



引用格式:李诗平,马林,朱栋梁,等. 二肽 Amadori 中间体的合成、表征及在卷烟中的应用 [J]. 轻工学报,2016,31(5):8-14.

中图分类号:TS41⁺3;TS264.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.5.002

文章编号:2096-1553(2016)05-0008-07

二肽 Amadori 中间体的合成、表征及在卷烟中的应用

Amadori compounds of dipeptides: synthesis, characterization and application in cigarettes

李诗平^{1,2},马林¹,朱栋梁²,陈开波²,周顺²,张亚平²,
王孝峰²,何庆²

LI Shi-ping^{1,2},MA Lin¹,ZHU Dong-liang²,CHEN Kai-bo²,ZHOU Shun²,
ZHANG Ya-ping²,WANG Xiao-feng²,HE Qing²

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
 2. 安徽中烟工业有限责任公司 烟草化学安徽省重点实验室,安徽 合肥 230088
1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. China Tobacco Anhui Industrial Co., Ltd., Anhui Key Laboratory of Tobacco Chemistry, Hefei 230088, China

关键词:
二肽; Amadori 中间体; Maillard 反应; 卷烟加香

Key words:
dipeptide; Amadori compounds; Maillard reaction; cigarette flavoring

摘要:以具有代表性的三种二肽 Gly-Gln, Ala-Gln 和 Gly-Gly 为氮源,以葡萄糖为糖源,制备了三种二肽 Amadori 中间体 (APs). 采用 HPLC 监控反应进程以比较三种二肽的反应活性,其顺序依次为 Ala-Gln > Gly-Gln > Gly-Gly. 采用 LC-MS/MS 和 ESI-MS/MS 对三种二肽的 APs 的纯度及断裂模式进行表征和分析,结果表明,三种二肽 APs 的 LC/MS 纯度分别可达 95% (Gly-Gln-APs)、97% (Ala-Gln-APs) 和 98% (Gly-Gly-APs),三种二肽 APs 断裂模式相似,主要碎片离子包括丢失糖分子形成的 [M - 162]⁺ 和 [M - 180]⁺ 碎片离子,以及丢失水分子形成的 [M - 36]⁺ 和 [M - 84]⁺ 离子. 加香应用评价表明,三种二肽 APs 皆能与烟香协调,提高香气量和烟气浓度,其中 Ala-Gln-APs 添加效果最好,对卷烟的香气特征和口感特性皆有明显的正面作用.

收稿日期:2016-01-23

基金项目:安徽中烟工业有限责任公司科技项目(2014112)

作者简介:李诗平(1975—),男,安徽省安庆市人,安徽中烟工业有限责任公司工程师,郑州轻工业学院硕士研究生,主要研究方向为烟草化学.

通信作者:马林(1964—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术和卷烟工艺.

Abstract: Three dipeptide Amadori intermediates (APs) were prepared by three representative dipeptide Gly-Gln, Ala-Gln and Gly-Gly as the nitrogen source, and glucose as sugar sources. The reaction process was monitored by HPLC to compare reactivity of dipeptides, the reactivity order is Ala-Gln > Gly-Gln > Gly-Gly. The purity and fracture modes of three dipeptide APs were characterized and analysis using LC-MS/MS and ESI-MS/MS. The results showed that the LC/MS purity of three dipeptide APs was up to 95% (Gly-Gln-APs), 97% (Ala-Gln-APs) and 98% (Gly-Gly-APs). Three fracture pattern of dipeptide APs was similar, the main fragment ions including loss of sugar molecules formed $[M-162]^+$ and $[M-180]^+$ fragment ions; and loss of water molecule is formed $[M-36]^+$ and $[M-84]^+$ ions. The cigarette application evaluation showed that the three dipeptide APs have encountered with incense smoke harmonize and improve the aroma and the amount of gas concentration, wherein Ala-Gln-APs shows the best effects. An obvious positive effect could be found both in aroma and taste characteristics.

0 引言

Maillard 反应是一类非酶促棕色化反应,是在氨基化合物与羰基化合物之间进行的一系列复杂反应^[1-2]. 在烟草、食品加工过程中, Maillard 反应是影响香味和颜色的重要反应^[3],在烟叶调制、醇化及卷烟加工、贮藏、燃吸等过程中 Maillard 反应始终在发生,是形成均衡、丰富烟气香味不可缺少的因素.

Amadori 中间体 (APs) 是 Maillard 反应的关键中间产物,它是 Maillard 反应初期由 N-取代葡萄糖胺转化而来的^[4]. Maillard 后续反应从 APs 开始进行,APs 自身是没有芳香气味的非挥发性物质,但它能在不同的反应条件下及卷烟燃吸过程中生成各种芳香物质,已经发现 APs 是烟草^[5]和食品的重要潜香物质.

肽广泛存在于食品和蛋白酶解物中,被认为是 Maillard 反应中重要的风味增香剂和前体物^[6-7]. 小分子肽与还原糖发生的 Maillard 反应同样会产生大量香味成分,其中有些香味成分是肽类物质 Maillard 反应所特有的. 新鲜烟叶通常含有较多的蛋白质^[8],烟叶在调制、复烤和醇化过程中,蛋白质在蛋白酶的作用下不断分解和转化,降解为游离氨基酸和低分子肽^[9].

目前,氨基酸与还原糖之间 Maillard 反应的研究已广泛而深入,而有关肽和蛋白质作为

氮源的 Maillard 反应的研究相对较少. 本项目组前期研究对不同类型烟叶中游离二肽的组成及含量差异进行了分析和比较^[10],本文将筛选具有代表性的三种二肽作为氮源,以葡萄糖为糖源,进行二肽 APs 的制备,并评价其在烟草加香中的作用.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

材料:甘氨酸-L-谷氨酰胺-水合物(简称甘谷二肽, Gly-Gln)、N-(2)-L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(简称丙谷二肽, Ala-Gln)、N-甘氨酸甘氨酸(简称双甘氨酸, Gly-Gly),纯度 $\geq 98\%$,均购自上海三杰生物技术有限公司;无水葡萄糖、焦亚硫酸钠、甲醇、异丙醇,均为分析纯级,购自国药集团;硼酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH = 10.4)、氯甲酸-9-芴基甲酯(Fmoc-Cl),分析纯, Sigma 公司产;空白卷烟,香料评价专用,安徽中烟工业有限责任公司试制.

仪器:4000 Q Trap 质谱仪,美国应用生物系统公司产;Waters Acquity 超高压液相色谱仪(UPLC),美国 Waters 公司产;Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司产;RE-2000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂产;JK-250B 超声波清洗器,合肥金尼克机械制造有限公司产;DF-101S 控温油浴锅,金坛市晶波实验仪器厂产.

1.2 二肽 APs 的合成

优化文献[11]方法合成三种二肽 APs: 准确称取 10 g D-葡萄糖(56 mmol)、2 g 焦亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 10 mmol)、1.5 g 水置于 3 个烧瓶中, 摇晃混匀后, 置于 95 °C 油浴中加热 0.5 h, 待瓶内混合物成为均匀糖浆状, 且温度稳定后, 分别加入 13 mmol 二肽(对应三种二肽质量分别为 Gly-Gln 2.9 g, Ala-Gln 2.8 g, Gly-Gly 1.6 g), 并不时搅拌, 继续上述 95 °C 反应, 每 0.5 h 取样进行高效液相色谱(HPLC)分析, 2 h 后停止反应, 并冷却至室温。

在上述产物中加入 20 mL 甲醇, 40 °C 下超声分散, 冷却、离心后取上清液, 搅拌下滴入 100 mL 异丙醇中。将沉淀物抽滤, 常温真空干燥, 得淡黄色固体粗产物, 三种二肽 APs 粗产物质量分别为 Gly-Gln-APs 3.3 g, Ala-Gln-APs 3.8 g, Gly-Gly-APs 1.8 g。产物用甲醇重结晶, 得白色粉末状沉淀, 对应的三种二肽 APs 精提物质量分别为 Gly-Gln-APs 2.6 g, Ala-Gln-APs 2.7 g, Gly-Gly-APs 1.3 g, 真空干燥后 -15 °C 冷冻保存。

1.3 二肽的 HPLC 分析

依参考文献[10, 12-13]方法, 取 500 μg 上述反应混合物溶于 2.5 mL 硼酸盐缓冲液中, 加入 Fmoc-Cl 衍生化试剂(500 μL , 5.8 mmol/L

于丙酮中), 剧烈搅拌反应, 反应产物分别用正戊烷: 乙酸乙酯 = 80 : 20(质量比)的溶剂 2 mL 萃取两次, 合并水相进行 HPLC 分析。测定条件如下。

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C-18 柱(2.1 mm \times 50 mm \times 1.7 μm); 柱温 25 °C; 流动相为 0.045% TFA/水溶液(A), 0.050% TFA/80% 乙腈水溶液(B); 流速 0.3 mL/min; 洗脱梯度为 95% A + 5% B(0 ~ 2 min), 40% A + 60% B(2 ~ 10 min), 0% A(10 ~ 19 min), 95% A + 5% B(19 ~ 20 min); 进样量 10 μL 。紫外吸收检测器, 吸收波长 265 nm。

1.4 二肽 APs 的 LC-MS/MS 表征

准确称取 1 mg 二肽 APs 于 100 mL 水中, 进行 LC-MS/MS 分析, 测定条件如下。

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C-18 柱(2.1 mm \times 50 mm \times 1.7 μm); 流动相为甲醇(60%) 和 0.1% 醋酸铵水溶液(40%); 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL 。电离模式为电喷雾(ESI)正离子模式; 电喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 550 °C; 去簇电压(DP)为 40 V; 扫描时间 1 s。检测模式为全扫描(SCAN)及多反应监测模式(MRM), 通过针泵进样优化 MRM 参数, 优化结果见表 1。

表 1 二肽 APs MRM 参数

Table 1 MRM parameters of dipeptides APs

二肽	APs	$[\text{M} + \text{H}]^+ (m/z)$	MS/MS 离子 (m/z)	丢失 (m/z)	丢失碎片	CE/V	CXP/V
Gly-Gln	单糖化	383	348	36	-2H ₂ O	12	9
			203	180	-C ₆ H ₁₂ O ₆	13	12
	双糖化	546	510	36	-2H ₂ O	12	7
			366	180	-C ₆ H ₁₂ O ₆	14	7
Ala-Gln	单糖化	380	296	84	-3H ₂ O - CHO	22	5
			218	162	-C ₆ H ₁₂ O ₅	23	13
	双糖化	542	458	84	-3H ₂ O - CHO	27	7
			326	216	-2H ₂ O - C ₆ H ₁₂ O ₆	30	11
Gly-Gly	单糖化	295	211	84	-3H ₂ O - CHO	21	14
	双糖化		133	162	-C ₆ H ₁₂ O ₅	25	7

1.5 二肽 APs 的加香应用评价

分别取 0.1 g 二肽 APs,用 75% 酒精稀释定容至 100 mL,采用加香注射机对每支卷烟加香注射 20 μL ,折算加香量为 30 $\mu\text{g/g}$.将加香的卷烟样品置于温度(22 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 \pm 3)%的环境下平衡 48 h,而后进行评吸.

感官评吸组由 9 位专业评委组成,全体评委统一评吸.以未加香卷烟作为对照样,采用对比评吸的方法进行评价.每位评吸人员比较试验样品与对照样品感官差异程度,并描述加香感官效果,按照 ABC 三级(A 级为具有应用价值的新型香原料,能提升香气品质而无负面作用;B 级具有较好的香气特性,能提供某些特色;C 级单独使用时,作用很小或具有负面作用.)进行打分,结果取各评吸人员打分的均值.

2 结果与讨论

2.1 三种二肽反应活性比较

图 1 为 Ala-Gln 与葡萄糖反应 0.5 h 后取样 HPLC 测试结果,可以看出,通过 HPLC 测定反应体系中游离二肽的含量变化,可以监控二肽的反应活性和反应进程.

图 2 为三种二肽反应体系的反应进程比较.从图中可看出,三种二肽的反应活性顺序依次为 Ala-Gln > Gly-Gln > Gly-Gly,由极性氨基

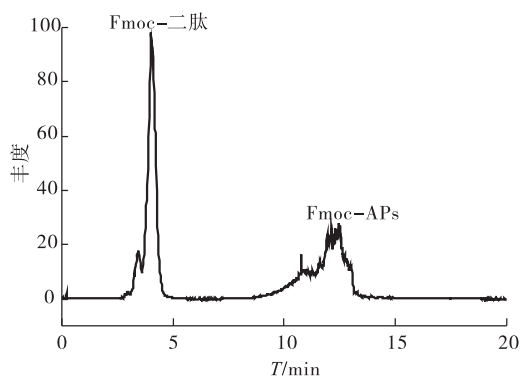


图 1 Ala-Gln 反应体系的 HPLC 图
(反应 0.5 h 后)

Fig. 1 HPLC spectrum of the reaction mixture containing Ala-Gln and glucose after 0.5 h of heating

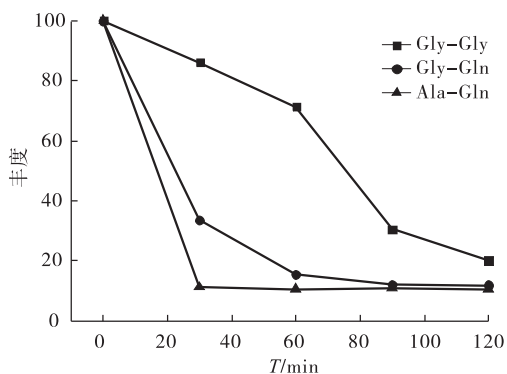


图 2 三种二肽反应体系的反应进程比较
Fig. 2 Time-course reaction of the mixtures constituted by dipeptides

酸 Gly 构成的双甘氨酸 Gly-Gly 反应活性最低,而包含非极性的氨基酸基团(如 Ala, Gln),能够明显提高二肽的反应活性,这与前人的研究结论^[14]是吻合的.三种二肽的反应体系在反应 120 min 后均趋于稳定,为减少更多副反应的发生,实验选择反应时间为 120 min.

2.2 二肽 APs 的 LC-MS/MS 表征

图 3 为三种二肽 APs 在 LC-MS 中的全扫描质谱图.由图 3 可以看出,Gly-Gln 和 Ala-Gln 两种二肽由于存在两个游离氨基,其 APs 不仅有单糖化化合物,还存在部分双糖化化合物.通过外标法计算三种二肽 APs 的 LC-MS 纯度分别可达 95% (Gly-Gln-APs),97% (Ala-Gln-APs) 和 98% (Gly-Gly-APs).前人研究对于 APs 的提纯往往需要通过柱层析^[14-16]或者柱分离^[11,17]等方式,操作繁琐且难以实现工业化.本方法合成与提纯简便,适用于 APs 的规模化生产,具有较好的应用前景.

图 4 以 Gly-Gln-APs 为例,说明了二肽 APs 在 ESI-MS/MS 电离模式下的断裂模式.结合表 1 可以看出,三种二肽 APs 断裂模式相似,主要碎片离子包括丢失糖分子形成的 $[\text{M} - 162]^+$ 和 $[\text{M} - 180]^+$ 碎片离子,以及丢失水分子形成的 $[\text{M} - 36]^+$ 和 $[\text{M} - 84]^+$ 离子,这与前人研究中对于氨基酸 Amadori 中间体在 ESI 中

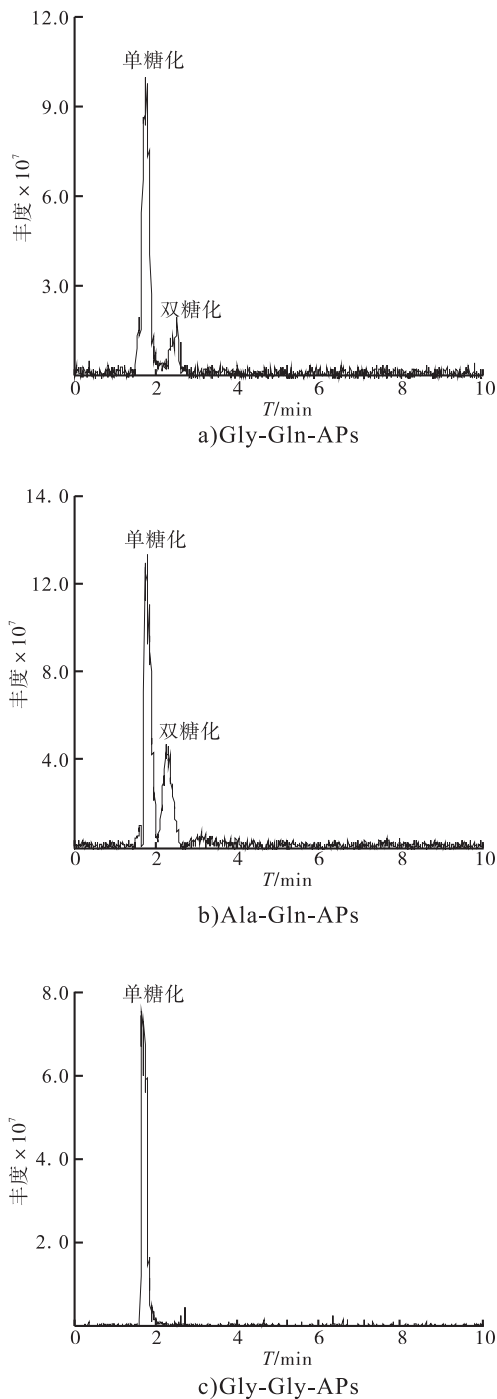


图3 三种二肽 APs 的 LC-MS 图

Fig.3 LC-MS spectrum of dipeptides APs

的断裂模式是一致的^[15-16]。

2.3 二肽 APs 的加香应用评价

三种二肽 APs 分别以 30 $\mu\text{g/g}$ 的比例添加到试制卷烟中,评价其在卷烟中的添加效果,结果见表 2。

从表 2 可以看出,三种二肽 APs 皆能与烟香谐调,能够提高香气量和烟气浓度,其中 Ala-Gln-APs 增香效果最好,对卷烟的香气特征和口感特性皆有明显的正面作用。

3 结论

1) 以具代表性的三种二肽 Gly-Gln, Ala-Gln 和 Gly-Gly 为氮源,以葡萄糖为糖源,制备出了三种二肽 APs,其合成及提纯方法简便,具有较好的应用前景。

2) 采用 HPLC 监控反应进程,比较了三种二肽的反应活性,活性顺序依次为 Ala-Gln > Gly-Gln > Gly-Gly。

3) 分别采用 LC-MS/MS 和 ESI-MS/MS 对三种二肽 APs 的纯度与断裂模式进行了表征和分析。三种二肽 APs 的 LC/MS 纯度分别可达 95% (Gly-Gln-APs)、97% (Ala-Gln-APs) 和 98% (Gly-Gly-APs)。三种二肽 APs 断裂模式相似,主要碎片离子包括丢失糖分子形成的 $[M - 162]^+$ 和 $[M - 180]^+$ 碎片离子,以及丢失水分子形成的 $[M - 36]^+$ 和 $[M - 84]^+$ 离子。

4) 加香应用评价结果表明,三种二肽 APs 皆能与烟香谐调,能够提高香气量和烟气浓度,其中 Ala-Gln-APs 增香效果最好,对卷烟的香气特征和口感特性皆有明显的正面作用。

参考文献:

- [1] WALLER G R, FEATHER M S. The Maillard reaction in food and nutrition[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1983: 3-18.
- [2] NURSTEN H. The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications[M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005: 1-30.
- [3] AMES J M. Applications of the Maillard reaction in the food chemistry[J]. Food Chemistry, 1998, 62: 431.

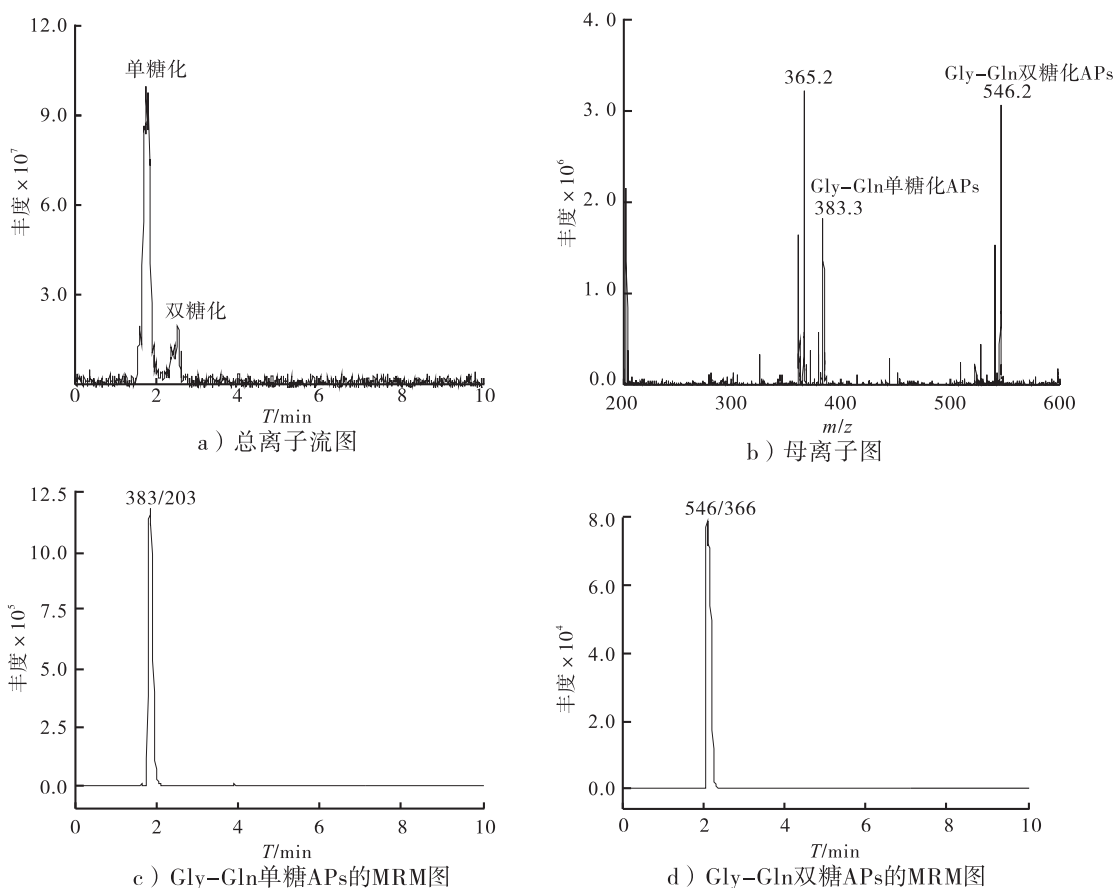


图4 Gly-Gln-APs的ESI-MS/MS图

Fig. 4 ESI-MS/MS spectrum of Gly-Gln-APs

表2 二肽 APs 添加效果评价表

Table 2 Sensory quality of cigarettes added with dipeptides APs

序号	Amadori 潜香香料	添加效果	评价等级
1	Gly-Gln-APs	烟香较谐调,香气量增加,烟气浓度提高,刺激性略有增加,可掩盖杂气	B+
2	Ala-Gln-APs	烟香谐调,香气质提升,香气量增加,可掩盖杂气,降低刺激性,改善余味,烟气细腻柔和	A-
3	Gly-Gly-APs	烟香较谐调,香气量增加、烟气浓度提高,刺激性略有增加,可掩盖杂气	B+

[4] WRODNIGG T M, EDER B. The Amadori and heyns rearrangements; Landmarks in the history of carbohydrate chemistry or unrecognized synthetic opportunities [J]. Top Curr Chem, 2001, 215: 115.

[5] NOGUCHI M, SATOH Y, NISHIDA K, et al. Studies on storage and ageing of leaf tobacco [J]. Agr Biol Chem, 1971, 35: 65.

[6] AASLYNG M D, MARTENS M, POLL L, et al. Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring [J].

J Agric Food Chem, 1998, 46(2): 481.

[7] OH Y C, SHU C K, HO C T. Formation of novel 2(1H)-pyrazinones as peptide-specific Maillard reaction products [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40(1): 118.

[8] 赵谋明, 饶国华, 林伟锋. 烟草蛋白质研究进展 [J]. 烟草科技, 2005(4): 31.

[9] GAWORSKI C L, HECK J D, BENNETT M B, et al. Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco; Skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR

- mice[J]. *Toxicology*, 1999, 139: 1.
- [10] 何庆,朱栋梁,张晓宇,等. 不同类型烟叶中游离二肽的组成及含量差异分析[J]. *中国烟草学报*, 2015(4): 1.
- [11] ZHI G H, CHI Y L, BAI M X, et al. Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1147(2): 165.
- [12] FRED J, JOHN P Q, CRAIG M W. LC/ESI-MS determination of proteins using conventional liquid chromatography and ultrasonically assisted electrospray[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 3688.
- [13] MELUCCI D, XIE M, RESCHIGLIAN P, et al. Fmoc-Cl as derivatizing agent for the analysis of amino acids and dipeptides by the absolute analysis method [J]. *Chromatographia*, 1999, 49: 317.
- [14] CARMELA M, MARIANNA V, AURORA N, et al. Glycation of lysine-containing dipeptides [J]. *Journal of Peptide Science*, 2006 (12): 291.
- [15] HORVAT S, JAKAS A. Peptide and amino acid glycation: New insight into the Maillard reaction [J]. *J Pept Sci*, 2004(10): 119.
- [16] YEBOAH F K, YAYLAYAN V A. Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects[J]. *Food*, 2001, 45: 164.
- [17] TOMAS D, NATHALIE C, STEA P D, et al. Simultaneous quantitative analysis of Maillard reaction precursors and products by high-performance anion exchange chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 7259.