

响应面法优化烟叶中蔗糖酯的 超声波萃取工艺

陈风华¹, 李山², 贾春晓¹, 王瑞玲¹, 王莹莹¹, 毛多斌²

(1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:对烟叶中蔗糖酯(SE)的超声波萃取工艺进行了研究.以气相色谱-质谱(GC-MS)法作为分析手段,采用响应面法考察了萃取溶剂、温度、时间和料液比等因素对萃取SE的影响.结果表明,烟叶中SE的最佳萃取条件为:以乙腈为萃取溶剂,料液比为1:29,萃取温度为43℃,时间16 min.在此条件下,烟叶中SE总萃取量的验证值为5.039,理论预测值为5.067;SE的平均回收率为99.87%,与单因素最佳条件下的平均回收率(92.13%)相比提高了7.74%.对10种烟叶样品测定的结果表明,烟叶中SE的种类和含量因产地、品种、等级的不同而有所不同.

关键词:烟叶;蔗糖酯;超声波萃取法;气相色谱-质谱联用;响应面法

中图分类号:TS424;TQ651.2 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.04.004

Optimization on ultrasonic-assisted extraction technology of sucrose esters from tobacco by response surface methodology

CHEN Feng-hua¹, LI Shan², JIA Chun-xiao¹, WANG Rui-ling¹, WANG Ying-ying², MAO Duo-bin²

(1. College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted extraction technology of sucrose esters (SE) from tobacco was studied. The qualitative and quantitative analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method, and the effect of various factors including extraction solvent, temperature, time and solid liquid ratio on the total extract yield of SE was investigated by response surface methodology (RSM). The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: the extraction solvent acetonitrile, the solid liquid ratio 1:29, the temperature 43℃ and the extraction time 16 min. Under the optimized conditions, the total extract yield of SE was 5.039 (actual) or 5.067 (theoretical), the average recovery was 99.87%, 7.74% more than that obtained under the optimized conditions of single factor tests. The determination results of 10 kinds of tobacco leaf showed that the kinds and content of SE in tobacco leaves were different with different origin, variety and level.

Key words: tobacco; sucrose ester; ultrasonic extraction; GC-MS; response surface methodology

收稿日期:2013-06-01

基金项目:中国烟草总公司卷烟增香保润重大科技专项(110201101025(BR-07))

作者简介:陈风华(1982—),女,河南省漯河市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为应用化学.

通信作者:贾春晓(1965—),女,河南省社旗县人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为天然产物提取、应用化学.

0 引言

蔗糖酯 SE(sucrose esters)是烟叶中一种重要的潜香物质或香味前体物质,其中含量较高的是蔗糖四酯 STE(sucrose tetra-ester)^[1]. 常温条件下 SE 没有气味,但在卷烟高温燃吸时发生裂解,可以释放出异丁酸、异戊酸、3-甲基丁(或戊)酸等成分,而这些有机酸对烟叶的香味有重要影响,可赋予卷烟烟气特有的香气特征^[2-4],当卷烟中加入适量的 SE 时,可明显提高其香气质量^[5]. 此外,许多研究表明,某些 SE 还参与植物病虫害防治和植物生长调节等,发挥着重要的生物学作用^[6-8]. 因此,对烟叶中 SE 的种类及含量进行研究具有重要意义.

目前,烟叶中 SE 的常用萃取方法是溶剂(或超声波辅助溶剂)萃取法^[1,9-11]和超临界 CO₂ 流体萃取法^[12-13]. 与有机溶剂相比,超临界 CO₂ 流体萃取法对 SE 的萃取率及选择性均较高,但成本也相对较高,且国产超临界 CO₂ 萃取设备尚达不到文献[12]中的最高压力. 因此,如何优化溶剂萃取条件、提高其萃取效率,仍是分离纯化烟叶中 SE 的关键. 超声波辅助溶剂萃取法具有快速、价廉、安全、高效等特点,已在烟草化学成分分离中得到广泛应用^[13]. 而响应面法用于烟叶中 SE 的萃取条件研究目前尚未见文献报道.

本文拟采用超声波萃取法萃取烟叶中的 SE,并对萃取工艺进行研究. 以 SE 的萃取量为指标,考察萃取过程中萃取溶剂、温度、时间和料液比等因素对萃取 SE 的影响.

1 实验

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料与试剂 棕榈酸甲酯(纯度为 99%)、N,O-双-三甲基三氟乙酰胺(BSTFA)-三甲基氯硅烷(TMCS)(99:1,V/V),美国 Acros Organics 公司产;蔗糖八乙酸酯(纯度 >98%),美国 Aldrich 公司产;二甲基甲酰胺 DMF、乙腈(色谱纯),天津四友精细化工有限公司产;二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、正己烷、无水硫酸钠和氯化钾均为分析纯试剂. 实验用香料烟及烤烟样品均由上海烟草(集团)公司技术中心北京工作站提供,45℃烘干 2 h 后粉碎,过 40 目筛.

1.1.2 仪器 GC 6890—MS 5973 N 型气相色谱—质谱联用仪,美国 Agilent 公司产,配 G1701DA MSD 化学工作站, NIST 02 谱库和自动进样器; RE—52

旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产; AB265—S 型电子天平(感量 0.000 01 g),瑞士 Mettler 公司产; SB—3200DT 型超声萃取装置,宁波新芝生物科技有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 SE 的萃取及衍生 称取 2 g 粉碎后的烟末,放入 150 mL 锥形瓶中并加入 58 mL 乙腈,超声萃取 16 min(温度 43℃),然后过滤,并用乙腈洗涤滤渣 3 次,每次 20 mL,合并萃取液和洗涤液;在 40℃下用旋转蒸发仪蒸发至干,然后加入 60 mL 甲醇-水(V:V = 80:20)溶解,用正己烷洗涤 3 次,每次 20 mL,然后再用 70 mL 的 CHCl₃:H₂O:饱和 KCl = 4:2:1 溶液萃取,收集三氯甲烷相. 将三氯甲烷相用水洗涤 3 次,每次 10 mL,然后加入 15 g 无水硫酸钠,干燥过夜,滤出干燥剂后滤液蒸发至干,用三氯甲烷定容至 5 mL. 从中取出 1.0 mL 于衍生瓶中进行衍生化反应. 衍生化的反应条件如下^[10]:在 1.0 mL 萃取液中加入浓度为 123.6 μg/mL 的棕榈酸甲酯(内标)溶液 0.3 mL 和 BSTFA-TMCS:DMF(1:1,V/V)溶液 0.2 mL,密封,在 75℃的水浴中保温 1 h 即可用于 GC-MS 分析.

1.2.2 GC-MS 分析条件 色谱条件:HP-5MS 毛细管色谱柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm);升温程序为:初温 120℃,保持 3 min,以 15℃/min 升至 280℃,再以 2℃/min 升至 300℃,保持 5 min 后结束. 进样口温度为 280℃;载气为高纯氦气(99.999%);流速为 1.0 mL/min;进样量为 0.5 μL,不分流进样.

质谱条件:采用电子轰击源,电子能量为 70 eV;四极杆温度为 150℃;传输线温度为 280℃,电子倍增器电压为 1.22 kV;采用全扫描工作方式,扫描范围为 30 ~ 500 u.

2 结果与讨论

2.1 SE 的定性分析

混合香料烟样品按 1.2.1 节实验方法处理,得到 SE 的硅醚衍生产物,再按 1.2.2 节中的 GC-MS 分析条件对 SE 进行定性分析. 由于质谱数据库中没有相应的 SE 衍生物的标准质谱图,因此,通过人工解析质谱图并对照文献[1]和[10]中报道的数据进行定性分析,确认了 5 组蔗糖四酯,分别用 SE I—SE V 表示,分子量依次为 622,636,650,664 和 678.

该类蔗糖四酯的结构特点是蔗糖的葡萄糖结构单元上有 4 个酰基化基团取代,其中 6 位碳原子

的羟基是乙酯化的,而果糖结构单元上的羟基都是游离的. SE I—SE V 中 3,4,5 位碳原子上的酰基 (R_1, R_2 和 R_3) 总碳数依次相差 1, 其结构通式如图 1 所示.

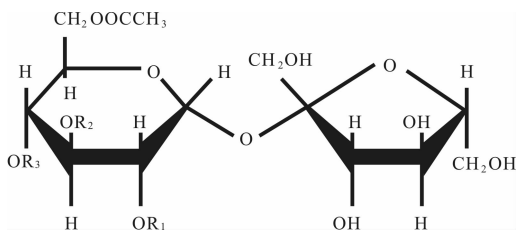


图 1 蔗糖四酯的结构通式

2.2 萃取条件的单因素实验

SE 的萃取量与其峰面积成正比, 所以用 SE 的峰面积与内标(棕榈酸甲酯)峰面积的比值即相对峰面积代表其萃取量, 以烟叶中 5 组 SE 的总萃取量为指标分别考察萃取溶剂、料液比(烟叶样品质量与萃取溶剂体积之比, $g \cdot mL^{-1}$)、萃取温度和时间的影响.

由于 SE 的极性较大, 故分别用二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、乙腈和乙酸乙酯为萃取溶剂, 固定料液比为 1:30, 常温下超声萃取 20 min. 结果表明, 乙腈对 SE 的萃取量最大. 考查料液比时, 用乙腈作溶剂, 料液比分别为 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:70 和 1:90, 常温下超声萃取 20 min, 结果表明, 料液比为 1:30 时萃取量最大. 然后固定料液比为 1:30, 改变温度(20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C 和 60 °C)在萃取时间为 10 min, 15 min, 20 min, 25 min 和 30 min 时分别进行萃取(即每个温度点按不同萃取时间进行 5 次实验). 结果表明, 恒温 40 °C, 萃取时间为 15 min 时萃取量最大. 因此, 单因素实验确定的最佳萃取条件为: 乙腈为溶剂, 料液比为 1:30, 萃取时间为 15 min, 温度为 40 °C. 同时, 单因素实验结果还表明萃取溶剂、时间、温度和料液比是影响 SE 萃取量的主要因素.

2.3 响应面法优化超声波萃取工艺

根据单因素实验结果, 以烟叶中 5 组 SE 的总萃取量为响应值(R), 以萃取温度(X_1)、萃取时间(X_2)和料液比(X_3)为自变量设计响应面分析试验. 按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta x$ 对自变量进行编码, 其中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为实验中心点处自变量的真实值, Δx 为自变量的变化步长. 因素和水平的取值见表 1.

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 对 3

个主要影响因素进行 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验, 方案及结果见表 2.

表 1 试验因素、水平及编码

因素	编码	水平		
		-1	0	1
温度 $X_1 / ^\circ C$	x_1	30	40	50
时间 X_2 / min	x_2	10	15	20
料液比 $X_3 / (g \cdot mL^{-1})$	x_3	20	30	40

注: $x_1 = (X_1 - 40) / 10$; $x_2 = (X_2 - 15) / 5$; $x_3 = (X_3 - 30) / 10$.

表 2 响应面法设计及试验结果

实验号	编码变量			响应值
	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	0	4.35
2	-1	1	0	4.77
3	1	-1	0	4.79
4	1	1	0	4.82
5	0	-1	-1	4.59
6	0	-1	1	4.69
7	0	1	-1	4.89
8	0	1	1	4.55
9	-1	0	-1	4.49
10	1	0	-1	4.85
11	-1	0	1	4.64
12	1	0	1	4.59
13	0	0	0	5.00
14	0	0	0	4.98
15	0	0	0	5.02
16	0	0	0	5.18
17	0	0	0	5.03

采用 Design-Expert 软件, 对响应值(R)的试验数据(表 2)进行多元回归分析和最小二乘法拟合, 获得 R 对编码自变量的二次多项回归模型方程:

$$R = 5.04 + 0.1x_1 + 0.076x_2 - 0.044x_3 - 0.098x_1x_2 - 0.1x_1x_3 - 0.11x_2x_3 - 0.2x_1^2 - 0.16x_2^2 - 0.2x_3^2$$

对该模型进行回归方差分析和显著性检验, 结果如表 3 所示. 可见, 该模型 $F = 14.22, P < 0.01$, 表明模型极显著. 失拟项 $F = 0.88$, 相应的概率 $P > 0.1$, 失拟不显著, 说明回归方程无失拟因素存在, 回归方程与实测值能很好的拟合. 其中得到的复相关系数 $r^2 = 0.9481$, 说明该模型与实际试验拟合较好, 自变量与 R 之间线性关系显著; 调整决定系数 $r_{adj}^2 = 0.8815$, 说明 R 的变化有 88.15% 来源于所选变量(萃取温度、萃取时间和料液比). 因此, 该回归方程对试验拟合较好, 误差小, 可以较好地描述各因素与 R 之间的真实关系.

由回归方程做出 R 对各因素的响应面立体图与等高线图,结果如图 2 所示.从图 2 可直观地看出各因素对 R 的影响,图中曲线比较陡峭,则表明该因素对 R 的影响较大.响应面开口向下均为山丘形,随着每个因素的增大, R 增大,当 R 增大到极值后逐渐减小,说明该模型有稳定点,且稳定点是最大值.各因素之间都有一定的交互作用,其中萃取温度与时间的交互作用最为明显.同时温度(x_1)是影响 R 的最显著因素,表现为等高曲线陡峭,回归分析结果(表 3)也印证了图中的预测值.

回归方程的各项方差分析结果表明一次项和二次项都有显著性因素,因此各试验因子对 R 的影响不是简单的线性关系.所以,可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件.通过最优化分析,以 R 为评价指标,计算得出最佳萃取条件为萃取温度 $42.5\text{ }^\circ\text{C}$,萃取时间 16.2 min ,料液比 $1:28.5$.在此条件下, R 的理论值为 5.067 .考虑到实际操作的限制性,将该优化后的萃取条件修正为超声温度 $43\text{ }^\circ\text{C}$,超声时间 16 min ,料液比 $1:29$.

2.4 模型验证

为检验此方法的可靠性,采用上述修正后的最优条件进行萃取试验.取混合香料烟样品 2 g ,加入乙腈 58 mL ,在超声萃取装置中,设定温度为 $43\text{ }^\circ\text{C}$,萃取 16 min ,重复测定 6 次,计算总萃取量和相对标准偏差(RSD).由于没有商品化 SE 标准品,而蔗糖八乙酸酯与烟草中的 SE 性质相似,则以蔗糖八乙酸酯为标准品,在烟叶样品中加入一定量蔗糖八乙酸酯,使加入浓度约为 $12\text{ }\mu\text{g/mL}$,据加入量和回收量计算回收率^[10],并对 10 种烟叶样品中的 SE 含量进行测定.结果表明,在最佳萃取条件下,SE 总萃取量为 5.039 ,与理论预测值 5.067 接近,SE 的平均回收率为 99.87% ,与单因素最佳条件测得的平均回收率相比提高了 7.74% ; $RSD < 2.9\%$,与文献[10]方法相比, $RSD (< 4.58\% \text{ [10]})$ 有所降低,而回收率($86.21\% \text{ [10]})$ 明显提高,表明 RSM 法优化得到的萃取条件参数准确可靠,具有实用价值.用内标标准曲线法测得的烟叶样品(第 1 种样品为香料烟样品,其余均为烤烟样品)中 SE 的含量结果见表 4.

表 3 模型回归方程方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率 P	显著性
模型	0.770	9	0.085	14.22	0.001 0	极显著
x_1	0.080	1	0.080	13.35	0.008 1	极显著
x_2	0.047	1	0.047	7.76	0.027 1	显著
x_3	0.015	1	0.015	2.55	0.154 0	不显著
x_1x_2	0.038	1	0.038	6.34	0.039 9	显著
x_1x_3	0.042	1	0.042	7.01	0.033 0	显著
x_2x_3	0.048	1	0.048	8.08	0.025 0	显著
x_1^2	0.170	1	0.17	27.68	0.001 2	极显著
x_2^2	0.110	1	0.11	18.21	0.003 7	极显著
x_3^2	0.170	1	0.17	28.38	0.001 1	极显著
残差	0.042	7	5.994E-003			不显著
失拟项	0.017	3	5.558E-003	0.88	0.523 0	
净误差	0.025	4	6.320E-003			
总离差	0.810	16				

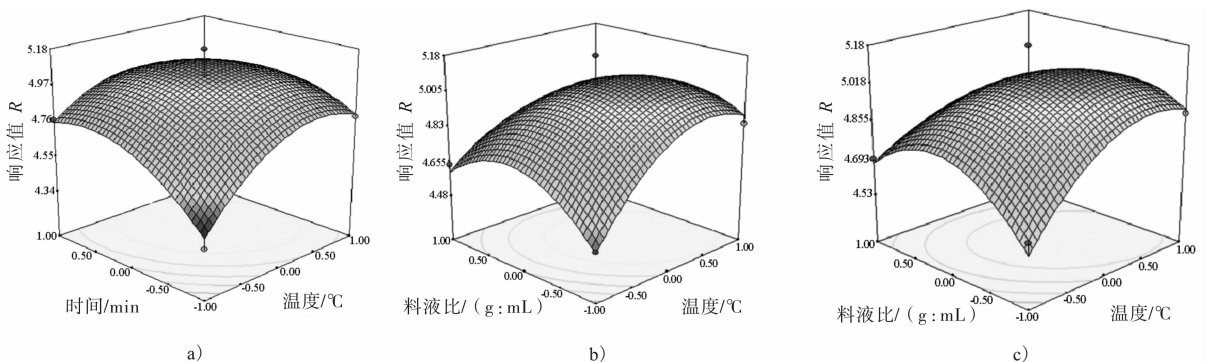


图 2 响应面立体图与等高线图

表4 2012年10种烟叶中SE的含量

样品	SE I	SE II	SE III	SE IV	SE V	$\mu\text{g/g}$
混合香料烟	63.14	190.21	572.52	889.78	741.46	
津巴布韦 L ₂₀ A	19.13	62.32	—	1.61	—	
赞比亚 L ₁ LA	6.23	20.26	—	1.32	—	
玉溪 1YC ₂ F	31.16	117.98	—	8.16	—	
楚雄 KC ₂ F	40.02	141.88	—	9.66	—	
大理南涧红大 HCOA ₂ /S	23.38	110.82	—	5.23	—	
师宗 K326 CF—3	17.98	70.41	—	6.68	—	
红河 CF—3	30.11	131.12	—	7.63	—	
文山 C3F	36.23	151.11	—	8.45	—	
湖南郴州 CF—3—2	28.03	118.98	—	6.86	—	

注:“—”表示未检出。

3 结论

本文以气相色谱-质谱(GC-MS)法作为分析手段,采用响应面法考察了萃取溶剂、温度、时间和料液比等因素对萃取SE的影响,得出如下结论。

1)采用响应面分析法对烟叶中蔗糖酯的超声波萃取工艺进行了研究,得到的最佳萃取条件为:以乙腈为萃取溶剂,料液比为1:29,萃取温度为43℃,时间16 min。

2)本方法的平均回收率为99.87%, $RSD < 2.9\%$,表明本文方法具有较高的准确度和精密度。

3)对10种烟叶样品测定的结果表明,烟叶中SE的种类和含量因产地、品种、等级的不同而有所不同:香料烟中SE种类多(鉴定出5组)且含量较高;烤烟中鉴定出3组SE,其含量明显低于香料烟。

参考文献:

- [1] Severson R F, Arrendale R F, Chortyk O T, et al. Isolation and characterization of the sucrose esters of the cuticular waxes of green tobacco leaf[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33(5):870.
- [2] Schlotzbauer W S, Severson R F, Martin R M. The contribution of sucrose esters to tobacco smoke composition[J]. Beitr Tabakfor Int, 1986, 13(5):229.
- [3] 曾世通,李鹏,胡军.低级脂肪酸多元醇混合酯的合成及其在烟草中的加香评价[J].烟草科技, 2009(3):33.
- [4] 孔光辉,王伟,崔国民.烤烟烟叶腺毛及其分泌物研究进展[J].烟草农业科学, 2006, 2(3):235.
- [5] Severson R F, Johnson A W, Jackson D M, et al. Cuticular constituents of tobacco: Factors affecting their production

and their role in insect and disease resistance and smoke quality[J]. Recent Advances in Tobacco Science, 1985(11):105.

- [6] Toshiake M, Koushi, Akira K. Germination and growth inhibition of surface lipids from nicotine species and identification of sucrose esters[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 52(8):1889.
- [7] Daniel H J. Biological activity of acyl glucose esters from *Datura wrightii* glandular trichomes against three native insect herbivores[J]. Chemical Ecology, 2005(31):1475.
- [8] Breda S, Marija S, Irena V. Analysis of sucrose esters-insecticides from the surface of tobacco plant leaves[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1127:273.
- [9] Noel W, Einolf, Geoffrey C W. Estimation of sucrose esters in tobacco by direct chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984(32):785.
- [10] 蔡莉莉,谢复炜,谢剑平.香料烟中蔗糖酯的气相色谱/质谱分析[J].烟草科技, 2009(3):40.
- [11] Li D, Xie F, Zhao M, et al. Rapid quantification of sucrose esters in oriental tobacco by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2007(30):35.
- [12] Mashraf K, Taylor L T, Nazem N, et al. Isolation of tetra-acyl sucrose esters from Turkish tobacco using supercritical fluid CO₂ and comparison with conventional solvent extraction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005(53):1866.
- [13] 郭青,林文强,牟定荣,等.超声波萃取技术在烟草成分分离中的应用研究综述[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2011, 26(5):96.