

高氯酸萃取—连续流动法测定烟草中的淀粉含量*

吴玉萍, 邵岩, 邓建华, 王东丹, 宋春满, 赵立红

(云南省烟草科学研究所, 云南 玉溪 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 1.0mL50% 的酒精和 1.2mL72% 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。采用该方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, 方法的平均回收率 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, 该方法操作步骤简单, 检测成本低, 快速准确。

关键词: 高氯酸; 连续流动法; 烟草; 淀粉

中图分类号: O652.62

文献标识码: A

Determination of Leaf Starch Content by HClO₄ Extract with Continuous Flow Method

WU Yu-ping, SHAO Yan, DENG Jian-hua,
WANG Dong-dan, SONG Chun-man, ZHAO Li-hong

(Yunnan Tobacco Research Institute, Yuxi 653100, China)

Abstract: Starch is one of the constituents in tobacco leaf difficult to measure. In order to determine the starch content in tobacco leaf quickly and accurately, the method by HClO₄ extract with continuous flow was studied. Accordingly, 0.1g of tobacco leaf sample was extracted with 1.0ml of ethanol and 1.2ml of 72% HClO₄, the starch content of the extract was measured by the continuous flow method (at the wavelength of 660nm). The starch contents of Yunnan flue-cured tobacco, the de-enzymed tobacco, the burley tobacco and the oriental tobacco were measured. The average recovery rate of starch was 96.71% and the relative standard deviation ranged between 1.79%~5.58%. Compared with the conventional enzymic and acidic hydrolytic methods, this method appeared to be simpler, cheaper, quicker and more accurate.

Key words: HClO₄; Continuous Flow Method; Tobacco; Starch Content

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^[3]后测定还原糖的方法测定烟叶中的淀粉含量, 但这两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^[4]。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^[5], 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

收稿日期: 2005-9-20, 修回日期: 2005-11-2

* 基金项目: 云南省烟草专卖局 (公司) 科技项目 (05-17)

作者简介: 吴玉萍 (1974-), 女, 云南建水人, 助理研究员, 主要从事色谱、光谱仪器分析工作。

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。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 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。

1.1.2 仪器 API305D 自动化学分析仪（美国）；METTLER AG204 型电子天平（感量 0.1mg，瑞士）。

1.1.3 试剂 可溶性淀粉为标准品，高氯酸、碘化钾、碘酸钾、聚氧乙烯月桂醚（Brij-35）均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

(1)B-水 在 1L 蒸馏水中加入 32 滴 Brij-35 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 1 升，并各加入 32 滴 Brij-35。

(2) 淀粉储备液：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 10 分钟后，转入 500mL 容量瓶中，用蒸馏水定容、摇匀备用。

1.2.2 样品处理条件实验

对样品处理过程中的两个影响因子高氯酸和酒精的加入量进行了双因素交叉分组全面实验。两个因素均设定 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。

1.2.3 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% 的酒精搅拌均匀，逐滴加入 1.2mL 72% 的高氯酸，并不断搅拌，加完后放置 10 分钟，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 50 毫升，振荡 30 分钟，然后过滤，用水洗干净残渣，最后以约 38 毫升的水将残渣洗入 60 毫升的试管中，再加入 5 毫升 5:4 的盐酸，在沸水中水解 2 个小时后，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。

1.2.4 工作曲线和样品检测

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，得淀粉工作曲线，其线性回归方程为：

$$Y = 0.00003114 + 0.0003811X - 0.00000013X^2, \quad r = 0.99996$$

式中：Y-吸光度；X-淀粉浓度（mg/L）；检出限：0.5mg/L；测定线性范围：0 ~ 200mg/L。

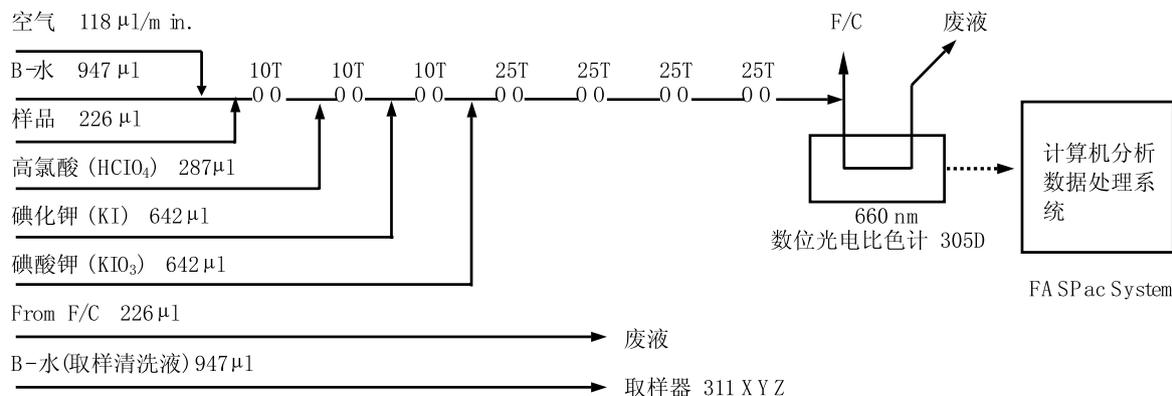


图 1 工作曲线标准液及样品提取液在连续流动仪上淀粉的测试流程图（T 表示混合圈匝数）

Fig.1 Determination flow chart of starch by continuous flow

2 结果与分析

2.1 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；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酒精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，两个实验因素的4个不同水平的SSR测试结果表明差异均为极显著（见表3）。两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酒精和1.2ml高氯酸溶解烟草样品中的淀粉。

2.2 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。

表1 样品前处理的实验设计和测试结果

Table 1 The Experiment design of sample processing and the results

实验编号 NO.	条件组合 Treatment	A HClO ₄		B Ethanol		测定值 Found (%)		
		加入高氯酸的量 (v)	加入酒精的量 (v)	1	2	3		
1	A1B1	0.6ml	0.5ml	4.63	4.87	4.61		
2	A1B2	0.6ml	1ml	3.99	3.87	3.69		
3	A1B3	0.6ml	2ml	1.07	1.06	1.12		
4	A1B4	0.6ml	3ml	0.21	0.27	0.26		
5	A2B1	1.2ml	0.5ml	2.01	1.96	2.01		
6	A2B2	1.2ml	1ml	5.04	4.95	5.12		
7	A2B3	1.2ml	2ml	4.32	4.12	4.25		
8	A2B4	1.2ml	3ml	1.79	1.65	1.69		
9	A3B1	2.4ml	0.5ml	0.32	0.29	0.30		
10	A3B2	2.4ml	1ml	1.06	0.93	1.01		
11	A3B3	2.4ml	2ml	4.82	4.61	4.68		
12	A3B4	2.4ml	3ml	4.20	4.09	4.11		
13	A4B1	3.6ml	0.5ml	0.26	0.24	0.30		
14	A4B2	3.6ml	1ml	0.42	0.43	0.45		
15	A4B3	3.6ml	2ml	3.31	3.37	3.35		
16	A4B4	3.6ml	3ml	5.09	4.93	4.82		

表2 方差分析表

Table 2 Result of variance analysis

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	显著水平
Source of variation	df	SS	MS	F	P
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 两个因素4个水平间的SSR测试结果

Table 3 The SSR test result of 4 levels of two factors

处理 A 间 SSR 测试结果				处理 B 间 SSR 测试结果			
SSR test of levels of A				SSR test of levels of B			
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
No.	average	P=5%	P=1%	No.	average	P=5%	P=1%
2	3.2425	a	A	3	3.3317	a	A
3	2.5350	b	B	4	2.7592	b	B
1	2.4625	c	B	2	2.5800	c	C
4	2.2475	d	C	1	1.8167	d	D

2.3 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。

3 结论与讨论

建立了采用高氯酸萃取——连续流动法测定烟

表4 AXB 交互 SSR 测试结果
Table 4 The SSR test result of AXB interaction

处理号 No.	平均值 average	5% 显著水平 P=5%	1% 显著水平 P=1%
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)

Table 5 The starch values of the 4 types of tobacco determined by the three methods (n=7)

烟样 Samples	高氯酸萃取—连续流动法 HClO ₄ extraction—continuous flow method		酶解法 conventional enzymic method	酸解法 acidic hydrolytic method	
	平均值 average (%)	RSD (%)	Certified	平均值 average (%)	RSD (%)
	白肋烟 burley tobacco	0.16	5.58	0.11	1.31
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

Table 6 Results of recovery experimentation

样品 Sample	样品中含量 Content in the sample (mg/L)	添加量 Added (mg/L)	测定量 Found (mg/L)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Averagerecovery rate (%)
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	

叶淀粉含量的方法,该方法通过加入 1ml50% 的酒精和 1.2ml72% 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。

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酒精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三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, 洗可发, 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] 廖堃, 张世楠. 酶水解-连续流动法测定烟草中的淀粉含量 [A]. 年中烟烟草化学学组年会暨学术研讨会论文集 [C]. 2004, 114-116.
- [4] Mohapatra S.C. Comparison of methods for starch extraction and estimation [J]. *CORESTA*, 1988, (3) : 71.
- [5] 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) : 24-28.