



李山,张瑾洁,王志才,等.固相萃取-超高效液相色谱-多级质谱联用法测定烟叶中5种类胡萝卜素的含量[J].轻工学报,2026,41(2):116-125.

LI S,ZHANG J J,WANG Z C,et al. Simultaneous determination of five carotenoids in tobacco leaves by solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-multistage mass spectrometry[J]. Journal of Light Industry,2026,41(2):116-125. DOI:10.12187/2026.02.011

固相萃取-超高效液相色谱-多级质谱联用法 测定烟叶中5种类胡萝卜素的含量

李山¹,张瑾洁²,王志才¹,刘光伟¹,李星亮¹,白冰³,毛多斌³,贾春晓³

1. 甘肃烟草工业有限责任公司 技术研发中心,甘肃 兰州 730050;

2. 平舆县第一初级中学,河南 驻马店 463400;

3. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院,河南 郑州 450001

摘要:【目的】建立同时测定烟叶中5种类胡萝卜素的定性和定量分析方法。【方法】利用超声波提取结合固相萃取对烟叶进行提取净化,采用超高效液相色谱-多级质谱联用(UHPLC-MSⁿ)法对类胡萝卜素进行定量分析。【结果】适宜的提取条件为:以丙酮为超声提取溶剂,料液比1:40、超声功率120 W和超声时间50 min;适宜的净化条件为:HF Bond Elut C18柱,淋洗液为乙腈、洗脱液为二氯甲烷;在多级质谱选择反应监测(SRM)模式下,5种类胡萝卜素的标准曲线线性关系良好,相关系数 r 均大于0.999 5;方法的检出限(LOD)为66.00~224.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限(LOQ)为18.20~67.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为88.3%~93.3%,相对标准偏差均小于5%。【结论】该方法简便、灵敏度高、精密度好,适合烟叶中主要类胡萝卜素的定性和定量分析,可为烟草香气前体物的代谢机制研究及烟叶风味品质定向提升提供参考。

关键词:烟叶;固相萃取;超高效液相色谱-多级质谱联用;类胡萝卜素

中图分类号:TS41 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)02-0116-10

0 引言

类胡萝卜素是烟叶中性挥发性香味成分的重要前体物^[1-3],其降解产物大马酮、紫罗兰酮、二氢猕猴桃内酯、柠檬醛等香味物质在卷烟中可呈现木香、花香、果香和甜香,使烟气醇和、烟香饱满,吃味改善,对提升烟叶品质具有重要作用^[4-6]。因此,建立准确、快速测定分析烟叶中类胡萝卜素含量组成

的方法,对阐明其在调制、陈化及加工过程中的变化机制并拓展其应用具有重要意义。

植物中类胡萝卜素的早期测定方法多采用高效液相色谱(HPLC)法^[7-10],但由于该类化合物种类繁多且异构体众多,HPLC法难以有效分离,因此,近年来的研究多采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法^[11-15],如L. M. Londoño-giraldo等^[13]利用高效液相色谱-大气压化学电离质谱联用

收稿日期:2024-12-31;修回日期:2025-03-10;出版日期:2026-04-15

基金项目:甘肃省重点研发计划项目(22YF7GA052);中国烟草总公司重大科技项目(110202201053(SJ-03))

作者简介:李山(1987—),男,河南省开封市人,甘肃烟草工业有限责任公司工程师,主要研究方向为烟草化学。E-mail:lishan2013@aliyun.com

通信作者:贾春晓(1965—),女,河南省南阳市人,郑州轻工业大学教授,主要研究方向为烟草成分分析。E-mail:jiachx@zzuli.edu.cn

(HPLC-APCI-MS)法分析了圣女果中的类胡萝卜素分布,发现野生圣女果的番茄红素含量高于栽培圣女果,而黄色圣女果则几乎不含番茄红素;X. Y. Feng等^[15]利用超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS-MS)法对红辣椒中辣椒红素、叶黄素、玉米黄质、 β -隐黄质的代谢特征进行分析,发现变色红辣椒的类胡萝卜素组成与正常红辣椒相似,但类胡萝卜素含量总体降低。然而,烟叶中类胡萝卜素的定性定量分析多采用HPLC法^[16-17],鲜见采用HPLC-MS法的相关报道。受烟叶中复杂基质和类胡萝卜素异构体的影响,HPLC法往往需耗费较长时间才能实现各组分之间的分离,且仅凭保留时间定性缺乏必要的结构信息,而MS检测器通过选择离子或提取离子可显著降低基质干扰、提高检测灵敏度并缩短分析时间,因此HPLC-MS法更适合用于烟叶中类胡萝卜素的定性和定量分析。若进一步采用MS多级质谱(MSⁿ),还可以获得更多特征离子碎片信息,为复杂基质中化合物结构鉴定提供依据,从而获得更准确的定性和定量结果。

固相萃取技术由液固萃取和液相色谱技术相结合发展而来,主要通过固相填料对样品组分的选择性吸附/解吸实现对复杂基质样品的分离、纯化和富集,已广泛应用于食品、生物医药、环境等分析检测领域^[18-19]。

基于此,本文拟采用超声波结合固相萃取对烟叶进行提取净化,通过质谱中准分子离子和特征离子碎片对类胡萝卜素进行定性鉴定,并同步利用UHPLC-MSⁿ法对烟叶中5种类胡萝卜素进行定量分析,以期为准确快速对烟叶中类胡萝卜素进行定性和定量分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

主要材料:烟叶,由甘肃烟草工业有限责任公司提供。

主要试剂:叶黄素、八氢番茄红素和 β -胡萝卜素标准品,郑州轻工业大学实验室自制(市售样品纯度较低且价格昂贵),结构经红外光谱、核磁共振及高分辨质谱表征,纯度均大于98%;紫黄素、 α -胡

萝卜素、苏丹红I号,纯度均大于95%,百灵威科技有限公司;丙酮、石油醚、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、无水乙醇、BHT,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙腈、二氯甲烷、甲醇,均为色谱纯,德国Merck公司。

1.2 主要仪器与设备

LTQ XL型超高效液相色谱-线性离子阱质谱仪,配有大气压化学电离源(APCI)及Xcalibur 2.2数据处理系统,AutoTrace 280型固相萃取装置,美国Thermo公司;R100NN型旋转蒸发仪,郑州长城科工贸有限公司;HF Bond Elut C18柱、Bond Elut SI硅胶柱和Bond Elut FI硅酸镁柱等固相萃取小柱,美国Agilent公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制 1) 内标溶液配制。准确称取苏丹红I号20.96 mg于50 mL容量瓶中,用二氯甲烷定容至刻度,得到质量浓度为0.419 2 mg/mL的内标溶液,置于4℃冰箱中贮存,备用。

2) 混合标准储备液配制。分别称取5种类胡萝卜素标准品,叶黄素10.15 mg、八氢番茄红素5.79 mg、 β -胡萝卜素1.79 mg、 α -胡萝卜素1.27 mg和紫黄素3.36 g,置于25 mL容量瓶中,用二氯甲烷定容至刻度,得到一定质量浓度的标准储备液,置于4℃冰箱中贮存,备用。分别移取上述标准储备液0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、3.0 mL、5.0 mL、7.0 mL和9.0 mL,置于10 mL容量瓶中,各加入0.5 mL内标溶液,用二氯甲烷定容至刻度,摇匀,即得到含有不同浓度梯度的类胡萝卜素混合标准溶液。将上述系列混合标准溶液按照优化条件进行UHPLC-MSⁿ分析,得到标准曲线及相关系数。

1.3.2 烟叶样品提取 将烟叶样品粉碎,过60目筛。准确称取烟叶粉末2.0 g,置于具塞锥形瓶中,加入料液比(g/mL)为1:40的丙酮,于120 W功率下超声提取50 min,抽滤并用丙酮洗涤3次,合并滤液和洗涤液,于30℃旋转蒸发仪中浓缩烘干,经二氯甲烷溶解后,用质量分数5%磷酸溶液洗涤,再用饱和食盐水洗至中性,将有机相用无水硫酸钠干燥,经减压浓缩后,得类胡萝卜素粗提物。

提取条件优化:以总类胡萝卜素提取量为指标,

分别对提取溶剂(丙酮、石油醚、二氯甲烷、正己烷、体积比1:2的丙酮/石油醚),料液比(g/mL,1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60),超声时间(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min),超声功率(80 W、100 W、120 W、140 W、160 W、180 W)进行优化,当优化其中一个因素时,其他因素均设定为固定条件(提取溶剂为丙酮、超声时间30 min、料液比1:30、超声功率100 W)。

根据单因素试验结果,设计的正交试验因素与水平见表1。

1.3.3 样品净化 将1.3.2所得类胡萝卜素提取物经HF Bond Elut C18固相萃取小柱(已经12 mL甲醇活化和12 mL超纯水平衡)净化后,先用乙腈淋洗,再用二氯甲烷洗脱至流出液无色,将洗脱液浓缩至2 mL,待UHPLC-MSⁿ分析。

净化条件优化:对固相萃取色谱柱(HF Bond Elut C18柱、Bond Elut SI硅胶柱、Bond Elut FI硅酸镁柱)、淋洗液(甲醇、二氯甲烷、正己烷、乙腈)、洗脱液(丙酮、二氯甲烷、甲醇、正己烷)进行优化。

1.3.4 分析条件 UHPLC条件:色谱柱为Waters C18柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm),流动相为质量分数90%甲醇和10%二氯甲烷;流量为0.3 mL/min;柱温20℃;进样方式为自动进样;进样量为2 μL。

MSⁿ条件:离子源为APCI;扫描模式为正离子扫描;毛细管加热温度为350℃;电晕针电压为4 kV;碰撞气体为高纯He;定性分析采用全扫描或中性丢失扫描模式;定量分析采用选择反应监测模式;扫描速率为1 scan/s;扫描范围为200~800 amu。

1.3.5 方法学考查 1) 精密度测定。准确称取2.0 g烟叶粉末,在最优条件下提取净化后,进行UHPLC-MS²分析,测定5种类胡萝卜素含量,平行测

定5次,计算平均含量及相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)。

2) 回收率测定。采用实际样品添加标样的方法,分别按50%、100%、150%加标量加入叶黄素、β-胡萝卜素、八氢番茄红素、紫黄素和α-胡萝卜素,在最优条件下提取净化后,根据5种类胡萝卜素的原含量、加标量和测定量计算回收率和RSD。

3) 检出限和定量限测定。以3倍和10倍信噪比(S/N)分别计算各化合物的检出限和定量限。

1.3.6 实际烟叶样品测定 采用上述方法对不同产地、不同等级的14种烤烟和3种香料烟烟叶中类胡萝卜素含量进行测定,平行测定3次,取峰面积的平均值,通过内标标准曲线法计算相应类胡萝卜素含量。

1.4 数据处理

采用Excel 2013进行数据处理,利用Origin 2019进行绘图。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素提取条件优化结果分析

不同提取条件对类胡萝卜素提取效果的影响见图1。由图1可知,单因素试验确定的适宜提取条件为提取溶剂为丙酮、料液比为1:30、超声功率为120 W和提取时间为40 min。

正交试验结果见表2。由表2可知,三个因素的最优水平组合为A₃B₃C₂,即超声波提取烟叶中类胡萝卜素的最优工艺条件为料液比1:40、超声时间50 min、超声功率120 W。根据极差结果可知,各因素影响的主次顺序是A>B>C,即料液比对实验结果影响最大,超声时间影响次之,超声功率影响最小。

2.2 固相萃取条件优化结果分析

烟叶丙酮提取物基质较复杂,直接进样会对分析结果产生较大影响,采用固相萃取方法对样品进行必要净化可减少谱峰干扰。针对类胡萝卜素化合物特性,固相萃取小柱分别选择C18柱、硅胶柱和硅酸镁柱。结果表明,通过硅胶和硅酸镁两种极性柱净化,未能将类胡萝卜素与干扰物质完全分开,而C18柱能够很好地保留类胡萝卜素并分离杂

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels designed for orthogonal test

水平	因素		
	A	B/min	C/W
1	1:20	30	100
2	1:30	40	120
3	1:40	50	140

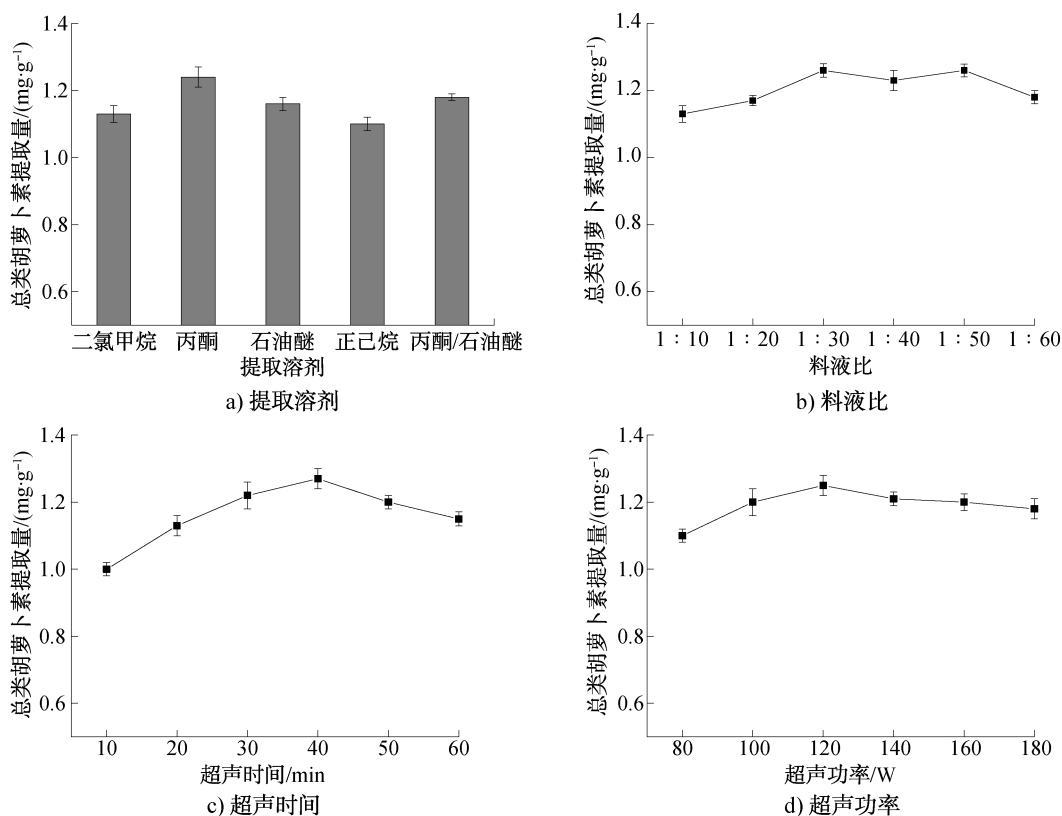


图 1 不同提取条件对类胡萝卜素提取效果的影响

Fig. 1 Effects of different extraction conditions on carotenoid extraction

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	总类胡萝卜素提取量/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1.268 5
2	1	2	2	1.273 1
3	1	3	3	1.282 1
4	2	1	2	1.278 8
5	2	2	3	1.261 8
6	2	3	1	1.275 9
7	3	1	3	1.286 0
8	3	2	1	1.275 1
9	3	3	2	1.300 0
K_1	3.823 8	3.833 4	3.819 6	
K_2	3.826 8	3.810 1	3.851 8	
K_3	3.861 0	3.857 9	3.830 0	
k_1	1.274 6	1.277 8	1.273 2	
k_2	1.270 0	1.270 0	1.283 9	
k_3	1.287 0	1.286 0	1.276 7	
极差	0.092 0	0.085 3	0.060 2	

质,因此选择 C18 固相萃取小柱为净化色谱柱,并以总类胡萝卜素提取量为指标进一步对淋洗液和

洗脱液进行考查,结果见图 2。由图 2a)可知,当以甲醇、二氯甲烷、正己烷为淋洗液时,馏分中均检测到干扰物质和类胡萝卜素,表明这 3 种淋洗液易造成目标物流失,而当以乙腈为淋洗液时,馏分中未检测到类胡萝卜素,因此选取乙腈作为淋洗液。由图 2b)可知,以二氯甲烷为洗脱液时,馏分中总类胡萝卜素提取量较高且二氯甲烷用量较少,故选取二氯甲烷作为洗脱液。按照优化条件,以总类胡萝卜素提取量为指标,对固相萃取的回收率进行考查,发现总类胡萝卜素平均回收率为 94.9%,符合分析要求,且烟叶提取样品经固相萃取小柱净化后杂质明显减少,确保了定量分析准确性。

2.3 类胡萝卜素 MS 定性测定结果分析

根据类胡萝卜素化合物的分子结构,由 MS 裂解规律可以判断,各种类型类胡萝卜素分子在 APCI 中主要形成丢失水分子 (H_2O , 18 Da)、己二烯 (C_6H_{10} , 82 Da)、二甲基庚二烯 (C_9H_{16} , 124 Da)、三甲基环己二烯 (C_9H_{14} , 122 Da)、四甲基环己二烯 ($C_{10}H_{16}$, 136 Da)、三甲基环己烯 (C_9H_{16} , 124 Da)、

四甲基环己烯 ($C_{10}H_{18}$, 138 Da)、三甲基环氧环己烯 ($C_9H_{14}O$, 138 Da)、四甲基环氧环己烯 ($C_{10}H_{16}O$, 152 Da) 等中性分子的碎片离子, 因此可以利用 MS^2 图中此类特征碎片离子来鉴定类胡萝卜素化合物的结构。

由于利用 MS 的准分子离子和特征碎片离子来鉴定类胡萝卜素化合物结构的研究鲜见报道, 故本研究以紫黄素的定性鉴定为例, 通过对比保留时间初步将该化合物定性为紫黄素, 正离子模式下该化合物的 MS^2 图见图 3。由图 3 可知, 在 APCI 中, 该化合物分子形成的加氢离子 ($[M+H]^+$) 质荷比 (m/z)

为 601。主要特征碎片离子 m/z 有 583、509、431、203 等, 这些碎片离子与紫黄素分子离子裂解得到的特征离子相吻合, 即 m/z 583 是紫黄素分子加氢离子丢失一分子 H_2O 形成的; 碎片离子 m/z 509 是由加氢离子丢失一分子 H_2O 后开环, 再丢失一分子 C_4H_8 (56 Da) 和一分子 H_2O 后形成的; 碎片离子 m/z 431 是由加氢离子连续丢失 H_2O 和四甲基环氧环己烯 ($C_{10}H_{16}O$, 152 Da) 分子形成的。紫黄素的 MS 裂解途径见图 4, 结合图 4 可进一步判断该化合物为紫黄素。后文采用相同方法对烟叶样品萃取液中其他类胡萝卜素化合物进行定性鉴定。

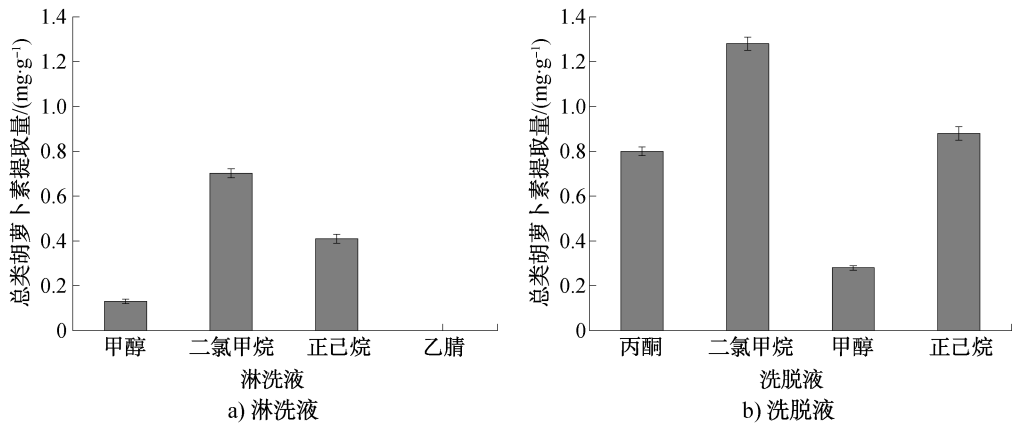


图 2 不同固相萃取条件对类胡萝卜素提取效果的影响
Fig. 2 Effects of different SPE conditions on carotenoid extraction

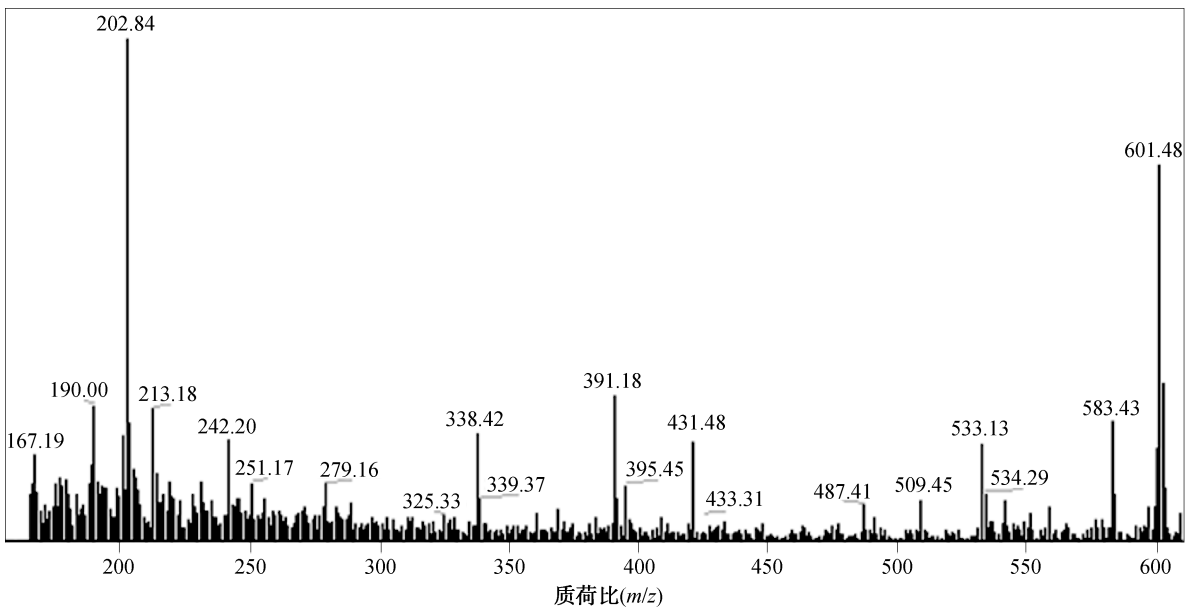


图 3 紫黄素的 MS^2 图
Fig. 3 MS^2 spectrum of violaxanthin

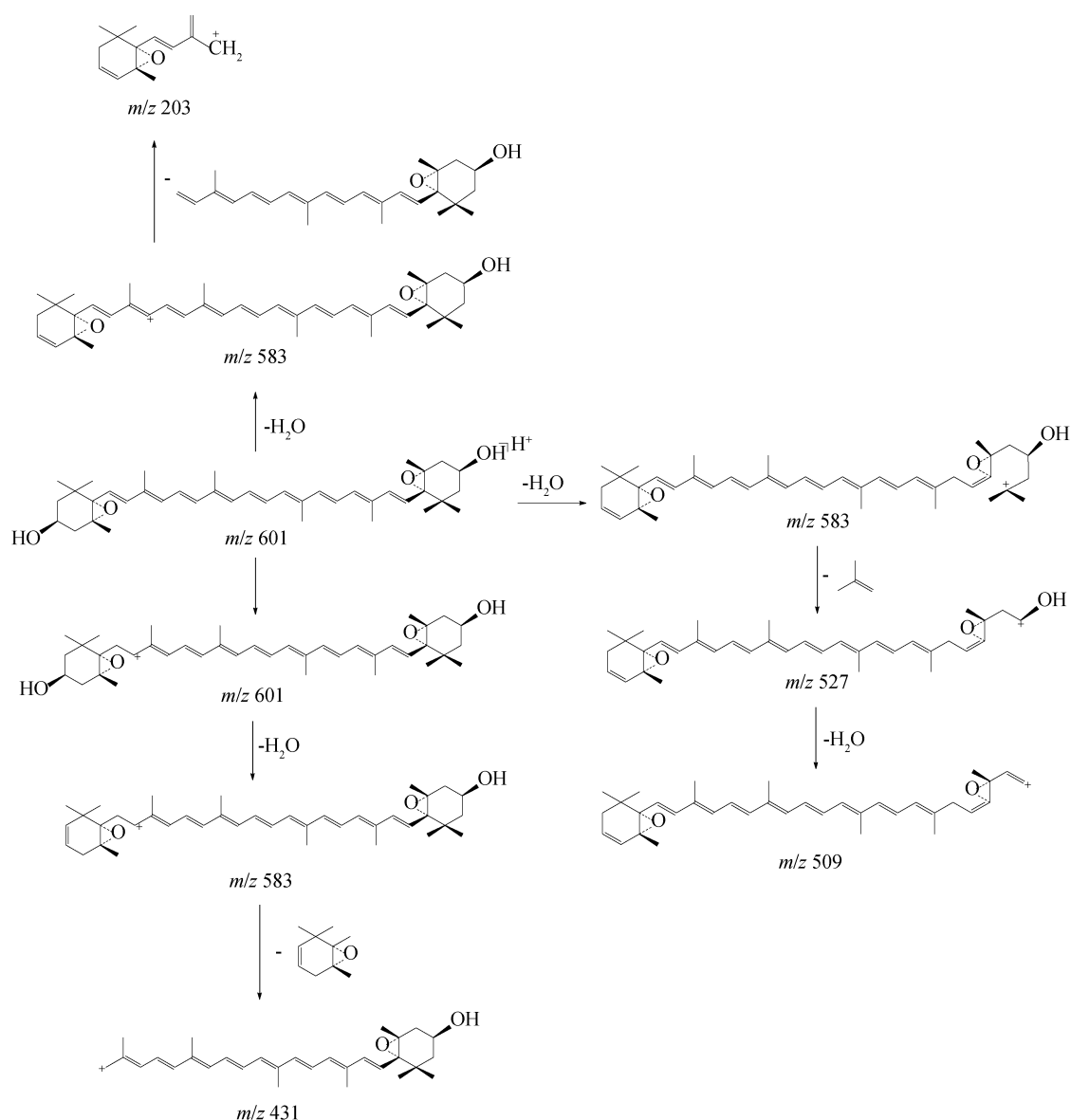


图4 紫黄素的MS裂解途径

Fig. 4 MS fragmentation pathways of violaxanthin

2.4 MS 条件优化结果分析

对叶黄素、八氢番茄红素、 β -胡萝卜素、紫黄素和 α -胡萝卜素的混合标样进行UHPLC- MS^n 分析。母离子扫描显示,在正离子模式下,目标化合物容易加和氢离子,以 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 形式存在,因此,选用正离子模式对类胡萝卜素混合标样进行全扫描,确定分子离子峰;然后优化碰撞能量,使母离子进一步碎裂,得到 MS^2 图;从各自 MS^2 图中选择其特征碎片离子,依此选择母离子和信噪比高、干扰小的特征子离子作为定量分析离子对。各化合

物的特征离子、定量分析离子对和碰撞能量参数见表3。在此 MS^2 分析条件下,对5种类胡萝卜素混合标样和烟叶样品萃取液进行UHPLC- MS^2 分析,得到的混合标样提取离子色谱图和烟叶样品萃取液的选择反应监测(SRM)色谱图(内标为苏丹红I)分别见图5和图6。由图5和图6可知,通过选择特征离子扫描,5种类胡萝卜素之间以及与杂质之间有较高的分离度,各化合物峰形良好,表明该条件适合于烟叶样品的定性和定量分析。

表3 5种类胡萝卜素的MS²参数
Table 3 MS² parameters of five carotenoids

化合物	相对分子质量	特征离子 (m/z)		定量分析 离子对 (m/z)	碰撞能量/%
		母离子 [$M+H$] ⁺	子离子		
$\alpha(\beta)$ -胡萝卜素	536	537	413, 399, 347	399/537	20
八氢番茄红素	544	545	489, 475, 435	435/545	20
叶黄素	568	569	551, 533, 509	533/569	20
紫黄素	600	601	583, 509, 431	583/601	20

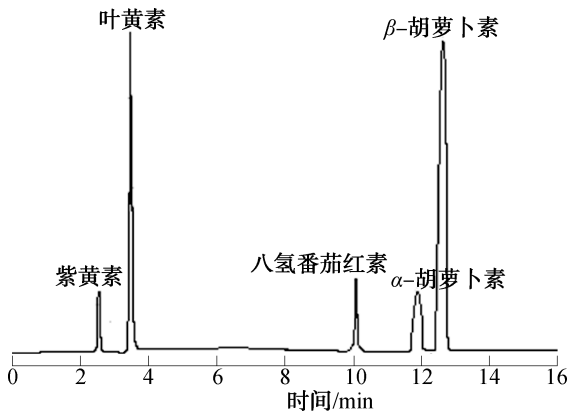


图5 混合标样的提取离子色谱图
Fig. 5 EIC of mixed standards

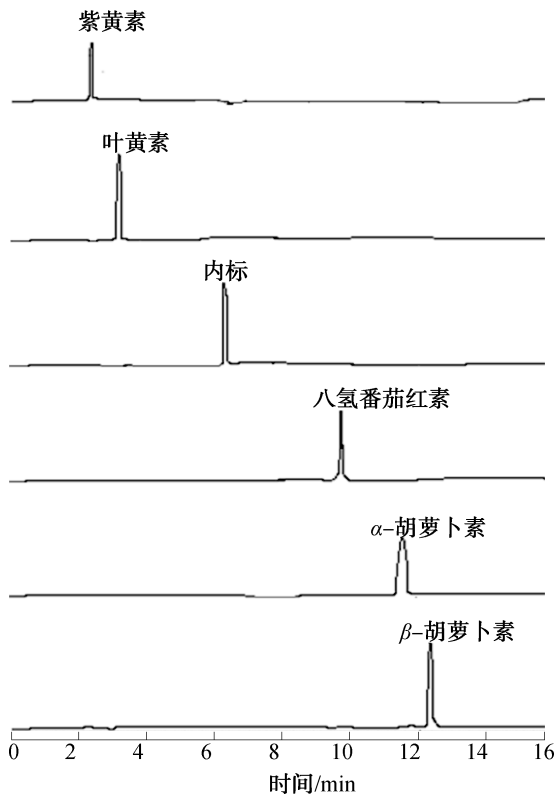


图6 烟叶样品提取液的SRM色谱图
Fig. 6 SRM chromatogram of tobacco leaf sample extracts

2.5 线性方程及相关参数分析

5种类胡萝卜素的线性方程及相关参数见表4。由表4可知,相关系数 r 均大于0.999,表明该方法线性关系良好;检出限和定量限较小,说明该方法的灵敏度较高。

2.6 精密度和回收率测定结果分析

5种类胡萝卜素平行测定5次, RSD 介于1.61%~2.17%之间,精密度符合测试要求。

5种类胡萝卜素的回收率测定结果见表5。由表5可知,叶黄素、 β -胡萝卜素、八氢番茄红素、紫黄素和 α -胡萝卜素回收率分别为90.5~93.3%、89.7%~91.5%、90.8%~92.2%、87.6%~89.9%和88.3%~91.3%, RSD 均小于5%,说明该方法的准确度和精密度均较高,符合微量成分测试要求。

2.7 方法验证

采用本文方法对不同产地、不同等级的14种烤烟和3种香料烟烟叶中类胡萝卜素含量进行测定,结果见表6。由表6可知,云南产区烟叶类胡萝卜素种类更全、部分组分含量更高,烤烟整体含量与种类均高于新昌香料烟,且同品种烟叶高等级品系的类胡萝卜素含量普遍更高,可见产地、品种、等级均可影响烟叶类胡萝卜素的种类与含量;同时,该方法具有实际适用性与普适性,可为后续烟草类胡萝卜素代谢及转化的深入研究提供关键的实际数据支撑。

本文通过固相萃取净化前处理结合MS检测器特征离子扫描,降低了基质干扰,将分析时间缩短至15 min以内,与欧阳璐斯等^[16]研究结果(色谱分析时间为3.5 min)相比,明显提高了分析检测效率。与番茄、辣椒等植物果实中类胡萝卜素的一级MS检测^[11-15]相比,该方法较大限度地减少了基质干扰,获得的结果也更为准确。

表4 5种类胡萝卜素的线性方程及相关参数

Table 4 Linear equations and related parameters of five carotenoids

化合物	线性方程	相关系数 <i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检出限/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
叶黄素	$y = 11.21x - 0.039$	0.999 7	3.38 ~ 304.50	53.70	179.00
β -胡萝卜素	$y = 1.98x - 0.075$	0.999 6	0.36 ~ 32.20	18.20	60.67
八氢番茄红素	$y = 2.88x - 0.022$	0.999 6	1.16 ~ 104.20	46.90	156.33
紫黄素	$y = 1.36x + 0.065$	0.999 8	0.22 ~ 20.20	67.20	224.00
α -胡萝卜素	$y = 1.74x - 0.004$	0.999 9	0.84 ~ 75.90	19.80	66.00

表5 5种类胡萝卜素的回收率测定结果

Table 5 Recovery determination results of five carotenoids

化合物	加标量 50%		加标量 100%		加标量 150%	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
叶黄素	90.5	2.7	92.3	1.1	93.3	3.8
β -胡萝卜素	90.0	1.4	91.5	2.8	89.7	2.4
八氢番茄红素	92.2	1.9	90.8	1.7	91.9	3.6
紫黄素	87.6	2.3	89.9	1.9	88.5	1.5
α -胡萝卜素	88.3	3.6	90.6	2.0	91.3	2.1

表6 烟叶中类胡萝卜素含量

Table 6 Carotenoids content in tobacco leaves

烟叶	叶黄素	八氢番茄红素	β -胡萝卜素	α -胡萝卜素	紫黄素	mg/g
云南玉溪 K326 C ₁ F	1.212±0.032	0.264±0.010	0.307±0.013	0.012±0.005	0.088±0.003	
云南沧源云烟 87 B ₂ F	0.138±0.005	0.206±0.009	0.031±0.002	0.030±0.003	0.128±0.005	
云南沧源云烟 87 C ₃ F	0.068±0.002	0.171±0.005	0.025±0.001	0.024±0.001	0.072±0.001	
云南沧源云烟 87 X ₂ F	0.526±0.013	0.077±0.002	0.061±0.003	0.018±0.002	0.050±0.002	
云南文山 B ₂ F	0.473±0.015	0.238±0.008	0.181±0.006	0.035±0.001	0.103±0.003	
云南文山 C ₃ F	0.072±0.002	0.209±0.005	0.029±0.002	0.028±0.001	0.092±0.002	
云南文山 X ₂ F	0.064±0.002	0.187±0.003	0.012±0.001	0.010±0.001	0.073±0.002	
浙江新昌上一	—	—	—	—	0.062±0.002	
浙江新昌中一	0.108±0.003	—	—	—	0.094±0.003	
浙江新昌下一	0.312±0.011	—	0.091±0.002	—	0.098±0.004	
河南襄城中烟 100 B ₂ F	0.116±0.008	0.009±0.000	0.038±0.001	—	0.046±0.003	
河南禹州中烟 100 B ₂ F	0.113±0.006	0.447±0.016	—	—	0.154±0.001	
黑龙江哈尔滨 B ₂ F	0.078±0.002	0.143±0.005	—	—	0.072±0.002	
云南曲靖云烟 87 C ₄ F	0.217±0.009	0.180±0.005	0.053±0.002	0.012±0.001	0.109±0.002	
云南临沧区 K326 C ₃ F	0.047±0.002	—	0.016±0.002	0.027±0.001	—	
河南郟县中烟 100 C3F	0.274±0.008	—	0.062±0.003	—	0.045±0.001	
河南洛阳豫烟 10 B ₂ F	0.063±0.003	0.002±0.000	0.017±0.001	—	0.059±0.003	

注:—表示未检出。

3 结论

本文利用 UHPLC-MSⁿ 方法,对烟叶中5种类胡萝卜素进行了定性和定量分析,得到以下结论:1)最优提取条件为:丙酮为提取溶剂、料液比 1:40、超声功率 120 W、超声时间 50 min;2)适宜净化条件为:HF Bond Elut C18 柱、淋洗液为乙腈、洗脱液为二氯甲烷;

3)在选择反应监测(SRM)模式下,建立的 UHPLC-MSⁿ 法可同时快速测定烟叶中5种类胡萝卜素含量,检出限为 66.00~224.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 18.20~67.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 88.3%~93.3%,RSD 均小于 5%,灵敏度和准确度较高。验证实验结果表明本方法具有可行性与普适性。本文研究结果对烟叶中类胡萝卜素的存在及转化研究,以及烟叶品质提

升、卷烟加工指导具有重要作用。

参考文献:

- [1] 刘涛,曹建敏,郭存,等.不同烤烟品种化学成分及致香物质差异分析[J].中国烟草科学,2023,44(2):74-82.
LIU T, CAO J M, GUO C, et al. Difference analysis on chemical composition and aroma components of different flue-cured tobacco cultivars[J]. Chinese Tobacco Science, 2023, 44(2): 74-82.
- [2] LI C, WANG C L, CHENG Z Y, et al. Carotenoid biosynthesis genes LcLCYB, LcLCYE, and LcBCH from wolfberry confer increased carotenoid content and improved salt tolerance in tobacco[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 10586.
- [3] 龙章德,王敏,薛云,等.烟叶中 β -胡萝卜素高效降解菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[J].轻工学报, 2022, 37(4): 86-93.
LONG Z D, WANG M, XUE Y, et al. Screening and identifying of β -carotene degrading strains from tobacco leaves and its optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(4): 86-93.
- [4] 王玉华,王德权,高政绪,等.烤烟自然醇化过程中类胡萝卜素降解产物含量变化及其与感官质量的关系[J].浙江农业科学,2020,61(2):340-344,394.
WANG Y H, WANG D Q, GAO Z X, et al. Changes of carotenoid degradation products during natural aging of flue-cured tobacco and its relationship with sensory quality[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2020, 61(2): 340-344, 394.
- [5] 吴巧茜,施友志,李林林,等.类胡萝卜素降解菌株的原位筛选及其在雪茄提质增香中的应用[J].生物技术通报,2023,39(9):192-201.
WU Q Y, SHI Y Z, LI L L, et al. *In situ* screening of carotenoid degrading strains and the application in improving quality and aroma of cigar[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(9): 192-201.
- [6] FU W T, ZHENG X Y, CHEN X C, et al. The potential roles of carotenoids in enhancing phytoremediation of bisphenol a contaminated soil by promoting plant physiology and modulating rhizobacterial community of tobacco[J]. Chemosphere, 2023, 316: 137807.
- [7] 王静,王杰,阿娜尔,等.枸杞类胡萝卜素指纹图谱的建立及其抗氧化活性谱效关系研究[J].中国药房, 2022, 33(5): 575-578.
WANG J, WANG J, A N E, et al. Establishment of carotenoid fingerprint in *Lycium barbarum* and study on its antioxidant activity spectrum-effect relationship[J]. China Pharmacy, 2022, 33(5): 575-578.
- [8] SANDMANN G. HPLC analysis of carotenoids from bacteria[J]. Methods in Enzymology, 2022, 670: 139-153.
- [9] PAVELKOVÁ P, KRMEĽA A, SCHULZOVÁ V. Determination of carotenoids in flowers and food supplements by HPLC-DAD[J]. Acta Chimica Slovaca, 2020, 13(1): 6-12.
- [10] 王楠,周宝成,葛志伟,等.高效液相色谱法测定番茄果肉中4种天然类胡萝卜素含量[J].分析科学学报, 2024, 40(5): 592-596.
WANG N, ZHOU B C, GE Z W, et al. Determination of four natural carotenoids in tomato flesh by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Analytical Science, 2024, 40(5): 592-596.
- [11] DAOOD H G, RÁTH S, PALOTÁS G, et al. Efficient HPLC separation on a core-C30 column with MS2 characterization of isomers, derivatives and unusual carotenoids from tomato products [J]. Journal of Chromatographic Science, 2022, 60(4): 336-347.
- [12] GRUJIĆ V J, TODOROVIĆ B, KRANVOGL R, et al. Diversity and content of carotenoids and other pigments in the transition from the green to the red stage of *Haematococcus pluvialis* microalgae identified by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS[J]. Plants, 2022, 11(8): 1026.
- [13] LONDOÑO-GIRALDO L M, BUENO M, CORPAS-IGUARÁN E, et al. HPLC-DAD-APCI-MS as a tool for carotenoid assessment of wild and cultivated cherry tomatoes[J]. Horticulturae, 2021, 7(9): 272.
- [14] 赖长鸿,王寒雪,李培杰,等.瑄溪蜜柚果肉中类胡萝卜素组分的特征解析[J].中山大学学报(自然科学版)(中英文), 2024, 63(4): 71-77.
LAI C H, WANG H X, LI P J, et al. Characteristics of carotenoid components in juice sacs of pomelo (*Citrus grandis* cv 'Guanximiyou') [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2024, 63(4): 71-77.
- [15] FENG X Y, YU Q Q, LI B, et al. Comparative analysis of carotenoids and metabolite characteristics in discolored red pepper and normal red pepper based on non-targeted metabolomics [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112398.
- [16] 欧阳璐斯,陈森林,王铭,等.低氧贮存片烟解封过程中化学成分变化研究[J].云南大学学报(自然科学版), 2025, 47(1): 154-162.
OUYANG L S, CHEN S L, WANG M, et al. Study on the change of chemical composition during unsealing of the tobacco in hypoxic storage[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2025, 47(1): 154-162.
- [17] FAN X, ZI W H, AO J C, et al. Analysis and application evaluation of the flavour-precursor and volatile-aroma-component differences between waste tobacco stems[J]. Heliyon, 2022, 8(9): e10658.
- [18] 余晶晶,史莉莉,刘雨欣,等. COFs 材料磁固相萃取-HPLC-MS/MS 法测定烘焙食品中两种主要晚期糖基化终末产物[J].轻工学报, 2023, 38(6): 52-61.

YU J J, SHI L L, LIU Y X, et al. Determination of two major advanced glycation end products in baked food using HPLC-MS/MS based on COFs material magnetic solid phase extraction [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(6): 52-61.

[19] HAO J W, LIU X Q, CHEN N D, et al. Solid-phase extraction followed by direct TOF-MS-MS and HPLC analysis of ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* from different places of China [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 98: 103845.

Simultaneous determination of five carotenoids in tobacco leaves by solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-multistage mass spectrometry

LI Shan¹, ZHANG Jinjie², WANG Zhicai¹, LIU Guangwei¹, LI Xingliang¹,
BAI Bing³, MAO Duobin³, JIA Chunxiao³

1. Technology R&D Center, Gansu Tobacco Industrial Co., Ltd., Lanzhou 730050, China;

2. No. 1 Junior High School of Pingyu, Zhumadian 463400, China;

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

Abstract: **[Objective]** To develop a qualitative and quantitative analytical method for simultaneously determining five carotenoids in tobacco leaves. **[Methods]** Tobacco leaves were extracted and purified by ultrasonic extraction combined with solid-phase extraction, and the carotenoids were quantitatively analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-multistage mass spectrometry (UHPLC-MSⁿ). **[Results]** The optimal extraction conditions were as follows: acetone was used as the ultrasonic extraction solvent, with a solid-to-liquid ratio of 1 : 40, ultrasonic power of 120 W, and ultrasonic time of 50 min; while the optimal purification conditions were: HF Bond Elut C18 column, acetonitrile as the leaching solution, and dichloromethane as the eluent. Under the selected reaction monitoring (SRM) mode, the standard curves of the five carotenoids showed a good linear relationship with correlation coefficients (r) all greater than 0.999 5. The limits of detection (LOD) of the method were 66.00~224.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the limits of quantification (LOQ) were 18.20~67.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the average recoveries were 88.3%~93.3%, and the relative standard deviations (RSDs) were all less than 5%. **[Conclusion]** This method is simple, highly sensitive and precise, which is suitable for the qualitative and quantitative analysis of the main carotenoids in tobacco leaves. It provides a reference for the research on the metabolic mechanisms of tobacco aroma precursors and the targeted improvement of tobacco leaf flavor quality.

Key words: tobacco leaves; solid-phase extraction; UHPLC-MSⁿ; carotenoids

[责任编辑:王晓波 贾学伟]