

应用代谢组学技术研究不同品质白茶的代谢物与风味特征



作者

Chen Yang, Weidong Dai,
Junfeng Tan 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
中国北京

摘要

本应用简报通过基于 UHPLC-Q-TOF/MS 的非靶向代谢组学分析方法探讨了白茶中非挥发性化合物对茶叶风味特征的影响。使用 UHPLC-Q-TOF/MS 分析茶叶的提取物，然后进行特征化合物的提取和比对，得到 1915 种化合物。基于这些化合物的主成分分析 (PCA) 和有监督的偏最小二乘差异分析 (PLSDA) 表明，三种不同品质白茶样品可以很好地分离。通过与标准品和数据库进行匹配，鉴定出多达 99 种代谢物。经由显著性检验和相关性分析发现，有显著差异的代谢物中有 41 种与风味高度相关；其中，茶氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和 AMP 与鲜味呈正相关，而黄烷-3-醇、聚酯型儿茶素、原花青素 B3 和可可碱与苦味和涩味呈正相关。结果表明，代谢组学技术是一种有效的发现茶叶中特征代谢物的手段，这些特征代谢物有望作为潜在标记物用来区分不同品质的白茶，以应对人为掺假和标签错贴的现象。

前言

白茶 (*Camellia sinensis* L.) 是中国传统茶叶之一，主要产于中国福建省的北部和东部。近年来，白茶已被证明对健康具有潜在益处^[1]，因而促进了其在中国的消费。不同品质的白茶具有不同的生物活性、香气、风味和商业价值。已有文献对白茶中少数已知的高丰度物质进行了定量研究^[2,3]。为进一步了解白茶品质，防止人为掺假和标签错贴，本应用报告介绍一种采用代谢组学方法研究不同品质白茶中的非挥发性组分，旨在阐明白茶的特征和差异代谢物及其与白茶风味（鲜味、苦味和涩味）之间的关系。

实验部分

样品前处理

将新鲜茶叶按品质分类，包括 10 种白毫银针 (SN)、8 种白牡丹 (WP) 和 11 种寿眉 (SM)。将这些茶叶按照典型的白茶制作工序（包括萎凋和干燥）加工为白茶。制成白茶后，将其研磨成粉末（使用 100 目筛网过筛），并于 4 °C 下保存。称取每个茶粉样品 1 g，加入到 100 mL 沸水中，在 100 °C 下浸提 5 分钟后使用纤维素滤膜过滤，用于茶叶风味的量化评价。对于包括鲜味、苦味和涩味的茶叶风味的等效量化评价方法，参见之前研究中的详细描述^[4]。

茶叶代谢物提取

将茶粉（每个样品 0.1 g）在 10 mL 去离子水 (100 °C) 中浸提 5 分钟，提取茶叶代谢物。移取 2 mL 溶液，然后以 10000 × g 的速度将其离心 10 分钟。使用 0.22 μm 膜

过滤上清液，然后进行 UHPLC-Q-TOF/MS 分析。将等体积的每种茶叶样品 (50 μL) 混合，制备得到质控 (QC) 样品。这些质控样品用于评估代谢组学分析的数据可靠性与稳定性。图 1 为样品前处理示意图。

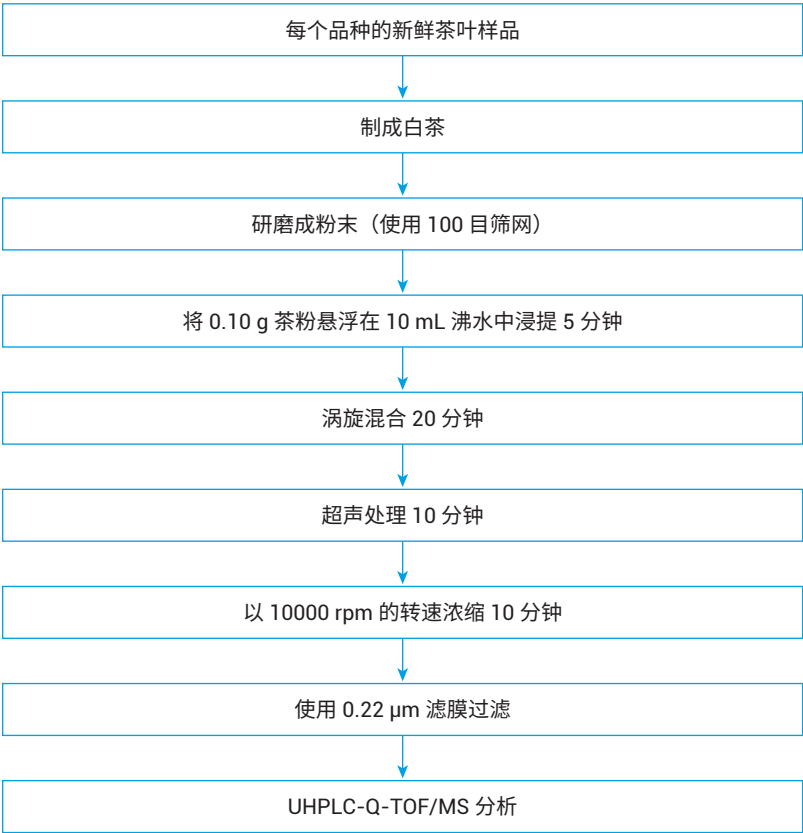


图 1. 茶叶样品前处理流程

非靶向代谢组学研究

采用 UHPLC 与 Q-TOF 质谱仪的联用系统进行数据采集。表 1 所示为 HPLC 分离和 MS 检测的详细条件。使用 LC/Q-TOF 获得 TOF 扫描和自动 MS/MS 数据，以及标准化化合物的靶向 MS/MS 数据。

代谢组学分析工作流程

为进行非靶向代谢组学分析，首先在 TOF 扫描模式下获得各组样品和 QC 样品的精确质量质谱图。使用 Agilent MassHunter Profinder 软件（8.0 版）对得到的原始数据进行分子特征提取，并将结果导入 Mass Profiler Professional (MPP) 软件（14.8 版，安捷伦科技公司，Santa Clara, CA），根据 QC 样品中各峰的变异系数 ($\leq 30\%$) 进行峰对齐和初步过滤。通过以下方式鉴定所得峰：

- 与数据库（包括 Metlin 和 HMDB）进行匹配
- 与标准化化合物进行匹配
- 根据 MS/MS 谱图进行解析

采用包括主成分分析、偏最小二乘差异分析和层次聚类分析的化学计量学方法，来展示有显著差异的代谢物在不同品质白茶中的表现。对鉴定出的差异代谢物的丰度与茶叶风味进行了 Pearson 相关性分析。

在三组茶叶样品中，对得到的具有高度相关性的差异代谢物进行了验证。图 2 所示为茶叶代谢组学分析的完整工作流程。

表 1. 仪器条件

参数	值
液相色谱条件	
HPLC	内置脱气机的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪；带温控功能的自动进样器；柱温箱
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 × 3.0 mm, 1.8 μm
柱温	40 °C
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 甲醇
流速	0.4 mL/min
进样量	3.0 μL
进样针反冲	使用纯甲醇冲洗 5 s
梯度洗脱曲线	0–4 分钟 B 由 10% 升至 15% 4–7 分钟 B 由 15% 升至 25% 7–9 分钟 B 由 25% 升至 32% 9–16 分钟 B 由 32% 升至 40% 16–22 分钟 B 由 40% 升至 55% 22–28 分钟 B 由 55% 升至 95% 28–30 分钟 B 为 95% 30–31 分钟 B 由 95% 降至 10% 31–35 分钟 B 为 10%
ESI-Q-TOF MS 条件	
质谱仪	配备双喷射电喷雾离子源的 Agilent 6540/6545 超高分辨率精确质量 Q-TOF LC/MS
极性	正离子模式
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化气压力	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
MS 扫描范围	<i>m/z</i> 100–1100
MS/MS 扫描范围	<i>m/z</i> 50–1100
参比离子	<i>m/z</i> 121.0509/922.0098
扫描模式	TOF 扫描、自动 MS/MS 和靶向 MS/MS

结果与讨论

茶叶提取物的分离与检测

如之前的报道所述，使用优化的 UHPLC 梯度洗脱可以分离白茶提取物中的数千种化合物^[5]。将色谱柱洗脱液通过电喷雾离子源接口引入到 Q-TOF MS 质谱仪中，在 TOF 扫描模式下进行检测。如典型的 QC 样品的总离子流色谱图（图 3）所示，所选条件可以使未知化合物实现适当的分离。使用 MassHunter Profinder 软件（8.0 版）对采集的数据进行递归分子特征提取 (MFE)，获得可靠的代谢物特征。

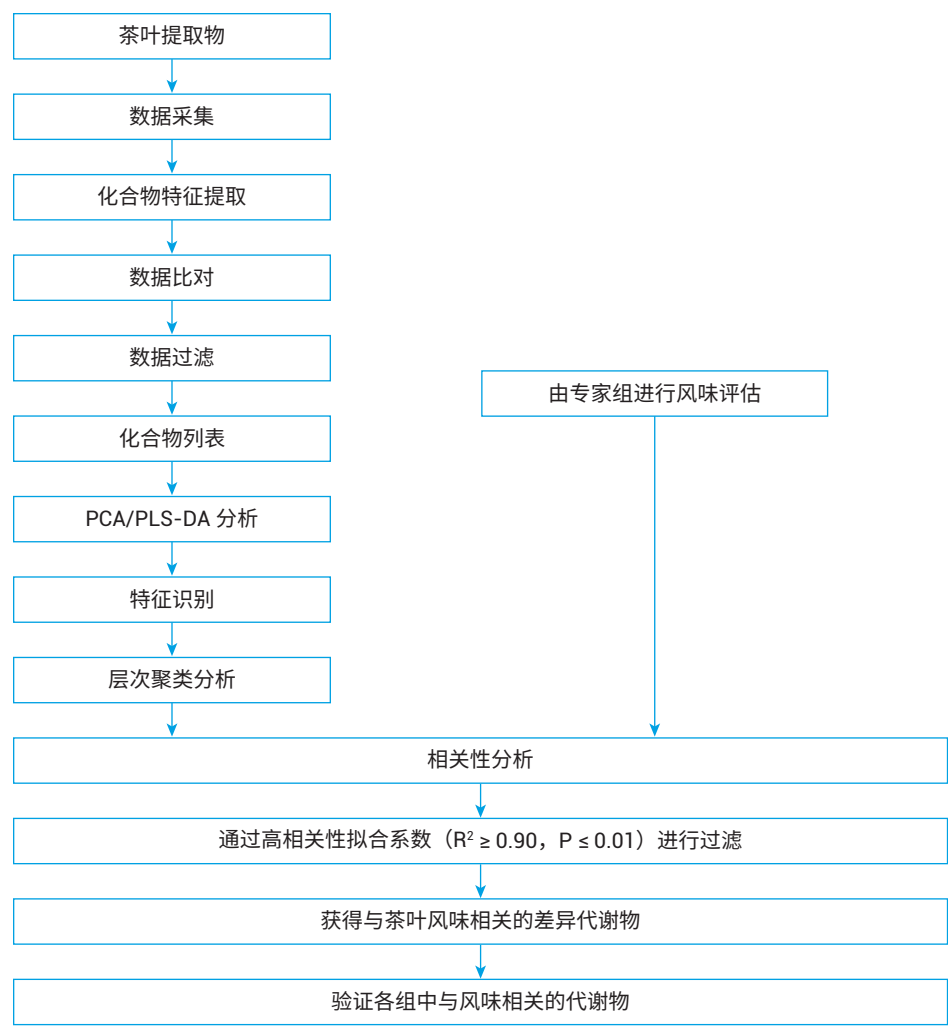


图 2. 代谢组学分析工作流程示意图

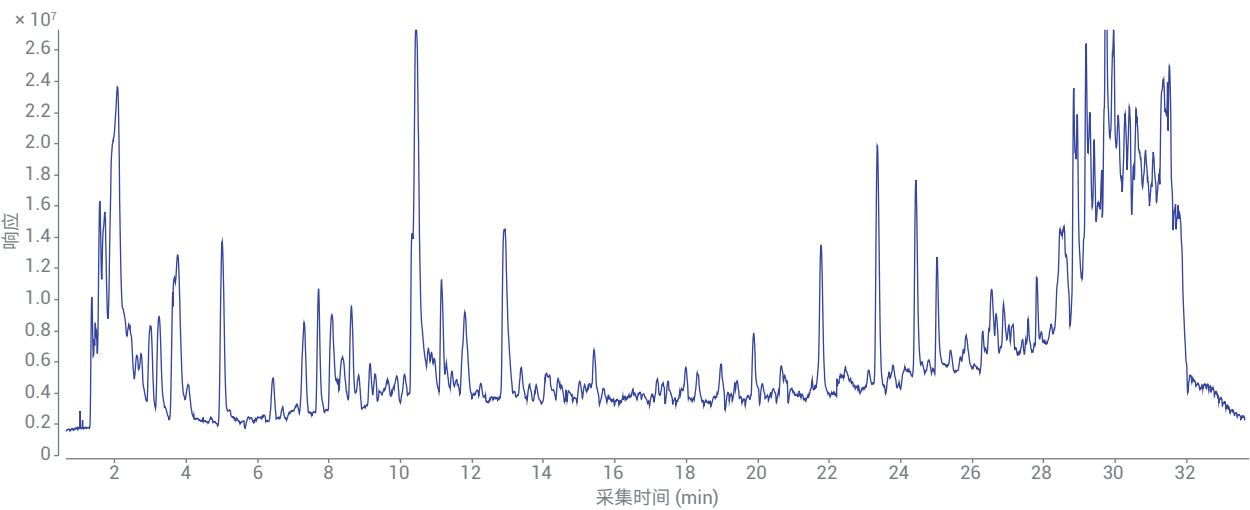


图 3. 典型的白茶 QC 样品的总离子流色谱图

化学计量学分析

将每个样品提取到的化合物结果导入 MPP (14.8 版) 软件中进行化合物比对和过滤，使得 QC 样品中所有化合物的变异系数均在 30% 以内。这样得到了包含 1915 种化合物的列表。基于这些化合物的 PCA 得分图表明，通过这些化合物模式的差异可以将白茶样品类别分为：SN、WP 和 SM (图 4A)。应用有监督的 PLSDA 模型，并根据化合物模式对该模型的样品预测进行了验证。基于所选化合物，PLSDA 得分图显示这些白茶样品按类别可以很好地分离 (图 4B)。混淆矩阵表显示 PLSDA 模型预测的准确度很高 (表 2)。

表 2. 显示预测准确度的混淆矩阵表

	SN _p	WP _p	SM _p	准确度
(T)SN	10	0	0	100
(T)BP	0	8	0	100
(T)SM	0	0	11	100
整体准确度				100

T = 实测值
p = 预测值

初步鉴定出的代谢物

根据数据库搜索和精确 MS/MS 谱图解析鉴定得到 99 种代谢物。使用标准品对其中一些代谢物进行了进一步确认，如表 3 中所示。

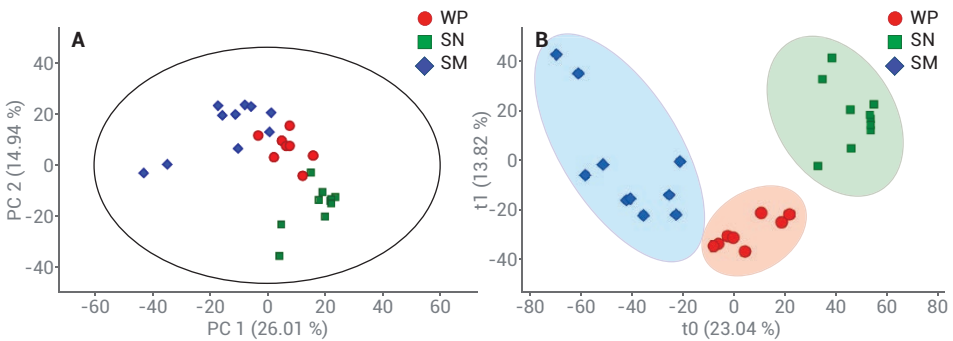


图 4. PCA 得分图 (A) 和 PLSDA 得分图 (B) 显示基于提取的 1915 种化合物可以对三种不同品质白茶实现很好的分离。红色圆形：WP；绿色正方形：SN；蓝色菱形：SM

表 3. 鉴定得到的代谢物及其保留时间、精确质量、质量偏差和 MS2 碎片

编号	鉴定的化合物	RT (min)	精确质量 (m/z)	加合物	质量偏差 (ppm)	MS2 碎片
1	咖啡因*	10.53	195.0875	M+H	-1	138, 110, 69
2	胆碱	1.49	104.107	M+H	-4.8	60, 58
3	可可碱*	6.46	181.0718	M+H	-1.1	138, 110, 83
4	甜菜碱	1.58	118.0861	M+H	-1.7	72, 55
5	甘油磷酸胆碱	1.75	258.1084	M+H	-6.6	184, 104, 60
6	茶氨酸*	2.07	175.1076	M+H	-0.6	158, 130, 84, 56
7	苯丙氨酸 (Phe)*	5.06	166.0855	M+H	-4.8	120, 103, 91, 77
8	异亮氨酸 (Ile)*	3.27	132.1017	M+H	-1.5	114, 86, 72, 56
9	亮氨酸 (Leu)*	3.03	132.1017	M+H	-1.5	86, 69, 56
10	脯氨酸 (Pro)*	1.66	116.0708	M+H	1.7	70, 43
11	色氨酸 (Tyr)*	7.79	205.097	M+H	-1	188, 159, 146, 118
12	缬氨酸 (Val)*	1.97	118.0862	M+H	-0.9	72, 63, 58, 55
13	酪氨酸 (Tyr)*	2.74	182.0809	M+H	-1.7	136, 119, 91, 77
14	天冬酰胺 (Asn)*	1.52	133.0606	M+H	-1.5	74
15	谷氨酰胺 (Gln)*	1.54	147.076	M+H	-2.7	130, 84, 56
16	天冬氨酸 (Asp)*	1.55	134.045	M+H	1.5	88, 74, 43
17	γ-氨基丁酸 (GABA)*	1.52	104.0707	M+H	1	86, 69
18	儿茶素 (C)*	8.86	291.0865	M+H	0.7	139, 123, 95
19	表儿茶素 (EC)*	11.32	291.0864	M+H	0.3	207, 139, 123, 55
20	没食子儿茶素 (GC)*	5.24	307.0815	M+H	0.7	223, 195, 163, 139
21	表没食子儿茶素 (EGC)*	8.65	307.0813	M+H	0	289, 153, 139
22	表儿茶素没食子酸酯 (ECG)*	13.27	443.0971	M+H	-0.5	273, 153, 139, 123
23	没食子儿茶素没食子酸酯 (CG)*	11.63	459.0923	M+H	0.2	289, 181, 153, 139
24	表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)*	10.43	459.0923	M+H	0.2	441, 289, 153, 139
25	表没食子儿茶素双没食子酸酯	13.45	611.103	M+H	-0.2	441, 289, 153
26	表没食子儿茶素 3-甲基没食子酸酯	12.31	473.108	M+H	0.2	455, 289, 167, 139
27	表没食子儿茶素 3-香豆酸酯	16.23	453.1178	M+H	-0.4	435, 209, 139
28	表阿夫儿茶素*	13.39	275.0912	M+H	-0.7	191, 139, 107, 55

* 通过标准化合物确认

表 3. 鉴定得到的代谢物及其保留时间、精确质量、质量偏差和 MS2 碎片列表 (续)

编号	鉴定的化合物	RT (min)	精确质量 (m/z)	加合物	质量偏差 (ppm)	MS2 碎片
29	表阿夫儿茶素 3-没食子酸酯	15.92	427.1027	M+H	0.7	275, 153, 139, 107
30	1-甲基黄嘌呤	3.97	167.0563	M+H	-0.6	110, 55
31	腺苷*	3	268.1042	M+H	0.8	136
32	鸟苷*	3.31	284.0992	M+H	0.7	152, 135
33	5'-甲硫腺苷	8.22	298.0968	M+H	-0.3	136
34	(S)-5'-脱氧-5'-(甲基亚磺酰基)腺苷	2.58	314.0919	M+H	0.3	164, 136, 97
35	胞苷 2'-磷酸	1.73	324.0595	M+H	1.2	112
36	环磷酸腺苷 (cAMP)	2.35	330.0594	M+H	-1.2	312, 136
37	AMP*	1.87	348.0707	M+H	0.9	136
38	ADP*	1.77	428.0362	M+H	-1.2	348, 136
39	咖啡酰莽草酸	12.64	337.0891	M+H	-8	163, 145, 135, 117
40	3- <i>p</i> -香豆奎宁酸	11.95	339.1075	M+H	0	165, 147, 119
41	4- <i>p</i> -香豆奎宁酸	8.89	339.1074	M+H	-0.3	147, 119
42	1-咖啡酰奎宁酸	11.75	355.1021	M+H	-0.8	337, 309, 163, 121
43	4-咖啡酰奎宁酸	7.13	355.1021	M+H	-0.8	337, 309, 163, 121
44	3,5-二咖啡酰奎宁酸	17.26	517.1337	M+H	-0.8	471, 453, 163, 121
45	绿原酸*	9.71	355.1025	M+H	0.3	163, 145, 117, 89
46	茶没食子素*	3.76	345.0817	M+H	0.3	327, 171, 153, 125
47	奎宁酸*	1.72	193.0711	M+H	2.1	149, 111, 95, 83
48	小木麻黄素*	8.1	652.1146	M+NH ₄	0.3	482, 447, 303, 277
49	三没食子酰葡萄糖	12.12	654.13	M+NH ₄	-0.1	467, 297, 153
50	苯甲基樱草糖苷	11.81	425.142	M+Na	0.5	331, 255, 179, 153
51	苯乙醇樱草糖苷	14.46	455.1294	M+K	-4.4	351
52	芳樟醇樱草糖苷	25.99	471.2205	M+Na	1	335, 333
53	芳樟醇氧化物樱草糖苷	20.5	487.2156	M+Na	1.3	335, 333
54	芳樟醇氧化物樱草糖苷异构体	18.08	503.191	M+K	-0.4	351
55	原花青素 A1	3.44	577.1334	M+H	-1.2	559, 425, 407, 121
56	原花青素 B1*	8.39	579.1501	M+H	0.7	409, 291, 289, 127
57	原花青素 B2*	9.46	579.1503	M+H	1	409, 301, 289, 127
58	原花青素 B3	7.12	579.1496	M+H	-0.2	409, 271, 127
59	原花青素 B5	7.41	579.1494	M+H	-0.5	427, 409, 289, 127
60	原花青素 C1	8.21	867.2133	M+H	0.2	849, 591, 153, 139
61	茶黄素*	24.29	565.134	M+H	-0.2	427, 259, 139
62	茶黄素-3-没食子酸酯*	24.05	717.1447	M+H	-0.4	699, 397, 153, 139
63	茶黄素-3,3'-双没食子酸酯*	24.28	869.1554	M+H	-0.7	731, 561, 333, 139
64	聚酯型儿茶素 A	8.53	915.1617	M+H	0.2	897, 763, 139, 153
65	聚酯型儿茶素 B	5.9	763.1514	M+H	1.2	595, 443, 305, 139
66	聚酯型儿茶素 C	4.82	611.1392	M+H	-1.2	593, 139
67	聚酯型儿茶素 F	9.82	899.167	M+H	-0.9	425, 287, 153
68	木犀草素-8- <i>C</i> -葡萄糖苷*	14.75	449.1077	M+H	-0.5	353, 329, 299

* 通过标准化合物确认

表 3. 鉴定得到的代谢物及其保留时间、精确质量、质量偏差和 MS2 碎片列表 (续)

编号	鉴定的化合物	RT (min)	精确质量 (m/z)	加合物	质量偏差 (ppm)	MS2 碎片
69	牡荆素*	17.78	433.1126	M+H	-0.9	313, 139, 85
70	异牡荆素*	18.13	433.1126	M+H	-0.9	313, 283, 121, 81
71	异牡荆素 2"-O-葡萄糖苷	11.55	595.1654	M+H	-0.6	433, 313, 139, 85
72	槲皮素 3-O-半乳糖苷*	18.53	465.1031	M+H	0.7	303, 165, 91
73	槲皮素 3-O-葡萄糖苷*	18.88	465.1032	M+H	0.9	303
74	槲皮素 3-O-葡萄糖苷酸	17.27	479.0815	M+H	-1.5	303
75	芸香苷*	18.87	611.1613	M+H	1	465, 303, 85
76	槲皮素二葡萄糖苷	15.78	627.1554	M+H	-0.3	303
77	槲皮素 3-O-葡萄糖芸香糖苷*	17.75	773.2143	M+H	1	611, 465, 303
78	槲皮素 3-O-半乳糖芸香糖苷*	17.59	773.2145	M+H	1.3	611, 465, 303, 145
79	槲皮素三葡萄糖苷	14.86	789.2085	M+H	0.1	303
80	杨梅苷*	17.76	465.103	M+H	0.4	319
81	杨梅素 3-O-葡萄糖苷	15.78	481.098	M+H	0.6	319
82	杨梅素 3-O-半乳糖苷*	15.61	481.0981	M+H	0.8	319, 127, 85
83	芹菜素-6,8-C-二葡萄糖苷*	12.69	595.1665	M+H	1.2	559, 475, 307, 153
84	芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-阿糖胞苷	14.54	565.1559	M+H	1.2	427, 409, 391, 379
85	芹菜素-6-C-阿糖胞苷-8-C-葡萄糖苷*	15	565.1559	M+H	1.2	547, 529, 511, 469
86	山柰酚 3,7-二鼠李糖苷	16.7	579.1706	M+H	-0.4	287
87	山柰酚 3-O-阿糖胞苷*	21.59	419.0971	M+H	-0.5	287
88	山柰酚 3-O-葡萄糖苷*	21.23	449.1082	M+H	0.7	287, 85
89	山柰酚 3-O-半乳糖苷*	20.58	449.1083	M+H	0.9	287
90	山柰酚 7-O-芸香糖苷	20.59	595.1656	M+H	-0.3	449, 287
91	山柰酚 3-O-芸香糖苷*	21.31	595.1663	M+H	0.8	449, 287, 147, 331
92	山柰酚 7-(6"-没食子酰葡萄糖苷)	18.83	601.1186	M+H	-0.3	287, 153, 125
93	山柰酚 3-(6"-没食子酰葡萄糖苷)	19.94	601.1186	M+H	-0.3	287, 153, 125
94	杨梅素 3-(3"-没食子酰鼠李糖苷)	8.98	617.1134	M+H	-0.5	319, 153, 125
95	山柰酚 3-O-葡萄糖芸香糖苷*	20.37	757.2192	M+H	0.8	595, 449, 287, 331
96	山柰酚 3-O-半乳糖芸香糖苷*	19.49	757.2197	M+H	1.5	595, 449, 287, 331
97	N-(1-脱氧-1-果糖)亮氨酸	3.41	294.1551	M+H	1	276, 258, 230, 212
98	N-(1-脱氧-1-果糖)苯丙氨酸	5.27	328.1392	M+H	0.3	292, 264, 132, 120
99	茶氨酸葡萄糖苷	2.22	337.1605	M+H	-0.3	301, 208, 158

* 通过标准化合物确认

不同品质白茶间代谢物含量的差异

在 99 种鉴定的代谢物中，有 64 种代谢物的丰度在 3 种不同品质白茶间存在显著差异 ($P \leq 0.05$)。采用层次聚类分析方法，对这 64 种代谢物的丰度变化进行了可视化分析。如图 5 所示，根据鉴定出的差异代谢物丰度变化模式，可以准确地对每一品质的白茶进行分组。这些代谢物主要包括四组化合物：

- 儿茶素/儿茶素二聚体
- 酚酸/水解单宁/氨基酸
- 黄酮醇苷/黄酮苷
- 生物碱/核苷酸/香气前体

这四组代谢物中，大多数黄酮醇苷/黄酮苷在白毫银针中的丰度最低，在白牡丹中的丰度相对较高，在寿眉中的丰度最高。

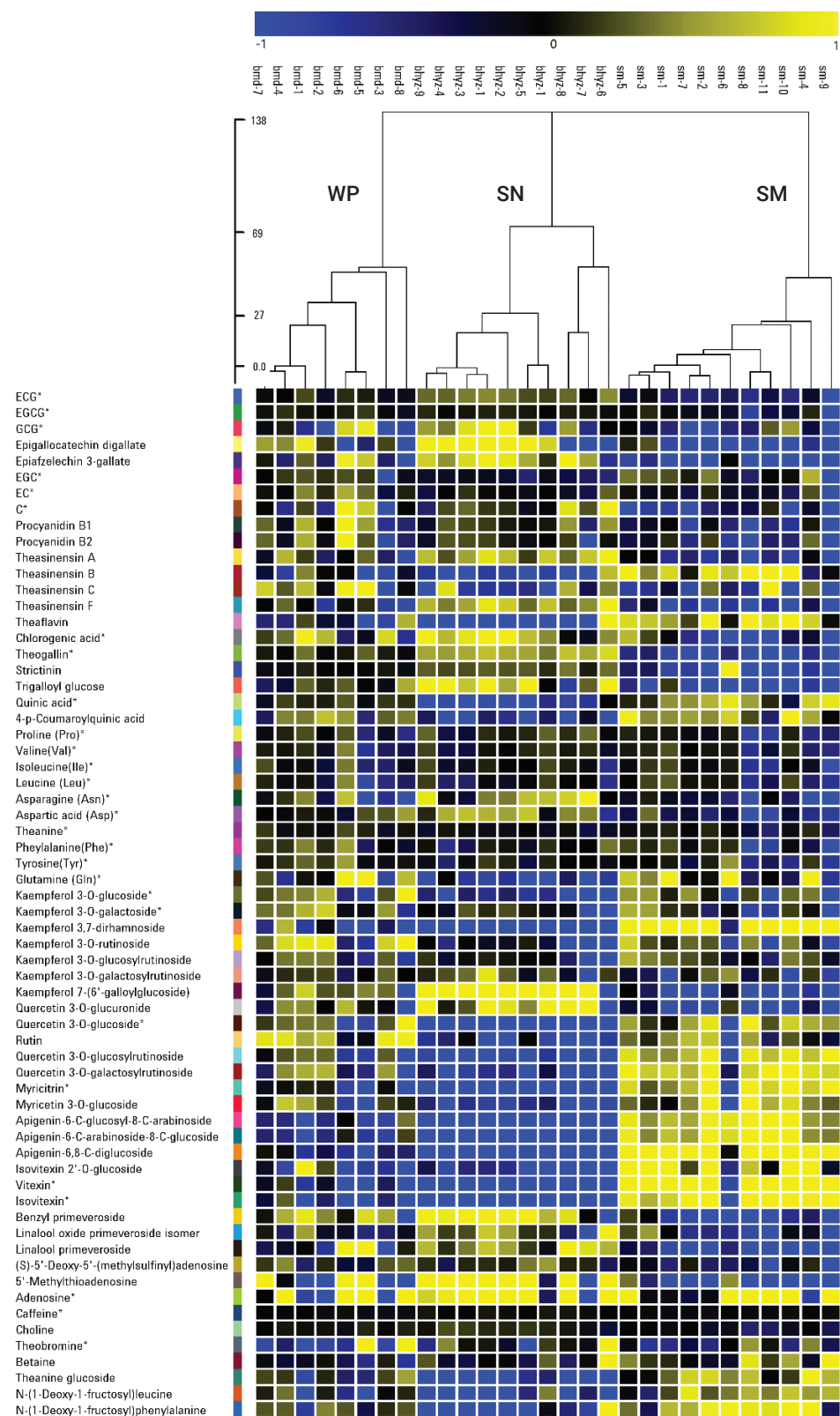


图 5. 三种不同品质白茶中有显著差异的代谢物的丰度变化层次聚类分析图

差异代谢物含量与白茶风味的相关性研究

通过 Pearson 相关性分析，研究代谢物对特定茶风味（包括鲜味、苦味和涩味

等）的影响。如图 6A 所示，64 种代谢物中有 41 种与任一种风味都具有高度相关性 ($R^2 \geq 0.9$)。黄色或蓝色单元格分别表示代谢物丰度与相应的风味呈正相关

或负相关。图 6A 表明大多数差异代谢物对三种风味表现出一致的影响趋势。图 6B-6D 显示了三种不同品质白茶中的主要差异代谢物 ($P \leq 0.01$) 的丰度变化。

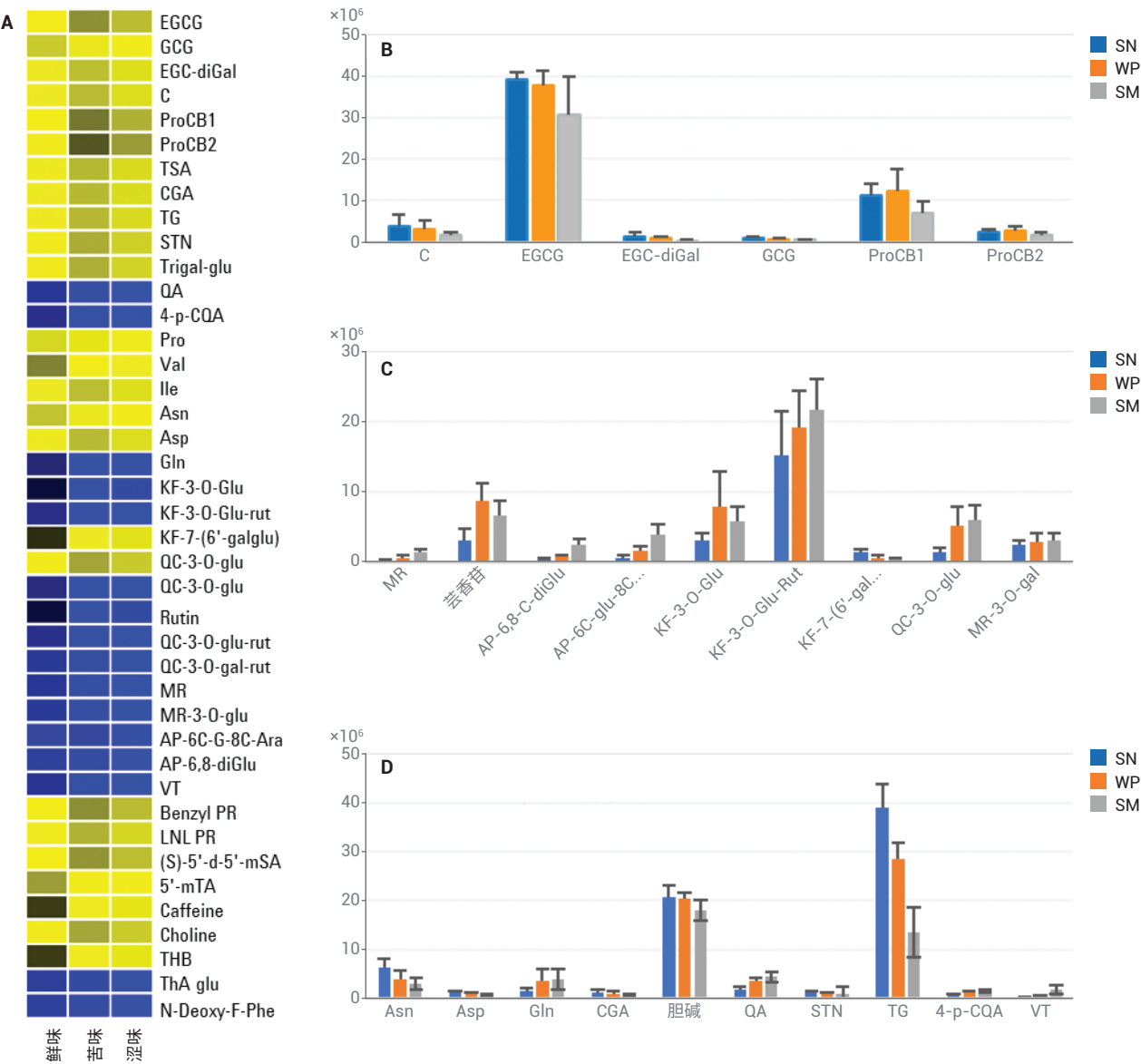


图 6. 鉴定的差异代谢物丰度与白茶品质（针对鲜味、苦味和涩味）的相关性。(A) Pearson 相关性图，显示了差异代谢物丰度与三种茶叶风味之间的正（黄色）相关性或负（蓝色）相关性；(B-D) 主要差异代谢物的丰度变化，包括儿茶素和儿茶素二聚体 (B)，黄酮醇苷和黄酮苷 (C)，酚酸、水解单宁和氨基酸 (D)

与白茶风味呈正相关的儿茶素和儿茶素二聚体在 SN 和 WP 中的含量相对高于 SM 中的含量（图 6B）。黄酮醇苷和黄酮苷类化合物与白茶风味呈负相关，并且其中大部分在 SN 中的含量较低，而在 WP 和 SM 中的含量则相对较高（图 6C）。一些酸（例如 Asn、TG 和胆碱）在 SN 和 WP 中的含量较高，而其他酸的情况则恰恰相反（图 6D）。

结论

通过非靶向代谢组学分析，成功地对三种主要品质的白茶特征进行了研究。在鉴定出的差异代谢物中，有 64 种在三种不同品质白茶间存在明显的丰度差异，并且有 41 种与白茶的鲜味、苦味和涩味具有极好的相关性。以上结果表明，这些代谢物的含量对白茶的风味特征具有显著影响，有望作为标记物用于区分不同品质的白茶。

参考文献

1. Mao, J. T.; et al. White Tea Extract Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells: the Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ and 15-Lipoxygenases. *Cancer Prev. Res.* **2010**, 3(9), 1132–1140
2. Ning, J.-M.; et al. Chemical Constituents Analysis of White Tea of Different Qualities and Different Storage Times. *Eu. Food Res. Technol.* **2016**, 242(12), 2093–2104
3. Tan, J.; et al. Flavonoids, Phenolic Acids, Alkaloids and Theanine in Different Types of Authentic Chinese White Tea Samples. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, 57, 8–15
4. Dai, W.; 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.* **2015**, 63, 9869–9878
5. Tan, J.; 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.* **2016**, 79, 106–113

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。