

# 草甘膦对茶树叶片主要生化成分的影响

郭永春<sup>1</sup>, 王淑燕<sup>1</sup>, 王鹏杰<sup>1</sup>, 陈金发<sup>3</sup>, 周 鹏<sup>4</sup>, 欧阳立群<sup>4</sup>, 赵 峰<sup>2\*</sup>, 叶乃兴<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>福建农林大学园艺学院/茶学福建省高校重点实验室, 福州 350002; <sup>2</sup>福建中医药大学药学院, 福州 350122;

<sup>3</sup>国家茶叶质量安全工程技术研究中心, 安溪 362400; <sup>4</sup>福建省产品质量检验研究院, 福州 350002

**摘要:**以金观音茶树为试材, 将草甘膦定量施于栽培基质, 通过观察叶片的表现药害, 并采用超高效液相串联质谱方法测定草甘膦施用前(0天)和施用后(7天和33天)叶片中的农药残留(草甘膦及氨基甲麟酸)及生化成分(游离氨基酸、儿茶素和生物碱)的含量变化, 从而科学地评估草甘膦的使用对茶叶质量安全的影响。结果表明:草甘膦施用33天, 茶树叶片未见明显药害表征, 但可检测到草甘膦及其代谢物氨基甲麟酸;草甘膦施用后, 游离氨基酸和儿茶素总量降低, 生物碱总量先升后降;多元统计分析表明, 草甘膦施用前后样品组间的茶氨酸、咖啡碱、表没食子儿茶素没食子酸酯、谷氨酰胺、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和表没食子儿茶素含量存在显著差异。综上, 茶园草甘膦的施用不易使茶树叶片产生明显的药害表征, 但可在茶树叶片中残留较长时间, 并显著改变茶树叶片中游离氨基酸、儿茶素和生物碱类化合物的含量。因此, 建议茶园尽量不使用草甘膦除草剂。

**关键词:**茶树;草甘膦;生化成分;氨基酸;儿茶素;生物碱

中图分类号:S571.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)3-0394-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.006

## Effect of glyphosate on main biochemical components of tea leaves

GUO Yong-chun<sup>1</sup>, WANG Shu-yan<sup>1</sup>, WANG Peng-jie<sup>1</sup>,  
Chen Jin-fa<sup>3</sup>, ZHOU Peng<sup>4</sup>, OUYANG Li-qun<sup>4</sup>, ZHAO Feng<sup>2\*</sup>, YE Nai-xing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University/Key Laboratory of Tea Science  
in Universities of Fujian Province, Fuzhou 350002, China;

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

<sup>3</sup>National Engineering Research Center for Tea Quality-and-Safety, Anxi 362400, China;

<sup>4</sup>Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China

**Abstract:** Taking *Camellia sinensis* 'Jin-guanyin' as test material, glyphosate was quantitatively applied on tea plants cultivation substrate. By observing the apparent phytotoxicity of tea leaves, and using ultra-high performance liquid phase tandem mass spectrometry to determine the pesticide residues (glyphosate and aminomethylphosphonic acid) and main quality components (free amino acids, catechins and alkaloids) in the tea leaves before (0 d) and after (7 d and 33 d) glyphosate applying, to explore the impact of glyphosate application on the quality and safety of tea production. The results showed that: glyphosate was applied for 33 days, and there was no obvious sign of phytotoxicity in tea leaves, but glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid were still detected; The total amount of free amino acids and catechins decreased after the application of glyphosate, while the total amount of alkaloids first increased and then decreased; Multivariate statistical analysis shows, there are obvious differences of theanine, caffeine, epigallocatechin gallate, glutamine, epicatechin gallate, epicatechin, arginine, aspartic acid, glutamic acid and epigallocatechin between the sample groups before and after glyphosate application. In summary, the application of glyphosate in tea gardens is not easy to cause phytotoxicity in the tea leaves, but it can remain in the leaves of tea plants for a long time and significantly change the content of free amino acids, catechins and alkaloids in tea leaves.

收稿日期:2020-11-03 接受日期:2020-12-31

基金项目:福建省“2011 协同创新中心”中国乌龙茶产业协同创新中心专项(闽教科[2015]75号);国家茶叶质量安全工程技术研究中心开放课题(2018NTQS0301);福建农林大学优秀硕士学位论文论文资助基金(2019S01)

\* 通信作者 Tel:86-015306078980; E-mail: ynxtea@126.com, zhaofeng0591@fjtc.edu.cn

**Key words:** *Camellia sinensis*; glyphosate; biochemical components; amino acids; catechins; alkaloids

茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 是一种多年生叶用经济作物,在世界上多个国家被广泛种植<sup>[1]</sup>。杂草可与茶树争夺肥水和生长空间,影响茶叶产量和品质<sup>[2]</sup>,草甘膦是一种常见的内吸传导型除草剂,具有高效、廉价和杀草谱广等优点,近几十年来在茶园杂草管理中被广泛应用<sup>[1]</sup>。现阶段,我国的福建、贵州等部分省份已通过地方法规限制茶园使用草甘膦,但生产中依旧难以避免由于不合理用药导致的茶园草甘膦污染<sup>[3]</sup>。

草甘膦具有广谱性,在杀灭杂草的同时,也会被作物根部吸收并转运至全株,影响作物生长代谢<sup>[4]</sup>。其作用机理是通过干扰植物莽草酸代谢途径,影响芳香氨基酸的合成,使植物代谢紊乱,因此草甘膦作用于植物莽草酸代谢的过程必然会影响到作物的品质<sup>[5]</sup>。已有研究表明,草甘膦施用后,玉米<sup>[6]</sup>、马铃薯<sup>[5]</sup>和柑橘<sup>[7]</sup>等农作物的产量下降。也有学者开始关注草甘膦对茶树生长和代谢的影响,例如,Gao 等<sup>[8]</sup>指出,茶园施用田间推荐剂量的草甘膦除草剂后,茶树地上部未有药害表征;Tong 等<sup>[9]</sup>通过水培体系研究发现,草甘膦经茶树根部吸收后转运到叶部,极有可能是茶叶中草甘膦残留的主要途径。本课题组前期通过对幼龄和成年茶树施用草甘膦发现,喷洒到土壤的草甘膦被茶树根部吸收后,经茎部转运富集至叶部<sup>[10]</sup>。目前,草甘膦的施用对茶树叶片主要生化成分(如:氨基酸、儿茶素和生物碱)的具体影响尚未见报道。

本研究通过观察草甘膦施用后茶树叶片的表现药害,并对草甘膦施用前(0天)和施用后(7和33天)茶树叶片中的农药残留(草甘膦和氨甲基膦酸)及主要生化成分(儿茶素、生物碱和氨基酸)进行定量测定,从而探究草甘膦施用后茶树叶片的表现药害、草甘膦在茶树叶片中的代谢情况及其施用对茶叶主要生化成分的具体影响,相关试验结果可为草甘膦在茶叶生产质量的安全管控方面提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料处理及制备

以全国优良品种金观音(*C. sinensis* ‘Jin-guanyin’)一年生茶树为试验材料,将泥炭土和珍珠岩按照1:1(体积比)混匀后作栽培基质。将茶树植于体积为2L的盆钵并进行2个月的适应性培养,选取

长势基本一致的植株,于2019年10月将草甘膦异丙胺盐定量施于栽培基质上,具体方法为:(1)分别将45、450和900 mg/mL的草甘膦施于栽培基质(每单位体积土壤基质的施用量,即浓度分别为0.3 mg/mL(低于推荐施用浓度)、3 mg/mL(推荐施用浓度)和6 mg/mL(高于推荐施用浓度)的草甘膦在每个盆钵(2L)定量喷施300 mL),取茶树叶片进行药害表征观察。(2)将45 mg/mL的草甘膦施于栽培基质(浓度为0.3 mg/mL的草甘膦在每个盆钵(2L)定量喷施300 mL),分别于0(施用前)、7和33天采集茶树嫩梢第二三叶(每个时期6次生物学重复),采集后的样品以液氮速冻,通过冷冻干燥干燥后,放入研钵磨碎成粉,用于农药残留及茶叶品质化学组分的测定。

#### 1.1.2 仪器与试剂

仪器:超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS,美国Agilent公司);超高效液相色谱串联-飞行时间质谱连用仪(UPLC-TOF-MS,美国Waters-G2-S公司)。

试剂:草甘膦异丙胺盐(有效成分30%,山东三农生物科技有限公司);草甘膦标准品草甘膦内标(1,2-C<sup>13</sup>N<sup>15</sup>草甘膦,上海安谱有限公司);乙酸铵、甲酸和36%盐酸(色谱纯,西陇科学股份有限公司);十水四硼酸钠和磷酸二氢钾(分析纯,西陇科学股份有限公司);甲酸铵(试剂级,西陇科学股份有限公司);乙腈和甲醇(色谱级,山东禹王和天下新材料有限公司);氯甲酸-9-苄基甲酯(FMOC-Cl,分析纯,纯度不低于99.0%,上海源叶生物科技有限公司);60 mg/3 mL阳离子交换柱(PCX,博纳艾杰尔科技公司);氨基酸衍生试剂盒(美国Waters公司)。

茶氨酸(theanine, Thea)、天冬酰胺(asparagine, Asn)、谷氨酰胺(glutamine, Glu)、豆叶氨酸和L-胱氨酸购自成都德思特生物技术公司;氨基酸混合标准储备液购自美国Sigma公司,包括:天冬氨酸(aspartic acid, Asp)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、丝氨酸(serine, Ser)、甘氨酸(glycine, Gly)、组氨酸(histidine, His)、苏氨酸(threonine, Thr)、丙氨酸(alanine, Ala)、精氨酸(arginine, Arg)、色氨酸(tryptophan, Try)、脯氨酸(proline, Pro)、酪氨酸(tyrosine, Tyr)、缬氨酸(valine, Val)、蛋氨酸(methionine, Met)、赖氨

酸(lysine, Lys)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、瓜氨酸(citrulline, Cit)、肌氨酸(sarcosine, Sar)、异亮氨酸(isoleucine, Ile)、乙醇胺(ethanolamine, EOHNH<sub>2</sub>)、鸟氨酸(ornithine, Orn)、DL-β-氨基异丁酸(β-aminoisobutyric acid, β-AiBA)、l-α-氨基己二酸(α-amino-adipate, α-AAA)、γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)、L-亮氨酸(leucine, Leu)、羟赖氨酸(hydroxylysine, Hy-Pro)、L-肌肽、半胱氨酸、羟基-L-脯氨酸、尿素、鹅肌肽、牛磺酸、δ-1-甲基-L-组氨酸、高胱氨酸、L-α-氨基丁酸、3-甲基-L-组氨酸、β-丙氨酸、L-肌酸酐、胱硫醚、氯化铵;儿茶素(catechin, C)、表儿茶素(epicatechin, EC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechingallate, EGCG)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallic acid catechin gallate, GCG)、儿茶素没食子酸酯(catechin gallate, CG)等8种儿茶素单体标准品购自香港 Farco chemical supplies 公司;茶叶碱和咖啡碱(caffeine, CA)标准品购自香港 Farco chemical supplies 公司;可可碱(theobromine, TB)标准品购自 Stanford Chemicals 公司,标准品纯度均大于98%。

## 1.2 测定指标及方法

### 1.2.1 草甘膦及氨甲基磷酸的测定

按照 SN/T 3983-2014《出口食品中氨基酸类有机磷除草剂残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》以 UPLC-MS/MS 测定样品中的草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸的含量。

### 1.2.2 游离氨基酸及其衍生物的测定

按照 Chen 等<sup>[1]</sup>的方法,具体如下:称取 0.050 g 待测茶样,加纯水定容至 5 mL,涡旋混匀,于 25 °C 超声提取 30 min,上清液移入离心管离心 5 min,取 10 μL 经 0.22 μm PTFE 滤膜过滤的提取液与 70 μL AccQ-Fluor 硼酸盐缓冲液(PH = 8.8)混合,加入 20 μL AccQ-Fluor 试剂(3 g/L),涡旋后于 55 °C 烘箱中反应 10 min,冷却至室温后采用 UPLC-MS/MS 进行测定。

色谱条件:HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱(Waters, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm);柱温:40 °C;流动相 A:甲酸铵水溶液(10 mmol/L),流动相 B:乙腈;流速:0.3 mL/min;洗脱梯度:0 ~ 12 min, 0% → 20% B;12 ~ 16 min, 20% → 35% B;16 ~ 18 min, 35% → 90% B;18 ~ 20 min, 90% → 5% B;进样体积:0.5 μL。质谱条件:电喷雾

电离,正离子模式;多反应监测模式;电喷雾电压,4.5 kV;气帘气压力:0.21 MPa;雾化气压力:0.38 MPa;辅助气压力:0.38 MPa;辅助气温度 550 °C。

### 1.2.3 生物碱和儿茶素组分的测定

按照 Zhou 等<sup>[12]</sup>的方法,具体如下:称取 0.100 g 待测茶样,加提取液(甲醇:乙腈:水 = 2:1:3, V/V)定容至 5 mL,涡旋后于室温下超声提取 30 min, 15 000 rpm 离心 3 min,取上清液至离心管,过 0.22 μm PTFE 滤膜后采用超高效液相色谱串联-飞行时间质谱连用仪 UPLC-TOF-MS 进行测定。

色谱条件:HSS T3 色谱柱(Waters, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm);柱温:40 °C;流动相 A:0.1% 甲酸,流动相 B:乙腈;流速:0.3 mL/min。梯度洗脱程序:0 ~ 10 min, 95% → 75% B;10 ~ 13 min, 75% → 48% B;13 ~ 15 min, 48% → 20% B;15 ~ 15.01 min, 20% → 5% B;15.01 ~ 17 min, 5% B;17 ~ 17.01 min, 5% → 95% B;进样体积:5 μL。质谱条件:电喷雾电离,负离子模式;毛细管电压:2.5 kV;扫描范围:50 ~ 1 200 Da;离子源温度:120 °C;去溶剂化温度:400 °C;去溶剂化流速:800 L/h。

## 1.3 数据统计与分析

通过 Excel 2010 进行数据统计,以“平均值 ± 标准偏差”表示每个处理组的试验结果;采用 IBM SPSS Statistics 19.0 的 ANOVA 进行组间差异显著性分析;将游离氨基酸、生物碱和儿茶素的定量结果进行标准化处理后以 Ttools 绘制热图;采用 SIMCA P 14.1 软件进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA);采用 Origin 2019 软件作柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 草甘膦施用后茶树叶片的药害表征及其残留

由图 1A 可知,45、450 和 900 mg/L 的草甘膦施用 33 天,相较于未施药前(0 天),茶树生长正常,叶片未出现干枯、皱缩和脱落等常见药害表征。现阶段,国家食品安全标准 GB 2763—2019 规定茶叶中草甘膦的最大残留限量(maximum residue limits, MRLs)为 1.0 mg/kg<sup>[3]</sup>,如图 1 B 所示,即使在 45 mg/L 较低施药剂量下,茶树叶片在 7 天和 33 天均检测到草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸(aminomethylphosphonic acid, AMPA)残留。叶片中的草甘膦含量在 7 天较高,达到 2.6 mg/kg (大于 MRLs),在 33 天已降低至 0.33 mg/kg (小于 MRLs);AMPA 含量在 7 天达 0.21 mg/kg,在 33 天降低至 0.08 mg/kg。

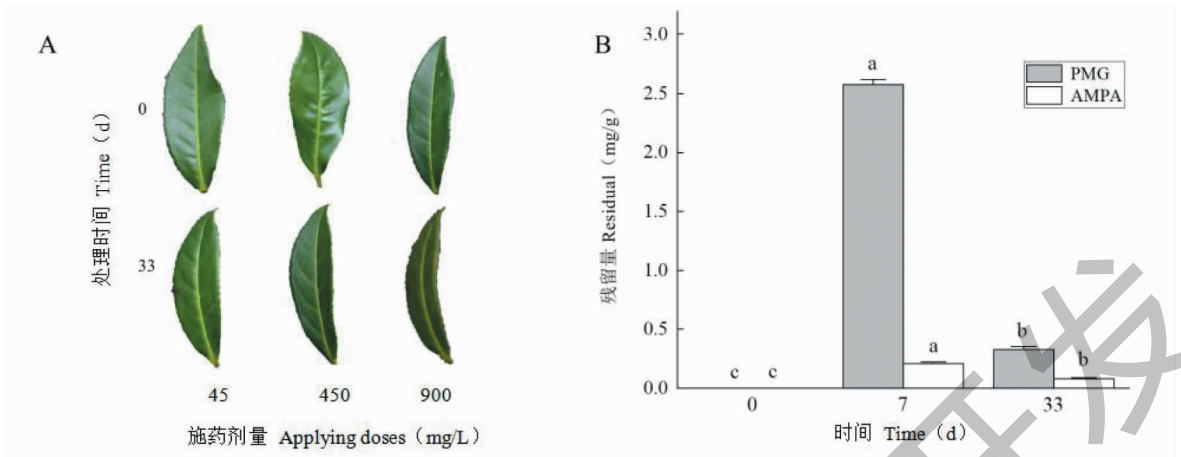


图1 草甘膦施用不同时间后的叶片表征(A)及茶树叶片中的草甘膦和氨甲基磷酸含量(B)

Fig. 1 Observation of the phytotoxicity (A) and the content of PMG and AMPA in tea leaves (B) under the spraying of PMG at different times

## 2.2 草甘膦对茶树叶片游离氨基酸含量的影响

本试验样品共定量到 28 个游离氨基酸组分(见表 1),其中的 27 个游离氨基酸组分的含量在施药后发生显著性变化( $P < 0.05$ ),游离氨基酸总量在草甘膦施药 7 天和 33 天均显著降低( $P < 0.05$ )。茶氨酸的含量在 7 天和 33 天下降较明显,降幅分别达到 38.03% 和 62.03%;苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的含量在草甘膦施用后 7 天升高,在施用后 33 天降低并低于施用前(0 天)。此外,谷氨酸、谷氨酰

胺、天冬氨酸、甘氨酸、组氨酸、蛋氨酸、鸟氨酸的含量在 7 天和 33 天均显著降低;肌氨酸、羟脯氨酸、赖氨酸和精氨酸的含量在草甘膦喷施后 7 天变化不显著,在 3 天后显著上升;苏氨酸、丙氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸在 7 天变化不显著,在 33 天显著降低;脯氨酸、缬氨酸、天冬酰胺、异亮氨酸、乙醇胺、L-2-氨基己二酸和丝氨酸的含量在 7 天显著升高,在 33 天显著降低; $\beta$ -氨基异丁酸和亮氨酸在 7 天显著升高,在 33 天变化不显著。

表 1 草甘膦施用对茶树叶片游离氨基酸组分含量的影响( $n = 6$ )

Table 1 The content of amino acids in tea leaves after glyphosate applying ( $n = 6$ )

游离氨基酸 Amino acids (mg/g)	处理时间 Time(d)		
	0	7	33
茶氨酸 Thea	14.75 ± 0.68 <sup>a</sup>	9.14 ± 0.77 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.47 <sup>c</sup>
谷氨酸 Glu	5.46 ± 0.36 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.26 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.16 <sup>c</sup>
谷氨酰胺 Gln	4.49 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.08 <sup>c</sup>
天冬氨酸 Asp	5.23 ± 0.53 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.18 ± 0.32 <sup>a</sup>
甘氨酸 Gly	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>c</sup>
组氨酸 His	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>c</sup>
蛋氨酸 Met	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
鸟氨酸 Orn	0.05 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>b</sup>
肌氨酸 Sar	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>a</sup>
羟脯氨酸 Hy-Pro	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lys	0.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>a</sup>
精氨酸 Arg	3.71 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.98 ± 0.29 <sup>b</sup>	5.90 ± 0.50 <sup>a</sup>
瓜氨酸 Cit	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>
苏氨酸 Thr	0.53 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>

续表 1 (Continued Tab. 1)

游离氨基酸 Amino acids (mg/g)	处理时间 Time(d)		
	0	7	33
丙氨酸 Ala	0.58 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>b</sup>
γ-氨基丁酸 GA-BA	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>
脯氨酸 Pro	0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>c</sup>
酪氨酸 Tyr	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>c</sup>
缬氨酸 Val	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phe	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>c</sup>
天冬酰胺 Asn	0.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>
异亮氨酸 Ile	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>c</sup>
乙醇胺 EOHNH <sub>2</sub>	0.35 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>c</sup>
L-2-氨基己二酸 α-AAA	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>c</sup>
丝氨酸 Ser	1.09 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.05 <sup>c</sup>
色氨酸 Trp	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>
β-氨基异丁酸 β-AIBA	0.06 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>
亮氨酸 Leu	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>
游离氨基酸总量 Total amino acids	37.81 ± 2.00 <sup>a</sup>	28.74 ± 1.81 <sup>b</sup>	25.18 ± 1.17 <sup>c</sup>

注:表中数据使用平均值 ± 标准偏差表示,同一行不同上标字母表示在 0.05 水平差异显著 ( $P < 0.05$ ),下同。

Note: The data in the table is expressed by mean ± SD, different superscript letters in the same row indicate significant differences at the 0.05 level ( $P < 0.05$ ), the same below.

### 2.3 草甘膦对茶树叶片儿茶素类化合物含量的影响

本试验共有 6 个儿茶素组分的含量高于定量限(见表 2),其中,6 个儿茶素组分的样品组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ),儿茶素总量在草甘膦施用后 7

天和 33 天均显著下降。此外,草甘膦施用后,C 和 EC 的含量在 7 天降低,在 33 天升高;而 EGC 和 GC 的含量在 7 天升高,在 33 天降低;ECG 和 EGCG(酯型儿茶素)的含量在 7 天和 33 天均下降。

表 2 草甘膦施用对茶树叶片儿茶素组分含量的影响 ( $n = 6$ )Table 2 The content of catechins in tea leaves after glyphosate applying ( $n = 6$ )

儿茶素类 Catechins (mg/g)	处理时间 Time(d)		
	0	7	33
儿茶素 C	0.43 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>
表儿茶素 EC	11.23 ± 0.16 <sup>a</sup>	10.47 ± 0.16 <sup>b</sup>	11.77 ± 0.03 <sup>a</sup>
表没食子儿茶素 EGC	30.06 ± 0.25 <sup>a</sup>	30.37 ± 0.36 <sup>a</sup>	29.39 ± 0.44 <sup>b</sup>
没食子儿茶素 GC	4.17 ± 0.13 <sup>ab</sup>	4.31 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.12 ± 0.20 <sup>b</sup>
表儿茶素没食子酸酯 ECG	12.20 ± 0.24 <sup>a</sup>	10.59 ± 0.14 <sup>b</sup>	9.84 ± 0.15 <sup>c</sup>
表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG	45.30 ± 0.47 <sup>a</sup>	44.91 ± 0.67 <sup>a</sup>	40.11 ± 0.61 <sup>b</sup>
儿茶素总量 Total catechins	103.39 ± 0.96 <sup>a</sup>	101.01 ± 1.16 <sup>b</sup>	95.69 ± 1.24 <sup>c</sup>

### 2.4 草甘膦对茶树叶片生物碱类化合物含量的影响

本试验样品共定量到 2 个生物碱组分(见表 3),2 种生物碱组分的样品组间均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ),生物碱总量在草甘膦施用后 7 天显著升高,在 33 天显著下降。可可碱的含量在 7 天和

33 天均持续性地显著降低,而咖啡碱的含量在 7 天显著上升,在 33 天显著降低且低于处理前(0 天)。

### 2.5 草甘膦对茶树叶片主要生化成分影响的多元统计分析

#### 2.5.1 热图可视化分析

为更直观地反映各组间样品的含量变化规律及

表3 草甘膦施用对茶树叶片生物碱含量的影响 ( $n=6$ )  
Table 3 The content of alkaloids in tea leaves after glyphosate applying ( $n=6$ )

生物碱类 Alkaloid (mg/g)	处理时间 Time(d)		
	0	7	33
可可碱 TB	0.95 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>c</sup>
咖啡碱 CA	20.67 ± 0.08 <sup>b</sup>	22.50 ± 0.17 <sup>a</sup>	18.90 ± 0.24 <sup>c</sup>
生物碱总量 Total alkaloids	21.63 ± 0.14 <sup>b</sup>	23.07 ± 0.26 <sup>a</sup>	19.28 ± 0.35 <sup>c</sup>

组内样品的聚集模式,将上述生物碱、儿茶素和游离氨基酸组分的定量结果进行标准化并绘制热图。如图2所示,组内样品聚集良好,组间样品得以完全区分。36种化学组分按照其含量变化特征聚为两类:A类中的7个组分含量在33天明显升高,B类中的

27个组分含量在33天明显下降。其次,A1类4个组分含量在7天变化不明显,A2类3个组分含量在7天下降;B1类18个组分含量在7天升高,B2类9个组分含量在7天下降,GC和Cit的变化趋势不明显。

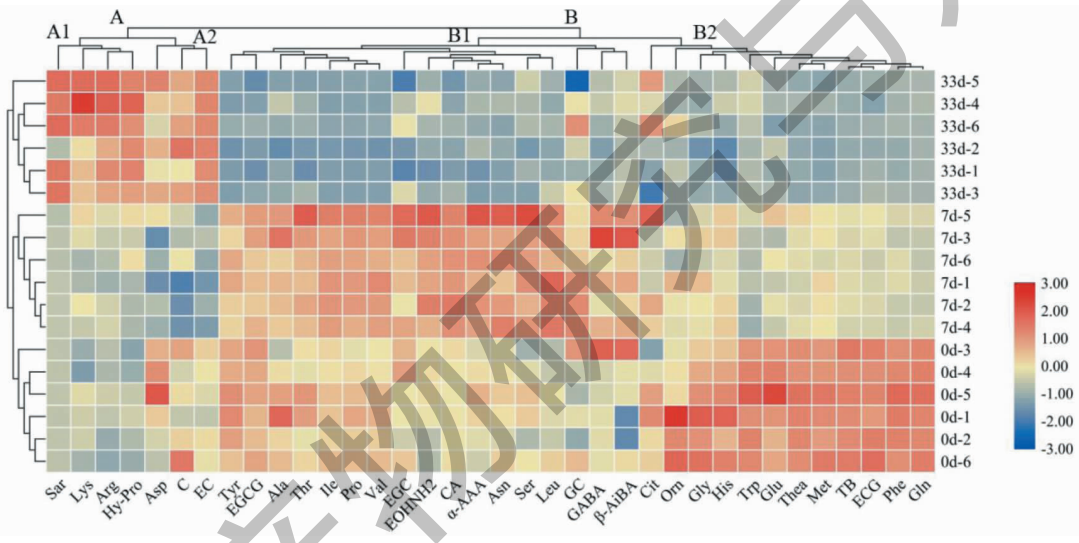


图2 草甘膦施用后茶树叶片中36种化学组分的含量热图

Fig. 2 Heat map of 36 chemical components in tea leaves after glyphosate applying

注:颜色刻度表示标准化转换后的值,蓝色表示低含量水平;红色表示高含量水平。Note: The color scale indicates the standardized converted value, blue indicates a low content level; red indicates a high content level.

### 2.5.2 偏最小二乘判别分析(PLS-DA)

为进一步确定各组样品间的差异,对36种茶叶代谢组分进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)。由图2A可知,模型累积方差贡献率为95.3%,预测准确率为98.5%,表明了该模型用于区分样品的可行性。图3B显示了PLS-DA模型的交叉验证结果,图中左侧所有的 $R^2$ 和 $Q^2$ 点均低于最右侧的 $R^2$ 和 $Q^2$ 原始点,纵轴截距( $R^2 = 0.174$ ,  $Q^2 = -0.361$ )进一步表明原始模型的有效性。由图2B可知,0天、7天和33天的样品分别位于第四、一和三象限,0天和7天的样品在 $t[2]$ 轴上完全分开,0天和33天的样品在 $t[1]$ 轴上完全分开,7天和33天的样品需

[1]轴和 $t[2]$ 轴相结合才能区分。由此可见,草甘膦喷施后7天和33天的样品差别较小,而与草甘膦喷施前的样品(0天)存在较大差异。

如图3D所示,共有10种化合物的VIP(variable importance for the projection, VIP)值大于1,变量VIP值由高至低依次是茶氨酸(Thea)、咖啡碱(CA)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、谷氨酰胺(Gln)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表儿茶素(EC)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和表没食子儿茶素(EGC)。此外,这10种化合物在因子载荷图(见图3C)中发现这些化合物均属于离密集区较远的变量。



变量对分类越关键<sup>[19]</sup>,VIP 总结变量 X(代谢组分)和自变量 Y(样品)相关性,VIP 值大于 1,表示该代谢组分对样品组间区分的贡献较大<sup>[20]</sup>,共有 10 个化合物的 VIP 值大于 1,且在因子载荷图中属于离密集区较远的变量,依次是茶氨酸、咖啡碱、表没食子儿茶素没食子酸酯、谷氨酰胺、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和表没食子儿茶素。此外,这 10 个化合物的绝对含量在 0、7 和 33 天均具有显著差异( $P < 0.05$ ),因此,这 10 个化合物是区分茶树草甘膦施用前(0 天)和施用后(7 天和 33 天)的关键化合物。

#### 4 结论

草甘膦在茶树叶片中残留时间较长,并存在草甘膦残留超标及 AMPA 生物毒性的风险;其次,草甘膦的施用能够间接阻止茶树叶片中茶氨酸、可可碱、表儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯等组分的合成,并改变茶树嫩梢的游离氨基酸、儿茶素和生物碱类化合物的总量及其组分构成,最终影响鲜叶品质。此外,通过多元统计分析筛选出 10 个茶树草甘膦施用前后差异较大的关键化合物,变量 VIP 值由高至低依次为:茶氨酸、咖啡碱、表没食子儿茶素没食子酸酯、谷氨酰胺、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和表没食子儿茶素。因此,建议在茶叶生产中尽量不使用草甘膦除草剂。

#### 参考文献

- Tang XY, Shao ZL, Yang LC, et al. Uptake, translocation, distribution and metabolism of glyphosate in target weeds and non-target tea trees in tea garden[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9(18):140-145.
- Su J, Li G, Wu MJ, et al. Fitness of transgenic glyphosate-tolerant rice in different habitats and its influence on paddy field weeds[J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2015, 21:897-903.
- Yang YQ, Feng SH, Hu YJ, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residue in green tea by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2020, 1(40):125-132.
- Smedbol é, Lucotte M, Maccario S, et al. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid content in glyphosate-resistant soybean leaves, stems, and roots and associated phytotoxicity following a single glyphosate-based herbicide application[J]. J Agr Food Chem, 2019, 67:6133-6142.
- Helander M, Panuna A, Saikkonen K, et al. Glyphosate residues in soil affect crop plant germination and growth[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):19653.
- Reddy KN, Bellaloui N, Zablutowicz RM. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn[J]. J Agr Food Chem, 2010, 58:3646-3650.
- Kanissery R, Gairhe B, Kadyampakeni D, et al. Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition[J]. Plants, 2019, 8(11):499.
- Gao W, Zhang Y, Tong M, et al. Weeds control effect and residues of several herbicides in tea gardens[J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2019, 39:587-594.
- Tong M, Gao W, Jiao W, et al. Uptake, translocation, metabolism, and distribution of glyphosate in nontarget tea plant (*Camellia sinensis* L.) [J]. J Agr Food Chem, 2017, 65:7638-7646.
- Guo YC, Chen JF, Zhao F, et al. Study on the distribution of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in *Camellia sinensis* [J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2020, 40:510-518.
- Chen SR, Zhao F, Wang SY, et al. Analysis of free amino acids in tea based on AQC derivation with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J South Agr(南方农业学报), 2019, 50:2278-2285.
- Zhou P, Hu O, Fu H, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based untargeted metabolomics coupled with chemometrics approach for Tieguanyin tea with seasonal and year variations [J]. Food Chem, 2019, 283:73-82.
- Guiherme S, Santos MA, Gaivao I, et al. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)—the major environmental breakdown product of glyphosate [J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21:8730-8739.
- Zhan H, Feng Y, Fan X. Recent advances in glyphosate biodegradation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102:5033-5043.
- Fu H, Wei X, Fu H, et al. Research progress of shikimic acid pathway in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种): 1-20 [2020-11-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200109.1436.006.html>.
- Malalgoda M, Ohm JB, Howatt KA, et al. Effects of pre-harvest glyphosate use on protein composition and shikimic acid accumulation in spring wheat [J]. Food Chem, 2020, 332:127422.