

保健食品中洛伐他丁测定方法研究

杨大进 方从容 马 兰 王竹天

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为建立保健食品中洛伐他丁的高压液相色谱测定方法,首先明确了洛伐他丁酸式、内酯和甲酯 3 种结构中内酯为测定结构,通过研究提取、净化方法,尤其是温度、pH 值等重要影响因素和仪器分析条件后,确定了可行的检测方法。能在 2 d 内以一种结构进行洛伐他丁测定,保证结果能准确反映样品的实际情况。本方法低加标浓度平均回收率为 96.3%,高加标浓度平均回收率为 107.4%,相对标准偏差 3.0%,最小检出限 0.08 mg,结果符合食品理化分析的要求,适用于原料、胶囊、保健醋等试样的检测。6 年来的稳定性实验表明,固体样品的稳定性良好。

关键词:营养保健品;食品分析;洛伐他丁;色谱法,高压液相

Study on determination method of lovastatin in health foods

Yang Dajin, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: For developing the determination method of lovastatin in health foods by HPLC, we first inspected the molecular structure of lovastatin and ascertained that lactone is the best one for determination among the acid, lactone and methyl ester forms. The feasible method was decided through a complete research of extraction and purification method, important influence factors especially temperature, pH and HPLC operation conditions. Lovastatin in one structure was determined within 2 days, which accurately mirrors the real state of the sample. Recoveries of higher and lower standard spiked were 107.4% and 96.3% respectively, the RSD was 3.0%. The results fitted the demand of food analysis. This method can be used in the analysis of raw materials, capsules and functional vinegars. Results of 80 stability experiments showed that solid-state samples were more stable.

Key Words: Dietary Supplements; Food Analysis; Lovastatin; Chromatography, High Pressure Liquid

他丁类药物突出的功效是对动物和人体 3-羟甲基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA 还原酶)有抑制作用,从而达到调节血脂、降低胆固醇和治疗冠心病的目的。主要包括的品种有洛伐他丁(lovastatin)、辛伐他丁(simvastatin)、普伐他丁(pravastatin)、氟伐他丁(fluvastatin)、西立伐他丁(cerivastatin)和阿伐他丁(atovastatin)等。^[1~5]洛伐他丁是红曲霉在其生长后期产生的、能有效降低血浆胆固醇。1979 年由日本学者远藤章从红曲霉发酵液中分离得到,称为 Monacolin K。由于其疗效显著、毒副作用小、耐受性好而日渐受到重视,是目前在保健食品中

唯一应用的他丁类物质。

洛伐他丁的纯品为白色针状晶体,分子式 $C_{24}H_{36}O_5$,分子量为 404,在甲醇中的紫外吸收峰分别为 229、238、246 nm,其中最大吸收峰为 238 nm,易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、苯,不溶于正己烷。

国内外目前对于洛伐他丁的检测方法主要有紫外分光光度法、薄层色谱法和高效液相色谱法。^[6~10]文献报道洛伐他丁在甲醇中呈 3 种结构形式:pH7.7 时呈现开环酸式结构;pH 3.0 时呈现内酯结构;洛伐他丁开环酸式与甲醇形成酯的形式。采用何种形式进行分析在目前尚有较大争议,但只有最

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-01-20)

作者简介:杨大进 男 副研究员

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health, China (BJ-01-20).

大限度地将洛伐他丁转化为一种形式进行分析,才能保证结果的准确。本文认为洛伐他丁(Monacolin K)本身和标准物质均属于内酯形式,且内酯属于比较稳定的形式,故在此前提下开展检测方法研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 甲醇(色谱纯);三氯甲烷(分析纯);磷酸(分析纯);洛伐他丁标准储备液,准确称量洛伐他丁标准品 0.0400 g,加入检测用甲醇并定容至 100 mL,此溶液每毫升含 0.4 mg 洛伐他丁。洛伐他丁标准使用液:将洛伐他丁标准储备液用甲醇稀释 10 倍,此溶液每毫升含 40 μ g 洛伐他丁。

1.1.2 高效液相色谱仪 附紫外检测器(UV)美国 Water's 公司,Water's 600E;超声波清洗器;涡旋混匀器;离心机;真空泵。

1.2 分析步骤

1.2.1 试样处理

将片剂、胶囊或红曲发酵产物试样粉碎并混合均匀,根据试样中洛伐他丁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,置于涡旋混匀器混匀 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。液体试样调节 pH 值后可直接用三氯甲烷提取。

准确吸取三氯甲烷萃取液 1.0 mL 至 5 mL 试管中,将试管置于 50 $^{\circ}$ C 左右水浴中使用真空泵减压至挥去全部溶剂。

向试管中加入甲醇并定容至 5.0 mL,混匀,经 0.45 μ m 滤膜过滤后供液相色谱分析。

1.2.2 液相色谱参考条件

色谱柱 μ -BONDAPAKTMC18 或类似的 C18 柱 4.6 mm \times 250 mm;柱温 室温;检测器 紫外检测器,检测波长 238 nm;流动相 甲醇+水+磷酸 = 385 + 115 + 0.14;流速 1.0 mL/min。

1.2.3 色谱图

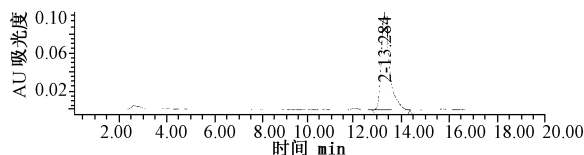


图 1 标准色谱图

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的选择 前处理方法的关键问题是如何保证洛伐他丁能以一种形式进行分析,保证分析结果能真正代表试样的实际含量。洛伐他丁具有 3 种结构,除开环酸式结构与甲醇形成的酯不能

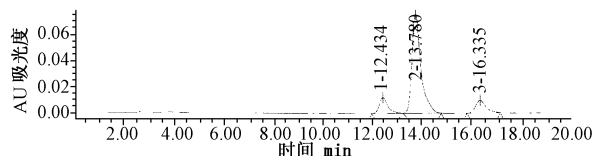


图 2 试样转化后色谱图

作为分析目标物外,开环酸式结构和内酯结构均可用于分析。Friedrich 在文献报道中提及洛伐他丁结构问题,并尝试按开环酸式结构进行分析,试样需要在 50 $^{\circ}$ C 0.1 mol/L NaOH 溶液中超声转化 1 h,再用 1 mol/L HCl 调为 pH 7.7,可成为开环酸式,流动相为磷酸盐缓冲溶液(pH 7.7) + 乙腈 = 65 + 35。按其论点,在有水存在的情况下,开环酸式比酯更稳定,且保留时间短。^[11]内酯结构的测定可按 1.2 进行。本文认为根据洛伐他丁的结构形式和稳定性因素,内酯结构是分析洛伐他丁的最佳形式。其原因是酯比较稳定,洛伐他丁本身和现有的标准物质均属于内酯结构,内酯的分析更简单。

2.1.1 酸度和温度对分析结果的影响 为了解酸度和温度等条件对分析结果的影响,进行了如下试验。试样于 2001 年 4 月 9 日分别按进行内酯和酸式 2 种结构处理并重复检测,处理好的试样保存于冰箱中,以观察试样的变化,具体变化情况见表 1、表 2。

表 1 不同放置时间和前处理温度对测定内酯结构分析结果的影响 %

日期	加热温度	加热时间 h	保留时间	保留时间	保留时间
			12 min	13 min	16 min
2001/4/9	室温(20)	/	0	100	0
	50	2	0	100	0
	80	2	38	62	0
	100	2	54	46	0
2001/4/10	室温(20)	/	0	100	0
	50	2	3	95	2
2001/4/11	室温(20)	/	5	94	1
	50	2	9	84	7
2001/4/12	室温(20)	/	9	87	4
	50	2	17	70	13

注:酸度为 pH 3,以可能存在的 3 个色谱峰面积的分数的表示。"/"为未加热

表 2 不同放置时间对测定内酯结构分析结果的影响

日期	保留时间 12 min	保留时间 13 min	保留时间 16 min
2001/4/9	0	100	0
2001/4/10	5	93	2
2001/4/11	10	83	7
2001/4/12	20	67	13

注:酸度为 pH 5.20 室温条件下,以可能存在的 3 个色谱峰面积的分数的表示。

从表 1、表 2 测定的内酯结构形式中可以看出, pH 3 时,未加热试样至少可以稳定 2 d,首日加热 50 $^{\circ}$ C 时无显著变化,随着加热温度的升高,试样转

化较为明显。此外 pH 值升高与试样转化之间呈正相关。经确证,保留时间 12 min 的物质是洛伐他丁的酸式结构,保留时间 13 min 的物质是洛伐他丁的内酯结构,保留时间 16 min 的物质是洛伐他丁开环酸式结构与甲醇形成的甲酯形式。因此 pH 3,不加热是洛伐他丁内酯结构分析的最佳条件,但处理完成的试样应尽可能保证在 2 d 之内分析。

在测定酸式结构时,按照 Friedrich 建立的方法,酸式结构在 3 d 内未见明显变化,保留时间为 9 min。但实验发现,提取溶液的碱性增加与试样的测定值呈负相关。

反复多次对上述 2 种结构测定比较,本文认为测定内酯结构前处理简单、快速,色谱分离效果好,2 d 之内检测结果稳定,更适于常规分析。

2.1.2 文献报道洛伐他丁在碱性水溶液中的溶解性要大于中性和酸性水溶液,经过大量多种酸度条件下的试样试验未发现三者之间有明显差异。

2.1.3 选择三氯甲烷作为提取溶剂的目的 三氯甲烷对于洛伐他丁有非常好的溶解性,三氯甲烷几乎不溶于水,故有利于两者之间分层,三氯甲烷挥发性尚好。采用三氯甲烷作为提取溶剂提取净化效果较好,在该波长条件下未见有杂质干扰。有文献指出测定发酵产物需要采用中型氧化铝柱作为净化手段,本文通过大量实际样品分析认为没有必要。

2.1.4 溶剂挥发方式 为使挥发时间尽可能短,采取 50 左右水浴加热、隔膜真空泵抽真空方式,实际应用效果良好。

2.2 仪器分析条件的选择 在关于洛伐他丁的仪器分析报道中,基本上以 ODS 反相色谱柱为主,本文对其分析的色谱柱进行了选择,Water's μ -BONDAPAKTM C18、日本 TOSOH TSK - GEL ODS - 80Ts、Varian Microsorb - MVTM 100A C18 等牌号的色谱柱均能对洛伐他丁进行很好的分离。以文中提供的流动相条件,Water's μ -BONDAPAKTM C18 在 20~13 min 左右出峰,而其他 2 种色谱柱在 30 min 以上还需 18 min 左右。流动相文献报道多为甲醇+水、乙腈+水或缓冲溶液体系,pH 值应在 3~4。通过对多种流动相系统进行实际应用,并从配制方便、价格便宜、毒性小等因素考虑甲醇+水体系最佳。

2.3 方法的线性范围 分别配制浓度为 2.60、5.20、26.0、52.0、260 μ g/mL 洛伐他丁标准溶液,在上述仪器条件下进行液相色谱分析,以峰面积对浓度作校正曲线,得到线性回归方程和线性相关系数分别为 $y = 23\,814.5x - 12\,802.4$, $r = 0.999\,9$ 。方法的最小检出限为 0.08 mg。

2.4 方法的准确性 根据试样测定步骤,作 2 个浓

度加标回收试验,每个浓度做 6 个平行,对于某一含量为 0.69 g/100 g 试样,低加标浓度(0.37 g/100 g)平均回收率为 96.3%,高加标浓度(1.11 g/100 g)平均回收率为 107.4%,回收率结果符合食品理化分析的要求,方法验证单位的验证结果与此相符。

2.5 方法的精密度 为考察方法的精密度,对某一保健食品同时进行 6 次测定,结果见表 3。相对标准偏差 3.0%,说明该方法的精密度较好。

表 3 试样精密度测定结果 g/100 g

1	2	3	4	5	6	平均值	RSD %
0.74	0.70	0.72	0.75	0.76	0.73	0.73	3.0

2.6 实际样品测定和稳定性情况 6 年来,共采用本方法对近 80 件送检样品包括洛伐他丁原料粉、胶囊、保健醋等样品进行检测,检测结果表明由于该类保健食品属于发酵产物,故批与批之间的含量存在差异。在规定的保存条件下 3 个月内固体样品含量没有显著变化。样品在常温干燥器中放置 2 年以上,含量也没有显著变化。试验结果见表 4。

表 4 实际样品稳定性试验结果 g/100 g

试验次数	加速保存试验		自然状态保存	
	时间	含量	时间	含量
原始数据		3.4		3.4
第一次试验	1 个月	3.6	6 个月	3.4
第二次试验	2 个月	3.4	1 年	3.5
第三次试验	3 个月	3.4	2 年	3.4

参考文献:

- [1] 傅绪杰,刘洪涛,蒋继传,等. 国产洛伐他丁治疗高脂血症[J]. 前卫医药杂志,1997,14(1):40.
- [2] 颜彦. 新型降脂药—氟伐他丁[J]. 岭南心血管病杂志,1997,3(2):46—48.
- [3] 高国静,华琦. 辛伐他丁与洛伐他丁调节血脂作用的比较[J]. 首都医科大学学报,1998,19(1):49—50.
- [4] 潘启超. 调血脂新药—西立伐他丁的研究[J]. 广州医药,2000,31(3):1—2.
- [5] 王文. 普伐他丁国内外研究[J]. 中国循环杂志,1995,10(11):696—698.
- [6] 程小冬,王庆国. 用反相色谱法测定洛伐他丁含量的方法研究[J]. 济宁医学院学报,1999,3:33—34.
- [7] 李兰生,关俊龙. 反相色谱法测定洛伐他丁含量的方法[J]. 青岛化工学院学报,1999,20(4):353—356.
- [8] 黄宏男. RP-HPLC 分离测定红曲中洛伐他丁[J]. 海峡预防医学杂志,2000,16(4):40—41.
- [9] 宋洪涛,宓鹤鸣,郭涛,等. HPLC 法对不同来源红曲中洛伐他丁的定量分析[J]. 中草药,1999,30(2):100—102.
- [10] 高嘉安,郭东,陈淑杰,等. 红曲霉菌生理活性物质 Monacolin K 的检测[J]. 吉林农业大学学报,1996,18

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2003)02-0125-04

反相高效液相色谱法分析米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸

赵珊¹ 李业鹏² 计融² 贺玉梅¹ 李玉伟²

(1. 北京市疾病预防控制中心,北京 100013;2. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为建立米曲霉培养液中圆弧偶氮酸的检测方法,采用4%乙酸水溶液(三氟乙酸调至pH 2.2)与乙腈配比做流动相(55+45),选择280 nm紫外吸收波长,测定米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸,圆弧偶氮酸在C18色谱柱上获得良好的分离,检出限为0.002 μg/mL;麦芽汁-蛋白胨培养液、麦芽汁-酵母膏培养液、马铃薯-酵母膏培养液中的圆弧偶氮酸回收率分别为93.4%、95.2%、96.7%;RSD分别为4.3%、3.4%、3.2%。该方法适宜米曲霉发酵液中圆弧偶氮酸的检测。

关键词:色谱法,高压液相;曲霉,米;真菌毒素类

Analysis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae* liquid media by reversed-phase high-performance liquid chromatography

Zhao Shan, et al.

(Beijing Center for Disease Prevention and Control, China, Beijing 100013)

Abstract: A new and efficient method for analyzing cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae* liquid media by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was developed. The cyclopiazonic acid was well separated on a C18 column using acetonitrile-4% acetic acid (pH 2.2 adjusted with trifluoacetic acid) (45+55) as the mobile phase, followed by an UN detection at 280 nm. The detection limit was 0.002 μg/mL. The spiked recoveries in wort-yeast culture, wort-peptone culture and potato-yeast-sugar culture were 93.4%, 95.2% and 96.7%, respectively. The RSD values were 4.3%, 3.4% and 3.2% respectively.

Key Words: Chromatography, High Pressure Liquid; *Aspergillus oryzae*; Mycotoxins

圆弧偶氮酸(Cyclopiazonic acid, CPA)是由曲霉属和青霉属的真菌产生的有毒代谢产物。其分子式为C₁₀H₂₀N₂O₃,分子量为336.15。1985年 Rao 和 Husain 首次报道了由 *Aspergillus flavus* 和 *Aspergillus tamaris* 产生的 CPA 引起的人类真菌毒素中毒。^[1] CPA 可引起大鼠的肝、肾组织及免疫系统的损伤,^[2] 往往与黄曲霉毒素同时存在,因此 CPA 的中毒往往被黄曲霉毒素中毒所掩盖。^[3] 目前,国内尚无 CPA 的检测方法,本文建立了米曲霉培养液中 CPA 的反相高效液相色谱法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 VE-328、UE-336、3042、3811 购自北京市食品发酵研究所。

1.1.2 马铃薯-葡萄糖琼脂培养基 马铃薯 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,115℃,15 min。^[5]

1.1.3 麦芽汁 购自北京市啤酒厂。

1.1.4 马铃薯汁 取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加入 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 20 min,纱布过滤。^[4]

1.1.5 麦芽汁-酵母膏培养液(简称麦-酵) 1%

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-01-20)
作者简介:赵珊 女 副主任技师 硕士

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health, China (BJ-01-20).