

基于响应面分析法对烟叶中果胶测定方法的优化

白晓莉¹, 侯英², 张朗², 潘纯祥², 陶自伟², 刘静², 杨蕾^{2,3*}

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 昆明 650202; 2. 云南同创检测技术股份有限公司检测事业部, 昆明 650106;
3. 昆明理工大学环境科学与工程学院, 昆明 650500)

摘要: 为了对酶解-连续流动法测定烟叶中果胶含量的方法进行优化, 采用 Box-Behnken 实验设计及响应面分析法对酶解过程中的酶解温度、酶解时间和缓冲液 pH 值进行优化。结果显示, 酶解温度对果胶测定影响最大, 缓冲液 pH 次之, 酶解时间影响最小, 且最优酶解条件为酶解时间 1.9 h、酶解温度 56 °C、缓冲液 pH 3.8; 在此条件下, 果胶具有良好的线性关系 ($R^2=0.999$), 加标回收率在 99.2%~100.9%, 相对标准偏差 $RSD (n=6) < 3\%$; 说明 Box-Behnken 设计结合响应面分析法优化所得的果胶测定方法具有较好的精密度及准确度, 适用于烟叶中果胶含量的批量测定。

关键词: 响应面分析; 连续流动法; 烟叶果胶; 定量测定

中图分类号: TS411

文章编号: 1007-5119 (2015) 05-0085-05

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2015.05.016

The Optimization of the Method of Tobacco Pectin Determination Based on the Response Surface Methodology

BAI Xiaoli¹, HOU Ying², ZHANG Lang², PAN Chunxiang², TAO Ziwei², LIU Jing², YANG Lei^{2,3*}

(1. Technology Centre, China tobacco Yunnan industrial Co., Ltd., Kunming 650202, China; 2. Testing Centre, Yunnan Comtestor Co., Ltd., Kunming 650106, China; 3. Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to optimize the method of determining tobacco pectin using enzymolysis-flow method, reaction temperature, enzymatic hydrolysis time and buffer pH were studied through the Box-Behnken experimental design and response surface methodology. The results showed that reaction temperature had the greatest impact on the determination of pectin, followed by buffer pH, and the enzymatic hydrolysis time comes last. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were pH 3.8, time 1.9 h and 56 °C. Under this condition, the linear relationship of pectin was optimal ($R^2=0.999$), with the recovery of pectin in tobacco ranged from 99.2% to 100.9%, and the $RSD (n=6)$ was less than 3%. This suggested that the optimized enzymatic hydrolysis conditions used by the Box-behnken design and response surface analysis have good precision and accuracy and are suitable for testing large number of samples.

Keywords: response surface methodology; continuous flow method; tobacco pectin; quantitative determination

果胶是烟叶细胞壁中胶层的主要组分, 其含量集中在 5%~9%^[1], 其结构主要是半乳糖醛酸以 α -1,4 糖苷键聚合形成的聚半乳糖醛酸^[2]。研究表明, 果胶对烟叶保湿能力和柔韧性有着重要的作用^[3]; 但是, 过高的果胶含量在烟草吸食过程中分解产生的甲醇对卷烟安全性具有不利影响^[4]。因此, 准确测定烟叶中的果胶含量对于评价烟草品质有着重要的意义^[5]。

目前, 果胶测定方法主要有两大类: 一类是直接测定果胶酸含量, 果胶含量以果胶酸计, 如重量法、容量法为主^[2], 该类方法操作复杂且重复性差, 目前已较少采用; 另一类是通过酸解或者酶解将果胶水解, 采用现代分析仪器测定水解产物半乳糖醛酸含量, 并以半乳糖醛酸来计果胶含量, 如咔唑比色法^[2]、色谱法^[6-12]和酶解-连续流动法^[13-15]等。其中, 比色法基质干扰较大而造

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项项目“再造烟叶工业应用的特色工艺研究”[110201301019 (ZZ-08)]; 云南中烟工业有限责任公司技术中心项目“造纸法再造烟叶大分子物理处理技术研究”(JSZX2014JC14)

作者简介: 白晓莉 (1978-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事有机合成、烟草化学研究。E-mail: 2818429250@qq.com

*通信作者, E-mail: yanglei@reascend.com

收稿日期: 2014-09-24

修回日期: 2015-01-15

成测定结果偏高^[7-9], 色谱法虽然具有较好的灵敏度及选择性, 但是该方法由于仪器操作复杂、检测成本高等特点而难以推广应用。近年来, 酶解-连续流动法是一种备受关注的测定烟草中果胶含量的新方法, 该方法条件温和、解聚率高且重现性好^[16]。然而, 果胶酶酶解过程中的酶解温度、酶解时间及缓冲液 pH 是影响准确测定果胶含量的重要因素。为了更为客观地反映上述三因素对酶解过程的影响及其交互效应, 文中采用响应面分析法优化了果胶酶对烟叶中果胶的酶解条件, 为采用酶解-连续流动法准确测定烟草中果胶含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

冰乙酸、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、氯化钙 (AR, 四川西陇化工有限公司); 对羟基苯甲酸酰肼 (纯度: 98%, ACROS 公司); 半乳糖醛酸 (纯度 97.0%, FLuka 公司); 果胶酶 (酶活力: 30000 U/g, 阿拉丁); 果胶 (含量 74.0%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 柠檬酸和柠檬酸三钠 (AR, 上海国药集团); 0.45 μm 水系微孔滤膜 (Φ 13 mm \times 0.45 μm , 津腾); 滤纸 (Φ 12.5 cm, 杭州特种纸业有限公司); 烟叶样品。

AA3 流动分析仪 (德国布朗卢比公司), SHB-III 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司 SHZ-D), MS204S 电子天平 ($d=0.1$ mg, 瑞士梅特勒公司), 电热恒温水浴锅 (DZKW-S-6 北京市永光明医疗仪器有限公司), 水浴恒温振荡器 (SHA-B 金坛市金南仪器厂) 和 Milli-超纯水系统。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理及检测 准确称取 0.2 g 烟末, 加入 60 mL 80%乙醇, 水浴回流 1 h 后趁热过滤; 残渣依次用无水乙醇及去离子水冲洗后, 用 50 mL 去离子水转移至三角瓶中, 加热煮沸 1 h 后趁热过滤, 残渣用热去离子水再次清洗, 随后将残

渣用 60 mL pH 4.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液转移至三角瓶中, 加入 15 mg 果胶酶, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 酶解 2 h 后定容至 100 mL 容量瓶中, 取适量经 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤后按照 YC/T 159—2002 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法^[17]中规定的还原糖测定条件对样品液中的半乳糖醛酸进行测定。

1.2.2 单因素试验 分别考察酶解过程中酶解温度 (45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$)、缓冲液 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0)、酶解时间 (1 h、2 h、3 h、4 h) 对果胶含量测定的影响。

1.2.3 Box-Behnken 实验设计 在单因素实验基础上, 采用 Design-Expert V8.05 软件中的 Box-Behnken 的实验设计原理, 选取酶解时间、缓冲液 pH、酶解温度做 3 因素 3 水平实验, 利用响应面分析法优化果胶酶对烟叶果胶的酶解条件, Box-Behnken 实验设计因素与水平见表 1。

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels in the table

因素	水平		
	-1	0	1
酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	50	55	60
缓冲液 pH	3	4	5
酶解时间/h	1	2	3

2 结果

2.1 单因素试验

参考文献^[13]的单因素实验方案, 将醇提-水煮去除水溶性糖后的样品残渣于缓冲液体积 60 mL、酶加入量 15 mg 的条件下, 分别考察酶解温度 (45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$)、缓冲液 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0) 和酶解时间 (1 h、2 h、3 h、4 h) 对果胶含量测定的影响。结果表明, 在缓冲液体积 60 mL、酶加入量 15 mg 的条件下, 果胶的最优酶解条件为酶解时间 2 h、酶解温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、缓冲液 pH 4.0, 该试验结果与文献^[13]的试验结果基本一致, 如图 1 所示。

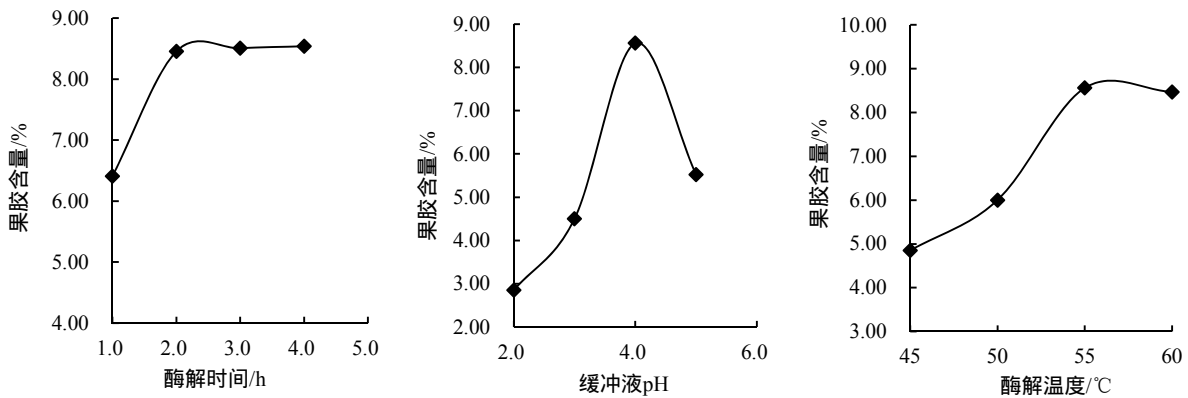


图 1 酶解时间、缓冲液 pH 和酶解温度对果胶测定量的影响

Fig. 1 Influences of the time on enzymolysis, buffer pH and different temperature on pectin determination

2.2 响应面实验

在单因素试验基础上，采用 Design-Expert V 8.05 软件中的 Box-Behnken 响应面分析法，以酶解时间、缓冲液 pH、酶解温度为变量，以果胶测定值为响应值进行响应面分析，试验设计结果见表 2。对表 2 的试验结果进行多元回归拟合及方差分析，结果如表 3 所示。由表 3 可知，模型的 P 值小于 0.0001，表明该模型回归极显著；失拟项 P 值为 0.1965 > 0.05，表明该项检验不显著，该实验方法可靠。该模型的决定系数 $R^2=0.9926$ ，表明模型在 99.26% 程度上能够解释果胶测定值与

变量之间的关系。同时，模型的校正决定系数 $R^2_{Adj}= 0.9831$ ，与 R^2 的数值相接近表明模型预测值和实际实验结果具有良好的相关性。

表 3 方差分析及显著性检验结果

Table 3 Analysis of variance and significant test

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	124.17	9	13.80	104.68	<0.0001	**
残差	0.92	7	0.13			
失拟性	0.60	3	0.20	2.52	0.20	
纯误差	0.32	4	0.08			
总离差	125.09	16				

注：**极显著 ($p < 0.01$)；*显著 ($0.01 < p < 0.05$)； $R^2=0.9926$ ， $R^2_{Adj}= 0.983$ 。

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 2 The experimental design and results of Box-Behnken

试验号	因素			果胶测量值/%	
	酶解温度	缓冲液 pH	酶解时间	实际值	预测值
1	-1	-1	0	2.26	2.35
2	1	-1	0	6.61	6.37
3	-1	1	0	3.85	4.09
4	1	1	0	3.48	3.39
5	-1	0	-1	2.22	2.26
6	1	0	-1	3.95	4.32
7	-1	0	1	2.38	2.01
8	1	0	1	3.3	3.26
9	0	-1	-1	6.52	6.39
10	0	1	-1	5.31	5.03
11	0	-1	1	4.72	5.00
12	0	1	1	4.97	5.10
13	0	0	0	9.42	9.43
14	0	0	0	9.12	9.43
15	0	0	0	9.2	9.43
16	0	0	0	9.59	9.43
17	0	0	0	9.81	9.43

由 Design-Expert 软件对果胶测定值进行二次多项回归拟合分析，可得到 Y (果胶测定值) 对 A (酶解温度)、 B (缓冲液 pH)、 C (酶解时间) 的二次多项回归方程：

$$Y = -556.81850 + 18.34085 * A - 23.77950 * B + 10.70975 * C - 0.23600 * A * B - 0.04500 * A * C + 0.36500 * B * C + 0.15591 * A^2 - 1.48025 * B^2 - 2.56775 * C^2$$

利用 Design-Expert.V8.05 软件得出模型最大预测值为 9.52%，此时酶解温度 55.67 °C、缓冲液 pH 3.83、酶解时间 1.92 h；同时，考虑到实际操作，选取酶解温度为 56 °C、缓冲液 pH 3.8、酶解时间 1.9 h 为最优酶解条件。另外，根据该回归方程，做出目标函数的响应曲面图，如图 2~4 所示，从中可以比较直观的看出酶解时间、酶解温度及缓冲液 pH 对果胶测定的影响，从图 2~4 可

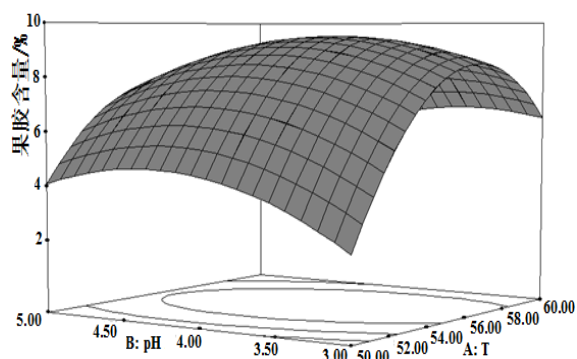


图2 酶解温度和缓冲液 pH 对果胶测定量的响应面

Fig. 2 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of the enzymolysis temperature and buffer pH

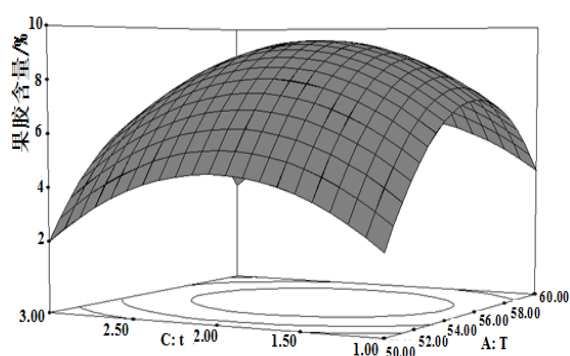


图3 酶解温度和酶解时间对果胶测定量的响应面

Fig. 3 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of the enzymolysis temperature and enzymolysis time

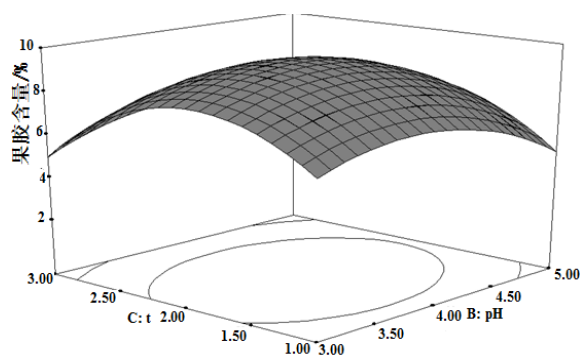


图4 酶解时间和缓冲液 pH 对果胶测定量的响应面

Fig. 4 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of the enzymolysis time and buffer pH

可以看出, 酶解温度对果胶测定影响最大, 缓冲液 pH 次之, 酶解时间影响最小。

2.3 工作曲线

配制浓度为 0.1~2.0 mg/mL 的半乳糖醛酸系列标准溶液, 采用连续流动分析仪进行测定, 以半乳糖醛酸的仪器响应值及其对应浓度进行回归

分析, 得半乳糖醛酸线性回归方程为 $y=4.0981 \times 10^{-5}x-0.15733 (R^2=0.999)$; 另外, 由连续流动分析仪检出限及定量限的计算方法计算所得, 该方法的检出限为 0.0056 mg/mL, 定量限为 0.0185 mg/mL。同时, 采用优化所得最优酶解条件对所购果胶标品的果胶含量进行确定, 测定结果如表 4 所示, 表明所购买果胶标品的果胶含量为 97.57% (以半乳糖醛酸计)。

表4 标准品果胶含量的确定

Table 4 Standard product pectin content is determined

果胶称样量/g	半乳糖醛酸含量/mg	果胶含量/%	平均值/%
0.0515	50.42	97.90	97.57
0.1010	97.72	96.75	
0.1506	147.66	98.05	

2.4 方法精密度

称取同一样品 6 份, 按照优化后的条件对样品进行处理与分析, 进行日内重复性实验, 并连续测定 3 d, 进行日间重复性实验。结果如表 5 所示, 在优化后的条件下, 方法的日内 RSD 为 1.51%~2.75%, 日间 RSD 为 1.19%。说明优化后的条件表现出良好的精密度。

表5 方法精密度实验

Table 5 Precision of the method

测定次数	果胶含量/%		
	第 1 天	第 2 天	第 3 天
第 1 次	9.35	9.25	9.25
第 2 次	9.39	9.39	9.21
第 3 次	9.49	9.54	9.40
第 4 次	8.91	9.56	9.44
第 5 次	9.45	9.28	8.71
第 6 次	9.21	9.25	8.96
日内平均	9.30	9.38	9.16
日内 RSD/%	2.29	1.51	2.75
日间平均		9.28	
日间 RSD/%		1.19	

2.5 方法回收率

称取同一样品 3 份, 按照优化后的条件进行加标回收率实验, 结果如表 6 所示, 在此条件下, 方法的回收率为 99.2%~100.9%, 表明优化后的条件准确度较高。

表 6 方法回收率实验

Table 6 The recovery experiment

样品	果胶加入量/mg	加标后果胶测定值/%	果胶回收率/%
烟末	0	9.31	-
烟末+低标	10	18.99	99.2
烟末+ 中 标	20	28.88	100.3
烟末+高标	30	38.84	100.9

2.6 样品测定

采用优化所得条件对 5 种不同烟叶样品进行果胶含量测定, 结果如表 7 所示。从测定结果可知, 优化所得条件对不同样品的测定中表现出良好的精密度, 且样品的果胶含量均处于工作曲线范围内, 符合检测要求。

表 7 不同烟叶中果胶含量测定

Table 7 Determination of pectin in different types of tobacco

测定次数	果胶含量/%				
	云 85C4F	云 85B4F	云 87B2K	云 87B2L	K326C3L
1	8.90	9.26	8.94	8.05	8.64
2	9.07	9.11	8.83	8.41	8.69
3	9.21	9.07	8.53	8.35	8.41
均值	9.06	9.15	8.77	8.27	8.58
RSD/%	1.68	1.06	2.44	2.32	1.78

3 小 结

近年来, 烟叶中果胶含量的准确测定备受业内人士的关注。较烟草行业制定的《YC/T 346—2010 烟草及烟草制品 果胶的测定 离子色谱法》^[17]而言, 酶解-连续流动法^[13-15]是一种快速、低成本测定烟草果胶的方法; 然而, 酶解-连续流动法中的酶解过程却是影响烟叶中果胶含量准确测定的主要环节。为此, 本文采用 Box-Behnken 实验设计结合响应面分析法确立了果胶酶的最优酶解条件为酶解温度 56 °C、酶解时间 1.9 h、缓冲液 pH 3.8, 同时还较为客观的反映了上述 3 个因素对果胶含量测定的影响, 即酶解温度对果胶测定影响最大, 缓冲液 pH 次之, 酶解时间影响最小。在此基础上, 对优化所得酶解条件进行方法学考察, 结果表明, 方法的线性良好 ($R^2=0.999$), 日内 RSD 为 1.51%~2.75%, 日间 RSD 为 1.19%, 且加标回收率在 99.2%~100.9%。说明优化所得的酶解条件在测定烟叶果胶含量中表现出良好的精密度及准确度, 可作为离子色谱

法的有益补充用于烟草中果胶含量的准确测定, 具有较强的实用价值。

参考文献

- [1] 武圣江, 宋朝鹏, 许自成, 等. 烘烤过程中烤烟细胞壁生理变化研究[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(3): 73-77.
- [2] 饶巍, 周冀衡, 钟科军, 等. 烟草果胶的提取分析研究进展[J]. 广州化学, 2009, 34(1): 71-77.
- [3] 金闻博, 戴亚. 烟草化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1993: 53.
- [4] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 50.
- [5] 李汉超, 王淑娴. 烟草、烟气化学及分析[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1991: 87.
- [6] Kinter P K, Van Buren J P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenylmethod[J]. Journal of Food Science, 1982(47): 756-764.
- [7] Penman A, Sanderson G R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates[J]. Carbohydrate Research, 1972(25): 273-282.
- [8] Scott R W. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials[J]. Analytical Chemistry, 1979(51): 936-941.
- [9] Matsushashi S, Hatanaka C. Difference between the free and conjugated galacturonate residues in their color reaction with carbazole or m-hydroxybiphenyl reagents[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992(56): 1141-1153.
- [10] 吴玉萍, 杨光宇, 王东丹. 高效液相色谱法测定烟草中的果胶含量[J]. 光谱实验室, 2004(1): 183-185.
- [11] 国家烟草专卖局. YC/T346—2010 烟草及烟草制品果胶的测定 离子色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] 李波, 许时婴. 气相色谱法测定多糖中的糖醛酸[J]. 色谱, 2004, 22(5): 560.
- [13] 徐志强, 陈开波, 蔡兵, 等. 酶解-流动分析法测定烟草中的果胶含量[J]. 烟草科技, 2005(9): 26-28.
- [14] 王鹏, 尚军, 戴迎雪, 等. 酶解-流动分析法测定烟草中果胶前处理方法的改进[J]. 烟草科技, 2009(2): 50-52.
- [15] 林洪, 李明, 章新, 等. 烟草中果胶的自动分析仪测定方法研究[J]. 玉溪师范学院学报, 2007, 23(12): 1-4.
- [16] Haikel G, Nicolas M, Katherine N, et al. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography[J]. Food Chemistry, 2006(96): 477-484.
- [17] 国家烟草专卖局. YC/T 159—2002 烟草及烟草制品水溶性糖的测定 连续流动法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.