

赤いプロポリスとその起源植物

Daugusch, A.a; Moraes, C.S.a; Fort, P.a; Pacheco, E.; Lima, I.B.b; Abreu, J.A.c; Park, Y.K.a*

^a Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, C.P. 6177, Campinas-SP.

^b Universidade Federal de Paraíba - UFPB, João Pessoa-PB.

^c Nectar Farmaceutica Ltda., R. Pernambuco 1066, Belo Horizonte-MG.

* Phone: +55-19-3521-2157; Fax: +55-19-3521-2153; E-mail: ykpark@fea.unicamp.br

要約

赤いプロポリスのサンプルは、ブラジルのパライバ州、ペルナンブコ州、アラゴアス州、セルジッピ州、そしてバイア州のマングローブ林で収穫した。ミツバチ達がプロポリス生産の為に *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (マメ科) の赤い樹液を採集している現場が観察された。各プロポリスサンプル、そして植物の赤い樹液中のフラボノイド類は RP-HPLC、RP-HPTLC 分析によって測定し、赤いプロポリスの起源植物は *D. ecastophyllum* であると結論された。*D. ecastophyllum* の植生率が低い地域では、ミツバチ達は別の植物からプロポリスを作る。*D. ecastophyllum* の樹脂のみで生産されたプロポリスには、その他の植物が混合しているタイプよりも強い抗菌活性が確認された。

キーワード : 赤いプロポリス、起原植物、*Dalbergia ecastophyllum*

1. はじめに

プロポリスはミツバチ (*Apis mellifera*) が様々な植物から採集した樹脂成分の混合物質で、巣箱の隙間を埋める、また保護する為に使用されている。(Greenaway et al., 1990; Ghisalberti, 1979)。プロポリスは紀元前 300 年から使用されており、細胞障害 (Matsuno et al., 1997)、抗ヘルペス (Vynograd et al., 2000)、抗腫瘍 (Park et al., 1998)、抗 HIV (Ito et al., 2001)、そしてダイオキシン消去 (Park et al., 2005) 等の多数の生物活性が確認されている。この様に多数の生物活性を持っている事から、プロポリスのサプリメント等の健康志向食品やドリンクとしての使用が日に日に高まっている (Burdock, 1998)。

以前、我々はプロポリスの物理化学的な特徴を基に、ブラジル南部由来の 5 つのグループ、南東部由来の 1 グループ、そして北東部由来の 6 つのグループの計 12 のグループに分類した (Park et al., 2002)。その際、幾つかのグループのプロポリスの起原植物も同定した。グループ 3 はヤナギ科のポプラのつぼみから滲出する樹脂が起原であると確認された。グループ 6、及び 12 のプロポリスは、各々が *Hyptis divaricata* (シソ科)、そして *Baccharis*

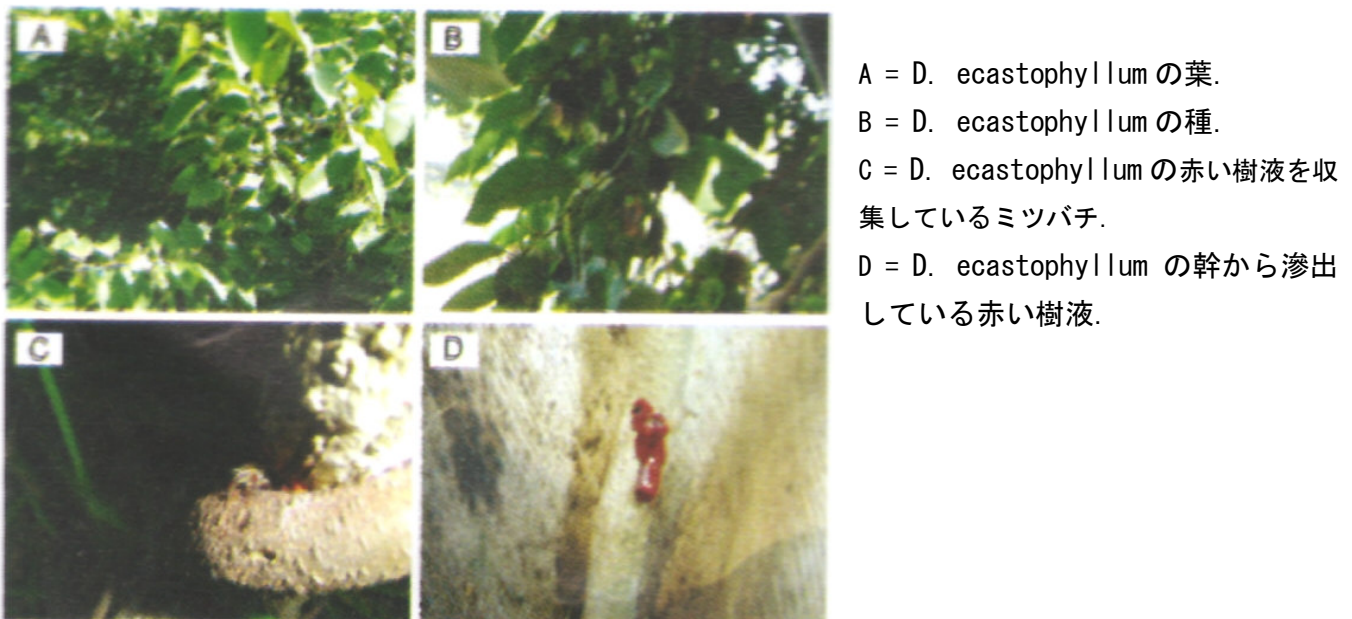
dracunculifolia (キク科)の花芽(新芽)部分の樹脂が起原となっておりと確証された。通常、プロポリスは黄褐色から茶色の樹脂系物質である。近年、我々はブラジル北東部の海岸区域、又は川縁で収穫できる赤いプロポリスに出会い、新たにグループ13と分類した。ミツバチ達がプロポリス生産の為に *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Donnelly et al., 1973; Matos et al., 1975)の赤い樹液を採集している現場が観察された為、同タイプのプロポリスの起源植物であると考えられた。そこで、我々は同植物の赤い樹液と、赤いプロポリスを比較研究する事に至った。

2. 材料と方法

2.1 プロポリスとその起原植物

プロポリスは、灌木が茂るブラジル北東部の海岸区域、又は川縁に設置された巣箱にて採集された。昆虫が *D. ecastophyllum* の幹に開けた穴から滲出する赤い樹液は写真1のDにて見る事が出来る。ミツバチ達は主に *D. ecastophyllum* に向かい、滲出している赤い樹液を穴の表面にて採集していく事が観察された(写真1のC)。赤い樹液のサンプル(写真1のC, D)を分析用にサンプリングし、同地域の巣箱で収穫したプロポリスとの比較研究に使用した。サンプリングした赤い樹液は80%のエタノールに溶解。プロポリスは、同エリアに設置された巣箱から約50gをサンプリングした。我々は北東部の5つの州(パライバ州、ペルナンブコ州、アラゴアス州、セルジッピ州、バイア州)にて同エリアの赤い樹液、及びプロポリスをサンプリングした他にも、品質評価の為にアラゴアス州の同地域にて6つの赤いプロポリスサンプルを収穫した。

写真1 ミツバチによる *D. ecastophyllum* の赤い樹液の収集。



2.2 赤い樹液、及びプロポリスのエタノールエキスの準備方法

赤い樹液 500mg を 5mL のエタノール(80%)に混ぜ、70 度にて 10 分間攪拌した。その後、遠心分離機より得た上澄み液を分析した。

2.3 RP-HPTLC - 逆相高性能薄層クロマトグラフィー分析

3 μ L のプロポリスサンプルのエタノール溶液、及び赤い樹液のエタノール溶液を、シリカゲルプレート(RP-18F254S - Mark 社製)を使い RP-HPTLC 分析を行った。溶媒はエタノール：水(55：45, v/v)を用い、UV 検出器(366nm)を利用しフラボノイド類を検出した。

2.4 RP-HPLC - 逆相高速液体クロマトグラフィー分析

プロポリスサンプルのエタノール溶液、及び赤い樹液のエタノール溶液に対するフラボノイド類、そしてその他のフェノール化合物の同定、定量を RP-HPLC 分析にて実施した。RP-HPLC にはカラム：YMC Pack ODS-A(RP-18, 4, 6 x 250 mm; 5 μ m)、そして DAD 検出器(SPD-M10A, Shimadzu Co.)を備えた。カラムは、水(溶液 A)、及びメタノール(溶液 B)の linear gradient にて、30%B(0-15 min) \rightarrow 90%B(15-75min) \rightarrow 90%B(75-95 min) \rightarrow 30%B(95-105 min)で溶離された - 溶離液(1 mL/min)、DAD 検出器 - 。クロマトグラムの測定は 268nm で行った。フラボノイド、及びその他の化合物の分析用標準品は Extrasynthese 社(フランス)を使用。

2.5 プロポリスエタノールエキス、及び赤い樹液の抗菌活性テスト

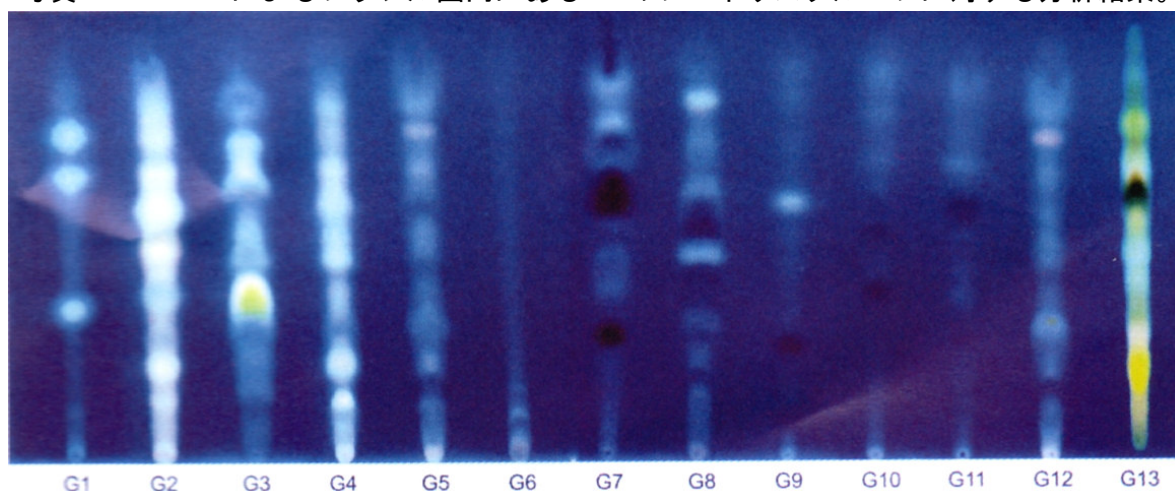
プロポリスサンプルに対する黄色ブドウ球菌(ATCC25923)の感受性を、Isla et al., 2005 を参考文献としてテストした。黄色ブドウ球菌は滅菌綿棒を使い寒天培地を用意したシャーレに植え付けた。シャーレにはプロポリス溶液を漬けた円形濾紙(ディスク)を置き、37 度にて一晩インキュベーションした。プロポリス溶液と、赤い樹液は、各々10 μ L を濾紙 No. 03(Whatman 社 - 5 x 1mm)に漬け、常温にて一晩真空乾燥を行い、その後 60 度にて 4 時間インキュベーションした。

3. 結果と論議

3.1 プロポリスとその起源植物

ブラジル産プロポリスは 12 のグループに分類されており、その中でも 3 つのグループ(3, 6, 12)のプロポリスに対する研究が良く進んでいる訳だが、これらの研究結果よりミツバチは花芽や若芽部分の樹脂を集めるものと明確化された。近年、我々はブラジル北東部の海岸区域、又は川縁に設置されている巣箱から赤いプロポリスを見つけ、グループ 13 と分類した(写真 2)。

写真2 RP-HPTLCによるブラジル国内にある13のプロポリスグループに対する分析結果。



ミツバチ達は、*D. ecastophyllum*の赤い樹液を集めプロポリスを生産している事が観察された(写真1のC, D)。プロポリスと赤い樹液のサンプルはRP-HPLC、RP-HPTLCを用いて分析を行い、その他にもアラゴアス州で収穫した6つのプロポリスサンプルを化学的な品質評価の為に分析した。

3.2 プロポリスとその起源植物

RP-HPLC(写真3)を用いる事により、プロポリスと*D. ecastophyllum*の赤い樹液のフラボノイドやその他の化合物を比較する為のチャート図を得た。含有化合物の同定は、分析用標準品との直接比較、及び保持時間、コクロマトグラフィー、吸光光度分析を基に行った。写真3、及び表1によると、プロポリスサンプルが示したチャート図は*D. ecastophyllum*の結果図と同じである事を示している。

過去の文献によると、南米の*D. ecastophyllum*(マメ科)のエキスには、リキリチゲニン(Liquiritigenin)、ダイゼイン(Daidzein)、Dalbergin、イソリキリチゲニン(Isoliquiritigenin)、フォルムオノネチン(Formononetin)、バイオチャニンA(Biochanin A)などのフラボノイド類が含有している(Donnelly et al., 1973)。イソリキリチゲニンは前立腺癌の成長を抑制する事が確認されており(Kanazawa et al., 2003)、リキリチゲニンとイソリキリチゲニンがキサンチンオキシダーゼを阻害する。肝炎、そして脳腫瘍の際に血中キサンチンオキシダーゼが増加する事から、キサンチンオキシダーゼの阻害は、それらの疾患の治療法として示唆されている(Kong et al., 2000)。

その他にも、アラゴアス州の同エリアにて6つの赤いプロポリスサンプルを収穫し、RP-HPLC、RP-HPTLC分析によって得られた結果を写真4に示しているが、サンプル2, 3, 4, 5は、写真3で示したチャート図とほぼ同じ形を示した。サンプル1, 6も同じ化合物が含有している事を示しているが、その含有量は低く、*D. ecastophyllum*には含有していない同定不可の成分ピークが確認されている(保持時間80~100min)。1、及び6のサンプルは、起源植物となる*D. ecastophyllum*の植生率が低い地域に設置された巣箱から採集されたサンプルで、ミツバチは他の植物からも樹脂を採集したものと考慮できる。

上記の6つのサンプルに対して、黄色ブドウ球菌 (ATCC25923) に対する抗菌活性テストを、Isla et al., 2005 を参考文献として実施した。結果は写真5にて確認でき、サンプル2, 3, 4, 5は、1、及び6と比較すると強い抗菌活性を示している。サンプル1、及び6は *D. ecastophyllum* と同一の化合物の含有量が低く、その他の植物から由来する化合物の存在が確認されている。

写真3 RP-HPLCによる赤いプロポリスと樹液のチャート図

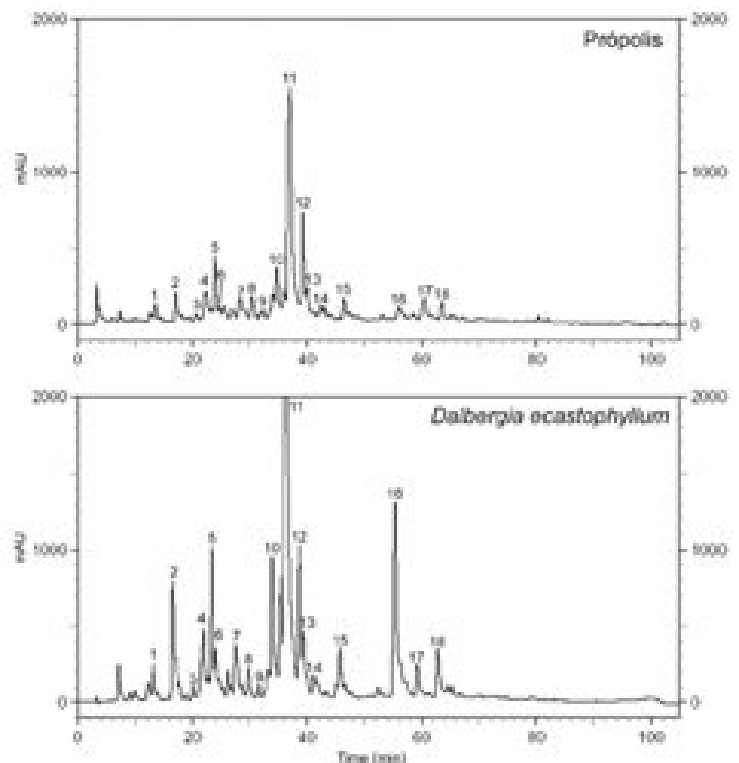


表1 プロポリスサンプル、及び *D. ecastophyllum* 中にて確認した化合物の同定、及び定量検査結果。

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Propolis ^a	<i>D. ecastophyllum</i> ^a
			Quantidade (mg/g)	Quantidade (mg/g)
1	13.42	Rutina	0,7	1,3
2	16.99	Liquiritigenina	1,8	7,1
3	20.63	Daidzeina	0,3	4,3
4	22.35	Pinobanksina	1,7	6,0
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+
6	24.59	Quercetina	0,5	1,9
7	28.40	Luteolina	1,2	2,1
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,4	0,9
10	34.62	Isoliquiritigenina	4,8	12,1
11	36.97	Formononetina	10,2	19,5
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+
13	40.08	Pinocembrina	3,3	7,1
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	1,7	2,6
15	46.45	Biochanina A	0,5	1,5
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+

(a) Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis e *D. ecastophyllum*.
 Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

(b) Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorção máxima UV

写真4 アラゴアス州で収穫した6つのサンプルに対するRP-HPLC、RP-HPTLC分析の結果

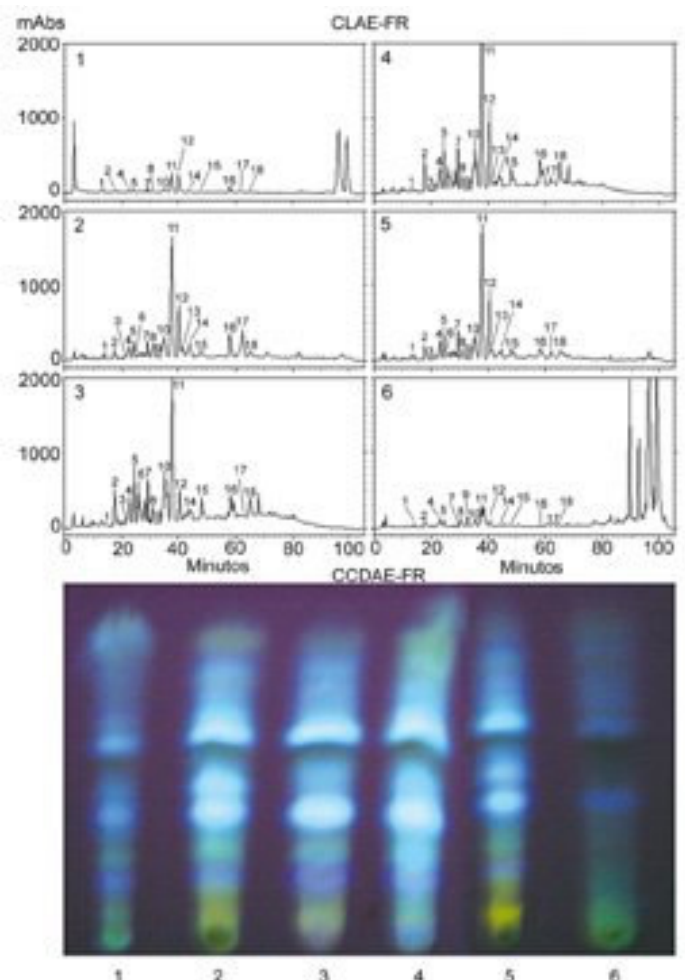


写真5 アラゴアス州で収穫した6つのサンプルに対する抗菌活性テスト



4. 結論

ブラジル北東部の海岸区域、又は川縁付近に設置された5つの巣箱からサンプリングされた5つのプロポリスを分析した(全サンプル違う州にて採集)。ミツバチ達が *D. ecastophyllum* の幹から滲出している赤い樹液を集め、プロポリスを生産している事を観察した。又、収穫した全サンプル、及び同植物の赤い樹液は RP-HPLC、RP-HPTLC 分析により非常に類似したチャート図を示した。これらの事から、赤いプロポリスの主要起源植物は *D. ecastophyllum* であると結論する事が出来る。*D. ecastophyllum* の植生率が低い地域に設置された巣箱のプロポリスサンプルは、同植物中にて確認できる化合物の含有量は低かったが、同植物中には無い同定不可の化合物の存在が確認され(保持時間 80~100min)、抗菌テストでも低い活性度を示した。この場合、ミツバチ達は他の植物の樹脂も集めプロポリスを生産している。これは、プロポリスの起源植物、そしてその植物の植生率が、グループ 13 のプロポリスを生産する為に重要な要素となる事を示している。

引用文献：

- Basnet, P.; Matsuno, T.; Neidlein, R. Z., 1997. Potent free radical scavenging activity of Propolis isolated from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* 52c, 828-833.
- Ghisalberti, E. L., 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60, 59-84.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* 36, 347-363.
- Donnelly, D. M. X.; Keenan, P. J.; Prendergast, J. P. 1973. Isoflavonoids of *Dalbergia*

ecastophyllum. *Phytochemistry* 12, 1157-1161.

- Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R., 1990. The composition and plant origins of propolis. *Bee World* 71, 107-118.
- Isla, M. I.; Paredes-Guzman, J. F.; Nieva-Moreno, M. I.; Koo, H.; Park, Y. K., 2005. Some chemical composition and biological activity of Northern Argentine propolis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1166-1172.
- Ito, J.; Chang, F. R.; Wang, H. K.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K. H., 2001. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 64, 1278-1281.
- Kanazawa, M.; Satomi, Y.; Mizutani, Y.; Ukimura, O.; Kawauchi, A.; Sakai, T.; Baba, M.; Okuyama, T., 2003. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. *European Urology* 43, 580-586.
- Kimoto, T.; Arai, S.; Kohguchi, M.; Nomura, Y.; Micallef, M. J.; Kurimoto, M.; Mito, K., 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.* 22, 506-515.
- Kong, L. D.; Zhang, Y.; Pan, X.; Tan, R. X.; Cheng, C. H. K., 2000. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57, 500-505.
- Matos, F. J. A.; Gottlieb, O. R.; Andrade, C. H. S., 1975. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. *Phytochemistry* 14, 825-826.
- Matsuno, T.; Matsumoto, Y.; Saito, N.; Morikawa, J., 1997. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z. Naturforsch.* 52c, 702-704.
- Park, Y. K.; Koo, M. H.; Abreu, J. A. S.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L., 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* 36, 24-28.
- Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2502-2506.
- Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1100-1103.
- Park, Y. K.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Nishiumi, S.; Yoshida, K.; Dausch, A.; Sato, H. H.; Pastore, G. M., 2005. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10306-10309.
- Vynograd, N.; Vynograd, I.; Sosnowski, Z., 2000. A comparative multicenter study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 7, 1-6.