

プロポリスの化学的品質評価について

田澤 茂実, 藁科 力, 野呂 忠敬*

静岡県立大学

On the Chemical Evaluation of Propolis

Shigemi Tazawa, Tsutomu Warashina, Tadataka Noro*

*Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka,
52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan*

(Received August 25, 2000)

We found that Brazilian propolis (I, II) and the propolis of other countries [Chinese (III), Japanese (IV), Australian (V), New Zealand, Hungarian, Bulugalian, Ukrainian, Uzbekistanian, Uruguayan (VI), American (VII) and South African (VIII)] could be distinguished from each other by 3D-HPLC analysis. Brazilian propolis were cinnamic acid derivative type containing drupanin, artepillin C, (*E*)-3-prenyl-4-(2,3-dihydrocinnamoyloxycinnamic acid, (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid as the main constituents, whereas, the propolis of other countries are flavonoid type containing pinobanksin, chrysin, pinocembrin, galangin and pinobanksin-3-acetate as the main constituents. The above results suggest that they are useful markers for the identification of the place of production of propolis. The 3D-HPLC analysis may be a effective method not only for the detection of flavonoids and cinnamic acid derivatives but also for chemical evaluation of propolis.

Keywords: propolis; *Apis mellifera*; cinnamic acid derivative; flavonoid; 3D-HPLC; chemical evaluation

プロポリスとは、ミツバチが周辺の種々の植物のつぼみや芽、葉、樹皮などからかじり取ってきた滲出物や小片などから作る膠状物質である。ミツバチはこれを巣箱の壁や枠、出入り口などに塗布して、巣の補強や修理などに使ったり、水や冷気の侵入や、昆虫などの侵入を防ぐのに使っている。また雑菌やウイルスの繁殖を防いだりするなど、巣内の殺菌剤

としても重要な役割を果たしている¹⁾。プロポリスは古くから東ヨーロッパを中心とした世界中の多くの地方で民間伝承薬として用いられ、数多くの薬理学的作用や治療効果が報告されている。最近では、抗菌作用²⁾、活性酸素消去作用³⁾、抗酸化作用⁴⁾、免疫増強・賦活作用⁵⁾、抗潰瘍・抗腫瘍作用⁶⁾、肝保護作用⁷⁾などを示す活性物質も単離報告されている。

プロポリスのエタノール抽出物の主要な成分は、フラボノイド、フェノール酸類、芳香族アルコール類とこれらのエステルなどから構成されているが⁸⁾、その組成は主に、採集した周りの植物相(起源植物)の違いにより特徴づけられる。起源植物としては、ヨーロッパや北アメリカ、アジアなどの温帯地域では *Populus* 属が、ベネズエラやチュニジアなどの熱帯地域では *Clusia* 属が、ブラジルでは *Araucaria* 属や *Baccharis* 属などが報告されている⁹⁾。従ってプロポリスを産出する地域(国)により、含まれている成分や組成が大きく異なることが予想される。これまでに各地域(国)産プロポリスの定性評価は、藤本やパルマ、パークら¹⁰⁾が紫外可視分光光度計による評価を報告している。しかしながら成分組成を中心とした品質評価はほとんど報告されていない。我々はこれまでに、ブラジル産プロポリスから新規化合物を10種類含む50種類以上の化合物を単離報告してきた¹¹⁾。今回、これらの成分をもとに、各地域(国)産プロポリスを、三次元検出-高速液体クロマトグラフィー(3D-HPLC)を用いて成分の異同を検討すると同時に、プロポリスの化学的品質評価を行う上での有用な指標成分の探索を行った¹²⁾。

実験の部

1. 標準品

chrysin, apigenin, luteolin, galangin, kaempferol, quercetin, myricetin, naringenin, fisetin, vanillin, gallic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, methyl gallate, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid は和光純薬工業(株)より、hesperitin は東京化成工業(株)より購入した。acacetin, tectochrysin, kaempferide, isorhamnetin, pinocembrin, isosakuranetin, sakuranetin, pinobanksin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), cinnamylideneacetic acid は、本学食品栄養科学部食品製造工学研究室熊澤茂則博士より、rhamnetin, eriodictyol は食品衛生学研究室下位

香代子博士より、genkwanin は(株)活性食品研究センター国分博氏よりご恵与頂いたものを用いた。またこれらの他に既報¹¹⁾により単離した化合物を用いた。

2. 試料

各地域(国)産プロポリスとして、次の合計24検体を検討した。そのうち8種について、3D-HPLCのパターンをFig.1に記載した。

- ・ブラジル産(アレクリン系:I).....4種
(ユーカリ系:II).....2種
- ・中国産(III).....4種
- ・日本産(IV).....2種
- ・オーストラリア産(V).....3種
- ・ニュージーランド産.....1種
- ・ハンガリー産.....1種
- ・ブルガリア産.....1種
- ・ウクライナ産.....1種
- ・ウズベキスタン産.....1種
- ・ウルクアイ産(VI).....1種
- ・アメリカ産(VII).....2種
- ・南アフリカ産(VIII).....1種

3. 3D-HPLC 測定装置及び測定条件

ポンプは、日本分光製 JASCO PU-980, photodiode array 検出器は、日本分光製 JASCO MD-1510, プログラムソフトは、日本分光製 JASCO-PDA 及び JASCO-BORWIN を使用した。カラムは、野村化学製 Develosil ODS-5 (4.6mm i.d.×250mm)を用いた。移動相は、2%酢酸を含む水-アセトニトリル混液をグラジエントプログラム; アセトニトリル濃度 20%(0分)→80%(60分)→100%(70分), 流速 1.0ml/min, 測定波長 200-450nm で測定した。

4. 試料溶液の調整

細かく砕いた各地域(国)産プロポリスの原塊 0.4g に75%EtOHを1ml加え、2時間攪拌させ抽出した。次に3000rpmで、20min遠心分離後、上澄液と固形

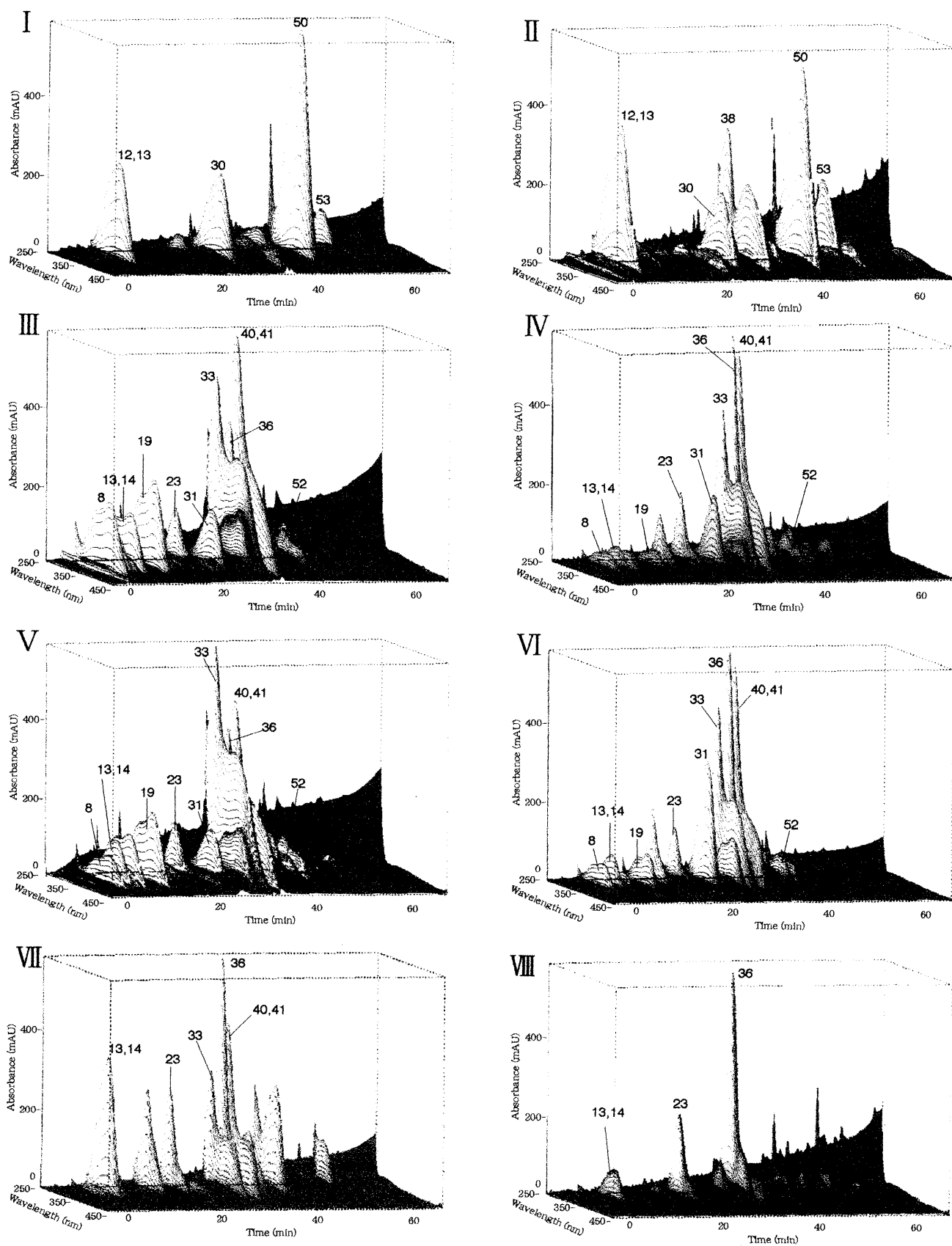


Fig. 1. Typical 3D-HPLC Chromatograms in Some Regional Propolis

I : Brazilian propolis (Alecrim origin)

II : Brazilian propolis (Eucalyptus origin)

III : Chinese propolis

IV : Japanese propolis

V : Australian propolis

VI : Uruguayan propolis

VII : American propolis

VIII : South African propolis

The numbers above the peaks compound numbers in **Chart 2**.

物に分けた。この上澄液を 10 μ l 取り, EtOH を 90 μ l 加え 10 倍希釈し, HPLC 分析用試料とした。

5. その他の実験装置

紫外可視分光光度計は, BECKMAN 株の DU 640 spectrophotometer により測定した。

結果及び考察

各地域(国)産プロポリスの 3D-HPLC による分析結果を Fig.1 に示した。またブラジル産(I)と中国産(III)を波長 280nm で測定した結果を Fig.2 に示した。同定方法は, 各ピークの保持時間及び UV 吸収スペクトルを標品と比較することにより決定した。

UV 吸収スペクトルは, 芳香族共役系を含んでいるフラボノイドやフェノール酸などでは, Chart 1 に示したようにそれぞれ特徴的なパターンを示す。フラボンは, 250~280nm 付近と 310~350nm 付近にピークをもち, フラボノールは, 250~270nm 付近と 350~390nm 付近にピークをもつのが特徴である。フラバノンやフラバノールでは 270~300nm 付近にピークをもち, それに加え 310~330nm の間に二次的ピークもつのが特徴である。桂皮酸誘導体は, 270

~330nm 付近にショルダーのあるピークをもつのが特徴である。これらの UV 吸収スペクトルのパターンの特徴から, 各化合物の同定を行った。

ブラジル産プロポリス(Fig.1-I, II ; Fig.2-A)では主な成分として, *p*-coumaric acid [13]をはじめ, prenyl 基を側鎖にもつ artemillin C [50]や drupanin [30], (*E*)-3-prenyl-4-(2,3-dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid [53], (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid [54]などの桂皮酸誘導体が多く検出された。またその他には aromadendrin [18]及び dihydrokaempferide [25]がブラジル産だけに検出され, フラバノンやフラバノールが多い傾向がみられた。

一方, 中国産(Fig.1-III; Fig.2-B), 日本産(IV), オーストラリア産(V), ニュージーランド産, ハンガリー産, ブルガリア産, ウクライナ産, ウズベキスタン産, ウルグアイ産(VI), アメリカ産(VII)プロポリスは, 地域(国)によって成分の含有量に違いがあるものの, 主な成分や組成については類似したパターンを示した。これらの地域(国)産の主な成分としては chrysin [33]や pinocembrin [36], galangin [40], pinobanksin-3-acetate [41], pinobanksin [23]などのフラボノイドが多く検出された。その他には caffeic acid [8]や *p*-coumaric acid [13], ferulic acid [15], 3,4-dicinnamic acid [19]など

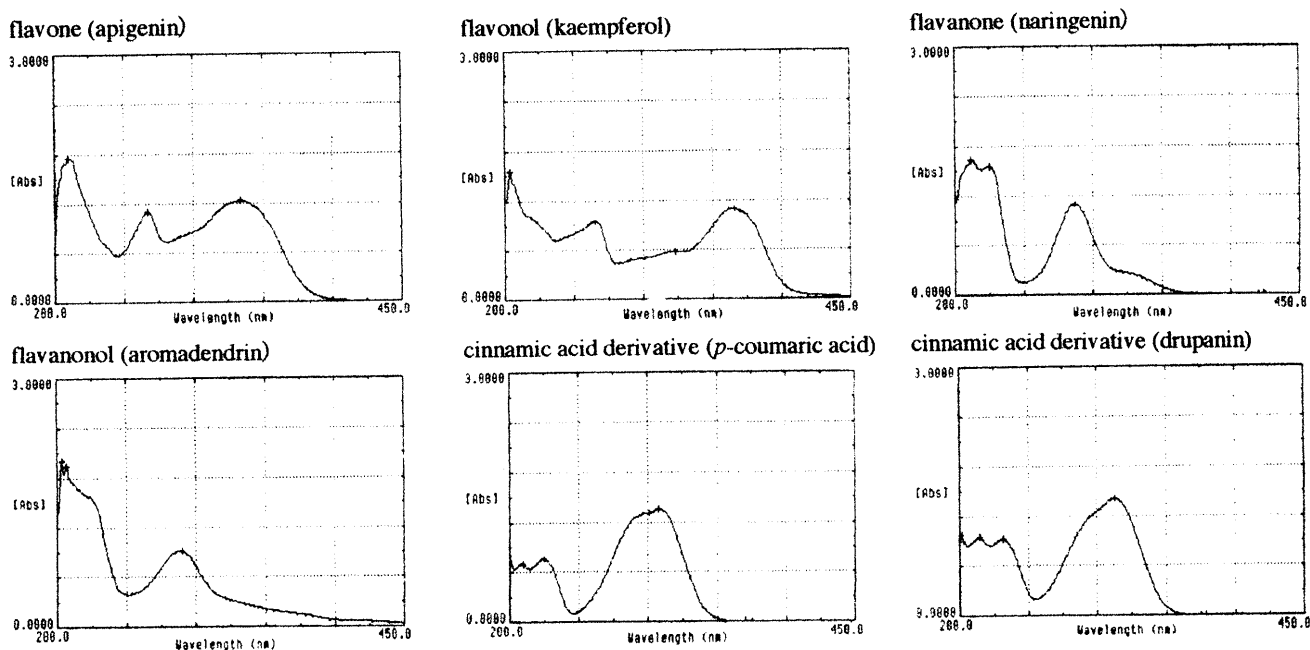


Chart 1. Main UV Spectrum Pattern of Flavonoids and Cinnamic acid derivatives

[Solvent : methyl alcohol]

の桂皮酸誘導体が検出された。これらの地域(国)産プロポリスの未同定ピークは、その多くがフラボノイドであり(Fig.2-B 参照), 中でもフラボンやフラボノールが多い傾向がみられた。これら地域(国)産プロポリスは、ブラジル産のものとは全く異なっており、ブラジル産に特徴的に認められたような prenyl 基を側鎖にもった桂皮酸誘導体は、全く検出されなかった。

南アフリカ産(VIII)プロポリスは、上述の地域(国)産プロポリスとは異なった成分パターンを示した。主な成分としては pinocembrin [36]や pinobanksin [23]などのフラボノイドが検出されたが、chrysin [33]や galangin [40], pinobanksin-3-acetate [41]は検出されなかった。

これらの主な含有成分の違いから、ブラジル産プロポリスは「桂皮酸誘導体中心のタイプ」であり、その他の地域(国)産プロポリスは「フラボノイド中心のタイプ」であることが示唆された。また prenyl 基を側鎖にもつ桂皮酸誘導体や、含有量の多いフラボノイドは、化学的品質評価を行う上での有用な指標成分になることが示された。

藤本は、UV 吸収スペクトルのパターンから、ブラジル産にみられるような UV の極大吸収が 300nm 前後で平坦になるものを「ユーカリ系」、中国産などにみられるような 292nm 付近に山があり、両側に肩があるものを「ポプラ系」と、起源植物と推定される名前をとって、世界の 2 大典型を示すものとして報告している。^{10a)} 我々の 3D-HPLC 分析結果は、それを成分組成からも支持している。

ブラジル産プロポリスは、採集した周りの主な植物相(起源植物)やプロポリスの原塊の色、香りなどからアレクリン系(I), ユーカリ系(II), パラナマツ系などと称されている。アレクリンとは、庭に植える芳香のある薬草として用いるある種の植物に付けられた名前であるが、植物学的にはシソ科やマメ科、キク科、クマツヅラ科など種々の科にわたる。我々の分析では、ブラジル産プロポリスのアレクリン系

(I)とユーカリ系(II)と称されるものの含有成分には、どちらも桂皮酸誘導体を主成分としており、成分組成にはほとんど大きな違いが認められなかったが、drupanin [30]の prenyl 基が分子内で環を巻いた構造の (*E*)-3-(2,2-dimethyl-2*H*-1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid [38]の含有量が、ユーカリ系に特徴的に多く検出された。一方、オーストラリア産プロポリス(V)は、ユーカリが起源植物と考えられているが、ブラジル産のユーカリ系(II)とは全く異なり、中国産(III)やウルグアイ産(VI), アメリカ産(VII)などとはほぼ同様な成分組成を示した。これらのことから、プロポリスのタイプの相違には、植物相(起源植物)のほかに、別の要因も関与していることが示唆される。実際、ブラジルにおいて養蜂家が飼っているハチは、アフリカミツバチとセイヨウミツバチの混血したアフリカ蜂化ミツバチ¹³⁾であり、その他の地域(国)ではヨーロッパ系のセイヨウミツバチ(トウヨウミツバチはプロポリスを産出しない)が主である。またアフリカミツバチが産出する南アフリカ産プロポリスが、他の地域(国)産のものと成分組成を異にしている結果からも、植物相(起源植物)と併せて、ハチの種類も重要な要因になることが推測された。

結論

我々の分析において、ブラジル産(I, II)プロポリスは、桂皮酸誘導体中心のタイプであり、artepillin C [50] や drupanin [30], (*E*)-3-prenyl-4-(2,3-dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid [53], (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid [54]などが特徴的な主な成分であった。一方、中国産(III), 日本産(IV), オーストラリア産(V), ニュージーランド産, ハンガリー産, ブルガリア産, ウクライナ産, ウズベキスタン産, ウルグアイ産(VI), アメリカ産(VII), 南アフリカ産(VIII)プロポリスは、フラボノイド中心のタイプであり、chrysin [33]や pinocembrin [36], galangin [40], pinobanksin-3-acetate[41], pinobanksin

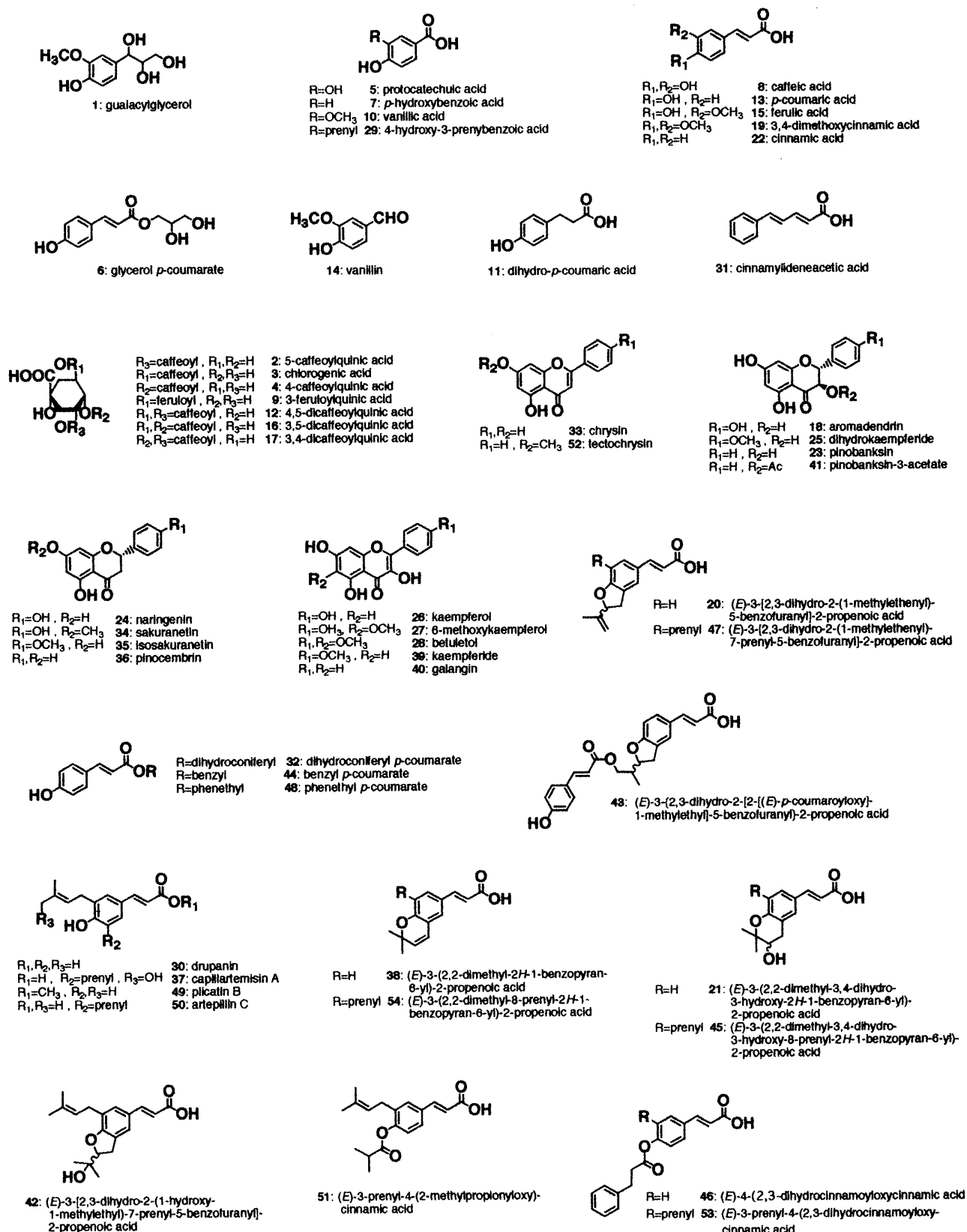


Chart 2.

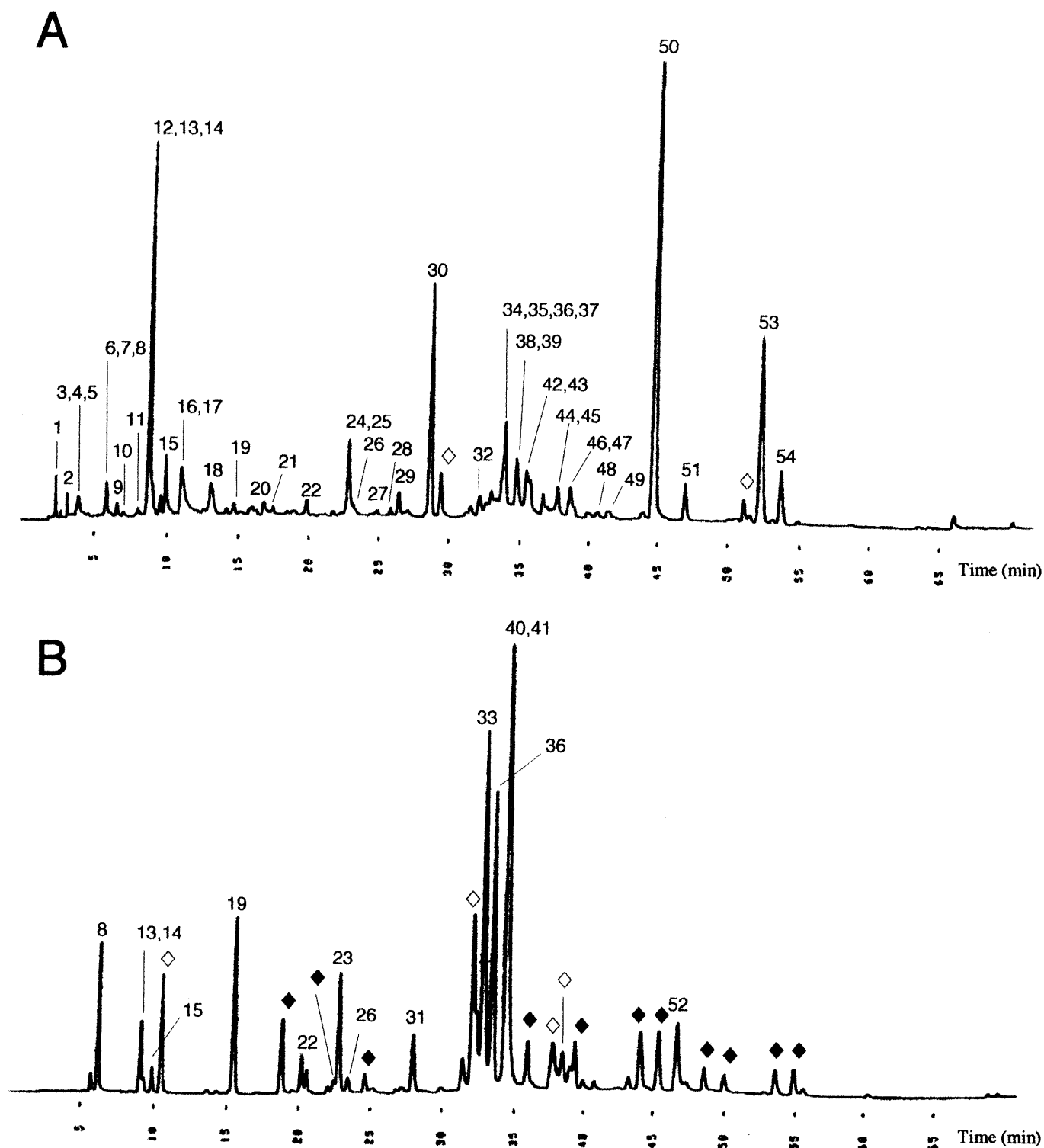


Fig. 2. Chromatograms of Brazilian Propolis and Chinese Propolis in 2D-HPLC

A) Brazilian propolis (state of Minas Gerais) [Fig.1-I]

B) Chinese propolis (province of Zhejiang) [Fig.1-III]

Pump : Jasco PU-280 , separation column : Deverosil ODS-5 (4.6 i.d. × 250mm),

mobile phase : 20%(0min)→80%(60min)→100%(70min) CH₃CN(2%AcOH contain),

flow rate : 1.0ml/min, column temperature : room temperture, detector : Jasco 875-UV (280nm).

The numbers above the peaks compound numbers in **Chart 2**.

◆Non-identified flavonoids ◇Non-identifiedcinnamic acid derivatives

[23]などが主な成分であった。これらの成分は、プロポリスの化学的品質評価を行う上で、有用な指標成分となる可能性が示唆された。

以上の結果から、3D-HPLCによる分析は、保持時間とUV吸収スペクトルパターンから化合物を同定することができ、多成分を含有するプロポリスの品質評価には、有効な分析方法であることが示された。

現在日本におけるプロポリスの規格基準¹⁴⁾では、総フラボノイド(querletin相当量)、またはquerletin含有量と吸光度を測定することになっているが、本研究においてquerletinの存在はほとんど認められなかった。これまで、プロポリスの主要な生理活性はquerletinなどによるものと考えられているが、querletinはほとんど検出されないことから、この考えは適切ではないと思われる。またブラジル産プロポリスと、その他の地域(国)産プロポリスとに、このように成分のパターンに大きな違いが認められることから、プロポリスの規格として単一のものではなく、それぞれにあった基準を作成する必要があると考えられる。今後、活性試験などを含めた分析と併せて、プロポリスを総合的に評価していくことが望まれる。

謝辞：本研究にあたり、フラボノイド標準品及びプロポリスに関する情報をご提供頂きました本学食品栄養科学部食品機能学研究室中山勉教授、熊澤茂則博士、食品衛生学研究室下位香代子博士に深謝いたします。またプロポリスの試料の一部をご供与頂きました日本プロポリス協議会に感謝いたします。

引用文献

- 1) 滝野慶則, 持田俊二, ミツバチ科学, **3**(4), 145-152 (1982).
- 2) Hashimoto T., Aga H., Tabuchi A., Shibuya T., Chaen H., Fukuda S. and Kurimoto M., *Nat. Med.*, **52**(6), 518-520 (1998).
- 3) a) Matsushige K., Basnet P., Kadota S. and Namba T., *J. Trad. Med.*, **13**, 217-228 (1996); b) Basnet P.,

Matsuno T. and Neidlein R., *Z. Naturforsch.*, **52C**, 828-833 (1997).

- 4) Hayashi K., Komura S., Ohishi N. and Yagi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(11), 1521-1524 (1999).
- 5) Tatefuji T., Izumi N., Ohta T., Arai S., Ikeda M. and Kurimoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**(7), 966-970 (1996).
- 6) a) Masuno T., Jung S-K., Matumoto Y., Saito M. and Morikawa J., *Anticancer Res.*, **17**, 3565-3568 (1997); b) Mitamura T., Matuno T., Sakamoto S., Maemura M., Kudo H., Suzuki S., Kuwa K., Yoshimura S., Sassa S., Nakayama T. and Nagasawa H., *Anticancer Res.*, **16**, 2669-2672 (1996).
- 7) a) Basnet P., Matsushige K., Hase K., Kadota S. and Namba T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**(11), 1479-1484 (1996); b) Sugimoto Y., Tarumi T., Kaneko Y., Isayama S., Kawai N., Sugimoto H., Yamada H. and Kamei C., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**(11), 1237-1239 (1999).
- 8) Donadieu Y., ミツバチ科学, **8**(2), 67-82 (1987).
- 9) Bankova V.S., Castro S.L. and Marcucci M.C., *Apidologie*, **31**, 3-15 (2000).
- 10) a) 藤本琢憲, 日本プロポリス協議会会報, **19**, 14-30 (1999); b) Palma M.S. and Malaspina O., ミツバチ科学, **20**(2), 85-88 (1999); c) Park Y.K., Ikegaki M., Alencarz S.M. and Moura F.F., ミツバチ科学, **21**(2), 85-90 (2000).
- 11) a) Tazawa S., Warashina T., Noro T. and Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(9), 1477-1479 (1998); b) Tazawa S., Warashina T. and Noro T., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(10), 1388-1392 (1999).
- 12) 日本薬学会東海支部例会, 岐阜, 1999年12月.
- 13) 竹内一男, ミツバチ科学, **11**(3), 105-112 (1990).
- 14) a) プロポリス食品規格基準, 1995年6月1日公示, (財)日本健康・栄養食品協会; b) 日本プロポリス協議会「自主基準」, 1994年9月20日発表.