

## 2) ケルセチンの分析

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野  
河合 慶親, 室田 佳恵子

### はじめに

ケルセチンは、野菜や果実、飲料等の植物性食品にひろく含まれている代表的なフラボノイドである。ケルセチンは強い抗酸化性を有し、生体内で抗酸化物質として働くことが期待されている。また、酵素活性阻害や遺伝子発現抑制などにも作用することが報告されており、生体に有益な非栄養素成分として注目されている。

植物中でケルセチンはグルコースやルチンなど種々の糖がフェノール性水酸基に結合した配糖体として存在しており、強い抗酸化活性を発揮するアグリコン（糖が脱離した基本構造）ではほとんど摂取することはない。配糖体のうち、単糖のグルコースが結合したものは SGLT1 を介して腸管細胞へ取り込まれ、細胞質に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼの作用によりアグリコンへ加水分解されるか、小腸粘膜に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼ活性 (LPH) によって加水分解されアグリコンとしてその場で吸収される。腸管細胞は、さらにアグリコンを抱合する第二相酵素（グルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素）を発現しており、これらによって代謝されたケルセチン抱合体が、門脈あるいはリンパを介して体内へと運ばれる。グルコース以外の単糖や二糖類が結合したケルセチン配糖体は、小腸では吸収されることなく盲腸や大腸に存在する腸内細菌の作用により分解され、アグリコンあるいは代謝産物として大腸で吸収される<sup>1)</sup>。

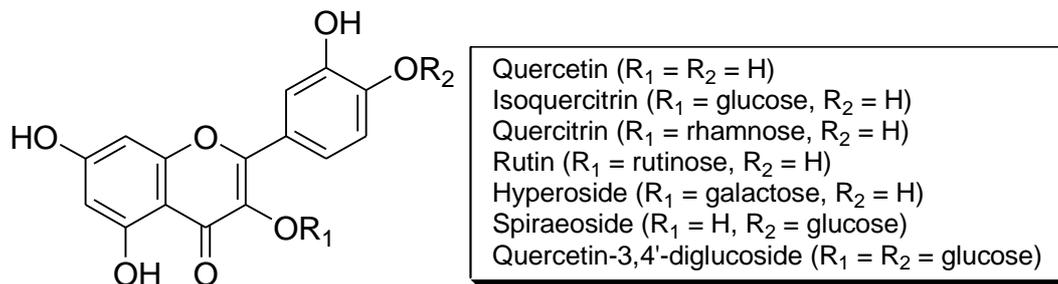


図 1 ケルセチンとケルセチン配糖体の構造

肝臓はケルセチンの腸代謝物をさらに代謝し、メチル化体（イソラムネチン）を含むより複雑な構造の代謝物を産生する。これらの一部は胆汁を介して排泄され、その

残りが循環系を経て、末梢組織へ運ばれ、最終的には尿中へ排泄される。循環血中では、ほとんどのケルセチン代謝物が血清アルブミンと結合（会合）した状態で存在しており、LDL や HDL に含まれているのは全体の数%にすぎない<sup>2)</sup>。

このように、生体内ではケルセチンは代謝物として存在していることから、生体利用性を評価するためには標的部位での代謝物量を定量することが必要になる。本項では、ヒト血漿中に存在するケルセチン代謝物の総量およびリポタンパク画分への分布を評価するための方法と、ラットなど実験動物の各末梢組織に蓄積したケルセチン代謝物の定量法について概説する。既に本シリーズ第Ⅱ集にて、ラット血漿中の総ケルセチン濃度定量法が紹介されている<sup>3)</sup>ので、そちらも参照されたい。

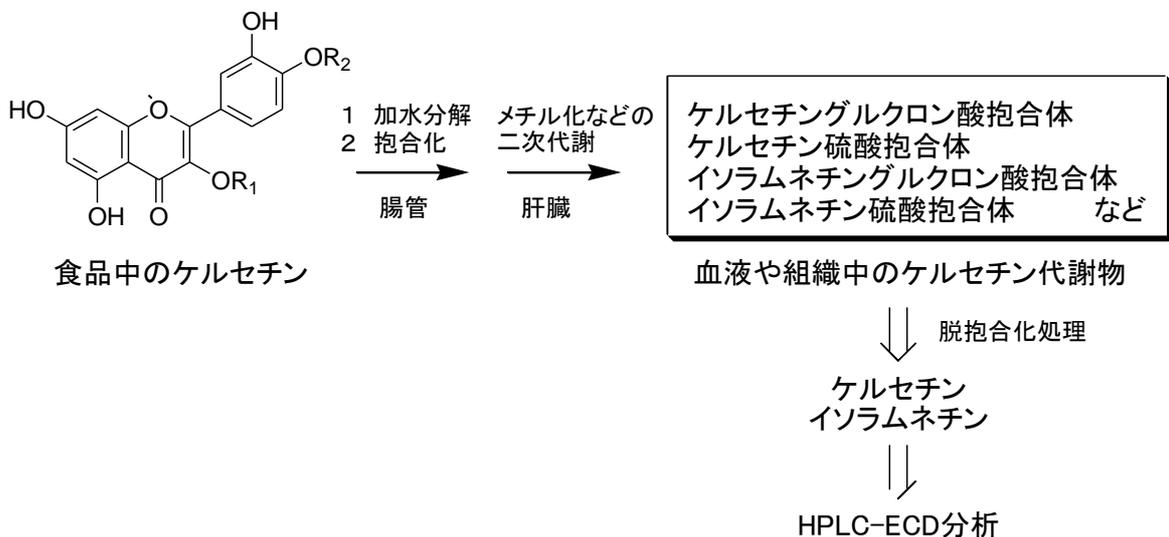


図 2 ケルセチンの代謝変換経路と代謝物の測定方法

## 準備するもの

### 1. 実験器具および装置

- ・ヘパリン採血管（血清を使用する場合は一般的なプラスチック遠沈管でよい）
- ・スクリーキャップ付ガラス試験管
- ・遠心機
- ・超遠心機および付属の遠心チューブ（開放型のアツチューブ使用）
- ・振盪恒温槽
- ・電気化学検出器—HPLC システム

### 2. 試薬

- 1) リポタンパク質の分離，脱抱合処理，および抽出用試薬

- ・ PBS (キレックス処理したもの)
  - ・ 生理食塩水
  - ・ 臭化カリウム
  - ・  $\beta$ -glucuronidase H-5 あるいは sulfatase H-1 (from *Helix pomatia*, いずれも Sigma)
  - ・ 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)
  - ・ 酢酸エチル
- 2) HPLC 分析用試薬
- ・ メタノール (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. ヒト血漿における総ケルセチン濃度の定量およびリポタンパク分布評価
  - 1) ヒト血液をヘパリン処理採血管に入れ、静かに動かしながら十分に攪拌する。得られた血液は採血管のまま 3500rpm, 20 分, 4°C で遠心し、血球を除去する。
  - 2) 採血した血漿に KBr 0.325g/ml plasma を添加し、血漿比重を  $d=1.21$  に調整する。この血漿を泡立てないように静かに容器をふり動かして KBr を溶かす。
  - 3) これに冷生理食塩水 (血漿 : 生理食塩水 = 4 vol : 3 vol) を重層し、超遠心機による密度勾配遠心を行う (max 500,000~600,000g, 40 分, 4°C)。
  - 4) 遠心分離後、得られた画分を上から順にカイロミクロン/VLDL 層 (白濁), 中間層 1 (透明), LDL 層 (黄色) として褐色チューブに分取する。さらにもう一度遠心を行い (max 500,000~600,000g, 6 時間, 4°C), 得られた画分を HDL 層 (黄色), 中間層 2 (透明), リポタンパク除去血漿画分 (濃黄色層) として褐色チューブに分取する。
  - 5) 使用する血漿およびリポタンパク除去画分は 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を用いて 5-10 倍に希釈し、その他の画分は希釈せずに以降の操作に用いる。
  - 6)  $\beta$ -glucuronidase H-5 (あるいは sulfatase H-1) を 50~100U/100 $\mu$ l となるように酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) に溶かし酵素溶液とする。これを各サンプル (標準的な使用量は 100 $\mu$ l) と同容量加え, 37°C で 30 分インキュベートする。  
非抱合体 (アグリコン) のみを検出する場合にはこのステップは省く。必要ならば内部標準としてサンプルに 2.5 $\mu$ M のケンフェロール 10 $\mu$ l (25pmol) をピペ

ッティングしながら加える。

- 7) 酢酸エチルを全量の 2 倍量加えて、30 秒ボルテックスミキサーを用いて十分混合する。これを 13000rpm, 10 分, 4°C で遠心し、上清を新しいチューブに回収する。残った下層に再び酢酸エチルを加えボルテックスミキサーで混合した後、同様に遠心し、上清を合一する。
- 8) 回収した酢酸エチル層を窒素ガスで乾固させ、HPLC 移動相 40 $\mu$ l に溶かし、30 秒ボルテックスミキサーで混ぜ合わせたものを HPLC 分析用試料とする。筆者らの分析例<sup>2)</sup>を項末に示した。

## 2. 動物組織中の総ケルセチン濃度の定量

- 1) 組織 1g に対し 4ml の PBS あるいは生理食塩水を加え組織ホモジネートを調製する。血液中のケルセチンと区別するために、生理食塩水で十分に灌流した組織を用いる。
- 2)  $\beta$ -glucuronidase H-5 (あるいは sulfatase H-1) 溶液を 1000U/ml となるように 0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.0) に溶かし酵素溶液とする。ホモジネートをスクリーキャップ付ガラス試験管に入れ、酵素溶液を等量添加し、よく混合させ 37°C で 2 時間インキュベートする。用いるホモジネート量はサンプルにより異なる (筆者らは 1-2ml としている)。
- 3) 反応後、酢酸エチル 2ml を添加しボルテックスミキサーによって 1 分間激しく攪拌する。遠心分離 (3000rpm, 15 分, 4°C) し、酢酸エチル画分を回収する。残った下層に再び酢酸エチルを加えボルテックスミキサーで混合した後、同様に遠心し、上清を合一する。
- 4) ロータリーエバポレーターあるいは窒素ガスを吹き付けることにより酢酸エチル画分を濃縮乾固させ、分析 HPLC 移動相 200 $\mu$ l に溶解し HPLC 分析に用いる。

## 3. HPLC 分析

### 1) 分析条件

移動相：メタノール/H<sub>2</sub>O/酢酸 = 46/52/2 (v/v/v), 50mM 酢酸リチウム二水和物を含む

流速：1.0ml/min

注入量：20 $\mu$ l

カラム：TSK-gel ODS-80Ts, 4.6 $\times$ 150mm (Tosoh)

電気化学検出器 Amperometric electrochemical detector (TOA) : 800mV

- 2) ケルセチン二水和物およびイソラムネチン標品を 0.05~5 $\mu$ M の範囲に調製して HPLC 分析を行い、ピーク面積から検量線を作成する。

### プロトコルのポイント、注意点等

1. 酵素添加量と反応時間については、これで十分かどうか事前に確認しておくこと。筆者らは各 3 点程度検討し最適条件を決定した。
2. 酵素反応中および操作過程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、最終濃度 5mM となるようにアスコルビン酸を添加したほうが良い場合もある。
3. 酢酸エチル抽出液あるいは乾固した状態で $-80^{\circ}\text{C}$ 保存が可能であるが、数日以内に分析することが望ましい。
4. 酵素由来の不純物がケルセチンあるいはイソラムネチンのピークと重なる場合がある。事前にサンプルを除いた対照分析を行い、サンプルに由来しない不純物ピークを見極めておくことが重要である。
5. 内部標準はケンフェロールの他、ジオスメチン、ミリセチンなどでも代用可能である。

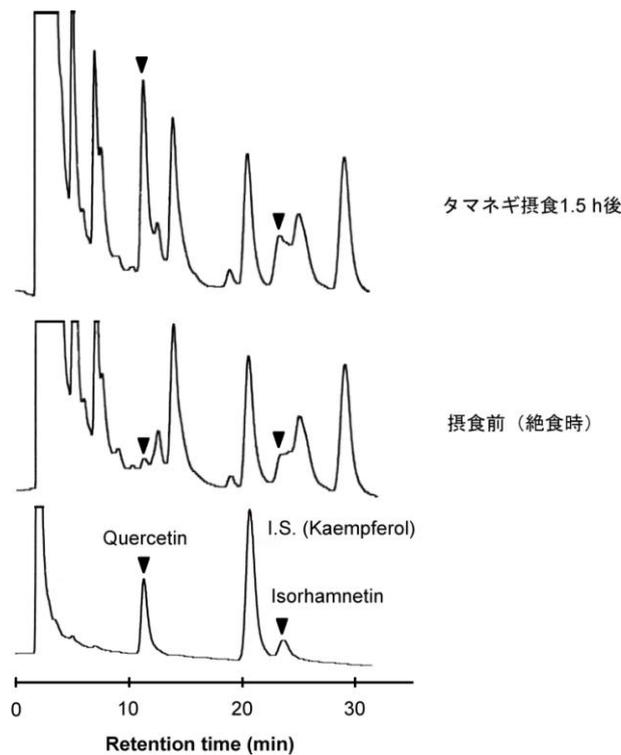


図3 タマネギ摂食前後のヒト血漿中ケルセチンの検出例

ケルセチンアグリコンとして 2mg/kg 体重に相当するタマネギを摂食した前後の血漿を脱抱合処理し、ECD-HPLC にて分析したクロマトグラムを示した。

表 1 ヒト血漿における総ケルセチン濃度とリポタンパクへの分布<sup>2)</sup>

	血漿濃度 ( $\mu\text{M}$ )	カイロミクロン	LDL	HDL	非リポタンパク
		/VLDL			画分
		上段 : pmol/mg protein, 下段 : 血漿中%			
絶食時	0.263 $\pm$	143.7 $\pm$ 90.7	18.8 $\pm$ 12.5	8.74 $\pm$ 4.50	2.97 $\pm$ 1.55
	0.042	(5.08 $\pm$ 0.26)	(3.60 $\pm$ 0.76)	(4.62 $\pm$ 0.93)	(79.7 $\pm$ 1.94)
タマネギ摂 取 90 分後	1.031 $\pm$ 0.180 <sup>a</sup>	149.3 $\pm$ 49.9 (1.36 $\pm$ 0.24)	35.4 $\pm$ 14.2 (2.20 $\pm$ 0.68)	35.7 $\pm$ 14.8 (3.78 $\pm$ 1.32)	13.99 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup> (83.9 $\pm$ 3.25)

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3), <sup>a</sup> p<0.05 (絶食時に対して)

### 参考文献

- 1) Murota, K. and Terao, J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **417**, 12-17 (2003).
- 2) Murota, K., Hotta, A., Ido, H., Kawai, Y., Moon, J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T. and Terao J., Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *J. Med. Invest.*, **54**, 370-374 (2007).
- 3) 東敬子, 血漿中ケルセチン代謝物の分析, 「食品機能性評価マニュアル集」, 第Ⅱ集, 食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編, (日本食品科学工学会, 茨城), pp. 14-18 (2008).