

# 分光光度法定量测定烟草叶面分泌物含量研究

张小全, 杨志晓, 李钦奎, 李 伟, 杨铁钊

(河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**用紫外可见分光光度计对烟草叶面分泌物提取液进行定量检测,并对不同基因型烟草叶面分泌物的二氯甲烷萃取液进行全波长扫描分析.结果发现,235 nm处有一特征吸收峰,在此波长下建立定量测定的回归方程,并对回归方程的准确性进行检验,发现235 nm处的检测误差小于5%.用分光光度法可对烟草叶面分泌物进行快速、简便有效的定量检测.

**关键词:**分光光度法; 定量测定; 叶面分泌物; 烟草

中图分类号:S852.65

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)04-0018-03

## Determination of the Exudates from Tobacco Leaf Surface Glandular by Spectrophotography

ZHANG Xiao-quan, YANG Zhi-xiao, LI Qin-kui, LI Wei, YANG Tie-zhao

(College of Tobacco Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:**The exudates from tobacco leaf surface glandular were tested by UV-visible absorption spectrum. The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extracts from the different tobacco genotypes of leaf surface were investigated by wavelength scanning spectrometer in the range of 200 – 1 000 nm. There was a stronger absorption peak at 235 nm for the different tobacco genotypes. Regression equation was obtained with standard solutions. Its accuracy was tested under 235 nm and the error was less than 5%. The correlation was higher, which may be relevant to that terpenoid components (the major components of tobacco leaf surface glandular exudates). The spectrophotography by spectrometer maybe the simple and easy determination of the leaf surface glandular exudates of tobacco.

**Key words:**spectrophotography; quantitative detecting; leaf surface glandular exudates; tobacco

烟草叶面分泌物与烟叶香气物质密切相关,其含量高低对烟叶香气质量有重要影响<sup>[1]</sup>.一般而言,烟草叶面分泌物较多,粘性较大,表现出较浓的香味,去除表面分泌物后烟叶香气和口味明显减弱.烟草叶面分泌物主要由烟叶表面腺毛的腺头细胞分泌的萜醇类物质与糖酯类物质和由烟叶表面细胞分泌的蜡质、脂质、挥发性碳氢化合物以及其他复杂的高分子化合物或简单的低分子链烃物质组成<sup>[2-3]</sup>.大量的研究表明,烟草叶片分泌物的多少受品种、生态环境、栽培技术等多种因素的影响<sup>[4-8]</sup>.研究不同材料在不同栽培措施下的叶面分泌物产生规律,将对烤烟新品种选育和优质烤烟栽培技术的实施,提高烟

草香气的质和量都具有重要的指导意义.

烟草叶片分泌物的测定方法虽经多年探索,但目前国内外采用的方法仍主要是用二氯甲烷萃取叶面、GC/MS定性和定量分析叶面分泌物<sup>[7-9]</sup>,该方法测定时间长,方法繁琐,且成本高.用有机溶剂萃取,浓缩、干燥后称量测定的方法需要大量的叶面分泌物,而且该方法复杂,费时费事,操作中易造成一定的损失,导致定量检测结果不够准确.分光光度法是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一项技术,具有灵敏度高、操作简便快速的特点,对于复杂的组分系统,无需分离即可检测出其中所含的微量组分.本文采用分光光度法对叶面分泌物进行定量分析,探

收稿日期:2010-04-08

作者简介:张小全(1980—),男,讲师,博士;通信作者:杨铁钊(1956—),男,教授, E-mail: yangtiezhao@126.com

基金项目:河南省烟草专卖局项目(hykj200817);中国烟草总公司项目(110201002008)

讨论烟草叶面分泌物快速定量测定方法。

## 1 材料与方 法

烤烟品种(系)为 K326、NC89、8541、红花大金元、铁把子和香料烟 Basma, 种植于河南农业大学科教试验园区。土壤类型为沙壤土;全氮 0.9 g/kg, 速效氮 56.3 mg/kg;全钾 13.5 g/kg, 速效钾 124.56 mg/kg;速效磷 5.3 mg/kg;有机质 13.6 g/kg。4月25日移栽,田间管理按优质烟生产要求进行。移栽后跟踪观察,选择长势一致的烟株,从下部可烤叶算起,对第12、13片叶挂牌标记,当叶片生长将至工艺成熟期(九成熟)时,采收成熟度一致的叶片用于烟草叶面分泌物提取。

参照韩锦峰等<sup>[9]</sup>的烟草叶面分泌物的萃取方法。得到的萃取溶液在 40℃、常压情况下浓缩至 30 mL,移入 50 mL 玻璃瓶中,低温(0℃)避光保存。

将上述待测样转移并用二氯甲烷定容至 50 mL,再稀释 4 倍,进行全波长扫描。将 UNICO2102-PC 紫外-可见分光光度计开机预热 30 min 后,用二氯甲烷作基线、调零,然后用光程为 1 cm 的立方石英比色杯盛待测液,加盖玻璃盖子,以防二氯甲烷挥发。对待测液在 200~1 000 nm 波长范围内连续扫描,每次移动 1 nm。分别扫描得到全波长光吸收图谱,比较确定用于测定标准样品的适宜波长范围。

取上述 6 个烟草基因型的定容后待测液各 20 mL 混合,用水浴锅于 45℃下充分浓缩成膏状物,且无二氯甲烷气味,可得标准样品,供配制系列浓度梯度的标准样品溶液。在 1/10 000 电子天平上称取浓缩后的膏状物 0.113 5 g,用二氯甲烷定容至 100 mL,作母液。分别从母液中移取 0.5、1、2、3、4、5、8 mL,定容于 25 mL 容量瓶中。在选定波长下测得标准溶液的光密度,制作标准样品曲线及回归方程式。

将 6 个基因型的待测样剩余部分按照标准溶液的制作方法浓缩后称质量,定容,制得已知浓度的溶液,分别测得光密度,用回归方程计算其浓度,检验回归方程的误差范围。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶面分泌物萃取液特征吸收光谱分析

通过比较 5 个烟草基因型的叶面分泌物萃取液在 200~1 000 nm 范围的光吸收图谱(图 1)可知,各个烟草基因型的叶面分泌物萃取液在紫外光区均有明显的吸收单峰,吸收峰稳定在 235 nm 附近,不同烟草类型和不同烤烟基因型间叶面分泌物萃取液吸收峰位变化很小。根据化合物结构与光吸收的关系,在紫外区产生光吸收的物质必须具有不饱和结构。烟草叶面分泌物的主要化学成分萜醇类物质具有不饱和结构,与此吸收峰关系密切。

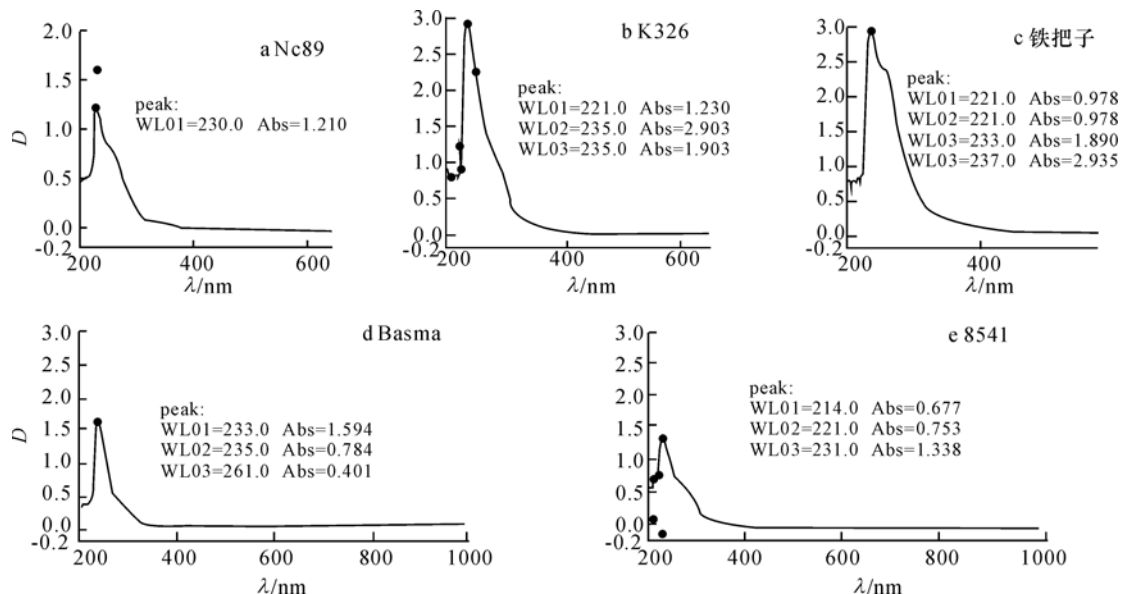


图 1 不同烟草基因型叶面分泌物萃取液的全波长扫描图

Fig. 1 The spectrums of leaf surface glandular exudates of the different tobacco genotypes

### 2.2 标准样品溶液回归方程的建立

以二氯甲烷作对照,将制得的已知浓度的标准溶液在 235 nm 波长下分别比色,记录光密度,并以此建立吸收曲线和回归方程(图 2)。该吸收曲线和方程的决定系数( $R^2$ ) = 0.999 6。不同浓度的分泌物

萃取液在该波长下光密度变化灵敏,测得光密度后,用回归方程计算的浓度与已知浓度的误差在 5% 以内。根据朗伯-比尔定律,标准样品的光密度在 0.2~0.8 范围内,所得的回归方程线性最好,待测样品溶液的光密度控制在该范围内,通过回归方程计算得

到的浓度才能很好地和实际浓度吻合. 因此确定 235 nm 的波长作为烟草叶面分泌物萃取液的吸收检测峰.

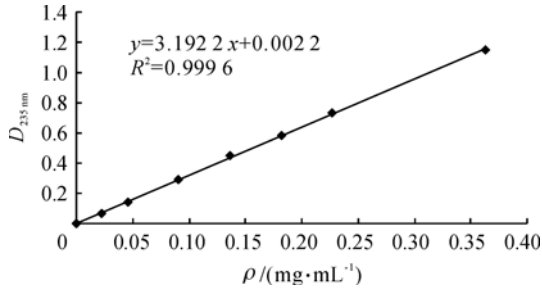


图2 叶面分泌物萃取液的光密度标准曲线和标准回归方程  
Fig.2 The absorbency standard curve and the equation of leaf surface glandular exudates

### 2.3 回归方程的误差检验

将6个基因型的叶面分泌物萃取物浓缩至膏状,取部分萃取物称质量,用二氯甲烷溶剂配制成已知浓度的溶液,并且使得溶液的光密度大致在0.2~0.8范围内.分别用UNICO2102-PC紫外-可见分光光度计测已知浓度溶液的光密度,并通过回归方程计算得到相应的浓度,计算测得浓度和实际浓度之间的误差.结果(表1)表明,由回归方程得到的浓度和已知浓度的误差均能控制在5%以内,说明通过标准溶液建立回归曲线和方程,再利用比色值得出溶液浓度的方法是可行的.可以作为定量测定烟草叶面分泌物的一种简便、准确的方法.

表1 叶面分泌物萃取液和标准回归方程准确度检测

Tab.1 The veracity testing of the standard curve and the equation of the exudates from tobacco leaf surface glandular

品种	$D_{235\text{ nm}}$	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		误差/%
		实测值	计算值	
红花大金元-1	0.634	0.193	0.198	2.59
红花大金元-2	0.681	0.207	0.213	2.90
K326-1	0.975	0.300	0.305	1.67
K326-2	0.880	0.268	0.275	2.61
NC89-1	0.394	0.123	0.123	0.00
NC89-2	0.340	0.109	0.106	-2.75
8541-1	0.704	0.228	0.220	-3.51
8541-2	0.856	0.255	0.267	4.71
铁把子-1	0.355	0.115	0.111	-3.48
铁把子-2	0.540	0.167	0.168	0.60
Basma-1	0.333	0.108	0.104	-3.70
Basma-2	0.344	0.109	0.107	-1.83

## 3 结论

通过烟草不同的类型和基因型的叶面分泌物萃取液的全波长扫描,发现本试验各个样品的最大光密度均在紫外光区235 nm附近,而且呈单峰曲线,

因此比较容易确定最大吸收峰位置.用不同浓度的标准溶液在235 nm波长下分别比色,建立标准回归方程.对12个已知浓度样品的检测结果表明,由回归方程得到的浓度和已知样本浓度的误差均能控制在5%以内,说明在该波长下建立的标准回归方程的准确度能达到定量检测的要求.

烟草叶面分泌物主要化学成分为萜醇类物质,是烟草的重要致香前体物质<sup>[4,5]</sup>,具有紫外光区吸收所必需的不饱和结构.因而,在紫外光区235 nm下检测的叶面分泌物与烟草致香前体物质关系密切.本试验建立的定量方法检测出烟叶叶面分泌物的多少,可以反映烟叶表面主要致香前体物质的量,但只能代表烟叶香气的一部分,定量出的物质对烟叶总体香气的贡献和影响有多大,还有待进一步研究.

用分光光度法对叶面分泌物进行定量检测,可实现烟草叶面分泌物的简便、快速、低成本、大批量、有效定量测定,为利用叶面分泌物指标进行高香气烟草新品种选育和优质烤烟栽培技术研究奠定基础.

### 参考文献:

- [1] 史宏志,官春云.烟草腺毛分泌物的化学成分及遗传[J].作物研究,1995,9(3):46-49.
- [2] CHAKRABORTY M K. The chemistry of tobacco trichome[J]. Tobacco Science,1963,7:122-127.
- [3] CHANG S Y, GRUNWALD C. Duvatrienediol, alkanes, and fatty acids in cuticular wax of tobacco leaf of various physiological maturity[J]. Phytochemistry,1976,15:961-963.
- [4] SEVERSON R F, ARRENDAL R F, CHORTY O T, et al. Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco type[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1984(32):566-570.
- [5] JOHNSON A W, SEVERSON R F, HUDSON J, et al. Tobacco leaf trichomes and their exudates[J]. Tobacco Science,1985,29:67-72.
- [6] CHANG K W, WEEKS W W, WEYBREW J A. Changes in the surface chemistry of tobacco leaf during curing with particular emphasis on trichomes[J]. Tobacco Science,1985,29:122-127.
- [7] NIELSON M T, SEVERSON R F. Variation of flavor components on leaf surfaces of tobacco genotypes differing in trichome density[J]. Agric Food Chem,1990,38:467-471.
- [8] WEEKS W W, SISSON V A, CHAPLIN J F. Differences in aroma, chemistry, solubilities, and smoking quality of cured flue-cured tobaccos with aglandular and glandular trichomes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1992,40:1911-1917.
- [9] 韩锦峰,王广山,王彦亭,等.烤烟叶面分泌物的初步研究[J].中国烟草科学,1995(2):10-12.

【责任编辑 周志红】