

紅麴色素中Rubropunctatin及Monascorubrin之 薄層層析—光密度定量法

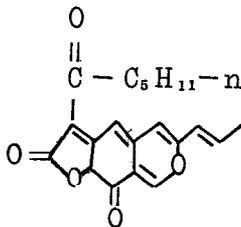
理學院 化學研究所

李宏瑛 陳鏡潭 許順吉

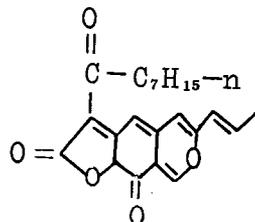
前 言

各國核准使用之食用合成色素有二十多種，近年檢討其慢性毒性，發現其中若干具有致癌性，已有不少被禁止使用。因此安全的天然食用色素之研究開發頗受各界之注目。紅麴菌 (*Monascus anka*) 除用於釀造紅露酒外，其產生之色素在國內及東南亞各國用為食品著色劑，已有悠久之歷史。由於紅麴色素之安全性和優良的著色效果，促使國內以及日本最近研究發展工業生產¹⁾此色素之可行性。顯然紅麴色素之增產研究對食品醫藥品等工業上頗具經濟價值。

紅麴色素之成分研究，始於1932年²⁾，此後經過多人的研究^{3~13)}已知其中包括黃色色素二種：Monascin^{8~12)}和 Ankaflavin¹³⁾，以及紅色色素二種：Rubropunctatin^{14~15)}和 Monascorubrin^{16~18)}。上述兩種紅色色素分別與氨或胺作用可轉變為紫色色素Rubropunctamine和 Monascorubramine^{14, 18)}。關於紅麴色素之分離檢驗，已有柱層層析^{9, 10, 18, 19)}及薄層層析^{9, 10, 13, 20)}之報告，但至今尚無此類色素之定量研究。要推出具有工業價值之紅麴色素，其產品之規格及品質管制上需要迅速、準確之定量法。本研究的目的係利用薄層層析光密度定量法 (TLC-Densitometry) 建立紅麴色素中之主要成分Rubropunctatin及 Monascorubrin之定量法，以配合此色素之工業生產²¹⁾。



Rubropunctatin



Monascorubrin

實驗部分

1 儀器：

- (1) Simadzu Dual wavelength Thin Layer chromatograph Scanner, Model CS-900.
- (2) Waters Associates Model ALC 200 Liquid chromatograph.
- (3) JEOL FX 100 FT NMR Spectrometer.

2 材料及藥品：

- (1) 紅麴菌：培養六天之 *Monascus anka* v-204 *
- (2) 標準品 (Rubropunctatin 及 Monascorubrin)：

由 *Monascin anka* wild 萃取而得之粗紅色色素 ** (已知包括 Rubropunctatin 及 Monascorubrin)，經薄層層析法 (TLC) 及高速液體層析法 (HPLC) 予以分離精製 (HPLC 法另報告)。TLC 條件：吸附劑——Silica gel F254 (E. Merck)；展開溶劑—— $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (30:1:70) (上層液)。HPLC 條件：管柱——Porasil 75-125 μ ，7.8 mm I.D. X (2) 61 cm；管柱壓力——1000 psi；流速——4.0 ml/min；偵測器——UV 偵測器 254nm。所得之純色素以 UV, IR 及 NMR (包括 PMR 及 CMR) 予以鑑定。

3. 檢品溶液及標準溶液之調製：

檢品溶液：稱取紅麴絲粉 (0.5009 克) 置入均化器 (Potter Elvehjem Homogenizer)，加入 3 ml 的 *n*-hexane 及少量 Pyrex 玻璃粉 (120 mesh) 研磨。研磨後移到 Soxhlet 萃取器連續萃取 4 小時，將萃取液濃縮得粗黃色色素。殘留於圓筒濾紙內的紅麴，繼以氯仿萃取 6 小時，將萃取液濃縮得粗紅色色素，加入氯仿配成溶液 50ml。

標準溶液：稱取 Rubropunctatin 5.0 mg 及 Monascorubrin 3.7 mg，各別溶於氯仿配成 10ml。

4. 薄層層析：

將 TLC 板 (Silica gel F254，厚度 0.25mm，20×20 cm) 放入烘箱 (100°C) 15 分鐘後取出，於板上點加標準溶液 5 點及檢品溶液 1 點。第 1 點到第 4 點及第 6 點，分別點加 Rubropunctatin 標準溶液 10, 20, 30, 40 及 10 μ l Monascorubrin 標準溶液 5, 10, 15, 20 及 5 μ l。第 5 點，點加檢品溶液 20 μ l

* 台灣大學農化系蘇遠志教授提供

** 台灣大學化學系陳發清教授提供

先以溶劑系 I : $\text{CH}_3\text{CN} / \text{C}_6\text{H}_6 / n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (15:85:70) 展開 1 小時, 取出讓其自然發揮發乾。繼以溶劑系 II : $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O} / n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (30:1:70) (上層液) 展開至溶劑前距板的上緣 1 cm 處, 而後打開玻璃蓋一細長小縫繼續展開 12 小時。展開後將 T L C 板置入乾燥器內以真空抽氣機抽乾。

5. T L C 掃描

以 T L C 掃描儀掃描積分。測定條件為: λ_s 475 nm, λ_R —630 nm; 光束—1.25 mm × 1.50 mm; 檢知器—反射測定; 記錄器—profile sensitivity × 1; 掃描速度—10mm/min.

掃描後所得之第 1 點至第 4 點各點之積分值分別除以第 6 點之積分值, 所得積分值比對標準品之量 (μg) 作圖, 可得標準校準曲線。第 5 點檢品積分值除以第 6 點積分值, 所得積分值比對應校準曲線即可定量。

結果及討論

標準品的鑑定 (14, 16):

Rubropunctatin 和 Monascorubrin 的紫外線光譜及紅外線光譜幾乎完全相同。其吸收最大值 (λ_{\max}) 均為 443 nm. IR (KBr) cm^{-1} : 1755 為 α, β -不飽和五環內酯之 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動; 1936 及 1577 為共軛雙鍵之伸縮振動。

Rubropunctatin 之 PMR (CDCl_3) δ 值: 7.87 (1H, s); 6.89 (1H, s); 6.49 (1H, m); 6.15 (1H, d); 5.16 (1H, s); 2.90 (2H, t) 1.95 (3H, d); 1.71 (3H, s); 1.62 (2H, s); 1.26 (4H, m); 0.88 (3H, t)。

Monascorubrin 之 PMR (CDCl_3) δ 值: 7.87 (1H, s); 6.89 (1H, s); 6.49 (1H, m); 6.15 (1H, d); 5.16 (1H, s); 2.90 (2H, t); 1.95 (3H, d); 1.71 (3H, s); 1.58 (2H, s); 1.26 (8H, s, broad); 0.88 (3H, t)。

對照兩者之 PMR 光譜, 可知除 δ 1.26 之吸收峯恰相差 4 個 H (Monascorubrin 較 Rubropunctatin 多 4 個 H) 外, 其餘圖形均幾乎相同。爲了進一步鑑別, 在 CDCl_3 溶液中測定 Rubropunctatin 之 CMR 光譜如圖 1。其中 77.45, 76.17 及 74.89 ppm 三信號爲 CDCl_3 。其餘吸收峯分別爲: 196.65 ($\text{C}=\text{O}$); 190.06 ($\text{C}=\text{O}$); 170.90 ($\text{C}=\text{O}$); 168.46 ($>\text{C}=\text{C}$); 155.70 ($>\text{C}=\text{C}$); 152.04 ($-\text{CH}=\text{C}$); 140.87 ($>\text{C}=\text{C}$); 135.56 ($-\text{CH}=\text{C}$); 121.58 ($-\text{CH}=\text{C}$); 115.48 ($>\text{C}=\text{C}$); 108.70 ($-\text{CH}=\text{C}$); 103.33 ($-\text{CH}=\text{C}$); 84.90 ($>\text{C}=\text{C}$); 28.69 ($-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$); 及 7 支信號 40.59, 30.46, 27.34, 22.40, 21.55, 17.70, 12.94 各爲 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_3$ 。以上共有 21 支信號與 Rubropunctatin 的分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ 中有 21 個 C 相符合, 故鑑定爲

Rubropunctatin。除上述信號外，另有三支 noise，因此光譜(圖 1)為掃描一萬次時之圖譜，當掃描到七千次時，其他信號高度相對減低，只此三支信號不出現，故判斷其為 noise。

薄層層析—光密度定量法：

已有若干報告記載紅麴色素之薄層層析，或用為成分之分離製備¹³⁾[Silica gel, 展開溶劑： $(C_2H_5)_2O/C_6H_6$ (25:70)]，或用於成分之檢驗²⁰⁾[Silica gel, 展開溶劑： $C_6H_6/CH_3OH/CHCl_3$ (30:10:9)]。惟其分離效果尚未能應用於光密度定量法(Densitometry)。因 Rubropunctatin 與 Monascorubrin 之構造極為相似，僅有的差別只在側鏈中 Monascorubrin 比 Rubropunctatin 多 $-C_2H_4$ ，二者之分離相當難。本研究在傳統的 T L C 程序中做若干的修飾，獲得良好的分離效果。當 T L C 板以溶劑系 I： $CH_3CN/C_6H_6/n-C_6H_{14}$ (15:85:70)展開後，檢品中各成分之 R_f 為 0.00 (痕量之未知成分)，0.16 (Rubropunctatin) 及 0.19 (Monascorubrin)。繼著以溶劑系 II： $CH_3COOH/H_2O/n-C_6H_{14}$ (30:1:70) (上層液)展開。先在密閉系展開至溶劑前端距 T L C 板上緣 1 cm 處，然後打開蓋子留一細長小縫繼續展開。這展開方式原理上可視為 continuous flow chromatography²²⁾ 的一種。痕跡量的未知成分仍在原點($R_f 0.00$)，但 Rubropunctatin 與 Monascorubrin 二 spots 的中心距離已相離了 3 cm，足夠滿足 T L C—光密度定量法之嚴格要求。

Rubropunctatin 和 Monascorubrin 之 T L C 掃描圖，示於圖 2 及圖 3。兩者標準液和檢品液積分值如表 1 及表 2，由此繪校準線圖如圖 4，圖 5 及圖 6。二種紅色色素成分各以 T L C—光密度定量法測定三次，得每一克紅麴菌絲內有 Rubropunctatin 37.7 ± 0.9 mg，Monascorubrin 39.5 ± 1.2 mg。

薄層層析—光密度定量法中，樣品成分以薄層層析展開分離後，各成分之 spot 宜圓而均勻，以 T L C 掃描儀掃描時才能得到對稱的掃描圖。各成分之 spot 應相離足夠的距離(中心距離相距 3 cm 以上)，掃描積分時才不致重疊。薄層層析—光密度定量法為一快捷，操作簡便，再現性良好的定量方法。紅麴色素成份之含量利用此法可迅速確實地定量出來，適合於工業上大量生產時之規格與品質檢定。

表 1 Rubropunctatin 標準液及檢品液之積分值

spots	1	2	3	4	5	6
	標準液	標準液	標準液	標準液	檢品液	內標準
$\mu\ell$	10.0	20.0	30.0	40.0	20.0	10.0
μg	5.0	10.0	15.0	20.0	x	5.0
Run 1	23.9	58.3	84.0	115.2	42.7	22.1
積分值 Run 2	22.0	55.5	77.9	108.3	42.5	21.7
Run 3	24.0	58.0	84.0	116.0	43.5	22.0
積分值比 Run 1	1.08	2.64	3.80	5.21	1.93	1.00
Rubro- punctatin I.S. Run 2	1.01	2.56	3.59	4.99	1.96	1.00
Run 3	1.09	2.64	3.82	5.27	1.98	1.00

表 2 Monascorubrin 標準液及檢品液之積分值

spots	1	2	3	4	5	6
	標準液	標準液	標準液	標準液	檢品液	內標準
$\mu\ell$	5.0	10.0	15.0	20.0	20.0	5.0
μg	1.85	3.70	5.55	7.40	x	1.85
Run 1	6.4	12.3	17.7	24.0	27.0	6.6
積分值 Run 2	7.2	13.6	19.5	25.7	14.0	6.5
Run 3	8.5	15.5	21.5	26.5	7.5	7.0
積分值比 Run 1	0.97	1.86	2.68	3.64	4.09	1.00
Monasco- rubrin I.S. Run 2	1.11	2.09	3.00	3.95	2.15	1.00
Run 3	1.21	2.21	3.07	3.79	1.07	1.00

圖 1: ^{13}C NMR spectrum of rubropunctatin

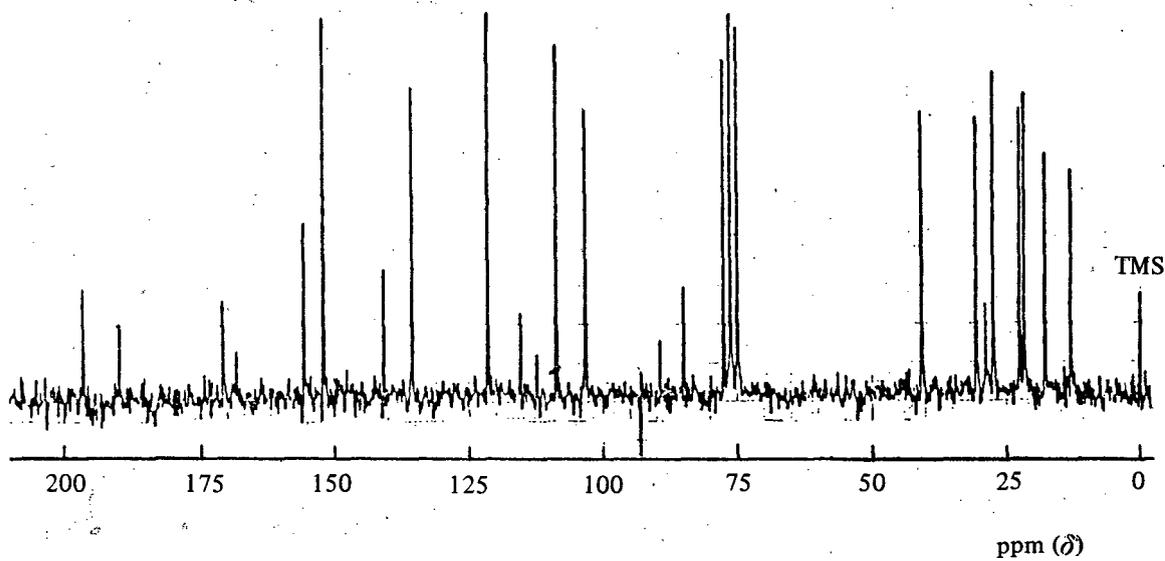
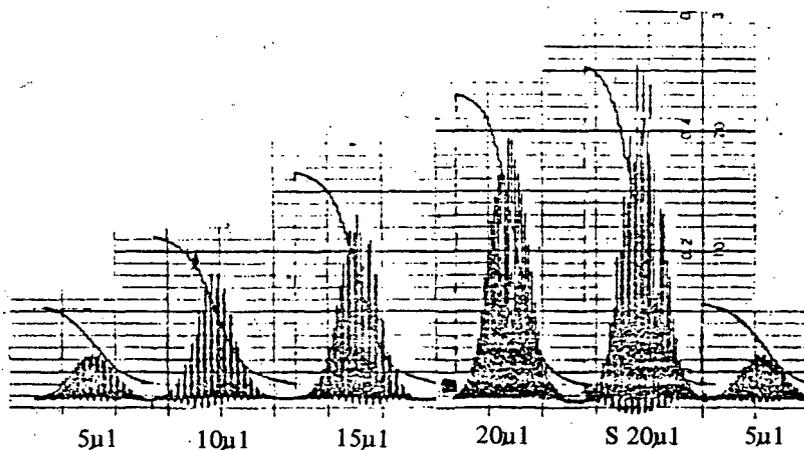


圖 2 Densitometric chart: Determination of monascorubrin in anka pigments



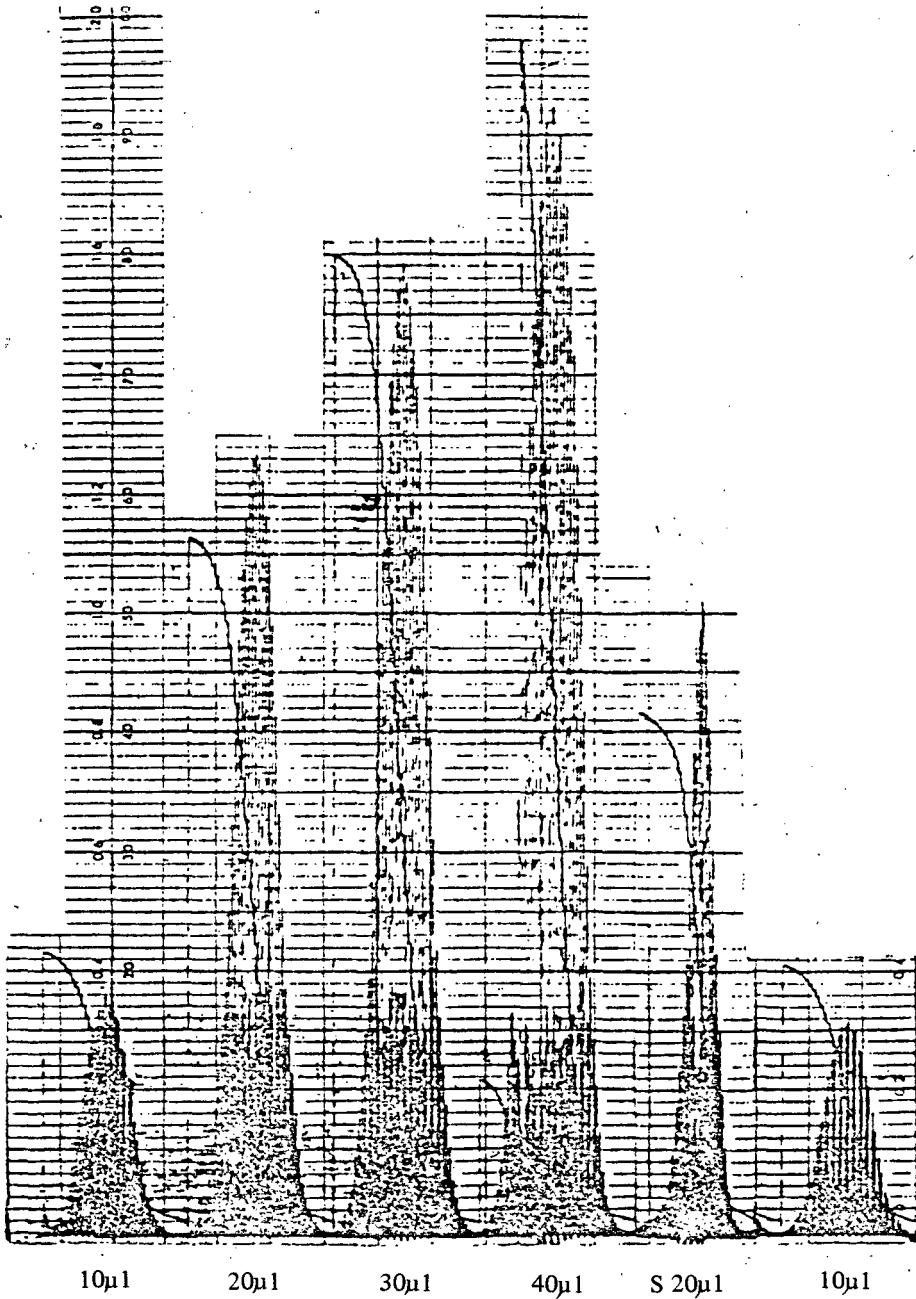


圖 3 Densitometric chart: Determination of rubropunctatin in anka pigments

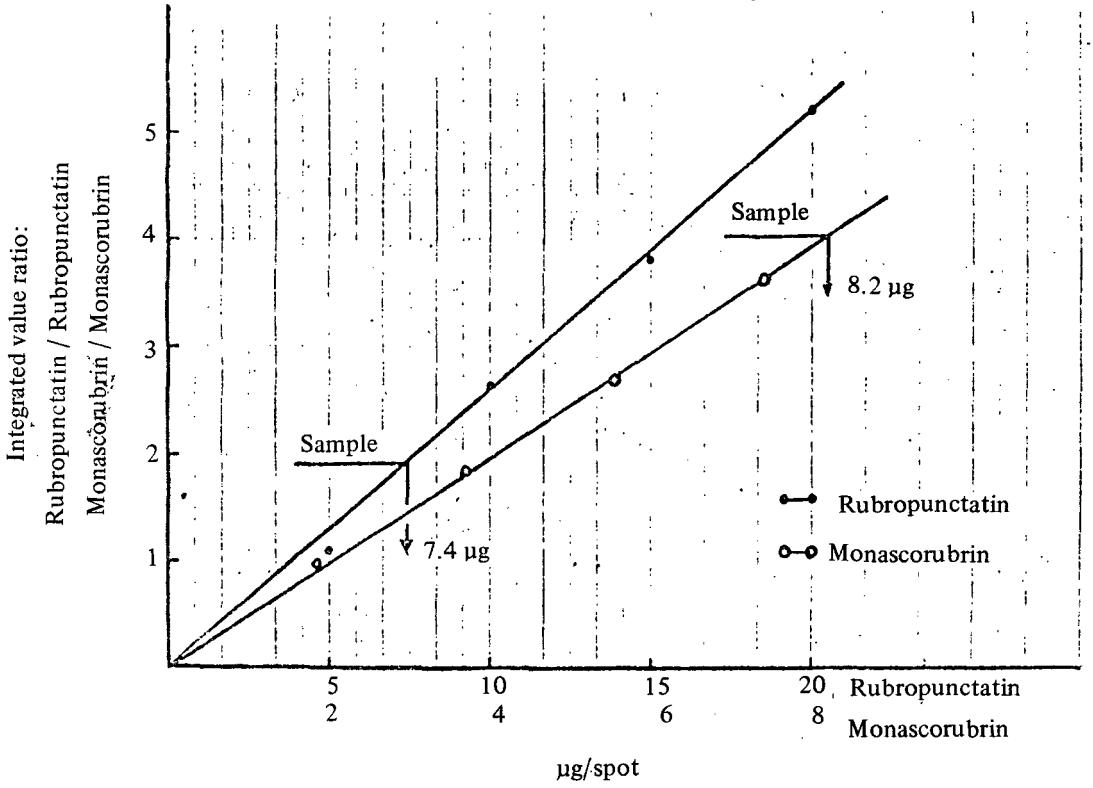


圖 4 Calibration curve of rubropunctatin and monascorubrin (1)

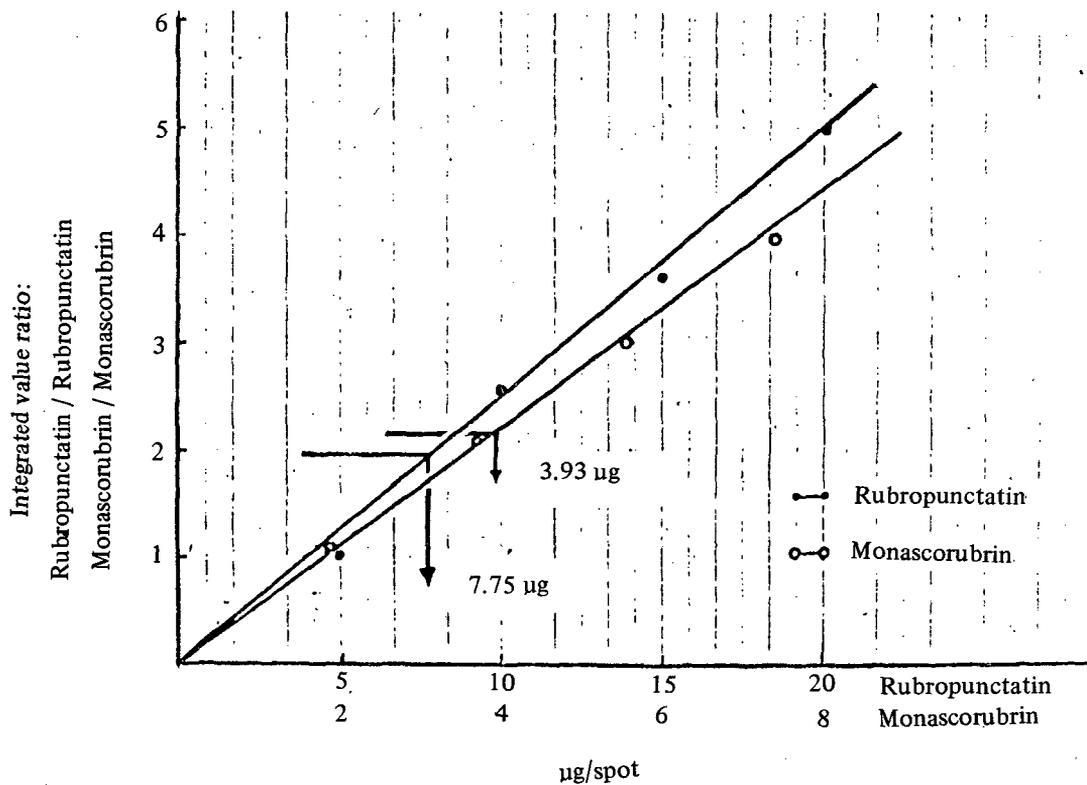


圖 5 Calibration curve of rubropunctatin and monascorubrin (2)

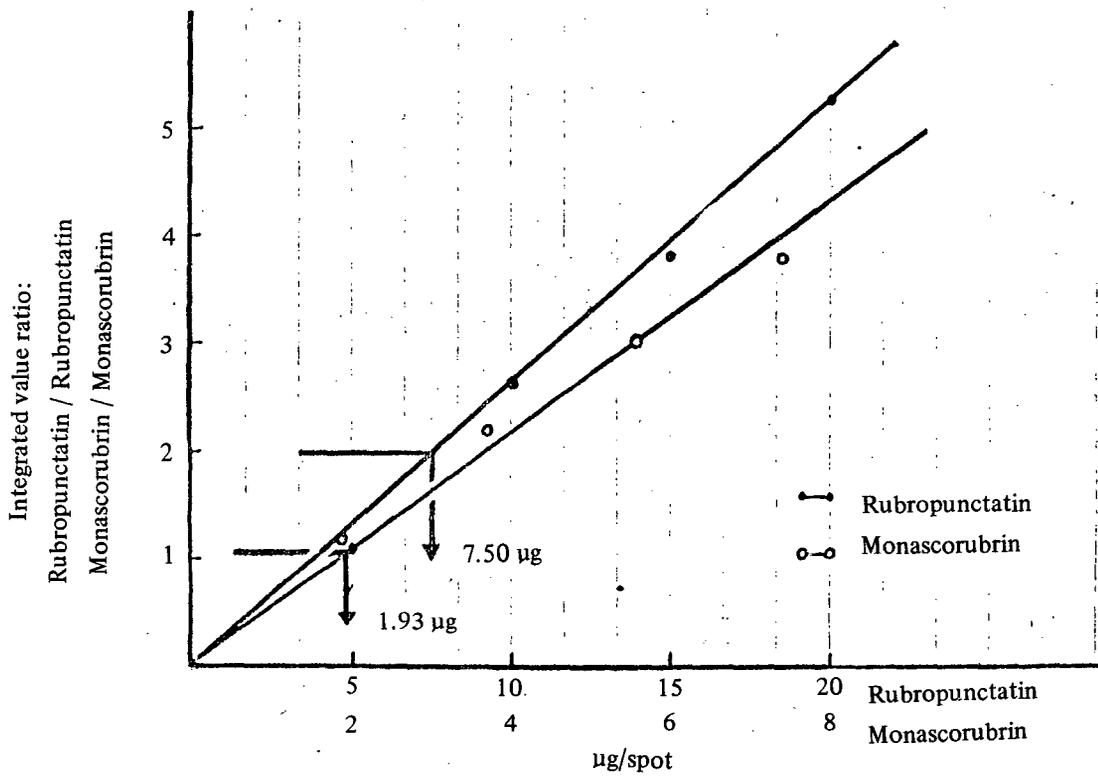


圖 6 Calibration curve of rubropunctatin and monascorubrin (3)

謝 辭

筆者感謝必安研究所陳玉盤所長准予借用T L C Scanner 並惠予指導儀器之使用。台灣大學化學系陳發清教授惠贈紅麴色素；台灣大學農化系蘇遠志教授惠賜 *Monascus anka* V-204 試樣，特申謝忱。

參考文獻

- (1)尾上旦，片山誠：食品工業，8(下)，52(1977)。
- (2)西川英次郎：日本農藝化學會誌，2，688(1926)。
- (3)H.Saloman, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, 15, 18, (1932)。
- (4)西川英次郎：日本農藝化學會誌，8，1007(1932)。
- (5)E.Nishikawa, Bull. Agr. Chem, Soc., Japan 8, 78-9(1932)。
- (6)E.Nishikawa, J. Agr. Chem. Soc., Japan 8, 1007-15(1933)。
- (7)P.Karrer, A. Geiger, Helv. Chim. Acta, 24, 289, (1941)。
- (8)B.C.Fielding, J.S.E. Holker, D.F. Jones, A.D.G. Powell, K.W. Richmond, A. Robertson, W.B. Whalley, J. Chem. Soc., 4579, (1961)。
- (9)F.C. Chen, P. S. Monchard, and W.B. Whalley, Chem. Comm. 131, (1969)。
- (10)F.C. Chen, P.S. Manchard, and W.B. Whalley, J. Chem. Soc. (C), 3577, (1971)。
- (11)A.J. Birch et al., J. Chem. Soc., 3583, (1962)。
- (12)Y. Inouye et al., Tetrahedron, 18, 1195, (1962)。
- (13)P.S. Manchard, W.B. Whalley and F. C. Chen, Phytochem., 12, 2531(1973)。
- (14)E.J. Haws, J.S.E. Holker, A. Kelly, A.D.G. Powell, and A. Robertson, J. Chem. Soc., 3598, (1959)。
- (15)E. J. Haws and J.S.E. Holker, J. Chem. Soc., 3820, (1961)。
- (16)B.C. Fielding et al., Tetrahedron letters, No. 5, 24, (1960)。
- (17)K. Nakanishi et al., J. Am. Chem. Soc., 81, 6339(1959)。
- (18)K. Kumasaki et al., Tetrahedron, 18, 1171, 1185, 1195, (1962)。
- (19)J.R. Hadfield, J. S. E. Holker, and D.N. Stanway, J. Chem. Soc. (C), 751(1967)。
- (20)Hin-Chung and Yun-Shen Bau, Plant Physiol. 60, 578(1977)

- (2) Y.C.Su, Proceedings of USA-ROC Joint Symposium on Fermentation Engineering (1978).
- (2) James M. Bobbitt, "Thin-Layer Chromatography", Eurasia Book Co., p.79 (1963).

Determination of Rubropunctatin and Monascorubrin in Anka Pigments by TLC-Densitometry

Hong-Jue Lee, Shuenn-Jyi Sheu and Ching-Tan Chen

Abstract

Method has been developed for the determination of Rubropunctatin and Monascorubrin in *Monascus Anka* by thin layer chromatography-densitometry. Measurement was carried out at following conditions: TLC plate — Merck silica gel F 254; Mobile phase — (1) $\text{CH}_3\text{CN} / \text{C}_6\text{H}_6$ n- C_6H_{14} (15:85:70), (2) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{n-C}_6\text{H}_{14}$ (30:1:70) (upper phase); Densitometry — λ_s : 375 nm, λ_R : 600 nm; Mode — Zigzag scanning in reflection mode. The pigment contents found in one gram of the anka cells were 37.7 3 0.9 mg for Rubropunctatin and 39.5 3 1.2 mg for Monascorubrin.