

肾亏虚证在不同年龄的患者中均最为常见,符合本病以肝脾肾亏虚为本的病机。年龄小于60岁的患者除单纯虚证外还常见到痰浊阻络或痰热内结证型,临床上该证型患者多体型中等或偏胖,素体偏实,平素嗜好肥甘厚味,酿生痰浊,痰浊郁而化热,痰浊(热)困脾,损伤脾气,而致清阳不升,筋脉不通,出现本虚标实以标实表现为主要的各种症状。年龄大于60岁的患者肝脾肾亏虚证候占60%以上,其次以虚实夹杂为多,此型患者多病程较长,久病阴阳气血损耗严重,肝脾肾俱虚,无力抗邪,而致痰浊瘀血内结,痰瘀入络,表现为本虚标实以虚为主。

根据病程划分后的证型分布显示中医证候的演变存在一定的规律。肝脾肾亏虚证贯穿于整个病程,在病程各个阶段均常见。病程小于2年的早期患者以单纯虚证或实证为主,痰浊或痰热内阻实证有痰浊困脾、阳气不升之象,但本虚与邪实均严重的虚实夹杂证很少。2至5年病程的患者肝脾肾亏虚更为明显,肝脾肾亏虚证占50%以上。病程5年以上的晚期患者中没有单纯实证证候,而表现为阳气衰败、真阴耗竭,肝脾肾俱虚,痰浊瘀血阻络,虚实夹杂,本虚与邪实均表现明显,病情复杂,治疗亦相对困难。可见本病发病初期证候相对单纯,虚实证候均可出现,至中期肝脾肾亏虚逐渐加重、以虚证为主,晚期则本虚与邪实俱严重、虚实夹杂、痰瘀入络。

根据上述证候特点,在本病的中医药治疗上应注意兼顾扶正与驱邪的两方面。对不同病程的患者均应注意补益肝脾肾、

填精益髓以扶助正气,对素体偏实、年龄偏小、病程较短的患者还应注意化痰通络、健脾降浊,病程较长的晚期患者则需注意二者兼顾、扶正以驱邪,并在化痰降浊的同时辅以活血化痰。

通过本次证候研究可见肝脾肾亏虚为MSA发病的根本病机,与国内其他证候研究具有一致性。在此基础上进一步证实了中医证候与年龄、病程相关,总结了不同年龄、病程患者的证候分布及演变规律,为探索更有效的中医药辨证治疗提供了一定的参考。

参 考 文 献

- [1] 许浩游,郑瑜.23例多系统萎缩患者中医证候及疗效分析.新中医,2012,44(7):69-71
- [2] 幸冰峰,周歆.36例多系统萎缩临床特征及中医证候治疗分析.西部中医药,2012,25(3):49-51
- [3] 陈霄,张敏,高青铭.中医辨证综合治疗多系统萎缩临床观察.吉林中医药,2012,32(4):374-376
- [4] 宋春侠,邹忆怀,王国相,等.多系统萎缩48例证候特征分析.天津中医药,2007,24(6):465-467
- [5] Gilman S, Wenning G K, Low P A, et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. Neurology, 2008, 71: 670-676
- [6] CFDA. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京:中国医药科技出版社, 2002

(收稿日期:2014年5月8日)

· 研究报告 ·

HPLC同时测定大腹皮中4种生物碱含量

汤丽娟¹, 吴皓^{1,2,3}, 郁红礼^{1,2,3}

(¹南京中医药大学, 南京 210023; ²江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029; ³国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029)

摘要: 目的: 建立同时测定大腹皮中4种生物碱含量的HPLC方法, 为控制大腹皮及其制剂质量提供依据。方法: 采用Thermo SCX色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μm); 乙腈-0.1%磷酸溶液(浓氨试液调节pH值为3.3)(73:27)为流动相, 等度洗脱; 检测波长215nm; 流速1.0mL/min; 柱温30℃。结果: 上述色谱条件下, 4种成分分离较好, 在一定范围内, 氢溴酸槟榔碱、盐酸槟榔次碱、氢溴酸去甲槟榔碱、盐酸去甲槟榔次碱线性关系良好, 加样回收率分别为96.9%、103.0%、102.8%、102.3%, RSD分别为1.82%、1.45%、1.75%、1.12%。结论: 本法准确、简便, 重复性好, 可用于大腹皮中4种生物碱含量测定, 可作为大腹皮及其制剂多指标质量评价和控制体系的参考依据。

关键词: 大腹皮; HPLC; 槟榔碱; 槟榔次碱; 去甲槟榔碱; 去甲槟榔次碱

基金资助: 《中国药典》(一部)大腹皮药材质量标准研究(No.779)

通讯作者: 郁红礼, 江苏省南京市栖霞区仙林大道138号南京中医药大学, 邮编: 210023, 电话: 025-86798281, E-mail: hongli76@126.com

HPLC determination of 4 alkaloids in *Arecae Pericarpium*

TANG Li-juan¹, WU Hao^{1,2,3}, YU Hong-li^{1,2,3}

(¹Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China; ³Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective: To determine the content of arecoline, arecaidine, guvacoline and guvacine in *Arecae Pericarpium*, a simple and rapid HPLC method has been developed. Methods: The separations were carried out at 30℃ on a cation-exchange column (SCX, particle size 5μm, 250mm×4.6mm), eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (adjusted to pH 3.3 with ammonium hydroxide). The flow-rate was 1.0mL/min and the eluent was monitored at 215nm. Results: Arecoline hydrobromide, arecaidine hydrochloride, guvacoline hydrobromide and guvacine hydrochloride were well separated by this method, and showed a good linearity in the given ranges respectively. The average recoveries of the four alkaloids were 96.9%, 103.0%, 102.8%, 102.3%, RSD of them were 1.82%, 1.45%, 1.75% and 1.12% respectively. Conclusion: The present method is accurate, handy and highly repeatable, can be used to determine the contents of the 4 major alkaloids in *Arecae Pericarpium*, which provides a scientific basis for the multi-index evaluation and quality control system of *Arecae Pericarpium* and its preparation.

Key words: HPLC; *Arecae Pericarpium*; Arecoline; Arecaidine; Guvacoline; Guvacine

Fund assistance: Chinese Pharmacopoeia *Arecae Pericarpium* Quality Standard Research (No.779)

大腹皮 (*Arecae Pericarpium*) 是棕榈科植物槟榔 (*Areca catechu* L.) 的干燥果皮, 具有行气宽中、行水消肿的功效, 用于治疗湿阻气滞、脘腹胀闷等^[1,24]。研究表明, 大腹皮具有显著的调节胃肠动力作用^[2]。

槟榔果实中含有多种生物碱, 其中槟榔碱 (arecoline)、槟榔次碱 (arecaidine)、去甲槟榔碱 (guvacoline)、去甲槟榔次碱 (guvacine) 含量较高^[3]。槟榔碱、槟榔次碱等生物碱具有调节胃肠功能的作用^[4], 可能是大腹皮调节胃肠动力的重要活性成分。

1989年, Huang J L等^[3]首次建立了槟榔中4种生物碱含量测定的HPLC方法。此后, 众多学者对槟榔中生物碱的HPLC测定法进行了研究^[5-6], 但均未同时测得4种生物碱的含量。本文首次建立了大腹皮中4种主要生物碱含量的HPLC测定方法。与Huang J L的方法相比, 本法操作简便, 色谱峰分离好, 可作为大腹皮及其制剂多指标质量评价和控制体系的参考依据。

材料

1. 仪器 Waters e2695高效液相色谱仪 (美国Waters公司), Thermo SCX色谱柱 (250mm×4.6mm, 5μm, 美国Thermo公司), LIDA-PHS-3C离子酸度计 (上海理达仪器厂), Sartorius BP211D电子天平、Sartorius BT 125D电子天平 (德国Sartorius公司), KQ-200KDE高功率数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 乙腈 (Merck公司, 色谱纯), 磷酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 色谱纯), 自制去离子水, 其余试剂均为分析纯。

2. 试剂与药剂 氢溴酸槟榔碱 (中国药品生物制品检定所, 批号: 111684-20040)、盐酸槟榔次碱 (英国Alfa公司, 批号: 10114762)、氢溴酸去甲槟榔碱 (加拿大Toronto公司, 批号: 3-MP-45-3)、盐酸去甲槟榔次碱 (英国Tocris公司, 批号: 18 A/123897) 对照品。各对照品质量分数均≥98%。实验所用12批

药材, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为大腹皮。

方法与结果

1. 溶液的制备

1.1 对照品溶液的制备 精密称取氢溴酸槟榔碱19.98mg、盐酸槟榔次碱6.39mg、氢溴酸去甲槟榔碱4.49mg、盐酸去甲槟榔次碱6.50mg, 加流动相溶解并定容至10mL量瓶中, 制成对照品储备液, 4℃冷藏备用。

1.2 供试品溶液制备 取大腹皮药材粉末 (过5号筛) 约0.5g, 精密称定, 精密加入乙腈-0.5%磷酸溶液 (30:70) 25mL, 置于100mL锥形瓶中, 称定重量, 超声处理20min, 用浓氨水调节pH为3-4, 再用提取溶剂补足减失的重量, 摇匀, 取上清液, 10 000r/min离心5min, 0.22μm微孔滤膜滤过, 续滤液即为供试品溶液。

2. 色谱条件 色谱柱: Thermo SCX (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液 (浓氨试液调节pH值为3.3) (73:27), 等度洗脱; 柱温: 30℃; 检测波长: 215nm; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 10μL。4种生物碱之间及与其他成分的分离度均大于1.5。理论塔板数均大于3 000。HPLC图见图1。

3. 方法学考察

3.1 线性关系考察 精密移取混合对照品储备液适量, 用流动相稀释, 分别制成7个浓度梯度的对照品溶液, 在方法与结果“2.”项色谱条件下进样10μL, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对照品进样量为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程。逐级稀释对照品溶液, 以信噪比3作为检测限, 以信噪比10作为定量限。结果见表1。

3.2 精密度考察 取同一浓度混合对照品溶液, 在方法与结果“2.”项色谱条件下进样10μL, 连续进样6次, 记录各对照品峰面积, 进行日内精密度考察; 每天进样2次, 连续3d, 记录

表1 4种生物碱对照品的线性关系

生物碱成分	回归方程	r值	线性范围(μg)	检测限(ng)	定量限(ng)
氢溴酸槟榔碱	$Y=20.5\times10^5X+1.640\times10^5$	0.9994	0.0620-4.0000	2.60	8.67
盐酸去甲槟榔次碱	$Y=24.5\times10^5X+0.330\times10^5$	0.9995	0.0200-1.3000	1.69	5.63
氢溴酸去甲槟榔碱	$Y=25.9\times10^5X+0.228\times10^5$	0.9995	0.0141-0.8750	1.17	3.89
盐酸槟榔次碱	$Y=18.4\times10^5X+0.243\times10^5$	0.9995	0.0201-1.2800	1.66	5.53

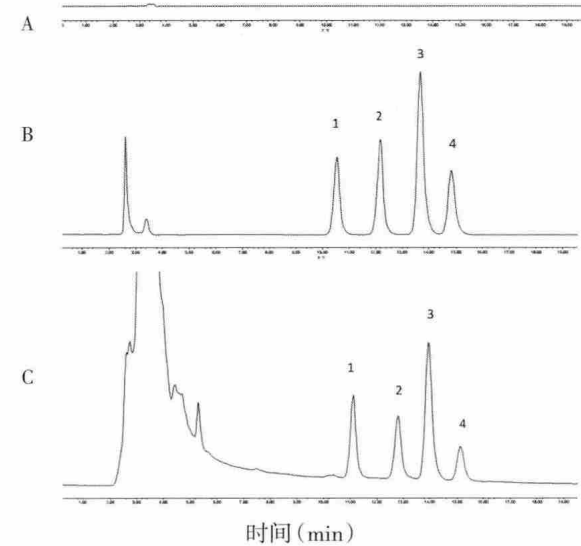


图1 4种生物碱的HPLC图

注: A.溶剂; B.对照品; C.大腹皮样品。1.盐酸槟榔次碱; 2.盐酸去甲槟榔次碱; 3.氢溴酸槟榔碱; 4.氢溴酸去甲槟榔碱。

各对照品峰面积, 进行日间精密度考察。氢溴酸槟榔碱、盐酸槟榔次碱、氢溴酸去甲槟榔碱、盐酸去甲槟榔次碱的日内精密度RSD分别为0.53%、0.74 %、0.59%、0.74%, 日间精密度RSD分别为0.66%、1.28%、0.97%、0.91%, 精密度良好。

3.3 重复性考察 取6份大腹皮药材样品(广西120613), 按方法与结果“1.2”项下方法制备供试品溶液, 在方法与结果“2.”项色谱条件下进样10μL测定, 记录各对照品峰面积, 计算质量分数。氢溴酸槟榔碱、盐酸槟榔次碱、氢溴酸去甲槟榔碱、盐酸去甲槟榔次碱含量的RSD分别为0.12%、0.71%、0.57%、0.24%。

3.4 稳定性考察 取同一供试品溶液, 分别于0、2、4、6、8、10、12、24、48h在方法与结果“2.”项条件下进样10μL, 记录各对照品峰面积。48h内氢溴酸槟榔碱、盐酸槟榔次碱、氢溴酸去甲槟榔碱和盐酸去甲槟榔次碱的RSD分别为0.67%、0.30%、1.36%、0.82%。结果表明供试品溶液在48h内稳定。

3.5 加样回收率考察 取大腹皮药材样品(广西120613)9份, 每份0.25g, 精密称定, 分别精密加入相当于其生物碱含量1.2、1.0、0.8倍的对照品, 按方法与结果“1.2”项下方法制备, 在方法与结果“2.”项条件下进样10μL, 计算加样回收率。结果见表2-表5。氢溴酸槟榔碱、盐酸槟榔次碱、氢溴酸去甲槟榔碱和盐酸去甲槟榔次碱的加样回收率分别是96.9%、103.0%、102.8%、102.3%, RSD分别为1.82%、1.45%、1.75%、1.12%。

表2 氢溴酸槟榔碱加样回收率(n=3)

序号	样品中含量(mg)	加标量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.969	1.151	2.090	97.7	96.9	1.82
	0.973	1.151	2.091	97.4		
	0.952	1.151	2.062	95.8		
2	0.945	0.958	1.851	94.9	98.1	98.4
	0.890	0.958	1.850	99.7		
	0.910	0.958	1.853	98.1		
3	0.952	0.770	1.689	95.2	94.8	98.4
	0.937	0.770	1.670	94.8		
	0.913	0.770	1.673	98.4		

表3 盐酸槟榔次碱加样回收率(n=3)

序号	样品中含量(mg)	加标量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.441	0.522	0.991	105.2	103.0	1.45
	0.452	0.522	0.982	102.5		
	0.440	0.522	0.963	100.2		
2	0.411	0.441	0.864	102.7	104.5	103.0
	0.432	0.441	0.893	104.5		
	0.421	0.441	0.875	103.0		
3	0.451	0.353	0.813	102.6	103.3	103.6
	0.418	0.353	0.783	103.3		
	0.416	0.353	0.782	103.6		

表4 氢溴酸去甲槟榔碱加样回收率(n=3)

序号	样品中含量(mg)	加标量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.294	0.316	0.619	103.6	102.8	1.75
	0.297	0.316	0.629	105.0		
	0.292	0.316	0.605	99.1		
2	0.293	0.301	0.606	104.0	102.0	101.3
	0.296	0.301	0.603	102.0		
	0.296	0.301	0.601	101.3		
3	0.293	0.252	0.553	103.2	104.4	103.6
	0.284	0.252	0.547	104.4		
	0.297	0.252	0.558	103.6		

表5 盐酸去甲槟榔次碱加样回收率(n=3)

序号	样品中含量 (mg)	加标量 (mg)	检出量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.285	0.325	0.616	101.9	102.3	1.12
	0.286	0.325	0.615	101.2		
	0.289	0.325	0.624	103.1		
2	0.262	0.261	0.533	103.9	100.8	101.5
	0.272	0.261	0.535	100.8		
	0.275	0.261	0.541	101.5		
3	0.286	0.220	0.514	103.6	103.0	101.4
	0.270	0.220	0.497	103.0		
	0.268	0.220	0.491	101.4		

4. 样品含量测定 取12批样品,按方法与结果“1.2”方法制备供试品溶液,在方法与结果“2.”项色谱条件下进样10μL测定,结果见表6。

表6 大腹皮中4种生物碱含量测定(n=3, mg/g)

产地	批次	槟榔碱	槟榔次碱	去甲槟榔碱	去甲槟榔次碱
广东	120308	3.60±0.01	1.69±0.01	0.78±0.01	1.27±0.01
广西	120613	3.69±0.04	1.94±0.01	0.84±0.02	1.17±0.01
广西	120601	3.38±0.02	2.27±0.01	0.67±0.01	1.46±0.02
广西	120415	3.77±0.02	2.01±0.03	0.89±0.03	1.40±0.03
广西	120308	3.53±0.02	1.72±0.02	0.78±0.02	1.26±0.03
广西	111118	3.26±0.02	1.64±0.02	0.64±0.01	1.04±0.02
广西	111107	2.66±0.02	1.50±0.02	0.51±0.01	0.88±0.01
台湾	120801	2.67±0.08	1.46±0.21	0.64±0.11	0.91±0.02
台湾	120701	2.87±0.06	1.12±0.02	0.54±0.02	1.11±0.02
台湾	120510	1.92±0.02	0.84±0.03	0.33±0.02	0.69±0.03
海南	120109	2.51±0.08	1.49±0.05	0.56±0.03	0.91±0.05
云南	120706	3.80±0.02	2.21±0.02	0.90±0.06	1.71±0.07

注: 槟榔碱重量=氢溴酸槟榔碱重量/1.5214; 槟榔次碱重量=盐酸槟榔次碱重量/1.2583; 去甲槟榔碱重量=氢溴酸去甲槟榔碱重量/1.5733; 去甲槟榔次碱重量=盐酸去甲榔次碱重量/1.2859。

讨论

1. 供试品溶液制备方法考察 槟榔属植物中生物碱的提取方法主要有超声法^[7]和回流法^[8]。两种方法提取效率相似,因超声法更简便,故采用超声法。槟榔属植物中生物碱的提取溶剂主要有无水乙醚^[9]、水^[10]、甲醇^[11]、乙醇^[12],也有文献用流动相作为生物碱的提取溶剂^[13]。乙腈-0.5%磷酸溶液(30:70)提取率最高,制备的供试液最稳定。

2. 色谱条件考察 4种生物碱色谱峰分离度受pH影响较大。当pH为3.3时,4个色谱峰完全分离,对称性良好,故选择乙腈-0.1%磷酸溶液(浓氨水调节pH至3.3)作为流动相。本研究

所建立的方法系统适应性和耐用性良好。采用Thermo SCX柱(250mm×4.6mm, 5μm, 美国Thermo公司)、Polysulfonix SCX柱(250mm×4.6mm, 5μm, 美国Sepax公司)、Ultimate XB-SCX柱(250mm×4.6mm, 5μm, 上海月旭公司)、Waters SCX柱(250mm×4.6mm, 5μm, 美国Waters公司)等色谱柱,分析效果亦较好,但不同色谱柱条件下4种生物碱成分的保留时间差异极大,可能与色谱柱有关。当柱温为25-35℃、流速为0.9-1.1 mL/min、检测波长为210-220nm、乙腈比例为71%-75%时,各色谱峰仍可完全分离。

本研究建立的方法,准确度高、重复性好。大腹皮中槟榔碱、槟榔次碱、去甲槟榔碱和去甲槟榔次碱的平均含量分别为0.33%、0.18%、0.07%、0.12%。采用的乙腈-0.5%磷酸溶液(30:70)超声提取法,比《中华人民共和国药典》收录的乙醚回流提取法^[14]操作更简便,提取效率更高,可作为大腹皮标准提取物的制备方法。本研究为建立大腹皮药材及其制剂的多指标质量控制和评价体系提供了可靠的参考依据。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版,2010

[2] 朱金照,张捷,冷恩仁,等.中药大腹皮提取液促进胃动力的机制探讨.海峡药学,2001,134:22

[3] Huang J L, Mcleish M J. High-performance liquid chromatographic determination of the alkaloids in betel nut. J Chromatogr, 1989, 475: 450

[4] 郑锦星. 槟榔提取物功能评价的研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2006

[5] 陈翠梅. 离子对RP-HPLC槟榔碱测定方法的建立与应用. 长沙: 中南大学, 2009

[6] 毛春芹, 陆兔林, 季德, 等. 高效液相色谱法测定不同产地大腹皮中槟榔碱的含量. 中国药理学杂志, 2013, 48(11): 909

[7] 罗士数, 张海德, 李国胜, 等. 槟榔中槟榔碱的超声波提取工艺研究. 食品科技, 2010, 35(8): 241

[8] 罗士数, 张海德, 朱莉, 等. 槟榔中槟榔碱的乙醇回流提取工艺研究. 食品科学, 2010, 31(30): 107

[9] 何际婵, 董志超, 王建荣. 反相高效液相色谱法测定槟榔中槟榔碱的含量. 中华中医药学刊, 2011, 29(9): 1969

[10] 张春江, 吕飞杰一, 台建祥, 等. 槟榔及其产品中生物碱成分的反相离子对高效液相色谱法测定. 食品科学, 2008, 29(7): 346

[11] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准(第五期). 香港: 2012: 41

[12] 刘文杰. 槟榔中生物碱的提取纯化及其抑菌性能研究性研究. 北京: 北京林业大学, 2012

[13] 尹萌, 孟月兰, 闻珣. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评”. 中草药, 2011, 42(6): 1094

(收稿日期: 2013年11月8日)