

# 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 的“散茶发花”茯茶加工前后的物质变化分析

黄浩<sup>1,2,3</sup>, 郑红发<sup>1</sup>, 赵熙<sup>1</sup>, 钟妮<sup>1</sup>, 黄建安<sup>2,3</sup>, 刘仲华<sup>2,3</sup>

(1. 湖南省农业科学院茶叶研究所, 湖南长沙 410125) (2. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南长沙 410128) (3. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128)

**摘要:**以大红袍、红茶与茯砖茶原料为供试原材料, 利用超高效液相色谱电喷雾四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-ESI-Q-TOF-MS)技术的代谢组学对不同茶叶原料茯茶的“发花”前后样品的整体成分组成差异进行了分析。结果表明, 不同原料“发花”前、后间差异成分数量均有不同, 各组差异代谢化合物个数分别为大红袍 49 个、红茶 40 个、茯砖茶原料 49 个; 综合 3 组茶叶的具体差异代谢化合物, 发现其从类别上表现出相似的变化规律, 即酯型儿茶素下降的极为显著, 而简单儿茶素除没食子儿茶素(GC)变化无明显差异外, 表儿茶素(EC)、儿茶素(DL-C)、表没食子儿茶素(EGC)的含量较原料都有所升高, 原花青素和咖啡碱、可可碱、茶碱、黄嘌呤与次黄嘌呤也有相同的变化; 黄酮类化合物槲皮素、山奈酚、牡荆素和芦丁的含量均有不同程度的升高; 而大黄素则是在各原料“发花”后均新增的蒽醌类化合物。

**关键词:** 散茶发花; 茯茶; “金花”菌; UPLC-ESI-Q-TOF-MS; 差异化合物

文章编号: 1673-9078(2018)02-252-264

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.039

## Analysis of Chemical Constituents Variation in Fu Tea before and after Processing by the Technology of ‘Fungal Fermentation with Loose Tea’ based on UPLC-ESI-Q-TOF-MS

HUANG Hao<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Hong-fa<sup>1</sup>, ZHAO Xi<sup>1</sup>, ZHONG Ni<sup>1</sup>, HUANG Jian-an<sup>2,3</sup>, LIU Zhong-hua<sup>2,3</sup>

(1. Tea Research Institute, Hunan Academy Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)(2. Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)(3. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Based on UPLC-ESI-Q-TOF-MS technology, the chemical constituents changes in Fu tea with different materials were analyzed during the process of ‘fungal fermentation’ of Fu tea produced using Dahongpao tea, blank tea and Fuzhuan brick as the raw materials. The results showed that the numbers of the overall biochemical components had significant difference in various raw materials of Fu tea before and after during the process of ‘fungal fermentation’. The number of metabolites in three kinds of Fu tea was 49 (Dahongpao tea), 40 (Black tea) and 49 (raw material of Fuzhuan brick tea), respectively. After comprehensively analyzing the specific variant compounds in three kinds of Fu tea, similar laws of changes in category were found. To be specific, ester catechins decreased significantly, while the content of simple catechins (i.e., EC, DL-C, and EG) were higher than that of raw materials while the content of GC remained constant. Besides, procyanidine and several important alkaloids in tea as caffeine, theobromine, theophylline, xanthine and hypoxanthine also changed in the same way. Several common kinds of flavonol compounds such as Quercetin, Kaempferol, Vitexin and Rutin raised in varying degrees, and the rheum emodin (an anthraquinone) was found after ‘fungal fermentation’ in three kinds of Fu tea.

**Key words:** fungal fermentation; Fu tea; ‘Golden flora’ fungi; UPLC-ESI-Q-TOF-MS; differential compounds

收稿日期: 2017-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471706); 湖南省自然科学基金(湖南省科学技术厅与湖南省农业科学院联合基金)资助项目(2016JJ6058); 国家现代农业(茶叶)产业技术体系建设专项(CARS-23); 湖南省茶叶研究所所长基金资助项目(2015SJ01)

作者简介: 黄浩(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事茶叶加工与功能成分化学研究

通讯作者: 郑红发(1975-), 男, 研究员, 学士, 主要从事茶叶加工与综合利用研究; 刘仲华(1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事茶叶功能成分利用研究

历年来,我国西北地区游牧民族日常生活以牛、羊肉及奶制品等高脂、高热量食物为主。由于蔬菜的缺乏,日常生活中,传统茯茶(茯砖茶)被人们作为膳食纤维添加而被广泛摄取,气候特点与饮食习惯造就了该茶在边疆地区的兴起,茯茶逐渐成为了人们日常生活的必需品,“宁可三日无粮,不可一日无茶”<sup>[1~3]</sup>的美誉在边疆地区的流传见证了茯茶在我国边疆地区的蓬勃发展;生活水平的提升与健康理念的加强,现代化茯茶加工工艺的发展及创新型茯茶产品的涌现推动了茯茶产业链的快速形成和高速发展,显著地提升了茯茶制品的流通量,如今,茯茶制品的销售地区也由过去的边疆地区逐渐向内陆地区甚至全世界迅速扩张。

茯茶特有的“发花”工艺造就了其独特的风味品质与保健功效<sup>[4,5]</sup>,现代科学研究证实了由“发花”工艺给茶叶品质成分与功能成分带来的巨大改变。然而,以往的研究多数是通过茯茶成品中单一成分或单一类别化合物的分离、提制及简单的常量成分的含量检测来推断茯茶品质与功能形成的机理<sup>[6]</sup>,缺乏对“发花”工艺带来的具体差异以及茯茶整体生化成分组成的变化规律研究。基于液相色谱-质谱联用技术(Liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)的代谢组学是目前植物、食品代谢组学研究中应用较广泛的方法<sup>[7~9]</sup>,其特点是可以高通量的实验数据与大规模计算,以系统生物学为基本出发点全面地研究生物机体代谢的变化规律,本研究利用不同茶类成分组成的差异及代谢组学的分析特点对不同原料加工而成的茯茶“发花”前后样品的整体生化成分组成的变化规律进行了研究,以期从茶样整体生化成分组成变化规律来考察与揭示“发花”的机理,为多样化茯茶制品的开发及茯茶产业进一步发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

“金花”菌-冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*),为本实验室自藏菌株<sup>[10,11]</sup>,分离自益阳茶厂股份有限公司产茯砖茶(800 g装,产于2007年)。

2013年产大红袍(乌龙茶,福建武夷山,A),2010年产红茶(红茶,常德石门,B),2008年金湘益茯砖茶原料(黑茶,湖南益阳,E)。按照“散茶发花”的技术要求采用以上三种不同茶类为原料进行“散茶发花”<sup>[12]</sup>处理(n=6),恒温恒湿培养箱中发花10 d即结束“发花”,“发花”茶样经70℃、4 h干燥即可,编号后置-20℃储存备用<sup>[13]</sup>。

乙腈(色谱纯,美国MERCK);甲醇(色谱纯,美国MERCK);甲酸(色谱纯,美国MERCK);超纯水(Millipore超纯水仪自制)。

### 1.2 仪器与设备

Delta 320 pH计(Mettler);Motic B1光学显微镜(Motic公司);万分之一电子天平(Mettler AE240),MIKRO-35高速冷冻离心机(德国产);苏净超净工作台(苏净集团安泰公司生产);振荡恒温培养箱(上海苏坤实业有限公司);恒温培养箱(江苏环保仪器厂);高温高压灭菌锅(上海医用核子仪器厂);恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备公司)等;冷冻干燥仪(广州倍立思有限公司),旋转蒸发仪(Switzerland, Buchi);液相-质谱联用分析系统(UPLC-MS/MS),包括Acquity UPLC™ system(Waters Corp., Milford, MA, USA),以及Waters公司G2-S质谱检测器,ESI离子源、飞行时间质量分析器(TOF);0.22 μm微滤过滤头(Millipore)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 三种茶类“散茶发花”茯茶制备与茶汤制备

按照“散茶发花”的技术要求将各茶类原料加水至相同最终含水量,接以相同剂量的冠突散囊菌,放置培养箱控温、湿度培养10 d,“发花”结束后放置70℃恒温干燥箱中4 h即可取出封存。

准确称取干燥茶样2.0 g至250 mL具塞三角瓶,加沸水100 mL置90℃水浴锅中浸提30 min,期间每10 min摇瓶一次,浸提结束后精细抽滤于100 mL容量瓶中冷却并定容,混匀备用<sup>[14,15]</sup>。分析检测样品需经孔径0.22 μm滤膜过滤。

#### 1.3.2 三种茶类“散茶发花”茯茶加工前后差异化合物分析

##### 1.3.2.1 三种茶类“散茶发花”茯茶发酵前后UPLC-ESI-Q-TOF-MS分析

色谱条件:液相-质谱联用分析系统(UPLC-MS/MS),包括Acquity UPLC™ system(Waters Corp., Milford, MA, USA),色谱柱:BEH C<sub>18</sub> column(i.d. 2.1 mm\*50 mm, particle size 1.7 μm, Waters Corp., Milford, MA, USA),流动相A为水相,5%乙腈(包含0.1%甲酸);流动相B为有机相,95%乙腈(包含0.1%甲酸),柱温45℃,流速为0.2 mL/min;梯度条件为:0~1 min, B: 10%;1~13 min, B: 10~100%;16~16.2 min, B: 10%;16.2~20 min, B: 10%<sup>[16]</sup>。

质谱条件:正、负离子模式以及Waters公司G2-S

质谱检测器(含 ESI 离子源、飞行时间质量分析器(TOF)),毛细管电压(capillary voltage)为 3 kV,采样锥电压(sample cone voltage)为 50 V;脱溶剂气流(desolvation gas flow)为 600 L/h,反吹气流量(cone gas flow)为 60 L/h,脱溶剂气温度(desolvation temperature)为 350 °C,源温度(source temperature)为 100 °C,质量扫描范围:50~1200  $m/z$ <sup>[17]</sup>。

### 1.3.2.2 数据分析

采用美国 Waters 公司的型号为 G2-S 的质谱仪,通过正、负离子模式进行检测,质量扫描范围为 50~1200  $m/z$ ,采集数据得到原始数据。通过 Masslynx 软件对原始数据进行提取,将质谱检测到的所有发酵物的峰进行峰对齐,归一化分析,自动谱峰判别处理,再应用多维统计方法分析所得数据<sup>[18]</sup>。运用主成分分析将质谱分析所得的多维数据降低到二维空间,最终以图形的形式展示数据分析的结果,分别对乌龙茶(大红袍)、红茶、黑茶(金湘益)三种茶叶发酵前与发酵 10 d 后样品运用偏最小二乘法-判别分析,建立 PLS-DA 的模型,从得分图中可以直观的观察到的供试茶样之间的分离情况,同时从载荷图中找到得分图中相对应的数轴,以不同数轴中离散的点来表示实验组对模型分离起贡献作用的发酵产物,图中向上的峰和向下的峰也可以表示这些发酵产物,从而找出差异发酵产物。通过变量重要性分析设定 VIP 值,将 VIP 值大于 2 的差异发酵物找出,再通过 T 检验得到相应的 P 值,观察 P 值来决定变量是否具有差异, $p < 0.05$  视为有显著差异, $p < 0.01$  视为有极显著差异。最后,通过质荷比匹配到相应的分子式,通过数据库<sup>[19]</sup>(www.hmdb.ca, Chemspider 等)搜索得到一些相匹配的物质,并对这些物质的分子分别打碎一一进行碎片离子扫描得到碎片离子谱图,通过结构分析进一步确定其归属,同时结合相关领域的文献报道,找出具体差异化学成分。

## 2 结果与讨论

### 2.1 茯茶制备

按照“散茶发花”的技术要求将各茶叶原料加水至相同终含水量,接以相同剂量的冠突散囊菌,放置培养箱控温湿度培养 10 d,“发花”结束后放置 70 °C 恒温干燥箱中 4 h 即可取出封存。经各茶样“发花”茯茶实物图比对发现,相同剂量和相同时间“发花”处理的“发花”茶样均表现出“金花”满批,除外观形态有细微差别外,其他并无表现出明显差异性。图 1 为三种茶类原料的茯茶“发花”实照图。

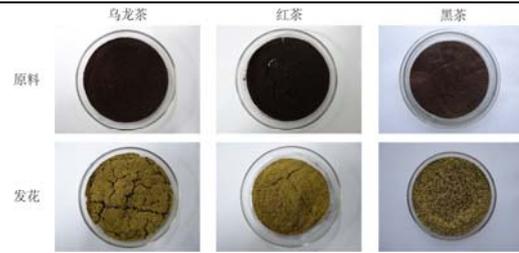


图 1 三种茶类“散茶发花”茯茶实照图

Fig.1 The photographs of Fu tea processed by “Fungal fermentation” with three tea materials

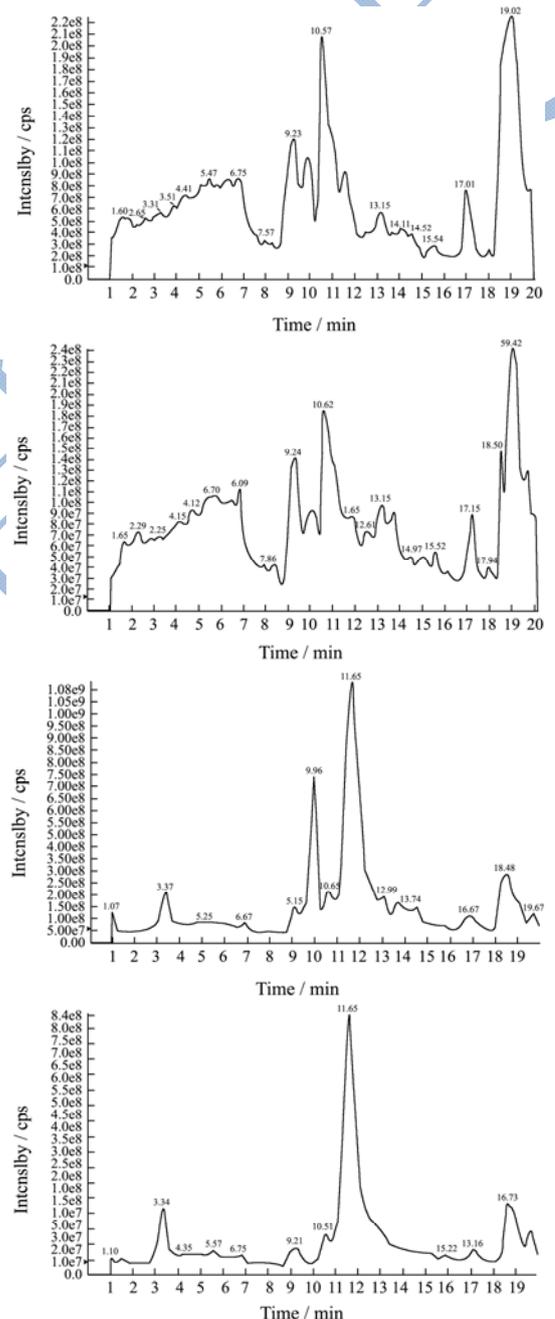


图 2 大红袍茯茶“发花”前后正、负离子 TIC 图比较

Fig.2 Comparison of positive and negative total ion chromatograms (TIC) of Fu tea processed by “Fungal fermentation” with Dahongpao tea

2.2 三种茶样原料加工的茯茶 LC-MS 色谱图

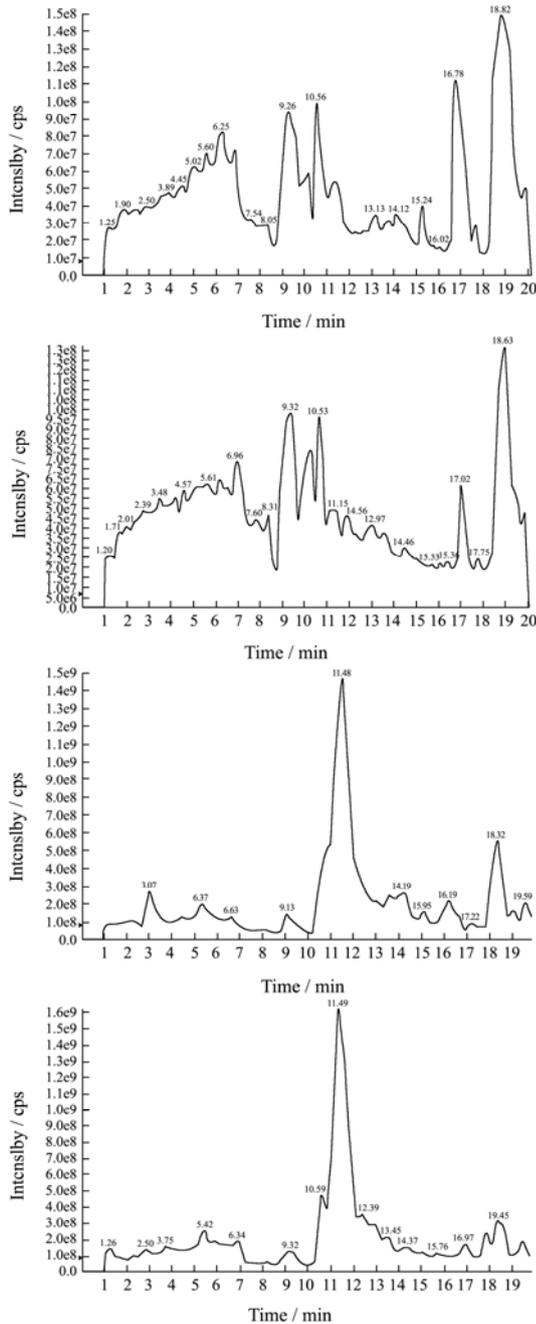


图3 红茶制茯茶“发花”前后正、负离子 TIC 图比较

Fig.3 Comparison of positive and negative total ion chromatograms (TIC) of Fu tea processed by “Fungal fermentation” with Black tea

将各茶样供试茶汤经 0.22 μm 微滤膜过滤后进样 LC-MS, 得到各茶样发酵前后的正、负离子模式的 LC 图谱 2、3 和 4, 由图可知, 在正、负离子模式下, 这 3 组茶样发酵前后的峰与保留时间是比较相似的, 各茶样经“发花”处理后, 生化成分发生了一定程度的变化, 这在图谱上的保留时间及峰高、低能直观观察到, 但当样本间存在较小的差异时在分析过程中必须对所

得峰进行数据匹配, 形成数据矩阵, 进而作下一步分析。

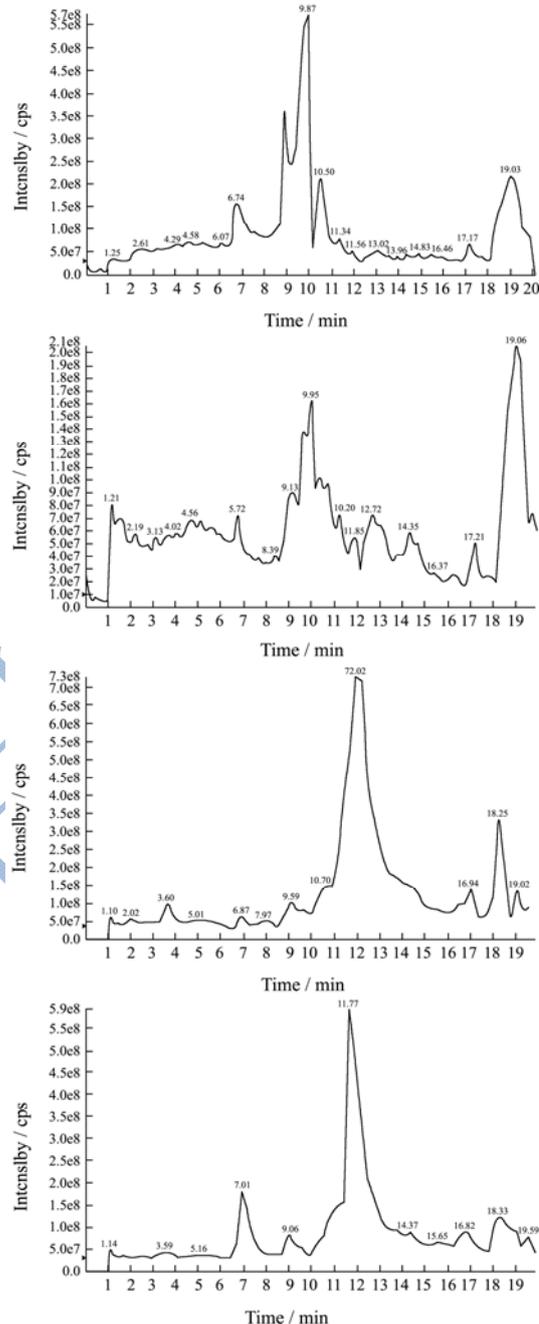


图4 金湘益砖茶原料制茯茶“发花”前后正、负离子 TIC 图比较

Fig.4 Comparison of positive and negative total ion chromatograms (TIC) of Fu tea processed by “Fungal fermentation” with the raw material of Jinxiangyi brick tea

2.3 PCA 与 PLS-DA 对三组茶样原料“散茶发花”前后差异代谢物分析

在大红袍制茯茶 PCA 得分图 5 中, 每个点代表一个对应的样本, 从图中看出“发花”前和“发花”后样本

在 PC1 和 PC2 两种主成分中呈现出分离状态,说明两组样本是有差异的,而图 5 载荷图上的离散点则代表得分图分离的变量,离散度越高,对得分图贡献越大;建立 PLS-DA 模型以论证每组茶样的 PCA 与 PCA-DA 的分析结果(图 6),从而研究各组茶样在“发花”处理后的物质变化规律,为每组茶样鉴定出具体差异发酵物。

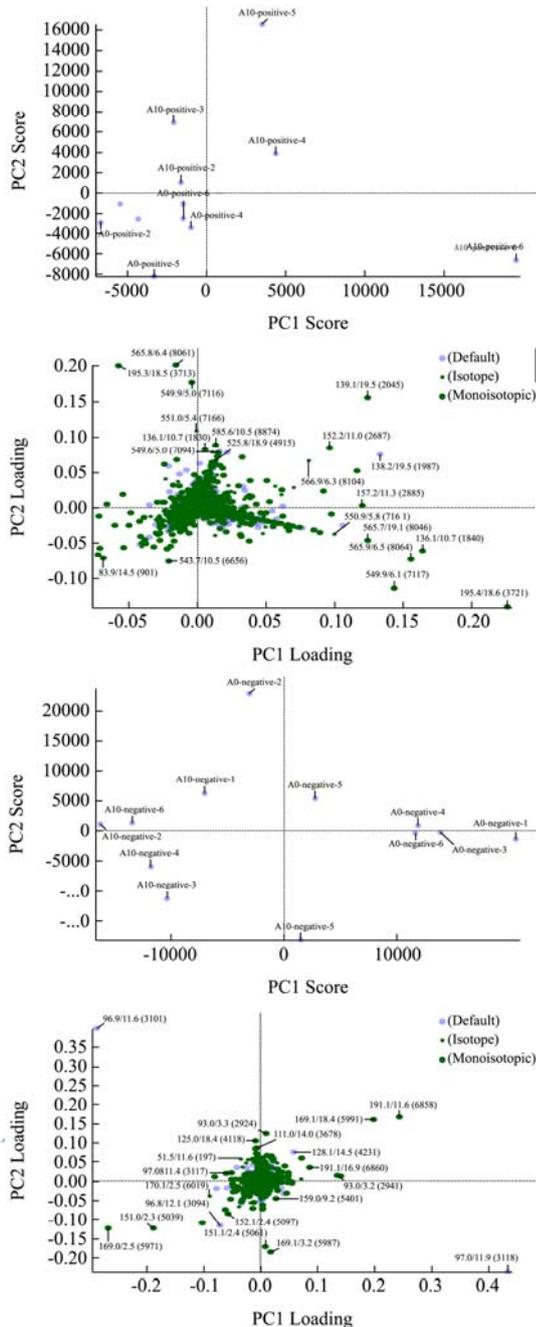


图 5 大红袍制茯茶正、负离子模式 PCA 得分图与载荷图

Fig.5 Score plot and load diagram of positive and negative PCA of the Fu tea processed by Dahongpao

通过 T 检验对“发花”前与“发花”后的每个发酵物进行计算求出 p 值, p<0.05 则认为有显著差异, p<0.01 则认为有极显著差异。由此得到具有差异性的发酵物

的质荷比,并将这些有差异的发酵物分子进行碎片离子扫描,根据质荷比及其碎片信息搜索数据库,确认其结构。

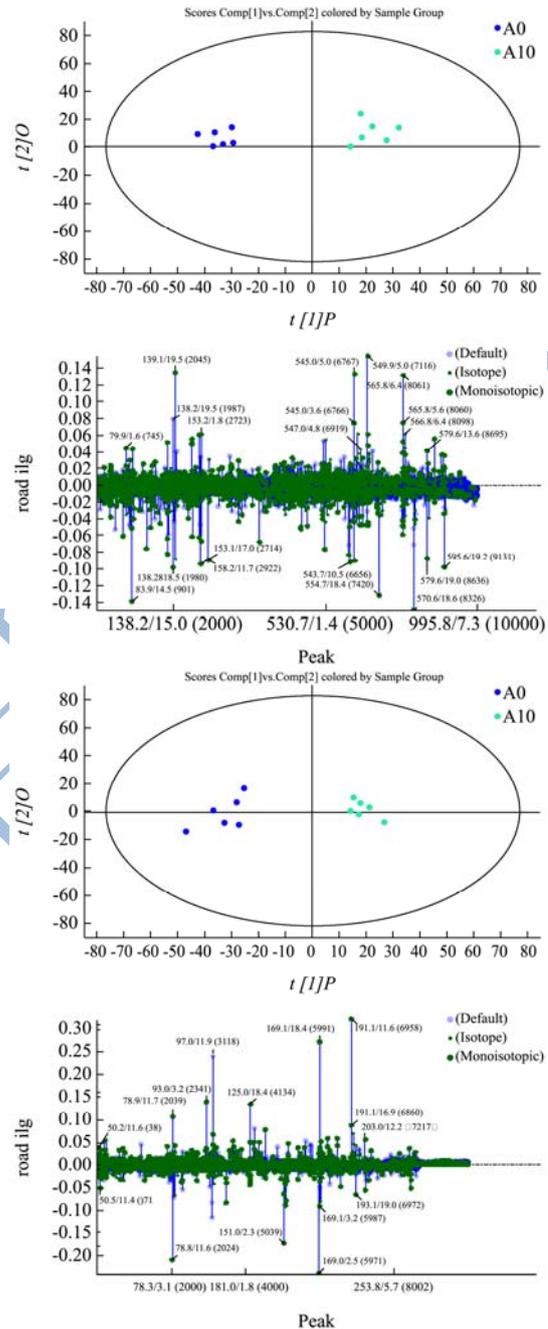


图 6 大红袍制茯茶正、负离子模式 PLS-DA 得分图与载荷图

Fig.6 Score plot and load diagram of positive and negative PLS-DA of the Fu tea processed by Dahongpao

根据以上分析流程,分析到大红袍制茯茶“发花”前后的差异变量共有 49 个,为分析差异物的显著性本研究采用 SPSS 软件对其进行分析统计,如表 1 所示,大红袍“发花”前后差异代谢物中 EGCG、GCG、ECG、CG 等酯型儿茶素均表现出极显著下降,且下降幅度均超 90%。除儿茶素类外,没食子酸、氨基酸类以及少量的酯类等 19 个化合物均呈不同程度的下降,而简

单儿茶素除 GC 无明显差异外, EC、DL-C、EGC 的含量较原料有 25%~40% 的幅度升高, 原花青素与茶叶中几种重要的生物碱也表现出相同变化, 其中除可可碱与茶碱外, 咖啡碱、黄嘌呤与次黄嘌呤含量均表现出极显著升高; 值得注意的是, 几种常见的茶叶中主要的黄酮化合物, 槲皮素、山奈酚、牡荆素和芦丁的含量均有增加, 升高的幅度依次为 78%、63%、75% 和 65%; 而大黄素则是在大红袍“发花”结束后新增的一种蒽醌类化合物。

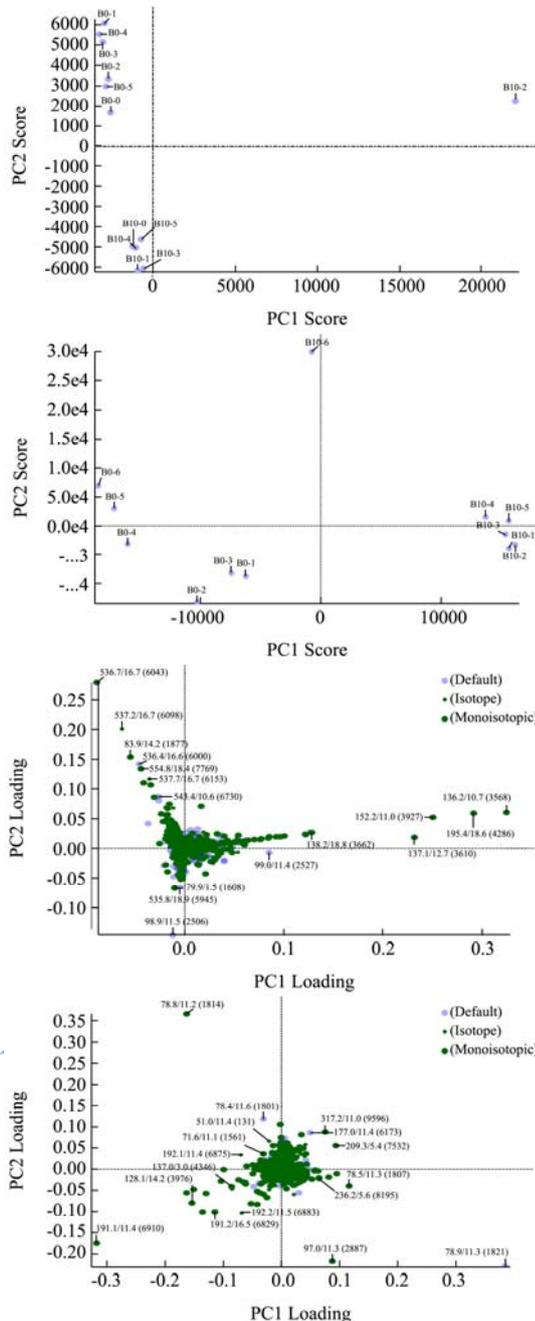


图 7 红茶制茯茶正、负离子模式 PCA 得分图与载荷图

Fig.7 Score plot and load diagram of positive and negative PCA of the Fu tea processed by Black tea

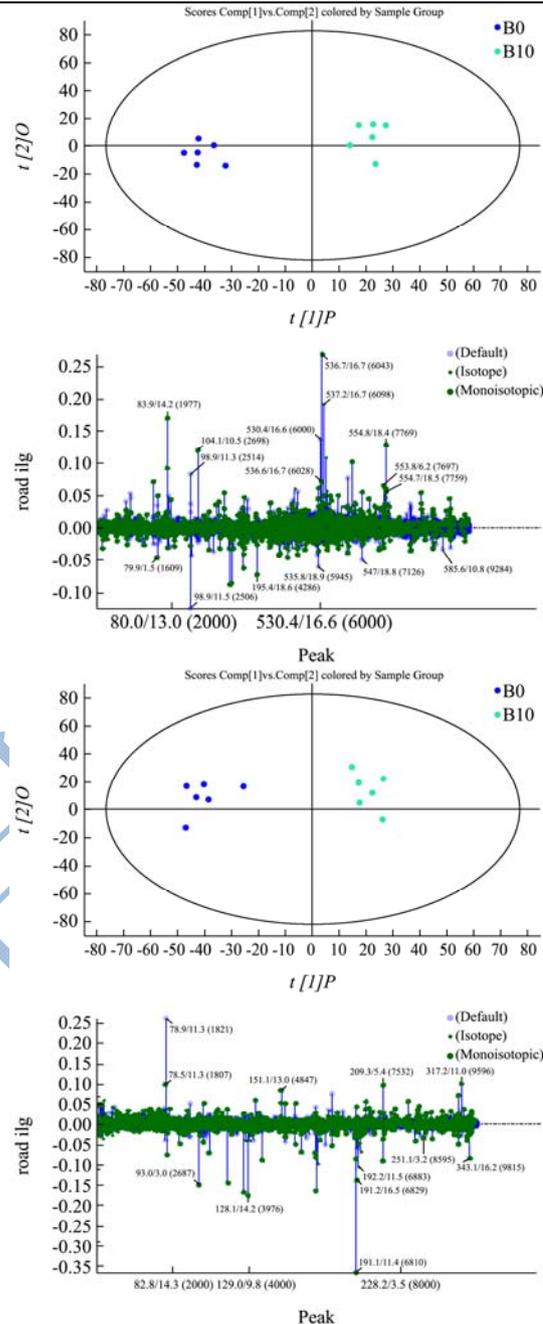


图 8 红茶制茯茶正、负离子模式 PLS-DA 得分图与载荷图

Fig.8 Score plot and load diagram of positive and negative PLS-DA of the Fu tea processed by Black tea

红茶制茯茶 PCA 得分图 7 中, 每个点代表一个对应的样本, 从图中可以看出发酵前和发酵后样本在 PC1 和 PC2 两种主成分中呈现出分离状态, 说明两组样本是有差异的, 而图 7 载荷图上的离散点则代表得分图分离的变量, 离散度越高, 对得分图贡献越大; 建立 PLS-DA 模型以论证每组茶样的 PCA 与 PCA-DA 的分析结果, 从而研究各组茶样在“发花”处理后的物质变化规律, 为每组茶样鉴定出具体差异发酵物。通过 T 检验对发酵前与发酵后的每个发酵物进行计算求

出 P 值,  $p < 0.05$  则认为有显著差异,  $p < 0.01$  则认为有极显著差异。

由此得到具有差异性的发酵物的质荷比, 并将这些有差异的发酵物分子进行碎片离子扫描, 根据质荷比及其碎片信息搜索数据库, 确认其结构。

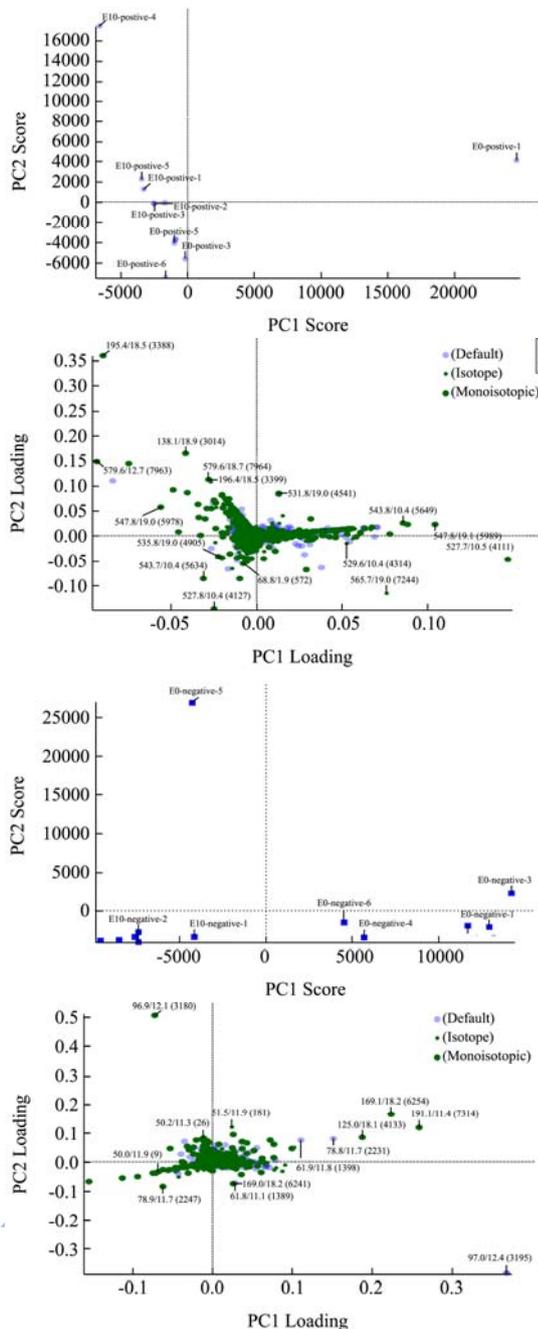


图9 金湘益茯砖茶原料制茯茶正、负离子模式 PCA 得分图与载荷图

Fig.9 Score plot and load diagram of positive and negative PCA of the Fu tea processed by the raw material of Jinxiangyi brick tea

根据以上分析流程, 分析到红茶制茯茶发酵前后的差异变量共有 40 个, 为分析差异物的显著性本研究采用 SPSS 软件对其进行分析统计。

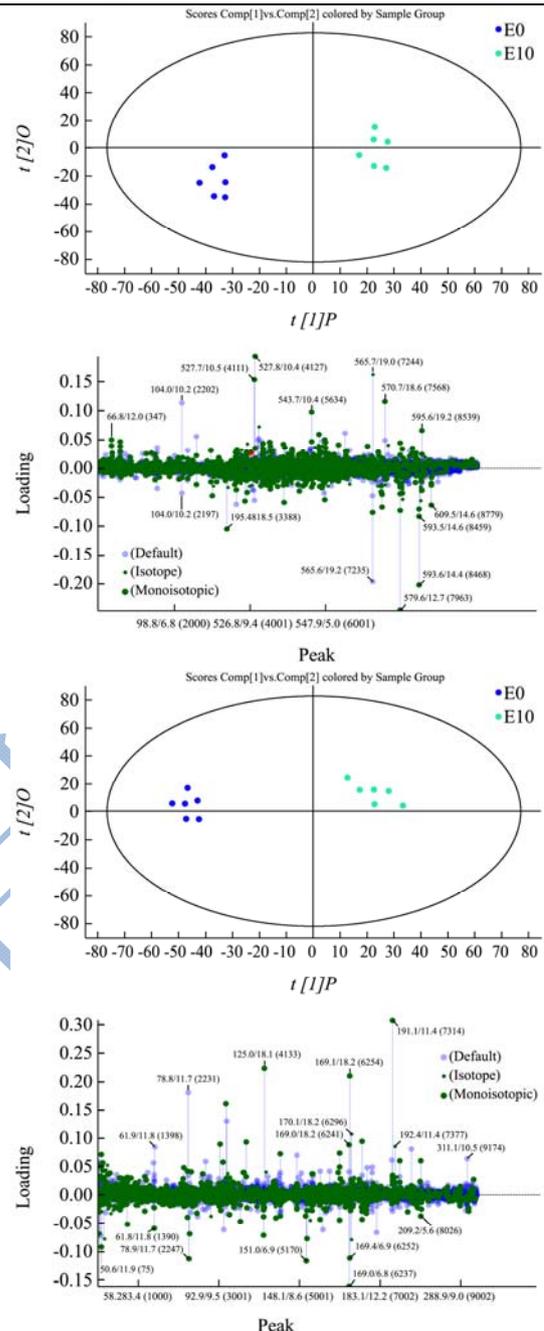


图 10 金湘益茯砖茶原料制茯茶正、负离子模式 PLS-DA 得分图与载荷图

Fig.10 Score plot and load diagram of positive and negative PLS-DA of the Fu tea processed by the material of Jinxiangyi brick tea

如表 2 所示, 红茶“发花”前后差异代谢物中 EGCG、GCG、ECG 和 CG 等酯型儿茶素均呈极显著下降, 下降幅度均超 90%。其中 EGCG 与 GCG 则没有在发花成品中监测到, 除儿茶素类外, 没食子酸、氨基酸类以及少量的酯类等 18 个化合物均呈不同程度的下降, 而简单儿茶素除 GC 无明显差异外, EC、DL-C、EGC 的含量较原料有 40%~55% 的幅度升高, 茶叶中几种重要的生物碱也相同的变化, 几种香气物

质如紫罗兰叶醛也有所增加在, 增加幅度达 50%, 值得注意的是, 4 种常见的黄酮化合物槲皮素、山奈酚、牡荆素和芦丁的含量均有不同程度升高, 升高的幅度依次为 56%、51%、75% 和 78%; 而大黄素则是在红茶“发花”结束后新增的一种蒽醌类化合物。

在金湘益砖茶原料茯茶 PCA 得分图 9 中, 每个点代表一个对应的样本, 从图中可以看出发酵前和发酵后样本在 PC1 和 PC2 两种主成分中呈现出分离状态, 说明两组样本是有差异的, 而图 9 载荷图上的离散点则代表得分图分离的变量, 离散度越高, 对得分图贡献越大; 建立 PLS-DA 模型以论证每组茶样的 PCA 与 PCA-DA 的分析结果 (图 10), 从而研究“发花”前后茶样在“发花”处理后的物质变化规律, 为每组茶样鉴定出具体差异发酵物。通过 T 检验对发酵前与发酵后的每个代谢物进行计算求出  $p$  值,  $p < 0.05$  则认为有显著差异,  $p < 0.01$  则认为有极显著差异。由此得到具有差异性的发酵物的质荷比, 并将这些有差异的发酵物分子进行碎片离子扫描, 根据质荷比及其碎片信息搜

索数据库, 确认其结构。

根据以上分析流程, 分析到金湘益砖茶原料茯茶发酵前后的差异变量共有 49 个, 为分析差异物的显著性本研究采用 SPSS 软件对其进行分析统计, 如表 3 所示, 金湘益砖茶原料“发花”前后差异代谢物中 EGCG、GCG、ECG、CG 等酯型儿茶素全部表现为极显著下降趋势, 下降均超 90%。

除儿茶素外, 没食子酸、氨基酸类以及少量酯类等 25 个化合物均有不同程度的下降; 而简单儿茶素除 GC 无明显差异外, EC、(±)-C、EGC 等较原料均有 30%~60% 的幅度升高; 原花青素与茶叶中几种重要的生物碱 Caffeine、Theobromine、Theophylline、黄嘌呤、次黄嘌呤和腺嘌呤表现出相同的变化; 值得注意的是, 几种常见黄酮化合物槲皮素、山奈酚、牡荆素、芦丁和香橙素的含量都有升高, 升高的幅度依次为 75%、20%、72% 和 71%; 常见香气物质 2,6 二甲基吡嗪的含量在“发花”结束后升高幅度达 66%, 大黄素则是在天尖茶原料“发花”结束后新增的一种蒽醌类化合物。

表 1 大红袍“散茶发花”茯茶加工前后差异代谢物

Table 1 Different metabolites before and after the processing of 'Fungal fermentation' of Fu tea processed by Dahongpao

| 编号 | 代谢物辨认                  | 原料(A <sub>0</sub> ) | 发花茯茶(A <sub>10</sub> ) |
|----|------------------------|---------------------|------------------------|
| 1  | Gallic acid/没食子酸       | 7915±870            | 1395±120**             |
| 2  | L-Theanine/茶氨酸         | 126±12              | 26±1**                 |
| 3  | Quercetin/槲皮素          | 65±1                | 303±90**               |
| 4  | Kaempferol/山奈酚         | 283±71              | 760±189**              |
| 5  | Myricetin/杨梅酮          | 113±30              | 29±1**                 |
| 6  | Vitexin/牡荆素            | 89±27               | 363±39**               |
| 7  | Rutin/芦丁               | 165±33              | 474±55**               |
| 8  | Chlorogenic acid/绿原酸   | 63±2                | 20±0**                 |
| 9  | Procyanidine/原花青素      | 1525±7              | 2550±226**             |
| 10 | CG/儿茶素没食子酸酯            | 6645±2114           | 375±91**               |
| 11 | GCG/没食子儿茶素没食子酸酯        | 18350±2464          | 1180±120**             |
| 12 | ECG/表儿茶素没食子酸酯          | 2810±396            | 210±18**               |
| 13 | EGCG/表没食子儿茶素没食子酸酯      | 85050±212           | 2075±955**             |
| 14 | EC/表儿茶素                | 1655±78             | 2745±261**             |
| 15 | (±)-C/儿茶素              | 3160±1018           | 5460±877**             |
| 16 | EGC/表没食子儿茶素            | 3745±268            | 4955±421**             |
| 17 | GC/没食子儿茶素              | 1775±115            | 1665±213               |
| 18 | Valine/缬氨酸             | 4.6±0.1             | 2.6±0.4**              |
| 19 | Asparaginic acid/天门冬氨酸 | 9.1±1.2             | 6.6±0.9*               |
| 20 | Alanine/丙氨酸            | 3.8±0.3             | 1.3±0.1**              |
| 21 | Serine/丝氨酸             | 4.5±0.6             | 1.4±0.2**              |
| 22 | Malic acid/苹果酸         | 20.9±1.8            | 6.3±0.7**              |
| 23 | Succinic acid/琥珀酸      | 7.0±1.2             | 3.9±0.8*               |

转下页

接上页

|    |  |           |             |
|----|--|-----------|-------------|
| 24 | Glyceric acid/甘油酸  | 8.3 ±0.9  | 3.8 ±0.6**  |
| 25 | Oxalate/草酸   | 12.3 ±1.1 | 6.7 ±0.5**  |
| 26 | Malonic acid/丙二酸   | 0.9 ±0.1  | 0.4 ±0.05** |
| 27 | Glycerol/甘油  | 0.4 ±0.03 | 0.2 ±0.03*  |
| 28 | Glycolic acid/羟基乙酸   | 1.5±0.2   | 0.6 ±0.1**  |
| 29 | Lysine/赖氨酸   | 3.4 ±0.7  | 1.5±0.2**   |
| 30 | Glycine/甘氨酸  | 2.9 ±0.6  | 1.2 ±0.1**  |
| 31 | Leucine/亮氨酸  | 3.3 ±0.3  | 1.8 ±0.2*   |
| 32 | 2,6-Dimethylpyrazine /2,6 二甲基吡嗪                                  | 16.2 ±1.2 | 7.9 ±0.8*   |
| 33 | Methyl pentanoate/戊酸甲酯   | 22.7 ±2.1 | 12.3 ±1.3*  |
| 34 | Methyl hexanoate/己酸甲酯  | 7.3 ±0.7  | 3.2 ±0.3**  |
| 35 | Theophylline/茶碱  | 44.9 ±8.2 | 57.6 ±4.3 * |
| 36 | Theobromine/可可碱  | 922 ±308  | 1105 ±120*  |
| 37 | Caffeine/咖啡碱   | 4885 ±883 | 6180 ±552** |
| 38 | Xanthine/黄嘌呤   | 0.9 ±0.1  | 1.7 ±0.2**  |
| 39 | Hypoxanthine/次黄嘌呤  | 6.4 ±1.1  | 12.7 ±1.4** |
| 40 | Aromadendrin/香橙素   | 8.3 ±1.2  | 18.2 ±1.4** |
| 41 | Glucosylisomaltol/异麦芽酚葡糖苷  | 7.4 ±1.6  | 14.9 ±1.9** |
| 42 | 3-Methylbutyl benzoate /3-甲基丁酯苯甲酸                                | 2.3 ±0.3  | 5.4 ±0.2**  |
| 43 | Mannitol/甘露醇   | 11.3 ±1.8 | 23.3 ±4.4** |
| 44 | Purine trione/尿酸   | 5.7 ±1.6  | 10.8 ±1.0** |
| 45 | 3,4',5-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavanone/3,4',5-三羟基-3',7 二甲氧基黄酮 | 5.9 ±1.1  | 9.1 ±1.3*   |
| 46 | 5-Ethyl-2-methylpyridine /5-甲基-2-乙基吡啶                            | 43.1 ±5.5 | 64.2 ±2.6*  |
| 47 | 2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol/2,6-二叔丁基-4-乙基苯酚                  | 7.4 ±1.6  | 13.0 ±2.7*  |
| 48 | Panaxacol/人参酮炔醇  | 4.3 ±0.8  | 7.3 ±1.3*   |
| 49 | Rheum emodin/大黄素   | 0         | 1.4 ±0.2**  |

表2 红茶“散茶发花”茯茶加工前后差异代谢物

Table 2 Different metabolites before and after the processing of “Fungal fermentation” of Fu tea processed by Black tea

| 编号 | 代谢物辨认                | 原料(B <sub>0</sub> ) | 发花茯茶(B <sub>10</sub> ) |
|----|----------------------|---------------------|------------------------|
| 1  | Gallic acid/没食子酸     | 7250 ±2361          | 1115 ±319**            |
| 2  | L-Theanine/茶氨酸       | 378 ±108            | 61 ±6**                |
| 3  | Kaempferol/山奈酚       | 1115 ±64            | 2295 ±290**            |
| 4  | Myricetin/杨梅酮        | 26 ±2               | 0                      |
| 5  | Quercetin/槲皮素        | 60 ±0.2             | 136 ±18**              |
| 6  | Vitexin/牡荆素          | 8 ±3                | 32 ±1**                |
| 7  | Rutin/芦丁             | 198 ±80             | 915 ±59**              |
| 8  | Chlorogenic acid/绿原酸 | 113 ± 12            | 23 ± 0**               |
| 9  | Procyandine/原花青素     | 388 ±166            | 643 ±24**              |
| 10 | CG/儿茶素没食子酸酯          | 5910 ±1453          | 213 ±16**              |
| 11 | GCG/没食子儿茶素没食子酸酯      | 1980 ±613           | 0                      |
| 12 | ECG/表儿茶素没食子酸酯        | 2390 ±14            | 42.4 ±19**             |
| 13 | EGCG/表没食子儿茶素没食子酸酯    | 9490 ± 608          | 0                      |
| 14 | GC/没食子儿茶素            | 1065 ±5             | 1060 ±2                |

转下页

| 接上页 |  |           |             |
|-----|--|-----------|-------------|
| 15  | EC/表儿茶素  | 418±200   | 701±17**    |
| 16  | (±)-C/儿茶素  | 627.5±100 | 1380±283**  |
| 17  | EGC/表没食子儿茶素  | 47 ±1     | 88±17**     |
| 18  | Asparaginic acid/天门冬氨酸   | 8.6 ±0.5  | 15.0 ±0.7*  |
| 19  | Serine/丝氨酸   | 14.7 ±4.2 | 7.6 ±1.0**  |
| 20  | Oxalate/草酸   | 16.1 ±1.1 | 5.4±0.6**   |
| 21  | Malonic acid/丙二酸   | 15.3 ±0.9 | 7.6 ±1.2*   |
| 22  | Lysine/赖氨酸   | 11.0 ±0.7 | 6.3 ±0.5*   |
| 23  | Leucine/亮氨酸  | 18.9 ±1.7 | 6.5 ±0.7**  |
| 24  | 2,6-Dimethylpyrazine/2,6 二甲基吡嗪                                   | 17.7 ±1.1 | 8.4 ±0.9**  |
| 25  | 2-methylpyrazine/2-甲基吡嗪  | 2.3 ±0.1  | 7.8 ±0.6**  |
| 26  | Methyl hexanoate/己酸甲酯  | 3.2 ±0.4  | 10.6 ±11**  |
| 27  | Methyl butyrate/丁酸甲酯   | 14.2 ±1.2 | 6.0 ±1.1**  |
| 28  | Theophylline/茶碱  | 56.6±9.7  | 118.5±0.7** |
| 29  | Theobromine/可可碱  | 1109±412  | 2530±42**   |
| 30  | Caffeine/咖啡碱   | 8400±976  | 10950±636** |
| 31  | Hypoxanthine/次黄嘌呤  | 2.7 ±0.2  | 5.6 ±1.0**  |
| 32  | Adenine/腺嘌呤  | 19.6 ±1.5 | 5.0 ±0.7**  |
| 33  | 3,4',5-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavanone/3,4',5-三羟基-3',7 二甲氧基黄酮 | 4.7 ±0.5  | 2.2 ±0.1**  |
| 34  | 5-Ethyl-2-methylpyridine/5-甲基-2 甲基吡啶                             | 9.0 ±0.8  | 4.0 ±1.0**  |
| 35  | 2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol/2,6-二叔丁基-4-乙基苯酚                  | 11.9 ±1.8 | 34.2 ±3.1** |
| 36  | 2-Acetyl-5-methylfuran/2-乙酰基甲基呋喃                                 | 13.3 ±1.1 | 7.6 ±0.9*   |
| 37  | Violet-leaf aldehyde/紫罗兰叶醛                                       | 10.2 ±1.1 | 21.3 ±1.5** |
| 38  | 3,5-Dimethyl-2-(1-propenyl)pyrazine/3,5-二甲基-2-(1-丙烯基)吡嗪          | 13.3 ±1.2 | 7.7 ±0.4*   |
| 39  | 2-Acetylpyrrole/乙基吡咯   | 12.6 ±0.7 | 5.9 ±0.8**  |
| 40  | Rheum emodin/大黄素   | 0         | 2.0±0.2**   |

表3 金湘益原料“散茶发花”茯茶加工前后差异代谢物

Table 3 Different metabolites before and after the processing of “Fungal fermentaiton” of Fu tea processed by the raw material of Jinxiangyi brick tea

| 编号 | 代谢物辨认                | 原料(E <sub>0</sub> ) | 发花茯茶(E <sub>10</sub> ) |
|----|----------------------|---------------------|------------------------|
| 1  | Gallic acid/没食子酸     | 4715±969            | 1034±66**              |
| 2  | L-Theanine/茶氨酸       | 66±16               | 17±1**                 |
| 3  | Quercetin/槲皮素        | 75 ±6               | 302 ±54**              |
| 4  | Kaempferol/山奈酚       | 209±25              | 262±46*                |
| 5  | Myricetin/杨梅酮        | 68 ±11              | 24 ±3**                |
| 6  | Vitexin/牡荆素          | 101± 39             | 358±28 **              |
| 7  | Rutin/芦丁             | 300 ±92             | 1020 ±99**             |
| 8  | Procyanidine/原花青素    | 970±240             | 2625±247**             |
| 9  | Chlorogenic acid/绿原酸 | 39 ±0               | 21 ±0**                |
| 10 | CG/儿茶素没食子酸酯          | 6590±1453           | 831±120**              |
| 11 | GCG/没食子儿茶素没食子酸酯      | 6535 ±1593          | 1057± 321**            |
| 12 | ECG/表儿茶素没食子酸酯        | 2430 ±184           | 296 ±50**              |
| 13 | EGCG/表没食子儿茶素没食子酸酯    | 24700 ±4808         | 1383± 590**            |

转下页

| 接上页 |  |           |             |
|-----|--|-----------|-------------|
| 14  | GC/没食子儿茶素  | 1115±5    | 1165±27     |
| 15  | EC/表儿茶素  | 987±274   | 2680±256**  |
| 16  | (±)-C/儿茶素  | 2810±495  | 4155±134**  |
| 17  | EGC/表没食子儿茶素  | 1430±192  | 3435±455**  |
| 18  | Asparaginic acid/天门冬氨酸   | 30.7±4.2  | 18.5±2.3**  |
| 19  | Alanine/丙氨酸  | 6.8±1.1   | 2.3±0.6**   |
| 20  | Serine/丝氨酸   | 7.3±0.3   | 5.2±0.7*    |
| 21  | Malic acid/苹果酸   | 16.9±2.1  | 7.8±1.1*    |
| 22  | Succinic acid/琥珀酸  | 10.5±1.7  | 5.3±0.8**   |
| 23  | Oxalate/草酸   | 17.3±1.5  | 8.9±1.3**   |
| 24  | Malonic acid/丙二酸   | 19.2±2.2  | 10.3±1.4*   |
| 25  | Glycerol/甘油  | 2.6±0.3   | 0.8±0.04**  |
| 26  | Glycolic acid/羟基乙酸   | 17.5±2.4  | 12.9±2.2*   |
| 27  | Glycine/甘氨酸  | 0.79±0.03 | 0.38±0.02** |
| 28  | Leucine/亮氨酸  | 19.7±1.8  | 9.9±0.7**   |
| 29  | 2,6-Dimethylpyrazine /2,6 二甲基吡嗪                                  | 5.2±0.6   | 11.8±2.1**  |
| 30  | Methyl pentanoate/戊酸甲酯   | 6.8±0.8   | 2.6±0.3**   |
| 31  | Methyl hexanoate/己酸甲酯  | 2.1±0.2   | 0.9±0.04**  |
| 32  | Theophylline/茶碱  | 168±37    | 213±4 **    |
| 33  | Theobromine/可可碱  | 702±162   | 876±6*      |
| 34  | Caffeine/咖啡碱   | 6560±481  | 7700±254*   |
| 35  | Xanthine/黄嘌呤   | 3.7±0.5   | 9.6±1.3**   |
| 36  | Hypoxanthine/次黄嘌呤  | 4.8±0.7   | 12.3±2.3**  |
| 37  | Aromadendrin/香橙素   | 29.8±3.4  | 42.3±9.8**  |
| 38  | Glucosylisomaltol/异麦芽酚葡萄糖苷                                       | 9.5±1.2   | 18.5±3.1**  |
| 39  | Mannitol/甘露醇   | 3.6±0.4   | 1.8±0.3**   |
| 40  | 3,4',5-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavanone/3,4',5-三羟基-3',7 二甲氧基黄酮 | 0.99±0.12 | 0.43±0.03** |
| 41  | 5-Ethyl-2-methylpyridine /5-甲基-2-乙基吡啶                            | 23.2±2.7  | 11.7±2.2**  |
| 42  | Panaxacol/人参酮炔醇  | 12.3±1.4  | 4.7±0.9**   |
| 43  | 2-Acetylpyrrole/2-乙酰吡咯   | 3.9±0.7   | 8.7±1.6**   |
| 44  | 2-methylpyrazine /2-甲基吡嗪   | 15.7±2.3  | 7.8±2.1*    |
| 45  | 2-Acetyl-5-methylfuran/2-乙酰基-5-甲基呋喃                              | 22.9±2.7  | 14.3±1.7*   |
| 46  | Adenine/腺嘌呤  | 16.3±4.2  | 8.2±2.1*    |
| 47  | 3,5-Dimethyl-2-(1-propenyl)pyrazine/3,5-二甲基-2-(1-丙烯基)吡嗪          | 9.7±0.8   | 4.8±0.5*    |
| 48  | Methyl butyrate/丁酸甲酯   | 0.5±0.03  | 0.23±0.01** |
| 49  | Rheum emodin/大黄素   | 0         | 2.2±0.1**   |

### 3 结论

3.1 本研究运用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术,对基于不同原料的茯茶“散茶发花”加工前后的茶叶样本进行了代谢物分析,结果显示,各茶样“发花”前后的化学成分发生了显著的变化,且分别从大红袍、红茶与金湘益砖茶原料制茯茶的“发花”前后找到了 49、40 和 49 种重要的且具有统计学意义的显著差异性代谢物,

研究中采用的三种茶类茯茶样本(乌龙茶、红茶与黑茶),跨茶类原料虽在茶叶品质与内生生化成分组成和含量上存在着一定差异,但经相同“发花”处理后,这种差异被不同程度的缩小,综合三种茶叶加工茯茶“发花”前后的差异代谢物结果,笔者发现不同茶样加工的茯茶可以从儿茶素类、氨基酸类、生物碱类及黄酮类总体类别上分析和讨论“发花”处理带来的物质变迁规律。

3.2 儿茶素是茶叶中具有较强抗氧化作用的重要活性成分,主要分为酯型儿茶素与简单儿茶素,各类茶叶中儿茶素含量各有不同,通常以绿茶中含量占优,本研究结果显示,各茶叶加工的茯茶“发花”前后差异显著代谢物中酯型儿茶素(EGCG/GCG/ECG/CG)均呈现出极显著下降趋势( $p < 0.01$ ) (表1、2和3),此类物质的变化主要与其自动氧化和酶促氧化相关,儿茶素类较不稳定,较为容易被水解酶水解形成简单儿茶素与没食子酸,这与各茶样制茯茶中部分简单儿茶素含量上升相符;同时微生物参与的发酵会在一定程度上产生有机酸从而使茶样处于酸性条件下,儿茶素类结构中的氢较为活泼容易发生聚合反应,进而形成黄烷醇类及原花青素类化合物,三种茶叶制茯茶“发花”样本中的原花青素含量较其对应原料均有不同程度的升高恰证实了这一点。

3.3 氨基酸类化合物是茶叶中一类重要的品质、功能化合物,其对增进茶汤鲜爽滋味具有积极作用,同时在黑茶加工中,氨基酸还是微生物能够直接利用的重要含氮化合物。其中茶氨酸是茶叶中一种重要的特异游离氨基酸,其通常占茶叶总氨基酸的50%以上<sup>[20]</sup>。研究证明在黑茶加工中其很容易被水解为谷氨酸与谷氨酰胺进而造成其含量显著降低,三种茶样加工茯茶中的茶氨酸与其他主要游离氨基酸均呈极显著下降,其中含量占优势的茶氨酸分别下降大红袍79%、红茶83%、金湘益原料74%,其原因可能是微生物分泌的胞外酶与微生物热将其水解后作为维持生长繁殖的碳源和氮源;同时,氨基酸类还能与多酚类、儿茶素类等氧化聚合形成色素或沉淀;此外,在黑茶加工的发酵过程中在高温、热的条件发生氧化与降解从而导致其含量下降显著。

3.4 生物碱是茶叶中又一重要且具有刺激大脑中枢神经作用的活性化合物,茶叶中的生物碱主要有咖啡碱,可可碱和茶碱。研究证明,黄嘌呤、次黄嘌呤、可可碱与茶碱均能作为合成咖啡碱的前提物质,因而可以推测这几种化合物在“发花”过程中应表现出类似的变化规律,三种茶样加工的茯茶中几种重要生物碱含量的升高证实了这一变化趋势,同时也间接说明此研究中所用的供试真菌“金花”菌具可能具有分泌咖啡碱合成酶的能力。

3.5 黄酮类化合物是茶叶中除儿茶素外又一重要的生物活性成分,茶叶中通常以黄酮苷形式存在<sup>[21]</sup>。本研究结果显示几种常见的黄酮化合物槲皮素、山奈酚、牡荆素、芦丁、杨梅酮、香橙素和柚皮素均被检测为显著差异代谢物,其中前四种在各茶样加工的茯茶中均有不同程度的上升,而含量占有的槲皮素与山奈酚

分别增加大红袍78%和63%、红茶56%和51%、金湘益原料75%和20%,这与之前的研究结果一致<sup>[22]</sup>,而后三种则是呈现相反的变化规律。这可能与其在茶叶中的含量及发花的周期相关,前四种为茶叶中黄酮苷化合物的主要糖基配体,在经“发花”处理后,黄酮苷化合物被水解为相应黄酮,但又因“发花”时间相对较短,因而其在成品中维持了一定的含量,反之则被氧化消耗而导致其含量进一步降低<sup>[22]</sup>。另外三种茶样制茯茶中又一差异代谢物3,4',5-三羟基-3',7'二甲氧基黄酮是Ali从植物(*Blumea balsamifera*)中首次分离到<sup>[23]</sup>,此研究结果显示三种茶叶制茯茶中该物质均有检测到且较其原料都有所降低。

3.6 此外,大黄素是在三种茶样制茯茶中新增的一种蒽醌类化合物,该物质在茯砖茶功能成分分离与“金花”菌的发酵产物分离纯化研究中均有报道<sup>[24]</sup>,因此笔者推测大黄素为“金花”菌的特异次级代谢产物。

## 参考文献

- [1] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等.高通量筛选研究茯砖茶降脂功效[J].茶叶科学,2006,26(3):209-214  
FU Dong-he, LIU Zhong-hua, HUANG Jian-an, et al. Research of FUZHUAN Tea's Therapy for Hyperlipidemia by High-Throughput Screening [J]. Journal of Tea Science, 2006, 26(3): 209-214
- [2] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等.黑茶微生物学研究进展[J].微生物学杂志,2006,26(1): 81-84  
YANG Fu-lin, DENG Fang-ming, ZHAO Ling-yan, et al. Development of black tea microbiology [J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(1): 81-84
- [3] 肖文军,任国谱,傅冬和,等.茯茶辅助调节血脂作用研究[J].茶叶科学,2007,27(3):211-214  
XIAO Wen-jun, REN Guo-pu, FU Dong-he, et al. Study on the regulation of blood lipid by Fuzhuan tea [J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(3): 211-214
- [4] Fu D, Ryan E P, Huang J, et al. Fermented *Camellia sinensis*, Fu Zhuan Tea, regulates hyperlipidemia and transcription factors involved in lipid catabolism [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2999-3005
- [5] Li Q, Liu Z, Huang J, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of Fuzhuan brick tea water extract in high-fat diet-induced obese rats [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(6): 1310-1316
- [6] 王增盛,施兆鹏,刘仲华,等.论茯砖茶品质风味形成机理[J].茶叶科学,1991,11:49-55  
WANG Zeng-sheng, SHI Zhao-peng, LIU Zhong-hua, et al.

- Discussion on the mechanism of quality and flavor formation of Fuzhuan brick tea [J]. Journal of Tea Science, 1991, 11(增刊): 49-55
- [7] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189
- [8] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(1-2): 155-171
- [9] Keller A C, Weir T L, Broeckling C D, et al. Antibacterial activity and phytochemical profile of fermented *Camellia sinensis*(fuzhuan tea) [J]. Food Research International, 2013, 53(2): 945-949
- [10] 黄浩,刘仲华,黄建安,等.“发花”散茶中“金花”菌的分离鉴定[J].茶叶科学,2010,5:350-354  
HUANG Hao, LIU Zhong-hua, HUANG Jian-an, et al. Isolation and identification of 'Jinhua' fungi from the Loose tea with 'Fungus Growing' [J]. Journal of Tea Science, 2010, 30(5): 350-354
- [11] 黄浩,郑红发,赵熙,等.不同茶类发花茯茶中“金花”菌的分离、鉴定及产黄曲霉毒素分析[J].食品科学,2017, 38(8):49-55  
HUANG Hao, ZHENG Hong-fa, ZHAO Xi, et al. Identification and aflatoxin production of 'golden flora' fungi isolated from fu tea produced from different kinds of tea [J]. Journal of Food Science, 2017, 38(8): 49-54
- [12] 黄浩.“散茶发花”的微生物与化学机制研究[D].长沙:湖南农业大学,2014  
HUANG Hao. Study the microorganisms and chemical mechanism in the processing of 'fungal fermentation with loose tea' [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014
- [13] Qin J-H, Li N, Tu P-F et al. Change in tea polyphenol and purine alkaloid composition during solid-state fungal fermentation of postfermented tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(5): 1213-1217
- [14] Yang X R, Ye C X, Xu J K et al. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia* var. *kucha* by HPLC [J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1132-1136
- [15] Zhang L, Li N, Ma Z-Z et al. Comparison of the chemical constituents of aged Pu-erh tea, ripened Pu-erh tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8754-8760
- [16] 陈红霞.普洱茶发酵过程的代谢组学研究[D].北京:北京化工大学,2013  
CHEN Hong-xia. A Metabonomic study during Pu-erh tea fermentation [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013
- [17] Xie Guoxiang, Wang Yungang. Characterization of pu-erh tea using chemical and metabolic profiling approaches [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(8): 3046-3054
- [18] Fan Twm, Lane An, Higashi Rm. The Handbook of Metabolomics [M]. Totowa: Humana Press, 2012
- [19] Rafael Llorach, Ignacio Garrido. Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skin polyphenols [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(11): 5859-5867
- [20] 肖会敏,何悦,黄敬群,等.HPLC法测定茶中茶氨酸、茶碱与咖啡因的含量[J].西北药学杂志,2012,27(3):200-202  
XIAO Hui-min, HE Yue, HUANG Jing-Qun, et al. Determination of theanine, theophylline and caffeine in tea by HPLC [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2012, 27(3): 200-202
- [21] 宛晓春.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,第三版,2003  
WAN Xiao-chun. Tea biochemistry [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, the third edition, 2003
- [22] 黄浩,赵熙,黄怀生,等.茯茶“散茶发花”加工前后差异化学成分分离与鉴定[J].茶叶科学,2016,36(1):27-37  
HUANG Hao, ZHAO Xi, HUANG Huai-sheng, et al. Isolation and identification of variant phytochemical in the processing of Fu Tea by fungal fermentation with loose tea [J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(1): 27-37
- [23] Ali D, Wong K, Lim P. Flavonoids from *Blumea balsamifera* [J]. Fitoterapia, 2005, 76(1): 128-130
- [24] 彭晓赞,梁法亮,李冬利,等.茯砖茶中冠突散囊菌的次级代谢产物及其生物活性研究[J].中草药,2013,44(14):5  
PENG Xiao-yun, LIANG Fa-liang, LI Dong-li, et al. Secondary metabolites of *Eurotium cristatum* from Fu Brick Tea and their biological activities [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(14): 5