

加速溶剂萃取 GC-MS 快速分析烟叶中的西柏三烯二醇

蔡长春¹, 任晓红², 冯吉¹, 邓建强², 李章海³, 饶雄飞¹, 王洪炜², 杨俊^{3*}

(1. 湖北省烟草科学研究院, 武汉 430030; 2. 湖北省烟草公司恩施州公司, 恩施 445000;

3. 中国科学技术大学先进技术研究院, 合肥 230088)

摘要: 采用加速溶剂萃取 (ASE) 结合衍生化气相色谱质谱 (GC-MS) 检测, 建立烤烟烟叶中 α -西柏三烯二醇 (α -CBD) 和 β -西柏三烯二醇 (β -CBD) 两种化合物的定量分析方法。对比研究了液固萃取 (LSE)、超声辅助萃取 (UAE)、索氏提取 (SE) 和 ASE 4 种不同样品前处理方法对目标物萃取效果的影响, 优选出 ASE 方法应用于烟叶中 CBD 的提取。优化设定 ASE 的工作参数, 萃取剂为二氯甲烷, 萃取温度 50 °C, 静态萃取时间 5 min, 循环萃取次数为 2 次。对分析方法的线性范围、检出限、定量限、回收率和精密度等进行了实验验证, 结果表明, 目标成分 α -CBD 和 β -CBD 的线性关系良好, 线性范围分别为 1.0 ~ 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 1.0 ~ 160.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 相关系数 (R) 分别为 0.999 2 和 0.999 6。两种目标物的最低检出限 (LOD) 和最低定量限 (LOQ) 分别为 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 0.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、0.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。回收率分别在 93.2% ~ 103.3% 和 91.6% ~ 99.1% 之间。检测 α -CBD 和 β -CBD 的相对标准偏差 (RSDs, $n=5$) 分别在 2.59% ~ 3.13% 和 2.11% ~ 2.84% 范围内。方法快速、准确, 在对不同地区、不同部位烤烟烟叶中西柏三烯二醇含量的比较分析中取得良好结果, 适用于烟叶中西柏三烯二醇的分析检测。

关键词: 加速溶剂萃取; 气相色谱质谱; 西柏三烯二醇; 烟叶

中图分类号: TS411

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)01-0159-06

Rapid analysis of cembratrien-diols in tobacco leaves by accelerated solvent extraction and GC-MS detection

CAI Changchun¹, REN Xiaohong², FENG Ji¹, DENG Jianqiang²,
LI Zhanghai³, RAO Xiongfei¹, WANG Hongwei², YANG Jun³

(1. Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030; 2. Enshi Tobacco Company of Hubei Province, Enshi 445000;

3. Institute of Advanced Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230088)

Abstract: A quantitative analysis method of α -cembratriene-diol (α -CBD) and β -cembratriene-diol (β -CBD) in flue-cured tobacco leaves was established by using accelerated solvent extraction (ASE) combined with derivatization gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) detection. The effects of four different sample pretreatment methods such as liquid-solid extraction, ultrasonic-assisted extraction, soxhlet extraction and ASE on the extraction rates of target compounds were compared, and the ASE method was selected to extract CBDs from flue-cured tobacco leaves. The working parameters of ASE were optimized as follows: dichloromethane was used as extraction solvent, extraction temperature was 50 °C, static extraction time was 5 min, and number of cycles were 2 times. Performance characteristics such as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), recovery and precision were studied. The linear ranges for α -CBD and β -CBD were 1.0 - 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 1.0 -160.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and the correlation coefficients (R) were 0.999 2 and 0.999 6, respectively. LOD and LOQ of the two target substances were 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. Average recoveries of α -CBD and β -CBD were 93.2% - 103.3% and 91.6% - 99.1%, while the relative standard deviations (RSDs, $n=5$) ranged from 2.59% to 3.13% and 2.11% to 2.84%, respectively. The proposed method is rapid and accurate and has achieved good results in the comparative analysis of the content of CBDs in flue-cured tobacco leaves from different regions and different parts. It is suitable for the analysis and detection of CBDs in tobacco leaves samples.

收稿日期: 2021-07-25

基金项目: 中国烟草总公司湖北省公司科技项目 (027Y2021-016) 资助。

作者简介: 蔡长春, 博士, 副研究员。E-mail: 373709032@qq.com

* 通信作者: 杨俊, 博士, 副教授。E-mail: yjun8202@ustc.edu.cn

Key words: accelerated solvent extraction; GC-MS (gas chromatography-mass spectrometer); cembra-trien-diols; tobacco leaves

许多陆生植物表面生长覆盖有单细胞或多细胞结构的腺毛组织,在植株表面形成空间障碍,作为抵御各种生物性或非生物性侵害的第一道防线^[1]。烟叶表面的腺毛组织体积大,分布广,具有较强的分泌能力^[2]。西柏三烯二醇(CBD)是烟叶表面腺毛分泌物的主要成分,占其腺毛分泌物的60%以上^[3],该类化合物不仅是卷烟关键香味成分的重要前体物质,还具有抑制肿瘤细胞生长、抑制前列腺素形成、抑制尼古丁感受以及神经保护剂等多种生物活性^[4]。烟叶CBD类物质包含两种异构体结构的分子,分别为(1S, 2E, 4R, 6R, 7E, 11E)西柏-2, 7, 11-三烯-4, 6-二醇(α -CBD)和(1S, 2E, 4S, 6R, 7E, 11E)西柏-2, 7, 11-三烯-4, 6-二醇(β -CBD)。在烟草生产过程中,生态条件、栽培技术、调制措施等对CBD类物质含量的影响很大^[5]。因此,建立快速、准确测定烟叶 α -CBD和 β -CBD的定量检测方法,探索CBD类物质与烟草品质的内在联系,是烟草科技工作者关注的热点。

关于CBD类物质的定量检测方法报道较少。2001年,Wang等以二氯甲烷溶剂从新鲜烟叶中提取CBD,提取得到的CBD经三甲基硅烷衍生化处理,用气相色谱质谱联用技术(GC-MS)对目标物质进行半定量分析^[6]。GC-MS也是目前我国烟草行业检测CBD的推荐标准方法^[7]。2016年,Zhou等改进了CBD的衍生化条件,实现了 α -CBD和 β -CBD的定量检测^[8]。近年来,付秋娟^[9]和郑庆霞^[10]等采用超高压液相色谱法、气相色谱串联质谱法发展了 α -CBD和 β -CBD的检测方法,但方法中所用仪器尚不普及,样品前处理技术仍需要改进。另外,样品定量分析过程中的取样和样品前处理环节所需时间约占总分析时间的60%以上,对复杂基质样品分析结果的准确性有很大影响^[11]。加速溶剂萃取(ASE)可使萃取溶剂处于高温高压状态下对目标成分进行萃取^[12]。对比传统的液固萃取(LSE)^[13]、索氏提取(SE)^[14]、超声辅助萃取(UAE)^[5, 15]等方法,ASE具有省时、省力、简便、节约溶剂、提高萃取效率、改善重现性和便于批量自动化操作等诸多优点^[16],已广泛应用于土壤、水果、蔬菜等复杂基质中目标成分的萃取^[12, 17]。同时,ASE也已被应用于烟草中糖酯^[18]和甾醇^[19]的提取。本研究通过优化ASE萃取烤后烟叶CBD的工作条件,减少萃取时间。采用气相色谱-质谱-选择离子检测模式

(GC-MS-SIM)进行定性定量检测,消除了复杂样品基质的干扰。研究建立ASE-GC-MS测定烟叶 α -CBD和 β -CBD方法,为烟叶中CBD快速、准确检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

材料:烤烟烟叶样品由湖北省烟草科学研究院提供,取自2019—2020年度湖北、云南和贵州3地的不同产区,品种为云烟87。烟叶经50℃烘干,研磨过60目筛,混合均匀后4℃冷藏,备用。

试剂:标准品 α -CBD(10 mg)、 β -CBD(10 mg)(美国LKT Laboratories公司,纯度均为98%)。内标物(IS)正十九烷(美国A Johnson Matthey公司,纯度为99%)。衍生化试剂双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)(内含1%三甲基硅烷咪唑, TMCS)(日本东京化成工业株式会社公司)。二氯甲烷为色谱纯(天津市津东天正精细化学试剂厂)。吡啶,丙酮,乙酸乙酯均为分析纯(上海凌峰化学试剂有限公司)。

仪器:Thermo ISQ GC/MS气相色谱-质谱联用仪(意大利ThermoFisher公司),DB-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)(美国Agilent公司),ASE 300加速溶剂萃取仪(美国Dionex公司),MilliQ超纯水仪(美国Millipore公司),HY-2A数显多用振荡器(金坛荣华机械制造有限公司),S7500超声仪(上海Brandson Ultrasonics公司),AL204-2C电子分析天平(Mettler Toledo公司),旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 CBD标准溶液的配制:用二氯甲烷分别溶解10 mg α -CBD和10 mg β -CBD,然后转移到10 mL容量瓶中,用二氯甲烷稀释至刻度,此溶液即为 α -CBD和 β -CBD的标准溶液(浓度均为1.0 mg·g⁻¹)。

内标溶液的配制:准确称取250 mg的内标正十九烷置于50 mL容量瓶中,用二氯甲烷稀释至刻度,即为内标溶液(浓度为5.0 mg·g⁻¹)。

衍生化溶液配制:准确移取10 mL双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)(内含1% TMCS)至25 mL容量瓶中,用吡啶溶剂定容至刻度。

1.2.2 标准曲线的绘制 分别移取1、50、100、150

和 200 μL 的 α -CBD 标准溶液至 2 mL 的色谱瓶中, 再分别加入 200 μL 的内标液。分别移取 1、40、80、120 和 160 μL 的 β -CBD 标准溶液至 2 mL 的色谱瓶中, 再分别加入 200 μL 的内标液。蒸干溶剂后, 往色谱瓶中加入 1 000 μL 的衍生化溶液。

对以上两组标准溶液进行衍生化反应, 然后用 GC-MS 方法进行测定, 并以浓度为横坐标, 目标分析物峰面积与内标物峰面积比 (A/A_{IS}) 为纵坐标分别绘制 α -CBD 和 β -CBD 的标准曲线。

1.2.3 烟叶 CBD 的萃取 以 ASE 方法萃取^[18], 采用 34 mL 的 ASE 萃取池, 在萃取池底部加入 5 g 无水硫酸钠, 再加入 0.5 g 烟叶样品, 最后在上层加 5 g 无水硫酸钠。ASE 条件选择萃取剂为二氯甲烷, 萃取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 压强 1 500 psi, 静态萃取时间 5 min, 预热时间 5 min, 循环次数 2 次。萃取液转移至 100 mL 容量瓶内, 定容。

作为 ASE 方法的对照, 试验中采用了其他 3 种不同萃取方法对烟叶 CBD 化合物进行了提取。第一, 液固萃取法 (LSE)^[6]。称取 0.5 g 烟样于 50 mL 的锥形瓶中, 加入 25 mL 的二氯甲烷, 以机械振荡器进行振荡萃取 2 h; 将提取液过滤并转移至 100 mL 容量瓶内 (滤纸上放无水硫酸钠 10 g), 其中, 锥形瓶、滤纸等均用二氯甲烷冲洗 3 次以上, 定容。第二, 索氏提取法^[19]。称取 0.5 g 烟样, 以 60 mL 的二氯甲烷浸润并进行索氏提取, 提取温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间为 2 h, 定容至 100 mL。第三, 超声辅助萃取法 (UAE)^[5]。称取 0.5 g 烟样于 50 mL 的锥形瓶中, 加入 25 mL 的二氯甲烷, 超声 10 min。将提取液过滤并转移至 100 mL 容量瓶内 (滤纸上放无水硫酸钠 10 g), 其中, 锥形瓶、滤纸等均用二氯甲烷冲洗 3 次以上, 定容。

1.2.4 衍生化过程 移取 10 mL 烟叶提取液, 加入 200 μL 内标液, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下水浴蒸发去除溶剂。加入 1 000 μL 衍生化溶液, 洗涤样品瓶器壁, 将所得溶液转入色谱瓶。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 环境中进行衍生化反应 100 min, 得到 GC-MS 的分析溶液^[8]。

表 1 目标物质的保留时间、定性离子及定量离子

Table 1 Retention time of analytes and ions for qualification and quantification

分析物	保留时间/min	定性离子/(m/z)	定量离子/(m/z)
衍生后的 α -CBD	31.32	73, 169, 231	169
衍生后的 β -CBD	35.20	73, 169, 231	169
内标(IS)	15.93	71, 85, 268	57

1.2.5 GC-MS 条件 GC 条件设置进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 1 μL ; 载气为 He, 流速为 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样方式为不分流进样。柱温箱的升温程序确定为起始温度 160 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 后以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升到 210 $^{\circ}\text{C}$ 保持 35 min, 再以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升到 250 $^{\circ}\text{C}$ 保持 15 min。MS 条件设置传输线温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度为 280 $^{\circ}\text{C}$, 电离源为 EI, 电离能为 70 eV, 溶剂延迟为 7 min。本试验中质谱的扫描模式有 2 种: 目标成分的定性检测采用全扫模式, 扫描范围为 m/z 40~600 amu; 目标成分的定量检测采用 SIM 模式, 每种目标物选择 1 个定量离子, 3 个定性离子。其中, 衍生化后的 α -CBD、 β -CBD 以及内标物的特征扫描离子列于表 1。

2 结果与分析

2.1 ASE 萃取条件优化

2.1.1 萃取方法对比 传统的液固萃取法 (LSE) 一直是烟草样品中西柏三烯醇类物质最常用的萃取方法^[6, 8]。超声辅助萃取 (UAE)^[5, 9]和索氏提取法 (SE)^[19]也已用于植物中双萜烯衍生物的提取。加速溶剂萃取法 (ASE) 具有较高的萃取效率和良好的重现性^[18]。本文比较了 4 种不同萃取方法 (LSE、UAE、SE 和 ASE) 的萃取效果, 并将结果示于图 1。

由图 1 可知, 对 α -CBD 而言, LSE、SE、UAE 和 ASE 4 种不同的样品前处理方法得到的萃取率, 以最高 GC-MS 相对丰度来表示, 分别为 5.31×10^9 、 4.86×10^9 、 5.68×10^9 和 5.89×10^9 个单位, ASE 的萃取率最高; 对 β -CBD 而言, LSE、SE、UAE 和 ASE 4 种方法的萃取率分别为 2.03×10^9 、 1.96×10^9 、 2.08×10^9 和 2.16×10^9 个单位, 4 种方法的萃取率相差不大, ASE 的萃取率仍是最高。ASE 原理是基于高温和加压条件下^[20], 通过促进溶剂渗透、增大溶质扩散效率和物质溶解度来提高萃取的效率, 故而与传统的萃取方法相比, ASE 具有萃取速度快、溶剂用量少、萃取效率高、使用方便、操作安全且易于自动化萃取等优点。因此, 本研究选择 ASE 作为烟叶样品中西柏三烯醇类的萃取方法。

2.1.2 ASE 工作参数优化 影响 ASE 萃取效率的因素主要包括萃取溶剂、萃取温度、静态萃取时间和循环次数等。萃取剂是影响 ASE 萃取效率最重要的因素^[18]。根据常用溶剂的性质, 我们考察了二氯甲烷、丙酮和乙酸乙酯作为萃取剂对 α -CBD 和 β -CBD 的提取率。结果 (图 2 (a)) 显示, 作为提取烟叶表面腺毛分泌物最常用的溶剂, 二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯对 α -CBD 的提取率分别为 5.79×10^9 、

5.05×10^9 和 5.24×10^9 个单位, 对 β -CBD 的提取率分别为 2.20×10^9 、 1.97×10^9 和 1.88×10^9 个单位, 二氯甲烷对 α -CBD 和 β -CBD 的提取率皆最高。主要是由于二氯甲烷的极性适中, 与西柏三烯二醇中的十四元大环和羟基皆具有较好的亲和力。因此, 本研究选择二氯甲烷作为萃取剂。

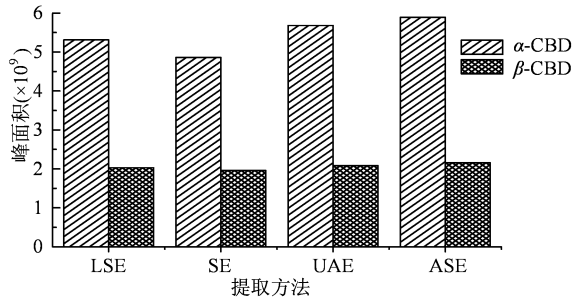


图 1 不同萃取方法对烤烟中西柏三烯二醇萃取效果的影响
Figure 1 Effects of extraction methods on CBDs from tobacco leaves

由于萃取温度对萃取动力学和溶剂黏度均有影响^[21], 本文对温度进行了优化, 考察的 ASE 温度区间为 $40 \sim 110$ $^{\circ}\text{C}$ 。由图 2 (b) 可知, 当萃取温度由 40 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 萃取效率有明显的增加; 但当温度由 50 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 110 $^{\circ}\text{C}$ 时, 萃取效率反而有

所下降。这主要是由于温度的适度升高可以促进溶质的溶解和溶剂的渗透, 且溶质的传质扩散速率得到了提高^[21]。然而, 随着温度的继续升高, 目标成分可能更容易发生降解反应, 同时杂质可能更易溶解到萃取剂中, 从而共同导致了萃取效率的下降。所以, 本试验选择的萃取温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

本试验也考察了静态萃取时间分别为 3、5 和 10 min 对萃取效率的影响。结果 (图 2 (c)) 显示, 静态萃取时间由 3 min 升高至 5 min 时, 萃取效率有明显提高, 这是由于较长的萃取时间可以使溶质的扩散过程更为完全^[21]。而继续增加静态萃取时间, 不仅增加了前处理的时间, 而且也可能导致更多杂质的溶解。所以, 本文最终选择静态萃取时间为 5 min。实验最后考察了循环次数 (1 次、2 次和 3 次) 对萃取效率的影响, 结果 (图 2 (d)) 显示在循环次数由 1 次增加到 2 次时, 萃取效率明显增加。为了节约萃取时间和萃取剂用量, 所以选择循环 2 次。

因此, 本研究最终选择的 ASE 工作参数是: 萃取剂为二氯甲烷, 萃取温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 压强为 1 500 psi, 预热时间为 5 min, 静态萃取时间为 5 min, 循环次数为 2 次。

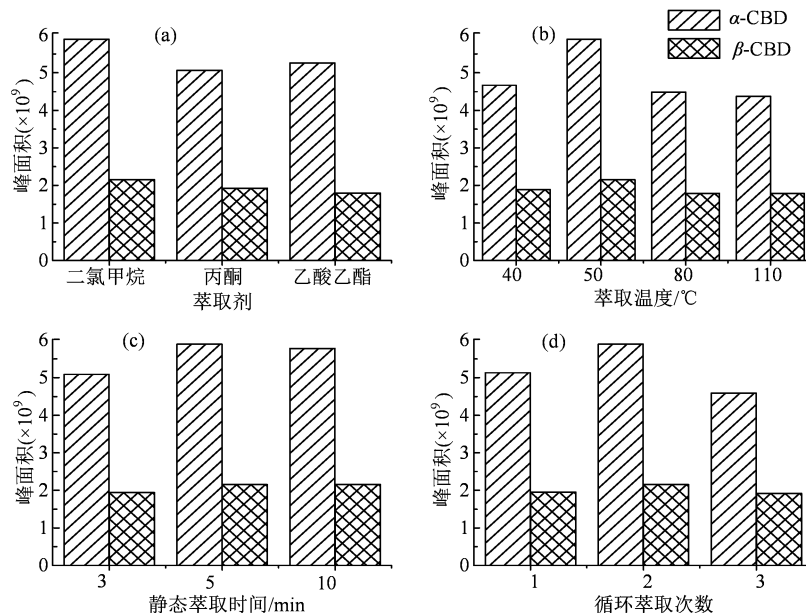


图 2 ASE 参数对烤烟中 CBD 萃取率的影响

Figure 2 Effects of ASE factors on extraction efficiency of cembranoids from flue-cured tobacco leaves

2.2 方法验证

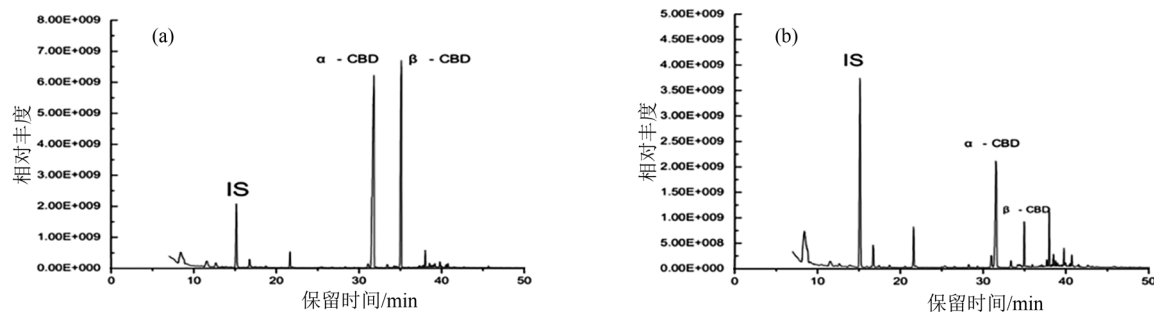
2.2.1 方法的线性范围、检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 定量分析时所用的质谱扫描模式为 SIM 模式, 图 3(a) 为标准样品的色谱图, 其中 15.93、31.32

和 35.20 min 所对应色谱峰的物质分别为内标正十九烷, 衍生化后的两种目标物 α -CBD 和 β -CBD。对谱图上的目标峰进行积分, 以目标分析物峰面积与内标物峰面积比 (A/A_{IS}) 与被测目标物浓度 (C)

作标准曲线,以 S/N 分别等于 3 和 10 时计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果 (表 2) 表明,目标成分 α -CBD 和 β -CBD 的线性关系良好,线性范围分别为 $1 \sim 200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1 \sim 160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 相关系数 (R) 分别为 0.999 2 和 0.999 6。两种目标物的 LOD 和 LOQ 分别为 $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $0.85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2.2 方法的回收率和精密度 为了验证本方法的准确性和精密度,分别对湖北恩施上部烟、中部烟

和下部烟 3 个不同部位的烤烟样品做了 3 个浓度的加标回收实验,且重复测定 3 次。精密度实验每组重复测定 5 次,以相对标准偏差 (RSD) 表示。结果 (表 3) 显示, α -CBD 和 β -CBD 的回收率分别在 93.2%~103.3% 和 91.6%~99.1% 之间。RSD 值 ($n=5$) 分别在 2.59%~3.13% 和 2.11%~2.84% 范围内。结果表明,方法的准确性好,精密度高,适用于烟叶样品中 CBD 含量的测定。



(a) CBD 标准样品; (b) 烟草样品。

图 3 样品的色谱图

Figure 3 Chromatogram of CBDs

表 2 α -CBD 和 β -CBD 的标准曲线、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Standard curves, linear ranges, detection limits and quantitation limits of α -CBD and β -CBD

化合物	浓度范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	回归方程	相关系数	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
α -CBD	1~200	$y = 0.01785x - 0.3308$	0.999 2	0.3	0.85
β -CBD	1~160	$y = 0.01646x - 0.1167$	0.999 6	0.2	0.66

表 3 方法的回收率和精密度

Table 3 Recoveries and repeatability of the method

样品	α -CBD			β -CBD		
	加标量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	回收率/%	RSD ($n=5$) /%	加标量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	回收率/%	RSD ($n=5$) /%
上部烟	396.1	97.8	3.13	79.2	95.7	2.11
	792.1	94.5		158.4	97.2	
	1 188.1	93.2		237.6	93.8	
中部烟	200.4	98.2	2.76	80.2	98.3	2.25
	400.8	99.8		160.3	94.9	
	601.2	103.3		240.4	98.0	
下部烟	195.1	99.7	2.59	78.0	91.6	2.84
	390.2	96.4		156.1	93.5	
	585.4	95.7		234.1	99.1	

2.3 实际样品分析

采用本方法对云南、湖北、贵州 3 个不同产区的烤后烟叶样品进行了分析,样品定量分析色谱图见图 3 (b)。不同烟叶样品 α -CBD 和 β -CBD 的检测结果 (表 4) 表明, α -CBD 和 β -CBD 因烟叶部位、产地的不同而存在明显差异。同一地区的烟叶样品,上部叶 α -CBD 和 β -CBD 含量显著高于中部烟和下部

烟,中部烟 α -CBD 和 β -CBD 含量略高于下部烟。不同地区的烟叶样品对比,贵州遵义烟叶样品 α -CBD 和 β -CBD 含量均高于云南和湖北的样品烟叶,云南的烟叶样品略高于湖北。对于同一烟叶样品, α -CBD 含量高于 β -CBD 约 2~4 倍。需要指出的是,本结果不包含因生态变化和降水量变化^[22] 等对烟叶西柏三烯醇类含量的影响。

表4 样品中 α -CBD和 β -CBD的检测结果Table 4 Measurement results of α -CBD and β -CBD of the tobacco samples

样品编号	样品名称	α -CBD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	β -CBD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	云南大理 B2F	651.86	221.72
2	云南大理 C2F	420.63	181.30
3	云南大理 X3F	404.59	124.60
4	湖北恩施 B4F	524.07	141.41
5	湖北恩施 C3F	391.32	117.41
6	湖北恩施 X3F	350.32	109.63
7	贵州遵义 B3F	1 239.69	424.18
8	贵州遵义 C3F	476.80	191.75
9	贵州遵义 X3F	443.32	165.14

3 结论

将 ASE 方法与 GC-MS-SIM 检测相结合, 发展了烤烟烟叶中西柏三烯二醇的准确定量方法。ASE 萃取效率高、重现性好。烟叶样品中 α -CBD 和 β -CBD 经 ASE 提取和衍生化处理后, 用 GC-MS-SIM 进行定性定量检测, 可消除复杂基质干扰, 有效提高分析方法的选择性和灵敏度。该方法适用于烟草样品中西柏三烯醇类化合物的快速、准确检测。烟草西柏三烯醇类成分的组成和含量差异是不同类型烟叶香吃味品质的重要化学物质基础。本研究可为优质烟叶的生产以及烟草西柏三烯醇类成分的高附加值开发利用提供研究支撑。

参考文献:

[1] WAGNER G J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs[J]. *Plant Physiol*, 1991, 96(3): 675-679.

[2] 韩锦峰, 张志勇, 刘华山, 等. 烟草腺毛及其分泌物西柏三烯醇类物质的研究进展[J]. *中国烟草学报*, 2013, 19(5): 118-124.

[3] 鞠馥竹, 张洪博, 闫宁, 等. 烤烟西柏三烯二醇含量遗传效应分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(8): 2633-2640.

[4] YAN N, DU Y M, LIU X M, et al. Chemical structures, biosynthesis, bioactivities, biocatalysis and semisynthesis of tobacco cembranoids: an overview[J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 83: 66-80.

[5] 黄志, 毕艳玖, 沙云菲, 等. 在线液相色谱-气相色谱/质谱联用快速分析烟叶中的西柏三烯二醇[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2020, 26(2): 227-233.

[6] WANG E M, WANG R, DEPARASIS J, et al. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 371-374.

[7] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 西柏烷二萜醇的测定 气相色谱-质谱联用法: YC/T 470—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[8] ZHOU Y, YANG Y, LI X L, et al. Determination of cembranediols in tobacco by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring with precolumn derivatization[J]. *Acta Chromatogr*, 2016, 28(4): 513-524.

[9] 付秋娟, 杜咏梅, 刘新民, 等. 超高效液相色谱法测定烟草西柏三烯二醇[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(3): 67-73.

[10] 郑庆霞, 刘萍萍, 陈千思, 等. 气相色谱-串联质谱检测新鲜烟叶中的萜类成分[J]. *烟草科技*, 2019, 52(7): 61-68.

[11] 黄维妮, 林子俺. 色谱分析中样品前处理技术的发展动态[J]. *色谱*, 2021, 39(1): 1-3.

[12] 牛改改, 邓建朝, 李来好, 等. 加速溶剂萃取及其在食品分析中的应用[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(1): 375-380.

[13] 李东芹. 液相色谱质谱 MRM-IDA-EPI 模式靶向分析生姜中的代谢产物[J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(2): 333-338.

[14] 杨阳, 张斌武, 蓝登明, 等. 黑果枸杞果实原花青素含量分析[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(22): 142-146.

[15] 张岚, 于婷婷, 孙婉玲, 等. 响应面法优化荞麦壳总黄酮超声辅助萃取工艺[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(20): 45-49.

[16] QIAN X B, YE J P, CHEN X M, et al. Analysis of cembranoids in flue-cured tobacco by accelerated solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring[J]. *J Chin Chem Soc*, 2014, 61(10): 1133-1140.

[17] 朱晓兰, 蔡继宝, 杨俊, 等. 加速溶剂萃取-气相色谱法测定土壤中的有机磷农药残留[J]. *分析化学*, 2005, 33(6): 821-824.

[18] ZHU H Y, FENG Y G, YANG J, et al. 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]. *J Sep Sci*, 2013, 36(15): 2486-2495.

[19] SHEN J C, SHAO X G. A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(6): 1003-1008.

[20] AHMAD R, AHMAD N, SHEHZAD A. Solvent and temperature effects of accelerated solvent extraction (ASE) with Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) technique for determination of Piperine and its ICP-MS analysis[J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 136: 37-49.

[21] RICHTER B E, JONES B A, EZZELL J L, et al. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation[J]. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033-1039.

[22] 向章敏, 周淑平, 耿召良. 烟叶表面化学成分的分析研究进展[J]. *西南农业学报*, 2015, 28(3): 1395-1398.