

普洱生茶加工过程中非挥发性成分的变化

李文婷, 范晓伟, 易伦朝, 胡永丹, 任达兵*
(昆明理工大学食品科学与工程学院 昆明 650000)

摘要 采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术分析普洱生茶加工过程中的非挥发性成分。结果表明:共鉴定或表征了 141 个化合物,其中 25 个化合物的含量变化较为明显,被筛选为差异性化合物(VIP>1, $P<0.05$)。4 个加工阶段中,杀青和蒸压成型是引起这些非挥发性成分变化的关键过程。杀青处理会显著降低大部分单体儿茶素和氨基酸的含量,而蒸压成型处理显著提高单体儿茶素的含量,并显著降低生物碱、氨基酸的含量。综合分析非挥发性成分的变化,有利于厘清普洱生茶生产过程中品质形成的机理。

关键词 普洱生茶; 加工过程; 非挥发性物质; 超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术

文章编号 1009-7848(2024)05-0405-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.05.034

茶是具有悠久历史和广受消费者喜爱的非酒精饮料^[1]。普洱茶已被认定为国家地理标志产品,它是将云南大叶种茶的鲜叶以特殊的加工工艺制作而成的特种茶叶^[2],根据生产工艺分为普洱生茶和普洱熟茶^[3]。普洱生茶的生产工艺包括萎凋、杀青、揉捻、晒干以及蒸压成型。由于不需要经过后发酵工艺,因此普洱生茶属于非发酵茶。经过高温蒸汽处理后压制得到普洱生茶饼,其外形紧实,适合长时间储存,这是云南特有的制茶方式^[3]。茶叶的加工工艺决定了茶叶中化合物的变化模式,这些化合物在热、酶等因素的作用下发生动态变化,最终形成茶叶的品质特征^[4]。

茶叶中的非挥发性成分主要包括茶多酚、氨基酸、生物碱,它们的组成和含量是影响茶汤滋味和色泽的重要因素。茶汤的苦味和涩味通常和多酚类化合物的含量呈正相关关系^[5]。根据呈味特性,茶叶氨基酸可分为鲜味氨基酸、苦味氨基酸、甜味氨基酸 3 类。茶氨酸是绿茶等未发酵中含量最丰富的氨基酸,是茶汤呈现鲜味的主要成分^[6-8]。此外,咖啡碱作为茶叶中的高含量成分,对茶汤苦味形成有重要作用^[9]。目前,已有一些茶叶品种^[10]、产地^[11]和储存期^[12-14]对普洱生茶非挥发性成分组成影响的研究报道,而加工过程对其非挥发性成分组成的影响还有待进一步研究。

超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术(UPLC-HRMS)具有高通量、高分辨率、高灵敏度的优点^[15],已成功应用于绿茶、红茶、白茶、黑茶等茶叶样本中儿茶素、氨基酸、生物碱等成分的定性和定量分析^[16-19]。本研究采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-HRMS)对普洱生茶中的非挥发性成分进行定性和半定量分析。基于其定性、定量分析结果,通过多元统计分析,研究加工过程中非挥发性成分变化对普洱生茶化学成分组成和品质形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶鲜叶于 2019 年 3 月在云南省西双版纳勐海县章朗古寨茶园基地采摘而得,采摘标准为一芽两叶。

液相色谱或质谱级的乙腈、甲醇、甲酸,德国 Merck 公司;氨基酸、生物碱、茶多酚等 135 个化学标准品(纯度 $\geq 98\%$),以上标准品购自北京伊诺凯科技有限公司、上海阿拉丁生化科技股份有限公司或成都曼斯特生物科技有限公司,具体信息参考课题组前期发表的相关文献[9, 20]。

1.2 仪器与设备

Dionex U300 超高效液相色谱仪、Q-Exactive Focus 四级杆-轨道阱高分辨质谱仪,赛默飞世尔科技公司;FAMO-10F 超滤型超纯水机,南京权坤生物科技有限公司;SK5200BT 超声仪器,上海科

收稿日期: 2023-05-18

基金项目: 云南省科技重大专项(202202AG050009)

第一作者: 李文婷,女,硕士生

通信作者: 任达兵 E-mail: rendabing425@kust.edu.cn

导超声仪器有限公司;MS105DU 电子分析天平,海梅特勒-托利多仪器有限公司;100~1 000 μL 手动移液枪,德国艾本德股份有限公司;FSJ-A05B1 粉碎机,广东小熊电器有限公司;TGL-16M 超速离心机,湘仪仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 普洱生茶样本的加工与收集 普洱生茶的制作包括萎凋、杀青、揉捻-干燥和蒸压成型 4 个主要阶段。萎凋:茶鲜叶在室温下(约 20 $^{\circ}\text{C}$)萎凋约 3 h。杀青:将萎凋叶在铁锅中炒青,耗时 30 min,温度约为 220 $^{\circ}\text{C}$ 。揉捻-干燥:炒青叶经揉捻后进行日晒干燥,获得晒青毛茶。蒸压成型:晒青毛茶用高温蒸汽处理软化后,采用石磨压制成饼状,并在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 24 h。每个加工阶段分别采集 6 个平行样本,并现场进行液氮冷冻。收集到的样本用真空冷冻干燥机在-50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 60 h 后磨成粉末,过 40 目筛后保存于-22 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.3.2 混标溶液的制备 准确称取各化学标准品 1.00 mg 于 10 mL 离心管中,加入适量 70% 甲醇溶液并定容后获得质量浓度为 0.1 mg/mL 的混标储备液,置于冰箱中避光保存待用。

1.3.3 样品制备 茶样提取方法参照本团队以前的研究^[21]。准确称取茶叶粉末 0.10 g 置于 5 mL 离心管中,加入 1 mL 70% 甲醇溶液与 10 μL 内标溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素与磺胺醋酰)后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min。将提取液离心 10 min (10 000 r/min)后,吸取上清液。茶粉末用 0.5 mL 70% 甲醇溶液洗涤 2 次,涡旋、离心,吸取上清液并定容于 2 mL 容量瓶。过 0.22 μm 有机滤膜后,装入棕色进样瓶待用。

取等体积(0.5 mL)的茶叶提取液在离心管内混合均匀后作为质量控制(QC)样本。在 UPLC-HRMS 分析过程中,每 10 个样本中插入一个 QC 样本,以监控仪器的稳定性和数据的可靠性。

1.3.4 UPLC-HRMS 分析条件

1.3.4.1 UPLC 条件 采用 0.1% 甲酸水(A)和乙腈(B)作为流动相,色谱柱型号为 ACQUITY U-PLC[®] BEH C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters);流速 0.3 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 1 μL 。洗脱梯度:0~3 min,5%~7% B;3~4 min,7%~10%

B;4~8 min,10% B;8~15 min, 10%~40% B;15~18 min, 40%~50% B;18~20 min, 50%~5% B;20~25 min, 5% B。

1.3.4.2 MS 条件 采用电喷雾离子源(ESI)分别在正、负离子扫描模式下进行数据采集。电喷雾电压:4 kV(-),3.5 kV(+);扫描范围 m/z 100~1 200;扫描模式:全扫描(Full scan),分辨率 70 000;源内诱导裂解电压(in-source CID):0 eV;数据依赖二级扫描(dd-MS²),分辨率 17 500;高能碰撞诱导电压:25,35,45 eV。辅助气体流速:10 L/min;鞘气流速:30 L/min;毛细管温度:320 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 定量分析

本研究采用内标法进行定量分析,通过公式(1)、(2)、(3)分别计算目标化合物的相对校正因子及含量。

$$F = \frac{A_s/C_s}{A_r/C_r} \quad (1)$$

式中, F ——相对校正因子; A_s/A_r ——混标中内标/对照品的峰面积; C_s/C_r ——混标中内标/对照品的质量浓度,mg/mL。

$$m_i = \frac{A_i \times m_s}{A_s \times m} \times F \quad (2)$$

式中, m_i ——茶样中化合物的含量,mg/kg; A_i/A_s ——样品溶液中目标化合物和内标的峰面积; m_s ——样品溶液中内标的质量,mg; m ——茶粉的质量,kg。

无标准品的物质采用式(3)计算其含量。

$$m_i = \frac{A_i \times m_s}{A_s \times m} \quad (3)$$

1.5 数据处理

采用 MZmine(version 2.38)对原始数据进行质谱峰检测、色谱峰构建、平滑以及解卷积等处理后,获得具有保留时间、离子加合物、理论质荷比,分子式等信息的表格。偏最小二乘判别分析(Partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)使用 SIMCA-P 11.5 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) 完成。应用 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) 进行热图可视化和单因素方差分析($P < 0.05$, 差异显著)。

2 结果与分析

2.1 非挥发性化合物的 UPLC–HRMS 定性分析

通过 MZmine 软件对数据预处理后,采用标准品比对和数据库搜索的方法,从 4 个阶段的茶叶样本中共定性出 141 个化学成分。这些成分包括 53 个儿茶素及其聚合物、24 个黄酮类化合物、30 个酚酸类化合物、5 个生物碱类化合物、13 个游离氨基酸、16 个其它类化合物。需要指出的是,52 个化合物是通过标准品比对获得的准确定性分析。

2.2 总含量的变化

为了探讨各加工处理对普洱生茶中非挥发性成分总含量的影响,首先比较了各类化学成分总含量在加工过程中的变化,结果如图 1 所示,总

含量是鉴定出的每类化合物含量的加和。可以看出,整个加工过程中,儿茶素类、黄酮及其糖苷类、酚酸类、其它类的化合物的总含量总体呈上升趋势,而氨基酸与生物碱的总含量总体呈下降趋势。特别地,与萎凋处理相比,杀青处理后氨基酸、生物碱、儿茶素类化合物的总含量显著降低。此外,与揉捻–干燥相比,蒸压成型处理显著增加了儿茶素类化合物、酚酸类、黄酮及糖苷类物质的总含量,同时显著降低生物碱、氨基酸的总含量。需要指出的是,杀青和蒸压成型 2 个加工环节均涉及使用高温处理茶叶。研究表明,高温加工处理会促进茶叶中的代谢物发生水解、取代、异构化、分解等化学反应^[22],导致各类成分的含量发生显著变化。

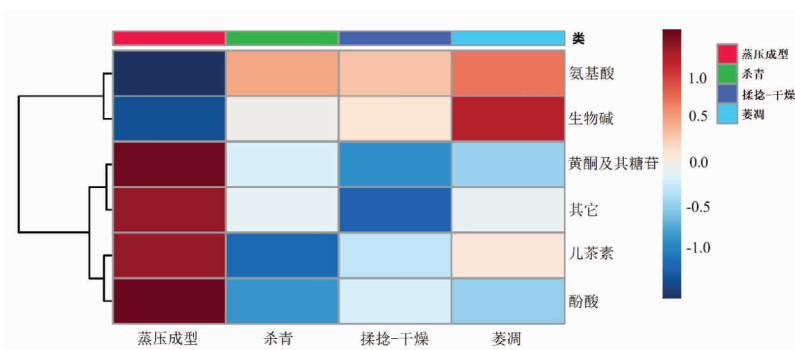


图 1 不同类代谢物总含量变化的热图可视化

Fig.1 Heatmap visualization of changes in total content of different classes of metabolites

2.3 4 个加工阶段茶叶样本的模式识别分析和差异性代谢物筛选

基于定性出的 141 个化学成分,采用 PLS–DA 方法对 4 个加工阶段的茶叶样本进行模式识别分析,模式识别结果见图 2a。交叉验证结果(图 2b)表明,前 5 个主成分的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.942 和 0.878,且模型 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.245 和 -0.471。这些结果说明该 PLS–DA 模型是稳健和可靠的。PLS–DA 的得分图表明,第 1 和第 2 主成分的贡献率分别为 49.4%和 24.3%,2 种主成分的累积贡献率为 73.7%,表明 2 个主成分能够基本反映样品的主要特征信息。从图 2a 可以看出,杀青和蒸压成型后的茶叶样本彼此之间能够显著分开,这进一步说明了杀青和蒸压成型处理是显著改变茶叶中化学成分的组成和含量的关键步

骤。基于单变量分析(P 值)和多变量分析【变量投影重要性值(VIP)]进一步分析化学成分组成的具体变化,以 $VIP > 1$ 和 $P < 0.05$ 为标准最终确定 25 个差异性化合物。其中,儿茶素类 8 个、黄酮及其糖苷类 1 个、酚酸类 4 个、生物碱类 4 个、氨基酸 4 个和其它类化合物 4 个,具体信息如表 1 所示。具体分析发现(图 3),儿茶素的含量在萎凋→杀青 S 阶段有 75%的物质下调和 12.5%的物质上调,而在蒸压成型→揉捻干燥阶段有 12.5%的物质下调和 87.5%的物质上调。生物碱和氨基酸在蒸压成型→揉捻干燥阶段 100%的物质下调,而酚酸在每个加工过程中都存在上调与下调物质。以上各成分的变化趋势表明,同属一类的各成分在变化趋势上并不总是一致的,因此有必要进一步分析差异代谢物在加工过程中的具体变化。

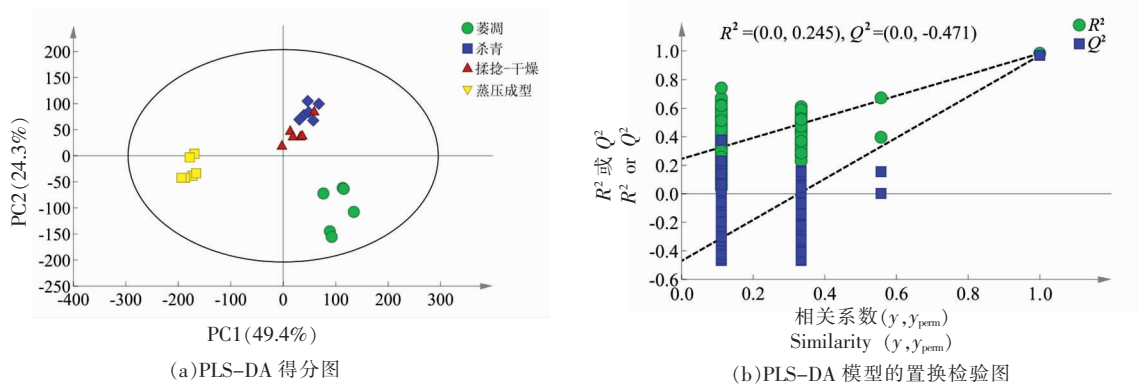
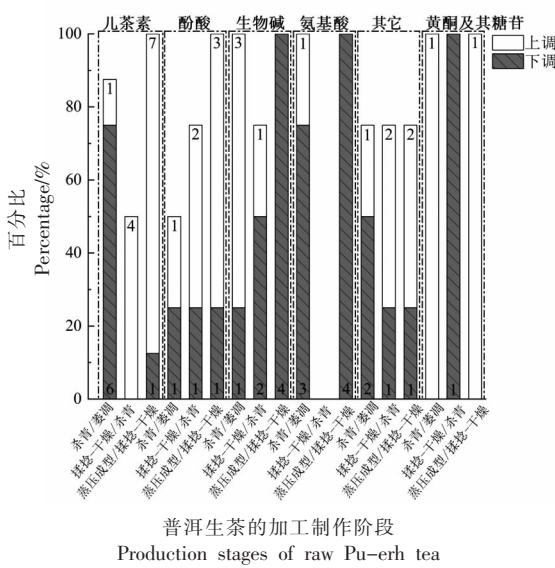


图2 茶叶样品的偏最小二乘判别分析

Fig.2 Partial least squares–discriminant analysis of tea samples



普洱生茶的加工制作阶段
Production stages of raw Pu-erh tea

图3 差异代谢物变化分析

Fig.3 Analysis of differential metabolite changes

2.4 RPT 加工过程中差异性代谢物的具体变化

2.4.1 儿茶素类、黄酮及其糖苷类、酚酸类 儿茶素、酚酸和黄酮(包括其糖苷)是茶叶中主要的多酚类物质,是决定茶汤滋味的重要物质^[23]。非酯型儿茶素是茶汤苦味的主要来源,而酯型儿茶素是主要的涩味成分^[20]。筛选到的差异性儿茶素类化合物包括7种单体儿茶素(儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯、表阿夫儿茶精3-没食子酸酯)和1种儿茶素聚合物(原花青素B2)。如表1所示,杀青处理会降低大部分单体儿茶素的含量,而蒸压成型处理显著提高这些成

分的含量。不同于单体儿茶素,原花青素B2(C4-C8号位连接)的含量仅在蒸压成型阶段显著降低。杀青阶段采用的高温会引起热敏性儿茶素发生降解^[24],这可能是它们含量有所下降的原因。此外,儿茶素含量降低的另一原因可能是它们可作为二羰基捕获剂与美拉德反应生成的糖-氨基化合物结合生成儿茶素羰基缩合产物^[25-26]。蒸压成型主要是利用高温蒸汽将茶叶软化,然后通过机械压制成特定的形状,因此是一个高温、高湿的处理过程。高温、高湿的环境可能会导致原花青素B2等聚合物在蒸压成型阶段发生降解而含量降低。聚合物的降解的产物主要是儿茶素单体等成分,因此儿茶素单体含量在蒸压成型阶段显著上升。与其它儿茶素不同,没食子儿茶素没食子酸酯的含量在杀青阶段显著升高,可能是因为聚酯型儿茶素A(C2'-C2'号位连接)在杀青阶段发生降解,而它恰好是分解产物之一,这表明不同连接方式的儿茶素低聚体在加工过程中的变化趋势明显不同,这可能与它们的稳定性存在关系。

芦丁作为筛选到的差异性黄酮及其糖苷类物质,它的含量主要在杀青和蒸压成型阶段显著增加。没食子素、羟基苯甲酸、4-香豆酰基奎宁酸和4-咖啡酰基奎宁酸是筛选到的4个酚酸类差异性代谢物,而它们的含量变化趋势并不相同。前期研究表明,酚酸物质作为合成酯型儿茶素的前体,伴随酯型儿茶素的水解产生^[27]。因此推测没食子素的含量在蒸压成型后显著增加,可能是含没食子酰基的儿茶素的降解生成没食子酸及其衍生物没食子素引起的。羟基苯甲酸的含量在杀青处理后

表 1 普洱生茶加工过程中 25 种差异性代谢物的含量

序号	化合物	含量/mg·kg ⁻¹					类型
		萎凋	杀青	揉捻-干燥	蒸压成型		
1	儿茶素 *	4 699.25 ± 709.23 ^b	4 656.07 ± 250.35 ^b	4 777.58 ± 596.48 ^b	6 023.30 ± 428.99 ^a	儿茶素	
2	表儿茶素 *	18 457.90 ± 556.15 ^b	17 317.64 ± 443.34 ^c	17 353.28 ± 688.37 ^c	20 613.70 ± 895.45 ^d	儿茶素	
3	没食子儿茶素 *	3 035.93 ± 402.86 ^a	2 370.59 ± 119.07 ^c	2 713.10 ± 186.20 ^b	3 091.52 ± 120.34 ^a	儿茶素	
4	表没食子儿茶素 *	10 866.88 ± 724.89 ^b	9 332.05 ± 376.18 ^c	10 295.96 ± 433.17 ^b	11 678.92 ± 387.08 ^a	儿茶素	
5	没食子儿茶素没食子酸酯 *	306.51 ± 143.02 ^c	563.51 ± 143.52 ^b	553.14 ± 236.11 ^b	965.79 ± 110.12 ^c	儿茶素	
6	表没食子儿茶素没食子酸酯 *	35 772.53 ± 2657.97 ^b	32 768.52 ± 1 270.74 ^c	35 306.63 ± 1 701.32 ^b	38 350.03 ± 2 474.68 ^a	儿茶素	
7	表阿夫儿茶精 3-没食子酸酯	581.78 ± 95.77 ^b	449.54 ± 78.65 ^c	593.91 ± 112.19 ^b	745.59 ± 97.70 ^c	儿茶素	
8	原花青素 B2*	2 434.97 ± 237.67 ^a	2 139.97 ± 237.67 ^b	2 293.06 ± 187.58 ^{ab}	1 523.95 ± 138.16 ^c	儿茶素	
9	芦丁 *	1 087.46 ± 191.83 ^b	1 307.02 ± 192.09 ^a	1 092.25 ± 132.15 ^b	1 431.12 ± 69.15 ^c	黄酮及其糖苷	
10	没食子素 *	11 816.09 ± 509.34 ^b	12 187.00 ± 211.95 ^b	12 204.66 ± 529.52 ^b	13 105.44 ± 442.90 ^b	酚酸	
11	羟基苯甲酸	4 770.37 ± 614.67 ^a	3 707.04 ± 141.49 ^c	4 202.91 ± 258.86 ^b	4 770.37 ± 124.65 ^a	酚酸	
12	4-香豆酰基奎宁酸	579.08 ± 52.45 ^c	836.47 ± 146.21 ^a	699.75 ± 90.84 ^{bc}	757.05 ± 90.31 ^{ab}	酚酸	
13	4-咖啡酰基奎宁酸	82.49 ± 16.58 ^{bc}	76.21 ± 32.64 ^c	152.09 ± 10.65 ^a	104.85 ± 10.78 ^b	酚酸	
14	咖啡因 *	55 658.77 ± 2564.29 ^a	49 230.57 ± 1 178.50 ^b	49 844.65 ± 1 173.71 ^b	45 467.72 ± 1 466.59 ^c	生物碱	
15	可可碱 *	1 670.48 ± 247.82 ^c	2 411.64 ± 114.26 ^b	2 611.90 ± 102.46 ^a	2 326.84 ± 78.17 ^b	生物碱	
16	甲基黄嘌呤同分异构体 I	963.87 ± 51.25 ^c	1 227.91 ± 38.41 ^a	1 052.16 ± 90.54 ^b	368.80 ± 13.83 ^d	生物碱	
17	甲基黄嘌呤同分异构体 II	1 127.78 ± 40.75 ^c	1 394.44 ± 60.84 ^b	1 288.73 ± 73.12 ^b	467.58 ± 22.20 ^d	生物碱	
18	茶氨酸 *	13 014.34 ± 612.02 ^b	14 258.65 ± 655.28 ^a	13 717.32 ± 638.31 ^a	8 635.86 ± 281.65 ^c	氨基酸	
19	苯丙氨酸 *	1 125.21 ± 53.68 ^a	481.28 ± 27.85 ^b	471.94 ± 35.38 ^b	265.66 ± 12.06 ^c	氨基酸	
20	亮氨酸 *	1 260.43 ± 72.88 ^a	633.89 ± 21.39 ^b	656.01 ± 36.93 ^b	382.69 ± 23.22 ^c	氨基酸	
21	色氨酸 *	645.85 ± 41.69 ^a	351.89 ± 23.84 ^b	333.43 ± 10.56 ^b	300.82 ± 4.19 ^c	氨基酸	
22	奎宁酸 *	2 407.95 ± 176.75 ^c	3 481.91 ± 155.43 ^a	2 951.35 ± 123.06 ^b	3 342.17 ± 143.22 ^a	其它	
23	甘油磷酸胆碱	163.32 ± 7.12 ^d	306.44 ± 7.28 ^c	351.98 ± 28.96 ^b	1 026.23 ± 24.07 ^a	其它	
24	胆碱	2 718.01 ± 210.13 ^c	1 313.20 ± 107.54 ^b	1 247.95 ± 79.17 ^b	995.15 ± 55.70 ^c	其它	
25	7-羟基香豆素	628.13 ± 77.19 ^b	724.30 ± 70.48 ^b	852.62 ± 82.36 ^a	875.19 ± 95.48 ^a	其它	

注: * 表示由标准品进行定性。

显著降低,4-香豆酰基奎宁酸酯的含量在杀青和蒸压成型处理后有明显增加,而4-咖啡酰基奎宁酸酯在蒸压成型处理后有明显降低,揉捻-干燥处理后显著增加。糖基化的咖啡酰基奎宁酸类成分在加工过程中可能会发生去糖基化作用,这可能是咖啡酰基奎宁酸的含量增加的原因之一。

2.4.2 生物碱、氨基酸类 氨基酸与生物碱同样是茶汤滋味的重要贡献者,特别在鲜味和苦味的形成中起关键作用^[9]。本研究的所有样本中,咖啡因始终是含量最高的生物碱类化合物,占到该类成分总含量的90.65%~93.61%,对茶汤苦味有显著贡献(阈值:500 $\mu\text{mol/L}$)^[28]。筛选到的4种差异性生物碱在含量变化上并不一致。其中,咖啡因的含量在加工过程中呈下降趋势,特别在杀青阶段的下降最为明显。相比之下,甲基黄嘌呤和可可碱的含量在杀青阶段显著增加,而在蒸压成型阶段显著下降。研究表明,甲基黄嘌呤和可可碱是咖啡因合成的前体物质^[29],因此咖啡因的降解可能引起可可碱和甲基黄嘌呤的含量增加。

根据呈味特性,氨基酸分为甜味氨基酸和苦味氨基酸。本研究筛选到的差异性氨基酸包括茶氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和色氨酸。茶氨酸是普洱茶中发现的主要成分之一,可以减轻茶汤的苦味,同时对鲜味有显著贡献(阈值:24.0 mmol/L)^[30],苯丙氨酸、亮氨酸和色氨酸是苦味氨基酸,它们的含量在蒸压成型后都显著降低,氨基酸含量的降低可能与热诱导引起的美拉德反应有关^[31]。茶氨酸的含量在杀青阶段显著升高,导致差异性氨基酸成分中鲜味氨基酸的含量占比从杀青前的81.1%提高到杀青后的90%。或许是因为茶氨酸的耐热耐酸性,使其在高温杀青作用中被破坏程度较小^[32]。以上结果表明,杀青处理显著改变了氨基酸的组成,可能对茶汤鲜味和苦味的形成具有重要作用。

2.5 关键代谢物代谢及加工过程中相互转化途径分析

为了探索普洱茶加工过程中各化学成分的相互转化,将差异代谢物映射到KEGG数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)中获得匹配数据,进行了生物代谢途径富集分析。结果表明,咖啡因代谢(Caffeine metabolism)、黄酮类生

物合成(Flavonoid biosynthesis)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、来自组氨酸和嘌呤的生物碱生物合成(Biosynthesis of alkaloids derived from histidine and purine)、苯丙烷的生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)与本研究中检测到的化合物的变化最为相关。为了更好地了解普洱生茶加工过程中代谢物的动态变化以及化合物变化之间的关系,绘制了主要代谢物的代谢途径(图4),并在图中标明了一些加工过程中化合物的相互转化。

如果将加工过程中的叶片视为一个在胁迫下的生物有机体,其内源代谢产物的动态变化便是由于胁迫反应而产生的。黄酮类化合物是防御性化合物,可促进植物的防御机制^[33]。磷烯醇丙酮酸(PEP)形成丙酮酸盐涉及亮氨酸、谷氨酸的生物合成,在杀青过程中茶氨酸含量增加了,这表明该过程可能促进谷氨酸向茶氨酸的转化。苯丙氨酸在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢途径中累积,之后在酶的作用下,苯丙氨酸通过黄酮类生物合成途径形成黄酮、儿茶素^[34]。众所周知,儿茶素容易被多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)氧化^[35]。因此,在酶催化过程中,儿茶素发生氧化聚合产生原花青素。在加工过程中儿茶素低聚体会降解生成单体儿茶素,而含有没食子酰基的儿茶素降解生成没食子酸,进而生成茶没食子素。另一方面,来自苯丙烷生物合成途径的没食子酸在茶没食子素合成酶的作用下生成茶没食子素,该途径生成的对香豆酸进入黄酮和黄酮醇的生物合成途径,生成游离黄酮及其糖苷。施丽娟等^[20]研究发现黄酮糖苷整体在普洱生茶中具有更高含量,推测黄酮糖苷在普洱生茶的加工中较稳定。奎宁酸、对香豆酰基奎宁酸是咖啡酰基奎宁酸的上游产物,它们在加工过程中的含量变化趋势相反。生物碱、核苷和核苷酸之间的存在转化,XMP和GMP生成黄嘌呤核苷,黄嘌呤核苷再通过咖啡因代谢途径参与到可可碱与咖啡因的合成^[6]。

3 结论

本研究采用UHPLC-HRMS技术,结合多元统计分析,对普洱生茶萎凋、杀青、揉捻-干燥、蒸

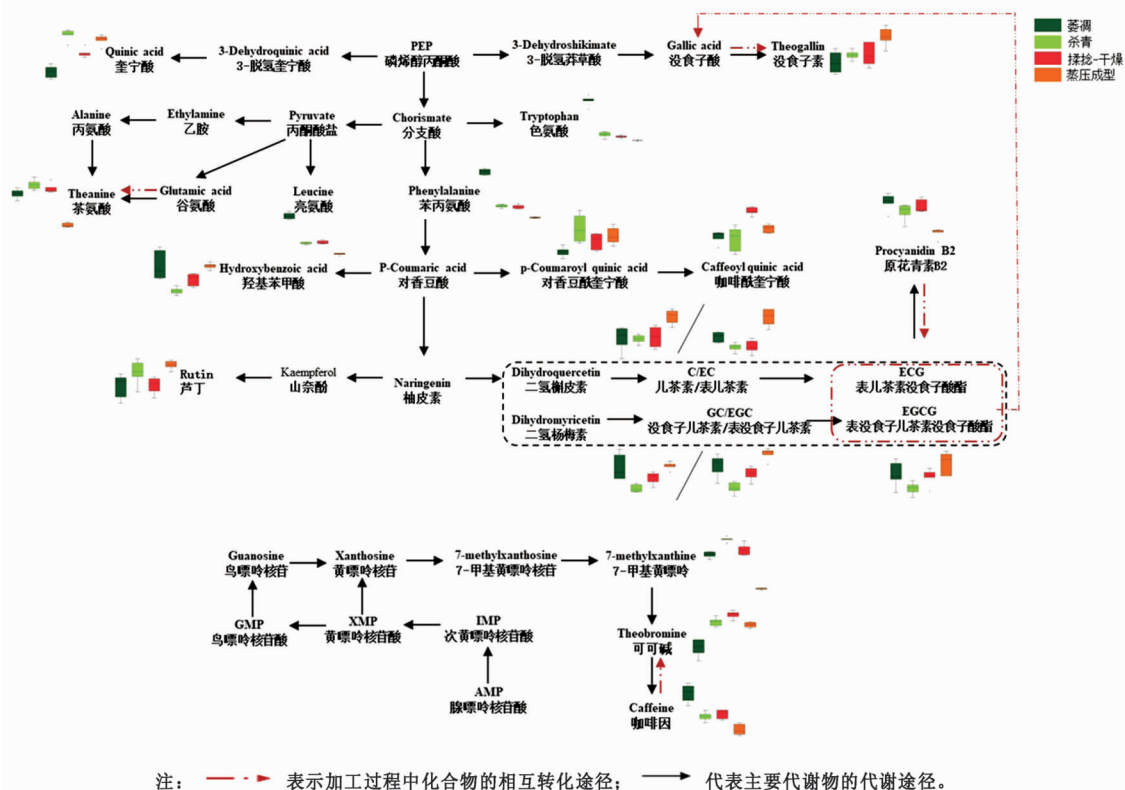


图 4 普洱生茶加工过程中主要代谢物的代谢及加工过程中相互转化途径

Fig.4 Metabolic pathways of main metabolites and their mutual transformation pathways during processing in raw Pu-erh tea

压成型 4 个加工过程中的非挥发性成分的组成和变化进行了研究。整个加工过程中,儿茶素类化合物、黄酮及其糖苷类化合物、酚酸类化合物的总含量总体呈上升趋势,而氨基酸与生物碱的总含量总体呈下降趋势。观察到杀青和蒸压成型对这些成分的影响最为显著,主要因为这 2 个阶段采用的高温是促进非挥发性代谢物发生水解、取代、异构化、氧化还原等反应的重要因素。通过 PLS-DA 方法对 4 个阶段的茶叶样本进行模式识别分析,进一步证明杀青和蒸压成型对化学组成的影响最为明显,同时筛选出 25 个重要的差异化合物。杀青处理引起单体儿茶素和儿茶素二聚体的热降解,而在蒸压成型处理后呈现相反的变化趋势。此外,蒸压成型处理这一云南特色制茶工艺对黄酮类化合物含量的提升有重要作用。氨基酸和生物碱的含量在加工结束后下降,且杀青处理后普洱生茶的鲜味氨基酸(茶氨酸)占比显著升高,减少了茶叶的苦涩味。茶叶的加工工艺不同而导致内

含成分的组成和含量存在较大差异,这些差异成分显著影响了茶叶的色、香、味。该研究为特色普洱生茶风味产品的开发提供了理论依据和参考,为加工过程中的茶叶的质量控制,品质提升提供理论基础。

参 考 文 献

[1] HO C T, ZHENG X, LI S. Tea aroma formation[J]. Food Science & Human Wellness, 2015, 4(1): 9-27.

[2] 闵天禄, 张文驹. 山茶属植物的进化与分布[J]. 植物多样性, 1996, 18(1): 1-13.

MIN T L, ZHANG W J. Evolution and distribution of *Camellia*[J]. Chinese Journal of Plant Taxonomy and Resources, 1996, 18(1): 1-13.

[3] LV H P, ZHANG Y J, LIN Z, et al. Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review [J]. Food Research International, 2013, 53 (2): 608-618.

- [4] WANG H J, HUA J J, JIANG Y W, et al. Influence of fixation methods on the chestnut-like aroma of green tea and dynamics of key aroma substances [J]. *Food Research International*, 2020, 136 (5): 109479.
- [5] TROSZVNSKA A, NAROLEWSKA O, ROBREDO S, et al. The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds[J]. *Food Quality & Preference*, 2010, 21(5): 463-469.
- [6] ZHANG L, CAO Q Q, GRANATO D, et al. Association between chemistry and taste of tea: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 101: 139-149.
- [7] XIN Z Q, MA S S, REN D, et al. UPLC-Orbitrap-MS/MS combined with chemometrics establishes variations in chemical components in green tea from Yunnan and Hunan origins [J]. *Food Chemistry*, 2018, 266: 534-544.
- [8] HUANG X J, CAO H L, GUO Y L, et al. The dynamic change of oolong tea constitutes during enzymatic-catalysed process of manufacturing[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(12): 3604-3612.
- [9] WANG D, SHI L J, FAN X W, et al. Development and validation of an efficient HILIC-QQQ-MS/MS method for quantitative and comparative profiling of 45 hydrophilic compounds in four types of tea (*Camellia sentences*) [J]. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131201.
- [10] 蒋睿, 罗理勇, 常睿, 等. 普洱生茶和熟茶的品质化学成分分析比较[J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2018, 40(6): 10.
- JIANG R, LUO L Y, CHANG R, et al. Comparative analysis of quality-related chemical components of raw Pu-erh tea and ripe Pur-erh tea[J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2018, 40(6): 10.
- [11] 杨晨, 戴伟东, 吕美玲, 等. 基于UHPLC-Q-TOF/MS的不同产地普洱生茶化学成分差异研究[J]. *茶叶科学*, 2017, 37(6): 605-615.
- YANG C, DAI W D, LÜ M L, et al. Study on the chemical constituents of Pu-erh teas from different areas by UHPLC-Q-TOF/MS[J]. *Tea Science*, 2017, 37(6): 605-615.
- [12] 宁井铭, 许姗姗, 侯智炜, 等. 贮存环境对普洱生茶主要化学成分变化的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 218-224.
- NING J M, XU S S, HOU Z W, et al. Effects of storage environment on the main chemical components of raw Pu-erh tea[J]. *Food Science*, 2019, 40 (8): 218-224.
- [13] XU S S, WANG J J, WEI Y M, et al. Metabolomics based on UHPLC-Orbitrap-MS and GNPS molecular networking reveals effects of time scale and environment of storage on the metabolites and taste quality of raw Pu-erh tea[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67 (43): 12084-12093.
- [14] ZHOU B X, MA C Q, WU T T, et al. Classification of raw Pu-erh teas with different storage time based on characteristic compounds and effect of storage environment[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 133(6): 109914.
- [15] REN D B, RAN L, YANG C, et al. Integrated strategy for identifying minor components in complex samples combining mass defect, diagnostic ions and neutral loss information based on ultra-performance liquid chromatography-high resolution massspectrometry platform: *Folium Artemisiae argyi*[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1550: 35-44.
- [16] NAVRATILOVA K, HRBEK V, KRATKY F, et al. Green tea: Authentication of geographic origin based on UHPLC-HRMS fingerprints[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019, 78: 121-128.
- [17] SHEVCHUK A, JAYASINGHE L, KUHNERT N. Differentiation of black tea infusions according to origin, processing and botanicalvarieties using multivariate statistical analysis of LC-MS data[J]. *Food Research International*, 2018, 109: 387-402.
- [18] 黄彪, 刘文静, 方灵, 等. 基于UPLC-MS/MS同时分析福建乌龙茶和白茶中的儿茶素类物质[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(10): 254-258, 270.
- HUANG B, LIU W J, FANG L, et al. Simultaneous analysis of catechins in several Fujian Oolong Tea and White Tea products by UPLC-MS/MS[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41 (10): 254-258, 270.
- [19] BOGDANOVA E, PUGAJEVA I, REINHOLDS I, et al. Two-dimensional liquid chromatography - high resolution mass spectrometry method for simultaneous monitoring of 70 regulated and emerging mycotoxins in Pu-erh tea [J]. *Journal of Chromatography A*,

- 2020, 1622: 1–12.
- [20] 施丽娟, 陈宁, 王丹, 等. 超高效液相色谱–三重四极杆串联质谱法定量分析云南大叶种茶酚类成分[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 271–280.
- SHI L J, CHEN N, WANG D, et al. Quantitative and comparative studies on phenolic constituents in different types of yunnan large leaf tea based on validated ultra–high performance liquid chromatography–triple quadrupole–tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2022, 43(8): 271–280.
- [21] 钟家怡. 绿茶中化学成分的高通量靶向定性及几种绿茶的比较分析[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021.
- ZHONG J Y. High throughput targeting characterization of chemical constituents in green tea and comparative analysis of several green teas[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021.
- [22] SAMYNATHAN R, SHANMUGAM K, NAGARAJAN C et al. The effect of abiotic and biotic stresses on the production of bioactive compounds in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. Plant Gene, 2021(5): 100316.
- [23] YAN Z M, ZHONG Y Z, DUAN Y H, et al. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits[J]. Animal Nutrition, 2020, 6(2): 115–123.
- [24] LONCARIC A, LAMAS P, GUERRA E, et al. Thermal stability of catechin and epicatechin upon disaccharides addition [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53: 1195–1202.
- [25] BI K H, ZHANG L, QIAO X G, et al. Tea polyphenols as inhibitors of furan formed in the maillard model system and canned coffee model[J]. Journal of Food Science, 2017, 82: 1271–1277.
- [26] TOTLANI V M, PETERSON D G. Epicatechin carbonyl–trapping reactions in aqueous maillard systems: Identification and structural elucidation [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2006, 54(19): 7311–7318.
- [27] 岳文杰, 洪翠云, 赵峰, 等. 基于代谢组学分析两种萎凋方式对白茶萎凋过程代谢物与品质的影响[J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(6): 9.
- YUE W J, HONG C Y, ZHAO F, et al. Effects of two withering methods on metabolites and quality during withering process of white tea based on metabolomics technology [J]. Subtropical Plant Science, 2021, 50(6): 9.
- [28] OHNSMANN J, GUILLERMO Q, GARRIGUES S, et al. Determination of caffeine in tea samples by fourier transform infrared spectrometry[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2002, 374(3): 561.
- [29] ASHIHARA H, CROZIER A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants[J]. Advances in Botanical Research, 1999, 30(8): 117–205.
- [30] TOO J C, KINYANJUI T, WANYOKO J K, et al. Effect of sunlight exposure and different withering durations on theanine levels in tea (*Camellia sinensis*)[J]. Food & Nutrition Sciences, 2015, 6(11): 1014–1021.
- [31] HO C T, SCHWAB W, SONG C, et al. Aroma compositions of large–leaf yellow tea and potential effect of theanine on volatile formation in tea [J]. Food Chemistry, 2019, 280: 73–82.
- [32] 戴宇樵, 吕才有, 何鲁南, 等. 基于代谢组学的‘云抗10号’晒青茶加工过程代谢物变化[J]. 中国农业科学, 2020, 53(2): 14.
- DAI Y Q, LÜ C Y, HE L N, et al. Metabolic changes in the processing of Yunkang 10 sun–dried green tea based on metabolomics[J]. China Agricultural Science, 2020, 53(2): 14.
- [33] SABA B, NAA B. Functional characterization of flavonoid 3′–hydroxylase, CsF3′ H, from *Crocus sativus* L.: Insights into substrate specificity and role in abiotic stress [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 667: 70–78.
- [34] EVA SÁNCHEZ –RODRÍGUEZ, MORENO D A, FERRERES F, et al. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes[J]. Phytochemistry, 2011, 72(8): 723–729.
- [35] LW A, XH A, SL B, et al. Understanding the formation mechanism of oolong tea characteristic non–volatile chemical constituents during manufacturing processes by using integrated widely–targeted metabolome and DIA proteome analysis [J]. Food Chemistry, 2019, 310: 125941.

Investigation on the Changes in Non-volatile Metabolites of Raw Pu-erh Tea during Manufacturing

Li Wenting, Fan Xiaowei, Yi Lunzhao, Hu Yongdan, Ren Dabing*

(College of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650000)

Abstract Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) was employed to comprehensively analyze the non-volatile compounds of raw Pu-erh tea (RPT) and their changes during the manufacturing process. The results showed that a total of 141 compounds were identified or annotated in RPT samples. The contents of 25 compounds changed significantly and were screened as differential compounds (VIP>1, $P<0.05$). Among the four major processing stages, de-enzyming and autoclaving-compressing treatments were the key processes that caused the changes of these compounds. De-enzyming remarkably reduced the contents of most monomeric catechins and amino acid, while autoclaving-compressing dramatically increased the contents of monomeric catechins but significantly reduced the contents of alkaloids and amino acids. It is beneficial to explore the quality formation during the production of RPT through comprehensive analysis of the changes in non-volatiles.

Keywords raw Pu-erh tea; manufacturing process; non-volatiles; UPLC-HRMS