

# プロポリスの香りを活かした生活向上製品の開発(第1報)

今泉茂巳、加島隆洋、田澤茂実<sup>1</sup>、林友香<sup>2</sup>、光永徹<sup>2</sup>

## Development of product for quality life utilizing propolis aroma ( I )

Shigemi IMAIZUMI, Takahiro KASHIMA, Shigemi TAZAWA\*, Tomoka HAYASHI\*\* and Tohru MITSUNAGA\*\*

ブラジル産グリーンプロポリスの原塊、エタノール抽出液、水抽出液の香気成分分析をSolvent Extraction Full Evaporation Dynamic Headspace (SE-FEDHS) 法やFull Evaporation Dynamic Headspace (FEDHS) 法により行った。プロポリスは非常に多くの香気成分を含んでおり、原塊についてAEDA法により主要香気成分15成分を選出した。その中で ethyl hydrocinnamate は寄与度が特に大きく、プロポリスに特徴的な香気成分であった。また、プロポリスをエタノール抽出するとこの成分の割合が著しく増加し、香りも大きく変化することが明らかになった。一方、水抽出液は他とは異なり、香りも弱く、脂肪酸の香りの寄与が大きいことが明らかになった。

プロポリスのエタノール抽出液の嗅覚刺激をラットに与えたところ、1検体のラットでBAT-SNAの低下がみられ、プロポリスの香気成分が交感神経活動に対する生理活性を持つことが示唆された。

### 1. はじめに

プロポリスはミツバチが樹木の芽や蕾などから集めた樹脂成分や花粉とミツバチ自身の唾液とを混ぜ合わせて作り出す樹脂状物である<sup>1)</sup>。「天然の抗生物質」とも呼ばれ、フラボノイド、酵素類、ビタミン、ミネラルを主成分とする300種類以上の成分を含んでいる。強い抗菌作用、抗炎症作用の他、多くの機能を持ち、健康の維持・促進に様々な効果をもたらすとされている<sup>2)</sup>。

プロポリスは健康素材としての歴史が古く、末端商品が定番化している。そのため、安定した需要があり、市場も安定しているが、逆に市場の拡大は難しく、いかにしてプロポリスを我々の生活により身近なものにし、市場を活性化していくかということに業界は苦労している。

プロポリスは原塊そのままでは摂取できないため、通常、エタノールや水で抽出したものを摂取するが、これら(特にエタノール抽出液)は独特で強い匂いと苦味を持ち、直接摂取しにくい。これが消費者にプロポリスの利用を躊躇させる一因になっており、また、実際の使用においてはジュースに混ぜる、ハチミツを加えるなどの手間が必要となる。しかし、近年タブレットやカプセルの商品が市場に出るようになったため、以前よりは摂取しやすくなってきている。このように、プロポリスの香りは言わば厄介者扱いを受けてきており、研究もほとんど行われていない。

本研究ではプロポリスの新規利用法の開拓と市場の活性化を目的として、プロポリスの香気成分の特徴や生理活性について明らかにし、香気成分を抽出したエキスを開発する。さらに、開発されたエキスをを使用した製品試作等を行い、香気成分エキスの活用法について検討する。本年度は、プロポリスの原塊、エタノール抽出液、水抽出液の香気成分に

ついて明らかにするとともに、エタノール抽出液の香気成分がラットの交感神経活動に与える影響について検討した。

### 2. 実験

#### 2.1 試料

ブラジル産グリーンプロポリスの原塊とそのエタノール抽出液、水抽出液を使用した。

原塊についてはペンタン-ジエチルエーテル(1/1)による抽出液を分析用試料とした。あらかじめエバポレーションして酸化防止剤を除去したジエチルエーテルとペンタンを同量混合して抽出溶媒を調整した。原塊1.5gを20mLバイアルに採取し、溶媒15mLを加えて約5°Cで抽出した。続いてそれを-20°Cの冷凍室で一晩静置した後、抽出液10mLを別の20mLバイアルに移し、無水硫酸マグネシウム4.00gを加えて脱水した。

エタノール抽出液は、2倍量のエタノールで抽出後、冷凍温度下でのワックス分等の析出、ろ過を行った後、エバポレーターにより濃縮したものを使用した。

#### 2.2 香気成分の分析

ゲステル社におい分析システムによりGC-O/MS分析を行った。

香気成分の捕集は、原塊(抽出液)とエタノール抽出液についてはSolvent Extraction Full Evaporation Dynamic Headspace (SE-FEDHS) 法<sup>2)</sup>で、水抽出液についてはFull Evaporation Dynamic Headspace (FEDHS) 法<sup>3)</sup>で行った。条件を表1に示す。原塊抽出液と水抽出液は試料100μLを、エタノール抽出液は10μLを10mLヘッドスペースバイアルに採取した。多機能オートサンプラー GERSTEL MPS2XL-xt (DHSオプション) によりバイアル内に2本のニードルが挿入され、一方のニードルからは窒素ガスがパージされ、もう一方のニードルの窒素ガス出口にはTenax TA捕集管が接続された。原塊とエタノール抽出液については香気成分捕集

<sup>1</sup> アビ株式会社社長良川リサーチセンター

<sup>2</sup> 国立大学法人岐阜大学応用生物科学部

表1 香気成分捕集条件(GERSTEL DHS)

|  |            |
|--|------------|
| Pre Purge Phase (Original Lump, Ethanol Extract) |            |
| Incubation Temp.                                 | 40 °C      |
| Incubation Time                                  | 0 min      |
| Purge Volume                                     | 300 mL     |
| Purge Flow Rate                                  | 50 mL/min  |
| Trap Temp.                                       | 40 °C      |
| Sampling Phase (All Samples)                     |            |
| Incubation Temp.                                 | 80 °C      |
| Incubation Time                                  | 0 min      |
| Purge Volume                                     | 3000 mL    |
| Purge Flow Rate                                  | 100 mL/min |
| Trap Adsorbent                                   | Tenax TA   |
| Trap Temp.                                       | 40 °C      |

表2 分析条件

|  |   |
|--|---|
| Thermal Desorption (GERSTEL MPS2/TDU/CIS4) |   |
| Desorp. Temp.                              | 30 °C(0.3 min) - 720 °C/min - 240 °C(3 min)                         |
| Desorp. Flow                               | 50 mL/min @ 20 kPa  |
| Desorp. Mode                               | Splitless   |
| CIS4 Temp.                                 | 10 °C(1.5 min) - 12 °C/min - 250 °C(60 min)                         |
| CIS Liner                                  | Tenax TA packed liner   |
| Injection Mode                             | Split 20:1(Original Lump, EtOH Extract)<br>Split 2:1(Water Extract) |
| Agilent 7890B GC                           |   |
| Column                                     | HP-INNOWax<br>(60 m x 0.25 mm i.d. x 0.5 µm thickness)              |
| Column Temp.                               | 50 °C(3 min) - 2 °C/min - 250 °C(17 min)                            |
| Carrier Gas                                | He  |
| Flow Rate                                  | 1.5 mL/min  |
| Interface Temp.                            | 250 °C  |
| Agilent 5977B MSD                          |   |
| Ion Source Temp.                           | 230 °C  |
| Quad. Temp.                                | 150 °C  |
| Scan Range                                 | m/z 28.7 - 350  |
| Split Ratio of Detectors                   | Single FPD : MS = 1 : 1   |

前に予めバイアル温度40°C、Tenax管温度40°Cで、流速50mL/min、6分間の窒素ガスのプレパージを行い、溶媒を除去した。全試料についてバイアル温度80°C、Tenax管温度40°Cで、流速100mL/min、30分間窒素ガスをパージして、試料のほぼ全量を気化、Tenax管に捕集すると同時に、水分を除去した。

分析はAgilent 5977B GC/MSD(TDU, CIS4, Single PFC付)により表2の条件で行われた。Tenax管に捕集された成分をTDUで加熱脱着した後CISに再捕集し、CISの温度を急速に上昇させ、捕集成分を気化してHP-INNOWaxカラム(60 m x 0.25 mm i.d. x 0.5 µm thickness)に導入し、コンス

タントフローモードで分離した。原塊とエタノール抽出液はスプリット比20:1で、水抽出液は2:1(Low Split Mode)で行った。カラムを通過したガスはほぼ1:1に分岐され、におい嗅ぎ分析と質量分析が同時に行われた。におい嗅ぎ分析については、分析者の技術的成熟度や当日の鼻の感度、幻嗅等の問題があるため、1試料について3回分析を行い、2回以上においを感じた場合に「においを感じた」と判定した。

## 2. 3 主要香気成分の探索

プロポリスの主要香気成分を絞り込むため、原塊抽出液について、Aroma Extract Dilution Analysis(AEDA)法により匂いを感じた成分のFDファクターを求めた。

## 2. 4 ラットの交感神経活動に対するプロポリス香気の影響評価

嗅覚刺激にはエタノール抽出液を蒸留水で100倍希釈し、溶解した部分のみを用いた。

ウレタン麻酔下ラットの肩甲骨周辺の毛を刈り、肩甲骨と褐色脂肪組織の間を切開し、褐色脂肪組織を支配する交感神経束を探索した。その束を末端側で切断し、1本1本に分け、その内1本の結合組織を除去した。剥き出しとなった神経を銀線電極に掛け、神経活動を測定した。

神経を電極に掛けたまま、嗅覚刺激を行った。30分間何も刺激を行わない状態でデータを取り、それをコントロールとした。続いてキムワイプを入れた紙コップに溶解液1mLを染み込ませたものをラットの鼻先に提示して嗅覚刺激を開始し、10分毎に新しく調製した溶解液と交換して、合計60分間嗅覚刺激を行った。嗅覚刺激終了後も測定を継続した。得られたデータから肩甲骨間褐色脂肪組織支配交感神経活動(BAT-SNA:Brown Adipose Tissue Sympathetic Nerve Activity)を求めた。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 プロポリスの香気成分

はじめにプロポリス原塊、エタノール抽出液、水抽出液について直接鼻で香りを嗅いだ。原塊は独特の強烈な香りを持ち、生薬のような匂いもあり、心地よい香りとは言えなかった。それと比べるとエタノール抽出液は、強烈な香りではあるものの余分な悪い臭いが幾分取れてスッキリした感じで、甘い香りも強くなって、好き嫌いはあると思うが、比較的好ましい香りであった。一方、水抽出液は非常に弱い香りしかしなかった。

GC-O/MS分析の結果、原塊は42、エタノール抽出液濃縮なしは36、濃縮ありは47、水抽出液は24のにおいを感じた。トップノートの成分は基本的に匂いが弱く、ミドルからベースノートの成分の香りが強かった。

原塊抽出液のトータルイオンクロマトグラムおよびアロマトグラムを図1に示す。FDファクター32以上の15成分についてNISTライブラリおよび香気成分専用データベースAroma Office<sup>2D</sup>により検索を行った結果、表3のとおりフェニルプロパノイド4成分、テルペン類6成分、その他4成分が同定され、残りの1成分は同定できなかった。特にethyl hydrocinnamate

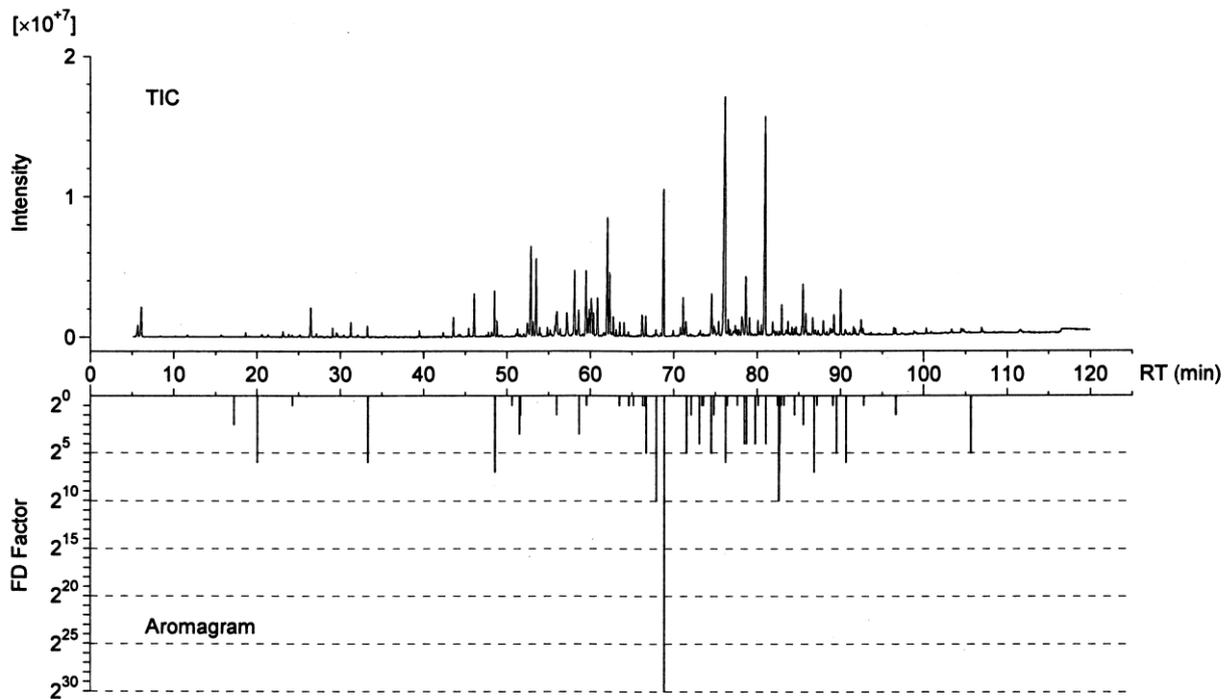


図1 プロポリス原塊のトータルイオンクロマトグラムおよびアロマグラム

(RT68.862)はFDファクターが1,073,741,824 ( $2^{30}$ )で他と比べて著しく大きく、プロポリスを特徴づける香り成分であることが明らかになった。

また、原塊、エタノール抽出液、水抽出液についてこれら香り成分のピーク面積を求めたところ、エタノール抽出液においてethyl hydrocinnamateの面積比率が著しく大きくなった。15成分のピーク面積合計に対する各成分の面積百分率を計算すると、原塊ではethyl hydrocinnamateのピーク面

積率は18.3%で最大ピーク(E)-nerolidol (69.1%)の約1/4であるが、エタノール抽出液では関係が逆転し、80.0%と非常に大きなピーク面積%を示した。ethyl hydrocinnamateの比率が大きくなった理由については明らかにすることができず、今後の課題となった。

水抽出液は他とは大きく分析結果が異なった。特徴的な匂いは、靴下が汗を吸って蒸れた時のような少し酸っぱい匂いで、スニффイングの際匂うとすぐには消えず、しばらく

表3 プロポリスの主要香り成分のにおいの種類、FDファクター、ピーク面積

| RT(min) | 成分名                               | におい             | FDファクター       | ピーク面積       |             |           |
|---------|-----------------------------------|-----------------|---------------|-------------|-------------|-----------|
|         |                                   |                 |               | 原塊          | EtOH抽出液     | 水抽出液      |
| 20.038  | 1-hexen-3-one                     | metallic, green | 64            | 22,289      | 53,852      | 21,077    |
| 33.317  | (E)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene | citrus, fruity  | 64            | 1,947,831   | 839,668     | 639,245   |
| 48.518  | linalool                          | citrus, fruity  | 128           | 8,317,725   | 4,064,807   | 1,934,062 |
| 66.733  | methyl hydrocinnamate             | fruity          | 32            | 5,151,010   | 1,913,118   | 537,789   |
| 67.922  | isopropyl hydrocinnamate          | fruity          | 1,024         | 1,347,838   | 605,409     | ND        |
| 68.862  | ethyl hydrocinnamate              | fruity          | 1,073,741,824 | 44,927,390  | 208,046,376 | 1,955,588 |
| 71.542  | cubebol                           | floral, sweet   | 32            | 4,652,900   | 1,307,716   | ND        |
| 74.491  | caryophyllene oxide               | fruity, sweet   | 32            | 5,638,282   | 2,282,939   | ND        |
| 76.206  | (E)-nerolidol                     | fruity, sweet   | 64            | 169,272,097 | 39,717,697  | 234,891   |
| 82.619  | eugenol                           | floral          | 256           | 1,009,889   | 345,110     | 1,335,282 |
| 82.674  | 4-ethylphenol                     | floral          | 128           | 305,686     | 192,854     | 367,963   |
| 86.832  | unknown                           | woody           | 128           | 252,671     | ND          | 53,818    |
| 89.515  | 2-isopropenyl-(+)-2-carene ?      | woody           | 32            | 455,237     | ND          | ND        |
| 90.649  | methyl jasmonate                  | citrus, fruity  | 64            | 1,430,464   | 482,484     | 154,128   |
| 105.638 | vanillin                          | vanilla         | 32            | 389,106     | 156,270     | 16,342    |

持続した。ガスクロマトグラムを詳細に調べたところ、表3には反映されていないacetic acid (RT55.043)やcaproic acid (RT64.362)といった脂肪酸の裾野が広いピークが見られた。これらが酸っぱい匂いの原因成分ではないかと思われる。

以上のことより、プロポリスは抽出により香気成分の組成が変化し、香りも変化することが明らかになった。

### 3. 2 プロポリス香気のラットの交感神経活動に対する効果

2体のラット(検体-1, 検体-2)にエタノール抽出液の嗅覚刺激を与えた時のBAT-SNAの経時変化を図2に示す。検体-1では嗅覚刺激によりBAT-SNAが約2%まで小さくなり、交感神経活動が抑えられることを示す結果が得られた。しかし、通常は嗅覚刺激終了後2~3時間でBAT-SNAが戻るのに対し、本検体では嗅覚刺激を終了してもBAT-SNAが戻らなかった。なお、実験中の脈や体温の変化はなかった。一方、検体-2では検体-1と異なり、嗅覚刺激開始後一度BAT-SNAが小さくなったが、すぐに100%付近に戻った。

以上より、エタノール抽出液の香気成分がラットの交感神経活動を抑える生理活性を持つ可能性が示唆されたが、さらに検体数を増やすなどして実験を行う必要があることも明らかになった。

### 4. まとめ

プロポリスの原塊、エタノール抽出液、水抽出液の香気成分について明らかにした。プロポリスに一番特徴的な香気成分はフルーティーな香りのethyl hydrocinnamateであった。また、プロポリスのエタノール抽出を行うと、この成分の割合が著しく大きくなった。水抽出液は他と異なり香りが弱く、蒸れた靴下様の香りが特徴的であった。この香りは脂肪酸によるものであると推測された。

プロポリスに抽出処理をすることで香気成分の組成が変化することが明らかになった。これは、今後の研究でプロポリス香気成分エキスの開発を行っていく際に、どのプロポリス素材を原料にしてエキスを作るかによってエキスの香りが変わることを意味している。

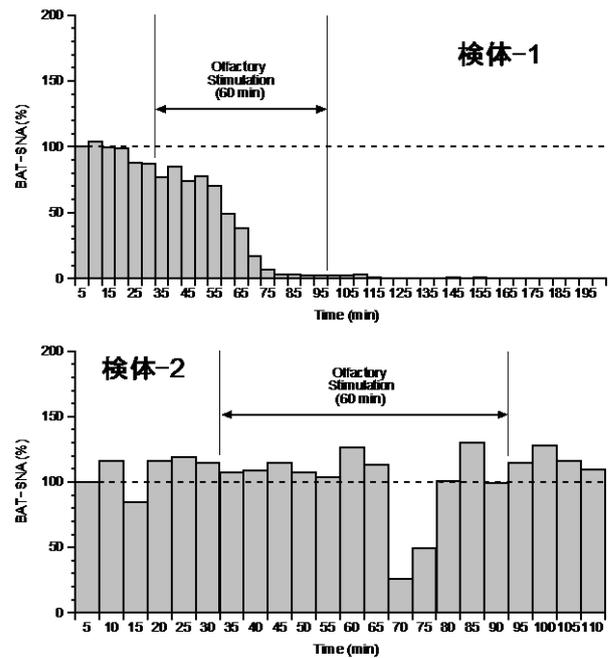


図2 エタノール抽出液の嗅覚刺激によるBAT-SNAの経時変化

2体のラットにプロポリスのエタノール抽出液の嗅覚刺激を与えたところ、1つの検体でBAT-SNAが低下し、プロポリス香気が交感神経活動に対して生理活性を持つことが示唆された。今後さらに実験を行って再現性を確認するとともに、副交感神経活動に対する生理活性についても検討していく予定である。

### 【参考文献】

- 1) 市瀬, ブラジルプロポリスの秘密, アルス社, pp. 252, 1998
- 2) 落合, アジレント/ゲステル食品中香気分析セミナー 2015テキスト, pp. 57-88, 2015
- 3) Ochiai et al., *J. Chromatogr. A*, 1240, pp. 59-68, 2012