

マウスにおけるジオスメチン及びジオスミンの体内動態の検討

川筋 透, 松永 孝之

Pharmacokinetic studies of diosmetin and diosmin in mice

Toru KAWASUJI and Takayuki MATSUNAGA

要 約

ジオスメチン及び配糖体ジオスミンのマウスにおける吸収性を、ODS カラムを用いた HPLC-UV 法 (275 nm, 345 nm) によって検討した。ジオスメチン (100 mg/kg) の経口投与後、マウス血漿中にジオスメチンは検出されず、グルクロニダーゼ処理血漿中にジオスメチンが検出された。投与30分、1時間及び4時間後でのジオスメチンのグルクロニダーゼ処理血漿中濃度は、それぞれ1.3 µg/mL、1.3 µg/mL 及び0.7 µg/mL であった。一方、ジオスミン (2 g/kg) の経口投与4時間後、グルクロニダーゼ処理血漿中にジオスメチンは検出されなかった。これらの結果から、ジオスメチンは、消化管から吸収され、グルクロン酸抱合体としてマウスの血漿中に存在することが示唆された。

Summary

The absorption of diosmetin and its glycoside, diosmin in mice was investigated by HPLC-UV (275 nm, 345 nm) using ODS column. Diosmetin was not detected in mouse plasma but was detected in glucuronidase-treated mouse plasma after oral administration of diosmetin (100 mg/kg). The concentration of diosmetin in glucuronidase-treated plasma at 30 min, 1h and 4 h after administration were 1.3 µg/mL, 1.3 µg/mL and 0.7 µg/mL, respectively. On the other hand, diosmetin was not detected in glucuronidase-treated plasma after oral administration of diosmin (2 g/kg). These results suggest that diosmetin is absorbed from gastrointestinal tract and is presented as glucuronide in mouse plasma.

キーワード：ジオスメチン、ジオスミン、マウス、血漿、グルクロン酸抱合体

Key words : Diosmetin, Diosmin, Mouse, Plasma, Glucuronide

生理活性天然物の有用性評価において、吸収・代謝に関する情報は重要である。また、マウスを用いて薬効評価試験を行う場合には、マウスに経口投与した場合の血中濃度を知っておくことが望ましい。

フラボノイドの体内動態に関して、多くのフラボノイドでは、動物体内で大部分が抱合体化され、遊離型は痕跡程度しか見出せない場合が多いとされている¹⁾。

ジオスミンは、柑橘類に含まれるフラボノイドの1つであり²⁾、ジオスメチンにルチノースが結合したフラボン配糖体である。ジオスミン及びジオスメチンには、種々の生理活性が知られており^{3,4)}、ヒトやラットでの体内動態が報告されているが⁵⁻⁸⁾、マウスでの体内動態に関する報告はほとんどみられない。

ジオスミンの体内動態に関して、ヒトとラットで異なる結果が報告されている^{5,7)}。ジオスミン経口投与後、ヒト血中にジオスミンは不検出であるが、ジオスメチンが検出されるとの報告⁵⁾がある一方で、ラット血中にジオスミンが検出されるとの報告⁷⁾もある。

また、ジオスメチンの体内動態に関しては、ジオスメチンを経口投与後、ラット血中にジオスメチンは検出されないが、ジオスメチンのグルクロン酸抱合体が検出されるという報告がある⁶⁾。

今回、ジオスメチン及び配糖体のジオスミンについて、マウスにおける体内動態を明らかにすることを目的として、経口投与後の血中濃度を測定し、消化管吸収性を検討したので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用薬物

ジオスメチン (LKT Laboratories)、ジオスミン (MP Biomedicals)、β-グルクロニダーゼ溶液 (和光純薬、25,000 units/mL、リンゴ貝起源、硫酸懸濁液)、安息香酸 (和光純薬) 他を使用した。

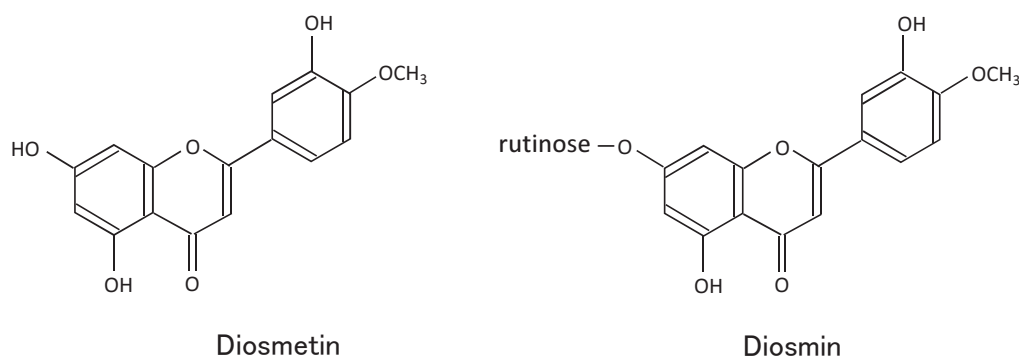


Fig. 1 Chemical structures of diosmetin and diosmin.

2. 投与・採血

投与前日夕刻に ICR 雄性マウス（体重25–40g）を個別金網ケージに移し、1 晩絶食（自由飲水）した。検体は0.5% Tween 80 水溶液に懸濁し、ジオスメチンは100 mg/kg、ジオスミンは2 g/kg の割合でゾンデを用いて強制経口投与し、一定時間経過後（～4 時間）に採血を行った。なお、溶媒投与群には0.5% Tween 80 水溶液を10 mL/kg の割合で経口投与した。採血前に麻酔薬のペントバルビタールナトリウムを約25 mg/kg 背部皮下投与した（5 mg/mL 液、約5 mL/kg）、10–15分後にマウスの眼窩静脈叢をヘパリン処理ガラス毛细管（先端破損）で傷つけ、マイクロチューブ（EDTA-2Na 0.25 mg 入）に血液を採取した。血液は3,000 rpm で10分間遠心し、遠心上清を再度遠心し、血漿を得た。血漿は HPLC 分析当日まで-80°C に保存した。

3. 標準液の調製

ジオスメチン DMSO 溶液（1 mg/mL）、ジオスミン DMSO 溶液（1 mg/mL）及び内部標準物質の安息香酸⁷⁾ のメタノール溶液（1 mg/mL）の各0.1 mL にメタノール 1.7 mL と水 2.0 mL を加えて25 µg/mL 混液を調製した（合計4.0 mL；メタノール45%，DMSO 5%）。次に、25 µg/mL 混液0.2 mL に、メタノール1.8 mL、水2.0 mL 加えて希釈し（合計4.0 mL）、ジオスメチン、ジオスミン及び安息香酸が各1.25 µg/mL となる標準液を調製し、0.2 µ のシリンジフィルター（ワットマン、13mm、ポリプロピレン）でろ過し、HPLC 分析における標準試料として使用した。

検量線の直線性を確認するため、25 µg/mL 混液 1 mL にメタノール 2 mL と水 2 mL を加えて5 倍希釈し5 µg/mL を調製した。同様な5倍希釈を繰り返し、1 µg/mL と0.2 µg/mL の標準液を調製した。

4. HPLC 分析

HPLC カラムは、L-column ODS ((財) 化学物質評価研

究機構、4.6 mm × 150 mm) を使用し、移動相は、メタノール/水/酢酸 (47:53:5)⁷⁾ とした。UV 検出器（島津製作所、SPD-10Avp）の波長は、275 nm⁷⁾ または345 nm⁵⁻⁶⁾ に設定した。流量は0.8 mL/分、カラム温度は34°C、注入量は10 µL とし、オートサンプラーで HPLC カラムに注入した。HPLC 装置の制御、データ処理には、島津製作所のクロマトグラフィデータシステム CLASS-VP を使用した。

5. 血漿中のジオスメチン及びジオスミンの分析

マウスの血漿は、メタノールと DMSO を添加して抽出・除蛋白し、遠心上清を HPLC で分析した。血漿40 µL の場合、DMSO を12 µL（血漿量×0.3）、安息香酸メタノール溶液（10 µg/mL）を60 µL（血漿量×1.5）、メタノールを160 µL（血漿量×4）添加し、混和後、氷冷放置した。4,000 rpm で10分間遠心し、遠心上清を0.2 µ のシリンジフィルターでろ過し、HPLC 分析試料とした（272 µL；血漿の6.8倍希釈）。内標の安息香酸は、血漿中濃度が15 µg/mL となる。

血漿に標準品を添加し分析する実験では、血漿に DMSO を加える段階で、ジオスメチンまたはジオスミンの DMSO 溶液を血漿に添加して HPLC 分析試料を調製した。血漿40 µL に対して、2.5 µg/mL または25 µg/mL の DMSO 溶液12 µL（血漿量×0.3）を添加した場合は、それぞれ0.75 µg/mL 血漿または7.5 µg/mL 血漿の濃度となる。

6. 血漿中のグルクロン酸抱合体の分析

血漿中のグルクロン酸抱合体を検出するため、血漿を酸性化し、グルクロニダーゼを反応させ、脱抱合を行った⁹⁾。すなわち、マイクロチューブ中の血漿40 µL に対して1M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）4 µL を加え、吸排混和し、次に β-グルクロニダーゼ（25,000 units/mL）2 µL を加えて、吸排混和し、37°C 1 時間ドライバスで加温することでグルクロニダーゼ処理を行った。グルクロニダーゼ処理血漿の場合も、血漿の場合と同じ手順で抽出・除蛋白を

行い、HPLC分析試料を調製した。血漿40 μL に対してグルクロニダーゼ処理血漿は46 μL になり、DMSO・メタノールの添加量は同じあり、最終的にHPLC分析試料は278 μL となるので、最初の血漿に対して6.95倍希釈となる。この希釈倍率に基づいて、血漿中濃度を算出した。

実験結果

1. 標準品の溶出挙動

配糖体のジオスミン(約4.2分)、内標の安息香酸(約6.3分)、アグリコンのジオスメチン(約15.7分)の順に溶出した(Fig. 2)。345 nmでの分析では、275 nmでの分析と異なり、安息香酸のピークは検出されなかった。345 nmでのジオスミン及びジオスメチンのピークは275 nm

での場合よりも大きく、ピーク検出感度はやや高かった。

標準品の濃度とピーク面積の間に0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで直線性がみられた。

2. 標準品添加血漿の分析

血漿に標準品を添加した場合、HPLCクロマトグラム上のジオスメチンの溶出位置には、275 nmと345 nmのいずれ場合も妨害ピークはみられなかった。一方、ジオスミンの溶出位置には、345 nmでは妨害ピークはなかったが、275 nmでは妨害ピークがみられた。

血漿に標準品を添加した場合の回収率を275 nmでの分析で検討した(Fig. 3)。その結果、ジオスメチンを0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血漿または7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血漿の濃度となるように添加した場合の回収率は、それぞれ60.7% (n=3) 及び99.9

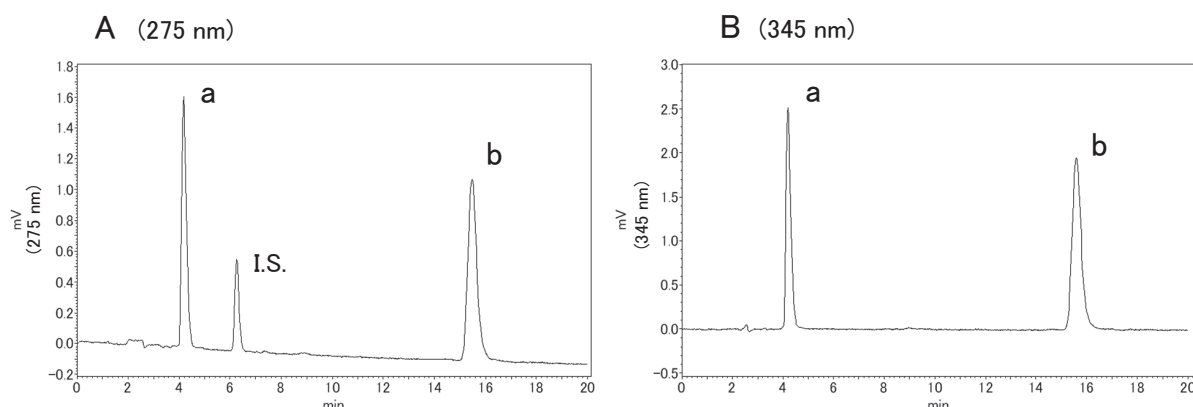


Fig. 2 HPLC chromatograms of standards of diosmetin and diosmin

a: diosmin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), b: diosmetin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), I.S.: internal standard benzoic acid (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ODS column was used. Mobile phase was methanol/water/acetic acid (47:53:5). Detector was conducted at 275 nm or 345 nm.

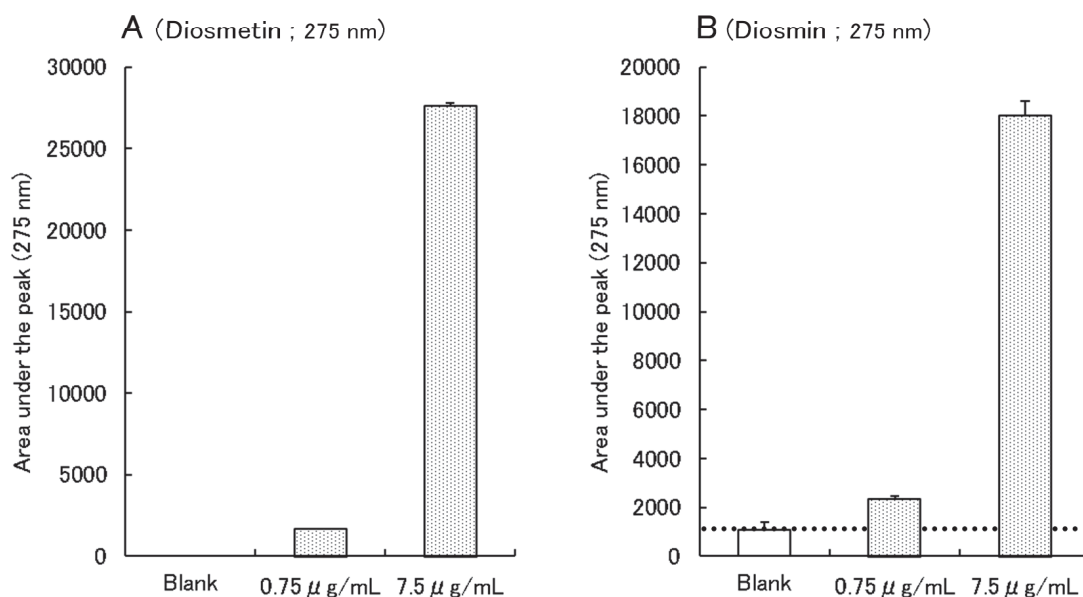


Fig. 3 Area under the peak in diosmetin- or diosmin-added mouse plasma

Diosmetin (A) or diosmin (B) was added to mouse plasma. Final concentrations were 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Blank: No addition. Each column is presented as a mean and S.E.(n = 3-5).

% (n=3)であった。一方、ジオスミンの場合は、無添加血漿におけるピーク面積 (n=5) を差し引いて回収率を計算したところ、ジオスミンを0.75 µg/mL 血漿または7.5 µg/mL 血漿の濃度となるように添加した場合の回収率は、それぞれ78.3% (n=3) 及び99.1% (n=3) となった。

3. ジオスメチン投与後のグルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの検出

ジオスメチンの100 mg/kg 経口投与30分後の血漿の分析では、ジオスメチンの溶出位置にピークは検出されなかった。一方、安息香酸の溶出時間 (約6.3分) の直前に、特異的ピークが検出された (約5.8分)。一方、血漿をグルクロニダーゼ処理すると、ジオスミンの溶出位置にピークが検出され、無処理血漿でみられた特異的ピーク (ジオスメチン関連グルクロナイド) は消失した (Fig. 4)。

ジオスメチン経口投与後のグルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの濃度は、30分値と1時間値がほぼ同じであり、4時間値はその約1/2であった。275 nm での分析と345 nm での分析では、ほぼ同じ結果が得られ、30分、1時間及び4時間後の濃度 (2波長での平均) は、それぞ

れ1.3 (1.29) µg/mL, 1.3 (1.35) µg/mL 及び0.7 (0.66) µg/mL であった (Fig. 5)。

なお、275 nm での内標法でも同様な濃度が算出され、30分、1時間及び4時間後の濃度は、それぞれ1.1 (1.13) µg/mL, 1.2 (1.16) µg/mL 及び0.6 (0.58) µg/mL (n=3) であった。

4. ジオスミン投与後の血漿分析

ジオスミンの2 g/kg 経口投与4時間後の血漿を345 nm で分析したところ (n=3)、ジオスミンのピークは検出されず、ジオスメチン投与時にみられる特異的なピーク (ジオスメチン関連グルクロナイド) も検出されなかった (Fig. 6,7)。また、グルクロニダーゼ処理血漿の分析 (n=3) では、ジオスメチンのピークも検出されなかった (Fig. 6,7)。

グルクロニダーゼ処理血漿の HPLC クロマトグラム上には、ジオスミンの溶出位置に不明ピークが出現したが、溶媒投与群にもみられるピークであり、ピークの大きさに差はほとんどみられなかった。

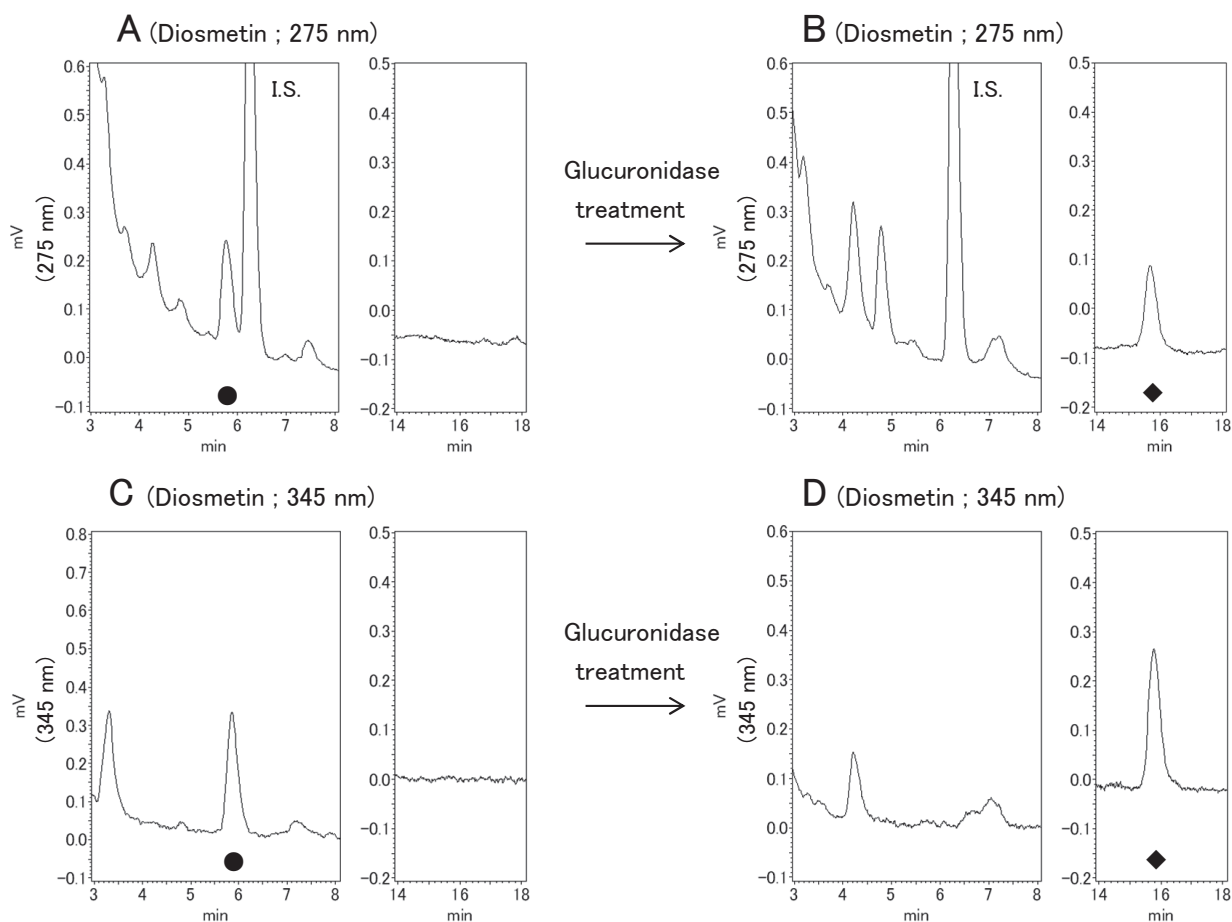


Fig. 4 HPLC chromatograms of glucuronidase-treated plasma of diosmetin-administered mice
Blood was collected 0.5 h after oral administration of diosmetin at 100 mg/kg. ●: diosmetin-related glucuronide, ◆: diosmetin. I.S.: internal standard (benzoic acid).

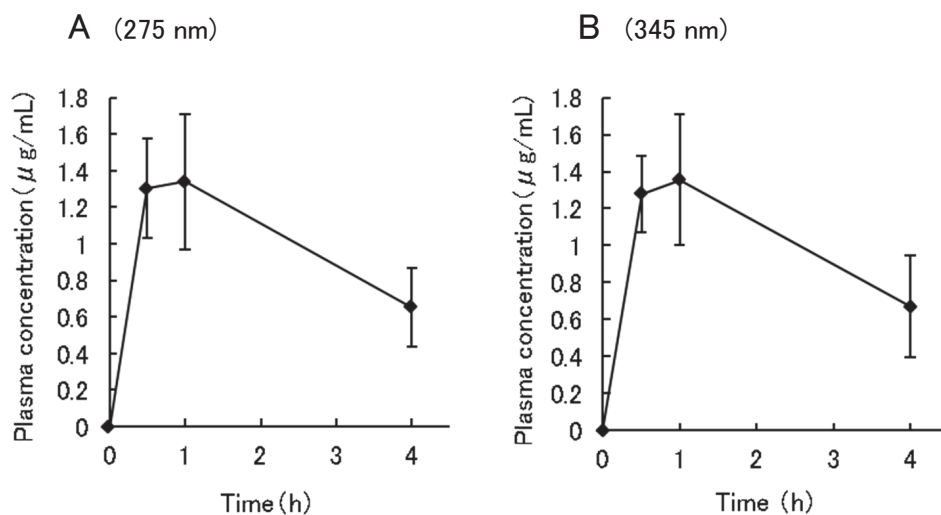


Fig. 5 Concentration of diosmetin in glucuronidase-treated mouse plasma
 Concentrations of diosmetin in glucuronidase-treated mouse plasma were determined at 275 nm (A) and 345 nm (B). Diosmetin was orally administered at 100 mg/kg. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 3 mice.

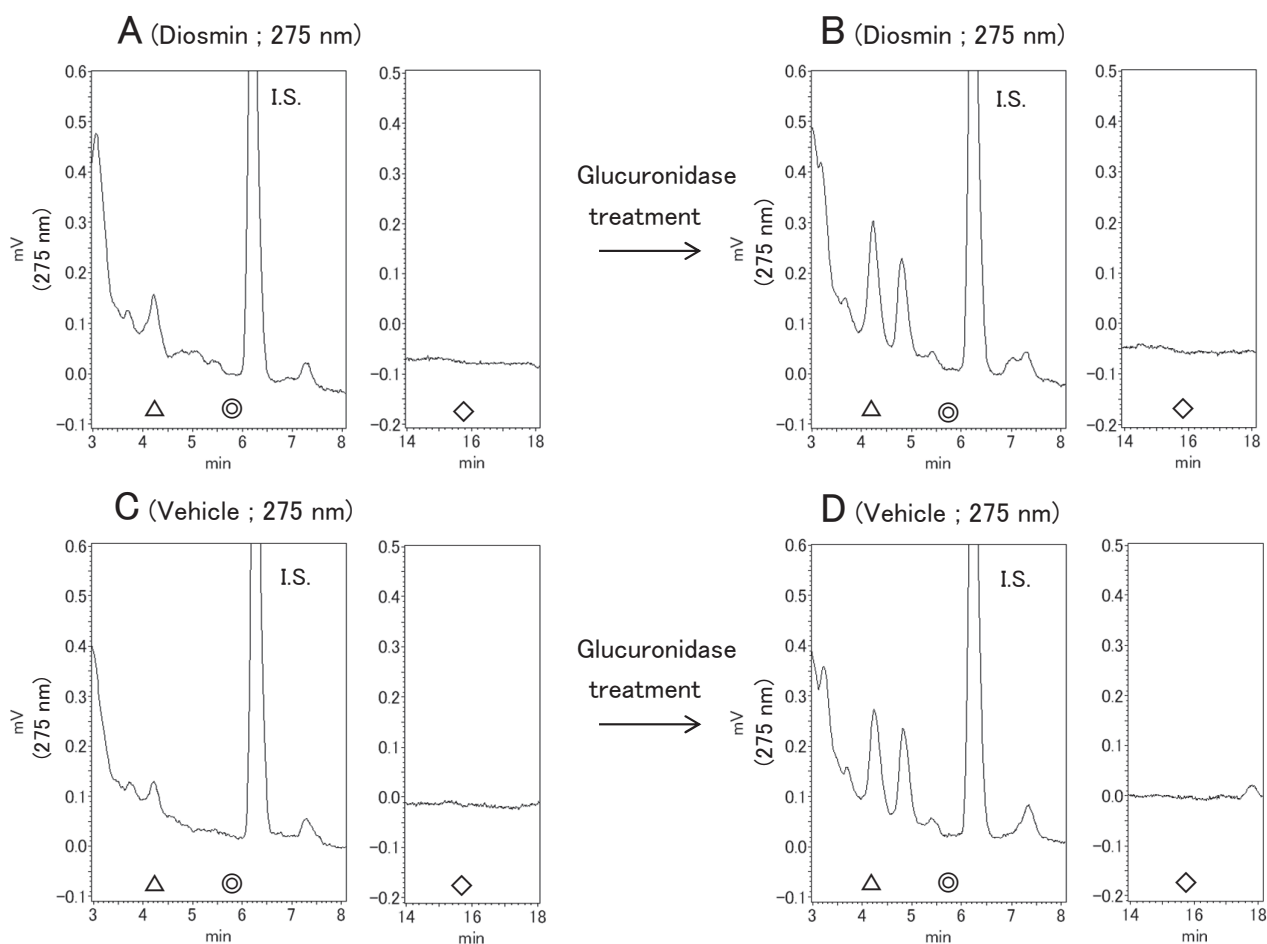


Fig. 6 HPLC chromatogram of glucuronidase-treated plasma of diosmin-administered mice (at 275 nm)
 Blood was collected 4 h after oral administration of diosmin at 2 g/kg. Vehicle: 0.5% tween 80 solution. Symbols show the retention time of diosmin (Δ), diosmetin-related glucuronide (\odot) and diosmetin (\diamond). I.S.: internal standard (benzoic acid).

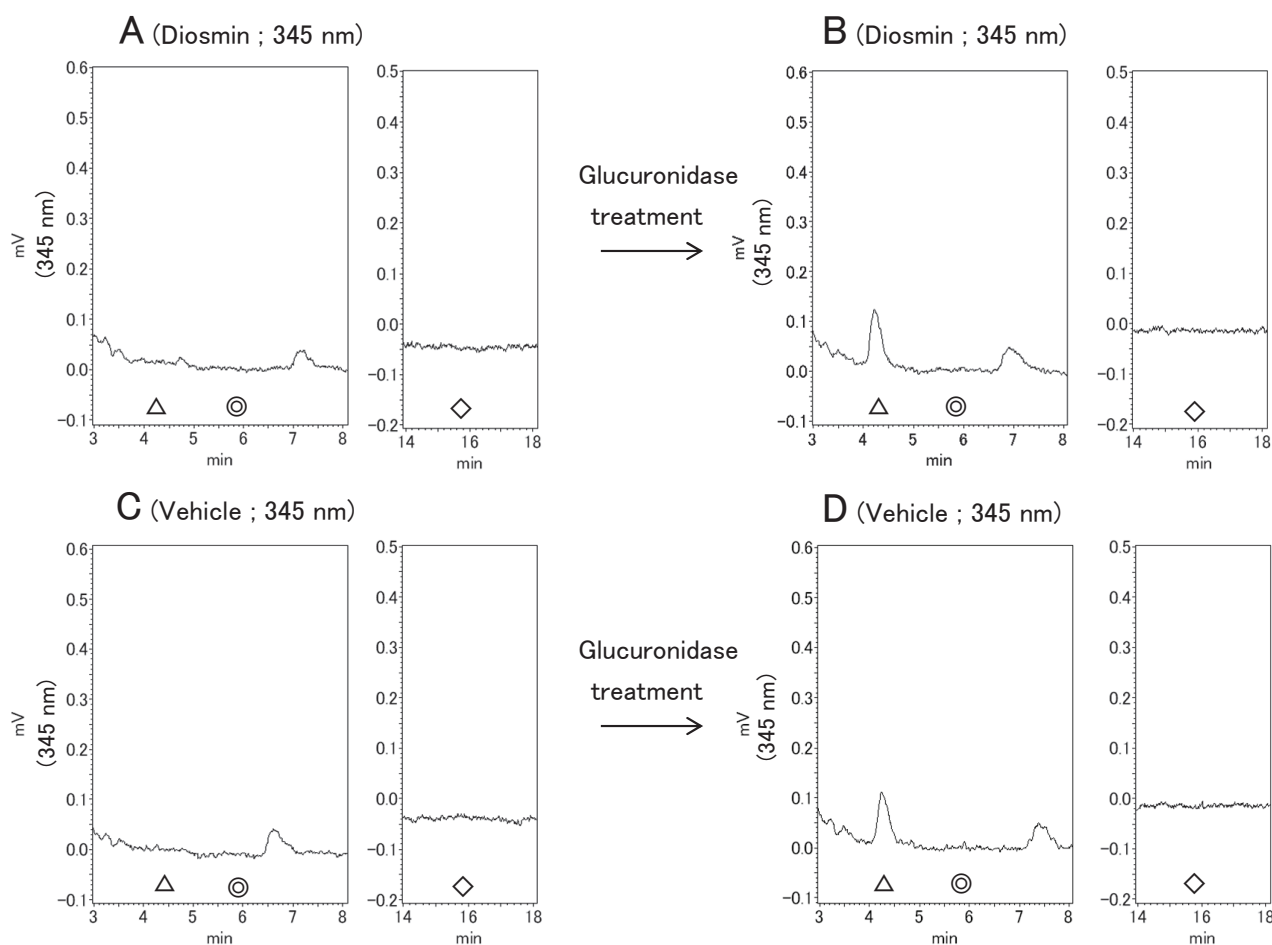


Fig. 7 HPLC chromatogram of glucuronidase-treated plasma of diosmin-administered mice (at 345 nm)

Blood was collected 4 h after oral administration of diosmin at 2 g/kg. Vehicle: 0.5% tween 80 solution. Symbols show the retention time of diosmin (Δ), diosmetin-related glucuronide (\odot) and diosmetin (\diamond).

考 察

血液試料中のジオスメチンやジオスミンの HPLC 分析では、検出波長に 275 nm⁷⁾ または 345 nm^{5,6)} を用いる方法が報告されており、今回、275 nm と 345 nm の 2 つの波長を HPLC 分析で用いた。今回の HPLC 条件では、ジオスメチンの場合は、2 波長とも妨害ピークはなく濃度測定に問題はなく、検出感度は 275 nm より 345 nm のほうが高かった。ジオスミンの場合は、275 nm においてジオスミンの溶出位置に妨害ピークがみられ、345 nm での分析が適していた。

ジオスメチンは、ラットへの経口投与後、すぐに抱合体化し、グルクロン酸抱合体として血中に存在するとされ、グルクロン酸抱合体の血中濃度は高く、100 mg/kg の経口投与で 10 μ g/mL までになり、少なくとも投与後 6 時間は血中に存在すると報告されている⁶⁾。また、主たる抱合体は、ジオスメチン-7,3'-ジグルクロナイドとジオスメチン-3'-グルクロナイドであると報告されている⁶⁾。

グルクロン酸抱合体の分析のために、血漿をグルクロニ

ダーゼで処理する方法が用いられる⁹⁾。今回、マウスの血漿でグルクロニダーゼ処理を行い、血中のグルクロン酸抱合体の有無を検討した。ジオスメチンの経口投与後、マウス血漿中にジオスメチンのピークは検出されなかったが、マウス血漿をグルクロニダーゼ処理すると、ジオスメチンのピークが検出された。また、ジオスメチン投与マウスの血漿には、溶媒投与マウスにはみられない特異的なピークが検出され、そのピークはグルクロニダーゼ処理で完全に消失したことから、ジオスメチンのグルクロン酸抱合体のピークと考えられた。

ラットの場合⁶⁾と同様に、今回のマウスの場合も、ジオスメチンは経口投与後、グルクロン酸抱合体となって血中に存在しているものと考えられた。グルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの濃度は、100 mg/kg の経口投与 30 分後に 1.3 μ g/mL 血漿となり、1 時間後はほぼ同じ値を示し、4 時間後は、その約 1/2 の 0.7 μ g/mL 血漿になるという推移を示した。

ヒトでの体内動態研究では、ジオスミンの 10 mg/kg の投与で、血中にジオスミンは検出されないが、ジオスメチ

ンが検出され、1時間後に約400 ng/mLとなり、その後、濃度は低下しながら長時間にわたって血中にジオスマチンが検出されるという報告がある⁵⁾。一方、ラットの場合、ジオスミンが血中に比較的高い濃度で長時間にわたって検出されるという報告もみられる⁷⁾。さらに、別のヒトでの報告では、ジオスミンの投与で、ヒト血漿中に遊離型のジオスマチンはみられず、ジオスマチンのグルクロン酸抱合体が検出されている⁸⁾。

今回、配糖体であるジオスミンの体内動態をマウスで検討するにあたり、投与後3-4時間で最も高濃度にジオスミンが検出されるというラットでの報告⁷⁾もあることから、投与4時間後のマウスの血漿を分析対象とした。ジオスミンの2 g/kgという高用量の経口投与において、血漿中にジオスミンは検出されず、グルクロニダーゼ処理を行ってもアグリコンであるジオスマチンのピークは検出されなかった。

今回のマウスの実験では、血中にジオスミンは検出されず、ラットでの報告⁶⁾と異なる結果であった。ジオスミン投与でジオスマチン及びジオスマチンのグルクロン酸抱合体は検出されず、ヒトでの報告^{5,8)}と異なる結果であった。

今回のマウスにおける単回経口投与と実験での血中濃度分析では、ジオスマチンの消化管吸収性は良いが、ジオスミンの消化管吸収は悪いという結果であった。また、血中に存在するのはジオスマチンでなく、そのグルクロン酸抱合体という結果であった。薬効評価においては混餌による長期投与も行われることから、連続経口投与の場合の体内動態については今後の検討課題である。

文 献

- 1) 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井 明: 天然抗酸化物質の吸収と代謝, 化学と生物, **38**, 104-114 (2000)
- 2) Kanaze F.I., Gabrieli C., Kokkalou E., Georgarakis M., Niopas I.: Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, J. Pharm. Biomed. Anal., **33**, 243-249 (2003)
- 3) Monograph Diosmin, Artern. Med. Rev., **9**, 308-311 (2004)
- 4) Rezai-Zadeh K., Shytle R. D., Bai Y., Tian J., Hou H., Mori T., Zeng J., Obregon D., Town T., Tan J.: Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease β -amyloid production, J. Cell. Mol. Med., **13**, 574-588 (2009)

- 5) Cova D., De Angelis L., Giavarini F., Palladini G., Perego R.: Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., **30**, 29-33 (1992)
- 6) Boutin J.A., Meunier F., Lambert P.-H., Henning P., Bertin D., Serkiz B., Volland J.-P.: In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats, Drug Metab. Dispos. **21**, 1157-66 (1993)
- 7) MA Ying-li, MA Chao: Studies on pharmacokinetics of diosmin in rats, China Journal of Chinese Materia Medica (中国中藥雜誌), **32**, 418-420 (2007)
- 8) Silvestro L., Tarcomnicu I., Dulea C., Attili N.R.B.N., Ciuca V., Peru D., Savu S.R.: Confirmation of diosmetin 3-O-glucuronide as major metabolite of diosmin in humans, using micro-liquid-chromatography-mass spectrometry and ion mobility mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem., **405**, 8295-8310 (2013)
- 9) Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinnae N.: Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans, FEBS Letters, **438**, 220-224 (1998)