

红曲色素组份分离及其抗氧化活性研究

屈炯, 王斌, 吴佳佳, 徐驰, 朱胜梅, 陈福生

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用不同展开剂对红曲色素进行薄层层析, 得到7种红色素、4种黄色素、2种橙色素, 共13个色素组份。采用·OH体系、O₂^{·-}体系和 DPPH 体系三种抗氧化模型, 分别测定了不同色素组份的抗氧化活性。结果表明, 红色色素组份和橙色素组份在上述3种氧化模型中均表现出较高的抗氧化活性。其中, 红色色素组份2的抗氧化效果最好, 在40 μg/mL的质量浓度下, 对·OH的清除率为32%, 比同浓度的Vc高20%; 对DPPH的清除率达64%, 比同浓度的Vc高41%; 对O₂^{·-}的清除率达到34%。

关键词: 红曲色素; 薄层层析; 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)06-0527-05

Study on Separation of Monascus Pigments and their Antioxidative Properties

QU Jiong, WANG Bin, WU Jia-jia, XU Chi, ZHU Sheng-mei, CHEN Fu-sheng

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Seven kinds of red pigments, four kinds of yellow pigments and three kinds of orange pigments were separated from fermented rice by *Monascus* spp. via thin layer chromatography (TLC). And their antioxidant activities were also evaluated. All the 7 red pigments and 3 orange pigments showed high scavenging effects on ·OH, O₂^{·-} and DPPH, among which Red Pigment No.2 (RP2) had the highest antioxidative activity. The scavenging rates of RP2 (40 μg/mL) on ·OH and DPPH were 32% and 64%, respectively, which were 20% and 41% higher respectively than those of Vc with the same concentration. The scavenging rate of this pigment on O₂^{·-} reached 34%.

Key words: Monascus pigments; thin layer chromatography; antioxidative activity

红曲色素是由红曲菌 (*Monascus* spp.) 产生的一种天然食用色素^[1], 在我国和东南亚国家有上千年的应用历史, 表现出安全性高、稳定性好等特性^[2]。红曲色素是混合色素, 包括红、黄、橙等三类色素^[3]。大量研究表明, 红曲色素具有抑菌和防腐等功效^[4-5]。近年来, 对红曲色素的抗氧化性有报道。连喜军等^[6]用化学发光法研究了红曲色素主要成分对羟自由基的清除作用, 证明红曲色素中红色素组份具有较强的清除羟自由基能力。Chi等^[7]用不同的有机试剂提取红曲色素, 证明用正己烷提取的红曲色素具有很强的清除DPPH自由基的能力。但关于红曲色素不同组份的抗氧化活性比较还未见报道。

本文首先采用不同的展开剂, 分离得到了13种红曲色素组份, 然后分别采用·OH体系、O₂^{·-}体系和DPPH体系三种抗氧化模型, 对红曲色素的抗氧化活性进行了系统的研究。现将结果报道如下。

收稿日期: 2008-03-04

作者简介: 屈炯(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品微生物研究

通讯作者: 陈福生, 教授

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

红曲菌 959[#]、1164[#]、2606[#], 均为实验室保藏菌株, 分别高产红色色素、黄色色素和橙色素。

1.1.2 培养基

土豆培养基^[8]: 用于红曲菌活化。

米饭培养基^[9]: 用于红曲菌的固体发酵, 即红曲制备。

1.1.3 试剂与仪器

邻二氮菲、邻苯三酚等 国药集团化学试剂有限公司(上海); DPPH Alfa Aesar 公司; YOKO-1F 薄层层析涂敷器, 武汉药科新技术开发公司; 紫外-可见分光光度计 UV-1700, 岛津国际贸易有限公司; 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红曲米的制备^[9]

将活化的红曲菌 959[#]、1164[#]、2606[#]分别接种到

斜面试管中, 30 °C培养 7 d 后, 以无菌水 (10 mL) 洗孢子, 并将孢子液接入盛有米饭培养基的三角瓶中。30 °C培养 15 d, 当米饭培养基米粒变红无白心时, 取出, 40 °C烘干, 即为红曲米。

1.2.2 红色色素与黄色色素的薄层分离

将红曲米粉碎, 过 40 目筛, 按 1:10(g/mL)的固液比, 将红曲粉与 80%乙醇混匀后, 避光静置 3.5 h, 4800 r/min 离心 15 min, 取上清, 真空浓缩, 即为红曲总色素^[10]。将浓缩物点样于硅胶 G 薄板上, 红色色素以甲苯:乙酸乙酯:甲酸=7:3:1 (V/V) 展开^[11], 分别收集各红色色素条带, 以 80%乙醇提取, 即得红色色素各组份, 将全部红色色素条带, 以 80%乙醇提取, 即为总红色色素; 黄色色素以正己烷:乙酸乙酯:石油醚=30:17:5 (V/V) 展开, 分别收集各黄色条带, 以 80%乙醇提取, 即得黄色色素各组份, 收集全部黄色色素条带, 以 80%的乙醇提取, 即为总黄色色素。

1.2.3 橙色色素的薄层分离

红曲米粉碎, 过 40 目筛, 按 1:10(g/mL)的固液比, 将红曲粉与乙酸乙酯混匀后, 避光静置 3.5h, 4800 r/min 离心 15 min, 取上清, 真空浓缩, 点样于硅胶 G 薄板上, 以正己烷:乙酸乙酯:石油醚=30:17:5 (V/V) 展开, 收集橙色色素条带, 以乙酸乙酯提取, 得总橙色色素, 适当浓缩后, 点样于硅胶 G 薄板上, 以甲苯:乙酸乙酯:甲酸=7:3:2 (V/V) 展开, 收集各橙色条带, 以乙酸乙酯提取, 即为橙色色素各组份。

1.2.4 红色色素各组份清除·OH 效果的测定^[12]

溶液的配制: 磷酸缓冲液 (pH 7.40, 0.15 mol/L); 1×10^{-3} mol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液; 1×10^{-3} mol/L FeSO₄ 溶液; 0.15% (V/V) H₂O₂; 色素样品 6 mg/mL, 以 80%乙醇溶解; Vc: 6 mg/mL。

$$\text{清除率} (\%) = \frac{A_3 - A_1 - A_0}{A_2 - A_1} \times 100$$

表 1 红曲色素清除·OH 实验加样表

Table 1 Experimental design of scavenging effect evaluation of Monascus pigments on hydroxyl radical

组号	磷酸缓冲液/mL	邻二氮菲/mL	FeSO ₄ /mL	样品/mL	去离子水/mL	H ₂ O ₂ /mL
A ₁	1	0.5	0.5	0	0.5	0.5
A ₂	1	0.5	0.5	0	1	0
A ₃	1	0.5	0.5	0.02	0.48	0.5
A ₀	2.98	0	0	0.02	0	0

实验按表 1 加样, 混合均匀, 于 37 °C 水浴 60 min, 在 510 nm 测吸光值。以 Vc 做阳性对照, 按下面公式计算·OH 的清除率。

1.2.5 红曲色素各组份清除 O₂^{·-} 效果的测定^[13]

溶液的配制: Tris-HCl (pH8.20, 50 mmol/L) 缓冲液; 5 mmol/L 邻苯三酚溶液, 用 10 mmol/L HCl 溶液配制, 使用前 25 °C 预热; 6 mg/mL 样品, 用 80%乙醇溶解; Vc: 6 mg/mL。

按表 2 加样, 迅速混合均匀, 于 25 °C 下每隔 30 s 在 420 nm 处测定一次吸光值, 自氧化速率控制在 0.06/min。邻苯三酚自氧化 3 min 后, 迅速加一滴 Vc, 混合, 终止反应。室温下放置 5 min 后测定 A₄₂₀。清除率按如下公式计算。

$$\text{清除率} (\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1} \right) \times 100$$

表 2 红曲色素清除 O₂^{·-} 实验加样表

Table 2 Experimental design of scavenging effect evaluation of Monascus pigments on super oxide anion radical

组号	Tris-HCl 缓冲液/mL	邻苯三酚/mL	样品/mL
A ₁	3	0.04	0
A ₂	2.98	0.04	0.02
A ₀	3.02	0	0.02

1.2.6 红曲色素各组份清除 DPPH 效果的测定^[14]

溶液的配制: Tris-HCl (pH 7.40, 50 mmol/L) 缓冲液; 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液; 6 mg/mL 样品, 用 80%乙醇溶解; Vc: 6 mg/mL。

按表 3 加样, 混合均匀, 室温下放置 30 min, 在 517 nm 测吸光值。以 Vc 做阳性对照。按以下公式计算清除率。

$$\text{清除率} (\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1} \right) \times 100$$

表 3 红曲色素清除 DPPH 实验加样表

Table 3 Experimental design of scavenging effect evaluation of Monascus pigments on DPPH radical

组号	Tris-HCl 缓冲液/mL	DPPH/mL	样品/mL
A ₁	2	1	0
A ₂	1.98	1	0.02
A ₀	2.98	0	0.02

2 结果与分析

2.1 红曲色素组份的分离

红曲色素经过不同配比的展开剂展开, 分别得到 7 种红色色素组份, 4 种黄色色素组份, 2 种橙色色素组份, 薄层图谱及它们的 R_f 值见图 1。

将红色色素的全部条带刮下, 以 80%乙醇提取, 离心取上清浓缩后即得红曲总红色色素, 用 RP 表示。

各红色色素条带(共7条色素带)分别刮下后,提取,浓缩,即为红色色素的各个组份。按Rf值从大到小依次用RP1~RP7表示。以同样的方法,获得总黄色色素(用YP表示)和各黄色色素组份(共4个组份),按Rf值从大到小分别用YP1~YP4表示;总橙色素(用OP表示)和各橙色素组份(共2个组份),按Rf值从大到小分别以OP1和OP2表示。

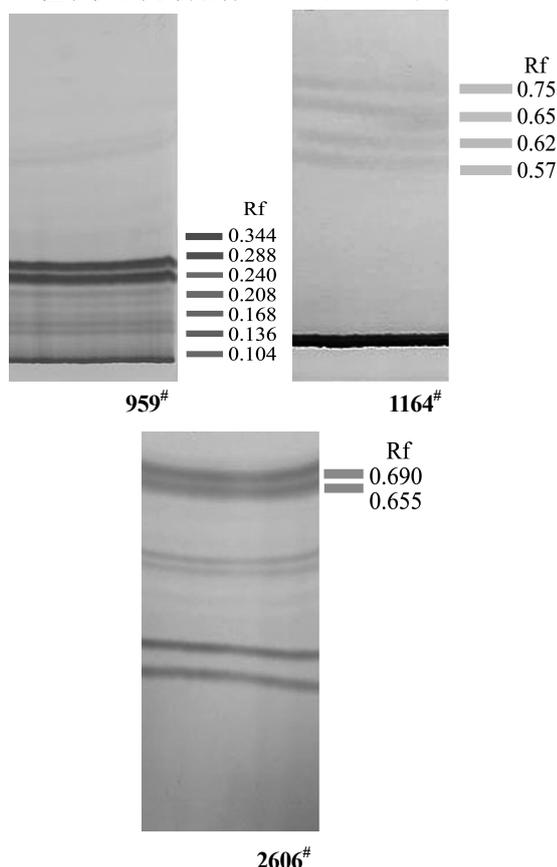


图1 红曲色素的薄层层析图

Fig.1 TLC chromatograms of Monascus pigments

注: 红色素展开剂配比: 甲苯:乙酸乙酯:甲酸 7:3:1 (V/V); 黄色素展开剂配比: 正己烷:乙酸乙酯:石油醚 30:17:5 (V/V); 橙色素展开剂配比: 正己烷:乙酸乙酯:石油醚 30:17:5 (V/V), 甲苯:乙酸乙酯:甲酸 7:3:2 (V/V)

Note: Mobile phases of red pigment: toluene,ethyl acetate, and formic acid (7:3:1 V/V); mobile phases of yellow pigment: hexane, ethyl acetate, and petroleum ether (30:17:5 V/V); mobile phases of orange pigment: hexane,ethyl acetate and petroleum ether (30:17:5 V/V), toluene, ethyl acetate,and formic acid(7:3:1 V/V).

2.2 红曲色素的抗氧化作用

在预备实验中发现,总黄色色素及其各组份的抗氧化活性均很差,所以在以下的实验中,仅测定了总黄色色素的抗氧化活性。对于红色色素,虽然分离得到了7个组份(图1),但是仅RP1和RP2的含量高,

且分离效果好,所以在以下实验中,只选取这两个组份作为抗氧化活性的研究材料。

2.2.1 红曲色素对·OH的清除作用

邻二氮菲-Fe²⁺是一种常用的氧化还原指示剂,其颜色变化可以敏锐地反映溶液氧化还原状态的改变。H₂O₂/Fe²⁺体系通过Fenton反应产生·OH,邻二氮菲-Fe²⁺溶液可以被·OH氧化为邻二氮菲-Fe³⁺,从而使邻二氮菲-Fe²⁺在510 nm处的最大吸收峰消失^[15]。

依据上述原理,测定了红曲色素各组份对·OH的清除作用,结果见图2。

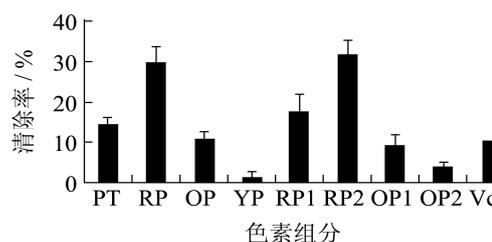


图2 红曲色素各组分(40 μg/mL)对·OH的清除作用

Fig.2 Scavenging effect of Monascus pigments (40μg/mL) on hydroxyl radical

注: PT为总色素,RP为红色素,OP为橙色素,YP为黄色素,RP1为红色组份1,RP2为红色组份2,OP1为橙色素组份1,OP2为橙色素组份2。下同。

*Legend: PT: total Pigment; RP: Red Pigment; OP: Orange Pigment; YP: Yellow Pigment; RP1: Red Pigment 1; RP2: Red Pigment 2; OP1: Orange Pigment 1; OP2: Orange Pigment2.(The same as in the following Fig)

由图2可以看出,在相同的浓度下(40 μg/mL),红曲色素各组份的抗氧化活性存在很大差异,从总的色素组份看,红色素的抗氧化活性最强,·OH的清除率达到29.64%,黄色素的最弱,仅为1.03%;从色素的各组分看,红色素组份的抗氧化活性较强,其中第二组份最强,达到31.17%,而橙色素组份的较弱,其中第二组份最弱,仅为3.85%。从图2还可以看出,相同浓度下,Vc的·OH的清除率为10.18%,比红曲总色素、总红色素、总橙色素、红色组份1、红色组份2等对·OH的清除率低。这些结果表明,从总体上讲,红曲色素清除·OH的能力较强,具有较强的抗氧化能力。

2.2.2 红曲色素对O₂^{·-}的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化产生O₂^{·-},同时产生有色中间物质,加入抑制剂后可以抑制邻苯三酚的自氧化,同时抑制有色中间物质的产生,这样,通过比色可以得出红曲色素各组份对O₂^{·-}的清除效率^[12],见图3。

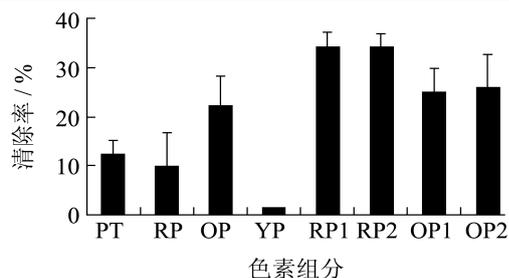


图3 红曲色素各组分(40 µg/mL)对O₂·⁻的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of Monascus pigments (40 µg/mL) on Super oxide anion radical

由图3可看出,在相同的浓度下(40 µg/mL),红曲色素各组分对O₂·⁻的清除能力存在一定差异,从总的色素组分看,橙色素的抗氧化活性最强,对O₂·⁻的清除率达到22.22%,黄色色素的最弱,仅为1.2%;从色素的各组分看,红色色素组分1和红色色素组分2的抗氧化活性都比较强,分别达到34.25%和33.89%;而橙色色素组分的较弱,橙色色素组分1和橙色色素组分2分别为24.86%和25.83%。这些结果表明,从总体上讲,红曲色素具有较强的清除O₂·⁻的能力。

2.2.3 红曲色素主要组分对DPPH的清除作用

二苯代苦味肼基自由基(DPPH)是一种稳定存在的自由基,其乙醇溶液呈深紫色,并在517 nm处有强的吸收。红曲色素等自由基清除剂可直接作用于DPPH,使其乙醇溶液还原为浅黄色,从而使517 nm处的吸光值消失或减弱^[16],这样通过比色可以得出各色素组分对DPPH的清除效率,见图4。

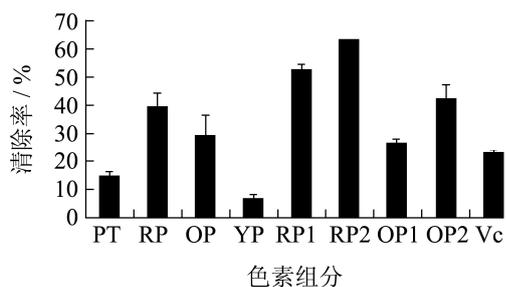


图4 红曲色素各组分(40 µg/mL)对DPPH的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of Monascus pigments (40 µg/mL) on DPPH radical

由图4可看出,在相同的浓度下(40 µg/mL),红曲色素各组分对DPPH的清除能力存在一定差异。从总的色素组分看,红曲红色色素的抗氧化活性最强,对DPPH的清除率达到39.44%,黄色色素的最弱,仅为6.34%;从色素的各组分看,红色色素组分1和红色色素组分2的抗氧化活性都比较强,分别达52.63%和63.53%;而橙色色素组分的较弱,橙色色素组分1仅为26.69%。从

图4还可看出,相同浓度下,Vc对DPPH的清除率为22.68%,比红曲总红色素、总橙色素、红色组分1、红色组分2、橙色组分1、橙色组分2等对DPPH的清除率低。这些结果表明,红曲色素具有较强的清除DPPH单电子的能力。

2.2.4 红曲色素在不同测定体系中抗氧化活性的比较

由图2~4可以看出,尽管红曲色素的抗氧化能力在不同的测定体系中存在一定的差异,它们的抗氧化能力见表4。但是,它们的基本趋势是一致的,就红曲总的色素成分看,总色素提取物、总红色色素组分和总橙色色素组分的抗氧化能力较强,而中黄色色素的抗氧化能力较差;从各色素组分看,红色色素组分2和红色色素组分1的的抗氧化能力较强,橙色色素组分2也表现出较好的抗氧化能力;红曲色素各组分在不同的抗氧化体系中也表现出不同的抗氧化能力,其中红曲色素各组分对DPPH单电子的清除作用比较强,其次是对O₂·⁻的清除作用,对·OH的清除作用比较弱。

表4 红曲色素各组分对·OH、O₂·⁻、DPPH清除率比较表/%

Table 4 Comparison of scavenging effects of Monascus pigments on ·OH, O₂·⁻ and DPPH

色素组分	不同测定体系		
	·OH 测定体系	O ₂ · ⁻ 测定体系	DPPH 测定体系
PT	14.29	12.22	14.32
RP	29.64	9.86	39.44
OP	10.66	22.22	29.46
YP	1.03	1.2	6.34
RP1	17.5	34.25	52.63
RP2	31.17	33.89	63.53
OP1	8.5	24.86	26.69
OP2	3.85	25.83	42.11
Vc	10.18	-*	22.68

注: *Vc是清除O₂·⁻体系中的终止剂,因此没有做阳性对照。

3 小结

本文分别采用·OH体系、O₂·⁻体系和DPPH体系三种抗氧化模型,验证了红曲色素的抗氧化活性,证明红曲红色色素和橙色色素都有很强的清除自由基能力,尤其是红色组分2(RP2)。在40 µg/mL的浓度下,对·OH的清除率达到32%,比同浓度的Vc约高20%;对DPPH的清除率达到64%,比同浓度的Vc约高41%。红色组分1(RP1)在清除DPPH, O₂·⁻也表现出很高的清除自由基活性。橙色素(OP)在各个抗氧

化体系中也表现出一定的清除自由基能力。红曲红色色素和橙色色素对·OH、O₂^{·-}、DPPH 都有一定的清除作用,并且对 DPPH 的清除作用远远大于·OH、O₂^{·-}橙色的清除作用。

红曲色素是一种历史悠久,色泽自然的天然食用色素。红曲色素不仅可做为食品着色添加剂,而且还具有一定的保健作用,这为对其进一步研究、开发和应用提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] Chiu S W and Poon Y K. Submerged production of *Monascus* pigments[J]. *Mycologia*,1993,85: 214-218
- [2] 杨萌,吴振强,梁世中.功能红曲的研究现状及前景预测[J].现代食品科技,2007,23(3):95-98
- [3] 郭东川,吴诚华,李钟庆.红曲色素的两种新结构[J].真菌学报,1991,12(1):65-70
- [4] 童群义,高孔荣,周正宏.红曲色素抑菌作用的研究[J].食品工业科技,1997,(5):5-6
- [5] 宫慧梅,赵树欣.红曲中橙色色素的研究[J].食品研究与开发,2002,23(3):24-26
- [6] 连喜军,刘金福,罗庆丰,等.化学发光法分析红曲色素中各成分的抗氧化性[J].化学与生物工程,2005,(4):43-44
- [7] Chi D P, Hyuck J J, Hang W L, et al. Antioxidant Activity of *Monascus* Pigment of *Monascus purpureus* P-57 Mutant[J].

The Korean Journal of Microbiology,2005,41(2): 135-139

- [8] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002,251
- [9] 胡晓清,袁梦仙,陈福生,等.双向薄层层析测定红曲中 Monacolink[J].中国酿造,2004,(2): 30-33
- [10] Johns M and Stuart D M. Production of pigment by *Monascus Purpureus* solid culture[J]. *Industrial Microbiol.* 1991, 23-28
- [11] 张慧娟,沈良俊,许赣荣,等.红曲橙色色素的提取及其稳定性研究[J].食品与发酵工业,2005,31(12): 129-133
- [12] 李瑜,许时婴.蒜粉体外抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2006,27(1):25-28
- [13] 李春美,谢笔钧.茶多酚及其氧化产物清除不同体系产生的活性氧自由基的分光光度法研究[J].精细化工,2000,17(4): 241-244
- [14] Dhale M A, Divakar S, Kumar S U, et al. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties[J]. *Applied microbial and cell physiology*,2007,73: 1197-120
- [15] 吕英华,苏平,那宇,等.桑椹色素体外抗氧化能力研究[J].浙江大学学报,2007,33(1): 102-107
- [16] 文镜,贺素华,杨育颖,等.保健食品清除自由基作用的体外测定方法和原理[J].食品科学,2004,25(11):190-195

(上接第 523 页)

一般预处理为:用乙醇浸泡 24 h 以上,排出孔中空气,再将浸泡 24 h 后的大孔树脂装柱,用 95%或无水乙醇冲洗至流出液清亮无浑浊,蒸干无残留物。然后用 3%的 NaOH 溶液洗脱约 3 BV,关闭阀门浸泡 30 min,再用超纯水冲洗至中性。同样,用 3%柠檬酸溶液洗脱约 3 BV,并关闭阀门浸泡 30 min,用超纯水冲洗至中性。关闭,待用。

4.3 NKA-9 树脂除了吸附目标物之外,还会吸附杂质,而这些杂质会污染树脂。在使用几次后,树脂要回收。将要回收树脂用 80%乙醇洗脱多次,过滤,除去杂质,再用 80%乙醇浸泡,干燥,回收。

参考文献

- [1] 靳光乾,李岩.金银花栽培与贮藏加工新技术[M].中国农业出版社,2005
- [2] 刘斌.影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素

[J].中草药,2002,33(5):475-476

- [3] Li H, Liu Y J, Zhang Z H, et al. Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase[J]. *Journal of Chromatography A*,2005, 1098 (1-2):66-74
- [4] Xiang Z N, Zhan Y, Ning Z X. Purification of chlorogenic acid in Flos Lonicerae with system of polar ordered resins[J]. 2006, 14(3):357-362
- [5] 谢碧秀,孙智达.金银花中主要有机酸的研究进展[J].现代食品科技,2007,23(9):93-97
- [6] 李进飞,黄可龙,李春华.NKA - 9型树脂对绿原酸吸附分离性能的研究[J].华西药学杂志,2004,19(1):1-4
- [7] 丁利君.AB-8 树脂对半边旗提取液中黄酮的吸附作用[J].食品科学,2007,28(10):241-245
- [8] 刘恩荔,李青山.大孔吸附树脂分离纯化金银花中总有机酸的研究[J].中草药,2006,3(12):1792-1797