

热裂解色谱 /质谱法研究茶叶的指纹图谱

袁 敏¹, 张铭光^{2*}, 袁 鹏³, 朱 兰¹, 钟汉佐¹

(1. 华南师范大学化学与环境学院, 2. 生命科学学院, 广东广州 510631;

3. 华南理工大学自动化科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要:采用热裂解色谱 /质谱法研究茶叶的指纹图谱,考察了热解温度、热解时间对指纹图谱的影响. 并采用模糊聚类数据处理手段对图谱进行综合分析,结果表明:同一等级的茶叶相关系数 >0.900 , 不同等级的茶叶相关系数 <0.820 . 为茶叶的品质鉴定建立了一个快速、简便、科学的测试手段. 该方法准确、灵敏度高、谱图信息丰富以及重现性好,使茶叶质量控制又迈进了新的一步.

关键词:茶叶; 指纹图谱; 热裂解色谱 /质谱; 模糊聚类

中图分类号: 065

文献标识码: A

STUDY ON THE FINGERPRINT OF TEA BY PYROLYSIS CHROMATOGRAPHY /MASS SPECTROMETRY

YUAN Min¹, ZHANG Ming-guang^{2*}, YUAN Peng³, ZHU Lan⁴, ZHONG Han-zuo⁴

(1. School of Chemistry & Environment; 2. College of Life Science, South China Normal

University, Guangzhou 510631, China; 3. College of Automation and Engineering,

South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The fingerprint for the characterization of tea has been developed by pyrolysis chromatographic/mass spectrometry. The effects of pyrolysis temperature and pyrolysis time on the fingerprint has been studied in this paper. According to the relative retention times and the relative area resultants in chromatographic fingerprint, a comparison is conducted with fuzzy cluster analysis. The result shows that the correlation coefficient of the same grade tea is more than 0.900 and that of the different grade tea is less than 0.820. Pyrolysis Chromatography/Mass Spectrometry is a fast, simple and scientific determination method for the identify of quality of tea. The method is accurate, delicate and abundant in information. It has a good reproducibility and makes a great progress in the quality control of tea.

Key words: tea; fingerprint; pyrolysis chromatography/ mass spectrometry; fuzzy cluster

茶叶具有醒目提神、生津止渴、清肺活血、抑菌降脂等功效^[1]. 茶叶的质量主要受其品种、

产地、季节、加工和储存时间的影响。这些因素直接影响茶叶的化学组分,使其具有不同的色、香、味及药用功能。通常茶叶的品质鉴定主要是靠感官审评、理化评价及茶叶香气、茶多酚、氨基酸等一些化学成分的测定。但茶叶的色、香、味往往是由多种化学组分的协同效果引起的,如何用综合指标评价茶叶的品质还没有报道。近年来用指纹图谱技术鉴定中药品质已引起关注,我们在这方面也做了大量的研究工作^[2,3]。国外在选用裂解色谱测定植物、微生物指纹图谱等方面已有报道^[4,5]。由于茶叶有着与中药类似的植物特性,我们选用热裂解色谱/质谱法测定了各种茶叶的指纹图谱,并采用模糊聚类数据处理手段对图谱进行了综合分析,同时还考察了热解温度、时间对图谱的影响,找到了一种快捷、准确测定茶叶指纹图谱的新方法,对茶叶的品质鉴定具有一定的参考价值。

1 实验部分

(1)仪器。气-质联用仪(FNN IGAN),GC-16A气相色谱仪带氢火焰离子化检测器(FID),PRY-2A裂解装置(Shimadzu)。色谱柱:25 m × ϕ 0.32 mm OV-1701石英毛细管柱(中国科学院兰州化学物理研究所提供)。

(2)测试条件。柱温 T_c : 60 (5 min) $\xrightarrow{4^\circ/\text{min}}$ 230 (25 min), 检测器温度 T_D : 250 , 进样器温度 T_i : 230 ; 裂解温度: 350 ; 进样量: 50 mg; 扫描电压: 70 meV, 离子源温度: 250 , 传输线温度: 250 。

(3)样品制备。茶叶样品:茶艺乐园(中国)有限公司提供。分别取各种茶叶 5 g, 研磨粉碎, 备用。

2 实验结果与分析

2.1 实验条件的选择

2.1.1 普洱茶的热裂解色谱-质谱测定 选择荷香茶,在 1(2)条件下测定其热裂解产物。茶叶在热裂解过程中发生一系列复杂的反应,主要有气相、液相、固相 3 部分产物^[6]。质谱结果表明:气相部分主要是二氧化碳、甲烷、乙烷、丙烷、环丙烷、乙烯、丙烯、乙炔、氢气等 C_5 以下的烷烃类挥发产物;液相部分主要是水、乙醛、丙酮、苯、甲苯、苯酚、甲基苯酚、二甲基苯酚、羟基丙烷基苯酚、邻甲氧基苯酚、羟基甲氧基苯甲醛,还有一些是裂解不完全分子量较大的产物,如三甲基十二碳醇、3-羟基十二碳酸、四甲基十六烯醇,以及没有产生裂解的咖啡因;固相部分主要是焦炭。

2.1.2 裂解温度对图谱的影响 裂解产物受热解温度、热解时间影响显著^[7]。我们选择同一种茶叶样品,其它测试条件不变,在不同热解温度下进行测定。结果表明热解温度在 200 ~ 250 时,样品主要是一些没有产生裂解的挥发性组分;热解温度在 300 时,开始出现裂解峰,产物主要是裂解产物的气相部分,茶叶中的咖啡因没产生裂解,峰值最高;热解温度达到 350 时,产物由气相部分和液相部分组成,咖啡因部分开始裂解,此时谱图信息量较多,重现性较好。当裂解温度超过 400 时,产物进一步发生分子内的断链、脱水、脱羧基等二次裂解反应,导致裂解产物中气相部分大量增加,从图中看到的色谱峰主要集中在前面,这样不利于我们比较谱

图之间的差异. 所以, 本实验选择热解温度为 350 .

2.1.3 裂解时间对图谱的影响 其他测试条件不变, 在裂解温度为 600、500、400、350 下考察裂解时间对出峰的影响, 结果见图 1. 从图 1 中发现: 在 350 时, 裂解时间在 5~30 s 时出峰数逐渐增加, 35 s 以后开始减少; 在 400 时, 裂解时间在 5~25 s 时出峰数逐渐增加, 30 s 以后开始减少; 在 500 时, 裂解时间在 5~20 s 时出峰数逐渐增加, 25 s 以后开始减少; 在 600 时, 裂解时间在 5~10 s 时出峰数逐渐增加, 15 s 以后开始减少, 且减少幅度较大. 由此可以看出, 裂解温度越高, 所需裂解时间越短. 综合考虑裂解温度和裂解时间对裂解指纹图谱的影响, 经过反复的试验, 裂解时间定在 30 s 为宜.

2.2 茶叶指纹图谱的聚类分析

2.2.1 模糊聚类分析的选择 模糊聚类分析分 3 个步骤进行: 第一步, 预处理和标准化. 预处理的目的是选择最具代表性的特征参与模糊聚类. 在本实验中, 设 $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ 为待分类的 n 张茶叶热裂解色谱图, 对保留时间、浓度、峰面积等参数进行预处理, 选出能代表图谱特征的一组参数 $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{im})$ 作为参与模糊聚类的数据矩阵. 标准化的目的是为了消除量纲的影响, 并使数据分布在 $[0, 1]$ 的闭区间里. 标准化可先做平移 - 标准差变换, 再做平移 - 极差变换. 由于本应用中预处理后所有的参数都具有相同的量纲, 因而可直接做平移 - 极差变换.

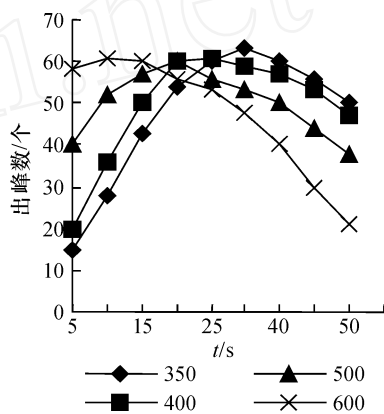


图 1 裂解时间对出峰数的影响

第二步, 求模糊相似关系 $R(x_i, x_j) = (r_{ij})_{n \times n}$, 表示被分类对象之间相似程度, 采用不同方法来求 r_{ij} , 模糊聚类的结果是不同的. 我们采用数量积法、相关系数法、最大最小法、算术平均最小法、几何平均最小法、绝对值减数法 6 种不同方法对 30 种茶叶裂解色谱图进行模糊聚类分析, 结果表明算术平均最小法和绝对值减数法较理想. 计算公式如下:

$$\text{算术平均最小法: } r_{ij} = 2 \sum_{k=1}^m (x'_{ik} \wedge x'_{jk}) / \sum_{k=1}^m (x'_{ik} + x'_{jk})$$

$$\text{绝对值减数法: } r_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{当 } i = j \\ 1 - C \sum_{k=1}^m |x'_{ik} \wedge x'_{jk}| & \text{当 } i \neq j \end{cases}$$

第三步, 聚类. 以上得到的模糊相似关系矩阵一般只满足自反性和对称性而不满足传递性, 即 R 只是相似矩阵, 需将它改造成模糊等价矩阵. 采用逐次平方法求得传递闭包 $t(R)$, 最后把传递闭包矩阵 $t(R)$ 中不同元素的值按从大到小的顺序依次排列为 $1 = \lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_t$, 可以得到一系列 λ 的截矩阵. 对于对象 x_i, x_j , 若 $\bar{r}_{ij}(\lambda) = 1$, 则在水平 λ 上将它们归为一类, 从而达到将对象集进行模糊聚类的目的. 在适当的 λ 值上进行截取, 就可得到所需的分类. 随着水平 λ 在 $[0, 1]$ 中发生改变, 相应的分类也发生变化. 当 λ 由 1 逐步降到 0 时, 类的个数由多变少, 而类中的元素由少变多, 也就是说: λ 值越大, 分类能力越强.

2.2.2 不同品种茶叶指纹图谱的聚类分析 30 种不同品种的茶叶作为供试样品并编号, 见表 1. 在 2.2 条件下测定不同品种的茶叶的指纹图谱, 色谱图见图 2. 实验结果表明, 茶叶裂解

色谱峰有约 60 多个,不同品种都有自己的特征图谱,其共有峰占 98%,图谱的差异主要是组分峰值强度的不同. 选择 52 个较明显的共有峰进行比较,以峰 32 为参照峰,设定其 α 值为 1,分别求出各组分的 α 值 (各组分的调整保留值与参照峰的调整保留值的比值)和 S_r 值 (各组峰面积与共有峰峰面积之和的比值),用模糊聚类分析法分析,得出聚类分析图,见图 3

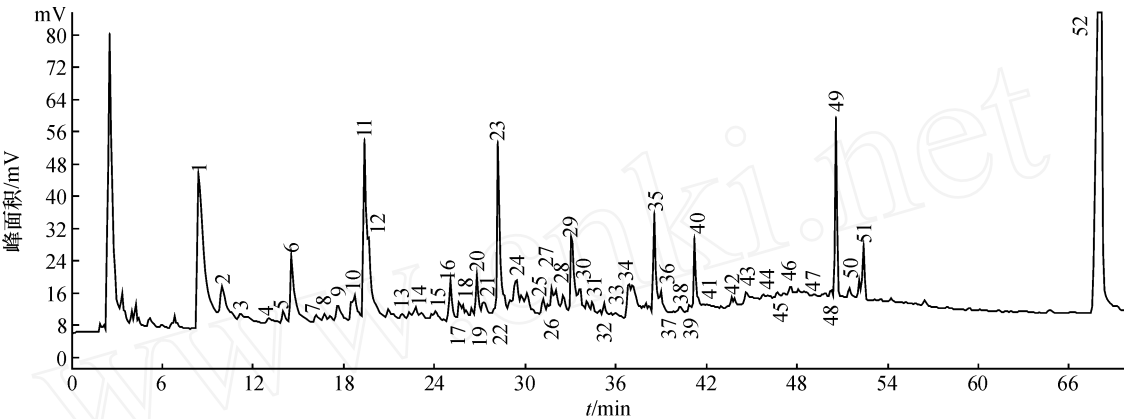


图 2 红茶的裂解色谱图

测试条件:柱温 T_c : 60 (5 min) $\xrightarrow{4\text{ /min}}$ 230 (25 min), 检测器温度 T_D : 250 ,进样器温度 T_I : 230 ;裂解温度: 350 ;进样量: 50 mg;

从聚类图可看出,当相关系数为 0. 918 时, 21、23 号为一类,其余各号各为一类;当相关系数为 0. 910 时, 21、23 号, 2、18 号各为一类,其余各号各为一类;当相关系数为 0. 890 时, 21、23、27 号, 2、18 号, 11、17 号各为一类,其余各号各为一类;以此类推,当相关系数为 0. 710 时,全部样品归为一类.

从聚类分析结果我们看到保健茶与其他茶叶相差较大, 1 号 (白雪茶) 与其它茶叶相关系数最小,其次是 22 号 (牛蒡), 25 号 (溪黄茶王)、13 号 (绞股蓝)、14 号 (金桑子) 和 16 号 (苦丁茶). 而发酵、半发酵、不发酵 3 大类茶之间的差异相对较小,相关系数 $>0. 800$. 而这 3 类茶里同类茶相关系数较高,如 21 和 23 号,都是龙井茶,其相关系数 $>0. 900$,可见运用模糊聚类法分析茶叶品种可得到与传统分类基本一致的结果.

2 3 图谱重现性的测定

随机抽取同一样品 5 份,在同一条件下测定,考察色谱峰调整保留时间 (α) 和峰强度 (T) 的一致性. 结果表明:各色谱峰 α 的相对标准偏差 (RSD) 均 $\leq 2. 73\%$, T 的 RSD 均 $\leq 11. 54\%$.

2 4 同种茶叶不同等级的指纹图谱测定

表 1 样品编号

编号	样品	编号	样品	编号	样品
1	白雪茶	11	红景天	21	明前狮峰龙井
2	白毫银针	12	黄枝香	22	牛蒡
3	碧螺春	13	绞股蓝	23	御前狮峰龙井
4	潮州黄枝香	14	金桑子	24	石乳香
5	甘露	15	金丝猴	25	溪黄茶王
6	大红袍	16	苦丁茶	26	小红袍
7	贡品碧螺春	17	老头	27	雪芽红茶
8	荷香	18	龙井	28	野漳
9	黑茶	19	马骊槭	29	奇种红茶
10	红茶	20	明前碧螺春	30	樟香

分别选择 3 种等级的单枞茶各 10 个样品,在 1(2)条件下测定其色谱指纹图谱,选用模糊聚类法分析,结果表明,同一等级的茶叶相关系数 > 0.900 ,不同等级的茶叶相关系数 < 0.820 .

3 结论

采用热裂解色谱/质谱法测定不同茶叶的指纹图谱,能反映不同品种、不同等级茶叶的差异,为茶叶的品质鉴定提供了科学依据.

热脱附/裂解色谱-质谱法具有快捷、信息丰富、重复性好的特点,能较准确地对裂解产物定性.热解温度和热解时间是影响图谱的信息量、重现性的关键因素.模糊聚类分析为大量复杂谱图的分析提供了一种直观、简便、快捷的方法.

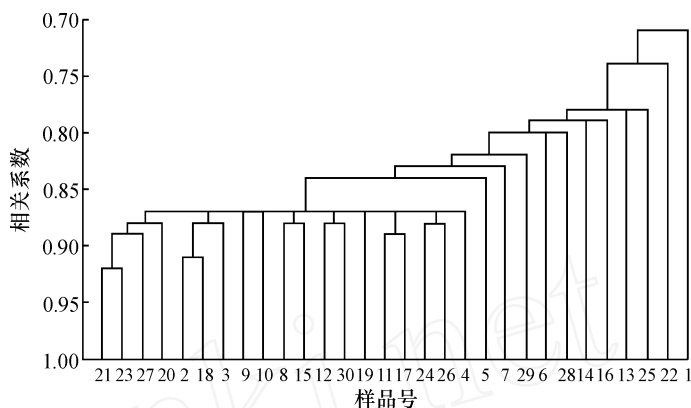


图 3 不同品种茶叶的聚类分析图

参考文献:

- [1] 刘勤晋,陈文晶,白文祥.普洱茶急性毒性安全性评价研究报告[J].茶叶科学,2003,23(2):141-145.
- [2] 袁敏,张铭光,袁鹏.广藿香裂解色谱指纹图谱及其聚类分析[J].中草药,2003,34(8):749-752.
- [3] 袁敏,张铭光,袁鹏.郁金的裂解色谱指纹图谱及聚类分析[J].色谱,2003,21(5):469-471.
- [4] PAGE D W, LEEUWEN J A, SPARK K M, et al. Pyrolysis characterisation of plant, humus and soil extracts from australian catchments[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2002, 65: 269-285.
- [5] TRAVIS F, MOHAMMAD H, BRUCE W, et al. Pyrolysis behavior and kinetics of biomass derived materials[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2002, 62: 331-349.
- [6] 郭艳,魏飞,王垚,等.应用裂解气相色谱对生物质快速裂解反应条件的研究[J].燃料化学学报,2000,28(5):415-418.
- [7] 郭艳,王垚,魏飞,等.杨木快速裂解过程机理研究[J].高校化学工程学报,2001,15(5):440.

【责任编辑 黄玉萍】