

普洱生茶的 HPLC 指纹图谱

倪倩^① 佟玲^{a,c} 李文博^b 高钧^a 王强

(中国药科大学中药学院 南京市童家巷 24 号 210009)

^a(天士力制药股份有限公司研究院 天津市北辰区普济河东道 2 号 300402)

^b(中国药科大学药学院 南京市童家巷 24 号 210009)

^c(沈阳药科大学药学院 沈阳市沈河区文化路 103 号 110016)

摘要 采用 Phenomenex synerg i 色谱柱(250mm×4.6mm, 4 μ m), 乙腈-0.05% 磷酸溶液梯度洗脱, 流速为 1.0mL·min⁻¹, 检测波长 210nm。对 10 批不同产地、不同生产年限普洱生茶样品进行处理, 运用中药指纹图谱相似度评价软件, 建立了该普洱生茶的 HPLC 指纹图谱; 与绿茶指纹图谱比较, 存在较大的差异, 该法简单精确, 为控制普洱生茶的质量提供了依据。

关键词 普洱生茶; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: O657.7⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)04-2103-04

1 引言

普洱茶是云南特有的地方名茶。普洱生茶是以符合普洱茶产地环境条件下生长的云南大叶种茶树鲜叶为原料, 经杀青、揉捻、日光干燥、蒸压成型等工艺制成的茶, 包括散茶及紧压茶^[1]。普洱生茶因具有降脂、抑菌、消食等保健作用^[2]而深受人们喜爱。但近年来部分茶商急功近利, 用老叶或其他地区的炒青绿茶冒充普洱生茶, 造成普洱生茶市场鱼龙混杂。目前, 普洱生茶品质主要从外形和内质两方面进行感官评价, 其中内质评价指标包括香气、汤色、滋味和叶底四方面。但是, 仅通过简单的感官审评来判定茶叶品质, 说服力不足。

指纹图谱是一种运用现代分析技术得到的能够标示某种中药材或中成药的色谱或光谱的图谱, 最终用于评价中药质量的科学方法^[3-5], 应用也取得了一定的成绩^[6,7], 已被广泛应用于中药品质评定和质量控制的指纹图谱技术, 本文拟建立普洱生茶的指纹图谱, 为全面控制普洱生茶的质量提供依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); HHSY11-Ni4 型水浴锅(天津天巴仪器仪表有限公司)。

乙腈(色谱纯, 美国默克公司); 磷酸(色谱纯, 天津康科德试剂公司); 普洱生茶样品为市售, 共收集 10 批, 样品产地及生产年限见表 1; 龙井产地为杭州, 碧螺春产地为苏州。实验用水为超纯水(自制)。

① 联系人, 电话: (022) 86342843; 手机: (0) 15122962493; 传真: (022) 86342841; E-mail: niqian87@163.com

作者简介: 倪倩(1987—), 江苏省淮安市人, 在读硕士, 主要从事中药的质量控制与评价工作。

收稿日期: 2010-09-01; 接受日期: 2010-09-15

对照品: 表儿茶素(EC) 批号 878-701102、儿茶素(C) 批号 877-200001、咖啡因(CAF) 批号 171215-200608 购于中国药品生物制品检定所,纯度均≥90%, 没食子酸(GA)、没食子酸儿茶素(GC)、表没食子酸儿茶素(EGC)、表没食子酸儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(EEG) 购于美国 Sigma 公司, 纯度均≥98%。

表 1 普洱茶生产年份及产地

茶叶编号	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
生产年份(年)	07	08	09	08	08	08	09	08	09	07
产地 (云南)	澜沧	勐海	思茅	普洱	西双版纳	澜沧	临沧	无量山	思茅	无量山

2. 2 实验方法

2. 2. 1 HPLC 色 谱 条 件

采用 Phenomenex synerg i 色谱柱 (250mm×4. 6mm, 4μm); 流动相: 乙腈-0. 05% 磷酸溶液梯度洗脱, 0—50min 时, 乙腈比例由 2% 变化为 25%; 流速: 1. 0mL/ min; 柱温: 30℃; 检测波长: 210nm。

2. 2. 2 供试品溶液的制备

准确称取普洱生茶样品 1. 0g, 置于 500mL 锥形瓶中, 准确加入 200mL 超纯水, 称重, 60℃水浴提取 40min, 称重, 加超纯水补足重量, 混匀, 过滤, 作为供试品溶液。

2. 2. 3 对照品溶液的配制

准确称取 CAF、EGCG、EGC、GA、GC、C、EGC 和 EC 各适量, 用甲醇溶解后定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 作为对照品溶液。

3 结果与讨论

3. 1 指纹图谱方法学考察

3. 1. 1 稳定性实验

取 01 号样品, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别在 0, 6, 12, 18, 24h 检测指纹图谱, 结果显示 GA、GC、EGC、C、CAF、EC、EGCG 和 ECG 峰面积的 RSD 分别为 1. 77%, 1. 65%, 1. 59%, 0. 85%, 1. 06%, 2. 10%, 1. 87% 和 1. 61%, 保留时间的 RSD 分别为 0. 98%, 0. 89%, 0. 69%, 0. 91%, 0. 72%, 0. 94%, 0. 77% 和 0. 83%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内测定指纹图谱是稳定的。

3. 1. 2 重复性实验

取 01 号样品, 按供试品溶液制备方法平行制备 5 份供试品溶液, 检测指纹图谱。结果测得 GA、GC、EGC、C、CAF、EC、EGCG 和 ECG 峰面积的 RSD 分别为 1. 01%, 0. 55%, 1. 03%, 0. 72%, 1. 10%, 1. 06%, 0. 84% 和 0. 95%, 保留时间的 RSD 分别为 1. 80%, 0. 94%, 0. 85%, 1. 71%, 1. 83%, 0. 97%, 1. 39% 和 1. 62%, 测定重复性良好。

3. 1. 3 精密度实验

取 01 号样品, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 检测指纹图谱。结果测得 GA、GC、EGC、C、CAF、EC、EGCG 和 ECG 峰面积的 RSD 分别为 0. 91%, 0. 70%, 0. 56%, 0. 53%, 0. 88%, 0. 67%, 0. 74% 和 0. 89%, 保留时间的 RSD 分别为 0. 98%, 1. 72%, 1. 58%, 2. 00%, 1. 11%, 1. 50%, 1. 42% 和 1. 33%, 表明精密度良好。

3. 2 指纹图谱的建立

对 10 批普洱生茶样品进行测定, 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本

2004A)”软件,生成色谱的方法为平均值,对保留时间 5—45min 的色谱峰进行多点校正后,自动匹配,见图 1。生成的对照指纹图谱见图 2。

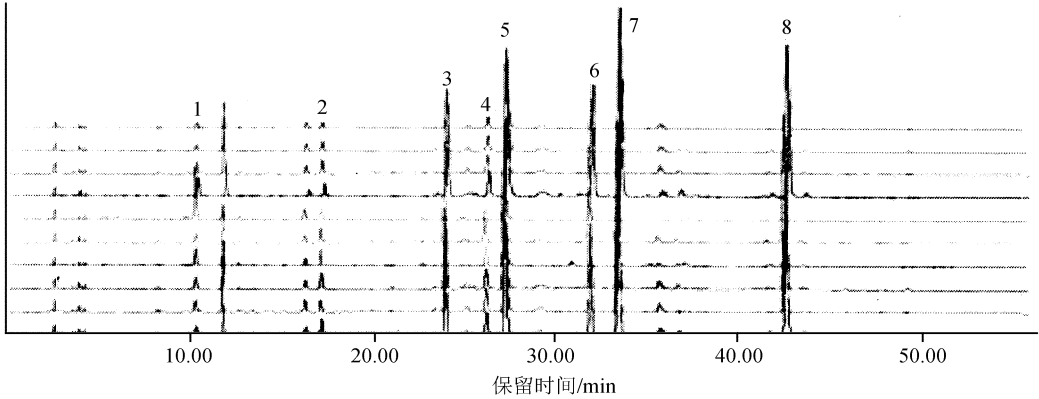


图 1 不同批次普洱生茶指纹图谱

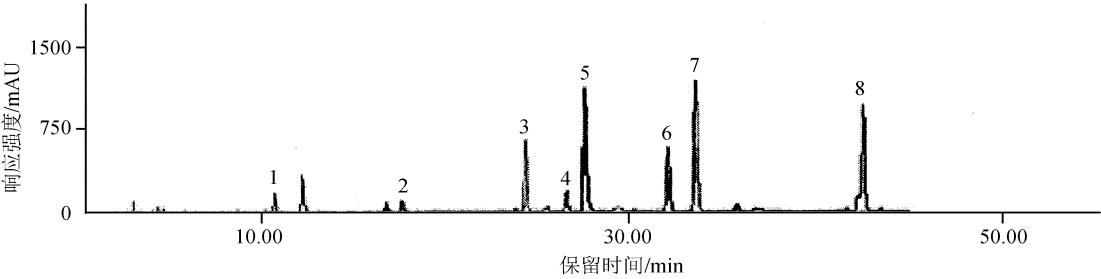


图 2 共有模式指纹图谱

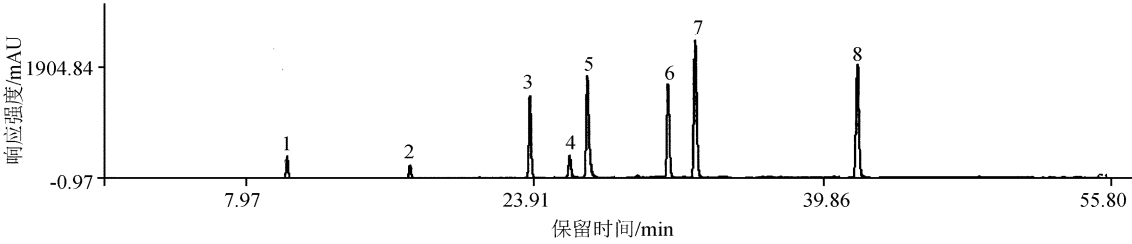


图 3 混合对照品图谱

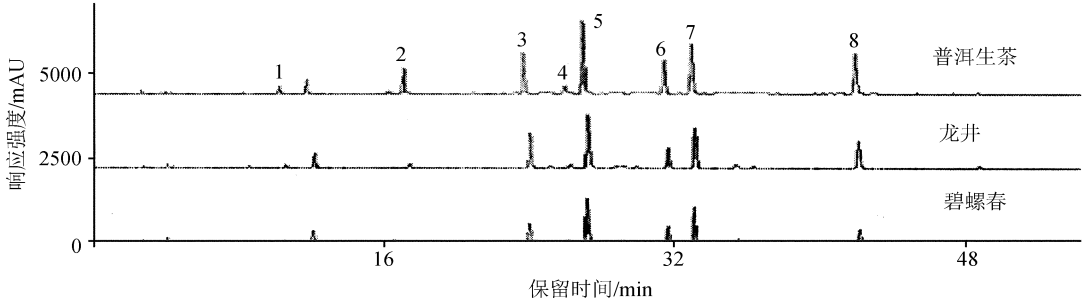


图 4 普洱生茶与龙井、碧螺春的对比图谱

3.3 指纹图谱的分析

3.3.1 主成分峰的确认

采用保留时间定性法确认普洱生茶指纹图谱中的主成分峰。结果见图 3, 其中 1 号峰为没食子酸(GA), 2 号峰为没食子酸儿茶素(GC), 3 号峰为表没食子酸儿茶素(EGC), 4 号峰为儿茶素(C), 5 号峰为咖啡因(CAF), 6 号峰为表儿茶素(EC), 7 号峰为表没食子酸儿茶素没食子酸酯(EGCG), 8 号峰为表儿茶素没食子酸酯(ECG)。

3.3.2 供试品溶液制备条件的优化

本品提取方法结合了人们日常饮茶习惯, 参考中国药典附录^[8]中浸出物检测法, 结合多次实验最终确定提取条件: 提取溶剂为超纯水, 料液比 1:200, 60℃水浴, 提取 40min。此条件下, 酯型儿茶素和儿茶素提取总量的检测结果达到最大值。

3.3.3 与绿茶的指纹图谱比较

从图 4 可以直观看出, 普洱生茶与和两种绿茶(龙井、碧螺春)之间的 HPLC 指纹图谱存在差异。普洱生茶儿茶素总量、酯型儿茶素及咖啡因的含量较高于其他类绿茶, 特别是 2 号(GC), 7 号(EGCG), 8 号(ECG), 这 3 个峰差异非常显著。

3.3.4 普洱生茶指纹图谱相似度计算

10 批普洱生茶指纹图谱与特征指纹图谱(共有模式指纹图谱)的相似度均在 0.9 以上, 表明不同产地、不同储存年限普洱生茶之间具有相关性。

4 结论

该实验方法所建立的普洱生茶的 HPLC 指纹图谱信息较全面, 预处理方法简单, 可为普洱生茶质量鉴别提供一种科学方法和依据, 并可与其他中药材指纹图谱的建立提供借鉴。更详细、更全面的普洱生茶质量评价方法的研究仍在进行中。

参考文献

- [1] 陈宗懋. 中国茶叶大辞典[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [2] 吕海鹏, 谷纪平, 林智等. 普洱茶的化学成分及生物活性研究进展[J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 8—18.
- [3] 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲等. 红花 RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究[J]. 药科学报, 2004, 39(3): 212—216.
- [4] 邹盛勤, 黄宏伟, 刘名权等. 中药陆英 HPLC 指纹图谱研究[J]. 光谱实验室, 2009, 26(1): 100—103.
- [5] 谢显珍, 黄兰芳. HPLC-DAD 研究黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱[J]. 光谱实验室, 2009, 26(3): 559—563.
- [6] 何昱, 洪筱坤, 王智华. 绿茶的色谱指纹谱分类模式初探[J]. 分析化学, 2006, 34(6): 843—847.
- [7] 成浩, 王丽鸳, 周健等. 基于化学指纹图谱的扁形茶产地判别分析研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 83—88.
- [8] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

HPLC Fingerprint Chromatography of Pu-er Raw Tea

NI Qian TONG Ling^{a,c} LI Wen-Bo^b GAO Jun^a WANG Qiang

(Department of Chinese Traditional Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, P. R. China)

a(Institute of Pharmaceutical Analysis, Tianjin Tasly Group Co. Ltd., Tianjin 300402, P. R. China)

b(Department of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, P. R. China)

c(Department of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, P. R. China)

Abstract A phenomenex synergi column (250mm × 4.6mm, 4μm) with acetonitrile and phosphoric acid (0.05%) as the mobile phase by stepwise gradient elution were used. The flow rate was 1.0mL/min, and the detection wavelength was 210nm. Ten batches of tea samples were determined, and the standard of similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of Chinese materia medica was used to establish the fingerprint chromatography of Pu-er raw tea. There was great difference in HPLC chromatograms between Pu-er raw tea and green tea. This method is simple, accurate, and can be applied to the quality control of Pu-er raw tea.

Key words Pu-er Raw Tea; Fingerprints; HPLC