◇◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇◇

超臨界二酸化炭素を用いたプロポリスからの 桂皮酸とクリシンの抽出

ラフマン イミット¹, 樋口綾子¹, 呉 暁聞¹, 滝口泰之^{1,†}, 山口達明¹, 景 世兵²

¹千葉工業大学工学部生命環境科学科, ²日本生物化学株式会社

Extraction of Cinnamic acid and Chrysin from Propolis by Using Supercritical Carbon Dioxide

Rahman YIMIT¹, Ayako HIGUCHI¹, Saowen WU¹, Yasuyuki TAKIGUCHI^{1,†},
Tatsuaki YAMAGUCHI¹, and Shin-Bing JING²

¹Department of Life and Environmental Sciences, Faculty of Engineering,
Chiba Institute of Technology, 2-17-1, Tsudanuma, Narashino, Chiba 275-0016, Japan

²Japan Biochemical Co., Ltd., 2-41-1, Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-0014, Japan

This paper was examined the optimal extraction conditions of bioactive substances, cinnamic acid and chrysin from a Chinese propolis by using super-critical carbon dioxide(SC-CO₂). Cinnamic acid was extracted at lower pressure and shorter time than chrysin. The optimal extraction temperature for cinnamic acid and chrysin was 310K. It was suggested that differences of extraction behavior was caused by solubilities of these substances.

Keywords: Supercritical fluid, Extraction, Propolis, Cinnamate, Chrysin

1. 緒 言

プロポリスとはミツバチが植物から採取した樹脂状物質を唾液と混ぜて巣内に塗りつけた物質で、巣の間隙を塞いで、外敵や寒気の進入を防いでいる [1]。これまでの研究から、プロポリスには抗菌性 [2]、抗ウイルス性 [3]、抗腫瘍性 [4]、マクロファージ活性化作用 [5]、眼疾患治療作用 [6]、血圧降下作用 [7]、血漿尿酸値低下作用 [8]、急性胃潰瘍に対する防御作用 [9] など多くの生理活性が認められ、健康食品素材としての需要が急速に高まっている。

プロポリスに含まれるこれらの生理活性物質の多くはフラボノイドやフェノール性化合物で、エタノールなどの有機溶媒による抽出が検討されてきたが、溶媒が完全に除去できないなどの問題点が指摘されている [10]。一方、超臨界二酸化炭素を用いた抽出分離法は、これまでの有機溶剤抽出と異なり、抽出溶媒の残留が皆無であることから、近年食品や医療分野において注

目される抽出技術である [11]。超臨界二酸化炭素は脂質に対し良溶媒であり、抽出温度、圧力などを操作することによって超臨界二酸化炭素の密度など基礎物性を著しく変化させ、抽出選択範囲を変化できる点が特徴である。これより樹脂状物質で多種の成分を含有しているプロポリスから生理活性成分を選択的に抽出する方法として超臨界二酸化炭素抽出法は適していると考えられる [12]。

本研究では、超臨界二酸化炭素抽出法によりプロポリスから性質の異なる桂皮酸とクリシンの抽出を行い、抽出条件による抽出成分の選択性について検討を行った。桂皮酸とクリシンの化学構造式を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 Chemical structures of cinnamic acid and chrysin
A : cinnamic acid , B : chrysin

(受付 2005 年 10 月 14 日, 受理 2006 年 1 月 10 日)

1 〒 275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1

2 〒 171-0014 東京都豊島区池袋 2-41-1

† Fax: 047-478-0424, E-mail: takiguchi.yasuyuki@it-chiba.ac.jp

2. 実験方法

2.1 プロポリスおよび抽出前処理

本実験では中国浙江省産のプロポリス原塊を使用した。プロポリス原塊, 粉殻, および珪藻土を重量比で2:1:3に混合し, ミキサにて粒径を1.4 mm以下まで粉末化したものを超臨界抽出試料とした。

2.2 超臨界抽出

超臨界抽出装置は日本分光社製超臨界抽出装置を用いた。10 mlの原料充填カラムに前処理したプロポリス粉末試料3.0 gを充填し, 抽出温度に保持されている恒温槽内に設置した。二酸化炭素は熱交換器で1度液化させ, 高压ポンプより流量2.0 ml/minで供給した。出口圧力制御弁で管内の圧力を10-30 MPaに制御することにより超臨界状態にした。

2.3 HPLCによる桂皮酸とクリシンの定量

超臨界抽出物を回収した試験管に10.0 mlのメタノールを入れ1日放置した。これを容器に残らず移し替え, 20.0 mlを追加し, 全量を30.0 mlにした。さらに1日放置した後, 上澄液を0.2 μ mのフィルタに通し, HPLC分析サンプルとした。溶離液は(v/v)メタノール:水:酢酸=75:60:5の溶液を使用した。カラムは資生堂製CAPCELL PAK C18 MGを使用し, 313 Kに保持した。溶離液の流速は0.7 ml/min, 成分の検出は275 nmで行った。市販の桂皮酸およびクリシンを用いて検量線を作成し, 定量した。

3. 結果および考察

3.1 抽出時間の影響

プロポリスを313K, 20 MPaで30 minの超臨界抽出を行った。そのクロマトグラムをFig. 2に示す。桂皮酸は保持時間10 minに, クリシンは30.4 minに現われた。次に, 313K, 20 MPaの抽出条件で30 min毎に超

Fig. 2 An HPLC chromatogram of Chinese propolis
A: cinnamic acid, B: chrysin

臨界抽出物を分画し, 120 minまでの桂皮酸およびクリシンの抽出量を測定した。結果をFig. 3に示す。桂皮酸は0-30 minの画分がもっとも抽出量が多く, その後, 徐々に抽出量が減少し, 90-120 minではほとんど抽出されなかった。一方, クリシンは時間と共に抽出量が多くなり, 90-120 minでもっとも多くなった。このことは桂皮酸に比べ, クリシンの超臨界二酸化炭素に対する溶解度が小さいことに起因すると考えられる。

3.2 抽出圧力の影響

抽出温度313Kに固定し, 抽出圧力を7-30 MPaに変化させて桂皮酸およびクリシンの抽出量を測定した。結果をFig. 4に示す。桂皮酸は10 MPa以上で抽出量が1.0 mg/gでほとんど変化しないが, クリシンは圧力

Fig. 3 Extraction yields of cinnamic acid and chrysin from Chinese propolis by using SC-CO₂ at 310K and 20 MPa. These yields showed the extracted weight of cinnamic acid or chrysin from 1 g of propolis per every 30 min. □: cinnamic acid; ■: chrysin.

Fig. 4 Effect of SC-CO₂ pressure on extraction of cinnamic acid and chrysin from a Chinese propolis. Extraction was carried out at 313 K for 30 min. ○: cinnamic acid; ●: chrysin.

Fig. 5 Effect of SC-CO₂ temperature on extraction of cinnamic acid and chrysin from a Chinese propolis.
Extraction was carried out at 20 MPa for 30 min. ○ : cinnamic acid; ● : chrysin.

の増加に比例して抽出量が増加しており、加圧によりクリシンの溶解度が高まったと思われる。

3.3 抽出温度の影響

抽出条件 20 MPa, 30 min, 抽出温度 303–318 Kにおいて抽出物中の桂皮酸およびクリシンの定量を行った。結果を Fig. 5 に示す。桂皮酸およびクリシンとも 310 K 付近に抽出量の緩やかな極大を示した。桂皮酸とクリシンの最適抽出温度に差はみられなかった。

3.4 抽出条件による成分分離

今回、中国産プロポリスから桂皮酸とクリシンの超臨界抽出における条件検討を行った。桂皮酸は圧力 10 MPa, 抽出時間 30 分程度の短時間でそのほとんどが抽出されたのに対し、クリシンは 30 MPa, 120 分の条件で抽出量が多くなった。桂皮酸とクリシンの分子量はそれぞれ 148 および 256 であり、抽出挙動の違いは両者の分子量の差に依存することが推察された。すなわち、桂皮酸はクリシンより低分子であるため、低圧条件で多くの桂皮酸が抽出されたと考える。したがって、この差を利用することで、選択的な抽出が可能と考える。また、プロポリス試料を一度、低圧で短時間超臨界抽出したのちに高圧で長時間、再抽出することで、高分子成分を多く含む抽出試料が得られると思われる。さらに、桂皮酸およびクリシンの抽出温度は 310 K 付近に極大値を示したことから、この付近に超臨界抽出の最適温度が存在する可能性がある。

引用文献

- [1] 中村純, 松香光夫; 補完代替医療素材としてのプロポリス. 日本補完代替医療学会誌, **2**, 45–57 (2005).
- [2] 阿賀創, 有尾武司, 丸田和彦, 渋谷孝, 米山勝, 杉本利之, 栗本雅司; ブラジル産プロポリスの抗菌作用. 医学と生物学, **124**, 205–209 (1992).
- [3] 立藤智基, 山内宏, 池田雅夫, 安藤俊作, 栗本雅司; ブラジル産プロポリスの抗ウイルス作用. 生薬学雑誌, **47**, 60–64 (1993).
- [4] 松野哲也; プロポリスに含まれる生理活性物質 抗ガン物質を中心に. ミツバチ科学, **13**, 49–54 (1992).
- [5] 新井成之, 栗本雅司; プロポリスのマクロファージ活性化作用と癌転移抑制効果実験について. ミツバチ科学, **15**, 155–162 (1994).
- [6] 太田好次; 癌疾患に対するプロポリスの効果. ニューフードインダストリー, **46**(8), 57–62 (2004).
- [7] 池野武行, 池野久美子; 芳香性プロポリスの血圧降下作用. ミツバチ科学, **19**, 55–60 (1998).
- [8] 吉積一真, 西岡信雄, 辻智子; プロポリスのキサントニンオキシダーゼ活性阻害作用及び血漿尿酸値低下作用. 薬学雑誌, **125**, 315–321 (2005).
- [9] 新井成之, 守安純子, 花谷利春, 元田龍一, 安藤俊作, 栗本雅司; プロポリス散剤のラット急性胃潰瘍に対する防御作用. 医学と生物学, **124**, 67–70 (1992).
- [10] 山口功; Bee-Propolis 中の有用な有機化合物の探索 – エタノール画分. 東京家政大学研究紀要, **44**, 59–62 (2004).
- [11] 後藤元信; 超臨界流体を用いた天然物の分離精製プロセスの開発. 日本食品工学会誌, **6**, 21–28 (2005).

要 旨

本研究では超臨界二酸化炭素抽出法によりプロポリスから桂皮酸およびクリシンの抽出を行い、抽出時間、圧力などの抽出条件による抽出成分の選択性への影響を検討した。超臨界二酸化炭素抽出法において成分の抽出挙動に影響を与える因子は抽出時間と抽出圧力であることがわかった。抽出時間の操作では桂皮酸のような低分子で超臨界二酸化炭素への溶解度が高い成分は低圧で短時間で抽出でき、クリシンのように比較的高分子で、溶解度の低い成分は抽出に高い圧力と時間を要することが示唆された。また、桂皮酸およびクリシンの抽出温度は共に 310 K 付近に極大を示した。