

# 美容・健康機能性に優れた青森県ブランド素材に関する試験・研究開発

## －1,3-ブチレングリコールによるウルソール酸抽出（2）－

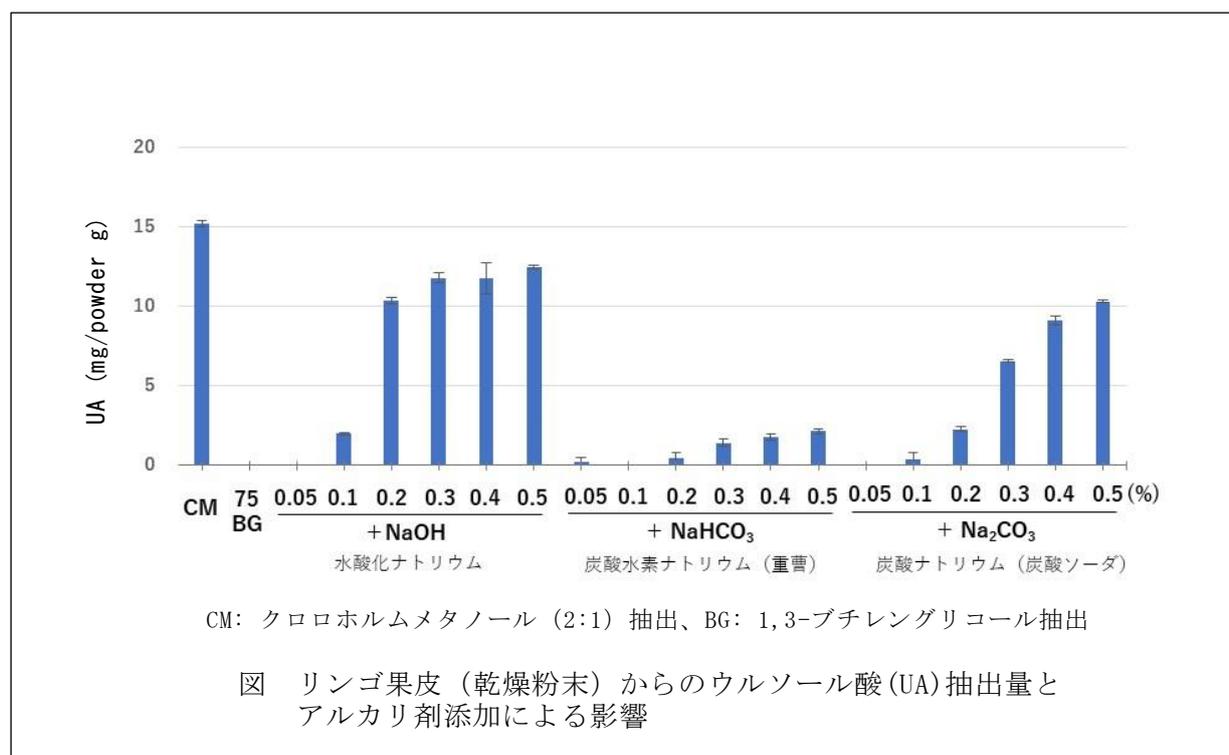
Research and development of Aomori brand materials with beauty and healthy functions

- Effect of some alkaline reagents on the extraction of ursolic acid by 1,3-butylene glycol (2) -

五十嵐 恵

青森県の特産果樹であるリンゴの果皮に特異的に含まれる美容健康機能性成分の一つとして、ウルソール酸に代表されるトリテルペノイド類が挙げられる。クロロホルムやメタノール、エタノールのような有機溶剤を用いることで比較的容易にリンゴ果皮からウルソール酸を抽出することは可能だが、化粧品用素材として活用するためには皮膚への影響の少ない溶媒を用いることが望ましい。そこで昨年度までに、皮膚への刺激性が少なく化粧品用エキス抽出に汎用される1,3-ブチレングリコール（BG）を用いた場合について検討し、100%に近い高濃度で用いるか水酸化ナトリウムを添加することにより3-5時間という短い抽出時間でリンゴ果皮からのウルソール酸を含むエキス抽出が可能であることを確認した。

本年度は水酸化ナトリウムに加え、同じくアルカリ剤である炭酸水素ナトリウム（重曹）及び炭酸ナトリウム（炭酸ソーダ）についても、0-0.5%範囲での添加が75%BGによるウルソール酸抽出量に与える効果を調査した。その結果、弱塩基性である炭酸水素ナトリウムでは0.5%添加でもほとんど効果が見られなかったが、強塩基性である炭酸ナトリウムでは0.3%以上の添加で抽出エキス中のウルソール酸含有量を明らかに上昇させる効果があることが分かった。



## 1. 目的・背景

青森県の特産果樹であるリンゴの果皮に特異的に含まれる美容健康機能性成分・ウルソール酸について、これまでに国内品種間での比較を行い、特に多い品種の中に青森県育成品種の千雪が含まれること、半年にわたる長期冷蔵貯蔵を経た果実や油上がりした果実であっても抽出される果皮ウルソール酸量にはほぼ影響しないこと、中性洗剤やアルカリ洗剤を用いた単純な表面洗浄によるトリテルペノイドの減少は考慮する必要はないことを見出した。

化粧品原料としての植物エキス抽出では、メタノール等の有害な溶媒よりも比較的皮膚に対して刺激性の少ない1,3-ブチレングリコール (BG) を用いることが望ましい。特にリンゴ果実からのBGによる抽出液は医薬部外品原料規格 (外原規) として登録されていることから、BGを抽出溶媒とした場合のウルソール酸を含むエキス抽出方法について検討することとした。BGは高濃度では粘度が高く浸透にも時間がかかることから操作性の良い50%前後での使用が一般的だが、多くのトリテルペノイド類は難水溶性であるため、含水BGによるウルソール酸含有エキスの抽出は難しい。一方、1%水酸化ナトリウム (0.5%以上で最大) 添加により、通常抽出不可能な30%以下のエタノールでも柿果皮からのウルソール酸やポモル酸の抽出が可能になることが示されている (井土、2016)。また、2%水酸化ナトリウムを添加してアルカリエタノールにすると、より効率的にトリテルペノイドを抽出できる (de Freitas Tostes et al. 2016) など、エタノールを用いた抽出に対するアルカリ添加効果が報告されている。

これらの報告例を元に昨年度実施した試験では、水酸化ナトリウムを添加することで比較的短時間での含水BGによる効率的なウルソール酸含有エキス調製が可能であることが示された。そこで、本年度は水酸化ナトリウムに加え、同じくアルカリ剤である炭酸水素ナトリウム (重曹) 及び炭酸ナトリウム (炭酸ソーダ) についても0-0.5%範囲で添加した場合の75%BGによるウルソール酸抽出への効果を調査した。

## 2. 実験方法等

### 2. 1. 材料

本試験での原料のリンゴ果皮は、ウルソール酸含量が比較的多い品種であるジョナゴールド廃棄果皮 (県内事業者排出) を用いた。減圧低温乾燥により乾燥したリンゴ果皮を家庭用ミルサーで粉末化し、抽出材料とした。

### 2. 2. 果皮トリテルペノイド抽出

果皮粉末約50mgを2ml破砕用チューブ (TOMY TM-625) に測り取り、直径5mmのジルコニアビーズ1個及び各抽出溶媒 (表1) 1mlを加えた。果皮粉末は超音波で拡散し、MicroSmash™ MS-100R (TOMY) を用いて3,000rpmで90秒6回の破砕操作を加えた後室温で1時間振とう (120rpm) した。更に室温で一晩静置したものを12,000rpmで10分遠心し、上清300μlを回収した。

表 1 抽出溶媒

溶媒 1	クロロホルム：メタノール (2:1) 混合 (CM)				
溶媒 2	1,3-ブチレングリコール (BG)：水 (75:25) (75%BG)				
溶媒 3-1	75%BG+0.05% NaOH	3-2	75%BG+0.05% NaHCO <sub>3</sub>	3-3	75%BG+0.05% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
溶媒 4-1	75%BG+0.1% NaOH	4-2	75%BG+0.1% NaHCO <sub>3</sub>	4-3	75%BG+0.1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
溶媒 5-1	75%BG+0.2% NaOH	5-2	75%BG+0.2% NaHCO <sub>3</sub>	5-3	75%BG+0.2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
溶媒 6-1	75%BG+0.3% NaOH	6-2	75%BG+0.3% NaHCO <sub>3</sub>	6-3	75%BG+0.3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
溶媒 7-1	75%BG+0.4% NaOH	7-2	75%BG+0.4% NaHCO <sub>3</sub>	7-3	75%BG+0.4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
溶媒 8-1	75%BG+0.5% NaOH	8-2	75%BG+0.5% NaHCO <sub>3</sub>	8-3	75%BG+0.5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

### 2. 3. ウルソール酸定量分析

表 1 の溶媒 1 (CM) で抽出した試料については、Savant™ SpeedVac™ SPD300DDA (Thermo Scientific™) で溶媒を除去した後、回収した上清の倍量 (600 $\mu$ l) のメタノールに溶解した。その他の溶媒 2 (75%BG) 又は溶媒 3-1~8-3 (アルカリ剤を含む 75%BG 溶媒) で抽出した試料には等量の塩酸(等モル)-メタノールを加えて中和した。これらの試料を 14,000rpm で 5 分遠心し、上清 550 $\mu$ l を更にフィルター (メルク Ultrafree®-MC-GV PVDF 0.22 $\mu$ m) をろ過して分析試料とした。

分析は ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters) により実施し、条件は以下のとおりとした。

【分析条件】 使用カラム：Waters BEH130C18、2.1x100mm、1.7 $\mu$ m

検出器：フォトダイオードアレイ (検出波長 210nm)

カラム温度：35°C、サンプル温度：8°C

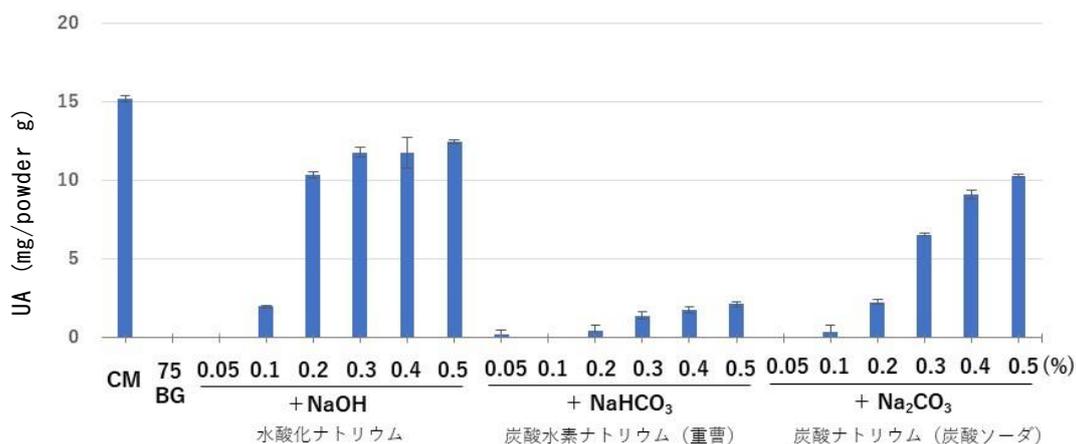
移動相：メタノール：水=95:5、流速 0.12ml/min、分析時間 5 分

サンプル注入量：1 $\mu$ l

EXTRASYNTHESE 社のウルソール酸 (Ref. 0037S) を標準として検量線を作成し、ピーク面積により試料中のウルソール酸量を定量した。

### 3. 結果

各抽出液に含まれるウルソール酸量 (果皮粉末重あたり) を図 1 に示した。75%BG 抽出液中のウルソール酸量が明らかに増加したのは、水酸化ナトリウムでは 0.2%以上、炭酸ナトリウムでは 0.3%以上を添加した場合となった。一方、炭酸水素ナトリウムでは 0.5%添加したものでも 75%BG 抽出液に含まれるウルソール酸量はわずかであり、この濃度では抽出促進効果は見られなかった。



CM: クロロホルムメタノール (2:1) 抽出、BG: 1,3-ブチレングリコール抽出

図1 リンゴ果皮 (乾燥粉末) からのウルソール酸(UA)抽出量  
75%BG に各アルカリ剤を 0.05-0.5% 添加した場合の抽出量を比較した。

#### 4. まとめ・考察

複数のアルカリ剤によるウルソール酸の 75%BG 抽出促進効果を比較した結果、水酸化ナトリウム及び炭酸ナトリウムでは 0.2-0.3% 以上で明らかに効果が確認されたのに対し、炭酸水素ナトリウムは 0.5% 以下の添加ではほとんど効果が見られなかった。水酸化ナトリウムによるトリテルペノイド抽出効率の向上については、トリテルペノイドのカルボキシ基の親水性向上及び水酸基の水素が離脱することによる水溶性の向上が寄与した結果とされている (井土ら 2016)。強塩基性である炭酸ナトリウムでは類似した効果が得られたが、炭酸水素ナトリウムは弱塩基性であるため上記の効果が起こりにくく、抽出効果が得られなかったと考えられた。以上により、含水 BG によるリンゴ果皮からのウルソール酸高含有エキス抽出にも、強塩基性アルカリ剤の添加が有効であることが示された。

#### 5. 参考文献

- 1) 井土 (2016) 科学研究費助成事業 研究成果報告書「未利用柿果皮の脂肪蓄積抑制作用解明と食品への応用」
- 2) 井土ら (2016) トリテルペノイドの抽出方法およびトリテルペノイド及びカロテノイドを分離する方法
- 3) de Freitas Tostes et al. (2016) Separation Sci.Tech. vol.51, 1-26. Efficient and selective method to separate triterpene acids by direct treatment of apple peels with alkaline ethanol.