

应用纪要

## 使用ACQUITY RDa检测器进行绿茶筛查

---

Lisa Reid, Lauren Mullin, Robert S. Plumb, Giorgis Isaac, Emmanuelle Claude, Jayne Kirk

Waters Corporation



---

### 摘要

一种使用Waters ACQUITY RDa检测器（一款高分辨率LC-MS飞行时间(ToF)质量分析器）对绿茶提取物进行快速、准确分析的方法。经儿茶素化合物分析证明，该仪器的动态范围高达3个数量级且质量精度高（始终在±5 ppm以内）。这款紧凑的台式飞行时间质谱仪非常适合天然产物筛查和真伪试验。

将ACQUITY RDa检测器与waters\_connect软件平台和UNIFI应用程序结合使用，数据采集和处理可在一套系统上一并执行。结合轻松定制的工作流程与谱库搜索功能，简化并加快了分析和处理过程，产生清晰显示的结果，这些结果可轻松转换为报告格式以快速制定决策。

## 优势

- 使用精确质量数和色谱特定保留时间匹配鉴定绿茶基质中的化合物
- 全面的筛查谱库可同时在正离子极性和负离子极性模式下快速处理数据
- 先进的数据可视化、处理和报告工具
- 系统性能稳定、可重现，质量精度高，对儿茶素有合适的动态范围

---

## 简介

数千年来，人们采用快速蒸煮并干燥的方式将新鲜采摘的山茶(*Camellia sinensis*)叶制成绿茶<sup>1</sup>。绿茶饮品的销量非常高，这是因为其中某些组分（例如黄酮类）具有明显的保健功效，茶叶中发现的其他化合物摄入后还可以起到娱乐消遣作用，例如咖啡因（一种甲基黄嘌呤兴奋剂和腺苷受体拮抗剂）。

绿茶含有一系列酚类化合物，特别是黄烷-3-醇类（称为儿茶素）<sup>1</sup>。据大量文献报道，绿茶中所含的儿茶素是一类具有抗炎和抗氧化特性的分子。研究人员认为，正是这些分子产生了与饮用绿茶产品相关的健康益处，例如预防癌症<sup>1,2</sup>。但是，市售绿茶中的抗氧化剂含量可能因生长条件、采摘时间、加工、储存和最终制备等因素不同而存在显著差异<sup>3</sup>。此外也有可能对健康产生不利影响，例如常见与绿茶消费品相关的肝毒性，尤其是儿茶素过量暴露以及可能被吡咯里西啶生物碱(PA)污染<sup>3</sup>。

液相色谱-质谱联用系统(LC-MS)是一种成熟、可靠的平台，适用于测量绿茶产品所含组分。这些系统能够分离各种异构体（例如，儿茶素和表儿茶素），并具有更高特异性，能够可靠地区分目标组分与其他高丰度的复杂基质分析物，例如黄酮类物质（山柰酚、槲皮素）或多酚类物质（茶倍素）。为确保检测的速度和效率，如果该方法对这些高度可变的天然化合物表现出较宽线性范围，则证明有益。

下文所述方法利用色谱保留时间、精确质量数和碎片离子谱图（基于理论谱图和分析推导得出）来鉴定已知绿茶成分。通过重点关注活性成分儿茶素，证明该系统具有较高选择性和较宽动态范围。ACQUITY RDa检测器是一种飞行时间质量分析器，相比传统的选择离子监测模式定量分析具有明显优势，因为其在“全扫描”模式下采集数据（意味着无需在检测前预选离子）。这些条件使该仪器非常适合在生产之前评估原料纯度和污染。将UNIFI应用程序与waters\_connect联用，在同一个软件平台上集中完成数据采集和处理工作，可确保整个工作流程快速、精简。

---

## 实验

### 样品描述

用25:75 v/v甲醇:水将绿茶基质（部件号：186006962，沃特世，英国威姆斯洛）稀释为浓度2.5 mg/mL的溶液，涡旋混合，超声处理30 min，然后在4 °C下以13,000 g离心10 min以除去颗粒。

用25:75 v/v甲醇:水稀释购自Sigma（英国多塞特）的100 µg/mL儿茶素标准品，绘制儿茶素标准曲线。儿茶素混标包含咖啡因以及七种常见绿茶儿茶素的认证多组分混合物：表没食子儿茶素3-没食子酸酯、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素3-没食子酸酯、没食子儿茶素、没食子儿茶素3-没食子酸酯和儿茶素3-没食子酸酯。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class FTN
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm)
柱温：	40 °C
进样体积：	10 µL
流速：	0.6 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度：	流动相A在99%下保持0.5 min，在0.5–16 min从99%减至65%，在16–18 min保持1%，然后在18–20 min重新平衡至初始条件

### 质谱条件

质谱系统：	ACQUITY RDa检测器
-------	----------------

电离模式：	负离子模式和正离子模式
采集范围：	50–2000
扫描速度：	10 Hz
毛细管电压：	0.8 kV（负离子模式），1.5 kV（正离子模式）
锥孔电压：	30 V（负离子模式），40 V（正离子模式）
碎裂锥孔电压：	60–120 V
IDC：	开
软件：	搭载UNIFI v1.9.12的waters_connect

ACQUITY RDa检测器采用SmartMS技术，可自动执行系统设置。这意味着所有校准、调谐和实时质量校正优化均在分析之前由仪器执行，并在每次进样间隙进行检查，因此无需手动操作。需要采用以下溶液：

实时校正标准液：	ACQUITY RDa实时校正标准液试剂盒（沃特世部件号：186009298）
校准液：	ACQUITY RDa检测器校正物和清洗套件（沃特世部件号：186009013）
清洗溶液：	ACQUITY RDa检测器校正物和清洗套件（沃特世部件号：186009013）

---

## 结果与讨论

LC-MS分析所用样品为市售绿茶基质和儿茶素混标，样品制备方法是：先简单稀释液体标准品或复溶冻干基质，然后离心以除去颗粒。绿茶基质未经过净化处理。

使用ACQUITY UPLC I-Class进样口和ACQUITY RDa检测器，在正离子和负离子采集模式下分析进样体积为10  $\mu\text{L}$ 的绿茶基质混标(8 mg/mL)。利用UNIFI软件，对照山茶(*Camellia sinensis*)科学数据库匹配组分。该谱库根据色谱保留时间(对于给定方法)、质量精度以及相比理论碎片离子谱图存在的碎片离子来辅助化合物鉴定。对照绿茶筛选后的UNIFI谱库(包含绿茶中常见的27种化合物)搜索生成的LC-MS数据。正离子模式数据提供了23个匹配的鉴定结果(7个结果经标准品确认, 16个推定结果仅质量精度和理论碎片匹配)。儿茶素-3-O-没食子酸酯在绿茶样品中的浓度不足以实现鉴定, 但是在混标中成功得到鉴定。负离子模式数据提供了24个匹配的鉴定结果(7个结果经标准品确认, 17个推定结果仅质量精度和理论碎片匹配)。图1所示为UNIFI的典型审查窗格, 其中清楚显示了鉴定出的化合物、色谱峰的XIC、低锥孔电压质谱图和高锥孔电压质谱图以及在样品中鉴定出的其他化合物的导航表。在通道2(碎裂锥孔电压)的质谱图中, 可以观察到母离子和碎片离子, 其保留时间与低能量质谱图相匹配。UNIFI处理信息学平台还能够对“不明”组分制表。筛选出不明化合物, 将其纳入处理部分或从中排除, 具体取决于需要确认已知成分还是进行全面筛查。

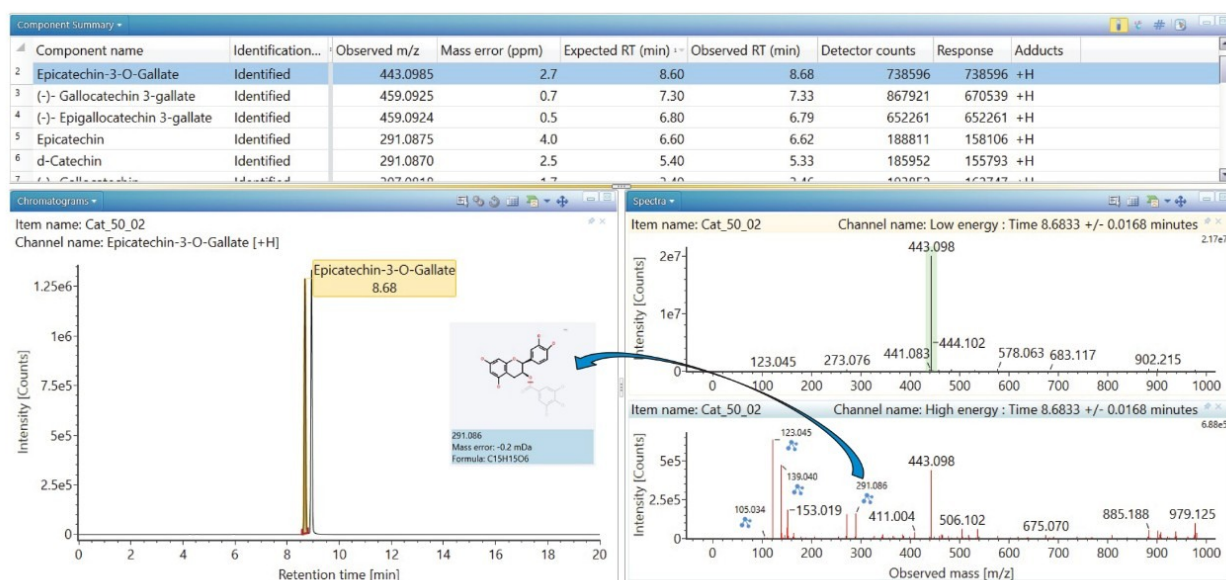


图1.UNIFI软件界面, 展示了儿茶素标准品进样的鉴定结果表, 其中包括各种化合物概要、鉴定出的表没食子儿茶素-3-没食子酸酯的XIC以及表没食子儿茶素-3-没食子酸酯的低锥孔电压和高锥孔电压质谱图。高能谱图显示了鉴定出的碎片离子, 可展开这些碎片离子以查看碎片离子质量数信息和结构, 如图所示。

除谱库搜索以外, 本研究还测试了系统动态范围, 以确保典型分析浓度下的数据可信度。在该评估中, 我们使用市售儿茶素标准品制备一系列稀释液, 浓度范围0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 每个浓度水平下进样10  $\mu\text{L}$ , 得到的柱上进样量范围为0.1 ng~250 ng。在正离子模式下执行分析, 结果表明这些化合物在ACQUITY RDa检测器上的线性范围达到2~3个数量级。柱上进样量为1 ng时, 所有8种儿茶素化合物的信噪比均大于400, 重复进样的重现性良好, %RSD小于4.7%。所有儿茶素混标的ULOQ为柱上进样量100 ng。柱上进样量为250 ng时, 色谱柱表现出过载迹象, 导致峰展宽, 但是所有化合物重复进样的重现性仍然可接受, 响应%RSD均小于

6.7%。

为评估系统在样品动态范围内的性能，本研究使用以下三种颗粒成型前浓度分析了市售绿茶基质，这三种浓度相当于绿茶组分总量为：0.8 mg/mL（稀释10倍）、8.3 mg/mL（典型分析水平）和82.5 mg/mL（浓缩10倍）。分析证明，该系统适用于检测各种样品规格以及不同样品中化合物浓度水平可能变化的内源性儿茶素。在8.3 mg/mL（绿茶组分混合物总量）的典型分析浓度下，所有化合物均处于确定的动态范围内，即各种儿茶素浓度小于10  $\mu\text{g/mL}$ （或柱上进样量为100 ng）。在10倍典型浓度83 mg/mL下，所有化合物（表没食子儿茶素-3-没食子酸酯除外，因为该化合物在高达此浓度下进样时超出了动态范围）均处于确定的系统动态范围内。8种儿茶素化合物中有5种从典型浓度稀释10倍至0.8 mg/mL后仍处于确定的动态范围内。有3种化合物低于确定的动态范围，分别是儿茶素、儿茶素-3-没食子酸酯和没食子儿茶素-3-没食子酸酯，可以看到这些化合物峰的信噪比大于3，但其响应低于柱上进样量为1 ng时的结果。

图2展示了整个分析中选定组分的响应（显示的化合物为表没食子儿茶素-3-没食子酸酯）。在显示谱图前先提供一张表格，详细列出所选的已鉴定化合物的所有分析数据、选定样品和选定组分的XIC色谱图，还有一张清晰显示分析过程中每次进样得到的化合物响应的柱形图。用户可以利用这些视图对整个分析进行直观比较，从而快速评估模式、异常或批效应。

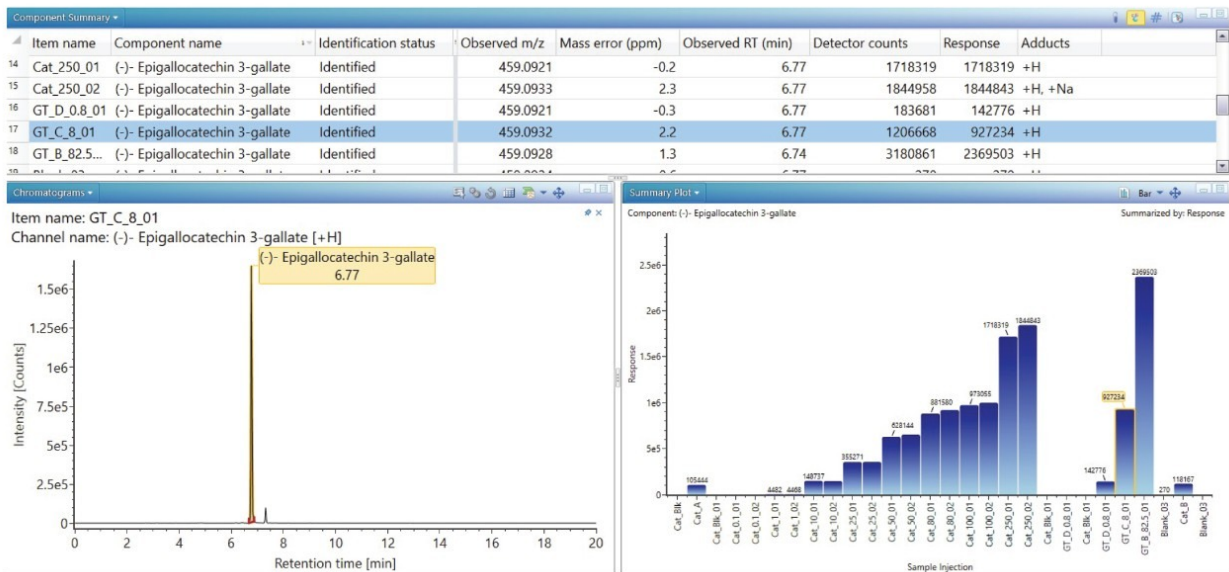


图2.展示进样表的UNIFI软件界面，其中包括每次进样的选定化合物概要、选定化合物的XIC以及汇总图，该汇总图直观地显示了分析过程中每次进样所得到的选定化合物表没食子儿茶素-3-没食子酸酯的响应。

标准品稀释系列和基质进样的分析连续采集总计12 h以上。在整个分析中，8种儿茶素标准品的色谱保留时间偏差上限均为0.05 min (3 s)，在最早洗脱的峰（没食子儿茶素）上观察到RSD上限为0.3%。

评估各标准品的质量精度，得到ppm偏差上限为±4.9，整个分析中所有化合物和进样的平均误差为±0.9 ppm。对每个样品重复进样两次，评估两次进样之间的信号强度和峰面积，所得结果在确定的仪器动态范围内，两次进样之间峰响应的变异上限为7.6%，平均变异为2.2%。在分析的开始和结束时进样儿茶素标准品，评估整个分析过程中的信号强度和峰面积稳定性。结果表明，在第1次进样与第35次进样之间（分析时间>12 h），在所有儿茶素标准品中仅观察到信号计数发生3.6%（平均值）的变化，计算出的响应差异仅为3.6%（平均值）。

---

## 结论

ACQUITY RDa检测器为天然产物筛查应用（包括但不限于绿茶分析）提供了一种稳定且有效的工具。该LC-MS系统具有优异的信号重现性、良好的质量精度和宽泛的动态范围，非常适合在天然产物分析实验室中使用。与UNIFI软件包结合使用，谱库搜索、数据处理和报告生成过程简单又快速。所有数据采集和处理工作全都集中在一个软件平台上完成，无需导出数据，因此不会影响数据完整性，并完全符合启用审计追踪的合规要求。

---

## 参考资料

1. Pinto, G; Illiano, A; Carpentieri, A; Spinelli, M; Melchiorre, C; Fontanarosa, C; Di Serio, M; Amoresano, A. Quantification of Polyphenols and Metals in Chinese Tea Infusions by Mass Spectrometry, *Foods* 9(6):835; June 2020.
2. Forester, S; Lamert, J. Antioxidant Effects of Green Tea, *Mol Nutr Food Res.*2011 Jun; 55(6): 844–854.
3. Younes, M; Aggett, P; et al.EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Scientific Opinion on the Safety of Green Tea Catechins, *EFSA Journal* 16(4); April 2018.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

UNIFI天然产物解决方案 <<https://www.waters.com/134777097>>

720007226ZH, 2021年4月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.