

# HPLC 法检测红曲霉菌 HNLI 发酵液中洛伐他汀含量

张凤琴, 李小龙, 刘 飞, 何农跃

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412008)

**摘要:** 用甲醇从红曲霉 HNLI 发酵液中萃取洛伐他汀, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 对其进行了检测。色谱条件为: 色谱柱 (XDB-C18, 4.6 mm × 250 mm), 柱温 30 °C, 检测波长为 237 nm, 以甲醇-水 (体积比为 70:30) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min。结果表明, 洛伐他汀在 10~50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 其相关回归方程为  $Y=363.82X+25.42$ ,  $R^2=0.9998$ 。该检测方法的重复性、稳定性良好, 精度较高。用此方法检测红曲霉 HNLI 的胞内、外产物洛伐他汀的质量浓度分别为 7.45 μg/mL 和 0.327 μg/mL。

**关键词:** 红曲霉; 洛伐他汀; 高效液相色谱法

**中图分类号:** TQ925+.7

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9833(2009)05-0026-03

## Determination of Lovastatin in Fermentation Broth of *Monascus* HNLI by HPLC

Zhang Fengqin, Li Xiaolong, Liu Fei, He Nongyue

(Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology,  
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412008, China)

**Abstract:** Methanol was used to extract Lovastatin from the fermentation broth of *Monascus* HNLI. HPLC method for determining the content of Lovastatin in the fermentation broth of *Monascus* HNLI was established. Samples were analyzed on the HPLC column with methanol-water(70:30)as mobile phase under the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 237 nm. The result showed that Lovastatin in the concentration of 10 μg/mL~50 μg/mL had good linearity with peak area and the correlative regression equation was  $Y=363.82X+25.42$ ,  $R^2=0.9998$ . The method had good reproducibility, well stability and high accuracy as well. The concentration of *Monascus* HNLI intracellular and extracellular lovastatin were 7.45 μg/mL, 0.327 μg/mL respectively.

**Keywords:** *Monascus* HNLI; Lovastatin; HPLC

红曲源于中国, 已有上千年的历史, 在发酵食品、食品色素、中药等领域有着广泛的应用<sup>[1]</sup>。1979年由日本学者远藤首先从红曲中分离出降血脂药物洛伐他汀 (Lovastatin)<sup>[2]</sup>。洛伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的抑制剂, HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成的关键酶, 洛伐他汀能对 HMG-CoA 进行有效的抑制, 具有明显减轻高血脂<sup>[3-5]</sup>, 降低冠心病的死亡率等作用<sup>[6]</sup>。1987年, 洛伐他汀作

为降血脂药被批准上市, 很快得到了广泛应用。由于一般红曲霉菌株发酵所产生的洛伐他汀含量并不高, 降血脂功效甚微。诱变筛选高产洛伐他汀的红曲菌株及高产洛伐他汀菌株培养工艺是红曲霉研究热点, 因此, 建立洛伐他汀的快速准确测定方法是十分必要的<sup>[7-9]</sup>。本文采用高效液相法, 用甲醇和水作流动相对洛伐他汀进行了检测, 以期为后期红曲霉发酵液中洛伐他汀的快速检测提供科学依据。

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 湖南省教育厅科研基金资助项目 (08C277), 湖南省科技计划基金资助项目 (2008TP4022-3)

作者简介: 张凤琴 (1976-), 女, 湖南祁阳人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事微生物技术与天然色素方面的研究,

E-mail: zhangfq05@163.com

## 1 试验材料与方 法

### 1.1 材料

**菌种** 红曲霉菌 HNL1 由绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室提供。

**培养基** 种子培养基: 质量分数分别为 5% 的蛋白胨和可溶性淀粉、0.01% 的  $MgSO_4$ 、0.05% 的  $KH_2PO_4$ 、6% 的蔗糖; 发酵培养基: 经过一定处理的味精废水, 质量分数为 5% 的可溶性淀粉、0.01% 的  $MgSO_4$ 、0.05% 的  $KH_2PO_4$ 、6% 的蔗糖。

**仪器** 电子天平: 湘仪天平仪器设备有限公司; 温控摇床: 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司; 离心机: 湖南凯达科学仪器有限公司; 双光束紫外可见分光光度计: 北京普析通用有取胜责任公司; 高效液相色谱仪: 安捷能化学工作站, XDB-C18 色谱柱。

### 1.2 方法

**红曲霉菌 HNL1 的发酵** 取红曲霉菌 HNL1, 接入种子培养基中, 于  $30^\circ C$ 、180 r/min 摇床条件下培养 2 d, 得到种子液。再将体积分数为 5% 的种子液直接接种于发酵培养液基中, 于  $30^\circ C$ 、180 r/min 摇床条件下培养 10 d 后, 得到红曲霉菌 HNL1 味精废水发酵液。

**发酵液样品溶液的制备** 取 10 mL 待测发酵液, 在室温下离心 20 min (3 000 r/min), 将上清液经孔径为  $0.45 \mu m$  的纤维素滤膜过滤, 所得滤液即为发酵液样品的胞外待测样; 取 10 mL 待测发酵液, 在前述条件下离心 20 min 后弃去上清液, 得到菌体。往菌体中加入一定量甲醇, 萃取 4 h 后再离心 20 min, 上清液经  $0.45 \mu m$  的纤维素滤膜过滤, 所得滤液即为发酵液样品的胞内待测样。

**标准样品溶液的制备** 准确称取 0.100 0 g 洛伐他汀标准样品, 置于 100 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解并稀释定容至刻度。分别取 1、2、3、4、5 mL 上述溶液于 100 mL 容量瓶中, 用超纯水稀释定容至刻度, 得质量浓度为 10、20、30、40、50  $\mu g/mL$  的标准溶液。

**洛伐他汀 HPLC 流动相的确立** 配置  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$  为 80:20、70:30、50:50 的溶液, 分别对标准品进行检测。根据洛伐他汀保留时值确定其最佳流动相的体积比。

## 2 结果与讨论

### 2.1 洛伐他汀高效液相色谱条件检测波长与流动相的确定

流动相采用甲醇与水, 其不同体积比对洛伐他汀保留时值的影响如图 1 所示, 检测波长为 237 nm, 进样体积为  $10 \mu L$ 。由图 1 可见, 当甲醇与水的体积比为 80:20、70:30、50:50 时, 洛伐他汀的保留时值分别为 12、15.9、20.5 min。为了避免待检测物多个峰叠加, 同时又能节省检测时间, 本试验采用流动相甲醇与水

的体积比为 70:30。综合以上各色谱条件下的样品检测结果, 洛伐他汀的较理想 HPLC 条件为: 色谱柱 (XDB-C18,  $4.6 mm \times 250 mm$ ), 柱温为  $30^\circ C$ , 检测波长为 237 nm, 流动相为甲醇-水 (体积比为 70:30), 流速为 1.0 mL/min。该条件下样品色谱图如图 2 所示。

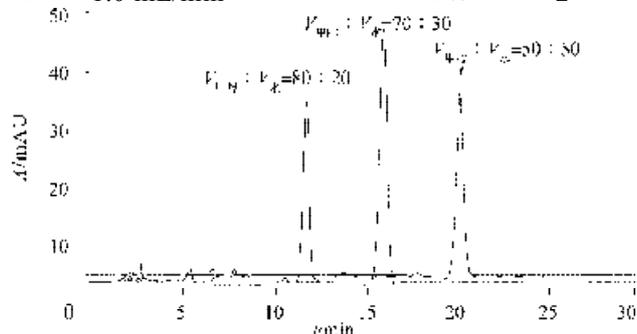


图 1 流动相对洛伐他汀保留值的影响

Fig. 1 Effects on the retention time of Lovastatin by the mobile phase

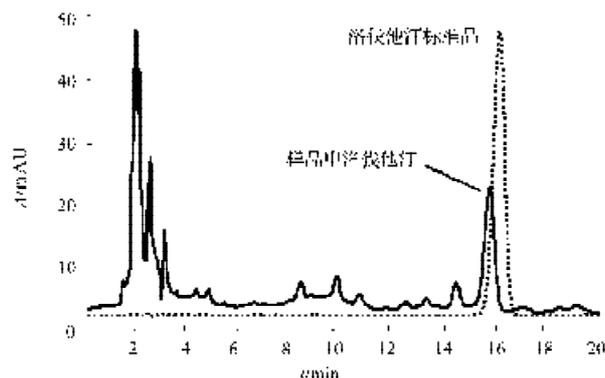


图 2 标准品与样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the sample and the Lovastatin standard

### 2.2 标准曲线的绘制

准确配制的 5 种洛伐他汀标准品的浓度梯度为 10、20、30、40、50  $\mu g/mL$ 。按 2.1 的色谱条件, 以峰面积 ( $Y$ ) 对质量浓度 ( $X$ ) 进行线性回归, 其标准曲线如图 3 所示, 回归方程为  $Y=363.82X+25.42$ ,  $R^2=0.9998$ , 图 3 说明洛伐他汀在 10~50  $\mu g/mL$  范围内线性良好。

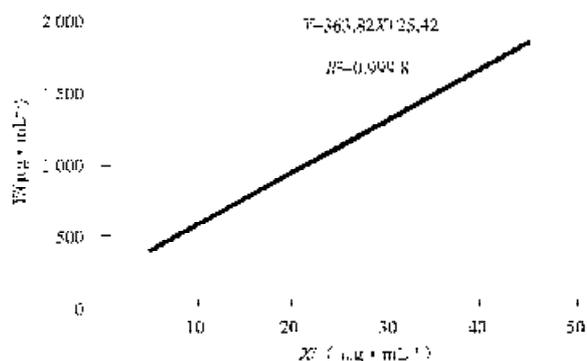


图 3 洛伐他汀标准曲线

Fig. 3 The standard curve of Lovastatin

### 2.3 胞内与胞外产洛伐他汀的测定

红曲霉 HNLI 产洛伐他汀 HPLC 色谱图见图 4。由图 4 可知,胞内、外洛伐他汀峰面积分别为 246.6、41.4 AU·s,前者为后者的 6 倍。根据前述回归方程式可计算出胞内洛伐他汀浓度为 7.45 μg/ml,胞外洛伐他汀的浓度为 0.327 μg/ml,说明洛伐他汀产物主要是在胞内贮存,极少能分泌到红曲霉的细胞外,与土曲霉发酵产洛伐他汀结论一致。另外,胞外洛伐他汀含量几乎不变,说明洛伐他汀不溶于水,与洛伐他汀为非极性物质微溶于水的理化性质相一致。

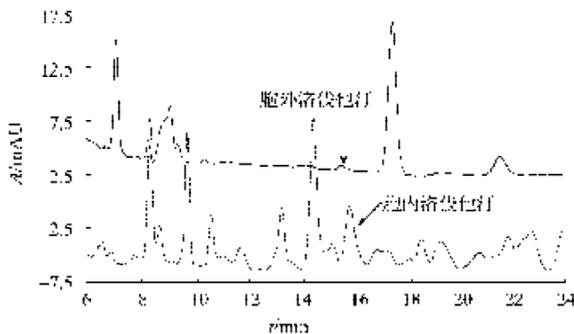


图 4 红曲霉产洛伐他汀胞内与胞外样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the inner cell sample and the broth

### 2.4 重复性、精密度和稳定性试验

依据 2.1 中的检测条件,对红曲霉发酵液中洛伐他汀进行 3 次重复检测,所得峰面积分别为 200、207.7、205.9 AU·s,其  $RSD=1.96\%$ ,小于 2%,表明该方法检测洛伐他汀重复性良好。取质量浓度为 30 μg/mL 的标准品,按上述液相色谱条件进行 3 次重复检测。标准品中洛伐他汀峰面积分别为 1 488、1 489、1 521 AU·s,  $RSD=1.2\%$ ,小于 2%,表明该方法精密度良好。新配制洛伐他汀标准品和洛伐他汀分别存放 12 h 和 24 h 后,峰面积有所增加,但  $RSD=1.8\%$ ,小于 2%,表明  $RSD$  在甲醇液中稳定性良好,但由于甲醇的挥发作用,洛伐他汀浓度随存放时间峰面积相应增加。

## 3 结论

洛伐他汀易溶于甲醇、乙醇、乙腈、略溶于水。选甲醇作溶剂,红曲霉 HNLI 发酵液中辅料成分几乎不被甲醇萃取,发酵液萃取 24 h 后洛伐他汀能充分地溶于甲醇,故甲醇是一种理想的溶剂。以甲醇-水作流动相简单方便,且检测成本低。在此流动相色谱条件下,洛伐他汀标准品和发酵液中辅料成分互不干扰,实验的重复性好,精密度高。

### 参考文献:

[1] 傅金泉. 中国红曲及其实用技术[M]. 北京: 中国轻工业出

版社, 1997.

Fu Jinquan. Chinese *Monascus* and Its Practical Technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1997.

[2] Aldra Endo, Monacolin K. A New Hypocholesterolemic Agent Produced by a *Monascus* Species[J]. *Antibiotics*, 1979, 32(8): 852.

[3] 陈晓平, 黄德嘉, 黄明慧, 等. 洛伐他汀对 II B 型高脂血症患者血脂、血糖及胰岛素代谢的影响[J]. 华西医科大学学报, 1999, 30(4): 444-445.

Chen Xiaoping, Huang Dejia, Huang Minghui, et al. Effects of Lovastatin on Plasma Lipid, Plasma Glucose and Insulin Metabolism of Patients with Type II B Hyperlipemia[J]. *Journal of West China University of Medical Sciences*, 1999, 30(4): 444-445.

[4] 孙焱, 陆尤, 张焱. 洛伐他汀联合阿昔莫司治疗高脂血症的疗效[J]. 中国药师, 2008, 11(9): 1084-1085.

Sun Yan, Lu You, Zhang Yan. Efficacy of Lovastatin Combined with Acipimox on Treatment of Patients with Hyperlipidemia[J]. *China Pharmacist*, 2008, 11(9): 1084-1085.

[5] 傅剑云, 夏勇, 孟佳. 红曲对实验性高脂血症大鼠体重及血脂水平的影响[J]. 中国临床康复, 2002, 5(1): 57-59.

Fu Jianyun, Xia Yong, Meng Jia. Effect of *Monascin* on Serum Lipid and Body Weight of Experimental Rats with Hyperlipemia[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2002, 5(1): 57-59.

[6] Bilhaime D W. Therapeutic Control of Hyperlipidemia in the Prevention of Coronary Atherosclerosis: A Review of Results from Recent Clinical Trails[J]. *Am J. Cardiol.*, 1988, 62: 1-9.

[7] 毛宁, 洪智勇. 红曲霉固态发酵产降脂物质的研究 I[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2003, 19(3): 58-61.

Mao Ning, Hong Zhiyong. A Study on the Production of Cholesterol Lowering Agent by *Monascus* with Solid State Fermentation I[J]. *Journal of Fujian Normal University: Natural Science*, 2003, 19(3): 58-61.

[8] 张朝晖, 王园, 周立平, 等. 不产桔霉素的红曲霉深层发酵生产莫纳可林 KU3[J]. 工业微生物, 2005, 35(4): 1-4.

Zhang Zhaohui, Wang Yuan, Zhou Liping, et al. Production of Monacolin K in Submerged Culture by Citrinin-free *Monascus* Species[J]. *Industrial Microbiology*, 2005, 35(4): 1-4.

[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, 27(4): 222-224.

Zhang Xiaoqian, Zhou Furong, Shi Jimin. Determination of Lovastatin in Xuezhikang Capsule and Fermentation Broth of *Monascus* by HPLC[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1997, 27(4): 222-224.

(责任编辑: 廖友媛)