

HS-GC-IMS 结合 ROAV 分析烤烟烟叶“糯米香”特征成分

李舒畅^{1,2}, 李 军³, 高宪辉⁴, 刘文霖⁵, 常诗瑜^{1,2}, 欧泽洁¹, 庞雪莉^{1*}, 孔凡玉^{1*}

(1.中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2.中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3.山东中烟工业有限责任公司, 济南 250014; 4.云南省烟草烟叶公司, 昆明 650218; 5.贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550003)

摘 要: 为准确鉴定烤烟中“糯米香”特征风味化合物, 以云南典型“糯米香”(NM)和非“糯米香”(CK)的云烟 87 烟叶为材料, 采用顶空-气相色谱-离子迁移谱(HS-GC-IMS)技术分析其挥发物的组成及相对含量; 基于挥发物的相对气味活度值(ROAV)和偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等统计学方法, 鉴定了“糯米香”特征关键标志风味化合物。结果表明, 从供试烟叶共鉴定出 57 种挥发物(包括单体和二聚体), 其中 2-乙酰基-1-吡咯啉(糯米香), 苯乙醛(果香), 壬醛(柑橘香)以及 2,3-丁二酮(奶甜香)被鉴定为“糯米香”与非“糯米香”烤烟烟叶间的差异性特征风味化合物, 其中 2-乙酰基-1-吡咯啉是“糯米香”特征的关键贡献化合物, 其余 3 种化合物对烤烟“糯米香”特征香韵具有重要的修饰作用。本研究可能为烤烟“糯米香”特征风味精准调控及评价方法开发提供数据基础。

关键词: 烤烟; 糯米香; 挥发性关键风味化合物; 顶空-气相色谱-离子迁移谱; 相对气味活度值; 2-乙酰基-1-吡咯啉

中图分类号: TS41+1

文献标识码: A

文章编号: 1007-5119(2023)06-0075-09

Analysis of Characteristic “Glutinous Rice”-like Aroma-active Odorants in Flue-cured Tobacco Leaves Based on HS-GC-IMS Combined with ROAV

LI Shuchang^{1,2}, LI Jun³, GAO Xianhui⁴, LIU Wenlin⁵, CHANG Shiyu^{1,2},
OU Zejie¹, PANG Xueli^{1*}, KONG Fanyu^{1*}

(1. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. China Tobacco Shandong Industry Co., Ltd., Jinan 250014, China; 4. Yunnan Tobacco Leaf Company, Kunming 650218, China; 5. Tobacco Science Institute of Guizhou Province, Guiyang 550003, China)

Abstract: In order to accurately identify the potent odorants in flue-cured tobacco (FCT) leaves with “glutinous rice”-like characteristic, different Yunyan 87 tobacco leaves with or without typical “glutinous rice”-like characteristic from Yunnan province were used as materials in this study. Firstly, volatile compositions and their relative content was analyzed by headspace-gas chromatography-ion migration spectroscopy (HS-GC-IMS). Then, the differential volatile markers between typical “glutinous rice”-like and non-“glutinous rice”-like tobacco leaves samples and the key chemical contributors to the “glutinous rice”-like characteristic were identified based on the relative odor activity value (ROAV) combined with orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). A total of 57 common odorants (including monomers and dimers) were identified. 2-Acetyl-1-pyrroline (“glutinous rice”-like), benzene acetaldehyde (fruity), nonanal (citrus-like), and 2,3-butanedione (sweet, buttery) are characterized as differential flavor compounds between typical “glutinous rice”-like and non-“glutinous rice”-like tobacco leaves samples, among which 2-acetyl-1-pyrroline is a key contributor to “glutinous rice”-like aroma, the other three compounds play an important role in modifying “glutinous rice”-like characteristic flavor of FCT. The results herein would provide chemical basis for the accurate regulation and the evaluation method development for “glutinous rice”-like characteristic odorants in FCT.

Keywords: flue-cured tobacco; “glutinous rice”-like aroma; volatile key odorants; headspace-gas chromatography-ion migration spectroscopy (HS-GC-IMS); relative odor activity value (ROAV); 2-acetyl-1-pyrroline

香气是烟草品质评价的核心内容, 香韵是烟气所表现出的某种香气韵调。烟草中常见的香韵有干草香、焦甜香、焦香、正甜香、木香、坚果香、辛香、清甜香、青滋香等^[1]。近年来, 烟草研究工作

者以香气品质为育种目标, 培育出多种具有特色香韵的烤烟新品种。其中, 具有独特“糯米香”香韵的烤烟受到卷烟工业企业广泛关注, 该香韵特征被描述为浓烈的糯米香味。前人围绕“糯米香”特征

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-TRIC07); 中国烟草总公司云南省公司科技项目(2021530000241011); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(2021520000240044)

作者简介: 李舒畅(1999-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全。E-mail: 3242309079@qq.com

*通信作者。E-mail: pangxueli@caas.cn; 孔凡玉, kongfanyu123@126.com

收稿日期: 2023-08-01

修回日期: 2023-10-23

烤烟的化学成分和香气组分开展了初步探究^[2-4],试图解析烤烟“糯米香”特征的关键物质基础。现有大部分研究多采用 GC-MS、LC-MS 等常规手段分析化学成分的差异,均未明确鉴别出烤烟中“糯米香”特征风味的关键贡献化合物。本研究组前期利用现代分子感官科学技术,基于气相色谱嗅觉检测/稀释嗅闻技术(GC-O/AEDA)以及多维气相色谱-高分辨质谱联用技术(GC*GC-QTOF/MS),将烤烟烟叶“糯米香”特征成分初步鉴定为 2-乙酰基-1-吡咯啉^[5]。但是,前期仅鉴定出一种特征风味化合物,“糯米香”烤烟烟叶中是否还存在其他特征风味化合物,需采用更高灵敏度和精确度的仪器分析手段结合统计学方法进行深入研究。

顶空-气相色谱-离子迁移谱(HS-GC-IMS)是一种用于分离和鉴定复杂基质中痕量挥发性有机化合物的新型分析方法,可基于不同离子在电场中气相迁移速度的差异来表征化学离子物质^[6]。该方法以操作便捷的顶空方式进样,无需复杂的样品前处理,同时结合了气相色谱(GC)的高分离能力和离子迁移光谱(IMS)的快速响应性能,具有响应速度快、灵敏度高、分析效率高、成本低廉等多重优势^[7-8],该技术在烟草挥发物的鉴定^[9]和挥发物差异分析^[10]方面得到了较为广泛地应用。为准确鉴定烤烟烟叶中“糯米香”特征风味化合物,对前期研究结果^[5]进行补充验证,本研究采用了更高灵敏度和精确度的 HS-GC-IMS,引入相对气味活性值的概念(ROAV),借助主成分分析、偏最小二乘法判别分析、聚类分析等统计学手段,对典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中差异性挥发物进行精确筛选和鉴定,以期明确烤烟“糯米香”特征风味的关键物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取云南曲靖地区大田长势相同、成熟度一致的云烟 87 烤后烟叶,参照 GB 2635—1992 挑选中部橘黄 1 级(C1F)烟叶作为试验样品;经专业卷烟感官质量评吸委员会 10 位专家评吸鉴定,确定具有典型“糯米香”特征样品(NM1、NM2)和非“糯米香”特征对照组(CK)样品做为本研究试验样品。

1.2 仪器与试剂

2-乙酰基-1-吡咯啉标准品(98%),加拿大 TRC 公司;其他香气标准品均购自北京百灵威科技有限公司;C₄~C₉ 正构烷酮标准品(99%),美国 Sigma-Aldrich 公司;无水乙醇(色谱纯),美国 AVANTOR 公司;FlavourSpec®风味分析仪(配有 CTC 自动顶空进样器),德国 G.A.S 公司;电子天平(感量 0.000 1 g),瑞士梅特勒托利多公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理 烟叶样品去脉、切丝后于 30 ℃ 下干燥处理并研磨过筛(60 目)。分别称取 0.5 g 烟末样品于顶空瓶中,80 ℃、500 r/min 孵育 15 min 后,用气密样针(85 ℃)抽取顶空气(500 μL)进行 GC-IMS 分析,每个样品平行处理 3 次。

1.3.2 GC-IMS 分析 不分流模式;MXT-5 型色谱柱(15 m×0.53 mm×1.0 μm);柱温 60 ℃;载气/漂移气为高纯 N₂(纯度≥99.99%),载气初始流速为 2 mL/min,保持 2 min,在 20 min 内线性上升至 100 mL/min;漂移气流速为 150 mL/min,IMS 柱温 45 ℃。

1.3.3 相对气味活度值(Relative odor activity value, ROAV)计算 参照刘登勇等^[11]方法,将对样品总体风味贡献最大的挥发性组分的 ROAV 定义为 100,其他组分的 ROAV 值由下列公式计算得出:

$$ROAV_x \approx \frac{C_x}{T_x} \times \frac{T_{stan}}{C_{stan}} \times 100$$

式中, C_x 、 T_x 分别为各挥发物的相对含量(%)和对应的空气中觉察阈值; C_{stan} 、 T_{stan} 分别为对整体风味贡献最大挥发物的相对含量(%)和空气中觉察阈值。通常认为,ROAV≥1 的挥发物为待测样品总体风味的主要贡献者^[12]。

1.3.4 供试烟叶挥发性组分定性、定量分析 通过正构烷酮校准保留时间,比对 GC-IMS 中内置 NIST 气相保留指数数据库和 IMS 迁移时间数据库对典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶挥发性组分进行定性,并利用峰面积归一法计算定性化合物的相对含量。

1.3.5 香味物质添加试验 参照 YCT 138—1998^[13],将一定浓度梯度的 2-乙酰基-1-吡咯啉乙醇溶液分别注入 4 组(10 支/组)标准烟支中,以 10 支注入相同量无水乙醇的标准烟支作为空白对照,由 10 名专家级感官评价员采取 9 分制(强,7~9;中等,4~6;

弱, 1~3; 无, 0) 对卷烟“糯米香”香气强度进行量化评价。

1.4 数据处理

利用 GC-IMS 配套软件 VOCal 查看谱图, 通过 Library Search 软件进行定性分析, 利用 Reporter 和 Gallery Plot 插件对指纹图谱进行对比分析, 采用 SIMCA 14.1 软件进行 PCA 和 OPLS-DA 分析, 采用 IBM SPSS 27.0 和 Excel 软件进行数据分析及作图。

2 结 果

2.1 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中挥发性风味组分构成

由烟叶挥发性组分的 GC-IMS 二维谱图(图 1) 可知, 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶样品挥发物的 GC 分离效果较好, 且 3 组不同样品中挥发物的种类大致相同, 但不同样品中挥发物的含量存在一定差异。如在保留时间为 300 s、400 s 和 500 s 时, 均可观察到斑点的颜色在不同样品间出现了较为明显的变化(图 1 黄框所示), 表明烟叶挥发物含量差异是形成烤烟“糯米香”特征风味的因素之一。

基于 HS-GC-IMS 分析, 在 3 组供试样品中共检测到 91 种共有挥发物, 其中 57 种得以准确定性(包括单体和二聚体)(表 1), 物质种类构成丰富, 包括 20 种醛类、11 种酮类、11 种含氮杂环类、8 种酯类、2 种酸类、2 种醇类、2 种醚类和 1 种含氧杂环类。由不同烟叶挥发物的含量分布指纹图谱(图 2)可以直观看出: 典型“糯米香”与非“糯米香”烤烟烟叶中挥发物组成及含量分布呈现较大差异。具体来看, 5-甲基-2(3H)-呋喃酮、2,6-二甲基吡啶、3-庚醇、2-甲基四氢呋喃-3-酮、壬醛、苯乙醛、E,E-2,4-庚二烯醛、2-乙基-5-甲基吡嗪、环己

酮、丙烯酸丁酯、2-己烯醛、辛醛、E-2-辛烯醛、E,Z-2,6-壬二烯醛、异戊烯醛、醋酸甲酯、癸醛、糠醛、2,3-丁二酮、2-乙酰基-1-吡咯啉等组分在试验组中相对含量明显高于对照组($p < 0.05$); 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪、丙酮、2-甲基丙烯醛、2-丁酮、1,4-二氧六环、苯甲醛、3-羟基丁酸乙酯、E-2-甲基-2-丁烯醛、异丁醇、 γ -丁内酯、E-2-辛烯醛、3,5-二甲基-1,2-环戊二酮、5-甲基-2-庚烯-4-酮、苯甲酸乙酯、葫芦巴内酯、二丙基硫醚、4-甲基-3-戊烯-2-酮、2-乙酰呋喃等组分的相对含量在对照组明显高于试验组($p < 0.05$)。

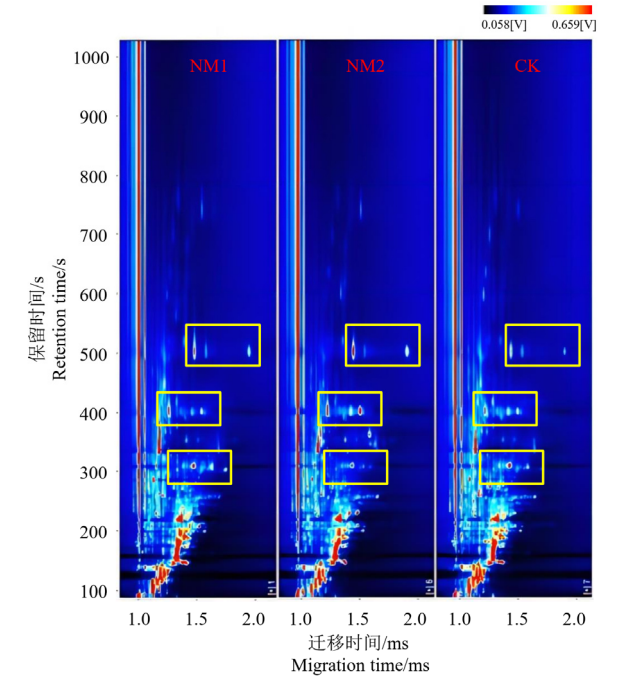


图 1 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中挥发性组分的 GC-IMS 二维谱图

Fig. 1 Two-dimensional GC-IMS spectra of volatile compounds in typical “glutinous rice”-like and non-“glutinous rice”-like tobacco leaves

表 1 基于 HS-GC-IMS 分析的典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中挥发性风味组分构成

Table 1 Volatile flavor compounds in flue-cured tobacco leaves with or without typical “glutinous rice”-like aroma characteristic by headspace-gas chromatograph-ion mass spectrometry (HS-GC-IMS)

序号 No.	挥发性风味组分 Volatile flavor compounds	保留时间 Retention time/s	迁移时间 Migration time/ms	相对含量 Relative content/%		
				NM1	NM2	CK
1	壬醛-M Nonanal-M	506.293	1.479 23	3.78±0.05b	4.60±0.10a	2.71±0.10c
2	壬醛-D Nonanal-D	507.243	1.943 58	1.40±0.00b	2.31±0.12a	0.89±0.07c
3	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 2-Ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	451.751	1.220 32	0.73±0.06c	0.69±0.07c	1.32±0.03b
4	苯乙醛-M Benzene acetaldehyde-M	406.380	1.257 61	4.33±0.05b	4.51±0.14b	2.48±0.09c
5	苯乙醛-D Benzene acetaldehyde-D	406.380	1.537 92	3.67±0.06b	3.99±0.14a	1.26±0.06c
6	甲基庚烯酮 Methyl-5-hepten-2-one	340.762	1.175 31	21.95±0.18b	15.67±0.13c	24.61±0.14a

表 1 （续）
Table 1 （Continued）

序号 No.	挥发性风味组分 Volatile flavor compounds	保留时间 Retention time/s	迁移时间 Migration time/ms	相对含量 Relative content/%		
				NM1	NM2	CK
7	苯甲醛-M Benzaldehyde-M	312.332	1.148 52	1.65±0.02a	1.57±0.03b	1.42±0.02c
8	苯甲醛-D Benzaldehyde-D	311.626	1.469 71	2.43±0.02b	1.88±0.03c	2.81±0.02a
9	E-2-辛烯醛 (E)-2-Octenal	421.497	1.325 64	0.81±0.01b	0.61±0.01c	0.97±0.01a
10	3,5-二甲基-1,2-环戊二酮 3,5-Dimethyl-1,2-cyclopentanedione	422.261	1.191 83	0.55±0.02b	0.42 ±0.00c	0.57±0.01b
11	2,6-二甲基-4-庚酮 2,6-Dimethyl-4-heptanone	306.023	1.331 79	0.31±0.01b	0.27±0.00c	0.34±0.01a
12	5-甲基-2-庚烯-4-酮 5-Methyl-2-hepten-4-one	325.726	1.214 73	0.35±0.01c	0.39±0.02b	0.43±0.01b
13	γ-丁内酯-D Dihydro-2(3H)-furanone-D	276.793	1.300 63	0.44±0.06c	0.79±0.04b	1.51±0.15a
14	2-乙酰基-1-吡咯啉-M 2-Acetyl-1-pyrroline-M	280.102	1.127 37	0.12±0.00b	0.12±0.01b	0.07±0.00c
15	E,E-2,4-庚二烯醛-M (E, E)-2,4-Heptadienal-M	370.724	1.196 56	0.74±0.04b	1.91±0.07a	0.26±0.00c
16	2-乙基-5-甲基吡嗪 2-Ethyl-5-methylpyrazine	350.293	1.204 41	0.20±0.01b	0.53±0.00a	0.15±0.01c
17	E,E-2,4-庚二烯醛-D (E, E)-2,4-Heptadienal-D	367.226	1.620 27	0.36±0.01b	1.63±0.07a	0.11±0.01c
18	辛醛 Octanal	357.117	1.410 45	0.43±0.02b	0.57±0.01a	0.39±0.02c
19	葫芦巴内酯 Sotolone	495.389	1.219 69	0.47±0.01b	0.41±0.02c	0.71±0.01a
20	琥珀酸乙酯 Diethyl succinate	703.475	1.294 62	0.62±0.03b	0.46±0.00c	0.67±0.02b
21	苯甲酸乙酯 Ethyl benzoate	639.893	1.264 33	0.35±0.01c	0.39±0.00b	0.58±0.01a
22	3-羟基丁酸乙酯 Ethyl 3-hydroxybutanoate	299.829	1.171 22	0.24±0.02c	0.22±0.00c	0.38±0.00b
23	2-乙酰呋喃-M 2-Acetylfuran-M	270.504	1.120 08	0.29±0.00a	0.22±0.00c	0.23±0.00b
24	二丙基硫醚 Dipropyl sulfide	252.079	1.157 01	0.44±0.01c	0.54±0.02b	0.72±0.01a
25	2-甲基-3-噻基呋喃 2-Methyl-3-furanthiol	232.841	1.146 39	0.71±0.00c	0.72±0.01c	0.84±0.00b
26	异戊烯醛-D 3-Methyl-2-butenal-D	197.585	1.354 87	2.16±0.03b	2.54±0.02a	1.25±0.01c
27	4-甲基-3-戊烯-2-酮 Mesityl oxide	202.262	1.446 06	0.40±0.01b	0.28±0.00c	0.62±0.00a
28	环己酮 Cyclohexanone	261.414	1.146 45	0.37±0.01b	0.46±0.00a	0.31±0.00c
29	2,6-二甲基吡啶 Pyridine, 2,6-dimethyl-	252.604	1.087 60	0.39±0.02b	0.36±0.00b	0.23±0.01c
30	5-甲基-2(3H)-呋喃-D 5-Methyl-2(3H)-furanone-D	241.900	1.377 12	0.31±0.02a	0.26±0.01b	0.21±0.01c
31	3-庚醇 3-Heptanol	252.266	1.323 48	0.32±0.00a	0.29±0.00b	0.20±0.00c
32	2-乙酰呋喃-D 2-Acetylfuran-D	271.915	1.439 64	0.23±0.00b	0.13±0.00c	0.24±0.00b
33	丙烯酸丁酯 Butyl acrylate	258.772	1.264 31	0.26±0.01c	0.32±0.01b	0.27±0.01c
34	2-己烯醛 2-Hexenal	231.788	1.518 97	1.23±0.02b	2.15±0.04a	0.53±0.01c
35	5-甲基糠醛 5-Methylfurfural	318.137	1.128 22	0.18±0.01c	0.18±0.01c	0.21±0.00b
36	5-甲基-2(3H)-呋喃-M 5-Methyl-2(3H)-furanone-M	242.592	1.124 83	0.18±0.01b	0.18±0.00b	0.12±0.00c
37	γ-丁内酯-M Dihydro-2(3H)-furanone-M	277.281	1.082 43	1.09±0.08c	1.18±0.00c	1.07±0.00c
38	E,Z-2,6-壬二烯醛 (E,Z)-2,6-Nonadienal	604.029	1.375 93	0.46±0.05b	0.57±0.03a	0.15±0.02c
39	2-甲基四氢呋喃-3-酮 Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone	205.976	1.075 17	0.38±0.01b	0.39±0.01b	0.31±0.01c
40	异戊烯醛-M 3-Methyl-2-butenal-M	198.085	1.092 51	0.28±0.00b	0.28±0.01b	0.15±0.01c
41	环戊酮 Cyclopentanone	193.093	1.105 12	0.17±0.00b	0.14±0.00c	0.14±0.00c
42	E-2-戊烯醛 (E)-2-Pentenal	184.235	1.360 45	1.05±0.04b	1.61±0.08a	0.35±0.00c
43	E-2-甲基-2-丁烯醛 (E)-2-Methyl-2-butenal	177.149	1.334 44	2.38±0.07c	2.68±0.07b	3.13±0.02a
44	1,4-二氧六环 1,4-Dioxane	157.985	1.321 83	7.38±0.28c	8.67±0.05b	8.53±0.10b
45	二甲基二硫醚 Dimethyl disulfide	178.599	0.986 12	0.57±0.02b	0.4±0.01c	0.39±0.00c
46	2-丁酮 2-Butanone	133.477	1.248 72	1.39±0.05b	0.95±0.01c	1.88±0.01a
47	2-甲基丙烯醛 2-Methyl-2-propenal	130.574	1.218 67	4.59±0.01b	3.88±0.03c	5.08±0.08a
48	2,3-丁二酮 2,3-Butanedione	127.349	1.182 61	8.11±0.06b	9.67±0.09a	6.36±0.08c
49	醋酸甲酯 Methyl acetate	116.381	1.194 63	1.6±0.04b	2.56±0.09a	1.33±0.02c
50	丙酮 2-Propanone	105.414	1.112 49	12.2±0.16b	9.32±0.09c	14.91±0.03a
51	乙酸-M Acetic acid-M	140.897	1.057 07	1.64±0.03c	2.05±0.02b	1.59±0.02c
52	2,5-二甲基呋喃 2,5-Dimethylfuran	167.993	1.031 03	0.31±0.01b	0.23±0.00c	0.22±0.01c
53	异丁醇 2-Methyl-1-propanol	149.174	1.372 14	0.94±0.01b	0.68±0.00c	1.53±0.01a
54	乙酸-D Acetic acid-D	140.647	1.156 90	1.25±0.20c	1.35±0.17bc	1.68±0.04b
55	2-乙酰基-1-吡咯啉-D 2-Acetyl-1-pyrroline-D	280.641	1.477 08	0.02±0.00c	0.03±0.00c	0.02±0.00c
56	癸醛 Decanal	742.224	1.541 65	0.60±0.00b	0.65±0.04b	0.41±0.02c
57	糠醛 Furfural	221.652	1.083 19	0.18±0.02b	0.15±0.01bc	0.14±0.00c

注：挥发性风味组分中的 M 为单体，D 为二聚体，同行不同字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)，下同。
Note: “M” represents monomer and “D” represents dimer in volatile flavor compounds. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). The same as below.

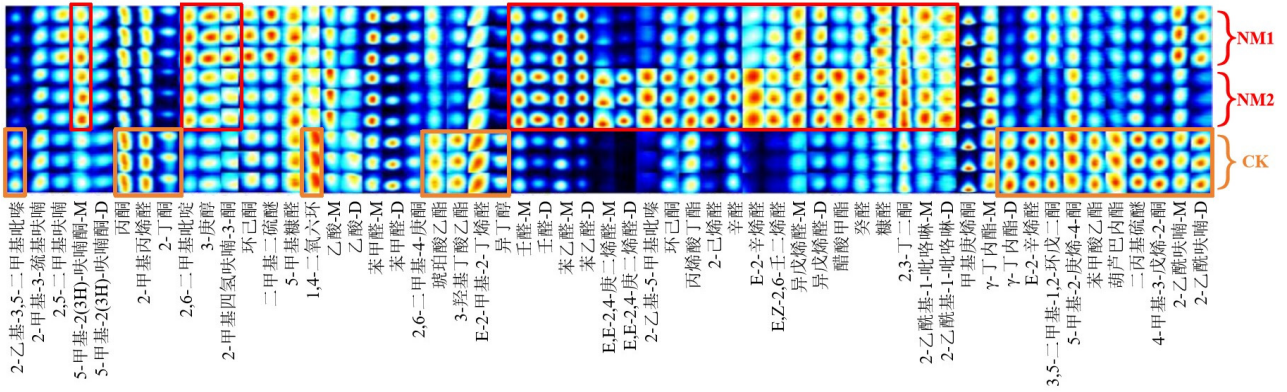


图 2 典型“糯米香”与非“糯米香”烤烟烟叶中挥发性风味组分的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of volatile flavor compounds in flue-cured tobacco leaves with or without typical “glutinous rice”-like aroma

2.2 基于相对气味活性值 (ROAV) 的挥发性风味化合物的香气贡献评价

典型“糯米香”与非“糯米香”烤烟烟叶中相对气味活性值(ROAV)≥1 的香气组分共 14 种(表 2), 其中 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪在试验组和对照组样品中均呈现最高的气味贡献值(ROAV=100), 其

他较重要的共有香气物质还包括壬醛、苯乙醛、2-乙酰基-1-吡咯啉 (ROAV > 10)。“糯米香”烤烟的关键特征风味化合物的鉴定还需进一步综合气味属性, 对典型“糯米香”与非“糯米香”烤烟烟叶的差异风味化合物进行多维度筛选判别^[14]。

表 2 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中挥发性组分的相对气味贡献值 (ROAV)

Table 2 Relative odor activity value (ROAV) of volatile compounds in typical “glutinous rice”-like and non-“glutinous rice”-like tobacco leaves

序号 No.	挥发性风味组分 Volatile compounds	觉察阈值 Perception threshold/(mg·kg ⁻¹)	气味属性 Odor description	ROAV		
				NM1	NM2	CK
1	壬醛-M Nonanal-M	0.002	柑橘, 黄瓜, 脂肪	10.49±0.87b	13.41±1.43a	4.12±0.24c
2	壬醛-D Nonanal-D	0.002	柑橘, 黄瓜, 脂肪	3.89±0.34b	6.71±0.67a	1.35±0.12c
3	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 2-Ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	0.00004	可可, 烤香, 烟草	100±0.00	100±0.00	100±0.00
4	苯乙醛-M Benzene acetaldehyde-M	0.0012	果香, 花香, 蜂蜜	20.02±1.65b	21.94±2.72b	6.29±0.36c
5	苯乙醛-D Benzene acetaldehyde-D	0.0012	果香, 花香, 蜂蜜	15.28±0.25b	16.61±0.59a	5.25±0.27c
6	甲基庚烯酮 Methyl-5-hepten-2-one	0.01889	柑橘, 蘑菇, 橡胶	6.44±0.54b	4.83±0.44c	3.96±0.07c
7	苯甲醛-D Benzaldehyde-D	0.1	杏仁, 果香, 焦糖	0.13±0.01a	0.11±0.01b	0.08±0.00c
8	E-2-辛烯醛 (E)-2-octenal	0.012	脂肪, 坚果, 花生	0.38±0.03b	0.30±0.03c	0.25±0.01c
9	2-乙酰基-1-吡咯啉-M 2-Acetyl-1-pyrroline-M	0.00002	糯米, 烤香, 爆米花	32.24±1.63b	34.90±3.68b	11.16±0.95c
10	辛醛 Octanal	0.01	柑橘, 脂肪, 青鲜	0.24±0.03b	0.33±0.04a	0.12±0.01c
11	茴香巴内酯 Sotolone	0.0006	棉花糖, 咖喱	4.34±0.41c	3.97±0.56c	3.62±0.08c
12	2-甲基-3-噻基咪唑 2-Methyl-3-furanthiol	0.005	煎炸, 肉香, 金属	0.79±0.06b	0.83±0.09b	0.51±0.01c
13	2,6-二甲基吡啶 Pyridine, 2,6-dimethyl-	0.003	青鲜, 苦味, 烤香	0.72±0.09b	0.71±0.07b	0.23±0.01c
14	丙烯酸丁酯 Butyl acrylate	0.0015	蘑菇	0.96±0.05b	1.26±0.15a	0.54±0.04c
15	2-己烯醛 2-Hexenal	0.03	脂肪, 青鲜, 腐臭	0.23±0.02b	0.42±0.05a	0.05±0.00c
16	E,Z-2,6-壬二烯醛 (E,Z)-2,6-Nonadienal	0.0011	黄瓜, 青鲜, 蜡状	2.36±0.45b	3.01±0.41b	0.41±0.05c
17	二甲基二硫醚 Dimethyl disulfide	0.0084	大蒜, 洋葱, 肉香	0.38±0.04a	0.28±0.03b	0.14±0.00c
18	2-甲基丙烯醛 2-Methyl-2-propenal	0.025	花香	1.02±0.09b	0.90±0.08b	0.62±0.00c
19	2,3-丁二酮 2,3-Butanedione	0.005	焦糖, 奶酪	8.99±0.78b	11.26±1.06a	3.87±0.13c
20	乙酸-M Acetic acid-M	0.001	酸味, 果香, 辛香	9.08±0.79b	11.93±1.07a	4.82±0.18c
21	异丁醇 2-Methyl-1-propanol	0.033	酒精, 苹果, 可可	0.16±0.02b	0.12±0.01c	0.14±0.00bc
22	乙酸-D Acetic acid-D	0.001	酸味, 果香, 辛香	6.92±1.07b	7.78±0.41b	5.09±0.03c
23	2-乙酰基-1-吡咯啉-D 2-Acetyl-1-pyrroline-D	0.00002	糯米, 烤香, 爆米花	5.54±0.47bc	7.89±2.01b	3.04±0.07c

注：觉察阈值数据参考 GEMERT^[15], 为空气中的阈值。
Note: The sensory threshold data of aroma compounds refer to GEMERT^[15], which is the threshold in the air.

2.3 基于 OPLS-DA 筛选典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶的标志性差异物

对三组样品中挥发性组分的 ROAV 值进行偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 利用变量重要性投影值 (Variable importance projection, VIP) 筛选试验组与对照组中的关键差异性风味化合物, 将同时满足 $VIP > 1$ 且 $p < 0.05$ 的组分定义为不同“糯米香”香气强度烤烟烟叶样品的差异性标志物^[16]。由图 3A 和图 3B 可以看出, 对照组和试验组中关键风味物质构成差异较大, 其中 2-乙酰基-1-吡咯啉

($VIP=3.000\ 32$, 糯米香, 单体), 苯乙醛($VIP=2.424\ 76$, 果香, 单体), 壬醛($VIP=1.774\ 07$, 柑橘香, 单体), 2,3-丁二酮($VIP=1.583\ 19$, 奶甜香), 乙酸($VIP=1.509\ 22$, 酸味, 单体)是关键差异风味组分(图 3B 红框所示)。模型置换验证结果(图 3C)显示, $R^2X(\text{cum})=0.986$, $R^2Y(\text{cum})=0.994$, $Q^2(\text{cum})=0.978$, 右侧的 R^2 和 Q^2 均高于左侧, 且 Q^2 与 Y 轴交于负半轴, 表明模型未出现过拟合现象, 有较高的可信度和较好的预测能力。

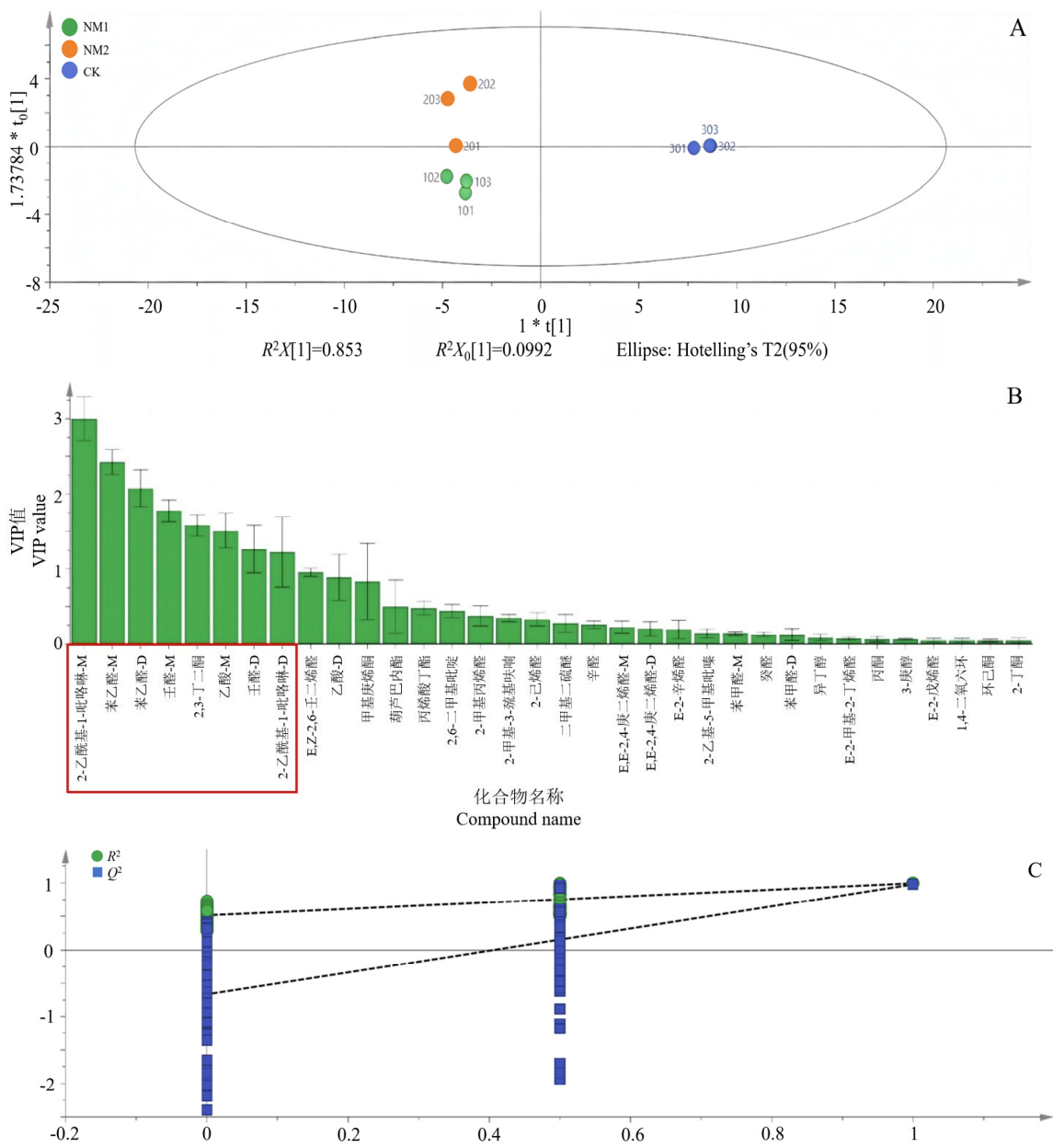


图 3 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中挥发性组分的 OPLS-DA 得分图 (A)、VIP 值图 (B)、模型置换验证图 (C)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (A), VIP value plot (B) and model replacement verification plot (C) of volatile compounds in flue-cured tobacco leaves with or without typical “glutinous rice”-like aroma

2.4 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶中差异性风味标志物的含量分布特征

由“糯米香”与非“糯米香”烟叶中差异性风味标志物的聚类热图（图 4）可知，除乙酸外，其余 4 种差异性风味标志物，包括 2-乙酰基-1-吡咯啉（糯米香）、苯乙醛（果香）、壬醛（柑橘香）以及 2,3-丁二酮（奶甜香）在试验组中的含量均显著高于对照组。其中 2-乙酰基-1-吡咯啉（2-acetyl-1-pyrroline, 2AP）拥有最高的 ROAV 值和最高的 VIP 值，且具有典型糯米香味特征，极有可能为烤烟“糯米香”特征的直接关键风味贡献化合物，需进一步结合香味物质添加试验对其香气贡献进行验证。

2.5 2AP 对“糯米香”风味贡献的添加验证

如表 3 所示，与对照相比，添加 4 个浓度梯度 2AP 的卷烟均产生了足以被实验员感知到的糯米香味特征，且 10 名实验员给出的香气强度赋分值的相对标准偏差（RSD）仅为 7%，表明数据的离散

程度相对较小，结果具有较高的可信度，由此验证了 2AP 对烤烟“糯米香”特征风味的直接贡献作用，即 2AP 为烤烟“糯米香”的直接关键风味贡献化合物。

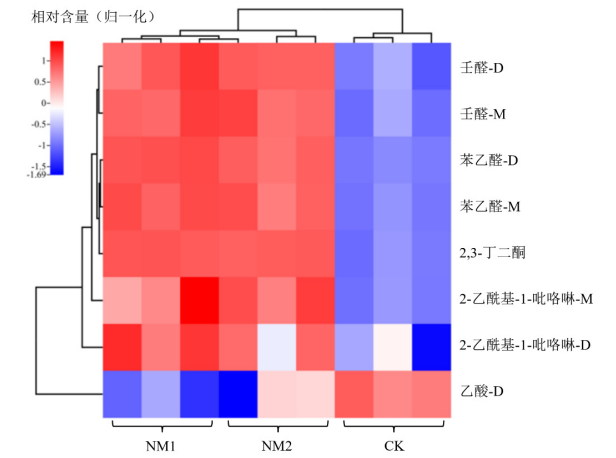


图 4 典型“糯米香”与非“糯米香”烟叶标志性差异物的聚类热图

Fig. 4 Cluster heatmap of iconic differential compounds in typical “glutinous rice”-like and non-“glutinous rice”-like tobacco leaves

表 3 卷烟香味物质添加试验评吸结果

Table 3 Evaluation of smoking results of cigarette flavor substance addition test

组别	2AP 溶液浓度	添加量	卷烟中 2AP 浓度	“糯米香”香气强度
Group	2AP concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Addition amount/ μL	2AP concentration in cigarette/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Aroma intensity
对照	0	10	0.00	0.00 $\pm$ 0.00
1	0.625	10	0.01	2.00 $\pm$ 0.47
2	1.25	10	0.02	2.90 $\pm$ 0.57
3	2.5	10	0.04	5.00 $\pm$ 0.67
4	5.0	10	0.08	8.20 $\pm$ 0.63

3 讨论

烟草的风味是由其香气组分的含量及觉察阈值共同决定^[17]，在分析关键风味化合物时不应局限于“以量定效”的原则^[18]。相对气味活度值法（ROAV）是一种基于觉察阈值和相对含量来客观描述香气组分对样品香气风格贡献值的一种常用方法，可用来考察对样品风格有决定性影响和修饰作用的香气组分^[19]，而将 ROAV 法与统计学分析方法结合，可实现复杂基质中特征香韵关键风味化合物的精确鉴定^[20]。

本研究通过 ROAV 法结合 PCA 和 OPLS-DA 等统计学分析发现，2-乙酰基-1-吡咯啉具有浓烈的糯米香味特征和极低的觉察阈值（0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）^[21]，是烤烟“糯米香”风味的关键化合物；苯乙醛、壬醛、

2,3-丁二酮也是“糯米香”与非“糯米香”的关键差异风味组分。2-乙酰基-1-吡咯啉为含氮杂环类碱性物质，验证了李振杰等^[4]研究中相比于普通烤烟，典型“糯米香”烤烟含有更多的碱类物质的结果。李勇等^[2]、张志明等^[3]和焦天雷等^[22]在烤烟“糯米香”特征香韵解析研究中都曾提出，苯乙醛、壬醛等醛类化合物在典型“糯米香”烤烟中占比较高，这一结论也与本研究的结果相吻合。

烤烟“糯米香”香韵的香气构成十分丰富，除了类似糯米的香气特征最为突出，还包括了甜香、花香等香气特征^[23]。壬醛、苯乙醛、2,3-丁二酮均为前人报道的烟草重要香气成分，呈现果香、花香和奶甜香等香气特征，有助于掩盖杂气、削弱刺激、改善吃味、增强回甘^[24-25]，可协助彰显烤烟典型“糯

米香”香韵风格特征,对烤烟“糯米香”特征香韵具有重要的修饰作用。由于烟草整体香韵风格的产生并非各香气组分的简单加和,而是通过复杂的协同作用形成。因此,3种不具有直接“糯米香”贡献的差异醛酮类香气化合物(壬醛,苯乙醛,2,3-丁二酮)是否可以和2AP协同作用,进一步彰显烤烟“糯米香”风味特征,还需通过阈值法、S型曲线法、OAV法等香气协同作用研究方法进行深入研究。另外,前人均证实高含量的生物碱类物质是“糯米香”烤烟的主要化学特征,因此,今后还可围绕生物碱类前体与2AP转化的关联性开展深入剖析。

4 结 论

本研究基于HS-GC-IMS和挥发物阈值信息,明确了典型“糯米香”和非“糯米香”烤烟烟叶中挥发性风味化合物组分构成、分布特征和相对气味贡献(ROAV)。基于ROAV值和统计学分析,筛选出4种烤烟“糯米香”特征的标志风味化合物,其中2-乙酰基-1-吡咯啉(糯米香)具有最高的相对气味活度值(ROAV)和最高的变量重要性投影值(VIP),是烤烟“糯米香”特征的直接关键贡献化合物;壬醛(柑橘香)、苯乙醛(果香)以及2,3-丁二酮(奶甜香)有助于掩盖杂气、削弱刺激、改善吃味、增强回甘,对烤烟“糯米香”特征香韵具有重要的修饰作用。研究采用更高灵敏度和精确度的仪器分析手段结合统计学方法,对前期研究结果进行了补充验证,可为烤烟糯米香特征风味精确评价方法创新开发及基于分子育种技术的糯米香特征风味调控研究提供数据支撑和理论基础。

参考文献

- [1] 刘俊辉,杨春强,范武,等.卷烟烟气中7种香韵特征赋予组群的筛查[J].烟草科技,2019,52(4):44-50.
LIU J H, YANG C Q, FAN W, et al. Screening of seven note character impact groups in cigarette smoke[J]. Tobacco Science & Technology, 2019, 52(4): 44-50.
- [2] 李勇,逢涛,师君丽,等. 硃砂烟叶主要香气物质特征解析[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(4): 78-84.
LI Y, PANG T, SHI J L, et al. Analysis of flavor compounds of cherry-red tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(4): 78-84.
- [3] 张志明,董高峰,殷沛沛,等. 硃砂烟叶形成机理及物质特征研究[J]. 中国食品工业, 2022(9): 109-112.
ZHANG Z M, DONG G F, YIN P P, et al. Study on the formation mechanism and material characteristics of cherry-red tobacco leaves[J]. China Food, 2022(9): 109-112.
- [4] 李振杰,蒋昆明,刘泽,等. 云产硃砂烟的化学特征研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(1): 173-180.
LI Z J, JIANG K M, LIU Z, et al. Study on chemical characteristics of Yunnan cherry-red tobacco[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(1): 173-180.
- [5] 李舒畅,黄建,庞夙,等. 基于感官组学的烤烟烟叶中糯米香特征成分的鉴定[J/OL]. 甘肃农业大学学报(2023-07-14)[2023-10-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1055.S.20230713.1731.012.html>.
LI S C, HUANG J, PANG S, et al. Identification of characteristic "glutinous rice"-like aroma-active in flue-cured tobacco leaves based on sensomics approaches[J/OL]. Journal of Gansu Agricultural University (2023-07-14)[2023-10-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1055.S.20230713.1731.012.html>.
- [6] CAVANNA D, ZANARDI S, DALL'ASTA C, et al. Ion mobility spectrometry coupled to gas chromatography: A rapid tool to assess eggs freshness[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 691-696.
- [7] WANG S, CHEN H, SUN B. Recent progress in food flavor analysis using gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS) [J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126158.
- [8] GUO X, SCHWAB W, HO C, et al. Characterization of the aroma profiles of oolong tea made from three tea cultivars by both GC-MS and GC-IMS[J]. Food Chemistry, 2022, 376: 131933.
- [9] QIN G, ZHAO G, OUYANG C, et al. Corrigendum to "Aroma components of tobacco powder from different producing areas based on gas chromatography ion mobility spectrometry[J]. Open Chemistry, 2022, 20(1): 350.
- [10] YAN T, ZHOU P, LONG F, et al. Unraveling the difference in the composition/content of the aroma compounds in different tobacco leaves: for better use[J]. Journal of Chemistry, 2022: 3293899.
- [11] 刘登勇,周宏光,徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法:“ROAV”法[J]. 食品科学, 2008(7): 370-374.
LIU D Y, ZHOU H G, XU X L. ROAV method: A new method for determining key odor compounds of Rugao Ham[J]. Food Science, 2008(7): 370-374.
- [12] 杨君,郝海燕,储国海,等. 基于GC-MS和GC-O联用分析佛手精油关键香气成分[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 194-197.
YANG J, GAO H Y, CHU G H, et al. Characterization of volatile constituents and odorous compounds in essential oil of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis swingle*) by GC-MS and GC-O[J]. Food Science, 2015, 36(20): 194-197.
- [13] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品感官评价方法:YC/T 138—1998[S]. 北京:中国标准出版社,1998.
State Tobacco Monopoly Administration. Tobacco and tobacco products—the sensory evaluation methods: YC/T 138—1998[S]. Beijing: Standards Press of China, 1998.
- [14] 李武峰,邱丽霞,关家伟,等. 基于HS-SPME-GC-MS和OPLS-DA模型探究不同嫩度驴肉的关键挥发性物质成分差异[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(12): 4258-4270.
LI W F, QIU L X, GUAN J W, et al. Exploring the differences of key volatile compounds in donkey meat with different tenderness based on HS-SPME-GC-MS and OPLS-DA models[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2022, 53(12): 4258-4270.
- [15] 范海默特. 化合物嗅觉阈值汇编[M]. 北京:科学出版社,2018.
Van GEMERT L J. Compilations of odour threshold values in air, water and other media[M]. Beijing: Science Press, 2018.
- [16] 谭凤玲,詹萍,王鹏,等. 基于感官评价及GC-MS结合OPLS-DA分析热杀菌对蟠桃汁呈香品质的影响[J]. 中国农业科学, 2022, 55(12): 2425-2435.
TAN F L, ZHAN P, WANG P, et al. Effects of thermal sterilization on aroma quality of flat peach juice based on sensory evaluation and GC-MS combined with OPLS-DA[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(12): 2425-2435.
- [17] 刘士健. 腊肉加工过程中主体风味物质变化研究[D]. 重庆:西南农业大学,2005.
LIU S J. Study on change of main flavour composition in preserved ham during processing[D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2005.
- [18] 李欢康,杨佳玮,刘文玉,等. 不同工艺核桃油挥发性物质比对及关键香气成分表征[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 185-192.
LI H K, YANG J W, LIU W Y, et al. Comparison of volatile components

- and characterization of key aroma components of walnut oil produced by different processes[J]. Food Science, 2021, 42(16): 185-192.
- [19] 李登科, 田楠, 田志章, 等. 应用顶空气相-离子迁移谱与相对气味活度值法分析卷烟特征香气物质[J]. 分析测试学报, 2021, 40(8): 1164-1170.
- LI D K, TIAN N, TIAN Z Z, et al. Analysis of typical aromatic matters in cigarettes using headspace-gas chromatography-ion mobility spectroscopy combined with relative odor activity value[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2021, 40(8): 1164-1170.
- [20] FANG Z, LI G, GU Y, et al. Flavour analysis of different varieties of camellia seed oil and the effect of the refining process on flavour substances[J]. Food Science & Technology, 2022, 170: 114040.
- [21] BUTTERY R G, LING L C, JULIANO B O, et al. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(4): 823-826.
- [22] 焦天雷, 朱杰, 和智君, 等. 砵砂烟叶的化学成分分析[J]. 中国食品工业, 2022(12): 115-119.
- JIAO T L, ZHU J, HE Z J, et al. Analysis of chemical constituents in cherry-red tobacco leaves[J]. China Food, 2022(12): 115-119.
- [23] 王文伦, 汪应华, 刘羿男, 等. 密集烘烤干筋期最高温度对烟叶致香物质的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(16): 130-134.
- WANG A L, WANG Y H, LIU Y N, et al. Effects of maximum temperature during stem-drying period on aroma components of flue-cured tobacco in bulk-barn[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(16): 130-134.
- [24] 茅中一, 洪祖灿, 刘加增, 等. 基于香气活性值的福建尤溪烟叶提取物香气特征成分分析[J]. 烟草科技, 2020, 53(10): 56-65.
- MAO Z Y, HONG Z C, LIU J Z, et al. Characteristic aroma components in tobacco extracts from Youxi based on odor activity value[J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(10): 56-65.
- [25] 胡小东, 张映翠, 方亮, 等. 楚雄州不同生态烟区烤烟致香成分含量比较分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1311-1316.
- HU X D, ZHANG Y C, FANG L, et al. Comparison of aroma components of flue-cured tobacco from different ecological regions in Chuxiong[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(3): 1311-1316.

《烟草科技》2023 年第 12 期目次

dsRNA- <i>endoPGs</i> 和 dsRNA- <i>RMK1</i> 介导的 RNAi 对烟草靶斑病的抑制作用.....	王 妍, 郭 依, 汪汉成, 等	1
不同浓度吐温-80 对烟草叶面微生物洗脱效果的影响.....	张振远, 滕环瑜, 潘 影, 等	7
一株二型蜡蚧菌的鉴定及其对烟蚜的致病性和防效.....	罗毅红, 刘明科, 胡 刚, 等	14
植保无人机喷雾助剂及喷头类型对烟田雾滴沉积分布的影响.....	冯 超, 王国宾, 郑成鹏, 等	21
滤棒特性对外周两段式加热型细支加热卷烟逐口理化指标的影响.....	张莹莹, 秦云华, 杨 柳, 等	28
空腔复合滤嘴结构对卷烟主流烟气常规化学成分释放量的影响.....	杨 歌, 徐月玲, 徐瑞霜, 等	40
基于 Lasso 回归模型分析烤烟原料烟气化学成分与感官评价指标的关系.....	吴晓炯, 张 宇, 高 扬, 等	49
结构设计对加热卷烟出口烟气温度与释放量的影响.....	韩敬美, 邬志锋, 张 霞, 等	58
电加热卷烟传热与原料组分变化的数值模拟.....	高峰涵, 黄洁洁, 王雨青, 等	67
基于物体显著性自监督学习的片烟杂物检测方法.....	王小飞, 李东方, 李玉珩, 等	76
YJ27 型加热卷烟接装机双路供料系统的设计.....	杨成波, 张 凌, 王 俊, 等	84
ZJ119 型卷接机组流化床供丝气流温度控制系统的设计.....	潘恒乐, 王荣文, 吴名辉, 等	91
烟碱在帕金森病中的神经保护作用及其机制的研究进展.....	何 雨, 张歆悦, 朱洲梅, 等	98