



胭脂虫及胭脂虫红色素的应用研究进展*

汤沈杨^{1**} 陈梦瑶¹ 肖花美^{1,2***} 李飞¹

(1. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058;

2. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西省作物生长发育调控重点实验室, 宜春 336000)

摘要 胭脂虫 *Dactylopius coccus* Costa 属同翅目 (Homoptera) 洋红蚧科 (Dactylopiidae) 洋红蚧属 (*Dactylopius*), 其饲养和应用历史悠久。从干燥的雌性胭脂虫体内可以提取出一种红色色素——胭脂虫红。胭脂虫红主要由胭脂红酸、胭脂酮酸、虫漆酸 D、DC (2-C- α -葡萄糖呋喃糖苷)、DC (2-C- β -葡萄糖呋喃糖苷) 以及 Spiroketalcarminic acid 等组成, 具有极高的稳定性和安全性, 应用范围极为广泛, 可用于医药、天然色素添加剂和化妆品等领域, 价格非常昂贵。鼓励边远地区的农民饲养胭脂虫曾是云南等省份的扶贫工作之一。胭脂虫红质量的高低受多方面因素影响, 如个体内在因素 (性别、生长发育阶段等)、环境因素 (温度、湿度、光照、害虫等)。目前, 可采用核磁共振光谱法 NMR、高效液相色谱结合二极管阵列和串联质谱与电喷雾电离 HPLC-DAD-ESI MS/MS、三维荧光光谱结合平行因子分析、多变量统计分析等技术检测和鉴定胭脂虫红。本文综述了胭脂虫及胭脂虫红色素的应用, 以期得到昆虫学业内更广泛的关注。

关键词 胭脂虫; 胭脂虫红色素; 胭脂红酸; 检测方法; 应用

Progress in research on the commercial use of cochineal insects and cochineal dye

TANG Shen-Yang^{1**} CHEN Meng-Yao¹ XIAO Hua-Mei^{1,2***} LI Fei¹

(1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. College of Life Sciences and Resource Environment, Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation, Jiangxi Province, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract The cochineal insect (Homoptera: Dactylopiidae) has a long history of artificial breeding and commercial use. A red pigment, cochineal, can be extracted from dried females. Cochineal is mainly comprised of carmine acid, kermesic acid, flavokermesic acid, DC, DC, and spiroketalcarminic acid, and has high stability and safety in a wide range of applications, including in medicines, as a natural pigment additive, cosmetics and other fields. Due to its high price, encouraging farmers to breed cochineal insects is a Poverty Alleviation project in remote parts of Yunnan Province. However, the quality of cochineal is affected by variables such as gender, and development stage, and environmental factors such as temperature, humidity, light and pests. Because of this variability, NMR, HPLC-DAD-ESI MS/MS, excitation-emission fluorescence data and three-way PARAFAC decomposition, multivariate statistical analysis and other techniques are used to detect and validate cochineal quality. This paper reviews the commercial application of cochineal and cochineal dye in order to attract additional research interest to these products.

Key words cochineal; cochineal dye; carminic acid; detection method; application

从干燥的雌性胭脂虫 *Dactylopius coccus* Costa 中可以提取出一种理化性质稳定、安全性极高的天然色素——胭脂虫红色素 (Stathopoulou *et al.*, 2013), 这种色素应用范围极广, 商业价

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31760514); 江西省自然科学基金青年基金 (20181BAB214012)

**第一作者 First author, E-mail: 3160100193@zju.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiaohuamei625@163.com

收稿日期 Received: 2019-05-31; 接受日期 Accepted: 2019-06-19

值极高,被广泛地应用于食品、化妆品、药品等多个领域 (Ohgiya *et al.*, 2009)。同时由于其衍生功能不断被发现,胭脂虫红市场逐渐开拓新兴领域,受到了消费者的青睐。由于胭脂虫红色素的高附加值,在我国云南等省份,曾鼓励边远地区农民大规模饲养胭脂虫。随着技术水平的提高,胭脂虫红的检测和鉴定方法不断被完善,但由于养殖、提纯等条件的限制,导致胭脂虫红的产量并不能满足其实际需求,在实际应用中存在大量问题。本文简要综述了胭脂虫的生物学特性、饲养及胭脂虫红色素的提取和应用等领域的进展。

1 胭脂虫生物学背景

1.1 胭脂虫的驯化和应用历史

D. coccus 历史悠久,属同翅目 (Hemiptera) 洋红蚧科 (Dactylopiidae) 洋红蚧属 (*Dactylopius*) (郑乐怡和归鸿, 1999)。早在 1000 年前便开始被驯化 (Chavez-Moreno *et al.*, 2009), 但驯化地点并不确定, 可能在秘鲁也可能在墨西哥 (Portillo, 2005; Van Dam *et al.*, 2015)。胭脂虫饲养和染料制备技术可以追溯至 15 世纪 (陈晓鸣和冯颖, 2009)。不同种类的胭脂虫具有不同的发展历程, 按生产价值可分为真正胭脂虫和野生胭脂虫, 真正胭脂虫指具有商业价值的胭脂虫, *D. coccus* 隶属于此类 (张忠和, 2003; Madariaga *et al.*, 2006)。

D. coccus 原产于南美洲和墨西哥的热带和亚热带地区, 其加工产品普遍被玛雅人、印加人和阿兹特克人作为着色剂使用 (Haile *et al.*, 2002)。在西班牙殖民时期, 干燥的 *D. coccus* 红粉被大量进口至欧洲, 由于此种胭脂虫比欧洲或亚洲其他任何昆虫都富含色素, 因此成为了主要的着色剂, 几乎完全占据了欧洲市场。进入 19 世纪后, *D. coccus* 便被引入至中美洲和南美洲的仙人掌寄主上进行饲养。现今, 秘鲁是 *D. coccus* 的主要生产地 (Donkin, 1977; Muller-Maatsch *et al.*, 2016; Kannangara *et al.*, 2017)。

1.2 胭脂虫的种类及生物学特性

胭脂虫种类较多, 但目前已鉴定和发现的胭

脂虫多属于洋红蚧科, 以 De Lotto 的分类为标准, 胭脂虫可分为以下 9 种, 分别为 *Dactylopius ceylonicus* (Green, 1896), *Dactylopius confusus* (Cockerell, 1893), *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1893), *Dactylopius tomentosus* (Lamarck, 1801), *D. coccus* (Costa, 1835), *Dactylopius austrinus* (De Lotto, 1974), *Dactylopius confertus* (De Lotto, 1974), *Dactylopius zimmermanni* (De Lotto, 1974), *Dactylopius salmianus* (De Lotto, 1974)。

D. coccus 在所有已知胭脂虫种类中体型最大, 同时含有较多的胭脂红酸 (Guerra, 1992), 具有较高的商业价值。其他野生胭蚧属昆虫也能产生胭脂红酸, 但其所产生的胭脂红酸含量和总体质量均不高, *D. coccus* 是目前应用最为广泛的胭脂虫 (Chavez-Moreno *et al.*, 2009)。

研究表明, 雄性成虫体内的胭脂红酸含量极低, 而在雌虫体内, 尤其是雌性成虫体内, 胭脂红酸的含量占干重的 14%-26% (Flores-Alatorre *et al.*, 2014)。不同体型和生命周期阶段的胭脂虫, 其所含胭脂红酸的浓度不同。使用毛细管电泳测量雌性胭脂虫中卵、1 龄若虫、2 龄若虫、受精成虫、产卵成虫和不育成虫的胭脂红酸浓度, 发现体型最小的雌性不育成虫中胭脂红酸的含量相对于其个体重量的比例, 较其他雌性成虫更高。单就含量而言, 产卵雌虫的胭脂红酸含量最高 (Flores-Alatorre *et al.*, 2014)。

胭脂虫以吸食仙人掌韧皮部内的汁液为食, 摄取糖分和部分氨基酸等营养物质 (Wang and Nobel, 1995), 因此, 胭脂虫 (尤其是野生胭脂虫) 被视为仙人掌的主要害虫 (Zegbe *et al.*, 2014)。仙人掌的汁液主要由水 (约占 88%-95%) 组成, 氮含量较低, 约为 0-0.5%, 为获取更多的养分, 胭脂虫体内均有相应的共生菌, 以弥补胭脂虫饮食中氮的缺乏, 并提供其生长所必需的氨基酸, 同时回收尿酸, 增加胭脂虫的寿命 (Stintzing and Carle, 2005)。Bustamante-Brito 等 (2019) 发现部分洋红蚧属品种含有两种 *Wolbachia* 菌株, 分别为 *Candidatus Dactylopiibacterium carminicum* 和 *Spiroplasma* 的 β 蛋白细菌, 可以分解植物中

的多糖,同时在胭脂虫体内的碳氮循环中通过菌株的代谢作用固定活性氮。

胭脂虫为性二态性昆虫 (Gullan and Kosztarab, 1997)。雌虫的生长发育需要经过四个阶段,包括卵、1 龄若虫、2 龄若虫、成虫 (Hernandez-Gonzalez and Cruz-Rodriguez, 2018)。在最佳的环境条件下,雌虫的发育周期持续约 3 个月。在此过程中,虫体由椭圆形逐渐变成球形或卵形,长约 4-6 mm,虫体表面逐渐产生白色蜡粉或蜡丝。雌成虫体表蜡质物具有抵御环境威胁的作用 (Rodriguez *et al.*, 2001)。雄虫则需经过六个发育阶段,包括卵、1 龄若虫、2 龄若虫、前蛹、蛹、成虫,其体色偏暗红,体型较雌成虫小,长约 3 mm (Guerra, 1992)。

1.3 胭脂虫的饲养和培育

D. coccus 的养殖历史悠久,最传统的养殖方式为野外培育 (赖为民等, 2010)。目前,世界上大多数 *D. coccus* 的饲养方法为人工养殖。其培育技术主要分为放虫、管理和采收三个环节,其中切片接种法 (Infested cladode) 和纸袋接种法 (Tulle bag) 是国外比较常见的 *D. coccus* 放养方法 (Barbera *et al.*, 1995)。仙人掌掌片上 *D. coccus* 的数量是获得高产的关键性因素,成功接种 *D. coccus* 的掌片经室内挂放即可进行虫体培育 (Moran and Hoffmann, 1987)。由于气候等环境条件的不适宜,导致我国无法采取同样的方式进行饲养,需要通过人为改变饲养条件以满足 *D. coccus* 的生长需求。在我国, *D. coccus* 一般养殖于大棚或房屋内,将仙人掌悬挂其中并接种 *D. coccus*, 待雌性 *D. coccus* 成熟后便可采收。目前,我国培育 *D. coccus* 的试验点主要分布于昆明、禄丰、六库、景东、兴义等地 (赖为民等, 2010)。

除传统方式的养殖, Magakian 等 (1977) 试图在培养其他昆虫物种的培养基中培养胭脂虫细胞。于悬浮液中获得初始的胭脂虫细胞培养物后放于基质 (玻璃) 中,但 7 d 内便发生死亡。在悬浮培养过程中,发现两个增殖活性峰,两峰之间出现细胞的倍性增长以及死亡。在第一周的培

养期内,色素颗粒便消失了。且使用不同培养基进行培养过程中并未发现细胞行为的明显差异。

2 胭脂虫红的特性、提取和安全性评估

胭脂虫红是一种从干燥的雌性 *D. coccus* 体中提取出的唯一被 FDA 允许可同时在食品、药品、化妆品中添加的天然色素 (Mendez *et al.*, 2004; Stathopoulou *et al.*, 2013), 具有强烈的色泽度和极高的色牢度,是世界上最珍贵的天然红色染料之一。这一稀有且昂贵的天然染料,16 世纪以前被广泛地应用于纺织品中 (Serrano *et al.*, 2011)。目前,胭脂虫红仍作为一种重要的红色染料应用于纺织品、食品、饮品、化妆品、准药品以及医药品等 (Takeo *et al.*, 2018)。

2.1 胭脂虫红的组分及理化特性

胭脂虫红中着色化合物相对含量的高低决定染料的质量。胭脂虫红中最主要的组成成分-胭脂红酸 (Carminic acid), 又称洋红酸,相对分子量为 492.39,是一种葡萄糖基化蒽醌 (图 1), 约占总着色化合物的 94%-98% (De Graaff *et al.*, 2004; Greenstein, 2006)。

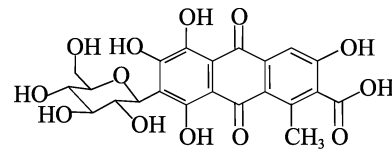


图 1 胭脂红酸结构图 (Ito *et al.*, 2017)

Fig. 1 Structure of carminic acid (Ito *et al.*, 2017)

胭脂红酸极易溶于水,在水中呈深红色,亦可溶解于其他溶液如甲醇、乙醇、丙酮、二甲亚砜等极性溶剂,并产生不同的颜色,但不溶于乙醚、氯仿、石油醚、甲苯、苯等非极性或弱极性溶剂 (李志国等, 2008)。胭脂红酸的 pH 适用范围为 2-9,在不同的 pH 值下呈现不同的颜色 (Kannangara *et al.*, 2017)。在酸性溶液中,其颜色随着 pH 的不同,呈现出从黄色 (pH=4.8) 到深紫色 (pH=6.2) 的不同色彩 (Greenstein, 2006)。酸性条件下,加入明矾沉淀可进一步纯化胭脂红

酸,并产生一种颜色更为鲜艳的红色铝盐,即胭脂虫红色淀,又称胭脂虫红铝(Carmine),被作为不溶性的红色染料使用(Flores-Alatorre *et al.*, 2014; Kannangara *et al.*, 2017)。

胭脂红酸具有极强的稳定性和抗氧化能力,如阳光直射 7 d 后仍能保存 50%以上;低温至高温范围内处理 8 h,保存率均达到 95%及以上(郭元亨, 2011)。但其稳定性具有一定限度,胭脂红酸与还原剂反应将致其稳定性下降,典型的结果是引起色淀反应,造成胭脂虫红色素的损失,如 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sn^{2+} 等的存在将影响胭脂红酸的含量(张弘等, 2008)。

胭脂红酸作为胭脂虫的防御化合物,对破坏单家蚁 *Monomorium destructor* 具有强大的取食

威慑作用(Eisner *et al.*, 1980)。但胭脂虫的天敌可防御胭脂红酸的威慑,如显盾瓢虫 *Hyperaspis trifurcata*、蚜虫蝇 *Leucopis* sp.、螟蛾 *Laetilia coccidivora*,可取食胭脂虫并消化胭脂红酸用于自身防御(Eisner *et al.*, 1994)。

胭脂虫红色素中次要成分约占 2%-6%,研究发现 DCIV(2-C- α -葡萄糖呋喃糖苷)和 DCVII(2-C- β -葡萄糖呋喃糖苷)是胭脂红酸的两种同分异构体,可在一定条件下转化为胭脂红酸(图 2)(Stathopoulou *et al.*, 2013; Flores-Alatorre *et al.*, 2014; Lech *et al.*, 2015)。但胭脂红酸非常稳定,仅有极少量的胭脂红酸转化为 DCIV 和 DCVII,绝大部分情况是由两个异构体转化成胭脂红酸(Zaima *et al.*, 2017)。

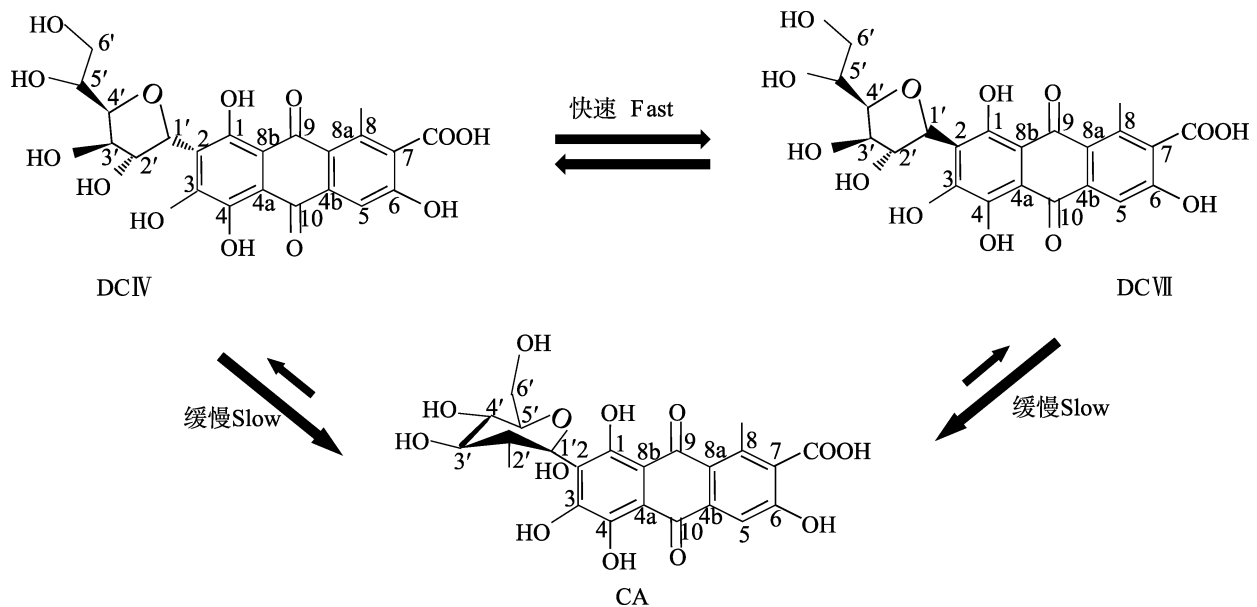


图 2 胭脂红酸, DCIV 和 DCVII 在水溶液中动态平衡示意图(Zaima *et al.*, 2017)

Fig. 2 Schematic illustration of the dynamic equilibrium between CA, DCIV and DCVII in aqueous solution (Zaima *et al.*, 2017)

胭脂虫红中胭脂酮酸(Kermesic acid)和虫漆酸 D(Flavokermesic acid)的含量也相对较高(Lech and Jarosz, 2016)。Kannangara 等(2017)发现结合在细胞膜上的 C-葡萄糖基转移酶可能参与了这两种酸与胭脂红酸之间的转化,从而促进胭脂红酸的生物合成。此外,在 *D. coccus* 中发现有 6-O- α -D-吡喃葡萄糖苷的虫漆酸 D,但这一成分尚未在波兰胭脂虫中发现(Lech *et al.*,

2015)。

Ito 等(2017)在 3 种商业化胭脂虫红提取液中通过超高效液相色谱-光电二极管阵列-电喷雾电离-飞行时间/质谱检测(UPLC-PDA-ESI-TOF/MS)发现一种新型色素——Spiroketalcarminic acid(1)(图 3)。其在提取液中的浓度与 DCIV、DCVII 相似,在强酸和热处理条件下仍可保持稳定。Spiroketalcarminic acid

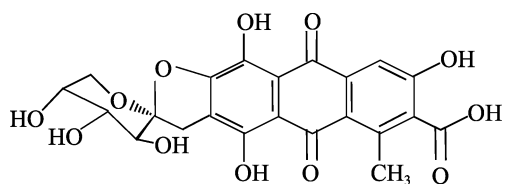


图 3 Spiroketalcarminic acid 结构图 (Ito *et al.*, 2017)

Fig. 3 Structure of spiroketalcarminic acid (Ito *et al.*, 2017)

尚未在风干的胭脂虫虫体和相应染料中被发现, 推测其是在色素制备过程中所产生的中间体。

2.2 影响胭脂虫红合成的因素

胭脂虫虫体中胭脂虫红含量、质量等的高低取决于多个因素, 如胭脂虫性别、虫体不同的生长发育阶段、寄主植物种类、气候类型、栽培技术 (如灌溉、施肥或膜状覆盖物), 以及胭脂虫的收获技术等。

Hosking (1984) 发现在 20-30 ℃ 之间, 虫体的发育速度与温度成正相关, 26-30 ℃ 最利于虫体的生长发育和繁殖 (Sullivan, 1990)。高湿度、长光照、低降水量等条件有利于胭脂虫的培育, 可缩短其世代历期, 提高虫体中胭脂虫红的含量 (Barbera *et al.*, 1992; Flores-Flores and Tekelenburg, 1995; 张中和, 2003)。胭脂虫寄生于仙人掌类植物, 寄主的生长状况对胭脂虫红的合成具有重要影响 (郑乐怡和归鸿, 1999)。生长期稍长、茎叶较嫩的仙人掌, 蛋白质和水分含量丰富, 更有利于胭脂虫的生长发育 (陈晓菲, 2004)。

2.3 胭脂虫红的提取

胭脂虫红的生产除需大型仙人掌种植园外, 还需人工从仙人掌上收获胭脂虫并进行干燥, 此外, 从胭脂虫中提取胭脂虫红是至关重要的过程 (Kannangara *et al.*, 2017)。胭脂虫红提取工艺已有几百年历史, 但世界各国仍在摸索其提取工艺 (余启洪和吴巧玲, 2008)。传统的提取方法为水提法和醇提法 (Gonzalez *et al.*, 2002; 孙锋等, 2005), 但传统提取方法生产的胭脂虫红易包含变应原的杂质蛋白且无法保证色料的应用浓度, 随时间推移易形成沉淀物。市隆人等

(2003) 对传统提取方法进行改进, 使生产的胭脂虫红不含变态反应源且不含分子量不少于 6 000 的蛋白质。也有研究人员对传统方法做进一步改善, 但尚未大规模应用, 如微波辅助法 (卢艳民等, 2009) 超声波辅助法 (卢艳民, 2009)。提取后需对初提的胭脂虫红色素进行精制, 目前所采用的方法主要是超滤膜精制和硅胶-凝胶层析法等 (卢艳民等, 2008)。

2.4 胭脂虫红安全性评估

随着胭脂虫红的广泛应用, 其安全性问题也成为科研人员研究的重点。目前, 市场上所使用的食品着色剂基本为胭脂红酸提取物或胭脂虫红铝 (Gabriel and Jack, 2000)。Grant 和 Gaunt (1987) 研究胭脂虫红对于大鼠 3 代繁殖的影响, 通过给雄性和雌性大鼠连续 3 代投喂不同浓度的胭脂虫红混合物, 并观察其体重、食物和水摄入量以及生育能力的变化。结果表明浓度低于 500 mg/kg 的胭脂虫红混合物未对成年大鼠的生长和生育能力产生影响。虽然所有实验组大鼠的骨化程度均较对照组稍高, 但对其后代的产前和产后发育未造成不良影响。

Grant 等 (1987) 通过大鼠研究胭脂虫红的致畸性和胚胎毒性, 通过口腔插管的方式, 对 30 只雌性大鼠, 在整个妊娠期每日给予不同剂量的胭脂虫红混合物, 结果表明实验组处理对于大鼠的体重、怀孕率、胚胎植入前的损失、平均幼年个体数、窝重及胎儿体重均未产生影响。同时实验组胎儿未表现出畸形形态, 且该组胎儿与对照组胎儿相比, 具有更高骨化程度的骨骼元素。

Ford 等 (1987) 则以大鼠为对象研究胭脂虫红的慢性毒性和致癌性, 发现不同实验组在持续投喂 109 周不同浓度的胭脂虫红饲料后, 其在血清和器官质量水平上均未出现与胭脂虫红饲喂相关的变化, 肿瘤发生率也未受影响。Mori 等 (1991) 通过对 B6C3F1 小鼠进行两年的生物测定以研究胭脂虫红的致癌性, 发现实验组和对照组所有小鼠均发生肿瘤, 包括肝细胞腺瘤、肺腺瘤、淋巴瘤、淋巴性白血病等, 由此证明胭脂虫红不具致癌性。Kawasaki 等 (1994) 也通过对

大鼠进行为期 13 周的不同浓度、组分的胭脂虫红混合物投喂试验,进行亚慢性毒性研究,发现实验组均未出现中毒症状或死亡现象,同时也未观察到由于施用胭脂虫红或硫酸铝钾而导致的组织病理学变化。除用 1.5% 或 3% 胭脂虫红混合物处理的雄性大鼠血清中谷氨酸脱氢酶 (GIDH) 水平有所提高,未发现同时施用胭脂虫红和硫酸铝钾的剂量依赖性协同效应。

虽然胭脂虫红在繁殖、毒性、致畸性、致癌性等方面具有极高的安全性,但高剂量处理对小鼠的神经行为有一定的影响。Tanaka (1995) 对 F₀ 代 5 周龄到 F₁ 代 9 周龄的小鼠分别投喂 0、0.5%、1.0%、2.0% 的胭脂虫红混合物,测定其神经行为参数,发现哺乳期间,雄性后代在出生后第 4 天其神经行为受到了显著影响,同时高剂量处理组的雌性 F₀ 代 8 周龄和 F₁ 代 3 周龄的一些行为参数出现了显著不同。

在一定剂量范围内胭脂红酸具有极高的安全性,这符合毒理学的基本原则,但凡毒性,皆与剂量相关。在红色蜜饯中胭脂红酸的最大允许残留量为 200 mg/kg (Rubio *et al.*, 2019); 在熟肉制品中最大使用量为 500 mg/kg; 膨化食品中最大使用量为 100 mg/kg (食品安全国家标准, 2014)。因此, FDA 允许胭脂红酸既可以在食品中使用,又可以在药品、化妆品中使用。总体而言,胭脂红酸是安全的 (Mendez *et al.*, 2004)。

2.5 胭脂虫红致敏性

胭脂红酸本身不具有诱变潜力,但在实际生产和应用过程中出现了一系列急性过敏案例 (Takeo *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2019)。由于胭脂虫红相关产品的使用,日本出现了一些过敏病例,过敏患者均为女性。调查过程中发现面部瘙痒、发红、肿胀等过敏症状的产生均与化妆品如口红、眼影等的使用有关 (Takeo *et al.*, 2018)。另有部分案例源于摄取胭脂虫红的食品、饮品等 (Beaudouin *et al.*, 1995)。

Quirce 等 (1994) 对天然染料制造工厂的十

名员工 (其中包括一名已在哮喘症状恶化过程中过世的员工) 进行调查,其中一名员工具有与工作相关的过敏性鼻炎和哮喘症状,另一名员工具有过敏性鼻炎症状;通过皮肤测试、RAST 和 ELISA 检测血清特异性 IgE、IgG 亚类抗体评价个体对胭脂虫红和胭脂虫红铝的免疫敏化程度,3 名具有呼吸道症状的员工对胭脂虫红铝和胭脂虫红的皮肤针刺试验均呈阳性;对患有哮喘的员工用胭脂虫红铝和胭脂虫红进行支气管刺激可立即引起反应,且只在该员工体内发现有胭脂虫红铝和胭脂虫红的 IgE 特异性抗体;RAST 抑制试验表明主要过敏原的分子量在 10-30 kd 之间,推测员工职业性哮喘由特异性 IgE 抗体介导。Takeo 等 (2018) 就日本所报道过的所有因胭脂虫红染料诱发的急性过敏案例 (共 22 例) 进行分析,并对新发现的 6 例用胭脂虫提取物进行皮肤点刺试验 (SPT) 和胭脂红特异性血清 IgE 测试,并利用患者血清进行 2D Western blot 以鉴定抗原。结果发现皮肤点刺试验中 5 例呈阳性,2D western blot 结果显示患者 IgE 对 38 kd 的蛋白起反应。

为鉴定出胭脂虫红中的主要致敏蛋白, Ohgiya 等 (2009) 利用 3 位过敏患者的血清来探索纯化后提取物中的免疫印迹。首先测定了与 IgE 相结合蛋白质的部分氨基酸序列,并克隆出含有完整编码区的相应 cDNA,最后利用重组蛋白在酵母中表达以寻找免疫印迹。结果表明其中一个氨基酸序列包含了从过敏患者血清中提取的所有与过敏现象有关的氨基酸序列。这一蛋白质具有 335 个氨基酸,分子量为 38 kd,与磷脂酶具有一定的同源性, Ohgiya 等 (2009) 将这一 38 kd 的蛋白质通过质谱鉴定后命名为 CC38K。目前, CC38K 蛋白质被认为是胭脂虫红染料中最主要的致敏原,胭脂红酸水合铝或钙螯合产物的胭脂虫红铝通常含有这一蛋白,胭脂虫红染料中的其他组分也可能含有这一蛋白 (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), 但这一蛋白是单独致敏还是只有与半抗原结合后才能成为过敏原还不得而知,还需进一步考证 (Takeo *et al.*, 2018)。

3 胭脂虫红的检测和鉴定

胭脂虫作为生产色素的原料,其商业价值与颜色质量息息相关,通常颜色质量被理解为颜料含量,即胭脂虫红中色素分子的含量越高,该染料的市场价值也越高 (Mendez *et al.*, 2004)。目前,已有多种检测和鉴定胭脂虫红的方法(表 1)。

3.1 核磁共振光谱法 (NMR)

核磁共振光谱 (NMR) 是目前最强大,最有效,非破坏性的检测技术之一,可以分析和测

量所有类别,无需制备太多样品和解离分析物,具有高重现性和简单性等特点,且可回收样品用于进一步分析 (Beckonert *et al.*, 2007)。采用定量 NMR (qNMR) 测定胭脂红酸,是基于给定的 NMR 共振强度与样品中相关成分的摩尔量成正比的规律,通过胭脂红酸上芳香族质子的信号强度与 3 个甲基中 9 个质子的比率来计算胭脂红酸的纯度和含量。基于 NMR 技术本身具有的特性,qNMR 方法无需参考相关化合物,快速简便,整个分析过程仅持续 10 min。该方法是具有可追溯性的绝对定量方法,同时也已应用于其他天然

表 1 胭脂虫红相关检测及鉴定方法比较
Table 1 Comparison of detection and identification methods for cochineal dye

检测技术 Detection technology	核磁共振光谱法 NMR	高效液相色谱结合二极管阵列和串联质谱与电喷雾电离 HPLC-DAD-ESI MS/MS	三维荧光光谱结合平行因子分析 3D-EEMs-PARAFAC	多变量统计分析 Multivariate statistical analysis
优点 Advantage	具有普适性;不需解离分析物,可回收样品;具有高分析重现性 (Beckonert <i>et al.</i> , 2007);快速简便,分析仪持续 10 min (Sugimoto <i>et al.</i> , 2010) Universal; no need to dissociate analytes and can recycle samples; high analytical reproducibility (Beckonert <i>et al.</i> , 2007); fast and easy, analysis lasts only 10 minutes (Sugimoto <i>et al.</i> , 2010)	较易识别糖苷化合物;快速可靠评估有限数量的样品 (Mantzouris <i>et al.</i> , 2011; Lech and Jarosz, 2016) Easy to identify glycoside compounds; fast and reliable evaluation of a limited number of samples (Mantzouris <i>et al.</i> , 2011; Lech and Jarosz, 2016)	易用性,高灵敏度,快速测量,便携;低成本;分析能力强;不受外界干扰时,可区分多个荧光光谱重叠的化合物 (Rubio <i>et al.</i> , 2019) Easy, high sensitivity, fast measurement and portable; low cost; strong analytical capability; compounds with multiple overlapping fluorescence spectra can be distinguished from external interference (Rubio <i>et al.</i> , 2019)	数据分析全面完善;结果较为准确可靠 (Mendez <i>et al.</i> , 2004) Comprehensive and complete data analysis; accurate and reliable results (Mendez <i>et al.</i> , 2004)
缺点 Disadvantage	与基于质谱的技术相比,敏感性较低 (Frank Van der <i>et al.</i> , 2015; Beckonert <i>et al.</i> , 2007) Less sensitive than MS (Beckonert <i>et al.</i> , 2007; Frank Van der <i>et al.</i> , 2015)	只有进行分离步骤时,才能在提取物中观察 Can only be observed in the extract when the separation step is carried out	二阶校正数值分析进展少,分析方法老套;同时测定的两种产品之间存在一定的选择性,一定程度上会相互影响 (Rubio <i>et al.</i> , 2019) The relevant analysis has little progress; the method is old-fashioned; certain selectivity between the two products measured at the same time, can affect each other to some extent (Rubio <i>et al.</i> , 2019)	需结合多维度数据,操作复杂;受不同参数测量弱点的综合影响 Combine multi-dimensional data, complicated operation

产物的分析和质量控制 (Sugimoto *et al.*, 2010)。与基于质谱的技术相比, 它相对较不敏感, 但 Frank 等 (2015) 的研究表明这种基于 NMR 的代谢组学方法灵敏度较低主要是由于方法学的限制, 并非工具的限制。

3.2 高效液相色谱结合二极管阵列和串联质谱与电喷雾电离 (HPLC-DAD-ESI MS/MS)

染料溯源一直是科学研究中的难点, 如将主成分分析 (PCA) 应用于识别不同红色制品的来源时, 其结果无法在统计上加以区分 (Peggie *et al.*, 2008)。采用表面增强拉曼光谱 (SERS) 等技术也同样不能很好地鉴定来源于不同胭脂虫品种的胭脂虫红 (Stathopoulou *et al.*, 2013)。连接到二极管阵列检测器 (DAD) 的高效液相色谱 (HPLC) 通常被用于鉴定和分析样品中的胭脂虫红 (De Graaff *et al.*, 2004)。通过高效液相色谱结合二极管阵列和串联质谱与电喷雾电离技术 (HPLC-DAD-ESI MS/MS) 标定胭脂虫中的化学组分, 指示出用于区分不同种类来源的染料标记, 然后结合分光光度法采用不同长度波长, 检测在反相苯基柱上分离的染色剂, 同时在负离子模式下配合使用 MS/MS, 获得的数据便构成了多反应监测 (MRM) 的基础, 并应用于鉴定着色剂中的成分 (Lech and Jarosz, 2016)。这一质谱联和高效液相色谱的技术同时被用于鉴定产自胭脂虫体中蒽醌类物质的存在, 基于这种特征性破碎模式, 更易识别糖苷化合物 (Mantzouris *et al.*, 2011; Lech and Jarosz, 2016)。

3.3 三维荧光光谱 (3D-EEMs) 结合平行因子分析 (PARAFAC)

荧光光谱与普通的色谱技术相比, 具有较高的灵敏度, 且操作快速简单 (Rubio *et al.*, 2019)。三维荧光光谱 3D-EEMs 可以反映出荧光强度, 同时根据发射波长及激发波长的变化特征, 准确反映出检测分子的相关特性 (Jacquin *et al.*, 2017)。但由于分析物信号之间的相互重叠, 导致最终无法完全判断结果 (Rubio *et al.*, 2019)。平行因子分析法 (PARAFAC) 由 Kiers 提出 (Kruskal

et al., 1989), 是一种三线性分解法, 在三线性分解模型的基础上采用交替最小二乘算法来完成 (张燕, 2009)。利用 3D-EEMs 与 PARAFAC 相结合的方法已成为一种新兴的探究胭脂虫红中相应组分特性的检测手段。Rubio 等 (2019) 通过这一方法同时测定了樱桃糖浆中的胭脂虫红和赤藓红, 在测定过程中无需任何耗时的清理程序, 或是分析前的蒸发步骤, 操作简单快捷。测量的结果可以根据赤藓红的荧光信号强度随胭脂虫红量的增加而降低来判断, 大大提高了检测的效率。

3.4 多变量统计分析法

在进行胭脂虫红的质量测定时, 多种数据被广泛运用, 如色度属性、胭脂红酸的百分比、色调测定、色谱图等。这些数据作为颜色测定时的不同参数, 通过不同的仪器进行测定分析, 如通过分光光度法测定胭脂红酸的相关信息, 通过液相色谱获得颜料的分布信息以及色素的组成等, 通过多维度、多层次的数据分析方法, 获得较为全面的数据。最终将所有数据通过适宜的统计技术, 如聚类分析和主成分分析等实现样品成分的分离和检测 (Mendez *et al.*, 2004)。这一方法被称为多变量统计分析法, 不仅被运用在胭脂虫红检测领域, 也被用于其他产品的检测上。Kamal (2016) 通过这一方法, 结合 NMR 谱, 鉴定出不同类型、产地的酱油品种。

4 胭脂虫红的应用前景

4.1 传统应用

历史上, 胭脂虫红频繁出现在画像、雕塑等文物中, 如 1583 年雕刻而成的著名镀金多彩雕塑——“Our Lady of Copacabana”, 科研人员通过微拉曼光谱结合扫描显微镜-能量色散光谱和高效液相色谱分析出雕塑的红色部分含有胭脂虫红 (Tomasini *et al.*, 2016)。

4.2 疾病治疗

研究表明蓼科、豆科、玄参科等高等植物中存在蒽醌化合物 (Schwab *et al.*, 2000, 王明明

等, 2019)。胭脂虫红色素中便含有这一类蒽醌类物质 (Greenstein, 2006)。Takahashi 等发现从胭脂虫体内提取的蒽醌类色素对于果蝇体内由致癌物导致的 DNA 损伤具有修复作用 (Jamison *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 2001)。同时胭脂虫红色素也可用于防治病毒性疾病, 如疱疹性口炎、艾滋病等 (Jamison *et al.*, 1990; Ayuko, 1992)。百日咳是症状极其顽固的一种病症, 一般可以持续 4-6 周, 医务人员采用了各种方法, 但成效仍不显著。Wachtl 发现胭脂虫红色素对于这种顽固的症状有一定的治疗效果 (Wachtl, 1843)。

4.3 光敏电池

染料敏化太阳能电池 (DSSCs) 是由纳米多孔半导体氧化物电极、相应吸附染料和电解质以及反电极组成 (Yum *et al.*, 2011)。其敏化剂包含了无机、有机、杂化染料等多种类型 (Gao *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2011)。胭脂虫红色素可以与 TiO_2 的表面强力结合, 通过激发态氧化电位及相关热力学优势来获得较强的电子驱动力, 因此在染料敏化太阳能电池中可以作为良好的光敏剂 (Sang-aroon *et al.*, 2013)。胭脂虫红色素与 TiO_2 的结合不仅使电池的制造成本降低, 同时也使光电转化效率得以提高 (Park *et al.*, 2014)。

4.4 害虫检测及蔬菜生产商业化

酸化的胭脂虫红色素可以有效地对一些昆虫幼虫进行染色, 基于该特点胭脂虫红色素在害虫检测中可起较大作用 (Pokora and Szilman, 1991)。小菜蛾 *Plutella xylostella* 是十字花科蔬菜的主要害虫, 也是墨西哥花椰菜的主要害虫, 由于其幼虫和蛹与花椰菜及周围环境颜色相近, 很难进行区分, Goche 等 (2012) 采用胭脂虫红色素浸染的方式, 对小菜蛾幼虫和蛹进行处理, 使幼虫和蛹与周围绿色环境形成鲜明对比, 有助于在蔬菜处理的过程中将其清除。同时, 对花椰菜侵染发现, 只有茎的边缘被染色, 且正好位于切口位置, 这一技术适用于花椰菜的商业化生产。

5 总结与展望

颜色作为最重要的感官特性之一, 可以直接影响消费者对于食物的选择和接受程度 (Martins *et al.*, 2016)。随着大众对于食品安全关注度的提高, 普遍认为天然色素的安全性高于人工合成色素。合成色素虽然成本相对较低, 颜色鲜艳且着色力强, 但由于物质组成中偶氮结构、芳香结构等片段的的存在常具有毒性 (聂晶和齐兴娟, 2002)。相较合成色素, 天然色素常常毒副作用小。同时随着社会经济的发展, 天然色素的利用越来越多, 胭脂虫红作为一种天然色素, 在食品着色、染料、化妆品等行业的用量越来越大。尤其是近几年来, 随着“回归自然热”的兴起, 西方食品商不断推出含有天然色素的加工食品, 天然色素市场大幅度上升, 价格上涨。

胭脂虫红色素是一个商业价值极高的产品, 目前被应用于食品、化妆品、药品等多个领域 (Ohgiya *et al.*, 2009)。安全性也得到了国际的肯定, 整个消费市场对它的需求在飞速增长。但我国市场胭脂虫红色素仍未实现大规模生产, 究其原因, 首先是我国饲养条件的限制, 其次是其先前所报道的过敏事件。但若在一定剂量范围内使用, 胭脂虫红色素仍具有应用价值, 而国内对胭脂虫的饲养还需依赖大量的人力物力, 随着测序技术的发展, 若能通过对胭脂虫基因组大数据进行分析, 明确胭脂虫红的合成途径, 将合成途径基因转入大肠杆菌中, 利用合成生物学创造能够生产胭脂虫红的大肠杆菌, 便可实现胭脂虫红的“细菌工厂化”生产, 实现室内批量化生产胭脂虫红, 同时也可在生产过程中加入流程去除致敏蛋白, 再经传统工艺提纯后, 实现商业化用途。

参考文献 (References)

- Ayuko WO, 1992. Use of quinones in the treatment of cancer or AIDS. England, A2, EP0499467. 1992-8-19.
- Barbera G, Carimi F, Inglese P, Panno M, 1992. Physical, morphological and chemical-changes during fruit-development and ripening in 3 cultivars of prickly pear, *Opuntia-Ficus-Indica* (L) Miller. *Journal of Horticultural Science*, 67(3): 307-312.
- Barbera G, Inglese P, Pimienta BE, De AJE., 1995. Agro-ecology,

- cultivation and uses of cactus pear. *Fao Plant Production & Protection Paper*, (132): 110.
- Beaudouin E, Kanny G, Lambert H, Fremont S, Moneretvautrin DA, 1995. Food anaphylaxis following ingestion of carmine. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 74(5): 427–430.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy JG, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK, 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2(11): 2692–2703.
- Bustamante-Brito R, Vera-Ponce de Leon A, Rosenblueth M, Martinez-Romero JC, Martinez-Romero E, 2019. Metatranscriptomic analysis of the bacterial symbiont *Dactylopiibacterium carminicum* from the carmine cochineal *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Life (Basel)*, 9(1): 4.
- Chavez-Moreno CK, Tecante A, Casas A, 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: A historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation*, 18(13): 3337–3355.
- Chen XF, 2004. The studies of biological and ecological characteristics on *Dactylopius coccus* Costa at artificial conditions. Masteral dissertation. Shangdong: Shandong Agricultural University. [陈晓菲, 2004. 胭脂虫在人工可控条件下的生物生态学研究. 硕士学位论文. 山东: 山东农业大学.]
- Chen XM, Feng Y, 2009. An Introduction to Resource Entomology. Beijing: Science Press. 55–67. [陈晓鸣, 冯颖, 2009. 资源昆虫学概论. 北京: 科学出版社. 55–67.]
- De Lotto, 1974. On the identity of the cochineal insects (Homeptera: Coccoid: Dactylopiidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 37(1): 167–193.
- De Graaff JHH, Roelofs WGT, van Bommel MR, 2004. The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs. Riggisberg. London: Abegg-Stiftung and Archetype Publication Ltd. 285.
- Donkin RA, 1977. Spanish Red: An ethnogeographical study of cochineal and the *Opuntia Cactus*. *Transactions of the American Philosophical Society*, 67(5): 1–84.
- Eisner T, Nowicki S, Goetz M, Meinwald J, 1980. Red cochineal dye (carminic Acid): its role in nature. *Science*, 208(4447): 1039–1042.
- Eisner T, Ziegler R, McCormick JL, Eisner M, Hoebeke ER, Meinwald J, 1994. Defensive use of an acquired substance (Carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia*, 50(6): 610–615.
- Flores-Alatorre HL, Abrego-Reyes V, Reyes-Esparza JA, Angeles E, Alba-Hurtado F, 2014. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae) at various maturation stages. *Journal of Economic Entomology*, 107(4): 1700–1705.
- Flores-Flores V, Tekelenburg A, 1995. Dacti (*Dactylopius coccus* Costa) dye production. *Fao Plant Production & Protection Paper*, (132): 167–185.
- Ford GP, Gopal T, Grant D, Gaunt IF, Evans JG, Butler WH, 1987. Chronic toxicity/carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 25(12): 897–902.
- Frank Van der, Beatrice V, Jarryd LP, Allan T, Chun GL, Dennis C. 2015. Sensitivity of nmr-based metabolomics in drug discovery from medicinal plant. *European Journal of Medicinal Plants*, 5(2): 191–203.
- Gabriel JL, Jack F, 2000. Carmine. *Natural Food Colorants: Science and Technology*. Boca Raton: CRC Press. 1–10.
- Gao FG, Bard AJ, Kispert LD, 2000. Photocurrent generated on a carotenoid-sensitized TiO₂ nanocrystalline mesoporous electrode. *Journal of Photochemistry & Photobiology A Chemistry*, 130(1): 49–56.
- Goche D, Viguera AL, Portillo L, Llanderal C, 2012. Use of *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea) pigments in the detection of larvae and pupae of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Neotropical Entomology*, 41(3): 249–251.
- Gonzalez M, Mendez J, Carnero A, Lobo MG, Afonso A, 2002. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24): 6968–6974.
- Grant D, Gaunt IF, 1987. Three-generation reproduction study on carmine of cochineal in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 25(12): 903–912.
- Grant D, Gaunt IF, Carpanini FM, 1987. Teratogenicity and embryotoxicity study of carmine of cochineal in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 25(12): 913–917.
- Greenstein GR, 2006. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals (14th edition). *Reference Reviews*, 21(6): 40–40.
- Guerra GP, 1992. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: Coccinea) with emphasis on the life cycle of *Dactylopius coccus* Costa. Doctoral dissertation. Virginia State: Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Gullan PJ, Kosztarab M, 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42: 23–50.
- Guo YH, 2011. Improvement of determination of carminic acid and cochineal dye's extraction and quality. Masteral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [郭元亨, 2011. 胭脂红酸检测方法及其色素提取改善. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]

- Haile M, Belay T, Zimmerman HG, 2002. Current and potential use of cactus in Tigray, Northern Ethiopia. *Proceedings of the Fourth International Congress on Cactus Pear and Cochineal*. 75–86.
- Hernandez-Gonzalez IA, Cruz-Rodriguez JA, 2018. *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) as a biological control agent of the wild cochineal (Hemiptera: Dactylopiidae) of prickly pear cactus. *Environmental Entomology*, 47(2): 334–339.
- Hosking JR, 1984. The effect of temperature on the population-growth potential of dactylopius-Austrinus De Lotto (Homoptera, Dactylopiidae), on ppuntia-aurantiaca lindley. *Journal of the Australian Entomological Society*, 23(2): 133–139.
- Ichi T, Koda T, Yukawa C, Sakata S, Zuo THZ, 2003. Purified cochineal red material and method for its production. China, 1388821A. 2003-1-1. [市隆人, 香田隆俊, 汤川千代树, 坂田慎, 左藤浩之. 提纯的胭脂虫红色料和生产它的方法. 中国. 1388821A. 2003-1-1.]
- Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H, 2017. Spiroketalcarminic acid, a novel minor anthraquinone pigment in cochineal extract used in food additives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 65(9): 883–887.
- Jacquin C, Lesage G, Traber J, Pronk W, Heran M, 2017. Three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence (3DEEM) for quick and pseudo-quantitative determination of protein-and humic-like substances in full-scale membrane bioreactor (MBR). *Water Research*, 118: 82–92.
- Jamison JM, Krabill K, Flowers DG, Tsai CC, 1990. Polyribonucleotide-anthraquinone iInteractions- invitro antiviral activity studies. *Cell Biology International Reports*, 14(3): 219–228.
- Kamal GM, 2016. NMR spectrpscopy combine with multivariate statistical analysis for the differentiation of types and origins of Sov sauce. Doctoral dissertation. Wuhan: Chinese Academy of Sciences. [Kamal GM, 2016. NMR 谱结合多变量统计分析区分不同类型、产地的酱油. 博士学位论文. 武汉: 中国科学院大学.]
- Kannangara R, Siukstaite L, Borch-Jensen J, Madsen B, Kongstad KT, Staerk D, Bennedsen M, Okkels FT, Rasmussen SA, Larsen TO, Frandsen RJN, Moller BL, 2017. Characterization of a membrane-bound C-glucosyltransferase responsible for carminic acid biosynthesis in *Dactylopius coccus* Costa. *Nature Communications*, 8(1): 1987.
- Kawasaki Y, Umemura T, Sai K, Hasegawa R, Momma J, Saitoh M, Matsushima Y, Nakaji Y, Tsuda M, Kurokawa Y, 1994. A 13-week toxicity study of simultaneous administration of cochineal and aluminum potassium sulfate in rats. *Eisei Shikenjo Hokoku*, (112): 48–56.
- Kruskal CP, Rudolph L, Snir M, 1989. Techniques for parallel manipulation of sparse matrices. *Theoretical Computer Science*, 64(2): 135–157.
- Lai WM, Yang YH, Wang JM, 2010. Primary research on breeding methods of *Dactylopius coccus*. *Sichuan Journal of Zoology*, 29(1): 124–126. [赖为民, 杨光友, 王锦鸣, 2010. 胭脂虫养殖方式初探. 四川动物, 29(1): 124–126.]
- Lech K, Jarosz M, 2016. Identification of Polish cochineal (*Porphyrophora polonica* L.) in historical textiles by high-performance liquid chromatography coupled with spectrophotometric and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(12): 3349–3358.
- Lech K, Witkos K, Wilenska B, Jarosz M, 2015. Identification of unknown colorants in pre-Columbian textiles dyed with American cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(3): 855–867.
- Li ZG, Zhang JY, Zhao JJ, Bao SL, Yang JX, Wu CL, 2008. The introduction of cochineal and its application. *China Food Additives*, (5): 54–59. [李志国, 张建云, 赵杰军, 包松莲, 杨家秀, 吴楚林, 2008. 胭脂虫及其加工利用概述. 中国食品添加剂, (5): 54–59.]
- Lu YM, 2009. Study on extraction and purification of cochineal red pigment. Masteral dissertation. Kunming: Kunming University of Science and Technology. [卢艳民, 2009. 胭脂虫红色素提取与精制研究. 硕士学位论文. 昆明: 昆明理工大学.]
- Lu YM, Zhou MC, Zheng H, Zhang H, 2008. Study on refinement of cochineal dye by ultrafiltration membrane. *Food Science*, 29(9): 196–198. [卢艳民, 周梅村, 郑华, 张弘, 2008. 超滤膜精制胭脂虫红色素的研究. 食品科学, 29(9): 196–198.]
- Lu YM, Zheng H, Zhou MC, Zhang H, 2009. Study on extraction of cochineal eye by microwave technique. *Hubei Agricultural Sciences*, 48(3):707–709. [卢艳民, 郑华, 周梅村, 张弘, 2009. 胭脂虫红色素的微波萃取条件优化. 湖北农业科学, 48(3): 707–709.]
- Madariaga C, Gavilan V, Viguera P, Madariaga V, 2006. Health and interculturality in Latin America. *Anthropological perspectives. Chungara-Revista De Antropologia Chilena*, 38(1): 152–155.
- Magakian IA, Abroian LO, Gabrielian NA, 1977. In vitro cell culture of the Ararat cochineal insect, *Porphyrophora hamelii* Brandt. *Ontogenez*, 8(4): 383–388.
- Mantzouris D, Karapanagiotis I, Valianou L, Panayiotou C, 2011. HPLC-DAD-MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(9): 3065–3079.
- Martins N, Roriz CL, Morales P, Barros L, Ferreira ICFR, 2016. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52: 1–15.

- Mendez J, Gonzalez M, Lobo MG, Carnero A, 2004. Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5): 1331–1337.
- Moran VC, Hoffmann JH, 1987. The effects of simulated and natural rainfall on cochineal insects (Homoptera, Dactylopiidae) - colony distribution and survival on Cactus cladodes. *Ecological Entomology*, 12(1): 61–68.
- Mori H, Iwata H, Tanaka T, Morishita Y, Mori Y, Kojima T, Okumura A, 1991. Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 29(9): 585–588.
- Muller-Maatsch J, Bechtold L, Schweiggert RM, Carle R, 2016. Co-pigmentation of pelargonidin derivatives in strawberry and red radish model solutions by the addition of phenolic fractions from mango peels. *Food Chemistry*, 213: 625–634.
- National Food Safety Standard, 2014. GB 2760-2014 Standards for the Use of Food Additives. Beijing: Standards Press of China. 80–82. [食品安全国家标准, 2014. GB 2760-2014 食品添加剂使用标准. 北京: 中国标准出版社. 80–82.]
- Nie J, Qi XJ, 2002. Research trends of food synthetic pigments (review). *China Academic Journal Electronic Publishing House*, 14(1): 58–60. [聂晶, 齐兴娟, 2002. 食用合成色素研究动态(综述). 中国食品卫生杂志, 14(1): 58–60.]
- Ohgiya Y, Arakawa F, Akiyama H, Yoshioka Y, Hayashi Y, Sakai S, Ito S, Yamakawa Y, Ohgiya S, Ikezawa Z, Teshima R, 2009. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochineal allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5): 1157–1162.
- Park KH, Kim TY, Han S, Ko HS, Lee SH, Song YM, Kim JH, Lee JW, 2014. Light harvesting over a wide range of wavelength using natural dyes of gardenia and cochineal for dye-sensitized solar cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128: 868–873.
- Peggie DA, Hulme AN, Mcnab H, Quye A, 2008. Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). *Microchimica Acta*, 162(3/4): 371–380.
- Pokora Z, Szilman P, 1991. Use of acetocarmines for staining of larvae of digenetic Trematoda in situ. *Wiad Parazytol*, 37(2): 235–240.
- Portillo L, 2005. Origen de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae): Norte o Sudamérica? *Dugesiana* 12(1): 1–8.
- Quirce S, Cuevas M, Olaguibel JM, Tabar AI, 1994. Occupational asthma and immunological responses induced by inhaled carmine among employees at a factory making natural dyes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93(1): 44–52.
- Rodriguez LC, Mendez MA, Niemeyer HM, 2001. Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within the Americas. *Antiquity*, 75(287): 73–77.
- Rubio L, Sanllorente S, Sarabia LA, Ortiz MC, 2019. Determination of cochineal and erythrosine in cherries in syrup in the presence of quenching effect by means of excitation-emission fluorescence data and three-way PARAFAC decomposition. *Talanta*, 196: 153–162.
- Sang-aroon W, Laopha S, Chaikomnugool P, Tontapha S, Saekow S, Amornkitbamrung V, 2013. DFT and TDDFT study on the electronic structure and photoelectrochemical properties of dyes derived from cochineal and lac insects as photosensitizer for dye-sensitized solar cells. *Journal of Molecular Modeling*, 19(3): 1407–1415.
- Schwab CE, Huber WW, Parzefall W, Hietsch G, Kassie F, Schulte-Hermann R, Knasmüller S, 2000. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(1): 1–69.
- Serrano A, Sousa MM, Hallett J, Lopes JA, Oliveira MC, 2011. Analysis of natural red dyes (cochineal) in textiles of historical importance using HPLC and multivariate data analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(2): 735–743.
- Stathopoulou K, Valianou L, Skaltsounis AL, Karapanagiotis I, Magiatis P, 2013. Structure elucidation and chromatographic identification of anthraquinone components of cochineal (*Dactylopius coccus*) detected in historical objects. *Analytica Chimica Acta*, 804: 264–272.
- Stintzing FC, Carle R, 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(2): 175–194.
- Sugimoto N, Tada A, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara T, Yoshida Y, Kubota R, Tahara M, Shimizu K, Ito S, Yamazaki T, Kawamura Y, Nishimura T, 2010. Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51(1): 19–27.
- Sullivan PR, 1990. Population-growth potential of *Dactylopius-Ceylonicus* green (Hemiptera, Dactylopiidae) on *Opuntia-Vulgaris* Miller. *Journal of the Australian Entomological Society*, 29(2): 123–129.
- Sun F, Yang YP, Cao HM, Cheng WL, 2005. Probe of the modification of the procedure of the natural dye carmine extraction. *Textile auxiliaries*, 22(8): 41–43. [孙锋, 杨月鹏, 曹红梅, 程万里, 2005. 天然染料胭脂虫色素提取工艺的探讨. 印染助剂, 22(8): 41–43.]
- Takahashi E, Marczylo TH, Watanabe T, Nagai S, Hayatsu H, Negishi T, 2001. Preventive effects of anthraquinone food

- pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480(3): 139–145.
- Takeo N, Nakamura M, Nakayama S, Okamoto O, Sugimoto N, Sugiura S, Sato N, Harada S, Yamaguchi M, Mitsui N, Kubota Y, Suzuki K, Terada M, Nagai A, Sowa-Osako J, Hatano Y, Akiyama H, Yagami A, Fujiwara S, Matsunaga K, 2018. Cochineal dye-induced immediate allergy: Review of Japanese cases and proposed new diagnostic chart. *Allergology International*, 67(4): 496–505.
- Tanaka T, 1995. Reproductive and neurobehavioral effects of cochineal administered to mice in the diet. *Toxicology and Industrial Health*, 11(1): 1–12.
- Tomasini EP, Marte F, Careaga VP, Landa CR, Siracusano G, Maier MS, 2016. Virtuous colours for mary identification of lapis lazuli, smalt and cochineal in the Andean colonial image of our lady of Copacabana (Bolivia). *Philosophical Transactions of the Royal Society a Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2082): 1–11.
- Van Dam AR, Martinez LP, Chavez AJ, May BP, 2015. Range wide phylogeography of *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(3): 299–310.
- Wachtl C, 1843. On the treatment of hooping-cough by cochineal. *Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences*, 5(121): 330–331.
- Wang MM, Gu PZ, Wang XM, Sun Z, Wang WW, 2019. Research progress of anthraquinone natural compounds and tumor therapy. *Anhui Chemical Industry*, 45(2): 1–6. [王明明, 顾浦中, 王晓曼, 孙赞, 王维维, 2019. 蒽醌类天然化合物及肿瘤治疗研究进展. *安徽化工*, 45(2): 1–6.]
- Wang N, Nobel PS, 1995. Phloem exudate collected via scale insect stylets for the CAM species *Opuntia-Ficus-indica* under current and doubled CO₂ concentrations. *Annals of Botany*, 75(5): 525–532.
- Wilson KE, Thompson JE, Huner NPA, Greenberg BM, 2001. Effects of ultraviolet-A exposure on ultraviolet-B-induced accumulation of specific flavonoids in *Brassica napus*. *Photochemistry and Photobiology*, 73(6): 678–684.
- Yu QH, Wu QL, 2008. Studies on the methods for extraction of cochineal pigment. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2008(9): 59–61. [余启洪, 吴巧玲, 2008. 胭脂虫红色素提取方法的研究进展. *农产品加工(学刊)*, 2008(9): 59–61.]
- Yum H, Liu X, Jang YJ, Kim ME, Shahriar SM, 2011. Pulse delay via tunable white light cavities using fiber-optic resonators. *Journal of Lightwave Technology*, 29(18): 2698–2705.
- Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N, 2017. Kinetic study of the equilibration between carminic acid and its two isomers isolated from cochineal sye. *Chem. Pharm. Bull.(Tokyo)*, 65(3): 306–310.
- Zegbe JA, Serma-Perez A, Mena-Covarrubias J, 2014. Mineral nutrition enhances yield and affects fruit quality of 'Cristalina' cactus pear. *Scientia Horticulturae*, 167: 63–70.
- Zhang H, Zheng H, Chen J, Lu YM. 2008. Study on stability of cochineal extract. *Food Science*, 29(11): 59–64. [张弘, 郑华, 陈军, 卢艳民, 2008. 胭脂虫红色素稳定性研究. *食品科学*, 29(11): 59–64.]
- Zhang Y, 2009. Applications of second-order calibration methods in fluorometric and chromatographic analysis. Masteral dissertation. Hunan: Hunan University. [张燕, 2009. 化学计量学二阶校正法在荧光和色谱分析中的应用. 硕士学位论文. 湖南: 湖南大学.]
- Zhang ZH, 2003. A study on basic ecology for cultivating cochineal insect. Doctoral dissertation. Kunming: Research Institute of Resources Insects of Chinese Academy of Forestry. [张忠和, 2003. 胭脂虫培育的生态学基础. 博士学位论文. 昆明: 中国林业科学研究院资源昆虫研究所.]
- Zheng LY, Gui H, 1999. *Insect Classification*. Nanjing: Nanjing Normal University Press. 434–437. [郑乐怡, 归鸿, 1999. 昆虫分类. 南京: 南京师范大学出版社. 434–437.]
- Zhou H, Liqiong WU, Gao Y, Tingli MA, 2011. Dye-sensitized solar cells using 20 natural dyes as sensitizers. *Journal of Photochemistry & Photobiology A Chemistry*, 219(2): 188–194.