

响应面法对青稞红曲中两种 Monacolin K 的提取工艺优化

谭友莉,马云桐*,黄凤,文静,余志芳,欧泉

成都中医药大学药学院 四川省中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137

摘要:优化青稞红曲中两种 Monacolin K 的提取工艺,并建立其含量测定方法。在单因素试验基础上,利用 Box-Behnken 中心组合试验及响应面分析法确定优化提取工艺,结合 HPLC 法以 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸水 (60:40, v/v) 为流动相, 1.0 mL/min 为流速, 在 238 nm 处测定两种 Monacolin K 含量。所建立测定两种 Monacolin K 含量方法, 线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验结果良好, 最佳工艺条件为: 提取溶剂纯甲醇, 提取温度 60 °C, 液固比 20:1 mL/g, 超声提取 1 h, 酸型与内酯型 Monacolin K 得率分别为 2.51 mg/g 和 1.65 mg/g, 经验证所得模型方程能较好地预测实验结果。

关键词:青稞红曲; Monacolin K; 响应面法; HPLC 法; 含量测定

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.11.017

Optimization of Extraction Technology of Two Forms of Monacolin K from Highland Barley Monascus Using Response Surface Analysis

TAN You-li, MA Yun-tong*, HUANG Feng, WEN Jing, YU Zhi-fang, OU Quan

Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Traditional Chinese medicine resource research and utilization in Sichuan province provincial Department of construction State Key Laboratory cultivation base, Chengdu 611137, China

Abstract: The purpose of this study was to optimize the extraction process of two forms of Monacolin K from highland barley Monascus, and to establish their content determination method. On the basis of single factor experiment, and adopting the Box-Behnken central composite experiment and response surface analysis to determine the optimal extraction technology. The HPLC method for the determination of two forms of Monacolin K was as follows: with ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), in the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water (60:40, v/v), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 238 nm. The results showed that the linearity, precision, repeatability, stability and recovery of the developed HPLC method were good. The optimized extraction conditions were finally determined to be: using methanol as extraction solvent, with extraction temperature of 60 °C, liquid-solid ratio of 20:1 (mL/g) and ultrasonic extraction of 1 h. Under the optimized extraction, the contents of acid form and lactone form of Monacolin K were 2.51 mg/g and 1.65 mg/g, respectively.

Key words: highland barley Monascus; Monacolin K; response surface analysis; high performance liquid chromatography; determination

青稞红曲是红曲霉属真菌接种于青稞上发酵而成的一种麦曲。其含有的 Monacolin K (即洛伐他汀) 成分是对 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶起抑制作用的物质^[1], 具有降血压、降血脂、减少动脉粥样硬化发生、防治冠心病等作用^[2,3]。在红曲中 Monacolin K 以开环的酸型和内酯型两种形态存在^[4]。据研究发现酸型 Monacolin K 因能被人体直接吸收, 发挥降脂作用, 减少了肝、

肾负担, 而优于需在体内水解转化为开环型发挥药效的内酯型 Monacolin K^[5]。因此, 有效提取青稞红曲中 Monacolin K, 并准确测定其两种形态的含量和比例, 对开发该药物资源和体现其降脂作用具有重要意义。本文采用超声提取法, 用响应面法对主要影响因子提取时间、温度和料液比之间的单一和交互作用等进行了较深入的研究, 得出最佳提取青稞红曲中 Monacolin K 的工艺参数, 并采用 HPLC 法同时测定内酯型和酸型 Monacolin K 的含量及比例, 为青稞红曲中 Monacolin K 的开发利用提供理论依据。

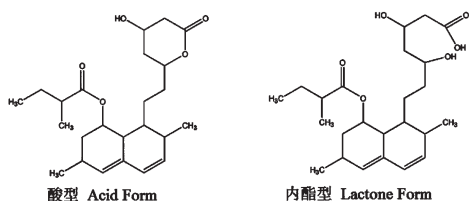


图1 酸型和内酯型 Monacolin K 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of acid form and lactone form of Monacolin K

1 材料与仪器

1.1 材料

青稞红曲(批号:20140605):由西藏月王生物技术有限公司提供。甲醇、乙腈为色谱纯[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],磷酸、氢氧化钠为分析纯(成都市科龙化工试剂厂),内酯型 Monacolin K 标准品($C_{24}H_{36}O_{50}$, 99.4%, 批号:100600-201003;中国食品药品检定研究院)。

1.2 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(G1322A 溶剂脱气器, G1311A 四元泵, G1315C 二极管阵列检测器);十万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];JA1003 千分之一天平(上海舜宇平科学仪器有限公司);KQ5200E 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DZKW-4 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温:30 °C,流动相:乙腈-0.1% 磷酸水(60:40, v/v),流速 1.0 mL/min,检测波长:238 nm,参比波长(400 nm),进样量:10 μL,样品经 0.45 μm 滤膜过滤后用 HPLC 法测定。

2.2 对照品溶液及样品溶液的制备

2.2.1 内酯型 Monacolin K 对照品

精密称定 Monacolin K(内酯)标准品 10.18 mg 加入甲醇定容至 100 mL,摇匀,作为内酯型洛伐他汀对照品溶液。HPLC 检测内酯型洛伐他汀保留时间在 15.862 min。

2.2.2 酸型 Monacolin K 对照品

称取 Monacolin K(内酯)标准品 20.10 mg,用含 20% 甲醇 pH = 12 的氢氧化钠溶液定容至 100 mL,

在 50 °C 条件下超声转化 1 h 自然冷却至室温。HPLC 检测发现转换后的酸型 Monacolin K 只有一个峰,保留时间在 8.673 min。

2.2.3 样品溶液的制备

取青稞红曲粉末(过三号筛)约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 磨口锥形瓶,加 20 mL 纯甲醇,称定重量,50 °C 超声提取 1 h,放冷,再称定重量,用纯甲醇补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,4 °C 冰箱储存备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围

精密吸取 0.2010 mg/mL 酸型和 0.1018 mg/mL 内酯型 Monacolin K 对照品溶液 2、5、10、15、20 μL,每个浓度进样 3 次。以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:内酯型 Monacolin K: $Y = 78.137X - 26.171$,相关系数 $r = 0.9999$;酸型 Monacolin K: $Y = 25.484X + 2.3171$,相关系数 $r = 0.9998$ 。表明酸型 Monacolin K 在 40 ~ 300 mg/L 和内酯型 Monacolin K 在 10 ~ 200 mg/L 范围内线性关系良好。

2.3.2 分离度实验

精密吸取 2.2 项样品溶液和对照品溶液,按照 2.1 项下色谱条件分别进样,如图 2,在样品中两种 Monacolin K 出峰时间和两种 Monacolin K 标准品出峰时间吻合。在样品中内酯型 Monacolin K 和酸型 Monacolin K 分离度良好,且需要的色谱峰附近不存在干扰峰,两种类型 Monacolin K 分离情况如下图 2 所示。

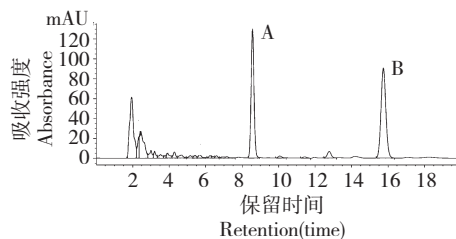


图2 样品中酸型和内酯型 Monacolin K 的分离图

Fig. 2 HPLC chromatogram of highland barley Monascus

注:A:酸型 Monacolin K;B:内酯型 Monacolin K

Note:A:acid form Monacolin K;B:lactone form Monacolin K

2.3.3 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液,按上述 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录酸型 Monacolin K 和内酯型 Monacolin K 峰面积,结果酸型和内酯型 Monaco-

lin K 峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.82%，表明仪器精密性良好。

2.3.4 重复性试验

按 2.2.3 项重复制备 6 份同一供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件测定，计算，得酸型 Monacolin K 平均含量为 0.26%，RSD 为 0.53%，内酯型 Monacolin K 平均含量为 0.15%，RSD 为 1.26%。结果说明，该检测条件重复性良好，满足样品检测的需要。

2.3.5 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别在 1、4、8、12、16、24 h 进样，记录酸型和内酯型 Monacolin K 峰面积，结果酸型 Monacolin K RSD 为 0.83%，内酯型 Monacolin K RSD 为 1.12%，表明在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验

取已知含量青稞红曲样品 6 份，加入一定量酸型和内酯型 Monacolin K 标准液进行回收试验。酸型 Monacolin K 的平均回收率为 99.6%，RSD 为 0.24%；内酯型 Monacolin K 的平均回收率为 98.4%，RSD 为 0.71%。

2.4 两种 Monacolin K 提取单因素试验设计

在进行响应面分析之前，先通过单因素实验选出对青稞红曲中两种 Monacolin K 提取得率具有显著影响的因素，并确定其试验水平。本文称取 1.0 g 青稞红曲，考察不同浓度甲醇（45%、55%、65%、75%、85%、100%），提取温度（40、50、60、70、80℃），提取时间（10、30、60、90、120 min），液固比（10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 mL/g）对青稞红曲中两种 Monacolin K 提取得率的影响。

2.5 两种 Monacolin K 提取响应面法实验设计与数据分析方法

以单因素试验的结果为基础，根据 Box-Behnken 试验设计原理，选取提取温度（A）、液固比（B）、提取时间（C）等对两种 Monacolin K 提取影响显著的 3

表 1 Box-Behnken 试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平 Levels	因素 Factors		
	提取温度 Extraction temperature (℃) A	液固比 Liquid- to-solid ratio (mL/g) B	提取时间 Extraction time (min) C
-1	55	15:1	30
0	60	20:1	60
1	65	25:1	90

个因素，在单因素试验的基础上采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法。具体试验因素与水平设计方案见表 1。

采用 Design-Expert 8.0 软件对实验数据进行回归分析，拟合二次多项式方程。多项式模型方程拟合可靠性 R^2 越接近 1，则多项式模型与实际拟合可靠性越高，其统计学上的显著性由 F 值检验，F 值越大表明该变量对因变量的影响越显著；因素的线性效应、平方效应及其交互效应的显著性由模型系数的 P 值检验，概率 P 值越小，则相应的显著程度越高， $P < 0.01$ 时影响为极显著， $P < 0.05$ 影响显著。

3 结果与讨论

3.1 单因素试验结果

3.1.1 提取溶剂对青稞红曲中两种 Monacolin K 得率的影响

设定提取温度 50℃，液固比 20:1 mL/g，超声提取 2 h，分别以 45%、55%、65%、75%、85%、100% 不同浓度甲醇作为提取溶剂，测定两种 Monacolin K 的峰面积。结果表明，甲醇浓度越高两种 Monacolin K 提取得率越高。使用纯甲醇提取溶液所得的酸型 Monacolin K 的平均得率为 0.233%；内酯型 Monacolin K 平均得率为 0.153%。采用纯甲醇提取样品，色素含量低，能保护柱子；不需要蒸干溶剂再定容，过滤容易；因不含水，酸型和内酯型 Monacolin K 稳定性更好，含量更确定可靠。故采用纯甲醇提取青稞红曲中两种 Monacolin K。

3.1.2 提取温度对青稞红曲中两种 Monacolin K 的得率的影响

设定纯甲醇为提取溶剂，液固比为 20:1 mL/g，超声提取时间为 2 h 条件下，在 40、50、60、70、80℃ 温度下，分别测定两种 Monacolin K 的峰面积，结果表明在 60℃ 左右时，两种 Monacolin K 的得率达到最值。因此选择温度为 60℃ 左右为宜。

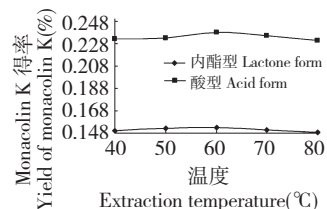


图 3 提取温度对得率的影响

Fig. 3 The effect of extraction temperature on the extraction yield of Monacolin K

3.1.3 液固比对青稞红曲中 Monacolin K 的得率的影响

设定在 60 °C 下,纯甲醇为提取溶剂,超声提取时间为 2 h,以 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 (mL/g) 液固比,分别测定两种 Monacolin K 的峰面积,结果表明液固比为 20:1 mL/g 附近时两种 Monacolin K 的得率达到最值之后提取得率略有下降。因此液固比选择在 20:1 mL/g 左右。

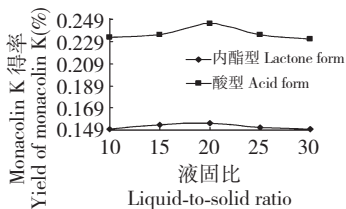


图 4 液固比对得率的影响

Fig. 4 Effect of liquid-to-solid ratio on the extraction yield of Monacolin K

3.1.4 超声提取时间对青稞红曲中 Monacolin K 的得率的影响

设定 60 °C 下,以纯甲醇为提取溶剂,液固比 20 : 1 mL/g,分别提取 10、30、60、90、120 min,分别测定两种 Monacolin K 的峰面积,结果表明,两种 Monacolin K 得率随着时间的增长呈上升趋势,60 min 附近达到最大之后趋于平缓,为减少能耗,节约时间,提取时间选择在 60 ~ 70 min 之间。

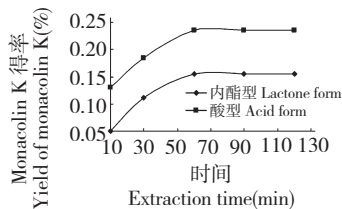


图 5 提取时间对得率的影响

Fig. 5 The effect of extraction time on the extraction yield of Monacolin K

3.2 响应面法优化青稞红曲中两种 Monacolin K 提取工艺

3.2.1 响应面分析方案与结果

对两种 Monacolin K 提取工艺进行响应面分析,其具体试验方案及结果见表 2。

表 2 试验分析方案及实验结果

Table 2 Box-Behnken design arrangement and the experimental results

编号 No.	A	B	C	酸型 Monacolin K 得率	内酯型 Monacolin K 得率
				Yield of acid form Monacolin K (mg/g)	Yield of lactone form Monacolin K (mg/g)
1	-1	1	0	2.32	1.52
2	0	1	1	2.34	1.54
3	1	0	-1	2.10	1.40
4	0	-1	1	2.08	1.42
5	0	-1	-1	2.05	1.46
6	-1	0	-1	2.07	1.44
7	0	0	0	2.48	1.67
8	0	0	0	2.50	1.64
9	1	0	1	2.20	1.50
10	0	0	0	2.43	1.66
11	0	0	0	2.45	1.65
12	-1	-1	0	2.21	1.48
13	1	-1	0	2.31	1.52
14	1	1	0	2.22	1.49
15	0	1	-1	2.10	1.45
16	0	0	0	2.49	1.68
17	-1	0	1	2.25	1.49

采用 Design-Expert 8.0 软件进行二次回归响应面分析,得到 Monacolin K 得率 Y 对提取温度 A、液固比 B、提取时间 C 的二次多项回归模型:

酸型 Monacolin K 得率: $Y_1 = 2.47 - 0.0025A + 0.041B + 0.069C - 0.050AB - 0.020AC + 0.052BC - 0.096A^2 - 0.11B^2 - 0.22C^2$

内酯型 Monacolin K 得率:

$Y_2 = 1.66 - 0.0025A + 0.015B + 0.025C - 0.018AB + 0.013AC + 0.033BC - 0.084A^2 - 0.074B^2 - 0.12C^2$

各因素 的方差分析见表 3、4。

表 3 酸型 Monacolin K 提取的二次响应面回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model of extracting acid form Monacolin K

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	Prob > F
Model	0.39	9	0.044	21.82	0.0003
A-A	0.0003125	1	0.00005	0.025	0.8787
B-B	0.014	1	0.014	6.82	0.0349
C-C	0.065	1	0.038	18.94	0.0033
AB	0.010	1	0.010	5.01	0.0602
AC	0.002025	1	0.0016	0.80	0.4004
BC	0.011	1	0.011	5.52	0.0491
A ²	0.036	1	0.039	19.54	0.0031
B ²	0.040	1	0.050	24.94	0.0016
C ²	0.20	1	0.20	100.92	<0.0001
残差 Error	0.014	7	0.001996		
失拟性 Lack of fit	0.011	3	0.003525	4.15	0.1015
纯误差 Pure error	0.0034	4	0.00085		
总差 Total	0.41	16			

注: $R^2 = 0.9656, R^2_{Adj} = 0.9213, P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

Note: $R^2 = 0.9656, R^2_{Adj} = 0.9213, P < 0.05$ means significant difference; $P < 0.01$ means extremely significant difference.

表 4 内酯型 Monacolin K 提取的二次响应面回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for regression model of extracting lactone form Monacolin K

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	Prob > F
Model	0.14	9	0.015	28.82	0.0001
A-A	0.00005	1	0.00005	0.095	0.7674
B-B	0.0018	1	0.0018	3.41	0.1075
C-C	0.005	1	0.005	9.46	0.0179
AB	0.001225	1	0.001225	2.32	0.1717
AC	0.000625	1	0.000625	1.18	0.3129
BC	0.004225	1	0.004225	7.99	0.0255
A ²	0.030	1	0.030	55.87	0.0001
B ²	0.023	1	0.023	43.33	0.0003
C ²	0.059	1	0.059	112.33	<0.0001
残差 Error	0.0037	7	0.0005286		
失拟性 Lack of fit	0.0027	3	0.0009	3.6	0.1239
纯误差 Pure error	0.001	4	0.00025		
总差 Total	0.14	16			

注: $R^2 = 0.9737, R^2_{Adj} = 0.9399, P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著

Note: $R^2 = 0.9737, R^2_{Adj} = 0.9399, P < 0.05$ means significant difference; $P < 0.01$ means extremely significant difference

从表 3 可以看出, Y_1 模型 $P = 0.0003 < 0.01$, 此时 Y_1 回归模型极其显著, 表明该试验方法可靠。失

拟项 $P=0.1015 > 0.05$, 检验为不显著, 说明 Y_1 回归模型与实测值能较好的拟合。 Y_1 模型相关系数 $R^2 = 0.9656$, 表明可信度良好; $R^2_{Adj} = 0.9213$, 说明 92.13% 的实验数据可用该模型进行解释。 综上, Y_1 模型可以对酸型 Monacolin K 提取工艺进行分析和预测。 从 F 值可以看出, 影响酸型 Monacolin K 得率的各因素按影响大小排序依次为 C (提取时间)、B (液固比)、A (提取温度), 其中 C 达到极显著水平。

从表 4 可以看出, Y_2 模型 $P=0.0001 < 0.01$, 此时 Y_2 回归模型极其显著, 表明该试验方法可靠。 失拟项 $P=0.1239 > 0.05$, 检验为不显著, 说明 Y_2 回归模型与实测值能较好的拟合。 Y_2 模型相关系数 $R^2 = 0.9737$, 表明可信度良好; $R^2_{Adj} = 0.9399$, 说明 93.99% 的实验数据可用该模型进行解释。 综上, Y_2 模型可以对内酯型 Monacolin K 提取工艺进行分析

和预测。 从 F 值可以看出, 影响内酯型 Monacolin K 得率的各因素按影响大小排序依次为 C (提取时间)、B (液固比)、A (提取温度), 其中 C 几乎达到极显著水平。

等高线的形状可反映出交互效应的强弱, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 而圆形则与之相反。 根据回归方程, 作出响应面和等高线, 考察拟合响应曲面的形状, 从中分析提取温度、液固比和提取时间对 Monacolin K 得率的影响, 结果见图 6、7。

对于 Y_1 模型: 由图 6 和表 3 可以观察到, 液固比和超声提取时间对应的酸型洛伐他汀 Monacolin K 得率响应曲面为开口向下的凸形曲面, 随着因素的增大, 响应值增大, 当响应值增大到极值后, 随着因素的增大, 响应值逐渐减小。 且只有 BC 的 $P = 0.0491 < 0.05$, 所以说明液固比和超声提取时间之

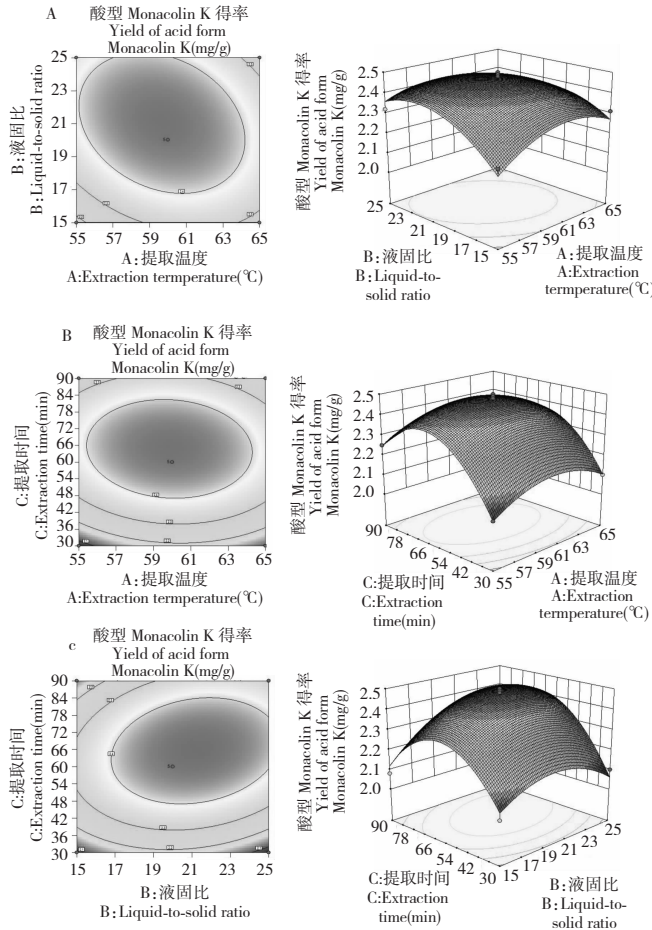


图 6 提取温度和液固比 (A)、提取温度和超声提取时间 (B) 及液固比和超声提取时间 (C) 对酸型 Monacolin K 得率影响的等高线图和响应面

Fig. 6 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of extraction temperature and liquid/solid ratio (A), extraction temperature and extraction time (B), liquid/solid ratio and extraction time (C) on the extraction yield of acid form Monacolin K

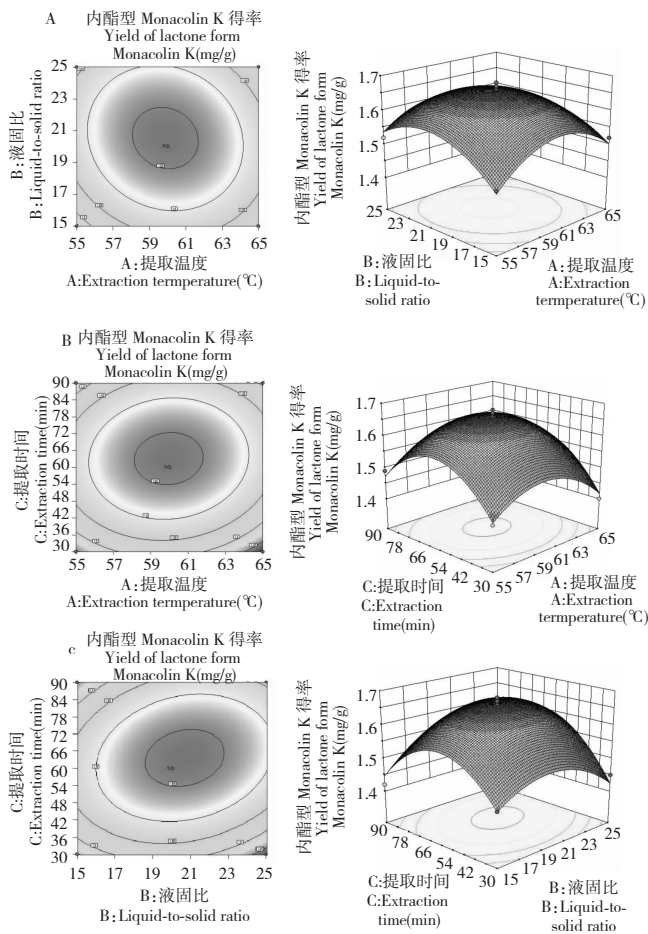


图7 提取温度和液固比(A)、提取温度和超声提取时间(B)及液固比和超声提取时间(C)对内酯型 Monacolin K 得率影响的等高线图和响应面

Fig. 7 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of extraction temperature and liquid/solid ratio (A), extraction temperature and extraction time (B), liquid/solid ratio and extraction time (C) on the extraction yield of lactone form Monacolin K

间有较强的交互作用,其余各因素间的交互作用不明显。

对于 Y_2 模型:由图 7 和表 4 可以观察到,液固比和超声提取时间对应的内酯型洛伐他汀 Monacolin K 得率响应曲面为开口向下的凸形曲面,随着因素的增大,响应值增大,当响应值增大到极值后,随着因素的增大,响应值逐渐减小。且只有 BC 的 $P = 0.0255 < 0.05$,所以说明液固比和超声提取时间之间有较强的交互作用,其余各因素间的交互作用不明显。

3.2.2 青稞红曲中两种 Monacolin K 提取工艺条件

通过软件中 Optimization 的 Numerical 功能,优化提取青稞红曲中 Monacolin K 的理论最佳工艺为:提取温度为 59.77 °C,液固比为 20.94:1 mL/g,提取时间为 64.70 min,酸式洛伐他汀 Monacolin K 最大得率预测值为 2.48134 mg/g,内酯型洛伐他汀

Monacolin K 最大得率预测值为 1.66217 mg/g。为检验 RSA 法的可靠性,采用上述最优提取条件进行 Monacolin K 提取试验。为操作便利,将最佳条件修正为提取温度为 60 °C,液固比为 20:1 mL/g,提取时间为 60 min,实际测得青稞红曲中酸型 Monacolin K 得率 2.51 mg/g,内酯型 Monacolin K 得率 1.65 mg/g。结果证明,Monacolin K 得率与理论预测值相当,故优化方案得到的提取条件准确可靠,具有实用价值。

4 结论

响应面法克服了正交设计只能处理离散的水平值和不能给出直观图形,并无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷^[6-9]。本文采用响应面法研究青稞红曲中 Monacolin K 提取工艺参数,并通过响应面图直观分析了各因素及因素

之间对青稞红曲中 Monacolin K 得率的影响,优化提取青稞红曲中 Monacolin K 的理论最佳工艺为:提取温度为 59.77 °C,液固比为 20.94:1 mL/g,提取时间为 64.70 min。结合单因素实验对最佳工艺进行修正确定最佳提取条件:以纯甲醇为提取溶剂,提取时间为 1 h,液固比 20:1 mL/g,提取温度 60 °C,得到青稞红曲中酸型 Monacolin K 得率为 2.51 mg/g,内酯型 Monacolin K 得率为 1.65 mg/g。此外,本文建立了 HPLC 测定青稞红曲中两种 Monacolin K 含量的方法,该方法克服了以往多数研究只测定红曲中 Monacolin K 总量或只检测内酯型 Monacolin K 含量,从而忽视二者比例的缺陷,不能较好体现青稞红曲的降脂价值^[10-12]。通过本实验优化了青稞红曲中 Monacolin K 提取工艺及含量测定方法,为青稞红曲中 Monacolin K 的进一步研究提供理论基础。

参考文献

- Chen P (陈平). Research status and prospects of Monascus metabolites. *Guangxi Light Ind*(广西轻工业),2009,9(9):4-5.
- Chen CY(陈春艳). Advances in functional red yeast rice with Monascus pigment. *J Hunan Univ Sci Eng*(湖南科技学院学报),2007,9:40-42.
- Wang WF(王文凤), Yuan BB(袁兵兵), Xu L(徐玲), et al. Current application of red koji. *Ferment Sci Tech*(发酵科技通讯),2014,43:39-44.
- Wen J(文镜), Chang P(常平), Liu D(刘迪), et al. RP-HPLC quantitative determination of Lovastatin in Monascus at its open ring form. *Food Sci*(食品科学),2003,24:108-112.
- Sun W(孙伟), Liu AY(刘爱英), Liang ZQ(梁宗琦). Studies and development of Monacolin K in Monascus spp. *Southwest Chin J Agric Sci*(西南农业学报),2003,16:112-116.
- Zhang ZZ(张泽志), Wang FA(王福安), Gao X(高霞), et al. The response surface method optimization celery microwave extraction technology of total flavonoids. *J Zhengzhou Univ*(郑州大学学报),2010,31(6):95-99.
- Pan GB(潘国波), Yang XM(杨小明), Ding Y(丁艳), et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total triterpenoid saponins from *Chaenomeles speciosa* using response surface analysis. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,24:1292-1296.
- Zhang ZZ(张泽志), Gao X(高霞), Lin Y(林钰), et al. Microwave extraction peanut shell flavonoids by the response surface method optimization process. *J Henan Univ Tech*(河南工业大学学报),2010,31(4):32-36.
- Zhang ZZ(张泽志), Han CL(韩春亮), Li CW(李成未). The response surface method in the application of the experimental design and optimization. *J Henan Inst Edu*(河南教育学院学报),2011,20(4):34-37.
- Shen-Du JZ(申屠建中), Zhang X(章霞), Chen ZG(陈志根), et al. RP-HPLC determination of simvastatin in human plasma by solid-phase extraction. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2002,22:18-23.
- Wan YP(万玉萍), Li Y(栗旻). The content determination of lovastatin in health food by HPLC. *Chin J Pub Heal*(中国公共卫生),2003,19:1255-1256.
- Luo RC(罗仁才), Sun KQ(孙开奇), Xie SM(谢申猛), et al. Determination of total Lovastatin in red rice. *J Hyg Res*(卫生研究),2003,32:157-158.
- Tsantrizos YS, et al. Novel quinazolinones and enniatins from *Fusarium lateritium* Nees. *Can J Chem*, 1993, 71: 1362-1367.
- Shen S, et al. A novel and other bioactive secondary metabolites from a marine fungus *Penicillium oxalicum* 0312F1. *Nat Prod Res*, 2013, 27: 2286-2291.
- Pathak SR, et al. Synthesis and antihypertensive activity of novel quinazolin-4(3H)-one derivatives. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2014, 14: 34-38.
- Krishnan SK, et al. Synthesis, antiviral and cytotoxic investigation of 2-phenyl-3-substituted quina-zolin-4-(3H)-ones. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15: 673-681.
- Lannutti BJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, 2011, 117: 591-594.

(上接第 1978 页)