

烟草农业

领导信箱

ldxx@tobacco.gov.cn

烟草论坛

留言板

电子邮件定制

短信互动

国家烟草专卖局总机

010-63605000

新闻投稿热线:

010-63606303

010-63605947

010-63605142

cx-out@tobacco.gov.cn

高效液相色谱法测定烟叶中的总茄尼醇

2008-07-30

茄尼醇是十分重要的医药原料,具有抗菌、消炎、止血的功效和较强的抗癌生物活性,同时,还是合成治疗心血管疾病、抗癌、抗溃疡等药物如辅酶  $Q_{10}$  及维生素  $K_2$  的中间体<sup>[1-3]</sup>。烟叶中茄尼醇含量丰富,因此利用烟叶特别是废弃烟叶生产茄尼醇,可以获得较高的经济附加值。测定茄尼醇含量的方法,国外报道中主要用气相色谱法<sup>[4]</sup>,但利用该方法时需将待检测样品三甲基甲硅烷化以降低茄尼醇的沸点,该方法实验条件要求高且样品前处理过程复杂,不适合样品数量较多时使用。国内报道的茄尼醇定量分析方法主要是液相色谱法<sup>[1,5-7]</sup>和库仑滴定法<sup>[8]</sup>。库仑滴定法仪器价格低廉,但操作过程繁琐费时,需预先分离有可能和溴反应的杂质后才能测定;液相色谱(HPLC)法不需要分离大多数可溶性杂质,方法简单、准确、快速,是定量分析茄尼醇的最常用方法。茄尼醇在烟叶中以游离态和结合态两种形式存在,其中结合态的茄尼醇主要以酯化形式存在<sup>[4]</sup>。目前利用 HPLC 法检测烟叶中总茄尼醇含量时都要先对烟叶样品进行多次萃取浓缩,然后用氢氧化钾的醇溶液对浓缩物进行皂化,最后再多次萃取并浓缩定容,即得到待测溶液<sup>[6-7]</sup>,此法复杂费时。作者试图建立快速简便的烟叶样品前处理方法,并结合 HPLC 法,分析烟叶中总茄尼醇含量。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

2005 年湖北恩施生产的白肋烟样品(湖北烟草科研院所)。

茄尼醇(标准品,美国 SIGMA 公司);正己烷(AR,上海国药集团化学试剂有限公司);甲醇(SP,美国 Fisher Scientifics 公司);乙醇(SP,江苏汉邦科技有限公司)。

TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); KBF-240 型通风干燥箱(德国 BINDER 仪器公司); HH SY ZI-NI4 型恒温水浴锅(北京长源实验设备厂); METTLE AE200 型电子天平(感量 0.0001g, 瑞士梅特勒仪器公司); 高效液相色谱仪, 包括 PDA-100 检测器、P680 四元梯度泵、TCC-100 柱温箱、ASI-100 自动进样器、CHROMELEON 控制处理软件(美国 DIONEX 仪器公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 烟叶的预处理和茄尼醇的提取

将烟叶去梗后, 在 65 ℃ 的通风干燥箱中干燥 3 h, 粉碎, 过 40 目筛, 制备的烟叶粉末保存于干燥器内备用。准确称取 2.0000 g 烟叶粉末, 置于 50 mL 比色管中, 加入 50 mL 正己烷盖好密封, 置于 65 ℃ 恒温水浴锅中, 每隔 0.5 h 振荡摇匀一次, 24 h 后取出用冷水冷却至室温, 静置, 待烟叶粉末等固悬物沉降, 即制得烟叶的正己烷萃取液。取出 25 ~ 35 mL 正己烷萃取液, 转入另一洁净带塞容器中, 封好备用。余下正己烷萃取液和烟渣过滤, 烟渣用甲醇洗涤后用滤纸包好, 于通风干燥箱中 50 ℃ 干燥 3 h, 于干燥器内保存备用。

### 1.2.2 游离茄尼醇含量的测定

取 4 mL 烟叶的正己烷萃取液, 注入 10 mL 比色管中, 加入适量蒸馏水, 振荡混合成乳浊液, 对萃取液进行水洗除杂, 后转入带塞玻璃离心管中, 以 3500 r/min 离心 8 min 后分层。取上层溶有茄尼醇的正己烷萃取液, 用甲醇稀释 40 倍, 制成待测溶液, 取此溶液进行 HPLC 分析, 测定游离茄尼醇的含量。采用的色谱条件是: 色谱柱: COSMOSIL C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm);

## 2.2 试验条件的确定

### 2.2.1 烟叶样品的烘干温度

选取未经过预处理的同一烟叶样品, 分成 9 份, 依次编号为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>。将其置于通风干燥箱内干燥 3 h, 粉碎, 过 40 目筛, 制备成烟叶粉末。分别精确称取 2.0000 g 粉末, 按照 1.2.1 和 1.2.2 小节中的方法萃取并测定游离茄尼醇的含量, 结果如表 1 所示。由表 1 可知温度在 50 ~ 80 ℃ 时, 烘干温度对正己烷浸提烟叶中游离茄尼醇的影响不大, 但 65 ℃ 略优于 50 和 80 ℃。

### 2.2.2 萃取温度和时间对正己烷萃取茄尼醇的影响

考虑到茄尼醇的熔点为 42.5 ℃ 和易溶于正己烷

的特点,以及提高温度有利于正己烷扩散进入烟叶组织细胞内等因素,设置了 50、65 和 70 °C 3 组水浴温度处理。对同一烟叶样品在不同萃取温度和萃取时间下的萃取效果进行比较;在 3 种不同温度下,分别萃取 15、20、24、39 和 44 h,考察温度和萃取时间对正己烷

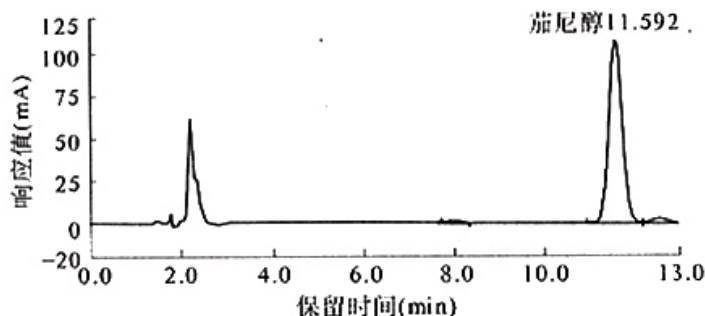


图 1 茄尼醇标准的色谱图

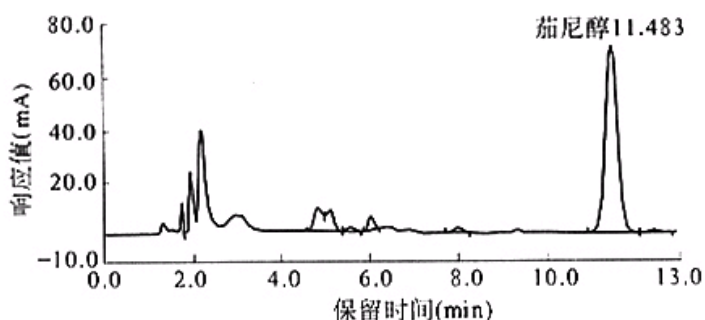


图 2 烟叶提取物中茄尼醇的色谱图

表 1 不同烘干温度处理后烟叶中游离茄尼醇的含量

样品	烘干温度(°C)	游离茄尼醇含量(%)	平均值(%)
A <sub>1</sub>	50	1.29	1.29
A <sub>2</sub>	50	1.31	
A <sub>3</sub>	50	1.28	
B <sub>1</sub>	65	1.33	1.33
B <sub>2</sub>	65	1.35	
B <sub>3</sub>	65	1.32	
C <sub>1</sub>	80	1.31	1.32
C <sub>2</sub>	80	1.33	
C <sub>3</sub>	80	1.32	

萃取游离茄尼醇的影响(见图 3)。由图 3 可知,在 70 °C 下萃取 39 h 的萃取量最高,但与 65 °C 下萃取 24 h 结果相差不大。由于正己烷沸点为 68.7 °C,70 °C 萃取时,比色管内压力大,试验操作要求高,故选择 65 °C、24 h 作为适宜的萃取温度和时间。

### 2.2.3 KOH 浓度和皂化时间的影响

分别用 0.1、0.01 和 0.001 mol/L 的 KOH 水溶液对萃取液进行皂化处理,在 3 个浓度下分别处理 0.25、0.5 和 1 h,考察不同浓度的 KOH 水溶液和皂化时间对总茄尼醇含量测定的影响。结果如图 4,KOH 浓度为 0.01 mol/L 皂化 0.5 h 时效果较好。

浓度为 0.01 mol/L、皂化 0.5 h 时效果较好。

### 2.3 HPLC 工作曲线

准确称取茄尼醇标准品 0.1109 g (含茄尼醇 0.1000 g), 置于 100 mL 容量瓶中, 用正己烷溶解并定容至刻度, 得质量浓度为 1000 mg/L 的标准液。取一定量的茄尼醇标准液用甲醇稀释配制成浓度为 34.000、17.000、8.500、4.250 和 2.125 mg/L 的标准系列溶液。以不同质量浓度的茄尼醇标准溶液 20  $\mu$ L 分别进样, 利用 CHROMELEON 软件自动以峰面积  $Y$  对其质量浓度  $X$  (mg/L) 作图, 线性回归方程为  $Y = 1.2985X + 0.1851$ ,  $r = 0.99998$ 。结果表明, 质量浓度为 2.125 ~ 34.00 mg/L 时, 线性关系良好。

### 2.4 回收率

#### 2.4.1 茄尼醇色谱测定的回收率

茄尼醇色谱测定的回收率其试验结果如表 2 所

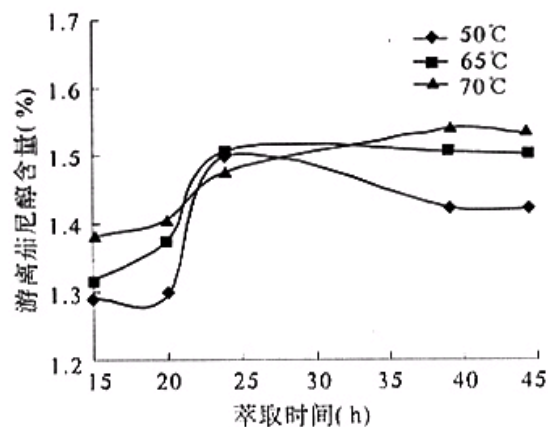


图 3 萃取温度和萃取时间对正己烷萃取游离茄尼醇的影响

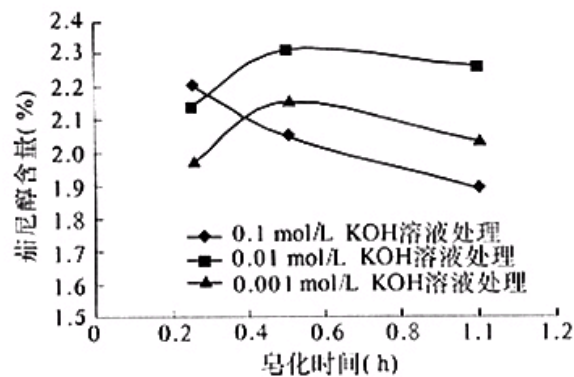


图 4 皂化时间对烟叶总茄尼醇含量的影响

示, 平均回收率 100%, 变异系数 0.729%, 说明该色谱条件下检测结果准确可靠。

#### 2.4.2 烟叶中总茄尼醇分析方法的总回收率

烟叶中总茄尼醇分析方法的总回收率其试验结果见表 3。平均回收率为 97.6%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.7% ( $n = 3$ ), 说明方法准确可靠。

### 2.5 精密度

茄尼醇色谱测定方法的精密度的试验, 5 次测定

茄尼醇色谱测定方法的精密度的试验, 测定同一样品溶液中茄尼醇浓度的结果分别为 28.25、28.31、28.33、28.34 和 28.34 mg/L, 标准偏差为 0.0378 mg/L, 变异系数为 0.134 %。

## 2.6 样品测定结果

测定了 38 个不同烟叶样品中的总茄尼醇和其中任意 5 个样品中游离茄尼醇的含量, 烟叶中总茄尼醇含量在 0.3% ~ 3.3%; 游离茄尼醇占总茄尼醇含量的 63% ~ 84% (表 4)。游离茄尼醇和总茄尼醇来自于同一萃取液, 可见茄尼醇酯也被萃取到正己烷中。在烟叶提取物的色谱图中茄尼醇酯的峰位置无法确认是由于没有茄尼醇酯标准品, 以及茄尼醇酯化物混合物组成的复杂性。所以要测定总茄尼醇含量, 必须将其酯化形式转化成游离茄尼醇。

烟叶残渣的分析表明其茄尼醇含量均在 0.02% 以下, 因此, 在检测烟叶样品中的茄尼醇含量时, 残渣中的茄尼醇可以忽略不计。

表 2 HPLC 测定茄尼醇的回收率

样品 编号	实际值 (mg/L)	测量值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
1	5.000	4.962	99.24		
2	10.000	9.993	99.93		
3	15.000	15.210	101.4	100.0	0.729
4	20.000	19.941	99.71		
5	30.000	29.943	99.81		

表 3 回收率试验结果 (n=3)

试验	本底值 (mg)	添加值 (mg)	测量值(平 均值)(mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	28.33	25	50.79	95.2		
2	28.33	25	51.35	96.3	97.6	2.7
3	28.33	25	53.90	101.3		

表 4 不同烟叶样品中的游离茄尼醇和总茄尼醇含量

(%)

样品	游离茄尼醇含量	总茄尼醇含量
1	1.99	2.83
2	1.16	1.39
3	1.17	1.84
4	0.63	0.92
5	1.37	1.82

### 3 结论

国内外文献均有报道烟叶中茄尼醇有很大一部分以酯化形式存在<sup>[4,7,9]</sup>,若在提取过程中不加化学处理,茄尼醇的提取率普遍偏低<sup>[7]</sup>。采用正己烷对烟叶直接进行固液萃取,不但可以利用 HPLC 法测定烟叶中游离茄尼醇含量;而且通过对正己烷萃取液直接进行皂化,还可以利用 HPLC 法测定烟叶中总茄尼醇含量,该方法快速、简便、准确,适用于烟叶中茄尼醇含量的测定。

华中农业大学生命科学技术学院

中国烟草白肋烟试验站

童康琼 兰明蓉 赵云飞

冀志霞 陈守文

《烟草科技》



主管: 国家烟草专卖局办公室

地址: 中国北京西城区月坛南街55号(100045)

建议使用: 800\*600分辨率以上, IE5.0以上浏览器

未经许可, 本网站包括图像、图标、文字在内的所有数据不得转载

主办: 国家烟草专卖局信息中心

备案序号: 京ICP备05033420号