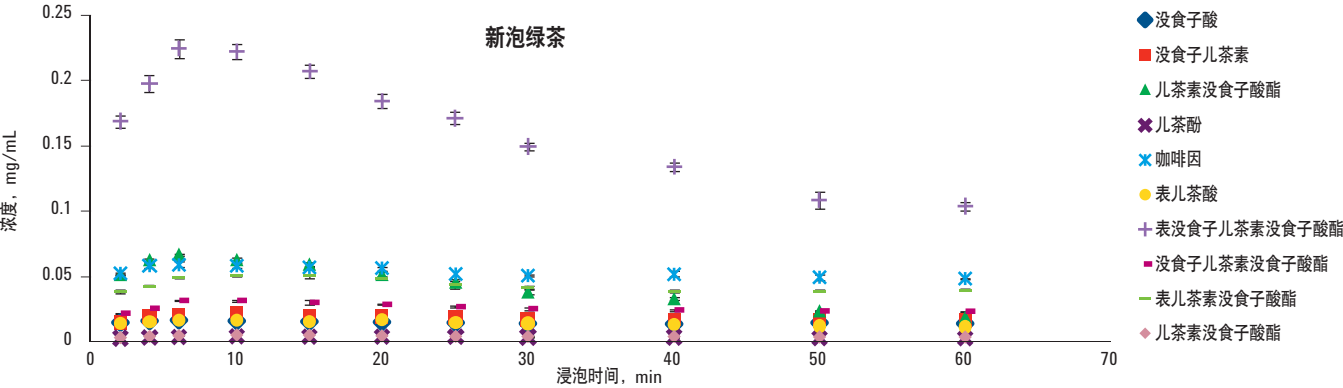


图 7. 新泡绿茶样品; 将 1 种绿茶包商品浸泡于 6 oz 刚沸的水中, 按不同浸泡时间取样

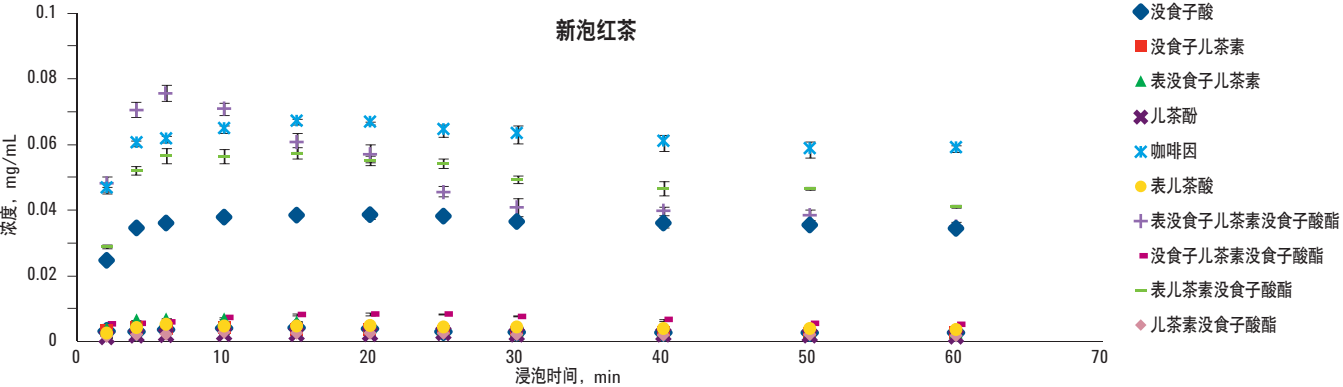


图 8. 新泡红茶样品; 将 1 种茶包商品浸泡于 6 oz 刚沸的水中, 按不同浸泡时间取样

图 9 显示脏样品在高压 (550 bar) 下进行超过 1500 次进样的色谱柱寿命研究, 没有出现压力增加或峰变宽的现象。绿茶样品用绿茶商品包浸泡在 6 oz 沸水中六分钟, 不经过过滤或稀释, 直接高效液相色谱进样分析。样品一天更换两次, 这是由于儿茶酚普遍降解 (但咖啡因相对稳定)。Agilent Poroshell 120 SB-C18 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm) 色谱柱的 2 μm 滤头很适合分析脏样品, 因为它比亚 2 μm 色谱柱中的 0.5 μm 滤头更能防止堵塞。

结论

本文将分析绿茶中儿茶酚的原始高效液相色谱方法成功地从全多孔 Agilent ZORBAX SB-C18, 1.8 μm 色谱柱转移到了表面多孔的 Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.7 μm 色谱柱上。两根色谱柱的选择性极为相似, 所以无需调整方法就可以保持十种化合物的分离度。建立了全部化合物的高度线性校正曲线, 定量分析了不同的瓶装茶叶样品和新泡茶茶叶样品, 并比较了儿茶酚的含量。使用 Poroshell 120 色谱柱较大的 2 μm 滤头用于色谱柱寿命测试, 结果表明脏样品在高压下超过 1500 进样后色谱图上没有出现不良效果。

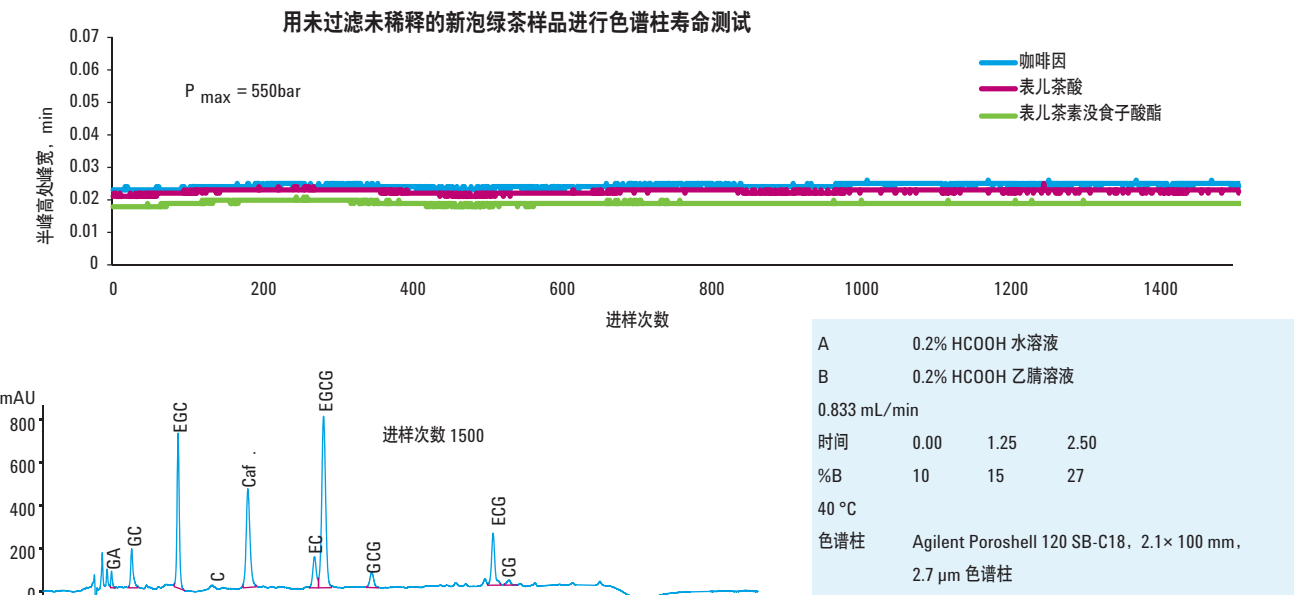


图 9. 使用未过滤未稀释的新泡绿茶样品进行 1500 进样的色谱柱寿命测试, 结果表明没有出现峰变宽或压力增加的情况

参考文献

1. A. Drewnowski, C. Gomez-Carneros, Bitter Taste, Phytonutrients, and the Consumer: A Review, The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 72, Issue 6, December 2000, Pages 1424-1435.
2. A. Dullo, C. Duret, D. Rohrer, L. Girardier, N. Mensi, M. Fathi, P. Chantre, J. Vandermander, Efficacy of a Green Tea Extract Rich in Catechin Polyphenols and Caffeine in Increasing 24-hour Energy Expenditure and Fat Oxidation in Humans, American Journal of Clinical Nutrition, Volume 70, Issue 6, December 1999, Pages 1040-1045.
3. E. Roberts, The Chemistry of Tea Manufacture, Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 9, Issue 7, July 1958, Pages 381-390.
4. H. Graham, Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry, Journal of Preventative Medicine, Volume 21, Issue 3, May 1992, Pages 334-350.
5. T. Yoshida, R. Majors, H. Kumagai, High-Speed Analysis using Rapid Resolution Liquid Chromatography on ZORBAX column packed 1.8 μm Particles, Journal of Separation Science, Volume 29, Issue 16, November 2006, Pages 2421-2432.

www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司对本资料中包含的错误, 以及由于提供、展示或使用本材料造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物中的信息、说明和性能指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011
2011年4月14日 中国印刷
5990-7824CHCN



Agilent Technologies