

研究报告

食用色素红曲红组分分析与初步安全性评价研究

王柯新^{1,2},谭剑斌²,黄振峰³,王红霞^{2,4},杨杏芬⁴,陈壁锋²,胡婷婷³,黄志彪²,赵敏²,曾转萍¹

(1. 广东药科大学公共卫生学院,广东广州 510310;2. 广东省疾病预防控制中心,广东广州 511430;
3. 华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 510006;4. 南方医科大学公共卫生学院,
广东广州 510515)

摘要:目的 对食用色素红曲红开展关键组分分析和毒理学评价,为进一步利用提供基础数据。方法 通过 GB 1886.181—2016 对红曲红样品进行鉴别试验和理化指标检测,并采用高效液相色谱(HPLC)测定样品中桔青霉素(CIT)和莫拉可林(Monacolin K)含量水平。采用超高效液相色谱-静电场轨道阱-质谱(UPLC-Orbitrap-MS²),对红曲红的组分及其含量进行分析,并对分子结构进行表征。采用限量法开展红曲红小鼠急性经口毒性实验,在此基础上,开展 SD 大鼠经口 14 d 毒性实验。结果 受试样品红曲红的质量规格符合食品安全国家标准要求,其中 CIT 和 Monacolin K 的含量分别为 0.030 8 mg/kg(单位色价计)和 0.166 mg/g;受试样品检测出 20 种组分,其中红色素、橙色素、黄色素比例分别为 88.38%、2.04%、5.96%。小鼠急性经口毒性实验结果红曲红半数致死量(LD₅₀)>20 g/kg·BW;大鼠 14 d 经口毒性实验,5 g/kg·BW 剂量组与对照组比较,一般临床观察、血液学、血清生化、尿液常规、病理学检查等指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 受试样品红曲红由红色素为主要特征成分的多组分构成,初步安全性评价未见明显的毒性作用和靶器官,可为进一步长期安全性研究提供参考。

关键词:红曲红;食用色素;成分分析;安全性评价

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)02-0163-11

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.02.003

Composition analysis and preliminary safety evaluation of edible *Monascus* red pigment

WANG Kexin^{1,2}, TAN Jianbin², HUANG Zhenfeng³, WANG Hongxia^{2,4}, YANG Xingfen⁴,
CHEN Bifeng², HU Tingting³, HUANG Zhibiao², ZHAO Min², ZENG Zhuanping¹

(1. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Guangzhou 510310, China;
2. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 511430, China;
3. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangdong
Guangzhou 510006, China;4. School of Public Health, Southern Medical University, Guangdong
Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To provide scientific basis for the development and utilization of edible pigment *Monascus* red, the analysis of its key components and toxicological evaluation were carried out. **Methods** Identification test and physicochemical indexes test were carried out based on the samples according to the method in National food safety standard GB 1886.181—2016. The content of citrinin (CIT) and Monacolin K were detected through high performance liquid chromatography (HPLC). UPLC-Orbitrap-MS² were used for chemical composition and content determination, in which the molecular structure was also characterized. The 14-day oral toxicity test of SD rats was carried out, based on the acute oral toxicity test of *Monascus* red by the limited method. **Results** The quality and specification of test samples conformed to the provisions of China National Food Safety Standard. The content of CIT and Monacolin K was 0.030 8 mg/kg (converted as one color value) and 0.166 mg/g. Twenty compounds were separated in *Monascus* red by UPLC-Orbitrap-MS², red pigment, orange pigment and yellow pigment of it accounted for 88.38%, 2.04% and 5.96%, respectively. The

收稿日期:2022-07-21

基金项目:广东省重点领域研发计划(2019B020210002,2019B020210001);广州市科技计划(201803010105)

作者简介:王柯新 女 在读研究生 研究方向为疾病预防与控制 E-mail:2721016913@qq.com

通信作者:赵敏 女 主任医师 研究方向为食品安全性评价和风险评估 Email:zhaomin900901@qq.com

曾转萍 女 副教授 研究方向为慢性病流行病学 E-mail:1141518464@qq.com

results of acute oral toxicity showed that *Monascus* red was innocuous ($LD_{50} > 20 \text{ g/kg} \cdot \text{BW}$). In the 14-day repeated oral dose toxicity test, compared with the control group, rats in $5 \text{ g/kg} \cdot \text{BW}$ dose group exhibited no significant differences in the general clinical observation, growth and development, hematology, blood biochemistry, routine urine detection, gross anatomy, organ weight, organ-to-body ratio, and histopathological examinations. **Conclusion** *Monascus* red is composed of multiple components characterized by red pigments. There is no obvious toxic effects found in the preliminary safety evaluation, which can provide reference for further long-term research.

Key words: *Monascus* red; food pigment; component analysis; safety evaluation

红曲红(*Monascus* red)是以大米、大豆为主要原料的液体培养基经红曲菌液态发酵培养、提取、浓缩、精制而成;或以红曲米为原料,经萃取、浓缩、精制而得到的聚酮类复合物^[1]。作为一种传统的天然食用色素,在中国、日本、泰国和菲律宾等亚洲国家应用已久^[2],在我国作为食品添加剂用于调制乳、糕点饼干、腌腊肉等食品着色。红曲红具有耐光、耐热、稳定、呈色效果好、着色力强、防腐抗菌等优点^[3-4],开发潜力大。由于菌株、底物、发酵条件、生产工艺的不同,生成的红曲红在色价、结构与组成上具有多样性和复杂性,其色素主要分为红色素、橙色素、黄色素 3 大类,目前已鉴定出 111 种红曲红组分,仍有大量未知组分,结构鉴定面临挑战^[5-6]。红曲菌发酵过程中也会代谢生成一种真菌毒素桔青霉素(Citrinin, CIT),现有研究表明 CIT 具有明确的肾脏毒性和遗传毒性,我国和日本食品添加剂红曲红的标准中也因此增加了 CIT 的限量^[1,7]。此外,红曲菌发酵生成红曲红的过程中会生成一些生物活性物质,如莫拉可林 K(Monacolin K),具有降脂、降压、抗炎等功效^[8-10],但同时有人群个案报道摄入含 Monacolin K 的红曲米作为膳食补充剂,导致血清中肌酸激酶(Creatine kinase, CK)升高,丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转移酶(Glutamyltransferase, GGT)升高等不良反应。由于红曲红生产工艺不一、组分复杂多样,且缺乏按照国际公认的评价指南开展的系统安全性评价研究,其安全性受到质疑,国际市场推广受限^[11-13]。本研究以液态发酵的红曲红为研究对象,对其进行组分分析及分子结构表征,并开展急性经口和 14 d 经口毒性试验等初步安全性评价,为红曲红进一步深入的研究提供基础数据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

受试样品红曲红由广东省科隆生物科技有限公司提供,采用黄豆和米粉为原料,经 *Monascus*

purpureus 液态发酵-压滤-酒精浸提-浓缩-喷雾干燥生成,不含辅料。批号 202103060311,黑紫色粉末,溶于水,10 kg/箱真空包装,常温避光保存。

1.1.2 实验动物及饲养条件

SPF 级昆明种小鼠 20 只,雌雄各半,体质量 18~22 g,SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体质量 60~90 g,购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002,实验动物在动物房检疫间观察 5 d,使其适应环境并确认健康后使用。试验期间光照 12/12 h 明暗交替,温度 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 26 \text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%,动物自由饮水和摄食,分笼饲养,小鼠 5 只/笼,大鼠 2 只/笼。颗粒饲料由广东省医学实验动物中心提供;动物实验室为屏障环境,使用许可证号:SYXK(粤)2018-0011。实验通过动物福利伦理委员会审批,实验管理参照《良好实验室规范》^[14]的要求。

1.1.3 主要仪器与试剂

电子分析天平 TE612-L(德国 Sartorius),真空抽滤机 SHZ-D(上海霄汉),旋转蒸发器(德国 Heidolph),超声仪 KQ-400KDE(昆山市超声仪器有限公司),冷冻离心机、超高分辨液质联用仪 LTQ-Orbitrap-Elite 均购自美国赛默飞世尔,高效液相色谱系统(美国 Waters 2695),HPLC 二极管阵列检测器(PDA,美国 Waters 2998),紫外/可见分光光度计[UV-2802S,尤尼柯(上海)仪器有限公司],恒温水浴锅(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),7600 自动生化分析仪(日本日立),sysmex XT-2000i 全自动血球计数仪(日本东亚),STA COMPACT MAX 血凝仪(法国 STAGO),H800 尿液分析仪(长春迪瑞)。

CIT(阿拉丁, CAS 号:518-75-2), Monacolin K(上海麦克林, CAS 号:75330-75-5),氨水、硝酸、丙酮均购自天津市致远化学试剂有限公司,75%乙醇(色谱级),其他实验用试剂均为分析纯;血液、尿液常规检测和生化检测用试剂由原仪器生产商供应。

1.2 方法

1.2.1 受试物检测

1.2.1.1 鉴别试验与色价测定

依据 GB 1886.181—2016《食品安全国家标准

食品添加剂 红曲红^[1]中描述的方法对样品红曲红进行呈色试验、最大吸收波长测定和色价的计算。

1.2.1.2 CIT与 Monacolin K 含量的检测

依据 GB 5009.222—2016《食品安全国家标准 食品中桔青霉素的测定》^[15]、QB/T 2847—2007《功能性红曲米(粉)》^[16],采用高效液相色谱(High-performance liquid chromatography, HPLC)法对 CIT 和 Monacolin K 进行定量。

1.2.1.3 理化指标检测

依据 GB 5009.76—2014《食品安全国家标准 食品添加剂中砷的测定》^[17]采用氢化物原子荧光光度法检测样品中砷含量;依据 GB 5009.75—2014《食品安全国家标准 食品添加剂中铅的测定》^[18]采用石墨炉原子吸收光谱法检测样品中铅含量;依据 GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》^[19]采用同位素稀释液相色谱-串联质谱法检测样品中的黄曲霉毒素 B₁ 含量;依据 GB 5009.150—2016《食品安全国家标准 食品中红曲色素的测定》^[20]通过直接干燥法进行干燥减重测量。

1.2.1.4 色素组分分析和分子结构表征

采用超高效液相色谱-静电场轨道阱-质谱(UPLC-Orbitrap-MS²)分析红曲红的色素组分及分子结构表征。

色谱条件:T3柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm, 美国 Waters),流动相:A为0.1%甲酸水溶液,B为乙腈。洗脱条件:0~0.5 min,98.0%~37.5%A;0.5~3.5 min,37.5%~16.8%A;3.5~10.5 min,16.8%~7.0%A;10.5~13.0 min,7.0%~0.1%A;13.0~14.0 min,0.1%A,14.0~17.0 min,99.0%A。流速0.40 mL/min,进样量5 μL,柱温30℃。

质谱条件:电喷雾离子源,正离子模式扫描,质量范围300~600 amu,毛细管电压3.2 kV,离子源温度120℃,碰撞能量15~40 eV。

1.2.2 小鼠急性经口毒性实验

依据 GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》^[21],采用限量法,将急性经口毒性试验剂量设为20 g/kg·BW。动物禁食不禁水4 h后,24 h内两次(间隔4 h)经口灌胃给予红曲红溶液,灌胃后观察14 d,记录小鼠的体质量、中毒表现及死亡情况。

1.2.3 大鼠14 d经口毒性实验

1.2.3.1 剂量设计与实验分组

依据急性经口毒性实验结果,参考 GB 15193.22—2014《食品安全国家标准 28天经口毒性试验》^[22],结合红曲红在纯净水中的溶解度及大鼠最大灌胃体积(20 mL/kg·BW),将剂量设计为5 g/kg·BW,为最大

给予量,同时设阴性对照组。

1.2.3.2 实验方法

40只SD大鼠按体质量分层后随机分成2组,分别为5 g/kg·BW剂量组和对照组,每组20只,雌雄各半。以纯净水为溶媒,实验时将红曲红粉末配制成0.25 g/mL的溶液,连续经口灌胃给予剂量组大鼠14 d,对照组给予等体积的纯净水。实验结束前,动物禁食不禁水16 h,期间收集尿液。实验结束时,大鼠腹腔注射2.25%戊巴比妥钠麻醉后,经腹主动脉采血进行血液学和血清生化检测,解剖取脏器进行后续检测。

1.2.3.3 一般临床观察、体质量、摄食

实验期间每天观察1次动物的一般临床表现,并记录动物出现中毒体征、程度和持续时间及死亡情况。在实验前和实验结束时,对剂量组和阴性对照组大鼠进行眼部检查。每周记录2次体质量(包括终期空腹体质量)、摄食量,计算食物利用率。实验结束时,计算体质量增长量、总摄食量、总食物利用率。

1.2.3.4 血液学、血生化、尿常规检查

实验结束时,对大鼠进行血液学指标检测,包括红细胞计数(Red blood cell count, RBC)、血红蛋白浓度(Hemoglobin concentration, HGB)、红细胞压积(Hematocrit, HCT)、血小板计数(Platelet count, PLT)、白细胞计数(White blood cell count, WBC)及分类、凝血酶原时间(Prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(Activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间(Thrombin time, tt)。

血液生化指标检测指标包括:ALT、AST、GGT、血糖(Glucose, Glu)、总蛋白(Total protein, TP)、白蛋白(Albumin, Alb)、钾(K)、钠(Na)、氯(CL)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆红素(Total bilirubin, TBIL)、肌酐(Creatinine, Cre)、尿酸(Uric acid, UA)、尿素氮(Urea nitrogen, BUN)、CK、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)。尿常规检查指标包括:酸碱值(pH)、蛋白(PRO)、葡萄糖(Glu)、酮体(Ketone body, KET)、隐血(Occult blood, BLD)、胆红素(Bilirubin, BIL)、尿胆原(Urobilinogen, UBG)、白细胞(Leukocyte, LEU)、比重(Specific gravity, SG)。

1.2.3.5 大体解剖及病理检查

实验结束时对所有动物进行大体解剖检查,包括体表、颅、胸、腹腔及其脏器,并称脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、肾上腺、睾丸/卵巢的绝对质量,计算相对质量(脏/体比值)。将上述脏器用10%福尔马林液固定,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染色后进行组织病理学检查。

1.3 统计学分析

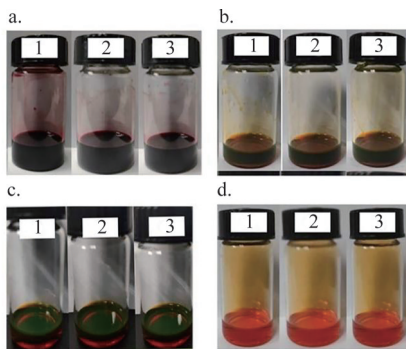
采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示,组间比较用 *t* 检验;计数资料用例数或构成比表示,组间比较用非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试物鉴定

2.1.1 鉴别试验、色价测定

呈色试验结果显示 3 份样品均符合 GB 1886.181—2016 对红曲红的呈色试验要求。全波长扫描结果显示,3 份样品的最大紫外吸收峰均在 502 nm 处出现,为红曲红的特征紫外吸收波长(480~520 nm)。3 份样品在 502 nm 波长处平均色价为 144.32。见图 1、图 2。



注:a:75%乙醇配制2%的红曲红溶液后2倍稀释,呈现橙红色至深红色;b:稀释液、氨水、丙酮1:1:1混匀,50℃水浴加热1min,呈现橙黄色;c:继续加热10min呈现黄绿色荧光;d:稀释液、硝酸1:3混匀,呈现黄色

图1 呈色试验结果

Figure 1 Color test of *Monascus red*

2.1.2 CIT和Monacolin K含量检测

HPLC 分析显示,3 份样品 CIT 平均含量为 0.0308 mg/kg(以单位色价计),满足 GB 1886.181—2016 的要求。3 份样品中 Monacolin K 平均含量为

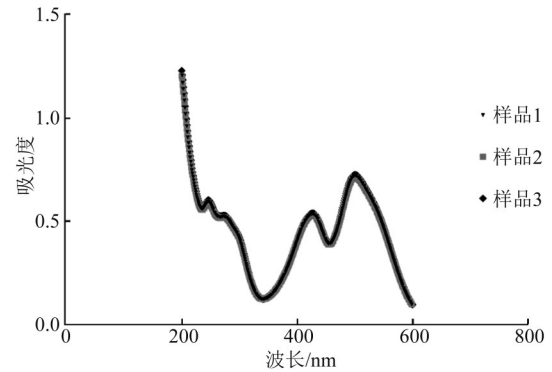


图2 红曲红全波长扫描

Figure 2 Full-wave length scanning of *Monascus red*

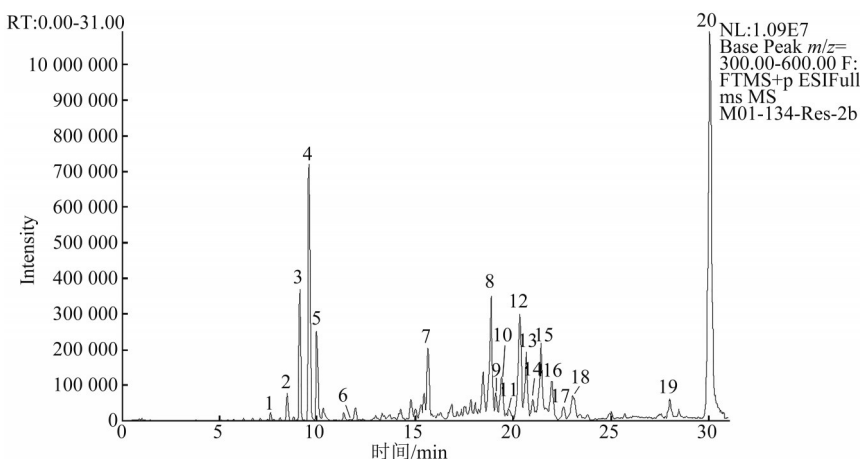
0.166 mg/g。

2.1.3 理化指标检测

3 份样品干燥减重 $\leq 6\%$,铅含量均值为 0.207 mg/kg,未检出砷、黄曲霉素 B₁,符合 GB 1886.181—2016 中理化指标规定。

2.1.4 色素组分分析

根据样品各主要色谱峰的保留时间、一级质谱的准分子离子和二级质谱的特征碎片离子信息,结合相关文献对主要色谱峰进行定性分析。提取质量范围为 300~600 amu,测得共有 20 个组分,以红色素为主,占比 88.38%;橙色素和黄色素占比分别为 2.04%、5.96%。主要特征成分进行色素组分鉴定分析,共鉴定出 7 种色素组分,包括红色素特征成分红曲红胺(Rubropunctamine)和红曲红素(Monascorubramine),占比分别为 5.48%、2.11%;另外还有两种红色素 *N*-leucyl 衍生物 *N*-leucyl-rubropunctatin、*N*-leucyl-monascorubrin,占比分别为 11.42%、6.91%;橙色素红斑红曲素(Rubropunctatine)占比 2.04%;黄色素红曲素(Monascin)、Monasfluore B 占比分别为 3.42%、2.54%。红曲红 UPLC 总离子流图见图 3、化合物鉴定结果见表 1。



注:提取质量范围 300~600 amu,编号 1~20 分子式见表 1

图3 红曲红 UPLC 总离子流图

Figure 3 Total Ion Chromatography of *Monascus red*

表1 红曲红组分UPLC-Orbitrap-MS²分析结果

Table 1 Analysis results of *Monascus* red component by UPLC-Orbitrap-MS²

峰号	保留时间/min	分子量	分子离子 ([M+H] ⁺ , m/z)	分子式	碎片峰(二级质谱)		鉴别	含量/%
					([M+H] ⁺ , m/z)			
1	7.61	452	453.34	C ₂₆ H ₄₇ NO ₅	435.33, 417.32, 387.06, 340.26, 322.25, 250.99, 228.1, 209.1, 202.50, 151.56, 128.22		红色素	0.26
2	8.44	565	566.42	C ₂₉ H ₆₀ NO ₉	548.41, 530.40, 488.29, 453.34, 435.33, 424.23, 358.27, 340.2, 322.25, 318.32, 278.64, 228.16, 209.16, 193.09		红色素	0.83
3	9.09	339	340.26	C ₁₇ H ₂₅ NO ₆	331.25, 322.25, 283.22, 254.70, 228.16, 194.04, 132.14, 114.09, 91.84		红色素	4.48
4	9.52	395	396.8	C ₂₂ H ₅ NO ₇	387.79, 378.79, 331.25, 283.22, 228.16, 209.16, 134.08, 114.09		红色素	9.85
5	9.95	452	453.34	C ₂₆ H ₄₇ NO ₅	444.34, 435.33, 387.79, 341.24, 322.25, 245.18, 228.16, 194.53, 156.24		红色素	4.79
6	11.77	250	251.09	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	251.14, 235.11, 233.08, 232.07, 221.10, 207.66, 189.05, 167.03, 155.08, 141.05, 129.38, 111.04, 83.87, 78.75, 61.33		Citrinin	0.06
7	15.64	353	354.17	C ₂₁ H ₂₄ NO ₄	336.18, 326.17, 310.18, 308.16, 292.17, 282.19, 256.10, 240.10, 212.11, 200.11, 144.64, 125.74, 115.05, 97.28		Rubropunctamine	5.48
8	18.47	381	382.2	C ₂₃ H ₂₇ NO ₄	367.18, 354.20, 340.19, 338.21, 320.20, 288.84, 260.86, 256.10, 240.10, 212.11, 200.11, 166.77, 140.91, 106.36		Monascorubramine	2.11
9	18.85	467	468.24	C ₂₇ H ₃₄ NO ₆	453.21, 440.21, 424.25, 418.18, 396.18, 370.16, 354.17, 326.17, 310.18, 254.08, 228.26, 149.25, 128.32		N-leucyl-rubropunctatin	11.42
10	19.11	566	567.3	C ₂₉ H ₄₅ NO ₁₀	539.31, 507.29, 477.31, 469.23, 453.24, 369.88, 354.17, 338.22, 324.54, 310.19, 292.18, 255.10, 212.11, 182.74		红色素	0.70
11	19.37	354	357.17	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	339.16, 329.17, 321.15, 311.16, 301.18, 287.16, 285.18, 283.17, 259.10, 241.08, 231.10, 215.11, 213.09, 185.10, 156.95, 145.58, 117.59, 95.58		Rubropunctatin	2.04
12	20.33	332	333.2	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O	315.19, 297.18, 287.20, 285.18, 273.18, 247.17, 229.16, 217.12, 201.09, 189.13, 175.11, 159.08, 136.41, 121.68, 100.43		红色素	10.32
13	20.64	358	359.18	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	340.23, 331.19, 315.19, 313.18, 297.18, 287.20, 285.18, 261.11, 259.20, 243.10, 233.12, 217.12, 215.11, 213.09, 201.09, 187.11, 173.10, 159.12, 145.10, 125.14, 87.19		Monascin	3.42
14	20.98	409	410.19	C ₂₈ H ₂₆ O ₃	396.20, 388.20, 366.21, 361.16, 331.17, 304.13, 219.89, 151.17		—	0.89
15	21.42	495	496.27	C ₂₉ H ₃₈ NO ₆	468.27, 452.28, 434.27, 370.16, 354.18, 326.18, 274.39, 259.84, 206.43, 183.68, 151.18		N-leucyl-monascorubrin	6.91
16	21.95	384	385.2	C ₂₃ H ₂₈ O ₅	367.19, 357.20, 341.21, 329.21, 315.19, 313.22, 311.20, 259.10, 241.09, 215.11, 213.09, 185.10, 172.09, 149.33, 114.51		Monasfluore B	2.54
17	22.57	399	400.17	C ₂₉ H ₂₂ NO	382.16, 372.18, 358.16, 356.18, 340.15, 326.14, 309.22, 302.10, 298.11, 274.11, 260.09, 234.01, 218.08, 204.07, 198.95, 147.07, 119.07		红色素	0.84
18	23.02	423	424.21	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	415.20, 407.33, 402.21, 380.22, 375.17, 331.17, 239.15, 156.10		—	2.66
19	27.97	309	310.31	C ₂₀ H ₄₀ NO	297.42, 293.28, 286.75, 275.27, 268.26, 254.25, 226.22, 212.20, 198.18, 177.16, 163.15, 149.13, 135.12, 123.12, 109.10, 95.09		红色素	1.25
20	30.04	337	338.34	C ₂₂ H ₄₄ NO	321.31, 314.54, 303.30, 296.29, 282.28, 268.26, 254.25, 240.23, 226.22, 212.20, 177.16, 163.15, 149.13, 135.12, 121.10, 107.08		红色素	29.14

注：“—”表示尚未鉴别的物质

2.2 小鼠急性经口毒性实验

实验期间雌、雄动物均未观察到中毒反应和死亡,得到红曲红小鼠急性经口毒性试验半数致死剂量(LD₅₀)>20 g/kg·BW,红曲红为实际无毒级物质,见表2。

表2 红曲红急性经口毒性实验

Table 2 Acute oral toxicity test of *Monascus* red

性别	剂量/(g/kg·BW)	动物数/只	始体质量/g	终体质量/g	死亡数/只	LD ₅₀ /(g/kg·BW)
雌性	20	10	20.74±0.80	32.09±2.28	0	>20
雄性	20	10	20.87±0.80	41.46±3.85	0	>20

2.3 大鼠14 d经口毒性实验

2.3.1 一般临床观察与眼部观察

大鼠一般生理体征、行为表现、外观、皮毛、黏膜、分泌物未见异常,剂量组大鼠尿液呈橘红色,粪便呈红色,实验期间动物无死亡。实验前与实验结束时,两组大鼠眼部检查均未见异常。

2.3.2 体质量、摄食、食物利用率情况

剂量组大鼠各周体质量、饲料摄食量和食物利用率指标与阴性对照组比较,差异均无统计学意义(P>0.05);剂量组体质量增长、总摄食量和总食物利用率指标与阴性对照组比较,差异均无统计学意义

义($P>0.05$)。结果表明该受试样品对大鼠体质量增长、摄食量和食物利用率无明显影响,见表3、表4。

2.3.3 血液学检查

剂量组血液学指标与对照组比较,雄性大鼠中性粒细胞(Neutrophil, NEUT)、淋巴细胞(Lymphocyte,

LYM)比率以及雌性大鼠HGB与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),但均在本实验室历史依据范围内[雄性NEUT: 5.47%~28.02%; LYM: 66.98%~91.44%; 雌性HGB: 122.0~149.1 g/L],不具有毒理学意义,其余指标差异均无统计学意义($P>0.05$),见表5、表6。

表3 红曲红14 d经口毒性实验大鼠各周体质量变化情况($n=10$)

Table 3 Peripheral body weight changes of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* ($n=10$)

性别	剂量/(g/kg·BW)	始体质量/g	第1周体质量/g		第2周体质量/g	
			第一次	第二次	第一次	第二次
雄性	0	89.65±2.89	113.59±4.48	150.22±8.72	177.95±9.23	214.02±13.27
	5	89.93±4.21	113.03±5.52	147.40±8.23	175.13±8.60	207.68±10.17
雌性	0	83.81±2.70	103.81±4.56	134.57±7.07	150.29±8.39	168.78±10.71
	5	83.75±2.80	103.71±3.65	133.10±5.65	149.08±4.74	168.87±6.01

表4 红曲红14 d经口毒性实验大鼠增重、摄食量及食物利用率变化情况($n=10$)

Table 4 Changes in weight gain, food intake and food utilization rate of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* ($n=10$)

性别	剂量(g/kg·BW)	体质量增长/(g/只)	第1周		第2周		总体			
			摄食量/g	食物利用率/%	体质量增长/(g/只)	摄食量/g	食物利用率/%	体质量增长/(g/只)	摄食量/g	食物利用率/%
雄性	0	60.56±6.97	121.70±7.26	49.76±4.75	63.80±9.45	167.08±9.73	38.15±4.87	124.36±12.12	288.78±15.18	43.09±3.84
	5	58.16±6.25	120.59±11.44	48.36±4.53	60.28±4.93	163.64±11.13	36.97±3.66	118.44±8.97	284.23±22.15	41.79±3.24
雌性	0	50.76±5.76	105.34±4.09	48.21±5.44	34.21±4.72	126.09±6.98	27.19±4.12	84.96±9.73	231.43±9.84	36.75±4.40
	5	49.35±3.98	107.50±4.92	45.92±3.17	35.76±4.06	127.15±5.58	28.15±3.10	85.12±5.59	234.65±9.89	36.29±2.23

表5 红曲红14 d经口毒性实验大鼠血液学指标($n=10$)

Table 5 Hematological values of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* ($n=10$)

指标	雄鼠		雌鼠	
	对照组	5 g/kg·BW 剂量组	对照组	5 g/kg·BW 剂量组
WBC/($\times 10^9/L$)	5.61±1.45	6.43±2.18	4.23±1.23	4.74±1.35
中性粒细胞计数 NEUT/%	6.71±2.44	12.12±3.72*	7.30±1.92	9.28±3.09
淋巴细胞 LYM/%	89.04±2.26	83.78±4.16*	88.11±2.27	86.36±3.76
单核细胞 MONO/%	2.93±0.96	2.79±0.86	2.83±1.33	2.63±0.66
RBC/($\times 10^{12}/L$)	6.82±0.29	6.99±0.27	7.17±0.25	6.99±0.31
HGB/(g/L)	130.70±6.77	133.20±4.44	136.10±3.03	133.00±3.46*
HCT/%	32.38±1.58	33.08±0.74	32.77±0.75	32.08±0.95
平均红细胞体积 MCV/fL	47.46±1.05	47.39±1.44	45.73±1.47	45.97±1.56
平均红细胞血红蛋白含量 MCH/pg	19.15±0.46	19.08±0.53	19.00±0.56	19.04±0.64
平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC/(g/L)	403.70±6.57	402.70±6.75	415.40±6.98	414.70±5.77
PLT/($\times 10^9/L$)	1 294.60±115.13	1 184.20±121.78	1 129.80±161.52	1 177.70±176.02

注:*与对照组比较, $P<0.05$

表6 红曲红14 d经口毒性实验大鼠凝血指标($n=10$)

Table 6 Blood coagulation indicators of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* ($n=10$)

指标	雄鼠		雌鼠	
	对照组	5 g/kg·BW 剂量组	对照组	5 g/kg·BW 剂量组
PT/s	15.59±0.60	15.13±0.50	15.31±1.32	15.50±0.63
凝血酶原时间国际标准化比值 PT-INR	1.28±0.06	1.23±0.05	1.26±0.14	1.27±0.07
APTT/s	21.90±2.02	20.80±1.27	19.95±1.57	19.77±1.53
凝血酶时间 TT/s	29.75±1.77	29.93±1.81	31.32±1.16	31.07±1.03

2.3.4 血清生化检查

剂量组雌性大鼠TG与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),但在本实验室历史依据范围内[雌性TG: 0.18~1.13 mmol/L],不具有毒理学意义,其余血清生化指标差异均无统计学意义($P>0.05$),

见表7。

2.3.5 尿液检查

由于尿量不足,雄鼠对照组数量为8只,剂量组数量为9只。剂量组尿常规指标与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表8。

表7 红曲红14 d经口毒性实验大鼠血清生化指标(n=10)

Table 7 Blood biochemical indicators of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* (n=10)

指标	雄鼠		雌鼠	
	对照组	5 g/kg·BW 剂量组	对照组	5 g/kg·BW 剂量组
ALT/(U/L)	35.26±5.48	38.76±6.27	28.24±3.74	31.9±4.26
AST/(U/L)	164.12±47.3	166.3±34.71	149.90±21.83	153.82±25.73
GGT/(U/L)	2.56±0.21	2.49±0.24	2.60±0.34	2.74±0.30
GLU/(mmol/L)	9.57±2.61	7.76±3.82	8.05±3.95	7.96±3.98
TP/(g/L)	51.17±1.81	51.04±1.61	52.44±2.24	52.44±1.75
ALB/(g/L)	30.64±0.60	30.89±0.89	31.99±1.27	32.24±0.85
K/(mmol/L)	5.42±0.26	5.63±0.23	5.42±0.33	5.17±0.28
Na/(mmol/L)	145.00±1.05	144.8±0.63	143.7±0.95	143.89±1.44
CL/(mmol/L)	104.13±1.20	104.19±1.93	106.82±1.48	105.87±1.91
TC/(mmol/L)	1.96±0.29	1.86±0.58	1.60±0.36	1.88±0.35
TG/(mmol/L)	0.53±0.29	0.59±0.17	0.29±0.03	0.34±0.05*
TBIL/(μ mol/L)	1.31±0.18	1.34±0.21	1.08±0.21	1.07±0.22
CRE/(μ mol/L)	17.70±2.58	20.3±6.00	24.8±5.65	24.7±4.14
UA/(μ mol/L)	72.6±12.4	81.7±21.09	75.9±13.27	85.2±7.50
BUN/(mmol/L)	5.69±1.05	6.63±2.04	8.28±1.34	8.05±1.51
CK/(U/L)	1 128.50±349.99	1 120.60±312.79	1 093.80±217.68	1 160.10±353.24
LDH/(U/L)	1 709.10±667.69	1 826.80±592.75	1 764.50±450.44	1 736.53±495.49
ALP/(U/L)	268.10±60.96	287.40±57.57	208.40±41.68	218.70±34.52

注:*与对照组比较, $P<0.05$

表8 红曲红14 d经口毒性实验大鼠尿常规指标

Table 8 Urinalysis indicators of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red*

项目	程度	雄鼠		雌鼠	
		对照组(n=8)	5 g/kg·BW 剂量组(n=9)	对照组(n=10)	5 g/kg·BW 剂量组(n=10)
PRO(g/L)	—	8(100.0)	6(66.7)	10(100.0)	9(90.0)
	trace	0(0.0)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)
	0.3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	1.0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)
	≥ 3.0	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
SG	<1.005	1(12.5)	0(0.0)	1(10.0)	0(0.0)
	1.01	7(87.5)	7(77.8)	8(80.0)	6(60.0)
	1.015	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)	4(40.0)
	1.02	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	1.025	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
pH	≥ 1.030	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
	6.5	2(25.0)	2(22.2)	2(20.0)	2(20.0)
	7	4(50.0)	2(22.2)	5(50.0)	2(20.0)
	7.5	2(25.0)	3(33.3)	3(30.0)	4(40.0)
	8	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	1(10.0)
UBG(μ mol/L)	8.5	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)
	≥ 9.0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	—	8(100.0)	7(77.8)	10(100.0)	9(90.0)
	34	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)
	68	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
BIL(μ mol/L)	≥ 135	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	—	8(100.0)	7(77.8)	10(100.0)	10(100.0)
	17	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
	51	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	≥ 103	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
KET(mmol/L)	—	8(100.0)	7(77.8)	10(100.0)	9(90.0)
	0.5	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)
	1.5	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
	3.9	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	≥ 7.8	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
BLD(Ery/ μ L)	—	8(100.0)	8(88.9)	10(100.0)	10(100.0)
	10	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	25	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	≥ 200	0(0.0)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)
GLU(mmol/L)	—	8(100.0)	9(100.0)	10(100.0)	10(100.0)
	5.6	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

续表8

项目	程度	雄鼠		雌鼠	
		对照组(n=8)	5 g/kg·BW 剂量组(n=9)	对照组(n=10)	5 g/kg·BW 剂量组(n=10)
LEU(Leu/uL)	14	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	28	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	≥56	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	—	8(100.0)	3(33.3)	10(100.0)	6(60.0)
	15	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	1(10.0)
	70	0(0.0)	2(22.2)	0(0.0)	3(30.0)
VC(mmol/L)	125	0(0.0)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)
	≥500	0(0.0)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)
	—	7(87.5)	7(77.8)	9(90.0)	8(80.0)
	0.6	1(12.5)	2(22.2)	1(10.0)	2(20.0)
	1.4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	2.8	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
MALB(g/L)	≥5.7	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	—	8(100.0)	6(70.0)	10(100.0)	8(80.0)
	0.15	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)
	≥0.15	0(0.0)	3(30.0)	0(0.0)	1(10.0)

注：“trace”表示微量，“—”表示未检出。

2.3.6 病理检查

实验结束时对所有大鼠的体表、颅、胸、腹腔及其脏器进行大体检查,未见异常情况。剂量组各脏器指标与阴性对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明该受试样品 14 d 经口毒性试验脏

器质量、脏/体比值指标正常,见表 9、表 10。

对所有大鼠的脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、肾上腺、睾丸/卵巢进行组织病理学检查发现,剂量组动物组织病理学评分与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表9 红曲红 14 d 经口毒性实验大鼠脏器重量(n=10, g)

Table 9 Organ weight of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* (n=10, g)

脏器	雄鼠		雌鼠	
	对照组	5 g/kg·BW 剂量组	对照组	5 g/kg·BW 剂量组
心脏	0.90±0.07	0.91±0.13	0.69±0.05	0.70±0.06
脑	1.37±0.07	1.35±0.07	1.28±0.04	1.28±0.06
胸腺	0.76±0.15	0.69±0.13	0.59±0.13	0.56±0.09
肝	7.66±0.75	7.62±0.68	5.92±0.51	6.08±0.65
肾	2.11±0.21	2.09±0.18	1.61±0.16	1.60±0.19
肾上腺	0.050 9±0.011 9	0.047 3±0.009 3	0.052 4±0.001 0	0.052 8±0.014 1
睾丸/卵巢	2.25±0.21	2.18±0.16	0.118 7±0.026 5	0.119 3±0.035 6
脾	0.59±0.08	0.61±0.12	0.46±0.12	0.43±0.08

表10 红曲红 14 d 经口毒性实验大鼠脏/体比值结果(n=10, %)

Table 10 Organ Coefficient of rats in the 14 d oral toxicity test of *Monascus red* (n=10, %)

脏器	雄鼠		雌鼠	
	对照组	5 g/kg·BW 剂量组	对照组	5 g/kg·BW 剂量组
心脏	0.42±0.02	0.44±0.05	0.42±0.03	0.42±0.03
脑	0.64±0.04	0.66±0.05	0.78±0.06	0.78±0.06
胸腺	0.36±0.06	0.33±0.06	0.36±0.06	0.34±0.05
肝	3.57±0.21	3.71±0.38	3.63±0.21	3.69±0.23
肾	0.98±0.06	1.03±0.12	0.98±0.06	0.97±0.08
肾上腺	0.023 9±0.006 9	0.022 3±0.004 6	0.031 4±0.005 8	0.030 6±0.007 9
睾丸/卵巢	1.04±0.10	1.06±0.11	0.071 2±0.015 2	0.070 6±0.018 4
脾	0.28±0.03	0.30±0.06	0.27±0.06	0.26±0.04

3 讨论

红曲红作为目前唯一由微生物天然代谢生成的色素,在我国及周边地区已有上千年的食用历史,在中国、日本、韩国被允许用作食品添加剂。因红曲红着色效果好,且具有防腐抗菌的特性,同时含有多种生物活性成份,开发潜力巨大。目前已鉴别出红曲

红组分有 100 多种,但仍有大量组分尚未鉴定^[4,24-25]。

红曲红中 CIT 的发现使其安全性受到质疑,同时缺乏红曲红的系统安全性评价研究,因此,本研究依据 GB 1886. 181—2016 对受试物进行鉴别试验、色价测定及理化指标检测,采用 HPLC 法测定 CIT 和 Monacolin K 含量,通过 UPLC-Orbitrap-MS² 进行组分

分析与分子结构表征,在此基础上开展急性和 14 d 经口毒性试验,初步评价红曲红的食用安全性,为进一步安全性研究提供依据。

本研究受试样品的呈色试验、色价、全波长扫描、理化指标、CIT 等检测结果均满足 GB 1886.181—2016 要求,为符合国标要求的食品添加剂红曲红。UPLC-Orbitrap-MS²法相较于传统的 HPLC,采用填料粒径小于 2 μm 的高效色谱柱与超高压输液泵,在物质分离方面更快捷、灵敏,高分辨率、能分离出更多色谱峰,同时兼具质谱分析能对物质定性的优点,更适用于对组分未知的物质进行检测与鉴定^[26],目前在食品组分检测方面应用广泛。UPLC-Orbitrap-MS²法组分分析结果显示本样品中红色素、橙色素、黄色素占比分别为 88.38%、2.04%、5.96%,已鉴别的组分包括红色素(红曲红胺、红曲红素、*N*-leucyl-rubropunctatin、*N*-leucyl-monascorubrin)、橙色素(Rubropunctatin)、黄色素(Monascin、Monasfluore B)。红曲红作为一种聚酮类复合物组分复杂,其主要特征组分包括红色的 Monascorubramine、Rubropunctamine,橙色的 Monascorubrin、Rubropunctatin,黄色的 Monascin、Ankaflavin^[4] 3 大类。但不同生产条件下得到的红曲红组分不尽相同,红、橙、黄 3 种色素的主要特征成分在本样品中均有分离得到,其中红色素组分占比最大。现有研究表明,红曲红复杂组分是因聚酮合成酶生成的碳骨架,在受环境影响而表达多样的修饰酶的修饰作用下所致^[5]。

目前以食用色素红曲红为受试物开展的毒理学安全性评价研究有限,多以红曲米为研究对象。红曲米是以大米为原料,经红曲菌发酵制得的,呈颗粒状(或用颗粒制成粉末),可分为高产 Monacolin K 的功能性红曲米和食品添加剂红曲米^[16,23]。MOHAN KUMARI 等^[27]用 *M. purpureus* MTCC 410 发酵的红曲米对大鼠进行急性毒性试验,结果显示其 LD₅₀>5 g/kg·BW; BUNNOY 等^[28]对 *M. purpureus* CMU 002U 发酵红曲红进行雌性大鼠急毒试验,结果显示其 LD₅₀>5 g/kg·BW。杜新芳^[29]对红曲米提取物进行急性经口毒性试验,结果显示其最大耐受剂量>15.0 g/kg·BW。急性经口毒性试验显示上述红曲类产品均为实际无毒级。本研究受试物红曲红的急性经口毒性试验 LD₅₀>20 g/kg·BW,为实际无毒级,与上述研究结论一致。

YU 等^[30]对高产 Monacolin K 的 *M. purpureus* NTU 568 发酵生成的红曲米在 0.1、0.5、1.0 g/kg·BW 进行 28 d、90 d 经口重复给样实验,均未见明显毒性表现。BUNNOY 等^[28]对 *M. purpureus* CMU 002U 发

酵红曲红在 2 000 mg/kg·BW 剂量下对雄性大鼠进行 30 d 经口毒性试验,结果未产生任何毒性反应。MOHAN KUMARI^[27]等采用饲料掺入法,对 *M. purpureus* MTCC 410 发酵的功能性红曲米进行大鼠亚慢性经口毒性试验,给予含 0、2.0%、4.0%、8.0%、12.0% 红曲米饲料 14 周,未见任何毒性反应,但样品组大鼠血清和肝脏中胆固醇和甘油三酯水平显著降低。本研究中,大鼠 14 d 经口毒性试验结果未见明显的毒性作用和靶器官。但 DOI 等^[31]在红曲色素 Y-001(不含 CIT)100、300、1 000 mg/kg·BW 剂量范围内进行 SD 大鼠 90 d 经口重复给样实验,结果显示,雌鼠 1 000 mg/kg·BW 剂量组出现部分动物胸腺细胞减少、胸腺重量降低,所有动物出现肝小叶中心细胞肥大导致肝重增加,肾脏近端小管空泡化等病理学改变,伴有尿检相关参数变化,得到最大无作用剂量为 300 mg/kg·BW,该红曲色素大于 90% 成分为 *N*-leucyl rubropunctatin 和 *N*-leucyl monascorubrin,这两种特征组分在本研究受试物中也有检出,占比分别为 11.42%、6.91%,含量相对较低。因此红曲色素主要特征成分组成和含量的差别,可能是引起毒性差异的原因。

除红曲红自身安全性外,CIT 和 Monacolin K 的存在也是红曲红安全性受到关注的重要因素。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)2012 年对 CIT 进行了风险评估,依据 CIT 90 d 经口毒性试验在 20 μg/kg·BW 剂量下未观察到有害作用,将不引起人类肾毒性的每日最高可接触水平暂定为 0.2 μg/kg·BW^[13],本研究中 CIT 摄入量为 22.25 μg/kg·BW,接近 CIT 的未观察到有害作用剂量,未见其引起的肾脏毒性反应。同时 Monacolin K 引起横纹肌溶解的潜在风险也值得注意。2018 年 EFSA 对红曲米中 Monacolin K 风险评估报告指出,有人群个案报道,摄入含 Monacolin K (3 mg/d)的膳食补充剂红曲米会产生肌肉骨骼系统的不良反应^[32],本研究中 Monacolin K 摄入量为 0.83 mg/kg·BW,未见 Monacolin K 引起的相关指标异常改变。

综上所述,本研究条件下,符合相关质量规格标准的食用色素红曲红,在一定剂量条件下开展的初步安全性评价研究未见毒性作用。但组分分析研究提示红曲红的组成复杂,需进一步进行组分分析和分子结构表征,并在此基础上开展包括遗传毒性在内的系统毒理学研究,为开发应用提供科学依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家

- 标准 食品添加剂 红曲红: GB 1886.181—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Food additive-Monascusred: GB 1886.181—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [2] LIN Y L, WANG T H, LEE M H, et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: A review [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(5): 965-973.
- [3] 王金字, 董文宾, 杨春红, 等. 红曲色素的研究及应用新进展[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 245-248.
- WANG J Z, DONG W B, YANG C H, et al. The new research and application progress of *Monascus* pigments[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(1): 245-248.
- [4] 周文斌, 贾瑞博, 李燕, 等. 红曲色素组分、功效活性及其应用研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(7): 6-10.
- ZHOU W B, JIA R B, LI Y, et al. Research progress of components, biological activity and application of *Monascus* pigment[J]. China Brewing, 2016, 35(7): 6-10.
- [5] CHEN W P, FENG Y L, MOLNÁR I, et al. Nature and nurture: Confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus azaphilone* pigments [J]. Natural Product Reports, 2019, 36(4): 561-572.
- [6] YANG Y, LIU B, DU X J, et al. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8331.
- [7] 日本厚生劳动省. 食品添加剂公定书:第9版[S]. 日本, 2018. The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. Food additives book: the 9th edition [S]. Japan, 2018.
- [8] AKIHISA T, TOKUDA H, YASUKAWA K, et al. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 562-565.
- [9] KOHAMA Y, MATSUMOTO S, MIMURA T, et al. Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35(6): 2484-2489.
- [10] ENDO A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(8): 852-854.
- [11] 涂志英, 邵伟. 国内外红曲的应用现状及发展趋势[J]. 中国酿造, 2008, 27(7): 7-9.
- TU Z Y, SHAO W. Current application and trend of red koji in the world[J]. China Brewing, 2008, 27(7): 7-9.
- [12] BLANC P J, LAUSSAC J P, BARS J L, et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 27(2-3): 201-213.
- [13] EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed [J]. EFSA Journal, 2012, 10(3): 2605.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准 良好实验室规范: GB/T 22278—2008 [S]. 北京: 国家标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. National food safety standard- Principles of good laboratory practice: GB/T 22278—2008 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中桔青霉素的测定: GB 5009.222—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health Commission of the People's Republic of China, National Food and Drug Administration. National food safety standard- Determination of citrinin in food: GB 5009.222—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [16] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 功能性红曲米(粉): QB/T 2847—2007 [S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- National Development and Reform Commission. Functional red kojic rice (powder): QB/T 2847—2007 [S]. Beijing: China Light Industry Press, 2007.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂中砷的测定: GB 5009.76—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Determination of arsenic in food additives: GB 5009.76—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂中铅的测定: GB 5009.75—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Determination of lead in food additives: GB 5009.75—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定: GB 5009.22—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health Commission of the People's Republic of China, National Food and Drug Administration. National food safety standard-Determination of aflatoxin B and G in foods: GB 5009.22—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中红曲色素的测定: GB 5009.150—2016[S]. 北京: 中国标准委员会, 2016.
- National Health Commission of the People's Republic of China, National Food and Drug Administration. National food safety standard-Determination of Monascascolours in foods: GB 5009.150—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 急性经口毒性试验: GB 15193.3—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-Acute toxicity test: GB 15193.3—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [22] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 28天经口毒性试验: GB 15193.22—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health Commission of the People's Republic of China.

- National food safety standard-repeated dose 28-day oral toxicity study: GB 15193.22—2014 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂 红曲米: GB 1886.181—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-Food additives-Red yeast rice: GB 1886.181—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [24] YANG H H, LI J, WANG Y, et al. Identification of water-soluble *Monascus* yellow pigments using HPLC-PAD-ELSD, high-resolution ESI-MS, and MS-MS [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 536-541.
- [25] 陈景智. 红曲色素的液态发酵生产工艺研究[D]. 福州: 福州大学, 2018.
- CHEN J Z. Study on the liquid fermentation process of *Monascus* pigment[D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2018.
- [26] 李国萍. 色谱-质谱联用技术在石榴籽等样品分析中的应用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- LI G P. Application of chromatography-mass spectrometry in the analysis of pomegranate seeds and other samples [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.
- [27] MOHAN KUMARI H P, NAIDU K A, VISHWANATHA S, et al. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(8): 1739-1746.
- [28] BUNNOY A, SAENPHET K, LUMYONG S, et al. Safety evaluation of Thai red yeast rice (*Monascus fermented rice*)[C]. The 2nd International Conference on Food and Applied Bioscience, 2014-02-06.
- [29] 杜新芳. 功能红曲的安全性评价[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2012.
- DU X F. Safety evaluation of functional red kojic rice [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2012.
- [30] YU C C, WANG J J, LEE C L, et al. Safety and mutagenicity evaluation of nanoparticulate red mold rice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(22): 11038-11048.
- [31] DOI Y, SUGIYAMA T, HAGIWARA A, et al. A 90-day oral repeated-dose toxicity study of *Monascus* Color Y-001 in rats[J]. Fundamental Toxicological Sciences, 2021, 8(2): 37-47.
- [32] YOUNES M, AGGETT P, AGUILAR F, et al. Scientific opinion on the safety of monacolins in red yeast rice [J]. EFSA Journal, 2018, 16(8): e5368.