

古田红曲米抗氧化活性物质的分离纯化

张红林¹, 李桂玲^{1,2}, 苏国成¹, 刘静雯^{1,2}, 李健^{1,3}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建厦门 361021)
(3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

摘要: 本文对产自不同地区的红曲米进行抑菌、抗氧化活性的测定, 结果显示古田红曲米的抗细菌活性稍强于其它地区产的红曲米。采用凝胶柱层析、反相和正相硅胶柱层析等分离纯化方法, 结合核磁共振波谱及质谱检测等技术手段对古田红曲的甲醇提取活性物质进行分析和结构鉴定。结果表明不同有机溶剂提取物的抑菌效果有很大差异, 同浓度下抑菌效果从大到小依次为枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>黑曲霉>塔宾曲霉>酿酒酵母菌; 抗氧化实验中, 古田红曲米抗氧化活性较强, 此外, 古田红曲乙酸乙酯提取物以及50%水-50%甲醇到0%水-100%甲醇提取物的抗氧化活性也较好。最后, 从古田红曲米中分离纯化出2个化合物, 鉴定为亚油酸和 α -亚麻酸, 它们均有一定的抗氧化和抗肿瘤等活性。

关键词: 红曲米; 抑菌; 抗氧化; 分离纯化; 结构鉴定; 活性

文章编号: 1673-9078(2018)05-136-142

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.020

Separation and Purification of the Antioxidant Compounds from Gutian Red Yeast Rice

ZHANG Hong-lin¹, LI Gui-ling^{1,2}, SU Guo-cheng¹, LIU Jing-wen^{1,2}, LI Jian^{1,3}

(1. Jimei University College of Food and Biological Engineering, Xiamen 361021, China) (2. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China) (3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: The antibacterial and antioxidant activities of red yeast rice from different areas were investigated in this paper, and the results showed that the antibacterial activity of Gutian red yeast rice was slightly stronger than that of the red yeast rice from other regions. The active compounds of Gutian red yeast rice were extracted with methanol by gel column chromatography, reversed phase and positive phase silica gel column chromatography, and then were analyzed by nuclear magnetic resonance spectrum and mass spectrometry. Results indicated that the bacteriostatic effects were different for different organic solvent extracts, and the overall order of bacteriostatic effects for extracts (under the same concentration) was as follows: *Bacillus subtilis* > *E. coli* > *Aspergillus niger* > *Tarbinia asiatica* > *Brewer's yeast*. In antioxidant experiment, the antioxidant activity of Gutian red yeast rice was stronger than others. In addition, the antioxidant activities of ethyl acetate extract, 50% water-50% methanol extract and 0% water-100% methanol extract of Gutian red yeast rice were also stronger. Finally, two compounds with certain antioxidant and antitumor activities were identified as alpha linolenic acid and linoleic acid and were successfully separated and purified from red yeast rice.

Key words: red yeast rice; bacteriostatic; antioxidant; separation and purification; structure identification; activity

红曲又称丹曲, 是由红曲霉接种到大米发酵而来

收稿日期: 2017-12-31

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2017J01636); 福建省教育厅中青年
教师教育科研项目(JA15276); 教育部留学归国人员科研启动基金
(201507030002); 国家海洋局海洋生物资源综合利用工程技术研究中心开
放课题

作者简介: 张红林(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的分离
纯化及活性研究

通讯作者: 李健(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性物质、
功能食品和食品安全

的一种紫红色米曲, 是一种药食两用的传统食品。明代《天工开物》中记载: 红曲具有杀菌和抑菌作用, 在鱼肉上涂红曲可以延缓它的变质^[1]。虽然古代有此记录, 但近现代对红曲的研究较少。1979年, 日本学者远藤章^[2]首次从红曲中分离到一种可抑制人体胆固醇合成的活性物质, 命名为 Monacolin K, 才由此掀起国内外学者对红曲的广泛关注。Lee等^[3]研究了红曲发酵产生的色素 Monascin 和 Ankaflavin, 发现它们对提高学习和记忆能力以及延缓衰老有很好的功效。温学伟等^[4]通过对红曲的抗氧化研究得出: 红曲中含有

许多如色素、酚类、Dimerumic acid、他汀类不同的抗氧化物质, 它们的存在可以消除氧自由基的伤害, 保护人体健康。Liu 等^[5]以分离纯化到的红曲色素 Ankascin 568 plus 喂食小鼠 4 个月, 结果表明: 4 个月后总胆固醇下降与低密度脂蛋白均有所下降。李明起等^[6]以柱层析分离纯化功能性红曲米中的有效成分, 得到了红曲黄色素, 洛伐他汀粗品, 醇溶性红曲红色素, 水溶性红曲红色素 4 种组分。

现代研究表明, 红曲中除含有洛伐他汀和红曲色素外, 还有脂肪酸、甾醇、生物碱和黄酮等多种活性物质, 具有降血压、降血脂、降血糖以及抗肿瘤等药理作用^[7]。红曲的功效众多, 成分复杂, 但近年来, 对红曲的研究主要集中在红曲色素及其功效, 红曲菌株筛选以及发酵等方面的研究, 对其进行脂溶性活性物质的分离纯化研究报道较少, 因此对红曲进行活性物质的分离纯化研究就有一定的现实意义。本文以不同产地红曲及不同有机溶剂红曲提取物为材料, 对其进行抑菌, 抗氧化活性的测定, 并以此结果为依据, 选择抑菌活性较好的古田红曲为材料, 进一步对甲醇提取物进行活性物质的分离纯化, 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析、制备型反相中压色谱柱层析、正相硅胶柱层析等分离纯化方法, 结合薄层层析(TLC), 紫外吸收光谱(UV)、核磁共振波谱(NMR)以及质谱(MS)等技术, 对其进行分析追踪和结构鉴定, 最终分离出亚油酸和 α -亚麻酸两个活性化合物。亚油酸能抑制肠道病原菌, 具有防癌, 抗氧化作用, 其参与人体心血管疾病的控制, 增强机体免疫能力^[8]。 α -亚麻酸也在抗氧化, 调节血脂, 降低血糖血压, 预防心血管疾病, 抑制癌症的发生和转移方面具有很好的生理活性^[9], 此 2 种物质为红曲相关食疗和药用的研究提供了理论基础和一定的借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

古田红曲米, 福建古田平湖镇玉源村; 梅州红曲米, 广东梅州市客家红曲生物制品有限公司; 丽水红曲米, 浙江丽水力克生物科技有限公司; 上饶红曲米, 江西省诺博生物科技有限公司; 酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、黑曲霉和塔宾曲霉, 菌株由集美大学食品与生物工程学院提供; 牛津杯 ($\Phi 8$ mm), 东台市吉泰制品厂; 甲醇、丙酮、乙酸乙酯、分析纯, 西陇化工股份有限公司; 乙醇、石油醚、分析纯, 国药集团有限公司; DPPH、标准品, Sigma 公司; 技术琼脂粉、酵母浸膏, 广东环凯微生物科技有限公司;

胰蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限公司; 氘代氯仿、色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-3 型循环水多用型真空泵, 郑州杜甫仪器厂; DBS-100 型全自动部分收集器, 上海青浦沪西仪器厂; ZF 型紫外分析仪, 上海康华生仪器制造厂; Lambda 265 型紫外可见分光光度计, 美国珀金埃尔默公司; AVANCE 400 MHz 型核磁共振仪, Bruker 公司; P0100 型制备型中压反相色谱仪, 北京慧德易科技有限公司; Varian 300 型液质联用仪, 瓦里安公司; Sephadex LH-20 型葡聚糖凝胶, GE Healthcare 公司。

1.3 方法

1.3.1 测定样品的制备

将购买的古田、梅州、丽水, 上饶 4 个地区的红曲米以粉碎机高速粉碎, 过 100 目筛, 然后各称取 50 g 置于 300 mL 锥形瓶, 以甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚 5 种有机溶剂进行萃取, 萃取条件: 料液比 1:3, 温度 30 °C, 超声时间 2 h, 超声功率 100 Hz, 萃取 3 次, 将提取液合并, 抽滤, 旋转蒸发器浓缩蒸干, 分别配制 2、5、10、20、40、80、160、320 mg/mL 母液备用。

另外称取 50 g 和 1000 g 古田地区红曲米以同样提取条件进行提取。50 g 的一份将提取物以 100%水-甲醇、75%水-甲醇、50%水-甲醇、25%水-甲醇、100%甲醇共 5 个梯度进行洗脱, 每个梯度洗 1 L, 将洗脱液浓缩蒸干, 配制 2 mg/mL 的样品液备用。1000 g 的一份则经过抽滤, 旋转蒸发浓缩成甲醇粗提物的浸膏。

1.3.2 牛津杯法测定抑菌活性

按照 Huang 等^[10]的方法稍作改动, 在无菌条件下, 将经过高压蒸汽灭菌的固体培养基(酿酒酵母, 黑曲霉和塔宾曲霉用 YPD 培养基, 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌用 LB 培养基)冷却至温度在 40 °C~45 °C 之间, 加入一定量的未经稀释菌悬液, 使菌浓度为 $(1.0\sim 5.0)\times 10^4$ CFU/mL, 摇匀后均匀倒入培养皿中, 待培养基冷却凝固后, 用经灭菌的镊子夹取经灭菌的牛津杯摆放于其中, 用移液枪吸取 200 μ L 各供试化合物加入牛津杯内, 同时做试剂空白和阳性对照。酿酒酵母阳性对照用两性霉素 B, 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌用氯霉素, 待溶剂扩散后, 取下牛津杯, 放入恒温培养箱中培养。测量抑菌圈直径, 并计算 3 次测量的平均值。

1.3.3 DPPH 法测定抗氧化能力

参照曾岚等^[11]的方法并做稍微的改动进行测定。将 2 mg/mL 不同有机溶剂萃取古田红曲米粗提物、不同地区红曲米粗提物以及不同梯度甲醇-水洗脱液 0.1 mL 分别加入 2 mL 6.25×10^{-5} mol/L DPPH 甲醇溶液中, 混匀暗处放置 30 min, 以甲醇溶液做空白对照, 测量其在 517 nm 处的吸光度 (A_i)。同时, 测定 2 mL DPPH 甲醇溶液与 0.1 mL 甲醇混合液在 517 nm 处的吸光度 (A_0); 测定 2 mL 甲醇溶液与 0.1 mL 样品液在 517 nm 处的吸光度 (A_j)。按照以下公式(1)计算自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - (A_i - A_j) / A_0) \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 化合物的分离纯化, 结构鉴定

1.3.4.1 化合物的分离纯化

将古田地区甲醇萃取物浸膏以少量硅胶粉(200~300目)拌样, 拌至呈肉松状松散。上预先处理好的制备型中压液相(反相 C18 硅胶柱)色谱, 水(H)和甲醇(M)用不同比例配成混合物, 分别是 100%H; 75%H-25%M; 50%H-50%M; 25%H-75%M; 100%M, 形成不同极性的洗脱溶剂对样品进行梯度洗脱, 洗脱液经过旋转蒸发仪浓缩, 以 TLC 进行分析, 用紫外分析仪、碘显色、5%硫酸-95%乙醇、碘化铋钾分别显色, 比较不同显色方法的情况差异, 合并相似的组分, 寻找目标点进行下一步的分离纯化。

将合并后的目标组分以 Sephadex LH-20 凝胶柱进行纯化, 经过中压液相和 LH-20 凝胶柱层析多次分离纯化, 得到相对比较纯的单一目标组分, 最后以正相硅胶柱层析进行除杂, 得到纯化后的化合物。

1.3.4.2 化合物的结构鉴定

(1) 核磁共振分析(NMR)

将纯化后得到的化合物 A 和 B 经过旋蒸浓缩后转移至核磁管中, 真空减压蒸发蒸干溶剂, 加入氘代氯仿, 以 TMS 作为内标, 通过 400 MHz 核磁共振仪测定化合物的核磁谱。测定的项目包括: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 。

(2) 电喷雾质谱分析(ESI-MS)

将纯化得到的化合物 A 和 B 蒸干, 取微量以 25% 氯仿-甲醇溶液溶解, 过 0.22 μm 有机滤膜后测定质谱。电离源为电喷雾电离源, 采用负离子及正离子相切换的模式测定。

1.3.5 数据统计分析

红曲粗提物抑菌、抗氧化实验部分所有测定数据均做 3 个平行, 测定结果以平均值 \pm 标准偏差表示。其中不同产地红曲米甲醇萃取物对细菌抑菌能力的比较及不同有机溶剂的古田红曲米萃取物抑菌能力的比较这两部分以 SPSS 17.0 软件分析并处理数据, 以

$p < 0.05$ 表示具有统计学差异; 其它部分实验数据均采用 Origin 9.1 软件进行处理。

2 结果与讨论

2.1 牛津杯法测定抑菌活性

2.1.1 不同产地红曲米甲醇萃取物对细菌抑菌能力的比较

将福建及其周边地区的红曲米各取一份, 对其进行甲醇提取做枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌实验, 以 SPSS 17.0 软件进行数据处理, 实验结果如表 1。

表 1 不同产地红曲米甲醇萃取物对细菌的抑菌作用

Table 1 Bacteriostatic effects of methanol extracts of red yeast rice on bacteria from different regions

不同产地红曲 提取物	抑菌圈直径/mm	
	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
古田红曲提取物	15.12 \pm 0.43 ^A	14.12 \pm 0.31 ^A
梅州红曲提取物	13.16 \pm 0.23 ^B	12.58 \pm 0.31 ^B
丽水红曲提取物	14.84 \pm 0.26 ^A	13.96 \pm 0.48 ^A
上饶红曲提取物	12.54 \pm 0.57 ^B	12.38 \pm 0.08 ^B
阳性对照	40.13 \pm 0.25	39.07 \pm 0.70
空白对照	-	-

注: 表中“-”表示抑菌圈直径 $\Phi \leq 8$ mm, 无明显抑菌作用。

从表 1 分析我们得出, 同一地区红曲提取物对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌效果有差异, 其中, 红曲提取物对枯草芽孢杆菌的抑菌效果要略高于大肠杆菌; 不同产地的红曲米甲醇提取物对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌效果也不相同, 古田和丽水红曲提取物之间对这两种菌株的抑菌效果差异不显著 ($p > 0.05$), 但是它们对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌抑菌效果要好于梅州和上饶红曲米提取物, 且古田红曲米相对于其它 3 个地区, 其对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌作用更好。赵树新等^[12]人报道, 红曲具有抑菌作用主要是具有多种抑菌活性物质, 包括红曲色素、Monascidin A、安卡内酯、几丁质酶、桔霉素和糖肽类物质等。本研究得出的红曲提取物具有抑菌作用, 可能是由于红曲提取物中的红曲色素及其它活性物质的存在导致的。

2.1.2 古田红曲米甲醇提取物对不同菌种的抑菌活性

配制系列梯度的古田红曲米甲醇提取物样品溶液, 对它做细菌和酿酒酵母的抑菌实验, 实验数据以 Origin 9.1 进行处理, 结果如下图 1 所示。

从图 1 可以看出, 随着红曲米提取物浓度的逐渐

增大,对某一菌种而言,其抑菌圈直径呈逐渐增大的趋势。同一浓度的红曲米提取物对不同菌种的抑菌效果也不相同,其中抑菌效果从大到小为枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>酿酒酵母菌。因为牛津杯直径为8 mm,因此我们认为,如果抑菌圈直径小于8 mm则无明显的抑菌效果。从图中可以看出,当甲醇提取物浓度为20 mg/mL时,红曲米提取物对酿酒酵母菌无明显作用。

此外,由实验结果我们可以推断出,不同菌种对同一浓度的样品敏感性不同,枯草芽孢杆菌敏感性远大于大肠杆菌,细菌的敏感性远远大于酿酒酵母菌。

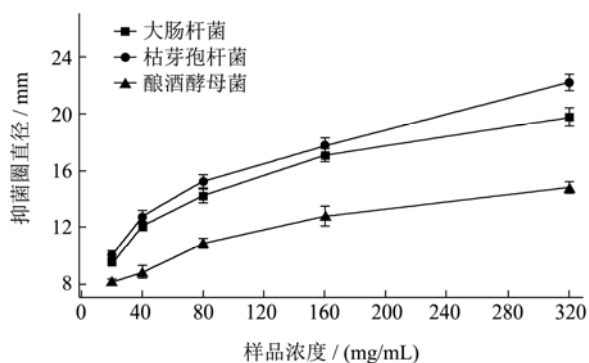


图1 不同浓度古田红曲米甲醇提取物对细菌和酿酒酵母的抑菌作用

Fig.1 Bacteriostatic effects of methanol extracts of different concentrations of Gutian red yeast rice on bacteria and *saccharomyces cerevisiae*

2.1.3 不同有机溶剂的古田红曲米萃取物抑菌能力的比较

选取80 mg/mL以不同有机溶剂萃取的古田红曲米提取物为实验材料,对其做大肠杆菌、枯草芽孢杆

菌、酿酒酵母,黑曲霉和塔宾曲霉的抑菌实验,以SPSS 17.0软件进行数据处理,实验结果如表2。

从表2可以得出,同一浓度乙酸乙酯和丙酮提取物对相同菌株的抑菌活性差异不显著($p>0.05$),且这两种提取物对各供试菌株均有很好的抑菌效果。甲醇和乙醇提取物之间的抑菌活性除了黑曲霉差异显著外($p<0.05$),其余的差异不显著($p>0.05$);石油醚提取物与其余提取物相比,同一菌株抑菌方面,均表现为差异显著($p<0.05$)。对同一溶剂提取物而言,除丙酮和乙酸乙酯提取物对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌效果差异不显著外,甲醇、乙醇和石油醚的提取物对这两种细菌均表现为差异显著;在对黑曲霉和塔宾曲霉的抑菌实验中,除乙醇提取物对这两种霉菌抑菌显著外,其余有机溶剂提取物抑菌效果均表现为不显著($p>0.05$);此外,同一有机溶剂提取物中,酿酒酵母菌和其它菌种的抑菌活性基本上表现为差异显著($p<0.05$)。

总的来说,不同有机溶剂萃取出的古田红曲米提取物对同一菌种的抑菌活性并不相同,对不同菌种的抑菌活性差异也很大。其中同一溶剂,同一浓度的提取物对不同菌种的抑菌活性从大到小基本分为:枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>黑曲霉>塔宾曲霉>酿酒酵母,大致可分布为:细菌>霉菌>酵母菌。此外,我们也可以发现,随着提取溶剂极性的较低,相应提取物抑菌活性大致呈现先升高再降低的趋势,其中丙酮和乙酸乙酯提取物抑菌活性相对较高,甲醇和乙醇次之,石油醚提取物抑菌活性最弱,其原因可能是由不同微生物细胞类型不同以及其对抑菌活性物质的敏感度差异造成的^[13]。

表2 古田红曲米不同有机溶剂提取物对不同菌种的抑菌作用

Table 2 Bacteriostatic effects of different organic solvent extracts of red yeast rice on different strains

有机溶剂提取物	抑菌圈直径/mm				
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	酿酒酵母	黑曲霉	塔宾曲霉
甲醇提取物	14.14±0.26 ^{Bbc}	15.22±0.73 ^{Ba}	10.82±0.42 ^{Ce}	13.52±0.31 ^{Ccd}	12.82±0.62 ^{Bd}
乙醇提取物	13.94±0.12 ^{Bb}	14.86±0.38 ^{Ba}	10.26±0.43 ^{Cd}	13.92±0.21 ^{BCb}	12.36±1.69 ^{Bc}
丙酮提取物	16.96±0.23 ^{Aa}	17.76±0.68 ^{Aa}	12.94±0.58 ^{Ac}	14.92±0.22 ^{Ab}	14.46±0.42 ^{Ab}
乙酸乙酯提取物	16.44±0.55 ^{Aa}	17.38±0.75 ^{Aa}	11.84±0.52 ^{Bc}	14.48±0.47 ^{ABb}	13.94±0.26 ^{Ab}
石油醚提取物	10.84±0.49 ^{Cb}	12.16±0.53 ^{Ca}	-	10.58±0.39 ^{Db}	10.54±0.19 ^{Cb}
阳性对照	39.05±0.53	40.19±0.58	13.73±0.19	12.34±0.07	12.16±0.12
阴性对照	-	-	-	-	-

注:1.同一列不同有机溶剂提取物中具有不同大写字母上标的为差异显著($p<0.05$),相同大写字母的则表示差异不显著($p>0.05$);同一行中,具有不同小写字母的表示差异显著($p<0.05$),具有相同小写字母的表示差异不显著($p>0.05$)。2.表中“-”表示抑菌圈直径 $\Phi\leq 8$ mm,无明显抑菌作用。

2.2 DPPH 法测定抗氧化能力

2.2.1 不同产地红曲米甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力

将甲醇提取古田红曲米粗提物与甲醇提取梅州、丽水、新余红曲米粗提物进行清除 DPPH 自由基能力的测定, 其结果如图 2。

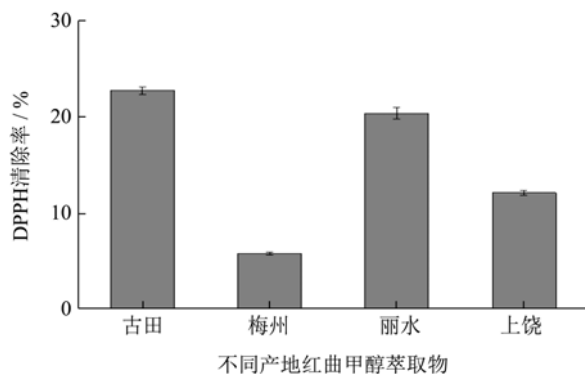


图 2 古田与其它地区红曲米提取物清除 DPPH 自由基的能力
Fig.2 Ability of the extracts of red yeast rice from Gutian and other regions to scavenge DPPH free radicals

由图 2 可知, 不同地区红曲米甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力有显著差异。其中古田红曲米甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力最强, 丽水红曲米次之, 但是和甲醇提取物抗氧化能力相近。古田和丽水红曲米抗氧化能力明显高于上饶和梅州红曲米, 出现这种情况的原因可能是与地域环境有关, 不同地域产生的红曲其抗氧化成分也不尽相同。林凤^[14]曾经研究过, 国内红曲主要起源于古田地区, 悠久的红曲菌种历史环境可能导致了它的独特菌种及相对高抗氧化性。

2.2.2 不同有机溶剂萃取古田红曲米提取物清除 DPPH 自由基的能力

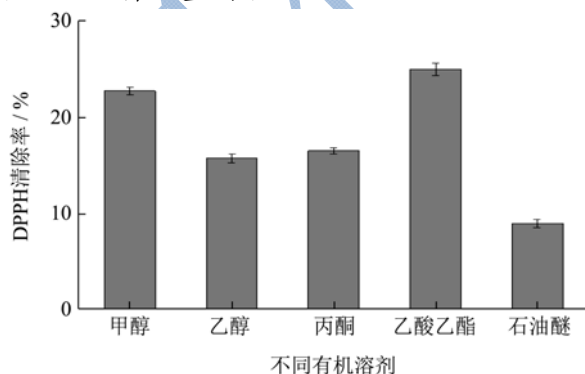


图 3 不同有机溶剂萃取古田红曲米提取物清除 DPPH 自由基的能力

Fig.3 Ability of different organic solvent extracts of Gutian red yeast rice to scavenge DPPH free radicals

将甲醇提取古田红曲米粗提物与乙醇、丙酮、乙

酸乙酯、石油醚提取古田红曲米粗提物进行清除 DPPH 自由基能力的测定, 其结果如图 3。

由图 3 可知, 不同有机溶剂萃取古田红曲米粗提物其清除 DPPH 自由基的能力存在差异, 按照由大到小的顺序排列为: 乙酸乙酯>甲醇>丙酮>乙醇>石油醚。甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力除了比乙酸乙酯提取物清除 DPPH 能力略低外, 都显著高于其它有机溶剂提取物。甲醇提取物比乙酸乙酯提取物清除 DPPH 自由基能力低的原因推测可能和它的极性有关, 由于甲醇极性较大, 萃取出一些非活性物质杂质, 导致其有效成分相对降低。

2.2.3 古田红曲米甲醇梯度洗脱液清除 DPPH 自由基的能力

将 2 mg/mL 古田红曲米甲醇萃取物不同梯度洗脱液进行清除 DPPH 自由基的测定, 结果如图 4。

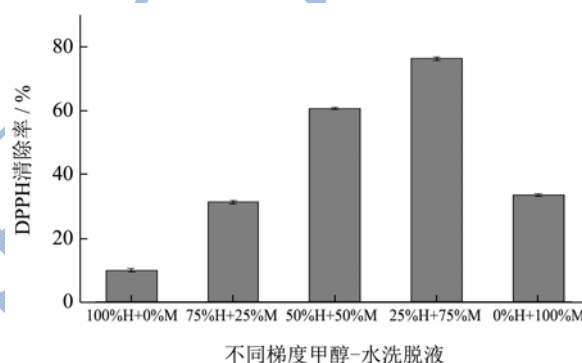


图 4 古田红曲米水-甲醇梯度洗脱液清除 DPPH 自由基的能力
Fig.4 Ability of gradient eluent by water and methanol from Gutian red yeast rice to scavenge DPPH free radicals

由图 4 可知, 不同梯度洗脱液其抗氧化活性也不一样。随着甲醇比例的加大, 其抗氧化能力在逐渐的升高, 在 75%M 时达到最大值, 然后随着甲醇比例继续增大, 其清除 DPPH 自由基的能力开始下降。不同梯度洗脱液清除 DPPH 自由基能力从大到小依次排列为: 75%M>50%M>100%M>25%M>0%M。说明与水相比, 相对极性小一点的甲醇洗脱液其清除 DPPH 自由基的能力较强。因此, 选择实验样品时, 最好挑选 50%M~100%M 洗脱液部分进行抗氧化实验研究。

2.3 结构鉴定

2.3.1 化合物 A 的结构鉴定

用氘代氯仿溶解化合物 A, 得出的 NMR 数据如表 3 所示。化合物 A 的氢谱中有 8 种质子信号, $\delta 10.24$ 为羧基的氢信号, $\delta 5.37$ 为双键的氢信号, $\delta 2.80(2H, m)$ 为处于两个双键之间的-CH₂-质子信号, $\delta 2.07(2H, m)$ 为-CH₂-CH=CH-中-CH₂-质子信号, $\delta 1.66(2H, m)$ 为饱和脂肪酸上的-CH₂-质子信号, $\delta 1.33(12H, m)$ 为

C-8~C-13 上的-CH₂-质子信号, δ0.91 为末端甲基氢信号。

化合物 A 的碳谱中有 17 个碳信号, 其中 δ130.24、δ130.04、δ128.08、δ127.91 可推测为共轭双键的碳信号, δ33.70 为-CH₂-COOH 中-CH₂-信号, δ14.08 为末端-CH₃ 碳信号, 其它信号可推测为甲基或者亚甲基的碳信号。用 25% 氯仿-甲醇溶解化合物 A 进行 ESI-MS 分析。ESI(-)-MS: $m/z=279.41[M-H]^-$, 则 $M=280.41$ 。

表 3 化合物 A 的 C、H 归属

Table 3 C, H assignment of compound A

Position	¹³ C	¹ H
1	-	10.24(1H,s)
2	130.24	5.42(1H,m)
3	130.04	5.40(1H,m)
4	128.08	5.39(1H,m)
5	127.91	5.37(1H,m)
6	29.06	1.35(2H,m)
7	33.70	2.38(2H,m)
8	31.94	1.28(2H,m)
9	29.71	1.33(2H,m)
10	29.59	1.46(2H,m)
11	29.36	1.65(2H,t)
12	29.15	1.66(2H,m)
13	29.08	1.68(2H,m)
14	27.22	2.08(2H,m)
15	27.19	2.07(2H,m)
16	25.64	2.80(2H,m)
17	22.58	1.66(2H,m)
18	14.08	0.91(3H,t)

经数据解析, 并与数据库比对, 鉴定化合物 A 为亚油酸, 分子式为 C₁₈H₃₂O₂, 结构如图 5 所示。亚油酸可以作为医药品的原料, 有研究表明, 亚油酸具有降低体内脂肪含量, 防止动脉硬化, 抑制癌症和肿瘤生成, 同时它也可以增强人体免疫力, 降低人体血液中胆固醇和血脂的作用^[15]。

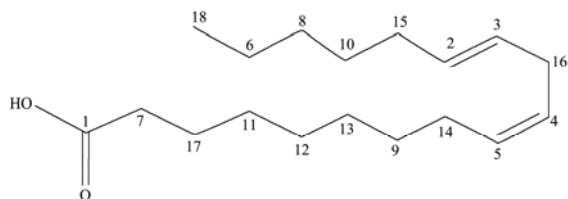


图 5 化合物 A 的结构图

Fig.5 The structure of compound A

2.3.2 化合物 B 的结构鉴定

用氘代氯仿溶解化合物 B, 得出的 NMR 数据如表 4 所示。化合物 B 的氢谱中有 8 种质子信号, δ9.79

为羧基的氢信号, δ5.37 为双键的氢信号, δ2.81(4H, t) 为处于两个双键之间的-CH₂-质子信号, δ2.07(4H, m) 为-CH₂-CH=CH-中-CH₂-质子信号, δ1.65(2H, s) 为 C-3 上的-CH₂-质子信号, δ1.33(8H, m) 为 C-4~C-7 上的-CH₂-质子信号, δ0.95 为末端甲基氢信号。化合物 B 的碳谱中有 18 个碳信号, 其中 δ130.23、δ130.09、δ130.03、δ128.08、δ127.98 和 δ127.91 为-CH=CH-上的碳信号, δ33.68 为-CH₂-COOH 中-CH₂-信号, δ27.21 为 C-3 上-CH₂-碳信号, δ29.36、δ29.08、δ29.06 和 δ29.03 为 C-4~C-7 的-CH₂-碳信号, δ27.19 和 δ22.58 为 C-8 和 C-17 的碳信号, δ14.06 为末端-CH₃ 碳信号。用 25% 氯仿-甲醇溶解化合物 B 进行 ESI-MS 分析。ESI(+)-MS: $m/z=301.09[M+Na]^+$, 则 $M=278.09$ 。

经数据解析, 并与文献^[16]比对, 鉴定化合物 B 为 α-亚麻酸, 分子式为 C₁₈H₃₀O₂, 结构如图 6 所示。

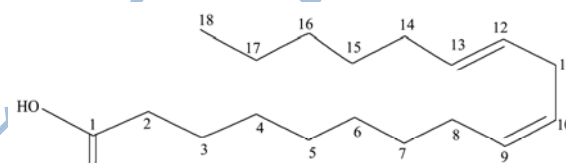


图 6 化合物 B 的结构图

Fig.6 The structure of compound B

表 4 化合物 B 的 C、H 归属

Table 4 C, H assignment of compound B

Position	¹³ C	¹ H
1	-	9.79(1H,s)
2	33.68	2.38(2H,t)
3	27.21	1.65(2H,s)
4	29.36	1.36(2H,m)
5	29.08	1.34(2H,m)
6	29.06	1.33(2H,m)
7	29.03	1.32(2H,m)
8	27.19	2.07(2H,m)
9	130.09	5.37(1H,m)
10	127.91	5.37(1H,m)
11	25.64	2.81(2H,t)
12	130.03	5.37(1H,m)
13	128.08	5.37(1H,m)
14	24.69	2.80(2H,t)
15	127.98	5.37(1H,m)
16	130.23	5.37(1H,m)
17	22.58	2.09(2H,m)
18	14.08	0.91(3H,t)

α-亚麻酸是人体必需的油脂, 具有降脂、降血压、改善心血管疾病等作用, 将其作为食品添加剂加入到

食品中可用来预防和治疗视力下降, 心血管疾病, 老年痴呆症和癌症等病症^[17]。 α -亚麻酸对损伤细胞具有保护作用, 对部分癌细胞具有抑制生长作用, 能调节胰岛素缺乏小鼠体内脂肪和血糖代谢^[18], 其众多功效有待进一步研究。

3 结论

3.1 本文通过比较古田红曲和其它地区红曲对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌作用研究, 得出古田红曲米相比其它地区红曲具有较高的抗菌活性这个结论, 并以此为依据, 选取古田红曲米对其不同有机溶剂萃取物进行了进一步的抑菌研究, 结果表明, 不同有机溶剂萃取物对同一菌种的抑菌活性差别很大, 同一溶剂萃取物对不同菌株的抑菌活性也不相同, 其中乙酸乙酯和丙酮提取物的抑菌活性与其它有机溶剂提取物相比总体上来说具有较好的效果。此外, 我们得出不同菌株对红曲提取物的敏感度由大到小依次为: 枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>黑曲霉>塔宾曲霉>酿酒酵母菌。同时, 在以甲醇-水为洗脱剂对古田红曲米不同极性洗脱液抗氧化活性实验中, 我们发现, 50%水-甲醇洗脱液至 100%甲醇洗脱液这一部分相对而言具有较高的抗氧化活性。最后, 对古田红曲米甲醇提取物进行了分离纯化及结构鉴定, 成功分离出亚油酸和 α -亚麻酸两种活性物质, 这两种活性物质都具有一定的抗氧化, 降血脂及抗肿瘤等生理活性作用, 这在一定程度上验证了红曲是具有功能性活性成分的药食两用的食材。

3.2 综上, 本实验所得结果为红曲相关抑菌、抗氧化产品的开发提供了一定的理论指导及借鉴作用, 同时红曲中的活性物质为进一步开发研究功能性红曲产品奠定了基础。

参考文献

- [1] 王亚威,武晓红,王鸿.红曲霉抑菌作用和抑菌成分的研究[J].中国调味品,2012,37(2):32-34,41
WANG Ya-wei, WU Xiao-hong, WANG Hong. Studies on the inhibitory effect and components of monascus [J]. China Condiment, 2012, 37(2): 32-34, 41
- [2] 王玲,吴军林,吴清平.红曲降血脂功能的研究及应用概况[J].食品工业科技,2014, 35(8):387-389,393
WANG Ling, WU Jun-lin, WU Qing-ping. Research and application progress of red yeast rice for lowering the blood Cholesterol Level [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(8): 387-389, 393
- [3] Lee C L, Lin P Y, Hsu Y W, et al. Monascus-fermented monascin and ankaflavin Improve the memory and learning ability in amyloid β -protein intracerebroventricular-infused rat via the suppression of alzheimer's disease risk factors [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 387-399
- [4] 温学伟,马新,周立平,等.红曲抗氧化的研究进展[J].食品工业科技,2011,32(2):376-378
WEN Xue-wei, MA Xin, ZHOU Li-ping, et al. Research advances of antioxidant action in monascus [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(2): 376-378
- [5] Liu S F, Wang Y R, Shen Y C, et al. A Randomized, double-blind clinical study of the effects of ankaflavin 568 plus on blood lipid regulation [J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2017
- [6] 李明起,陈运中,潘叶.柱层析分离纯化功能性红曲米中的有效成分[J].中国酿造,2011,30(5):41-45
LI Ming-qi, CHEN Yun-zhong, PAN Ye. Separation and purification of effective components in functional monascus pigment by column chromatography [J]. China Brewing, 2011,30(5): 41-45
- [7] 周香珍,林书发,何书华.红曲药理学评价研究进展[J].中国现代中药,2016,18(7):936-941
ZHOU Xiang-zhen, LIN Shu-fa, HE Shu-hua. Research progress in pharmacodynamics evaluation red yeast rice [J]. Modern Chinese Medicine, 2016, 18(7): 936-941
- [8] 赵敏.亚油酸及亚油酸甲酯的抗炎作用研究[D].成都:西南交通大学,2012
ZHAO Min. Research on anti-inflammatory action of linoleic acid and methyl linoleate [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2012
- [9] SanGiovanni J P, Chew EY. The role of omega-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina [J]. Progress in Retina and Eye Research, 2005, 24(1): 87-138
- [10] Huang T H, Chen C L, Hung C J, et al. Comparison of antibacterial activities of root-end filling materials by an agar diffusion assay and alamar blue assay [J]. Journal of Dental Sciences, 2012, 7(4): 336-341
- [11] 曾岚,陈荣华,蒋昀,等.发酵麦麸酚酸类物质的抗氧化活性的研究[J].食品科技,2015,12:128-131
ZENG Lan, CHEN Rong-hua, JIANG Yun, et al. Study on antioxidant activity of phenolic acids fermented in the wheat bran [J]. Food Science and Technology, 2015, 12: 128-131
- [12] 赵树欣,张建玲.红曲抑菌物质研究的现状与展望[J].中国酿造,2011,30(3):5-8
ZHAO Shu-xin, ZHANG Jian-ling. Antibiotic components in

- hongqu [J]. China Brewing, 2011, 30(3): 5-8
- [13] Oskay M, Sari D. Antimicrobial screening of some turkish medical plants [J]. Pharmaceutical Biology, 2007, 45(3): 176-181
- [14] 林风. 福建古田为红曲发源地考证[J]. 中草药, 2017, 48(13): 2793-2800
- LIN Feng. Textual research on gutian as place where red yeast rice originated [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(13): 2793-2800
- [15] Benjamin S, Spener F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits [J]. Nutrition & Metabolism, 2009, 6(1): 36
- [16] Falkenstein E, Groth B, Mithöfer A, et al. Methyljasmonate and α -linolenic Acid are Potent Inducers of Tendril Coiling [J]. Planta, 1991, 185(3): 316-322
- [17] 吴俏瑾, 杜冰, 蔡尤林, 等. α -亚麻酸的生理功能及开发研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10)
- WU Qiao-jin, DU Bing, CAI You-lin, et al. Research development of alpha-linolenic acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10)
- [18] Oliva M E, Ferreira M R, Chicco A, et al. Dietary Salvia (*Salvia Hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats [J]. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids, 2013, 89(5): 279