



两步同时蒸馏萃取同时分离游离态和结合态香味成分

胡雅琴¹ 蔡继宝¹ 梁凤霞¹ 朱晓兰² 高 芸² 苏庆德^{1*}

(1 中国科学技术大学化学系 合肥 230026;

2 中国科学技术大学烟草与健康研究中心 合肥 230052)

摘 要: 研究建立了一种同时测定烟草中游离态及结合态香味成分的新方法。烟草样品在弱酸性 (pH5.59) 条件下用二氯甲烷同时蒸馏萃取 (SDE) 4h, 调节烟草水溶液的pH至酸性 (pH2.5), 再用新鲜的二氯甲烷, 继续同时蒸馏萃取 (SDE) 4h。两份二氯甲烷萃取液浓缩后用气相色谱 (GC) 和气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析。整个分离过程在同一个同时蒸馏萃取装置中分两步完成, 简化了结合态香味成分的分离, 只用一份样品即可测定游离态及结合态香味成分。经测定, 方法的相对标准偏差 (n=6) 为 1.2%-10.2%。

关键词: 同时蒸馏萃取; 游离态香味成分; 结合态香味成分

Investigation of two-step simultaneous distillation extraction
for isolation free and bound volatiles

HU Ya-qin¹ CAI Ji-bao¹ LIANG Feng-xia¹ SHU Xiao-lan² GAO Yun² SU Qing-de^{1*}
(1 Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei,
230026;

2 Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of
China, Hefei, 230052)

Abstract: A two-step simultaneous distillation extraction (two-step SDE) method followed by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for determination of free and bound volatiles in tobaccos was investigated and developed. Sample was first subjected by SDE with dichloromethane under pH=5.59 for 4h to isolate free volatiles, following the sample was adjusted to pH=2.5, which was also SDE with fresh dichloromethane for 4 h to hydrolyze and isolate bound volatiles. The resulting free and bound volatiles extracts were concentrated and analysed by GC and GC-MS. The whole procedure was carried out in one SDE apparatus. Compared to the conventional method to isolate free and bound volatiles, it is simpler, faster and more effective. The relative standard deflections (RSD) vary between 1.2%-10.2%.

Keywords: SDE; Free & bound volatiles; GC; GC-MS

1 引言

烟草中的香味成分同时以游离态形式和结合态形式存在。游离态香味成分易挥发释放。结合态香味成分一般不具挥发性或挥发性很低, 在烟草的加工、贮藏中不易损失, 但在燃吸时, 结合态香味成分裂解, 从而释放出香味成分, 对卷烟烟气香味产生贡献。因此, 烟草中的游离态香味成分及结合态香味成分对卷烟产品的吃味和香味具有重要意义^[1, 2]。分离植物中游离态香味成分常用的方法是水蒸气蒸馏。^[9]分离结合态香味成分的经典方法是先用甲醇提取出目标物, 经大孔树脂吸附, 然后用不同的溶剂洗脱和溶剂萃取, 使结合态香味成分与水溶性糖、有机酸、生物碱、氨基酸、游离态香味成分分离, 然后将结合态香味成分进行酸水解^[3, 8]或用酶水解^[4, 7], 得到的以游离态形式用气相色谱 (GC) 和气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析鉴定^[3, 8]。这种传统的分离方法要消耗两份样品才能测定游离态及结合态香味成分, 并涉及到L-L分配、层析柱净化和多次浓缩, 制样时间长、有机试剂消耗多, 因此改进和发展有关样品前处理技术是必要的。

本文采用两步同时蒸馏萃取(SDE),先将游离态香味成分分离,然后调节烟草水溶液的pH值,使结合态香味成分在弱酸(pH2.5)条件下水解进行第二步同时蒸馏萃取(SDE)。结合态香味成分水解后,变成挥发性的成分,被萃入新鲜的二氯甲烷,浓缩后用气相色谱(GC)和气相色谱-质谱(GC-MS)分析鉴定。水溶性糖、有机酸、生物碱、氨基酸、蜡质、色素仍留在水相,无需大孔树脂分离。整个分离过程在同一装置中进行,结合态香味成分直接从样品中水解转入有机相,避免了提取时的损失。游离态香味成分是分离结合态香味成分的副产物,可同时测定。

2 实验部分

2.1 试剂及样品

所有试剂及无水硫酸钠均为分析纯。十七烷用石油醚配成1.6g/l的溶液做内标。DM-401大孔吸附树脂(20-60目),净品级(天津海光化工有限公司)。

烤烟烟样在37℃烘箱中干燥8h,磨成40-60目烟末,储存在广口瓶中备用。

2.2 两步同时蒸馏萃取(SDE)分离游离态及结合态香味成分

称取烟样5.0g,加入250mL pH5.59的弱酸性柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液于图1左边的装置中。在另一烧瓶中加入60mL CH_2Cl_2 和200 μL 内标溶液,同时蒸馏萃取(SDE)4h。加入2.85mL H_3PO_4 ($3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),调节缓冲溶液的pH值至pH2.5。更换新鲜的二氯甲烷,加入200 μL 内标溶液,再同时蒸馏萃取4h。两份二氯甲烷萃取液在40℃下用旋转蒸发仪浓缩至1mL。取1.0 μL 注入气相色谱仪分析。

2.3 用传统方法提取结合态香味成分^[3]

称取烟样5.0g,加入100mL无水甲醇,振荡过夜,过滤,残渣再用100mL甲醇提取4h,合并提取液,在减压下于45℃用旋转蒸发仪浓缩至干。加水溶解,水溶液过DM-401层析柱(2cm(i.d.) \times 30cm),依次用水、甲醇洗柱。蒸去甲醇后,加100mL水溶解,然后用二氯甲烷萃取3次(50mL \times 3),获得的水溶液加入到250mL pH2.5的柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液中,按2.2中第二步SDE的条件同时蒸馏萃取。结合态香味成分水解后即被萃取到 CH_2Cl_2 中。干燥、浓缩条件与1.3中相同。

2.4 气相色谱(GC)和气相色谱-质谱(GC-MS)分析

气相色谱仪及气相色谱-质谱仪均为美国Perkin Elmer公司的AutoSystem GC和AutoSystem TurboMass GC-MS。

石英毛细管气相色谱柱为DB-5(30m \times 0.25mm i.d, 0.25 μm 5%polyphenyl methylsiloxene, 美国J&W公司)。

气相色谱条件为:进样口温度250℃,FID温度280℃,He(99.999%)作载气。分流方式进样,分流比30:1,进样量1.0 μL 。柱温箱温度程序为:50℃保持2min,4℃/min升至250℃,保持10min。

气相色谱-质谱条件为:EI方式电离,电离源能量70eV,扫描范围35-450 μ ,扫描时间:0.3sec,传输线温度250℃,离子源温度170℃。He(99.999%)做载气,进样量1.0 μL 。质谱检索联合采用Wiley库和NIST库。其他气相色谱条件同上。

3 结果与讨论

3.1 两步同时蒸馏萃取(SDE)的原理

第一步同时蒸馏萃取(SDE)将挥发性的游离态香味成分分离后,和结合态香味成分共存的杂质主要是:色素、油脂、蜡质、水溶性糖、氨基酸、生物碱和有机酸^[3]。色素、油脂和蜡质沸点高,难挥发,干扰小。第一步SDE结束后,调节烟草水溶液至酸性,进行第二步SDE,使结合态香味成分水解。水解释放出的苷元被萃入有机相,而亲水性杂质在此条件下仍留在水相。

本实验采用改进的装置做同时蒸馏萃取(SDE)。这可以实现在线调节溶液pH值。在离线的情况下,可测量将250mL缓冲溶液由pH5.59调至pH2.5消耗的 H_3PO_4 ($3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的体积。当加入的体积为2.85ml时pH变为pH2.5。用在线实验验证,测定加入2.85ml H_3PO_4 ($3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后,第二步SDE前后溶液的pH值。结果表明,两个pH值均为pH2.5。这表明在线调节溶液pH值是可行的,缓冲体系的pH值前后无明显变化。实验装置见图1。



图1 经改进的同时蒸馏萃取装置图

The modified simultaneous steam distillation and extraction apparatus

3.2 两步SDE条件的优化

3.2.1 第一步SDE条件的优化

第一步同时蒸馏萃取时提取游离态香味成分的过程。采用pH5.59的弱酸性条件，一方面接近烟草的自然pH值，另一方面烟碱很少被蒸出，不会导致掩盖其他色谱峰。结合态香味成分在此条件下基本不水解^[3]。游离态香味成分的色谱图见图2。分析结果见表1。

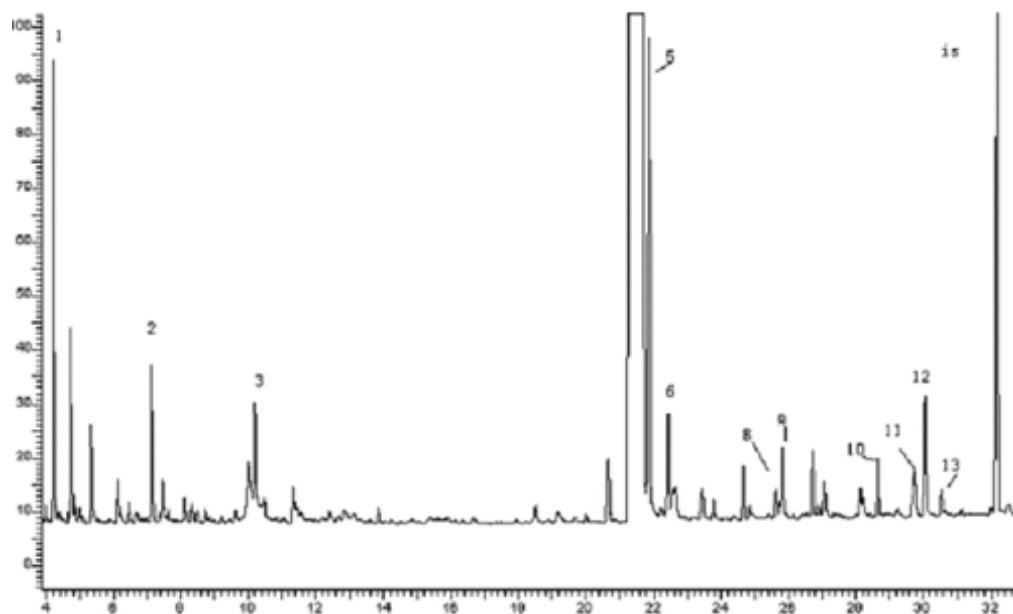


图2 游离态香味成分色谱图

图中所标物质为：1-康醇 2-苯甲醇 3-苯甲醛 4-四氢萘 5-茄酮 6-大马酮 7-法尼醇 8-香叶基丙酮

9-降茄酮 10-巨豆三烯酮A 11-巨豆三烯酮B 12-巨豆三烯酮C 13-巨豆三烯酮D

Figure2 chromatogram of free volatiles compounds

Components in figure2 are 4-naphthene, 1, 2, 3, 4-tetrahydro-1, 1, 6-trim 5-solanone 6-damascone 7-farnesol 8-gernaly acetone

9-norsolanone 10-megastigmatrinone1 11-megastigmatrinone2 12-megastigmatrinone3 13-megastigmatrinone4

表1 两种方法测定同一烟草样品 (n=6) 的结果

Table 1. Results from replicated analysis of a tobacco sample (n=6) obtained by two methods

康醇	Furfural	1	19.88	24.84	3.9	9.7
苯甲醇	Benzylalcohol		8.44	7.08	4.3	8.03
苯甲醛	Benzaldehyde		7.54	7.63	4.9	8.56
四氢萘		萘	0.46	14.26	2.4	11.13
Naphthalene, 1, 2, 3, 4-Tetrahydro-1, 1, 6-trim						
茄酮	Solanone		36.64	24.64	10.2	18.89
大马酮	Damascone		5.18	0.76	1.2	0.76
法尼醇	Farnesol		0	2.31	7.5	1.12
香叶基丙酮	Geranylacetone		0.84	0.22	1.6	0.19
降茄酮	Norsolanone		4.73	2.56	4.4	1.96
巨豆三烯酮 A	Megastigmatrienone1		1.36	8.64	2.7	6.55
巨豆三烯酮 B	Megastigmatrienone2		5.90	19.05	5.6	11.76
巨豆三烯酮 C	Megastigmatrienone3		10.24	15.14	6.6	12.00
巨豆三烯酮 D	Megastigmatrienone4		1.70	17.54	6.2	7.95

游离态和结合态香味物质有很多重合的组成，因此第一步SDE时应将游离态香味成分彻底除去，避免对结合态香味成分产生干扰。为选择合适的萃取时间，以烟草中常见的康醇、苯甲醇、苯甲醛、四氢萘、茄酮、大马酮、法尼醇、香叶基丙酮、降茄酮、巨豆三烯酮的含量为指标，考察萃取时间对提取量的影响，萃取时间和提取量的关系见图5。从图5看来，萃取时间大于4h后，提取量基本不变。本实验将第一步SDE的时间定为4h。

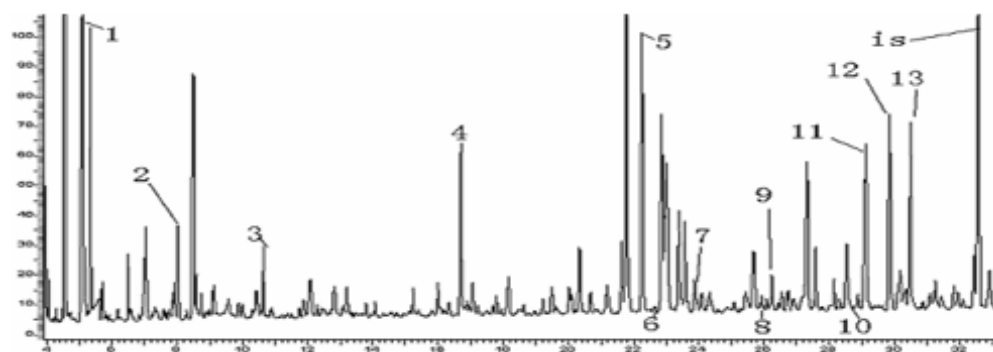


图3 分步同时蒸馏萃取（SDE）分离结合态香味成分色谱图。图中所标物质与图2中相同。

Fig3 chromatogram of two-step SDE to isolate bound volatiles compounds.
Components in figure3 are the same as those in figure2

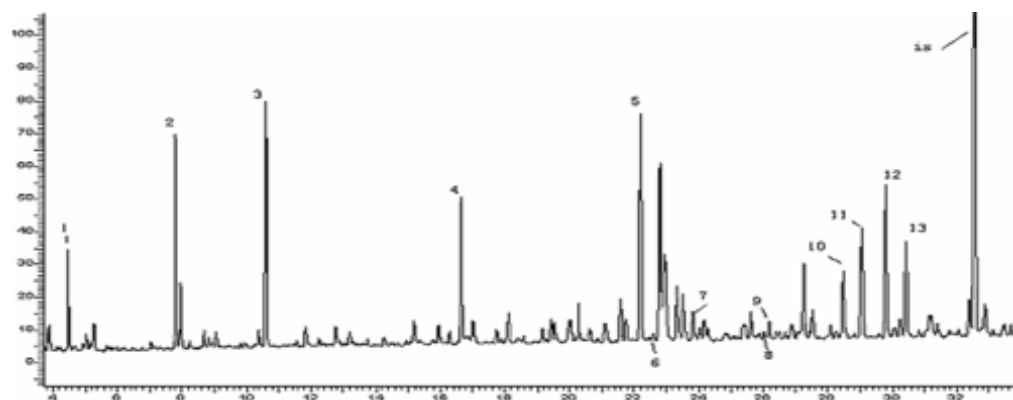


图4 传统方法分离结合态香味成分色谱图。图中所标物质与图2中相同。

Fig4 chromatogram of conventional method to isolate bound volatiles compounds.
Components in figure4 are the same as those in figure2

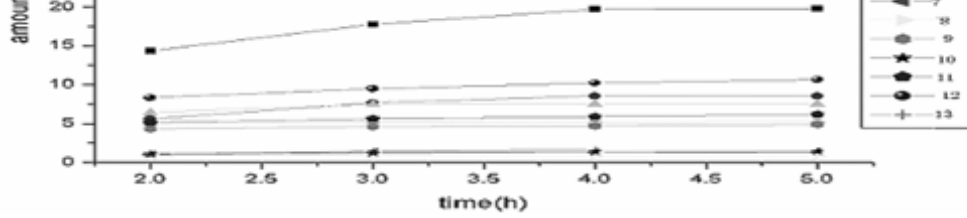


图5 第一次SDE萃取时间和提取效率关系图图中所标物质与图2中相同。

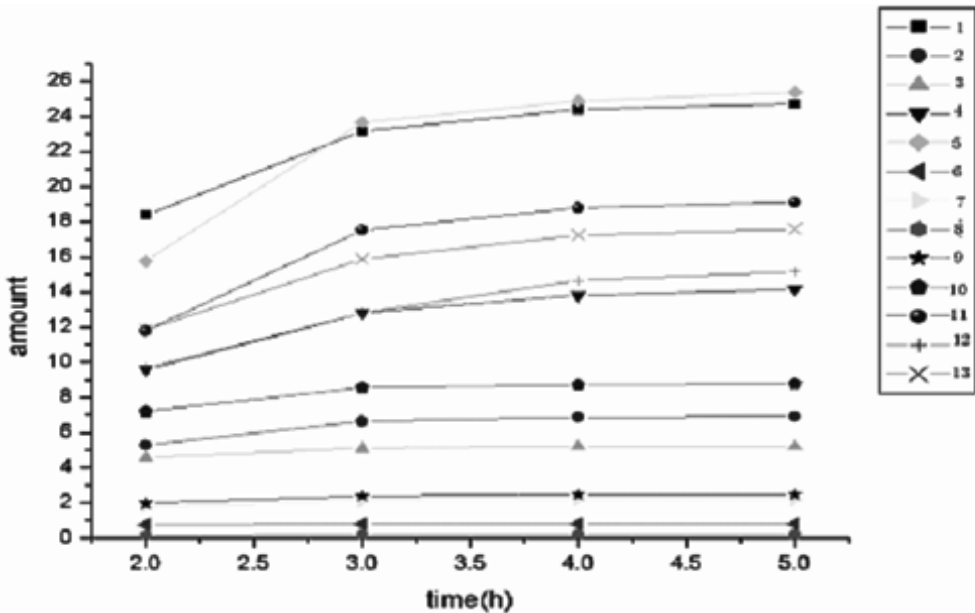
Figure5 Effect of the first SDE extraction time on extraction efficiency.
Components in figure5 are the same as those in figure2.

3.2.2 第二步SDE条件的优化

有关烟草结合态香味成分的水解方法已有文献报道。在PH2.5时结合态香味成分完全水解[3, 8]。仿照前法，对第二步SDE的水解时间进行优化。萃取时间和提取量的关系见图6。从图6看来，第二步SDE时间选为4h是合适的。

图6 第二次SDE萃取时间和提取效率关系图。图中所标物质与图2中相同。

Figure6 Effect of the second SDE extraction time on extraction efficiency.
Components in figure6 are the same as those in figure2.



3.3 两种前处理方法分析结果比较

采用相同的指标来评价两种前处理方法的分离效果。本实验用两种前处理方法得到的色谱图为图3-4，测定结果如表1所示。

色谱图表明，由于两步同时蒸馏萃取省去了很多净化步骤，出峰较传统方法多，但各指标均得到很好的分离。

表2 两种方法消耗时间和溶剂的比较

Table2.comparison time and solvent consumptions of two methods

方法method	时间 (h)	有机溶剂 (ml)
两步同时蒸馏萃取 two-step SDE	8	120
传统方法 conventional method	>24	> 350

表1中结果表明，13个指标中11个指标用两步同时蒸馏萃取法（SDE）得到的高。主要原因是两步同

时蒸馏萃取法是直接水解烟草样品中的结合态香味成分，而传统的前处理方法水解的是经过提取和多步净化后的水溶液，中间步骤多，损失也多。本法得到的苯甲醇和苯甲醛的量比传统方法少，可能是和沸点较低、极性大的物质在同时蒸馏萃取过程中损失多有关[10]。有文献研究香味物质在同时蒸馏萃取过程的回收率发现，沸点高、极性弱的香味成分回收率高。本文也用实验验证，测定苯甲醛、苯甲醇在同时蒸馏萃取4h后的回收率分别是71.4%，41.3%。本法比传统方法多一步同时蒸馏萃取，因此，损失的苯甲醇和苯甲醛比传统方法多。从总的提取效率上看，两步同时蒸馏萃取法要优于传统的前处理方法。

两种方法消耗的时间和溶剂，见表4。两步同时蒸馏萃取用的时间和溶剂明显少于传统方法。

3.4 烟草中游离态及结合态香味成分的对比例分析

表1中的结果表明苯甲醇、茄酮、大马酮、降茄酮的含量游离态高于结合态，康醇、苯甲醛、四氢萘、法尼醇、巨豆三烯酮的含量结合态比游离态高。不同组分游离态和结合态含量的差异可能与烟的吃味有关，有待进一步研究。

3.5 两种方法精密度的测定

分别按照2.2，2.3中所述方法，对平行样品测定6次，计算精密度，测定结果见表1。

4 结论

本文建立了一套同时分析烟草中游离态及结合态香味成分的新方法，优化了两步同时蒸馏萃取的条件。与传统方法相比，本方法不仅操作更简单，消耗溶剂更少，提取效率也更高。本法可用于其他植物体内。与传统方法相比，本方法不仅操作更简单，消耗溶剂更少，提取效率也更高。本法可用于其他植物体内游离态及结合态香味成分的测定，有广泛应用前景。

References

- [1]YZ. Gunta, C. L. Bayonove, R. L. Baumes, R. E. Cordonnier, J. chromatogr. 331(1985)83.
- [2]R. A. Hechman, M. F. Dube. L. Dwo, J. M. River, Rec, Adv. Tobacco. Sci35(1981)107267-275
- [3]Jibao Cai ,Baizhan Liu, Ping Ling, Qingde Su. J. Chromatography A2002, 947
- [4]Corallia Osorio, Camraenza Duque, Margoth Suarez, Luis Eder Salamanca, Fernado Uruena. J. Sep. Sci. 2002, 25, 147-154
- [5]Dongmei Wang, Takako Yoshimura, Kikue Kubota, Akio Kobayashi. J. Agri. Food Chem. 2002, 48, 5411-5418
- [6]Chang-cherng Chyau, Pei-Tzu Ko, Chi-Huarng Chang, Jeng-Leun Mau. Food chemistry2003 (80)387-392
- [7]R. Boulanger, J. crouzet. Food chemistry2001(74)209-216
- [8]Liu Baizhan(刘百战), Xu Yutian(徐玉田). Chinese Tobacco Science(中国烟草学报)1998:4(1)
- [9]JibaoCai, BaizhaLiu, QingdeSu. J. ChromatographyA2001. 930:1-7
- [10]Jing Yanqiu(景延秋), Xi Kefa(洗可法). Chinese Tobacco Science(中国烟草学报)1999:2

【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