

超临界流体萃取结合柱色谱法从废次烟叶中分离纯化茄尼醇的研究

位 华¹, 宓鹤鸣^{1*}, 柳正良²

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 上海永昊生物医药研究所, 上海 200940)

摘要:目的 建立一种从废次烟叶中提取分离茄尼醇的方法, 并考察相关因素对提取分离的影响。方法 采用超临界 CO₂ 萃取法从废次烟叶中提取得到茄尼醇粗品, 再用硅胶柱色谱法结合重结晶进行分离纯化。结果 超临界 CO₂ 萃取茄尼醇的实验条件为: 萃取压力 20 MPa、萃取温度 55 ℃、萃取时间 1.5 h、95%乙醇为改性剂, 由此得到质量分数为 30%的茄尼醇粗品; 硅胶柱色谱用石油醚-乙醚-醋酸乙酯-丙酮(15:5:3:1)进行分离洗脱, 收集相关流份, 经重结晶, 得到质量分数大于 98%的茄尼醇样品。结论 本法简便、合理, 由此可获得高纯度茄尼醇。

关键词:烟草; 茄尼醇; 超临界萃取; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)05-0690-03

Extraction and separation of solanesol from *Nicotiana tabacum* by supercritical fluid extraction and silica gel column chromatography

WEI Hua¹, MI He-ming^{1*}, LIU Zheng-liang²

(1. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Yonghao Biomedicine Institute, Shanghai 200940, China)

Key words: *Nicotiana tabacum* L.; solanesol; supercritical fluid extraction (SFE); HPLC

烟叶来源于茄科植物烟草 *Nicotiana tabacum* L. 的干燥叶片。性温、味辛, 有毒, 具有消肿、解毒、杀虫等功效, 主要用于疮痈肿毒、头癣、秃疮、毒蛇咬伤等症, 可治风痰、鹤膝(包括骨结核、慢性化脓性膝关节炎等), 也可用于灭钉螺、蚊、蝇、老鼠和杀虫等。其中, 茄尼醇(solanesol)是烟草的有效成分之一。现代研究表明茄尼醇具有脂质抗氧化作用和消除机体内自由基的功能, 它也是合成辅酶 Q₁₀、维生素 K₂、抗溃疡和抗癌药物不可缺少的重要天然原料^[1]。从烟叶中提取分离不同纯度的茄尼醇方法主要有溶剂法^[2]和色谱法, 这些方法获得的茄尼醇的质量分数最高在 95%^[3~6], 美国 Sigma 公司提供的化学对照品质质量分数仅保证大于 90%, 实际检测质量分数为 90.058 9%。为此, 本实验采用超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)技术结合柱色谱法对烟草中茄尼醇的提取、分离和纯化进行研究, 获得了高纯度的茄尼醇。

1 仪器与试剂

1 L 超临界流体萃取设备(江苏华安超临界萃取有限公司); Waters 高效液相色谱系统(配有 515 泵, 2487 检测器, N2000 色谱工作站)。烟叶来源于山东地区栽培烟草, 经宓鹤鸣教授鉴定其原植物为

烟草 *N. tabacum* L. 的黄花栽培品系; 茄尼醇对照品(Sigma 公司, 质量分数为 90%, 用于定性分析; 自制品, 质量分数 98.26%, 用于定量分析。); 实验用 CO₂(上钢气体厂); 硅胶(200~300 目, 青岛海洋化工厂); 乙醇、石油醚、乙醚、醋酸乙酯、丙酮为分析纯, 正己烷、异丙醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 SFE 萃取方法: 取一定量烟叶粉碎过一定数目筛, 50 ℃烘干。精确称取一定量过筛后的烟叶碎末, 用乙醇浸润过夜后, 装入萃取釜中, 调节温度、压力、CO₂ 流速, 运行一段时间后, 在分离釜出口处收集萃取液, 将萃取液浓缩至浸膏状, 得茄尼醇粗品(I)。

2.2 分离与纯化: 取由 SFE 得到的茄尼醇粗品(I) 10 g, 溶于石油醚(25 mL)中, 将此溶液缓缓加入色谱柱(70 cm×4 cm, 硅胶量 350 g), 依次用石油醚、乙醚、醋酸乙酯、丙酮梯度洗脱, 分段收集洗脱液, 采用薄层色谱对各洗脱流份进行跟踪检测[石油醚-醋酸乙酯(25:1)展开, 碘熏显色], 并与茄尼醇对照品对照, 归并富含茄尼醇流份, 减压回收溶剂, 得到橙黄色浆状茄尼醇粗品(II) 1.23 g, 经高效液相色谱分析茄尼醇质量分数约为 79.4%。

收稿日期: 2004-10-12

作者简介: 位 华(1979—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 第二军医大学药物分析专业硕士研究生, 主要研究方向为中药现代化与标准化。

Tel: (021) 25070389 E-mail: wh7975@hotmail.com

* 通讯作者 Tel: (021) 25070389 E-mail: mhm19470718@sina.com

对茄尼醇粗品(Ⅱ)再进行一次柱色谱分离操作,可获得浅黄色到类白色的茄尼醇结晶物,质量分数达到 95.19%,对此结晶进一步在正己烷、丙酮等试剂组成的混合溶剂中,在不同的时间和温度下放置,进行反复重结晶,最后获得茄尼醇精制品 0.74 g,经高效液相色谱分析茄尼醇质量分数为 98.26%。

2.3 茄尼醇的 HPLC 测定

2.3.1 色谱条件^[7]:色谱柱:Hypersil SiO₂ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:正己烷-异丙醇(90:10);检测波长:205 nm;柱温:室温;体积流量:1 mL/min;进样量:10 μL。在此条件下,样品、对照品的图谱见图 1,表明茄尼醇色谱峰分离良好,达到定量要求。

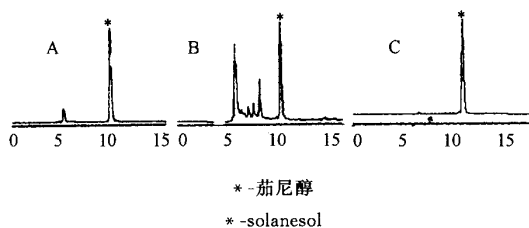


图 1 Sigma 公司茄尼醇对照品(A)、SFE 粗提物(B)和自制品茄尼醇对照品(C)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of solanesol reference substance from Sigma Company (A), SFE extract (B), and solanesol reference substance purified in test (C)

2.3.2 对照品溶液的制备:称取茄尼醇对照品约 10 mg,精密称定(10.4 mg),置 50 mL 量瓶中,加正己烷至刻度,摇匀,作为贮备液(0.208 mg/mL),备用。

2.3.3 供试品溶液的制备:取 SFE 萃取的茄尼醇粗品(Ⅰ)适量(约 30 mg),精密称定,溶于适当溶剂中,定容,混匀,精密吸取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加正己烷稀释至刻度,超声混匀后,放至室温,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取 10 μL 进行高效液相色谱分析。取重结晶茄尼醇精品适量(约 10 mg),精密称定,置 50 mL 量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,混匀,备用。

2.3.4 线性关系考察:精密量取茄尼醇对照品贮备液适量,稀释为 2.08、4.16、8.32、16.60、33.20、41.60 μg/mL,依次进样 10 μL。以色谱峰面积积分值对进样量回归,得线性方程 $Y = 3\,335\,904\,X + 41\,049$, $r = 0.999\,8$,表明茄尼醇在 2.08~41.6 μg/mL 时,质量浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 SFE 工艺优化:在 SFE 萃取中,影响萃取结果的因素主要是萃取时间、萃取温度、萃取压力和改性剂,选用正交试验,以茄尼醇的质量分数为指标,考察 4 因素在 3 个水平情况下对萃取的影响。正交试验安排及分析结果见表 1。

表 1 正交试验方案与结果分析

Table 1 Analytical results of orthogonal test

编号	A 时间 /h	B 温度 /℃	C 压力 /MPa	D 乙醇体 积分数/%	茄尼醇 /%
1	1.5	45	20	95	38.10
2	1.5	55	25	85	11.70
3	1.5	65	30	75	9.10
4	2.0	45	25	75	4.90
5	2.0	55	30	95	26.50
6	2.0	65	20	85	13.20
7	2.5	45	30	85	9.20
8	2.5	55	20	75	14.90
9	2.5	65	25	95	12.00
K ₁	58.90	52.20	66.20	76.60	
K ₂	44.60	53.10	28.60	34.10	
K ₃	36.10	34.30	44.80	28.90	
k ₁	19.63	17.40	22.06	25.53	
k ₂	14.86	17.70	9.53	11.36	
k ₃	12.03	11.43	14.93	9.63	
R	7.60	6.27	12.53	15.90	

直观分析结果表明,对烟草中茄尼醇提取率的影响程度大小依次为 D>C>A>B,由此得出 SFE 最佳工艺条件为 A₁B₂C₁D₁,即萃取时间 1.5 h、萃取温度 55℃、萃取压力 20 MPa、改性剂乙醇体积分数为 95%为最佳提取条件。所得茄尼醇粗品(Ⅰ)为深红棕色、黏稠状物质,收率为 5.03%,经高效液相色谱分析该粗品中茄尼醇的质量分数为 38.1%。在此条件下对最佳工艺进行了验证试验,结果粗提物中茄尼醇的质量分数为 34.2% (n=3)。

3 讨论

实验研究结果显示,对茄尼醇这样一种弱极性化合物,用 SFE 法提取是可行的,本法与其他方法比较有一定的优势,如果提取过程可彻底摆脱用正己烷等价格高且有污染的有机溶剂,仅用少量安全的常规溶剂乙醇作改性剂即可获得质量分数高达 30%的茄尼醇粗品,而且还有生产周期短,提取效率高等优点。在 SFE 法萃取茄尼醇试验的摸索中,同时设计了不加改性剂的正交实验条件,其结果表明此条件下所得粗品中茄尼醇普遍低于加入乙醇为改性剂所得粗品中茄尼醇。本实验中采用优化条件,粗提物中茄尼醇质量分数为 34.2%,而烟叶中茄尼醇的质量分数仅为 0.43%,说明该实验条件能够提取出含较高茄尼醇的粗品。

在茄尼醇粗品(I)硅胶柱色谱分离过程中,考察了洗脱溶剂的种类和配比,最终确定了上述混合溶剂为茄尼醇富集洗脱液,可经一次洗脱得到质量分数约为80%的茄尼醇粗品(II),二次柱色谱分离结果可以获得质量分数95%的样品,其中硅胶柱的洗脱连续性及收集流份的体积对茄尼醇柱色谱分离都有重要的影响。

重结晶被视为取得高纯度茄尼醇的关键,本实验反复选用正己烷、乙醚、丙酮等为重结晶溶剂,结果发现采用混合溶剂重结晶能获得质量分数98.26%的茄尼醇精品,其中结晶溶剂的种类、配比、用量,以及结晶温度和时间等对茄尼醇结晶的形成和纯度有重要的影响。

在茄尼醇的测定过程中,粗品试样须经微孔滤膜滤过,以防堵塞;在分离过程中,考察了不同流动相比、不同体积流量、不同柱温等因素对分离的影响,结果选用正己烷-异丙醇(90:10)为流动相,体积流量为1 mL/min,主峰和杂质峰能清晰地分开,此时目标化合物茄尼醇的保留时间在9 min左右,

分离效果满意。

本实验最终分离纯化得到的茄尼醇样品的质量分数远较Sigma公司提供的化学对照品要高。因此,本实验研究工作中除最初定性分析使用Sigma公司的茄尼醇外,有关定量分析研究均使用自制质量分数98%以上的茄尼醇制备对照品溶液。

References:

- [1] Zheng K L. One kind of method separating purification and measuring solanesol's content from the matter distilled of tobacco leaf [J]. *J Guizhou Norm Univ: Nat Sci* (贵州师范大学学报:自然科学版), 2003, 21 (1): 7-9.
- [2] Wang Y J, Li S F. Utilization of solanesol and nicotine and their extraction methods from tobacco leaves [J]. *Tianjin Chem Ind* (天津化学工业), 2003, 17 (3): 37-40.
- [3] Tawara T. Extraction of solanesol [P]. JP: 52139711, 1997-11-21.
- [4] Tawara T. Purification of solanesol [P]. JP: 63190840, 1998-08-08.
- [5] Zhang D Y, Zhang H Y. Process for extracting solanesol from mouldy or broken tobacco [P]. CN: 1087076, 1994-05-25.
- [6] Ma S X, Xu K L. Process for purifying solanesol [P]. CN: 1345711, 2002-04-24.
- [7] Zhang M S, Huang J X. Determination of solanesol in the extracts of tobacco leaves by high performance liquid chromatography [J]. *Chromatography*, 2001, 19 (5): 470-471.

悬浮聚合法制备咖啡因分子印迹聚合物微球及其性能研究

陈移蛟,周兴国,李桂玲*

(华中科技大学同济医学院,湖北 武汉 430070)

摘要:目的 建立一种分析测定中草药的方法,并对生物碱有效成分进行分离。方法 以咖啡因为模板分子,采用水溶液悬浮聚合法制备了用于色谱分离(作HPLC的固定相)的微米级分子印迹聚合物微球(MIPMs)。结果 当以茶叶碱为竞争分子时,MIPMs对咖啡因有强的吸附和特异性选择识别能力。结论 该MIPMs能对茶叶中的咖啡因进行分离富集。

关键词:咖啡因;悬浮聚合;色谱固定相;分子印迹聚合物微球

中图分类号:R283.6; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0692-04

Preparation of molecularly imprinted microspheres against caffeine by aqueous micro-suspension polymerization and its recognition characteristics

CHEN Yi-jiao, ZHOU Xing-guo, LI Gui-ling

(Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Key words: caffeine; aqueous micro-suspension polymerization; HPLC stationary phase; molecularly imprinted polymeric microspheres (MIPMs)

分子印迹技术是结合高分子化学、生物化学、有机化学等学科发展起来的一门边缘学科。分子印迹聚合物可在分子水平上对物质进行选择识别。类

似于酶和底物、抗体和抗原的关系,且具有生物活性物质无法比拟的稳定性和寿命长等优点。由于其独特的性能,故在化合物的分离中得到了广泛的应用。

收稿日期:2004-11-08

作者简介:陈移蛟(1974—),女,湖北监利人,华中科技大学硕士研究生,主要从事药物合成及分析。E-mail: cyjailong@163.com

* 通讯作者 Tel: (027) 83650692 E-mail: gueilingli@163.net