

刘洪林, 曾艺涛, 童华荣, 等. 基于咖啡碱和氨基酸中碳氮稳定同位素比率的不同年份普洱生茶真实性认证 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 1-9. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040201

LIU Honglin, ZENG Yitao, TONG Huarong, et al. Authenticity Certification of Pu'er Raw Tea in Different Years Based on the Stable Isotope Ratios of Carbon and Nitrogen in Caffeine and Amino Acids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(5): 1-9. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040201

· 研究与探讨 ·

基于咖啡碱和氨基酸中碳氮稳定同位素比率的不同年份普洱生茶真实性认证

刘洪林^{1,*}, 曾艺涛², 童华荣³, 张 凯⁴, 李 照⁵, 杨天来³
(1.重庆第二师范学院旅游与服务管理学院, 重庆 400067;
2.重庆市辅仁中学校, 重庆 400067;
3.西南大学食品科学学院, 重庆 400715;
4.重庆市农业技术推广总站, 重庆 401121;
5.重庆市规划和自然资源调查监测院, 重庆 400014)

摘 要:采用咖啡碱和氨基酸中碳氮稳定同位素比率分析方法(气相色谱-燃烧-同位素比值质谱, GC-C-IRMS)开展不同年份普洱生茶真实性认证研究。化学计量学分析表明, 基于茶叶咖啡碱和氨基酸中碳氮稳定同位素比率结合化学计量学模型可以对不同年份普洱生茶进行有效区分, 预测和验证准确率均达到 80% 以上, 其中 BP-ANN 认证性能最优, 预测和验证准确率均达到 100%; 进一步筛选和鉴定, 得到不同年份普洱生茶的 3 种化学标记, 包括 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Thea}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{Glu}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ 。因此, 基于 GC-C-IRMS 分析的咖啡碱和氨基酸中碳氮稳定同位素比率分析方法可以用于不同年份普洱生茶真实性认证。本研究初步建立了普洱生茶产品认证的指标体系及技术体系, 也为其他食品的认证研究提供研究思路和方法参考。

关键词:普洱生茶, 生产年份, 咖啡碱, 氨基酸, 碳氮稳定性同位素比率

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)05-0001-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040201



本文网刊:

Authenticity Certification of Pu'er Raw Tea in Different Years Based on the Stable Isotope Ratios of Carbon and Nitrogen in Caffeine and Amino Acids

LIU Honglin^{1,*}, ZENG Yitao², TONG Huarong³, ZHANG Kai⁴, LI Zhao⁵, YANG Tianlai³

(1.College of Tourism and Service Management, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;

2.Chongqing Furen High School, Chongqing 400067, China;

3.School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

4.Chongqing Agricultural Technology Extension Station, Chongqing 401121, China;

5.Chongqing Planning and Natural Resources Survey and Monitoring Institute, Chongqing 400014, China)

Abstract: The method of carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis in caffeine and amino acids (gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, GC-C-IRMS) was used to carry out the authenticity certification of Pu'er raw tea in different years. Chemometrics analysis showed that the stable isotope ratios of carbon and nitrogen in caffeine and

收稿日期: 2022-04-19

基金项目: 2022 年重庆市教育委员会人文社会科学研究项目规划项目重点项目 (22SKGH450); 2022 年重庆市自然科学基金项目 (2022NSCQ-MSX5393); 2022 年重庆市教育委员会科学技术研究项目 (KJQN202201619); 重庆市人文社科重点研究基地“重庆市统筹城乡教师教育研究中心”专项 (JDKT202209); 重庆第二师范学院科研平台(区域旅游产业发展研究协同创新中心)项目 (2021XJPT07); 重庆第二师范学院第三批校级研究所(川渝地区乡村旅游产业发展研究所)项目; 重庆市教委科学技术研究计划项目 (KJQN201901603; KJQN202001603); 重庆市高等教育教学改革研究项目 (213374; 213367); 重庆市教育科学“十四五”规划重点课题项目 (2021-GX-146)。

作者简介/通信作者: 刘洪林 (1991-) (ORCID: 0000-0003-4744-4795), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 茶学, E-mail: 475844900@qq.com。

amino acids combined with chemometrics model could effectively distinguish Pu'er raw tea in different years. And the accuracy of prediction and verification were more than 80%, BP-ANN had the best certification performance, whose accuracy of prediction and verification were 100%. Through further screening and identification, three chemical markers of Pu'er raw tea in different production years were obtained, which included $\delta^{15}\text{N}_{\text{Thea}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{glu}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$. Therefore, the analysis method of carbon and nitrogen stable isotope ratios in caffeine and amino acids based on GC-C-IRMS could be used to authenticate the authenticity of Pu'er raw tea in different years. This study preliminarily established the index system and technical system of Pu'er tea product certification, which also provided research ideas and method references for other food certification research.

Key words: Pu'er raw tea; production years; caffeine; amino acids; carbon and nitrogen stable isotope ratios

中国黑茶(CDT)是一种后发酵茶,是中国六大茶类之一^[1]。黑茶在适当的条件下可以通过陈化以确保和提高其质量^[2]。普洱茶是具有代表性的黑茶之一,普洱生茶直接由晒青绿茶经蒸压而成^[3]。普洱生茶在仓储陈化过程中化学成分均发生显著变化^[4-5]。但妥善保存的普洱茶不会变质,陈化后,茶的香气更佳,口感更醇厚^[6-7]。近年来,普洱生茶越来越被追求健康生活方式的消费者所接受和重视^[8-9]。在适当的贮藏条件下,普洱生茶在一定年限内越陈价格越昂贵^[10-11]。因此,消费者对普洱生茶关注最多的是普洱生茶的生产年份(储存年份),其生产年份很大程度上影响了消费者交易的意愿^[12-13]。因此,应开发一种可靠、准确的分析和验证不同生产年份普洱生茶产品真实性的方法,以保护消费者和生产者的利益。

稳定同位素技术适合应用于普洱茶真实性认证研究,因为不同元素的同位素组成提供了关于普洱茶来源的充分信息^[14-15]。近年来,稳定同位素比值分析在普洱茶真实性认证中得到了广泛的应用,尤其是在产地溯源,但在普洱茶生产年份上的认证还鲜有研究^[16-17]。特异性化合物同位素分析(CSIA)不仅是鉴别普洱茶来源的有效方法之一,也是了解茶树代谢的有效方法之一^[18-19]。咖啡碱是存在于咖啡(*Coffea arabica*)或茶(*Camellia sinensis*)等一些植物的种子、叶子和根部的主要生物碱^[20]。咖啡碱碳氮稳定同位素比率已被用作咖啡豆地理来源的化学标记^[21-22]。氨基酸(如组氨酸和苯丙氨酸)的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 特征可用于区分不同植物种类对有效氮源的获取^[23]。氨基酸是植物(如茶)中占主导地位的低分子量含氮生物分子,这些化合物合成过程中的同位素分馏模式记录了植物生长环境的一系列信息^[24-25]。然而,对普洱茶中咖啡碱和氨基酸中 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 特征分析还鲜有研究,本研究将探讨其分析和真实性认证的可行性。

咖啡碱和氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 通常由元素分析同位素比值质谱(EA-IRMS)测定。但是,该方法需要大量的高纯度咖啡碱来进行实验,且咖啡碱的提取和纯化费力且耗时^[26]。此外,在EA-IRMS测量之前的咖啡因提取/纯化过程中,咖啡碱的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 可能会受到非定量恢复的影响。因此,本文提出了一种利用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱(GC-C-IRMS)测定普洱茶中咖啡碱和氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的分析方法。

本研究探讨利用咖啡碱和氨基酸中氮和碳稳定同位素比值来进行不同生产年份普洱茶认证的可行性。为了获得准确的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值,研究了相关的潜在误差来源。利用GC-C-IRMS测定不同生产年份普洱茶中咖啡碱和6种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 特征,分析差异性及相关关系,建立化学计量学模型,筛选出重要化学标记,以期构建快速、可靠的不同生产年份普洱茶认证技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

不同生产年份的茶样:采集2014年、2015年、2016年、2017年、2018年来自中国云南省(云南临沧凤庆,纬度24°35',经度100°04')同一厂家生产的同一品牌(香竹菁)普洱生茶样品(每年采集样本数 $n=9$)。普洱生茶样品相对应的即为储存了5~9年的样品。所有样品均为饼茶(嫩度相同),且来自同一采收季节。另外收集了上述同一来源不同年份茶样($n=5$)进行模型验证(不用于模型训练),只标记一个序号,作为盲样处理。

氯仿(纯度99.0%)、氢氧化钠(纯度96.0%)、纯商用咖啡碱试剂(纯度98.0%) 日本和光纯药工业株式会社;无水硫酸钠 日本东京关东化学株式会社;IAEA-CH-7(纯度98.5%)、IAEA-600咖啡碱(纯度98.5%)、L-谷氨酸标准品、NBS-22燃料油、IAEA-CH-6蔗糖、IAEA-NO3硝酸钾 北京博研科创生物技术有限公司;USGS 40 L-氨基酸标准品(丙氨酸、茶氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、苏氨酸和丝氨酸,纯度98%)、Amberlite IR120阳离子交换树脂(氢型) 北京普天同创生物科技有限公司;ACN(Acetonitrile)衍生辅助试剂、N-叔丁基二甲基甲硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺(N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide, MTBSTFA)、二氯甲烷(纯度99.8%)、异丙醇(纯度99.5%)、丙酮(纯度95%)、乙酸乙酯(纯度99%)、三乙胺(纯度99.5%)、醋酸酐(纯度98%) 上海吉至生化科技有限公司

X-620型TP型匀浆器、ALC PK 131R离心机、GC IsoLink II+ConFlo IV™ IRMS、ISQ 7610单四极杆GC-MS、Delta V Advantage同位素比值质谱仪 美国赛默飞世尔科技公司

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 所有茶样粉碎过筛 40 目,取 0.1 g 茶样,加入 5 mL 超纯水,沸水浴中浸提 5 min,冷冻离心机 4000 r/min 下离心 10 min,取上清,冷藏保存,备用^[27-28]。

1.2.2 咖啡碱的碳氮稳定同位素比率测定 商业咖啡碱和 IAEA-600 的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 采用 EA-IRMS 法测量^[21]。精密量取茶样提取液 1 mL,置于 10 mL 离心管中,加氯化钠饱和,摇匀,加 2.5 mL 乙腈,涡旋混匀 1 min,超声波功率 200 W 下超声 10 min,离心 (2500 r/min) 2 min,用吸管吸取上清液 3 mL 于 10 mL 容量瓶中,残渣再用 2×2.5 mL 乙腈提取 2 次,合并有机层,定容至刻度,加无水硫酸镁 1 g 和中性氧化铝粉末 1 g,摇匀。静置后取 1 μL 供 GC-C-IRMS 进样分析。GC 柱温程序:起始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min;随即以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 6 min。注射温度设置为 200 $^{\circ}\text{C}$,无分流模式;HP-1 毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm);载气为氦气,柱流速 1 mL/min。IRMS 燃烧炉温度设置为 1030 $^{\circ}\text{C}$,氦反冲从 $t=0$ 开始,一直持续到 700 s,并在 1990 s 重新开始,直到分析结束。在 $t=30$ 、80、130、170、1930 和 1970 s 引入 6 组参考气体(CO_2)。在这些条件下,咖啡碱的保留时间约为 1200 s^[6]。

1.2.3 氨基酸的碳氮稳定同位素比率测定 利用 EA-IRMS 测量了非衍生的单一氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值、标准品 L-谷氨酸 USGS40、燃料油 NBS-22、食糖 IAEA-CH-6 中 $\delta^{13}\text{C}$ 值和谷氨酸 USGS40、硝酸钾 IAEA- NO_3 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值^[28]。氨基酸衍生条件:称取一定质量的丙氨酸(Ala)、茶氨酸(Thea)、谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)和丝氨酸(Ser),加 0.1 mol/L 盐酸超声溶解,配制成除天门冬氨酸、谷氨酸质量浓度分别为 3.25、3.11 mmol/L 外,其他氨基酸浓度为 2.5 mmol/L 的混合氨基酸对照品溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。吸取一定量的氨基酸溶液 400 μL 放于 2 mL 自动进样瓶中,加入适量 40 nmol/L 的正缬氨酸作为内标,置于氮吹仪中于室温下吹干,分别加入 40~100 μL 的 ACN 衍生辅助试剂、40~100 μL 的 MTBSTFA 衍生试剂(MTBSTFA 与 ACN 的比例为 1:1),加入量依据不同的氨基酸量而定,依设定温度 110 $^{\circ}\text{C}$ 衍生 30 min,反应完成后冷却至室温,待用^[29]。

GC-C-IRMS 使用条件:Trace GC Ultra(GC Iso-Link+ConFlo IV, Thermo Scientific)与 IRMS (DELTA V, Thermo Scientific)通过开放分流界面进行单体氨基酸同位素分析,并使用单四极 GC-MS (ISQ Thermo Scientific)。进行 $\delta^{15}\text{N}$ 分析时,使用自动取样器以无分裂模式注入 0.8~1.0 μL 样品。HP-INNOWAX 毛细管柱 (60 m×0.32 mm×0.25 μm),载气为氦气,柱流速 1.4 mL/min,注射温度设置为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。GC 柱温程序:起始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,保持

2 min;随即以 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 140 $^{\circ}\text{C}$,2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 180 $^{\circ}\text{C}$,6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 220 $^{\circ}\text{C}$,最后 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min。进行 $\delta^{13}\text{C}$ 分析时,使用自动取样器以无分裂模式注入 1.0 μL 样品。采用分流模式注入,采用更强的极性柱,可以获得更高更锐利的峰,ZB-FFAP 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm),GC 柱温程序:起始温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min;随即以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 120 $^{\circ}\text{C}$,3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 190 $^{\circ}\text{C}$,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 7 min。IRMS 燃烧炉温度设置为 1030 $^{\circ}\text{C}$,用 Nafion 膜组成的疏水阀除去水蒸气。在对 $\delta^{15}\text{N}$ 进行分析时,在燃烧氧化反应器后加入液氮捕集器以从氧化和还原分析物中去除 CO_2 ^[30-31]。

1.3 数据处理

采用 SPSS 统计软件(version 23.0, IBM, USA)进行单因素方差分析(ANOVA)、线性判别分析(LDA)和 BP 人工神经网络(BP-ANN)。使用 SIMCA 软件(version 13.0, Umetrics, Umea, Sweden)进行层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)。在进行 PCA、HCA、LDA、PLS-DA 和 BP-ANN 应用之前,所有变量都进行了自动放缩^[21]。

2 结果与分析

2.1 方法学验证

2.1.1 GC-C-IRMS 测定咖啡碱 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值方法学验证结果 适用性考察:利用 1.2 实验方法 EA-IRMS 测得的商用咖啡碱的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值与 GC-C-IRMS 方法测得的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值进行比较,结果表明 GC-C-IRMS 测定的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值与 IRMS 测定的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的精密度值分别为 0.14%、0.18% 和 0.15%、0.20%。其结果在相同精度范围内,且两种方法的标准差相似,均小于 0.2%。因此,除了实验部分所描述的标准化之外,GC-C-IRMS 无需任何校正因子即可使用。

准确性考察:利用 1.2 实验方法重复分析商用咖啡碱 3 次。GC-C-IRMS 测定的平均精度为: $\delta^{15}\text{N}$ 为 $\pm 0.15\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}$ 为 $\pm 0.5\text{‰}$ 。

不确定度考察:利用 1.2 实验方法对普洱茶样品重复提取 10 次并测量其 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值。获得的标准偏差 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $\pm 0.1\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}$ 为 $\pm 1.0\text{‰}$ 。

2.1.2 GC-C-IRMS 测定氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值方法学验证结果 适用性考察:利用 1.2 实验方法将 GC-C-IRMS 测得的标准氨基酸混合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值与 EA-IRMS 测得的纯非衍生单氨基酸的同位素值进行了比较,均进行 3 次重复。经校正后,EA-IRMS 和 GC-C-IRMS 测量值之差分别不高于 $\pm 0.5\text{‰}$ 和 $\pm 1.6\text{‰}$ 。

准确性考察:利用 1.2 实验方法对氨基酸对照品的重复衍生 10 次,每个重复进行 3 次重复。GC-C-

IRMS 测定的平均精度为: $\delta^{15}\text{N}$ 为 $\pm 0.1\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}$ 为 $\pm 0.5\text{‰}$ 。

不确定度考察: 利用 1.2 实验方法对普洱生茶样品进行提取和衍生 10 次并测量 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值。获得的标准偏差 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $\pm 0.2\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}$ 为 $\pm 0.7\text{‰}$ 。

2.2 不同生产年份普洱茶中咖啡碱和主要游离态氨基酸中 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的变化

从表 1 中可以看出, 五个年份生产的普洱茶中不同化合物之间(咖啡碱、6 种主要游离态氨基酸)的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值差异显著($P < 0.05$), 所有普洱茶中咖啡碱的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值($-31.85\text{‰} \pm 0.72\text{‰}$)要低于所有主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值。主要游离态氨基酸中丝氨酸 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值 $>$ 天门冬氨酸 $>$ 谷氨酸 $>$ 丙氨酸 $>$ 苏氨酸 $>$ 茶氨酸。同时研究发现, 谷氨酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值 $>$ 丙氨酸 $>$ 天门冬氨酸 $>$ 茶氨酸 $>$ 咖啡碱 $>$ 苏氨酸 $>$ 丝氨酸, 这种差异可能与不同生产年份环境因子影响有关。

单因素方差分析结果(表 1)显示, 按照不同生产年份对茶样品进行分组, 2018 年生产的普洱生茶中咖啡碱、6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 显著低于其他年份($P < 0.05$), 这可能是逐年大气中 CO_2 浓度的增加, 植物进行光合作用, 影响气孔的开闭, 继而影响 $\delta^{13}\text{C}$ 值^[27-28]。同时, 2018 年和 2017 年生产的普洱茶中咖啡碱、6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值没

有显著变化($P > 0.05$), 但 2016 年至 2014 年的普洱生茶中除丝氨酸、咖啡碱外, 其余化合物的 $\delta^{15}\text{N}$ 值呈逐年降低的趋势($P < 0.05$)。此外, 同一年样品中各化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 最大值和最小值存在较大差异, 单一变量无法准确认证不同年份的普洱茶。为了更加准确认证普洱茶, 利用化学计量学结合这些具有统计学意义的多变量(咖啡碱、6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$)对不同生产年份普洱茶样品进行聚类趋势评价, 探讨真实性认证的可能性。

2.3 不同生产年份普洱茶的无监督识别分析

2.3.1 HCA 分析 如图 1 所示, HCA 描述了 2 个变量聚类树。HCA 中聚类到同一簇的变量相关性较高^[30]。所有化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值聚类到了同一聚类树, 证明咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间存在较强相关性。同时可以看出, 所有化合物的 $\delta^{15}\text{N}$ 值聚类到了同一聚类树, 证明咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值之间也存在较强相关性, 这种不同化合物间 $\delta^{13}\text{C}$ 值的相互间的相似性和 $\delta^{15}\text{N}$ 值相互间的相似性机理是下一步研究重心。此外, HCA 显示了多个样本聚类树, 对不同生产年份的普洱茶分组效果较差。可以看出, 仅有 2014 年普洱茶能单独聚类到同一个集群。2015 年茶样和 2016 年茶样、2017 年茶样和 2018 年茶样均分别聚类成一个混合集群, 无法区分开来, 相近年份的普洱茶较

表 1 不同生产年份茶中的咖啡碱和氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值(‰, $n=9$)

Table 1 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of caffeine and amino acid of tea samples with different production years (‰, $n=9$)

变量	2014年普洱茶			2015年普洱茶			2016年普洱茶			2017年普洱茶			2018年普洱茶			F	P 值
	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值	平均值±标准差	最小值	最大值		
$\delta^{13}\text{C}$ 咖啡碱	-31.04±0.14 ^a	-31.15	-30.68	-31.27±0.12 ^b	-31.41	-31.05	-31.60±0.15 ^c	-31.84	-31.36	-32.50±0.14 ^d	-32.73	-32.35	-32.85±0.13 ^e	-33.05	-32.64	290.27	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 丙氨酸	-22.27±0.15 ^a	-22.38	-21.91	-23.30±0.16 ^b	-23.44	-23.07	-23.54±0.16 ^c	-23.79	-23.29	-24.38±0.15 ^d	-24.62	-24.22	-24.64±0.14 ^e	-24.85	-24.42	391.56	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 茶氨酸	-29.03±0.17 ^a	-29.14	-28.67	-29.24±0.14 ^b	-29.38	-29.02	-29.55±0.19 ^c	-29.79	-29.31	-30.43±0.19 ^d	-30.66	-30.28	-30.76±0.16 ^e	-30.96	-30.55	267.91	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 谷氨酸	-20.46±0.13 ^a	-20.57	-20.10	-21.60±0.13 ^b	-21.75	-21.37	-21.83±0.13 ^c	-22.08	-21.57	-22.65±0.18 ^d	-22.89	-22.50	-22.90±0.19 ^e	-23.11	-22.68	404.76	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 天门冬氨酸	-19.59±0.19 ^a	-19.70	-19.23	-19.90±0.10 ^b	-20.04	-19.68	-20.12±0.14 ^c	-20.36	-19.87	-20.91±0.12 ^d	-21.14	-20.76	-21.14±0.10 ^e	-21.35	-20.93	204.65	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 苏氨酸	-28.47±0.18 ^a	-28.58	-28.11	-29.24±0.15 ^b	-29.38	-29.02	-29.55±0.17 ^c	-29.79	-29.30	-30.43±0.11 ^d	-30.67	-30.28	-30.76±0.12 ^e	-30.96	-30.54	386.53	0.000
$\delta^{13}\text{C}$ 丝氨酸	-15.31±0.12 ^a	-15.42	-14.95	-16.30±0.18 ^b	-16.44	-16.07	-16.47±0.13 ^c	-16.72	-16.21	-17.25±0.16 ^d	-17.49	-17.09	-17.44±0.18 ^e	-17.66	-17.22	309.57	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 咖啡碱	2.60±0.31 ^c	1.91	2.99	2.59±0.39 ^c	2.04	3.14	3.51±0.63 ^b	2.30	4.34	4.71±0.44 ^a	4.03	5.24	4.93±0.26 ^a	4.34	5.16	62.26	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 丙氨酸	3.58±0.33 ^d	2.89	3.97	5.00±0.53 ^c	4.26	5.75	6.24±0.84 ^b	4.63	7.36	7.83±0.58 ^a	6.94	8.52	8.11±0.34 ^a	7.34	8.40	107.32	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 茶氨酸	3.77±0.35 ^c	3.08	4.16	3.88±0.39 ^c	3.33	4.43	4.91±0.63 ^b	3.70	5.75	6.23±0.44 ^a	5.55	6.76	6.57±0.26 ^a	5.98	6.80	83.65	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 谷氨酸	4.97±0.34 ^d	4.28	5.36	7.56±0.57 ^c	6.76	8.36	9.00±0.89 ^b	7.28	10.18	10.79±0.61 ^a	9.85	11.52	11.20±0.36 ^a	10.39	11.51	170.40	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 天门冬氨酸	2.83±0.30 ^d	2.14	3.22	4.39±0.60 ^c	3.55	5.24	5.67±0.94 ^b	3.86	6.93	7.32±0.64 ^a	6.33	8.09	7.32±0.37 ^a	6.49	7.64	89.06	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 苏氨酸	1.50±0.37 ^c	0.81	1.89	1.63±0.46 ^c	0.99	2.28	2.55±0.73 ^b	1.14	3.53	3.79±0.51 ^a	3.00	4.39	3.88±0.30 ^a	3.20	4.14	48.65	0.000
$\delta^{15}\text{N}$ 丝氨酸	1.12±0.33 ^c	0.43	1.51	1.05±0.43 ^c	0.45	1.65	1.87±0.68 ^b	0.56	2.78	3.00±0.47 ^a	2.27	3.57	3.07±0.28 ^a	2.43	3.31	41.22	0.000

注: 平均值是三次重复分析的结果, 不同小写字母表示不同生产年份普洱茶之间差异显著(Duncan, $P < 0.05$)。

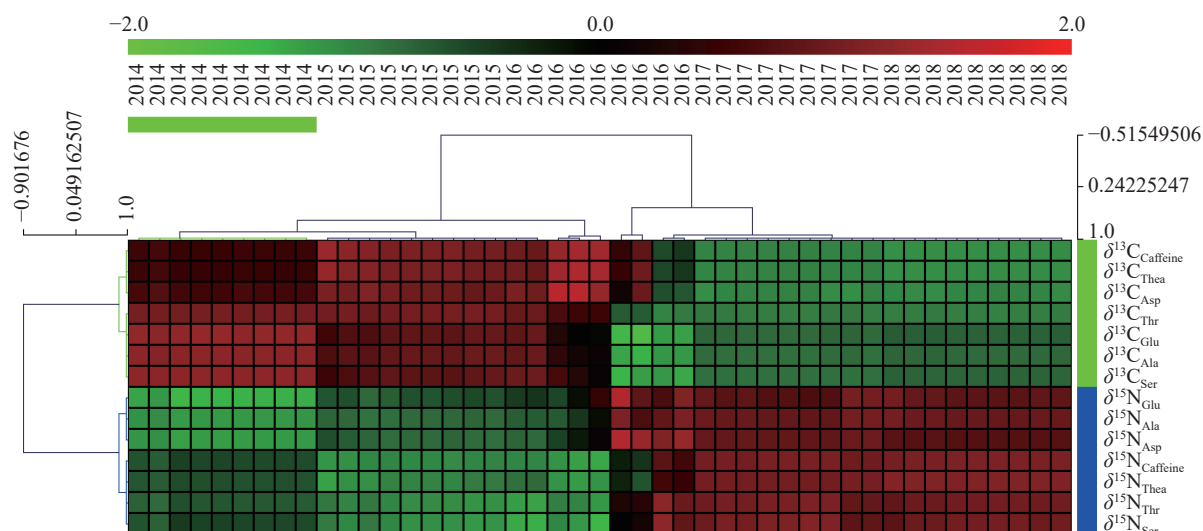


图1 样本与咖啡碱和6种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的HCA相关矩阵

Fig.1 HCA correlation matrix of the relationship between the samples and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of caffeine and amino acid of tea samples

注: 每个方框表示每个样本和一个变量的皮尔逊相关系数, 相关系数的值用绿色或红色的强度表示。2014、2015、2016、2017、2018 分别表示 2014 年普洱茶、2015 年普洱茶、2016 年普洱茶、2017 年普洱茶、2018 年普洱茶。

难以区分, 这可能是由于相近年份生产的茶样其在土壤性质、环境条件的相似性所致^[17]。因此, 采用 HCA 结合咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸的 14 个 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值对不同生产年份的普洱茶无法进行有效认证。

2.3.2 PCA 分析 PCA 分析结果表明, 前二个主成分(PCs)分别代表 2014 年至 2018 年普洱茶样品的可变性的方差贡献率的 93.2% 和 4.8%。可见, 前二个主成分的累积方差贡献率较高(98.0%), 表明此模型 PCA 分类性能较强。从图 2A 中可以看出 2015 年茶样、2016 年茶样、2017 年茶样和 2018 年茶样均很难区分出来, 仅 2014 年茶样的鉴别较容易。从图 2B 所示的加载图中可以观察到 PC1 和 PC2 平面中变量的取向, PC1 中大部分变量的方差贡献相差不大, 均有较大贡献; 而 PC2 的主要特征变量包括 $\delta^{13}\text{C}$ 丝氨酸、 $\delta^{15}\text{N}$ 苏氨酸、 $\delta^{15}\text{N}$ 丝氨酸和 $\delta^{15}\text{N}$ 咖啡碱。PC1 能将 2014 年茶样认证出来, PC2 很难能将茶样认证出来。总体而言, 不同生产年份普洱茶样品可根据咖啡碱和 6 个主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值图谱的 PCA 初步分组。

通过两种无监督模式识别方法(HCA 和 PCA)的应用, 无法对 2014 年至 2018 年普洱茶样本进行区分。因此, 进一步探索其他监督识别化学计量工具, 对不同生产年份茶样进行认证。

2.4 不同年份普洱茶的有监督识别证实方法的预测建模

2.4.1 PLS-DA PLS-DA 分析结果表明, 该方法结合咖啡碱和 6 个主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值是认证不同生产年份普洱茶的合适方法(图 3), 因为 PLS-DA 模型显示了极好的模型性能($R^2\text{X}=1.00$, $R^2\text{Y}=0.86$, $Q^2=0.83$)。该模型解释了 X 的 100% 变

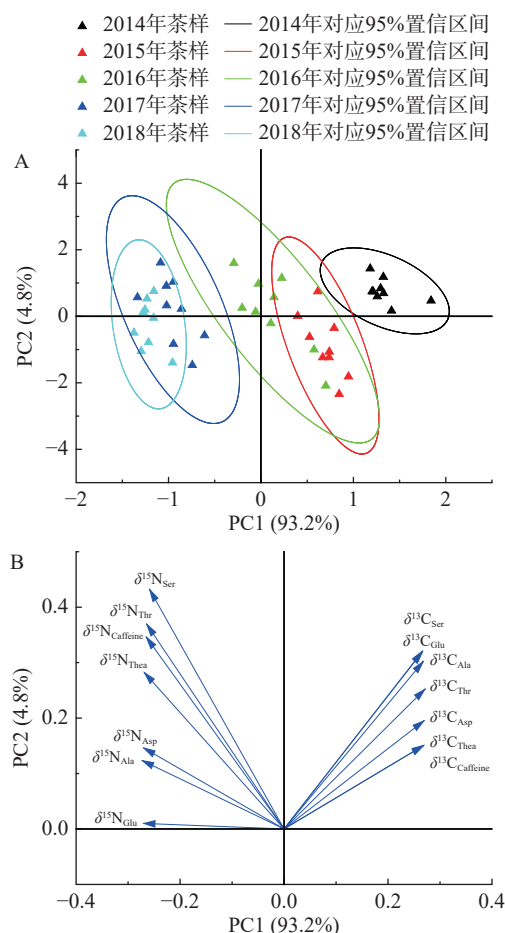


图2 主成分分析图

Fig.2 Principal component analysis diagram

化和 Y 的 86% 变化, 预测能力 Q^2 为 83%。PLS-DA 得分图显示了 5 个生产年份普洱茶的聚类, 但研究发现, 相近年份的茶样存在重叠现象, 2014 年茶样、2015 年茶样和 2016 年茶样混淆, 2017 年茶样和

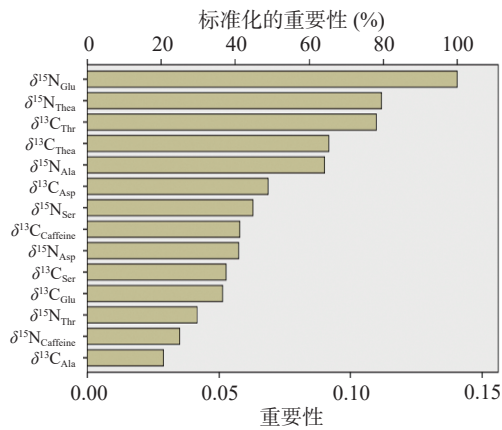


图 4 BP-ANN 依据咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值中不同生产年份普洱茶证实的变量重要性 ($P<0.05$)

Fig.4 Importance of independent batches with correct authentication tea of different production years in BP-ANN of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of caffeine and six main amino acids ($P<0.05$)

用。第二个 Fisher 判别函数对 2015 年茶样有明显的证实作用。识别能力以模型训练中茶样正确分类的百分比表示, 总体准确率为 90.6%, 结果很好, 对 2016 年茶样、2017 年茶样和 2018 年茶样识别效果相对较差, 仅为 85.7%。采用典型的交叉验证和外部验证方法以茶样正确分类的百分比表示预测能力。交叉验证方法的预测总准确率为 87.5%, 外部验证方法的预测总准确率为 84.6%, 该方法预测结果较好。交叉验证和外部验证方面, 2018 年茶样的准确率 (71.4% 和 50.0%) 低, 可能与样本数量有关, 后期研究将扩大样本量以提高认证的准确性(图 5 和表 3)。

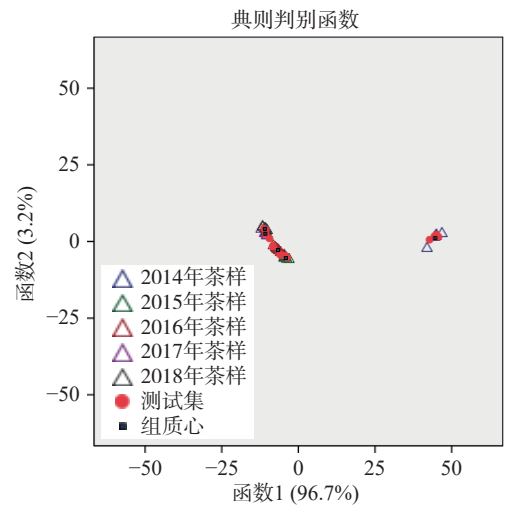


图 5 基于咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的不同生产年份普洱茶真伪认证的 LDA 模型得分图

Fig.5 The score plot of LDA model of authentication of tea of different production years on the basis of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of caffeine and six main amino acids

对比三个预测模型性能, BP-ANN 的识别和预测能力优于 PLS-DA 和 LDA。结合咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值认证不同生产年份茶样, BP-ANN 是最佳证实方法。通过 3 种不同的有监督识别方法选取的变量中, 三种模型共同筛选出 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Thea}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{Glu}}$ 和 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ 为结合咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值认证不同生产年份普洱茶的最重要的化学标记。

2.4.4 预测模型在“盲”数据集下验证 为了进一步检验为预测所开发的化学计量学的稳定性, 对各预测

表 3 LDA 模型进行模型训练、交叉验证和预测结果
Table 3 Model training, cross-validation and prediction results by the LDA model

	2014年茶样	2015年茶样	2016年茶样	2017年茶样	2018年茶样	准确率(%)
训练集						
2014年茶样	5	0	0	0	0	100.0
2015年茶样	0	6	0	0	0	100.0
2016年茶样	0	1	6	0	0	85.7
2017年茶样	0	0	0	6	1	85.7
2018年茶样	0	0	0	1	6	85.7
识别能力(%)						90.6
交叉验证集						
2014年茶样	5	0	0	0	0	100.0
2015年茶样	0	6	0	0	0	100.0
2016年茶样	0	1	6	0	0	85.7
2017年茶样	0	0	0	6	1	85.7
2018年茶样	0	0	0	2	5	71.4
预测能力(%)						87.5
测试集						
2014年茶样	4	0	0	0	0	100.0
2015年茶样	0	2	1	0	0	66.7
2016年茶样	0	0	2	0	0	100.0
2017年茶样	0	0	0	2	0	100.0
2018年茶样	0	0	0	1	1	50.0
预测能力(%)						84.6

模型的性能进行比较,建立 PLS-DA、BP-ANN 和 LDA 模型对 2014 年~2018 年茶样盲样($n=5$ 个/每年茶样)进行了“盲”验证。通过盲数据集验证,PLS-DA、BP-ANN 和 LDA 模型的总体准确率分别为 88.0%、96.0% 和 80.0%(表 4),预测效果较好($>80\%$)。结果显示,在 PLS-DA、BP-ANN 和 LDA 下,2014 年茶样预测准确率均为 100%,2015 年茶样预测准确率分别为 80%、100% 和 80%,2016 年茶样预测准确率均为 80%,2017 年茶样预测准确率分别为 80%、100% 和 80%,2018 年茶样预测准确率均为 100%、100% 和 60%。结果表明,BP-ANN 模型结合咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值在证实不同生产年份茶样具有最佳的验证性能。

表 4 模型在“盲”数据集验证结果
Table 4 Models performance under a “blind” dataset

	2014年 茶样	2015年 茶样	2016年 茶样	2017年 茶样	2018年 茶样	准确率 (%)
PLS-DA	2014年 茶样	5	0	0	0	100.0
	2015年 茶样	0	4	1	0	80.0
	2016年 茶样	0	1	4	0	80.0
	2017年 茶样	0	0	1	4	80.0
	2018年 茶样	0	0	0	5	100.0
	预测能力 (%)					88.0
BP-ANN	2014年 茶样	5	0	0	0	100.0
	2015年 茶样	0	5	0	0	100.0
	2016年 茶样	0	1	4	0	80.0
	2017年 茶样	0	0	0	5	100.0
	2018年 茶样	0	0	0	5	100.0
	预测能力 (%)					96.0
LDA	2014年 茶样	5	0	0	0	100.0
	2015年 茶样	0	4	1	0	80.0
	2016年 茶样	0	1	4	0	80.0
	2017年 茶样	0	0	1	4	80.0
	2018年 茶样	0	0	0	2	60.0
	预测能力 (%)					80.0

3 结论

采用 GC-C-IRMS 成功分析了不同年份普洱茶产品的咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 指纹图谱,普洱茶中咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 分析方法验证效果好,适合普

洱茶中分析。采用咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 指纹技术对普洱生茶产品的证实是可行的。各模型预测准确率达到 80% 以上,验证准确率达到 85% 以上,BP-ANN 证实性能最优。同时筛选出了不同年份普洱茶样品认证的重要的化学标记,为普洱茶产品认证的有效的指标体系。综上所述,开发了一种可行的普洱生茶中咖啡碱和 6 种主要游离态氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 分析方法,并结合化学计量学模型对普洱茶产品成功认证。本研究初步建立了普洱茶产品认证的指标体系及技术体系,为普洱茶产品的认证体系的建立提供技术和理论支撑,也为其他食品的证实研究提供研究思路和方法参考。为了完善现有普洱茶产品认证程序,建议在更大的样本集和不同的地点对这种新方法进行测试,以进一步评价咖啡碱和氨基酸化合物碳氮稳定同位素比值分析在普洱茶产品认证中的适用性。

参考文献

- [1] LIU Z, YUAN Y W, ZHANG Y Z, et al. Geographical traceability of Chinese green tea using stable isotope and multi-element chemometrics[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2019, 33: 778–788.
- [2] ZHAO H Y, ZHANG S L, ZHANG Z W. Relationship between multi-element composition in tea leaves and in provenance soils for geographical traceability[J]. *Food Control*, 2017, 76: 82–87.
- [3] 吕嘉彬, 杨柳青, 孟雁南. 茯砖茶中金花菌群的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 316–322. [LÜ J X, YANG L Q, MENG Y N. Development of golden flower fungus community in Fuzhuan brick tea: A review[J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 316–322.]
- [4] WANG L Y, WEI K, JIANG Y W, et al. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233: 1049–1055.
- [5] 侯黎, 杜昱光, 王曦, 等. 发酵陈皮黑茶的化学成分差异及体外活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 226–232. [HOU C, DU Y G, WANG X, et al. Differences in chemical components and *in vitro* activity of fermented orange peel black tea[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 226–232.]
- [6] WU C, YAMADA K, SUMIKAWA O, et al. Development of a methodology using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for the determination of the carbon isotope ratio of caffeine extracted from tea leaves (*Camellia sinensis*) [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2012, 26(8): 978–982.
- [7] 曹永, 赵谋明, 赵甜甜, 等. 不同黑茶提取物功能性成分分析及活性评价[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 54–59. [CAO Y, ZHAO M M, ZHAO T T, et al. Functional component analysis and activity evaluation of different black tea extracts[J]. *Food Science*, 2017, 38(18): 54–59.]
- [8] LV H P, ZHANG Y J, LIN Z, et al. Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review[J]. *Food Research International*, 2013, 53: 608–618.
- [9] 吕海鹏, 王梦琪, 张悦, 等. 普洱茶后发酵过程中多酚类成分生物转化的研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 306–312. [LÜ H P, WANG M Q, ZHANG Y, et al. Research progress on biotransformation of polyphenols in post fermentation process of

- Pu'er tea[J]. Food Science, 2018, 39(23): 306–312.]
- [10] LÜ S D, WU Y S, SONG Y Z, et al. Multivariate analysis based on GC-MS fingerprint and volatile composition for the quality evaluation of Pu-erh green tea[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8: 321–333.
- [11] 李孚杰, 潘丹贞, 张丛兰, 等. 纤维素酶法提取板栗壳色素的工艺条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 149–153. [LI F J, PAN D Z, ZHANG C L, et al. Optimization of technological conditions for extracting pigment from chestnut shell by cellulase[J]. Food Science, 2012, 33(2): 149–153.]
- [12] HOU Y, SHAO W F, XIAO R, et al. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model[J]. Experimental Gerontology, 2009, 44: 434–439.
- [13] CAP Y N, LIU T X. Analysis of aroma composition in Pu-erh raw and ripe teas with different storage time[J]. Agro Food Industry Hi-tech, 2011, 32(10): 64–67.
- [14] HAYES J M. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes[J]. Rev Mineral Geochem, 2001, 43: 225–277.
- [15] CENGİZ M F, TURAN O, OZDEMİR D, et al. Geographical origin of imported and domestic teas (*Camellia sinensis*) from Turkey as determined by stable isotope signatures[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(12): 3234–3243.
- [16] LOU Y X, FU X S, YU X P, et al. Stable isotope ratio and elemental profile combined with support vector machine for provenance discrimination of oolong tea (wuyi-rock tea)[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017: 5454231.
- [17] TEECE M A, FOGEL M L. Stable carbon isotope biogeochemistry of monosaccharides in aquatic organisms and terrestrial plants[J]. Org Geochem, 2007, 38: 458–73.
- [18] REID L M, O'DONNELL C P, DOWNEY G. Recent technological advances for the determination of food authenticity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, 17: 344.
- [19] KELLY S, HEATON K, HOOGEWERFF J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis[J]. Trends Food Sci Technol, 2005, 16: 555.
- [20] ASHIHARA H, CROZIER A. Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6: 407.
- [21] WECKERLE B, RICHLING E, HEINRICH S, et al. Origin assessment of green coffee (*Coffea arabica*) by multi-element stable isotope analysis of caffeine[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 374: 886.
- [22] DUNBAR J, WILSON A T. Determination of geographic origin of caffeine by stable isotope analysis[J]. Anal Chem, 1982, 54: 590.
- [23] VAN LEEUWEN K A, PRENZLER P D, RYAN D, et al. Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for traceability and authenticity in foods and beverages[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2014, 13: 814–837.
- [24] BOL R, OSTLE N J, BALESIDENT J, et al. Influence of long-term fertilizer and manure on the distribution and ^{15}N natural abundance values of amino acids in the Versailles '42 parcelles': Preliminary results[J]. Abstr Pap Am Chem Soc, 2001, 221: 534.
- [25] BOL R, OSTLE N J, PETZKE K J. Compound specific plant amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values differ with functional plant strategies in temperate grassland[J]. J Plant Nutr Soil Sci, 2002, 165: 661–667.
- [26] RICHLING E, HOHN C, WECKERLE B, et al. Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (EA-C/P-IRMS)[J]. Eur Food Res Technol, 2003, 216: 544.
- [27] PERVA-UZUNALIC A, SKERGET M, KNEZ Z, et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine[J]. Food Chemistry, 2006, 96: 597.
- [28] LAURSEN K H, SCHJOERRING J K, OLESEN J E, et al. Multielemental fingerprinting as a tool for authentication of organic wheat, barley, faba bean, and potato[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 4385–4396.
- [29] STYRING A K, KUHL A, KNOWLES T D J, et al. Practical consideration in the determination of compound-specific amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values in animal and plant tissues by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, following derivatisation to their N-acetylisopropyl esters[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26: 2328–2334.
- [30] MAURO P, LUCA Z, KRISTIAN H L, et al. Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ analyses of amino acids for potential discrimination between organically and conventionally grown wheat[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63: 5841–5850.
- [31] FRIEDMAN M, KIM SY, LEE S J, et al. Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States[J]. Journal of Food Science, 2005, 70: C550.