

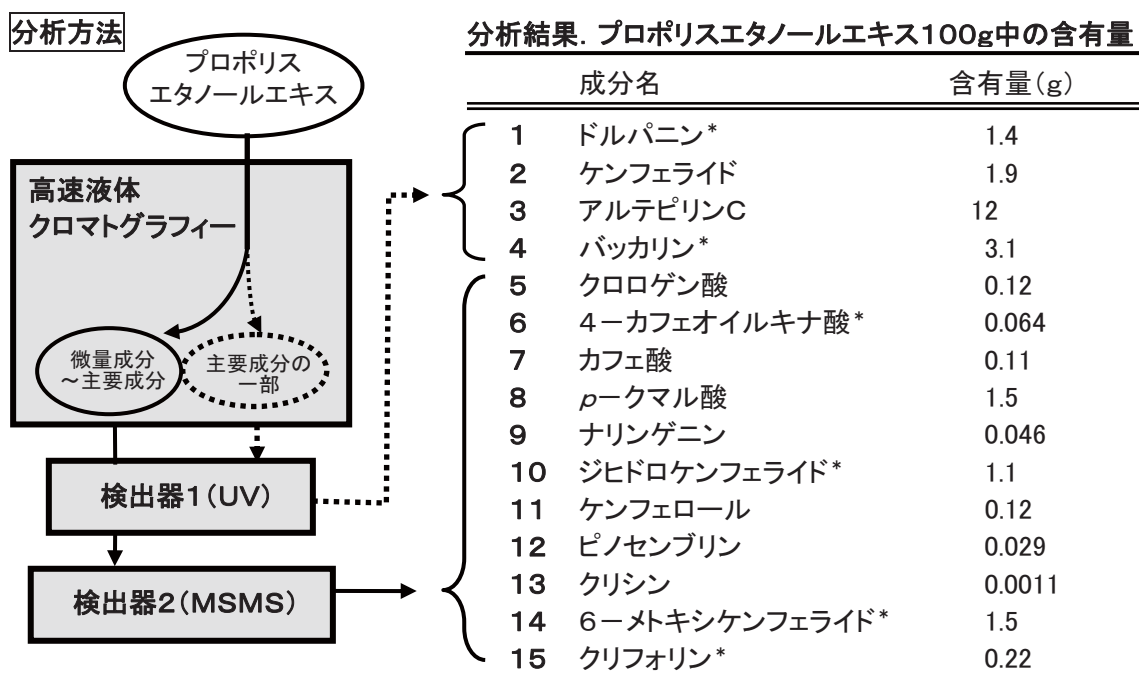
ブラジル産プロポリスの成分分析法を開発 —機能成分15種類の一斉分析を実現—

ミツバチ産品を製造・販売する株式会社 山田養蜂場（岡山県鏡野町、代表：山田英生）はプロポリスの有用成分15種類を一斉に分析する独自の技術を世界で初めて開発しました。従来の成分毎に分析する方法に比べ、分析にかかる時間と溶媒の消費量を大きく削減し、低コストで環境にやさしい分析法の開発に成功しています。また、これまでは入手が困難であった標準品^{注1}6種をプロポリスから分離して確保することにも成功し、プロポリスの特徴的な成分を分析・定量することが可能となりました。

＜研究概要＞

15種類のプロポリス成分を用いた混合標準品を作成し、プロポリス製品の主な原料である『プロポリスエタノールエキス』^{注2}に含まれる成分の一斉分析法を検討しました。その結果、高速液体クロマトグラフィー^{注3}を用いて各成分を分離後、タンデム質量分析計（以下MSMS^{注4}と表記）でさらに分離して検出する方法と、高速液体クロマトグラフィーに接続した紫外線吸光度検出器（以下UV^{注5}と表記）で検出する方法を併用することにより、多様な成分特性と広い濃度範囲から成る15成分を一斉に定量することがわかりました。

＜ブラジル産プロポリスエタノールエキスの分析方法と結果＞



ブラジル産プロポリスエタノールエキスを本技術により一斉分析した結果、主要な成分4種類、微量な成分11種類が検出、定量されました。
（*は市販されておらず、これまで分析が難しかった成分）

世の中の健康意識や、商品の安全性・信頼性に対する要望が高まる中、お客様からの成分表示に対するお問合せが増加しています。山田養蜂場では、本技術により、安心・安全なプロポリスを安定して供給するための独自の品質評価方法を確立しました。今後も、山田養蜂場みつばち健康科学研究所では、分析可能なプロポリス成分の種類を増やし、技術の向上を目指します。

（本件に関するお問い合わせ先）

株式会社山田養蜂場 文化広報室 寺田、畑 〒708-0393 岡山県苫田郡鏡野町市場 194
TEL/FAX:0868-54-1906/3346（月～金 9:00～17:30、土日祝除く） <http://www.3838.com>

ブラジル産プロポリス成分の一斉分析法の確立

1. 研究の背景と目的

(1) プロポリスとは

プロポリスはミツバチが巣を冷気や風雨、病気などから守るために作る濃緑色から茶色の粘着性物質で、ミツバチが植物の新芽や樹皮から採集したガム質・樹液・植物色素系物質・香油などの集合体に唾液を混ぜて作り出します。人類がプロポリスを利用してきた歴史は、いまから 2000 年以上前にさかのぼるといわれています。また、古来より伝統薬物として利用されてきたプロポリスは、現在、健康食品として広く利用され、その有用性として、抗菌、抗酸化、抗腫瘍、抗炎症など様々な活性が報告されています。

(2) プロポリスの成分組成

プロポリスの成分は採取された地域の植物相に依存するため、風土や地理的な違いによりその成分組成は大きく異なります。当社で用いているプロポリスは、ブラジルのミナス・ジェライス州で採取されたもので、バッカリス・ドゥラクンクリフォリア（キク科の植物）を主な起源植物としています。桂皮酸誘導体^{注6}であるアルテピリンC^{注7}を多く含み、その他フラボノイド^{注8}、カフェオイルキナ酸^{注9}、テルペノイド^{注10}など特徴的な成分を幅広く含むことが知られ、これらが総合的に働いてプロポリスの多種多様な有効性を発揮していると考えられています。

(3) 成分分析の現状

成分分析は、高速液体クロマトグラフィーなどの分析機器を組み合わせて、成分を 1 種類ずつ分析する方法が一般的です。当社においても、目的成分の含有量と特性に合わせて機器を選択し、分析したい成分に合わせて条件とサンプル濃度の調製を行っておりました。しかし、この方法でプロポリス成分を分析するには、必要な時間、溶媒、サンプルなどが成分の数だけ必要となり、多くの時間と労力、経費を要してしまいます。

また、標準品と試料中の成分の比較により成分含有量を測定するため、プロポリスの成分を分析するには、プロポリス成分それぞれの標準品が必要となります。しかし、プロポリスには、標準品が市販されていない成分が多く含まれており、それらはプロポリスから 1 つ 1 つ単離しなければなりません。また得られた成分の標準品としての純度を保証する必要もあり、プロポリスの成分分析は極めて困難なものと考えられていました。

(4) 本研究の目的

以上より、この研究ではブラジル産プロポリスエタノールエキスに含まれる成分を効率的に分析するため、①プロポリスから各種成分を精製して当社独自の混合標準品を作製し、②様々な特性をもつプロポリス成分を一斉に定量する方法を確立することを目的としました。

2. 試験概要

(1) 当社独自の混合標準品の調製

ブラジル産プロポリスの原塊をエタノールで抽出し、各種カラムクロマトグラフィー^{注1}などの手法を用いて8成分を精製し、更にそれらの純度が95%以上であることを確認しました。これら8成分に加え、これまで、自社研究でプロポリスに含まれていることが明らかとなっている7成分を合わせた15種類の当社独自の混合標準品を調製しました。

【混合標準品の組成（15成分）】

- 精製成分（8成分）：4-カフェオイルキナ酸、ジヒドロケンフェライド、ドルパニン、ケンフェライド、6-メトキシケンフェライド、アルテピリンC、バッカリン、クリフォリン
- その他有用成分（7成分）：桂皮酸誘導体（カフェ酸、*p*-クマル酸）、フラボノイド（ナリンゲニン、ケンフェロール、クリシン、ピノセンブリン）、カフェオイルキナ酸（クロロゲン酸）

(2) 一斉分析法の確立

(1)の混合標準品を用いて分析条件を検討した結果、「高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LCMSMS）」を用いることで、高速液体クロマトグラフィーだけでは分けることが難しい成分を短時間で分離することが可能となりました。LCMSMSは高速液体クロマトグラフィーで分離した成分を質量特性でさらに分離して高感度に検出することができます。

また、検出方法が異なる2種類の検出器（MSMSおよびUV）を併用し、ほとんどの成分はMSMSで、MSMSでは検出可能な濃度範囲を超える成分は液体クロマトグラフ部分に付属しているUVで定量することにより、広い濃度範囲を一度に定量できることがわかりました（図1）。この方法を用いてプロポリスエタノールエキス（固形分含量55%）を一斉分析した結果、図2、表1の定量結果が得られました。

図1:プロポリスの分析方法

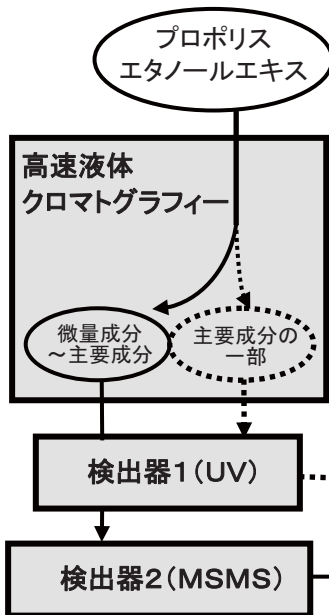
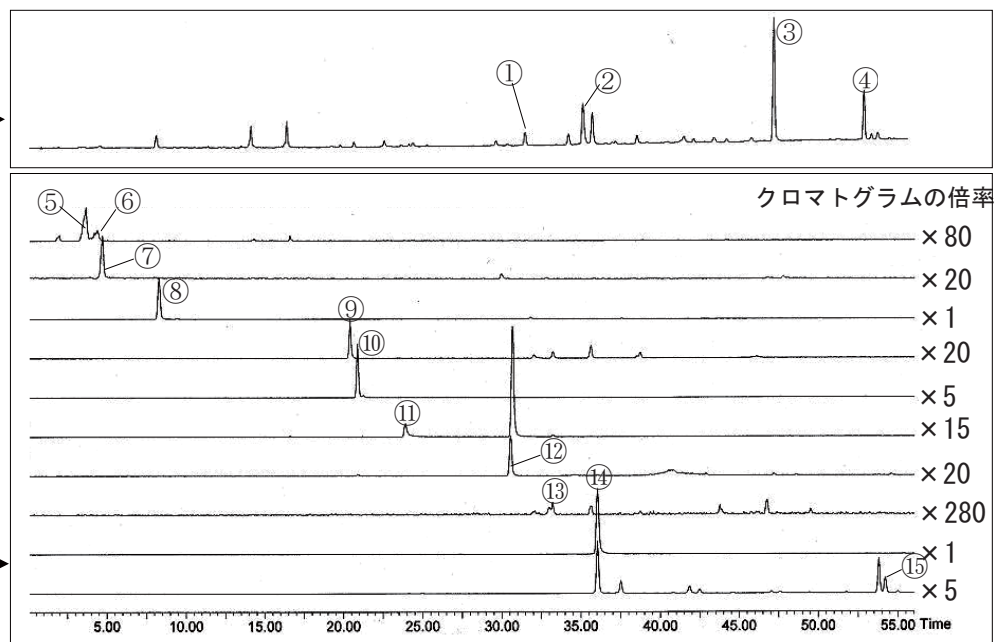


図2:ブラジル産プロポリスの成分分析結果



【分析成分】

- ①：ドルパニン*、②：ケンフェライド、③：アルテピリンC、④：バッカリン*、
⑤：クロロゲン酸、⑥：4-カフェオイルキナ酸*、⑦：カフェ酸、⑧：*p*-クマル酸、
⑨：ナリンゲニン、⑩：ジヒドロケンフェライド*、⑪：ケンフェロール、⑫：ピノセンブリン、
⑬：クリシン、⑭：6-メトキシケンフェライド*、⑮：クリフォリン*
（*は市販されておらず、これまで分析が難しかった成分）

分析を行うとチャート上の特定の位置に各成分に相当するピークが現れます。ピーク面積は成分の相対量に比例するため、既知の濃度の標準品も同様に分析し、標準品のピーク面積とエキス中の成分のピーク面積を比較することで含有量を決定することができます。

表1:ブラジル産プロポリスエタノールエキス100g中の含有量

	成分名	含有量(g)	検出器
1	ドルパニン	1.4	UV
2	ケンフェライド	1.9	UV
3	アルテピリンC	12	UV
4	バッカリン	3.1	UV
5	クロロゲン酸	0.12	MSMS
6	4-カフェオイルキナ酸	0.064	MSMS
7	カフェ酸	0.11	MSMS
8	p-クマル酸	1.5	MSMS
9	ナリンゲニン	0.046	MSMS
10	ジヒドロケンフェライド	1.1	MSMS
11	ケンフェロール	0.12	MSMS
12	ピノセンブリン	0.029	MSMS
13	クリシン	0.0011	MSMS
14	6-メトキシケンフェライド	1.5	MSMS
15	クリフォリン	0.22	MSMS

(3) まとめ

今回の結果から、MSMSとUVの2種類の検出器を併用することで、幅広い濃度範囲の成分を一斉に定量することが可能になりました。また、多様な成分を短時間で分離することができるため、分析に用いる有機溶媒の消費量を抑えることができ、成分分析にかかるコストと環境への負荷も軽減することに成功しています。

現在、プロポリスに含まれるその他の成分の単離を続けており、分析できる成分を増やし、今後も工夫を重ねることで技術の向上を目指していく予定です。

3. 用語説明

注1) 標準品：純度が保証されている物質のこと。正確に濃度を調整した標準品溶液を機器で分析した値と、試料溶液の分析値とを比較することで試料中の目的の物質の量を測定することができる。

注2) プロポリスエタノールエキス：プロポリス原塊をエタノールで抽出して得られたエキス。

注3) 高速液体クロマトグラフィー：多成分から目的成分を分離するために用いる装置。

注4) MSMS：質量の特性で分離を行う装置。各化合物に特徴的な質量を選択することにより、他の検出器で重なって検出される成分を高感度かつ選択的に検出できる。

注5) UV：紫外線の吸収を持つ多くの化合物の検出に用いられる検出器。

注6) 桂皮酸誘導体：アルテピリンCなど、桂皮酸骨格といわれる構造をもつ天然化合物の総称で、ブラジル産プロポリスに特に多く含まれていることが知られている。

注7) アルテピリンC：ブラジル産プロポリスに含まれる主要な成分のひとつ。抗菌、抗酸化、抗腫瘍などさまざまな作用が報告されている。

注8) フラボノイド：ポリフェノールの一種。強い抗菌作用や抗酸化作用が報告されている。

注9) カフェオイルキナ酸：ポリフェノールの一種で、カフェ酸とキナ酸が結合した化合物の総称。抗酸化作用のほか免疫活性賦活作用などが報告されている。

注10) テルペノイド：イソプレネンといわれる炭化水素を構成単位とする一群の天然化合物の総称。

注11) カラムクロマトグラフィー：成分の分離に用いる一般的な実験手法の1つ。

4. 研究者紹介

樋上 進 (ひかみすすむ) 部員のプロフィール

株式会社山田養蜂場本社 研究開発部
みつばち健康科学研究所 研究室所属 修士（農学）
2008年入社。
主な研究テーマは天然素材からの有用物質の精製など。

