

高氯酸萃取-连续流动法测定 烟草中的淀粉含量^①

吴玉萍 邵岩^② 赵立红 邓建华 王东丹 宋春满

(云南省烟草科学研究所 云南省玉溪市聂耳路 47 号 653100)

摘要 淀粉是烟草中较难测定的成分之一。为了快速准确地测定烟草中的淀粉含量,研究了高氯酸萃取-连续流动法测定烟样中淀粉含量的方法,即每 0.1g 烟草样品用 1.0mL 50% 的乙醇和 1.2mL 72% 高氯酸萃取烟草样品中的淀粉,通过自动化学分析仪(滤光片波长 660nm)测定淀粉含量。采用本法测定了云南烤烟烟叶、杀青烟叶、白肋烟和香料烟的淀粉含量,平均回收率为 96.71%,相对标准偏差在 1.79%—5.58% 之间。与传统的酸解法和酶解法比较,本法操作步骤简单、检测成本低、快速准确。

关键词 淀粉, 高氯酸萃取, 连续流动法, 烟草。

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)03-0488-05

1 前言

淀粉是烟草中一类重要的碳水化合物,对烟叶色、香、味有不利影响,即影响烟叶的外观和内在品质;新鲜烟叶中淀粉含量很高,通过调制后大部分淀粉经酶解反应降解为还原糖。但调制后的烟叶仍残留一定量的淀粉,这对烟叶内在质量有不利的影响^[1,2]。因此,测定调制前后烟叶中的淀粉含量对于研究烟株生长情况和监控烟叶的内在质量有一定意义。由于淀粉的分离比较困难,长期以来淀粉被认为是较难测定的烟草组分之一,通常采用酸解或酶解后测定还原糖的方法测定烟叶中的淀粉含量,但这 2 种方法都不易除净烟叶组织中的还原糖,而且还会有除淀粉外的高分子碳水化合物(如半纤维素)的水解,造成较大的干扰,使结果往往偏高^[3]。用碘显色法测定淀粉含量已广泛用于淀粉酶活性的测定,也有用于食品(包括烟草)中淀粉的定量分析^[4],但其提取淀粉的方法是采用加热沸腾提取淀粉,用碘显色在分光光度计上比色测定淀粉含量,此方法也不够快速简便,本文用高氯酸氢键断开剂来选择性溶解淀粉分子,即用萃取法达到分离淀粉与非淀粉的目的。烟叶中萃取出来的淀粉与碘酸钾和碘化钾反应生成的碘进行碘显色,即用连续流动法测定烟草中的淀粉含量,建立了简便、快速、准确测定烟草淀粉的方法。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

(1) 材料: 云南烤烟、白肋烟、杀青烟叶、香料烟 4 种类型的烟叶由云南省烟草研究所提供。

(2) 仪器: API305D 自动化学分析仪(美国 API 公司); METTLER AG204 型电子天平(感量 0.1mg, 瑞士梅特勒/METTLER 公司)。

① 项目来源: 云南省烟草公司资助项目(05-17)

② 联系人, 电话: (0877) 2052442(办); (0877) 2056537; E-mail: ypwu@yntsti.com; shaoyan@yntsti.com

作者简介: 吴玉萍(1974-), 女, 云南省建水县人, 助理研究员, 从事光谱和色谱仪器分析工作。

收稿日期: 2005-12-13; 接受日期: 2005-12-20

(3) 试剂:可溶性淀粉为标准品,高氯酸、乙醇、碘化钾、碘酸钾、聚氧乙烯月桂醚(Brij-35)均为分析纯试剂。实验用水为蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

(1) B-水:在 1L 蒸馏水中加入 32 滴聚氧乙烯月桂醇醚(Brij-35, 30%)即可。

分别配制 0.1mol/L 高氯酸溶液、0.08mol/L 碘化钾溶液、0.00025mol/L 碘酸钾溶液 1L,并各加入 32 滴 Brij-35。

(2) 淀粉储备液 1mg/mL:称取 0.5g 可溶性淀粉,置于 250mL 烧杯中,一滴一滴地加入 5.4mL 72% 高氯酸,边加入边搅拌,加完 10min 后,转入 500mL 容量瓶中,用蒸馏水定容、摇匀备用。

2.2.2 样品处理条件实验

对样品处理过程中的 2 个影响因子高氯酸和乙醇的加入量进行了双因素交叉分组全面实验。2 个因素均设定 4 个实验水平,共进行了 16 个实验,每个实验 3 次重复。样品前处理的因素水平实验设计见表 1。

2.2.3 烟草样品处理

(1) 高氯酸萃取法:准确称取 40℃ 烘干并粉碎过 0.45mm 孔筛的烟草样品 0.1g 放入 50mL 烧杯中,加入 1.0mL 50% 的乙醇搅拌均匀,逐滴加入 1.2mL 72% 的高氯酸,并不断搅拌,加完后放置 10min,期间偶尔搅拌几次,然后移入 100mL 容量瓶中,用蒸馏水定容、摇匀、过滤,同时做一组空白。用自动化学分析仪检测。

(2) 酸解法:准确称取 40℃ 烘干并粉碎过 0.45mm 孔筛的烟草样品 0.5g,加入 5% 乙酸 50mL,振荡 30min,然后过滤,用水洗干净残渣,最后以约 38mL 的水将残渣洗入 60mL 的试管中,再加入 5mL 盐酸(5+4),在沸水中水解 2h 后,用碘液检验,直到没蓝色出现则表示烟样中的淀粉已经水解完全了,转入 100mL 的容量瓶中定容,过滤,同时做一组空白。按照行标 YC/T 159-2002 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法》检测淀粉水解后的还原糖含量,然后,换算出淀粉的含量。

2.2.4 校准曲线和样品检测

校准曲线标准液及样品提取液在连续流动仪上的测试流程见图 1。

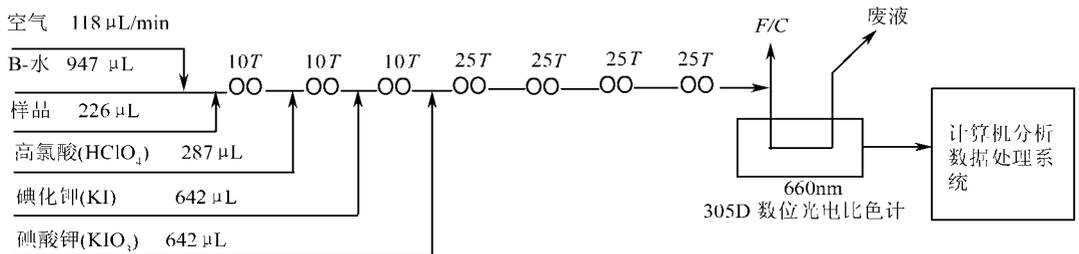


图 1 在连续流动仪上淀粉的测试流程图(T 表示混合圈匝数)

准确吸取 1mg/mL 淀粉标准储备溶液各 0.00、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、15.00、20.00mL,分别置于 100mL 容量瓶中,用高氯酸溶液(高氯酸:水 $V/V = 1.2:100$)定容,摇匀;即配成 0、10、20、40、60、80、100、150、200mg/L 的标准溶液。上仪器检测各淀粉标准溶液的吸光度。以

吸光度和淀粉浓度作图,得淀粉校准曲线,其线性回归方程为:

$$y = 0.00003114 + 0.0003811x - 0.00000013x^2, r = 0.99996$$

式中: y ——吸光度; x ——淀粉浓度(mg/L); 检出限: 0.45mg/L; 测定线性范围: 0—200mg/L。

3 结果与分析

3.1 样品处理的条件选择

不同提取条件下烟草淀粉测试结果见表 1; 对实验结果进行了方差分析, 结果见表 2, 由表 2 可看出, 烟草样品前处理实验中加入高氯酸的量和加入乙醇的量对淀粉的测定值的影响均达到极显著差异, 同时二者又存在着极显著的互作关系, 2 个实验因素的 4 个不同水平的 SSR 测试结果表明差异均为极显著(见表 3)。2 个因素不同水平的实验组合的淀粉测定结果的多重比较见表 4, 其中实验编号 6 和 16 处理与其他处理的测试结果差异达到了极显著水平, 测定结果最高说明这两个样品前处理方法淀粉溶解较完全, 而 6 和 16 处理间的差异不显著, 同时考虑实验 16 所用试剂较多, 故本方法选用编号 6 的实验条件, 即加入 1mL 乙醇和 1.2mL 高氯酸溶解烟草样品中的淀粉。

表 1 样品前处理的实验设计和测试结果

实验编号	条件组合	A HClO ₄		B Ethanol		测定值(%)		
		加入高氯酸的量(mL)		加入乙醇的量(mL)		1	2	3
1	A1B1	0.6		0.5		4.63	4.87	4.61
2	A1B2	0.6		1		3.99	3.87	3.69
3	A1B3	0.6		2		1.07	1.06	1.12
4	A1B4	0.6		3		0.21	0.27	0.26
5	A2B1	1.2		0.5		2.01	1.96	2.01
6	A2B2	1.2		1		5.04	4.95	5.12
7	A2B3	1.2		2		4.32	4.12	4.25
8	A2B4	1.2		3		1.79	1.65	1.69
9	A3B1	2.4		0.5		0.32	0.29	0.30
10	A3B2	2.4		1		1.06	0.93	1.01
11	A3B3	2.4		2		4.82	4.61	4.68
12	A3B4	2.4		3		4.20	4.09	4.11
13	A4B1	3.6		0.5		0.26	0.24	0.30
14	A4B2	3.6		1		0.42	0.43	0.45
15	A4B3	3.6		2		3.31	3.37	3.35
16	A4B4	3.6		3		5.09	4.93	4.82

表 2 方差分析表

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著水平
处理 A 间	3	6.6994	2.2331	327.8975	0.0000
处理 B 间	3	14.0732	4.6911	688.8079	0.0000
AXB 互作	9	142.6734	15.8526	2327.6996	0.0000
误差	32	0.2179	0.0068		
总变异	47	163.6639			

表 3 2 个因素 4 个水平间的 SSR 测试结果

处理 A 间 SSR 测试结果				处理 B 间 SSR 测试结果			
处理号	平均值	5% 显著水平	1% 显著水平	处理号	平均值	5% 显著水平	1% 显著水平
2	3.2425	<i>a</i>	<i>A</i>	3	3.3317	<i>a</i>	<i>A</i>
3	2.5350	<i>b</i>	<i>B</i>	4	2.7592	<i>b</i>	<i>B</i>
1	2.4625	<i>c</i>	<i>B</i>	2	2.5800	<i>c</i>	<i>C</i>
4	2.2475	<i>d</i>	<i>C</i>	1	1.8167	<i>d</i>	<i>D</i>

3.2 方法的精密度和酶、酸解法的比较

分别对 4 个不同类型的烟草样品,取 7 个同一烟叶样品,按上述条件进行测定(空白都检测不出来),结果见表 5,高氯酸萃取法的相对标准偏差为 1.79%—5.58%,酸解法的相对标准偏差 1.57%—6.25%,说明前者的精密度比后者好,该方法可以用于烟草中淀粉的定量分析。

3.3 方法回收率

采用标样加入法测定了淀粉的回收率,结果见表 6,表明淀粉的平均回收率为 96.71%,因此,认为本方法是可行的。

4 结论

建立了采用高氯酸萃取-连续流动法测定烟叶淀粉含量的方法,该方法通过加入 1mL 50% 的酒精和 1.2mL 72% 的高氯酸溶解烟草样品中的淀粉,并通过连续流动仪测定含量,方法的回收率在 90.52%—100.15% 之间,相对标准偏差在 1.79%—5.58% 之间,方法适于烟草中淀粉的定量分析。

表 4 AXB 交互 SSR 测试结果

处理号	平均值	5%显著水平	1%显著水平
6	5.0367	a	A
16	4.9467	a	A
1	4.7033	b	B
11	4.7033	b	B
7	4.2300	c	C
12	4.1333	c	C
2	3.8500	d	D
15	3.3433	e	E
5	1.9933	f	F
8	1.7100	g	G
3	1.0500	h	H
10	1.0000	h	H
14	0.4333	i	I
9	0.3033	ij	I
13	0.2667	j	I
4	0.2467	j	I

表 5 三种方法检测结果的比较

(n=7)

烟样	高氯酸萃取-连续流动法		酶解法	酸解法	
	平均值(%)	RSD(%)	平均值(%)	平均值(%)	RSD(%)
白肋烟 burley tobacco	0.16	5.58	0.11	1.31	6.25
烤烟 Flue-cured tobacco	4.72	4.21	4.25	5.05	5.16
香料烟 Oriental tobacco	5.51	2.21	5.44	6.22	1.96
杀青烟样 deenzymed tobacco	19.73	1.19	19.81	19.92	1.57

注:酶解法数据由红塔集团玉溪烟厂技术中心检测提供。

表 6 回收率试验结果

样品	样品中含量 (mg/L)	添加量 (mg/L)	测定量 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
白肋烟 burley tobacco	4.09	9.51	13.51	99.05	96.71
烤烟 Flue-cured tobacco	50.33	20.19	70.55	100.15	
香料烟 Oriental tobacco	57.03	50.31	105.89	97.12	
杀青烟样 deenzymed tobacco	193.32	50.31	238.86	90.52	

本方法采用高氯酸萃取连续流动法测定烟草样品中淀粉的含量,通过实验可以看出在样品的前处理过程中加入高氯酸和乙醇的数量和比例是影响淀粉溶解是否完全的关键因素。

采用高氯酸萃取连续流动法与传统的酸解、酶解法相比,高氯酸萃取连续流动法操作简便、快速,省去了很多繁琐的前处理步骤,如酸解、酶解法须排除烟草中可溶性糖的干扰、需要于恒温下水解 2h 等;酸解法可能将其他高分子碳水化合物(如半纤维素等)水解,检测结果偏高;对于淀粉含量高的烟草样 3 种方法检测的值基本相符合,对于中低含量淀粉的烟草样:高氯酸萃取-连续流动法的测定结果低于酸解法,略高于酶解法,与酶解法检测值差异不大,相对也较准确。因此,高氯酸萃取-连续流动法更适于烟草中淀粉的快速定量分析。

参考文献

- [1] Goins G. D. The Chemistry and Quality of Cured Leaves[J]. *Tob. Sci.*, 1996, **40**: 10—18.
 [2] 朱忠, 冼可发, 杨军. 烟叶成熟度与其化学成分的相关性研究进展[J]. *烟草科技*, 2002, (8): 33—35.
 [3] Mohapatra S C. Comparison of Methods for Starch Extraction and Estimation[J]. *CORESTA*, 1988, (3): 71.
 [4] 张峻松, 贾春晓, 毛多斌, 张文叶, 李炎强. 碘显色法测定烟草中的淀粉含量[J]. *烟草科技*, 2004, (5): 24—28.

Determination of Starch from the HClO_4 Extraction of Tobacco by Continuous Flow Method

WU Yu-Ping SHAO Yan ZHAO Li-Hong DENG Jian-Hua WANG Dong-Dan SONG Chun-Man
(Yunnan Tobacco Science Research Institute, Yuxi, Yunnan 653100, P. R. China)

Abstract Starch in tobacco is difficult to determine. In this paper, starch was fast and accurately determined by spectrophotometry at 660nm with HClO_4 extraction. The average recovery is 96.71% with the relative standard deviation of 1.79%—5.58%. Compared with the conventional enzymic and acidic hydrolytic methods, this method is simple, cheap, rapid and accurate, and was applied to the determination of starch in burley tobacco, flue-cured tobacco oriental tobacco and de-enzymed tobacco with satisfactory results.

Key words Starch, HClO_4 Extraction, Continuous Flow Method, Tobacco.

致本期及以往各期每篇论文的联系 拟赠 2004 年 1—6 期《光谱实验室》1 套的通知

各有关同志:

谢谢你对本刊的支持。

《光谱实验室》2004 年 1—6 期已出版完毕, 共发表论文 349 篇, 涉及谱学分析各个分支学科的最新研究成果。如果你认为对你有帮助的话, 可以赠送你一套, 净重 2.2kg, 邮资自付(普通印刷品 11 元, 挂号另加 3 元, 请用邮票支付), 有意者来信告知收件人和详细地址, 同时将邮票放在信中挂号寄来。

《光谱实验室》编辑部

2006 年 5 月 25 日

电话: (010) 62452937, 电邮: gsys@263.net; gsys81@citiz.net; gsys@public.sti.ac.cn。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095。