

# **Produktion und Isolierung der Farbstoffe von *Monascus purpureus* in kristalliner Form in Milligrammmengen = Production and isolation of the pigments from *Monascus purpureus* as pure crystals in quantities of several milligrams**

Autor(en): **Bieri, Philipp / Baumberger, Franz**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **97 (2006)**

Heft 2-3

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982025>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Produktion und Isolierung der Farbstoffe von *Monascus purpureus* in kristalliner Form in Milligrammmengen

## Production and isolation of the pigments from *Monascus purpureus* as pure crystals in quantities of several milligrams

Philipp Bieri und Franz Baumberger  
Berner Fachhochschule, Technik und Informatik, 3400 Burgdorf

Eingegangen am 12. Januar 2006, akzeptiert am 5. Mai 2006

### Einleitung

Der Schimmelpilz *Monascus purpureus* ist eine natürliche Farbstoffquelle, welche seit Jahrhunderten in Ostasien zur Herstellung von Rotschimmelreis gebraucht wird. Rotschimmelreis ist ein Fermentationsprodukt aus handelsüblichem poliertem Reis, das mit *Monascus purpureus* beimpft worden war. Rotschimmelreis findet traditionell in der asiatischen Küche seinen Einsatz und wird dort zum Rotfärben von Getränken und Esswaren eingesetzt (1). In den letzten Jahren ist Rotschimmelreis als möglicher färbender Zusatz zu Fleischerzeugnissen ins Gespräch gekommen. Die rote Farbe des fermentierten Reises könnte dabei eine Alternative zum Pökelfarbstoff darstellen. Da Rotschimmelreis auch leicht konservierende Eigenschaften besitzt (2, 3), ist ein möglicher Teilersatz von Nitrit durch Rotschimmelreis mindestens vorstellbar. Neben den Farbstoffen bildet *Monascus purpureus* noch weitere Stoffwechselprodukte, unter anderen das nierentoxische Citrinin. Die nur wenigen toxikologischen Informationen zu weiteren teils wenig bekannten Stoffwechselprodukten machen die Anwendung von Rotschimmelreis in Lebensmitteln problematisch (4).

In der Schweiz ist Rotschimmelreis zur Zeit weder als Zutat noch als Zusatzstoff erlaubt (5). Dennoch sind wir 2004 unabhängig voneinander von zwei kantonalen Lebensmittelkontrollstellen angefragt worden, ob wir die 6 Hauptpigmente von *Monascus purpureus* zu Referenzzwecken in Reinform isolieren oder darstellen könnten.

Die färbende Wirkung von *Monascus purpureus* beruht auf sechs Hauptfarbstoffen, die in Kombination dem Reis seine typische rote Farbe geben. Die Pigmente sind Sekundärmetaboliten von *Monascus purpureus*, die eine Polyketidstruktur besitzen (6). Die sechs Hauptfarbstoffe treten in drei charakteristischen Substanzpaaren auf (Abb. 1). Die beiden Farbstoffe eines Paares besitzen dieselbe chemische Grundstruktur. Sie unterscheiden sich nur in der Länge der gesättigten Seitenkette, die entweder 6 oder 8 Kohlenstoffatome enthält. Daraus resultiert bei je einem Farbstoffpaar eine sehr ähnliche Lichtabsorption im ultravioletten und im sichtbaren Bereich.

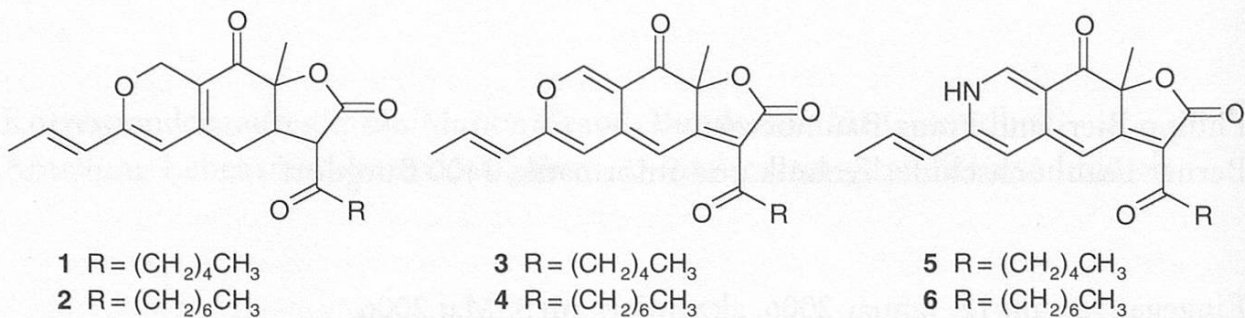


Abbildung 1 Strukturformeln der sechs Hauptpigmente von *Monascus purpureus*

Gelb:	Monascin 1
	Ankaflavin 2
Orange:	Rubropunctatin 3
	Monascorubrin 4
Rot:	Rubropunctamin 5
	Monascorubramin 6

Die beiden orangen Pigmente Rubropunctatin 3 und Monascorubrin 4 haben eine sehr hohe Affinität zu Verbindungen mit primären Aminogruppen. Sie reagieren unter Bildung einer Schiff'schen Base und Abspaltung von Wasser mit wässriger Ammoniaklösung sehr leicht zu den beiden roten Pigmenten Rubropunctamin 5 und Monascorubramin 6 (Abb. 2) (6).

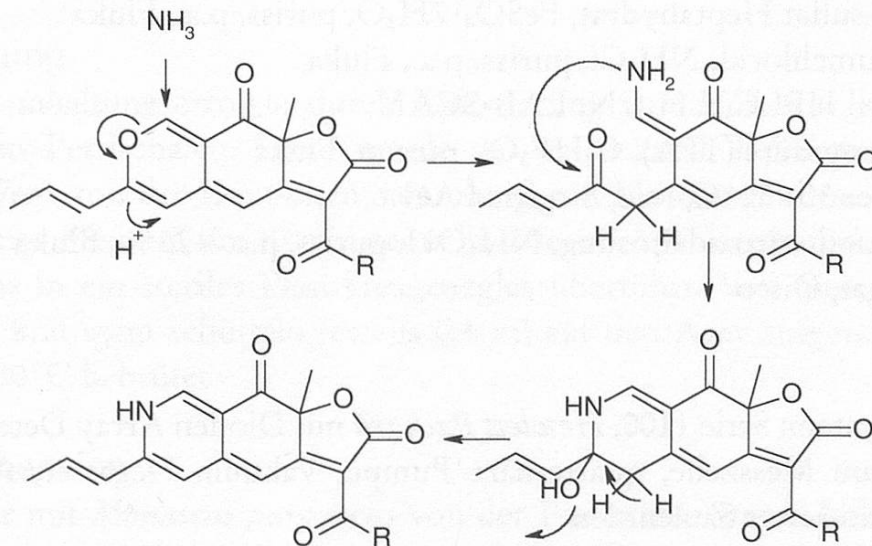


Abbildung 2 Bildung der roten Pigmente durch eine Schiffsche Base Reaktion der orangen Pigmente mit Ammoniak (6)

In der nachfolgenden Arbeit beschreiben wir eine Methode zur Gewinnung der sechs Hauptpigmente von *Monascus purpureus* in Hundertmilligramm Mengen und in kristalliner Form. Dazu wurde *Monascus purpureus* in zwei Schritten fermentiert. Im ersten Schritt stand das Pilzwachstum im Vordergrund, im zweiten die maximale Pigmentproduktion. Das in der Fermentation erhaltene Pilzmaterial wurde getrocknet. Die Extraktion dieses Pilzmaterials mit Petrolether lieferte ein Gemisch der gelben und orangen Pigmente. Dieses Pigmentgemisch wurde mit präparativer HPLC aufgetrennt und so die beiden gelben und orangen Pigmente in reiner Form isoliert. Die roten Pigmente erhielten wir durch Umsetzung des orangen Farbstoffgemisches mit wässriger Ammoniaklösung und anschließender Trennung mittels präparativer HPLC. Die vollständige Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Farbstoffe erfolgte durch NMR-, MS-, UV-VIS-, IR-Messungen und Bestimmung der Schmelzpunkte.

## Methoden und Resultate

### Chemikalien

- D(+)-Glucose, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, wasserfrei, Riedel-de Haën
- Hefeextrakt, gepulvert, Merck
- Stärke löslich nach Zulkowsky, z.A., Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MicroSelect, Fluka
- Dikaliumhydrogenphosphat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, zur Analyse, Merck
- TWEEN 20, Fluka
- Magnesiumsulfat Heptahydrat, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, z.A., Merck

- Natriumchlorid, NaCl, z.A., Merck
- Eisen(II)-sulfat Heptahydrat, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, puriss. p.a., Fluka
- Ammoniumchlorid, NH<sub>4</sub>Cl, puriss. p.a., Fluka
- Acetonitril HPLC, CH<sub>3</sub>CN, LAB-SCAN
- Trifluoressigsäure (TFA), C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, purum, Fluka
- Petrolether 30–50 °C, rein, Siegfried AG
- Ammoniumhydroxid-Lösung, NH<sub>4</sub>OH, puriss. p.a. ~25 %, Fluka
- Bacto-Agar, Difco

### Geräte

- HPLC-System: Serie 1100, *Hewlett Packard* mit Dioden Array Detektor (DAD) mit 10 mm Messzelle, quarternäre Pumpe, Vakuum Degasser, Autosampler, thermostatisierter Säulenofen
- Prep-HPLC-System: Serie 1100, *Hewlett Packard* mit Dioden Array Detektor (DAD) mit 0,3 mm Messzelle, quarternäre Pumpe, Vakuum Degasser, Autosampler, thermostatisierter Säulenofen, 0,5 ml Injektionsloop, Fraktionensammler
- Elektrospray Ionisation MS, Single Quadrupol, SCIEX API 150 EX, *Perkin Elmer*
- Labfors Kleinfermenter-System, 0,5 bis 5 Liter, *Infors AG*
- Autoklav, *LVSA 500*, Zirbus GmbH
- Schmelzpunktsbestimmung: *Büchi B-540*
- FT-IR: *Perkin-Elmer spectrum one*

### Mikroorganismen und Medien

Zur Gewinnung der Pigmente wurde mit *Monascus purpureus* Went DSM 1379 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig) gearbeitet.

Für die Stammhaltung wurde YpSs-Agar verwendet. Der YpSs-Agar wurde in einem Medium zubereitet, das pro Liter deion. Wasser 1 g Dikaliumhydrogenphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 4 g Hefeextrakt und 15 g lösliche Stärke enthielt.

Fermentiert wurde in zwei Schritten, wie in (7) beschrieben, wobei im ersten das Wachstum des Pilzes in Vordergrund stand, beim zweiten eine maximale Pigmentproduktion gewünscht war. Das Wachstumsmedium enthält pro Liter deion. Wasser 40 g Glucose, 10 g Hefeextrakt, 3 g Kaliumdihydrogenphosphat und 10 g TWEEN 20. Das Pigmentmedium enthält pro Liter deion. Wasser 40 g Glucose, 0,5 g Magnesiumsulfat Heptahydrat, 0,5 g Natriumchlorid, 0,1 g Eisen(II)-sulfat Heptahydrat, 1 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,5 g Ammoniumchlorid.

Glaswaren, Lösungen und Agarmedien wurden jeweils bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert, der Kleinfermenter bei 131 °C für 30 Minuten.

## Kultivierungsmethoden

### Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte durch Kultivierung von *Monascus purpureus* auf YpSs-Agar in Petrischalen. Dazu wurde das getrocknete Pellet vom *Monascus purpureus* Went von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen in 1 ml des Stammhaltungs Medium für 30 min gequellt. Diese Suspension wurde mit ca. 5 ml des Mediums in ein steriles Plastikreagenzglas überführt. Von dieser Suspension wurde nach kräftigem schütteln jeweils 0,1 ml auf den Agar aufgetragen und für 21 Tage bei 30°C bebrütet.

### Sporensuspension

Der Agar mit *Monascus purpureus* von der Petrischale wurde halbiert und die eine Hälfte in eine 100 ml Schottflasche transferiert, die etwa 5–6 sterile Glaskügelchen und 100 ml physiologische Kochsalzlösung enthielt. Nach dem Schütteln wurde durch eine sterile Gaze filtriert, das Filtrat gesammelt und in einer sterilen Glasflasche aufbewahrt.

### Wachstumsmedium

Schottflaschen (250 ml) wurden mit je 50 ml Wachstums-Medium beschickt und dieses Medium mit je 5 ml der Sporensuspension beimpft und für 7 Tage bei 30°C inkubiert. Fermentiert wurde auf einem reproduzierbaren Schüttler bei 160 Oszillationen pro Minute.

### Pigmentmedium

Der Kleinfermenter wurde mit jeweils 5 l Pigment-Medium gefüllt und dieses Medium mit 100 ml der Wachstumslösung beimpft. Fermentiert wurde bei einer Temperatur von 30°C, einer Belüftung von 3 l/min (=0,6 v/v/m) und einer Rührerdrehzahl von 200 U/min für 3 Wochen.

### Pigmentextraktion

Die Pigmentlösung wurde über einen Papierfilter abgenutscht und der feste Rückstand wurde während vier Tagen bei 40°C im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Material, ca. 25 g, wurde mit einem Mörser zerkleinert und dann mit Hilfe einer Kugelmühle pulverisiert. Der feinpulverige Rückstand wurde einer Soxhlet Extraktion mit Petrolether 30–50°C unterworfen. Extrahiert wurde kontinuierlich während 10 Tagen. Gegen Ende der Extraktionszeit fielen ca. 3 g eines orangen Rückstands aus dem Petrolether aus, der als Gemisch der beiden orangen und der beiden gelben Farbstoffe identifiziert wurde.

### *Präparative Trennung des Farbstoffgemisches*

Die Isolation der beiden gelben und orangen Pigmente durch präparative HPLC erfolgte durch batchweise Trennung einer Lösung von 1 g Pigmentgemisch (aus dem Soxhlet Rückstand) gelöst in 15 ml Acetonitril/Wasser (90:10, v/v). Gerät: Hewlett Packard HPLC-System Serie 1100, Säule: Uptisphere C18 NEC (Interchim, 250×10 mm, Partikelgröße 5 µm), isokratischer Fluss von 5,5 ml/min Acetonitril/Wasser (80:20, v/v). Eingespritzt wurden pro Trenngang 0,5 ml Lösung und die Fraktionierung erfolgte anhand der Signale bei einer Wellenlänge von 330 nm. Den separierten gesammelten Fraktionen wurde am Rotavap das Acetonitril abgezogen, dadurch fiel aus der verbleibenden Wasserphase das jeweilige Pigment als Feststoff aus und konnte abgenutscht werden. Getrocknet wurden die separierten Pigmente bei 40°C im Vakuumtrockenschrank. Aus je 3 g rohem Pigmentgemisch erhielten wir je 750 mg der beiden orangen Farbstoffe Rubropunctatin und Monascorubrin, sowie 500 mg Monascin und 100 mg Ankaflavin.

### *Umsetzung der orangen Pigmente zu den roten Farbstoffen*

Für die Umsetzung der orangen Pigmente zu den roten wurde das rohe Pigmentgemisch (gelb + orange) aus der Soxhlet Extraktion verwendet. Zu 1 g Pigmentgemisch in 15 ml Acetonitril/Wasser (90:10, v/v) wurden 1 ml Ammoniumhydroxidlösung 25 % gegeben, was ungefähr einem fünffachen Überschuss entspricht. Eine sofortige Farbveränderung nach rot war zu beobachten. Nach kräftigem Schütteln der Lösung und einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurden im HPLC-Chromatogramm keine orangen Pigmente mehr nachgewiesen, die Umsetzung erfolgte demnach vollständig. Man addierte 0,5 ml Trifluoressigsäure (TFA) zum Reaktionsgemisch. Die präparative Trennung des so erhaltenen Gemisches aus den gelben und roten Pigmenten und die Aufarbeitung der roten Farbstoffe erfolgte analog zur Trennung und Aufarbeitung der gelben und orangen Pigmente (vgl. oben). Den beiden Fließmitteln Acetonitril/Wasser (90:10, v/v) wurden aber je 0,05 % TFA beigesetzt.

### *Analytik und Charakterisierung der Pigmente*

Die Reinheitsanalyse und Charakterisierung der sechs separierten und isolierten Pigmente erfolgte mit Hilfe von HPLC, LC-MS, UV-VIS-Spektroskopie, Dünnschicht-Chromatographie, Schmelzpunktbestimmung sowie NMR- und IR-Spektroskopie.

#### **HPLC, LC-MS und UV-VIS**

Die Reinheits-Analyse der separierten und isolierten Pigmente erfolgte mit HPLC auf einer Spheriosorb 80-5 ODS2-Säule (Macherey-Nagel, 250×4,6 mm, Partikelgröße 5 µm), Fließmittel: Acetonitril/Wasser (80:20, v/v) mit je 0,05 % TFA, Fluss 1 ml/min, Detektion 330 nm. Abbildung 3 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines Gemisches aller sechs isolierten Pigmente. Die Reinheitsbestimmung

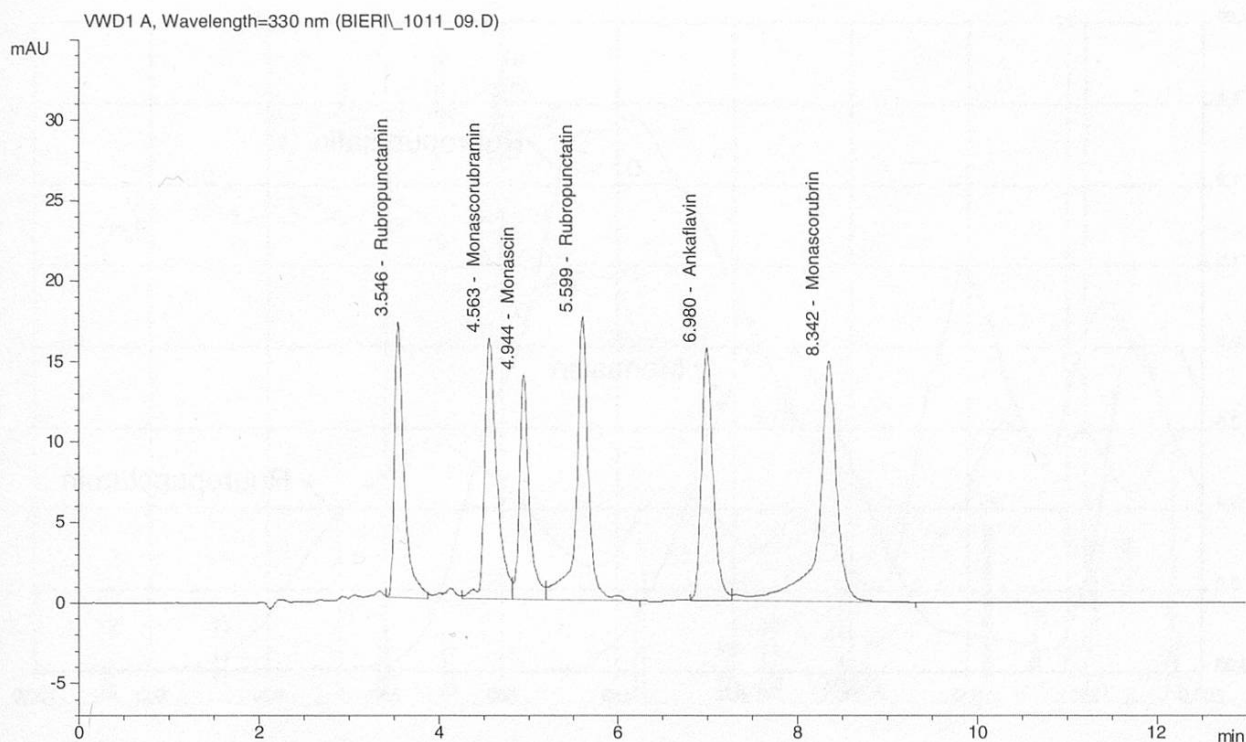


Abbildung 3 HPLC-Chromatogramm eines Gemischs aller sechs isolierten Pigmente

erfolgte über die Flächenprocente bei  $\lambda$  330 nm. Alle Pigmente waren >98 % rein. Durch Einsatz eines Diodenarray-Detektors wurden die UV-VIS-Spektren der einzelnen Pigmente mitbestimmt. Abbildung 4 zeigt die repräsentativen UV-VIS-Spektren jeweils eines der gelben, orangen und roten Pigmente nach deren Isolation. Diese UV-VIS-Spektren geben die Farbverschiebungen der drei Pigmente von  $\lambda_{\max}$  383 nm (gelb), zu  $\lambda_{\max}$  445 nm (orange) bis zu  $\lambda_{\max}$  531 nm (rot) sehr schön wieder. Dank einer LC-MS Kopplung wurden die separierten Pigmente ebenfalls anhand ihrer Masse identifiziert. Dazu wurde ein SCIEX API 150 EX Massenspektrometer von Perkin Elmer verwendet (8). Tabelle 1 liefert eine Übersicht über die Retentionszeiten und die bestimmten Molmassen der isolierten sechs Pigmente.

Tabelle 1

Übersicht über die Retentionszeiten und Molmassen der sechs isolierten Pigmente

<i>Pigment</i>	<i>Retentionszeit/min</i>	<i>Molmasse/g/mol</i>
Monascin	4,94	358,3
Ankaflavin	6,98	386,5
Rubropunctatin	5,60	354,4
Monascorubrin	8,34	382,5
Rubropunctamin	3,55	353,4
Monascorubramin	4,56	381,5



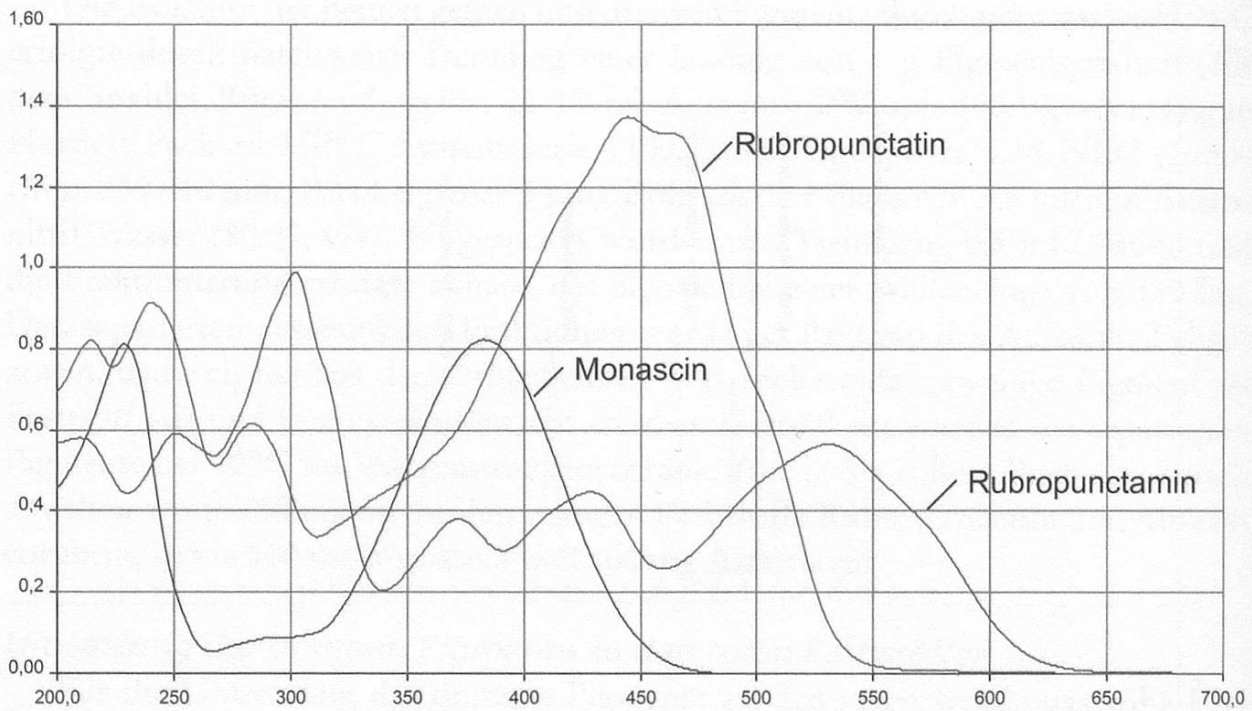


Abbildung 4 UV-VIS Spektrum jeweils eines gelben (Monascin), orangen (Rubropunctatin) und roten (Rubropunctamin) Pigments

### Dünnschichtchromatographie

Zur schnellen Pigmentidentifizierung kann Dünnschichtchromatographie eingesetzt werden. Dazu wurden RP-18 DC-Platten (*Machery-Nagel*) verwendet. Als Fließmittel diente Wasser/Acetonitril (1:1, v/v). In der Tabelle 2 sind die  $R_F$ -Werte der sechs Pigmente von *Monascus* dargestellt. Die Eigenfarbe der Pigmente ist für deren Identifizierung hilfreich.

Tabelle 2  
Übersicht über die  $R_F$  Werte der Pigmente

Pigment	$R_F$ -Wert
Monascin	0,33
Ankaflavin	0,22
Rubropunctatin	0,31
Monascorubrin	0,21
Rubropunctamin	0,52
Monascorubramin	0,40

### NMR-Analytik

Zur vollständigen Charakterisierung der isolierten Farbstoffe wurde von allen isolierten Pigmenten je ein  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY-, HETCOR- und HMBCGP-NMR aufgenommen. In der Abbildung 5 ist zur Veranschaulichung das Protonenspektrum mit der Signaluordnung von Monascin 1 als repräsentatives Beispiel dargestellt.

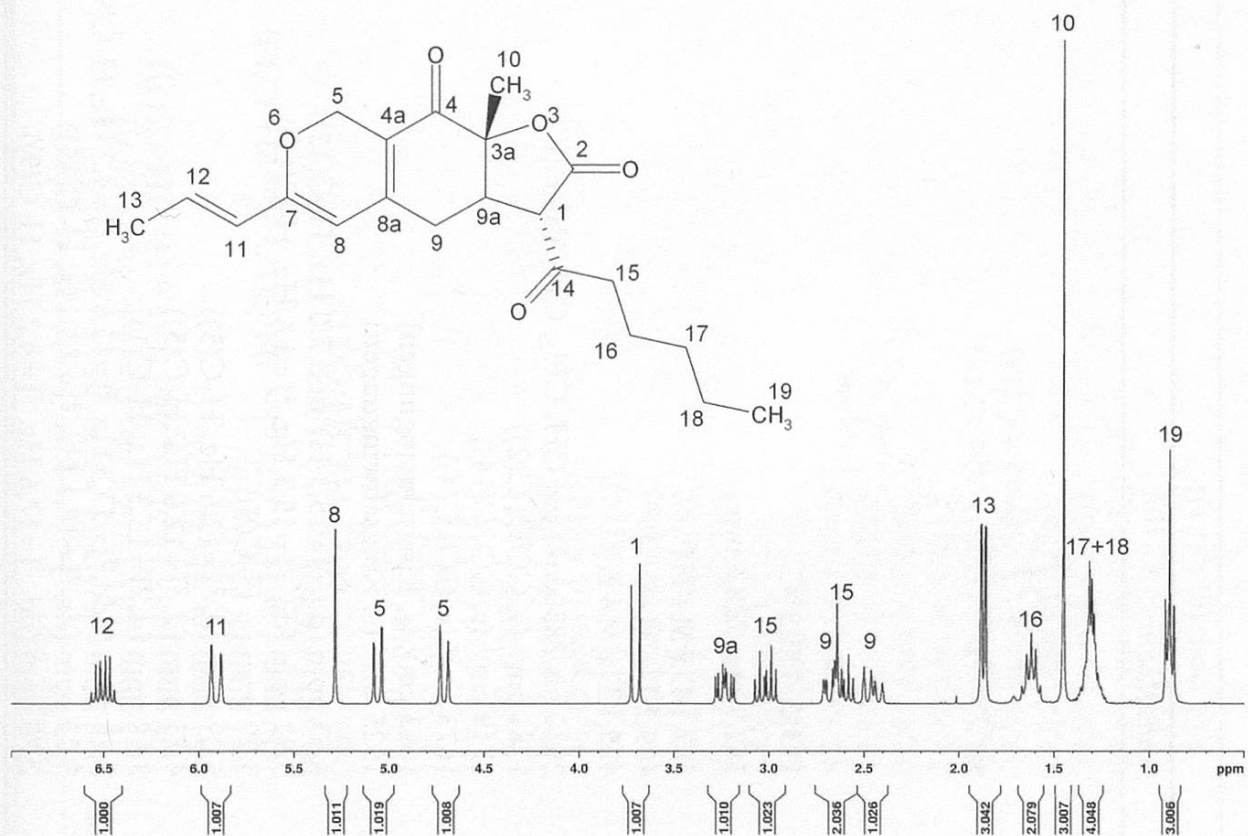


Abbildung 5 <sup>1</sup>H-NMR des isolierten Monascin aus *Monascus purpureus*

In den Tabellen 3, 4 und 5 finden sich die jeweiligen, vollständigen Datensätze aller sechs isolierten Pigmente mit Angaben zu den gemessenen Schmelzpunkten, UV-VIS-Maxima, MS-Daten, IR-Banden, sowie die vollständigen Signal-Zuordnungen aus den <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren.

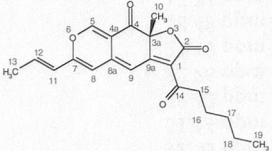
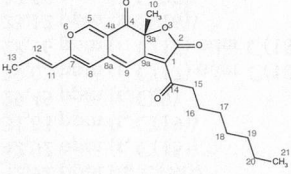
Tabelle 3  
Datensätze der gelben Pigmente Monascin und Ankaflavin

	<i>Monascin</i>	<i>Ankaflavin</i>
Struktur		
Smp.	149,0–149,5 °C	113,0–113,5 °C
UV/VIS max	383,0 nm, 228,8 nm	382,9 nm, 228,6 nm
MS	359,0 Da[M+H] <sup>+</sup> , 381,1 Da[M+Na] <sup>+</sup> 397,0 Da[M+K] <sup>+</sup>	387,1 Da[M+H] <sup>+</sup> 409,2 Da[M+Na] <sup>+</sup> 425,1 Da[M+K] <sup>+</sup>
FT-IR (KBr)	2960 bis 2870 cm <sup>-1</sup> (w, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1785 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1716 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1666 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1646 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen) 1522 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)	2930 bis 2850cm <sup>-1</sup> (w, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1781 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1719 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1673 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1663 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen) 1525 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> )	6,51 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,3 Hz, und 7,0 Hz, H-C(12)) 5,91 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,3 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(11)) 5,29 ppm (s, H-C(8)) 5,06 ppm (d, <sup>2</sup> J=12,6 Hz H-C(5)) 4,71 ppm (d, <sup>2</sup> J=12,6 Hz, H-C(5)) 3,70 ppm (d, <sup>3</sup> J=13,3 Hz, H-C(1)) 3,25 ppm (ddd, <sup>3</sup> J=13,3 Hz, <sup>3</sup> J=11,6 Hz, <sup>3</sup> J=4,2 Hz, H-C(9a)) 3,04 ppm (dt, <sup>2</sup> J=18,2 Hz, <sup>3</sup> J=7,5 Hz, H-C(15)) 2,72 ppm (dd, <sup>2</sup> J=17,7 Hz, <sup>3</sup> J=4,2 Hz, H-C(9))	6,53 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,3 Hz und 7,0 Hz, H-C(12)) 5,92 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,3 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(11)) 5,29 ppm (s, H-C(8)) 5,09 ppm (d, <sup>2</sup> J=12,6 Hz, H-C(5)) 4,73 ppm (d, <sup>2</sup> J=12,6 Hz, H-C(5)) 3,68 ppm (d, <sup>3</sup> J=13,3 Hz, H-C(1)) 3,25 ppm (ddd, <sup>3</sup> J=13,3 Hz, <sup>3</sup> J=11,6 Hz, <sup>3</sup> J=4,2 Hz, H-C(9a)) 3,03 ppm (dt, <sup>2</sup> J=18,1 Hz, <sup>3</sup> J=7,5 Hz, H-C(15)) 2,70 ppm (dd, <sup>2</sup> J=17,6 Hz, <sup>3</sup> J=4,2 Hz, H-C(9))

	<i>Monascin</i>	<i>Ankaflavin</i>
	2,63 ppm (dt, $^2J=18,2$ Hz, $^3J=7,2$ Hz, H-C(15))	2,63 ppm (dt, $^2J=18,1$ Hz, $^3J=7,2$ Hz, H-C(15))
	2,45 ppm (dd, $^2J=17,7$ Hz, $^3J=11,6$ Hz, H-C(9))	2,45 ppm (dd, $^2J=17,6$ Hz, $^3J=11,6$ Hz, H-C(9))
	1,89 ppm (dd, $^3J=7,0$ Hz und $^4J=1,6$ Hz, 3H-C(13))	1,89 ppm (dd, $^3J=7,0$ Hz und $^4J=1,6$ Hz, 3H-C(13))
	1,64 ppm (m, 2H-C(16))	1,64 ppm (m, 2H-C(16))
	1,47 ppm (s, 3H-C(10))	1,47 ppm (s, 3H-C(10))
	1,32 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18))	1,30 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18) plus 2H-C(19) plus 2H-C(20))
	0,91 ppm (t, $^3J=6,9$ Hz, 3H-C(19))	0,89 ppm (t, $^3J=6,7$ Hz, 3H-C(21))
$^{13}\text{C-NMR}$	202,50 ppm (s, C(14))	202,49 ppm (s, C(14))
	189,85 ppm (s, C(4))	189,82 ppm (s, C(4))
	169,58 ppm (s, C(2))	169,50 ppm (s, C(2))
	160,46 ppm (s, C(7))	160,50 ppm (s, C(7))
	150,84 ppm (s, C(8a))	150,75 ppm (s, C(8a))
	135,40 ppm (d, C(12))	135,45 ppm (d, C(12))
	124,39 ppm (d, C(11))	124,38 ppm (d, C(11))
	113,95 ppm (s, C(4a))	114,00 ppm (s, C(4a))
	103,32 ppm (d, C(8))	103,28 ppm (d, C(8))
	83,20 ppm (s, C(3a))	83,17 ppm (s, C(3a))
	63,79 ppm (t, C(5))	63,83 ppm (t, C(5))
	54,87 ppm (d, C(1))	54,90 ppm (d, C(1))
	42,95 ppm (d, C(9a))	42,92 ppm (d, C(9a))
	42,93 ppm (t, C(15))	42,92 ppm (t, C(15))
	31,14 ppm (t, C(17))	31,63 ppm (t, C(19))
	29,42 ppm (t, C(9))	29,45 ppm (t, C(9))
	22,76 ppm (t, C(16))	29,02 ppm (t, C(17) oder C(18))
	22,40 ppm (t, C(18))	28,96 ppm (t, C(17) oder C(18))
	18,48 ppm (q, C(13))	23,12 ppm (t, C(16))
	17,74 ppm (q, C(10))	22,58 ppm (t, C(20))
	13,89 ppm (q, C(19))	18,49 ppm (q, C(13))
		17,73 ppm (q, C(10))
		14,08 ppm (q, C(21))

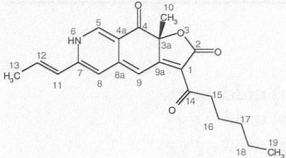
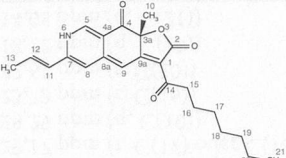
Tabelle 4

## Datensätze der orangen Pigmente Rubropunctatin und Monascorubrin

	<i>Rubropunctatin</i>	<i>Monascorubrin</i>
Struktur		
Smp.	156,5–157,0°C	142,5–143,0°C
UV/VIS max	444,6 nm, 283,6 nm 240,2 nm, 214,7 nm	444,5 nm, 283,5 nm 240,7 nm, 214,5 nm
MS	355,3 Da[M+H] <sup>+</sup> 377,2 Da[M+Na] <sup>+</sup> 393,2 Da[M+K] <sup>+</sup>	383,3 Da[M+H] <sup>+</sup> 405,3 Da[M+Na] <sup>+</sup> 421,2 Da[M+K] <sup>+</sup>
FT-IR (KBr)	3070 bis 2860 cm <sup>-1</sup> (w, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1752 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1724 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1654 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1633 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen) 1573 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)	3100 bis 2850 cm <sup>-1</sup> (w, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1752 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1725 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1655 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1633 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen) 1571 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> )	7,89 ppm (s, H-C(5)) 6,91 ppm (s, H-C(9)) 6,61 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,5 Hz, <sup>3</sup> J=7,0 Hz, H-C(12)) 6,16 ppm (s, H-C(8)) 6,06 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,5 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(11)) 2,95 ppm (m, H-C(15)) 1,97 ppm (dd, <sup>3</sup> J=7,0 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(13)) 1,73 ppm (s, H-C(10))	7,88 ppm (d, <sup>5</sup> J=0,7 Hz, H-C(5)) 6,90 ppm (d, <sup>5</sup> J=0,7 Hz, H-C(9)) 6,54 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,5 Hz, <sup>3</sup> J=7,0 Hz, H-C(12)) 6,16 ppm (s, H-C(8)) 6,06 ppm (dq, <sup>3</sup> J=15,5 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(11)) 2,95 ppm (m, H-C(15)) 1,97 ppm (dd, <sup>3</sup> J=7,0 Hz, <sup>4</sup> J=1,6 Hz, H-C(13)) 1,72 ppm (s, H-C(10))

	<i>Rubropunctatin</i>	<i>Monascorubrin</i>
	1,62 ppm (m, H-C(16))	1,62 ppm (m, H-C(16))
	1,34 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18))	1,30 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18) plus 2H-C(19) plus 2H-C(20))
	0,89 ppm (t, $^3J=6,0$ Hz, H-C(19))	0,89 ppm (t, $^3J=7,0$ Hz, H-C(21))
$^{13}\text{C}$ -NMR	197,45 ppm (s, C(14))	197,42 ppm (s, C(14))
	190,82 ppm (s, C(4))	190,78 ppm (s, C(4))
	171,66 ppm (s, C(9a))	171,61 ppm (s, C(9a))
	169,23 ppm (s, C(2))	169,20 ppm (s, C(2))
	156,41 ppm (s, C(7))	156,40 ppm (s, C(7))
	152,79 ppm (d, C(5))	152,75 ppm (d, C(5))
	141,62 ppm (s, C(8a))	141,56 ppm (s, C(8a))
	136,40 ppm (d, C(12))	136,34 ppm (d, C(12))
	122,37 ppm (d, C(11))	122,37 ppm (d, C(11))
	116,29 ppm (s, C(4a))	116,31 ppm (s, C(4a))
	113,23 ppm (s, C(1))	113,28 ppm (s, C(1))
	109,57 ppm (d, C(8))	109,55 ppm (d, C(8))
	104,18 ppm (d, C(9))	104,18 ppm (d, C(9))
	85,78 ppm (s, C(3a))	85,77 ppm (s, C(3a))
	41,61 ppm (t, C(15))	41,65 ppm (t, C(15))
	31,40 ppm (t, C(17))	31,72 ppm (t, C(19))
	28,32 ppm (q, C(10))	29,19 ppm (t, C(17) oder C(18))
	23,39 ppm (t, C(16))	29,17 ppm (t, C(17) oder C(18))
	18,76 ppm (q, C(13))	28,29 ppm (q, C(10))
	13,96 ppm (q, C(19))	23,72 ppm (t, C(16))
		22,62 ppm (t, C(20))
		18,72 ppm (q, C(13))
		14,08 ppm (q, C(21))

Tabelle 5  
Datensätze der roten Pigmente Rubropunctamin und Monascorubramin

	<i>Rubropunctamin</i>	<i>Monascorubramin</i>
Struktur		
Smp.	Zersetzung ab ca. 190 °C	Zersetzung ab ca. 190 °C
UV/VIS max	530,9 nm, 428,7 nm, 372,8 nm, 302,1 nm, 251,2 nm	530,6 nm, 428,7 nm, 372,8 nm, 302,1 nm, 251,2 nm
MS	354,3 Da [M+H] <sup>+</sup> 376,0 Da [M+Na] <sup>+</sup> 391,9 Da [M+K] <sup>+</sup>	382,1 Da [M+H] <sup>+</sup> 404,1 Da [M+Na] <sup>+</sup> 420,1 Da [M+K] <sup>+</sup>
FT-IR (KBr)	3200 bis 2850 cm <sup>-1</sup> (m, NH und CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1735 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1709 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1612 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1571 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)	3200 bis 2850 cm <sup>-1</sup> (m, NH und CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Valenz) 1738 cm <sup>-1</sup> (s, COO, C(2)) 1708 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(4)) 1613 cm <sup>-1</sup> (s, CO, C(14)) 1571 cm <sup>-1</sup> (s, Ringschwingungen)
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> )	12,72 ppm (s, H-N(6)) 9,32 ppm (s, H-C(5)) 7,05 ppm (dq, <sup>3</sup> J=16,0 Hz, <sup>3</sup> J=6,7 Hz, H-C(12)) 6,80 ppm (s, H-C(9)) 6,76 ppm (s, H-C(8)) 6,38 ppm (dq, <sup>3</sup> J=16,0 Hz, <sup>4</sup> J=1,5 Hz, H-C(11)) 2,89 ppm (m, H-C(15)) 2,07 ppm (dd, <sup>3</sup> J=6,7 Hz, <sup>4</sup> J=1,5 Hz, H-C(13)) 1,83 ppm (s, H-C(10))	12,69 ppm (d, <sup>3</sup> J=5,0 Hz, H-N(6)) 9,32 ppm (d, <sup>3</sup> J=5,0 Hz, H-C(5)) 7,05 ppm (dq, <sup>3</sup> J=16,0 Hz, <sup>3</sup> J=6,7 Hz, H-C(12)) 6,80 ppm (s, H-C(9)) 6,76 ppm (s, H-C(8)) 6,38 ppm (dq, <sup>3</sup> J=16,0 Hz, <sup>4</sup> J=1,2 Hz, H-C(11)) 2,89 ppm (m, H-C(15)) 2,07 ppm (dd, <sup>3</sup> J=6,7 Hz, <sup>4</sup> J=1,2 Hz, H-C(13)) 1,83 ppm (s, H-C(10))

	<i>Rubropunctamin</i>	<i>Monascorubramin</i>
<sup>13</sup> C-NMR	1,68 ppm (m, H-C(16))	1,67 ppm (m, H-C(16))
	1,38 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18))	1,32 ppm (m, 2H-C(17) plus 2H-C(18) plus 2H-C(19) plus 2H-C(20))
	0,92 ppm (t, <sup>3</sup> J=6,5 Hz, H-C(19))	0,87 ppm (t, <sup>3</sup> J=6,6 Hz, H-C(19))
	196,60 ppm (s, C(14))	196,56 ppm (s, C(14))
	195,38 ppm (s, C(4))	195,36 ppm (s, C(4))
	174,40 ppm (s, C(2))	174,39 ppm (s, C(2))
	172,99 ppm (s, C(9a))	172,02 ppm (s, C(9a))
	153,72 ppm (s, C(8a))	153,69 ppm (s, C(8a))
	147,39 ppm (s, C(7))	147,35 ppm (s, C(7))
	140,90 ppm (d, C(5))	140,88 ppm (d, C(5))
	138,11 ppm (d, C(12))	138,09 ppm (d, C(12))
	123,35 ppm (d, C(11))	123,32 ppm (d, C(11))
	117,49 ppm (s, C(4a))	117,47 ppm (s, C(4a))
	116,11 ppm (d, C(8))	116,07 ppm (d, C(8))
	101,06 ppm (s, C(1))	101,14 ppm (s, C(1))
	98,66 ppm (d, C(9))	98,64 ppm (d, C(9))
	86,82 ppm (s, C(3a))	86,82 ppm (s, C(3a))
	40,60 ppm (t, C(15))	40,69 ppm (t, C(15))
	31,89 ppm (t, C(17))	31,81 ppm (t, C(19))
	29,58 ppm (q, C(10))	29,67 ppm (t, C(17))
24,54 ppm (t, C(16))	29,59 ppm (q, C(10))	
22,53 ppm (t, C(18))	29,20 ppm (t, C(18))	
19,19 ppm (q, C(13))	24,83 ppm (t, C(16))	
14,04 ppm (q, C(21))	22,65 ppm (t, C(20))	
	19,18 ppm (q, C(13))	
	14,11 ppm (q, C(21))	



## Diskussion

Die sechs Hauptpigmente von *Monascus purpureus* wurden in hoher Reinheit und in Hundertmilligramm Mengen hergestellt und isoliert. Damit stehen erstmals alle sechs Referenzsubstanzen für die Überprüfung und Analyse von mit Rotschimmelreis eingefärbten Produkten zur Verfügung. Als bevorzugte Analysenmethode bietet sich die HPLC an, wie sie von Wild (4) und Teng et al. (8) beschrieben wurden.

In einer früheren Arbeit versuchten wir die sechs Farbpigmente aus käuflichem «Rotem Reismehl» zu gewinnen (9). Es hatte sich aber gezeigt, dass aus diesem Reismehl praktisch nur die beiden gelben Pigmente in isolierbaren Mengen gewonnen werden konnten. In einigen Reis-Extrakten konnten wir in der HPLC-Analyse die orangen Pigmente in Spuren nachweisen, die roten hingegen nie. Daher suchten wir nach einer Methode, die es erlauben würde alle sechs Pigmente in Milligramm-Mengen zu isolieren. Erste Fermentationsversuche von *Monascus purpureus* zeigten die bevorzugte Bildung der gelben und orangen Pigmente. Nach diesen erfolgversprechenden ersten Resultaten versuchten wir als erstes die Fermentation des Pilzes auf einer Reiskultur, was nicht zum Ziel führte. Wir entschieden uns daher *Monascus purpureus* in Submerskulturen zu züchten. Reproduzierbare Resultate erzielten wir schliesslich bei einem zweistufigen Verfahren. In einem ersten Schritt wurde das Pilz-Wachstum von *Monascus purpureus* in einem N-freien Medium gefördert. In einem nachfolgenden zweiten Schritt in einem N-armen Medium erhielten wir eine gute Pigmentproduktion der gelben und orangen Farbstoffe. Die Fermentation in einem N-reichen Medium führte zu einer Abnahme der orangen Pigmente und zur Bildung von schwerisolierbaren roten Farbstoffen. Nach der Fermentation wurde das Pilzmaterial durch Filtration von der Kulturbrühe abgetrennt. In der Kulturbrühe selbst wurden nur sehr geringe Mengen an Pigmenten nachgewiesen und sie wurde aus diesem Grund verworfen. Der feste Pilzrückstand wurde bei 40 °C im Vakuum getrocknet und anschliessend im Mörser zerkleinert.

Mit dem Submersverfahren erzielten wir reproduzierbare Resultate sowohl was die Mengenverhältnisse der Fermentation betrifft, als auch bezüglich der Zusammensetzung der Pigmente. Allerdings zeigte sich, dass das Mischverhältnis der gelben und orangen Farbstoffe unausgewogen war. Nach Soxhlet-Extraktion des Fermentationsrückstandes wurde das Pigmentgemisch aus gelben und orangen Farbstoffen auf einer Uptisphere C18-NEC präparativen HPLC-Säule getrennt. Als Fliessmittel erwies sich Acetonitril/Wasser/80/20 als ideal, da nach der Trennung das Acetonitril abgedampft werden kann und die Farbpigmente im Wasser ausfallen.

Die roten Farbpigmente konnten nicht direkt aus dem Fermentationsrückstand isoliert werden und wurden durch Umsetzung der beiden orangen Farbpigmente mit wässrigem Ammoniak erhalten. Hierzu wurde das gelb-orange Pigmentgemisch mit wässrigem Ammoniak umgesetzt und anschliessend die roten Farbpigmente mittels präparativer HPLC von den gelben abgetrennt. Gute Trennung der roten und gelben Pigmente erhielten wir durch Zusatz von 0,05 Vol% Trifluoressigsäure zum Fliessmittel.

Alle sechs Farbpigmente wurden mit dieser Methode rein und in kristalliner Form in Hundertmilligramm-Mengen gewonnen. Hierbei lieferten 25 g getrocknetes Pilzmaterial je 750 mg der beiden orangen Farbpigmente Rubropunctatin 3 und Monascorubrin 4 sowie 500 mg Monascin 1 und 100 mg Ankaflavin 2 (gelbe Farbpigmente). Alle sechs Hauptpigmente von *Monascus purpureus* wurden nach deren Isolierung mittels HPLC und DC auf deren Reinheit überprüft, mit ESI-MS massenspektrometrisch nachgewiesen, sowie ein UV/VIS Spektrum aufgenommen. Die Strukturzuordnung aller sechs Pigmente wurde mit Hilfe von  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR und Schmelzpunktbestimmungen überprüft. Die korrekte Signal-Zuweisung in den NMR-Spektren erreichten wir mit COSY-, HETCOR- und HMBC-NMR Messungen.

Je nach Hersteller ist der Farbstoffgehalt von Rotschimmelreismehl unterschiedlich (4). Wir haben festgestellt, dass in einigen Rotschimmelreisproben gewisse Pigmente, vor allem die orangen und roten, nicht gefunden wurden. Fermentationsversuche in Nährmedien mit ausgewogenen N-Quellen, lieferten beispielsweise auch praktisch keine orangen Pigmente. Also müssen bei unerlaubter Färbung von Lebensmitteln mit Rotschimmelreis nicht zwangsläufig alle sechs Pigmente nachweisbar sein. Umso wesentlicher ist es, alle sechs Leitpigmente in reiner Form als Referenzmaterial für die Lebensmittelüberprüfung zur Hand zu haben.

## Dank

Wir danken der Berner Fachhochschule und deren Forschungskommission für die grosszügige Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Gewinnung der sechs Hauptpigmente von *Monascus purpureus* (gelb: Monascin 1 und Ankaflavin 2; orange: Rubropunctatin 3 und Monascorubrin 4; rot: Rubropunctamin 5 und Monascorubramin 6) in Milligrammmengen und in kristalliner Form beschrieben. Die Produktion erfolgte durch Fermentation in zwei Schritten, wobei im ersten Schritt das Wachstum des Pilzes im Vordergrund stand, beim zweiten die maximale Pigmentproduktion gewünscht war. Zur Gewinnung der beiden gelben und orangen Pigmente wurde eine Soxhlet Extraktion des getrockneten Pilzrückstandes mit Petrolether durchgeführt. Dieses Pigmentgemisch wurde mit präparativer HPLC getrennt und die reinen gelben bzw. orangen Pigmente konnten isoliert werden. Die Gewinnung der roten Pigmente erfolgte ebenfalls aus dem rohen Pigmentgemisch. Hierbei wurde der getrocknete Pilzrückstand nach der zweistufigen Fermentation mit wässriger Ammoniaklösung umgesetzt. Präparative HPLC-Trennung lieferte die roten Pigmente in Reinform und als Kristalle. Alle sechs Pigmente wurden in Hundertmilligramm-Mengen erhalten und vollständig charakterisiert.

## Résumé

Ce travail présente une méthode pour isoler et obtenir les six pigments principaux de *Monascus purpureus* (jaune: monascine 1 et ankaflavine 2; orange: rubropunctatine 3 et monascorubrine 4; rouge: rubropunctamine 5 et monascorubramine 6) en quantité milligrammique et sous forme cristalline. La production se déroule à partir d'une fermentation en deux étapes où dans la première, la croissance du champignon est privilégiée tandis que dans la seconde la production maximale de pigment est recherchée. Pour l'obtention des pigments jaunes et oranges, on a procédé à une extraction Soxhlett avec de l'éther de pétrole sur des résidus de champignons séchés. Le mélange de pigments ainsi obtenu a ensuite été séparé par chromatographie préparative HPLC et les pigments purs jaunes et oranges ont pu être isolés. L'obtention des pigments rouges a été effectuée également à partir d'un mélange de pigment préalablement soumis à l'action d'une solution ammoniacale. La séparation successive par chromatographie préparative HPLC a permis d'obtenir les pigments rouges avec une grande pureté et sous forme cristalline.

## Summary "Production and isolation of the pigments from *Monascus purpureus* as pure crystals in quantities of several milligrams"

This work presents a method for the isolation of the six major pigments from *Monascus purpureus* (yellow: Monascin 1 and Ankaflavin 2; orange: Rubropunctatin 3 and Monascorubrin 4; red: Rubropunctamin 5 and Monascorubramin 6) in quantities of several milligrams and as pure crystals. *Monascus purpureus* was cultivated with submerged methods. First, *Monascus purpureus* was grown in an inoculum medium in shake flasks for one week. In the second step the maximized production of pigments was favoured and the inoculum medium was transferred into a 5 l fermenter. The culture was incubated for 3 weeks. After filtration, the fungal mycelium was dried, and then extracted with petroleum ether in a Soxhlet apparatus. In this way a mixture of the yellow and orange pigments was obtained. This mixture was separated by preparative HPLC and the pure yellow and orange pigments were gained. To get the red pigments a mixture of the yellow and orange pigments was reacted with aqueous ammonium hydroxide solution and the reaction mixture then separated by preparative HPLC to give the pure red pigments as red needles.

## Key words

Red Yeast Rice, *Monascus*, Pigments, Food Colorants, Analytical Standard

## Literatur

- 1 Salomon H. und Karrer R.: Ein Farbstoff aus «rotem» Reis, Monascin. *Helv. Chim. Acta* 15, 18–22 (1932)
- 2 Vösgen W.: Verwendung von fermentiertem Reis in Fleischprodukten. *Fleischwirtschaft* 77, 32–34 (1997)
- 3 *Marnzen*: Pharmaceuticals ltd. Hiroshima, Japan (1994)
- 4 Wild D.: Rotschimmelreis (Angkak). *Fleischwirtschaft* 80, 91–93 (2000)

- 5 Jahresbericht des Kantonalen Laboratoriums Zürich 2001, Seite 27
- 6 *Juzlova P., Martinkova L. and Kren V.*: Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 163–170 (1996)
- 7 *St. Martin E.J.*: Method for direct production of crystalline pigments from *Monascus* during fermentation. European patent application. Publication number 0 455 900 A1 (1991)
- 8 *Teng S.S. and Feldheim W.*: Analysis of Anka Pigments by Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia* **47**, 529–536 (1998)
- 9 *Bieri P.*: Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Farbstoffe in Rotschimmelreis sowie Isolierung und Strukturnachweis der beiden gelben Farbstoffe Monascin und Ankaflavin, Diplomarbeit, HTI-Burgdorf, 2004

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Franz Baumberger, Berner Fachhochschule,  
Pestalozzistrasse 20, 3400 Burgdorf, E-Mail: [franz.baumberger@bfh.ch](mailto:franz.baumberger@bfh.ch)