南路边茶高效液相色谱指纹图谱的建立

胡燕，齐桂年
（四川农业大学园艺学院，四川雅安 625014）

摘要：应用高效液相色谱法初步建立了南路边茶的指纹图谱。采用线性梯度洗脱，乙腈和0.3%甲酸水溶液为流动相，柱温为30 ℃，检测波长为280 nm，流速为1.0 mL/min。根据平均相对保留时间、共有峰、平均相对峰面积等对色谱指纹图谱进行了分析。方法的精密度、重复性和稳定性良好。通过对48批不同生产企业、不同生产年限的南路边茶样品进行分析，以咖啡碱为参照峰，共确定了37个色谱峰作为南路边茶的特征指纹峰。运用相似度评价和聚类分析法对各批次南路边茶样品指纹图谱进行了化学模式识别研究。各批次南路边茶样品与对照指纹图谱共有模式的相似度均大于0.90；对相对峰面积的聚类分析结果表明，当临界值为15时，48批南路边茶样品可聚为2类。该研究为南路边茶的鉴别和质量控制提供了参考。

关键词：茶叶；高效液相色谱法；指纹图谱；聚类分析
文章篇号：1673-9078(2013)9-2283-2287

Establishment of High Performance Liquid Chromatographic Fingerprint of Southern Route Tea

HU Yan, QI Gui-nian
(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The chromatographic fingerprint of southern route tea was established by high performance liquid chromatography (HPLC). A suitable chromatographic system was established using a linear gradient elution with acetonitrile and water containing 0.3% formic acid as the mobile phase with a detection wavelength of 280 nm and the flow speed of 1.0 mL/min. According to the average relative retention time, common peaks, and average relative peak area in HPLC were assayed respectively. The HPLC fingerprint was established with good stability, precision and reproducibility. The chromatographic fingerprint was analyzed based on the analysis of HPLC chromatogram of 48 batches of southern route tea samples. It was confirmed that 37 peaks in chromatograms can be selected as characrerixation peaks while the caffeine peak was chosen as the referential peak. The HPLC fingerprints were analyzed by similarity evaluation and cluster analysis to conduct the chemical pattern recognition. The similarity of 48 batches of southern route tea was more than 0.90. Results from a cluster analysis of the relative peak area showed that the 48 batches of southern route tea samples could be divided into about two types.

Key words: tea; HPLC; fingerprint; cluster analysis

黑茶属于后发酵茶，是我国的六大基本茶类之一。四川边茶是我国黑茶类的一个重要组成部分，生产历史悠久，主要分为南路边茶和西路边茶。其中的南路边茶以雅安为制造中心，其品质优良，经熬耐泡，深受藏族同胞喜爱，2008年，雅安南路边茶制作技艺被列为第二批“国家级非物质文化遗产”名录[1]。历史上的南路边茶种类繁多，根据不同层次的消费，计有芽细、毛尖、金尖、康砖、金仓和金玉等品种，现已精简为金尖和康砖两个品种。金尖茶和康砖茶的五大制作工序与三十二道工艺完全一样，二者的差别主要是在配料上有条茶和红苔的比例不同，形成了品茶时口感上的差别。康砖茶中需拼配一定比例的条茶，具有香气纯正，滋味尚浓醇，汤色红褐、尚明，叶底棕褐稍花的品质特点；金尖茶是用做庄茶、复制做庄茶配以适量茶梗、茶果壳舂制而成，外形呈圆角长方形，稍紧实，无脱层，色泽棕褐，内质香气纯正，汤色黄红、尚明；金尖茶中红苔的配比要大于康砖茶，因梗的比例较高，口感更为醇和。

过去对黑茶的研究主要集中在初制工序及渥堆过程中的化学变化[2~3]、加工过程中微生物种群的分离鉴定[4~6]及砖茶降氟技术等方面[7]。南路边茶的原料主要是产自雅安雨城区周公山一带以及名山、天全、荥经等地的茶叶，多是一芽五叶到六叶的嫩度。经过一系

收稿日期：2013-05-28

作者简介：胡燕（1982-），女，博士，工程师，研究方向：园艺植物资源开发与利用

通讯作者：齐桂年（1956-），男，博士，教授，研究方向：茶叶加工及植物资源开发与利用

列的加工工序后，内含物质如多酚类、咖啡碱、茶色素等的种类和含量均会发生变化；同时，原料拼配比例的不同也会对南路边茶成品的质量产生不同程度的影响。目前对南路边茶质量的评价主要是测定某些主要指标成分的含量并结合感官审评，难以全面反映其质量。色谱指纹图谱技术目前已广泛应用于中药的真伪鉴别、质量控制、新药开发等领域[8~10]，但应用于茶叶尤其是黑茶的研究较少[11~14]。该试验借鉴了中药化学指纹图谱技术，通过分析八家南路边茶主要生产企业的成品样，初步建立了南路边茶的高效液相色谱指纹图谱，为南路边茶的质量控制提供了一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验采用的金尖茶和康砖茶成品样均取自2010~2012 年四川省雅安市八家主要的南路边茶生产企业，每家企业每年取 1 个金尖茶和 1 个康砖茶成品样，连续取样 3 年，共计 48 个样品，样品来源及出厂日期见表 1；作为对照的甘露、黄芽、毛峰、茉莉花茶产地均为雅安市名山县。

表 1 南路边茶的样品来源及出厂日期

Table 1 Sample source of southern route tea and delivery date

编号	样品来源	出厂日期
S1	雅安市蔡龙茶厂	2010 年 3 月
S2	雅安市蔡龙茶厂	2011 年 12 月
S3	雅安市蔡龙茶厂	2012 年 3 月
S4	四川省雅安市和龙茶厂	2010 年 4 月
S5	四川省雅安市和龙茶厂	2011 年 11 月
S6	四川省雅安市和龙茶厂	2012 年 9 月
S7	四川吉祥茶业有限公司	2010 年 12 月
S8	四川吉祥茶业有限公司	2011 年 12 月
S9	四川吉祥茶业有限公司	2012 年 2 月
S10	四川省雅安茶厂有限公司	2010 年 2 月
S11	四川省雅安茶厂有限公司	2011 年 7 月
S12	四川省雅安茶厂有限公司	2012 年 8 月
S13	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2010 年 1 月
S14	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2011 年 3 月
S15	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2012 年 4 月
S16	名山县西藏朗赛茶厂	2010 年 12 月
S17	名山县西藏朗赛茶厂	2011 年 7 月
S18	名山县西藏朗赛茶厂	2012 年 2 月
S19	雅安市友谊茶叶有限公司	2010 年 2 月
S20	雅安市友谊茶叶有限公司	2011 年 7 月
S21	雅安市友谊茶叶有限公司	2012 年 8 月
S22	雅安市周公山精制茶厂	2010 年 4 月
S23	雅安市周公山精制茶厂	2011 年 8 月
S24	雅安市周公山精制茶厂	2012 年 7 月
S25	雅安市蔡龙茶厂	2010 年 8 月
S26	雅安市蔡龙茶厂	2011 年 11 月
S27	雅安市蔡龙茶厂	2012 年 4 月
S28	四川省雅安市和龙茶厂	2010 年 7 月
S29	四川省雅安市和龙茶厂	2011 年 9 月
S30	四川省雅安市和龙茶厂	2012 年 9 月
S31	四川吉祥茶业有限公司	2010 年 4 月
S32	四川吉祥茶业有限公司	2011 年 1 月
S33	四川吉祥茶业有限公司	2012 年 7 月
S34	名山县西藏朗赛茶厂	2010 年 7 月
S35	名山县西藏朗赛茶厂	2011 年 4 月
S36	名山县西藏朗赛茶厂	2012 年 3 月
S37	四川省雅安茶厂有限公司	2010 年 9 月
S38	四川省雅安茶厂有限公司	2011 年 4 月
S39	四川省雅安茶厂有限公司	2012 年 2 月
S40	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2010 年 1 月
S41	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2011 年 12 月
S42	四川省雅安义兴藏茶有限公司	2012 年 12 月
S43	雅安市友谊茶叶有限公司	2010 年 2 月
S44	雅安市友谊茶叶有限公司	2011 年 1 月
S45	雅安市友谊茶叶有限公司	2012 年 7 月
S46	雅安市周公山精制茶厂	2010 年 7 月
S47	雅安市周公山精制茶厂	2011 年 12 月
S48	雅安市周公山精制茶厂	2012 年 9 月

注：S1~S24 为金尖茶，S25~S48 为康砖茶。

1.2 仪器与药品

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪（配有在线真空脱气装置、四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器）；LCsolution 色谱工作站，日本岛津）；超声波清洗器，上海冠特超声波仪器有限公司；电子天平，德国赛多利斯股份公司；台式高速离心机，上海安亭科学仪器厂；电热恒温水浴锅，北京中兴伟业仪器有限公司；微型植物实验粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司。

乙腈为色谱纯，美国 Fisher 公司；水为二次蒸馏水；甲酸为分析纯，天津科密欧化学试剂开发中心；咖啡碱标准品购自中国标准物质中心。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件

流动相 A：0.3%甲酸水溶液；流动相 B：乙腈。色谱柱：汉邦科技 Lichrospher C18 色谱柱(5 μm，250

mm×4.6 mm）。检测波长：280 nm。柱温：30 ℃。流速：1.0 mL/min。分析时间：45 min。

梯度洗脱程序：0~3 min，2~5% B；3~5 min，5~12% B；5~10 min，12~16% B；10~16 min，16 ~23% B；16~25 min，23~26% B；25~35 min，26~30% B；35~40 min，30~50% B；40~45 min，50~2% B。系统平衡色谱柱时间：15 min。

1.3.2 样品前处理

称取 2.00 g 粉碎茶样（过 40 目筛）于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 140 mL 90 ℃的蒸馏水，立即移入 90 ℃水浴中浸提 15 min，每隔 5 min 摇动一次。浸提完毕后，冷却至室温，离心 15 min（转速 4000 r/min），取上清液用 0.45 μm 水相滤膜过滤后上机分析。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验

取同一样品按 1.4 制备，在 1.3 的色谱条件下连续进样 6 次，以 20 号峰为参照峰，HPLC 图谱中各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差（RSD）分别为 0.25~1.44%和 0.66~2.05%，表明仪器的精密度良好。

2.1.2 重复性试验

取同一样品 5 份，按 1.4 平行制备，在 1.3 的色谱条件下分别进样检测，记录 HPLC 色谱图，以 20 号峰为参照峰，测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.34~1.29%和 0.87~2.18%，表明该提取方法的重复性良好。

2.1.3 稳定性试验

取同一样品按 1.4 制备，分别在 0、2、4、8、12、16、20、24 h 不同时间点，按 1.3 色谱条件进样检测，测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 1.15~2.11%和 1.32~2.54%，表明样品提取液在 24 h 内稳定。

2.2 溶剂空白试验

以二次蒸馏水按照 1.3 的色谱条件进样测试，结果表明空白溶剂对测定无干扰。

2.3 南路边茶 HPLC 指纹图谱的构建

2.3.1 参照峰的选择

选择出峰时间适中、峰面积在色谱图中所占的比例较大且在各样品中均存在的组分峰作为参照峰。色谱图中 20 号峰为咖啡碱，选择其作为参照峰。

2.3.2 共有指纹峰的标定

按 1.3 的色谱条件，对取自雅安市 8 家南路边茶生产企业的 48 批南路边茶成品样的水提取物溶液分别进样分析，指纹图谱见图 1。

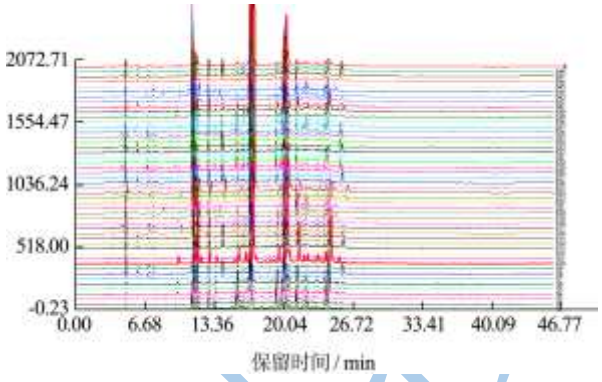


图 1 48 批南路边茶样品的 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprints of 48 batches of southern route tea samples

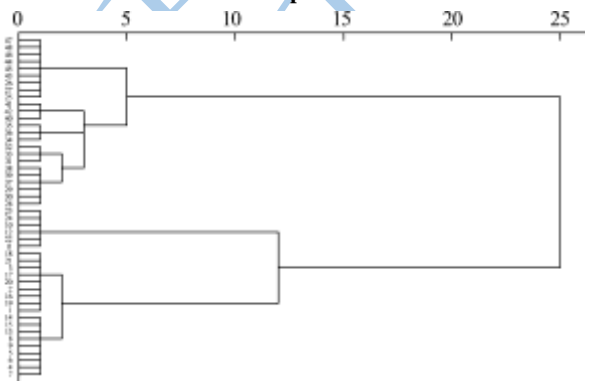


图 2 48 批南路边茶样品的系统聚类分析图

Fig.2 Dendrogram of 48 batches of southern route tea samples using cluster analysis

将各色谱峰的保留时间与同一图谱中参照峰的保留时间比较，其比值为各色谱峰的相对保留时间；各色谱峰按相对保留时间一一匹配后，选择 90%以上样本共有的峰为样本集的共有峰。该试验最终选择了 37 个色谱峰为各色谱图的共有峰，48 批样品所拥有的 37 个共有峰的平均相对保留时间作为南路边茶指纹图谱的相对保留时间，见表 2。基于雅安茶厂的金尖茶（编号：S12）色谱峰总面积较大，峰数较多，将其指定为参比样品，求出 48 批样品中各共有峰 i 的相对峰面积 A_r，其计算公式为 $A_r=(A_{ri}/A_{rs})\times100\%$，其中 A_{ri} 为某样品中某个共有峰 i 的峰面积，A_{rs} 为参比样品的总峰面积值；将 48 批黑茶样品各共有峰的相对峰面积与样品编号建立矩阵，采用 SPSS19.0 软件对样品进行聚类分析，选择组间联接及连续变量的欧氏距离平方，得到各黑茶样品的聚类树状图（图 2）。聚类结果表明，当临界值为 15 时，48 个黑茶样品聚为 2 类，一类为康砖茶，另一类为金尖茶；对 48 批南路边茶的指纹图

谱进行拟合，建立了对照指纹图谱共有模式（图 3）。

表 2 48 批南路边茶样品共有峰的平均相对保留时间

Table 2 The average relative retention time of common peaks of 48 batches of southern route tea samples

色谱峰编号	平均相对保留时间/min	色谱峰编号	平均相对保留时间/min	色谱峰编号	平均相对保留时间/min
1	0.17	13	0.80	25	1.19
2	0.29	14	0.83	26	1.22
3	0.35	15	0.87	27	1.27
4	0.42	16	0.90	28	1.30
5	0.45	17	0.92	29	1.32
6	0.51	18	0.95	30	1.35
7	0.58	19	0.96	31	1.38
8	0.60	20	1.00	32	1.40
9	0.67	21	1.07	33	1.43
10	0.69	22	1.11	34	1.44
11	0.71	23	1.15	35	1.47
12	0.76	24	1.18	36	1.49
37	1.52				

2.3.3 南路边茶 HPLC 指纹图谱的相似度评价

将 48 批南路边茶样品的 HPLC 图通过 Lcsolution 工作站以 AIA 格式导出，然后分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2004A 版）软件中，先对同一茶企业不同生产年限的色谱图进行拟合，分别建立八个厂家南路边茶指纹图谱共有模式，再以 48 批样品对照指纹图谱共有模式为参照，对 8 个共有模式指纹图谱进行相似度评价，结果见表 3。分析表 3 数据可知，八家南路边茶生产企业的样品与指纹图谱共有模式之间相似性良好，相似度在 0.91~0.99 之间，均大于 0.90，说明它们所含的化学成分极其相似，质量较稳定；八个厂家的样品之间的相似度大部分大于 0.90，其中周公山茶厂的样品与其它七家企业样品的相似度较低，在 0.85~0.91 之间，分析原因可能是原料来源与拼配比例等略有差异，而作为对照的甘露、黄芽、毛峰、茉莉花茶与指纹图谱共有模式的相似度均较低，在 0.71~0.77 之间，从图 4 也可以看出，对照的 HPLC 图谱与康砖茶和金尖茶的 HPLC 图谱差异明显，说明不同原料嫩度、不同加工工艺等对茶叶组分的影响较大。

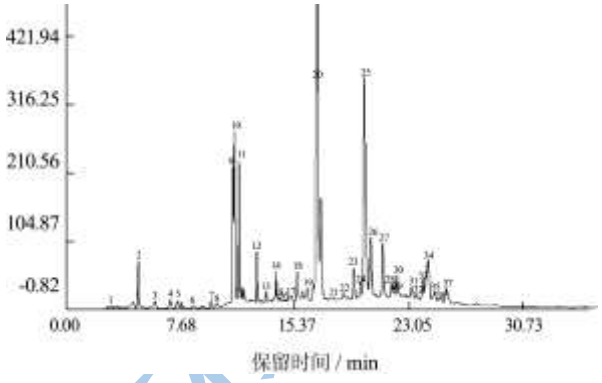


图 3 南路边茶的 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig.3 Common pattern simulated from HPLC fingerprints of southern route tea samples (common peaks:1~37)

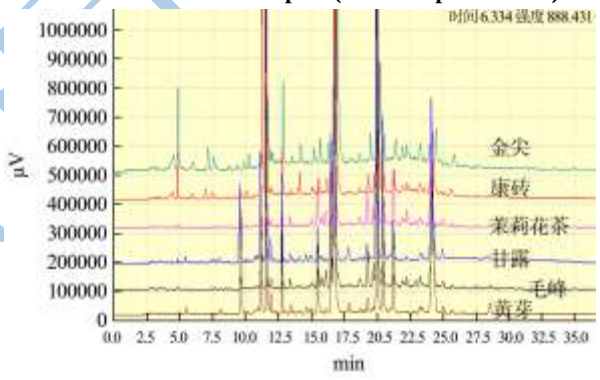


图 4 不同茶样的 HPLC 图

Fig.4 The HPLC chromatography of various teas

表 3 不同厂家南路边茶样品与共有模式的相似度分析

Table 3 Similarity analysis between southern route tea samples of different manufactures and common pattern

茶企业	吉祥	和龙	雅安茶厂	周公山茶厂	蔡龙	友谊	义兴	朗赛	甘露	黄芽	毛峰	茉莉花茶	共有模式
吉祥	1.00	0.91	0.92	0.89	0.95	0.91	0.97	0.96	0.76	0.71	0.70	0.74	0.98
和龙	0.91	1.00	0.93	0.86	0.97	0.92	0.89	0.91	0.70	0.69	0.66	0.69	0.96
雅安茶厂	0.92	0.93	1.00	0.91	0.95	0.89	0.91	0.90	0.74	0.68	0.64	0.66	0.95
周公山茶厂	0.89	0.86	0.91	1.00	0.88	0.85	0.85	0.86	0.72	0.71	0.66	0.69	0.91
蔡龙	0.95	0.97	0.95	0.88	1.00	0.91	0.92	0.91	0.75	0.71	0.70	0.73	0.99
友谊	0.91	0.92	0.89	0.85	0.91	1.00	0.92	0.96	0.76	0.79	0.78	0.75	0.95
义兴	0.97	0.89	0.91	0.85	0.92	0.92	1.00	0.98	0.77	0.72	0.71	0.75	0.97
朗赛	0.96	0.91	0.90	0.86	0.91	0.96	0.98	1.00	0.75	0.76	0.75	0.74	0.97
甘露	0.76	0.70	0.74	0.72	0.75	0.76	0.77	0.75	1.00	0.73	0.64	0.87	0.77
黄芽	0.71	0.69	0.68	0.71	0.71	0.79	0.72	0.76	0.73	1.00	0.84	0.64	0.74

转下页

接上页

毛峰	0.70	0.66	0.64	0.66	0.70	0.78	0.71	0.75	0.64	0.84	1.00	0.62	0.71
茉莉花茶	0.74	0.69	0.66	0.69	0.73	0.75	0.75	0.74	0.87	0.64	0.62	1.00	0.74
共有模式	0.98	0.96	0.95	0.91	0.99	0.95	0.97	0.97	0.77	0.74	0.71	0.74	1.00

3 结论

边茶是少数民族群众传统的生活必需品，其产品的生产状况和质量好坏攸关少数民族同胞生活的稳定和国家的安定团结。该研究采用四川省雅安市八家主要边茶生产企业 2010~2012 年生产的共计 48 批南路边茶成品样初步构建了南路边茶的 HPLC 指纹图谱。结果表明，雅安市八家主要边茶生产企业连续三年生产的南路边茶样品中主要色谱峰的整体图貌基本一致，说明质量较稳定；但各共有峰的平均相对峰面积仍存在差异，说明不同企业的样品内在化学成分的含量稍有差别，这可能是由于不同企业收购的原料，其品种、产地、采摘季节、嫩度、气候条件、保存条件、发酵程度及拼配比例等方面会存在差异；而取自南路边茶原料产地的甘露、黄芽、毛峰和茉莉花茶与八家边茶企业的南路边茶样品相似度均较低，说明不同的原料嫩度和加工工艺对茶叶内含化学成分的影响较大。该试验所建立的 HPLC 指纹图谱能在一定程度上为南路边茶质量的客观评价和控制提供科学依据。

参考文献

[1] 赵长治,谢雪娇.“南路边茶”历史发展述略[J].重庆教育学院学报,2010,23(1):68-73
Zhao C Z, Xie X J. On historic development of southern route tea [J]. Journal of Chongqing College of Education, 2010, 23(1): 68-73

[2] 齐桂年,田鸿,刘爱玲,等.四川黑茶品质化学成分的研究[J].茶叶科学,2004,24(4):266-269
Qi G N, Tian H, Liu A L, et al. Studies on the quality chemical components in sichuan brick tea [J]. Journal of Tea Science, 2004, 24(4): 266-269

[3] 陈昌辉,郭金龙,汪艳霞,等.雅安藏茶制作工艺的品质变化[J].林产化学与工业,2011,31(4):69-74
Chen C H, Guo J L, Wang Y X, et al. Quality variation during the processing of Ya’an tibet tea[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2011, 31(4): 69-74

[4] 周红杰,李家华,赵龙飞,等.渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J].茶叶科学,2004,24(3):212-218
Zhou H J, Li J H, Zhao L F, et al. Study on main microbes on quality formation of yunnan puer tea during pile-fermentation process [J]. Journal of Tea Science, 2004, 24(3): 212-218

[5] 温志杰,张凌云,吴平,等.黑茶加工中微生物作用的研究[J].茶叶通讯,2010,37(2):26-29
Wen Z J, Zhang L Y, Wu P, et al. Research progress of microbiology mechanism of dark tea [J]. TEA COMMUNICATION, 2010, 37(2): 26-29

[6] 付润华.康砖茶渥堆微生物及不同渥堆处理品质成分变化的研究[D].雅安:四川农业大学,2008
Fu R H. Study on the microorganism during pile-fermentation and the change of quality contents under different conditions of pile-fermentation to the kangzhuan tea [D]. Ya’an: Sichuan Agricultural University, 2008

[7] 李荣林,祝雅松,李月双.降低黑茶中可溶态氟含量的研究[J].江西农业学报,2010,22(8):53-55
Li R L, Zhu Y S, Li Y S, et al. Study on decreasing content of soluble fluorine in dark tea [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2010, 22(8): 53-55

[8] Christophe Tistaert, Bieke Dejaegher, Yvan Vander Heyden. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 690(2): 148-161

[9] Dong-Zhi Yang, Yi-Qiang An, Xiang-Lan Jiang, et al. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation [J]. Talanta, 2011, 85(2): 885-890

[10] Baogang Xie, Tao Gong, Minghai Tang, et al. An approach based on HPLC-fingerprint and chemometrics to quality consistency evaluation of Liuwei Dihuang Pills produced by different manufacturers [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48(4): 1261-1266

[11] 宁井铭,张正竹,谷勋刚,等.基于高效液相色谱的普洱晒青毛茶指纹图谱识别方法[J].农业工程学报,2010,26(3): 243-248
Ning J M, Zhang Z Z, Gu X G, et al. Fingerprint identification method of Pu’er raw tea based on high performance liquid chromatography profiles [J]. Transactions of the CSAE, 2010, 26(3): 243-248

[12] Liang Zhang, Ning Li, Yan-Yun Che, et al. Development of the fingerprints of crude *Pu-erh* tea and ripened *Pu-erh* tea by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of

Chinese Pharmaceutical Sciences, 2011, 20: 352-359

[13] Patcharee Pripdeevech, Theeraphan Machan. Fingerprint of volatile flavour constituents and antioxidant activities of teas from Thailand [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 797-802

[14] Taotao Ma, Cheng Huang, Xiaoming Meng, et al. Fingerprint analysis of Hawk-tea by high-performance liquid chromatography [J]. 2011, 129(2): 551-556

现代食品科技