

HPLC法测定功能红曲中红曲可林 K、红曲可林 L 和脱水红曲可林 K

李 艳¹, 张现涛², 秦民坚^{1*}

(1 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009; 2 广东省中药研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定功能红曲中红曲可林 K(monacolin K)、红曲可林 L(monacolin L) 和脱水红曲可林 K(dehydromonacolin K) 的方法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05% 磷酸(78:22); 检测波长 238 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35℃; 进样量 20 μL。结果 红曲可林 K、红曲可林 L 和脱水红曲可林 K 的线性范围分别为 0.08~0.84、0.04~0.38、0.04~0.40 μg; 加样回收率分别为 99.2%、99.6%、99.3%, RSD 分别为 1.7%、1.5%、1.4%(n=9)。结论 本方法简便、灵活、准确, 重复性好, 可用于功能红曲中红曲可林 K、红曲可林 L 和脱水红曲可林 K 的测定。

关键词: 功能红曲; 红曲可林 K; 红曲可林 L; 脱水红曲可林 K; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1286-03

红曲亦名丹曲, 是以大米为原料, 经红曲霉 *Monascus purpureus* Went 发酵而成的一种紫红色米曲, 是中国传统的具有活血化瘀、健脾消食等功效的药食两用的中药^[1]。红曲有功能红曲和普通红曲两种, 功能红曲含有多种生理活性物质, 如红曲可林(monacolin)类物质、麦角甾醇、γ-氨基丁酸、天然植物激素等; 普通红曲不含有明显降脂成分红曲可林类物质, 更多的应用于酿酒和食品。1979 年红曲霉被发现可产生具有抑制胆固醇合成的物质红曲可林 K(monacolin K) 后, 红曲的降血糖、调血脂及降胆固醇的功效成为众人关注的焦点^[2]。广为医生和患者接受的血脂康胶囊、脂必妥片、脂必妥胶囊等心血管一线中药均以红曲为主要原料。近年来本课题组开发了以红曲为主要原料的银曲胶囊已获得临床批文^[3,4]; 通过对全国 20 多份功能红曲样品检测发现大部分样品除了洛伐他汀外再无其他红曲可林类物质。主要是由于普通红曲价格约为 4 元/kg, 功能红曲的价格约为 150 元/kg, 而化学合成的洛伐他汀较为便宜, 部分不法商人将洛伐他汀添加到普通红曲中以冒充功能红曲, 使用《中国药典》方法无法鉴别真伪。功能红曲的化学成分和药理作用多样, 洛伐他汀是无法替代的。因此为了寻找更合理的红曲质量评价方法, 本课题组对红曲进行系统的化学成分研究, 从中共得到化合物 60 多个, 其中红曲可林类化合物 17 个, 包括 7 个新的化合物和 6 个新的天然产物^[5]; 这些红曲可林类化合物中, 红曲可林 K(monacolin K)、红曲可林 L(monacolin L) 和脱水红曲可林 K

(dehydromonacolin K) 量较高。为了更好地评价和控制药品质量, 建立更加高效准确的分析检测方法, 本实验建立了利用高效液相色谱法同时测定功能红曲中这 3 种成分的测定方法, 并参照文献在前处理中用 NaOH 处理样品使闭环结构(内酯型)完全转化为开环结构(酸型)的方法, 测定开环结构的量, 即为红曲可林 K、红曲可林 L 和脱水红曲可林 K 的总量, 取得了满意的效果^[6]。

1 仪器与试剂

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 Hz); 离心机(上海常思工贸有限公司)。

红曲药材经中国药科大学中药资源教研室主任秦民坚教授鉴定为红曲 *Rubrum Fermentum*, 购自上海红太阳生物制品有限公司, 批号分别为 091001、091002、091003; 红曲可林 K、红曲可林 L 和脱水红曲可林 K 对照品(内酯型)均为自制, 质量分数均大于 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 检测波长的选择: 分别取 20 μg/mL 红曲可林 K、5 μg/mL 红曲可林 L 和 5 μg/mL 脱水红曲可林 K 对照品溶液, 在 200~400 nm 扫描, 结果均在 238 nm 波长处有最大吸收, 故选择 238 nm 为测定波长。

2.2 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%

* 收稿日期: 2010-01-29

基金项目: 广东省科技计划项目(2009A0309011)

作者简介: 李 艳(1984—), 女, 湖南耒阳人, 硕士, 研究方向为中药质量控制。

* 通讯作者 秦民坚 Tel: (025) 86185130 Fax: (025) 83412291 E-mail: minjianqin@sina.com

磷酸(78:22);检测波长238 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温35℃;进样量20 μL。理论板数按红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K峰计应不低于4 000。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备:精密称取经五氧化二磷减压真空干燥24h的红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K对照品适量,加甲醇分别制成0.5、0.125、0.125 mg/mL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,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K质量浓度分别为20、5、5 μg/mL的混合溶液,作为混合闭环对照品储备液;另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 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,摇匀,静置10 min,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K质量浓度分别为20、5、5 μg/mL的混合溶液,作为混合开环对照品储备液。

2.3.2 供试品溶液的制备:分别取样品细粉2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%乙醇50 mL,称定质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)20 min,放至室温,再称定质量,用75%乙醇补足减失的质量,摇匀,离心10 min(3000转/min),精密量取上清液5 mL,置50 mL量瓶中,精密加入0.1 mol/L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。

2.4 线性关系考察:分别精密量取混合开环对照品储备液0.5、1.5、2.5、4.0、5.0 mL于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制得系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液20 μL分别注入液相色谱仪,测得峰面积。以峰面积为纵坐标,进样质量的常用对数值为横坐标,计算其回归方程。结果表明红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K分别在0.08~0.84、0.04~0.38、0.04~0.40 μg线性关系良好,回归方程分别为: $Y=56.55X-21.66$, $r=0.9999$; $Y=41.53X-1.92$, $r=0.9998$; $Y=30.50X+6.79$, $r=0.9999$ 。

2.5 精密度试验:取同一供试品溶液(批号091001)20 μL,重复进样6次,测得峰面积。结果红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K峰面积的RSD分别为0.76%、0.84%、0.57%。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液(批号091001),在0、2、4、6、8、12 h进样20 μL,测定峰面

积,结果红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K峰面积的RSD分别为1.63%、1.45%、1.28%,表明12 h内测定结果稳定。

2.7 重现性试验:取批号091001红曲样品6份,平行制备供试品溶液,进行测定,结果红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K质量分数平均值分别为0.75%、0.06%、0.11%,RSD分别为0.56%、0.92%、0.77%。

2.8 加样回收率试验:精密称取红曲样品(批号091001)9份,每份约0.1 g,每3份为1组,按高、中、低3个水平分别精密加入各单一对照品储备液适量(红曲可林K 1.2、1.5、1.8 mL;红曲可林L 0.3、0.5、0.7 mL;脱水红曲可林K 0.8、1、1.2 mL),制备供试品溶液,进行检测,计算红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K的回收率。结果平均回收率分别为99.2%、99.6%、99.3%,RSD分别为1.7%、1.5%、1.4%($n=9$)。

2.9 样品测定:取3批红曲样品,制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液和混合开环对照品溶液20 μL,注入液相色谱仪进行测定,进样3次取峰面积的平均值,根据回归方程计算质量分数,结果见表1。色谱图见图1。

表1 功能红曲中红曲可林类成分的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of monacolin compounds in *Rubrum Fermentum* ($n=3$)

批号	红曲可林 K / %	红曲可林 L / %	脱水红曲可林 K / %
091001	0.75	0.06	0.11
091002	0.78	0.07	0.09
091003	1.23	0.04	0.08

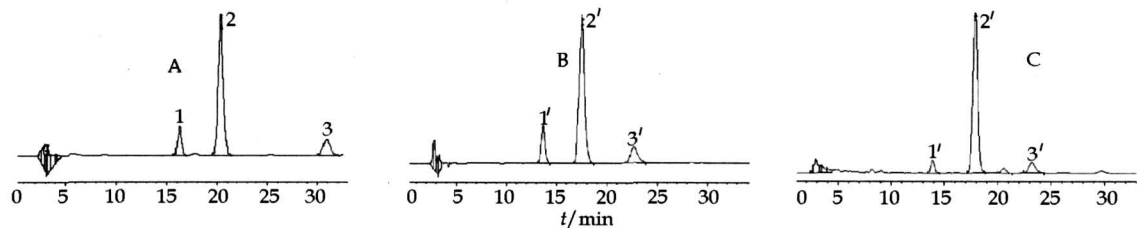
3 讨论

3.1 样品处理方法的选择

3.1.1 提取溶剂的选择:以0.2 mol/L氢氧化钠和75%乙醇作为提取溶剂,结果表明,0.2 mol/L氢氧化钠作为提取溶剂,在选定的色谱条件下,开环红曲可林K峰前移并且峰形变差;而75%乙醇提取,红曲可林K、红曲可林L和脱水红曲可林K峰形良好,无杂质干扰。

3.1.2 乙醇比例的选择:考察了50%、75%、95%乙醇作为提取溶剂时对测定的开环结构总量的影响,试验结果表明:选择75%乙醇的提取效率较高。

3.1.3 NaOH浓度的选择:红曲可林类化合物均有开环和闭环两种结构,为更准确测定红曲中指标成分,在前处理中用NaOH处理样品使闭环结构完全转化为开环结构,再测定开环结构的量。考察0.1、0.2、1 mol/L氢氧化钠水溶液对红曲样品提取



1-闭环红曲可林 L 2-闭环红曲可林 K 3-闭环脱水红曲可林 K

1'-开环红曲可林 L 2'-开环红曲可林 K 3'-开环脱水红曲可林 K

1-monacolin L in lactone form 2-monacolin K in lactone form 3-dehydromonacolin K in lactone form

1'-monacolin L in hydroxy acid form 2'-monacolin K in hydroxy acid form 3'-dehydromonacolin K in hydroxy acid form

图 1 闭环对照品(A)、开环对照品(B)和功能红曲(C)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance in lactone forms (A), reference substance in hydroxy acid forms (B), and *Rubrum Fermentum* (C)

液进行碱化处理 10 min, 试验结果表明: 1 mol/L 氢氧化钠水溶液浓度太高, 对化合物结构有破坏; 0.1、0.2 mol/L 氢氧化钠均能使闭环红曲可林类化合物完全转化为开环结构, 故选择 0.1 mol/L 氢氧化钠, 反应 10 min 对样品进行前处理。

3.1.4 超声时间考察: 考察了超声时间分别为 10、20、30、40 min 时对测定的开环结构总量的影响。试验结果表明: 超声 10 min 时测得量与 20 min 时基本一致, 而超声至 40 min 时无变化, 所以确定超声时间为 20 min。

3.2 对于含有大量的红曲可林类化合物的功能红曲而言, 仅仅测定红曲可林 K 不能全面反映红曲的质量; 本实验选择多指标成分采用 HPLC 法对功能红曲进行质量控制, 更为准确、科学, 为检测市场上

流通的各种红曲产品提供了一种可行的测定方法, 可以有效防止伪劣掺假产品的出现, 同时该法还为制定红曲药材的质量标准提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 邢旺兴, 寇鹤鸣, 贺祥, 等. 红曲考证 [J]. 中药材, 2000, 23 (3): 175
- [2] Endo A. Monacolin K: A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. *J Antibiotics*, 1979, 32: 852-854
- [3] 邵文豪, 张现涛, 顾艳, 等. 银曲胶囊中萜类内酯含量测定 [J]. 中成药, 2009, 31(2): 附 4 附 5
- [4] 顾燕, 刘萌, 张现涛, 等. 高效液相色谱法测定银曲胶囊中银杏总黄酮醇苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (8): 2016-2017
- [5] Zhang Y T, Wang Y, Zhang X T, *et al*. A new decalin derivative from red yeast rice [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11 (9): 792-795
- [6] 罗仁才, 孙开奇, 谢申猛, 等. 红曲中 Monacolin K 总量的测定方法 [J]. 卫生研究, 2003, 32 (2): 157-158

马兜铃酸 I 在煎煮过程中的缩合反应研究

王勇, 夏博, 邓晓春*

(深圳大学生命科学学院, 广东 深圳 518060)

摘要: 目的 研究了马兜铃酸 I 的热不稳定性及其在中药煎煮过程中的化学反应。方法 利用荧光光谱和电喷雾串联质谱技术进行考察。结果 马兜铃酸 I 在加热条件下不稳定, 煎煮过程中生成相对分子质量为 414 的马兜铃酸 I 衍生物, 可能的形成机制是两个马兜铃酸分子失去硝基后缩合。结论 该反应具有普遍性, 在马兜铃单煎液、关木通单煎液、马兜铃或关木通的药对共煎液以及马兜铃酸 I 对照品与当归的共煎液都检测到, 在各种体系中还同时检测到未反应的马兜铃酸 I, 提示该反应进行不完全。

关键词: 马兜铃酸 I; 马兜铃; 关木通; 缩合反应; 电喷雾质谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1288-05

马兜铃酸主要存在于马兜铃属和细辛属植物中, 是 3,4-次甲二氧基-10-硝基-1-菲酸类化合物, 也

* 收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 深圳市科技计划项目(200528)

作者简介: 王勇(1970-), 男, 副教授, 主要从事质谱学和中药化学研究。E-mail: wyong@szu.edu.cn