

茄子叶中茄尼醇的 RP-HPLC 分析

周统武^{1,2}, 蔡娟¹ (1. 茂名学院化学与生命科学学院, 广东茂名 525000; 2. 南京工业大学理学院, 江苏南京 210009)

摘要 [目的] 建立测定茄子叶中茄尼醇的 RP-HPLC 分析方法。[方法] 采用 Agilent 1100 HPLC, Hypersil ODS 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm), 流动相 V(甲醇) V(乙醇) 为 60:40 等度洗脱, 洗脱流速 1.0 ml/min, 柱温 30℃, 检测波长 210 nm, 保留时间约 10.720 min。[结果] 茄尼醇质量浓度在 6.90~220.80 μg/ml (R=0.9995) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率(n=9) 为 99.94%, RSD=2.08%。通过与传统提取方法比较, 确定最佳的提取方法为微波辐射法。[结论] 所建方法具有简便、快速、准确、重复性好的特点, 适用于茄子叶中茄尼醇的含量测定。

关键词 茄尼醇; RP-HPLC; 茄子叶; 微波辐射

中图分类号 TQ177.1+66 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05342-02

RP-HPLC method for Determining the Content of Solanesol in Eggplant Leaves

ZHOU Tong-wu et al (College of Chemistry and Life Science, Maoming University, Maoming, Guangdong 525000)

Abstract [Objective] The study aimed to establish a sensitive RP-HPLC method for determining the content of solanesol in eggplant leaves. [Method] The Agilent 1100 HPLC system, Agilent Hypersil ODS column (A.L.D. 250 mm×4.0 mm, particle size 5 μm) was operated at a column temperature of 30℃. The mobile phase was V(methanol) V(ethanol) = 60:40 at a flow rate of 1.0 ml/min. 210 nm was set as the UV detection wavelength for solanesol, retention time was probable 10.720 min. [Result] The results showed a good linear relationship within 6.90 - 220.80 μg/ml (R=0.9995), the average recovery (n=9) is 99.94%, RSD = 2.08%. Comparison with conventional extraction method, the optimum extraction method was microwave irradiation. [Conclusion] The method was rapid, simple, accurate and good reproducibility, it was suitable for the determination of solanesol of eggplant leaves.

Key words Solanesol; RP-HPLC; Eggplant leaves; Microwave irradiation

茄尼醇(solanesol) 被发现主要存在于茄科植物中, 如茄子叶、烟叶、番茄叶等。它是九聚异戊二烯伯醇, 属四倍半萜烯醇, 结构式见图 1, 首先由 Rowland 等在 1956 年从烟草愈伤组织中分离获得^[1]。

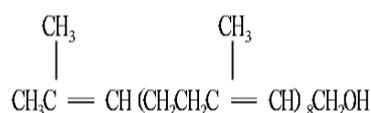


图 1 茄尼醇的化学结构

Fig.1 Chemical structure of solanesol

茄尼醇是一种很重要的医药中间体, 可用作合成维生素 K 及辅酶 Q₁₀(治疗心脏病的药物) 的原料^[2-4], 而且茄尼醇本身也有希望成为具有医疗效果的物质。中国是茄子生产大国, 在种植茄子的同时将产生大量的茄子茎叶亟待利用。从中提取茄尼醇, 不但减少对环境的污染, 而且有利于提高农业生产的附加值, 实现可持续发展的循环经济发展模式。

茄尼醇的测定方法主要有库仑滴定法^[5]、薄层扫描法^[6]、气相色谱法^[7]和 RP-HPLC 法^[8]。前 2 种方法进行茄尼醇的定量分析时步骤较多, 测量误差大, 已失去应用价值; 气相色谱法要经过衍生化反应, 样品处理麻烦且重现性差。因此, 笔者通过利用 RP-HPLC 法测定茄子叶提取物中茄尼醇的含量, 避免了上述缺点, 而且方法简单、快速, 所得结果的精密度和准确性均较理想。

1 材料与方

1.1 试验材料 试验用茄子叶采自广东省湛江市, 为廉江长丰 2 号品种。主要仪器为 Agilent 1100 HPLC, Hypersil ODS 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm); 紫外检测器; KS-8893 型超声波清洗仪(宁波海曙科生超声设备有限公司); 加热回流装置; 索氏提取器; NJC100-1 型微波萃取设备(南京杰全微波设备有限公司)等。主要试剂有 HPLC 流动相的甲醇、乙醇均为

色谱纯, 作为提取溶剂的乙醇(乙醇 95%), 水为三蒸水, 茄尼醇对照品[潍坊三强集团有限公司, w(茄尼醇 98%)]。

1.2 供试品及对照品溶液的制备

1.2.1 供试品溶液制备。取真空干燥后的长丰 2 号叶片, 粉碎并筛分(过 80 目筛), 然后准确称取 100 g 粉末(精确到 0.1 g), 加入反应釜中, 再加入 1 500 ml 的乙醇(95%), 于 65℃、微波功率 600 W 的条件下提取 10 min; 完成后真空抽滤, 抽滤后再向滤渣中加入相同体积的乙醇, 同一条件下提取 4 次, 合并混匀提取液, 棕色瓶取样, 避光 4℃ 保存, 备用。

1.2.2 对照品溶液制备。精密称取茄尼醇对照品 11.04 ng, 甲醇溶解定容至 50 ml 棕色容量瓶中, 摇匀, 得茄尼醇质量浓度为 220.80 μg/ml 的标准溶液, 避光 4℃ 保存, 备用。

1.2.3 色谱条件的选择。Hypersil ODS 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm), 流动相 V(甲醇) V(乙醇) 为 60:40 等度洗脱, 洗脱流速 1.0 ml/min, 柱温 30℃, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μl。采用上述色谱条件分析, 峰形尖锐, 分离效果好, 保留时间约 10.720 min。对照品和样品的色谱图见图 2。

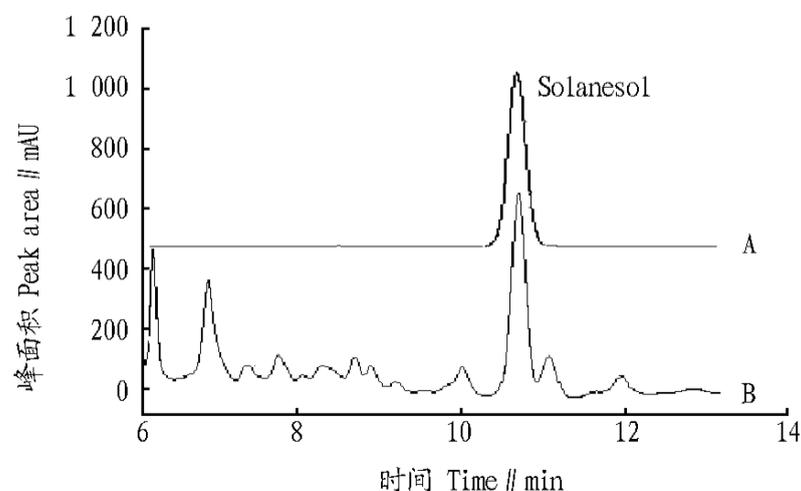


图 2 对照品(A)和样品(B)的 RP-HPLC 图谱

Fig.2 RP-HPLC chromatograms of solanesol standard (A) and extracts of eggplant leaf sample (B)

1.3 线性关系与标准曲线 用质量浓度(茄尼醇) 220.80 μg/ml 的对照品母液精密配制质量浓度为 6.90、13.80、27.60、

作者简介 周统武(1978-), 男, 广东高州人, 硕士, 实验师, 从事天然产物化学方面的分析与研究。

收稿日期 2009-01-21

55.20、110.40、220.80 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 甲醇(色谱纯) 定容。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 按照“1.2.3”所述的色谱条件进行 HPLC 分析, 重复5次进样, 取平均值。

1.4 系统适应性试验 取供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 得茄尼醇与相邻色谱峰的分离度。

1.5 精密度试验 取茄子叶的供试品溶液按上述色谱条件分析, 每次进样10 μl , 重复进样10次进行测定。

1.6 重现性试验 称取茄子叶5份, 按“1.2.1”的方法制备样品。按上述色谱条件进行分析, 以峰面积定量。

1.7 稳定性试验 对同一供试品溶液, 在20 h 内每隔2 h 进样分析, 测茄尼醇含量。

1.8 回收率试验 取已知含量的供试品溶液, 分别加入 0.055、0.110、0.221 mg 的茄尼醇对照品进行回收率试验。供试品溶液平行处理9份, 按照样品测定的方法进行分析, 计算平均回收率。

2 结果与分析

以茄尼醇的质量浓度(X , $\mu\text{g/ml}$) 与对应的峰面积(Y , mAU) 进行线性回归, 回归方程为: $Y = 74.212X + 37.781$, 回归系数 $R = 0.9995$ 。结果表明, 茄尼醇在质量浓度为 6.90 ~ 220.80 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 线性关系良好。系统适应性试验得出, 茄尼醇与相邻色谱峰的分离度为 1.7, 表明分离效果良好。精密度试验结果为, 平均值($n = 10$) 为 70.36 $\mu\text{g/ml}$, 标准偏差为 1.24 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 1.76%, 表明精密度良好。重现性试验得出, 平均值($n = 5$) 为 69.04 $\mu\text{g/ml}$, 标准偏差 0.85 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 1.23%, 表明此方法重现性良好。稳定性试验结果表明, 测得茄尼醇含量的 RSD 为 0.79%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定性良好。回收率试验结果见表 1, 平均回收率为 99.94%, RSD 为 2.08%。

表1 茄尼醇加样回收率试验结果

Table 1 Results of sampling recovery of solanesol				
序号 Sequence	本底值 ng Background value	加入量 ng Addition amount	检测量 ng Detectable amount	回收率 % Recovery
1	0.141	0.055	0.198	103.64
2	0.141	0.055	0.195	98.18
3	0.141	0.055	0.197	101.81
4	0.141	0.110	0.249	98.18
5	0.141	0.110	0.248	97.27
6	0.141	0.110	0.251	100.00
7	0.141	0.221	0.363	100.45
8	0.141	0.221	0.365	101.36
9	0.141	0.221	0.359	98.64

表2 不同提取方法对茄尼醇提取率的影响

Table 2 Effects of different extraction methods on extraction rate of solanesol (n=5)						
提取方法 Extraction methods	提取时间 h Extraction time	提取温度 Extraction temperature	固液比 g/ml Solid and liquid ratio	提取功率 W Extraction power	提取率 % Extraction rate	溶剂回收率 % Solvent recovery
浸润提取	20.00	20	1:30	0	0.31	79.23
热回流提取	8.00	70	1:20	0	0.23	82.85
索氏提取	8.00	75	1:20	0	0.35	80.07
MAE	0.67	65	1:15	600	0.39	87.35

注: 提取率 = (提取液中茄尼醇质量 / 提取原料的质量) $\times 100\%$ 。

Note: Extraction rate = (solanisol amount in extraction solution / extraction amount) $\times 100\%$.

2.1 流动相的选择 茄尼醇为九聚异戊二烯伯醇, 紫外中 λ_{max} 仅为 204 nm, HPLC 测定茄尼醇含量时, 许多文献报道, 反相色谱流动相体系主要是选择异丙醇-乙腈, 或者甲醇-乙腈, 但使用这两种流动相时在此紫外波长下检测会产生强烈干扰, 而且价格昂贵, 保留时间很长, 浪费流动相, 不利于检测分析, 所以笔者尝试使用甲醇-乙醇作为流动相。选择不同体积比的甲醇和乙醇来洗脱, 结果表明, 随着乙醇的增加, 茄尼醇出峰越快, 容易与其他杂质峰重叠。在 $V(\text{甲醇})/V(\text{乙醇})$ 为 60:40, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 峰形尖锐, 分离度高, 能获得理想的分离结果。所以该试验选择 $V(\text{甲醇})/V(\text{乙醇}) = 60:40$ 作为流动相。

2.2 检测波长的选择 通过紫外分光光度计考察了茄尼醇的最大吸收峰在 204 nm 处, 但在此波长下已接近紫外吸收的末端, 检测时误差较大, 而且检测结果也难于稳定, 因此选择检测波长为 210 nm, 可保证减小检测误差, 且结果稳定。

2.3 提取方法的选择 以乙醇(95%) 为提取溶剂, 分别采用浸润法、加热回流法、索氏提取法、微波辐射提取法对茄子叶进行提取, 按表 2 的提取时间、提取温度、固液比、微波功率的条件重复提取 4 次, 测定提取液中茄尼醇的含量, 结果见表 2。表 2 表明, 热回流、索氏、浸提的提取率均低于微波辐射提取法, 而且微波提取具有所用时间短、溶剂用量小、溶剂回收率高等优点, 利于工业生产。因此笔者采用微波辐射法提取茄子叶中的茄尼醇, 既克服了传统提取的诸多缺点, 又保证了很高的提取率。

2.4 提取溶剂的选择 分别以乙醇(95%)、正己烷、石油醚、丙酮、甲醇为提取溶剂, 采用“1.2.1”的微波提取方法对茄子叶进行提取, 结果见图 3。

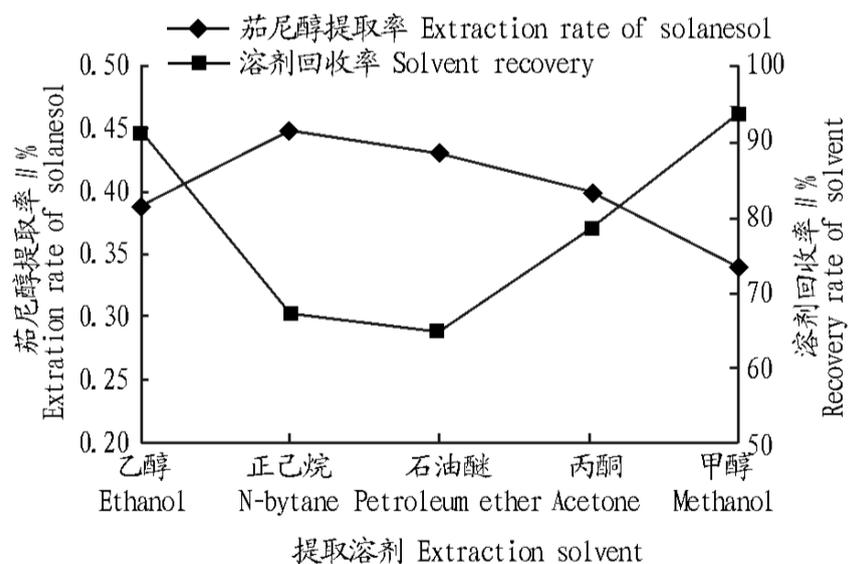


图3 不同溶剂对茄尼醇提取率的影响

Fig. 3 Effects of different extraction solvents on extraction rate of solanesol (n=5)

的本身特有的化学性质来检测孔雀石绿,该方法主要鉴于孔雀石绿与硫酸钛在浓硫酸存在的情况下能发生特异性结合,且其他物质不能与硫酸钛结合,在 Na^+ 存在下能使孔雀石绿与硫酸钛的结合物发生沉淀,从而通过1:1的比例间接计算出结果。目前,该方法在其他水产禁用药物的检测中还未被使用过。该检测方法所需要的检测时间少,可根据是否有白色沉淀进行初步判定;其次,该方法的重现性较理想,实验成本低,操作简单,周期短,对操作人员及实验环境要求不苛刻,具有广阔的应用前景,适用于检测水产品中孔雀石绿残留。

Roybal 等通过对鲑鱼的孔雀石绿药浴实验证明:鱼体内同时残留孔雀石绿和无色孔雀石绿,还有少部分其他代谢产物^[20],无色孔雀石绿的残留量一直较高,其残留量大小是由代谢时间决定的,因此检测水产品中的孔雀石绿残留通常是同时检测孔雀石绿和无色孔雀石绿。该实验首次采用普通的化学方法,结果是仅能检测到孔雀石绿母体的存在,无法检测到无色孔雀石绿,故该技术还需要改进,深入对孔雀石绿分子结构改造的研究,从而建立一种简单、快速、灵敏的孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿的同步检测方法,进一步完善孔雀石绿的含量测定及水产品中残留检测的方法标准。

参考文献

- [1] CUP S J, BELAND F A. Malachite green: a toxicological review[J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 15: 219-238.
- [2] ROBERTA A M, NAN M, PEGGY J W, et al. Genotoxicity of malachite green and leuconalchite green in female Bg Bue B6C3F1 mice[J]. *Mutation Research*, 2004, 561: 127-138.
- [3] HOFFMAN G L, MEYER F P. Parasites of freshwater fishes[M]. Neptune New Jersey: TFH Publications, 1974: 130-144.
- [4] ALDERMAN D J. Malachite green: a review[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1985, 8(3): 289-298.
- [5] ANNALaura S, CARLO N, ISABELLA D A, et al. Effects of malachite green (MG) and its major metabolite leuconalchite green (LMG) in two human cell lines[J]. *Toxicology in vitro*, 2005, 19: 853-858.

(上接第5343页)

图3表明,正己烷和石油醚作为提取溶剂时,提取率最高,分别为0.45%和0.43%,溶剂回收率较低,分别为65.14%和63.29%,但正己烷和石油醚的价格较昂贵,大量使用会极大地增加成本。甲醇和丙酮提取率均较低,而且毒性较大,大量使用会污染环境,危害健康。而乙醇(95%)不但提取率较高,为0.39%,而且获得很高的溶剂回收率,为87.35%。从安全、环保和成本考虑,乙醇价格较便宜,毒性相对较小,适合作为微波提取茄尼醇的理想溶剂。

3 结论

在该文中选定的色谱条件下,利用反相色谱柱测定茄子叶中的茄尼醇,结果表明,此方法灵敏度高,重复性和精密度好,峰形尖锐对称,具有较高的分离度,非常适用于测定茄尼醇粗品中茄尼醇的含量。

- [6] CELADA J D, CARRAL J M, ROYUELA M S, et al. Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs[J]. *Aquaculture*, 2004, 239: 249-259.
- [7] MARIA E A, CIANCARLO P, MAURIZI O T. Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid phase[J]. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41: 7391-7394.
- [8] SRIVASTAVA S, SINHAR, ROY D. Toxicological effects of malachite green[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66(5): 319-329.
- [9] MEYER F P, JORGENSEN T A. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1983, 112(6): 818-824.
- [10] FERNANDES C, LAITHA V S, RAO V K. Enhancing effects of malachite green on development of hepatic preneoplastic lesions induced by nitrosodimethylamine in rats[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12: 839-845.
- [11] RAO K V. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter[J]. *Toxic Letters*, 1995, 81(223): 107-113.
- [12] 邱绪建, 林洪, 王联珠, 等. 孔雀石绿及其代谢物无色孔雀石绿在鲫鱼肌肉中的代谢规律[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(5): 745-748.
- [13] 蔡泓, 陈伟, 岑小青, 等. 水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量快速检测的研究[J]. *化学试剂*, 2006, 28(7): 411-413.
- [14] LEE K C, WU J L, CAI Z W. Determination of malachite green and leuconalchite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 843: 247-251.
- [15] PEIERS, ALDERI A B. Determination of residues of malachite green in fish by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529: 173-177.
- [16] 朱宽正, 王鹏, 林雁飞, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中孔雀石绿、结晶紫以及它们的隐色代谢物残留[J]. *色谱*, 2007, 25(1): 66-69.
- [17] LUIS V, CECILIA D, ANTONIO L Z, et al. Determination of the sum of malachite green and leuconalchite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067: 101-105.
- [18] 龚鹏飞, 王权, 陈永军. 孔雀石绿单克隆抗体的制备及其鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(4): 359-362.
- [19] 唐宁, 周梅仙, 杨平. HPLC 测定鱼体内孔雀石绿主要代谢物的残留[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(27): 11635-11636.
- [20] ROYBAL J E, DENVER C O, PFENNING A P. Determination of malachite green and its metabolite leuconalchite green in catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue by liquid chromatography with visible detection[J]. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1995, 78: 453-457.

参考文献

- [1] ROWLAND R L, LAIMER P H, GILES J A. Hue-cured, I. Tobacco isolation of α -unsaturated alcohols[J]. *J Am Chem Soc*, 1956, 78(18): 4680-4683.
- [2] 孙心齐, 赵瑾, 王超杰, 等. 从废次烟叶中提取茄尼醇的研究[J]. *河南大学学报: 自然科学版*, 1995, 25(2): 37-39.
- [3] 张歆, 倪晋仁, 黄文. 超临界 CO_2 萃取烟草中茄尼醇[J]. *精细化工*, 2006, 23(5): 481-482.
- [4] HAMAURA K, YAMASUI, MINAMIN, et al. Synthesis of [3- ^{14}C] coenzyme Q₀[J]. *J Label Comp Radiopharmaceut*, 2002, 45: 823-829.
- [5] 刘快之, 李德亮, 陈伯森, 等. 库仑滴定法测定烟叶提取物中茄尼醇[J]. *化学研究*, 1997, 8(3): 56-59.
- [6] 李烈, 马振元, 钱秋霞, 等. 薄层扫描法测定烟叶中茄尼醇的含量[J]. *中草药*, 2002, 33(5): 420-421.
- [7] SEVERSON R F. Gas chromatographic method for the determination of free and total solanesol in tobacco[J]. *J Chromatogr*, 1977, 139: 269-282.
- [8] CHENA J H, LIUX P, XUX Q, et al. Rapid determination of total solanesol in tobacco leaf by ultrasound-assisted extraction with RP-HPLC and ESI-TOF/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43: 879-885.