

安化黑茶水溶性成分高效液相色谱 指纹图谱及定量分析

王 斌¹, 邓慧芸¹, 吴 茂¹, 郭亚平¹, 邓 斌^{1,2}, 马 强¹, 谢练武^{1,*}

(1.中南林业科技大学理学院应用化学研究所, 湖南 长沙 410004;

2.湘南学院化学生物与环境工程学院, 湖南 郴州 423043)

摘 要: 目的: 运用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法研究湖南安化黑茶指纹图谱, 并对安化黑茶的主要成分进行定量分析, 为湖南安化黑茶的成分分析与鉴别提供理论依据。方法: 以22个安化黑茶样品与4种外省黑茶 (云南普洱茶、湖北青砖茶、广西六堡茶、四川土司黑茶) 为实验材料, 采用梯度洗脱 (A相为0.17%乙酸溶液, B相为乙腈), 柱温30℃, 检测波长280 nm, 流速1.0 mL/min, 建立安化黑茶HPLC指纹图谱, 并进行了相似度评价与主成分分析, 确定共有色谱峰。结果: 22个安化黑茶样品具有19个共有色谱峰, 这些黑茶样品在共有模式下的相似度为0.783~0.958, 而广西六堡茶、四川土司黑茶、湖北青砖茶以及云南普洱茶与安化黑茶相似度很低 (<0.3); 定量分析表明, 安化黑茶中没食子酸、表没食子儿茶素没食子酸酯的含量明显高于4种外省黑茶, 而广西六堡茶中的咖啡因和云南普洱茶中的没食子儿茶素含量明显高于安化黑茶; 此外, 茯砖素A仅在安化黑茶中检出, 可作为安化黑茶的标志性成分。结论: 根据所构建的安化黑茶HPLC指纹图谱及找到的标志性成分茯砖素A, 可用于安化黑茶的鉴定与评价。

关键词: 安化黑茶; 水溶性成分; 指纹图谱; 高效液相色谱; 化学模式识别

HPLC Fingerprint and Quantitative Analysis of Water-Soluble Components in Anhua Dark Tea

WANG Bin¹, DENG Huiyun¹, WU Mao¹, GUO Yaping¹, DENG Bin^{1,2}, MA Qiang¹, XIE Lianwu^{1,*}

(1. Institute of Applied Chemistry, College of Sciences, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2. School of Chemical Biology and Environmental Engineering, Xiangnan University, Chenzhou 423043, China)

Abstract: Objective: To fingerprint dark tea from Anhua, Hunan using high performance liquid chromatography (HPLC) and to quantitatively determine its major water-soluble constituents for the purpose of providing theoretical evidence for the identification of Anhua black tea. Methods: A total of 22 dark tea samples from Anhua, Hunan and 4 dark tea samples from other provinces (Liupu tea from Guangxi, Tusi tea from Sichuan, brick tea from Hubei and Pu'er tea from Yunnan) were fingerprinted by HPLC. The chromatographic conditions were as follows: gradient elution using 0.17% acetic acid aqueous solution as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B; column temperature, 30℃; flow rate, 1.0 mL/min; and detection wavelength, 280 nm. Similarity evaluation and principal component analysis were performed to ascertain the peaks common to these tea samples. Results: A total of 19 peaks were common to all Anhua dark tea samples with similarities ranging from 0.783 to 0.958 while the similarities between Anhua dark tea and other dark tea samples were quite low (lower than 0.3). Furthermore, the contents of gallic acid and epigallocatechin gallate in Anhua dark tea were remarkably higher than in any other dark tea, but caffeine in Liupu tea and gallic acid in Pu'er Tea were significantly more abundant in Anhua dark tea. In addition, fuzhuanin A could be detected only in Anhua dark tea and hence regarded as an effective indicator for the identification of Anhua dark tea. Conclusion: The established HPLC fingerprinting method can be used to identify and evaluate Anhua dark tea based on fuzhuanin A content.

Key words: Anhua dark tea; water-soluble components; fingerprint; high performance liquid chromatography (HPLC); chemical pattern recognition

收稿日期: 2017-02-27

基金项目: 人社部留学回国人员择优资助重点项目 (2015-192);

湖南省重点实验室专项 (2014FJ3011; 2016XGJSYB01; 2015TP4021-5);

湖南省普通高校“十二五”专业综合改革试点项目 (2012-266)

作者简介: 王斌 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物化学与精细化学品。E-mail: 15673149675@163.com

*通信作者: 谢练武 (1972—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为精细化工与天然活性物质。E-mail: xiecsu@126.com

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720018

中图分类号: S571.1; O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0125-06

引文格式:

王斌, 邓慧芸, 吴茂, 等. 安化黑茶水溶性成分高效液相色谱指纹图谱及定量分析[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 125-130.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720018. <http://www.spkx.net.cn>WANG Bin, DENG Huiyun, WU Mao, et al. HPLC fingerprint and quantitative analysis of water-soluble components in Anhua dark tea[J]. Food Science, 2017, 38(20): 125-130. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720018. <http://www.spkx.net.cn>

黑茶是我国六大茶类之一^[1], 按地域划分主要有: 安徽古黟黑茶(安茶)、湖南黑茶(茯茶)、四川藏茶(边茶)、云南黑茶(普洱茶)、广西六堡茶、湖北老黑茶及陕西黑茶(茯茶)。其中, 安化黑茶是湖南省安化县特有的标志产品, 具有茶汤红浓, 香味醇正, 滋味浓厚, 回味甘甜的特点, 并有降脂、降血压、抗氧化、降血糖、延缓衰老、抗癌、助消化、等多种保健功能^[2-7]。安化黑茶加工工艺独特, 茶叶品质优良以及保健功效突出^[8-9], 深受人们喜爱, 随着安化黑茶市场越来越大, 安化黑茶的相关研究也越来越引人关注。安化黑茶在生产渥堆过程中微生物自身代谢、微生物呼吸热以及胞外酶的综合作用导致黑茶中儿茶素、茶多酚等多种水溶性成分发生了变化^[10-11], 因而导致了安化黑茶独特的口感。目前, 安化黑茶的研究主要集中在黑茶的香气成分^[12-15]、品质化学成分^[16-18]以及黑茶鉴别^[19-21]等方面, 黑茶水溶性成分的定量分析和采用水溶性成分进行黑茶的鉴别研究较少。而且, 对黑茶鉴别和品质评判多依赖于感官评价, 缺少能够量化的指标。

指纹图谱具有整体性、可量化的特点, 已被广泛应用于中药质量控制、食品评价、种子检测和鉴定等领域^[22-26], 也常用于分析茶叶中的非挥发性成分。由于该方法操作简单, 精密度、稳定性和重复性良好^[27], 本实验采用该方法分析安化黑茶中水溶性成分, 以期找到安化黑茶标志性成分, 为安化黑茶的鉴别和质量控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

22个(S1~S22)安化黑茶样品来自湖南省安化县的9个不同生产厂家, 4个外省黑茶样品(S23~S26)、1个干燥过的新鲜茶叶样品(S27)与1个新鲜茶叶样品(S28), 用于对照分析, 样品情况如表1所示。

乙腈(色谱纯) 国药集团化学试剂有限公司; 冰醋酸(分析纯) 广东光华科技股份有限公司。

表1 黑茶样品来源信息

Table 1 Information about the dark tea samples used in this study

编号	样品名称	样品来源	生产日期
S1	湘益茯砖茶	湖南益阳茶厂有限公司	2014.3
S2	白沙溪茯砖茶	湖南白沙溪茶厂	2015.5
S3	久扬茯砖茶	湖南久扬茶业有限公司	2014.12
S4	高马二溪茯砖茶	湖南高马二溪茶业	2015.8
S5	黑美人金花茯茶	湖南黑美人茶业有限公司	2014.12
S6	湘丰茯砖	湖南浩茗茶业食品有限公司	2015.8
S7	金花茯砖	湖南中茶茶业有限公司	2015.7
S8	益阳茶厂天尖茶	湖南益阳茶厂有限公司	2015.2
S9	怡清源野尖	湖南怡清源茶业有限公司	2015.7
S10	久扬天尖	湖南久扬茶业有限公司	2014.8
S11	湘丰天尖	湖南浩茗茶业食品有限公司	2014.9
S12	白沙溪天尖	湖南白沙溪茶厂	2015.8
S13	黑美人天尖茶	湖南黑美人茶业有限公司	2014.7
S14	高马二溪天尖	湖南高马二溪茶业	2014.7
S15	中茶贡茶	湖南中茶茶业有限公司	2015.3
S16	久扬百两茶	湖南久扬茶业有限公司	2015.3
S17	湘丰千两茶	湖南湘丰茶业有限公司	2015.3
S18	黑美人千两花卷	湖南黑美人茶业有限公司	2015.10
S19	高马二溪百两茶	湖南高马二溪茶业	2014.12
S20	白沙溪百两茶	湖南白沙溪茶厂	2014.8
S21	怡清源百两茶	湖南怡清源茶业有限公司	2014.10
S22	中茶千两茶	湖南中茶茶业有限公司	2014.10
S23	四川土司黑茶	汶川县映香茶业	2014.8
S24	云南普洱茶	云南龙生绿色产业有限公司	2014.11
S25	湖北青砖茶	湖北赵李桥茶厂	2015.4
S26	广西六堡茶	广西梧州茂圣茶业	2015.4
S27	干燥新鲜茶叶	湖南省安化县	2016.4
S28	新鲜茶叶	湖南省安化县	2016.4

对照品: 茯砖素A(fuzhuanins, FZA), 由安徽农业大学凌铁军教授馈赠。没食子儿茶素((-)-gallocatechin, GC, 批号BZP0451)、表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin gallate, EGCG, 批号BZP0159)、没食子儿茶素没食子酸酯((-)-gallocatechin gallate, GCG, 批号BZP0162)、表儿茶素没食子酸酯((-)-epicatechin gallate, ECG, 批号BZP0160)、咖啡因(cafeine, CAF, 批号BZP0602)、没食子酸(gallic acid, GA, 批号BZP0110)、儿茶素没食子酸酯((-)-catechin gallate, CG, 批号BZP0452)、表儿茶素((-)-epicatechin, EC, 批号BZP1035)、表没食子儿茶素

(-)-epigallocatechin, EGC, 批号BZP0161)、茶黄素-3,3'-双没食子酸(theaflavine-3,3'-digallate, TFBG, 批号B20141), 所有对照品纯度均不小于98%, 购于合肥博美生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Prominence LC-20A高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪 日本岛津公司; KQ 2200型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; H-X01无油真空泵 天津华鑫仪器有限公司; SQ 2119型多功能粉碎机 上海帅佳电子科技有限公司; PB 230-N电子精密天平 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

称取1.000 g粉碎茶样(过40目筛)于100 mL锥形瓶中, 加入25 mL 90 °C的蒸馏水, 立即放入90 °C水浴中浸提20 min, 每隔5 min振荡1次。提取完成后, 静置, 冷却至室温, 取上层清液, 过0.45 μm滤膜, 待用。

1.3.2 色谱条件

流动相A为0.17%乙酸溶液(V/V), 流动相B为乙腈; 色谱柱为Pgrandsil-STC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测波长280 nm, 柱温30 °C, 流速1.0 mL/min。分析时间80 min。梯度洗脱方法: 0~4 min, 6% B; 4~16 min, 6%~14% B; 16~22 min, 14%~15% B; 22~32 min, 15%~18% B; 32~37 min, 18% B; 37~55 min, 18%~35% B; 55~60 min, 35%~55% B; 60~65 min, 55%~25% B; 65~70 min, 25%~20% B; 70~80 min, 20%~6% B。系统平衡色谱柱时间为10 min。

1.3.3 方法学考察

1.3.3.1 标准曲线的绘制

将每一种标准物质配制为不同系列质量浓度的标准溶液, 在1.3.2节色谱条件下进样10 μL, 测定3次, 取峰面积平均值绘制标准曲线。

1.3.3.2 精密度实验

取同一黑茶样品按1.3.1节方法制备, 在1.3.2节色谱条件下连续进样5次, 计算各共有峰对应的保留时间和峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 考察仪器的精密度。

1.3.3.3 稳定性实验

取同一黑茶样品, 按1.3.1节方法制备提取液, 在1.3.2节的色谱条件下分别于0、2、4、8、12、14、16、18、20、24 h进样, 计算各共有峰对应的保留时间和峰面积的RSD, 考察黑茶提取液的稳定性。

1.3.3.4 重复性实验

取同一黑茶样品6份, 按1.3.1节方法平行制备分析样品, 按1.3.2节色谱条件分别进样, 计算各共有峰对应保留时间和峰面积的RSD, 考察该方法的重复性。

1.4 数据分析

采用Excel 2010进行实验数据处理与标准曲线绘制, 然后采用SPSS进行主成分分析。对所有黑茶样品进行HPLC分析后, 将色谱图数据文件导入《国家药典》委员会发布的中药指纹图谱相似度评价系统(A版), 进行相似度分析。

2 结果与分析

2.1 方法学考察结果

2.1.1 标准曲线

以标准物质量浓度(mg/mL)为x轴, 峰面积为y轴, 绘制标准曲线, 得到11种水溶性成分对照品溶液的线性回归方程, 如表2所示。每种对照品的峰面积与质量浓度间的相关系数均大于0.999, 说明线性关系良好。

表2 黑茶中多种成分色谱峰面积与质量浓度间的线性回归方程
Table 2 Linear equation between peak areas and concentrations of dark tea components

标准品	线性回归方程(以峰面积定量)	相关系数 R^2
GA	$y=5\ 605\ 698.4x-555.571$	0.999 1
GC	$y=549\ 806.3x+33\ 074.275$	0.999 3
EGC	$y=2\ 008\ 748.5x-22\ 738.623$	0.999 6
CAF	$y=24\ 313\ 970.2x-183\ 194.508$	0.999 0
EC	$y=6\ 118\ 949.9x+106\ 529.620$	0.999 7
EGCG	$y=9\ 260\ 134.4x-822\ 327.946$	0.999 0
GCG	$y=11\ 500\ 156.9x-232\ 374.75$	0.999 9
ECG	$y=16\ 202\ 755.5x-58\ 998.221$	0.999 2
CG	$y=14\ 450\ 715.7x-450\ 241.863$	0.999 4
TFBG	$y=47\ 892\ 780.8x-25\ 916.669$	0.999 9
FZA	$y=156\ 586\ 084.1x-282\ 560.85$	0.999 9

2.1.2 仪器精密度结果

在精密度实验中, 谱图中各共有峰对应的保留时间的RSD为0.67%~2.32%, 对应峰面积的RSD为0.17%~2.75%, 表明该实验方法所使用的色谱仪分析测定重复性良好。

2.1.3 样品稳定性结果

在稳定性实验中, 谱图中各共有峰对应的保留时间的RSD为0.13%~0.59%, 对应峰面积的RSD为0.23%~2.25%, 表明本实验的样品稳定性较好。

2.1.4 分析方法重复性结果

在重复性实验中, 谱图中各共有峰对应的保留时间的RSD为0.23%~0.88%, 对应峰面积的RSD为0.51%~2.73%, 表明本实验方法的重复性良好。

2.1.5 加标回收率结果

为了进一步考察分析方法的准确性, 取1 g黑茶样品, 加入一定量的对照品(CAF、EC、CG)溶液, 按

照1.3.1节方法制备加标样溶液，按照1.3.2节分析方法进行，分别测定黑茶样品及加标样品含量，重复2次，结果取平均值，计算各个成分的回收率，见表3。

表3 加标回收率实验结果

Table 3 Recoveries of spiked standards

标准品	样品中原有量/mg	对照品加入量/mg	实测量/mg	回收率/%
CAF	0.285 3	0.299 2	0.589 5	101.7
EC	0.065 0	0.098 0	0.162 0	99.0
CG	0.007 2	0.013 5	0.020 8	100.8

从表3可以看出，所测标准品的回收率均在98.0%~105%之间，符合方法学规定，此分析方法可用于黑茶样品的分析。

2.2 湖南安化黑茶指纹图谱的构建

按照已建立的HPLC分析方法，对9个不同黑茶厂家的22个安化黑茶样品进行分析，将所得到的色谱图数据文件导入《国家药典》（2010版）发布的中药指纹图谱相似度评价系统，得到安化黑茶的HPLC指纹图谱，如图1A所示。共发现19个共有峰，如图1B所示，通过与对照品液相谱图比对，共确定了11种化合物，分别为GA、GC、CAF、EGC、EC、EGCG、GCG、ECG、TFBG、FZA与CG。

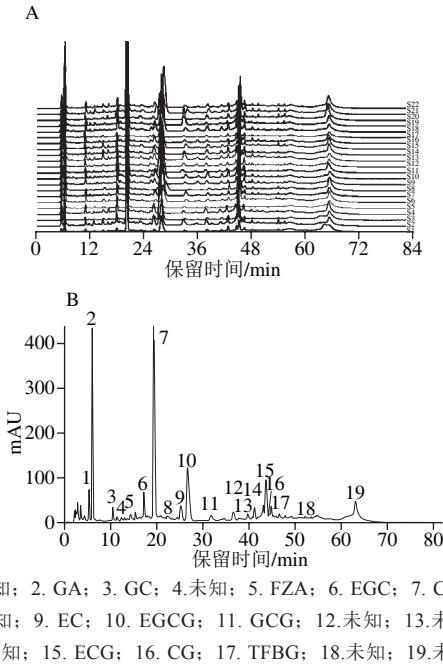


图1 黑茶样品水溶性成分(A)和安化黑茶水溶性成分共有峰(B) HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of water-soluble components (A) and common peaks (B) from Anhua dark tea samples

2.3 安化黑茶样品HPLC指纹图谱的相似度评价

在共有模式下，对所有黑茶样品进行相似度评价，得到了26个黑茶样品的相似度结果，如表4所示。

表4 共有模式下安化黑茶与其他产地黑茶的相似度

Table 4 Similarities between Anhua dark tea and other dark teas under common pattern

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.867	S14	0.900
S2	0.956	S15	0.958
S3	0.938	S16	0.851
S4	0.929	S17	0.952
S5	0.955	S18	0.922
S6	0.783	S19	0.953
S7	0.950	S20	0.923
S8	0.936	S21	0.881
S9	0.925	S22	0.943
S10	0.891	S23	0.171
S11	0.909	S24	0.198
S12	0.938	S25	0.285
S13	0.929	S26	0.180

从表4看出，安化黑茶在共有模式下的相似度为0.783~0.958，其中除了湘丰茯砖茶的相似度较低（0.783）以外，其余安化黑茶在共有模式下的相似度均在0.85以上。4个外省黑茶在共有模式下与安化黑茶的相似度较低，都小于0.3。不同产地、不同品种的黑茶相似度差异，可能决定于原料、加工工艺、以及茶叶鲜嫩程度等的不同。

2.4 黑茶中水溶性成分的含量分析

表5 不同品牌黑茶中主要成分含量

Table 5 Contents of major components in different brands of dark tea

mg/g											
编号	GA	GC	EGC	CAF	EC	EGCG	GCG	ECG	CG	FZA	TFBG
S1	6.688 5	8.777 9	6.929 6	10.342 1	1.560 4	9.482 4	1.497 4	2.100 5	1.198 8	0.002 9	0.304 0
S2	9.017 5	16.747 5	3.322 7	15.787 5	0.687 5	9.192 5	1.167 5	1.991 8	0.835 0	0.025 0	0.275 9
S3	7.647 5	7.045 0	4.189 2	9.335 0	1.550 0	9.597 5	0.860 0	1.972 6	0.950 0	0.007 8	0.166 5
S4	14.016 7	2.422 5	14.979 8	16.011 0	4.009 3	18.792 3	2.959 0	4.980 3	1.637 0	0.031 6	0.168 6
S5	10.349 6	12.945 4	4.134 7	10.727 8	0.487 0	5.113 3	1.345 4	1.145 0	1.192 5	0.012 3	0.207 3
S6	14.492 0	5.718 6	6.934 8	8.335 5	2.110 7	6.661 5	1.511 7	1.170 4	1.303 0	0.035 1	0.380 0
S7	23.253 0	17.008 8	20.035 3	21.372 6	4.099 8	14.592 7	1.360 4	3.737 4	1.039 0	0.001 7	0.261 0
S8	14.026 8	24.742 8	9.126 6	17.069 1	2.946 4	13.389 3	1.760 1	4.466 9	1.239 5	0.001 4	0.149 7
S9	9.663 6	25.959 2	11.223 5	19.842 5	2.597 4	25.154 6	1.434 3	4.126 9	1.107 6	0.008 3	0.262 4
S10	16.432 7	25.266 7	24.567 9	19.609 7	5.043 8	25.917 6	1.920 3	4.821 7	1.271 2	0.004 7	0.349 9
S11	12.634 0	1.468 8	10.300 0	15.961 6	0.908 3	10.112 2	2.023 8	2.116 8	1.294 4	0.005 3	0.440 1
S12	14.177 9	16.530 9	8.426 7	18.370 0	0.719 6	15.026 8	1.490 1	2.241 8	0.991 9	0.011 6	0.303 8
S13	13.712 1	20.624 9	6.966 3	14.099 1	1.227 0	6.824 6	1.412 0	1.754 6	1.241 4	0.010 1	0.244 1
S14	16.259 0	26.698 5	24.186 2	19.593 5	5.204 0	26.539 9	2.166 3	5.015 9	1.321 9	0.051 5	0.560 1
S15	17.116 5	24.518 6	15.727 0	16.293 7	4.382 5	19.712 4	1.847 6	4.882 2	2.434 4	0.138 6	0.547 3
S16	8.003 0	15.548 1	11.760 0	17.188 8	3.886 8	26.296 4	2.370 4	6.751 2	0.930 3	0.013 2	0.219 6
S17	8.733 2	16.557 5	4.813 9	20.022 8	0.822 0	14.283 5	1.848 3	3.178 3	1.123 8	0.007 7	0.290 5
S18	24.039 3	19.043 1	18.492 9	22.655 4	4.430 5	17.431 7	1.179 9	4.009 0	1.037 6	0.004 3	0.264 6
S19	16.49 8	17.805 1	8.681 1	21.537 0	0.807 6	16.479 9	6.288 3	2.323 7	1.252 2	0.009 8	0.175 7
S20	13.240 2	17.342 1	12.793 6	19.478 1	2.438 8	14.938 2	2.460 2	4.034 6	1.302 4	0.041 0	0.411 7
S21	19.777 3	19.915 3	11.420 9	21.049 9	4.402 3	22.938 1	1.730 8	5.083 9	1.374 6	0.087 8	0.550 3
S22	13.794 7	15.504 5	6.796 0	18.056 6	2.282 4	12.646 3	1.294 8	3.124 5	0.842 1	0.002 6	0.143 2
S23	4.234 3	38.533 0	0.908 6	22.032 1	ND	ND	0.537 9	0.159 7	8.559 0	ND	0.037 1
S24	4.119 3	54.313 1	3.250 0	20.829 3	ND	2.291 8	0.524 9	0.164 9	0.830 5	ND	0.030 2
S25	4.856 3	42.765 3	3.702 9	22.687 2	2.719 2	3.330 9	1.226 2	2.062 0	1.460 9	ND	0.044 0
S26	4.777 3	29.915 3	3.250 5	28.049 9	3.747 2	2.938 1	1.730 8	2.472 4	1.374 6	ND	0.028 2
S27	31.549 6	49.676 6	11.748 5	32.273 0	5.809 1	8.204 0	0.891 0	1.533 7	1.191 8	ND	0.534 7
S28	6.797 5	25.892 4	13.300 2	30.360 2	1.657 7	70.618 1	4.299 8	9.262 3	2.567 1	ND	ND

注：ND.未检出。

按照1.3.1节中的方法制备所有黑茶样品溶液, 按1.3.2节色谱条件, 进样10 μL , 连续进样3次, 计算峰面积平均值, 根据相应化合物标准曲线方程, 计算各茶叶中11种主要成分的含量, 以干质量计, 如表5所示。首先, 除了在安化黑茶中检测出FZA以外, 在4个外省黑茶样品、新鲜茶叶及干燥后的新鲜茶叶中均未检出FZA, 可以说明, FZA是安化黑茶在加工过程中产生的, 可能是独特的渥堆工艺导致了FZA的产生^[28], 说明FZA可以作为安化黑茶的标志性成分。其次, 新鲜茶叶中的CAF含量高于其他所有发酵黑茶, 因此得出, 随着安化黑茶的不断加工, 茶叶中CAF含量在不断减少, 有可能是咖啡碱与茶多酚的氧化产物以及蛋白质等物质以氢键缔合形成络合物而导致的结果; 另外, 除少数茯砖茶外, 所有发酵黑茶CAF含量都相差不大, 因为咖啡碱属于杂环含氮化合物, 环状结构比较稳定, 难以被微生物破坏利用^[29]。同时, 所有黑茶都含有TFBG, 而在新鲜茶叶中未检出TFBG, 说明TFBG也是在黑茶加工过程中产生的。在黑茶的渥堆过程中, 随渥堆时间延长, 微生物的代谢速度加快, 堆体温度不断升高^[30], 儿茶素氧化速度加快; 另一方面, 可能由于微生物的酶促氧化导致了儿茶素在渥堆发酵过程中发生氧化、聚合, 导致茶黄素类的形成与累积^[31]。另外, 安化新鲜茶叶中EGCG、ECG、CG的含量远高于其他发酵安化黑茶, 黑茶渥堆发酵的过程中, 儿茶素的水解及非酶促氧化是EGCG、ECG、CG减少的主要原因^[29]。

在4个外省黑茶样品中, 四川土司黑茶未检出EC、EGCG, 但其CG含量较高, 达到安化黑茶的8倍左右; 云南普洱茶中未检出EC^[32], 但GC含量却高出所有黑茶样品; 广西六堡茶中CAF含量高出所有安化黑茶; 湖北青砖茶各成分含量与安化黑茶并无明显差异。此外, 通过安化黑茶与外省黑茶的含量比较, 发现安化黑茶中GA、EGCG的含量都高于其他4种外省黑茶样品。所有这些差异性变化, 可能是由于黑茶产地不同, 加工过程中物质间的相互转化、加工工艺以及原料来源等的不同而导致^[33-35]。

2.5 主成分分析

主成分分析可以有效地将多维变量进行降维处理, 筛选出最少的可以代表所分析问题的数据, 删除无用信息, 从而使分析问题简单化^[36]。在样品定量分析的基础上, 将28个样品中所含的各化合物的含量作为变量, 对所有黑茶样品进行主成分分析, 如表6所示。主成分分析方法所提取的前4个主成分可以概括80.722%的黑茶成分含量信息。同时, 得到了主成分分析散点图, 如图2所示。所有安化黑茶样品被归为一大类, 所选外省黑茶样品被归为另一大类; 未发酵的安化干燥新鲜茶叶和安化新鲜茶叶, 由于没有经过茶叶的加工发酵过程, 与其他安化黑茶所含的成分存在较大的差异, 因此被各分为一类。此分类结果与相似度分析结果一致, 并且符合事实。

表6 主成分分析方差贡献分析

Table 6 Analysis of variance contribution in principal component analysis

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累计贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.783	34.391	34.391	3.783	34.391	34.391
2	2.159	19.628	54.020	2.159	19.629	54.020
3	1.857	16.878	70.897	1.857	16.878	70.897
4	1.081	9.828	80.722	1.081	9.825	80.722
5	0.682	6.197	86.919			
6	0.588	5.345	92.264			
7	0.328	2.985	95.250			
8	0.241	2.193	97.443			
9	0.162	1.472	98.914			
10	0.085	0.771	99.685			
11	0.035	0.315	100			

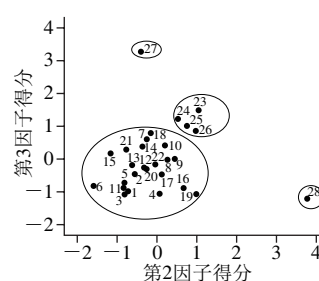


图2 主成分分析散点图

Fig. 2 Scatter plot of principal component analysis

3 结论

本实验利用HPLC法构建了安化黑茶的HPLC指纹图谱, 并在此基础上进行了相似度分析, 得出安化黑茶在共有模式下的相似度在0.85以上, 而广西六堡茶、四川土司黑茶、湖北青砖茶以及云南普洱茶4种外省黑茶与安化黑茶的相似度很低, 都小于0.3; 此外, 在HPLC指纹图谱的基础上进行了定量分析及主成分分析, 得到了较好的分析结果, 并找到了安化黑茶与四川土司黑茶、广西六堡茶与湖北青砖茶之间水溶性成分的含量差异, 确定了安化黑茶的标志性成分FZA, 是辨别安化黑茶与其他外省黑茶的重要依据。HPLC指纹图谱结合主成分分析方法分离效率高、分析速度快、准确率高, 同时为安化黑茶提供了量化的鉴定方法, 具有一定的优越性, 可用于安化黑茶与其他地区黑茶的鉴别。

参考文献:

- [1] 胡燕, 齐桂年. 四川黑茶的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(1): 134-140. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.01.012.
- [2] 刘艳, 廖成勇. 安化黑茶的保健功能研究[J]. 产业与科技论坛, 2012, 11(15): 116-117. DOI:10.3969/j.issn.1673-5641.2012.15.066.
- [3] 彭金富, 裴奇, 黄路, 等. 黑茶的减肥作用及其影响因素的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 269(12): 961-964. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2013.12.004.

- [4] FOSTER M T, GENTILE C L, COX-YORK K, et al. Fuzhuan tea consumption imparts hepatoprotective effects and alters intestinal microbiota in high saturated fat diet-fed rats[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(5): 1213-1220. DOI:10.1002/mnfr.201500654.
- [5] GREYLING A, RAS R T, ZOCK P L, et al. The effect of black tea on blood pressure: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e103247. DOI:10.1371/journal.pone.0103247.
- [6] 张广慧, 沈喜梅, 周则卫, 等. 黑茶的药理作用研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(3): 340-344. DOI:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.03.029.
- [7] OREM A, ALASALVAR C, KURAL B V, et al. Cardio-protective effects of phytosterol-enriched functional black tea in mild hypercholesterolemia subjects[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 31: 311-319. DOI:10.1016/j.jff.2017.01.048.
- [8] 金朱葆. 认识和了解安化黑茶[J]. *中国茶叶加工*, 2009(3): 42-44. DOI:10.15905/j.cnki.33-1157/ts.2009.03.011.
- [9] WOODWARD K A, HOPKINS N D, DRAIJER R, et al. Acute black tea consumption improves cutaneous vascular function in healthy middle-aged humans[J]. *Clinical Nutrition*, 2016. DOI:10.1016/j.clnu.2016.12.013.
- [10] 刘建宇, 刘丹, 张辉, 等. 安化黑茶化学成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1449-1457. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.031.
- [11] 张亚, 黄亚亚, 梁艳, 等. 黑茶渥堆工艺研究进展[J]. *食品与机械*, 2017, 33(3): 216-220. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2017.03.044.
- [12] 李建勋, 杜丽平, 王超, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黑茶香气成分[J]. *食品科学*, 2014, 35(2): 191-195. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201402036.
- [13] 彭雪萍, 李星科, 朱玉梅, 等. 不同类型黑茶香气成分的对比分析研究[J]. *中国食品添加剂*, 2014(2): 124-129. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2014.02.016.
- [14] 胡琳玲, 刘遵莹, 刘秋玲, 等. 高效液相色谱法同时检测黑茶中16种多环芳烃化合物[J]. *茶叶科学*, 2014, 34(4): 324-330. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2014.04.002.
- [15] JOSHI R, GULATI A. Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in Kangra orthodox black tea[J]. *Food Chemistry*, 2015, 167(33): 290-298. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.06.112.
- [16] 雷雨. 我国不同类别黑茶品质差异的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [17] KRISHNAN R, MARU G B. Isolation and analyses of polymeric polyphenol fractions from black tea[J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(3): 331-340. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.11.039.
- [18] BOTH S, CHEMAT F, STRUBE J. Extraction of polyphenols from black tea—Conventional and ultrasound assisted extraction[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(3): 1030-1034. DOI:10.1016/j.ultsonch.2013.11.005.
- [19] 胡燕, 齐桂年. 我国不同产地黑茶的FTIR指纹图谱分析[J]. *核农学报*, 2014, 28(4): 684-691. DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2014.04.0684.
- [20] 谢丹, 龙立平, 王姣亮, 等. 黑茶的电化学指纹图谱研究[J]. *湖南城市学院学报(自然科学版)*, 2014, 23(1): 36-39. DOI:10.3969/j.issn.1672-7304.2014.01.010.
- [21] SZYMCZYCHA-MADEJA A, WELNA M, POHL P. Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified-multivariate classification of different tea products[J]. *Microchemical Journal*, 2015, 121: 122-129. DOI:10.1016/j.microc.2015.02.009.
- [22] YANG D Z, AN Y Q, JIANG X L, 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. DOI:10.1016/j.talanta.2011.04.059.
- [23] TISTAERT C, DEJAEGHER B, HEYDEN Y V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 690(2): 148-161. DOI:10.1016/j.aca.2011.02.023.
- [24] XIE B, GONG T, TANG M, 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 & Biomedical Analysis*, 2008, 48(4): 1261-1266. DOI:10.1016/S0040-4020(01)00936-X.
- [25] 丰加涛, 金郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制[J]. *色谱*, 2008, 26(2): 180-185. DOI:10.3321/j.issn:1000-8713.2008.02.009.
- [26] 聂韡, 朱培林, 房海灵, 等. HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量[J]. *中草药*, 2017, 48(1): 185-191. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.026.
- [27] 刘英, 吴曙光, 尹州, 等. 指纹图谱技术在茶叶研究上的应用[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(1): 13-20. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2013.01.009.
- [28] LUO Z M, DU H X, LI L X, et al. Fuzhuanins A and B: the B-ring fission lactones of flavan-3-ols from Fuzhuan brick-tea[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6982-69-90. DOI:10.1021/jf401724w.
- [29] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J]. *食品科学*, 2008, 29(2): 64-67. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.02.007.
- [30] 温琼英, 刘素纯. 黑茶渥堆(堆积发酵)过程中微生物种群的变化[J]. *茶叶科学*, 1991, 8(11): 10-16. DOI:10.13305/j.cnki.jts.1991.s1.002.
- [31] 刘仲华, 黄建安, 施兆鹏. 黑茶初制中主要酶类的变化[J]. *茶叶科学*, 1991, 6(11): 17-22. DOI:10.13305/j.cnki.jts.1991.s1.003.
- [32] 吴桢. 普洱茶渥堆发酵过程中主要生化成分的变化[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [33] 邵静娜, 葛国平, 何卫中, 等. 渥堆过程中黑茶生化成分变化及其影响因素研究进展[J]. *茶叶*, 2015, 41(3): 137-141. DOI:10.3969/j.issn.0577-8921.2015.03.005.
- [34] 黄群, 李彦坡, 陈林杰, 等. 冠突散囊菌液态发酵过程中黑茶活性成分变化研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 231-234. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2007.12.053.
- [35] 胡绍德, 陈畅畅, 李大祥, 等. 黑茶中多酚组分和多酚总量分析[J]. *蚕桑茶叶通讯*, 2011, 152(2): 26-28. DOI:10.3969/j.issn.1007-1253.2011.02.016.
- [36] 邹瑶, 齐桂年, 刘婷婷, 等. 四川黑茶渥堆中品质成分的主成分及聚类分析[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 304-307. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.058.