

プロポリスの分光光度計による分析 ～簡単に信頼性の高い定性評価法

Mario Sergio Palma and Osmar Malaspina

「蜂やに」として知られてきたプロポリスは、ミツバチの働き蜂によって集められて加工され、巣の中の多目的な上塗り材、すきま充填材および抗生物質として用いられる植物の分泌物質の複合的な樹脂状混合物である。

組成は樹脂、ワックス、水分、フェノール化合物、精油、および無機成分からなっている。実際の組成は働き蜂が利用する植物源に左右される。プロポリスは抗ウイルス性、抗(真)菌性、抗潰瘍性、抗細菌性、免疫増強性、抗炎症性、抗酸化性など、幅広い生理活性を有する(Bankova et al., 1992; Aga et al., 1994)。

これらの性質のためにプロポリスは古代から世界の多くの地域で天然の薬剤として使用されて来た(Ghisalberti, 1979)。近年、プロポリスは医薬品または化粧品によく利用されている(Pochnkova, 1986)。プロポリス原塊を様々な用途で利用する場合、一般に有機成分の大部分を含むエタノール抽出物の形である香油やチンクとして製品化されることが多い(Greenaway et al., 1990)。薬品や健康食品にはこの有機成分の画分を混合するのが普通である。このような抽出物を得るためには、多くの場合70% (v/v) のエタノールを溶媒として用いる。この条件ではフラボノイドが主な溶出物となる。フラボノイドはフェノール化合物の一種であり、よく知られている生理活性の本質的な部分であろう。こうした事実が、プロポリスの化学組成と起源について強い関心を集めてきた。

最近、プロポリスの医薬品、化粧品、健康食品としての利用が、特にブラジルと日本でブームとなった。前述した方法によってプロポリス原塊から抽出された有機成分の組成に関する情

報は重要であるが、ヨーロッパ、北アメリカ、日本、ブラジルで、プロポリスのエタノール抽出物の品質管理上の統一的な規約がない。

生理活性や、時には膨大な数のフラボノイド化合物に起因する、危険性に対するは、プロポリスの組成、あるいは少なくともエタノール抽出物のフェノール化合物組成に、直接依存するものである。

プロポリス製品を開発し、販売している会社は一般的に、非常に高性能な分析機器や、金のかかる化学的手順を踏むことにも多額の資金を投資しない。しかしながら、最低限の化学的分析、少なくとも、大まかな化学組成についての知見を得ることは不可欠である。

フェノール化合物は生理活性のある成分であり、エタノール抽出物の最も多く含まれている物質のグループであるので、プロポリスの香油やチンクは、それらの存在を特徴づけることが重要である。海外で加工用原料として利用されるプロポリスの大半がブラジルで生産されている現状に則し、また簡単に、信頼性が高く、また安価な実験手順によってこのミツバチ生産物のエタノール抽出物の品質管理を行う必要性から、我々はブラジル産原塊からのエタノール抽出物に含まれるフェノール化合物の最も一般的な組成の定性的情報を得るために、紫外可視分光光度測定法の利用を提案したい。

材料および方法

サンプル収集

プロポリスのサンプルは下記のブラジルの各地方の数地域で集められた。

アマゾナス=マナウス地域のドック保護林

ミナス・ジェライス＝南部地域でサウザンブ
ーガムとレモンユーカリの優勢な再植林地
サン・パウロ＝リオ・クラロ市内でレモンユ
ーカリが優占種である場所

パラナ＝州の南部地域でナンヨウスギとユーカ
リを植物源とする場所

リオ・グランデ・ド・スル＝主たる植物源がマ
ツとナンヨウスギであるセラ・ガウチャの山
地

プロポリスの抽出

いずれのプロポリスサンプルも粉末にし、各
2gを100 mlの99.5%エタノールで、ソクス
レー抽出器で5時間加熱抽出した。各抽出液は
No.2濾紙(孔径5 μ m, Whatman濾紙)で濾
過した。濾液は凍結乾燥し、得られた残留物を
それぞれ99.5%のエタノールで1%エキス溶
液に調製した。これらの溶液を紫外可視分光吸
光度計で測定した。

UVスペクトルの標準化

基準となる紫外可視分光吸光度スペクトルは
プロポリスの中に含まれている主要な物質群ご
とに、フラボノイドの標準品から得た。これに
は以下のものを用いた。

フラボン＝クリシンおよびアピゲニン(米
Sigma Chem社製)

フラボノン＝ピノセンブリン(フランス Ext-
rasyntèse製)

フラボノール＝ケルセチン(米Carlo Erba
Analyticals製)、ガランギン(フランス
Extrasyntèse製)

標準物質は単独、あるいは各フラボノイドを
同じ割合で混合した溶液を天然試料を模倣した
ものとして用いた。標準溶液は室温下で各フラ
ボノイド10mgを99.5%エタノールで攪拌し
ながら溶かして調製した。各標準溶液の紫外可
視スペクトルはダイオードアレイ検出器を装備
した紫外可視分光光度計(Pharmacia製
5200)で測定し、200~600 nmの範囲で得た。

結果および考察

種々の植物由来のフラボノイド分析の経験か
ら、これらの化合物はすべての維管束植物に見

られるが、ある物質群は他よりも広範囲に分布
している。フラボンやフラボノールはすべてに
含まれるが、イソフラボンやビフラボニルは極
く一部の植物に見られる。

プロポリス原塊は、フラボノイドとフェノ
ール酸に富む、樹脂性の植物の芽から集められた
物質を含んでいる(Bankova et al., 1992)。こ
れまでの研究からフラボノイドは12のグル
ープに小分類され、その中には約4000もの化
合物が含まれることがわかっている。これらの化
合物は植物の中では糖鎖を有する配糖体として
含まれている可能性もあり、またあるひとつの
植物にあるフラボノイドの数種の配糖体が含ま
れていることもあるだろう。しかしながらプロ
ポリス原塊中の大部分のフラボノイドはアグリ
コンである(Bankova et al., 1992; Park et
al., 1995)。

そこで、配糖体によって複雑になる可能性は
無視して、ブラジルのプロポリス原塊のアグリ
コン態フラボノイドを分析するために、分光光
度計でフラボノイドの標準品のスペクトルとブ
ラジル産の種々のプロポリスサンプルの抽出物
のスペクトルを比較するという簡単なプロトコ
ルを開発することとした。

一般にフラボノイドは芳香族共役系を含んで
いるので、紫外部に高い吸収帯がある。図1に
はいくつかの標準フラボノイド化合物、クリシ
ンとアピゲニン(フラボン・タイプ)、ケルセチ
ンとガランギン(フラボノール・タイプ)とピ
ノセンブリン(フラバノン・タイプ)の紫外可
視スペクトルを示した。

図1からわかるように、フラボノールは2つ
のよく分離された吸収帯をもつ。これらは250
~270 nmの間のピークと、350~390 nmの
間に現れるピークによる。フラボンでは300
nm付近の二次的なピーク(スペクトルではショ
ルダーピークとなっている)に加えて、250
~270 nmと330~350 nmの間に現れる2つ
の主ピーク(スペクトルではショルダーとなっ
ている)の存在が特徴となる。フラバノンでは
3つのピークが、約225 nm付近と275~290
nmの間に現れ、それに加えて310~330nm

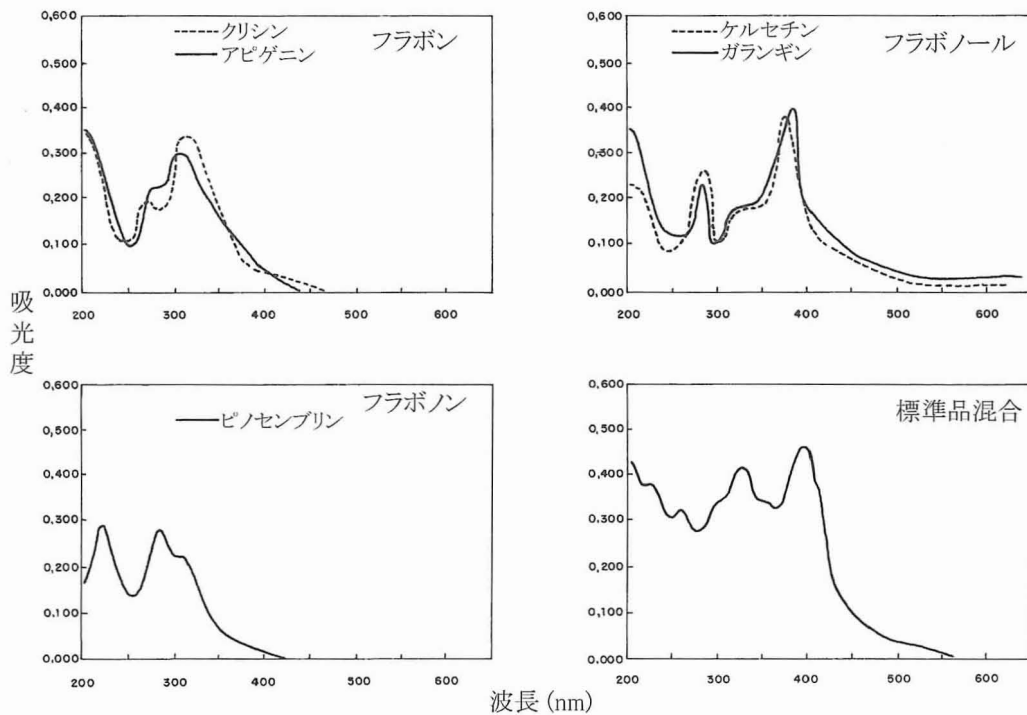


図1 フラボノイド標準品の UV スペクトル

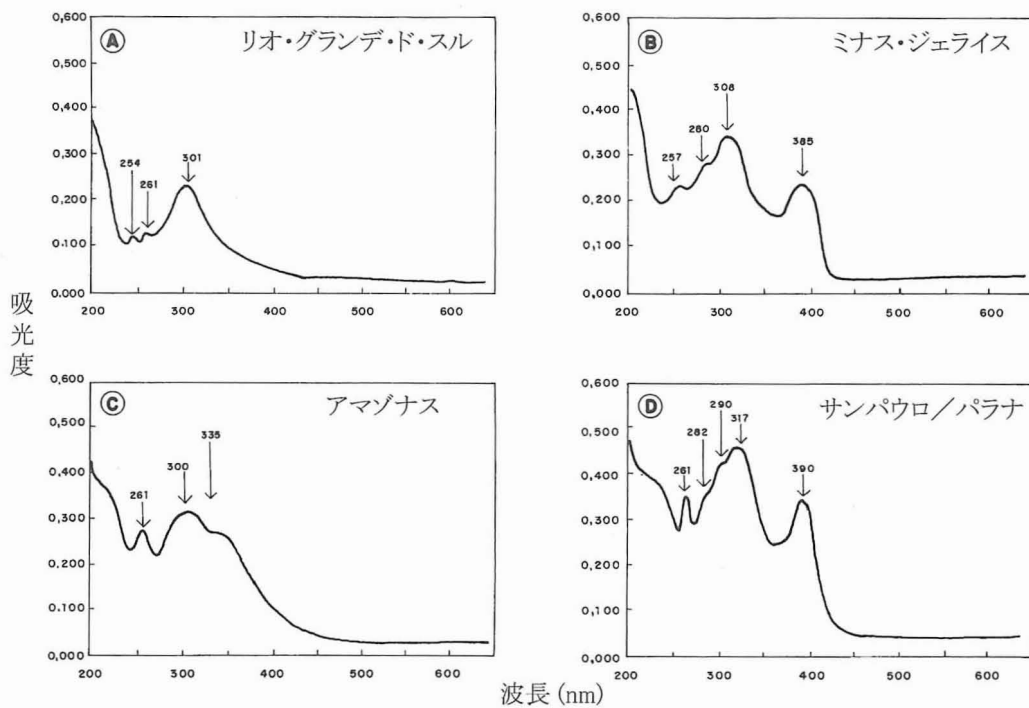


図2 ブラジル各地から得られたプロポリスサンプルの UV スペクトル

の間に二次的なピーク（スペクトルではショルダーとなっている）がある。これらの化合物を混合するとスペクトルも複合されたパターンとなり、そのうち少なくとも上記した6つのピークが明確に現れるのが観察できる。

この簡便な分析の有用性を実証するため、いくつもの異なる起源のプロポリスサンプルを入手した。各地のサンプルのスペクトルを図2に示した。

図2Aのリオ・グランデ・ド・スルで得られたプロポリスサンプルのスペクトルのパターンは非常に単純で254, 261および301 nmに極大吸収(λ_{max})があり、フラボンのスペクトルパターンと一致する。アマゾン産のプロポリスのスペクトルパターンは225 nmにショルダーピークがあり、261, 300と335 nmに極大吸収があって、これはフラボンとフラバノンの両方のパターンが組合わさったものとよく一致するように見える(図2C)。

サンパウロ、パラナおよびミナス・ジェライスからのプロポリスのサンプルは非常に複雑な紫外可視スペクトルパターンを示しており、図2B, Dに示されるようにフラボン、フラバノン、フラボノールの混合物によく一致する。

以上の結果は、プロポリスサンプルの識別と、それぞれのプロポリスサンプルに含まれる、3種のフラボノイド群の同定作業における紫外外部吸収分析の有用性を明瞭に示している。

アマゾンとリオ・グランデ・ド・スルからのプロポリスサンプルは基本的にフラボノイドの単一の物質群で構成されており、一方、サンパウロ、パラナおよびミナス・ジェライスからのサンプルはさらにいろいろな複数の種類のフラボノイド群を含んでいることが容易に読み取れる。推測ではあるが、ユーカリ属の樹がこれらの3州におけるプロポリスの共通起源植物であろう。

なお、可視波長スペクトルはプロポリスの分析にはほとんど寄与していない。

(著者の住所は下記参照) (翻訳 橋 三千三)

引用文献

- Aga, H., T. Shibuya, T. Sugimoto, M. Kurimoto and S. Nakajima. 1994. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(5): 945-946.
- Bankova, V., A. Dyulgerov, S. Popov, L. Esvtatieva, L. Kuleva, O. Pureb and Z. Zamjansan. 1992. *Apidologie* 23: 79-85.
- Ghisalberti, E. 1979. *Bee World* 60(2): 59-84.
- Greenaway, W., T. Scasbrook and F. R. Whatley. 1987. *Proc. R. Soc. Lond. B* 232: 249-272.
- Park, Y. K., M. H. Koo, H. H. Sato and J. L. Contado. 1995. *Arq. Biol. Technol.* 38 (4): 1253-1259.
- Pochnkova, P. 1986. *Pchelnite Produkti v Medizinata*. BAN Publ., Sofia. pp. 56-86.

MARIO SERGIO PALMA and OSMAR MALASPINA. Spectrophotometric analysis of propolis: a simple and reliable method of qualitative evaluation. *Honeybee Science* (1999) 20 (2): 85-88. Center of Study of Social Insects; Institute of Biosciences of Rio Claro, São Paulo State University (UNESP)-Rio Claro, SP, Brazil.

The acquisition of UV spectra have been routinely by propolis processing companies in order to detect and grossly quantify the flavonoids in raw propolis samples and alcoholic extracts. This procedure was used in presence of standard flavonoid compounds to develop a simple and reliable protocol in order to perform fast qualitative analysis of propolis products. The UV spectra revealed that flavonols present two well defined groups of bands: two main peaks, one between 250-270 nm and another one between 350-390 nm; in addition to a secondary peak around 300 nm. The flavones are characterized by the presence of two main peaks, between 250-270 nm and 330-350 nm; the flavanones present two main peaks, at ca. 225 nm and between 275-290 nm, in addition to a secondary peak between 310-330 nm. The mixture of these compounds presents a pattern, in which at least six of the peaks described above are clearly observable. In spite the simplicity of the method, the UV spectra were very useful to distinguish among propolis samples from different regions of Brazil and may be applied to any propolis samples from abroad.