

UPLC 法测定槟榔提取液中的槟榔碱含量

孔兰芬 杨式华 杨盼盼 和玉凤 邱昌桂* (云南同创检测技术股份有限公司, 云南昆明 650106)

摘要 [目的]建立以超高效液相色谱法(UPLC)测定槟榔提取液中槟榔碱含量的方法。[方法]采用 Waters 公司的 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 35 ℃,流动相:乙腈-甲醇-0.1%冰醋酸溶液(每 1 000 mL 含磷酸二氢钾 0.6 g,十二烷基磺酸钠 1.0 g)=25:20:55,等度洗脱,进样量 1.0 μL,流速 0.2 mL/min,检测波长 215 nm。[结果]整个洗脱在 5.0 min 之内完成,槟榔碱在 2.0 min 左右出峰,峰型较好,且槟榔碱在 0.013~0.663 mg/mL 范围内呈良好的线性关系,相关系数为 0.999 8,平均回收率为 98.1%,RSD 为 2.26%(n=5)。[结论]该方法操作简便、快速、灵敏度高、重复性好,可用于控制槟榔提取液及其制成方剂中槟榔碱的含量。

关键词 超高效液相色谱法;槟榔提取液;槟榔碱

中图分类号 R284.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)08-0177-02

Determination of Arecoline from Areca Nut Extract by Ultra-high Performance Liquid Chromatography (UPLC)

KONG Lan-fen, YANG Shi-hua, YANG Pan-pan et al (Yunnan Comtestor Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650106)

Abstract [Objective] To establish a UPLC method for determination of arecoline in areca nut extract. [Method] The compound was determined by UPLC with WATERS ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column. The column temperature was set at 35.0 ℃. The mobile phase consisted of acetonitrile, methanol and 0.1% glacial acetic acid (containing 0.6 g potassium dihydrogen phosphate and 1.0 g twelve alkyl sodium sulfonate per 1 000 mL solution) (25:20:55), with isocratic elution at the flow rate of 0.2 mL/min. The sample volume was 1.0 μL. The determination wavelength was 215 nm. [Result] The whole elution was completed in 5.0 min. The better peak of arecoline appeared in about 2.0 min and there was a good linear range between 0.013-0.663 mg/mL. The correlation coefficient was 0.999 8 with the average recovery rate of the method was 98.1%, RSD = 2.26% (n=5). [Conclusion] The proposed method had the advantages of easy operation, rapid, high sensitivity and reproducible for the content control of arecoline in areca nut extract and its preparation.

Key words Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC); Areca nut extract; Arecoline

DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.08.054

槟榔属于棕榈科植物类,具有杀虫消积、降气、行水、截疟等功效,其主要的有效成分为槟榔碱(Arecoline)。槟榔碱的化学名为 N-甲基-1,2,5,6-四氢烟酸甲酯,具有一定毒性^[1],且性质并不十分稳定,所以槟榔及其制成方剂中槟榔碱含量有必要得到更好的控制。目前,测定槟榔碱含量的方法主要有酸碱滴定法^[2]、薄层色谱法^[3]、毛细管电泳法^[4]、分光光度法^[5]、气相色谱-质谱联用仪^[6]、阳离子交换色谱法^[7-8]、反相高效液相色谱法^[9-14]及高效液相色谱-质谱联用法^[15-16]等,鲜见有用 UPLC 法来测定的报道。笔者采用 UPLC 法考察了色谱条件和定量的线性范围,并对槟榔碱进行含量测定,以期今后测定并控制槟榔及其制成方剂中槟榔碱含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器。ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统,配 ACQUITY PDA 检测器,Empower 色谱工作站(Waters 公司);电子天平(Mettler Toledo New Classic MF)。

1.1.2 试剂。氢溴酸槟榔碱对照品(百灵威科技有限公司,含量≥98.0%);槟榔提取液(云南某有限公司)。乙腈、甲醇为色谱纯(DIMA 公司),磷酸二氢钾为分析纯(广东汕头市西陇化工厂,含量≥99.0%),十二烷基磺酸钠为优级纯(西亚试剂,含量≥99.0%),冰醋酸为分析纯(西陇化工股份有限公司,含量≥99.5%),无水乙醇(西陇化工股份有限公司,含量≥99.8%)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 分析柱,流动相为乙腈-甲醇-0.1%冰醋酸溶液(每 1 000 mL 含磷酸二氢钾 0.6 g、十二烷基磺酸钠 1.0 g)=25:20:55,进样量 1.0 μL,流速 0.2 mL/min,柱温 35.0 ℃,检测波长 215 nm,分析时间 5.0 min。

1.2.2 对照品溶液的制备。精密称取氢溴酸槟榔碱对照品 10.3 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解且定容至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含槟榔碱 663.46 μg 的储备溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备。精密移取槟榔碱提取液 0.5 mL 于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,去续滤液,即得。

2 结果与分析

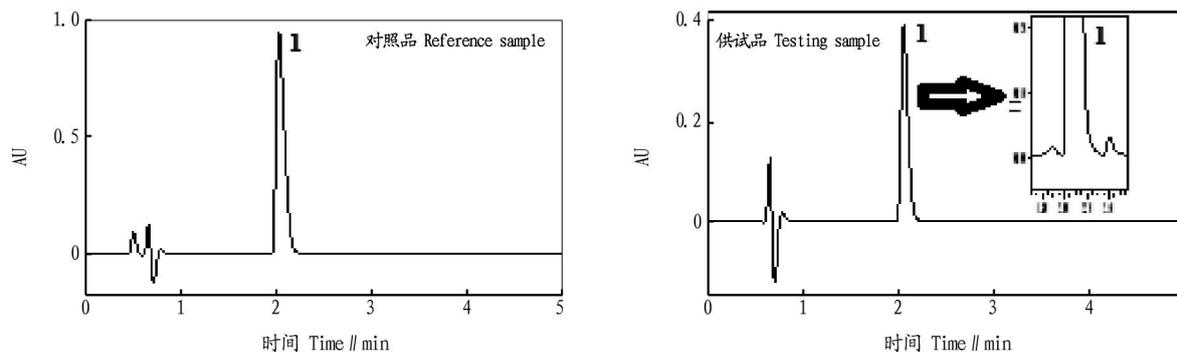
2.1 线性关系考察 使用梯度稀释方法配制 1/2、1/5、1/10、1/20、1/50 储备液浓度的校准溶液,使用 UPLC 测定并制作工作曲线,以槟榔碱峰面积与对应的浓度做线性回归,得到线性回归方程($Y = 1.65e + 007x + 1.52e + 005$) 相关系数(0.999 8) 线性范围 0.013~0.663 mg/mL。由此可见,该方法具有良好的线性关系,满足样品的定量测定。此外,对照品及供试品溶液的色谱图见图 1。

2.2 精密度试验 精密吸取浓度为 331.73 μg/mL 的氢溴酸槟榔碱对照品溶液连续进样 5 次,每次 1.0 μL,测得氢溴酸槟榔碱峰面积平均值为 5 796 852 μV·s,峰面积的 RSD 值为 0.17%,表明氢溴酸槟榔碱进样精密度良好。

2.3 稳定性试验 取同一批样品的供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、16、20、24 h 进样 1.0 μL,按上述色谱条件测定,峰面积的 RSD 值为 0.30%,表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

作者简介 孔兰芬(1984—),女,云南建水人,工程师,硕士,从事药品、食品等分析研究。* 通讯作者,副研究员,博士,从事分析化学研究。

收稿日期 2017-12-25; **修回日期** 2018-01-05



注 “1”为槟榔碱,对照品出峰时间为2.031 min,供试品出峰时间为2.030 min

Note “1” is arecoline, the peak time of reference sample is 2.031 min, the peak time of testing sample is 2.030 min

图1 对照品及供试品溶液的色谱图

Fig. 1 The chromatogram of reference and testing sample solution

2.4 重复性试验 取同一批样品的供试品溶液5份,平行测定,进样量为1.0 μL ,槟榔碱含量为0.115、0.114、0.115、0.115、0.116 mg/mL,平均含量为0.115 mg/mL,含量的RSD值为0.61%,表明该方法重复性较好。

2.5 回收率试验 称取同一批样品的槟榔提取液0.5 mL

于50 mL容量瓶中(5份),分别加入对照品储备液1.5 mL,再加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,去续滤液,精密吸取1.0 μL ,按照“2.1”色谱条件测定,得平均回收率为98.1%,RSD值为2.26%(表1)。

表1 重复性试验结果

Table 1 Repeatability test results

成分 Component	加入前量 Amount before adding//mg	加入量 Adding amount mg	加入后测得量 Amount after adding mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
槟榔碱 Arecoline	5.750	0.995	6.750	100.5	98.1	2.26
		0.995	6.716	97.1		
		0.995	6.731	98.6		
		0.995	6.689	94.4		
		0.995	6.745	100.0		

2.6 样品测定 分别精密吸取供试品溶液1.0 μL ,注入UPLC测定,记录峰面积,计算含量,结果3批样品的含量,分别为0.115、0.120、0.118 mg/mL。

3 结论与讨论

3.1 不同仪器对比 分别取同一对照品在HPLC(Agilent 1260)及UPLC(ACQUITY H-Class)上试验,色谱条件除色谱柱型号及规格不同外,其余条件相同。HPLC中是以Symmetry C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)为分析柱,15.224 min出峰,总分析时间为30 min,与“2.1”相比,分析时间增加6.0倍,表明HPLC及UPLC在相同条件下检测槟榔提取液中的槟榔碱时,UPLC在准确、快速方面显示出更大的优势。

3.2 不同流动相选择 经查阅相关资料^[16-17],选择①乙腈-0.5%甲酸溶液(50:50或10:90);②乙腈-甲醇-0.5%甲酸溶液(20:35:45);③乙腈-0.1%冰醋酸溶液(每1000 mL含磷酸二氢钾0.6 g,十二烷基磺酸钠1.0 g)(42:58)或(80:20)为流动相时,结果槟榔碱在8 min以内均未出峰;④选择甲醇-0.1%冰醋酸溶液(每1000 mL含磷酸二氢钾0.6 g、十二烷基磺酸钠1.0 g)(48:52)或(55:45)为流动相,结果槟榔碱在4 min及2.2 min以内出峰,但峰型及峰纯度较差,峰内包含了2个物质的信息;⑤选择乙腈-甲

醇-0.1%冰醋酸溶液(每1000 mL含磷酸二氢钾0.6 g,十二烷基磺酸钠1.0 g)(15:30:55)为流动相,3.2 min出峰,但基线不平稳,且拖尾。经反复试验,确定该试验的色谱条件,槟榔碱在2.0 min左右出峰,峰型较好,拖尾明显改善。从上述各种条件尝试后还得出,随着甲醇比例的加大,出峰时间会相应提前,加入一定量的乙腈,有利于改善峰型。

采用该法测定槟榔提取液中的槟榔碱含量,分析时间为5.0 min,与HPLC法相比,该法操作简便、快速,灵敏度高,重复性好,为今后测定并控制槟榔及其制成方剂中槟榔碱的含量提供参考。

参考文献

- [1] 柯铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1992: 426.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005年一版[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 254.
- [3] 林励, 徐鸿华, 邓沛峰, 等. 槟榔中槟榔碱含量的薄层扫描测定[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(8): 491-492.
- [4] 袁炜, 吕建德, 傅小芸. 槟榔中槟榔碱和槟榔次碱的毛细管电泳分析[J]. 分析化学, 2000, 28(6): 749-752.
- [5] 高敏, 高淑芹. 光度法测定槟榔中槟榔碱的含量[J]. 化学分析计量, 2003, 12(1): 28-30.
- [6] 陈好, 闫晓楠. 藿香正气软胶囊中槟榔碱的限量检查方法研究[J]. 天津药学, 2017, 29(5): 21-23.

(下转第190页)

态空间时视觉感受“四园一体,天人合一”;动态空间时视觉感受“色彩、位移、线条的变幻无穷”;层次空间俯仰视觉感受“丛植、配植、间植、列植的立体感、丰富感”。在美学特征上,充满生趣盎然的融合美、山水地形的线条美、造型艺术的色彩美、旅游文化的心神美^[4]。为此,品种苗木选择应注意在江南茶区茶园周围选栽香樟、丁香、红枫、红叶石楠、金合欢、金叶女贞等常绿树种;茶园主干道、环园道选植红梅、红玉兰、红豆杉、紫楠木、花梨木、金钱柳等珍贵品种。栽植适期同上所述。规范要求如下:乔木型树种行距6~7 m,株距3~4 m;灌木型树种行距2~3 m,株距1~2 m;乔木、灌木型树种相间组合定植^[5]。

3.3 园区周边果园建设 品种与移栽密度上,坡地单株栽植 枇杷按 240~330 株/hm²;核桃按 360~400 株/hm²;板栗按 390~450 株/hm²;石榴按 420~480 株/hm²;水蜜桃按 570~690 株/hm²;柿按 750~840 株/hm²^[6]。林下可栽培适合的中药材,如黄精、野葛、百合、石斛、苦参、鸡血藤等。种类和品种、建园规范、栽培技术、采收加工等参照《果树栽培学》(第3版)、《药用植物栽培学》(第2版)和《芳香植物栽培学》相关论述。

由于茶园间作与配植列植的经济林带,形成立体复合完整的生态系统,发挥着强大的生态功能。调查显示现代茶园与传统茶园相比,种群由茶树1类、增为茶林花果药5类,生态位由茶树0.9 m高度、镶嵌到5.0 m以上,物种多度增长数倍以上,茶树遮阴度上升20%;茶树根群集中分布在20~60 cm土层,间作乔木根群集中分布在60~200 cm处,土壤3大类群微生物大量繁衍;茶园间作的花卉、经济林的叶果、地

表梯坎的绿肥等全部被利用;茶园温度、湿度、空气质量、土壤水分等生态因素产生激剧变化,微域小气候得到明显改善^[7]。因此,现代茶园生物多样性大幅提升,生态平衡点显著提高,自我生理调节能力逐渐增强,病虫害相对减少,水、有机、生态循环更加有利于茶树物质代谢与营养生长,茶园产出率、生产能力、综合效益逐年上升,能量转化、物质传递、价值增长整体优良。

4 小结

通过以上适宜配套技术的运用与实施,现代茶区基本建成,包括生态茶园、生态林园、生态果园、生态花园“四园一体”的生态景观^[8];生态保护、旅游观光、科技示范、经济高效“四种功能”的生态工程;机械作业、现代管理、综合利用、低碳发展“四个适应”的生态布局;园林化、良种化、水利化、有机化“四化标准”的生态文明。

参考文献

[1] 杨亚军. 中国茶树栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 242-255.
 [2] 杨亚军, 梁月荣. 中国无性系茶树品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 29-122.
 [3] 何金明, 肖艳辉. 芳香植物栽培学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 137-190.
 [4] 董晓华. 园林规划设计[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 28-64.
 [5] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2009: 201-629.
 [6] 河北农业大学. 果树栽培学各论[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 273-505.
 [7] 江平. 九华山生态环境绿色修饰与深度融合[J]. 茶业通报, 2011, 33(4): 161-162.
 [8] 江平, 汪忠祥. 九华山生态园区工程建设议[J]. 茶业通报, 2014, 36(1): 17-18.

(上接第178页)

[7] 陈浩桢, 赖宇红, 王晓钰, 等. 高效阳离子交换色谱法测定槟榔中槟榔碱的含量[J]. 中药材, 2002, 25(1): 27-28.
 [8] 高珊珊. 高效阳离子交换色谱法测定大腹皮中槟榔碱的含量[J]. 医药导报, 2015, 34(S1): 85-86.
 [9] 杨春, 苏少忠, 徐杏云, 等. RP-HPLC法测定胃通颗粒中槟榔碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(5): 459-460.
 [10] 宋英, 朱兰, 谈静. 反相高效液相色谱法测定痛风口服液中槟榔碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 742-744.
 [11] 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.
 [12] 涂佳, 邓学良, 陈翠梅, 等. 反相高效液相色谱法测定生物材料中槟榔碱

的含量[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(4): 328-329.
 [13] 周丹, 刘启兵, 刘月丽, 等. 海南槟榔提取物中多酚和槟榔碱的含量测定[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(19): 2224-2227.
 [14] 周军, 陈飞, 曲佳, 等. HPLC法测定越鞠保和丸中槟榔碱的含量测定[J]. 天津药学, 2017, 29(5): 26-27.
 [15] 文开齐. 高效液相色谱/质谱联用法测定槟榔食品中槟榔碱的含量[J]. 中国实用医药, 2008, 3(8): 12-13.
 [16] 丁芳林, 彭书练. HPLC/ESI-MS法测定槟榔中的槟榔碱[J]. 农产品加工·学刊, 2008(4): 76-79.
 [17] 唐四和. HPLC测定小儿消积止咳口服液辛弗林、氢溴酸槟榔碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1298-1300.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。