

## プロポリスの香りを活かした生活向上製品の開発(第2報)

今泉茂巳、加島隆洋、田澤茂実\*、林友香\*\*、光永徹\*\*

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

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

プロポリスのエタノールエキス製造過程で副生される冷凍濾過物を原料として、直接蒸留法により精油を試作した。採油率は0.04%(v/w)と小さかった。得られた精油(EO-FR)は黄色を有し、香調は、嗅ぎ始めはフローラルかつ若干スパイシーで、後になってプロポリスらしい香りもした。SE-FEDHS法によるGC-O/MSを行ったところ、原塊自体の香気成分プロファイルとは異なり、ethyl hydrocinnamateの臭気強度が大きく、逆に一部のオフフレーバー成分や高沸点成分のにおいは弱くなったか全く感じなかった。原塊から試作した精油(EO-OL)とは比較的近い香気成分プロファイルを示した。

精油EO-FRの香りをラットに嗅がせた結果、60分間の嗅覚刺激終了後に交感神経活動が抑制され、その状態がしばらく続き、1時間20分後に元の神経活動に復帰した。これは、EO-FRが交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性を示唆している。

#### 1. はじめに

プロポリスは、ミツバチが植物の樹脂、特に新芽やつぼみ、植物が分泌する滲出物などを集めて巣に持ち帰り、巣の隙間に詰めた物質であり<sup>1)</sup>、起源植物由来成分を基本とする多種多様の成分を含んでいる。プロポリスは経験的にその抗菌効果や防腐効果が知られ、古代エジプトではミイラの腐食防止に利用されていた<sup>1)</sup>。現在では、主にヨーロッパや南米の一部の国で皮膚の外傷治療や口腔ケアなどにプロポリスが利用されており、日本でも健康食品素材として利用され、20年ほど前から関連商品が世の中に出回るようになった<sup>1)</sup>。

プロポリスは通常、エタノールや水で抽出したエキスの形で摂取される。特にエタノールエキスは独特で強いにおいと苦味・辛味を持ち、従来は水にエキスを数滴たらしめて飲用していたため、そのにおいと味がプロポリスの摂取しにくさの要因となってきた。しかし、近年はタブレットやカプセルの商品が市場に出るようになり、以前より摂取しやすくなっている。

健康食品素材としての長い歴史と上述の商品開発に支えられ、プロポリスの市場規模は300億円程度で安定している<sup>1)</sup>。しかし、更なる市場の拡大はなかなか難しく、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。

本研究では従来着目されてこなかったプロポリスの香りに焦点を当て、プロポリスの香気成分を活用した新たな製品を開発することを目的とする。前報<sup>2)</sup>ではプロポリス原塊の香気成分15成分とそのFDファクターについて報告した。本報では、エタノールエキス製造過程で副生される冷凍濾過物を原料とした精油の試作、ならびに、試作精油の

香気成分の概要とラットの交感神経活動に与える効果について報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 試料

ブラジル産グリーンプロポリスの原塊ならびにそのエタノールエキス、エタノールエキス製造過程で副生された冷凍濾過物を使用した。

エタノールエキスは、EPP-B55A(アピ株式会社)を使用した。これは、原塊に3倍量のエタノールを加えて抽出し、冷凍温度下でのワックス分等の析出、ろ過を行った後、減圧蒸留により濃縮したものである。

冷凍濾過物はEEP-B55Aの上記製造工程において、ろ過した際の残滓を使用した。

##### 2.2 精油の試作

ピュアスティーラーHC/M((株)黄河)を使用し、直接蒸留法(Hydrodistillation)により精油を試作した。

冷凍濾過物約2 kgを25 Lステンレス釜に採り、蒸留水を4 L加えて、蒸留を行った。加熱強さ「最強」で加熱を始め、蒸留液が溜まり始めたら加熱強さを「中+1」に落として5時間蒸留を続けた。上記試作を5回繰り返し、5回分の精油を合わせて試作精油(EO-FR)とした。

比較として、原塊を原料とした精油(EO-OL)も試作した。原塊502 gをステンレス釜に採り、蒸留水を4 L加え、同様の方法で5時間蒸留した。

##### 2.3 香気分析

###### 2.3.1 原塊試料の調整

原塊の分析はエーテル抽出液で行った。原塊1.00 gを20 mLバイアルに採り、エバポレーションにより精製したジエチルエーテル10 mLを加えて抽出した。それを-20℃の冷凍室で一晩静置した後、抽出液を別のバイアルに移し、無水硫酸マグネシウム4.00 gを加えて脱水し、分析用試料

\*アピ株式会社長川リサーチセンター

\*\*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	
Incubation Temp.	40 °C
Incubation Time	0 min
Purge Volume	300 mL
Purge Flow Rate	50 mL/min
Trap Temp.	40 °C
Sampling Phase	
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(58 min)
CIS Liner	Tenax TA packed liner
Injection Mode	Split 2:1 (Low Split Mode)
Agilent 7890B GC	
Column	HP-INNOWax (60 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm thickness)
Column Temp.	50 °C(3 min) - 10 °C/min - 130 °C - 3 °C/min - 250 °C(9 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

(OL)とした。

### 2. 3. 2 香気成分分析

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Solvent Extraction Full Evaporation Dynamic Headspace (SE-FEDHS) 法<sup>3)</sup>で、表1の条件により行った。クロマトグラムの最大ピークの高さが $1 \sim 2 \times 10^7$ 程度になるように、精油のジエチルエーテル1,000倍希釈液3 µLまたは原塊抽出液10 µLを10 mL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

ードルを挿入し、一方のニードルから窒素ガスをパージし、もう一方のニードルの窒素ガス出口にTenax TA捕集管を接続して成分を捕集した。はじめにバイアル温度40°C、Tenax管温度40°C、流速50 mL/minで6分間窒素ガスをパージして溶媒を除去した後、バイアル温度を80°Cに上げ、さらに流速100 mL/minで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TDU, CIS4, Single PFC付きAgilent 5977B GC/MSD システムにより表2の条件で行った。Tenax管に捕集された成分をTDUで加熱脱着した後CISに再捕集した。続いてCISの温度を急速に上昇させ、捕集成分を気化してスプリット比2:1 (Low Split Mode)でHP-INNOWaxカラム(60 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm thickness)に導入し、コンスタントフローモードで分離した。カラム出口ガスをほぼ1:1にスプリットし、におい嗅ぎ分析と質量分析を同時に行った。

におい強度はOID (Odor Input Device)により強度1~4の4段階で評価した。各試料7回分析を行い、3回以上においを感じた成分について「においを感じた」と判定し、におい強度を平均して小数点以下を四捨五入した。

### 2. 4 ラットの交感神経活動に対するの影響評価

冷凍濾過物の精油EO-FRについて評価を行った。精油を蒸留水で100倍に希釈し、よく振ってエマルジョンにしたものを試料溶液として使用した。

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試料溶液1 mL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試料溶液と交換して、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. 結果と考察

### 3. 1 精油の試作

冷凍濾過物を原料として直接蒸留法により精油を試作したところ、原塊を原料とした場合と異なり、蒸留開始後1.5時間までは原料に残存するエタノールも同時に蒸留され、精油が分離しなかった。その後、精油はエタノールを含む蒸留水中にエマルジョンとして存在し、やはり分離回収できなかった。蒸留開始3.5時間後に精油の分離が確認でき、実質的に採油できたのは2時間程度であった。5回分の蒸留で冷凍濾過物10.2 kgから4.20 mLの精油(EO

表3 冷凍濾過物の精油 (EO-FR) ならびに原塊の精油 (EO-OL)、原塊 (OL) のにおい嗅ぎGC-MS分析結果

Cpd No.	RT (min)	RI (min)	Compound Name	Odor Character	Odor Intensity		
					EO-FR	EO-OL	OL
1	9.220	1057	ethyl 2-methylbutyrate	fruity, green apple			2
2	9.422	1073	ethyl isovalerate	fruity, pear			1
3	9.926	1111	1-hexen-3-one	metallic, green	2	2	4
4	10.363	1136	thuja-2,4(10)-diene	green	2	1	
5	10.961	1184	ethyl 3-methylpentanoate	fruity, green apple			2
6	11.239	1198	heptanol ?	sweet, fruity, pear	2		1
7	11.543	1224	$\beta$ -phellandrene	fruity			1
8	12.034	1257	$\gamma$ -terpinene	herbal			2
9	13.040	1315	1-octen-3-one	metal, terpene, green	3	3	3
10	14.164	1389	3-hexen-1-ol	green			2
11	14.609	1408	nonanal	green	2	2	2
12	(14.86-14.90)		(unknown)	fresh, water	2		
13	15.085	1433	(unknown)	herbal	1	2	
14	15.232	1441	ethyl caprylate	sweet, fruity, pear	2		
15	15.479	1456	p-cymenene	minty		1	
16	16.974	1528	(unknown)	green, stink	1	1	
17	17.385	1547	linalool	citrus, fruity	3	3	4
18	17.593	1557	$\beta$ -cubebene	woody	3		4
19	17.635	1561	$\alpha$ -patchoulene	weak-floral		3	
20	18.779	1604	$\beta$ -elemene	herbal, green	3	3	3
21	19.134	1631	butyric acid	rancid, cheese			3
22	(19.89-19.92)		(unknown)	herbal		1	
23	20.173	1674	2-methylbutyric acid	rancid, cheese			4
24	20.339	1681	acetophenone	floral, herbal		2	2
25	20.927	1697	$\alpha$ -humulene	herbal	2		
26	(21.30-21.34)		(unknown)	green	1	2	
27	21.785	1729	E,E-2,4-nonadienal + 2,3-dihydrobenzofuran	baked sweet potato	1	2	3
28	21.871	1739	$\alpha$ -muurolene	minty, weak-woody			2
29	24.598	1831	E,E-2,4-decadienal	baked sweet potato	2	2	3
30	(24.79-24.84)		(unknown)	herbal, floral	2		
31	24.881	1843	$\beta$ -maaliene ?	baked sweet potato		2	
32	24.962	1843	1,1,4a-trimethyl-5,6-dimethylenedecahydronaphthalene	bad	2		
33	25.176	1851	calamenene	herbal, floral	3	3	3
34	25.282	1862	methyl hydrocinnamate	fruity			2
35	(25.55-25.65)		(unknown)	sweet, weak-cool			2
36	26.169	1883	isopropyl 3-phenylpropanoate ?	fruity	2	2	3
37	26.698	1903	ethyl hydrocinnamate	fruity	4	3	3
38	27.690	1939	(unknown)	stink		2	
39	28.040	1957	$\beta$ -ionone	floral			3
40	28.277	1965	(Z)-jasmonone	woody			1
41	28.568	1975	$\beta$ -calacorene	citrus			1
42	28.912	1986	isopropyl 3-phenylpropanoate	fruity	1		2
43	29.124	1987	8,9-dehydrocycloisolongifolene	citrus		2	
44	29.904	2020	methyleugenol	woody			3
45	30.57付近	2042	4-ethylguaiaicol	floral			1
46	30.664	2045	nerolidol	fruity, sweet	1	2	4
47	30.723	2047	ledol	sugar sweet			4
48	31.001	2056	3-phenylpropanol	floral			4
49	32.030	2091	viridiflorol	floral, green			3
50	32.852	2119	rosifoliol	floral			1
51	34.427	2138	spathulenol	herbal			3
52	34.534	2175	eugenol	herbal			2
53	34.642	2179	$\tau$ -cadinol	woody			3
54	(34.75-34.81)		(unknown)	floral			2
55	35.731	2216	isospathulenol ?	woody			2
56	36.302	2236	cadalene	woody			2
57	37.374	2273	isospathulenol ?	woody	2	3	3
58	(38.19-38.25)		(unknown)	woody	2	2	3
59	(38.32-38.41)		(unknown)	sweet			2
60	(38.74-38.87)		(unknown)	woody			2
61	(39.25-39.26)		(unknown)	woody			2
62	39.534	2349	methyl jasmonate	fruity			3
63	(40.99-41.04)		(unknown)	bad, herbal			2
64	41.425	2417	1-phenyl-3-hexanone ?	floral			2
65	45.176	2556	1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-one ?	floral			2
66	45.635	2573	dihydrodehydro- $\beta$ -ionone ?	floral			2
67	45.872	2582	vanillin	vanilla			4
68	47.092	2629	hydrocinnamic acid	acid, sweat	2		3
69	(49.61-49.74)		(unknown)	herbal			2
70	(57.88-57.95)		(unknown)	acid, sweat			3

\*RT,RI欄の(00.00-00.00)はOID (Odor Input Device)の強度ボタンを押していた時間を示す。

-FR)が得られた。採油率は0.04%(v/w)で、原塊の精油(EO-OL)の0.31%と比べると1/10程度の採油率であった。蒸留開始から3時間の間に蒸留される精油成分を回収できれば採油率は向上すると考えられ、原料のエタノール含量を減らす等の対策が今後の課題として残った。精油の色はEO-FR、EO-OL共に黄色であった。

### 3.2 精油の香気成分分析

試作した精油を直接鼻で嗅いだところ、試作した精油は原塊自体とは香調が異なり、フローラルな感じであった。また、EO-FRはEO-OLと比べると若干スパイシーな感じがあり、後からプロポリスらしい香りも匂った。

EO-FR、EO-OL、原塊(OL)のGC-O/MS結果を表3に示す。EO-FRとEO-OLは多少の違いはあるものの全体的には似た香気成分プロファイルを示した。においを感じた成分数はEO-FRが26成分で、EO-OLの24成分とほぼ同数で、OLの55成分と比べるとほぼ半数であった。Cpd-9、Cpd-11、Cpd-20、Cpd-33のように3試料で臭気強度に差がない成分もある一方、前報<sup>2)</sup>で最も寄与の大きい香気成分とされたCpd-37(ethyl hydrocinnamate)の臭気強度がEO-FRで増加した。実際GC-Oを行った際にも非常に強烈な果実香を感じ、これが精油のスパイシーさに寄与すると思われる。逆に金属臭のCpd-3(1-hexen-3-one)は精油で臭気強度が弱く、腐敗臭・チーズ様のCpd-21(butyric acid)やCpd-23(2-methylbutyric acid)のにおいは精油では感じられなかった。また、精油2試料はRT 27 min以降、OLで感じたにおいの多くが感じられなかった。これらの中にはウッディーな香調ものも多く、先述のオフフレーバー成分(Cpd-3、Cpd-21、Cpd-23)と共に、これらの臭気強度が弱いことも原塊と精油の香りの違いに寄与していると思われる。

精油の2試料でRT 27 min以降においがあまり感じられないのは、香気成分の沸点が高く蒸留されにくいためであると考えられる。また、Cpd-21(butyric acid)、Cpd-23(2-methylbutyric acid)、Cpd-40((Z)-jasnone)、Cpd-67

(vanillin)、Cpd-68(hydrocinnamic acid)は水溶性成分であり、蒸留水に溶解していることも考えられるが、これは今後の検討課題となった。

### 3.3 精油のラットの交感神経活動に対する効果

精油EO-FRの香りをラットに嗅がせた時の交感神経活動の変化を図1に示す。BAT-SNA値は2体のラットの評価で得られた値の平均値である。嗅覚刺激を与えている60分間の間に若干交感神経活動が上がる傾向はあるが、嗅覚刺激終了後に徐々に交感神経活動が抑制され、その状態がしばらく続き、1時間20分後に元の神経活動に復帰する傾向を示した。交感神経活動抑制率は約80%であった。この結果は、EO-FRが交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性を示唆している。

## 4. まとめ

プロポリスのエタノールエキス製造過程で副生される冷凍濾過物を原料として直接蒸留法により精油を試作した。得られた精油は黄色を有し、香調は、嗅ぎ始めはフローラルかつ若干スパイシーであるが、後になってプロポリスらしい香りもした。採油率が0.04%(v/w)と小さく、原料のエタノール含量をできるだけ減らし、蒸留初期から精油を分離させる等の対策が必要なことが課題として残った。

香気成分分析では、原塊と比べethyl hydrocinnamateの臭気強度が大きく、逆にオフフレーバー成分の一部や高沸点成分のにおいは弱くなったか全く感じなかった。

精油EO-FRの香りをラットに嗅がせた結果、60分間の嗅覚刺激終了後に交感神経活動が抑制され、その状態がしばらく続き、1時間20分後に元の神経活動に復帰した。これは、EO-FRが交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性を示唆している。

### 【参考文献】

- 1) 熊澤, ぶんせき 2018(5), pp.193, 2018
- 2) 今泉ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, No.11, pp.35-38, 2017
- 3) 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

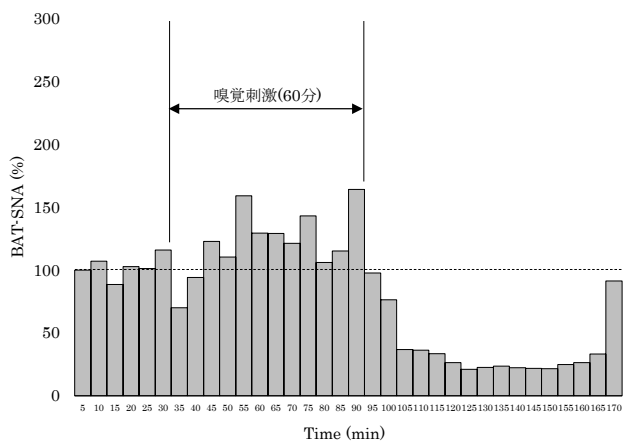


図1 精油EO-FRの嗅覚刺激によるBAT-SNAの経時変化