

文章编号 :1009 - 038X(2003)03 - 0046 - 07

# HPLC 法测定红曲中酸型与内酯型 Monacolin K

朱 华 , 许赣荣 , 陈 蕴

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

**摘 要 :**功能性红曲产品中的 Monacolin K 包括酸型和内酯型两种成分.采用 HPLC 法,色谱柱为 ZORBAX SB C-18  $5\ \mu\text{m}$   $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$  柱温  $28\ \text{C}^{\circ}$ , $V(\text{乙腈}) : V(0.1\ \text{g/dL}$  磷酸水溶液) $= 65 : 35$  为流动相,紫外检测器波长为  $238\ \text{nm}$ ,可同时对酸型和内酯型的 Monacolin K 进行定量检测,线性关系和重复性均满足要求.固体红曲样品可以用甲醇直接萃取,液态的红曲样品在甲醇萃取之前需调整 pH 值  $6\sim 7$ ,测定结果能反映原样品中两种形态 Monacolin K 的含量.色素对 Monacolin K 检测存在一定影响,但对于多数功能性红曲色价低、Monacolin K 高的特点,这一影响作用较轻,可以忽略.

**关键词 :**红曲霉 ;功能红曲 ;莫纳可林 K ;HPLC 法

中图分类号 :657.7

文献标识码 :A

## HPLC Analysis of Acid Form and Lactone Form Monacolin K from *Monascus* Red Rice

ZHU Hua , XU Gan-rong , CHEN Yun

(Key laboratory of Industrial Biotechnology , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

**Abstract :** High-performance liquid chromatography , using a ZORBAX SB C-18 column(  $5\ \mu\text{m}$  ,  $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$  ) and acetonitrile- $0.1\ \text{g/dL}$  phosphate solution(  $63 : 35$  ) as mobile phase with detection at  $238\ \text{nm}$  was used to analyze the Monacolin K in functional red rice( or red yeast rice ). Under such chromatographic condition , the two forms of Monacolin K ( acid form and lactone form of Monacolin K ) can be determined simultaneously. The method demonstrated good linear relationship and repeatability. Solid *Monascus* product samples could be measured after directly extracted by methanol , while liquid *Monascus* fermentation broth was extracted by methanol after adjusting the solution pH to  $6\sim 7$ . The results can show the real content of the two forms of Monacolin K in the samples. Pigments were found to effect the determination of Monacolin K. However , this effect can often be ignored when the pigment content is low and Monacolin K content is high.

**Key words :** *Monascus* ; functional *Monascus* red rice ; Monacolin K ; HPLC

红曲是我国的传统发酵产品,长期用于食品着色和酿酒.近年来,对红曲霉功能性代谢产物的研

究十分活跃.红曲产品中具有降血脂作用的功能性成分有多种,1979年,日本远藤章<sup>[1]</sup>从红曲霉属

收稿日期 2002-12-11; 修回日期 2003-01-19.

作者简介:朱华(1977-),男,浙江绍兴人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

[*Monascus ruber* (红色红曲霉)] 的培养液中获得一种胆固醇合成抑制剂 Monacolin K (莫纳可林 K, 也作 Lovastatin, Mevinolin), 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, 从而能调节人体内异常血脂的作用。其后, 又从 *M. ruber* 培养物中获得抑制胆固醇合成的物质莫纳可林 X, J, L, M 等, 总称 Monacolins<sup>[2-4]</sup>, 但起主要作用的物质是 Monacolin K, 即洛伐它汀。

Monacolin K 在常态下是透明的针状结晶, 不易溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮、氯仿和苯; 分子式  $C_{24}H_{36}O_5$  (内酯型), 相对分子质量 404.55, 结构式见图 1。在酸性条件下有酸型和内酯型两种形态。

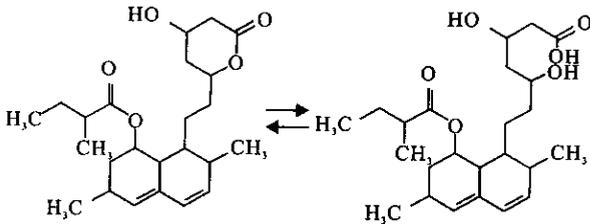


图 1 酸性环境下莫纳可林 K 两种形态的动态平衡

Fig.1 Balance of the two forms of Monacolin K in acid condition

关于 Monacolin K 的测定, 目前采用最多的是 HPLC 法。Vincent P. Gullo 等人在 80 年代经过反应形成的洛伐他汀衍生物, 用反相 HPLC 法对 Lovastatin 进行定量测定<sup>[5]</sup>。目前基本上已形成了以  $C_{18}$  柱作为分离柱, 联合紫外检测 (237 nm 或 230 nm), 采用乙腈或甲醇和磷酸水溶液混配比作为流动相的 HPLC 检测方法<sup>[6-8]</sup>。有的方法<sup>[9]</sup>在 HPLC 之前, 也采用柱分离色素的预处理方法; 在精度要求不高时, 也利用 Monacolin K 在 237 nm 波长处有最大吸收而采用紫外分光光度法测定<sup>[10]</sup>, 或薄层扫描法测定<sup>[11]</sup>。目前还有采用 SFCC (超临界流体色谱) 测定 Lovastatin 的方法<sup>[12]</sup>, 该方法具有检测速度快、灵敏度高、节省有机流动相的优点, 但由于设备条件的限制, 目前还没有得到普遍应用。

当前, 功能性红曲 Monacolin K 的 HPLC 检测方法, 照搬了美国药典中土曲霉内酯式洛伐它汀的检测方法。土曲霉发酵的洛伐它汀, 大部分原是酸型, 但经过提纯精制, 全部都转化为内酯式。因此, 检测内酯型是无可非议的。根据参考文献报道<sup>[6-13]</sup>, 发酵液中的 Monacolin K 是以两种形态存在, 即闭环的内酯型结构和开环的酸型结构。功能性红曲米, 无需经过提纯处理。Monacolin K 一般同时存在两种形态, 不能照搬美国药典中洛伐它汀的

检测方法。在以往的报道中, 多数研究结果只反映了红曲中 Monacolin K 的总量, 有的甚至仅检测内酯型 Monacolin K<sup>[9]</sup>, 而忽略了两种类型的比例, 因此不能真正体现红曲产品的降脂价值。

酸型 Monacolin K 对 HMG-CoA 还原酶的抑制能力比内酯型的更为有利, 当 Monacolin K 的内酯型结构转变成酸型结构后, 抑制能力大约提高一倍<sup>[14]</sup>。检测红曲样品时要明确得到其中 Monacolin K 的两种形态各自的含量和比例。当然, 在测定过程中, 样品经过不同的预处理, 莫纳可林 K 既可成为内酯形结构, 也可成为酸式结构, 这两种结构的物质用 HPLC 测定时的出峰时间是不同的; 只要控制好整个测定的条件, 就能使测定的最终结果真实反映样品中两种形态的 Monacolin K 的含量。

目前国内功能性红曲产品, 质量参差不齐, 甚至有掺入洛伐它汀的现象, 也没有一个权威的国家标准检测方法可同时检测功能性红曲中两种类型 Monacolin K。针对这一现状, 作者开展了本课题的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 红曲样品及试剂

红曲样品: 本实验室自制或其他来源; 菌种: 本实验室保藏的红曲霉 9901 菌种; 洛伐他汀 (内酯型 Monacolin K) 纯品, 浙江海正药业提供, 并由此自制酸型 Monacolin K; 3 种纯红曲色素来自可口可乐公司: 紫色素 (Monascorubramine)、橙色素 (Monascorubrine) 和黄色素 (Ankaflavin), 其中发现紫色素和橙色素都不是色谱纯, HPLC 检测下有较小的杂质峰; 乙腈为色谱纯, 其他药品均为分析纯。

### 1.2 Monacolin K 的测定方法

#### 1.2.1 Monacolin K 标准样品的处理方法

Monacolin K 的内酯型标样和酸型标样分别配制, 其内酯型标准样品直接溶解于甲醇或乙腈。酸型标准溶液在 Akira Endo 方法<sup>[14]</sup>的基础上, 加以改进, 在碱性条件下水解内酯型 Monacolin K, 使之转化为酸型结构。

#### 1.2.2 红曲发酵产品的处理方法

红曲发酵有液态发酵和固态发酵两种。固态发酵的产物 (红曲米等) 最终研磨成粉状 (过 80 目) 后进行萃取。经过冷冻干燥、喷雾干燥等制得的红曲液态发酵产品, 其萃取方法与固态发酵产品萃取方法相同。

固态发酵样品和液态发酵液干粉的萃取: 称取 0.5 g (或其他量) 样品, 加入适量甲醇, 50 °C 水浴 1 h, 中间间歇振荡 3~4 次, 最终定容到 25 mL。

发酵液的萃取:量取 5 mL 发酵液,加入甲醇近 20 mL,50 ℃ 水浴 1 h,中间间歇振荡 3~4 次,最终定容到 25 mL.

1.2.3 红曲米色价的测定 红曲米研磨(过 80 目)称取 0.5 g(或其他量)样品,加入适量体积分数 70%乙醇,50 ℃ 水浴 1 h,中间间歇振荡 3~4 次,最终定容到 25 mL.在 505 nm 处测定 OD 值.

色价计算公式:色价=OD 值×稀释倍数(U/g)

1.2.4 高效液相色谱仪及色谱条件 色谱仪:HP1100,色谱柱:ZORBAX SB C-18 5 μm,250 mm×4.6 mm,流动相:V(乙腈):V(0.1 g/dL 磷酸水溶液)=65:35,柱温:28 ℃,紫外检测波长:238 nm;流量:1 mL/min,进样量 20 μL,样品经 0.45 μm 滤膜过滤后用 HPLC 法测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 Monacolin K 标准样品的制备和检测

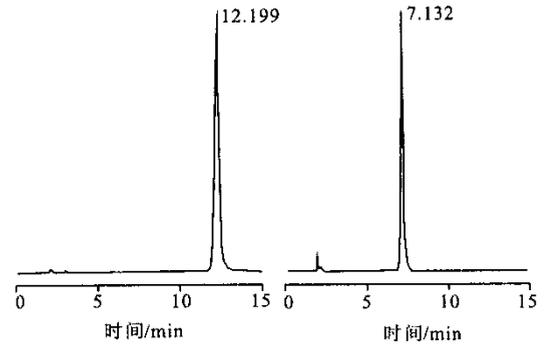
2.1.1 内酯型 Monacolin K 标准样品的制备和检测 内酯型 Monacolin K(Lovastatin)可直接溶于甲醇或乙腈,配成标准溶液,HPLC 图谱见图 2(左)所示.标样内酯型 Monacolin K 的  $R_t$  为 12.199 min,单一峰.使用甲醇或乙腈作溶剂时,相同质量浓度的标准样品在 HPLC 检测中得到几乎相同的保留时间和相对峰面积.内酯型 Monacolin K 标样的甲醇溶液在 4 ℃ 冰箱中保存长时间后(1 个月)会变质,在色谱图中出现杂峰,而乙腈溶液则长时间(至少 2 个月)保存不变质.因此配置内酯型 Monacolin K 标样时,宜使用乙腈为溶剂.

### 2.1.2 酸型 Monacolin K 标准样品的制备和检测

按照文献[14]中的方法配制 50 mg/L 的酸型标样在 HPLC 图谱中呈现一个单一的峰,但制备得到的水溶液中有悬浮状的不溶结晶物存在.在此标准样品溶液中加入甲醇后使悬浮结晶物全部溶解,然后用 HPLC 法测定.结果发现,色谱图上除原有的酸型 Monacolin K 峰外,又出现一内酯型 Monacolin K 峰.这说明,上述方法未能使内酯型 Monacolin K 完全转化为酸型 Monacolin K.改进的方法是,调整 pH 值并加入甲醇,将标准样加热处理后,可得到酸型 Monacolin K 单一峰,其保留时间  $R_t$  为 7.132 min(见图 2,右).这一处理方法,可以使酸型 Monacolin K 的标样质量浓度提高到 200 mg/L,以满足检测的需要.

2.1.3 HPLC 检测 Monacolin K 质量浓度与相对峰面积的标准曲线 分别对 Monacolin K 的酸型和内酯型两种标准样品进行检测,质量浓度均分为 5,

10,25,50,100,200 mg/L,结果见图 3.



左图:内酯型 Monacolin K, $R_t$  = 12.199 min;右图:酸型 Monacolin K, $R_t$  = 7.132 min

图 2 标准样品色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of standard samples

由图 3 可以看出,在 5~200 mg/L 的质量浓度范围内,内酯型和酸型的 Monacolin K 都和峰面积有着很好的线性关系.测定时将样品中 Monacolin K 质量浓度控制在此范围内就可以较为真实的反映样品中 Monacolin K 的含量.

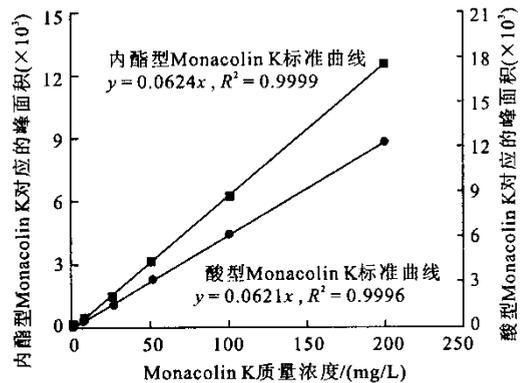


图 3 内酯型、酸型 Monacolin K 标准样品质量浓度与相对峰面积的线性关系

Fig.3 Linear relationship between the content of two forms of Moanacolin K and relative peak area

2.1.4 重复性实验 对本实验室的红曲霉 9901 发酵液样品进行萃取,萃取液重复进样 5 次,结果见表 1.其结果说明,该检测条件有着很好的重现性,完全满足样品检测的需要.

### 2.2 色谱流动相和萃取时溶液 pH 值对酸型和内酯型 Monacolin K 之间相互转化的影响

2.2.1 色谱流动相 pH 值对两种形态 Monacolin K 相互转化的影响 根据资料,内酯型 Monacolin K 和酸型 Monacolin K 根据环境 pH 值不同可以相互转化.在碱性环境中,主要以开环的酸型存在,在酸性环境中,两者共存<sup>[7,13]</sup>.实验采用 V(乙腈):V(0.1 g/dL 磷酸水溶液)=65:35 的流动相为一酸性

环境, Monacolin K 的两种标样在高效液相色谱检测过程中一直保持着各自的形态, 没有发生任何转化. 标样的检测结果说明, 采用这一流动相可以同时检测 Monacolin K 的两种形态.

表 1 红曲霉 9901 发酵液萃取液重复测定结果

Tab. 1 The repeatability of the analysis result of extract solution of *Monascus sp.* 9901 broth

项 目	Monacolin K 形态	
	酸型	内酯型
Monacolin K 质量浓度/ (mg/L)	110.80	3.32
	110.75	3.36
	110.65	3.36
	110.61	3.37
	110.57	3.37
平均值/(mg/L)	110.68	3.36
偏差/(mg/L)	0.106	0.023
变异系数/%	0.095	0.677

2.2.2 溶液 pH 值对萃取过程中两种形态 Monacolin K 相互转化的影响 Monacolin K 的两种形态在溶液中保持一定的平衡, 溶液 pH 值的改变将使这一平衡随之发生变化. 在样品萃取时又加入了甲醇作为萃取剂, 因此需要了解在有机萃取剂甲醇的影响下, 溶液的 pH 值对 Monacolin K 两种形态的转化规律. 这样才能控制一定的样品溶液 pH 值, 使结果能真实反映原样品中 Monacolin K 两种形态的比例. 对于干燥的固体红曲样品, 可以近似认为没有水分存在, 而甲醇的离解常数非常小, 远小于水, 因此在用甲醇萃取时基本上不存在甲醇溶液中 Monacolin K 两种形态发生互变的情况. 为了解发醇液萃取过程中的这一规律, 设计如下实验:

在仅含有内酯型 Monacolin K 的甲醇-水溶液(甲醇体积分数约 20%)中用 NaOH 溶液调至不同的 pH 值, 在仅含有酸型 Monacolin K 的甲醇-水溶液中用 HCl 调至不同的 pH 值. 50 °C 水浴 1 h 后, 测定溶液中内酯型洛伐它汀和酸型洛伐它汀含量, 结果见图 4.

图 4 表示不同 pH 值条件下, 纯的内酯型 Monacolin K 在溶液中被转化成酸型 Monacolin K 的转化率(右侧曲线)和不同 pH 值下纯的酸型 Monacolin K 在溶液中被转化成内酯型 Monacolin K 的转化率(左侧曲线). 从图中可以看出, 在此样品萃取过程中, 当 pH 值小于 7 时, 内酯型 Monacolin K 能较为稳定的存在, 当 pH 值大于 6 时, 酸型 Monacolin K 能较为稳定的存在. 对比图中两条曲线可以发现, 碱性条件下 Monacolin K 的内酯型非常容易转化成酸型, 而酸性条件下其酸型转化成内

酯型却相对不易. 因此可以得知, 当 pH 值位于 6~7 的范围内时, 采用本萃取方法萃取测定样品中 Monacolin K 两种形态的含量, 可以较为真实地反映原来样品中两种形态的 Monacolin K 的组成比例, 同时两者之和即为被测液中的 Monacolin K 总量.

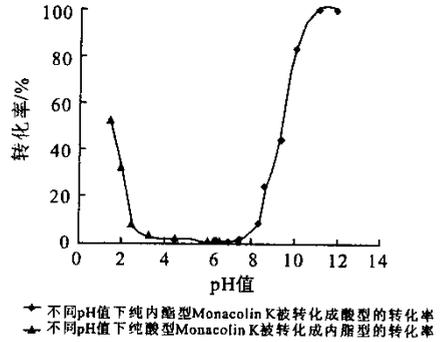


图 4 溶液 pH 值对 Monacolin K 两种形态相互转化的影响

Fig. 4 Effect of the pH of the extract solution on the conversion of two forms of Monacolin K

此外, 在酸性条件下将酸型 Monacolin K 转化成内酯型 Monacolin K 的实验中, 当溶液酸性很强时( $\text{pH} < 2$ )除了检测得到 Monacolin K 的两种形态物质外, 还发现另一物质, 其出峰时间比内酯型 Monacolin K 大约晚 1 min. 参照文献 [7], 这种物质应是甲酯化 Monacolin K.

2.2.3 Monacolin K 两种形态在发酵液中的变化规律 发酵液本身就是一个具有特定 pH 值的缓冲体系, Monacolin K 的两种形态在这样一种溶液中也有着一定的平衡. 控制一定的培养基配比和培养条件, 可以使液态发酵液有着各种不同的 pH 值, 随机抽取 43 个点, 作散点图见图 5.

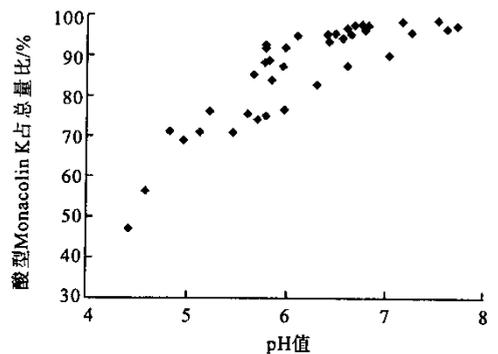
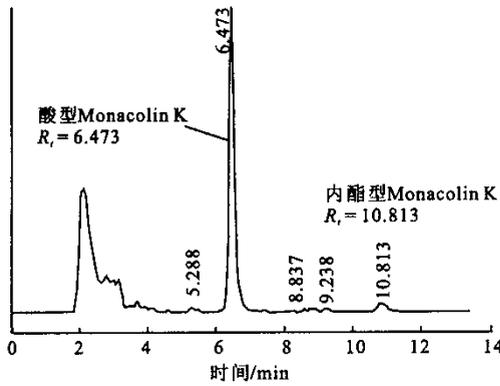


图 5 发酵液最终 pH 值与发酵液中 Monacolin K 两种形态比例的关系

Fig. 5 The relationship between the final pH of fermentation broth and ratio of two forms of Monacolin K in broth

从图 5 可见,发酵液的 pH 值对 Monacolin K 的两种形态的组成有重要的影响. 发酵液 pH 值较低时 ( $pH < 5$ ) 发酵液中有较多的内酯型 Monacolin K 存在;随着发酵液 pH 值的升高,发酵液中酸型 Monacolin K 的含量随之增加;pH 值在 6 以上时,发酵液中的 Monacolin K 绝大部分都以酸型存在.

在无 Monacolin K 产量、pH 值 6.3~6.7 的发酵液中添加纯内酯式 Monacolin K,分别于 27 °C 继续培养 4 h 和 24 h,发酵结束后检测发酵液中 Monacolin K 含量. 结果表明,无论是经过 4 h 还是 24 h,Monacolin K 在发酵液中均完全以内酯型存在,说明内酯型 Monacolin K 在发酵液中较难转变成酸型 Monacolin K. 由此推测,红曲霉在发酵代谢过程中合成 Monacolin K 时主要以酸型存在. 图 6 所示为本实验室红曲霉 9901 菌种液态发酵的发酵液 (pH 值 6.4) 用甲醇萃取后 HPLC 法检测的色谱图.



酸型 Monacolin K 标样  $R_t = 6.469$  min;内酯型 Monacolin K 标样  $R_t = 10.752$  min;发酵液 pH 6.4

图 6 红曲霉 9901 发酵液的 HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of the fermentation broth of *Monascus sp.* 9901

### 2.3 色素对 Monacolin K 检测的影响

色素与 Monacolin K 在分子上有着相似的结构,对 238 nm 波长的紫外光同样产生吸收,因此有必要考察红曲产品中的色素对 Monacolin K 测定的影响.

表 2 显示,在 3 种色素和 Monacolin K 标准样混合液的 HPLC 图谱中,紫色素和橙色素很难与酸型 Monacolin K 分开,黄色素和内酯型 Monacolin K 可以基本分离开. 峰面积/检测量的比值反映这一色谱条件对不同物质的选择性,在 238 nm 波长的紫外光检测条件下,同样的检测量所对应的峰面积相差很大;Monacolin K 的两种形态的这个比值远大于色素的,这使得在这一色谱条件下,对含量较

少的色素的样品进行 Monacolin K 的准确检测成为可能. 而 3 种色素中,紫色素对 Monacolin K 检测的影响相对最大. 峰面积/ $OD_{\lambda_{max}}$  的比值反映出 3 种色素在相同色价下,紫色素在 HPLC 下的峰面积响应值最大.

表 2 Monacolin K 和色素的 HPLC 响应值

Tab.2 HPLC response values of Monacolin K and pigments

Monacolin K 标样或色素	出峰时间/min	单位检测量的相对峰面积	峰面积/ $OD_{\lambda_{max}}$
酸型 Monacolin K	6.641	3005.8	-
内酯型 Monacolin K	11.116	3112.0	-
紫色素 (Monascorubramine)	6.706	1157.1	1366.8 <sub>(516 nm)</sub>
橙色素 (Monascorubrine)	6.635	414.3	262.0 <sub>(464 nm)</sub>
黄色素 (Ankaflavin)	11.806	452.8	698.8 <sub>(388 nm)</sub>

本实验室曾采用不同的流动相以使酸型 Monacolin K 与紫色素、橙色素相分离,发现当采用  $V(\text{乙腈}):V(0.1 \text{ g/dL 磷酸溶液}) = 50:50$  的流动相时,各种组分出峰时间分别为:酸型 Monacolin K 17.368 min,内酯型 Monacolin K 36.151 min,紫色素 18.664 min. 这时可以将酸型 Monacolin K 和与之影响较大的紫色素相互分离. 为了对比这两种流动相以及红曲色素存在对 Monacolin K 检测的影响,分别采用这两种流动相,对目前市场上的某 5 种功能性红曲产品进行检测,结果见表 3.

从表 3 可见,富含 Monacolin K 的功能性红曲产品往往具有较低的色价,其中的色素含量一般较低. 当在红曲产品中含有较高的 Monacolin K 时(如样品 S1, S2, S3, S4),两种流动相下测得的 Monacolin K 两种形态的含量均十分接近;而在红曲产品中 Monacolin K 含量很少时(如样品 S5),两种流动相下测定的量就有较大的差别,采用流动相 A 测得的 Monacolin K 含量明显多于采用流动相 B 测得的含量. 这于流动相 A 对色素与 Monacolin K 的分离效果较差有关,特别受紫色素的干扰较大. 鉴于功能性红曲中色素少、Monacolin K 含量高的特点,功能性红曲中的色素对 Monacolin K 检测的影响不是很大,因此一般可以采用流动相 A,  $V(\text{乙腈}):V(0.1 \text{ g/dL 磷酸溶液}) = 65:35$  进行检测. 采用流动相 A 具有检测时间短、减少溶剂仪器等消耗费用的优点. 对于少数色素很高的功能性红曲产品,可以采用流动相 B,它能相对较好地分离各种色素和 Monacolin K,但溶剂消耗量大,分析时间较长.

表 3 两种不同色谱流动相对 5 种功能性红曲产品的检测结果

Tab.3 The analysis result of 5 kinds of functional *Monascus* red rice with two different mobile phases

红曲 样品	色价 <sub>505 nm</sub> / (U/g)	酸型 Monacolin K 质量/(mg/kg)		内酯型 Monacolin K 质量/(mg/kg)	
		色谱流动相 A	色谱流动相 B	色谱流动相 A	色谱流动相 B
		( $R_{t\text{标}}=6.789$ min)	( $R_{t\text{标}}=17.162$ min)	( $R_{t\text{标}}=11.113$ min)	( $R_{t\text{标}}=35.509$ min)
S1	48.2	4836.3	4918.9	9145.1	9118.8
S2	182.5	4723.8	4845.4	6213.8	6660.9
S3	27.8	3221.8	3244.8	1983.8	2213.0
S4	97.4	8264.3	8375.1	6674.0	6765.8
S5	131.2	361.8	114.0	171.1	135.79

注 流动相 A. V(乙腈):V(0.1 g/dL 磷酸溶液)=65:35 流动相 B. V(乙腈):V(0.1 g/dL 磷酸溶液)=50:50.

### 3 结 论

1) 酸型 Monacolin K (Mevinolic acid) 的标准样品可以通过内酯型 Monacolin K (Lovastatin) 的纯品制取. 本实验中的 HPLC 检测条件对 Monacolin K 的两种形态都有很好的分离效果, 酸型 Monacolin K 的出峰时间约为 7 min, 内酯型 Monacolin K 的出峰时间为 11~12 min. 在 5~200 mg/L 的范围内, 峰面积与 Monacolin K 的检测量呈线性关系, 重复性实验证明该检测方法具有良好的重现性.

2) 酸型和内酯型的 Monacolin K 在一定条件下可以相互转化, 与溶液 pH 值有着密切的关系. 在本检测方法的样品预处理中, 发现在碱性条件下, 内酯型 Monacolin K 很容易转变成酸型的 Monacolin K, 在碱性较强时即能完全转化; 在酸性条件下, 酸型 Monacolin K 也能转变成内酯型的

Monacolin K, 但转化不完全. 在样品溶液 pH 值 6~7 时, 经萃取检测后的两种形态的 Monacolin K 含量, 能较为真实地反映原样品中的两种形态 Monacolin K 的组成比例. 因此, 萃取前应将发酵液 pH 值调整至 6~7. 液态发酵的发酵液 pH 值对产品中 Monacolin K 两种形态的比例有重要影响, 在较低 pH 值 (4.4) 时, 发酵液中有一半左右的 Monacolin K 以内酯型存在, 在 pH 值大于 6 时, 发酵液中的 Monacolin K 绝大多数以酸型存在.

3) 红曲产品中的色素对 Monacolin K 的检测具有一定影响, 最重要的是紫色素对酸型 Monacolin K 的影响. 通过使用含乙腈比例较低的流动相可以使紫色素和酸型 Monacolin K 相互分离. 但功能性红曲往往不同于高色价的红曲产品, 其中的色素含量一般较低, 而 Monacolin K 含量很高. 这种情况下可以忽略色素对 Monacolin K 检测造成的影响, 检测结果仍然真实可靠.

### 参考文献:

- [1] Akira Endo. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. *J Antibiotics*, 1979, 32: 852-854.
- [2] Akira Endo, Keiji Hasumi. Dihydromonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis[J]. *J Antibiotics*, 1985, 38: 321-327.
- [3] Akira Endo, Keiji Hasumi, Shigenori Negishi. Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*[J]. *J Antibiotics*, 1985, 38: 420-422.
- [4] Akira Endo. Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis[J]. *J Antibiotics*, 1986, 39: 1670-1673.
- [5] Vincent P Gullo, Robert T Goegelman, Irving Putter, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of derivatized hypocholesteremic agents from fermentation broth[J]. *J Chromatogr*, 1981, 212: 234-238.
- [6] Roman Kysilka, Vladimir Kren. Determination of Lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquid[J]. *J Chromatogr*, 1993, 630: 415-417.
- [7] Jozica Fiedrich, Mateja Zuzek, Mojca Bencina, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as

mevinolinic acid in fermentation broth[J]. **J Chromatogr A**, 1995, 704: 363–367.

- [ 8 ] 王春娜. HPLC 法检测功能红曲中的洛伐他汀[J]. 北京农学院学报, 2000, 15(2): 48–51.
- [ 9 ] 张小茜, 周富荣, 石济民. 高效液相色谱法测血脂康胶囊及红曲中洛伐他汀的含量[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 222–224.
- [ 10 ] 张建国, 刘文华. 紫外分光光度法测定洛伐他汀胶囊含量[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 20(3): 152.
- [ 11 ] 宋洪涛, 郭涛, 宓鹤鸣, 等. 薄层扫描法测定血脂平胶囊中洛伐他汀的含量[J]. 中草药, 1997, 28(12): 723–725.
- [ 12 ] Strode J T B, Taylor L T, HOWARD A L, *et al.* Feasibility of lovastatin analysis by packed column supercritical fluid chromatography with ultraviolet detection[J]. **J Pharm Biomed Anal**, 1999, 20: 137–143.
- [ 13 ] Matilde Manzoni, Manuela Rrlini, Silvia Bergomi, *et al.* Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains [J]. **Biotechnology Techniques**, 1998, 12: 529–532.
- [ 14 ] Akira Endo. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-Hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase[J]. **J Antibiotics**, 1980, 33: 334–337.

(责任编辑 杨勇)

(上接第 45 页)

- [ 9 ] Cheng Q Li, H Merdek K. Molecular characterization of the  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling[J]. **J Bacteriol**, 2000, 182: 4836–4840.
- [ 10 ] Chitlaru E, Roseman S. Molecular cloning and characterization of a novel  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii* [J]. **J Biol Chem**, 1996, 271: 33433–33439.
- [ 11 ] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Sequencing, expression, and transcription analysis of the *Clostridium paraputrificum* *chiA* gene encoding chitinase ChiA[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 51: 340–347.
- [ 12 ] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase *ChiB* and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain[J]. **J Bacteriol**, 1997, 179: 7306–7314.
- [ 13 ] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Characterization of *Clostridium paraputrificum* Chitinase A from a Recombinant *Escherichia coli*[J]. **J Biosci Bioeng**, 2001, 92: 466–468.
- [ 14 ] Li H, Morimoto K, Katagiri N, *et al.* A Novel  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase of *Clostridium paraputrificum* M-21 with High Activity on Chitobios[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 60(4): 420–427.
- [ 15 ] Mursheda K A, Hayashi H, Karita S, *et al.* Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercoarium* Xyn10B to xylan hydrolysis[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2001, 65: 41–47.
- [ 16 ] O'Brien M, Colwell R R. A rapid test chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1987, 53: 1718–1720.
- [ 17 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248–254.
- [ 18 ] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**, 1970, 227: 680–685.

(责任编辑 李春丽)