

## ブラジル産プロポリスの品質評価に関する研究

緑川 淑, A. H. Banskota, 手塚 康弘,  
松繁 克道, 門田 重利

プロポリス (Propolis) とは, ミツバチが巣の保全の為に作る濃緑色~茶褐色の粘着性物質であり, ミツバチが樹木より採取したガム質・樹液・植物色素系物質・香油等の集合体に, 自身の分泌物・蜜蠟等を混合して作られる (Ghisalberti, 1979). 伝統薬物としてのプロポリスの使用の歴史は紀元前 300 年以上前にさかのぼり, 抗腫瘍活性, 抗酸化活性, 抗炎症活性, 抗菌活性など様々な生物活性が報告されている (Burdoc, 1998; Marcucci, 1995).

プロポリスの組成は採取された地域の植物相に依存することから, ヨーロッパ, 南北アメリカ, アジア, アフリカ産それぞれ風土的地理的な違いにより成分構成が異なり, これまで 160 種以上の化合物が確認されている (Marcucci, 1995; Bankova et al., 1999). 手法としては GC-MS と HPLC 分析がプロポリス中の化合物の同定と, 基源植物の調査に使用された (Bankova et al., 1999; Greenaway et al., 1991; Markham et al., 1996; Tomas-Barberan et al., 1993). 興味あることに, それらの化学成分組成の相違にもかかわらず, 温帯から熱帯までの全ての領域からのプロポリスは, 同様の生理活性を示したことから (Burdoc, 1998; Marcucci, 1995), 適当な生物学的評価法の選択は, 異なる基源からのプロポリスの評価法として有用であると考えられた. Kujumgiev et al. (1999) は, 12 種の異なるプロポリスの抗真菌活性, 抗ウイルス活性について調査し, 全てのプロポリスがグラム陽性菌に対して活性を持つことを報告している. Miyataka et al. (1997) はブラジルと中国産の 2 種のプロポリスに対しヒアルロニダーゼ抑制活性試験を行抑

制活性試験を行い, ヒアルロニダーゼ抑制活性はプロポリスの評価のための優れた生理化学的な方法であると結論した. プロポリスの生理活性についての研究は, 抗酸化活性 (Hayashi et al., 1999, Scheller et al., 1990, Yamauchi et al., 1992, Pascual et al., 1994, Volpert and Elstner, 1993, Matsushige et al., 1996), 抗癌または細胞毒性活性 (Banskota et al., 1998, Grunberger et al., 1988, Matsuno, 1995, Matsuno et al., 1997, Scheller et al., 1989), 肝保護活性 (Basnet et al., 1996, Gonzalez et al., 1994, Gonzalez et al., 1995, Sugimoto et al., 1999) についての報告があり, 活性成分もいくつか単離されている.

日本国内で繁用されているブラジル産プロポリスについては, その外観, 香り, またエタノールに溶解させた時の濾液の色, 香り等の経験的要素がプロポリス原料の等級付けの大きな判断基準となっていた. 現在では, 吸光分析や HPLC 分析も用いられているが, プロポリスの持つ生理活性や含有する個々の成分との関連を論じられるものでない.

そこで我々は, ブラジル産プロポリスの等級別原料 6 種を入手し, 等級を反映する生理活性の検討, その活性に寄与する成分の解明, さらに LC-MS を用いたそれらの成分の分析を行い, プロポリスの品質評価法を確立することを試みた.

### 1. ブラジル産プロポリスの活性

サンプルは 1999 年にブラジル Minas Gerais 州 Belo Horizonte 市で入手した 6 種を用いた. これらは, 等級の高い順に, Ultra

Green (以下UGと略), Super Green (SG), CPI (CPI), Blend (BI), Parana Green (PG), Brown (Br) と命名されている。UG, SG 及び CPI は Minas Gerais 州産で現地の養蜂家の間では高品質とされるグリーンタイプの原料である。BL はブレンドされたもの, PG は Parana 州産のグリーンタイプ, Br は茶黒褐色の原料である。

通常プロポリスは水, エタノール, グリセリン等で抽出して用いられていることから, 6種のプロポリスそれぞれについて, 水及びメタノールで抽出してエキスを作製した。即ち, プロポリスを粉碎後熱水抽出(80°C, 3hr)し, 濾液を凍結乾燥して水エキスを得た。次いで, 残渣をメタノールで3時間還流抽出後, 濾液を減圧乾固してメタノールエキスを作製し, 治療補助目的での使用と関連する, 細胞増殖阻害活性試験, DPPH ラジカル消去活性試験, 肝保護活性試験を行い, その等級間の強さを比較した。

高肝転移性の human HT-1080 fibrosarcoma 細胞 (Rasheed et al., 1974) 及び murine colon 26-L5 carcinoma 細胞 (Ohnishi et al., 1997) に対する各プロポリスエキスの細胞増殖阻害活性を MTT アッセイ法 (Rubinstein et al., 1990; Banskota et al., 1998) により検討した。その結果, メタノールエキスが対応する水エキスより強い阻害活性を示していたが, いずれのプロポリスエキスも等級間の IC<sub>50</sub> 値に殆ど差が見られず, これらの癌腫を用いた細胞増殖阻害活性試験はプロポリス等級比較には有用で無い事が解った。

DPPH ラジカル消去活性試験 (Hatano et al., 1989) においては, 水エキスが対応するメタノールエキスより強い活性を示したが, 細胞増殖阻害活性同様に等級間に殆ど差は見られなかった。

肝保護活性は, D-GalN/TNF- $\alpha$  で誘発する初代培養肝細胞死モデルを使用し (Seglen, 1976), 200  $\mu$ g/ml 及び 100  $\mu$ g/ml の濃度で測定した。それぞれのプロポリスのメタノールエキスと水エキスの活性を比較すると, 初代培養肝細胞に対する毒性を示した Br を除いて,

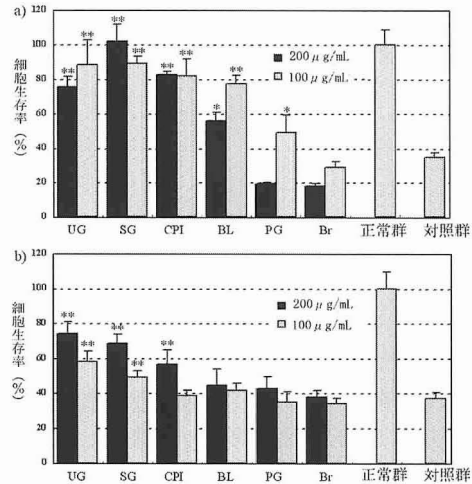


図1 D-GalN/TNF- $\alpha$ で誘発する初代培養肝細胞死モデルにおけるプロポリスメタノールエキス(a)及び水エキス(b)の肝細胞死阻害活性。結果は平均±標準偏差で示す (n=4, 正常群と対照群は n=8)。対照群に対する有意差: \*\*p<0.01, \*p<0.05。

メタノールエキスは対応する水エキスより強い肝細胞死抑制活性を示した。Br 以外のメタノールエキスは 100  $\mu$ g/ml 及び 200  $\mu$ g/ml で活性を示し, UG, SG, CPI の水エキスは 200  $\mu$ g/ml で有意な肝保護活性を示した。特に, 水エキスが細胞毒性を示さなかった事は興味深い。各エキス 100  $\mu$ g/ml 及び 200  $\mu$ g/ml の濃度での細胞生存率と等級を比較すると, 最も等級の低い Br から最も等級の高い UG まで等級が高くなるにつれ生存率も高くなっており, 両者の間に相関が見られた (図1)。したがって本活性試験は, 前述の2種の活性試験とは異なり, ブラジル産プロポリスの等級を比較する目的で使用可能な方法と考えられる。

## 2. ブラジル産プロポリス中の活性成分

上記の3種の活性試験においてブラジル産プロポリスのエキスが活性を示すことが明らかになったので, 次にそれらの活性に寄与する成分の解明を試みた。

プロポリスメタノールエキスよりカラムクロマトグラフィー及び pTLC により, クロマン誘導体4種, 桂皮酸誘導体4種, ラブダンタイプ

のジテルペン 6 種, フラボノイド 4 種, ベンゾフラン誘導体 7 種, その他 2 種の計 27 種の化合物を単離し, 細胞増殖阻害活性, DPPH ラジカル消去活性, 肝保護活性を測定した。

27 種の中で murine colon 26-L5 carcinoma に対して増殖阻害活性を示した化合物は, betuletol (19;  $IC_{50}$ ,  $4.95 \mu\text{g/ml}$ ) であり human HT-1080 fibrosarcoma に対して増殖阻害活性を示した化合物は, coniferyl aldehyde (9;  $IC_{50}$ ,  $4.05 \mu\text{g/ml}$ ), kaempferide (20;  $IC_{50}$ ,  $2.91 \mu\text{g/ml}$ ), ermanin (21;  $IC_{50}$ ,  $2.30 \mu\text{g/ml}$ ) の 3 化合物であった。

化合物濃度  $100 \mu\text{g/ml}$  で DPPH ( $60 \mu\text{M}$ ) に対する捕捉率 50% 以上を示した化合物は, artepillin C (5; 96.6%), coniferyl aldehyde (9;

91.9%), betuletol (19; 94.1%), kaempferide (20; 94.7%), dimeric coniferyl acetate (23; 58.2%) であった。

ブラジル産プロポリス中の肝保護活性成分については以前に caffeoylquinic acids が報告されているが (Basnet et al., 1996), 本研究においてメタノールエキスは対応する水エキスより強い肝細胞死阻害活性を示したことから, 肝細胞死阻害活性に寄与する他の化合物の存在が示唆された。ポジティブコントロールとして使用した silibinin ( $IC_{50}$ ,  $39.6 \mu\text{M}$ ) より強い肝細胞死阻害活性を示した化合物は, 4-dihydrocinnamoyloxy-3-prenyl cinnamic acid (6;  $IC_{50}$ ,  $26.9 \mu\text{M}$ ), 4-hydroxy-3-prenyl cinnamic acid (7;  $IC_{50}$ ,  $34.4 \mu\text{M}$ ), vanillin (8;  $IC_{50}$ ,  $22.1 \mu$

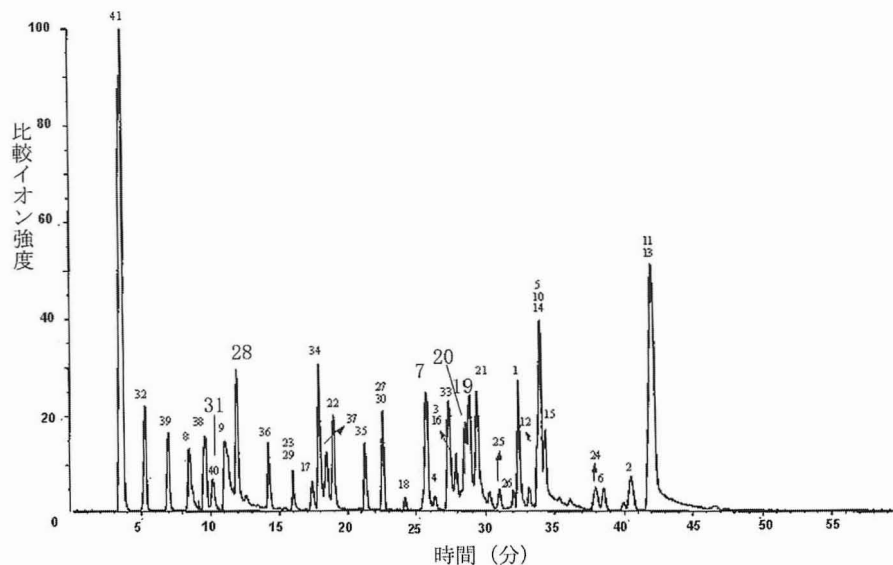


図2 標準品 (1-41) のトータルイオンクロマトグラム (TIC)。

化合物名: 1, 3-Hydroxy-2,2-dimethyl-8-prenylchromane-6-propenoic acid; 2, 2,2-dimethyl-8-prenylchromene-6-propenoic acid; 3, 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid; 4, 2,2-dimethylchromene-6-carboxylic acid; 5, artepillin C; 6, 4-dihydrocinnamoyloxy-3-prenylcinnamic acid; 7, 4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid; 8, vanillin; 9, coniferyl aldehyde; 10, isocupressic acid; 11, 15-acetoxyisocupressic acid; 12, agathic acid; 13, agathic acid 15-methyl ester; 14, agathalic acid; 15, cupressic acid; 16, tremetone; 17, viscidone; 18, 12-acetoxyviscidone; 19, betuletol; 20, kaempferide; 21, ermanin; 22, 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanol; 23, dimeric coniferyl acetate; 24, (*E*)-3-{4-hydroxy-3-[(*E*)-4-(2,3-dihydrocinnamoyloxy)-3-methyl-2-butenyl]-5-prenylphenyl}-2-propenoic acid; 25, (*E*)-3-[2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-7-prenyl-5-benzofuranyl]-2-propenoic acid; 26, propolis-benzofuran A; 27, propolis-benzofuran B; 28, 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid; 29, methyl 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid; 30, methyl 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; 31, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; 32, chlorogenic acid; 33, chrysin; 34, quercetin; 35, kaempferol; 36, quercitrin; 37, cinnamic acid; 38, *p*-coumaric acid; 39, caffeic acid; 40, ferulic acid; 41, gallic acid.

M), betuletol (19; IC<sub>50</sub>, 12.7 μM), kaempferide (20; IC<sub>50</sub>, 17.6 μM), ermanin (21; IC<sub>50</sub>, 15.0 μM), 3,5,7 trihydroxy- 4'- methoxyflavanol (22; IC<sub>50</sub>, 22.0 μM), (*E*)-3- {4-hydroxy-3-[(*E*)-4-(2,3-dihydro cinnamoyloxy)-3-methyl-2-butenyl]-5-prenyl}-2-propenoic acid (24; IC<sub>50</sub>, 15.2 μM), propolis- benzofuran B (27; IC<sub>50</sub>, 15.0 μM) の 9 化合物であった。

### 3. ブラジル産プロポリスの LC-MS 分析

前章でブラジル産プロポリスメタノールエキスより単離した 27 化合物 (1-27), 以前にブラジル産プロポリス水エキスから単離されていた 4 種の dicaffeoylquinic acid 類 (28-31), プロポリスからの単離報告のある 10 化合物 (32-41) の計 41 化合物を標品として LC-MS 分析を行った。

最初に、個々の標品についてパルスインジェクション法にて LC-MS 測定を行ない、それぞれの標品の保持時間 (tr) と擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> を示す事を確認した。次いで、41 化合物を混合し LC-MS 分析を行ない、各化合物がトータルイオンクロマトグラム (TIC) で良好な分離を示す事を確認した (図 2)。なお、TIC において分離できなかった一部の化合物についても、擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> の質量数でのマスクロマトグラムでは明瞭に分離していた。結果として HPLC 条件は、島津製 CLC-ODS (150 × 6.0 mm) カラム、移動相は 0.5% 酢酸とメタノールをグラジエント条件 (0.5% AcOH-MeOH (70:30, v/v) to 0.5% AcOH-MeOH (20:80, v/v) for 30 min, 30 min 以後保持) で流量 1.0 ml/min で使用 (カラム温度 40°C), サンプル注入量は 10 μl, LC-MS 条件はイオン化モード, negative APCI; TIC range, *m/z* 143 to 900; vaporization temperature, 400°C; orifice temperature, 60°C; needle voltage, 2.80 kV; ion injection time, 0.1 s を用いる事にした。この条件では、測定は 60 分で充分であり、水エキスから単離した化合物は 20 分以内に溶出し、メタノールエキスから得た化合物は 50 分以内に溶出した。

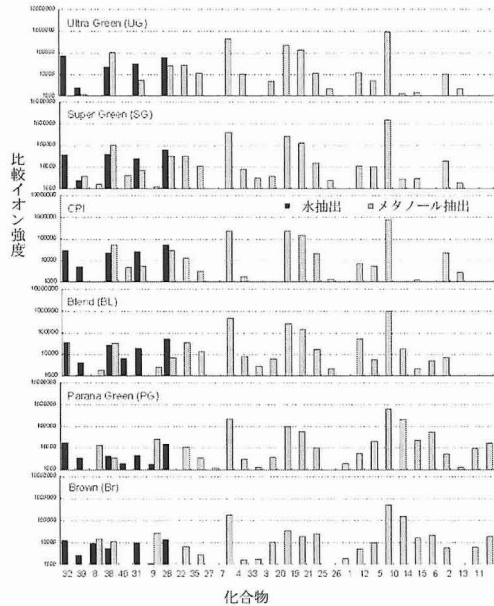


図 3 等級毎ブラジル産プロポリス (UG, SG, CPI, BL, PG, Br) 水およびメタノールエキス中の化合物のイオン強度

ブラジル産プロポリス 6 種について LC-MS 分析を行った結果、水エキスに共通して検出された化合物は、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (28), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (31), *p*-coumaric acid (38) であった。また、メタノールエキスには diterpene, chroman 誘導体, flavonoids, caffeoylquinic acid 誘導体, cinnamic acid 誘導体, その他のフェノール性化合物を含む多くのピークが認められ、12 種類の化合物 (1, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 19-22, 35) が共通に検出された。

6 種のプロポリスのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を比べると、それぞれのイオン強度は異なるものの、水エキス同士、メタノールエキス同士では類似していた。しかし、エキス間で化合物ごとのイオン同士を比較すると等級の高いもの同士 (UG, SG, CPI) は類似のパターンを示し、等級の低いもの同士 (PG, Br) も類似のパターンを示した。ブレンドタイプ (BL) は等級の高いもの (UG, SG, CPI) と等級の低いもの (PG, Br) の中間的なパターンを示した (図 3)。この結果から、今回の LC-MS 条件でブ

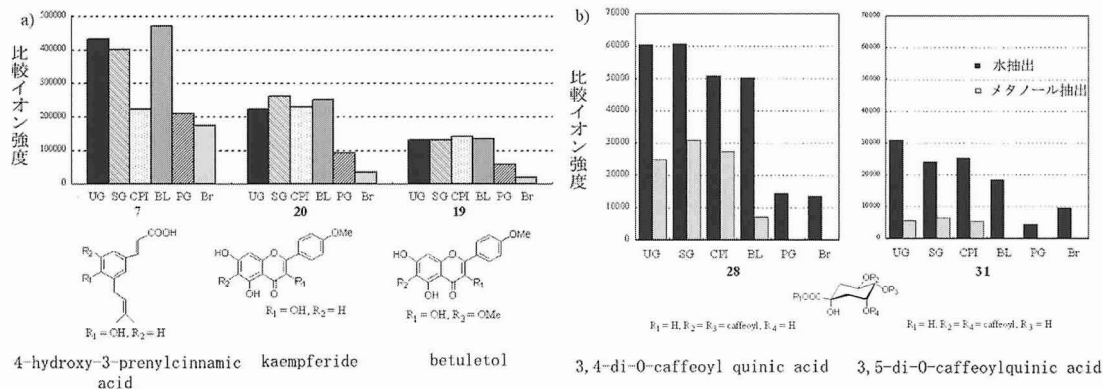


図4 a) ブラジル産プロポリスメタノールエキス中の化合物7, 20, 19のイオン強度  
b) ブラジル産プロポリス水およびメタノールエキス中の化合物28, 31のイオン強度

ラジル産プロポリスを分析しそのイオン強度パターンを比較する事で、その等級の高低を判別する事が可能であると考えられた。次に肝細胞死阻害活性との相関が認められた化合物について、等級とイオン強度の関係を比較してみると、silibininよりも強い肝細胞死阻害活性を示したflavonoids 19, 20及びdicafeoylquinic acid 28, 31は等級の高いサンプルで高いイオン強度を示していた(図4)。したがって、これらの化合物19, 20, 28, 31のイオン強度も、ブラジル産プロポリスの品質評価に有効な指標であると考えられる。

上記のように、LC-MS分析がブラジル産プロポリスの品質評価に有効であったので、同条件で他の産地(ペルー産, オランダ産, 中国産)のプロポリス原料の分析を試みた。これらの産地のプロポリス原料のクロマトグラムはブラジル産のものとは異っており、含有成分が異なっている事を示している。これは、始めに述べたように、プロポリスはミツバチが周辺の樹木から集めてくるものであるので、産地が異なると基源植物が異なる為である。品質を評価する上において産地を明らかにする必要があるが、今回の結果はLC-MS分析で産地の特定を行う可能性も示唆しているものと考えられる。

以上のように、含有成分(特に、肝細胞死阻害活性成分)に注目したLC-MS分析法は、従

来科学的方法が十分に無かったブラジル産プロポリスの品質評価において有用な手法になる事が明らかになった。なお、類似のLC-MS法はブラジル産プロポリスに限らず、他の地域のプロポリスの品質評価においても有用な手法となると思われる。

(Banskota, 手塚, 門田: 〒930-0194 富山県富山市杉谷2630 富山医科薬科大学和漢薬研究所化学応用部門 緑川, 松繁: 〒325-0025 栃木県黒磯市下厚崎5-452 日本プロポリス(株))

#### 引用文献

- Banskota, A. H. et al. 1998. J. Nat. Prod. 61: 896-900.  
Bankova, V. et al. 1999. Z. Naturforsch. 54c: 401-405.  
Basnet, P. et al. 1996. Biol. Pharm. Bull. 19: 1479-1484.  
Burdoc, G. A. 1998. Food Chem. Toxic. 36: 347-363.  
Ghisalberti, E. L. 1979. Bee World 60:59-84.  
Gonzalez, R. et al. 1994. Phytother. Res. 8: 229-232.  
Gonzalez, R. et al. 1995. Phytother. Res. 9: 114-117.  
Greenaway, W. et al. 1991. Z. Naturforsch. 46c: 111-121.  
Grunberger, D. et al. 1988. Experientia 44: 230-232.  
Hatano, T. et al. 1989. Chem. Pharm. Bull. 37: 2016 - 2021.

- Hayashi, K. et al. 1999. *Chem. Pharm. Bull.* 47: 1521-1524.
- Kujumgiev, A. et al. 1999. *J. Ethnopharmacol.* 64: 235-240.
- Marcucci, M. C. 1995. *Apidologie*, 26:83-99.
- Markham, K. R. et al. 1996. *Phytochemistry* 42: 205-211.
- Matsuno, T. 1995. *Z. Naturforsch.* 50c: 93-97.
- Matsuno, T. et al. 1997. *Anticancer Res.* 17: 3565-3568.
- Matsushige, K. et al. 1996. *J. Trad. Med.* 13: 217-228.
- Miyataka, et al. 1997. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 496-501.
- Ohnishi, Y. et al. 1997. *Tumor Biol.* 18: 113-122.
- Pascual, C. et al. 1994. *J. Ethnopharmacol.* 41: 9-13.
- Rasheed, S. et al. 1974. *Cancer* 33: 1027-1033.
- Rubinstein, L. V. et al. 1990. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113 -1118.
- Scheller, S. et al. 1989. *Z. Naturforsch.* 44 c: 1063-1065.
- Scheller, S. et al. 1990. *Int. J. Radiat. Biol.* 57: 461-465.
- Seglen, P. O. 1976. *Methods Cell Biol.* 13: 29-83.
- Sugimoto, Y. et al. 1999. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 1237 - 1239.
- Thomas-Barberan, F. A. et al. 1993. *Phytochemistry* 34: 191-196.
- Volpert, R. and E. F. Elstner. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 851-857.
- Yamauchi, R. et al. 1992. *Biosci. Biotec. Biochem.* 56:1321-1322.
- KIYOSHI MIDORIKAWA<sup>2)</sup>, A. H. BANSKOTA<sup>1)</sup>, YASUHIRO TEZUKA<sup>1)</sup>, KATSUMICHI MATSUSHIGE<sup>2)</sup> and SHIGETOSHI KADOTA<sup>1)</sup>. Quality evaluation of Brazilian propolis. *Honeybee Science* (2003) 24(1): 15-20. 1) Department of Natural Products Chemistry, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama, 930-0194 Japan, 2) Nihon Propolis Co., Ltd. 5-452 Shimoatuzaki, Kuroiso, Tochigi, 325-0025 Japan.

Quality evaluation of the propolis is important, before to be used in food and beverage. In order to settle of the adequate method for this propose, we carried out three different biological activities, *i.e.*, hepatoprotective, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, and antiproliferative activities, on six different propolis from Brazil. The hepatoprotective activity was in accordance with the grade setted up by beekeepers in Brazil. Thus, the hepatoprotective constituents were identified, and by using them as standered compounds, LC-MS method was settled as the most convenient method.