

# 果実加工残渣からの高純度五環性トリテルペノイド精製方法の開発

藪川 啓司、井土 良一

## Development of a Purification Method to Obtain High-purity Pentacyclic Triterpenoids from Fruit Processing Residues.

Keiji Yabukawa and Ryouichi Izuchi

Pentacyclic triterpenoids present in peels that are discharged in large quantities during fruit processing, exhibit many potentially exploitable physiological activities. Because the structure of each triterpenoid is similar, it is difficult to isolate and purify individual molecules. We thus developed a simple method for the isolation and purification of pentacyclic triterpenoids. Liquid chromatography (LC) with a C30 column was used to determine an optimal mobile phase. In primary purification, water, methanol, and acetonitrile were assessed as mobile phases for the simultaneous purification of multiple components. In secondary purification, water and acetonitrile were used as mobile phases to achieve higher purity of the primary purified product. Pentacyclic triterpenoids were purified from dried apple processing residues using an established method, and euscaphic, annurcoic, and pomolic acids were simultaneously purified in the primary purification. Secondary purification of an annurcoic acid fraction yielded a highly purified product with a purity of 95.7% (HPLC). Purification was repeated and 10.15 mg of annurcoic acid was obtained from 85.79 g of dried apple processing residue. This established method can easily yield multiple pure pentacyclic triterpenoids using preparative LC. This method is thus expected to simplify sample preparation and contribute to the effective utilization of processing residues as source materials.

**Keywords** : processing residues, pentacyclic triterpenoid, purification method

### 1. 緒言

果実加工の際、果皮を含む加工残渣が大量に発生する。例えば、日本で主要な果実の一つである柿はドライフルーツなどに加工されるが、生果重量の約15%が残渣となる(文部科学省、食品成分データベース)。柿に限らず、様々な果実の加工残渣の発生は、環境への負荷などが問題とされている。一方で、果皮等の残渣には生理活性物質が豊富に含まれている(Sagar *et al.* 2018)。我々は先の研究で、柿果皮のアセトン抽出物中に五環性トリテルペノイドが含まれることを示した(Izuchi & Katsuki 2021)。五環性トリテルペノイドは、植物の二次代謝物で、6つのイソプレレンで構成され、5つの環構造をもつテルペン類である。これらの成分は、肝臓保護作用や抗炎症作用(Liu 1995)、抗脂質異常作用(Ghaffari-Moghaddam *et al.* 2012)、心保護作用(Nagoor Meeran *et al.* 2018)などの様々な生理活性を示すため、薬理学的に注目されている。

五環性トリテルペノイドの標品や高濃度含有品は、植物から抽出したものを精製して生産されている。しかし、五環性トリテルペノイドは、構造が非常に類似しており、極性の差が僅かであることから、単一の成分を分離精製することが難しい。以上より、果実加工残渣からの高純度五環

性トリテルペノイド精製法の開発は、残渣の有効利用と入手困難な成分の供給にとって重要である。

本研究では、簡便な工程での高純度五環性トリテルペノイドの精製法を開発を行った。五環性トリテルペノイドの分析には逆相カラムを用いたHPLC法が一般的であることから、精製にも逆相系カラムを用いたクロマトグラフィー精製を採用することとした。クロマトグラフィー精製による成分の単離には、適切な溶媒とカラム担体の選定が重要である(末吉 2004)。我々は、五環性トリテルペノイドはC30カラムを用いた方が分離しやすい可能性を報告した(Izuchi & Katsuki 2021)。本報では、各成分を高純度で分離精製できる溶媒条件を決定した。また、多様な五環性トリテルペノイドが含まれているリンゴ(Nile *et al.* 2019、Sut *et al.* 2018)の加工残渣を用いて、決定した条件の検証を行った。

### 2. 方法

#### 2-1. 五環性トリテルペノイド標品

Euscaphic acid (純度93.4%)はMedChemExpressから購入した。Maslinic acid (97.8%)はCayman Chemicalから購入した。Corosolic acid (95.9%)、

ursolic acid (95.3%) は FujifilmWako から購入した。Erythrodiol (98.4%) は ChromaDex から購入した。Hederagenin は Extrasynthese から購入した。Betulinic acid (98.7%) は 東京化成工業から購入した。Oleanolic acid (97.9%) は MP Biomedicals から購入した。Echinocystic acid と uvaol (95.5%) は Sigma-Aldrich から購入した。Tormentic acid (96.0%) は Toronto Research Chemicals から購入した。Pomolic acid (99.3%) は カキ果皮を自動分取精製装置 (Isolera One, Biotage) と分取液体クロマトグラフィー (分取 LC, 1260 Infinity, Agilent Technologies) を用いて精製した。精製物は地磁気共鳴 (NMR) 分析で目的成分であることを確認した (Izuchi & Katsuki 2021)。

## 2-2. 五環性トリテルペノイドの分取精製方法

### (1) リンゴからの五環性トリテルペノイドの抽出方法

リンゴ (フジ) の加工残渣 (皮、軸、種を含む) を凍結乾燥機 (FDU-2110, 東京理化学器械) で乾燥し、ミルサーで粉末状にした。果皮粉末 15 g にアセトン 200 mL を加え、室温で 120 rpm で 3 時間振とうした (NR-30, Taitec)。抽出液を、R9A ローターを装着した高速冷却遠心機 (CR21G II, エッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ) で遠心した (16,500 × g, 10 min, 20°C)。上清を回収し、沈殿物に 10 mL のアセトンを加え、遠心する操作を二回繰り返した。回収した上清は、エバポレーター (Rotavapor R-300, BÜCHI) で減圧乾固し、得られた抽出物をアセトン抽出物とした。

### (2) リンゴ果皮アセトン抽出物の粗精製

アセトン抽出物 200 mg をセライト No.535 (FujifilmWako) 3 g に吸着させ、ドライヤーで完全に乾燥させた。空のカラムに調製した試料を全量充填し、分離用カラム (SNAP Cartridge KP-C18-HS 60 g, Biotage) の上部に接続してフラッシュ自動精製装置 (Biotage) で分画した。分離条件は展開溶媒を 0.1% 酢酸含有 65% 含水エタノール、流速 30 mL/min とし、30 mL ずつ分画した。五環性トリテルペノイドを含む画分を回収し、遠心エバポレーター (miVAC QUATTRO concentrator, Genevaca) で濃縮乾固した。乾固物をメタノール 2 ~ 4 mL に溶解し、粗精製液とした。

### (3) 五環性トリテルペノイドの一次精製方法

粗精製液から分取 LC (1290 Infinity, Agilent Technologies) を用いて、五環性トリテルペノイドを分離精製した。分離条件は、C30 カラム (YMC, 250 × 内径 20.0 mm、粒径 5 μm)、カラム温度を 40°C とし、酢酸/水/アセトニトリル/メタノール = 0.1 / 15 / 34 / 51 (pH 4) を移動相として、流速 7.5 mL/min で行った。目的の成分を含む画分を回収し、一次精製物とした。

一次精製物を溶媒が完全に無くなるまで遠心エバポレーターで濃縮乾固し、2 mL のメタノールに溶解した。一次精製物の同定は、LC-Q-TOF-MS (microTOF-Q II, Bruker) を用いて、標品の保持時間と精密質量の比較により行った。LC 分析条件は、C30 カラム (YMC, 150 × 内径 4.6 mm 粒径 3 μm) を用いて、移動相 A を 0.1% 酢酸水、移動相 B を 0.1% 酢酸含有アセトニトリル/メタノール = 3 / 1 とし、移動相 B 濃度を 80%、流速 0.4 mL/min でアイソクラティック分析を行った。MS 条件は、イオン化法を APCI とし、ポジティブイオンモードで、キャピラリー電圧: 4500 V、乾燥ガス: N<sub>2</sub>、ガス流量: 7.0 L/min、乾燥温度: 180°C、ネブライザー: 1.6 Bar、コリジョン電圧: 10.0 eV、質量範囲: m/z50-2200 で行った。

次に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, LC-20A, 島津製作所) を用いて、一次精製物の純度を調査した。分析条件は、酢酸/水/アセトニトリル/メタノール = 0.1 / 15 / 34 / 51 (pH 4) を移動相として、C30 カラム (YMC, カラム長 150 mm × 内径 4.6 mm、粒径 3 μm)、流速 0.6 mL/min、カラム温度 40°C、検出波長 200 nm で行った。得られたクロマトグラムピーク総面積値に対する目的成分のピーク面積値との比を純度として算出した。

### (4) 一次精製物の構造解析

一次精製物のうち、標品が販売されていない成分の精密質量測定と NMR 測定を行った。精密質量測定は、大気圧イオン化 -TOF-MS (JMS-T100LP AccuTOFTM LC-plus 4G) で測定した。測定は Direct Analysis in Real Time (DART+) イオン化法で、オリフィス温度: 80°C、オリフィス電圧 1: 30 V、リングレス: 5 V、オリフィス電圧 2: 5 V、イオンガイド: RF500 V、質量範囲: m/z65-1,000、ドリフト補正: PEG600 で行った。NMR 測定は、5 mm UltraCOOL\_CH プローブを備えた NMR 装置 (JNM-ECA800R) で行った。試料約 1 mg を重メタノール (CD<sub>3</sub>OD) 約 0.3 mL に溶解後、5 mm ミクロ試験管 (シゲミ) に移し、25°C で測定した。一次元 NMR は <sup>1</sup>H-1D (800.14 MHz)、<sup>13</sup>C-NMR (201.20 MHz) にて、<sup>13</sup>C-1D、Distortion less Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) 135°, DEPT90° を測定した。二次元 NMR は Correlation Spectroscopy (COSY)、Hetero-nuclear Single Quantum Coherence (HSQC) と Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)、Hetero-nuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC) を測定した。解析は 2D NMR Ver4.13.1 で行った (中村 2009)。

### (5) 移動相のアセトニトリル濃度の検討方法

0.1% 酢酸を含む 60 ~ 80% (v/v) アセトニトリルを移

動相として、10種の五環性トリテルペノイド標品 (annurcoic acid、euscaphic acid、pomolic acid、maslinic acid、corosolic acid、betulinic acid、oleanolic acid、ursolic acid、erythrodiol、uvaol) を各濃度 10 µg/mL にメタノールで調製した混合溶液を LC-MS で分離した。検出はトータルイオンクロマトグラム (TIC) で行い、各条件での成分の分離度合とピーク強度を比較した。

#### (6) Annurcoic acid の二次精製方法

標品が販売されていない annurcoic acid を、一次精製物 (2.3. に 記 載 ) から HPLC1260 Infinity (Agilent Technologies) を用いて C30 カラム (YMC、カラム長 250 mm × 内径 20.0 mm、粒径 5 µm) で分離した。分離条件は 60% (v/v) アセトニトリルを移動相 (pH 4) とし、流速 7.5 mL/min、カラム温度 40°C で行った。目的成分を含む画分を回収し、最終精製物とした。一部を LC-20A (島津製作所) を用いて分析し、純度を算出した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1. リンゴ加工残渣由来の五環性トリテルペノイドの一次精製

リンゴ加工残渣に含まれる五環性トリテルペノイドを抽出し、粗精製および一次精製を行った。精製方法の検証として、保持時間が早い成分を対象とした。フラクション (1) 13 ~ 14 分、(2) 14 ~ 15 分、(3) 16 ~ 17 分、(4) 17 ~ 18 分を分取した。各フラクションを LC-Q-TOF-MS で分析した結果、フラクション (1) は euscaphic acid、フラクション (2) は標品がなかった。フラクション (3) と (4) は pomolic acid であった。次に、フラクション (2) を同定するために構造解析を行った (Table)。得られた NMR データから、フラクション (2) は annurcoic acid であることが分かった (Waldbauer *et al.* 2016)。各成分の純度を HPLC で算出した結果、フラクション (1) 80.0%、(2) 78.9%、(3) 74.3%、(4) 83.9% であった (Fig. 1)。以上より、一次精製方法は、果実の加工残渣から複数の五環性トリテルペノイドを同時に精製できることが示された。しかし、精製物の純度が低かったため、標品を製造するためには、高純度化が必要であった。

**Table** フラクション (2) の成分の  $^{13}\text{C}$ -NMR (201.20 MHz)、 $^1\text{H}$ -NMR (800.14 MHz)、HSQC、HMQC データ

carbon		HSQC/HMQC	
$^{13}\text{C}$ (ppm)		$^1\text{H}$ (ppm)	分裂様式
16.492	CH <sub>3</sub>		1.30 s
16.753	CH <sub>3</sub>		0.92 d
17.856	CH <sub>3</sub>		0.87 s
20.507	CH <sub>2</sub>	1.52	1.63 m, m
22.209	CH <sub>3</sub>		1.12 s
24.956	CH <sub>2</sub>	2.05	2.07 m, m
24.976	CH <sub>3</sub>		1.22 s
25.546	CH <sub>3</sub>		1.12 s
26.736	CH <sub>2</sub>	1.52	2.53 m, m
27.22	CH <sub>3</sub>		1.19 s
27.423	CH <sub>2</sub>	1.22	1.71
29.745	CH <sub>2</sub>	0.98	1.83 m, td
33.992	CH <sub>2</sub>	1.36	1.61 m, m
38.964	C		
39.167	CH <sub>2</sub>	1.63	1.73 m, m
41.247	C		
42.794	C		
43.133	CH		1.36 m
48.434	CH		1.77 dd
50.659	CH <sub>2</sub>	1.16	2.31 m, dd
55.244	CH		2.53 br_s
58.988	CH		1.18
70.606	CH-O		4.60 dd
73.856	C-O		
128.986	CH=		5.30 t
140.439	C=		
183.09	C=O		
217.548	C=O		

重メタノール信号を基準に  $^1\text{H}$  は 3.31 ppm、 $^{13}\text{C}$  は 49.15 ppm を化学シフトの基準とした。  
s: 一重線 (singlet)、d: 二重線 (doublet)、t: 三重線 (triplet)、q: 四重線 (quartet)、  
br: ブロード (broad)、m: 分裂様式不明、炭素番号は不明

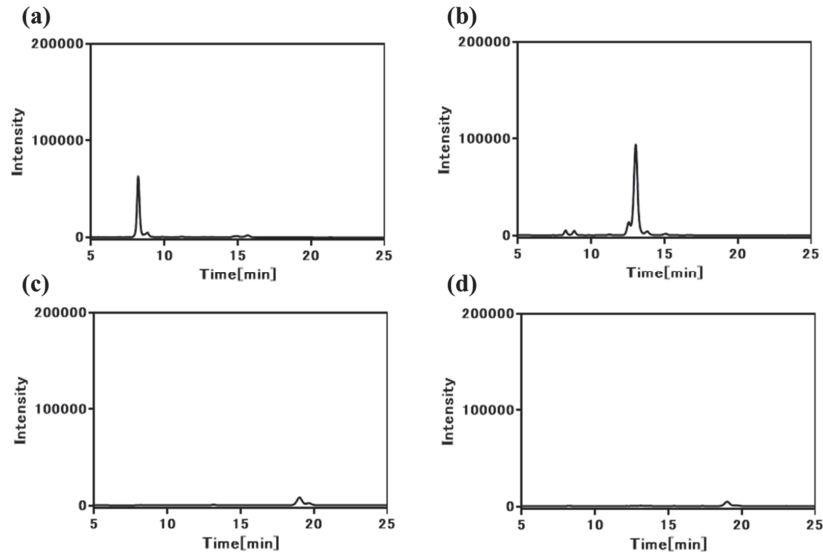


Fig. 1 一次精製物のクロマトグラム (HPLC)

(a) フラクシオン 1 : euscaphic acid、(b) フラクシオン 2 : annurcoic acid、(c) フラクシオン 3 : pomolic acid、(d) フラクシオン 4 : pomolic acid

### 3-2. 移動相のアセトニトリル濃度が五環性トリテルペノイドの分離に及ぼす影響

より高純度の五環性トリテルペノイドを得るため、二次精製の移動相条件を検討した。0.1% 酢酸を含む 60、65、70、80% (v/v) アセトニトリル (pH 4) を移動相として、10 種五環性トリテルペノイド混合液を分離した (Fig. 2)。60 および 65% アセトニトリルでは、全ての成分が分離できた。60% アセトニトリルでは、betulinic acid(6)、oleanolic acid(7)、ursolic acid(8)、erythrodiol(9)、uvaol(10) の溶出に時間を要した。65% アセトニトリルでは、corosolic acid(5) の感度が 60% よりも低く、

betulinic acid(6)、oleanolic acid(7)、ursolic acid(8) の感度が高かった。70% アセトニトリルでは、60 min 以下で全成分を溶出できた。一方で、annurcoic acid(2) と pomolic acid(3) のピークが一部重なっていた。80% アセトニトリルでは、annurcoic acid(2) と pomolic acid(3) のピークがほぼ完全に重なっていた。また、euscaphic acid(1)、annurcoic acid(2)、pomolic acid(3)、maslinic acid(4)、corosolic acid(5)、betulinic acid(6)、oleanolic acid(7) の保持時間が近く、極性の高い erythrodiol(9) と uvaol(10) の感度が低かったため、分取に適していなかった。

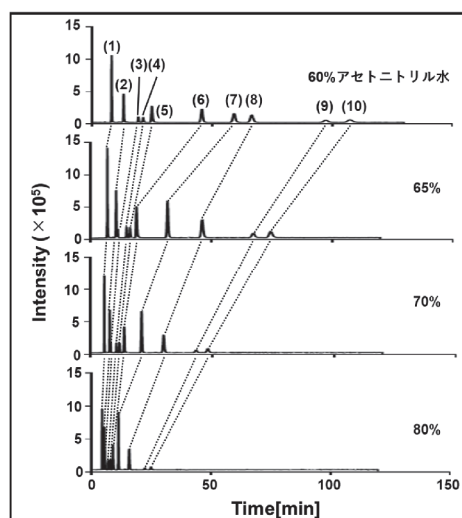


Fig. 2 移動相のアセトニトリル濃度が分離に及ぼす影響

(1)euscaphic acid、(2)annurcoic acid、(3)pomolic acid、(4)maslinic acid、(5)corosolic acid、(6)betulinic acid、(7)oleanolic acid、(8)ursolic acid、(9)erythrodiol、(10)uvaol

以上の結果より、0.1% 酢酸を含む 60 ~ 70% アセトニトリル (pH 4) を移動相として、C30 カラムを用いて分取することで、複数の五環性トリテルペノイドを精製できることがわかった。疎水性が比較的低い成分は 60%、高い成分は 70% に近いアセトニトリルを用いることで、比較的短時間で精度良く各成分を分取できると考えられる。

### 3-3. Annurcoic acid の高純度化

標品が販売されていない annurcoic acid を対象成分とし、annurcoic acid を含む一次精製画分 (フラクション (2)) の二次精製を行った。移動相は 60% アセトニトリル (pH 4) で行った。保持時間 32.5 ~ 33.75 分のフラクションを回収し、二次精製物とした (Fig. 3)。二次精製物の純度は 95.7% (HPLC 法) だった。市販の五環性トリテルペノイド標品の純度は 93 ~ 99% であるため、二次精製物は標品として使用できる純度であることが示された。精製を繰り返し、85.79 g の乾燥リンゴ搾りかすから 10.15 mg の annurcoic acid が得られた。

以上より、確立された精製法によって、果皮から高純度の五環性トリテルペノイドが得られることが示された。

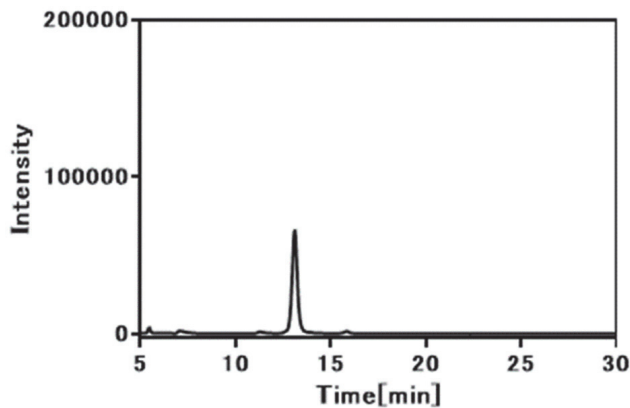


Fig. 3 annurcoic acid の二次精製物 (HPLC : 199 nm)

## 4. 結論

果皮に含まれる五環性トリテルペノイドの分取 LC を用いた高純度精製方法を確立した。pH4 に調製した 60 ~ 70% (v/v) アセトニトリルが分取に適当であった。また、アセトニトリル濃度を目的成分によって変更することで効率的に果皮から複数の成分が精製可能であると考えられる。確立した手法を用いて、85.79 g の乾燥リンゴ加工残渣から純度 95.7% (HPLC) の annurcoic acid が 10.15 mg 得られた。この手法は、複数種の五環性トリテルペノイドの高純度精製品の作製に適用できる。したがって、標品作成の簡便化や、素材となる加工残渣の有効利用への貢献が期待できる。

## 5. 参考文献

- Ghaffari-Moghaddam, M.; Bin H. Ahmad, F.; Samzadeh-Kermani, A., 2012, Biological Activity of Betulinic Acid: A Review., *Pharmacol. Pharm.*, **3**(2), p.119-123. DOI: 10.4236/pp.2012.32018.
- Izuchi, R.; Katsuki, T., 2021, Pomolic acid in persimmon peel suppresses the increase in glycerol-3 phosphate dehydrogenase activity in 3T3-L1 adipocytes., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**(3), p.691-696. DOI: 10.1093/bbb/zbba079.
- Liu, J., 1995, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid., *J. Ethnopharmacol.*, **49**(2), p.57-68. DOI: 10.1016/0378-8741(95)90032-2.
- 文部科学省, 食品成分データベース, [https://fooddb.mext.go.jp/selectFood/sel\\_top.pl](https://fooddb.mext.go.jp/selectFood/sel_top.pl), (2024年10月30日参照)
- Nagoor Meeran, M. F.; Goyal, S. N.; Suchal, K.; Sharma, C.; Patil, C. R.; Ojha, S. K., 2018, Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms, and Pharmaceutical Development of Asiatic Acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise., *Front. Pharmacol.*, **9**, p.892. DOI: 10.3389/fphar.2018.00892.
- 中村 博, 2009, パソコンによる FT-NMR のデータ処理. 第 2 版, 三共出版, 東京, ISBN 978-4-7827-0597-1.
- Nile, S. H.; Nile, A.; Liu, J.; Kim, D. H.; Kai, G., 2019, Exploitation of apple pomace towards extraction of triterpenic acids, antioxidant potential, cytotoxic effects, and inhibition of clinically important enzymes., *Food Chem. Toxicol.*, **131**, p.110563. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110563.
- Sagar, N. A.; Pareek, S.; Sharma, S.; Yahia, E. M.; Lobo, M. G., 2018, Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **17**(3), p.512-531. DOI: 10.1111/1541-4337.12330.
- 末吉 恵津子, 2004, 植物からの活性成分の抽出と単離、広島大学技術センター報告集, **1**, p.93-95. [https://www.hiroshima-u.ac.jp/system/files/4337/report2004\\_26.pdf](https://www.hiroshima-u.ac.jp/system/files/4337/report2004_26.pdf) (2024年10月30日参照)
- Sut, S.; Poloniato, G.; Malagoli, M.; Dall'Acqua, S., 2018, Fragmentation of the main triterpene acids of apple by LC-APCI-MSn., *J. Mass Spectrom.*, **53**(9), p.882-892. DOI: 10.1002/jms.4264.
- Waldbauer, K.; Seiringer, G.; Nguyen, D. L.; Winkler, J.; Blaschke, M.; McKinnon, R.; Urban, E.;

Ladurner, A.; Dirsch, V. M.; Zehl, M.; Kopp, B., 2016, Triterpenoic acids from apple pomace enhance the activity of the endothelial nitric

oxide synthase (eNOS). *J. Agric. Food Chem.*, **64**(1), p.185-194. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05061.