

GC/MS 指纹图谱在南平烤烟质量控制中的应用

曹建敏¹, 刘帅帅², 郭承芳¹, 邱 军¹, 王允白¹, 郭先锋¹, 宁 扬¹

(1 中国农业科学院烟草研究所, 农业部烟草类作物质量控制重点实验室, 山东 青岛 266101;

2 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要:为了研究烤烟致香物质 GC/MS 指纹图谱在烤烟质量控制中的应用,以南平烤烟为研究对象,将样品根据感官评吸质量档次结果划分为中等、中等+和较好3类,并分别构建了这3类质量档次的标准指纹图谱,计算每一类别样品指纹图谱与标准指纹图谱的相似度.结果表明,相似度值都较大,表明相似性较好.根据指纹图谱相似度确定了每个类别质量档次相似度的阈值,其阈值分别为0.731 2、0.703 6和0.676 7.利用主成分分析的主成分投影图对3个质量档次烤烟样品进行了模式识别,模式识别结果的空间分布较好,区域较明显,表明该质量控制体系有较好的可用性和分辨率.最后利用未知样品对该质量控制体系进行验证,验证结果表明,该体系的准确性较高,误判率较低,适合应用于烤烟质量控制.

关键词:GC/MS; 烤烟; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号:S572; O658

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2013)01-0001-05

Application of GC/MS Fingerprint in the Quality Control of the Flue-Cured Tobacco

CAO Jianmin¹, LIU Shuaishuai², GUO Chengfang¹, QIU Jun¹, WANG Yunbai¹,
GUO Xianfeng¹, NING Yang¹

(1 Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture, Tobacco Research
Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China;

2 Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to study the application of aroma substances GC/MS fingerprint in the quality control of flue-cured tobacco, the Nanping flue-cured tobaccos were grouped into 3 grades—medium, medium+ and better—according to the sensory evaluation, and the corresponding standard fingerprints of the three grades flue-cured tobacco were established. The fingerprint similarity of each sample with standard fingerprint was calculated. The high values indicated the high similarity, threshold of the three grades were defined according to the similarity of the fingerprint, which were 0.731 2, 0.703 6 and 0.676 7 respectively. Pattern recognition of the three grades flue-cured tobacco was carried out by projection drawing of principal constituent analysis. Pattern recognition results showed the good spatial distribution in the chart, obvious section, which indicated the feasibility and resolution of the quality control system. The unknown samples were used to test the effectiveness of the quality control system. The result indicated that the system had high accuracy, low error rate, and adaptability to the quality control of flue-cured tobacco.

收稿日期:2012-04-09 网络出版时间:2013-01-11

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130111.0926.006.html>

作者简介:曹建敏(1978—),女,助理研究员,硕士;通信作者:王允白(1964—),男,研究员,硕士,E-mail:ycswyb@163.com

基金项目:中国农业科学院科技经费项目(201118)

Key words: GC/MS; flue-cured tobacco; fingerprint; quality control

色谱指纹图谱技术在产品质量控制方面具有重要的意义,随着色谱技术的不断成熟和指纹图谱技术的发展,色谱指纹图谱技术的应用领域也越来越广泛,特别是在中药^[1-4]和白酒^[5-6]质量控制与真假产品鉴定中起到重要的作用。在烟草研究领域,色谱指纹图谱技术处于起步阶段,但发展较快,目前在烟用香精香料质量控制中^[7-9]研究较多,方法也较为成熟,在卷烟生产中,色谱指纹图谱主要用于产品质量稳定性控制和真假卷烟的鉴别^[10-11]。而在卷烟原料烟叶方面的研究较少,目前对原料烟叶的质量判断主要是利用感官评吸的方法进行,由于评吸结果易受评吸者主观因素的影响,从而导致判断结果误差较大,结果不够准确。由于指纹图谱技术在产品质量控制方面具有独特的优势,因此研究烤烟烟叶的色谱指纹图谱技术具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用烤烟样品均来自南平烟区,随机选取80个样品;癸醇内标来自美国Sigma公司,体积分数 $\geq 99.0\%$;二氯甲烷为色谱纯,氯化钠、无水硫酸钠为分析纯。

气质联用仪:Agilent7890A-5975C(美国安捷伦公司);同时蒸馏萃取装置(SDE);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);BS214S分析天平(德国Sartorius公司);水浴锅;电热套。

1.2 方法

1.2.1 致香物质提取方法 称取样品25 g(精确至0.01 g)于1 000 mL圆底烧瓶中,随后加入20 g NaCl和400 mL去离子水,摇匀后接到SDE装置的一端,另一端接一装有40 mL二氯甲烷的平底小烧瓶,然后将小平底烧瓶端置于60℃水浴中加热,大圆底烧瓶端放到电热套中加热,同时蒸馏萃取3 h后,将萃取液用无水硫酸钠干燥,然后加入1 mL癸醇内标,在旋转蒸发仪40℃水浴中旋转浓缩至1 mL,过0.45 μm 滤膜于进样瓶中进行GC/MS分析。

1.2.2 GC/MS条件 色谱柱:HP-5MS(Agilent 19091S-433, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm);进样口温度:260℃;进样量:1 μL ,分流比20:1;接口温度:280℃;升温程序:60℃,2 min;以2℃/min升至260℃,10 min;再以5℃/min升至280℃,10 min。载气:氮气;尾吹:氮气。流速:1.2 mL/min;离子源温度:230℃;四级杆温度:150℃;扫描范围:30~550

aum;谱库:NIST08;Agilent化学工作站。

1.2.3 相似度计算 相似度计算方法主要包括相关系数、夹角余弦、欧式距离和程度相似度^[12-15]等,其中前3个计算方法在运算过程中的灵敏度不高^[16-18],因此,本试验选用程度相似度法计算样品指纹图谱与标准指纹图谱的相似度。相似度(Qu)计算参照刘永锁等^[19]的方法。

$$Qu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\min(x_i, y_i)}{\max(x_i, y_i)},$$

式中, x_i, y_i 为色谱图A和B中相同色谱峰的峰面积, n 为色谱峰的数目。

1.2.4 感官评吸 由中国农业科学院烟草研究所评吸委员会组织7名具有省级以上感官评吸资格证书的专家依据GB 5606.4—2005卷烟第4部分^[20]进行评吸。

1.2.5 数据处理 数据的统计分析主要运用DPS v7.05和SPSS18.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同质量档次烤烟标准指纹图谱的建立

以南平烤烟为例,对烤烟烟叶色谱指纹图谱在质量控制中的应用进行探讨,将选取的80个南平烤烟样品经过评吸后进行统计分析,通过评吸对南平烤烟样品的感官指标(香气质、香气量、余味、杂气、刺激性、燃烧性、灰分、总得分)进行打分。烤烟质量档次是对烤烟感官质量的综合性评价,质量档次从整体上反应了烤烟质量的优劣。如表1所示,将南平烤烟质量档次划分为较好、中等+和中等3个档次。可以看出,质量档次为较好的总得分范围为75.00~75.88,平均值为75.35;质量档次为中等+的总得分范围为72.50~74.88,平均值为73.71;质量档次为中等的总得分范围为69.20~72.42,平均值为71.26。

根据评吸结果的质量档次将80个样品划分为中等、中等+和较好3个类别,其中,中等质量档次有20个样品,中等+质量档次有41个样品,较好质量档次有19个样品(表2)。

2.2 不同质量档次烤烟指纹图谱相似度评价

按照致香物质的提取方法进行处理,通过GC/MS进行致香物质的检测,对特征指纹峰进行保留时间和质谱图匹配后,以癸醇内标峰为参照峰求出样品中所有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,对3个类别烤烟样品的相对峰面积进行方差分析。根据方差分析结果确定了差异性显著的66个特征峰,利

用中位数法,分别得到 3 个类别质量档次的烤烟标准指纹图谱.将所选取的烤烟样品的指纹图谱看作是以 66 个特征峰为维数,以相对峰面积为物质含量的空间 66 维向量.分别计算南平 3 个质量档次烤烟样品与所属类别以及和其他 2 个类别烤烟标准指纹图谱的相似度,结果如表 2 所示.从表 2 中可以看

出,相同类别样品之间的相似度尽管存在着某些差异,但其主流是稳定可靠的,而且每个样品与所属类别标准指纹图谱的相似度都较高,整体上都体现出每个类别样品都具有相对较高的稳定性.这说明色谱指纹图谱是一种可靠、可用、准确的质量控制方法,也是一种有效的化学鉴别方法.

表 1 南平烤烟不同质量档次感官评吸结果

Tab. 1 The sensory evaluation results of different quality grade flue-cured tobacco

项目	较好			中等 +			中等		
	平均值	最小值	最大值	平均值	最小值	最大值	平均值	最小值	最大值
香气质	11.45	11.30	11.88	11.06	10.67	11.63	10.52	10.00	10.88
香气量	15.89	15.60	16.25	15.84	15.30	16.20	15.71	15.40	15.88
余味	19.71	19.13	20.25	19.06	18.63	19.50	18.37	17.80	19.00
杂气	13.45	13.17	13.75	13.08	12.75	13.63	12.43	11.90	13.00
刺激性	8.95	8.75	9.13	8.74	8.25	9.08	8.31	8.00	8.50
燃烧性	3.07	2.88	3.20	3.07	2.88	3.20	3.05	2.88	3.17
灰分	2.83	2.38	2.92	2.86	2.50	3.00	2.86	2.63	3.00
总得分	75.35	75.00	75.88	73.71	72.50	74.88	71.26	69.20	72.42

表 2 不同质量档次烤烟样品指纹图谱与标准指纹图谱的相似度¹⁾

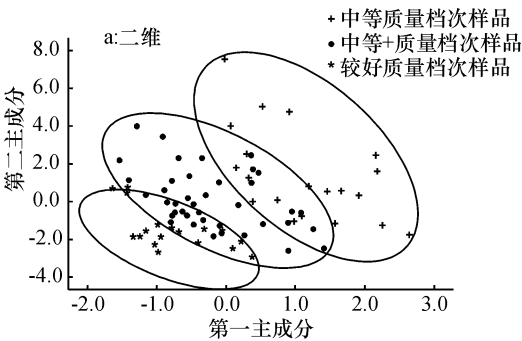
Tab. 2 The similarity degree between fingerprint of different quality grade flue-cured tobacco and standard fingerprint

标准 图谱	样品 编号	不同档次样品			标准 图谱	样品 编号	不同档次样品			标准 图谱	样品 编号	不同档次样品			
		较好	中等	中等 +			较好	中等	中等 +			较好	中等	中等 +	
中等	1	0.734 7	0.726 2	0.659 1	中等 +	8	0.848 1	0.781 0	0.616 1	中等 +	36	0.607 7	0.765 2	0.821 4	
	2	0.746 4	0.702 7	0.601 1		9	0.730 1	0.725 2	0.661 9		37	0.821 3	0.796 8	0.587 0	
	3	0.789 5	0.728 7	0.608 6		10	0.642 5	0.775 9	0.714 4		38	0.612 9	0.802 6	0.757 1	
	4	0.735 7	0.689 6	0.595 6		11	0.644 0	0.703 6	0.734 1		39	0.723 5	0.741 3	0.637 9	
	5	0.758 4	0.633 4	0.517 5		12	0.793 8	0.773 7	0.632 4		40	0.641 1	0.757 5	0.768 4	
	6	0.731 2	0.682 7	0.611 5		13	0.693 0	0.726 3	0.746 2		41	0.661 1	0.782 0	0.643 3	
	7	0.732 4	0.662 8	0.591 6		14	0.652 4	0.804 7	0.776 8		阈值		0.703 6		
	8	0.796 0	0.620 4	0.545 3		15	0.699 7	0.711 4	0.634 0		较好	1	0.566 1	0.710 0	0.719 5
	9	0.799 9	0.552 5	0.447 2		16	0.659 1	0.761 4	0.710 1		2	0.424 8	0.564 8	0.733 3	
	10	0.732 7	0.620 9	0.504 8		17	0.618 1	0.708 2	0.733 6		3	0.468 3	0.632 8	0.744 9	
	11	0.734 1	0.543 8	0.443 8		18	0.660 6	0.761 4	0.754 8		4	0.418 4	0.559 1	0.676 7	
	12	0.804 4	0.665 1	0.558 0		19	0.799 5	0.814 5	0.635 4		5	0.432 5	0.590 6	0.697 9	
	13	0.826 4	0.644 9	0.524 6		20	0.696 1	0.785 5	0.724 4		6	0.550 8	0.719 9	0.719 0	
	14	0.752 6	0.537 3	0.439 3		21	0.609 1	0.748 3	0.802 5		7	0.660 3	0.801 2	0.755 2	
	15	0.739 9	0.661 8	0.541 8		22	0.582 7	0.742 0	0.758 5		8	0.407 3	0.562 4	0.706 0	
	16	0.855 4	0.712 9	0.626 0		23	0.617 4	0.799 8	0.775 5		9	0.499 1	0.695 1	0.784 5	
	17	0.809 1	0.583 9	0.506 3		24	0.631 3	0.737 1	0.652 2		10	0.571 4	0.753 3	0.720 6	
	18	0.837 6	0.617 5	0.536 0		25	0.766 1	0.774 5	0.645 5		11	0.649 1	0.777 2	0.818 2	
	19	0.799 7	0.641 2	0.531 5		26	0.638 3	0.724 9	0.711 0		12	0.527 1	0.707 8	0.777 6	
	20	0.842 1	0.726 2	0.659 1		27	0.790 7	0.751 1	0.561 1		13	0.698 4	0.758 5	0.700 1	
中等 +	阈值	0.731 2				28	0.679 0	0.753 6	0.624 8		14	0.609 5	0.759 7	0.682 7	
	1	0.635 3	0.732 0	0.747 0	中等 +	29	0.724 7	0.745 3	0.616 2		15	0.684 1	0.756 0	0.803 2	
	2	0.653 3	0.717 3	0.701 8		30	0.718 8	0.729 0	0.708 2		16	0.527 3	0.663 7	0.795 5	
	3	0.734 1	0.737 6	0.649 9		31	0.679 3	0.742 4	0.788 2		17	0.722 8	0.798 3	0.805 0	
	4	0.581 2	0.739 7	0.766 0		32	0.610 5	0.721 7	0.721 1		18	0.657 9	0.760 3	0.681 2	
	5	0.768 3	0.711 8	0.686 0		33	0.612 3	0.781 3	0.841 8		19	0.661 0	0.695 7	0.732 1	
	6	0.823 3	0.704 0	0.574 6		34	0.774 2	0.755 9	0.620 2		阈值			0.676 7	
	7	0.786 1	0.739 3	0.639 1		35	0.694 1	0.744 2	0.736 9						

1) 表中数据表示不同质量档次烤烟样品与相应档次标准指纹图谱的类内和类间相似度.

将每个类别中所有样品与该类别标准指纹图谱类内相似度的最小值定义为阈值,由此可知,质量档次为中等的烤烟标准指纹图谱的阈值为 0.731 2,中等+烤烟标准指纹图谱的阈值为 0.703 6,较好烤烟标准指纹图谱的阈值为 0.676 7. 在鉴别未知样品质量档次时,分别计算未知样品与 3 个类别标准指纹图谱的相似度,再将每个相似度值跟与之相对应的质量档次阈值进行比较,如果相似度值大于阈值,那么就认为该未知样品属于这个质量档次,反之,就不属于该类别.

由表 2 中可以看出,同一个样品与 2 个类别的标准指纹图谱的相似度可能都大于该类别的阈值,造成这种结果的原因是由于样品介于 2 个类别之间,并不是误判,也是由于烤烟样品在质量的空间分布上具有连续性,而不同类别烤烟之间的界限又存在模糊性特点所造成的.



为了能够直观地反映不同类别质量档次烤烟向量的空间分布和相似度计算结果的意义,通过主成分投影图进行模式识别. 由主成分分析的结果表明,前 3 组主成分的累计贡献率为 74.32%,能反映系统大部分的信息量,因此可以作二维投影图和三维投影图(图 1). 由于感官质量评价对于中等与中等+、中等+与较好这 2 类质量档次之间的判别较为模糊,没有清晰的界限,从而导致质量档次为中等和中等+、中等+与较好之间存在交叉现象,即样品分属于 2 个类别. 从图 1 中也可以看出,质量档次为中等与较好样品之间界限比较清晰,而某些中等+样品与中等、较好样品之间存在交叉现象. 虽然个别样品在不同质量档次间存在交叉的现象,但是整体而言,样品档次划分界限较为清晰,对于烤烟样品质量控制存在一定的应用价值.

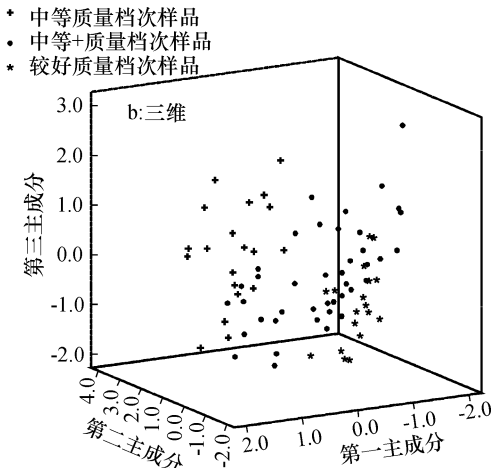


图 1 不同质量档次烤烟的主成分投影图

Fig.1 The principal component projection map of different quality grade flue-cured tobacco

2.3 不同质量档次烤烟指纹图谱验证

为了对 3 个质量档次标准指纹图谱在烟草质量控制中的可用性和准确性进行验证,选取南平 10 个未知烤烟样品,分别计算这 10 个未知样品指纹图谱与 3 个类别标准指纹图谱的相似度,结果如表 3 所示. 再结合 3 个类别质量档次的阈值,可以得出,样品 1、样品 2、样品 3、样品 7 为中等质量档次,样品 3、

样品 4、样品 5、样品 6、样品 7 为中等+质量档次,样品 5、样品 8、样品 9、样品 10 为较好质量档次. 再对这 10 个未知样品进行感官评吸,通过打分得到样品 1、样品 2、样品 3 质量档次为中等,样品 4、样品 5、样品 6、样品 7 的质量档次为中等+,样品 8、样品 9、样品 10 的质量档次为较好. 从分析可知,验证的整体准确率较高,仅有样品 3、样品 5 和样品 7 分属于 2 个

表 3 不同质量档次烤烟指纹图谱验证

Tab.3 Verification of fingerprint in different quality grade flue-cured tobacco

质量档次	阈值	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
中等	0.731 2	0.861 0	0.733 4	0.794 2	0.612 3	0.694 1	0.607 7	0.821 3	0.418 4	0.432 5	0.550 8
中等+	0.703 6	0.690 7	0.689 6	0.730 0	0.768 2	0.808 1	0.756 6	0.710 9	0.527 4	0.555 9	0.584 6
较好	0.676 7	0.608 6	0.595 6	0.650 2	0.658 5	0.736 9	0.621 4	0.587 0	0.841 8	0.697 2	0.800 6

类别,表明这3个样品位于2个相邻类别的相交处,该结果的出现仍然是由于烤烟样品在质量空间的分布上具有连续性,感官评吸对于中等与中等+、中等+与较好这2类质量档次之间的判别具有模糊性,没有清晰的界限,从而导致质量档次为中等和中等+、中等+与较好之间存在交叉现象。

3 结论

色谱指纹图谱技术在产品质量控制中发挥着重要的作用,本试验建立了3个质量档次烤烟的标准指纹图谱,并利用主成分投影图对3个类别质量档次进行了模式识别。随后利用未知样品对3个类别质量档次进行验证。验证结果表明,该技术对质量档次为中等和较好样品的判断较准确,在对中等+的样品判断时,存在样品分属于2个类别的情况,这也跟实际情况相符,因为中等+样品位于中等和较好样品之间,感官评吸对其质量档次的判别本身就具有一定的模糊性,所以该判断结果也是合理的,因此该色谱指纹图谱相似度评价体系在烤烟质量判断和特色评价中具有重要的意义。由于所选样品的质量档次都在中等以上,所以该文未对质量档次较差的样品进行分析,这是本文工作的一个缺憾,在以后的工作中,需要进一步验证该评价体系对质量档次较差样品评价的准确性。此外,还可借助质谱能够对色谱峰进行定性的功能,深入挖掘影响烤烟质量的特征化学成分,指导烤烟的质量评价工作。

参考文献:

- [1] 易伦朝,吴海,梁逸曾. 色谱指纹图谱与中药质量控制[J]. 色谱,2008,26(2):166-171.
- [2] 周建良,齐炼文,李萍. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 色谱,2008,26(2):153-159.
- [3] 靳然,赵百孝. 气相色谱指纹图谱在中药分析及质量评价中的应用[J]. 现代科学仪器,2010(1):122-123.
- [4] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理,2001,12(3):141-151.
- [5] 徐抗震,宋纪蓉,任莹辉,等. 色谱指纹图谱在苹果酒质量评价中的应用[J]. 色谱,2007,25(1):93-95.
- [6] 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等. GC-MS 法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J]. 中国酿造,2008(9):74-76.
- [7] 陈爱明,梁逸曾,张良晓,等. 烟用香精香料指纹图谱质量控制系统的构建[J]. 计算机与应用化学,2009,26(3):373-378.
- [8] 王平,朱晓兰,苏庆德. 色谱指纹图谱分析在香精香料质量控制中的应用[J]. 化工新型材料,2010,38(4):114-116.
- [9] 王钧,赵曰利. 色谱指纹图谱对香精香料质量控制的研究[J]. 中国测试技术,2005,31(3):45-46.
- [10] 廖堃,胡纲. 气相色谱-质谱指纹图谱在甄别真假卷烟上的应用[J]. 分析测试学报,2006,25(1):22-26.
- [11] 李军,朱苏闽,林平. 固相微萃取-气相色谱-质谱指纹图谱鉴别仿冒品牌卷烟[J]. 烟草科技,2002(12):26-28.
- [12] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282-287.
- [13] 谷瑞敏,涂洪谊,孙鹤. 中药色谱指纹图谱相似度计算方法探讨[J]. 中成药,2009,31(7):988-990.
- [14] 蔡利,李秋潼,黎洪利,等. 烟用香精香料指纹图谱相似度评价方法的选择[J]. 安徽农业科学,2010,38(23):12925-12926.
- [15] 詹雪艳,史新元,展晓日,等. 基于相似系统理论的相似度计算方法的改进[J]. 分析化学,2010,38(2):253-257.
- [16] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282-287.
- [17] KENDRICK B S, DONG A, ALLISON S D, et al. Quantitation of the area of overlap between second-derivative amide I infrared spectra to determine the structural similarity of a protein in different states[J]. J Pharm Sci, 1996,85(2):155-158.
- [18] WILLIAMS C A, BALE P. Bias and limits of agreement between hydrodensitometry, bioelectrical impedance and skinfold calipers measures of percentage body fat[J]. Eur J Appl Physiol, 1998,77(3):271-277.
- [19] 刘永锁,曹敏,王义明,等. 相似系统理论定量评价中药材色谱指纹图谱的相似度[J]. 分析化学,2006,34(3):333-337.
- [20] 刘钟祥,GB5606.4—2005 卷烟:第四部分:感官技术要求[S]. 北京:中国标准出版社,2005.

【责任编辑 周志红】