

# 高效液相色谱法分析武夷岩茶中的生物碱含量

## The analysis of alkaloid content in Wuyi Rock Tea with high-performance liquid chromatography

刘志彬 张是宁 张雯 倪莉

LIU Zhi-bin ZHANG Shi-ning ZHANG Wen NI Li

(福州大学食品科学技术研究所, 福建 福州 350108)

(Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**摘要:**选取 10 种典型武夷岩茶(5 种肉桂和 5 种水仙)作为研究对象,以绿茶、铁观音和红茶为对照,通过高效液相色谱法检测样品叶片及冲泡茶汤中的可可碱、茶碱和咖啡碱含量,并依据各样品的生物碱含量进行主成分分析。试验结果发现,武夷岩茶叶片中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量分别约占茶叶干重的 2.341%, 0.065%, 0.011%, 低于绿茶、铁观音和红茶;茶叶经过 60 s 沸水冲泡后,约 46.56%, 46.36%, 50.15% 的咖啡碱、可可碱和茶碱溶于茶汤中。此外,通过主成分分析发现,武夷岩茶的 3 种生物碱含量与绿茶、铁观音和红茶的生物碱含量有显著差异。

**关键词:**武夷岩茶;生物碱;高效液相色谱法;主成分分析

**Abstract:** Wuyi Rock Tea is a kind of semi-fermented oolong tea, with unique flavor. The alkaloid content in the tea is associated with its flavor quality. In this study, 10 typical Wuyi Rock Tea, including 5 Rougui and 5 Shuixian, were used to quantitative analyze the theobromine, theophylline and caffeine content in the tea leaves and tea infusions. Moreover, the alkaloid content in green tea, Tieguanyin Tea and black tea sample were also measured. Then, Principal Component Analysis (PCA) was utilized to further investigate the difference of the alkaloid content in all these tea samples. The results indicated that, the caffeine, theobromine and theophylline content in the Wuyi Rock Tea leaves were 2.341%, 0.065% and 0.011%, respectively, which were lower than those in green tea, Tieguanyin Tea and black tea. After immersed in boiling water for 60 s, approximate 46.56%, 46.36% and 50.15% of caffeine, theobromine, and theophylline were dissolved into the infusions. PCA analysis shown that

Wuyi Rock Tea samples had significantly different alkaloid profile with green tea, Tieguanyin Tea and black tea.

**Keywords:** Wuyi rock tea; alkaloid; high-performance liquid chromatography; principal component analysis

武夷岩茶是中国传统名茶,产于福建省武夷山地区,属于半发酵型乌龙茶。武夷岩茶具有独特的“岩骨花香”的风味品质,深受消费者喜爱<sup>[1]</sup>。独特的风味品质不仅取决于其精湛的制作工艺,还与其化学因子有着密切的关系。茶叶中的主要成分包括茶多酚、碳水化合物、茶氨酸、生物碱、矿物质元素等<sup>[2]</sup>。其中,由于易溶于水,在冲泡过程生物碱大量溶于茶汤中,是形成茶叶滋味的重要物质,也是决定茶叶品质的重要因素;此外,生物碱还具有增强大脑皮质兴奋程度,减少疲乏感等生理功能<sup>[3]</sup>。但生物碱,尤其是咖啡因的过量摄入也可能增加患心脑血管疾病风险<sup>[4]</sup>。因此,检测武夷岩茶中生物碱的含量,对评估武夷岩茶的感官品质及其生理功效具有重要的意义。

茶树体内的生物碱主要是嘌呤类生物碱,也有少量嘧啶类生物碱。在茶叶中发现的嘌呤碱有 8 种,即咖啡碱、可可碱、茶碱、腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤和拟黄嘌呤等,其中最主要的是咖啡碱、可可碱和茶碱 3 种<sup>[3]</sup>。其中,咖啡碱约占茶叶干重的 2%~4%,可可碱约占 0.05%,茶碱约占 0.002%<sup>[3]</sup>。关于武夷岩茶的 3 种生物碱含量的分析,仅有凌育赵等<sup>[5]</sup>曾采用高效液相色谱(HPLC)法分析了 1 种武夷山乌龙茶的 3 种生物碱含量,分别为 2.68%, 0.24%, 1.04%。但该研究样品收集不够全面,且未分析按照传统冲泡习惯获得的茶汤的生物碱含量。为了进一步获得武夷岩茶生物碱含量的基础数据,本试验收集了 10 种武夷岩茶样品(5 种肉桂和 5 种水仙),同时以绿茶、铁观音和红茶(各 1 种)作为对照样品,通过 HPLC 法分析其叶片粉碎并用蒸馏水充分浸提的样品及按照传统短时间冲泡获得的茶汤样品中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量,然后依据各样品的生物碱含量进行主成

**基金项目:**福建省教育厅科研项目(编号:JA13044);国家自然科学基金(编号:31501494);福建省自然科学基金(编号:2016J01707)

**作者简介:**刘志彬,男,福州大学助理研究员,硕士。

**通讯作者:**倪莉(1972-),女,福州大学教授。

E-mail: nili@fzu.edu.cn

**收稿日期:**2016-07-14

分分析,以考察各样品生物碱组成的差异。本试验的开展旨在对武夷岩茶的生物碱含量进行定量分析,为深入了解武夷岩茶的感官品质及生理功效提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肉桂(5种)、水仙(5种)、绿茶(1种)、铁观音(1种)和红茶(1种):福建公泰茶业有限公司。

### 1.2 试剂与仪器

咖啡碱(分析标准品,纯度>99%)、可可碱(分析标准品,纯度>99%)和茶碱(分析标准品,纯度>98%):上海源叶生物科技有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,默克化工技术(上海)有限公司;

高效液相色谱仪(HPLC):L-2000型,配置L-2455型二极阵列检测器,日本HITACHI公司;

数显恒温水浴锅:HH-6型,常州国华仪器有限公司;

电子天平:BSA124S型,德国赛多利斯公司;

纯水机:QYSW-10B型,重庆前沿水处理设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

(1)茶粉浸提液样品(tea extract, TE)制备:将茶样用粉碎机磨碎,过60目筛,称取1.000 g粉碎样品至50 mL烧杯,加入10 mL水,用玻璃棒充分搅拌均匀湿润,然后移到70 °C水浴中,浸提30 min(隔10 min搅拌一次)。浸提后冷却至室温,用滤纸过滤,保留滤液。残渣再用10 mL的水溶液提取一次,重复以上操作,合并滤液,定容至25 mL,0.22 μm滤膜过滤待测。

(2)茶汤样品(tea infusion, TI)制备:准确称取茶样1.000 g,加入20 mL煮沸蒸馏水,浸泡60 s,然后用滤纸过滤,保留滤液,0.22 μm滤膜过滤待测。

1.3.2 生物碱标准曲线绘制 采用HPLC法绘制咖啡碱、可可碱和茶碱的标准曲线。色谱柱:Symmetry C<sub>18</sub> Column(5 μm,4.6 mm×250 mm),柱温:30 °C,检测波长:275 nm,总流速:1 mL/min,上样量20 μL,流动相A:含0.2 mL/100 mL乙酸的去离子水,流动相B:乙腈,梯度洗脱程序:0~30 min,90% A~60% A。配置系列浓度的咖啡碱、可可碱和茶碱标准溶液,进行HPLC分析,根据分析结果绘制以生物碱浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标的标准曲线。

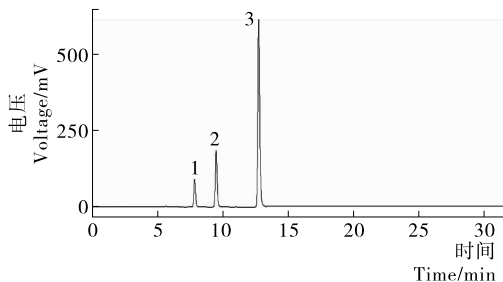
1.3.3 样品生物碱含量测定 按照1.3.2的HPLC条件分析13种茶叶的TE和TI样品,并根据1.3.2所绘制的标准曲线计算各样品中咖啡碱、可可碱和茶碱的含量。

1.3.4 主成分分析 采用Past软件(Version 3.09)对13种茶叶TE样品的咖啡碱、可可碱和茶碱含量进行主成分分析,并绘制PCA图。

## 2 结果与分析

### 2.1 咖啡碱、可可碱和茶碱的色谱分离效果

取适量咖啡碱、可可碱和茶碱标准品母液混合,按照上述色谱条件进行HPLC分析,考察在该色谱条件下,3种生物碱的分离效果,结果见图1。由图1可知,3种生物碱的色



1. 可可碱 2. 茶碱 3. 咖啡碱

图1 咖啡碱、茶碱和可可碱标准品的HPLC色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of theobromine, theophylline and caffeine standard

谱峰峰型对称且尖锐,分离度理想,因此该色谱条件可用于分析样品中的3种生物碱含量。

### 2.2 咖啡碱、可可碱和茶碱的标准曲线

分别配置系列浓度梯度的咖啡碱、可可碱和茶碱标准品溶液,按照1.3.2的色谱条件进行HPLC分析,记录各色谱峰的峰面积(Y),结合其浓度(X),绘制3种生物碱的标准曲线,结果见表1。

表1 咖啡碱、可可碱和茶碱标准曲线

Table 1 Standard curve of caffeine, theobromine and theophylline

样品	保留时间/min	标准曲线	R <sup>2</sup>
咖啡碱	12.70	Y=6E+07X-419 502	0.997
可可碱	7.80	Y=3E+07X+4 923.5	1.000
茶碱	9.45	Y=4E+07X+2 133	1.000

### 2.3 13种茶粉浸提液样品和茶汤样品中咖啡碱、可可碱和茶碱的含量

按照1.3.2的色谱条件对13种茶叶样品的茶粉浸提液(TE)和茶汤(TI)进行HPLC分析,根据保留时间判断3种生物碱的色谱峰。其中代表性样品肉桂样品1的茶汤样品和茶粉浸提液样品的HPLC色谱图见图2。

记录各样品3种生物碱的峰面积,根据标准曲线计算各样品3种生物碱含量,并换算为茶叶干物质的百分含量,结果见表2。

由表2可知,在茶粉浸提液中,肉桂的平均咖啡碱、可可碱和茶碱含量为(2.122±0.146)%,(0.060±0.013)%,(0.008±0.001)%;而水仙的平均咖啡碱、可可碱和茶碱含量为(2.559±0.231)%,(0.071±0.012)%,(0.014±0.005)%,水仙的3种生物碱含量高于肉桂。许祯毅<sup>[6]</sup>采用HPLC法分析了肉桂的咖啡碱含量约为2.52%~3.01%,与本研究的结果较为接近。

总体而言,武夷岩茶叶片中的3种生物碱含量低于绿茶、铁观音和红茶。绿茶是不发酵茶,铁观音是浅度发酵的乌龙茶,这两者的制作过程对茶叶叶片的化学成分影响较小,生物碱得以较大程度保留。而武夷岩茶是深度发酵乌龙茶,在制作过程经过萎凋、做青、烘焙等工序,小分子的化学

成分变化较为显著,例如生物碱在烘焙过程中大量流失,因此武夷岩茶中的生物碱含量低于绿茶和铁观音。王尔茂等<sup>[7]</sup>对比了手工轻做青和机械重做青对乌龙茶水浸出物的影响,发现手工轻做青会的乌龙茶咖啡碱的含量较高。本试验所采用的红茶样品为金骏眉,金骏眉是选用茶叶的嫩芽所生成的一类红茶<sup>[8]</sup>,李远华等<sup>[9]</sup>的研究发现,茶叶的咖啡碱含量从芽至第 5 叶呈递减趋势,因此虽然红茶发酵程度最高,但由于使用的是嫩芽,其生物碱含量反而是最高的。

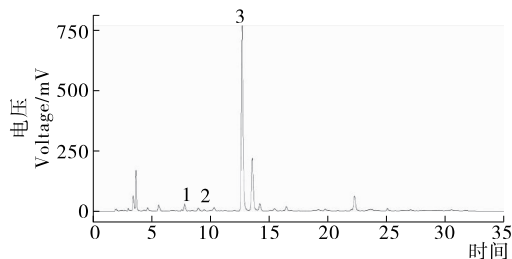
2.4 13 种茶叶生物碱的 60 s 沸水冲泡溶出率

作为饮料,茶汤一般是使用沸水短时间冲泡茶叶叶片制得。在本试验中使用沸水冲泡各茶叶样品 60 s,获得茶汤样品,并分析其生物碱含量,然后计算各样品生物碱的 60 s 沸水冲泡溶出率,结果见表 3。

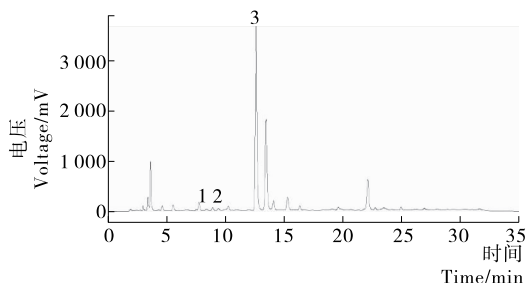
表 3 咖啡碱、可可碱和茶碱的 60 s 沸水冲泡溶出率

Table 3 The extraction ratio of caffeine, theobromine and theophylline %

样品	咖啡碱	可可碱	茶碱
肉桂 1	45.18	38.29	49.41
肉桂 2	46.97	35.86	34.44
肉桂 3	51.81	51.56	52.41
肉桂 4	42.09	63.17	40.08
肉桂 5	47.55	49.38	58.31
水仙 1	45.50	37.19	66.61
水仙 2	40.27	45.95	59.20
水仙 3	51.72	46.43	43.13
水仙 4	47.90	52.40	53.29
水仙 5	46.61	43.37	44.58
绿茶	50.77	45.23	63.34
铁观音	20.98	39.73	19.92
红茶	51.35	42.74	48.09



(a) 肉桂1的茶汤样品



(b) 茶粉浸提液样品

1. 可可碱 2. 茶碱 3. 咖啡碱

图 2 肉桂 1 的茶汤样品和茶粉浸提液样品的 HPLC 色谱图

Figure 2 HPLC chromatogram of tea infusions and tea leaves of Rougui sample 1

表 2 茶粉浸提液 (TE) 和茶汤 (TI) 中咖啡碱、可可碱和茶碱的百分含量

Table 2 The caffeine, theobromine and theophylline content in tea leaves (TE) and tea infusions (TI) %

样品	咖啡碱		可可碱		茶碱	
	TE	TI	TE	TI	TE	TI
肉桂 1	2.354	1.064	0.061	0.023	0.008	0.004
肉桂 2	2.018	0.948	0.052	0.019	0.007	0.002
肉桂 3	2.144	1.111	0.059	0.031	0.009	0.005
肉桂 4	1.982	0.834	0.046	0.029	0.008	0.003
肉桂 5	2.111	1.004	0.081	0.040	0.008	0.005
水仙 1	2.678	1.218	0.081	0.030	0.012	0.008
水仙 2	2.765	1.113	0.069	0.032	0.011	0.007
水仙 3	2.542	1.315	0.071	0.033	0.018	0.008
水仙 4	2.171	1.040	0.052	0.027	0.010	0.005
水仙 5	2.641	1.231	0.082	0.036	0.020	0.009
绿茶	3.222	1.636	0.082	0.037	0.038	0.024
铁观音	3.833	0.804	0.067	0.026	0.012	0.003
红茶	4.085	2.098	0.103	0.044	0.047	0.023

由表 3 可知,生物碱作为易溶于水的小分子成分,溶出率较高,尤其是在武夷岩茶、绿茶、红茶中,3 种生物碱的 60 s 沸水冲泡溶出率约为 40%~60%。但铁观音的生物碱溶出率较低(19.92%~39.73%),这主要是由于铁观音的制作过程需要经过揉捻的工序,将发酵的叶片揉捻成紧密的球状,因此在短时间冲泡过程中铁观音叶片细胞还没有充分溶胀,限制了生物碱的溶出。

2.5 13 种茶叶生物碱含量的主成分分析

对 13 种茶叶的茶粉浸提液中 3 种生物碱含量进行主成分分析,并绘制 PCA 图,结果见图 3。由图 3 可知,13 种样

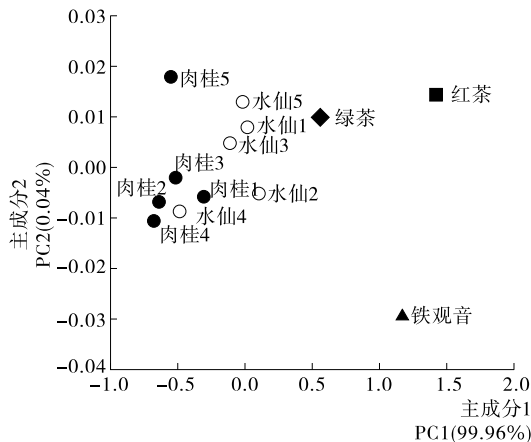


图 3 13 种茶叶茶粉浸提液生物碱含量的 PCA 图

Figure 3 PCA plot of the alkaloid content in the 13 tea samples

(下转第 43 页)

和经济优势。同时实现了猪血的水解,并使培养基中的游离氨基酸态氮的含量从发酵前的 0.02 g/100 g 增加为 3.13 g/100 g,说明丁酸梭菌在生长过程中猪血中的蛋白质得到有效的水解。

本项目创新性地利用猪血来实现益生菌丁酸梭菌和猪血高游离氨基酸饲料的偶联生产,开辟了动物血液利用的新途径,具有良好的经济社会效益和广阔的市场应用前景。

### 参考文献

- [1] 宋会仪, 吴天星. 酪酸梭状芽孢杆菌微生态制剂的生物学功能及在饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 10-11.
- [2] KUROIWA T, IWANAGA M, KOBARI K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy[J]. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 1990, 64: 1 425-1 432.
- [3] KANAI T, MIKAMI Y, HAYASHI A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease[J]. Journal of Gastroenterology, 2015, 50(9): 1-12.
- [4] LIU Ting-ting, ZHANG Shuai, DENG Fei-yue. Effects of glutamine and *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, small intestinal morphology and microflora in weanling piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(6): 998-1 005.
- [5] 赵熙, 冉陆, 杨玉兰, 等. 丁酸梭菌活菌制剂对肠道菌群影响的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(6): 332-333.
- [6] MASAHIDE S, MANO H, TAKASHI Y, et al. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8[J]. In-

- ternational Journal of Oncology, 2013, 42(3): 903-911.
- [7] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 新一代微生态制剂-酪酸梭状芽孢杆菌的研究和开发前景[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 297.
- [8] 张晓阳, 卢忆, 马艳莉, 等. 丁酸梭菌生理功能及应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2012(12): 3-5.
- [9] 王赞, 李爱彬, 陈湘来, 等. 猪血的开发和利用[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 272-274.
- [10] 李雨露, 吕长鑫. 猪血的功能特性及开发利用[J]. 肉品卫生, 2001(12): 26-27.
- [11] 万佳蓉, 马美湖, 周传云. 多菌种混合发酵猪血的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 50-53.
- [12] 周毅, 杨萍, 肖前程. 降解猪血蛋白的优良菌株筛选鉴定及产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2015(3): 58-63.
- [13] 李斌, 章梁, 黄泽元. 酶解猪血制备血红素工艺的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 153-156.
- [14] 戚薇, 何玉慧, 李安东, 等. 酪酸梭状芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(2): 18-21.
- [15] 孔青, 陈琳, 周雯, 等. 丁酸梭菌淀粉培养基的优化研究[J]. 食品工业科技, 2009(12): 197-199.
- [16] ZHANG Chun-hui, MA Yu-jiu, YANG Fang-xiao, et al. Optimization of medium composition for butyric acid production by *Clostridium thermobutyricum* using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2009, 100 (18): 4 284-4 288.
- [17] 徐向宏, 何明珠. 试验设计与 Design-Expert、SPSS 应用[M]. 北京: 科学技术出版, 2010: 161-167.
- [18] 周光理. 食品分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 101.
- [19] 岳鹏, 王芃, 孙勇民. 混料设计优化复合酶解制备低聚木糖工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 254-256.
- [20] 阎宝清, 夏立秋, 龙如花, 等. 利用混料设计优化多杀菌素发酵培养基[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 200-203.

(上接第 29 页)

品的生物碱含量可以反映在 2 个主成分上,其中第 1 主成分反映了原始变量 99.96% 的变异信息,第 2 主成分反映了原始变量 0.04% 的变异信息。在这两个主成分下,将 13 种茶叶的生物碱含量进行二维投射,获得可视化的样品分布情况图。其中 5 种肉桂样品和 5 种水仙样品距离较为接近,而与红茶、铁观音的距离较远,反映了不同茶叶种类间较为显著的生物碱含量差异。

### 3 结论

本试验采用高效液相色谱法对 5 种肉桂和 5 种水仙的茶叶及茶汤中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量进行检测,并与绿茶、铁观音和红茶的茶叶及茶汤中的 3 种生物碱进行比较。经 HPLC 检测研究发现,武夷岩茶叶片中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量分别约占茶叶干重的 2.341%, 0.065%, 0.011%, 低于绿茶、铁观音和红茶;茶叶经过 60 s 沸水冲泡后,约 46.56%, 46.36% 和 50.15% 的咖啡碱、可可碱和茶碱溶出。经 PCA 分析发现,武夷岩茶的 3 种生物碱含量与绿茶、铁观音和红茶的生物碱含量有显著差异。本试验的开展对深入了解武夷岩茶的感官品质和生理功效具有显著意义。

### 参考文献

- [1] 修明. 武夷岩茶品质特征及审评方法[J]. 中国茶叶加工, 2004 (1): 39-40.
- [2] 周燕波, 陈启荣. 茶叶成分及其医疗价值[J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(11): 16-18.
- [3] 谭和平, 叶善蓉, 邹燕, 等. 茶叶中生物碱的分析方法概述[J]. 中国测试技术, 2008, 34(5): 5-9.
- [4] ZULLI A, SMITH R M, KUBATKAP, et al. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research[J]. European Journal of Nutrition, 2016, 55(4): 1 331-1 343.
- [5] 凌育赵, 曾满枝. HPLC 法测定广东南昆山白毛茶中的嘌呤碱[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 155-157.
- [6] 许祯毅. 高效液相色谱法测定武夷岩茶中咖啡碱的条件探讨[J]. 广东化工, 2014, 41(24): 98-99.
- [7] 王尔茂, 阮志燕, 孙颖, 等. 轻重做青对凤凰单枞乌龙茶呈香物质的影响[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 23-26.
- [8] 廉明, 吕世懂, 吴远双, 等. 我国 4 种红茶的挥发性成分分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(3): 301-309.
- [9] 李远华, 李照莹. 铁观音等引种武夷山的植物学性状观察及主要生化成分分析[J]. 江西农业学报, 2014, 26(4): 23-25.