



王光耀,王仰勋,何声宝,等. DNA 质量浓度测定在烟丝加工均质化中的应用研究[J]. 轻工学报,2022,37(3):88-93.
WANG G Y, WANG Y X, HE S B, et al. Application of DNA mass concentration determination in cut tobacco processing homogenization[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(3):88-93. DOI:10.12187/2022.03.012

DNA 质量浓度测定在烟丝加工均质化中的应用研究

王光耀¹, 王仰勋¹, 何声宝², 白国强¹, 张威², 王英元², 张晓慧², 刘楠²

1. 江苏中烟工业有限责任公司 南京卷烟厂, 江苏 南京 210012;
2. 国家烟草质量监督检验中心, 河南 郑州 450001

摘要: 为探索与研究实用的烟丝加工均质化检测手段, 以烟丝 DNA 质量浓度作为烟丝加工均质化检测指标, 以常规化学成分检测和感官评吸结果评价样品的均匀性后, 测定了不同品种、不同重复烟丝样品 DNA 质量浓度, 以分析 DNA 质量浓度测定用于烟丝加工均质化检测的合理性, 设定并验证了烟丝 DNA 质量浓度合理波动范围, 实现了对烟丝加工均质化的检测。结果表明: 以“DNA 质量浓度平均值 \pm 2 倍标准差”作为烟丝 DNA 质量浓度的合理波动范围, 可以达到烟丝加工均质化检测的目标, DNA 质量浓度测定在未来卷烟加工均质化领域有着广阔的应用前景。

关键词: DNA 质量浓度测定; 烟丝加工均质化; 卷烟加工

中图分类号: TS213.2; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)03-0088-06

0 引言

近年来, 随着我国烟草特色工艺技术的推广和发展, 烟草行业对卷烟生产过程中的精细化程度及卷烟产品的稳定性、一致性要求越来越高^[1-2], 消费者对卷烟产品质量稳定性的要求也伴随卷烟产品的结构升级不断提高^[3-4]。新的形势对卷烟工业企业的生产加工提出了新的要求, 企业要获得更好的发展, 势必要对卷烟生产的均质化进行深入研究^[5]。均质化是指同一批次或不同批次的产品品质一致, 不同生产点生产的同规格产品品质一致^[6]。

卷烟生产的均质化研究涉及很多方面, 而制丝线烟丝掺配、加工均匀性是其中较为重要的研究内

容, 直接关系到卷烟产品质量稳定性和一致性^[7]。烟丝掺配、加工的均质化检验, 是塑造卷烟产品风格特征、保障卷烟产品质量稳定性的必要环节^[8], 目前的检验手段主要是人员现场监督、成品评吸检验和成品化学检验, 存在一定局限性: 人员现场监督一般是按照产品工艺要求对某个加工过程进行监督, 很难实现生产加工的全程监督; 评吸检验是主观性检验技术, 虽然检验人员可以大体确定不同批次样品总体风格特征的差异, 但很难客观、准确地反映原料均质化程度和工艺参数设置的合理性; 化学检验技术是评吸检验技术的补充, 虽然一定程度上能够反映原料掺配的均匀程度, 但是也存在时效性差且不能为工艺参数设置提供参考的问题; 基于化学检验技术发展

收稿日期: 2021-05-31; 修回日期: 2021-11-17

基金项目: 江苏中烟工业有限责任公司项目(532020DS17)

作者简介: 王光耀(1978—), 男, 河南省平顶山市人, 江苏中烟工业有限责任公司高级工程师, 主要研究方向为烟草工程。E-mail: ni01812@jszygs.com

通信作者: 刘楠(1980—), 男, 河南省邓州市人, 国家烟草质量监督检验中心高级工程师, 主要研究方向为烟草检测。E-mail: dananliu@163.com

起来的红外检验技术,同样不能为工艺参数设置提供参考,且其检验数据的准确性还有待提高^[9]。

因此,寻找合适的检测指标或技术手段,既能对烟丝掺配和加工均匀性进行判断,又能对工艺参数的不正常波动进行预警,对卷烟生产的均质化有重要意义。烟草DNA存在于天然原料中,对于原料掺比、工艺参数的变化都较为敏感^[10-11],原料在制丝线各个工艺环节中DNA质量浓度的变化,可以客观反映其均质化程度,DNA质量浓度测定技术在原料均质化检验领域具有应用潜力。鉴于此,本文拟以常规化学成分检测和感官评吸评价样品的均匀性,然后测定不同品种、不同重复烟丝样品DNA质量浓度,以分析DNA质量浓度测定用于烟丝加工均质化检测的合理性,设定并验证烟丝DNA质量浓度的合理波动范围,以期对烟丝加工均质化的检测提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂:氯仿(三氯甲烷)、西曲溴铵(CTAB)、乙醇、苯酚,均为色谱纯,德国默克公司产。

主要仪器:Nano-300型超微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司产;AA3型连续流动分析仪,英国Seal公司产;FP240型烘箱,德国Binder公司产。

1.2 取样方法

在南京卷烟厂某规格卷烟的制丝线进行取样,取样点设在贮丝柜之后的传送带上,烟丝经过该取样点之后,被风力传送至卷接车间。取样人员佩戴一次性手套,随机抓取5把烟丝,其质量之和不小于1 kg,将烟丝放在一次性塑料布(2块,1 m×1 m)上,现场按4分法进行混匀,混匀后按5点取样法抽取样品约50 g(每个取样点约10 g),装入可密封的样品袋内,其余烟丝放回制丝线传送带。在取样点随机进行10次取样(样品编号s1—s10),送至实验室进行检测。

在与s1—s10同规格同配方卷烟制丝线取样点随机进行3次取样(样品编号y1—y3),在与s1—s10不同规格不同配方卷烟制丝线取样点也随机进行3次取样(样品编号b1—b3),随后将样品袋密封

好,送至实验室进行检测。另外,以南京卷烟厂卷烟生产常用的5个品种片烟的烟丝样品(样品编号p1—p5)做对比实验。

1.3 样品均匀性评价方法

1) 常规化学成分检测方法

按照相应标准的规定^[12-17],对烟丝样品进行常规化学成分糖、总氮、总植物碱、氯、钾和水分检测,以各指标的相对标准差和《打叶烟叶 烤烟质量均匀性评价》(YC/T 366—2010)^[18]所测定的糖碱比评价样品的均匀性。

2) 感官评吸方法

将抽取的烟丝制成卷烟,依照《卷烟 第4部分:感官技术要求》(GB 5606.4—2005)^[19]和《烟草及烟草制品 感官评价方法》(YC/T 138—1998)^[20]进行评吸,以感官评吸结果来辅助评价样品的均匀性。

1.4 DNA质量浓度测定方法

为确定适宜的用于DNA质量浓度测定的样品质量,进行了8个质量梯度(0.025 g,0.050 g,0.075 g,0.100 g,0.125 g,0.150 g,0.175 g和0.200 g)的DNA提取实验,每个质量梯度进行6次平行实验,对比DNA提取效果以确定适宜的DNA提取样品质量。

所有样品均在实验室内进行粉碎,过40目筛,并将过筛后的样品反复混匀。样品DNA提取过程如下:将适量样品和液氮在研钵中研磨,而后移入2 mL离心管中;加入600~800 μL的CTAB提取缓冲液(CTAB于65℃水浴预热),混匀,每3~5 min轻轻振荡几次,20 min后12 000 r/min离心10~15 min;小心吸取上清液500 μL,在上清液中加入各400 μL的苯酚、氯仿溶液,混匀,于4℃,12 000 r/min条件下,离心10~15 min;吸取上清液350 μL,加入等体积的氯仿,混匀,于4℃,12 000 r/min条件下,离心10~15 min,重复2~3次,以不出现蛋白层为限;取上清液,-20℃沉淀1~2 h,于4℃,12 000 r/min条件下,离心10~15 min;弃去上清液,用50%~70%乙醇洗涤沉淀2次;室温下干燥10~15 min后,于-20℃或-70℃下保存备用。

为保证DNA质量浓度测定结果的准确性,每个样品均进行多次平行检测。以超微量分光光度计进行所抽取样品的DNA质量浓度测定,DNA的纯度

根据 OD260/OD280 比值判断。

1.5 DNA 质量浓度测定用于烟丝加工均质化检测的合理性分析方法

以不同品种样品 DNA 质量浓度测定结果进行合理性分析,理论上掺配、加工情况一致性较好的烟丝其 DNA 质量浓度应该非常接近,因此可以尝试利用烟丝 DNA 质量浓度来衡量烟丝掺配、加工的均匀性。以样品 p1—p5 做对比实验,每个品种进行 3 次平行实验,以 DNA 质量浓度为指标,确定 DNA 质量浓度测定技术检测烟丝样品加工均质化的合理性。

以不同重复样品 DNA 质量浓度测定结果进行合理性分析。对样品 s1—s10 中提取的 DNA 质量浓度进行检测,每个样品进行 8 次平行测定,取其平均值作为样品 DNA 质量浓度。以 DNA 质量浓度为指标,确定 DNA 质量浓度测定技术检测样品加工均质化的合理性。

1.6 DNA 质量浓度波动范围确定及其有效性验证方法

利用统计学 95% 置信区间的计算方法,以 DNA 质量浓度平均值 ± 2 倍标准差,即($S_m \pm 2SD$)作为烟丝 DNA 质量浓度的波动范围。

理论上,同规格同配方的卷烟因其具有同样的烟丝掺配、加工工艺条件,其 DNA 质量浓度应该是接近的,而不同规格不同配方卷烟的 DNA 质量浓度应该具有较大差别。对样品 y1—y3 和 b1—b3 的 DNA 质量浓度进行检测,以 DNA 质量浓度为指标验证烟丝 DNA 质量浓度波动范围的有效性。

2 结果与讨论

2.1 样品均匀性评价结果

2.1.1 常规化学成分评价结果 烟丝样品 s1—s10 的常规化学成分检测结果如表 1 所示。由表 1 计算可得,样品 s1—s10 总氮、氯、碱、糖、钾水分的相对标准差分别为 2.01%、2.05%、1.39%、1.78%、3.37%、4.13%,糖碱比相对标准差也只有 2.23%,达到 a 级 (<8%),说明 10 次取样的样品均匀性、一致性较好,同时也说明取样时制丝线的工作状态正常,在制丝线取到的样品都是有效的,可以用来做进一步的分析。

2.1.2 感官评吸评价结果 以 s1 作为对照样品,分别与 s2—s10 进行对比评吸和三角评吸,对比评吸中所有样品的得分范围为 89~91 分,样品得分差异在 1 分之内,说明所取样品无显著性差异;样品的三角评吸结果表明所有样品无差异,进一步说明了所取样品的均匀性、一致性较好。

2.2 DNA 质量浓度测定方法条件优化

不同质量的烟丝样品 DNA 质量浓度测定结果如表 2 所示。由表 2 可知,随着样品质量的增加, DNA 质量浓度也逐步增加。样品量太少,不易称取,且影响结果的均匀性;样品量过大,裂解不充分,将导致 DNA 质量浓度下降,且样品量过大,对 DNA 的纯度也有一定影响。0.100 g 样品用于 DNA 质量浓度测定与分析,质量适中,比较容易称取,且裂解完全, DNA 纯度和实验重复性均较好。

表 1 烟丝样品常规化学成分检测结果

Table 1 Test results of routine chemical composition of cut tobacco samples

样品	总氮/%	氯/%	碱/%	糖/%	钾/%	水分/%	糖碱比
s1	1.95	0.35	2.28	20.85	2.28	10.80	9.15
s2	2.05	0.35	2.26	19.83	2.48	10.65	8.79
s3	2.00	0.34	2.24	20.26	2.29	10.72	9.03
s4	1.99	0.34	2.23	20.37	2.40	10.37	9.12
s5	2.08	0.35	2.31	19.86	2.40	9.56	8.60
s6	2.00	0.34	2.24	19.69	2.47	9.72	8.81
s7	1.97	0.34	2.33	20.28	2.43	10.51	8.71
s8	2.02	0.36	2.28	20.15	2.50	10.17	8.83
s9	2.05	0.34	2.25	20.62	2.47	10.07	9.17
s10	2.05	0.35	2.27	20.14	2.52	10.03	8.88
平均值	2.02	0.34	2.27	20.21	2.42	10.26	8.91
标准差	0.04	0.01	0.03	0.36	0.08	0.42	0.20

表2 不同质量的烟丝样品 DNA 质量浓度测定结果

Table 2 Determination results of DNA mass concentration of cut tobacco samples with different weights

样品质量/g	DNA 质量浓度/(ng·μL ⁻¹)						平均值/(ng·μL ⁻¹)	标准差/(ng·μL ⁻¹)	相对标准差/%
	平行检测 1	平行检测 2	平行检测 3	平行检测 4	平行检测 5	平行检测 6			
0.025	26.561	24.983	26.634	25.252	27.634	24.598	25.944	1.177	4.54
0.050	43.888	49.163	48.506	45.586	47.667	43.996	46.468	2.298	4.94
0.075	76.033	75.102	75.014	74.451	75.145	79.145	75.815	1.709	2.25
0.100	117.997	119.687	122.983	124.471	116.974	122.845	120.826	3.038	2.51
0.125	145.548	142.897	140.142	139.699	138.874	144.964	142.021	2.852	2.01
0.150	151.334	151.425	157.861	159.013	152.753	150.813	153.867	3.616	2.35
0.175	150.567	168.546	165.369	160.779	170.229	161.569	162.843	7.071	4.34
0.200	165.718	149.849	159.576	155.226	159.589	149.580	156.590	6.288	4.02

2.3 DNA 质量浓度测定用于烟丝加工均质化检测的合理性分析结果

2.3.1 不同品种烟丝样品 DNA 质量浓度分析结果

不同品种烟丝样品(样品 p1—p5)的 DNA 质量浓度测定结果如表 3 所示。由表 3 可知,各品种间 DNA 质量浓度差异较大,说明如果卷烟生产中烟丝掺配比例发生变化,烟丝整体的 DNA 质量浓度也会发生显著变化,以烟丝 DNA 质量浓度来衡量烟丝掺配的均匀性是合理的。

表3 不同品种烟丝样品 DNA 质量浓度测定结果

Table 3 Determination results of DNA mass concentration of cut tobacco samples of different varieties

样品	DNA 质量浓度/(ng·μL ⁻¹)			平均值/(ng·μL ⁻¹)
	平行检测 1	平行检测 2	平行检测 3	
p1	156.786	158.364	157.259	157.470
p2	138.257	135.632	137.953	137.281
p3	92.756	96.753	95.147	94.885
p4	89.632	88.254	89.121	89.002
p5	67.451	68.127	66.147	67.242

2.3.2 不同重复烟丝样品 DNA 质量浓度分析结果

不同重复烟丝样品(s1—s10)的 DNA 质量浓度测定结果如表 4 所示。由表 4 可知,10 个样品的 DNA 质量浓度分析结果均匀性、一致性较好,10 个样品的 DNA 质量浓度 SD 为 1.895 ng/μL,经计算相对标准差仅为 2.06%,说明可以用烟丝 DNA 质量浓度来对烟丝样品的均匀性进行检测。

2.4 DNA 质量浓度范围确定及有效性验证结果

根据 2.3.2 中的检测结果,借用统计学 95%置信区间的计算方法,以(92.050±3.790) ng·μL⁻¹作为烟丝 DNA 质量浓度波动范围。样品 s1—s10 在

表4 不同重复烟丝样品的 DNA 质量浓度测定结果

Table 4 DNA mass concentration determination results of different repeated cut tobacco samples

样品	DNA 质量浓度/(ng·μL ⁻¹)
s1	92.201
s2	95.061
s3	89.292
s4	92.441
s5	90.211
s6	93.440
s7	91.373
s8	91.254
s9	90.571
s10	94.672
平均值	92.050
标准差	1.895

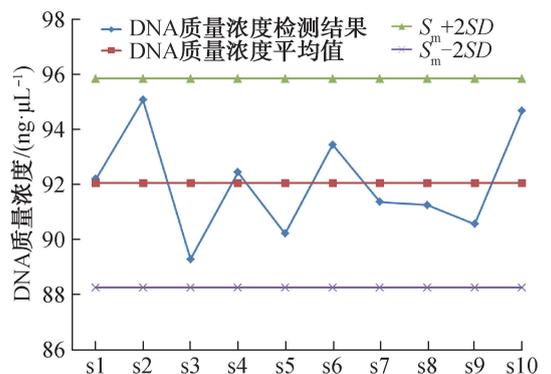


图1 样品 s1—s10 在烟丝 DNA 质量浓度波动范围内的位置示意图

Fig. 1 Position diagram of sample s1—s10 within the fluctuation range of cut tobacco DNA mass concentration

该烟丝 DNA 质量浓度波动范围内的位置如图 1 所示。由图 1 可知,均质化较好的样品 s1—s10 的 DNA 质量浓度均在烟丝 DNA 质量浓度的波动范围内。

样品 y1—y3 和 b1—b3 在该烟丝 DNA 质量浓度波动范围内的位置如图 2 所示。由图 2 可知,样品 y1—y3 与 s1—s10 同规格同配方,其 DNA 质量浓度值均在设定波动范围内,而 b1—b3 与 s1—s10 不同规格不同配方,其 DNA 质量浓度值均在设定波动范围外,说明本文设定的烟丝 DNA 质量浓度波动范围是合理、有效的,可以应用于制丝线烟丝加工均质化的检测。

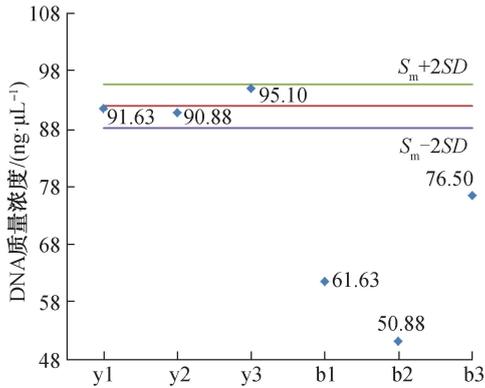


图 2 样品 y1—y3 和 b1—b3 在烟丝 DNA 质量浓度波动范围内的位置示意图

Fig. 2 Position diagram of samples y1—y3 and b1—b3 within the fluctuation range of cut tobacco DNA mass concentration

3 结论

在南京卷烟厂某规格卷烟制丝线末端进行取样,以常规化学成分检测和感官评吸结果对烟丝的均匀性进行了评价,结果表明:所有常规化学成分检测结果相对标准差最高只有 4.13%,两两对比评吸打分结果偏差在 1 分以内,说明样品均匀性、一致性满足要求,可以用于 DNA 质量浓度测定。不同品种烟丝样品 DNA 质量浓度测定结果差异较大,不同重复烟丝样品 DNA 质量浓度测定结果相对标准差为 2.06%,说明以 DNA 质量浓度为检测指标可以来衡量样品均匀性。进一步以($S_m \pm 2SD$)作为 DNA 质量浓度合理波动范围,并以同规格同配方和不同规格不同配方的烟丝样品对该范围进行验证,结果表明以($S_m \pm 2SD$)作为 DNA 质量浓度波动范围是合理有效的,可以对制丝线烟丝加工的均质化进行检测。DNA 质量浓度测定技术在卷烟均质化加工领域具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 陆婉珍,袁洪福,褚小立. 近红外光谱仪器[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [2] 李艳红,何彬. 配方打叶原料均质化的研究与实践:以云南省烟草烟叶公司配方打叶原料细分探索为例[J]. 昆明学院学报,2020,42(6):22-25.
- [3] 衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [4] 张波. 打叶复烤过程化学成分均质化分析[J]. 神州,2017,31:222.
- [5] 王鹏泽,何雷,武广鹏,等. 近红外光谱分析技术在烟草中的研究与应用[J]. 现代农业研究,2021,27(12):22-24.
- [6] 张培弘. 应用信息化技术实现卷烟产品多点异地生产均质化[J]. 数字化用户,2013(10):59.
- [7] 邓发达,朱立军,戴亚,等. 近红外技术测定成品卷烟中总糖和还原糖及绿原酸的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(12):6181-6182,6188.
- [8] 覃鑫. 在线近红外光谱(NIR)快速测定烟草化学成分[J]. 西昌学院学报(自然科学版),2010,24(1):52-54,79.
- [9] 王丽芝,潘存宽,张峻松. 利用近红外快速测定烟草化学成分的研究[J]. 安徽农学通报,2009,15(14):48-49,219.
- [10] WANG W Y, TWU C W, CHEN H H, et al. Long term survival analysis of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA levels EJ3 [J]. Cancer, 2013, 119(5):963-970.
- [11] 李友琼,黄慧嫔,阳文辉,等. 不同保存温度和时间对 EBV-DNA 载量检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(7):877-880.
- [12] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品总植物碱的测定 连续流动硫氰酸钾法:YC/T 468—013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [13] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性

- 糖的测定 连续流动法:YC/T 159—2019 [S].北京:中国标准出版社,2019.
- [14] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法:YC/T 161—2002[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [15] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 氮的测定 连续流动法:YC/T 162—2011[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [16] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法:YC/T 217—2007[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [17] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法:YC/T 31—1996 [S].北京:中国标准出版社,1996.
- [18] 国家烟草专卖局.打叶烟叶 烤烟质量均匀性评价:YC/T 366—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.卷烟 第4部分:感官技术要求:GB 5606.4—2005[S].北京:中国标准出版社,2005.
- [20] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 感官评价方法:YC/T 138—1998[S].北京:中国标准出版社,1998.

Application of DNA mass concentration determination in cut tobacco processing homogenization

WANG Guangyao¹, WANG Yangxun¹, HE Shengbao², BAI Guoqiang¹,
ZHANG Wei², WANG Yingyuan², ZHANG Xiaohui², LIU Nan²

1. Nanjing Cigarette Factory, China Tobacco Jiangsu Industrial Co., Ltd., Nanjing 210012, China;

2. China National Tobacco Quality Supervision and Test Centre, Zhengzhou 450001, China

Abstract: In order to explore and study the practical detection means of cut tobacco processing homogenization, the cut tobacco DNA mass concentration was used as the detection index of cut tobacco processing homogenization. The uniformity of the sample were evaluated through the results of routine chemical composition detection and sensory evaluation. The DNA mass concentration of different varieties and different repeated cut tobacco samples were measured to analyze the rationality of DNA mass concentration measurement for the detection of cut tobacco processing uniformity. The reasonable fluctuation range of cut tobacco DNA mass concentration was set and verified to realize the homogenization detection of cut tobacco processing. The results showed that using the mean value \pm double standard deviation of DNA mass concentration as the reasonable fluctuation range of cut tobacco DNA mass concentration could achieve the purpose of homogenization detection of cut tobacco processing.

Key words: DNA mass concentration determination; cut tobacco processing homogenization; cigarette processing

(责任编辑:吴晓亭)