

Original

喜樹中のカンプトテシン及びその類縁物質の高沸点溶媒を使用した抽出法並びにモノリスカラムによる迅速HPLC分析法

中沢真子、簗野 博、長岡正人、相山律男*

Extraction Method with High Boiling Solvent for Camptothecin and Its Analogues in *Camptotheca acuminata*, and Rapid HPLC Analysis with Monolithic Column.

Masako Nakazawa, Hiroshi Hatano, Masato Nagaoka and Ritsuo Aiyama

Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi-shi, Tokyo, 186-8650, Japan

Received April 3, 2003. Revised manuscript received May 7, 2003. Accepted May 9, 2003

Abstract

For determining camptothecin and its analogues in several parts of a Chinese tree, *Camptotheca acuminata*, a small-scale extraction method with a high boiling solvent such as 2-methoxyethanol and a high throughput analysis using a monolithic column were developed. A number of plant samples were simultaneously extracted in a small scale and the contents of the constituents in the extracts were measured within 4 min by this HPLC method.

Keywords: camptothecin, HPLC, monolithic column, 2-methoxyethanol, extraction

【緒言】

中国原産の喜樹 (*Camptotheca acuminata* DECNE.) などから単離・抽出されたカンプトテシン (CPT) は高い抗腫瘍活性を示すアルカロイドである。[1] 1970年代に米国国立がん研究所により癌化学療法剤として開発が試みられたが、重篤な副作用のため断念された。[2] その後、誘導体の合成研究が進められ、副作用の軽減された水溶性誘導体である塩酸イリノテカンが見出された。[3] 塩酸イリノテカンは、I型DNAトポイソメラーゼを阻害する事によってDNA合成を阻害する癌化学療法剤として現在広く知られている。[4]

喜樹に含まれるCPTとその類縁物質として主なものには10-Hydroxycamptotecin (OPT)、10-Methoxycamptothecin

(10 MCP) [5]、20-Deoxycamptothecin (20 DOC) [6] などがある。

これらの物質の樹齢や樹木の各部位における含量変動、また季節変動等を検討するにあたり、多検体の同時抽出処理法および短時間分析法が必要となった。従来、喜樹中のCPT含量の定量ではメタノール還流による抽出が最も効率がよいとされてきたが、還流抽出操作の繰り返しは煩雑であり、多検体の抽出には適さない。そこで、より簡単に多くの検体を抽出処理する方法について検討を行った。また、多検体を分析するためにはHPLCによる短時間分析法も同時に必要であるため、迅速分析法について検討を行った。

〒186-8650 東京都国立市谷保1796番地 ヤクルト本社中央研究所
TEL: 042-577-8970, FAX: 042-577-3020

*E-mail: ritsuo-aiyama@yakult.co.jp

【材料と方法】

装置

HPLC分析は、Waters社製ミレニウムを解析装置としたWaters社製液体クロマトグラフ装置2690セパレーションモジュール（アライアンス）を使用した。

ドライバスはScinics社製のAL-250型に直径17 mm、深さ5 cmの穴を40個あけたアルミニウム製ブロックを入れて用いた。

小型超高速粉碎機は大阪ケミカル株式会社製のワンダーブレンダーWB-1（電気容量：700 W、回転数：25000回転、容量：150 mL）及びワンダークラッシュミルWDL-1（電気容量：1000 W、回転数：25000回転、容量：200 mL）を使用した。

超音波洗浄器はEYELA製のMUS-20（発振出力：250 W、周波数：38 KHz、槽容量：約12 L）を使用した。

HPLCカラムは以下のものを使用した。Mightysil RP 18 GP（5 μ m；4.6×250 mm、5 μ m；4.6×150 mm、3 μ m；4.6×75 mm、3 μ m；4.6×50 mm、3 μ m；4.6×30 mm）、Develosil C 30-UG-3（3 μ m；4.6×50 mm）、Xterra RP 18（3 μ m；4.6×50 mm）、Symmetry C 18（3 μ m；4.6×50 mm）、Chromolith Performance RP-18 e（4.6×100 mm）

試験管はガラス製ディスポーザブルの16×125 mmサイズを使用した。

試薬と材料

ジメチルスルホキシド（和光純薬特級、和光純薬生化学用、関東化学分光分析用、関東化学特級）、2-メトキシエタノール（純正化学特級）、メタノール（和光純薬特級）、エタノール（和光純薬特級）、エチレングリコール（関東化学特級）、2-エトキシエタノール（関東化学特級）、2-ブトキシエタノール（関東化学特級）、2-(2-エトキシエトキシ)エタノール（関東化学特級）、2-(2-メトキシエトキシ)エタノール（関東化学特級）、炭酸プロピレン（関東化学特級）、HPLC用アセトニトリルおよびメタノール（関東化学）を使用した。

喜樹はヤクルト本社所有の静岡県産の栽培地より樹齢20年高さ約15 mの木を採取した。幹については地上部から約2 mごとに7箇所サンプリングし、下から順に1～7の番号をつけた。枝については、1本の枝から3箇所サンプリングし、幹に近いほうから順に1～3の番号を付けた。根は4箇所サンプリングし、地上に近い方から順に1～4の番号を付け、更に皮の部分と木部の部分に分けた。その他、葉、果実、果実の柄をサンプリングした。これらの各部位について十分に乾燥させた後、粉碎機で微粉碎した。

溶解度測定法

各溶媒におけるCPTの溶解度は以下の方法で測定した。

測定方法

- ① 約2～3 mgを量り、溶媒を5 mL加え室温平衡法で行った。
- ② 得られた液を遠心分離し上清の2 μ LをHPLCで分析した。
- ③ ただし、ジメチルスルホキシドの場合はCPTの秤量を約20 mgとし、注入量は1 μ Lで分析した。

メタノールによる加熱還流法

500 mLのメタノールに5 gのサンプルを加え、約2時間の加熱還流を3回繰り返した後ろ過処理を行う。ろ液を合わせた後、減圧下濃縮乾固し、これを一定量のジメチルスルホキシドに溶かしてHPLC用サンプルとした。

HPLC測定条件

CPT及びその類縁物質は以下のHPLC条件で分析した。カラムはMightysil RP 18 GP（5 μ m；4.6×250 mm）を25℃で用いた。移動相は、メタノール、アセトニトリル、及び50 mmol/LのKH₂PO₄を容量比35：15：50で混液とし、流速を1.2 mL/minとした。クロマトグラムの測定は検出波長254 nmで行った。HPLCによる分析1サイクルを45分間とした。

迅速HPLC法は以下の条件で行った。カラムはChromolith Performance RP-18 e（4.6×100 mm）を30℃で用いた。移動相は、メタノール、アセトニトリル、及び50 mmol/LのKH₂PO₄を容量比5：15：80で混液としたものを1液とし、5：40：55で混和したものを2液として、2液の割合を0～100%まで4分間で変化させるリニアグラジェントとした。流量は6.0 mL/minから4分間で7.0 mL/minの流量グラジェントで行った。クロマトグラムの測定は検出波長254 nmで行った。HPLCによる分析を4分間とし、続いて初期状態への洗浄は1液を用いて1分間行い、都合5分間を分析1サイクルとした。

【結果と考察】

1. 抽出方法の検討

① 溶媒の選択

一般的に植物からの抽出には、溶媒にメタノールを使用するため加熱還流装置が必要である。また、正しい値を得るためには数回の繰返し抽出操作が必要であるため、1日に抽出できるサンプル数は数検体に限られる。そこで、より多くの検体を同時に抽出できる方法の確立を目的として以下の検討を行った。

サンプルは抽出効率を上げ、かつ小容量化を図るため、粉碎ミルで微粉碎した。抽出溶媒は、煩雑な還流装置を使用せずに加熱抽出するために高沸点溶媒の使用を試みた。以下に検討を試みた高沸点溶媒とその沸点を示した。エチレングリコール（198℃）、2-メトキシエタノール（125℃）、2-エトキシエタノール（135℃）、2-ブトキシエタノール（170℃）、

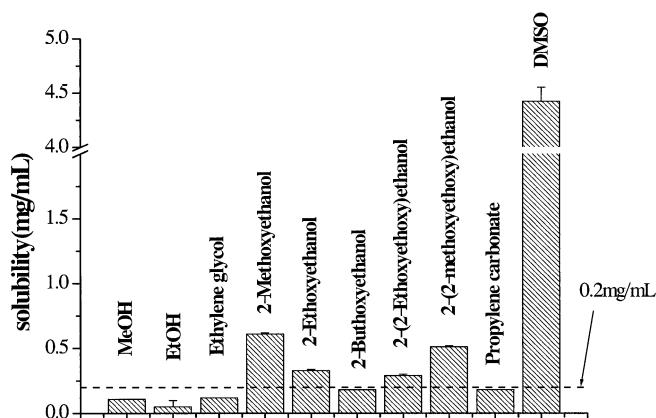


Figure 1. Solubility of CPT in high boiling solvents

2-(2-エトキシエトキシ)エタノール (196°C)、2-(2-メトキシエトキシ)エタノール (193°C)、炭酸プロピレン (241°C)、ジメチルスルホキシド (DMSO; 189°C)。

CPTは各種溶媒に非常に溶けにくい性質を持つため、抽出する際にはその溶解度が重要な因子となる。従って、上記の溶媒における溶解度を測定した。結果をFigure 1に示す。この結果から、全ての溶媒がメタノールやエタノールよりも高い溶解度を示した。CPTは波長254 nm付近に吸収の極大を示し、この波長によるクロマトグラム上でCPTピークの高さが約0.8 AUとなる試料濃度は、0.2 mg/mL (10 μ L注入時)である。この濃度が試料溶液の最大濃度と考えられ、この濃度を明らかに超える溶媒は、5種類であった。この中で最も高い溶解度を示した溶媒はDMSOの4.4 mg/mLであり、続いて2-メトキシエタノールの0.6 mg/mLであった。そこで、これらを抽出溶媒の候補とし、以下の試験を行った。

抽出したサンプルはHPLCで分析するため、抽出溶媒由来

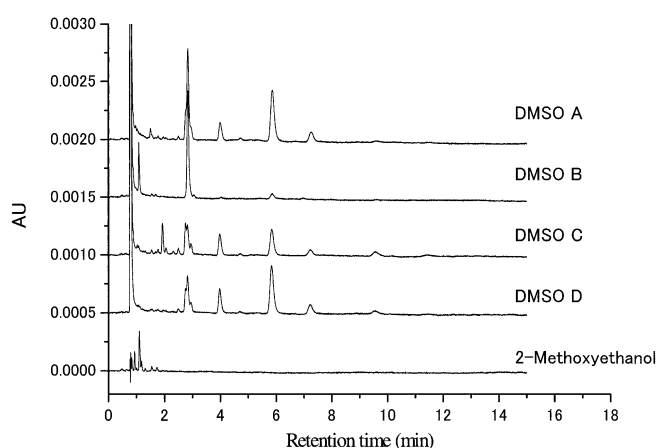


Figure 2. Result of solvent tests

HPLC conditions: column, Mightysil RP 18 GP, 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm; flow rate: 1.0 mL/min; eluent, 50 mM potassium phosphate- methanol-acetonitrile (50:35:15, v/v); detection, 254 nm; temperature, 25°C.

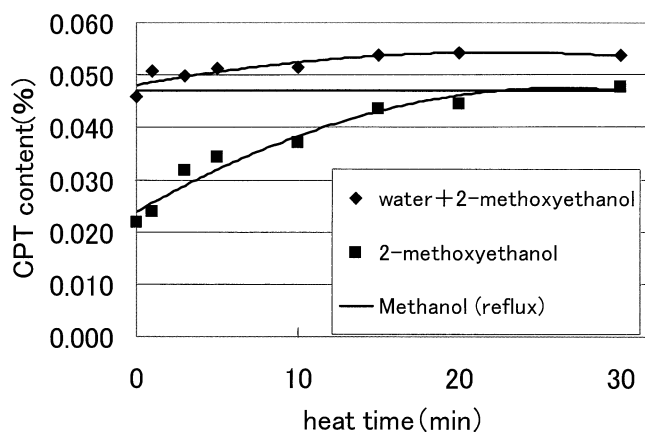


Figure 3. Relationship between heating times after ultrasonic treatment and CPT amounts in extracts

の不純物ピークが存在する場合、分析を妨害する可能性がある。そこで、DMSOと2-メトキシエタノールについてHPLCにおける不純物ピークを比較した。DMSOは製造元やグレードを変えても不純物ピークが多く、HPLC溶媒としての使用に適さないと考えられた。一方、2-メトキシエタノールは分析に影響を与えるような不純物ピークを検出しなかったため、これを抽出溶媒として選択した (Figure 2)。

② 抽出方法の検討

粉碎したサンプルを試験管にとり、溶媒を加えた後超音波で処理し、その後過熱した。抽出溶媒としては、2-メトキシエタノールのみを加えた場合と、予め水を加えた後2-メトキシエタノールを加えた場合とで比較した。結果をFigure 3に示す。2-メトキシエタノールのみを加えた場合では、超音波処理により植物の乾燥重量あたり0.020%のCPTが抽出され、その後の加熱で0.045%まで抽出された。これは、メタノール還流法とほぼ同程度の値であった。一方、加水したサンプルでは超音波処理のみでも0.045%を超え、加熱により最終的に0.055%という値が得られた。このように抽出効率が改善された理由としては、メタノール抽出では還流操作の繰返しによる回収率の損失があること、また水による膨潤と2-メトキシエタノールによる溶解度の向上が考えられた。

これらの検討の結果、抽出方法を以下のように決定した。

- a. 粉碎した喜樹の0.5 gを試験管に秤量する。
- b. 水1 mLを正確に添加する。
- c. 攪拌の後30分間放置する。
- d. 2-メトキシエタノール4 mLを正確に添加する。
- e. 10分間超音波処理する。
- f. ドライバス上80°Cで20分間加熱する。
- g. 遠心分離して上清を得る。

2. 分析方法の検討

喜樹中には、CPTとその類縁物質及び、エラグ酸の誘導

体などがいくつか存在している。これらの成分の定量分析は、汎用型カラムを使用し通常45分かけて実施していた (Figure 4)。しかし、多数の検体を分析する為にはより短時間での分析方法が必要であるため、以下の検討を行った。

上述のカラムと同じ充填剤で、長さを150 mm、75 mmと短くしたカラムによる分析を試みた。その結果、150 mmの

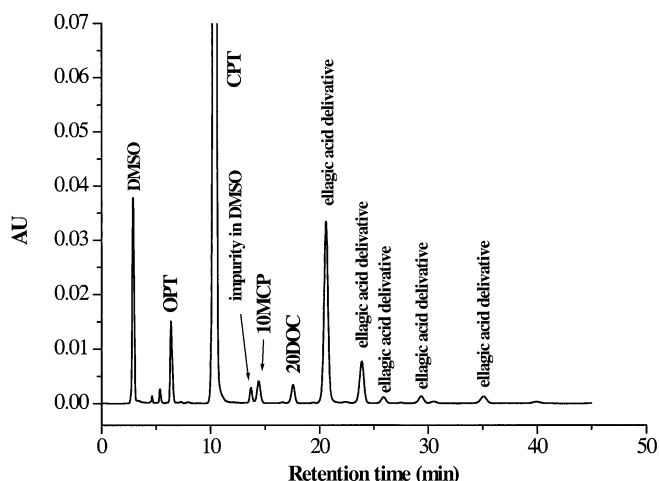


Figure 4. Typical chromatogram of plant extract in the usual manner

HPLC conditions: column, Mightysil RP 18 GP, 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm; flow rate: 1.0mL/min; eluent, 50mM potassium phosphate- methanol-acetonitrile (50:35:15, v/v); detection, 254nm; temperature, 25°C.

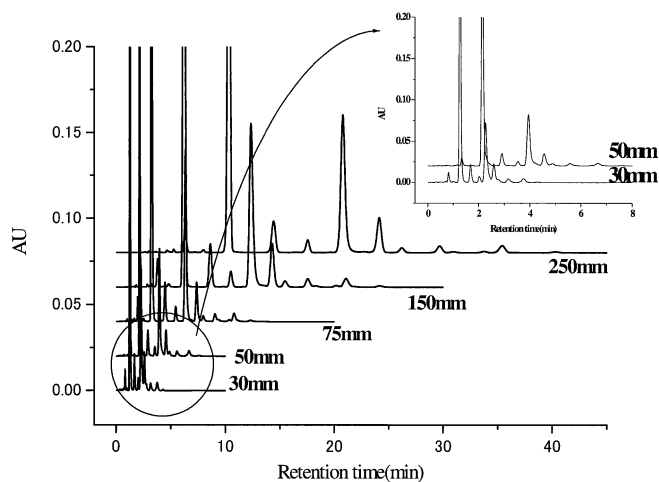


Figure 5. Effect of length of packed columns

HPLC conditions: column, Mightysil RP 18 GP, 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm, Mightysil RP 18 GP, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150mm, Mightysil RP 18 GP, 5 μ m, 4.6 $\times$ 75mm, Mightysil RP 18 GP, 3 μ m, 4.6 $\times$ 50mm, Mightysil RP 18 GP, 3 μ m, 4.6 $\times$ 30 mm; flow rate:1.0mL/min; eluent, 50mM potassium phosphate-methanol-acetonitrile (50:35:15, v/v); detection, 254nm; temperature, 25°C.

長さのカラムでは約25分間に、また75 mmの長さのカラムでは約15分間まで分析時間を短縮できた。更に、同じ充填剤で粒子径を3 μ mと小さくし、長さも50 mm、30 mmと短くしたカラムによる分析を試みた。その結果、50 mmのカラムでは約10分間で分析が可能であった。しかし、30 mmのカラムでは良好な分離が得られなかった (Figure 5)。そこで、50 mmのカラムについてさらに詳細な検討を進めた。各メーカーの50 mmカラムにおける分析結果をFigure 6に示す。これらのクロマトグラムから、最も分離が良いと思われたのはカラムCであり、その分析時間は約8分でであった。このカラムCについて、さらに分析時間の短縮を試みた。流速を1.0

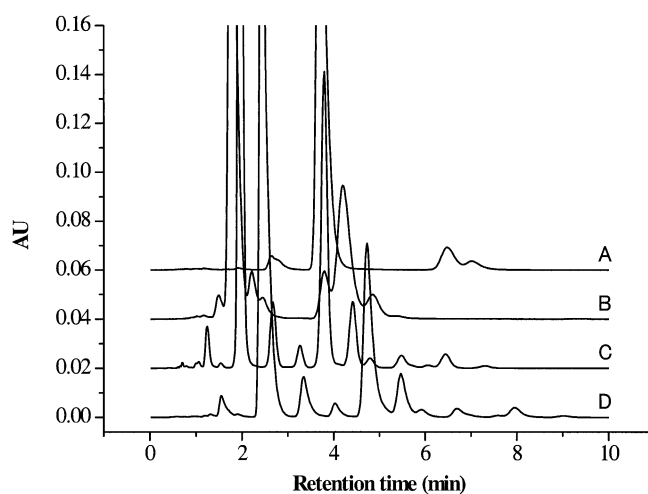


Figure 6. Comparative study with columns by different suppliers

HPLC conditions: flow rate: 1.0mL/min; eluent, 50mM potassium phosphate-methanol-acetonitrile (50:35:15, v/v); detection, 254 nm; temperature, 25°C.

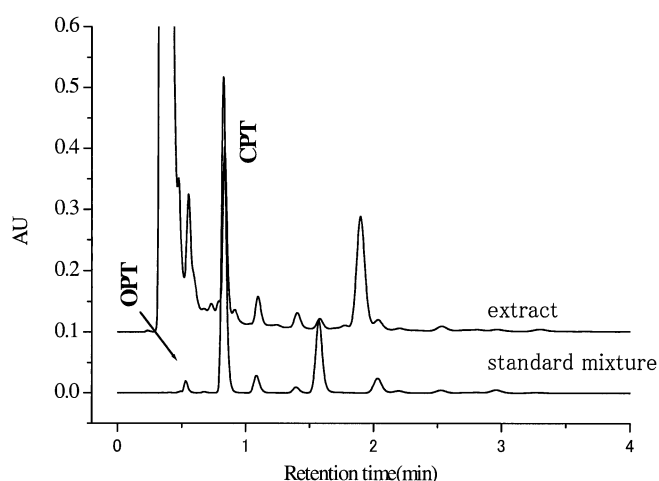


Figure 7. Isocratic chromatogram with a monolithic column

HPLC conditions: column, Chromolith Performance RP-18 e, 4.6 $\times$ 100mm; flow rate: 5.0 mL/min; eluent, 50 mM potassium phosphate-Methanol-acetonitrile (60:20:20, v/v); detection, 254 nm; temperature, 30°C.

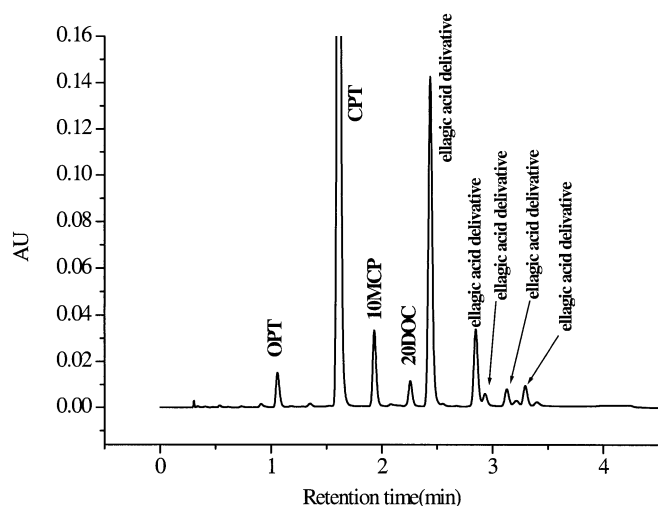


Figure 8. Proposed chromatogram for rapid analysis

HPLC conditions: column, Chromolith Performance RP-18e, 4.6×100mm; flow rate: 6.0~7.0mL/min in 4 minutes; eluent A:50mM potassium-phosphate-acetonitrile-methanol (80:15:5, v/v), eluent B: 50mM potassium phosphate-acetonitrile-methanol (55:40:5, v/v), 0% to 100% B in 4minutes; detection, 254nm; temperature, 30°C.

mL/minから1.5 mL/minに上げたところ、分析時間は約6分に短縮することができたが、各ピーク間の分離度が著しく低下した。従って、これ以上分析時間を短縮することは困難であると判断した。

そこで、従来の粒子充填型のカラムと異なる新規に開発されたモノリスカラム [7] [8] [9] [10] を使用した分析法の検討を試みた。このカラムを使用して、高流速での分析を行ったところ、Figure 7に示したように約4分間でのアイソクラティック分析条件が得られた。しかし、実際の抽出サンプルの中には注入直後に大きなピークが現れることがあり、この条件ではOPTが重なり、検出できないことが明らかになった (Figure 7)。OPTの溶出を遅らせ、かつ短時間での分析が可能となるようにグラジェント法を用いた条件について更に検討した。その結果、メタノール含量を5%に保ち、アセトニトリル含量を15%から40%に増加させるリニアグラジェントに、移動相の流速を6.0 mL/minから7.0 mL/minに上昇させる流量グラジェントを組み合わせることで、分析時間を4分間とするHPLC法を確立した。Figure 8にクロマトグラムを示す。

3. 分析法のバリデーション

OPT、CPT、10 MCPおよび20 DOCのクロマトグラムから判定すると、それぞれの成分ピークはベースライン分離しており、このカラムでの高い分離特異性が得られている (Figure 8 参照)。また各物質を用いた検量線には直線性が

Table 1. Detection and Quantitation Limits

Analyte	Detection Limit (ng/injection)	Quantitation Limit (ng/injection)
OPT	0.49	1.47
CPT	12.28	37.21
10MCP	0.89	2.69
20DOC	0.26	0.79

Table 2. Range for Quantitation

Analyte	Range for Quantitation (ng/injection)		
OPT	1.47	-	91.85
CPT	37.21	-	2788.25
10MCP	2.69	-	197.84
20DOC	0.79	-	69.66

Table 3. Repeatability

Analyte	Repeatability RSD(%)
OPT	0.13
CPT	0.14
10MCP	0.13
20DOC	0.12

あり、それぞれの係数は以下の式で示した。OPT ; $y = 755.10x - 70.93$ ($R = 0.9998$)、CPT ; $y = 780.89x - 3501.48$ ($R = 0.9998$)、10 MCP ; $y = 777.62x - 507.38$ ($R = 0.9998$)、20 DOC ; $y = 788.12x - 267.94$ ($R = 0.9997$)。検出限界及び定量限界は、定量限界付近の低濃度測定点の回帰分析による残渣標準偏差及び回帰直線の傾きから算出した (Table 1)。範囲はTable 2に示した。併行精度は、6回の繰り返し注入の結果から相対標準偏差で示した (Table 3)。真度は回収率として表し、ほぼ100%に近い値が得られた (Table 4)。

4. 喜樹中のCPT及びその類縁物質の測定

この方法を用いて測定した1本の喜樹におけるCPTとその類縁物質の含量測定の結果をTable 5に示した。CPTと10 MCPは根から幹に向かって徐々に含量が減少する傾向にあり、OPTは幹の部分でこれらと違った挙動を示した。枝では、部位による差は認められなかった。果実では果実の柄と分けて分析したところ、果実ではCPT含量は約0.07%であったが、柄の部分では他の成分は同程度であるにもかかわらず、CPTは低い値であった。

Table 4. Accuracy

OPT		CPT		10MCP		20DOC	
Concentration ng/injection	Recovery(%)	Concentration ng/injection	Recovery(%)	Concentration ng/injection	Recovery(%)	Concentration ng/injection	Recovery(%)
91.85	96.94	2788.25	99.87	197.84	99.53	69.66	100.91
73.48	96.45	2230.60	100.55	158.27	99.11	55.73	100.29
55.11	97.27	1672.95	101.61	118.70	99.88	41.80	100.57
36.74	95.42	1115.30	100.26	79.14	97.71	27.86	98.02
18.37	96.03	557.65	101.00	39.57	97.83	13.93	98.22
9.19	97.10	278.82	100.90	19.78	97.69	6.97	98.21
4.59	97.90	139.41	100.12	9.89	95.37	3.48	97.32

Table 5. Contents of CPT and it's analogues in several parts of *Camptotheca acuminata*

Parts		CPT Contents (%)	OPT Contents(%)	10MCP Contents (%)
Root 1 xylem	(Deep)	0.05	0.0001>	0.007
Root 2 xylem	↓	0.05	0.0001>	0.007
Root 3 xylem		0.06	0.0003	0.007
Root 4 xylem	(Barely)	0.07	0.0005	0.010
Root 1 bark	(Deep)	0.04	0.0092	0.007
Root 2 bark	↓	0.07	0.0123	0.015
Root 3 bark		0.09	0.0136	0.016
Root 4 bark	(Barely)	0.12	0.0186	0.019
Trunk 1	(High)	0.09	0.0003	0.016
Trunk 2		0.09	0.0001>	0.013
Trunk 3		0.07	0.0001>	0.011
Trunk 4	↓	0.03	0.0001	0.005
Trunk 5	(Low)	0.02	0.0010	0.002
Trunk 6		0.03	0.0028	0.001
Trunk 7		0.03	0.0039	0.001
Branch 1	(Stem side)	0.03	0.0013	0.004
Branch 2	↓	0.03	0.0014	0.004
Branch 3	(front)	0.03	0.0021	0.005
Leaves		0.05	0.0155	0.009
Stipe		0.01	0.0108	0.005
Fruit		0.07	0.0127	0.015

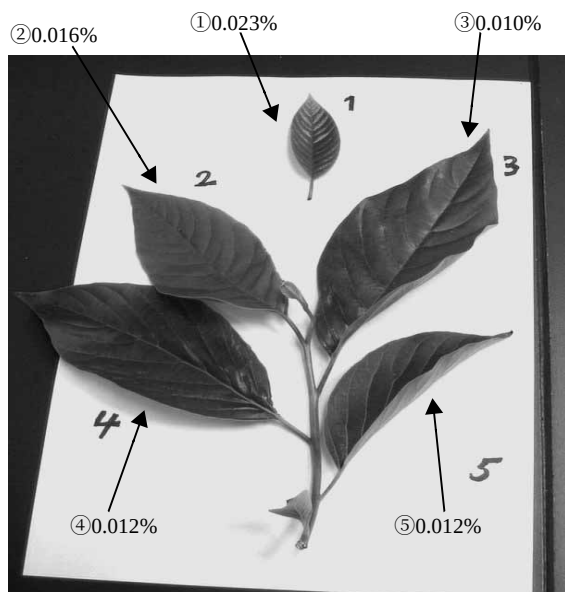


Figure 9. CPT contents in each leaf on the same branch

次に、最もCPT含量が多かった根について、皮と木部に分けて分析した。根の皮の部分にはCPTも多く含まれているが、不純物であるOPTも含まれていた。葉におけるCPT含量は0.05%、OPT含量は0.015%であり、果実の柄におけるCPT含量は0.01%、OPT含量は0.011%であった。これらは他の部位に比較して、CPTの含量に対しOPT含量が多い傾向にあった。

また、Figure 9に示したように、1本の枝についていた5枚の葉で比較すると、最も若い1番の葉に多くのCPTが含まれていた。しかし、Figure 10に示したように1枚の葉においてはCPT含量の差は認められなかった。

5. 結論

喜樹中のCPTとその類縁物質含量を測定するために、多検体同時抽出法ならびにHPLCによる迅速分析法を確立した。

従来行われていた抽出法では、煩雑な加熱還流装置を用いた繰返し操作が必要であり、サンプルは数g必要であった。1日に抽出できる検体数は限られ、多くの検体の抽出には不向きであった。本法では、高沸点溶媒による抽出を行うため、試験管とドライバスによる簡易多検体抽出が可能となり、1日の抽出数が約100検体となった。また、サンプル調製に微粉碎化工程を設けたため、必要なサンプル量は従来の1/10程度で十分となった。

分析法については、一般的な粒子充填型HPLCカラム（内径4.6 mm、長さ25 cm）を用いて、45分かけて測定していたが、モノリスカラムを用い、有機溶媒グラジエントと流速グラジエントの組み合わせによって4分間の分析が可能となった。

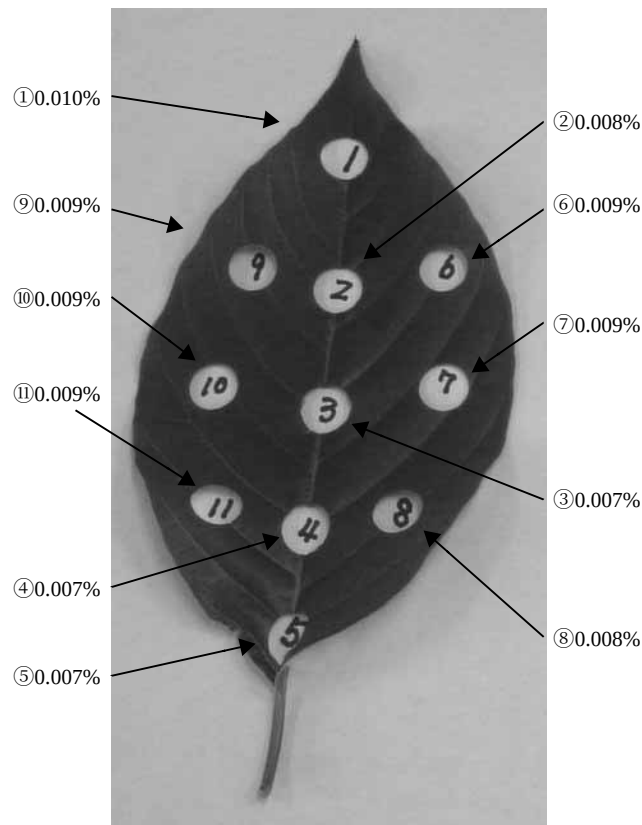


Figure 10. CPT contents in different parts of leaf

【文献】

- [1] M. E. Wall; M. C. Wani; C. E. Cooc; K. H. Palmer; A. T. McPhail; G. A. Sim, J., *Am. Chem. Soc.*, **1966**; 88, 3888
- [2] J.-C. Cai; C. R. Hutchinson, *The Alkaloids*, **1983**, vol. 21, ed. By A. Brossi, Academic Press, new York, p.101.
- [3] S. Sawada; S. Okajima; R. Aiyama; K. Nokata; T. Furuta; T. Yokokura; E. Sugino; K. Yamaguchi; T. Miyasaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39 (6) 1446-1454
- [4] Kjeldsen, E.; Svejstrup, J. Q.; Gromova, I. I.; Alsner, J.; Westergaard, O., *J. Mol. Biol.*, **1992**, 228, 1025-1030.
- [5] Wani, M. C.; Wall, M. E., *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 1364.
- [6] Adamovics, John A.; Cina, Jeff A.; Hutchinson, C. Richard, *Phytochemistry* **1979**, 18 (6), 1085-6.
- [7] K.Cabrera; G. Wieland; K. Nakanishi; N. Soga; H. Minakuchi and K.K. Unger, *Trends in Analytical Chemistry*, **1998**, 17, 50-53.
- [8] K. Nakanishi, *J. Porous Mat.* **1997**, 4, 67-112.
- [9] H. Minakuchi; K.Nakanishi; N. Soga; N. Ishizuka; N. Tanaka, *J. Chromatogr.* **1997**, 762, 135-146.
- [10] H. Minakuchi; K. Nakanishi; N. Soga; N. Ishizuka; N. Tanaka, *J. Chromatogr.* **1998**, 797, 121-131.