

HPLC法测定山楂红曲胶囊中洛伐他汀

崔琳^{1,2}, 牛向伟^{1,2}, 张菁菁^{1,2}, 闫春风^{1,2}

1. 颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000

2. 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000

摘要: 目的 建立山楂红曲胶囊中洛伐他汀的处理及含量测定方法。方法 色谱柱为Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 紫外检测波长238 nm, 柱温25 °C, 体积流量1.0 mL/min, 流动相为甲醇: 0.1%磷酸溶液(75: 25)。结果 洛伐他汀质量浓度在2.04~306 μg/mL与峰面积线性关系良好, 平均回收率为98.58%, RSD=1.12% (n=9)。结论 该方法准确、简便, 可用于山楂红曲胶囊的质量控制。

关键词: 山楂红曲胶囊; 洛伐他汀内酯; 酸式洛伐他汀; HPLC

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)04-0668-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.012

Improvement of determination method of lovastatin in Monascus Capsules

CUI Lin^{1,2}, NIU Xiangwei^{1,2}, ZHANG Jingjing^{1,2}, YAN Chunfeng^{1,2}

1. Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China

2. Hebei Provincial Engineering Technology Research Center for New Pharmaceutical Excipients in Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China

Abstract: **Objective** To establish a method of processing and determining for the lovastatin in Monascus Capsules. **Methods** Inspecting the influence of water bath temperature to the transformation of lovastatin structure, on the basis of "content determination standards for lovastatin in the health food". Chromatographic separation was achieved on a Kromasil C₁₈ analytical column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the detection wavelength was set at 238 nm, maintained at 25 °C. The prepared mobile phase was delivered at a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase consisted of 75% Methanol and 25% Phosphoric acid (0.1%). **Results** the linear range was 2.04 to 306 μg/mL. The average recovery was 98.58%. The precision was 1.12% (n = 9). **Conclusion** The improved method for determination is that transforming acid structure of lovastatin into lactone structure, the method which is accurate and simple can be applied to control the quality of Monascus Capsules.

Key words: Monascus Capsules; Lovastatin lactone; acid type lovastatin; HPLC

山楂红曲胶囊是由山楂和红曲两种原料制成的一种新型保健品,主要功效为降血脂。其中红曲中的洛伐他汀是红曲霉菌和土曲霉菌酵解产物,研究表明红曲降脂成分酸式洛伐他汀含有羟甲基戊二酸的活性结构,与羟甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶结构非常相似,因此酸式洛伐他汀为HMG-CoA还原酶竞争抑制剂,酸式洛伐他汀的竞争抑制作用可有效减少或阻断内源性胆固醇的合成^[1-2]。红曲中的洛伐他汀因其疗效显著、毒副作用小、耐受性好而被广泛的应用到保健品中。

洛伐他汀有两种结构形式,一种为酸式(开环结构),另外一种为内酯型(闭环结构)。由于洛伐他汀闭环型结构比较稳定,因此山楂红曲胶囊质量标准^[3]将检测洛伐他汀的标准物质定为闭环结构洛伐他汀。但在制备山楂红曲胶囊中加入的功能性红曲米粉品中的洛伐他汀主要以开环型和闭环型两种结构的形式同时存在,甚至有时开环型的含量十分接近闭环型的含量,使得采用《保健食品检验与评价技术规范》中规定的处理方法检测洛伐他汀的含量结果不准确,也无法准确地反映出该产品的

质量。故本文参考有关文献方法^[4-7]通过改变一定的工艺把开环结构的洛伐他汀转化为闭环结构并用高效液相色谱法测定山楂红曲胶囊中洛伐他汀含量,以便更好地控制产品质量。

1 仪器与试剂

岛津 SPD-M10AVP 液相色谱仪;Class-VP 工作站,AE204 十万分之一电子天平;KQ-700DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XMTD 型恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司)。

洛伐他汀标准品(批号 100600-201003,纯度 99.4%)购自中国药品生物制品检定研究院;山楂红曲胶囊(批号:131201、131202、131203)颈复康药业集团有限公司;甲醇(色谱纯)赛默飞世尔科技有限公司,批号 160914。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1% 磷酸(75:25);体积流量 1.0 mL/min;柱温室温;检测波长 238 nm;进样量 10 μL;理论塔板数以洛伐他汀峰计不低于 4 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取洛伐他汀对照品适量,置棕色容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度 0.408 mg/mL,作为对照品贮备液。

对照品溶液的配制 精密吸取对照品贮备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相定容至刻度,摇匀,既得每毫升含洛伐他汀 40.8 μg 的对照品溶液。

酸式洛伐他汀(开环)的制备 称取洛伐他汀(闭环)标准品 4 mg,以 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液定容至 100 mL,在 50 °C 条件下超声转化 1 h,放置到室温后再放置 1 h,微孔滤膜滤过既得^[8]。

2.2.2 供试品溶液的制备 原标准中试样的处理方法依据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)“保健食品中洛伐他汀的测定”规定的方法处理。过程如下:准确称取研细后的山楂红曲胶囊 0.5 g 置 50 mL 试管中,加入 10.0 mL pH=3 磷酸水溶液。超声提取 10 min 后再加入 10.0 mL 三氯甲烷,置涡旋混匀器 3 min。静置后去掉上层水相,将三氯甲烷层以 3 000 r/min 离心 3 min。准确吸取上清液 1.0 mL 至 5.0 mL 试管中,将试管置于 50 °C 左右水浴中使用真空泵减压干燥至挥去全部溶剂。向试管中加入流动相并定容至 5.0 mL,彻底混匀,经微孔滤膜过滤后待进样。

改进后的样品处理方法 准确称取研细后的山

楂红曲胶囊 0.5 g 置 50 mL 试管中,加入 10.0 mL pH=3 磷酸水溶液。超声提取 10 min 后再加入 10.0 mL 三氯甲烷,置于涡旋混匀器 3 min 后,以 4 000 r/min 离心 5 min,去掉水层,三氯甲烷液置分液漏斗中分取。准确吸取三氯甲烷液 1.0 mL 至 5.0 mL 试管中,置 70 °C 水浴挥干溶剂后再放置 1~2 h。向试管中加入流动相并定容至 5.0 mL,混匀,微孔滤膜过滤后既得。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 按山楂红曲胶囊工艺要求制备不含红曲的阴性样品,按供试品溶液制备方法操作,制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取对照品溶液、酸式洛伐他汀溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果阴性对照品溶液在与洛伐他汀对照品及供试品溶液相同保留时间处无色谱峰,表明阴性样品对测定无干扰。理论塔板数不低于 4 000。色谱图见图 1。

由图中 C、D 可以看出,本实验中改进后的样品处理方式最终得到的洛伐他汀的含量明显高于原处理方法,估计可能原因是洛伐他汀的开环结构向闭环结构的转化不仅需要一定的温度和时间。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取对照品贮备液 0.05、0.25、0.5、1.25、2.5、7.5 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相配制浓度为 2.04、10.2、20.4、51、102、306 μg/mL 洛伐他汀标准溶液,在上述色谱条件下分别进样 10 μL 进行色谱分析,以洛伐他汀浓度为横坐标(X)、峰面积积分值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y=31\,284X+9\,584.7$, $r=1$ ($n=6$)。结果表明,洛伐他汀质量浓度在 2.04~306 μg/mL 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件连续进样 5 次,计算峰面积的 $RSD=1.14\%$ 。说明仪器的精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12 h 进样,计算峰面积的 $RSD=1.26\%$ ($n=5$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批样品,依法制备供试品溶液 6 份并测定含量。结果洛伐他汀平均含量 2.4 mg/g, $RSD=1.35\%$,结果说明本方法重复性好。

2.3.6 加样回收试验 准确称取已知含量的样品(2.4 mg/g)9 份,分别精密加入对照品贮备液 1.2、1.5、1.8 mL,按供试品溶液制备方法操作并测定含

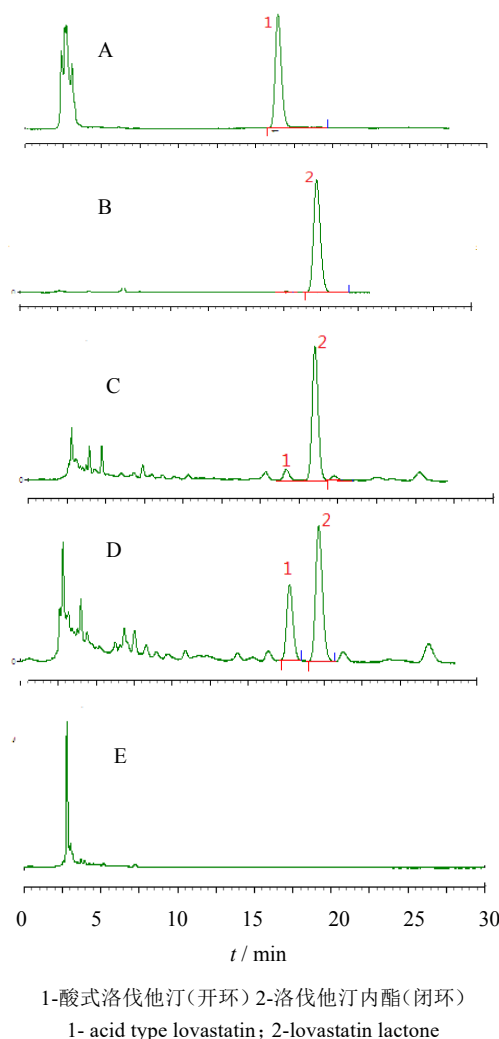


图1 酸式洛伐他汀(开环)(A)、洛伐他汀对照品(闭环)(B)、原处理方法(C)、改进方法后(D)和山楂红曲胶囊阴性样品(E)的HPLC图

Fig.1 Chromatogram of acid type lovastatin (A), lovastatin lactone reference (B), original processing method (c), improved method (D), and negative sample (E)

量,计算回收率。结果平均回收率为98.58%,RSD值为1.12%。

2.4 含量测定

取3批山楂红曲胶囊(批号:131201、131202、131203),每批称取3份,按供试品溶液制备方法操作,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液10 μ L,注入液相色谱仪,3批样品的平均含量分别为2.40、2.38、2.45 mg/g,RSD=1.23%、1.32%、1.27%。

3 讨论

本实验对原有的样品处理方法进行了改进,得

到的实验结果在2.04~306 μ g/mL线性关系良好,重复性的RSD值为1.35%,加标回收率在97.3%~101%,RSD值为1.12%。结果表明,该方法在山楂红曲胶囊中洛伐他汀含量的测定中,快速、准确、灵敏,适用于该品种中洛伐他汀含量的测定。

由整个实验过程可以看出,洛伐他汀的开环结构向闭环结构的转化过程主要发生在氯仿有机溶剂中,而在水中的转化率很低,具体的转化过程的反应机制还需要进一步研究。

根据文献报道^[9]当红曲产品中的洛伐他汀产品同时存在酸式和内酯结构时,酸处理无法将酸式结构全部转化为内酯结构进行测定,使测定结果偏低。而本实验中,红曲产品中的开环结构的洛伐他汀基本完全转变为闭环结构,使得结果较为准确。

当前,洛伐他汀的主要存在形式主要有开环结构和闭环结构,具体采用何种结构进行分析,在目前尚有较大争议。但无论采用哪种结构,只有最大限度地洛伐他汀转化为一种形式,才能保证实验结果的准确性。

参考文献

- [1] 马祖兵,孙强,李小芳,等.红曲降脂成分他汀类物质检测方法的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(23):228-234.
- [2] 王玲,吴军林,吴清平.红曲降血脂功能的研究及应用概况[J].食品工业科技,2014,35(8):387-389,393.
- [3] 保健食品检验与评价技术规范[S].2003.
- [4] 姜冰洁,许贇荣,张薄博,等.降脂红曲产品质量标准的探讨[J].中草药,2015,46(3):453-456.
- [5] 王丽君,崔海波.洛伐他汀开环工艺条件的研究[J].河北化工,2008,31(1):23-24.
- [6] 廖一民,向世学.高效液相同时测定保健食品中两种结构形式洛伐他汀的含量[J].中国卫生检验杂志,2006,16(3):286-287,315.
- [7] 程杰,刘姣,陈品英,等.高效液相色谱法测定脂必妥胶囊中洛伐他汀含量[J].中国药业,2011,20(8):36-37.
- [8] 陈东洋,冯家力,张昊,等.不同前处理方法对保健食品洛伐他汀含量测定的影响[J].食品工业科技,2014,11(35):295-297.
- [9] 陈发贵,张丹,刘敏,等.高效液相色谱法测定青稞红曲中内酯式和酸式洛伐他汀的含量[J].中国酿造,2016,35(10):162-165.