

洗涤剂法测定烟草及烟草制品中中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、酸性洗涤木质素的研究

杨斌 殷引 张浩博 余永桢 沈轶

上海烟草集团有限责任公司技术中心,上海市杨浦区长阳路717号200082

摘要:为准确测定烟草及其制品中各种纤维素含量,优化了洗涤剂法的前处理条件,并定量分析了烟叶及烟草制品中中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和酸性洗涤木质素(ADL)。结果表明:1)前处理中用苯、乙醇、乙醚混合溶剂回流4h能除去绝大部分酯溶性的干扰物质;2)使用高温淀粉酶能够消除烟叶中淀粉对中性洗涤纤维检测带来的干扰;3)NDF、ADF、ADL检测限分别为0.26%、0.17%、0.17%,回收率为89%~101.4%;4)不同类型烟叶原料之间NDF和ADF含量的差异明显高于不同类型卷烟之间的差异;5)烟草及烟草制品的ADL含量基本都在3%以下。

关键词:中性洗涤纤维;酸性洗涤纤维;酸性洗涤木质素;洗涤剂法

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2012.03.003

中图分类号: TS411 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2012)03-0010-06

Determination of NDF, ADF and ADL in tobacco and tobacco products with detergent method

YANG Bin, YIN Yin, ZHANG Hao-bo, SHE Yong-zhen, SHEN Yi

Technical Center of Shanghai Tobacco Group Co., Ltd, Shanghai 200082

Abstract: Pretreatment conditions of detergent method were optimized and contents of NDF (Neutral Detergent Fiber), ADF (Acid Detergent Fiber) and ADL (Acid Detergent Lignin) in tobacco and tobacco products were determined. Results showed: 1) using mixture-solvent (containing benzene, ethanol, and ether) can remove most ester soluble interfering substances in tobacco after 4-hour washing; 2) using α -amylase can clear up interference of starch during NDF determination; 3) limits of detection of NDF, ADF and ADL are 0.26%, 0.17%, 0.17%, respectively, and the recoveries were all between 89%~101.4%; 4) differences between contents of NDF and ADF in different types of tobacco leaves are more obvious than in tobacco products; and 5) ADL contents in most tobacco and tobacco products were below 3%.

Keywords: neutral detergent fiber; acid detergent fiber; acid detergent lignin; detergent method

前人研究表明,各等级烟叶总细胞壁物质含量为20%~30%,在烟梗和烟草薄片中甚至要占总质量的三分之一以上,其对烟叶的燃烧性能和烟丝的填充值以及卷烟的香吃味都有直接影响,而纤维素、半纤维素和木质素是构成植物细胞壁的主要物质^[1-3],其准确定量意义重大。

目前,纤维素、半纤维素和木质素的测定方法大致可以分为三种:粗纤维法、纤维洗涤剂法和酶法^[4]。传统的粗纤维法不精确,存在测量值低于实际值的情况;酶法分析成本高,无法克服酶抑制剂对测定结果的干扰,不能区分纤维类物质中的各化学组分;洗涤剂法简单方便,不需要复杂的仪器设备,结果稳定,重复性高^[5]。

从纤维素、半纤维素以及木质素的结构单元、聚合度等方面可以发现纤维素、半纤维素、木质素没有较为明确的定义,国内外的有关标准和文献上也从未出现纤维素、半纤维素和木质素的明确概念,给现阶段烟草行业的许多相关研究造成了困难^[5-7]。一般认为,样品

作者简介:杨斌(1984—),学士,工程师,从事原料配方技术研究工作,

E-mail: yangb@sh.tobacco.com.cn

通讯作者:沈轶(1978—),硕士,高级工程师, E-mail: shenyi@sh.tobacco.com.cn

收稿日期:2011-04-06

通过前处理并经中性洗涤剂洗涤后,不能消化的残渣为 NDF,主要包括几乎全部的纤维素、半纤维素、木质素和少量的蛋白质;在酸性洗涤剂的作用下,半纤维素亦被除去得到 ADF;ADF 经过 72% 硫酸消化得到的不溶物即为 ADL。以上几个步骤通过换算,即可分别得出一般概念中的纤维素、半纤维素和木质素的量,数据可用于日常的分析研究,这一方法目前已经是较为主流的方法^[8-12],但是在烟草领域的测定尚未见报道。本文基于洗涤剂法,通过助滤剂的选择、脱脂方法的确认和高温淀粉酶的应用,以期提高烟草制品中纤维素含量测定的准确度和精密度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

样品:烟叶样品取自卷烟工业公司仓库,其中烤烟 3 个、香料烟、白肋烟、晒烟、国产造纸法薄片、梗丝各一个;卷烟样品为市场在售产品,其中烤烟型 2 种、混合型 2 种。

主要仪器:磨粉机(Cyclotec1093 型,FOSS TECATOR 公司);分析天平(XP404S,感量 0.1mg,瑞士 METTLER 公司);纤维分析仪(Fibertec2010 型,丹麦 FOSS 公司);马弗炉(L9/11/C6, JING HONG);红外光谱仪(MPA,德国 BRUKER 光谱仪器公司)。

试剂:无水氯化钙或变色硅胶、苯、乙醇、乙醚、十二烷基硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠、98% 浓硫酸(AR,国药集团化学试剂有限公司);四硼酸钠、无水磷酸氢二钠、丙酮(AR,上海试一化学试剂有限公司);乙二醇乙醚(AR,无锡市民丰试剂厂);十六烷基三甲胺溴(BR,北京奥博星生物技术责任有限公司);微晶纤维素、石英砂、正辛醇(消泡剂)、 α -高温淀粉酶(活性 50 kU/g, AC-ROS 化学试剂公司);水为蒸馏水或同等纯度的水。

1.2 试剂配制

1.2.1 中性洗涤剂(3% 十二烷基硫酸钠)

称取约 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠和约 6.8 g 四硼酸钠,放入 100 mL 烧杯中,加适量蒸馏水溶解(可加热),再加入约 30 g 十二烷基硫酸钠和 10 mL 乙二醇乙醚;称取约 4.65 g 磷酸氢二钠置于另一烧杯中,加蒸馏水后加热溶解,冷却后将上述两溶液转入 1000 mL 容量瓶并用水定容至刻度。此溶液 pH 值应在 6.9-7.1 之间^[13-17]。

1.2.2 酸性洗涤剂(2% 十六烷基三甲胺溴)

用 50 mL 量筒量取约 27.2 mL 98% 浓硫酸,缓慢加入已装有 500 mL 蒸馏水的烧杯中,冷却后转移至 1000 mL 容量瓶,使用水定容至刻度,配置成 1.0

mol/L 硫酸溶液;称取约 20 g 十六烷基三甲胺溴于 1000 mL 烧杯中,加入配置好的 1.0 mol/L 硫酸溶液,搅拌溶解,转移至 1000 mL 容量瓶,使用水定容至刻度^[13-17]。

1.3 试验方法

1.3.1 不同种类烟叶原料及烟草制品的试验处理

选取不同种类烟草原料及烟草制品样品,粉碎后过 40 目筛,测定样品含水率。按照 1.3.3 至 1.3.6 的分析步骤分别测定中性洗涤纤维素、酸性洗涤纤维素和酸洗木质素;选择某一样品相同步骤重复测定 8 次,计算其平均值、标准偏差及相对标准偏差,得到重复性数据。

1.3.2 空白实验及助滤剂的试验处理

选取 2 种助滤剂,其中酸洗硅藻土称取 1 g,石英砂称取 2 g,参照 1.3.3 至 1.3.6 的分析步骤进行空白实验,考察助滤剂的流失情况。选择流失较少、过滤效果较好的一种助滤剂,重复测定 10 次,根据 NDF、ADF、ADL 检测结果,计算本方法的检测限和定量限。

1.3.3 试样脱脂

准确称取 5 g 试样,置于 250 mL 圆底烧瓶中。依次加入苯、乙醇各 50 mL 和乙醚 10 mL。将圆底烧瓶置于水浴锅中加热,开启冷凝水。维持微沸状态 4 h。取小烧杯和经与试样相同脱脂处理并经丙酮冲洗后的滤纸置于烘箱中烘干至恒重,放入干燥器中备用。停止加热后,将烧瓶静置冷却,转移全部液体到滤纸上进行抽滤,并用丙酮冲洗至滤出液无色,将滤纸和滤渣一起转移到小烧杯中,放入烘箱中在 $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下烘干至恒重,置于干燥器中。

1.3.4 中性洗涤纤维的测定

热抽提单元:称取约 2 g 石英砂放入石英过滤坩埚中,然后准确称取约 0.5 g 脱脂后试样,放置于石英砂上面。将盛有样品的石英坩埚放置在纤维分析仪的热浸提单元上,在热浸提单元中加入约 100 mL 中性洗涤剂和 25 mg α -高温淀粉酶,并加入 1.0 mL 正辛醇作为消泡剂,快速加热至沸,并调整功率保持微沸状态 1 h。加热结束后,立即进行抽滤,并用 90°C - 100°C 水冲洗管壁和剩余物,直至滤出液无泡沫。

冷抽提单元:将热浸提后的试样和坩埚放在纤维分析仪的冷浸提单元上,用丙酮冲洗剩余物 3 次,确保剩余物与丙酮充分混和,至滤出液无色为止。抽干后将坩埚和剩余物放入 $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干 3-4 h 至恒量,在干燥器中冷却后称量。再烘干 30 min,冷却,称量,直至两次称量之差小于 2 mg。然后将坩埚和剩余物置于马弗炉中,在 $(510 \pm 10)^\circ\text{C}$ 条件下灰化 3 h,

于干燥器中冷却后称重。

1.3.5 酸性洗涤纤维的测定

参照 1.3.4, 在热浸提单元中, 加入大约 100 mL 酸性洗涤剂(替代中性洗涤剂) 不用加入淀粉酶。

1.3.6 酸洗木质素的测定

热抽提单元步骤参照 1.3.5; 冷抽提单元中丙酮冲洗抽干后, 在每个坩锅内放置一玻棒, 加入 25 mL 72% 硫酸, 搅拌 3 h 后过滤, 其余步骤参照 1.3.4。

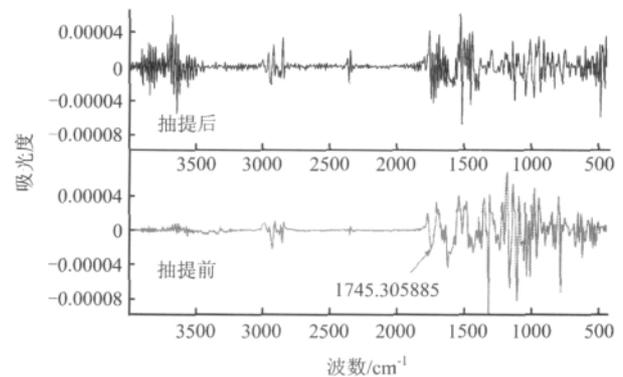
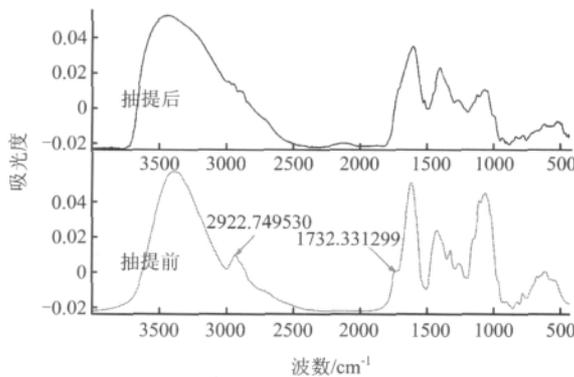
2 结果与讨论

2.1 空白实验及助滤剂的选择

进行空白实验, 考察酸洗硅藻土和石英砂分别用作助滤剂的流失情况。单位表示为每克助滤剂按实际检测步骤处理后损失的克重, 数据如表 1。

表 1 助滤剂的损失情况

	损失的酸洗硅藻土	损失的石英砂
NDF	(0.0008 ± 0.0009) g/g	(0.0003 ± 0.0003) g/g
ADF	(0.0015 ± 0.0014) g/g	(0.0004 ± 0.0002) g/g
ADL	(0.0032 ± 0.0007) g/g	(0.00065 ± 0.0002) g/g



左图为吸收光谱, 右图为光谱的二阶导数处理

图 2 脱脂前后的烟草制品的傅立叶红外光谱图

通过红外光谱比较了抽提前后烟草主要成分的变化(见图 2)。左图显示为抽提前后烟草的吸收光谱, 箭头所示的两处吸收峰 2922 cm^{-1} 和 1732 cm^{-1} 左右(肩峰)分别为 $-\text{CH}_2$ 和 $\text{R}-\text{C}=\text{O}-\text{O}$ 化合物的吸收区域。特别是 $1720-1750\text{ cm}^{-1}$ 间的吸收峰, 常被用来判定脂质化合物存在与否。同时在 1100 cm^{-1} 附近有该两类化合物强烈的伸缩振动区域, 表明该两处吸收峰主要是脂溶性化合物引起的分子振动, 且在烟草中含有较高的比重。洗涤后 2922 cm^{-1} 和 1732 cm^{-1} 两处的吸收峰难以辨认, 基本可以确认脂溶性化合物被去除。右图

经中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和酸洗木质素测试表明, 每克石英砂的损失要小于酸洗硅藻土。经观察, 相同情况下石英砂的过滤速度也快于酸洗硅藻土, 因此本方法选择石英砂作为助滤剂。

2.2 样品脱脂及其对洗涤纤维含量测定的影响

2.2.1 样品脱脂方法的验证

由于待测样品的不确定性, 本方法选择采取热抽提的脱脂方式。经过傅立叶红外光谱对抽提前后的样品进行了验证, 确认了用苯、乙醇、乙醚混合溶剂回流 4 h 能除去绝大部分酯溶性的干扰物质。

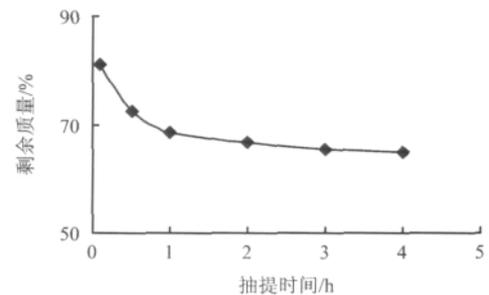


图 1 烟草样品脱脂的失重曲线

为二阶导数处理图, 有利于辨别难以用吸收光谱直接观测出的微小差别。从抽提前后的二阶导数谱中可以看出, 原始谱中脂质判定峰 1745 cm^{-1} 洗涤后同测试噪音相似, 可以判定该样本中无脂质类化合物。因此确认该烟草前处理方法对脂质类化合物去除有效。

2.2.2 脱脂对洗涤纤维素含量测定的影响

郭小义等认为脱脂工艺对烟草样品分析结果影响不大, 可以不进行脱脂处理^[18]。由于烟草样品种类多, 成分复杂、差异较大。对烟草样品脱脂后分析, 一方面可以减小干扰物质带来的误差, 提高分析的准确

性;另一方面,经过脱脂,可以增加分析检测的上样量,提高结果的重复性。脱脂的方法有冷浸提、热浸提、索氏抽提等方法,浸提的效果略有不同。经实验表明(见表2),虽然部分样品即使不进行脱脂,最后检测结果的差异很小,但仍有部分样品脱脂前后的检测数据

差异较大。考虑到残渣容易堵塞石英坩埚滤芯,且烟叶中烃类、萜烯类、脂肪酸类、甾醇类等脂溶性成分含量较高,例如茄尼醇可占烟叶重量0.3%~3%^[19],对溶剂抽提法定量结果影响较大,建议予以考虑去除。

表2 脱脂对部分样品检测结果的影响

(%)

处理	样品 A			样品 B		
	NDF	ADF	ADL	NDF	ADF	ADL
脱脂	21.49	16.40	1.30	16.06	13.20	0.87
未脱脂	21.57	16.45	1.35	18.62	14.91	1.44

2.3 淀粉对中性洗涤纤维含量测定的影响

以往的研究表明,烟草及烟草制品中的淀粉含量一般在2%~4%,而烤烟烟叶的淀粉含量相对较高^[20]。对试样进行脱脂和中性洗涤剂处理,在残渣中仍有部分淀粉残留(见图3),表明烟叶中的淀粉不易去除,会对中性洗涤纤维含量的测定带来一定的影响。因此,在测试中性洗涤纤维时,建议加入高温淀粉酶对淀粉进行处理。

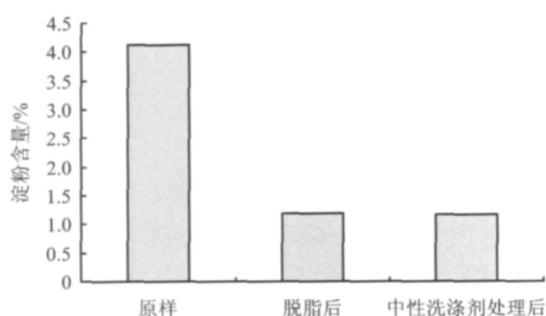


图3 烤烟烟叶经过脱脂和中性洗涤剂处理后的淀粉残留

2.4 重复性实验

选择某样品进行重复性分析测试,数据如下:

可以看出,NDF、ADF的测试重复性较好。ADL的含量因为相对较低,导致RSD略大。

2.5 方法检测限、定量限的确定

本检测方法的检测限和定量限由空白试验的标准偏差(SD)计算,即:3倍SD为检测限,10倍SD为定量限。检测限和定量限以烟草及其烟草制品的上样量百分比记(一般上样量约为0.7g干物质)。

表3 重复性实验数据

	NDF	ADF	ADL
1	19.87	12.69	1.27
2	20.04	13.51	1.43
3	18.23	12.40	1.36
4	18.72	11.99	1.43
5	18.70	12.62	1.25
6	19.36	12.41	1.45
7	19.27	12.37	1.60
8	19.06	12.56	1.40
平均值/%	19.16	12.57	1.40
SD	0.61	0.44	0.11
RSD	3.19%	3.48%	7.82%

表4 方法检测限、定量限

	方法检测限/%	方法定量限/%
NDF	0.26	0.86
ADF	0.17	0.57
ADL	0.17	0.57

2.6 回收率实验

取微晶纤维素作为纤维素标样分别进行NDF、ADF、ADL的实验。数据(如下表5、6)表明,微晶纤维素的中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量在97.0%和99.9%,而酸洗木质素含量为0.01%,说明本方法是

对检测样品中的洗涤纤维素含量有较好的选择性和灵敏度。加入烟草样品中进行相同实验,得到中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维回收率为 89%~101.4%、93.8%~

96.3%。由于半纤维素和木质素的标准品无法获取,因而,对于半纤维素和木质素的洗涤纤维回收率未进行考察。

表5 样品回收率测试结果 (%)

样品名称	NDF	加入纤维素量	测定值	回收率	ADF	加入纤维素量	测定值	回收率
空白	0.0	100.0	97.0	97.0	0.0	100.0	99.9	99.9
样品一	24.1	8.4	31.6	89.3	17.2	8.4	25.1	93.8
样品二	18.5	8.8	27.4	101.4	12.5	8.5	20.7	96.3

表6 样品检出率测试结果 (%)

样品名称	ADL	加入纤维素量	测定值	检出率
空白	0.0	100.0	0.0	0.0
样品一	1.7	8.3	1.7	0.8
样品二	1.6	8.3	1.6	0.1

注:1. 纤维素不应在 ADL(酸洗木质素)测试中检出,故标注“检出率”。

2.7 对烟草和烟草制品中中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和酸洗木质素含量的研究

对烤烟、白肋烟、晒烟、烟梗、造纸法薄片等不同烟草和卷烟制品中的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和酸洗木质素的含量进行了测定,其中(ADF-ADL)可近似看作纤维素含量,(NDF-ADF)可近似看作半纤维素含量,结果见表7和8。

表7 不同种类烟叶原料中 NDF、ADF、ADL、(ADF-ADL)、(NDF-ADF)含量 (%)

样品	NDF	ADF	ADL	(ADF-ADL)	(NDF-ADF)
国内烤烟 A	19.96	12.30	1.18	11.12	7.66
国内烤烟 B	19.73	10.70	2.19	8.51	9.03
国内烤烟 C	17.89	10.97	1.20	9.77	6.92
白肋烟	16.06	13.20	0.87	12.33	2.86
晒烟	20.86	14.02	1.47	12.55	6.84
香料烟	16.93	8.77	1.12	7.65	8.16
造纸法薄片	40.36	37.69	1.64	36.05	2.67
烟梗	26.96	25.81	2.12	23.69	1.15

烟梗、造纸法薄片的 NDF 和 ADF 含量明显较高,ADL 含量与烤烟接近。3 种烤烟样品之间(ADF-ADL)的差异较大,估计是由于不同部位烟叶造成,具体规律还有待进一步分析,李兴波等认为随着烟叶部

位自上而下,纤维素含量逐渐增加^[1]。与其他烟叶相比较,晒烟和白肋烟的 ADF 含量较高,而香料烟的 ADF 含量相对较低。

表 8 不同种类卷烟样品中 NDF、ADF、ADL、(ADF-ADL) 、(NDF-ADF) 的含量

单位 / %	NDF	ADF	ADL	(ADF-ADL)	(NDF-ADF)
烤烟型卷烟 A	20.75	13.75	1.45	12.3	7.00
烤烟型卷烟 B	21.49	16.40	1.30	15.1	5.09
混合型卷烟 A	21.78	15.12	1.29	13.83	6.66
混合型卷烟 B	24.09	17.24	1.65	15.59	6.85

由表 8 可以发现,卷烟中由于梗丝和薄片的使用, ADF 的含量也较高,但不同类型卷烟间 NDF、ADF 和 ADL 含量及其差值差异不明显,说明 4 种被测卷烟配方中梗丝或薄片使用比例都相对较小或接近;另外,所检测的烟草及烟草制品的 ADL 含量基本都在 3% 以下,这些都是与以往的研究结果相一致的。

3 结论

研究确定了采用洗涤剂法测定烟草及烟草制品中中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和酸性洗涤木质素含量的方法:选择石英砂作为助滤剂;苯、乙醇、乙醚混合液作为脱脂溶剂,效果明显;建议加入高温淀粉酶对淀粉进行处理,会减少其中性洗涤纤维含量的测定带来的影响。

研究还发现了烟梗、造纸法薄片的 NDF、ADF 含量高,出烟叶 1 至 2 倍;晒烟和白肋烟的 ADF 含量较高,达到 13%~14%;而不同类型卷烟中由于烟叶配方比例的作用,NDF、ADF、ADL 相互间差值相比无明显差异,在 2% 的范围内。

本方法准确、有效,以期为烟草中纤维素含量的相关研究提供参考。

参考文献

[1] 李兴波, 阎克玉, 阎洪祥, 等. 河南烤烟(40 级) 细胞壁物质含量及规律性研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 1999, 14(3): 27-30.

[2] 郑书敏. 烟杆 - 潜在的纸浆造纸原料[J]. 国际造纸, 2001, 20(1): 46-48.

[3] 王月侠, 葛善礼, 贾涛, 等. 烟梗化学组成的分析[J]. 烟草科技, 1996, (3): 16-17.

[4] 柴巍中. 膳食纤维主要分析方法及其在我国的应用[J]. 中国食物与营养, 2003, (8): 36-38.

[5] 蒋永清. 纤维性物质分析方法的演变[J]. 国外畜牧学, 1994, (6): 32-33.

[6] GB/T 6434 — 94. 饲料中粗纤维测定方法[S].

[7] 冯继华, 曾静芬, 陈茂椿. 应用 Van Soest 法和常规法测定纤维素及木质素的比较[J]. 西南民族学院学报, 1994, 20(1): 55-56.

[8] Standard Terminology of Cellulose and Cellulose Derivatives. ASTM International, Designation: D 1695 — 96 (Reapproved 2001).

[9] Standard Test Method for Acid-insoluble Lignin in Wood. ASTM International, Designation: D 1106 — 96 (Reapproved 2001).

[10] Fulgencio S. In Vitro Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis. J. Agric. Food Chem., 2000, (48): 3342 — 3347.

[11] GB/T 2677.10 — 1995. 造纸原料综纤维素含量的测定[S].

[12] GB/T 8310 — 2002. 茶粗纤维测定[S].

[13] GB/T 12394 — 90. 食物中不溶性膳食纤维的测定方法[S].

[14] GB/T 747 — 2003. 纸浆酸不溶木质素的测定[S].

[15] AOAC 978.10 Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food (F. G. Crucible) [S].

[16] AOAC 978.18 Water Activity of Preserved Food[S].

[17] AOAC 2002.04 Anylase-treated Neutral Detergent Fiber in Feeds[S].

[18] 郭小义, 戴云辉, 郭紫明, 等. 应用纤维素测定仪测定烟草中的纤维素[J]. 烟草科技, 2009, (1).

[19] Rowland R. L., Latimer P. H., Giles J. A. Fluecured Tobacco Isolation of Solanesol, anunsaturated alcohol[J]. Amer. Chem. So., 1956, 78: 4680-4683.

[20] 孙文梁, 周宛虹, 余永楨. 酶水解—离子色谱法测定烟草及烟草制品中的淀粉[M]. 中国烟草学会学术年会论文集(农业部分), 2009: e 64-71.