

# 应用 UHPLC/Q-TOF/MS 研究茶叶 (*Camellia Sinensis* L.) 的糖基化次 级代谢物

非靶向特异性修饰代谢组学方法

## 应用简报

食品

## 作者

Weidong Dai, Junfeng Tan,  
Dongchao Xie, Pengliang Li,  
Haipeng Lv, Yin Zhu 和 Zhi Lin  
中国农业科学院茶叶研究所,  
中国杭州

Meiling Lu  
安捷伦科技（中国）有限公司

## 摘要

糖基化广泛存在于植物的一系列生物过程中，并被认为对人体健康有益，但是有关这一生物过程的研究有限，其主要原因在于缺乏有效的分析方法鉴定植物中丰富多样的糖基化代谢物。本应用简报介绍了 Dai 等人最近报道的一种研究茶叶 (*Camellia Sinensis* L.) 中糖基化过程的非靶向特异性修饰代谢组学方法<sup>[1]</sup>。将安捷伦超高效液相色谱 (UHPLC) 与高分辨率四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF/MS) 结合使用，在全离子源内碎裂模式下对绿茶进行分析。利用实验室定制的工作流程对采集的数据进行处理，基于特定糖基化修饰的特征性中性丢失模式，选择性地提取与糖基化相关的化合物。直接在数据库中搜索糖基化代谢物或相应的底物，进一步鉴定这些化合物。借助这一策略，同时检测出 202 种糖基化代谢物，包括葡糖基化/半乳糖基化、鼠李糖基化、芦丁糖基化和樱草糖基化，其中在绿茶浸泡液中推断鉴定出 68 种糖基化代谢物。基于 MS/MS 谱图，初步解析出另外 44 种新型糖基化代谢物。此方法使用户能够分析、发现和鉴定植物样品中的新型糖基化代谢物。



Agilent Technologies

## 前言

生物分子的内源性修饰广泛存在于生物体中，可以调控一系列生物过程，并且已经在系统生物学领域得到广泛研究<sup>[1,2]</sup>。这些修饰（包括糖基化和酰化）不仅发生在大分子（例如基因和蛋白质）中，同样也发生在小分子（例如植物中的代谢物）中<sup>[3,4]</sup>。它们可以改变代谢物的极性、挥发性、化学稳定性和生物活性，从而保护植物免受生物和非生物胁迫<sup>[5,6]</sup>。大量的次级代谢物大大增加了植物代谢组的复杂性。

与未修饰的类似物及其他主要代谢物相比，糖基化次级代谢物被普遍认为是更好的抗氧化剂、活性氧清除剂或辅酶<sup>[7]</sup>。遗憾的是，有关糖基化的系统研究受限于缺乏可靠的分析方法。随着超高效液相色谱 (UHPLC) 和具有高分析灵敏度和高分辨率的精确质量质谱的发展，对修饰代谢物的分析成为可能。尤其是非靶向特异性修饰代谢组学方法展现出同时大规模分析生物液体中代谢物的各种修饰的潜力<sup>[8]</sup>。

茶是一种主要的健康饮料，被认为对人体健康有一定的益处和保护作用。但是，尚不清楚相关机制，部分原因在于对茶叶的内源性代谢物的了解有限。众所周知，茶叶中富含儿茶素、黄酮、黄烷醇、氨基酸等。尽管这些茶叶代谢物尚未得到全面研究，但是经常观察到这些代谢物发生糖基化<sup>[9,10]</sup>。在茶叶中观察到的典型糖基化包括葡糖基化、半乳糖基化、鼠李糖基化、芦丁糖基化 (rutinosylation) 和樱草糖基化 (primeverosylation)。图 1 列出了它们相应的糖结构。上述各种糖基化均可将糖基连接至底物以生成糖基化代谢物。在串联质谱仪的碰撞诱导解离过程中，糖基化代谢物容易以中性丢失的方式丢失特定的糖基。应用非靶向特异性修饰代谢组学方法，通过匹配中性丢失模式能够实现这些化合物的

特异性分析<sup>[8]</sup>。为研究典型的茶叶糖基化，我们详细介绍并应用了这种非靶向特异性修饰代谢组学工作流程。

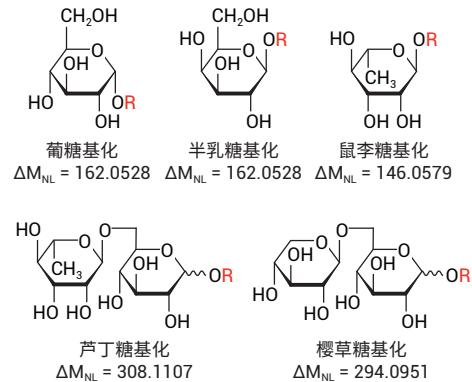


图 1. 茶树中的典型糖基化修饰。各种糖基化中的 R 表示待修饰的底物； $\Delta M_{NL}$  表示由于糖基中性丢失而造成糖基化代谢物与其底物之间的精确质量数差异

## 实验部分

### 化学品

利用一组购自 Sigma (St. Louis, MO, USA) 的化合物进行鉴定确认，其中包括山柰酚-3-O-半乳糖苷、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-7-吡喃葡萄糖苷、L-茶氨酸、D-葡萄糖、槲皮素-3-葡萄糖苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、绿原酸、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、异绿原酸 B、茶没食子素、茶黄素-3-没食子酸酯、芦丁（槲皮素-3-芸香糖苷）、异绿原酸 C 和杨梅苷（杨梅素-3-鼠李糖苷）。另外三种化合物分别是甲基水杨酸樱草糖苷、山柰酚-3,7-二鼠李糖苷和七叶苷，购自 ChemFaces (中国武汉)。此外，在实验室中合成并纯化了茶氨酸葡萄糖苷标准化合物，并使用  $^1\text{H-NMR}$  测定其结构。

## 茶叶样品前处理

在中国农业科学院茶叶研究所的茶园内种植了 14 个品种的茶树，包括尖波黄、宁州 2 号、福云 6 号、黄观音、政和大白茶、高芽齐、槠叶齐、毛蟹、龙井 43 号、悦茗香、锡茶 5 号、鼎早 2 号、皖农 95 号和鄂茶 1 号。等量采集各个品种的新鲜茶叶，充分混合，以便在混合的茶叶样品中获得尽可能多的糖基化代谢物。按照之前报道的程序，利用绿茶制作工艺对所得到的茶叶样品进行处理<sup>[11]</sup>。另外，使用相同的程序将各个品种的新鲜茶叶分别制成绿茶。将得到的绿茶样品研磨成粉末，取 30 mg 粉末加入 1.5 mL 60% 甲醇溶液 (v/v)，涡旋 20 s 充分混合。将混合物超声处理 10 min，然后在 10000 g 下离心 10 min。利用 0.22 μm 滤膜对收集的含有主要茶叶代谢组的上清液进行过滤，以备 LC/Q-TOF/MS 分析。图 2 展示了整个过程的示意图。

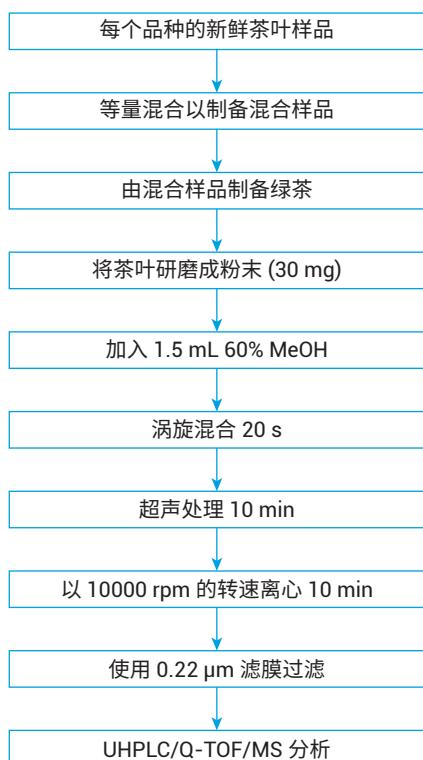


图 2. 茶叶样品前处理程序

## 茶叶样品的 LC/Q-TOF/MS 分析

使用 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 与高分辨率四极杆飞行时间质谱的联用系统 (UHPLC/Q-TOF/MS)，在梯度洗脱和正离子模式下对得到的茶叶提取物进行分析，分析条件相比于之前的工作<sup>[12]</sup> 略有改动。表 1 列出了 UHPLC 和 Q-TOF/MS 的详细实验条件。

## 详细 LC/MS 条件

表 1. 仪器条件

### 液相色谱条件

仪器	内置脱气机的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
自动进样器	带温控功能的 Agilent 1290 Infinity II 自动进样器
柱温	Agilent 1290 Infinity II 柱温箱
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm
柱温	40 °C
流动相	A) 含 5 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液 B) 含 5 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸的甲醇
流速	0.40 mL/min
进样量	1.0 μL
后运行时间	4 min
梯度洗脱曲线	0–4 min: 10%–15% B 4–7 min: 15%–25% B 7–9 min: 25%–32% B 9–16 min: 32%–40% B 16–22 min: 40%–55% B 22–28 min: 55%–95% 28–30 min: 95%

### ESI-MS/MS 条件

仪器	配备安捷伦双喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统
电离模式	正离子
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器气体压力	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	500 V
扫描模式	TOF 扫描和靶向 MS/MS 扫描
扫描范围	扫描范围: 100–1000 (MS)/50–1000 (MS2)
碰撞能量	0、5、10、15、20、25、30、35、40、45
参比离子	121.0509, 922.0098

## 非靶向特异性修饰代谢组学分析的工作流程

为实施非靶向特异性修饰代谢组学分析，在全离子源内碎裂模式下采集扫描 TOF 谱图，所用的 CE 范围为 0–45 eV，为后续研究奠定基础。

首先，使用 Agilent MassHunter 定性分析软件（7.0 版，安捷伦科技公司，美国），对不同碰撞能量下采集的混合茶叶样品的扫描 TOF/MS 数据进行初步特征提取。然后将结果导入 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件（13.1 版，安捷伦科技公司，美国）中进行峰对齐。导出得到的峰列表，并利用实验室定制的软件 Neutral Loss MSFinder 进行中性丢失匹配<sup>[8]</sup>。具有相同的共流出曲线并且质量数差异与  $m/z$  162.0528、146.0579、308.1107 和 294.0951（图 1）特征中性丢失一致的离子对应于糖基化代谢物的母离子以及底物离子，这些底物离子为发生葡糖基化/半乳糖基化、鼠李糖基化、芦丁糖基化和樱草糖基化修饰的母离子解离的碎片离子。将保留时间 ( $t_R$ ) 与中性丢失质量数 ( $\Delta M_{NL}$ ) 匹配的误差范围分别设为  $\Delta t_R < 0.1 \text{ min}$  和  $\Delta M_{NL} < 0.002 \text{ Da}$ 。根据定制的茶叶 PCDL、Metlin 和人代谢组数据库 (HMDB) 鉴定得到的糖基化代谢物或底物。对于那些数据库中未找到的糖基化代谢物或底物，借助 Agilent MassHunter MSC 软件（7.0 版），根据其 MS/MS 谱图进行解析。使用实验室中的标准品进一步确认了一些初步鉴定出的化合物。图 3 显示了所开发的工作流程的示意图。

## 基于糖基化模式区分茶叶品种

传统上，茶叶生产商选择特定的茶树品种来制作不同类型的茶叶，例如绿茶、红茶、乌龙茶、黄茶和普洱茶。这表明各种茶树都有其适用范围，适合生产一种特定类型的茶叶。为了深入研究 14 个茶树品种之间糖基化模式的差异是否与制茶的适用性相关，基于鉴定出的糖基化化合物的相对丰度进行主成分分析 (PCA)。

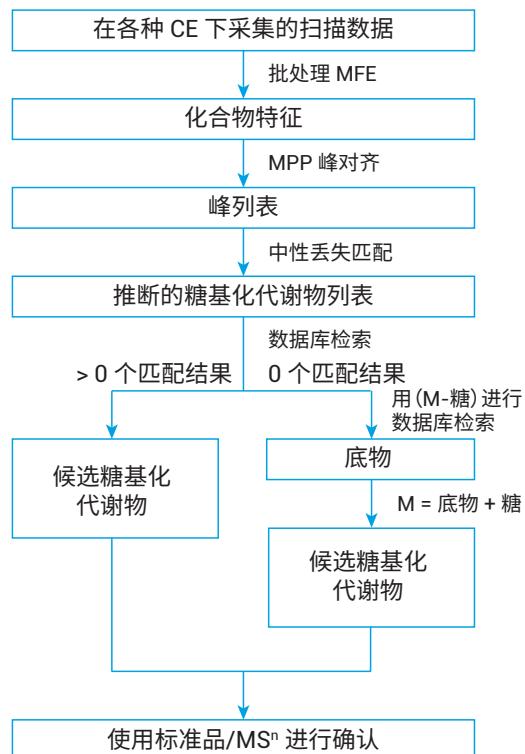


图 3. 非靶向特异性修饰茶叶糖基化分析的详细工作流程示意图。

MFE = 分子特征提取；M 表示糖基化代谢物；底物是与一个或几个糖基共价结合以形成糖基化代谢物的化合物； $MS^n$  中的  $n$  可以是 2 或 3，当  $n = 3$  时，意味着 Q-TOF 在源内碎裂模式下运行，然后在碰撞池中进一步解离，再进行第三级碎片的精确 TOF 扫描

## 结果与讨论

### 代谢物糖基化鉴定的策略和工作流程

图 1 显示，内源性糖基化通过共价结合将某些糖基（例如，单糖或二糖）加到代谢物底物上。对气相中的糖基化代谢物施加适当的能量时，单糖或二糖配体很容易通过中性丢失途径从前体上解离。糖基化代谢物与其底物之间的质量数差异对应于糖基的质量数，并且可以作为各种特异性糖基化类型的特征质量数指标。为同时采集复杂样品的尽可能多的糖基化特征，应用非选择性全离子源内碰撞诱导解离 (ISCID)。



图 4. 茶叶中糖基化模式的分析策略。通过匹配完整的糖基化代谢物母离子和 ISCID 产生的碎片离子来确定糖基（中性丢失）。橙色平行四边形和深红色椭圆形分别表示两种不同类型的糖基，而灰色表示待糖基化的底物

在仪器配置中，将 Q-TOF/MS 的四极杆设置为将所有离子从离子源传输至施加了碰撞能量的碰撞池中。将所得的碎片离子进一步传输至 TOF 分析仪中进行精确质量扫描。为了选择性地检索与糖基化相关的离子特征，开发出一种基于特异性中性丢失匹配的策略<sup>[8]</sup>。仅质量数差异对应于一种特异性糖基中性丢失（图 4）且具有相同的色谱共流出曲线的一对离子形态才表示一种糖基化。图 3 显示了更详细的工作流程，可直接鉴定糖基化代谢物或鉴定其底物，并通过中性丢失模式逐步重建前体。

为了验证该方法，以槲皮素-3-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-半乳糖苷、杨梅素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-芸香糖苷和甲基水杨酸樱草糖苷作为各种常见糖基化类型的模型化合物进行了初步考察。从理论上讲，当施加合适的碰撞能量时，由葡糖基化、半乳糖基化、鼠李糖基化、芦丁糖基化和樱草糖基化产生的化合物发生糖基解离，生成分别包含  $162.0528$  ( $C_6H_{10}O_5$ )、 $146.0579$  ( $C_6H_{10}O_4$ )、 $308.1107$  ( $C_{12}H_{20}O_9$ ) 和  $294.0951$  ( $C_{11}H_{18}O_9$ ) 典型中性质量数丢失的质谱图。Q-TOF/MS 的高分辨率使用户能够区分葡糖苷化/半乳糖基化 ( $m/z_{(NL)} = 162.0528$ ) 与咖啡酰基化 ( $m/z_{(NL)} = 162.0317$ )，以及鼠李糖基化 ( $m/z_{(NL)} = 146.0579$ ) 与香豆酰基化 ( $m/z_{(NL)} = 146.0368$ )，而使用传统的三重四极杆或基于 Q-trap 的串联质谱时无法区分。例如，在山柰酚-3-半乳糖苷的 ISCID MS/MS 谱图中， $m/z$  287.0553 对应于 [M-糖] 离子形态，比山柰酚-3-半乳糖苷的母离子 (449.1082) 低 162.0529 (图 5A)。槲皮素-3-葡萄糖苷和杨梅素-3-鼠李糖苷的中性丢失为 162.0520 和 146.0578，分别对应于葡糖苷化 (图 5B) 和鼠李糖基化 (图 5C)。对于其他两种模型化合物，也观察到了类似的特征 (数据未展示)。模型化合物的谱图表明，将中性丢失特征与色谱共流出特性结合使用，可以从复杂样品 (例如茶叶) 中选择性地检索糖基化模式。

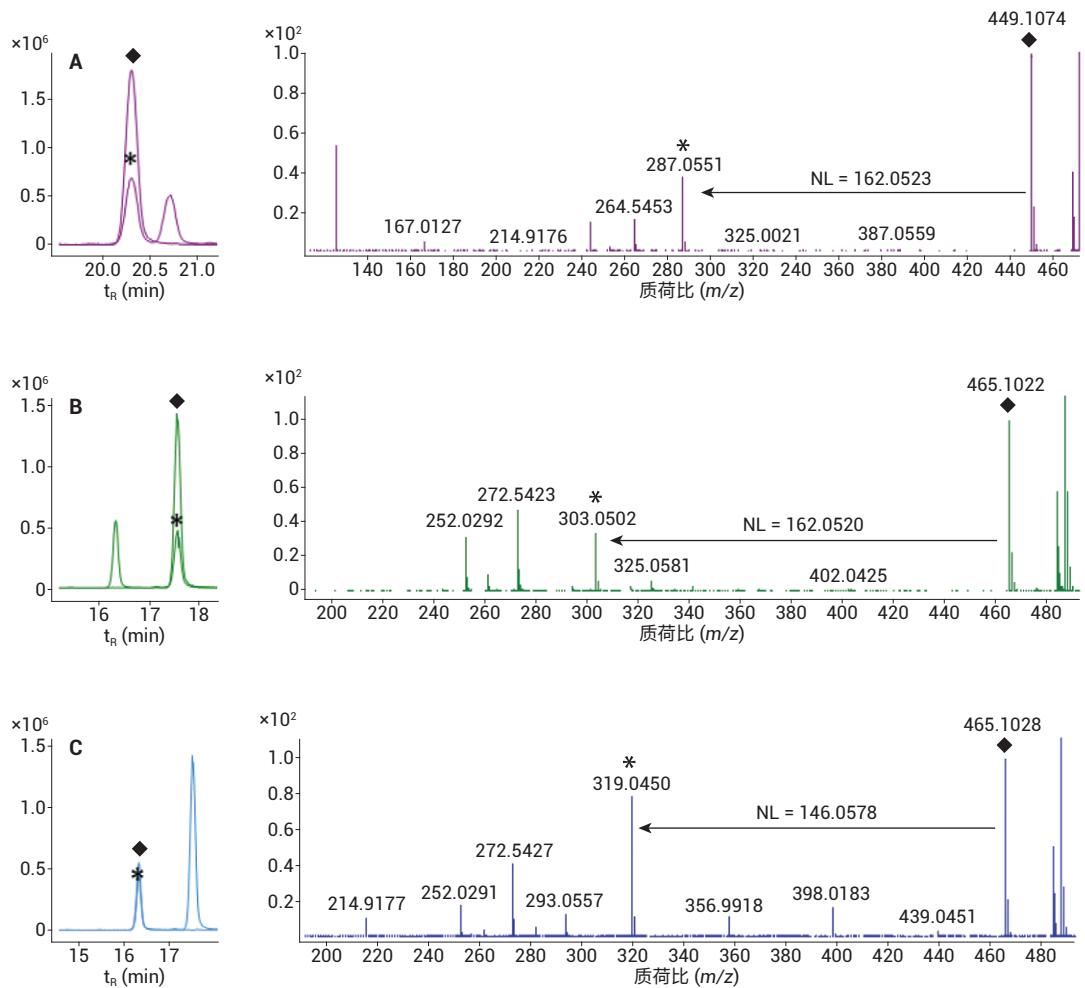


图 5. 糖基化化合物的母离子和底物离子的提取离子色谱图的典型叠加图（左图）及其基于 ISCID 的碎裂模式（右图）。A) 山柰酚半乳糖苷；B) 榆皮素-3-葡萄糖苷；C) 杨梅素-3-鼠李糖苷。通过实验测得的  $m/z$  162.0523、162.0520 和 146.0578 中性丢失分别对应于半乳糖、葡萄糖和鼠李糖丢失。◆ 表示母离子，\* 表示底物离子（糖基中性丢失生成的碎片）

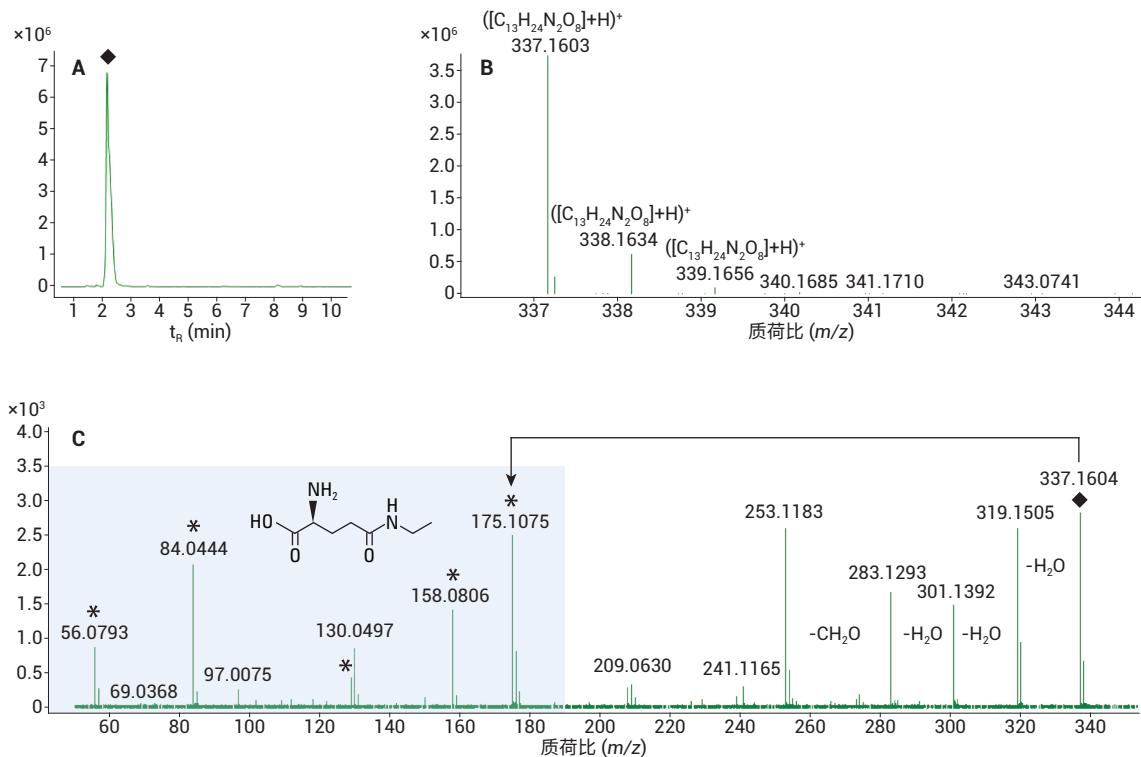


图 6.  $m/z$  为 337.1603 且保留时间为 2.26 分钟的一种新型化合物的鉴定。A) 提取离子色谱图; B) 精确 TOF/MS 谱图, 包含计算出的分子式; C) 化合物的精确 MS/MS 谱图。注: 图 C 中质荷比 175.1075 的峰对应为 337.1604 母离子发生中性丢失 162.0529 (glu/gal) 后产生的, 并且在阴影区域中还存在带 \* 标记的特征 MS/MS 峰, 表明该化合物包含茶氨酸底物

## 应用开发的策略鉴定绿茶中的糖基化代谢物

使用图 3 所示的工作流程, 处理在不同的碰撞能量下采集的扫描 TOF/MS 数据。在搜索中性丢失匹配后, 共发现 202 种化合物为混合样品中的糖基化代谢物, 其中 120 种化合物为葡萄糖基化/半乳糖基化代谢物, 38 种化合物为鼠李糖基化代谢物, 21 种化合物为芦丁糖基化代谢物, 23 种化合物为樱草糖基化代谢物。对这些化合物的进一步靶向 MS/MS 分析表明, 在 202 种化合物中, 144 种化合物可生成源自特定糖基部分的中性丢失 (表 2), 而其余 58 种化合物中的大多数化合物由于丰度较低而无法生成合格的 MS/MS 谱图。

## 优化数据库检索策略以扩大鉴定范围

LC/Q-TOF/MS 的高分析灵敏度和高分辨率有助于从一份植物样品 (例如绿茶浸泡液) 中同时采集数千种化合物的精确 TOF/MS 谱图。但是, 这些代谢物的鉴定非常具有挑战性, 并且已成为植物代谢组学研究的瓶颈, 因为只有极少一部分色谱和 MS 信号能够得到结构解析或记录在数据库中<sup>[13,14]</sup>。在搜索了可用的数据库 (包括定制的茶叶 PCDL、Metlin 和 HMDB, 其中包含数以万计的条目) 后, 在 144 种经过 CID-MS<sup>2</sup> 验证的糖基化化合物中, 只有 68 种化合物得到进一步的结构解析 (表 2)。

表 2. 一些通过结构解析得到的绿茶中的糖基化代谢物

鉴定的化合物	<i>m/z</i> (ESI+)	t <sub>R</sub> (min)	加合物	质量偏差 (ppm)	糖基化类型	MS <sup>2</sup>	包括在数据库中
3'-甲氧基蜂斗酸鼠李糖苷	455.1153	1.65	M+Na	-1.5	Rha	148, 184, 130, 258, 309	否
葡糖基纤维三糖	705.184	1.65	M+K	-1.4	Glu/Gal	611, 543, 432	是
烟酸葡萄糖苷	286.0913	1.66	M+H	-2.9	Glu/Gal	124, 252	否
丝氨酸鼠李糖苷	252.1065	1.67	M+H	-5.0	Rha	148, 134, 118, 106	否
L-谷氨酸二葡萄糖苷	472.1658	1.67	M+H	-0.6	Glu/Gal	134, 148, 292, 310	否
甲基鸟嘌呤三葡萄糖苷	652.23	1.68	M+H	-1.2	Glu/Gal	148, 325, 335, 490	否
谷氨酸葡萄糖苷	310.114	1.68	M+H	2.4	Glu/Gal	114, 130, 148, 226, 246	否
鸟嘌呤三葡萄糖苷	638.2163	1.68	M+H	1.8	Glu/Gal	325, 134, 145, 163, 476, 541	否
七叶苷	341.0865	7.89	M+H	-0.6	Glu/Gal	139, 151, 165, 123, 179	是
1-O-咖啡酰葡萄糖	343.1032	8.21	M+H	2.5	Glu/Gal	297, 139, 307, 181	是
1-(4-羟苯基)-1,2,3-丙三醇-2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	347.1306	8.61	M+H	-8.8	Glu/Gal	301, 285, 185, 203	是
水杨酸-β-D-葡萄糖苷	323.0731	8.81	M+Na	-2.0	Glu/Gal	185, 161, 203, 153	是
(1S,2S,4R,8S)-p-薄荷烷-1,2,8,9-四醇-2-葡萄糖苷鼠李糖苷	535.2352	10.09	M+Na	-1.7	Rha	407, 357, 365, 389	否
3,4-二羟基-5-异戊烯苯甲酸甲酯-3-葡萄糖苷	399.1644	10.18	M+H	-1.4	Glu/Gal	163, 131, 237, 279	是
泛酸樱草糖苷	514.2137	10.26	M+H	1.3	Pri	382, 393, 273, 291, 220	否
Lusitanicoside	465.1723	10.29	M+Na	-1.8	Glu/Gal	303, 277, 175	是
杨梅素-3-葡萄糖苷	481.0970	14.41	M+H	-1.4	Glu/Gal	319	是
杨梅素芸香糖苷	627.1546	14.95	M+H	-1.5	Rut	175, 319, 455	否
芹菜素二葡萄糖苷	595.1651	15.27	M+H	-1.1	Glu/Gal	433, 313, 271, 415	否
山柰酚-3,7-二鼠李糖苷	579.1699	15.42	M+H	-1.6	Rha	433, 303, 313, 415	是
槲皮素-3-O-半乳糖芸香糖苷	773.2128	16.01	M+H	-0.9	Rut	303, 465, 611	是
槲皮素-3-半乳糖苷	465.1018	16.21	M+H	-2.0	Glu/Gal	303	是
槲皮素-3-O-半乳糖苷	465.1019	16.91	M+H	-1.8	Glu/Gal	303	是
Aeglin	533.1986	17.04	M+Na	-1.4	Glu/Gal	481, 499, 469, 409, 371	是
芦丁	611.1597	17.27	M+H	-1.6	Rut	303, 465, 561	是
异槲皮苷	465.1020	17.29	M+H	-1.6	Glu/Gal	303	是
山柰酚-7-葡萄糖芸香糖苷	757.2176	17.95	M+H	-1.2	Rut	287, 449, 595, 611	是
肉桂酸二葡萄糖苷	473.1659	18.84	M+H	1.2	Glu/Gal	371, 127, 321, 311	是
2,6-二羟基苯甲酸苄酯-2-葡萄糖苷	429.1149	18.97	M+Na	-1.6	Glu/Gal	249, 267, 287, 321	是
紫云英苷	449.1070	19.01	M+H	-1.9	Glu/Gal	287, 85	是
甲氧芸苔宁芸香糖苷	575.1727	19.01	M+H	-0.1	Rut	331, 398, 267, 429	否
山柰酚-3-葡萄糖芸香糖苷	757.2175	19.02	M+H	-1.4	Rut	287, 449, 595	是
山柰酚-3-O-半乳糖苷	449.1070	19.21	M+H	-1.9	Glu/Gal	287	是
氧化芳樟醇芸香糖苷	479.2482	19.46	M+H	-1.0	Rut	252, 295, 259, 333, 171	否
银杏内酯-C-芸香糖苷	749.2492	24.77	M+H	-0.9	Rut	147, 309, 441, 587	否
桑辛素-C-樱草糖苷	605.2249	24.79	M+H	3.3	Pri	457, 441, 221, 311, 385	否

Gl: 葡糖苷化; Gal: 半乳糖基化; Rha: 鼠李糖基化; Rut: 芦丁糖基化; Pri: 樱草糖基化。以蓝色高亮显示的碎片离子表示糖基化代谢物的底物离子。如需查看完整的化合物列表, 请参阅参考文献 1 的支持信息。

为扩大糖基化代谢物鉴定的覆盖范围，当推断的糖基化代谢物列表中未查询到相应离子特征时，对底物 ( $[M\text{-糖}]^+$ ) 进行数据库检索鉴定（图 3）。可以结合底物部分和糖基部分来重建所查询离子特征的可能结构。使用此策略，进一步解析混合绿茶浸泡液中的 44 种糖基化代谢物，它们被认为是新型化合物。其中，一种典型的离子特征 ( $m/z = 337.1599, t_R = 2.26 \text{ min}$ ) 表现出的 NL 为 162.0524，与糖基化代谢物相对应（图 6）。该离子特征与数据库中的任何候选化合物均不匹配，但底物离子特征  $m/z = 175.1071$  与茶氨酸（茶叶中的特征性游离氨基酸）匹配。因此，将离子特征  $m/z 337.1599$  初步鉴定为茶氨酸葡萄糖苷。该化合物此前未有报道。使用实验室中合成的茶氨酸葡萄糖苷标准品进一步确认了该新型化合物的鉴定结果。

## 不同品种的绿茶中糖基化代谢物的变化

为考察不同品种的茶叶之间糖基化的差异，对 14 个品种的茶叶样品进行了非靶向代谢组学分析。对鉴定出的糖基化代谢物进行主成分分析，14 种绿茶的混合样品（QC 样品以蓝色显示）集中在 PCA 得分图的中心（图 7），表明该批代谢组学数据重现性和可靠性非常出色。此外，茶叶样品可以很容易地在得分图中分为两个部分。PCA 得分图的右侧为皖农 95 号、槠叶齐、高芽齐、尖波黄、福云 6 号和宁州 2 号，它们表现出相似的糖基化模式；左侧为龙井 43 号、锡茶 5 号、鄂茶 1 号、政和大白茶、兔毫 2 号、毛蟹、悦茗香和黄观音，它们也具有相似的糖基化代谢物图谱。

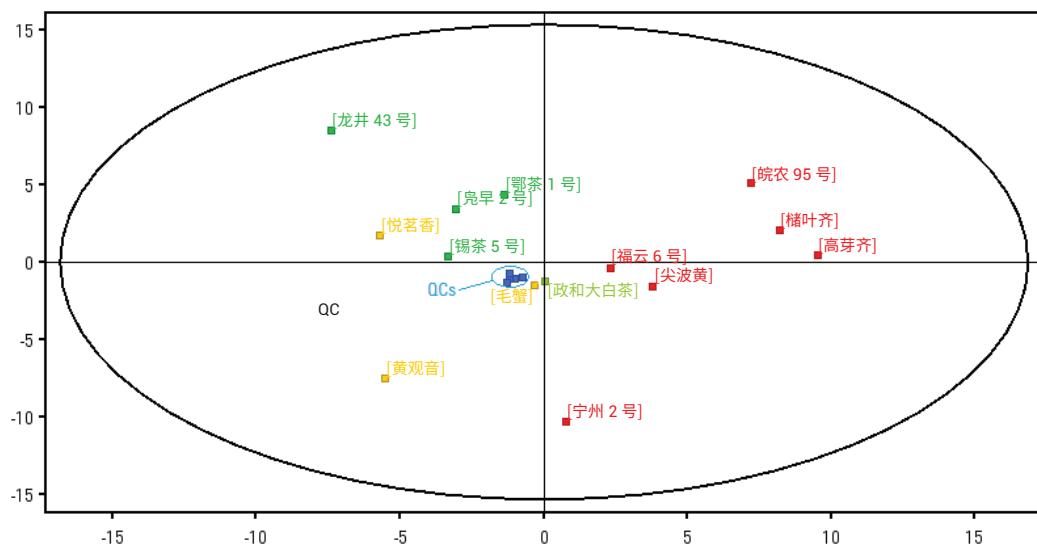


图 7. 14 个品种的绿茶样品的主成分分析得分图。以红色显示的品种通常适合制作全发酵茶（如红茶）；以绿色和橙色显示的品种通常分别适合制作绿茶和半发酵茶（如乌龙茶）

一些糖基化代谢物对 PCA 图左侧和右侧的茶叶样品之间差异贡献显著。PCA 得分图左侧的茶叶样品中半乳糖基化化合物含量升高，葡萄糖基化则表现出相反的趋势。例如，山奈酚-3-O-半乳糖苷和槲皮素-3-O-半乳糖苷在左侧表现出明显更高的水平 ( $p < 0.05$ )；山奈酚-3-O-芸香糖苷和山奈酚-3-O-葡萄糖芸香糖苷表现出相反的趋势 ( $p < 0.05$ ) (图 8)。根据经验，右侧的茶树适合制作红茶，左侧的茶树通常适合制作绿茶和半发酵茶。因此，茶树中半乳糖基化/葡萄糖基化的比例可能是制作不同类型茶的重要因素。

## 结论

本研究详细介绍了一种基于 UHPLC/Q-TOF/MS 的非靶向特异性修饰代谢组学方法，并成功地将其应用于绿茶浸泡液中葡萄糖基化、半乳糖基化、鼠李糖基化、芦丁糖基化和樱草糖基化次级代谢物的分析和鉴定。所述工作流程大大拓展了糖基化代谢物的鉴定范围，并提高了对未知代谢物进行结构解析的能力。该方法可以进一步扩展以分析植物中许多其他重要的修饰。

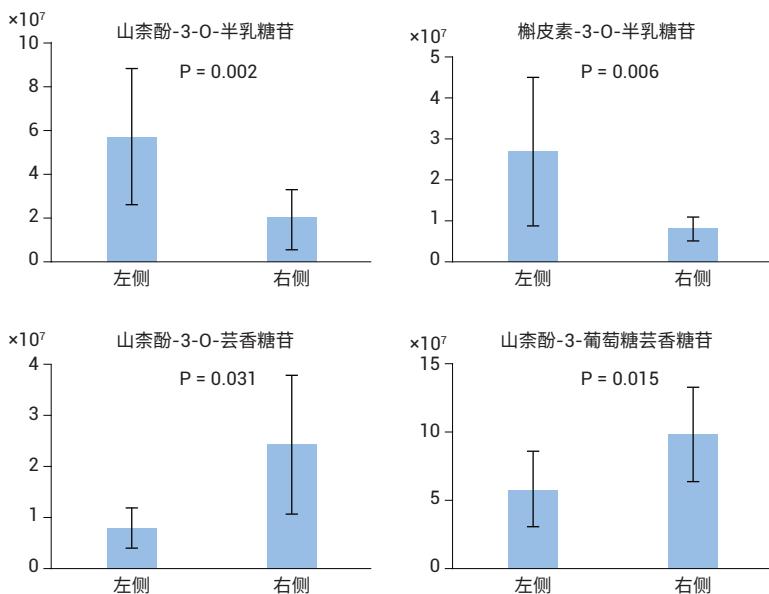


图 8. 位于 PCA 得分图 (图 6) 左侧的茶树品种 (政和大白茶、碧早 2 号、毛蟹、龙井 43 号、悦茗香、锡茶 5 号、黄观音和鄂茶 1 号) 与位于右侧的茶树品种 (尖波黄、宁州 2 号、高芽齐、槠叶齐、皖农 95 号和福云 6 号) 之间典型的独特糖基化代谢物

## 参考文献

1. W. D. Dai, et al. "Nontargeted modification-specific metabolomics investigation of glycosylated secondary metabolites in tea (*Camellia sinensis* L.) based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry" *J. Agric. Food Chem.* **64**, 6783-6790 (2016)
2. D. O. Croci, et al. "Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors" *Cell* **156**, 744-758 (2014)
3. J. Cheng, et al. "Unraveling the mechanism underlying the glycosylation and methylation of anthocyanins in peach" *Plant Physiology* **166**, 1044-1058 (2014)
4. L. Cui, et al. "Identification of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of astringent taste compounds in tea (*Camellia sinensis*)" *J. Exp. Bot.* **67**, 2285-2297 (2016)
5. T. Huan, et al. "MyCompoundID MS/MS Search: Metabolite Identification Using a Library of Predicted Fragment-Ion-Spectra of 383,830 Possible Human Metabolites" *Anal. Chem.* **87**, 10619-10626 (2015)
6. L. Li, et al. "MyCompoundID: using an evidence-based metabolome library for metabolite identification" *Anal. Chem.* **85**, 3401-3408 (2013)
7. V. Arbona, et al. "Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants" *Intern. J. Mol. Sci.* **14**, 4885-4911 (2013)
8. W. Dai, et al. "Nontargeted Modification-Specific Metabolomics Study Based on Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **86**, 9146-9153 (2014)
9. A. Drewnowski, C. Gomez-Carneros. "Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review" *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 1424-1435 (2000)
10. H.P. Lv, et al. "Bioactive compounds from Pu-erh tea with therapy for hyperlipidaemia" *J. Functional Foods* **19**, 194-203 (2015)
11. W. Dai, et al. "Nontargeted analysis using ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry uncovers the effects of harvest season on the metabolites and taste quality of tea (*Camellia sinensis* L.)" *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9869-9878 (2015)
12. J. Tan 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" *Food Res. Intern.* **79**, 106-113 (2016)
13. J. Chen, et al. "Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information" *Anal. Chem.* **80**, 1280-1289 (2008)
14. J. Mitchell, et al. "Development and in silico Evaluation of Large-Scale Metabolite Identification Methods Using Functional Group Detection for Metabolomics" *The FASEB J.* **29**, 567. 522 (2015)

查找当地的安捷伦客户中心：  
[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：  
800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：  
[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：  
[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的  
详细信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接  
损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2017  
2017年7月13日, 中国出版  
5991-8066ZHCN



**Agilent Technologies**