

液相色谱-串联质谱法 同时测定烟草中 6 种 Amadori 化合物

贾春晓¹, 修龙飞², 牟定荣³, 毛多斌²

(1. 郑州轻工业学院材料与化学工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002; 3. 红塔烟草(集团)有限公司技术中心, 云南 玉溪 653100)

摘要:建立了液相色谱-串联质谱法同时测定烟草中 6 种 Amadori 化合物的定性和定量分析方法。试样以 70% 甲醇水溶液为萃取剂, 经过正交实验优化后的超声萃取条件为: 料液比 1 : 30、萃取功率 120 W, 萃取时间 25 min。所得萃取液用正己烷洗涤除去杂质后, 在选择反应监测模式下进行液相色谱-串联质谱定性及定量分析, 其中 Amadori 化合物采用外标标准曲线法定量。结果表明: 所测定的 6 种 Amadori 化合物线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.995 0。方法的检出限(LOD)为 20.06~39.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限(LOQ)为 66.85~132.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率在 86.56%~88.86% 之间, 相对标准偏差(RSD)均小于 5%。该方法简便、灵敏度高、重现性好, 适用于烟草中 Amadori 化合物的定性和定量分析。

关键词:烟草; 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS); Amadori 化合物

中图分类号: O 657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2015)01-0045-07

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2014.0052

Simultaneous Determination of Six Kinds of Amadori Compounds in Tobaccos by LC-MS/MS

JIA Chun-xiao¹, XIU Long-fei², MOU Ding-rong³, MAO Duo-bin²

(1. College of Material and Chemical Engineering of Zhengzhou University

of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Food and Bioengineering of Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

3. Research and Development Center of Hongta Tobacco (Group) Corporation, Ltd, Yuxi 653100, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) method for qualitatively and quantitatively analyzing six kinds of Amadori compounds (Fru-Gly, Fru-Ala, Fru-Pro, Fru-Thr, Fru-Glu and Fru-Amb) in tobaccos was developed. The sample was extracted with 70% methanol water solutions and assisted by ultrasound, and the extraction conditions which were optimized by orthogonal experiment as followings: the solid liquid ratio was 1 : 30, the extraction power was 120 W, and the extrac-

收稿日期: 2014-03-10; **修回日期:** 2014-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(21176229/B060804); 中国烟草总公司卷烟增香保润重大科技专项(110201101025(BR-07)资助

作者简介: 贾春晓(1965—), 女(汉族), 河南南阳人, 教授, 从事天然产物和烟草化学方面研究。E-mail: jiachx@zzuli.edu.cn

通信作者: 毛多斌(1962—), 男(汉族), 河南南阳人, 教授, 从事烟草化学和有机合成方面研究。E-mail: maoduobin@zzuli.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-20; **网络出版地址:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7538/zpxb.youxian.2014.0052.html>

tion time was 25 min. The extraction products from tobaccos were cleaned up by hexane and then analyzed by LC-MS/MS under the selected reaction monitoring (SRM) mode. The contents of six kinds of Amadori compounds were determined by external standard curve method. The results show that the limits of detection (LOD) are 20.06-39.86 $\mu\text{g/kg}$, and limits of quantity (LOQ) are 66.85-132.9 $\mu\text{g/kg}$. The correlation coefficients are greater than 0.995 0, the average recoveries are 86.56%-88.86%, and the relative standard deviations (RSD) are less than 5%. This method is simplify, sensitive and accurate, which is suitable for qualitative and quantitative analysis of Amadori compounds in tobaccos.

Key words: tobacco; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); Amadori compounds

Amadori 化合物是由还原糖和氨基酸经缩合、脱水、Amadori 重排而得到的一类 Mainland 反应中间产物,即 1-氨基-1-脱氧-2-酮糖^[1],它是烟草中一种重要的香味前体物质^[2]。Amadori 化合物在通常状态下没有气味,但在卷烟燃吸过程中,能够裂解释放出对卷烟香气具有重要贡献的香味物质,如吡嗪类、呋喃类以及吡咯类化合物等^[3-4]。因此,研究其萃取条件和分析其在烟草中的含量,对评价烟草的内在质量及提高卷烟香气具有重要的指导意义。

Amadori 化合物极性高、种类多、结构类似,对其进行定性定量分析难度较大^[5]。目前,国内外对于 Amadori 化合物的分析主要采用气相色谱 (GC) 法^[6]、高效液相色谱 (HPLC) 法^[7-9]、高效液相色谱-质谱 (HPLC/MS) 法^[10]、离子交换色谱 (IEC) 法和离子交换色谱-串联质谱 (IEC-MS/MS) 法^[11-13] 等,其中, HPLC/MS 和 IEC-MS/MS 法是目前最有效的定性分析方法。然而,由于没有市售标准品,采用标准样品同时进行 Amadori 化合物的定量分析研究鲜有报道。

液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 具有快速、简便、灵敏度高等优点^[14-15]。本研究拟采用超声波辅助萃取,并通过正交实验优化前处理条件,在此基础上采用 LC-MS/MS 技术,并结合标准样品,对烟草中的 Amadori 化合物进行定性鉴定;另外,采用标准曲线法对烟草中的 6 种 Amadori 化合物进行定量测定。

1 实验部分

1.1 仪器

LTQ XL 型液相色谱-串联质谱仪:美国

Thermo 公司产品,配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Xcalibur 2.2 数据处理系统;KQ-5200DB 型超声波清洗仪:昆山市超声仪器有限公司产品;SHZ-D (Ⅲ) 型循环水真空泵:郑州市中原科技仪器厂产品;AB265-S 型分析天平 (感量 0.000 01 g):瑞士 Mettler 公司产品;RE-52AA 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;Mili-Q 超纯水仪:美国 Milipore 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

甘氨酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Gly)、丙氨酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Ala)、脯氨酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Pro)、苏氨酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Thr)、谷氨酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Glu)、 α -氨基丁酸与葡萄糖 Amadori 化合物 (Fru-Amb) 标准对照品:本课题组用化学合成法自制,其结构经红外光谱、核磁共振、多级质谱及高分辨质谱表征,纯度均大于 98%;实验用水:Mili-Q 超纯水;甲醇 (色谱纯)、无水甲醇 (分析纯):天津四友精细化工有限公司产品;正己烷 (分析纯):天津市凯通化学试剂有限公司产品;甲酸:美国 Acros Organics 公司产品。

1.3 烟叶样品的前处理

各种烟叶样品均由红塔烟草集团提供。将烟叶样品于 30 $^{\circ}\text{C}$ 烘干粉碎,过 60 目筛。准确称取 2.000 g 烟叶粉末,置于带塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇水溶液,在料液比 1:30,功率 120 W 的条件下,超声萃取 20 min;抽滤后,滤渣用 70% 甲醇水溶液洗涤 3 次 (每次 30 mL),合并滤液和洗涤液,在减压条件下于 30 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发

浓缩至干;然后,用 50 mL 70% 甲醇水溶液溶解,正己烷洗涤 3 次(每次 30 mL),以除去色素等杂质;将洗涤后的甲醇-水相浓缩至干,再用 70% 甲醇水溶液定容至 10 mL,过 0.45 μm 有机滤膜,待 LC-MS/MS 分析。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Thermo Hypersil Gold (100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.9 μm);流动相: 甲醇-水 (0.1% 甲酸) 溶液 (50 : 50, V/V);等

度洗脱;流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$;柱温 20 $^{\circ}\text{C}$;自动进样,进样量 2 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描,选择反应监测模式 (SRM),离子源喷雾电压 5 kV,毛细管电压 12 V,透镜电压 50 V,毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,气体 (N_2) 压力 250 kPa,质量扫描范围 m/z 200~500。6 种目标化合物的定性和定量离子对及碰撞能量等参数列于表 1。

表 1 Amadori 化合物质谱检测条件

Table 1 MS/MS conditions for the detection of Amadori compounds

化合物	母离子/(m/z)	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞能量/%
Fru-Gly	238	220/202	220/192	20
		220/192		
Fru-Ala	252	234/216	234/206	25
		234/206		
Fru-Pro	278	260/242	260/242	25
		260/232		
Fru-Thr	282	264/246	264/236	20
		264/236		
Fru-Glu	310	292/274	292/264	25
		292/264		
Fru-Amb	266	248/230	248/220	26
		248/220		

2 结果与讨论

2.1 超声萃取条件的优化

2.1.1 单因素实验 考察萃取条件时,以烟叶样品中 Amadori 化合物的实际萃取量为指标。因为萃取量与其峰面积成正比,所以用 6 种 Amadori 化合物的总峰面积的对数值代表其总萃取量,以烟叶中 Amadori 化合物的总萃取量为指标,分别考察了萃取溶剂、所选溶剂浓度、料液比 (烟叶样品质量与萃取溶剂体积之比, g/mL)、超声功率和萃取时间对萃取量的影响。

由于 Amadori 化合物具有较大的极性,因此分别选用甲醇、乙醇、二氯甲烷和乙腈为萃取溶剂,固定其他条件对烟叶样品进行萃取。结果表明,甲醇的萃取效果最好。根据上述结果,又考察了不同浓度的甲醇水溶液 (50%、60%、

70%、80%、90%) 对萃取量的影响。结果表明,用 70% 甲醇水溶液作为萃取溶剂时,Amadori 化合物的总萃取量最大。

以 70% 甲醇水溶液作为萃取溶剂,分别考察了不同料液比 (1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50),不同超声功率 (80、100、120、140、160 W) 以及不同萃取时间 (10、15、20、25、30 min) 的萃取结果,示于图 1。由图 1 可知,当料液比为 1 : 30,超声功率为 120 W,超声时间为 20 min 时,总萃取量达到最大值。

2.1.2 正交实验设计及结果分析 根据单因素实验结果,以料液比 (A)、萃取功率 (B)、萃取时间 (C) 为影响因素进行正交实验,选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表安排实验因素水平。正交实验因素水平表及正交结果分别列于表 2 和表 3。

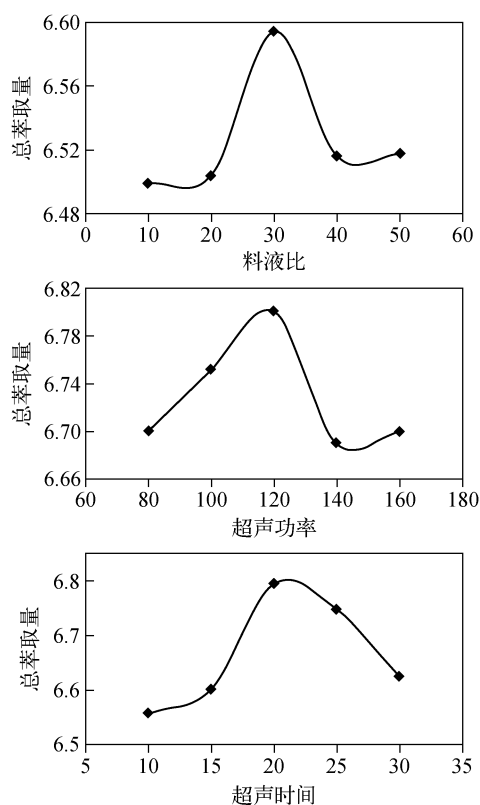


图1 料液比,超声功率和萃取时间
对萃取结果的影响

Fig.1 The effect of solid-liquid ratio,
ultrasonic power and extraction time
vs extraction results

表2 正交实验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	实验因素		
	料液比 (m/V)	萃取功率/W	萃取时间/min
	A	B	C
1	1 : 20	100	15
2	1 : 30	120	20
3	1 : 40	140	25

由表3可知,极差 R 是各因素对 Amadori 化合物萃取因素的影响程度,因素主次顺序为 $A > B > C$,即萃取料液比是影响提取效果的主要因素,其次为萃取功率,而萃取时间的影响最小。比较 K_1 、 K_2 、 K_3 可知,Amadori 化合物的最佳萃取条件为 $A_2B_2C_3$,即料液比 1 : 30、萃取功率 120 W、萃取时间 25 min。

2.2 质谱条件的优化

Amadori 化合物含有羧基和多个羟基,容易加和氢离子形成正电荷母离子 $[M+1]^+$,因此,选用正离子模式对 Amadori 化合物的混合标准溶液进行全扫描,以确定分子离子峰。然后优化碰撞能量,使母离子进一步碎裂,并对其子离子进行全扫描。在此基础上,选择 2 个信噪比高、峰形好、干扰小的特征子离子作为定性离子对,并将响应值最高的 2 个子离子作为定量离子对,采用 SRM 扫描模式,该方法鉴别点

表3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal experiments

序号	因素			lgA
	A	B	C	
1	1	1	1	6.591
2	1	2	2	6.631
3	1	3	3	6.663
4	2	1	2	6.654
5	2	2	3	6.688
6	2	3	1	6.631
7	3	1	3	6.581
8	3	2	1	6.614
9	3	3	2	6.612
K_1	6.629	6.609	6.612	
K_2	6.658	6.644	6.632	
K_3	6.603	6.636	6.644	
R	0.055 00	0.035 00	0.031 80	
因素主次				$A > B > C$

(IPs) 均能满足欧盟 2002/657/EC 的决议要求^[16]。所得 6 种 Amadori 化合物的 SRM 色谱图示于图 2。

2.3 线性方程、相关系数和检出限

准确称取 0.010 20 g Fru-Gly、0.022 03 g Fru-Ala、0.194 90 g Fru-Pro、0.015 82 g Fru-Thr、0.010 05 g Fru-Glu、0.031 24 g Fru-Amb, 用 70% 甲醇水溶液溶解, 定容至 50 mL 容量瓶中, 配制成混标储备液。分别用移液管移取 0.10、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、10.0 mL 混标储备液于 10 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇水溶液定容, 得到一系列不同浓度的标准溶液。按 1.4 节条件进行测定, 分别以相应的 Amadori 化合物离子峰面积 y 对浓度 x 拟合线性方程, 相关系数 r 均大于 0.995 0, 各组分的线性方程、线性范围、检出限、定量限列于表 4。

2.4 回收率和精密度实验

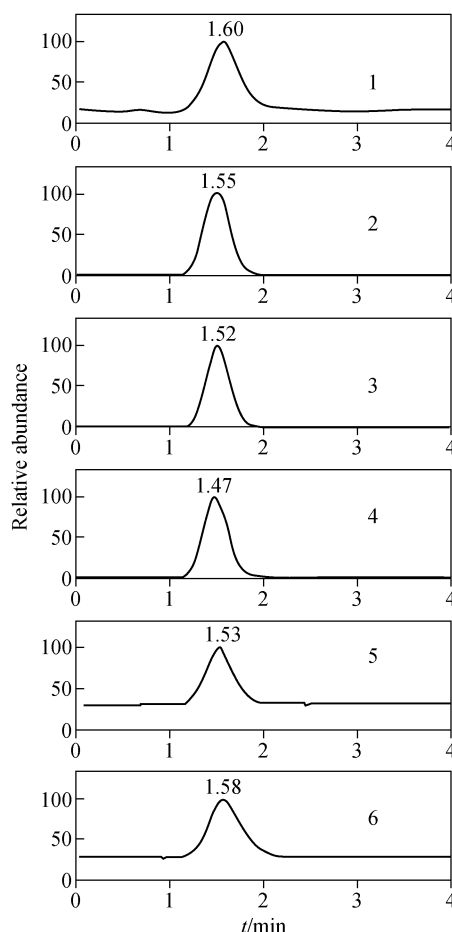
准确称取 2.000 g 烟叶样品, 按照 1.3 节方法进行处理, 按 1.4 节条件进行分析, 测定 6 种 Amadori 化合物的含量, 平行测定 5 次, 计算平均含量及 RSD_1 , 结果列于表 5。

采用实际样品添加标样的方法测定回收率。取 2.000 g 烟叶样品粉末, 分别加入一定量的 Amadori 化合物标样, 按 1.3 节和 1.4 节的方法进行处理与分析, 并根据 6 种 Amadori 化合物的原含量、加标量和测定量计算回收率和 RSD_2 , 结果列于表 5。

2.5 实际样品的测定

采用本方法对 12 个烟样进行测定, 平行测定 3 次, 取峰面积的平均值, 通过外标标准曲线

法计算相应的 Amadori 化合物含量, 结果列于表 6。



注: a. Fru-Gly; b. Fru-Ala; c. Fru-Amb;
d. Fru-Pro; e. Fru-Thr; f. Fru-Glu

图 2 六种 Amadori 化合物的 SRM 色谱图
Fig. 2 SRM chromatogram of 6 kinds of Amadori compounds

表 4 线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 Linear equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantification

化合物	线性方程	相关系数 r	检出限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性范围/(g/L)
Fru-Gly	$y=1.059 \times 10^5 x + 1\ 726$	0.998 0	20.06	66.85	0.002 040~0.204 0
Fru-Ala	$y=4.255 \times 10^5 x + 1\ 350$	0.997 7	39.86	132.9	0.004 406~0.440 6
Fru-Pro	$y=2.000 \times 10^6 x + 1.206 \times 10^5$	0.997 5	23.72	79.05	0.038 98~3.898
Fru-Thr	$y=1.215 \times 10^5 x + 2.064 \times 10^4$	0.998 1	29.31	97.70	0.003 164~0.316 4
Fru-Glu	$y=3.000 \times 10^6 x + 2.601 \times 10^4$	0.997 4	20.08	66.93	0.002 010~0.201 0
Fru-Amb	$y=3.000 \times 10^6 x + 2.223 \times 10^4$	0.999 3	25.67	85.57	0.006 248~0.624 8

表 5 回收率与精密度结果($n=5$)
Table 5 Results of recovery and precision($n=5$)

化合物	取样量/g	样品平均含量/mg	加标量/mg	加标后平均含量/mg	平均回收率/%	RSD ₁ /%	RSD ₂ /%
Fru-Gly	2.000	1.302	5.560	6.123	86.71	3.69	1.69
Fru-Ala	2.000	1.721	4.880	5.994	87.56	1.86	3.46
Fru-Pro	2.000	15.84	31.33	43.68	88.86	2.25	2.76
Fru-Thr	2.000	1.849	6.810	7.832	87.86	1.54	2.10
Fru-Glu	2.000	2.286	10.09	11.02	86.56	2.32	2.30
Fru-Amb	2.000	1.763	7.820	8.614	87.61	3.05	1.89

表 6 实际样品测定
Table 6 Determination of actual samples

样品编号	Fru-Gly/ (mg/g)	Fru-Ala/ (mg/g)	Fru-Pro/ (mg/g)	Fru-Thr/ (mg/g)	Fru-Glu/ (mg/g)	Fru-Amb/ (mg/g)
1	0.871 8	1.075	8.075	5.475	1.066	0.564 6
2	0.345 1	1.655	9.071	1.126	0.770 4	0.549 36
3	0.562 1	1.082	6.379	1.598	0.167 6	1.170
4	0.686 7	1.431	7.235	1.782	0.181 9	1.216
5	0.671 8	2.289	8.086	1.433	0.164 8	0.934 3
6	0.658 3	1.125	6.951	0.913 4	0.308 1	0.879 4
7	0.341 9	1.343	8.002	1.438	0.380 3	0.635 1
8	0.845 7	0.543 0	7.160	1.081	1.072	1.035
9	0.492 1	1.526	7.505	1.483	0.503 1	0.863 5
10	0.316 1	2.156	9.774	0.738	0.641 4	0.942 2
11	0.843 1	1.458	9.432	1.511	0.996 4	0.876 3
12	0.412 9	1.938	9.181	1.251	1.015	0.432 8

3 结论

建立了 LC-MS/MS 同时测定烟草中 6 种 Amadori 化合物的定性和定量分析方法。优化了前处理提取方法,确定的最优萃取条件为:萃取剂为 70% 甲醇,超声功率 120 W,超声时间 25 min,料液比 1:30;6 种 Amadori 化合物的测定线性关系良好,相关系数 r 均大于 0.995 0;方法的检出限(LOD)为 20.06~39.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限(LOQ)为 66.85~132.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率在 86.56%~88.86%之间,相对标准偏差均小于 5%。该方法的前处理简单、定量限低,回收率和精密度均能满足烟草中 Amadori 化合物的分析要求,可为我国烟草行业香味前体物质的研究提供技术支持。

参考文献:

- [1] TANJA M W, BRIGITTE E. The Amadori and heynsrearrangements: Landmarks in the history of carbohydrate chemistry or unrecognized synthetic opportunities[J]. Topics in Current Chemistry, 2001, 215: 115-152.
- [2] HODGE J E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry[J], 1953, 6(1): 928-943.
- [3] LAYREN D D, MARK T N. 烟草-生产、化学和技术[M]. 国家烟草专卖局科教司和中国烟草科技信息中心,译. 北京:化学工业出版社,2003: 257-269.
- [4] TANJA M W, CHRISTIANE K. The Amadori rearrangement as key reaction for the synthesis of

- neoglycoconjugates[J]. Carbohydrate Research, 2008, 30 (343): 2 057-2 066.
- [5] WANG J, LU Y M, LIU B Z, et al. Electrospray positive ionization tandem mass spectrometry of Amadori compounds[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2008, 43: 262-264.
- [6] SUN J G, HE J W, WU F G, et al. Comparative analysis on chemical components and sensory quality of aging flue-cured tobacco from four main tobacco areas of China[J]. Agricultural Sciences, 2011, 10 (8): 1 222-1 231.
- [7] GE S J, LEE T C. Effective HPLC method for the determination of aromatic amadori compounds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44 (4): 1 053-1 057.
- [8] HUYGHUES D A, VAROUJAN A Y. A multidetector HPLC system for the analysis of Amadori and other Maillard reaction intermediates [J]. Food Chemistry, 1994, 51: 109-117.
- [9] BAPTISTA J A, CARVALHO R C. Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration[J]. Food Research International, 2004, 8: 739-749.
- [10] 翟玉俊, 黄伟, 陈华, 等. LC-MS 法定性定量测定烟草中的 1-氨基-1-脱氧-2-酮糖[J]. 烟草科技, 2011, 285(4): 58-61.
- ZHAI Yujun, HUANG Wei, CHEN Hua, et al. Qualitative and quantitative analysis of 1-amino-1-deoxyketoses in tobacco by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Tobacco Science Technology Society, 2011, 285(4): 58-61(in Chinese).
- [11] DAVIDEK T, KRAEHENBUHL K, DEVAUD S, et al. Analysis of Amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77 (1): 140-147.
- [12] BLANKI, DAVIDEK T, DEVAUD S, et al. Analysis of Amadori compounds by high performance anion exchange chromatography-pulse amperometric detection[J]. International Congress Series, 2002, 1 245: 263-267.
- [13] DAVIDEK T, CLETY N, AUBIN S, et al. Degradation of the Amadori compound N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl) glycine in aqueous model systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50 (19): 5 472-5 479.
- [14] 林黛琴, 万承波, 邱萍, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定食品中 4 种黄色工业染料[J]. 质谱学报, 2013, 34(3): 170-178.
- LIN Daiqin, WAN Chengbo, QIN Ping, et al. Rapid determination of four high yellow dyes in foods by HPLC-MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2013, 34(3): 170-178(in Chinese).
- [15] 卢艳芬, 徐丽君, 王辉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中的 7 种 β 2-兴奋剂[J]. 质谱学报, 2012, 33(5): 280-285.
- LU Yanfang, XU Lijun, WANG Hui, et al. Simultaneous determination of 7 kinds of β 2-agonist in feed by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2012, 33 (5): 280-285(in Chinese).
- [16] 侯建波, 谢文, 陈笑梅, 等. 液相色谱-串联质谱-同位素稀释法同时测定猪肉中 54 种药物残留[J]. 质谱学报, 2012, 33(1): 42-54.
- HOU Jianbo, XIE Wen, CHEN Xiaomei, et al. Simultaneous determination of 54 drugs residues in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotopes dilution technique[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2012, 33 (1): 45-54 (in Chinese).