

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

太田千穂¹⁾ 緒方瞳¹⁾ 山本健太¹⁾ 原口浩一²⁾
加藤善久³⁾ 遠藤哲也⁴⁾ 古賀信幸¹⁾

In vitro Metabolism of 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone by Rat Liver Microsomes

Chiho Ohta¹⁾ Hitomi Ogata¹⁾ Kenta Yamamoto¹⁾ Koichi Haraguchi²⁾
Yoshihisa Kato³⁾ Tetsuya Endo⁴⁾ Nobuyuki Koga¹⁾

(2015年11月27日受理)

はじめに

植物成分フラボノイド類のうち、フラボン骨格を有するものをフラボン類というが、置換基の種類によって、ポリフェノール型、ポリメトキシ型および混合型に分類される。置換基がすべて水酸基から成るポリフェノール型フラボン類には、apigenin, kaempferol, quercetinなどが、すべてメトキシ基であるポリメトキシ型フラボン(PMF)類には、nobiletin, tangeretin, sinensetinなどが、また、水酸基とメトキシ基が混在している混合型には、diosmetin, natsudaidainが含まれる。従来から、ポリフェノール型フラボン類は、抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用などの生理活性を有することが知られているが^{1, 2)}、最近、柑橘果皮に含有されるPMF類のうち nobiletin が、抗炎症作用^{3, 4)}と抗がん作用⁵⁾に加え、脳機能改善作用^{6, 7)}を有することが報告され、非常に注目されている。

本研究の5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (TetraMF) は、ショウガ科ケンベリア属 (*Kaempferia parviflora*) の根茎から見つかったPMF類の1つで、5,7-dimethoxyflavone (DMF)、3,5,7-trimethoxyflavone (TriMF)、5,7,4'-TriMF、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone および、これらの5位のメトキシ基が脱メチル化されたものと共に見出された⁸⁾。原産国タイでは、本植物を「クラチャイダム」と呼び、古くから、健康のために根茎スライスを煮出してお茶として、また酒に漬けて薬酒として用いられている。さらに、民間薬としても、疼痛の軽減、胃腸疾患の改善および男性の性功能向上のために使用されている。一方、日本では、「黒ショウガ」と呼ばれてお

り、この抽出物がメタボリック症候群予防のための栄養補助食品として売られている。最近、黒ショウガ由来のPMF類は、P糖たんぱく質の阻害作用⁹⁾、がん細胞に対する細胞毒性¹⁰⁾、抗アレルギー作用¹¹⁾、抗炎症作用¹²⁻¹⁴⁾、その他多くの生理作用¹⁵⁻¹⁸⁾を有することが報告されており、注目されている。

ところで、PMF類の動物体内での代謝に関する研究では、PMF類が生体内に摂取されると、主に肝臓のチトクロムP450 (CYP) により、フラボン骨格のA環あるいはB環が水酸化されたり、また、メトキシ基が酸化的に脱メチル化されたりすることが知られている¹⁹⁻²²⁾。例えば、Nielsenらは、柑橘果皮成分である tangeretin につき Aroclor 1254 前処理ラット肝ミクロゾーム (Ms) を用いて代謝を調べ、B環の3'位の水酸化反応とA環の6, 7あるいは4'位のメトキシ基の脱メチル化反応が主な代謝経路であることを報告した¹⁹⁾。これまで当研究室でも、柑橘果皮成分の nobiletin につき、動物肝 Ms, ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種による代謝を調べたところ、代謝物として3種類の一脱メチル化体と2種類の二脱メチル化体が生成されることを明らかにした。また、CYP分子種のうち、主にA環の脱メチル化にはCYP3A酵素が、B環の脱メチル化にはCYP1A1, CYP1A2およびCYP1B1が関与することも明らかにした^{23, 24)}。

また、Mekjaruskulらは、黒ショウガ由来のPMF類の代謝について報告した²⁵⁾。彼らは、エタノール抽出物(7種類のPMFを含有)をラットに経口投与し、ラット糞尿中の代謝物をLC-MSにより調べ、一脱メチル化体、二脱メチル化体、三脱メチル化体およびそれら

別刷請求先：古賀信幸，中村学園大学栄養科学部，〒814-0198 福岡市城南区別府5-7-1

E-mail: nobuyuki@nakamura-u.ac.jp

- 1) 中村学園大学栄養科学部 2) 第一薬科大学
3) 徳島文理大学香川薬学部, 4) 北海道医療大学薬学部

の硫酸あるいはグルクロン酸の抱合体を、合計11種類が生成されることを報告した。しかしながら、この中には TetraMF 由来と考えられる代謝物は、全く含まれていなかった。そこで、本研究では、TetraMF のラット肝 Ms による *in vitro* 代謝を調べた。また、代謝に関与する CYP 分子種を推定するために、CYP2B 酵素、CYP1A 酵素および CYP3A 酵素の誘導剤として有名な、それぞれ phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) および dexamethasone (DEX) を前処理したラット肝 Ms でも同様に調べた。

実験方法

1. 試薬

TetraMF 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、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。CYP 誘導剤である PB (Na 塩), MC および DEX, さらに、その他の試薬と有機溶媒は、和光純薬 (株) より購入した。

2. 実験動物と薬物処理

Wistar 系雄性ラット (体重約200 g) は、九動 (株) より購入し、1 群4匹として、未処理群、PB 前処理群、MC 前処理群および DEX 前処理群の4群に分けた。PB は生理食塩水に溶解し80 mg/kg/day の用量を、MC はコーン油に溶解し20 mg/kg/day の用量を、DEX はコーン油に溶解し100 mg/kg/day の用量をそれぞれ3日間連続腹腔内投与した。実験動物は最終投与日の翌日に屠殺し、直ちに肝臓を摘出後、常法により肝 Ms を調製した²³⁾。なお、本研究は中村学園大学の実験動物委員会の承認を得た後、「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、行った。

3. 代謝物の分析

0.2 mM TetraMF, NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ およびラット肝 Ms (1 mg protein) を100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計1 mL として、37°C で20分間インキュベート後、冷メタノール 3 mL 添加により反応を停止した。氷中にて30分間放置した後、3,000 rpm で10分間遠心分離を行い、上清を HPLC および LC-MS に付した。代謝物の定量は、基質である TetraMF の検量線を用いて行った。HPLC の分析条件は次の通りである。分析機器、高速液体クロマトグラフ LC-10AT (島津製); 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20-60% (10 min) - 60% (8 min) - 100% (5 min); 流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 340

nm。一方、代謝物の分子量測定に用いた LC-MS の分析条件は次の通りである。分析機器, 質量分析計付高速液体クロマトグラフ LCMS-8030 (島津製); カラム, Shim-pack XR-ODS II (150×2.0 mm, 2.2 μm 粒径); カラム温度, 40°C; 移動相, A液0.1%ギ酸, B液100%アセトニトリル, B液20-60% (5 min) - 60% (4 min) - 100% (5 min); 流速, 0.4 mL/min。

4. その他

ラット肝 Ms のタンパク定量は、Lowry²⁶⁾ の方法に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich 製) を用いた。

実験結果

1. ラット肝 Ms による代謝

TetraMF をラット肝 Ms および NADPH 生成系とともに、37°C で20分間反応させた。また、代謝に関与する CYP 分子種を明らかにするため、3種類の CYP 誘導剤前処理ラットから調製した肝 Ms を用いた。Fig. 1に、生成された TetraMF 代謝物の HPLC による溶出パターンを示す。

TetraMF は保持時間14.72 min に検出された。代謝物と思われるピークは、未処理 Ms で4種類、PB 前処理 Ms, MC 前処理 Ms および DEX 前処理 Ms でいずれも9種類検出された (Fig. 1, Fig. 2)。基質の TetraMF を中心に前方に検出された8種類のピークを、それぞれ M1 (保持時間14.25 min), M2 (13.04 min), M3 (12.67 min), M4 (12.48 min), M5 (12.01 min), M6 (11.61 min), M7 (11.36 min) および M8 (10.44 min) とした。また、後方の3種類を、BM1 (保持時間 15.09 min), BM2 (17.22 min) および BM3 (20.58 min) とした。

次に、各代謝物の生成活性を TetraMF の検量線を用いて計算した (Fig. 2)。未処理 Ms では、4種類の代謝物が検出されたが、主代謝物は M2 であり、その生成活性は、0.86 nmol/min/mg protein であった。次いで、BM2, BM3 および M8 が、それぞれ、0.10, 0.09 および 0.03 nmol/min/mg protein であった。また、PB 前処理 Ms では、未処理 Ms と同様に、M2 が最も多く生成され、未処理 Ms の2.8倍と増加した (2.45 nmol/min/mg protein)。さらに、BM2, BM3 および M8 も、未処理 Ms のそれぞれ、1.2倍、1.4倍および2.4倍に増加した。なお、新たに5種類の代謝物 (M1, M3, M5, M6 および M7) が生成されたが、生成活性はいずれも 0.01~0.18 nmol/min/mg protein と低かった。一方、MC 前処理 Ms では、M1 が最も多く生成された (1.48 nmol/min/mg protein)。また、新たに M4 および BM1

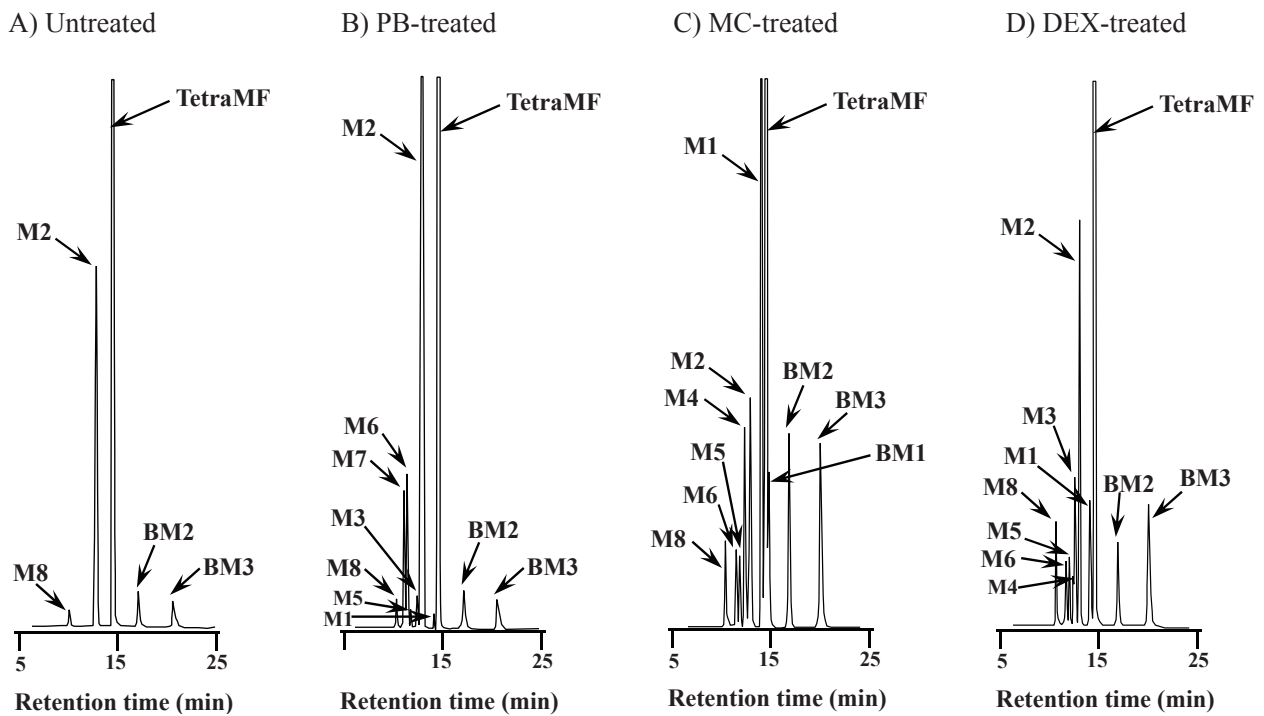


Fig. 1 HPLC chromatograms of TetraMF and its metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B), MC-treated (C) and DEX-treated (D) rats.

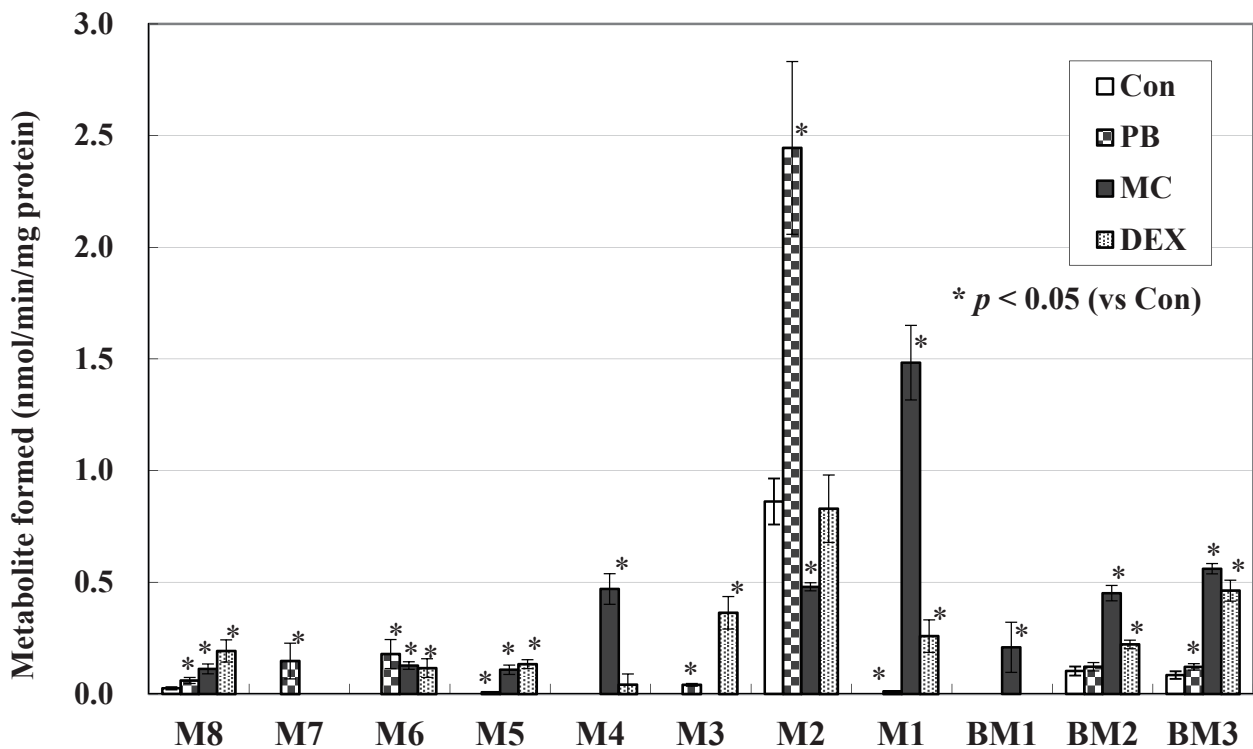


Fig. 2 Effect of CYP inducers on TetraMF metabolism by rat liver microsomes.

Con represents liver microsomes of untreated rats. Each bar represents mean \pm S.D. of four rats.

*Significantly different from untreated rats, $p < 0.05$.

が検出され、それぞれ0.47および0.21 nmol/min/mg proteinであった。なお、BM2, BM3およびM8は、未処理Msのそれぞれ4.4倍、6.6倍および4.4倍と顕著に増加したが、M2は逆に未処理Msの60%に減少した。さらに、DEX前処理Msでは、M2が最も多く、未処理Msと類似していたが、M8とBM3は、未処理Msの5倍以上に増加した。また、未処理Msで見られないM6, M5, M3およびM1が新たに生成された。

2. 代謝物の化学構造

TetraMF代謝物の分子量を明らかにするため、TetraMF代謝抽出液をLC-MSにて分析した。すなわち、TetraMF代謝抽出液としては、MC前処理ラット肝Msのものを主に用いたが、M3およびM7に関しては、それぞれDEXおよびPB前処理ラット肝Msのものをを用いて調べた。その結果をTable 1に示した。

TetraMFは、保持時間6.56 minに、 m/z 343 $[M+H]^+$ として検出された。一方、代謝物のうち、M5, M2およびBM3は m/z 329 $[M+H-14]^+$ であることから一脱メチル化体であること、M8, M6, BM1およびBM2は m/z 315 $[M+H-28]^+$ であ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。また、M3は m/z 359 $[M+H+16]^+$ を有することから一水酸化体であること、M7とM1は m/z 345 $[M+H+2]^+$ を有することから一水酸化・一脱メチル化体、さらにM4は m/z 331 $[M+H-12]^+$ を有することから一水酸化・二脱メチル化体であることも判明した。

考 察

今回、CYP誘導体前処理ラット肝MsによるTetraMFの代謝を調べた。LC-MSの結果をもとに、Fig. 3にTetraMFの推定代謝経路を示した。ラット肝においてTetraMFから3種類の一脱メチル化体(M5, M2, BM3)、4種類の二脱メチル化体(M8, M6, BM1, BM2)、1種類の一水酸化体(M3)、2種類の一水酸化・一脱メチル化体(M7, M1)、および1種類の一水酸化・二脱メチル化体(M4)の生成が明らかになった。これらの結果から、TetraMFの代謝反応は3段階で連続的に起こることが示唆された。

一般に、PMF類は、脱メチル化されて水酸基になると、逆相系HPLCにおいて、母化合物より早く溶出される^{23, 24)}。しかしながら、最近、PMF類のA環5位の水酸化体が、そのメトキシ体より、遅く溶出されることが報告された^{25, 27)}。本研究のBM3は、 m/z 329 $[M+H-14]^+$ を有することから一脱メチル化体であったが、母化合物のTetraMFより約6分遅れて溶出されたことから、BM3は5-OH-7,3',4'-TriMFであると推定された。また、LC-MSの結果から、BM1およびBM2はいずれも二脱メチル化体であったが、BM3と同様に母化合物より遅く溶出されたことから、両者とも二脱メチル化のうち、一つはA環の5位が脱メチル化された代謝物であることが示唆された。一方、BM1の生成は、MC前処理肝でのみ生成されたことから、この生成にはMC誘導性

Table 1 LC-MS data of TetraMF and its metabolites formed by rat liver microsomes

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (m/z)	Metabolic pattern
M8	5.61	315 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation
M7	6.19	345 $[M+H+2]^+$	Hydroxylation and mono-demethylation
M6	6.21	315 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation
M5	6.41	329 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation
M4	6.72	331 $[M+H-12]^+$	Hydroxylation and di-demethylation
M3	6.89	359 $[M+H+16]^+$	Hydroxylation
M2	6.99	329 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation
M1	7.71	345 $[M+H+2]^+$	Hydroxylation and mono-demethylation
TetraMF	7.88	343 $[M+H]^+$	
BM1	8.18	315 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation
BM2	9.44	315 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation
BM3	11.74	329 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation

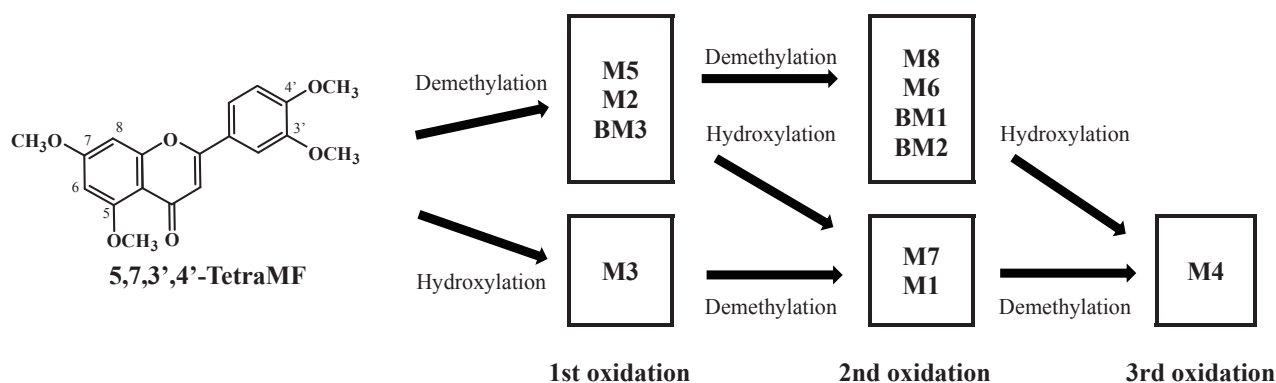


Fig. 3 Postulated metabolic pathways of TetraMF in rat liver.

CYP1A 酵素が、また、BM2および BM3の生成は、MC および DEX 前処理肝により顕著に増加したことから、これらの生成には MC 誘導性 CYP1A 酵素と DEX 誘導性 CYP3A 酵素が関与することが示唆された。

次に、M2および M5も、BM3と同様に一脱メチル化体であった。このうち M2は、未処理 Ms で主代謝物であり、PB 前処理によって2.8倍に増加した。この結果は、既報^{23, 24)} の nobiletin 代謝のパターンと類似しており、これと比較すると、M2は A 環 7 位の脱メチル化体 (7-OH-5,3',4'-TriMF) であると推定できる。一方、M5 については MC および DEX 前処理で有意に増加したことから、B 環 4' 位の脱メチル化体 (4'-OH-5,7,3'-TriMF) と考えられる。

一方、M3は、PB および DEX 前処理肝でのみ生成された。これまでフラボノイド類の代謝において、水酸化反応は主に A 環の 6 位および B 環の 3' 位で水酸化されることが報告されている¹⁹⁻²²⁾。本研究の TetraMF では 3' 位がメトキシ基で置換されていることから、M3は、6-OH-5,7,3'-TriMF であると考えられる。一方、前述の Mekjaruskul ら²⁵⁾ の黒ショウガ抽出物によるラットでの in vivo 代謝では、糞尿中から11種類の代謝物を報告している。しかしながら、これらの中に水酸化された代謝物は含まれていない。実際、本研究でも、M3は、未処理肝で全く生成されなかった。この事実は、M3が PB 誘導性 CYP2B 酵素あるいは DEX 誘導性 CYP3A 酵素により、特異的に生成されることを示唆している。

MC 前処理肝では、M1 (一水酸化・一脱メチル化体) が最も多く生成された。しかしながら、水酸化体の M3 は、MC 前処理肝で全く生成されなかった。これらの結果から、MC 前処理肝による M1は、まず脱メチル化された後、水酸化されて生成されたものと推察される。また、MC 前処理ラット肝では、M4 (一水酸化・二脱メチル化体) も特異的に増加した。この M4は、M1が脱メチル化されたものと推定されるが、この点は今後の課題である。また、TetraMF から M1へ、さらには M4

への一連の代謝反応において、MC 誘導性の CYP1A 酵素が強く関与することが示唆された。

最近、水酸基が 1～3 個置換された PMF 類が生理活性を有するという報告が増えてきている²⁸⁻³¹⁾。例えば、nobiletin 代謝物の 3',4'-diOH 体が抗炎症作用を示すこと、また、ある PMF の 5-OH 体が抗がん作用を示すこと、さらに、ある PMF の水酸化体が細胞増殖阻害作用を示すことなどが明らかにされた。ごく最近では、TetraMF の 5,6-diOH 体や TriMF の三脱メチル化 (5,6,4'-triOH) 体が抗アレルギー作用を示すことが報告された³²⁾。これらの結果は、黒ショウガ含有の PMF 類が示す生理活性に関して、母化合物だけではなく、代謝物も大きく関与している可能性を示している。この点も今後の課題である。

総 括

1. 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (TetraMF) のラット肝 Ms による代謝を調べた。また、CYP 誘導剤前処理の効果も調べた。
2. TetraMF 代謝物として、合計11種類が検出された。LC-MS の結果、分子量から、一脱メチル化体が 3 種類 (BM3, M2, M5)、一水酸化体が 1 種類 (M3)、二脱メチル化体が 4 種類 (BM1, BM2, M6, M8)、一水酸化・一脱メチル化体が 2 種類 (M1, M7)、一水酸化・二脱メチル化体が 1 種類 (M4) であった。
3. 未処理ラット肝では、M2が主代謝物であったが、PB 前処理により、M2, M6および M8が有意に増加した。MC 前処理では、M1, BM3, M4, BM2および BM1が有意に増加した。また、DEX 前処理では、BM3, M3, M1, BM2および M8が有意に増加した。以上の結果から、TetraMF の代謝には、CYP1A 酵素および CYP3A 酵素が強く関与することが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業，H27-食品-指定-017 古賀信幸）および日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究(C)，No. 25350115 太田千穂）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。

Abstract

Polymethoxyflavones (PMFs) such as 5,7-dimethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone (TriMF), 3,5,7-TriMF, 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (TetraMF) and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone are found abundantly in the rhizomes of black ginger (*Kaempferol Parviflora*) and have been reported to show various biological effects such as inhibitory effect of P-glycoprotein, anti-inflammatory effect, cytotoxicity against cancer cell lines, anti-gastric ulcer effect and anti-allergic activity. To elucidate whether parent compounds or their metabolites possess their activities, we examined the *in vitro* metabolism of TetraMF by rat liver microsomes and the effects of cytochrome P450 (CYP) inducers such as phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) and dexamethazone (DEX) on the metabolism of TetraMF. In this study, eleven metabolites were detected and determined by LC-MS. They consist of a hydroxy (OH)-TetraMF (M3), three monodemethylated TetraMF (BM3, M2, M5), four didemethylated TetraMF (BM1, BM2, M6, M8), two OH-monodemethylated TetraMF (M1, M7) and a OH-didemethylated TetraMF (M4). M2 was the main metabolite in untreated, PB-treated and DEX-treated rats. PB treatment increased M2, M6 and M8 significantly. MC treatment increased BM3 and BM2 significantly and resulted in three new metabolites, M1, BM1 and M4. DEX treatment increased BM3, BM2 and M8, and also produced M1 and M3. These results suggest that MC- and DEX-induced CYP, CYP1A and CYP3A enzymes, are most important in TetraMF metabolism.

文 献

- 1) 十一元晴. 2005. カンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究. 薬学雑誌125(3): 231-254.
- 2) Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical

significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96(2-3): 67-202.

- 3) 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: 2065-2071.
- 4) Tanaka S, Sato T, Akimoto N, Yano M, Ito A. 2004. Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* 68: 433-439.
- 5) Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M. 2004. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 20(Suppl. 1): 95-101.
- 6) 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.
- 7) 大泉康. 2015. 認知症の予防・治療技術開発の新しい戦略—天然物を用いたアプローチ—. 薬学雑誌 135(3): 449-464.
- 8) 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.
- 9) Patanasethanont D, Nagai J, Yumoto R, Murakami T, Sutthanut K, Sripanidkulchai BO, Yenjai C, Takano M. 2007. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(1): 223-233.
- 10) Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 75(1): 89-92.
- 11) Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Kummee S. 2008. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology* 116(1): 191-193.
- 12) Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. 2008. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide,

- prostaglandin E2 and tumor necrosis factor- α productions in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 120(1): 81-84.
- 13) Sae-wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. 2009. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 124(3):576-580.
- 14) Horigome S, Yoshida I, Tsuda A, Harada T, Yamaguchi A, Yamazaki K, Inohana S, Isagawa S, Kibune N, Satoyama T, Katsuda S, Suzuki S, Watai M, Hirose N, Mitsue T, Shirakawa H, Komai M. 2014. Identification and evaluation of anti-inflammatory compounds from *Kaempferia parviflora*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 78(5): 851-860.
- 15) Nakao K, Murata K, Deguchi T, Itoh K, Fujita T, Higashino M, Yoshioka Y, Matsumura S, Tanaka R, Shinada T, Ohfune Y, Matsuda H. 2011. Xanthine oxidase inhibitory activities and crystal structures of methoxyflavones from *Kaempferia parviflora* rhizome. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34(7): 1143-1146.
- 16) Murata K, Hayashi H, Matsumura S, Matsuda H. 2013. Suppression of benign prostate hyperplasia by *Kaempferia parviflora* rhizome. *Pharmacognosy Research* 5(4): 309-314.
- 17) Wu L, Liu H, Li L, Liu H, Yang K, Liu Z, Huang H. 2014. 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone exhibits chondroprotective activity by targeting β -catenin signaling in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452(3): 682-688.
- 18) Horikawa T, Shimada T, Okabe Y, Kinoshita K, Koyama K, Miyamoto K, Ichinose K, Takahashi K, Aburada M. 2012. Polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora* induce adipogenesis on 3T3-L1 preadipocytes by regulating transcription factors at an early stage of differentiation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35(5): 686-692.
- 19) 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.
- 20) Breinholt VM, Offord EA, Brouwe C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. 2002. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 40(5): 609-616.
- 21) 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.
- 22) Xiao J, Högger P. 2013. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. *Current Drug Metabolism* 14(4): 381-391.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Mekjaruskul C, Jay M, Sripanidkulchai B. 2012. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution, excretion, and metabolite identification of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* extract in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 40(12): 2342-2353.
- 26) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275
- 27) Zheng J, Fang X, Cao Y, Xiao H, He L. 2013. Monitoring the chemical production of citrus-derived bioactive 5-demethylnobiletin using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(34): 8079-8083.
- 28) Li S, Pan MH, Lai CS, Lo CY, Dushenkov S, Ho CT. 2007. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15(10): 3381-3389.
- 29) Lai CS, Li S, Chai CY, Lo CY, Dushenkov S, Ho CT, Pan MH, Wang YJ. 2008. Anti-inflammatory and antitumor promotional effects of a novel urinary metabolite, 3',4'-didemethylnobiletin, derived from nobiletin. *Carcinogenesis* 29(12): 2415-2424.
- 30) Qiu P, Dong P, Guan H, Li S, Ho CT, Pan MH, McClements DJ, Xiao H. 2010. Inhibitory effects of 5-hydroxy polymethoxyflavones on colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 54(Suppl. 2): S244-252.
- 31) Qiu P, Guan H, Dong P, Li S, Ho CT, Pan MH, McClements DJ, Xiao H. 2011. The p53-, Bax- and p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by 5-hydroxy polymethoxyflavones. *Molecular Nutrition and Food Research* 55(4): 613-622.
- 32) Sato A, Tamura H. 2015. High antiallergic activity of 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone and 5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone from eau de cologne mint (*Mentha × piperita citrata*). *Fitoterapia* 102: 74-83.