

HPLC法同时测定脂必妥片中 3种 Monacolin类成分的含量*

李艳¹, 刘素娟¹, 张雷红², 王英³, 张现涛^{2*}, 叶文才^{1,3}

(1. 中国药科大学中药学院, 南京 210038 & 2 广东省中药研究所, 广州 510520

3 暨南大学中药及天然药物研究所, 广州 510632)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定脂必妥片中洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀 3 种成分的含量。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.05% 磷酸 (78:22) 为流动相, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C, 检测波长: 238 nm。结果: 洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀的线性范围分别为 4.18~20.88 μg·mL⁻¹ (r=0.9998)、0.50~3.96 μg·mL⁻¹ (r=0.9999) 和 1.30~6.50 μg·mL⁻¹ (r=0.9999); 加样回收率 (n=9) 分别为 99.8%、99.5%、100.4%。结论: 本方法简便、准确, 重复性好, 可用于脂必妥片中洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀 3 种成分的含量测定。

关键词: 脂必妥片; HPLC; 洛伐他汀; 莫纳可林 L; 脱水洛伐他汀; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0270-04

HPLC simultaneous determination of three kinds of Monacolin compounds in Zhibituo tablets*

LI Yan¹, LU Su-juan¹, ZHANG Lei-hong², WANG Ying³,

ZHANG Xian-tao^{2*}, YE Wen-cai^{1,3}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

2 Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China

3 Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of monacolin K, monacolin L and dehydromonacolin K in Zhibituo tablets. **Methods** An Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid solution (78:22). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 238 nm. **Results** The linearity was obtained over 4.18-20.88 μg·mL⁻¹ (r=0.9998) for monacolin K, 0.50-3.96 μg·mL⁻¹ (r=0.9999) for monacolin L, and 1.30-6.50 μg·mL⁻¹ (r=0.9999) for dehydromonacolin K, respectively. The average recoveries (n=9) of monacolin K, monacolin L and dehydromonacolin K were 99.8%, 99.5%, 100.4%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and with high repeatability. It can be suitable for the simultaneous determination of monacolin K, monacolin L and dehydromonacolin K in Zhibituo tablets.

Key words Zhibituo tablets; HPLC; monacolin K; monacolin L; dehydromonacolin K; assay

脂必妥片用于高脂血症、动脉粥样硬化及由此引起的头晕、头痛、胸痛、肢体麻木、舌质紫暗或有斑点等症的治疗, 主要成分和功能红曲。功能红曲主要生理活性成分 Monacolin 类物质, 具有一些突出的特点, 特别是与单纯的洛伐他汀相比, 含相同的剂量情况下具有更强的降脂综合疗效, 并降低了长期服

用他汀类降脂药物可能产生的毒副作用^[1,2]。目前, 国家标准和相关文献中脂必妥片仅通过测定洛伐他汀的含量进行质量控制^[3,4], 尚未见多成分同时测定的报道。为了进一步完善脂必妥片的质量控制方法, 本文建立了高相液相色谱法同时测定脂必妥片中洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀 3 种

* 广东省科技计划项目——粤港关键领域重点突破项目 (2009A0309011)

** 通讯作者 Tel: (020) 28854894 E-mail: zxtcp@yaho.com.cn.

成分的含量,以全面控制其制剂的质量。

1 仪器与试药

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (DAD 检测器); AG285 分析天平 (Mettler Toledo 公司); 华南超声波清洗器 (功率 250 W, 频率 45 kHz); 离心机 (上海常思工贸有限公司)。

脂必妥片 (成都地奥九泓制药厂, 批号: 0806045 0811028, 0812043); 洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀对照品 (内酯型) 均为自制, 纯度均大于 98.0%; 甲醇为色谱纯, 磷酸、氢氧化钠均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取经五氧化二磷减压真空干燥 24 h 的对照品洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀适量, 加甲醇分别制成浓度为 $1.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品储备液。精密移取上述单一对照品储备液各 1 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 摇匀, 静置 10 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀浓度分别为 $41.76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $7.93 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $12.96 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 作为混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取脂必妥片 3 片, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 (250 W, 45 kHz) 20 min, 放至室温, 再称定重量, 用 75% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 离心 10 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 精密量取上清液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 摇匀, 静置 10 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.05% 磷酸 (78: 22); 检测波长: 238 nm; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。理论板数按洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀峰计应不低于 4000。在上述色谱条件下, 各相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 拖尾因子均在 0.95~1.05 之间; 理论塔板数均大于 10000。色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察 分别精密量取“2.1.1”项下混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL, 摇匀, 静置 10 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列浓度 (5 个浓度) 对照品溶液。精密吸取对照品溶液 20

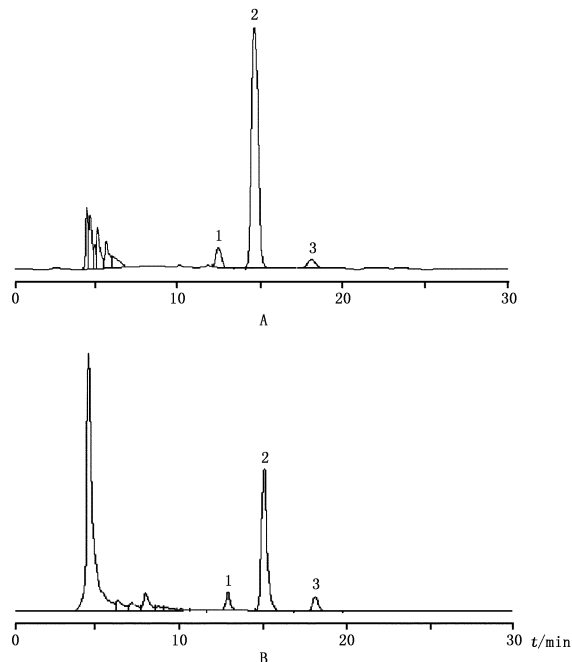


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of standard (A) and Zhibi tablets (B)
1. 莫纳可林 L (monacolin L) 2. 洛伐他汀 (monacolin K) 3. 脱水洛伐他汀 (dehydromonacolin K)

μL 分别注入液相色谱仪, 测得峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标, 进样浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得到洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀的线性回归方程分别为:

$$Y = 55.37X + 3.12 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 39.52X - 1.31 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 30.27X - 0.54 \quad r = 0.9999$$

结果表明三者浓度分别在 4.18~20.88、0.50~3.96、1.30~6.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性范围内呈良好线性关系。

2.4 精密度试验 在上述色谱条件下, 取同一混合对照品溶液连续进样 6 次, 测得洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀峰面积的 RSD 分别为 0.96%, 1.2%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号: 0806045), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 测定峰面积。结果洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀峰面积的 RSD 分别为 0.93%, 1.2%, 1.3%, 表明 12 h 内测定结果稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一批号脂必妥片 (批号: 0806045) 6 份, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液, 进行测定, 结果洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀含量平均值分别为 0.28%, 0.03%, 0.04%; RSD 分别为 0.49%, 0.91%,

1. 1%, 表明本法重复性良好。

2.7 回收率试验 精密称取已知含量的脂必片(批号: 0806045)适量(约相当洛伐他汀 2.94 mg), 共 9 份, 每 3 份为 1 组, 按高、中、低 3 个水平分别以样品中洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀含有量的 80%, 100%, 120% 精密加入各对照品适量, 按“2.3.2”项下方法制备所需溶液, 按测定方法进行检测, 计算洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀的回收率, 见表 1。总回收率 ($n = 9$) 分别为 99.8%, 99.5%, 100.4%。

表 1 回收率测定结果 ($n = 3$)

Tab 1 The results of recovery test

成分 (component)	加入量 (added) /mg	回收率 (recovery) %	RSD /%
洛伐他汀 (monacolin K)	2.35	99.1	0.8
	2.94	100.4	0.6
	3.53	99.8	1.2
莫纳可林 L (monacolin L)	0.17	99.6	1.5
	0.21	99.7	1.1
	0.25	99.2	1.2
脱水洛伐他汀 (dehydrated monacolin K)	0.42	100.2	0.9
	0.53	100.3	1.4
	0.63	100.6	1.3

2.8 样品测定 取 3 批脂必妥片(批号: 0806045, 0811028, 0812043)各 5 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液和混合对照品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪进行测定, 记录峰面积, 计算含量。结果见表 2。色谱图见图 1。

表 2 脂必妥片中 3 种 Monacolin 类成分的含量测定 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 2 Determination of the monacolin compounds in Zhibituo tablets

样品编号 (sample No)	洛伐他汀 (monacolin K)	莫纳可林 L (monacolin L)	脱水洛伐他汀 (dehydrated monacolin K)
0806045	2.81	0.16	0.52
0811028	2.84	0.20	0.53
0812043	2.77	0.15	0.46

3 讨论

3.1 检测波长的选择 精密移取“2.1.1”项下的单一对照品储备液各 1.0 mL, 分别置 3 个 50 mL 量瓶中, 各精密加入 0.1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 静置 10 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成洛伐他汀、莫纳可林 L 和脱水洛伐他汀浓度分别为 20.88, 3.97, 6.48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一开环对照品溶液。取上述溶液, 在 200~400 nm 波长范围内扫描, 记录扫描光谱图。结果表明, 3 种成分在 220, 237.8, 246 nm 处均有强吸收, 为了同时测定 3 种成

分含量, 选择三者均有较强吸收的 238 nm 作为检测波长。

3.2 测定指标的选择 脂必妥片的主要成分为功能红曲, 由于生产功能红曲选用的发酵霉和发酵工艺对其主要生理活性成分 Monacolin 类化合物的种类和数量有明显的影响, 根据本课题组对原药材功能红曲的研究发现, Monacolin 类化合物中洛伐他汀 (monacolin K)、莫纳可林 L (monacolin L) 和脱水洛伐他汀 (dehydrated monacolin K) 3 种成分的含量相比其他此类成分而言, 更具有代表性, 故选用这 3 种成分作为测定指标。

3.3 流动相的选择 用甲醇-水、甲醇-0.05% 磷酸水溶液和乙腈-0.05% 磷酸水溶液进行流动相选择试验, 经摸索, 发现采用甲醇-0.05% 磷酸 (78:22) 时, 对 3 个成分分离最好, 均达到基线分离。且较原国家标准使用缓冲盐对色谱柱及仪器的危害要小很多, 说明本方法具有更好的适用性。

3.4 提取溶剂的选择 Monacolin 类化合物易溶于乙醇、甲醇、氯仿、乙酸乙酯, 样品采用 75% 乙醇超声处理进行提取, 尽量减少了有机溶剂的使用量, 提取方法简单, 易行, 可操作性强。

3.5 氢氧化钠浓度的选择 Monacolin 类化合物均有开环和闭环 2 种结构, 为更准确测定红曲中指标成分的含量, 在前处理中用氢氧化钠处理样品使闭环结构完全转化为开环结构, 再测定开环结构的含量^[5]。考察 0.1 mol \cdot L⁻¹、0.2 mol \cdot L⁻¹、1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠水溶液对红曲样品提取液进行碱化处理 10 min, 试验结果表明, 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠水溶液浓度太高, 对化合物结构有破坏; 0.1 mol \cdot L⁻¹、0.2 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠均能使闭环 Monacolin 类化合物完全转化为开环结构, 故选择 0.1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠, 反应 10 min 对样品进行前处理。

3.6 方法的可用性 脂必妥片原质量控制方法以单一成分洛伐他汀 (monacolin K) 为指标, 专属性不够强。本实验旨在研究建立同时测定脂必妥中 3 种 Monacolin 类成分的方法, 从而为制定该产品的质量标准提供更可靠的依据, 进一步提高脂必妥片的质量标准。从测定结果可以看出, 所检测 3 个批次的脂必妥中 3 种 Monacolin 类成分的含量基本一致, 可推断出 3 批产品来源于同一发酵霉和发酵工艺所生产的原料。

参考文献

- 1 Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemie agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiotics* 1979 (32): 852

- 2 ZHAO Hai (赵海), JI Yuan-Qiao (及元乔). Research progress of Zhibituo an adjusting blood-lipid natural drug (天然调脂药物研究进展—脂必妥的研究). *Cap Med* (首都医药), 2002 9(9): 70
- 3 Drug Specifications Promulgated by the State Drug Administration PR China (国家食品药品监督管理局标准). WS₁-(X-393)-2003Z
- 4 CHEN Zhi-qiang (陈志强), ZHUO Rui (卓瑞), JIN Yang (金杨), *et al*. The quantitative analysis of lovastatin in Zhibituo tablet with RP-HPLC (反相高效液相色谱法检测脂必妥片中洛伐他汀的含量). *Amin Acids Biotech Res* (氨基酸和生物资源), 2008 30(3): 74
- 5 Roman K, Vladimír K. Determination of lovastatin (mevin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *J Chromatogr A*, 1993 630(2): 415

(本文于 2010年 3月 24日收到)

关于举办第二届全国药品质量分析论坛的通知 (第二轮)

为了不断提高药品质量,交流药物分析技术及方法,促进药品生产工艺改进,保障公众用药安全有效。中国药学会药物分析杂志编辑部定于 2011年上半年召开“第二届全国药品质量分析论坛”。欢迎广大从事药品检验、药物分析、药品生产质量控制及相关领域人员参会交流和投稿。现将论坛有关事宜通知如下。

一、会议地址: 江苏泰州

二、会议时间: 2010年 4月 18~ 22日

三、征文截止时间: 2011年 3月 15日

四、参会回执截止时间: 2011年 3月 28日

五、会议征文与要求

(一)征文内容: 未在国内公开发表的专项成果、研究论文、专题报告、综述评论等, 内容包括: 化学药物、抗生素药品; 中药、天然药物及制剂; 生物技术药品、生化药品; 药用辅料与药包材; 药物有关物质与药品; 其他有关药品质量控制研究论文。

(二)征文格式:

来稿应不超过 6000字。每篇来稿须撰写 600~ 800字的摘要。所有稿件均应附英文文题和摘要, 内容须与中文一致。

结构式摘要应明确列出 4 个要素, 即“目的 /Objective(s)”, “方法 /Method(s)”, “结果 /Result(s)”, “结论 /Conclusion(s)”。目的 /Objective(s): 研究、研制、调查等前提、目的和任务, 所涉及的主题范围。方法 /Method(s): 所用的理论、条件、对象、材料、工艺、结构、手段、装备、程序等。结果 /Result(s): 实验及研究的结果、数据, 被确定的关系, 观察结果得到的效果、性能等。结论 /Conclusion(s): 结果分析、研究、比较、评价、应用, 提出的问题, 今后的课题、假设、启发、建议、预测等。

投稿请登陆药物分析杂志主页 (www.ywfxzz.cn), 点击“在线投稿”按提示要求操作上传稿件, 期刊栏目请选择“论坛”。投稿时请留下联系人有效电子邮箱及手机等信息。

(三)征文投稿联系人

中国食品药品检定研究院 药物分析杂志编辑部 (邮编 100050) 刘小帅 于宝珠

电话: 010- 67058427/010- 67012819 转 8 或 3

传真: 010- 67058427/010- 67012819 转 4 或 3

E-mail: ywfx@nicpbp.org.cn

参会请登陆 www.nicpbp.org.cn 或 www.ywfxzz.cn 下载并填写回执后发传真或邮件至本编辑部。

中国药学会药物分析杂志编辑部

2010年 2月 9日