

利用固相微萃取和气相色谱-质谱 联用法分析嫁接红茶香气变化的 化学计量学方法

应用简报

作者

Wei Chen, Chengying Ma,
Aiqing Miao, Shi Pang,
Dandan Qi
广东省农业科学院茶叶研究所
中国广东

Wenwen Wang
安捷伦科技（中国）有限公司
中国北京

摘要

开发出一种固相微萃取 (SPME) 和气相色谱/三重四极杆质谱 (GC/QQQ) 方法，用于分析嫁接红茶样品。使用 Agilent MassHunter Profinder 和 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件进行数据提取和统计分析。对鉴定或初步鉴定的特征挥发性化合物进行主成分分析和层次聚类分析，以揭示不同茶叶样品之间的差异。



Agilent Technologies

前言

茶 (*Camellia sinensis*) 是一种是全球流行的饮料，在中国尤其受到欢迎。作为感官品质的关键指标之一，茶香气是挥发性组分的体现。嫁接是茶树繁殖和品种改变中广泛使用的技术。由于替换砧木后接穗中的次级代谢产物可能发生变化，因此移植后可能发生挥发性组分的变化[1,2]。气相色谱-质谱 (GC/MS) 与化学计量学结合，是研究和揭示茶样品中挥发性和半挥发性化合物的复杂混合物变化的有效技术。

在本研究中，为揭示嫁接引起的香气特征差异，将固相微萃取 (SPME) 与扫描模式下的 GC/QQQ 和化学计量学方法相结合，对由非嫁接和嫁接英红 9 号（中国广东省流行的一个茶树品种）制得的红茶样品中的挥发性组分进行提取和分析。利用 Agilent MassHunter Profinder 软件提取化合物信息并将数据导出为化合物交换文件 (cef 文件)。为了以良好的重现性获得特征挥发性化合物的数据矩阵，利用生物信息学数据挖掘和化学计量学分析软件 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 进行样品保留时间对齐和数据过滤 [3,4]。对所得的化合物进行主成分分析 (PCA) 和层次聚类分析 (HCA)，以鉴定各种茶叶样品之间的差异。

实验部分

茶叶样品

用非嫁接英红 9 号 (CK) 以及四个不同品种的茶树（包括白毛 2 号 (BM)、黑叶水仙 (HY)、黄枝香单枞 (HZX) 和五岭红 (WLH)）砧木上的嫁接英红 9 号制备五组转子红碎茶（压碎-撕裂-揉捻型）样品（包括六个生物学平行样品），如图 1 所示。



图 1. 本研究中所用茶的来源

仪器条件

表 1. GC/QQQ 条件

参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B
色谱柱	DB-5MS, 60 m × 0.32 mm, 0.25 μm (部件号 123-5562)
柱温箱升温程序	在 50 °C 下保持 3 分钟，以 5 °C/min 的速率升至 250 °C，保持 5 分钟
载气	氦气
流速	1.0 mL/min
进样模式	手动，SPME 纤维
进样口温度	270 °C
接口温度	280 °C
质谱系统	Agilent 7000D
离子源	EI, 70 eV
离子源温度	230 °C
四极杆温度	Q1 和 Q2 = 150 °C
谱图采集	全扫描，35–500 m/z

SPME 条件

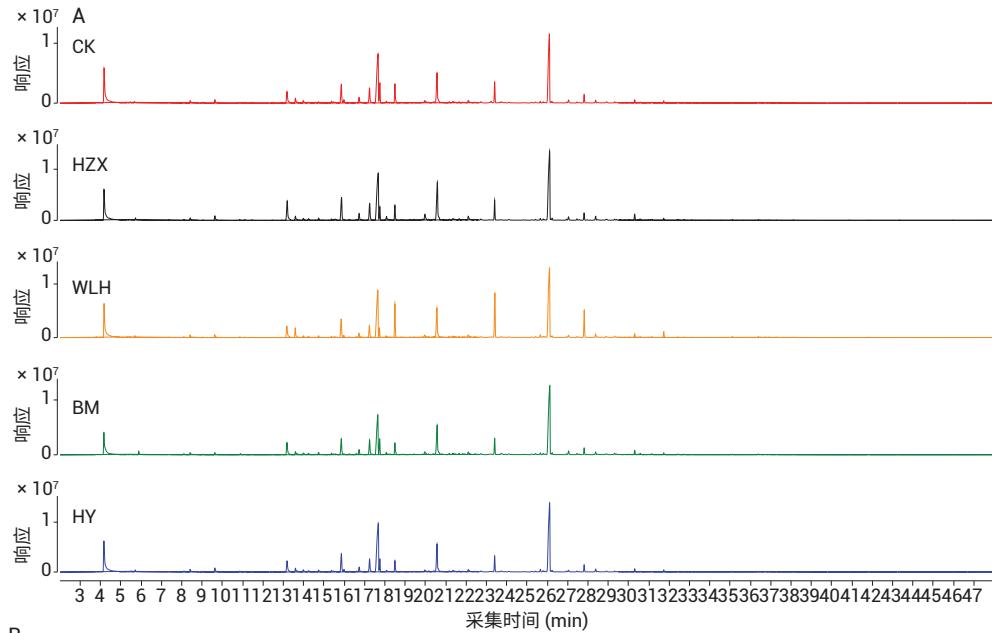
称取 3.5 g 红茶样品放入玻璃样品瓶中，注入 10 mL 沸水，然后加入 10.0 μL 癸酸乙酯（溶于乙醚中，浓度为 0.2 μg/μL）作为内标。将样品瓶密封并转移至 60 °C 水浴中，保持 5 分钟。用 DVB/CAR/PDMS-50/30 μm SPME 纤维在 60 °C 下萃取 40 分钟。在 270 °C 下对 SPME 纤维脱附 4.5 分钟。

结果与讨论

数据提取

图 2A 显示出不同嫁接红茶样品的总离子流色谱图。MassHunter Profinder 软件是一种在分析中处理多个样品的高效工具，让用户能够在许多样品中显示、查

看并编辑同一个化合物的结果。交叉样品处理可获得更高质量的结果。使用 Profinder 软件 (B.08 版) 通过分子特征提取 (MFE) 功能进行色谱峰提取 (图 2B)。在 Profinder 软件中获得每个样品的 Cef 文件，并导入 MPP 软件中进行分析。



B

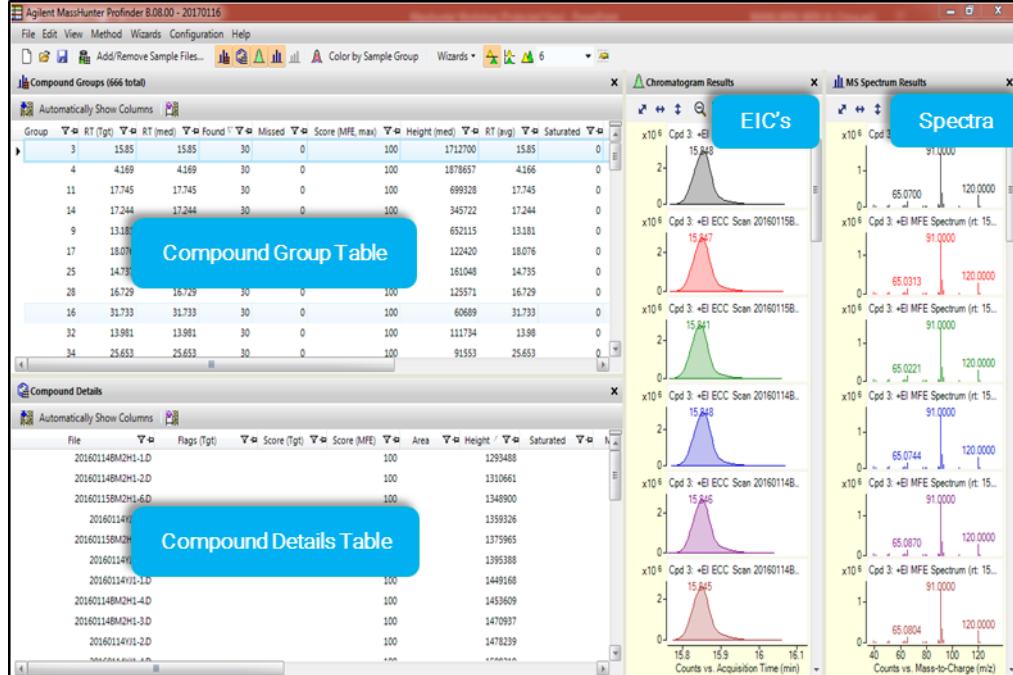


图 2. A) 五组红茶样品的总离子流色谱图, B) Agilent MassHunter Profinder 软件的主界面

数据过滤与化合物鉴定

使用 MPP 软件进行数据过滤和化学计量学分析 (B.14.5 版)。对所有 cef 文件进行数据过滤。对于五组样品，通过数据对齐总共获得了 584 个条目。随后基于发生频率、样品变异性和平单因素方差分析 (单因素 ANOVA) 的过滤器进行逐步数据过滤。在至少一个样品组 (发生频率过滤器) 内始终存在 102 个条目，并表现出良好的重现性 (变异系数 < 25%，样品变异性

过滤器)。然后，通过单因素 ANOVA 选择了 44 个条目，有关 CK (非嫁接组) 的 p 值截止限为 0.05，倍数变化阈值为 1.5 (FC \geq 1.5)。最后，基于 NIST14 数据库进行谱库搜索，通过 ID 浏览器初步鉴定出 34 种化合物 (图 3)。通过参比标样确认了八种挥发性化合物，并列于表 2 中。对主要由醛、醇、酮和酯组成的 34 种化合物进行主成分分析和层次聚类分析。

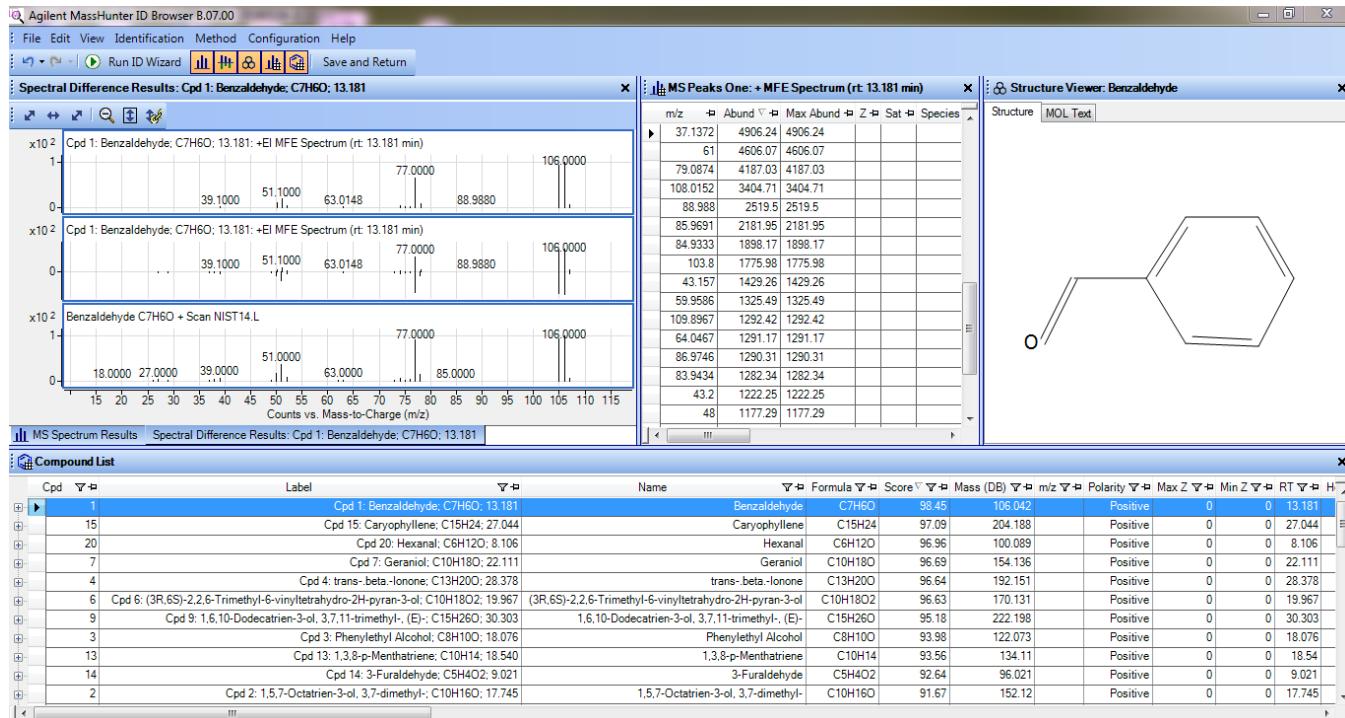


图 3. 用于化合物鉴定的 Agilent Mass Profiler Professional 的 ID 浏览器功能

表 2. 根据参比标样鉴定出的化合物

编号	RT (min)	化合物	CAS 号
1	8.10	己醛	66-25-1
2	13.18	苯甲醛	100-52-7
3	14.74	(E,E)-2,4-庚二烯醛	4313-03-5
4	16.24	(E)-2-辛烯醛	2548-87-0
5	19.44	(E)-2-壬烯醛	18829-56-6
6	20.81	癸醛	112-31-2
7	22.11	香叶醇	106-24-1
8	28.38	(E)-β-紫罗兰酮	79-77-6

主成分分析 (PCA)

PCA 是一种常用的无监督统计方法，用于降低大数据集的维数，以揭示样本间的差异。对 34 种选定的化合物进行 PCA。前三个主成分解释了原始数据中约 90% 的变化。3D 评分图显示，CK 与四个嫁接样品组之间得到了清晰的分离，表明所选择的化合物具有非嫁接和嫁接样品歧视的特征（图 4）。PC1 解释了 47.6% 的方差；沿该坐标实现了 HZX、BM 与其他组的分离。PC2 解释了 25.4% 的方差；CK、HY 与 WLH 的样品沿该坐标彼此分离。

层次聚类分析 (HCA)

HCA 是一种强大的方法，用于揭示数据集中的子群，允许将具有相似丰度特征的观察结果合并成聚类。对 34 种选定的化合物进行 HCA。结果显示为树状图（图 5）。根据茶样品的嫁接处理方法将其分为五个聚类。来自 BM 嫁接组的样品与来自 CK 的样品具有相似的化合物丰度，而 HZX 的丰度特征与 CK 和其余嫁接组均有所不同。

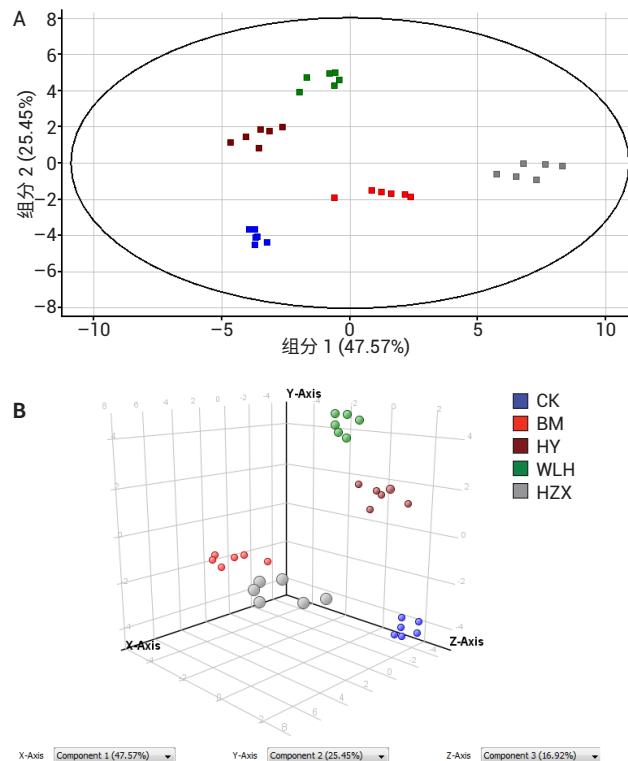


图 4. 五组红茶样品的 2D 和 3D PCA

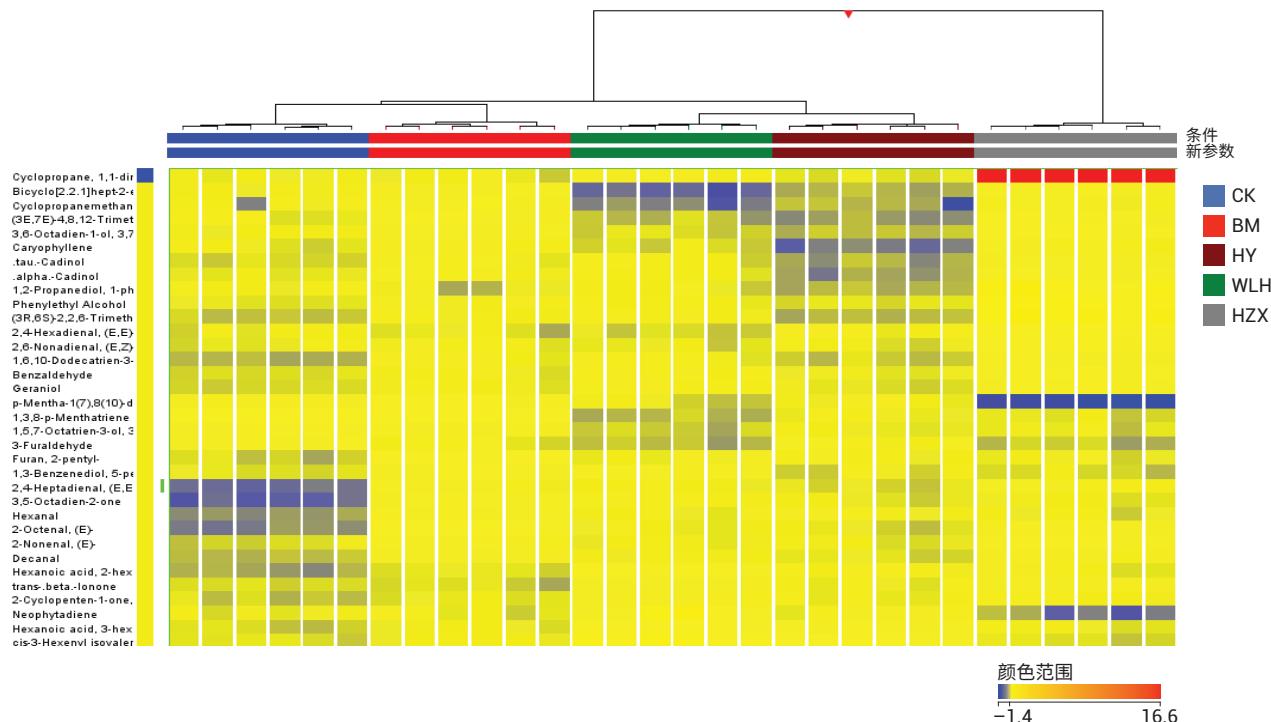


图 5. 与各种红茶样品中检出化合物关联的 HCA 热点图

结论

使用 Agilent 7000D GC/QQQ 进行非靶向 GC/MS 分析，能够提供信息丰富的数据，以便对嫁接红茶进行分类和区分。Agilent MSD Productivity MassHunter 和 Agilent Mass Profiler Professional 软件能够自动挖掘并处理数据，以找出特征化合物。采用 PCA 和 HCA 基于鉴定出的化合物使五组样品获得了清晰的分离。结果表明嫁接影响红茶的挥发性有机化合物特征，这一发现可能有利于指导茶树繁殖中的砧木选择。

参考文献

1. E. J. Warschefsky, et al. "Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes" *Trends in Plant Science* **21**(5), 418-437 (2016)
2. R. Joshi, et al. "Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in Kangra orthodox black tea" *Food Chemistry* **167**, 290-298 (2015)
3. M. Wang, et al. "An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products" *Food chemistry* **152**, 391–398 (2014)
4. S. Baumann 等人，使用安捷伦 GC/Q-TOF 和 Mass Profiler Professional 软件表征橄榄油，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0106CHCN

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。

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

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 8 月 15 日, 中国出版
5991-8330ZHCN



Agilent Technologies