

Fig. 3. Mass spectra of major constituents in grapefruit seed extract (GSE) products
a) Peak X in sample S12. b) Peaks A-F in sample S1.

行った。その結果、賦形剤として用いた糖類に由来すると考えられるシグナル(3.42~3.58)以外に、長鎖アルキル基(0.89 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3), 1.28~1.36, 1.89 (m, $\text{CH}_2 \times n$)), *N*-メチル基(2.92 (6H, s, $\text{CH}_3 \times 2$), *N*-ベンジル基

(4.68 (2H, s, CH_2), 7.50~7.58 (5H, m, Ph-H $\times 5$))と考えられるBZK由来のシグナルが観察された。さらに、製品S1にアルキル鎖長C14のBZK-Cl標品を添加し、同様にしてNMR測定を行ったところ、新たなシグナルは観察されず、

BZK に由来するシグナル強度のみが増大したことから、観察された NMR シグナルが BZK に由来すること、また、LC/MS において製品 S1 中に観察されたピーク A~F が、アルキル鎖長 C8~18 の BZK であることが確認された。

一方、著者らが市販グレープフルーツ(ホワイト種)より種子を取り出し、それを原料として調製したエタノール抽出物のクロマトグラムを Fig. 2c に示したが、保持時間 3.8 分、4.5 分および 5.7 分にピーク 1, 2, 3 が観察され、ESI (pos.) において、 m/z 273, 471 および 515 を与えた。これらは、それぞれグレープフルーツおよび種子の成分として知られるナリンゲニン(naringenin (MW: 272)), リモニン(limonin (MW: 470))⁶⁾ およびノミリン(nomilin (MW: 514))⁶⁾ の標品と保持時間およびマススペクトルが一致した。なお、市販グレープフルーツ(ルビー種)を用いた場合も同様な結果であった。したがって、市販グレープフルーツの種子より調製したエタノール抽出物中には、BZT および BZK は全く検出されなかったことから、GSE 製品が BZT および BZK を含有する原因は現時点では明らかではないが、製造工程で混入あるいは人為的に添加された可能性も考えられる。

2. GSE 製品および GSE 配合製品中の BZT および BZK の定量

実際に市場で流通している食品添加物 GSE 製品 (6 社 13 製品)、化粧品配合剤 GSE 製品 (10 社 16 製品)、さらに GSE を配合した健康食品製品 (4 社 5 製品) および除菌・消臭スプレー製品 (7 社 7 製品) 中の BZT および BZK の定量を行った。各試料中の BZT および BZK は、各標品との保持時間および MS スペクトルの一致により同定した。なお、BZT および BZK の含量は、塩化物 (BZT-Cl および BZK-Cl) として求め、アルキル鎖長の異なる BZK に由来するピーク A~F が観察された製品については、観察されたピーク面積を合算し、アルキル鎖長 C14 の BZK-Cl 相当量として算出した (Table 1)。

食品添加物 GSE 13 製品では、BZK が 11 製品より 0.007~13.9% 検出された。その濃度は製品によって大きく異なり、粘性の高い製品 S1~S3 が高い値を示したのに対し、粘性の低い液体または粉末状の製品 S4~S11 では低い値を示した。これら 11 製品は、液体製剤または粉末製剤であり、各製品の内容物表示または添付文書に GSE を主たる成分とする製剤であることが記載されていた。また、高濃度の BZT が検出された食品添加物 GSE 1 製品 S12 の製品の内容物表示または添付文書には、主成分が脂肪酸およびフラボノイドであると記載されていた。また前述のように、市販グレープフルーツの種子より調製したエタノール抽出物では、フラボノイドとしてナリンゲニン (Fig. 2, ピーク 1) が検出されたが、BZK が高濃度に検出された食品添加物 GSE 製品 S1~3 および BZT が高濃度に検出された製品 S12 の分析で、ナリンゲニンは検出されなかった (検出下限約 5 ppm)。なお、製品 S13 では BZT または BZK いずれも検出されず、オレイン酸および

リノール酸が主成分として検出されたが、ナリンゲニンは観察されなかった。

化粧品配合剤 GSE 製品 (10 社 16 製品) では、すべての製品 S14~29 より BZT が主成分として高濃度 (14.6~28.8%) で検出された。また、このうち、1 製品 S29 からは、BZT および BZK の両者が検出された。なお、今回入手した化粧品配合剤 GSE 製品は、天然志向の自家製化粧品を調製するための基剤の 1 つとして販売されており、内容物表示または添付文書には、天然由来の GSE と記載されているのみで、BZT または BZK が含まれているとは全く記載されていない。

健康食品製品 (4 社 5 製品) のうち、GSE を有効成分とする健康食品 2 製品 S30, 31 より BZT が検出された。また、健康食品製品 S32 は、ローカロリー甘味料として販売されているものであるが、非常に低濃度の BZT が検出された。これは、その内容物表示に、GSE が内容物の 1 つとして記載されていたことから、BZT を含有する GSE を配合した結果と考えられた。

除菌・消臭スプレー製品 (7 社 7 製品) は、いずれも GSE を天然抗菌成分として配合し、食品、台所、まな板および食品製造機器用の殺菌・消臭を目的とするものである。いずれの製品の内容物表示にも BZT または BZK を配合しているとの記載はなかったが、7 製品中 3 製品 S35, S36, S41 より BZK が、4 製品 S37~40 より BZT が検出された。

BZT および BZK は、日本薬局方に収載され、厚生労働局長通知「名称を記載しなければならない医薬部外品の成分の別名等について」^{*5)} に含まれる成分名の表示が義務づけられている医薬品であり、また、食品添加物としての使用は認められていない。BZT-Cl および BZK-Cl の急性毒性^{*6)}は、BZT-Cl: ラット経口 LD₅₀ 368 mg/kg, マウス経口 LD₅₀ 338 mg/kg, BZK-Cl: ラット経口 LD₅₀ 240 mg/kg, とされているが、どのくらいの量の BZT または BZK を含有する GSE 製品が食品に一般的に使用されているかが不明であるため、これら GSE 製品が人体に与える影響については不明である。しかし、EFSA (European Food Safety Authority: 欧州食品安全庁) が欧州連合域内の食品の安全確保対策の一環として、食品及び飼料に関する衛生情報を相互交換するシステムとして構築した EU/RASFF (European Union/Rapid Alert System for Food and Feed: 欧州連合の食品および飼料に関する緊急警告システム) においては、GSE 製品中から BZT が検出された例が食品不適格事例としてたびたび通告されている^{*7)}。

*5) 厚生労働局長通知「名称を記載しなければならない医薬部外品の成分の別名等について」薬食発第 0307001 号, 平成 19 年 3 月 7 日 (2007)。

*6) MDL Information Systems, Inc., Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)。

*7) EU/RASFF (European Union/Rapid Alert System for Food and Feed. http://ec.europa.eu/food/food/rapid-alert/index_en.htm (Accessed on 29 June 2007)。

今回、著者らが食品添加物 GSE 製品 (6 社 13 製品)、化粧品基剤 GSE 製品 (10 社 16 製品)、GSE 配合健康食品製品 (4 社 5 製品) および除菌・消臭スプレー製品 (7 社 7 製品) 中の BZT および BZK の定量を行った結果、41 製品中 38 製品より BZT または BZK が検出されたことから、わが国に流通する GSE 製品の多くが BZT または BZK を含有している可能性が高いと考えられる。したがって、わが国においても、GSE 製品およびこれを配合した製品の使用については十分な注意が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 日本食品添加物協会 “既存添加物名簿収載品目リスト注解書”, 1999.
- 2) von Woedtke, T., Schluter, B., Pffegel, P., Lindequist, U. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, **54**, 452-456 (1999).
- 3) Takeoka, G., Dao, L., Wong, R., Lundin, R., Mahoney, N. Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3316-3320 (2001).
- 4) Takeoka, G., Dao, L., Wong, R., Mahoney, N. Identification of benzalkonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7630-7636 (2005).
- 5) Ganzera, M., Aberham, A., Stuppner, H. Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in grapefruit seed extract. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3768-3772 (2006).
- 6) Ozaki, Y., Fong, C., Herman, Z., Maeda, H., Miyake, M., Ifuku, Y., Hasegawa, S. Limonoid glucosides in *Citrus* seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 137-141 (1991).

調査・資料

既存添加物エステル系ガムベースの成分分析

(2007年3月19日受理)

多田敦子^{1,*} 増田愛乃^{2,3} 杉本直樹¹
山形一雄² 山崎 壮¹ 棚元憲一¹

Analysis of Constituents of Ester-Type Gum Bases Used as Natural Food Additives

Atsuko TADA^{1,*}, Aino MASUDA^{2,3}, Naoki SUGIMOTO¹,
Kazuo YAMAGATA², Takeshi YAMAZAKI¹ and Kenichi TANAMOTO¹

¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

²College of Bioresource Sciences, Nihon University: 1866 Kameino,
Fujisawa-shi, Kanagawa 252-8510, Japan;

³Present address: Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences,
University of Shizuoka: 52-1 Yata, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan;

*Corresponding author

The differences in the constituents of ten ester-type gum bases used as natural food additives in Japan (urushi wax, carnauba wax, candelilla wax, rice bran wax, shellac wax, jojoba wax, bees wax, Japan wax, montan wax, and lanolin) were investigated. Several kinds of gum bases showed characteristic TLC patterns of lipids. In addition, compositions of fatty acid and alcohol moieties of esters in the gum bases were analyzed by GC/MS after methanolysis and hydrolysis, respectively. The results indicated that the varieties of fatty acids and alcohols and their compositions were characteristic for each gum base. These results will be useful for identification and discrimination of the ester-type gum bases.

(Received March 19, 2007)

Key words: 食品添加物 food additive; ガムベース gum base; ワックス wax; エステル ester; トリグリセリド triglyceride; 脂肪酸 fatty acid; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

緒 言

既存添加物名簿収載品目リスト^{*1}に収載されている天然由来のガムベースの中には、ワックス（ろう）と総称されている品目群が含まれている。ワックスとは狭義には高級脂肪酸と高級アルコールのエステル（以下、長鎖エステル）を指す。しかし、一般的には、これと似た性状を示す、脂肪酸とステロールのエステル、脂肪酸とグリセロールのエステル（トリグリセリド）、さらには長鎖炭化水素までを含めて広義にワックス（ろう）と言われることが多い。原料も植物、動物、鉱物、石油と多岐にわたる。食品

添加物においても広義のワックスがガムベースとして既存添加物名簿に収載されている。これまで、既存添加物として国内で流通しているワックスの成分については詳細な検討がなされておらず、成分組成に関する情報も少ないため、その成分内容等の実態が把握できていない。これらのうち、エステル結合をもつ化合物を構成成分として含有するとされている品目（以下、エステル系ガムベース）に注目すると、成分規格がある品目としては、カルナウバロウ、カンデリラロウおよびミツロウが第7版食品添加物公定書¹⁾に収載されており、ランolinが第8版²⁾に新規収載された。また、日本食品添加物協会による第三版既存添加物自主規格³⁾には、ウルシロウ、コメヌカロウ、シェラックロウ、ホホバロウ、モクロウおよびモンタンロウが収載されている。現時点では既存添加物としての国の成分規格が定められていない品目が多いことから、今後国の成分規格案を検討するうえでも詳細な成分分析が必要である。

そこで、日本食品添加物協会より既存添加物として提供されたエステル系ガムベース 10 品目を用い、その成分内

* 連絡先

¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

² 日本大学, 生物資源科学部, 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

³ 現所属: 静岡県立大学大学院, 生活健康科学研究科, 〒422-8526 静岡県駿河区谷田 52-1

^{*1} 厚生省生活衛生局長通知“食品衛生法に基づく添加物の表示等について、別添1 既存添加物名簿収載品目リスト”平成8年5月23日, 衛化第56号(1996). [最終改正 平成19年9月11日]

容の実態把握を目的として、各品目の成分組成を TLC および GC/MS により分析した。さらに、含有成分の差異について検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

既存添加物エステル系ガムベースは、日本食品添加物協会より現在入手可能な品目として提供を受けた 10 品目各 1 検体 (ウルシロウ (urushi wax), カルナウバロウ (carnauba wax), カンデリラロウ (candelilla wax), コメヌカロウ (rice bran wax), シェラックロウ (shellac wax), ホホバロウ (jojoba wax), ミツロウ (bees wax), モクロウ (Japan wax), モンタンロウ, (montan wax) および ラノリン (lanolin)) を用いた。また、上記既存添加物と同様の製品名を有する試薬が市販されている場合には購入し、比較対照として用いた。カルナバワックス (carnauba wax) (Alfa Aesar 社製, 和光純薬工業(株)販売) および カルナウバロウ黄色 (carnauba wax yellow) (Acros Organics 社製, 関東化学(株)販売) をカルナウバロウの対照試薬として、蜜ろう白色ペレット (bees wax, white pellets), 蜜ろう黄色ペレット (bees wax, yellow pellets) (和光純薬工業(株)製), ミツロウ黄色 (bees wax, yellow), ミツロウ白色 (bees wax, white) (ナカライテスク(株)製), および蜜ろう (bees wax) (関東化学(株)製) をミツロウの対照試薬として、ラノリン無水 (lanolin Anhydrous) (MP Biomedicals 社製, 和光純薬工業(株)販売), ラノリン無水 (lanolin, anhydrous (technical grade)) およびラノリン (lanolin) (Alfa Aesar 社製, 和光純薬工業(株)販売) をラノリンの対照試薬として用いた。

TLC および GC/MS 分析用標品として、次に示す試薬を用いた。脂肪酸メチルエステル混合物 (oil reference standard, AOCS, Cat. No. O7756, SUPELCO 社製, C14~C24 直鎖偶数飽和脂肪酸, C18, C20, C22 直鎖一価不飽和脂肪酸, C18 直鎖二価および三価不飽和脂肪酸の計 11 種含有), 直鎖飽和脂肪酸メチルエステルキット (Cat. No. ME7-1KT, SUPELCO 社製, C25~C31 直鎖飽和脂肪酸メチルエステル 7 種含有), およびバクテリア酸メチルエステル (Bacterial acid methyl ester CP mix, AOCS, Cat. No. 47080-U, SUPELCO 社製, C16 の 2-ヒドロキシ直鎖飽和脂肪他 25 種の脂肪酸メチルエステルを含有)。長鎖脂肪酸およびトリグリセリド標品として *cis*-11-イコセン酸 (*cis*-11-icosenoic acid) およびトリパルミチン (tripalmitin) (SIGMA-ALDRICH 社製), 炭化水素標品として *n*-ヘプタコサン (*n*-heptacosane), *n*-ノナコサン (*n*-nonacosane), *n*-ヘントリアコタン (*n*-hentriacotane) および *n*-トリトリアコタン (*n*-tritriacotane) (FLUKA 社製), *cis*-13-ドコセノール (*cis*-13-docosenol) (長鎖アルコール標品, 東京化成工業(株)製), 11-イコセノール (11-icosenol) (長鎖アルコール標

品, MP Biomedicals 社製), ジおよびモノグリセリド標品として 1-モノパルミチン (1-monopalmitin) および 1,2-ジパルミチン (1,2-dipalmitin) (フナコシ(株)製), ステロール標品として ステグマステロール (stigmasterol) (タマ生化学(株)製) を用いた。また、日本食品添加物協会を通じて入手した既存添加物植物性ステロール (phytosterols mixture) を、ステロールエステルおよびステロール確認用標品として用いた。

トリメチルシリル (TMS) 化およびメタノリシスの反応試薬として、トリメチルシリル化試薬 (TMSI-H, ジーエルサイエンス(株)製) および 5% 塩化水素-メタノール溶液 (和光純薬工業(株)製) を用いた。

2. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS): (株)島津製作所製 GC/MS system (GCMS-QP5050)

3. TLC 分析

各種エステル系ガムベース製品は、ヘキサンに溶解して 10 mg/mL の試料溶液を調製し、5 μ L を silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (10 \times 10 cm, No. 5628, Merck 社製) にスポットした。ただし、シェラックロウはヘキサンに不溶であったためトルエンに溶解し、5 mg/mL の試料溶液を調製し、10 μ L をスポットした。また、各種標準試薬の調製に用いた溶媒、濃度およびスポット量は、次に示すとおりである。ヘントリアコタン (20 mg/mL トルエン, 8 μ L), 既存添加物植物性ステロール (5 mg/mL ヘキサン, 1 μ L), トリパルミチン, 1,2-ジパルミチン および 1-モノパルミチン (5 mg/mL ヘキサン, 6 μ L), *cis*-11-イコセン酸 および *cis*-13-ドコセノール (10 mg/mL ヘキサン, 1.5 μ L), ステグマステロール (ステロール標準品, 10 mg/mL ヘキサン, 0.5 μ L)。また、長鎖エステル標品として、既報⁴⁾で合成したイコセン酸イコセニル (1 mg/mL ヘキサン, 5 μ L) を用いた。展開溶媒として、ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸混液 (80:20:1) を用いた。原点より約 8 cm 展開後、十分に風乾した後に、10% 硫酸エタノール溶液を噴霧し加熱するか、またはヨウ素ガスに曝露させて、各スポットの可視化を行った。各試料の TLC 分析は 2 回ずつ繰り返して 2 試験の結果が一致することを確認し、結果として示した。

4. GC/MS 分析

各ガムベースの総脂肪酸および長鎖アルコールの組成を比較するために、以下に示す方法で遊離およびエステル構成脂肪酸および長鎖アルコールを誘導体化し、GC/MS で分析した。

脂肪酸組成分析用には、各試料 3.0 mg を既報⁴⁾と同様の方法でメタノリシスし、脂肪酸メチルエステル体に誘導体化し、ヘキサン抽出層を 3.0 mL に定容した試料を用いた。別途、脂肪酸メチルエステル混合物、直鎖飽和脂肪酸メチルエステルキットおよびバクテリア酸メチルエステルの各 1.0 mg/mL ヘキサン溶液を調製し、比較標準液とした。

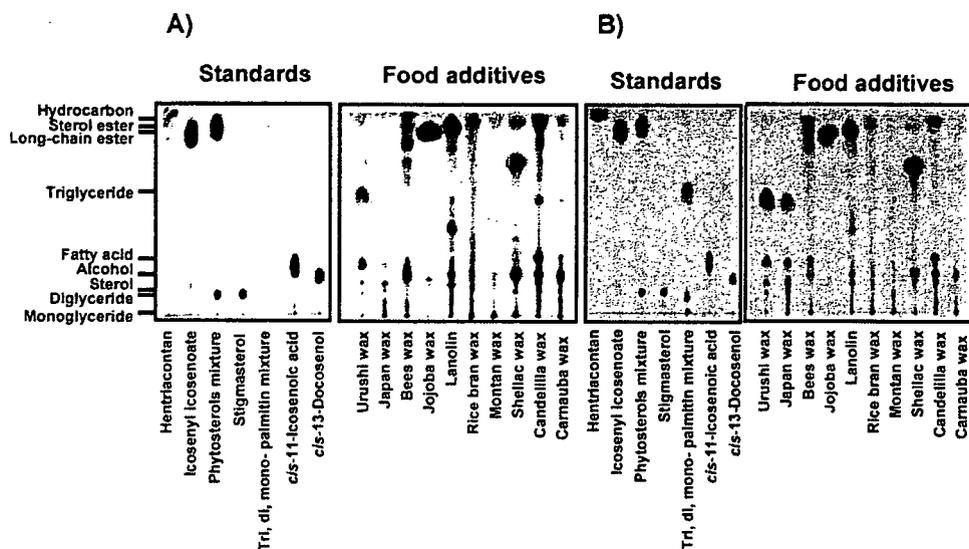


Fig. 1. TLC profiles of various kinds of ester-type gum bases used as natural food additives and the standards

Solvent: hexane-diethyl ether-acetic acid=80:20:1

A) Spots were visualized with 10% H_2SO_4 followed by heating; B) Spots were visualized with iodine vapor

長鎖アルコール組成分析用には、各試料 10 mg を既報³⁾と同様の方法でアルカリ加水分解後、生成した長鎖アルコールを TMS 化アルコールに誘導体化し、ヘキサン抽出層を 1.5 mL に定容した試料を用いた。別途、11-イコセノールおよび *cis*-13-ドコセノールより TMS 化体を合成し、比較標準液を調製した。

調製した試料溶液は、以下の条件の GC/MS に付した。GC/MS 測定条件: カラム, DB-1 (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚, 0.25 μ m, J&W Scientific); カラム入口圧, 100 kPa; キャリヤーガス流量, 1.0 mL/min; 注入口温度, 300°C; カラム温度, 180°C→5°C/min→280°C→15°C/min→300°C (8 min); イオン源温度, 250°C; イオン化エネルギー, 70 eV; 注入量, 1.0 μ L; 試料注入方式, スプリット (4:1); 測定モード, EI スキャン法 (m/z 60~800)。

各試料の分析は 2 回ずつ繰り返して行い、2 試験の結果が一致することを確認し、結果として示した。

結果および考察

1. TLC 分析

TLC 分析により、エステル系ガムベース品目間の成分組成の比較を行った。Fig. 1A に硫酸発色、Fig. 1B にヨウ素発色の結果を示した。今回用いた TLC 条件では、標準品の移動度は R_f 値の高いほうから順に、炭化水素 (0.96)、ステロールエステル (0.91)、長鎖エステル (0.85)、トリグリセリド (0.59)、脂肪酸 (0.27)、アルコール (0.20)、ジグリセリド (0.10)、ステロール (0.09)、モノグリセリド (0.01) であった。硫酸発色 (Fig. 1A) では、ステロールエステル、ステロールが赤~赤紫色に、遊離脂肪酸が黄色に、炭化水素、長鎖エステル、アルコールが褐色に発色した。トリ、ジ、モノパルミチン (パルミチンのトリ、ジ、

モノグリセリド) はヨウ素発色法 (Fig. 1B) のみで検出された。

TLC 分析により、各ガムベース品目の大まかな含有脂質成分組成を把握できた。また TLC パターンの比較により大きく次の 3 つのグループに分けることができた。1) 炭化水素、ステロールエステル、長鎖エステルなどに相当する R_f 値に濃いスポットが認められる品目 (ミツロウ $R_f=0.73, 0.85, 0.91, 0.96$, ホホバロウ $R_f=0.85$, ラノリン $R_f=0.91$, シェラックロウ $R_f=0.73, 0.93$, およびカンデリラロウ $R_f=0.85, 0.94$)、2) 脂肪酸のグリセリンエステル (トリ、ジ、モノグリセリド) に相当する R_f 値に濃いスポットが認められる品目 (ウルシロウおよびモクロウ)、3) 遊離脂肪酸よりも R_f 値の高い領域に濃いスポットを示さない品目 (コメヌカロウ、モンタンロウおよびカルナウバロウ)。グループ 1 の品目は、TLC パターンにより相互に区別が可能であった。エステル系ガムベースの多くでは、確認試験として赤外吸収スペクトル (IR) が採用されているが、グループ 2 のウルシロウとモクロウ、また、グループ 3 のコメヌカロウ、モンタンロウおよびカルナウバロウは、同じグループの品目同士で IR スペクトル³⁾ が類似しているため区別が不可能であるうえ、今回行った TLC でも相互に区別できなかった。そこで、次に GC/MS 分析により、さらに詳しい構成成分の調査を行った。

2. GC/MS による脂肪酸組成分析

エステル系ガムベース製品の構成脂肪酸を確認するために、各製品をメタノリシスし、得られた脂肪酸メチルエステルを GC/MS で分析した。化合物の同定は、脂肪酸メチルエステルおよび飽和炭化水素標準品の MS スペクトル、その保持時間と炭素鎖長との関係式、MS スペクトルのライブラリー (NIST および WILEY) データとの一

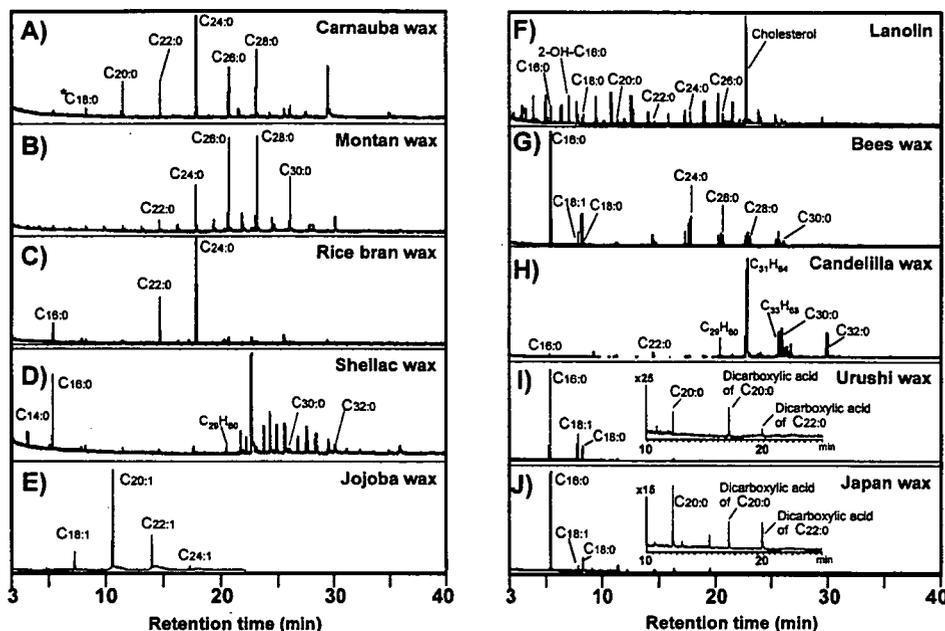


Fig. 2. GC/MS TIC profiles of fatty acid methyl esters obtained by methanolysis of ester-type gum bases used as natural food additives

A) carnauba wax, B) montan wax, C) rice bran wax, D) shellac wax, E) jojoba wax, F) lanolin, G) bees wax, H) candelilla wax, I) urushi wax, J) Japan wax

* The abbreviation C_{18:0} means of the methyl ester of the normal chain fatty acid with 18 carbons and no (0) unsaturated bond.

致、および既報の成分分析の結果^{4)~29)}との比較により行った。その結果 (Fig. 2), 品目間で脂肪酸組成が異なり、TLC パターンが類似した品目同士 (カルナウバロウ (Fig. 2A) とモンタンロウ (Fig. 2B) とコメヌカロウ (Fig. 2C), ウルシロウ (Fig. 2I) とモクロウ (Fig. 2J)) でも、脂肪酸組成を調べることで、品目相互の区別が可能であることが示された。また各品目の組成分析の結果は下に述べるが、これまでの脂肪酸組成に関する報告 (ウルシロウ^{5)~7)}, カルナウバロウ⁸⁾, カンデリラロウ^{9)~11)}, コメヌカロウ^{11), 12)}, シェラックロウ^{13), 14)}, ホホバロウ^{4), 15)~17)}, ミツロウ^{18)~20)}, モクロウ^{7), 21), 22)}, モンタンロウ^{14), 23), 24)}, およびラノリン^{19), 25), 26)}) とおおよそ一致した。

各品目は、検出された成分内容により大きく次の 4 グループ、F-I) 主に偶数炭素飽和脂肪酸が検出された品目 (カルナウバロウ, モンタンロウおよびコメヌカロウ), F-II) 主に一価不飽和脂肪酸が検出された品目 (ホホバロウ), F-III) 脂肪酸以外の成分も検出された品目 (シェラックロウ, ラノリン, ミツロウおよびカンデリラロウ), および F-IV) ジカルボン酸が検出された品目 (ウルシロウおよびモクロウ) に分けることができた。

グループ F-I では脂肪酸の炭素鎖長分布は品目により異なった (Fig. 2A, 2B, 2C)。グループ F-III では脂肪酸以外の成分に品目による特徴が認められた。つまり、シェラックロウ (Fig. 2D) では直鎖飽和脂肪酸以外に、*m/z* 57 をベースイオンとし *m/z* 390 のイオンを示す 23 分付近の顕著なピーク (未同定) や、C₂₉H₆₀ などの炭化水素など

が認められた。ラノリン (Fig. 2F) では、脂肪酸以外にコレステロールが検出された。また 2-ヒドロキシ-C_{16:0} 脂肪酸が検出された。ミツロウ (Fig. 2G) では C₂₄~C₃₀ の各直鎖偶数炭素飽和脂肪酸よりも少し短い保持時間にそれぞれ C₂₇H₅₆, C₂₉H₆₀, C₃₁H₆₄, C₃₃H₆₈ の飽和炭化水素が認められた。これら炭化水素の存在は既知の報告²⁸⁾と一致した。カンデリラロウ (Fig. 2H) ではエステルより、炭化水素をより多く含むことが報告^{9), 10), 29)}されており、今回の分析でも、C₃₁H₆₄ の飽和炭化水素が顕著に認められた。グループ F-IV のウルシロウ (Fig. 2I) とモクロウ (Fig. 2J) では、主に C_{16:0} のパルミチン酸が検出され、少量の C_{18:1} (オレイン酸) や C_{18:0} (ステアリン酸), さらに微量成分として C₂₀, C₂₂ の飽和ジカルボン酸の存在が確認された。C_{20:0}, C_{22:0} のジカルボン酸は、モクロウ特有の粘韌性に関与すると推測されている成分^{5), 21)}であり、TIC で検出された全ピーク面積に対する C_{20:0} ジカルボン酸と C_{22:0} ジカルボン酸ピーク面積割合の合計は、ウルシロウで 1.1%, モクロウで 3.4% であった。ジカルボン酸の割合がウルシロウよりもモクロウのほうが高いという結果は、既報^{5), 21), 22)}とも一致した。

3. GC/MS によるアルコール組成分析

エステル系ガムベース製品の構成アルコールを確認するために、各製品を加水分解および TMS 化し、得られた TMS 化アルコールを GC/MS で分析した。化合物の同定は、長鎖アルコール標品 (*cis*-13-ドコセノールおよび 11-イコセノール) の TMS 化体の MS スペクトル, その保持

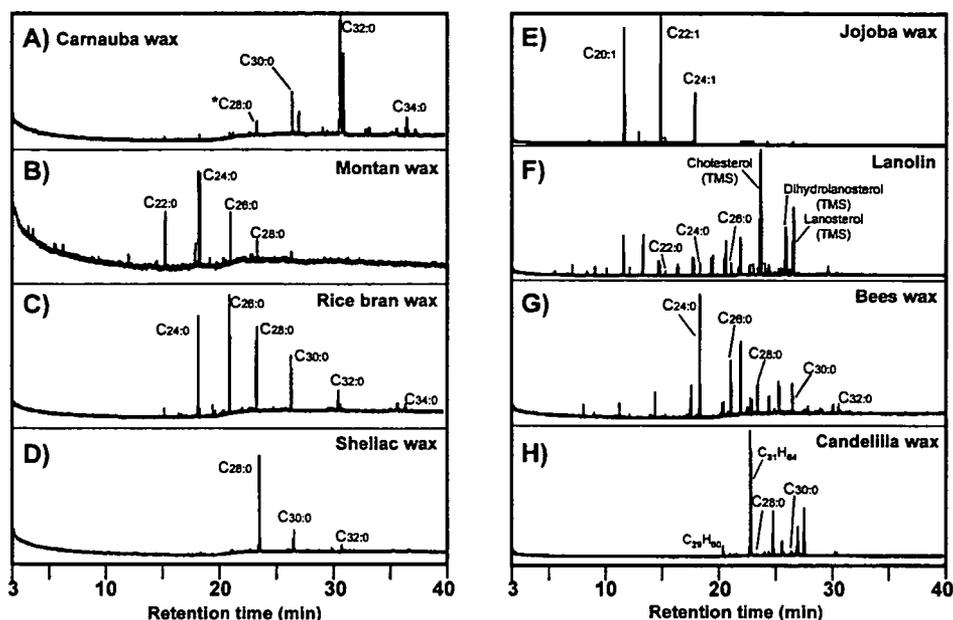


Fig. 3. GC/MS TIC profiles of trimethylsilylated alcohols obtained by hydrolysis and trimethylsilylation of ester-type gum bases used as natural food additives

A) carnauba wax, B) montan wax, C) rice bran wax, D) shellac wax, E) jojoba wax, F) lanolin, G) bees wax, H) candelilla wax

* The abbreviation C_{28:0} means the trimethylsilylated normal chain alcohol with 28 carbons and no (0) unsaturated bond.

時間と炭素鎖長との関係式, MS スペクトルのライブラリー (NIST および WILEY) データとの一致, および既報の成分分析の結果^{4)~31)}との比較により行った. その結果 (Fig. 3), 品目間でアルコール組成が異なり, TLC 結果の類似した品目同士 (カルナウバロウ (Fig. 3A) とモンタンロウ (Fig. 3B) とコメヌカロウ (Fig. 3C)) でも, アルコール組成を調べることで, 品目相互の区別が可能であることが示された. また各品目の組成分析の結果は下に述べるが, これまでのアルコール組成に関する報告 (カルナウバロウ^{8), 29)}, カンデリラロウ^{11), 29)}, コメヌカロウ^{12), 14), 30)}, シェラックロウ^{13), 14)}, ホホバロウ^{4), 15~17)}, ミツロウ^{18), 19), 31)}, モンタンロウ^{4), 23)}, およびラノリン^{25), 26)}) とおおよそ一致した.

各品目は検出された成分内容により大きく 4 グループに分けることができた, A-I) 主に偶数炭素飽和アルコールが検出された品目 (カルナウバロウ, モンタンロウ, コメヌカロウおよびシェラックロウ), A-II) 主に一価不飽和アルコールが検出された品目 (ホホバロウ), A-III) アルコール以外の成分も検出された品目 (ラノリン, ミツロウおよびカンデリラロウ) および A-IV) 主に脂肪酸のグリセロールエステルを含有していた品目 (ウルシロウおよびモクロウ) (データは示さない). グループ A-I) ではアルコールの炭素鎖長分布が品目により異なっていた. グループ A-III) のラノリン (Fig. 3F) では, アルコールに加え, コレステロール, ジヒドロラノステロール, ラノステロールが検出された.

4. 市販試薬の分析

またクロマトグラムなどは示していないが, 上述した 10 品目の製品以外に, これら既存添加物と同様の製品名を有する市販試薬 (カルナウバロウ 2 種, ミツロウ 5 種およびラノリン 3 種) も分析し, TLC パターンや構成脂肪酸および構成アルコールの比較を行った. その結果, ミツロウの脂肪酸分析で他製品より炭化水素含量の高い試薬 1 製品が, またカルナウバロウのアルコール分析で未同定ピークの比率が高い試薬 1 製品が観察された. しかし, これら以外は添加物製品と, 対応する市販試薬とで TLC パターンや GC/MS による構成脂肪酸およびアルコールの種類やピーク強度比はよく一致した. したがって, 今回分析した既存添加物製品と試薬製品は, およそ同じ成分組成であると推察される.

結 論

天然由来のエステル系ガムベース 10 品目について, 成分分析を行った. その結果, TLC 分析により, いくつかの品目では他品目と区別できることが確認された. TLC パターンのみでは判別できない品目同士については, GC/MS により構成脂肪酸およびアルコールを分析し, 各ガムベース品目に特徴的な成分組成を確認することで判別できることが分かった. 本研究で得られた結果は, エステル系ガムベース製品の種類の推定・判別を行ううえで, 有用な情報であると考えられる.

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業により実施したものである。エステル系ガムベースの収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

文 献

- 1) 第7版食品添加物公定書. 東京, 日本食品添加物協会, 1999.
- 2) 第8版食品添加物公定書. 厚生労働省, 2007.
- 3) 日本食品添加物協会自主規格専門委員会編. 第三版既存添加物自主規格. 東京, 日本食品添加物協会, 2002.
- 4) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of the constituents in jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **46**, 198-204 (2005)
- 5) Tachibana, S., Sakuragi, M., Sumimoto, M., Chemical conversion of extractives for the production of chemicals and fuels III. Sunlight bleaching of urushi wax. *Mokuzai Gakkaishi*, **35**, 356-361 (1989).
- 6) Jin, Z.-L., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Masuda, A., Yamagata, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of constituents in urushi wax, a natural food additive. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 167-172 (2006).
- 7) Xu, J., Kawachi, S., Characteristics of major fatty acid components of Haze wax from different cultivars and habitats. *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 436-442 (1988).
- 8) 脂肪酸, アルコール組成, 油脂及び油脂製品試験法部会・ガスクロデータ小委員会編. カルナウバろうの脂肪酸組成・付アルコール組成. *油化学*, **27**, 336 (1978).
- 9) Tulloch, A. P., Comparison of some commercial waxes by gas liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 367-371 (1973).
- 10) Tonogai, Y., Tsuji, S., Ito, Y., Harada, M., Fundamental studies on a method for the analysis of natural waxes in foods by gas chromatography (Systematic determination method of natural waxes in foods. I). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **26**, 160-168 (1985).
- 11) 脂肪酸, アルコール組成, 油脂及び油脂製品試験法部会・ガスクロデータ小委員会編. キャンデリラろうの脂肪酸組成・付アルコール組成. *油化学*, **27**, 337 (1978).
- 12) Iwai, M., Nagano, N., Utilization of lipase. II. Hydrolysis of rice bran wax ester by two kinds of commercial lipases. *Yukagaku (J. Japan Oil Chem. Soc.)*, **36**, 852-856 (1987).
- 13) Schmidt, H., Analytische Untersuchungen an Schellackwachs. *Fette Seifen Anstrichm.*, **84**, 478-488 (1982)
- 14) Lawrence, J. F., Iyengar, J. R., Page, B. D., Conacher, H. B. S., Characterization of commercial waxes by high-temperature gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **236**, 403-419 (1982)
- 15) Spencer, G. F., Plattner, R. D., Miwa, T., Jojoba oil analysis by high pressure liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 187-189 (1977).
- 16) Spencer, G. F., Plattner, R. D., Compositional analysis of natural wax ester mixtures by tandem mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 90-94 (1984).
- 17) Med, Gvedovici, A., Lazou, K., d'Oosterlinck, A., Zhao, Y., Sandra, P., Analysis of jojoba oil by LC-coordination ion spray-MS (LC-CIS-MS). *J. Sep. Sci.*, **25**, 173-178 (2002).
- 18) Yoshida, T., Sasaki, M., Identification and quality control of beeswax from Oriental and European honeybees. *Honeybee Sci.*, **16**, 167-174 (1995).
- 19) Asperger, A., Engewald, W., Fabian, G., Thermally assisted hydrolysis and methylation—A simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **61**, 91-109 (2001).
- 20) Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., Toribio, L., Bernal, J. Jr., Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. *J. Chromatogr. A*, **1007**, 101-106 (2003).
- 21) Tachibana, S., Itoh, K., Ohkubo, K., Oki, T., Sumimoto, M., Chemical conversion of extractives for the production of chemicals and fuels IX, Chemical compositions and physical properties in haze-wax from 13 cultivars grown in ehime prefecture. *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 1151-1158 (1992).
- 22) Sumimoto, M., Tachibana, S., Abe, Z., Kuroiwa, Y., Ishii, A., Conversion and utilization of wax as forest products. Research on Energy from Biomass: Reports of special project research on energy under grant in aid of scientific research of the Ministry of Education Science and Culture, Japan, **7**, 115-120 (1984).
- 23) Popl, M., Havel, Z., Über die chromatographische Auftrennung von Montanwachs und die Identifizierung der Einzelfraktionen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie. *Fette Seifen Anstrichm.*, **77**, 51-54 (1975).
- 24) Asano, S., Characterization of Montan waxes by composition of fatty acids and hydrocarbons. *Kanzei Chuou Bunsekisho Hou*, **17**, 83-86 (1977).
- 25) Moldovan, Z., Jover, E., Bayona, J. M., Gas chromatographic and mass spectrometric methods for the characterization of long-chain fatty acids. Application to wool wax extracts. *Analyt. Chim. Acta*, **465**, 359-378 (2002).
- 26) 長澤則夫, 羊毛, その魅力と科学. *加工技術*, **36**, 780-783 (2001).
- 27) Apon, J. M. B., Nicolaidis, N., The determination of the position isomers of the methyl branched fatty acid methyl esters by capillary GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 467-473 (1975).
- 28) Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., del Nozal, M. J., Martín, M. T., Bernal, J. Jr., Quality assurance of commercial beeswax Part I. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *J. Chromatogr. A*, **1024**, 147-154 (2004).
- 29) 府瀬川健蔵監修, 改訂 ワックスの性質と応用 第2版. 東京, 幸書房, 1993.
- 30) Vali, S. R., Ju, Y.-H., Kaimal, T. N. B., Chern, Y.-T., A process for the preparation of food-grade rice bran wax

- and the determination of its composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 57-64 (2005).
- 31) Bonaduce, I., Colombini, M. P., Characterization of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. *J. Chromatogr. A*, **1028**, 297-306 (2004).

酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験

島村智子^{*1}§, 松浦理太郎^{*1}, 徳田貴志^{*1}, 杉本直樹^{*2}, 山崎 壮^{*2},
松藤 寛^{*3}, 松井利郎^{*4}, 松本 清^{*4}, 受田浩之^{*1}

^{*1} 高知大学農学部生物資源科学科

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*3} 日本大学生物資源科学部食品科学工学科

^{*4} 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

Comparison of Conventional Antioxidants Assays for Evaluating Potencies of Natural Antioxidants as Food Additives by Collaborative Study

Tomoko Shimamura^{*1}§, Ritaro Matsuura^{*1}, Takashi Tokuda^{*1}, Naoki Sugimoto^{*2},
Takeshi Yamazaki^{*2}, Hiroshi Matsufuji^{*3}, Toshiro Matsui^{*4},
Kiyoshi Matsumoto^{*4} and Hiroyuki Ukeda^{*1}

^{*1} Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University,
200 Monobe-B, Nankoku, Kochi 783-8502

^{*2} National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

^{*3} Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences,
Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510

^{*4} Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School
Kyusyu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

In recent years, there has been a need for a new quality criterion for antioxidants based on its anti-oxidative activity in Japan. In particular, novel official methods of evaluating the antioxidative activities of food additives are required. In order to investigate the possibility of developing official methods, the reproducibilities of three simple conventional antioxidant assays (DPPH assay, ABTS assay, and WST-1 assay) based on spectrophotometric detection were evaluated by collaborative study between three laboratories. DPPH and ABTS assays were performed to evaluate the antioxidant activity (TEAC, Trolox equivalent activity) of all nine antioxidants used in this study, whereas the WST-1 assay was suitable for evaluating the superoxide dismutase (SOD)-equivalent activity of seven antioxidants (excepting D- α -tocopherol and D- δ -tocopherol). The HorRat values from the collaborative study revealed that the DPPH and ABTS assays showed higher reproducibility than the WST-1 assay. It was assumed that the lower reproducibility would be due to the measuring principle, because the WST-1 assay, unlike the DPPH and the ABTS assays, is a competitive enzyme assay. Based on the results, we concluded that the DPPH and ABTS assays would be candidates in validation studies of methods for the purpose of developing an official methodology.
(Received Jun. 20, 2007 ; Accepted Aug. 9, 2007)

Keywords: antioxidant, food additive, antioxidative activity, radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity

キーワード: 酸化防止剤, 食品添加物, 抗酸化活性, ラジカル消去活性, スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性

現在, 日本国内で使用されている酸化防止剤は, 合成添加物と既存添加物に大別される。既存添加物とは, 平成7年の食品衛生法の改正に伴い, 従来から使用されていた天

然添加物に対する経過措置として使用が認められているものである。合成添加物では, 成分含量または組成に基づく規格基準が設定されている。その一方, 既存添加物は, 天然由来の複雑な混合物である品目も多く, 有効成分, および成分組成の特定が困難であるため, 有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。さらに, 有効成分, および成分組成が未だ明らかとされてい

^{*1} 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

^{*2} 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*3} 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

^{*4} 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

§ 連絡先 (Corresponding author), tomokos@kochi-u.ac.jp

ない品目も存在している。これらについては、将来、規格基準を設定することを目的として、網羅的な成分組成の確認、有効成分の同定、および定量法の開発を行っているが¹¹⁻⁹⁾、現状の機器分析では不可能である場合も多い。従って、成分組成に基づいた規格が設定できない既存添加物に対しては、一定の品質を確保するために、新たな評価法を規格基準法として適用する必要があると考えられる。このうち、酸化防止剤の場合は、その有効性、すなわち、抗酸化活性に基づく新たな品質評価法の策定、ならびに公定法への適用が検討事項となっている。

抗酸化活性評価に関しては、これまでにその原理や易操作性に基づき多種多様な方法が報告されている。その代表的なものとして、ラジカルの対電子の電子スピンの起因する現象を直接的、またはスピントラップ剤の使用により間接的に測定する電子スピン共鳴 (ESR) 法⁹⁾、ラジカル消去活性を分光学的に測定する 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法⁷⁾⁸⁾、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 法⁹⁾、脂質過酸化の程度を分光学的に測定するロタン鉄法¹⁰⁾、チオバルビツール酸 (TBA) 法¹⁰⁾、 β -カロテン退色法¹¹⁾、あるいは蛍光強度を指標として用いる oxygen radical absorption capacity (ORAC) 法¹²⁾などが挙げられる。また、活性酸素種消去活性の測定法として、スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性を分光学的に測定するシトクロム *c* 法¹³⁾、2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) 法¹⁴⁾、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) 法¹⁵⁾、あるいはルシゲニンなどの化学発光プローブを利用する方法¹⁶⁾も報告されている。その他、同じく活性酸素種の一つであるヒドロキシラジカルの消去活性を分光学的に測定するデオキシシリボース法¹⁷⁾なども知られている。

本研究では、既存添加物の抗酸化活性評価の公定法の候補として、(1)過去の研究において使用されてきた実績がある、(2)短時間での測定が可能である、(3)特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることを条件とし、ラジカル消去活性測定法の中から DPPH 法と ABTS 法を、活性酸素種消去活性測定法の中から WST-1 法を選出した。WST-1 法は 1999 年に報告された比較的新しいスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性測定法であるが、取り扱いが容易な測定キットが存在することから、様々な分野での利用が進んでいる¹⁵⁾。以上の 3 法を用いて既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤の抗酸化活性評価を研究室 A, B, C の 3 カ所で同一試薬、同一手法により行い、各測定法で得られた結果の検証を行うことにより、公定法化への可能性を検討した。

実験方法

1. 試薬

本研究では、以下の 9 種類の酸化防止剤を測定試料として用いた；カテキン、ケルセチン、*trans*-フェルラ酸、没食子酸、モリン、セサモール (東京化成工業製)、D- α -トコフェロール (MP Biochemical 製)、D- δ -トコフェロール、エラグ酸 (Sigma 製)。また、DPPH は和光純薬工業製、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD; EC. 1.15.1.1, ウシ赤血球由来) は Sigma 製、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Aldrich 製、ABTS は Roche Diagnostics 製、SOD Assay-Kit WST は同仁化学研究所製を使用した。その他の試薬は、市販の特級試薬をそのまま用いた。また、全ての実験において蒸留水を Auto Pure WQ501 (Millipore 製) に通して処理した、比抵抗 18 M Ω ·cm の超純水を使用した。

2. 共同試験

研究室 A, B, C の 3 カ所での共同試験は、酸化防止剤試薬のロット、試薬秤取量、溶媒容量、溶液調製操作に用いる器具の種類、希釈手順、データ解析方法を全て指定し、同一プロトコルに従って行った。

3. DPPH 法⁷⁾⁸⁾

試料溶液 200 μ l に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ l、99.5% エタノールで調製した 0.2 mM DPPH 溶液 1 ml を順次添加し、室温で暗所にて正確に 30 分間反応させた。その後、517 nm の吸光度 (A_s) を測定した。試料溶液のかわりに 99.5% エタノールを添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として、試料の阻害率 (%) を以下の式で求めた。また、50% 阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。標準物質として用いた Trolox も同様の方法で IC₅₀ を求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = (Ac - A_s) / Ac \times 100$$

DPPH 法では、全ての酸化防止剤を 99.5% エタノールに溶解した。

4. ABTS 法⁹⁾

7 mM ABTS 溶液 5 ml に 140 mM ペルオキシ二硫酸カリウム 88 μ l を加えた後、室温暗所で 12-16 時間反応させた。その後、734 nm における吸光度が 0.7 ± 0.02 になるように、99.5% エタノールで希釈し、これを ABTS^{•+} working solution とした。この ABTS^{•+} working solution 1 ml に対して、10 μ l の試料溶液を添加し、10 秒間攪拌した。その後、30°C でインキュベーションを行い、試料溶液の添加から正確に 4 分後に 734 nm における吸光度 (A_s) を測定した。試料溶液のかわりに、99.5% エタノールを添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として、試料の阻害率 (%) を以下の式で求めた。また、50% 阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。標準物質として用いた

表 1 各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性

酸化防止剤	Trolox 等価活性			RSD _r (%)	RSD _R (%)	HorRat
	A	B	C			
カテキン	2.66	2.45	1.86	3.29	18.10	1.32
ケルセチン	3.28	2.82	2.66	8.63	13.45	0.95
セサモール	1.88	1.47	1.72	3.13	12.29	0.94
フェルラ酸	1.03	0.87	0.87	1.80	9.89	0.83
没食子酸	4.52	3.66	3.70	3.69	12.62	0.85
モリン	1.10	0.90	0.90	5.12	12.60	1.05
エラグ酸	3.13	3.63	3.63	4.74	9.16	0.63
D-α-トコフェロール	1.10	0.54	0.57	3.81	42.85	3.72
D-δ-トコフェロール	0.71	0.58	0.58	5.08	12.48	1.11

Trolox も同様の方法で IC₅₀ を求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

ABTS 法では、全ての酸化防止剤を 99.5% エタノールに溶解した。

5. WST-1 法

市販の SOD Assay-Kit WST を使用し、添付マニュアルを一部改変して測定を行った。96 穴マイクロプレートに試料溶液 20 μl, WST-working solution 200 μl, Enzyme working solution 20 μl を順次添加し、マイクロプレートシェーカー (800 rpm) で室温にて 10 分間攪拌した。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。試料添加時の吸光度を A_{sample}、試料溶液のかわりに超純水、あるいは 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank1}、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を用いた際の吸光度を A_{blank2}、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を加え、かつ試料溶液のかわりに超純水、あるいは 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank3} とし、以下の式から各試料の阻害率 (%) を求めた。また、50% 阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。同様の手順で、SOD の IC₅₀ も求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

WST-1 法では、カテキン、フェルラ酸、没食子酸の溶解に超純水を用い、その他の酸化防止剤は 99.5% エタノールで溶解した。

6. IC₅₀, TEAC, SOD 等価活性の算出方法

試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし、少なくとも 4 点を含む回帰直線を引いた。その回帰直線の決定係数が 0.93 以上であることを確認した後、50% 阻害を挟む 2 点を選び出し、その 2 点に対して新たに回帰直線を引いた。そこで得られた回帰式の y に 50 を代入し、IC₅₀ の試料濃度 (x) を求めた。この操作を 3 回繰り返し、各回で求められた IC₅₀ の値の平均値を各酸化防止剤、Trolox、なら

びに SOD の IC₅₀ とした。

DPPH 法、および ABTS 法では、Trolox の IC₅₀ と試料の IC₅₀ が等価であるとみなし、各試料のラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) で表した。TEAC は下記の式 1 で求めた。また、WST-1 法では、SOD の IC₅₀ と試料の IC₅₀ が等価であるとみなし、各試料のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性を SOD 等価活性で表した。SOD 等価活性の算出には下記の式 2 を用いた。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/ml}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/ml}) \quad \dots \text{式 1}$$

$$\text{SOD 等価活性} = \text{SOD の IC}_{50} (\text{units/ml}) / \text{試料の IC}_{50} (\text{mg/ml}) \quad \dots \text{式 2}$$

7. 統計解析

各手法で求められた測定値 (活性) の繰り返し精度 RSD_r (%), 室間再現精度 RSD_R (%), および室間再現精度の予測値との比、すなわち HorRat 値を求めた¹⁰⁾。

実験結果

1. DPPH 法

各種酸化防止剤の DPPH 消去活性を測定した結果を表 1 に示した。今回測定に供した 9 種類の酸化防止剤全てについて、TEAC を求めることが可能であった。また、3 カ所の全てで没食子酸に最も高い DPPH 消去活性が認められ、続いて、エラグ酸、ケルセチン、カテキン、セサモールが中間的な活性を示した。その一方で、フェルラ酸、モリン、D-α-トコフェロール、D-δ-トコフェロールは比較的低い活性しか示さなかった。続いて、3 カ所で求められた TEAC の繰り返し精度 RSD_r (%), 室間再現精度 RSD_R (%), および HorRat 値を求め、表 1 に併せて示した。HorRat 値はその値が 2 以下であれば、室間再現精度が許容範囲内であるとみなされる。検証の結果、D-α-トコフェロールを除く 8 種類の酸化防止剤の測定において、HorRat 値が 2 以下の値となったことから、DPPH 法は比較的高い測定精度を有していると考えられた。

表 2 各種酸化防止剤の ABTS ラジカル消去活性

酸化防止剤	Trolox 等価活性			RSD _r (%)	RSD _R (%)	HorRat
	A	B	C			
カテキン	2.14	0.98	0.90	3.16	52.06	3.72
ケルセチン	1.88	2.45	1.37	3.34	27.74	1.88
セサモール	3.33	3.80	3.70	2.01	7.10	0.44
フェルラ酸	1.90	0.36	0.69	8.90	82.68	6.19
没食子酸	3.97	3.63	3.49	4.12	7.44	0.46
モリン	0.80	0.82	0.80	3.44	3.40	0.26
エラグ酸	2.88	2.25	2.25	7.53	15.99	1.04
D- α -トコフェロール	0.50	0.61	0.58	2.84	9.96	0.81
D- δ -トコフェロール	0.60	0.73	0.67	2.84	10.13	0.80

表 3 各種酸化防止剤のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性

酸化防止剤	SOD 等価活性			RSD _r (%)	RSD _R (%)	HorRat
	A	B	C			
カテキン	54.80	40.80	31.60	14.34	29.91	3.01
ケルセチン	16.30	8.90	20.00	16.25	45.16	5.31
セサモール	0.18	0.08	0.20	13.81	44.32	10.39
フェルラ酸	3.83	N.D.	4.66	11.68	16.86	2.40
没食子酸	1072	324	916	15.87	57.32	3.59
モリン	5.60	N.D.	3.96	27.43	33.03	4.61
エラグ酸	55.30	133.40	186.60	18.59	54.93	4.70

2. ABTS 法

各種酸化防止剤の ABTS 消去活性を測定した結果を表 2 に示した。今回測定に供した 9 種類の酸化防止剤全てについて、TEAC を求めることが可能であった。また、その消去活性の強弱は DPPH ラジカル消去活性と同じ傾向を示した。続いて、3 カ所で求められた TEAC の繰り返し精度 RSD_r (%), 室間再現精度 RSD_R (%), および HorRat 値を求め、表 2 に併せて示した。検証の結果、カテキン、フェルラ酸を除く 7 種類の酸化防止剤の測定において HorRat 値が 2 以下となったことから、ABTS 法も DPPH 法と同様に比較的高い測定精度を有していると考えられた。

3. WST-1 法

各種酸化防止剤のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性の測定結果を表 3 に示した。本測定では、D- α -トコフェロールと D- δ -トコフェロールの試料溶液を反応系に添加した際に白濁を生じたため、測定を続行することができなかった。これは、WST-1 法の反応溶媒のエタノール濃度が DPPH 法、および ABTS 法と比較して低く、脂溶性のトコフェロールが反応溶媒に溶解しなかったことが原因であった。また、研究室 B での測定では、フェルラ酸とモリンが 50% 阻害に達せず、その SOD 等価活性を求めることができなかった。その一方で、研究室 A と C では、フェルラ酸とモリンの活性を求めることが可能であった。これら 2 種類の酸化防止剤の測定結果における研究室間の不-

致の原因については明らかでない。3 カ所、あるいは 2 ケ所の研究室で活性を求めることができた酸化防止剤のうち、没食子酸の SOD 等価活性が極めて高く、それ以外の酸化防止剤の活性は没食子酸と比較すると低いものであった。WST-1 法で求められた結果についても先の DPPH 法、ならびに ABTS 法と同様、繰り返し精度 RSD_r (%), 室間再現精度 RSD_R (%), および HorRat 値を求め、表 3 に示した。しかしながら、全ての酸化防止剤の測定結果において HorRat 値が 2 以上となり、室間再現精度に劣るといった結果となった。また、エタノールに溶解して測定に供した脂溶性酸化防止剤(ケルセチン、セサモール、モリン、エラグ酸)の HorRat 値が水溶性酸化防止剤と比較して高い傾向にあった。このことから、反応溶媒が水系である WST-1 法では、水への拡散が困難である脂溶性物質を測定に用いた場合、その活性を求めることは可能であるものの、反応溶媒への均一な拡散が可能な水溶性物質と比較すると室間再現精度に劣ることが判明した。

考 察

本研究では、既存添加物のうち、酸化防止剤に分類される品目の抗酸化活性に基づく新たな品質規格の策定を最終目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の公定化に対する適用性の検討を行った。その結果より、DPPH 法、ならびに ABTS 法は単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性評価

において、比較的高い精度を示すことが判明した。DPPH法とABTS法はSingle Electron Transferの原理に基づくラジカル消去活性測定法であり、過去の研究においても、互いに似た挙動を示すことが報告されている¹⁹⁾。酸化防止剤は食品の酸化を抑制し、食品の変色、着色、ならびに風味の変化を抑制することを目的として使用される。その食品中での主要な役割は、不飽和脂肪酸の酸化防止である。Rivero-Pérezらは、赤ワインの抗酸化活性をDPPH法とABTS法を含む複数の抗酸化活性測定法で評価した研究において、DPPH法、ならびにABTS法の評価結果とラット肝ミクロソームの脂質過酸化の程度をTBA法で評価した結果との間に有意な相関が認められたとの報告を行っている²⁰⁾。この研究は、*in vivo*での効果を想定したものであったが、食品中で生じる脂質過酸化についても同様の関係が成り立つものと推察された。このことから、DPPH法、ならびにABTS法は酸化防止剤の抗酸化活性評価に対して有用であると考えられた。これらの2種類の分析法については、今後、天然物由来の複雑な組成を持つ既存添加物に対する適用性を調べるとともに、本格的な分析法の妥当性確認を行うことにより、公定法化できる可能性があるものと考えられた。分析法の公定法化に向けた妥当性確認方法のガイドラインはいくつか存在するが、AOAC、ISO、IUPACの三者が合意したHarmonized protocolが代表的である。この場合、定量法では8ヶ所以上、定性法では10ヶ所以上の共同試験参加機関による共同試験の有効なデータがなければならぬとされている²¹⁾。

その一方で、本研究では、WST-1法の精度がDPPH法、ABTS法と比較して劣るという結果となった。これは、以下に示す測定原理の違いが原因であると考えられた。WST-1法は、ヒポキサンチンを基質とするキサンチンオキシダーゼの酵素反応において生成したスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)によるWST-1の還元を利用したものである。抗酸化物質が測定系に存在すると、酵素反応により生成した O_2^- の消去が生じるため、WST-1のホルマザンへの還元が減少する。すなわち、WST-1と抗酸化物質の競合が起こる。DPPH法とABTS法は、測定系に一定量存在する安定ラジカルの消去率を測定するものであり、WST-1法とは原理的に異なる。この原理の違いが、精度の差の原因となった可能性が高いと考えられた。また、WST-1法はキット化されており簡便性が高いことが利点であるが、反応液の全量が240 μ lと少ないことから、測定誤差が生じやすいことも高い精度が得られなかった原因であると推察された。これは、今回採用したマイクロプレート法からUkedaらの報告したバッチ法¹⁵⁾に変更することにより、改善可能であると推察された。従って、WST-1法の公定法化をはかるためには測定手順の改良が必要であると考えられた。

今回の研究において比較的高い測定精度を有することが

判明したDPPH法、ならびにABTS法は抗酸化物質のラジカル消去活性の測定に対して有用であるが、特に植物系試料に多く含まれるSODやカタラーゼ等の抗酸化酵素の活性測定には適していない。こうした酵素類の抗酸化活性測定法の公定法化については、他の候補を選出して別途検討する必要があるものと考えられた。

要 約

既存添加物のうち、酸化防止剤に分類される品目の抗酸化活性に基づく新たな品質規格策定を最終目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の公定法化に対する適用性の検討を行った。本研究では、代表的な分光学的抗酸化活性測定法であるDPPH法、ABTS法、WST-1法による単一化合物酸化防止剤(9種類)の抗酸化活性測定を3カ所の研究室で共同試験し、得られた結果の室間再現精度の検証を行った。その結果、DPPH法、ならびにABTS法は単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性測定において、比較的高い測定精度を示すことが判明した。その一方で、WST-1法は先の2法と比較すると測定精度に劣るという結果が得られた。DPPH法、ならびにABTS法は更に研究室数を増やして試験室間共同試験を行い、分析法の妥当性確認を行うことにより、公定法化を進めることが可能であると考えられた。

本研究は、平成17年度、平成18年度厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

文 献

- 1) Sato, K., Sugimoto, N., Ohta, M., Yamazaki, T., Maitani, T. and Tanamoto, K., Structure determination of minor red pigment in carthamus red colorant isolated by preparative LC/MS, *Food Add. Contam.*, 20, 1015-1022 (2003).
- 2) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Analysis of the constituents in Jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 198-204 (2005).
- 3) 金 哲龍, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 増田愛乃, 山形一雄, 山崎 壮, 棚元憲一, 既存添加物ウルシロウの成分分析, *食衛誌*, 47, 167-172 (2006).
- 4) Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent, *Food Add. Contam.*, 23, 1253-1259 (2006).
- 5) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates, *Food Add. Contam.*, in press. (2007).
- 6) Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M. and Packer, L., Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JESFR30 ESR spectrometer

- system. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, 35-44 (1997).
- 7) Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200 (1958).
 - 8) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J., HPLC method for evaluation of free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1201-1204 (1998).
 - 9) Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannale, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237 (1999).
 - 10) 大澤俊彦, 抗酸化活性の評価系—過酸化脂質の検出法—, 「生物化学実験法 33 食品中の生体機能調節物質研究法」, 第1版, 川岸母朗編, (学会出版センター, 東京), pp. 13-16 (1996).
 - 11) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木征吉, 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, 41, 611-618 (1994).
 - 12) Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4026-4037 (2004).
 - 13) McCord, J.M. and Fridovich, I., Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055 (1969).
 - 14) Ukeda, H., Maeda, S., Ishi, T. and Sawamura, M., Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, 251, 206-209 (1997).
 - 15) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S. and Sawamura, M., Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 485-488 (1999).
 - 16) Corbisier, P., Houbion, A. and Remacle, J., A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.*, 164, 240-247 (1987).
 - 17) Halliwell, B., Gutteridge, M.C. and Aruoma, O.I., The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radical. *Anal. Biochem.*, 165, 215-219 (1987).
 - 18) Horwitz, W., Kamps, L.R. and Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 1344-1354 (1980).
 - 19) Villaño, D., Fernández-Pachón, S., Troncoso, A. M. and García-Parrilla, M. C., Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta*, 538, 391-398 (2005).
 - 20) Rivero-Pérez, M.D., Muñoz, P. and González-Sanjosé, M. L., Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5476-5483 (2007).
 - 21) 後藤哲久, メソッドバリデーションの実際 (AOACの場合), 「食品分析法の妥当性の確認ハンドブック」, 第1版, 永田忠博編, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 32-38 (2007).
- (平成 19 年 6 月 20 日受付, 平成 19 年 8 月 9 日受理)

New Lanostane Triterpene Lactones from the Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossium* (Fr.) C. F. BAKER

Riham Salah EL DINE,^a Ali Mahmoud EL HALAWANY,^a Norio NAKAMURA,^b Chao-Mei MA,^a and Masao HATTORI^{*a}

^aInstitute of Natural Medicine, University of Toyama; 2630 Sugitani, Toyama 930-019, Japan: and ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts; Kodo, Kyotanabe, Kyoto 610-0395, Japan.

Received November 21, 2007; accepted February 20, 2008; published online February 21, 2008

Four new lanostane triterpene lactones (colossolactone I, colossolactone II, colossolactone III and colossolactone IV) were isolated from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossium* (Fr.) C. F. BAKER along with five known compounds. The structures of the new compounds were determined on the basis of MS, NMR and circular dichroism.

Key words *Ganoderma colossium*; Ganodermataceae; lanostane triterpene lactone; colossolactone

The fungal family Ganodermataceae is represented by more than 200 species, which mostly occur in subtropical and tropical regions. The fruiting bodies of *Ganoderma* species have been widely used in traditional Chinese, Japanese and Korean medicine to treat a variety of conditions from ancient time.¹⁾ Interesting biological activities have been observed in these mushrooms; *Ganoderma lucidum* KARST. showed cytotoxic²⁾ and antiviral activities,^{3,4)} *Ganoderma colossium* (Fr.) C. F. BAKER showed anti-inflammatory, cytotoxic¹⁾ and antimicrobial activities,^{5,6)} *Ganoderma applanatum* (LEYSS. ex Fr.) KARST.^{7,8)} revealed antibacterial and aldose reductase inhibitory activities, *Ganoderma concinna* RYV. Nov. sp. induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells,⁹⁾ and *Ganoderma pfeifferi* BRES. showed antimicrobial activity.¹⁰⁾ These basidiomycetes are known to be prolific producers of lanostane type triterpenoids, and over 130 such compounds have been recognized from the genus *Ganoderma*. Colossolactones were isolated previously from the Vietnamese mushroom *G. colossium*, such triterpenoids being characterized by the presence of a six-membered α,β -unsaturated δ -lactone group in their side chain with or without a seven membered lactone ring as the ring A, and this type of triterpenoids has not yet been reported previously from fungal metabolites. However, representatives of this structural type such as schisanlactones, kadsulactone A and lancilactones were isolated previously from the stems and roots of plants such as *Schisandra* species,¹¹⁾ *Kadsura heteroclita* ROXB.¹²⁾ and *Kadsura lancilimba* How¹³⁾ which are used as folk medicines for the treatment of rheumatism, stomachache and enterogastritis.^{12,13)} In a hope to isolate new secondary metabolites from the Vietnamese mushroom, which are effective for inhibiting viral protease from human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV), we investigated phytochemically a triterpene fraction from the fruiting bodies of the cultivated *G. colossium*.

Results and Discussion

Repeated column chromatography (CC) of a methanol-soluble fraction of the chloroform extract of the fruiting bodies of *G. colossium* after defatting led to the isolation of four new lanostane triterpene lactones called colossolactone I (1), colossolactone II (2), colossolactone III (3) and colossolac-

tone IV (4) in addition to five known compounds, ergosterol (5),¹⁴⁾ colossolactone B (6), colossolactone C (7), colossolactone G (8)¹¹⁾ and schisanlactone A (9).¹¹⁾ The known compounds were identified by comparison of the spectroscopic data with their reported ones and structures of new compounds were determined as follows.

Compound 1 was obtained as colorless needles (hexane-acetone), mp 266–268 °C with a positively optical rotation ($[\alpha]_D^{25.5} +23.8^\circ$) (CHCl₃). A molecular formula of C₃₀H₄₆O₃ was estimated from the high resolution electron impact mass (HR-EI-MS) spectrum. The ¹H-NMR spectrum showed signals for seven methyls with the most characteristic peaks including a doublet at δ_H 1.02 ($J=6.3$ Hz) and an allylic methyl at δ_H 1.90, one oxymethine at δ_H 3.20 (dd, $J=4.0, 11.5$ Hz), one methine at δ_H 4.50 (dd, $J=4.0, 13.5$ Hz) and an olefinic methine at δ_H 6.59 (m). The ¹³C-NMR spectrum displayed 30 carbon signals, in which signals characteristic for seven methyls, six methines (including two oxymethines at δ_C 78.8 and 80.2) and eight quaternary carbons (including one carbonyl at δ_C 166.6) and four olefinic carbons at δ_C 128.1, 134.1, 134.4 and 139.7 were assigned from the distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) spectra. These findings suggested that compound 1 was an oxygenated lanostane-type triterpene. The UV absorbance at 245 nm indicated the presence of an α,β -unsaturated lactone,¹⁵⁾ and the IR spectrum showed the presence of a hydroxyl group at 3530 cm⁻¹ and one conjugated δ -lactone group at 1708 cm⁻¹. Comparison of the ¹H-NMR spectrum of 1 with the closely related compound colossolactone B¹¹⁾ resulted in the assignments for signals at δ_H 4.50 as H-22, δ_H 6.59 as H-24, δ_H 1.52 as H-20 and δ_H 1.90 as H-27 as well as ¹³C-NMR signals at δ_C 166.6 as C-26 and δ_C 80.2 as C-22. The presence of mass spectral fragment ions at m/z 111¹³⁾ and 314 [M-side chain-H]¹⁶⁾ indicated that this lanostane type triterpene contained an α -methyl, α,β -unsaturated δ -lactone group as a side chain. The main difference between 1 and colossolactone B was the presence of a methyl group as C-19 instead of an acetylated primary alcohol as in colossolactone B. In the ¹H-¹H-correlation spectroscopy (COSY) spectrum, the following correlations were found: H-23 (δ_H 2.56, 1.98) with H-22 (δ_H 4.50) and H-24 (δ_H 6.59), H₃-27 (δ_H 1.90) with H-24 (δ_H 6.59), H₃-21 (δ_H 1.02) with H-20 (δ_H 1.52) and H-20 (δ_H 1.52) with H-22 (δ_H 4.50). In the heteronuclear

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: saibo421@inn.u-toyama.ac.jp

Table 1. ¹H-NMR Data of Compounds 1–4 (CDCl₃, Except 2 in C₅D₅N)

Position	1	2	3	4
1	1.70, 1.24 m, 2H	3.70 dd, 1H (4.5, 11.1)	0.95, 2.18 m, 2H	1.99 m, 2H
2	1.56, 1.65 m, 2H	2.35, 2.39 m, 2H	1.80, 1.98 m, 2H	2.56 m, 2H
3	3.20 dd, 1H (4.0, 11.5)	3.46 dd, 1H (5.7, 12.3)	3.29 dd, 1H (2.7, 5.4)	—
5	1.21 dd, 1H (4.4, 12.0)	1.19 m, 1H	1.30 m, 1H	1.80 m, 1H
6	1.70 m, 2H	1.78 m, 2H	1.54 m, 2H	2.40 m, 2H
7	2.08 m, 2H	2.05 m, 2H	2.08 m, 2H	2.08 m, 2H
11	2.12 m, 2H	2.11 m, 2H	2.02 m, 2H	2.41 m, 2H
12	1.80, 1.66 m, 2H	1.90 m, 2H	1.28 m, 2H	1.79, 2.46 m, 2H
15	1.26, 1.62 m, 2H	1.68 m, 2H	1.25, 1.58 m, 2H	1.25, 1.64 m, 2H
16	1.28, 2.03 m, 2H	1.80 m, 2H	1.28, 2.03 m, 2H	2, 2.5 m, 2H
17	2.06 m, 1H	2.50 m, 1H	2.10 m, 1H	2.11 m, 1H
18	0.68 s, 3H	0.68 s, 3H	0.69 s, 3H	0.74 s, 3H
19	0.97 s, 3H	1.22 s, 3H	4.60 s, 1H	1.60 m, 3.18, d (14.4)
20	1.52 m, 1H	1.47 m, 1H	1.52 m, 1H	1.58 m, 1H
21	1.02 d, 3H (6.3)	0.94 d, 3H (6.3)	1.03 d, 3H (6.5)	1.01 d, 3H (6.5)
22	4.50 dd, 1H (4.0, 13.5)	4.42 dd, 1H (4.0, 13.5)	4.50 dd, 1H (4.0, 13.5)	4.52, dd, 1H (2.5, 13)
23	1.98, 2.56 m, 2H	2.41 m, 2H	2.00, 2.58 m, 2H	1.96, 2.55 m, 2H
24	6.59 m, 1H	6.60 m, 1H	6.53 m, 1H	6.61 m, 1H
27	1.90 s, 3H	1.87 s, 3H	1.91 s, 3H	1.92 s, 3H
28	0.99 s, 3H	1.13 s, 3H	0.97 s, 3H	1.28 s, 3H
29	0.80 s, 3H	1.00 s, 3H	1.02 s, 3H	1.32 s, 3H
30	0.90 s, 3H	0.81 s, 3H	0.94 s, 3H	0.94 s, 3H
OMe			3.40 s, 3H	

multiple-bond correlations (HMBC) spectrum, H₃-27 protons were correlated with C-24 (δ_C 139.7), C-25 (δ_C 128.1) and C-26 (δ_C 166.6) and H₃-21 protons were correlated with C-17 (δ_C 45.7), C-20 (δ_C 40.4) and C-22 (δ_C 80.2). Based on these correlations, an α -methyl, α,β -unsaturated δ -lactone ring was concluded to be linked to ring D at the δ position.

The presence of a hydroxyl group at C-3 was confirmed from the ¹³C-NMR spectrum and was supported by the HMBC correlations observed between C-3 (δ_C 78.8) and signals of H-28 (δ_H 0.99)/H-29 (δ_H 0.80) of a *gem*-dimethyl. The remaining of the structure had the same pattern of the basic lanostane triterpene nucleus.¹¹ By COSY and ¹H-detected multiple quantum coherence (HMQC) experiments, all protons and carbons were finally assigned as shown in Tables 1 and 2, respectively.¹³ The β -orientation of the hydroxyl group at C-3 was deduced from the multiplicities of H-3 (δ_H 3.20, dd, $J=4.0, 11.5$ Hz).²¹ The configurations of H-20, H-13 and H-14, H-5 were found to be β and α , respectively, by comparing with reported data, in which authors carried NOESY experiments for similar lanostene core.¹³ For the determination of the absolute configuration at C-22 in compound 1, circular dichroic (CD) measurement was carried out. Since a strong negative cotton effect at 259 nm ($\Delta\epsilon_{259} -1.498$, CHCl₃) was observed, the absolute configuration at C-22 in 1 was consequently assigned as *S*-configuration.^{12,13,17} Accordingly compound 1 was determined to be (2*S*)-3- β -hydroxylanosta-8,24-dien-26,22-olide and called colossolactone 1.

Compound 2 was obtained as white amorphous powder with a positively optical rotation ($[\alpha_D^{25.5} +7.9^\circ]$ (CHCl₃), and assigned a molecular formula of C₃₀H₄₆O₄ by HR-EI-MS. The UV absorption at 245 nm and IR spectra showed characteristic bands at 3434 cm⁻¹ (OH group) and 1708 cm⁻¹ (δ -lactone moiety). The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of 2 showed the presence of seven methyl groups including a secondary methyl (δ_H 0.94, d, $J=6.3$ Hz) and six tertiary methyl groups (δ_H 0.68, 0.81, 1.00, 1.13, 1.22, 1.87). The ¹H-NMR spectra

Table 2. ¹³C-NMR Data of Compounds 1–4 (CDCl₃, Except 2 in C₅D₅N)

Carbon	1	2	3	4
1	35.4	73.8	29.7	27.5
2	27.7	39.8	22.8	27.1
3	78.8	75.5	77.5	177.3
4	38.8	40.2	36.4	74.5
5	50.2	49.1	47.7	55.1
6	18.2	17.6	20.4	33.8
7	26.4	26.0	25.7	27.1
8	134.1	134.1	137.6	139.2
9	134.4	137.0	128.3	121.7
10	36.9	44.1	39.4	91.5
11	20.9	25.1	22.5	33.0
12	30.7	32.0	31.0	30.7
13	44.4	44.3	44.3	44.5
14	49.8	50.4	50.4	50.5
15	30.7	31.6	31.1	30.1
16	27.7	28.7	27.6	27.1
17	45.7	46.6	45.7	45.5
18	15.5	16.2	15.7	15.5
19	19.1	15.5	104.0	41.5
20	40.4	40.7	40.4	40.3
21	13.3	13.8	13.3	13.3
22	80.2	80.5	80.1	80.1
23	27.7	28.7	27.9	27.9
24	139.7	140.5	139.0	139.7
25	128.1	127.8	128.0	128.0
26	166.6	166.2	166.5	166.5
27	17.1	18.7	17.2	17.1
28	27.9	28.2	23.8	32.0
29	15.4	15.4	25.7	25.2
30	24.3	24.9	23.2	24.5
OMe			55.2	

showed two protons on oxygenated carbons at δ_H 3.70 and 3.46. The ¹³C-NMR spectra showed four olefinic carbons (δ_C 134.1, 137.0, 140.5, 127.8) and one carbonyl (δ_C 166.2). The NMR spectral data resembled those of compound 1 except for the presence of an additional hydroxyl group (δ_H 3.70, δ_C 73.8). In the ¹H-NMR and ¹H-¹H COSY spectra, the lower

field shift of H-2 [δ_{H} 2.35 and 2.39, δ_{C} 39.8 and the correlations of H-2 with H-1 (δ_{H} 3.70) and H-3 (δ_{H} 3.46)] in comparison to those of **1** showed that a hydroxyl group was attached to C-1. Also we attempted the HMBC to confirm that the location of the hydroxyl group was at C-1 by detection of cross peaks between H-1 with C-2, C-3, C-5 and C-19. The β -orientation of the hydroxyl group at C-1 was deduced from the J -constants of H-1' (δ_{H} 3.70, dd, $J=4.5, 11.1$ Hz).²⁾ Also the S configuration of C-22 was confirmed from the CD measurement ($\Delta\epsilon_{259} -1.680$, CHCl_3). Accordingly **2** was determined to be (2*S*)-1,3- β -dihydroxylanosta-8,24-dien-26,22-olide and called colossolactone II.

Compound **3** was obtained as colorless needles, mp 245—250 °C with a positively optical rotation ($[\alpha]_{\text{D}}^{27} +54.9^\circ$) (CHCl_3). A molecular formula $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$ was estimated from the HR-EI-MS spectrum. The UV absorbance at 243 nm and a characteristic IR band at 1706 cm^{-1} suggested the presence of a conjugated carbonyl group. The ^{13}C -NMR spectrum displayed 31 carbon signals. Similarities in the spectra indicated that **3** was related in structure to compound **1**. Comparison of the ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data suggested that the most prominent differences were the absence of H₃-19 and the lower field shift of H-19 (δ_{H} 4.60, s), appearance of a methoxy group at δ_{H} 3.40 and an acetal carbon at δ_{C} 104. The HMBC experiment showed that a signal of the acetal carbon at δ_{C} 104 was correlated with protons of OCH₃ and H-5 and a signal due to the oxygenated tertiary carbon atom at δ_{C} 77.5 was correlated with those of H-19 (δ_{H} 4.60), H-28 (δ_{H} 0.97) and H-29 (δ_{H} 1.02). These findings suggested that the acetal carbon at C-19 was connected with C-3 through an oxygen atom.¹⁸⁾ Thus, the connection of the A ring and the acetal ring (F ring) became clear as shown in structure **3** (Fig. 1). A nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) experiment was carried out to determine the relative configuration at C-19 (Fig. 3). The NOESY correlations observed between (H-19 and H₃-29) showed that an ether linkage between C-3 and C-19 was formed in the β side.¹⁸⁾ CD measurements were used for the assignment of the absolute configuration at C-22. The CD spectrum showing the same pattern of the negative Cotton effect ($\Delta\epsilon_{259} -1.284$, CHCl_3) at the same wavelength as in compound **1**, revealed the S configuration at C-22. The remaining of the structure had the same pattern as in compound **1**. Accordingly compound **3** was assigned as (2*S*)-3 β ,19-epoxy-lanosta-8,24-dien-26,22-olide and called colossolactone III.

Compound **4** was obtained as white amorphous powder, with a positively optical rotation ($[\alpha]_{\text{D}}^{25.5} +94.3^\circ$) and assigned the molecular formula $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$ by HR-EI-MS. The UV spectrum showed λ_{max} at 243 nm. The IR spectrum indicated the presence of a hydroxyl group (3449 cm^{-1}) and carbonyl groups ($1763, 1717\text{ cm}^{-1}$). The ^{13}C -NMR spectrum displayed 30 carbon signals, in which nine low-field signals corresponded to two carbonyl (δ_{C} 166.5, 177.3), four olefinic (δ_{C} 121.7, 128.0, 139.2, 139.7) and three oxygenated carbons (δ_{C} 74.5, 80.1, 91.5) and high-field signals were assigned to six methyl, ten methylene, three methine and two quaternary carbons. The ^1H -NMR data were similar to those of compound colossolactone D¹⁾ showing signals for one secondary (δ_{H} 1.01) and five tertiary (δ_{H} 1.92, 1.32, 1.28, 0.94, 0.74) methyls. These findings were consistent with the molecular

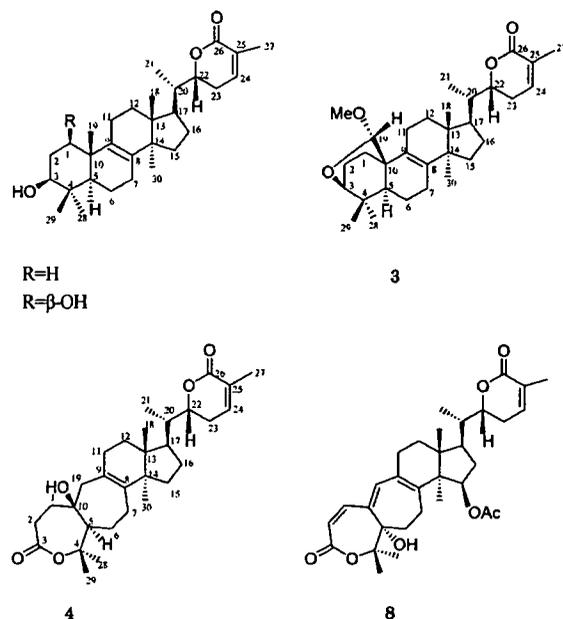


Fig. 1. Structures of Compounds Isolated from the Fruiting Bodies of *Ganoderma colossum*

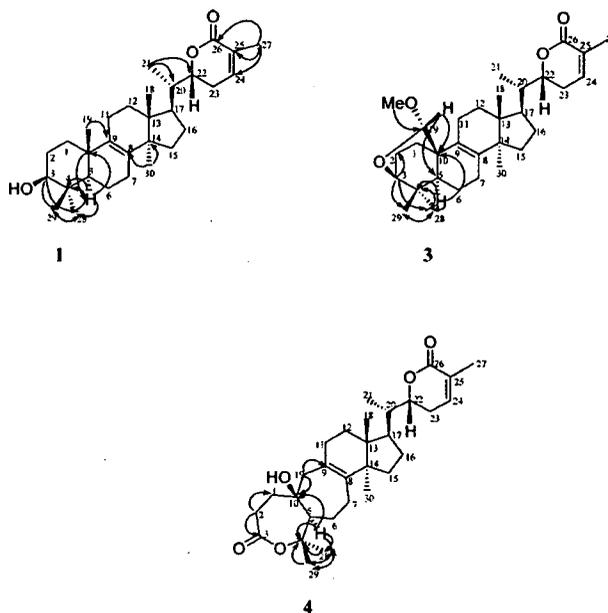


Fig. 2. HMBC Correlations of Compounds **1**, **3** and **4**

formula determined by HR-EI-MS and suggested the structure of **4** in Fig. 1.

The seven membered lactone ring of **4** was assigned as the ring A based on the biogenetic and NMR spectral consideration but differ from colossolactone D in lacking the conjugated system shared between ring A and ring B and also the absence of a hydroxyl group at C-15. This assignment was supported by the downfield shifts at δ_{H} 1.28 and 1.32 for *gem*-dimethyl proton signals (H₃-28 and H₃-29) and, the downfield shifts of C-4 (δ_{C} 74.5) and C-3 (δ_{C} 177.3) carbon signals.¹⁹⁾ A significant peak at m/z 111 in the mass spectrum as well as the ^1H -NMR signals at δ_{H} 1.92 (s), 6.61 (m) and

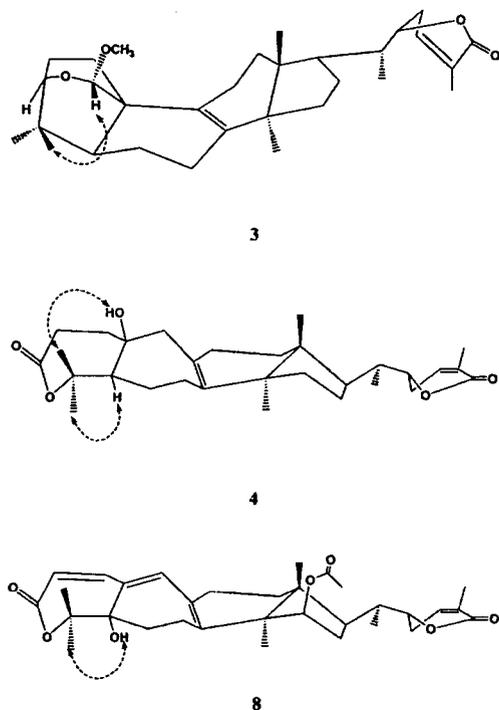


Fig. 3. NOESY Correlations of Compounds 3, 4 and 8

4.52 (dd, $J=2.5, 13.0$ Hz) indicated the presence of a six membered α,β -unsaturated lactone ring substituted at the δ position. The HMBC experiment showed that H-1 was correlated with a carbonyl carbon ($\delta_C 177.3$) and H-5 was correlated with C-28, C-29 and the low field C-4 ($\delta_C 74.5$). In the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra, 4 had only six methyl groups and no cyclopropane ring, which confirmed the presence of a seven membered B ring.¹³ The presence of a hydroxyl group at C-10 was confirmed from the HMBC correlation between C-10 ($\delta_C 91.5$) and down field shifted H_α -19 ($\delta_H 3.18$) and the correlation between C-9 ($\delta_C 121.7$) and the same proton. The stereochemistry of this compound was determined from the CD spectrum to confirm the *S*-configuration of C-22 ($\Delta\epsilon_{259} -1.349$, CHCl_3) and also from the NOESY spectrum to indicate the configuration of a hydroxyl group at C-10; the proton of the OH group ($\delta_H 2.05$) had a NOE correlation with H_β -29 ($\delta_H 1.32$) indicating that the hydroxyl group was projected with β -orientation. Also the α -orientation of H-5 ($\delta_H 1.80$) was determined from the NOESY spectrum (Fig. 3) through the correlation with H_β -28 ($\delta_H 1.29$) leading to the *trans*-fusion between ring A and ring B, in which ring A is a seven-membered ring. Accordingly compound 4 was determined to be (22*S*)-A,B-dihomo-19-nor-4-oxalanosta-8,24-dien-26,22-olide, and called colossolactone IV. The absolute configuration of a hydroxyl group at C-5 in 8 was not yet determined by Kleinwachter *et al.*,¹¹ but the α -orientation of this hydroxyl group was established from a clear correlation of proton signals between the hydroxyl group ($\delta_H 1.82$, brs) and H_β -28 in the NOESY experiments.

Experimental

General Experimental Procedures Melting points were measured on a Yanagimoto micro hot stage melting point apparatus. Optical rotations were measured with a DIP-360 automatic polarimeter (Jasco Co., Tokyo, Japan). UV spectra were measured with a UV2200/UV-VIS recording spectropho-

tometer (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were measured with Varian UNITY 500 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) spectrometer and Jeol JNA-LAA 400WB-FT (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz). HR-EI-MS and EI-MS were measured with a JMX-AX 505 HAD mass spectrometer (Jeol Co., Tokyo) at an ionization voltage of 70 eV. IR spectra were measured with a fourier transform (FT)/IR-460 infrared spectrometer (Jasco Co., Tokyo). CD spectra were recorded in CHCl_3 on a Jasco J-805 spectrometer. Column chromatography was carried out on silica gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh, Merck). Medium pressure liquid chromatography (MPLC) was carried out on a LiChroprep Si 60 (Merck Co., Darmstadt). Thin layer chromatography (TLC) was carried out on pre-coated Silica gel 60 F254 plates (0.25 mm, Merck) and Rp-18 F254S (0.25 mm, Merck) and spots were detected under a UV light and by spraying with *p*-anisaldehyde/ H_2SO_4 followed by heating.

Fungal Material The fruiting bodies of *Ganoderma colossum* (Fr.) C. F. BAKER were obtained from Vietnam in September 2005, and a voucher specimen is deposited at the Museum of Ethnomedicines in the University of Toyama.

Extraction and Isolation The pulverized fruiting bodies of *G. colossum* (3.5 kg) were extracted with CHCl_3 (81 \times 4) at room temperature for 5 d. The combined extracts were filtered and concentrated to give a dark brown residue of 582 g. The chloroform extract was dissolved in MeOH (1 l) and defatted with hexane (21 \times 3). The two were separately evaporated to give dark orange and dark brown extracts of 98 g and 474 g, respectively. An orange precipitate (10 g) formed at the interface between the MeOH and hexane layers was chromatographed over a silica gel column (5 \times 55 cm). The elution was started with hexane (100%), then hexane–acetone mixtures (9.5:0.5) with increasing the concentration of acetone till 20% to afford compounds 1 (170 mg) and 5 (2.9 g). Two hundred grams of the MeOH extract was chromatographed on silica gel (2 kg) with hexane–acetone mixtures (9:1–1:1). Fractions (200 ml each) were collected and their homogeneity was monitored by TLC with solvent systems increasing the solvent polarity: (hexane–acetone 9:1, 4:1, 7:3 and 1:1). The spots were visualized after spraying with *p*-anisaldehyde followed by heating. Those showing similar TLC profiles were combined to give 8 pools (I–VIII). Pool V (fractions 93–124, 5.5 g) was further subjected to silica gel column chromatography (40 cm \times 4 cm) eluted with a hexane–acetone mixture (9:1–4:1) to afford compounds 3 (67 mg) and 4 (32 mg), and two subfractions A1 and A2. Subfraction A1 (2 g) was subjected to silica gel column chromatography (20 cm \times 2.5 cm) eluted with a hexane–EtOAc mixture (4:1 v/v) yielding compounds 6 (31 mg), 7 (75 mg), and subfraction A2 (600 mg), which was chromatographed over an MPLC Si gel 60 column (24 cm \times 1 cm) using a hexane–EtOAc mixture (7.5:2.5 v/v) affording compound 9 (25 mg). Pool VI (fractions 125–160, 60 g) was chromatographed over a silica gel column (70 cm \times 8 cm) eluted with a CHCl_3 –MeOH mixture (9.9:0.1–9:1) to afford compounds 2 (200 mg) and 8 (5.3 g).

(22*S*)-3 β -Hydroxylanosta-8,24-dien-26,22-olide (1, Colossolactone I) Colorless needles (hexane–acetone), mp 266–268 °C. $[\alpha]_D^{25} +23.8^\circ$ ($c=0.5$, CHCl_3). CD: ($\Delta\epsilon_{259} -1.498$, CHCl_3). UV (CHCl_3) nm λ_{max} (log ϵ): 245 (6.00). IR (KBr) cm^{-1} 3530, 2942, 1708, 1373, 1143. ^1H - and ^{13}C -NMR (see Tables 1, 2, respectively). EI-MS m/z : 454 [$\text{M}]^+$ (52.4), 440 [$\text{M}-\text{Me}]^+$, 421 [$\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 314 [$\text{M}-\text{side chain}]^+$, 299 [$\text{M}-\text{side chain}-\text{Me}]^+$, 281 [$\text{M}-\text{side chain}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 111 [α,β -unsaturated δ -lactone moiety] and 55. HR-EI-MS m/z 454.34448 (Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$, 454.34470).

1,3 β -Dihydroxylanosta-8,24-dien-26,22-olide (2, Colossolactone II) White amorphous powder $[\alpha]_D^{25} +7.9^\circ$ ($c=0.3$, CHCl_3). CD: ($\Delta\epsilon_{259} -1.680$, CHCl_3). UV (CHCl_3) nm λ_{max} (log ϵ): 245 (5.88). IR cm^{-1} 3434, 2948, 2365, 1708, 1374, 1144. ^1H - and ^{13}C -NMR (see Tables 1, 2, respectively). EI-MS m/z : 470 [$\text{M}]^+$, 455 [$\text{M}-\text{Me}]^+$, 452 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 434 [$\text{M}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 419 [$\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$, 408 [$\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{Me}-\delta$ lactone moiety] $^+$, 407 [$\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{Me}-\delta$ lactone moiety- $\text{H}]^+$, 295, 282.1, 174 and 55. HR-EI-MS m/z 470.34413 (Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$, 470.33961).

(22*S*)-3 β ,19-Epoxylnosta-8,24-dien-26,22-olide (3, Colossolactone III) Colorless needles (hexane–acetone), mp 245–250 °C. $[\alpha]_D^{27} +54.9^\circ$ ($c=0.5$, CHCl_3). CD: ($\Delta\epsilon_{259} -1.284$, CHCl_3). UV (CHCl_3) nm λ_{max} (log ϵ): 243 (5.87). IR cm^{-1} 2945, 2345, 1706, 1140. ^1H - and ^{13}C -NMR (see Tables 1, 2, respectively) EI-MS m/z : 482 [$\text{M}]^+$, 450 [$\text{M}-\text{OCH}_3]^+$, 435 [$\text{M}-\text{OCH}_3-\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 422, 407, 379, 314, 295, 281, 111 and 89. HR-FAB-MS m/z 482.34052 (Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$, 482.33961).

(22*S*)-A,B-Dihomo-19-nor-4-oxalanosta-8,24-dien-26,22-olide (4, Colossolactone IV) White amorphous powder, $[\alpha]_D^{25} +94.3^\circ$ ($c=0.18$, CHCl_3). CD: ($\Delta\epsilon_{259} -1.349$, CHCl_3). UV (CHCl_3) nm λ_{max} (log ϵ): 253 (5.81). IR cm^{-1} 3449, 2963, 2345, 1763, 1717. ^1H - and ^{13}C -NMR (see Tables 1, 2, respectively). EI-MS m/z : 484 [$\text{M}]^+$, 466 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 451