

# HPLC-MS<sup>n</sup>对普洱茶各萃取组分与茶褐素中化学成分的分析

郭雪梅, 梁玉红, 陈欣, 张梁\*

(安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** 普洱茶是一类具有多种保健功效的后发酵茶, 茶褐素是其重要的功能成分。茶褐素是普洱茶在渥堆过程中形成的一类结构非常复杂的混合物。茶褐素的主要成分是一类黄烷-3-醇的微生物代谢产物, 其中以 Puerins I-VIII 为代表。利用系统的有机溶剂萃取, 获得普洱茶不同萃取物和茶褐素组分, 对获得的组分进行多酚类成分分析, 发现在茶褐素部位未检出 EC、GC、ECG, 其中可可碱含量明显高于其他萃取部位。采用高效液相色谱-质谱联用法 (LC-MS<sup>n</sup>) 对普洱茶各萃取组分和茶褐素组分进行成分分析, 比较普洱茶茶褐素与其他萃取物之间的化学成分差异, 发现了茶褐素部位的主要标志性代谢产物普洱茶素。

**关键词:** 普洱茶; 茶褐素; LC-MS<sup>n</sup>; 成分分析

中图分类号: TS272.54

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)06-0853-05

## Analysis of chemical compounds of theabrownine from pu-erh tea using HPLC-MS<sup>n</sup>

GUO Xuemei, LIANG Yuhong, CHEN Xin, ZHANG Liang

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Pu-erh tea is a kind of post-fermented tea products, the bioactive polyphenols and theabrownine of which possess varieties of healthcare functions. Theabrownine is a type of structurally complicated tea pigments, which are formed during the piling fermentation of ripened pu-erh tea. The different fractions and theabrownine of ripened pu-erh tea were separated using organic solvents' extraction, and subsequently were compared polyphenols chemically using high-performance liquid chromatography. EC, GC and ECG were not detected in the theabrownine. However, Theabrownine of theabrownine is higher than other extractions. The puerines were identified as the special component in theabrownine by using high-performance liquid chromatography coupled mass spectrum (LC-MS<sup>n</sup>).

**Key words:** Pu-erh tea; theabrownine; LC-MS<sup>n</sup>; composition analysis

普洱茶是中国云南省特有的后发酵黑茶品种。普洱毛茶在经过加水-渥堆-翻堆-装袋-出袋-晒干等工序, 让其快速红转而成普洱熟茶<sup>[1]</sup>。渥堆是普洱熟茶加工过程中一道重要工序, 它促进了茶叶内含物的转化以及茶褐素的生成, 形成了普洱熟茶独有的品质特征。经过渥堆之后, 茶多酚尤其是其中的儿茶素物质显著地降低, 但是没食子酸成分含量明显升高<sup>[2]</sup>。李连喜等<sup>[3]</sup>对茶褐素进行研究, 结果发现茶褐素是一类十分复杂的化合物, 除含有多酚类成分的氧化聚合、缩合产物外, 还含有蛋白质、氨基酸、糖类、核酸等结合物。Gong 等<sup>[4]</sup>人利用

CP-Py-GC-MS<sup>[4]</sup> (热解气相色谱光谱分析) 方法对普洱茶茶褐素的成分进行分析, 结果发现其主要成分有生物碱、酚类、含氮化合物、烃类、酮类、呋喃、乙醇、脂肪酸、酯类和胺类等。吕海鹏<sup>[5]</sup>对普洱茶的化学成分进行分析, 测定了普洱茶中的儿茶素、咖啡碱、茶多糖、蛋白质等化合物的含量, 结果发现普洱中的儿茶素主要是以非酯型的儿茶素形式存在, 其中表儿茶素(EC)含量较高。

利用传统分析天然产物化学的手段和波谱解析技术, 我们前期在普洱茶中发现了一类属于黄烷-3-醇的微生物代谢产物 Puerins I-VIII<sup>[6]</sup>。此外, 我们

收稿日期: 2016-05-03

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31201335)和安徽省自然科学基金青年项目(1308085QC51)共同资助。

作者简介: 郭雪梅, 硕士研究生。E-mail: 1175030129@qq.com

\* 通信作者: 张梁, 博士, 副教授。E-mail: zhangliang@ahau.edu.cn

还利用各种色谱、波谱技术对普洱茶的化学成分进行了分离纯化,鉴定了普洱熟茶中的11个黄酮类化合物。研究发现普洱茶素 Puerins I-VIII 属于黑茶中儿茶素的微生物转化成分,属于黑茶的标志性代谢产物。一般认为茶褐素是黑茶,尤其是普洱茶中的特异性成分。但是,茶褐素组分的化学成分与这些普洱茶素类成分是否具有关联,尚缺少细致的研究。为了探明茶褐素部分的化学成分结构及其组成,作者用液相色谱-质谱联用(LC-MS<sup>n</sup>)对茶褐素部位的化学成分进行了分析,并且通过与普洱茶其它非茶褐素部位的成分进行对比,鉴定了茶褐素部位的主要标志性代谢产物—普洱茶素。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究收集的普洱茶是由黎明茶厂提供。样品批号为勐海熟茶 2010 八角亭 7590 熟饼。在生产过程中,茶叶鲜叶经过杀青、揉捻、晒干制成晒青毛茶,再经后发酵、蒸揉、成型制成普洱茶成品。

### 1.2 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(配有 Waters 1525 Binary HPLC 泵, Waters 2707 自动进样针, Waters 2489 UV/Visible 检测器), (Waters 公司, 美国); 色谱柱 Agilent SB-aq C18 (4.6×250 mm, 5 μm), (Agilent Technology 公司, 美国)。TSQ Vantage 三重四极杆液相色谱-质谱联用仪(Thermo Fisher 科技公司, 美国), 包括 UltiMate3000、UHPLC、自动进样器、柱温箱及 TSQ 质谱仪。KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AB104-N 电子分析天平(Mettler Toledo 公司, 瑞士); EYELA 旋转蒸发仪(东京, 日本); AV400 型核磁共振仪(Bruker 公司, 美国); VORTEX-GENIE2 漩涡混合器(Scientific Industries 公司, 美国); 无水乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇, 以上试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 甲醇, 乙腈均为色谱纯。

### 1.3 样品的制备

取普洱茶 5 kg, 粉碎, 无水乙醇浸提 2 次, 料液比 1:5, 浸提 24 h, 抽滤, 无水乙醇溶液减压浓缩得到浸膏 A。茶渣用 90 °C 水浸泡 6 h, 抽滤, 滤液分别用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇三种有机溶剂依次萃取 2 次, 减压浓缩分别得到二氯甲烷浸膏 B、乙酸乙酯浸膏 C、正丁醇浸膏 D; 水相减压浓缩, 加入无水乙醇, 静置 24 h, 抽滤, 收集沉淀干燥后即得茶褐素 F, 将水相继续减压浓缩, 得到浸膏 E。

准确称量无水乙醇部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水相部位、茶褐素样品各 10 mg, 1 mL 50% 甲醇溶液溶样, 先混旋 3 min, 然后超声 20 min, 13000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液, 将上清液稀释 5 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

### 1.4 各萃取物测定的 HPLC 条件

按照文献[7]建立的茶多酚类成分的分析方法, 对主要的化合物进行了含量测定。HPLC 条件: 流动相 A 为 0.2% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈。运行时间为 60 min, 梯度洗脱条件如下: 甲酸水(A)-乙腈(B) (V/V), 95:5~70:30 (0~60 min); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 278 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 5 μL, 测定各个萃取物组分和茶褐素主要化学成分的含量。

### 1.5 UPLC-MS 分析

UPLC 条件: 流动相 A 为 0.05 % 甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱条件: 0~2 min, A: 95%; 2~9 min, A: 95%~72%; 9~11 min, A: 72%~10%; 11~13 min, A: 10%; 13~17 min, A: 10%~95%。检测波长: 280 nm, 柱温 30 °C±5 °C, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 5 μL。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 源电压 3.5 kV, 毛细管温度 325 °C, 毛细管电压 35 kV, 壳气压 172.375 kPa, 辅助气压 82.74 kPa; 采用全离子扫描方式, 扫描范围(质荷比, *m/z*) 100~2000。

### 1.6 茶褐素中普洱茶素的分离纯化和鉴定

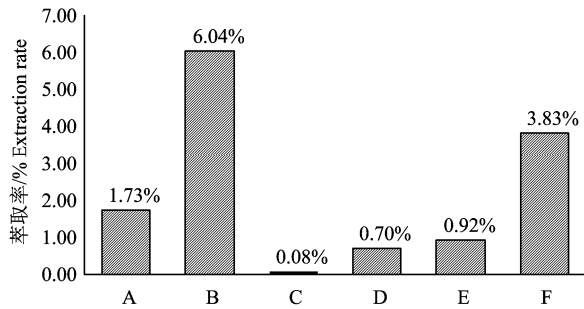
将茶褐素部位样品通过 HPD700 大孔吸附树脂, 用醇水作为洗脱剂, 洗脱梯度分别是 5%、10%、15%、20%、50% 和 95% 的乙醇。减压浓缩各层洗脱剂下的溶液, 取 20% 乙醇洗脱下的干燥物质。用纯水溶解样品, 将该物质通过 ODS 反相柱, 分别用 20%、40%、60%、80% 和 100% 的甲醇洗脱。将各梯度下的溶液减压浓缩。将 20% 梯度下的干燥物质用纯水溶解, 将该物质通过 HPLC 进行分离制备。HPLC 条件: 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水, 梯度洗脱条件: 0~12 min, A: 25~48; 12~18 min, A: 48~60; 18~30 min, A: 60~85; 30~35 min, A: 85~25; 35~45 min, A: 25。检测波长: 254 nm, 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量: 50 μL, 温度 30 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 普洱茶各萃取物和茶褐素的主要成分

热水提取普洱茶获得普洱茶水提取物, 之后依次采用二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得

到二氯甲烷 (B)、乙酸乙酯 (C) 和正丁醇 (D) 萃取物。普洱茶各组分的提取率结果如图 1 所示, 二氯甲烷提取物 (B) 含量最高, 占茶叶干重的 6.04%, 主要成分是咖啡碱和其他脂溶性物质; 乙酸乙酯萃取物主要含有黄酮醇类成分、儿茶素、以及茶黄素类物质; 正丁醇属于亲水性有机溶剂, 主要用于萃取水溶性成分, 包括糖苷类、水溶性色素等(表 1)。各个萃取物的提取率依次为二氯甲烷(B) > 茶褐素 (F) > 无水乙醇 (A) > 水相部位 (E) > 正丁醇 (D) > 乙酸乙酯 (C)。



A. 无水乙醇萃取部位; B. 二氯甲烷萃取部位; C. 乙酸乙酯萃取部位; D. 正丁醇萃取部位; E. 水相部位; F. 茶褐素。下同

A. fractions of EtOH extracts; B. fractions of dichloromethane extracts; C. fractions of ethyl acetate extracts; D. fractions of *n*-butyl alcohol extracts; E. fractions of aqueous phase; F. theabrownin. The same below

图 1 各个部位成分的提取率

Figure 1 The extraction rate of each part

表 1 各个萃取部位中主要化合物的含量

Table 1 The contents of major compounds in individual extract part

化合物 Compounds	A	B	C	D	E	F
GA	21.13	0.35	1.93	0.74	2.22	1.77
可可碱 Theobromine	12.11	10.15	16.41	6.50	31.41	31.76
EC	21.07	30.72	10.38	1.09	8.52	0.00
CAF	0.01	7.23	1.13	1.15	1.17	0.85
GC	0.00	0.00	1.69	0.00	0.78	0.00
ECG	0.06	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00

## 2.2 各个萃取物与茶褐素主要成分的 LC-MS<sup>n</sup> 分析结果

利用 LC-MS<sup>n</sup> 对各种萃取物进行成分分析, 结果如表 2 和图 2 所示。LC-MS<sup>n</sup> 分析发现无水乙醇中主要化学成分为没食子酸、羟基-甲氧基取代苯丙酸、表儿茶素等, 属于酚酸类化合物。与其他萃取物相比, LC-MS<sup>n</sup> 分析发现了茶褐素中特有的质谱信号。离子碎片峰也能够提供重要的信息。可以通

过这些离子碎片信号对一些缺少标准物质对照的色谱峰进行推导。例如, 在 7.80~8.96 min 的时间段内检测到[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 416.13, 通过分析发现此化合物的分子量 MW 为 417, 经过与已报到文献相比, 其分子量 MW 与 Puerines V-VIII 的分子量相同。LC-MS<sup>n</sup> 对[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 416.13 进行碰撞诱导解离 (CID), 二级碎片离子 *m/z* 372.21, 354.19, 330.20, 271.10, 219.06, 这些碎片离子与 Puerines V、VI、VII、VIII 的碎片离子相同<sup>[6]</sup>, 进一步验证了茶褐素部位中 Puerines V、VI、VII 和 VIII 的存在。

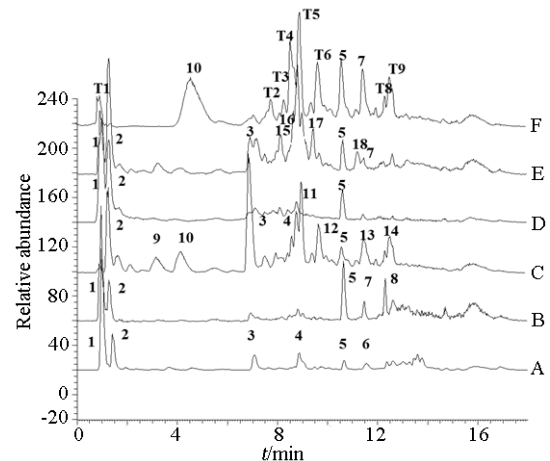


图 2 各个萃取部位化学成分的 LC-MS 的 TIC

Figure 2 The total ion chromatography of LC-MS of each extract part

本试验发现茶褐素部位的物质是由槲皮素, 山奈酚还有大量的糖构成的。在此过程中茶褐素部位的物质是可以结合 1 到 4 个不同糖苷元, 形成一系列以槲皮素和山奈酚为母核的黄酮氧苷的化合物。

Peak 11 准分子离子峰为[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 463.08, 其分子量为 464。以[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 463.08 为母离子, 通过 CID 获得其二级碎片离子 *m/z* 301.03 (-146/鼠李糖)。推断其标志性离子 *m/z* 301.14 为槲皮素的准分子离子峰。可以推导 Peak 11 化合物含有槲皮素母核, 1×鼠李糖基团。

Peak 14 准分子离子峰为[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 739.16, 其分子量为 740, 以[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 739.16 为母离子, 通过 CID 获得其二级碎片离子 593.16 (-146/鼠李糖), *m/z* 447.32 (-146/鼠李糖), *m/z* 284.95 (葡萄糖-H<sub>2</sub>O) 推断其标志性离子 *m/z* 284.95 为山奈酚的准分子离子峰。可以推导 Peak 14 化合物含有山奈酚母核, 2×鼠李糖基团和 1 葡萄糖缩水基团。

Peak 16 准分子离子峰为[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 609.14, 其分子量为 610。以[M-H]<sup>-</sup> *m/z* 609.14 为母离子, 通过 CID 获得其二级碎片离子 *m/z* 463.0 (-146/鼠李糖),

表 2 普洱茶各组分中主要化学成分的 LC-MS 结果

Table 2 The identification of compounds from individual extract part of ripened pu-erh tea

编号 No.	保留时间/min Rt	Negative <i>m/z</i>	分子量 MW	MS <sup>n</sup>
1	0.96	390.90[2M-H], 194.95[M-H]	196	176.93, 158.81
2	1.42	237.0[M+CH <sub>3</sub> CHCHCOOH-H], 339.03[2M-H], 169.01[M-H]	170	124.90
3	7.06	579.15 [2M-H], 289.07 [M-H]	458	248.96, 180.97, 146.96, 129.97, 112.98
4	8.60	883.17[2M-H], 441.08[M-H]	442	331.11, 289.03, 271.04, 168.93
5	10.67	723.50[M+HCOOH-H], 713.47[M+2H <sub>2</sub> O-H]	678	677.44, 451.36, 225.10
6	11.53	603.07[2M-H], 301.06 [M-H]	302	179.02, 150.97
7	11.46	949.06[M-H]	950	903.58, 677.49, 451.6
8	12.31	421.18 [M-H]	422	375.18, 301.21, 227.04
9	3.24	611.14[2M-H], 304.99[M-H]	306	221.12, 178.98, 168.97
10	4.24	579.15[2M-H], 335.07[M+HCOOH-H], 289.07[M-H]	290	288.96
11	9.01	463.08[M-H]	464	301.03
12	9.73	447.09[M-H]	448	284.01
13	11.57	603.07[2M-H], 301.06 [M-H]	302	179.02, 150.97
14	12.60	739.16[M-H]	740	593.16, 447.32, 284.95
15	8.16	631.06[M+CH <sub>3</sub> CHCHCOOH-H], 563.14[M-H]	564	473.07, 443.17, 353.13, 383.09
16	8.87	609.14[M-H]	610	463.00, 301.08
17	9.40	593.15[M-H]	594	549.13, 447.13, 285.01
18	11.23	901.23[M-H]	902	755.23, 609.20, 301.14
T1	0.95	191.05[M-H]	192	126.95, 84.82
T2	7.80	416.13[M-H]	417	372.21,
T3	8.32	400.14[M-H]	401	356.17
T4	8.58	400.14[M-H]	401	356.17
T5	8.96	400.14[M-H]	401	356.17
T6	9.69	447.09 [M-H]	448	323.04, 301.03, 284.05, 255.03
T7	12.38	571.08[2M-H], 285.04[M-H]	286	419.10, 284.98
T8	12.56	327.21 [M-H]	328	309.19, 291.19, 229.13, 221.01, 171.00

A	B	C	D	E	F	Identification 鉴定
1	1		1	1		Hydroxy-methoxy-phenylpropionic acid
2	2	2	2	2		Gallic acid
3		3		3		EC
4		4				ECG
5	5	5	5	5	5	Unknown
6						Quercetin
	7				7	Unknown
	8					Unknown
		9				EGC
		10			10	C
		11				Quercetin-glucopyranoside
		12				Quercetin-rhamnoside
		13				Quercetin
		14				Kaempferol-rhamnopyranosyl-glucopyranosyl- glucopyranoside
			15			
			16			Quercetin-rhamnopyranosyl-glucopyranoside
			17			Kaempferol-rhamnopyranosyl-glucopyranoside
			18			Quercetin- rhamnopyranosyl-rhamnopyranosyl-rhamnopyranosyl-glucopyranoside
				T1		Phenolic acid
				T2		puerins V, VI, VII, VIII
				T3		puerins I, II, III, IV
				T4		puerins I, II, III, IV
				T5		puerins I, II, III, IV
				T6		Quercetin-rhamnopyranoside
				7		Kaempferol
				T8		Kaempferol-rhamnopyranosyl-glucopyranosyl-glucopyranoside

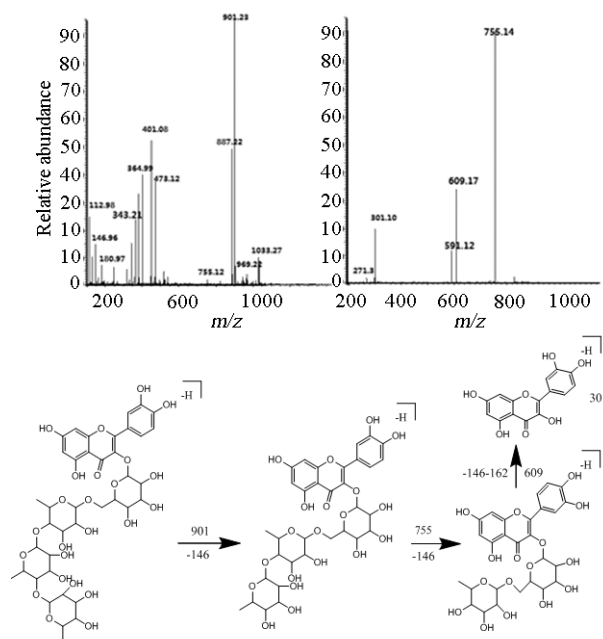


图 3 Peak18 的色谱峰的质谱裂解碎片解析

Figure 3 Elucidation of peak18 by mass fragments

$m/z$  301.14 (鼠李糖+葡萄糖- $H_2O$ ) 推断其标志性离子  $m/z$  301.14 为槲皮素的准分子离子峰。通过对碎片离子的分析, 可以推导 Peak 16 化合物含有槲皮素母核, 1×鼠李糖基团和 1 葡萄糖缩水基团。

Peak17 准分子离子峰为 $[M-H]^-$   $m/z$  593.15, 其分子量为 594。以 $[M-H]^-$   $m/z$  593.15 为母离子, 通过 CID 获得其二级碎片离子  $m/z$  447.13 (-146/鼠李糖),  $m/z$  284.95 (葡萄糖- $H_2O$ ) 推断其标志性离子  $m/z$  284.95 为山奈酚的准分子离子峰。可以推导 Peak 17 化合物含有山奈酚母核, 1×鼠李糖基团和 1 葡萄糖缩水基团。

Peak18 准分子离子峰 $[M-H]^-$   $m/z$  901.23, 其分子量为 902。以 $[M-H]^-$   $m/z$  901.23 为母离子, 通过 CID 获得其二级碎片离子  $m/z$  755.23(-146/鼠李糖),  $m/z$  609.2 (-146/鼠李糖),  $m/z$  301.14 (鼠李糖+葡萄糖- $H_2O$ ) 推断其标志性离子  $m/z$  301.14 为槲皮素的准分子离子峰。通过对碎片离子的分析, 可以推导 Peak 18 化合物含有槲皮素母核, 3×鼠李糖基团和 1 葡萄糖缩水基团。其推导过程如图 3 所示。

### 2.3 茶褐素组分中普洱茶素的分离鉴定

普洱茶素:  $C_{21}H_{23}NO_7$ ; 白色无定型粉末; ESI-MS 在正离子模式下给出的离子峰为 $[2M+H]^+$   $m/z$ :

802.3,  $[M+H]^+$   $m/z$ :402.1 结合  $^1H$ -NMR 数据得出其分子式  $C_{21}H_{23}NO_7$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  4.50 (1H, brs, H-2), 3.81 (1H, *dd*,  $J=7.5$ , 13.0 Hz, H-3), 2.41 (1H, *dd*,  $J=3.5$ , 1.5 Hz, H-4), 2.70 (1H, *dd*,  $J=3.5$ , 16.4 Hz, H-4), 6.74 (1H, s, H-6), 6.65 (1H, *d*,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.63 (1H, *dd*,  $J=2.0$ , 8.0 Hz, H-6'), 2.12 (2H, m, H-3''), 2.40 (2H, m, H-4''), 5.15 (1H, s, H-5''), 2.47 (2H, m, H-6''), 0.84 (3H, *t*,  $J=6.9$  Hz, H-7''), 将其参考数据与文献[7]对比, 确定其结构为 puerins I。

### 3 讨论

就普洱茶各萃取组分进行 HPLC 成分分析, 发现茶褐素部位的成分与其他各萃取组分区别很大, 茶褐素部位的化学成分比较复杂。茶褐素部位中存在大量的糖的信号, 本试验想通过一定的方法除去里面的糖, 以便发现其中一些潜在的含量低、但结构新颖的化学成分。其中普洱茶素就是其中之一。茶褐素的分离难度大, 也造成现在对茶褐素的研究深度较浅, 希望通过分析对比可以对茶褐素做进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 周红杰. 云南普洱茶[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004.
- [2] 罗龙新, 吴小崇, 邓余良, 等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 53-60.
- [3] 李连喜. 不同制法普洱茶茶褐素及其在贮存中变化的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2005.
- [4] GONG J S, TANG C, PENG C X. Characterization of the chemical differences between solvent extracts from Pu-erh tea and Dian Hong black tea by CP-Py-GC/MS[J]. J Anal Appl Pyrol, 2012, 95: 189-197.
- [5] 吕海鹏. 普洱茶的化学成分分析及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [6] ZHOU Z H, ZHANG Y J, XU M, et al. Puerins A and B, two new 8-C substituted flavan-3-ols from Pu-er tea[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(22): 8614-8617
- [7] 张梁, 周杰, 秦金花. 多种茶叶废料中多酚类成分和咖啡碱的含量测定[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 113-116.
- [8] WANG W, ZHANG L, WANG S, et al. 8-C N-ethyl-2-pyrrolidinone substituted flavan-3-ols as the marker compounds of Chinese dark teas formed in the post-fermentation process provide significant antioxidative activity[J]. Food Chem, 2014, 152: 539-545.