



## 研究报告

## 红色红曲霉 Mr-1 的次级代谢产物生物活性成分分析

陈琪<sup>Δ1</sup> 刘书渊<sup>Δ1</sup> 杨晓曦<sup>2</sup> 万俊<sup>1</sup> 徐媛媛<sup>1</sup> 姚玥<sup>1</sup> 郑好轶<sup>2</sup> 葛立军<sup>\*1</sup>

1 浙江中医药大学生命科学院 浙江 杭州 310053

2 佛山市真红生物制品有限公司 广东 佛山 528200

**摘要:**【背景】红曲霉(*Monascus*)是一种重要的药食同源性真菌,其自身产生的次级代谢产物具有多种生理活性功能,然而红曲霉中的生物活性成分却鲜有报道。利用红曲霉发酵液进行药效物质成分追溯,对了解红曲霉药效物质基础具有十分重要的意义。【目的】对红色红曲霉(*M. ruber*) Mr-1 次级代谢产物中的生物活性成分和生物学功能进行研究。【方法】采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱等色谱技术对活性成分进行分离纯化,通过核磁共振和高分辨质谱技术对化合物结构进行解析;对鉴定的化合物进行体外抗氧化、抑菌和酶活性测定。【结果】从红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物中分离得到 4 个活性化合物,鉴定为 3 个黄酮类化合物 Luteolin (1)、Hesperetin (2)、Glycitein (3)和 1 个萜类化合物 Ursolic acid (4)。化合物 1、2、4 为首次从红曲菌科中分离得到。在抗氧化试验中,化合物 1 对 ABTS<sup>+</sup>、DPPH 和 OH<sup>-</sup> 自由基具有较强的清除能力, IC<sub>50</sub> 分别为 13.36、8.74 和 32.75 μg/mL; 在抑菌试验中,化合物 4 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)表现出中等强度的抑菌能力,抑菌圈直径分别为 13.4 mm 和 11.9 mm; 在 α-葡萄糖苷酶抑制活性试验中,化合物 4 表现出很强的抑制能力, IC<sub>50</sub> 为 21.34 μg/mL。【结论】红色红曲霉 Mr-1 是宝贵的微生物种质资源,其产生的次级代谢产物生物活性成分多样,具有开发成功能性食品原料的潜能。

关键词: 红曲霉, 抗氧化, 抑菌, α-葡萄糖苷酶

Bioactive components of secondary metabolites from *Monascus ruber* Mr-1CHEN Qi<sup>Δ1</sup> LIU Shuyuan<sup>Δ1</sup> YANG Xiaotun<sup>2</sup> WAN Jun<sup>1</sup> XU Yuanyuan<sup>1</sup> YAO Yue<sup>1</sup>  
JEONG Hojin<sup>2</sup> GE Lijun<sup>\*1</sup>

1 College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China

2 Foshan Zhen Hong Biological Products Company Limited, Foshan, Guangdong 528200, China

**Abstract:** [Background] *Monascus* is an important food and drug homologous fungus, whose secondary

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81673639); College Students New Talent Innovation Project of Zhejiang Province (2019R410041)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: gelijun@zcmu.edu.cn

Received: 08-09-2020; Accepted: 19-10-2020; Published online: 11-12-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81673639); 浙江省大学生新苗人才创新项目(2019R410041)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: gelijun@zcmu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-08; 接受日期: 2020-10-19; 网络首发日期: 2020-12-11

metabolites have many physiological functions. However, the bioactive components in *Monascus* are rarely reported. It is of great significance to trace the active substances in *Monascus* fermentation broth for understanding the material basis of *Monascus* efficacy. **[Objective]** To study the bioactive components and biological functions of secondary metabolites of *Monascus ruber* Mr-1. **[Methods]** The active components were separated and purified by silica gel column and Sephadex LH-20. The structures of the compounds were analyzed by NMR and HR-ESI-MS. The antioxidant, antibacterial and enzyme activities of the identified compounds were determined *in vitro*. **[Results]** Four active compounds were isolated from the secondary metabolites of *Monascus ruber* Mr-1, which were identified as three flavonoids, luteolin (**1**), hesperetin (**2**), glycoitin (**3**), and one terpenoid, ursolic acid (**4**). Compounds **1**, **2** and **4** were isolated from *Monascus* for the first time. In the antioxidant test, compound **1** had strong scavenging ability to ABTS<sup>+</sup>, DPPH and OH<sup>-</sup>, with IC<sub>50</sub> of 13.36, 8.74 and 32.75 μg/mL, respectively; in the antibacterial test, compound **4** showed moderate antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, and the diameter of inhibition zone was 13.4 and 11.9 mm, respectively; in the α-glucosidase inhibitory activity test, compound **4** showed a strong inhibitory activity, with IC<sub>50</sub> of 21.34 μg/mL. **[Conclusion]** *Monascus ruber* Mr-1 is a valuable microbial germplasm resource. Its metabolites contain diverse bioactive components and it has the potential to be developed into functional food materials.

**Keywords:** *Monascus*, antioxidant, antibacterial, α-glucosidase

红曲霉(*Monascus*)是一类小型的丝状真菌,在中国、日本、泰国、菲律宾和印度尼西亚等东南亚国家被广泛应用,已有超千年的历史<sup>[1]</sup>。在中国的闽浙等地区,人们将红曲霉接种于蒸煮的大米上,利用固态发酵生产红曲米。根据 Ainsworth 真菌分类系统,红曲霉属于真菌界(*Eumycete*)真菌门(*Eumycophyta*)子囊菌亚门(*Ascomycotina*)不整囊菌纲(*Plectomycetes*)散囊菌目(*Eurotiales*)红曲菌科(*Monascaceae*)红曲霉属(*Monascus*)<sup>[2]</sup>。目前已被广泛接受的红曲霉属有 9 种,包括红色红曲霉(*M. ruber*)、紫色红曲霉(*M. purpureus*)、烟色红曲霉(*M. fuliginosus*)、安卡红曲霉(*M. anka*)、从毛红曲霉(*M. pilosus*)等<sup>[3]</sup>。现代研究发现红曲霉中富含多种酶类、红曲多糖、洛伐他汀(Lovastatin)、γ-氨基丁酸、二聚酸和红曲色素(Monascus Pigments, MPs)等<sup>[4-7]</sup>成分,具有抗氧化<sup>[8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>、抑菌<sup>[10]</sup>、抗肿瘤<sup>[11]</sup>、降血糖<sup>[12]</sup>等功能。

我们对已发表的研究报道进行总结分析,发现红曲霉目前的研究主要集中在高产 Lovastatin 和 MPs 的菌株筛选、发酵工艺条件的优化和提取物生物活性的测定等方面,而对于红曲霉次级代谢产物中化学成分的报道却很少。为了进一步阐明红曲

霉中的药效物质基础,本研究以自主筛选的红色红曲霉(*Monascus ruber*) Mr-1 为研究对象,对其发酵液中的次级代谢产物进行分离和纯化,并对鉴定的化合物进行体外抗氧化、抑菌和抑制降血糖相关的α-葡萄糖苷酶活性研究,以期获得更多以红曲霉为来源的特殊活性成分,为将来对红曲霉资源大规模的开发与应用提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 发酵菌株和供试病原菌

发酵菌株是由本实验室自主筛选保藏的红色红曲霉(*M. ruber*) Mr-1 菌株。供试病原菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)和李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115),均购买于广东省微生物菌种保藏中心,现保藏于浙江中医药大学发酵工程实验室。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 20 min, 备用。

PDA 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 土豆 200.0, 琼脂糖 20.0。1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 20 min, 备用。

PD 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 土豆 200.0。

$1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min, 备用。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、阿卡波糖(Acarbose)和 4-硝基苯基- $\alpha$ -D 吡喃葡萄糖苷(pNPG), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶, 上海源叶生物科技有限公司。恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 液-质联用仪, Waters 公司; 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; 紫外分光光度计, 岛津公司。

## 1.2 红色红曲霉 Mr-1 的发酵培养

将冷冻保藏的红色红曲霉 Mr-1 菌株取出至室温解冻, 将解冻后的菌株用 PDA 培养基平板接种进行活化培养, 28 °C 培养 7 d。将活化好的红色红曲霉 Mr-1 菌株接种于装有 50 mL PD 液体培养液的 250 mL 三角锥形瓶中, 28 °C、160 r/min 培养 3 d 得到种子液。将种子液转接到装有 300 mL PD 液体培养液的 1 L 三角锥形瓶中, 28 °C、160 r/min 培养 7 d 即得红曲霉发酵液。

### 1.3 红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物的提取

将红曲霉发酵液 90 L 用 2-3 层纱布过滤获得滤液, 用乙酸乙酯进行萃取。将滤液与乙酸乙酯以 1:2 的体积比混合, 用搅拌机搅拌 30 min 后静置, 取萃取的上清液。反复萃取 3 次, 合并所得萃取液进行减压浓缩, 获得乙酸乙酯粗浸膏约 38 g。

### 1.4 红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物的分离纯化与鉴定

将乙酸乙酯粗浸膏用甲醇溶解后与硅胶(200-300 目)等比例混匀拌样, 以石油醚:乙酸乙酯(20:1-0:100, 体积比)、乙酸乙酯:甲醇(20:1-20:5, 体积比)梯度洗脱, 通过薄层层析进行组分分析, 共得到 7 个组分 Fr.1 (3.1 g)、Fr.2 (2.7 g)、Fr.3 (2.2 g)、Fr.4 (3.1 g)、Fr.5 (2.5 g)、Fr.6 (2.2 g)和 Fr.7 (3.2 g)。将 Fr.2 用硅胶(270 g, 300-400 目)柱层析分离, 石油醚:乙酸乙酯(10:1-0:1, 体积比)分离获得组分 Fr.2.1、Fr.2.2、Fr.2.3 和 Fr.2.4, Fr.2.3 用 Sephadex LH-20 凝胶柱以甲醇:氯仿(1:1, 体积比)进行洗脱

分离到化合物 2 (21.3 mg); 将 Fr.3 用硅胶(220 g, 300-400 目)柱层析分离, 石油醚:乙酸乙酯(10:1-0:1, 体积比)分离获得组分 Fr.3.1、Fr.3.2 和 Fr.3.3, 将 Fr.3.2 用制备型薄层板反复制备, 再用重结晶的方法提纯最终获得化合物 1 (28.2 mg); Fr.5 继续用硅胶(250 g, 300-400 目)柱层析分离, 石油醚:乙酸乙酯(10:1-0:1, 体积比), 获得组分 Fr.5.1、Fr.5.2、Fr.5.3、Fr.5.4 和 Fr.5.5, 将 Fr.5.3 组分继续用 Sephadex LH-20 凝胶柱以甲醇进行洗脱获得 Fr.5.3.1、Fr.5.3.2、Fr.5.3.3 和 Fr.5.3.4。Fr.5.3.4 继续用 Sephadex LH-20 凝胶柱以甲醇:氯仿(1:1, 体积比)进行洗脱分离到化合物 3 (37.8 mg); Fr.7 用制备型薄层板点样制备获得 Fr.7.1、Fr.7.2、Fr.7.3、Fr.7.4 和 Fr.7.5, 将 Fr.7.3 用 Sephadex LH-20 凝胶柱以乙醇进行洗脱获得 Fr.7.3.1、Fr.7.3.2、Fr.7.3.3 和 Fr.7.3.4, 将组分 Fr.7.3.2 继续用 Sephadex LH-20 凝胶柱以乙醇进行洗脱分离到化合物 4 (19.6 mg)。分离纯化流程见图 1。通过化合物的波谱数据( $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HR-ESI-MS 等谱图)分析, 参考相对应的文献对单体化合物的结构进行鉴定。

## 1.5 体外抗氧化活性试验

### 1.5.1 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的测定

ABTS<sup>+</sup>自由基的测定参照文献[13]的方法并稍做修改。用去离子水将 ABTS<sup>+</sup>粉末和过硫酸钾配制成浓度为 7.4 mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup>溶液和 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液。将 ABTS<sup>+</sup>溶液和过硫酸钾溶液按照 1:1 等体积混合, 在避光、常温的状态下放置 12 h 以上, 形成 ABTS<sup>+</sup>储备液。将 ABTS<sup>+</sup>储备液用磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)进行稀释制成 ABTS<sup>+</sup>工作液, 并使其在 734 nm 检测光处的吸光度值为  $0.70 \pm 0.02$ 。取 3 mL 的 ABTS<sup>+</sup>工作液与 0.1 mL 适当浓度(10-500  $\mu\text{g/mL}$ )的化合物溶液涡旋混匀, 室温避光反应 10 min, 用紫外分光光度计在 734 nm 处检测吸光度值, 每个浓度梯度的溶液做 3 次平行重复。用 Vc 作为阳性对照, ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力(%)按公式(1)计算, 结果以

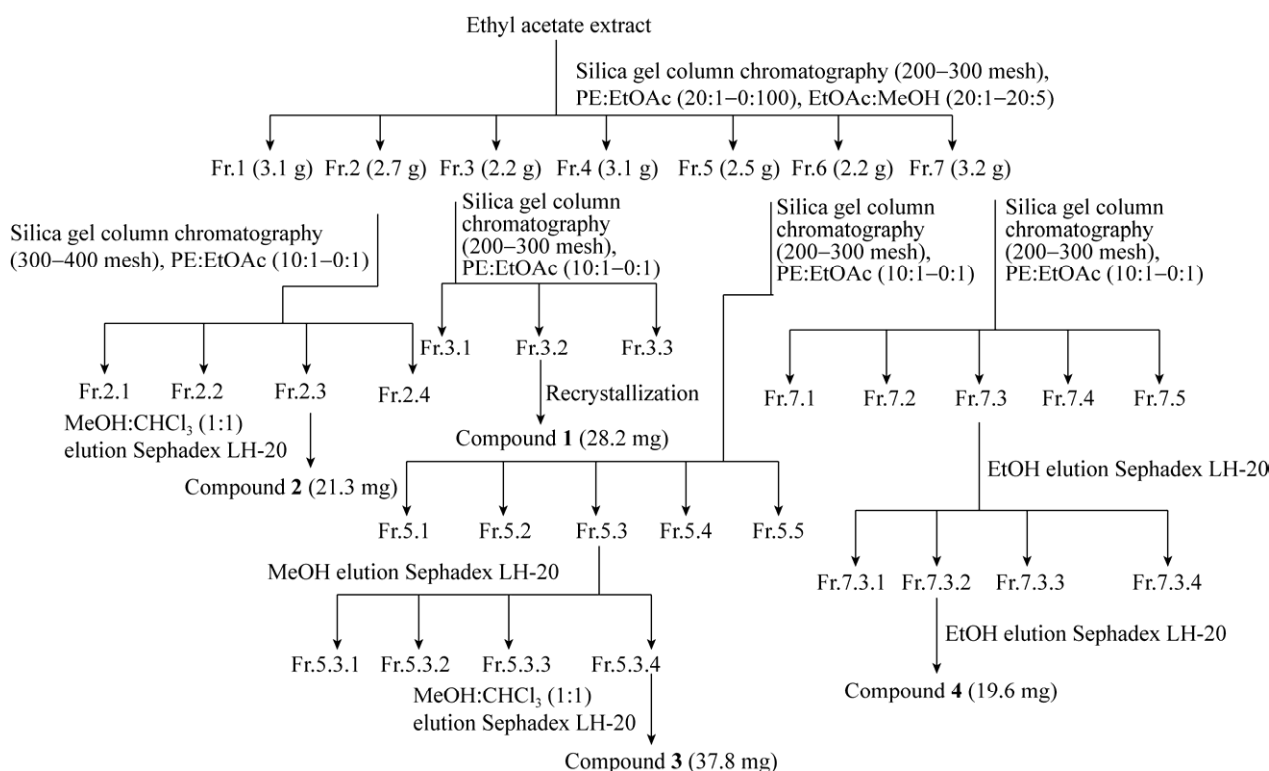


图1 乙酸乙酯提取物的分离纯化

Figure 1 Isolation and purification of ethyl acetate extract

$IC_{50}$  值来表示, 即抑制 50% 的  $ABTS^+$  自由基所需要的样品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

$$ABTS^+ \text{ 自由基清除能力}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为空白孔的吸光度值;  $A_1$  为测定孔的吸光度值。

### 1.5.2 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力测定参照文献[13]的方法稍做修改。取 2 mL 的 DPPH 乙醇溶液(0.1 mmol/L), 加入 2 mL 适当浓度(10–200  $\mu\text{g/mL}$ )的化合物溶液, 涡旋混匀, 在室温避光的条件下反应 30 min, 用紫外分光光度计在 517 nm 波长处检测吸光度值, 每个浓度梯度的溶液做 3 次平行重复。用 Vc 作为阳性对照, DPPH 自由基清除能力(%)按公式(2)计算, 结果以  $IC_{50}$  值来表示, 即抑制 50% 的 DPPH 自由基所需要的样品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

$$DPPH \text{ 自由基清除能力}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为空白孔的吸光度值;  $A_1$  为测定孔的吸光度值。

### 1.5.3 羟基( $\text{OH}^-$ )自由基清除能力的测定

羟基( $\text{OH}^-$ )自由基清除能力测定参照文献[14]的方法稍做修改。在反应体系中加入适当浓度(10–100  $\mu\text{g/mL}$ )的化合物溶液、6 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液和 6 mmol/L 水杨酸溶液各 2 mL, 最后加入 2 mL 的 6 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液, 涡旋混匀, 在 37  $^\circ\text{C}$  条件下反应 30 min, 用紫外分光光度计在 510 nm 波长处检测吸光度值, 每个浓度梯度的溶液做 3 次平行重复。用 Vc 作为阳性对照,  $\text{OH}^-$  自由基清除能力(%)按公式(3)计算, 结果以  $IC_{50}$  值来表示, 即抑制 50% 的  $\text{OH}^-$  自由基所需要的样品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

$$\text{OH}^- \text{ 自由基清除能力}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_0$  为空白孔的吸光度值;  $A_1$  为测定孔的吸光度值。

### 1.6 抗细菌活性测定

采用滤纸片法检测化合物的抗菌活性,将分离得到的单体化合物和阳性对照药物(氨苄青霉素)配制成浓度为 5 mg/mL 的溶液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用。将直径 5 mm 的无菌滤纸片平铺在无菌平板上,取 6  $\mu\text{L}$  溶液均匀洒在滤纸片上,将滤纸片贴在涂布有细菌悬浊液的平板上,在 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中倒置培养。

### 1.7 降血糖相关酶 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

$\alpha$ -葡萄糖苷酶的测定参考文献[15]的方法稍做修改。用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.8)将  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 4-硝基苯基- $\alpha$ -D 吡喃葡萄糖苷(pNPG)分别配制成 0.5 U/mL 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液和 0.2 mg/mL 的 pNPG 溶液。在反应体系中加入磷酸盐缓冲液、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液和适当浓度(50–200  $\mu\text{g/mL}$ )的单体化合物溶液各 1 mL,涡旋混匀,在 37  $^\circ\text{C}$  条件下孵育 30 min,再加入 1 mL 的 pNPG 溶液,充分混合,37  $^\circ\text{C}$  条件下反应 10 min,最后加入 1 mL 的碳酸钠溶液(1 mol/L)终止反应,

用紫外分光光度计在 405 nm 波长处检测吸光度值,每个浓度梯度的溶液做 3 次平行重复。以阿卡波糖为阳性对照,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力(%)按公式(4)计算,结果以  $IC_{50}$  值来表示,即抑制 50% 的酶活力所需要的样品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制能力}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $A_0$  为对照组的吸光度值;  $A_1$  为样品组吸光度值。

### 1.8 数据分析

实验结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)来表示。用 Excel 2010 进行数据处理,用 SPSS 18.0 计算  $IC_{50}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性代谢产物的结构鉴定

采用多种色谱分离方法,从红色红曲霉 Mr-1 乙酸乙酯的粗提物中分离纯化得到 4 个单体化合物。通过对波谱数据的分析与文献报道比对,将分离纯化得到的 4 个单体化合物确定为 Luteolin (1)、Hesperetin (2)、Glycitein (3)和 Ursolic acid (4) (图 2)。

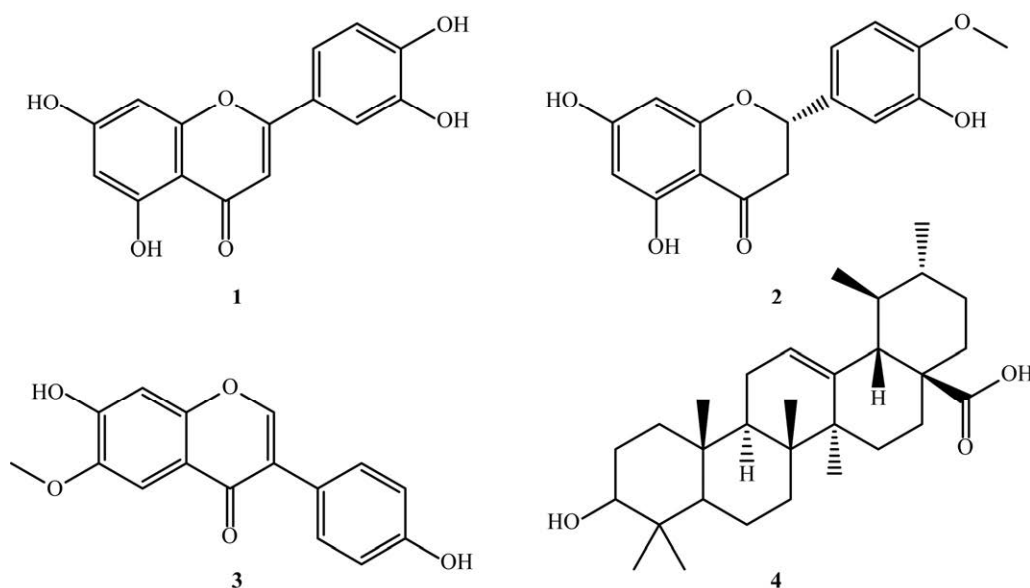


图 2 化合物 1–4 的结构图

Figure 2 Structures of compounds 1–4

化合物 **1** (28.2 mg): 黄色粉末, 溶于 DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知  $m/z$ :  $[M+H]^+$  287.055 5, 分子式为  $C_{15}H_{11}O_6$ , 计算值为 287.055 0, 因此推测该化合物分子式为  $C_{15}H_{10}O_5$ 。 $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.0 (s, 1H, 5-OH), 10.8 (s, 1H, 7-OH), 9.9 (s, 1H, 3'-OH), 9.4 (s, 1H, 4'-OH), 7.4 (m, 1H, H-2'), 7.4 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H, H-6'), 6.9 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H, H-5'), 6.7 (s, 1H, H-3), 6.4 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H, H-8), 6.2 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H, H-6)。 $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  182.1 (s, C-4), 164.6 (s, C-7), 164.3 (s, C-2), 161.9 (s, C-5), 157.7 (s, C-9), 150.1 (s, C-4'), 146.2 (s, C-3'), 122.0 (s, C-1'), 119.4 (s, C-6'), 116.5 (s, C-5'), 113.8 (s, C-2'), 104.2 (s, C-10), 103.3 (s, C-3), 99.3 (s, C-6), 94.3 (s, C-8)。该结构的图谱数据与文献[16]的报道相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 Luteolin。

化合物 **2** (21.3 mg): 黄色粉末, 溶于甲醇、DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知  $m/z$ :  $[M+H]^+$  303.086 9, 分子式为  $C_{16}H_{15}O_6$ , 计算值为 303.086 3, 因此推测该化合物分子式为  $C_{16}H_{14}O_6$ 。 $^1H$  NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  6.9–7.0 (m, 3H, H-2',5',6'), 5.9 (m, 2H, H-6, 8), 5.3 (dd,  $J=12.7, 2.9$  Hz, 1H, H-2), 4.9 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.0–3.1 (dd,  $J=17.1, 12.7$  Hz, 1H, H-3a), 2.7 (dd,  $J=17.1, 3.0$  Hz, 1H, H-3b);  $^{13}C$  NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  196.2 (C-4), 166.9 (C-7), 164.0 (C-5), 163.3 (C-9), 147.9 (C-4'), 146.4 (C-3'), 131.7 (C-1'), 117.6 (C-6'), 113.1 (C-2'), 111.2 (C-5'), 102.0 (C-10), 95.7 (C-6), 94.8 (C-8), 78.9 (C-2), 55.0 (6-OMe), 42.6 (C-3)。该结构的图谱数据与文献[17]的报道相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 Hesperetin。

化合物 **3** (37.8 mg): 白色粉末, 溶于 DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知  $m/z$ :  $[M+H]^+$  285.075 9, 分子式为  $C_{16}H_{13}O_5$ , 计算值为 285.075 7, 因此推测该化合物分子式为  $C_{16}H_{12}O_5$ 。 $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.6 (s, OH-4'), 9.5 (s, OH-7),  $\delta$  8.3 (s,

1H, H-2), 7.4 (s, 1H, H-5), 7.4 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H, H-2',6'), 6.9 (s, 1H, H-8), 6.8 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H, H-3',5'), 3.9 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174.8 (C-4), 157.6 (C-4'), 153.3 (C-7), 152.9 (C-2), 152.2 (C-9), 147.4 (C-6), 130.5 (C-2'), 130.5 (C-6'), 123.4 (C-3), 123.3 (C-1'), 116.7 (C-10), 115.4 (C-3'), 115.4 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.3 (C-8), 56.3 (6-OMe)。该结构的图谱数据与文献[18]的报道相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 Glycitein。

化合物 **4** (19.6 mg): 白色粉末, 溶于 DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知  $m/z$ :  $[M+H]^+$  457.367 0, 分子式为  $C_{30}H_{49}O_3$ , 计算值为 457.367 6, 因此推测该化合物分子式为  $C_{30}H_{48}O_3$ 。 $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5.1 (t,  $J=3.4$  Hz, 1H, H-12), 4.3 (s, 1H, 3-OH), 3.0 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H, H-3), 2.1 (d,  $J=11.3$  Hz, 1H, H-18), 1.0 (s, 3H, 23-CH<sub>3</sub>), 0.9 (s, 3H, 29-CH<sub>3</sub>), 0.9 (s, 3H, 27-CH<sub>3</sub>), 0.9 (s, 3H, 26-CH<sub>3</sub>), 0.8 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, 30-CH<sub>3</sub>), 0.8 (s, 3H, 24-CH<sub>3</sub>), 0.7 (s, 3H, 25-CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  178.7 (C-28), 138.7 (C-13), 125.0 (C-12), 77.3 (C-3), 55.3 (C-5), 52.8 (C-18), 47.5 (C-17), 47.3 (C-9), 42.1 (C-8), 42.1 (C-14), 38.9 (C-4), 38.9 (C-19), 38.8 (C-20), 38.7 (C-1), 37.0 (C-22), 36.8 (C-10), 33.2 (C-7), 30.7 (C-21), 28.7 (C-23), 28.0 (C-15), 27.5 (C-2), 24.3 (C-16), 23.7 (C-27), 23.3 (C-11), 21.6 (C-30), 18.5 (C-6), 17.5 (C-26), 17.4 (C-29), 16.6 (C-25), 15.7 (C-24)。该结构的图谱数据与文献[19]的报道相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 Ursolic acid。

## 2.2 单体化合物的抗氧化活性

4 种单体化合物的抗氧化活性如表 1 所示。由表 1 中结果可知, 化合物 **1** 表现出较强的抗氧化能力, 对 ABTS<sup>+</sup>、DPPH 和 OH<sup>-</sup> 自由基均具有较强的清除能力,  $IC_{50}$  值分别为  $13.36 \pm 0.07$ 、 $8.74 \pm 0.21$  和  $32.75 \pm 0.18$   $\mu\text{g/mL}$ , 阳性对照 Vc 的  $IC_{50}$  值分别为  $2.85 \pm 0.03$ 、 $8.45 \pm 0.13$  和  $38.71 \pm 0.26$   $\mu\text{g/mL}$ 。通

表 1 红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物的清除自由基和抗氧化活性

Table 1 Effects of *Monascus ruber* Mr-1 secondary metabolites on free radical scavenging and antioxidant activities

体外抗氧化活性 <i>In vitro</i> antioxidant activity	ABTS <sup>+</sup> 清除能力 ABTS <sup>+</sup> scavenging activity ( <i>IC</i> <sub>50</sub> , μg/mL)	DPPH 清除能力 DPPH scavenging activity ( <i>IC</i> <sub>50</sub> , μg/mL)	OH <sup>-</sup> 清除能力 OH <sup>-</sup> scavenging activity ( <i>IC</i> <sub>50</sub> , μg/mL)
Compound 1	13.36±0.07	8.74±0.21	32.75±0.18
Compound 2	30.29±0.16	196.91±1.11	97.66±0.89
Compound 3	118.10±0.48	1 924.91±3.54	74.49±0.34
Compound 4	621.72±2.93	1 240.91±4.22	524.86±1.08
Vc	2.85±0.03	8.45±0.13	38.71±0.26

Note: Data derived from three independent experiments were statistically analyzed, and the results are presented as mean±SD (*n*=3)

过试验结果比对, 化合物 1 对 OH<sup>-</sup>自由基的清除能力略优于 Vc 的效果, 其余 3 种化合物对 3 种自由基均表现出不同程度的清除能力。

### 2.3 单体化合物的抑菌活性

4 种单体化合物的抗细菌活性如表 2 所示。

由表 2 中结果可知, 化合物 4 对 *S. aureus* 和 *L. monocytogenes* 的抑菌圈直径分别为 13.4±0.2 mm 和 11.9±0.3 mm, 表现出较强的抑菌性能; 阳性对照 Ampicillin 对 *S. aureus* 和 *L. monocytogenes* 的抑菌圈直径分别为 18.5±0.3 mm 和 18.7±0.2 mm, 其余 3 种化合物对 2 种致病性细菌表现出中等强度的抑制能力。

### 2.4 单体化合物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

4 种单体化合物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用如表 3 所示。由表 3 中结果可知, 化合物 4 对

表 2 红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物对 2 种致病细菌的生长抑制活性(30 μg/滤纸片)

Table 2 Inhibitory activity of *Monascus ruber* Mr-1 secondary metabolites against two pathogenic bacteria (30 μg/disc)

抑菌活性	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> (inhibition zone, mm)	李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i> (inhibition zone, mm)
Compound 1	8.6±0.1	10.5±0.2
Compound 2	11.5±0.3	10.5±0.2
Compound 3	9.3±0.3	10.7±0.2
Compound 4	13.4±0.2	11.9±0.3
Ampicillin	18.5±0.3	18.7±0.2

Note: Data derived from three independent experiments were statistically analyzed, and the results are presented as mean±SD (*n*=3)

表 3 红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用结果

Table 3 Effects of *Monascus ruber* Mr-1 secondary metabolites on α-glucosidase inhibition

体外酶抑制试验 <i>In vitro</i> enzyme inhibition assay	α-葡萄糖苷酶的抑制 α-glucosidase inhibition ( <i>IC</i> <sub>50</sub> , μg/mL)
Compound 1	290.53±1.94
Compound 2	1 194.31±7.35
Compound 3	925.88±5.08
Compound 4	21.34±0.37
Acarbose	28.65±0.39

Note: Data derived from three independent experiments were statistically analyzed, and the results are presented as mean±SD (*n*=3)

α-葡萄糖苷酶具有很强的抑制能力, *IC*<sub>50</sub> 值为 21.34±0.37 μg/mL, 阳性对照 Acarbose 的 *IC*<sub>50</sub> 值为 28.65±0.39 μg/mL。通过试验结果比对, 化合物 4 对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果较优于阳性对照 Acarbose, 其余 3 种化合物在一定程度上均表现出对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用。

## 3 讨论与结论

利用多种色谱分离方法从红色红曲霉 Mr-1 次级代谢产物中分离纯化得到 4 个活性化合物, 分别是 Luteolin (1)、Hesperetin (2)、Glycitein (3) 和 Ursolic acid (4), 化合物 1、2 和 4 为首次从红曲菌科中发现。化合物 1 主要存在于紫苏<sup>[20]</sup>等唇形科植物中, 化合物 2 主要存在于芸香科柑橘类<sup>[21]</sup>植物中, 化合物 3 主要存在于大豆<sup>[22]</sup>等豆科植物中, 以上 3 种化合物均为黄酮类化合物。黄酮类化合物

是指 2 个芳香环通过三碳链相互连接而成的一系列化合物, 有共同的 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 的骨架<sup>[23]</sup>, 根据其三碳链是否氧化成环、B 环的位置和取代模式, 划分出不同类型的黄酮类化合物<sup>[24]</sup>, 如黄酮、黄酮醇、黄烷酮、异黄酮等, 具有抗氧化、抑菌、抗肿瘤、抗炎症等功能<sup>[25]</sup>。化合物 4 为萜类化合物, 主要存在于女贞<sup>[26]</sup>等木犀科植物中。萜类化合物是以异戊二烯为基本组成单位的一类化合物的统称<sup>[27]</sup>, 具有驱虫、抗肿瘤、降血糖、抗炎症等功能<sup>[28-29]</sup>。

从抗氧化活性试验结果可知: 4 种化合物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除能力为 1>2>3>4, 对 DPPH 自由基的清除能力为 1>2>3>4, 对 OH<sup>-</sup> 自由基的清除能力为 1>3>2>4。Seyoum 等<sup>[30]</sup>研究了黄酮类化合物的抗氧化与结构间的构效关系。研究发现, 黄酮类化合物 A 环和 B 环的相邻位点有 2 个或 3 个羟基取代时比单羟基取代或间位羟基取代时抗氧化活性更强; Promden 等<sup>[31]</sup>对黄酮类化合物的研究发现 A 环上间羟基取代比单羟基取代的化合物抗氧化性更强。我们对 ABTS<sup>+</sup> 自由基和 DPPH 自由基的清除能力的测定结果与上述研究结果一致, 黄酮类化合物 B 环具有 C-3',4' 相邻羟基取代的结构比单羟基取代或间位羟基取代的结构表现出更强的抗氧化活性; 在清除 Fenton 反应产生的羟基自由基方面, 黄酮类化合物的抗氧化能力却表现出化合物 1>3>2, 这可能是由于反应体系差异导致抑制机理不同所致。在 Fenton 反应中应更加注意金属的螯合作用, 有研究认为有些化合物可能通过金属的螯合作用或改变铁的氧化还原反应来发挥保护作用<sup>[32]</sup>。化合物 4 属于乌苏烷型五环三萜类化合物, 其结构特点是 30 个碳的骨架上连接有 2 个羟基和 1 个烯键, 从体外抗氧化试验结果中可知其并未表现出较好的抗氧化活性。目前国内外相关文献中, 对于化合物 1 抗炎症、降血糖等<sup>[33]</sup>方面的作用报道较多, 而抗氧化活性方面鲜有报道。

从抑菌活性试验结果可知, 化合物 1-4 对 *L. monocytogenes* 和 *S. aureus* 均表现出中等强度的抑菌效果, 相较于阳性对照 Ampicillin, 它们的抗菌效果表现一般。由于受到分离化合物的含量限制, 抗菌谱只检测了 2 种革兰氏阳性菌, 这些化合物或许对其他类型的病原菌有较好的抑制作用, 后续有待进一步验证。

从降血糖相关酶抑制试验结果可知, 4 种化合物对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力为 4>1>3>2。Proenca 等<sup>[34]</sup>研究了黄酮类化合物对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力与结构间的构效关系, 黄酮类化合物 A 环或 B 环具有相邻的羟基时比单羟基或间位羟基取代时对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用更强; Sarian 等<sup>[35]</sup>研究发现黄酮类化合物 C 环上 C-2 和 C-3 位置为双键时可以增强对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用。我们对 α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定结果与上述研究结果一致, 黄酮类化合物 B 环上具有相邻羟基取代且 C 环上 C-2 和 C-3 位置为双键时表现出更强的 α-葡萄糖苷酶抑制作用。Wang 等<sup>[36]</sup>研究了化合物 4 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用, 发现化合物 4 主要是破坏了 α-葡萄糖苷酶构象而起到抑制 α-葡萄糖苷酶的活性, 其活性测定结果与本文测定结果一致, 化合物 4 对 α-葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用, 其抑制效果优于 Acarbose。

本研究从红色红曲霉 Mr-1 的次级代谢产物中分离出 4 个生物活性成分, 其中 3 个活性成分为首次从红曲菌科中发现, 丰富了红曲菌科中的生物活性成分种类, 增加了对其药效物质基础的认识, 并从构效关系上对生物活性成分的抗氧化活性和 α-葡萄糖苷酶抑制作用进行了简单分析, 为后续研究提供了参考性的依据。由于受到分离化合物含量的影响, 本实验未能进一步测试化合物抗其他致病性菌的活性, 但研究结果表明, 红色红曲霉 Mr-1 是宝贵的微生物种质资源, 是潜在的抗氧化剂、抑菌剂和降血糖抑制剂来源, 具有开发成功能性食品原料的潜能。



## REFERENCES

- [1] Patakova P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(2): 169-181
- [2] Shao YC, Xu L, Chen FS. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers[J]. Mycoscience, 2011, 52(4): 224-233
- [3] Shao YC, Lei M, Mao ZJ, Zhou YX, Chen FS. Insights into *Monascus* biology at the genetic level[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3911-3922
- [4] Lin CH, Lin TH, Pan TM. Alleviation of metabolic syndrome by monascin and ankaflavin: the perspective of *Monascus* functional foods[J]. Food & Function, 2017, 8(6): 2102-2109
- [5] Li L, Chen S, Chen FS, Gao MX. Review on biosynthetic pathway of secondary metabolites and the related genes in *Monascus* spp.[J]. Microbiology China, 2013, 40(2): 294-303 (in Chinese)  
李利, 陈莎, 陈福生, 高梦祥. 红曲菌次级代谢产物生物合成途径及相关基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(2): 294-303
- [6] Feng YL, Yu X, Chen FS. Pigments production of *Monascus* sp. improved by glycerol utilization and its mechanism: a review[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2277-2285 (in Chinese)  
冯艳丽, 余翔, 陈福生. 红曲菌利用甘油促进色素产生及其机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2277-2285
- [7] Yan L, Liu XH, Li YH. Research progress and application of metabolites from *Monascus*[J]. China Condiment, 2020, 45(7): 191-193 (in Chinese)  
颜丽, 刘秀河, 李钰涵. 红曲霉代谢产物的研究进展与应用[J]. 中国调味品, 2020, 45(7): 191-193
- [8] Dhale MA, Javagal M, Puttananjaiiah MKH. Protective and antioxidative effect of rubropunctatin against oxidative protein damage induced by metal catalyzed reaction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 409-416
- [9] Lee CL, Wen JY, Hsu YW, Pan TM. The blood lipid regulation of *Monascus*-produced monascin and ankaflavin via the suppression of low-density lipoprotein cholesterol assembly and stimulation of apolipoprotein A1 expression in the liver[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2018, 51(1): 27-37
- [10] Nozaki H, Date S, Kondo H, Kiyohara H, Takaoka D, Tada T, Nakayama M. Ankalactone, a new  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone from *Monascus anka*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(3): 899-900
- [11] Zheng YQ, Zhang Y, Chen DS, Chen HJ, Lin L, Zheng CZ, Guo YH. *Monascus* pigment rubropunctatin: a potential dual agent for cancer chemotherapy and phototherapy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(12): 2541-2548
- [12] Lin CP, Lin YL, Huang PH, Tsai HS, Chen YH. Inhibition of endothelial adhesion molecule expression by *Monascus purpureus*-fermented rice metabolites, monacolin K, ankaflavin, and monascin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(10): 1751-1758
- [13] Kotora P, Šeršeň F, Filo J, Loos D, Gregáň J, Gregáň F. The scavenging of DPPH, galvinoxyl and ABTS radicals by imine analogs of resveratrol[J]. Molecules, 2016, 21(1): E127
- [14] Nie JY, Li R, Wang Y, Tan J, Tang SH, Jiang ZT. Antioxidant activity evaluation of rosemary ethanol extract and their cellular antioxidant activity toward HeLa cells[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(7): e12851
- [15] Maher S, Choudhary MI, Saleem F, Rasheed S, Waheed I, Halim SA, Azeem M, Abdullah IB, Froeyen M, Mirza MU, et al. Isolation of antidiabetic withanolides from *Withania coagulans* dunal and their *in vitro* and *in silico* validation[J]. Biology, 2020, 9(8): 197
- [16] Park Y, Moon BH, Lee E, Lee Y, Yoon Y, Ahn JH, Lim Y.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of hydroxyflavone derivatives[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2007, 45(8): 674-679
- [17] Correia-Da-Silva M, Sousa E, Duarte B, Marques F, Carvalho F, Cunha-Ribeiro LM, Pinto MMM. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(1): 95-106
- [18] Soidinsalo O, Wähälä K. Synthesis of phytoestrogenic isoflavonoid disulfates[J]. Steroids, 2004, 69(10): 613-616
- [19] Seebacher W, Simic N, Weis R, Saf R, Kunert O. Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2003, 41(8): 636-638
- [20] Miguel LL. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin[J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2009, 9(1): 31-59
- [21] Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A, Lagana G, Daglia M, Meneghini S, Nabavi SM. Flavanones: citrus phytochemical with health-promoting properties[J]. Biofactors, 2017, 43(4): 495-506
- [22] Dixon RA, Sumner LW. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 878-885
- [23] Chen BB, Wang LL, Li L, Zhu RY, Liu HX, Liu CY, Ma RF, Jia QQ, Zhao DD, Niu JZ, et al. *Fructus Ligustri Lucidi* in osteoporosis: a review of its pharmacology, phytochemistry, pharmacokinetics and safety[J]. Molecules, 2017, 22(9): 1469
- [24] Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of

- action[J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3961
- [25] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview[J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 162750
- [26] Das S, Rosazza JPN. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids[J]. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(3): 499-508
- [27] Santos-Buelga C, Feliciano AS. Flavonoids: from structure to health issues[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 477
- [28] Ashley EA, Pyae Phy A, Woodrow CJ. Malaria[J]. *The Lancet*, 2018, 391(10130): 1608-1621
- [29] Sharma SH, Thulasingam S, Nagarajan S. Terpenoids as anti-colon cancer agents-a comprehensive review on its mechanistic perspectives[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 795: 169-178
- [30] Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(18): 2058-2070
- [31] Promden W, Monthakantirat O, Umehara K, Noguchi H, De-Eknamkul W. Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*[J]. *Molecules*, 2014, 19(2): 2226-2237
- [32] Ruiz-larrea B, Leal AM, Martín C, Martínez R, Lacort M. Effects of estrogens on the redox chemistry of iron: a possible mechanism of the antioxidant action of estrogens[J]. *Steroids*, 1995, 60(11): 780-783
- [33] Mlala S, Oyedeji AO, Gondwe M, Oyedeji OO. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents[J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2751
- [34] Proenca C, Freitas M, Ribeiro D, Oliveira EFT, Sousa JLC, Tome SM, Ramos MJ, Silva AMS, Fernandes PA, Fernandes E.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure-activity relationship study[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1): 1216-1228
- [35] Sarian MN, Ahmed QU, Mat So'ad SZ, Alhassan AM, Murugesu S, Perumal V, Syed Mohamad SNA, Khatib A, Latip J. Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: a structure-activity relationship based study[J]. *Biomed Research International*, 2017, 2017: 8386065
- [36] Wang J, Zhao J, Yan Y, Liu D, Wang CT, Wang H. Inhibition of glycosidase by ursolic acid: *in vitro*, *in vivo* and *in silico* study[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(3): 986-994