

Determination of Lupenone Extract

Zhen Mou, Yuanmin Wang, Hongmei Wu, Xiangpei Wang*

Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang Guizhou
Email: *wxp0123@126.com

Received: Oct. 30th, 2016; accepted: Nov. 14th, 2016; published: Nov. 17th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: In order to provide the foundation for the development of lupenone used as a new anti-diabetic drug, we determined the content and purity of lupenone extract from *Rhizoma Musae*. **Methods:** Methanol-acetonitrile = 1:1 (V:V) single pump as the mobile phase, column temperature 25°C, the wavelength of 206 nm, flow rate 1 mL/min, Diamonsi-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). **Results:** Three batches of lupenone extract isolated in lupenone contents were 98.27%, 97.40%, 99.29%. **Conclusion:** The method is simple, convenient, fast and can be used for the determination and quality control and lupenone extract. At the same time, the purity of three batches of lupenone extract were more than 97%, so lupenone can be developed into a new anti-diabetic drug.

Keywords

Rhizoma Musae, Lupenone, HPLC, Determination

羽扇豆酮提取物的含量测定

牟 珍, 王远敏, 吴红梅, 王祥培*

贵阳中医学院, 贵州 贵阳
Email: *wxp0123@126.com

收稿日期: 2016年10月30日; 录用日期: 2016年11月14日; 发布日期: 2016年11月17日

*通讯作者。

文章引用: 牟珍, 王远敏, 吴红梅, 王祥培. 羽扇豆酮提取物的含量测定[J]. 药物资讯, 2016, 5(4): 67-72.
<http://dx.doi.org/10.12677/pi.2016.54012>

摘要

目的：测定从芭蕉根中分离的羽扇豆酮提取物的含量，鉴定其纯度，为羽扇豆酮提取物抗糖尿病新药的开发奠定基础。方法：以甲醇-乙腈 = 1:1 (V:V) 单泵作为流动相，柱温 25℃，波长 206 nm，流速 1 mL/min，Diamonsi-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。结果：分离得到的三批羽扇豆酮提取物中羽扇豆酮的含量分别为 98.27%、97.40%、99.29%。结论：该方法简单、方便、快速，可以用于羽扇豆酮提取物的含量测定及质量控制，同时三批羽扇豆酮提取物的纯度均达到 97% 以上，可以用于羽扇豆酮抗糖尿病新药的开发研究。

关键词

芭蕉根，羽扇豆酮，高效液相色谱，含量测定

1. 引言

芭蕉根为芭蕉科植物芭蕉(*Musa basjoo* Sied.et Zucc.)的干燥根茎，为贵州省的民族习用药材[1] [2]。文献报道[3] [4] [5]，芭蕉根含有羽扇豆酮。现代研究表明[6] [7] [8]羽扇豆酮具有抑制 α -葡萄糖苷酶(α -Glu)、乙酰胆碱脂酶(AchE)及蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B)活性与抗氧化作用。课题组徐锋等[3]研究发现羽扇豆酮提取物具有较为明显降血糖及降糖化血红蛋白的药效作用，但羽扇豆酮提取物还未建立科学可靠的含量测定方法，难以对其进行质量控制，也缺乏其纯度的评价，不利于羽扇豆酮提取物抗糖尿病新药的开发研究。因此，本实验从芭蕉根中分离出三批羽扇豆酮提取物样品，采用高效液相色谱法(HPLC)对其羽扇豆酮的含量进行测定，以期为羽扇豆酮提取物抗糖尿病新药研究及其质量控制提供基础。

2. 实验材料与仪器

2.1. 实验材料

羽扇豆酮提取物样品是由贵阳中医学院生药实验室从芭蕉根药材中提取得到，共 3 批，第一批分离的时间为 2014 年 6 月，第二批分离的时间为 2014 年 11 月，第三批分离的时间为 2015 年 4 月，试验分别均匀取每批样品 3 份，共 9 份样品，见表 2。

2.2. 仪器

日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(HPLC) (HPD-M20A 紫外可见检测器, LC solution 色谱工作站); AUY220 分析天平(日本岛津); HS-10260T 超声波清洗机(天津市恒奥科技发展有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司); Diamonsil-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

2.3. 试剂

试剂：甲醇、乙腈为色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司生产；娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)，其余所用试剂均为分析纯。

对照品：羽扇豆酮对照品为贵阳中医学院生药实验室提取分离而得，纯度 $\geq 98\%$ (面积归一化法得到)。

3. 实验方法与结果

3.1. 色谱条件的选择

3.1.1. 试验波长的选择

徐峰等[3]用 RP-HPLC 法测定了芭蕉根内的羽扇豆酮含量, 作者通过对羽扇豆酮对照品进行全波段紫外扫描, 结果发现羽扇豆酮在 210 nm 左右吸收较强, 且分别比较 206 nm、210 nm、290 nm 等波长下芭蕉根中羽扇豆酮的理论塔板数及其峰面积, 结果证明在波长 206 nm 处羽扇豆酮的理论塔板及峰面积达到最优, 且基线也平稳, 故本试验选择 206 nm 为测定其含量的波长。

3.1.2. 试验温度的选择

试验考察了 25℃、30℃ 两个温度, 结果发现羽扇豆酮样品在 25℃ 时可以达到较好的分离, 且理论塔板数最高, 故试验以 25℃ 作为样品含测的温度。

3.1.3. 试验流速的选择

试验分别考察了 0.8 mL/min、1 mL/min 的流速, 结果表明试验流速在 1 mL/min 时分离效果好, 分析时间短, 故以 1 mL/min 的流速进行试验。

3.1.4. 流动相的选择

流动相考察了甲醇:乙腈 = 1:1 (v:v) 单泵和双泵的分流效果, 结果以甲醇:乙腈 = 1:1 (v:v) 单泵的基线稳定。

3.1.5. 色谱条件的确定

通过上述色谱条件的优选, 最终确定的色谱条件为: Diamonsil-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为: 甲醇:乙腈(1:1)单泵, 流速 1 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长: 206 nm。

3.2. 系统适应性试验

3.2.1. 对照品的制备

取羽扇豆酮对照品约 10 mg, 精密称定, 加甲醇配制成每 1 mL 含 464.00 μg 的对照品溶液。

3.2.2. 样品溶液的制备

取分离得到的 3 批羽扇豆酮提取物样品约 10 mg, 每批样品均匀取三份样, 精密称定, 置于 25 mL 容量瓶内, 加甲醇适量, 超声溶解, 加甲醇至刻度, 摇均, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

3.2.3. 空白溶液的制备

以甲醇溶液作为空白试剂。

3.2.4. 实验测定方法

分别精密吸取对照品溶液 10 μL、样品溶液 10 μL、空白溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 在上述拟定的色谱条件下进样分析, 羽扇豆酮的理论塔板数不低于 2500。结果见图 1。

3.2.5. 线性关系的考察

取不同浓度的羽扇豆酮对照品(139.2、278.4、417.6、559.8、696.0、839.2 μg/mL), 按“3.1.5”项下的实验条件进样检测, 记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(μg/mL)为横坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线的回归方程为 $y = 3393.9x - 55776$, $R^2 = 0.9986$ 。结果表明, 羽扇豆酮进样量在 139.2 μg/mL~839.2 μg/mL 之间与峰面积呈良好的线性关系。

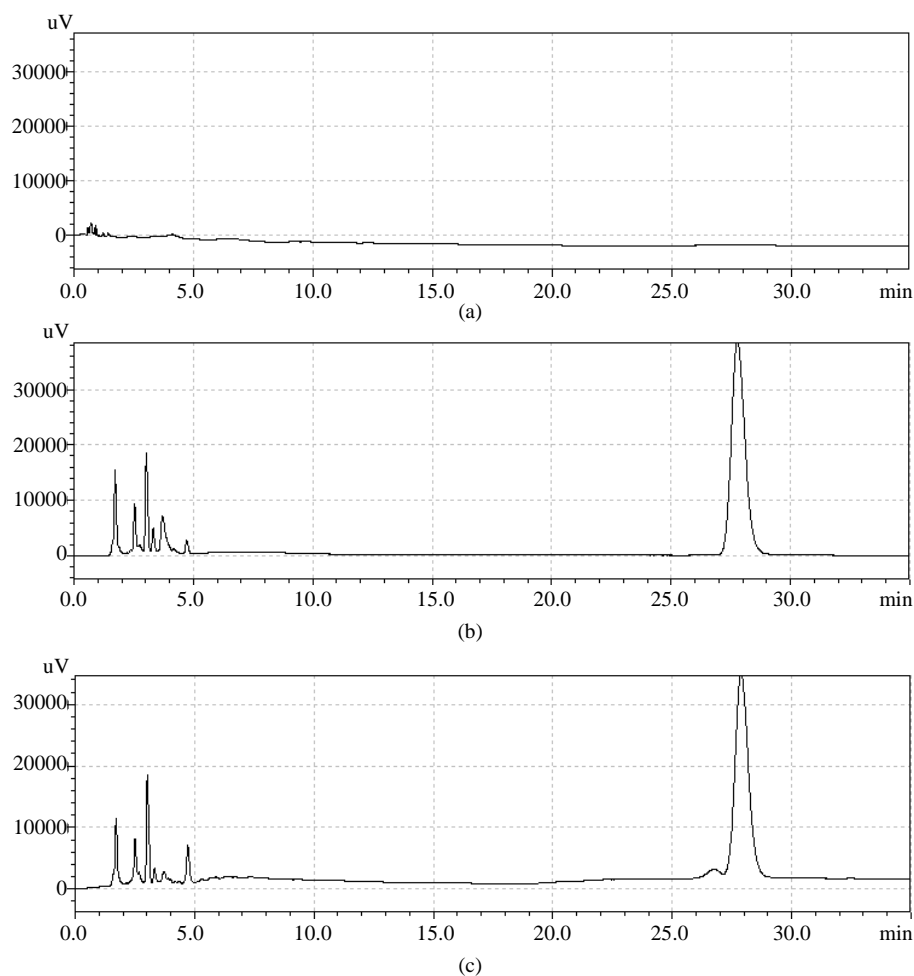


Figure 1. The maps of solvent blank, standard and sample ((a) is solvent blank; (b) as standard substance; (c) for the sample)

图 1. 空白溶剂、对照品、样品图谱((a)为溶剂空白; (b)为对照品; (c)为样品)

3.2.6. 精密度试验

精密吸取羽扇豆酮对照品溶液 10 μL , 按“3.1.5”项下的色谱条件注入液相色谱仪, 重复 6 次, 记录保留时间和峰面积。结果表明, 羽扇豆酮保留时间和峰面积的 RSD (%) 值分别为 0.08 和 0.56, 表明仪器的精密度良好。

3.2.7. 稳定性试验

精密吸取 9 号样品溶液 10 μL , 按“3.1.5”项下的色谱条件注入液相色谱仪, 分别测定样品溶解后 0、2、4、6、8、10 h 的峰面积及保留时间, 记录保留时间和峰面积, 并计算其 RSD 值, 结果表明样品峰面积及 RSD (%) 值分别为 0.20、2.82, 样品稳定性符合要求。

3.2.8. 重复性试验

取第三批羽扇豆酮 6 份, 每份约 10 mg 精密称定, 按“3.2.2”项下的供试品溶液制备方法操作, 吸取供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按“3.1.5”项下的色谱条件测定峰面积, 按外标一点法计算出各样品中羽扇豆酮含量 99.29%, 并求出相对标准偏差 RSD (%), 其 RSD (%) 均小于 3% ($n = 6$), 故(试验)重现性良好。

3.2.9. 加样回收率试验

取重复性试验的羽扇豆酮样品 6 份于 10 mL 容量瓶内, 每份约 10 mg, 精密称定, 加甲醇至刻度, 精密量取 5 mL 于 25 mL 容量瓶内, 加入羽扇豆酮对照品适量, 加甲醇至刻度, 取供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按“3.1.5”色谱条件, 测定峰面积, 计算出回收率, 计算公式: 回收率 = [测得量(μ g) - 样品中含对应对照品的量(μ g)] \div 对照品加入量(μ g) \times 100%。结果表明羽扇豆酮平均回收率在 95%~105%之间, 其 RSD (%)均小于 3% (n = 6), 表明回收率符合要求。见表 1。

3.2.10. 9 份样品的含量测定

分别取 9 份样品及对照品溶液 10 μ L, 按“3.1.5”项下色谱条件操作, 测定羽扇豆酮的含量。结果见表 2。

4. 讨论

徐峰等[3]测定了芭蕉根药材中羽扇豆酮的含量, 并对芭蕉根中羽扇豆酮色谱条件进行了系列的考察, 本文也分别对流速、波长、流动相等进行了考察, 波长和流动相的结果基本一致, 但本实验的流速在 1 mL/min 时能够达到快速的分离效果。

Table 1. Results of the average recovery

表 1. 加样回收率结果

NO	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	峰面积 (A)	总量 (mg)	回收率	平均加样回收率	RSD (%)
1	4.56	5.18	1185590	9.79	1.01	1.00	1.49
2	5.29	5.18	1260008	10.40	0.99		
3	5.15	5.18	1262202	10.42	1.02		
4	5.36	5.18	1286181	10.62	1.02		
5	4.90	5.18	1214635	10.03	0.99		
6	4.80	5.18	1200082	9.91	0.99		

Table 2. The results for content of lupenone extract

表 2. 羽扇豆酮提取物的含量测定结果

编号	提取时间 (年/月)	百分含量 (%)	RSD (%)	平均百分含量 (%)
1 号	2014.6	98.95	0.14	98.27
2 号	2014.6	97.07	4.91	
3 号	2014.6	98.79	0.02	
4 号	2014.11	97.44	1.78	97.40
5 号	2014.11	97.06	0.94	
6 号	2014.11	97.69	3.03	
7 号	2015.4	98.98	1.77	99.29
8 号	2015.4	99.53	2.54	
9 号	2015.4	99.34	0.13	

羽扇豆酮具有较好的抗糖尿病活性, 本文测定了三批从芭蕉根中提取得到的羽扇豆酮提取物, 其羽扇豆酮的含量分别为 98.27%、97.40%、99.29%, 可用于羽扇豆酮抗糖尿病的新药开发研究。

分离于 2014 年 6 月、2014 年 11 月的羽扇豆酮提取物样品的含量均没有分离于 2015 年 4 月份的样品的纯度高, 说明羽扇豆酮样品的稳定性可能会受到外界因素的干扰, 故应注意样品的存放环境, 避免其分解, 保证药品的有效性和安全性。

本文建立的羽扇豆酮提取物 HPLC 含量测定方法, 具有快速, 简便, 重现性好, 回收率高等特点, 可用于羽扇豆酮提取物的质量控制。

基金项目

1) 国家自然科学基金, 项目编号: 81260686; 2) 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金, 项目编号: 黔科合人字(2013)46 号; 3) 贵州省中药现代化公关计划项目, 项目编号: 黔科合 ZY[2012]3016 号。

参考文献 (References)

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 346.
- [2] 包骏, 冉懋雄. 贵州苗族医药研究与开发[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1999: 153.
- [3] Xu, F., Wu, H.M., Wang, X.P., *et al.* (2014) RP-HPLC Characterization of β -Sitosterol and Lupenone—An Agent Shown to Possess Anti-diabetic Activity in Diabetic Sprague-Dawley Rats, *Olecules*, **19**, 14114-14127.
- [4] 王祥培, 郝俊杰, 许士娜, 等. 芭蕉根醋酸乙酯部位的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 515-516.
- [5] 汤容容, 王祥培. 含羽扇豆酮药材的功效及国内资源分布状况分析[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(5): 13-16.
- [6] Wu, H.M., Xu, F. Hao, J.J., *et al.* (2015) Antihyperglycemic Activity of Banana (*Musa nana* Lour.) Peel and Its Active Ingredients in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering*, 231-238.
- [7] El Tahir Mohamed, I. (2005) Antibacterial, Antiviral and Phytochemical Investigations on Some Sudanese Medicinal Plants. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy,.
- [8] Na, M., Kim, B.Y., Osada, H., *et al.* (2009) Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Lupeol and Lupenone Isolated from *Sorbus commixta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicin Chemistry*, **24**, 1056-1059. <http://dx.doi.org/10.1080/14756360802693312>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org