

# 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 C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 柱温 35 °C, 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 C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column. The column temperature was set at 35.0 °C. 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

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, 其具有一定毒性<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2]</sup>、薄层色谱法<sup>[3]</sup>、毛细管电泳法<sup>[4]</sup>、分光光度法<sup>[5]</sup>、气相色谱-质谱联用仪<sup>[6]</sup>、阳离子交换色谱法<sup>[7-8]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[9-14]</sup>及高效液相色谱-质谱联用法<sup>[15-16]</sup>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, 以期为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 C<sub>18</sub> (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 °C, 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

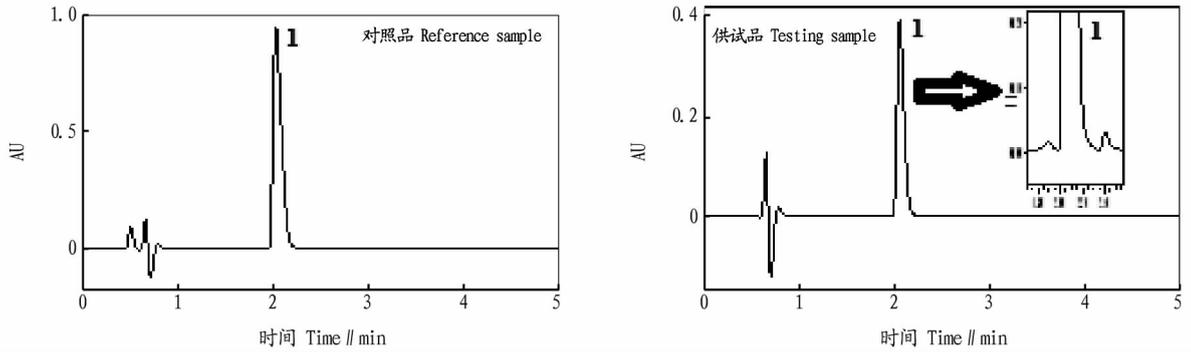
**2.1 线性关系考察** 使用梯度稀释方法配制 1/2、1/5、1/10、1/20、1/50 储备液浓度的校准溶液, 使用 UPLC 测定并制作工作曲线, 以槟榔碱峰面积与对应的浓度做线性回归, 得到线性回归方程 ( $Y = 1.65e + 007x + 1.52e + 005$ ), 相关系数 (0.999 8), 线性范围 0.013 ~ 0.663 mg/mL。由此可见, 该方法具有良好的线性关系, 满足样品的定量测定。此外, 对照品及供试品溶液的色谱图见图 1。

**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, 从事医药品、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  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$ ，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 C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )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<sup>[16-17]</sup>，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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

态空间憩时视觉感受“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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。

**3.3 园区周边果园园建设** 品种与移栽密度上,坡地单株栽植,枇杷按240~330株/hm<sup>2</sup>;核桃按360~400株/hm<sup>2</sup>;板栗按390~450株/hm<sup>2</sup>;石榴按420~480株/hm<sup>2</sup>;水蜜桃按570~690株/hm<sup>2</sup>;柿按750~840株/hm<sup>2</sup><sup>[6]</sup>。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大菌群微生物大量繁衍;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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>;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,汪志祥. 九华山生态园区工程建设设议[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。