

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102156178 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 201110076306.1

(22) 申请日 2011.03.29

(71) 申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

(72) 发明人 谢剑平 孟全新 张杰 宗永立
李鹏

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110
代理人 姜振东

(51) Int. Cl.
G01N 30/89 (2006.01)

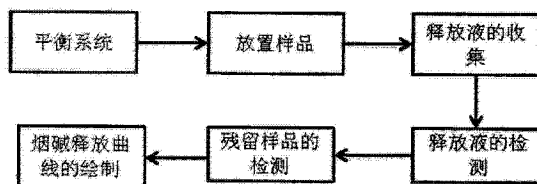
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法

(57) 摘要

一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征是:通过模拟口含型烟草制品中的烟碱在人体口腔的释放情况,并对释放量和释放速率进行即时定量,进而检测口含型烟草制品的烟碱释放速率以及释放程度。烟碱释放收集是通过体外释放收集装置来实现的,能够模拟口含型烟草制品中烟碱在人体口腔的释放过程,即人工唾液在恒温条件下,持续不断的从烟草制品中萃取出烟碱的过程,同时该装置可以对烟碱释放液进行即时收集;释放液中的烟碱含量检测是通过高效液相色谱法实现的。本方法优点是:能快速准确地检测各种口含型烟草制品的烟碱释放速率以及释放程度,重复性好,灵敏度高,检测周期短,适用于不同行业不同目的研究进行较大批量样品的快速分析。



1. 一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:通过模拟口含型烟草制品中的烟碱在人体口腔的释放情况并对释放量和释放速率进行即时定量,进而检测口含型烟草制品的烟碱体外释放速率以及释放程度,该方法包括以下步骤:

1)、体外烟碱释放与收集:创建模拟口含型烟草制品在人体口腔中烟碱释放情况的模型,该模型包括人工唾液、体外释放、收集装置,即:模拟人在使用口含烟时的情况,使人工唾液在恒温条件下持续不断的流入口含型烟草制品,实现口含型烟草制品的体外烟碱释放和收集过程;

2)、收集液及残留样品中烟碱含量定量分析:利用高效液相色谱仪实现对收集液及残留样品中烟碱含量的定量分析;

3)、绘制体外烟碱释放曲线:由烟碱定量结果计算烟碱累积释放率,根据烟碱累积释放率,绘制烟碱释放曲线。

2. 根据权利要求1所述的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:所述人工唾液组分包括三类化合物:无机盐类化合物,如氯化钠、氯化钾、氯化钙;有机化合物:如柠檬酸、葡萄糖;生物活性酶蛋白:如粘蛋白(mucin)、溶菌酶、淀粉酶(α -amylase)。

3. 根据权利要求1所述的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:口含型烟草制品的体外烟碱释放和收集过程通过一烟碱释放和收集装置实现,该装置包括依次通过管路连接的溶媒储存瓶、恒流泵、温控单元、烟碱溶出释放单元和释放液收集单元。

4. 根据权利要求1所述的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:高效液相色谱仪中的液相色谱参数如下:色谱柱为C18反相色谱柱,流动相为甲醇和20mmol的磷酸盐缓冲溶液,流速1mL/min,柱温为35℃;检测器为紫外检测器,最大吸收波长 $\lambda_{\max}=260\text{nm}$ 。

5. 根据权利要求4所述的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:所述C18反相色谱柱可以为Waters XTerra RP C18色谱柱,也可以为Waters XTerra MS C18色谱柱或Kromasil C18色谱柱。

6. 根据权利要求1所述的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,其特征在于:步骤3)中利用Origin软件绘制烟碱释放曲线。

一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及烟草领域,具体讲是涉及一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,通过该方法可以为研究或衡量口含型烟草制品的安全性和进行品质调控提供具体的数据支撑。

背景技术

[0002] 袋装口含型烟草制品是将烟叶粉碎后,将不同颗粒度的烟粉经过水蒸汽热处理等工艺加工后装在小袋中的烟草制品。该类制品与卷烟的最大区别是:属于无烟气烟草制品,使用时是将其放在口腔上唇侧部与牙龈之间,烟草成分经唾液溶解后通过口腔粘膜吸收。

[0003] 近年来,由于各国政府对公共场所吸烟行为的限制,使得口含型烟草制品的消费量呈逐年增加的趋势。在美国,口含型烟草制品的销量已经连续5年(2001-2006年)以6%的速度持续增长,2007年增速达到7.1%。据统计,2006年度,美国的口含型烟草制品销售量已超过40亿美元 [Tobacco Control 2008, 17, (5), 332-338]。而该类产品的质量检测与控制却缺少相关技术方法。

[0004] 烟碱是烟草中重要的生物碱,烟碱释放量是口含型烟草制品安全和品质的重要指标,通过烟碱释放实验可以了解食用产品时的烟碱吸收情况,进而可用于品质管理、研发等方面。

[0005] 目前,对烟碱释放情况研究工作分两种方式:一种是体内实验,检测人体血液或尿液中的烟碱变化情况。该方法实验结果易受志愿者个体生理差异及消费烟草制品的习惯影响,实验不易控制且对人体伤害较大。

[0006] 另一种是体外实验,模拟烟碱释放情况自创装置进行研究。体外实验相对较为简单,可控制性强,易于实现对烟碱释放的监测。

[0007] 体外实验仅有两例公开报道:1. NASR M. 等用一种透析装置研究了口含烟草制品烟碱的释放情况 [Journal of Aoac International 1998, 81:540-43],过程为:将样品浸泡在一个盛有溶出介质的透析袋装置中,按固定时间间隔取出释放液,对释放液中的烟碱含量进行检测。该方法过于简单,所测烟碱释放速率易受透析袋影响,仅能够用于在一定程度上区分几个不同品牌口含烟草制品烟碱的释放差异,不能对较大数量的样品进行处理。2. E. Luque-Pe Àrez 等将口含烟草制品放置在支撑液膜装置中,并与紫外分光光度计联用在线检测了其烟碱的总释放量 [Analytica Chimica Acta 1999, 387:155-64]。该方法实现了在线检测烟碱的总释放量,但支撑液膜装置不稳定,液膜剂易流失,测定结果波动较大,且无法检测烟碱的释放速率。

发明内容

[0008] 本发明的目的正是针对目前口含型烟草制品烟碱释放检测方法的缺失或不足,提出了一种检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,利用该方法能够模拟口含型烟草制品中的烟碱在人体口腔的释放情况并对释放量和释放速率进行即时定量,可以检测口含型烟

草制品的烟碱释放速率以及释放程度,为研究和衡量口含型烟草制品安全性和进行品质调控提供技术支持。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

本发明的检测口含型烟草制品烟碱释放情况的方法,通过模拟口含型烟草制品中的烟碱在人体口腔的释放情况并对释放量和释放速率进行即时定量,进而检测口含型烟草制品的烟碱体外释放速率以及释放程度,该方法包括以下内容:

1)、体外烟碱释放与收集:创建模拟口含型烟草制品在人体口腔中烟碱释放情况的模型,该模型包括人工唾液、体外释放、收集装置,即:模拟人在使用口含烟时的情况,使人工唾液在恒温条件下持续不断的流入口含型烟草制品,实现口含型烟草制品的体外烟碱释放和收集过程;

2)、收集液及残留样品中烟碱含量定量分析:利用高效液相色谱仪实现对收集液及残留样品中烟碱含量的定量分析;

3)、绘制体外烟碱释放曲线:由烟碱定量结果计算烟碱累积释放率,根据烟碱累积释放率,绘制烟碱释放曲线(利用 Origin 软件绘制曲线)。

[0010] 所述人工唾液组分包括三类化合物:无机盐类化合物,如氯化钠、氯化钾、氯化钙;有机化合物:如柠檬酸、葡萄糖;生物活性酶蛋白:如粘蛋白(mucin)、溶菌酶、淀粉酶(α -amylase)。该人工唾液是由下列用量配比的物质组分制成:氯化钠 0.85 mg/mL;氯化钾 0.35 mg/mL;氯化钙 0.15 mg/mL;磷酸二氢钾 0.18 mg/mL;氯化镁 0.25 mg/mL;柠檬酸 0.06 mg/mL;葡萄糖 0.20 mg/mL;尿素 0.08 mg/mL;粘蛋白(mucin) 2.45 mg/mL;溶菌酶(lysozyme) 0.60 units/mL;淀粉酶(α -amylase) 2.50 units/mL;酸性磷酸酶(acid phosphatase) 0.01 units/mL。加入粘蛋白等活性物质前,pH用盐酸或氢氧化钠调节至 6.2 - 7.5 的某一值,室温搅拌 10 min 后加入粘蛋白等活性物质,再室温搅拌 30 min 即完成配制。人工唾液可以按照上述配方自行配置,也可通过市场渠道购买。本人工唾液的有益效果是:使用本发明所制的人工唾液与口含型烟草制品混合后,能模拟其化学成份在口腔分泌物中的释放行为,与真实情况接近,为口含型烟草制品化学成份的提取搭建统一的平台,便于分析测定该类制品的化学成分及含量,进而客观地评价该制品的品质及特点。

[0011] 口含型烟草制品的体外烟碱释放和收集过程通过一烟碱释放和收集装置实现,该装置包括依次通过管路连接的溶媒储存瓶、恒流泵、温控单元、烟碱溶出释放单元和释放液收集单元。

[0012] 上述温控单元包括恒温槽、设置在恒温槽中的加热管线段,所述溶出释放单元包括溶出池及附件,溶出池为一柱状玻璃套管,玻璃套管外层通过管路与恒温槽连通,玻璃套管内腔通过穿装在溶出池上端的磨口塞中的管路与加热管线段连通,玻璃套管内腔下部设有样品支架,玻璃套管内腔底部出口通过管路与释放液收集单元中的收集瓶连通。

[0013] 本发明所用的高效液相色谱仪中的液相色谱参数如下:色谱柱为 C18 反相色谱柱,流动相为甲醇和 20mmol 的磷酸盐缓冲溶液,流速 1mL/min,柱温为 35°C;检测器为紫外检测器,最大吸收波长 λ_{\max} =260nm。

[0014] 上述 C18 反相色谱柱可以为 Waters XTerra RP C18 色谱柱,也可以为 Waters XTerra MS C18 色谱柱或 Kromasil C18 色谱柱。

[0015] 所述残留样品中的烟碱含量定量分析采用以下方法,首先选用合适的萃取介质对

烟碱进行萃取,该萃取介质对样品中的烟碱萃取完全,且不破坏烟碱的存在形态;所述萃取介质最佳是乙醇与5%NaOH溶液的混合溶液(9:1),也可以用体积比为其他比例的乙醇与5%NaOH溶液的混合溶液、水、5%NaOH溶液,用最佳萃取介质,残留样品中烟碱更为完全,其烟碱的色谱峰峰型尖锐、对称性好。

[0016] 本发明的具体操作是:将人工唾液加入到溶媒存储瓶中,打开恒流泵、恒温槽,设定恒流泵流速,恒温槽温度,待系统稳定后,将袋装口含型烟草制品放置在溶出池下端的样品支架上,同时计时,并将释放液按1-5 min的时间间隔收集到相应的收集瓶中。释放液收集完毕后,将释放后残留样品取出放入50-100 mL的三角瓶中,加入20 mL乙醇与5%NaOH溶液的混合溶液(9:1),超声萃取30 min。烟碱释放液和残留样品萃取溶液过0.45 μm滤膜后,进入高效液相色谱进行定量检测,根据定量结果计算烟碱释放程度和速率,烟碱释放程度和速率通过烟碱随时间的累积释放率求得。烟碱累积释放率由一段时间的烟碱释放量除以样品总烟碱含量计算(样品总烟碱含量为30 min的烟碱释放量与残留样品中烟碱含量的总和),并根据需要绘制袋装口含型烟草制品烟碱释放曲线。

[0017] 本发明能够模拟袋装口含型烟草制品中的烟碱在人体口腔的释放情况并对释放量和释放速率进行即时定量,可以检测袋装口含型烟草制品的烟碱释放速率以及释放程度,为研究衡量口含型烟草制品安全和品质优劣提供具体技术数据支持。该检测方法快速准确、重复性好,适用于各种规格袋装口含型烟草制品的检测,便于推广。

[0018] 本发明所述检测方法与人体消费口含型烟草制品的真实情况接近,灵敏度高,重复性好,检测周期短,适用于不同行业不同目的研究进行较大批量样品的快速分析,可在医药、烟草等行业的普通化学分析实验室推广应用。

附图说明

[0019] 图1为本发明的检测流程图。

[0020] 图2为本发明中所用检测装置的结构示意图。

[0021] 图2中各部件标号如下:1. 溶媒存储瓶,2. 恒流泵,3. 恒温槽,4. 加热管线段,5. 保温管,6. 溶出池,7. 玻璃磨口塞,8. 导管,9. 样品支架,10. 释放液收集瓶,11. 溶出池支架。

[0022] 图3为实施例1条件下烟碱释放曲线。

[0023] 图4为实施例2条件下烟碱释放曲线。

[0024] 图5为实施例3条件下烟碱释放曲线。

[0025] 图6为实施例4条件下烟碱释放曲线。

具体实施方式

[0026] 本发明以下结合附图(实施例)做进一步说明:

首先对检测装置及使用方法结合图2予以描述:该装置包括依次通过管路连接的溶媒储存瓶1、恒流泵2、温控单元、烟碱溶出释放单元和释放液收集单元,溶媒储存瓶1中装有人工唾液,通过管路与恒流泵2相连;温控单元包括恒温槽3、加热管线段4和保温管5等。加热管线段4放置在恒温槽3中,一端与恒流泵2相连,另一端通过管路与溶出池6上端相连,暴露在恒温槽外与溶出池磨口塞之间的管路为保温管5,保温管为一内径稍大于管路外

径的柱状玻璃套管,该套管外腔通过管路与恒温槽 3 连通,使保温管处于恒温环境,该保温管内芯为人工唾液流经通道。烟碱溶出释放单元包括溶出池 6 及附件。溶出池 6 为一外径 6-8 cm、内径 4-6 cm 的柱状玻璃套管,玻璃套管外层通过管路与保温管 5 串联并与恒温槽 3 连通,使溶出池处于恒温环境。溶出池 6 上端装有玻璃磨口塞 7,玻璃套管内腔下部设有样品支架 9,玻璃磨口塞 7 有一内置玻璃导管 8 可使人工唾液稳定的滴在样品中间,流经样品的释放液通过玻璃套管内腔底部出口、管路载入收集瓶 10 中,溶出池 6 外装有溶出池支架 11,可调节溶出池高度并保持其平稳。释放液收集单元包括收集瓶及托盘,收集瓶 10 分别编号(与收集时间相对应),其体积为 5-50 mL,放置在收集瓶托盘上,用于收集释放液。

[0027] 使用该装置时,设定恒温槽温度为 37°C,通过恒温槽、加热线圈、保温管以及恒温溶出池使体系维持在 37°C 的人体温度,并通过恒流泵实现释放液不断流出,新鲜介质不断流入,调节流速模拟烟碱在口腔中的释放-吸收的过程。具体过程如下:将人工唾液加入到溶媒存储瓶 1 中,打开恒流泵、恒温槽,设定恒流泵流速(0.1 - 2 mL/min),恒温槽温度,待系统稳定后,打开玻璃磨口塞,将样品平放在支架上,盖上磨口塞,同时计时,按 1-5 min 的时间间隔收集到相应的收集瓶中。释放液通过高效液相色谱进行定量分析,根据定量结果计算烟碱释放程度和释放速率,绘制袋装口含型烟草制品烟碱释放曲线。

[0028] 以下结合实施例对本发明做进一步描述:

实施例 1

流速为 0.2 mL/min,温度为 37°C,人工唾液 pH 为 6.7;其释放液中烟碱的检测采用高效液相色谱法,色谱参数如下:色谱柱为 Waters XTerra RP C18 反相色谱柱,流动相为甲醇和 20 mmol 的磷酸盐缓冲溶液(流动相中添加三乙胺,含量为 0.2%,其目的是三乙胺能有效地改善烟碱色谱峰的拖尾,保留时间变大,磷酸盐缓冲液的 pH=6.0),其比例为 23:77,流速 1 mL/min,柱温为 35°C。

[0029] 将 pH 为 6.7 的人工唾液加入到溶媒存储瓶中,打开恒温槽、恒流泵,设定流速为 0.2 mL/min,待系统稳定到 37°C 后,打开玻璃磨口塞,将样品平放在支架上,盖上磨口塞,同时计时,每 5 min 收集一次,共收集 60 min,释放液收集完毕后,将释放后残留样品取出放入 50 mL 的三角瓶中,加入 20 mL 乙醇与 5% NaOH 溶液的混合溶液(9:1),超声萃取 30 min。烟碱释放液和残留样品萃取溶液过 0.45 μm 滤膜后,进入高效液相色谱进行定量检测,根据定量结果计算烟碱释累积放率,绘制口含型烟草制品烟碱释放曲线(见图 3)。从图 3 中可看出,该口含型烟草制品烟碱前 30 min 释放相对较快,30min 内的烟碱释放量已接近 60%,30 min 到 60 min 释放速率较前 30 min 明显减慢,60 min 内释放了 76%。

[0030] 实施例 2

流速为 0.4mL/min,温度为 37°C,人工唾液 pH 为 6.4;其释放液中烟碱的检测采用高效液相色谱法,色谱参数同实施例 1。

[0031] 将 pH 为 6.4 的人工唾液加入到溶媒存储瓶中,打开恒温槽、恒流泵,设定流速为 0.4 mL/min,待系统稳定到 37°C 后,打开玻璃磨口塞,将样品平放在支架上,盖上磨口塞,同时计时,每 5 min 收集一次,共收集 60 min,释放液收集完毕后,将释放后残留样品取出放入 50 mL 的三角瓶中,加入 20 mL 乙醇与 5% NaOH 溶液的混合溶液(9:1),超声萃取 30 min。烟碱释放液和残留样品萃取溶液过 0.45μm 滤膜后,进入高效液相色谱进行定量检测,根据定量结果计算烟碱释累积放率,绘制口含型烟草制品烟碱释放曲线(见图 4)。从图

4 中可看出,该口含型烟草制品烟碱前 20 min 释放最快,20 min 内释放了 62 %,20 min 到 30 min 释放速率较前 20 min 明显减慢,30 min 内释放了 74 %,30 min 后烟碱释放速率进一步减慢,60 min 内释放了 90 %。

[0032] 实施例 3

流速为 1 mL/min,温度为 37 ° C,人工唾液 pH 为 7.0 ;其释放液中烟碱的检测采用高效液相色谱法,色谱参数同实施例 1

将 pH 为 7.0 的人工唾液加入到溶媒存储瓶中,打开恒温槽、恒流泵,设定流速为 1 mL/min ,待系统稳定到 37 ° C 后,打开玻璃磨口塞,将样品平放在样品支架上,盖上磨口塞,同时计时,分别在 1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min、10min、12min、14min、16min、18min、20min、24min、28min、32min 时收集释放液至相应的收集瓶中。释放液收集完毕后,将释放后残留样品取出放入 50 mL 的三角瓶中,加入 20 mL 乙醇与 5 % NaOH 溶液的混合溶液(9:1),超声萃取 30 min。烟碱释放液和残留样品萃取溶液过 0.45 μ m 滤膜后,进入高效液相色谱进行定量检测,进高效液相色谱进行定量检测,根据定量结果计算烟碱释放累积释放率,绘制口含型烟草制品烟碱释放曲线(见图 5)。从图 5 中可看出,该口含型烟草制品烟碱前 5 min 释放最快,释放量以每分钟 10.5 % 的速度增加,6 min 到 10 min 释放速率较前 5 min 有所减慢,释放量以每分钟 4.3 % 的速度增加,11 min 到 20 min 较 6 min 到 10 min 释放速率进一步减慢,释放量以每分钟 1 % 的速度增加,前 20 min 烟碱已释放 90 %,20 min 后烟碱释放速率变化已不明显。

[0033] 实施例 4

流速为 2 mL/min,温度为 37 ° C,人工唾液 pH 为 7.2 ;其释放液中烟碱的检测采用高效液相色谱法,色谱参数同实施例 1。

[0034] 将 pH 为 7.2 的人工唾液加入到溶媒存储瓶中,打开恒温槽、恒流泵,设定流速为 2 mL/min ,待系统稳定到 37 ° C 后,打开玻璃磨口塞,将样品平放在支架上,盖上磨口塞,同时计时,分别在 1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min、10min、12min、14min、16min、18min、20min、22min、24min、26min、28min、30min 时收集释放液,释放液收集完毕后,将释放后残留样品取出放入 50 mL 的三角瓶中,加入 20 mL 乙醇与 5 % NaOH 溶液的混合溶液(9:1),超声萃取 30 min。烟碱释放液和残留样品萃取溶液过 0.45 μ m 滤膜后,进入高效液相色谱进行定量检测,根据定量结果计算烟碱释累积放率,绘制口含型烟草制品烟碱释放曲线(见图 6)。从图 6 中可看出,该口含型烟草制品烟碱前 5 min 释放最快,5 min 内释放了 64 %,6 min 到 10 min 释放速率较前 5 min 有所减慢,10 min 内释放了 86 %,随着时间的增加烟碱释放速率进一步减慢,前 20 min 烟碱已释放 95 % 以上,20 min 后烟碱释放速率变化已不明显。

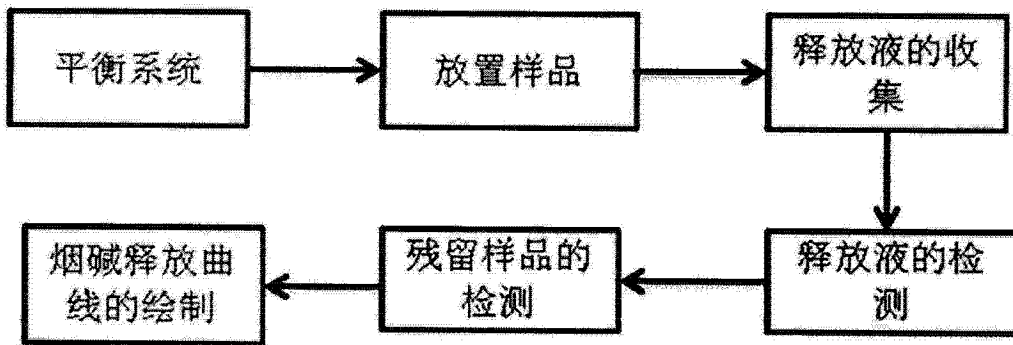


图 1

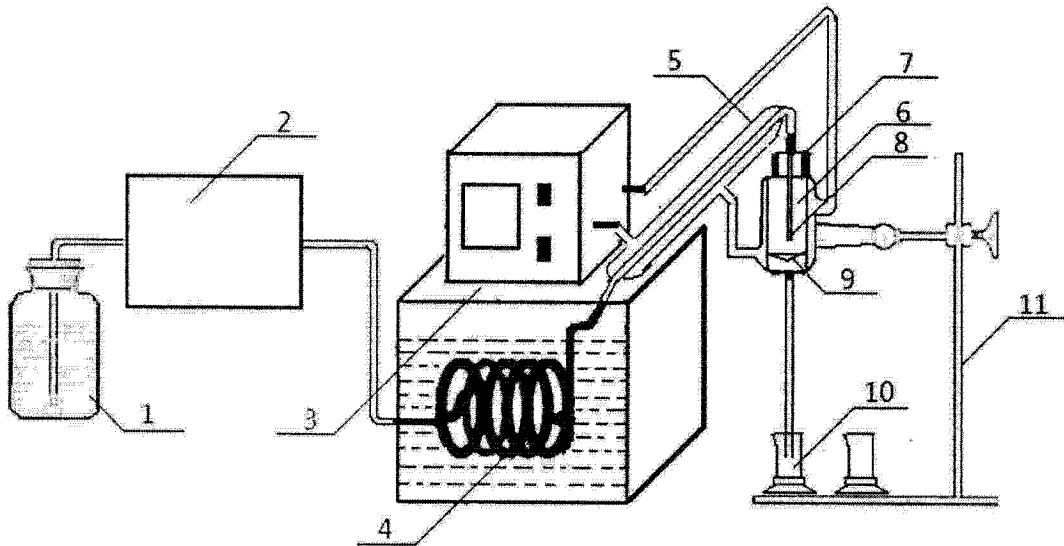


图 2

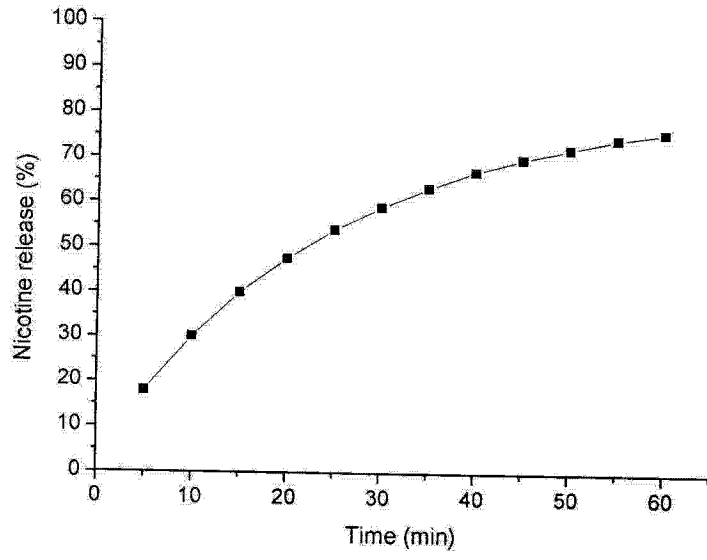


图 3

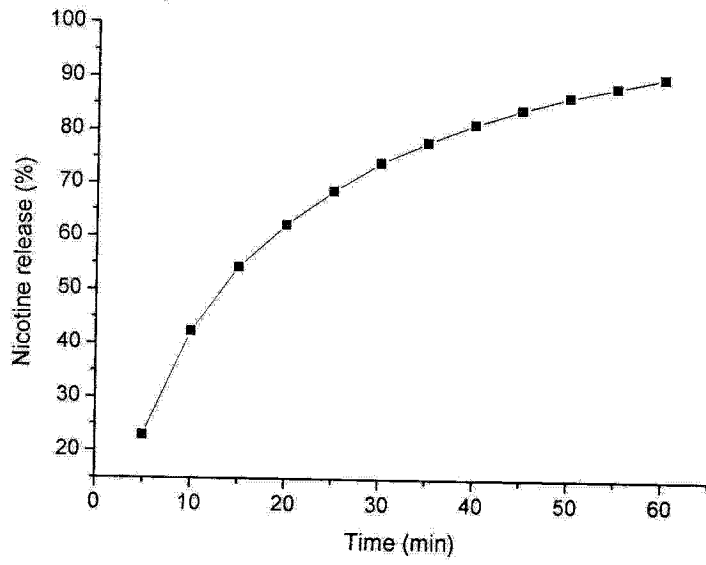


图 4

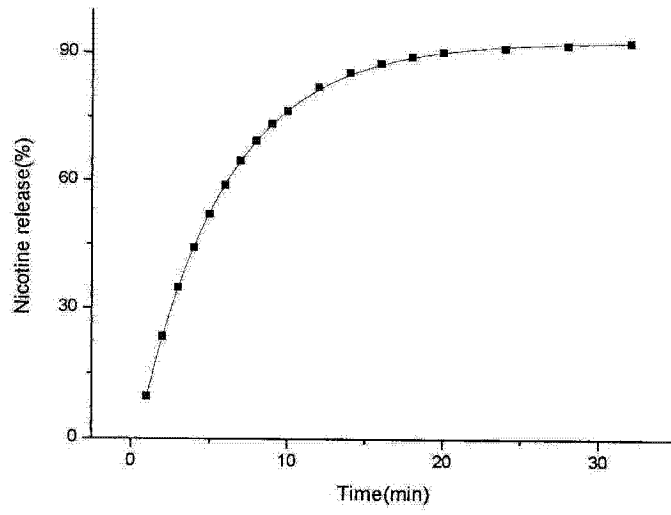


图 5

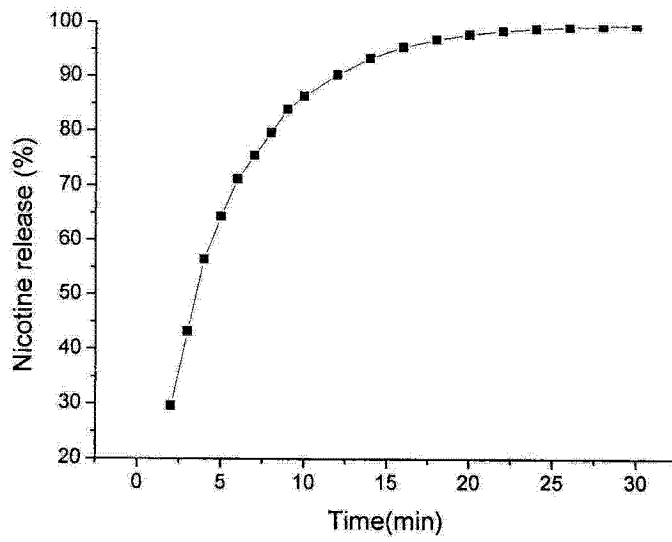


图 6