

高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯肼在线 筛选与鉴别茶叶中抗氧化活性成分

王虹^{1,2} 陈军辉^{*1} 赵恒强¹ 王磊磊^{1,2} 张道来 王小如^{1,3} 杨东方²

¹ (国家海洋局第一海洋研究所, 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

² (上海海洋大学生命学院, 上海 201303)

³ (厦门大学化学化工学院化学系现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 将基于在线高效液相色谱-二苯基三硝基苯肼 (HPLC-DPPH^{*}) 快速筛选自由基清除剂的方法与电喷雾飞行时间质谱 (ESI-TOF/MS) 结合, 建立了茶叶粗提取物中抗氧化活性成分在线筛选与鉴别的方法。本方法是在 HPLC 色谱柱分离后进行分流, 一路进入 ESI-TOF/MS 用于各化合物的快速鉴别, 另一路流出液与稳定的自由基 DPPH^{*} 混合, 实现在线筛选自由基清除剂的作用。本方法用于茶水中抗氧化成分的快速筛选与鉴别, 筛选出 11 个具有明显 DPPH^{*} 自由基清除作用的化合物, 通过 ESI-TOF/MS 在线分析获得的质谱信息, 结合相关文献和数据库, 实现了各化合物的快速鉴别。11 个化合物分别为茶氨酸、Theogallin、没食子儿茶素、茶碱、色氨酸、表没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶酚、没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯及儿茶素没食子酸酯。本方法效率高、稳定性好, 是复杂天然产物中抗氧化剂快速筛选与鉴别的有力工具。

关键词 茶叶, 抗氧化成分, 筛选, 鉴别, 高效液相色谱, 电喷雾飞行时间质谱

1 引言

自 20 世纪 80 年代, 出于对人工合成的抗氧化剂的安全性考虑, 人们越来越倾向于开发使用天然的抗氧化剂。从草药、水果和蔬菜中分离植物成分用作食品、化妆品和药品中的防腐剂成为研究热点^[1]。目前, 普遍采用抗氧化活性测定指导下的分离方法, 这项工作步骤烦琐、劳动强度大, 常导致活性测定结果不准确, 特别是那些易被氧化的最有潜力的抗氧化剂。因此, 迫切需要开发一种从复杂的天然产物提取物中快速筛选潜在抗氧化剂的方法。

Koleva 等^[2]建立了一种从复杂的混合物中在线筛选自由基清除剂的快速方法, 高效液相色谱 (HPLC) 柱后在线添加稳定的自由基 DPPH^{*} (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), 混合物经 HPLC 柱分离后, 色谱柱洗脱液中包含的抗氧化剂对 DPPH^{*} 发生给质子作用, 使 DPPH^{*} 在 517 nm 的特征吸收消失, 在色谱图中形成负吸收峰, 从而实现了在线检测自由基清除剂的作用。目前, 此项技术已广泛应用于玻璃苣 (*Borago officinalis* L.) 叶粗提取物、苹果 (*Malus domestica* L.) 和 *Mentha* 等^[3~7] 中抗氧化成分的筛选。但是该方法只能进行天然产物粗提取物中抗氧化成分的快速筛选, 并不能对具有抗氧化活性的成分进行在线快速鉴别。

茶叶中主要含有茶多酚、生物碱、香气等成分^[8~11]。茶多酚是茶叶中酚类及其衍生物的总称, 是茶叶中一类重要的化学成分, 主要包括儿茶素类、黄酮、黄酮醇类、花青素类、花白素类和酚酸及缩酚酸类。茶多酚类化合物具有明显的抗氧化活性^[11]。本研究在 HPLC-DPPH^{*} 抗氧化成分筛选技术基础上, 结合 ESI-TOF/MS 分析, 以茶叶提取物为研究对象, 建立一种适用于天然产物提取物中抗氧化活性成分快速筛选与鉴定的方法, 弥补采用单一技术缺乏抗氧化活性成分快速鉴定能力的不足。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

两台 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配有二极管阵列 (DAD) 检测器, 四元泵等;

2008-08-13 收稿; 2009-03-05 接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 20675021)、福建省科技厅茶叶质量控制项目 (No. 2006N0043)、海洋公益性行业科研专项 (No. 200705011) 和海洋一所基本科研业务专项 (No. GY-022008T32) 资助

* E-mail: jhchen@fio.org.cn

G1969A 型电喷雾飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司), 配有电喷雾离子源; KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q (18.2 M \cdot cm) 超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司); THZ-8 恒温水浴振荡器 (浙江嘉兴电热仪器厂); MKRO-22R 冷冻离心机 (德国 Iettich 公司); 在线反应池为 PEEK 盘管 (10 m \times ϕ 254 mm i d); Sinochrom ODS-BP C₁₈ 色谱柱 (200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 大连依利特公司)。甲醇、甲酸为色谱纯, DPPH^{*} (二苯基三硝基苯肼, 纯度为 95%, Sigma-Aldrich Chemie 公司); 茶叶样品为福建水仙茶和青岛崂山绿茶。

2.2 供试品溶液及 DPPH^{*} 溶液制备

准确称取 0.5 g 茶叶 (粉碎过 0.45 mm 孔径筛) 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 水 (90 $^{\circ}$ C), 在 90 $^{\circ}$ C 水浴中振荡提取 10 min, 放置至室温 (25 $^{\circ}$ C), 离心 10 min (转速 6000 r/min), 取 10 mL 上层清液过 0.45 μ m 水相滤膜, 待测。

准确称量 DPPH^{*} 标准品, 用甲醇溶解配制成 6×10^{-5} mol/L 的溶液, 由于 DPPH^{*} 溶液的吸光值随温度变化较大, 因此将配制好的 DPPH^{*} 溶液立即置于冰箱中, 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

2.3 抗氧化成分在线筛选与鉴别条件

2.3.1 抗氧化成分在线筛选与鉴别流程

HPLC-MS/DPPH-DAD 在线筛选与鉴别茶叶中抗氧化活性成分实验装置的流程图见图 1。茶叶提取液经 HPLC 1 色谱柱分离, 柱后流出液通过分流装置按一定比例分流成两路, 一路进入质谱仪, 实现各成分的在线质谱分析; 另一路进入 DAD 检测器, 实现各成分的紫外吸收检测。DAD 检测器的流出液进入混合池, 与 HPLC 2 引入的稳定 DPPH^{*} 自由基溶液在混合池中混合, 茶叶抗氧化成分与 DPPH^{*} 自由基的混合物进入反应池 (温度可控) 发生反应, 然后进入 HPLC 2 的 DAD 检测器, 采用 DPPH^{*} 自由基的特征吸收波长 (517 nm) 进行在线检测, 记录由于抗氧化剂对 DPPH^{*} 自由基的清除造成的其在 517 nm 处吸收值的降低而形成的负峰; 对比 DAD 检测器获得的色谱图与形成负峰的色谱图, 即可确定具有 DPPH^{*} 自由基清除能力的化合物。结合质谱分析结果, 即可实现抗氧化成分的在线快速筛选与鉴别。

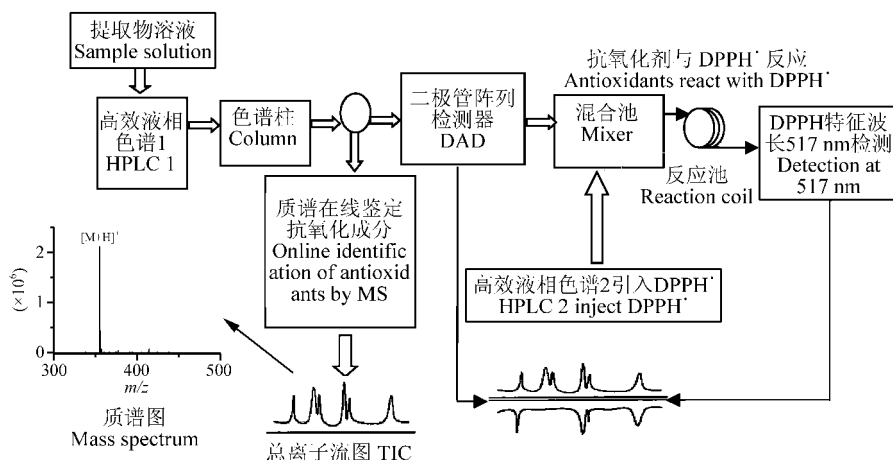


图 1 实验装置流程图

Fig 1 Experimental apparatus flow chart

2.3.2 仪器工作条件

HPLC 1 工作条件: Sinochrom ODS-BP C₁₈ 色谱柱, 流动相为 0.05% 甲酸溶液 (A) 和色谱纯甲醇 (B), 梯度洗脱程序为 t : 0 5 15 20 25 30 45 60 65 min, B: 13% 13% 20% 20% 25% 25% 40% 80% 100%; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流速 1.0 mL/min, DAD 210 和 278 nm 检测, 进样量为 20 μ L。HPLC 1 色谱柱后分流至 ES-TOF/MS 的流速为 0.3 mL/min, 另一路液体的流速为 0.7 mL/min。

ES-TOF/MS 工作条件: 正离子电离模式, 毛细管电压 4500 V, 喷雾气压 413.7 kPa; 干燥气 (N₂) 流速 12 L/min; 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C; 破碎电压 100 V。实验过程采用质荷比 (m/z) 121.0509 为参比离子对测定结果进行时时校正, 以保证结果的准确性, 分辨率 m/z 在 922.0098 处为 11300, 全扫描 (Scan) 质荷比 (m/z) 范围为 120 ~ 500。

HPLC 2 工作条件:引入 DPPH[®] 自由基甲醇溶液,流速 0.4 mL/min,反应池后紫外检测波长为 517 nm。

3 结果与讨论

3.1 茶叶抗氧化成分提取条件选择

常用于茶叶中儿茶素化合物提取的方法^[12]主要有热水或沸水浸提、甲醇或乙醇浸提和甲醇回流提取。因为人们用热水泡茶,所以本实验选择水为提取剂,与超声波辅助提取法和水浴加热提取法进行了比较。结果表明,水浴加热法的提取效率优于超声波辅助提取法。经实验比较确定最佳提取条件为水浴加热 90 min,恒温提取 10 min。

3.2 色谱条件优化

儿茶素类化合物的分析测定多采用 C₁₈ 柱^[12]。本实验采用特 C₁₈ 柱,比较了甲醇和乙腈为流动相 B 时的分离效果。结果表明,二者的分离效果差异不大。本实验选择价格便宜且毒性小的甲醇为流动相 B。还考察不同浓度的冰醋酸和甲酸(与质谱条件兼容)对分离的影响,最终确定采用 0.05% 甲酸水溶液为流动相 A。此外,实验中对不同柱温进行了比较,25℃ 条件下各峰分离效果最好。儿茶素类化合物在 210 nm 附近和 270~280 nm 有两个最大吸收带^[13],因此采用 210 和 278 nm 双波长进行检测。按 2.3.2 色谱条件测定供试品溶液(见图 2A),各色谱峰对称性良好,且达到了基线分离。

3.3 茶叶抗氧化活性成分在线筛选

3.3.1 DPPH[®] 自由基浓度和引入速度对信噪比的影响

使用茶叶提取液,采用内径为 0.254 mm、长度为 10 m PEEK 管为反应池,考察了 DPPH[®] 甲醇溶液浓度分别为 1.2×10^{-4} 、 6×10^{-5} 和 1×10^{-5} mol/L 时对茶叶抗氧化成分和自由基反应形成的负峰信噪比的影响。结果表明,在 DPPH[®] 自由基浓度为 6×10^{-5} mol/L 时,形成的负峰信噪比最大。因此,选用 6×10^{-5} mol/L DPPH[®] 自由基甲醇溶液用于后续条件优化。还考察了 DPPH[®] 自由基溶液(6×10^{-5} mol/L)引入速度分别为 0.2、0.4 和 0.6 mL/min 时对形成负峰的信噪比的影响。结果表明:在 0.4 mL/min 的流速下,茶叶抗氧化成分和自由基反应完全,形成的负峰信噪比最大。

3.3.2 不同反应环尺寸对分离度和信噪比的影响

考察了不同内径(0.254 和 0.508 mm)和长度(5、10 和 15 m)的 PEEK 盘管对反应过程的影响。结果表明:在 DPPH[®] 自由基溶液的流速一定的情况下,对相同内径不同长度的反应环,反应环越短,基线峰宽越窄,分离度越好;但反应环过短反应进行不完全,清除 DPPH[®] 自由基效果不佳,形成的负峰信噪也比较低。而对于相同长度不同内径的反应环,内径越细,分析时间越短,基线峰宽越窄,分离度越好。综合考虑,选择内径为 0.254 mm,长度为 10 m 的 PEEK 管作为反应池; 6×10^{-5} mol/L DPPH[®] 甲醇溶液,流速为 0.4 mL/min,为最佳实验条件。在此条件下,所得负峰色谱图如图 2B 所示,从图 2B 可见,茶叶提取液中有 11 种成分具有较为明显的清除 DPPH[®] 自由基的能力。

3.3.3 方法的适用性考察

本方法适用于 HPLC 等度或梯度洗脱,流动相可以是含 10%~90% 有机溶剂的水溶液,或 pH 3~6 的挥发性酸或挥发性缓冲盐溶液,与文献[2]的实验结果基本一致。另外,对方法的重复性进行了考察,取同一茶叶供试品溶液,重复进行 6 次,测定 4 个最大负峰的峰面积,计算各负峰 6 次测定峰面积的 RSD 值。结果表明:4 个负峰峰面积的 RSD 值均 < 7.2%,说明本方法的重复性良好。据文献[2,14]报道,HPLC-DPPH[®] 筛选抗氧化剂的灵敏度较高,检出限可达 0.33~94 mg/L,但是依据测定物的化学性质而变,说明本方法可用于不同天然产物粗提物中微量抗氧化剂的快速筛选与鉴别。

取同一茶叶供试品溶液,按优化所得的最佳条件,分别进样 2、4、8、16 和 32 μL 样品溶液,研究在线

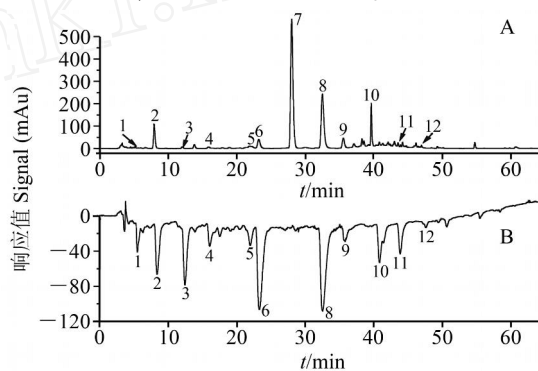


图 2 茶叶提取液(A)及其在线清除 DPPH[®] 自由基色谱(B)

Fig 2 Chromatograms of tea extract (A) and their on-line screening of radical scavenging (B)

清除 DPPH^{*} 自由基的量效关系。由实验结果 (图 3) 可知,在线清除 DPPH^{*} 自由基的负峰面积与用量具有较好的线性关系,说明本方法在合适的样品用量范围内,可以用于抗氧化剂的定量分析。图 3 中直线的斜率表示物质清除 DPPH^{*} 自由基能力强弱^[4],单位浓度的表没食子儿茶素没食子酸酯对 DPPH^{*} 自由基的清除能力最强,其次是没食子儿茶素,与文献^[15]的结果一致。

3.4 茶叶抗氧化成分 ESI-TOF/MS 鉴别

在 ESI 正离子模式下,对雾化器压力、干燥气流速、干燥气温度、破碎电压和毛细管电压等条件进行了优化。雾化压力分别为 207、276、345、414 和 552 kPa 时对质谱响应信号有一定的影响。随着雾化压力的增大,儿茶素类化合物的质谱检测信号由弱变强,且噪音变小。但在 552 kPa 时,儿茶素类化合物的质谱检测信号与 414 kPa 差别不大,确定最佳雾化压力为 414 kPa。考察了干燥气的流速分别为 10、11 和 12 L/min 对质谱响应信号的影响。干燥气流速太小,样品溶剂不能充分挥发;干燥气流速太大,样品会被吹散,降低检测的灵敏度。干燥气体流速为 12 L/min 时,质谱信号最好。因此,确定最佳干燥气流速为 12 L/min。考察了干燥气温度分别为 300、325 和 350 对儿茶素质谱响应信号的影响。结果表明:干燥气温度对儿茶素质谱响应信号的影响显著,干燥气温度 350 时获得的质谱结果最好。电喷雾飞行时间质谱在线分析获得的总离子流色谱图 (TIC) 如图 4 所示,可以看出茶叶中各化合物质谱分析信号良好。

本研究采用的高分辨飞行时间质谱仪能够得到各待测组分的准分子离子峰及其精确分子量,根据各化合物的精确分子量,利用 ESI-TOF/MS 系统自带的 Analyst QS 软件可对其分子式进行推测,利用该软件的同位素匹配功能对各离子峰的同位素峰高和位置进行匹配,可以进一步确认推测结果的可靠性。参考相关文献,结合 DAD 光谱图,即可对各化合物进行定性鉴别。下面就以 4 号峰为例,对高分辨飞行时间质谱鉴别茶叶抗氧化成分的过程进行介绍。4 号峰在 HPLC-ESI-TOF/MS 分析过程中只产生了 m/z 181.0723 ($[M+H]^+$) 的质谱信号 (见图 5),采用系统自带的 Analyst QS 软件对其分子式进行推测,误差范围设定为 5×10^{-6} (国际上一般认为 5×10^{-6} 以内推测结果是可靠的),得到两个可能的分子式 $C_7H_9N_4O_2$ 和 $C_9H_{11}NO_3$ 。利用该软件的同位素匹配功能对离子峰的同位素峰高和位置进行匹配 (见图 5),进一步确认该离子峰分子式可能为 $C_7H_9N_4O_2$,通过参考相关文献和中国科学院上海有机化学研究所化学专业数据库,确定该化合物的分子式为 $C_7H_8N_4O_2$,并确定该化合物为茶碱。图 2 中显示的另外 10 个具有抗氧化活性的组分及 1 个含量极高的组分的 HPLC-ESI-TOF/MS 分析鉴别结果见表 1。

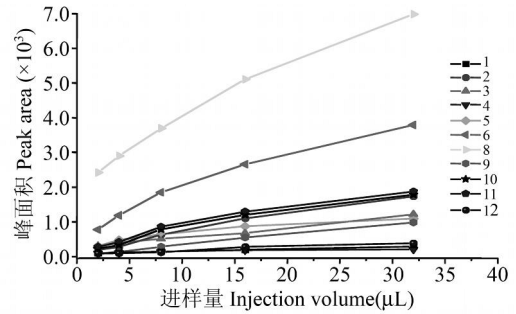


图 3 茶叶各成分清除 DPPH^{*} 自由基能力比较 (序号与图 2 中峰号一致)

Fig 3 Comparison of free radical scavenging capability of antioxidants in tea (serial number according with peak no in Fig 2)

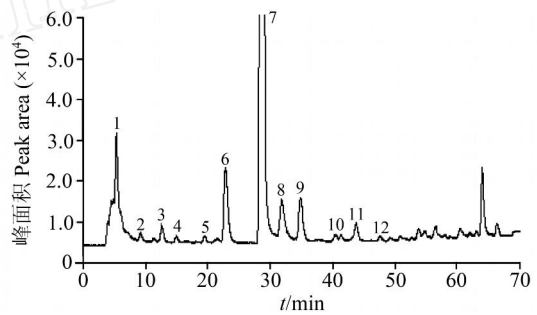


图 4 茶叶样品 HPLC-ESI-TOF/MS 分析总离子流色谱图 (峰号与图 2 中峰号一致)

Fig 4 HPLC-ESI-TOF/MS total ion chromatogram of the extract of tea (peak number according with peak number in Fig 2)

4 号峰在 HPLC-ESI-TOF/MS 分析过程中只产生

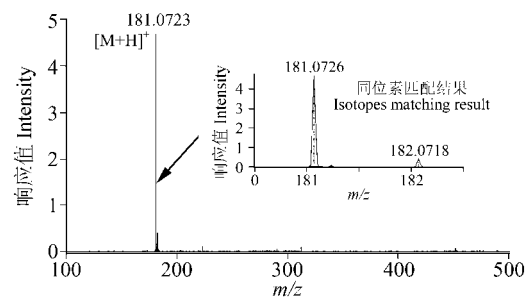


图 5 4 号峰 ESI-TOF/MS 质谱图及其准分子离子峰理论同位素强度与实际测得的同位素强度匹配结果

Fig 5 Observed mass ($[M+H]^+$) of peak 4 by ESI-TOF/MS and its isotopics compared with calculated isotopics

表 1 茶叶水提取物 HPLC-ESI-TOF/MS 分析各抗氧化成分的精确质量数及鉴别结果 (序号与图 2 中峰号一致)

Table 1 HPLC-ESI-TOF/MS accurate mass measurements of antioxidants in the water extract of tea and the results of identification of all this compounds (serial number according with peak number in Fig 2)

峰号 No	保留时间 R_t (min)	选择离子 Selected ion	测定值 Experimental value (m/z)	理论值 Calculated value (m/z)	分子式 Formula	偏差 Error ($\times 10^{-6}$)	化合物 Compounds	文献 References
1	5.50	$[M+H]^+$	175.1089	175.1082	$C_7H_{14}N_2O_3$	3.61	茶氨酸 Theanine	16
2	8.50	$[M+H]^+$	345.0805	345.0821	$C_{14}H_{16}O_{10}$	-4.85	Theogallin	17
3	12.35	$[M+H]^+$	307.0809	307.0817	$C_{15}H_{14}O_7$	-2.86	没食子儿茶素 Galocatechin grad	18
4	15.65	$[M+H]^+$	181.0723	181.0720	$C_7H_8N_4O_2$	1.38	茶碱 Theophylline	D
5	21.49	$[M+H]^+$	205.0983	205.0977	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	2.91	色氨酸 Tryptophan	D
6	22.54	$[M+H]^+$	307.0808	307.0817	$C_{15}H_{14}O_7$	-3.18	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	18
7	28.75	$[M+H]^+$	195.0876	195.0882	$C_8H_{10}N_4O_2$	-3.08	咖啡碱 Caffeine	18
8	31.81	$[M+H]^+$	459.0919	459.0927	$C_{22}H_{18}O_{11}$	-1.82	表没食子儿茶素没 食子酸酯 Epigallocatechin-3-gallate	18
9	35.70	$[M+H]^+$	291.0846	291.0868	$C_{15}H_{14}O_6$	-7.78	表儿茶酚 Table catechol	18
10	40.33	$[M+H]^+$	459.0912	459.0927	$C_{22}H_{18}O_{11}$	-3.35	没食子酸酯 Gallate	18
11	43.69	$[M+H]^+$	443.0965	443.0978	$C_{22}H_{18}O_{10}$	-2.98	没食子儿茶素没 食子酸酯 Galocatechin-3-gallate	18
12	47.75	$[M+H]^+$	443.0961	443.0978	$C_{22}H_{18}O_{10}$	-3.89	儿茶素没食子酸酯 Catechin gallate	18

注 (note): D: 中国科学院上海有机化学研究所化学专业数据库 (Scientific Database for Chemistry of Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences)。

3.5 用于其它天然产物中抗氧化成分筛选与鉴别的研究

在选定的最佳实验条件下, 本方法还用于中草药甘草、丹参^[19]以及海洋中药海马等天然产物粗提物中抗氧化活性成分的筛选与鉴别, 均获得较为满意的实验结果。图 6 为甘草氯仿萃取物中抗氧化活性成分在线筛选实验结果。由图 6 可以看出, 甘草氯仿萃取物中具有 DPPH 自由基清除作用的化合物主要有 4 种, 根据 ESI-TOF/MS 在线分析测得的结果可知, 这 4 个化合物分别为异甘草素 (isoliquiritigenin (C7))、甘草香豆素 (glycoumarin (C8))、glycyrrhisoflavone B (C9) 和 dehydroglyasperin D (C5)。

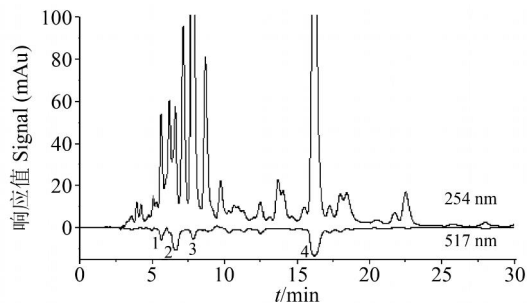


图 6 甘草提取液及其在线清除 DPPH 自由基色谱图

Fig 6 Chromatograms of Licorice extract and their on-line screening of radical scavenging

4 结论

本研究所建立的在线快速筛选与鉴别茶叶中抗氧化活性成分的方法, 不仅可用于茶叶中抗氧化成分的快速筛选与鉴别, 还可用于陆源中草药及海洋药物中抗氧化活性成分快速筛选与鉴别。本方法的适用范围广, 重复性与稳定性好, 突破了传统方法离线筛选、离线鉴定的模式, 特别适合天然产物复杂体系中抗氧化活性成分的快速筛选与鉴别, 提高了复杂天然产物中抗氧化活性成分的筛选效率。

References

- 1 Nakatani N. *Biofactors*, **2000**, 13: 141 ~ 146
- 2 Koleva I I, Niederländer H A G, van Beek T A. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 2323 ~ 2328
- 3 Bandoniene D, Murkovic M. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2002**, 53: 45 ~ 49
- 4 Bandoniene D, Murkovic M. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50: 2482 ~ 2487
- 5 Koar M, Doman H J D, Baer K H C, Hiltunen R. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52: 5004 ~ 5010
- 6 Exarchou V, Fiamegos F C, van Beek T A, Nanos C, Vervoort J. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112 (1-2): 293 ~ 302

- 7 Pukalskas A, van Beek T A, de Waard P. *J. Chromatogr A*, **2005**, 1074: 81 ~ 88
- 8 Yan S H. *J. Infrared Spectra*, **2005**, 13 (6): 313 ~ 325
- 9 Michael J, Michael A, Bruce A, Gary J. *Anal. Chem.*, **2005**, 77 (14): 4385 ~ 4389
- 10 Zhou Bei(周蓓), Wang Lin(王琳), Li Wei(李伟), Sun Yi(孙怡), Ye Hong(叶红), Zeng Xiao-Xiong(曾晓雄). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36 (4): 494 ~ 498
- 11 Wei Yang(魏决), Ding Ming-Yu(丁明玉). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), **2002**, 18 (1): 35 ~ 38
- 12 Zhou Yao-Hong(邹耀洪). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31 (3): 381 ~ 381
- 13 Dai Jun(戴军), Wang Hong-Xin(王洪新), Chen Shang-Wei(陈尚卫). *Chinese J. Chromatography* (色谱), **2001**, 19 (5): 398 ~ 402
- 14 Lissi E A, Modak B, Torres R, Escobar J, Urzua A. *Free Radical Res*, **1999**, 30 (6): 471 ~ 477
- 15 Zhu Fa-Wei(朱发伟). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **2005**, 36 (8): 1271 ~ 1272
- 16 Zhu Xiao-Lan(朱小兰), Chen Bo(陈波), Luo Xu-Biao(罗旭彪), Yao Shou-Zhuo(姚守拙). *Chinese J. Chromatogr* (色谱), **2003**, 21 (4): 400 ~ 402
- 17 Cartwright R A, Roberts E A H. *J. Sci. Food Agr*, **2006**, 5 (12): 593 ~ 597
- 18 Kang Hai-Ning(康海宁), Chen Bo(陈波), Han Chao(韩超), Chen Jun-Hui(陈军辉), Wang Xiao-Ru(王小如). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **2007**, 26 (2): 211 ~ 215
- 19 Wang Xiao-Ru(王小如), Li Xian-Chun(黎先春), Li Lei(李磊). *Key Technology of Quality Control for Traditional Chinese Medicinal Materials* (中药及中药材质量控制关键技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), **2006**: 204 ~ 205

On-line Screening and Identification of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extract of Tea by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

WANG Hong^{1,2}, CHEN Jun-Hui^{*1}, ZHAO Heng-Qiang¹,
WANG Lei-Lei^{1,2}, ZHANG Dao-Lai¹, WANG Xiao-Ru^{1,3}, YANG Dong-fang²

¹ (Qingdao Key Lab on Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao 266061)

² (College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201303)

³ (Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Science of the Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract A new method based on the HPLC on-line scavenging diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH[®]) radical activity and ESI-TOF/MS for the rapid screening and identification of radical scavengers from water extract of tea was developed. Water extract of tea was separated by HPLC. The outlet of HPLC flow cell was connected to a split valve in order to divert a flow to ESI-TOF/MS for on-line rapid identification of the antioxidants in water extract of tea, and another stream react post-column with the DPPH solution for on-line screening the antioxidants in water extract of tea. The results showed that eleven compounds in tea have scavenging radical activity, and all the eleven compounds including theanine, theogallin, galocatechin grade, theophylline, tryptophan, epigallocatechin, epigallocatechin-3-gallate, table catecholc, gallate, galocatechin-3-gallate and catechin gallate were identified by ESI-TOF/MS according to literatures and data base. The method has also been used for several other natural products successfully. This method is reliable, efficient and it is a powerful tool for rapid screening and identification of free radical scavenging compounds in complex natural products.

Keywords Tea, antioxidants, screening, identification, high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry

(Received 13 August 2008; accepted 5 March 2009)