

应用代谢组学方法研究陈年白茶的潜在标记物

作者

Weidong Dai, Junfeng Tan,
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

本应用简报介绍了一种代谢组学方法，用于分析白茶中的非挥发性化合物，从而寻找白茶陈化的可能化学标记物。研究采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪与 Agilent 6540/6545 Q-TOF LC/MS 进行原始数据的采集，然后对数据进行提取和统计分析。在前期工作^[1]的基础上，本应用简报采用安捷伦的 MPP 软件作为主要的化学计量学软件进行数据统计分析。结果表明，随着陈化时间的延长，白茶中的某些化合物发生了显著变化，初步鉴定得到 125 种此类差异化合物。在这些初步鉴定得到的化合物中，有 7 种是储存过程中产生的新化合物，被鉴定为 8-C N-乙基-2-吡咯烷酮取代的黄烷-3-醇 (EPSF)。EPSF 的含量随着储存时间的延长而增高，其前体物质茶氨酸和黄烷-3-醇的含量则随之减小，表明 EPSF 可能为长期储存白茶中的标记化合物。

前言

传统的中国白茶一直被认为对健康具有潜在益处^[2]，这一认识促进了中国白茶的消费^[3]。长期储存的白茶被认为具有较高的保健功效和商业价值。目前已有的报导仅对白茶储存过程中一些常见的高丰度物质进行了研究，例如，在不同储存时间下，鉴定发现白茶中儿茶酚和氨基酸的含量降低，而没食子酸的含量则有所增高^[3]。然而，储存过程中常见代谢物的减少可能伴随着新化合物的形成，这在之前的报道中非常罕见。本研究采用基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UHPLC-QTOF/MS) 的代谢组学方法，对储存过程中白茶中的非挥发性组分进行了系统的研究，并寻求与白茶质量和储存时间变化相关的潜在标记物。

实验部分

样品前处理

两种白茶样品（白毫银针 (BHYZ) 和白牡丹 (BMD)) 在 2000 年至 2015 年间生产，购自中国福建的两家茶叶公司。BHYZ 只采单芽，而 BMD 采的是一芽两叶。将新鲜的生茶叶按照典型的白茶制作流程（包括萎凋和干燥过程）加工为白茶^[4]。所有白茶产品保存在温度为 15–25 °C、湿度为 25%–50% 的储存室中。将陈年白茶研磨成粉末，然后使用甲醇/水 (v/v: 7/3) 对茶的代谢物进行提取。将提取液离心、过滤后进行 LC/MS 分析。将等体积的各提取样品充分混合，制备质控样品，用于监测批量连续采集的数据的可靠性。

液相色谱条件

参数	值
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	溶剂 A: 0.1% 甲酸水溶液 溶剂 B: 甲醇
流速	0.4 mL/min
进样量	3.0 μL
进样针反冲	用纯甲醇冲洗 5 s
梯度洗脱曲线	0–4 min B 由 10% 升至 15%
	4–7 min B 由 15% 升至 25%
	7–9 min B 由 25% 升至 32%
	9–16 min B 由 32% 升至 40%
	16–22 min B 由 40% 升至 55%
	22–28 min B 由 55% 升至 95%
	28–30 min B 保持 95%
	30–31 min B 由 95% 降至 10%
	31–35 min B 保持 10%

ESI-Q-TOF MS 条件

参数	值
MS	配备双喷射电喷雾离子源的 Agilent 6540/6545 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

代谢组学分析工作流程

茶叶提取物的分析过程与之前的报道^[5] 略有不同，如图 1 所示。在获得不同品质、不同储存年限的茶叶提取物的原始数据后，对数据进行分子特征提取，得到可靠的化合物。将所有样品中的化合物信息批量导入 Agilent Mass Profiler Professional 软件（MPP，14.9 版）。在该软件中，首先在允许的保留时间窗口和精确质量窗口的变化范围内对来自不同样

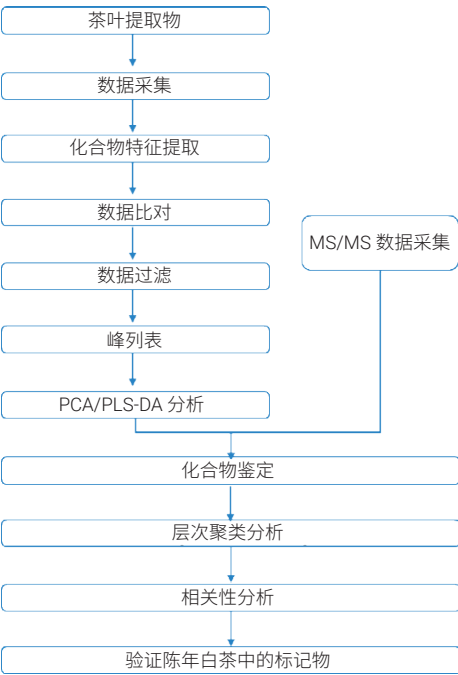


图 1. 代谢组学分析工作流程示意图

品的化合物进行比对，然后使用保留时间和精确质量数对化合物进行统一标识。通过合理的数据过滤得到化合物（峰）表。之前的报道使用 Simca-P 和 PASWstat 软件^[1]，而本应用简报则使用 MPP 进行 PCA/PLSDA 分析、层次聚类分析和相关性分析。应用 Agilent MassHunter 采集与定性分析软件包进行特征识别和标记物验证。

结果与讨论

数据质量验证

如之前的报道所述，使用优化的 UHPLC 梯度洗脱能够分离茶叶提取物中的数千种化合物^[4,5]。首先使用精确质量数 Q-TOF/MS 在扫描模式下检测分离后的茶叶代谢物中存在的化合物。在批量样品分析过程中，每分析 10 个样品之后分析一次质控样品，用以评估数据质量。使用 MassHunter Profinder（8.0 版）软件提供的分子特征提取算法，提取两种不同品质的白茶在不同储存时间下的化合物，将结果导入 MPP 软件，进行数据比对和统计分析。对总数据集进行初始数据比对后，得到含有 2584 个化合物的数据集。然后对满足在 QC 样品中相对标准差小于 35% 的化合物进行单变量和多变量分析。如图 2 所示的非监督主成分分

析 (PCA) 表明，QC 样品紧密聚类于得分图的中心。这一结果表明，在该代谢组学研究中，茶叶样品提取和 UHPLC/Q-TOF MS 分析具有出色的重现性。在 PCA 得分图中，BHYZ 和 BMD 两种品质的白茶样品得到清晰的分离（图 2），表明白茶的品质对非挥发性化学成分的影响比储存时间的影响更大。因此，在接下来的分析中，我们分别研究了两种品质白茶的储存时间。

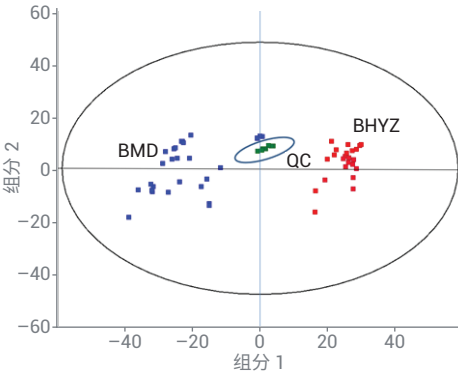


图 2. PCA 得分图显示在不同储存时间下两种品质白茶（BHYZ 和 BMD）可以清晰地区分开。注：QC 样品用于验证分析方法的可靠性

储存时间对白茶代谢物的影响

采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘差异分析 (PLS-DA) 方法, 基于化合物的丰度研究了储存时间对白茶样品的影响。如图 3 所示, 通过 PCA 分析, 上方得分图显示了不同储存时间茶叶样品之间可以得到些许分离。相比之下, 通过 PLS-DA 分析, 可以清楚地看到, 对于任一品质的白茶 (BHYZ 和 BMD), 具有相似储存时间的茶叶样品在得分图的同一区域内聚类 (图 3)。这些结果表明, 非挥发性白茶化合物随着储存时间的延长发生了显著变化。

鉴定的代谢物在储存过程中的变化

通过搜索 HMDB 和 MetLin 数据库和谱库, 并使用分子结构关联软件对精确 MS/MS 谱图进行解析, 初步鉴定得到 125 种差异代谢物。以下部分化合物通过标准品进行了确认:

- 黄烷-3-醇
- 二聚黄烷-3-醇 (茶黄素、茶双没食子儿茶素和原花青素)
- 生物碱
- 黄酮醇/黄酮糖苷
- 氨基酸
- 酚酸
- 核苷
- 有机酸
- 脂质
- 碳水化合物

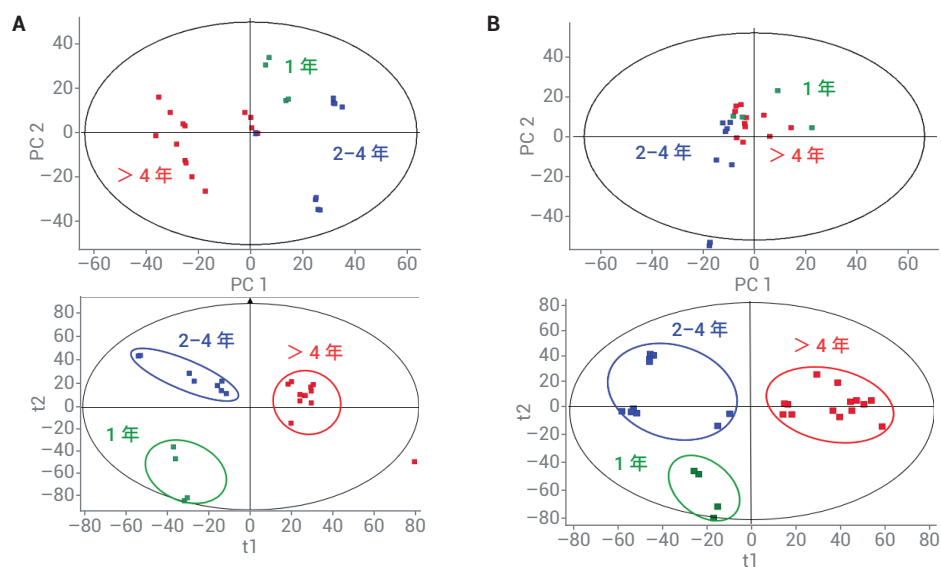


图 3. 两种品质白茶随储存时间变化的 PCA (上图) 和 PLS-DA 得分图。A. BMD; B. BHYZ

图 4 的层次聚类分析图展示了白茶子类中鉴定的化合物的丰度变化明显。限于篇幅，仅以 BMD 子类为例进行展示。如每种化合物的丰度颜色标度所示，这些化合物可分为五个主要类别：

- **G1:** 茶叶储存 1 年和 2-4 年的强度极低，而储存 8 年或更长时间则强度极高
- **G2:** 茶叶储存 1 年具有中等强度或相对高强度，储存 2-4 年具有低强度，但之后随着储存时间的延长强度升高
- **G3:** 茶叶储存 1 年或 2-4 年具有中等至高强度，而储存 8 年或更长时间强度更低
- **G4:** 储存 1 年以内具有高强度，储存更长时间后强度略有降低
- **G5:** 储存 1 年具有低强度，储存 2-4 年具有高强度，储存更长时间后强度略有降低

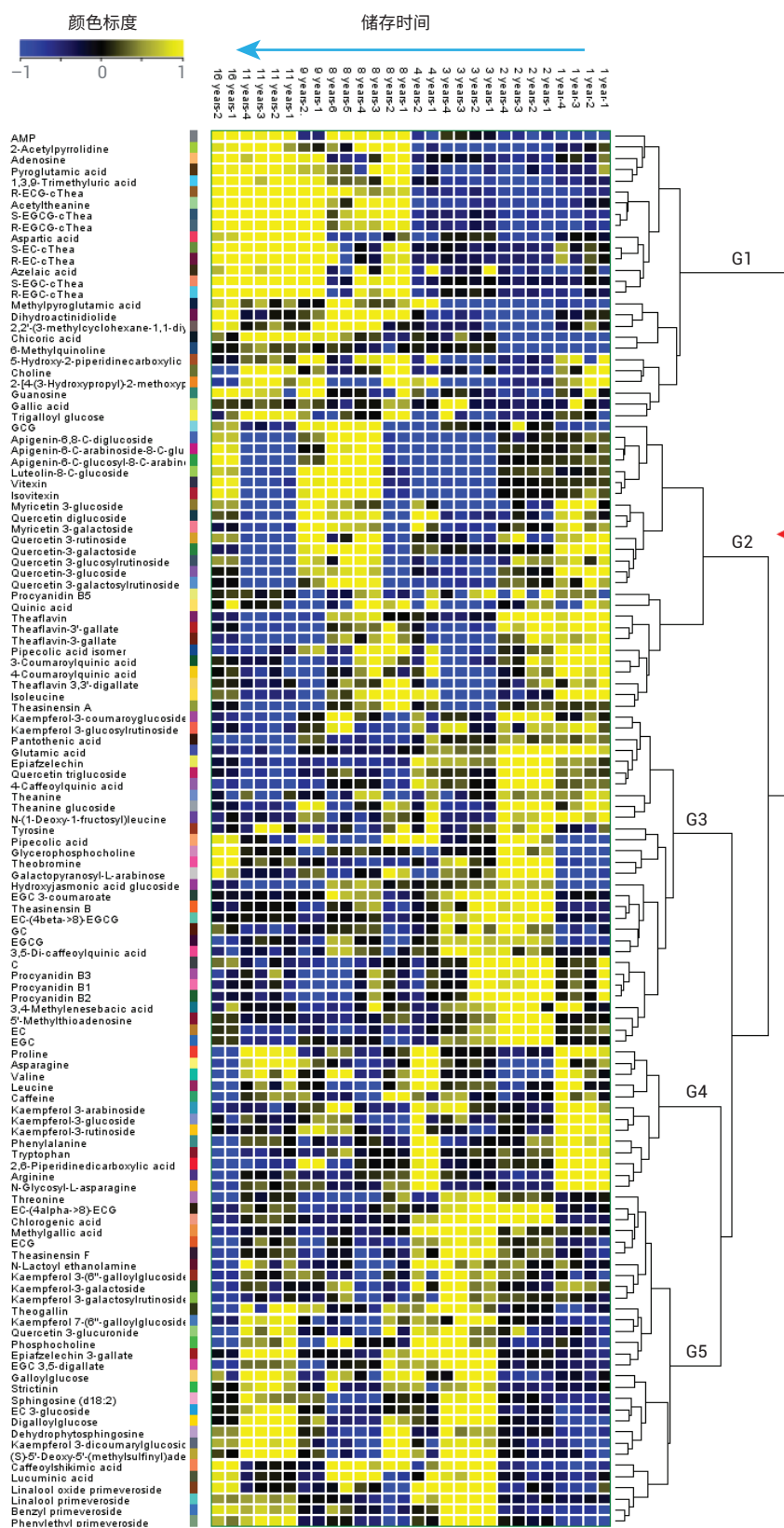


图 4. 白茶子类 BMD 中鉴定的化合物的丰度随储存时间变化的层次聚类分析图

陈年白茶中 EPSF 的鉴定及其存在情况

在鉴定得到的差异化合物中，有 7 种为陈年白茶中最新鉴定得到的化合物。两种化合物的 m/z 为 570.1606，两种为 418.1496，另外两种为 402.1542，剩下一种为 554.1657。图 5 显示了相应的提取离子色谱图。以图 5 中的峰 1 为例，母离子可以生成大量的碎片离子，如图 6A 所示。通过解析 MS/MS 谱图中每个主要离子碎片，可以确定峰 1 为 S-EGCG-cThea（一种 8-C N-乙基-2-吡咯烷酮取代的黄烷-3-醇 (EPSF)），该化合物可能的碎裂途径如图 6B 所示。另外 6 个峰也被鉴定为 EPSF 类化合物，只是其作为底物的黄烷-3-醇有所不同（表 1）。这 7 种化合物中有 3 种为首次报道，且 7 种均为在白茶中首次发现的化合物。

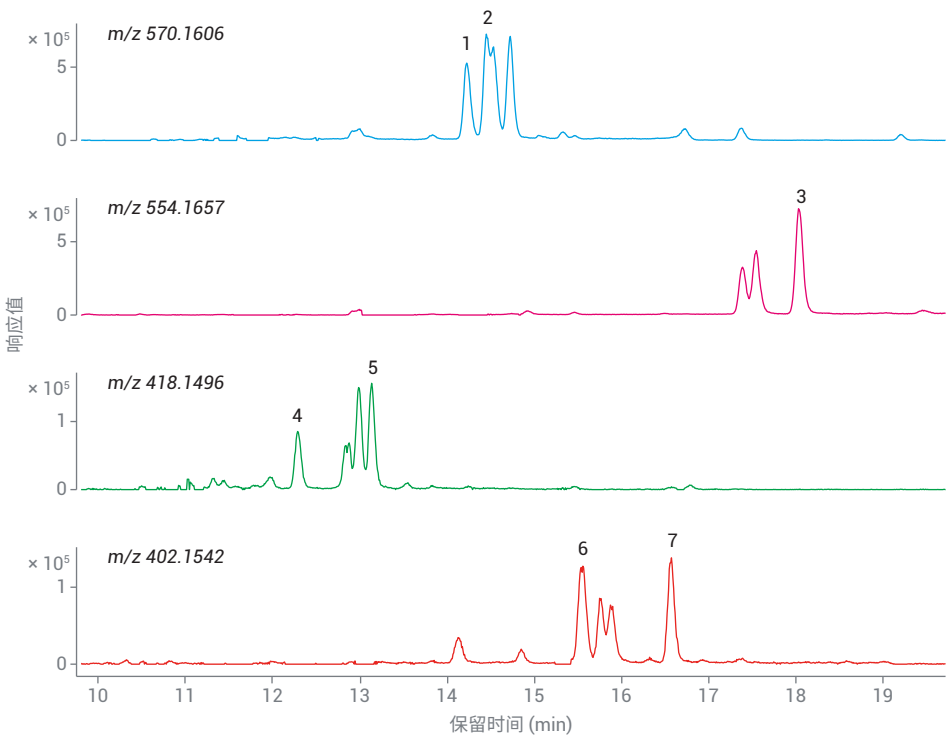


图 5. 陈年白茶中 7 种 EPSF 的典型提取离子色谱图 (EIC)。注：白茶样品为储存时间超过 6 年的 BHYZ 子类

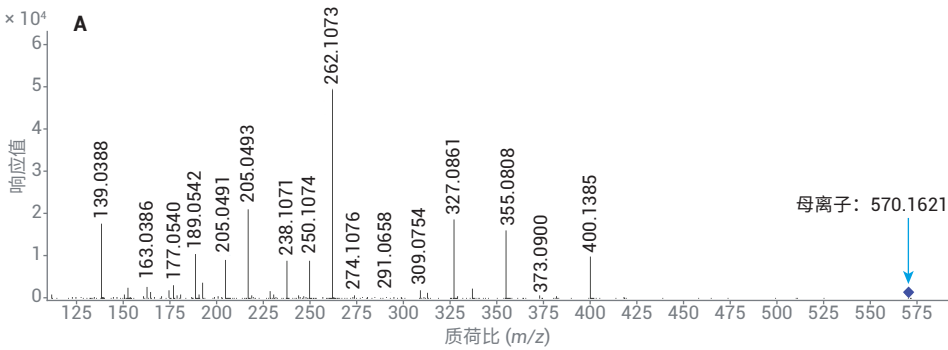


图 6A. 图 5 中峰 1 的 MS/MS 谱图

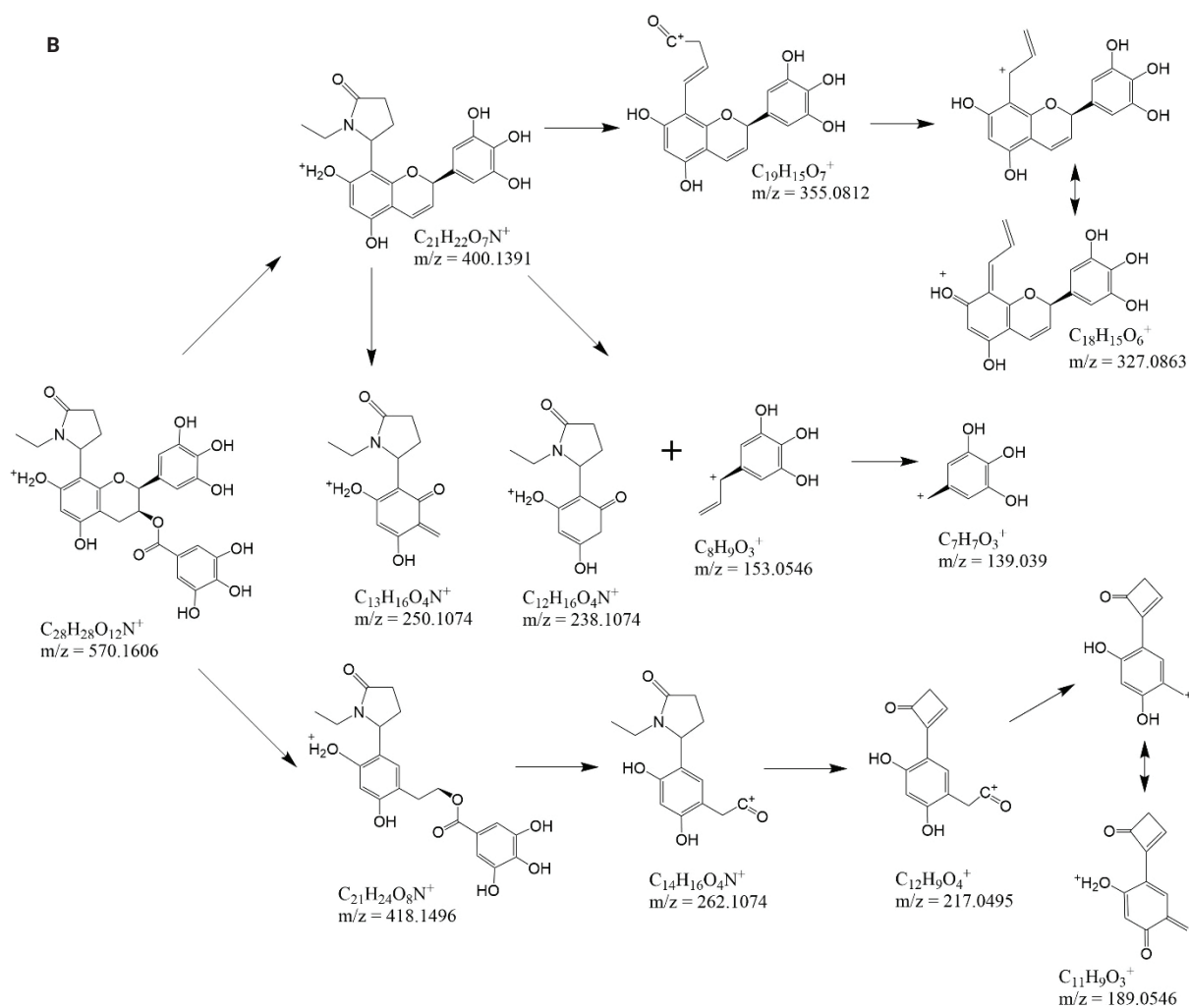


图 6B. 化合物（图 5 峰 1）的结构和可能的碎裂途径

表 1. 鉴定出的 EPSF 化合物列表

序号	鉴定结果	RT (min)	分子式	$[M+H]^+$ (m/z) _{exp}	误差 (ppm)	MS/MS 碎片 (m/z)
1	S-EGCG-cThea	14.24	$C_{28}H_{28}O_{12}N$	570.1617	1.93	400.1391, 355.0812, 327.0863, 262.1074, 250.1074, 238.1074, 217.0495, 139.0390
2	R-EGCG-cThea	14.45	$C_{28}H_{28}O_{12}N$	570.1613	1.23	384.1229, 339.0863, 311.0914, 262.1065, 250.0490, 177.0514, 123.0441
3	R-ECG-cThea	18.06	$C_{28}H_{28}O_{11}N$	554.1657	1.80	400.1391, 355.0812, 327.0863, 262.1074, 250.0490, 177.0546, 139.0390
4	S-EGC-cThea	12.30	$C_{21}H_{23}O_8N$	418.1506	2.39	384.1447, 311.0914, 262.1074, 250.1074, 205.0490, 177.0546, 123.0411
5	R-EGC-cThea	13.15	$C_{21}H_{23}O_8N$	418.1505	2.15	
6	S-EC-cThea	15.55	$C_{21}H_{23}O_7N$	402.1551	2.24	
7	R-EC-cThea	16.58	$C_{21}H_{23}O_7N$	402.1553	2.74	

储藏过程中 EPSF 的变化及其与白茶中前体化合物的相关性

在两种不同品质白茶中，7 种 EPSF 的含量均随储存时间的延长而增高（图 7A 和图 7B）。而且，储存 4 年以上的白茶与储存 ≤ 4 年的白茶之间具有更为显著的差异。该结果表明 EPSF 可以作为陈年白茶的标记物。这些 EPSF 丰度的增高与茶氨酸和黄烷-3-醇的含量随储存时间减少相关（图 7C），表明这两种化合物都是白茶中 EPSF 的潜在前体化合物。通过茶氨酸和黄烷-3-醇溶液的标准反应以及实验室控制的快速陈化白茶分析可以进一步证实这一点^[1]。

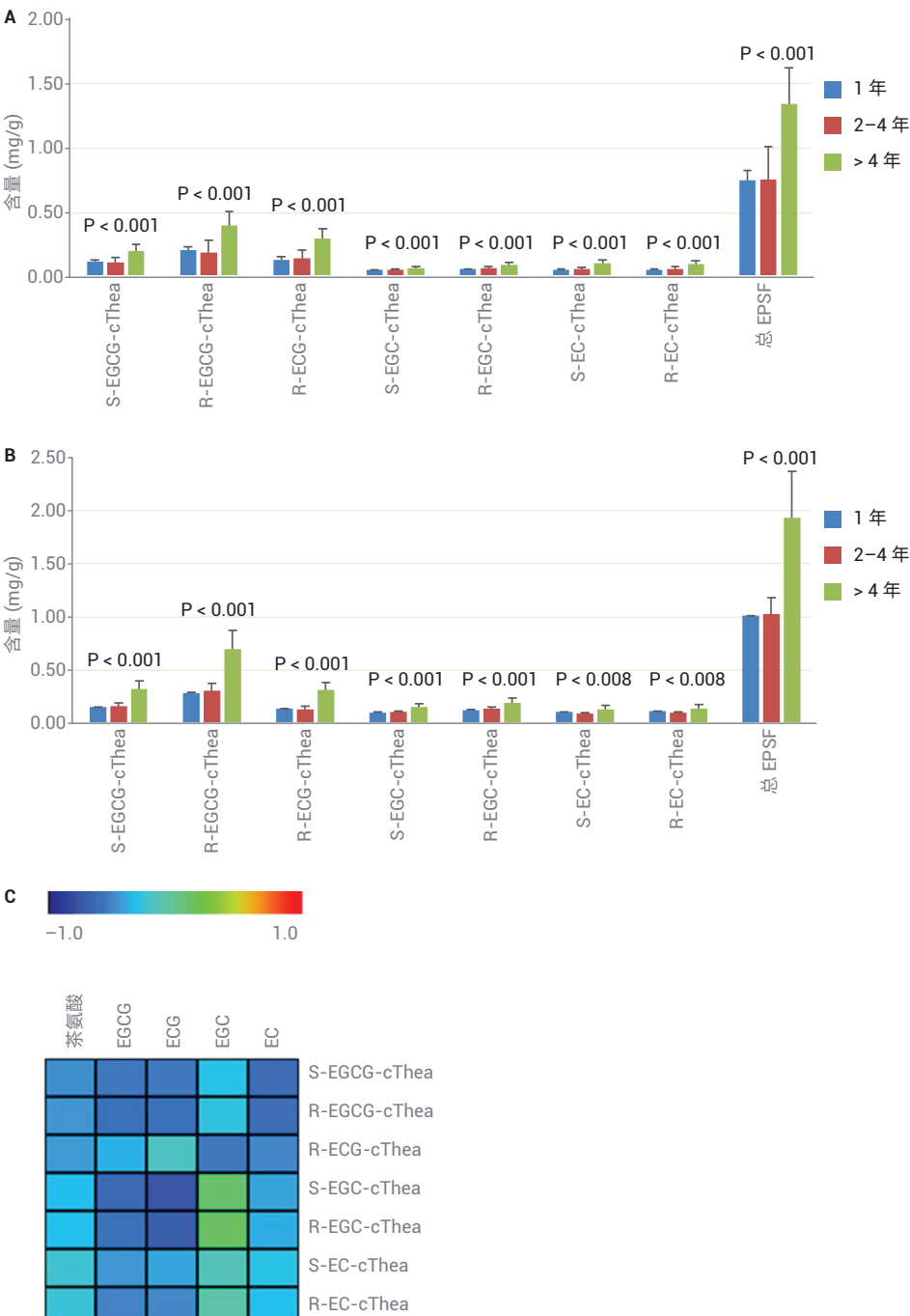


图 7. 白茶子类 BHZY (A) 和 BMD (B) 中 EPSF 的含量（注：使用 ANOVA 检测了各组间化合物含量的差异显著性）。(C) 白茶中 EPSF 与茶氨酸以及 EPSF 与黄烷-3-醇丰度的相关性分析

结论

非靶向代谢组学方法可以很好地用于白茶储存标记物的研究。使用精确质量数、MS/MS 谱图和标准品比对，在白茶样品中鉴定出多达 125 种差异代谢物。EPSF (8-C N-乙基-2-吡咯烷酮取代的黄烷-3-醇) 是在陈年白茶样品中最新鉴定出的化合物，其丰度与储存时间呈正相关。这类化合物的丰度变化与其前体化合物茶氨酸和黄烷-3-醇的丰度降低相关性良好，表明 EPSF 可能为长期储存白茶的陈化标记物。

参考文献

1. Dai, W. D. et al. Metabolomics Investigation Reveals That 8-C N-Ethyl-2-Pyrrolidinone-Substituted Flavan-3-ols Are Potential Marker Compounds of Stored White Teas. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66(27), 7209-7218
2. 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
3. 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
4. Dai, W. et al. Characterization of white tea metabolome: comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach. *Food Res. Int.* **2017**, 96, 40-45
5. Yang, C. 等，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，安捷伦科技公司应用简报，5994-0866ZHCN，2019 年 4 月

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。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 11 月 5 日，中国出版
5994-1493ZHCN