

## 基于 UPLC-Q-Orbitrap 高分辨质谱分析贵州红茶的品质特征

蒋 勋<sup>1,2,3</sup>, 陶 会<sup>1</sup>, 宋杰玉<sup>1</sup>, 徐 婵<sup>1</sup>, 孙晓红<sup>1</sup>, 李占彬<sup>2</sup>, 杨鸿波<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>贵州医科大学公共卫生与健康学院 环境污染与疾病监控教育部重点实验室 贵阳 550025

<sup>2</sup>贵州省分析测试研究院 贵阳 550000

<sup>3</sup>昆明市疾病预防控制中心病媒消毒科 昆明 650228)

**摘要** 贵州红茶因其生态优势,具有优良的品质。为深入了解贵州红茶的品质特征,采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Orbitrap)对选取的3种贵州红茶(遵义红茶、普安红茶、石阡苔茶)中的非挥发性代谢产物进行非靶向代谢组学分析。结果表明,通过色谱-质谱联用分析,鉴定得到3种贵州红茶含有的96种代谢物,主要包括黄酮类、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、酚酸等。通过主成分分析(PCA)可有效区分3种贵州红茶,且不同品种间存在显著差异,根据FC值、P值和VIP值筛选出3种贵州红茶间的23种差异代谢物。代谢通路分析表明,其主要代谢通路是黄酮类物质的代谢,这可能是3种红茶滋味差异的影响因素。本研究从代谢组学角度揭示3种贵州红茶的代谢物差异,为茶叶品种鉴别提供参考。

**关键词** 高分辨质谱; 贵州红茶; 主成分分析; 差异代谢物

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0341-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.034

茶叶是世界上第二大非酒精饮料,红茶约占全球茶叶产量的78%<sup>[1]</sup>。红茶属于全发酵茶,具有红茶、红汤、红叶、香甜味醇的特征。贵州是产茶大省,具有“低纬度、高海拔、寡日照、云雾弥漫”的生态优势。在国家的支持下,贵州大力发展农村产业革命,致力于发展茶叶、食用菌等十二大贵州特色产业。贵州的遵义红茶、普安红茶、石阡苔茶是贵州省的优质名茶,均获得原国家质量监督检验检疫总局地理标志。分析贵州茶叶的优良品性,对品牌保护和真伪鉴别具有重要意义。

当下常规的红茶品质评价方式是感官评审或开展基于国标的多项检测项目,存在主观性以及操作繁琐的问题,需探寻一种快速且准确评价茶叶品质的分析方法。非靶向代谢组学是在特定条件下,对指定生物样品的全部小分子代谢物(<1500 u)进行定性、定量检测<sup>[2]</sup>。核磁共振(NMR)<sup>[3]</sup>、气相色谱质谱联用(GC-MS)<sup>[4]</sup>、液相色谱-质谱联用(LC-MS)<sup>[5]</sup>等方法已被广泛运用于茶叶的非靶向代谢组学研究,以评价气候条件、地理位置、土壤等外界因素导致的不同产地或品种间植物的体

内代谢物差异。鉴于四极杆静电场轨道阱(Orbitrap)高分辨质谱具有高选择性、高灵敏度、高质量准确性和对大量化合物进行快速分析的特点<sup>[6]</sup>,目前国内已有很多Orbitrap高分辨质谱用于中药材的分析和食品安全检测方面,而食品品质分析上的应用还是偏少。本研究旨在利用UPLC-Q-Orbitrap高分辨质谱技术分析贵州红茶的成分,简化前处理的步骤,分析贵州3种红茶间的差异,为茶叶的真伪鉴别提供参考。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料与试剂

从市场采购的70个贵州红茶样品,包括遵义红茶、普安红茶和石阡苔茶。其中遵义红茶33个样品,普安红茶25个样品,石阡苔茶12个样品。

Milli-Q超纯水,美国Merck Millipore公司;甲醇(分析纯级),天津科密欧化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯级),德国Merck公司;甲酸(色谱纯级),上海安谱实验科技股份有限公司。

#### 1.2 仪器与设备

Q Exactive HF-X静电场轨道阱高分辨质谱仪,配有Compound Discoverer 3.2数据处理软件和高效电喷雾离子源(HESI)、Thermo Scientific SII for Xcalibur液相色谱装置,美国Thermo

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21966011)

第一作者: 蒋勋,女,硕士生

通信作者: 杨鸿波 E-mail: hbyang@gmc.edu.cn

Fisher Scientific 公司;SK250HP 超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;Milli-Q Integra115 超纯水系统,Merck Millipore 公司;BSM-220.4 电子天平,上海卓精电子科技有限公司;多功能粉碎机,安康市红太阳机电有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 样品制备 将茶叶磨成粉状,取 0.2 g 茶粉放入 15 mL 离心管,取 70% 的甲醇 10 mL,在室温下超声(250 W, 53 Hz)1 h,之后用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取滤液放于 2 mL 进样瓶中,用于 UPLC-Q-Orbitrap/MS 非靶向代谢组学检测。

从每个样品中各取 200  $\mu\text{L}$  液体混合在一起,得到质量控制样本 QC 样品<sup>[7]</sup>(Quality control),在对编写好的序列样品进行检测前,先连续注入 QC 样品运行 5 次以平衡系统,在整个样品的检测过程中,每检测 5 个茶叶样品就运行 1 次 QC 样品,以检测仪器的稳定性。每次运行完 QC 样品后,注入一次空白样品,以减少样品检测过程中的残留效应<sup>[8]</sup>。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~2 min, 10% B;2~25 min, 10%~90% B;25~35 min, 90%~10% B;35~40 min, 10% B);柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ,体积流量:0.3 mL/min,进样量:2  $\mu\text{L}$ 。

1.3.3 质谱条件 采用 Exactive 质谱系统配备的高效电喷雾离子源(HESI),采用正、负离子分别扫描模式,扫描方式采用一级全扫描/数据依赖型二级质谱扫描(Full MS/dd-MS<sup>2</sup>),一级质谱 Full MS 的分辨率为 60 000,二级质谱 dd-MS<sup>2</sup> 的分辨率为 15 000,扫描范围为 100~1 500  $m/z$ ;离子传输管温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,辅助器温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,喷雾电压 3.2 kV,鞘气流速为 12 L/min,辅助气流速为 3 L/min,碰撞电压设为阶梯电压,分别为 20, 40, 60 eV。

### 1.4 数据处理

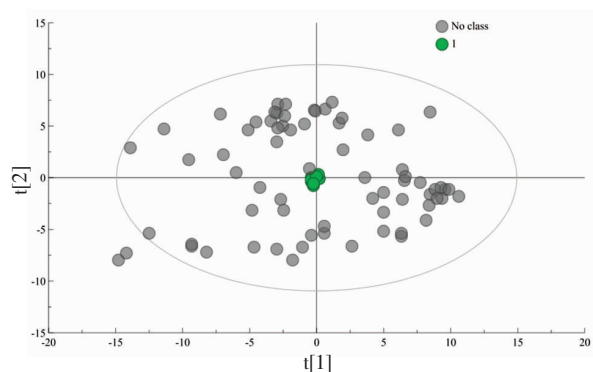
利用 Compound Discoverer 3.2 软件对 UPLC-Q-Orbitrap 检测到的原始数据进行峰对齐、峰提取、过滤、归一化处理等数据预处理。数据处理的参数设为:峰对齐保留时间偏移:2 min、化合物检测质量容许偏差: $5\times 10^{-6}$ 、信噪比(S/N):3、最小峰信号强度:1 000 000;保留所有 QC 样本中相对标

准偏差(RSD)小于 30%的离子,利用面积归一化法对化合物进行相对定量<sup>[9]</sup>。将 Compound Discover 3.2 得到的数据导入 Excel 中,通过后编辑得到二维矩阵形式的数据,导入 SIMCA 14.1 软件进行多元统计分析。最后采用 MetaboAnalyst 在线软件和 Compound Discover 3.2 的 Metabolika 数据库进行了代谢通路分析。火山图和箱线图由 Origin 软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法学验证

本文利用 QC 样品对分析方法的稳定性和数据的可靠性进行了检验,在图 1 中可看到 QC 样品密集分布在 PCA 得分图上,说明 QC 样品的重复性较好,系统稳定性高,数据具有可靠性,满足分析要求<sup>[10]</sup>。



注:No class:试验样;1:质控样。

图 1 QC 样品的 PCA 得分图

Fig.1 PCA score plot of QC sample

### 2.2 代谢物鉴定

Orbitrap 高分辨质谱非靶向分析贵州红茶后,将得到的原始数据导入 Compound Discoverer 3.2 软件进行分析,共得到了 2 638 个质谱信号。通过将化合物的准确质量、分子离子峰和碎片离子与 Chemspider 和 MassList 数据库进行一级谱图库的匹配以及和 mzCloud 和 mzVault 数据库进行二级谱图的匹配后进行代谢物的定性。利用空白样品去除背景离子后,在与 mzCloud 进行匹配鉴定时,按匹配得分应大于 80 分筛选代谢物;最终共鉴定得到 14 类 96 个代谢物。如图 2 所示,其中包括黄酮类 30 种(黄酮 12 种、黄烷酮 4 种、黄酮醇 4 种、

黄酮苷 10 种);氨基酸及其衍生物 18 种(*L*-酪氨酸、*L*-组氨酸等)、核苷酸及其衍生物 7 种(腺苷酸、尿嘧啶等)、酚酸类 6 种(没食子酸、咖啡酸等)、有机酸类 5 种(曲酸、柠檬酸等)、生物碱 5 种(可可碱、甜菜碱等)、其它类 5 种(大黄素、12 氧代植物二烯酸等)、杂环化合物 4 种(2-吡啶酮、3-羟基-2-甲基吡啶等)、芳烃类 4 种(肉桂酸甲酯、鞣花酸等)、木脂素 3 种(罗汉松酯素、香豆素等)、脂质 3 种( $\alpha$ -桐酸、 $\alpha$ -亚麻酸等)、碳水化合物 2 种(葡萄糖酸、*D*-葡糖-6-磷酸)、萜类 2 种(脱落酸、积雪草酸)、维生素 2 种(烟酸、胆碱)。

### 2.3 差异代谢物筛选

为研究 3 种贵州红茶间的品种差异,将鉴定得到的 96 个代谢物进行差异代谢物的筛选,根据差异倍数 (Fold change, FC)、变量影响投影 (Variable influence on projection, VIP)、*P* 值进行筛选,筛选条件有  $P < 0.05$  且  $\log_2 FC > 1$ 、 $VIP > 1$ ,共得到 23 个代谢物在 3 种茶叶中存在差异 (表 1),分别为 3 个单体儿茶素类、3 个黄酮类、3 个黄

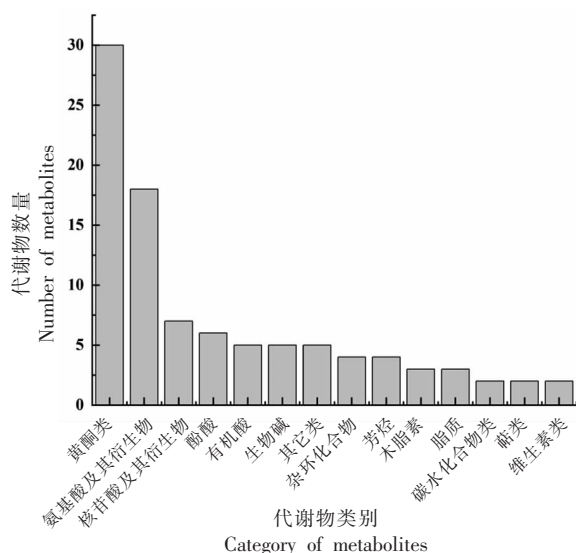


图 2 3 种贵州红茶中总的代谢物

Fig.2 Total metabolites in 3 kinds of Guizhou black tea

酮醇类、6 个黄酮苷类、4 个有机酸类、3 个生物碱、以及 1 个木脂素类化合物。

表 1 3 种贵州红茶的 23 种差异代谢物

Table 1 23 differential metabolites among three kinds of Guizhou black tea

| 序号 | 物质名称                            | 保留时间/min | 分子式   | 加和离子               | <i>m/z</i> |           | 质量误差 $\times 10^6$ | $MS^2$ 离子碎片            |
|----|---------------------------------|----------|---|--------------------|------------|-----------|--------------------|------------------------|
|    |                                 |          |   |                    | 测定值        | 理论值       |                    |                        |
| 1  | Betaine<br>甜菜碱                  | 1.347    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>              | [M+H] <sup>+</sup> | 117.07923  | 117.07898 | 2.18               | 58.06594<br>118.08665  |
| 2  | 7-Methylxanthine<br>7-甲基黄嘌呤     | 3.109    | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | 166.04913  | 166.04908 | 0.33               | 124.05083<br>150.03009 |
| 3  | Kojic acid<br>曲酸                | 5.953    | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 142.02667  | 142.02661 | 0.42               | 97.02897<br>125.02388  |
| 4  | Catechin<br>儿茶素                 | 7.517    | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>              | [M-H] <sup>-</sup> | 290.07915  | 290.07904 | 0.40               | 109.02840<br>125.02333 |
| 5  | (-)-Epicatechin<br>表儿茶素         | 7.563    | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>              | [M+H] <sup>+</sup> | 290.07885  | 290.07904 | -0.64              | 123.04433<br>139.03906 |
| 6  | Caffeic acid<br>咖啡酸             | 8.700    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 180.04156  | 180.04226 | -3.89              | 134.03733<br>135.04410 |
| 7  | Neochlorogenic acid<br>新绿原酸     | 8.704    | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>              | [M-H] <sup>-</sup> | 354.09514  | 354.09508 | 0.15               | 135.04410<br>191.05611 |
| 8  | (-)-Epigallocatechin<br>表没食子儿茶素 | 9.513    | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>              | [M+H] <sup>+</sup> | 306.07369  | 306.07395 | -0.85              | 139.03903<br>181.04954 |

(续表 1)

| 序号 | 物质名称                                | 保留时间/min | 分子式   | 加和离子                | <i>m/z</i> |           | 质量误差×<br>10 <sup>6</sup> | MS <sup>2</sup> 离子<br>碎片 |
|----|-------------------------------------|----------|---|---------------------|------------|-----------|--------------------------|--------------------------|
|    |                                     |          |   |                     | 测定值        | 理论值       |                          |                          |
| 9  | Coumarin<br>香豆素                     | 12.637   | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>    | [M+H] <sup>+</sup>  | 146.03681  | 146.03678 | 0.20                     | 91.05479<br>103.05465    |
| 10 | Prunin<br>柚皮素-7-O-葡萄糖苷              | 13.437   | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | [M+Na] <sup>+</sup> | 434.12133  | 434.12130 | 0.07                     | 153.01836<br>273.07562   |
| 11 | Maesopsin<br>墨沙酮                    | 13.464   | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | [M-H] <sup>-</sup>  | 288.06352  | 288.06339 | 0.46                     | 107.01288<br>125.02345   |
| 12 | Naringin<br>柚皮苷                     | 13.634   | C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub> | [M-H] <sup>-</sup>  | 580.17933  | 580.17921 | 0.21                     | 125.02442<br>169.01425   |
| 13 | Naringenin<br>柚皮素                   | 13.690   | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>  | 272.06820  | 272.06847 | -1.02                    | 91.05488<br>147.04417    |
| 14 | Rutin<br>芦丁                         | 13.818   | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | [M-H] <sup>-</sup>  | 610.15368  | 610.15338 | 0.48                     | 151.00266<br>300.02734   |
| 15 | Quercetin-3β-D-glucoside<br>异槲皮苷    | 13.843   | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | [M-H] <sup>-</sup>  | 464.09575  | 464.09548 | 0.60                     | 151.00266<br>301.03528   |
| 16 | Quercetin<br>槲皮素                    | 13.881   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>  | 302.04234  | 302.04265 | -1.04                    | 153.01836<br>229.04967   |
| 17 | 4,5-Dicaffeoylquinic acid<br>异绿原酸 C | 14.250   | C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> | [M-H] <sup>-</sup>  | 516.12647  | 516.12678 | -0.60                    | 173.04465<br>353.08762   |
| 18 | Kaempferol<br>山奈酚                   | 14.600   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>  | 286.04743  | 286.04774 | -1.07                    | 121.02866<br>153.01839   |
| 19 | Salsolinol<br>去甲猪毛菜碱                | 17.461   | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> | [M-H] <sup>-</sup>  | 179.09391  | 179.09463 | -3.99                    | 178.08658                |
| 20 | Quercitrin<br>槲皮苷                   | 17.462   | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | [M+H] <sup>+</sup>  | 448.10054  | 448.10056 | -0.05                    | 153.01842<br>285.03936   |
| 21 | Afzelin<br>山奈酚-3-O-鼠李糖苷             | 18.102   | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | [M+H] <sup>+</sup>  | 432.10567  | 432.10565 | 0.05                     | 165.01823<br>287.05487   |
| 22 | Luteolin<br>木犀草素                    | 18.322   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | [M-H] <sup>-</sup>  | 286.04781  | 286.04774 | 0.25                     | 133.02837<br>285.04068   |
| 23 | Hispidulin<br>高车前素                  | 18.838   | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | [M-H] <sup>-</sup>  | 300.06337  | 300.06339 | -0.05                    | 284.03250<br>299.05576   |

#### 2.4 3种贵州红茶的代谢物分布特征分析

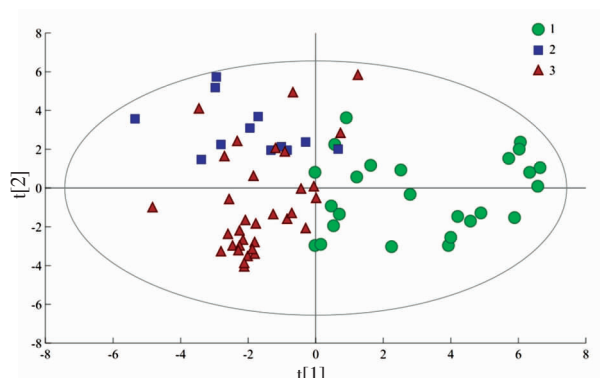
如图3所示,将23种差异代谢物的数据信息经预处理后导入SIMCA14.1进行主成分分析,拟合后得到 $R^2_x=0.847>0.5$ ,则说明方程的拟合性好,以及 $Q^2=0.582$ ,说明方程的预测性也较好。PCA是一种无监督的分析方法,可以直观的显示样品间的分组和相似性,PCA得分图中样本间的距离越近则说明代谢物的含量丰度越相似。3种贵州红茶在PCA图上被投射为不同形状的小点,

3种红茶基本得到了区分。普安红与石阡苔茶、遵义红区分得较好,说明代谢物的差异较明显。石阡苔茶和遵义红茶有部分重叠的情况,提示2种茶叶某些样品间的代谢物具有相似性。

图4是根据3种贵州红茶差异代谢物的PCA得分图得到的载荷图。可以利用主成分载荷图上变量的分布来说明相同方向上的主成分的构成情况<sup>[1]</sup>。横坐标主成分1的正轴主要分布的物质主要有槲皮素及其糖苷衍生物、有机酸类、生物碱类

组分,对应普安红茶;负轴分布的主要物质为柚皮黄酮类组分,对应遵义红茶和石阡苔茶;纵坐标主成分 2 的负轴分布的主要物质为柚皮黄酮类组分,对应遵义红茶;因此,槲皮素及其糖苷衍生物、

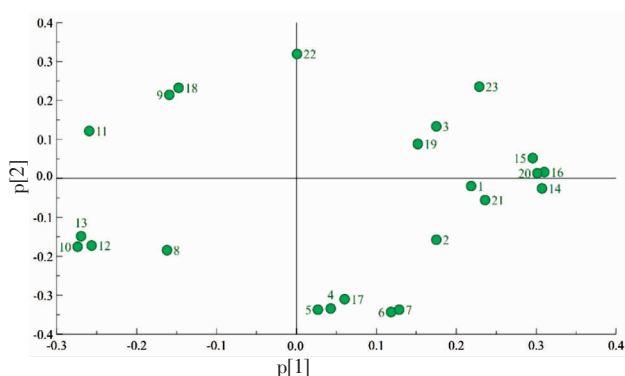
有机酸类、生物碱类、柚皮黄酮类组分可能是普安红茶区别于遵义红茶和石阡苔茶的主要代谢特征物,而柚皮黄酮类化合物组分可能为遵义红茶和石阡苔茶的区别代谢特征物。



注:1:普安红茶;2:石阡苔茶;3:遵义红茶。

图 3 3 种贵州红茶基于 23 种差异代谢物的 PCA 得分图

Fig.3 PCA score chart of three kinds of Guizhou black tea based on 23 differential metabolites



注:图中数字为表 1 中序号。

图 4 3 种贵州红茶的差异代谢物载荷图

Fig.4 Loading plots of differential metabolites of three kinds of Guizhou black tea

2.5 3 种贵州红茶的差异代谢物的代谢特征分析  
将 3 种贵州红茶间的 96 种代谢物限定在  $P <$

0.05 且  $|\log_2FC| > 1$  条件中,利用 Origin 软件做出火山图。

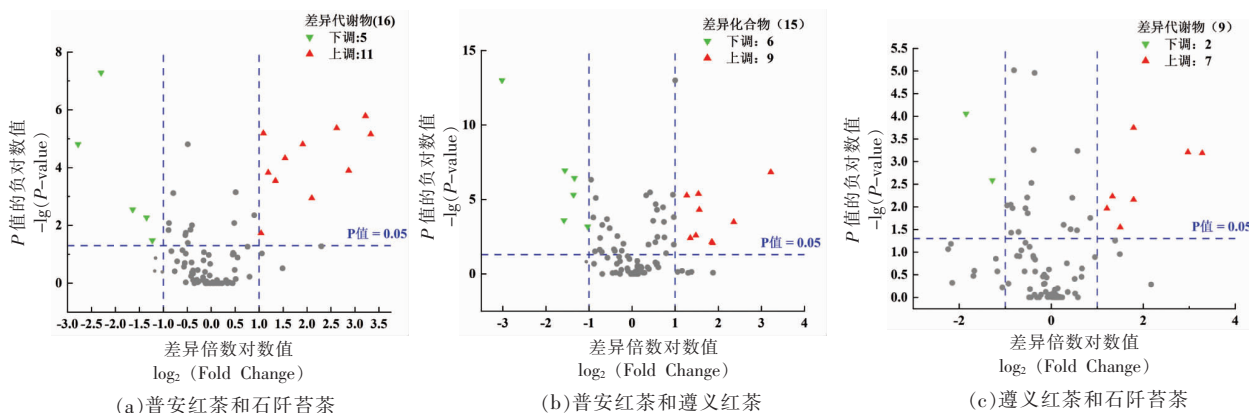
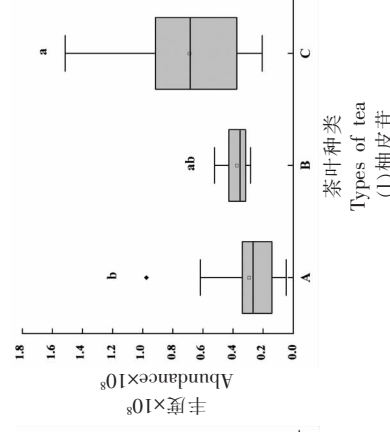
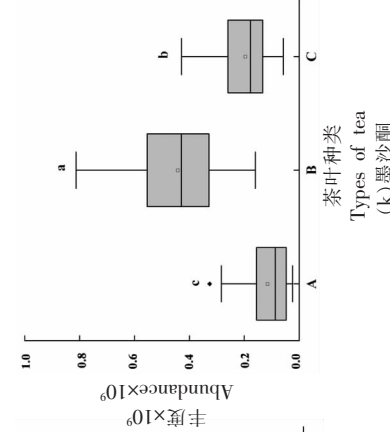
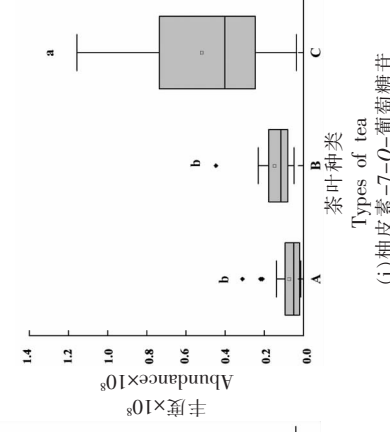
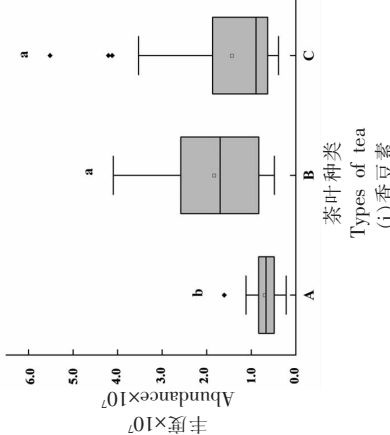
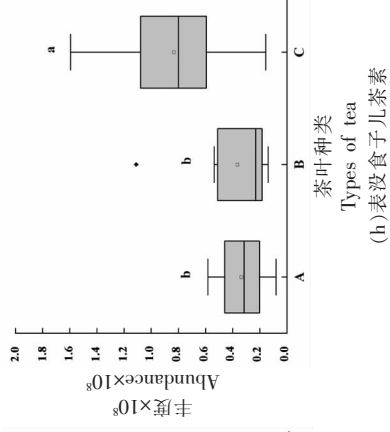
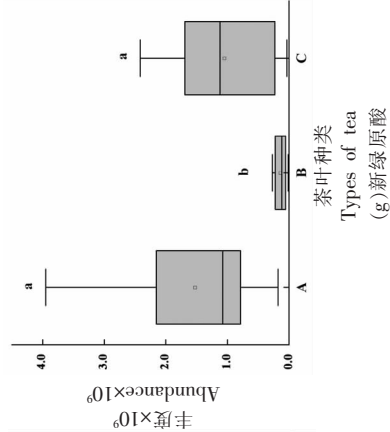
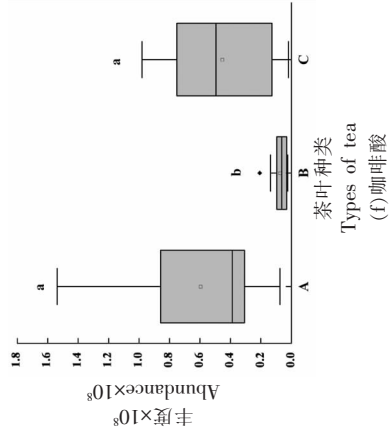
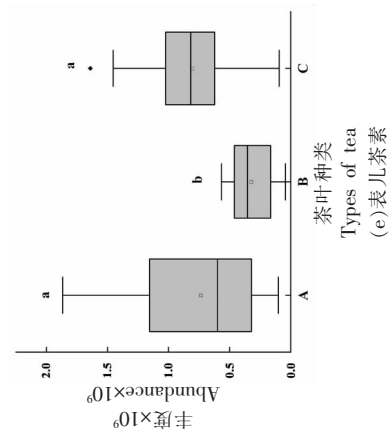
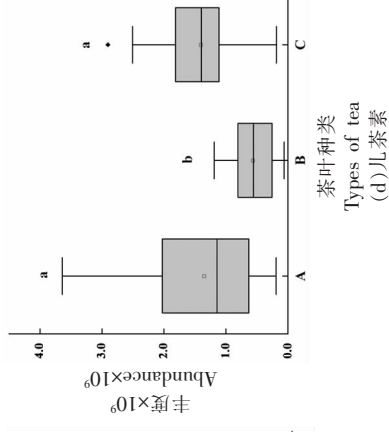
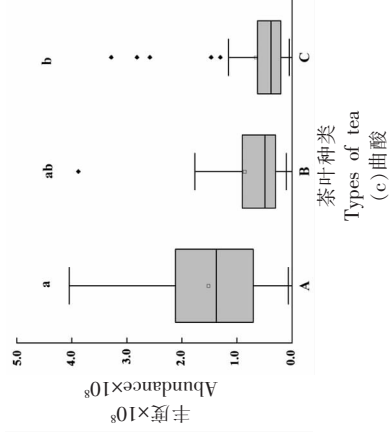
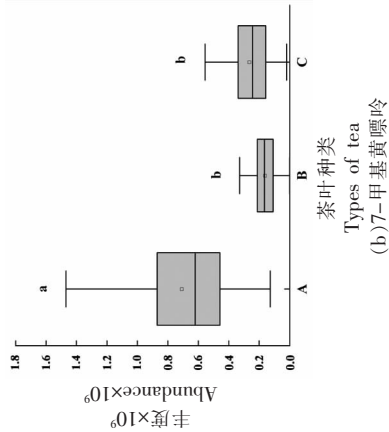
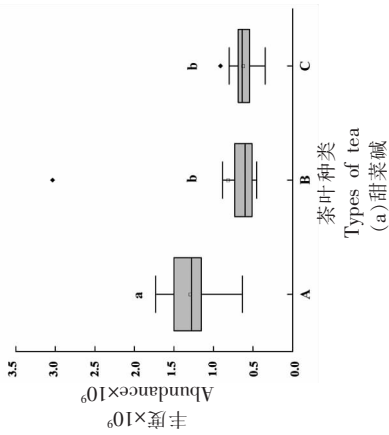


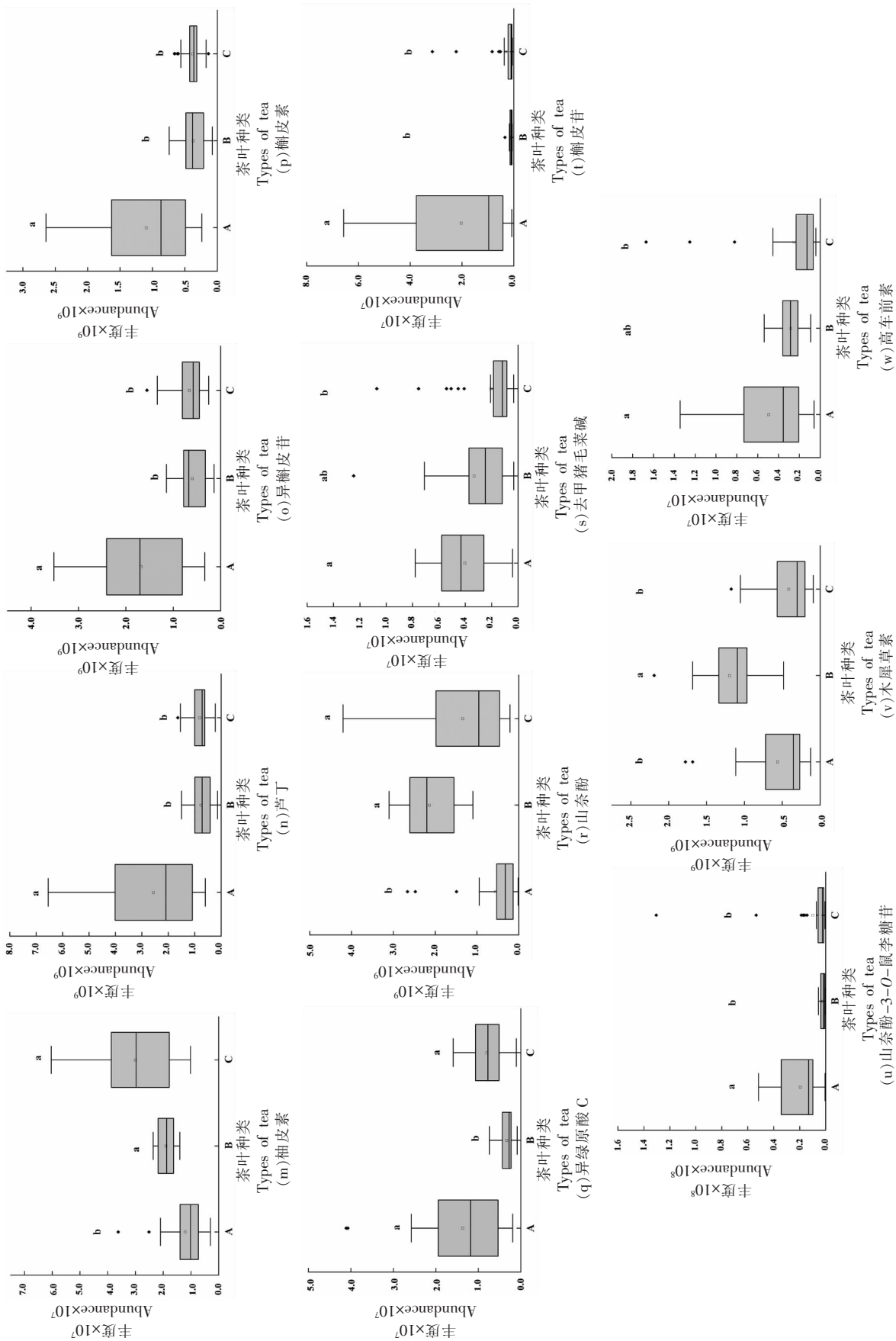
图 5 3 种贵州红茶的代谢物火山图

Fig.5 Volcano plots of metabolites of three kinds of Guizhou black tea

在图 5a 的火山图中,普安红茶和石阡苔茶间共有 16 个差异代谢物。普安红茶与石阡苔茶相比较,普安红茶有 5 种代谢物含量是显著低于石阡苔茶,分别是山奈酚、柚皮素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、墨沙酮、香豆素,11 种代谢物含量显著高于石阡苔茶,分别是槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁、山奈酚-3-O-鼠李糖苷、甜菜碱、7-甲基黄嘌呤、儿茶素、咖啡酸、异绿原酸 C、新绿原酸。

图 5b 中,普安红茶和遵义红茶相比较,普安红茶和遵义红茶间共有 15 个差异代谢物。普安红茶有 6 种代谢物含量是显著低于遵义红茶,分别是山奈酚、柚皮素-7-O-葡萄糖苷、柚皮素、柚皮苷、表没食子儿茶素、墨沙酮,9 种代谢物含量是显著高于遵义红茶,分别是曲酸、山奈酚-3-O-鼠李糖苷、高车前素、槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁、7-甲基黄嘌呤、去甲猪毛菜碱。





注: A: 普安红茶, B: 石阡苔茶, C: 遵义红茶; 图中小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 6 3 种贵州红茶的 23 种差异代谢物的相对含量丰度

Fig.6 Relative abundance of 23 differential metabolites in three kinds of Guizhou black tea

图 5c 中,遵义红茶和石阡苔茶间则是 9 种差异代谢物,遵义红茶和石茶苔茶相比较,遵义红茶有 2 种代谢物含量是显著低于石阡苔茶的,分别是木犀草素、墨沙酮,7 种代谢物含量是显著高于石阡苔茶的,分别有表儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素、柚皮素-7-O-葡萄糖、咖啡酸、异绿原酸 C、新绿原酸。

为方便 3 种茶叶间进行数据对比,将数据整理成箱线图。普安红茶和遵义红茶的咖啡酸、新绿原酸和异绿原酸 C 的含量都显著高于石阡苔茶。新绿原酸和异绿原酸 C 是一类伴随存在的绿原酸类化合物,是由咖啡酸和奎宁酸缩合而成的酚酸类化合物<sup>[12]</sup>,酚酸是一类含有酚环的有机酸。有机酸的含量多的茶叶,酸度增大,有利于增强某些多酚氧化酶的活性,有助于红茶的发酵,可以促进茶叶优良品质以及某些香气物质的形成<sup>[13]</sup>,且酚酸类物质是合成酯型儿茶素的必要成分之一。根据 Chen 等<sup>[10]</sup>、朱文卿等<sup>[12]</sup>和张燕红<sup>[14]</sup>的研究成果,咖啡酸、绿原酸虽然在茶汤内含量较低,但与茶汤的酸味和涩味存在一定的协同作用,即会对茶汤的酸味、涩味起到一定的增强作用。

儿茶素是茶多酚的主要组成成分,约占总量的 60%左右,是茶汤中的重要滋味成分,遵义红茶中的儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)3 种非酯型儿茶素的含量显著高于石阡苔茶,茶汤的苦涩味受茶汤中的酯型儿茶素与非酯型儿茶素的比例和含量的影响,非酯型儿茶素的含量较高,则有茶汤的苦涩味会较弱一些,口感上会更爽口<sup>[15]</sup>。

在石阡苔茶中,木犀草素和墨沙酮的含量显著高于其它两种红茶。木犀草素是在自然界分布较广的一种天然黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等药理活性<sup>[16]</sup>。墨沙酮具有明显的神经元保护作用<sup>[17]</sup>,且在淋巴细胞刺激试验中表现出免疫抑制活性<sup>[18]</sup>。

黄酮类化合物是存在于自然界的一类黄色色素,是茶叶里的主要次生代谢产物,是茶汤中重要的呈味和呈色物质<sup>[19]</sup>。山奈酚、槲皮素和杨梅素是茶叶中主要存在的 3 种黄酮醇<sup>[20]</sup>,在普安红茶中,槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷和芦丁等槲皮素类化合物的含量显著高于遵义红茶和石阡苔茶的。李辛

雷等<sup>[21]</sup>的研究成果表明,异槲皮素和芦丁含量的增加能使茶汤显著变黄。在普安红中山奈酚-3-O-鼠李糖苷的含量也是最高的,Scharbert 等<sup>[22]</sup>的研究表明山奈酚-3-O-鼠李糖苷和异槲皮苷等黄酮醇-3-糖苷类物质能带来天鹅绒般的收敛味觉,同时协助咖啡因给茶汤带来苦味。黄酮苷类物质虽在鲜叶里的含量较低,但对人体有较强的生理作用。槲皮素类化合物具有抗癌作用,抗氧化功能、抗炎、降低血糖、保护心血管和神经的作用<sup>[23]</sup>。

普安红茶中 7-甲基黄嘌呤的含量在 3 种红茶中是最高的,7-甲基黄嘌呤是茶叶中生成可可碱、咖啡碱的中间产物<sup>[24]</sup>,而 7-甲基黄嘌呤的增加可以促进咖啡碱合成酶基因的表达,进而促进咖啡碱的合成<sup>[25]</sup>。而咖啡碱的存在可以局部抑制蛋白质和酚类结合而产生的凝固作用,有利于茶汤滋味的形成。

## 2.6 代谢通路分析

将鉴定得到的差异代谢物信息导入 MetaboAnalyst 5.0 在线软件进行代谢通路分析,则得到图 7 贵州红茶的差异代谢物的代谢通路图,则有主要涉及到的代谢通路有黄酮和黄酮醇生物合成(Flavone and flavonol biosynthesis, impact=1),类黄酮生物合成(Flavonoid biosynthesis, impact=0.11)。

考虑到 MetaboAnalyst 5.0 的通路分析仅限于利用模式生物拟南芥的代谢数据,则同时又根据

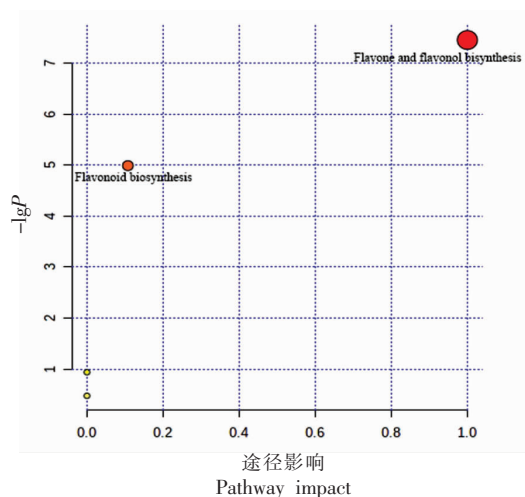


图 7 代谢通路分析

Fig.7 Analysis of metabolic pathway



Compound Discoverer 3.2 软件的 Metabolika 数据库对贵州红茶的差异物代谢通路进行进一步分析, 可得到主要代谢通路有黄酮及其衍生物生物合成通路 (Superpathway of flavones and derivatives biosynthesis) 和异黄酮通路 (通过柚皮素) (Superpathway of isoflavonoids [via naringenin])。

从代谢通路的分析结果可以发现, 黄酮类相关代谢是区分贵州 3 种红茶的主要代谢通路。黄酮类化合物属于多酚类物质, 是由苯丙烷代谢途径的一个特定分支合成的次级代谢产物, 而苯丙氨酸是这一途径的起始产物<sup>[26]</sup>。

### 3 结论

采用 UPLC-Q-Orbitrap 高分辨质谱分析贵州的 3 种红茶, 得到了 14 类 96 种代谢物, 其中含量较高的化合物是黄酮类和氨基酸及其衍生物, 黄酮类是茶叶中的重要呈色和呈味物质, 而氨基酸是茶汤里鲜味的重要来源, 也是茶叶香气的基础物质, 对美好滋味和香气的形成具有重要贡献<sup>[27-28]</sup>, 这两类物质对于形成贵州红茶的优良品质具有重要作用。利用多元统计分析筛选出了 3 种贵州红茶间的 23 种差异代谢物, 通过分析差异物的丰度可以得到普安红茶和遵义红茶中咖啡酸和绿原酸类物质的含量较高, 普安红茶中槲皮素类化合物的含量较高, 而石阡苔茶中含量较高的成分则是木犀草素和墨沙酮, 这些化合物可能是 3 种红茶形成自己独特滋味和品质的关键成分。代谢通路分析则提示, 主要影响 3 种红茶间差异的代谢通路是黄酮类化合物相关代谢通路。结果表明, 利用代谢组学的方法可寻找不同品种红茶间的代谢物差异, 利于不同品种茶叶间的鉴别。

### 参 考 文 献

- [1] LI T H, XU S S, WANG Y J, et al. Quality chemical analysis of crush-tear-curl (CTC) black tea from different geographical regions based on UHPLC-Orbitrap-MS[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(9): 3909-3925.
- [2] JIANG C K, MA J Q, APOSTOLIDES Z, et al. Metabolomics for a millenniums-old crop: Tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(23): 6445-6457.
- [3] JI H G, LEE Y R, LEE M S, et al. Metabolic phenotyping of various tea (*Camellia sinensis* L.) cultivars and understanding of their intrinsic metabolism[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 321-330.
- [4] DAI W D, XIE D C, LU M L, et al. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach[J]. Food Research International, 2017, 96: 40-45.
- [5] QI D D, MIAO A Q, CHEN W, et al. Characterization of the volatile compounds profile of the innovative broken oolong-black tea in comparison with broken oolong and broken black tea[J]. Food Control, 2021, 129: 108197.
- [6] YAN X T, ZHANG Y, ZHOU Y, et al. Technical overview of Orbitrap high resolution mass spectrometry and its application to the detection of small molecules in food (update since 2012)[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2020, 52(3): 1-34.
- [7] TAN J F, DAI W D, LU M L, et al. Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach[J]. Food Research International, 2016, 79: 106-113.
- [8] 徐春晖, 王远兴. 基于 UPLC-QTOF-MS 结合非靶向代谢组学鉴别 3 种江西名茶[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 316-323.
- [8] XU C H, WANG Y X. Discrimination of three famous tea in Jiangxi based on UPLC-QTOF-MS combined with non-targeted metabolomics[J]. Food Science, 2022, 43(2): 316-323.
- [9] 赵燕妮, 陈丹, 陈雪峰, 等. 基于脂质组学的不同原料茯茶“发花”前后脂类变化研究[J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(3): 40-47.
- [9] ZHAO Y N, CHEN D, CHEN X F, et al. Study on the change of lipids before and after fungal-fermentation process of Fu brick tea with different raw materials based on lipidomics[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2021, 39(3): 40-47.
- [10] CHEN L, LIU F, YANG Y F, et al. Oxygen-enriched fermentation improves the taste of black tea by reducing the bitter and astringent metabolites[J].

- Food Research International (Ottawa, Ont.), 2021, 148: 110613.
- [11] SHEVCHUK A, JAYASINGHE L, KUHNERT N. Differentiation of black tea infusions according to origin, processing and botanical varieties using multivariate statistical analysis of LC-MS data[J]. Food Research International, 2018, 109: 387-402.
- [12] 朱文卿, 任汉书, 徐美霞, 等. 咖啡酰奎宁酸类化合物的生物学活性及提高其生物利用度技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 321-329.
- ZHU W Q, REN H S, XU M X, et al. Advances in research on biological activity and bioavailability of caffeoylquinic acids[J]. Food Science, 2021, 42(3): 321-329.
- [13] 周宇飞, 徐帅, 杨益欢, 等. 茶叶中有机酸对茶品质的影响及其检测方法研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(5): 254-259.
- ZHOU Y F, XU S, YANG Y H, et al. Research progress on the effect of organic acids on tea quality and their detection methods in tea[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(5): 254-259.
- [14] 张燕红. 典型酚酸类化合物的呈味特性及对绿茶茶汤苦涩味的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- ZHANG Y H. The taste characteristics of typical phenolic acids and their effects on the bitterness and astringency of green tea infusion[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [15] 石玉涛, 陈金磊, 肖秀丹, 等. 加工工艺对香茶儿茶素组分含量的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 70-76.
- SHI Y T, CHEN J L, XIAO X D, et al. Effect of processing technology on the components of catechin in fragrant tea [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(5): 70-76.
- [16] TAHERI Y, SHARIFI-RAD J, ANTIKA G, et al. Paving luteolin therapeutic potentialities and agro-food-pharma applications: Emphasis on pharmacological effects and bioavailability traits[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 1987588.
- [17] XIANG L, LEI F, XING D M, et al. Neuron protective constituents from *Rheum nanum* and *Rheum sublancoletum*[J]. Tsinghua Science & Technology, 2005, 10(4): 426-429.
- [18] VEITCH N C, GRAYER R J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins[J]. Natural Product Reports, 2008, 25(3): 555-611.
- [19] 张纪伟, 沈雪梅, 赵一帆, 等. 不同贮存年份普洱生茶中3种主要黄酮醇类化合物含量的变化[J]. 西南农业学报, 2021, 34(9): 1853-1857.
- ZHANG J W, SHEN X M, ZHAO Y F, et al. Changes in content of three main flavonoids in raw Pu-erh tea with different storage years[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(9): 1853-1857.
- [20] HE H F, WEI K, YIN J F, et al. Insight into tea flavonoids: Composition and chemistry[J]. Food Reviews International, 2021, 37(8): 812-823.
- [21] 李辛雷, 王佳童, 孙振元, 等. 金花茶和白色山茶及其3个杂交品种类黄酮成分与花色的关系[J]. 园艺学报, 2019, 46(6): 1145-1154.
- LI X L, WANG J T, SUN Z Y, et al. Flavonoid components and their effects on flower colors in *Camellia nitidissima*, white *C. japonica* and their three hybrid cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(6): 1145-1154.
- [22] SCHARBERT S, HOFMANN T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(13): 5377-5384.
- [23] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. 槲皮素研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5185-5193.
- FENG Y L, LI H, LIU J, et al. Research progress on therapeutic potential of quercetin[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(20): 5185-5193.
- [24] 周晨阳, 金基强, 姚明哲, 等. 茶树等植物中嘌呤生物碱代谢研究进展[J]. 茶叶科学, 2011, 31(2): 87-94.
- ZHOU C Y, JIN J Q, YAO M Z, et al. Progress on purine alkaloids metabolism in tea and other plants[J]. Journal of Tea Science, 2011, 31(2): 87-94.
- [25] 田奥磊. 武夷岩茶大红袍茶氨酸和咖啡碱代谢生理特性研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2018.
- TIAN A L. Study on the physiological characteristics of theanine and caffeine metabolism in Dahongpao [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2018.
- [26] LI X, ZHANG L P, ZHANG L, et al. Methyl salicylate enhances flavonoid biosynthesis in tea leaves by stimulating the phenylpropanoid pathway [J].

- Molecules, 2019, 24(2): 362.
- [27] LI D, LI C Y, HU C J, et al. Study on the accumulation mechanism of amino acids during bruising and withering treatment of Oolong tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (47): 14071-14080.
- [28] HO C T, ZHENG X, LI S, et al. Tea aroma formation[J]. Food Science & Human Wellness, 2015, 4(1): 9-27.

### Analysis of Quality Characteristics of Guizhou Black Tea Based on UPLC-Q-Orbitrap High-resolution Mass Spectrometry

Jiang Xun<sup>1,2,3</sup>, Tao Hui<sup>1</sup>, Song Jieyu<sup>1</sup>, Xu Chan<sup>1</sup>, Sun Xiaohong<sup>1</sup>, Li Zhanbin<sup>2</sup>, Yang Hongbo<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025

<sup>2</sup>Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550000

<sup>3</sup>Department of Vector Disinfection, Kunming City Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228)

**Abstract** Guizhou black tea has excellent quality due to its ecological advantages. In order to have an insight into the quality characteristics of Guizhou black tea, non-targeted metabolomics analysis for the nonvolatile tea metabolite of three representative of Guizhou black tea (Zunyi red tea, Pu'an red tea, Shiqian moss tea) was conducted by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap). The results showed that 96 metabolites contained in three kinds of Guizhou black teas were identified through chromatographic mass spectrometry analysis, including flavonoids, amino acids and their derivatives, nucleotides and their derivatives, and phenolic acids. According to the principal component analysis (PCA), the three kinds of Guizhou black tea can be effectively distinguished, and it is concluded that there were significant differences between different varieties of black tea. Then, 23 kinds of differential metabolites among the three kinds of Guizhou black tea were screened out according to the FC value, *P* value and VIP value. Metabolic pathway analysis shows that its main metabolic pathway is the metabolism of flavonoids, which may be the reason for the differences in the taste of the three kinds of black teas. This study revealed the differential metabolites of the three kinds of Guizhou black teas from the perspective of metabolomics, and provided a reference for the identification of tea varieties.

**Keywords** high-resolution mass spectrometry; Guizhou black tea; principal component analysis; differential metabolites