

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.05.020

刘洪斌, 段晓亮, 李颖, 等. 大米中 2-乙酰基-1-吡咯啉检测技术及形成机制研究进展[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(5): 227-233.

LIU H B, DUAN X L, LI Y, et al. Detection technologies and formation mechanisms of 2-acetyl-1-pyrroline in rice: a review[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(5): 227-233.

大米中 2-乙酰基-1-吡咯啉检测技术及形成机制研究进展

刘洪斌¹, 段晓亮², 李颖¹, 赵璐瑶²✉

(1. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100020;

2. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮食品质与营养研究所, 北京 100037)

摘要: 2-乙酰基-1-吡咯啉是大米中的特征香气成分, 其含量高低直接影响大米品质和价格。因此, 开展大米中 2-乙酰基-1-吡咯啉精准检测方法研究, 对于明确呈香机理、提升大米品质及促进进出口贸易都具有重要意义。综述了当前主要的前处理技术和基于 GC、GC-MS、GC-O-MS、GC-TOF-MS、GC×GC-TOF-MS、HPLC-MS/MS 等仪器检测 2-乙酰基-1-吡咯啉的研究进展, 分析了各种方法的优缺点, 以及 2-乙酰基-1-吡咯啉形成机制的研究进展, 以期实现大米中 2-乙酰基-1-吡咯啉的精准检测及大米品质提升提供借鉴。

关键词: 大米; 2-乙酰基-1-吡咯啉; 检测技术; 机理; 研究进展

中图分类号: TS210.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2022)05-0227-07

Detection Technologies and Formation Mechanisms of 2-acetyl-1-pyrroline in Rice: A Review

LIU Hong-bin¹, DUAN Xiao-liang², LI Ying¹, ZHAO Lu-yao²✉

(1. China Animal Disease Control Center, Beijing 100020, China; 2. Institute of Food Quality and Nutrition, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing, 100037, China)

Abstract: 2-acetyl-1-pyrroline, a characteristic aroma component in rice, directly affects the quality and price of rice. Therefore, the research on the accurate detection method of 2-acetyl-1-pyrroline is of great significance to clarify the aroma mechanism, improve the quality and promote import and export trade for rice. This paper reviews current major pretreatment methods, detection technologies by GC, GC-MS, GC-O-MS, GC-TOF-MS, and HPLC-MS/MS, the advantages and disadvantages of various methods and the research progress of the formation mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline, aiming to provide reference for the accurate detection of 2-acetyl-1-pyrroline and the improvement of rice quality.

Key words: rice; 2-acetyl-1-pyrroline; detection methods; mechanism; research progress

收稿日期: 2022-04-12

基金项目: 粮食品质资源数据库研究与应用课题 (JY2103-1); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项课题 (ZX2212)

Supported by: Special Fund of Chinese Central Government for Basic Scientific Research Operations in Commonweal Research Institutes (No. JY2103-1); Fundamental Research Funds of non-profit Central Institutes (No. ZX2212)

作者简介: 刘洪斌, 男, 1986 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为食品检测技术。E-mail: liuhongbin111@163.com.

通讯作者: 赵璐瑶, 女, 1991 年出生, 博士, 助理研究员, 研究方向为粮油品质机理。E-mail: zly@ags.ac.cn.

大米作为我国居民的主食之一，其品质一直备受消费者和科研人员的关注。研究表明，大米的香味由多种挥发物组成，包括烃类、芳烃类、醛类、酮类、酯类、酸类、醇类、烯及烯醇类、杂环化合物等^[1]。在所有挥发物中，2-乙酰基-1-吡咯啉（2-acetyl-1-pyrroline, 2-AP）是目前研究最多的大米特征性香气成分^[2]，其含量的高低直接影响大米的品质与价格。

2-AP是一种沸点较低的小分子杂环化合物，其相对分子质量为111.14，具有烤面包味、坚果味及爆米花味^[3]，在空气中的气味阈值很低（0.02~0.04 ng/L），因此在大米蒸煮过程中很容易被闻到^[4]。但是，2-AP在大米中的含量通常低至 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，在用现代分析方法检测过程中，仪器灵敏度低、基质干扰、色谱分离共流出等问题会导致2-AP检测不出^[5]，或存在检测结果不稳定、回收率低等问题。因此，如何建立适当的检测方法，以实现2-AP的精确测定非常重要。

到目前为止，2-AP的检测方法主要有气相色谱法（Gas Chromatography, GC）、气相色谱-质谱法（Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS）、气相色谱-串联质谱法（Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, GC-MS/MS）、气相色谱-飞行时间质谱法（Gas Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry, GC-TOF-MS）、全二维气相色谱-飞行时间质谱法（Two Dimensional Gas Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry, GC \times GC-TOF-MS）、气相质谱-嗅闻-质谱法（Gas Chromatography-Olfactometry-Mass Spectrometry, GC-O-MS）及高效液相色谱-串联质谱法（High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS）等。本文综述了2-AP各种前处理方法、检测方法的优缺点，以及2-AP形成机制的研究进展，并展望了未来的发展方向。

1 样品前处理方法

1.1 水蒸馏法

水蒸馏法是提取植物样品中挥发成分最常见的方法之一。在蒸馏过程中，可通过减少装置内的压力而降低沸点，从而在较低的温度下即可收

集到待测组分，避免待测组分的分解。Sugunya等^[6]采用水蒸馏法、氮磷检测器（Nitrogen Phosphorus Detector, NPD）和高选择性的色谱柱CP-Wax 51测定了考道马里105糙米中包含2-AP在内的140种挥发化合物，样品用量为0.5 g，内标为2,4,6-trimethylpyridine（TMP），并对2-AP等挥发物进行了相对定量分析，但未对方法的检测限和定量限等参数进行评估。在蒸馏过程中，随水蒸气蒸发的2-AP需要经过冷凝管冷凝后收集，因此耗时较长。

1.2 同时蒸馏萃取法

同时蒸馏萃取法（simultaneous distillation-extraction, SDE）将水蒸气蒸馏和溶剂萃取的过程合二为一，Buttery等^[7]将水和乙醚作为萃取溶剂，在高温（100 $^{\circ}\text{C}$ ）下进行2-AP的萃取，样品用量为0.5 g，GC-MS结果显示10种香米中2-AP的含量为0.006~0.09 mg/kg。SDE法提取温度较高，可能会造成2-AP的损失。SDE法相比蒸馏法，在减少冷凝时间的同时，也降低了2-AP在转移过程中的损失。

1.3 溶剂萃取法

溶剂萃取法是利用大米样品中包含2-AP的各组分在溶剂中的溶解性质差异而达到分离的效果。Hien等^[8]直接用400 mL纯乙醇为萃取溶剂，将100 mg大米粉末在70 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取2 h后高速离心，上清液直接进行GC-MS检测，结果不同品种大米中2-AP的含量为0~430.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。溶剂萃取法操作温度低，相比蒸馏法和同时蒸馏萃取法，减少了2-AP在萃取过程中的降解，操作方便。但有时受基质影响严重，可能造成结果失真。

1.4 固相微萃取法

固相微萃取法（Solid Phase Micro Extraction, SPME）是基于涂有固定相的熔融石英纤维来吸附、富集样品中待测物质的一种前处理方法。SPME法集采样、萃取、浓缩于一体，前处理速度快，是目前食品中挥发性成分分析主要的前处理方法之一。SPME法的萃取效果除受样品基质影响外，还可能受纤维涂层类型、萃取温度、萃取时间等多因素的影响。Hopfer等^[9]测试了不同

SPME 纤维从大米中提取和解吸 2-AP 的能力,结果显示两种混合纤维(二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷和二乙烯基苯/聚二甲基硅氧烷对 2-AP 的提取率最高,GC-MS/MS 的检测限和定量限可达到 pg 级,分别为 3 pg/g 和 39 pg/g。因此,将 SPME 技术和 GC-MS/MS 联用,可大大提高分析 2-AP 的灵敏度。目前,传统水蒸馏法、溶剂萃取法等前处理方法正逐渐被自动化固相微萃取技术取代,随着新型性能更加稳定的 SPME 的研制,SPME 顶空进样结合 GC-MS/MS 技术将越来越多地应用于大米 2-AP 的分析中。

2 检测方法

以 GC 为基础的检测方法常用于分析小分子低沸点的弱极性化合物,因此非常适合分析 2-AP,因此 2-AP 的检测方法大多以 GC 为基础,通过结合不同的检测器,来达到对 2-AP 的定性和定量分析。

2.1 GC-FID/NPD

在 GC 分析 2-AP 的过程中,以 2-AP 在色谱柱上的保留时间进行定性,即通过对比样品中 2-AP 的保留时间和标准品的保留时间,来确认样品中是否含有 2-AP。常用的检测器有火焰离子化检测器(Flame Ionization Detector, FID)及氮磷检测器(Nitrogen Phosphorus Detector, NPD)。有研究表明,在采用大口径熔融石英毛细管柱和顶空进样检测香米中的 2-AP 时,NPD 比 FID 的灵敏度更高,检测限分别为 5 ng/g 和 20 ng/g^[10]。

GC 法本身灵敏度低,且 GC 分离时,样品基质中与 2-AP 性质相似的物质可能会与 2-AP 共流出,会对测定结果的准确性造成很大影响。因此,选择合适的检测器及更适合分离 2-AP 的色谱柱,对于 2-AP 的定量分析非常关键。

2.2 GC-MS

在检测 2-AP 时,相比 FID 及 NPD 等检测器,质谱检测器的灵敏度更高、定性能力更强,因此 GC-MS 更适于大米中 2-AP 的测定。顶空进样-固相微萃取技术(Headspace-Solid Phase Micro Extraction, HS-SPME)集采集、萃取、浓缩和进样于一体,是目前国际上比较流行的检测微量挥

发性有机物的方法^[11]。在 GC-MS 对 2-AP 进行测定时,常采用选择性离子检测(Selected ion Monitor, SIM)法,即采集用于 2-AP 定量分析离子(m/z 111、83、68),通过内标物的标准曲线进行定量。

Lee 等^[12]采用 HS-SPME 结合 GC-MS 法,研究了预包装大米饭中 2-AP 的检测方法,结果显示,在 20 mL 顶空瓶中将 1 000 ng 的 2-AP 同位素内标加入 4 g 预包装米饭中,可以获得较好的回收率(78.25%~99.91%)和线性范围(9.91~126.67 ng/g, $R^2=0.9998$),对于定量测定米饭中的 2-AP 有较好的准确度(RSD=2.7%)。

GC-MS 是目前 2-AP 检测领域使用最多、应用范围最广的技术,虽然灵敏度比 GC 更高,但是由于大米本身基质比较复杂,也会遇到检测结果不稳定,重现性差等问题,因此并不适用于 2-AP 的精确测定。

2.3 GC-MS/MS

相比 GC-MS,GC-MS/MS 的检测灵敏度更高,更加适合对微量及痕量水平挥发物的分析。在采用 GC-MS/MS 分析时,除了标准品和保留时间,基于全扫描条件下 2-AP 的碎片离子丰度特征以及 NIST 标准谱库中 2-AP 的碎片离子都可以对 2-AP 进行定性^[13]。而对于大米中 2-AP 的定量,使用最多的还是内标法,常用的非同位素内标主要有 2,6-二甲基吡啶(2,6-DMP)、2,4,6-三甲基吡啶(TMP)及 2-乙酰基吡咯(2-Pyr)等。TMP 具有与 2-AP 相似的物理化学性质,且结构稳定,保留时间与 2-AP 也比较接近,因此较其他内标的使用范围更广。但有研究表明,在质谱总离子流图中,TMP 峰会和大米中的其他组分发生重叠。因此,与 TMP 性质类似的 2,6-DMP,以及与 2-AP 性质更为接近的 2-Pyr 也会用作 2-AP 定量的内标。

相比非同位素内标,稳定同位素内标在对 2-AP 进行定量分析时优势更加明显,近年来已经取得了广泛应用。目前,2-AP 最常用的同位素内标为氘代 2-AP-(CD₃)和 ¹³C 标记的 2-AP-(¹³CH₃)。此外,Maraval 等^[14]以 2-AP-d2(吡咯环上的 5 号位 2 个 H 被 D 取代)为内标,结合 GC-MS/MS 实现了香米中 2-AP 的精确定量,线

性范围为 5.9~779 ng/g ($R^2=0.9989$), 检测限和定量限分别为 0.1 ng/g 和 0.4 ng/g。

当前, 美国对香米(如巴斯马蒂)的需求正在增加, 通常香米中 2-AP 的含量较高。在香米育种筛选实验中, 由于样品比较珍贵, 通常需要在单粒大米水平上对 2-AP 的含量进行精准检测。Helene 等^[9]将 HS-SPME 结合 GC-MS/MS 用于分析单粒大米样品中的 2-AP, SPME 萃取温度为 40 °C, 采用同位素内标 [$^2\text{H}_2\text{-}_6$]-2AP 进行定量, 结果显示 2-AP 的线性范围在 53~5 380 pg/g 之间, 检测限低于 2-AP 的阈值 (0.02~0.04 ng/L)。

因此, GC-MS/MS 的灵敏度和稳定性相比 GC-MS 更高, 且能够在单粒大米水平分析 2-AP 的含量, 对于样品珍贵的育种试验意义显著, 对于促进香米育种、建立痕量检测 2-AP 的标准也都有重要意义。但是, GC-MS/MS 需要温度较高的前处理过程, 如能优化前处理方法, 避免高温导致的 2-AP 降解, GC-MS/MS 将是目前 GC 相关方法中最有前景建立 2-AP 准确定量的技术。

2.4 GC-TOF-MS

研究人员除采用常规的 GC-FID/NPD 或 GC-MS 方法外, 还采用 GC-TOF-MS 对大米样品中的 2-AP 进行测定。Ali 等^[15]采用冷纤维 SPME 结合 GC-TOF-MS 测定了 9 个伊朗香米和 2 个印度香米中 2-AP 的含量, 结果显示, 与商用 SPME 相比, 实验室改性的冷纤维 SPME 也能够准确地识别出样品中的 2-AP 并进行富集检测。

GC-TOF-MS 是传统 GC-MS 的替代升级, 适合于复杂基质的全组分分析。通过配备代谢组学产物数据库、SIMICA 数据统计学软件等, 可开展挥发物组学研究, 因此更适于 2-AP 的相关机制分析, 如 2-AP 生成前体及产物的分析和鉴定等, 不适合单纯建立 2-AP 的定量方法。

2.5 GC×GC-TOF-MS

GC×GC-TOF-MS 在 GC-TOF-MS 的基础上, 利用强极性与非极性正交组合的二维色谱柱^[16], 采用程序升温对挥发物进行分离, 可以提高仪器分辨率与峰容量, 同时扫描全谱范围离子, 提高仪器的检测通量, 特别适合于进行植物相关调控机制分析。

近年来, 随着 2-AP 研究的不断深入, 研究人员也逐渐转向 2-AP 的形成机制研究, 从机理层面为香米的呈香机制提供支撑。6-甲基-5-氧代-2,3,4,5-四氢吡啶 (6M5OTP), 2-乙酰吡咯, 吡咯和 1-吡咯啉等化合物与 2-AP 的产生密切相关。Daygon 等^[17]采用 GC×GC-TOF-MS 从代谢组学角度进行香米的呈香机理研究, 结果显示 6-甲基-5-氧代-2,3,4,5-四羟基吡啶 (6M5OTP) 是和 2-AP 具有相似香味的同分异构体, 该结果也通过 GC-TOF-MS 检测 6M5OTP 的标准品得到了验证。全基因组关联分析表明, 所有化合物的产生与 FGR 基因存在关联性, 为 2-AP 的产生及香气累积途径提供了新的见解。

因此, 随着 GC-TOF-MS 和 GC×GC-TOF-MS 应用于 2-AP 机制研究的不断深入, 2-AP 的形成及反应过程将逐步明确, 对于提升大米品质具有重要意义。

2.6 GC-O-MS

GC-O-MS 是将仪器检测和嗅觉分析相结合进行挥发物分析的技术。在实验过程中, GC 将试样组分离, 研究人员通过嗅探口对闻到的气味进行描述并记录, 进而获得被测化合物的气味特征。

大米品种及生长区域的不同导致不同的大米具有不同的香气类型。Yang 等^[18]采用 GC-O-MS 分析了六种风味明显不同的大米样品(巴斯马蒂、茉莉、两个韩国梗稻品种、黑米和一种非香米)的香气组成。经过培训的评估人员对米饭样品中 36 种挥发物进行了描述, 结果显示 25 种挥发物具有中等或更高的强度 (气味强度 ≥ 3), 被认为是主要的气味活性化合物。随后通过 GC-O 测定了 25 种挥发物的气味阈值, 结果显示, 2-AP 的气味阈值最低 (0.02 ng/L), 其次是 11 种醛类 (0.09~3.1 ng/L)、愈创木酚 (1.5 ng/L) 和 1-辛烯-3-醇 (2.7 ng/L)。根据气味阈值和气味活性值 (Odor Activity Value, OAV), 评估了每种主要气味活性化合物的重要性, 显示 2-AP、己醛、(E)-2-壬醛、辛醛、庚醛和壬醛的 OAV 占每种大米香气 OAV 的相对比例在 97% 以上, 并且可以作为区分六种风味大米的标志物。相比 GC-MS 等分析仪器, GC-O 能够识别出和基质组分共流出的气

味组分,可以更加直观地描述气味特征,对于鉴别特殊大米中未知的香气活性成分具有重要意义。

基于GC的仪器方法对小分子低沸点的2-AP有较大的优势,但需要与高温蒸馏或高温萃取等样品前处理方法相结合。2-AP本身具有热不稳定性,在高温条件下可由糖与氨基酸发生美拉德反应而生成。因此,采用GC相关的分析方法可能会因前处理过程中2-AP的损失或继续生成而影响结果的准确性。

2.7 HPLC-MS/MS

与GC分离分析相比,高效液相色谱不需要温度较高的前处理过程,因此对待测物的沸点、热稳定性等要求较低,对2-AP的检测结果更准确。Jost等^[19]采用HPLC-MS/MS建立了大米和小麦面包中2-AP的分析方法。以pH 7.4的磷酸缓冲液为提取剂进行超声提取,以邻苯二胺为衍生试剂进行衍生,生成稳定性较好的2-乙酰基-1-吡咯啉啉(2-APQ)衍生物,通过加入2-APQ-d4同位素内标进行2-AP的定量。方法的检测限和定量限分别为0.26 μg/kg和0.79 μg/kg,检测的11个巴斯马蒂米样品中2-AP含量为41~356 μg/kg。该方法唯一的不足是衍生化反应需要在避光条件下反应24 h。有研究表明,2-AP在面包烘烤过程中可由鸟氨酸和磷酸三糖磷酸形成^[20],目前未见大米加工过程中形成2-AP的报导,而以上HPLC-MS/MS法中的样品提取只需要在室温条件下进行,2-AP不会因发生降解而损失,避免了由此引起的测定结果不准确的问题,因此非常适合对面包中2-AP的精确定量。

但是,从目前来看,GC相关技术由于前处理简单,且可同时分析大米中其他化合物包括2-AP等,仍然是分析2-AP的主流技术。而HPLC-MS/MS由于检测结果更加准确,对于食品加工过程中产生的2-AP的定量分析有重要意义。

3 2-AP形成机制

近年来,关于大米中2-AP的形成机制研究一直在进行中。然而,对于2-AP的形成时期问题,即2-AP是在高温蒸煮过程中,通过氨基酸和碳水化合物发生美拉德反应形成,还是在大米原料即

水稻生长过程中形成,一直存在争议。另外,关于2-AP形成的控制基因和生成前体研究也取得了一些进展。

3.1 形成时期

有研究表明,日本早抽穗品种“宫古里”在籽粒发育过程中,2-AP的含量在抽穗后4或5周达到峰值,然后在7或8周迅速下降至最大值的20%;对于晚抽穗品种“Hierl”中,2-AP浓度在抽穗后4周时达到峰值,然后在8周时逐渐降低到最大值的40%^[21]。因此,大米中的2-AP可在水稻生长阶段形成。Yoshihashi^[22]等研究表明,香米考马道里105样品中的2-AP在烹饪中不会形成。此外,2-AP的含量会随着大米储存时间的延长而减少,在储存8个月后,2-AP的含量降至初始含量的7%^[23],该研究表明,2-AP不会在大米储藏过程中形成。因此,2-AP应在水稻生长过程中形成,且在烹饪和储藏过程中不会形成。

另外,研究表明非香米中也含有2-AP,只是含量较香米低^[24]。同时,不同的大米品种具有不同的感官特性,表明除2-AP之外的挥发物也在贡献米饭的香味^[25]。因此,2-AP不应该是区分香米和非香米的唯一标准。我国水稻品种众多,研究我国大米样品中2-AP的含量和形成规律对于提升我国大米品质具有重要意义。

3.2 控制基因

大米香气的形成一般由多个基因控制,近年来学者们一直致力于大米香气控制基因的挖掘,为高品质水稻育种提供依据。Lorieux等^[26]研究了控制大米香气形成的基因,包括一个主基因和两个QTL标记。结果显示,8号染色体上的几个片段与2-AP形成的主基因即甜菜碱醛脱氢酶(Betaine Aldehyde Dehydrogenase, BADH2)密切相关。

随后,各国研究人员就BADH2基因展开研究,其中,Bradbury等^[27]认为非芳香水稻品种含有BADH2基因,可产生功能性BADH2酶,而芳香水稻品种含有突变BADH2基因,因此产生非功能性酶,进而产生更多的2-AP。Mathure等^[24]研究表明,2-AP的合成与BADH2基因相关,非巴斯马蒂香米的2-AP含量要高于巴斯马蒂香米;

在巴斯马蒂香米中, 2-AP 的含量与 1-十四烯和吡嗪呈正相关。潘阳阳等^[28]研究了 2-AP 代谢通路在水稻籽粒发育过程中的变化, 以美香占 2 号香稻和黄华占非香稻为对象, 结果表明, BADH2 基因的表达水平在两种水稻生长周期内发生了变化, 只有美香占 2 号水稻具有合成 2-AP 的物质基础, 多胺降解途径和谷氨酸-脯氨酸转化通路同时有助于 2-AP 的积累。

尽管如此, BADH2 基因并不是控制大米中 2-AP 形成的唯一基因, 且不同品种的控制基因可能存在差异, 关于 2-AP 形成的控制基因研究仍在进行中。

3.3 形成前体

在研究 2-AP 控制基因的基础上, 研究人员继续对 2-AP 形成的前体进行了探索, 主要基于水稻的愈伤组织和同位素示踪实验来进行。Yoshihashi 等^[29]采用同位素示踪法进行 2-AP 的前体研究, ¹⁵N 脯氨酸、¹⁵N 甘氨酸和脯氨酸-1-¹³C 的示踪实验结果表明 2-乙酰-1-吡咯啉的氮源是脯氨酸, 而 2-AP 的碳源不是脯氨酸, 且 2-AP 是在水稻生长阶段形成。此外, Huang 等^[30]研究了泰农 71 和泰农 72 两种香稻中 2-AP 生物合成的机制, 通过愈伤组织研究发现, 这两个品种中 δ 1-吡咯啉-5-羧酸合成酶, 包括 δ 1-焦-5-羧酸合成酶 (P5CS) 和鸟氨酸氨基转移酶 (OAT) 的活性显著增加, 且 P5CS1 和 P5CS2 基因的表达水平显著高于普通水稻, 用 ¹⁵N 标记的谷氨酸进行示踪实验的结果表明, 2-乙酰-1-吡咯啉的氮源来自谷氨酸。以上研究就 2-乙酰-1-吡咯啉的氮源来源不一致, 可能由于仅有有限的同位素标记物用于模拟实验, 关于氮源来源是谷氨酸还是脯氨酸、两者均有或还有更多其他来源, 结论还需要进一步验证。

此外, Poonlaphdecha 等^[31]采用水稻愈伤组织对 2-AP 的合成前体进行了研究, 通过在愈伤组织中添加[U-¹³C]葡萄糖、乙酸钠 (1,2-¹³C₂) 和辛酸钠 (1,2,3,4-¹³C₄), 结果表明这些化合物可能是 2-AP 乙酰基的供体, 且 1-吡咯啉是水稻合成 2-AP 的限制因素。

当前, 关于 2-AP 形成的前体研究主要是以愈伤组织开展模拟实验, 能不能反应稻谷生长阶段

2-AP 的实际合成情况还有待进一步探讨。同时, 在模拟实验中, 仅采用几种同位素标记化合物用于前体研究, 对于深入明确 2-AP 的前体具有很大的局限性, 未来有必要基于高分辨质谱进行前体的广泛筛选和验证。

4 结论和展望

开展大米中 2-AP 精准检测方法的研究, 对于明确呈香机理、提升大米品质、及促进进出口贸易都具有重要意义。本文综述了各种前处理技术的优缺点, SPME 技术正在成为 2-AP 提取的主流技术。GC、GC-MS、GC-O-MS 等技术由于配置比较低、受基质干扰比较大等问题, 在重现性和灵敏度方面还有待进一步提高, 对于 2-AP 的精准定量还有一定的局限性。GC-MS/MS 的灵敏度更高, 甚至可以实现单粒米水平 2-AP 的定量分析, 可使大米等复杂基质中 2-AP 的定量结果更加准确。而新型基于衍生化反应的 HPLC-MS/MS 分析方法的应用, 可有效解决采用 GC-MS 分析检测时 2-AP 在高温前处理过程中损失或新生成的问题, 应成为 2-AP 精准检测的首选方法。

由于 HPLC-MS/MS 技术并不是挥发物研究的主流方法, 在推广和实际应用中不如 GC-MS 普遍, 因此未来的研究方向仍要进一步围绕大米中 2-AP 的高效提取方法及精准定量仪器定量方法展开。2-AP 的形成时期和控制基因已明晰, 但形成前体和路径仍需进一步研究确定, 结合 GC-TOF-MS、GC×GC-TOF-MS 等技术将进一步促进 2-AP 的形成机制研究。

参考文献:

- [1] YUN D, ZHONG Y, YU W J, et al. Effect of hydrostatic high pressure pretreatment on flavor volatile profile of cooked rice[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 58(3): 479-487.
- [2] MA R R, TIAN Y Q, ZHANG H H, et al. Interactions between rice amylose and aroma compounds and their effect on rice fragrance release[J]. *Food Chemistry*, 2019, 289(8): 603-608.
- [3] BRYANT R J, MCCLUNG A M. Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(2): 501-513.
- [4] DIAS L G, HACKE A, BERGARA S F, et al. Identification of volatiles and odor-active compounds of aromatic rice by OSME analysis and SPME/GC-MS[J]. *Food Research International*, 2021, 142(4): 110206-110225.
- [5] TINAKORN S, WONGPORNCHAI S, KITSAWATPAIBOON

- P. Rapid method for quantitative analysis of the aroma impact compound, 2-Acetyl-1-Pyrroline, in fragrant rice using automated headspace gas chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(21): 8183-8189.
- [6] SUGUNYA M, KEAWSAARD, DUMRI K. Quantification of the rice aroma compound, 2-Acetyl-1-Pyrroline, in uncooked khao dawk mali 105 brown rice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(2): 773-779.
- [7] BUTTERY R G, LING L C, JULIANO B O, et al. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1983, 31(4): 823-826.
- [8] HIEN N L, YOSHIHASHI T, SARHADI W A, et al. Sensory test for aroma and quantitative analysis of 2-Acetyl-1-Pyrroline in Asian aromatic rice varieties[J]. *Plant Production Science*, 2006, 9(3): 294-297.
- [9] HELENE H, JODARI F, NEGRE-ZAKHAROV F, et al. HS-SPME-GC-MS/MS method for the rapid and sensitive quantitation of 2-Acetyl-1-pyrroline in single rice kernels[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 64(20): 4114-4120.
- [10] MO X L, XU Y, FAN W L. Characterization of aroma compounds in chinese rice wine qu by solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(4): 2462-2469.
- [11] LEE Y S, OH Y J, KIM T Y, et al. Quantitation of 2-acetyl-1-pyrroline in aseptic-packaged cooked fragrant rice by HS-SPME/GC-MS[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(1): 266-272.
- [12] TULYATHAN V, SRISUPATTARAWANICH N, SUWANAGUL A. Effect of rice flour coating on 2-acetyl-1-pyrroline and n-hexanal in brown rice cv. Jao Hom Supanburi during storage[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2008, 47(3): 367-372.
- [13] SUGUNYA W, SRISEADKA T, CHOONVISASE S. Identification and quantitation of the rice aroma compound, 2-Acetyl-1-pyrroline, in bread flowers (*vallis glabra ktze*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(2): 457-462.
- [14] ISABELLE M, SEN K, AGREBI A, et al. Quantification of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by stable isotope dilution assay through headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 675(2): 148-155.
- [15] GHIASVAND A, LUCIE S, JANUSZ P. Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME-GC-TOF-MS[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007, 22(5): 377-391.
- [16] HA J, SEO D, SHIN D. Determination of elaidic and vaccenic acids in foods using GC×GC-FID and GC×GC-TOFMS[J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 252-258.
- [17] DAYGON V D, CALINGACION M, FORSTER L C, et al. Metabolomics and genomics combine to unravel the pathway for the presence of fragrance in rice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 18-28.
- [18] YANG D S, SHEWFELT R L, LEE K S, et al. Comparison of odor-active compounds from six distinctly different rice flavor types[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(8): 2780-2787.
- [19] JOST T, HEYMANN T, GLOMB M A. Efficient analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in foods using a novel derivatization strategy and LC-MS/MS[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2019, 22(2): 121-129.
- [20] SCHIEBERLE P. Formation of 2-Acetyl-1-pyrroline and other important flavor compounds in wheat bread crust[J]. In *Thermal Generation of Aromas*, 1989, 13(2): 132-138.
- [21] TOMIO I, TAMAKI M, HAYATA Y, et al. Variation of 2-Acetyl-1-Pyrroline concentration in aromatic rice grains collected in the same region in Japan and factors affecting its concentration[J]. *Plant Production Science (Japan)*, 2015, 7(2): 178-183.
- [22] YOSHIHASHI T. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(2): 619-622.
- [23] TULYATHAN V, LEEHARATANALUK B. Changes in quality of rice (*oryza sativa* L.) cv. khao dawk mali 105 during storage[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2007, 31(3): 2-11.
- [24] MATHURE S V, JAWALI N, THENGANE R J, et al. Comparative quantitative analysis of headspace volatiles and their association with BADH2 marker in non-basmati scented, basmati and non-scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of India[J]. *Food Chemistry*, 2014, 142(1): 383-391.
- [25] DAYGON V D, PRAKASH S, CALINGACION M, et al. Understanding the Jasmine phenotype of rice through metabolite profiling and sensory evaluation[J]. *Metabolomics*, 2016, 18(5): 211-218.
- [26] LORIEUX M, PETROV M, HUANG N, et al. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait[J]. *TAG Theoretical & Applied Genetics*, 1996, 22(2): 131-139.
- [27] BRADBURY L M T, GILLIES S A, BRUSHETT D J, et al. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(4-5): 439-449.
- [28] 潘阳阳, 陈宜波, 王重荣, 等. γ -氨基丁酸和 2-乙酰-1-吡咯啉代谢通路在水稻籽粒发育过程中的变化分析[J]. *中国水稻科学*, 2021, 35(2): 121-129.
- PAN Y Y, CHEN Y B, WANG C R, et al. Changes of γ -aminobutyric acid and 2-acetyl-1-pyrroline metabolic pathways during rice grain development [J]. *Chinese Rice Science*, 2021, 35(2): 121-129.
- [29] YOSHIHASHI T, HUONG N, INATOMI H. Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 2001-2004.
- [30] HUANG T C, TENG C S, CHANG J L, et al. Biosynthetic mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline and its relationship with Delta-1-pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) callus[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7399-7406.
- [31] POONLAPHDECHA J, GANTET P, MARAVAL I, et al. Biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice calli cultures: Demonstration of 1-pyrroline as a limiting substrate[J]. *Food Chemistry*, 2016, 197(15): 965-972. 