

湖南师范大学

硕士学位论文

液相色谱-质谱在槟榔功效成分和违禁药物分析中的应用研究

姓名：文开齐

申请学位级别：硕士

专业：分析化学

指导教师：陈波

20071101

摘 要

槟榔是常用中药，实际中分食用和药用槟榔。作为食用的槟榔，槟榔与香烟、口香糖已并列成为许多国家现今最流行的口腔嗜好品，它在全世界许多国家的销售量越来越大。本实验结合液质联用技术具有很好的灵敏度、专属性、可信度和样品前处理简单等优点，为槟榔食品分析提供可靠的定性分析和高灵敏度的定量分析结果。本论文主要内容如下：

1. 综述了槟榔食品发展状况和所面临的问题，讨论了 HPLC-ESI/MS 的优越性及其在食品检测中的应用。

2. 槟榔碱是槟榔的最主要功效成分。本文通过对处理后样品进行提取条件研究，得到提取的最佳条件，对槟榔的提取液用 LC/MS 进行定性分析，结合计算机检索系统和质谱理论，对槟榔样品里所含的槟榔碱，进行了质谱解析。同时通过薄层色谱制备槟榔碱纯品，并用 LC/MS 对槟榔碱进行了定量，前处理更为简便。

3. 用分光光度法、容量法及 LC/MS 法对槟榔碱进行了定量，定量结果 LC/MS 法比分光光度法和容量法稍高。

4. 麻黄碱和甲基麻黄碱是麻黄的主要成分，摄入一定量的麻黄生物碱，将有害身心健康，禁止添加到食品中。本研究建立麻黄碱及甲基麻黄碱的液相分离条件，提高了检测的抗干扰能力和检测限。探索最佳的质谱条件，提高定性的可靠性，能够对槟榔食品中违禁添加的麻黄碱、甲基麻黄碱及其代谢物进行准确检测。

关键词：液相色谱-电喷雾质谱联用、槟榔碱、功效成分、麻黄碱、甲基麻黄碱

ABSTRACT

Betelnut is a kind of traditional Chinese medicine, classified into medicinal and edible betelnut. Betelnut, cigarette and chutty have been considered as popular mouth hobby staple in many countries, and the demand become larger and larger. Based on high sensitive, specificity, credibility of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and simple sample preparation, our work provide reliable qualitative and quantitative results for betelnut analysis. The main contents are as follows:

1. Development status and current problems of betelnut food has been summarized. The advantages of HPLC/ESI-MS technique and its application in food detection have been discussed.

2. Arecoline is the main function component of betelnut. We obtained optimum extraction conditions by research on prepared sample. Combining with computer index system and mass spectrometry theory, we qualitative analyze betelnut extract by LC-MS and mass spectrometric analyze arecoline. Furthermore we prepared arecoline by thin layer chromatography, and quantitative determined arecoline by LC-MS. The pretreatment was simpler.

3. By spectrophotometry, volumetric determination and LC-MS, the quantitative analysis of arecoline was obtained. The quantitative result by LC-MS was higher than that by spectrophotometry and volumetric

determination.

4. Ephedrine and methylephedrine is the main constituent of ephedra. Ingesting some ephedra will do harm to health. So it is forbidden to add ephedra into foods. LC separation of ephedrine and methylephedrine was established, and it improved anti-interference ability and detection limit. Furthermore, good reliability of qualitative analysis was obtained by research on the best MS conditions. The method was used to accurately determine ephedrine, methylephedrine and its metabolites as illegal food additives in betelnut.

Keywords: HPLC/ESI-MS, arecoline, efficacy component, ephedrine, methylephedrine

湖南师范大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：2243 2007年 11月 29日

湖南师范大学学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权湖南师范大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

- 1、保密□，在_____年解密后适用本授权书。
- 2、不保密□。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：2243 日期：2007年 11月 29日
导师签名：陈以 日期：2007年 11月 29日

第一章 绪 论

1 引言

槟榔^[1] (*Areca catechu* L.) 又名宾门、仁频、青仔、白槟榔、橄榄子、大肚子、洗瘴丹和宾门药钱等，为棕榈科植物。原产马来西亚，我国主要分布在海南、广东、广西、福建和云南等地。其果和种子均可入药，药材名为槟榔花、枣槟榔和大肚子。

槟榔有药用和食用之分，而且药用之槟榔与嚼食之槟榔外型及内部结构均有差别。国家《药典》所描述的槟榔为：扁球形或圆锥形，质坚硬，不易破碎，断面可见棕色种皮与白色胚乳相间的大理石样花纹。而食用的槟榔为橄榄型，中果皮厚多纤维，中间有一卵型种子，中果组织纤维具有良好的咬嚼性。实际上，药用槟榔实为槟榔子（有时也称桃榔），食用槟榔是槟榔壳^[2]。对于食用槟榔，槟榔果是槟榔树的种子，是各种槟榔咀嚼产品的基本成分。

自古以来，槟榔就是我国东南沿海各省居民迎宾敬客、款待亲朋的待客佳果，因古时敬称贵客为“宾”、“郎”，“槟榔”的美誉由此得来。海南待客有“茶，烟，酒，槟”等四种等级，槟榔只有在迎贵宾，婚庆等重大节日才摆上筵席，可见其地位。

目前，全世界大约有2至4亿人习惯嚼槟榔产品，其中主要是印度人和中国人。嚼食槟榔是亚洲很多地区的传统习惯，不分年龄、性别和社会阶层，在一些地区女性嚼得更多。在印度某些地方，几乎1/3的青少年嚼槟榔。嚼槟榔的习惯不仅在亚洲盛行，在欧洲、北美和澳大利亚的移民中也很流行^[3]。

槟榔的药用价值：

《本草纲目》^[4]对槟榔的药性做了这样的解释：槟榔子“消谷逐

水，除痰劈，杀三虫，伏尸，疗寸白。治腹胀，生捣末服，利水谷道。傅疮，生肌肉止痛。烧灰，傅口吻白疮。宣利五脏六肺雍滞，破胸中气，下水肿。治心痛积聚。除一切风，通关节，利九窍，补五劳七伤，健脾调中，除烦，破症结。主喷逐，膀胱诸气，五膈气。风冷气，脚气，食欲不消。治冲脉为病，气逆里急。治泻痢后重，心腹诸痛，大小便气秘，痰气喘急。疗诸疔，御瘴疠。”主要功能在于利气行水，杀虫，消积。大腹皮（槟榔壳）与槟榔子的功效相似，也是疏气，健脾胃和调中，并能消肌肤中水气、浮肿及洗疮毒等。

现代药理学研究^[5]表明槟榔具有：

1. 驱虫作用，特别是对猪肉绦虫和牛肉绦虫有较强的瘫痪作用，能使蛔虫中毒。

2. 抗真菌和抗病毒作用。

3. 对胆碱受体的作用，可以兴奋胆碱受体引起腺体分泌增加，特别是唾液分泌增加，滴眼时可使瞳孔缩小。另外可增加肠蠕动、收缩支气管、减慢心率及引起血管扩张，血压下降等。

4. 其他作用，在小鼠皮下注射槟榔碱，能改善它的活动记忆力。

还有报道偶尔嚼槟榔者能增进食欲，减少腹泻、咽痛，治疗腹痛，并可使牙齿不易松动。

综上所述，槟榔非一般食品，不是以提供营养素为目的，而是以调节功能为主。而功效成分是槟榔保健功能的关键所在，也是产品质量的主要指标。国内外对槟榔的研究都十分重视功效成分的开发和研究，因此，弄清其功效成分对其有着极其重要的意义。

1.2 槟榔的研究进展及其面临的问题

槟榔果是我国卫生部颁布的药、食同用的物质，人们嚼食槟榔的历史悠久。为了提高槟榔食品的品质和食用安全性，槟榔食品的研究一直受到食品科技工作者的重视，并且槟榔食品的生产技术得到不断

地改进和完善。

陈勇^[6]、严聘等^[7]在保留传统工艺的基础上,应用现代科技,研究工业化生产使用槟榔的生产工艺,系统地解决了槟榔去烟垢、苯并芘及槟榔碱的控制、炮制入味等技术难题。曾祥林等^[8]采用现行的不同炮制工艺对槟榔进行饮片加工,并对其生产周期、饮片外观、醚溶性生物碱、水溶性及水溶物中总生物碱的含量进行了考察。据高家鉴^[9]报道,经对同批原药材采用不同炮制方法加工制成的槟榔饮片含量测定表明,按现行的传统方法浸润处理加工,使槟榔碱损失高达 25% 以上,采用冷压浸渍法可使槟榔碱保留率达 90% 以上,而将原材料直接打碎成颗粒饮片,更能使槟榔碱完全保留。万新等^[10]对鲜食槟榔加工技术进行了研究,其鲜食槟榔的制作采用常温及特效护绿保鲜剂浸泡处理工艺。Susanto, E 等^[11]研究报道了最适合槟榔烘干的温度,对槟榔干的制作具有指导意义。印度和泰国在 20 世纪末对食用槟榔综合加工技术进行了较系统研究。例如,印度 Siva, R1 G1 等^[12]人进行了槟榔食用油提取深加工试验。用槟榔脂肪制成的槟榔饼干,风味比人造黄油制作的好。泰国 Banyat, S.^[13]研究了一种槟榔干制设备,类似于风速仪,它可以准确地控制气温、风速,调节槟榔烘干过程中的气温和风速。

然而,我国槟榔产品长期在低水平徘徊,受伪劣产品冲击、科技含量低、质量不稳定、缺乏科学的功能评价,仅根据传统药膳学中食(药)物的性味归经或根据产品中的某些活性成份来推测其功能性^{[2][14,15]},许多已知的活性成份是否具备所宣称的生理功能,尚缺有力的科学依据;部分产品质量比较差,有些厂商甚至为了获取更大的商业利益,使自己的产品更具竞争力,在槟榔中加入违禁药物,不仅起不到保健作用,还会严重威胁到人民的健康。

目前,槟榔功能成分清楚但检测方法不多,现在主要的检测方法

有 HPLC, TLC, LC 和比色法。我国槟榔功效成分的检测主要面临以下问题: (1) 储备性研究不够, 研究方面空白较多, 对研究测定方法认识不够, 投入的人力、物力不足。 (2) 缺乏统一的对照标准和对照标准品, 含有多种功效成分, 以什么作为对照及对照所用标准品质量, 决定其检测的结果。 (3) 无法进行有效的质量控制。

槟榔成分的复杂性在造成功效成分难以检测的同时, 也给违禁成分的检测造成了一定的困难。所以, 开展现在市面上流行的槟榔产品中槟榔碱、槟榔次碱等功效成分的研究就很有意义。同时, 在抽样调查中, 也很有必要建立一种高效检测槟榔食品中是否含有麻黄碱、甲基麻黄碱等违禁成分的方法。

综上所述, 应建立具有高灵敏度、高选择性及快速的分析方法, 解决槟榔功效成分和违禁成分的测定, 以确保人民的身体健康。同时这也是注重诚信与质量的社会, 一个企业得以生存的保障。高效液相色谱-质谱联用技术基本满足了这种要求。

1.3 LC-MS联用技术进展

液相色谱-质谱 (LC-MS) 成为现代实验室一种快速、准确的分析工具, 是由于它相对于通常的检测方式, 能提供更优越的选择性和更低的检测限。

高效液相色谱作为一个强有力的分离工具, 在过去的几十年间得到了飞速发展。从 20 世纪初俄国植物学家茨维特 (M. S. Tswett) 提出经典液相色谱法后, 色谱分析法获得迅速发展, 从早期的柱色谱、纸色谱、薄层色谱、气相色谱等, 到近代的毛细管色谱、毛细管电泳、电色谱、光色谱、高效液相色谱等, 色谱已经成为一类具有强大生命力的分离分析技术。色谱的分离能力为混合物的分离提供了强有力的分离分析手段, 但是色谱方法难以得到分析物的结构信息, 在实验过程中, 主要依靠与标样进行对比, 从而达到对未知物结构的推定。因

此，色谱方法在复杂混合物的结构分析方面还不如人意。

人们一直在努力探索其与各种检测仪器的联用，以达到连续在线检测的目的^[16]。HPLC-UV在国内外已被普遍应用，但这种方法有其局限性。首先，对于不具有显著生色团的化合物，用紫外检测存在困难；其次，所选溶剂的透光极限波长应小于化合物的特征吸收波长；另外，对于结构中存在的某些不影响生色团的变化，紫外光谱也难以显示其差别^[17]；并且，其灵敏度不能达到对细胞提取物中的低浓度样品的分析。放射免疫分析和酶解免疫分析常被用于分析尿样或其他生物样品，但由于这些方法的专属性不强，缺乏结构信息，只能做定量而非定性的检测，而且可能会得到错误的结果^[18]。与紫外、荧光、红外、蒸发光散射等检测器相比，质谱检测器具有许多优越性：第一、它具有更高的灵敏度。在多数情况下，样品量只需纳克甚至皮克；第二、它具有普遍性。在选择适当的电离方法的条件下，一般化合物都能被电离从而得到检测；第三、利用串联质谱检测方法，可获得更多的化合物结构信息^[17]，有利于对未知化合物的鉴定。

在过去的 60 年中，现代质谱技术被化学家广泛采用。在最初的 10 年里，主要用来分析石油中的主要成分。19 世纪 50 年代，每年可以得到上千种化合物的质谱图。从 1911 年到 1940 年，科学家的精力主要集中在仪器的开发和同位素的测定。从 1940 年到 2000 年，质谱被广泛的用于天然产物的研究^[19]。1954 年，John Beynon 在一篇发表于“Nature”上的学术论文中提出，质谱可以用于未知化合物的定性研究。他指出，美国石油协会得到的质谱图与化合物的结构相关，如：芳香化合物能给出大量的分子离子和与某些官能团相应的小分子离子^[19]。

到 50 年代末，质谱从工业实验室纯粹的分析应用中分离出来，用于阐述化合物的结构和裂解方式，使得质谱在学院与政府办的实验

室里应用更为普及。1962 年出版的 Biemann 自传, 作为里程碑, 标志着天然产物—质谱时代的到来, 此书的主要目的是提醒有机化学家们质谱在阐述化合物结构时的重要性, Biemann 在此书中提到了一些发表在分析或物理杂志上的文献, 并且记述了大量的天然产物的质谱图, 包括了脂肪酸、甘油酯、氨基酸、多肽、生物碱、类固醇、三萜类、糖类和核苷^[20]。

质谱仪器最主要的组成部件之一是离子源, 其作用是使被分析的物质电离成为离子, 并将离子汇聚成具有一定能量和一定几何形状的离子束。由于被分析物质的多样性和分析要求的差异, 物质电离的方法和原理也各不相同。在质谱分析中, 常用的电离方法有电子轰击 (EI)、快原子轰击 (FAB)、表面电离 (TI)、场致电离 (FD)、化学电离 (CI) 和大气压电离 (API) 等^[21]。液相色谱—质谱联用仪最重要的装置是接口(interface), 这个接口应使液相色谱的高流速与一般质谱的气相和高真空条件相匹配; 而且高效液相色谱流动相中非挥发性组分如磷酸盐缓冲液、离子对试剂等的加入, 是任何 LC-MS 接口技术都禁止的。为此, 科学家作了许多探索性工作。Barcel 等^[22]用在线连续流动液液萃取法; Kokkonen 等^[23]采用双柱技术并进一步简化为阀转换技术; Hsu^[24]采用离子交换色谱中电导检测发展起来的一种技术—微膜抑制剂方法, 用 TSP 和 PB 进行离子交换 LC-MS, 并用于离子对 LC-MS。在过去的二十多年里, 已有多种接口被发明并商品化, 如热喷雾接口 (TSP)、电喷雾接口 (ESP)、粒子束接口 (PB)、离子喷雾接口 (ISP) 和连续流快原子轰击接口 (CF-FAB) 等等^[25-31]。大气压电离 (API) 的出现, 成功地解决了液相色谱和质谱联用的接口问题, 使 LC-MS 逐渐发展成为成熟的技术。

为了避免流动相中的非挥发性物质, 如无机盐、蛋白质等对离子源的污染, 出现了 turboionspray, Z-spray 和正交气相辅助 ESI 等离子

源, 这些离子源的共同特点是喷雾针与进样锥孔、环状电极不在一条轴线上, 而是成一定的角度, 有垂直式、转弯式、斜角式以及组合式。这些离子源的应用, 大大减少了离子源的污染^[32]。早期的 ESI 接口最佳流速是 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 现代气相辅助 ESI 接口最佳流速可提高到 50-200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。为了提高最佳流速, 在 ESI 接口发展中的一个明显趋势是加热干燥气在离子源中的应用, 使用加热的氮气能大大加速液滴的蒸发。氮气流的方向在不同的离子源中不相同, 可以是顺流的或逆流的, 如在 Z-spray 接口中; 也可以如 turboionspray 接口一样, 与喷雾的方向垂直。这些方法部分地解决了 LC-MS 流动相中加入非挥发性组分的问题, 扩大了其应用范围。在样品量有限的情况下, 为了显著提高分析灵敏度, 一些低流速 ESI 源如 spray, Micro ESI, termed Micro ESI 和 nanospray 等^[33]也已经出现并使用, 这些离子源可产生流速低至几个 nL/min 到几个 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的喷雾, 可大大提高灵敏度。ESI/MS 与 LC 的联用, 被证实在检测灵敏度和定量测定的准确度方面都有所突破。

1.4 HPLC-ESI/MS联用的优越性与应用

传统的质谱技术如 EI、FBA 等无法测定大分子(分子量超过 2000Da)、极性分子和难汽化分子的结构。直至 80 年代末, 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解析电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)等软电离技术的出现, 给质谱技术带来了新的发展机遇, 掀起了质谱技术在生命科学中广泛应用的一场革命, 使简便、快速、准确地研究生物大分子成为可能^[34]。从 ESI 和 APCI 被引入液相色谱-质谱联用以来, 介绍他们用途的论文每年都在增加, ESI 成为了最广泛的电离方式^[35]。

化合物的裂解规律随着电离模式的不同而有差异, 硬电离技术如电子轰击(EI)和快原子轰击技术(FBA)在离子化过程能同时产生

大量的氢化分子离子和碎片离子；软电离技术如化学电离（CI）（电离的温和程度取决于所用的试剂），大气压化学电离（APCI）和电喷雾电离（ESI）主要产生氢化分子离子（或者是相应的离子形式），而基质辅助激光解析电离（MALDI）技术有时也得到类似的结果^[36]。

ESI是软电离方法，在正离子模式下主要产生氢化分子离子峰 $[M+H]^+$ ，不会产生很多的碎片离子，这对于测定分子量和定量检测是非常有用的，但对于结构的鉴定是不利的。不过这个缺陷可以通过碰撞诱导解离（CID）碰撞活化解离（CAD）（MS-MS）方法来弥补^[37]。在HPLC-MS仪器中，碰撞诱导解离（CID）区域是从离子源到质量分析器之间的离子通道，经过CID产生的碎片离子可以有效的转移到质量分析器。通过HPLC-MS，人们可以作不采用CID的运行来提高灵敏度和采用CID的运行获得碎片离子作为定性的检测^[38]。这个步骤可认为是简易的MS-MS方法。CID可以用来提高被分析物的碎片离子，这个可以在ESP源（源内CID）实现，也可以通过串联质谱来实现（MS-MS）。串联质谱是通过连续选择质荷比来实现的，一级操作分离出一个母离子，二级操作是测定母离子在CID解离后形成的碎片离子的质荷比^[37]。上面的CID解离可以重复很多次，这就是MSⁿ 串联质谱，所以HPLC-MS可以用于植物提取物定性和定量的测定。最新的研究表明，LC/MS锥孔电压程序变化方法显示了比 LC/MS/MS更优越的灵敏度和选择性^[39]。

高分离能力的液相色谱技术与高灵敏度和高选择性的大气压（API）质谱技术的联用使得样品处理过程变得非常简单。水溶液样品、甚至血浆等复杂体系可以经过简单的处理，甚至不做处理直接进样，因此获得了极为广泛的应用。对于液相色谱电喷雾质谱的应用，已经有多篇综述出版^[40-48]。主要的方面包括生化分析^[40,44,49-54]、天然产物分析^[39,46,55-57]、药物分析^[36,40,44,45,58-60]、环境污染物分析^[16,61] 和保

健食品分析^[41,62,63]等。而且由于检测手段的提高,衍生不是必要的手段,液相色谱-质谱联用已被广泛用于抗癌药物及其代谢产物的实时监测^[43]。目前,质谱法已成为研究生物大分子特别是蛋白质和核酸的核心技术之一^[34],是药物研究与开发和保健食品的标准分析工具,从新化合物的合成(结构表征)到临床试验中主要化合物的分析(代谢物的鉴定和药代动力学研究)都要用到^[64]。

液相色谱与质谱联用的同时,还可与其他的检测器相连,最常见的为紫外检测器。在分析中药提取物时,HPLC-DAD(光电二极管阵列检测器)-MS 技术借助色谱作为强有力的分离工具,以 DAD 和 MS 定性,能更好地提供色谱图中每个峰的紫外和质谱信息,在大多数情况下,通过与文献或标准品的比较,可以在线鉴别这些峰^[49]。

1.5 本文研究目的及意义

LC-MS 及 LC-ESI/MS 是一种理想的快速分析手段,对混合物的分析有很高的灵敏度和选择性以及广泛的适用性,可大大缩短分析时间,减少原料的浪费。本文以乙醚溶剂提取为提取方法,对槟榔碱提取条件进行研究,利用液质联用仪,对槟榔碱进行了定性和结构分析。从而说明通过分析对照已知化合物的色谱及质谱图,或与 LC-DAD-UV 和 LC-NMR(核磁共振)等分析手段相结合,可对复杂体系中的已知、未知结构的化合物进行定性分析;也进一步说明了广泛应用 LC-MS 在天然产物和其他复杂体系中的研究的可行性和实用性。同时,本文也为快速分析槟榔食品中的功效成分和违禁药物提供了一种新颖、方便、可行、有力的分析方法。

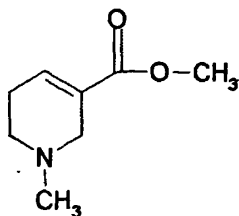
第二章 槟榔有效成分的分析

2.1 前言

槟榔含有多种人体所需的营养元素和有益物质，同时也含有多种药理活性成分，主要包括生物碱、酚类化合物、脂肪油以及多种氨基酸和各种各样的矿物质等。

槟榔的主要作用是由槟榔碱的功效体现的。首先是一定量的槟榔碱能使人产生兴奋发热作用，像烟草的尼古丁一样，给人以劲头和生理满足感。这是因为槟榔碱可兴奋 M—胆碱受体，可引起腺体分泌增加，特别是唾液分泌增加，也能兴奋 N—胆碱受体，表现为兴奋骨骼肌、神经节及颈动脉体等，对中枢神经系统也有拟胆碱作用。另外，槟榔碱能增强胃肠蠕动而产生腹泻，故可服用槟榔碱驱虫；槟榔碱还可收缩支气管、引起血管扩张等生理活动。

判断槟榔质量的好坏主要是槟榔碱的含量和纤维质量的优劣。槟榔碱（Arecoline）属于生物碱，是一种含氮杂环的有机物，属于弱极性碱，有类似碱的性质。分子式 $C_8H_{13}O_2N$ ，沸点 $209\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，溶于醇、醚、氯仿和苯等有机溶剂，不溶于水。



槟榔碱可以通过液相色谱分离后再通过质谱定性定量。游离槟榔碱以盐的形式存在，产品多以盐酸盐或硫酸盐的形式存在，市场上的槟榔碱都以盐的形式出售，很难得到槟榔碱的标样。在没有槟榔碱标

样下, 采用 LC/MS 计算机检索系统^[65,66]和质谱解析进行定性^[67,68]。由于其定量报道^[69-71]不多, 通过薄层色谱制备槟榔碱纯品, 用 LC/MS 对槟榔碱进行内标法选择性离子检测定量^[72-78], 从而说明该方法对槟榔碱研究的可行性和实用性^[79-80]。

2.2 实验部分

2.2.1 实验仪器与设备

植物用粉碎机 (天津泰斯特公司), 自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂), 液相色谱-质谱联用仪 (Waters 公司, 美国), 由 2695 液相分离单元, 2487 双波长紫外检测器, Micromass ZQ2000 质谱 (曼彻斯特, 英国) 组成。液相分离单元包括一个低压梯度泵、柱恒温箱、自动进样器和一个 20- μ L 的定量环, 质谱包括 ESI 电离源和四级杆质量分析器, 所有的操作和数据采集是通过 Masslynx^{4.0} 工作站来控制的。本文中配试剂所用水都为蒸馏水或双重纯水, 其他试剂均为分析纯试剂。

2.2.2 实验方法与步骤

2.2.2.1 样品的预处理

为了槟榔提取方便和计算槟榔碱含量, 必须对槟榔样品进行预处理。将市场上包装的食用槟榔剪碎, 用植物用粉碎机粉碎成粉末状后再用热水浸泡后除去碱性成分, 且用高温除去挥发物。

2.2.2.2 槟榔中槟榔碱的提取

称取处理过的槟榔 4 g 样品, 放入锥形瓶中, 加入浓氨水 5 mL 使样品完全浸湿, 加入无水乙醚 60 mL, 振摇 10 min, 放置 3 h, 加入 5 g 无水 Na_2SO_4 振摇 10 min, 静置使沉淀, 取醚液, 至分液漏斗中, 残渣用乙醚洗涤 3 次, 每次 6 mL, 合并醚液, 加滑石粉 0.5 g,

振摇 5 min, 加水 5 mL, 振摇 3 min, 静置至上层醚液澄清时, 分取醚液, 水层用少量乙醚洗涤, 合并醚液, 振摇 5 min, 澄清过滤后旋转蒸发浓缩至 2-4 mL 后用无水乙醚定容至 10 mL 备用。

2.2.2.3 槟榔碱的薄层色谱制备

1) 铺板与活化

称取 30 g 硅胶 GF254, 放入 100 mL 的烧杯中, 加入 60—75 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液, 将所需要的玻璃板平铺在水平的台面上, 首尾相连, 排成一行。将铺板器置于行首的玻璃板上, 然后将调好的硅胶 GF254 浆液一次性倒入铺板器中, 匀速推动。

铺好的薄层板置于水平位置, 晾干后, 放入干燥箱, 温度调至 105℃, 活化 60 min, 温度降至室温后, 置于干燥器中备用。

2) 样品准备

将槟榔的乙醚提取液自然挥干, 用 10 mL 氯仿提取干浸膏, 吸出, 过滤, 再用氯仿洗涤 3 次, 每次 4 mL 左右, 合并氯仿提取液, 定容为 25 mL, 再浓缩至 10 mL 左右密封备用。

3) 样品溶液及点样

取氯仿浓缩液作为样品溶液, 在自制的薄层制备板上用半自动点样仪进行条状点样, 点样带宽 0.5 cm 左右。

4) 展开

将薄层板放入层析缸中进行上行展开, 展距约为 8.5 cm, 展开剂氯仿—甲醇—氨水(10:0.2:0.2)。

5) 定位及色谱带的收集

展开结束后, 取出薄层板, 用氮气吹去薄层板上的展开剂, 在紫外 254 nm 下观察色谱带的位置, 标记下观察到的各条色谱带, 刮下所需要的色谱带位置上的吸附剂。

6) 洗脱

将所收集样品的吸附剂置于塞具锥形瓶中加 20 mL 氯仿进行超声洗脱, 过滤, 用氯仿清洗滤渣和过滤器, 合并滤液, 低温蒸发至浸膏状, 用乙醚溶解备用。

2.2.2.4 内标物的制备

用移液管精密吸取 1 mL β -蒎烯于 50 mL 容量瓶中用无水乙醚定容, 再精密吸取 5 mL 到 100 mL 容量瓶中, 用无水乙醚溶液定容, 作为内标物。

2.2.2.5 测定槟榔碱的 LC 条件

液相色谱分离条件: 色谱柱为 Spherigel C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 大连江申), 柱温为 30 $^{\circ}$ C, UV 光谱采集范围为 180-350 nm, 流动相为 (A) 0.5%甲酸溶液和 (B) 乙腈, 梯度条件为在最初的 6 min, A 维持 100%, 6—10 min, B 由 0%线性增加到 12%, 10—35 min, B 由 12%线性增加到 21%, 35—40 min, B 由 21%线性增加到 25%, 40—50 min, B 由 25%线性增加到 100%, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ l。由 DAD 流出的溶液经过三通阀分流, 只有 0.2 mL/min 进入到 MS 电离源。

两次实验运行之间用重蒸水冲洗自动进样针两次。

2.2.2.6 测定槟榔碱的质谱条件

用电喷雾离子化正离子采集模式 (ESI^+) 或电喷雾离子化负离子采集模式 (ESI^-), 产生分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 选择离子进行定量。质谱全扫描的质量范围: 0-300 amu (m/z), 毛细管电压(Capillary voltage): 3.2 KV, 锥孔电压(cone voltage): 20 V, 萃取电压(Extractor voltage): 4.0 V, 聚焦电压(RF lens): 0.5 V, 源温度(Source temperature): 110 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度(Desolvation temperature): 250 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流速(Gas flow for desolvation): 300 L/hr, 锥孔反吹气流速(Gas flow for desolvation): 50 L/hr。

两次实验运行之间用重蒸水冲洗自动进样针两次。

2.2.2.7 槟榔碱的定量测定

将薄层色谱制备的纯度 91.84% 槟榔碱用无水乙醚于 10 mL 容量瓶中定容，分别吸取 0.5、1、1.5、2 和 2.5 mL 于 10 mL 容量瓶中，各加入配好的内标液 0.5 mL 用无水乙醚定容作为槟榔碱的标准溶液，用内标法进行选择离子检测对提取得到的槟榔碱在 2.2.2.5 和 2.2.2.6 LC/MS 条件下进行定量测定。

2.3 结果与讨论

2.3.1 槟榔碱提取条件的选择

根据相似相溶原理，有机溶剂提取生物碱是一种比较方便快捷的方法，在选择有机溶剂时，以提取效率和容易分离为主要标准。槟榔碱的提取用无水乙醚作为其提取溶剂，在提取过程中加入适量的浓氨水可使槟榔内部纤维或木质素润胀，以便于提取。为了得到最佳的提取，下面对影响提取效率的提取时间、提取温度和溶剂浓度（即溶剂用量）进行了研究。结果用上述方法进行槟榔碱含量测定。

2.3.1.1 提取时间对提取效率的影响

选择食用槟榔作为提取研究的样品，分别选取 1、2、3 和 4 h 四个不同的提取时间，20 °C 下进行提取，提取液用上述方法测定含量。得到不同提取时间内槟榔碱含量，见 Table 2-1。

表 2-1 不同提取时间下的槟榔碱含量

提取时间 (h)	槟榔质量 (g)	峰面积	槟榔碱含量 (%)
1	4.0154	297334184	0.40
2	4.0180	297643267	0.42
3	4.0459	298938795	0.42
4	4.0158	297564783	0.42

当提取温度固定在 20 ℃ 时，提取时间在 2 h 以后提取较完全，因此当提取温度一定时，2 h 可以作为合适的提取时间。

2.3.1.2 提取温度对提取效率的影响

在考察了提取时间对槟榔提取率的影响后，提取温度也是一个很重要的因素。因此在改变提取温度而其他条件不变的情况下，分别在 0 ℃、10 ℃、20 ℃和 30 ℃下提取 2 h，用上述方法对槟榔碱含量进行定量。得到不同温度时的槟榔碱含量，见 Table 2-2。

表 2-2 不同提取温度下的槟榔碱含量

Table 2-2 Content of arecoline at different extraction temperature

提取温度 (℃)	槟榔质量 (g)	峰面积	槟榔碱含量(%)
0	4.0232	289335234	0.32
10	4.0210	293143345	0.38
20	4.0459	299038763	0.42
30	4.0440	298856442	0.42

选取以上四个不同的温度为考虑对象，是考虑在实际提取过程中方便及无水乙醚沸点太低的原因。实验结果可明显看出，20 ℃ 以后提取基本完全，温度低时不太容易提取完全，过高乙醚挥发快，一般需加额外设备。因此在室温情况下萃取 2 h 是比较合理的。

从提取槟榔碱含量与提取时间和温度的关系来看，提取温度 20℃ 左右，提取时间 2 h 左右提取较完全，且提取条件不苛刻，比较合理。

2.3.1.3 溶剂量对提取效率的影响

除时间和温度两个因素对提取的影响外，提取用的溶剂量也是考虑的主要因素。对食用槟榔在 20 ℃ 下各用 20、40、60、80 和 120 mL 乙醚提取 2 h，结果得到不同溶剂量提取的槟榔碱含量，见 Table 2-3。

表 2-3 不同溶剂量下的槟榔碱含量

Table 2-3 Content of arecoline under different extraction solution

volume			
溶剂量 (mL)	槟榔质量 (g)	峰面积	槟榔碱含量(%)
20	4.0466	294324531	0.39
40	4.1213	299023568	0.41
60	4.0712	299786342	0.42
80	4.0459	298748653	0.42
120	4.0456	298967425	0.42

实验结果表明：对于槟榔，在提取温度 20 ℃，提取 2 h 用乙醚溶剂 60 mL 时提取较完全。

2.3.2 槟榔碱纯品的制备

在实验方法 2.2.3.3 制得的薄层在紫外分析仪 254 nm 下得到三条色谱带，这些色谱带在紫外下成单一条状。

刮下这些色谱带，用氯仿超声洗脱，用 LC/MS 进行分析，其中该色谱带中从起点开始的第三条色谱的液相色谱和对应保留时间的质谱图如 Fig. 2-1。

对比槟榔碱标准质谱 Fig. 2-2，根据谱图分析，在该保留时间下峰的质谱图与标准质谱图的匹配率是 95.39%，而且两个质谱图主要碎片峰的差谱几乎没有峰，所以可先确定该物质就为槟榔碱。同时用面积归一化法计算槟榔碱的纯度为 91.84%，说明通过色谱制备得到的槟榔碱纯品的纯度很高。

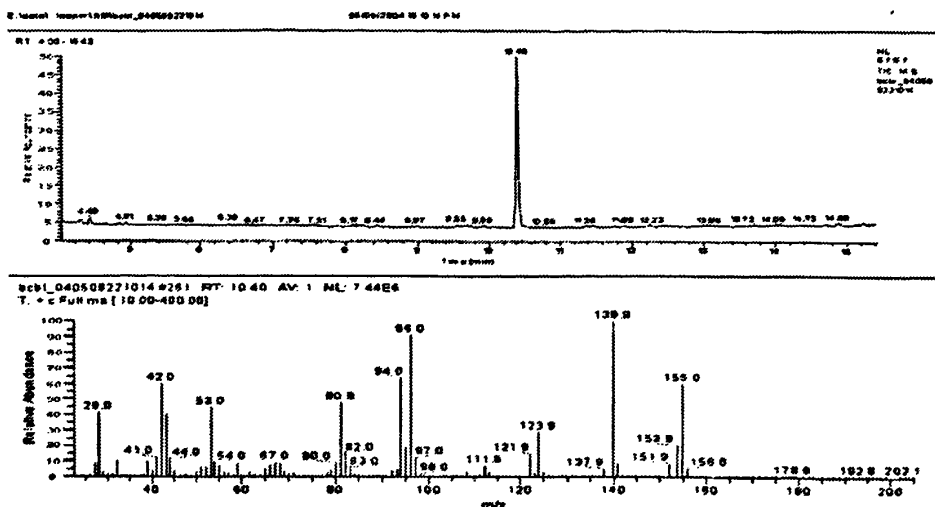


图 2-1 槟榔碱纯化后液相色谱和对应质谱图

Fig. 2-1 The liquid chromatogram and mass spectrum of purified arecoline

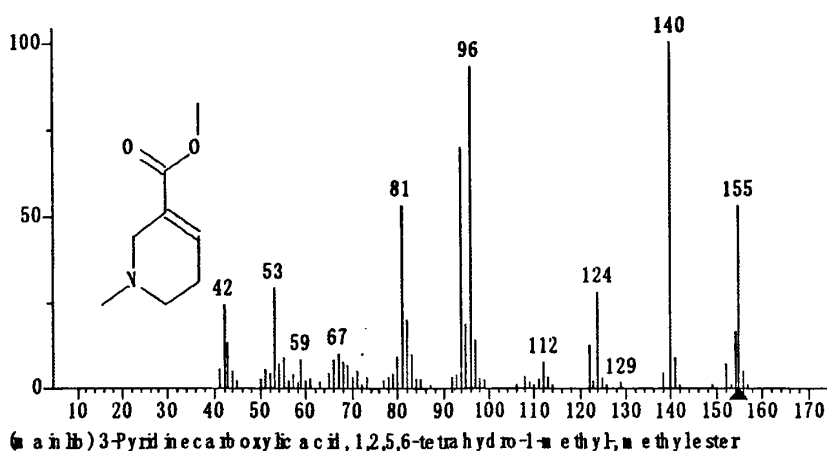


图 2-2 槟榔碱标准质谱图

Fig. 2-2 Standard mass spectrum of arecoline

在制备槟榔碱的过程中，点样时使用自制的半自动点样器，该装置操作方便，使用可靠。与普通毛细管相比，具有以下优点：1) 样品流出量可通过调节自动点样器的倾斜角度不定期控制。2) 样品损失量少。3) 可以更换容器，从而可以对不同样品点样。4) 薄层板几

乎不受损伤。

在点样前用甲醇先预展一次，甲醇可以溶解硅胶中的一些杂质，将其从硅胶上洗脱下来，这样就可以有效地避免薄层硅胶及铺板过程中杂质的带入。

薄层制备色谱一般要求所铺的薄层厚度为 1-2 mm，而且要求均匀。如薄层太厚，则会影响分离效果；如果薄层太薄，能够分离的样品量就小。

2.3.3 槟榔内槟榔碱的定性分析

2.3.3.1 分析条件

在没有已知物的情况下，用液相色谱进行定性定量分析，一般是通过文献上同一色谱条件下的有关保留值（保留时间和保留体积）进行判断，然后根据分析的过程中出现的问题，在色谱条件的范围内进行局部调整，以达到高效分离。所以，在进行定性的时候，选择色谱条件就要重点考虑分离效率和分离时间这两个因素。而这两个因素一般通过优化流动相和色谱柱来调整。

2.3.3.2 定性分析

为了确定液相色谱图中对应的峰是槟榔碱，可以通过解析质谱图从理论^[81]上对其进行确认。

2.3.3.3 槟榔碱的质谱解析

结合计算机检索系统，本文特作出该保留时间下质谱图的解析分析。以下是解析质谱图定性槟榔碱的详细内容：

1. 首先根据标准质谱图和实验槟榔的质谱图信息，可以确定标准质谱和实验槟榔的质谱图的荷质比对于主要的峰是一样的。
2. 根据“氮规律”质量数奇数可以得到该化合物含有奇数个 N 原子。
3. 结合计算机检索系统，根据同位素丰度，对于荷质比 155 的

分子离子峰可以得到一个环加两个双键的数值。

4. 由于是正离子电离方式，中性离子丢失不多，且分子离子在首先消去一个中性分子甲基后得到最稳定的 140 质量数的最高峰。同时根据 Beynon 表及其最小碎片质量数 42 的所有可能性可以得到该化合物只能含有不超过两个 N 原子。

5. 对于含有双键和杂环的化合物，它们的分子离子比较稳定，这从谱图和检索系统的碎片质量数上可以得到它们的一些稳定的碎片峰。

6. 具体质谱的解析过程

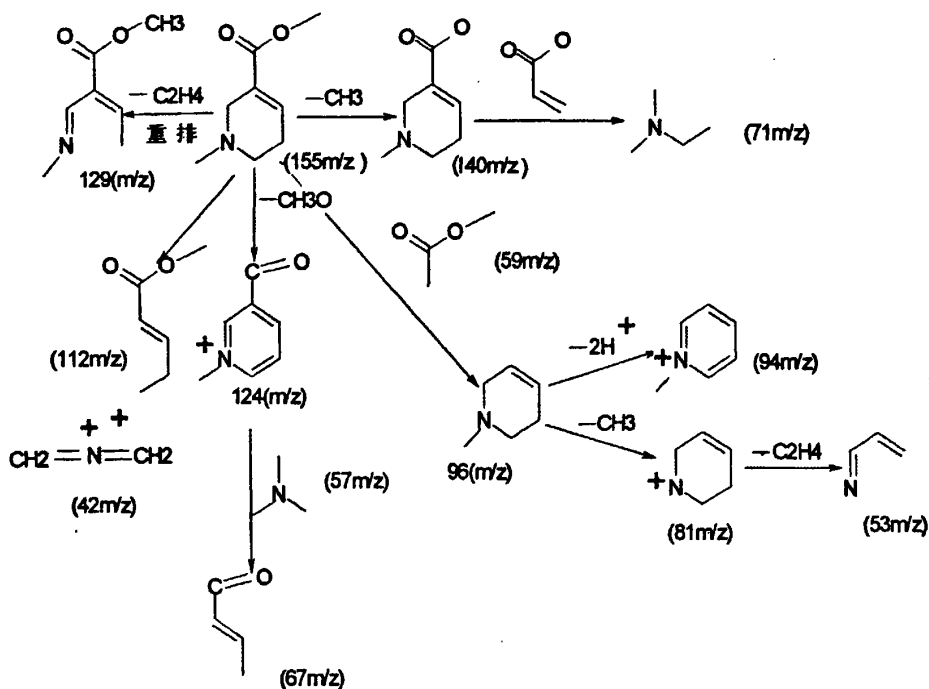


图 2-3 槟榔碱质谱的主要解析过程

Fig. 2-3 Fragmentation process of arecoline in mass spectrum

2.3.4 LC/MS 对槟榔内槟榔碱的定量分析

2.3.4.1 内标物的选择

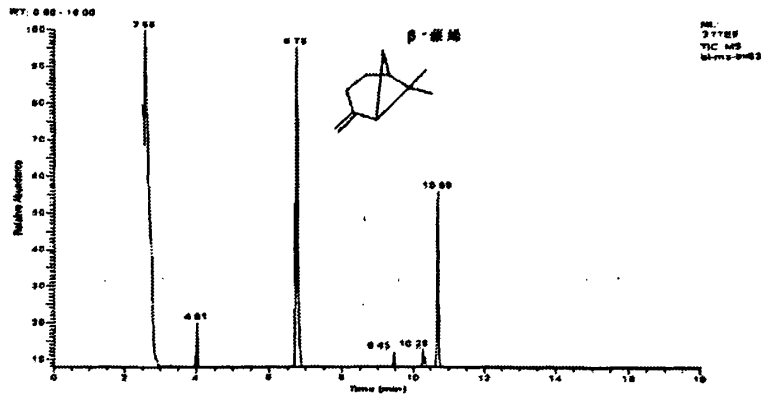


图 2-4 β -蒎烯作内标的液相图

Fig. 2-4 The liquid chromatogram of β -pinene

从图上可以看出 β -蒎烯保留时间在 6.75 min，槟榔碱保留时间在 10.68 min， β -蒎烯能与槟榔碱完全分离，也能跟其他几个小峰很好的分开。

2.3.4.2 方法的精密度

精密度是指在测试条件下，同一个均匀样品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。本实验中，以槟榔碱制备品作为试样，用自动进样器进样连续九次进行精密度试验，以峰面积计算，得到槟榔碱的 RSD=1.16%，槟榔碱用此法测定精密度良好。

表 2-4 精密度测定

Table 2-4 Precision of the method

序号	1	2	3	4
槟榔碱峰面积	387654164	396840128	392677436	393606973
序号	5	6	7	8
槟榔碱峰面积	389773127	391337444	388810872	390102969
序号	9	平均值	RSD (%)	
槟榔碱峰面积	394677155	395217661.42	1.16	

从表中数据可以看出，槟榔碱用此法测定精密度良好。

2.3.4.3 槟榔碱的回收率

回收率是用来反映该方法的测定结果与真实值或参考值接近程度的准确性。取已知槟榔作为样品，分别加入不同浓度的制备标准样品，配成三种不同浓度的样品，按 2.2.3.5 和 2.2.3.6 LC/MS 条件下进行测定，以两次测定的平均计算，测定结果如表所示。

表 2-5 LC/MS 回收率的测定

Table 2-5 Recovery of the LC/MS method

方法	初始值 (%)	加入量 (%)	检出量 (%)	回收率 (%)
LC/MS	0.460	0.120	0.580	100.0
		0.240	0.696	98.3
		0.360	0.829	102.5

从表中可以看出，槟榔碱的对照品标样的 LC/MS 回收率在 98.3-102.5%，这说明该方法准确度比较高。

2.3.4.4 线性范围

线性是指在设计的范围内，测试结果与试样中被测物浓度直接成正比关系的程度。

将槟榔碱制备品的乙醚液作为标准贮备液，将贮备液再稀释配成 5 种不同浓度的标准品溶液，在 2.2.3.5 和 2.2.3.6 条件下用内标法选择性离子检测进行测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标作线性回归，得到的标准曲线图。

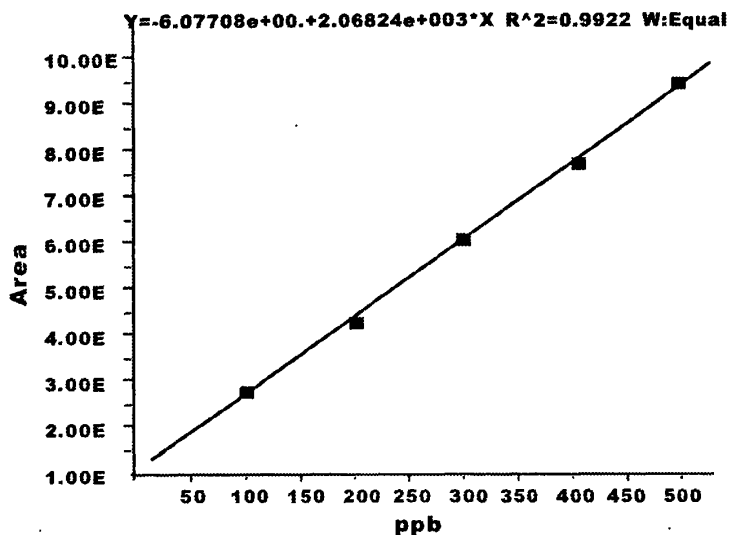


图 2-5 槟榔碱标准曲线图

Fig. 2-5 Standard curve of arecoline

由以上标准曲线图可以看出，槟榔碱在 100-500 ppb 定量范围内浓度与峰面积呈现较好的线性关系。

2.3.4.5 检测限与定量限

检测限是指试样中被测物能被检出的最低量，定量限是指样品中被测物能被定量测定的最低量。常用信噪比法确定，一般以信噪比 3: 1 或 2: 1 时相应的浓度或注入仪器的量来确定检测限；以信噪比 10: 1 时相应的浓度或注入仪器的量来确定定量限。

在 2.2.3.5 和 2.2.3.6 LC/MS 条件下，信噪比 3: 1 时得到槟榔碱的检测限为 6.6 ng/mL (ppb)，信噪比 10: 1 时得到槟榔碱的定量限为 22 ng/mL (ppb)。

2.3.4.6 槟榔碱稳定性试验

试样对时间的稳定性，是指在不同时间段测得试样的浓度。本实验取样品分别在不同时间段测得的峰面积，得到时间与峰面积的稳定性实验如 Fig. 2-6。

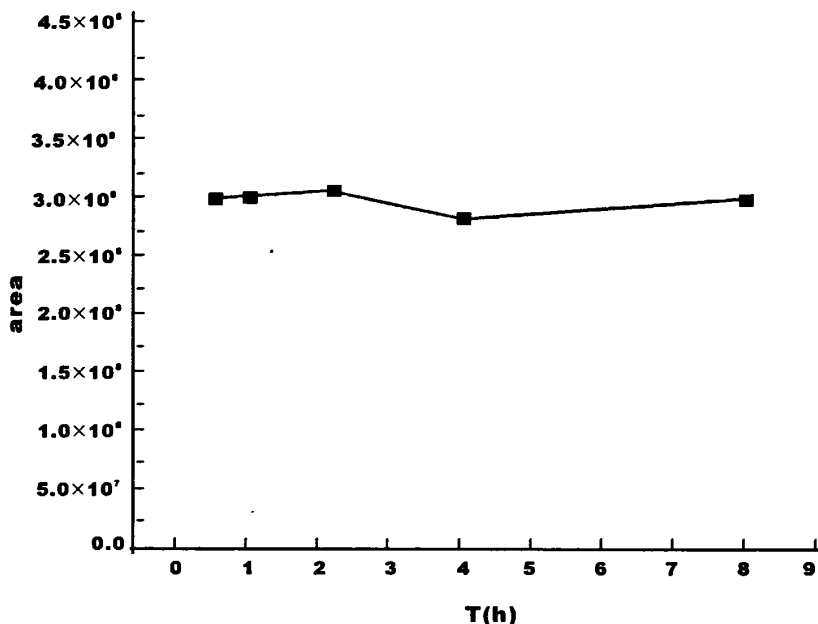


图 2-6 槟榔碱稳定性试验

Fig. 2-6 Study on stability of arecoline

图 2-6 结果说明, 槟榔碱对于时间在乙醚溶液中的稳定性比较好, 随着时间延长稳定性稍微有下降趋势, 这可能也说明槟榔碱本身的不稳定性, 需要以盐的形式存在或存在于溶剂中。

2.4 小结

本章节通过对处理后样品进行提取条件研究, 得到提取的最佳条件, 对槟榔提取液用 LC/MS 进行定性分析, 结合计算机检索系统和质谱理论, 对槟榔样品里所含的槟榔碱, 进行了质谱解析。同时通过薄层色谱制备槟榔碱纯品, 用 LC/MS 对槟榔碱进行定量, 前处理更为简便, 定量结果也说明了槟榔内槟榔碱的含量高(>0.4%)。

1. 研究提取条件时, 主要考虑影响因素中的提取时间、温度和溶剂量。从槟榔碱含量与提取时间、温度和溶剂量的关系来看, 提取温度 20 °C, 提取时间 2 h 左右时, 每 4 g 食用槟榔乙醚用量 60 mL 时提取完全, 高效。

2. 选择 β -蒎烯作为内标, 此法精密度试验表明该方法精密度很高; 槟榔碱的回收率在 98.3-102.5%, 说明方法准确度良好; 槟榔碱在 100-500 ppb 定量范围内浓度与峰面积呈现较好的线性关系; 槟榔碱的检测限为 6.6 ng/mL, 定量限为 22 ng/mL; 且槟榔碱稳定性较好。

第三章 不同槟榔产品中槟榔碱含量的比较

3.1 前言

近代研究表明, 槟榔含多种生物碱, 主要是槟榔碱、槟榔次碱等, 为槟榔的主要活性成分。文献报道测定槟榔碱含量的方法主要有: 水蒸汽蒸馏后酸碱滴定法(容量法)、非水滴定法、电位滴定法、酸性离子比色法、薄层扫描法、液相色谱法主要为离子交换色谱法^[82-85]。药典中所载药材含量测定方法为提取后酸碱滴定法(容量法)。本文分别采用分光光度法和容量法对湖南省长沙市销售的不同槟榔产品中槟榔碱含量进行了测定。

3.2 实验部分

3.2.1 分光光度法测定槟榔碱实验部分

3.2.1.1 药品和仪器

药品: 无水乙醇, HBr (48%), KOH, AgNO₃, 氯仿, 无水硫酸钠, 乙酸, 乙酸钠, 溴钾酚绿, 均为化学纯; 不同槟榔购于长沙市面上, 均系嚼用槟榔食品。

仪器: 旋转蒸发仪; 722 型可见分光光度计。

3.2.1.2 实验方法

分别精密称取研碎的青果、七妹、宾之郎、友文样品4 g, 用无水乙醇25 mL 加热回流提取1 h, 滤取提取液, 残渣再如上法提取3次。合并4次提取液, 回收乙醇, 浓缩液放置冷却后加浓氨水调至pH=10, 用四氯化碳多次搅拌提取。提取液用无水硫酸钠干燥, 水浴上减压浓缩得总碱。

将总碱加热溶于50 mL无水乙醇中，放冷后滴加HBr（48%）至pH=4，用无水硫酸钠干燥后再于水浴上浓缩至10 mL，放置冰箱中，得微黄色槟榔碱氢溴酸盐结晶。将此结晶加热溶于100 mL 无水乙醇，加10 g 活性炭脱色，水浴加热回流0.5 h，过滤，活性炭用热无水乙醇洗涤2次，再次浓缩冷却后析出结晶，得白色槟榔碱氢溴酸盐。

将槟榔碱氢溴酸盐加热溶于无水乙醇中，滴加质量分数4% AgNO₃乙醇溶液（乙醇（90%）+水（10%）），过滤沉淀，蒸馏可得红棕色油状槟榔碱。

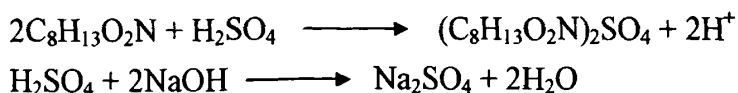
3.2.1.3 分析方法

槟榔碱可与溴钾酚绿形成离子对，离子对可被氯仿定量提取。加入氢氧化钾无水乙醇溶液后，溴钾酚绿可以游离析出显色，因此可以用分光光度法于波长618 nm 处测定溶液的吸光度。参照文献^[81]所述方法，吸取1 mL 槟榔碱样品（总碱或槟榔碱），分别测定槟榔碱含量。

3.2.2 容量法测定槟榔碱实验部分

3.2.2.1 实验原理

由于槟榔碱具有生物碱的性质，所以在提取过程中可以根据酸碱中和滴定原理进行定量分析。这就是回滴定法对槟榔碱进行定量的原理。



反应中槟榔碱以氮碱的形式与强酸反应，生成生物碱的硫酸盐形式，过量的硫酸再用氢氧化钠中和，这样来完成整个定量过程。

3.2.2.2 实验方法

1) 实验步骤

取槟榔粉末 4 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加乙醚 80 mL，

振摇后加氨水试液 4 mL, 振摇 10 min, 加无水硫酸钠 10 g, 振摇 5 min, 静置沉淀, 分取乙醚液, 置分液漏斗中残渣用乙醚洗涤 3 次, 每次 10 mL, 合并醚液, 加滑石粉 0.5 g, 振摇 3 min, 加水 2.5 mL, 振摇 3 min, 静置, 至上层醚液澄清时, 分取醚液, 水层用少量乙醚洗涤, 合并醚液, 低温蒸发至约 20 mL, 移置分液漏斗中, 精密加入硫酸滴定液 (0.01 mol/L) 20 mL, 振摇提取, 静置分层, 分取醚液, 醚层用水振摇洗涤 3 次, 每次 5 mL, 合并洗液与酸液, 滤过, 滤器用水洗涤, 合并洗液与酸液, 加甲基红指示液数滴, 用 NaOH (0.02 mol/L) 滴定液滴定。每 1 mL H_2SO_4 滴定液 (0.01 mol/L) 相当于 3.014 mg 的槟榔碱 ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$)。

2) 指示剂的配制

甲基橙指示剂的配制: 用 0.01 g 左右甲基橙粉末加水配成 10 mL 溶液, 混匀成 0.01% 的水溶液。

酚酞指示剂的配制: 取水 4 mL 水和 6 mL 无水乙醇混匀后加入 0.01 g 左右酚酞粉末, 充分溶液配成 0.1% 的 60% 乙醇溶液。

甲基红指示剂配制: 称取约 10.00 mg 甲基红粉末加无水乙醇配成 0.1% 的酒精溶液。

3) 标定液的配制

1. 0.02 mol/L NaOH 溶液的配制

精密称取 4 g 于 100 mL 容量瓶中, 取 10 mL 于 500 mL 容量瓶中混匀定容待标定。

0.02 mol/L NaOH 溶液的标定: 将邻苯二甲酸氢钾在 105℃ 恒温箱内干燥恒重后准确称取两份 1.6 g 左右分别用新煮沸过的冷水溶解于 500 mL 容量瓶中, 取 50 mL 于锥形瓶中加两滴配好的酚酞指示剂, 用碱式滴定管标定 NaOH 溶液。

2. 0.01 mol/L H_2SO_4 滴定液的配制

取浓硫酸 5.4 mL 用水定容到 100 mL 容量瓶中，混匀后取 10 mL 定容至 1000 mL 后再混匀待滴定。

0.01 mol/L H_2SO_4 滴定液的标定：用减量法同时精确称取两份充分干燥的无水碳酸钠 0.7000 g 于 500 mL 容量瓶加水混匀后定容，再取 25 mL 于锥形瓶中，加 2 滴配好的甲基橙指示剂，用酸式滴定管标定 H_2SO_4 溶液。

3.3 结果与讨论

3.3.1 槟榔碱和槟榔碱氢溴酸盐的分离方法

槟榔果中除含有槟榔碱，还含有槟榔次碱和去槟榔次碱等。Fig. 3-1 为槟榔碱和槟榔次碱的分子结构式。槟榔次碱和去槟榔次碱分子中含有游离羧基，亲水性较强，所以难溶于亲脂性的有机溶剂中，即易溶于水，难溶或几乎不溶于无水乙醇、氯仿或乙醚。槟榔碱中含有酯键，没有羧基，所以易溶于乙醇、氯仿和乙醚等有机溶剂，也易溶于水。因而，本文在用分光光度法测定时，提取槟榔碱采用无水乙醇或氯仿作为溶剂可避免槟榔次碱的影响。

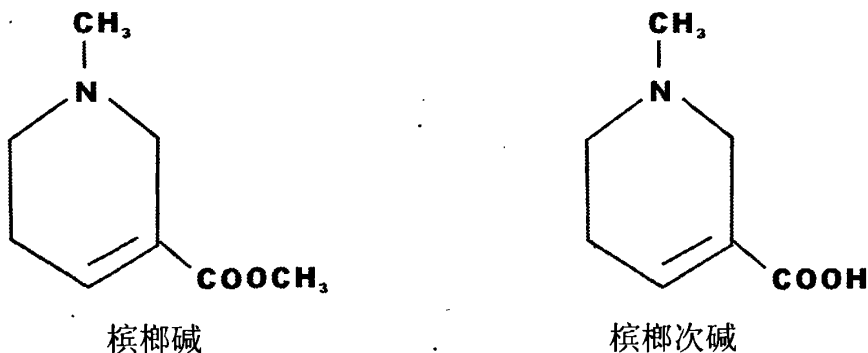


图 3-1 槟榔碱和槟榔次碱的分子结构式

Fig. 3-1 Structure of arecoline and arecaidine

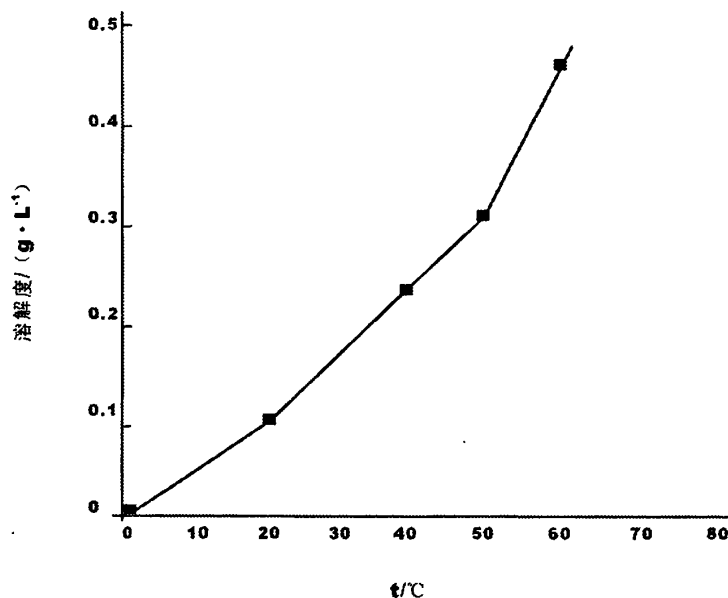


图 3-2 不同温度下槟榔碱氢溴酸盐在乙醇中的溶解度

Fig. 3-2 Solubility of arecoline hydrobromide in the alcohol at different temperature

Fig. 3-2 为槟榔碱氢溴酸盐在乙醇中的溶解度随温度的变化。在室温下, 1 g 槟榔碱氢溴酸盐可溶于 10 mL 乙醇, 2 mL 沸醇, 微溶于氯仿、乙醚。根据槟榔碱氢溴酸盐在乙醇中的溶解度随温度变化较大的特性, 本文将总碱加热溶于无水乙醇, 然后再浓缩并冷却结晶, 从而将槟榔碱氢溴酸盐分离出来。

3.3.2 pH 值对槟榔碱氢溴酸盐生成的影响

用分光光度法测定时, 在槟榔碱生成槟榔碱氢溴酸盐的过程中, 氢溴酸的滴加量是关键影响因素。在槟榔碱含量未知的情况下, 根据 pH 值的大小判别反应的程度。以 1 kg 槟榔鲜果为原料, pH 值与氢溴酸槟榔碱生成量的关系, 见 Table 3-1。由表可以看出, 当 pH 值为 4 时, 氢溴酸槟榔碱生成量最大, 继续增加氢溴酸加入量, 生成量不再变化。

表3-1 pH 值与氢溴酸槟榔碱生成量的关系

Table 3-1 Relation of pH and production of arecoline

hydrobromide						
pH	3	4	5	6	7	8
氢溴酸槟榔碱/g	3.2	3.2	2.7	1.9	1.1	0.1

表 3-2 不同槟榔产品中槟榔碱含量

Table 3-2 Content of arecoline in different betelnut

样品	槟榔碱含量 (%)	RSD (%)
青果	0.6012	2.32
七妹	0.4952	2.52
友文	0.4812	3.62
宾之郎	0.4325	3.48

表 3-3 不同槟榔产品中槟榔碱含量

Table 3-3 Content of arecoline in different betelnut

样品	槟榔质量 (g)	消耗的氢氧化钠体积 (mL)	槟榔碱含量 (%)
青果	4.0466	13.41	0.5935
七妹	4.1213	15.34	0.4985
友文	4.0712	16.15	0.4842
宾之郎	4.0459	17.56	0.4237

3.3.3 分光光度法测定各样品中的槟榔碱含量

本试验的重点是把握显色条件的选择,而影响显色反应的因素主要有显色剂用量、pH、温度和时间等。实验结果表明:成熟的不同的槟榔产品中的槟榔碱含量相差不大,而都与青果的含量有较大的差别。结果见 Table 3-2。

3.3.4 容量法测定各样品中的槟榔碱含量

这种测定方法比较经典,在很多实验条件不太成熟的地方均可采用。相比较而言,由于实验工作者的主观因素导致的操作误差是其必需要特别注意的一个方面。本文实验结果表明:成熟的不同的槟榔产品中的槟榔碱含量相差也不大,与青果的含量也有较大的差别。结果见 Table 3-3。

3.3.5 槟榔碱分光光度法与容量法定量测定

表 3-4 分光光度法和容量法槟榔碱含量测定比较

Table 3-4 The comparison of arecoline contents by spectrophotometry and volumetric determination

方法	槟榔碱含量			
	青果	七妹	友文	宾之郎
光度法 (%)	0.60	0.50	0.48	0.43
容量法 (%)	0.59	0.50	0.48	0.42

从表上的测得的结果可以看出,用分光光度法定量测得槟榔各样品的槟榔碱含量与容量法接近,有些误差都是正常的,说明用这两种方法测定槟榔各样品的含量均能达到实验要求。结果见 Table 3-4。

3.3.6 槟榔碱 LC/MS 与容量法定量测定比较

分别称取各种槟榔样品按照 2.2.3.2 方法提取后得到的乙醚液转移到容量瓶中用乙醚定容,然后取 2 mL 左右于样品瓶,按照 2.2.3.5 和 2.2.3.6 LC/MS 条件进行测定,测得的结果代入回归方程 $y = -6.07708e+003 + 2.06824e+0.03x$,再根据浓度换算,计算各槟榔样品中槟榔碱的含量,见 Table 3-5。根据 LC/MS 测得的槟榔样品中的槟榔碱含量与容量法对比,见 Table 3-6。

表 3-5 LC/MS 测得的各种槟榔中的槟榔碱含量

Table 3-5 Analysis of arecoline in several betelnut samples by

LC/MS

样品	槟榔质量 (g)	峰面积	槟榔碱含量(%)
青果	4.0127	417292104	0.63
七妹	4.0210	356072200	0.51
友文	4.0076	297334184	0.47
宾之郎	4.0454	282649280	0.43

表 3-6 容量法和 LC/MS 槟榔碱含量测定比较

Table 3-6 The comparison of arecoline contents by volumetric

determination and LC/MS

方法	槟榔碱含量			
	青果	七妹	友文	宾之郎
容量法 (%)	0.59	0.50	0.48	0.42
LC/MS (%)	0.63	0.51	0.47	0.43

从表上的测得的结果可以看出, 用 LC/MS 定量测得槟榔各样品的槟榔碱含量与容量法接近, 且结果比容量法还稍高。对于其中容量法与 LC/MS 测得的食用槟榔的槟榔碱有些差别, 那是因为容量法定量时, 包含槟榔加工过程中的碱性成分, 使得其测定结果高出实际很多, 这也说明 LC/MS 定量进样前处理方式不需要特别对待, 同样能准确的定量。

3.4 小结

本实验在前人研究的基础上, 简化实验条件, 能够简单、方便和快速地对不同槟榔产品的槟榔碱含量进行比较, 从而为槟榔品质指标体系和评价方法与技术体系的建立提供参考, 且容易推广应用。

第四章 槟榔中违禁药物的分析

槟榔食品的成分非常的复杂,对功效成分的分析带来很大困难的同时,也给违禁成分的分析一个很大挑战。借助高效液相色谱的高分离能力和质谱的高选择性,我们可以成功的对槟榔食品中的违禁药物进行检测。

4.1 前言

随着经济的发展,各类保健食品正在逐步进入千家万户。于是,食品安全也就成了人们关注的热点问题。严禁向保健食品内添加任何处方类药物,这已成为全球共同的声音。在严把食品卫生关的今天,槟榔食品的安全问题也就成为了重要课题。因我省许多地方都有嚼食槟榔的习惯,故在我省开展槟榔食品安全的研究尤为重要。据文献报道^[86-92],我省也有许多的工作者在从事这方面的工作。如彭进平、张兆平等对我省食用槟榔卫生检测结果分析;夏立新、刘军鸽等对槟榔食品中糖精、苯甲酸和山梨酸的研究;肖学成、彭蔚和袁晓等对槟榔卤水中的麻黄碱的检测。

麻黄是一种中药,其主要成分为麻黄碱、甲基麻黄碱等。而麻黄碱、甲基麻黄碱均属于芳香族氨基醇衍生物。人摄入一定量的麻黄会出现心跳加速,血压升高,大脑皮层和皮质下中枢兴奋,易产生欣快感。因此也是体育竞技中的违禁药物,还因其具有抑制食欲的作用而被加入减肥保健食品中,我国对此已明令禁止。

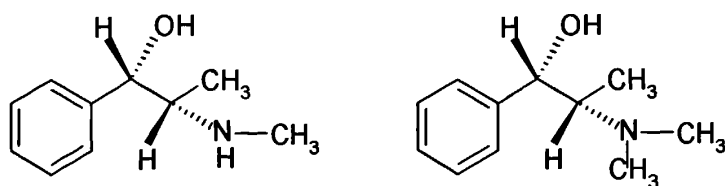


图 4-1 麻黄碱和甲基麻黄碱的结构式

Fig. 4-1 Structure of ephedrine and methylephedrine

目前一些不法厂商希望通过添加违禁药物于槟榔食品中, 达到增强产品效果。为防止此类现象出现, 有必要建立一种检测槟榔食品中麻黄碱以及甲基麻黄碱的方法。本文采用 HPLC/ESI-MS 分析测定, 不仅利用了高效液相色谱的高分离能力, 同时还利用了质谱能给出结构信息的能力, 对检测目标进行准确地定性、定量, 得到了较好的效果。本方法前处理简单, 抗干扰能力强, 灵敏度高, 重现性好, 能对槟榔食品中的麻黄碱, 甲基麻黄碱进行准确的定量测定。

4.2 实验部分

4.2.1 仪器

液相色谱-质谱联用仪 (Waters 公司, 美国), 由 2695 液相分离单元, 2487 双波长紫外检测器, Micromass ZQ2000 质谱 (曼彻斯特, 英国) 组成。液相分离单元包括一个低压梯度泵、柱恒温箱、自动进样器和一个 20- μ L 的定量环, 质谱包括 ESI 电离源和四级杆质量分析器, 所有的操作和数据采集是通过 Masslynx^{4.0} 工作站来控制的。

4.2.2 化学试剂

麻黄碱和甲基麻黄碱的标准品从湖南化学试剂公司获得 (中国, 长沙)。检测的样品是从市场上购得 (中国, 长沙)。甲醇 (CH_3OH) 为色谱级, 超纯水在本实验室用 Millipore 公司的 Milli-Q 纯水系统

(Bedford, MA) 制得。其他试剂均为分析纯, 包括乙酸 (CH_3COOH), 甲酸 (HCOOH), 三乙胺 ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$)。用于 HPLC 分析的非色谱级试剂均过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜, 所有试剂在使用前均经过超声脱气。

4.2.3 标准溶液的配制

麻黄碱和甲基麻黄碱用纯水溶解, 配成浓度为 $0.3\ \text{mg/ml}$, $1\ \text{mg/ml}$ 的储备溶液。标准储备溶液各取 $1\ \text{ml}$ 转移到 $10\ \text{ml}$ 容量瓶, 加纯水稀释至刻度得到混合标准溶液, 然后逐渐稀释得到一系列标准工作液。所有的储备溶液和工作液储存在冰箱里, 使用前恢复到室温。

4.2.4 样品溶液的处理

称取从市场上购得的样品 $5\ \text{g}$, 碎粉后加 $1\ \text{mol/L}$ 的 HCl 溶液 $30\ \text{mL}$ 浸泡 $1\ \text{h}$, 样品浸泡液用滤纸过滤于漏斗中, 用 $10\ \text{mL}\ 1\ \text{mol/L}$ 的 HCl 溶液, 淋洗残渣两次, 定容至 $50\ \text{mL}$ 进柱前过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜。 $1\ \text{ml}$ 样品转移到 $50\ \text{mL}$ 容量瓶中, 加纯水稀释到刻度, 取 $10\ \mu\text{L}$ 样品进 HPLC-MS 系统分析。

4.2.5 液相色谱条件

色谱柱 Spherigel C_{18} ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$) (大连江申分离科学技术公司); 流动相: A (0.1% 甲酸水+浓度为 $1.4\ \text{mL/L}$ 的三乙胺) +B (甲醇 (0.015% 乙酸)) = $90 + 10$ (体积分数), 进样前柱子用流动相平衡 $20\ \text{min}$; 流速: $1\ \text{mL/min}$; 检测波长: $210\ \text{nm}$; 进样体积为 $10\ \mu\text{L}$ 。柱温设置为 $30\ ^\circ\text{C}$ 。从 UV 检测器出来的溶液经过分流, $0.2\ \text{mL/min}$ 的溶液进入到 MS 的离子源。

4.2.6 质谱条件

为得到氢化分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或钠化分子离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 用正离子

采集模式。毛细管电压(Capillary voltage)为 3.2 kV, 萃取电压(Extractor voltage)为 4.0 V, 聚焦电压(RF lens)为 0.5 V, 源温度(Source temperature)为 105 °C, 脱溶剂温度(Desolvation temperature)为 300 °C, 脱溶剂气流速(Gas flow for desolvation)和锥孔反吹气流速(Gas flow for desolvation)分别设置为 250 L/h 和 50 L/h。全扫描的质量范围为 60-300 amu (m/z)。

4.3 结果与讨论

4.3.1 液相色谱条件

液相色谱分离一般建立在反相液相色谱上, 最常用的色谱柱是硅胶键合的 C_{18} 柱, 最基本的流动相是甲醇(乙腈)-水, 被分析物在色谱柱上的保留除了与溶剂强度相关之外, 还取决于其他一些条件, 包括流动相的 pH 值、离子强度、添加剂和流动相温度等等。

4.3.1.1 色谱柱的选择

C_{18} 和 C_8 柱是目前液相色谱分析中常用的色谱柱。本文在参考了相关文献的基础上, 考察了这两种色谱柱, 发现 C_{18} 柱比较理想。

4.3.1.2 流动相的优化

由于电喷雾技术的特点和化合物在溶液中离子化状态, 流动相的组成常常显著影响分析物的离子化效率, 因此要优化流动相的条件。利用甲醇-水、乙腈-水等反相液相色谱常用流动相, 用相同浓度的标准品的响应值进行对比, 结果表明甲醇-水的灵敏度比乙腈-水作流动相的灵敏度高。并且用甲醇和水作流动相时, 这两个化合物能分开, 保留时间和分离度取决于所用的甲醇-水的比例, 采用实验部分所述的色谱条件, 这些化合物可以得到较好的分离度和适合的分析时间。

4.3.1.3 柱温的选择

分离温度也可以明显影响这类化合物在柱上的 C_{18} 保留, 一般来

说温度升高硅羟基的解离去势增大,保留时间后延,对不同化合物的色谱选择性和出峰顺序也有可能发生改变。本文在参考了相关文献的基础上,考察了不同温度条件下在 C_{18} 上保留的影响,最后确定实验柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.3.1.4 流量的选择

一般来说,流动相流量越大,离子化效率越低,ESI 流量范围可以从 $10\text{ }\mu\text{L/min}$ 到 1 mL/min ,但流量在 $0.1\text{--}0.3\text{ mL/min}$ 之间灵敏度最高;一定内径的 HPLC 柱又要求适当的流量方可保证分离效率。因此兼顾色谱分离和 ESI 离子化效率流量定为 0.2 mL/min 。

4.3.1.5 流动相添加剂对灵敏度的影响

使用流动相添加剂,是反相色谱中控制峰间距,改善分离的一种常用的方法。同时,添加剂还可以改善物质的离子化效率,在正离子条件下甲酸、乙酸、三氟乙酸和甲酸铵是常采用的添加剂,有利于离子化。电喷雾质谱的特点是在溶液状态电离,因此,流动相组成及添加剂势必将影响分析物的灵敏度。而本文要分析的生物碱,如:麻黄碱、槟榔碱等均为弱碱。对于碱性物质,酸性流动相可能会有利于其质子化,从而提高灵敏度,同时适当调整 pH 值以提高氢离子浓度,通过化学平衡的位移抑制硅羟基分解是一种有效的方式。从而改善色谱性能如峰形、分辨率等。在 pH 低于 3 的流动相中,基本上可以忽略硅羟基的解离,但是考虑到色谱柱本身的使用寿命,一般来说流动相 pH 值也不能低于 2。随着 pH 值的降低和残留硅羟基的作用减小,被分析物的保留时间会缩短,同时峰形也将得到改善。

本文考察了添加剂浓度对分析物的质谱灵敏度、色谱分辨率、峰形等的影响。根据文献的报道,实验采用的是 $0.02\text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4\text{--H}_3\text{PO}_4$ 溶液来调节 pH 值。因流动相中非挥发性组分如磷酸盐缓冲液、离子对试剂等的加入,是任何 LC-MS 接口技术都禁止的。所以,实

验采用 0.1%甲酸水和甲醇为流动相，分别比较了在甲醇中加入五种不同浓度的乙酸 0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.025%和 0.030%，当乙酸浓度低于 0.015%时，峰形较好，但部分分析物灵敏度明显降低；而乙酸浓度高于 0.015%时，保留时间增大。部分目标化合物拖尾严重，分离效果不好。故本实验流动相确定为 A: 0.1%甲酸水，B: 甲醇 (0.015%乙酸)，pH 值为 3 左右，各种化合物能得到了很好的分离。

同时，因本实验所分析的物质均含有 N 原子，这使得化合物在 RP-C₁₈ 上，不在流动相中加改性剂的情况下有拖尾的现象。为了抑制拖尾，考察了几种改性剂及不同浓度对分离的影响。在液相分离中，三乙胺是分析含氮化合物最常用的改性剂。在本文中，分别考察了体积分数为 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0 mL/L 的三乙胺对分离的影响，结果显示三乙胺的浓度为 1.4 mL/L 时，峰形比较对称而且尖锐。当浓度升高时，峰形没有很大改善，基线随着甲醇比例的增加有很大的漂移，而且麻黄碱和甲基麻黄碱的分离度有所下降；更糟糕的是三乙胺会大大的抑制被分析物的离子化效率。所以，最后选择三乙胺的浓度为 1.4 mL/L。

4.3.2 质谱条件的优化

电喷雾电离，在正离子模式下分析各种生物碱可以获得较高的灵敏度，是目前 LC-MS 法分析此类化合物普遍采用的离子化方式。本文采用电喷雾离子化源，正离子检测方式对各主要成分进行一级全扫描，将对应的准分子离子峰进行二级质谱分析。通过流动注射(FIA)优化了毛细管电压、锥孔电压、源温度、脱溶剂温度等条件。同时，因 ESI 是一种软电离技术，麻黄碱和甲基麻黄碱具有相对稳定的化学结构，所以能承受比较高的电压，当锥孔电压为 20 V 时，分子离子的强度最大，几乎不产生碎片离子，在 40 V 的电压下，产生了碎片

离子。所以如实验部分所述,在选择离子模式中,锥孔电压设为 20 V;在扫描离子模式中,锥孔电压设为 40 V,以得到有利于结构鉴定的麻黄碱和甲基麻黄碱碎片离子。结果表明,所有离子均有良好响应,各化合物的准分子离子峰均为 $[N+H]^+$,通过子离子扫描获得各化合物的碎片离子。利用这些离子来进行准确的定性和定量分析。

4.3.3 标准品的 HPLC-UV-MS 分析

在给定的色谱条件下,被分析物达到了基线分离, Fig. 4-2 给出的是以 210 nm 和选择离子(SIR)记录的标准品的色谱图,甲基麻黄碱、麻黄碱的保留时间分别为 12.78 min 和 14.68 min。

4.3.4 方法的线性范围和检测限

准确吸取麻黄碱和甲基麻黄碱的标准混和溶液,加入重蒸水稀释至 1 mL,浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 和 10.0 mg/L。在优化的实验条件下进行液相色谱检测。麻黄碱和甲基麻黄碱在 0.05-10 mg/L 浓度范围下绘制校正曲线,校正曲线至少有六个不同的浓度点,且每天都重新配制。每份做校正曲线的标准溶液重复进样三次。利用色谱峰面积对样品浓度进行线性回归,得到麻黄碱、甲基麻黄碱的线性回归方程分别为: $y=193.57x+4.6833$, $y=341.96x+25.3199$; 相关系数(r^2)分别为: 0.999 和 0.996; 线性范围分别为: 0.05-10 mg/L 和 0.10-10 mg/L; 检测限分别为: 0.025 和 0.05 mg/L。

实验表明:本方法的检测限(LOD)低,所以在没有质谱的情况下,这个方法可以用于这类物质的常规检测,由于质谱的检测限更低,所以联用技术在微量检测中显示了优越性,而且在没有标准品的情况下,质谱能提供结构信息,便于定性检测。

表 4-1 麻黄碱和甲基麻黄碱的线性范围、相关系数和检测限

Table 4-1 Linear, correlation and detection limit of ephedrine and metylephedrine

化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 r^2	检测限 (mg/L)
麻黄碱	0.05~10	$y=197.63x+4.6535$	0.999	0.025
甲基麻黄碱	0.10~10	$y=344.87x+27.4269$	0.996	0.05

表 4-2 方法的精密度和准确性

Table 4-2 Precision and accuracy of the method

加入标准品	加入量 (mg·L ⁻¹)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
麻黄碱	0.5	95.2	6.8
甲基麻黄碱	0.5	94.9	8.6
麻黄碱	2.0	100.9	2.9
甲基麻黄碱	2.0	100.6	5.3

4.3.5 方法的精密度和准确性

在浓度范围 0.05-10 mg/L 间, 选择了 0.5 mg/L 和 2 mg/L 两种浓度的麻黄碱和甲基麻黄碱加入槟榔样品中重复进样三次来考察方法的精密度。平均回收率是用测得浓度除以标定浓度得到的比值, 通过计算掺杂已知浓度标样和内标的槟榔样品的回收率来考察该方法的准确性。对加标槟榔样品进行三次平行实验后, 当加标浓度为 0.5 mg/L 时, 麻黄碱和甲基麻黄碱的方法回收率分别为 95.2%和 94.9%, 相对标准偏差分别为 6.8%和 8.6%; 当加标槟榔样品的浓度为 2.0 mg/L 时, 麻黄碱和甲基麻黄碱的方法回收率分别为 100.9%和 100.6%, 相对标准偏差分别为 2.9%和 5.3%。研究表明, 色谱峰面积在所考察的浓度范围内与浓度呈良好的线性关系, 方法的精密度高, 相对标准偏差小于 9% ($S/N=3$), 麻黄碱的回收率介于 95.2~100.9%

之间,甲基麻黄碱的回收率介于 94.9~100.6%。精密度和准确性数据见表 4-2。从表中可以看出,该方法的精密度和准确性符合可接受的标准。说明该方法用于槟榔样品中麻黄碱和甲基麻黄碱的测定,能获得准确的结果。

4.3.6 分离效果

在上述实验条件下,甲基麻黄碱和麻黄碱分离效果良好,混合标准品色谱图见 Fig. 4-2,盐酸提取槟榔样品色谱图见 Fig. 4-3,且在样品测定中麻黄碱和甲基麻黄碱色谱峰附近不存在干扰物质,见 Fig. 4-4。

4.3.7 试样的检测

在优化的实验条件下,随机对市场上出售的食用槟榔进行了检测。Fig. 4-3 为本实验检测的食用槟榔在上述实验条件下的液相色谱图。检测表明,本人实验检测的食用槟榔不含麻黄碱和甲基麻黄碱。实验结果说明我们建立的方法消除干扰能力强、灵敏度高,可以用于食用槟榔样品中麻黄碱和甲基麻黄碱的检测。

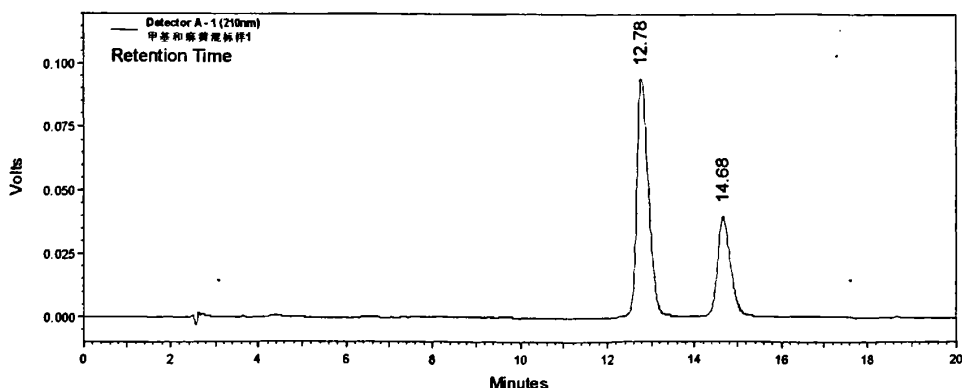


图 4-2 麻黄碱和甲基麻黄碱标准品色谱图

Fig. 4-2 Standard chromatograms of ephedrine and methylephedrine

注:甲基麻黄碱的色谱峰在 12.78 min 处,麻黄碱的色谱峰在 14.68 min 处。

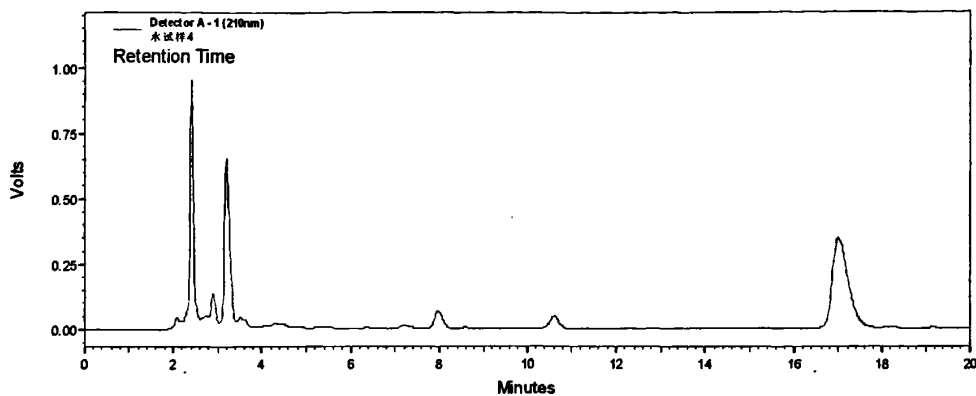


图 4-3 盐酸提取槟榔样品色谱图

Fig. 4-3 Chromatogram of betelnut sample extracted in hydrochloric acid

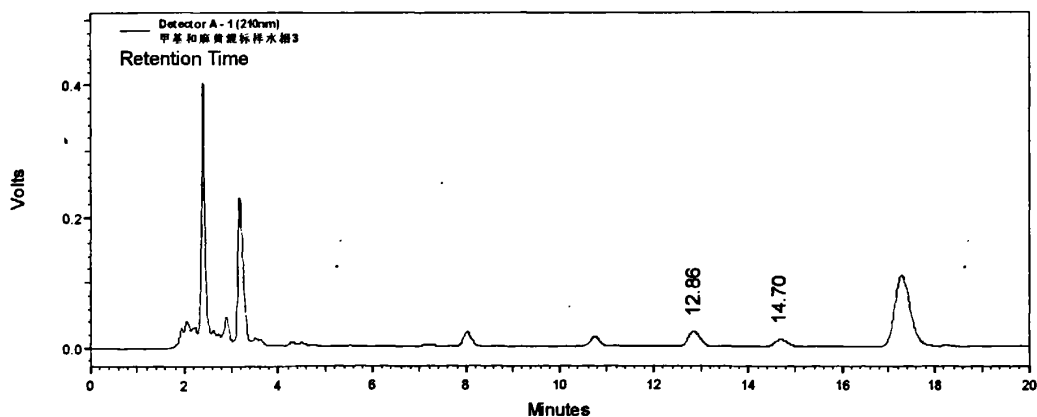


图 4-4 混有麻黄碱和甲基麻黄碱标准品盐酸提取槟榔样品色谱图

Fig. 4-4 Chromatogram of betelnut sample mixed with ephedrine and methylephedrine extracted in hydrochloric acid

注:甲基麻黄碱的色谱峰在 12.86 min 处,麻黄碱的色谱峰在 14.70 min 处。

4.4 小结

本实验流动相简单，分析时间短且样品预处理方便、灵敏度高、重复性好。借助质谱的定性能力，能对目标物进行结构确证，得到完全的结构信息，大大提高方法的可靠性和抗干扰能力，准确快速地同时检测槟榔食品中的麻黄碱及甲基麻黄碱。为卫生监督部门打击产商投机取巧这种不法行为提供了一种方便、可行的分析方法。

结 语

本论文运用高效液相色谱/电喷雾质谱联用技术对槟榔中的功效成分槟榔碱以及槟榔食品中的违禁添加药物麻黄碱和甲基麻黄碱进行了快速、准确的定性和定量分析。该实验通过对处理后槟榔样品进行提取条件研究,得到提取的最佳条件,对槟榔提取液用 LC/MS 进行定性分析,结合计算机检索系统和质谱理论,对样品里所含的槟榔碱,进行了质谱解析。同时通过薄层色谱制备槟榔碱纯品,用分光光度法、容量法和 LC/MS 对槟榔碱进行定量,定量结果 LC/MS 比分光光度法和容量法稍高,前处理更为简便。通过优化实验条件,对槟榔食品中的违禁添加的药物麻黄碱和甲基麻黄碱的同时检测填补了槟榔食品安全检测中的空白,为食品质量监督部门提供了有效的检测手段。

参考文献

- [1] 陈重明, 陈建国. 槟榔的民族植物学. 植物资源与环境, 1994, 3(1): 36-41.
- [2] 王永进, 廖启钊. 棕榈科植物桄榔学名的订正. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 126.
- [3] Inokuchi, J. Okabe, H. Yamauchi, T. Nagamatsu, A. Nonaka, G. Nishioka, I. Anti-hypertensive substance in seeds of areca catechu L. Life science, 1986, 38(15):1375-1382.
- [4] 李时珍. 本草纲目. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 1231-1232.
- [5] 郭松超, 孙斌, 郑艳燕等. 桄榔粉对老龄小鼠机能的改善作用. Acta Nutrimenta, 1998, 20(1): 96-98.
- [6] 陈勇. 食用槟榔工业化生产研究. 深圳大学学报, 1995, 12(1-2): 74-80.
- [7] 严聃, 李彦. 食用槟榔的加工工艺研究. 食品与机械, 2003, (6): 34-35.
- [8] 曾祥林, 刘利敏. 槟榔不同炮制工艺的质量研究. 中药饮片, 1993, 22(2): 24-27.
- [9] 高家鉴. 不同炮制方法对槟榔中槟榔总碱含量的影响. 中成药, 1999, 21(9): 458-459.
- [10] 万新, 万剑镇, 艾初湘. 鲜食槟榔加工技术研究. 食品科技, 2003, (4): 19-22.
- [11] Susanto E, SyahrilM, Waspodo P. The effect of drying temperature and treatment of areca fruit (Areca catechu L.) on the quantity of the whole seed. Warta IHP, 1995, 12 (1): 36 - 40.
- [12] Siva Rami Reddy G, Ramachandraiah O S, Jaganmohan Rao S, et al. Processing of arecanut for the recovery of edible fat. Journal of Plantation Crops, 1976, 4(2): 51 - 53.
- [13] Banyat Saitthiti. Equipment for studying the characteristic of betelnut drying.

Thailand, Bangkok, 1989, 11.

[14] 张海德, 黄玉林, 何继芹等. 槟榔果中的生理活性物质及槟榔食品研究进展. 安徽农学通报, 2006, 12(11): 31-32.

[15] 谭乐和. 世界槟榔加工技术发展现状及我国槟榔产业化发展对策. 热带农业科学, 2005, 25(4): 40-43.

[16] T. D. Behymer, T. A. Bellar, W. L. Budde, Liquid chromatography/ particle beam/mass spectrometry of polar compounds of environmental interest. Anal. Chem., 1990, 62(15): 1686-1690.

[17] 赵维民, 杨一鸣, 秦国伟, 徐任生. 热喷雾液质联用技术在药用植物化学研究中的应用. 天然产物研究与开发, 1999, 11(3): 82-87.

[18] S. A. Eremin, A. B. Smirnov, G. Gallacher, D. A. Smith, D. L. Colbert. Detection of ephedrine and phenylpropanolamine in urine using a polarization fluoroimmunoassay. Analyst, 1993, 118: 1325-1328.

[19] J. S. Grossert, A retrospective view of mass spectrometry and natural Products-sixty years of progress, with a focus on contributions by R. Graham Cooks. Int. J. Mass Spectrom., 2001, 212: 65-79.

[20] K. Biemann, Mass Spectrometry: Organic Chemical Applications, McGraw-Hill, New York, 1962.

[21] 周同惠, 汪尔康等. 分析化学手册•质谱分册. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2000. 10.

[22] D. Barcelo, G. Durand, R. J. Vreeken, G. J. De Jong, U. A. T. Brinkman, Nonpolar solvents for normal-phase liquid chromatography and postcolumn extraction in thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. Anal. Chem., 1990, 62(15): 1696-1700.

[23] P. S. Kokkonen, W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, Phase-system switching in continuous-flow fast atom bombardment liquid chromatography mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectr., 1991, 5: 19-24.

[24] Hsu J, Interfacing ion chromatography with particle beam mass spectrometry for the determination of organic anionic compounds. Anal. Chem., 1992, 62(4): 434-443.

- [25] W. M. A. Niessen, U. R., Tjaden, J. V. D. Greef, Strategies in developing interfaces for coupling liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1991, 554(1): 3-26.
- [26] P. Arpino, Combined Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Part I : Compling by means of a moving belt interface. *Mass Spectr. Rev.*, 1989, 8(1): 35-55.
- [27] R. C. Willonghby, R. F. Browner, Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy. *Anal. Chem.*, 1984, 56(14): 2626-2631.
- [28] C. R. Blakley, M. L. Vestal, Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1983, 55(4): 750-754.
- [29] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.*, 1985, 57(3): 675-679.
- [30] R. B. Prime, B. Shushan, Thermogravimetric analyzer/atmospheric pressure chemical ionization tandem triple quadrupole mass spectrometer system for evolved gas analysis. *Anal. Chem.*, 1989, 61(11): 1159-1164.
- [31] R. M. Caprioli, T. Fan, J. S. Cottrell, A continuous-flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrum. *Anal. Chem.*, 1986, 58(14): 2949-2954.
- [32] W. M. A. Nissen, State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1999, 856(1-2): 179-197.
- [33] W. Matthias, M. Matthias, Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.*, 1996, 68(1): 1-8.
- [34] 郭寅龙, 刘晗青, 余翀天, 液相色谱/电喷雾质谱(LC/ESI/MS)在蛋白质分析鉴定中的应用. *分析测试技术与仪器*, 2001, 7 (9): 129-133.
- [35] M. Stobiecki, Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 2000, 54: 237-256.
- [36] Z. Tozuka, H. Kaneko, T. Shiraga, Y. Mitani, M. Beppu, S. Terashita, A. Kawamura and A. Kagayama, Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(5): 793-808.

- [37] R. B. Cole(Ed), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York, 1997, P131, 258.
- [38] Fred A. Mellon, R. N. Bennett, B. Holst, G. Williamson, *Intact Glucosinolate Analysis in plant Extracts by Programmed Cone Voltage Electrospray with LC/MS/MS Methods*. *Analytical Biochemistry*, 2002, 306(1): 83-91.
- [39] R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization- mass spectrometry in drug metabolism studies*. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(5): 357-372.
- [40] Z. L. Qin, *Advances in Biopharmaceutical analysis in the People's Republic of China 1995-1997*. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 1998, 17(1): 183-192.
- [41] J. Sherma, *High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of botanical medicines and dietary supplements: a review*. *J AOAC Int.*, 2003, 86(5): 873-876.
- [42] G. Guetens, G. D. Boeck, M. S. Highley, M. Wood, R. A. Maes, A. A. Eggermont, A. Hanauske, E. A. Bruijn, U. R. Tjaden, *Hyphenated techniques in anticancer drug monitoring. II. Liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry*. *J. Chromatogr. A*, 2002, 976(1-2), 239-472.
- [43] B. A. Thomson, *Atmospheric Pressure Ionization and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Together at Last*. *J. Am Soc. Mass Spectrom.*, 1998, 9(3), 187-193.
- [44] C. K. Lim, G. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25(5): 547-570.
- [45] B. L. Ackermann, M. J. Berna, A. T. Murphy. *Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, 12(1): 105-110.
- [46] X. G. He. *On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques*. *J. Chromatogr. A*, 2000, 880(1-2): 203-326.
- [47] W. M. Niessen, *Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques*. *J. Chromatogr. A*. 1998,

794(1-2): 407-435.

[48] J. Sherma, High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of botanical medicines and dietary supplements: a review. *J AOAC Int.* 2003, 86(5): 873-876.

[49] Liquid chromatography/mass spectrometry of peptides of biological samples, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 352(1): 71-83.

[50] M. S. Diaz-Cruz, M. J. L. Alda, R. Lopez and D. Barcelo, Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(5): 917-923.

[51] S. Sabarinath, M. Rajanikanth, K. P. Madhusudanan, R. C. Gupta, A sensitive and selective liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric assay for the simultaneous quantification of α , β - arteether and its metabolite dihydroartemisinin in plasma, useful for pharmacokinetic studies. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(5): 732-742.

[52] M. Careri, A. Mangia, Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000(1-2): 609-635.

[53] R. W. Giese, Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000(1-2): 401-412.

[54] C. G. Huber, H. Oberacher Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, 20(5): 310-314.

[55] M. A. Strege, High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1999, 725(1): 67-78.

[56] Y. C. Ma, H. Y. Kim, Determination of Steroids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8(6):1010-1020.

[57] M. T. Galceran, E. Moyano, High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (pneumatically assisted electrospray) of hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A*, 1994, 683(1): 9-19.

[58] E. R. Filho, Adaila Marta Paixao Almeida and Marcel Tabak, Fragmentation of dipyridamole and related dipyrimidines by electrospray ionization collisional

activated decomposition mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2003, 38(5): 540-547.

[59] M. S. Lee, E. H. Kerns, LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrom. Rev.*, 1999, 18(3-4): 187-279.

[60] J. N. Kyranos, H. Cai, D. Wei, W. K. Goetzinger, High-throughput high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for modern drug discovery. *Analytical Biotechnology*, 2001, 12(1): 105-111.

[61] E. A. Scribner, E. M. Thurman, L. R. Zimmerman, Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Sci. Total Environ.*, 2000, 248(2-3): 157-167.

[62] F. F. Liu, C. Y. Ang, T. M. Heinze, J. D. Rankin, R. D. Beger, J. P. Freeman, J.O. Jr. Lay, Evaluation of major active components in St. John's Wort dietary supplements by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and electrospray mass spectrometric confirmation. *J. Chromatogr. A.* 2000, 888(1-2): 85-92.

[63] J. K. Prasain, K. Jones, M. Kirk, L. Wilson, M. Smith-Johnson, C. Weaver, S. Barnes, Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(15): 4213-4218.

[64] M. L. Reyzer, Y. Hsien, K. Ng, W. A. Korfmacher, R. M. Caprioli, Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38(5): 1081-1092.

[65] 谢亚雄, 朱雁. 烟草提取物的 GC/MS 分析. *质谱学报*, 2000, 21(3): 99-100.

[66] 许大年, 刘石磊. 色谱—质谱自动处理与鉴定系统-AMDIS 简介. *现代科学仪器*, 2002(6): 42-44.

[67] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 人民卫生出版社, 1995. 320-321.

[68] 朱良. 分析仪器手册. 北京: 化学工业出版社, 1997. 817.

[69] 黄永华. 槟榔有效化学成分分析测定. *食品与机械*, 2002, 89(3): 38-39.

[70] 袁炜, 吕建德, 傅小芸. 槟榔食品中槟榔碱和槟榔次碱的毛细管电泳分析.

分析化学研究简报, 2000, 28(6): 749-752.

[71] Lee, Seung Ho. Kim, So Youhg, Son, Kun Ho. Kang, Shin Jung. Chang, Seung Yeup. Park, Jeong Hill. Lee Kyong Soon. Isolation and quantitative determination of arecoline from arecase semen. College of pharmacy, 2001, 32(1):39-42.

[72] K. Johns. Trace D S Q or focus D S Q uer's guide. Thermo Finnigan 2003, 81-132.

[73] Xcalibur. High chem: mass frontier software. Thermo Finnigan. 2002, 139-158.

[74] Xcalibur. Getting productive: qualitative analysis. Thermo Finnigan. 2002, 32-107.

[75] Xcalibur. Getting productive: qualitative analysis. Thermo Finnigan. 2002, 43-96.

[76] Xcalibur. Getting productive: process set up and the analysis of quantitative datd. Thermo Finnigan. 2002, 17-69.

[77] Xcalibur. Trace GC. AI/AS 3000 Autosampler users manual. Thermo Finnigan. 2002, 7-10.

[78] Trace DSQ. 简明操作手册. Thermo Finnigan. 2003.

[79] Eckhard Rabe. Book Review: Handbook of GC/MS —Fundamentals and Applications by Hans—Joachim Hubschmann. Starch Strike. 2002, 54(6): 264.

[80] Osama Y. Al—Dribashi, Kenichiro Nakashima. Hyphenated chromatographic chromatographic methods for biomaterials. Biomedical Chromatography, 2000, 14(6): 406-408.

[81] F. W. 麦克拉弗蒂. 质谱解析. 北京: 化学工业出版社, 1987. 259-263.

[82] 张林丽, 陈国佩, 韦凤. 槟榔不同炮制品中槟榔碱含量的比较. 中药材, 2002, 25(6): 404-405.

[83] 曾琪, 李忠海, 袁列江等. 槟榔生物碱的研究现状及展望. 食品与机械, 2006, 22(6): 158-161.

- [84] 史载锋, 吴亚弟, 林小明等. 槟榔碱提取分离工艺的研究. 海南师范学院学报, 2006, 19(3): 246-247.
- [85] 宋英, 朱兰, 谈静等. 反相高效液相色谱法测定痛风口服液中槟榔碱的含量. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 742-744.
- [86] 彭蔚, 袁晓, 肖学成. HPLC 法检测槟榔卤水中的麻黄碱. 实用预防医学, 2004, 11(5): 1012.
- [87] 刘祥东, 梁琼麟, 罗国安等. HPLC 法测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱中杂质. 中草药, 2005, 36(9): 1316-1319.
- [88] 林凯, 范琦, 杨成钢等. RP-HPLC 法测定麻黄中麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱. 中草药, 2006, 37(2): 282-284.
- [89] 颜红, 李晓瑜, 彭富全. HPLC-MS 同时检测减肥类保健食品中常见 4 种化学药物. 现代食品与药品杂志, 2006, 16(5): 9-11.
- [90] 彭进平, 张兆强, 胡晓红等. 湖南省食用槟榔卫生检测结果分析. 实用预防医学, 2005, 12(10): 1087-1089.
- [91] 肖学成, 彭蔚, 袁晓等. 高效液相色谱法同时检测槟榔中苯甲酸、山梨酸和糖精含量. 实用预防医学, 2002, 9(5): 561.
- [92] 夏立新, 刘军鸽, 刘爱玲. 高效液相色谱法测定槟榔中的糖精、苯甲酸和山梨酸. 岳阳师范学院学报, 2002, 15(1): 53-55.

附 录

硕士期间发表的论文

- [1] 文开齐, 陈波*, 姚守拙. 高效液相色谱法测定槟榔食品中麻黄碱和甲基麻黄碱. 《中国食品卫生杂志》已接受.
- [2] 文开齐, 刘美红. 高效液相色谱法测定槟榔食品中甲基麻黄碱. 《卫生职业教育》2007, 25(8), 143-144.

致 谢

本论文是在我的导师陈波教授的亲自指导下完成的。在此谨向陈波教授致以衷心的感谢和崇高的敬意！

感谢陈波教授在论文的选题、实验、及论文的定稿等各个阶段给予的悉心教诲！导师渊博的学识，敏锐的思维，严谨务实的治学态度，沉稳谦和的师者风范是我终生学习的榜样。

感谢马铭教授、谢青季教授、张友玉教授、杨明生副教授等对我的热情指导！他们的一席话、一个解答、一句叮咛曾使我茅塞顿开，获益匪浅。

感谢康雪君老师、马金余老师等在我学习和实验过程中对我的大力支持！他们诲人不倦、忘我投入的敬业精神给我留下了深刻印象。

感谢刘轶琛、王娟、刘国柱、付善良、言丽娜等同学对我的热心帮助！

最后，感谢不断给予我关心和鼓励的家人及朋友，他们是我顺利完成论文不可缺少的力量和源泉。