

Injection: 2 μ L

MS 条件; キャピラリー電圧: 3.9 kV (pos.), 2.5 kV (neg.), コーン電圧: 30 V (pos. neg.), ソース温度: 120°C, 脱溶媒温度 450°C, 脱溶媒ガス流量: 800 L/hr, コーンガス: 50 L/hr, MS 検出器: ESI-MS (resolution mode), スキャン範囲: m/z 50-1000

3-2) チコリ色素の指標成分(化合物 1 及び 2)の単離

チコリ色素製品 5.07056 g を少量の H_2O に溶解したものを HP-20 を担体としたオープンカラムに付し, 0% MeOH, 10% MeOH, 30% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH の順に各 200 mL ずつ溶出させて分画した. 得られた画分について TLC 及び LC/MS により, 成分組成を確認した後, 減圧乾燥し, Fr. a 3.0810 g, Fr. b 0.69277 g, Fr. c 0.46711 g, Fr. d 0.50340 g, Fr. e 0.22250 g を得た.

TLC でスポットが確認された Fr. d 中の成分の単離・精製には, Fr. d 0.50340 g をできるだけ少量の 70%MeOH に溶解し, ODS-A を担体としたオープンカラムに付し, 0.1%HCOOH : MeOH=95 : 5 で溶出させた. 得られた画分の組成を LC/MS で確認した後, 減圧下乾燥し, Fr. f (nonspot) 0.0751 g, Fr. g (spot) 0.03568 g (ピーク 1 に相当する化合物 1)を得た. 次に, Fr. g をできるだけ少量の 70%MeOH に溶解し, 再度, ODS-A を担体としたオープンカラムに付し, 0.1%HCOOH : MeOH=95 : 5 で溶出させ, 得られた画分の組成を TLC 及び LC/MS で確認し, 減圧下乾燥し, Fr. h (nonspot) 0.01590 g, Fr. g (spot) 0.01712 g を得た.

また, Fr. b と Fr. c を下記の条件の分取 HPLC に付し, ピーク 2 に相当する化合物 2 を単離した.

分取 HPLC 条件;

LC/MS 条件; カラム: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (10×50 mm, nacalai tesque), 移動相: CH₃CN : 0.1%HCOOH=3 : 97, 流速: 4 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 500 μ L, PDA 検出器: 190~600 nm, 260 nm

3-3) 化合物 1 及び 2 の構造解析

単離した化合物 1 及び 2 をそれぞれ D_2O に溶解し NMR 測定を行い, 得られた結果と 3-1) LC/TOF-MS 精密質量分析の結果より構造解析した.

3-4) チコリ酸の LC/MS 測定

チコリ色素製品を 10% MeOH に溶解し 10 mg/mL に調製したもの, チコリ酸市販試薬を MeOH に溶解し 1 mg/mL に調整したものを LC/MS に付した.

3-5) チコリ酸のアルカリ加水分解

チコリ約 20 mg に 1M NaOH を加え, 40°C で超音波処理下, 1 時間アルカリ加水分解した後, 反応液に 1M HCl を加えて中和した. 中和した反応液を 10 mg/mL に調製し, LC/MS に付し, 反応生成物(カフェ酸)を確認した. 試料溶解溶媒として H_2O を用い, チコリ 9.27 mg を 10 mg/mL に調製したものを比較対象とした.

3-6) チコリ色素及びチコリ色素加水分解物中のチコリ酸及びカフェ酸の定量

チコリ色素: 試料溶解溶媒として 10%

MeOH を用い、チコリ色素製品を 10 mg/mL に調製した(n = 3).

チコリ加水分解: チコリ色素約 20 mg に 1M NaOH を加え、40°C で超音波処理下、1 時間アルカリ加水分解した後、反応液に 1M HCl を加えて中和した。中和した反応液を 10% MeOH で希釈し、10 mg/mL に調製した(n = 3).

チコリ酸: チコリ酸約 1 mg を MeOH に溶解し 1.0 mg/mL に調製したものを標準原液とした。標準原液を MeOH で希釈し、0.005 mg/mL, 0.0025 mg/mL, 0.001 mg/mL に調製し、検量線用標準液とした。

カフェ酸: カフェ酸約 1 mg を MeOH に溶解し 1.0 mg/mL に調製したものを標準原液とした。標準原液を MeOH で希釈し、0.00125 mg/mL, 0.000625 mg/mL, 0.0003125 mg/mL, 0.00015625 mg/mL に調製し、検量線用標準液とした。

調製したチコリ色素及びチコリ加水分解物の試料液、チコリ酸及びカフェ酸の標準液を LC/MS に付し、それぞれの濃度と面積の関係(チコリ酸: $y = 3E+07x - 819.3$ $r^2 = 1$, カフェ酸: $y = 7E+08x + 8399.6$ $r^2 = 0.99$)からチコリ酸及びカフェ酸の含量を求めた。なお、それぞれ SIR mode (チコリ酸 = neg. m/z 473, カフェ酸 = neg. m/z 179)により検出した。

C. 研究結果及び考察

1) LC/MS によるチコリ色素中の指標成分の確認

チコリ色素製品を LC/MS に付したところ、検出波長 260 nm におけるクロマトグラム上にピーク 2 保持時間 6.1 min (化合物 2), ピーク 1 保持時間 8.4 min (化合物 1)

が確認された(Fig. 1)。この2つのピークについて MS スペクトルを測定したところ、ピーク 2 は $[M+H]^+$ m/z 127, ピーク 1 は $[M+H]^+$ m/z 145 を与え、それぞれ分子量 126 および 144 の化合物と推定された。

2) チコリ色素の分画、単離・精製

Fig. 1 に示したようにチコリ色素製品について未知の化合物が 2 つ観察されたため、これらの構造を検討することとした。

チコリ色素製品を HP-20 を担体としたオープンカラムに付し、0%, 10%, 30%, 70%, 100% MeOH を移動相として順次溶出させ、Fr. a~e の 5 つに分画した。更に、LC/MS により確認したところ、Fr. b, Fr. c にピーク 1, ピーク 2 が確認された。一方、TLC においては、波長 254nm を照射したところ、Fr. d にスポットが確認された。スポットが確認された Fr. d を ODS-A を担体とするオープンカラムに付し、再度精製し、化合物 1 (MW 126) を得た。

一方、ピークが確認された Fr. b, Fr. c も同様に ODS-A を担体とするオープンカラムに付し分画を行い、次いで、分取 HPLC により再精製し化合物 2 (MW 144) を得た。

3) 化合物 1 及び 2 (ピーク 1 及び 2) の構造決定

化合物 1 及び 2 について、高分解能、精密質量測定能力をもつ TOF-MS の測定を行なった。TOF-MS では小数点 4~5 桁の質量数まで精密に求めることが可能であるため、構造未知の化合物の組成式を推定することができる。化合物 1 は、TOF-MS において、 $[M+H]^+$ m/z 127.0393,

$[\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3 + \text{H}]^+$ との計算値 127.0395 と一致することから、組成式 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ (MW 126) と推定された。また、IHD (不飽和度) を計算すると、 $N=\{(2C+2)-H\}/2=4$ である。すなわち、分子内に二重結合または環を 4 つ持つ化合物と推定された。

また、化合物 1 は、 ^1H -NMR において、 $\delta 4.56$ ppm (2H, s), $\delta 6.53$ ppm (1H, d, $J=3.78$ Hz), $\delta 7.39$ ppm (1H, d, $J=3.78$ Hz), $\delta 9.33$ ppm (1H, s) に 4 種のシグナルが観察されが観察された。 $\delta 6.53$ ppm と $\delta 7.39$ ppm はスピンカップリングしていると考えられた。 ^{13}C -NMR において、6 種のシグナルが観察され、 $\delta 56.1$ ppm, $\delta 111.1$ ppm, $\delta 127.3$ ppm, $\delta 151.9$ ppm, $\delta 161.4$ ppm, $\delta 180.6$ ppm が観察された。更に、DEPT135 により、 $\delta 56.1$ ppm は CH_2 , $\delta 111.1$ ppm, $\delta 127.3$ ppm 及び $\delta 151.9$ ppm は CH, $\delta 161.4$ ppm 及び $\delta 180.6$ ppm は 4 級炭素であると推定された。また、HMBC 及び HMQC 相関より、化合物 1 を 5-ヒドロキシメチルフルフラール(5-(hydroxymethyl) furfural: HMF)と推定した。HMF 市販試薬と化合物 1 について、LC/MS による保持時間、UV スペクトル、MS スペクトルを比較したところ、これら全てが一致したことから化合物 1 を HMF と同定した (Fig. 3)。

化合物 2 は、TOF-MS において、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 145.0496, $[\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4 + \text{H}]^+$ との計算値 145.0501 と一致することから、組成式 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$ (MW 144) と推定された。また、IHD (不飽和度) を計算すると、 $N=\{(2C+2)-H\}/2=3$ である。すなわち、分子内に二重結合または環を 3 つ持つ化合物と推定された。また、化合物 2 は、 ^1H -NMR において、 $\delta 2.03$ ppm (3H, s), $\delta 4.22$ ppm (2H,

m)は $\delta 4.36$ ppm (1H, dd)にそれぞれ CH_3 , CH_2 , CH に由来する 3 種のシグナルが観察された。H-H COSY において、 $\delta 2.03$ ppm (3H, s)に交差ピークが観察されなかったことから、他の ^1H とスピン結合しない位置に CH_3 基が存在することが示唆された。

また、 ^{13}C -NMR において、 $\delta 15.4$ ppm, $\delta 71.3$ ppm, $\delta 67.4$ ppm, $\delta 130.1$ ppm, $\delta 165.5$ ppm, $\delta 188.4$ ppm に 6 つのシグナルが観察され、この内、 $\delta 165.5$ ppm, $\delta 180.4$ ppm のシグナルは $=\text{C}-\text{O}$ または $\text{C}=\text{O}$ に由来すると考えられた。更に、HMBC 及び HMQC 相関を観察した結果、化合物 2 を

4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one と同定した (Fig. 3)。なお、化合物 2 については、市場に標品が流通しておらず、LC/MS 等による比較確認は行っていない。

化合物 1 及び 2 は、チコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において、チコリの根に含まれる糖類が変性した化合物と考えられる。チコリ色素以外にも、製造工程に焙煎を含む添加物では化合物 1 及び 2 を含有する可能性が否定できない。したがって、今回同定した化合物 1 及び 2 をチコリ色素の指標成分とすることは困難と考えられた。

4) チコリ色素中のチコリ酸及びカフェ酸の分析

チコリの葉の特有な成分としてチコリ酸(chicoric acid)が報告されている (Fig. 4)。一方、チコリ色素はチコリの根を基原とし、更に焙煎して得られたものであるため、葉に含有されるチコリ酸がチコリ色素に含まれる可能性は低い。しかし、チ

コリに特有な成分の報告は、チコリ酸以外に無く、これ以外にチコリ色素の指標成分を設定するための情報がない。よって、チコリ色素製品にもチコリ酸が含まれているかどうか確認することとした。

LC/MSにより、チコリ色素製品中のチコリ酸を走査したところ、保持時間 24.58 min にチコリ酸と考えられる ESI-MS neg. において $[M-H]^-$ m/z 473 を与えるピークが微量ではあるが検出された (Fig. 5)。同条件下でチコリ酸市販試薬と比較したところ、保持時間、UV/Vis 吸光スペクトル、MS スペクトルがすべて一致したことから、チコリ色素中には微量のチコリ酸が含まれていることが判明した。しかし、検出波長 UV 254 nm における LC/UV でチコリ酸のピークは殆ど検出できないことから、LC/UV によるチコリ色素の品質評価を想定したとき、指標成分として設定するにはチコリ酸の含有量は十分でないと考えられた (Fig. 5)。

次に、チコリ酸は酒石酸にカフェ酸が 2 つ結合した構造であるので、チコリ色素をアルカリ加水分解し、チコリ酸から生成するカフェ酸が検出できるかどうか、LC/MS で検討した (Fig. 6)。

加水分解後のチコリ色素製品中のカフェ酸及びチコリ酸を走査したところ、保持時間 19.45 min にカフェ酸と考えられる ESI-MS neg. において $[M-H]^-$ m/z 179, ESI-MS pos. において $[M+H]^+$ m/z 181 を与えるピーク、保持時間 22.89 min にチコリ酸 (ESI-MS neg. $[M-H]^-$ m/z 473) を与えるピークが検出された (Fig. 6)。同条件下でカフェ酸市販試薬と比較したところ、保持時間、UV/Vis 吸光スペクトル、MS スペ

クトルが完全に一致した。以上のことから、加水分解物後のチコリ色素製品中にはチコリ酸から生成したカフェ酸が検出できることが明らかとなった。検出波長 UV 254 nm において、チコリ色素にはカフェ酸が検出されなかったが、チコリ色素加水分解物中のカフェ酸が十分に検出されたことから、加水分解前後のカフェ酸の有無を指標とすることがチコリ色素の品質評価に利用できると考えられた。また、カフェ酸の試薬は安価であるが、チコリ酸の試薬は非常に高価であることから、チコリ色素の指標成分としてカフェ酸を採用する方がコスト面からも実用的であると考えられた。

5) チコリ色素中のチコリ酸、チコリ加水分解中のカフェ酸の定量

絶対検量線法により、チコリ色素及びチコリ色素加水分解物中のチコリ酸及びカフェ酸の含量を求めた結果、チコリ色素には、チコリ酸が 0.192 ± 0.002 mg/g (AV $\pm$ SD, $n = 3$) 含まれていたが、カフェ酸は検出されなかった。一方、チコリ色素加水分解物には、チコリ酸が 0.136 ± 0.008 mg/g (AV $\pm$ SD, $n = 3$)、カフェ酸が 0.031 ± 0.003 mg/g (AV $\pm$ SD, $n = 3$) 含まれていることがわかった。

以上の結果から、チコリ色素加水分解物中にチコリ酸が多く残存していたことから、チコリ色素中のチコリ酸の加水分解が十分ではなかったと考えられた。チコリ酸をカフェ酸に加水分解する条件が設定できれば、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に利用できると考えられた。

D. 結論

一般飲食物添加物は一般に飲食される食品等の抽出物であることから安全性に問題がないと考えられ、早急な成分規格設定は必要ないと考えられている。このため、一般飲食物添加物 106 品目のうち 3 品目について規格設定されているのみであり、規格設定が遅れている。そこで、本研究では一般飲食物添加物のうち、「チコリ色素」について、成分規格を設定するための基礎情報を得るために、中に指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。HPLC により、チコリ色素製品中に観察された化合物 1 及び 2 を単離精製し、NMR によりその化学構造を決定した。

その結果、化合物 1 が 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF)、化合物 2 が 4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one であり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性した生じた化合物と考えられた。これらは、製造過程において焙煎処理を伴う他の添加物においても含有されると予想さ

れることから、チコリ色素の指標成分としては不適當と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた。

E. 参考資料

- 1) 木村拓子, 山本進一, 小川勲, 三浦啓彦, 長谷川正木: チコリ酸およびその類縁化合物の抗酸化作用. 日本化学会誌, 11, 739-750 (1999)

F. 研究発表

- 1) 論文発表
平成 26 年度は特になし。
- 2) 学会発表
平成 26 年度は特になし。

G. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし。

H. 健康危機情報

知り得る限りでは特になし。

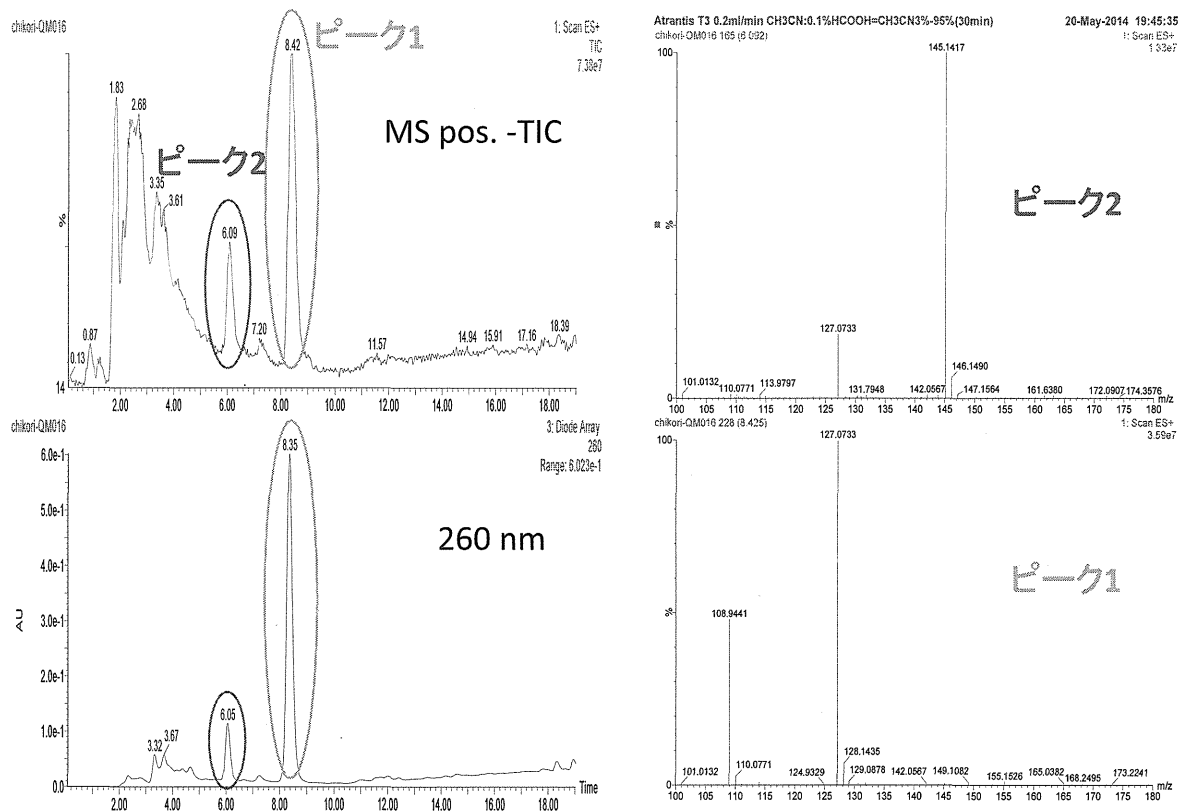
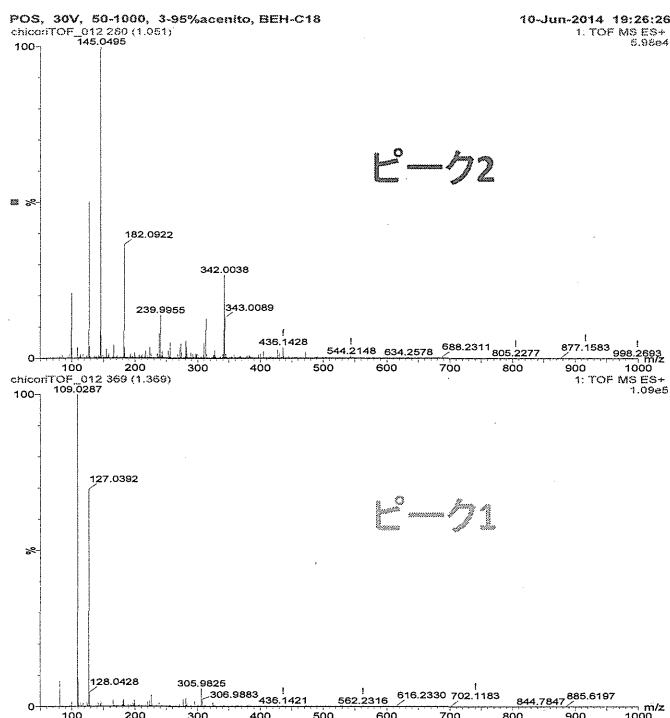


Fig. 1 チコリ色素製品の LC/MS プロファイル



$[M+H]^+$	1	2
計算値	127.0395	145.0501
MS実測値	127.0393	145.0496
組成式	$C_6H_7O_3$	$C_6H_9O_4$
Fit conf(%)	99.74	99.98
↓		
分子量	126	144
組成式	$C_6H_6O_3$	$C_6H_8O_4$

Fig. 2 ピーク 1, 2 の LC/TOF-MS 測定結果と組成式の推定

* Fit conf(%)とは、精密質量と同位体比の一致度を表す。

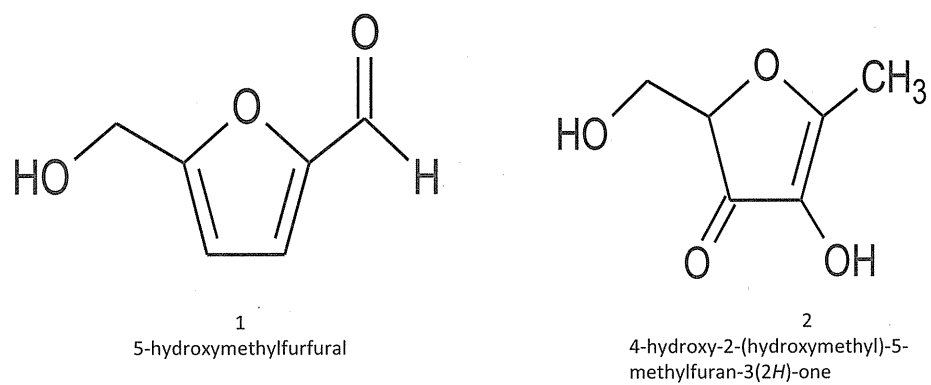


Fig. 3 化合物 1 及び 2 の構造式

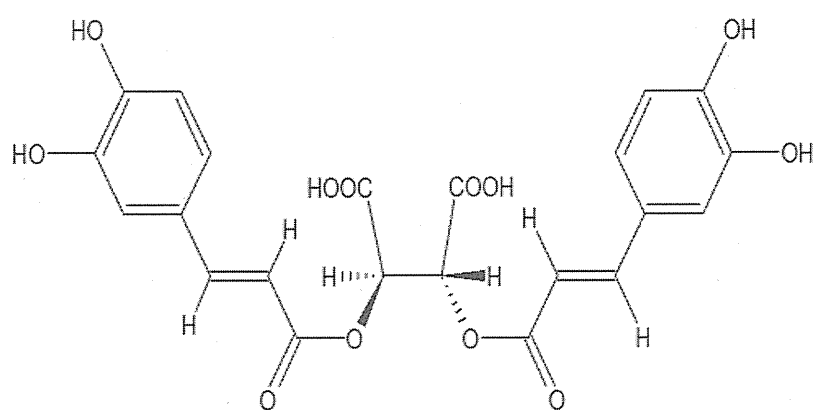


Fig. 4 チコリ酸(chicoric acid)の構造式

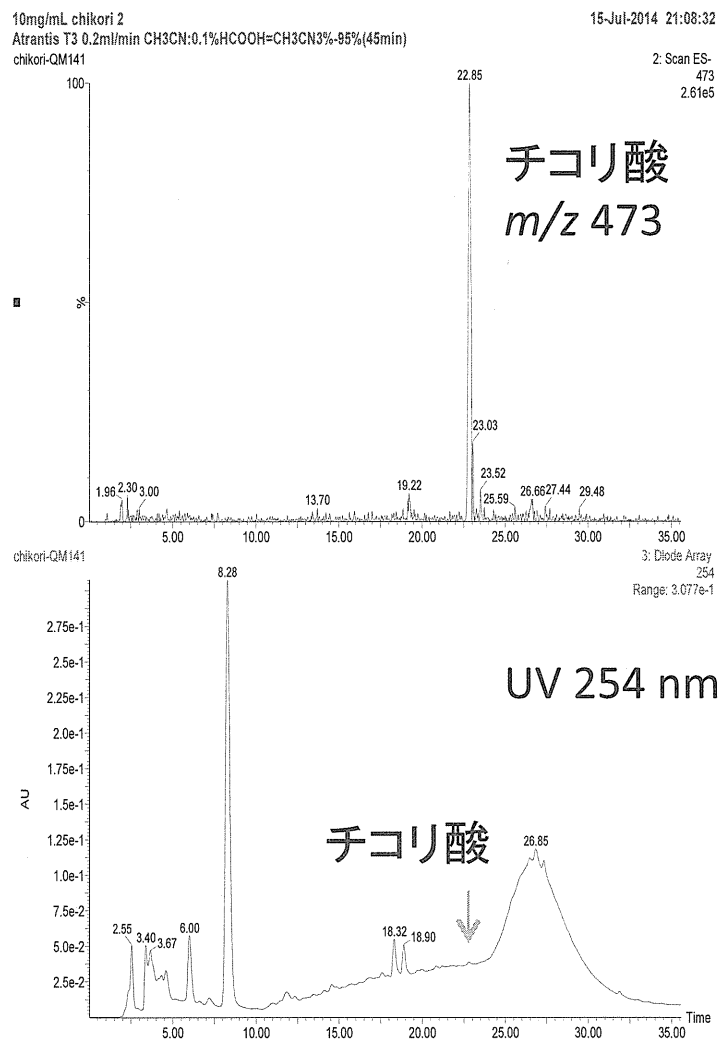


Fig. 5 チコリ色素製品の LC/MS プロファイル
上段: MS (neg.) extract m/z 473, 下段: UV 254 nm

10.0mg/ml chicori (1MNaOH1MHCl) 2
Atrantis T3 0.2ml/min CH3CN:0.1%HCOOH=CH3CN3%-95%(45min)
chikori-QM145

16-Jul-2014 01:14:50

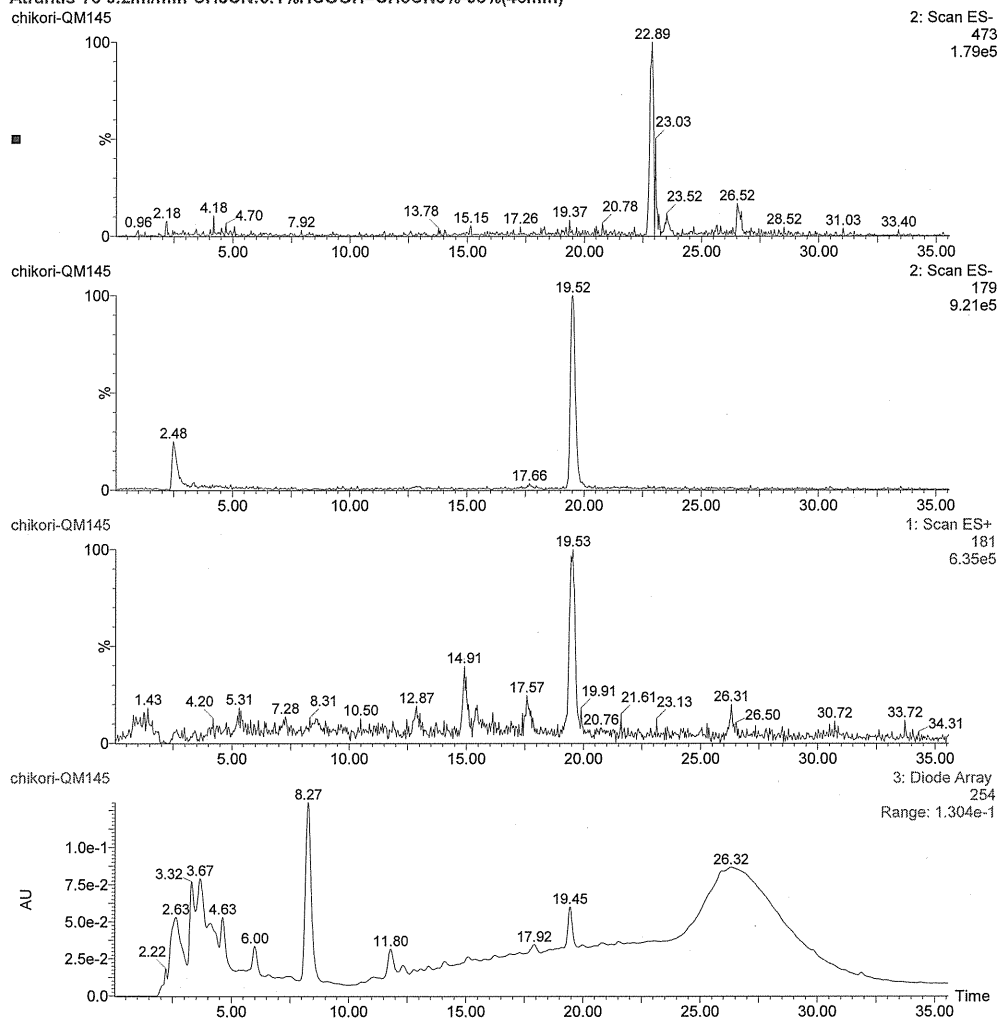


Fig. 6 加水分解後のチコリ色素製品のLC/MS プロファイル

上段: MS (neg.) extract m/z 473 for chicoric acid, 中上段: MS (neg.) extract m/z 179,

中下段: MS (neg.) extract m/z 181, 下段: UV 254 nm

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
平成 26 年度分担研究報告書
既存添加物の成分規格試験法の検討
～INADEQUATE によるカルミン酸，耐酸性カルミン（4-アミノカルミン酸）の
 ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属～

分担研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨 2002年，我々の研究グループは耐酸性カルミン（acid-stable carmine）が，コチニール色素及びそのアルミニウムレーキ又はその塩類であるカルミン（carmine）とは全く別の化合物4-アミノカルミン酸（4-aminocarminic acid）を主色素としていることを報告した．この報告では，類似化合物のモデル合成の結果との比較により，耐酸性カルミンの主色素成分の化学構造を決定しており，各種スペクトルデータの完全帰属によるものではない．そこで，本研究は，耐酸性カルミンの主色素の化学構造が4-アミノカルミン酸であることを完全証明することを目的とした．800MHz NMR・極低温CHプローブを用いた1D- ^1H ， ^{13}C ， ^{15}N -NMR及び2D-HMQC，HMBC，INADEQUATE解析の結果，耐酸性カルミンの主色素の化学構造が4-アミノカルミン酸であることの確証を得ることができた．

協力研究者

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
大槻崇 国立医薬品食品衛生研究所
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

コチニール色素は既存添加物名簿に収載され、『本品は，エンジムシ

（*Dactylopius coccus* Costa（*Coccus cacti* Linnaeus））から得られた，カルミン酸（carminic acid（ $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ ））を主成分とするものである．』とされている．カルミン酸（Fig. 1）は，コチニールカイガラムシやポーランドコチニールカイガラムシといった一部のカイガラムシ中に天然に存在する赤色素であり，繊維などの染料，絵画などの絵の具，細胞染色，薬や食品の染色剤，化粧品など，古くからさまざまな分野で利用されてきた．わが国では，コチニール色素は食品への使

用が許可されているが，コチニール色素の主色素成分カルミン酸を原料として化学的処理により構造を改変した色素はすべて化学的合成品扱いとなり，食品への使用は現在認められていない．一方，カルミン酸のアルミニウムレーキ又はその塩類であるカルミン（carmine）は，我が国を除く多くの諸外国で食品への使用が許可されている．

カルミン酸は pH により色調が変化し，酸性溶液では橙色，中性溶液で赤色，アルカリ性溶液で赤紫色を示すことが知られている．一方，pH に依存せず，酸・アルカリ性条件下でも赤色を保つ耐酸性カルミン（acid-stable carmine）と呼ばれるものが 2000 年頃から流通し始めた．耐酸性カルミンは，カルミン酸をアンモニアと反応させたものであると考えられ，世界的にも食品への使用は認められていない．しかし，耐酸性カルミンの化学構造について検討された例はなく，すなわ

ち、構造未知のため、食品から耐酸性カルミンを検知する方法も存在しなかった。2002年、我々の研究グループは、カルミン酸とカルミン酸のアントラキノン部の kermesic acid に類似した構造を持つ purprin の両者についてアミノ化、次いでメチル化を行い、両者の化学シフトの比較から、耐酸性カルミンの主色素の化学構造がカルミン酸の4位の水酸基がアミノ基に置換した4-アミノカルミン酸 (4-aminocarminic acid) であると報告した (Fig. 1)¹⁾。この報告により、耐酸性カルミン (acid-stable carmine) はアルミニウムレーキ又はその塩類であるカルミン (carmine) とは全く別の化合物を主色素としていることが明らかとなった。しかし、両者の名称が酷似していることから混同され、カルミンを添加したとされる加工食品について未許可添加物の耐酸性カルミンが使用されている可能性が懸念され始めた。国内外において、耐酸性カルミンの検出が試みられ、結果として我が国^{2), 3)}を含め多くの国々で未指定添加物耐酸性カルミンが次々と検出され、カルミンと耐酸性カルミンが実際に混同されて食品に使用されていることが明らかとなってきた^{4), 5)}。

カルミン酸の結晶構造は、ISHIDA ら⁶⁾によるX線結晶解析により明らかとされており、結晶状態ではカルミン酸カリウム塩3水和物として存在すると報告されている。このことから、カルミン酸の化学構造に疑問の余地はないが、¹³C-NMR の帰属に関しては、メチル化等の処理をしたものや、類似化合物の化学シフトとの比較によるものしか報告がなく、完全に

帰属された報告はない。NMR により構造解析を行う場合には、Corelation Spectroscopy (COSY) 法や ¹H-detected Multiple Quantum Coherence (HMQC) 法、¹H-detected Multi-Bond heteronuclear quantum Coherence (HMBC) 法などの ¹H 観測の二次元測定を駆使して ¹³C-¹³C 間の結合などの構造情報を得る。しかし、これらの測定法は、プロトンがほとんどついていない分子 (四級炭素など ¹H を持たない炭素核は ¹H 核の信号を得ることはできないため、¹³C-¹³C 間等の結合の確認が出来ない) などの場合、解析が困難となる。この問題を解決するのが Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment (INADEQUATE) 法である。INADEQUATE 法は ¹³C-¹³C 間の直接結合を検出するため、構造情報について非常に有力な情報を得ることができる。すなわち、有機化合物の炭素骨格のつながりを完璧に決めることができるため、天然物等の複雑な化学構造の決定に利用される。しかし、¹³C の天然存在比は約 1% であり、¹³C 同士が隣り合う確率はその 1% となるため、0.01% と非常に少ない存在確率となり、結果として通常の NMR 装置では十分な感度が得られず、¹³C 同位体を用いて合成する等の対処が必須であった。このため、inadequate (不適切な、不十分な) という略語が示すように、測定対象が限定される特殊な測定法に分類されている。

近年、NMR の高磁場化、極低温プローブの開発により、検出感度が向上した。極低温プローブは、検出コイルや信号増幅回路を -250°C に冷却し、金属内の原子と

電子の熱運動を小さくして電気回路の抵抗・熱ノイズを抑えることによって、感度を大幅に向上させるものである。また、検出感度は磁場強度の 3/2 乗に比例するので、高磁場・極低温プローブの併用により、S/N は数十倍になり、天然存在比のままでの測定が可能になってきた。

本研究では、当研究所に設置されている 800MHz NMR・極低温 CH プローブを用いて INADEQUATE 測定を行い、カルミン酸及び耐酸性カルミンの ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属を行い、耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-アミノカルミン酸であることを完全証明することを目的とした。

B. 研究方法

B-1) 試薬

NMR 測定にはカルミン酸 MP Biomedicals/Wako (Cat No. : 154942, Lot No. : MR29804) を、耐酸性カルミンの調製には、カルミン酸 TCI (Cat No. : C0782, Lot No. : JEKHO-KD) を用いた。28%アンモニア水は、Wako (Cat No. : 016-03146, Lot No. : EPH5344), ^{15}N アンモニア水は、ISOTEC/Sigma (Cat No. : 609390, Lot No. : SZ1192V, 98 atom % ^{15}N , $\sim 14\text{ N in H}_2\text{O}$), $\text{DMSO-}d_6$ は、Euriso-top (Cat No. : D010B, Lot No. : Y3021), D_2O は、ISOTEC/Sigma (Cat No. : 151882, Lot No. : TA2195V), その他溶媒は HPLC グレード、または特級を用いた。

B-2) 耐酸性カルミンの調製

耐酸性カルミンは、既報¹⁾の方法を参考に合成した。すなわち、スクリュウキャップ付き試験管に、カルミン酸 1 g, 28%

アンモニア水 ($^{14}\text{NH}_3$ または $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液) 2 mL, milliQ 水 1 mL を封入し、ブロックヒーターで $120^\circ\text{C} \cdot 2\text{ h}$ 加熱した。B-3) の LC 条件にて、未反応のカルミン酸が反応液中に存在しないことを確認した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を ODS オープンカラム (担体 : Chromatorex ODS, 富士シリシア化学(株), Cat No. : DM1020T, Lot No. : R030504, 100-200 mesh, 100 g, カラム管直径 4 cm) に付し、15% MeOH で溶出させ、主色素画分を得た後、溶媒を除去し、約 0.75 g の化合物 S-14N または S-15N を得た。後述するがこの状態で NMR を測定したところ、合成した耐酸性カルミンの主色素成分である化合物 S はアンモニウム塩として存在している可能性が考えられた。また、 $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -NMR 測定において、化合物 S はシグナルがブロード化し、INADEQUATE 測定に十分な感度が得られなかったため、以下の方法でアンモニウム塩を酸型 (フリー体) の化合物 (H と表示する) に変換した。合成した化合物 S-14N または S-15N を 0.1N HCl 水溶液 5 倍モル当量に溶かし、超音波処理を 10 分行ったのち、ミニカラム (Waters C18 Cartridge Sep-pak Vac 20cc (5g) P/N WAT036925) に付した後、過剰の HCl を milliQ 水で洗い流し、MeOH で溶出させた。溶出液を乾固して酸型化合物 H-14N または H-15N を得た (以後、この酸型 (フリー体) に交換したものを精製耐酸性カルミン (化合物 H-14N または H-15N), HCl 洗浄前のアンモニアで合成しただけのものを粗製耐酸性カルミン (化合物 S-14N または S-15N) と呼ぶことにする)。

B-3) LC/MS, LC/TOF-MS 分析

カルミン酸（試薬）を水に溶解したものと、28%アンモニア水（ $^{14}\text{NH}_3$ または $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液）中で合成した粗製耐酸性カルミン（S-14N, S-15N）の水溶液（50～250 $\mu\text{g/mL}$ ）を Table 1, 2 の分析条件で LC/MS 測定した。

B-4) NMR 分析

^1H -, ^{13}C -, ^{15}N -NMR スペクトルは、重溶媒に $\text{DMSO}-d_6$ または D_2O を用いて、5mm ϕ NMR 試料管に封入し、JEOL 製 JNM-ECA800 (JEOL CH UltraCOOL probe), ECA800 (HCN probe), ECA600 (Varian CH cold probe), ECA600 (TH probe) の4台で状況に応じて使用した。スペクトルの化学シフトはすべて native scale のまま δ 値を ppm 単位で表示した。CORrelation Spectroscopy (COSY), ^1H -detected Multiple Quantum Coherence (HMQC), ^1H -detected Multi-Bond heteronuclear quantum Coherence (HMBC) は試料濃度 20 mg/mL ($\text{DMSO}-d_6$) で測定した。Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment (INADEQUATE) と $1\text{D}-^{15}\text{N}$ -NMR は、試料濃度 400 mg/mL ($\text{DMSO}-d_6$) で測定した。

$2\text{D}-^{13}\text{C}$ -INADEQUATE 測定条件：測定温度 = 30, 50°C, 繰り返し時間 = 2～4 s, $^1J_{\text{cc}}$ カップリング定数 = 55～80 Hz. F2 (横) 軸ポイント数 = 8192, F1 (縦) 軸ポイント数 = 128, 積算回数 = 400～1600 (1.1～5 日間)。

$1\text{D}-^{15}\text{N}$ -NMR 測定条件：観測範囲 = -50～650 ppm, ^1H -デカップリング, noe off.

C. 結果及び考察

C-1) カルミン酸と耐酸性カルミンの LC 分離と精密質量

カルミン酸及び粗製耐酸性カルミン (S-14N, S-15N) の水溶液を LC 測定した。Table 1 に示す LC/MS 分析条件において、カルミン酸（試薬）は保持時間 6.8 分 (peak-A), 耐酸性カルミン (S-14N, S-15N) は共に 8.9 分 (peak-B, peak-C) に主色素のピークが観察された (Fig. 2). Peak-A は、ESI スキャンモードにおいて m/z 493 (pos.) および 491 (neg.), λ_{max} 276 nm, 492 nm を与えた。一方、peak-B (S-14N) は m/z 492 (pos.) および 490 (neg.), λ_{max} 274 nm, 525 nm, 563 nm を与え、peak-C (S-15N) は m/z 493 (pos.) および 491 (neg.), λ_{max} 274 nm, 525 nm, 563 nm を与えた (Table 3). 次に、より詳しい分子組成を得るために、高分解能質量分析 (LC/TOF-MS) を行った。Table 2 に示す LC/TOF-MS 分析条件において、それぞれ 4.0 分 (peak-A に対応) と 4.7 分 (peak-B, peak-C に対応) に主色素ピークが観察された。Peak-A の精密質量は、 m/z 493.0977 (pos.), 491.0824 (neg.) を与え、カルミン酸のプロトン付加分子イオンの理論値 m/z 493.0982 [$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}+\text{H}$] $^+$ および脱プロトン分子イオンの理論値 m/z 491.0826 [$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}-\text{H}$] $^-$ とそれぞれ -0.5 mDa, -0.2 mDa の差で一致し、カルミン酸であることが確認された (Table 3). 一方、Peak-B の精密質量は、 m/z 492.1125 (pos.), 490.0983 (neg.) を与え、(14N) アミノカルミン酸のプロトン付加分子イオンの理論値 m/z 492.1142 [$\text{C}_{22}\text{H}_{21}^{14}\text{NO}_{12}+\text{H}$] $^+$ および脱プロトン分子イ

オンの理論値 m/z 490.0986

$[\text{C}_{22}\text{H}_{21}^{14}\text{NO}_{12}\text{-H}]^-$ とそれぞれ-1.7 mDa, -0.3 mDa の差で一致した (Table 3). また,

Peak-C の精密質量は, m/z

493.1108(pos.), 491.0962(neg.)を与え,

(15N) アミノカルミン酸のプロトン付加分子イオンの理論値 m/z 493.1112

$[\text{C}_{22}\text{H}_{21}^{15}\text{NO}_{12}\text{+H}]^+$ および脱プロトン分子イオンの理論値 m/z 491.0956

$[\text{C}_{22}\text{H}_{21}^{15}\text{NO}_{12}\text{-H}]^-$ とそれぞれ-0.4 mDa, +0.6 mDa の差で一致した (Table 3). 以上の結果より, Peak-B, peak-C はカルミン酸上の OH 基が NH_2 に置換されたアミノカルミン酸であることが確認された.

C-2) INADEQUATE 法によるカルミン酸の ^{13}C -NMR スペクトルの帰属

試薬カルミン酸を用いて INADEQUATE 測定の実験条件検討を行った. INADEQUATE 測定は, 非常に感度が低い測定であるため, できるだけ高濃度の試料液を調製する必要がある. 試薬として g 単位で入手可能ではあるが, 重溶媒に対する溶解度には限界がある. D_2O に溶解させたところ, 150 mg/mL 程度が限界であった. 次に, $\text{DMSO-}d_6$ に溶解させたところ, 400 mg/mL 程度溶解した. 粘性のある赤黒い溶液となったが, $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -NMR を測ってみたところ, 1 scan で全ピークの存在が確認できた. したがって, INADEQUATE 測定用の試料液の濃度は 400 mg/mL とすることとした.

INADEQUATE 測定時のパラメータとして, 繰り返し時間と ^{13}C - ^{13}C 間のカップリング定数 ($^1J_{\text{CC}}$) がある. 繰り返し時間は, ^{13}C - T_1 の 1.3 倍以上を設定するので, おおまかな ^{13}C - T_1 をあらかじめ測定しておく必要

がある. Inversion Recovery 法により測定したカルミン酸の 22 本の ^{13}C シグナルの T_1 は, null point から計算して 0.1~1.0 s (Table 4) であったことから, 繰り返し時間を 2~4 s に設定した. また, INADEQUATE 測定では, $^1J_{\text{CC}}$ カップリング定数をもつ炭素核の信号のみが相関シグナルとして観測される (信号強度は J 値に依存). $^1J_{\text{CC}}$ は十分な S/N が得られるまで積算した $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル上に観察されるカーボンサテライトシグナルの幅から求めるのが最も正確ではあるが, シグナルが混んでいたたりブロードだったりする場合にはこの方法は困難である. カルミン酸の場合はこれに当たり, 各シグナルのカーボンサテライトシグナルの幅を求めることが困難であった. このため, 一般的な $^1J_{\text{CC}}$ カップリング定数が, $\equiv\text{C-C}\equiv$ が 35~40 Hz, $>\text{C}=\text{C}<$ が 60~75 Hz 付近といわれていることとカルミン酸の化学構造を鑑み, 65→55→75 Hz と変えて 3 回測定した. また, 400 mg/mL に調製した試料液では $1\text{D-}^{13}\text{C}$ -NMR が 1 scan で全ピークの存在を確認できたが, 同試料液について INADEQUATE を測定したところ, 相関シグナルは期待通りの感度で観察されなかった. 試料液の粘度が高すぎるため, shim が合いづらく S/N が悪いのかと考え, 測定温度を 30°C から 50°C に上げてみたところ, $1\text{D-}^{13}\text{C}$ シグナルで S/N が約 1.4 倍に向上した. よって, カルミン酸は濃度 400 mg/mL ($\text{DMSO-}d_6$), 50°C で測定することとした. なお, 化学シフト及びピーク強度は試料濃度, 測定温度によって変化したため, INADEQUATE 測定は試料濃度と測定温度を固定した.

Fig. 3に50°C, $J = 55$ Hzで測定したカルミン酸のINADEQUATEスペクトルを示す. なお, 設定した J 値によっても, 一部に相関が観察されない, あるいは非常に弱い場合があり, $^1J_{cc}$ カップリング定数が炭素核によって若干異なることが示唆されたが, ここでは最も相関が観察された結果のみを示した.

2D-INADEQUATE スペクトルは, 他の二次元スペクトルとは異なり, 横軸 (F2) は ^{13}C の化学シフトを表し, 縦軸 (F1) はF2軸に対して2倍の周期の ^{13}C の化学シフトを表すだけで意味を持たない. 化学結合している ^{13}C のシグナル同士が, 横一直線上に並び, シグナルから対角線までの距離が等しく現れ, 対角線に対して対称には現れない. Fig. 3において帰属が明らかなカルミン酸の CH_3 基のシグナル (δ 20.6 ppm) を出発として炭素-炭素結合の追跡を行った. このシグナルは δ 143.7 ppm (C-8) とのみ相関があり, 次に δ 130.5 ppm (C-7) と δ 122.9 ppm (C-8a) との相関がみられた. 前者の δ 130.5 ppm (C-7) のシグナルは, δ 169.7 ppm (C00) と δ 162.2 ppm (C-6) と相関があり, δ 162.2 ppm (C-6) は δ 112.9 ppm (C-5) と, δ 112.9 ppm (C-5) は δ 136.0 ppm (C-4b) と, δ 136.0 ppm (C-4b) は δ 186.6 ppm (C-10) と δ 122.9 ppm (C-8a) に相関が観察された. 以下, 同様に炭素-炭素結合のシグナル相関を追跡したところ, Fig. 4aの太線で示すように炭素骨格がすべてつながり, 試薬濃度 400 mg/mL (DMSO- d_6), 測定温度 50°Cにおいて, カルミン酸の ^{13}C -NMR スペクトルが完全帰属できた. なお, Fig. 3内の拡大図にある通り,

INADEQUATE シグナルは結合している $^1J_{cc}$ カップリング定数で分裂して観察される. カルミン酸の炭素間の $^1J_{cc}$ は, アントラキノ骨格部分で52~75 Hz, 糖とメチル基側鎖部分で35~42 Hzであった.

Table 5に今回帰属したシフト値 (this study) と, これまでに報告されているカルミン酸の ^{13}C -NMRの帰属 (literatureの4報)を表にした. Table 5中, 列a, bは, INADEQUATE法によりそれぞれ測定温度30°Cと50°C (Fig. 3)のとき完全帰属したシフト値, 列cは, 濃度によるシフト変化の例として20 mg/mLでの測定値を示した. 20 mg/mLの濃度ではINADEQUATE測定を行っていないが, HMQC, HMBC (Fig. 4aの矢印)と400 mg/mLの結果から補完して帰属し, 表中の青字部分はHMBCでこの ^1H とも相関が出なかった ^{13}C を表している. 400 mg/mLと20 mg/mLでシフト値を比較すると, 糖の2'位と4'位で順番が入れ替わっていた (Table 5の列a, c). 濃度及び測定温度によるケミカルシフトの変化を考慮すると, 過去に報告された帰属は, 本報告で完全帰属したケミカルシフトと比べて, 順番が入れ替わっている等若干の差違はあるものの, 大きな間違いがなく, カルミン酸の化学構造が正しいことが確認された.

C-3) 耐酸性カルミン (アミノカルミン酸) のアミノ基の置換位置の確認

合成した耐酸性カルミンの主色素成分であるアミノカルミン酸のアミノ基の置換位置の確認を行った. $^{14}\text{NH}_3$ 又は $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液とカルミン酸を反応させて合成した粗製耐酸性カルミン (化合物 S-14N また

は S-15N) について、同濃度、同温度で 1D- ^{13}C -NMR を測定したところ (Fig. 5b, 5c), ^{13}C 化学シフトに差違は観察されなかった. ^{14}N の天然存在比は 99.635%だが、スピン量子数 (I) = 1 の四極子核のため、 $-\text{NH}_2$ の形では異方性が生じ、 ^{14}N の信号がブロードニングするため ^{13}C とのカップリングは見え、 ^{13}C は 1 本のシグナルとなる. 一方、 ^{15}N は天然存在比 0.365%, $I = 1/2$ なので、 ^{13}C のシグナルは $2I + 1 = 2$ 本に分裂する. すなわち、天然存在比のままの N 化合物であれば、N に結合した ^{13}C シグナルは、 ^{14}N からの 99.7% の 1 本のシグナルと、 ^{15}N からの $0.365 \div 2\%$ の 2 本のシグナルが、 $0.1825 : 99.7 : 0.1825$ の強度で合計 3 本のシグナルとして理論的には観察されるはずであるが、ノイズに埋もれていたり、シグナルの裾にかぶっていたりして、通常は 1 本のシグナルとして観察される. 実際に、別に測定した ^{15}N ホルムアミド (DMSO- d_6) 標準試料では 160 ppm の ^{13}C シグナルが $^1J_{\text{CN}} = 14 \text{ Hz}$ で 2 本に分裂して観察された. また文献⁹⁾によれば、citrulline の $-\text{C}(=\text{O})-^{15}\text{NH}_2$ の 162 ppm の ^{13}C シグナルは $^1J_{\text{CN}} = 19 \text{ Hz}$ で 2 本に分裂したことが報告されており、 ^{15}N ホルムアミド標準試料の測定結果が妥当であると判断した. したがって、 $^{14}\text{NH}_3$ 水溶液とカルミン酸を反応させた粗製耐酸性カルミン (化合物 S-14N) と $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液 (98 atom % ^{15}N) とカルミン酸を反応させて合成した粗製耐酸性カルミン (化合物 S-15N) について 1D- ^{13}C -NMR 測定を行ったとき、化合物 S-15N では ^{15}N が結合している ^{13}C のシグナルが 2 本に分裂して観察されると予想される.

$^{14}\text{NH}_3$ 又は $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液で合成した粗製耐酸性カルミン (化合物 S-14N または S-15N) について同条件下で ^{13}C -NMR スペクトルを比較した結果、化合物 S-14N または S-15N はほぼ等しいスペクトルを与えた (Fig. 5b, 5c). しかし、化合物 S-15N (400 mg/mL, 30°C) では $\delta 146.1 \text{ ppm}$ のシグナルのみが $^1J_{\text{CN}} = 15 \text{ Hz}$ で 2 本に分裂していたことから、この炭素に $^{15}\text{NH}_2$ が置換したと考えられた. さらに $^{15}\text{NH}_2$ 置換部位が 1 か所のみであることの確証を得るため、化合物 S-15N (DMSO- d_6 溶液) について、1D- ^{15}N -NMR を測定したところ、 $\delta 18 \text{ ppm}$ と $\delta 79 \text{ ppm}$ に 2 本のシグナルが観察された (Fig. 6a). 一般にアミンの ^{15}N シフト値は、 $0 \sim 120 \text{ ppm}$ であり、また $>\text{C}-^{15}\text{NH}_2$ の ^{15}N の δ 値は 70 ppm であったという報告¹⁰⁾もあるため、化合物 S-15N の ^{15}N -NMR スペクトル上に観察された 2 本の ^{15}N シグナルのうち、高磁場側のシグナルは、化合物 S-15N のカルボニル基がアンモニウム塩となっているためではないかと考えられた. そこで、化合物 S-15N を B-2) の方法で HCl 洗浄後、得られた精製耐酸性カルミン (化合物 H-15N) について 1D- ^{15}N -NMR を測定した結果、 $\delta 18 \text{ ppm}$ のシグナルが消失し、 $\delta 70 \text{ ppm}$ のみが観察された (Fig. 6c). 比較として、 $^{15}\text{NH}_3$ 標準試料 (D_2O 溶液) の 1D- ^{15}N -NMR を測定したところ、 $\delta -5 \text{ ppm}$ にシャープなシグナルが観察された (Fig. 6b). 以上のことから、化合物 S-15N の 1D- ^{15}N -NMR スペクトルにおいて $\delta 79 \text{ ppm}$ に観察されたシグナルが分子上に化学結合した $^{15}\text{NH}_2$ 、 $\delta 18 \text{ ppm}$ に観察されたシグナルが $-\text{COO}^- \cdot ^{15}\text{NH}_4^+$ に由来するものであると確認できた. したがって、耐酸性カル

ミン（化合物 S）の主色素成分はカルミン酸の構造上に N が一つ、また、 δ 146.1 ppm の ^{13}C シグナルに由来する炭素に N が置換しているアミノカルミン酸であることが明らかとなった。また、 $1\text{D-}^{15}\text{N-NMR}$ 測定の結果より、合成した耐酸性カルミンの主色素成分であるアミノカルミン酸は、アンモニウム塩（化合物 S）として存在し、酸処理によりフリー体（化合物 H）に変換されることがわかった。

C-4) INADEQUATE 法による耐酸性カルミンの $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの帰属

Fig. 5b, 5c に示す通り、化合物 S-14N と化合物 S-15N に ^{13}C 化学シフトの差違は観察されなかった。ただし、カルミン酸と比べ、170~160 ppm のシグナルがブロードであり、同一調製濃度において S/N も若干悪かった。カルミン酸の試行錯誤の測定条件をもとに、化合物 S-14N 及び化合物 S-15N について INADEQUATE 測定を行ったところ、5 日間測定し積算回数を増やしてしてもすべての炭素結合の相関を観察することができなかった (Fig. 4b, 4c の太線)。測定温度を $30^\circ\text{C} \rightarrow 50^\circ\text{C}$ に上げることでカルミン酸では $1\text{D-}^{13}\text{C-NMR}$ の S/N が 1.4 倍向上したことから、化合物 S-14N 及び化合物 S-15N についても同様に測定温度を上げてみたが、その S/N は 1.1 倍程度しか改善されなかった。そこで、B-2) の方法で化合物 S-14N 及び化合物 S-15N を HCl 洗浄し、フリー体（化合物 H-14N 及び化合物 H-15N）に変換したところ、 $1\text{D-}^{13}\text{C-NMR}$ のシグナルがシャープに観察され、その S/N が 3 倍以上も向上した。この結果より、HCl 処理してフリー体（化

合物 H-14N）にした試料について INADEQUATE 測定を行ったところ、約 1 日の積算で ^{13}C シグナルを完全帰属することができた (Fig. 7)。Fig. 7 内の拡大図にある通り、耐酸性カルミン H-14N の炭素間の $^1J_{\text{CC}}$ は、アントラキノン骨格部分で 51~75 Hz、糖とメチル基側鎖部分で 36~41 Hz で、カルミン酸と比べてほとんど変化はなかった。前述したように、粗製耐酸性カルミン（化合物 S）は、同位体 ^{15}N の導入に関係なく ^{13}C 化学シフトに差違はなく、精製耐酸性カルミン（化合物 H）についても同様であった (Fig. 5d, 5e)。ただし酸処理によりフリー体とした化合物 H-15N では ^{15}N とのカップリングにより 139.7 ppm の炭素が 2 本に分裂しており、この炭素は Fig. 7 の INADEQUATE 法により、4 位であることが確認できた。Fig. 5b-5e のとおり、アンモニウム塩（化合物 S-14N 及び化合物 S-15N）とフリー体（化合物 H-14N 及び化合物 H-15N）では $^{13}\text{C-NMR}$ において観察される炭素の化学シフトは大きく異なる。Fig. 4b, 4c の太線で示す通り、化合物 S では、INADEQUATE 法ですべての炭素の結合をつなげることではできなかったが、HMQC, HMBC, 146.1 ppm のダブルレットになるシグナルが 4 位であることを考慮して帰属した。その結果、フリー体では特に 9 位が大きく低磁場側へシフトし、1~4 位が高磁場側へシフトすることがわかった。

Table 6 に、耐酸性カルミンについて今回帰属した $^{13}\text{C-NMR}$ のシフト値 (this study) と、これまでに報告されている $^{13}\text{C-NMR}$ の帰属 (literature の 2 報) を示した。Table 6 中、列 j, k は、化合物 H-14N

を INADEQUATE 法によりそれぞれ 30℃, 50℃ (Fig. 7) のとき完全帰属したシフト値, 列 m は化合物 H-15N のシフト値, 列 e, f, g は, INADEQUATE 測定を行ったが, 全ての相関が得られなかったため HMBC から補完したシフト値 (それぞれ S-14N (30℃), S-14N (50℃), S-15N (30℃)) であり, 表中の青字部分は HMBC でどの ^1H とも相関が出なかった ^{13}C を表している (Fig. 3b, 3c). また耐酸性カルミンも濃度によりシフト値が変化した. その例として 20 mg/mL での測定値を併記した (列 h: S-15N, 列 l: H-14N, 列 n: H-15N). 精製耐酸性カルミン (H-15N) の 400mg と 20mg では, 4 位と 8 位が逆転していた (列 m, n: HMBC とダブルットから帰属は明らか). 我々が酸処理によりフリー体とした化合物 H-14N について測定したシフト値 (列 l) を, Stathopoulou ら¹¹⁾が耐酸性カルミンに TFA 添加して酸性条件で測定した値と比較したところ, 近似していることがわかった. そこで粗製耐酸性カルミン (化合物 S-15N) 20 mg/mL の試料を用いて TFA 添加前後の 1D- ^{13}C を測定してみた (Table 6, 列 h と j). その結果, 1% TFA を添加することで, 1 位, 3 位のブロード気味のシグナルの S/N が 6 倍以上になり, シフトもフリー体の耐酸性カルミン (列 n) とほぼ同じ値になった. つまり, TFA を添加して液性を酸性にすることでカルボン酸の解離が抑えられ, 溶液中での構造が安定し感度が上がったと考えられる. また, カルミン酸に TFA を添加した場合のシフト値を Table 5 の列 d に示したが, 試薬カルミン酸も TFA 添加により S/N が 6 倍以上向上し, 6 位と 8 位のシ

フト変化が大きかった (Table 5 の列 c と d の比較). このことから試薬カルミン酸も酸型ではなく, 塩型 (カルミン酸カリウム塩 3 水和物⁶⁾) として存在している可能性が示唆された.

以上のことから, 耐酸性カルミンの主色素成分は, 4-アミノカルミン酸であることが確認でき, その ^{13}C ケミカルシフトは, 酸型またはアンモニウム塩型で変化することがわかった.

D. 結論

本研究では, 耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-アミノカルミン酸であることを完全証明することを目的とした. 800MHz NMR・極低温 CH プローブを用いて INADEQUATE 測定を行い, カルミン酸及び耐酸性カルミンの ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属を行った. また, 安定同位体 ^{15}N を導入した耐酸性カルミンの合成を行い, NH_2 基の置換位置の特定を試みた. 1D- ^1H , ^{13}C , ^{15}N -NMR 及び 2D-HMQC, HMBC, INADEQUATE の解析結果より, 耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-アミノカルミン酸であることの確認を得ることができた.

E. 参考文献

- 1) Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T., Maitani, T., Structure of Acid-Stable Carmine, J. Food Hyg. Soc. Japan, **43**, 18-23 (2002).
- 2) 川崎洋子, 杉本 直樹, 佐藤 恭子, 山崎 壮, 石綿 肇, 米谷 民雄, 輸入アップルシロップ製品中の耐酸性コチニールの

同定, 食品衛生学雑誌, 43, 191-195 (2002).

3) 食品中の4-アミノカルミン酸の試験法について. (食安監発 0402 第1号, 平成25年4月2日).

4) Dapson, R. W., A Method for determining identity and relative purity of carmine, carminic acid and aminocarminic acid, *Biotechnic & Histochemistry*, 80, 201-205 (2005).

5) Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Lazzaro, F., Borzi, M. A., Traulo, P., Gagliano, G., Aminocarminic acid in E120-labelled food additives and beverages, *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 5, 295-300 (2012).

6) Ishida, T., Inoue, M., Baba, K., Kozawa, M., Absolute Configuration and Structure of Carminic Acid Existing as the Potassium Salt in *Dactylopius cacti* L., *Acta Cryst.* C43, 1541-1544 (1987).

7) Schmitt, P., Günther, H., Hägele, G., Stilke, R., A ¹H and ¹³C NMR study of Carminic Acid, *Org. Magn. Reson.*, 22, 446-449 (1984).

8) Schulze, F., Titus, J., Mettke, P., Berger, S., Siehl, H. U., Zeller, K. P., Sicker, D., Karminsäure : Das Rot aus *Cochenilleläusen*, *Chem. Unserer Zeit*, 47, 222-228 (2013).

9) Nieto, R., Cruz, F., Tejedor, J. M., Barroso, G., Cerdán, S., Origin of the ammonia used for mitochondrial citrulline synthesis as revealed by ¹³C-¹⁵N spin coupling patterns

observed by ¹³C NMR, *Biochimie*, 74, 903-911 (1992).

10) Boyd, M., Hay, M. P., Boyd, P. D. W., Complete ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR assignment of tirapazamine and related 1,2,4-benzotriazine N-oxides, *Magn. Reson. Chem.*, 44, 948-954 (2006).

11) Stathopoulou K., Valianou L., Skaltsounis A. L., Karapanagiotis I., Magiatis P., Structure elucidation and chromatographic identification of anthraquinone components of cochineal (*Dactylopius coccus*) detected in historical objects, *Analytica Chimica Acta*, 804, 264-272, (2013).

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) 原田晋, 小川有子, 杉本直樹, 穂山浩 : フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた, コチニール色素によるアナフィラキシーの2症例. *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌*, 8, 180-186 (2014).
- 2) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内嵩暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穂山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹: ¹H NMR による精確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討. *分析化学*, 63, 323-329 (2014).

2. 学会発表

- 1) Miura, T., Suematsu, T., Sugimoto, N., Nakao, S., Takaoka, S., Yamada, Y.: Development of quantity analytical standard by using qNMR. 3rd Annual

Practical Applications of NMR in
Industry Conference (PANIC) (2015. 2)

2) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山
卓美, 杉本直樹, 穠山浩: HILIC カラムを
用いた LC/MS によるカラメル III 中の 2-
アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイ
ミダゾール (THI) の直接定量. 日本食品
衛生学会第 108 回学術講演会 (2014. 12)

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし