

桂花提取物膜分离产品的成分分析及其在卷烟中的应用

作者

湖北中烟工业有限责任公司, 武汉 430051

..... 王 娜 司 辉 喻世涛 朱 巍 熊国玺

摘 要

为了提高桂花提取物的质量, 采用膜分离技术对其进行分离纯化, 应用液质分析对所得到的产品进行成分分析, 并通过对这些产品进行评吸, 分析化学成分和烟用效果之间的关系。结果表明, 膜分离技术在保留桂花提取物原有特色香味的同时, 可以有效去除对烟气感官质量有负面影响的大分子物质, 达到提高桂花提取物质量的目的。纯化后桂花提取物的主要成分为有机酸类和多糖类化合物。添加在卷烟中, 有改善口感、柔和烟气的积极作用。

关键词

桂花提取物 膜分离 液质分析 卷烟应用

Analysis of Membrane Separation Products of *Osmanthus Fragrans* Extract and Their Application in Cigarette

WANG Na SI Hui YU Shitao ZHU Wei XIONG Guoxi

(Technology Center of China Tobacco Hubei Industrial Corporation, Wuhan 430051, China)

Abstract: In order to improve the smoking quality of *Osmanthus Fragrans* extract, membrane separation techniques were adopted to remove impurities. The corresponding products were analyzed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) and the relationship between the chemical contents and smoking effects was also analyzed through smoking evaluation of these products. The results showed that membrane separation technique effectively separate macromolecular contents which have negative influence on smoking quality and obtain extracts with excellent quality. Purified *Osmanthus Fragrans* extract contents organic acids and polysaccharides. When applied in cigarettes, it actively improved taste and softened smoke.

Key words: *Osmanthus Fragrans* extract membrane separation liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis application in cigarette

各种天然植物(包括中草药)的花、果实、根、茎、叶都是重要的香原料来源, 因此, 天然烟用提取物凭借其源自天然、各有效成分比例协调、绿色、环保、降害等显著特点, 在烟草行业中的应用越来越广泛^[1-3]。随着国家局“中式卷烟”和“调香工程”战略的实施, 湖北中烟围绕打造低焦低害卷烟的目标, 缔造淡雅香品类, 开创了淡雅香风格卷烟的先河, 对丰富中式卷烟品牌具有奠基性意义。而淡雅香是由天然本草提取物与醇和的烟草本香相互辉映而体现的。由此可见, 在中式卷烟核心技术的形成中, 天然烟用提取物的作用将会越来越重要。

膜分离技术是一门新兴的高科技技术。它是

以选择性透过膜为分离介质, 当膜两侧存在某种推动力(如压力差、浓度差、电位差等)时, 原料侧组分选择性地透过膜, 以达到分离、提纯的目的。膜分离具有如下特点: ①可在常温及低压下进行分离, 因而能耗低, 约为蒸发法或冷冻法的 1/5~1/10; ②设备体积小, 结构简单, 占地面积小; ③分离过程只是简单的加压输送流体, 工艺流程简单, 易于操作管理; ④物质在浓缩分离过程中不发生相的变化, 因而适合于保味和热敏性物质的处理; ⑤能将不同分子量的物质分级。由于膜分离技术兼有分离、浓缩、纯化和精制的功能, 又有高效、节能、环保、分子级过滤以及过程简单、易于自动化控制等特性, 目前已被广泛应用于各种工业化领域^[4-5]。

本文采用膜分离技术对桂花提取物进行分离

收稿日期: 2011-04-26

纯化,并通过评吸鉴定,找到最佳的膜分离工艺。以确保在保留天然烟用提取物原有特色香味的同时,去除其中影响烟气感官质量的蛋白质、果胶、纤维素等大分子物质,获得高品质的提取物,达到提高天然烟用提取物质量的目的。本研究对“淡雅香”品类的丰富和提升具有积极的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桂花(湖北龙泰中药有限公司);磷酸、无水硫酸钠等(AR,国药集团化学试剂有限公司);二氯甲烷(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);牛血清蛋白(BSA);考马斯亮兰 G-250 染料试剂(杭州新锐生物工程有限公司);10 元空白卷烟叶组(武汉卷烟厂)。

膜分离设备(湖北工业大学膜技术研究所);FINNIGAN LC-MS/MS 液质联用仪,配备 TSQ Quantum 三级四极杆质谱仪、Surveyor 自动进样器、Surveyor 液相泵、电喷雾离子源、Xcalibur 液质联用分析软件、Quantum Tune Master 质谱分析软件(美国 Thermo Electron 公司);分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司);数显电热恒温干燥箱(武汉鼎立烘箱炉业有限公司);旋转蒸发器 RE-5IAA(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D 循环式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);数显恒温水浴锅 HH-6(常州澳华仪器有限公司);电热套(巩义市予华仪器有限公司);冰箱(博西华家用电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 桂花提取物及其膜分离产品的制备

选用 5 kg 桂花,加入 50 L 95%乙醇回流提取 2 h,提取两次,合并两次提取液,静置过夜,取上清液,冷却后用 500 目滤布过滤得到桂花滤液,在 60℃下减压浓缩成 25 kg,得到桂花提取物 I。

将所得到的桂花提取物 I 加入 1 倍量(质量比)的水,搅拌均匀后,经过孔径为 20 nm 的陶瓷膜元件进行分离除杂,除杂完成后,得到桂花一级膜滤液和未通过膜的桂花一级浓缩液。

将所得到的桂花一级膜滤液经过截留分子量为 10 kDa 的卷式膜元件进行分离除杂,除杂完成后,得到桂花二级膜滤液和未通过膜的桂花二级浓缩液。

1.2.2 蛋白质的测定

蛋白质的测定采用考马斯亮兰法,具体步骤如下。

溶液的配制:

(1)采用牛血清蛋白(BSA),配制成 1.0 mg/mL 和

0.1 mg/mL 的标准蛋白质溶液。

(2)称取 100 mg 考马斯亮兰 G-250 染料,溶于 50 mL 95%的乙醇后,再加入 120 mL 85%的磷酸,用水稀释至 1 L。得到考马斯亮兰 G-250 染料试剂。

标准曲线的测定:取 6 支试管,按顺序分别加入样品、水和试剂,即用 1.0 mg/mL 的标准蛋白质溶液向试管分别加入:0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mL,然后用无离子水补充到 0.1 mL。最后各试管中分别加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂,混合均匀。

加完试剂 2~5 min 后,即可开始用比色皿,在分光光度计上测定各样品在 595 nm 处的吸光度值 A_{595} 。空白为 0.1 mL H_2O 加 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂。用标准蛋白质量(mg)为横坐标,用吸光度值 A_{595} 为纵坐标,作图,即得到一条标准曲线。

最后,取 0.1 mL 待测样品加入空白试管中,加 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂。加完试剂 2~5 min 后,即可开始用比色皿,在分光光度计上测定待测样品在 595 nm 处的光吸收值。空白为 0.1 mL H_2O 加 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂。由上述标准曲线,根据测出的待测样品的光吸收值,即可查出待测样品的蛋白质含量。

1.2.3 果胶的测定

果胶的测定采用中华人民共和国农牧渔业部标准 NY 82.11-1988,具体步骤如下。

溶液的配制:

(1)称取 2 g 氢氧化钠,溶解于水中,稀释至 50 mL,得到 1 M 氢氧化钠溶液。

(2)准确称取半乳糖醛酸 100 mg,溶解于水中,加入 0.5 mL 1M 氢氧化钠溶液,并定容至 100 mL,混匀。得到 1 mg/mL 的半乳糖醛酸原液。

(3)称取 0.1 g 吡唑,溶于无水乙醇后,稀释至 100 mL。得到 0.1%吡唑乙醇溶液。

标准曲线的测定:

移取上述半乳糖醛酸原液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL,分别注入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,即得一组浓度为 10、20、30、40、50、60、70 $\mu\text{g/mL}$ 的半乳糖醛酸标准溶液。

取大试管(25×200 mm),吸移入 1 mL 上述配制的一组半乳糖醛酸标准溶液,加入 0.5 mL 0.1%吡唑乙醇溶液,不断摇动试管,再加入 6 mL 浓硫酸。立刻将试管放入 85℃水浴里保持 5 min,再使之冷却 15 min。然后立刻用分光光度计在 525 nm 波长处,用 2 cm 比色皿测量吸光值。空白为 1 mL

H₂O 加 0.5 mL 0.1% 吡唑乙醇溶液和 6 mL 浓硫酸。

以测得的吸光值为纵坐标, 每毫升标准溶液中的半乳糖醛酸的含量为横坐标, 作图, 即得到一条标准曲线。

果胶的测定:

(1) 果胶的沉淀

将 15 mL 天然烟用提取物置于 50 mL 刻度离心管中, 加入 95% 热 (75 °C) 乙醇溶液 25 mL, 在 85 °C 水浴中加热 10 min, 充分搅拌。再加 95% 乙醇使总体接近 50 mL, 离心 15 min, 弃去上清液。在 85 °C 水浴上再用 63% 乙醇洗涤沉淀。离心分离, 弃去上清液。

(2) 果胶总量提取液的制备

将按照上述方法制备出的果胶沉淀, 全部洗入 100 mL 容量瓶中。加入 5 mL 1 M 氢氧化钠溶液, 用水稀释至刻度, 混匀。至少放置 15 min, 并不时摇荡。过滤后, 滤液用于比色测定。

(3) 取大试管 (25 × 200 mm), 吸移入 1 mL 待

测样品滤液, 加入 0.5 mL 0.1% 吡唑乙醇溶液, 并产生白色絮状沉淀, 不断摇动试管, 再加入 6 mL 浓硫酸。立刻将试管放入 85 °C 水浴里 5 min, 再使之冷却 15 min。然后立刻用分光光度计在 525 nm 波长处, 用 2 cm 比色皿测量吸光值。空白为 1 mL H₂O 加 0.5 mL 0.1% 吡唑乙醇溶液和 6 mL 浓硫酸。

由上述标准曲线, 根据测出的待测样品的光吸收值, 即可查出待测样品的果胶含量。

1.2.4 卷烟加料及评吸方法

准确称取普通烟草浸膏和特色烟草浸膏各 0.04 g 加水至 1.60 g, 均匀喷洒于 40.00 g 10 元空白卷烟叶组; 在封口袋中密封后, 于烘箱中 80 °C 下烘 30 min; 取出后将加料后的卷烟叶组卷制成烟支给专业评吸人员评吸。评吸打分参照郑州烟草院单体/香精作用评价原始记录表。表中每一评分项目的分值从 1.0 到 5.0, 每 0.5 分一个档次。评吸时对每一项进行打分。打分标准说明如表 1 所示。

表 1 香精评分表

分数	香气特征					烟气特征			口感特征		
	香气质	香气量	杂气	透发性	劲头	浓度	细腻柔和程度	刺激程度	干燥程度	回甜	余味
1	差	少	重	沉闷	小	小	粗糙	大	强	苦	差
2	较差	较少	较重	较沉闷	较小	较小	较粗糙	较大	较强	较苦	较差
3	中等	中等	有	中等	中等	中等	中等	中等	中等	中等	中等
4	较好	较足	微有	较透发	较大	较大	较细腻柔和	较小	较弱	较甜	较干净舒适
5	好	充足	无	透发	大	大	细腻柔和	小	弱	甜	干净舒适

1.2.5 液质分析方法

采用自动进样器直接进样; 正、负离子方式检测; 采用全扫描一级质谱 (Full scan)、全扫描二级质谱 (Full scan MS2) 等方式进行测定; 仪器自动优化的二级相对碰撞能量均为 30%。ESI 离子源; 扫描范围 m/z 50~1 000; 离子源喷射电压 4.5 kV; 毛细管电压 21 V; 毛细管温度 175 °C; 氮气流速 40 个单位。

2 结果与讨论

2.1 桂花提取物的膜分离试验

考虑到在膜分离过程中需要保持天然烟用提取物的香气成分, 本文的膜分离试验设计在低温 (30~40 °C) 下进行。该试验相关的数据列于表 2。

由表 2 可知, 根据 1.2.1 方法所述, 用 95% 乙醇回流提取桂花, 得到桂花提取物 I 25 kg。加入 1 倍量 (质量比) 水后, 使用两组膜元件对其进行分离除杂, 产率分别为 63.20% 和 58.54%, 这样的产率

是具有工业化生产价值的。并且, 两次分离的进膜和出膜压力均在 0.2~0.7 MPa 之间, 也是可以实现工业化生产的。

表 2 桂花提取物的膜分离试验

	桂花提取物 I	桂花一级膜滤液
膜元件	陶瓷膜	卷式膜
投料/kg	50.0	31.6
工作时间/min	265	45
工作温度/°C	30~40	30~40
进膜压力/MPa	0.2	0.2
出膜压力/MPa	0.7	0.6
过滤速度/(kg/h·支)	7.2	25.0
出料/kg	31.6	18.5
产率/%	63.20	58.54

2.2 桂花提取物膜分离样品的蛋白质和果胶含量的测定

桂花提取物首先采用膜孔径为 20 nm 的陶瓷膜元件。该元件属于超滤范围,截留分子量为 40 万左右,因此可以截留大分子的蛋白质、果胶等物质。而截留分子量为 10 kDa 的卷式膜元件,可以截留分子量大于 1 万的大分子物质。因此,本文对提取物各级滤液和浓缩液的蛋白质和果胶浓度进行了检测,结果列于表 3。

表 3 桂花提取物膜分离样品的蛋白质和果胶含量

样品名称	蛋白质浓度/(mg/L)	果胶浓度/(μg/L)
桂花提取物 I	30.66	69.47
桂花一级浓缩液	12.60	51.13
桂花一级滤液	4.01	26.00
桂花二级浓缩液	7.82	45.16
桂花二级滤液	1.59	23.07

由表 3 可以看出,未分离桂花提取物 I 的蛋白质

浓度和果胶浓度分别为 30.66 mg/L 和 69.47 μg/L,经陶瓷膜过滤后,滤液浓度分别为 4.01 mg/L 和 26.00 μg/L,经卷式膜过滤后,滤液浓度仅为 1.59 mg/L 和 23.07 μg/L。由此可见,膜孔径为 20 nm 的陶瓷膜元件和截留分子量为 10 kDa 的卷式膜元件可以除去提取物中绝大部分的蛋白质和果胶。

2.3 桂花提取物膜分离样品的感官评吸

桂花提取物和经两级膜分离所得到的一级、二级滤液在 10 元价位空白卷烟叶组中进行加料的感官评吸结果见表 4。从表 4 可知,桂花提取物 I、桂花一级滤液和桂花二级滤液用于 10 元价位空白卷烟叶组进行的卷烟加料评吸比较,在增加香气、甜润烟气方面,三者的加料效果为:二级滤液最佳,一级滤液次之,提取物 I 最差。

表 4 桂花提取物膜分离样品的感官评吸结果

样品	香气特征/分					烟气特征/分			口感特征/分		
	香气质	香气量	杂气	透发性	劲头	浓度	细腻柔和程度	刺激程度	干燥程度	回甜	余味
空白卷烟	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.0	3.5	3.5
桂花提取物 I	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	2.5	3.0	4.0	2.5
桂花一级滤液	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4.0	3.5	3.5	4.0	3.5
桂花二级滤液	4.0	3.5	3.5	4.0	3.5	3.5	4.5	3.5	3.5	4.5	4.0

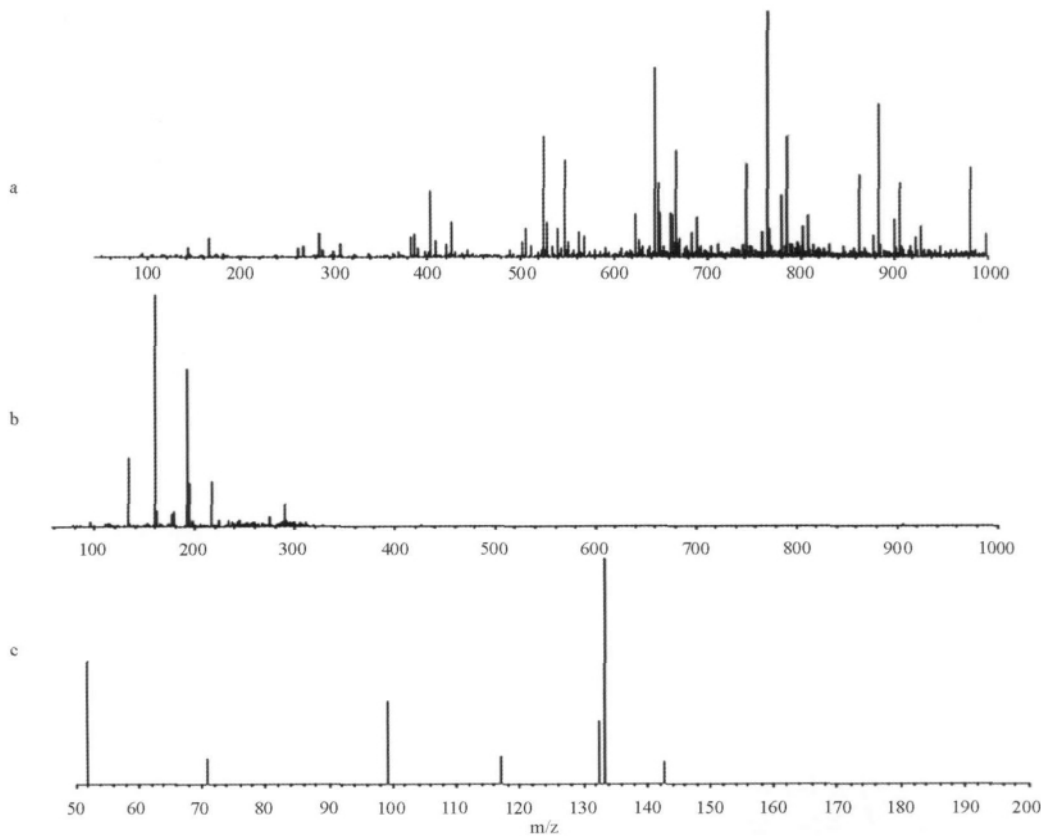


图 1 桂花二级滤液液质分析谱图

a: 正离子全扫描一级质谱; b: 负离子全扫描一级质谱; c: 全扫描 m/z 161 二级质谱

2.4 桂花提取物最佳膜分离样品的液质分析

根据以上评吸结果,本文对桂花二级滤液进行成分分析,采用液质联用,自动进样器直接进样;正、负离子方式检测;全扫描一级质谱(Full scan)、全扫描二级质谱(Full scan MS₂)等方式进行测定。

结果见表 5。桂花二级滤液正、负离子全扫描一级质谱及全扫描 m/z 161 二级质谱列于图 1。具体分析列于表 5。由表 5 可知,桂花二级滤液主要含有黄酮类、醛酮类、糖苷类、氨基酸以及一些蛋白质和果胶。

表 5 桂花二级滤液的液质分析结果

样品名称		分析结果		
		名称	分子式	分子摩尔质量
桂花二级滤液	黄酮类	山萘素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.23
		槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23
		杨梅素	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.24
		儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.11
	醛、酮类	β -紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	192.33
		香草醛	C ₈ H ₈ O ₈	152.15
	糖苷类	4-O- β -D-吡喃半乳糖基-4-D-呋喃果糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
		槲皮素-3-半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.37
	18 种氨基酸			
	蛋白质			
	果胶			

3 结论

本文采用膜分离技术对桂花提取物进行了分离纯化处理,并对各级纯化产品进行了分析和烟用评吸评价。分析表明,膜分离可以除去提取物中绝大部分的蛋白质和果胶,提高了提取物的质量。

桂花提取物 I、桂花一级滤液和桂花二级滤液用于 10 元价位空白卷烟叶组进行的卷烟加料评吸比较,在增加香气、甜润烟气方面,三者的加料效果从高到低依次为二级滤液>一级滤液>提取物 I。这主要是由于桂花中所含有的独特香气成分主要为挥发性的黄酮类、醛、酮类物质,采用醇提取正是希望得到这类分子量较小的物质,对卷烟香气产生有益的作用。然而,桂花提取物 I 是由醇回流而得,其中除了黄酮类、醛、酮类物质外,还存在蛋白质、果胶等给卷烟带来残留、刺激等不良影响的物质。因此,当膜分离元件的孔径为 20 nm 时,除去了这些带来不良影响的大分子物质,产品的质量得到改善。当膜分离元件的截留分子量为 10 kDa 时,可进一步除去这些大分子物质,使小分子的黄酮

类、醛、酮类物质得以富集,最终导致所得到的二级滤液质量优于一级滤液。

总体而言,膜分离技术可以在保留天然烟用提取物原有特色香味的同时,去除其中影响烟气感官质量的大分子物质,获得高品质的提取物,达到提高天然烟用提取物质量的目的。本研究为工业化生产中获得高品质的天然烟用提取物提供了切实可行的方法。

参考文献

- [1] 欧阳文. 实用烟用香精香料手册[M]. 昆明:云南科技出版社,1996.
- [2] DWO L. 加香技术—料液和香精[J]. 中国烟草学报, 1999 (4):12-15.
- [3] 张悠金. 烟用香精香料[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,1996.
- [4] 时钧,袁权,高从堦,等. 膜技术手册[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [5] 任建新. 膜分离技术及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2002.

国内行业简讯

●据山东省经信委和轻工协会联合下发的《关于促进日用化学品行业发展的指导意见》,计划到 2015 年山东省香料香精化妆品行业将实现销售收入 55 亿元,年均增长 13%。

●北京天利海香精香料有限公司现已完成一期投资 2 亿元,生产规模 3 000 吨(甲、乙基麦芽酚),二期工程计划投资 1 亿元,两期工程全部完工后,年可创产值 7 亿元,税收 5 000 万元。其现主产品甲、乙基麦芽酚的产销量已占国内市场 60%、国际市场 50%。

(本刊讯)