

原著論文

スチルベン化合物の異性化とイタドリ (*Polygonum cuspidatum*) に含まれるスチルベン岡田武彦¹・小西祐理花²・石原浩二^{1,2}・益岡典芳^{1,2}*cis-trans* Isomerization of stilbene compounds and their content in *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae)Takehiko OKADA¹, Yurika KONISHI², Kohji ISHIHARA^{1,2} and Noriyoshi MASUOKA^{1,2}

Abstract: The stability of *trans*-stilbene compounds (*trans*-resveratrol and *trans*-piceid) was examined under the fluorescent light. The *cis*-isomer was detected and the content was determined using LC-MS. The results indicated that the isomerization of *trans*-piceid to the *cis*-isomer was more rapid than that of *trans*-resveratrol. Under a dark condition, roots and leaves of *Polygonum cuspidatum* were extracted with methanol and water (1:1), and then the contents of the extract were analyzed. *trans*-Resveratrol and *trans*-piceid were detected from the roots but were not from the leaves. *trans*-Piceid in the roots is thirteen times as much as that of *trans*-resveratrol.

Keywords: *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, stilbene compounds, *cis-trans* isomerization, *Polygonum cuspidatum*

I. 緒言

イタドリ(虎杖, *Polygonum cuspidatum*)はタデ科の多年生植物で, 新芽は食用として利用される. その名前は「痛取り」から由来しており, 多少ながらの止血効果もある. 古くから日本, そして中国では根茎を天日乾燥させた虎杖根が漢方薬として利用されている. 健胃作用, 緩下作用, 利尿作用, 通経作用, 血糖降下作用などが知られている. 種々の疾患(糖尿病, リウマチ, アテローム性動脈硬化, 高脂血症, がん, 水虫など)予防と治療にも使用されてきた(Compile commission of Zhonghua Bencao 1999). また, イタドリは至る所で生育が可能であり, 強い繁殖力を持つために, 北アメリカなど一部の国では悪質な雑草として悪評を得るほどであるが, 様々な有効成分を含むこと, 強い繁殖力から機能性食品の材

料として期待できることも報告されている(Vastano et al. 2000). その根には生理活性成分としてはアントラキノン, スチルベン, フラボノイド, フェノールなど様々な成分が含まれている(Xian et al. 2002, Qian et al. 2006). その中でスチルベン化合物に注目した. スチルベンはフレンチパラドックスで注目された生理活性物質*trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene)とその配糖体(3,5,4'-trihydroxystilbene 3-O-β-D-glucoside, *trans*-piceid)が含まれている(図1). これらの化合物は植物本来の成分ではなく, 植物が生産するフィト

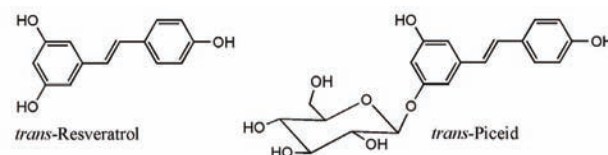


図1. スチルベン化合物

1. 〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1 岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻 Graduate School of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Okayama, 700-0005 Japan

2. 〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1 岡山理科大学理学部臨床生命科学科 Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Okayama, 700-0005 Japan

アレキシンであり(Dixon 2001), フェニルアラニンから生合成される。動物で血小板凝集抑制, 血栓症予防, 動脈硬化予防, 抗腫瘍, 寿命延長効果などが報告され, 寿命延長や生活習慣病予防についてはサーチュリン(sirturins)の活性化を介していると推定されている(Borra et al. 2005, Baur et al. 2006)。

イタドリの種類により, 含まれるスチルベン化合物が異なる(Vastano et al. 2000, Huang et al. 2008)ことから, 本研究では日本産(岡山)イタドリに含まれるスチルベン化合物を, また, 日本ではイタドリの若葉が食用にされる(橋本 2007)ことから, 若葉に含まれるスチルベン化合物について調査することにした。

また, resveratrolはシス-トランス異性化が起こる(図2)ことが報告されている(Iwata et al. 2002)ので, その分析を容易にするため, 先ず異性化反応を検討したのちイタドリの分析を行った。



図2. Resveratrolのシス-トランス異性化

II. 材料と方法

1. 材料

イタドリ葉および根は岡山理科大学(岡山市北区理大町)構内の南斜面で採取した。*trans*-PiceidはLKT Lab. Inc.(米国)から購入し, *trans*-resveratrol(生化学用)およびその他の薬品(特級)は和光純薬工業(日本)から購入した。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)装置はLC-2000 Plus(日本分光製)で逆相カラム(ODS, $\Phi 4.6 \times 150$ mm)を使用した。液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)装置はJMS-T 100CS(日本電子製)で, LCのカラムは逆相カラム(ODS, $\Phi 2.0 \times 75$ mm)を使用した。照度計はEL-1000(LINE SEIKI製)を使用した。

2. シス-トランス異性化反応

trans-Resveratrolおよび*trans*-piceidはメタノールに溶解し(1 mg/mlの濃度), 褐色瓶で冷蔵保存した。この保存液をメタノールで希釈し, ガラス製容器

(30ml)に入れた。照度 1070 ± 30 ルクス(蛍光灯光源32Wで162cmの距離)の光を照射した。光暴露開始18時間後まで2時間おきに3 mlづつを遮光容器に移し, その後LC-MS分析を行った。

3. イタドリからスチルベンの抽出と分析

イタドリの根(50.0g)をミキサーで細かく砕き, 50%メタノール水で3回抽出・減圧濾過を行なった。褐色ナスフラスコに入れ, ロータリーエバポエーターで減圧濃縮を行なった。その結果5.87gのメタノール抽出物が得られた。続いて, メタノール抽出物を水に溶かし, 酢酸エチルで5回分配抽出を行なった。1回目は酸性の酢酸エチル(3%塩酸を含む)で抽出した(Vastano et al. 2000)。酢酸エチル抽出液を褐色のナスフラスコに入れ, ロータリーエバポエーターで減圧濃縮させた。減圧濃縮を繰り返し, 塩酸を完全に除去し, 酢酸エチル抽出物(1.92g)を得た。抽出物は褐色容器に保存し分析した。

イタドリ葉からの抽出も根の場合と同様に行った。イタドリの葉(50.1g)をミキサーで細かく砕き, 50%メタノールで3回抽出・減圧濾過を行なった。根の場合と同様に濃縮すると抽出物(4.21g)が得られた。酢酸エチルで5回分配抽出を行なった。1回目は酸性酢酸エチル(3%塩酸)で抽出した。酢酸エチル抽出物(0.75g)を得た。

III. 結果

1. LC-MSによる*trans*-resveratrolと*trans*-piceidの分析法

trans-Resveratrolと*trans*-piceidの紫外・可視スペクトルを測定した。*trans*-Resveratrol: λ_{\max} 306nm ($\epsilon 2.80 \times 10^4$), *trans*-piceid: λ_{\max} 305nm ($\epsilon 2.92 \times 10^4$)であった。両物質とも306nm付近に吸収極大がみられたので, 306nmでHPLC分析を行った。LC-MSのLC分析条件は次の様に設定した。カラム温度:40°C, 流速:0.2ml/min, 溶媒A:0.5%ギ酸水, 溶媒B:メタノールとし, 40分間で溶媒Bの溶媒比率を0%から100%に直線的に増加させたグラジエント溶出を用いて分析した。MSはエレクトロスプレー負イオン化モー

ド, 検出器電圧は2400Vで測定し, 質量 (m/z) 範囲は50.0~1000.0を記録した. *trans*-Resveratrolのマススペクトルは m/z 227(100%), 228(24), *trans*-piceidは m/z 227(100%), 228(17), 389(21)のピークを示した. m/z 227のマスクロマトグラムで, 標準物質の濃度とピーク強度との関係を調べた. *trans*-Resveratrolは0-20 μ g/mlの濃度範囲でピーク強度面積と良好な直線性(γ 0.9837)を示し, *trans*-piceidは0-200 μ g/mlの濃度範囲でピーク強度面積と良好な直線性(γ 0.9969)を示した.

2. *trans*-Resveratrolと*trans*-piceidのシストランス異性化反応

蛍光灯による光曝露により, *trans*-resveratrolおよび*trans*-piceid溶液で紫外可視スペクトルに変化が起こった(図3). *trans*-Resveratrolおよび*trans*-piceidの306nmの吸収が減少した. どちらの化合物も273nmに等吸収点が見られた.

生成物を調べるために, *trans*-resveratrolと*trans*-piceid溶液を一定時間光曝露した後, それぞれの反応液をLC-MSで分析(20 μ l)した. 2時間ごとに m/z 227でマスクロマトグラムを作成した. 図4aに *trans*-resveratrolを6時間光照射したとき, 図4bに *trans*-piceidを6時間光照射したときのマスクロマトグラムを示す.

光照射前の*trans*-resveratrolの保持時間は22.2分で *trans*-piceidは19.3分であった. 光曝露すると新しいピークが*trans*-化合物の後に溶出された. *trans*-Resveratrolの場合は, 23.1分に, *trans*-piceidの場合は21.3分にピークが見られた. また, 暴露時間の増加に伴い新しいピークの強度が強くなった. 23.1分と21.3分の各ピークのマススペクトルから, それぞれのシス異性体と同定した. *trans*-Resveratrolと*trans*-piceid溶液の光曝露時間と異性体のピーク強度の関係を図5aと図5bに示した.

3. イタドリ中のスチルベン化合物の分析

3-1 イタドリの根の抽出液のHPLC分析(306nm)では, *trans*-piceidのピークしか確認できなかつ

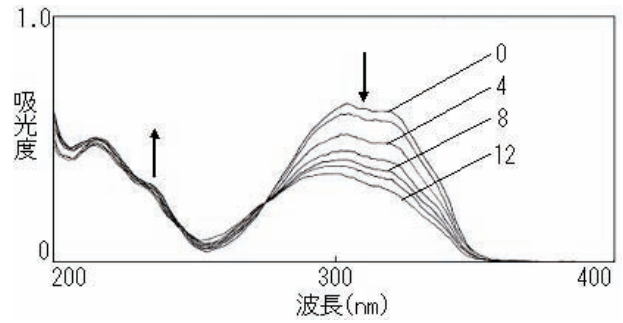


図3. *trans*-Resveratrolの光反応による吸収スペクトルの変化
光曝露によるスペクトル変化. 2時間おきに12時間まで測定した.

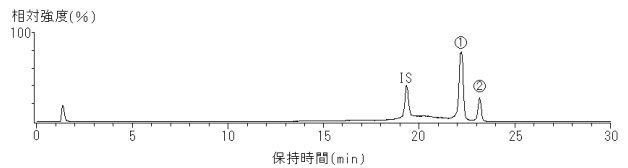


図4 a. 光照射6時間後の*trans*-resveratrolのマスクロマトグラム (m/z 227). 内部標準(IS)は*trans*-piceid, ①:*trans*-resveratrol, ②:*cis*-resveratrol

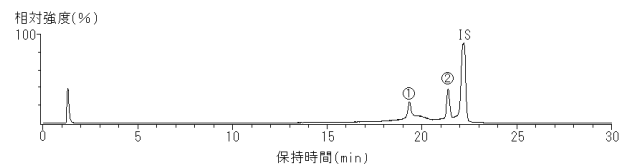


図4 b. 光照射6時間後の*trans*-piceidのマスクロマトグラム (m/z 227). 内部標準(IS)は*trans*-resveratrol, ①:*trans*-piceid, ②:*cis*-piceid

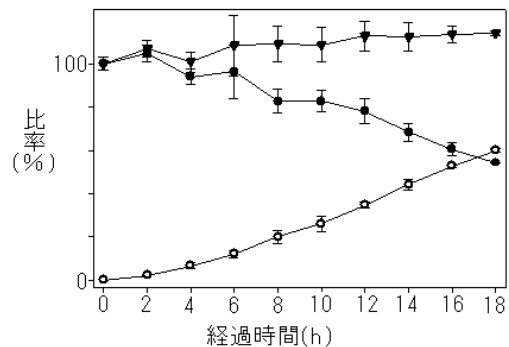


図5 a. *trans*-Resveratrolの異性化. ●:*trans*-Resveratrol, ○:*cis*-resveratrol, ▼:*trans*-resveratrol + *cis*-resveratrol

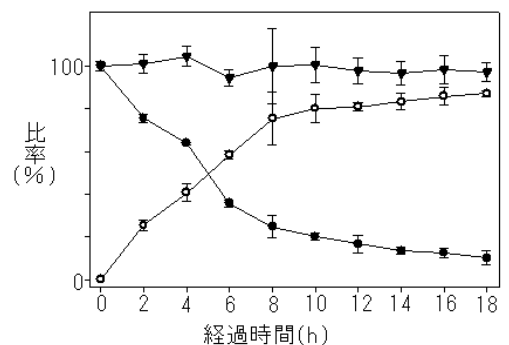


図5 b. *trans*-Piceidの異性化. ●:*trans*-Piceid, ○:*cis*-piceid, ▼:*trans*-piceid + *cis*-piceid

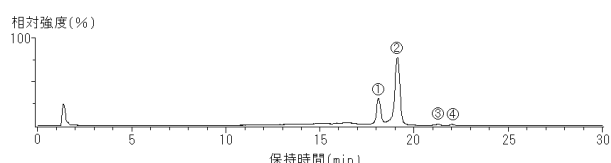


図6. イタドリ根の m/z 227のマスククロマトグラム. ①:Resveratrolside, ②:*trans*-piceid, ③:*cis*-piceid, ④:*trans*-resveratrol

た. LC-MSで分析を行なった(図6). マスククロマトグラム(m/z 227)では18.1分, 19.1分, 21.3分, 22.2分の位置にピークが見られたので, それぞれのピークのマススペクトルを分析した. 18.1分のピークは*trans*-piceidより前に溶出されること, マススペクトルは m/z 227(100%), 228(5), 385(5)で, m/z 385がM-1ピークと推定すると, Vastano等の報告(2000)しているpiceidの異性体, resveratrolside (3,5,4'-trihydroxystilbene 4'-O- β -D-glucoside)の性質とよく一致していた. 一方, 19.1分のピークは*trans*-piceidの標準物質と保持時間が一致し, 同一のマススペクトル(m/z 227, 389)が見られることから, *trans*-piceidと同定した. 同様に21.3分のピークは*cis*-piceid, 22.2分は*trans*-resveratrolであると同定した. 根にはresveratrolおよび多量のpiceidなどの配糖体が含まれていた.

3-2 イタドリ葉の抽出液のHPLC分析(306nm)では, resveratrolとpiceidのピークは確認できなかった. LC-MSを使った m/z 227のマスククロマトグラムで, 19.3分, 21.2分に小さいピークがみられた(データは表示していない). それぞれのマススペクトルでは m/z 227のピークは小さく(ベースピークの3%), 19.3分のピークのMSは m/z 300(100%), 301(82), 463(64), 609(15)で, 21.2分のピークのMSは m/z 300(100%), 301(86), 463(72), 609(12)で, スペクトルは酷似していた. 各質量数から考えると, これはフラボノイド類, rutin(querctin-3-rutinoside, $C_{27}H_{30}O_{16}$)の分子量610, isoquerctin(querctin-3-glucoside, $C_{21}H_{20}O_{12}$)分子量464, querctin($C_{15}H_{10}O_7$)分子量302に相当していた. イタドリの葉の抽出液ではresveratrolとpiceidの両物質は含まれていても極めて微量にしか含まれていな

表1. イタドリ(葉もしくは根)1g当たりのスチルベン化合物の含有量.

イタドリ	<i>trans</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>cis</i> -Resveratrol* (mg/g)	<i>trans</i> -Piceid (mg/g)	<i>cis</i> -Piceid* (mg/g)
葉	<0.04**	<0.04**	<0.001**	<0.001**
根	0.36 \pm 0.05	<0.003**	4.92 \pm 0.50	0.09 \pm 0.02

**cis*-化合物は*trans*-体として定量した. ** 定量下限 (S/N = 3).

いと推定された. 各スチルベン化合物の濃度の含有量を表1にまとめた.

IV. 考察

trans-Resveratrol, *trans*-piceidは蛍光灯曝露で*cis*-resveratrolおよび*cis*-piceidが生じることが明らかになった. *trans*-Resveratrol, *trans*-piceid量は曝露時間とともに減少して, *cis*-resveratrolおよび, *cis*-piceidが増加する. 配糖体に比べて, アグリコンの異性化の速度は1/3であることが分かった. また, 蛍光灯曝露下では*cis*-異性体の安定性が高いことが示された.

イタドリの根および葉に含まれるスチルベン化合物を調べるため, 遮光条件下にresveratrolを抽出してLC-MSで分析した. イタドリの根では, 多量の配糖体(*trans*-piceid, resveratrolside)がみられた. その*trans*-piceid量は*trans*-resveratrol量の13倍であった. また, イタドリの根部に*cis*-piceidがほとんど見られないことから, resveratrolはイタドリの根部に*trans*-resveratrolおよび*trans*-piceidの型で存在することが示された. また, 葉にはresveratrolおよびpiceidがほとんど存在しないこと及びresveratrolが光により異性化することより, 葉にフィトアレキシンとして必要な*trans*-resveratrolは根に存在する*trans*-resveratrolおよびその配糖体から必要に応じて供給されることが示唆された.

引用文献

- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342.
- Borra, M. T., Smith, B. C. and Denu, J. M. (2005). Mecha-

- nism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* 280: 17187-17195.
- Compile commission of Zhonghua Bencao (1999). The compile commission of Zhonghua Bencao of the state administration of traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. "Zhonghua Bencao" Vol II, 653-658pp. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai.
- Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- 橋本郁三 (2007). 食べられる野生植物大辞典. 147-149pp. 柏書房
- Huang, W-Y., Cai, Y-Z., Xing, J., Corke, H. and Sun, M. (2008). Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. *Planta Med.* 74: 43-49.
- Iwata, K., Ogawa, R. and Hamaguchi, H. (2002). Analysis of the solvent- and temperature-dependent raman spectral changes of S1 trans-stilbene and the mechanism of the trans to cis isomerization: dynamic polarization model of vibrational dephasing and the C=C double-bond rotation. *J. Phys. Chem. A* 106: 3614-3620.
- Qian, G., Leung, S-Y., Lu, G-H. and Leung, K. S-Y. (2006). Differentiation of *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* from closely related herbs by HPLC fingerprinting. *Chem. Pharm. Bull.* 53: 1179-1186.
- Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C-T., Zhou, Z. and Rosen, R. T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 253-256.
- Xian, K., Xuan, L., Xu, Y., Bai, D. and Zhong, D. (2002). Constituents from *Polygonum cuspidatum*. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 605-608.

(2009年8月20日受理)