

5,7,4'-Trimethoxyflavonoid 類のラット肝による代謝 —フラボン類とフラバノン類との比較—

山本 健太 太田 千穂 徳富 美沙紀 古賀 信幸

In vitro Metabolism of 5,7,4'-Trimethoxyflavonoids by Rat Liver Microsomes — Comparison of Flavones and Flavanones —

Kenta Yamamoto Chiho Ohta Misaki Tokutomi Nobuyuki Koga

(2019年11月27日受理)

はじめに

フラボノイド類は、野菜や柑橘に広く分布している植物成分であり、炭素骨格 C₆-C₃-C₆構造の A 環, C 環および B 環のうち, C 環構造の違いにより, フラボン類やフラバノン類などにさらに細かく分類される。この中で, フラボン類とフラバノン類の違いは, C 環の C₂-C₃の結合が二重結合であればフラボン類, 単結合であればフラバノン類である。その結果, フラボン類は平面構造であるが, 一方, フラバノン類は B 環が折れ曲がった構造となる。また, フラボノイド類には, 水酸基だけが置換したポリフェノール型フラボノイド類 (apigenin, quercetin, naringenin など) やメトキシ基だけが置換したポリメトキシ型フラボノイド類 (nobiletin, tangeretin など) や水酸基とメトキシ基の両方が置換した混合型 (diosmetin, hesperetin など) がある。ポリフェノール型フラボノイド類は, 抗酸化作用¹⁾, 抗炎症作用²⁾, 抗がん作用^{3,4)} など多くの生理作用を有することが明らかとなっている。一方, ポリメトキシ型フラボノイド類も, 抗炎症作用^{5,6)}, 抗がん作用^{7,8)}, 脳機能改善作用⁹⁾ などが報告されている。また, ポリメトキシ型は, ポリフェノール型よりも生体内利用率が高いため¹⁰⁾, より強い生理作用を発揮するものと期待される。

本研究の Apigenin trimethyl ether (5,7,4'-trimethoxyflavone, 以下 ATM と略す, Fig. 1) は, 黒ショウガ (*Kaempferia parviflora*) の根茎¹¹⁾ や柑橘果皮¹²⁾ にも含まれるポリメトキシ型フラボン類の 1 つである。タイでは, 古くから黒ショウガの根茎を滋養強壮, 循環器や消化器系の改善などに効果があるとして, 伝統的な民間薬として使用されてきた。ATM に

は, 抗アレルギー作用¹³⁾, 抗アルツハイマー作用^{14,15)}, 抗がん作用¹⁶⁾, 抗炎症作用¹⁷⁾, 抗菌作用^{18,19)}, 抗肥満作用²⁰⁾, 血管弛緩作用²¹⁾ など様々な生理作用が報告されている。一方, Naringenin trimethyl ether (5,7,4'-trimethoxyflavanone, 以下 NTM と略す, Fig. 1) は, センダン科ジュラン属 (*Aglaia odorata*) の葉に分布しており²²⁾, この葉は, タイで民間薬として心臓病, 打撲傷, 外傷の治療薬および解熱薬として用いられてきた。また, NTM は, 抗炎症作用²²⁾ および抗がん作用²³⁾ を有することが報告されている。

ポリメトキシ型フラボノイド類の動物体内での代謝に関しては, 肝臓の代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) による A 環あるいは B 環の水酸化反応や, メトキシ基の酸化的脱メチル化反応が報告されている²⁴⁻²⁶⁾。これまでに当研究室では, 柑橘果皮成分である nobiletin の代謝をラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム (Ms) で行った結果, 代謝物として 3 種類の一脱メチル化体 (7-, 6- および 4-OH 体) と 2 種類の二脱メチル化体 (3',4'- および 6,7-diOH 体) が生成されることを明らかにした²⁷⁾。また, ヒト CYP 分子種を用いて検討したところ, CYP3A 酵素が A 環のメトキシ基

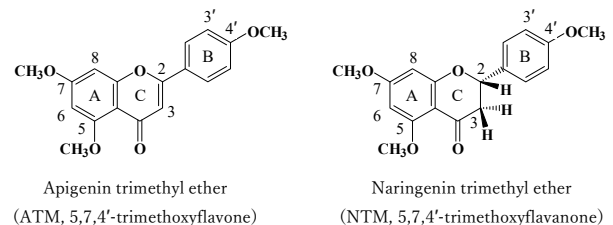


Fig. 1 Chemical structures of ATM and NTM used in this study.

の脱メチル化に、CYP1A 酵素が B 環のメトキシ基の脱メチル化に関与することを示した²⁸⁾。フラバノン類の代謝に関しては、Nikolic と Breemen が、ラット肝 Ms によるポリフェノール型フラバノン類の代謝を調べ、A 環、B 環および C 環の水酸化反応が起こることを報告している²⁹⁾。また、当研究室では hesperetin の代謝を調べ、4' 位のメトキシ基が酸化的脱メチル化されることを報告している³⁰⁾。しかし、ポリメトキシ型フラバノン類の代謝については、報告が見当たらない。

そこで本研究では、ポリメトキシ型フラボノイド類において基本骨格の違いで代謝がどう異なるかを明らかにするため、置換基として3つのメトキシ基が置換されたフラボン類の ATM およびフラバノン類の NTM の代謝について、ラット肝 Ms を用いて調べた。

実験方法

1. 試薬

ATM と naringenin はフナコシ (株) より購入した。NADP および glucose-6-phosphate (G-6-P) はオリエンタル酵母 (株) より購入した。また、G-6-P 脱水素酵素 (G-6-PD)、は和光純薬 (株) より購入した。その他の試薬は、和光純薬 (株) の特級または HPLC 用を使用した。

2. NTM の合成

NTM の合成は naringenin 500 mg をアセトン100 mL、炭酸カリウム18.4 g およびジメチル硫酸6.4 mL とともに、40℃で22時間反応させて行った。メチル化反応終了後、アセトンを飛ばし、水を加えた後、分液漏斗を用いて NTM を酢酸エチルで抽出した。次に、酢酸エチル層を濃縮し、Bond Elut SI カラム (Si 10 g, 30 × 50 mm, Agilent 製) にかけて、酢酸エチルで溶出した後、分取用 HPLC で精製を行った。分取用 HPLC の条件は、次の通りである。分析機器、LC-10ADvp (島津製作所製)；カラム、Mightysil RP-18 GP (250 × 20 mm i.d., 5 μm 粒径)；移動相、60% アセトニトリル-0.1% ギ酸；流速、4.0 mL/min；検出波長、280 nm。アセトニトリルで再結晶したところ、純度99.6%の白色結晶を得た。一方、メチル化の確認は、一部の酢酸エチル層を濃縮し、アセトニトリルに溶解後、HPLC および質量分析計付 HPLC (LC-MS/MS) に付して行った。HPLC の分析条件は次の通りである。分析機器、LC-20AB (島津製作所製)；カラム、Mightysil RP-18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm 粒径)；移動相、A 液0.1% ギ酸、B 液100% アセトニトリル、B 液濃度20 - 60% (10 min) - 60% (8 min) - 100% (5 min)；流速、1.0 mL/min；検出波長、280 nm (ATM の場合、340 nm)。LC-MS/MS

の分析条件は次の通りである。分析機器、LCMS-8030 (島津製作所製)；カラム、Shim-pack XR-ODS II (150 × 2.0 mm, 2.2 μm 粒径)；カラム温度、40℃；移動相、A 液0.1% ギ酸、B 液100% アセトニトリル、B 液濃度20 - 60% (5 min) - 60% (4 min) - 100% (5 min)；流速、0.2 mL/min。MS 条件：イオン化法、ESI (ポジティブイオンモード)；スキャン範囲、*m/z* 250-450；コリジョンエネルギー、-40.0 eV；DL 温度、300℃；スプレー電圧、4.5 kV；ネブライザーガス流量、3.0 L/min；ドライイングガス流量、15.0 L/min。

3. ラット肝 Ms の調製

Wistar 系の雄性ラット4匹 (体重約200 g, 実験開始時6週齢) は、九動 (株) より購入した。ラット肝 Ms は、ラットを屠殺し、直ちに肝臓を摘出後、常法²⁷⁾ により調製した。なお、本研究は中村学園大学の実験動物委員会の承認 (動倫2016-7) を得た後、「中村学園大学における実験動物のための指針」に従って行った。

4. 代謝物の分析

ラット肝 Ms による ATM および NTM の代謝は既報²⁷⁾ に準じて行った。0.2 mM ATM あるいは NTM を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂, ラット肝 Ms (1 mg protein) および100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計1 mL とし、37℃で20 min 反応させた。反応後、冷メタノール3 mL 添加で反応を停止し、遠心分離 (3000 rpm, 15 min) 後、上清を HPLC および LC-MS に付した。分析条件は、前述の 2. と同様であるが、ATM 代謝物は検出波長340 nm で測定した。代謝物の定量は、ATM あるいは NTM の検量線を用いて行った。

5. その他

ラット肝 Ms のタンパク量は、Lowry らの方法に従い定量した³¹⁾。なお、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。統計処理は、Students' t-test により危険率5%以下 ($p < 0.05$) で有意差ありと判断した。

実験結果

1. ラット肝 Ms による代謝

ATM あるいは NTM をラット肝 Ms および NADPH 生成系とともに、37℃で好氣的に20 min 反応させた。Fig. 2に生成された ATM 代謝物と NTM 代謝物の HPLC クロマトグラムを示す。

ATM は保持時間16.28 min に検出されたが、その代謝物と思われるピークが4種類検出された。親化合物の ATM よりも早く溶出された2種類のピークを ATM に近い順から、それぞれ M1 (保持時間12.96 min) および M2 (10.36 min) とした。一方、遅く溶出されたピー

クを BM1 (17.06 min) および BM2 (23.77 min) とした。

次に, NTM は保持時間 16.92 min に検出され, その

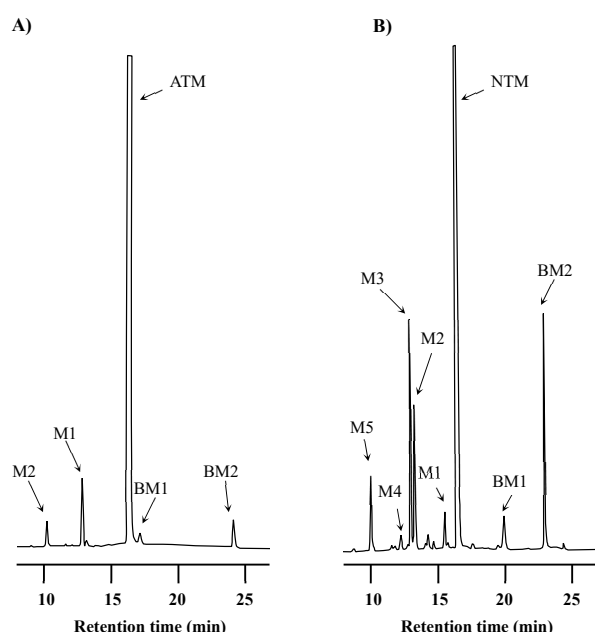


Fig. 2 HPLC chromatograms of ATM-derived metabolites (A), NTM-derived metabolites (B) formed by rat liver microsomes.

代謝物と思われるピークが 7 種類検出された。ATM と同様に, 親化合物より前方に, M1 (16.04 min), M2 (13.84 min), M3 (13.56 min), M4 (12.86 min) および M5 (10.77 min) とした。一方, 遅く検出されたピークを BM1 (20.39 min) および BM2 (23.28 min) とした。

ATM および NTM の代謝物の定量は, ATM および NTM の検量線をそれぞれ用いて行った。その結果を Table 1 および 2 に示す。まず, ATM では, M1 が主代謝物であり, 0.22 nmol/min/mg protein であった。次いで, BM2, M2 および BM1 が続き, それぞれ 0.15, 0.10 および 0.08 nmol/min/mg protein であった。次に, NTM では, 主代謝物は BM2 および M3 であり, それぞれ 0.44 および 0.42 nmol/min/mg protein であった。次いで, M2 および M5 と続き, それぞれ 0.29 および 0.17 nmol/min/mg protein であった。

2. 代謝物の化学構造

ATM および NTM の代謝物の化学構造を明らかにするため, それぞれの代謝反応液を LC-MS にて分析した。その結果を Table 1 および 2 に示す。まず, ATM は m/z 313 $[M+H]^+$ として検出された。一方, 代謝物の M1 および BM2 は m/z 299 $[M+H-14]^+$ であることから一脱メチル化体, M2 および BM1 は m/z 285 $[M+H-28]^+$ であ

Table 1 Quantification of ATM metabolites formed by rat liver microsomes and LC-MS/MS data of ATM and its metabolites

Metabolite	Retention time (min)	*Metabolite formed (nmol/min/mg protein)	Molecular weight (m/z)	Metabolic pattern	Fragment ion (m/z)				Postulated structure
					A-ring		B-ring		
					167	181	119	133	
M2	5.46	0.097 ± 0.004	285 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation	○		○		7,4'-diOH
M1	6.88	0.216 ± 0.045	299 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation		○	○		4'-OH
ATM	8.68		313 $[M+H]^+$			○		○	
BM1	9.10	0.081 ± 0.014	285 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation	○		○		5,4'-diOH
BM2	12.51	0.146 ± 0.040	299 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation	○			○	5-OH

*Values are mean ± S.D. of four rats.

Table 2 Quantification of NTM metabolites formed by rat liver microsomes and LC-MS/MS data of NTM and its metabolites

Metabolite	Retention time (min)	*Metabolite formed (nmol/min/mg protein)	Molecular weight (m/z)	Metabolic pattern	Fragment ion (m/z)						Postulated structure
					A-ring				B-ring		
					167	181	183	197	119	133	
M5	5.61	0.173 ± 0.042	287 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation	○				○		7,4'-diOH
M4	6.88	0.032 ± 0.004	331 $[M+H+16]^+$	Hydroxylation				○		○	8-OH
M3	7.18	0.423 ± 0.038	301 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation		○			○		4'-OH
M2	7.31	0.287 ± 0.023	301 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation	○					○	7-OH
M1	8.54	0.075 ± 0.017	317 $[M+H+2]^+$	Hydroxylation and mono-demethylation			○			○	5,6-diOH
NTM	9.13		315 $[M+H]^+$			○				○	
BM1	11.33	0.107 ± 0.024	331 $[M+H+16]^+$	Hydroxylation							unknown
BM2	12.35	0.442 ± 0.089	301 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation	○					○	5-OH

*Values are mean ± S.D. of four rats.

ることから二脱メチル化体であることが明らかとなった。次に、NTMは m/z 315 $[M+H]^+$ として検出された。代謝物の M3, M2 および BM2 は、いずれも m/z 301 $[M+H-14]^+$ であることから一脱メチル化体、M5 は m/z 287 $[M+H-28]^+$ であることから二脱メチル化体、また、M4 および BM1 は m/z 331 $[M+H+16]^+$ であることから一水酸化体、M1 は m/z 317 $[M+H+2]^+$ であることから一脱メチル化・一水酸化体であると認められた。

さらに、上記の脱メチル化反応および水酸化反応が起こった位置を詳細に調べるために LC-MS/MS を用いて、プロダクトイオンスキャンを行った。Ma らは、フラボノイド類を LC-MS/MS で分析すると、逆ディールスマルター開裂により A 環由来と B 環由来のフラグメントイオンが検出されることを報告した³²⁾。Fig. 3 には代謝物の化学構造から推定されるフラグメントイオンを示した。例えば、A 環由来のフラグメントイオン m/z 181 が検出されたり、B 環由来のフラグメントイオン m/z 133 が検出された場合、それぞれの環で全く代謝を受けていないことを示している。Table 1 および 2 には、各代謝物が、どのフラグメントイオンを有しているかを示した。まず、ATM では、A 環由来のフラグメントイオン m/z 181 は ATM と M1 で検出された。このイオンが検出された M1 は、A 環に全く変化がないことが示された。次に、A 環の一脱メチル化を示すフラグメントイオン m/z 167 は、M2, BM1 および BM2 で、また、B 環由来のフラグメントイオン m/z 133 は、ATM と BM2 で検出され

た。次に、B 環の一脱メチル化を示すフラグメントイオン m/z 119 は、M2, M1 および BM1 で検出された。

一方、NTM では、同様に A 環由来のフラグメントイオン m/z 181 は、NTM と M3 で検出された。次に、A 環の一脱メチル化を示すフラグメントイオン m/z 167 は、M5, M2 および BM2 で検出された。A 環の一水酸化を示すフラグメントイオン m/z 197 が M4 で、さらに、A 環の一脱メチル化・一水酸化を示すフラグメントイオン m/z 183 が M1 で検出された。また、B 環由来のフラグメントイオン m/z 133 は、NTM, M4, M2, M1 および BM2 で検出された。次に、B 環の一脱メチル化を示すフラグメントイオン m/z 119 は、M5 と M3 で検出された。なお、NTM の BM1 では、これらの特徴的なフラグメントイオンはいずれも検出されなかった。

考 察

今回、フラボノイド骨格の異なる ATM および NTM についてラット肝 Ms による代謝を調べ、比較した。LC-MS/MS の結果から推定した ATM の代謝経路を Fig. 4a に、NTM の代謝経路を Fig. 4b に示す。

まず、ラット肝 Ms により ATM は、2 種類の一脱メチル化体 (M1, BM2) および 2 種類の一脱メチル化体 (M2, BM1) に代謝されることが明らかになった。そのうち、M1 では B 環由来のフラグメントイオン m/z 119 が検出されたため、4'-OH 体であると推定された。

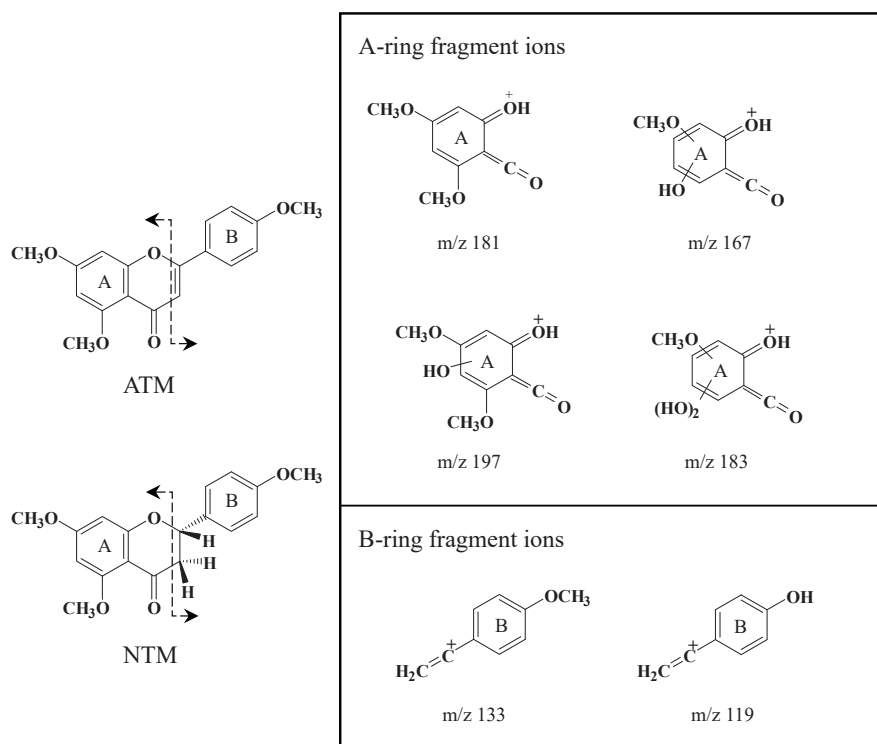


Fig. 3 Characteristic fragment ions from ATM and NTM metabolites produced by C-ring cleavage in LC-MS/MS.

また、BM2は親化合物の ATM よりも遅く溶出されたことから、BM2は5-OH 体であると推定された。最近、ポリメトキシ型フラボン類の A 環 5 位の水酸化体は、逆相系 HPLC で分析した際に、そのメトキシ体よりも遅く溶出されることが報告されている³³⁻³⁵⁾。

次に、M2および BM1は二脱メチル化体であったが、LC-MS/MS の結果からいずれも A 環と B 環からそれぞれ一脱メチル化されていると考えられる。なお、BM1は HPLC において親化合物の ATM より遅く溶出されることから、BM1の二脱メチル化の一つは、A 環 5 位が脱メチル化されていると考えられる。以上の結果を考え合わせると、BM1は5,4'-diOH 体、M2は7,4'-diOH 体であることが推定された。

一方、ラット肝 Ms により NTM は、3 種類の一脱メチル化体 (M2, M3, BM2)、1 種類の二脱メチル化体 (M5)、2 種類の一水酸化体 (M4, BM1) および 1 種類の一脱メチル化・一水酸化体 (M1) に代謝されるこ

とが明らかになった。LC-MS/MS より、M3は B 環から一脱メチル化された4'-OH 体であると推定される。また、BM2は NTM より遅く溶出されたため、A 環 5 位が脱メチル化された5-OH 体と考えられた。そのため、残る一脱メチル化体の M2は7-OH 体と推定される。次に、M5は LC-MS/MS の結果から、A 環と B 環からそれぞれ一脱メチル化されていると考えられる。また、M5は親化合物よりもずっと早く溶出されているため、7,4'-diOH 体であることが示唆された。

M1は、LC-MS/MS の結果から、A 環において一脱メチル化され、かつ一水酸化体された構造であることが判明した。マウス肝 Ms による tangeretin (5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone) の代謝では、5 位および 6 位が脱メチル化された5,6-diOH 体が生成されている²⁵⁾。また、当研究室では、ラット肝 Ms による 3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone の代謝で、A 環 5 位が脱メチル化され、さらに 6 位が水酸化された代謝物が生

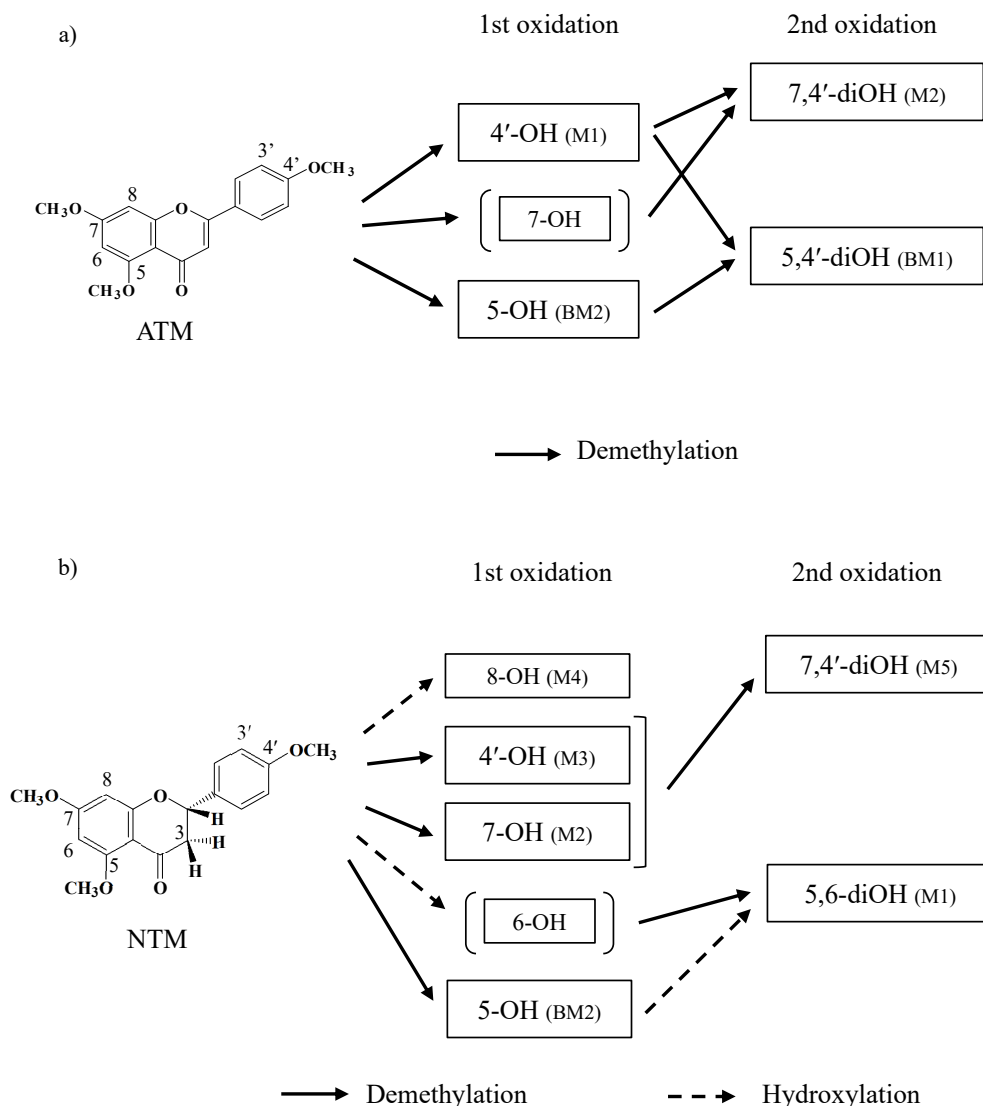


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of ATM (a) and NTM (b) in rat liver.

成されること³⁵⁾, 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone および 3,7,3',4'-tetramethoxyflavone の代謝では, 6 位水酸化体が生成されることを報告している^{34,36)}。A 環における水酸化の位置は, 8 位と 6 位が考えられるが, これまでの報告³⁴⁻³⁶⁾ をみると 6 位の方がはるかに多い。以上のことから, M1 は 5 位が脱メチル化され, かつ 6 位が水酸化された 5,6-diOH 体であることが示唆された。次に, M4 および BM1 は m/z 331 $[M+H+16]^+$ を有することから一水酸化体であることが明らかになった。このうち, M4 は LC-MS/MS の結果から, A 環 6 位あるいは 8 位水酸化体であると考えられた。当研究室のこれまでの報告³³⁻³⁵⁾ では, A 環 6 位の水酸化体は親化合物の近くに溶出されており, M4 のように早くは溶出されない。この事実から, M4 は 8 位水酸化体であると考えられる。もしこれが事実であれば, 8 位の水酸化はフラバノン類に特有の代謝経路であるかもしれない。なお, BM1 は一水酸化体と考えられたが, A 環および B 環由来のフラグメントイオンが検出されなかったことから現時点で構造は特定できなかった。

ラット肝 Ms による ATM と NTM の代謝を比較すると, 大きな相違点がみられた。まず, 代謝物の総量では NTM が 1.539 nmol/min/mg protein で ATM の 2.9 倍であった。また, 共通の代謝物である 4'-OH 体, 5-OH 体および 7,4'-diOH 体は, それぞれ NTM の方が ATM の 2.0 倍, 3.0 倍および 1.8 倍であった。また, これらの代謝物は, ATM では 4'-OH 体 > 5-OH 体 > 7,4'-diOH 体の順であったが, NTM では 5-OH 体 > 4'-OH 体 > 7,4'-diOH 体の順であった。さらに, NTM では検出された 7-OH 体が ATM では検出されなかった。これは, 7 位が脱メチル化された後, 直ちに 4' 位が脱メチル化されて, 7,4'-diOH 体が生成されたためと考えられる。このように, 平面的なフラボン骨格よりも立体的なフラバノン骨格の方が代謝されやすいことが明らかになった。しかし, 当研究室で混合型の diosmetin と hesperetin につき, ラット肝 Ms の代謝を比較したところ, フラボン骨格の方がわずかではあるが代謝されやすいことを報告した³⁰⁾。この事実は, ポリメトキシ型と混合型では代謝パターンが異なる可能性を示している。今後, 代謝に関与する各 CYP 酵素の基質特異性についての検討が必要であろう。

総括

1. 5,7,4'-Trimethoxyflavone (ATM) および 5,7,4'-trimethoxyflavanone (NTM) のラット肝 Ms による代謝を行い, 骨格の違いによる代謝への影響を調べた。
2. ATM 代謝物として, 4 種類が検出され, M1 が主

代謝物であった。LC-MS/MS の結果, 2 種類の一脱メチル化体 (M1, BM2), 2 種類の二脱メチル化体 (M2, BM1) が明らかになった。

3. NTM 代謝物として, 7 種類が検出され, BM2 が主代謝物であった。LC-MS/MS の結果, 3 種類の一脱メチル化体 (M2, M3, BM2), 1 種類の二脱メチル化体 (M5), 2 種類の一水酸化体 (M4, BM1), 1 種類の一脱メチル化・一水酸化体 (M1) が明らかになった。
4. NTM の方が, ATM より代謝物の総量が多く, 共通の代謝物である 4'-OH 体, 5-OH 体および 7,4'-diOH 体も約 2~3 倍多く生成された。

以上の結果から, ラット肝 Ms による ATM と NTM の代謝では, 立体的なフラバノン骨格の方が平面的なフラボン骨格より, 代謝されやすいことが明らかになった。

謝辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金 (食の安全確保推進研究事業, H30-食品-指定-005 古賀信幸) の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表します。また, ATM 代謝物の分析にご協力いただきました 4 年生 (檜垣映里, 渡邊菜) に感謝致します。

文献

- 1) Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **33**(12): 1061-1080.
- 2) Tsai SJ, Huang CS, Mong MC, Kam WY, Huang HY, Yin, MC. 2011. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(1): 514-521.
- 3) Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anticancer Research* **19**(2A): 1261-1269.
- 4) Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**(5): 896-899.
- 5) Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. 2000. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Research* **60**(18):

- 5059-5066.
- 6) Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. 2003. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology* **65** (12): 2065-2071.
- 7) Kohno H, Yoshitani S, Tsukio Y, Murakami A, Koshimizu K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H, Tanaka T. 2001. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Life Sciences* **69**(8): 901-913.
- 8) Minagawa A, Otani Y, Kubota T, Wada N, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Okada Y, Sato T, Ito A, Kitajima M. 2001. The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Japanese Journal of Cancer Research* **92**(12): 1322-1328.
- 9) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2008. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**(3): 739-744.
- 10) Wen X, Walle T. 2006. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition* **34**(10): 1786-1792.
- 11) Sutthanut K, Sripanidkulchai B, Yenjai C, Jay M. 2007. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1143**(1-2): 227-233.
- 12) Xing TT, Zhao XJ, Zhang YD, Li YF. 2017. Fast separation and sensitive quantitation of polymethoxylated flavonoids in the peels of citrus using UPLC-Q-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**(12): 2615-2627.
- 13) Kobayashi S, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K. 2015. Anti-allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Functional Foods* **13**: 100-107.
- 14) Youn K, Lee J, Ho CT, Jun M. 2016. Discovery of polymethoxyflavones from black ginger (*Kaempferia parviflora*) as potential β -secretase (BACE1) inhibitors. *Journal of Functional Foods* **20**: 567-574.
- 15) Sawasdee P, Sabphon C, Sitthiwongwanit D, Kokpol U. 2009. Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytotherapy Research* **23**(12): 1792-1794.
- 16) Walle T, Ta N, Kawamori T, Wen X, Tsuji PA, Walle UK. 2007. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids-methylated versus unmethylated flavones. *Biochemical Pharmacology* **73**(9): 1288-1296.
- 17) Sae-Wong C, Matsuda H, Tewtrakul S, Tansakul P, Nakamura S, Nomura Y, Yoshikawa M. 2011. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* **136**(3): 488-495.
- 18) Uckoo RM, Jayaprakasha GK, Vikram A, Patil BS. 2015. Polymethoxyflavones isolated from the peel of Miaray Mandarin (*Citrus miaray*) have biofilm inhibitory activity in *Vibrio harveyi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**(32): 7180-7189.
- 19) Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* **75**(1): 89-92.
- 20) Okabe Y, Shimada T, Horikawa T, Kinoshita K, Koyama K, Ichinose K, Aburada M, Takahashi K. 2014. Suppression of adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytochemistry* **21**(6): 800-806.
- 21) Tep-Areenan P, Sawasdee P. 2010. Vasorelaxant effects of 5, 7, 4'-trimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. *International Journal of Pharmacology* **6**(4): 419-424.
- 22) Yodsaoe O, Sonprasit J, Karalai C, Ponglimanont C, Tewtrakul S, Chantrapromma S. 2012. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* **76**: 83-91.
- 23) Konoshima T, Takasaki M, Kozuka M, Inada A, Nakanishi T, Tokuda H, Matsumoto T. 1989. Studies on inhibitors of skin tumor promotion (V)-inhibitory effects of flavonoids on Epstein-Barr virus activation II. *The Japanese Journal of Pharmacognosy* **43**(2): 135-141.
- 24) Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO. 1998. *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* **28**(4): 389-401.
- 25) Breinholt VM, Rasmussen SE, Brøsen K, Friedberg TH. 2003. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacology and Toxicology* **93**(1): 14-22.
- 26) Xiao J, Hogger P. 2013. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. *Current Drug Metabolism* **14**(4): 381-391.
- 27) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M, Ohta H. 2007. Comparative study

- on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters and rat cytochrome P450. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30**(12): 2317-2323.
- 28) Koga N, Ohta C, Kato Y, Haraguchi K, Endo T, Ogawa K, Ohta H, Yano M. 2011. *In vitro* metabolism of nobiletin, a polymethoxy-flavonoid, by human liver microsomes and cytochrome P450. *Xenobiotica* **41**(11): 927-933.
- 29) Nikolic D, van Breemen RB. 2004. New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **32**(4): 387-397.
- 30) 太田千穂, 忝岡樹子, 太田英明, 加藤善久, 古賀信幸. 2009. 植物成分 diosmetin および hesperetin のラット肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 **41**: 247-254.
- 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- 32) Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. 1997. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision - induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**(12): 1357-1364.
- 33) Lin YS, Li S, Ho CT, Lo CY. 2012. Simultaneous analysis of six polymethoxyflavones and six 5-hydroxy-polymethoxyflavones by high performance liquid chromatography combined with linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(49): 12082-12087.
- 34) 太田千穂, 緒方 瞳, 山本健太, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸. 2016. 黒ショウガ成分 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone のラット肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 **48**: 155-161.
- 35) 山本健太, 太田千穂, 徳富美沙紀, 古賀信幸. 2019. 柑橘果皮成分3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone のラット肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 **51**: 97-104.
- 36) 太田千穂, 山本健太, 徳富美沙紀, 加藤善久, 古賀信幸. 2019. 3, 7, 3', 4'-Tetramethoxyflavone のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 **51**: 89-96.