

基于 UHPLC-QE-MS 代谢组学分析小粒种咖啡豆特征成分

苗 玥¹, 谭 超¹, 彭春秀², 龚加顺^{1*}

¹ 云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201

² 云南农业大学园林园艺学院 昆明 650201

摘要 以云南小粒咖啡生豆和埃塞俄比亚咖啡生豆为研究对象,采用超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-QE-MS)对咖啡生豆代谢产物进行代谢组学分析,探究云南不同地区咖啡生豆代谢产物差异,以及与埃塞俄比亚咖啡生豆相比的特征成分。试验结果表明:云南小粒咖啡生豆与埃塞俄比亚生豆有 36 种差异物质,包括表儿茶素、3-O-咖啡酰-1-O-甲基奎宁酸等 16 种多酚,十八碳三烯酸等 8 种脂类,牡荆甙等 6 种糖类以及少量生物碱类、有机酸类、萜类,其中 Mammeigin、牡荆甙、3-O-咖啡酰-1-O-甲基奎宁酸、2,2-二甲基丁二酸、十八碳三烯酸等 24 种化合物含量高于埃塞俄比亚生豆,表儿茶素、决明子苷、脂氧素等 12 种化合物含量显著低于埃塞俄比亚生豆。不同地区云南小粒咖啡生豆的代谢组学分析结果显示:差异代谢物共有 44 种,包括谷氨酸、苯丙氨酸等 14 种氨基酸,棕榈酰胺、花生酸等 11 种脂类,绿原酸、奎宁酸等 10 种多酚,苹果酸等 3 种有机酸以及少量萜类、糖类、醇类和其它类。以上结论:利用 UHPLC-QE-MS 技术并结合多元统计分析的方法,可分析不同区域条件下咖啡生豆代谢产物差异,为咖啡豆产地溯源提供方法依据。

关键词 小粒咖啡;超高效液相色谱串联质谱;多元分析;代谢通路

文章编号 1009-7848(2022)11-0355-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.11.037

咖啡作为全球最重要的经济作物,主要包括 3 大种植区——亚洲的太平洋地区、非洲和拉丁美洲,有 3 大原生种——阿拉比卡种、罗布斯塔种和利比里亚种。阿拉比卡种(小粒种)咖啡无论是种植产量还是消费量都居于三大原生种之首。中国 98.3% 的咖啡主要种植在云南省,产量占全国总量的 99.3%^[1]。云南兼具亚热带季风气候、热带季风气候、高原山地气候的特点,区域差异和垂直变化十分明显^[2],使得云南小粒咖啡呈现莓果、柑橘、草本、花香、茶等多样化品质特点。埃塞俄比亚是咖啡的发源地,盛产独特而出众的咖啡豆,带着奔放的花香与果香味,受到咖啡从业人员的青睐以及消费者的喜爱。研究云南咖啡与埃塞俄比亚咖啡之间的差异物质,揭示云南咖啡豆特征成分,寻找云南小粒咖啡优势,可为云南咖啡树立自身品牌提供数据支撑。

为了明确生物内源性代谢物的性质及含量,

探究其对内、外因变化的应答规律,代谢组学已经被广泛运用于食品研究中,尤其是食品安全性、防伪评估以及植物源性食品的品质鉴定、检测原料中不易挥发性化合物及动态监控食品代谢物构成^[3]。代谢组学是通过整体分析植株中化合物分布,进而寻找各组别间差异代谢产物的一种行之有效的分析方法^[4]。挖掘可能发生变化的代谢通路,掌握植物生理信息,能对果实的营养品质进行监控并提供初步的理论支持^[5]。较多的代谢组学方法:例如核磁共振(NMR)^[6]、同位素比率质谱(IRMS)^[7]、电子喷雾电离-质谱[(ESI)-(HR)MS]^[8]、拉曼光谱^[9]、近红外光谱^[10]、LC-MS/MS^[11]和 GC/MS^[12]等,已被广泛用于咖啡品质评价和寻找特征标记物的研究中。由于液-质联用方法性能稳定,目前被广泛用于代谢组学分析。本研究采用的超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-QE-MS)灵敏度高、特异性强、用时短,能同时鉴定多种化合物^[13]。

本文以云南 5 个主产区咖啡豆以及埃塞俄比亚咖啡豆为研究对象,采用代谢组学法全面分析、阐释不同区域云南小粒咖啡之间以及与埃塞俄比亚咖啡豆特征差异物的差异,挖掘云南地区咖啡豆特征成分以及代谢通路的变化,以期对中国咖啡品质质量评价体系的建立,以及产地溯源提供

收稿日期: 2021-11-23

基金项目: 农业农村部农产品质量安全风险评估-构建咖啡品质指标体系项目(125D0202);云南省云岭学者专项(YNWR-YLXZ-2018-026)

第一作者: 苗玥,女,博士生

通信作者: 龚加顺 E-mail: gong199@163.com

理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小粒种咖啡豆(见表1)由云南德潞咖啡有限公司提供,在咖啡豆分析测试之前均储存于-20℃冰箱。

甲醇、乙腈、乙酸铵、乙酸均为色谱纯级,购自CNW Technologies公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)、高分辨质谱、离心机均来自赛默飞公司;天平、研磨仪,上海净信科技有限公司;纯水仪,Merck Millipore公司;超声仪,深圳市方奥微电子有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 称取20 mg经液氮研磨后的样品放于样品瓶中同时加入1 mL提取液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=2:2:1$),涡旋混匀30 s;35 Hz,4 min研磨处理,冰水浴超声5 min;重复以上提取步骤3次;于-40℃放置1 h,之后于4℃、12 000 r/min条件下离心15 min;取上清液上机检测。

1.3.2 色谱条件 使用Waters ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)液相色谱柱对目标化合物进行分离。A相:水+5 mmol/L乙酸铵+5 mmol/L乙酸;B相:甲醇。进样量2 μL;洗脱梯度如下:0~1.2 min,1% B;1.2~9.5 min,1%~99% B;9.5~11.8 min,99% B;11.8~12.0 min,99%~1% B;12~15 min,1% B。

1.3.3 质谱条件 利用Thermo Q Exactive HFX质谱仪进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:鞘层气体流量和辅助气体流量分别为30 Arb和10 Arb,毛细管温度为350℃,全MS分辨率:60 000,MS/MS分辨率为7 500,NCE模式下碰撞能量:10/30/60,喷雾电压:4 kV(正离子模式)、3.8 kV(负离子模式)。

1.4 数据处理

1.4.1 代谢产物鉴定 利用ProteoWizard软件将原始数据转换成mzXML格式,之后用R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、提取、对齐和积分等处理,然后通过BiotreeDB(V2.1)自建二级质谱数据库匹配并进行物质注释,Cutoff值为0.3。然后

表1 咖啡豆样本

编号	品种	产地
LCZK	卡蒂姆	临沧镇康,云南,中国,亚洲
DHMS		德宏芒市,云南,中国,亚洲
BSLY		保山隆阳,云南,中国,亚洲
PEML		普洱孟连,云南,中国,亚洲
DBK		大理宾川,云南,中国,亚洲
DBT	铁皮卡	大理宾川,云南,中国,亚洲
AS	阿拉比卡	埃塞俄比亚,非洲

利用公共PlantCyc数据库、KEGG数据库对物质进行功能注释^[4]。

1.4.2 差异代谢产物的筛选 利用SIMCA 14.1对代谢组学结果分析,进行单变量和多变量分析,从而获得组间差异代谢物。

1.4.3 代谢通路图的绘制 通过差异代谢产物的KEGG号,登录KEGG(<https://www.kegg.jp/>),使用KEGG Mapper、Search Pathway分析,数据库会匹配与化合物相关的代谢通路图,并绘制相关代谢网络。

2 结果与分析

2.1 代谢产物的代谢组学分析结果

在超高效液相色谱串联质谱检测到的所有代谢产物中,能同时与数据库物质的一级 m/z 和数据库的碎片离子(二级) m/z 匹配到的物质,正离子模式下有18 622个,负离子模式下有12 618个。采用主成分分析对7组咖啡样品进行鉴别。由图1可知,QC(质量控制)样本重合度较高,说明本试验方法稳定性强且数据质量高。两个主成分(PCs)解释了大部分的变化,PC1和PC2分别为正离子模式的37.5%和12.2%,负离子模式的40.9%和16.6%。然而,存在个别样品处于在置信区间外,如在正离子模式下AS组咖啡豆大多数样品未在置信区间内,可能是由于AS是早期阿拉比卡咖啡豆,而云南小粒咖啡是波旁变种和铁毕卡变种的混合群体,因此二者之间存在较多差异物。图中存在重叠样品,说明样本中某些分子组成、浓度相近,可能的原因是相同品种间的聚集或不同品种间组分含量相近。综上,PCA无监督分析方法所存在一定的组内误差,需要进一步分析研究消除无

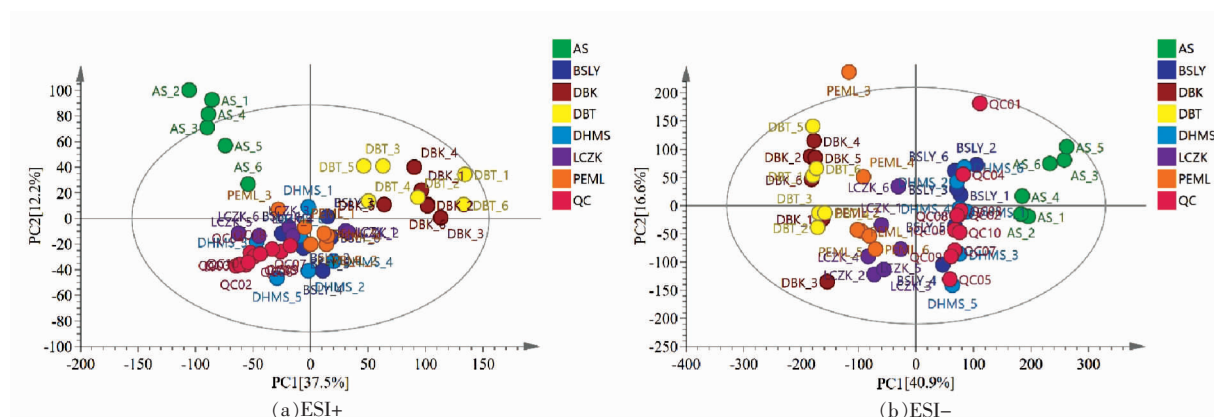


图 1 PCA 得分图

Fig.1 PCA scores

关的随机误差。

2.2 云南咖啡豆与埃塞俄比亚咖啡豆相比的特征成分

利用监督性正交偏最小二乘判别分析将与分类信息无关的噪音滤除,充分提高了模型的有效性和解析能力,排除样本之间的误差及其它的随机误差,并使组间的差异得到最大化^[14]。由表 2 可知,6 个分组模型的评价指标 R^2Y_{cum} 、 Q^2_{cum} 均 > 0.9,说明所建模型良好。

将 P -value 值 < 0.05, Fold change ≥ 2 或 ≤ 0.5 以及 VIP 值 > 1 作为筛选标准,共筛选得到差异代谢物 306 个。利用火山图分析云南不同区域咖啡豆与埃塞俄比亚咖啡豆 306 种差异代谢物的变化情况,在右上角象限内说明该类化合物上调,而左上角说明该类化合物相对下调。如表 3 及图 2 可知最终一共筛选得到 36 种显著差异代谢物,其中包括表儿茶素、3-*O*-咖啡酰-1-*O*-甲基奎宁酸等 16 种多酚,十八碳三烯酸等 8 种脂质类,牡荆甙、水杨素等 6 种糖类,乙酸异丁酸蔗糖酯等 2 种有机酸类,生物碱类:6-羟基-1*H*-吡啶-3-乙酰胺、吡啶-3-羧酸,萜类(2 种)。这些物质可作为区分云南小粒咖啡与埃塞俄比亚咖啡的潜在标志物,其中有 24 种化合物含量云南地区显著高于埃塞俄比亚地区,包括 10 种多酚类化合物如:3-*O*-咖啡酰-1-*O*-甲基奎宁酸、3-*O*-咖啡酰莽草酸等,这些物质具有清除自由基,抗菌,消炎,抗病毒,降糖,降血脂,保肝利胆等多种功效^[15]。7 种脂质类物质如(9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-羟基-10,12,15-十八碳三烯酸、(*Z,E,Z*)-9,11,13-十八碳三烯酸等具

表 2 云南小粒咖啡与埃塞俄比亚咖啡相比 OPLS-DA 模型质量参数

Table 2 OPLS-DA quality parameters of Yunnan coffee beans compared with Ethiopian coffee bean

组别	R^2X_{cum}	R^2Y_{cum}	Q^2_{cum}
LCZK vs AS	0.519	0.999	0.968
DHMS vs AS	0.494	1.000	0.974
BSLY vs AS	0.506	1.000	0.976
PEML vs AS	0.506	1.000	0.976
DBK vs AS	0.582	1.000	0.987
DBT vs AS	0.579	1.000	0.976

有优异的生物学活性,如抗癌,减少脂肪堆积,降血压和消炎等^[16]。Castro-Moretti 等^[17]使用液相色谱串联质谱法监测到咖啡果蛀虫侵袭会导致阿拉比卡种子中绿原酸含量的增加,而罗布斯塔中的有机酸和糖醇含量也会增加。

2.3 云南不同地区咖啡豆的差异代谢产物分析

利用单维分析与多维分析相结合的方法,根据 OPLS-DA 分析计算的变量权重重要性排序值(VIP)来筛选组间差异代谢物(VIP > 1),VIP 值与样品组间分类判别的影响强度以及解释能力成正比,VIP 值越大,解释能力以及影响强度越强^[18]。使用 s-plot 图对变量进行鉴别,且每个变量与模型之间的相关性以及协变性也可由 s-plot 图体现。如图 3 所示,红色标识为所筛选得到的 106 种差异代谢物。利用 t 检验判别筛选的 106 种物质在两组之间是否具有统计学差异,并排除 $P > 0.05$ 的变量。最终筛选得到 44 种差异代谢物(图 4),包括谷氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等 14 种氨基酸,棕榈

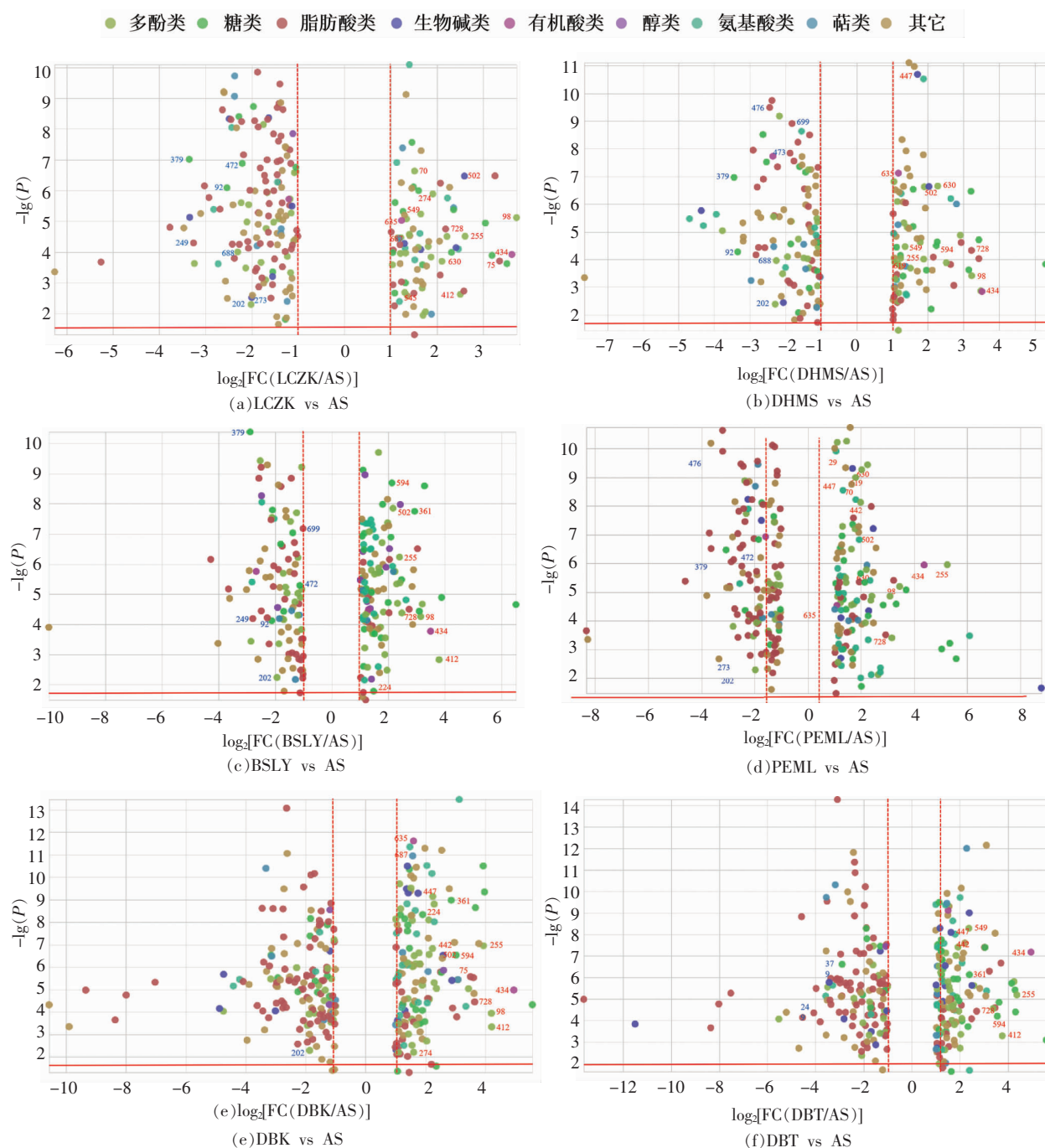


图2 UHPLC-QE-MS 的火山图

Fig.2 Volcanic map of UHPLC-QE-M

酰胺、花生酸、亚油酸等 11 种脂质类,3-羟基香豆素、绿原酸、奎宁酸等 10 种多酚,富马酸、苹果酸、琥珀酸等 3 种有机酸,糖类:海藻糖、水苏糖,萜类:赤霉素 A113、藏红花酸,醇类:肌醇,其它类:Cafamarine。有研究通过 HILIC-MS 代谢组学方法分析得到绿原酸、异绿原酸 C、隐绿原酸、奎宁酸、

咖啡酸、3-O-p-香豆酰奎宁酸等物质也可作为咖啡烘焙豆的潜在生物标记物^[9]。咖啡中的氨基酸类物质在美拉德反应中扮演了重要的角色,它是产生吡啶、吡咯等芳香化合物的重要前体物质;糖类物质会影响咖啡在冲泡过程中产生的挥发性风味组分;脂质类物质可以降低咖啡中的苦味及涩

表 3 云南各地区咖啡豆与埃塞俄比亚咖啡豆主要差异代谢物
Table 3 Main differential metabolites of coffee beans from Yunnan and Ethiopia

ID 号	质荷比	保留时间/s	化学结构式	名称	LCZK vs AS		DHMS vs AS		BSLY vs AS		PEML vs AS		DBK vs AS		DBT vs AS	
					含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值
29	405.17	391.77	C ₂₅ H ₂₄ O ₅	Mammecin	↑	1.09×10 ⁻⁴	↑	1.70×10 ⁻⁶	↑	6.33×10 ⁻⁶	↑	6.49×10 ⁻⁹	↑	4.86×10 ⁻⁷	↑	7.19×10 ⁻⁶
70	362.12	364.77	C ₁₈ H ₁₉ NO ₇	燕麦生物碱 A2	↑	3.13×10 ⁻⁶	↑	5.33×10 ⁻⁶	↑	7.40×10 ⁻⁵	↑	2.94×10 ⁻⁸	↑	3.79×10 ⁻⁸	↑	8.96×10 ⁻⁵
75	375.21	449.85	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	脂氧素 A4	↓	4.00×10 ⁻⁴	↓	1.74×10 ⁻⁴	↓	3.55×10 ⁻⁶	↓	1.25×10 ⁻⁷	↓	3.27×10 ⁻⁶	↓	3.04×10 ⁻⁵
92	467.15	421.12	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	牡荆甙	↑	7.38×10 ⁻⁶	↑	1.13×10 ⁻⁴	↑	1.18×10 ⁻⁴	↑	7.43×10 ⁻⁵	↑	1.22×10 ⁻⁵	↑	1.03×10 ⁻⁵
98	655.33	471.51	C ₄₀ H ₄₆ O ₈	Argenteane	↑	3.69×10 ⁻⁵	↑	5.30×10 ⁻⁴	↑	9.25×10 ⁻⁵	↑	1.61×10 ⁻⁵	↑	7.29×10 ⁻⁵	↑	3.54×10 ⁻⁶
162	663.17	438.56	C ₃₄ H ₃₆ O ₁₄	山奈酚	↓	6.52×10 ⁻⁵	↓	5.28×10 ⁻⁵	↓	2.03×10 ⁻⁴	↓	9.37×10 ⁻⁵	↓	3.90×10 ⁻⁶	↓	2.16×10 ⁻⁶
202	477.14	422.51	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	橙皮苷	↑	5.52×10 ⁻³	↑	3.58×10 ⁻³	↑	4.28×10 ⁻³	↑	3.71×10 ⁻³	↑	1.82×10 ⁻³	↑	2.09×10 ⁻³
224	529.19	302.93	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	脱氧有机酸	↑	7.09×10 ⁻⁶	↑	2.65×10 ⁻⁶	↑	1.02×10 ⁻²	↑	3.22×10 ⁻⁶	↑	2.43×10 ⁻⁸	↑	9.47×10 ⁻⁵
249	385.20	513.63	C ₂₃ H ₂₈ O ₅	(6β,7α,12β,13β)-7-Hydroxy-11,16-dioxo-8,14-apianadien-22,6-olide	↑	1.46×10 ⁻⁴	↑	1.38×10 ⁻⁴	↑	1.04×10 ⁻⁴	↑	6.71×10 ⁻⁵	↑	3.81×10 ⁻⁵	↑	4.68×10 ⁻⁵
255	455.15	338.50	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	二氢杨梅素	↓	1.01×10 ⁻⁴	↓	1.80×10 ⁻⁴	↓	3.09×10 ⁻⁶	↓	4.16×10 ⁻⁶	↓	2.78×10 ⁻⁷	↓	1.04×10 ⁻⁵
273	277.22	615.15	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	(9S,10E,12Z,15Z)-9-羟基-10,12,15-十八碳三烯酸	↑	3.72×10 ⁻³	↑	4.01×10 ⁻³	↑	3.46×10 ⁻³	↑	1.44×10 ⁻³	↑	8.75×10 ⁻⁴	↑	1.04×10 ⁻³
274	581.19	391.78	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	柚皮苷	↓	1.02×10 ⁻⁵	↓	2.26×10 ⁻⁴	↓	4.39×10 ⁻⁵	↓	3.87×10 ⁻⁵	↓	2.16×10 ⁻³	↓	3.04×10 ⁻⁵
280	337.09	242.57	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	3-O-咖啡酰莽草酸	↑	3.95×10 ⁻⁵	↑	2.18×10 ⁻²	↑	2.16×10 ⁻⁴	↑	1.26×10 ⁻⁵	↑	1.45×10 ⁻⁶	↑	1.13×10 ⁻⁸
358	311.29	727.80	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	油酸乙酯	↑	2.16×10 ⁻⁴	↑	4.91×10 ⁻⁴	↑	1.80×10 ⁻²	↑	7.27×10 ⁻⁴	↑	1.38×10 ⁻³	↑	6.35×10 ⁻³
361	475.17	293.47	C ₁₇ H ₃₀ O ₁₅	alpha-D-Xylopyranosyl-(1->6)-beta-D-glucopyranosyl-(1->4)-D-glucose	↑	4.94×10 ⁻⁴	↑	3.66×10 ⁻⁴	↑	2.69×10 ⁻⁷	↑	7.16×10 ⁻⁶	↑	8.69×10 ⁻⁹	↑	2.01×10 ⁻⁶
379	309.10	464.60	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	水杨苷	↑	1.57×10 ⁻⁶	↑	1.31×10 ⁻⁶	↑	9.61×10 ⁻⁹	↑	1.68×10 ⁻⁶	↑	5.82×10 ⁻⁷	↑	8.99×10 ⁻⁷
403	291.09	476.96	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素	↓	9.04×10 ⁻⁵	↓	1.70×10 ⁻⁴	↓	1.37×10 ⁻⁶	↓	1.60×10 ⁻⁶	↓	3.68×10 ⁻⁸	↓	2.37×10 ⁻⁷

(续表 3)

ID 号	质荷比	保留时间/s	化学结构式	名称	LCZK vs AS		DHMS vs AS		BSLY vs AS		PEML vs AS		DBK vs AS		DBT vs AS	
					含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值	含量变化	Q 值		
412	597.16	410.85	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₃	Eriodictyol 7-(6-trans-p-coumaroylglucoside)	↑	2.98×10 ⁻³	↑	1.47×10 ⁻³	↑	1.36×10 ⁻³	↑	5.12×10 ⁻³	↑	2.30×10 ⁻⁴	↑	3.50×10 ⁻⁴
420	519.21	435.66	C ₃₀ H ₃₀ O ₈	(-)-梣子素	↑	2.14×10 ⁻⁵	↑	2.87×10 ⁻⁴	↑	6.81×10 ⁻⁶	↑	4.26×10 ⁻⁶	↑	4.18×10 ⁻⁶	↑	1.18×10 ⁻³
434	847.40	499.73	C ₄₀ H ₆₀ O ₁₉	蔗糖乙酸酯	↓	2.76×10 ⁻⁴	↓	1.53×10 ⁻³	↓	2.27×10 ⁻⁴	↓	4.22×10 ⁻⁶	↓	1.00×10 ⁻⁵	↓	3.49×10 ⁻⁷
442	360.11	373.85	C ₁₈ H ₁₇ NO ₇	燕麦生物碱 2s	↓	3.19×10 ⁻⁴	↓	2.28×10 ⁻⁶	↓	7.40×10 ⁻⁶	↓	1.01×10 ⁻⁷	↓	3.44×10 ⁻⁷	↓	7.58×10 ⁻⁵
447	191.08	322.77	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	6-羟基-1H-咪唑-3-乙酰胺	↑	2.09×10 ⁻⁴	↑	7.52×10 ⁻⁹	↑	5.45×10 ⁻⁶	↑	1.76×10 ⁻⁸	↑	5.20×10 ⁻⁹	↑	7.82×10 ⁻⁸
472	557.19	397.13	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	决明子苷	↓	2.01×10 ⁻⁶	↓	7.00×10 ⁻⁵	↓	1.49×10 ⁻⁵	↓	8.73×10 ⁻⁷	↓	3.10×10 ⁻⁶	↓	7.25×10 ⁻⁶
473	361.20	498.73	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	7-甲氧基迷迭香酚	↑	1.90×10 ⁻⁷	↑	3.36×10 ⁻⁷	↑	5.07×10 ⁻⁶	↑	8.82×10 ⁻⁸	↑	4.19×10 ⁻⁶	↑	3.00×10 ⁻⁶
476	347.19	349.09	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	Annulide G	↑	5.60×10 ⁻⁶	↑	3.91×10 ⁻⁸	↑	7.41×10 ⁻⁸	↑	8.76×10 ⁻⁹	↑	3.79×10 ⁻⁸	↑	8.74×10 ⁻⁶
502	162.05	360.35	C ₃ H ₇ NO ₂	3-咪唑甲酸	↑	4.13×10 ⁻⁶	↑	2.25×10 ⁻⁶	↑	1.87×10 ⁻⁷	↑	4.39×10 ⁻⁷	↑	5.92×10 ⁻⁷	↑	4.79×10 ⁻⁶
545	549.16	408.86	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	5,7-dihydroxy-2-phenyl-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-8-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)-4H-chromen-4-one	↑	2.63×10 ⁻³	↑	6.51×10 ⁻⁴	↑	7.86×10 ⁻⁶	↑	4.43×10 ⁻⁷	↑	1.17×10 ⁻⁴	↑	1.15×10 ⁻⁴
549	369.12	464.77	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	3-O-咖啡酰奎宁酸	↑	3.03×10 ⁻⁵	↑	8.20×10 ⁻⁵	↑	4.66×10 ⁻⁷	↑	9.38×10 ⁻⁶	↑	1.15×10 ⁻⁸	↑	5.89×10 ⁻⁸
594	463.27	503.28	C ₂₆ H ₃₈ O ₇	Retinyl β-glucuronide	↓	2.46×10 ⁻⁴	↓	7.74×10 ⁻⁵	↓	6.25×10 ⁻⁸	↓	1.25×10 ⁻⁵	↓	5.79×10 ⁻⁷	↓	6.26×10 ⁻⁵
619	593.19	456.42	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	Margaritene	↑	1.84×10 ⁻⁴	↑	3.22×10 ⁻⁴	↑	9.03×10 ⁻⁵	↑	1.90×10 ⁻⁸	↑	5.52×10 ⁻⁷	↑	2.65×10 ⁻⁵
630	563.18	454.38	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	白杨素-7-葡萄糖醛酸苷	↑	4.06×10 ⁻⁴	↑	2.19×10 ⁻⁶	↑	3.38×10 ⁻⁴	↑	5.66×10 ⁻⁶	↑	2.17×10 ⁻⁵	↑	1.31×10 ⁻⁴
635	301.18	383.67	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	人参聚炔 F	↓	4.34×10 ⁻⁵	↓	9.96×10 ⁻⁷	↓	6.10×10 ⁻⁵	↓	5.39×10 ⁻⁵	↓	1.39×10 ⁻¹⁰	↓	1.54×10 ⁻⁸
687	347.18	383.67	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	赤霉素 A113	↓	1.15×10 ⁻⁴	↓	2.17×10 ⁻⁵	↓	1.15×10 ⁻⁴	↓	6.97×10 ⁻⁵	↓	3.40×10 ⁻¹⁰	↓	1.01×10 ⁻⁸
688	305.10	437.81	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	(R)-Heraclenol	↓	2.40×10 ⁻⁴	↓	1.97×10 ⁻⁴	↓	1.63×10 ⁻⁵	↓	1.42×10 ⁻⁴	↓	7.30×10 ⁻⁵	↓	1.13×10 ⁻⁴
699	279.23	614.33	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	石榴酸	↑	1.88×10 ⁻⁷	↑	9.36×10 ⁻⁸	↑	6.38×10 ⁻⁷	↑	1.48×10 ⁻⁸	↑	2.90×10 ⁻⁶	↑	2.44×10 ⁻⁷
728	147.07	43.93	C ₆ H ₁₀ O ₄	2-二甲基丁二酸	↑	6.74×10 ⁻⁵	↑	1.04×10 ⁻⁴	↑	5.98×10 ⁻⁵	↑	3.62×10 ⁻⁴	↑	2.79×10 ⁻⁵	↑	4.05×10 ⁻⁵

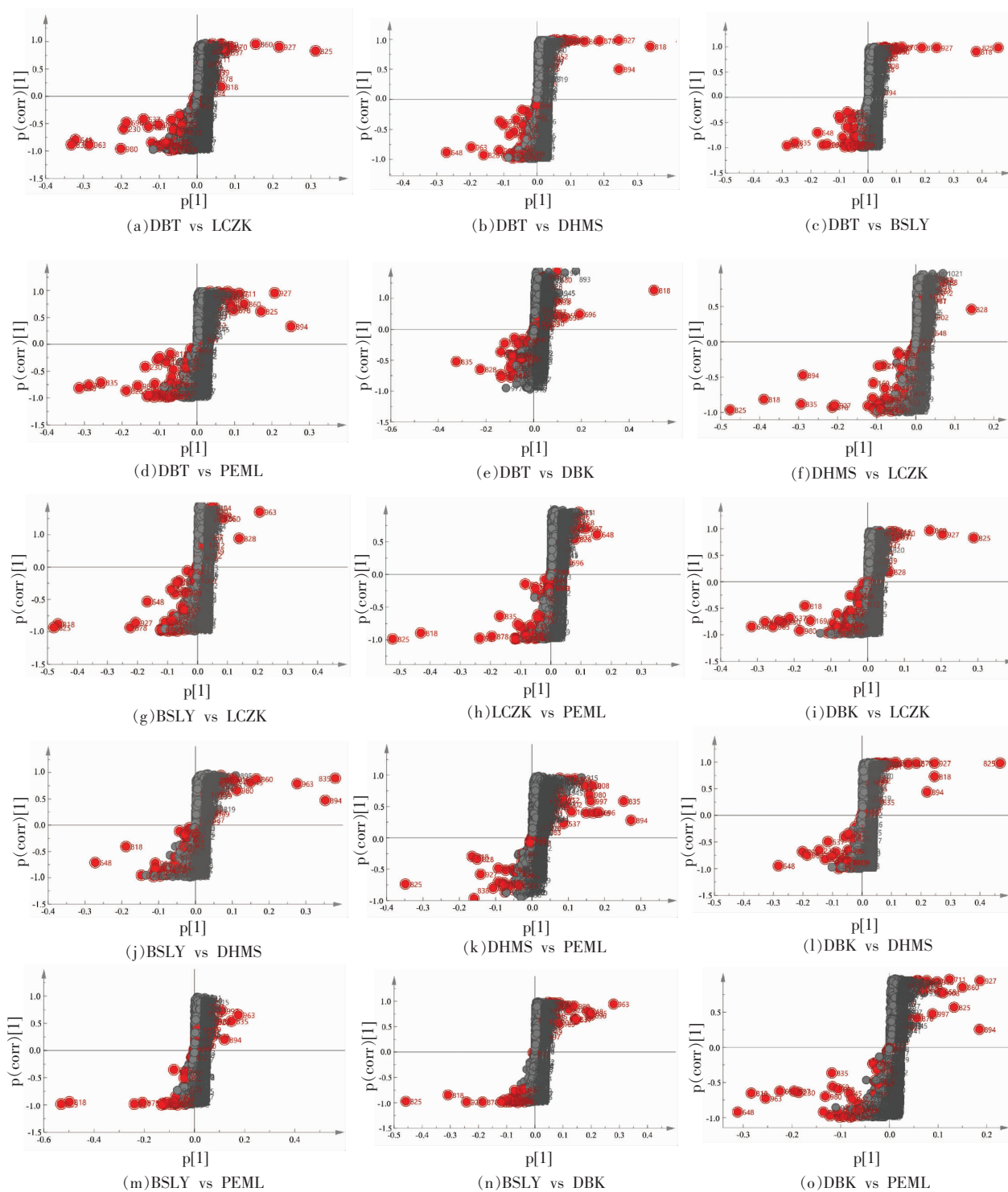


图3 UHPLC-QE-MS的OPLS-DA s-plot图

Fig.3 OPLS-DA s-plot of UHPLC-QE-MS

味组分进而使口感圆润丰满^[20]。UHPLC-(Q)TOF-MS法发现棕榈酸、5-咖啡酰-奎尼酸、咖啡醇、*N*-乙酰-*L*-苯丙氨酸、3-羟基辛酸及1-*O*-Sinapoyl-glucose可以作为鉴别哥伦比亚地区咖啡豆的特征

成分标记物^[21]。咖啡中的二萜类化合物具有抗血管生成、抗肿瘤和抗炎的作用, Hu等^[22]采用LC-MS/MS技术对云南小粒咖啡烘焙豆中的萜类物质进行分离,发现多种贝壳杉烷二萜类物质,该发现

为开发功能型咖啡提供理论依据。有研究对8种不同成熟度咖啡豆进行¹H NMR代谢组学研究,

发现糖、咖啡酰奎宁酸、咖啡因、葫芦巴碱和奎宁酸可以作为咖啡豆成熟度的标记物^[23]。

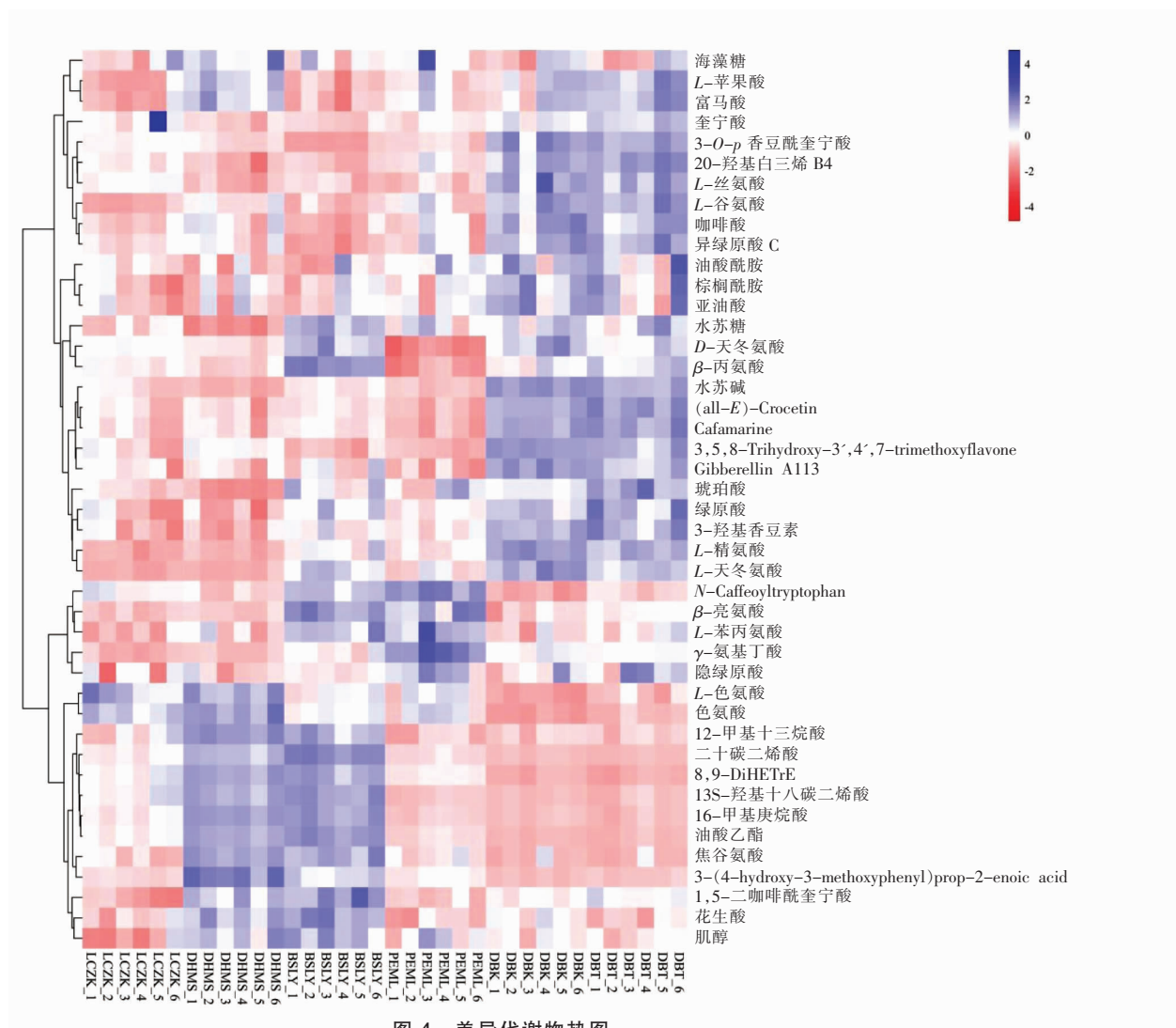


图4 差异代谢物热图

Fig.4 Heatmap of the differential metabolites

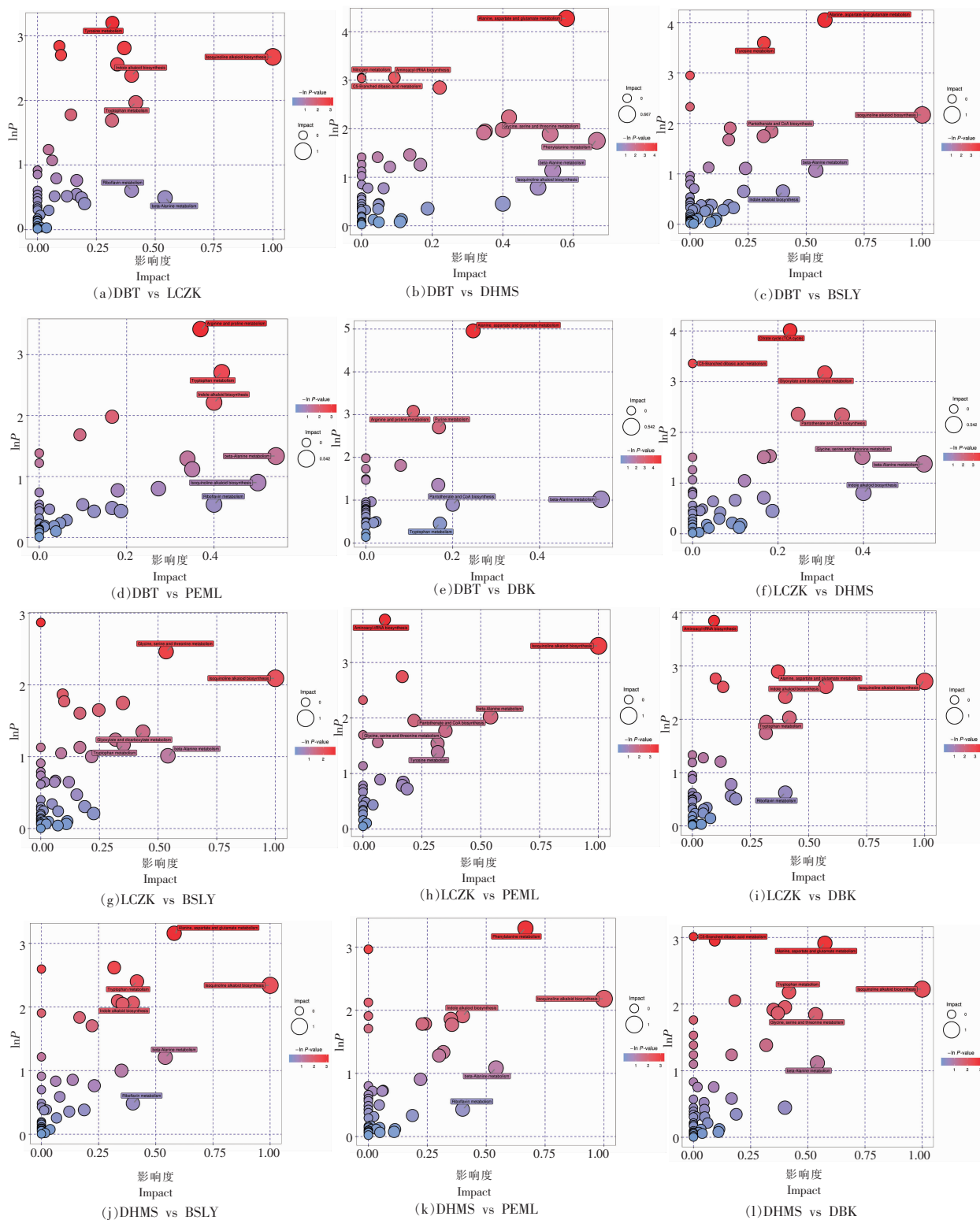
2.4 差异代谢产物在代谢通路中的分布分析

生物体中的复杂代谢反应是由不同的蛋白质和基因形成的复杂网络和通路, 其对其调控并不是单独进行的, 不同蛋白质和基因间的相互影响最终导致代谢组发生系统性的改变。京都基因与基因组百科全书 Pathway 数据库^[24]将代谢反应和代谢过程中基因和基因组所对应的蛋白相串联用于展示细胞的能量代谢、物质运输、信号传递、细胞周期调控等生理生化过程和同系保守的子通路信息。通过综合分析法(富集分析、拓扑分析)对差异代谢物所在通路进行筛选, 找到与代谢物差异

相关性最高的关键通路^[25]。通过综合分析法共标注到7个较为重要的代谢途径, 包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 苯丙氨酸代谢, 酪氨酸代谢, 异喹啉生物碱生物合成, 吲哚生物碱生物合成(图5)。氨基酸和蛋白质是环境胁迫下氮、硫代谢的主要产物, 这些生物分子也是三羧酸循环、磷酸戊糖途径以及糖酵解的中心, 作为许多次级代谢物(如谷胱甘肽、生物碱和牛磺酸)的前体^[26]。谷氨酸是合成谷氨酰胺的底物, 而 γ -氨基丁酸、精氨酸和脯氨酸的基础结构是由谷氨酸的碳骨架和 α -氨基组成的。对

于细胞壁蛋白形成和渗透调节而言,脯氨酸是必不可少的,此外,脯氨酸还是氮的储存物质和恢复生长的能源^[27]。酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸用于蛋白质的合成,是许多天然产物的前体,如生物碱、

激素和细胞壁成分。此外,色氨酸还是硫代葡萄糖苷、生长素、抗毒素和生物碱等许多次级代谢物的前体,这些物质可增强芳香化合物的生物合成;苯丙氨酸参与苯丙酸途径中几种植物化学物质和抗



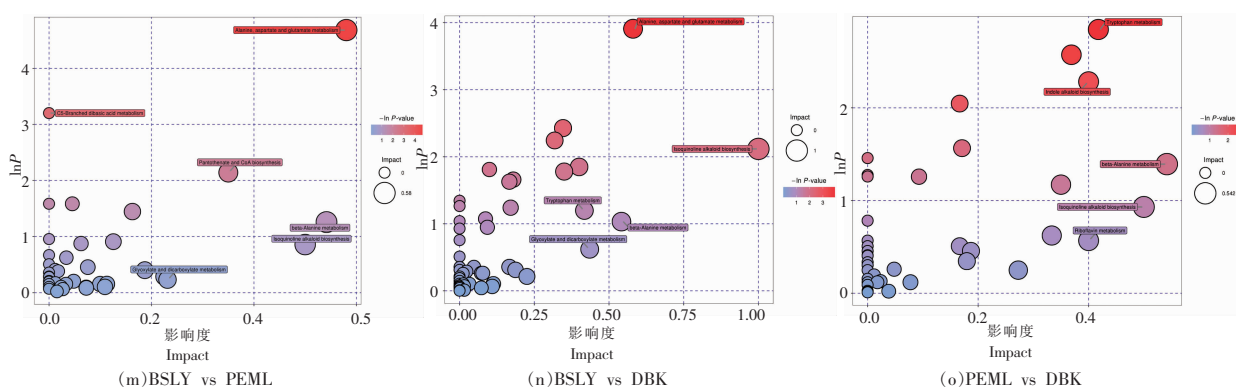


图5 气泡图

Fig.5 Bubble chart

氧化剂的生物合成。生物碱类物质具有许多有益的生物活性作用,其积累受到生物和非生物环境的控制,一般将生物碱分为5大类,天然异喹啉生

物碱具有镇痛、抗菌等作用^[28],吲哚类生物碱具有抗肿瘤、舒张血管的作用^[29]。

表4 云南各地区地理环境特点

Table 4 Geographical characteristics of various regions in Yunnan

产地	平均气温/℃	年平均降雨量/mm	年平均日照时间/h	气候类型	特点
临沧	18.7	1 625.4	1 989	南亚热带季风气候	低纬山地,气候较热,霜期短,四季不明显,雨量充沛,干湿季分明,立体气候显著
德宏	19.6	1 654.6	2 252.9	南亚热带季风气候	夏长冬短、干湿分明、冬无严寒、夏无酷暑,雨量充沛,冬季多雾
保山	15.5	966.5	2 300	西南季风区亚热带高原气候	“一山分四季,十里不同天”的立体气候,热、温、寒3种气候类型俱全,冬无严寒,夏无酷热,四季如春,终年常绿
普洱	17.8	1 524.4	2 000	高原南亚热带季风气候	区域内气候明显,有4种不同的气候类型,分别为北热带、北亚热带、中亚热带和南亚热带,具有低纬度、气温高、多雨湿润和少风等特点,冬元严寒,夏元酷暑
大理	17.9	559.4	2 719.4	亚热带低纬高原季风气候	冬干夏湿地处低纬高原,四季温差小,干湿季节分明,以低纬度高原季风气候为主

从表4可以看出,不同地区气温、降水量有较大差异。咖啡树为了更好地在产地生长,会通过调节代谢水平进而适应外部环境的改变,导致咖啡中各种代谢物的含量和品质有所差异,然而,产地影响咖啡代谢途径及其机理的研究未见报道,有待进一步研究。

3 结论

本研究基于UHPLC-QE-MS的代谢组学技

术对云南5个区域及埃塞俄比亚地区的咖啡样品进行代谢组学分析,探究不同产地对咖啡代谢产物的影响。经归一化分析筛选后共鉴定出17 072个代谢产物,对样品进行PCA和OPLS-DA等多元分析,云南地区与埃塞俄比亚的样品相比共有36种差异物质,其中Mammeigin、牡荆甙、3-O-咖啡酰-1-O-甲基奎宁酸、3-O-咖啡酰莽草酸、2,2-二甲基丁二酸、十八碳三烯酸等24种化合物含量显著高于埃塞俄比亚地区样品,脂氧素、柚皮苷、

表儿茶素、决明子苷等 12 种化合物含量显著低于埃塞俄比亚地区样品,且从差异代谢物结果中可知云南小粒咖啡的多酚类物质显著高于埃塞俄比亚地区样品。与不同地区云南小粒咖啡相比共筛选得到差异代谢物 44 种,且倍数在 1.01~4.96 倍之间,这些差异代谢物可将不同地区咖啡豆样品进行较好地地区分,说明在咖啡的代谢产物中可能含有其产地信息。综上所述,基于 UHPLC-QE-MS 技术的代谢组学方法用于分析不同区域咖啡豆的特征代谢产物具有一定的可行性,可为因环境条件不同进而导致的咖啡品质差别提供一定的理论基础。本研究结果表明利用基于 UHPLC-QE-MS 技术并结合多元统计分析的方法,可用于分析不同环境条件对咖啡代谢产物的影响,为咖啡豆的产地溯源提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 黄家雄,黄琳,吕玉兰,等. 中国咖啡产业发展前景分析[J]. 云南农业科技, 2018, 304(6): 6-9.
HUANG J X, HUANG L, LÜ Y L, et al. Analysis of the development prospects of China's coffee industry[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2018, 304(6): 6-9.
- [2] 彭春秀,苗玥,龚加顺,等. 一种利用 UHPLC-QE-MS 指纹图谱鉴定咖啡生豆的方法: CN202110443391.4[P]. 2021-07-30[2021-11-23].
PENG C X, MIAO Y, GONG J S, et al. A method for identifying raw coffee beans using UHPLC-QE-MS fingerprinting: CN202110443391.4 [P]. 2021-07-30[2021-11-23].
- [3] 赵丹,杜仁鹏,刘鹏飞,等. 代谢组学技术在植物源性食品研究中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 212-216.
ZHAO D, DU R P, LIU P F, et al. A review of applications of metabolomics techniques in plant-derived food research[J]. Food Science, 2015, 36(3): 212-216.
- [4] SOUARD F, DELPORTE C, STOFFELEN P, et al. Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS [J]. Food Chemistry, 2017, 245: 603-612.
- [5] 郑海英,张冬青,赵晓丹. 代谢组学法研究转录因子 SINAC4 对番茄果实代谢产物的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 44-50.
- [6] ZHENG H Y, ZHANG D Q, ZHAO X D. Metabonomic study on the effect of transcriptional factor SINAC4 on tomato fruit metabolites[J]. Food Science, 2019, 40(10): 44-50.
- [7] DEFERNEZ M, WREN E, WATSON A D, et al. Low-field ^1H NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees[J]. Food Chemistry, 2017, 216: 106-113.
- [8] RODRIGUES C I, MAIA R, MIRANDA M, et al. Stable isotope analysis for green coffee bean: A possible method for geographic origin discrimination [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2009, 22(5): 463-471.
- [9] GARRETT R, SCHMIDT E M, PEREIRA L F P, et al. Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics [J]. LWT - Food Science and Technology, 2013, 50(2): 496-502.
- [10] EL-ABASSY R M, DONFACK P, MATERNY A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1443-1448.
- [11] 陈秀明,奚星林,潘丙珍,等. 基于近红外光谱技术的咖啡掺假快速鉴别方法[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 253-257.
CHEN X M, XI X L, PAN B Z, et al. Study of the rapid identification method of coffee adulteration based on near-infrared spectroscopy[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 253-257.
- [12] SILVA C C D, GARRETT R, REZENDE C M, et al. Comprehensive lipid analysis of green Arabica coffee beans by LC-HRMS/MS [J]. Food Research International, 2020, 137: 109727.
- [13] PUTRI S P, IRIFUNE T, YUSIANTO, et al. GC/MS based metabolite profiling of Indonesian specialty coffee from different species and geographical origin [J]. Metabolomics, 2019, 15(10): 126-137.
- [14] WILSON I D, PLUMB R S, JOHNSON K A, et al. High resolution 'ultra performance' liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies [J]. Journal of Proteome Research, 2005, 4(2): 591-598.

- [14] 祝爱艳, 梁露, 侯金雪, 等. 赣南脐橙代谢组学研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 281–286.
ZHU A Y, LIANG L, HOU J X, et al. Metabolomic study of Gannan navel orange[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 281–286.
- [15] ARAÚJO F F D, FARIAS D D P, NERI–NUMA I A, et al. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127535.
- [16] CHANDA W, JOSEPH T P, GUO X F, et al. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids against microbial pathogens[J]. Journal of Zhejiang University–Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2018, 19(4): 253–262.
- [17] CASTRO–MORETTI F R, COCURON J C, VEGA F E, et al. Differential metabolic responses caused by the most important insect pest of coffee worldwide, the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68: 2597–2605.
- [18] 贾聪, 芦鑫, 高锦鸿, 等. 基于代谢组学分析不同颜色花生红衣的组成差异[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 46–51.
JIA C, LU X, GAO J, et al. Metabolomic analysis of differences in chemical composition of peanut skins with different colors[J]. Food Science, 2019, 40(19): 46–51.
- [19] PÉREZ –MÍGUEZ R, CASTRO –PUYANA M, SÁNCHEZ–LÓPEZ E, et al. Untargeted HILIC–MS–based metabolomics approach to evaluate coffee roasting process: Contributing to an integrated metabolomics multiplatform[J]. Molecules, 2020, 25(4): 887.
- [20] 朱龙杰, 曹毅, 朱怀远, 等. 美拉德反应产物中三类官能团化合物的质量分布与主体香气特征[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 264–271, 337.
ZHU L J, CAO Y, ZHU H Y, et al. Mass distribution of three kinds of functional compounds and main aroma characteristics in Maillard reaction products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 264–271, 337.
- [21] HOYOS OSSA D E, GIL–SOLSONA R, PENUELA G A, et al. Assessment of protected designation of origin for Colombian coffees based on HRMS–based metabolomics[J]. Food Chemistry, 2018, 250: 89–97.
- [22] HU G L, GAO Y, PENG X R, et al. Lactam ent–Kaurane Diterpene: A new class of diterpenoids present in roasted beans of *Coffea arabica*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(22): 6112–6121.
- [23] HU G, PENG X, WANG X, et al. Excavation of coffee maturity markers and further research on their changes in coffee cherries of different maturity [J]. Food Research International, 2020, 132(2): 109121.
- [24] MINORU K, YOKO S, MASAYUKI K, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1) D457–D462.
- [25] XIA J, SINELNIKOV I V, HAN B, et al. Metabo analyst 3.0 – Making metabolomics more meaningful [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W251–W257.
- [26] XIA L, M X D, CHENG Y H, et al. Transcriptomic and metabolomic insights into the adaptive response of *Salix viminalis* to phenanthrene[J]. Chemosphere, 2020, 262: 127573.
- [27] 王玮, 吴传万, 王欣, 等. 外源脯氨酸对盐胁迫下萝卜幼苗生长、抗氧化酶活性及渗透调节物质积累的影响[J]. 江西农业学报, 2019, 31(3): 51–56.
WANG W, WU C W, WANG X, et al. Effects of exogenous proline on growth, antioxidant enzyme activity and osmotic adjustment substance accumulation in radish seedlings under salt stress[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2019, 31(3): 51–56.
- [28] FUMIHIKO SATO T I T T. Metabolic engineering in isoquinoline alkaloid biosynthesis[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2007, 8(4): 211–219.
- [29] RAI A, SMITA S S, SINGH A K, et al. Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis[J]. Molecular Plant, 2013, 6(5): 1531–1549.

Metabolomic Analysis of the Characteristic Components of *Coffea arabica* L. Based on UHPLC-QE-MS

Miao Yue¹, Tan Chao¹, Peng Chunxiu², Gong Jiashun^{1*}

¹College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

²College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract Metabonomics profiling of Yunnan and Ethiopian coffee beans were conducted by UHPLC-QE-MS, to investigate the differences metabolites of green coffee beans in different regions of Yunnan Province and the characteristic components compared with those in Ethiopia. The results showed that there were 36 differential substances in Yunnan green coffee beans compared with Ethiopian green beans, including 16 metabolites of polyphenols such as 3-*O*-caffeoyl-1-*O*-methylquinic acid and epicatechin; 8 metabolites of lipids, such as octadecatrienoic acid; 6 metabolites of sugars, such as agnuside; and alkaloids, organic acids, terpenes. Among them, the contents of 24 compounds such as mammeigin, agnuside, 3-*O*-caffeoyl-1-*O*-methylquinic acid, 2,2-dimethylsuccinic acid and octadecatrienoic acid in Yunnan green coffee beans were significantly higher than those in Ethiopia green coffee beans, and 12 compounds such as epicatechin, cassitoroside and lipoxin in Ethiopia were significantly higher than those in Yunnan. The analysis of Yunnan green coffee from different regions showed that there were 44 differential metabolites, including 14 metabolites of amino acids such as glutamic acid and alanine; 11 metabolites of fatty acids such as palmitic amide and arachidic acid; 10 metabolites of polyphenols such as chlorogenic acid and quinic acid; malic acid and other 3 organic acids, and terpenoids, sugars, alcohols, others. The results showed that UHPLC-QE-MS combined with multivariate statistical analysis method could be used to study the differences of metabolites of coffee beans in different regions, providing theoretical basis for origin traceability of coffee beans.

Keywords *Coffea arabica* L.; UHPLC-QE-MS; multivariate analysis; metabolic pathways