

## 绿茶中 21 种黄酮醇糖苷类化合物的鉴别及地理溯源

黄永桥<sup>1</sup>, 高亮<sup>2</sup>, 吴新文<sup>1</sup>, 李占彬<sup>2</sup>, 杨昌彪<sup>2</sup>, 毛敏霞<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 贵州省检测技术研究应用中心 贵阳 550014

<sup>2</sup> 贵州省分析测试研究院 贵阳 550014)

**摘要** 分析 6 个产地绿茶中黄酮醇糖苷类化合物种类和含量差异,探究黄酮醇糖苷类化合物对绿茶地理溯源的可行性分析。采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)对黄酮醇糖苷类化合物进行定性鉴别,建立起超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)测定绿茶中黄酮醇糖苷类化合物的定量分析方法。共鉴别出 21 种黄酮醇糖苷类化合物,包括 5 种杨梅素糖苷、8 种槲皮素糖苷和 8 种山奈素糖苷,定量分析结果表明不同产地绿茶中黄酮醇糖苷类化合物含量存在差异,K-glu-rha-glu 含量最高,占总含量的 33.1%~57.8%;山奈素糖苷含量最高,杨梅素糖苷含量最低。通过对 6 个地区绿茶中黄酮醇糖苷类化合物的差异性及相关性的分析结果可以用于茶叶地理溯源;PCA 能有效的区分不同产地的绿茶;BP-ANN 识别的准确率为 100.0%,且得到 2 种规范化的重要性为 100%的黄酮醇糖苷类化合物标记物( $P<0.05$ );PLS-DA 模型预测能力为 78.2%,筛选出了 8 种标志物(VIP>1);LSD 模型的整体判别准确率为 100%,交叉验证结果准确率为 100%。本研究结果为茶叶地理溯源和化学分类提供了数据参考。

**关键词** UPLC-Q-Orbitrap HRMS; UPLC-MS/MS; 茶叶; 黄酮醇糖苷类化合物; 鉴别; 地理溯源

**文章编号** 1009-7848(2024)02-0315-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.02.030

茶在中国有着悠久的饮用历史,茶的各种生物活性、健康益处及独特的口感使其成为世界上广泛消费的饮料<sup>[1]</sup>。茶叶中富含儿茶素、黄酮醇、茶黄素等酚类化合物,其中黄酮醇糖苷类化合物(Flavonol glycosides, FGs)主要以糖苷的形式存在,在黄酮醇母体苷元的 C-3 位有糖分子部分,黄酮醇母体苷元主要有杨梅素苷、槲皮素苷和山奈素苷,糖分子分为单糖(葡萄糖、半乳糖、鼠李糖等)、二糖和三糖<sup>[2-3]</sup>。迄今为止,已报道的茶叶中黄酮醇糖苷类化合物有 20 多种<sup>[4-6]</sup>。

黄酮醇糖苷类化合物在生理活性方面有一定的功效,如抗氧化、降血脂、清除自由基、抵御紫外线、抗菌、抗癌、体重调节、维持骨密度和神经保护活性等生理功能<sup>[7-9]</sup>。有研究发现黄酮醇糖苷类化合物味觉阈值极低,呈苦涩味,对茶汤的苦涩味贡献较大,对茶汤中咖啡因的苦味具有正向增强作用;同时对茶汤的滋味和色泽等感官品质具有重要作用<sup>[10-12]</sup>。有学者提出黄酮醇糖苷类化合物与儿

茶素相比,它们的稳定性相对较高,被认为是 1 组有研究价值的生物标志物,用于区分茶叶的产地或品种<sup>[13-14]</sup>。

液相色谱-紫外检测因成本低且易操作,被广泛用于茶叶和饮料中酚类化合物的识别和定量分析<sup>[15-16]</sup>。然而,由于液相色谱法灵敏度较差且易受干扰,很难对茶叶中低含量的黄酮醇糖苷类化合物进行有效分离和准确定量。液相色谱-质谱联用仪技术具有选择性好、灵敏度高、分辨率好、重复性好等优点,是茶叶中黄酮醇糖苷类化合物分析常用的检测方法<sup>[17-18]</sup>。三重四极杆质谱仪(Triple quadrupole mass spectrometry, QQQ-MS/MS)可以产生分子、离子的特征产物离子,有良好的灵敏度和选择性,适用于目标物的定量分析<sup>[4,18-19]</sup>。四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(Quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, Q-Orbitrap HRMS)是一种高分辨率、宽质量范围和高灵敏度的方法,能对化合物进行精确质量数测定,适用于目标物与未知物的识别和筛查<sup>[20-21]</sup>。

本研究探讨用黄酮醇糖苷类化合物含量来分析绿茶地理溯源的可行性,通过高分辨质谱仪结合三重四极杆质谱仪,建立 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合 UPLC-QQQ-MS/MS 分析茶叶中 21 种

收稿日期: 2023-02-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072446);贵州省科技计划项目(黔科中引地[2021]4026)

第一作者: 黄永桥,男,本科,工程师

通信作者: 毛敏霞 E-mail: mmx0467@163.com

黄酮醇苷类化合物的鉴别和定量方法。对不同地区绿茶中黄酮醇苷类化合物含量进行测定和比较,分析绿茶中黄酮醇苷类化合物的差异性及相关性。采用主成分分析(Principal component analysis, PCA)、方向传播算法-人工神经网络(Back propagation-artificial neural network, BP-ANN)、偏最小二乘法判别(Partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、线性判别(Linear discriminant analysis, LSD)等化学计量学分析模型,探究黄酮醇苷类化合物的差异性及相关性对绿茶产地判别及溯源的可行性分析,筛选重要化学标记,以期茶叶指纹图谱和化学判别提供依据,为茶叶地理溯源研究和化学分类提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈(色谱纯级),德国默克公司;甲酸(色谱纯级),上海安谱实验科技股份有限公司;实验室用水为 Milli-Q 纯水机制备。

槲皮素-3-O-葡萄糖-鼠李糖糖苷(Q-glu-rha)标准品、槲皮素-3-O-半乳糖糖苷(Q-gal)标准品、槲皮素-3-O-葡萄糖糖苷(Q-glu)标准品、山奈素-3-O-葡萄糖-鼠李糖糖苷(K-glu-rha)标准品、山奈素-3-O-葡萄糖糖苷(K-glu)标准品,均 $\geq 98\%$ ,上海安谱实验科技股份有限公司。

茶叶样品分别购自贵州省6个地州市茶叶生产企业生产的40批次绿茶,均选取当地茶叶进行生产的绿茶,其中遵义地区13批次;铜仁地区4批次;黔南地区6批次;黔西南地区4批次;贵阳地区5批次;黔东南地区8批次。

### 1.2 仪器与设备

6470A 三重四级杆质谱仪、1290 超高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Q-Exactive HF-X 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统及 Dionex UltiMate 3000 快速高效液相色谱系统,美国 Thermo-Fisher 公司;GM200 刀式研磨粉碎仪,德国 Retsch 公司;超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;UMV-2 多管涡旋混合器,北京普立泰科仪器有限公司;Milli-Q 纯水机,美国 Millipore 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制 准确称取 Q-glu-rha、Q-gal、Q-glu、K-glu-rha 和 K-glu 标准品,分别用甲醇配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的储备液;于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。储备液用 70% 甲醇溶液稀释至质量浓度为 0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  制备标准工作液,临用现配。

#### 1.3.2 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析条件

1.3.2.1 色谱 ZORBAX Eclipse Plus-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相 A:0.1% 乙酸水溶液, B:乙腈;流速:0.3 mL/min;柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;进样量:5.0  $\mu\text{L}$ ;梯度洗脱:0.0~2.0 min, 2% B;2.0~8.0 min, 2%~20% B;8.0~28.0 min, 20%~65% B;28.0~35.0 min, 65%~98% B;35.0~37.0 min, 98% B;37.0~37.1 min, 98%~2% B;37.1~40.0 min, 2% B。

1.3.2.2 质谱 加热电喷雾离子源(HESI),负离子模式;离子源温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;离子传输管温度: $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;喷雾电压:3.5 kV;鞘气流速:180 mL/min,辅助气:45 mL/min;扫描模式:Full MS-ddMS<sup>2</sup>;采集范围: $m/z$  100~900;一级扫描分辨率:70 000;二级子离子扫描分辨率:17 500;归一化碰撞能量(NCEs):40 eV,黄酮醇糖苷类化合物质谱信息见表 1。

#### 1.3.3 UPLC-QQQ-MS/MS 分析条件

1.3.3.1 色谱 ZORBAX Eclipse Plus-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相 A:0.1% 乙酸水溶液, B:乙腈;流速:0.3 mL/min;柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;进样量:2.0  $\mu\text{L}$ ;梯度洗脱:0~0.5 min, 5% B;0.5~2.0 min, 5%~16% B;2.0~3.0 min, 16% B;3.0~13.0 min, 16%~18.5% B;13.0~13.5 min, 18.5%~20.0% B;13.5~14.5 min, 20%~60% B;14.5~15.0 min, 60%~90% B;15.0~17.0 min, 90% B;17.0~17.1 min, 90%~5% B;17.1~20.0 min, 5% B。

1.3.3.2 质谱 电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式;多反应监测(MRM);毛细管电压:-3.5 kV;雾化器压力:68.95 kPa;干燥气和鞘气流速:10 L/min;干燥气和鞘气温度: $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;子离子均选取脱去糖苷后的骨架苷元离子。

1.3.4 样品前处理 茶叶样品经粉碎后过 425  $\mu\text{m}$  孔径的筛子,称取试样 1.00 g 于 50 mL 离心管

表 1 黄酮醇糖苷类化合物的定性、定量分析质谱参数  
Table 1 Qualitative and quantitative analysis of flavonol glycosides mass spectrometry parameters

序号	化合物	缩写	分子式	保留 时间/ min	相对分子 质量	Q-Orbitrap HRMS		QQQ-MS/MS		碰撞 能量/ eV	
						[M-H] <sup>-</sup> 理论 分子质量/ $m \cdot z^{-1}$	[M-H] <sup>-</sup> 测量 分子质量/ $m \cdot z^{-1}$	母离子 [M-H] <sup>-</sup> / $m \cdot z^{-1}$	去簇 电压/ V		
1	杨梅素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-半乳糖苷	M-gal-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>22</sub>	4.38	788.20112	787.19385	787.19409	787	170	317	40
2	杨梅素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷	M-glu-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>22</sub>	4.52	788.20112	787.19385	787.19409	787	170	317	40
3	杨梅素-3-O-鼠李糖-葡萄糖苷	M-rha-glu	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	4.68	626.14830	625.14102	625.14105	625	100	317	35
4	杨梅素-3-O-半乳糖苷	M-gal	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	4.87	480.09039	479.08311	479.08313	479	100	317	23
5	杨梅素-3-O-葡萄糖苷	M-glu	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	5.03	480.09039	479.08311	479.08313	479	100	317	23
6	槲皮素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-半乳糖苷	Q-gal-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	5.41	772.20621	771.19893	771.19928	771	230	301	40
7	槲皮素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷	Q-glu-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	5.65	772.20621	771.19893	771.19928	771	230	301	40
8	槲皮素-3-O-鼠李糖-半乳糖苷	Q-gal-rha-rha	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	6.02	756.21129	755.20402	755.20416	755	230	301	40
9	槲皮素-3-O-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖苷	Q-glu-rha-rha	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	6.28	756.21129	755.20402	755.20416	755	230	301	40
10	槲皮素-3-O-鼠李糖-半乳糖苷	Q-gal-rha	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	6.64	610.15338	609.14611	609.14569	609	170	301	40
11	槲皮素-3-O-鼠李糖-葡萄糖苷	Q-glu-rha	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	6.99	610.15338	609.14611	609.14569	609	170	301	40
12	槲皮素-3-O-半乳糖苷	Q-gal	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	7.37	464.09548	463.08820	463.08829	463	140	301	22
13	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	Q-glu	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	7.64	464.09548	463.08820	463.08829	463	140	301	22
14	山奈素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-半乳糖苷	K-gal-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	7.95	756.21129	755.20402	755.20410	755	160	285	35
15	山奈素-3-O-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖苷	K-glu-rha-glu	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	8.26	756.21129	755.20402	755.20410	755	160	285	35
16	山奈素-3-O-鼠李糖-半乳糖苷	K-gal-rha-rha	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	8.97	740.21638	739.20910	739.20959	739	739	285	35
17	山奈素-3-O-鼠李糖-葡萄糖-半乳糖苷	K-glu-rha-rha	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	9.25	740.21638	739.20910	739.20959	739	739	285	35
18	山奈素-3-O-鼠李糖-半乳糖苷	K-gal-rha	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	9.80	594.15847	593.15119	593.15100	593	170	285	35
19	山奈素-3-O-鼠李糖-葡萄糖苷	K-glu-rha	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	10.09	594.15847	593.15119	593.15100	593	170	285	35
20	山奈素-3-O-半乳糖苷	K-gal	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	10.63	448.10056	447.09328	447.09329	447	135	285	21
21	山奈素-3-O-葡萄糖苷	K-glu	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	10.88	448.10056	447.09328	447.09329	447	135	285	21

中,准确加入 30 mL 70%甲醇溶液,超声 15 min,涡旋振荡 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液过膜上机。

1.3.5 数据处理 试验数据计算采用 Excel 2016 版;图谱绘制和主成分分析采用 Origin 2018 版;化学结构式绘制采用 ChemDraw 7.0 版;差异显著性分析、方向传播算法-人工神经网络分析和线性判别采用 SPSS 22.0 版;偏最小二乘判别分析使用 SIMCA 14.1 版。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄酮醇糖苷类化合物的色谱分离

茶叶中富含较多氨基酸、有机酸、茶多酚(如儿茶素、茶黄素类、黄酮类及黄酮醇类)等成分。为了有效地对茶叶中的黄酮醇糖苷类化合物进行分离,试验选用 150 mm×1.8 μm 的色谱柱,并对流动相组成进及其洗脱梯度行了对比优化,当使用乙腈-0.1%乙酸水做为流动相,采用梯度洗脱 21 种化合物全部洗脱出来,且有较好的分离度,图 1 为绿茶样品色谱图。

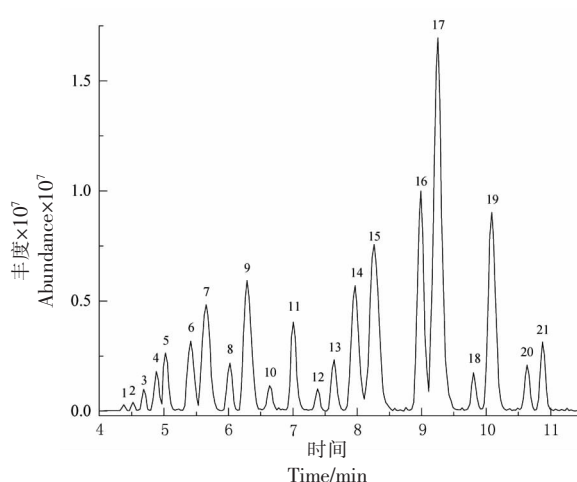
### 2.2 黄酮醇糖苷类化合物的识别

根据化合物的结构规律及裂解规律,结构式中减少不同的取代基,其质量数会相应减少。如羟基减少 16 u、葡萄糖及半乳糖减少 162 u、鼠李糖减少 146 u、阿拉伯糖减少 132 u 等<sup>[5,22-24]</sup>。研究表明<sup>[2-3,18,25]</sup>,半乳糖和葡萄糖为同分异构体,在液相色谱有效的分离条件下,半乳糖的糖苷色谱峰时间会早于葡萄糖的糖苷,说明在极性上半乳糖>葡萄糖。

研究采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 对黄酮醇糖苷类化合物进行分析,根据其结构规律及裂解规律、与有标准物质的化合物进行比较(色谱图上的保留时间、母离子及其特征碎片离子)分析,并与相关文献进行比对,最终对 21 种黄酮醇糖苷类化合物进行识别确认。图 2 为 Q-glu-rha-glu 二级质谱图。

### 2.3 UHPLC-QQQ-MS/MS 方法学验证

使用购买的 5 种标准物质建立的定量方法进行方法学验证,选取同一茶样,按建立的分析方法分别进行标准曲线、重复性和加标回收试验。结果表明,在质量浓度 0.02~10.00 μg/mL 的范围内,相



注:1. M-gal-rha-glu;2. M-glu-rha-glu;3. M-rha-glu;4. M-gal;5. M-glu;6. Q-gal-rha-glu;7. Q-glu-rha-glu;8. Q-gal-rha-rha;9. Q-glu-rha-rha;10. Q-gal-rha;11. Q-glu-rha;12. Q-gal;13. Q-glu;14. K-gal-rha-glu;15. K-glu-rha-glu;16. K-gal-rha-rha;17. K-glu-rha-rha;18. K-gal-rha;19. K-glu-rha;20. K-gal;21. K-glu。

图 1 绿茶中 21 种黄酮醇糖苷类化合物的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 21 flavonol glycosides in green tea

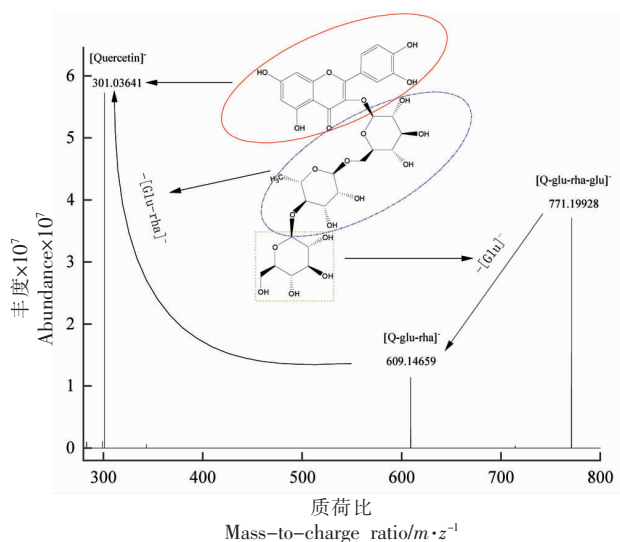


图 2 Q-glu-rha-glu 二级质谱图

Fig.2 MS<sup>2</sup> spectra of Q-glu-rha-glu

关系数均大于 0.99;加入相同加标量的标准品进行 6 次平行试验,加标回收率在 79.3%~106.5%之间,相对标准偏差在 3.6%~7.9%之间,说明建立的定量分析方法有较好的回收率和重复性。

### 2.4 黄酮醇糖苷类化合物的定量方法

现阶段商品化的黄酮醇糖苷类化合物的标准



品较少,文献报道<sup>[17-18,24,26-28]</sup>多采用相对定量的方法对其进行定量,即用已有标准品的黄酮醇糖苷类化合物对其它黄酮醇糖苷类化合物进行相对定量。本研究以 Q-glu-rha 为标准品对其它没有标准品黄酮醇糖苷类化合物进行相对定量。配置有标准物质的 5 种黄酮醇糖苷类化合物系列标准工作溶液,对其在茶叶中的含量进行准确定量分析。

## 2.5 茶叶中黄酮醇糖苷类化合物的含量

表 2 显示不同地区绿茶中 21 种黄酮醇糖苷类化合物的组成及含量,根据单因素 ANOVA 检验分析结果,每批次样品均测定 2 次。由表 2 可知,不同地区的绿茶中总黄酮醇糖苷类化合物的含量存在差异,黔西南地区绿茶中总黄酮醇糖苷含量最高,黔南地区绿茶总黄酮醇糖苷含量最低。在 21 种糖苷中 K-glu-rha-glu 含量最高,占总含量的 33.1%~57.8%;Q-gal-rha-rha 平均含量最低;3 种糖苷中以山奈素糖苷含量最高,其次为槲皮素糖苷,杨梅素糖苷含量最低;不同茶叶中以三糖苷的平均含量最高,二糖苷次之,平均含量最低的为单糖苷。

差异性分析结果显示,黔西南地区绿茶茶叶中总黄酮醇糖苷、槲皮素糖苷、山奈素糖苷、单糖苷、二糖苷含量显著高于其它地区( $P<0.05$ ),贵阳地区绿茶和黔东南地区绿茶中总黄酮醇糖苷、山奈素糖苷、单糖苷、二糖苷、三糖苷无显著差异( $P>0.05$ );黔西南地区绿茶和黔东南地区绿茶中杨梅素糖苷含量显著高于其它地区( $P<0.05$ );贵阳地区绿茶中三糖苷含量显著高于其它地区( $P<0.05$ );遵义地区绿茶和黔南地区绿茶在总黄酮醇糖苷、杨梅素糖苷、槲皮素糖苷、山奈素糖苷、单糖苷、二糖苷、三糖苷含量无显著差异( $P>0.05$ )。

6 个地区的绿茶中 21 种糖苷中 Q-gal 和 K-gal 含量虽有差异但不显著( $P>0.05$ );黔西南地区绿茶中 Q-glu、M-glu、K-glu-rha 和 K-glu 的含量显著高于其它几个地区绿茶( $P<0.05$ )。贵阳地区绿茶中 K-glu-rha-glu 含量显著高于其它几个地区,且为 21 种糖苷化合物中含量最高。

## 2.6 不同地区绿茶的识别分析

2.6.1 主成分分析(PCA) 在进行主成分分析之前,先对绿茶样本是否存在异常样本进行判定。Hotelling's  $T_2$  Range 算法是常用一种常用的判定

方法,当样本的值超过  $T_2$  临界(99%)值时,说明该样本与其它样本间存在较大差异。结果如图 3 所示,绿茶样本的值均未超过  $T_2$  临界(99%)值,说明选取的绿茶样本可用于主成分分析模型的建立。

根据表 2 计算出的每个茶叶中单个黄酮醇糖苷类化合物的含量,使用主成分分析 PCA 来阐明每个茶叶中黄酮醇糖苷类化合物组成的贡献,以反映通过程序鉴别的茶叶样品的聚类。图 4 显示了分配给不同程序的茶叶的得分图。前两个主成分分别代表 6 个地区的茶叶样品的可变性的方差贡献率的 42.1%和 20.2%,累计方差贡献率为 62.3%。

从图 4a 中可知,6 个地区的绿茶样品对应的分值有明显差异,各地区的茶样有较好的聚集且茶样且无重叠部分,PC1 和 PC2 平面中 6 个地区绿茶样品得到有效的聚类,样品的区分度较好。从图 4b 的加载图中可以观察到变量的方向,PC1 和 PC2 中除 K-gal 和 Q-gal 贡献较小外,其它化合物贡献均大于 0.2,但不存在突出贡献变量。综上,不同产地绿茶样品可根据黄酮醇糖苷类化合物的含量进行 PCA 聚类分析。

2.6.2 BP 人工神经网络分析(BP-ANN) 使用 SPSS 软件进行 BP 人工神经网络分析,随机抽取 70%的茶叶样本作为训练集,剩余的 30%茶叶样本作为测试集,对 BP 人工神经网络分析模型的识别能力和预测能力进行了评价。结果表明,该模型的输入层神经元为 21 个、隐藏层神经元为 13 个和输出层神经元为 6 个,隐藏层层数为 1。

从表 3 可知,在模型训练和测试过程中,代表 6 个不同地区的所有茶叶样品识别的准确率均为 100.0%,说明 BP 人工神经网络分析模型具有较好的适用性。根据模型中的重要性和规范化的重要性得知(图 5),规范化的重要性大于 80%的化学标记有 9 个,分别为 K-gal-rha-rha、K-glu-rha、K-gal、K-glu、K-glu-rha-rha、K-gal-rha-glu、M-gal-rha-glu、Q-gal-rha-glu 和 Q-gal-rha-rha,其中 K-gal-rha-rha 和 K-glu-rha 的重要性达到 100%。

2.6.3 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA) 为确定分组样品的差异,进一步采用 PLS-DA,以 21 种黄酮醇糖苷类化合物为自变量( $X$ ),6 个地区绿茶作为因变量( $Y$ ),建立 PLS-DA 分析模型。结果表

表2 茶叶中黄酮醇糖苷化合物的含量(mg/kg)

化合物	遵义绿茶(n=13)	铜仁绿茶(n=4)	黔南绿茶(n=6)	黔西南绿茶(n=4)	贵阳绿茶(n=5)	黔东南绿茶(n=8)
M-gal-rha-glu	1.45 ± 0.83 <sup>d</sup>	7.95 ± 5.04 <sup>b</sup>	4.29 ± 2.63 <sup>cd</sup>	18.08 ± 5.09 <sup>a</sup>	6.26 ± 1.93 <sup>bc</sup>	15.68 ± 3.04 <sup>a</sup>
M-glu-rha-glu	2.37 ± 0.93 <sup>c</sup>	5.97 ± 2.07 <sup>b</sup>	3.82 ± 1.88 <sup>bc</sup>	10.85 ± 5.42 <sup>a</sup>	6.32 ± 1.64 <sup>b</sup>	10.85 ± 1.64 <sup>a</sup>
M-rha-glu	14.39 ± 3.78 <sup>c</sup>	30.69 ± 6.51 <sup>b</sup>	17.77 ± 3.82 <sup>c</sup>	32.08 ± 2.59 <sup>b</sup>	29.58 ± 4.41 <sup>b</sup>	38.78 ± 5.15 <sup>a</sup>
M-gal	93.35 ± 59.99 <sup>b</sup>	177.23 ± 69.65 <sup>b</sup>	146.32 ± 24.44 <sup>ab</sup>	136.29 ± 10.67 <sup>ab</sup>	122.93 ± 27.47 <sup>ab</sup>	181.03 ± 25.39 <sup>a</sup>
M-glu	113.52 ± 66.26 <sup>c</sup>	283.00 ± 27.58 <sup>b</sup>	162.26 ± 30.81 <sup>c</sup>	409.32 ± 88.27 <sup>a</sup>	232.96 ± 43.64 <sup>b</sup>	371.22 ± 26.35 <sup>c</sup>
Q-gal-rha-glu	119.85 ± 33.17 <sup>c</sup>	534.98 ± 386.70 <sup>a</sup>	232.08 ± 90.18 <sup>bc</sup>	486.62 ± 89.94 <sup>a</sup>	365.10 ± 37.38 <sup>ab</sup>	522.82 ± 78.34 <sup>a</sup>
Q-glu-rha-glu	347.61 ± 103.69 <sup>d</sup>	689.66 ± 142.76 <sup>c</sup>	233.36 ± 58.88 <sup>d</sup>	1 709.14 ± 413.63 <sup>a</sup>	1 441.99 ± 233.15 <sup>b</sup>	1 554.98 ± 136.37 <sup>ab</sup>
Q-gal-rha-rha	1.87 ± 1.83 <sup>d</sup>	17.37 ± 2.78 <sup>b</sup>	23.10 ± 8.46 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.48 <sup>d</sup>	4.77 ± 2.21 <sup>d</sup>	11.07 ± 4.85 <sup>c</sup>
Q-glu-rha-rha	6.75 ± 6.31 <sup>c</sup>	72.39 ± 42.93 <sup>a</sup>	39.75 ± 13.71 <sup>b</sup>	8.14 ± 5.23 <sup>c</sup>	15.16 ± 3.49 <sup>c</sup>	18.97 ± 6.00 <sup>c</sup>
Q-gal-rha	9.41 ± 9.53 <sup>c</sup>	34.65 ± 3.67 <sup>b</sup>	13.55 ± 3.22 <sup>bc</sup>	56.46 ± 45.71 <sup>a</sup>	25.45 ± 5.32 <sup>bc</sup>	24.26 ± 4.28 <sup>bc</sup>
Q-glu-rha	94.42 ± 37.60 <sup>c</sup>	216.35 ± 35.43 <sup>b</sup>	40.45 ± 5.10 <sup>d</sup>	623.46 ± 93.72 <sup>a</sup>	188.53 ± 11.28 <sup>b</sup>	210.60 ± 35.17 <sup>b</sup>
Q-gal	29.52 ± 30.10 <sup>a</sup>	38.02 ± 24.20 <sup>b</sup>	17.44 ± 4.60 <sup>a</sup>	31.25 ± 7.76 <sup>a</sup>	30.02 ± 4.38 <sup>a</sup>	43.89 ± 7.35 <sup>a</sup>
Q-glu	52.54 ± 24.88 <sup>c</sup>	176.08 ± 16.73 <sup>d</sup>	36.42 ± 8.99 <sup>c</sup>	971.36 ± 106.44 <sup>a</sup>	241.36 ± 43.14 <sup>c</sup>	316.64 ± 55.03 <sup>b</sup>
K-gal-rha-glu	934.48 ± 406.43 <sup>abc</sup>	1 352.83 ± 794.29 <sup>a</sup>	1 228.50 ± 152.27 <sup>ab</sup>	715.12 ± 135.70 <sup>c</sup>	805.51 ± 147.24 <sup>bc</sup>	925.05 ± 102.02 <sup>abc</sup>
K-glu-rha-glu	3 774.96 ± 1 323.61 <sup>c</sup>	4 785.43 ± 562.10 <sup>c</sup>	2 254.41 ± 305.06 <sup>d</sup>	6 010.86 ± 128.51 <sup>b</sup>	7 733.96 ± 173.61 <sup>a</sup>	6 772.75 ± 551.37 <sup>ab</sup>
K-gal-rha-rha	27.43 ± 18.65 <sup>c</sup>	235.46 ± 35.80 <sup>b</sup>	433.62 ± 85.41 <sup>a</sup>	16.64 ± 6.64 <sup>c</sup>	45.86 ± 21.97 <sup>c</sup>	67.71 ± 26.74 <sup>c</sup>
K-glu-rha-rha	24.01 ± 25.61 <sup>c</sup>	491.74 ± 373.89 <sup>a</sup>	185.25 ± 31.44 <sup>b</sup>	53.54 ± 32.47 <sup>bc</sup>	102.46 ± 27.52 <sup>bc</sup>	61.57 ± 15.30 <sup>bc</sup>
K-gal-rha	25.23 ± 13.50 <sup>d</sup>	165.75 ± 23.62 <sup>b</sup>	76.48 ± 15.60 <sup>b</sup>	77.28 ± 41.90 <sup>b</sup>	46.44 ± 5.90 <sup>c</sup>	55.97 ± 9.02 <sup>c</sup>
K-glu-rha	459.57 ± 64.94 <sup>d</sup>	1 924.06 ± 828.36 <sup>b</sup>	470.44 ± 53.55 <sup>d</sup>	5 296.61 ± 684.89 <sup>a</sup>	1 323.05 ± 143.81 <sup>c</sup>	1 239.74 ± 129.82 <sup>c</sup>
K-gal	397.87 ± 499.18 <sup>a</sup>	274.96 ± 113.14 <sup>a</sup>	200.30 ± 35.41 <sup>a</sup>	93.94 ± 26.03 <sup>a</sup>	150.10 ± 43.20 <sup>a</sup>	177.20 ± 20.93 <sup>a</sup>
K-glu	119.63 ± 36.32 <sup>c</sup>	404.64 ± 225.57 <sup>b</sup>	114.32 ± 25.29 <sup>c</sup>	1 422.36 ± 142.91 <sup>a</sup>	462.14 ± 55.36 <sup>b</sup>	452.13 ± 49.43 <sup>b</sup>
总黄酮醇糖苷	6 650.22 ± 1 581.80 <sup>d</sup>	11 919.23 ± 436.62 <sup>c</sup>	5 933.92 ± 479.51 <sup>d</sup>	18 181.60 ± 1 030.36 <sup>a</sup>	13 379.93 ± 459.58 <sup>b</sup>	13 072.88 ± 647.83 <sup>bc</sup>
杨梅素糖苷	225.08 ± 128.14 <sup>d</sup>	504.85 ± 84.87 <sup>ab</sup>	334.46 ± 54.88 <sup>cd</sup>	606.62 ± 91.31 <sup>a</sup>	398.05 ± 72.28 <sup>bc</sup>	617.54 ± 48.11 <sup>a</sup>
槲皮素糖苷	661.97 ± 87.33 <sup>c</sup>	1 779.52 ± 533.08 <sup>b</sup>	636.14 ± 153.69 <sup>c</sup>	3 888.62 ± 299.97 <sup>a</sup>	2 312.37 ± 293.43 <sup>c</sup>	2 703.22 ± 263.86 <sup>b</sup>
山奈素糖苷	5 763.17 ± 1 529.38 <sup>c</sup>	9 634.86 ± 1 011.77 <sup>b</sup>	4 963.32 ± 374.66 <sup>c</sup>	13 686.35 ± 748.85 <sup>a</sup>	10 669.52 ± 407.66 <sup>b</sup>	9 752.12 ± 574.74 <sup>b</sup>
单糖苷	806.43 ± 664.96 <sup>cd</sup>	1 353.94 ± 125.99 <sup>b</sup>	677.06 ± 86.14 <sup>d</sup>	3 064.53 ± 305.40 <sup>a</sup>	1 239.51 ± 135.20 <sup>bc</sup>	1 542.11 ± 132.72 <sup>b</sup>
双糖苷	603.01 ± 87.70 <sup>d</sup>	2 371.50 ± 803.85 <sup>b</sup>	618.69 ± 55.39 <sup>d</sup>	6 085.90 ± 861.11 <sup>a</sup>	1 613.15 ± 153.03 <sup>c</sup>	1 569.34 ± 164.17 <sup>c</sup>
三糖苷	5 240.78 ± 1 588.33 <sup>d</sup>	8 193.79 ± 365.06 <sup>c</sup>	4 638.16 ± 416.85 <sup>d</sup>	9 031.18 ± 329.00 <sup>bc</sup>	10 527.38 ± 282.81 <sup>a</sup>	9 961.43 ± 674.67 <sup>ab</sup>

注:小写字母表示差异显著(P&lt;0.05)。

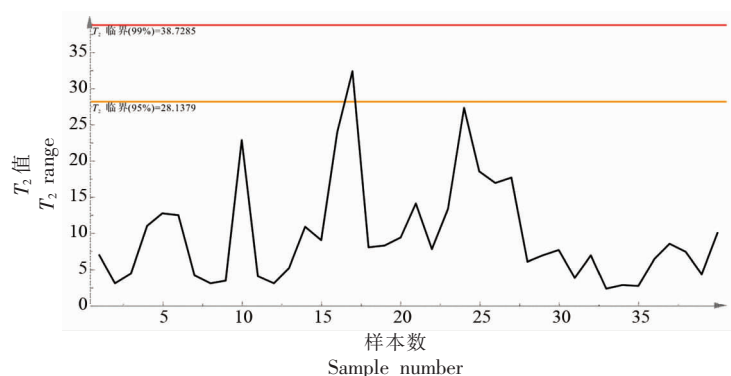


图 3 绿茶样品的 Hotelling's  $T_2$  Range 图

Fig.3 Hotelling's  $T_2$  Range plot of green tea samples

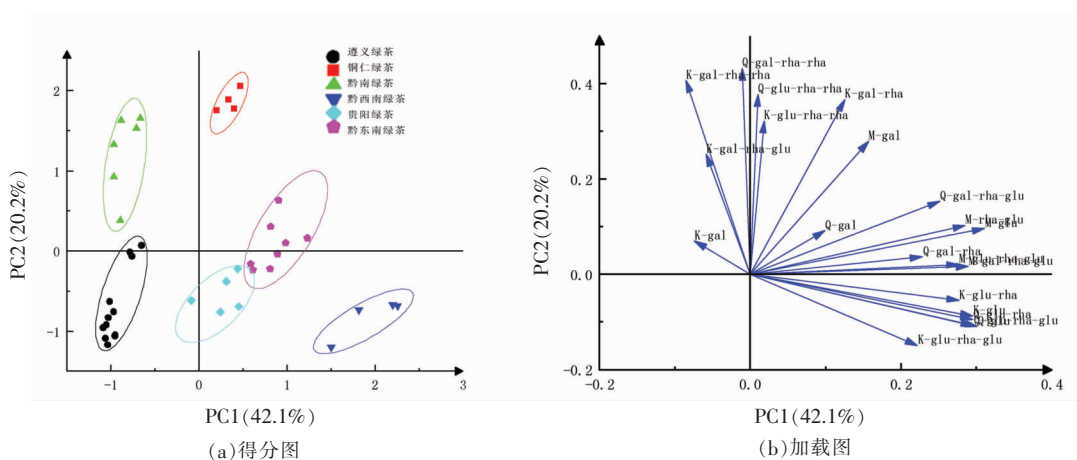


图 4 依据 21 种黄酮醇糖苷类化合物的含量对不同产地绿茶进行主成分分析

Fig.4 PCA plots of green tea from different producing area based on the content of 21 flavonol glycosides

表 3 BP-ANN 的训练和测试结果

Table 3 Model training and prediction results of the BP-ANN model

样本集	观察值	预测值						准确率/%
		遵义绿茶	铜仁绿茶	黔南绿茶	黔西南绿茶	贵阳绿茶	黔东南绿茶	
训练	遵义绿茶	12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	铜仁绿茶	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔南绿茶	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔西南绿茶	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	100.0
	贵阳绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	100.0
	黔东南绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	100.0
	总体百分比/%		44.4	11.1	11.1	7.4	11.1	14.8
测试	遵义绿茶	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	铜仁绿茶	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔南绿茶	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔西南绿茶	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	100.0
	贵阳绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	100.0
	黔东南绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	100.0
	总体百分比/%		7.7	7.7	23.1	15.4	15.4	30.8

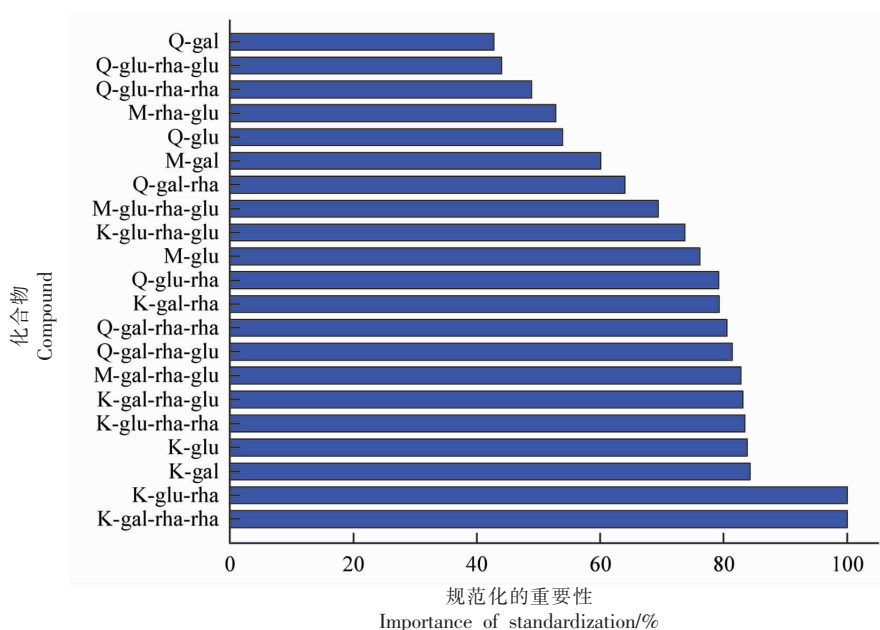


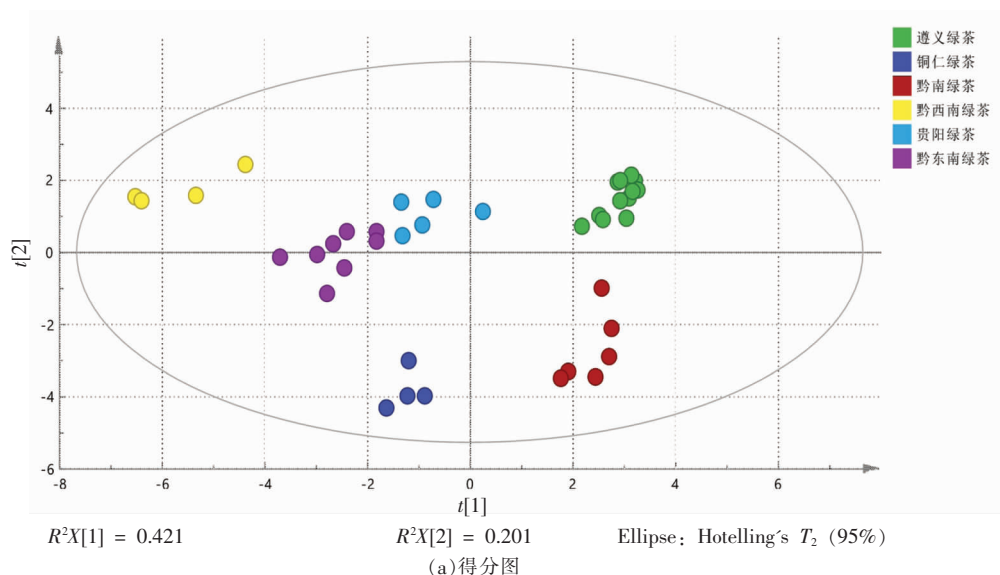
图5 BP-ANN依据21种黄酮醇苷类化合物结果的变量重要性

Fig.5 The variable importance of BP-ANN based on the results of 21 flavonol glycoside compounds

明,分析模型的拟合指数分别为  $R^2X(\text{cum})=0.992$ 、 $R^2Y(\text{cum})=0.942$ ,预测指标  $Q^2(\text{cum})=0.782$ ,表明该模型能反映总自变量的99.2%,能反映总因变量的94.2%,预测能力为78.2%,说明建立的PLS-DA分析模型结果可靠。

PLS-DA得分图(图6a)显示了 $R^2X$ 中特征值贡献度最大的两个,且两个 $R^2X$ 均没有特征贡献变量,说明21种黄酮醇苷类化合物的值对该模型

的总方差影响均衡。图6b显示了在PLS-DA预测模型中自变量对于分析结果的贡献率,变量值与各糖苷对于模型贡献率呈正相关。从图中可知,VIP值>1的变量有K-gal-rha-rha、K-glu-rha-glu、K-gal-rha、K-glu-rha-rha、Q-gal-rha-rha、M-gal-rha-glu、Q-glu-rha-rha和K-glu-rha,该8个变量可以作为绿茶中地理溯源的PLS-DA模型最重要的化学标记成分。



(a)得分图



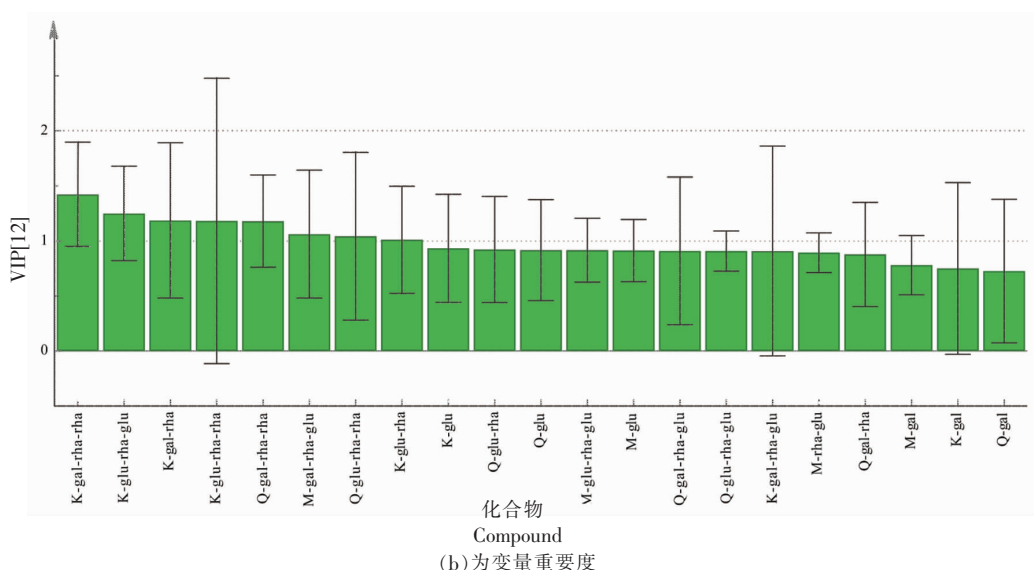


图 6 不同产地绿茶样品 PLS-DA 分析结果图

Fig.6 Comparison of the PLS-DA analysis results of green tea samples from different regions

2.6.4 线性判别分析(LSD) LSD 以 21 种黄酮醇糖苷类化合物为自变量,6 个地区绿茶作为因变量,建立判别模型,分析方法采用 Fisher 函数和交叉检验。由表 4 可知,此模型对绿茶产地的整体判别

准确率为 100%,6 各地区茶叶的交叉验证结果准确率为 100%,其中铜仁绿茶的准确率为 75%。说明使用线性判别对不同产地绿茶的判别效果较好。

表 4 基于黄酮醇糖苷类化合物含量的茶叶分类判别结果

Table 4 The discrimination results of tea based on the content of flavonol glycosides

类别		类别	预测组成员					总计		
			遵义绿茶	铜仁绿茶	黔南绿茶	黔西南绿茶	贵阳绿茶		黔东南绿茶	
原始 <sup>a</sup>	计数	遵义绿茶	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.0	
		铜仁绿茶	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	
		黔南绿茶	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0	6.0	
		黔西南绿茶	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	4.0	
		贵阳绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	5.0	
		黔东南绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.0	
		百分比/%	遵义绿茶	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	铜仁绿茶	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0		
	黔南绿茶	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0		
	黔西南绿茶	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0		
	贵阳绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	100.0		
	黔东南绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0		
	交叉验证 <sup>bc</sup>	计数	遵义绿茶	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.0
			铜仁绿茶	1.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0
黔南绿茶			0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0	6.0	
黔西南绿茶			0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	4.0	
贵阳绿茶			0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	5.0	
黔东南绿茶			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.0	

(续表 4)

类别	预测组成员						总计	
	遵义绿茶	铜仁绿茶	黔南绿茶	黔西南绿茶	贵阳绿茶	黔东南绿茶		
百分比/%	遵义绿茶	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	铜仁绿茶	25.0	75.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔南绿茶	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	黔西南绿茶	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0
	贵阳绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	黔东南绿茶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0

注:a. 正确地对 100.0%个原始已分组个案进行了分类;b. 仅对分析中的个案进行交叉验证;c. 正确地对 97.5%个进行了交叉验证的已分组个案进行了分类。

### 3 结论

采用高分辨质谱仪结合三重四极杆质谱仪,建立了测定茶叶中黄酮醇糖苷类化合物的分析方法。通过与标准物质比对、分析黄酮醇糖苷类化合物组成及裂解规律,并结合高分辨质谱进行结果解析,共鉴定识别出茶叶中 21 种黄酮醇糖苷类化合物,包括 5 种杨梅素糖苷(三糖苷 2 种、二糖苷 1 种、单糖苷 2 种)、8 种槲皮素糖苷(三糖苷 4 种、二糖苷 2 种、单糖苷 2 种)和 8 种山奈素糖苷(三糖苷 4 种、二糖苷 2 种、单糖苷 2 种)。使用三重四极杆质谱仪对不同产地绿茶中的 21 种黄酮醇糖苷类化合物进行测定,以 Q-glu-rha 为标准品对其它没有标准物质的黄酮醇糖苷类化合物进行相对定量。

结果表明,不同产地绿茶中黄酮醇糖苷类化合物的含量及分布存在差异,经化学计量学模型分析,采用 21 种黄酮醇糖苷类化合物对绿茶地理溯源分析。PCA 显示各地区的茶样有较好的区分度,样品得到有效的聚类。BP-ANN 显示分析模型具有较好的适用性,对 6 个地区的绿茶样品识别的准确率均为 100.0%,并得到 2 种规范化的重要性为 100%的黄酮醇糖苷类化合物标记物( $P<0.05$ )。PLS-DA 显示预测能力为 78.2%,预测能力较好,分析结果可靠,判别出重要化学标记成分 8 种(VIP>1)。LSD 表明对 6 个地区整体判别准确率为 100%,交叉验证结果准确率为 100%,判别效果较好。综上,采用 21 种黄酮醇糖苷类化合物的指纹技术对绿茶地理溯源分析是可行的。

研究开发建立的分析方法适用于分析茶叶中的黄酮醇糖苷类化合物,结合各分析模型成功对

不同产地的茶叶进行了地理溯源分析。研究结果为茶叶指纹图谱和化学判别提供参考指标,为茶叶地理溯源提供科学依据,为茶叶产品认证及建立质量追溯体系提供相应技术和理论支撑。在后续研究中应增加有统计意义和代表性的样本量,构建出稳健、有效的产地判别模型,以进一步评价黄酮醇糖苷类化合物在茶叶品质中的适用性。

### 参 考 文 献

- [1] PINTO M S. Tea: A new perspective on health benefits[J]. Food Research International, 2013, 53(2): 558-567.
- [2] FANG Z T, SONG C J, XU H R, et al. Dynamic changes in flavonol glycosides during production of green, yellow, white, oolong and black teas from *Camellia sinensis* L. (cv. Fudingdabaicha)[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(2): 490-498.
- [3] FANG Z T, LV Y Q, SONG C J, et al. Simultaneous preparation of abundant flavonol triglycosides from tea leaves[J]. Molecules, 2020, 25(21): 5140.
- [4] WU Y H, JIANG X L, ZHANG S X, et al. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS[J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2016, 1017-1018(4): 10-17.
- [5] DOU J P, LEE V S Y, TZEN J T C, et al. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(18):

- 7462-7468.
- [6] TAN J, ENGELHARDT U H, LIN Z, et al. Flavonoids, phenolic acids, alkaloids and theanine in different types of authentic Chinese white tea samples[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 57(4): 8-15.
- [7] RHA C S, JEONG H W, PARK S, et al. Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer effects of purified flavonol glycosides and aglycones in green tea[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 278.
- [8] LEA M A. Flavonol regulation in tumor cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(7): 1190-1194.
- [9] MENEZES R, RODRIGUEZ - MATEOS A, KALTSATOU A, et al. Impact of flavonols on cardiometabolic biomarkers: A meta - analysis of randomized controlled human trials to explore the role of inter - individual variability[J]. *Nutrients*, 2017, 9(2): 117.
- [10] 刘阳, 陈根生, 许勇泉, 等. 冲泡过程中西湖龙井茶黄酮苷类浸出特性及滋味贡献分析[J]. *茶叶科学*, 2015, 35(3): 217-224.
- LIU Y, CHEN G S, XU Y Q, et al. Extracting characteristics of flavone and flavonol glycosides in xihulongjing tea under different brewing conditions and their contribution to tea taste[J]. *Journal of Tea Science*, 2015, 35(3): 217-224.
- [11] 林杰, 段玲靓, 吴春燕, 等. 茶叶中的黄酮醇类物质及对感官品质的影响[J]. *茶叶*, 2010, 36(1): 14-18.
- LIN J, DUAN L L, WU C Y, et al. Flavonols in tea (*Camellia sinensis*) and its impact on sensory taste[J]. *Journal of Tea*, 2010, 36(1): 14-18.
- [12] 宋楚君, 范方媛, 龚淑英, 等. 不同产地红茶的滋味特征及主要贡献物质[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(2): 383-394.
- SONG C J, FAN F Y, GONG S Y, et al. Taste characteristic and main contributing compounds of different origin black tea [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(2): 383-394.
- [13] CHEN S, LI M H, ZHENG G Y, et al. Metabolite profiling of 14 Wuyi rock tea cultivars using UPLC-QTOF MS and UPLC-QqQ MS combined with chemometrics[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 104.
- [14] ZHENG X Q, NIE Y, GAO Y, et al. Screening the cultivar and processing factors based on the flavonoid profiles of dry teas using principal component analysis[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 67(4): 29-37.
- [15] JIANG H Y, ENGELHARDT U H, THRÄNE C, et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC[J]. *Food Chemistry*, 2015, 183(15): 30-35.
- [16] WU C Y, XU H R, HÉRITIER J, et al. Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(1): 144-149.
- [17] 董方, 张群峰, 阮建云. 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定茶叶中黄酮醇糖苷种类及含量[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(1): 204-212.
- DONG F, ZHANG Q F, RUAN J Y. Determination of flavonol glycosides in teas by ultra-high performance liquid chromatography combined with triple four-bar tandem mass spectrometry[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 37(1): 204-212.
- [18] 王智聪, 沙跃兵, 余笑波, 等. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定茶叶中15种黄酮醇糖苷类化合物[J]. *色谱*, 2015, 33(9): 974-980.
- WANG Z C, SHA Y B, YU X B, et al. Determination of flavonol glycosides in tea samples by ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array detection-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(9): 974-980.
- [19] 黄永桥, 杨昌彪, 马凯, 等. QuEChERS结合UHPLC-MS/MS法测定畜肉中阿苯达唑及其代谢物的残留量[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(19): 258-263.
- HUANG Y Q, YANG C B, MA K, et al. Determination of albendazole and its metabolites residues in meat by UHPLC-MS/MS with QuEChERS extraction method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(19): 258-263.
- [20] 叶金, 吴宇, 辛媛媛, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速精准测定粮食中多种真菌毒素[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(4): 449-456.
- YE J, WU Y, XIN Y Y, et al. Determination of mycotoxins in cereals by UPLC-Quadrupole/Orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, 36(4): 449-456.
- [21] 马俊美, 范素芳, 孙磊, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定牛奶中19种唑

- 诺酮类抗生素[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 309-317.
- MA J M, FAN S F, SUN L, et al. Determination of 19 kinds of quinolones in milk by ultra performance liquid chromatography/quadrupole orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 309-317.
- [22] VAN DER HOOFT J J J, AKERMI M, ÜNLÜ F Y, et al. Structural annotation and elucidation of conjugated phenolic compounds in black, green, and white tea extracts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 8841-8850.
- [23] 叶晓珂. 树莓叶黄酮类活性成分的分离与鉴定研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2011.
- YE X K. Study on separation and identification of flavonoids from raspberry[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2011.
- [24] KELEBEK H. LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature[J]. Food Chemistry, 2016, 204(8): 227-238.
- [25] LIN L Z, CHEN P, HARNLY J M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(17): 8130-8140.
- [26] ZHAO Y Y, GUO H Z, CHEN Y G, et al. Simultaneous quantification of flavonol glycosides, terpenolactones, polyphenols and carboxylic acids in *Ginkgo biloba* leaf extract by UPLC-QTOF-MSE based metabolomic approach[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2017, 26(11): 789-804.
- [27] 吴春燕, 须海荣, JULIEN H, 等. 不同茶树品种中黄酮苷含量的测定[J]. 茶叶科学, 2012, 32(2): 122-128.
- WU C Y, XU H R, JULIEN H, et al. Determination of the flavone glycosides in various tea cultivars[J]. Journal of Tea Science, 2012, 32(2): 122-128.
- [28] KIM J C, SHIM Y S. Method validation of analytical method for 12 flavonol glycosides in foods using ultra high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(3): 659-664.

### Identification and Geographical Traceability of 21 Flavonol Glycosides in Green Tea

Huang Yongqiao<sup>1</sup>, Gao Liang<sup>2</sup>, Wu Xinwen<sup>1</sup>, Li Zhanbin<sup>2</sup>, Yang Changbiao<sup>2</sup>, Mao Minxia<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou Testing Technology Research and Application Center, Guiyang 550014

<sup>2</sup>Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550014

**Abstract** To distinguish the differences in the types and contents of flavonol glycoside in green tea from 6 production areas, and explore the feasibility of flavonol glycoside for geographical traceability of green tea. In this study, the qualitative identification of flavonol glycosides by ultrahigh performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS), and a quantitative method of flavonol glycosides in green tea was established based on ultra high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that a total of 21 kinds of flavonol glycosides were positively identified in green tea, including 5 myricetin glycosides, 8 quercetin glycosides and 8 kaempferol glycosides. The quantitative analysis showed that the content of flavonol glycosides varied from different producing area in green tea, in which the content of K-glu-rha-glu was the highest, accounting for 33.1%-57.8% of 21 kinds of flavonol glycosides, followed with the kaempferol glycoside, while content of myricetin glycoside was the lowest. By analyzing the differences and correlations of flavonol glycosides in green tea from 6 production areas indicate that they can be used for geographical traceability of tea. The green teas from different producing areas could be effectively distinguished by PCA. The precision rate was 100.0% for BP-ANN recognition, and 2 kinds of compound markers for flavonol glycoside were acquired with 100% importance ( $P < 0.05$ ). The predictive ability of PLS-DA model was 78.2%, and 8 biomarkers (VIP > 1) were screened out. The entirety precision rate was 100% by LSD model, and the precision rate of cross validation result was 100%. The results of this study may provide scientific basis for the study of geographical traceability and chemical classification of tea.

**Keywords** UPLC-Q-Orbitrap HRMS; UPLC-MS/MS; tea; flavonol glycosides; identify; geographical traceability