

## ホウ酸を用いたクエルセチンの簡便なケイ光定量法に関する研究

芳野恭士\*、持山由規子、杉山笑美子、小川健二郎

沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

\*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

## Convenient Fluorometric Determination of Quercetin Using Boric Acid

Kyoji YOSHINO, Yukiko MOCHIYAMA, Emiko SUGIYAMA, Kenjiro OGAWA

Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

(Received November 22, 2005; Accepted December 14, 2005)

### Abstract

A fluorometric quantitative method for determining flavonols was developed that uses boric acid to detect the chemical structure  $R - CX - C - CO - C = C - R'$  ( $X=O, OH, OCH_3$ ). The total flavonol levels in the plasma, liver, and kidney of mice administered orally with quercetin were determined by this analytical method. The maximum excitation wavelength of the fluorophore generated in the reaction with the flavonol, i.e. quercetin, and boric acid was 460 nm and the maximum emission wavelength was 506 nm. The calibration curve for quercetin was linear between 5.0  $\mu$ g/mL and 0.50 mg/mL. Recoveries of quercetin from the homogenates of mouse liver and kidney were good, at 80 ~ 90%, however, recovery from the plasma was too high, at around 130%. In the plasma, liver and kidney of mice administered orally with quercetin at doses of 100 and 200 mg/kg body weight, the concentration of total flavonols 60 min after the administrations was dose dependent. These results suggest that this analytical method could evaluate the concentration of total flavonols in the plasma, liver, and kidney of mice administered orally with quercetin, detecting the sum of the concentrations of the original compound and its metabolites retaining the chemical structure  $R - CX - C - CO - C = C - R'$  ( $X=O, OH, OCH_3$ ).

Keywords: Quercetin, Boric acid, Fluorometric analysis, Mouse

### 1. 緒言

植物に普遍的に存在する抗酸化物質として、種々のフェノール化合物が知られている。このうち、高等植物に広く分布し、我々の食事に多く含まれる成分にフラボノイドがあり、代表的な物質として、フラボノールが挙げられる。

フラボノールの一種であるクエルセチンには、

フラボノール構造を持つ茶カテキンと同様、抗酸化作用[1]や抗腫瘍作用[2]のあることが報告されており、多様な保健作用を示す食品素材として注目されている。しかし、これらのフェノール化合物の生物活性については多くの報告がある一方で、動物体内動態が十分に明らかでないために、その作用機序の解明が遅れている。

動物に吸収されたフェノール化合物から生じる代謝物の中で、フェノール構造が失われていないものについては、元の化合物同様の生物活性が期待できる。実際、クエルセチンの代謝物である3'-O-メチル化物とグルクロン酸抱合体には、抗酸化作用のあることが報告されている[3]。従って、フェノール化合物の摂取による生物活性の評価の際には、動物体内に吸収された未変化物だけでなく、その代謝物の効果も合わせて考えることが重要であるが、フェノール化合物の代謝物は多様であるため、それらを個々に定量することは煩雑である。

ところで、フラボノールとホウ酸が反応するとケイ光物質を生じることが知られており、この反応に必要な化学構造は、フラボン骨格中のR - CX - C - CO - C = C - R' (X=O, OH, OCH<sub>3</sub>)であるとされている[4]。本研究では、この反応を利用することにより、クエルセチンを経口投与したマウスを用いて、体内に吸収されたクエルセチンとその代謝物の総量を測定するための、簡便な分析法について検討した。

## 2. 実験

### 2.1 各種ポリフェノールのケイ光誘導体化とそのケイ光スペクトル及びケイ光強度の測定

シグマ社より購入したクエルセチン、クエルシトリン、ミリセチン、ケンフェロール、(-)-エピカテキン及び(-)-エピガロカテキンガレートの0.83 µmol/mLの各脱水アセトン溶液0.1 mLに、飽和ホウ酸脱水アセトン溶液1 mL、0.01% (w/v) 無水クエン酸脱水アセトン溶液1 mL、脱水アセトン0.9 mLを加えて混和した。対照実験には、フェノール化合物の溶液の代わりに同量の脱水アセトンを用いた。反応液について、日本分光社製FP

777型分光ケイ光光度計を用いて、励起極大波長とケイ光極大波長及びその時のケイ光強度を測定した。実験に用いた化合物の化学構造を

Figure 1に示す。

### 2.2 有機溶媒によるフラボノールの抽出効率の測定

クエルセチン及びクエルシトリンについて、0.5 mg/mLの20%(v/v)エタノール溶液を調製し、その0.2 mLにクロロホルム、酢酸エチルまたは*n*-ブタノールの各2 mLを加え、1分間振盪抽出した。溶液を3,000 rpmで10分間遠心分離し、有機溶媒層1 mLを取った。窒素気流下で溶媒を蒸発乾固させ、残渣を脱水アセトン0.1 mLに溶解し、2.1の項と同様の方法で反応を行った。反応液のケイ光強度を励起波長455 nm、ケイ光波長505 nmを用いて測定した。対照実験には、フラボノール溶液の代わりに同量の20%(v/v)エタノールを用いた。抽出溶媒の代わりに同量の脱水アセトンを用いた場合の蛍光強度を100%として、それぞれの抽出溶媒における抽出率を算出した。

### 2.3 クエルセチンの検量線の作成

5.0 µg/mL ~ 1.0 mg/mLのクエルセチン/20%(v/v)エタノール溶液について、抽出溶媒として酢酸エチルを用い、2.2の項と同様に反応及び測定を行うことで、検量線を作成した。

### 2.4 マウス血漿または肝臓及び腎臓ホモジネートからのクエルセチンの添加回収率の測定

日本SLC社より購入した4週令の雄性ddY系マウスから、ジエチルエーテル麻酔下に血漿、肝臓及び腎臓を採取した。肝臓と腎臓は、40 mM リン酸緩衝液(pH7.4)でその10%ホモジネートを調製した。

マウス血漿または肝臓及び腎臓ホモジネートの各0.8 mLに1.25 mg/mLに調製したクエルセチン/20%(v/v)エタノール溶液0.2 mLを加え、37で5分間インキュベートした。この溶液を酢酸エチル2 mLで抽出した後、その有機溶媒層1 mLを取り、溶媒を蒸発乾固させた。残渣に脱水アセトン0.1 mLを加え、2.2の項と同様の方法で反応及び測定を行った。対照実験には、クエルセチン溶

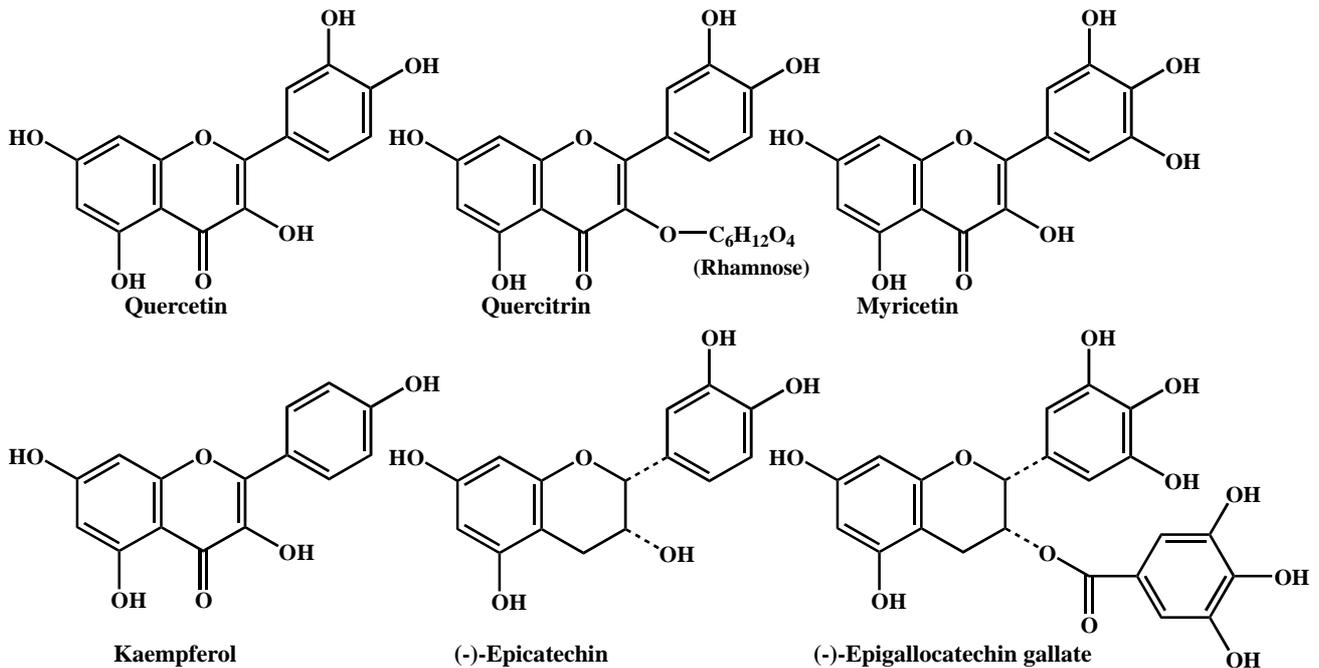


Figure 1 Chemical structures of flavonols and catechins.

液の代わりに同量の20%(v/v)エタノールを用いた。また、生体試料の代わりに同量の20%(v/v)エタノールを用いた場合の蛍光強度を100%として、それぞれの添加回収率を算出した。

## 2.5 クエルセチン投与マウスの血漿、肝臓及び腎臓中のフラボノール量の測定

日本 SLC 社より購入した4週令の雄性 ddY 系マウスに、100 または 200 mg/kg 体重となるように、クエルセチンの20%(v/v)エタノール溶液0.5 mL を経口投与した。投与60分後、ジエチルエーテル麻酔下にマウスから血漿、肝臓及び腎臓を採取した。対照群には、20%(v/v)エタノール溶液を経口投与した。各群のマウスは、15匹とした。肝臓及び腎臓は、40 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で30%ホモジネートを調製した。

マウスの血漿または臓器のホモジネートは、0.5 mL ずつ5匹分の計2.5 mL を合わせ、各3試料を準備した。これらを酢酸エチル5 mL で抽出し、有機溶媒層2.5 mL を取って溶媒を蒸発乾固させ、残渣に脱水アセトン0.1 mL を加えて2.2の項と同

様の方法で反応及び測定を行った。それぞれの試料のフラボノール量は、クエルセチンの検量線を用いてクエルセチン相当量として算出し、各3試料の平均±標準偏差を求めた。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 各種ポリフェノールのケイ光誘導体のケイ光スペクトル及びケイ光強度

クエルセチン、クエルシトリン、ミリセチン、ケンフェロール、(-)-エピカテキン及び(-)-エピガロカテキンガレートの励起極大波長、ケイ光極大波長及びその時のケイ光強度を Table 1 に示す。

クエルセチン、クエルシトリン、ミリセチン及びケンフェロールといったフラボノール類とホウ酸との反応で生成したケイ光物質の励起極大波長とケイ光極大波長は互いに類似しており、それぞれ約455 nm 及び約505 nm であった。例として、クエルセチンの励起及びケイ光スペクトルを Figure 2 に示す。

一方、カテキン類である(-)-エピカテキンと(-)-

Table 1 Fluorescence produced in the reaction with flavonols or catechins and boric acid.

	Ex (nm)	Em (nm)	Fluorescence intensity
Quercetin	460	506	1690
Quercitrin	450	506	701
Myricetin	469	514	1880
Kaempferol	451	496	1090
( ) Epicatechin	330	409	18.7
( ) Epigallocatechin gallate	329	410	23.1

Ex; Excitation wavelength, Em; emission wavelength.

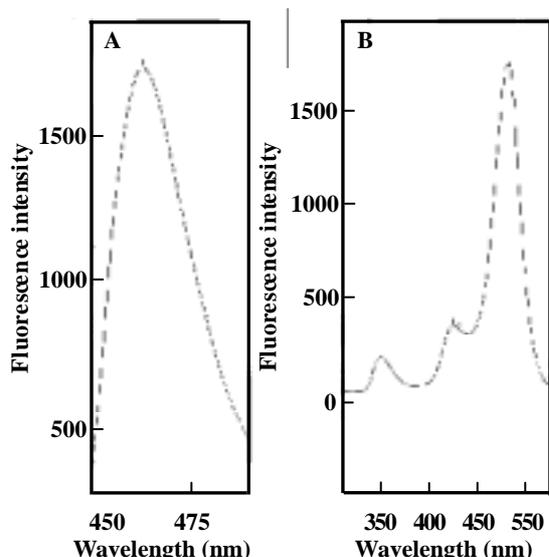


Figure 2 Fluorescence spectrums of the substance generated in the reaction with quercetin and boric acid.

A; Excitation spectrum, B; emission spectrum.

エピガロカテキンガレートの励起極大波長とケイ光極大波長も互いに類似していたが、フラボノール類とは異なり、それぞれ約 390 nm 及び約 410 nm であった。また、同モル濃度でのケイ光強度は、フラボノール類に比較してカテキン類では低かった。この結果から、ホウ酸との反応を用いたケイ光分析法は、カテキン類よりもフラボノールの測定に適していることが示唆された。

### 3. 2 有機溶媒によるフラボノールの抽出

フラボノールとホウ酸の反応において、水の混入は著しいケイ光強度の低下を引き起こす。そのため、動物の臓器や血液試料中のフラボノール量を本分析法で測定する際、試料からのフラボノール

の有機溶媒による抽出操作が必要となる。

そこで、クエルセチンとクエルシトリン溶液を、クロロホルム、酢酸エチル、*n*-ブタノールの3種類の有機溶媒で抽出した場合の抽出効率の測定結果を Table 2 に示す。クエルセチンとクエルシトリンが最も効率良く抽出されたのは、酢酸エチルであり、その抽出率は約 80%であった。また、酢酸エチルは揮発性もよく、抽出後の濃縮が容易であることから、フラボノールの抽出に適した溶媒であるものと考えられる。

### 3. 3 クエルセチンの検量線

Figure 3 に示すように、クエルセチンの検量線は、5.0 µg/mL ~ 0.50 mg/mL の範囲で、相関係数 0.99 と良好な直線性が見られた。検出限界は、2.0 µg/mL であった。Nakamura ら[5]は、ラットにクエルセチンを 1.0 g/kg 体重の投与量で経口投与すると、血中に約 13 µg/mL のクエルセチンとその 3'-*O*-メチル化物であるイソラムネチン及びそれらの抱合体が検出されることを報告している。本分析法は、報告された濃度の試料を直接測定するには感度が十分とはいえないが、酢酸エチルを用いた抽出により試料の濃縮を行うことで、その測

Table 2 Percent extraction of quercetin and quercitrin with some organic solvents.

Extractants	Percent extraction (%)	
	Quercetin	Quercitrin
Control (acetone anhydrous only)	100	100
Chloroform	5.48	41.1
Ethyl acetate	83.5	80.0
<i>n</i> -Butanol	72.9	74.9

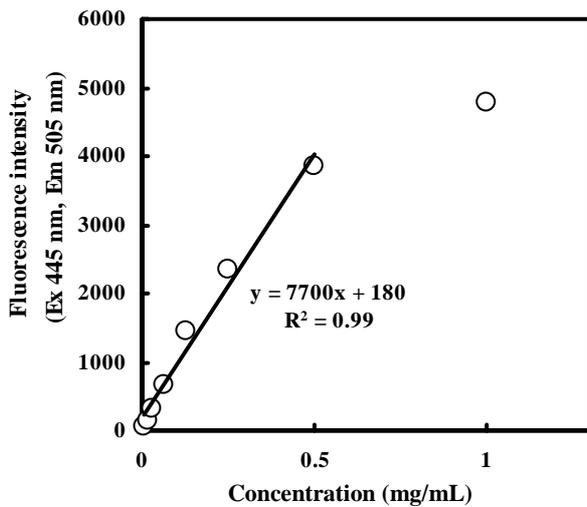


Figure 3 Calibration curve of quercetin in the analytical method with boric acid.

Ex; Excitation wavelength, Em; emission wavelength.

定が可能である。

### 3.4 マウス血漿または肝臓及び腎臓ホモジネートからのクエルセチンの添加回収率

マウス血漿または肝臓及び腎臓ホモジネートからのクエルセチンの添加回収率を Table 3 に示す。肝臓及び腎臓のホモジネートからの添加回収率は、約 80~90%と良好であった。一方、血漿からの添加回収率は約 130%と僅かに高かった。

### 3.5 クエルセチン投与マウスの血漿、肝臓及び腎臓中のフラボノール量

クエルセチンを 100 または 200 mg/kg 体重の投与量で経口投与し、60 分後のマウスの血漿、肝臓及び腎臓中のフラボノール濃度を測定した結果を Figure 4 に示す。対照群のマウスでは、0.44 µg/mL 血漿、0.77 µg/g 肝臓及び 0.90 µg/g 腎臓のフラボノール量が検出された。本研究では、マウスを絶食していないため、これらはマウスが摂取した飼料より吸収されたものと考えられた。クエルセチンを 100 または 200 mg/kg 体重の投与量で経口投与したマウスでは、対照群のマウスに比較して、それぞれ 0.83 または 2.17 µg/mL 血漿、1.58 または 3.37 µg/g 肝臓、1.33 または 3.08 µg/g 腎臓のフラボノール量の増加が見られた。

マウス血漿、肝臓、腎臓のいずれにおいても、投与量に依存してフラボノール量が増加していたことから、本分析法でこれらの動物試料中のフラボノール濃度を測定することが可能であることが示唆された。前述のように、1.0 g/kg 体重の投与量でクエルセチンを経口投与したラットの血中で、約 13 µg/mL のクエルセチンとその代謝物が検出された報告があるが[5]、本研究で得られた 0.83 または 2.17 µg/mL 血漿という測定値は、投与量が報告された実験の 1/10 または 1/5 であることから予想される値に近いものと考えられる。

クエルセチンは、植物中では通常ルチンなどの配糖体として存在しているが、動物体内で吸収される際には、消化管内でグルコシダーゼにより糖が切れ、アグリコンのクエルセチンとなることが報告されている[6]。また、吸収されたクエルセチンなどのフラボノールは、グルクロン酸抱合反応や、*O*-メチル化反応を受けるものと考えられるが[6,7]、これらの反応はクエルセチン中の R - CX - C - CO - C = C - R' (X=O, OH, OCH<sub>3</sub>)の部分の化

Table 3 Recovery of quercetin from mouse plasma and tissue homogenates.

Sample	Recovery (%)
Plasma	128±5.36
Liver	91.7±5.31
Kidney	77.1±4.62

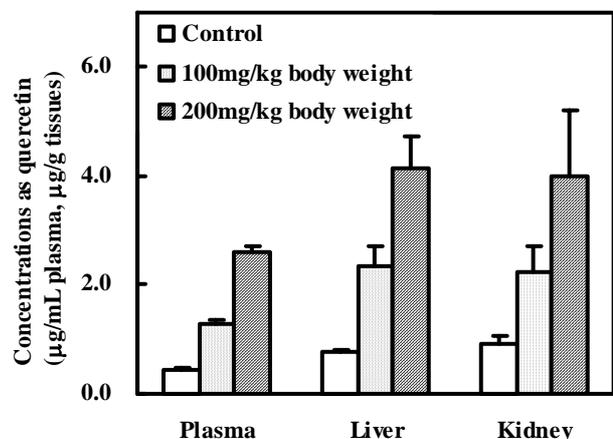


Figure 4 Concentrations of flavonols in plasma and tissues of mice administered with quercetin.

学構造には影響を与えないため、観察されたケイ光強度の増加は、吸収されたクエルセチンとその代謝物に由来するものと考えられた。

各試料で検出された濃度から、マウスの血漿、肝臓及び腎臓全体に含まれると予想されるフラボノール量を試算すると、その合計は対照群及び100または200 mg/kg 体重のクエルセチン投与群のそれぞれで1.38, 4.01, 7.30 µg/マウスであった。試算に当たり、4週令 ddY 系雄性マウスの血漿の量を0.6 mL、肝臓及び腎臓の重量をそれぞれ1.08及び0.32 gとした。従って、クエルセチンを100または200 mg/kg 体重の投与量でマウスに経口投与して60分後には、投与されたクエルセチンの約0.18%が、マウスの血漿、肝臓及び腎臓中に取りこまれているものと考えられる。放射性物質を用いた実験でも、動物に経口投与したクエルセチンの吸収率は1%以下であることが報告されており[7]、本研究により同様の結果を確認できたものと考えられる。

#### 4. まとめ

クエルセチンをマウスに経口投与した際の、血漿、肝臓及び腎臓中のクエルセチン及びその代謝物の総量を測定するための、簡便なケイ光分析法について検討を行った。

クエルセチンをホウ酸と反応させることで生成するケイ光物質のケイ光強度を、励起波長455 nm、ケイ光波長505 nmを用いて測定した。本分析法におけるクエルセチンの検量線は、5.0 µg/mL ~ 0.50 mg/mL の範囲で直線性が見られ、マウスの血漿または肝臓及び腎臓ホモジネートからのクエルセチンの添加回収率は、約80~130%であった。クエルセチンを経口投与して60分後のマウス血漿、肝臓及び腎臓について本分析法による測定を行ったところ、投与量に依存して、フラボノール量の増加が見られた。

本分析法は、フラボノールの種々の代謝物のう

ち化学構造が既知のものを、高速液体クロマトグラフィー法で個々に測定する方法に比較して簡便で、分子内のR - CX - C - CO - C = C - R' (X=O, OH, OCH<sub>3</sub>)という化学構造が保持されていれば、化学構造が未知の代謝物も合わせて測定することが可能と考えられる。さらに、酢酸エチルによる抽出操作によって試料を濃縮することができるため、微量試料の分析も可能である。

今後の検討課題としては、実際にどのようなクエルセチンの代謝物が検出されるのかを確認することが挙げられる。様々な保健作用を持つクエルセチンとその代謝物の動物体内における濃度を測定することは、その食事摂取量の指標となるばかりでなく[8]、生物活性の作用機序を解明するために重要と考えられ、本分析法はそのための有用な手段となるものと期待される。

#### 参考文献

- 1) M. Ferrali, C. Signorini, B. Caciotti, L. Sugherini, L. Ciccoli, D. Giachetti, M. Comporti, Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS Lett.*, vol.416, pp.123-129 (1997).
- 2) M. R. Vijayababu, P. Kanagaraj, A. Arunkumar, R. Ilangovan, M. M. Aruldas, J. Arunakaran, Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol.131, pp.1-7 (2005).
- 3) C. Manach, C. Morand, V. Crespy, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat, C. Remesy, Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS Lett.*, vol.426, pp.331-336 (1998).

- 4) C. W. Wilson, A study of the boric acid color reaction of flavone derivatives, *J. Amer. Chem. Soc.*, vol.61, pp.2303-2306 (1939).
- 5) Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai, Effects of quercetin and rutin on serum and hepatic lipid concentrations, fecal steroid excretion and serum antioxidant properties, *J. Health Sci.*, vol.46, pp.229-240 (2000).
- 6) C. Manach, C. Morand, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat, C. Remesy, Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Lett.*, vol.409, pp.12-16 (1997).
- 7) I. Ueno, N. Nakano, I. Hirono, Metabolic fate of [<sup>14</sup>C]quercetin in the ACI rat, *J. Exp. Med.*, vol.53, pp.41-50 (1983).
- 8) J. H. M. de Vries, P. C. H. Hollman, S. Meyboom, M. N. C. P. Buysman, P. L. Zock, W. A. van Staveren, M. B. Katan, Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol.68, pp.60-65 (1998).