

烟叶中淀粉含量测定方法的比较

何其芳^{1,2}, 李荣华¹, 郭培国¹, 宁正祥², 邱妙文³, 赵伟才³

(1. 广州大学生命科学学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

(3. 广东省烟草公司南雄科学研究所, 广东南雄 512400)

摘要: 分别研究了烟叶中检测淀粉含量的三种方法, 通过相对标准偏差和回收率的对比对三种检测方法进行了分析。结果显示: 酸解法的相对标准偏差为 2.26%, 回收率为 107.86%; 碘显色法的相对标准偏差为 1.0397%, 回收率为 98.45%; 高氯酸萃取-连续流动法的相对标准偏差为 1.33%, 回收率为 98.63%。酸解法的检测结果的精密准确度明显不如其它两种, 碘显色和连续流动法的精密准确度则比较接近, 且都较适合烟叶中淀粉含量的检测, 适合广泛应用。

关键词: 烟叶; 淀粉; 酸解法; 碘显色法; 连续流动法

文章编号: 1673-9078(2012)2-229-232

Comparison of Detection Methods for Starch in Tobacco

HE Qi-fang^{1,2}, LI Rong-hua¹, GUO Pei-guo¹, NING Zheng-xiang², QIU Miao-wen³, ZHAO Wei-cai³

(1. College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 51006, China)

(2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(3. Graduate School of Tobacco in Nanxiong, Nanxiong 512400, China)

Abstract: Three detecting methods for starch in tobacco were compared by parallel test and standard recovery. Results showed relative standard deviation and the recoveries of starch of the acid hydrolyzation was 2.26% and 107.86%, respectively. Those of the iodine coloration methods were 1.0397% and 98.45%, respectively. For continuous flow methods, the relative standard deviation and recoveries of starch were 1.33% and 98.63%, respectively. The accuracy of acid hydrolyzation was worse than the other two methods. The accuracy of iodine coloration was close to the continuous, thus both of the two methods can be adapt to detect starch in tobacco.

Key words: tobacco; starch; acid hydrolyzation; iodine coloration; continuous flow method

烟草是我国最主要的经济作物之一, 在我国国民经济中占有举足轻重的地位。淀粉是烟叶中的一类重要的碳水化合物, 也是烟叶干物质中的主要组成部分, 新鲜烟叶中的淀粉含量很高, 在个别品种中甚至高达 40%^[1]。在烟叶的烘烤过程中, 大部分的淀粉会降为还原糖, 淀粉含量降低。烟草行业中要求调制后的烟叶淀粉含量小于 3.5%, 过多的淀粉会对吸用烟叶的内在质量和烟气产生不良影响, 但淀粉在烘烤过程中分解产生的单糖可使烟叶弹性好、吃味佳, 极大地改善了烟制品的抽吸口感和烟气对喉部刺激, 所以新鲜烟叶中也需要累积一定量的淀粉^[2-6]。因此测定烟叶中淀粉的含量对于监控烟叶内在质量和叶组配方的设计具有一定意义^[7]。

收稿日期: 2011-08-27

基金项目: 广东省烟草专卖局(公司)科技计划(200903、200905、201003);

中国烟草总公司面上项目(2010[99]18、2011[151]19)

作者简介: 何其芳(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事烟草化学方面研究

通讯作者: 郭培国(1963-), 男, 教授, 主要从事烟草分子生物学和分子育

种的教学与研究

目前在烟草淀粉分析方法中比较常见的有酸解法^[8]、酶解法^[9]、碘显色法^[10,11]、液相色谱法^[12,13]和连续流动法^[7,14], 本文选取其中的酸解法、碘显色法和高氯酸萃取-连续流动法进行了比较, 旨在为建立烟草中淀粉含量测定的行业标准提供一些依据, 并且测定比较了 10 个烟草品种的烤制烟叶中淀粉的含量。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中的 10 个烟叶品种分别为: K399、K326、粤红一号、丰字 6 号、大白筋 599、红花大金元、NC82、NC89、G33、K346, 所有烟叶均采用三段式烘烤, 实验中检测的均为烘烤后的烟叶中淀粉的含量。

1.2 仪器与设备

AAIII 自动分析仪, 德国布朗卢比公司; EL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; PC1800 紫外分光光度计, 北京谱析通用; 恒温振荡器, 常州澳华仪器有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅, 广东原凯微生物科技有限公司; JB-2 型恒温磁力搅拌器,

上海雷磁仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 酸解法

葡萄糖标准溶液:精确称取 1.0000 g 干燥后的分析纯葡萄糖,移入 100 mL 容量瓶中,定容、摇匀后再取 10 mL 移入 100 mL 容量瓶中定容,即得到 0.001 g/mL 葡萄糖标准液。3,5-二硝基水杨酸显色剂采用许尧兴的方法^[15]配制。

分别取0.001 g/mL的葡萄糖标准溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL,置于具塞25 mL试管中,用蒸馏水补充至2.0 mL,加入3,5-二硝基水杨酸显色剂(DNS) 2.0 mL后在沸水中加热6 min,取出,用冷水冷却,加蒸馏水定容到25 mL,摇匀,静置10 min后用分光光度计(波长为540 nm)检测吸光度,根据得数作出葡萄糖的标准曲线: $Y=1.363X+0.021$,其中X代表溶液中葡萄糖的质量(单位为mg),Y代表吸光度,曲线在溶液中葡萄糖质量在0.01~1 mg的范围内 $R^2=0.998$ 。

准确称取磨碎的烟叶(过40目筛)0.2000 g于250 mL锥形瓶中,加入100 mL5%乙酸室温下振荡45 min后过滤,滤渣用蒸馏水转移到100 mL锥形瓶中,加入浓盐酸(体积比为5+4)9 mL,在沸水中水解2 h,再用NaOH溶液调至中性(指示剂为甲基红),转移到100 mL容量瓶中并定容。取定容后的液体2.0 mL加入2.0 mL DNS,采用与标准溶液相同的处理方法测得各样品的吸光度,由标准曲线查出其葡萄糖含量后再换算成淀粉含量。

1.3.2 碘显色法

碘-碘化钾溶液:精确称取0.5000 g I_2 和5.000 g KI于烧杯中,用蒸馏水溶解后转入到250 mL容量瓶中,定容。淀粉标准储备溶液根据李星亮^[10]和王洪波^[14]等的方法配制:分别精确称取0.1500 g直链淀粉和0.6000 g支链淀粉于烧杯中,用沸水完全溶解、冷却后,分别转入500 mL容量瓶中,定容摇匀后各取30 mL移入到同一个100 mL容量瓶中,定容后得到了淀粉混合标准溶液。

分别移取淀粉混合标准工作液0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 mL置于50 mL容量瓶中,加入5 mL 40%高氯酸溶液,用蒸馏水定容,再取10 mL定容后的溶液加1 mL碘-碘化钾溶液使其显色,选定600 nm为吸光波长,利用分光光度计检测。根据所测数值作出淀粉的标准曲线: $Y=0.221X-0.024$,其中其中X代表溶液中的溶液质量(单位为mg),Y代表吸光度值,曲线在溶液中溶液含量在0.045~0.45 mg的范围内 $R^2=0.999$ 。

准确称取磨碎的烟叶(过40目筛)0.2000 g置于具

塞三角瓶中,加入25 mL 80%的乙醇-氯化钠饱和溶液,50 °C条件下振荡20 min后过滤,再向滤渣中加入10 mL 40%高氯酸溶液,室温下振荡25 min,然后加入10 mL蒸馏水过滤,并将滤液置于100 mL容量瓶中,定容摇匀后即成待测液。取10 mL待测液加1 mL碘-碘化钾溶液使其显色,在600 nm测定吸光度,然后从工作曲线上查出对应的含量。

1.3.3 高氯酸萃取-连续流动法

连续流动法根据采用的检测原理又可以继续细分,常见的种类主要有酶水解-连续流动法^[7]和高氯酸萃取-连续流动法^[14],实验中采用的是高氯酸萃取-连续流动法,其原理与碘显色法相同,均是检测碘与淀粉的络合物的吸光度,只是连续流动法将光度法自动化了^[14],因此相关溶液和待测液的制备方法与碘显色法相同,只是最后用自动分析仪代替分光光度计进行检测。

连续流动法测得的淀粉标准曲线为: $Y=0.246X+0.021$,其中X代表溶液中的溶液质量(单位为mg),Y代表吸光度值,曲线在溶液中溶液含量在0.045~0.45 mg的范围内 $R^2=0.999$ 。

2 结果与分析

2.1 酸解法条件的优化

烟叶本身便含有一定量的可溶性还原糖,其是否去除干净是影响水解法测定淀粉含量的关键因素^[8]。

表 1 5%乙酸体积和萃取时间对测定结果的影响

Table 1 The effect of volume of acetic acid (5%) and extraction time on the detection results

| 样品/g | 5%乙酸体积/mL | 振荡时间/min | 淀粉含量/% |
|--------|-----------|----------|-----------|
| 0.2004 | 50 | 30 | 5.69±0.18 |
| 0.2059 | 50 | 45 | 5.17±0.16 |
| 0.2003 | 50 | 60 | 4.97±0.13 |
| 0.2025 | 100 | 30 | 5.03±0.14 |
| 0.2014 | 100 | 45 | 4.74±0.11 |
| 0.2006 | 100 | 60 | 4.73±0.12 |
| 0.2032 | 150 | 30 | 4.83±0.14 |
| 0.2023 | 150 | 45 | 4.72±0.13 |
| 0.2016 | 150 | 60 | 4.73±0.12 |

常用来除去烟叶中还原糖的主要有 80%乙醇和 5%乙酸水溶液,从经济角度出发,本实验采用后者,并通过振荡萃取来去除烟叶中的还原糖,为了在保证可溶性还原糖去除干净的同时试剂和时间也消耗得最少本实验对乙酸的用量和振荡时间进行了两因素三水平的正交实验(表 1,正交试验中的材料为烘烤后的 K326,是从十个待测材料中随机抽取的,并且为了尽

量减少其它因素的影响,在碘显色法和连续流动法的优化过程中以及各检测方法重复性、回收率的测定实验中也采用它做为检测材料)。结果表明采用 100 mL 5%乙酸振荡 45 min 效果最好,试剂用量少且用时较短。为保证酸解过程进行完全,在酸化结束后取 1 滴水解液与碘液反应,观察是否显蓝色,最后确定用 9 mL 浓盐酸沸水中水解 2 h 能水解完全。

2.2 碘显色法和高氯酸萃取-连续流动法样品前处理条件的优化

碘显色法和高氯酸萃取-连续流动法的原理都是淀粉可与碘结合显蓝色,两者的区别在于后者将部分手动处理转变成了自动法、机械化,而两种方法的前处理过程是相同的^[14],因此可以用碘显色法做代表来进行条件优化,其优化结果可直接用到高氯酸萃取-连续流动法中。

烟叶中含有的植物色素和醌类等有色物质对这两种测定方法均有明显的干扰,为了测定结果的准确性要先去除这些干扰物质。A J Sensabaugh Jr等^[16]曾采用甲醇-氯化钠饱和溶液混合液水浴加热萃取法去除烟草中的干扰物质,本实验从安全性考虑决定用乙醇代替甲醇,在 50 °C 条件下振荡 20 min 以去除色素。

在高氯酸萃取法中较常用的有静置、搅拌、振荡和超声萃取,本实验以烘烤后的 K326 为原材料,分别用静置、搅拌和振荡这三种方法处理不同时间后测定吸光度,结果发现采用振荡法处理 25 min 最合适(表 2)。

表2 萃取方法和时间对测定结果的影响

Table 2 The effect of different methods and time on the detection results

| 萃取方法 | 萃取时间/min | 淀粉含量/% |
|------|----------|-----------|
| 静置 | 15 | 2.34±0.07 |
| | 20 | 2.51±0.06 |
| | 25 | 2.86±0.06 |
| 搅拌 | 15 | 2.63±0.06 |
| | 20 | 2.81±0.05 |
| | 25 | 2.94±0.04 |
| 振荡 | 15 | 2.78±0.04 |
| | 20 | 2.92±0.05 |
| | 25 | 3.05±0.04 |

2.3 三种方法的比较

按优化后的处理方法分别用酸解法、碘显色法和连续流动法对烘烤后的 K326 烟叶的淀粉含量平行测定 6 次,由表 3 可知,三种试验方法的重复性均较好,可满足测定烟草中淀粉含量的要求。而当中以碘显色法的效果最稳定,相对标准偏差(RSD%)仅为 1.0397。

称取已知含量的 K326 烟草样品各 3 份(每份均为 0.2 g 左右),采用标样加入法分别测定各方法的回收率。结果(表 3)表明碘显色法和连续流动法的回收率很接近都在 98% 左右,酸解法的回收率则大于 100%。

表 3 三种方法的比较

Table 3 The comparison of these three methods

| 检测方法 | 标准偏差 S/% | 相对标准偏差 RSD/% | 回收率/% |
|-------|----------|--------------|--------|
| 酸解法 | 0.1060 | 2.2601 | 107.86 |
| 碘显色法 | 0.0314 | 1.0397 | 98.45 |
| 连续流动法 | 0.0418 | 1.3312 | 98.63 |

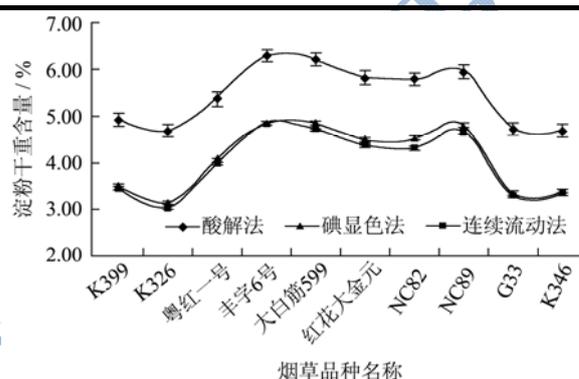


图 1 不同烟叶中淀粉的含量

Fig.1 The contents of starch in different tobacco leaves

从三种检测方法分别测定的 10 种供试烟叶的淀粉含量(图 1)观察可知:三种方法测定的结果存在一定的相关性,且呈现出良好的线性相关关系,但其中酸解法测定的结果总大于碘显色法和连续流动法,且酸解法与其它两种方法的比值分别在 127.62%~155.30% 和 123.91%~149.36% 之间,即它的测定结果与另外两种方法测定的结果存在不可忽略的偏差。而连续流动法测定的结果虽然也总是比碘显色法的结果略高,但两者的区别较小,比值仅在 105.34%~101.51% 之间,并且两组检测数据的正相关性很显著,相关系数高达 0.9981。

分析认为,三种检测方法表现以上规律是因为在酸解法中虽然在前处理中已尽量将还原糖等干扰物去掉,但在水解过程中存在的除淀粉外的高分子碳水化合物(如半纤维素、果胶)也会水解,从而影响测定结果。而在相同的前处理条件下,碘显色法的测定值比连续流动法的低,可能是因为连续流动法不能扣除样品背景吸收,但可以看出这两种方法的测定值和回收率的差异性并不明显,只是碘显色法的测定结果相对更加稳定。

3 结论

在这三种方法的对比中,酸解法和另外两种方法主要是对比两种不同的淀粉含量检测原理的优劣性,

而碘显色法和高氯酸萃取-连续流动法的比较主要是研究加入自动分析仪将光度法自动化后除了更加方便快捷外对测定结果的大小和稳定性是否有影响。从比较结果可知:酸解法中干扰比较多,难以避免,测定结果往往偏高,而且前处理过程也比较麻烦。而碘显色法和高氯酸萃取-连续流动法均重复性好,准确度较高,方法操作简单、方便,都符合烟草中淀粉含量的测定要求。同时这两种方法又各有特点,连续流动法减少了手工操作,检测速度加快,效率高,但此方法中使用的仪器比较昂贵,而碘显色法的测定结果、回收率与连续流动法都很接近,并且能扣除样品背景吸收的干扰,测定结果显得更加稳定,所以碘显色法更适合于一般实验室采用的较快捷准确的检测方法。因此可根据具体的实验要求和条件从碘显色法和连续流动法中选择适合的检测方法。

参考文献:

- [1] 尹启生,蔡宪杰,王信民,等.大田中后期烤烟淀粉酶活性及淀粉含量的变化[J].烟草科技,2006(9):55-58
- [2] Weeks W W. Chemistry of tobacco constituents influences flavor and aroma [J]. Rec Adv Tob Sci,1985, 11: 175-95
- [3] 魏玉磊.烟草中糖对主流烟气成分的影响研究[J].食品工业,2010(3):62-63
- [4] 罗志刚,曾满枝,凌晨,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定烟草中水溶性总糖[J].中国烟草科学,2000(2):34-36.
- [5] 周璐,陶红,沈光林,等.碱氧与酶处理改善梗丝性质的研究[J].现代食品科技,2010,6(5):463-465,485.
- [6] 陶红,沈光林,赵谋明,等.酶技术改善烟叶品质的研究进展[J].现代食品科技,2008,24(7):737-740,708
- [7] 廖胡纲,张世楠.酶水解-连续流动法测定烟草中的淀粉含量[J].中国烟草学报.2006,12(1):20-22
- [8] 尹建雄,卢红,谢强,等.3,5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J].云南农业大学学报,2007,22(6):829-833
- [9] MOHAPATRA S C. Comparison of methods for starch extraction and estimation [J]. CORESTA, 1988, 3: 71
- [10] 李星亮.烟草中淀粉含量测定[J].安徽农业科学,2010,38(15):7818-7819,7825
- [11] 张峻松,贾春晓,毛多斌,等.碘显色法测定烟草中的淀粉含量[J].烟草科技,2004(5):24-26
- [12] 董学畅,乔永峰,孙海林,等.高效液相色谱法测定烟草中的淀粉含量[J].云南民族大学学报(自然版),2003,12(4):210-211
- [13] 王岚,施红林,李忠,等.高效液相色谱法测定烟草中淀粉和果胶含量[J].理化检验-化学分册,2006(42):174-175,178
- [14] 王洪波,徐玉琼,王颖,等.高氯酸超声萃取-连续流动法测定烟草中的淀粉[J].烟草科技,2009(5):44-46
- [15] 许尧兴,姚晓红.两种测定程序对饲用 α -半乳糖苷酶活性检测结果的比较[J].浙江农业学报,2004,16(6):349-353
- [16] A J Sensabaugh Jr, Kenneth L Bush. Cobrimetric method for the determination of starch in tobacco [R]. R J Reynolds Industries, Inc