

# Calophyllum inophyllum の抗 HIV 活性成分 inophyllum A, B, C, D, E, P の 液体クロマトグラフィーによる分析法の確立

河津 一儀・仁戸田照彦・神崎 浩

(生物資源開発学講座)

## An Analytical Method of Inophyllums A, B, C, D, E, and P, Anti-HIV Constituents of Calophyllum inophyllum by HPLC

Kazuyoshi Kawazu, Teruhiko Nitoda, and Hiroshi Kanzaki

(Department of Bioresources Chemistry)

In order to optimize cell culture conditions for producing inhibitors of HIV reverse transcriptase isolated from *Calophyllum inophyllum*, a rapid and accurate analytical method for determining the quantity of the inhibitors, inophyllums A, B, C, D, E, and P was desired. We have established a quantitative analytical method using HPLC, together with LCMS.

Key words : LC-MS, 4-Phenylcoumarin, Guttiferae, HIV reverse transcriptase, AIDS

### 緒 言

*Calophyllum inophyllum* (和名 テリハボク) は、オトギリソウ科に属する亜熱帯性常緑高木で、樹皮や根や種子が生薬として用いられ、また、葉は魚毒として利用されてきた。

最近、この *C. inophyllum* の成分である inophyllum A, B, C, D, E, P (Fig. 1) が、抗 HIV 活性 (HI ウイルスの逆転写酵素, HIVRT, 阻害活性) を持つことが報告された。特に、inophyllum B, P は強い活性を示している<sup>1)</sup>。

これらの 6 化合物のうち、inophyllum P 以外の 5 化合物 inophyllum A-E は、著者の 1 人らが<sup>2,3)</sup>、すでに 1968 年に、*C. inophyllum* の葉から魚毒成分として単離構造決定し命名していたものである。4-フェニルクマリン類縁体であり、12位の炭素が、カルビノール炭素か、ケトン炭素かで、大きくアルコール体とケトン体の 2 つに分けられる (Fig. 1)。

抗 HIV 活性に関する報告の出現により、inophyllum 化合物群は注目されてきている。しかし、現在の供給源は、天然植物体からの抽出のみである。そこで、*C. inophyllum* の培養細胞による生産の可能

性を追究することは意義あることと考えた。培養生産の条件検討のためには、inophyllum 化合物の迅速かつ正確な定量法を確立しておかなければならない。本報では HPLC の分析条件を検討し、定量法を確立したので報告する。

### 材料と方法

#### 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

Inophyllum 化合物の分離定性定量分析には Inertsil ODS-3 カラム (GL Sciences, 5  $\mu$ m,  $\phi$  4.6  $\times$  250mm) を装着した日立 L-7000 を用いた。

#### 液体クロマトグラフィー—マススペクトル (LCMS)

高速液体クロマトグラフィーによる分離ピークの化合物確認および目標化合物の溶出位置の探索は、LCMS で行った。LCMS は、高速液体クロマトグラフィーに用いたと同じカラムを装着した島津 LC-10AD を連結した日本電子質量分析装置 JMS-SX 102A を用いて、フリット FAB モードで陽イオンを測定した。加速電圧は、8.0kV とし、マトリックスのグリセリンは 1% メタノール溶液として、

Received October 1, 1997

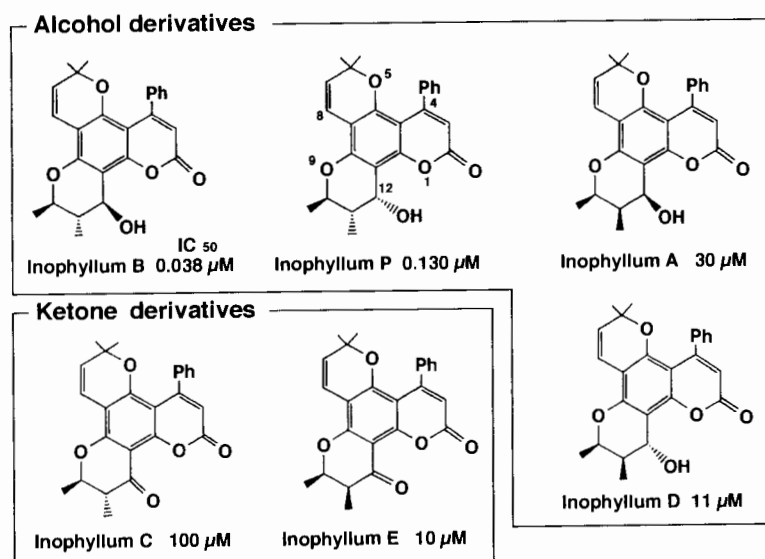


Fig. 1 Chemical structures and HIVRT inhibitory activities of inophyllum compounds.

LC1000 (Yokogawa Analytical Systems) により毎分0.3ml挿入した。溶離液の溶出速度は毎分1mlとし、スプリット比は通常、200:1とした。

#### Inophyllum 化合物の標品

Inophyllum 化合物の標準試料としては、著者の1人らが以前に *C. inophyllum* の葉から単離した<sup>2,3)</sup> inophyllum A-E のうち、現在も著者が保有する inophyllum A および C を、メタノール溶液として用いた。

#### C. inophyllum 葉の抽出物

マレーシア、セルダンの UPM (Universiti Putra Malaysia) の構内で採取した *C. inophyllum* の苗木を、ポットに植え、温室で栽培した。その新鮮葉 (2.53 g) を採取し、鋏で带状 (約1 cm幅) に切断した後、5倍量のメタノールに1週間浸漬した。綿ろ過し濃縮した後、水を加え、等量の酢酸エチルで3回抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮乾固し、酢酸エチル抽出物 (38.41 mg) を得た。少量の酢酸エチルに再溶解して、セルロースパウダーを加えた。減圧で酢酸エチルを除去乾燥した後、ジエチルエーテルを加えて、ジエチルエーテル抽出物 (23.6 mg) を得た。メタノール溶液 (944  $\mu$ g/ml) とし、5  $\mu$ l を HPLC 分析に供した。

## 結 果

#### HPLC 分析条件の検討

Inophyllum A および C の標品を用い、HPLC の

分析条件を検討した。検出は、inophyllum A の極大吸収波長286nmで行い、溶離液としては、水-メタノールを毎分1mlの流速で用い、メタノール濃度を、メタノール100%から95%、90%と徐々に下げていくと、inophyllum A と inophyllum C はメタノール100%ではそれぞれ、 $t_R$  4.84 min, 4.22 min, 95%ではそれぞれ、6.37 min, 5.20 min, 90%ではそれぞれ、9.00 min, 6.88 min となった。90%メタノールで inophyllum A, C の溶出時間の差が、2分以上となったので、この条件で葉の抽出物の分析を試みたが、inophyllum A, C と他の成分のピークが完全に分離しなかったため、さらに80%、70%にメタノール濃度を下げたところ、80%では inophyllum A は  $t_R$  23.35 min, inophyllum C は  $t_R$  15.72 min となり、70%メタノールでは溶出しなかった。そこで、78%、76%、75%のメタノール濃度で分析したところ、78%ではそれぞれ、 $t_R$  31.90 min, 20.80 min, 76%では、40.35 min, 25.88 min, 75%では、45.59 min, 28.90 min となり、76%メタノールを用いれば、inophyllum A, C のピークが他の成分のピークと完全に分離し、また溶出時間も長すぎないので、この条件で分析を行うことにした。この条件での両標品の検出限界はそれぞれ、0.6 ng, 0.18 ngであった。

#### HPLC における分離ピークの LC/FABMS による化合物確認

葉抽出物の HPLC上、標品 inophyllum A, C と

同じ保持時間を示すピークのマスマスペクトルを、LC/FABMS で測定して、inophyllum A, C であることを確認した (Fig. 2).

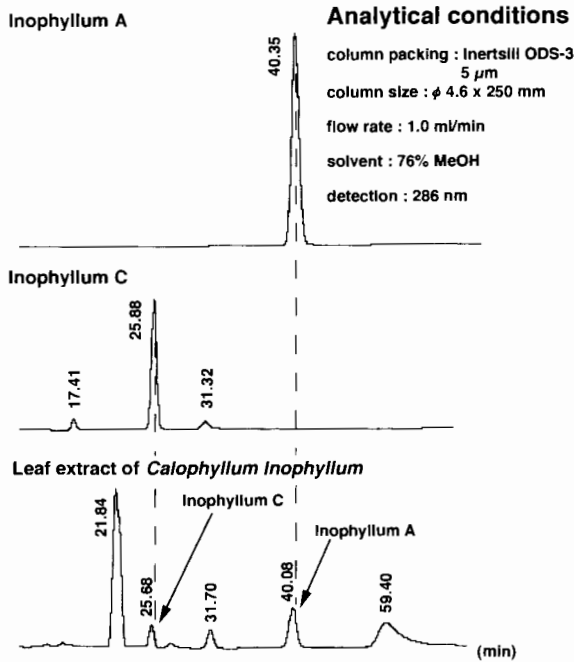


Fig. 2 HPLC traces of the leaf extract of *C. inophyllum* and authentic samples.

他の inophyllum 化合物の HPLC 上の溶出位置 (保持時間) のマスマスペクトルによる探索

アルコール体の分子量は404であるので、水素付加分子イオン  $m/z$  405のマスマクロマトグラム (Fig. 3) を、葉の抽出物について測定したところ  $t_R$  13.33 min の inophyllum A 以外に11.08 min に顕著なピークが観測されたので、そのマスマスペクトルを取り出したところ、inophyllum A と類似のスペクトルであった。したがって、アルコール体である inophyllum B, D, P のうちのいずれかである。また、ケトン体の分子量は402であるので、水素付加分子イオン  $m/z$  403のマスマクロマトグラム (Fig. 4) を、葉の抽出物について測定したところ、 $t_R$  9.92 min の inophyllum C の少し前 (8.92 min) に、大きいピークが観測され、そのマスマスペクトルは、inophyllum C と同様のスペクトルを示したので、inophyllum C の異性体である inophyllum E と推定した。

以上の結果から、*C. inophyllum* の葉の抽出物の HPLC における  $t_R$  21.84 min のピークが inophyllum E, 25.68 min のピークが inophyllum C, 31.70 min のピークが inophyllum B, D, P のうちのいずれか、40.08 min のピークが inophyllum A であることが明らかとなった。4つのピークは完全に分離してい

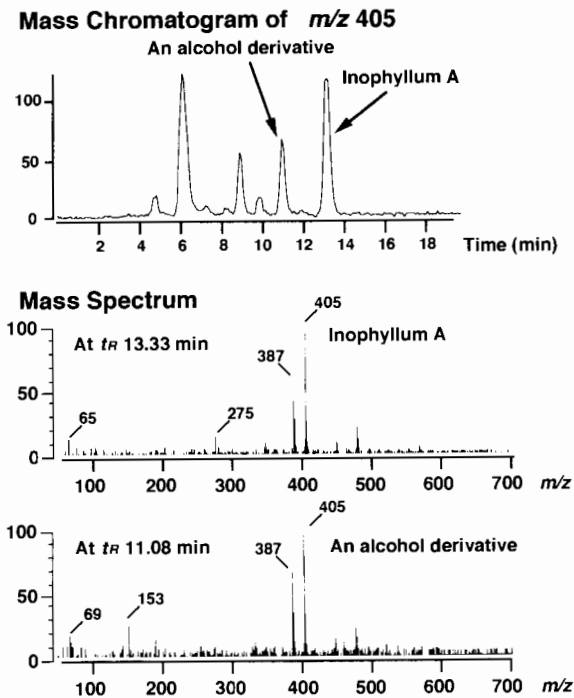


Fig. 3 Mass chromatogram of  $m/z$  405 of the leaf extract and mass spectra of prominent peaks.

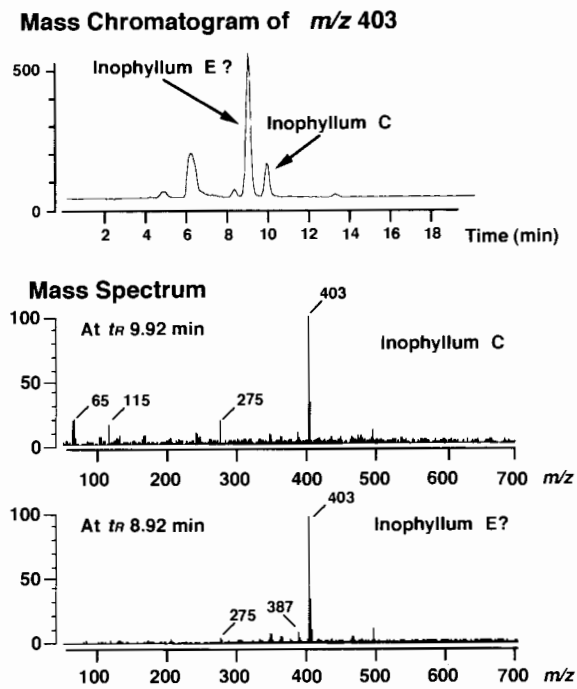


Fig. 4 Mass chromatogram of  $m/z$  403 of the leaf extract and mass spectra of prominent peaks.

るので、分析条件が確立できたと考えてよい。

#### Inophyllum 化合物の定量

分離条件が確立できたので、定量を試みた。検量線はアルコール体の標品として inophyllum A を、ケトン体の標品として C を用いて作成した。Inophyllum A, C の標品の、数種類の濃度のメタノール溶液を調製し、HPLC に供し、ピーク面積を測定した。分析は2度ずつ行い、縦軸にピーク面積を、横軸に試料注入量を取り、それぞれの検量線を作成した。葉の抽出物を1.9mgずつ2回注入して、ピーク面積から葉中の inophyllum 化合物含有量を求めた結果、新鮮葉キログラム当たり、inophyllum A, 1アルコール体, C, E の含量は、それぞれ120mg, 46mg, 28mg, 270mgであった。1アルコール体, E の含量は、それぞれ A, C 換算量である。以上により、HPLC を用いて、葉に含まれる inophyllum 化合物の定量法を確立できた。今後この定量法を用いて、細胞培養による inophyllum 化合物の生産条件の検討を行うことが可能になった。

#### 要 約

最近、抗 HIV 活性化化合物として注目されている *Calophyllum inophyllum* の葉の成分、inophyllum 化合物を細胞培養で生産するためには、培養条件検討時に用いる当該成分の迅速かつ正確な分析法が必

要である。本研究では、著者らの一人が以前に単離した inophyllum 化合物の標品を用いて、HPLC による分離定性定量分析条件を確立した。また、LCMS を用いれば、標品のない inophyllum 化合物の HPLC 上の溶出位置を決定できることを示した。

#### 謝 辞

LCMS の測定は、本農学部質量分析計によって行われた。実験に協力してくださった学部学生中越聡子嬢に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Patil, A. D., A. J. Freyer, D. S. Eggleston, R. C. Haltiwanger, M. F. Bean, P. B. Taylor, M. J. Caranfa, A. L. Been, H. R. Bartus, R. K. Johnson, R. P. Hertzberg and J. W. Westley : The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J. Med. Chem.*, **36**, 4131-4138 (1993)
- 2) Kawazu, K., H. Ohigashi and T. Mitsui : The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn. *Tet. Lett.*, 2383-2385 (1968)
- 3) Kawazu, K., H. Ohigashi, N. Takahashi and T. Mitsui : Piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum*. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **50**, 160-167 (1972)