

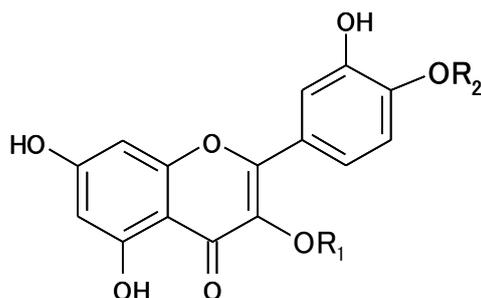
2. 生体内吸収成分の分析技術

1) 血漿中ケルセチン代謝物の分析

(独) 農研機構 野菜茶業研究所 東 敬子

はじめに

ケルセチンは野菜に存在する最も一般的なフラボノイドであり、果物や茶にも広く分布している。ケルセチンを多く含む野菜としてタマネギ、モロヘイヤ、サニーレタスなどがあげられる。フラボノイドは優れた抗酸化物質であり、中でもケルセチンは高い抗酸化活性を持つため動脈硬化やがんの予防効果が期待されている。植物体中では、カテキン類以外のフラボノイドの多くは図 1 のような水酸基上に糖が結合した形、すなわち配糖体として存在しており、糖が結合していない遊離の状態（アグリコン）で存在することは少ない。



- $R_1=H, R_2=H$: ケルセチン(Quercetin)
 $R_1=\beta-D\text{-glucose}, R_2=H$: イソケルシトリン(Isoquercitrin) (Quercetin 3-glucoside)
 $R_1=\alpha-L\text{-rhamnose}, R_2=H$: ケルシトリン(Quercitrin) (Quercetin 3-rhamnoside)
 $R_1=\beta-D\text{-rutinose (Glu-Rham)}, R_2=H$: ルチン(Rutin) (Quercetin 3-rutinoside)
 $R_1=\beta-D\text{-galactose}, R_2=H$: Quercetin 3-galactoside
 $R_1=H, R_2=\beta-D\text{-glucose}$: Quercetin 4'-glucoside
 $R_1=\beta-D\text{-glucose}, R_2=\beta-D\text{-glucose}$: Quercetin 3,4'-diglucoside

図 1 ケルセチンと数種のケルセチン配糖体の構造

ケルセチン配糖体の生体内での吸収に関するこれまでの研究によると、ケルセチン配糖体のうち糖が二つ以上結合した配糖体（例えばルチン）では、主に腸内細菌に由来する加水分解により糖部分が脱離して生じたアグリコンが主に大腸から吸収されることがわかっている。一方、グルコースが一個結合した配糖体は主に小腸で吸収され、その経路として次の二つがあると考えられている。一つは、小腸上皮細胞に存在するナトリウム依存型グルコーストランスポーターを介して選択的に細胞内に取り込まれた後、 β -グルコシダーゼによりアグリコンに加水分解

される経路，もう一つは，取り込まれる前に上皮細胞表面に存在するラクトース加水分解酵素でアグリコンに変換され，疎水性が高まることで受動的に吸収される経路である．いずれにしても，ケルセチン配糖体は吸収に際してアグリコンに変換された後，グルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け，肝臓に運ばれてさらに抱合体化やメチル化を受けることが明らかにされている（図 2¹⁾）．したがって，ケルセチンを含む食品を摂取した後の血漿中には，ケルセチンおよびケルセチンのメチル化体であるイソラムネチンのグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体が存在する．ケルセチン抱合体として Quercetin 3-glucuronide, Quercetin 3'-glucuronide, Quercetin 4'-glucuronide, Quercetin 3'-sulfate, Quercetin 3-sulfate, イソラムネチン抱合体として Isorhamnetin 3-glucuronide などが知られている²⁾．そのため，血漿中のケルセチン代謝物を定量するには，それらの抱合体を加水分解して脱抱合体化し，それにより生成するケルセチンおよびイソラムネチンを HPLC で分析する方法が一般に用いられている．

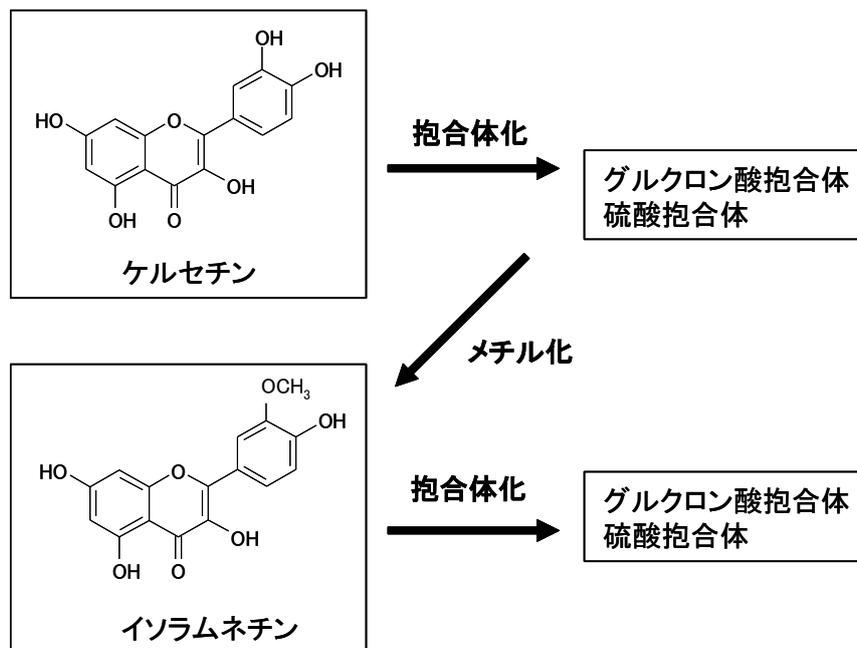


図 2 ケルセチンの代謝変換経路¹⁾

準備するもの

1. 実験器具・機器

- ・ 振とう恒温水槽
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 超小型卓上遠心機
- ・ 冷却遠心機

- ・超音波洗浄器
- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置: 送液ポンプ (1 台), カラムオーブン, オートサンプラーを使用する場合は冷却機能のあるもの, 電気化学検出器 (クーロケム II (esa 社) など)
- ・HPLC カラム: TSK gel ODS-80Ts (東ソー), CAPCELL PAK C₁₈MG (資生堂) などの ODS カラム (4.6mm×150mm)
- ・マイクロピペットおよびチップ
- ・1.5ml プラスチック遠沈管

2. 試薬

1) 脱抱合体化処理および抽出用試薬

- ・サルファターゼ/β-グルクロニダーゼ
Sulfatase Type H-1 from *Helix pomatia* あるいは β-Glucuronidase Type H-5 from *Helix pomatia* (いずれも Sigma) が利用できる.
- ・0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0)
0.1M 酢酸ナトリウムを 0.1M 酢酸で pH5.0 に調整する. 冷蔵保存.
- ・メタノール/酢酸 (100:5, v/v) 混液

2) HPLC 分析用試薬

- ・メタノール (HPLC 用)
- ・アセトニトリル (HPLC 用)
- ・超純水
- ・酢酸 (特級)
- ・酢酸リチウム二水和物 (特級)
- ・ケルセチン二水和物 (HPLC 用, Sigma)
- ・イソラムネチン (HPLC 用, EXTRASYNTHESE)

プロトコール

1. 脱抱合体化処理および抽出

- 1) 恒温水槽を 37℃に温めておく.
- 2) サルファターゼ/β-グルクロニダーゼをサルファターゼ活性が 25units/40μl になるように 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶かし, 直ちに氷冷する.
- 3) 血漿 20μl を 1.5ml プラスチック遠沈管に取り (1 サンプル 2 連), 2) の酵素溶液 40μl を加え, 試験管ミキサーで軽く混合する.
- 4) 超小型卓上遠心機を用いて 3) の混合液を遠沈管の底に沈めた後, 37℃に保った恒温水槽中で振とうしながら 45 分間反応させる.
- 5) 反応液にメタノール/酢酸 (100:5, v/v) 混液を 340μl 加え, 試験管ミキサー

で 30 秒間激しく攪拌し、さらに 30 秒間の超音波処理を行う。試験管ミキサーによる 30 秒間の攪拌をもう一度繰り返す。

- 6) 5000g, 5 分間, 5℃の条件で遠心分離する。
- 7) 上清の一定量を取り, 同量の超純水を加えてよく混合し, HPLC 分析に供試する。すぐに分析できない場合は-80℃で保存する。

2. HPLC 分析

1) 分析条件

移動相：メタノール／アセトニトリル／水／酢酸 (10:21:67:2, v/v/v/v) を調製した後, 酢酸リチウム二水和物を 50mM の濃度になるように溶解する。

流速：0.9 ml/min

カラム温度：35℃

オートサンプラー温度：5℃

注入量：20 μ l

電気化学検出器クーロケム II：ガードセル電位 850mV, E1 電位 100mV, E2 電位 800mV

2) 検量線の作成

ケルセチン二水和物およびイソラムネチン標品の 1~20 μ M 溶液 (70%メタノールに溶解) を調製して HPLC 分析を行い, ピーク面積値から検量線を作成する。この濃度範囲では直線性がみられる。

プロトコールのポイント, 注意点等

1. 酵素反応時間が 45 分間で十分であるかどうかを血漿試料の一部を用いて事前に確認しておくこと。不適切な場合は生成物濃度が最高に達する最適反応時間を設定する。
2. 酵素反応中のケルセチンおよびイソラムネチンの分解防止のためには, 酵素液に 7.5mM のアスコルビン酸 (終濃度 5mM) を添加しておくことが勧められる。
3. 溶液状態でのケルセチンおよびイソラムネチンの安定性は高くないため, 血漿中のケルセチン代謝物を脱抱合体化後, 直ちに HPLC 分析できない場合は, -80℃で凍結させて保存する。その後, 2 週間以内に分析するのが望ましい。
4. Sulfatase Type H-1 は, 従来用いられてきた Sulfatase Type H-5 (Sigma) (下記文献 3~5 参照, 現在販売中止) の代替品として使用されるようになった。純度は Sulfatase Type H-5 よりも低い。

Sulfatase Type H-5 を用いた実験例として, 6.2%のタマネギ粉末を添加した飼料で 1 日あたりアグリコン量 3.9mg のケルセチン配糖体を 2 週間摂取した

ラットの血漿中ケルセチン代謝物濃度を測定した結果⁵⁾を図 3 に示す。

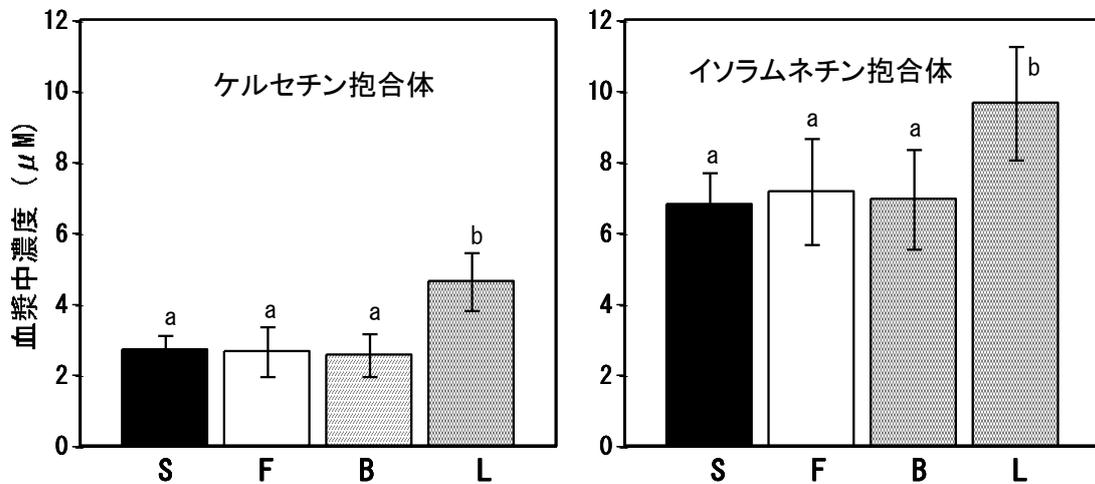


図 3 タマネギと各種脂質を同時摂取したラットの血漿中ケルセチン代謝物濃度
ケルセチンアグリコン量 3.9mg/day のタマネギ粉末、4.6% の脂質を含む
飼料で 2 週間飼育。S: 大豆油、F: 魚油、B: 牛脂、L: 大豆レシチン

参考文献

- 1) 寺尾純二, da Silva, E.N., Piskula, M.K., 山本憲朗, 文斎鶴, フラボノイドの吸収代謝と抗酸化機構, フリーラジカルの臨床, **13**, 85-89 (1998).
- 2) 東敬子, 室田佳恵子, 寺尾純二, 野菜フラボノイドの生体利用性と抗酸化活性, ビタミン, **80**, 403-410 (2006).
- 3) Piskula, M.K. and Terao, J., Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, **128**, 1172-1178 (1998).
- 4) Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Higashio, H. and Terao, J., Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1706-1712 (2002).
- 5) Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Horie, H. and Terao, Enhancing effect of lipids and emulsifiers on the accumulation of quercetin metabolites in blood plasma after the short-term ingestion of onion by rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2548-2555 (2003).