

## 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法快速分析烟草中 7 种潜香物质

吴新华<sup>1,2</sup>, 朱瑞芝<sup>1,3</sup>, 王 凯<sup>1,3</sup>, 任卓英<sup>1</sup>, 牟定荣<sup>1</sup>, 魏万之<sup>3</sup>, 缪明明<sup>4</sup>

(1. 红塔烟草(集团)有限责任公司技术中心, 云南 玉溪 653100;

2. 昆明理工大学, 云南 昆明 650224; 3. 湖南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410082;

4. 云南烟草科学研究院, 云南 昆明 650106)

**摘要:** 使用超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-ESI-MS/MS)在多反应离子监测(MRM)模式下分离鉴定了烟草中 7 种潜香物质。烟样经甲醇提取, XAD-2 柱分离纯化, 选择中性丢失 162 u 扫描确定母离子。通过对母离子二级质谱扫描( $MS^2$ ), 并根据  $m/z$  192.7、179.2、163.1、134.7、133.2 等特征碎片离子峰分析结果确定了 7 种潜香型物质, 分别为熊果苷、香豆酸-葡萄糖苷、香豆素奎尼酸、新绿原酸、绿原酸、葡萄糖基阿魏酸、3-氧化紫罗兰醇葡萄糖苷。

**关键词:** 烟草; 潜香物质; 超高效液相色谱-质谱联用

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2010)02-0088-06

## Rapid Analysis of 7 Aroma Precursors in Tobacco by UPLC-ESI-MS/MS

WU Xin-hua<sup>1,2</sup>, ZHU Rui-zhi<sup>1,3</sup>, WANG Kai<sup>1,3</sup>,

REN Zhuo-ying<sup>1</sup>, MOU Ding-rong<sup>1</sup>, WEI Wan-zhi<sup>3</sup>, MIAO Ming-ming<sup>4</sup>

(1. R&D Center of Hongta Tobacco (Group) Co Ltd, Yuxi 653100, China;

2. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China;

4. Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming 650106, China)

**Abstract:** A method for identification of 7 aroma precursors in tobacco was established by using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry interfaced with electro-spray ionization (UPLC-ESI-MS/MS) in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Aroma precursors in tobacco were extracted with methanol, cleaned up with XAD-2 column, then detected and identified by ESI-MS/MS with the neutral loss method. According to the characteristic product ions of  $m/z$  192.7, 179.2, 163.1, 134.7, 133.2 acquired by product ion scan ( $MS^2$ ), 7 potential flavor compounds are identified, they are arbutin, *trans-p*-coumaric acid-4- $\alpha$ - $\beta$ -D-glucopyranoside, coumaroylquinic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, feruloylglycoside, 3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glycoside. The method is rapid, convenient and suitable for the determination of aroma precursors in tobacco leaves.

收稿日期: 2009-08-27; 修回日期: 2009-11-24

作者简介: 吴新华(1984~), 男(汉族), 湖北监利县人, 硕士研究生, 从事烟草化学研究。E-mail: wuxinhuagg@yahoo.com.cn

通信作者: 朱瑞芝(1978~), 女(汉族), 湖北公安县人, 博士, 从事烟草化学研究。E-mail: zhu.ruizhi@163.com

**Key words:** tobacco; aroma precursors; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry interfaced with electro-spray ionization(UPLC-MS/MS)

卷烟香味是烟草品质的重要体现,因此对于烟草香味成分的分、鉴定和分析一直以来都是烟草研究的重要领域。其中潜香物质是烟草香气组成的重要部分,包括有机酸、多酚(主要以葡萄糖苷和酯的形式存在)等。这些化合物在烟叶生长发育过程中形成,其本身不具有香气特征,但在烟草成熟、调制、醇化和燃烧过程中,可释放出香气物质,从而对烟气香味产生贡献。潜香物质在烟草调香过程中具有重要作用,对烟草等级、烟气特征、吸食品位都有重要的影响<sup>[1]</sup>。

目前对容易获得标样的潜香物质的分析方法主要有液相色谱法<sup>[2-4]</sup>,而对于很难获得对照品的潜香物质,如糖苷物质,其分析方法主要有以下 3 种:1) 衍生生化处理,再使用气相色谱-质谱联用的方法进行分析<sup>[5]</sup>;2) 先将糖苷粗提物酶(水)解,然后用气相色谱法或气相色谱-质谱联用法分析糖苷酶(酸)解后的苷元,对糖苷结合态香味成分进行定性定量分析<sup>[6-8]</sup>;3) 分离纯化,结合核磁分析和气相色谱进行定性定量分析<sup>[9]</sup>。以上对于难以获得标样的糖苷类潜香物质的分析方法,均存在前处理复杂、分析周期长等缺点,本工作通过 UPLC-ESI-MS/MS 的中性丢失扫描,采用多反应离子监测(MRM)模式,分离鉴定烟草中的 7 种潜香物质。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Acquity™ 超高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;API 3200 QTrap 串联三重四极杆线性离子阱质谱仪:美国 ABI 公司产品;Millipore 超纯水仪:美国 Millipore 公司产品;Branson 3510 超声波发生仪:Branson 公司产品。

甲醇(色谱纯):美国 Fisher 公司产品;水为去离子水;其他有机试剂均为分析纯。2007 年产玉溪 KC3FG 46-2-3 烤烟样品:由红塔集团提供。

### 1.2 样品处理

**1.2.1 潜香物质的分离** 准确称取 10 g 烟样(过 80 目筛)于锥形瓶中,加入 100 mL 甲醇超声萃取 1 h,萃取液过滤浓缩至干,加入 100 mL 水溶解过 XAD-2 柱,先用 400 mL 水洗去酸、碱

和糖等;再用 300 mL  $V(\text{乙醚}):V(\text{正己烷})=1:1$  的溶液洗去游离香味物质和油脂、腊质成分;最后用 300 mL 甲醇洗脱潜香物质<sup>[9]</sup>,甲醇洗脱液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,待质谱中性丢失扫描分析用。

**1.2.2 UPLC-MS/MS 分析样品** 准确称取 1 g 烟样(过 80 目筛)于锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇超声萃取 1 h,静置,取上清液 1 mL 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机系滤膜,进行 UPLC-MS/MS 分析。

### 1.3 色谱质谱条件

Acquity™ BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 m  $\times$  100 mm  $\times$  1.7  $\mu\text{m}$ );柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ,样品室温度 4  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积 2  $\mu\text{L}$ ;流动相 A 为甲醇,B 为 0.1% 乙酸-乙酸铵(10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)水溶液;流速 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>;洗脱条件为:0~2 min,由 10% A 线性变化为 100% A,并保持 4 min,6~7 min,由 100% A 台阶梯度变化为 10% A。

电喷雾负离子模式;电喷雾电压 -4 500 V;离子源温度 500  $^{\circ}\text{C}$ ;离子源辅助气 1,2:4.14  $\times$  10<sup>5</sup> Pa。

## 2 结果与讨论

### 2.1 潜香物质的鉴定

根据文献报道<sup>[10]</sup>,以吡喃葡萄糖结合的糖苷、咖啡酸等物质在 ESI-MS/MS 分析中易产生中性丢失 162 u 的峰,通过实验发现,鼠李糖苷除据文献报道的丢失碎片峰 146 u 外,也有丢失 162 u 的现象,这可能是鼠李糖基和连接苷键的 O 一起丢失而产生的 162 u 丢失;香豆酸衍生物也有中性丢失 162 u,这可能为丢掉香豆酸。本实验利用质谱的中性丢失扫描功能,在优化的碰撞能条件下,对经过前处理的烟草样品进行中性丢失 162 u 的扫描,得到 7 种潜香型物质,质谱图示于图 1。带负电荷的母离子分别为: $m/z$  271.1、325.3、337.1、353.3、355.4、369.0。对分子离子做 MS<sup>2</sup> 碎裂分析,全扫描质谱图示于图 2。对于有杂质干扰的目标物,采用多反应监测模式同时检测所有子离子,根据液相梯度洗脱下各离子的保留时间确定目标物碎裂峰和杂质碎片峰,其液相色谱图示于图 3。

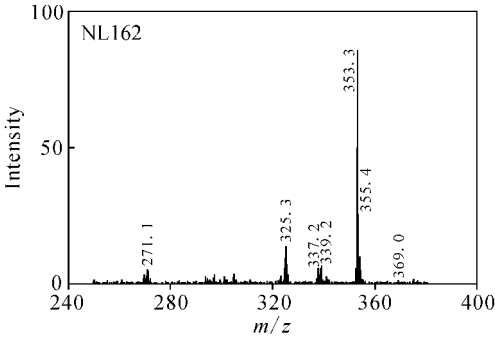
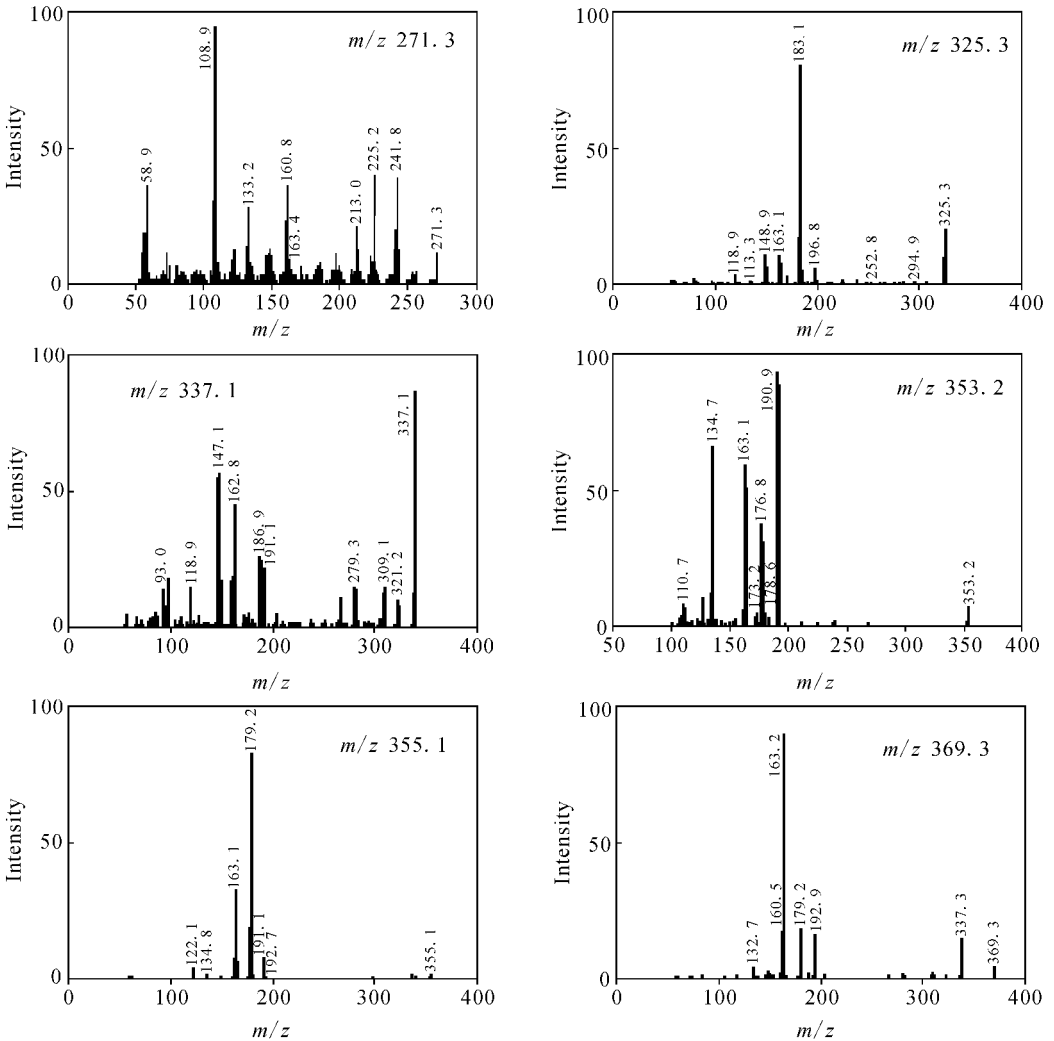


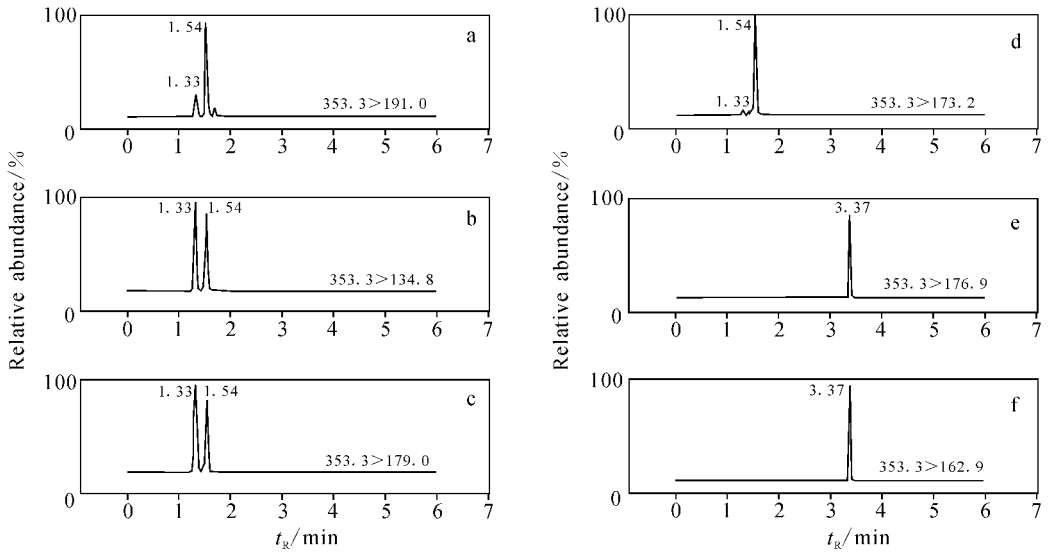
图 1 烟样中性丢失扫描质谱图

Fig. 1 Neutral loss scan mass spectrum of tobacco sample

分子离子  $m/z$  271.3 含有碎片离子  $m/z$  163.4 和 133.2, 分析为葡萄糖基, 苷元离子峰  $[M-162]^-$  为  $m/z$  108.9, 结合文献[11]判断为熊果苷, 其碎裂为分子离子的糖基丢失  $-CH_2OH$ , 产生碎片离子  $m/z$  241.8, 熊果苷糖基葡萄糖环断裂  $-CO$ , 产生碎片峰  $m/z$  213.0。

分子离子  $m/z$  325.3 含有碎片离子  $m/z$  163.1 和 133.3, 分析为葡萄糖基, 苷元离子峰  $[M-162]^-$  为  $m/z$  163.1, 结合文献[11]判断为香豆酸-葡萄糖苷。推测其碎裂规律为: 分子离子的糖基丢失  $-CH_2OH$ , 产生碎片离子  $m/z$  294.9, 香豆酸-葡萄糖苷糖基葡萄糖环断裂  $-C_2H_2O$ , 产生碎片离子  $m/z$  252.8,  $m/z$  118.9 是香豆酸丢失  $-COOH$  产生的。

图 2 烟叶中 7 种潜香物质的 MS<sup>2</sup> 碎片离子全扫描质谱图Fig. 2 MS<sup>2</sup> product ion spectra of 7 aroma precursors in tobacco

图 3 多反应监测  $m/z$  353.3 子离子液相色谱图Fig. 3 Liquid chromatogram of  $m/z$  353.3 with multiple reaction monitoring

分子离子  $m/z$  337.1 产生碎片  $m/z$  162.8, 但无糖基进一步的裂解碎片  $m/z$  133.1, 也无糖基丢失  $-\text{CH}_2\text{OH}$  产生碎片峰, 排除是糖苷可能, 分析  $m/z$  118.9 为 162.8 u 丢失  $-\text{COOH}$ , 判断为香豆酸, 结合特征峰  $m/z$  191.1 判断为香豆素奎尼酸, 其碎裂为分子离子先失  $\text{H}_2\text{O}$  产生碎片离子峰  $m/z$  321.3, 再丢失  $-\text{COOH}$  产生碎片峰  $m/z$  279.3, 香豆酸在丢失  $-\text{COOH}$  产生  $m/z$  118.9 碎片后, 再丢失末端  $-\text{C}_2\text{H}_2$  产生碎片离子  $m/z$  93.0。

分子离子  $m/z$  353.3 的碎片离子主要有  $m/z$  134.8, 163.1, 173.2, 176.9, 179.0, 191.0。通过 MRM 模式下的液相梯度洗脱, 发现离子对  $353.3 > 134.8$ ,  $353.3 > 173.2$ ,  $353.3 > 179.0$ ,  $353.3 > 173.2$ , 与文献报道的新绿原酸和绿原酸的子离子相同<sup>[12]</sup>, 保留时间分别为 1.33、1.54 min, 碎片峰  $m/z$  163.1 和 176.9, 其保留时间均为 3.37 min, 可判断为杂质碎片。推测其碎裂规律为: 母离子断裂 C—O 键形成咖啡酸碎片离子  $m/z$  178.8 和奎尼酸碎片离子  $m/z$  190.9 ( $[\text{M}-178.8]^-$ ), 咖啡酸进一步丢失  $-\text{COOH}$  产生碎片离子  $m/z$  134.8,  $[\text{M}-178.8]^-$  脱水形成碎片离子峰  $m/z$  173.2。

分子离子  $m/z$  355.1 的碎片离子有  $m/z$

192.7 和 134.8, 分析为阿魏酸,  $m/z$  163.1 为阿魏酸丢失  $\text{CH}_3\text{O}$ ,  $m/z$  134.8 为进一步丢失  $-\text{COOH}$  产生。根据碎片  $m/z$  179.2 和 163.1, 判断含有糖基, 结合文献<sup>[13]</sup> 分析为葡萄糖基阿魏酸。

分子离子  $m/z$  369 的碎片离子有  $m/z$  192.9、179.2、163.2、132.9, 分析含葡萄糖基, 糖基碎片离子峰  $m/z$  179 丢失与苷键连接的 O 产生碎片  $m/z$  163.2, 丢失  $\text{CH}_2\text{O}$  产生碎片离子  $m/z$  132.9。此外, 有  $m/z$  160.9 碎片峰分析为糖基丢失  $-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$  苷元从双键处断裂丢失  $-\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$  产生的。结合文献<sup>[8]</sup> 分析为 3-氧化紫罗兰醇葡萄糖苷。

综上, 对烟叶中 7 种潜香物质进行了鉴定, 其分析结果列于表 1。

## 2.2 潜香物质的质谱碎裂规律研究

根据上述裂解碎片离子的结构分析, 确定了不同潜香型物质特征碎片峰, 并总结其在 ESI-MS/MS 模式下的碎裂规律, 示于图 4。糖苷物质易断裂糖苷键和  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , 形成  $m/z$  163, 133 等特征离子峰; 香豆酸和咖啡酸易丢失  $-\text{COOH}$  分别形成  $m/z$  118.9, 134.8 等特征离子峰; 阿魏酸易丢失  $-\text{CH}_3\text{O}$  和  $-\text{COOH}$  形成  $m/z$  163.1, 134.7 等特征离子峰。

表 1 烟叶中 7 种潜香物质的液相色谱-质谱分析参数及结果  
Table 1 The parameters and results of 7 aroma precursors by UPLC-MS/MS

化合物	$t_R/\text{min}$	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup>	化合物结构
1	2.03	271.1	241.8, 213.1, 133.1, 122.9, 109	熊果苷 Arbutin
2	3.03	325.3	294.9, 252.8, 183.1, 163.1, 133.3, 118.9	香豆酸-葡萄糖苷 <i>trans-p</i> -Coumaric acid-4- $\alpha$ - $\beta$ -D-glucopyranoside
3	1.60	337.1	321.3, 279.3, 191.1, 162.8, 147.1, 118.9, 93.1	酰基奎尼酸 Coumaroylquinic acid
4,5	1.35/1.51	353.3	191.0, 178.8, 173.2, 134.8	新绿原酸, 绿原酸 Neochlorogenic acid, Chlorogenic acid
6	3.63	355.4	192.7, 191.2, 178.9, 163.1, 134.7	葡萄糖基阿魏酸 Feruloylglycoside
7	3.16	369.0	192.9, 179.1, 160.9, 163.2, 132.9	3-氧化- $\alpha$ -紫罗兰酮葡萄糖苷 3-Oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside

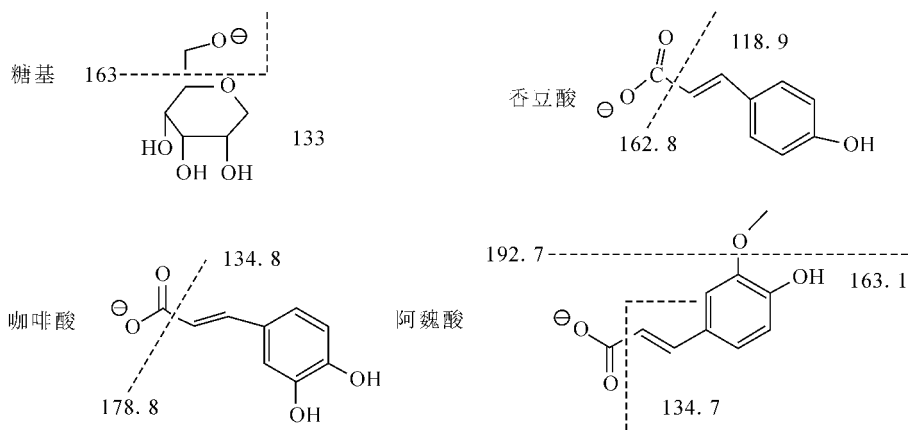


图 4 潜香型物质碎裂规律

Fig. 4 The fragmentation of aroma precursors

### 3 结论

建立了超高效液相色谱-质谱法分析烟叶中 7 种主要潜香型物质的方法。使用中性丢失扫描并结合 MS<sup>2</sup> 特征离子峰分析, 能快速的确定潜香型物质母离子及其碎片离子。

在没有标准品的情况下, 由于样品中与目标物母离子质量数相同的杂质很多, 采用样品做 MS<sup>2</sup> 扫描会产生很多杂质碎片峰, 通过对各碎片离子的多反应监测保留时间的对比, 可以有效的排除杂质离子, 便于碎裂规律分析, 适合复杂体系未知物结构的研究。

### 参考文献:

[1] DAVIS D L, NIELSEN M T. Tobacco propyrogutamic duction[M]. Chemistry and Technology, Oxford, UK, Blackuwell Science, 1999: 256-284.  
[2] LI L, TSAO R, YANG R, et al. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-cur-

rent chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 702-710.

- [3] 白玉, 陈貌连, 宋凤瑞, 等. 芸香苷铜(II)络合物的电喷雾多级串联质谱分析[J]. 分析化学, 2004, 32(9): 1 209-1 212.  
[4] 周大勇, 徐青, 薛兴亚, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法测定枳壳中黄酮苷类化合物[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 31-35.  
[5] KILIC A, KOLLMANNBERGER H, NITZ S, et al. Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(6): 2 231-2 235.  
[6] CAI J, LIU B, LING P, et al. Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncased and cased tobaccos[J] Journal of Chromatography A, 2002, 947(2): 267-275.  
[7] MASTELIC J, JERKOVIC I. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. [J]. Food Chemistry,

- 2003, 80(1): 135-140.
- [8] BOULANGER R, CROUZET J. Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.); free and bound flavour compounds[J]. Food Chemistry, 2001, 74(2): 209-216.
- [9] JIANG L, KOJIMA H, YAMADA K, et al. Isolation of some glycosides as aroma precursors in young leaves of Japanese Pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.) [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(12): 5 888-5 894.
- [10] QU J, LIANG Q, LUO G, et al. Screening and identification of glycosides in biological samples using energy-gradient neutral loss scan and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76 (8): 2 239-2 247.
- [11] SCHIEBER A, KELLER P, CARLE R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple pear by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 910 (2): 265-273.
- [12] WANG Z, CLIFFORD M N. Comparison of the profiles of chlorogenic acids and their derivatives from three Chinese traditional herbs by LC-MS<sup>n</sup> [J]. 药物学报, 2008, 43(2): 185-190.
- [13] HARBAUM B, HUBBERMANN E, WOLFF C, et al. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> and NMR and their quantification by HPLC-DAD [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(20): 8 251-8 260.

## 《质谱学报》投稿须知

●文稿务求论点明确,文字简练,数据可靠。

●文题简明(20个汉字以内);中英文摘要须包括题目、作者姓名、作者单位、城市名、省名和邮政编码,并写成叙述性文摘(含有研究目的、方法、结果和结论);关键词为3~5个。

●文稿应采用阿拉伯数字进行分级编号,最多可用4级。引言不编号,也不写“引言”字样。

●基金项目名称及项目编号、作者简介(第1作者姓名(出生年~)、性别(民族)、籍贯、职称、学位、从事专业、E-mail)需在首页以页下注形式写明。

●文稿中外文字母、符号须分清大、小写;上下角的字母、数码和符号等位置的高低应区别明显;易混淆的外文字母、符号在第1次出现时用铅笔(电子版用红色)注明文种。

●文稿中的数据不能同时以表和图表述,只能选择其一;采用法定计量单位,物理量用法定量符号表示,不得用废弃的物理量,例如压强的单位用帕斯卡(Pa),不要用 bar 或者 torr 表示;在图和表中用量与单位的比值表示数值,即量与单位之间用除号“/”相隔,如  $t_R$ /min;正文中插图下要写明中英文图号、图题和图注。

●参考文献须按《文后参考文献著录规则》著录。

●欢迎登录网站投稿,网址 <http://www.jcmss.com.cn>。

●来稿须附作者单位(学术委员会或业务部门)对文稿内容的学术性、真实性,作者署名是否准确以及内容有无保密问题的审查证明和版权转让协议书,以上两项均可在网站的“下载中心”下载。

●收稿后本刊立即向作者发送收稿通知单;若待审处理时间超过3个月不予回复,作者可改投他刊;退修稿逾期半年不修回者,本刊即作自动退稿处理;录用稿一经排版,作者要求退稿需部分补偿编辑部经济损失。

●来稿一经刊登,本刊将按规定酌致稿酬,并赠作者当期《质谱学报》2册。本刊已纳入重庆维普、《中国学术期刊(光盘版)》、《方正 Apabi 电子期刊》、《中文科技期刊数据库》、《CEPS 中文电子期刊服务》、《书生数字期刊》和入网“万方数据-数字化期刊群”等数据库,本刊所付稿酬包含上述几项报酬。

●请勿一稿两投。