

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
(H26-食品-一般-001)

平成28年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法の検討

～ラック色素のアンモニア処理および構造解析～

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 ラック色素の主成分ラッカイン酸類とコチニール色素の主成分カルミン酸は、アントラキノン骨格を持った水溶性の色素化合物で、その色調は酸性溶液では橙色、中性溶液で赤色、アルカリ性溶液で紫色を示す。一方、耐酸性カルミンと呼ばれる未指定添加物は、カルミン酸をアンモニア処理して得られる4-アミノカルミン酸を主色素成分とし、酸性条件下でも赤紫色を示すことが知られており、食品に添加される違反事例が報告されている。本研究はこの報告を元に、ラック色素をアンモニア処理し、酸性条件下での色調の確認とその主色素成分の構造解析を行なった。主色素成分として、4-アミノラッカイン酸Cを同定すると共に、LC/MS分析の結果、アンモニア処理ラック色素は4位のヒドロキシ基にアミノ基が置換した4-アミノラッカイン酸類を主色素成分とすることが確認された。現時点では、耐酸性カルミンと同様ないわゆる耐酸性ラック色素の報告はないが、容易に合成可能であることが確認されたことから、今後、未指定添加物として監視する必要があると考えられた。

研究協力者

多田敦子 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

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノン骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の1成分からなるのに対し¹⁾、ラック色素は、laccaic acid A, B, C, E等複数の成分から構成される(Fig. 1)^{2), 3)}。また、コチニール色素の主色素成分の carminic acid のレーキ化合物はカルミンと呼ばれ、我が国を除いた多くの国で食品に着色料として使用されている。さらに、その名称から混同されやすいが、carminic acid をアンモニアと反応させて得られる耐酸性カルミンと呼ばれる世界的にも使用が許可されていない着色料が2000年頃から流通し始めた⁴⁾。これらカルミン及び

耐酸性カルミンは carminic acid に対して化学的構造改変を伴うものであることから、我が国では既存添加物とは見なせず、食品への使用は共に認められていない。

耐酸性カルミンの特徴として、carminic acid が酸性溶液では橙色、中性溶液で赤色、アルカリ性溶液で赤紫色を示すのに対して、pHに依存せず、酸・アルカリ条件下でも赤色を示すことが挙げられる。2002年、我々の研究グループは、carminic acid と carminic acid 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 carminic acid 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)⁵⁾。この報告以降、欧州を中心に、実際に4-aminocarminic acid が食品に添加されたことを示す分析結果が報告されている^{6), 7), 8), 9)}。4-Aminocarminic acid は、carminic acid をアン

モニア処理することで, carminic acid の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に容易に置換し合成される. このような置換反応は, アントラキノン骨格を持つ化合物, ラック色素の主要成分である laccaic acid に対しても同様に起こりうると予想される. 現時点では, ラック色素をアンモニア処理して合成された, いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが, 今後, 流通が確認されたとき, これについても, 耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから, その分析法の確立が望まれる.

本研究では, 既報に従い^{4), 5)}, ラック色素をアンモニア処理し, LC/MS 及び NMR を用いて生成する色素成分の構造解析を行ったので報告する.

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ラック色素(粉末状)は, 日本シエラック工業(株)から購入した. ¹⁴N アンモニア水(¹⁴NH₄OH, Cat. No 016-03146)は, 和光純薬工業(株), ¹⁵N アンモニア水(¹⁵NH₄OH, Cat. No 609390)は, シグマアルドリッチ社より購入した. NMR 用溶媒 dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆)は, ISOTEC 社より購入した.

B-2) ラック色素のアンモニア処理

ラック色素 300 mg を, 100 mL の 10% アンモニア水を加えて溶解した後, スクリューキャップ付きのテストチューブに移し, ブロックヒーターで 120°C・2h 加熱した. ブロックヒーターのスイッチを切り, 一晚静置した後, 溶媒を減圧留去して得られた残渣をアンモニア処理ラック色素とした.

アンモニア処理ラック色素の色調は, 残渣約 300 mg に 200 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液を加えて溶解した後, 0.1% ギ酸水溶液(pH 2), 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液(pH 6)または 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液(pH 10)を加えて 100 倍希釈し, 各々を白色蛍光灯で確認した.

アンモニア処理ラック色素中の成分は, 上述の残渣 300 mg に 200 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液を加えて溶解した後, 0.1% ギ酸含有

20% メタノールを加えて 10 倍希釈し, この溶液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを LC/MS 用試料液とした.

LC 条件: 装置, ACQUITY UPLC/SQD system (Waters 社製); カラム, XTerra MS C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm, Waters 社製); カラム温度, 40°C; 移動相 A, 1% ギ酸含有水; 移動相 B, 1% ギ酸含有メタノール; 溶出, A : B = 80 : 20 (0-10 min)→75 : 25 (10-35 min); 注入量, 10 μL; 流速, 0.3 mL/min; PDA 検出器, 200 ~ 500 nm; 検出波長, 280 nm.

MS 条件: キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V; ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス流量, 600 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; スキャン範囲, *m/z* = 200 ~ 700 (ESI neg.).

B-3) Laccaic acid C 及び 4-aminolaccaic acid C の単離

ラック色素 2.5 g を 0.05% 炭酸ナトリウム溶液 500 mL に溶解させ, ろ紙ろ過(FILTER PAPER QUALITATIVE ADVANTEC No.2, 直径 15 cm, 東洋濾紙(株)製)した. このろ液を, あらかじめ 0.1% ギ酸含有 30% メタノールで平衡化しておいた ODS オープンカラム(Chromatorex ODS, 富士シリシア化学(株)製, Cat. No DM1020T, 4.0 mm i.d.×400 mm)に負荷し, 200 mL の 0.1% ギ酸含有 30% メタノールと 200 mL の 0.1% ギ酸含有 40% メタノールで段階的に溶出させた. 得られた 20 画分(それぞれ 20 mL)を上述の LC/MS に付し, laccaic acid C を含む画分をまとめて, 溶媒を減圧留去した. この操作を 20 回行い, ラック色素合計 50 g から laccaic acid C 粗分離画分とした. 次に得られた粗分離画分を再度 300 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液に溶解し, 下述の LC/MS 条件で分取を繰り返し, 1,700 mg の laccaic acid C を得た.

次に単離精製した laccaic acid C に対して, B-2 項に示したように ¹⁴NH₄OH または ¹⁵NH₄OH を加えて反応させて, 下述の LC/MS 条件で分取を繰り返し, 600 mg の ¹⁴N-4-aminolaccaic acid C 及び 50 mg の ¹⁵N-4-aminolaccaic acid C を得た. 分取 LC/MS: カラム, XTerra Prep RP18 (19 mm i.d.×100 mm, 5 μm, Waters 社製); カラム温度,

40°C；移動相 A，0.1%ギ酸含有水；移動相 B，0.1%ギ酸含有メタノール；溶出(laccaic acid C)，A : B = 75 : 25 (0-15 min)；溶出(4-aminolaccaic acid C)，A : B = 75 : 25→40 : 60 (0-10 min)；注入量，700 μ L；流速，8 mL/min；分取トリガー， m/z 538 [M-H]⁻ (laccaic acid C 及び ¹⁵N-4-aminolaccaic acid C)；分取トリガー(¹⁴N-4-aminolaccaic acid C)， m/z 537 [M-H]⁻。

B-4) NMR 分析

NMR スペクトルは、重溶媒に DMSO-*d*₆を用いて、JEOL 製 JNM-ECA800 を使用して測定した。プローブに JEOL CH UltraCOOL probe を用いて、¹H-、¹³C-NMR スペクトル及び COrelation Spectroscopy (COSY)，¹H-detected Multiple Quantum Coherence (HMQC)，¹H-detected Multi-Bond heteronuclear quantum Coherence (HMBC)，Incredible Natural Abundance Double QUANTum Transfer Experiment (INADEQUATE)測定した。

INADEQUATE 測定条件：probe temperature，50°C；relaxation delay，1 s；*J* constant，70 Hz；X points，8192；Y points，128；scan times，320000(laccaic acid C (4 days))及び 486400(aminolaccaic acid C (6 days))。

¹⁵N-NMR 測定条件：probe temperature，50°C；relaxation delay，2 s；Spectral width，-50 ~ 650；X points，32768；scan times，880；NOE，false。

C. 結果及び考察

C-1) アンモニア処理ラック色素の LC/MS 分析

ラック色素及びアンモニア処理ラック色素について色調の pH 依存性について検討したところ、ラック色素は pH が高くなるにつれて、橙色から紫色に変化した。一方、アンモニア処理ラック色素は pH に依存せず、紫色だった(Table 1)。

次に LC/MS 分析を実施したところ、ラック色素及びアンモニア処理ラック色素において、それぞれ5つのピークが確認された(ピーク 1~5，ラック色素；ピーク 1'~5'，アンモニア処理ラック色素)(Fig. 2)。ピーク 1~5 の吸収スペクトルが 490 nm 付近に極大吸収波長を示したの

に対して、ピーク 1'~5'のそれは、550 nm 付近に二つの極大吸収波長を示した。

各ピークに由来するマススペクトルを確認した結果、ピーク 1，2，4 及び 5 は、それぞれ m/z 494，538，495 及び m/z 536 を与える脱プロトン分子 [M-H]⁻ のピークが強く観測され、それぞれを laccaic acid E，C，B 及び A と同定した(Table 2)^{2), 3), 10), 11), 12), 13), 14)}。ピーク 3 に由来するマススペクトルには、 m/z 359，315 及び m/z 271 を与えるピークが観測された。これは、岡らがラック色素を LC/MS/MS 分析した際に観測した、anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体由来する m/z 359 [M-H]⁻，315 [M-H-CO₂]⁻ 及び m/z 271 [M-H-2CO₂]⁻ と一致していることから、ピーク 3 は anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体と推定した¹⁵⁾。

一方、ピーク 1'~5'に由来する m/z は、それぞれピーク 1~5 に対して 1 少ない値を示した(Table 2)。これは、既に杉本らが報告したように⁵⁾、カルミン酸をアンモニア処理した際、アントラキノン骨格の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換し、分子量が 1Da 減少する結果と一致し、すなわち、ピーク 1'~5'は、laccaic acid A，B，C，E 及び anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した色素化合物と推測された。

C-2) Laccaic acid C の構造解析

Laccaic acid 及びアンモニア処理を施して得られる誘導体の化学構造を明らかにすることにした。しかし、現在は laccaic acid A，B，C，E の標準試薬は市販されていない。そこで本研究では、ラック色素から laccaic acid を単離・精製した後、そのアンモニア処理誘導体を NMR 分析に付すことで構造を明らかにする。

ラック色素を ODS オープンカラムに付し、メタノールの濃度をステップワイズに上げて溶出した際、laccaic acid C が他の laccaic acid と容易に分離した。そこで、laccaic acid C を含む画分を集めた後、分取 LC/MS でさらに精製したところ、1,700 mg の laccaic acid C が得られた。500 mg の laccaic acid C を 600 μ L の DMSO-*d*₆ に

溶解し, NMR 分析に付した. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには, 芳香環に由来する δ_{H} 6.92, 7.04, 7.13 及び δ_{H} 7.56 のプロトンシグナルと δ_{H} 3.11 及び δ_{H} 4.12 のプロトンシグナルが観測された(Table 3). $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには, 25 のカーボンシグナルが観測された(Fig. 3)(Table 3). HMQC 分析において, δ_{H} 3.11, 4.12, 6.92, 7.04, 7.13 及び δ_{H} 7.56 は, それぞれ δ_{C} 35.36, 54.05, 116.48, 132.83, 130.82 及び δ_{C} 115.86 との相関が観測された. また HMBC 分析では δ_{H} 6.92 と δ_{C} 119.36 及び δ_{C} 125.0, δ_{H} 7.04 と δ_{C} 35.36, 125.55, 130.82 及び δ_{C} 155.00, δ_{H} 7.13 と δ_{C} 132.83 及び δ_{C} 155.00, δ_{H} 7.56 と δ_{C} 118.32, 121.23, 168.54, 183.12 及び δ_{C} 186.75 の相関が観測された. いずれのプロトンと相関が得られなかった 10 個のカーボンシグナルについては, 2D-INADEQUATE 分析で $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関を観測し, 帰属することにした. その結果, 次に示す $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関が観測された. δ_{C} 121.23-140.17-(169.53)-118.32-136.53-(115.86)-(169.65)-186.75-118.83-(104.90)-(183.12)-148.50-153.12-122.55-(158.93)-(104.90)-119.36-(155.00)-(116.48)-132.83-125.04-130.82 及び δ_{C} 54.05 - 170.76 (Fig. 4).

NMR 分析及び LC/MS 分析の結果から, Fig. 4 に示した化学構造が導かれ, 既に報告されている laccaic acid C の化学構造と矛盾のない結果が得られた¹³⁾.

C-3) 4-Aminolaccaic acid C の構造解析

C-2 で単離した laccaic acid C 800 mg をアンモニア処理し, LC/MS 分析に付した結果, その保持時間, 吸収スペクトル及びマススペクトルは, ピーク 2' のそれと一致した. 次に, アンモニア処理 laccaic acid C を NMR 分析に付した. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには, 芳香環に由来する δ_{H} 6.81, 7.05, 7.32 及び δ_{H} 7.57 のプロトンシグナルと δ_{H} 2.99, 3.11 及び δ_{H} 3.83 のプロトンシグナルが観測された(Table 3). $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには, 25 のカーボンシグナルが観測された(Fig. 3)(Table 3). HMQC 分析において, δ_{H} 3.83, 6.81, 7.05, 7.32, 及び δ_{H} 7.57 は, それぞれ, δ_{C} 54.99, 118.12, 129.06, 133.78 及び δ_{C} 113.88 との相関が観測された. また, δ_{H} 2.99 及び δ_{H} 3.11

は δ_{C} 35.78 との相関が観測された. HMBC 分析では δ_{H} 6.81 と δ_{C} 122.59, 124.83 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.05 と δ_{C} 35.78, 125.59, 133.78 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.32 と δ_{C} 35.78, 116.08, 129.06 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.57 と δ_{C} 119.62, 138.33, 167.20, 169.41, 177.15 及び δ_{C} 180.00 の相関が観測された. 2D-INADEQUATE 分析では次に示す $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関が観測された.

δ_{C} 138.66-119.99-167.20-113.88-138.33-119.62-138.66, δ_{C} 180.00-104.76-(144.11)-102.00-177.15, δ_{C} 116.08-122.59-133.78-124.83 及び δ_{C} 129.06-118.12-155.85 (Fig. 5).

残りの 4 つのカーボンシグナル(δ_{C} 162.84, 164.43, 170.59 及び δ_{C} 171.07)については, laccaic acid C のケミカルシフトから推定して, 帰属した(Table 3).

Laccaic acid C と同じく, アンモニア処理 laccaic acid C もカーボンと隣接する 7 つのプロトン及び 25 のカーボンを有していた. このことから, laccaic acid C と比べてアンモニア処理 laccaic acid C が 1Da 少ない分子量を示すことは, アンモニア処理により, laccaic acid C のヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換したためと推測された. そこで, アミノ基(-NH₂)の置換位置を明らかにする目的で, laccaic acid C を $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ を用いてアンモニア処理し, NMR に付した. ^{14}N のスピン量子数が 1 なのに対して, ^{15}N のそれは 1/2 であるため, $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ のカップリングが生じる¹⁶⁾. 実際には, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには 25 のカーボンシグナルが観測され, そのうち 4 位のカーボンシグナルは, ダブルレット ($J_{\text{CN}} = 15.41$ Hz) のシグナルとして観測された(Fig. 6). 以上の結果から laccaic acid C をアンモニア処理して得られる誘導体は, 4-aminolaccaic acid C であることを明らかにした.

Laccaic acid A, B 及び E のアントラキノン骨格に結合したヒドロキシ基の位置は, laccaic acid C のそれと同じである. また, LC/MS 分析から推定された anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体も, アンモニア処理により laccaic acid(A, B, C 及び E)と同様に, 分子量が 1 少なくなること, 極大吸収波長が長波長側にシフトすることから, laccaic acid(A, B, C 及び E)と同じア

ントラキノ骨格を持つと推測される。以上の理由から、本研究ではピーク 1', 3', 4'及び 5'を、それぞれ、4-aminolaccaic acid E, 4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid 誘導体, 4-aminolaccaic acid B 及び 4-aminolaccaic acid A と結論した(Table 2)。

D. 結論

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノ骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の 1 成分からなるのに対し、ラック色素は、laccaic acid A, B, C, E 等複数の成分から構成される。ラック色素をアンモニア処理することで pH に依存しない色調が確認された。これは、ラック色素中の主色素成分 laccaic acid A, B, C 及び E の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した 4-aminolaccaic acid A, B, C 及び E に起因することを明らかにした。現時点では、ラック色素をアンモニア処理して合成された、いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが、今後、流通が確認されたとき、これについても、耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから、その分析法の確立が必要と考えられた。また、食品の製造過程において、ラック色素から意図せず 4-aminolaccaic acid 類が産生される可能性は否定できない。この点については、耐酸性カルミン(4-aminocarminic acid)と同様に注意が必要であり、4-aminolaccaic acid 及び 4-aminocarminic acid が食品または添加物から検出された際、それらが意図せず産生されたものなのかの判断基準を整理しておく必要があると思われる。

E. 参考文献

- 1) Schmitt, P., Günther, H., Hägele, G., Stilke, R., A ¹H and ¹³C NMR study of carminic acid. *Org. Magn. Reson.*, **22**, 446-449 (1984).
- 2) Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K.,

Tanaka, T., Mizuno, M., Identification of lac dye components by electrospray high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Mass Spec. Soc. Jpn.*, **46**, 63-68 (1998).

- 3) Hirata, K., Uematsu, Y., Suzuki, K., Iida, K., Yasuda, K., Saito, K., Analysis of main pigments and other ingredients in lac color product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **42**, 109-113 (2001).

- 4) Schul, J., U.S. Patent 5147673 (Sep. 15, 1992).

- 5) Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T., Maitani, T., Structure of acid-stable carmine. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **43**, 18-23 (2002).

- 6) Kawasaki, Y., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Ishiwata, H., Maitani, T., Identification of acid-stable carmine in imported apple syrup product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **43**, 191-195 (2002).

- 7) 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*, **5**, 295-300 (2012).

- 8) Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mastroianni, R., Mazzucco, E., Manfredi, M., Marengo, E., Retrospective analysis for the identification of 4-aminocarminic acid photo-degradation products in beverages. *Food additives & Contaminants: Part A*, **32**, 285-292 (2015).

- 9) Miller, A., Lassek, E., Pfister, J., Klinger, R., Höbel, W., Knapp, H., Gaßmann, F., Wollein, U., Schramek, N., Detection of 4-aminocarminic acid in beverages and cake glaze from the German market: a food additive not approved in the EU. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **11**, 127-135 (2016).

- 10) Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Lac pigments: part III-isolation of laccaic acid A & B & the constitution of laccaic acid A. *Indian J. Chem.*, **7**, 977-986 (1969).

- 11) Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N.,

Venkataraman, K., The constitution of laccaic acid B. *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2437-2440 (1967).

12) Bhide, N. S., Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Srinivasan, R., Lac pigments: part IV—constitution of laccaic acid B. *Indian J. Chem.*, **7**, 987-995 (1969).

13) Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Venkataraman, K., Laccaic acid C, the first natural anthraquinone with an amino acid side chain. *Indian J. Chem.*, **7**, 188-189 (1969).

14) Mehandale, A. R., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Venkataraman, K., Desoxyerythrolaccin and laccaic acid D. *Tetrahedron Lett.*, **18**, 2231-2234 (1968).

15) Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Nakazawa, H., Ito, Y., Separation of lac dye components by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, **813**, 71-77 (1998).

16) Nieto, R., Cruz, F., Tejedor, J.M., Barroso, G., Cerdán, S., Origin of the ammonia used for mitochondrial citrulline synthesis as revealed by ^{13}C - ^{15}N spin coupling patterns observed by ^{13}C NMR. *Biochimie*, **74**, 903-911 (1992).

F. 研究業績

1. Nishizaki, Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Preparation of ammonia-treated lac dye and structure elucidation of its main component. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **57**, 193-200 (2016).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

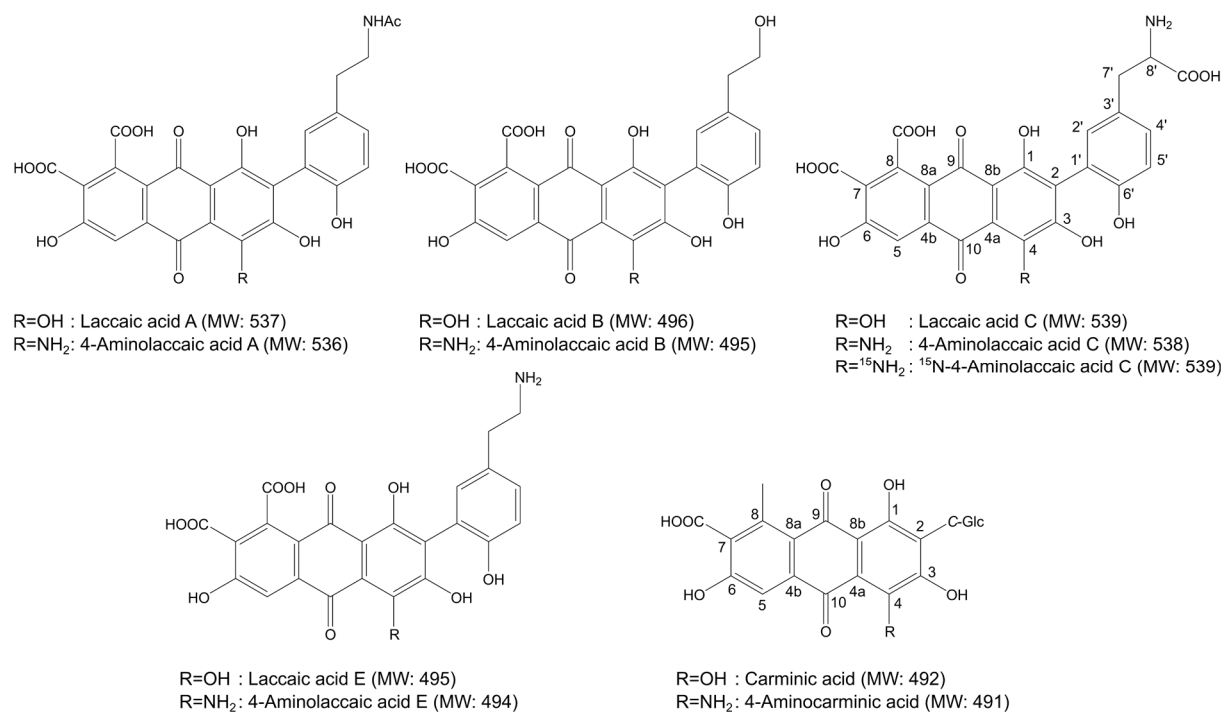


Fig. 1 Structures of anthraquinone derivatives in this study.

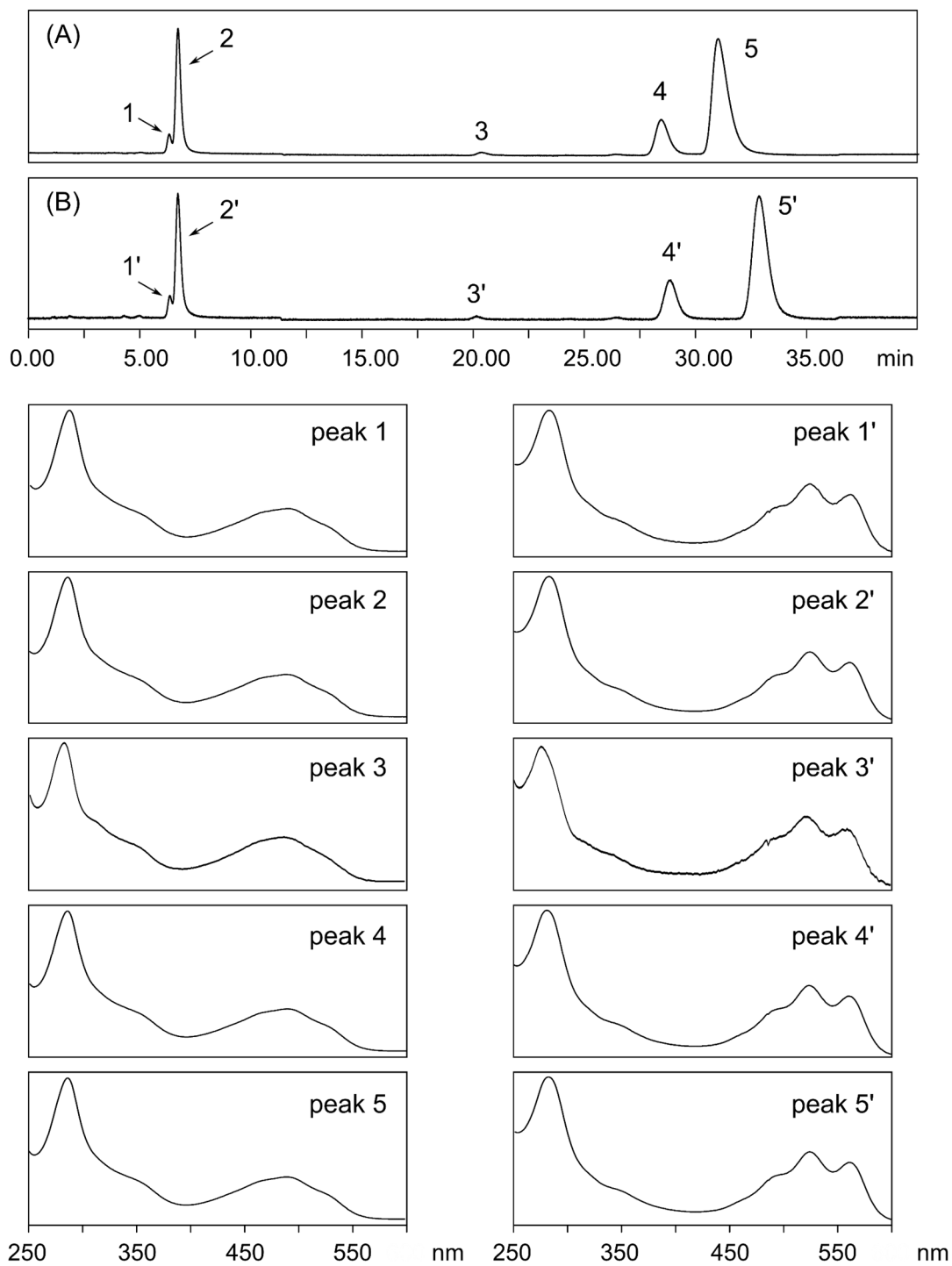


Fig. 2. LC/MS analysis of lac dye and ammonia-treated lac dye.

(A) Lac dye; (B) Ammonia-treated lac dye. HPLC chromatograms were recorded at 480 nm. PDA spectra of peaks 1 to 5 and 1' to 5' are shown below. MS analyses of peaks a to e and 1' to 5' are summarized in Table 2.

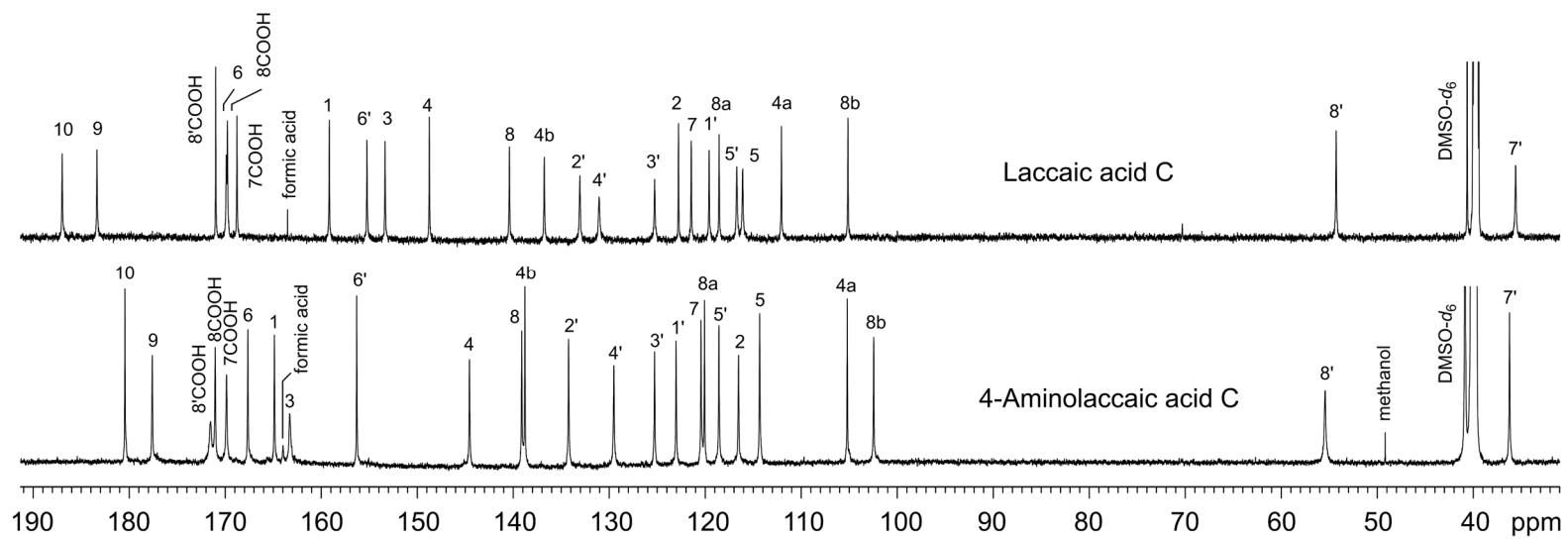


Fig. 3. ¹³C-NMR spectra of laccaic acid C and 4-aminolaccaic acid C.

¹³C-¹⁵N spin coupling of ¹⁵N-4-aminolaccaic acid C was observed at δ_C 141.44 (15.41 Hz) (Fig. 6).

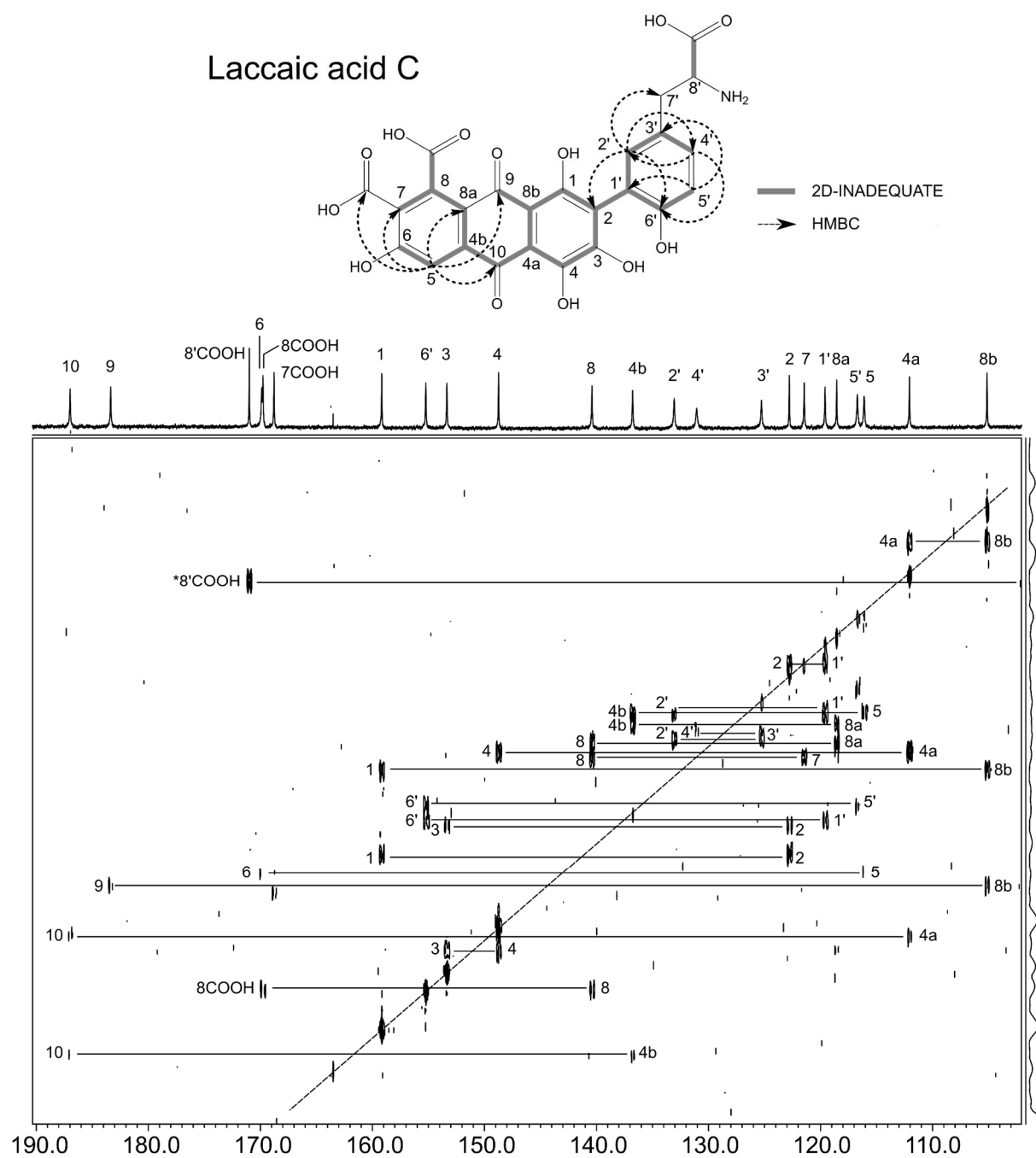


Fig. 4. 2D-INADEQUATE spectrum of laccaic acid C.

* indicate carbon skeletons as follows: δ_C 54.05-170.76 (8'-8'COOH).

4-aminolaccaic acid C

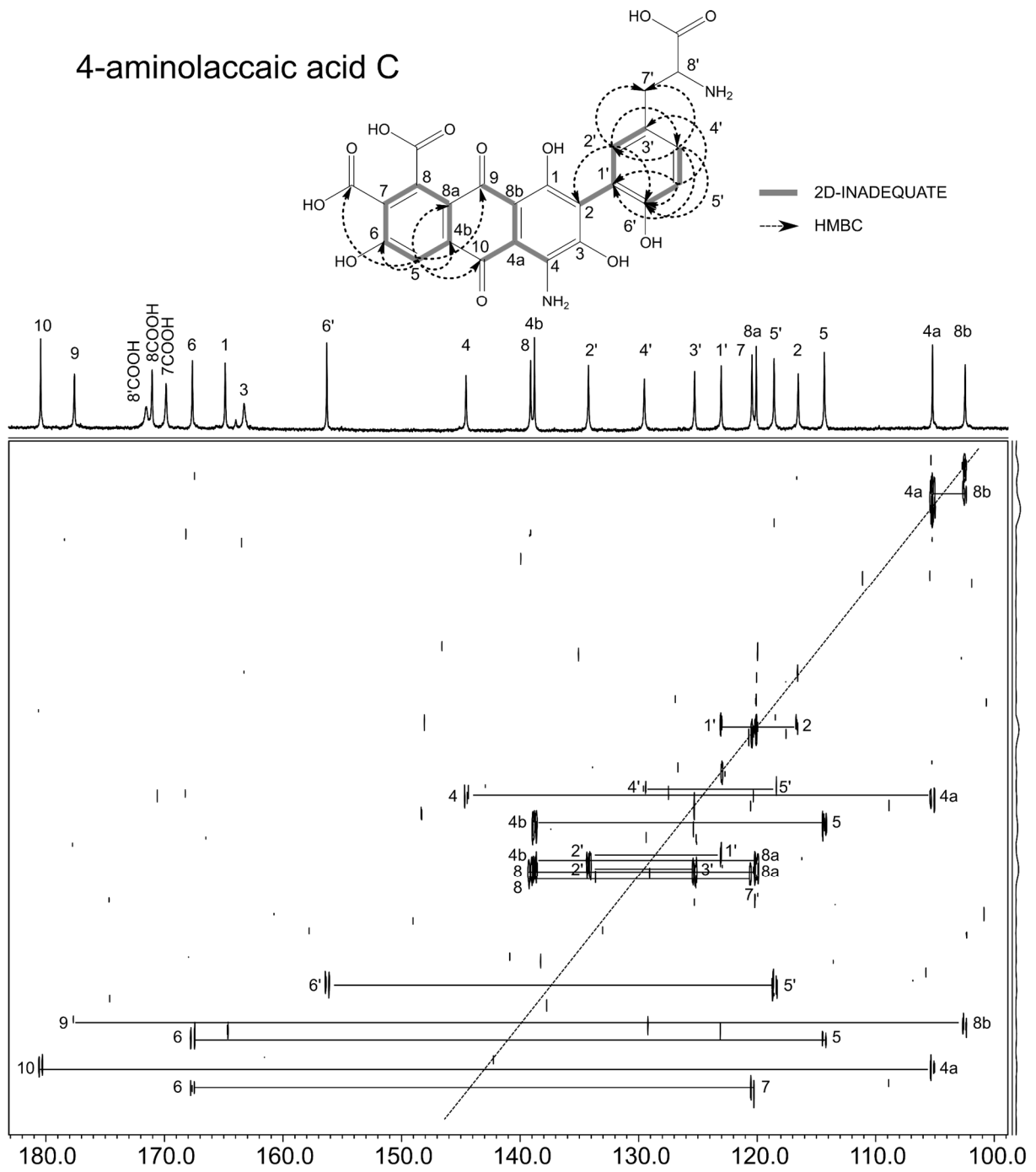


Fig. 5. 2D-INADEQUATE spectrum of 4-aminolaccaic acid C.

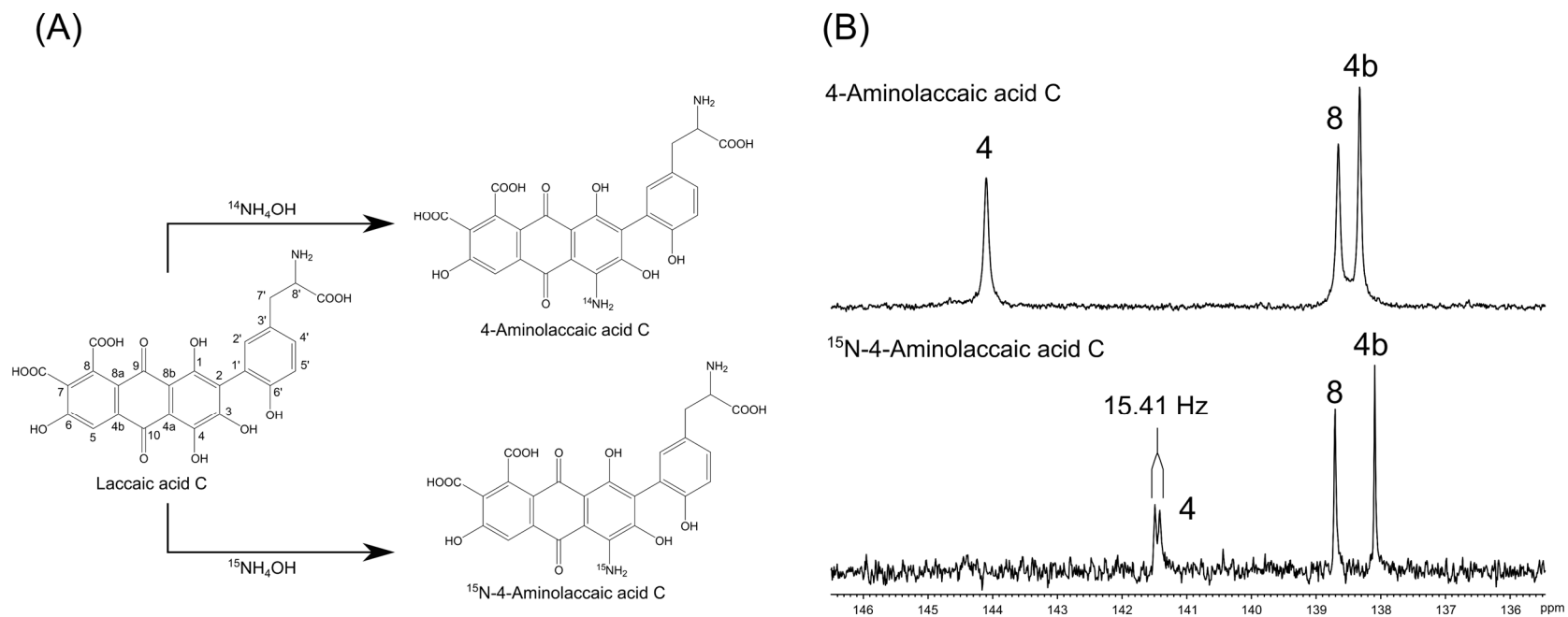


Fig. 6. Synthesis of ^{14}N - and ^{15}N -4-aminolaccaic acid C (A) and ^{13}C -NMR spectra of ^{14}N - and ^{15}N -4-aminolaccaic acid C (B).

Table 1. The color of lac dye and ammonia-treated lac dye at different pH conditions.

Lac dye			Ammonia-treated lac dye		
pH 2	pH 6	pH 10	pH 2	pH 6	pH 10
orange	red	purple	purple	purple	purple

The pH solutions consisted of 0.1% formic acid (pH 2), 10 mM ammonium formate (pH 6), and 0.05% sodium carbonate solution (pH 10).

Table 2. The observed m/z of peaks 1–5 and 1'–5' in lac dye and ammonia-treated lac dye, respectively, as determined by LC/MS analysis.

Lac dye			Ammonia-treated lac dye		
peak	m/z	Compound	peak	m/z	Compound
1	494	laccaic acid E	1'	493	4-aminolaccaic acid E
2	538	laccaic acid C	2'	537	4-aminolaccaic acid C
3	359	anthraquinonedicarboxylic acid derivative	3'	358	4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid derivative
4	495	laccaic acid B	4'	494	4-aminolaccaic acid B
5	536	lacciac acid A	5'	535	4-aminolaccaic acid A

Peaks 1–5 and 1'–5' are shown in Fig. 2.

Table 3. ¹H- and ¹³C-NMR chemical shifts of laccaic acid C and 4-aminolaccaic acid C

No.	Laccaic acid C		4-Aminolaccaic acid C	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	-	158.93	-	164.43*
2	-	122.55	-	116.08
3	-	153.12	-	162.84*
4	-	148.50	-	144.11
4a	-	118.83	-	104.76
4b	-	136.53	-	138.33
5	7.56 (1H, s)	115.86	7.57 (1H, s)	113.88
6	-	169.65	-	167.20
7	-	121.23	-	119.99
8	-	140.17	-	138.66
8a	-	118.32	-	119.62
8b	-	104.90	-	102.00
9	-	183.12	-	177.15
10	-	186.75	-	180.00
1'	-	119.36	-	122.59
2'	7.04 (1H, s)	132.83	7.32 (1H, s)	133.78
3'	-	125.04	-	124.83
4'	7.13 (1H, d, <i>J</i> =5.50)	130.82	7.05 (1H, d, <i>J</i> = 5.50)	129.06
5'	6.92 (1H, d, <i>J</i> =7.34)	116.48	6.81 (1H, d, <i>J</i> =7.34)	118.12
6'	-	155.00	-	155.85
7-COOH	-	168.54	-	169.41
8-COOH	-	169.53	-	170.59**
7'	3.11 (2H, brs)	35.36	2.99 (1H, s)	35.78
			3.11 (1H, s)	
8'	4.12 (1H, s)	54.05	3.83 (1H, s)	54.99
8'-COOH	-	170.76	-	171.07**

Solvent, DMSO-*d*₆. brs, broad singlet; d, doublet; s, singlet. Sets of * and ** indicate interchangeable.