

不同产地烟草中 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖化合物含量分析

陈修红, 王叶, 王军* (中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 [目的] 分析比较不同产地烟叶中 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖(Pro-Fru)化合物含量的差异。[方法] 以水为溶剂, 在超声辅助条件下提取烟叶样品中的 Pro-Fru 物质, 经过 C₁₈-SPE 固相萃取柱分离后利用高效液相色谱串联三重四级杆质谱对国内 5 个产地的 30 个烟草样品进行定量分析。[结果] HPLC-MS/MS 方法适用于烟叶中 Pro-Fru 化合物的准确分析, 测定烟草样品中 Pro-Fru 化合物的含量在 3~7 mg/g。四川、云南地区的烟叶样品中 Pro-Fru 化合物的含量相对最为丰富。[结论] 研究可为了解各烟叶性质, 科学选用烟叶进行配方提供参考依据。

关键词 烟草; 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖; 液相色谱质谱串联; 产地

中图分类号 S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)22-07557-02

Analysis of the Contents of 1-L-Proline-1-deoxy-D-Fructose Compound in Tobacco Samples from Different Producing Areas

CHEN Xiu-hong, WANG Jun et al (College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract [Objective] To analyze and compare the different contents of 1-deoxy-1-L-proline-D-fructose (Pro-Fru) in tobacco samples from different producing areas. [Method] Using water as the extraction solvent, under the assisted ultrasonic conditions, Pro-Fru compound in 30 tobacco samples from 5 different domestic producing areas was extracted. After the extracts were separated with C₁₈ solid phase extraction column, HPLC-MS/MS quantitative analysis for the samples was carried out. [Result] HPLC-MS/MS was a good method for the analysis of Pro-Fru compound in tobacco samples. The contents of Pro-Fru compound in tobacco samples were at 3-7 mg/g. The contents of Pro-Fru compound were more abundant in the samples from Sichuan and Yunnan Provinces in all of the samples measured. [Conclusion] The study can provide reference basis for obtaining tobacco properties and scientifically selecting tobacco leaves.

Key words Tobacco; 1-L-Proline-1-deoxy-D-Fructose; HPLC-MS/MS; Producing areas

Amadori 化合物(1-氨基-1-脱氧酮糖)是氨基酸与葡萄糖通过美拉德反应生成的关键中间产物之一, 在烟草烤制、陈化、加工及燃吸等过程中均有不同程度的产生与积累^[1]。这类化合物是重要的非挥发性香味前体物质, 对卷烟的烟气质量有重要影响^[2], 也是评价烟草感官质量和烟草加香研究的重要目标物之一^[3-5]。我国烟草分布广泛, 烟草种质资源丰富^[6], 不同产地和品种的烟叶经过烘烤和醇化后其中的香味物质含量有较大区别, 通过分析其中香味物质前体 Amadori 化合物的含量, 对了解烟叶风味品质, 选择烟叶提高烟叶配方科学性具有一定的借鉴意义。

烤烟型烟叶中的 Amadori 化合物以 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖(Pro-Fru)含量最为丰富, 其含量约占 Amadori 化合物总含量一半以上, 该物质对烟叶吸味具有积极贡献^[7], 对评价烟叶质量具有参考价值。笔者采用高效液相串联质谱技术^[8]对 5 个产地的 30 个样品中 1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖化合物进行定量分析, 比较该化合物在这批不同产地烟叶中的含量, 以期了解各烟叶性质, 科学选用烟叶进行配方提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 原材料: 来自四川、云南、安徽、山东、河南 5 个产地, 共 30 个烤烟单料烟叶样品。主要试剂: 超纯水, 去离子水经过 Milli-Q 超纯水仪制得, 18.2 MΩ·cm; 甲醇, 色谱级, 北京百灵威科技有限公司; 甲酸, 纯度 99%, Acros 公司; Pro-Fru 物质, 自制^[9]。

主要仪器: Agilent 1260 液相色谱仪, 配置在线脱气机、

二元泵、自动进样器、柱温箱、可变波长紫外检测器, 美国 Agilent 公司; Agilent 6460-QQQ 质谱仪, 美国 Agilent 公司; ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(3.5 μm, 2.1 × 150 mm), 美国 Agilent 公司; ProElut C₁₈-SPE 固相萃取小柱(100 mg/1 ml), DIKMA 公司; ASE-12 固相萃取仪, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; KQ-300 型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FA1104B 万分之一电子天平, 上海越平科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 固相萃取小柱活化处理。用 5 ml 甲醇淋洗小柱, 再用 5 ml 超纯水淋洗, 控制流速在 2 滴/s。

1.2.2 样品处理。烟叶样品冷冻干燥后磨成 60 目粉末, 分别称取 300 mg 左右(精确到 0.1 mg)的烟草粉末, 定量加入 200 ml 超纯水, 室温超声 20 min, 定容到 250 ml, 振荡 5 min 后再静置 5 min。取上清液用 0.45 μm 微孔水系滤膜过滤, 再取 2 ml 滤液用 C₁₈-SPE 固相萃取柱纯化, 取中间流出的 1 ml 液体作为样液, 分析备用。

1.2.3 标准液制备。准确称取 33.4 mg Pro-Fru 化合物用超纯水溶解, 定容于 25 ml 容量瓶中, 配制成浓度为 1.336 mg/ml 标准品储备液, 4 °C 冰箱保存备用。稀释成浓度为 200.4 μg/ml 的标准品母液, 分别取 50、100、200、300、500 μl 标准品母液于 5 ml 容量瓶中, 用超纯水定容成不同浓度的标准液。

1.2.4 液质联用条件。ZORBAX SB-C₁₈ 为色谱柱, 柱温 30 °C, 流动相为含 0.3% 甲酸的甲醇: 含 0.3% 甲酸的水以 65:35 (V:V) 等度洗脱, 流速为 0.3 ml/min, 进样量 20 μl; 三重四级杆质谱采用多反应检测(MRM)模式, 电喷雾正离子模式(ESI⁺)为离子化条件, 毛细管喷雾电压为 3 500 V, 干燥气温度 300 °C, 干燥气流量 10 L/min, 离子源雾化气压力 310 kPa, 鞘气温度 250 °C, 鞘气流量 11 L/min。

作者简介 陈修红(1987-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 研究方向: 食品与烟草化学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事食品与烟草化学研究。

收稿日期 2014-06-27

2 结果与分析

2.1 Pro-Fru 化合物定量分析离子对选择 由标准样 Pro-Fru 的产物离子流色谱图(图1)和质谱图(图2)可知,保留时间在 1.6 min 左右出现的 Pro-Fru 化合物对应的主要质谱碎片为: $m/z = 278, 260, 242, 232, 214, 128, 116$ 。其中 260 是离子 $[M + H - H_2O]^+$ 的质荷比,242 是离子碎片 $[M + H - 2H_2O]^+$ 的质荷比,与化合物的结构密切相关,可作为液质定量分析的定量离子和辅助定性离子。

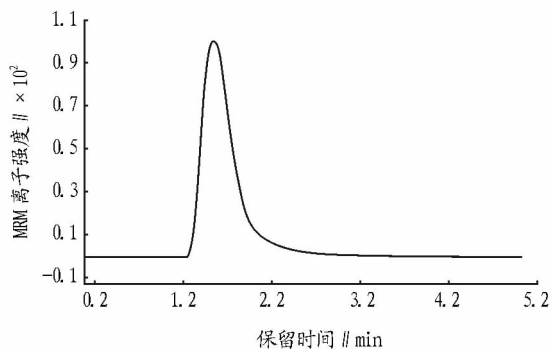


图1 Pro-Fru 化合物的产物离子流

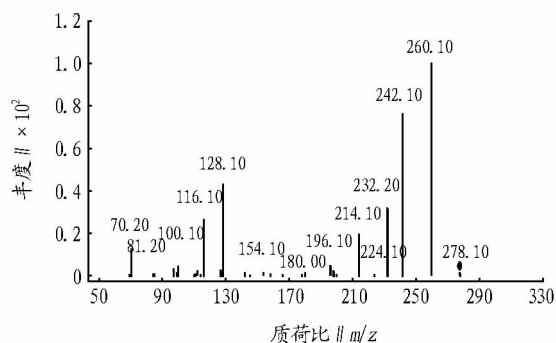


图2 Pro-Fru 化合物的二级质谱

2.2 标准曲线和检出限 不同浓度的标准品稀释液经 0.45 μm 水系膜过滤后进行 HPLC-MS/MS 定量分析。采用外标法,以浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得标准曲线线性回归方程为 $Y = 63\ 155.45X - 51\ 160.32$ (图3)。将最小

浓度的标准品溶液逐级稀释测定,采用信噪比 S/N 为 3 时对应的浓度作为检出限。结果表明,Pro-Fru Amadori 化合物在 2.004 ~ 20.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围内,峰面积与浓度线性关系良好,相关系数 $R^2 = 0.999\ 4$,检出限为 49.1 ng/ml 。

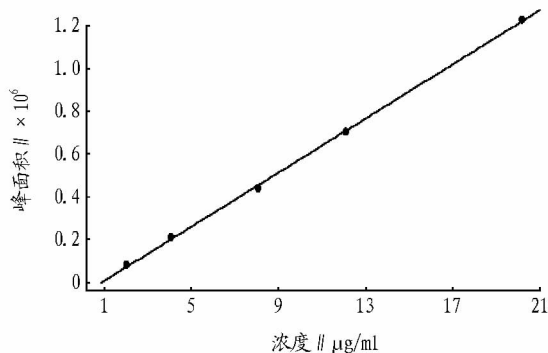


图3 Pro-Fru 化合物的标准曲线

2.3 样品分析 经固相萃取柱除杂纯化后的烟草样品进行液质定量分析,结果如图4所示。从 MRM 离子流色谱图可以看出该方法下色谱峰分离效果良好。分析四川、云南、安徽、山东、河南 5 个产地的 30 个不同烟草样品中 Pro-Fru 化合物含量,所测得烟草样品中 Pro-Fru 化合物的含量在 3 ~ 7 mg/g ,不同产地差异较大;分析的这 30 个样品中,四川、云南产地样品中 Pro-Fru 化合物含量相对较高,山东、河南产地样品含量相对较低,安徽产地样品含量居中(图5)。

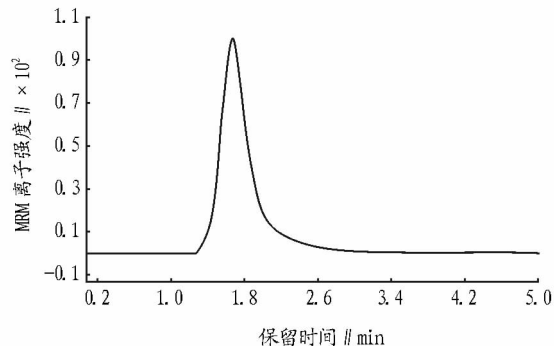


图4 烟草样品中 Pro-Fru 化合物 MRM 色谱

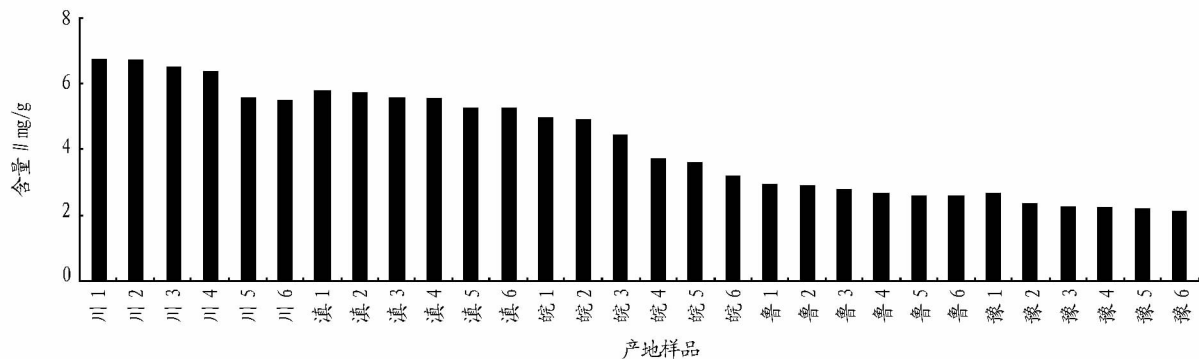


图5 不同产地烟草样品中 Pro-Fru Amadori 化合物含量比较

3 结论

气候和土壤条件是直接影响烟草生长发育的重要因素^[10],生长环境不同会造成烟叶中代谢积累物含量差异,从而影响着烟叶品质^[11]。该研究比较了四川、云南、安徽、山东、

河南 5 个产地的 30 个烟草样品中 Pro-Fru 化合物含量,这些样品中四川、云南地区烟叶中 Pro-Fru 化合物含量较高,这为了解各种烟叶的性质,优化烤烟烤制、陈化、加工工艺,科学 (下转第 7587 页)

量中很有限的一部分,尤其是在复杂的外部环境中,绝大多数微生物不能用传统的纯培养方法获得,这在一定程度上限制了微生物修复技术的推广应用。因此,需要将微生物修复、植物修复、菌根根际生物修复等技术联合应用,提高石油污染物的降解率,并在修复过程中利用物理、化学和分子生物学方法对修复效果进行有效地评估,使石油污染土壤修复过程向全面系统化、最优化和成熟化发展。

表1 生物修复石油污染土壤的优缺点比较

方法	优点	缺点
自然衰减	节约成本,对环境没有影响	周期长
堆肥法	短时间内具有较高的降解效果	需要添加生物废物和膨松剂,成本较高
植物修复	处理面积大,可通过植物根际加强本源微生物的活性,促进修复	只使用与低浓度的石油污染土壤(一般指油含量小于150 g/kg土壤)
微生物刺激修复	利用本源微生物可以就近原位降解	添加营养物质,电子受体和表面活性剂活化本源微生物,降解过程不易人为控制
微生物强化修复	污染物降解迅速,彻底而高效	需要筛选高效降解菌或菌群,不宜原位修复油污土壤
植物-微生物联合修复	污染物降解效率高	运行成本较高

参考文献

- [1] 詹研. 中国土壤石油污染的危害及治理对策[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(3): 91-93, 96.
- [2] 陆秀君, 郭书海, 孙清, 等. 石油污染土壤的修复技术研究现状及展望[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(1): 63-67.
- [3] MASHALASH K, AMIR H C, MAJID T. Effects of crude oil contamination on geotechnical properties of clayey and sandy soils[J]. Engineering Geology, 2007, 89(3/4): 220-229.
- [4] 李洪梅, 邵玉环, 江丽华, 等. 不同浓度石油烃对油菜产量、土壤中石油烃残留量及土壤微生物的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 382-385.
- [5] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 我国部分油田土壤及油泥的石油污染初步研究[J]. 土壤, 2007, 39(2): 247-251.
- [6] 张树才, 牟桂芹. 石油污染地的土壤修复技术[J]. 生态与环境, 2009(8): 29-31.
- [7] 朱雄文. 石油污染土壤修复技术进展研究[J]. 辽宁化工, 2009, 38(7): 577-579.
- [8] 邓绍云, 徐学义, 邱清华. 我国石油污染土壤修复研究现状及展望[J]. 北方园艺, 2012(14): 184-190.
- [9] SWANNELL R P, HEAD M. Oil-spills - bioremediation comes of age[J]. Nature, 1994, 368(6470): 396-397.
- [10] 董志涛, 吴金伟. 石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. 广州化工, 2010, 38(6): 32-34.
- [11] 凌婉婷, 朱利中, 高彦征, 等. 植物根对土壤中 PAHs 的吸收及预测[J]. 生态学报, 2005, 25(9): 2320-2325.

(上接第 7558 页)

选用烟叶组进行配方提供了一些参考依据。

参考文献

- [1] 景延秋, 官长荣, 张月华, 等. 烟草香味物质分析研究进展[J]. 中国烟草科学, 2005, 26(2): 44-48.
- [2] 杨德廉, 王树声, 王宝华, 等. 烟草中氨基酸变化规律及其与烟叶品质关系研究进展[J]. 中国烟草科学, 1998(3): 11-13.
- [3] 官长荣. 烟草调制学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 190-191.
- [4] 刘立全, 王月霞. 美拉德反应在烟草增香中的应用研究进展[J]. 烟草科技, 1994(4): 21-24.
- [5] 周正红, 杨华连, 沈光林. 美拉德反应产物及其在烟草中的增香研究[J]. 烟草科技, 1998(4): 8-11.

- [12] LISTE H, FELGENTREU D. Crop growth, culturable bacteria and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long term contaminated field soil[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 31(1/2): 43-52.
- [13] 陈嫣, 李广贺, 张旭, 等. 石油污染土壤植物根际微生态环境与降解效应[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2005, 45(6): 784-787.
- [14] KIRK J L, KLIRONCMOS J N, LEE H, et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2005, 133(3): 455-465.
- [15] SHAHSAVARI E, ADETUTU E M, ANDERSON P A, et al. Plant residues—A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil[J]. Science of the Total Environment, 2013, 443: 766-774.
- [16] PELAEZ A I, LORES I, SOTRES A, et al. Design and eld-scale implementation of an "on site" bioremediation treatment in PAH-polluted soil[J]. Environmental Pollution, 2013, 181: 190-199.
- [17] CHAGAS-SPINELLI A C O, KATO M T, DE LIMA E S, et al. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 113: 510-516.
- [18] LIN T C, PAN P T, CHENG S S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 176: 27-34.
- [19] SOLEIMANI M, FARHOUDI M, CHRISTENSEN J H. Chemometric assessment of enhanced bioremediation of oil contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 254/255: 372-381.
- [20] 甄丽莎. 石油污染土壤的微生物修复[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 321-324.
- [21] BENTO F M, CAMARGO F A, OKEKE B C, et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(9): 1049-1055.
- [22] YU S H, KE L, WONG Y S, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments[J]. Environment International, 2005, 31(2): 149-154.
- [23] NIKOLOPOULOU M, KALOGERAKIS N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 56(11): 1855-1861.
- [24] NIKOLOPOULOU M, PASADAKIS N, KALOGERAKIS N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers[J]. Desalination, 2007, 211(1/2/3): 286-295.
- [25] 陈雪兰, 成杰民. 植物-微生物联合修复石油-重金属复合污染土壤的研究[J]. 中国环境管理干部学院学报, 2012, 22(5): 35-38.
- [26] 郭军权, 王文龙, 刘恩斌, 等. 石油污染土壤生物治理技术研究进展[J]. 环境管理, 2013(3): 73-75.
- [27] 王丽萍, 郭光霞, 华素兰, 等. 丛枝菌根真菌-植物对石油污染土壤修复实验研究[J]. 中国矿业大学学报, 2009, 38(1): 91-95.
- [28] 耿春女, 李培军, 陈素华, 等. 不同 AM 真菌对三叶草耐油性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6): 648-652.
- [29] 刘鹏, 李大平, 王晓梅, 等. 石油污染土壤的生物修复技术研究[J]. 化工环保, 2006, 26(2): 91-94.
- [30] 刘继朝, 崔岩山, 张燕平, 等. 植物与微生物对石油污染土壤修复的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2009(2): 80-83.
- [31] 唐景春, 孙青. 石油污染土壤生物修复的管理和成本分析[J]. 环境科学与管理, 2010, 35(6): 125-129.
- [32] 焦海华, 黄占斌, 白志辉. 石油污染土壤修复技术研究进展[J]. 环境整治, 2012(2): 48-56.

- [6] 任民, 王志德, 牟建民, 等. 我国烟草种质资源的种类与分布概况[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(Z1): 8-14.
- [7] 王军, 陆益敏, 刘百战, 等. Amadori 化合物合成方法综述[J]. 烟草化学, 2007(6): 53-55.
- [8] 王红瑞, 谢媛媛, 梁琼麟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定烟草中五种 Amadori 化合物[J]. 色谱, 2013, 31(12): 1189-1193.
- [9] BLANK I, DEVAUD S, MATTHEY-DORET W, et al. Formation of odorants in Maillard systems based on L-proline as affected by pH[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 3643-3650.
- [10] 王现军, 朱忠玉. 中国烟草布局的特点和发展趋势[J]. 地域研究与开发, 1995, 14(2): 14-18.
- [11] 杜铮, 魏庆华, 刘卫群. 河南省不同地区烤烟碳氮代谢与衰老启动关系的分析[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 52-55.