

## 瓜拉那叶中化学成分的定性分析及咖啡因的含量测定

肖治均<sup>1</sup>, 杨欣欣<sup>1</sup>, 梅矩铭<sup>2</sup>, 梅竹松<sup>2</sup>, 刘春生<sup>1</sup>, 雷海民<sup>1</sup>, 文娟娟<sup>2</sup>, 徐拥军<sup>2</sup>, 陈吓第<sup>2</sup>, 王学勇<sup>1</sup>, 加洛·萨尔塞多·罗萨雷斯<sup>3</sup>, 马长华<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 厄瓜多尔教育与产业协作促进会, 厄瓜多尔 EC090150

3. 瓜亚基尔大学, 厄瓜多尔 EC090150

**摘要:** 目的 利用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱联用质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 技术快速鉴别瓜拉那 *Paullinia cupana* 叶中的化学成分, 建立高效液相色谱 (HPLC) 法测定瓜拉那叶中咖啡因的含量。方法 定性分析采用 Waters Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 3 μL, 在电喷雾正负离子模式下采集数据。定量分析采用 Prevail 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相为纯水-乙腈, 梯度洗脱, 体积流量为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 检测波长 275 nm。结果 利用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术, 根据质谱一级精确相对分子质量和二级特征碎片, 从瓜拉那叶中共鉴定出 46 个化学成分, 包括 22 个酚酸类, 7 个黄酮类, 7 个生物碱类, 5 个长链脂肪酸类和 5 个其他类化合物。建立 HPLC-UV 测定瓜拉那叶咖啡因含量的方法中, 咖啡因在 0.201 8~2.018 0 μg 线性关系良好 ( $R^2=0.999\ 8$ ), 平均加样回收率 ( $n=9$ ) 为 99.52%, RSD=1.16%, 瓜拉那叶中咖啡因质量分数在 2.8% 左右。结论 首次采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术鉴定瓜拉那叶中的化学成分, 提供了一种快速、高效的分析方法, 所建立的 HPLC-UV 测定咖啡因含量的方法准确、可靠, 为瓜拉那叶后续的深入研究奠定了基础。

**关键词:** 瓜拉那叶; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 咖啡因; 酚酸; 黄酮; 生物碱; 长链脂肪酸类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 01-0060-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.007

## Qualitative analysis of chemical constituents in *Paullinia cupana* leaves and determination of caffeine content

XIAO Zhijun<sup>1</sup>, YANG Xinxin<sup>1</sup>, MEI Juming<sup>2</sup>, MEI Zhusong<sup>2</sup>, LIU Chunsheng<sup>1</sup>, LEI Haiming<sup>1</sup>, WEN Juanjuan<sup>2</sup>, XU Yongjun<sup>2</sup>, CHEN Xiadi<sup>2</sup>, WANG Xueyong<sup>1</sup>, PAG PASAPORTE DR. SALCEDO<sup>3</sup>, MA Changhua<sup>1</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Ecuador Association for the Promotion of Educational and Industrial Collaboration, Guayaquil EC090150, Ecuador

3. University of Guayaquil, Guayaquil EC090150, Ecuador

**Abstract:** **Objective** UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology was used to identify the chemical constituents in the leaves of *Paullinia cupana*, and a method of HPLC was established for the determination of caffeine in *Paullinia cupana* leaves. **Methods** The Waters Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used for qualitative analysis. The mobile phase was 0.1% formic acid water (A) - acetonitrile (B) with gradient elution and the flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume was 3 μL, and the data were collected under the electrospray positive and negative ion mode. Quantitative analysis was carried out at 30 °C on a prevail column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of pure water (A) - acetonitrile (B) with gradient elution and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume was 10 μL and the detection wavelength was 275 nm. **Results** Using UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology, 46 chemical constituents including 22 phenolic acids, seven flavonoids, seven alkaloids, five long-chain fatty acids and five other compounds were identified from *Paullinia cupana* leaves according to the first accurate molecular weight and secondary characteristic fragments of mass spectrometry. For the quantitative analysis method, caffeine had good linear

收稿日期: 2021-06-15

基金项目: 厄瓜多尔植物泡林藤与宝乐果雄花资源开发及应用(2020071720314)

第一作者: 肖治均(1996—),男,中药分析硕士研究生,研究方向为中药质量控制。E-mail: 1931782942@qq.com

\*通信作者: 马长华(1960—),教授,硕士研究生导师,研究方向为中药质量控制。E-mail: machanghua60@sina.cn

relationship in the range of 0.201 8—2.018 0  $\mu\text{g}$  ( $R^2 = 0.999\ 8$ ). The average recoveries ( $n = 9$ ) was 99.52% and the RSD was 1.16%. The content of caffeine in Guarana leaves is about 2.8%. **Conclusion** For the first time, UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology was used to identify the chemical components in *Paullinia cupana* leaves, which provided a fast and efficient analysis method. The HPLC-UV method for the determination of caffeine content was accurate and reliable, which laid a foundation for the further study of *Paullinia cupana* leaves.

**Key words:** *Paullinia cupana* leaves; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; caffeine; phenolic acids; flavonoids; alkaloids; long chain fatty acids

瓜拉那 *Paullinia cupana* 为无患子科泡林腾属植物,又名“寇纳茶”或“巴西可可”,原产于巴西亚马逊盆地热带雨林,是亚马逊地区典型的特有热带植物<sup>[1-2]</sup>。现代研究表明,瓜拉那种子富含生物碱、维生素和多种酚酸类化合物,具有很高的营养价值和生物活性,主要用于抗精神疲劳、抗衰老、补益肝肾、降低胆固醇、减肥和调节胃肠道等<sup>[3-6]</sup>。据报道,瓜拉那种子中富含咖啡因,其含量最高可占种子干质量的6%,是咖啡豆、茶叶和可乐坚果的4~6倍<sup>[7]</sup>。在南美洲,瓜拉那种子还被开发制作成畅销的功能饮料和滋补品<sup>[8]</sup>。近年来,国内外学者多倾心于研究瓜拉那种子的植物来源<sup>[9]</sup>、化学成分<sup>[10-12]</sup>和生物活性<sup>[13-17]</sup>,而对来源更广泛,加工更便捷和价格更低廉的瓜拉那叶报道很少,或鲜有报道<sup>[18-19]</sup>。

线性离子阱-静电场轨道阱联用质谱(LTQ-Orbitrap-MS)是近年来发展起来的一项新质谱联用技术,其综合了LTQ的多级质谱功能以及Orbitrap的高分辨能力,可在较短时间内同时实现对母、子离子的高分辨采集和多级质谱碎裂,显著提高了复杂体系中化学成分的快速鉴别与分析能力,是天然植物化学成分分析的强有力手段<sup>[20-21]</sup>。基于瓜拉那叶丰富的资源和瓜拉那种子全面的生理功能<sup>[7]</sup>,本研究拟采用超高效液相色谱(UPLC)-LTQ-Orbitrap-MS技术对鲜有报道的瓜拉那叶中的化学成分进行系统的表征分析,并利用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法对瓜拉那叶中咖啡因的含量进行测定,对瓜拉那叶进行初探研究,以期为进一步研究瓜拉那叶的生物活性提供参考,并为瓜拉那叶资源的合理开发奠定基础。

## 1 材料

LTQ-Orbitrap XL 质谱,配有热电喷雾离子源(HESI)、Xcalibur 2.1 工作站(美国 Thermo Scientific 公司); Agilent1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有自动进样器、四元泵和紫外检测器;DFT-50A-型粉碎机(温岭市林大机械有限公司);CPA225D 十万分之一电子天平、BS110S 万分之一天平(德国 Sartorius 仪器有

限公司); KO-300DB 型 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

瓜拉那叶购于厄瓜多尔瓜亚基尔市,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为无患子科泡林腾属瓜拉那 *Paullinia cupana* 的干燥叶片。咖啡因、茶碱和可可碱(南通飞宇生物科技有限公司,批号分别为 FY1138B0322、FY1380B0515 和 FY1392B0223,质量分数均>98%);乙腈(质谱纯, Fisher 公司);乙腈(色谱纯, Fisher 公司);甲酸(质谱纯,德国 Merck 公司);超纯水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);其他试剂均为市售分析纯(北京化工厂)。

## 2 方法

### 2.1 色谱及质谱条件

**2.1.1 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 色谱条件** 采用 Waters Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱 0~3 min(5%~15%B), 3~5 min(15%~25%B), 5~20 min(25%~65%B), 20~33 min(65%~80%B), 33~37 min(80%~100%B), 37~40 min(100%B);进样量 3  $\mu\text{L}$ ;体积流量 0.3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.1.2 质谱条件** HESI 离子源,正负离子检出模式,离子源温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,电离源电压 4 kV,毛细管电压 35 V,管透镜电压 110 V,鞘气和辅助气均为高纯氮气(质量分数>99.99%),鞘气体积流量 40 arb,辅助气体积流量 20 arb;激活能量单位 0.25 q;激活时间 30 ms;归一化碰撞能量 35%;傅里叶高分辨扫描范围  $m/z$  100~1 500;一级扫描分辨率 30 000;数据采用傅里叶变换高分辨全扫方式数据依赖性 ddMS<sup>2</sup> 和 ddMS<sup>3</sup>。

**2.1.3 HPLC-UV 定量条件** 采用 Prevail 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为纯水(A)-乙腈(B),梯度洗脱 0~8 min, 10%~30%B; 8~15 min, 30%B; 15~20 min, 30%~10%B;进样量 10  $\mu\text{L}$ ,体积流量 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 275 nm。

## 2.2 溶液制备

**2.2.1 供试品溶液的制备** 取适量干燥瓜拉那叶, 粉碎机粉碎, 过60目筛, 准确称取瓜拉那叶0.100 0 g置具塞三角瓶中, 加70%甲醇30 mL, 精密称质量, 超声(功率300 W、频率40 kHz)处理45 min后, 放冷, 再称定质量, 用溶液补足减失的量, 摇匀, 过0.22 μm微孔滤膜, 取续滤液, 即得定性用供试品溶液和定量用供试品溶液。

**2.2.2 咖啡因对照品溶液的制备** 精密称取咖啡因对照品适量, 加甲醇溶解配成质量浓度为1.009 mg·mL<sup>-1</sup>, 以此为对照品母液, 置于4 °C冰箱中避光保存备用, 根据需要配成所需浓度, 进样前过

0.22 μm微孔滤膜, 取续滤液, 即得咖啡因对照品溶液。

## 3 结果

### 3.1 瓜拉那叶化学成分定性分析

色谱及质谱条件下, 分别测定瓜拉那叶正负离子模式下的总离子流图, 使用Xcalibur软件(Thermo Fisher Scientific)对质谱数据进行分析, 通过一级高分辨率质谱信息推导其可能的分子式, 质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ , 结合多级质谱裂解特征碎片、相对丰度和相关文献数据报道, 对瓜拉那叶中的化学成分进行定性分析, 质谱正负离子模式下的基峰离子流图见图1, 化合物的详细数据见表1。

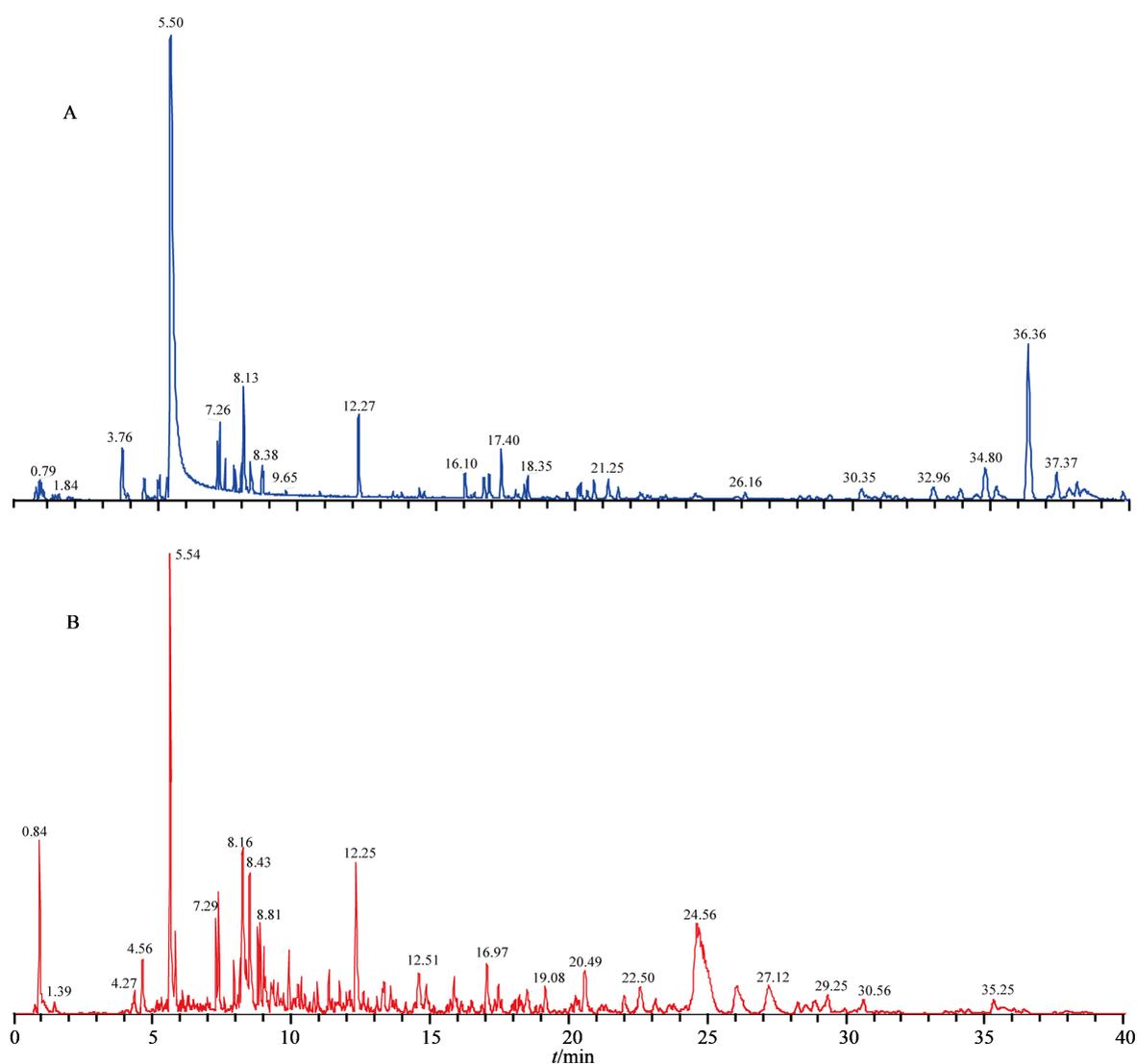


图1 瓜拉那叶UPLC-LTQ-Orbitrap-MS正离子(A)和负离子(B)质谱基峰离子流图

Fig. 1 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS positive ion (A) and negative ion (B) mass spectrums base peak ion flow diagrams of *Paullinia cupana* leaves

表1 瓜拉那叶化学成分质谱鉴定结果

Table 1 Mass spectrometry identification results of chemical constituents of *Paullinia cupana* leaves

序号	离子模式	$t_R$ / min	$m/z$		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	分子式	碎片离子 $m/z$	化合物
			观察	计算				
1	+	1.26	136.061 77	136.062 16	-0.160	$C_5H_6N_5$	107.99(100)、106.92(44.29)、 118.92(31.12)、118.07(24.83)	腺嘌呤(adenine)
2	+	1.27	142.086 25	142.086 56	0.305	$C_7H_{12}NO_2$	69.89(100)、113.91(95.48)、 123.95(36.34)、95.89(18.66)	3,3-二甲基谷酰胺(3,3-dimethylglutarimide)
3	-	1.99	357.102 75	357.106 20	2.899	$C_{12}H_{21}O_{12}$	314.20(100)、180.09(6.24)、 338.67(1.14)、195.07(0.50)	乳糖酸(lactobionic acid)
4	-	2.52	282.083 29	282.085 24	1.945	$C_{10}H_{12}N_5O_5$	149.92(100)、132.99(4.96)、 263.85(0.87)、	鸟苷(guanosine)
5	-	3.43	341.107 83	341.110 78	2.942	$C_{12}H_{21}O_{11}$	298.12(100)、179.12(32.12)、 160.98(9.26)	蔗糖(sucrose)
6	+	3.76	181.072 00	181.072 17	-0.380	$C_7H_9N_4O_2$	162.96(100)、137.00(71.05)、 137.98(35.72)、181.08(8.34)、	可可碱(theobromine)
7	+	4.52	181.072 00	181.072 51	-0.040	$C_7H_9N_4O_2$	123.93(100)、162.95(11.00)、 136.95(5.73)、152.88(1.36)、	茶碱(theophylline)
8	-	4.56	179.033 88	179.035 45	1.565	$C_9H_7O_4$	134.93(100)、178.84(60.05)	咖啡酸(caffeic acid)
9	-	5.31	227.070 27	227.067 63	-3.189	$C_{14}H_{11}O_3$	182.93(100)、154.99(15.12)、 180.99(10.17)、164.96(7.70)	白藜芦醇(resveratrol)
10	-	5.41	337.091 79	337.093 41	1.616	$C_{16}H_{17}O_8$	162.99(100)、191.05(7.36)、 172.96(5.71)	3- <i>p</i> -CoQA
11	-	5.43	163.038 97	163.040 54	1.569	$C_9H_7O_3$	118.92(100)、134.18(0.29)、 134.92(0.28)	<i>p</i> -coumaric acid
12	+	5.50	195.087 65	195.087 97	-0.231	$C_8H_{11}N_4O_2$	137.99(100)、109.95(2.29)	咖啡因(caffeine)
13	+	5.52	138.054 95	138.066 28	0.092	$C_7H_8NO_2$	109.98(100)、109.33(11.93)、 111.02(10.88)、138.07(4.10)	异烟肼(isoniazid)
14	-	5.54	191.055 01	191.056 53	1.515	$C_7H_{11}O_6$	172.98(100)、126.94(66.17)、	奎尼酸(quinic acid)
15	-	5.56	353.086 70	353.087 89	1.181	$C_{16}H_{17}O_9$	191.02(100)、179.06(3.64)、 173.02(0.59)、135.07(0.62)	1-CQA
16	-	5.73	353.086 70	353.088 35	1.641	$C_{16}H_{17}O_9$	172.97(100)、178.96(54.97)、 190.96(15.29)、135.06(7.42)、 137.00(0.69)	隐绿原酸(4-CQA)
17	-	5.86	473.165 35	473.167 94	2.039	$C_{21}H_{29}O_{12}$	455.28(100)、146.95(86.63)、 323.24(28.27)、191.08(18.90)、 299.01(16.16)、	junipercomnoside E
18	-	6.24	595.129 36	595.131 65	2.289	$C_{26}H_{27}O_{16}$	421.08(100)、577.18(37.33)、 377.18(10.43)、191.06(5.04)	槲皮素-3-阿拉伯糖葡萄糖苷
19	-	6.40	337.091 79	337.093 29	1.496	$C_{16}H_{17}O_8$	191.02(100)、172.92(9.19)、 163.06(7.28)	5- <i>p</i> -CoQA
20	-	6.64	367.102 35	367.103 76	1.401	$C_{17}H_{19}O_9$	191.00(100)、172.97(34.63)、 192.96(9.59)	5-FQA
21	-	6.89	609.145 01	609.147 34	2.329	$C_{27}H_{29}O_{16}$	300.13(100)、271.02(19.08)、 301.10(18.52)、445.12(14.26)	芦丁(rutin)
22	+	6.90	303.049 92	303.050 87	0.941	$C_{15}H_{11}O_7$	257.06(100)、285.01(59.19)、 274.05(19.08)、152.99(14.39)	槲皮素(querctin)
23	+	7.26	287.055 01	287.055 66	0.645	$C_{15}H_{11}O_6$	241.04(100)、152.90(57.02)、 258.00(46.64)、231.15(34.03)、	山柰酚(kaempferol)
24	-	7.29	593.150 09	593.151 73	1.634	$C_{27}H_{29}O_{15}$	283.99(100)、429.20(48.94)、 285.07(36.79)、255.02(27.37)、 447.06(9.16)	山柰酚 3- <i>O</i> -芸香糖苷 (kaempferol 3- <i>O</i> - rutinoside)
25	-	7.50	463.087 10	463.089 51	2.408	$C_{16}H_{25}O_{13}$	301.05(100)、300.04(29.08)、 343.09(3.01)、	金丝桃苷(hyperoside)

续表1

序 号	离子 模式	$t_R$ / min	$m/z$		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	分子式	碎片离子 $m/z$	化合物
			观察	计算				
26	-	7.85	515.118 40	515.120 97	2.568	$C_{25}H_{23}O_{12}$	353.14(100)、172.96(11.98)、 335.17(11.44)、179.09(8.79)、 191.10(5.18)	异绿原酸B(3,4-DiCQA)
27	-	8.07	447.092 18	447.094 48	2.292	$C_{21}H_{19}O_{11}$	284.07(100)、285.05(58.69)、 255.01(16.39)、227.11(3.39)、	紫云英苷(astragalín)
28	+	8.11	163.038 97	163.039 40	0.429	$C_9H_7O_3$	144.89(100)、134.94(12.14)、 162.94(3.20)、116.87(3.72)	伞形花内酯 (7-hydroxycoumarin)
29	-	8.16	353.086 70	353.088 20	1.491	$C_{16}H_{17}O_9$	191.02(100)、179.00(42.82)、 134.92(9.82)、173.02(2.70)	新绿原酸(3-CQA)
30	-	8.16	515.118 40	515.120 61	2.208	$C_{25}H_{23}O_{12}$	353.13(100)、190.94(1.23)、 179.00(0.87)	苷类(DiCQA)
31	-	8.41	515.118 40	515.120 48	2.078	$C_{25}H_{23}O_{12}$	353.11(100)、335.16(4.36)、 179.00(3.86)	1,3-DiCQA
32	-	8.43	353.086 70	353.088 07	1.361	$C_{16}H_{17}O_9$	172.96(100)、179.03(53.12)、 190.95(17.76)、134.91(7.72)、 137.06(0.89)	隐绿原酸(4-CQA)
33	-	9.02	337.091 79	337.093 29	1.496	$C_{16}H_{17}O_8$	162.90(100)、191.04(6.47)、 173.03(5.79)	3- <i>p</i> -CoQA
34	-	9.11	353.086 70	353.088 29	1.581	$C_{16}H_{17}O_9$	191.01(100)、178.99(44.40)、 173.07(10.42)、134.97(10.67)、	绿原酸(5-CQA)
35	-	9.22	367.102 35	367.104 13	1.771	$C_{17}H_{19}O_9$	192.96(100)、172.96(3.74)、 191.12(1.90)	3-FQA
36	-	9.26	367.102 35	367.103 97	1.611	$C_{17}H_{19}O_9$	193.00(100)、191.02(18.68)、 173.05(3.78)	3-FQA 同系物
37	-	9.32	337.091 79	337.093 60	1.806	$C_{16}H_{17}O_8$	172.90(100)、162.96(10.48)、 191.05(2.59)	4- <i>p</i> -CoQA
38	-	9.43	367.102 35	367.104 06	1.701	$C_{17}H_{19}O_9$	173.01(100)、192.98(12.54)、 191.09(1.15)	4-FQA
39	-	9.43	529.134 05	529.136 29	2.237	$C_{26}H_{25}O_{12}$	367.17(100)、173.06(6.15)、 193.05(3.21)、335.15(3.01)、 353.19(2.96)、179.05(0.88)	CFQA
40	-	9.50	529.134 05	529.136 47	2.417	$C_{26}H_{25}O_{12}$	353.15(100)、367.11(40.17)、 173.00(7.96)、335.25(5.82)、 178.99(5.30)	CFQA-2
41	-	10.46	677.150 09	677.152 83	2.734	$C_{34}H_{29}O_{15}$	515.19(100)、353.06(5.11)	3,4,5-Tri-CQA
42	-	20.26	277.216 20	277.217 86	1.653	$C_{18}H_{29}O_2$	233.23(100)、259.18(39.49)、 232.45(24.69)、179.19(6.12)、	亚麻酸(linolenic acid)
43	-	23.14	199.132 87	199.134 45	1.031	$C_{11}H_{19}O_3$	181.05(100)、155.08(31.94)、 162.83(1.83)	cis-3-hydroxyundec-8- enoic acid
44	-	23.37	255.231 85	255.233 32	0.915	$C_{16}H_{31}O_2$	237.11(100)、182.88(10.48)、 162.88(8.11)、210.12(3.59)	棕榈酸(palmitic acid)
45	-	33.20	279.231 85	279.233 37	0.965	$C_{18}H_{31}O_2$	261.20(100)、191.07(16.93)、 251.39(5.58)、234.78(4.10)	亚油酸(linoleic acid)
46	-	37.42	281.247 50	281.249 36	1.305	$C_{18}H_{33}O_2$	263.20(100)、236.85(20.99)、 281.52(11.09)、139.30(9.08)	油酸(oleic acid)

+-正离子;--负离子

+- positive ion; -- anion

**3.1.1 酚酸类及其衍生物的结构鉴定** 从瓜拉那叶中共鉴定出22个酚酸类化合物,其中以绿原酸及其衍生物居多。绿原酸类化合物(chlorogenic acids, CGAs)是由奎宁酸和1~4个肉桂酸类形成的酯类化合物,最常见的是咖啡酸、对香豆素和阿魏

酸,因肉桂酸类可以在奎宁酸的不同位置取代而存在很多的同分异构体。奎尼酸及常见的肉桂酸结构见图2。

单咖啡酰奎宁酸(caffeoylquinic acid, CQA):负离子模式下,根据所获得的高分辨质谱数据(准分

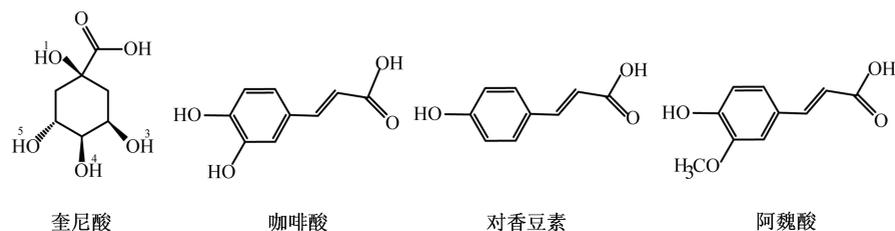


图2 奎宁酸及常见肉桂酸的结构式

Fig. 2 Structural formula of quinic acid and common cinnamic acids

子离子 $[M-H]^-$ ,  $m/z$  353.086 70), 推断化合物 **15**、**16**、**29**、**32** 和 **34** 的元素组成可能为  $C_{16}H_{17}O_9$ , 误差  $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 初步推断其为单咖啡酰奎宁酸及其同系物。根据文献数据报道<sup>[22-25]</sup>, 当咖啡酸在奎宁酸的4-位取时,  $MS^2$  谱的基峰离子为  $m/z$  173 [quinic acid -  $H_2O-H$ ], 而在1、3和5位取代的基峰离子为  $m/z$  191 [quinic acid -  $H$ ], 确定化合物 **16** 和 **32** 为隐绿原酸(4-CQA)及其异构体; 3位取代时, 其  $m/z$  179 碎片峰强度较1位和5位取代高, 从而确定化合物 **29** 为新绿原酸(3-CQA); 根据反相柱的色谱保留行为, 确定化合物 **15** 和 **34** 为1-CQA 和绿原酸(5-CQA)。4种绿原酸的二级质谱图见图3。

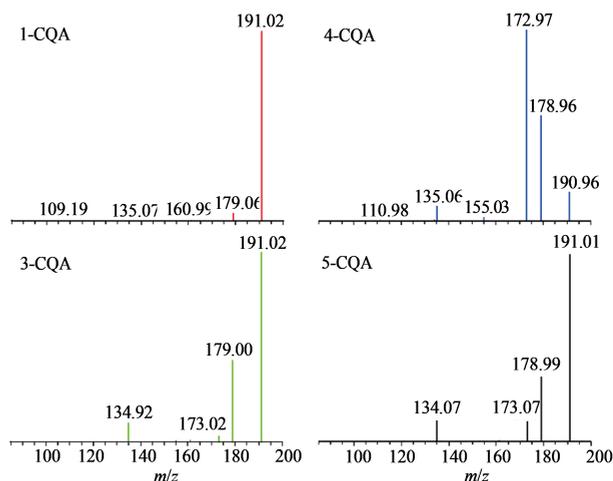


图3 负离子模式下绿原酸异构体的二级质谱图  
Fig. 3 Negative  $MS^2$  spectra for isomeric CQA

双咖啡酰奎宁酸(dicaffeoylquinic acid, DiCQA): 根据一级高分辨质谱数据得到精确相对分子质量 $[M-H]^-$ ,  $m/z$  515.118 40), 推断化合物 **26**、**30** 和 **31** 可能的分子式为  $C_{25}H_{23}O_{12}$ , 误差  $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 推断其为双咖啡酰奎宁酸及其同系物。此类化合物产生的二级碎片主要包括  $m/z$  353 [CQA -  $H$ ],  $m/z$  179 [caffeic acid -  $H$ ],  $m/z$  173 [quinic acid -  $H-H_2O$ ] 和  $m/z$  191 [quinic acid -  $H$ ], 根据文献数据<sup>[22-26]</sup>, 3,4-DiCQA 易产生  $m/z$  353 的基峰和峰度较高的  $m/z$  173 二级碎片; 1,3-DiCQA 易产生

$m/z$  353 的基峰和峰度较高的  $m/z$  335 的二级碎片, 因此, 推断化合物 **26** 和 **31** 分别为3,4-DiCQA 和1,3-DiCQA。化合物 **30** 产生的基峰为  $m/z$  353 和丰度较高的  $m/z$  191, 根据文献报道<sup>[22]</sup>, 化合物 **30** 可能为双咖啡酰奎宁酸与单糖形成的苷类。如图4所示, 以3,4-DiCQA 为例推断其可能的裂解途径。

三咖啡酰奎宁酸(dicaffeoylquinic acid, TriCQA): 化合物 **41** 的准分子离子 $[M-H]^-$ ,  $m/z$

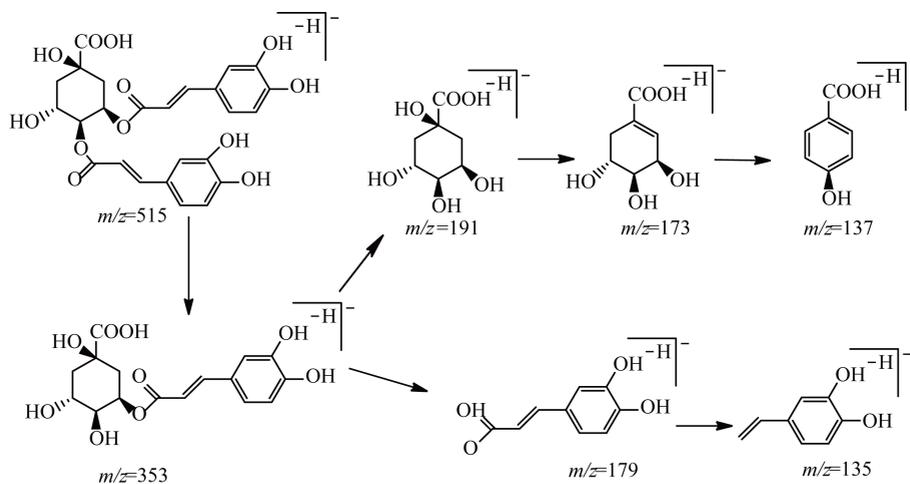


图4 3,4-二咖啡酰奎宁酸可能的裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathways of 3,4-DiCQA

677.150 09), 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 其可能的分子式为 $C_{34}H_{29}O_{15}$ , 判断化合物**41**可能是三咖啡酰奎尼酸, 根据文献数据<sup>[23]</sup>和二级碎片裂解规律, 推断化合物**41**为3,4,5-Tri-CoQA。

对香豆酰奎宁酸(p-coumaroylquinic acid, p-CoQA): 根据高分辨精确相对分子质量( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  337.091 79), 推断化合物**19**、**33**和**37**的分子式为 $C_{16}H_{17}O_8$ , 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 初步推断其为对香豆酰奎尼酸及其同系物。此类化合物出现的特征碎片离子为 $m/z$  163、 $m/z$  191和 $m/z$  173, 根据文献数据报道<sup>[22-25]</sup>, 推断化合物**19**、**33**和**37**分别为5-p-CoQA、3-p-CoQA和4-p-CoQA。

阿魏酰奎宁酸(feruloylquinic acid, FQA): 根据一级精确相对分子质量( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  367.102 35), 推断化合物**20**、**35**、**36**和**38**可能的分子式为 $C_{17}H_{19}O_9$ , 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 初步推断其为阿魏酰奎宁酸及其同系物, 此类化合物的二级特征碎片离子有 $m/z$  193 [ferulic acid-H] $^-$ 、 $m/z$  191和 $m/z$  173。3-、4-和5-取代的阿魏酰奎尼酸, 二级的基峰离子分别为 $m/z$  193、 $m/z$  173和 $m/z$  191, 与文献报道一致<sup>[22-25]</sup>, 推断化合物**20**和**38**分别为5-FQA和4-FQA, 化合物**35**和**36**表现出相同的裂解途径, MS<sup>2</sup>主要碎片峰丰度相差不大, 由于缺少三级碎片的佐证, 只能确认化合物**35**和**36**为3-FQA及其异构体。

咖啡基阿魏酰奎尼酸(caffeoyl feruloylquinic acids, CFQA): 根据精确相对分子质量( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  529.134 05), 推断化合物**39**和**40**可能的分子式为 $C_{26}H_{25}O_{12}$ , 初步推断其为咖啡基阿魏酰奎尼酸, 此类化合物产生的二级碎片主要有 $m/z$  367[FQA-H] $^-$ 、 $m/z$  353[CQA-H] $^-$ 、 $m/z$  193、 $m/z$  191和 $m/z$  179。2-位取代的咖啡基阿魏酰奎尼酸二级基峰离子为 $m/z$  353.15, 与化合物**39**相区别, 根据文献报道<sup>[22]</sup>, 推断化合物**40**为CFQA-2; 化合物**39**产生的基峰离子为 $m/z$  367.17, 由于缺少三级碎片的佐证, 未能鉴定出化合物**39**在哪个位置取代。

小分子酚酸类化合物: 化合物**14**精确相对分子质量( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  191.055 01), 推导可能的分子式为 $C_7H_{11}O_6$ , 根据二级特征碎片 $m/z$  172.98[M-H-H<sub>2</sub>O] $^-$ 、 $m/z$  126.94[M-H-COOH-H<sub>2</sub>O] $^-$ 和文献数据报道<sup>[25]</sup>, 确认化合物**14**为奎尼酸。

**3.1.2 黄酮类化合物的结构鉴定** 黄酮苷元: 在瓜拉那叶质谱的正离子模式下, 鉴定出槲皮素和山柰酚2个黄酮类苷元化合物。化合物**22**的精确相对分子质量( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  303.050 87), 推导其可能

的结构式为 $C_{15}H_{11}O_7$ , 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 二级特征碎片有 $m/z$  257.06[M+H-CO-H<sub>2</sub>O] $^+$ 、 $m/z$  285.01[M+H-H<sub>2</sub>O] $^+$ 和 $m/z$  274.05[M+H-HCO] $^+$ , 经高分辨精确相对分子质量、二级碎片裂解规律和碎片信息, 推测化合物**22**为槲皮素(quercetin)。化合物**23**的精确相对分子质量( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  303.050 87), 推导其可能的结构式为 $C_{15}H_{11}O_7$ , 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 二级特征碎片有 $m/z$  241.06[M+H-CO-H<sub>2</sub>O] $^+$ 、RDA裂解生成 $m/z$  152.90[M+H-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>] $^+$ 和 $m/z$  258.00[M+H-HCO] $^+$ , 经高分辨精确相对分子质量、二级碎片裂解规律和碎片信息, 推测化合物**23**为山柰酚(kaempferol)。

黄酮苷: 黄酮苷类化合物主要的裂解途径表现在糖基部分的裂解和苷元的特征裂解。化合物**21**精确相对分子质量( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  609.147 34), 可能的结构式为 $C_{27}H_{29}O_{16}$ , 误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 特征碎片为丢失芸香糖基形成的 $m/z$  300.13[M-H-C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub>] $^-$ 、丢失鼠李糖形成的 $m/z$  445.12[M-H-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>] $^-$ 和槲皮素苷元丢失HCO形成的 $m/z$  271.02[M-H-HCO] $^-$ , 经高分辨精确相对分子质量、二级碎片裂解规律、碎片信息和文献数据<sup>[16]</sup>报道, 推测化合物**21**为芦丁(rutin)。同理, 根据一级高分辨质谱、黄酮类化合物的裂解规律和文献数据报道<sup>[26-27]</sup>, 鉴定化合物**18**、**24**、**25**和**27**分别为槲皮素-3-阿拉伯糖葡萄糖苷、山柰酚3-O-芸香糖苷(kaempferol 3-O-rutinoside)、金丝桃苷(hyperoside)和紫云英苷(astragaloside)。

**3.1.3 生物碱类化合物的结构鉴定** 瓜拉那叶质谱正离子模式下鉴定出7个生物碱类化合物, 主要包括咖啡因和一些补益类生物碱, 如腺嘌呤、鸟苷、可可碱和茶碱等。根据定量液相色谱图可知, 瓜拉那叶中咖啡因的含量最高, 在质谱正离子模式下的总离子流图中发现, 保留时间在5.50 min时, 其强度最高, 化合物**12**的一级精确相对分子质量( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  195.087 97), 推导可能的分子式为 $C_8H_{11}N_4O_2$ , 偏差为-0.231, 化合物**12**的二级特征碎片表现为RDA裂解生成 $m/z$  137.99[M+H-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO] $^+$ 的基峰离子, 鉴定化合物**12**为咖啡因(cafeine)。化合物**6**和**7**具有相同的分子式 $C_7H_9N_4O_2$ , 根据液相标准品比对, 初步确认是可可碱和茶碱, 因2个化合物甲基取代位置不同, 质谱的二级碎片也表现出不同的裂解行为。化合物**6**和**7**均可发生RDA反应, 分别生成 $m/z$  137.98[M+H-CNOH] $^+$ 和 $m/z$  123.93[M+H-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO] $^+$ 的碎片离

子, 据此可以判断化合物 6 和 7 分别为可可碱(theobromine)和茶碱(theophylline), 如图 5 所示, 为咖啡因、可可碱、茶碱的二级质谱图与可能的裂解过程。化合物 4 的一级精确相对分子质量为  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  282.085 24, 推导其可能的分子式为  $C_{10}H_{12}N_5O_5$ , 误差  $\leq 5 \times 10^{-6}$ , 根据二级特征碎片  $m/z$  149.92  $[M-H-C_5H_8O_4]^-$  和  $m/z$  132.99  $[M-H-C_5N_5H_3O]^-$ , 推断化合物 4 为鸟苷(guanosine)。

**3.1.4 长链脂肪酸类化合物的结构鉴定** 质谱负离子模式下共鉴定出 5 个长链脂肪酸类化合物, 这类化合物主要的裂解行为表现为丢失  $H_2O$  和  $COOH$ 。化合物 42 的精确相对分子质量是  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  277.217 86, 推导其可能的分子式为  $C_{18}H_{29}O_2$ , 二级特征碎片有  $m/z$  233.23  $[M-H-COO]^-$ 、259.18  $[M-H-H_2O]^-$  和 232.45  $[M-H-COOH]^-$ , 根据一级高分辨质谱和二级特征裂解行为推断化合物 42 为亚麻酸(linolenic acid)。化合物 45 和 46 相对分子质量相差 2, 特征碎片表现出丢失  $H_2O$  和  $COOH$ , 根

据一级高分辨相对分子质量、二级特征碎片和裂解行为, 鉴定化合物 45 和 46 分别为亚油酸(linoleic acid)和油酸(oleic acid)。

**3.1.5 其他类化合物的结构鉴定** 瓜拉那叶中除鉴定出上述 4 类化合物, 还鉴定出蔗糖、白藜芦醇和伞形花内酯等化合物。

### 3.2 瓜拉那叶中咖啡因的含量测定

**3.2.1 专属性考察** 咖啡因对照品以及瓜拉那叶供试品色谱图见图 6, 结果表明专属性良好。

**3.2.2 线性关系考察** 精密吸取“2.2.2”项下咖啡因对照品母液 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中加甲醇稀释至刻度, 即得  $0.1009 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品, 以进样体积为 2、4、6、8、10、20  $\mu\text{L}$  分别注入色谱仪, 测定并记录各对照品溶液色谱图, 以对照品质量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标, 各对照品色谱峰面积为纵坐标, 绘制咖啡因标准曲线, 得回归方程:  $Y=2810.8X+10.618, R^2=0.9998$ 。咖啡因对照品质量在 0.2018~2.0180  $\mu\text{g}$  线性关系良好。

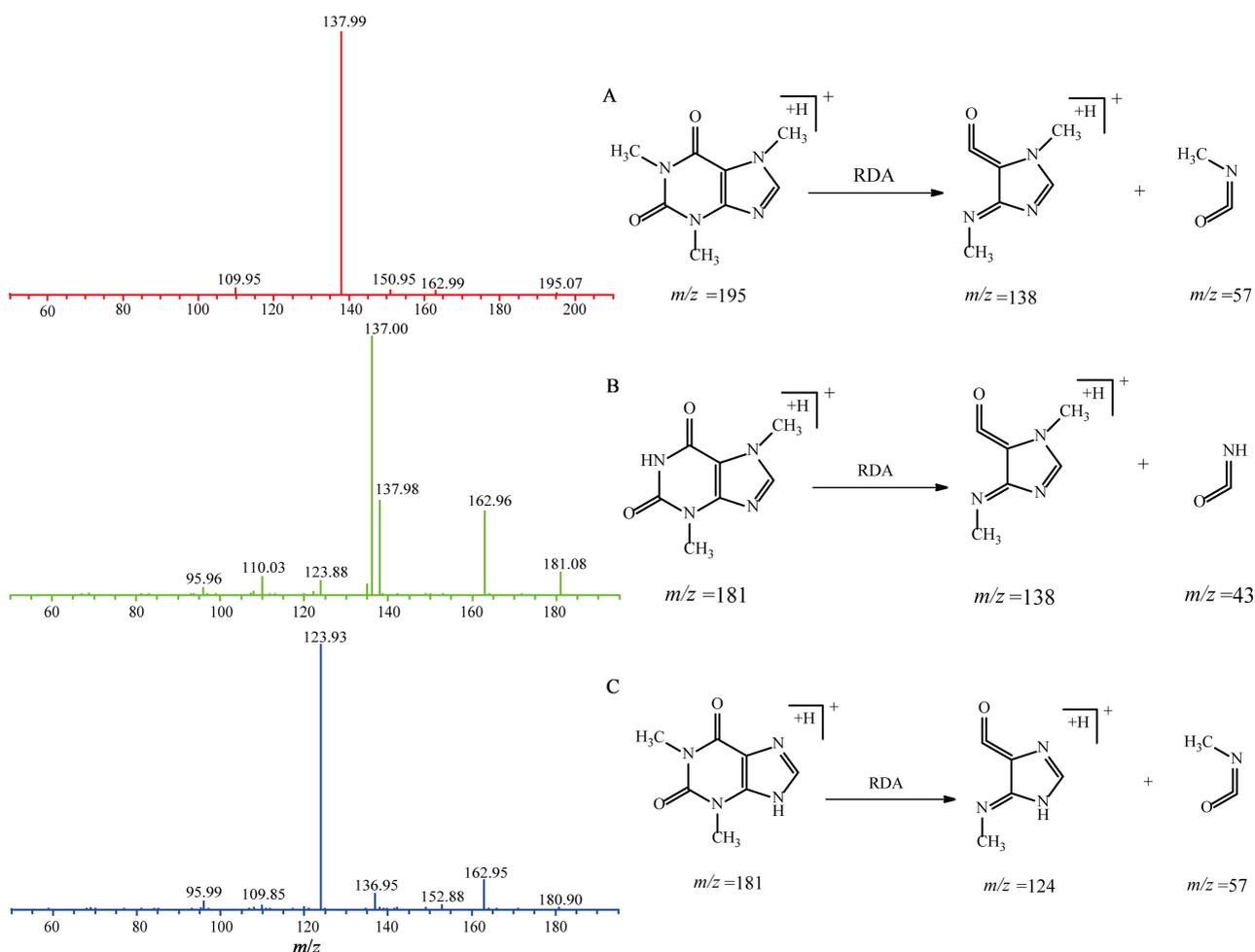


图 5 咖啡因(A)、可可碱(B)和茶碱(C)的二级质谱图与可能的裂解途径

Fig. 5 Secondary mass spectrograms of caffeine (A), theobromine (B) and theophylline (C) and theirs possible fragmentation pathways

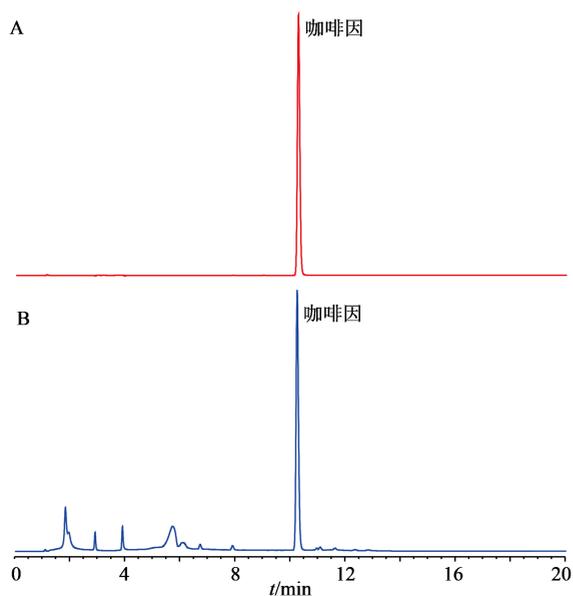


图6 咖啡因对照品(A)和瓜拉那叶供试品(B)的HPLC图  
Fig. 6 HPLC spectra of caffeine reference substances (A) and *Paullinia cupana* leaves specimens (B)

**3.2.3 精密度试验** 取咖啡因对照品溶液( $0.1009 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $10 \mu\text{L}$ ,连续进样6次,分别测定其峰面积,计算其RSD=1.00%,结果表明本实验所用仪器精密度良好。

**3.2.4 重复性试验** 取S1瓜拉那叶样品粉末,精密称定,按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液6份,进样测定各峰面积,进样量为 $10 \mu\text{L}$ ,计算其RSD=1.17%,表明本法重复性良好。

**3.2.5 稳定性试验** 取供试品溶液进行稳定性试验,在0、2、4、6、8、10、12、24 h测定峰面积,进样量为 $10 \mu\text{L}$ ,计算其RSD=0.21%,表明瓜拉那叶样品溶液在24 h内稳定。

**3.2.6 加样回收率试验** 准确称取S1瓜拉那叶粉末9份,每份约 $0.05 \text{ g}$ ,分别精密加入 $1.009 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咖啡因对照品溶液1.7、1.4、1.1 mL,按“2.2.1”项方法制备加样回收样品溶液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,进样,测得咖啡因的平均回收率( $n=9$ )为99.52%,RSD为1.16%。

**3.2.7 样品测定** 取3批瓜拉那叶,按照“2.2.1”项下方法制备供试品,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,计算瓜拉那叶中咖啡因的质量分数分别为2.79%、2.86%、2.81%。

#### 4 讨论

本研究建立UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术鉴定瓜拉那叶中的化学成分,利用其一级高分辨精确相对分子质量推导可能的化学式,再结合二级质谱的

特征碎片与可能的裂解途径,快速准确鉴定瓜拉那叶中的化学成分。经MS技术鉴定,发现瓜拉那叶中有众多绿原酸及其同系物的存在,利用MS技术结合文献数据报道对绿原酸系化合物(尤其是同分异构体)进行鉴定,可确定咖啡酸在相应肉桂酸上的取代位置。从瓜拉那叶中共鉴定22个以绿原酸类为代表的酚酸类化合物,据报道<sup>[28]</sup>,这类化合物有助于防治冠心病、动脉粥样硬化和卒中等心脑血管疾病的发生,与瓜拉那改善微循环、防治动脉硬化的功效相似。从瓜拉那叶中还鉴定出嘌呤类生物碱,其可兴奋血液运动中枢,增强肾脏的血流量和肾小球的滤出率,使其具有利尿作用,与瓜拉那报道可治疗便秘和痢疾的功能类似。以亚油酸、油酸、亚麻酸和棕榈酸为代表的长链脂肪酸类化合物可以降低血脂、血压,软化血管,促进微循环,预防动脉粥样硬化及心脑血管疾病,从而对人体起到滋养作用。

咖啡因属精神类药品,人体摄入少量会对大脑皮质神经网络进行刺激,增强大脑对外部刺激因素的感知能力,有助于瞬时记忆力的增强。但长期大量摄入咖啡因会使人精神萎靡、浑身无力,还会对肾脏、肝脏等解毒排毒器官造成严重损害<sup>[29]</sup>。因此,有必要利用现代分析技术对瓜拉那叶中咖啡因的含量进行测定,为瓜拉那叶开发成醒神类产品奠定基础。本研究利用HPLC-UV技术测定咖啡因含量时,综合实验分析与文献报道<sup>[30-31]</sup>,选择在波长275 nm处测定,并使用Prevail色谱柱,可有效解决咖啡因的拖尾问题,所建立的HPLC-UV技术能够将咖啡因与其类似吸收的咖啡酸、可可碱以及茶碱等其他成分有效分离后,再进行测定,在没有其他物质干扰的情况下,获得的测定结果更加可靠、精确。

本研究利用HPLC-UV技术测定瓜拉那叶中咖啡因的含量并结合MS技术对其化学成分进行定性分析,结果表明瓜拉那叶中咖啡因的含量较高,可达2.8%左右,所含化学成分丰富,且多为补益类化合物。鉴于此,应对来源广泛,加工便捷和价格低廉的瓜拉那叶进行深入研究,充分开发利用瓜拉那叶资源。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 庄馥萃. 刺激饮料植物之王——瓜拉那[J]. 世界农业, 1995(8): 31.

- Zhuang F C. King of stimulating beverage plants — — *Guarana* [J]. World Agric, 1995(8): 31.
- [2] 杨乃谦. 瓜拉那 [J]. 世界知识, 1981(15): 11.  
Yang N Q. Guarana [J]. World Aff, 1981(15): 11.
- [3] Schimpl F C, da Silva J F, Carvalho Gonçalves J F, et al. *Guarana*: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(1): 14-31.
- [4] Smith N, Atroch A L. Guarana's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2010, 7(3): 279-282.
- [5] Kleber Silveira A, Moresco K S, Mautone Gomes H, et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats [J]. Phytother Res, 2018, 32(12): 2466-2474.
- [6] de Oliveira Campos M P, Riechelmann R, Martins L C, et al. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy [J]. J Altern Complement Med, 2011, 17(6): 505-512.
- [7] Cláudio A F M, Ferreira A M, Freire M G, et al. Enhanced extraction of caffeine from guarana seeds using aqueous solutions of ionic liquids [J]. Green Chem, 2013, 15(7): 2002-2010.
- [8] 许利嘉, 肖伟, 马培, 等. 具开发前景的南美洲常用草药简介 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 84-90.  
Xu L J, Xiao W, Ma P, et al. Introduction folkloric herbs from South America in medicinal prospect [J]. Drugs Clin, 2011, 26(2): 84-90.
- [9] Ducke A. *Diversidade dos guaraná*s [M]. 1937.
- [10] Patrick M, Kim H A, Oketch-Rabah H, et al. Safety of *Guarana* seed as a dietary ingredient: A review [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(41): 11281-11287.
- [11] da Silva G S, Canuto K M, Ribeiro P R V, et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics [J]. Food Res Int, 2017, 102: 700-709.
- [12] Marques L L M, Panizzon G P, Aguiar B A A, et al. *Guaraná* (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds [J]. Food Chem, 2016, 212: 703-711.
- [13] de Carvalho F A L, Lorenzo J M, Pateiro M, et al. Effect of guarana (*Paullinia cupana*) seed and pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaf extracts on lamb Burgers with fat replacement by chia oil emulsion during shelf life storage at 2 °C [J]. Food Res Int, 2019, 125: 108554.
- [14] Rocchetti G, Barba F J, Lorenzo J M, et al. Untargeted metabolomics to explore the oxidation processes during shelf life of pork patties treated with guarana seed extracts [J]. Int J Food Sci Technol, 2020, 55(3): 1002-1009.
- [15] Silva M P, Thomazini M, Holkem A T, et al. Production and characterization of solid lipid microparticles loaded with guaraná (*Paullinia cupana*) seed extract [J]. Food Res Int, 2019, 123: 144-152.
- [16] Gómez B, Strozzi I, Barba F J, et al. Evaluation of the antioxidant capacity of a guarana seed extract on canola oil lipid stability using accelerated storage [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2018, 120(12): 1800293.
- [17] Pateiro M, Vargas F C, Chinchá A A I A, et al. Guarana seed extracts as a useful strategy to extend the shelf life of pork patties: UHPLC-ESI/QTOF phenolic profile and impact on microbial inactivation, lipid and protein oxidation and antioxidant capacity [J]. Food Res Int, 2018, 114: 55-63.
- [18] Bonatelli M L, Tsui S, Batista B D, et al. Bacterial communities associated with anthracnose symptomatic and asymptomatic leaves of *guarana*, an endogenous tropical crop, and their pathogen antagonistic effects [J]. Arch Microbiol, 2019, 201(8): 1061-1073.
- [19] de Carvalho Gonçalves J F, Santos U M D Jr, Silva J F D, et al. Physiological and anatomical characteristics of leaves of two clones of guarana [J]. Pesq Agropec Bras, 2006, 41(3): 393-398.
- [20] 周立分, 赵栋云, 刘霞, 等. LTQ-Orbitrap MS 在中药研发中的应用 [J]. 江西中医药, 2017, 48(12): 75-78.  
Zhou L F, Zhao D Y, Liu X, et al. Application of LTQ-Orbitrap MS in research and development of traditional chinese medicine [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2017, 48(12): 75-78.
- [21] Luo Z Q, Ma X Y, Liu Y, et al. An approach to characterizing the complicated sequential metabolism of salidroside in rats [J]. Molecules, 2016, 21(6): E706.
- [22] Zhang J Y, Zhang Q, Li N, et al. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in *Flos Lonicerae Japonicae* by HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. Talanta, 2013, 104: 1-9.
- [23] Clifford M N, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup> [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10): 3821-3832.
- [24] Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family [J]. Phytochemistry, 2011, 72(8): 781-790.
- [25] 王放, 张加余, 王青, 等. HPLC-HR-MS<sup>n</sup>法鉴定苦碟子注射液中酚酸类成分 [J]. 中南药学, 2013, 11(8): 561-565.

- Wang F, Zhang J Y, Wang Q, et al. Identification of phenolic acids from Kudiezi Injection by HPLC-HR-MS<sup>n</sup> [J]. Central South Pharm, 2013, 11(8): 561-565.
- [26] 张倩, 张加余, 隋丞琳, 等. HPLC-DAD-ESI-MS/MS 研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3564-3568.
- Zhang Q, Zhang J Y, Sui C L, et al. Regularity of changes in chlorogenic acids in *Lonicera japonica* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(23): 3564-3568.
- [27] 杜憬生, 吴立群, 刘敬功, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的菊花化学成分快速分析 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 621-623.
- Du J S, Wu L Q, Liu J G, et al. Rapid analysis of chemical constituents in chrysanthemum based on UPLC-Q-TOF-MS technology [J]. J Chin Med Mater, 2017, 40(3): 621-623.
- [28] 汤喜兰, 刘建勋, 李磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 243-246.
- Tang X L, Liu J X, Li L. Pharmacological effects of organic acids in Chinese herbs and its application in cardiovascular diseases [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 18(5): 243-246.
- [29] 加拿大卫生部发布咖啡因安全摄入量建议 [J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3): 298.
- Canadian Ministry of Health issued recommendations on safe caffeine intake [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(3): 298.
- [30] 王伟, 季晓晖, 李秀峰, 等. HPLC法同时测定茶叶中多酚、咖啡因和维生素C [J]. 分析试验室, 2014, 33(12): 1443-1446.
- Wang W, Ji X H, Li X F, et al. Simultaneous determination of tea polyphenols, caffeine and vitamin C by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(12): 1443-1446.
- [31] 徐丹萍, 艾凌艳, 夏小凤. 高效液相色谱法测定普洱熟沱茶叶中咖啡因的含量 [J]. 海峡药学, 2016, 28(8): 63-66.
- Xu D P, Ai L Y, Xia X F. Determination of the content of caffeine in cooked Pu'er tea by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2016, 28(8): 63-66.

[责任编辑 兰新新]