

胶束电动毛细管色谱法检测红曲米中的莫纳可林 K

张 良, 许 杨*, 李燕萍

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要 :建立了测定红曲米中莫纳可林 K 含量的胶束电动毛细管色谱(MEKC)方法。考察了运行缓冲液的种类、pH 及其浓度、有机添加剂、十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度和分离电压等实验条件对电泳分离效果及检测灵敏度的影响。在优化的实验条件下,以 20 mmol/L 硼砂(pH=10.6, 含 10% (体积分数) 乙醇和 40 mmol/L SDS)作为缓冲液,莫纳可林 K 能在 23 min 内实现很好的基线分离,线性范围为 5.00 ~ 100.00 mg/L,线性相关系数为 0.997 6,检出限(以信噪比(S/N)为 3 计)为 0.13 mg/L,加标回收率为 98.5% ~ 99.5%。精密度和稳定性试验中,峰面积和迁移时间的相对标准偏差均小于 3%,表明重复性良好。该方法简便、快速、灵敏,可用于红曲米中莫纳可林 K 含量的测定。

关键词 :胶束电动毛细管色谱;莫纳可林 K;红曲米

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)04-0393-04

Determination of Monacolin K in red fermented rice by micellar electrokinetic capillary chromatography

ZHANG Liang, XU Yang*, LI Yanping

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute of Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract : A method for Monacolin K determination in red fermented rice based on micellar electrokinetic capillary chromatography has been developed. The assay conditions including pH and the concentration of running buffer, organic additive, the concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS), and the separation voltage were optimized. Under the optimized conditions (20 mmol/L borate buffer (pH 10.6, containing 10% (v/v) methanol, 40 mmol/L SDS), the Monacolin K can be separated within 23 min, with the linear working range of 5.00 - 100.00 mg/L ($r^2 = 0.9976$) and a limit of detection (S/N = 3) of 0.13 mg/L. It had good recoveries (98.5% - 99.5%) and the relative standard deviations lower than 3%. The method is simple, rapid, sensitive, highly reproducible and can be successfully applied in the determination of Monacolin K in red fermented rice.

Key words : micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC); Monacolin K ; red fermented rice

莫纳可林 K(Monacolin K, 或称洛伐他汀、Lovastatin)是上世纪 70 年代由日本学者 Endo 等和欧洲学者分别从红曲霉和土曲霉发酵产物中得到的,它能有效抑制胆固醇生物合成中的关键酶 HMG-CoA (3-羟基-3-甲基-戊二酰基-辅酶 A 还原酶) 的活性,从而调节人体内异常的血脂水平^[1]。莫纳可林 K 存在酸式和内酯式两种形态(如图 1 所示)^[2],

本文主要检测红曲米中内酯式莫纳可林 K。

目前,国内外报道的检测莫纳可林 K 的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、紫外分光光度法(UV)、薄层色谱法(TLC)等^[3-7]。UV 和 TLC 方法操作繁琐、检测灵敏度都较低;HPLC 的检测灵敏度可达 0.2 mg/L^[7],但该方法检测时色素对莫纳可林 K 的分离有干扰,且存在有机溶剂使用多、易造成环境

* 通讯联系人:许杨教授,研究方向为微生物学和食品生物技术。Tel : (0791) 8329479, E-mail : xuyang1951@ yahoo. com. cn.
基金项目 :国家自然科学基金项目(30860123)。
收稿日期 :2009-12-02

污染、样品用量大等缺点。毛细管电泳(CE)作为一种高效分离分析方法,具有分析速度快、分离效率高、环保、样品用量少等优点^[8],特别是其中的胶束电动毛细管色谱法(MEKC),即可分析带电物质又可分析中性物质,独特的优势使其在药物和天然产物分析中得到了广泛的应用^[9,10]。尽管CE用于莫纳可林K的分离也有一些报道^[2,11-14],但都是采用毛细管区带电泳法(CZE)。本文采用新的缓冲体系(硼砂-乙醇体系)作为背景电解质的MEKC分离模式,对固态发酵红曲米中的莫纳可林K进行了检测,达到了较好的检测灵敏度。该法可以解决HPLC检测红曲米样品中莫纳可林K时色素对其干扰的问题,可用于发酵红曲米中莫纳可林K的质量控制。

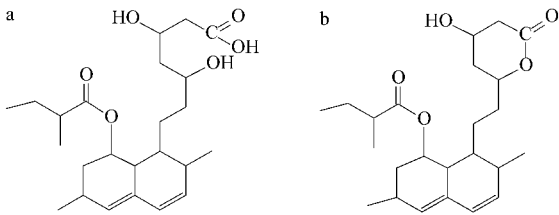


图 1 (a)酸式和(b)内酯式莫纳可林K的结构式
Fig. 1 Structural formulae of (a) acid and (b) lactone of Monacolin K

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman 高效毛细管电泳仪(美国 Beckman Coulter 公司);熔融石英毛细管柱(河北省永年锐沓色谱器件有限公司);PHS23C 型酸度计(上海雷磁仪器厂);3K18 冷冻离心机(美国 Sigma 公司);Kottermann 恒温水浴锅(德国 Kottermann 公司);2.5 L 超声波清洗设备(英国 Edisafe 公司),ELGA 超纯水仪(ELGA 公司)。

莫纳可林 K 标准品(美国 Sigma 公司);红曲米(红曲菌固态发酵大米而得);乙酸甲酯、硼砂、十二烷基硫酸钠(SDS)、甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯;实验用水为超纯水。

1.2 标准品溶液和样品溶液的制备

标准品溶液:精密称取莫纳可林 K 标准品 25 mg,用 5 mL 无水乙醇溶解,即得质量浓度为 5 g/L 的标准品溶液,置于 4 °C 冰箱中保存,使用时稀释成各种浓度的标准溶液。

样品溶液的制备:精密称取 0.3 g 红曲米粉末,置于 10 mL 离心管中,加入 4 mL 乙酸甲酯,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 20 min,离心(5 000 r/min)6 min,取上清液于另一 10 mL 离心

管中,沉淀残渣再重复提取一次,合并两次提取的上清液。将上清液置于 60 °C 水浴中蒸干,残渣用 2 mL 无水乙醇复溶,经 0.45 μm 有机膜过滤,滤液备用。

1.3 实验方法

电泳运行缓冲液为 20 mmol/L 硼砂溶液,含 10%(体积分数,下同)乙醇和 40 mmol/L SDS,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 10.6;石英毛细管(60.2 cm × 75 μm,有效长度为 50 cm);紫外检测波长为 237 nm;分离电压为 20 kV;分离温度为 25 °C。实验前将缓冲液用 0.45 μm 滤膜过滤并超声波脱气 5 min。新的毛细管使用前以 1 mol/L NaOH 溶液冲洗 60 min。每次实验前分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水、缓冲溶液冲洗 10 min。重复进样时只用缓冲溶液冲洗 2 min。更换不同缓冲溶液时按上述步骤重新处理。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的优化

2.1.1 运行缓冲液种类、浓度和 pH 值的选择

考察了不同浓度的甘氨酸缓冲体系和硼砂缓冲体系对分离效果的影响。结果发现:虽然甘氨酸缓冲体系相对于硼砂缓冲体系的运行电流要低,但硼砂体系的分离度和灵敏度都相对较高,所以本文选择硼砂电泳缓冲体系。进一步考察了硼砂的浓度为 5~50 mmol/L 时对分离度和分离电流的影响。结果表明:随着硼砂浓度的增加,电泳工作电流逐渐增大,硼砂浓度为 40 mmol/L 时已达到电泳允许最大工作电流 100 μA,硼砂浓度小于 10 mmol/L 时,分离度较小;当硼砂浓度为 20 mmol/L 时,电泳分离度达到最大值。综合考虑,本文选择硼砂浓度为 20 mmol/L。

在硼砂缓冲液浓度为 20 mmol/L 时,对 pH 从 9.8 至 12.6 每隔 0.4 个单位进行考察。结果发现:随着 pH 的增大,工作电流逐渐增大,目标峰峰高呈先增加后降低的趋势,缓冲体系的 pH 为 10.6 时峰高值达最大(见图 2)。由于电流大不利于后续的电泳分离条件的优化,而目标峰峰高过低则会影响检测的灵敏度。综合以上因素,本文选择 pH 为 10.6 的硼砂缓冲体系。

2.1.2 有机添加剂对分离检测的影响

电泳分离过程中,有机添加剂的加入可以改进介质的黏度、介电常数、双电层结构等,进而影响电渗流的大小,从而达到调节选择性、改进分离度的目的。实验中考察了甲醇、乙醇、DMSO 等 3 种有机添加剂及其不同含量时对分离效果的影响。结果表

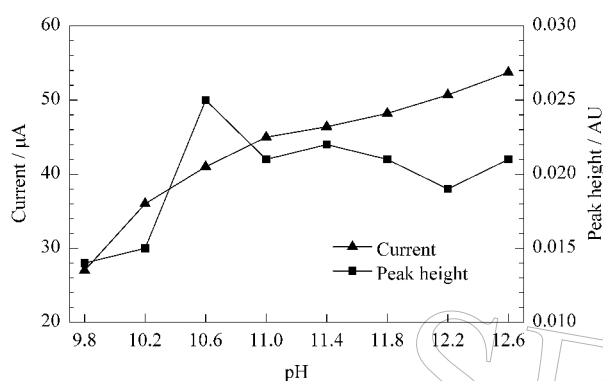


图 2 硼砂缓冲体系 pH 对莫纳可林 K 电流和峰高的影响

Fig. 2 Effects of pH of borax buffer on current and peak height of Monacolin K

Conditions : fused-silica capillary , 60.2 cm (effective length , 50 cm) \times 75 μm ; running buffer , 20 mmol/L borax-NaOH ; applied voltage , 20 kV ; capillary temperature , 25 $^{\circ}\text{C}$; injection , 3448 Pa \times 10 s .

明 ;以乙醇为有机添加剂时的目标峰较高(见图 3) , 有利于分析检测的灵敏度 ,所以本文选择乙醇作为有机添加剂。进一步考察了乙醇含量对分离的影响。随着乙醇添加比例的增加 ,目标物的迁移时间逐渐延长 ;乙醇含量为 10% (体积分数) 时 ,目标峰的检测灵敏度达到最大 ,故本文选择 10% 的乙醇作为有机添加剂进行下一步条件的优化。

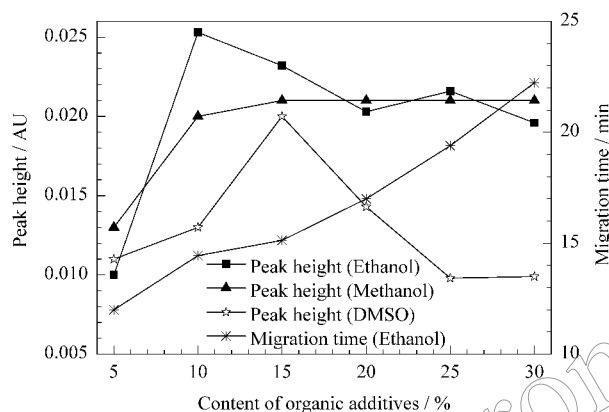


图 3 有机添加剂对莫纳可林 K 峰高和迁移时间的影响

Fig. 3 Effects of organic additives on peak height and migration time of Monacolin K

Conditions : running buffer , 20 mmol/L borax-NaOH buffer (pH 10.6) containing different organic additives. Other conditions are the same as in Fig. 2 .

2.1.3 SDS 浓度的选择

当缓冲溶液中的 SDS 浓度超过其临界胶束浓度(CMC) 8.2 mmol/L 时 , SDS 分子之间的疏水基团聚集在一起形成胶束(假定固定相) , 溶质基于在水相和胶束相之间的分配系数不同而得到分离^[7]。本实验考察了不同浓度(5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 35 , 40 , 45 , 50 mmol/L) 的 SDS 对分离效果的影

响 , 结果见图 4。从图 4 可看出随着 SDS 浓度的增加 , 目标峰迁移时间逐渐延长 , 峰高在 SDS 浓度为 10 mmol/L 时出现拐点后先增大后降低。当 SDS 浓度为 40 mmol/L 时 , 目标物的峰高达到最大 , 检测灵敏度最好。综合分析速度和灵敏度等因素 , 本文选择 SDS 浓度为 40 mmol/L。

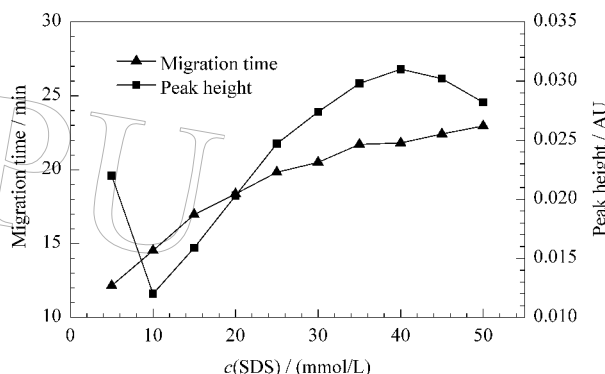


图 4 SDS 浓度对莫纳可林 K 迁移时间和峰高的影响

Fig. 4 Effects of SDS concentration on migration time and peak height of Monacolin K

Conditions : running buffer , 20 mmol/L borax-NaOH buffer (pH 10.6) containing different concentrations of SDS and 10% (v/v) ethanol. Other conditions are the same as in Fig. 2 .

2.1.4 分离电压的选择

考察了外加分离电压(11 , 14 , 17 , 20 , 23 , 26 , 29 kV) 对溶质分离效果的影响。结果表明 : 随着分离电压的增大 , 焦耳热逐渐增大 , 进而使背景噪声增加 ; 同时又会致使迁移时间也逐渐减小 , 这又利于样品的快速分析。综合考虑 , 选择 20 kV 作为电泳分离电压。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系

吸取莫纳可林 K 标准品溶液并用无水乙醇分别稀释至 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , 60 , 100 mg/L 的系列质量浓度 , 在上述电泳条件下进样测定。以峰面积(Y) 对样品质量浓度(X , mg/L) 做标准曲线 , 得到线性回归方程为 $Y = 4316.5 X + 8323.4$ ($r = 0.9976$)。结果表明 , 莫纳可林 K 在 5 ~ 100 mg/L 范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度

对同一样品溶液连续进样 6 次 , 在优化的电泳条件下测定 , 峰面积的相对标准偏差(RSD) 为 2.14% , 迁移时间的 RSD 为 0.04% , 结果表明精密度良好。

2.2.3 稳定性

取新制备的同一样品溶液 , 分别于 0 , 2 , 4 , 8 , 10 , 16 h 进样测定其峰面积和迁移时间 , 峰面积的

RSD 为 1.49% ,迁移时间的 RSD 为 1.65% ,表明稳定性良好。

2.2.4 重复性与检出限

精密称取同批次样品 ,按照 1.2 节方法分别制备 6 份样品溶液 ,在优化的电泳条件下测定 ,峰面积的 RSD 为 1.35% ,迁移时间的 RSD 为 0.53%。以信噪比(S/N)为 3 时相应的质量浓度为方法的检出限 ,其值为 0.13 mg/L。

2.3 样品测定及回收率

用方法对本实验室固态发酵的红曲米进行测定 ,在上述优化的实验条件下测定 3 次 ,计算出莫纳可林 K 的平均含量为 151.6 $\mu\text{g/g}$ 。在优化的电泳条件下莫纳可林 K 标准品和红曲米样品的电泳图谱见图 5。

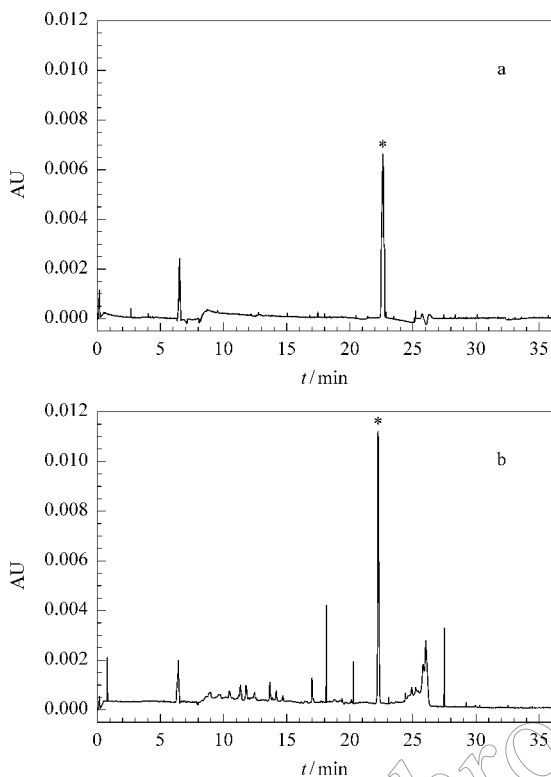


图 5 (a)莫纳可林 K 标准品溶液(10 mg/L)和(b)红曲米样品的胶束电动毛细管色谱图

Fig. 5 MEKC electropherograms of (a) Monacolin K standard solution (10 mg/L) and (b) red fermented rice

Conditions: running buffer, 20 mmol/L borax-NaOH buffer (pH10.6) containing 40 mmol/L SDS and 10% (v/v) ethanol.

Other conditions are the same as in Fig. 2.

* Monacolin K.

精密称取已知莫纳可林 K 含量的红曲米样品 9 份 ,每份 0.30 g ,分别精密加入一定量的标准品。每个样品按 1.2 节的样品制备方法平行制备 3 份 ,在优化的电泳条件下进行检测 ,计算得到的回收率结果见表 1。

表 1 红曲米中莫纳可林 K 的回收率($n=3$)

Table 1 Recovery of Monacolin K in red fermented rice ($n=3$)

Background/ μg	Added/ μg	Found/ μg	Recovery/ %	RSD/ %
45.8	35.0	80.4	98.8	1.9
45.8	45.0	90.6	99.5	1.7
45.8	55.0	100.0	98.5	0.5

3 结论

本文通过优化运行缓冲液体系的组成和分离条件 ,建立了一种基于胶束电动毛细管色谱法检测红曲米中莫纳可林 K 的方法。该方法既完全克服了 HPLC 方法中色素对测定的干扰问题 ,又解决了由于红曲米样品中莫纳可林 K 含量低而检测困难的问题。同时还具有进样量少、测定快速、灵敏度高、环保等显著特点 ,适用于固态发酵红曲米中的莫纳可林 K 的定量和定性分析。

参考文献 :

- [1] Endo A. J Antibiotics, 1976, XXIX (12) : 1346
- [2] Li M, Fan L Y, Zhang W, et al. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1) : 387
- [3] Xu G R, Chen Y, Yu H L, et al. Food and Fermentation Industries (许赣荣, 陈蕴, 虞慧玲, 等. 食品与发酵工业), 2002, 28(10) : 59
- [4] Xu W, Zhang S, Wang J F, et al. Food Research and Development (徐伟, 张帅, 王金凤, 等. 食品研究与开发), 2008, 29(7) : 28
- [5] Yang L, Zhang S H, Wang Q J. Food Research and Development (杨丽, 张水华, 王启军. 食品研究与开发), 2006, 27(2) : 113
- [6] Hu X Q, Yuan M X, Chen F S, et al. China Brewing (胡晓清, 袁梦仙, 陈福生, 等. 中国酿造), 2004(2) : 30
- [7] Wen J, Chang P, Gu X L, et al. Food Science (文镜, 常平, 顾晓玲, 等. 食品科学), 2000, 21(12) : 100
- [8] Chen Y. Capillary Electrophoresis Technology and Its Application. 2nd ed. Beijing : Chemical Industry Press (陈义. 毛细管电泳技术及应用. 2 版. 北京 : 化学工业出版社), 2001
- [9] Jin S P, Li P, Dong S Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (靳淑萍, 李萍, 董树清, 等. 色谱), 2009, 27(2) : 229
- [10] Cheng J Y, Wang T D, Kang J W. Chinese Journal of Chromatography (程佳懿, 汪彤丹, 康经武. 色谱), 2008, 26(6) : 658
- [11] Li M, Fan L Y, Zhang W, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(8) : 2719
- [12] Kittell J, Borup B, Voladari R, et al. Metab Eng, 2005, 7 : 53
- [13] Zhang Q Q, Wei Q T, Tang B, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (张庆庆, 危勤涛, 汤斌, 等. 中国实验方剂学杂志), 2008, 14(11) : 4
- [14] Sun J. Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine (孙骥. 内蒙古中医药), 2008(4) : 44