

基于 UPLC-MS/MS 分析红豆杉鲜叶和茶叶 非挥发性差异成分

李萌¹, 耿婉茹², 庞蕾³, 曲凤凤¹, 王培强¹, 王宝怡¹, 王洁¹, 张斌⁴, 张新富^{1*}

(1. 青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109) (2. 济南大学研究生院, 山东济南 250000)

(3. 山东理工大学档案馆, 山东淄博 255049) (4. 山东紫科曼地亚红豆杉有限公司, 山东淄博 255049)

摘要: 该研究以曼地亚红豆杉鲜叶 (*T. media* Fresh Leaves, TFL) 为材料, 通过杀青、揉捻、干燥制成红豆杉茶叶 (*T. media* Tea, TT)。运用超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 分析比较曼地亚红豆杉鲜叶加工前后的差异化合物。在 TFL 和 TT 中共鉴定到 796 种化合物, TFL 中有 777 种化合物, TT 中有 768 种化合物。根据 PCA 结合 OPLS-DA 筛选出差异化合物 330 种, 其中氨基酸、脂质、黄酮、酚酸等 255 种化合物在 TFL 中含量高, 有机酸等 105 种化合物在 TT 中含量高。TFL 和 TT 的关键差异化合物有 11 种, 包括柠檬康酸、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、(2'S,3'R)-5-(N,N-二甲基-3'-苯基异丝氨酸)-红豆杉三烯 A、1,3,5-苯三酚、澳大利亚紫杉碱、3-羟基吡啶、吡咯-2-羧酸在 TT 中含量较高; 苯甲醛、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸、木犀草素-7-O-(6"-咖啡酰)鼠李糖苷在 TFL 中含量较高。该研究将为红豆杉鲜叶的开发利用提供理论依据。

关键词: 红豆杉; 超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS); 代谢组学; 差异化合物; 加工工艺

文章编号: 1673-9078(2023)11-225-234

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1489

Analysis of the Non-volatile Differential Compounds of Fresh Leaves and Tea in *Taxus* by Using UPLC-MS/MS

LI Meng¹, GENG Wanru², PANG Lei³, QU Fengfeng¹, WANG Peiqiang¹, WANG Baoyi¹, WANG Jie¹, ZHANG Bin⁴, ZHANG Xinfu^{1*}

(1.College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2.Graduate School, University of Jinan, Jinan 250000, China) (3.Archives, Shandong University of Technology, Zibo 255049 China) (4.Shandong Zike Taxus Media Co. Ltd., Zibo 255049, China)

Abstract: In this study, *Taxus media* fresh leaves (TFL) were processed to *Taxus media* tea (TT) by fixing, rolling and drying, in order to compare the differential compounds between fresh leaves and tea. A total of 796 compounds were identified both in TFL and TT, with 777 compounds in TFL and 768 compounds in TT. Further, according to the analysis PCA and OPLS-DA, 330 differential compounds were identified, of which 255 compounds such as amino acids, lipids, flavonoids, and phenolic acids were significantly reduced in TT, and 105 compounds such as organic acids were significantly increased in TT. Eleven key differential compounds between TFL and TT were further selected, some of which like citraconic acid, mevalonic acid, (2'S,3'R)-5-(N,N-dimethyl-3'-phenylisoserine)-taxachitriene A, 1,3,5-benzenetriol,austrotaxine, 3-hydroxypyridine and pyrrole-2-carboxylic acid were higher in TT. Others like benzaldehyde, hesperetin-7-O-glucoside, 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid, and luteolin-7-O-(6"-caffeoyl) rhamnoside were higher in TFL. This study would provide a theoretical basis for the development and utilization of fresh leaves of *Taxus*.

引文格式:

李萌,耿婉茹,庞蕾,等.基于 UPLC-MS/MS 分析红豆杉鲜叶和茶叶非挥发性差异成分[J].现代食品科技,2023,39(11):225-234

LI Meng, GENG Wanru, PANG Lei, et al. Analysis of the non-volatile differential compounds of fresh leaves and tea in *Taxus* by using UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 225-234

收稿日期: 2022-11-22

基金项目: 青岛农业大学横向课题 (660/2420094)

作者简介: 李萌 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶加工与品质化学, E-mail: limengtea@163.com

通讯作者: 张新富 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶加工与品质化学, E-mail: zxfta@163.com

Key words: *T. media*; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); metabolomics; differential metabolites; processing technology

红豆杉(*Taxus*)是红豆杉科红豆杉属的一种裸子植物,常绿乔木和小灌木,有较高的药用价值和经济价值,也是第四纪冰川遗留下来的古老树种,被称为“植物中的黄金”^[1]。红豆杉植物在全世界约有11种,主要分布于北半球的温带至亚热带地区^[2,3]。我国有6种,分别为中国红豆杉、云南红豆杉、西藏红豆杉、东北红豆杉、南方红豆杉和曼地亚红豆杉^[3,4]。曼地亚红豆杉(*T. media*)是东北红豆杉(*T. cuspidata*)为母本和欧洲红豆杉(*T. baccata*)为父本的自然杂交种,也是研究最广泛的红豆杉之一^[5]。与其他红豆杉植物相比,曼地亚红豆杉生长速度快,对环境适应性强^[6,7]。

自紫杉醇(一种低毒、高效、广谱的天然抗癌药物,用于治疗卵巢癌等多种疾病^[7])被美国科学家Wall等^[8]和Schiff等^[9]从短叶红豆杉树皮中分离提取得到,红豆杉植物受到了极大的关注。Gai等^[10]研究表明,在红豆杉的枝条和树叶中存在有益于健康的黄酮类化合物。此外,也在红豆杉的其他组织中鉴定出氨基酸类、酚类、生物碱、木质素和多糖等化合物^[4,6,11]。据报道,这些物质具有抗氧化、抗炎和神经药理等作用,而且对乳腺癌和中枢神经系统疾病等具有显著的抑制作用^[12-14]。我国传统医学名录《本草纲目》和《盛景通志》中记载红豆杉可用于治疗霍乱、伤寒等症^[15]。红豆杉叶可以入药,具有消炎止痛、利尿消肿、治消化不良等功效。除此之外,相关研究表明,红豆杉茶叶能够显著有效地抑制晚期糖基化终末产物(AGEs)的形成,具有很好的抗氧化和抗糖基化作用^[16],其提取物具有减轻倦怠、乏力、调节人体血脂等作用^[17]。但关于红豆杉叶加工成茶前后非挥发性成分变化的研究鲜有报道。

代谢组学作为获得代谢信息和显著识别不同代谢物的常用技术,广泛用于鉴定和量化植物和食品等的代谢物研究。超高效液相色谱串联质谱(Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS)分析主要侧重于鉴定和定量非挥发性成分,如氨基酸、黄酮和有机酸等初级代谢物^[18-20]。本研究以红豆杉鲜叶(*T. media* Fresh Leaves, TFL)及加工而成的红豆杉茶叶(*T. media* Tea, TT)为材料,通过超高效液相色谱串联质谱技术分析曼地亚红豆杉鲜叶加工成茶前后的非挥发性成分种类和含量的差异变化,进一步筛选出差异成分,阐明红豆杉茶叶的非挥发性成分含量,为曼地亚红豆杉叶茶的加工和利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂



图1 红豆杉鲜叶 TFL (a) 和红豆杉茶叶 TT (b)

Fig.1 *T. media* fresh leaves (a) and *T. media* tea (b)

试验样品为曼地亚红豆杉,由山东紫科曼地亚红豆杉有限公司提供,采摘的鲜叶一部分置于液氮中转移到-80℃超低温冰箱中保存备用,另一部分制成红豆杉茶叶。

甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级),德国Meker公司;标准品(色谱级,纯度>99%),美国Sigma-Aldrich公司;纯净水,中国娃哈哈集团。

1.2 仪器与设备

6CST-40 型杀青机,浙江上洋机械有限公司;6CR-30 型揉捻机,浙江上洋机械有限公司;6CH94 型烘干机,浙江上洋机械有限公司;DF-1140 型分析天平,奥豪斯国际贸易有限公司;AB4500 Q TRAP 四极杆串联飞行时间质谱仪,美国AB SCIEX公司;Nexera X2 超高效液相色谱系统,日本岛津公司;Milli-Q Advantage A10 纯水系统,德国Merck Millipore公司;Scientz-100F 冷冻干燥机,中国新芝生物公司;MC 京制 00000246 精密天平,德国Sartorius公司;5430R 台式高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;G560E 涡旋振荡器,美国Industrial Industries公司;1083 型恒温振荡水浴器,德国GFL公司;MM400 冷冻混合研磨仪,德国Retsch公司。

1.3 方法

1.3.1 红豆杉鲜叶的处理

将鲜叶从-80℃超低温冰箱取出,置于冷冻干燥机中冻干(真空度2 Pa、温度-50℃),冻干后的样品放入-80℃冰箱备用。

1.3.2 红豆杉茶叶的制备

工艺流程:鲜叶摊放(4 h);杀青(220℃,3 min);

揉捻(轻 10 min-重 10 min-轻 5 min); 初烘(150 °C, 25 min); 复烘(110 °C, 50 min); 成品茶, 放置于-80 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 样品前处理

样品用液氮研磨成均匀粉末, 称取 100 mg 于 2 mL 离心管中, 加入 1.2 mL ϕ =70% 甲醇, 涡旋 30 s, 30 min 一次, 共涡旋 6 次。离心 10 min (12 000 r/min) 后吸取上清液至离心管中, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。各样本均进行三次生物学重复。

1.3.4 UPLC-MS/MS 条件

1.3.4.1 UPLC 条件

色谱柱: Agilent SB-C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m); 流动相 A (ϕ =0.1% 甲酸), 流动相 B (乙腈); 梯度洗脱: 0~9 min (95%~5% A), 9~10 min (5% A); 10~11.10 min (5%~95% A); 11.10~14 min (95% A); 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量 4 μ L。

1.3.4.2 MS/MS 条件

电喷雾离子源 (Electron Spray Ionization, ESI), 温度 500 °C, 质谱电压 5 500 V, 气体 I (GS I) 和气体 II (GS II) 分别设置为 55 psi 和 60 psi, 帘气 (Curtain Gas, CUR) 25 psi, 碰撞气体 (氮气) 5 psi, 碰撞诱导电离 (Collision Gas, CAD) 参数设置为高。

1.4 定性定量分析

定性分析: 通过保留时间和峰形信息对不同样品中的化合物质谱峰进行积分校正, 以确保定性和定量分析的准确性。通过比标准品, 武汉迈特维尔生物技术有限公司自建数据库 (Metware Database, MWDB) 和化合物信息公共数据库 KNAPSACK (<http://kanaya.naist.jp/KNAPSACK>) 等对 TFL 和 TT 中各化合物进行分析鉴定。

定量分析: 通过峰面积归一法对得到的各化合物进行相对定量, 计算每种组分的峰面积与峰面积总和的比值, 作为各化合物的相对含量。试验重复三次, 结果以均值 $\pm$ 标准差表示。

1.5 数据分析

使用 Microsoft excel 绘制图表。使用 SPSS 软件进行差异显著性分析。使用 R (MetaboAnalystR) 软件进行正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 绘图, R (Base Package) 软件进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 和 Venn 绘图。使用 Mev 绘制热图。采用变量投影重要性 (Variable Important In

Projection, VIP) 和差异倍数 (Fold Change, FC) 对差异性成分进行筛选。

2 结果与讨论

2.1 化合物分析

通过 UPLC-MS/MS 对 TFL 和 TT 进行检测, 得到化合物的总离子流图和检测多峰图。两种样品共检测出 796 种化合物, 包括 196 种黄酮、139 种酚酸、95 种氨基酸及衍生物 (以下称“氨基酸类”)、91 种有机酸、84 种脂类、55 种核苷酸及衍生物 (以下称“核苷酸类”)、15 种生物碱和 121 种其他化合物, TFL 和 TT 的部分化合物组成和含量存在显著差异。

从图 2a 可以看出样本化合物在种类和数量上的差异, TFL 检测到的化合物有 777 种, TT 中的化合物为 768 种。如图 2b 所示, 根据化合物在样品中的有无筛选特有成分, 有 6 类 28 种物质只存在于 TFL 中; 有 6 类 19 种物质只存在于 TT 中; 两样品之间共有化合物 749 种, 可以看出 TFL 和 TT 由较为一致的化合物组成, 加工工艺主要对样品中化合物的含量产生显著影响。

由图 2c 和 2d 可知在加工前后各化合物含量也随之发生变化, 黄酮、氨基酸类、脂类化合物在 TFL 中显著积累, 黄酮类物质含量占化合物的 43.74%, 根据结构可以分为: 黄酮醇、双黄酮、异黄酮、黄烷醇类、花青素等。此外, 异鼠李素仅在鲜叶中检测到, 其作为一种有力的抗氧化剂, 广泛存在于植物果实和叶片中^[21]。其次是氨基酸类, 占 14.16%, L-异亮氨酸、L-正亮氨酸和 L-亮氨酸等是在 TFL 中含量较高的氨基酸类化合物。有机酸类、酚酸类、核苷酸类、生物碱类和其他成分在 TT 中有较高积累。黄酮类化合物占非挥发组分的 41.29%, 扁蓄苷是在 TFL 和 TT 相对含量均最高的黄酮类物质, 扁蓄苷具有抑制人乳腺癌细胞增殖、调控细胞周期的作用^[22]。有机酸在 TT 中的含量仅次于黄酮占 13.86%, 柠檬酸是 TT 中含量最高的有机酸, 柠檬酸、异柠檬酸、苹果酸等常见有机酸也被检测到。酚酸在 TT 中的含量高于 TFL, 可以分为单羟基苯甲酸、双羟基苯甲酸、三羟基苯甲酸等, Elansary 等^[23]研究表明红豆杉中酚类成分可能有抗癌作用。而 2-羟基腺苷、5-脱氧-5-甲硫腺苷等是核苷酸类中含量较高的化合物。刘茜等^[24]发现红豆杉的抗氧化作用可能与生物碱类成分密切相关, 而 7-O-乙酰基紫杉碱 A 是 TT 中含量最高的生物碱。此外, 维生素、原花青素、糖及醇类等其他类在 TT 中也有较大比重。

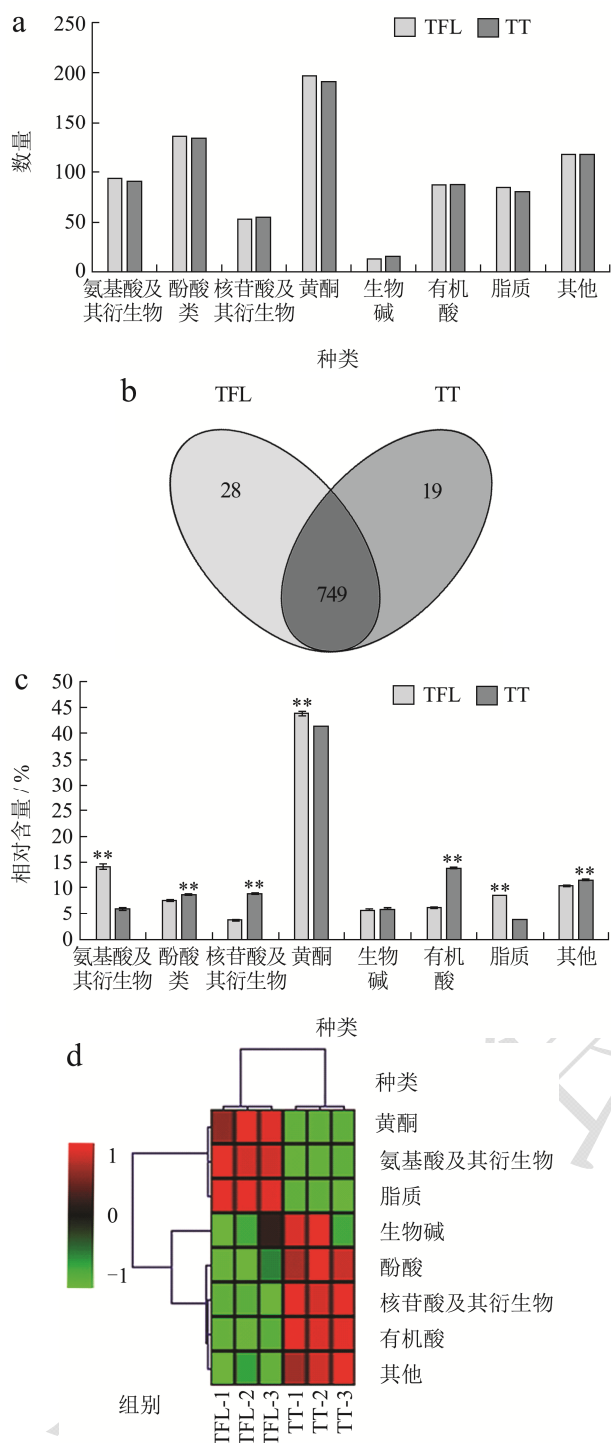


图2 TFL和TT中化合物种类的数量(a), Venn图(b), 相对含量(c), 聚类热图(d)

Fig.2 Number (a), Venn diagram (b), relative content (c) and clustering heat diagram (d) of compound species in TFL and TT

注：“其他”包括糖及醇类、鞣质、维生素、木脂素、香豆素、萜类和其他类。同一类别化合物，**表示差异极显著 ($P \leq 0.01$)。

黄酮类化合物是红豆杉中的重要成分之一，具有抗癌抗肿瘤的作用^[25,26]，研究发现，TFL和TT中含有丰富的黄酮类物质。Sun等^[16]研究表明，儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素等化合物

是红豆杉茶叶中有效抗氧化成分，这些成分在试验中均被检测到。此外，金松双黄酮、芹素等成分也均被检测到，与之前的研究结果一致^[27]。紫杉醇被公认为世界上最有效的植物抗癌药^[28]，先前研究报道，紫杉醇主要从红豆杉植株的树皮中提取制备，其含量约为干重的0.005%~0.07%^[29]。已有研究表明，紫杉醇在曼地亚红豆杉的种子中的相对含量最高，其次为树皮、鲜叶、种皮^[30]。本试验发现，紫杉醇在曼地亚红豆杉鲜叶中的相对含量为0.28%，加工成茶后其含量上升为0.56%，表明加工过程能够促进紫杉醇的形成。因此，通过将红豆杉鲜叶加工成茶的方式提取紫杉醇，避免了剥取树皮造成的植株死亡，以更好的保护红豆杉资源。

2.2 PCA分析

主成分分析为无监督模识别的分析方法，通过对数据“简化和降维”对代谢谱进行处理归纳，显示样本组之间是否存在差异。通过PCA分析，可以直观的从总体反映出TFL和TT中样本组之间的差异度大小。由图3a可知，第1主成分(PC1)和第2主成分(PC2)的贡献率分别为77.85%和6.93%，总贡献率为84.78%，说明TFL和TT二者之间整体区分度较好。

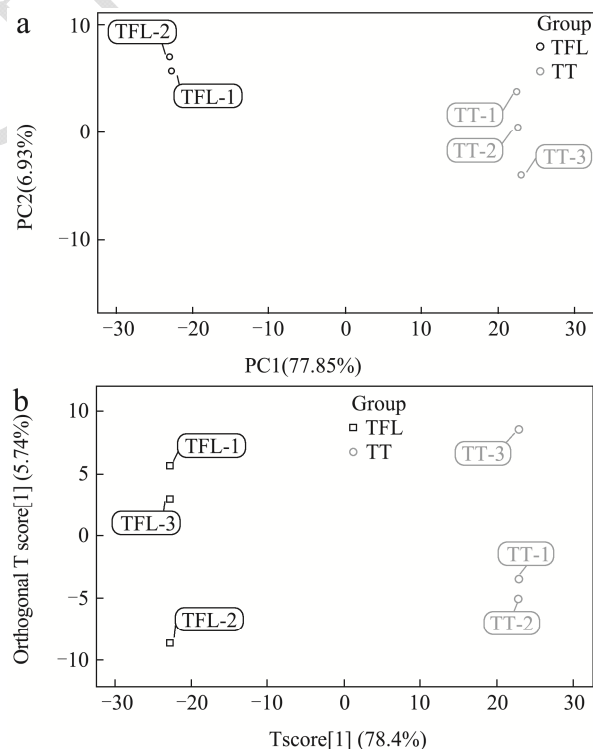


图3 TFL和TT化合物的PCA图(a)和OPLS-DA图(b)

Fig.3 The PCA diagram (a) and the OPLS-DA diagram (b) of compounds in TFL and TT

注：百分比表示该成分对数据集的贡献率； R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 是数据模型质量参数。

2.3 OPLS-DA 分析

进一步采用有监督的 OPLS-DA 模型分析 796 种化合物(图 3b)。在 OPLS-DA 中,主要通过参数指标对模型质量进行评估, R^2X 越接近 1,模型越稳定可靠; R^2Y 越大,模型的解释能力越强; Q^2 大于 0.9,模型为出色的模型。由图 3b 可以看出,各样本在区间和组间区分效果较好,差异明显。 $R^2X=0.841$, $R^2Y=1$, $Q^2=0.995$,说明本研究建立的 OPLS-DA 模型具有良好的拟合参数,该模型对 TFL 和 TT 具有良好的稳定性和较好的预测能力,可以利用 VIP 值筛选差异成分。

2.4 差异化合物分析

基于 OPLS-DA 结果获得的 VIP 值筛选差异化合物,通常认为 $VIP \geq 1.0$ 为差异显著, VIP 值越大,差异越显著。进一步结合 FC 值判断变化趋势。根据 $VIP > 1$, $\text{fold change} \geq 2$ 和 $\text{fold change} \leq 0.5$ 相结合的方法筛选得到差异化合物 330 种,氨基酸类 63 种,黄酮 60 种,脂类 59 种,酚酸 51 种,有机酸 30 种,核苷酸类 22 种,生物碱 8 种和其他化合物 37 种。

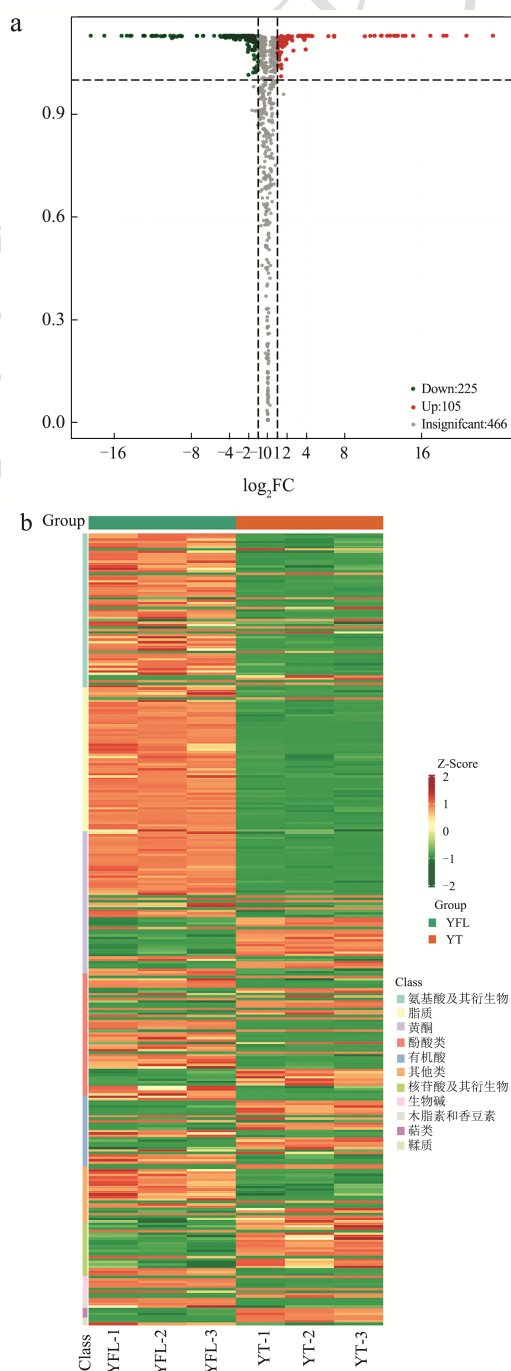
为了更直观的观察变化规律,对鉴定出的 330 种差异化合物进行可视化处理,如图 4a 和 4b 所示。有 225 种差异化合物显著下降,这些物质以氨基酸、脂质、黄酮、酚酸等化合物为主,主要包括 L-甘氨酸、L-异亮氨酸、 γ -亚油酸、根皮素、松柏醇等,占有化合物的 28.26%,其中苯甲醛是下调最大的差异化合物。有 105 种差异化合物显著增加,这些物质以有机酸类为主,主要包括柠檬酸、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、L-谷氨酸-O-葡萄糖苷等,占有化合物的 13.19%,其中柠檬酸是上调最大的差异化合物。无差异显著的化合物有 446 种,占 56.03%。

黄酮作为茶汤苦涩味的主要贡献物,与茶汤口的感紧密相关,也是茶汤中重要的着色物质^[31]。在 60 种黄酮差异化合物中,39 种化合物下调,21 种化合物上调。槲皮素、柚皮素等大部分化合物的含量在加工后显著下降,可能是在加工过程中发生了水解、酶促和氧化反应,导致加工过程中产生苷元和糖体^[32,33]。

氨基酸不仅是茶汤鲜爽的主要基础物质,还会影响茶的香气和品质^[34]。在本研究中鉴定出 63 种氨基酸差异化合物,52 种化合物下调,11 种化合物上调,L-瓜氨酸则是 TFL 和 TT 中差异最大的氨基酸类化合物。在加工后,L-丝氨酸、L-赖氨酸等的含量显著降低。N-乙酰-L-亮氨酸、L-谷氨酸-O-葡萄糖苷等的含量显著增加,这些变化对茶汤的滋味有一定的影响。这可能是由于高温和干燥的作用促进了氨基酸的氧化

和糖基化反应,导致氨基酸发生脱羧或脱氨^[35]。在揉捻过程中细胞破碎率增加,也使得氨基酸的浸出加快^[36]。因此,在加工过程中可以合理的减轻揉捻,降低杀青温度,增加氨基酸物质的积累。

本文检测的各种脂类差异化合物,主要包括游离脂肪酸、甘油酯、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺,加工后除了 1 种游离脂肪酸(十五烷酸)有所上调,其余的化合物均呈下降趋势。研究表明,脂类在供氧充足的情况下会氧化分解生成烃、醇和酸等化合物^[37]。之前的研究表明,温度对植物脂类风味物质的形成具有显著性影响,在热力作用下可引起脂类降解^[38,39],从而表明脂类降解与加工温度有关。



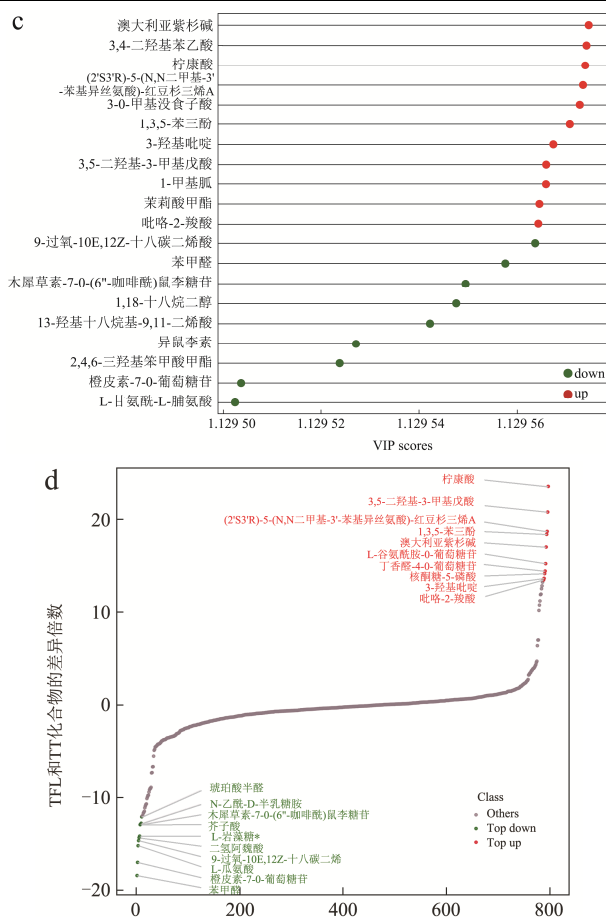


图 4 TFL 和 TT 的差异化合物热图 (a), 差异化合物火山图 (b), 投影重要性示意图 (c) 和基于 $\log_2FC$ 值对关键差异化合物筛选 (d)

Fig.4 The heat map of differential compounds (a), the volcano diagram of differential compounds (b), the schematic diagram of the importance of projection (c), and screening of key difference compounds based on $\log_2FC$ value (d) in TFL and TT

注: 红色代表上调差异表达化合物, 绿色代表下调差异表达化合物。

有机酸作为重要的呈味物质, 是碳水化合物分解的中间产物, 同时抑制苦味和涩味^[40]。在 30 种有机酸差异化合物中, 吡咯-2-羧酸、柠檬酸、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、茉莉酸甲酯是在加工后形成的独特化合物, 表明加工条件促进了这些化合物的形成。在加工过程中, 琥珀酸等常见有机酸的含量显著增加, 这些呈味物质的含量变化对调和茶汤滋味起到了重要作用。

加工后原儿茶醛、对羟基苯甲酸、阿魏酸等酚酸类化合物含量显著上调。相比之下, 龙胆酸、原儿茶酸、咖啡酸在加工后显著上调。此外, 苯甲醛具有特殊的杏仁和坚果香气^[41], 在加工后显著下降。1,3,5-

苯三酚在加工后显著上调。这些结果表明, 在加工过程中可能发生了强烈的氧化还原和水解反应, 以促进酚酸类物质的转化^[42]。

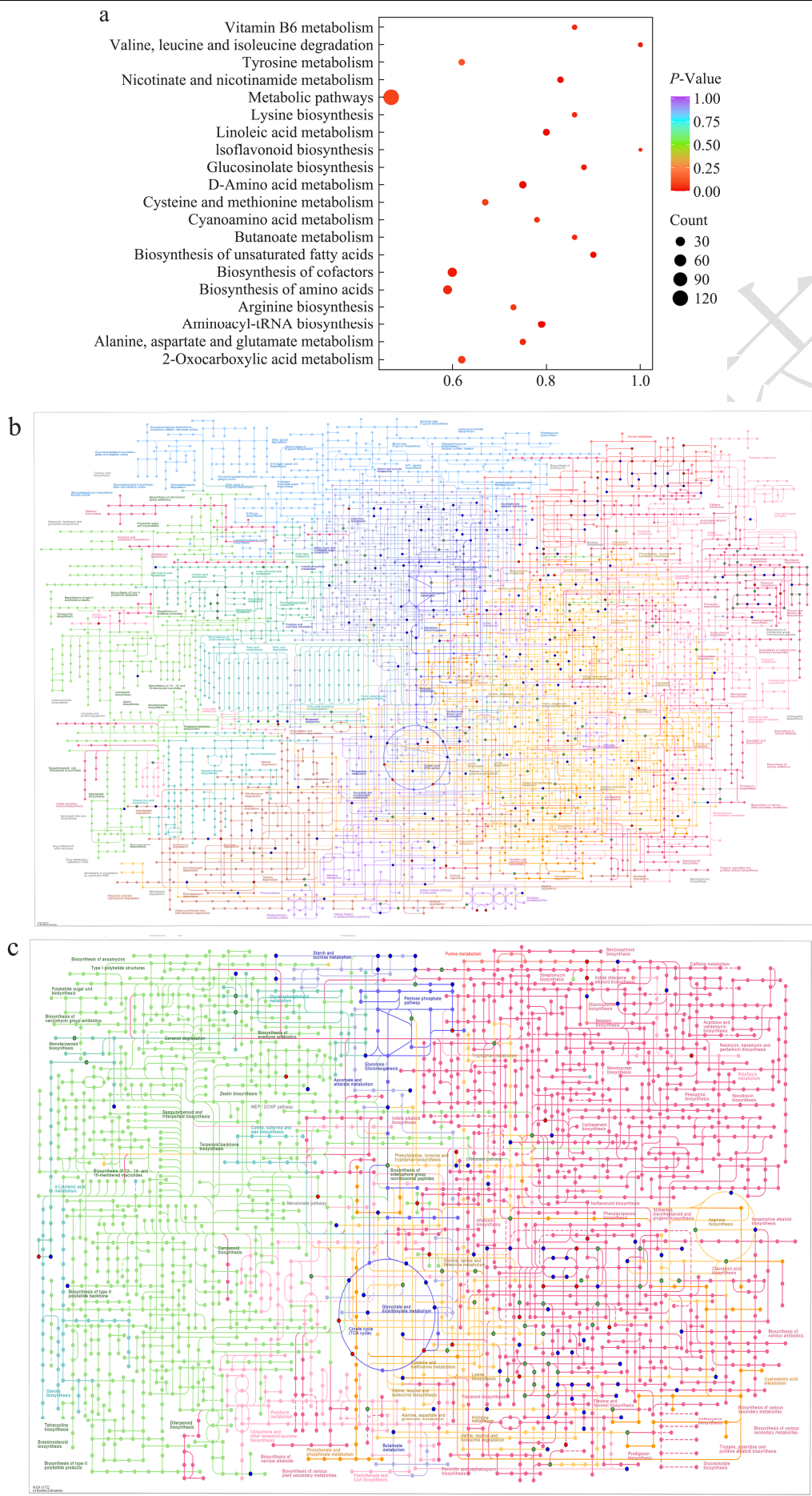
茶汤的风味与茶叶中滋味成分的含量及比例等都有密切关系。从结果可以看出加工工艺对于化合物的转化特别重要。因此, 可以通过调整加工过程中温度、时间和其他影响化合物转化的一些参数, 降低茶汤的苦涩味, 改善茶汤口感, 从而获得优良风味品质的成茶。

2.5 关键差异化合物分析

图 4c 为差异化合物 VIP 贡献值最大的前 20 种物质, 其中 11 种化合物为上调趋势, 包括澳大利亚紫杉碱、3,4-二羟基苯乙酸、柠檬酸、(2'S3'R)-5-(N,N-二甲基-3'-苯基异丝氨酸)-红豆杉三烯 A、3-O-甲基没食子酸、1,3,5-苯三酚、3-羟基吡啶、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、1-甲基胍、茉莉酸甲酯、吡咯-2-羧酸; 9 种化合物为下调趋势, 包括 9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸、苯甲醛、木犀草素-7-O-(6"-咖啡酰)鼠李糖苷、1,18-十八烷二醇、13-羟基十八烷基-9,11-二烯酸、异鼠李素、2,4,6-三羟基苯甲酸甲酯、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、L-甘氨酸-L-脯氨酸。

进一步进行 $\log_2$ 处理, 比较 TFL 和 TT 化合物的差异倍数, 前 20 种差异化合物如图 4d 所示。与 TFL 相比, 上调的前 10 种差异化合物包括柠檬酸 (23.50 倍)、3,5-二羟基-3-甲基戊酸 (20.73 倍)、(2'S3'R)-5-(N,N-二甲基-3'-苯基异丝氨酸)-红豆杉三烯 A (18.64 倍)、1,3,5-苯三酚 (18.33 倍)、澳大利亚紫杉碱 (16.96 倍)、L-谷氨酰胺-O-葡萄糖苷 (15.16 倍)、丁香醛-4-O-葡萄糖苷 (14.36 倍)、核酮糖-5-磷酸 (14.09 倍)、3-羟基吡啶 (13.58 倍)、吡咯-2-羧酸 (13.41 倍); 下调的前 10 种差异化合物包括苯甲醛 (-18.48 倍)、橙皮素-7-O-葡萄糖苷 (-17.06 倍)、L-瓜氨酸 (-15.27 倍)、9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸 (-14.71 倍)、二氢阿魏酸 (-14.39 倍)、L-岩藻糖 (-14.23 倍)、芥子酸 (-13.00 倍)、木犀草素-7-O-(6"-咖啡酰)鼠李糖苷 (-12.94 倍)、N-乙酰-D-半乳糖胺 (-12.84 倍)、琥珀酸半醛 (-12.15 倍)。

综上所述, 根据 VIP 值和 FC 值结合分析可知 TFL 和 TT 中 11 种关键差异代谢物为柠檬酸、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、(2'S3'R)-5-(N,N-二甲基-3'-苯基异丝氨酸)-红豆杉三烯 A、1,3,5-苯三酚、澳大利亚紫杉碱、3-羟基吡啶、吡咯-2-羧酸在 TT 中含量较高; 苯甲醛、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸、木犀草素-7-O-(6"-咖啡酰)鼠李糖苷在 TFL 中含量较高。



d

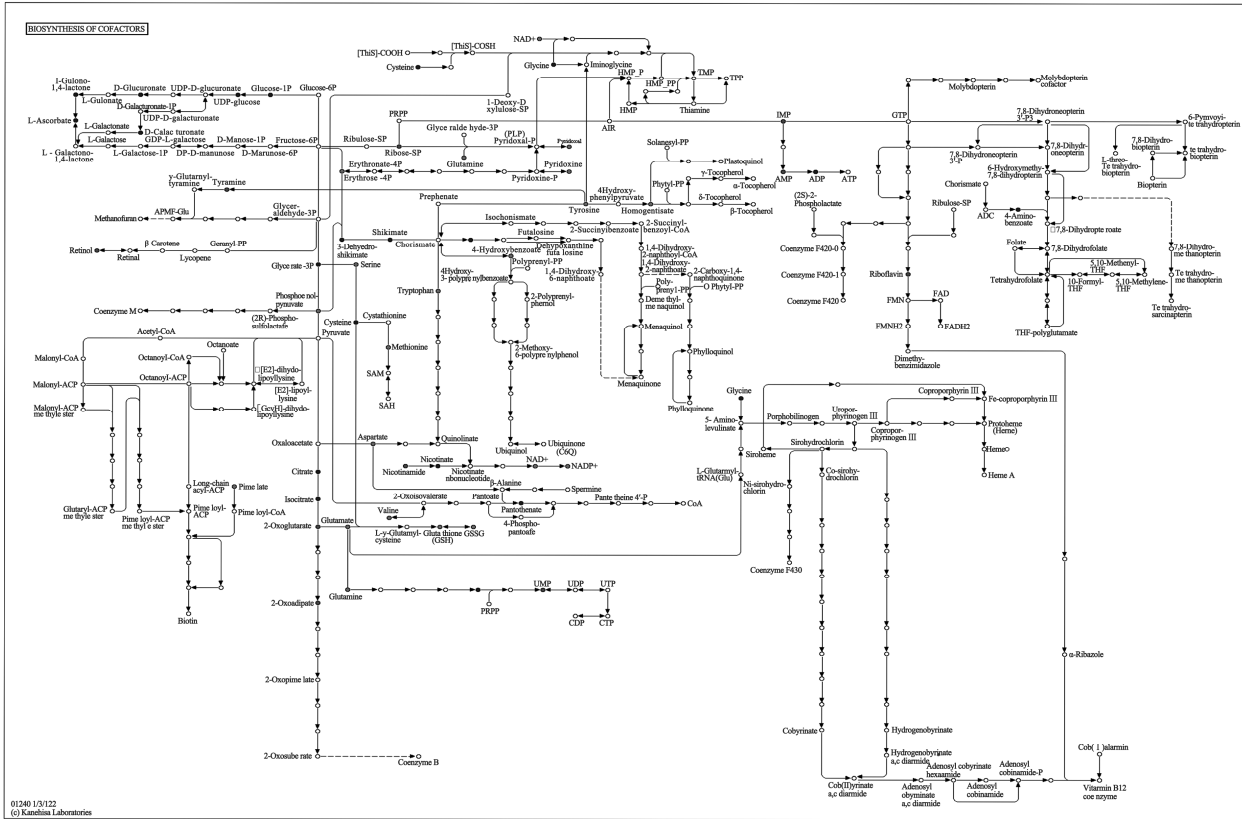


图5 TFL 和 TT 差异化合物 KEGG 富集图(a)和 KEGG 通路图(b~d)

Fig.5 The KEGG enrichment diagram (a) and KEGG pathway diagram (b~d) of differential compounds in TFL and TT

注：横坐标表示每种通路对应的 Rich factor，纵坐标为通路名称，点的颜色为 P-value，越红表示富集越显著。点的大小代表富集到的差异化合物的种数 (a)。红色表示代谢物含量在实验组中显著上调，蓝色代表该代谢物被检测到，但未发生显著变化，绿色表示代谢物含量在实验组中显著下调 (b~d)。

2.6 差异化合物通路分析

通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库对差异化合物进行通路富集分析，结果 (图 5a) 显示主要分布在 20 条代谢途径中，差异化合物数量富集最多的前 3 条通路分别是①代谢产物的生物合成通路 (Metabolic Pathways, 图 5b)，主要包括苯甲醛、L-岩藻糖、柚皮素、以及关键差异代谢物柠康酸等 123 种化合物，在此通路上有 39 种化合物上调，84 种化合物下调；②次生代谢物的生物合成通路 (Biosynthesis of Secondary Metabolites, 图 5c)，主要包括茉莉酸甲酯、根皮素、香橙素以及 3,5-二羟基-3-甲基戊酸等 86 种化合物，在此通路上有 23 种化合物上调，45 种化合物下调；③辅因子的生物合成通路 (Biosynthesis of Cofactors, 图 5d)，主要包括 L-酪胺、烟酰胺、视黄醇、L-酪氨酸等 29 种化合物，在此通路上有 10 种化合物上调，19 种化合物下调。

3 结论

本研究通过广泛靶向代谢组学探究了红豆杉鲜叶

加工成茶前后非挥发性化合物种类和含量的差异变化。在 TFL 和 TT 中共检测出 796 种化合物，两种样本在物质种类和数量上的组成基本一致。根据 PCA 结合 OPLS-DA 筛选出差异化合物 330 种，其中氨基酸、脂质、黄酮、酚酸等 255 种化合物显著降低，有机酸等 105 种化合物显著增加。TFL 和 TT 的关键差异化合物有 11 种，柠康酸、3,5-二羟基-3-甲基戊酸、(2'S3'R)-5-(N,N 二甲基-3'-苯基异丝氨酸)-红豆杉三烯 A、1,3,5-苯三酚、澳大利亚紫杉碱、3-羟基吡啶、吡咯-2-羧酸在 TT 中含量较高；苯甲醛、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、9-过氧-10E,12Z-十八碳二烯酸、木犀草素-7-O-(6"-咖啡酰)鼠李糖苷在 TFL 中含量较高。通过 KEGG 数据库对差异化合物进行通路富集分析，找到了差异化合物数量富集最多的前 3 条通路，分别是①代谢产物的生物合成通路；②次生代谢物的生物合成通路；③辅因子的生物合成通路。本项研究仅对红豆杉鲜叶加工成茶前后的非挥发性成分进行了初步比较，所检测到的物质可为红豆杉鲜叶的功能研究及开发利用提供一定的参考。未来，红豆杉叶茶的生物利用度和体内有益作用应受到更多关注。

参考文献

- [1] Shigemori H, Kobayashi J. Biological activity and chemistry of taxoids from the Japanese yew, *Taxus cuspidata* [J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 245-256.
- [2] 杨玉林,宋学东,董京祥,等.红豆杉属植物资源及其世界分布概况[J].森林工程,2009,25(3):5-10.
- [3] 乔亮杰,满瑞林,倪网东,等.曼地亚红豆杉枝条中紫杉醇的提取纯化研究[J].中国中药杂志,2009,34(8):973-976.
- [4] Zhang S, Lu X, Zheng T, et al. Investigation of bioactivities of *Taxus chinensis*, *Taxus cuspidata*, and *Taxus x media* by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Open Life Science, 2021, 16(1): 287-296.
- [5] 张静,廖海兵,金永春,等.UPLC 法同时测定曼地亚红豆杉中 3 个有效成分的含量[J].药物分析杂志,2011,31(11): 2073-2077.
- [6] Yu C, Zhan X, Zhang C, et al. Comparative metabolomic analyses revealed the differential accumulation of taxoids, flavonoids and hormones among six *Taxaceae* trees [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 285: 110196.
- [7] Yu C, Huang J, Wu Q, et al. Role of female-predominant MYB39-bHLH13 complex in sexually dimorphic accumulation of taxol in *Taxus media* [J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac062.
- [8] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [9] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol [J]. Nature, 1979, 277(5698): 665-667.
- [10] Gai Q Y, Jiao J, Wang X, et al. Simultaneous determination of taxoids and flavonoids in twigs and leaves of three *Taxus* species by UHPLC-MS/MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 189: 113456.
- [11] Tabaszewska M, Antoniewska A, Rutkowska J, et al. Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils [J]. Molecules, 2021, 26(15).
- [12] Sharifi-Rad J, Quispe C, Patra J K, et al. Paclitaxel: Application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 3687700.
- [13] Zhang S, Li L, Hu J, et al. Polysaccharide of *Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L.K.Fu attenuates neurotoxicity and cognitive dysfunction in mice with Alzheimer's disease [J]. Pharmaceutical Biology, 2020, 58(1): 959-968.
- [14] 朱婉萍,孔繁智,王红岗,等.复方红豆杉抗肿瘤作用的实验研究[J].浙江中医杂志,2007,42(3):173-174.
- [15] 李良松,冯仲科,刘德庆.红豆杉名实与功用通考[J].中国中药杂志,2011,36(12):1682-1685.
- [16] Sun M, Shen Z, Zhou Q, et al. Identification of the antiglycative components of Hong Dou Shan (*Taxus chinensis*) leaf tea [J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124942.
- [17] 武虹,王小雪,王朝旭.红豆杉茶水提取物调节人体血脂作用的研究[J].中国公共卫生管理,2002,18(3):242-244.
- [18] Sobolev A P, Di Lorenzo A, Circi S, et al. NMR, RP-HPLC-PDA-ESI-MSⁿ, and RP-HPLC-FD characterization of green and oolong teas (*Camellia sinensis* L.) [J]. Molecules, 2021, 26(17).
- [19] Doerfler H, Lyon D, Nägele T, et al. Granger causality in integrated GC-MS and LC-MS metabolomics data reveals the interface of primary and secondary metabolism [J]. Metabolomics, 2013, 9(3): 564-574.
- [20] Lee J E, Lee B J, Hwang J A, et al. Metabolic dependence of green tea on plucking positions revisited: A metabolomic study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19): 10579-10585.
- [21] 赵方舒,侯林,杨颖,等.异鼠李素抗肿瘤作用机制的研究进展[J].中国药房,2021,32(24):3054-3059.
- [22] 于茜,王巍嵩,朱赉赉.扁蓄苷对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡,周期及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J].中南药学, 2020,18(1):48-52.
- [23] Elansary H O, Szopa A, Kubica P, et al. Phenolic compounds of *Catalpa speciosa*, *Taxus cuspidate*, and *Magnolia acuminata* have antioxidant and anticancer activity [J]. Molecules, 2019, 24(3).
- [24] 刘茜,张业.南方红豆杉提取物的抗氧化、抗肿瘤活性研究[J].广西师范大学学报:自然科学版,2016,34(4):55-59.
- [25] 邸亮,许燕,殷光发,等.红豆杉属植物化学成分及其药理作用机制研究进展[J].山东化工,2021,50(16):101-103,119.
- [26] Qu C, Chen Z. Antitumor effect of water decoctions of *Taxus cuspidate* on pancreatic cancer [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014, 291675.
- [27] 徐蕊,吴泰宗,范杰平.曼地亚红豆杉枝叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J].南昌大学学报:工科版,2013,35(1):22-28.
- [28] 冯巧惠,李琼,贺延苓,等.紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌的抗癌功效及生物分子机制研究进展[J].药物生物技术, 2020,27(3):278-280.

- [29] 张凤梅.野生东北红豆杉不同部位和不同生长季节叶中紫杉醇含量测定[J].首都医药,2008,15(18):52-53.
- [30] Li M, Geng W, Wang Z, et al. Analysis of the utilization value of different tissues of *Taxus×Media* based on metabolomics and antioxidant activity [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 285.
- [31] Wang L F, Park S C, Chung J O, et al. The compounds contributing to the greenness of green tea [J]. Journal of Food Science, 2006, 69(8): S301-S305.
- [32] 易昶寺.不同干燥条件对茶叶化学成分及香气的影响[D].合肥:安徽农业大学,2014.
- [33] Buchner N, Krumbein A, Rohn S, et al. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(21): 3229-3235.
- [34] Chen S, Liu H, Zhao X, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture [J]. Food Research International, 2020, 128: 108778.
- [35] Wu L, Huang X, Liu S, et al. Understanding the formation mechanism of oolong tea characteristic non-volatile chemical constituents during manufacturing processes by using integrated widely-targeted metabolome and DIA proteome analysis [J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125941.
- [36] 朱小元,王玉洁,童城.加工工艺对石台富硒绿茶主要理化成分的影响[J].茶业通报,2019,41(4):173-176.
- [37] 肖新生,周旭,蒋黎艳.植物油加工工艺对风味物质影响的研究进展[J].中国油脂,2021,9:51-56.
- [38] Li C C, Hou L X. Review on volatile flavor components of roasted oilseeds and their products [J]. Grain & Oil Science & Technology, 2018, 1(4): 151-156.
- [39] Lin J, Blank I. Odorants generated by thermally induced degradation of phospholipids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(15): 4364-4369.
- [40] 何水平,郭春芳,孙云.茶叶有机酸的研究进展[J].亚热带农业研究, 2015,11(1):63-67
- [41] 包陈力根,关淳博,辛明航,等.HS-SPME-GC-MS 结合电子鼻分析烘烤对大球盖菇挥发性风味物质的影响[J].食品科学,2022,43(14):226-233.
- [42] Li J, Xiao Y, Zhou X, et al. Characterizing the cultivar-specific mechanisms underlying the accumulation of quality-related metabolites in specific Chinese tea (*Camellia sinensis*) germplasms to diversify tea products [J]. Food Research International, 2022, 161: 111824.