

Poroshell 120 SB-C18 管柱搭配 LC/MS，快速分析茶飲

應用備註

食品及飲料

作者

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

摘要

以安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱及安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，分析綠茶中常見的 10 種成分（9 種兒茶素 + 1 種咖啡因），結果顯示兩種管柱的選擇性幾乎相同。以 Poroshell 120 管柱經梯度沖提分析 1.4 分鐘後，再經液相層析儀串聯質譜儀 (LC/MS) 檢測 10 種化合物均能產生直線校正曲線。文中將分析定量幾種罐裝與沖泡的綠茶樣品，並加以比較。經由注入未過濾、未稀釋的沖泡綠茶樣品測試管柱使用壽命，結果證實能在 Poroshell 120 管柱內高壓注入不乾淨的樣品 1500 次以上。

緒論

多酚類化合物可降低罹患心臟疾病的風險、預防癌症，並對抗其他疾病，而新鮮茶葉與綠茶是常見的多酚來源，兒茶素的含量很高。兒茶素會影響茶的顏色與味道，茶的特殊苦味即是兒茶素所致 [1]。茶中的兒茶素，以表沒食子兒茶素沒食子酸酯 (epigallocatechin gallate) 最值得注意，因為是茶的萃取物中，含量最高的多酚類化合物 [2]。

雖然各種類別的茶，均來自相同品種的茶樹 *Camellia sinensis*，但不同的加工處理方式，就會產生不同類別的茶。茶的類別，是由茶葉採收後的發酵（氧化）時間所決定。茶葉採收後，若未儘快乾燥，很快就會枯萎及氧化。此時茶葉的葉綠素會分解，釋出鞣質，導致茶葉變黑。而加熱茶葉會停止氧化，並將分解葉綠素的酵素去除活性，此過程會持續特定一段時間。紅茶為完全發酵茶，烏龍茶為半發酵茶，而綠茶為不發酵茶 [3,4]。由於發酵會降低兒茶素的含量，因此每份綠茶的兒茶素抗氧化劑含量最多，而紅茶最少。



Agilent Technologies

本應用範圍備註中，Yoshida 等人 [5] 利用安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱開發用於檢測茶中兒茶素的 HPLC 分析法，移轉至相同尺寸的安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱後，選擇性幾乎不變。本分析法經過了改善，確能適用於 LC/MS，並製作校正曲線，分析罐裝茶及沖泡茶的樣品，以進行比較。另外並實施使用壽命研究，以未稀釋、未過濾的沖泡綠茶樣品，證實裝有大型 2 μm 濾片的 Poroshell 管柱具備優勢，能直接注入不乾淨樣品。

以 HPLC 分析茶飲並非創舉，但此分析法足以證實 Poroshell 120 管柱分析其他天然產品樣品的效用。本分析證實 Poroshell 120 管柱可分析一組 10 種結構非常相似的化合物，包含 4 對差向異構物。這 4 對差向異構物採用價格平庸，又容易取得的樣品做為代表。

實驗

本分析採用安捷倫 1200 系列快速分離 LC (RRLC) 系統，搭配安捷倫 6410 三重四極桿質譜儀 (QQQ)：

表 1. 分析兒茶素的各種分析法參數

	安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱，4.6 × 150 mm、5 μm (p/n 883975-902)	安捷倫 ZORBAX RRHT SB-C18 管柱，4.6 × 50 mm、1.8 μm (p/n 827975-902)	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，4.6 × 50 mm、2.7 μm (p/n 689975-902)	安捷倫 ZORBAX RRHT SB-C18 管柱，2.1 × 50 mm、1.8 μm (p/n 827700-902)	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，2.1 × 50 mm、2.7 μm (p/n 689775-902)	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，2.1 × 50 mm、2.7 μm (p/n 689775-902)	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，2.1 × 50 mm、2.7 μm (p/n 689775-902)	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 685775-902)
流速 (mL/分鐘)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.25	1.50	0.83
移動相 A	0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液	0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液	0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液	0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液	各種添加劑的水溶液	0.2% CH ₃ COOH 水溶液	0.2% CH ₃ COOH 水溶液	0.2% HCOOH 水溶液
移動相 B	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	0.2% HCOOH 溶於 CH ₃ CN
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
沖提停止時間 (分鐘)	15.00	5.00	5.00	1.40	1.40	1.20	0.95	4.00 (含再平衡時間)
沖提後的時間 (分鐘)	10.00	3.00	3.00	1.00	1.00	0.80	0.60	n/a
總循環時間 (分鐘)	25.00	8.00	8.00	2.40	2.40	2.00	1.55	4.00
TCC 溫度 (°C)	40	40	40	40	40	40	40	40
注入量 (μL)	15.0	5.0	5.0	1.0	1.0 (LC/UV), 1.5 (LC/MS)	1.5	1.5	2.0
樣品濃度 (mg/mL)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03 (LC/UV), 0.003 (LC/MS)	0.003	0.003	n/a
系統壓力 (bar)	84	169	117	575	380 (LC/UV), 425 (LC/MS)	505	585	540

- G1312B 二元幫浦 SL 推送移動相 A：H₂O 含多種修飾劑 (0.1% H₃PO₄、0.2% HCOOH、0.2% CH₃COOH、0.02% CF₃COOH、PH 3.6-5.6 的 10 mM CH₃COONH₄、PH 3-4.5 的 10 mM HCOONH₄)，移動相 B：CH₃CN。沖提梯度為 t₀ 時使用 10% B，逐漸升高為 15% B，再逐漸升高為 27% B；梯度沖提時間依管柱的尺寸與流速而變，見表 1
- G1367C 自動液體注射器 (ALS) SL，注入量視特定分析法參數而定，見表 1
- G1316B 恆溫管柱室 (TCC) SL，溫度固定為 40 °C
- G6410A QQQ 質譜儀，質譜離子源：電灑法 AP-ESI，乾燥氣體溫度及流速：350 °C、10 L/分鐘，霧化器氣體壓力：50 Psi，毛細管電壓：選擇離子偵測 (SIM) 模式為 ± 3500 V，m/z 值列於圖 1。兒茶素於負離子模式中監測，咖啡因於正離子模式中監測
- 使用 MassHunter B.02.01 版擷取資料，定性分析則使用 B.02.00 版，定量分析使用 B.03.01 版

綠茶中的兒茶素

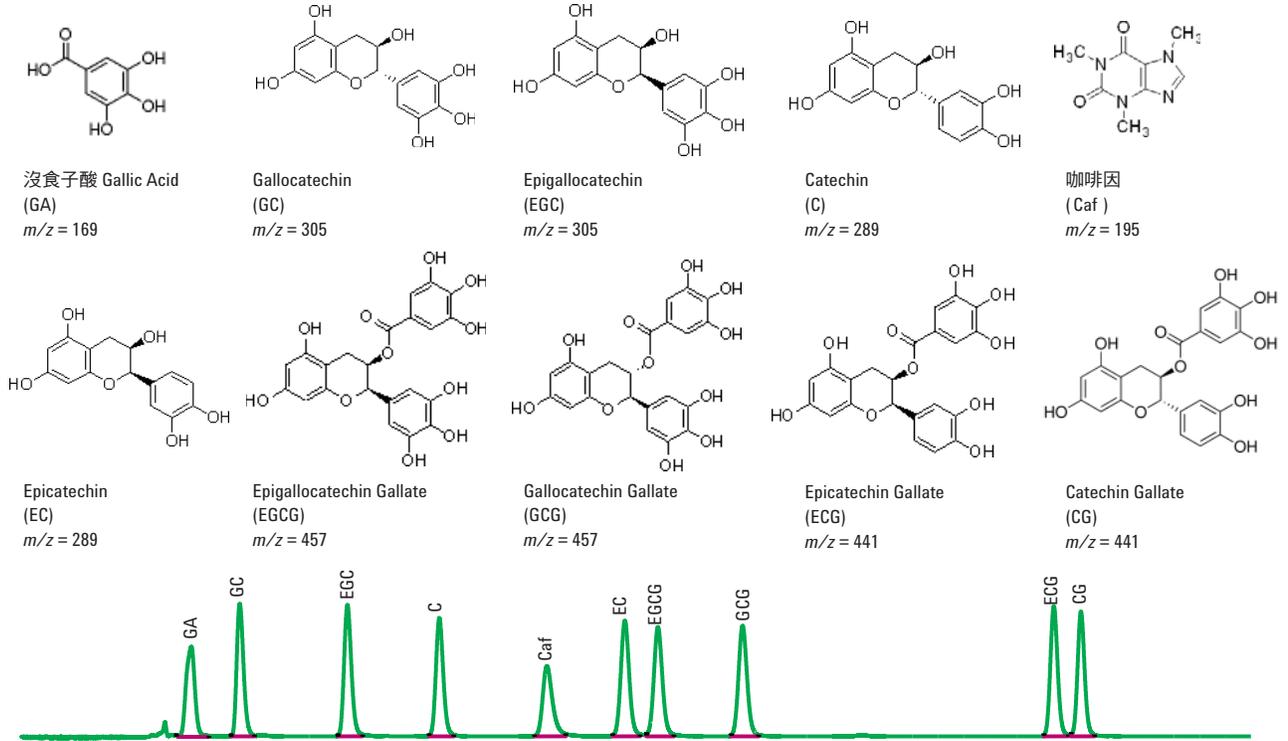


圖 1. 待檢出化合物，自安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱沖提出來的順序；移動相為 H_3PO_4 。（註：後續層析圖顯示的選擇性可能有些微不同，但沖提順序不變。）

本分析使用 6 種安捷倫管柱：

- 安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱， $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ p/n 883975-902
- 安捷倫 ZORBAX RRHT SB-C18 管柱， $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 、 $1.8 \mu\text{m}$ p/n 827975-902
- 安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱， $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ p/n 689975-902
- 安捷倫 ZORBAX RRHT SB-C18 管柱， $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 、 $1.8 \mu\text{m}$ p/n 827700-902
- 安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱， $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ p/n 689775-902
- 安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱， $2.1 \times 100 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ p/n 685775-902

待檢出化合物及其沖提順序的層析圖，顯示於圖 1。所有分析物以乾粉型態均購自 Sigma Aldrich 公司（賓州貝利方特市 (Bellefont) 廠房）。沒食子酸 (gallic acid)、ePigallocatechin、兒茶素 (catechin)、咖啡因 (caffeine)、ePigallocatechin gallate 等標準品，均個別溶於水中，濃度製備成 1 mg/mL ；Gallocatechin、ePicatechin、gallocatechin gallate、ePicatechin gallate、catechin gallate 等標準品，則個別溶於 CH_3CN/H_2O 中 (1:1)，濃度製備成 0.5 mg/mL 。上述 1 mg/mL 的標準品溶液，各取 1 單位， 0.5 mg/mL 的標準品溶液，則取 2 單位，混合配製成各種分析物的濃度，均為 0.03 mg/mL 的複合樣品。必要時，可加水稀釋此複合樣品。除了罐裝樣品 A，由日本的同仁寄送至本實驗室之外，其餘茶樣品均購自當地。定量用的罐裝茶及沖泡茶樣品，均以 1:10 的比例，加水稀釋後注入。使用壽命研究用的沖泡茶樣品，未經稀釋也未經過濾，直接注入管柱。此外，乙腈、甲酸、醋酸、三氟乙酸 (trifluoroacetic acid)、醋酸銨、甲酸銨等，均購自 Sigma Aldrich 公司（賓州貝利方特市廠房）；水則採用 18 M- Ω Milli-Q 水（麻州 Bedford 市）。

結果及討論

先前 T. Yoshida 等人的分析 [5] 顯示，以 $4.6 \times 150\text{-mm}$ 、 $5\text{-}\mu\text{m}$ 的安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱，分析兒茶素的分析時間為 15 分鐘，而使用 $4.6 \times 50\text{-mm}$ 、 $1.8\text{-}\mu\text{m}$ 的安捷倫 ZORBAX 快速分離高處理量 SB-C18 管柱，則分析時間縮短為 5 分鐘。此分析另外使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱，以進行比較。圖 2 顯示了使用較小顆粒充填的較短型 HPLC 管柱，在保持相同的解析度時，所節省的分析時間。

以 $2.1 \times 50\text{ mm}$ 的管柱執行本分析法，分析時間可再縮短為 1 分鐘。管柱的內徑變小，便能以較低的流速執行相同的分析，而較低流速較適合以 MS 檢測。ZORBAX SB-C18 管柱與 Poroshell 120 SB-C18 管柱，選擇性幾乎相同，因此較容易移轉分析法，如圖 3 所示，但 $1.8\text{-}\mu\text{m}$ 的 ZORBAX 管柱與 $2.7\text{-}\mu\text{m}$ 的 Poroshell 管柱，系統背壓則有明顯差異。ZORBAX 管柱內充填的全多孔性顆粒，直徑較小，而 Poroshell 管柱內充填的表面多孔性顆粒，直徑較大，可大幅降低背壓。Poroshell 管柱的充填顆粒，其多孔性外殼的質量傳導距離短，且顆粒大小的分佈範圍

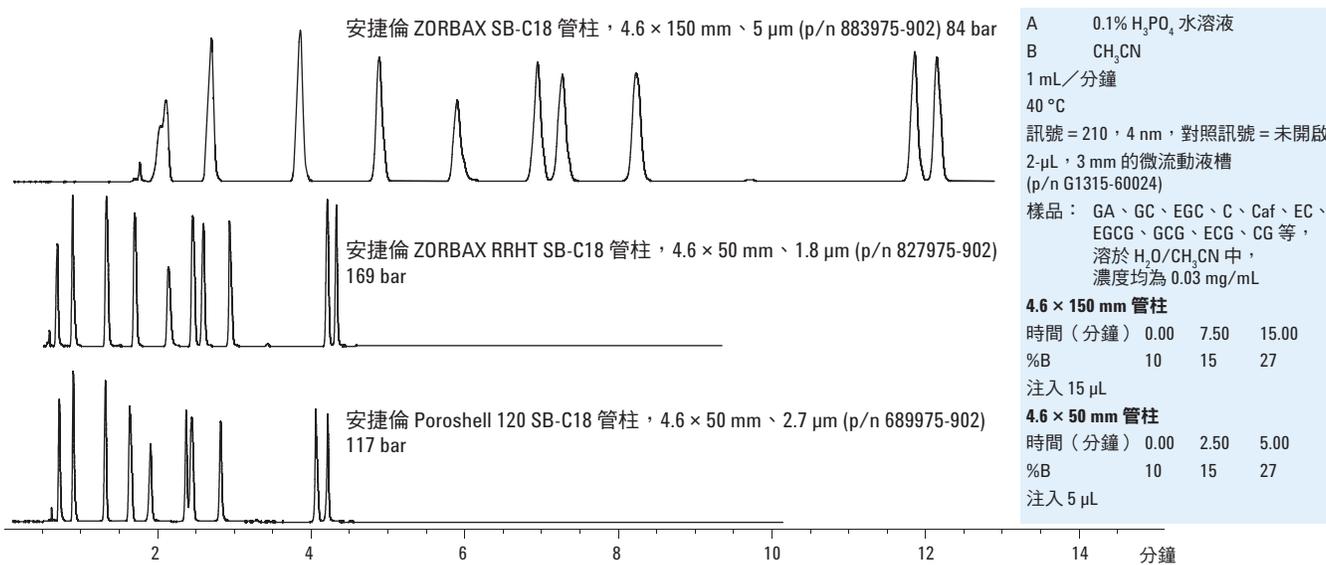


圖 2. 原本以 150 mm 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 管柱，分析兒茶素的方法，調整後套用至 50 mm 、 $1.8\text{ }\mu\text{m}$ 的安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱，及 50 mm 、 $2.7\text{ }\mu\text{m}$ 、以表面多孔性顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱

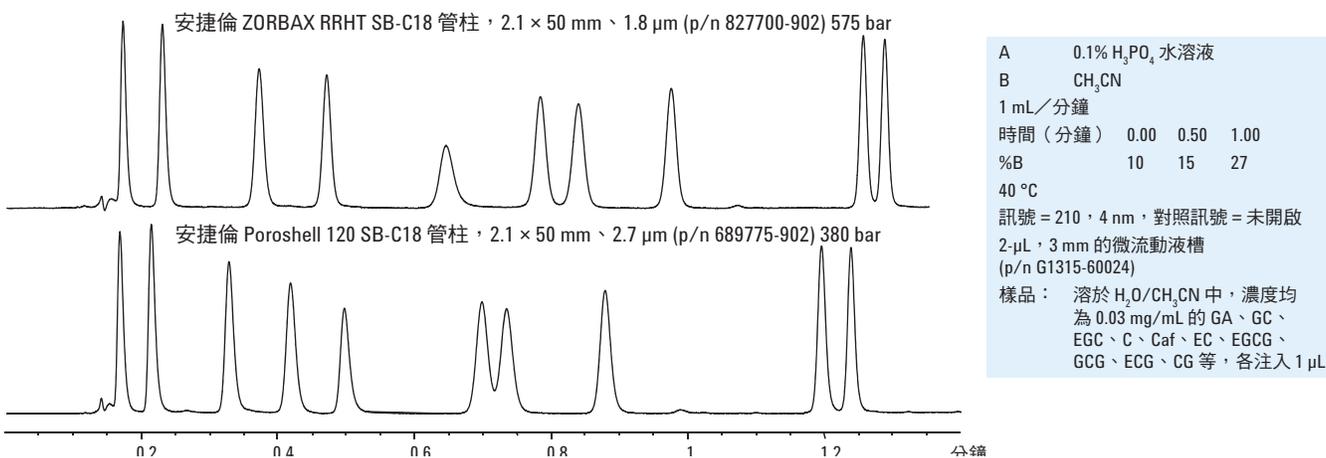


圖 3. 兒茶素分析法移轉至內徑 2.1 mm 的管柱，以搭配 LC/MS 使用，並將流速固定為原先 $4.6 \times 150\text{ mm}$ 管柱分析法的 1 mL/分鐘 ，依管柱容積調整梯度沖提時間，以進一步縮短分析時間

明顯窄於次 2 μm 的全多孔性顆粒，因此有相似的效能。本分析例顯示，背壓的差異相當大，足以決定該使用 400 bar 或 600 bar 的層析儀。

內徑 2.1 mm 的管柱，採用的流速較低，適合搭配 LC/MS 使用，但原本使用的磷酸移動相，則不能使用於 LC/MS 系統。經篩選後，與 MS 相容，用於本兒茶素分析的數種的移動相，列於圖 4。除了圖 4 呈現的結果之外，本分析也在 PH 3-4.5 時，篩選出 10 mM 的醋酸銨緩衝液，其沖提後的層析圖，幾乎與醋酸銨的數

據相同。整體而言，整個篩選過程中，選擇性保持不變，因此是根據分析物的訊號強度，挑選出最合適的移動相。圖 4 以相同的比例，顯示各個層析圖。銨鹽配製成的緩衝液，及三氟乙酸移動相，均出現顯著的離子抑制現象。2 種最佳的候選溶液，為甲酸與醋酸，其中使用醋酸時，各種化合物的訊號稍微較強。應注意的是，正離子掃描的結果，較不受離子抑制作用影響，因此圖 4 中的負離子掃描的結果，可做為層析圖的代表，不過咖啡因的正離子掃描結果，仍遵循相同的模式。

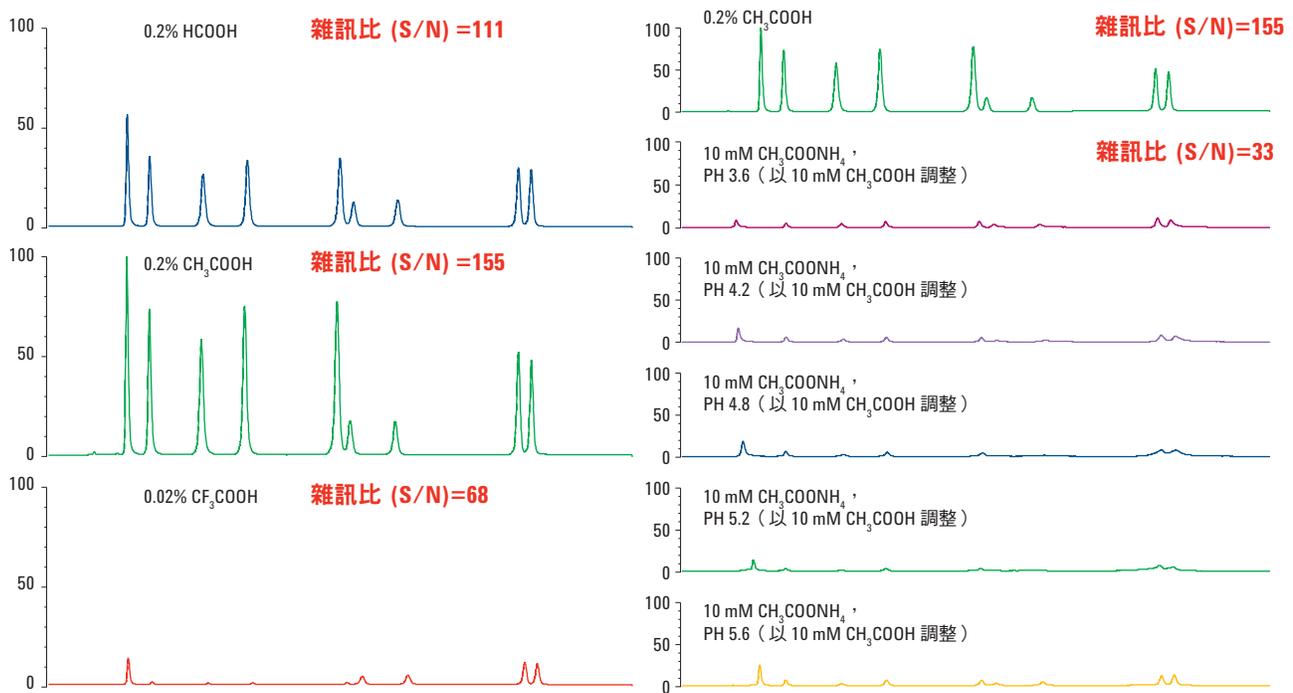


圖 4. 篩選各種與 MS 相容的移動相，尋找可替代原本 LC/UV 法使用的 H_3PO_4 的移動相（註：相較於兒茶素類化合物，咖啡因顯著較不受離子抑制作用影響，因此並未列出其正離子 SIM 層析圖。）

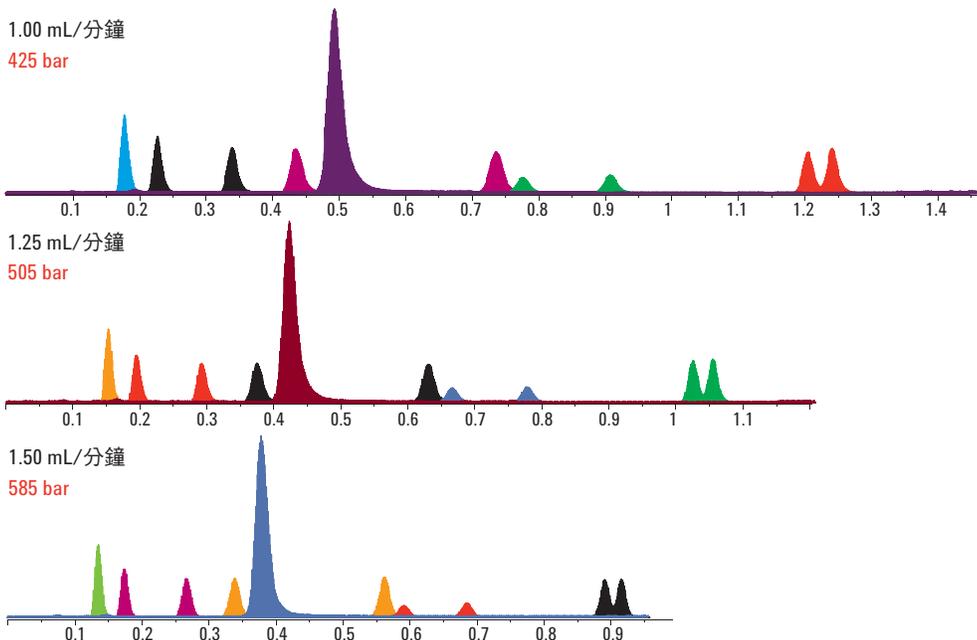
圖 5 並排顯示萃取離子層析圖 (EIC)，可見安捷倫 Poroshell 管柱產生的背壓較低，故能更快完成分析，產生的背壓卻不會高於 600 bar。使用 150 mm 管柱的 15 分鐘分析法，改用 50 mm 的 Poroshell 120 管柱後，分析時間可縮短至少於 1 分鐘，又能保持原本分析法的選擇性。比較圖 3 與圖 5，可見以同樣的管柱 (安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱， $2.1 \times 50\text{-mm}$ 、 $2.7\text{-}\mu\text{m}$) 執行相同的分析法 (1 mL/分鐘)，卻產生明顯不同的背壓。產生背壓不同的主要因為連接 HPLC 與 MS 的 0.12 mm 小內徑長型輸送管線。內徑較大的輸送管線不適用於此類分析，因為可能使波帶變寬，降低此精細調整與解析度。

待檢出的 10 種化合物，其各自的校正曲線，至少由 6 個點構成 (至多 10 個)，而每種標準品均分析 3 次。全部 10 種分析物的線性迴歸與相關係數的數據，列於表 2。所有曲線的線性程度均高，各分析物在管柱 (Poroshell 120 SB-C18 管柱， $2.1 \times 50\text{ mm}$) 中的最大分析量為 10 ng。所有茶樣品均以 1:10 的比例，加水稀

釋後注入管柱，避免濃度高於校正標準品的最高濃度。唯獨沖泡茶樣品中的 EGCG 化合物，以 1:10 的比例加水稀釋後，仍超出最高濃度，於是利用表 2 的線性迴歸方程式，以外插法計算出 EGCG 的濃度。

表 2. 兒茶素與咖啡因的校正資料；所有標準品均分析 3 次，校正曲線至少由 6 點構成

	線性迴歸線	相關係數, R ²
沒食子酸 (Gallic acid)	$y = 0.466 x$	0.995
Gallocatechin	$y = 0.407 x$	0.996
Epigallocatechin	$y = 0.355 x$	0.996
Catechin	$y = 0.601 x$	0.996
咖啡因	$y = 3.439 x$	0.995
Epicatechin	$y = 0.638 x$	0.995
Epigallocatechin gallate	$y = 0.153 x$	0.998
Gallocatechin gallate	$y = 0.183 x$	0.996
Epicatechin gallate	$y = 0.396 x$	0.998
Catechin gallate	$y = 0.371 x$	0.996



A	0.2% CH ₃ COOH 水溶液	
B	CH ₃ CN	
	40 °C	
管柱	安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 2.1 x 50 mm, 2.7 μm	
來源	350 °C, 10 L/分鐘, 50 Psi, -/ +3500 V	
擷取	SIM- (169、305、289、457、441), SIM+ (195)	
樣品	溶於 H ₂ O/CH ₃ CN 中，濃度均 為 0.003 mg/mL 的 GA、GC、 EGC、C、Caf、EC、EGCG、 GCG、ECG、CG 等， 各注入 1.5 μL	
1.00 mL/分鐘		
時間 (分鐘)	0.00	0.50
%B	10	15
27		
1.25 mL/分鐘		
時間 (分鐘)	0.00	0.42
%B	10	15
27		
1.50 mL/分鐘		
時間 (分鐘)	0.00	0.36
%B	10	15
27		

圖 5. 兒茶素分析在提高流速，並依管柱容積調整沖提梯度後，分析速度又再加快

挑選的罐裝茶已進行分析，各種茶樣品的成分及產地，列於表 3，定量結果則顯示於圖 6。茶樣品 A 為日本茶，未開封，已於室溫下儲存約 3 年。樣品 A 只檢出沒食子酸 (gallic acid) 與咖啡因，原本可能有其他兒茶素，但已隨時間分解。罐裝茶樣品 B 及 D，為不同品牌的日本綠茶，兩者標示於標籤上的成份相同，經本分析法分析後，各種兒茶素的含量也約略相同。茶樣品 C 也是綠茶，標示成分也與樣品 B、D 相同，不過是台灣茶。相較於日本綠茶樣品 B、D，樣品 C 的 ePicatechin gallate 與 catechin gallate 含量較高，但其他 8 種分析物的含量則較低。罐裝茶樣品 E 與 F 為日本茶的混合茶，兩者的標籤均標示含有部分綠茶。樣品 E 的主成分為大麥，因此咖啡因與兒茶素的含量，均明顯低於其他茶樣品。茶樣品 F 為烏龍茶的混合茶，成分與其他綠茶有些微差異。相較於純日本茶的樣品 B 及 D，烏龍混合茶的食子酸 (gallic acid) 與咖啡因的含量較高，epicatechin gallate 與 catechin gallate 的含量相同，其餘的兒茶素含量則較低。

表 3. 罐裝茶樣品的成分及產地

罐裝茶樣品	產地	成分
A	日本	(未知)
B	日本	純水、綠茶、維生素 C
C	台灣	礦泉水、綠茶、維生素 C、天然調味料
D	日本	水、綠茶、維生素 C
E	日本	薏仁、糙米、胚芽米、綠茶、大麥、魚腥草、菊苣 (chickory)、藜麥 (quinoa)、明日葉、維生素 C
F	日本	烏龍茶、普洱茶、綠茶、紅茶、菊苣、大豆、芝麻、維生素 C

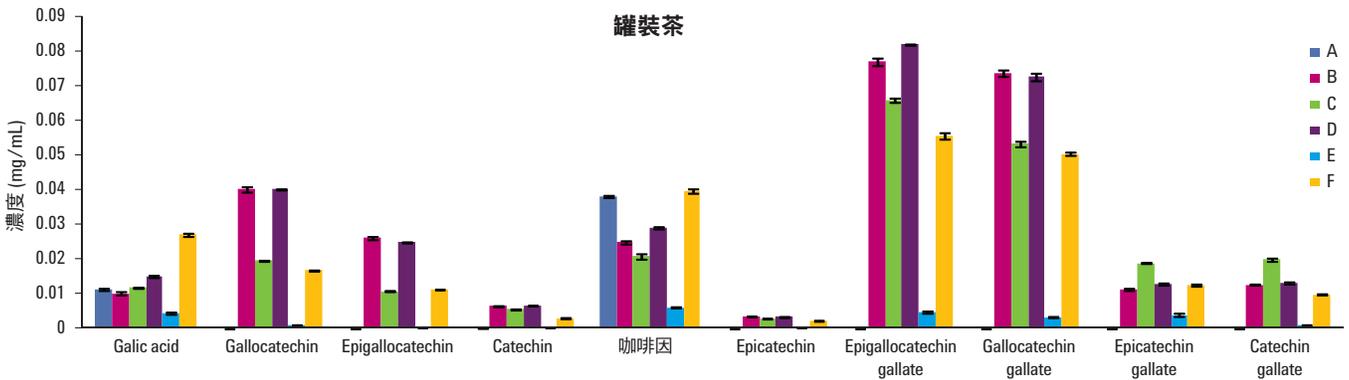


圖 6. 分析的 6 種罐裝茶樣品：3 種綠茶 (2 種日本綠茶 [B、D]、1 種台灣綠茶 [C])、1 種大麥混合茶 (E)、1 種烏龍混合茶 (F)、1 種未知 (A)

圖 6 為罐裝茶樣品的結果比較，圖 7 為現泡的綠茶樣品，圖 8 為現泡的紅茶樣品。兩種沖泡的茶樣品，在茶包沖泡 6-10 分鐘後，大部分化合物均出現最大濃度。過了這段最佳的沖泡時間之後，兩種茶樣品的化合物均開始分解。最值得注意的是 ePigallocatechin gallate，此成分在 60 分鐘內，就分解了最大濃度的 50% 以上。同樣令人感興趣的是，沖泡綠茶樣品與罐裝綠茶樣品，兩者的 epigallocatechin gallate 含量差異為何。

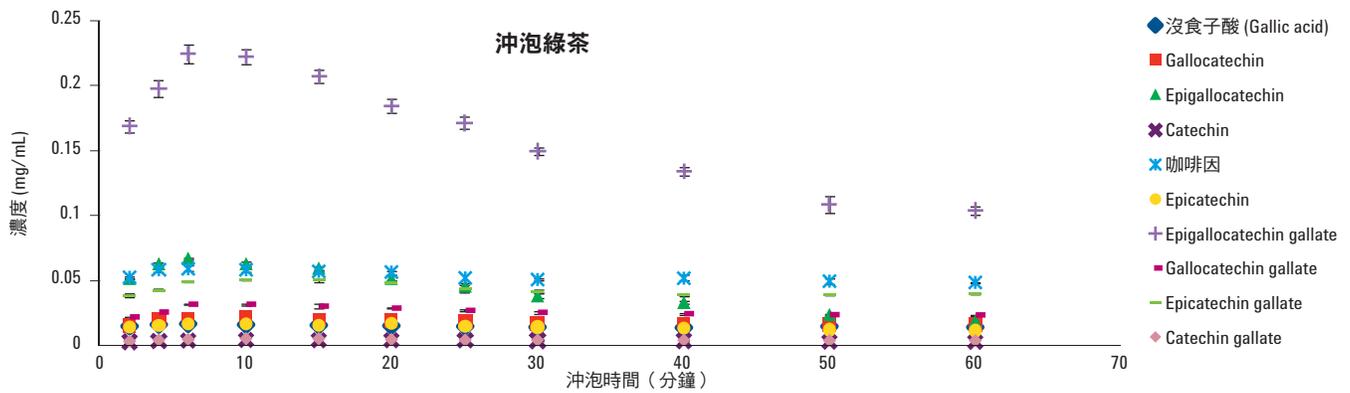


圖 7. 現泡綠茶樣品：1 種市面上的茶包，泡於 6 oz 沸水中，一段時間後取出

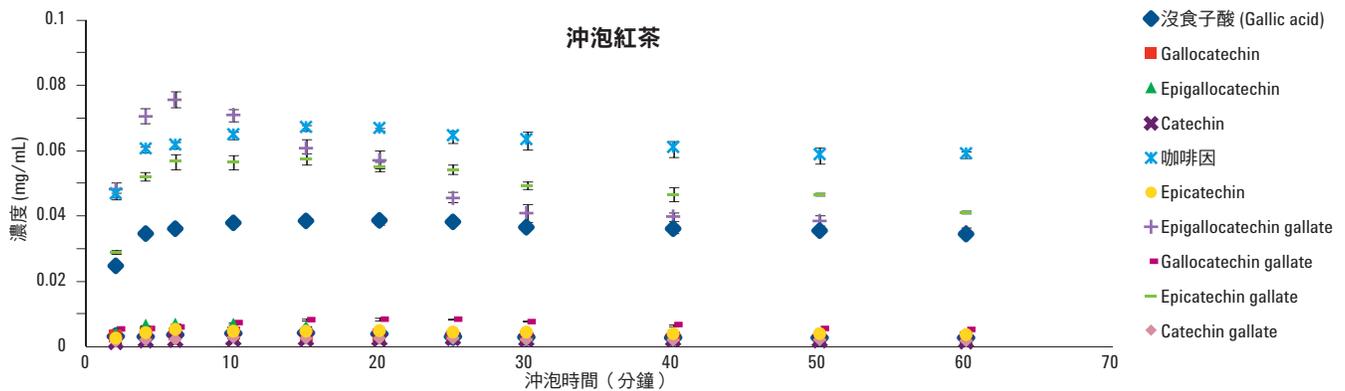


圖 8. 現泡紅茶樣品：1 種市面上的茶包，泡於 6 oz 沸水中，一段時間後取出

圖 9 顯示使用壽命研究的結果，該研究高壓 (550 bar) 注入超過 1500 次不乾淨的樣品，結果壓力並未上升，波峰寬度也未擴大。綠茶樣品為將市面上的茶包，置於 6 oz 的沸水中，沖泡 6 分鐘而成，之後未經過濾也未經稀釋，便直接注入 HPLC 中。兒茶素會大量分解（咖啡因較穩定），因此樣品需每天更換 2 次。安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 (2.1 × 100 mm、2.7 μm) 管柱中的 2 μm 濾片，非常適用於不乾淨的樣品，防止堵塞的功能也強於次 2 μm 管柱的 0.5 μm 濾片。

結論

分析綠茶中兒茶素的現有 HPLC 分析法，已自全多孔性顆粒充填的 1.8 μm 安捷倫 ZORBAX SB-C18 管柱，成功移轉至表面多孔性顆粒充填的 2.7 μm 安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 管柱。兩種管柱的選擇性幾乎相同，不需調整分析法，分離 10 種化合物的結果便能相同。所有成分的校正曲線，線性程度均相當高，因此各種罐裝茶與現泡茶，均能測定其兒茶素含量，並加以比較。本分析亦使用 Poroshell 120 管柱中較大型的 2 μm 濾片，進行使用壽命試驗，結果顯示，高壓注入不乾淨的樣品 1500 次以上後，不影響層析結果。

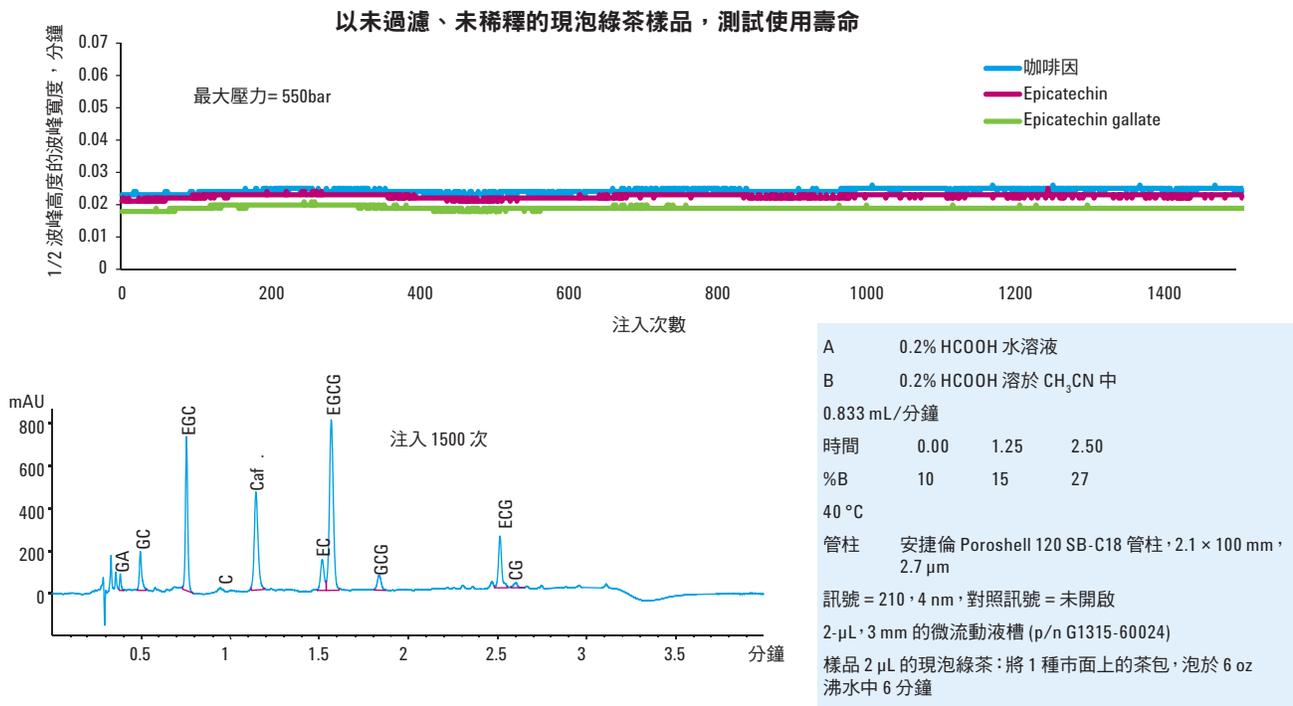


圖 9. 使用壽命研究，以未過濾、未稀釋的現泡綠茶樣品，注入 1500 次以上後，波峰寬度並未增大，壓力也未上升

參考資料

1. A. Drewnowski、C. Gomez-Carneros。《苦味植物營養素，和消費者：回顧報告》(Bitter Taste, Phytonutrients, and the Consumer:A Review)。美國臨床營養期刊 (The American Journal of Clinical Nutrition)，第 72 卷，第 6 期。2000 年 12 月。頁 1424-1435。
2. A. Dullo、C. Duret、D. Rohrer、L. Girardier、N. Mensi、M. Fathi、P. Chantre、J. Vandermander。《富含兒茶素多酚類與咖啡因的綠茶萃取物，在提高人體 24 小時的能量消耗，及脂肪分解方面的效用》(Efficacy of a Green Tea Extract Rich in Catechin PolyPhenols and Caffeine in Increasing 24-hour Energy Expenditure and Fat Oxidation in Humans)。美國臨床營養期刊，第 70 卷，第 6 期。1999 年 12 月。頁 1040-1045。
3. E. Roberts。《茶生產化學》(The Chemistry of Tea Manufacture)。食品與農業科學月刊 (Journal of the Science of Food and Agriculture)，第 9 冊，第 7 期。1958 年 7 月。頁 381-390。
4. H. Graham。《綠茶的組成、消耗及多酚化學》(Green Tea Composition, Consumption, and PolyPhenol Chemistry)。預防醫學期刊 (Journal of Preventative Medicine)，第 21 冊，第 3 期。1992 年 5 月。頁 334-350。
5. T. Yoshida, R. Majors, H. Kumagai。《使用 1.8 μm 顆粒充填的 ZORBAX 管柱，於快速分離液相層析儀中，進行高速分析》(High-Speed Analysis using Rapid Resolution Liquid Chromatography on ZORBAX column Packed 1.8 μm Particles)。分離科學期刊 (Journal of Separation Science) 第 29 冊，第 16 期。2006 年 11 月。頁 2421-2432。

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2011 年
於美國印製
2011 年 4 月 14 日
5990-7824CHTW



Agilent Technologies