

槟榔不同工艺处理品中 3 种生物碱的含量比较

古桂花^{1,2}, 胡虹¹, 曾薇¹, 徐仿周¹, 袁劲松^{1*}

(1. 北京大学深圳医院, 广东 深圳 518036; 2. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515041)

[摘要] **目的:** 建立测定槟榔中槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱的 HPLC-DAD 方法, 并比较不同处理工艺对 3 种生物碱含量的影响。**方法:** 采用 Partisil 10 SCX 阳离子色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 10 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸(三乙胺试液调 pH 3.8)(50:50), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 215 nm, 柱温 25 °C。考察不同烘烤时间和不同煮沸时间条件下, 槟榔皮、核中 3 种生物碱含量的变化。**结果:** 生物碱的含量随烘烤或者煎煮时间的延长而降低, 在不同工艺条件下降低程度不同, 100 °C 烘烤 8 h 后生物碱的损失率约 50%, 煮沸 0.5 h 后损失率高达 80%, 说明煎煮对槟榔皮、核中生物碱含量的影响较烘烤要大。**结论:** 所建立的 HPLC-DAD 方法适用于槟榔生物碱的定量分析, 为开发槟榔药食两用的安全剂量标准提供实验依据。

[关键词] 高效液相色谱; 槟榔; 槟榔碱; 槟榔次碱; 去甲基槟榔次碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0044-04

Content Comparison of Three Alkaloids in *Areca catechu* under Different Processing Conditions

GU Gui-hua^{1,2}, HU Hong¹, ZENG Wei¹, XU Fang-zhou¹, YUAN Jin-song^{1*}

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China;

2. Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC-DAD method for simultaneously determining the content of arecoline, arecaidine and guvacine in *Areca catechu*, and compare their content changes under different processing conditions. **Method:** Determination was performed on a Partisil 10 SCX cation column (4.6 mm × 250 mm, 10 μm), mobile phase of acetonitrile-0.5% H₃PO₄ (adjusted pH 3.8 with triethylamine) (50:50), flow rate 1 mL·min⁻¹, detection wavelenth 215 nm and column temperature 25 °C. Under different baking and boiling time conditions, content change of three kinds of alkaloids in peel and core of *A. catechu* was investigated. **Result:** The content of alkaloids decreased along with extension of baking and boiling time, decreasing level was different under different technology conditions, loss rate of alkaloids was about 50% by baking 8 h at 100 °C, but loss rate was up to 80% after boiling 0.5 h, it showed that effect of baking on alkaloids in peel and core of *A. catechu* was more than boiling. **Conclusion:** This established HPLC-DAD method was suitable for quantitative of alkaloids in *A. catechu*, this study could provide experimental basis for development safety dosage standard of edible and officinal of *A. catechu*.

[Key words] HPLC; *Areca catechu*; arecoline; arecaidine; guvacine

槟榔是中国四大南药之一,具有杀虫消积、行气利水、截疟的功效^[1-3]。作为嗜好品的槟榔,其消费

仅次于烟草、酒精和咖啡因^[4],嚼食时能使人产生轻微的欣快感和兴奋性,长期嚼食会有一定的成瘾

[收稿日期] 20121009(012)

[基金项目] 深圳市科技局计划项目(201002059)

[第一作者] 古桂花, 硕士, 从事中药药理研究, Tel:13590317630, E-mail: fair.gu@gmail.com

[通讯作者] * 袁劲松, 博士, 主任中医师, 从事天然药物化学以及中药药理研究, Tel:0755-83923333-8203, E-mail: yjs888@163.com

性^[5]。近年来国内外众多学者研究发现,过量嚼食槟榔会引起不同程度的毒性反应^[6-7]。其主要毒性成分为生物碱类,含量约0.3%~0.7%,主要包括槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱等^[8]。本实验采用槟榔食品制作过程中可能用到的工艺条件对新鲜槟榔进行前处理,通过HPLC测定处理后样品中槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱的含量,以探索食品槟榔的减毒工艺条件,为槟榔的安全剂量标准研究提供依据。

1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),Sartorius BP211D型电子天平(德国Sartorius公司),Millipore型超纯水机(美国Millipore公司)。

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、盐酸去甲基槟榔次碱对照品(SIGMA-ALORICH,批号分别为027H37873,067K47202),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。新鲜槟榔原药材采购于海南省万宁市龙滚镇,经北京大学深圳医院药剂科副主任中药师曾向总鉴定为棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 提取方式考察

2.1.1 氨性乙醚提取法 取新鲜槟榔样品,低温烘干粉碎,称取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨水0.5 mL,乙醚50 mL,立即超声5 min,倾出提取液至预置1 mL磷酸液(5→1 000)的锥形瓶中,加乙醚20 mL超声5 min,合并乙醚提取液,至旋转蒸发仪上挥去乙醚,残渣加50%乙腈10 mL溶解,离心5 min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

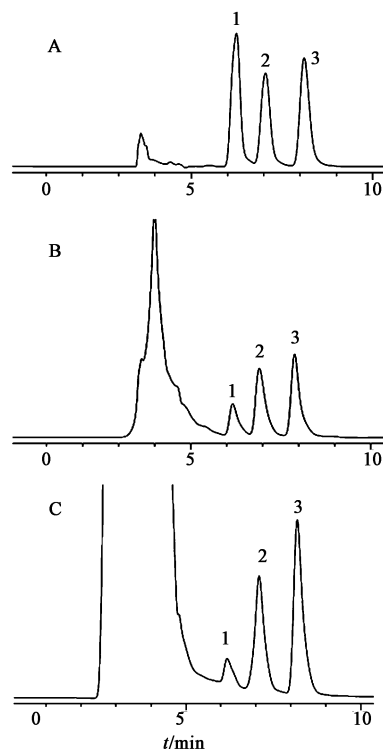
2.1.2 甲醇超声提取法 取新鲜槟榔样品,低温烘干粉碎,称取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加30 mL甲醇超声提取40 min,转移至量瓶中,0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

通过比较上述2种提取方式的效率,发现甲醇超声提取法较氨性乙醚提取法简单、快捷、分离度好。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、氢溴酸槟榔碱对照品1.14, 1.04, 1.00 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,混合均匀,即得混合对照品储备液。

2.3 色谱条件 Partisil 10 SCX 阳离子色谱柱(4.6 mm×250 mm, 10 μm),流动相乙腈-0.5%磷酸(5→

1 000,三乙胺试液调pH 3.8)(50:50),流速1 mL·min⁻¹,检测波长215 nm,柱温室温(25℃),进样量20 μL。见图1。



A. 对照品; B. 槟榔皮样品; C. 槟榔核样品;
1. 去甲基槟榔次碱; 2. 槟榔次碱; 3. 槟榔碱

图1 槟榔 HPLC

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密称取去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、氢溴酸槟榔碱对照品65, 76, 93 mg, 分别制成6份不同质量浓度的对照品溶液进样测定,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、槟榔碱的回归方程分别为 $Y = 40.782X + 236.38$ ($r = 0.9997$), $Y = 45.497X + 386.71$ ($r = 0.9995$), $Y = 44.45X + 249.37$ ($r = 0.9996$),表明去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、槟榔碱的质量浓度分别在3.25~65, 3.8~76, 4.65~93 mg·L⁻¹呈良好线性关系。

2.4.2 检测限与定量限 取混合对照品储备液,稀释到合适质量浓度,进样,分别测得去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、槟榔碱的检测限为0.057, 0.079, 0.131 mg·L⁻¹ (S/N = 3), 定量限分别为0.205, 0.243, 0.412 mg·L⁻¹ (S/N = 10)。

2.4.3 精密度试验 取混合对照品储备液,重复进样6次,测得去甲基槟榔次碱、槟榔次碱、槟榔碱峰面积的RSD分别为1.23%, 0.19%, 0.24%,表明仪

器精密密度良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批样品,按 2.1.2 项下制备 6 份供试品溶液,分别测定,测得去甲基槟榔次碱、槟榔次碱及槟榔碱含量的 RSD 分别为 3.29%, 2.10%, 2.50%, 表明本方法重复性良好。

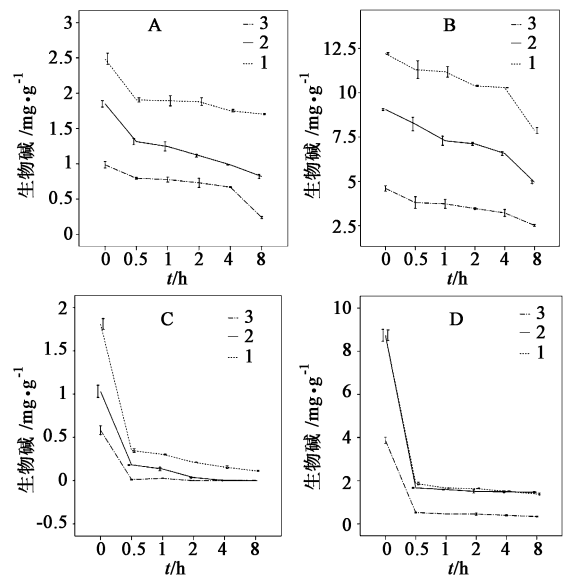
2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测得去甲基槟榔次碱、槟榔次碱及槟榔碱峰面积的 RSD 分别为 1.23%, 0.72%, 0.24%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4.6 加样回收试验 取已知含量的样品,精密称取 9 份,每份约 0.6 g, 3 份为一组,每组分别加入相当于样品中各成分含量 80%, 100%, 120% 的对照品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算去甲基槟榔次碱、槟榔次碱及槟榔碱的加样回收率,结果见表 1。说明该测定方法稳定可行。

表 1 槟榔中 3 种生物碱成分的加样回收率试验

组分	样品中含量		加入量		测得值		回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/mg	/mg	/mg			
去甲基槟榔次碱	0.516	0.45	0.956	97.79	100.15	0.20			
	0.516	0.54	1.072	102.92					
	0.516	0.63	1.145	99.75					
槟榔次碱	0.682	0.54	1.234	102.10	102.77	0.19			
	0.682	0.69	1.384	101.75					
	0.682	0.84	1.560	104.47					
槟榔碱	1.046	0.84	1.879	99.15	102.22	0.25			
	1.046	1.05	2.123	102.58					
	1.046	1.26	2.368	104.95					

2.5 不同处理工艺样品的测定 取同一批次的新鲜槟榔,核皮分离,常温减压真空干燥,分别在不同烘烤(100 ℃)时间和不同煮沸时间(0, 0.5, 1, 2, 4, 8 h)下对槟榔核、皮进行处理,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,一式 6 份,测定不同处理品中槟榔碱、槟榔次碱及去甲基槟榔次碱的含量。用统计软件 SPSS 17.0 进行差异显著性分析和线图分析,结果表明不同烘烤时间和不同煮沸时间条件下,槟榔皮、核中 3 种生物碱的含量变化存在显著性差异。见表 2, 图 2。



A. 皮烘烤; B. 核烘烤; C. 皮煮沸; D. 核煮沸;
1. 槟榔碱; 2. 槟榔次碱; 3. 去甲基槟榔次碱

图 2 不同烘烤和煮沸时间对槟榔中生物碱含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 2 不同烘烤和煮沸时间对槟榔中生物碱含量影响的差异显著性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	成分	烘烤和煮沸时间/h					
		0	0.5	1	2	4	8
烘烤	皮 A ¹⁾	2.486 ± 0.078c ²⁾	1.905 ± 0.029b	1.892 ± 0.068b	1.879 ± 0.052b	1.751 ± 0.018a	1.705 ± 0.007a
	B	1.850 ± 0.044f	1.314 ± 0.044e	1.245 ± 0.063d	1.116 ± 0.019c	0.986 ± 0.004b	0.820 ± 0.031a
	C	0.986 ± 0.042e	0.795 ± 0.012d	0.776 ± 0.034d	0.731 ± 0.063c	0.669 ± 0.006b	0.239 ± 0.015a
核	A	12.201 ± 0.056d	11.300 ± 0.479c	11.181 ± 0.287c	10.387 ± 0.028b	10.288 ± 0.011b	7.870 ± 0.159a
	B	9.052 ± 0.043e	8.228 ± 0.368d	7.290 ± 0.246c	7.113 ± 0.078c	6.574 ± 0.106b	4.954 ± 0.078a
	C	4.602 ± 0.141e	3.800 ± 0.316d	3.731 ± 0.242d	3.467 ± 0.045c	3.220 ± 0.184b	2.514 ± 0.053a
煎煮	皮 A	1.811 ± 0.059e	0.348 ± 0.021d	0.305 ± 0.004d	0.213 ± 0.002bc	0.156 ± 0.013ab	0.114 ± 0.005a
	B	1.033 ± 0.067e	0.183 ± 0.006d	0.135 ± 0.020c	0.037 ± 0.006b	0.003 ± 0.005ab	-
	C	0.583 ± 0.049c	0.014 ± 0.005ab	0.027 ± 0.001b	-	-	-
核	A	8.743 ± 0.239e	1.872 ± 0.059d	1.659 ± 0.015c	1.634 ± 0.016c	1.504 ± 0.020b	1.383 ± 0.040a
	B	8.740 ± 0.262c	1.664 ± 0.018b	1.591 ± 0.016ab	1.497 ± 0.070a	1.489 ± 0.040a	1.465 ± 0.023a
	C	3.867 ± 0.143d	0.522 ± 0.015c	0.460 ± 0.006bc	0.452 ± 0.046bc	0.393 ± 0.028ab	0.337 ± 0.013a

注:“-”表示未检出;¹⁾表示 A. 槟榔碱, B. 槟榔次碱, C. 去甲基槟榔次碱;²⁾表示标有不同字母的同列平均值在 5% 水平上呈显著差异(单因素方差分析 Duncan 分析法)。

3 讨论

根据相似相容原理,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,以提取效率和分离难易为主要标准。本实验考察了氨性乙醚和甲醇2种溶剂,发现甲醇超声提取法提取效率高、损失量小,HPLC杂质峰较少,同时由于槟榔碱性性质不稳定,可被碱水解,又易随水蒸气挥发^[9],故实验选用甲醇单独提取槟榔,将超声水浴温度控制<25℃,以确保提取过程中槟榔碱的稳定,加样回收试验表明本法可行,且操作简便、快捷,在确保药品成分稳定的同时,大大提高了提取效率。

目前有文献报道采用薄层扫描法^[10]、毛细管电泳法^[11]、高效液相色谱法^[12]测定槟榔药材中槟榔碱的含量,但尚无同时测定槟榔中槟榔碱、槟榔次碱和去甲基槟榔次碱含量的报道。槟榔碱、槟榔次碱和去甲基槟榔次碱是槟榔中3种主要的生物碱类成分,且均在215nm处有最大吸收峰。本试验使用DAD检测器采集紫外吸收信号,保证样品与对应的对照品成分有相同的紫外吸收,为样品成分的定性提供依据,另外利用DAD进行峰纯度的监测,进一步提高了方法的灵敏度。

本研究首次采用HPLC-DAD同时测定槟榔多种生物碱的含量,并应用于不同处理工艺后的样品,发现生物碱的含量随烘烤或者煎煮时间的延长而降低,100℃烘烤8h后生物碱的损失率约50%,而煮沸0.5h后损失率高达80%,说明煎煮比烘烤对槟榔皮、核中生物碱含量的影响要大得多。可能是由于生物碱在植物体内大多与鞣酸结合成盐,煮沸后更容易溶于水的缘故。但处理工艺对3种生物碱含量的影响严重程度无显著差别,可能是因为3种生物碱的性质比较接近,但槟榔碱的含量变化较另外2种生物碱小,此结论有待进一步考察。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:752.
- [2] 蒋次鹏. 南瓜子槟榔特效方治疗绦虫病的概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2000,6(6):64.
- [3] 梁自平,冯汉财,陈延. 达原饮治疗湿阻便秘经验略谈[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):227.
- [4] 张春江,吕飞杰,陶海腾. 槟榔活性成分及其功能作用的研究进展[J]. 中国食物与营养,2008,18(6):50.
- [5] Talon N T. Observations on betel-nut use, habituation, addiction and carcinogenesis in Papua New Guineans [J]. P N G Med J,1989,32(3):195.
- [6] Secretan B, Straif K, Baan R. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(11):1033.
- [7] Javed F, Al-Hezaimi K, Warnakulasuriya S. Areca-nut chewing habit is a significant risk factor for metabolic syndrome:a systematic review[J]. J Nutr Health Aging, 2012,16(5):445.
- [8] 赵振东,谢艳丽,牛成,等. 毛细管电泳法分析槟榔中槟榔碱和槟榔次碱[J]. 海南师范学院学报,2009,22(2):170.
- [9] 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.
- [10] 林励,徐鸿华,邓沛峰. 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.
- [11] 王瑞,梁生旺,卫军波,等. 高效毛细管电泳及其在中药成分分析中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(1):61.
- [12] 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(4):76.

[责任编辑 全燕]