



李石头,毕一鸣,帖金鑫,等. 基于UHPLC法的巨豆三烯酮前体物同分异构体的定量分析及其在不同产地烟叶中的分布情况[J]. 轻工学报,2023,38(5):83-87.
LI S T, BI Y M, TIE J X, et al. Quantitative analysis of isomers of megastigmatrienone precursors based on UHPLC method and their distribution in tobacco leaves from various geographic origins [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(5): 83-87. DOI: 10. 12187/2023. 05. 011

基于UHPLC法的巨豆三烯酮前体物同分异构体的定量分析及其在不同产地烟叶中的分布情况

李石头¹, 毕一鸣¹, 帖金鑫¹, 杨晨², 李庆祥¹, 李永生¹, 杨鹏飞², 毛多斌²

1. 浙江中烟工业有限责任公司 技术中心, 浙江 杭州 310000;
2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001

摘要: 以烟叶中重要致香成分巨豆三烯酮前体物(3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷)两种同分异构体,即(6*R*, 9*R*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(*rr*OIPG)和(6*R*, 9*S*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(*rs*OIPG)为研究对象,建立超声辅助萃取-超高效液相色谱法对*rr*OIPG和*rs*OIPG进行定量分析,并利用该方法考查国内外7个产地烟叶中两种同分异构体的分布情况。结果表明:*rr*OIPG和*rs*OIPG分别在25.85~258.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.9991$)和6.28~62.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.9990$)内具有良好的线性关系,检出限分别为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,仪器精密度较高,样品的稳定性和重复性较好,加标回收率分别为83.94%和105.90%,*RSD*分别为1.22%和1.93%;根据*rr*OIPG和*rs*OIPG含量分布可较好地区分国内外产地烟叶,国外产地烟叶中*rs*OIPG含量明显高于国内产地烟叶,且国内外产地烟叶中*rr*OIPG的含量均高于*rs*OIPG。该方法可行性较好,前处理步骤简单,适用于烟叶中*rr*OIPG和*rs*OIPG的定量分析。

关键词: 3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷;同分异构体;超高效液相色谱法;定量分析

中图分类号: TS41 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2023)05-0083-05

0 引言

巨豆三烯酮是一种重要的中性香味成分,具有甜润的烟草香、干果香和辛香底韵,且在卷烟中具有增香提质、降低杂气的作用^[1-2]。天然产物中的巨豆三烯酮含有5种同分异构体,分别为(4, 6*Z*,

8*Z*)-巨豆三烯酮、(4, 6*E*, 8*Z*)-巨豆三烯酮、(4, 6*Z*, 8*E*)-巨豆三烯酮、(4, 6*E*, 8*E*)-巨豆三烯酮和(4, 7*E*, 9)-巨豆三烯酮^[3-4],这些物质均产自类胡萝卜素的降解与代谢过程^[5-7]。烟叶在生长早期会积累类胡萝卜素以保护烟叶组织免受氧化应激胁迫^[8],而类胡萝卜素可直接降解或通过糖基化中间

收稿日期:2023-03-31;修回日期:2023-05-30;出版日期:2023-10-15

基金项目:烟草总公司重点科技研发项目(中烟办(2020)66号)

作者简介:李石头(1986—),男,河南省叶县人,浙江中烟工业有限责任公司工程师,主要研究方向为烟草化学与卷烟产品研发。E-mail:lishitou@zjtobacco.com。

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业大学教授,博士生导师,主要研究方向为烟草化学、烟用香精香料及生物催化与转化。E-mail:duobinmao@126.com。

体产生巨豆三烯酮。其中,通过糖基化中间体产生的巨豆三烯酮主要以没有香味的糖苷态存在,并在烟叶发酵和燃烧过程中通过酶解和热解反应释放糖苷配基 3-氧代- α -紫罗兰醇,该醇可进一步脱水重排生成巨豆三烯酮^[9-10]。

巨豆三烯酮具有较多糖苷前体物^[11-12],在烟草中以 3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(OIPG)的含量较高^[13]。OIPG 有两种同分异构体,分别为(6*R*, 9*R*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(rrOIPG)和(6*R*, 9*S*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(rsOIPG)^[14]。烟草中糖苷类物质的分析多采用间接分析方法,即对糖苷类物质先进行酶水解或酸水解,再使用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对释放的苷元进行分析^[15-17];也有少数使用中心切割反相/反相二维液相色谱-质谱^[18]、高效液相色谱-质谱联用^[19-20]等技术直接进行检测,但上述方法使用的仪器昂贵,操作较复杂,且不能有效区分同分异构体。目前,尚未见利用超高效液相色谱(UHPLC)法对这两种同分异构体进行定量分析的报道。鉴于此,本研究拟以烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 为研究对象,建立超声辅助萃取-UHPLC 法对其进行定量检测,并对国内外 7 个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量进行对比分析,以期明确巨豆三烯酮两种香味前体物对卷烟香气的贡献,进而为卷烟产品加香的精细调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

主要材料:云南玉溪 C₃F、河南南阳 B₂F、四川凉山 B₂F、津巴布韦、巴西 MBO-GX、加拿大 CAO118CHC 和美国 2019BF1M,浙江中烟工业有限责任公司。

主要试剂:rrOIPG 和 rsOIPG 标准品、异落叶松脂醇-9-O- β -D-葡萄糖苷,结构经核磁共振波谱表征,纯度均大于 97%,郑州轻工业大学实验室;二氯甲烷(分析纯),中国医药集团有限公司;甲醇、乙腈,均为色谱纯,美国 Fisher Chemical 公司;超纯水,杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 主要仪器与设备

BSA323 S 型电子天平(感量 0.000 01 g),上海

赛多利斯天平仪器厂;Bruker 600 MHz 型超导核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克拜厄斯宾(北京)有限公司;Bond Elut C18 型固相萃取小柱,安捷伦科技(上海)有限公司;ACQUITY UPLC I-Class 型 UHPLC 仪,ACQUITY PDA 型二极管阵列检测器,沃特世科技(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 将烟叶于 45 °C 条件下烘干、粉碎,过 40 目筛网,量取 5.00 g 烟末与 100 mL 二氯甲烷,于 25 °C、100 W 条件下超声处理 20 min,过滤,将所得烟末置于 45 °C 烘箱中烘干至恒重;精准称取 2.500 0 g 上述烟末,与 100 mL 甲醇在同样条件下经超声萃取后,取滤液减压浓缩并定容至 5 mL;取 1 mL 上述液体以 0.5 mL/min 的流速通过预活化的固相萃取小柱,待液体全部流入小柱后,用体积分数为 20% 的乙腈水溶液洗脱,取第 3~4 mL 洗脱液用于下一步分析;取 450 μ L 洗脱液,加入 50 μ L 内标溶液,过 0.22 μ m 滤膜后,待检测。

1.3.2 方法学验证 标准溶液配制和检出限测定:称取一定量的 rrOIPG 和 rsOIPG 标准品,用超纯水稀释后配制成质量浓度分别为 0.5 mg/mL 和 0.2 mg/mL 的 A 储备液和 B 储备液;称取一定量的异落叶松脂醇-9-O- β -D-葡萄糖苷,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的内标溶液,并配制 9 个不同质量浓度梯度的系列标准溶液。其中,rrOIPG 质量浓度梯度为 25.85 μ g/mL、51.70 μ g/mL、77.55 μ g/mL、103.40 μ g/mL、129.25 μ g/mL、155.10 μ g/mL、206.80 μ g/mL、232.65 μ g/mL 和 258.50 μ g/mL,rsOIPG 质量浓度梯度为 6.28 μ g/mL、12.55 μ g/mL、18.82 μ g/mL、25.10 μ g/mL、31.38 μ g/mL、37.65 μ g/mL、43.92 μ g/mL、50.20 μ g/mL 和 62.75 μ g/mL。利用 UHPLC 仪对上述标准溶液进行检测,以 rrOIPG 和 rsOIPG 峰面积与内标峰面积之比为横坐标(x)、样品质量浓度为纵坐标(ρ)绘制标准曲线。根据信噪比(S/N)为 3 的计算方法测定检出限。

精密实验:取 1.3.1 中的待测样,于 UHPLC 仪中连续进样 6 次,对 rrOIPG 和 rsOIPG 的色谱峰进行积分并计算相对标准差(RSD)。

稳定性实验:取 1.3.1 中的待测样,分别在 0 h、6 h、12 h 和 24 h 时于 UHPLC 仪上样,对 rrOIPG 和 rsOIPG 的色谱峰进行积分并计算 RSD 。

重复性实验:使用同一种烟末,按 1.3.1 的方法重复处理 6 次后于 UHPLC 仪上样,对 rrOIPG 和 rsOIPG 的色谱峰进行积分并计算 RSD 。

加标回收实验:准确称取 3 份经二氯甲烷处理后的烟末样品进行加标回收实验,其中 rrOIPG 和 rsOIPG 标准品添加量分别为 400 μg 和 60 μg ,采用内标标准曲线法进行定量分析。

1.3.3 分析条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UP-
LC[®] BEH C18(2.1 mm×100 mm×1.7 μm);柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$;流动相为体积比 90:10 的乙腈-乙酸水溶液(乙酸体积分数为 0.1%);检测器为 PDA 检测器,检测波长为 242 nm;流速为 0.4 mL/min;进样量为 2.5 μL 。

1.3.4 数据处理 每组实验平行测定 3 次,实验结果以平均值表示,利用 R 语言对数据进行主成分分析,采用 Origin 2020 制图。

2 结果与讨论

2.1 烟末样品的 UHPLC 谱图分析

烟末样品的 UHPLC 谱图见图 1。由图 1 可知,经 1.3.1 前处理得到的烟末样品色谱峰形态良好,目标化合物 rrOIPG 和 rsOIPG 色谱峰能达到基线分离,适合进行定量测定。

2.2 方法学考察

rrOIPG 和 rsOIPG 的标准曲线见图 2。由图 2 可知,rrOIPG 的线性方程为 $\rho = 58.03x + 7.8021$, $R^2 = 0.9991$;rsOIPG 的线性方程为 $\rho = 93.953x + 3.7609$, $R^2 = 0.9990$,分别在 25.85~258.50 $\mu\text{g/mL}$

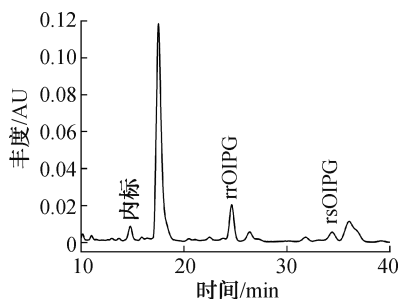


图 1 烟末样品的 UHPLC 谱图

Fig. 1 UHPLC chromatogram of tobacco powder sample

和 6.28~62.75 $\mu\text{g/mL}$ 内具有良好的线性关系,且检出限分别为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据精密度实验结果可知,rrOIPG 和 rsOIPG 的 RSD 分别为 0.32% 和 0.43%,说明仪器精密度较高。

根据稳定性实验测定结果可知,rrOIPG 和 rsOIPG 的 RSD 分别为 0.70% 和 1.20%,说明根据 1.3.1 制备的待测样品溶液在 24 h 内相对稳定。

根据重复性实验结果可知,rrOIPG 和 rsOIPG 的 RSD 分别为 1.47% 和 1.90%,说明该方法重复性良好。

由加标回收实验结果可知,rrOIPG 和 rsOIPG 的加标回收率分别为 83.94% 和 105.90%, RSD 分别为 1.22% 和 1.93%,表明该方法具有稳定的回收率和准确性,可用于烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 含量的测定。

2.3 不同产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 含量分析

7 个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量见图 3。由图 3a) 可知,rrOIPG 在 7 个产地的含量分布差异较大,其中含量最高的产地是巴西(303.0 $\mu\text{g/g}$),其次为河南(281.3 $\mu\text{g/g}$),最低的是津巴布韦(84.8 $\mu\text{g/g}$)。由图 3b) 可知,rsOIPG 在四川和云南烟叶中未检出,在河南烟叶中微量存在,而在国外产地的烟叶中大量存在。值得注意的是,尽管津巴布韦烟叶中 rrOIPG 含量最低,但 rsOIPG 含量较高。

7 个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量分布见图 4。由图 4 可知,rrOIPG 和 rsOIPG 的含量差异使国内外产地烟叶的置信区间在主成分分析上有明显区分,这可能是国外优质烤烟感官品质总体上优于国内烤烟的原因之一。

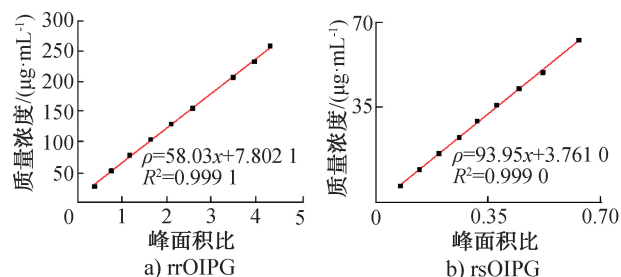


图 2 rrOIPG 和 rsOIPG 的标准曲线

Fig. 2 The diagram of standard curves of rrOIPG and rsOIPG

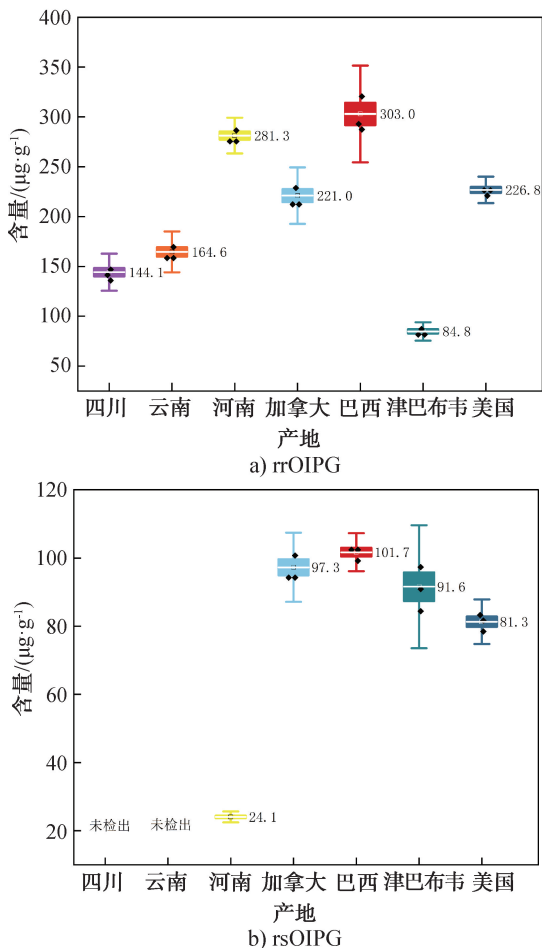


图3 7个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量
Fig. 3 The content of rrOIPG and rsOIPG in tobacco leaves from seven regions

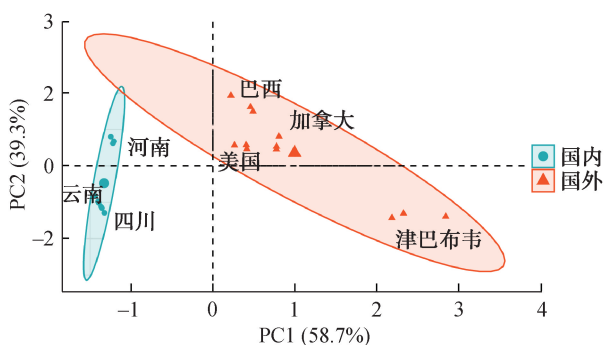


图4 7个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量分布
Fig. 4 The content distribution of rrOIPG and rsOIPG in tobacco leaves from seven regions

3 结论

本文以 OIPG 两种同分异构体 (rrOIPG 和 rsOIPG) 为研究对象,建立了超声辅助萃取-UHPLC 法直接检测烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 含量的方法,即烟叶经二氯甲烷预处理、甲醇超声萃取和 C18 固

相萃取小柱富集纯化后,便可在 UHPLC 仪中达到良好的分离效果;该方法线性关系良好,仪器精密度较高,样品的稳定性和重复性较好,rrOIPG 和 rsOIPG 的加标回收率分别为 83.94% 和 105.90%,RSD 分别为 1.22% 和 1.93%。本研究方法可行性较高,前处理步骤简单,适用于烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的定量分析。使用该方法测定了国内外 7 个产地烟叶中 rrOIPG 和 rsOIPG 的含量分布,发现国内外烟叶样品中 rrOIPG 和 rsOIPG 含量分布差异较大,其中国外产地烟叶中 rsOIPG 含量明显高于国内产地烟叶,且国内外产地烟叶中 rrOIPG 的含量均高于 rsOIPG。目前,业界尚未见有关 OIPG 两种构型区分的报道,故本研究结果可为巨豆三烯酮香味前体物的研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] 杨靖,毛多斌,陈芝飞,等. GC-MS/O 技术测定卷烟烟气中巨豆三烯酮的香气活力值[J]. 中国烟草学报, 2016,22(6):11-17.
- [2] BANOŽIĆ M, JOKIĆ S, AČKAR D, et al. Carbohydrates: Key players in tobacco aroma formation and quality determination[J]. *Molecules*, 2020,25(7):1734.
- [3] SLAGHENAUFU D, PERELLO M C, MARCHAND S, et al. Quantification of megastigmatrienone, a potential contributor to tobacco aroma in spirits[J]. *Food Chemistry*, 2016,203:41-48.
- [4] 蒋举兴,孔维松,吴俊,等. 香精中巨豆三烯酮 E/Z 异构体的相对量比和在 4 种常用气相色谱柱上的出峰顺序[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2018,40(5):984-994.
- [5] KODAMA H, FUJIMORI T, KATO K. Glucosides of ionone-related compounds in several nicotiana species [J]. *Phytochemistry*, 1984,23(3):583-585.
- [6] 刘冰. 高温对烟草巨豆三烯酮前体物代谢及其基因甲基化的影响[D]. 北京:中国农业科学院,2020.
- [7] LIANG Z J, FANG Z X, PAI A, et al. Glycosidically bound aroma precursors in fruits: A comprehensive review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022,62(1):215-243.
- [8] 李辰. 类胡萝卜素合成关键酶基因的调控及在植物中的抗逆效应[D]. 天津:天津大学,2020.
- [9] TUFARIELLO M, FRAGASSO M, PICO J, et al. Influence of non-saccharomyces on wine chemistry: A focus on aroma-related compounds[J]. *Molecules*, 2021,26:644.
- [10] ZENG S T, SUN S H, LIU S, et al. Synthesis of α -ionyl- β -

- d-glucoside and its property of flavor release [J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014, 115: 1049–1056.
- [11] SU C, QI B W, WANG J, et al. Megastigmene glycosides from *Urena lobata* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 127: 123–128.
- [12] LIANG Z J, FANG Z X, PAI A, et al. Glycosidically bound aroma precursors in fruits: A comprehensive review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(1): 215–243.
- [13] 毛多斌, 申思, 牟定荣, 等. 超声萃取-高效液相色谱法测定烟草中 β -D-吡喃葡萄糖-3-氧代- α -紫罗兰醇苷[J]. *分析实验室*, 2012, 31(6): 30–34.
- [14] BAUMES R L, AUBERT C C, BAYONOVE C L. Absolute configuration of free and bound 3-hydroxy-beta-damascone and of 3-oxo-alpha-ionol beta-D-glucopyranoside in tobacco [J]. *Journal of Essential Oil Research*, 1994, 6(6): 601–606.
- [15] CAI K, ZHAO H N, XIANG Z M, et al. Enzymatic hydrolysis followed by gas chromatography-mass spectroscopy for determination of glycosides in tobacco and method optimization by response surface methodology [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(17): 7006–7014.
- [16] 李锋, 朴永革, 李宝志, 等. 延边烟叶糖苷类香味成分分析研究[J]. *农业与技术*, 2018, 38(17): 20–22.
- [17] COLEMAN III W M, DUBE M F, GERARDI A R, et al. Enhancement of volatile aglycone recovery facilitated by acid hydrolysis of glucosides from nicotiana flower species [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(46): 11483–11490.
- [18] 陈敏, 董惠忠, 沈世豪, 等. 中心切割反相/反相二维液相色谱-串联质谱法测定烟叶潜香类糖苷[J]. *质谱学报*, 2021, 42(6): 1175–1182.
- [19] JIA C X, ZHU Y H, ZHANG J J, et al. Identification of glycoside compounds from tobacco by high performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion-trap tandem mass spectrometry coupled with electrospray ionization orbitrap mass spectrometry [J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017, 28: 629–640.
- [20] 吴琼, 汪阳忠, 安彤, 等. 利用特征中性丢失和非靶向液相色谱-质谱联用技术鉴定烟草中的糖苷成分[J]. *分析测试学报*, 2023, 42(1): 68–74.

Quantitative analysis of isomers of megastigmatrienone precursors based on UHPLC method and their distribution in tobacco leaves from various geographic origins

LI Shitou¹, BI Yiming¹, TIE Jinxin¹, YANG Chen², LI Qingxiang¹,
LI Yongsheng¹, YANG Pengfei², MAO Duobin²

1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310000, China;

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Investigating the quantitative analysis of two stereoisomeric compounds, specifically (6*R*, 9*R*)-3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside (rrOIPG) and (6*R*, 9*S*)-3-oxo- α -ionol- β -D-pyranoside (rsOIPG), megastigmatrienone precursors of the prominent aroma components in tobacco leaves, represented the core focus of this study. A meticulously-devised methodology combining ultrasound-assisted extraction with ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) was deployed to ascertain the precise quantification of rrOIPG and rsOIPG. This robust analytical approach was judiciously employed to elucidate the geographical distribution patterns of these stereoisomers within tobacco leaves sourced from seven diverse global regions. The results revealed the compelling linear response characteristics of rrOIPG and rsOIPG, scanning concentration ranges of 25.85 to 258.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.9991$) and 6.28 to 62.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.9990$), respectively. Exceptionally low detection limits of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for rrOIPG and 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for rsOIPG underscore the method's inherent precision. The analysis exhibited superb stability and reproducibility, epitomized by recovery rates of 83.94% for rrOIPG and 105.90% for rsOIPG, and *RSDs* were 1.22% and 1.93%, respectively. According to the content distribution of rrOIPG and rsOIPG, the tobacco leaves from domestic and foreign origins could be well distinguished, and the content of rsOIPG configuration in foreign origins was significantly higher than that in domestic origins. In terms of the distribution of the two configurations, the content of rrOIPG configuration was higher than that of rsOIPG configuration. The developed technique exhibits high feasibility and streamlined pretreatment processes, making it well-suitable for the quantitative analysis of rrOIPG and rsOIPG in tobacco leaves.

Key words: 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside; isomers; ultrahigh-performance liquid chromatography method; quantitative analysis