

烟梗中木质素的分子量分析

孙瑞琪¹, 任梦梦¹, 熊骏威², 王军^{1*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 上海烟草集团有限公司技术中心, 上海 201315)

摘要 [目的] 建立烟梗中木质素分子量的分析方法, 为评价烟梗品质以及优化加工工艺提供参考方法。[方法] 从烟梗中分离、提取得到木质素, 经 DMAC 高温活化后, 选用 LiCl/DMAC 溶剂体系进行溶解, 通过优化凝胶渗透色谱(GPC)条件后进行分析。[结果] 优化后 GPC 分析条件为样品浓度 2.0 mg/mL、柱温 60 ℃、流速 0.8 mL/min, 流动相为 0.5% (*w:v*) LiCl/DMAC 溶剂; 在优化的 GPC 条件下, 利用标准品 PS 对系统校正, 测得的烟梗木质素的分子量为 $10^3 \sim 10^4$ Da, 重均分子量(*M_w*)为 8 064 Da。[结论] 根据该研究中建立的方法, 利用 LiCl/DMAC 溶剂体系, 可以解决烟梗中木质素的结构复杂、难溶解造成分子量不易测定的问题, 因此利用 LiCl/DMAC 溶剂体系能有效地测定烟梗中木质素的分子量。

关键词 烟梗; 木质素; 分子量; 凝胶渗透色谱; LiCl/DMAC 溶剂

中图分类号 TS 42 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)20-0180-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.047



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analysis of the Molecular Weight of Lignin in Tobacco Stem

SUN Rui-qi¹, REN Meng-meng¹, XIONG Jun-wei² et al (1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083; 2. Technology Center of Shanghai Tobacco Group Co., Ltd., Shanghai 201315)

Abstract [Objective] To establish an analytical method for the molecular weight of lignin in tobacco stems, and provide a reference method for evaluating tobacco stem quality and optimizing processing technology. [Method] The lignin was separated and extracted from tobacco stems. After being activated by DMAC at high temperature, the LiCl/DMAC solvent system was selected for dissolution, and the gel permeation chromatography (GPC) conditions were optimized for analysis. [Result] The optimized GPC analysis conditions were: sample concentration was 2.0 mg/mL, column temperature was 60 ℃, flow rate was 0.8 mL/min, mobile phase was 0.5% (*w:v*) LiCl/DMAC solvent; under optimized GPC conditions, using standard PS to calibrate the system, the measured molecular weight of tobacco stem lignin was $10^3 \sim 10^4$ Da, and the weight average molecular weight (*M_w*) was 8 064 Da. [Conclusion] According to the method established in the article, the use of LiCl/DMAC solvent system can solve the problem that the structure of lignin in tobacco stems is complex and difficult to dissolve, which makes it difficult to determine the molecular weight. Therefore, the use of LiCl/DMAC solvent system can effectively determine the molecular weight of lignin in tobacco stems.

Key words Tobacco stem; Lignin; Molecular weight; Gel permeation chromatography (GPC); LiCl/DMAC solvent

烟草是一年生草本植物, 属茄科(Solanaceas)烟草属(*Nicotiana*)。烟梗即烟草叶片的粗硬叶脉, 占整个烟叶重量的 25% 左右^[1], 作为烟叶的一部分, 主要起支撑叶片的作用。烟梗中木质素的平均含量约为 8%, 其分子聚合度较大, 燃烧热裂解性能较差^[2], 热裂解后会产生苯酚、邻苯二酚、烷基儿茶酚等物质, 这些酚类化合物不仅会引起涩口, 而且对健康有害^[3]。烟梗中木质素的聚合度及分子量是影响木质素高温条件下裂解的重要因素^[4], 会影响燃吸品质, 因此, 除了研究木质素的含量, 还需要分析木质素分子量的大小, 才能够有效地评价烟梗的品质。

目前用来测定分子量分布的方法主要有质谱法、凝胶渗透色谱法、光散射法、蒸汽压渗透法、超滤法等。其中凝胶渗透色谱(GPC)法是目前分子量测定最常用的方法, 其分离原理是基于分子体积大小不同而对不同分子量的样品进行分离和测定^[5-7]。但由于烟梗中木质素分子的溶解度较差, 影响分子量的准确测定。目前常用四氢呋喃(THF)作为溶剂溶解木质素, 但木质素在溶解前需要进行烦琐的提取及衍生化处理以提高溶解性。衍生化的方法有乙酰化、甲基化、硅

烷化等^[8], 但这些方法操作复杂, 溶解性改善有限, 导致测定误差较大^[9], 应用受到限制。LiCl/DMAC(氯化锂/二甲基乙酰胺)体系中, LiCl 溶解在 DMAC 中形成大阳离子[Li(DMAC)]⁺和游离的 Cl⁻, 这样能够有效地打开原晶区的氢键网络, 使氢键等相互作用发生断裂, 分子链变得较为松弛, 易溶于溶剂中^[10-12], 更容易与紧密排列的结晶区接触, 增加大分子的溶解度^[13-15]。因此, 该研究利用 LiCl/DMAC 溶剂体系活化木质素分子, 对木质素的分子量及其分布进行研究。

1 材料与方法

1.1 试材 烤烟烟梗(湖南短梗)。超纯水(去离子水经过 Milli-Q 超纯水仪制的, 18.2 MΩ·cm); 二甲基乙酰胺(DMAC)、无水氯化锂(色谱级, 北京百灵威科技有限公司); 吡啶(分析纯, 北京百灵威科技有限公司); α-淀粉酶、糖化酶(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 脱碱木质素(分析纯, 北京百灵威科技有限公司)。

1.2 仪器 Agilent 1260 凝胶渗透色谱仪(配置示差折光检测器、光散射检测器, 安捷伦科技有限公司); GPC 分离柱[重均分子量(*M_w*) 200~3 000 000 Da, PLgel MIXED-C 5 μm, 7.5 mm×300 mm, 安捷伦科技有限公司]; 万分之一天平(BS200S-WEI, 德国 Sartorius 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 烟梗样品前处理。

1.3.1.1 去除脂溶性物质。烟梗经冷冻干燥除去水分, 经高

基金项目 烟草行业卷烟烟气重点实验室(上海烟草集团)基金项目(20183100001-41227)。

作者简介 孙瑞琪(1997—), 女, 山东济南人, 博士研究生, 研究方向: 食品与烟草化学。*通信作者, 副教授, 博士, 博士生导师, 从事食品与烟草化学研究。

收稿日期 2021-11-22

速粉碎机打碎呈粉末状,过 60 目筛;称取 1.0 g 左右的粉状样品,加入 25 mL 乙酸乙酯超声 30 min,离心(4 000 r/min, 5 min),所得沉淀物再利用上述方法第二次超声处理。

1.3.1.2 乙醇超声提取去除可溶性糖、色素及酚类物质等。向“1.3.1.1”沉淀中加入 25 mL 的 85% 乙醇超声 30 min (2 遍),离心(4 000 r/min, 5 min),滤渣用冷水反复洗涤,向上清液中加入 DNS 试剂,沸水浴共热 5 min 后,根据是否显色判断滤渣中可溶性糖是否去除完全。

1.3.1.3 α -淀粉酶、糖化酶酶解去除淀粉大分子物质。向“1.3.1.2”滤渣中加入 40 mL pH=6 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液及 2 000 U/g 的 α -淀粉酶,60 °C 恒温水浴水解 2.5 h;之后加入 40 mL pH=4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液及 10 000 U/g 的糖化酶,60 °C 恒温水浴水解 1.5 h,离心(4 000 r/min, 5 min),滤渣用冷水反复洗涤。

1.3.1.4 纤维素酶、果胶酶、蛋白酶酶解去除纤维素、果胶、蛋白质等大分子物质。向“1.3.1.3”滤渣中加入 40 mL pH=4.7 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,分别加入纤维素酶、果胶酶、蛋白酶(用量分别为 150、5 000、5 000 U/g),摇匀后置于恒温振荡培养箱中,在 45 °C (90 r/min) 条件下酶解 10 h;酶解后,将酶解液离心(4 000 r/min, 5 min),滤渣用冷水反复洗涤。

1.3.2 烟梗中木质素的提取。向“1.3.1.4”滤渣中加入 25 mL NaOH/尿素溶液,其中 NaOH 的质量分数是 8%,尿素的质量分数是 12%;在 -10 °C 下搅拌 30 min,然后离心分离,得到下层滤渣。向滤渣中加入 20 mL 质量分数为 17.5% 的硫酸溶液,在 100 °C 下搅拌反应 30 min,离心分离,得到上层清液和下层滤渣。用纯水洗涤下层滤渣至中性,再用丙酮洗涤 3 次,然后放在 50 °C 的烘箱中干燥 20 min;再加入 25 mL NaOH/尿素溶液,其中 NaOH 的质量分数是 8%,尿素的质量分数是 12%;在 -10 °C 下搅拌 30 min,然后离心分离,将滤渣进行冷冻干燥,即得到提取的烟梗木质素。

1.3.3 烟梗木质素的活化。称取 50 mg 提取的木质素于玻璃瓶中,加入 10 mL 的 DMAC 溶液,在 150 °C 油浴中加热 2 h 活化木质素,离心后得到滤渣。

1.3.4 烟梗木质素的溶解。加入适量的无水 LiCl 在 10 mL DMAC 中,使得 LiCl 浓度为 8% (w/v),待 LiCl 完全溶解后,加至活化后的木质素滤渣中,100 °C 加热搅拌 2 h,降温至 50 °C,搅拌 24 h,室温放置一段时间后,用 DMAC 稀释定容至 25 mL 容量瓶中,待用。

1.3.5 烟梗木质素分子量的测定。

1.3.5.1 溶液配制。

(1) 样品溶液。分别称取 25、50 mg 提取的木质素,按照“1.3.3”和“1.3.4”方法将其活化、溶解,定容至 25 mL 容量瓶中,制得浓度为 1.0、2.0 mg/mL 的样品溶液,备用。

(2) 流动相。称取一定量的无水 LiCl 加至 DMAC 溶液中配制成 0.5% (w/v) LiCl/DMAC 溶液,待其完全溶解后,使用溶剂过滤器过滤 3 次,滤膜采用 0.22 μ m 的有机膜,每次过滤均需重新更换滤膜。

(3) 标准品溶液。因聚苯乙烯(PS)含有苯环,结构与木

质素更相近,所以选择 PS 作为标准品。准确称取 0.020 0 g 的 PS 标准品,加入流动相使其完全溶解,将其定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,制得 2.0 mg/mL 的标准品溶液。

1.3.5.2 凝胶渗透色谱分析(GPC 检测)。分别将“1.3.5.1”样品溶液及标准品溶液用 0.45 μ m 的有机膜过滤,之后进行 GPC 分析。标准品聚乙烯的比折光指数增量 (dn/dc) 为 0.152,重均分子量 (Mw) 为 114 200 Da,相对于水的折光率为 0.041。GPC 检测条件:流动相 0.5% (w/v) LiCl/DMAC 溶液,进样量 50 μ L,样品浓度 2.0 mg/mL,激光相对能量 (LS) 100%,柱温 60 °C,示差折光检测器 (RI) 温度 40 °C,流速 0.8 mL/min,分析时间 20 min。

2 结果与分析

2.1 烟梗木质素 GPC 分析条件的优化

2.1.1 样品浓度的优化。在其他条件不变的情况下(流速 0.8 mL/min、柱温 60 °C、LS 100%),按照“1.3.5”方法,考察不同样品浓度(1.0、2.0 mg/mL)对 GPC 分析的影响,结果如图 1 所示。

样品浓度对色谱峰响应值影响较大,一般样品浓度越大,峰响应越好。由图 1 可知,当样品浓度由 1.0 mg/mL 增至 2.0 mg/mL 时,LS 90°响应值显著增强,原因在于 LS 检测器是利用物质微粒(包括分子)对光的散射作用来进行分析的,其响应值与分子量和浓度线性相关,当浓度较高时响应值较大,有助于分子量的分析;但样品浓度过高会超过色谱柱有效分离样品的承载能力,影响色谱柱的柱效,导致对称的色谱峰变形。该研究中样品浓度为 2.0 mg/mL 时测定效果达到了需求,综上所述选择样品浓度 2.0 mg/mL 进行分析。

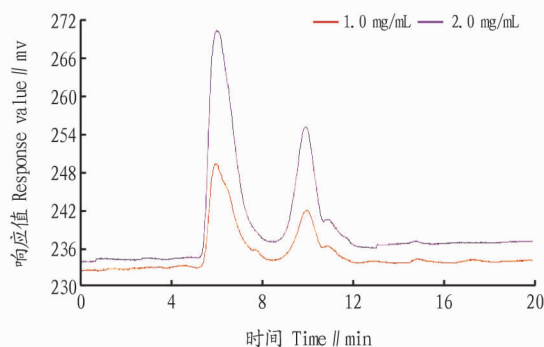


图 1 不同样品浓度条件下 LS 90° 色谱图

Fig.1 Chromatograms of LS 90° under different sample concentrations

2.1.2 流速的选择。在其他条件不变的情况下(样品浓度 2.0 mg/mL、LS 100%、柱温 50 °C),考察不同流速(0.6、0.8、1.0 mL/min)对 GPC 分析的影响,结果如图 2~3 所示。

由图 2~3 可知,当流速为 0.6 mL/min 时,峰形较宽,保留时间较长,峰形拖尾明显;当流速为 1.0 mL/min 时,峰形较窄,柱压较高;流速为 0.8 mL/min 时,峰形较好,且柱压和保留时间合适,所以确定流速为 0.8 mL/min。

2.1.3 柱温的选择。在其他条件不变的情况下(流速 0.8 mL/min、样品浓度 2.0 mg/mL、LS 100%),按照“1.3.5”方法,考察不同柱温(50、60、70 °C)对 GPC 分析的影响,结果如

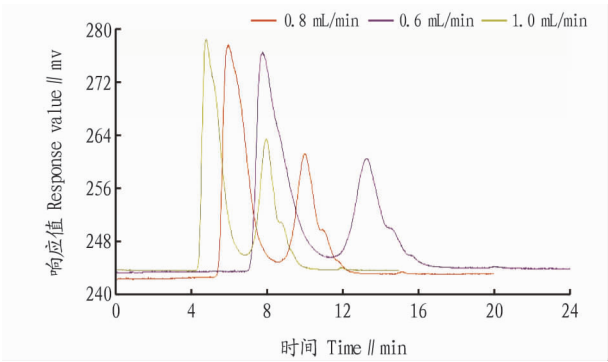


图 2 不同流速条件下 LS 90° 色谱图

Fig.2 Chromatograms of LS 90° under different flow rates

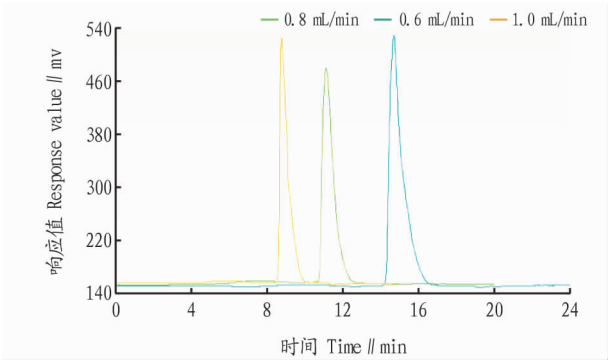


图 3 不同流速条件下 RI 色谱图

Fig.3 Chromatograms of RI under different flow rates

图 4 所示。

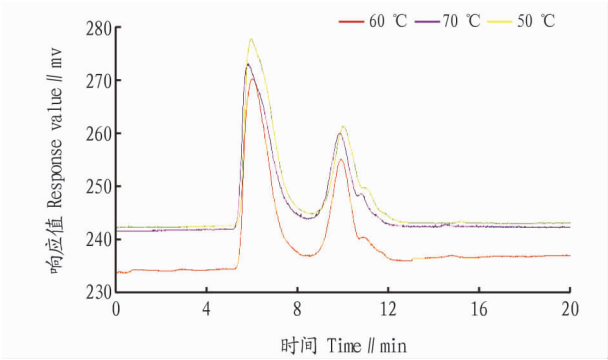


图 4 不同柱温条件下 LS 90° 色谱图

Fig.4 Chromatograms of LS 90° under different column temperature

柱温对柱压力及峰响应值影响较大。当温度较低时,流动相黏度较大,柱压力较大,不利于流动相通过色谱柱,影响分离效果;当温度较高时,虽然流动相的黏度明显降低,但温度升高,目标物的折光指数显著降低,检测灵敏度较差,且容易造成柱流失,对色谱柱填料不利。从图 4 可以看出,当柱温为 50 °C 时,温度较低,分离效果欠佳;当柱温为 70 °C 时,响应值较低;而当柱温为 60 °C 时,峰基线平稳,峰形较好,灵敏度良好,最终选择柱温 60 °C 为分析条件。

2.2 烟梗木质素分子量分析 在优化的 GPC 参数条件下,利用标准品聚苯乙烯对系统进行校正,结合 RI 与 LS 90°、LS 15° 检测器,测定烟梗木质素的分子量,标准品及样品色谱图分别如图 5~6 所示。烟梗木质素分子量分布及各分子量计

算结果如图 7 所示。

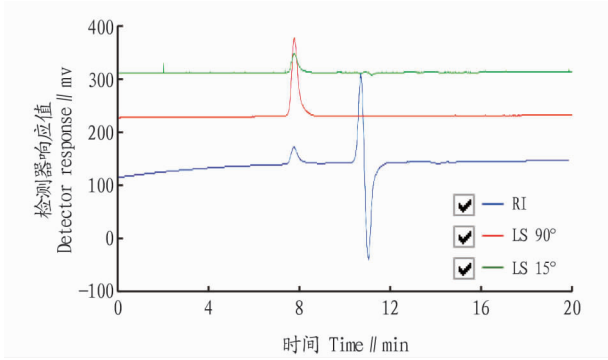


图 5 聚苯乙烯 (PS) 标准品的色谱图

Fig.5 Chromatograms of polystyrene (PS) standards

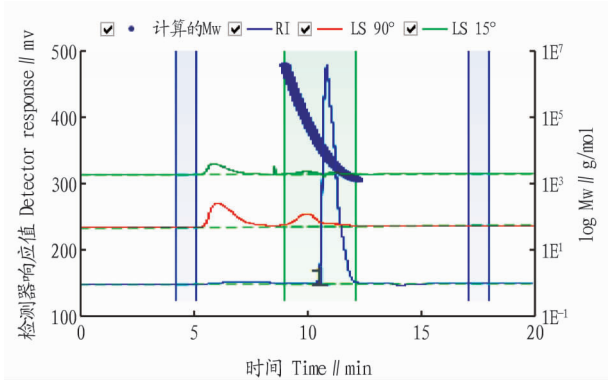


图 6 烟梗木质素的色谱图

Fig.6 Chromatogram of lignin in tobacco stem

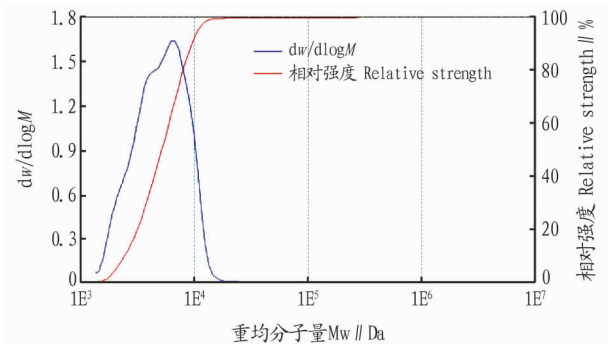


图 7 烟梗木质素的分子量分布

Fig.7 The molecular weight distribution of lignin in tobacco stem

通过图 7 的数据计算,得到烟梗木质素的 M_w 为 8 064 Da,烟梗木质素分子量集中分布在 $10^3 \sim 10^4$ Da。由图 6 可知,样品在 RI 中的保留时间比在 LS 中的保留时间更长,样品 RI 与 LS 出峰时间并没有像标准品那样更相近。原因在于 LS 响应与浓度及分子量有关,而 RI 响应仅与浓度有关,当使用标准品校正时,其分子量较均匀且为定值,相当于此时 LS 也仅与浓度有关,因此标准品的 RI 及 LS 峰形能对应。但是样品木质素的分子量分布较宽,有高分子量部分和低分子量部分,LS 此时与浓度和分子量都相关,这就造成 LS 与 RI 中色谱峰不能完全对应。这种差异可以为分子量分布提供分析手段。

经过上述研究发现烟梗木质素活化处理后可以溶解在

(下转第 217 页)

方案、教学方案设计上下功夫,研发农业物流新技术、新系统,开设农业物流信息方面的课程,主动融入学科竞赛有关的知识点,增强学科竞赛的知识储备。5 项竞赛主办方可结合农业物流信息人才需求,把握人才发展方向,在竞赛方案制定上主动求变,不断优化调整,在大选题范围内适当增加农业物流信息及技术应用的方向,能起到直接培养农业物流信息人才的作用。

3.3 引入优质外部资源全程参与竞赛 研究结果显示,在农业生产、农资供应、农产品销售 3 个环节都有少部分物流信息化程度较高的主体,甚至在农资供应商的上游农资生产企业信息化技术水平更高,这些主体发展对农业物流信息人才培养有一定的引领作用,对与农业物流信息人才培养相关的 5 项竞赛来说皆是优质的外部资源。竞赛主办方务必重视引入这部分资源,具体可邀请他们参与竞赛主题制定,甚至应主体需要设置一些竞赛专题,作为企业导师身份参与指导竞赛队伍,甚至担任竞赛评委等,促进产学研实质性合作。

3.4 推动优秀竞赛成果转化 总结近 4 年全国高校“创意、创新、创业”电子商务挑战赛省级赛和“互联网+”大学生创新创业大赛省赛的竞赛,结果显示虽然大多数的参赛队伍止步于校级选拔赛,但也有部分队伍进入省赛,甚至有 1 支队伍进入国赛并获奖。分析国赛获奖队伍的项目计划书,选题都是来自“三农”方面,参赛项目都蕴含着现有的产学研合作的成果,在此基础先进行一定程度的创新,从而将当前成果提炼到更高的水平。推而广之,从众多参赛作品中提炼筛选出优秀的竞赛成果,再转化为实际的社会应用,不仅体现农业物流信息人才培养的成效,同样对未来农业发展有极强的

示范引领作用。

参考文献

- [1] 新华社,中共中央 国务院关于全面推进乡村振兴加快农业农村现代化的意见[EB/OL].(2021-02-21)[2021-07-15].http://www.xinhuanet.com/2021-02/21/c_1127122068.htm.
- [2] 石军刚.农业物流人才开发的紧迫性及途径分析:基于新农村建设视角[J].广东农业科学,2009,36(11):262-264.
- [3] 方政,黄世祥.农业信息人才培养策略[J].农村经济,2009(12):120-122.
- [4] 商务部,中央农办,发展改革委,等.商务部等 17 部门关于加强县域商业体系建设 促进农村消费的意见[EB/OL].(2021-06-11)[2021-07-15].<http://www.mofcom.gov.cn/article/b/d/202106/20210603070393.shtml>.
- [5] 陈艳.信息化建设促进我国现代农业物流发展的措施探究[J].南方农业,2019,13(27):87-88.
- [6] 马福晶.基于 Web 的农业物流信息化的研究[J].农业网络信息,2008(2):63-65,68.
- [7] 朱蔓莉,周明.基于构件的农业物流信息化研究[J].安徽农业科学,2008,36(29):12976-12978.
- [8] 刘红.我国中部地区农村信息化水平综合评价研究[J].农村经济与科技,2021,32(7):237-240.
- [9] 申媛媛,邬锦雯,刘鑫东.基于 CART 决策树回归的乡村信息化水平测度模型研究[J].科技管理研究,2020,40(14):91-98.
- [10] 梁雯,司俊芳.安徽省农村物流发展问题研究:基于灰色关联分析法[J].东北农业大学学报(社会科学版),2017,15(4):85-90.
- [11] 刘德军,张广胜.现代农产品物流信息化及技术现状分析[J].安徽农业科学,2009,37(12):5701-5703.
- [12] 舒辉,胡毅.基于扎根理论的农业物流生态圈协同影响因素分析[J].中国流通经济,2020,34(1):30-41.
- [13] 李学兰.基于“互联网+”农业物流电子商务发展路径:以安徽为例[J].集宁师范学院学报,2017,39(3):65-68.
- [14] 史健.论安徽现代农业物流体系的建设[J].中国农学通报,2007,23(2):485-488.
- [15] 姜阔,李玉华.我国现代农业物流发展模式与评价指标体系的构建[J].物流技术,2014,33(1):51-53,118.
- [16] 赵跃华.现代物流管理概论[M].北京:北京大学出版社,2015:188-192.

(上接第 182 页)

LiCl/DMAC 溶剂体系中,且检测器测到的色谱图峰形较好,基线平稳,响应值较强,因此可以利用 LiCl/DMAC 溶剂体系测定木质素的分子量。

3 结论

从烟梗中分离提取获得的木质素经 DMAC 高温活化后,选用 LiCl/DMAC 体系进行溶解,烟梗木质素分子量采用 GPC 分析,通过优化最终确定样品浓度为 2.0 mg/mL,柱温为 60 ℃,流速为 0.8 mL/min,流动相为 0.5% (*w:v*) LiCl/DMAC 溶剂;在优化的 GPC 条件下,利用标准品 PS 对系统校正,测得的烟梗木质素的分子量为 $10^3 \sim 10^4$ Da, *M_w* 为 8 064 Da。该方法为测定烟梗中木质素分子量提供了参考。

参考文献

- [1] 黄志强,包秀萍,高锐.烟梗及其制品提质处理的研究进展[J].河南农业科学,2013,42(10):1-3.
- [2] 易聪华,张素文,冀唯妮,等.酸碱法脱除烟梗中木质素降低烟气有害成分[J].华南理工大学学报(自然科学版),2016,44(6):21-26.
- [3] 邓宇.烟叶中木质素的测定、裂解和降解研究[D].无锡:江南大学,2006:2-3.
- [4] 胡文冉,范玲,李晓荣,等.棉花纤维中木质素的相对分子量[J].作物学报,2017,43(6):940-944.

- [5] 吴扬兰,王远亮,徐世荣,等.GPC-RI-MALLS 技术测定羟乙基淀粉的分子量及分子量分布[J].重庆大学学报(自然科学版),2007,30(7):121-123,129.
- [6] 仲宣惟,黄清泉,奚廷斐.多角度激光光散射检测器和示差折光检测器联用测定壳聚糖分子量及分子量分布[J].药物分析杂志,2006,26(9):1258-1260.
- [7] 阙微娜,滕艳坤,杨宏伟.高效体积排阻色谱-示差折光检测器-多角激光光散射仪联用测定右旋糖酐 70 原料药的分子质量[J].中国药房,2014,25(9):843-845.
- [8] RASHID T, KAIT C F, MURUGESAN T. Effect of temperature on molecular weight distribution of pyridinium acetate treated kraft lignin[J]. Procedia engineering, 2016, 148: 1363-1368.
- [9] 李浩,邓永红,邱学青.乙酰化处理对碱木质素在四氢呋喃中微结构的影响[J].物理化学学报,2015,31(1):128-136.
- [10] 卢艳丽,姚桂芬.用于纤维素分子量分布检测的一种新型 GPC 溶剂[J].国外纺织技术(纺织针织服装化纤染整),2002(10):23-25.
- [11] 张慧慧,邵惠丽,胡学超.纤维素在 LiCl/DMAc 中的 GPC 研究的现状及进展[J].合成纤维,2004,33(5):27-29.
- [12] 李状,石锦志,廖兵,等.LiCl/DMAc 体系对蔗渣的溶解性[J].化工进展,2010,29(9):1634-1639.
- [13] 李状,石锦志,廖兵,等.纤维素/LiCl/DMAc 溶液体系的研究与应用[J].高分子通报,2010(10):53-59.
- [14] 王红乐,傅英娟,邵志勇,等.预处理对纤维素在氯化锂/N,N-二甲基乙酰胺体系中溶解行为的影响[J].纸和造纸,2014,33(2):31-35.
- [15] 郭静,黄文飞,王金香,等.碱处理棉纤维结构及其在 LiCl/DMAc 中的溶解特性[J].大连工业大学学报,2011,30(4):270-273.