

# 白肋烟中糖酯类化合物的分离与鉴定

袁凯龙<sup>1</sup>, 朱俊臣<sup>2</sup>, 谢越<sup>2</sup>, 刘化兵<sup>1</sup>, 金慧清<sup>1</sup>,  
孙翠荣<sup>2</sup>, 张晓兵<sup>1</sup>, 冯鸿儒<sup>3</sup>, 潘远江<sup>3</sup>

(1. 浙江中烟工业有限责任公司, 浙江 杭州 310008;

2. 浙江大学药学院, 浙江省先进给药系统重点实验室, 浙江 杭州 310058; 3. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310027)

**摘要:** 烟草中糖酯类化合物是重要的致香前体物, 对烟叶的品质具有重要影响。但目前还未见关于白肋烟烟叶中糖酯类化合物的分离分析研究。本实验利用高分辨液相色谱-串联质谱(LC-MS<sup>n</sup>)技术, 从白肋烟叶提取物中共分离鉴定出 4 类蔗糖酯和 2 类葡萄糖酯, 每类均包含多种同系物。其中, 4 种蔗糖酯为首次发现, 8 种葡萄糖酯的结构鉴定在栽培烟草中为首次报道。本研究丰富了烟草中糖酯类化合物的种类, 对烟草中不同类型蔗糖酯和葡萄糖酯的分析鉴定和代谢研究具有参考意义。

**关键词:** 白肋烟; 蔗糖酯; 葡萄糖酯; 液相色谱-串联质谱(LC-MS<sup>n</sup>); 结构鉴定

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)03-0375-11

doi: 10.7538/zpxb.2023.0084

## Separation and Identification of Sugar Esters in Burley Tobacco

YUAN Kai-long<sup>1</sup>, ZHU Jun-chen<sup>2</sup>, XIE Yue<sup>2</sup>, LIU Hua-bing<sup>1</sup>, JIN Hui-qing<sup>1</sup>, SUN Cui-rong<sup>2</sup>,  
ZHANG Xiao-bing<sup>1</sup>, FENG Hong-ru<sup>3</sup>, PAN Yuan-jiang<sup>3</sup>

(1. China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310008, China; 2. Key Laboratory of Advanced Drug Delivery Systems of Zhejiang Province, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** Sugar esters in tobacco play an important role as precursors generating tobacco aroma species, and their presence significantly influence the quality of tobacco leaves. Typically present in trace amounts, sugar esters in tobacco exhibit a diverse range of isomers, making their separation and analysis a significant challenge. To address this challenge, mass spectrometry has been extensively applied for the identification and differentiation of various of sugar ester compounds in tobacco. However, there is no study regarding the separation and analysis of sugar esters specifically within Burley tobacco leaves. In this research, Burley tobacco leaf extracts were obtained using the solvent extraction technique, and underwent separation using silica gel column chromatography. Ultimately, the fractions comprising glucose esters and various sucrose esters were collected, respectively. The structural identification of these acquired sugar esters was achieved by liquid chromatography-tandem

mass spectrometry (LC-MS<sup>n</sup>). According to the MS<sup>2</sup> fragment ions of sucrose esters, the mass difference of 162.05 and 204.06 was mainly observed, implying an unbound fructose ring and a fructose ring acetylated in the sucrose ester, respectively. The composition information of fatty acids substituted to the glucose ring were further revealed based on the MS<sup>3</sup> or MS<sup>2</sup> fragment ions from sucrose esters or glucose esters. By combining the relative molecular weight, molecular formula, and the above mentioned fragment information, four types of sucrose esters from SE-I to SE-IV (referred to as compound 1-20) and two types of glucose esters GE-I to GE-II (referred to as compound 21-31) were finally identified. Among them, four sucrose esters of distinct molecular weights were newly discovered, and the structures of eight glucose esters were reported for the first time in cultivated tobacco. The sugar esters were analyzed by high-resolution mass spectrometry, which could effectively distinguish the number of fatty acids substituted on glucose and fructose, thus facilitating the differentiation of sugar ester types. Nevertheless, the identification of sugar esters in this study was limited to determine the characteristic skeleton and fatty acid composition. Detailed information on specific fatty acid types and substitution sites require further investigation using NMR technique. In conclusion, these results contribute to the current knowledge of sugar esters in Burley tobacco by expanding the range of identified types and providing high-resolution mass spectrometry data for various types of sugar esters for the first time. These findings hold significant reference value for the analysis, identification, and metabolism of different sucrose and glucose esters in tobacco.

**Key words:** Burley tobacco; sucrose esters; glucose esters; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS<sup>n</sup>); structural identification

烟叶糖酯类化合物是重要的致香前体物,在烟草调制过程中会释放具有明显香味的3-甲基丁酸、异丁酸、3-甲基戊酸等脂肪酸,能够改善烟草的香气风格和吸食品质<sup>[1-2]</sup>。烟叶中糖酯类化合物主要包括蔗糖酯(sucrose ester, SE)和葡萄糖酯(glucose ester, GE),是含量仅次于西柏烷的一类重要烟叶表面化合物,主要来源于烟叶表面的腺毛分泌物<sup>[3-4]</sup>。部分糖酯类化合物具有保湿、增润、抗菌、杀虫等作用,对烟叶品质有着重要影响<sup>[5-6]</sup>。

由于糖酯类化合物通常以微量形式存在于烟草中,且包含大量异构体,对其分析和鉴定面临挑战。气相色谱-质谱(GC-MS)<sup>[1]</sup>、液相色谱-质谱(LC-MS)<sup>[7-8]</sup>、离子淌度质谱(IMS-MS)<sup>[9]</sup>、直接化学电离质谱(DCI-MS)<sup>[10]</sup>等技术具有选择性强、灵敏度高等优点,已被用于烟草中蔗糖酯的分析。Severson等<sup>[1]</sup>利用凝胶柱色谱和GC-MS从抗虫烟草TI-165中分离并鉴定了6种SE同系物。采用GC-MS分析蔗糖酯需要较复杂的衍生反应,为简化处理,研究者选用离子阱或三重四

极杆LC-MS对烟草SE进行分析,成功鉴定了4类SE(SE-I~SE-IV),示于图1<sup>[11-15]</sup>。目前,针对SE的分析普遍使用低分辨质谱技术,对SE结构研究可能不够准确。如,低分辨质谱无法确定42 u的质量差值是对应乙酰基还是脂肪酸链中3个亚甲基<sup>[8]</sup>。因此,有必要利用高分辨质谱对烟叶中SE进行鉴定。针对GE,目前的研究主要围绕野生烟草,如荫生烟草<sup>[16]</sup>、摩西烟草<sup>[17]</sup>等茄科植物<sup>[18-19]</sup>。Shinozaki等<sup>[16]</sup>利用硅胶柱色谱从荫生烟草中分离出3类GE(GE-I~GE-III),示于图1,根据红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)和GC-MS,确定了GE的类型和脂肪酸组成。

白肋烟是一类重要的栽培烟草(*nicotiana tabacum* L.),是生产混合型卷烟的主要原料,但目前很少有关于白肋烟中SE、GE的鉴定报道。

基于此,本研究利用高分辨液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱(LC-ESI-IT-TOF MS<sup>n</sup>)技术,结合正相硅胶柱色谱前处理,对白肋烟中可能存在的蔗糖酯和葡萄糖酯进行分离分析和鉴定,希望为烟叶制品的生产和监控提供指导。

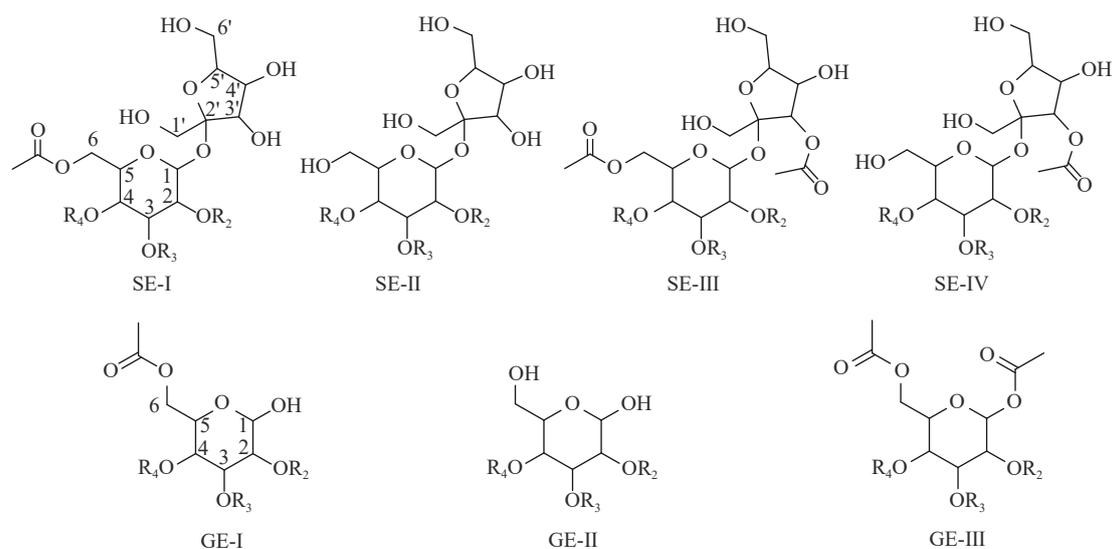


图1 4类蔗糖酯(SE-I~SE-IV)<sup>[11-15]</sup>和3类葡萄糖酯(GE-I~GE-III)<sup>[16]</sup>的化学结构式  
Fig. 1 Chemical structure formulas of four types of sucrose esters (SE-I~SE-IV)<sup>[11-15]</sup>  
and three types of glucose esters (GE-I~GE-III)<sup>[16]</sup>

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与装置

高效液相色谱-串联电喷雾-离子阱-飞行时间质谱(HPLC-ESI-IT-TOF MS)仪:日本岛津公司产品;KQ-250E型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;BSA224S Sartorius电子天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品;LNG-T98冷冻浓缩离心干燥器:太仓市华美生化仪器厂产品;Micro CL17高速离心机:赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品。

### 1.2 材料与试剂

白肋烟成熟烟叶:浙江中烟集团有限公司产品;甲醇(HPLC级):杭州邦易化工有限公司产品;蒸馏水:广州屈臣氏食品饮料有限公司产品;乙酸乙酯(分析纯)、石油醚(分析纯)、甲醇(分析纯)、甲酸(LC-MS级):国药集团化学试剂有限公司产品;蔗糖八乙酸酯(纯度98%):上海麦克林生化科技股份有限公司产品。

### 1.3 烟叶中糖酯类化合物的提取和分离

取适量的白肋烟叶粉碎、混匀,称取15 g烟叶粉末,加入150 mL乙酸乙酯,室温超声提取20 min,重复2次。将提取液合并、减压浓缩,用装填20 g硅胶(100~200目)的玻璃柱管(24 mm×300 mm)进一步分离,分别用不同比例的石油醚和乙酸乙酯进行洗脱,洗脱程序为100 mL石油醚,140 mL石油醚-乙酸乙酯(6:1, V/V),

120 mL石油醚-乙酸乙酯(1:1, V/V),120 mL石油醚-乙酸乙酯(1:5, V/V),110 mL石油醚-乙酸乙酯(1:10, V/V),400 mL乙酸乙酯。收集含有目标物的洗脱液,减压浓缩至干,复溶于甲醇,LC-MS<sup>n</sup>分析检测。

### 1.4 实验条件

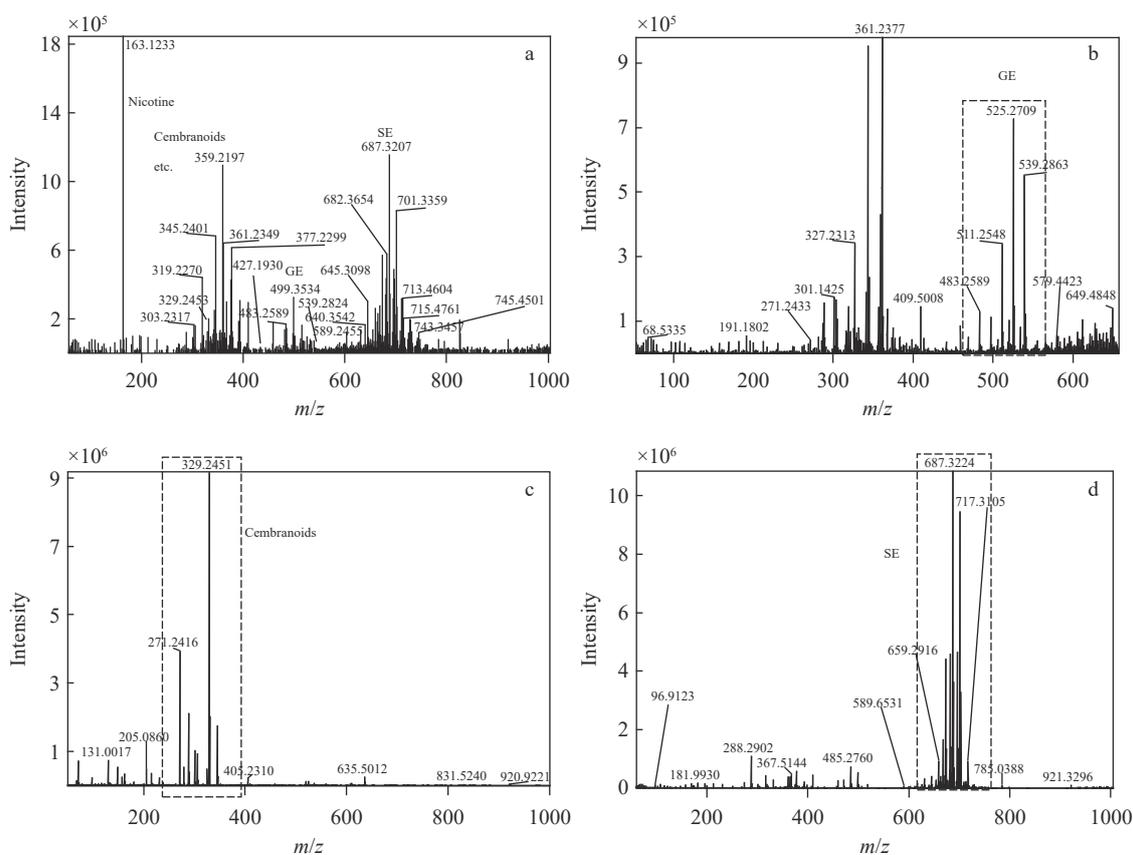
**1.4.1 色谱条件** YMC ODS C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm×3 μm);流动相:A为0.1%甲酸水溶液,B为甲醇;等度洗脱:0~20 min(88%B);流速0.3 mL/min;柱温30 ℃。

**1.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),正、负离子采集模式;检测电压1.57 kV;氮气流速1.5 L/min;曲线脱溶剂管(CDL)温度200 ℃;氮气流速压强100 kPa;离子累计时间30 ms;碰撞气体为高纯氩气;一级质谱扫描范围 $m/z$  50~1 000;多级质谱在正离子模式下采集,质量扫描范围 $m/z$  100~800;二级质谱碰撞能量为15%、19%;三级质谱碰撞能量为22%、25%;采用三氟乙酸钠聚合物进行高分辨质量校正;使用LCMSsolution Ver3软件进行数据采集和处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 烟叶提取物的分离和分析

烟叶提取物的质谱直接进样分析结果示于图2a。结合文献<sup>[1,5]</sup>发现,白肋烟叶中的乙酸乙酯提取物包含尼古丁( $m/z$  163.123 3[M+H]<sup>+</sup>)、



注: a. 烟叶提取物; b. 烟叶提取物经硅胶柱色谱分离得到的石油醚洗脱物; c. 烟叶提取物经硅胶柱色谱分离得到的石油醚-乙酸乙酯(6 : 1,  $V/V$ )洗脱物; d. 烟叶提取物经硅胶柱色谱分离得到的石油醚-乙酸乙酯(1 : 10,  $V/V$ )洗脱物

图 2 正离子模式下, 烟叶提取物的质谱检测结果

Fig. 2 MS analysis of tobacco extract under positive ion mode

西柏烷等二萜类(如  $m/z$  329.2453、359.2197  $[M+Na]^+$ )、蔗糖酯( $m/z$  589.2455~743.3457  $[M+Na]^+$ )、葡萄糖酯( $m/z$  427.1930~539.2824  $[M+Na]^+$ )等成分。为实现蔗糖酯、葡萄糖酯的分离和富集, 本实验利用硅胶柱色谱对烟叶提取物进行前处理, 结果示于图 2b。当石油醚(PE)作为洗脱溶剂时, 葡萄糖酯等一系列低极性成分被洗脱; 在石油醚-乙酸乙酯(EtOAc)为 6 : 1、1 : 1( $V/V$ )的洗脱条件下, 西柏烷等二萜类成分被洗脱, 其中 PE-EtOAc(6 : 1,  $V/V$ )洗脱物的检测结果示于图 2c; 在 PE-EtOAc 为 1 : 5、1 : 10( $V/V$ ), EtOAc 作为洗脱溶剂时, 一系列蔗糖酯组分依次被收集, 其中 PE-EtOAc(1 : 10,  $V/V$ )洗脱物的检测结果示于图 2d, 此时尼古丁等强极性组分仍被保留在硅胶柱中, 利用甲醇可将其洗脱下来。

## 2.2 烟叶中糖酯类化合物的鉴定

为准确识别和表征糖酯类化合物的结构, 本

实验利用 HPLC-ESI-IT-TOF  $MS^n$  进一步分析白肋烟叶中分离的蔗糖酯和葡萄糖酯。在正、负离子模式下, 糖酯类化合物均有响应,  $[M+Na]^+$  响应最强, 因此被选为多级质谱分析的前体离子。检测到的 4 类蔗糖酯(SE-I~SE-IV)和 2 类葡萄糖酯(GE-I~GE-II)的相对分子质量、分子式、准分子离子峰  $[M+Na]^+$ 、多级质谱碎片离子列于表 1、2, 原始谱图示于附图 1~48(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载)。每个糖酯化合物的  $[M+Na]^+$  与理论值的质量偏差均小于  $5 \times 10^{-6}$ 。由相对分子质量、分子式、多级质谱碎片离子, 并结合相关文献推导出每类糖酯化合物的结构。

**2.2.1 烟叶中蔗糖酯 SE-I 的鉴定** 本实验在 PE-EtOAc(1 : 10,  $V/V$ )洗脱液中检测到 4 种蔗糖酯同系物, 即表 1 中的化合物 1~4, 示于图 3a。  $[M+Na]^+$  分别为  $m/z$  701.3362、687.3203、673.3027、659.2870, 主要的  $MS^2$  碎片离子分别

表1 从白肋烟叶中检测到的4类蔗糖酯(SE-I~SE-IV)的相对分子质量、分子式、  
[M+Na]<sup>+</sup>准分子离子峰、多级质谱碎片离子及其脂肪酸组成

Table 1 Relative molecular weight, molecular formula, [M+Na]<sup>+</sup> excimer ion peak, MS<sup>n</sup> product ions and fatty acid combinations of four types of sucrose esters (SE-I-SE-IV) detected from Burley tobacco leaves

序号 No.	相对分子质量 Relative molecular weight	分子式 Molecular formula	[M+Na] <sup>+</sup>		质量 偏差 Mass error (×10 <sup>-6</sup> )	产物离子 Product ion (m/z)		脂肪酸 组成 Fatty acid	类型 Type	参考 文献 Reference
			理论 质荷比 Calculated m/z	实测 质荷比 Measured m/z		MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>			
1	678.3463	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> O <sub>15</sub>	701.3355	701.3362	1.00	539.2807	423.1977, 363.1775, 307.1133, 247.0919	C2C6C6C6	I	[1, 7-12]
2	664.3306	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>15</sub>	687.3198	687.3203	0.73	525.2645	423.1971, 409.1830, 349.1624, 307.1120, 293.0976, 191.0277	C2C6C6C5	I	
3	650.3150	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>15</sub>	673.3042	673.3027	-2.23	511.2466	423.1956, 409.1825, 395.1661, 307.1114, 293.0964	C2C6C6C4, C2C6C5C5	I	
4	636.2993	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>15</sub>	659.2885	659.2870	-2.28	497.2308	423.1981, 409.1821, 395.1664, 381.1481, 307.1160, 293.0980	C2C6C6C3, C2C5C5C5, C2C6C5C4	I	
5	636.3357	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	659.3249	659.3223	-3.94	497.2682	381.1854, 265.1024	C6C6C6	II	[8]
6	622.3201	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>14</sub>	645.3093	645.3081	-1.86	483.2534	381.1862, 367.1713, 265.0975, 251.0865	C6C6C5	II	
7	608.3044	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>14</sub>	631.2936	631.2945	1.43	469.2379	381.1905, 367.1722, 353.1591	C6C6C4, C6C5C5	II	
8	594.2888	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>14</sub>	617.2780	617.2795	2.43	455.2249	367.1714, 353.1596	C6C6C3, C5C5C5, C6C5C4	II	
9	580.2731	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>14</sub>	603.2623	603.2605	-2.98	441.2069	325.1242	C6C6C2	II	
10	566.2575	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>14</sub>	589.2467	589.2492	4.24	427.1957	-	-	II	
11	720.3568	C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> O <sub>16</sub>	743.3461	743.3454	-0.94	539.2801	423.1970, 363.1751, 307.1127, 247.0934	C2C6C6C6	III	[9]
12	706.3412	C <sub>33</sub> H <sub>54</sub> O <sub>16</sub>	729.3304	729.3310	0.82	525.2643	423.1965, 409.1822, 349.1587, 307.1124, 293.0983, 191.0335	C2C6C6C5	III	[9, 10, 13]
13	692.3255	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>16</sub>	715.3148	715.3130	-2.52	511.2482	423.1872, 409.1818, 395.1655, 307.1150, 293.0924	C2C6C6C4, C2C6C5C5	III	[9, 10, 13]

续表

序号 No.	相对分子质量 Relative molecular weight	分子式 Molecular formula	[M+Na] <sup>+</sup>		质量 偏差 Mass error (×10 <sup>-6</sup> )	产物离子 Product ion (m/z)		脂肪酸 组成 Fatty acid	类型 Type	参考 文献 Reference
			理论 质荷比 Calculated m/z	实测 质荷比 Measured m/z		MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>			
14	678.3099	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>16</sub>	701.2991	701.2973	-2.57	497.2356	423.1773, 409.1807, 395.1660, 381.1490, 307.1150, 293.0956	C2C6C6C3, C2C6C5C4, C2C5C5C5	III	[11]
15	664.2942	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>16</sub>	687.2835	687.2826	-1.31	483.2173	409.1804, 395.1667, 381.1498, 367.1399, 307.1082, 293.0990	C2C6C5C3, C2C5C5C4, C2C6C4C4	III	本研究
16	650.2786	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>16</sub>	673.2678	673.2689	1.63	469.2031	381.1481, 367.1317, 353.1273	C2C5C4C4, C2C6C5C2	III	本研究
17	636.2993	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>15</sub>	659.2885	659.2907	3.34	455.2158	367.1604, 353.1454	C6C5C4, C5C5C5	IV	本研究
18	622.2837	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>15</sub>	645.2729	645.2749	3.10	441.2090	N.D.	-	IV	[8]
19	608.2680	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>15</sub>	631.2572	631.2594	3.49	427.1995	N.D.	-	IV	
20	594.2524	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>15</sub>	617.2416	617.2431	2.43	413.1795	N.D.	-	IV	本研究

注: Cn表示总碳数为n的脂肪酸; N.D.表示未确定

表 2 从白肋烟叶中检测到的 2 类葡萄糖酯(GE-I 和 GE-II)的相对分子质量、分子式、  
[M+Na]<sup>+</sup>准分子离子峰、多级质谱碎片离子及其脂肪酸组成

Table 2 Relative molecular weight, molecular formula, [M+Na]<sup>+</sup> excimer ion peak, MS<sup>n</sup> product ions and fatty acid combinations of two types of glucose esters (GE-I and GE-II) detected from Burley tobacco leaves

序号 No.	相对分子质量 Relative molecular weight	分子式 Molecular formula	[M+Na] <sup>+</sup>		质量 偏差 Mass error (×10 <sup>-6</sup> )	MS <sup>2</sup> 产物离子 MS <sup>2</sup> product ion (m/z)	脂肪酸 组成 Fatty acid	类型 Type	参考 文献 Reference
			理论 质荷比 Calculated m/z	实测 质荷比 Measured m/z					
21	516.2934	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>10</sub>	539.2827	539.2815	-2.23	423.1964, 363.1764, 307.1119, 191.0262	C2C6C6C6	I	[11]
22	502.2778	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	525.2676	525.2656	-3.81	423.1954, 409.1817, 349.1596, 307.1142, 293.0981	C2C6C6C5	I	[11]
23	488.2621	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>10</sub>	511.2514	511.2509	-0.98	423.1980, 409.1809, 395.1651, 335.1349, 307.1137, 293.0980, 191.0262	C2C6C6C4, C2C6C5C5	I	[11]
24	474.2465	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	497.2357	497.2350	-1.41	423.1954, 409.1831, 395.1672, 381.1551, 307.1150, 293.0990	C2C6C5C4, C2C5C5C5, C2C6C6C3	I	本研究
25	514.2778	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	537.2670	537.2684	2.61	421.1795, 307.1139	C2C6C6C6 (Ω=1)	I	本研究
26	486.2465	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	509.2357	509.2376	3.73	409.1824, 407.1657, 393.1553	C2C6C5C5 (Ω=1)	I	本研究
27	474.2829	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	497.2727	497.2704	-4.63	381.1850, 265.0967	C6C6C6	II	本研究
28	460.2672	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	483.2565	483.2564	-0.21	381.1884, 367.1675, 265.1023	C6C6C5	II	本研究
29	446.2516	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	469.2408	469.2425	3.62	381.1856, 367.1700, 353.1634, 311.1083, 265.1012	C6C6C4, C6C5C5	II	本研究

续表

序号 No.	相对分子质量 Relative molecular weight	分子式 Molecular formula	[M+Na] <sup>+</sup>		质量 偏差 Mass error (×10 <sup>-6</sup> )	MS <sup>2</sup> 产物离子 MS <sup>2</sup> product ion ( <i>m/z</i> )	脂肪酸 组成 Fatty acid	类型 Type	参考 文献 Reference
			理论 质荷比 Calculated <i>m/z</i>	实测 质荷比 Measured <i>m/z</i>					
30	418.2203	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	441.2095	441.2073	-4.99	423.2168, 325.1191, 283.1068, 265.0945	C6C6C2	II	本研究
31	404.2046	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	427.1939	427.1930	-2.11	409.1868, 325.1191, 293.0990, 283.1122	C6C5C2	II	本研究

是  $m/z$  539.280 7、525.264 5、511.246 6、497.230 8, 质量差值分别为 162.055 5、162.055 8、162.056 1、162.056 2 u, 对应果糖片段的丢失。以上结果表明, 这 4 种蔗糖酯均包含 1 个羟基全部游离的果糖结构。根据 MS<sup>3</sup> 碎片离子进一步推导出葡萄糖上的脂肪酸组成。以  $m/z$  687.320 3[M+Na]<sup>+</sup> 对应的蔗糖酯(化合物 2)为例, 其裂解途径示于图 4a。MS<sup>2</sup> 碎片离子  $m/z$  525.264 5 碎裂产生  $m/z$  409.183 0、423.197 1, 质量差值分别是 116.081 5、102.067 4 u, 分别对应 1 个 C6 酸(116.083 7 u)和 C5 酸(102.068 1 u)的丢失;  $m/z$  409.183 0 继续碎裂产生碎片离子  $m/z$  349.162 4、307.112 0、293.097 6, 质量差值分别是 60.020 6、102.071 0、116.085 4 u, 分别对应丢失 1 个 C2 酸(60.021 1 u)、C5 酸、C6 酸。上述结果表明, 该蔗糖酯结构可能属于 SE-I, 由 1 个完全酯化的葡萄糖和 1 个羟基全部游离的果糖组成, 葡萄糖上的脂肪酸组成推测为 C2C6C6C5。其他 3 种同系物也被证实属于 SE-I, 脂肪酸组成分别为 C2C6C6C6、C2C6C6C4/C2C6C5C5、C2C6C6C3/C2C5C5C5/C2C6C5C4。SE-I 是烟草中含量最多的一类蔗糖酯, 已被较多文献<sup>[3, 7-12]</sup>报道。

**2.2.2 烟叶中蔗糖酯 SE-II 的鉴定** 在 EtOAc 洗脱液的总离子流图中发现 6 种蔗糖酯同系物, 即表 1 中化合物 5~10, 示于图 3b。[M+Na]<sup>+</sup> 分别是  $m/z$  659.322 3、645.308 1、631.294 5、617.279 5、603.260 5、589.249 2, 依次相差 1 个亚甲基(14.015 7 u)。以化合物 5 为例, 裂解途径示于图 4b。基于相对分子质量, 确定其分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>14</sub>, 主要的 MS<sup>2</sup> 产物离子是  $m/z$  497.268 2, 质量差值 162.054 1 u, 对应果糖片段(162.052 8 u)的丢失, 表明该蔗糖酯结构中含有 1 个羟基全部

游离的果糖。在 MS<sup>3</sup> 碎裂中,  $m/z$  497.268 2 离子产生  $m/z$  381.185 4, 质量差值(116.083 0 u)对应 1 个 C6 酸(116.083 7 u)的丢失。 $m/z$  381.185 4 离子进一步碎裂得到  $m/z$  265.102 4, 表明继续丢失了 1 个 C6 酸。除此之外, 没有观察到其他碎片离子。结合相对分子质量、分子式和 MS<sup>n</sup> 碎片离子, 可以推断该蔗糖酯的葡萄糖环上可能取代有 3 个 C6 脂肪酸。与同样含有 3 个 C6 脂肪酸的化合物 1(分子质量 678.346 3)相比, 二者的分子式相差 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O 片段, 质量差值 42.013 9 u, 对应相差 1 个乙酰基(42.010 6 u)。上述结果表明, 化合物 5 属于 SE-II, 由 1 个羟基全部游离的果糖和 1 个部分酯化的葡萄糖构成, 葡萄糖上取代有 3 个 C6 脂肪酸。其余 5 个同系物也被证实属于 SE-II 结构。

虽然化合物 5~10 已由 Ashraf-Khorassani 等<sup>[8]</sup>从东方烟草中发现, 但具体的脂肪酸组成在本实验首次被报道。另外, 本实验还可以区分乙酰基(42.010 6 u)或 3 个亚甲基(42.047 1 u)对应的相对分子质量。

### 2.2.3 烟叶中蔗糖酯 SE-III 和 SE-IV 的鉴定

PE-EtOAc(1:5, V/V)洗脱物中 SE-III 和 SE-IV 的检测结果显示于图 3c。在 PE-EtOAc(1:5, V/V)洗脱液的总离子流图中, 提取 6 种 SE-III(化合物 11~16)和 4 种 SE-IV(化合物 17~20), 这 2 类结构与 SE-I、SE-II 的区别在于果糖环上均取代有 1 个乙酰基。如表 1 所示, 6 种 SE-III 和 4 种 SE-IV 的 [M+Na]<sup>+</sup> 与 MS<sup>2</sup> 产物离子的质量差值范围分别为 204.061 7~204.066 7 u 和 204.059 9~204.074 9 u, 表明被 1 个乙酰基取代的果糖片段(204.063 4 u)的丢失。对于 MS<sup>3</sup> 碎裂途径以及葡萄糖上的脂肪酸组成, SE-III 和 SE-IV 分别与 SE-I 和 SE-II 类似, 示于图 4c、4d。尽管在化合

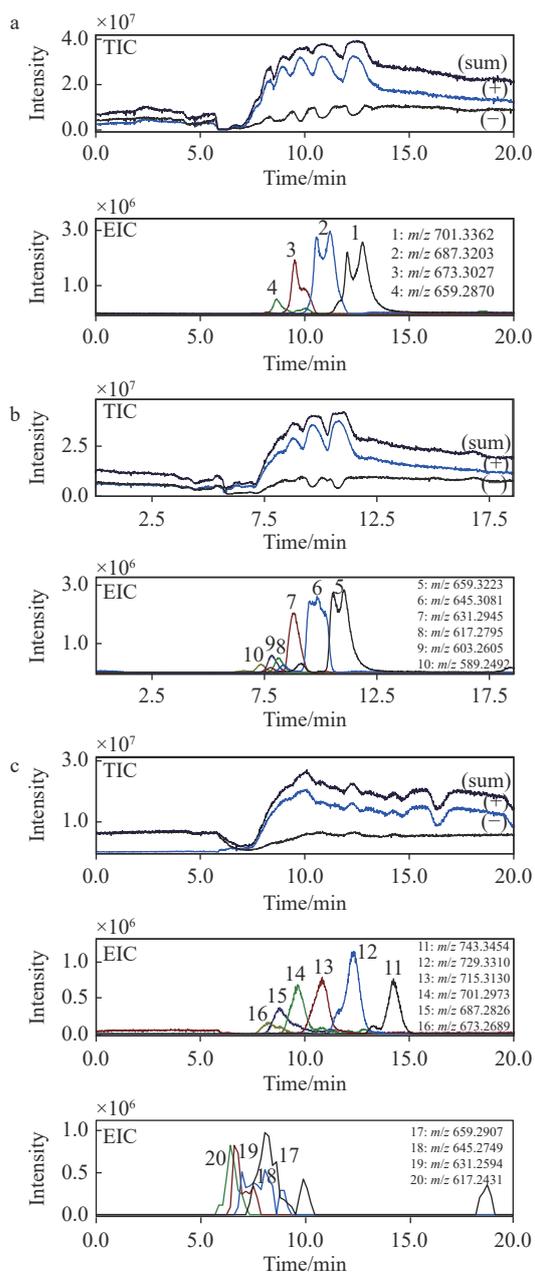


图3 烟草提取物经硅胶柱色谱分离得到的来自 PE-EtOAc(1 : 10, V/V)洗脱物中的 SE-I(a), EtOAc 洗脱物中的 SE-II(b), PE-EtOAc(1 : 5, V/V)洗脱物中的 SE-III 和 SE-IV(c)的总离子流图和提取离子流图

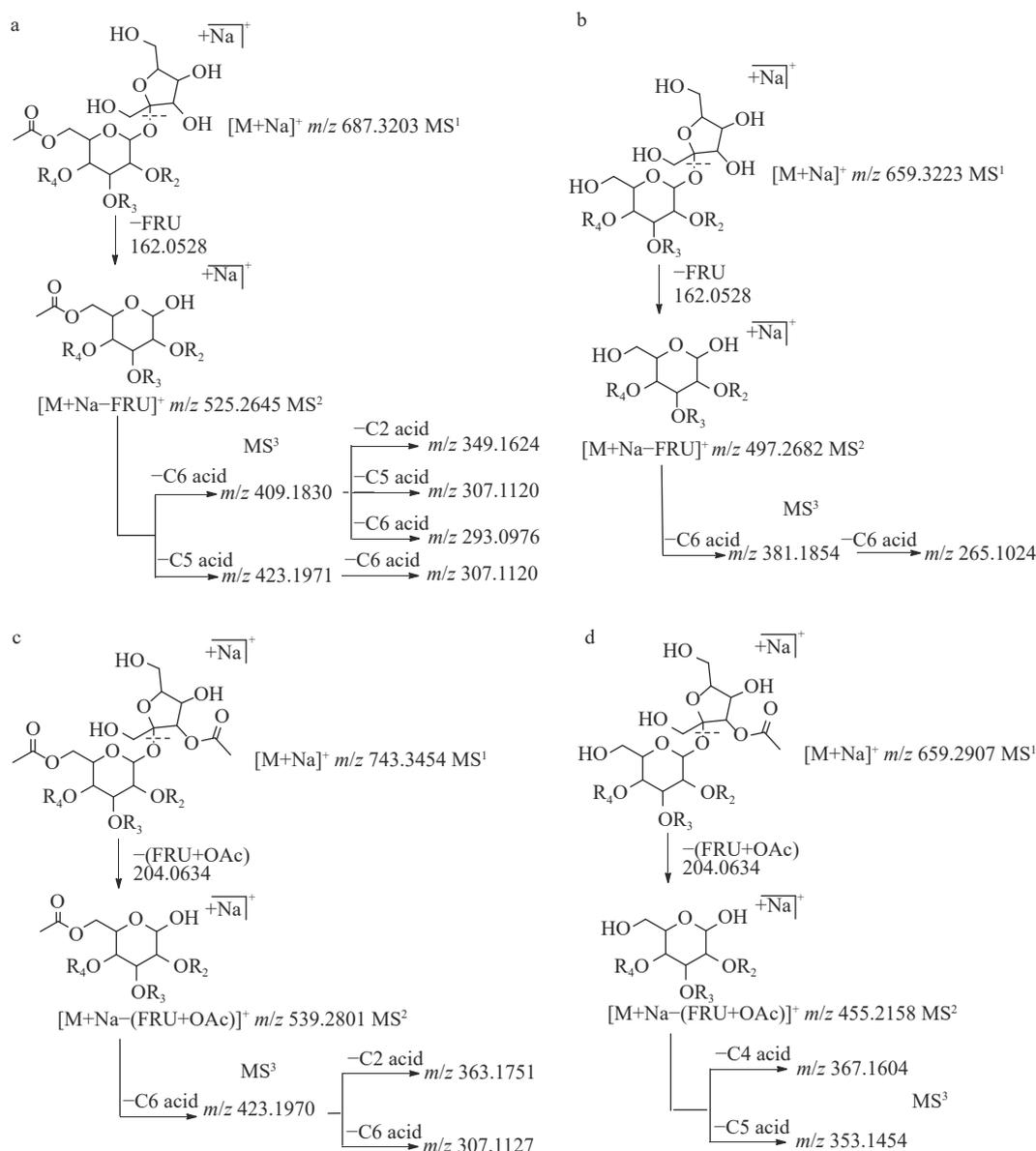
Fig. 3 Total ion current chromatograms and extracted ion chromatograms of SE-I from PE-EtOAc (1 : 10, V/V) eluate (a), SE-II from EtOAc eluate (b), SE-III and SE-IV from PE-EtOAc (1 : 5, V/V) eluate (c) of tobacco leaf extract extracted by silica gel column chromatography

物 18~20 未检测到 MS<sup>3</sup> 碎片离子, 但根据 HR-MS 数据可以发现, 这 3 种化合物的 [M+Na]<sup>+</sup>

( $m/z$  645.274 9、631.259 4、617.243 1) 与 [M<sub>化合物 17</sub>+Na]<sup>+</sup> ( $m/z$  659.290 7) 分别相差 14.015 8、28.031 3、42.047 6 u, 基本对应  $n\text{CH}_2$ , 表明化合物 18~20 与化合物 17 仅在葡萄糖上取代的脂肪酸碳链长度有区别, 脂肪酸数量没有差异。根据这些特征, 并结合 MS<sup>2</sup> 碎片离子, 将化合物 18~20 归属为 SE-IV。最终, 推导 SE-III 是由 1 个完全酯化的葡萄糖和 1 个单乙酰取代的果糖连接构成, SE-IV 是由 1 个被 3 个脂肪酸酯化的葡萄糖和 1 个单乙酰取代的果糖连接构成。6 种 SE-III 同系物和 1 种 SE-IV 的脂肪酸组成分别列于表 1, 4 种蔗糖酯(化合物 15~17, 20)为首次发现。

**2.2.4 烟叶中 2 类葡萄糖酯 GE-I 和 GE-II 的鉴定** 在 PE 洗脱液中检测到 6 种 GE-I(化合物 21~26)和 5 种 GE-II(化合物 27~31), 相对分子量、分子式以及 MS<sup>2</sup> 产物离子列于表 2, 3 种葡萄糖酯(化合物 21、25、28)的提取离子流图示于图 5。2 类葡萄糖酯结构的主要区别是 GE-I 的葡萄糖环被包含乙酸在内的 4 个脂肪酸取代, 而 GE-II 只有 3 个脂肪酸取代。以化合物 21 为例, 其裂解途径示于图 6a。在 MS<sup>2</sup> 碎裂中,  $m/z$  539.281 5 母离子首先丢失 C6 酸(116.085 1 u) 产生  $m/z$  423.196 4; 该离子分别进一步丢失 C2 酸(60.021 1 u) 和 2 个 C6 酸, 得到产物离子  $m/z$  363.176 4、307.111 9、191.026 2。由此推测, 化合物 21 的结构为葡萄糖上有 4 个脂肪酸取代, 脂肪酸组成为 C2C6C6C6, 属于 GE-I。化合物 28 的裂解途径示于图 6b, 其母离子  $m/z$  483.256 4 在 MS<sup>2</sup> 碎裂中产生离子  $m/z$  381.188 4、367.167 5, 质量差值分别是 102.068 0、116.088 9 u, 对应 C5 酸、C6 酸的丢失。 $m/z$  265.102 3 可能是由  $m/z$  381.188 4 或  $m/z$  367.167 5 继续丢失 C6 酸或 C5 酸产生的。此外, 没有发现其他碎片离子。由此推测, 化合物 28 的结构为葡萄糖上取代 3 个脂肪酸, 脂肪酸组成为 C6C6C5, 属于 GE-II。

另外, 本研究还发现了属于 GE-I 结构的含有不饱和脂肪酸链的葡萄糖酯, 示于图 6c。 $m/z$  537.268 4 前体离子在 MS<sup>2</sup> 碎裂中首先丢失 C6 酸(116.083 7 u), 得到  $m/z$  421.179 5 产物离子; 该离子进一步碎裂产生  $m/z$  307.113 9, 质量差值 114.065 6 u, 对应含有 1 个不饱和度( $\Omega=1$ )的 C6 酸(114.068 1 u)。根据 HR-MS 检测得到的 [M+Na]<sup>+</sup> 小数部分的差异可区分 GE-I 和 GE-II。由此推



注: a. 化合物 2; b. 化合物 5; c. 化合物 11; d. 化合物 17

图 4 4 种蔗糖酯可能的碎裂途径

Fig. 4 Possible fragmentation pathways of four types of sucrose esters

测, 化合物 25 的结构为葡萄糖取代有 4 个脂肪酸 C2C6C6C6, 其中 1 个 C6 酸含有 1 个碳碳双键 ( $\Omega=1$ ), 属于 GE-I。基于类似方法, 分别推导出其他葡萄糖酯的可能结构和脂肪酸组成, 列于表 2。除化合物 21~23<sup>[13]</sup>以外, 本实验检测到的葡萄糖酯均为在栽培烟草中首次发现。但由于质谱检测的局限, 本实验只能确定蔗糖酯、葡萄糖酯的特征骨架和脂肪酸组成, 无法提供脂肪酸种类和取代位点的准确信息, 后续可利用核磁共振(NMR)技术进一步研究。

### 3 结论

本实验利用高分辨液相色谱-串联质谱技术, 结合正相硅胶柱前处理方法, 从白肋烟叶的乙酸乙酯提取物中共鉴定出 4 类蔗糖酯和 2 类葡萄糖酯, 每类均包含多种同系物。其中, 4 种蔗糖酯为首次发现, 8 种葡萄糖酯的结构鉴定在栽培烟草中为首次发现。本研究提供了各种类型糖酯类化合物的高分辨质谱数据, 丰富了烟草中糖酯类化合物的结构类型, 对烟草中不同类型蔗糖酯和葡萄糖酯的分离分析以及代谢研究具有参考价值。

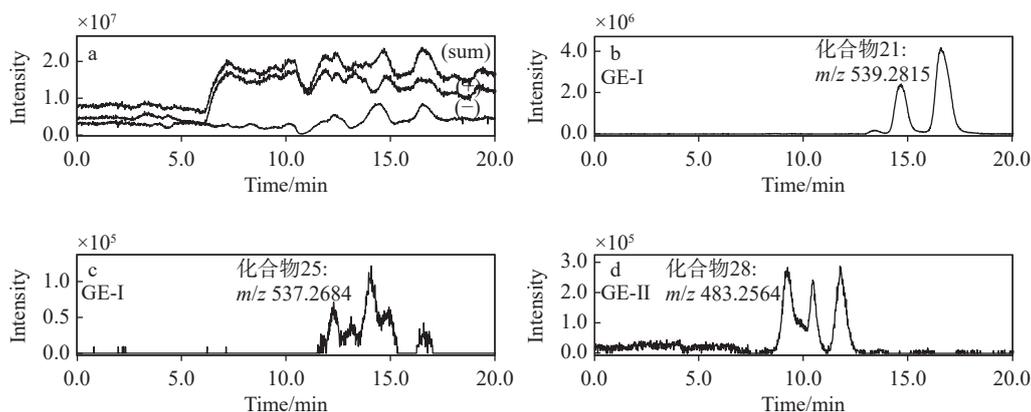
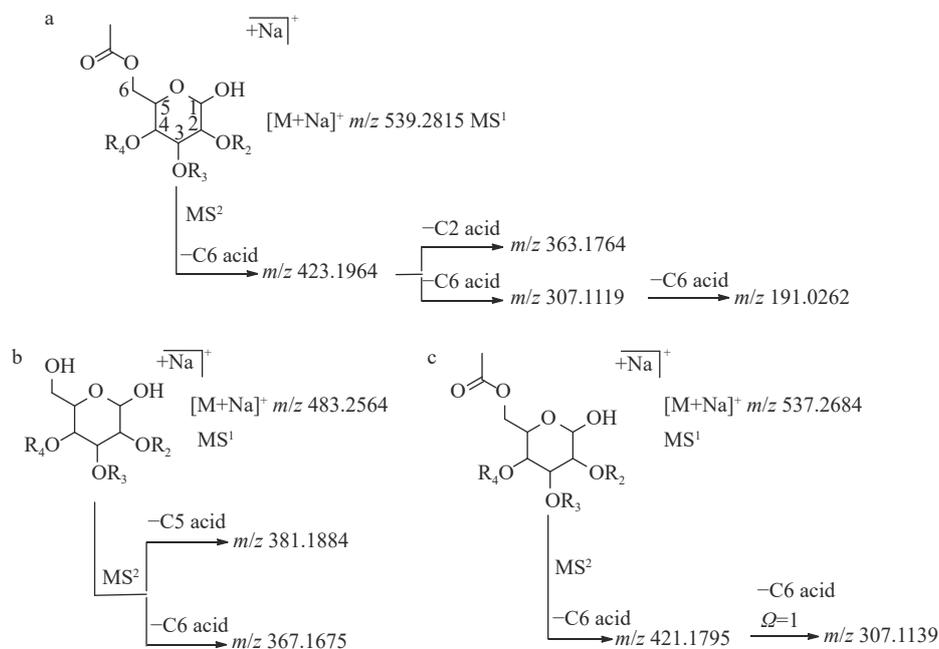


图5 PE洗脱物中3种葡萄糖酯(化合物21、25、28)的总离子流图(a)和提取离子流图(b、c、d)  
Fig. 5 Total ion current chromatogram (a) and extracted ion chromatograms (b, c, d) of three types of glucose esters (compound 21, 25, 28) from PE eluate



注: a. 化合物21; b. 化合物28; c. 化合物25

图6 3种葡萄糖酯可能的碎裂途径

Fig. 6 Possible fragmentation pathways of three types of glucose esters

#### 参考文献:

- [1] SEVERSON R F, ARRENDALE R F, CHORTYK O T, GREEN C R, THOME F A, STEWART J L, JOHNSON A W. Isolation and characterization of the sucrose esters of the cuticular waxes of green tobacco leaf[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 870-875.
- [2] 陈欢. 糖酯在烟草中的应用研究进展[J]. *农产品加工*, 2021(13): 79-80, 85.  
CHEN Huan. Application research progress of sucrose esters in tobacco[J]. *Farm Products Processing*, 2021(13): 79-80, 85(in Chinese).
- [3] 陈欢, 罗昭标. 烟草糖酯的分析与合成研究进展[J]. *农产品加工*, 2019(18): 54-57.  
CHEN Huan, LUO Zhaobiao. Research progress on analysis and synthesis of sucrose esters from tobacco[J]. *Farm Products Processing*, 2019(18): 54-57(in Chinese).
- [4] 马旭东, 王召军, 闫筱筱, 崔红, 张洪映. 分泌型烟草腺毛形态和叶面化学成分的比较[J]. *烟草科技*, 2021, 54(1): 10-16.  
MA Xudong, WANG Zhaojun, YAN Xiaoxiao, CUI Hong,

- ZHANG Hongying. Comparative studies on secretory glandular trichome morphology and leaf surface chemistry between tobacco varieties[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2021, 54(1): 10-16(in Chinese).
- [5] SEVERSON R F, ARRENDALE R F, CHORTYK O T, JOHNSON A W, JACKSON D M, GWYNN G R, CHAPLIN J F, STEPHENSON M G. Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco types[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(3): 566-570.
- [6] XIA Y, JOHNSON A W, CHORTYK O T. Enhanced toxicity of sugar esters to the tobacco aphid (homoptera: Aphididae) using humectants[J]. *Journal of Economic Entomology*, 1997, 90(4): 1 015-1 021.
- [7] ASHRAF-KHORASSANI M, NAZEM N, TAYLOR L T, COLEMAN W M III. Separation and identification of sucrose esters from Turkish tobacco using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Beiträge Zur Tabakforschung International*, 2005, 21(7): 381-389.
- [8] ASHRAF-KHORASSANI M, NAZEM N, TAYLOR L T, COLEMAN W M III. Isolation, fractionation, and identification of sucrose esters from various oriental tobaccos employing supercritical fluids[J]. *Beiträge Zur Tabakforschung International*, 2008, 23(1): 32-45.
- [9] 范若静, 陈秀萍, 张芳, 张菁, 郭寅龙. 液相色谱-离子淌度-四极杆/飞行时间串联质谱法快速检测烟叶中蔗糖酯[J]. *质谱学报*, 2016, 37(4): 301-309.
- FAN Ruojing, CHEN Xiuping, ZHANG Fang, ZHANG Jing, GUO Yinlong. Fast detection of sucrose esters in tobacco leaf using liquid chromatography coupled with ion mobility-quadrupole/time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37(4): 301-309(in Chinese).
- [10] EINOLF W N, CHAN W G. Estimation of sucrose esters in tobacco by direct chemical ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(4): 785-789.
- [11] DING L, XIE F, ZHAO M, WANG S, XIE J, XU G. Rapid quantification of sucrose esters in oriental tobacco by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2007, 30(1): 35-41.
- [12] DING L, XIE F, ZHAO M, XIE J, XU G. Rapid characterization of the sucrose esters from oriental tobacco using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(19): 2 816-2 822.
- [13] DING L, XIE F, XU G, LIU K, WANG S, XIE J. Separation and detection of polar cuticular components from Oriental tobacco leaf by integration of normal-phase liquid chromatography fractionation with reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(21): 3 429-3 436.
- [14] JIA C, WANG Y, ZHU Y, XU C, MAO D. Preparative isolation and structural characterization of sucrose ester isomers from oriental tobacco[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 372: 73-77.
- [15] ZHU H, FENG Y, YANG J, PAN W, LI Z, TU Y, ZHU X, HUANG G. Separation and characterization of sucrose esters from Oriental tobacco leaves using accelerated solvent extraction followed by SPE coupled to HPLC with ion-trap MS detection[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(15): 2 486-2 495.
- [16] SHINOZAKI Y, MATSUZAKI T, SUHARA S, TOBITA T, SHIGEMATSU H, KOIWAI A. New types of glycolipids from the surface lipids of *Nicotiana glauca* L. [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(3): 751-756.
- [17] MATSUZAKI T, SHINOZAKI Y, SUHARA S, SHIGEMATSU H, KOIWAI A. Isolation and characterization of tetra- and triacylglycerols from the surface lipids of *Nicotiana glauca* L. [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53(12): 3 343-3 345.
- [18] SCHUMACHER J N. The isolation of 6-O-acetyl-2, 3, 4-tri-O-[(+)-3-methylvaleryl]- $\beta$ -D-glucopyranose from tobacco[J]. *Carbohydrate Research*, 1970, 13(1): 1-8.
- [19] 贾春晓, 王瑞玲, 王莹莹, 毛多斌. 超声萃取-气相色谱-质谱法测定烟叶中的葡萄糖四酯[J]. *分析试验室*, 2013, 32(12): 55-60.
- JIA Chunxiao, WANG Ruiling, WANG Yingying, MAO Duobin. Determination of glucose tetra-esters in tobaccos by ultrasonic extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2013, 32(12): 55-60(in Chinese).

(收稿日期: 2023-07-25; 修回日期: 2023-09-07)