

不同海拔岭头单枞茶的分类研究

魏建华¹, 陆奕娜¹, 黄学泓¹, 韩建欣^{2*}

(1. 汕头海关技术中心, 广东汕头 515031; 2. 山西省生物研究院有限公司, 山西太原 030006)

摘要 应用高效液相色谱法研究不同海拔岭头单枞茶的指纹图谱, 采用相似度分析软件进行分析比较, 获得 21 个共有特征峰; 根据相对峰面积, 采用判别分析法进行分类研究, 初步建立岭头单枞茶产地海拔鉴定方法, 从而间接反映茶叶的品质。结果表明, 该方法简单、实用, 是指纹图谱技术结合化学计量法在凤凰单枞茶叶分类鉴定中的一个有益尝试。

关键词 岭头单枞茶; 高效液相色谱; 色谱指纹图谱; 判别分析法

中图分类号 TS272.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)02-0204-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.059



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Classification Studies of Lingtou Dancong Tea in Different Altitudes

WEI Jian-hua, LU Yi-na, HUANG Xue-hong et al (1. Shantou Customs Technology Center, Shantou, Guangdong 515031; 2. Shanxi Biological Research Institute Co., Ltd., Taiyuan, Shanxi 030006)

Abstract The chromatographic fingerprint of Lingtou Dancong tea was studied by high performance liquid chromatography (HPLC). The similarity analysis software was used to analyze and compare the fingerprints. Twenty-one common characteristic peaks for identification were obtained. According to the relative peak area, the discriminant analysis method was used for classification research, and the method for identifying the elevation of Lingtou Dancong tea origin was established, which indirectly reflected the quality of tea. The results showed that the method was simple and practical, and it was a useful attempt in the classification and identification of Fenghuang Dancong tea by the combination of fingerprint technology and stoichiometry.

Key words Lingtou Dancong tea; High performance liquid chromatography; Chromatographic fingerprint; Identifying analysis method

岭头单枞是国家地理标志产品——凤凰单枞茶中的一个重要品种, 其产地主要是广东凤凰山区^[1]。茶的立地条件有很大差异, 海拔为 300~1 000 m。依照茶园所处海拔将凤凰单丛茶分为低山茶(海拔 300~400 m)、中山茶(海拔 500~700 m)和高山茶(海拔 800~1 100 m)。无论是品质还是经济价值均以高山茶居首, 中山茶次之, 低山茶居末^[2]。由于经济利益的驱动, 市场上会出现以低产地海拔假冒高产地海拔现象, 严重侵害消费者的利益。

由于种植的产地海拔不同导致气候、环境等因素不同, 造成岭头单枞的化学成分的种类和含量不同, 进而有不同的口感和品质^[3]。笔者通过高效液相法指纹图谱, 结合试验分析与化学计量法, 尝试建立一种基于高效液相指纹图谱和判别分析法的不同海拔岭头单枞的快速鉴定方法, 对岭头单枞的产地海拔进行快速客观的判定, 从而间接鉴定其品质^[4-7]。对于茶叶交易市场、茶叶经销商、消费者、公安机关、海关和科研机构等具有很强的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备。 Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国); DAD 检测器, 四元梯度泵; Millipore Advantage A10 超纯水系统(美国); 梅特勒-托利多 AL204-IC 电子分析天平(瑞士); CBL photoelectron TECHNOLOGY Model C9860A 型超声波清洗器。

1.1.2 试剂。 液相用乙腈、甲酸为色谱纯; 液相用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。化学试剂(标准品): 没食子酸(GA)、表没食子酸儿茶素(EGC)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)、儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、儿茶素没食子酸酯(CG), 北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.3 试材。 该试验材料是向茶农直接购买的已知产地海拔 30 个岭头单枞春茶样品, 来自广东省潮州市饶平县浮滨镇产区, 分别为海拔 400 m 以下的低山茶 10 个样品、海拔 600 m 左右的中山茶 10 个样品和海拔 1 000 m 左右的高山茶 10 个样品。

1.2 方法

1.2.1 供试品的制备。 称取 3.00 g(粉碎)干茶样, 用 50% 乙醇在室温下浸提 15 min, 过滤并洗涤滤渣 3 次, 合并滤液, 冷却后定容 100 mL; 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

1.2.2 色谱条件。 色谱柱: Phenomenex Synergi MAX-RP C₁₂ 80A(250 mm×4.6 mm, 4 μm); 柱温 30 °C; 流动相 A 相为 1% 甲酸, B 为乙腈; B 相梯度从 10% 到 30%; 流速: 1 mL/min, 60 min; 检测波长 280 nm^[8]。

1.2.3 样品测定。 吸取“1.2.1”所得供试品溶液, 注入高效液相色谱仪中进行高效液相色谱检测, 进样量为 20 μL。按照“1.2.2”色谱条件分析测定, 采集 60 min 色谱数据。

1.3 数据分析软件 色谱指纹图谱相似度评价软件选用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版本); 判别分析用的统计软件是 SPSS 20.0。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验。 取同一供试品溶液(编号为 20160402-1

基金项目 汕头市科技计划项目“基于化学指纹图谱的凤凰单枞茶真伪鉴别、品系和分级判别研究”。

作者简介 魏建华(1977—), 女, 山西大同人, 高级工程师, 硕士, 从事检验检测技术应用研究。* 通信作者, 副研究员, 从事生物与食品方面的研究。

收稿日期 2019-08-09; **修回日期** 2019-08-19

的岭头单枞茶),依据“1.2.2”色谱条件,连续进样5次。采用色谱相似度评价软件进行指纹图谱相似度分析,与生成的对照指纹图谱对比,各图谱的相似度均等于1,表明仪器稳定,精密密度良好。

2.1.2 重现性试验。取同一批供试品(编号为20160402-1的岭头单枞茶),精密称取5份,按“1.2.1”方法平行制备5份供试品溶液,分别依据“1.2.2”色谱条件进样,同法进行检测。选用相似度软件对其指纹图谱进行分析,与生成的对照指纹图谱相比,发现5份样品的相似度均等于1,表明该方法重现性良好。

2.1.3 稳定性试验。取同一份供试品溶液(编号为20160402-1的岭头单枞茶),依据“1.2.2”色谱条件进样,分别于0、3、6、9、15、24 h进样检测。选用相似度软件对其指纹图谱进行分析,与生成的对照指纹图谱相比,发现6份样品的相似度均大于0.990,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2 色谱指纹图谱的建立 分别将属于低山茶、中山茶、高山茶的样品的高效液相色谱图导入色谱指纹图谱相似度评价软件中进行指纹图谱相似度分析,每类茶相似度大于0.9,生成对照图谱,使用匹配数据功能获得每类岭头单枞中10个样品都具有的共有峰;将3类岭头单枞茶的对照图谱使用相似度分析软件进行相似度分析,相似度大于0.9,通过匹配数据功能,获得3类岭头单枞茶指纹图谱所具有的共有峰;确定共有特征峰的数量及与共有特征峰对应的保留时间。

2.3 数据标准化

2.3.1 确定基峰及指纹图谱中相同色谱峰的认定范围。分析该研究收集的所有茶叶的高效液相色谱图,发现在保留时间为(17.204±0.250) min内峰面积最大峰,是整个指纹图谱中峰面积最大或次大峰。经标准品检测,该峰为表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的色谱峰。以下数据处理都选择该峰为基峰,进行保留时间和峰面积的标准化。以该峰为基峰,求得8个标准品在每次上机时的保留时间和相对保留时间,具体见表1。

由表1可见,对于8个标准品来说,同样的仪器和色谱条件下,不同次的检测,其相对保留时间的相对标准偏差小于2%。因此该研究设定对于不同茶样品指纹图谱中是否含有相同的峰的标准方法是保留时间为(17.204±0.250) min内峰面积最大峰,即表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的色谱峰,以该峰为基峰,计算相对保留时间,设定相对保留时间

的相对标准偏差为2%,处于该设定范围,认为是相同的色谱峰。避免了保留时间数据漂移和色谱检测仪器造成的峰不一致问题,提高鉴定模型的准确性和实用性。

2.3.2 保留时间和峰面积的标准化。将每类样品指纹图谱中共有特征峰的保留时间和峰面积进行标准化处理,获得数据预处理文件。保留时间标准化:分别计算每类岭头单枞的指纹图谱中的共有特征峰保留时间与基峰的保留时间的比值,作为相对保留时间。峰面积数据标准化:分别计算每个凤凰单枞的指纹图谱中的共有特征峰峰面积与基峰峰面积的比值,作为相对峰面积。

表1 标准品在不同时间测定的保留时间和相对保留时间

Table 1 Retention time and relative retention time of standard products measured at different times

标准品 Standards	保留时间 Retention time//min	相对保留时间 Relative retention time	相对标准 偏差 RSD//%
GA	4.466	1.390 5	1.455 0
EGC	8.645	8.640 5	0.685 8
C	11.474	11.474 0	0.336 2
EC	15.705	15.705 0	0.606 2
EGCG	17.442	17.442 0	0.000 0
GCG	19.740	19.740 0	0.383 6
ECG	28.582	28.582 0	0.932 7
CG	29.787	29.787 0	1.170 3

2.4 筛选用于识别的共有特征峰 从“2.2”中获得的共有峰中,根据共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积筛选共有特征峰,相对保留时间一致的且稳定出现的峰作为用于识别岭头单枞不同海拔的共有特征峰。

对于每类岭头单枞茶具体筛选步骤:①相对峰面积排序,去除与最大峰面积比小于0.01%的共有峰。②相对保留时间,将经过上一步骤保留下的峰的相对保留时间,根据每类岭头单枞的共有特征峰的相对保留时间一一进行匹配,设定相对保留时间的相对标准偏差范围为2%,各类岭头单枞的共有特征峰的相对保留时间处于该设定范围,认为每类岭头单枞指纹图谱与此峰的相对保留时间一致的,保留该峰,否则弃去。如表2所示,共获得凤凰单枞产地海拔识别用共有特征峰21个。将这21个峰对应的相对保留时间进行集中排序,以用于识别的共有特征峰作为列,每个样品作为行,所述相对峰面积填入相应的单元格,获得岭头单枞茶产地海拔鉴定的数据预处理文件。

表2 岭头单枞茶产地海拔用于识别的共有特征峰相对保留时间

Table 2 The relative retention time of the common feature peaks used for identification of the elevation of Lingtou Dancong tea origin

峰号 Peak number	相对保留时间 Relative retention time			均值 Mean value	相对标准 偏差 RSD//%
	400 m 以下的春茶 Spring tea below 400 m	600 m 左右的春茶 Spring tea around 600 m	800~1 000 m 的春茶 Spring tea in 800~1 000 m		
1	0.360 4	0.355 0	0.355 7	0.357 0	1.263
2	0.502 2	0.502 7	0.502 8	0.502 5	0.346
3	0.646 0	0.636 9	0.637 9	0.640 3	1.038
4	0.683 3	0.682 4	0.683 0	0.682 9	1.383

续下表

续表 2

峰号 Peak number	相对保留时间 Relative retention time			均值 Mean value	相对标准 偏差 RSD//%
	400 m 以下的春茶 Spring tea below 400 m	600 m 左右的春茶 Spring tea around 600 m	800~1 000 m 的春茶 Spring tea in 800~1 000 m		
5	0.740 2	0.706 1	0.707 5	0.717 9	1.763
6	0.881 7	0.841 3	0.840 6	0.854 5	1.684
7	0.928 5	0.914 3	0.914 0	0.918 9	0.905
8	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000
9	1.264 2	1.241 9	1.239 8	1.248 6	0.872
10	1.311 4	1.345 3	1.34 25	1.333 0	1.295
11	1.498 5	1.467 9	1.465 8	1.477 4	0.922
12	1.642 3	1.615 3	1.611 7	1.623 1	0.816
13	1.697 3	1.725 4	1.722 5	1.715 1	0.531
14	2.077 0	2.104 5	2.101 6	2.094 4	0.810
15	2.134 6	2.161 7	2.123 2	2.139 8	0.605
16	2.215 8	2.228 1	2.159 4	2.201 1	1.275
17	2.354 0	2.342 2	2.342 1	2.346 1	0.451
18	2.479 9	2.481 0	2.479 3	2.480 1	0.904
19	2.966 3	2.980 8	2.893 6	2.946 9	1.083
20	3.025 8	3.090 2	3.111 1	3.075 7	1.070
21	3.280 6	3.231 9	3.254 2	3.255 6	0.943

2.5 判别分析 上述数据集中包含 3 组 30 条单茶叶样品数据,用变量 T 作为样品标识。每条样品数据都由 21 个变量信息(记为 x_1, x_2, \dots, x_{21})构成。选取每组数据其分类情况已知,并用分类变量 P 记录类别, P 值为 1 代表产地海拔为 400 m 以下, P 值为 2 代表产地海拔为 600 m 左右, P 值为 3 代表产地海拔为 800~1 000 m 的样品。使用 SPSS 20.0 软件将典则判别分析源文件输入统计软件中进行典则判别分析,以 P 为分组变量,对数据集进行判别分析。线性判别函数中选取了 2 个较大的特征值,累计方差达到 100%,保留了变量的所有信息量(表 3)。

表 3 凤凰单枞茶产地海拔鉴定典则判别函数的特征值

Table 3 The eigenvalues of the discriminant function of the altitude identification rule of Lingtou Dancong tea origin

函数 Function	特征值 Eigenvalues	方差 Variance %	累积方差 Cumulative variance//%	正则相关性 Regular correlation
1	2 159.292	96.8	96.8	1.000
2	72.487	3.2	100.0	0.993

从 3 组不同海拔的岭头单枞茶样品散点图(图 1)可以看到,在以典则判别函数 1 为 X 轴、典则判别函数 2 为 Y 轴的坐标图中,3 个产地海拔范围的岭头单枞茶有明显的分类,第 1 类即海拔为 400 m 以下的岭头单枞茶样品明显聚集在坐标图的右侧,第 2 类即海拔为 600 m 左右的岭头单枞茶样品明显聚集在坐标图的左侧上半部分,第 3 类即海拔为 800~1 000 m 的凤凰单枞茶样品明显聚集在坐标图的左侧下半部分,3 组样品界限分明。

3 组共 30 个样品的分类结果显示,样本中的第 1 类即产地海拔为 400 m 以下的凤凰单枞茶中有 10 个样品,没有误判;第 2 类即海拔为 600 m 左右的凤凰单枞茶有 10 个样品,没有误判;第 3 类即海拔为 800~1 000 m 的凤凰单枞茶有 10

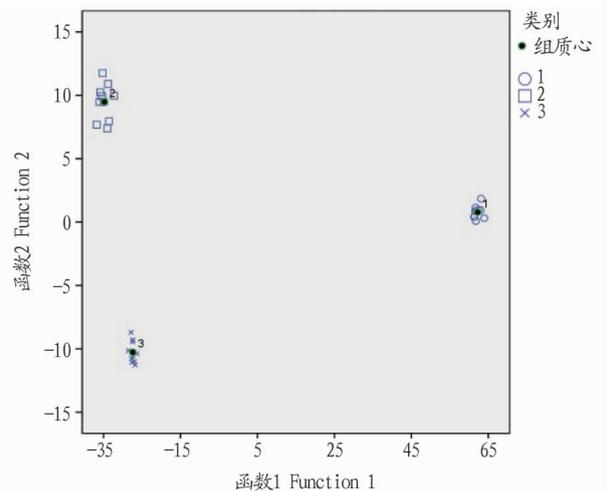


图 1 不同产地海拔的岭头单枞茶样品散点图

Fig.1 Scatter plot of Lingtou Dancong tea sample at different origin altitudes

个样品,没有误判;对已知产地海拔的凤凰单枞茶样本正确分类率为 100%。

3 结论与讨论

茶叶提取物在给定试验条件下所得到的色谱指纹图谱反映了该茶叶的化学组成及其含量分布状况,尝试利用其特征峰鉴别茶叶产地海拔的不同,从而间接反映茶叶的品质^[8-9]。根据相似度软件进行相似度分析,发现同一海拔的岭头单枞茶指纹图谱的相似度大于 0.9,不同海拔的岭头单枞茶的标准指纹图谱进行的相似度分析,相似度也都大于 0.9,说明对于岭头单枞茶来说,所含有的化学成分相似,化学成分的含量也大致相似,无法通过相似度软件直接区分不同海拔的岭头单枞茶。但是海拔的不同是影响岭头单枞茶品质的非常重要的因素。通过共有峰的识别,筛选出 21 个用

(下转第 212 页)

表2 回收率试验结果(n=5)

Table 2 Results of recovery tests (n=5)

加标量 Standard addition ng/mL	测得量 Measured amount ng/mL	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1.0	0.966 3	96.63	97.22	0.83
	0.967 2	96.72		
	0.971 3	97.13		
	0.986 7	98.67		
	0.969 4	96.94		
5.0	4.852 6	97.05	98.29	1.45
	4.899 5	97.99		
	4.841 5	96.83		
	5.001 7	100.03		
	4.977 3	99.55		
10.0	10.603 4	106.03	99.54	3.37
	9.988 3	98.78		
	9.893 2	98.93		
	9.785 4	97.85		
	9.813 6	96.13		
20.0	19.823 5	99.12	98.65	1.04
	19.574 5	97.87		
	19.480 1	97.40		
	20.003 4	100.02		
	19.766 9	98.83		
50.0	49.794 8	99.58	99.23	0.92
	48.995 3	97.99		
	49.276 7	98.55		
	50.028 4	100.05		
	50.000 9	100.00		

此次研究通过采用UPLC-MS法测定花椒及花椒制品中罗丹明B的含量,结果表明,该方法前处理简单快速、高灵敏度、准确性好、分析时间短及可操作性强,可用于大批次花椒及花椒制品中罗丹明B的定性定量分析。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:159.
- [2] 中华人民共和国卫生部.卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知:卫法监发[2002]51号[A].2002.
- [3] 佚名.利欲熏心 花椒也染色[J].广西质量监督导报,2012(11):10.
- [4] 郝凤桐.毒花椒:罗丹明B堪比苏丹红[J].健康必读,2011(7):33.
- [5] 宋晓响,张磊,姜杰.2013年大连市部分市售食品污染物监测结果[J].职业与健康,2014(22):3225-3228,3231.
- [6] 陈海燕,黄秋研,李锦清,等.顺德区市售辣椒类及调味品常规非食用色素添加的分析评价[J].农业机械,2013(35):70-73.
- [7] 佚名.染色花椒煮肉汤变“血水”[J].人人健康,2013(6):24.
- [8] 王艳春,刘晓峰,李博,等.北京市通州区调味品中工业染料监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2014,24(24):3584-3585,3588.
- [9] 徐声乐,王兴,刘金萍,等.罗丹明B及其在食品中检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(17):136-139.
- [10] 王传现,韩丽,方晓明,等.食品中罗丹明B的高效液相色谱荧光检测[J].分析仪器,2008(1):27-30.
- [11] 林长虹,胡书玉,黄达锴,等.辣椒及其制品中罗丹明B的超高效液相色谱荧光检测[J].广东化工,2011,38(4):140-141.
- [12] 胡侠,肖光,潘伟,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定辣椒粉及辣椒油中的7种罗丹明染料[J].色谱,2010,28(6):590-595.
- [13] 胡慧,李兵,占春瑞.香肠中罗丹明B的高效液相色谱串联质谱检测方法[J].食品科学,2010,31(4):223-225.

(上接第206页)

于判别分析的共有特征峰,采用判别分析方法建立不同海拔岭头单枞茶的鉴别模型。对海拔不同的凤凰单枞茶的分析结果表明,对于海拔400 m以下、600 m左右和800~1 000 m的3类春茶,通过判别分析建立的鉴别模型鉴别准确率为100%。验证了基于化学指纹图谱的岭头单枞茶以产地海拔分级判别研究是可行的。

在茶叶成分复杂、品种鉴定的依据成分不完全明确的前提下,利用色谱指纹图谱来鉴别岭头单枞茶的品种是切实可行的,并为不同品种及不同产地样品之间的鉴别提供了科学依据^[10]。该研究在此基础上利用指纹图谱技术和化学计量法软件对产地海拔岭头单枞的茶叶进行研究,获得21个判别用共有特征峰,进行判别分析,判别结果鉴别准确率为100%,一定程度上反映了该鉴别方法的应用前景,以改变人工感官评审的方法,使茶叶评审客观化、科学化和标准化^[11-12]。该研究虽然只针对岭头单枞茶进行产地海拔的分类与鉴定,但仍然可以作为其他凤凰单枞茶研究的参考。

参考文献

- [1] 张佳.凤凰茶区考察报告[J].茶叶,2013,39(2):88-90,106.
- [2] 唐颖,唐劲驰,操君喜,等.凤凰单丛茶品质的海拔区间差异分析[J].中国农学通报,2015,31(34):143-151.
- [3] 欧阳石光.茶叶香气指纹图谱及特征识别的初步研究[D].泰安:山东农业大学,2011.
- [4] 李永玲.非线性化学指纹图谱结合模式识别方法在食品鉴别方面的应用研究[D].重庆:西南大学,2015.
- [5] 朱潘伟,刘东红,黄伟,等.指纹图谱技术在食品品质检测中的应用[J].粮油加工,2008(6):125-128.
- [6] 俞良莉,陆维盈,刘洁,等.食品非目标性检测技术[J].食品科学技术学报,2016,34(6):1-6.
- [7] 陈勤,陈汉林,黄亚辉.四个凤凰单丛茶品质特点与生化成分分析研究[J].广东茶业,2015(4):15-19.
- [8] 梅洪娟,马瑞君,庄东红.指纹图谱技术及其在植物种质资源中的应用[J].广东农业科学,2014,41(3):159-164.
- [9] 马瑞君,梅洪娟,庄东红,等.不同品种(系)凤凰单丛茶DNA指纹图谱的构建[J].茶叶科学,2014,34(5):515-524.
- [10] 贺巍.基于化学指纹图谱的茶叶产地、原料品种判别分析和生化成分预测[D].南京:南京农业大学,2011.
- [11] 晏婧好,赵超艺,罗军武.凤凰单丛代表样茶感官审评比较分析[J].广东茶业,2006(5):18-21.
- [12] 杨环,周春娟,石恩宇.基于科学实验与感官审评的鸭屎香凤凰单丛香型品质鉴定[J].韩山师范学院学报,2018,39(3):42-46,66.