



CO₂膨胀前后烟丝中游离氨基酸的变化研究

张鼎方 刘江生

(龙岩卷烟厂 福建省龙岩市乘风路1299号 364021)

摘要: AccQ-2A氨基酸衍生化试剂衍生化、超声波水解提取烟叶中的游离氨基酸、反相高效液相色谱法测定CO₂膨胀前后烟丝中的游离氨基酸。结果表明: CO₂膨胀前后烟丝中的脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量总体有呈下降的趋势, 而精氨酸、天冬氨酸等氨基酸的含量总体上有呈上升的趋势, 在CO₂膨胀前后样品所测16种游离氨基酸的总量大体有下降趋势(除下部Z0₁略有上升), 其中福建B₃F烟丝和上部B0₁烟丝等下降较为明显。

关键词: CO₂膨胀烟丝生产技术; 游离氨基酸; 烟草; 反相高效液相色谱法

CO₂膨胀烟丝生产技术是国际上70年代发展起来的一种烟丝加工新技术, 它的发展受到了国家和烟草企业的相当重视。氨基酸是烟草中的一类重要化学物质, 烟草中的游离氨基酸在烟叶的烘烤、陈化、调制及抽吸过程中均会与烟叶中的还原糖发生非酶棕色化反应, 生成吡喃、吡嗪、吡咯、吡啶类等杂环化合物, 某些氨基酸如苯丙氨酸还可自身分解成香味化合物, 如苯甲醇、苯乙醇等^[1]。其数量的多少和质量的高低会直接影响烟丝的内含物, 烟丝CO₂膨胀过程(特别是松片回潮和过CO₂冷端、热端)中, 由于采用冷端CO₂低温浸泡、热端迅速升温膨胀等过程, 改善了烟丝的某些品质, 提高了烟丝的填充能力, 降低了卷烟焦油释放量, 同时也使包括游离氨基酸在内的许多化学成分的含量产生变化^[2]。研究CO₂膨胀前后烟丝中游离氨基酸的种类和数量的多少及相对变化对于指导烟丝加工工艺, 提高烟丝的内含物都有着重要的意义^[3]。本实验采用反相高效液相色谱法对CO₂膨胀前后的游离氨基酸进行了定性、定量分析, 为卷烟配方和加工工艺参数的优化提供理论依据。

1 实验

1.1 材料与仪器

材料: 2001年的云南B₃F、贵州B₃F、福建B₃F等烟丝样品、2000年福建的下部Z0₁切丝后、中部S0₁切丝后、上部B0₁切丝后等烟丝样品。

试剂: Waters AccQ-Tag流动相A溶液; Waters AccQ-Fluor试剂盒(包括硼酸缓冲液1、衍生剂粉2A); 乙腈(HPLC级); 正缬氨酸(内标); 氨基酸标准样品: 天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、精氨酸、酪氨酸、胱氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和脯氨酸, 均为生化试剂, 购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

仪器: Waters 2690 高效液相色谱仪(带荧光检测器和自动进样器); 超声波发生器(57X型, NEY公司)

1.2 色谱条件

液相色谱柱: AccQ-Tag氨基酸分析柱(3.9×150mm, 4μm)

流动相A: Waters AccQ-Tag流动相A溶液按1: 10稀释, B: 乙腈, C: 超纯水

恒流流速: 1.0mL/min

柱温: 37℃

进样量: 3.0μL

荧光检测波长: 激发波长250nm, 发射波长395nm

淋洗梯度: 见下表

4	19.00	91	9	0	1.0
5	29.50	83	17	0	1.0
6	35.00	0	60	40	1.0
7	38.00	100	0	0	1.0
8	47.00	100	0	0	1.0

1.3 样品处理

将烟丝在烘箱中恒温40℃烘干至恒重，粉碎，过40目筛，筛下物为实验用烟样粉末，置于广口瓶中备用。准确称取2.000g 烟末于50 mL锥形瓶中，加入200μl 0.1mg/mL的内标溶液和50 mL的超纯水，室温下超声振荡萃取60min，过滤。取过0.45μm滤膜的滤液50于水解管中，加入70μL AccQ-1衍生化缓冲溶液，涡旋搅拌器震荡10秒，边震荡边加入20μL AccQ-2A氨基酸衍生化试剂，加完震荡10秒，置55℃的烘箱衍生化反应10 min后取出。将水解管中的溶液转移至微量色谱管中，置液相色谱瓶中进行HPLC分析^[4]。

1.4 氨基酸的定性与定量分析

用标样色谱图、文献参照和标样加入的方法，通过对照保留时间进行定性，对氨基酸的出峰顺序加以确认。采用内标法进行定量分析。即先根据氨基酸标样与内标物色谱峰的峰面积之比与相应的氨基酸浓度，制作各氨基酸的工作曲线，求出相应的线性方程，然后由待测样品中的各氨基酸与内标的色谱峰面积之比，求出相应氨基酸的含量。氨基酸标准溶液的色谱图及各成份标准曲线见图1和表2^[5]。

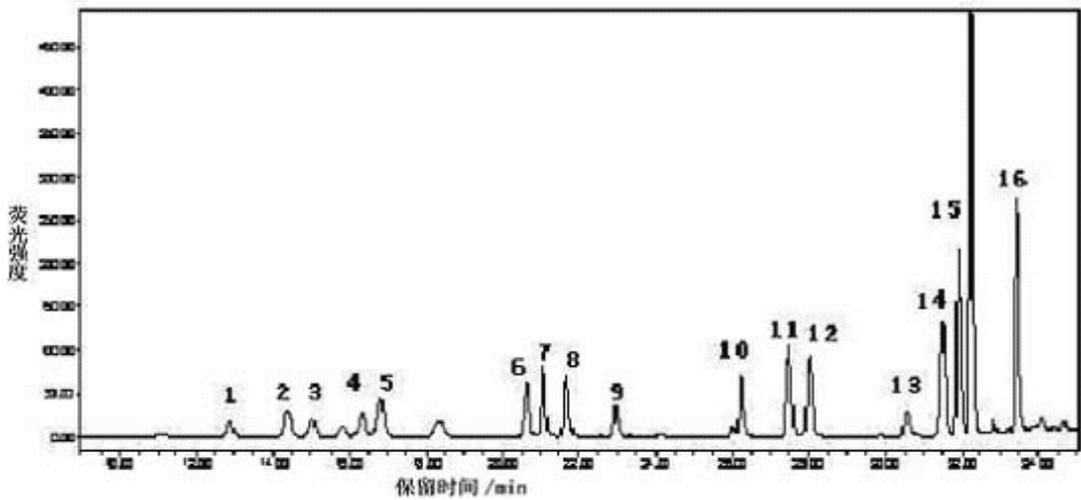


图1 氨基酸标准溶液的色谱图(50ppm)

1. 天冬氨酸 2. 丝氨酸 3. 谷氨酸 4. 甘氨酸 5. 组氨酸 6. 精氨酸 7. 苏氨酸 8. 丙氨酸 9. 脯氨酸
10. 半胱氨酸 11. 酪氨酸 12. 缬氨酸 13. 赖氨酸 14. 异亮氨酸 15. 亮氨酸 16. 苯丙氨酸

表2 氨基酸保留时间及标准曲线

氨基酸	英文缩写	相关系数	曲线方程
天冬氨酸	Asp	r=0.9972	Y=0.007037X+0.004687
丝氨酸	Ser	r=0.9988	Y=0.006906X+0.038206
谷氨酸	Glu	r=0.9995	Y=0.006734X+0.015022
甘氨酸	Gly	r=0.9978	Y=0.006932X+0.021072
组氨酸	His	r=0.9961	Y=0.007520X+0.005375
精氨酸	Arg	r=0.9966	Y=0.005851X+0.018235
苏氨酸	Thr	r=0.9985	Y=0.006004X+0.009876
丙氨酸	Ala	r=0.9945	Y=0.003719X+0.020168

亮氨酸	Leu	r=0.9953	Y=0.005976X+0.016235
苯丙氨酸	Phe	r=0.9905	Y=0.006574X+0.010346

曲线方程中，Y为待测物与内标的峰面积比，X为待测物与内标的浓度比。

2 结果与讨论

2.1 重现性实验

通过云南B₃F烟样做平行实验 (n=5)，从结果上看，缬氨酸、赖氨酸含量相对偏差8.4%和8.7%，这可能与含量较低有关。其它氨基酸含量相对偏差均在3%—7%之间。

2.2 回收率实验

采用标样加入法测定回收率，烟样中加入0.1mg/mL混合氨基酸标准溶液2mL，利用前述样品制备方法进行处理，最后用液相色谱法测定，算出各种氨基酸回收率，结果见表3。由表可见，除了赖氨酸回收率为74.0%、组氨酸回收率为75.5%，回收率稍低了些外，其它14种氨基酸回收率都在82.5%—106.5%之间，回收率结果令人满意。

表3 回收率实验结果

氨基酸种类	样品含量 (mg/g)	实际测定值 (mg/g)	差值 (mg/g)	回收率 (%)
脯氨酸	0.913	1.109	0.196	98.0
半胱氨酸	0.132	0.308	0.176	88.0
酪氨酸	0.21	0.382	0.172	86.0
缬氨酸	0.144	0.309	0.165	82.5
赖氨酸	0.110	0.258	0.148	74.0
异亮氨酸	0.143	0.321	0.178	89.0
亮氨酸	0.326	0.51	0.184	92.0
苯丙氨酸	0.248	0.439	0.191	95.5
天冬氨酸	0.412	0.618	0.206	103.0
丝氨酸	0.245	0.439	0.194	97.0
谷氨酸	0.387	0.584	0.197	98.5
甘氨酸	0.192	0.377	0.185	92.5
组氨酸	0.094	0.245	0.151	75.5
精氨酸	0.330	0.517	0.187	93.5
苏氨酸	0.236	0.417	0.181	90.5
丙氨酸	0.849	1.062	0.213	106.5

2.3 CO₂膨胀过程中游离氨基酸含量及其变化

对烟丝CO₂膨胀过程中游离氨基酸含量变化进行了分析，结果见表4、表5、表6和图2。

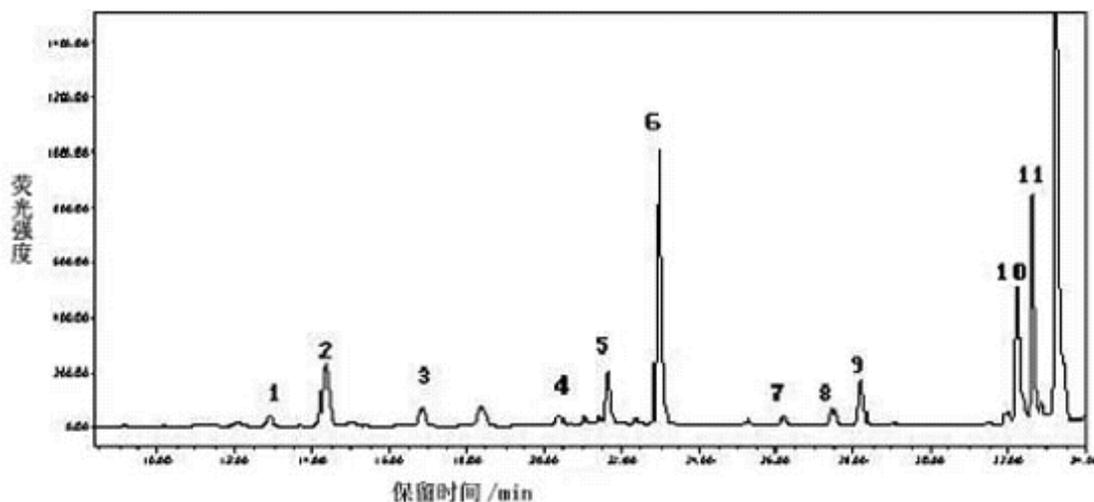


图2 样品溶液 (含内标) 游离氨基酸测量的色谱图 (样品编号X1)

1. 天冬氨酸 2. 丝氨酸 3. 组氨酸 4. 精氨酸 5. 丙氨酸 6. 脯氨酸
7. 半胱氨酸 8. 酪氨酸 9. 缬氨酸 10. 异亮氨酸 11. 亮氨酸

类	膨胀前	膨胀后	前	胀后	前	后
脯氨酸	0.96	0.85	1.08	0.91	0.87	0.45
半胱氨酸	0.14	0.11	0.2	0.13	0.27	0.28
酪氨酸	0.18	0.15	0.19	0.20	0.21	0.25
缬氨酸	0.07	0.06	0.08	0.14	0.12	0.10
赖氨酸	0.07	0.06	0.05	0.10	0.09	0.08
异亮氨酸	0.21	0.17	0.19	0.14	0.13	0.11
亮氨酸	0.37	0.38	0.28	0.32	0.29	0.32
苯丙氨酸	0.15	0.22	0.32	0.24	0.21	0.27
天冬氨酸	0.42	0.75	0.35	0.41	0.44	0.49
丝氨酸	0.25	0.22	0.33	0.24	0.3	0.23
谷氨酸	0.68	0.43	0.41	0.38	0.34	0.21
甘氨酸	0.19	0.16	0.21	0.19	0.32	0.28
组氨酸	0.18	0.10	0.13	0.09	0.14	0.13
精氨酸	0.16	0.19	0.24	0.30	0.20	0.24
苏氨酸	0.11	0.18	0.24	0.23	0.28	0.27
丙氨酸	0.6	0.68	0.72	0.84	0.49	0.53

表 5: CO₂膨胀前后不同部位的烟丝样品游离氨基酸的检测结果 (mg/g)

氨基酸种 类	上部 BO ₁	上部 BO ₁	中部 SO ₁	中部 SO ₁	下部 ZO ₁	下部 ZO ₁
	切丝后	膨胀后	切丝后	膨胀后	切丝后	膨胀后
脯氨酸	0.74	0.42	0.87	0.44	0.85	0.65
半胱氨酸	0.24	0.29	0.17	0.10	0.10	0.11
酪氨酸	0.28	0.23	0.14	0.25	0.17	0.15
缬氨酸	0.11	0.13	0.09	0.11	0.08	0.11
赖氨酸	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08
异亮氨酸	0.13	0.09	0.07	0.05	0.12	0.08
亮氨酸	0.26	0.28	0.18	0.27	0.16	0.14
苯丙氨酸	0.26	0.20	0.16	0.22	0.19	0.16
天冬氨酸	0.47	0.62	0.4	0.54	0.53	0.64
丝氨酸	0.19	0.15	0.24	0.22	0.16	0.14
谷氨酸	0.64	0.38	0.26	0.24	0.21	0.19
甘氨酸	0.23	0.22	0.24	0.18	0.13	0.11
组氨酸	0.17	0.14	0.16	0.12	0.18	0.17
精氨酸	0.26	0.29	0.13	0.2	0.13	0.18
苏氨酸	0.34	0.29	0.21	0.19	0.13	0.24

从表4、表5可看出,对于不同产地的烟丝经膨胀后,脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量都有不同程度的下降,而亮氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸等氨基酸的含量都有不同程度的上升。其中云南B₃F烟丝中的组氨酸和谷氨酸含量下降较为明显,分别下降了44.4%和36.1%,而天冬氨酸却上升极为显著;贵州B3F烟丝中的丝氨酸、组氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量下降

较明显,分别下降了27.3%、30.8%和38.2%,而含量上升的氨基酸种类并没有升幅特别明显的,都在20%以下;福建B₃F烟丝中下降较为明显的氨基酸主要是脯氨酸和谷氨酸,分别下降了48.3%和38.2%,含量上升的氨基酸种类同样也没有升幅特别明显的,都在12%以下。对于不同部位的烟丝经膨胀后,脯氨酸、组氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量都有不同程度的下降,其中脯氨酸的含量下降尤为明显,降幅都在23%以上,而缬氨酸、精氨酸、天冬氨酸等氨基酸的含量都有不同程度的上升。具体分析来看,上部BO₁烟丝中的脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸等氨基酸的含量下降很明显,降幅分别为43.2%、35.1%及40.6%,而天冬氨酸升幅明显,上升了31.9%;中部SO₁烟丝中脯氨酸和甘氨酸分别下降了49.4%和25.1%,降幅明显,升幅明显的有精氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、亮氨酸等,分别上升了53.8%、35.1%、40.5%、50.0%;另外,在下部ZO₁烟丝膨胀过程中,只有脯氨酸下降较明显,降幅达23.5%,而缬氨酸、精氨酸及丙氨酸等氨基酸的含量分别上升了37.5%、38.5%、28.6%,升幅较为明显。

综上所述,总的来说,不同产地和不同部位的烟丝经膨胀后,脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量总体有呈下降的趋势,而精氨酸、天冬氨酸等氨基酸的含量总体上有呈上升的趋势。在烟丝中所测得的氨基酸含量较高的种类主要有脯氨酸、天冬氨酸、谷氨酸,其中脯氨酸下降趋势明显,天冬氨酸普遍有所上升,而丙氨酸的含量除了在上部BO₁烟丝中出现明显下降,大体上是呈上升趋势的。

表6 膨胀前后氨基酸总量测定结果对比 (mg/g)

	云南 B ₃ F	贵州 B ₃ F	福建 B ₃ F	上部 BO ₁	中部 SO ₁	下部 ZO ₁
膨胀前氨基酸总量	4.74	5.02	4.70	5.03	3.81	3.56
膨胀后氨基酸总量	4.71	4.86	4.24	4.28	3.78	3.60

从表6可以看出,烟丝在CO₂膨胀前后样品所测16种游离氨基酸的总量除了下部ZO₁烟丝略有上升(约1%),其余的大体上呈下降趋势;其中福建B₃F烟丝和上部BO₁烟丝分别下降了10%和15%,下降较为明显,贵州B₃F烟丝下降了约3%,而云南B₃F、中部SO₁下降了不到1%,幅度较为不明显。

3 结论

膨胀烟丝与卷烟的质量有极其密切的关系,研究烟丝在膨胀过程中的化学成分变化,对相对提高膨胀烟丝的综合质量,科学、合理选择膨胀原料,优化膨胀配方具有重要的意义。本文采用超声波水解提取烟叶中的游离氨基酸方法,以反相高效液相色谱法对CO₂膨胀前后不同产地及不同部位的烟丝样品中的游离氨基酸进行了分析研究,鉴定出16种游离氨基酸。结果表明,不同产地和不同部位的烟丝经膨胀后,脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸等氨基酸的含量总体有呈下降的趋势,而精氨酸、天冬氨酸等氨基酸的含量总体上有呈上升的趋势。CO₂膨胀后,不同产地及烟叶不同部位制成的烟丝中的16种游离氨基酸的总量大都呈不同程度的下降趋势,只有下部ZO₁烟丝略有上升,其中福建B₃F烟丝和上部BO₁烟丝下降较为明显。

参考文献

- [1]刘百战,孙哲建,徐玉田,等.毛细管气相色谱法测定卷烟中的游离氨基酸[J].中国烟草学报,1999,2:1-6
- [2]唐纲岭等.烟丝膨胀前后某些重要香味成分和常规成分的分析研究.中国烟草学报,1999,3:1-7.
- [3]Kato H. Chemical studies on amino-carbonyl reactions III. Formation of substituted pyrrole-2-aldehydes by reaction of aldoses with alkylamines[J]. Agr. Biol. Chem., 1967, 31: 1086-1096.
- [4]符云鹏,刘国顺,刘学芝,等.烤烟叶片发育过程中氨基酸含量变化的研究[J].中国烟草学报,1998,4(1):15-19.
- [5]路莘,等.植物游离氨基酸测定中提取剂和纯化方法的研究[J].氨基酸杂志(现刊名:氨基酸和生物资源),1991(2):7-11.

【打印】 【关闭】

Copyright 2004 <http://www.tobacco.org.cn/> Inc. All rights reserved.

版权所有：中国烟草学会