

高效液相-阳离子交换色谱法测定藏药安神丸中 槟榔碱的含量

逯雯洁^{1*}, 林鹏程², 海平¹

(1. 青海省药品检验检测院, 青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810016;

2. 青海民族大学青海民族大学化学与生命科学学院, 西宁 810007)

摘要: **目的** 建立高效液相-阳离子交换色谱法测定藏药安神丸中槟榔碱含量的方法。**方法** 样品用乙醚溶液和碳酸盐缓冲液提取后, 用 Sepax Polysulfonix-SCX (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 强阳离子交换树脂色谱柱分离, 以乙腈-0.2%磷酸溶液(pH 3.8, 10:90, V:V)作为流动相进行洗脱, 0.5 mL/min 流速, 用紫外检测器于 215 nm 波长处进行测定。**结果** 氢溴酸槟榔碱在 7.028~210.840 μg/mL 范围内线性关系良好($r^2=0.9998$), 回归方程为 $Y=44.5058X-56.3314$, 加标回收率为 95.67%~97.41%, 相对标准偏差为 1.07%~1.80% ($n=3$)。**结论** 此方法具有良好的精密度、稳定性及回收率, 可用于安神丸中槟榔碱成分的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 安神丸; 槟榔碱

Determination of the arecoline content in Tibetan medicine Anshen pills by high performance liquid chromatography-cation exchange chromatography

LU Wen-Jie^{1*}, LIN Peng-Cheng², HAI Ping¹

(1. Qinghai Provincial Institute of Drug Control, Key Laboratory for the Study of the Modernization of Tibetan Medicine in Qinghai, Xining 810016, China; 2. College of Chemistry and Life Science, Qinghai University of Nationalities, Xining 810007, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of the arecoline content in Tibetan medicine Anshen pills by high performance liquid chromatography-cation exchange chromatography. **Methods** The samples were extracted with a mixture of ether solution and buffer bicarbonate, separated by Sepax Polysulfonix-SCX (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (pH3.8, 10:90, V:V) as mobile phase for elution, and detected by ultraviolet detector in 215 nm. **Results** Arecoline had good linearity in the range of 7.028~210.840 μg/mL ($Y=44.5058X-56.3314$, $r^2=0.9998$), the average recoveries ranged from 95.67%~97.41%, and the relative standard deviations was 1.07%~1.80% ($n=3$). **Conclusion** This method has good precision, stability and recovery rate, which is suitable for determination of arecoline quantity in Anshen pills.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; Anshen pills; arecoline

基金项目: 青海省科技厅项目(2012-N-523)、青海省科技厅科研基础条件平台项目(2017-ZJ-Y40)

Fund: Supported by Project of Qinghai Science and Technology Department (2012-N-523) and Basic Conditions Platform Project of Qinghai Science and Technology Department (2017-ZJ-Y40)

*通讯作者: 逯雯洁, 主管药师, 主要研究方向为中藏药品检验。E-mail: luwenjie608@hotmail.com

*Corresponding author: LU Wen-Jie, Pharmacist, Qinghai Provincial Institute of Drug Control, Xining 810016, China. E-mail: luwenjie608@hotmail.com

1 引言

安神丸是由槟榔、沉香、丁香、肉豆蔻、木香等 15 味药材制成的传统藏成药,具有安心养神、抑风的功效,多用于龙失调引起的气入命脉、神经官能症、神昏谵语、多梦、耳鸣、心悸颤抖、癫狂、哑结等症^[1]。动物实验表明,安神丸脂溶性提取物可改善较大龄鼠脂质代谢功能,提高其抗氧化能力^[2]。现行药品标准将其收载于《卫生部药品标准》藏药第一册。安神丸是具有区域特色、疗效显著和患者需要的藏成药品种,但是其质量标准不完善,产品质量难以控制。而藏药标准是国家药品发展水平的体现,是药品监管工作的技术依据,因此需要提高藏成药的质量标准,增加产品质量可控性。

槟榔是安神丸的君药,槟榔碱是从槟榔中提取的最主要的保健和药理活性成分^[3],槟榔碱的含量直接影响着槟榔果实的药用价值和营养品质^[4]。槟榔碱可用于临床炎症性疾病的治疗,并具有一定的特殊毒性^[5-7]。在心脑血管方面,槟榔碱与胆固醇有亲和力,可预防动脉粥样硬化^[3]。现在测定食品药品中槟榔碱的主要方法有溴甲酚绿吸光度法^[8]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9-18]、液相色谱质谱联用法^[18,19]、电位滴定法^[20]等。其中,高效液相色谱法专属性好、效能高,报道较多的是离子交换色谱法。本研究选择槟榔碱为控制本品质量的指标性成分,建立了高效液相-阳离子交换色谱法测定藏药安神丸中槟榔碱含量的分析方法,以为安神丸质量控制提供参考,确保安神丸产品的质量稳定性和疗效一致性。

2 材料与方 法

2.1 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent G1315D 检测器(美国 Agilent 公司); SepaxPolysulfonix-SCX(250 mm×4.6 mm, 5 μm)型强阳离子交换色谱柱(美国赛分公司); METTLER AB204-S 电子天平、METTLER TOLEDOXS 105DU 电子天平(瑞士 METTLER 公司); Milli-Q advantage A10 超纯水器(美国 Merck millipore 公司)。

2.2 材料与试剂

所用样品及药材均由青海金诃藏药药业股份有限公司提供,3 批样品的批号分别为 20120107、20120513、20120720。

氢溴酸槟榔碱对照品购自中国食品药品检定研究院,批号为(111684-200401)。

乙腈(HPLC 级,德国 Merck 公司);磷酸、氨水、乙醚、碳酸钠、碳酸氢钠(分析纯,四川西陇化工有限公司);实验用水均为超纯水。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

色谱条件:色谱柱: SepaxPolysulfonix-scx (250 mm×4.6 mm, 5 μm)强阳离子交换树脂色谱柱;流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(浓氨试液调节 pH 至 3.8)(10:90, V:V);流速:0.5 mL/min,检测波长为 215 nm,进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备

准确称取氢溴酸槟榔碱对照品 53.46 mg,用流动相溶液定容至 50 mL,配制成浓度为 0.7028 mg/mL 的对照品储备溶液。

精密吸取上述对照品储备溶液 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,配制成浓度为 0.0703 mg/mL 对照品工作溶液。

2.3.3 供试品溶液制备

(1)超声提取法

取适量样品研细,称取 1.5 g 样品粉末置于具塞锥形瓶中,加乙醚 50 mL,再加 3 mL 碳酸盐缓冲液(取碳酸钠 1.91 g 和碳酸氢钠 0.56 g,用超纯水定容至 100 mL),放置 30 min,时时振摇,于冰水浴中超声提取 30 min,分取乙醚提取液,加入盛有 1 mL 0.5%磷酸溶液的蒸发皿中,残渣依次加 30 mL 和 20 mL 乙醚超声提取 2 次,每次 5 min,将乙醚提取液转移至同一蒸发皿中,静置挥去乙醚,残渣用 50%乙腈溶液定容至 25 mL,过滤得滤液。

(2)加热回流提取法

取适量样品研细,称取 1.5 g 样品粉末置于具塞锥形瓶中,加乙醚 50 mL,再加 3 mL 碳酸盐缓冲液(取碳酸钠 1.91 g 和碳酸氢钠 0.56 g,用超纯水定容至 100 mL),放置 30 min,时时振摇,加热回流 30 min,分取乙醚提取液,加入盛有 1 mL 0.5%磷酸溶液的蒸发皿中,残渣依次加 30 mL 和 20 mL 乙醚加热回流 2 次,每次 15 min,将乙醚提取液转移至同一蒸发皿中,静置挥去乙醚,残渣用 50%乙腈溶液定容至 25 mL,过滤得滤液。

比较上述 2 种方法的提取率,选择提取率高且简便的方法进行后续实验。

2.3.4 供试品提取时间的优化

用 2.3.3 中的超声提取法,分别提取 20、30、40 min,比较不同提取时间内槟榔碱的提取率。

2.3.5 阴性样品溶液的制备及测定

按照《卫生部药品标准》藏药第一册收载的本品处方和制备工艺,依据组方比例称取除槟榔药材外的其余 14 味药材,制成不含槟榔的阴性样品,按 2.3.3 中的方法制得阴性样品溶液,用高效液相-阳离子交换色谱法对其进行测定。

3 结果与分析

3.1 供试品溶液的制备方法比较

用超声提取法制备供试品溶液时,溶液中氢溴酸槟

榔碱的含量为 (0.87 ± 0.015) mg/g ($n=6$, mean \pm sd), 其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.70%; 用加热回流提取法制备供试品溶液时, 溶液中的氢溴酸槟榔碱的含量仅为 (0.74 ± 0.026) mg/g ($n=6$, mean \pm sd), 其 RSD 达到 3.58%, 因此超声提取法的提取率高, 且相对标准偏差较低, 所以后续实验选用超声提取法。

3.2 提取时间的考察

运用超声提取法, 分别对样品提取 20、30、40 min, 不同提取时间内氢溴酸槟榔碱的含量测定结果见图 1。结果表明, 提取时间达到 30 min 后, 溶液中的槟榔碱含量迅速升高, 而提取 40 min 后, 槟榔碱含量并没有明显变化, 所以最优的提取时间为 30 min。

3.3 阴性对照溶液的测定

由图 2 可以看出, 阴性样品色谱在对应保留时间处未

见相应检测成分的色谱峰, 说明应用高效液相色谱法时, 样品中其他成分对氢溴酸槟榔碱的测定无干扰。

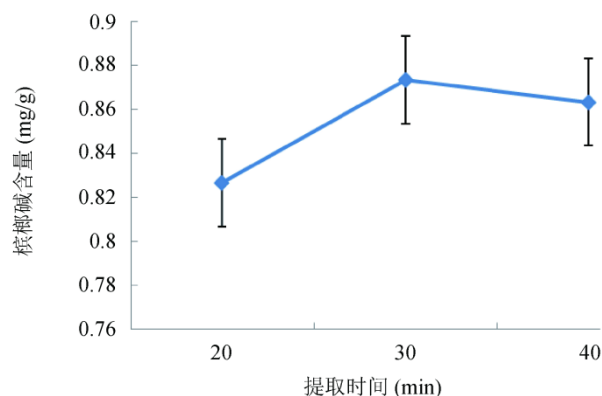
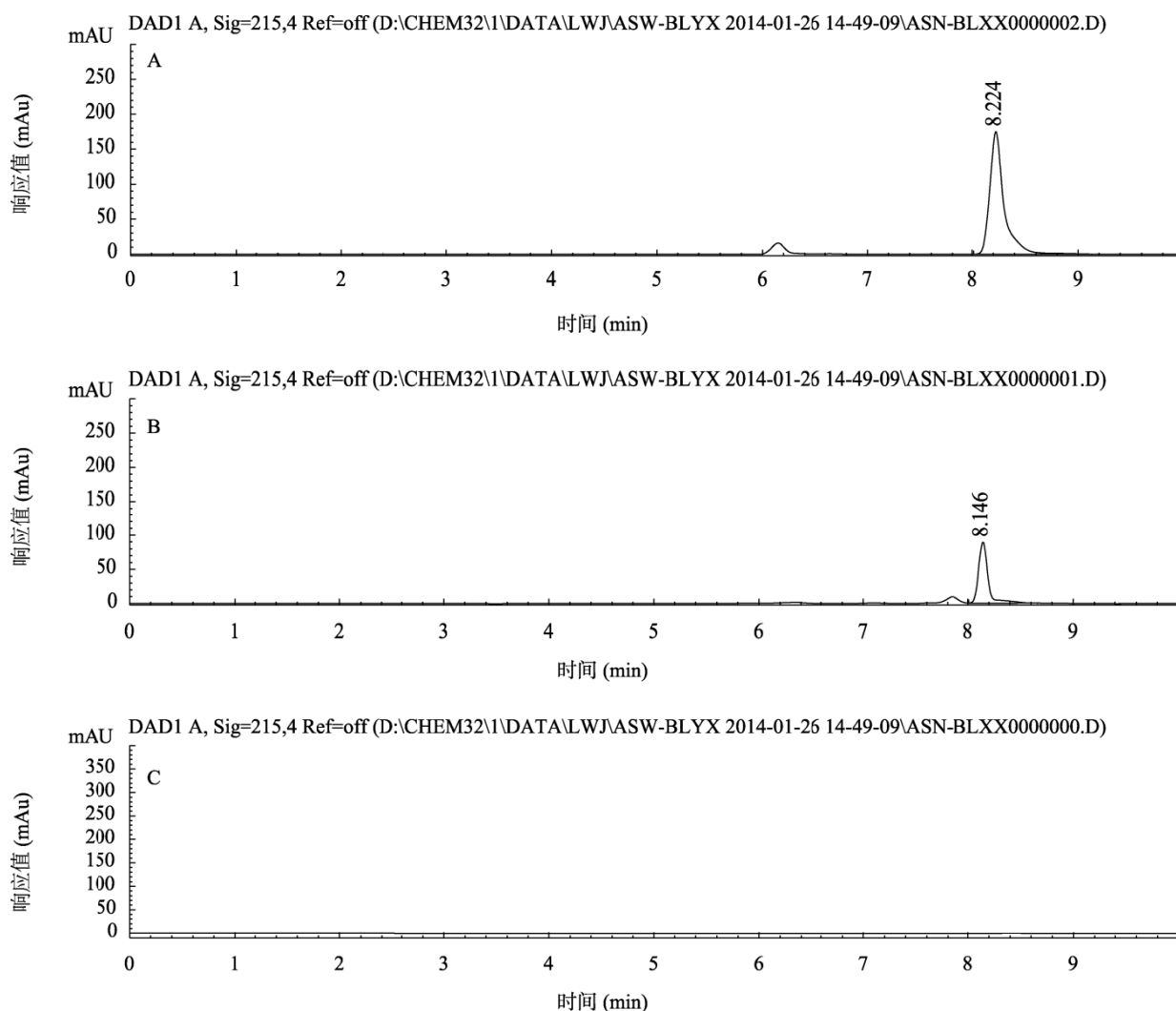


图 1 不同提取时间内氢溴酸槟榔碱含量($n=6$)
Fig. 1 Content of arecoline hydrobromide in different extraction time($n=6$)



注: A: 氢溴酸槟榔碱对照品; B: 安神丸样品; C: 阴性样品。

图 2 氢溴酸槟榔碱标准品、安神丸样品及阴性样品的高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of arecoline hydrobromide standards, Anshen pills and negative samples

3.4 线性关系考察

分别精密吸取 2.3.2 中的对照品储备溶液 0.1、0.2、0.5、0.7、1、3 mL 用流动相溶液溶解并定容至 10 mL, 分别取样 10 μ L 按上述条件测定, 以氢溴酸槟榔碱峰面积为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线, 见图 3。结果显示, 氢溴酸槟榔碱在 7.028~210.840 μ g/mL 范围内线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=44.5058X-56.3314$, $r^2=0.9998$ 。

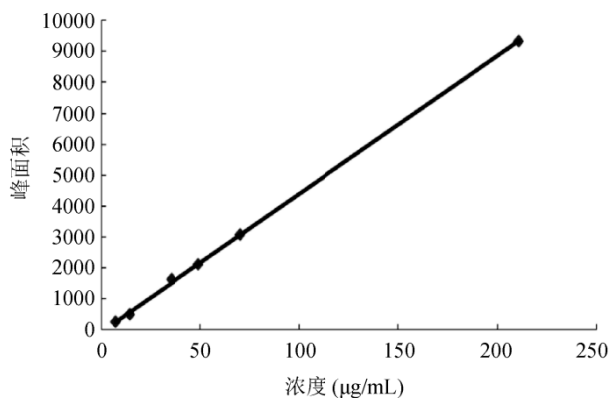


图3 对照品峰面积与浓度线性关系图

Fig. 3 Linear relationship between peak area and concentration of reference material

3.5 稳定性实验

取 10 μ L 供试品溶液(批号 20120107)分别在 0、2、4、8、12 h 按 2.3.1 中方法进行测定, 以峰面积计算 RSD 为 0.55%, 说明氢溴酸槟榔碱供试品溶液在 12 h 内较稳定。

3.6 回收率和精密度

分别在已知含量的安神丸样品(批号 20120107, 槟榔碱含量为 0.8896 mg/g)中, 添加 0.5622、0.7028、0.8434 mg/mL 3 个浓度水平的氢溴酸槟榔碱对照品进行加标回收率测定, 每个添加水平进行 3 次平行实验。按用超声提取法对样品进行预处理, 并用 2.3.1 中的方法进行测定, 计算平均回收率及 RSD, 结果见表 1, 测定结果的相对标准偏差在 1.07%~1.80%, 平均回收率为 95.67%~97.41%, 表明该方法具有较高的准确度和良好的重现性, 满足日常检测要求。

表 1 加标回收率实验结果($n=3$)

Table 1 Results of the standard recovery experiment($n=3$)

加入量(mg/g)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.5622	95.92	1.07
0.7028	97.41	1.80
0.8434	95.67	1.46

3.7 样品测定

取 3 批安神丸样品, 按样品 2.2.3 中超声提取法制备, 按 2.3.1 中的色谱条件测定, 外标法计算安神丸样品中含量, 平均值(0.87 ± 0.015) mg/g (mean \pm sd), RSD 为 1.05%。

4 结论

本研究建立了高效液相-阳离子交换色谱法测定藏成药安神丸处方中氢溴酸槟榔碱含量的分析方法并优化了槟榔碱的提取条件。此方法在有良好的精密度、稳定性、回收率, 适合安神丸中槟榔碱的测定, 为藏成药品种安神丸的质量标准制定提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部标准(藏药第一册) [S].
The pharmacopoeia committee of the health department of the people's republic of China. The standard of drugs by the health department of china (volum 1 of Tibetan medicine) [S].
- [2] 杨生妹, 杜玉枝, 索有瑞, 等. 藏成药安神丸脂溶性提取物对大鼠脂质代谢及抗氧化功能的影响[J]. 中草药, 2003, 34(9): 833-834.
Yang SM, Du YZ, Suo YR, et al. Effect of lipid extract of Nerves-Soothing pill on lipid metabolism and antioxidation function in rats [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2003, 34(9): 833-834.
- [3] 蒋志, 陈其城, 曹立幸, 等. 槟榔及其活性物质的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1684-1687.
Jiang Z, Chen QC, Cao LX, et al. Advance in studies on areca nuts and their active substances [J]. Chin J Chin Mater Med, 2013, 38(11): 1684-1687.
- [4] 张彪, 李喜宏, 张文涛, 等. 槟榔不同温度储藏特性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(2): 206-209.
Zhang B, Li XH, Zhang WT, et al. Storage characteristics of betel nut at different temperatures [J]. Food Res Dev, 2017, 38(2): 206-209.
- [5] 温剑, 张亚宁. 中药槟榔加工使用与毒副作用研究. 中国现代中药, 2014, 16(7): 604-607.
Wen J, Zhang YN. Traditional Chinese medicine arecae semen processing and side effects study [J]. Mod Chin Med, 2014, 16(7): 604-607.
- [6] 黄龙, 翦新春. 槟榔致癌物质与口腔癌[J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41(1): 102-107.
Huang L, Jian XC. Areca nut-related carcinogens and oral cancer [J]. Int J Stomatol, 2014, 41(1): 102-107.
- [7] Amudhan MS, Begum VH, Hebbar KB. A review on phytochemical and pharmacological potential of *Areca catechu* L. seed [J]. Int J Pharm Sci Res, 2012, 14(1): 4151-4157.
- [8] 高敏. 光度法测定槟榔中槟榔碱的含量[J]. 化学分析计量, 2003, 1(1): 28-30.
Gao M. Determination of arecoline in areca by photometry [J]. Chem Anal Met, 2003, 1(1): 28-30.
- [9] 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.
Cheng HA, Lai YH, Wang XY, et al. Determination of Arecoline in Areca

- nut by high performance liquid chromatography-cation exchange chromatography [J]. *Chin Med Mat*, 2002, 25(1): 27-28.
- [10] Cox S, Irina Piatkov I, ViekersER, *et al.* High performance liquid chromatographic determination of arecoline in human saliva [J]. *J Chromatogr A*, 2004, (1032): 93-95.
- [11] 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, 5(28):459-460.
Yang C, Su SZ, Xu XY, *et al.* Determination of arecoline hydrobromide in Weitong granules by RP-HPLC [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2003, 5(28): 459-460.
- [12] 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, 1(25): 27-28.
Chen HA, Lai YH, Wang XY, *et al.* Determination of arecoline hydrobromide in areca by high performance liquid chromatography-cation exchange chromatography [J]. *Chin Med Mat*, 2002, 1(25): 27-28.
- [13] 丁野, 姚蓉, 龙海燕, 等. 槟榔药材高效液相色谱指纹图谱研究[J]. *中国药业*, 2011, 20(19): 22-23.
Ding Y, Yao R, Long HY, *et al.* Study on HPLC fingerprints of areca semen [J]. *Chin Pharm*, 2011, 20(19): 22-23.
- [14] 徐常本. 槟榔传统切制与产地趁鲜切制槟榔碱含量的比较研究[J]. *中药材*, 2016, 39(4): 764-766.
Xu CB. Comparative study of arecoline contents of *Areca catechu* seeds by traditional slice method and fresh-cut method [J]. *Chin Med Mat*, 2016, 39(4): 764-766.
- [15] 贾哲, 韩婷, 刘欢, 等. 基于多元统计分析的食用槟榔及药用槟榔主要化学成分的含量对比研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(11): 5158-5161.
Jia Z, Han T, Liu H, *et al.* Comparative analysis of the determination of principal chemical components in edible betel nut and semen areca based on multivariate statistical analysis [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(11): 5158-5161.
- [16] 周文菊, 骆骄阳, 刘洪美, 等. 槟榔在不同储藏条件下的药效组分变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 56-64.
Zhou WJ, Luo JY, Liu HM, *et al.* Change of pharmacological components of areca semen under different storage conditions [J]. *Chin J ExpTradit Med Form*, 2017, 23(19): 56-64.
- [17] 何晓燕, 刘玉杰, 吴纯洁, 等. 槟榔炒制过程中不同炮制品的指纹图谱分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(17): 44-46.
He XY, Liu YJ, Wu CJ, *et al.* Fingerprint analysis of different processed products of areca semen in frying process [J]. *Chin J ExpTradit Med Form*, 2013, 19(17): 44-46.
- [18] 李凯悦, 王伟英, 严新宇, 等. 美拉德反应对槟榔炮制过程中槟榔碱转化的影响[J]. *华西药理学杂志*, 2017, 32(2): 150-153.
Li KY, Wang WY, Yan XY, *et al.* Impact of Maillard reaction on the arecoline transformation during areca semen parching process [J]. *West China J Pharm Sci*, 2017, 32(2): 150-153.
- [19] 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.
Chen Y, Yan XN. Study on limit test method of arecoline in Huoxiangzhengqi soft capsule [J]. *Tianjin Pharm*, 2017, 29(5): 21-23.
- [20] 陈雄, 方宣启, 胡勇辉, 等. 电位滴定法测定槟榔中游离碱度的不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(2): 521-524.
Chen X, Fang XQ, Hu YH, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of free alkalinity in edible betelnut by potentiometric titration [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(2): 521-524.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



逯雯洁, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为中藏药品检验。

E-mail: luwenjie608@hotmail.com