

ネパール産プロポリスの成分研究

戸泉 文江^{1,2} Suraj Praksh SHRESTHA² 竹田 忠紘² 横山 祥子¹

Chemical Constituents of Nepalese Propolis

Fumie TOIZUMI^{1,2} Suraj Praksh SHRESTHA² Tadahiro TAKEDA² Shoko YOKOYAMA¹

Abstract

Propolis, a complex resinous material collected by honeybees from buds and exudates of certain plant sources neighboring its hive, is considered to possess broad spectrum of biological activities and has historical utilization in folk medicine. Thus, it is extensively being used in health food, pharmaceutical preparations etc. The chemical consistency of propolis is highly dependent on the flora of the region from where it is collected. In this study, we investigated propolis from different geographical locations in Nepal and isolated several known compounds. As a result, we clarified the origins of propolis in Nepal.

Key words : propolis, chemical constituents, Nepal, caffeic acid derivatives, flavone derivatives

キーワード : プロポリス 成分 ネパール カフェ酸誘導体 フラボン誘導体

緒言

プロポリスはミツバチがその行動圏にある種々の植物から摂取した樹液や花粉などと、自らの分泌物を混ぜ合わせた物質である。ミツバチはプロポリスを巣の入り口に塗って冷気や水の浸入を防ぎ、巣の壁に塗ることで修理・補強に用いている。また、ミツバチの巣内は35～36℃で湿度も高く、雑菌が増殖しやすい環境であるにもかかわらずプロポリスがあることで菌の増殖を防いでいる。このようなプロポリスの働きを把握し、人々は古来より民間薬として利用してきた。プロポリスの民間薬としての歴史は長く、紀元前300年頃から利用され、古代エジプト人は死体の防腐保存のために使用したといわれている。現在海外では外用薬として利用されており、日本では生理活性物質の含有が顕著な健康補助食品として広く用いられている。¹⁻⁴⁾

プロポリスの成分としてフラボン類、アルデヒド類、カルコン類など200種類以上の物質が報告されており、主な生物活性としては抗菌活性、抗炎症活性、抗酸化活性、免疫調整活性、抗腫瘍活性がある。抗腫瘍成分に関するプロポリス中の成分研究では、カフェイン酸フェネチルエステル、アルテピリンC等の化合物が各種腫瘍細胞に対し細胞毒性を示すことが知られている。^{2,5-6)} プロポリスの成分は地域によってまた起源植物によって科学的な組成が異なるため多様であり、そのことは同時に生物活性の差としても現れる。そのため構成成分を明らかにし、活性成分を特定することは、プロポリスを利用するうえで大変重要である。現在、ヨーロッパ産、ブラジル産、中国産、オーストラリア産などのプロポリスは構成成分が明らかになってきており、また起源植物も特定されている。しかしながら、南アジア産のプロポリスの研究はあまり進んでおらず、活

¹九州保健福祉大学 薬学部 薬学科 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1

²慶應義塾大学 薬学部 〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare 1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka-shi, Miyazaki, 882-8508, Japan

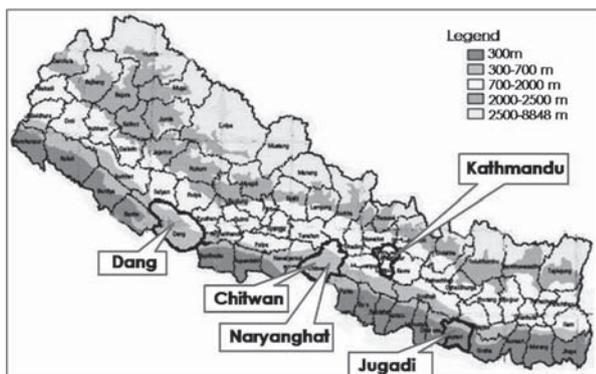
² School of Pharmaceutical Sciences, Keio University 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

性等のデータも少ない。そこで我々は、ネパールの標高の異なる地域で採取されたプロポリスを比較し構成成分の解明を試みた。また、Chitwan産で見られるような亜熱帯地方にみられるプロポリスの成分はデータが少なく、さらなる成分の解明が必要だと考えたため、今回、Chitwan地区にあるNaryanghat（標高約300m）から採取されたプロポリスの成分について探索するとともに、HPLCでChitwan産やNaryanghat産とは異なる成分ピークを示したKathmandu産（標高約1100m）の成分の探索を行い、成分を比較した。

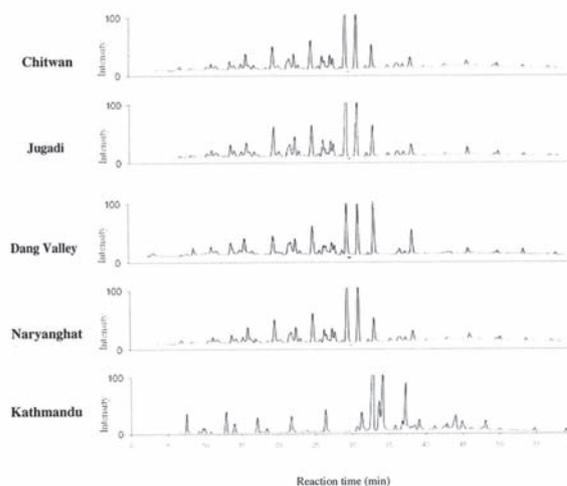
方法と結果

1. ネパール各地のプロポリスの成分分析

ネパールの様々な地域で採集されたプロポリス構成成分を明らかにするため、それぞれをHPLCで分析し成分ピークを比較した。分析条件は、カラム：Capcell Pak C18 column (5mM, 4.6mm I.d x 250mm, Shiseido Fine Chemicals)、グラジエント法 (A → B : 35 → 100% in 60min, A : 0.01% TFA in water, B : CH₃CN)、吸光度：250nm、流速：0.5mL/minとした。その結果、標高約300mにあるChitwan、Naryanghat、Jugadi、Dang Valleyと標高約1100mにあるKathmanduでは成分ピークが異なることが分かった。そこで、標高約300mの地域の一つであるNaryanghat産と標高約1100mのKathmandu産のプロポリスの成分を単離し構成成分の解明を試みた。



【Fig. 1 ネパールの都市と標高】



【Fig. 2 ネパール各地のプロポリス HPLC 分析】

分析条件

Column : Capcell Pak C18 column (5mM, 4.6mm I.d x 250mm, Shiseido Fine Chemicals)

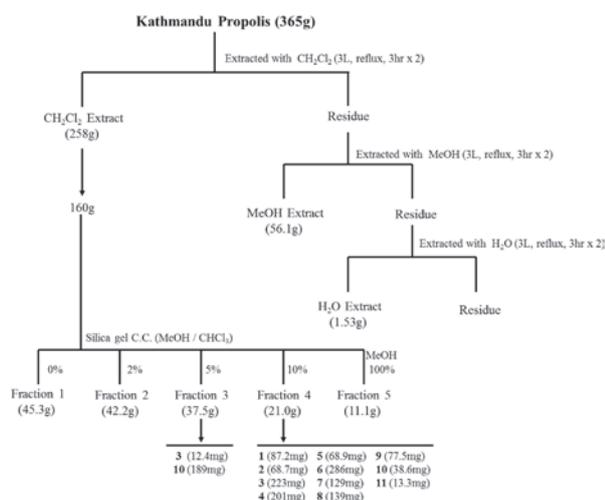
グラジエント法 (A → B : 35 → 100% in 60min, A : 0.01% TFA in water, B : CH₃CN)

UV : 250nm

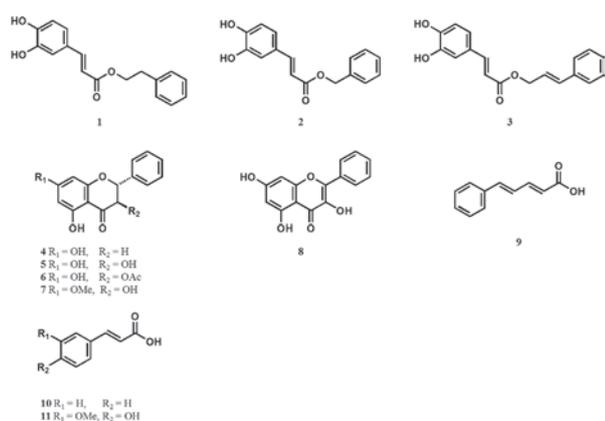
Rate : 0.5mL/min

1) Kathmandu産プロポリスの抽出分離

Kathmandu産のプロポリスをCH₂Cl₂ 3Lで2回還流させながら抽出し、CH₂Cl₂抽出物258gを得た。そのうち160gをSilica gel、Lobar RP-18、DIAION HP-20、HPLCの各種カラムクロマトグラフィーで繰り返し精製を行った。物質の同定には、核磁気共鳴装置 (JEOL FT-NMR A-500 および JEOL FT-NMR ECP-600) を使用し、¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBCを測定、スペクトルデータを分析し、また文献値との比較により、カフェ酸エステル誘導体、フラボノイド誘導体およびケイヒ酸誘導体を得た。⁷⁻¹²⁾



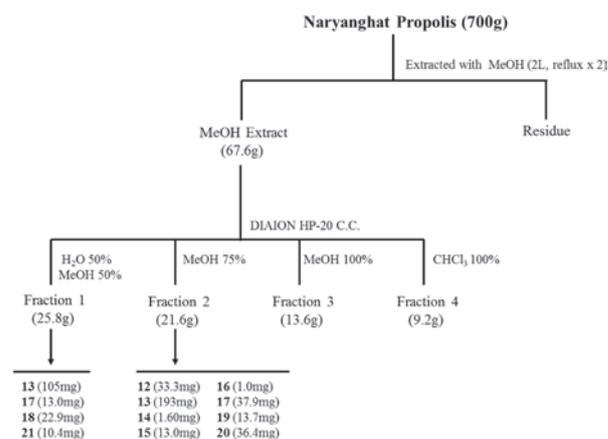
【Chart 1 Kathmandu 産プロポリスの抽出分離】



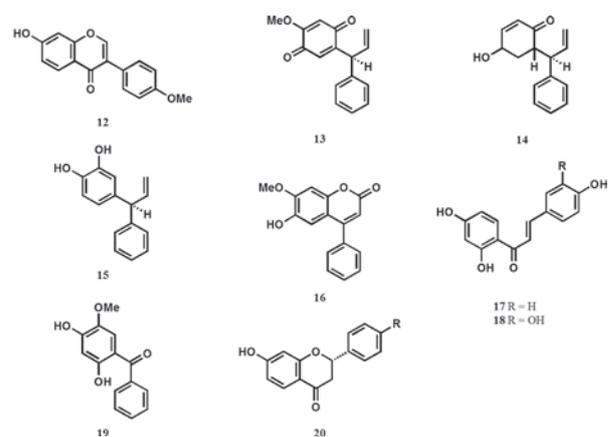
【Fig. 3 Kathmandu 産プロポリスより単離された物質】

1. Naryanghat 産プロポリスの抽出分離

次に Naryanghat 産プロポリスを MeOH 2L で 2 回還流抽出し、MeOH 抽出物を 238g 得た。このうち 67.6g を Silica gel、Lobar RP-18、DIAION HP-20、HPLC の各種カラムクロマトグラフィーで繰り返し精製を行った。物質の同定は、核磁気共鳴装置 (JEOL FT-NMR A-500 および JEOL FT-NMR ECP-600) を使用し、¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBC を測定、スペクトルデータを分析し、また文献値との比較により、10 種のフラボノイド誘導体を得た。¹³⁻²¹⁾



【Chart 2 Naryanghat 産プロポリスの抽出分離】



【Fig. 4 Naryanghat 産プロポリスより単離された物質】

考察

今回、ネパールで採集したプロポリスの構成成分の解明を目的とし、亜熱帯地方である Naryanghat から採取されたプロポリスの成分について探索と、HPLC 分析で Chitwan 産や Naryanghat 産とは異なる成分ピークを示した Kathmandu 産の成分の探索を行い、成分を比較した。その結果、Kathmandu 産のプロポリスから、カフェ酸エステル誘導体 (1-3) フラボノイド誘導体 (4-8)、ケイヒ酸誘導体 (9-11) を単離し、また、Naryanghat 産からフラボノイド誘導体 (12 ~ 20) を単離した。Kathmandu 産から単離した B 環に水酸基を持たないフラボノイド誘導体は flavanone や flavone であった。それに対し Naryanghat 産は閉

環した構造の neoflavonoid を主成分とし、chalcone、isoflavone、flavanone といった多彩な構造を持つフラボノイドが単離され、2つのプロポリスは全く植生の違う起源植物から成り立っていることが示唆された。

Kathmandu 産のプロポリス成分は、他で報告されているヨーロッパ産、中国産のポプラ (*Populus* sp.) 由来プロポリス成分と類似していることから、起源植物はポプラであることが明らかとなった。また、Naryanghat 産のプロポリスの成分は、先行実験者により行われた Chitwan 地区の森林に多く自生しているマメ科の *Dalbergia sissoo* の成分研究で明らかとなった化合物と非常に酷似していた。このため、Naryanghat 産のプロポリスの起源植物は *Dalbergia sissoo* であることが明らかとなった。また、化合物 16 はこれまでのネパール産プロポリスからは単離されておらず今回初めての報告である。

Kathmandu 産と Naryanghat 産におけるプロポリスの成分の違いはネパールにおけるそれらの地域の標高の違いに基づくものと考えられる。これまでに *Dalbergia* 属植物を起源とするプロポリスはブラジル北東部より得られていたものが知られていたが²²⁾、成分については未解明な部分も多く今回の結果は亜熱帯地域におけるプロポリスの起源に関する知見に寄与するものと考えられる。

参考文献

- Ghisalberti E. L.: Propolis: a review. *Bee World*. 60: 59-84, 1979.
- Burdock G. A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363, 1998.
- Marcucci M. C.: Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*. 26: 83-99, 1995.
- Bankova S. B., Tezuka Y., Kadita S. : Recent progress in pharmacological research of propolis. *phytother. Res*. 15: 561-571, 2001.
- 門田重利、手塚康弘：プロポリス成分 CAPE およびその類縁体の癌転移抑制活性に関する研究． *ミツバチ科学* . 25(3): 107-112, 2004.
- 滝野慶利、持田俊二：プロポリス，その化学成分と生物活性． *ミツバチ科学* . 3(4): 145-152, 1982.
- Ojeda-Contreras A. J., Hernandez-Mrtinez J., Dominguez Z. et al.: Utilization of Caffeic Acid Phenethyl Ester to Control *Alternaria alternata* Rot in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit. *Journal of Phytopathology*. 156: 164-173, 2008.
- Yamauchi R., Kato K., Oida S., et al.: Benzyl Caffate, an Antioxidative Compound Isolated from Propolis. *Biosci. Biotech. Biochem*. 56(8): 1321-1322, 1992.
- Fang J., Su W., Cheng Y.: *Phytochemistry*. 27: 1359-1397, 1988.
- Kuroyanagi M., Noro T., Fukushima S., et al.: Studies on the Seeds of *alpinia katsumadi* HAYATA. *Chem. Pharm. Bull*. 31(5): 1544-1550, 1983.
- Aqrawal P. K. : CARBON-13 NMR OF FLAVONOIDS. Elsevier Science. 1986.
- Arnel B. Concepcion, Maruoka, K., Yamamoto H.: Organoaluminum-Promoted Cycloaddition of Trialkylsilylketene with Aldehydes: A New, Stereoselective Approach to cis-2-Oxetanones and 2(Z)-Alkenoic Acids. *Tetrahedron*. 51(14): 4011-4020, 1995.
- Herath H. M. T. B., Dassanayake R. S., Priyadarshani A. M. A., Susila De Silva, Wannigama G. P., Joanne J. : Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*. 47(1): 117-119, 1998.
- Suresh Awale, Suraj Prakash Shrestha, Tezuka Y., et al.: Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod*. 68(6): 858-864, 2005.
- Shiuh-Chuan Chan, Yuan-Shiun Chang, Sheng-Chu Kuo: Neoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. *Phytochemistry*. 46(5): 947-949, 1997.
- Cheng-jun Ma, Gui-sheng Li, Da-lei Zhang, et al.: One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1078: 188-192, 2005.
- Nagai M., Nagumo S., Eguchi I. : 蘇木から Brazilin

の生合成前駆体といわれる Sappanchalcone の分離. 薬学雑誌. 104(9): 935-938, 1984.

- 18) Wen Wang, Xingchu Weng, Dongliang Cheng : Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry*. 71: 45-49, 2000.
- 19) Nesrin Tanrisever, Frank R. Fronczek, Nikolaus Fischer H., et al.: Ceratiolin and other flavonoids from *Ceratiola ericoides*. *Phytochemistry*. 26(1): 175-179, 1986.
- 20) Al Rahim M., Nakajima A., Misawa N., Shindo K., Adachi K., Shizuri Y., Ohizumi Y., Yamakuni T.: *Euroiopean Journal of Pharmacology*. 600: 10-17, 2008.
- 21) Miyata Y., Sato T., Imada K., Dobashi A., Yano M., Ito A.: *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*. 366: 168-173, 2008.
- 22) Andreas D., Cleber S. M., Patricia F., et al.: Botanical origin of Brazilian reddish propolis and its major chemical constituents. *ミツバチ科学*. 27(2): 55-62, 2007.