**Phân tích các alcaloid trong các sản phẩm có chứa hạt Areca bằng phương pháp sắc ký lỏng-Tandem khối phổ**

## **Trừu tượng**

Nhai hạt cau dưới các hình thức khác nhau, chẳng hạn như trầu cau hoặc pan masala và gutkha được sản xuất thương mại, là cách làm phổ biến ở tiểu lục địa Ấn Độ và nhiều vùng của châu Á, và có liên quan đến nhiều kết quả tiêu cực về sức khỏe, đặc biệt là ung thư miệng và thực quản . Các alcaloid đặc hiệu của hạt Areca arecoline, arecaidine, guvacoline và guvacine có liên quan đến cả trách nhiệm lạm dụng và khả năng gây ung thư của hạt areca. Do đó, sự thay đổi về mức độ của các alcaloid areca có thể có khả năng đóng góp vào sự thay đổi trong khả năng gây nghiện và gây ung thư trên các sản phẩm có chứa hạt areca. Ở đây, chúng tôi đã phát triển phương pháp sắc ký lỏng khối sắc ký chính xác và mạnh mẽ (LC-MS / MS) để định lượng đồng thời cả bốn ancaloit areca và áp dụng phương pháp này để phân tích một loạt các sản phẩm thu được từ Ấn Độ, Trung Quốc, và Hoa Kỳ. Kết quả phân tích cho thấy sự thay đổi đáng kể về mức độ của các alcaloid trên các sản phẩm được thử nghiệm, với guvacine là phổ biến nhất (1,39-8,16 mg / g), tiếp theo là arecoline (0,64-2,22 mg / g), arecaidine (0,14-1,70 mg / g) và guvacoline (0,17-0,99 mg / g). Sự khác biệt đáng kể về sự đóng góp tương đối của các alcaloid riêng lẻ vào tổng hàm lượng alkaloid cũng được quan sát thấy giữa các sản phẩm khác nhau. Kết quả của chúng tôi nhấn mạnh sự cần thiết phải giám sát có hệ thống mức độ cấu thành trong các sản phẩm chứa hạt cau và hiểu rõ hơn về mối quan hệ giữa hồ sơ hóa học và tiềm năng gây hại của các sản phẩm này.

## **GIỚI THIỆU**

Tiêu thụ hạt areca, hạt của cây Arech catechu , rất phổ biến ở Ấn Độ, Bangladesh, Malaysia, một số vùng của Trung Quốc và một số quốc gia khác thuộc tiểu lục địa Ấn Độ, châu Á và Thái Bình Dương, với hơn 600 triệu người dùng trên toàn cầu. Phổ các hậu quả về sức khỏe liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm có chứa hạt areca, bao gồm nghiện và một loạt các tác dụng gây ung thư và độc hại, rất giống với các kết quả liên quan đến việc sử dụng thuốc lá không khói. Những ảnh hưởng bất lợi đáng chú ý nhất là các tổn thương miệng tiền ung thư (đặc biệt là xơ hóa dưới niêm mạc) cũng như ung thư miệng và thực quản. Dựa trên các bằng chứng từ các nghiên cứu dịch tễ học, động vật và cơ học, Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế đã phân loại hạt cau là chất gây ung thư ở người.

Mục tiêu của chúng tôi là phát triển phương pháp sắc ký lỏng (LC-MS / MS) mạnh mẽ và chính xác để phân tích đồng thời arecoline, arecaidine, guvacine và guvacoline và áp dụng phương pháp đã phát triển vào một loạt các sản phẩm theo thứ tự để cung cấp những hiểu biết ban đầu về sự thay đổi tiềm năng của các mức độ alkaloid trên các công thức khác nhau.

## **NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

### **Thận trọng**

Areca alkaloids độc hại và có khả năng gây ung thư và gây đột biến, và cần được xử lý hết sức cẩn thận, sử dụng quần áo bảo hộ và thông gió thích hợp mọi lúc.

### **Hóa chất**

Arecaidine hydrobromide, arecoline hydrobromide, guvacine hydrochloride, guvacoline hydrobromide, arecaidine-D 5 hydrobromide và arecoline-D 5 hydrobromide được mua từ Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada). Tất cả các hóa chất và dung môi khác được mua từ Công ty Hóa chất Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) hoặc Fisher Khoa học (Fairlawn, NJ). Tất cả các dung dịch nước được chuẩn bị với nước tinh khiết trên hệ thống Millipore 0,22 μm (Billerica, MA).

### **Mẫu sản phẩm**

Các sản phẩm được mua để phân tích các alcaloid đặc hiệu của areca bao gồm nhiều loại hạt areca và các sản phẩm chứa hạt cau được sản xuất khác nhau được mua từ các thị trường địa phương ở Ấn Độ, Trung Quốc và Hoa Kỳ. Chín loại hạt areca nguyên chất, giảm một nửa, nghiền nát, xắt nhỏ và cắt lát (được bán với số lượng lớn để sử dụng trong các chế phẩm tùy chỉnh và cho các dịch vụ truyền thống) đã được mua từ các thị trường địa phương ở Mumbai, Ấn Độ. Sản xuất pan masala và gutkha được lấy từ hai địa điểm: Pan Parag, Pan Bahar, Rajnigandha, Rajshree, RMD và Vimal được lấy từ Indore, Madhya Pradesh, Ấn Độ và Pan Parag gutkha và Tulsi được mua tại một cửa hàng dân tộc ở Minneapolis, MN. Các mẫu sản phẩm hạt cau được sản xuất thương mại của Trung Quốc đã được lấy tại ba cửa hàng bán lẻ ở một khu vực thuộc thành phố Trường Sa, tỉnh Hồ Nam, Trung Quốc.

### **Độ ẩm và độ pH**

Việc đo độ ẩm và pH được thực hiện bằng phương pháp được báo cáo trước đó.  Độ ẩm được xác định bằng trọng lượng, thông qua sự khác biệt về trọng lượng của mẫu hạt areca trước và sau khi sấy trong 3 giờ trong một khối gia nhiệt đặt ở 99 ° C. Để đo pH, ~ 200 mg mẫu đất được trộn với 5 ml HPLC loại H 2 O, được chiết xuất ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và ly tâm thành các hạt hạt areca. Độ pH của dịch chiết nước được đo bằng máy đo pH.

### **Chuẩn bị mẫu**

Các mẫu được nghiền thành bột mịn bằng máy xay cà phê nhỏ (Krups F203) và 400 mg bột được chiết với 2 mL nước khử ion ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ với rung liên tục trong 10 phút. Các hạt areca được chia thành từng phần bằng cách ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng / phút trong 5 phút và phần nổi phía trên được chuyển sang lọ mới được dán nhãn trước. Các mẫu để phân tích LC-MS / MS đã được chuẩn bị bằng cách thêm 50 ng mỗi tiêu chuẩn nội bộ arecaidine-D 5 và arecoline-D 5 vào 10 μL chiết xuất hạt areca và pha loãng thành 1000 μL với axit trifluoroacetic (TFA) 1%.

### **Đặc tính phương pháp**

Các đặc điểm của phương pháp phát triển đã được thiết lập bằng cách sử dụng các dung dịch chuẩn của các alcaloid areca nut. Arecaidine-D 5 và arecoline-D 5 đã được sử dụng làm tiêu chuẩn nội bộ để giải thích cho sự thay đổi trong các phản ứng của thiết bị. Do không có đồng vị có nhãn guvacine và guvacoline, arecaidine-D 5 đã được sử dụng làm chất chuẩn nội cho guvacine và arecoline-D 5 cho guvacoline. Độ chính xác của phương pháp đã được kiểm tra bằng cách tiêm các nồng độ alkaloids khác nhau đã biết trong khoảng 0,1 đến 500 pg / μL và tính lại nồng độ bằng cách sử dụng tỷ lệ diện tích cực đại của chất phân tích cho chuẩn nội và đường cong hiệu chuẩn bên ngoài. Độ chính xác phần trăm trung bình sau đó được xác định bằng cách chia nồng độ tính toán và nồng độ đã biết. Độ chính xác của phương pháp cho mỗi chất phân tích được xác định bằng cách tiêm chúng ở giới hạn định lượng (LOQ) của chúng trong ba lần và xác định hệ số biến thiên của ba phép đo. LOQ được thiết lập là mức thấp nhất của mỗi alkaloid tạo ra hệ số biến đổi nhỏ hơn 15% trong khi mức thấp nhất tạo ra tín hiệu riêng biệt nhưng lớn hơn 15% CV được đặt làm giới hạn phát hiện (LOD).

### **Phân tích thống kê**

Các số liệu thống kê tiêu chuẩn như phương tiện, độ lệch chuẩn và thử nghiệm t được ghép nối (để so sánh mức độ kiềm giữa nước bọt và dịch chiết nước) được tính toán bằng Sigma Plot v.12.5 (Phần mềm Systat).

## **Kết quả và thảo luận**

Trong khi một số phương pháp đã được sử dụng trước đây để phân tích các alcaloid areca nut, bao gồm sắc ký lỏng hoặc điện di vùng mao mạch với phát hiện UV,  LC-MS, LC-MS / MS,  và GC-MS.  Hầu hết các phương pháp này cung cấp độ chọn lọc chất phân tích không đầy đủ để phân tích chiết xuất phức tạp của các sản phẩm hạt cau, trong khi phương pháp LC-MS / MS được báo cáo trước đây đã được sử dụng để chỉ phân tích arecoline và arecaidine, nhưng không phải là các alcaloid areca khác. Tính mới của LC-MS / MS được phát triển của chúng tôi bao gồm khả năng phân tích cả bốn ancaloit trong một lần chạy với độ chọn lọc và độ nhạy cao.

Trước khi áp dụng phương pháp đã phát triển để phân tích các sản phẩm khác nhau, chúng tôi đã tối ưu hóa quy trình trích xuất để đạt được hiệu quả tối đa. Điều này là cần thiết chủ yếu do sự thay đổi kích thước của các hạt areca trong các sản phẩm này, dẫn đến hiệu quả chiết xuất không nhất quán trên các mẫu. Do đó, các mẫu được nghiền thành bột mịn để mang lại sự đồng đều hơn trong quy trình chiết xuất. Ảnh hưởng của thời gian chiết và nhiệt độ cũng được nghiên cứu bằng cách sử dụng các loại sản phẩm khác nhau. Quy trình tối ưu (1 giờ ủ ở nhiệt độ phòng) đã được chọn để chiết xuất alkaloid vì thời gian ủ dài hơn và nhiệt độ cao hơn không tạo ra sự thay đổi đáng kể trong sản lượng alkaloid.

Một yếu tố tiềm năng khác của người tiêu dùng có thể ảnh hưởng đến phơi nhiễm với các thành phần hạt cau là việc sử dụng đồng thời các sản phẩm có chứa hạt cau với các sản phẩm khác, như thuốc lá. Ví dụ, trong khi pan masala được chuẩn bị mà không cần thêm thuốc lá, các gói thuốc lá cùng nhãn hiệu thường được sản xuất và bán để trộn với pan masala trước khi người tiêu dùng sử dụng.  Chúng tôi đã phân tích ba mẫu pan masala với các gói thuốc lá có sẵn của cùng một thương hiệu: Rajshree, RMD và Vimal. Khi được biểu thị trên mỗi gram pan masala , mức độ của các alcaloid được chiết xuất có hoặc không có thêm thuốc lá là tương tự nhau. Sự thiếu tác dụng của thuốc lá đối với mức độ chiết xuất của areca alkaloids phù hợp với mức độ rất giống nhau của cả bốn loại ancaloit giữa pan masala Pan Parag và gutkha của cùng một thương hiệu. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng bản thân thuốc lá là một nguồn chất gây ung thư phong phú, bao gồm cả chất gây ung thư đường uống và thực quản đặc hiệu thuốc lá N ′ -nitrosonornicotine. Do đó, việc bổ sung thuốc lá vào các công thức có chứa hạt areca làm tăng tổng phơi nhiễm gây ung thư ở người dùng.

### **Tóm lược**

Một lượng lớn các sản phẩm có chứa các loại hạt cau khác nhau và các thành phần khác đang được bán và tiêu thụ bởi hàng trăm triệu người dùng trên toàn thế giới. Areca alkaloids guvacine, arecaidine, guvacoline và arecaline có liên quan đến việc gây nghiện các sản phẩm đó, cũng như các kết quả bất lợi liên quan đến sức khỏe khi sử dụng.  Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một phương pháp mạnh mẽ và chính xác để phân tích các thành phần quan trọng này và lần đầu tiên đặc trưng mức độ của chúng trong nhiều loại sản phẩm và công thức thu được từ Ấn Độ, Trung Quốc và Hoa Kỳ. Mặc dù số lượng mẫu được phân tích hạn chế ở đây, nghiên cứu này thể hiện bước quan trọng đầu tiên hướng tới đặc tính đa dạng hóa học và khả năng gây ung thư và gây ung thư của các sản phẩm chứa hạt cau khác nhau. Với các kết quả sức khỏe bất lợi liên quan đến việc sử dụng hạt cau và số lượng người dùng cao trên toàn thế giới, có một nhu cầu cấp thiết để mở rộng các nghiên cứu như vậy. Công việc trong tương lai cũng nên kết hợp các biện pháp dựa trên dấu ấn sinh học của việc tiếp xúc và tác dụng của thành phần hạt cau.