

蒙顶黄芽水溶性成分 LC-TOF/MS 指纹图谱及定量分析

刘 晓,张 厅,唐晓波*,马伟伟,王小萍,李春华,王 云
(四川省农业科学院茶叶研究所,四川成都 610066)

摘要:用液相色谱-飞行时间质谱联用仪(LC-TOF/MS)研究四川蒙顶黄芽指纹图谱,并对蒙顶黄芽的主要水溶性成分进行定量分析,为四川蒙顶黄芽的成分分析与鉴别提供理论依据。以24个蒙顶黄芽样品为实验材料,采用梯度洗脱(A相为0.1%甲酸溶液,B相为乙腈),柱温30℃,检测波长278nm,流速0.2mL/min,建立蒙顶黄芽LC-TOF/MS指纹图谱,确定共有色谱峰,并进行了定量分析。24个蒙顶黄芽样品具有16个共有色谱峰,确定了9种化合物,分别为GC(没食子儿茶素)、EGC(表没食子儿茶素)、CAF(咖啡碱)、C(儿茶素)、EC(表儿茶素)、EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)、GCG(没食子儿茶素没食子酸酯)、ECG(表儿茶素没食子酸酯)与CG(儿茶素没食子酸酯);定量分析表明,不经过闷黄工艺制成的蒙顶黄芽GC、EGC含量较低,EGCG、ECG含量较高;而用陈茶炒黄的蒙顶黄芽EGCG含量均较低;因子分析表明,14个品质成分综合为4个公因子,前4个公因子的特征值大于1且累计贡献率达80.44%,主要代表性指标为儿茶素类、咖啡碱、蛋白质和糖类等;当临界值小于20时,通过聚类分析将24个样品分为4类。根据构建的蒙顶黄芽LC-TOF/MS指纹图谱,可以鉴定和评价不同工艺的四川蒙顶黄芽。

关键词:蒙顶黄芽,液相色谱-飞行时间质谱,指纹图谱,因子分析,聚类分析

LC-TOF/MS Fingerprint and Quantitative Analysis of Water-soluble Components in Mengding Yellow Bud

LIU Xiao, ZHANG Ting, TANG Xiaobo*, MA Weiwei, WANG Xiaoping, LI Chunhua, WANG Yun

(Tea Research Institute of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: Sichuan Mengding yellow bud have been fingerprinted by using the liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry(LC-TOF/MS) and quantitatively determined its major water-soluble constituents for the purpose of providing theoretical evidence for the identification of Sichuan Mengding yellow bud. Used 24 samples of Mengding yellow buds as experimental materials, gradient elution (phase A was 0.1% formic acid solution and phase B was acetonitrile) was used. Column temperature was 30℃, detection wavelength was 278 nm, flow rate was 0.2 mL/min. The LC-TOF/MS fingerprint of Mengding yellow bud was established and cluster analysis was performed to determine the common chromatographic peaks. 24 samples of Mengding yellow buds had 16 common chromatographic peaks, and 9 compounds were identified, namely GC (gallocatechin), EGC (epigallocatechin), CAF (caffeine), C (catechin), EC (epicatechin), EGCG (epigallocatechin gallate), GCG (gallocatechin gallate), ECG (epicatechin gallate) and CG (catechin gallate). Quantitative analysis showed the content of GC and EGC in the yellow buds of Mengding yellow bud without piling fermenting process was low, and the content of EGCG and ECG was high, while the content of EGCG in Mengding yellow bud fried with stale tea was low. Factor analysis showed that 14 quality components were combined into 4 common factors. The characteristic values of the first four common factors were greater than 1 and the cumulative contribution rate was 80.44%. The main representative indicators were catechins, caffeine, proteins and sugars. In addition, when the critical value was less than 20, the cluster analysis divided 24 samples into 4 categories. According to the constructed LC-TOF/MS fingerprint of Mengding yellow bud, the Mengding yellow bud from different processes can be identified and evaluated.

Key words: Mengding yellow bud; liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry; fingerprint; factor analysis; cluster analysis

收稿日期:2020-05-27

作者简介:刘晓(1986-),女,硕士,助理研究员,研究方向:茶叶精深加工与新产品开发,E-mail:345828723@qq.com。

*通信作者:唐晓波(1978-),男,硕士,副研究员,研究方向:茶树栽培、茶叶加工、新产品开发与利用研究,E-mail:sectea@163.com。

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2018JY0253);成都市科技局技术创新研发项目(2018-YF05-01314-SN);四川省农业科学院中试熟化与示范转化工程项目(CGZH2019FP10);四川省“十三五”茶树育种攻关项目。

中图分类号:TS272.7 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2021)04-0194-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020050326

引文格式:刘晓,张厅,唐晓波,等.蒙顶黄芽水溶性成分 LC-TOF/MS 指纹图谱及定量分析[J].食品工业科技,2021,42(4):194-201.

LIU Xiao,ZHANG Ting,TANG Xiaobo,et al.LC-TOF/MS Fingerprint and Quantitative Analysis of Water-soluble Components in Mengding Yellow Bud[J].Science and Technology of Food Industry,2021,42(4):194-201. (in Chinese with English abstract) http://www.spvj.com

黄茶是我国六大茶类之一,是一类小众茶,为我国所独有。按鲜叶原料老嫩可分为黄芽茶、黄小茶和黄大茶三类。其中蒙顶黄芽是黄芽茶中的精品,自古以来都是宫廷贡茶,产于四川省雅安市名山区蒙顶山茶区。黄芽具有干茶黄、汤色黄、叶底黄的特点,并有抗氧化^[1]、助消化^[2]、抑制肝损伤^[3-4]等多种保健功能。蒙顶黄芽有着独特的闷黄工艺及口感^[5],受到越来越多消费者的青睐,产销量持续增长,黄茶产业日渐壮大。蒙顶黄芽的相关研究也越来越引人关注。目前,蒙顶黄芽的研究主要集中在加工工艺^[6-10]、品质化学成分^[11-16]、微生物动态变化规律^[17-18]、生物学功能^[19-20]等,但对黄茶水溶性成分的定量分析和采用水溶性成分进行黄茶的鉴别研究较少。而且,对黄茶鉴别和品质评判多依赖于感官评价,缺少能够量化的指标。

本研究搜集四川 24 个典型蒙顶黄芽样品,采用 LC-TOF/MS 指纹图谱及定量分析蒙顶黄芽水溶性成分,研究蒙顶黄芽的典型加工工艺特征,并进一步利用聚类分析对蒙顶黄芽样品进行分类,有助于构建系统科学的标准化蒙顶黄芽品质评价体系,为蒙顶黄芽的鉴别提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

24 个(S1~S24)蒙顶黄芽样品 源自四川省的 24 个不同生产厂家,所有茶叶样品的生产年份均为 2019 年 3 月,详见表 1,这 24 个茶样有没经过闷黄的,有用陈茶炒黄的,有传统工艺闷黄的,还有采用现代工艺闷黄的;考马斯亮蓝 G-250、95% 乙醇、磷酸、浓硫酸、无水葡萄糖、无水碳酸钠、无水磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、茚三酮、乙二胺四乙酸二钠、抗坏血酸、乙酸 成都科龙化工试剂厂;牛血清白蛋白(分析纯)、萘酚(分析纯)、福林酚(分析纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、

甲醇(色谱纯);标准品:没食子酸(纯度 $\geq 98\%$)、表儿茶素(纯度 $\geq 98\%$)、表没食子儿茶素(纯度 $\geq 98\%$)、表儿茶素没食子酸酯(纯度 $\geq 98\%$)、儿茶素没食子酸酯(纯度 $\geq 98\%$)、没食子儿茶素没食子酸酯(纯度 $\geq 98\%$) 美国 Sigma-Aldrich 公司;儿茶素(纯度 $\geq 98.67\%$)、表没食子儿茶素没食子酸酯(纯度 $\geq 99.61\%$)、没食子儿茶素(纯度 $\geq 99.5\%$) 国家标准物质中心;L-谷氨酸(纯度 $\geq 99\%$) 日本 TCI 公司;咖啡碱(纯度 $\geq 98\%$) 中国食品药品检定研究院。

1260 型液相色谱仪、1200/6210 型液相色谱-飞行时间质谱联用仪 美国 Agilent 公司;JA2003 型电子天平(精度:0.00001 g) 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;HH-6 型数显恒温水浴锅 常州市金坛友联仪器研究所;UV-1700 型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;5810R 型高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;BP 211D 型电子天平 德国 Sartorius 公司;Milli-Q 型超纯水器 美国 Millipore 公司;KH-500DE 型数控超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司;XW-80A 型漩涡混合器 上海驰唐实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 感官审评方式 感官审评根据茶叶感官审评方法^[21]黄茶标准进行。由 5 名国家二级评茶员以上资质的茶叶审评专家组成审评小组,审评得分为 5 人评分的平均值,审评术语由主评综合 5 人结果给出最后评语。其中外形占 25%,汤色占 10%,香气占 25%,滋味占 30%,叶底占 10%。

1.2.2 可溶性蛋白质的测定 参考刘小华等的方法,采用考马斯亮蓝 G-250 比色法^[22]法进行测定。

1.2.3 可溶性糖的测定 参照张正竹^[23]主编《茶叶生物化学实验教程》中“实验 2-6”进行测定。

1.2.4 茶多酚含量测定 参照 GB/T 8313-2018《茶

表 1 供试蒙顶黄芽样品的来源信息

Table 1 Sources of Mengding yellow bud samples used in this study

编号	样品名称	样品来源	编号	样品名称	样品来源
1	蒙顶黄芽(没闷黄)	雅安市名山区雅岚茶厂	13	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川雅安西康藏茶集团有限责任公司
2	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川川黄茶业集团有限公司	14	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川蒙顶山茶业有限公司
3	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川省南方叶嘉茶业有限公司	15	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市绿乡茗茶业有限公司
4	蒙顶黄芽(没闷黄)	雅安市蔡龙茶厂	16	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川蒙顶山丰丰茶业有限公司
5	蒙顶黄芽(传统闷黄)	成都听香草木间商贸有限公司	17	蒙顶黄芽(陈茶炒黄)	四川省蒙顶山绿川茶叶集团有限责任公司
6	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安馨芽茶业有限公司	18	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市名山区翠源春茶厂
7	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川省蒙顶山皇茗园茶业集团有限公司	19	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市蒙茗茶厂
8	蒙顶黄芽(陈茶炒黄)	雅安市名山区雅茗源茶业有限公司	20	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市雨曦农业发展有限公司
9	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川蒙顶山味独珍茶业有限公司	21	蒙顶黄芽(陈茶炒黄)	雅安市蒙山顶上茶业有限公司
10	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市名山区藕莲春茶厂	22	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雨城区聚祥春茶厂
11	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市三石茶业有限公司	23	蒙顶黄芽(传统闷黄)	雅安市雨雨露茶叶有限公司
12	蒙顶黄芽(现代闷黄)	雅安金蒙茶业有限公司	24	蒙顶黄芽(传统闷黄)	四川蒙顶山跃华茶业集团有限公司

叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》^[24]进行测定。

1.2.5 游离氨基酸总量测定 参照 GB/T 8314-2013《茶 游离氨基酸总量的测定》^[25]进行测定。

1.2.6 儿茶素组分和咖啡碱含量的测定 参照 GB/T 8313-2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》^[24]的前处理方法进行制备供试液,并按照如下液相色谱条件进行测定:

液相色谱柱:Gemini® 5 μm C18 110 A, 250 mm × 4.6 mm; 流动相 A 为 0.1% 乙酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 检测波长 278 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。梯度洗脱方法见表 2:

表 2 流动相的梯度洗脱程序

Table 2 Mobile phase gradient elution procedure

时间 (min)	A 流动相 (%)	B 流动相 (%)
0	92	8
5	92	8
32	80	20
40	70	30
42	5	95
46	5	95
48	92	8

1.2.7 指纹图谱的测定 准确称取 0.2 g 粉碎茶样于 50 mL 具塞离心管中,加入 20 mL 90 °C 的蒸馏水,立即放入 90 °C 水浴中浸提 20 min,每隔 5 min 涡旋振荡 10 s。提取完成后,静置,冷却至室温,取 1 mL 上层清液于 12000 r/min 下离心 8 min,供 LC-TOF MS 测定。

LC-TOF/MS 测定色谱条件:

液相色谱柱: Agilent XDB - C18 (3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

LC-TOF/MS 测定质谱条件:

离子源: 电喷雾离子源, 正离子模式; 雾化器压力: 40 psi; 毛细管电压: 3500 V; 干燥气流量: 10 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 除液电压: 65 V; 锥孔电压: 120 V; 扫描方式: 全扫描。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 进行实验数据处理与标准曲线绘制,然后采用 DPS 9.50 软件进行因子分析和聚类分析。对所有蒙顶黄芽样品进行 LC-TOF MS 分析后,将色谱图数据文件导入《国家药典》委员会发布的中药指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版),生成四川蒙顶黄芽的 LC-TOF/MS 共有峰特征指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

以标准物质量浓度(mg/mL)为 x 轴,峰面积为 y 轴,绘制标准曲线,得到 9 种水溶性成分对照品溶液的线性回归方程,如表 3 所示。每种对照品的峰面积与质量浓度间的相关系数均大于 0.999,说明线性

关系良好。

表 3 蒙顶黄芽中多种成分色谱峰面积与质量浓度间的线性回归方程

Table 3 Linear equation between peak areas and concentrations of Mengding yellow bud components

标准品	线性回归方程(以峰面积定量)	决定系数 R ²
GC	$y = 2.57225x + 7.23878$	0.9994
EGC	$Y = 2.36858x + 14.99183$	0.9991
CAF	$Y = 24.06874x + 96.44854$	0.9999
C	$Y = 6.12977x - 8.07584$	0.9998
EC	$Y = 7.03856x - 10.06779$	0.9999
EGCG	$Y = 11.93906x - 307.09457$	0.9994
GCG	$Y = 13.84687x - 62.42842$	0.9993
ECCG	$Y = 16.23839x - 130.17233$	0.9994
CG	$Y = 12.615x - 21.51485$	0.9990

2.2 四川蒙顶黄芽感官品质研究

四川蒙顶黄芽样品的感官审评结果见表 4。由表中可知,24 个蒙顶黄芽的感官品质有非常明显的差异,在干茶外形方面,蒙顶黄芽的形状、匀整度等方面差异不大;但在干茶外观颜色方面,1 和 4 号以翠绿为主,8、17 和 21 号以黄为主,其他样品色泽以嫩黄为主。在内质汤色方面,12 号嫩黄鲜亮,1、4、14、15、19 和 20 号的汤色以黄绿为主,2、3、5、6、7、8、11、17 和 21 号的汤色以黄为主,23 和 24 号的汤色以淡黄为主,9、10、13、16、18 号和 22 号以绿黄为主。在内质香气方面,1 和 4 号以栗香为主,2、5、6、7、12、13、15、16、18、19、20、23 和 24 号以甜香为主,3、9、10、11、14 和 22 号以清新为主,8、17 和 21 号带火功香。在内质滋味方面,3、6、10、12 和 13 号以鲜醇为主,2、5、7、8、17、18、19、21 和 22 号以醇和为主,9、11、14、15、16、20 和 24 号以醇厚为主,1 号和 4 号以浓厚为主。在叶底方面,2、12、14、15、16 和 18 号以嫩黄为主,3、5、6、7、8、9、10、11、13、19、20、22、23 和 24 号以黄为主,1 和 4 号嫩绿较亮,8、17 和 21 号黄欠亮。综合上述,1 和 4 号偏绿茶品质特征,8、17 和 21 号偏陈茶品质特征,其他样品呈现黄茶品质特征。24 个样品感官审评结果差异很大,主要是由闷黄工序的有无及闷黄条件的不同引起。

2.3 四川蒙顶黄芽指纹图谱的构建

按照已建立的 LC-TOF/MS 分析方法,对 24 个不同厂家的 24 个蒙顶黄芽样品进行分析,将所得到的色谱图数据文件导入《国家药典》(2012.1 版)发布的中药指纹图谱相似度评价系统,得到蒙顶黄芽的 LC-TOF/MS 指纹图谱,如图 1 所示。选择出峰时间适中、峰面积在色谱图中所占比例较大,且在四川蒙顶黄芽样品中均稳定存在的 3 号峰作为参照峰,共发现 16 个共有峰,如图 2 所示,通过与对照品液相色谱图比对,共确定了 9 种化合物,分别为 GC(没食子儿茶素)、EGC(表没食子儿茶素)、CAF(咖啡碱)、C(儿茶素)、EC(表儿茶素)、EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)、GCG(没食子儿茶素没食子酸酯)、

表4 不同蒙顶黄芽感官审评结果
Table 4 Sensory evaluation results of different Mengding yellow bud

编号	外形		汤色		香气		滋味		叶底		总分
	评语	分数	评语	分数	评语	分数	评语	分数	评语	分数	
1	单芽、匀整、翠绿较润	96.5	黄绿较亮	95.5	栗香	95.5	滋味浓厚	95.0	肥嫩单芽、嫩绿较亮	95.0	95.40
2	单芽、匀整、嫩黄油润	98.0	黄较亮	97.0	甜香浓郁持久	98.5	醇和回甘	97.0	肥嫩单芽、嫩黄明亮	97.5	97.68
3	单芽、匀整、嫩黄油润	98.5	黄较亮	97.3	清鲜	96.0	鲜醇回甘	97.5	肥嫩单芽、黄明亮	97.0	97.31
4	单芽、匀整、翠绿较润	96.0	黄绿较亮	95.5	栗香	96.0	滋味浓厚	95.0	肥嫩单芽、嫩绿较亮	95.0	95.55
5	单芽、匀整、嫩黄油润	97.5	黄较亮	95.0	甜香浓郁	97.0	醇和	96.5	肥嫩单芽、黄较亮	96.0	96.68
6	单芽、匀整、嫩黄较润	96.5	黄亮	97.0	甜香浓郁	98.0	鲜醇回甘	98.0	肥嫩单芽、黄较亮	95.0	97.23
7	单芽、匀整、嫩黄较润	97.0	黄尚亮	96.5	略带甜香	97.0	醇和	95.0	肥嫩单芽、黄较亮	96.5	96.30
8	单芽、匀整、黄较润	96.5	黄较亮	95.0	火功香	95.0	醇和	95.5	肥嫩单芽、黄较暗	94.0	95.43
9	单芽、匀整、嫩黄油润	98.0	绿黄较亮	96.0	清鲜带甜香	96.5	醇厚	94.5	肥嫩单芽、黄较亮	96.5	96.23
10	单芽、匀整、嫩黄较润	97.5	绿黄明亮	97.5	清鲜带甜香	96.0	鲜醇	96.5	肥嫩单芽、黄较亮	96.0	96.68
11	单芽、匀整、嫩黄较润	97.0	黄较亮	97.0	清鲜	95.5	醇厚	95.5	肥嫩单芽、黄尚亮	94.5	95.93
12	单芽、匀整、嫩黄油润	97.5	嫩黄鲜亮	98.5	甜香浓郁持久	98.0	鲜醇回甘	97.5	肥嫩单芽、嫩黄较亮	97.0	97.68
13	单芽、匀整、嫩黄油润	97.5	绿黄明亮	97.5	甜香	97.0	鲜醇回甘	97.5	肥嫩单芽、黄较亮	96.5	97.28
14	单芽、匀整、嫩黄较润	96.5	黄绿较亮	96.5	清鲜带甜香	96.5	醇厚回甘	97.0	肥嫩单芽、嫩黄较亮	97.0	96.70
15	单芽、匀整、嫩黄较润	97.0	黄绿明亮	97.5	甜香较浓郁持久	97.5	醇厚回甘	97.5	肥嫩单芽、嫩黄较亮	96.5	97.28
16	单芽、匀整、嫩黄较润	96.0	绿黄明亮	97.5	甜香较浓郁持久	98.0	醇厚	96.0	肥嫩单芽、嫩黄较亮	96.0	96.65
17	单芽、匀整、黄尚润	96.0	黄亮	97.0	火功香	95.5	醇和	95.5	肥嫩单芽、黄欠亮	95.5	95.78
18	单芽、匀整、嫩黄油润	97.0	绿黄明亮	97.5	甜香带闷味	96.5	醇和青味	95.0	肥嫩单芽、嫩黄尚亮	95.5	96.18
19	单芽、匀整、嫩黄显毫	97.5	黄绿明亮	96.5	甜香较浓郁持久	97.0	醇和	95.5	肥嫩单芽、黄明亮	96.0	96.53
20	单芽、匀整、嫩黄较润	97.5	黄绿较亮	96.0	略带甜香	97.0	醇厚	96.0	肥嫩单芽、黄明亮	96.5	96.68
21	单芽、匀整、黄尚润	96.0	黄较亮	95.5	火功香	95.0	浓厚带涩	95.0	肥嫩单芽、黄欠亮	95.0	95.38
22	单芽、匀整、嫩黄较润	97.5	绿黄明亮	97.5	清鲜	96.0	醇和	95.5	肥嫩单芽、黄明亮	97.0	96.48
23	单芽、匀整、嫩黄较润	96.0	淡黄明亮	96.0	甜香浓郁	97.0	醇厚回甘	96.5	肥嫩单芽、黄较亮	95.5	96.35
24	单芽、匀整、嫩黄较润	96.5	淡黄明亮	96.0	甜香浓郁	97.5	醇厚回甘	97.5	肥嫩单芽、黄较亮	96.0	96.95

ECG(表儿茶素没食子酸酯)与CG(儿茶素没食子酸酯)。

2.4 四川蒙顶黄芽水溶性成分的含量分析

按照1.2.6节中的方法进样10 μL ,连续进样3次,计算峰面积平均值,根据相应化合物标准曲线方程,计算各茶叶中8种主要成分的含量,以干质量

计,如表5所示。1号、4号的GC、EGC含量较低,EGCG和ECG含量较高。GC和EGC属于非酯性儿茶素,收敛性较弱,味醇和不苦涩;EGCG和ECG酯型儿茶素具有强烈收敛性,苦涩味较重,因此1号和4号呈现出绿茶的滋味特征;8号、17号和21号的EGCG均较低,8号最低,可能是因为陈放过程中

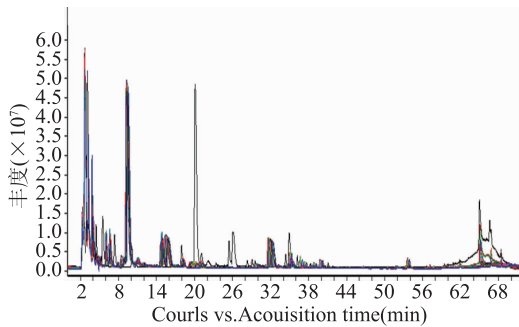


图1 24个蒙顶黄芽样品的LC-TOF/MS指纹图谱

Fig.1 LC-TOF/MS fingerprints of
24 Mengding yellow bud samples

EGCG 发生氧化反应而减少,与感官审评结果一致。不同蒙顶黄芽主要水溶性成分含量与周继荣等^[9]的研究结果一致,究其原因是因为苦涩口感特征的EGCG、ECG在闷黄的过程中水解成醇和口感特征的GC、EGC等。

从表6可以看出,采用现代工艺闷黄12号的茶多酚含量最低,酚氨比低,可溶性糖和氨基酸含量较高,与感官审评结果一致;1号和4号没经过闷黄,茶多酚和咖啡碱含量高,滋味浓厚;8号、17号和21号茶多酚含量均较低,是因为在贮藏过程中多酚类物质发生氧化反应形成儿茶素类;8号可溶性糖含量较高,可能是在炒黄过程中多糖类物质受高温作用发生脱水反应分解成可溶性糖;11、15、

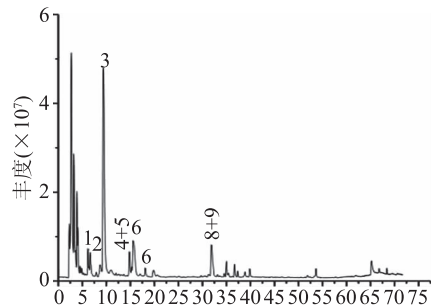


图2 蒙顶黄芽水溶性成分共有峰LC-TOF/MS指纹图谱

Fig.2 The common peak LC-TOF/MS fingerprint of
water-soluble components of Mengding yellow bud

注:1:GC;2:EGC;3:CAF;4:EC;5:C;
6:GCG;7:EGCG;8:ECG;9:CG。

17、18号游离氨基酸总量最低,这可能是氨基酸在贮藏的过程中氧化降解所致^[26]。综上所述,不同蒙顶黄芽主要生化成分分析结果与感官审评结果一致。

2.5 四川蒙顶黄芽样品的因子分析和聚类分析

对蒙顶黄芽样品的品质成分进行因子分析,所得的因子特征值和贡献率如表7所示。根据特征值大于1的原则提取了4个因子,其方差贡献率分别为33.42%、21.23%、16.97%、8.82%,其所包含的信息量占总体信息量的80.44%,基本反映了大部分变量的信息。

表5 不同蒙顶黄芽主要水溶性成分含量(mg/g)

Table 5 Contents of major components in different brands of Mengding yellow bud(mg/g)

编号	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCC	ECG	CG
1	0.093	0.418	0.283	0.614	10.784	2.137	4.004	0.193
2	0.180	0.566	0.201	0.650	8.422	2.143	3.669	0.166
3	0.135	0.808	0.298	0.561	7.821	2.067	3.963	0.200
4	0.054	0.477	0.284	0.643	11.744	2.421	4.148	0.261
5	0.060	0.571	0.301	0.518	9.328	2.308	3.249	0.258
6	0.130	0.537	0.335	0.478	9.421	2.439	3.164	0.287
7	0.176	0.657	0.382	0.506	9.612	2.929	3.720	0.302
8	0.145	0.753	0.166	0.700	6.206	1.942	3.367	0.188
9	0.293	0.959	0.224	0.726	8.739	2.231	2.700	0.307
10	0.208	0.929	0.197	0.828	7.947	2.219	3.838	0.205
11	0.230	0.896	0.177	0.826	7.020	2.485	3.403	0.216
12	0.278	1.262	0.263	0.990	10.034	2.262	3.298	0.251
13	0.369	1.465	0.277	1.071	9.112	1.920	3.199	0.263
14	0.289	1.073	0.238	0.901	9.320	1.758	2.770	0.241
15	0.238	1.477	0.272	1.058	10.662	1.639	2.939	0.243
16	0.206	0.631	0.227	0.655	9.236	2.151	3.297	0.262
17	0.115	0.568	0.118	0.558	6.905	3.706	2.939	0.291
18	0.357	1.889	0.365	1.466	8.097	1.707	2.942	0.200
19	0.078	0.568	0.157	0.704	9.446	2.968	3.670	0.205
20	0.137	0.685	0.187	0.770	9.635	2.950	3.793	0.248
21	0.213	0.719	0.186	0.700	6.953	2.554	3.122	0.212
22	0.137	0.994	0.182	0.757	8.833	4.718	3.003	0.270
23	0.085	0.589	0.186	0.534	9.281	2.242	3.087	0.261
24	0.121	0.570	0.238	0.502	9.662	2.342	3.157	0.263

表6 不同蒙顶黄芽主要生化成分分析结果

Table 6 Contents of main biochemistry components in different brands of Mengding yellow bud

编号	可溶性糖 (g/100 g)	茶多酚 (%)	可溶性蛋白质 (mg/g)	游离氨基酸 总量 (%)	咖啡碱 (g/100 g)	酚氨比
1	3.45	22.3	6.61	5.7	5.6	3.91
2	3.66	19.9	7.03	7.0	4.8	2.84
3	3.37	21.2	5.71	6.5	4.6	3.26
4	2.88	22.9	6.51	6.5	5.7	3.52
5	2.53	22.4	6.12	5.8	5.2	3.86
6	2.52	21.0	6.01	5.8	5.4	3.62
7	2.62	22.0	6.31	5.2	5.3	4.23
8	3.66	18.1	6.09	5.7	4.4	3.18
9	2.87	21.0	6.27	5.6	4.4	3.75
10	3.44	20.8	6.73	5.6	4.8	3.71
11	3.30	20.9	5.28	5.1	4.4	4.10
12	3.43	18.6	4.77	6.0	4.1	3.10
13	3.14	20.3	5.29	6.2	4.3	3.27
14	2.45	20.1	5.60	5.9	4.6	3.41
15	3.01	21.5	5.13	5.1	4.7	4.22
16	2.84	21.5	5.30	5.3	5.2	4.06
17	2.74	18.7	5.41	5.1	4.7	3.64
18	3.74	19.9	5.65	5.1	3.9	3.90
19	2.41	21.1	6.21	5.4	5.5	3.91
20	2.98	21.2	5.19	6.2	4.8	3.42
21	2.86	18.4	6.68	5.5	4.3	3.35
22	3.05	20.0	5.73	5.4	4.8	3.70
23	2.29	21.3	5.02	5.7	5.3	3.74
24	2.30	21.7	4.99	5.4	5.5	4.02

表7 因子分析特征值和贡献率

Table 7 Eigenvalue and contribution rate of factor analysis

成分	特征值	方差贡献率 (%)	累积贡献率 (%)
1	4.679	33.418	33.418
2	2.973	21.233	54.651
3	2.376	16.968	71.619
4	1.235	8.822	80.441

通过对因子的载荷矩阵旋转之后,可使载荷系数更接近1,这样得到的公因子能够更好的解释和命名变量^[27-28]。对载荷矩阵进行方差极大正交旋转,得到因子载荷矩阵方差为0.4568,因子载荷矩阵如表8所示。由表8可知,公因子1累积贡献率为28.93%,对应特征向量中贡献最大的是GC、EGC、EC和咖啡碱,其特征向量值均值0.80以上,基本可以代表非酯型儿茶素类和咖啡碱。公因子2累积贡献率为42.48%,对应的特征向量为ECG、CG和可溶性糖,基本可以代表酯型儿茶素类、蛋白质和糖类。公因子3累积贡献率为61.68%,对应的特征向量中贡献最大的C、EGCG和茶多酚,基本可以代表茶多酚。公因子4累积贡献率为75.58%,对应的特征向量为游离氨基酸和酚氨比,基本可代表氨基酸。

表8 因子载荷矩阵

Table 8 Rotated component matrix

品质成分	PC ₁	PC ₂	PC ₃	PC ₄
GC	-0.8861	0.1560	-0.1307	-0.0186
EGC	-0.9588	0.0117	0.0085	0.0961
C	-0.3288	0.1549	0.7028	0.0319
EC	-0.9120	-0.2071	0.0084	0.0845
EGCG	0.1115	0.0947	0.8943	-0.0827
GCG	0.1475	0.2621	-0.1647	0.1069
ECG	0.3829	-0.6822	0.3985	-0.2312
CG	0.0584	0.8448	0.2720	0.1303
可溶性糖	-0.5347	-0.6807	-0.1668	-0.2146
茶多酚	0.3796	-0.0261	0.8153	0.2507
可溶性蛋白质	0.2660	-0.2793	-0.0382	-0.1201
游离氨基酸	0.1424	-0.1973	0.1980	-0.9197
咖啡碱	0.8027	0.0184	0.5182	0.1493
酚氨比	0.0956	0.1217	0.3392	0.9209
方差贡献	4.0500	1.8973	2.6876	1.9460
累计贡献	0.2893	0.4248	0.6168	0.7558

根据因子分析的结果,对4个公因子(表8)的品质成分采用组间联接的聚类方法和平方欧式距离区间测量法进行聚类分析如图3。在遗传距离小于20处(如图3所示)进行聚类分析,可分为4个大的类群(图3)。没经过闷黄的1、4号聚为一类;采用现代

工艺闷黄的12号聚为一类;用陈茶炒黄的8、17号和21号聚为一类;传统工艺闷黄的2、3、5、6、7、9、10、11、13、14、15、16、18、19、20、22、23号和24号聚为一类。不同黄茶样品的聚类分析结果表明,不同加工工艺对黄茶内含化学成分的影响较大,可利用聚类分析对我国不同加工工艺和不同产地的黄茶样品进行初步区分。

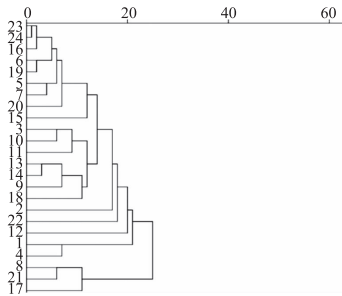


图3 不同蒙顶黄芽样品的系统聚类分析结果

Fig.3 Results of systematic cluster analysis of different Mengding yellow bud samples

3 结论

目前,对蒙顶黄芽的LC-TOF/MS指纹图谱研究尚未见报道。本试验初步构建了蒙顶黄芽的LC-TOF/MS指纹图谱,结果显示,24个四川蒙顶黄芽样品均有16个共有峰,但峰面积存在差异,说明不同厂家的四川蒙顶黄芽样品,由于生产工艺的差异,造成其内含化学成分含量的不同;通过聚类分析能初步区分不同工艺的蒙顶黄芽样品。闷黄是黄茶品质形成的关键工序,闷黄过程中的湿热作用导致多酚类物质的降低,但黄茶作为轻发酵茶,其品质形成机理可能还有残余酶类参与多酚类化合物的氧化,本身就存在内在的不稳定性,这也是黄茶指纹图谱研究的难点,这就需要实施茶叶的规范化加工,搜集更多全国范围的黄茶,并运用联用技术获得全国黄茶的特征谱及特征性成分,以更好地对黄茶物质基础进行研究。

本实验利用LC-TOF/MS法构建了24个蒙顶黄芽样品的LC-TOF/MS指纹图谱,得到了有关四川蒙顶黄芽质量的综合信息,并在此基础上进行了定量分析,因子分析表明,14个品质成分综合为4个公因子,前4个公因子的特征值大于1且累计贡献率达80.44%,主要代表性指标为儿茶素类、咖啡碱、蛋白质和糖类等,并找到了不同工艺蒙顶黄芽水溶性成分的含量差异;当临界值小于20时,通过聚类分析将24个样品分为4类。LC-TOF/MS指纹图谱结合定量分析分离效率高、分析速度快、准确率高,同时为蒙顶黄芽提供了量化的鉴定方法,比通过单一成分测定得到的结果更为丰富和全面,具有一定的优越性,不仅可应用于黄茶质量评价、黄茶加工工艺全过程的质量控制和最终产品的质量评价,还可以应用于功能性成分的定性和定量,同时可以确保黄茶产品质量的一致性、安全性及可靠性。本研究结果在一定程度上为四川蒙顶黄芽品质真伪的鉴定及产品的进一步开发利用提供了参考依据和数据支持。

参考文献

- [1] Gramza-Michałowska A, Kobus-Cisowska J, Kmiecik D, et al. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2016, 211: 448-454.
- [2] Wang Q, Zhao X, Qian Y, et al. *In vitro* antioxidative activity of yellow tea and its *in vivo* preventive effect on gastric injury [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(2): 423-426.
- [3] Kujawska M, Ewertowska M, Adamska T, et al. Protective effect of yellow tea extract on N-nitrosodiethylamine-induced liver carcinogenesis [J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(9): 1891-1900.
- [4] 文帅, 安然, 李冬利, 等. 不同闷黄工艺对黄茶品质及其抑制HepG2细胞增殖的影响[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(1): 75-81.
- [5] 夏涛. 制茶学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2014: 147-148.
- [6] 李兰兰, 张鹏程, 肖文军, 等. 夏季茶鲜叶加工花香型黄茶的品质变化研究[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(1): 82-88.
- [7] 陈昌辉, 邓小丽, 张跃华, 等. 蒙顶黄芽新工艺条件下品种适制性研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(18): 4403-4406, 4426.
- [8] 刘晓慧, 王日为, 张丽霞, 等. 山东黄茶加工工艺的研究[J]. 中国茶叶加工, 2010(2): 27-30.
- [9] 周继荣, 陈玉琼, 孙娅, 等. 鹿苑茶闷堆工艺研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 107-111.
- [10] 范方媛, 杨晓蕾, 龚淑英, 等. 闷黄工艺因子对黄茶品质及滋味化学组分的影响研究[J]. 茶叶科学, 2019, 39(1): 63-73.
- [11] 逯晓娟, 郑晓娟, 杜晓, 等. 蒙顶黄芽主要成分含量及组分分析[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 108-114.
- [12] 范方媛, 唐贵珍, 龚淑英, 等. 典型黄茶滋味品质特征属性及相关滋味化学组分[J]. 中国农业科学, 2020, 53(2): 371-382.
- [13] 尹鹏, 刘威, 刘盼盼, 等. 黄茶及其茶毫挥发性成分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 270-274.
- [14] 王治会. 黄茶闷黄中化学成分变化的动力学模型及滋味接受性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 13.
- [15] 李丹, 杜晓, 边金霖, 等. 蒙顶山黄茶“酶促闷黄”加工品质的审评及成分分析[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2016, 38(3): 477-486.
- [16] 滑金杰, 江用文, 袁海波, 等. 闷黄过程中黄茶生化成分变化及其影响因子研究进展[J]. 茶叶科学, 2015, 35(3): 203-208.
- [17] 刘晓, 张厅, 刘飞, 等. 蒙顶黄茶闷堆过程中主要品质成分及酶活性变化研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(27): 97-101.
- [18] Wang Q, Zhao X, Qian Y, et al. *In vitro* antioxidative activity of yellow tea and its *in vivo* preventive effect on gastric injury [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2013, 6(2): 423-426.
- [19] Xu J Y, Wang M, Zhao J P, et al. Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits [J]. Food Research International, 2018, 107: 567-577.

- [20] Kopjar M, Tadić M, Piližota V. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves [J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2015, 2 (1): 1-6.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 茶叶感官审评方法: GB/T 23776-2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [22] 刘小华, 张美霞, 于春梅, 等. 考马斯亮兰法测定壳聚糖中蛋白的含量 [J]. 中国交通医学杂志, 2006, 20(2): 159-160.
- [23] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 44-45.
- [24] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 茶叶

- 中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313-2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [25] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 茶游离氨基酸总量的测定: GB/T 8314-2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [26] 赵熙, 黄怀生, 粟本文, 等. 不同茶树品种制绿茶贮藏过程中品质变化规律 [J]. 茶叶通讯, 2014, 41(4): 18-22.
- [27] 李永迪, 刘仲华, 黄建安, 等. 基于主成分和聚类分析研究茯砖茶加工过程品质变化 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 1-4, 9.
- [28] 刘东娜, 李兰英, 龚雪蛟, 等. 峨眉山野生茶树资源农业性状多样性分析 [J]. 中国农学通报, 2020, 36(13): 103-109.

(上接第 107 页)

Journal of Pharmaceutics, 2019, 566: 631-640.

- [10] Vu Tuan Nguyen, Bernadine Flanagan, Deirdre Mikkelsen, et al. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(2): 337-343.
- [11] Dong Hoon Hur, Hong-Soon Rhee, Jae Hyung Lee, et al. Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene [J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 156: 1-10.
- [12] Pornchanok Tawecheep, Kallayanee Naloka, Minenosuke Matsutani, et al. Superfine bacterial nanocellulose produced by reverse mutations in the bcsC gene during adaptive breeding of *Komagataeibacter oboediens* [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 226: 1-8.
- [13] 吴谦, 谢必祺, 刘耀谦, 等. 木葡糖醋杆菌静置培养中的衰退现象初探 [J]. 中国酿造, 2013, 254(5): 19-21.
- [14] Wang Z G, Xiang D, Wang X B, et al. Preparation of an inoculum of *Gluconacetobacter xylinus* without mutants in shaken culture [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121: 713-720.
- [15] 李少慧. 细菌纤维素生物合成的调控及其红曲霉菌复合发酵的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [16] Chao Yaping, Makoto Mitarai, Yasushi Sugano, et al. Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50-L airlift reactor [J]. Biotechnology Progress, 2001, 17(4): 781-785.
- [17] Kuan-Chen Cheng, Jeffrey M, Catchmark, et al. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property [J]. Cellulose, 2009, 16(6): 1033-1045.
- [18] Erika F Souza, Maraysa R Furtado, Carlos W P Carvalho, et al. Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses

[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 285-289.

- [19] 沈新元. 高分子材料与工程专业实验教程 [M]. 第二版. 北京: 中国纺织工业出版社, 2010: 62.
- [20] 胡英, 李喆, 柯勤飞, 等. 天然纤维素结晶结构的表征 [J]. 合成纤维工业, 2018, 41(3): 78-81.
- [21] 颜志勇, 王华平, 陈仕艳, 等. 细菌纤维素的晶体结构 [J]. 材料导报, 2008, 22(8): 127-130.
- [22] Karol Fijałkowski, Anna Zywicka, Radosław Drozd, et al. Effect of *Gluconacetobacter xylinus* cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose [J]. Polish Journal of Chemical Technology, 2016, 18(4): 117-123.
- [23] Czaja W, Romanovicz D, Brown RM. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture [J]. Cellulose, 2004, 11(3): 403-411.
- [24] Kenji Tajima, Katsutoshi Nakajima, Hitomi Yamashita, et al. Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769 [J]. DNA Research, 2001, 8(6): 263-269.
- [25] Coucheron D H. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(18): 5723-5731.
- [26] Cook K E, Colvin J R. Evidence for a beneficial influence of cellulose production on growth of *Acetobacter xylinum* in liquid medium [J]. Current Microbiology, 1980, 3: 203-205.
- [27] Valla S, Kjosbakken J. Cellulose - negative mutants of *Acetobacter xylinum* [J]. Journal of General Microbiology, 1982, 28: 1401-1408.
- [28] Jung J Y, Park J K, Chang H N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(3): 347-354.