

一种快速测定烟用香料中总糖和还原糖的方法

张凤侠, 师金鸽*, 杨芳, 何媛, 张萌萌, 吕娟, 彭军仓 (陕西中烟工业有限责任公司技术中心, 陕西宝鸡 721013)

摘要 [目的]建立连续流动分析法测定烟用香料中总糖和还原糖含量的方法。[方法]以体积分数为5%的冰醋酸水溶液作为萃取剂,振荡萃取30 min,静置后直接用连续流动分析法同时测定烟用料液中总糖和还原糖含量。[结果]总糖和还原糖的回收率在94.65%~99.16%,相对标准偏差(RSD)≤2%。[结论]该方法操作简便,且检测结果准确度高和重复性好,符合实验室质量控制规范的要求,可用于烟用香料中总糖和还原糖含量的快速分析。

关键词 烟用香料;总糖;还原糖;连续流动分析法

中图分类号 TS41⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)20-0210-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.20.057



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

A Method for the Rapid Simultaneous Determination of Total Sugar and Reduced Sugar in Tobacco Flavors

ZHANG Feng-xia, SHI Jin-ge, YANG Fang et al (Technology Center, China Tobacco Shaanxi Industrial Co., Ltd., Baoji, Shaanxi 721013)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a method for the determination of total sugar and reducing sugar. [Method] The content of total sugar and reducing sugar in tobacco flavor was determined by continuous flow analysis after 30 minutes of oscillating extraction with 5% glacial acetic acid aqueous solution as extractant. [Result] The recovery rate of total sugar and reducing sugar ranged 94.65%~99.16%, and RSD was less than 2%. [Conclusion] The method is simple, accurate and reproducible, and meets the requirements of laboratory quality control standards. It can be used for rapid analysis of total sugar and reducing sugar content in tobacco flavors.

Key words Tobacco flavor; Total sugar; Reducing sugar; Continuous flow analysis method

烟用香料作为烟草添加剂是构成卷烟品牌风味和风格的重要因素^[1-2],由于其化学成分多样性和复杂性一直是卷烟产品质量控制的重点和难点。烟用香料由多种香料和适量溶剂调和制成^[3-4],受产地^[5]、加工^[6-7]等因素影响,产品质量可能存在一定的波动,因此,为了得到同一品牌香烟具备相同的吸食效果,对其分析与质量控制对提升和维护卷烟产品质量具有重要的作用^[8-9]。卷烟工业企业对烟用香精的理化指标仅从相对密度、折光系数、酸值和挥发性成分总量4个方面进行管控^[10],对其内在质量难以进行有效的控制,而烟用香料又具有高水分、高糖的特点,所以有必要对其总糖和还原糖含量进行检测,建立一种对烟用香料中总糖和还原糖的测定方法。

糖类物质作为重要的烟草添加剂,不仅能赋予卷烟制品的特征香吃味,而且还具有黏合、产酸及保润等作用,尤其是还原糖能够直接改善卷烟的吸食品质^[11],因此,烟草及烟草制品中糖类物质的含量一直是研究的热点。国内外学者根据糖的化学和物理特性,开发了多种分析测试方法,如滴定法^[12]、比色法^[13]、液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)^[14-15]、离子色谱法(IC-PAD)^[16-17]及气相色谱法(GC-MS)^[18]以及近红外光谱分析法^[19-20]等。其中滴定法和比色法虽然前处理简单、分析快速,但仅对总糖量进行了测定,未考虑多种糖醇物质的干扰;LC-MS/MS和IC-PAD也具有前处理简单、灵敏和快速等优点,但该方法仪器较为昂贵,且使用和维护费用较高;采用GC-MS分析烟草中水溶性糖需对其进行衍生化,该过程较为繁琐;近红外光谱分析法具备前

处理简单、分析速率快,但是灵敏度低,且前期建立模型需要大量的数据和较高的技术要求,运用过程中仍需适时维护。

连续流动分析法(CFA)^[21-22]作为一种湿化学自动分析方法,已广泛应用于烟草、医药和环境化工等领域,其具有前处理简便、分析速率高、准确性和精密度高、重现性好、通用性强以及检测批量大等优势,目前在烟草行业作为检测总糖、还原糖、总氮、钾、氯以及氢氰酸等指标的标准检测方法予以推广,但应用在烟用香料中的分析检测报道较少,笔者尝试采用连续流动分析法对烟用香料进行分析检测。

1 材料与方法

1.1 试验原理 烟用香料用5%冰醋酸水溶液萃取,过滤后,95℃条件下水解使蔗糖转化成果糖或葡萄糖,在85℃碱性条件下与对羟基苯甲酸酞肼反应生成偶氮化合物,呈现黄色,在410 nm处有最大吸收来测定总糖和还原糖含量。综合研究表明,当用水作为萃取剂时,一些烟草中的蔗糖也有水解的现象,由于单糖的还原性极强,容易被氧化,在稀酸中稳定性最强,故采用5%醋酸溶液萃取。

1.2 仪器与试剂 连续流动分析仪(法国AMS-Alliance, Alliance-FuturaII);电子天平、摇床(德国,赛多利斯);实验室常规玻璃器皿。对羟基苯甲酸酞肼、葡萄糖和氯化钙(AR, Sigma-Aldrich);一水合柠檬酸、乙酸(冰醋酸)和氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司, AR);盐酸(西安市长安区化学试剂厂, AR);Brij-35溶液(法国, AMS-Alliance);试验用水为蒸馏水。

1.3 试剂配制

(1)R1(还原糖):5%冰醋酸水溶液。量取99.5%的冰醋酸50.25 mL用蒸馏水定容至1 000 mL,加入1 mL Brij-35。

(2)R1(总糖):0.5 mol/L HCL溶液。1 000 mL容量瓶中加入500 mL蒸馏水,然后加入41.4 mL浓盐酸,用蒸馏水稀

基金项目 陕西中烟工业有限责任公司科技项目(ZB19012)。

作者简介 张凤侠(1982—),女,河南商丘人,工程师,硕士,从事烟草化学研究。*通信作者,工程师,硕士,从事烟草化学研究。

收稿日期 2019-05-09;修回日期 2019-06-18

释至刻度,加入 1 mL Brij-35。

(3) R2 (总糖和还原糖): 0.5 mol/L NaOH 溶液。1 000 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠,溶解 20.0 g 氢氧化钠于 800 mL 水中,混合并冷却,完全溶解后,添加 1 mL Brij-35 溶液,然后用蒸馏水稀释至刻度。

(4) R3 (总糖和还原糖): PAHBAH 溶液。量取 250 mL 0.5 mol/L 盐酸溶液于 500 mL 容量瓶中,加入 25 g 对羟基苯甲酸酰肼,直到溶解为止,加入 10.5 g 一水合柠檬酸,然后用 0.5 mol/L HCl 溶液稀释至刻度。

(5) R4:氯化钙溶液。溶解 1.176 g 二水合氯化钙溶于 1 000 mL 水中,加入 0.5 mL Brij-35。

1.4 样品处理 准确称取 0.5 g 烟用香料样品,置于 150 mL 锥形瓶中,准确加入 50.00 mL 5% 的冰醋酸水溶液,盖上塞子,振荡萃取 30 min,静置后取适量萃取液于进样瓶中进行连续流动分析,采用外标法定量。如果样品浓度在标准浓度范围之外,样品应当稀释并重新分析。

表 1 标准曲线方程、相关系数、空白标准偏差及检出限

Table 1 Standard curve equation, correlation coefficient, blank standard deviation and detection limit

被测物 Measured object	标准曲线方程 Standard curve equation	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	线性范围 Linear range mg/mL	空白平均值 Blank average %	空白标准偏差 Blank standard deviation (RSD) // %	检出限 Detection limit (LOD) // %
总糖 Total sugar	$y = 116.157x + 0.045$	0.999 9	0~30	0.302 4	0.008 7	0.32
还原糖 Reducing sugar	$y = 112.875x - 0.076$	0.999 9	0~30	0.216 5	0.007 5	0.24

以体积分数为 5% 的冰醋酸溶液即溶剂作为空白溶液,平行测定 20 次空白溶液的吸光度,用空白标准偏差法评估检出限(LOD)^[23],根据公式 $S_m = S_{bl} + k \cdot s_{bl}$ 计算出仪器的检出限。式中, S_m 为检出限; S_{bl} 为空白测量的平均值; s_{bl} 为空白测量的标准偏差; k 为 3;检测置信水平为 95%。由表 1 可知,总糖检出限为 0.32%、还原糖检出限为 0.24%。

2.2 重复性试验 取一烟用香料样品准确称取 10 份,每份 0.5 g (精确至 0.000 1 g),分别加入 50% 冰醋酸水溶液,以相同条件进行萃取和测定,测定和计算结果见表 2,由表中可知,总糖和还原糖的 RSD 均不大于 2%,具有较好的重复性。

表 2 方法的精密度

Table 2 Precision of the method %

被测物 Measured object	平均值 Mean	标准 偏差 SD	RSD
总糖 Total sugar	14.79	0.25	1.70
还原糖 Reducing sugar	13.61	0.23	1.71

2.3 回收率试验 准确称取一烟用香料样品 3 份,每份 10.00 g (精确至 0.000 1 g),分别准确加入 0.10、0.20、0.30 g (精确至 0.000 1 g) 的葡萄糖标准样品,使总糖、还原糖加标量分别为 10、20、30 mg/g。平行称取 3 次添加标准品后的样品 0.5 g (精确至 0.000 1 g),以相同的条件进行萃取和测定,测定结果见表 3。由表 3 可知,总糖和还原糖的回收率在 94.65%~99.16%。

2.4 总糖和还原糖含量的测定 按“1.4”测定 15 种样品中

1.5 标准样品配制

1.5.1 标准样品处理。移取适量葡萄糖于 80 °C 真空干燥箱中,4 h 后取出,保存在干燥器中冷却至少 30 min。

1.5.2 标准溶液配制。标准储备液配制:称取 6 g 葡萄糖,精确至 0.000 1 g,溶解于 5% 的冰醋酸溶液,并稀释到 100 mL 容量瓶中,葡萄糖含量为 30 mg/mL。标准工作液:准确移取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 标准储备液,用 5% 的冰醋酸水溶液分别定容至 100 mL 容量瓶中。

1.6 分析条件 取样时间为 30 s;清洗时间为 30 s;每小时进样量为 60 个;总糖和还原糖的检测波长为 410 nm。

2 结果与分析

2.1 校准曲线与检出限 对“1.5”配制的 6 个浓度的标准工作溶液进行分析检测,得到测定结果。以测定结果(%)为纵坐标、标准溶液浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准工作曲线,得到标准工作曲线方程和相关系数(表 1)。

的总糖和还原糖含量,结果见表 4。由表 4 可知,15 种不同

表 3 回收率试验

Table 3 Recovery test %

被测物 Measured object	未加标 Unspiked	加标量 Scaling amount	加标后 After spiking standard	回收率 Recovery rate
总糖 Total sugar	15.05	10.00	24.97	99.16
	15.37	20.00	34.49	95.62
	15.77	30.00	45.01	97.45
还原糖 Reducing sugar	13.48	10.00	22.94	94.65
	13.67	20.00	33.06	96.97
	13.51	30.00	42.96	98.16

表 4 烟用香料中糖含量测定结果

Table 4 Determination of sugar content in tobacco flavors

编号 No.	还原糖 Reducing sugar // %	总糖 Total sugar %	两糖比 Two sugar ratio
1	12.30	15.02	0.82
2	11.49	12.70	0.90
3	22.55	25.26	0.89
4	13.36	14.48	0.92
5	16.16	18.02	0.90
6	24.26	27.38	0.89
7	15.54	19.42	0.80
8	19.19	21.12	0.91
9	2.63	3.91	0.67
10	6.38	7.85	0.81
11	21.83	25.40	0.86
12	32.35	34.39	0.94
13	9.96	11.08	0.90
14	2.52	3.06	0.82
15	1.12	1.44	0.78

烟用香料中均含有糖,还原糖含量在 1.12%~32.35%,其中 $\leq 10\%$ 的样品有 5 种,10%~20%的有 6 种, $\geq 20\%$ 的样品有 4 种;总糖含量在 1.44%~34.39%,其中 $\leq 10\%$ 的样品有 4 种,10%~20%的有 7 种, $\geq 20\%$ 的样品有 4 种。两糖比在 0.67~0.94,说明烟用香料中两糖含量变幅较大,有可能是一部分糖在生产或者储存过程中发生了美拉德反应,也可能是一些多糖水解生成了还原糖。

3 讨论与结论

通过以上试验,验证了利用化学连续流动分析仪快速同时测定烟用香料中总糖和还原糖含量的可行性。鉴于目前该方法还未应用于烟用香精香料的分析检测,所以与片段流和流动注射分析体系相比,具有消耗量低、检测速度快等特点;与液相(LC-MS)、气相(GC-MS)等分析检测仪器相比较,具有前处理简单、仪器维护保养费用低等优点。综上所述,化学连续分析仪检测结果精密度高、重现性好,因此适合大批量的烟用香料香精中糖含量的分析。

参考文献

- [1] 《最新卷烟制造新工艺、新配方与烟草香精香料调配技术实用手册》编委会.最新卷烟制造新工艺、新配方与烟草香精香料调配技术实用手册[M].北京:中国科学技术出版社,2012.
- [2] KAUR G, MUTHUMALAGE K, RAHMAN I. Mechanisms of toxicity and biomarkers of flavoring and flavor enhancing chemicals in emerging tobacco and non-tobacco products[J]. Toxicology letters, 2018, 288: 143-155.
- [3] NURBANI N, SUMARMIYATI S. Exploration and characterization of mekai plant as flavoring ingredient in Bulungan District, Province of North Kalimantan[R]. 2017.
- [4] 钱东尔. 烟用香料前体的合成及其卷烟加香研究[D]. 南京: 东南大学, 2017.
- [5] KIM H S, PACK E C, KOO Y J, et al. Quantitative analysis of menthol and identification of other flavoring ingredients in capsule cigarettes marketed in Korea[J]. Regulatory toxicology and pharmacology, 2018, 92: 420-428.
- [6] 张文娟, 张国臣, 王宏伟, 等. 杏仁酸味烟用香料靶向组分的确定及制备工艺优化[J]. 中国烟草学报, 2018, 24(2): 8-17.
- [7] 杨鹏元, 洪广峰, 马宇平, 等. 焦麦芽烤甜香关键成分的确定及制备工艺

优化[J]. 中国烟草科学, 2016, 37(5): 68-74.

- [8] KRÜSEMANN E J Z, CREMERS J W J M, VISSER W F, et al. The sensory difference threshold of menthol odor in flavored tobacco determined by combining sensory and chemical analysis[J]. Chemical senses, 2017, 42(3): 233-238.
- [9] 李晶, 刘欣, 米其利, 等. 微型液液萃取-气相色谱-质谱法测定烟用香料中丁酸和乳酸的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(4): 413-418.
- [10] 国家烟草专卖局. 烟用香精: YC/T 164—2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.
- [11] 苏鑫, 姬厚伟, 刘剑, 等. 烟草中糖类物质分析的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(3): 44-49.
- [12] 熊江波, 陈文芳, 吴建富. 烟叶中还原糖测定方法的改进[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 637-640.
- [13] 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中水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(6): 829-833, 838.
- [14] FEIL R, LÜNN J E. Quantification of soluble sugars and sugar alcohols by LC-MS/MS[J]. Plant metabolomics, 2018, 1778: 87-100.
- [15] 张富强, 柳秋林, 董全江, 等. 气相色谱-质谱指纹图谱应用与烟用香精香料品质控制[J]. 广州化工, 2018, 45(12): 119-120.
- [16] 张涛, 曾婉俐, 向海英, 等. 在线固相萃取净化-离子色谱法测定烟草中的糖[J]. 江西农业大学学报, 2018, 30(8): 90-94.
- [17] WAGNER K A, HUANG C B, MELVIN M S, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method to quantify benzo[a]pyrene in tobacco products[J]. Journal of chromatographic science, 2017, 55(7): 677-682.
- [18] ZHANG L, ZHANG X T, JI H W, et al. Metabolic profiling of tobacco leaves at different growth stages or different stalk positions by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Industrial crops & products, 2018, 116: 46-55.
- [19] LI Z, LI C, GAO Y, et al. Identification of oil, sugar and crude fiber during tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed development based on near infrared spectroscopy[J]. Biomass and bioenergy, 2018, 111: 39-45.
- [20] 黄扬明, 田旷达, 张吉雄, 等. 中红外技术结合 PCA-MD 用于烟用香精香料定性研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(10): 129-130.
- [21] 彭丽娟, 王春琼, 王惠平, 等. 连续流动法测定烟草中水溶性总糖和还原糖的不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2019, 46(1): 105-110.
- [22] LI Y, ZHANG L N, WU L J, et al. Purification and enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by column clean-up coupled with continuous flow single drop microextraction[J]. Journal of chromatography A, 2018, 1567: 81-89.
- [23] 武汉大学. 分析化学: 下册[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 11-13.

(上接第 205 页)

况,每 14~21 d 抽样检查 1 次,发病率高于 2%时翻果检查 1 遍,剔除腐烂、病变果。贮藏室要注意通风透气和保温保湿等问题。

参考文献

- [1] 吴耕民. 中国温带果树分类学[M]. 北京: 农业出版社, 1984.
- [2] 谌金吾, 王正文, 黄胜先, 等. 4 种施肥管理对思州柚果实品质的影响[J]. 耕作与栽培, 2016(5): 7-10.
- [3] 谌金吾, 黄胜先, 王正文, 等. 岑巩思州柚园黑蚱蝉产卵危害调查[J]. 耕作与栽培, 2018(4): 28-29.
- [4] 谌金吾, 李星, 王正文, 等. 微生物菌肥对思州柚品质的影响[J]. 耕作与栽培, 2018(1): 15-16.
- [5] 廖炜. 柑橘采后储藏保鲜技术研究进展[J]. 中国市场, 2011(49): 28-29,

37.

- [6] 谢天永, 温晓钦. 沙田柚贮藏期烂果原因及对策[J]. 福建果树, 2003(3): 44-45.
- [7] 王友海, 费甫华, 谌丹丹, 等. 宜昌柑橘贮藏保鲜现状、问题及对策建议[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(18): 3519-3523.
- [8] 任艳芳, 刘畅, 徐玲玲, 等. 中草药提取液对柑橘采后主要病菌抑制效果研究[J]. 北方园艺, 2010(23): 179-181.
- [9] 中华人民共和国农业部. 绿色食品 农药使用准则: NY/T 393—2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [10] 郑文艳, 谢合平, 余桂林, 等. 不同化学保鲜剂对椪柑贮藏保鲜效果研究[J]. 浙江柑橘, 2017(3): 22-25.
- [11] 李鸿筠, 姚廷山, 王联英, 等. 5 种药剂对柑橘贮藏病害的防控效果评价[J]. 食品工业科技, 2014, 35(11): 319-323.
- [12] 胡亮. 预贮对柑桔贮藏保鲜效果影响的研究[J]. 中国南方果树, 2011, 40(1): 30-31.