

一测多评法测定红曲及脂必妥片中洛伐他汀和洛伐他汀酸

郝盛源¹, 王磊², 李红¹, 张迪¹, 许卉^{1*}

(1. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2. 烟台市食品药品检验检测中心, 山东烟台 264005)

[摘要] 目的: 建立适用于红曲及其制剂质量控制的洛伐他汀和洛伐他汀酸的一测多评含量测定方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, 以洛伐他汀为内标物, 测定其与洛伐他汀酸的相对校正因子, 建立可同时定量检测 2 种成分的一测多评方法。采用不同的 HPLC 仪器和色谱柱, 验证所建立方法的耐用性, 并与外标法测定结果比较, 以验证一测多评法的准确性。结果: 洛伐他汀酸和洛伐他汀的相对校正因子 (relative correction factor, RCF) 耐用性良好, 6 批红曲药材和 3 批脂必妥片中洛伐他汀酸含量的一测多评法测定结果均与外标法无显著性差异。结论: 该研究建立了准确、快速且耐用性良好的洛伐他汀酸和洛伐他汀同时定位定量的一测多评方法, 为红曲及其制剂质量标准的进一步完善提供了可靠依据。

[关键词] 红曲; 脂必妥片; 洛伐他汀; 洛伐他汀酸; 一测多评法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0074-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1432.074.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 14:32

Simultaneous Determination of Lovastatin and Lovastatin Acid in Fermentum Rubrum and Zhibituo Tablets by QAMS

HAO Sheng-yuan¹, WANG Lei², LI Hong¹, ZHANG Di¹, XU Hui^{1*}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Yantai Food and Drug Inspection Center, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for quantitative analysis of multiple-components by single marker (QAMS) for simultaneous determination of lovastatin and lovastatin acid in Fermentum Rubrum and its preparations. **Method:** Lovastatin was used as the internal reference substance, and the relative correction factor (RCF) of lovastatin acid was determined by RP-HPLC. Then the QAMS method was established for simultaneous determination of the two components. The durability of the established method was verified with varying HPLC instrument and chromatographic columns. Then the accuracy of the QAMS method was evaluated by comparing the contents of lovastatin acid with those obtained by the external standard method. **Result:** The RCF value showed good durability for both lovastatin and lovastatin acid. There were no significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method. **Conclusion:** An accurate, rapid and highly durable QAMS method has been developed for simultaneous determination the contents and locations of lovastatin and lovastatin acid, so as to provide reliable basis for the application of QAMS method in quality control of Fermentum Rubrum and its preparations.

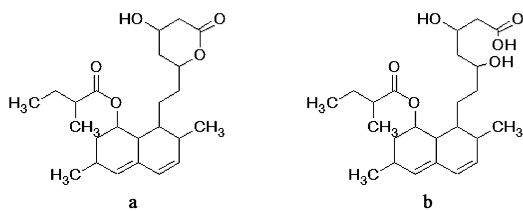
[Key words] Fermentum Rubrum; Zhibituo tablets; lovastatin; lovastatin acid; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS)

[收稿日期] 20160423(001)

[第一作者] 郝盛源, 在读硕士, 从事中药质量控制研究; Tel: 0535-6706066, E-mail: sarmas@126.com

[通讯作者] * 许卉, 博士, 教授, 从事中药质量控制研究; Tel: 0535-6706066; E-mail: xuhui33@sina.com

红曲 (*Fermentum Rubrum*) 是将紫色红曲霉菌 (*Monascus purpureus* Went CGMCC No. 0272) 菌株接种于稻米上经人工培养制成的一种食药双效发酵制品,具有良好的降胆固醇活性,是血脂康、脂必妥等天然他汀类降脂药物的原料,临床用于高脂血症、动脉粥样硬化等症的治疗^[1-3]。研究表明,红曲降脂作用的主要功效成分为洛伐他汀类物质,其作为胆固醇合成途径中 HMG-CoA 还原酶的竞争性抑制剂,可有效减少或阻断内源性胆固醇合成,从而发挥确切的降脂作用^[4-5]。洛伐他汀有闭环的内酯式和开环的 β -羟基酸式 2 种结构形式,即洛伐他汀和洛伐他汀酸(图 1),二者在体内同时存在,并相互转化,且洛伐他汀酸较洛伐他汀具有更强的生物学活性^[6-7]。因此,有必要针对红曲及其制剂中内酯和酸式两种形式的洛伐他汀同时进行质量控制。但在相关品种的现行质量标准中,均仅以洛伐他汀作为唯一的指标成分。例如,2015 年版《中国药典》(一部)在血脂康(片及胶囊)品种项下附载的原料红曲质量标准中规定:本品含洛伐他汀不得少于 0.22%;在血脂康胶囊质量标准规定:本品每粒(0.3 g)含红曲以洛伐他汀计,不得少于 2.5 mg;在国家中成药标准 WS-11524(ZD-1524)-2002 中规定:脂必妥片每片(0.35 g)含红曲以洛伐他汀计,不得少于 0.85 mg。



a. 洛伐他汀; b. 洛伐他汀酸

图 1 洛伐他汀及洛伐他汀酸的化学结构式

Fig. 1 Structure of lovastatin acid and lovastatin

针对红曲及其制品中 2 种不同形式洛伐他汀的含量测定,目前文献报道主要有 2 类方法。一类是以洛伐他汀为对照,根据洛伐他汀酸及洛伐他汀的峰面积之和与洛伐他汀对照的峰面积比值进行总量测定^[8]。该方法没有考虑两者的响应因子差异带来的误差,并且由于两者的活性存在差异,总量不能真实反映产品的生物活性。另一类方法是分别以洛伐他汀和洛伐他汀酸为对照,根据各自的色谱响应灵敏度,在同一色谱条件下分别测定酸式与内酯式的含量^[9]。但由于酸式对照品的化学稳定性较差,价格昂贵,不易获得和保存,限制了方法的推广

应用。

一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 被广泛接受应用于解决中药等复杂体系质量控制中缺乏对照品的瓶颈限制^[10-13]。鉴于洛伐他汀与洛伐他汀酸具有相近的分子结构,相同色谱条件下的相对校正因子 (relative correction factor, RCF) 较为稳定^[14],本文研究应用 QAMS 对红曲原料药及脂必妥片进行多指标质量控制,即以性质稳定、价格低廉、供应量大洛伐他汀对照品为内标物,通过建立其与洛伐他汀酸的 RCF,分别准确测定二者的含量,降低检测成本和时间,提高方法的实用性,也为进一步完善红曲及其制剂的质量控制方法提供科学依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪 (包括在线脱气机,二元高压泵,自动进样器和紫外检测器,美国 Agilent), XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo), KQ5200E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), TGL-20M 型高速离心机 (湘仪离心机仪器有限公司)。对照品洛伐他汀 (批号 18-MVI-65-2), 洛伐他汀酸 (批号 100600-201003) 均由中国食品药品检定研究院提供;脂必妥片为成都地奥九泓制药厂产品 (批号分别为 1412030, 1505024, 1511015), 红曲原料药为市售 (产地浙江丽水、安徽亳州、山东枣庄、山东泰安、福建福州、福建泉州), 甲醇、乙腈均为色谱纯,其他溶剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-0.01% 磷酸水 (60:40), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 238 nm, 进样量 20 μ L。

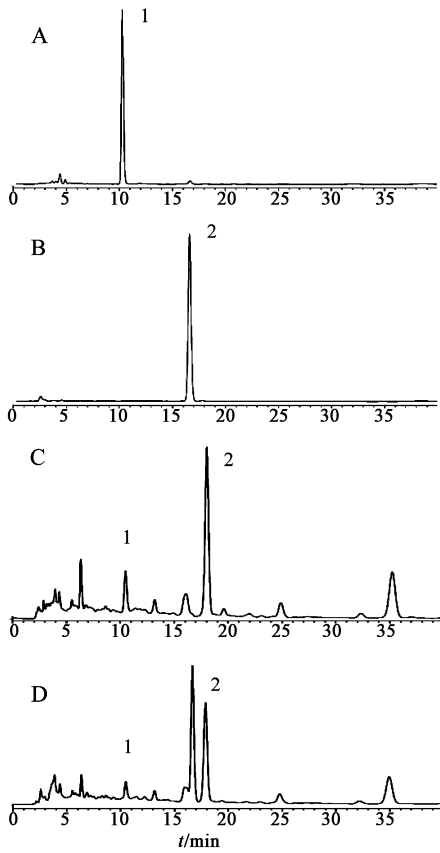
2.2 对照品溶液制备 取洛伐他汀和洛伐他汀酸对照品适量,精密称定,加乙腈制成质量浓度分别为 0.627, 0.624 g · L⁻¹ 对照品储备溶液;精密量取储备溶液 5 mL 至 25 mL 量瓶,加乙腈至刻度,摇匀,即得质量浓度均为 0.125 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取红曲药材粉末 (3 号筛) 约 0.4 g,精密称定,置 10 mL 具塞锥形瓶中,精密加入乙腈 10 mL,密塞,称定质量,充分振摇,超声提取 (功率 200 W, 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用乙腈补足减失的质量,摇匀,离心 (转速 3 000 r · min⁻¹) 10 min,取上清液,滤过,即得药材供试品溶液。脂必妥片去除薄膜衣,研细,过 3 号筛,取约

粉末 0.2 g, 精密称定, 同法操作, 得脂必妥片供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 取洛伐他汀酸及洛伐他汀对照品溶液、红曲药材和脂必妥片供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别进样测定。结果供试品溶液中洛伐他汀和洛伐他汀酸色谱峰与相应对照品色谱峰的保留时间一致, 分别为 18.01, 10.50 min; 两色谱峰峰形良好, 且均能达到基线分离, 分离度 > 1.5, 理论板数分别为 18 311 和 15 139, 样品中其他成分均无干扰, 表明所建立的 HPLC 方法用于红曲药材和脂必妥片中洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量测定专属性符合要求。见图 2。



A, B. 对照品; C. 红曲药材; D. 脂必妥片; 1. 洛伐他汀酸; 2. 洛伐他汀

图 2 红曲药材和脂必妥片 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Fermentum Rubrum and Zhibituo tablets

2.4.2 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 制得系列对照品溶液, 含洛伐他汀及洛伐他汀酸质量浓度分别为 0.005, 0.012, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 g·L⁻¹。按 2.1 项下色谱条件测定, 以相应的色谱峰面积积分值为

纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得洛伐他汀和洛伐他汀酸的回归方程分别为 $Y = 11\ 124X + 438.38$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 21\ 746X + 107.70$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围均为 0.005 ~ 0.100 g·L⁻¹。

2.4.3 精密度试验 取同一对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 洛伐他汀和洛伐他汀酸峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 分别取同一批号红曲药材和脂必妥片样品各 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 并进行 HPLC 测定。结果红曲药材的洛伐他汀和洛伐他汀酸平均质量分数为 0.222%, 0.089%, RSD 分别为 1.5%, 2.1%, 脂必妥片的洛伐他汀和洛伐他汀酸平均质量分数为 0.340%, 0.030%, RSD 分别为 2.9%, 2.5%, 表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取 2.3 项下制备的同一红曲药材和脂必妥片供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 连续进样测定, 结果洛伐他汀峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.8%, 洛伐他汀酸峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.9%, 表明 12 h 内供试品的稳定性良好。

2.4.6 加样回收试验 精密称取同一批号红曲药材和脂必妥片粉末各约 0.2, 0.1 g, 平行 6 份, 分别精密加入适量对照品溶液, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定洛伐他汀和洛伐他汀酸的色谱峰面积, 计算回收率, 结果见表 1, 2。分析结果显示, 红曲药材中洛伐他汀和洛伐他汀酸的平均加样回收率为 101.3%, 99.0%, RSD 0.8%, 1.3%, 脂必妥片中洛伐他汀和洛伐他汀酸的平均加样回收率为 98.6%, 97.2%, RSD 0.9%, 0.7%, 表明方法准确度良好。

2.5 相对校正因子测定及其耐用性考察 取不同浓度混合对照品溶液, 分别测定洛伐他汀酸 (lovastatin acid, LA) 和洛伐他汀 (lovastatin, LN) 的色谱峰面积。根据二者的回归方程及线性范围, 以洛伐他汀为内标物, 依据被测物质色谱峰面积 (A) 与其浓度 (C) 间的正比关系: $A = fC$, 按 $RCF = f_{LA}/f_{LN}$ 计算洛伐他汀对洛伐他汀酸的 HPLC 相对校正因子。

分别采用不同实验室的 Agilent 1100 型, Agilent 1260 型, 岛津 LC-20AT 型高效液相色谱系统, 以及 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex

表 1 红曲和脂必妥片中洛伐他汀回收率测定

Table 1 Results of recovery test of lovastatin of Fermentum Rubrum and Zhibituo tablets

样品	取样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
红曲 (福建福州)	0.205 8	0.457	0.400	0.858	100.3	101.3	0.8
	0.203 3	0.451	0.400	0.856	101.3		
	0.200 1	0.444	0.400	0.850	101.5		
	0.206 5	0.458	0.400	0.861	100.8		
	0.204 0	0.453	0.400	0.858	101.3		
	0.207 2	0.460	0.400	0.871	102.8		
脂必妥片 (1505024)	0.100 8	0.344	0.300	0.643	99.7	98.6	0.9
	0.101 2	0.345	0.300	0.639	98.0		
	0.100 4	0.342	0.300	0.638	98.7		
	0.100 7	0.343	0.300	0.638	98.3		
	0.101 5	0.346	0.300	0.644	99.3		
	0.101 1	0.345	0.300	0.637	97.3		

表 2 红曲和脂必妥片中洛伐他汀酸回收率测定

Table 2 Results of recovery test of lovastatin acid of Fermentum Rubrum and Zhibituo tablets

样品	取样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
红曲 (福建福州)	0.205 8	0.183	0.200	0.381	99.0	99.0	1.3
	0.203 3	0.181	0.200	0.374	96.5		
	0.200 1	0.178	0.200	0.377	99.5		
	0.206 5	0.185	0.200	0.385	100.0		
	0.204 0	0.184	0.200	0.383	99.5		
	0.207 2	0.182	0.200	0.381	99.5		
脂必妥片 (1505024)	0.100 8	0.030	0.030	0.059	96.3	97.2	0.7
	0.101 2	0.031	0.030	0.060	98.0		
	0.100 4	0.030	0.030	0.059	97.3		
	0.100 7	0.030	0.030	0.059	96.3		
	0.101 5	0.031	0.030	0.060	97.3		
	0.101 1	0.030	0.030	0.060	97.7		

Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱考察相对校正因子测定的耐用性, 结果见表 3。测定结果显示, 不同条件下所得 RCF 的平均值为 1.947, RSD 0.9%, 表明洛伐他汀对洛伐他汀酸的相对校正因子耐用性良好。

2.6 待测组分色谱峰定位 色谱峰的定位采用相对保留时间比值法进行确定, 即根据洛伐他汀酸与内参物洛伐他汀相对保留时间比值 (retention time ratio, RTR) 对洛伐他汀酸的色谱峰进行定位。实验考察了在不同 HPLC 仪器和色谱柱上洛伐他汀酸 RTR 的测定情况, 结果平均值为 0.582, RSD 1.3%, 见表 3, 表明不同仪器和色谱柱测定的 RTR 具有良

表 3 HPLC 测定洛伐他汀酸的相对校正因子和相对保留值

Table 3 RCF and RTR of lovastatin acid by HPLC determination on various instruments and columns

仪器	色谱柱	RCF	RTR
Agilent 1100	Agilent TC-C ₁₈	1.948	0.583
	Hypersil ODS C ₁₈	1.967	0.576
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.931	0.592
Agilent 1260	Agilent TC-C ₁₈	1.947	0.583
	Hypersil ODS C ₁₈	1.939	0.577
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.944	0.589
Shimadzu LC-20AT	Agilent TC-C ₁₈	1.940	0.568
	Hypersil ODS C ₁₈	1.922	0.590
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.983	0.581

好的重复性, 适用于目标待测成分色谱峰的定位。

2.7 一测多评法与外标法测定结果的比较 取 6 批不同产地的红曲和 3 批脂必妥片样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别采用外标法和一测多评法计算试样中洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量, 结果见表 4。配对 *t*-检验结果显示, 两种方法所得含量值无显著性差异 ($P_{\text{双侧}} = 0.89 > 0.05$), 说明一测多评法可用于红曲及其制剂的多成分质量评价研究。

表 4 红曲及脂必妥片中洛伐他汀和洛伐他汀酸测定

Table 4 Contents of lovastatin and lovastatin acid in Fermentum Rubrum and Zhibituo tablets %

样品信息	洛伐他汀 外标法	洛伐他汀酸	
		外标法	QAMS
红曲(浙江丽水)	0.114 2	0.032 3	0.032 5
红曲药材(安徽亳州)	0.121 0	0.023 1	0.022 9
红曲(山东枣庄)	0.177 8	0.079 9	0.079 3
红曲(山东泰安)	0.120 7	0.041 2	0.041 3
红曲(福建福州)	0.222 1	0.089 0	0.088 6
红曲(福建泉州)	0.207 5	0.077 4	0.077 1
脂必妥片(1412030)	0.313 3	0.027 2	0.027 5
脂必妥片(1505024)	0.340 9	0.030 1	0.031 0
脂必妥片(1511015)	0.339 4	0.030 9	0.030 7

3 讨论

洛伐他汀和洛伐他汀酸是与红曲功能主治相关的主要特征性成分, 药理活性显著。鉴于洛伐他汀对照品化学性质稳定、价廉易得, 故本文研究选用洛伐他汀为内标物, 建立红曲及其制剂中 2 个成分的一测多评法。

对洛伐他汀及洛伐他汀酸对照品溶液进行全波长扫描, 结果表明, 两者的最大吸收均在 238 nm, 故选为 HPLC 分析的检测波长。综合考虑色谱峰形、

分离度以及色谱运行时间,对流动相进行了筛选和优化。结果表明,在 C_{18} 反相色谱柱上,以乙腈-0.01% 磷酸水(60:40)为流动相,洛伐他汀与洛伐他汀酸的分离度均满足定量分析的要求,且具有良好的色谱峰形和适宜的色谱保留时间,选为 HPLC 分析的流动相条件。

在优化色谱分析条件下,进一步采用不同实验室 Agilent 1100, Agilent 1260, Shimadzu LC-20AT 共 3 台液相色谱仪以及 3 根不同品牌、型号的色谱柱对洛伐他汀与洛伐他汀酸的 RCF 测定耐用性进行了考察,并验证了一测多评法与外标法测定结果的一致性。结果表明,相对校正因子重复性良好,一测多评与外标法对于红曲及其制剂的洛伐他汀酸含量测定结果无显著性差异,说明一测多评可以同时测定红曲及其制剂中洛伐他汀与洛伐他汀酸的含量。

测定结果表明,在脂必妥片中可同时检出洛伐他汀酸和洛伐他汀,二者的质量分数比约为 1:10,3 批制剂的洛伐他汀含量均符合部颁标准的限度要求,即不低于 $2.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同产地红曲药材中洛伐他汀和洛伐他汀酸质量分数波动较大,分别在 0.11% ~ 0.22% 和 0.023% ~ 0.089%,特别是洛伐他汀酸的含量差异可超过 3 倍。如仅以洛伐他汀计,只有福建福州的红曲药材符合 2015 年版《中国药典》附载的“红曲质量标准”要求($\geq 0.22\%$),但山东枣庄和福建泉州产红曲药材的洛伐他汀与洛伐他汀酸总量分别为 0.258% 和 0.311%,均满足《中国药典》规定的含量限度要求。上述实验结果表明,不同工艺条件下生产的红曲药材质量差异显著,在洛伐他汀酸含量上的差异尤为突出,因此,同时测定洛伐他汀和洛伐他汀酸含量对于红曲及其制剂的质量控制更具实际意义,也十分必要。

[参考文献]

[1] YANG C W, MOU S A. The effect of red yeast rice (*Monascus purpureus*) in dyslipidemia and other disorders [J]. *Complem Ther Med*, 2012, 20 (6): 466-474.

[2] 蔡若舟, 侯安国. 脂必妥制剂临床应用研究进展 [J]. *云南医药*, 2014, 35 (2): 227-229.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:6.

[4] Endo A, Hasuimi K, Neiishi S. Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber* [J]. *J Antibiot*, 1985, 38 (3): 420-422.

[5] 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.

[6] MA J Y, LI Y G, YE Q, et al. Constituents of red yeast rice: a traditional Chinese food and medicine [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11): 5220-5225.

[7] Stubbs R J, Schwartz M, Bayne W F. Determination of mevinolin and mevinolinic acid in plasma and bile by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1986, 383(2): 438-443.

[8] 于文斌, 孟青青, 张松玲, 等. 高效液相法测定琦红丸中酸式及内酯洛伐他汀含量 [J]. *长春中医药大学学报*, 2011, 27(5): 848-849.

[9] 杨艳, 郑仁锦, 华永有, 等. 高效液相色谱法同时测定保健红曲中酸式与内酯洛伐他汀含量 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2014(12): 1714-1717.

[10] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2525-2529.

[11] 徐晓雪, 李晓鹏, 韩伟健, 等. 一测多评法测定手参中不同类型成分的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18): 40-43.

[12] 乔媛媛, 黄琦雅, 余婷婷, 等. 一测多评法测定藏族药肉果草中 4 种成分的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 99-102.

[13] 李敏, 郭威, 于姗姗, 等. 一测多评法测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(4): 79-82.

[14] 高慧敏, 宋宗华, 王智民, 等. 适合中药特点的质量评价模式—QAMS 研究概述 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(4): 405-416.

[责任编辑 顾雪竹]