

液体クロマトグラフィー／質量分析法を 用いたプロポリス成分の分析

熊澤 茂則・田澤 茂実・野呂 忠敬・中山 勉

現在、日本において健康食品の素材としても注目されているプロポリスは、ミツバチが周辺の植物の芽や浸出物を集めて作った樹脂状物質である。プロポリスの主な成分は、樹脂、ろう質、花粉、その他ミネラル類などであるが、実際の組成は原塊の採取地や蜂が利用する植物源に左右される。プロポリスは、世界各地で民間伝承薬として利用されており、近年、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などの数多くの薬理的効果が報告されている (Burdock, 1998)。プロポリスを薬品や健康食品として利用する場合、エタノール抽出物を利用することが多い。そのため、エタノールで抽出される成分が、プロポリスの生理活性に大きな役割を果たしていると考えられる。プロポリスのエタノール抽出物中に含まれる主な成分は、桂皮酸や α -クマール酸などのフェノール酸類、フラボノイド類などであり (Bankova et al., 2000)、これらの成分組成を分析することはプロポリスの生理活性の解明につながるだけでなく、プロポリスの品質管理を行う上でも非常に重要なことである。

天然物質の成分を同定するためには、各種クロマトグラフィーによって、目的とする成分を単離・精製した後、NMR (核磁気共鳴) や MS (質量分析) などの機器分析を行い、その化学構造を解明するのが一般的な流れである。このように一つ一つの成分を単離した上で機器分析を行うことは、最も確実な分析手段であるが、プロポリスのような多種類の化合物の混合物については、各成分の同定に至るまで多大な労力と時間を要する。そこで、プロポリスのエタノール抽出物の簡便な分析法として、HPLC (高速

液体クロマトグラフィー)、TLC (薄層クロマトグラフィー)、紫外分光光度計などによる評価法が提案されている (藤本, 1992; Palma and Malaspina, 1999; Park, 2000)。しかし、これらの方法からは、大まかな化学組成についての知見は得られるものの、個々の成分に関する情報まで知ることはできない。それにもかかわらず、これまでのプロポリス成分の分析例の中には、HPLC の保持時間を比較しただけで成分を同定しているものもあり、間違っただけの情報で報告しているものも少なからずあると考えられる。今回、私たちはプロポリスのエタノール抽出物に含まれる成分を分析するための信頼性の高い分析法の一つとして、HPLC と MS を合わせた LC/MS 法 (液体クロマトグラフィー / 質量分析法) の利用を紹介したい。

LC/MS 法は、決して新しい分析法ではなく、現在では食品や医薬分野だけでなく、環境分析に至るまで幅広く利用されている。HPLC と MS とを直接つなぐことにより、混合物を HPLC で分離した後、そのまま質量分析ができ、短時間で有用な情報が得られるという利点がある (原田・岡, 1996)。私たちは、この LC/MS 法をプロポリス成分の定性分析に利用するための検討を試みた。

材料および方法

プロポリスおよびフラボノイド標準試料

プロポリスは、ブラジルミナスジェライス州産の原塊を 70% エタノールで抽出したものを試料とした。また、フラボノイドの標準試料 (ケルセチン) は、関東化学 (株) から購入したものをを用いた。

LC/MS 分析

LC 装置は、資生堂 (株) 製セミマイクロ LC システムであるナノスペース SI-1 を用いた。分析条件は以下の通りである。

カラム：資生堂 Capcell Pack C18 UG120 (内径 2.0mm, 長さ 150mm)

溶離液：A 液, 水 (2% 酢酸); B 液, アセトニトリル (2% 酢酸)

グラジエント条件：0~60 分, B 液 20%→80%

流量：200 μ l/分

検出：UV 280 nm

サンプル：100 μ g/ml メタノール溶液に調製した試料を 2 μ l 注入した

MS 測定は、イオントラップ型質量分析計 LCQ (ThermoQuest 社) に、エレクトロスプレー (ESI) 用のイオン源を装着した装置を用い、資生堂の LC 装置 SI-1 に接続した。測定条件は以下の通りである。

イオン化モード：ESI 負イオン

キャピラリー電圧：-10V

キャピラリー温度：260 $^{\circ}$ C

シースガス：窒素 (85 arb)

スプレー電圧：5 kV

コリジョンエネルギー：30%

結果および考察

ブラジル産プロポリスの LC/MS 分析

図 1(a)に、ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物の HPLC クロマトグラムを示した。図 1(b)は、図 1(a)と同じ条件でケルセチンを分析した HPLC クロマトグラムである。ケルセチンは、プロポリスの主要な構成成分の一つであるとも報告されているが (Palma and Malaspina, 1998; 斉藤, 2000), 図 1(a)を見てもわかるように、今回使用したプロポリスサンプルにおいては、ケルセチンと同じ保持時間に、UV280 nm で検出される強度の強いピークは検出されなかった。ダイオードアレイ検出器を用いた多波長分析も行ったが、このサンプル中のケルセチンは検出限界 (10 μ g/ml) 以下であった。

図 1(a)に示したピーク 4 は、ケルセチンと近い保持時間に観測されたピークの一つであるが、HPLC の保持時間の比較だけで、このピークがケルセチンかどうかを判別することは不可

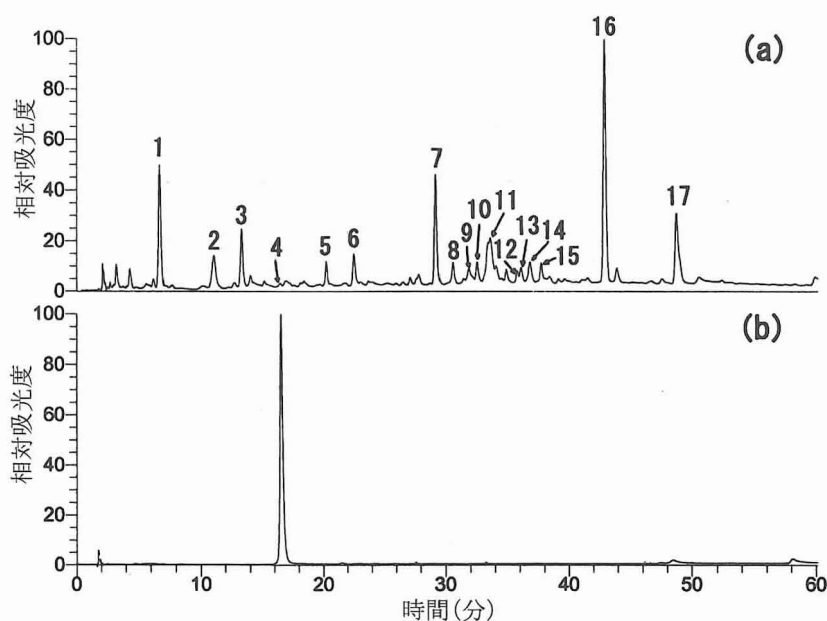


図 1 ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物とケルセチンの HPLC クロマトグラム(a)ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物, (b)ケルセチン

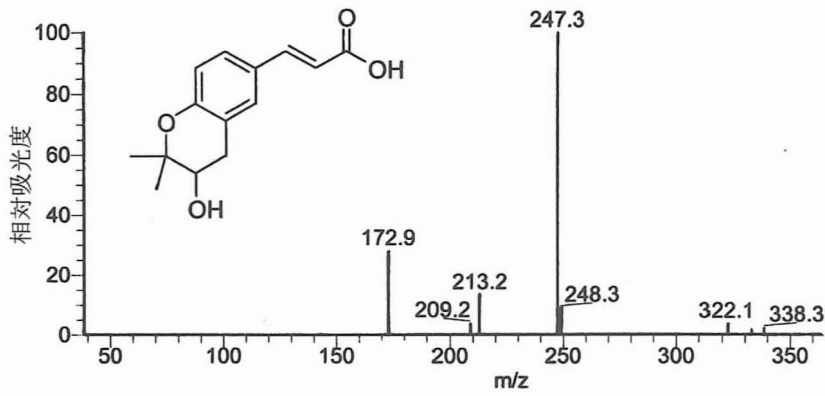


図2 ピーク4のMSスペクトル

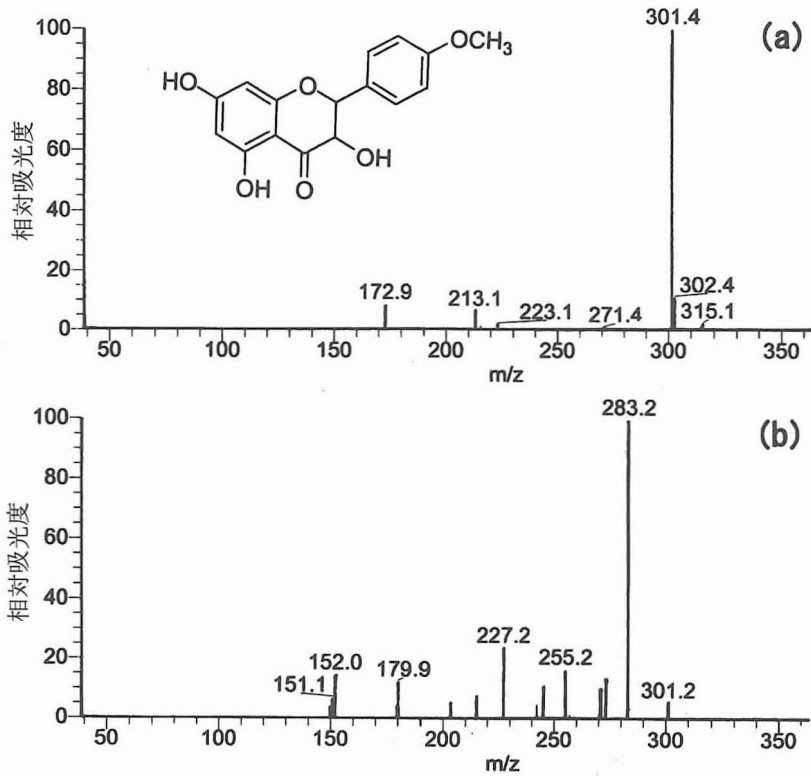


図3 ピーク6のMSスペクトル(a)とMS/MSスペクトル(b)

能である。しかし、LC/MS分析を行うことで、ピーク4がケルセチンであるかどうかを簡単に判別することができる。図2にピーク4のMSスペクトルを示したが、 m/z 247.3に $[M-H]^-$ と考えられる分子イオンピークが観測されたため、ピーク4の分子量は248であることが確認された。ケルセチンの分子量は302であるため、ピーク4はケルセチンとは異なる化合物であることがLC/MS分析から、明らか

にすることができた。実際、ピーク4は単離・精製した後、NMR(核磁気共鳴)などの詳細な機器分析を行うことにより、(*E*)-3-(2,2-dimethyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-2*H*-1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acidであることを確認している(Tazawa et al., 1999)。

このように、LC/MS分析は、HPLCにおいて観測されるピークの分子量を簡単に調べることができるため、プロポリスのような多種多様

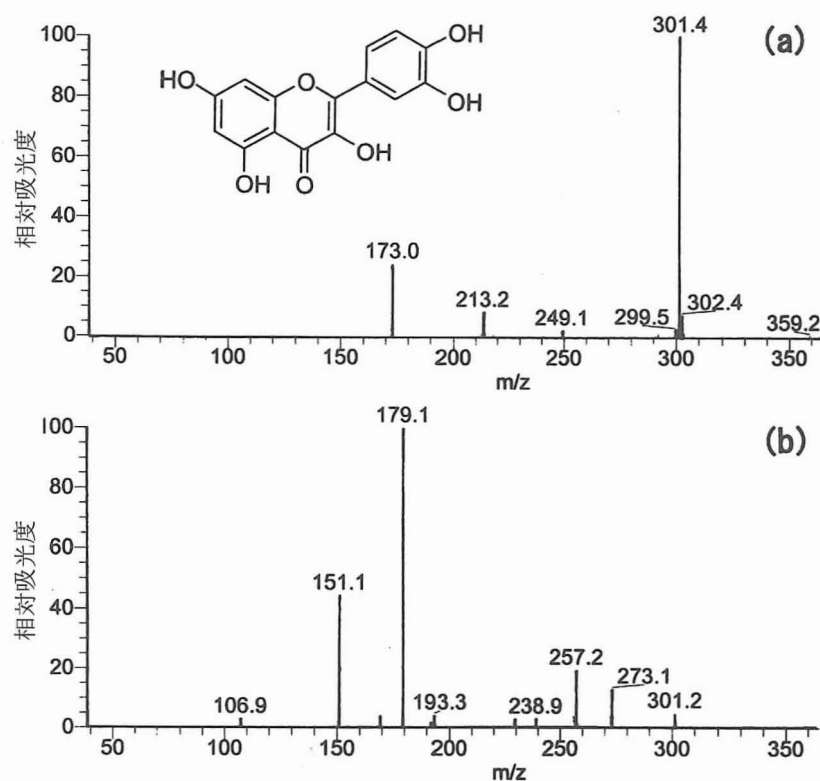


図4 ケルセチンのMSスペクトル(a)とMS/MSスペクトル(b)

表1 ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物のピーク帰属

peak	<i>t</i> R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	化合物
1	6.63	163.2	<i>p</i> -coumaric acid
2	10.96	515.3	3, 5-dicaffeoylquinic acid
3	13.20	515.4	3, 4-dicaffeoylquinic acid
4	18.01	247.3	(<i>E</i>)-3-(2, 2-dimethyl-3, 4-dihydro-3-hydroxy-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid
5	20.12	677.3	未同定
6	22.39	301.4	dihydrokaempferide
7	29.07	231.4	drupanin ((<i>E</i>)-3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid)
8	30.48	315.5	未同定
9	31.74	327.5	dihydroconiferyl <i>p</i> -coumarate
10	32.42	315.5	capillartemisin A
11	33.49	299.4	kaempferide
12	35.67	314.7	<i>E</i> -3-[2, 3-dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7-prenyl-5-benzofuran-2-yl]-2-propenoic acid
13	35.98	393.6	<i>E</i> -3-{2, 3-dihydro-2-[2-[3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]oxy-1-methylethyl]-5-benzofuran-2-yl}-2-propenoic acid
14	36.71	313.5	未同定
15	37.62	315.5	(<i>E</i>)-3-(2, 2-dimethyl-3, 4-dihydro-3-hydroxy-8-prenyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid
16	42.77	299.5	artepillin C
17	48.62	297.7	(<i>E</i>)-3-(2, 2-dimethyl-8-prenyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid

な混合物試料の組成分析には非常に有効である。しかし、LC/MS分析は万能ではなく、注意深く利用しなければならない時もある。例えば、ピーク6は単離後のNMR解析などから、

ジドロケンフェリド (dihydrokaempferide) であることが既に明らかになっているが (Tazawa et al., 1998), この化合物の分子量もケルセチンと同じ302である。仮に、ピーク

6がHPLCにおいてケルセチンと近い保持時間を示していたら、このピークをケルセチンと判断しかねない。実際に、図3(a)と図4(a)に示すように、ピーク6とケルセチンのMSスペクトルは良く似たパターンを示している。しかし、このような場合、MS/MSスペクトルを測定することで判別は可能となる。図3(b)と図4(b)に、 m/z 301の分子イオンピークを解裂させた両化合物のMS/MSスペクトルを示したが、そのスペクトルパターンは大きく異なっていることが確認できる。すなわち、ピーク6のMS/MSスペクトルでは特徴的な m/z 283のフラグメントイオンピークが強く観測される(図3(b))のに対し、ケルセチンのMS/MSスペクトルではこのようなフラグメントイオンピークは観測されていない(図4(b))。この m/z 283のフラグメントイオンピークは、フラバノール構造に特徴的なものであると考えられるため(Lin et al., 1993)、仮に分子量が同じ化合物であってもMS/MS分析を行うことで、両者の化合物の相同性を比較することは可能となる。もちろん、このMS/MS分析もLCと連結したままオンラインで測定可能なため、容易にデータを取得することができる。

表1に、図1で観測された主なピークのLC/MS分析の結果をまとめた。複数成分が重なっているピークもあるが、各成分の分子量を確実に明らかにすることができた。なお、これらの成分は、別途単離後、NMR等の機器分析により構造を決定している。LC/MSは、確実にデータを出してくれる装置であり、ダイオードアレイ検出器を組み合わせることで、より詳しい情報を得ることもできる(He, 2000)。このように、LC/MS法は“分子量”という各成分の固有の情報を与えてくれるため、プロポリスの簡便な成分分析法としての利用効果は高い。今後、多くの研究者がプロポリスの成分分析にLC/MS法を利用していくことを期待したい。(熊澤, 中山: 〒422-8526 静岡市谷田52-1 静岡県立大学食品栄養科学部; 田澤, 野呂: 同大学大学院生活健康科学研究科)

引用文献

- Bankova, V. S., S. L. Castro and M. C. Marcucci. 2000. *Apidologie* 31: 3-15.
- Burdock, G. A. 1998. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- 藤本琢憲. 1992. *ミツバチ科学* 13: 145-150.
- Lin, Y. Y., K. J. Ng and S. Yang. 1993. *J. Chromatogr.* 629: 389-393.
- 原田健一・岡尚男. 1996. *LC/MSの実際*. 講談社サイエンティフィック.
- He, X. -G. 2000. *J. Chromatogr. A.* 880: 203-232.
- Palma, M. S. and O. Malaspina. 1998. *ミツバチ科学* 19: 61-67.
- Palma, M. S. and O. Malaspina. 1999. *ミツバチ科学* 20: 85-88.
- Park, Y. K., M. Ikegaki, S. M. Alencar and F. F. Moura. 2000. *ミツバチ科学* 21: 85-90.
- 齊藤典行. 2000. *New Food Industry* 42: 39-43.
- Tazawa, S., T. Warashina, T. Noro, and T. Miyase. 1998. *Chem. Pharm. Bull.* 46: 1477-1479.
- Tazawa, S., T. Warashina and T. Noro. 1999. *Chem. Pharm. Bull.* 47: 1388-1392.
- SHIGENORI KUMAZAWA, SHIGEMI TAZAWA*, TADAT-
AKA NORO* and TSUTOMU NAKAYAMA. Analysis of propolis by liquid-chromatography-mass spectrometry. *Honeybee Science* (2000) 21(4): 164-168. School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka; *Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan
- It is necessary to determine the phytochemical constituents in propolis in order to ensure the reliability of pharmacological and clinical research, to understand their bioactivities and to enhance product quality control. Analysis by HPLC, TLC and UV spectra has been used for these purposes. It is usually difficult to obtain the detail information of each component in propolis by a single method, since propolis contains various kinds of compounds. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) was applied to the analysis of the ethanol extracts of Brazilian propolis. The negative electrospray ionization mode was used, and the constituents of the propolis were compared with standard samples by mass analysis. Further tandem mass spectrometry (MS/MS) was applied to identify the compounds. This study demonstrates that LC/MS could be a very useful technique for propolis characterization.