

降脂红曲产品中 Monacolin K 检测方法的比较

赵光隆, 张薄博, 许赣荣*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为准确测定降脂红曲类产品中 Monacolin K(MK)的质量浓度。作者对中华人民共和国轻工行业标准(2007)、保健食品检验与评价技术规范(2003 版)、台湾食品中 MK 检验方法(2012)以及其它方法进行比较。确定朱华等的检测方法较优, MK 在质量浓度 10~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 加标回收率为 96.3%, 方法精密度 RSD=1.6%。该方法简单、快捷, 能够比较准确地反映红曲类产品中不同构型 MK 质量浓度, 具有很高的实用价值。

关键词: 降脂红曲; 莫纳可林 K; 检测方法

中图分类号: R 927.11 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)01-0046-05

Compare of Monacolin K Detection Method in Lipid-Lowering *Monascus* Products

ZHAO Guanglong, ZHANG Bobo, XU Ganrong*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To accurately examine the amounts of *Monacolin K* (MK) in lipid-reducing *Monascus* products, in this paper we compared to the light industry standard of the People's Republic of China (2007), the health care food inspection and evaluation specification(2003), Taiwan food inspection method of MK (2012) and Zhu Hua et al. applied method. The results show that Zhu Hua et al. applied method was superior. MK linearity was good within 10~400 $\mu\text{g/mL}$, and addition recovery rate was 96.3%, RSD=1.6%. This method was simple, quick and accurate to examine the amounts of MK, with very great practical value.

Keywords: lipid-lowering *monascus*, MK, detection method

降脂红曲是经过红曲菌发酵, 富含降血脂活性物质 Monacolin K(以下简称 MK)的红曲产品。自从 1979 年, 日本远藤章^[1]从红色红曲菌(*Monascus ruber*)的培养液中获得一种胆固醇合成抑制剂, 并命名为 Monacolin K(中文名, 莫纳可林 K), 后被证

实与降血脂药物洛伐他汀(lovastatin)为同一种物质。它能够有效抑制胆固醇合成过程中关键酶 HMG-CoA(3-羟基-3-甲基-戊二酰基-辅酶 A 还原酶)的活性^[2]。

MK 有两种分子构型: $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (酸式构型)、

收稿日期: 2015-03-20

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD23B02)。

* 通信作者: 许赣荣(1957—)男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 主要从事功能性红曲及微生物发酵法生产天然色素研究。

E-mail: grxu123@126.com

引用本文: 赵光隆, 张薄博, 许赣荣. 降脂红曲产品中 Monacolin K 检测方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 46-50.

$C_{24}H_{36}O_5$ (内酯式构型),结构式见图 1。微生物发酵法得到的都是酸式结构的 MK, 它可以直接溶于体液并发挥生理作用; 但它比内酯式的稳定性差, 内酯式的 MK 要在体内先转化成酸式的才能被吸收并发挥作用^[3]。

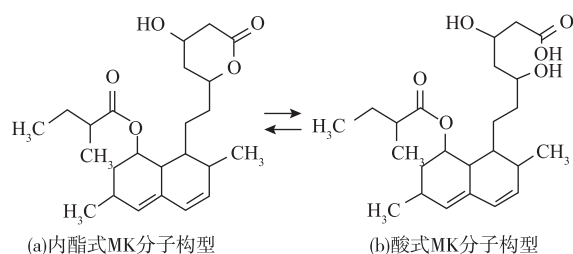


图 1 MK 分子结构

Fig. 1 MK molecular structure

红曲菌和土曲霉都可发酵产生降脂活性成分 MK。微生物发酵法合成的 MK 是酸式结构。但为了保证洛伐他汀的稳定性, 在土曲霉生产洛伐他汀的提取纯化过程中将其转化成内酯式结构。降脂红曲产品一般是通过固态发酵来生产的, 无需复杂的后处理就可直接服用, 故产品中保留了大量的酸式 MK, 但在生产过程中, 由于烘干贮存等过程, 酸式 MK 会自然转变成内酯式结构^[4]。一般情况下固态发酵的降脂红曲产品中酸式 MK 和内酯式 MK 共存。

目前国内市场上有多种类型的降脂红曲产品: 中成药、中药饮片、保健食品。对这些产品中 MK 的测定, 也是依据各自的标准采用不同的方法来检测。这些标准分别是: 中华人民共和国轻工行业标准(2007)^[5](以下简称轻工方法)、保健食品检验与评价技术规范(2003 版)^[6](以下简称保健食品方法)、台湾食品中 MK 之检验方法(2012)^[7](以下简称台湾方法)。此外朱华等在 2005 年报道过的一种方法^[8](以下简称朱华等的方法)。

从检测技术的角度来看, 仔细考察上述 4 种检测 MK 的方法, 发现有相同之处, 也有不同之处。保健食品方法中 MK 的检测方法参考美国药典^[9]中洛伐他汀的检测方法, 只测定内酯式 MK。即使降脂红曲产品中含有酸式结构的 MK, 用此法也无法得出酸式结构 MK 的含量。还有一个值得注意的问题是, 不同的方法采用的萃取溶剂种类不同, 或者样品萃取时间有长有短。显然, 依据不同的标准, 就有不同的方法检测 MK, 这就很可能出现一个问题, 即按照不同的方法检测同一个产品, 可能会得到不同

的检测数据。

因此, 作者对同一批降脂红曲产品, 按照上述 4 种不同的方法进行了测定, 根据检测数据对不同的检测方法展开讨论和比较, 从而为建立更为科学、规范的降脂红曲活性成分 MK 的检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Waters 液相色谱仪: 色谱柱: Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×250 mm; 5 μ m); Waters 公司产品。

1.2 试剂

洛伐他丁标准品: 中国食品药品检定研究院提供。

2 检测方法

2.1 标准溶液制备

取 MK 内酯型标准品 20 mg, 精确称量, 以乙腈溶解并定容至 10 mL, 作为标准原液, 于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

2.1.1 MK 内酯型标准溶液制备 取一定量标准原液以乙腈稀释至 5.0~400.0 μ g/mL, MK 内酯型标准溶液。

2.1.2 MK 酸型标准溶液 取标准原液 1 mL 于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL, 旋涡混合均匀, 于 50 $^{\circ}$ C 超声波水浴振荡反应 1 h, 冷却至室温后, 以乙腈定容至 10 mL, 继以乙腈稀释至 5~418 μ g/mL, 供作 MK 酸型标准溶液。内酯式 MK 相对分子质量为 404.55, 酸式 MK 相对分子质量为 422.57, 故经过换算得此时的酸式 MK 的浓度。 y 为检测峰面积, x 为对应 MK 质量浓度, 绘制标准曲线。

酸式: $y=74\ 175x-77\ 348$, $R^2=0.999\ 8$, 准确检测下限 10.4 μ g/mL

内酯式: $y=75\ 873-87\ 703$, $R^2=0.999\ 1$, 准确检测下限 10.0 μ g/mL

从原理上推测, 用内酯式公式足以代表酸式的计算。

2.2 各标准中的检测方法

2.2.1 中华人民共和国轻工行业标准(2007)中的检测方法 提取条件: 将红曲米粉碎(40 目, 粉状)并充分混合均匀。准确称取 400.0~600.0 mg 试样于 50 mL 容量瓶中, 加入 30 mL 75%乙醇(体积分数), 摇匀, 室温下超声 50 min。加 75%乙醇至接近刻度, 再超声 10 min, 之后冷却至室温, 用 75%乙醇定容至

50 mL。以 3 500 r/min 的旋转速度离心 10 min。取上清液经 0.45 μm 过滤,滤液待用^[5]。

色谱条件:色谱柱:EclipseXDB-C18(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250mm);流动相: $V(\text{甲醇}):V(\text{水}):V(\text{磷酸})=385:115:0.14$ (体积分数);流量:1.0 mL/min;紫外检测波长 238 nm;进样量:20 μL ;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ ^[5]。

2.2.2 保健食品检验与评价技术规范 (2003 版)的检测方法 提取条件:将片剂、胶囊或红曲发酵产物试样粉碎并混合均匀,根据样品中洛伐他汀含量准确称取一定量试样于 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。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 1.0~5.0 mL 试管中,将试管置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 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 0.45 μm 滤膜过滤后待进样^[6]。色谱条件:同轻工方法。

2.2.3 台湾 MK 之检测方法(2012) 提取条件:检体均质混匀后称取 0.2 g,精确称定,置于 25 mL 定量瓶中,加入甲醇约 25 mL,旋涡混合均匀后,于室温超声波水浴中震荡萃取 30 min,冷却至室温后,以甲醇定容。以 3 000 r/min 离心 10 min,取上层液,以滤膜过滤,供作检液^[7]。

色谱条件:色谱柱:EclipseXDB-C18(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm);流动相: $V(\text{乙腈}):V(0.1\%\text{磷酸溶液})=65:35$;流量:1.5 mL/min;紫外检测波长 238 nm;

进样量:10 μL ;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ ^[7]。

2.2.4 朱华等的检测方法 提取条件:乙醇提取法:精确称取 0.5 g 样品于 50 mL 标准比色管中,用体积分数 70%乙醇定容至 50 mL,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴浸提 1 h,其间每隔 20 min 震荡摇匀一次。浸提结束取出冷却至室温,取上清液微滤待测^[8]。

色谱条件:色谱柱:EclipseXDB-C18(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm);流动相: $V(\text{乙腈}):V(0.1\%\text{磷酸溶液})=55:45$;流量:1 mL/min;紫外检测波长 238 nm;进样量:20 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ^[8]。

3 结果与讨论

3.1 内酯式 MK 加标回收率实验

为了探究 4 种方法中不同的提取条件对样品提取效果如何,作者进行了加标回收实验,称取同一批红曲粉 3 份,分别加入 3 个梯度的内酯式 MK,进行加样内酯式 MK 回收实验,统一采用本实验色谱条件检测,结果如表 1 所示,4 种标准的检测方法中,保健食品方法回收率最低且相对标准偏差较大无法满足检测准确性的要求。台湾方法中提取时间较短,回收率偏低。轻工方法与朱华等的方法样品提取回收率都比较高,回收率 $\geq 95.0\%$,均满足样品检测准确性要求,样品检测稳定性朱华等的方法 RSD=1.6%优于轻工行业标准

3.2 流动相的比较实验

流动相作为液相检测中非常重要的因素,不同的流动相成分以及不同成分的比例对样品的出

表 1 内酯式 MK 回收率实验比较

Table 1 Compares the lactone type MK recovery experiment

检测方法	质量分数/(mg/kg)	加标/(mg/kg)	测得值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
轻工方法	660	2 900	3 511	96.6	95.0	1.8
	636	5 700	6 158	95.2		
	647	8 600	9 157	93.3		
保健食品方法	577	2 900	3 210	89.8	86.9	3.4
	561	5 700	5 517	83.9		
	565	8 600	8 143	87.1		
台湾方法	583	2 900	3 317	93.3	92.0	1.8
	602	5 700	5 908	90.1		
	609	8 600	8 655	92.6		
朱华等的方法	663	2 900	3 530	97.6	96.3	1.6
	634	5 700	6 173	96.7		
	667	8 600	9 122	94.6		

峰时间和峰形有直接影响,直接影响到样品检测的准确性。实验对不同检测方法中的流动相对标准品的分离效果较好进行比较。轻工方法和保健食品方法: $V(\text{甲醇}):V(\text{水}):V(\text{磷酸})=385:115:0.14$ 流动相,从标准品图谱(图2)来看,酸式 MK $R_t=11.638$,内酯式 MK $R_t=13.296$,色谱峰相邻,从混合标样来看,两峰刚好分开,但是在实际样品检测中,由于样品成分复杂和外界条件干扰等因素峰形会发生前沿或拖尾现象,使得两峰无法完全分开。台湾方法: $V(\text{乙腈}):V(0.1\% \text{磷酸溶液})=65:35$,标准样品图谱(图3),酸式 MK $R_t=4.345$,内酯式 MK $R_t=7.605$,流动相中乙腈含量过高导致 MK 的保留时间比较短,在实际样品检测中会与样品中的杂质和溶剂峰混杂在一起,影响含量的准确测定。朱华等的方法: $V(\text{乙腈}):V(0.1\% \text{磷酸溶液})=55:45$,从图谱来看(图4),降低流动相中乙腈的含量,延长了 MK 的出峰时间,有效的避免了杂质和溶剂峰的干扰且峰形良好,分离效果较好。

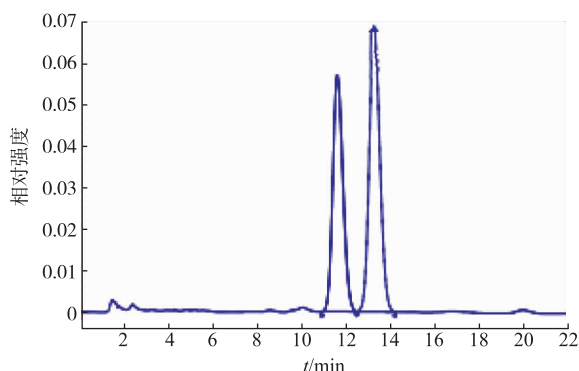


图2 轻工和保健食品方法混合标样图谱

Fig. 2 Light Industry and Health food industry method HPLC analysis

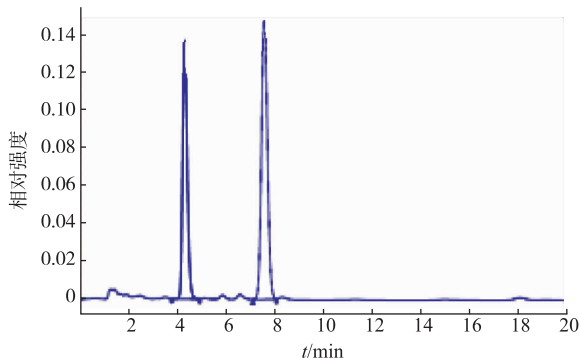


图3 台湾方法混合标样图谱

Fig. 3 Taiwan method HPLC analysis

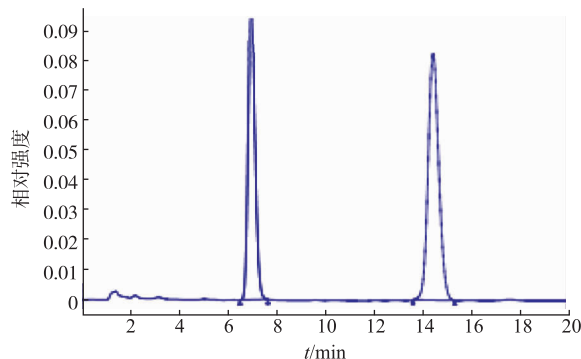


图4 朱华等方法混合标样图谱

Fig. 4 Zhu Hua et al. applied method HPLC analysis

3.3 样品检测实验

称取同一批降脂红曲粉3份,分别用4种标准中的方法进行检测,结果表明:轻工方法红曲粉中 MK 同时以酸式和内酯式的2种形式存在,提取相对比较彻底,液相检测两峰略有重叠,基本满足样品检测的要求。保健食品方法的萃取方法中用 $\text{pH}=3$ 的磷酸水溶液提取过程中要将部分酸式 MK 转化成内酯式,这导致酸式含量减少,并且提取不够彻底,过程步骤复杂,随机误差偏大;台湾方法的萃取时间较短,无法将 MK 萃取完全,导致 MK 总含量偏低,并且出峰时间过早,尤其酸式 MK 的检测峰与杂质峰发生重叠,影响检测结果的准确性;朱华等的方法萃取效率最高,液相检测峰型和出峰时间都比较理想,能够比较准确的反应其出红曲粉中的存在形态和含量。

4 结语

通过比较轻工方法、保健食品方法、台湾方法以及朱华等的检测 MK 的方法,发现,采用不同的方法(主要是目标物的萃取条件和色谱条件),对同一样品会得到不同的检测结果。轻工方法中的提取条件比较符合样品检测要求,但在该方法的色谱条件中,酸式和内酯式 MK 两峰易出现重叠,导致检测误差;保健食品方法中的样品提取过程中,需要将部分酸式 MK 转化成内酯式,导致检测结果中酸式比例偏低,且操作过程步骤复杂,且该法只用内酯式的 MK 表示含量,对同时含有酸式和内酯式 MK 的红曲产品有失公允;台湾方法中的样品提取时间较短,会导致 MK 提取不够彻底,并且 HPLC 出峰过早,易使杂质峰重叠;朱华等的检测方法中样品提取和色谱条件比较符合样品检测的要求,过程

表 2 不同提取方法结果比较

Table 2 Compares the results of different extraction methods

检测方法	酸式/(mg/kg)	内酯式/(mg/kg)	总质量分数/(mg/kg)	酸式比例/%	内酯式比例/%
轻工方法	2300	660	2961	77.7	22.3
	2246	636	2882	77.9	22.1
	2290	647	2937	78.0	22.0
保健食品方法	1234	577	1810	68.2	31.8
	1326	561	1887	70.3	29.7
	1294	565	1859	69.6	30.4
台湾方法	1697	583	2280	74.4	25.6
	1734	602	2336	74.2	25.8
	1751	609	2361	74.2	25.8
朱华等的方法	2391	663	3055	78.3	21.7
	2302	634	2936	78.4	21.6
	2407	667	3075	78.3	21.7

简便快捷,具有较高的实用价值。

作者研究的 HPLC 检测方法只采用了一种柱子
对不同方法所获得的提取液进行检测,难免对其它

方法中涉及到 HPLC 的有关条件无法完全模拟或满足,因此也不能完全否认这些方法。

参考文献:

- [1] AKIRA Endo. MK, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. **J Antibiotics**, 1979, 32: 852-854.
- [2] OUYANG Shu, ZHU Baoquan, GONG Bingyong. Study of cholesterol biological synthetase inhibitors-antibiotics SIPI-89-17-III [J]. **Journal of Chinese Antibiotics**, 1998, 18(2): 128-135.
- [3] YANG Dajin, FANG Congrong, MA Lan, et al. Study on determination method of lovastatin in health foods[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2003, 15(2): 125-127.
- [4] CHEN Yun, CHEN Ye, XU Ganrong. The effect of drying and radiation on the Monacolin K content in functional *monascus* red rice[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(4): 16-19.
- [5] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 中华人民共和国轻工行业标准[S]. QB/T 2847-2007.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. GB 16740-2003.
- [7] 台湾地区“行政院”卫生署. 食品中 MK 之检验方法[S]. 1011900494-2012.
- [8] ZHU Hua, XU Ganrong, CHEN Yun. HPLC analysis of acid form and lactone form Monacolin K [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2003, 22(3): 46-52.
- [9] United States Pharmacopeial Convention United States Pharmacopeial Convention. Lovastatin and Lovastatin tablets[M]. USP35, US, 2012.2850-2851.