

董方, 张群峰, 阮建云. 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定茶叶中黄酮醇糖苷种类及含量[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 204-212.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.01.027

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定茶叶中黄酮醇糖苷种类及含量

董方^{1,2}, 张群峰², 阮建云²

(1. 江西省农业科学院园艺研究所, 江西 南昌 330200; 2. 中国农业科学院茶叶研究所, 浙江 杭州 310008)

摘要: 基于超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)联用技术对茶叶中黄酮醇糖苷(FGs)种类及含量进行测定并对提取方式和检测条件进行优化。用75%(体积分数)甲醇水溶液提取目标化合物,再用Waters Acquity HSS T3色谱柱(粒径为1.8 μm,长度×内径为100.0 mm×2.1 mm)分离目标化合物,以含有0.1%(体积分数)甲酸的乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾正离子源(ESI⁺)与质谱多反应监测(MRM)方法对成品茶中15种FGs进行定量测定。结果表明,在0.1~20.0 μg/ml的质量浓度范围内FGs的基质标准曲线的线性关系良好,其检测限(LOD)为0.08~0.23 μg/L,定量限(LOQ)为0.25~0.76 μg/L,相对标准偏差(RSD)为1.30%~2.80%,出峰时间为3.60~7.40 min。与现有最优检测技术相比,超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法具有分析速度快、灵敏度高、稳定性好等特点,可为提高茶叶品质成分的检测效率提供参考。

关键词: 茶叶; 黄酮醇糖苷; 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法; 质谱多反应监测; 优化

中图分类号: O658; TS272 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)01-0204-09

Determination of flavonol glycosides in teas by ultra-high performance liquid chromatography combined with triple four-bar tandem mass spectrometry

DONG Fang^{1,2}, ZHANG Qun-feng², RUAN Jian-yun²

(1. Institute of Horticulture, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

Abstract: The extraction methods and detection conditions of flavonol glycosides (FGs) in teas were optimized based on ultra-high performance liquid chromatography combined with triple four-bar tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS) technology, and the varieties and contents were determined. The target compounds were extracted with 75% (volume fraction) methanol aqueous solution, separated on Waters Acquity HSS T3 column (particle size was 1.8 μm, length × inner diameter was 100.0 mm × 2.1 mm), and gradient elution was carried out using acetonitrile solution containing 0.1% (volume fraction) formic acid as moving phase. Positive electrospray ionization (ESI⁺) and mass spectrometry multiple reaction monitoring (MRM) methods were used to quantitatively determine 15 flavonol glycosides in made teas. The results indicated that the matrix standard curve of FGs showed a good linearity in the concentration range of 0.1–20.0 μg/ml, the limit of detection (LOD) was 0.08–0.23

μg/L, the limit of quantity (LOQ) was 0.25–0.76 μg/L, the relative standard deviation (RSD) was 1.30%–2.80%, and the peak out time was 3.60–7.40 min. Compared with the existing optimal detection technology, UPLC-QqQ-MS/MS method has fast analysis speed, high sensitivity and good stability, which can provide reference for improving the detection efficiency of tea quality components.

收稿日期: 2020-05-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0200900); 国家茶产业技术体系建设专项(CARS-19)

作者简介: 董方(1992-), 男, 陕西西乡人, 硕士研究生, 研究方向为茶树栽培生理与生态。(E-mail) 18305811752@163.com

通讯作者: 张群峰, (E-mail) hill@tricaas.com

Key words: tea; flavonol glycosides; ultra-high performance liquid chromatography combined with triple four-bar tandem mass spectrometry; mass spectrometry multiple reaction monitoring; optimization

黄酮醇糖苷(Flavonols glycosides, FGs)是茶叶中除儿茶素外较为重要的多酚类物质之一,大都由黄酮醇苷元(杨梅素、槲皮素、山柰酚等)或黄酮苷元(芹菜素等)与糖分子(葡萄糖、半乳糖、芸香糖等)结合形成O-糖苷^[1-2]。已有研究发现,FGs不仅对茶叶中的苦涩味及茶汤的光泽度、亮度具有重要作用^[3-6],而且具有类黄酮物质的生理学共性,在生物体中发挥着抗氧化、清除活性氧自由基及抵御紫外线、抗菌抑菌等作用^[7-8]。

国内外有很多FGs检测方法的报道,目前常用的检测方法主要包括紫外分光光度法(UV spectrophotometer)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱检测法(LC-MS)、超高效液相色谱法(UPLC)、毛细管电泳法(CE)及电化学检测法(ED)等^[9]。超高效液相色谱是一种基于HPLC系统开发的色谱技术,它充分利用了小粒度色谱柱、超高压液相色谱泵的优势,能够更灵敏、更快速地实现分离检测,目前已在茶(*Camellia sinensis* L.)、洋葱(*Allium cepa* L.)和银杏(*Ginkgo biloba* L.)等多种植物的FGs检测中得到应用^[10-12]。Kim等^[13]采用UPLC-PDA(超高效液相色谱-二极管阵列)建立了针对荞麦、红茶、野生欧芹FGs类化合物的检测方法,共有12种FGs得到了较好的分离,但是其含量的线性范围较大,为0.88~14.00 mg/kg;Jiang等^[14]首次采用UPLC检测到绿茶、乌龙茶和红茶中18种FGs类化合物,但是分离时间较长,为30~60 min;刘阳等^[2]研究了FGs在绿茶中的浸出特性,并基于常规HPLC检测方法,分离并定量了11种与茶汤滋味相关性最高的黄酮苷类物质,但也存在分离时间长、定量准确度低的问题。UPLC与MS/MS的联用,已经成为植物化学组分研究的新趋势,为茶叶中化合物的痕量分析提供了定量保证。本研究基于多种FGs标准品,在已有研究结果的基础上,采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS),并结合紫外光谱、质谱参数和色谱保留规律,测定茶叶中FGs种类和含量,以期实现快速分离和准确鉴定茶叶中的FGs。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

绿茶成品茶(西湖龙井)产自浙江省杭州市西

湖区中国农业科学院茶叶研究所示范园(120°5'21.39"E,30°10'57.19"N),原料品种为龙井43,选用清明前1芽1叶,由杭州龙冠实业公司提供;红茶成品茶(滇红金针)产自云南省农业科学院茶叶研究所科研试验基地(100°25'55.19"E,21°59'25.76"N),原料品种为云南勐海大叶种,选用清明前1芽1叶,由勐海县云茶科技有限公司提供。

甲醇(质谱级)、乙腈(质谱级),产自德国Merck公司;甲酸(色谱级)、杨梅素-3-半乳糖苷(M-3-Ga)标准品、杨梅素-3-葡萄糖苷(M-3-G)标准品、槲皮素-3-半乳糖苷(Q-3-Ga)标准品、槲皮素-3-葡萄糖苷(Q-3-G)标准品、槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖苷(Q-3-GaRh)标准品、槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷(Q-3-GRh)标准品、山柰酚-3-半乳糖苷(K-3-Ga)标准品、山柰酚-3-葡萄糖苷(K-3-G)标准品、山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷(K-3-GaRh)标准品、山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷(K-3-GRh)标准品,所有标准样品纯度 $\geq 98\%$,均产自美国Sigma公司;试验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器与设备

艾卡A11基本型分析研磨机,产自德国IKA公司;BT125D型电子分析天平,产自德国Sartorius公司;Thermo Heraeus Fresco 17微量冷冻离心机,产自美国赛默飞世尔科技公司;KQ-500E型超声波清洗机,产自昆山超声波仪器公司;超高效液相色谱-三重四级杆-串联质谱联用仪(ACQUITY UPLC-QqQ-MS/MS H-Class),配有ACQUITY UPLC二极管阵列(PDA)检测器、Acquity HSS T3色谱柱(粒径为1.8 μm ,柱长 \times 内径为100.0 mm \times 2.1 mm),产自美国Waters公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的制备 准确称取M-3-Ga标准品、M-3-G标准品、Q-3-Ga标准品、Q-3-G标准品、Q-3-GaRh标准品、Q-3-GRh标准品、K-3-Ga标准品、K-3-G标准品、K-3-GaRh标准品、K-3-GRh标准品,分别加入75%(体积分数)甲醇溶液振荡超声处理(振荡频率为3 000 r/min,超声功率为40 kHz,超声时间为10 min),配制质量浓度为1.0 mg/ml的母液。用75%(体积分数)甲醇溶液稀释上述标准品的母液,配制质量浓度分别为0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、

10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作溶液。

1.3.2 供试样品的前处理 供试样品的前处理方法参照 Zhang 等^[15-16]的方法。取适量成品绿茶、成品红茶,用研磨机磨碎后精确称取 50 mg 磨碎的成品绿茶、成品红茶样品,分别溶解于 1 ml 75% (体积分数) 甲醇溶液中,用最大频率 (40 kHz) 连续超声处理 10 min,之后再于 12 000 r/min 离心 10 min,取 500 μl 上清液,加入 500 μl 75% (体积分数) 甲醇溶液稀释,然后过 0.22 μm 聚四氟乙烯 (PTFE) 滤膜,用于上机分析,每种茶设 3 个重复。

1.3.3 仪器分析条件 色谱条件:采用 Waters Acquity HSS T3 色谱柱 (粒径为 1.8 μm ,柱长 \times 内径为 100.0 mm \times 2.1 mm,产自 Waters 公司,产地为美国 Milford) 进行分离。洗脱条件参照 Zhang 等^[15,17]的方法,流动相 A 为 0.1% (体积分数) 甲酸,流动相 B 为乙腈 (混有体积分数为 0.1% 的甲酸),洗脱程序:0 min, 5% 乙腈; 0.1~3.0 min, 5%~20% 乙腈; 3.1~4.3 min, 20% 乙腈; 4.4~9.0 min, 20%~45% 乙腈; 9.1~11.0 min, 45%~100% 乙腈; 11.1~13.0 min, 100% 乙腈; 13.1~15.0 min, 回到 5% 乙腈的初始条件。所有试验的柱温均设置为 40 $^{\circ}\text{C}$,样品温度设置为 6 $^{\circ}\text{C}$,流速为 0.4 ml/min,进样

量为 2 μl ,紫外 (UV) 检测波长为 370 nm。

质谱条件:采用 Waters Xevo TQ 质谱仪 (Waters 公司,产地为 Milford, MA, USA),使用电喷雾电离源 (ESI) 正离子模式,毛细管电压设为 3.5 kV,源温度设为 150 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂温度设为 500 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气体流速设为 50 L/h,脱溶剂气体流速设为 800 L/h。

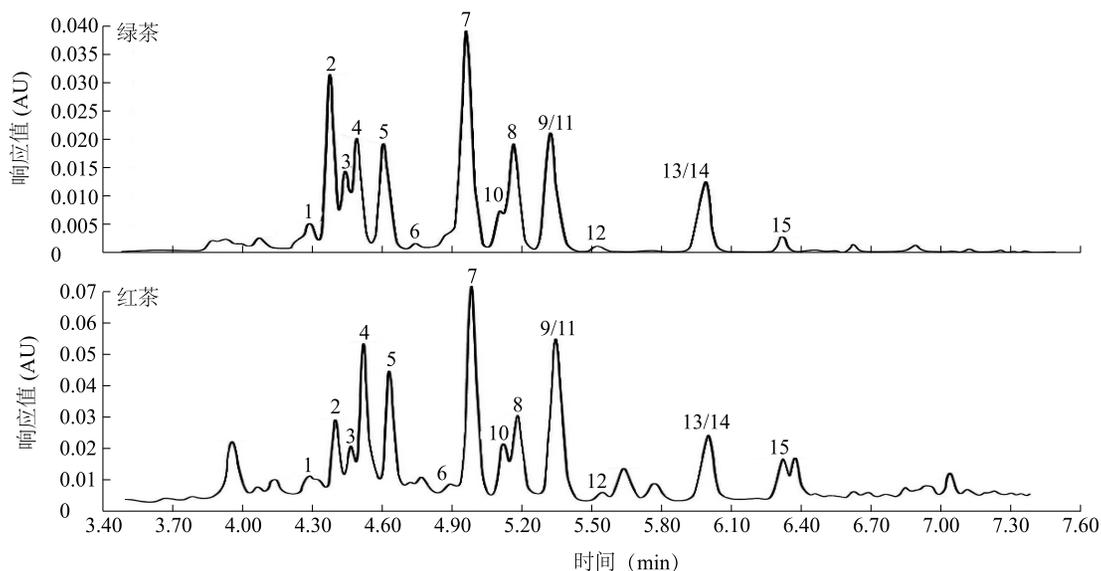
1.4 数据处理

采用 Mass Lynx 4.0 软件对 MS 检测 [含多反应监测 (MRM)] 与紫外检测器 (PDA) 检测获得的原始图谱进行质谱峰或紫外光谱峰的提取和积分。标准曲线的绘制、FGs 含量的换算采用 Excel 2010。

2 结果与分析

2.1 茶叶中黄酮醇糖苷的定性检测

本研究在相同色谱条件、相同质谱条件下对不同茶叶中的黄酮醇糖苷 (FGs) 进行 UPLC 分析和 MRM 分析,结果表明,不同组分的 FGs 化合物在 3.60~7.40 min 全部洗脱分离,对应的 UPLC 色谱图见图 1,根据最大波长吸光度,利用 FGs 标准品,结合二级质谱碎片,并与参考文献 [10]、[14]、[17]、[18] 比对,鉴定出茶叶中 15 种 FGs,相关定性参数见表 1。



1: 杨梅素-3-葡萄糖-鼠李糖苷 (M-3-GRh); 2: 杨梅素-3-半乳糖苷 (M-3-Ga); 3: 杨梅素-3-葡萄糖苷 (M-3-G); 4: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (Q-3-GaRhG); 5: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (Q-3-GRhG); 6: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖苷 (Q-3-GaRh); 7: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷 (Q-3-GRh); 8: 槲皮素-3-半乳糖苷 (Q-3-Ga); 9: 槲皮素-3-葡萄糖苷 (Q-3-G); 10: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (K-3-GaRhG); 11: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (K-3-GRhG); 12: 山柰酚-3-半乳糖苷 (K-3-GaRh); 13: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷 (K-3-GRh); 14: 山柰酚-3-半乳糖苷 (K-3-Ga); 15: 山柰酚-3-葡萄糖苷 (K-3-G)。

图 1 西湖龙井 (绿茶) 与滇红金针 (红茶) 中黄酮醇糖苷在 370 nm 波长下的超高效液相色谱 (UPLC) 结果

Fig.1 Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) results of flavonol glycosides in Westlake Longjing (green tea) and Dianhong Jinzhen (black tea) detected at the wavelength of 370 nm

表 1 茶叶中黄酮醇糖苷的定性参数

Table 1 Qualitative parameters of flavonol glycosides in teas

| 峰序号 | 黄酮醇糖苷 (FGs) | 质荷比 (m/z) | 保留时间 (min) | 主要二级质谱碎片 MS/MS (m/z) |
|-----|-------------|---------------|------------|--------------------------|
| 1 | M-3-GRh | 626.15 | 4.29 | 319 |
| 2 | M-3-Ga* | 480.09 | 4.40 | 319 |
| 3 | M-3-G* | 480.09 | 4.47 | 319 |
| 4 | Q-3-GaRhG | 772.21 | 4.52 | 303 |
| 5 | Q-3-GRhG | 772.21 | 4.64 | 303 |
| 6 | Q-3-GaRh* | 610.15 | 4.77 | 303 |
| 7 | Q-3-GRh* | 610.15 | 4.99 | 303 |
| 8 | Q-3-Ga* | 464.10 | 5.19 | 303 |
| 9 | Q-3-G* | 464.10 | 5.35 | 303 |
| 10 | K-3-GaRhG | 756.21 | 5.12 | 287 |
| 11 | K-3-GRhG | 756.21 | 5.35 | 287 |
| 12 | K-3-GaRh* | 594.16 | 5.52 | 287 |
| 13 | K-3-GRh* | 594.16 | 6.01 | 287 |
| 14 | K-3-Ga* | 448.10 | 6.01 | 287 |
| 15 | K-3-G* | 448.10 | 6.32 | 287 |

峰序号与图 1 相同。标注“*”的表示标准品。M-3-GRh: 杨梅素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; M-3-Ga: 杨梅素-3-半乳糖苷; M-3-G: 杨梅素-3-葡萄糖苷; Q-3-GaRhG: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷; Q-3-GRhG: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷; Q-3-GaRh: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖苷; Q-3-GRh: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; Q-3-Ga: 槲皮素-3-半乳糖苷; Q-3-G: 槲皮素-3-葡萄糖苷; K-3-GaRhG: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷; K-3-GRhG: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷; K-3-GaRh: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷; K-3-GRh: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷; K-3-Ga: 山柰酚-3-半乳糖苷; K-3-G: 山柰酚-3-葡萄糖苷。

由图 1 还可以看出, 杨梅素-3-葡萄糖-鼠李糖苷 (M-3-GRh)、槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (Q-3-GaRhG)、槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (Q-3-GRhG)、山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (K-3-GaRhG) 和山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷 (K-3-GRhG) 分别对应 1 号峰、4 号峰、5 号峰、10 号峰和 11 号峰, 根据它们的相对分子质量、色谱保留的一般规律、二级质谱碎片和相关报道^[10,14,17-18]进行综合鉴定; 其余 FGs 根据标准品进行验证, M-3-Ga、M-3-G、Q-3-GaRh、Q-3-GRh、Q-3-Ga、Q-3-G、K-3-GaRh、K-3-GRh、K-3-Ga 和 K-3-G 分别对应 2、3、6、7、8、9、12、13、14 和 15 号峰。根据色谱保留的一般规律, 在反相色谱柱洗脱的过程中, 按出峰时间排序依次为杨梅素糖苷 (3 个羟

基)、槲皮素糖苷 (2 个羟基)、山柰酚糖苷 (1 个羟基), 10 号峰对应的 K-3-GaRhG 不符合这一规律; 对于相同苷元, 按出峰时间排序依次为三糖糖苷、二糖糖苷、单糖糖苷, 而对于不同苷元的 FGs, 出峰顺序为半乳糖苷类化合物、葡萄糖苷类化合物。由二级质谱碎片信息可知, 杨梅素糖苷、槲皮素糖苷和山柰酚糖苷的主要碎片离子质荷比分别为 319、303 和 287。

2.2 黄酮醇糖苷标准品的质谱分析和色谱分析

为了优化 FGs 的定量方法, 选取 Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh 标准品, 采用多反应监测 (MRM) 和紫外检测器 (PDA) 检测方法分别建立 FGs 标准品峰面积与对应质量浓度梯度的标准曲线, 综合比较 2 种检测方法的灵敏性和稳定性。

由表 2 可以看出, 在 2 种检测方法下, 5 种 FGs 标准品的峰面积与对应质量浓度梯度的标准曲线在 0.1~20.0 $\mu\text{g/ml}$ 质量浓度范围内均具有较好的线性关系 ($R^2 > 0.99$)。从检测限和定量限来看, 利用 MRM 方法的检测限 (LOD) 为 0.08~0.23 $\mu\text{g/L}$, 定量限 (LOQ) 为 0.25~0.76 $\mu\text{g/L}$; 而 PDA 方法, LOD 为 1.00~1.58 $\mu\text{g/L}$, LOQ 为 3.33~5.25 $\mu\text{g/L}$, 整体上高于前者 1~2 个数量级。由此可见, MRM 方法的检测灵敏度更高。

将提取的同一茶叶样品在 2 种检测方法下各重复检测 6 次, 结果发现, 色谱峰的保留时间波动均小于 0.1 min, 并且标准品峰面积的相对标准偏差 (RSD) 约为 0.5%, 说明 MRM 方法与 PDA 方法检测的精密度良好。

准确称取 6 份质量为 50 mg 的绿茶样品, 按照方法 1.3.2 进行样品前处理, 然后每份样品均采用 MRM 和 PDA 2 种方法检测。如表 3 所示, MRM 方法的 5 种 FGs 的 RSD 为 1.30%~2.80%, PDA 方法的 5 种 FGs 的 RSD 为 2.70%~4.70%, 说明 MRM 方法的重复性较 PDA 方法好。

2.3 茶叶中黄酮醇糖苷的定量检测

由于质谱具有高灵敏度、方法稳定等特点, 加上茶叶中的 FGs 具有良好的色谱分离性能, 因此本研究根据现有标准品, 选择 MRM 模式, 利用二级质谱准确定量绿茶、红茶中的 FGs, 优化后的 FGs 质谱参数见表 4, 其中母离子均采用加氢离子峰 $[M+H]^+$, 子离子则为黄酮醇苷元离子。

表2 2种检测方法下黄酮醇糖苷的标准曲线、决定系数、线性范围、检出限与定量限

Table 2 Standard curve, determination coefficient, linear range, detection and quantitation limit of flavonol glycosides under two detection methods

| 检测方法 | 标准品 | 标准曲线 | 标准曲线的 决定系数 (R^2) | 线性范围 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 检测限 ($\mu\text{g}/\text{L}$) | 定量限 ($\mu\text{g}/\text{L}$) |
|------------|----------|---|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 多反应监测(MRM) | Q-3-GRh | $Y_1 = 1.570 \ 3 \times 10^4 x_1 + 6 \ 770$ | 0.998 7 | 0.1~20.0 | 0.08 | 0.27 |
| | M-3-Ga | $Y_2 = 8.269 \ 1 \times 10^4 x_2 + 37 \ 995$ | 0.999 3 | 0.1~20.0 | 0.08 | 0.25 |
| | Q-3-G | $Y_3 = 5.937 \ 4 \times 10^4 x_3 + 46 \ 237$ | 0.999 6 | 0.1~20.0 | 0.19 | 0.62 |
| | K-3-G | $Y_4 = 6.280 \ 5 \times 10^4 x_4 + 27 \ 163$ | 0.996 4 | 0.1~20.0 | 0.23 | 0.76 |
| | K-3-GaRh | $Y_5 = 4.728 \ 4 \times 10^4 x_5 + 68 \ 682$ | 0.999 7 | 0.1~20.0 | 0.11 | 0.38 |
| 紫外检测器(PDA) | Q-3-GRh | $Y_6 = 9.837 \ 0 \times 10^5 x_6 + 582 \ 068$ | 0.999 0 | 0.1~20.0 | 1.23 | 4.00 |
| | M-3-Ga | $Y_7 = 2.000 \ 0 \times 10^6 x_7 + 1 \ 000 \ 000$ | 0.999 4 | 0.1~20.0 | 1.20 | 4.00 |
| | Q-3-G | $Y_8 = 1.000 \ 0 \times 10^6 x_8 + 1 \ 000 \ 000$ | 0.997 6 | 0.1~20.0 | 1.00 | 3.33 |
| | K-3-G | $Y_9 = 1.000 \ 0 \times 10^6 x_9 + 265 \ 078$ | 0.996 1 | 0.1~20.0 | 1.58 | 5.25 |
| | K-3-GaRh | $Y_{10} = 9.164 \ 6 \times 10^5 x_{10} + 1 \ 000 \ 000$ | 0.999 4 | 0.1~20.0 | 1.22 | 4.10 |

Q-3-GRh: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; M-3-Ga: 杨梅素-3-半乳糖苷; Q-3-G: 槲皮素-3-葡萄糖苷; K-3-G: 山柰酚-3-葡萄糖苷; K-3-GaRh: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷。 Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5 分别为多反应监测(MRM)方法下标准品 Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh 的色谱峰平均积分面积; x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 分别为多反应监测(MRM)方法下标准品 Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh 对应的检测质量浓度; $Y_6, Y_7, Y_8, Y_9, Y_{10}$ 分别为 PDA 检测方法下标准品 Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh 的色谱峰平均积分面积; $x_6, x_7, x_8, x_9, x_{10}$ 分别为 PDA 检测方法下标准品 Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh 对应的检测质量浓度。

表3 2种检测方法的重复性试验($n=6$)Table 3 Repeatability tests of two detection methods($n=6$)

| 检测方法 | 黄酮醇糖苷类型 | 平均峰面积 | 相对标准偏差 (%) |
|------------|----------|------------|------------|
| 多反应监测(MRM) | Q-3-GRh | 512 925 | 2.80 |
| | M-3-Ga | 550 665 | 1.30 |
| | Q-3-G | 937 998 | 1.50 |
| | K-3-G | 1 296 863 | 1.60 |
| | K-3-GaRh | 2 238 291 | 2.60 |
| 紫外检测器(PDA) | Q-3-GRh | 1 599 584 | 4.70 |
| | M-3-Ga | 13 491 830 | 2.70 |
| | Q-3-G | 18 478 483 | 3.70 |
| | K-3-G | 26 764 613 | 4.60 |
| | K-3-GaRh | 40 838 017 | 2.70 |

Q-3-GRh: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; M-3-Ga: 杨梅素-3-半乳糖苷; Q-3-G: 槲皮素-3-葡萄糖苷; K-3-G: 山柰酚-3-葡萄糖苷; K-3-GaRh: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷。

针对未购置标准品的 FGs 进行相对定量,具体参照王智聪等^[10]的公式进行计算。选取决定系数较高的标准曲线(以 M-3-Ga 为标准品),用外标法准确定量成茶中的 M-3-Ga 含量,成茶中其他 FGs 的含量则根据 M-3-Ga 质谱峰面积及含量确定。由于无法准确得到无标准品 FGs 的质谱响应差异,因此假定 FGs 与 M-3-Ga 质谱响应一致,具体公式如下:

表4 MRM 方法下黄酮醇糖苷的质谱参数

Table 4 Mass spectrometry parameters of flavonol glycosides under multiple reaction monitoring (MRM) method

| 黄酮醇糖苷类型 | 母离子 [M+H] ⁺ | 二级质谱碎片 MS/MS (m/z) | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (V) | 电离模式 |
|-----------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|------|
| M-3-GRh | 627 | 319 | - | - | 正 |
| M-3-Ga | 481 | 319 | 28 | 30 | 正 |
| M-3-G | 481 | 319 | 28 | 30 | 正 |
| Q-3-GaRhG | 773 | 303 | - | - | 正 |
| Q-3-GRhG | 773 | 303 | - | - | 正 |
| Q-3-GaRh | 611 | 303 | 8 | 14 | 正 |
| Q-3-GRh | 611 | 303 | 8 | 14 | 正 |
| Q-3-Ga | 465 | 303 | 30 | 80 | 正 |
| Q-3-G | 465 | 303 | 30 | 80 | 正 |
| K-3-GaRhG | 757 | 287 | - | - | 正 |
| K-3-GRhG | 757 | 287 | - | - | 正 |
| K-3-GaRh | 595 | 287 | 16 | 10 | 正 |
| K-3-GRh | 595 | 287 | 16 | 10 | 正 |
| K-3-Ga | 449 | 287 | 40 | 14 | 正 |
| K-3-G | 449 | 287 | 40 | 14 | 正 |

M-3-GRh: 杨梅素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; M-3-Ga: 杨梅素-3-半乳糖苷; M-3-G: 杨梅素-3-葡萄糖苷; Q-3-GaRhG: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷; Q-3-GRhG: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷; Q-3-GaRh: 槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖苷; Q-3-GRh: 槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷; Q-3-Ga: 槲皮素-3-半乳糖苷; Q-3-G: 槲皮素-3-葡萄糖苷; K-3-GaRhG: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷; K-3-GRhG: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷; K-3-GaRh: 山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷; K-3-GRh: 山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷; K-3-Ga: 山柰酚-3-半乳糖苷; K-3-G: 山柰酚-3-葡萄糖苷。

$$C_j = A_j M_j C_i DV / m A_i M_i$$

式中: C_j 、 C_i 分别表示成茶茶汤中待测 FGs 含量、M-3-Ga 含量; A_j 、 A_i 分别表示待定量 FGs 化合物的峰面积、M-3-Ga 的峰面积; M_j 、 M_i 分别表示待定量 FGs 化合物的相对分子质量、M-3-Ga 的相对分子质量; D 表示进样前稀释倍数; V 表示提取液体积; m 表示样品质量。

如表 5 所示,不同 FGs 组分含量在绿茶和红茶间存在一定差异。绿茶中总黄酮醇糖苷含量为 5 492.40 mg/kg,而红茶中总黄酮醇糖苷含量为 5 910.19 mg/kg,高于绿茶中总黄酮醇糖苷含量。在绿茶中,K-3-GRhG、Q-3-GRhG 的含量较高,分别为 1 078.03 mg/kg、881.08 mg/kg,而含量较低的是 Q-3-GaRh、K-3-GaRh、K-3-G,分别为 14.69 mg/kg、

14.80 mg/kg、35.19 mg/kg;在红茶中,K-3-GRhG 含量最高,达 2 027.34 mg/kg,而 Q-3-GaRh、K-3-GaRh、K-3-G 的含量较低,分别为 47.91 mg/kg、42.92 mg/kg、22.59 mg/kg。从不同苷元类型的黄酮醇糖苷含量来看,绿茶中杨梅素糖苷(M-3-GRh、M-3-Ga、M-3-G)总含量为 940.18 mg/kg,显著高于红茶中杨梅素糖苷总含量(673.64 mg/kg);槲皮素糖苷(Q-3-GaRhG、Q-3-GRhG、Q-3-GaRh、Q-3-GRh、Q-3-Ga、Q-3-G)总含量在绿茶中最高,为 2 434.29 mg/kg,显著高于红茶中槲皮素糖苷总含量(2 061.34 mg/kg);而山柰酚糖苷(K-3-GaRhG、K-3-GRhG、K-3-GaRh、K-3-GRh、K-3-Ga、K-3-G)总含量在红茶中占绝对优势,为 3 175.21 mg/kg,显著高于绿茶中的山柰酚糖苷总含量(2 117.93 mg/kg)。

表 5 黄酮醇糖苷在绿茶、红茶中的含量($n=3$)

Table 5 Content of flavonol glycosides in green teas and black teas($n=3$)

| 峰序号 | 黄酮醇糖苷类型 | 黄酮醇苷元类型 | 黄酮醇糖苷含量(mg/kg) | | 定量方法 |
|-----|-----------|---------|----------------|----------------|-------|
| | | | 绿茶 | 红茶 | |
| 1 | M-3-GRh | 杨梅素苷元 | 186.47±1.37 | 222.47±6.84 | 相对定量 |
| 2 | M-3-Ga | 杨梅素苷元 | 488.17±15.38 | 287.36±11.62 | 标准品定量 |
| 3 | M-3-G | 杨梅素苷元 | 265.54±20.34 | 163.81±5.20 | 标准品定量 |
| 4 | Q-3-GaRhG | 槲皮素苷元 | 869.33±12.56 | 831.16±13.77 | 相对定量 |
| 5 | Q-3-GRhG | 槲皮素苷元 | 881.08±15.08 | 463.61±8.23 | 相对定量 |
| 6 | Q-3-GaRh | 槲皮素苷元 | 14.69±0.50 | 47.91±2.13 | 标准品定量 |
| 7 | Q-3-GRh | 槲皮素苷元 | 234.12±6.24 | 209.21±4.21 | 标准品定量 |
| 8 | Q-3-Ga | 槲皮素苷元 | 205.74±5.41 | 183.28±5.55 | 标准品定量 |
| 9 | Q-3-G | 槲皮素苷元 | 229.33±1.79 | 326.17±13.44 | 标准品定量 |
| 10 | K-3-GaRhG | 山柰酚苷元 | 225.08±2.62 | 540.91±2.85 | 相对定量 |
| 11 | K-3-GRhG | 山柰酚苷元 | 1 078.03±20.24 | 2 027.34±40.34 | 相对定量 |
| 12 | K-3-GaRh | 山柰酚苷元 | 14.80±0.09 | 42.92±1.57 | 标准品定量 |
| 13 | K-3-GRh | 山柰酚苷元 | 460.08±13.52 | 327.72±13.31 | 标准品定量 |
| 14 | K-3-Ga | 山柰酚苷元 | 304.75±1.16 | 213.73±1.85 | 标准品定量 |
| 15 | K-3-G | 山柰酚苷元 | 35.19±0.89 | 22.59±1.73 | 标准品定量 |

峰序号与图 1 相同。M-3-GRh:杨梅素-3-葡萄糖-鼠李糖苷;M-3-Ga:杨梅素-3-半乳糖苷;M-3-G:杨梅素-3-葡萄糖苷;Q-3-GaRhG:槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷;Q-3-GRhG:槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷;Q-3-GaRh:槲皮素-3-半乳糖-鼠李糖苷;Q-3-GRh:槲皮素-3-葡萄糖-鼠李糖苷;Q-3-Ga:槲皮素-3-半乳糖苷;Q-3-G:槲皮素-3-葡萄糖苷;K-3-GaRhG:山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖-葡萄糖苷;K-3-GRhG:山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷;K-3-GaRh:山柰酚-3-半乳糖-鼠李糖苷;K-3-GRh:山柰酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷;K-3-Ga:山柰酚-3-半乳糖苷;K-3-G:山柰酚-3-葡萄糖苷。

本研究利用质谱 MRM 检测法,基于 10 种标准品对茶叶 FGs 检测的质谱条件进行了优化,在成品茶(绿茶、红茶)中鉴定出 15 种 FGs,包括 3 种杨梅素糖苷、6 种槲皮素糖苷和 6 种山柰酚糖苷。此外,本研究对已有标准品的 FGs 进行了绝对定量,其余

5 种基于王智聪等^[10]的方法进行相对定量分析。与现有主流方法^[3, 10](表 6)相比,优化后的质谱条件使 FGs 化合物的检测时间缩短了 30%,并且组分的分离度更强。Wu 等^[3]利用负离子检测模式比较了 UPLC-QqQ-MS/MS 与 HPLC-MS 的差异,结果表

明,UPLC-QqQ-MS/MS法的检测灵敏度高于HPLC-MS法。而本研究采用正离子模式,进一步证实了在相同仪器设备条件下由二级质谱(MRM检测方法)建立的FGs检测方法的检出限整体上低于PDA方法1~2个数量级,灵敏度更高。与Wu等^[3]的方法

相比,用正离子模式MRM方法检测的FGs质谱峰响应强度更高,能够有效降低样品基质效应(即干扰组分对目标组分电离的影响)对分析的干扰程度,有利于低质量浓度FGs的定量分析。

表6 茶叶中黄酮醇糖苷检测方法的比较

Table 6 Comparison of detection methods for flavonol glycosides in tea

| 检测方法 | 浸提方式 | 电离模式 | 黄酮醇苷数量(个) | 保留时间(min) | 线性范围 | 定量限(LOQ) | 检出限(LOD) |
|------------------------------|----------------------------|--------------------|-----------|-------------|--|--|--|
| HPLC-UV-MS(a) | 蒸馏水 | [M+H] ⁺ | 2,5,4,0 | 34.35~46.51 | ns | ns | ns |
| UPLC-QqQ-MS/MS(b) | 99%(体积分数)甲醇(含体积分数为1.0%的甲酸) | [M+H] ⁻ | 5,5,5,0 | 10.25~14.54 | 0.36~25.00 μmol/L | 6.0×10 ⁻³ ~ 3.6×10 ⁻² μmol/L | 1.0×10 ⁻³ ~ 1.1×10 ⁻² μmol/L |
| HPLC-TOF-MS(b) | 99%(体积分数)甲醇(含体积分数为1.0%的甲酸) | [M+H] ⁻ | 5,5,5,0 | 12.25~39.45 | 1.60~50.00 μmol/L | 2.90~7.68 μmol/L | 0.90~2.43 μmol/L |
| UPLC-PDA(c) | DMSO(二甲基亚砜)+50%(体积分数)甲醇 | ns | 3,4,3,2 | 4.00~22.00 | 0.88~14.00 mg/kg | 0.64~0.94 mg/kg | 0.21~0.32 mg/kg |
| UPLC-PDA-MS/MS(d) | 80%(体积分数)甲醇水溶液 | [M+H] ⁺ | 3,6,6,0 | 12.00~18.50 | ns | ns | ns |
| UPLC-PDA(e) | 70%(体积分数)甲醇水溶液 | ns | 4,7,7,0 | 5.00~15.00 | 0.05~10.97 mg/L | 0.52~0.99 mg/L | 0.20 mg/L |
| HPLC-PDA(e) | 70%(体积分数)甲醇水溶液 | ns | 4,7,7,0 | 30.00~60.00 | 0.05~10.97 mg/L | 0.52~0.99 mg/L | 0.20 mg/L |
| HPLC-ESI-MS ⁿ (e) | 70%(体积分数)甲醇水溶液 | [M-H] ⁻ | 4,7,7,0 | 30.00~60.00 | 0.05~10.97 mg/L | ns | ns |
| HPLC-UV(f) | 高温(70~100℃)纯净水 | ns | 2,4,3,0 | 37.86~46.13 | ns | ns | ns |
| HPLC-PDA-MS ⁿ (g) | 纯净沸水(100℃) | [M-H] ⁻ | 5,5,0,0 | 26.00~40.00 | ns | ns | ns |
| UPLC-QqQ-MS/MS(h) | 75%(体积分数)甲醇水溶液 | [M+H] ⁺ | 5,5,5,0 | 3.60~7.40 | 0.1~20.0 μg/ml (MRM) 0.1~20.0 μg/ml (PDA) | 0.25~0.76 μg/L (MRM) 3.33~5.25 μg/L (PDA) | 0.08~0.23 μg/L (MRM) 1.00~1.58 μg/L (PDA) |

HPLC:高效液相色谱;UV:紫外;MS:质谱;UPLC:超高效液相色谱;QqQ:三重串联四极杆质谱;PDA:二极管阵列;ESI:电喷雾电离源。检测方法后标注a表示采用的检测材料为绿茶、白茶、乌龙茶的一芽三叶鲜样^[19];检测方法后标注b表示采用的检测材料为野茶树芽、第2叶、第4叶、茎、根冷冻鲜样^[3];检测方法后标注c表示采用的检测材料为红茶^[13];检测方法后标注d表示采用的检测材料为绿茶和红茶^[10];检测方法后标注e表示采用的检测材料为绿茶、乌龙茶和红茶^[14];检测方法后标注f表示采用的检测材料为龙井茶^[2];检测方法后标注g表示采用的检测材料为印尼绿茶和红茶^[20];检测方法后标注h表示采用的检测材料为龙井和滇红(本研究)。黄酮醇苷数对应的数字分别表示检测到的杨梅素糖苷种类数量、槲皮素糖苷种类数量、山柰酚糖苷种类数量、异鼠李素糖苷种类数量。MSⁿ表示串联质谱。ns表示空白。

3 讨论

3.1 MRM 检测方法的优势

本研究选取5种黄酮醇糖苷标准品(Q-3-GRh、M-3-Ga、Q-3-G、K-3-G、K-3-GaRh),分别同时采用MRM检测方法和PDA检测方法,基于方法的灵敏度和稳定性指标分析比较了二者对于茶叶中FGs的定性、定量效果。结果显示,在MRM方法下,成茶中15种FGs被定量测定,并且FGs的基质标准曲线在0.1~20.0 μg/ml质量浓度范围内

线性关系良好,其定量限为0.25~0.76 μg/L,检出限为0.08~0.23 μg/L,以上参数均优于PDA检测方法。同时,本研究利用目标化合物的二级质谱碎片进行定量,可以选择性地检测被定量化合物,使同分异构体(如M-3-Ga/M-3-G、Q-3-GaRh/Q-3-GRh)得到较好分离。此外,根据精密度试验和重复性试验的相对标准偏差,MRM检测方法的稳定性优于PDA检测方法。由此可见,基于二级质谱MRM模式建立的茶叶中FGs的MRM检测方法灵敏度和分离度高、稳定性好。然而,当不需要较高

的灵敏度和特异的分离度时,PDA 检测方法可以作为 MRM 检测的 1 种快速且经济的替代方法,茶叶中主要 FGs 化合物的色谱峰根据其保留时间能够轻松地得到鉴定,并通过积分进行定量分析^[21]。

3.2 MS(MRM)检测条件的优化

样品前处理对于样品鉴定和结果的准确性有至关重要的影响^[22]。溶剂法是黄酮类化合物常用的提取方法,利用热水法和有机溶剂法均能提取黄酮醇苷类物质。陈丛瑾等^[23]研究发现,黄酮苷类物质易溶于水以及甲醇、乙醇等强极性溶剂,高浓度的醇易于提取苷元,而用 60%(体积分数)乙醇或甲醇能有效提取含苷类的黄酮类化合物。尽管沸水也能够提高黄酮苷类物质提取率,但易将蛋白质、糖类化合物溶于水,从而降低了黄酮醇苷的浸出率。因此,本研究以 75%(体积分数)甲醇作为提取剂,结果显示,色谱峰分离效果优于其他试验结果^[2-3,13,20-21]。超高效液相色谱(UPLC)的出峰时间通常由物质本身的性质、固定相(色谱柱填料、柱长短、粒径)、流动相、柱温和流速等因素共同决定。本研究采用 T3 色谱柱,与 Kim 等^[13-14]采用的 C₁₈ 色谱柱相比,T3 色谱柱对极性较强的 FGs 类化合物的保留效果好。Kim 等^[13]选用含有 1.0%(体积分数)甲酸的 15%(体积分数)乙腈作为流动相进行等度洗脱,本研究使用含有 0.1%(体积分数)甲酸的 99.9%(体积分数)乙腈作为流动相,进行梯度洗脱,并且在分离时间、峰型方面的优势明显,能够保证短时间内将样品中的强保留组分洗脱。此外,在本研究中柱温设为 40 ℃,流速设为 0.4 ml/min,相较于 Kim 等^[13-14]的方法,在温度、流速上均提高了 50%,由此说明,在相同仪器条件下,适当提高柱温、流速有利于缩短 FGs 的分离时间,提高分离度。

3.3 黄酮醇糖苷在成茶中的积累与分布

不同茶树品种、产地的生长环境和加工工艺造成了茶叶品质成分的差异。有研究发现,UV-B 辐射的增强、温度的升高均能够提升植物体的 FGs 含量^[24-25]。本研究发现,与浙江茶区相比,云南茶区纬度低、海拔高,紫外线强度相对较高,加上较高的环境温度会诱导茶树体内的碳代谢,从而促进多酚类物质(FGs、儿茶素等)的积累;相反,在浙江茶区,纬度高,海拔低,春季温度相对较低,有利于加速茶树体内的氮代谢,促进茶树体内氨基酸的合成,而茶树类黄酮物质的合成相对受到抑制^[26-27]。FGs 对于

茶汤的苦味、涩味具有增强作用,一般认为酚氨比值低的茶鲜爽味高,适制绿茶,而酚氨比值高的茶苦味和涩味较高,适合加工成红茶^[18]。由此可见,云南茶区的茶叶更有利于加工成红茶、黑茶等发酵茶,而浙江茶区的环境条件为绿茶的加工提供了品质保证。

从品种的适制性来看,不同叶型茶树品种的适制性也有差异。研究发现,与小叶种茶树相比,大叶种茶树的多酚类物质含量高 10%以上,因此更适合加工成红茶,而小叶种茶树的氨基酸含量高,适合制成绿茶^[28]。戴伟东等^[18]对 FGs 与茶树品种适制性的研究发现,黄酮醇半乳糖苷化代谢旺盛的茶树品种适制绿茶,而黄酮醇葡萄糖苷化代谢旺盛的茶树品种适制红茶。FGs 组分中的 K-3-G/K-3-Ga 组分被认为与茶汤涩味高度相关,其含量的积累变化规律对茶叶的适制性起到了指示作用。而在本研究中,成品红茶中的 K-3-G 含量及其葡萄糖苷化程度(K-3-G 与 K-3-Ga 的比值)均小于绿茶成品茶,推测茶叶在发酵过程中可能降低了 K-3-G 含量,从而使红茶的涩味降低。

陈宗懋等^[29]的统计结果显示,红茶中的总 FGs 含量要高于绿茶,这与本研究结果一致。但 Peterson 等^[30]的研究结果与之相反,即在绿茶、乌龙茶中,总 FGs 含量则高于红茶。Jiang 等^[14]通过 UPLC 方法,在 3 类成品茶中共检测到 18 种 FGs,发现绿茶中的山柰酚糖苷组分含量最高,而红茶中的槲皮素糖苷含量占绝对优势。本研究结果则与之相反,即在绿茶中以槲皮素糖苷为主,而在红茶中则以山柰酚糖苷为主。由此可见,茶叶中的 FGs 含量可能受多种因素影响而呈动态变化,对不同茶类 FGs 的积累与分布规律仍需深入研究。

参考文献:

- [1] MATSUBARA Y, KUMAMOTO H, IIZUKA Y, et al. Studies on physiologically active substances in citrus peel. Part II. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49: 909-914.
- [2] 刘 阳,陈根生,许勇泉,等. 冲泡过程中西湖龙井茶黄酮苷类浸出特性及滋味贡献分析[J].茶叶科学,2015, 35(3): 217-224.
- [3] WU Y H, JIANG X L, ZHANG S X, et al. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QqQ-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1017: 10-17.

- [4] 林杰,段玲靓,吴春燕,等. 茶叶中的黄酮醇类物质及对感官品质的影响[J]. 茶叶, 2010, 36(1): 14-18.
- [5] 戴前颖,夏涛,高丽萍,等. 绿茶汤呈色物质研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6): 887-891.
- [6] 朱博,夏涛,高丽萍,等. 绿茶茶汤中黄酮醇及其苷类的测定方法以及对茶汤色度的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 146-150.
- [7] WANG S Y, BOWMAN L, DING M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells [J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1261-1269.
- [8] FERREYRA M L F, RIUS S P, CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 1-10.
- [9] 方芳,王凤忠. 植物黄酮醇的检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 327-332.
- [10] 王智聪,沙跃兵,余笑波,等. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定茶叶中15种黄酮醇糖苷类化合物[J]. 色谱, 2015, 33(9): 974-980.
- [11] 张维冰,王智聪,张凌怡. 超高效液相色谱-光电二极管阵列检测-串联四级杆质谱法测定红洋葱中黄酮醇及其糖苷类化合物[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 415-422.
- [12] ZHAO Y Y, GUO H Z, CHEN Y G, et al. Simultaneous quantification of flavonol glycosides, terpenoid lactones, polyphenols and carboxylic acids in *Ginkgo biloba* leaf extract by UPLC-QTOF-MS^E based metabolomic approach [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 26(11): 789-804.
- [13] KIM J C, SHIM Y S. Method validation of analytical method for 12 flavonol glycosides in foods using ultra high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(3): 659-664.
- [14] JIANG H Y, ENGELHARDT U H, THRÅNE C, et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC [J]. Food Chemistry, 2015, 183: 30-35.
- [15] ZHANG Q F, SHI Y Z, MA L F, et al. Metabolomic analysis using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) uncovers the effects of light intensity and temperature under shading treatments on the metabolites in tea [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112572.
- [16] DE VOS R C, MOCO S, LOMMEN A, et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 778-791.
- [17] VRHOVSEK U, MASUERO D, GASPEROTTI M, et al. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 8831-8840.
- [18] 戴伟东,解东超,吕美玲,等. 黄酮醇糖苷与茶树品种适应性关系[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 104-109.
- [19] 吴春燕,须海荣, HÉRITIER J, 等. 不同茶树品种中黄酮苷含量的测定[J]. 茶叶科学, 2012, 32(2): 122-128.
- [20] RIO D D, STEWART A J, MULLEN W, et al. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2807-2815.
- [21] BENVENUTI M E, O'CONNOR A. Melamine, ammeline and cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA [EB/OL]. [2020-01-02]. <http://www.waters.com/waters/library.htm>.
- [22] 王旭堂,刁志祥,张培杨,等. 超高效液相色谱荧光检测法测定鹌鹑蛋和鸡蛋中甲砒霉素残留量[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 206-211.
- [23] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. 植物中黄酮类化合物的提取方法研究概况[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(3): 42-46.
- [24] 梁滨,周青. UV-B辐射对植物类黄酮影响的研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(3): 191-194.
- [25] 骆耀平. 茶树栽培学[M]. 5版. 北京: 中国农业出版社, 2015: 88-100.
- [26] 宋楚君,范方媛,龚淑英,等. 不同产地红茶的滋味特征及主要贡献物质[J]. 中国农业科学, 2020, 53(2): 383-394.
- [27] 郭世昌,常有礼,胡非,等. 纬度和海拔高度对云南地面紫外线强度影响的数值试验[J]. 云南地理环境研究, 2004, 16(1): 9-13.
- [28] 江昌俊. 茶树育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 93-95.
- [29] 陈宗懋,甄永苏. 茶叶的保健功能[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 35-56.
- [30] PETERSON J, DWYER J, BHAGWAT S, et al. Major flavonoids in dry tea [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(6): 487-501.

(责任编辑:徐艳)