DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20160831.018
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20160831.1133.036.html

海南槟榔提取物中多酚和槟榔碱的含量测定

周 丹[1],刘启兵[1],刘月丽[1],翟锐锐[1],姚瑰玮[1],易西南[2] ✉
(1. 海南医学院药学院,海南 海口 571199;2. 海南医学院解剖学教研室,海南 海口 571199)

[摘要] 目的:测定海南槟榔乙醇提取物中多酚和槟榔碱的含量。方法:多酚的含量分析采用分光光度法,以没食子酸为对照品,以 $FeCl_3$-$K_3[Fe(CN)_6]$为显色剂,在 720 nm 处进行测定;槟榔碱的含量分析采用高效液相色谱法,色谱柱为 C_{18} 柱,流动相组成为乙二胺、甲醇和乙腈,检测波长为 215 nm,流速 1.0 mL/min。结果:海南槟榔乙醇提取物中多酚的含量为 10.54 mg/g,线性范围为 0.096~0.576 μg/mL,平均回收率为 101.40%,RSD 为 0.88%;海南槟榔乙醇提取物中槟榔碱的含量为 1.935 μg/g,RSD 为 1.8%。结论:该方法简单快捷,重现性好,适合于海南槟榔乙醇提取物中多酚和槟榔碱的含量测定。

[关键词] 槟榔;提取物;多酚;槟榔碱
[中图分类号] R93 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2016)19-2224-04

Determination of total polyphenols and arecoline in ethanol extracts from Areca Catechu

ZHOU Dan[1], LIU Qi-bing[1], LIU Yue-li[1], ZHAI Rui-rui[1], YAO Gui-wei[1], YI Xi-nan[2] ✉
(1.*School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*; 2.*Department of Anatomy, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*)

[*Foundation Project*]: *It is supported by Hainan Science and Technology Plan Projects* (*NO. ZDXM*20120050).
[*Author*]:*ZHOU Dan* (1981-), *Female*, *M.M.*, *Associate professor*, *Tel*: 13617547317, *E-mail*: *zhoudan*1014@126.*com*.
[*Correspondence to*]:*YI Xi-nan*(1962-),*M.M.*,*Researchers Professor*,*Tel*:66987170,*E-amil*:1272791897@*qq.com*
Received: 2016-07-12 *Revised*: 2016-07-28 *JHMC*,2016;22(19):2224-2227

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] Objective: To establish a method for determination of total polyphenols and arecoline in ethanol extracts from Areca catechu. Methods: The content of total polyphenols was determined by spectrophotometry at 215 nm, with the mixture solution of $FeCl_3$ and $K_3[Fe(CN)6]$ as the color developing agent. The content of arecoline was analyzed by HPLC. Hypersil BDS C_{18} was used and the mobile phase was consisted of diethylamine, metanol and acetonitrile. The detection wavelength was 215 nm, and the flow rate was 1.0 mL/min. Results: The content of total polyphenols in ethanol extracts from Areca catechu was 10.54 mg/g. Calibration graphs were constructed in the range of 0.096-0.576 μg/mL. The average recoveries were 101.40%. The RSD of the methods was 0.88%. The content of arecoline was 1.935 μg/g, with the RSD of 1.8%. Conclusions: The method was brief, fast, accurate, and suitable for the content determination of total polyphenols and arecoline in ethanol extracts from Areca catechu.

[KEY WORDS] Areca catechu; Ethanol extracts; Total polyphenols; Arecoline

槟榔(*Areca nut*, *Betel nut*.)是棕榈科(*Palmaceae*)植物槟榔(*Areca catechu L*.)的干燥成熟种子,别名有槟玉、宾门(广东)、仁频、国马(云南)、青仔(台湾)、大腹子等[1]。槟榔原产于斯里兰卡,在我

[基金项目] 海南省科技计划项目(ZDXM20120050)
[作者简介] 周丹(1981-),女,湖南望城人,硕士,副教授,电话:0898-66972095,13617547317,E-mail:zhoudan1014@126.com。
[通讯作者] 易西南(1962-),男,湖南醴陵人,博士,教授,电话:0898-66987170,E-amil:1272791897@qq.com。
[收稿日期] 2016-07-12 [修回日期] 2016-07-28 网络出版时间:2016-08-31 11:33:34

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

国主要分布于广东、福建、台湾、海南、云南。槟榔是四大南药之一，其种子、果皮、花均可入药[2]。槟榔味苦、辛，性温，具有消积驱虫、降气，行水的功能，用于食积腹痛、泻痢后重、绦虫病、蛔虫病、疟疾等[1]。国内外对槟榔的化学成分研究结果表明槟榔含有生物碱、酚类、氨基酸、多聚糖、矿物质、粗纤维、脂肪油、维生素、红色素等[3]。槟榔的药理活性研究表明槟榔具有抗细菌、真菌和病毒作用、抗老化、降低胆固醇、抗氧化、抗抑郁、抗癌等[4-6]。

槟榔的活性物质主要包括生物碱、酚类[7]。槟榔碱，在众多生物碱是含量最高，同时也是槟榔中最主要的保健和药理活性成分[8]。槟榔碱的药理生理活性研究主要集中在驱虫作用、刺激交感神经以及兴奋 M 胆碱受体、提神作用、抗动脉粥样硬化、抗炎症、抗氧化作用、抗血栓形成作用等[7,9]。目前槟榔碱含量的测定方法主要有酸碱滴定法、薄层扫描法、毛细管电泳法、分光光度法、高效液相色谱法等[10]。由于槟榔中槟榔碱以与鞣质结合形式存在，用滴定法只能测定总生物碱的含量，薄层扫描法、毛细管电泳法对仪器的要求较高或操作繁琐，而高效液相色谱法以操作简单、准确度高、重复性好等优点被广泛采用。

近期许多研究表明，槟榔的许多功效如抗细菌、真菌和病毒的作用、抗老化作用、降低胆固醇作用、抗氧化作用、抗凝血酶作用等都与其所含的活性成分多酚有关[1]。槟榔中多酚类物质包括缩合鞣质、水解类鞣质和非单宁黄烷醇等。测定多酚的常用方法有高锰酸钾滴定法、香草醛法、福林酚比色法(Folin-酚法)和铁氰化钾分光光度法等[12]。

国内外对槟榔碱或多酚的药理活性和含量测定研究较多，但未见对槟榔醇提物中槟榔碱和多酚含量的同时测定。本实验以乙醇为溶剂对海南槟榔进行提取，采用铁氰化钾分光光度法测定提取物中多酚的含量，采用高效液相色谱法测定提取物中槟榔碱的含量，并对多酚和槟榔碱的含量测定方法进行方法学验证。本实验将为海南槟榔乙醇提取物的药理活性研究提供物质基础，为海南槟榔深加工及市场开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与对照品

高液液相色谱仪，配 P230Ⅱ 高压恒流泵、UV230Ⅱ 紫外-可见检测器和 EC2006 色谱处理系统(大连依利特分析仪器有限公司)；722N 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)；800B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)；AE-100 型电子分析天平(南京庚辰科学仪器有限公司)，高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

没食子酸(批号：111684-200401)和槟榔碱对照品(批号：110831-201204)购自中国药品生物制品检定所；甲醇为色谱纯，乙醇、十二烷基磺酸钠、$FeCl_3$、$K_3[Fe(CN)6]$、HCl、乙腈、乙二胺溶液、磷酸均为分析纯；实验用水为二次去离子水。

1.2 试药

槟榔样品为海南产槟榔，采自海南省万宁市后安镇，经海南医学院中药学教研室田建平老师鉴定为槟榔(*Areca nut*，*Betel nut*)。

1.3 方法

1.3.1 槟榔样品溶液的制备 将鲜槟榔果洗净，切开，40℃烘干，粉碎。称取 20 g 槟榔粉末，按料液比 1∶10、1∶8、1∶6加 80%乙醇冷浸 3 d，提取 3 次，过滤，合并滤液，定容至 500 mL，得槟榔样品溶液。旋蒸，冷冻干燥，得槟榔乙醇提取物 16.20 g。收率 81.05%。

1.3.2 多酚的含量分析 准确移取 0.15 mL 样品溶液置于 25 mL 容量瓶中，加入 5 mL 无水乙醇，2 mL 0.3%十二烷基磺酸钠和 0.6% $FeCl_3$-0.9%$K_3[Fe(CN)_6]$(1∶0.9)混合溶液 1 mL，混匀后暗处放置 5 min，用 0.1 mol/L HCl 溶液定容至刻度，混匀，暗处放置 20 min。用 722 型分光光度计，以显色剂为空白，在 720 nm 处测定吸光度 A。

1.3.3 HPLC 法 色谱柱为大连依利特 C_{18} 柱(4.6 mm×200 mm，5 μm)；流动相为 80 mL 乙二胺溶液(磷酸调节 pH 至 7.5)与 20 mL 甲醇乙腈混合溶液(体积比为 20∶30)；流速 1.0 mL/min；柱温 25℃；检测波长为 215 nm；进样量 20 μL。

2 结果

2.1 槟榔提取物多酚的含量分析

2.1.1 对照品溶液的制备及标准曲线绘制 精密称取 0.005 30 g 没食子酸对照品，用无水乙醇溶解定容至 50 mL 容量瓶中，得到浓度为 106.0 mg/L 的没食子酸乙醇溶液。准确吸取没食子酸乙醇溶液 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、0.60 mL 于 25 mL 容量瓶中，按上述实验方法显色、测定吸光度 A。以 A 为纵坐标，以没食子酸浓度为横坐标，绘制标准曲线，计算相关系数。结果见图 1。经统计学处理，得回归方程为：$A=1.349c+0.040\ 7$，$R^2=0.999\ 2$。结果表明没食子酸含量在 0.096～0.576 mg/L 范围内，呈现良好的线性关系。

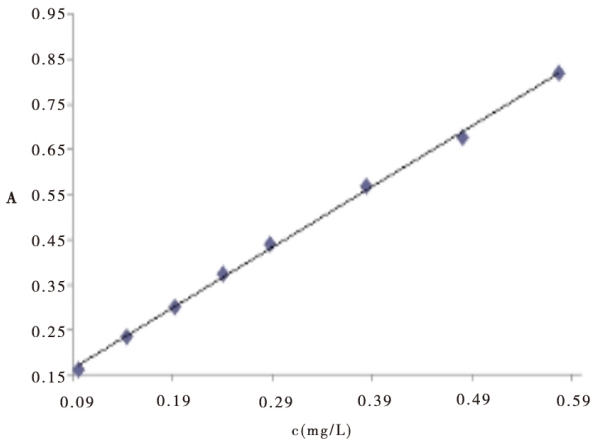


图 1 多酚标准曲线

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1.2 多酚含量的测定 准确吸取 0.15 mL 槟榔样品溶液置于 25 mL 容量瓶中，按上述实验方法显色、测定吸光度 A。根据标准曲线计算样品中多酚的含量为 10.54 mg/g。

2.1.3 精密度试验 取没食子酸对照品溶液 1.00 mL，按上述实验方法显色、测定吸光度 A。平行测定 6 次，计算结果的相对标准偏差(RSD)为 0.12%。

2.1.4 稳定性试验 准确移取没食子酸对照品溶液 1.00 mL，按上述实验方法显色，经显色反应后，分别在 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min 测定，考察该分析方法的稳定性。结果见图 2。结果表明样品在 15 ～45 min 内稳定。

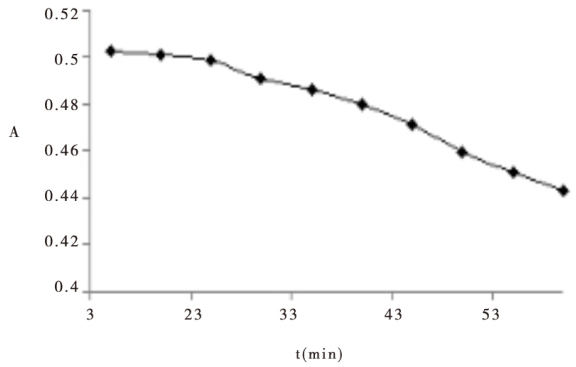


图 2 食子酸对照品溶液稳定性试验

2.1.5 重复性试验 精密称取 6 份样品粉末 0.2 g，按“槟榔样品溶液的制备”制得 6 份供试品溶液，按“样品中多酚含量的测定”进行显色和测定，计算结果的相对标准偏差(RSD)为 2.4%。

2.1.6 加标回收试验 精密称取已知多酚含量的样品 9 份，分别加入一定量的没食子酸对照品，按“槟榔样品溶液的制备”制得供试品溶液，按“样品中多酚含量的测定”进行显色和测定，计算加标回收率和 RSD，结果见表 1。从表 1 可以看出，平均回收率均为 101.40%，相对标准偏差 RSD 为 0.88%

表 1 加标回收试验结果($n=9$)

编号	样品质量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	加标回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.050 3	0.530 2	0.424 1	0.954	99.85		
2	0.050 0	0.527 0	0.421 6	0.950	100.32		
3	0.051 0	0.537 5	0.430 0	0.968	100.21		
4	0.050 6	0.533 3	0.533 3	1.076	101.75		
5	0.050 5	0.532 3	0.532 3	1.069	100.76	101.40	0.88
6	0.051 0	0.537 5	0.537 5	1.083	101.55		
7	0.050 3	0.530 2	0.636 2	1.180	102.11		
8	0.050 2	0.529 1	0.634 9	1.195	104.81		
9	0.050 7	0.534 4	0.641 3	1.183	101.22		

2.2 槟榔提取物槟榔碱含量分析

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取槟榔碱对照品 10.0 mg，用甲醇溶解，定容至 10 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤，取滤液作为对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制 分别取对照品溶液稀释配制成 11.2、22.4、44.8、89.6、112、224 mg/L 的标准品溶液，各取 20 μL 进样，以峰面积 A 为纵坐标，槟榔碱浓度 c 为横坐标，绘制标准曲线，见图 3。

从图 3 可以看出，在选择的试验条件下，槟榔碱的浓度与峰面积呈良好的线性关系，回归方程为：$A=36.555c-116.78$，$R^2=0.999\ 9$。

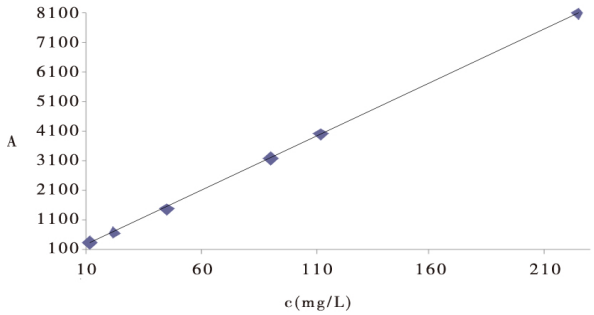
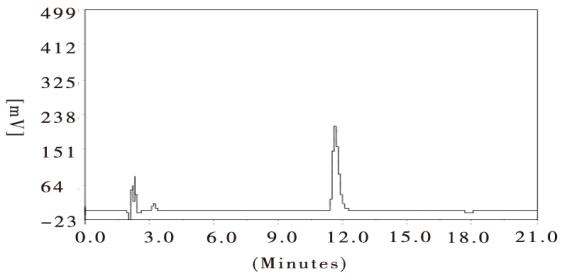


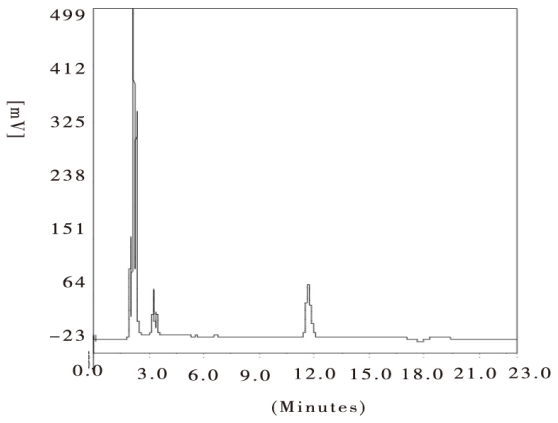
图 3 槟榔碱标准曲线

2.2.3 槟榔碱含量的测定

精密称取槟榔乙醇提取物 0.500 0 g，加甲醇溶解，用甲醇定容至 25 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤，取滤液作为供试液，按“色谱条件”分析，样品和对照品溶液色谱图如图 4。根据标准曲线计算槟榔乙醇提取物中槟榔碱的含量为 1.935 μg/g。



(a)



(b)

(a)槟榔碱对照品；(b)槟榔醇提物

图 4 槟榔乙醇提取物中槟榔碱色谱图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.4 精密度试验 吸取槟榔碱对照品溶液，按“色谱条件”重复进样 6 次，计算峰面积的 RSD 为 0.10%。

2.2.5 重复性试验 精密称取 6 份槟榔样品 2.0 g，按“槟榔样品溶液的制备”制得槟榔乙醇提取物，按“槟榔碱含量的测定”方法进样测定，计算 RSD 为 1.8%。

3 讨论

槟榔作为四大南药之一，具有很好的药理活性。槟榔的主要活性成分为槟榔碱和多酚类物质。国内外对槟榔碱或多酚的含量测定研究较多，但未见对槟榔醇提物中槟榔碱和多酚含量的同时测定。

本文采用有机溶剂提取法制得海南槟榔乙醇提取物，并建立了醇提物中多酚和槟榔碱的含量测定方法。以没食子酸为对照品溶液，采用 $FeCl_3$-$K_3[Fe(CN)_6]$比色法对槟榔中多酚含量进行测定，测得槟榔乙醇提取物中多酚的含量为 10.54 mg/g。以槟榔碱为对照品，采用 HPLC 法对槟榔醇提物中槟榔碱的含量进行测定，得到槟榔提取物中槟榔碱的含量为 1.935 μg/g。经方法学验证可知该方法的精密度和准确度均符合要求。

本研究将为海南槟榔乙醇提取物的药理活性研究提供物质基础，为海南槟榔深加工及市场开发提供科学依据。

参考文献

1 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京：中国医药科技出版社，2015：365.

2 庞玉新，王祝年.海南岛天然抗癌本草图鉴[M].一卷.中医古籍出版社，2009：248.

3 牟肖男，杨文强，王文婧，等.槟榔化学成分研究[J].暨南大学学报(自然科学版)，2014，35(1)：56-60.

4 高晓婷，杨大伟，蒋晨风.基于多级错流提取槟榔生物碱的工艺优化[J].食品与机械，2015，31(6)：182-258

5 张滃滃，杨大坚，张毅.槟榔的化学及药理研究概况.重庆中草药研究，2014，(1)：37-41.

6 Huang Pei Ling，Chi Chin Wen，Liu Tsung Yun. Effects of areca catechu L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Chem Toxicology，2010，48(1)：306-313.

7 田雪芬.槟榔青果不同方法提取物生物活性研究[D].郑州：河南大学，2015：1.

8 王光.槟榔碱的研究进展[J].国际病理科学工作者与临床杂志，2010，30(2)：171-175.

9 Liu S T，Young G C，Lee Y C，et al. A preliminary report on the toxicity of arecolane on early pregnancy in mice[J]. Food chem toxicol，2010，49(1)：144.

10 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[J].中华中医药学刊，2011，29(9)：1969-1971.

11 张丹，李丹，许启泰，等.槟榔提取物不同部位的抗氧化性比较及成分研究[J].食品工业科技，2015，36(2)：102-109.

12 郑仕宏，张海德，何双，等.Folin-Ciocalteus 法测定槟榔中多酚含量的研究[J].中南大业科技大学学报，2009，29(6)：165-169.

13 付煜荣，张万明，陈桂敏，等.景天三七中没食子酸和总酚酸含量测定[J].中成药，2006，28(7)：1016-1018.

(上接第 2223 页)

6 Sherman MP，Pritzl CJ，Xia C，et al.Lactoferrin acts as an adjuvant during influenza vaccination of neonatal mice[J]. Biochem Biophys Res Commun，2015，467(4)：766-770.

7 Arcella A，Oliva MA，Staffieri S，et al. *In vitro* and *in vivo* effect of human lactoferrin on glioblastoma growth[J]. J Neurosurg，2015，123(4)：1026-1035.

8 Li W，Zhu S，Hu J.Bone regeneration is promoted by orally administered bovine lactoferrin in a rabbit tibial distraction osteogenesis model[J]. Clin Orthop Relat Res，2015，473(7)：2383-2393.

9 Zong X，Song D，Wang T，et al.LFP-20，a porcine lactoferrin peptide，ameliorates LPS-induced inflammation via the MyD88/NF-κB and MyD88/MAPK signaling pathways[J]. Dev Comp Immunol，2015，52(2)：123-131.

10 Hou JM，Xue Y，Lin QM. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway[J]. Acta Pharmacol Sin，2012，33(10)：1277-1284.

11 Montesi M，Panseri S，Iafisco M，et al.Coupling hydroxyapatite nanocrystals with lactoferrin as a promising strategy to fine regulate bone homeostasis[J]. PLoS One，2015，10(7)：e0132633.

12 Careba I，Gradinaru D，Chiva A，et al.Correlations between eyelid tumors and tear lipocalin，lysozyme and lactoferrin concentrations in postmenopausal women[J]. J Med Life，2015，8(1)：94-98.

13 Hou JM，Chen EY，Wei SC，et al.Lactoferrin inhibits apoptosis through insulin-like growth factor I in primary rat osteoblasts[J]. Acta Pharmacol Sin，2014，35(4)：523-530.

14 Vandrovcova M，Douglas TE，Heinemann S，et al.Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation[J]. J Biomed Mater Res A，2015，103(2)：525-533.

15 Wł odarski KH，Galus R，Brodzikowska A，et al.The importance of lactoferrin in bone regeneration[J]. Pol Merkur Lekarski，2014，37(217)：65-67.

16 Montesi M，Panseri S，Iafisco M，et al.Coupling hydroxyapatite nanocrystals with lactoferrin as a promising strategy to fine regulate bone homeostasis[J]. PLoS One，2015，10(7)：e0132633.

17 Li H，Wang Z，Fu Q，et al.Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients[J]. Biomarkers，2014，19(7)：553-556.

18 Li SM，Zhou DX，Liu MY. Associations between polymorphisms of HLA-B gene and postmenopausal osteoporosis in Chinese Han population[J]. Int J Immunogenet，2014，41(4)：324-329.

19 Kaleta B，Walicka M，Sawicka A，et al.Toll-like receptor 4 gene polymorphism C1196T in polish women with postmenopausal osteoporosis - preliminary investigation[J]. Adv Clin Exp Med，2015，24(2)：239-243.

20 Kindler JM，Pollock NK，Laing EM，et al.Insulin resistance negatively influences the muscle-dependent IGF-1-bone mass relationship in premenarcheal girls[J]. J Clin Endocrinol Metab，2016，101(1)：199-205.

21 Castilla-Cortá zar I，Gago A，Muñ oz Ù，et al.Mechanisms underlying testicular damage and dysfunction in mice with partial IGF-1 deficiency and the effectiveness of IGF-1 replacement therapy[J]. Urology，2015，86(6)：1241.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net