

不同品种茶叶单宁的含量与结构测定

李敏¹, 王洁¹, 杨志伟^{1,2}, 林鹏^{1,2}, 林益明^{1,2,*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学湿地与生态工程研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 测定了本山、黄旦和铁观音三个品种茶树成熟叶片的总酚及可溶缩合单宁含量, 并通过基质辅助激光解吸附飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)研究了茶叶缩合单宁的基本结构。结果显示, 三种茶叶均具有较高的总酚含量, 大约为 200mg/g; 三种茶叶的缩合单宁是以(表)儿茶素(EC/C)和(表)儿茶素(EGC/GC)为基本结构单元的均聚物和杂聚物, 且大部分聚合物的结构单元之间存在 A 型和 B 型两种连接方式, 其中本山和黄旦缩合单宁的最高聚合度要大于铁观音。

关键词: 茶; 多酚; 缩合单宁; 基质辅助激光解吸附飞行时间质谱; 多聚物

Contents and Structure Analysis of Tannins in Leaves of Three Cultivars of *Camellia sinensis*

LI Min¹, WANG Jie¹, YANG Zhi-wei^{1,2}, LIN Peng^{1,2}, LIN Yi-ming^{1,2,*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China ;

2. Research Centre for Wetlands and Ecology Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : The contents of total polyphenols and extractable condensed tannins in leaves of three types of *Camellia sinensis* (Benshan, Huangdan and Tieguanyin) were determined. In addition, the structures of condensed tannins were characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Three types of tea leaves have total phenolic contents as high as 200 mg/g. The majority of condensed tannins in the three types of *C. sinensis* are identified as the mixtures of procyanidins and prodelphinidins with a medium level of galloylation through the linkage of A-type and B-type interflavan bonds. Meanwhile the degree of polymerizations is higher in Benshan and Huangdan than in Tieguanyin.

Key words : *Camellia sinensis* ; polyphenols ; condensed tannins ; MALDI-TOF MS ; polymers

中图分类号 : TS207.3

文献标识码 : A

文章编号 : 1002-6630(2009)02-0149-05

茶(*Camellia sinensis*)是一种保健功能良好的全球性饮品。茶叶中的多酚类化合物^[1]不仅可以阻碍癌细胞的DNA复制, 抑制其生长^[2-3], 还能保护线粒体及核酸的完整性, 延缓机体衰老^[4]。此外, 茶多酚可以防止食品及动物体内不饱和脂肪酸的氧化, 减少心血管疾病的发生^[5], 抑制病菌的繁殖, 维持人体肠道的正常代谢^[6]。

目前, 对茶叶中小分子量的多酚类物质已有较深入的了解^[1-3,6-7], 但对大分子缩合单宁的研究尚未见报道。作为重要的多酚类化合物, 缩合单宁不但能影响森林生态系统中氮元素的循环^[8]和食草动物的营养吸收^[9], 还是制造植物黏胶剂和鞣革工业的主要原料, 具有很高的科研价值和广阔的市场前景。但是由于缩合单宁结构复杂, 又缺乏有效的分离及纯化手段, 相关的研究一直

处于起步阶段。MALDI-TOF 质谱不需要对样品进行严格的纯化就可以准确快速的测定高分子化合物的结构信息, 而且在分析过程中不易产生碎片峰并能够很好的保证样品的完整性^[10], 这为人们了解单宁的结构提供了有力的保障和可靠的依据。

本实验选择了三个品种茶叶, 对总酚和可溶性缩合单宁含量进行测定, 并通过 MALDI-TOF 质谱分析茶叶缩合单宁的基本结构、结构单元的连接方式和聚合度的分布, 探讨不同品种间单宁含量和结构的差异。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本山、黄旦和铁观音三个品种茶树的成熟叶片于 2007 年 5 月采自福建省泉州市安溪县官桥镇。

收稿日期 : 2007-12-13

基金项目 : 国家自然科学基金项目(40376026 ; 30671646)

作者简介 : 李敏(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物单宁化学。E-mail : daocarenlin@126.com

* 通讯作者 : 林益明(1967-), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物生态学。E-mail : linym1967@xmu.edu.cn

磷酸、甲醇、丙酮、正丁醇、三氯化铁、铁氰化钾、阿拉伯胶均为分析纯试剂；三氟醋酸铯(纯度99%)；实验用水为二次去离子水。

1.2 仪器与设备

SHZ-B 循环水真空泵 上海仪表供销公司；SENCO 旋转蒸发器 上海申科科技有限公司；DK-526 电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司；UV-2000 紫外可见分光光度计 上海仪器有限公司；FD-1 冷冻干燥机 北京德天佑科技发展有限公司；Bruker Reflex 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 德国 Bruker 公司；Sephadex LH-20 色谱柱 美国 Amersham 公司。

1.3 方法

1.3.1 单宁的提取与纯化

取原料样品 20g，加入 200ml 丙酮-水(7:3, V/V)后用组织捣碎机捣碎，静提 30min。抽滤，取上清液。往残渣中加入 150ml 丙酮-水(7:3, V/V)并静提 30min，重复 2 次。合并上清液，在 35℃ 下旋转蒸干有机溶剂，剩下的溶液冷冻干燥处理，得到茶叶单宁粗提物。

使用规格为 2.5cm × 15.0cm 的 Sephadex LH-20 色谱柱进行样品分离。先用 500ml 甲醇-水(5:5, V/V)平衡，然后将 1.2g 粗提物与 10ml 甲醇-水(5:5, V/V)混合后上样。洗脱次序为：500ml 甲醇-水(5:5, V/V)，1000ml 丙酮-水，500ml 甲醇-水(5:5, V/V)。丙酮-水(7:3, V/V)洗脱时收集纯化的单宁溶液，在 35℃ 下将有机溶剂旋转蒸干，剩下的溶液冷冻干燥处理，得到单宁纯化物并在 -20℃ 保存。

1.3.2 样品溶液的制备

取 0.1g 新鲜样品，与 5ml 丙酮-水(7:3, V/V)混合后研磨成浆。静置 30min 后 4000r/min 离心 10min，将上清液转移到 50ml 容量瓶中。重复两次。蒸馏水定容，室温下避光保存备用。

1.3.3 总酚的测定

采用 PB 法^[11]。

1.3.4 可溶缩合单宁的测定

采用盐酸-正丁醇法^[12]。

1.3.5 MALDI-TOF 质谱分析

参考向平等^[13]的研究，本实验采用如下条件：氮激光波长 337nm，激光脉冲宽度 3ns；在反射模式下，加速电压 20.0kV，反射电压 23.0kV；以 Angiotensin (1046.5 相对分子质量(Mr))、Bombesin (1619.8Mr)、ACTHclip18~39 (2465.2Mr)和 Somatostatin28 (3147.47Mr) 为外标，DHB(10g/L)为基质，基质和样品(7.5g/L)以 1:3 (V/V)混合后取 1.5μl 在靶上点样。基质和样品溶液均用 Amberlite IRP 64 离子交换树脂进行去离子处理。适当比例的三氟醋酸铯分别加入到基质/样品溶液中以促进形成

单离子加合物([M+Cs]⁺)。

1.3.6 统计分析

数据统计分析采用 SPSS for Windows 13.0 软件，多组间比较用 One-Way ANOVA 法。

2 结果与分析

2.1 茶叶的总酚与可溶缩合单宁含量

三种茶叶的总酚含量在 199.05 ± 12.53 ~ 229.52 ± 18.20mg/g 之间，三种茶叶的总酚含量没有显著差异；对比文献报道^[7,14-15]，不同提取工艺下成品绿茶的总酚含量为 140 ~ 290mg/g，本山、黄旦和铁观音的总酚含量与此接近；本山、黄旦和铁观音的可溶性缩合单宁含量分别为 59.10 ± 17.5、37.43 ± 9.66、35.43 ± 3.04mg/g(表 1)。

表 1 三个品种茶叶的总酚和可溶缩合单宁含量

Table 1 Contents of total phenolics and soluble condensed tannins in leaves of three cultivars of *C. sinensis*

品种	总酚(mg/g)	可溶缩合单宁(mg/g)
本山	203.94 ± 13.40 ^a	59.10 ± 17.50 ^a
黄旦	199.05 ± 12.53 ^a	37.43 ± 9.66 ^{ab}
铁观音	229.52 ± 18.20 ^a	35.43 ± 3.04 ^b

注：* 不同字母表示差异显著(p < 0.05)。

2.2 茶叶缩合单宁的 MALDI-TOF 质谱分析

2.2.1 基本结构单元

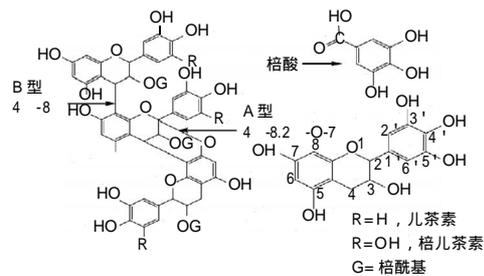
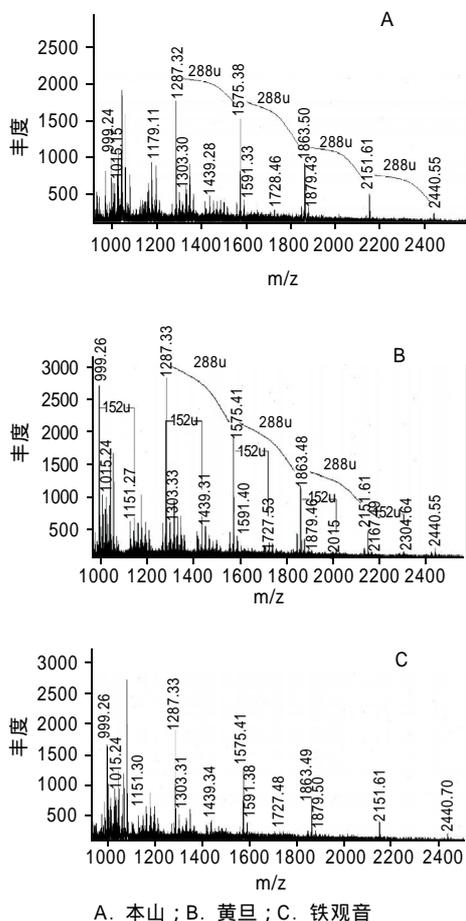


图 1 缩合单宁的结构单元及其连接方式

Fig.1 Structural units and linkage types of proanthocyanidin

按照酚羟基的数目及取代位置的不同，缩合单宁可以分成原花青定、原翠雀定和原天竺葵定等几类，它们的结构单元依次为(表)儿茶素(EC/C)和(表)儿茶素(EGC/GC)和(表)阿福豆素^[7]。对同一类型的缩合单宁而言，聚合度不同的聚合物之间以及聚合度相同的不同聚合物之间，在相对分子质量和空间构型上可能会有很大差异，但其基本结构单元是一致的(图 1)。这一特点在 MALDI-TOF 质谱图中就反映为一系列以相同核质比递增的可检测峰，其中每个峰与同系列的前、后峰(图 2)之间分子量的差别均为固定值。

从图 2A 中，能够找到一个相邻离子峰之间差值固



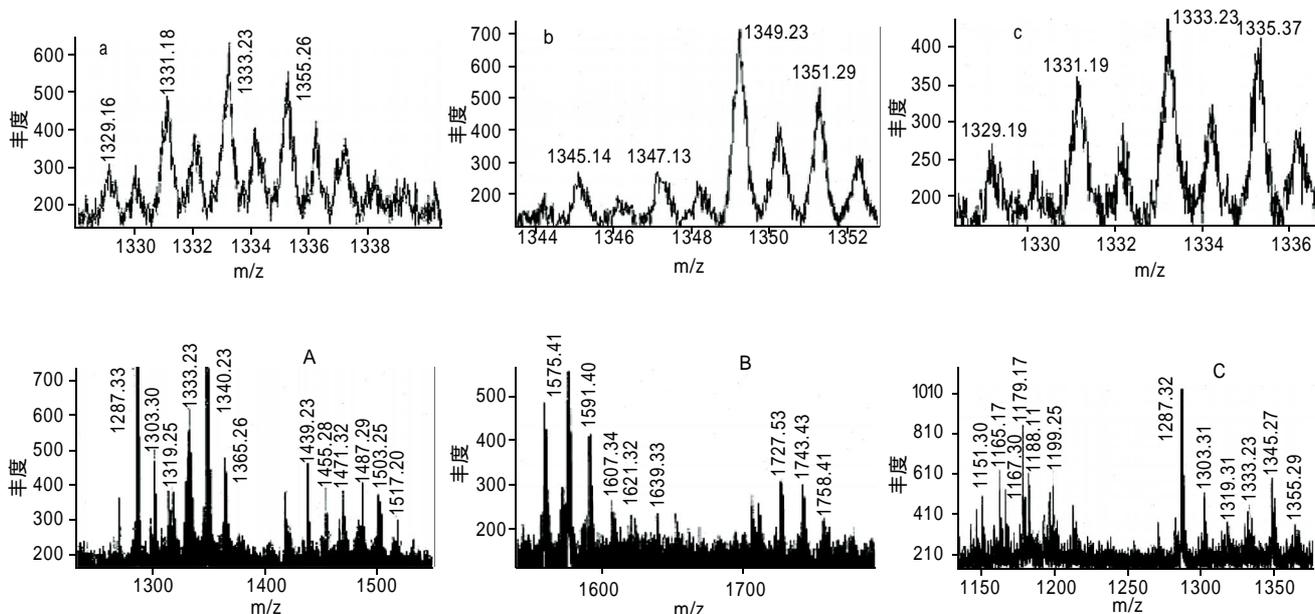
A. 本山; B. 黄旦; C. 铁观音

图2 MALDI-TOF 质谱检测三个品种茶叶缩合单宁

Fig.2 MALDI-TOF MS spectromgrams of condensed tannins form leaves of three cultivars of *C. sinensis*

定为 288u 的离子峰系列：999.24、1287.32、1575.38、1863.50、2151.61 和 2440.70u。考虑到 288u 恰好等于缩合单宁中 EC/C 结构单元的分子量，可以推测这一系列的离子峰属于原花青定。为了证明这一推论，参考 Krueger 等^[16]和 Yang 等^[17]的研究设立方程式 $m/z=290+288a+133$ 计算原花青定在质谱图中的质荷比，以比较观测值与计算值的差别，其中 290 代表末端单元 EC/C 的 Mr，288 代表延伸单元 EGC/GC 的 Mr，133 代表 Cs⁺ 的相对原子质量，a 代表了原花青定的聚合度。将数据计算后，可以发现上述离子峰的质荷比与理论值一致(表 2)，说明茶叶本山含有原花青定；同理，也可证明黄旦及铁观音含有原花青定。

在孙达旺等^[2,6-7]的研究中，茶多酚不但包括 EC/C，还包括 EGC/GC、(表)儿茶素鞣酸酯和(表)儿茶素鞣酸酯，这一方面证实了上面的结论，另一方面则暗示了其他缩合单宁存在的可能。观察图 2、3，能够看到大部分原花青定离子峰附近都有几个与其相差为 152u 和 16 × Nu 的离子峰(N=1、2、3、4)。由于缩合单宁的构成单元 EC/C 与 EGC/GC 中 C₃ 羟基上的氢被鞣酰基取代时增加的分子量为 152u，而相同聚合度下 EC/C 被 EGC/GC 替换时增加的分子量为 16u(图 1)，推测茶叶缩合单宁是一类以 EC/C 和 EGC/GC 为基本结构单元的复杂多聚物，并建立方程式 $m/z = 290 + 288a + 304b + 152c + 133$ 计算其理论质荷比以检验猜想的正确性^[16-17]，其中 290 代表末端单元 EC/C 的 Mr，288 代表 EC/C 的 Mr，304 代表 EGC/GC 的 Mr，152 代表鞣酰基的 Mr，133 代表 Cs⁺ 的相对原子



a. 本山; b. 黄旦; c. 铁观音; A. 本山; B. 黄旦; C. 铁观音。

图3 MALDI-TOF 质谱检测三种茶叶缩合单宁的连接方式(a,b 和 c) 及鞣酰化(A,B 和 C)

Fig.3 MALDI-TOF MS spectromgrams of interflavan bonds (a, b and c) and galloylation (A, B and C) in leaves three cultivars of *C. sinensis*

质量, a、b 和 c 则分别代表了 EC/C 和 EGC/GC 及 6-乙酰基的聚合度。从表 2 可以看出, 茶叶缩合单宁的 MALDI-TOF 质谱观测值与根据方程式 $m/z = 290 + 288a + 304b + 152c + 133$ 计算得到的数值没有差别或差别很小, 这表明上述猜想和事实相符。茶叶缩合单宁的基本结构单元为 EC/C 和 EGC/GC, 它既包含 EC/C 或 EGC/GC 组成的均聚物, 又含有 EC/C 和 EGC/GC 及 6-乙酰基组成的杂聚物, 结构十分复杂。

2.2.2 结构单元间的连接方式

仔细观测茶叶缩合单宁的质谱图(图 3), 发现了许多包括理论离子峰在内的质荷比差值为 $2u$ 的序列, 其中大部分离子峰的质荷比要小于根据方程式 $m/z = 458 + 456a + 152b + 133$ 计算得到的理论值。这种现象在 Krueger 等的研究中也曾出现^[16], 它不是在 MALDI-TOF 质谱检测过程中因样品破碎或脱水产生的离子峰^[18], 而是源于结构单元之间连接方式的不同。

植物缩合单宁可以通过 A、B 两种方式形成多聚分散物, 前者以一个 C-C 键及一个 C-O-C 键的双连接连接前后两个结构单元, 后者则通过 4-8 位(B 型)或 4-6 位的 C-C 键组成多聚物^[7,13](图 1)。由于形成 A 型连接比 B 型连接多消耗 2 个氢原子, 当聚合度不变时, A 型连接多的聚合物的 Mr 也就要小于其他聚合物, 这表现在质谱图中就是所观测到的一系列差值为 $2u$ 的对应离子峰序列。从图 3 及表 2 的数据可知: 本山、黄旦和铁观音的缩合单宁中, 存在 A 型与 B 型两种连接方式, 而且相同聚合度的不同聚合物之间结构单元的连接方式各不相同, 但拥有 A 型连接的聚合物要少于拥有 B 型连接的聚合物。

2.2.3 不同品种茶叶间缩合单宁的聚合度及聚合物的分布

作为一类结构复杂的高分子化合物, 缩合单宁的聚合度及聚合物的分布对植物单宁研究者探讨单宁的生物学作用及单宁的经济开发具有重要的意义。由图 2 和表 2 可

表 2 MALDI-TOF 质谱检测三个品种茶叶缩合单宁

Table 2 MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins form leaves of three cultivars of *C. sinensis*

聚合度	结构单元组成			连接方式		观测值 [M + Cs] ⁺			计算值 [M + Cs] ⁺
	儿茶素	槲儿茶素	6-乙酰基	A 型	B 型	本山	黄旦	铁观音	
3	3	0	0	0	2	999.24	999.26	999.26	999
	2	1	0	0	2	1015.15	1015.24	1015.24	1015
	1	2	0	0	2	1031.18	1031.22	1031.23	1031
	0	3	0	0	2	1047.18	1047.22	1047.23	1047
	0	3	1	0	2	1199.23	1199.26	N	1199
	1	2	1	2	0	1179.11	1179.15	1179.17	1179
	2	1	1	2	0	1163.11	1163.18	N	1163
	3	0	1	0	2	1151.23	1151.27	1151.30	1151
	4	0	0	0	0	1287.32	1287.33	1287.33	1287
	4	0	1	0	0	1439.28	1439.31	1439.34	1439
4	3	1	0	0	3	1303.30	1303.33	1303.31	1303
	2	2	0	0	3	1319.25	1321.30	1319.33	1319
	1	3	0	0	3	1335.26	1337.29	1335.37	1335
	1	3	0	1	2	1333.23	1333.23	1333.23	1333
	1	3	0	2	1	1331.18	1331.16	1331.19	1331
	1	3	0	1	0	1329.16	1329.14	1329.19	1329
	0	4	0	1	2	1349.23	1349.23	1349.27	1349
	5	0	0	0	4	1575.38	1575.41	1575.41	1575
	5	0	1	0	4	1728.46	1727.53	1727.48	1727
	4	1	0	0	4	1591.33	1591.40	1591.38	1591
6	6	0	0	0	5	1863.50	1863.48	1863.49	1863
	5	1	0	0	5	1879.43	1879.46	1879.50	1879
	4	2	0	0	5	1895.48	1895.50	1896.54	1895
	6	0	1	0	5	2015.50	2015.44	2015.44	2015
7	7	0	0	0	6	2151.61	2151.61	2151.61	2151
	7	0	1	0	6	N	2304.64	N	2303
	6	1	0	0	6	2167.52	2167.49	2167.61	2167
8	8	0	0	0	7	2440.70	2440.55	2440.70	2439
9	9	0	0	0	8	2728.66	2728.60	N	2727

注: N 表示未观测到。

知,本山、黄旦和铁观音的缩合单宁都是以EC/C和EGC/GC为结构单元的均聚物和杂聚物,每一聚体内的聚合物都存在由于结构单元的不同或结构单元间连接方式不同产生的差异。其中本山和黄旦的缩合单宁是从二聚体(m/z 999.24; 999.26)到九聚体(m/z 2828.66; 2728.60)分布的寡聚和多聚物,但铁观音的缩合单宁中最高聚合度的聚合物仅为八聚体(m/z 2440.70)。此外,三种茶叶缩合单宁的质谱图中,离子峰强度最大的聚合物均为三聚体(m/z 999.24; 999.26; 999.26)。以上现象说明:本山和黄旦缩合单宁的最高聚合度可能大于铁观音;三种茶叶的缩合单宁主要以三聚体形式的寡聚物存在。

参考文献:

- [1] STOCLET J C, CHATAIGNEAU T, NDIAYE M, et al. Review-vascular protection by dietary polyphenols[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 500: 299-313.
- [2] SUSAN M, ANDREA C, STEVE E, et al. Green tea catechins suppress the DNA synthesis marker MCM7 in the TRAMP model of prostate cancer[J]. *Molecular Oncology*, 2007, 1(2): 196-204.
- [3] HIROFUMI T, KIYOSHI K, YOSHINORI K, et al. A receptor for green tea polyphenol EGCG [J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2004, 11(4): 380-381.
- [4] KHAN S A, PRIVAMVADA S, ARIVARASU N A, et al. Influence of green tea on enzymes of carbohydrate metabolism, antioxidant defense, and plasma membrane in rat tissues[J]. *Nutrition*, 2007, 23(9): 687-695.
- [5] GUO S H, BEZARD E, ZHAO B L. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induce apoptosis through ROS-NO pathway[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39: 682-695.
- [6] HUI C L, ANDREW M J, CHIN S L, et al. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157: 876-884.
- [7] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 130-395.
- [8] KRAUS T E C, DAHLGREN R A, ZASOSKI R J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review[J]. *Plant and Soil*, 2003, 256: 41-66.
- [9] BARRY T N, MCNABB W C. Review article-The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants[J]. *British Journal of Nutrition*. 1999, 81: 263-272.
- [10] PASCH H, SCHREPP W. MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers[M]. Verlag Berlin: Springer, 2003: 21-67.
- [11] GRAHAM H D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 801-805.
- [12] TERRILL T H, ROWAN A M, DOUGLAS G B, et al. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992, 58 (3): 321-329.
- [13] 向平, 林益明, 林鹏, 等. 基质辅助激光解吸/飞行时间质谱分析缩合单宁的阳离子化问题[J]. *分析化学*, 2006, 6(7): 1019-1022.
- [14] YAO L H, JIANG Y M, CAFFIN N, et al. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets[J]. *Food Chemistry*, 2006, 96: 614-620.
- [15] 高岐, 赵三银, 蒋荣华, 等. 微波辅助浸提法测定茶叶中茶多酚的含量[J]. *江苏农业科学*, 2007(2): 189-190.
- [16] KRUEGER C G, VESTLING M M, REED J D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in Sorghum[Sorghum bicolor (L.) Moench][J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 538-543.
- [17] YANG Y, CHIEN M J. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 3990-3996.
- [18] TAKAHATA Y, OHNISHI-KAMEYAMA M, FURUTA S, et al. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 5843-5847.