

反相高效液相色谱法测定烟草中的茄尼醇

舒俊生¹, 陈开波¹, 徐志强¹, 毛健²

(1. 安徽中烟工业有限公司技术中心, 安徽合肥 230088) (2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 采用反相高效液相色谱测定烟草中的茄尼醇, 采用外标法进行定量, 确定了色谱分离的条件, 并通过皂化提取实验确定了茄尼醇最佳皂化条件: 58℃、0.6 mol/L KOH 甲醇溶液皂化 35 min。该法具有良好的线性 (相关系数为 0.9999), 检测限为 27.4 ng (S/N=3), 加标回收率为 99%, 方法的 RSD 为 0.41%, 方法简单、准确。

关键词: 茄尼醇; 反相高效液相色谱; 烟草

文章编号: 1673-9078(2013)4-894-897

Determination of Solanesol in Tobacco by RP-HPLC

SHU Jun-sheng¹, CHENG Kai-bo¹, XU Zhi-qiang¹, MAO Jian²

(1. Research and Development Centre, China Tobacco Anhui Industrial Co., LTD, Hefei 230088, China)

(2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A simple and rapid method was developed for determination of solanesol in tobacco by RP-HPLC and the saponification process was optimized. The solanesol content was quantitatively determined with the external standard method. The results indicated that the optimum saponification process was as follows: KOH-methanol solution 0.5 mol/L, of saponification temperature 30℃, and the saponification time 30 minutes. The method had good linearity with correlation coefficient of 0.9999. The limit of detection based on signal-to-noise ratio of 3 was 27.4 ng. The recovery of solanesol in tobacco was 99% with RSD of 0.41%.

Key words: solanesol; RP-HPLC; tobacco

茄尼醇是一种聚异戊二烯醇, 是茄科植物烟草烟叶中富含的主要萜类化合物之一^[1-2]。茄尼醇本身具有抗菌、消炎和止血作用, 而且是合成维生素 K₂ 和辅酶 Q₁₀ 的主要中间体, 还可以作为抗溃疡药物、抗癌药物的合成原料, 具有很高的药用价值^[3-4]。茄尼醇在烟叶中的含量比较大, 且烤烟高于白肋烟。茄尼醇对烟气中的苯并芘贡献较大, 对烟气安全性不利^[5], 因此准确测定烟草中的茄尼醇具有重要的现实意义。

茄尼醇测定方法应用较为广泛的是高效液相色谱法, 目前使用高效液相色谱测定烟草中的茄尼醇主要有三种, 第一种是正相色谱分离、示差折光检测器检测^[6]; 第二种是正相液相色谱分离、紫外检测器检测^[7]; 第三种是反相液相色谱分离和蒸发光散射检测器检测^[8]。示差折光检测器检测灵敏度较低, 对流动相温度变化敏感, 可控性能也差, 而且不能梯度洗脱; 采用正相色谱分离流动相, 分离效果较差不利于测试结果的准确性, 而且测试时间较长; 蒸发光散射检测器在烟草行业中应用还很少, 不利于方法的推广, 而且以上三种方法均未对茄尼醇进行皂化处理。本文采用反

相液相色谱分离, 紫外检测器测定烟草中茄尼醇的含量, 并对茄尼醇的皂化条件进行了优化, 方法的重复性好, 回收率高。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

HP1100 高效液相色谱仪, Agilent 可变波长紫外检测器, Agilent 自动进样器。茄尼醇标准品(Sigma 公司, 纯度>99%), 正己烷为分析纯, 甲醇、乙腈皆为色谱纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Econosphere C₁₈(250 mm×4.6 mm); 流动相: 甲醇-乙腈(85:15); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。

1.3 样品处理

烟叶 40℃下烘干, 粉碎过 80 目筛, 贮于样品瓶中备用。称取 0.2 g 烟末于 20 mL 具塞三角瓶中, 加入 KOH 甲醇溶液水浴振荡皂化, 皂化完成后加入 5 mL 正己烷旋涡混合 1 min, 静止分层, 取少量上层清液在 10000 r/min 下高速离心 10 min, 进样分析。

2 结果与讨论

收稿日期: 2012-12-23

作者简介: 舒俊生 (1975-), 博士, 研究方向: 食品科学

通信作者: 毛健 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

2.1 流动相的选择

茄尼醇的最大吸收波长为 210 nm, 因此所要采用的流动相溶剂最大截至吸收波长要低于 210 nm, 故选择甲醇和乙腈作为洗脱流动相, 经过反复实验最后确定流动相的配比为 85% 甲醇和 15% 乙腈。

2.2 标准工作曲线、线性范围及检出限

称取 13.4 mg 茄尼醇标准样品于 10 mL 容量瓶中定容备用。依次稀释为 1.00 mg/mL、0.67 mg/mL、 3.35×10^{-1} mg/mL、 1.34×10^{-1} mg/mL 四个浓度梯度, 制作标准曲线, 如图 1 所示。在 1.34×10^{-1} ~ 1.34 mg/mL 范围内, 以峰面积 Y 和质量浓度 (X) 进行线性回归, 得线性方程为 $Y=29005.84X+224.51$, 相关系数为 0.9999, 以信噪比为 3 计, 茄尼醇的最低检出限为 27.4 ng, 标准曲线见图 1。

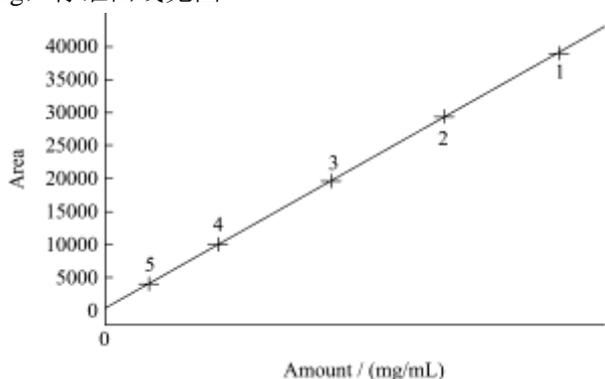


图 1 茄尼醇标准曲线

Fig.1 The standard curve of solanesol

2.3 皂化条件的优化

2.3.1 KOH 甲醇溶液浓度对茄尼醇含量的影响

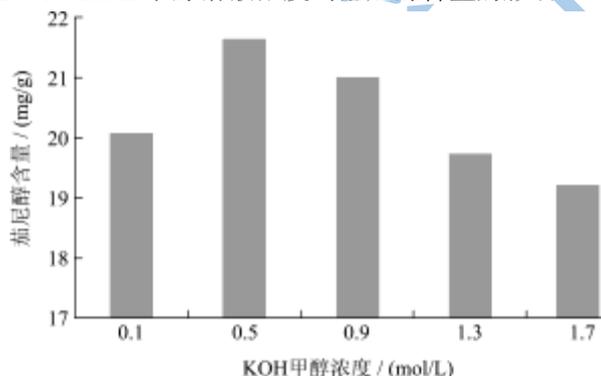


图 2 KOH 甲醇浓度对茄尼醇含量的影响

Fig.2 Effect of the concentration of KOH-methanol on the content of solanesol

分别配置 1.7 mol/L、1.3 mol/L、0.9 mol/L、0.5 mol/L、0.1 mol/L KOH 甲醇溶液, 按照样品处理试验步骤进行皂化试验, 皂化温度时 60 °C, 皂化时间 1 h。结果如图 2。由图可以知, 茄尼醇的含量随着 KOH 甲醇溶液浓度的增加而增加; 当浓度为 0.5 mol/L 时, 茄尼醇的含量最大为 21.66 mg/g; 但是当 KOH 甲醇浓度

大于 0.5 mol/L 时, 茄尼醇的含量开始不断下降。产生这种现象的原因在于低浓度的 KOH 甲醇溶液不足以使茄尼醇皂化完全, 但是浓度过高的 KOH 甲醇又会对茄尼醇造成破坏。采用 0.5 mol/L KOH 甲醇溶液作为皂化剂, 皂化效果最佳。

2.3.2 皂化时间对茄尼醇含量的影响

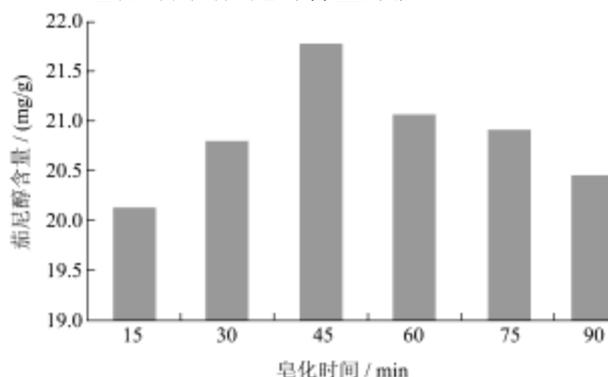


图 3 皂化时间对茄尼醇含量的影响

Fig.3 Effect of saponification time on the content of solanesol

按照样品处理的步骤进行皂化实验, 皂化温度 60 °C, KOH 甲醇溶液浓度为 0.5 mol/L, 分别皂化 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min, 考察皂化时间对皂化结果结果的影响, 结果如图 3。由图可知, 茄尼醇的含量随着皂化时间的增加而增加; 当皂化时间为 45 min 时, 茄尼醇的含量最大为 21.79 mg/g; 但是当皂化时间大于 45 min 时, 茄尼醇的含量开始不断下降。因此确定皂化时间为 30 min。

2.3.3 皂化温度对茄尼醇提取量的影响

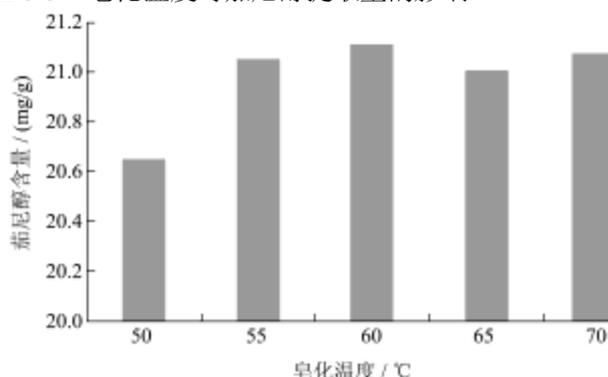


图 4 皂化温度对茄尼醇含量的影响

Fig.4 Effect of saponification temperature on the content of solanesol

按照样品处理的步骤进行皂化实验, 皂化时间为 30 min, KOH 甲醇溶液浓度为 0.5 mol/L, 分别在 50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C 下进行皂化, 考察温度对皂化的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 皂化温度在 55 °C 以上时, 茄尼醇基本皂化完全, 因此选择皂化温度为 60 °C。

2.3.4 皂化条件的响应面优化

在单因素实验的基础上, 根据 Box-Behnken 中

心组合原理,以 KOH-甲醇溶液浓度、皂化温度、皂化时间为自变量,茄尼醇提取量为响应值,设计了三因素三水平的响应面实验,因素水平及编码见表1,实验设计及结果见表2。

表1 因素水平及编码

因素	编码水平		
	-1	0	1
A [KOH-甲醇溶液浓度/(mg/L)]	0.1	0.5	0.9
B (皂化温度/°C)	55	60	65
C (皂化时间/min)	30	45	60

表2 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experiment design and the result

实验号	因素水平			茄尼醇/(mg/g)	
	A	B	C	实测值	预测值
1	-1	-1	0	20.96	21.33
2	1	-1	0	23.33	22.89
3	-1	1	0	20.65	21.09
4	1	1	0	22.53	22.16
5	-1	0	-1	22.79	22.34
6	1	0	-1	23.4	23.77
7	-1	0	1	21.57	21.20
8	1	0	1	21.96	22.41
9	0	-1	-1	23.35	23.42
10	0	1	-1	23.12	23.13
11	0	-1	1	22.37	22.36
12	0	1	1	21.75	21.68
13	0	0	0	24.9	24.92
14	0	0	0	24.92	24.92
15	0	0	0	24.95	24.92

用 Design Expert 8.0 对表2 中的数据进行多元回归分析,得到响应值(茄尼醇提取量)与皂化因素(KOH 甲醇溶液浓度、皂化时间、皂化温度)的三元二次回归方程为:
 $Y = 24.92 + 0.66A - 0.25B - 0.63C - 0.12AB - 0.055AC - 0.098BC - 1.64A^2 - 1.42B^2 - 0.86C^2$

由表3 可知,模型 $P < 0.01$,说明建立的模型是极显著的;回归模型的相关系数平方 $R^2 = 0.9487$,说明此模型对数据拟合效果较好,误差小,能够用来对茄尼醇的皂化工艺进行预测和分析。从表3 还可以看出, KOH-甲醇溶液浓度和皂化时间对茄尼醇的提取量影响显著,而皂化温度对茄尼醇提取量影响不显著。三个因素对茄尼醇提取量影响的大小依次为: KOH-甲醇溶液浓度 > 皂化时间 > 皂化温度,这与单因素实验反映出的规律一致。通过回归模型分析,得出

最佳皂化条件为: KOH-甲醇浓度为 0.62 mol/L、皂化时间为 34.98 min、皂化温度为 57.66 °C,在最佳工艺条件下,茄尼醇的提取量为 25.07 mg/g。考虑到实验的准确性和可操作性,将最优工艺条件修改为: KOH-甲醇浓度为 0.6 mol/L、皂化时间为 35 min、皂化温度为 58 °C,此条件下茄尼醇的提取量为 24.95 mg/g,与修改前误差较小,仅为 0.48%。

表3 回归方程系数显著性分析

误差来源	系数	均方	F 值	P 值	显著性
模型	24.80	2.76	10.27	0.0098	**
A	3.45	3.45	12.84	0.0158	*
B	0.48	0.48	1.79	0.2387	
C	3.14	3.14	11.69	0.0189	*
AB	0.060	0.060	0.22	0.6562	
AC	0.012	0.012	0.045	0.8402	
BC	0.038	0.038	0.14	0.7221	
A ₂	9.89	9.89	36.85	0.0018	**
B ₂	7.44	7.44	27.71	0.0033	**
C ₂	2.71	2.71	10.10	0.0246	*

注:“**”差异高度显著 ($P < 0.01$),“*”差异高度显著 ($P < 0.05$)。

2.4 精密度和回收率实验

采用已确定的样品处理方法对烟草样品中的茄尼醇进行提取,并按照既定的色谱条件连续进样6次,结果见表2。由表2 中的数据可以看出,6次测量的 RSD 为 0.41%,说明本文建立的方法精确度高。

表4 精密度实验 (n=6)

样品	1	2	3	4	5	6	RSD
茄尼醇/(mg/g)	21.05	21.13	21.1	21.24	21.01	21.2	0.41%

表5 回收率实验 (n=3)

序号	本底值/mg	添加量/mg	测定值	回收率%/平均回收率/%
1	21.12	1	22.06	94
2	21.12	5	26.25	103
3	21.12	10	31.24	101
4	21.12	15	35.8	98
5	21.12	20	41.01	99

为了考察本文建立的方法的回收率,精确称取已知浓度的平行样品5份,采用分别向其中加入 1 mg、5 mg、10 mg、15 mg、20 mg 标准样品,前面确立的样品处理条件进行处理,然后按照以确立的色谱条件重复测定3次,结果见表3。从表3 可以看出,平均回收率为 99%,说明本文建立方法的准确好。

3 结论

采用反相高效液相色谱测定烟草中的茄尼醇, 确定了色谱分离的条件, 通过皂化提取实验确定茄尼醇的最佳皂化条件: 58 °C、0.6 mol/L KOH 甲醇溶液, 皂化 35 min, 方法快速简便。并且通过回收率和精密度实验证明本文建立的茄尼醇测定方法准确可靠。

参考文献

- [1] 陈爱国, 申国明, 梁晓芳, 等. 茄尼醇的研究进展与展望[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(6): 44-48
- [2] Tang D, Zhang L, Chen H, et al. Extraction and purification of solanesol from tobacco: (I). Extraction and silica gel column chromatography separation of solanesol [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 56(3): 291-295
- [3] Huang W, Li Z, Niu H, et al. Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide-ethanol fluids[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(1): 92-96
- [4] 王非, 郑珩, 余永柱, 等. 高纯度茄尼醇的现状与市场前景[J]. 现代化工, 2005, 25(8): 19-22
- [5] Zhou H, Liu C. Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1129(1): 135-139
- [6] Zhou H, Liu C. Rapid determination of solanesol in tobacco by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection following microwave-assisted extraction [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 835(1-2): 119-122
- [7] 孙心齐, 王金中, 于丽, 等. 高效液相色谱内标法定量测定茄尼醇[J]. 化学研究, 2002, 13(4): 27-29
- [8] 李烈, 钱秋霞, 丛晓东. 用高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟叶中茄尼醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 2(22): 103-105
- [9] Zhao C, Zu Y, Li C. Extraction of solanesol from tobacco (*Nicotiana tobaccum* L.) leaves by bubble column[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2009, 48(1): 203-208