

# 采用 LCMS-QTOF 对不同茶叶的成分鉴定分析

## LCMS-QTOF-094

**摘要：**建立了采用 LCMS-QTOF 对红茶、绿茶及普洱茶中化学成分进行筛查的方法，以探究茶叶不同处理工艺后化学成分的差异。数据采集后经 MSDIAL 软件进行峰提取和峰对齐，采用 MetaboAnalyst 进行统计学分析，结合主成分分析 (PCA)、单因素方差分析 (ANOVA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 结果筛选差异性化合物。结果显示，茶叶经不同处理工艺后化学成分存在显著差异。经 MSDIAL 数据库比对和 Labsolutions Insight Explore 软件预测，共鉴定出 192 个差异性化合物，包括有机酸类、氨基酸类、核苷及核苷酸类、脂肪酸、儿茶素类、生物碱、黄酮及黄酮苷等天然活性物质。

**关键词：**LCMS-QTOF 红茶 绿茶 普洱茶 非靶向代谢组学分析

### 技术特点：

- ❖ LCMS-9050 可稳定快速地进行极性切换，一针进样，可同时采集正负离子模式下的数据。
- ❖ MSDIAL、MetaboAnalyst、LabSolutions Insight Explore 软件联合使用，可快速筛选差异化合物。

茶叶内含物质丰富，营养成分包括儿茶素、氨基酸、有机酸、生物碱及脂多糖等。因其具有广泛的生理活性，像茶多酚是良好的天然抗氧化剂，茶氨酸具有镇静、降血压和增强人体免疫力的作用，而咖啡碱属兴奋剂，在一定浓度范围内，对人体有强心、利尿、解毒等生理和保健作用，因此越来越多的人将茶叶奉为养生佳饮。然而茶叶经不同处理工艺后，其化学成分会发生较为明显的变化。

近年来，代谢组学以其高效、全面及准确的特点，广泛应用于植物、医药、微生物、食品等研究领域，并取得较大进展。目前基于代谢组学的茶叶品质特征与化学成分相关性研究也成为茶叶研究热点之一。

本次使用 LCMS-QTOF 仪器，采用非靶向代谢组学研究方法，对红茶、绿茶及普洱茶中的化学成分进行比较分析，从而阐明茶叶不同处理工艺后化学成分的变化，为茶叶相关研究提供参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用仪，具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D X3×2	自动进样器：	SIL-40C X3
柱温箱：	CTO-40C	飞行时间质谱仪：	LCMS-9050
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.120; LabSolutions Insight Ver. 4.0		

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：	Shim Pack GIST C18-AQ HP(100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30807-02		
流动相：	A相 -0.1% 甲酸; B相 - 甲醇		
分析流速：	0.3 mL/min		
柱温：	35°C	进样体积：	5 μL
洗脱方式：	梯度洗脱, B相初始比例为 2%, 时间程序见表 1		



## ■ 结果与讨论

### 2.1 QC 数据检查

通过 QC 数据重复性结果来监测分析批进样的稳定性，正、负离子模式下，6 个 QC 样品叠加色谱图重复性良好，初步判断整个分析批数据质量可靠，可用于后续数据处理分析。

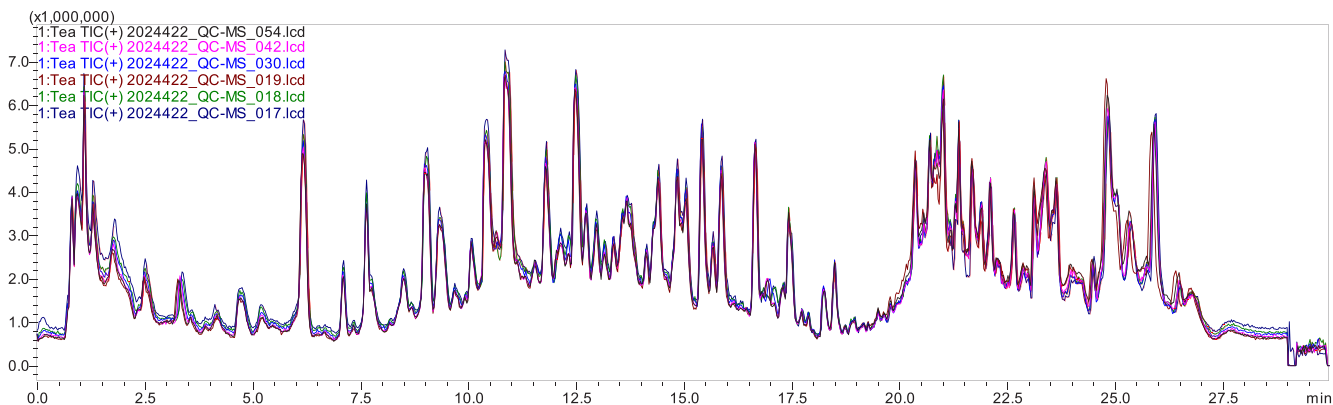


图 1 QC 样品色谱图（正离子模式）

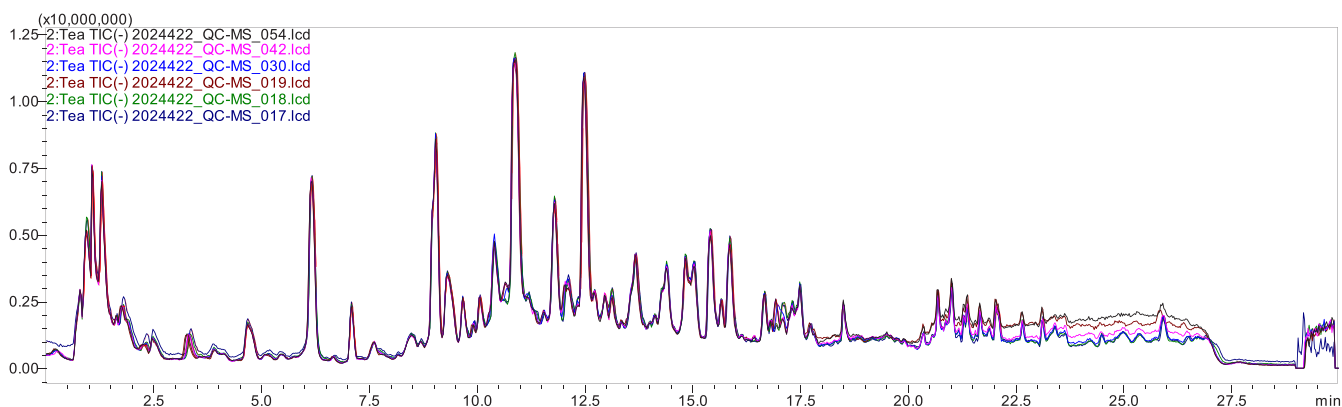


图 2 QC 样品色谱图（负离子模式）

### 2.2 差异性化合物筛选

采集后的数据经 MSDIAL 软件进行峰提取和峰对齐后，将峰对齐表导入 MetaboAnalyst 平台，设定缺失值处理、数据过滤及标准归一化等参数，进行统计学分析。

#### 2.2.1 主成分分析（PCA）

不同来源的红茶、绿茶、普洱茶及 QC 质控样品的 PCA 得分图见图 3，每个散点表示一个样本，样本均处于 95% 置信区间。在正离子模式下，PC1 的贡献率为 45.5%，PC2 的贡献率为 21.3%；在负离子模式下，PC1 的贡献率为 45.1%，PC2 的贡献率为 24.6%。各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明红茶、绿茶及普洱茶之间差异显著。质控组中的平行样本聚集在一起，表明整个测定过程未出现明显偏差，仪器稳定性较好。

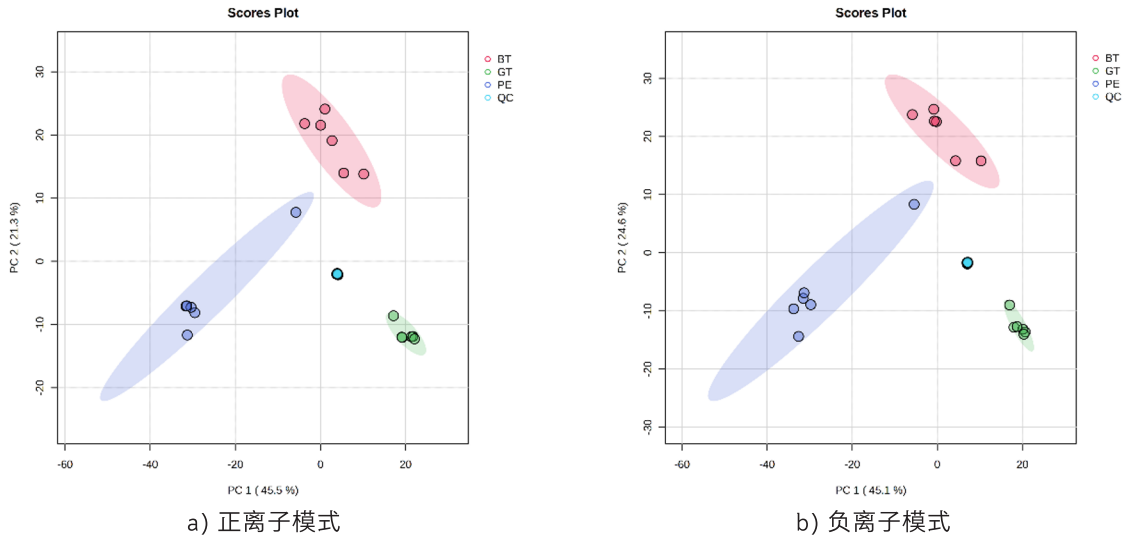


图3 PCA 得分图 (BT: 红茶, GT: 绿茶, PE: 普洱茶, QC: 质控)

### 2.2.2 单因素方差分析 (ANOVA)

不同来源的红茶、绿茶、普洱茶及 QC 质控样品数据经预处理后,在 ANOVA 统计分析窗口, P-value 设为 0.05, 显示差异性化合物图谱, 如图 4 所示, 图中除下部灰色以外的点代表不同样本间有显著性差异的化合物。

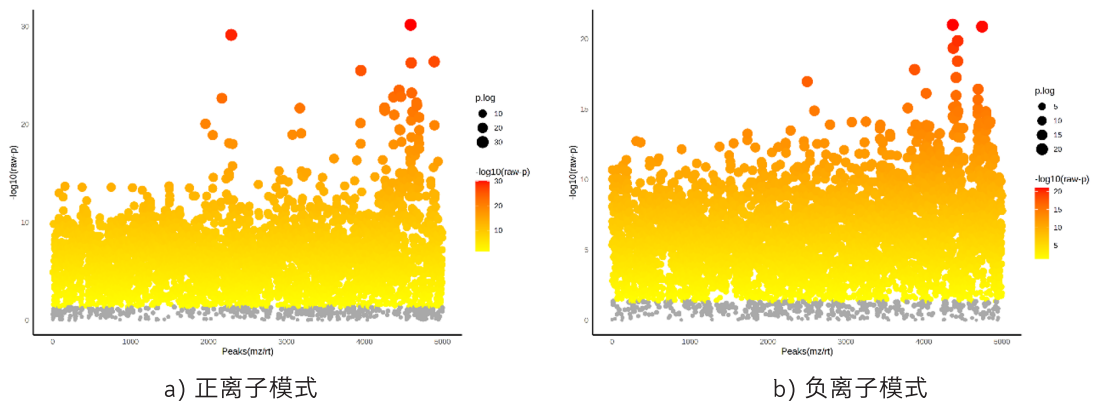


图4 ANOVA 统计分析结果

### 2.2.3 偏小二乘法判别分析 (PLS-DA)

不同来源的红茶、绿茶、普洱茶及 QC 质控样品的 PLS-DA 得分图如图 5 所示, 模型中各组样品均位于 95% 置信区间内, 且各组间区分效果较好, 表明红茶、绿茶及普洱茶之间差异显著。此外, 模型验证结果见图 6, R2 和 Q2 分别代表所建模型的解释率和预测能力, 它们的值越接近于 1 表明模型的拟合度越好, 可信度越高。正离子模式下 R2=0.99935, Q2=0.93877, 负离子模式下 R2=0.99801, Q2=0.91981, 表明模型稳健可靠。对模型进行置换检验, 100 次置换检验后, 绘制置换检验图 (图 7)。结果表明, 正离子模式和负离子模式下 P 值均小于 0.01, 模型未过拟合。

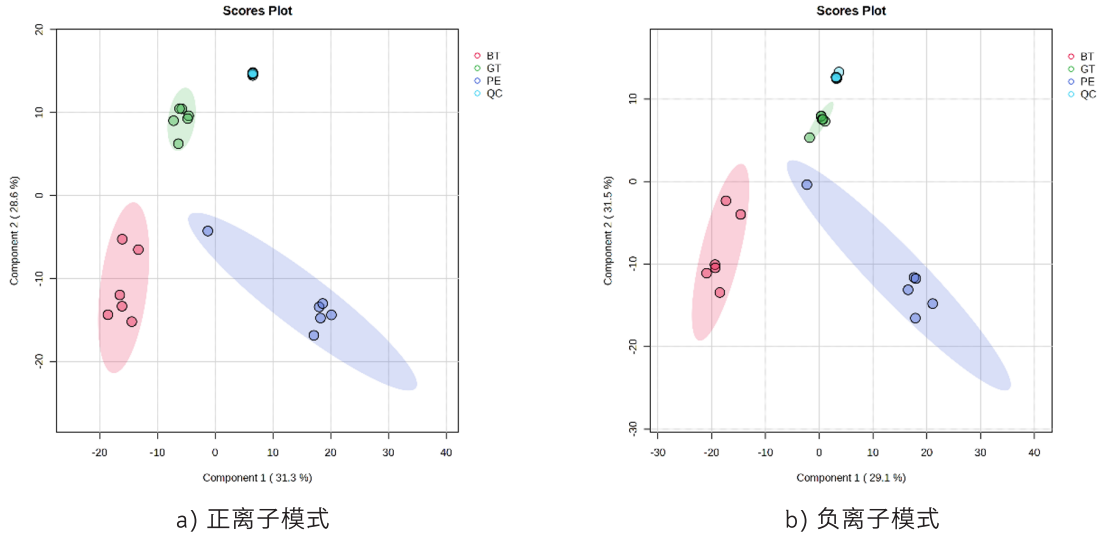


图5 PLS-DA 得分图 (BT: 红茶, GT: 绿茶, PE: 普洱茶, QC: 质控)

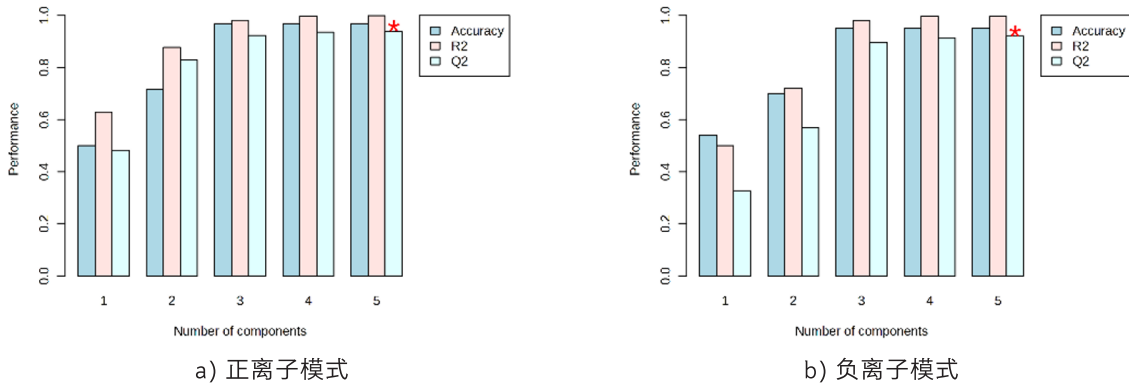


图6 模型验证图

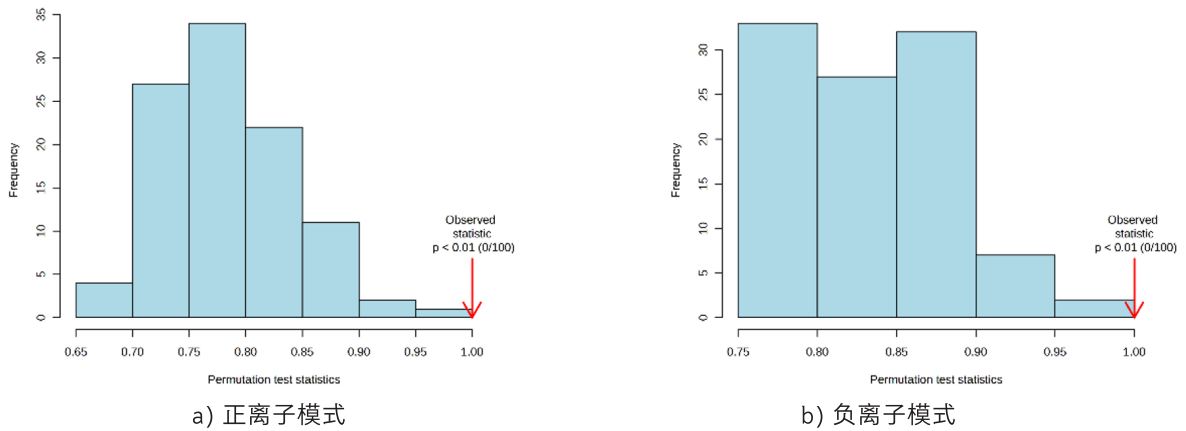


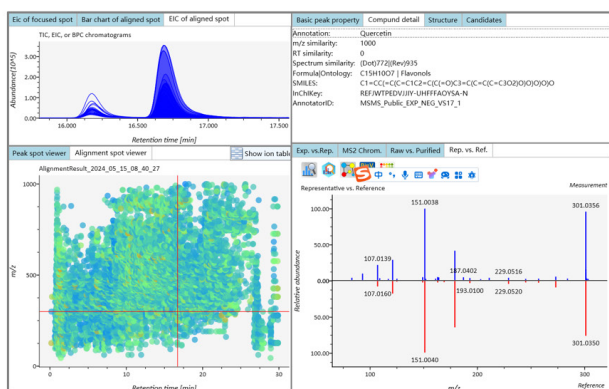
图7 PLS-DA 100 次置换检验结果

### 2.2.4 差异性化合物的筛选结果

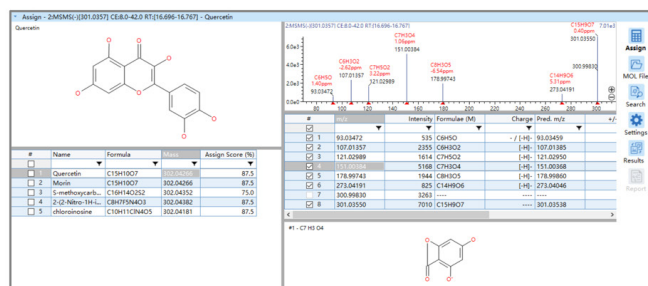
采用单因素方差分析和多元统计分析结果相结合的方法，对差异性化合物进行筛选。根据多元统计分析 PLS-DA 结果的 VIP 值（表示对应成分的组间差异在各组样本分类判别中的影响强度），可以初步筛选出红茶、绿茶和普洱茶间的差异性化合物，进一步筛选则通过结合 ANOVA 统计分析结果的 P-value 值进行。本试验差异性化合物的筛选标准为：化合物在不同样本间的差异为 P-value 小于 0.05，且 VIP≥1。最终正离子模式下共筛选得到 1412 个差异性化合物，负离子模式下共筛选得到 1582 个差异性化合物。

### 2.3 差异性化合物的鉴定

差异性化合物的鉴定通过比对 MSDIAL 软件数据库，结合 LabSolutions Insight Explore 软件的分子式预测、在线数据库检索（ChemSpider 或 PubChem）和 Assign 功能进行。正离子模式下共鉴定出 115 个差异性化合物，负离子模式下共鉴定出 101 个差异性化合物，正负离子模式同时匹配的化合物数量是 24 个，涵盖了儿茶素类、氨基酸类、黄酮及黄酮苷类等天然活性物质，表 2 为正负离子模式同时匹配的化合物鉴定结果表。



a) MSDIAL 软件数据库匹配结果



b) LabSolutions Insight Explore 结构预测结果

图 8 差异性化合物的鉴定

表 2 正负离子模式同时匹配的差异性化合物鉴定结果表

序号	RT (min)	化合物名称	分子式	加合离子	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)
1	3.132	黄嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	153.0408	153.0407	0.65
				[M-H] <sup>-</sup>	151.0260	151.0262	-0.99
2	3.100	N-乙酰-L-谷氨酸	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	190.0712	190.0710	1.05
				[M-H] <sup>-</sup>	188.0568	188.0565	1.86
3	1.414	奎尼酸	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	193.0708	193.0707	0.73
				[M-H] <sup>-</sup>	191.0560	191.0561	-0.58
4	7.911	L-色氨酸	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	205.0975	205.0972	1.71
				[M-H] <sup>-</sup>	203.0822	203.0826	-1.97
5	9.409	1,3,7-三甲基尿酸	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	211.0828	211.0826	1.09
				[M-H] <sup>-</sup>	209.0685	209.0680	2.34
6	10.742	圣草酚	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	289.0711	289.0707	1.52
				[M-H] <sup>-</sup>	287.0569	287.0561	2.75

7	11.027	表儿茶素	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	291.0859	291.0863	-1.41
				[M-H] <sup>-</sup>	289.0719	289.0718	0.48
8	9.440	儿茶素	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	291.0860	291.0863	-1.06
				[M-H] <sup>-</sup>	289.0721	289.0718	1.18
9	17.084	槲皮素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	303.0505	303.0499	1.88
				[M-H] <sup>-</sup>	301.0354	301.0354	0.07
10	9.202	表没食子儿茶素	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	307.0791	307.0812	-6.94
				[M-H] <sup>-</sup>	305.0639	305.0667	-9.11
11	5.182	腺苷 -2',3'- 环磷酸	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	330.0594	330.0598	-1.21
				[M-H] <sup>-</sup>	328.0445	328.0452	-2.26
12	12.147	3- 对香豆酰基奎宁酸	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	339.1074	339.1074	-0.12
				[M-H] <sup>-</sup>	337.0925	337.0929	-1.16
13	7.617	鸟苷 -3',5'- 环一磷酸	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	346.0549	346.0547	0.55
				[M-H] <sup>-</sup>	344.0396	344.0402	-1.63
14	6.580	鸟嘌呤核苷酸	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	364.0650	364.0653	-0.77
				[M-H] <sup>-</sup>	362.0505	362.0507	-0.61
15	13.812	牡荆素	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	433.1123	433.1129	-1.43
				[M-H] <sup>-</sup>	431.0982	431.0984	-0.39
16	14.517	异牡荆素	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	433.1126	433.1129	-0.74
				[M-H] <sup>-</sup>	431.0985	431.0984	0.30
17	13.281	表儿茶素没食子酸酯	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	443.0976	443.0973	0.74
				[M-H] <sup>-</sup>	441.0830	441.0827	0.63
18	13.139	荭草苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	449.1077	449.1078	-0.31
				[M-H] <sup>-</sup>	447.0927	447.0933	-1.32
19	13.392	异荭草苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	449.1080	449.1078	0.36
				[M-H] <sup>-</sup>	447.0930	447.0933	-0.65
20	16.845	茶黄素	C <sub>29</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	565.1340	565.1341	-0.09
				[M-H] <sup>-</sup>	563.1192	563.1195	-0.53
21	16.955	茶黄素 -3- 没食子酸酯	C <sub>36</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	717.1460	717.1450	1.38
				[M-H] <sup>-</sup>	715.1301	715.1305	-0.50
22	15.812	刺槐素	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	741.2227	741.2237	-1.30
				[M-H] <sup>-</sup>	739.2087	739.2091	-0.54
23	14.561	槲皮素 -3- 芸香糖苷 -7- 半乳糖苷	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	773.2191	773.2135	7.27
				[M-H] <sup>-</sup>	771.1990	771.1989	0.09
24	17.031	3,3'- 二没食子酸酯 茶黄素	C <sub>43</sub> H <sub>32</sub> O <sub>20</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	869.1556	869.1560	-0.43
				[M-H] <sup>-</sup>	867.1412	867.1414	-0.25

## 2.4 不同茶叶化学成分比较

以热图的方式提供了直观可视化的图谱，以方便识别不同样本之间不同质荷比化合物浓度值的差异。横坐标表示不同样本来源，纵坐标表示不同质荷比的化学成分，图中的彩色单元对应于数据表中不同质荷比的强度值，不同质荷比的强度值越大，颜色偏红，不同质荷比的强度值越小，颜色偏蓝。图 9 展示了不同茶叶中部分化合物的差异性比较结果。

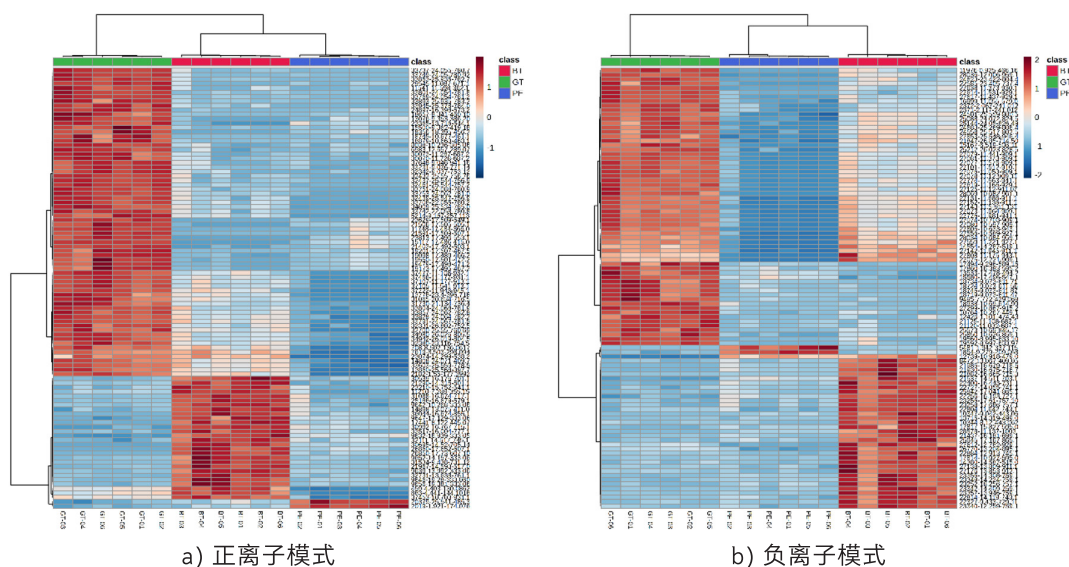


图 9 不同茶叶中部分化合物差异性比较结果

## ■ 结论

本文建立了采用超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用的非靶向代谢组学分析方法，对绿茶、红茶及普洱茶中的化学成分进行比较研究。采集后的数据经 MSDIAL 软件峰提取和峰对齐后，通过 MetaboAnalyst 平台进行数据预处理及统计学分析得到差异性化合物。通过与 MSDIAL 数据库比对和 LabSolutions Insight Explore 软件在线预测，共鉴定出 192 个差异性化合物，包括了有机酸类、氨基酸类、儿茶素类、生物碱、黄酮及黄酮苷等天然活性物质，本方法可为茶叶代谢组学相关研究提供参考。

岛津应用云

