

Acetaminophen 硫酸体の有機合成

森田千紘*・谷口玲央真**・吉田実央**・徳永祐希*・木下英樹***・
小野政輝***・黒木勝久***・榊原陽一***・水光正仁****・安田伸***

Chemical Synthesis of Acetaminophen O-Sulfate

Chihiro MORITA, Reoma TANIGUCHI, Mio YOSHIDA, Yuki TOKUNAGA, Hideki KINOSHITA,
Masateru ONO, Katsuhisa KUROGI, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO and Shin YASUDA

(Received 14 December 2021 ; accepted 18 January 2022)

Abstract

Sulfation is a major metabolic pathway responsible for inactivation and excretion of xenobiotics including drugs, wherein cytosolic sulfotransferases play an important role. However, it has not been fully elucidated whether these end products may possess any physiological functions, due to the difficulty of obtaining sufficient amounts of various sulfated metabolites. This study was designed to investigate whether acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol; APAP), an antipyretic analgesic drug, can react with sulfuric acid upon an established method for tyrosine *O*-sulfate synthesis to generate APAP *O*-sulfate (APAP-S). APAP was selected because it has a simple monophenol structure like tyrosine and undergoes sulfation in the body. Results demonstrated that 91.1 mg of the product was obtained as crystals from 1 g of APAP, therefore the calculated yield was 5.11% under molar basis. ¹H-NMR spectrum supported the product to be APAP-S. Moreover, a measuring of absorbance at the maximum absorption wavelength in UV absorption spectrum proved that purity of the synthesized APAP-S was 97.0% in comparison with an authentic standard. (163 words)

緒 言

細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素により触媒される硫酸化は、生体内ではステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の恒常性維持だけでなく、生体外異物や薬物の不活性化ならびに排泄を担う主要な薬物代謝反応経路の1つである(1-4)。しかしながら、薬物代謝後の硫酸体がしばらくは体内に残存し循環することや、ヒドロキシアリアルアミンなど一部の化合物が硫酸化によって代謝活性化される事例もあることから(5)、硫酸化後の代謝物の生理機能に関する研究は不明な部分も多く残る(6)。現状では安価で十分量の硫酸化代謝物の入手と続く代謝物研究が容易ではない場合も多い。

Acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol ; APAP) は別

名 paracetamol や *p*-acetamidophenol とも呼称され、一世紀以上の使用実績を持つ世界で広く使用される解熱鎮痛薬の1つである(7, 8)。アスピリンや、他の非ステロイド性の抗炎症剤と比較して副作用が低いなどの利点がある。APAP はフェノール構造を有しており、主要な薬物代謝経路を経て40–67% がグルクロン酸抱合へ、20–46% が硫酸抱合へ、約5% がシトクロム P450によって *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) を経てグルタチオン抱合へと代謝変換される(7)。これまでに高用量のAPAP が反応性代謝産物とされる NAPQI を介して肝毒性や細胞機能障害を引き起こすことが報告されている(9)。複数薬剤投与時の薬物間相互作用を調べた過去の報告では、APAP の硫酸化ならびにグルクロン酸抱合化の遅延をフェノバルビタールとその代謝物が引き起こすこと(10)、一方で投与条件によっては APAP 硫酸体

* 東海大学大学院農学研究科

** 東海大学農学部バイオサイエンス学科

*** 宮崎大学農学部応用生物科学科

**** 宮崎大学キャリアマネジメント機構

連絡先：安田伸 e-mail : shin.yasuda@agri.u-tokai.ac.jp

(acetaminophen *O*-sulfate; APAP-S) が APAP 自体の体内分布を促進しうること (11), APAP とは異なり APAP-S のみがアンチピリンの血中濃度の低下と脳内への移行を助長する働きを示すこと (12) が報告されている。しかしながら、試薬が高価なこともあり、これまで APAP-S そのものの機能的有用性や生物活性についてはあまり注目されてこなかった。そのため、簡便で安価に APAP-S を有機合成することが可能となれば今後様々な機能性研究に繋がると考えられる。

そこで本研究では既存のチロシン硫酸体 (tyrosine *O*-sulfate) 合成法 (13) を利用して、APAP を濃硫酸と反応させることで APAP-S の合成と分離精製が可能かどうかの検証を行うこととした。APAP はチロシン同様に単純なモノフェノール構造を有し、体内では硫酸化されるため選択した。

材料および方法

試薬類

n-ブチルアルコール、イソプロパノール、88% ギ酸、硫酸、*p*-acetamidophenol (APAP)、水酸化バリウム8水和物 (Ba (OH)₂)、8 mol/L 水酸化カリウム (KOH) 水溶液はナカライテスク (京都) より購入した。エタノール (EtOH)、石油エーテル、DowexTM 50W × 4 100–200 mesh (H) cation exchange resin (Dowex) は和光純薬 (大阪) より入手した。本研究では MilliQ グレードの水を使用した。APAP-S の標品として 4-acetaminophen sulfate potassium salt を Tronto Research Chemicals 社 (カナダ) より購入した。薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography; TLC) 用の silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001) プレートは Merck 社より購入した。

APAP-S の合成、分離精製および結晶化

本研究では、Jevons のチロシン硫酸体合成法に従った (13)。濃硫酸 10 mL に 1 g の APAP を少量ずつ加え、スターラーを用いて攪拌しながら -5℃ で 40 分間反応させた。次に碎氷 (約 350 mL) と過剰量 (約 130 g) の Ba (OH)₂ に反応液を注ぎ、pH が塩基性に傾くまで攪拌した。その後、大量に発生した硫酸バリウムを沈殿させて取り除くため、2,500 xg で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清に CO₂ ガスを吹き込むことで中和し、余剰の Ba (OH)₂ を炭酸バリウムとして析出させた後に上清を回収した。市販の pH 試験紙を用いて pH を確認し、中性になるまで本操作を 3 回程度繰り返した。次に、TLC プレートに APAP (10 mg/mL, 5 μL) および APAP-S

(20 mg/mL, 5 μL) の標品とともに回収した上清の濃縮液 (10 μL) をスポットし、UV 照射下で反応産物を検出した。展開溶媒には *n*-ブチルアルコール：イソプロパノール：ギ酸：水 (3:1:1:1; Vol.) を用いた (14)。

APAP-S 合成物を含む反応液を予めエバポレーターで 30 mL に濃縮後、これを Dowex 陽イオン交換樹脂カラム (10 mL 相当量) に負荷し、水で溶出させることにより、3 mL ずつの Fr.1 – Fr. 15 の 15 画分に分画した。TLC プレートに APAP (10 mg/mL, 1 μL) および APAP-S (20 mg/mL, 1 μL) の標品とともに回収した各画分 (1 μL) をスポットし、UV 照射下で確認後、合成物を含む画分を回収して再度濃縮を行い、計 3 回の分離精製を繰り返した。

APAP-S 様の合成物を含む画分 (計 8 本) を混合し、約 1 mL に濃縮した。既報 (13) に従い、これに 1 M KOH を少量ずつ加えて pH 5.0 に調整し、10 倍量の EtOH と石油エーテル (1:1) の混合液の添加によって合成物を析出させることで APAP-S の結晶をカリウム塩として得た。APAP-S 合成物は、ろ紙 (ADVANTEC No.3, 最大孔径 5 μm) とともに吸引ろ過後、凍結乾燥させた。

各種機器による APAP-S 合成物の測定と真正性の検証

APAP-S 合成物の真正性を調べるため、プロトン核磁気共鳴分光法 (¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy; ¹H-NMR) によるスペクトルの測定を行った。¹H-NMR は JEOL α 500 (日本電子) を用い、試料を重メタノールに溶解後、内部標準にテトラメチルシラン (TMS) を使用し、ケミカルシフトは δ (ppm) スケールで表示した。

高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography; HPLC) による APAP および APAP-S の分離と UV 検出は、0.1 mM となるよう予め調製した試料溶液を用いて、既報 (15) を一部改良して行った。HPLC システムには、日本分光製のフォトダイオードアレイ検出器 (MD-4010) を備えた LC-2000 PLUS シリーズとクロマトグラフィーデータシステム (ChromNAV Ver.2) を使用した。即ち、YMC 社製 ODS カラム (YMC-Pack ODS-A, 内径 4.6 mm x 150 mm, 粒子径 3 μm, 細孔径 12 nm) を用いた逆相クロマトグラフィーによるアイソクラティック溶離法により、移動相メタノール：水を 40:60 とともに、温度 30℃、注入量 10 μL、流速 0.7 mL/min、波長 241 nm における UV 検出を行った。

APAP と APAP-S の UV 吸収スペクトルは、0.03 mg/mL となるよう予め調製した試料溶液を用いて、石英セルとともに分光光度計 (V-530, 日本分光) により測定した。

その他の解析法

APAP-S 合成物のサルファターゼ処理は既報に基づき, sulfatase from *Petella vulgata* type IV (keyhole limpet) (シグマアルドリッチ) を用いて行った (16). APAP-S 合成物の融点測定は常法に従い, 融点測定器 (ATM-02, アズワン) を用いて APAP-S 標品の融点との比較を行った.

結果および考察

本研究は, 既存のチロシン硫酸体合成法 (13) を利用して, APAP-S の合成と分離精製が可能かの検証を行ったものである. 各種分析手技により, 得られた合成物の真正性についても調べることにした.

APAP-S の合成, 分離精製および結晶化

濃硫酸 10 mL に 1 g の APAP を少量ずつ加えて反応させ, さらに $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 処理ならびに CO_2 ガス処理により中和後の反応液の上清を濃縮した. その一部を TLC に供した結果, APAP (R_f 値: 0.917) のほかに APAP-S 様 (R_f 値: 0.639) の反応生成物の明確なスポットを認めた (Fig. 1).

次に Dowex 陽イオン交換樹脂を用いて APAP-S 様の合成物の分離精製を行った. 反応液をカラムに負荷後, 水を溶離液として 3 mL ずつ分取し, 計 15 の溶出画分を得た. これらを TLC に供した結果, Fr. 2 から Fr. 9 までにはっきりとした APAP-S 様のスポットを認めたものの (Fig. 2 A), 本実験条件のカラムボリュームでは, いずれの画分においても APAP の混入が認められた. そのた

め, これらの Fr. 2 から Fr. 9 を回収して混合し, 再度同条件で陽イオン交換カラムに負荷して 2 回目の分画を行った. その結果, Fr. 2 から Fr. 9 までに明確な APAP-S 様のスポットを認めた (Fig. 2 B). 特に Fr. 2 から Fr. 5 までは APAP の混入も無く, 純度の高い APAP-S 様の生成物のみの画分が得られた. 生成物の収量を確保するため, APAP の混入が認められた本 Fr. 6 から Fr. 9 のみを混合してさらに同条件で 3 回目の分画を行った. その結果, Fr. 2 から Fr. 5 において APAP の混入が無い APAP-S 様のスポットのみを認めた (Fig. 2 C). 以上より, 2 回目と 3 回目の分画で得たこれら Fr. 2 から Fr. 5 までの画分には APAP の混入がほとんど無く, 高純度の APAP-S が分離精製されていると考えられた. チロシン硫酸体の合成を行った我々の先行実験では, 本研究で用いたカラム条件の半分量でも一度に分離精製が可能であった (data not shown). そのため, 分離精製の工程を簡便にするためにも, APAP-S に適したカラムボリュームの検討が今後必要である.

分離精製後の APAP-S 様の合成物を含む計 8 本の画分を混合して濃縮し, KOH 存在下で過剰量の EtOH と石油エーテルにより APAP-S 様の生成物を析出させ結晶を得た. その結果, 1 g の APAP から 91.1 mg の生成物が得られ, モル換算で 5.11 % の収率を得ることができた. なお, Jevons の報告では 2 g のチロシンから濃硫酸との反応で 0.3 g のチロシン硫酸体を得ている (13). これまでに, 氷冷クロロホルムとピリジン溶液またはジメチルアニリン溶液と塩化スルホン酸を用いることにより, α -および β -ナフトールや, クレゾールおよびアルキルフェノール類などの目的とするフェノール性硫酸体エステル合成法 (平均収率 70–90%) や (17), 二硫化炭素と塩化スルホン酸を用いた *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (0.7 g) からの硫酸体合成法 (収量 400 mg) (18) が報告されている. また, セリルグリシンのケースでは 400 mg を 0.5 mL の濃硫酸と室温で 5 分間反応させることで 331 mg の *O* 硫酸体が得られている (19). そのため, 硫酸を用いた硫酸体合成法は汎用性に優れるとともに工程が簡便で化合物や反応条件によっては高収率が見込まれる有益な手技であると考えられる. また, 適切な溶媒の選択と低温下での析出により, 効率の良い冷却結晶化法が報告されている (15). 本研究では EtOH と石油エーテルとともに室温下で析出を行っているため, 収率向上のための溶媒選択や冷却下での結晶化を行うなど, 今後も析出条件の検討を必要とする.

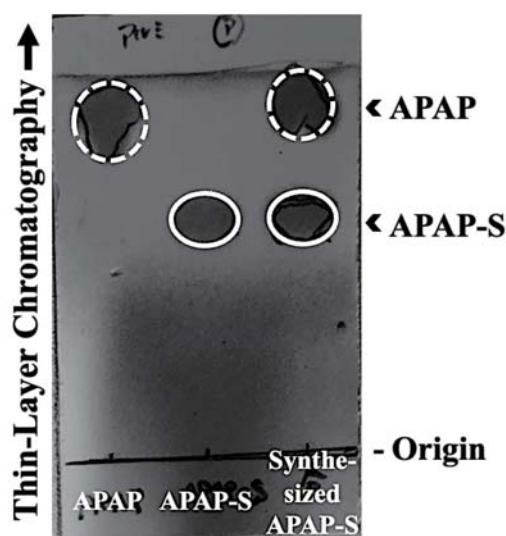


Fig. 1. Thin-layer analysis of the synthesized APAP-S with authentic standards of APAP and APAP-S. APAP was reacted with sulfuric acid for 40 minutes and neutralized with $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Detection was performed under UV irradiation at 254 nm.

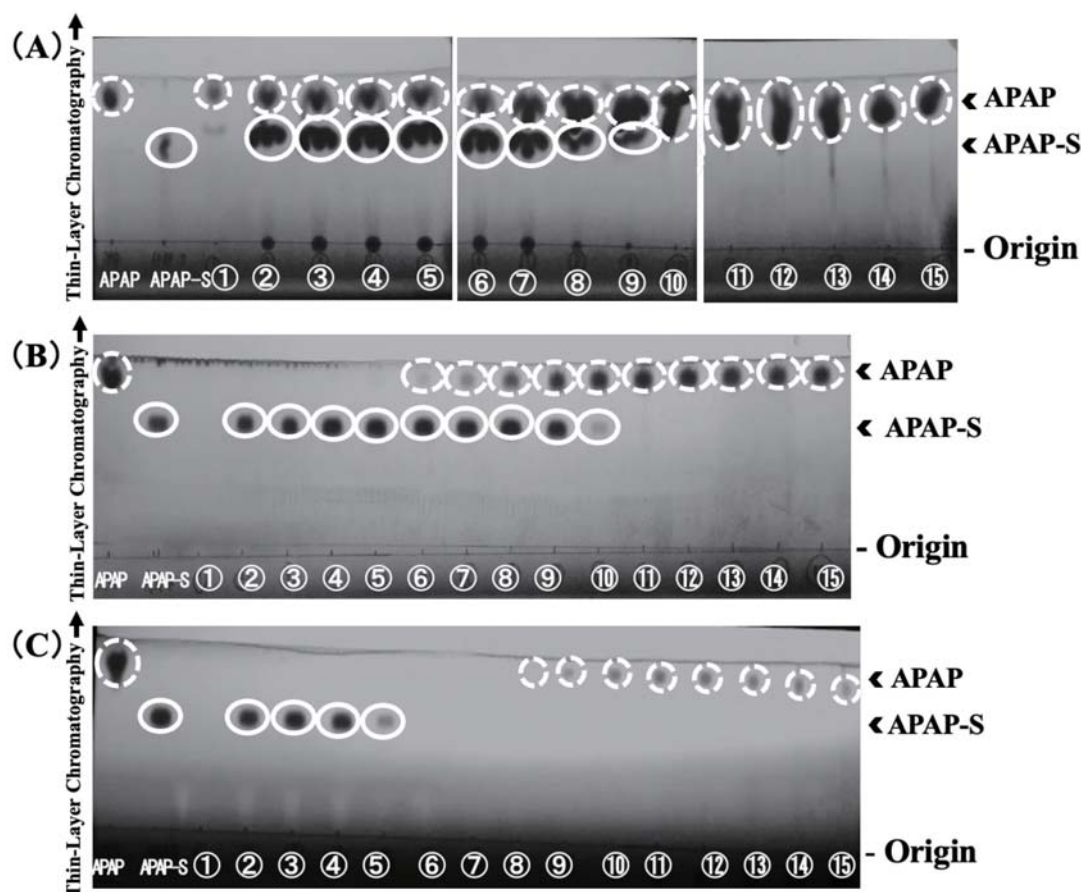


Fig. 2. Thin-layer analysis of the synthesized APAP-S after 1st (A), 2nd (B) and 3rd (C) times of Dowex column fractionations. Detection was performed under UV irradiation at 254 nm. Spots with dotted and lined circles indicate those of APAP and APAP-S, respectively.

APAP-S 合成物の真正性の検証

得られた生成物の真正性について検証を行った。Sulfatase 処理した結果、TLC 上で脱硫酸化された APAP のスポットを認めた (data not shown)。次に $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を行った結果、(i) *p*-置換フェニル基由来の 4 個のアロマティックプロトン [δ : 7.49 (d-like, $J=9.0$ Hz), 7.23 (d-like, $J=9.0$ Hz)] および (ii) 1 個のアセチル基由来のシグナル [δ : 2.10 (s)] が認められた (Fig. 3, Table 1)。したがって、TLC で APAP と異なる R_f 値を示すこと、sulfatase 処理により脱硫酸化されうること、および $^1\text{H-NMR}$ の結果より、生成物は APAP-S であることが示唆された (20, 21)。

次に APAP-S 合成物の純度について調べた。APAP-S 合成物は標品と同一の融点を示した (data not shown)。HPLC による分離検出を行った結果、標品の APAP と APAP-S の溶出時間はそれぞれ 3.34 min (Fig. 4 A) と 1.80 min (Fig. 4 B) であり、合成物においては APAP-S 標品の溶出時間と一致する単一のピークを認めた (Fig. 4 C)。

UV 吸収スペクトルを測定した結果、APAP, APAP-S, APAP-S 合成物いずれも 241 nm 付近に極大吸収波長を

有し、合成物は APAP-S の標品と一致したスペクトルを示した (Fig. 5)。このときの極大吸収波長における吸光度より、標品 (> 98%) を基準とした際に APAP-S 合成物は 97.0% の純度であることが判明した。

我々はこれまでに硫酸化代謝物の機能性に注目してきており、ナフトールを例に硫酸化代謝物の硫酸基の位置によっては不活性化されずに抗酸化活性を有する場合があること (22)、インドキシル硫酸がマクロファージの酸化レベルの亢進と貪食能の低下を引き起こすこと (23, 24) を報告してきた。薬物代謝を通じて標的化合物の多くは代謝物として体内に存在しうするため、例えば硫酸化を介してどの程度の活性を保持しうのかをケースバイケースで調査することは (6)、薬物代謝後の化合物の生理活性を理解する上でも重要である (25)。近年、APAP 由来の代謝物として *N*-acetylphenolamine (AM404) による受容体を介した鎮痛作用や抗炎症作用が報告されている (8)。APAP-S が免疫性血小板減少症の患者の抗体反応に感作する可能性や (26)、APAP-S のラットへの経口投与後には 25% (22-32%) が直接腸管より吸収され、50% 以上 (50-98%) が腸内細菌による脱硫酸化を経て

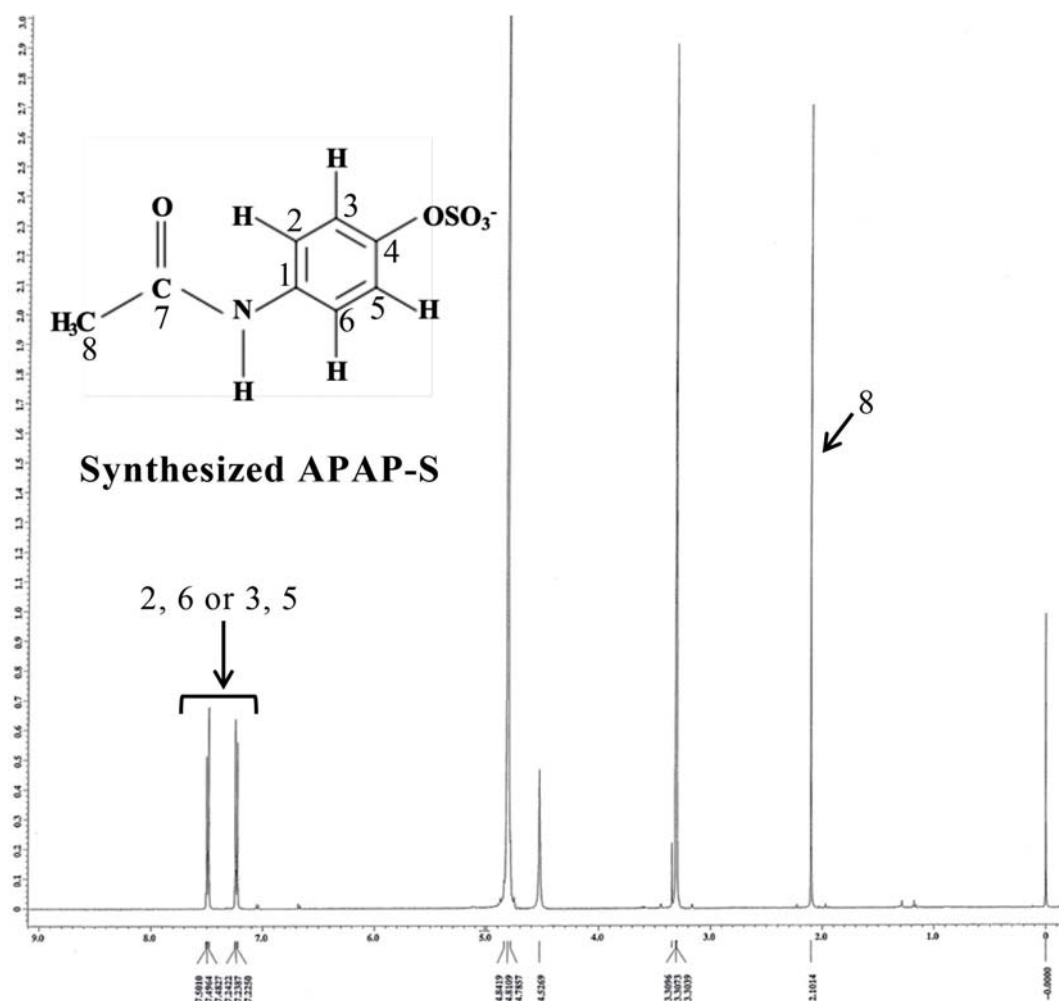


Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of the synthesized APAP-S (in deuterated methanol, 500 MHz) .

Table 1. ^1H -NMR spectral data of the synthesized APAP-S (in deuterated methanol, 500 MHz)

	Chemical shift (ppm)	Coupling constant (Hz)
2, 6 or 3, 5	7.23 d-like	(2H, d-like $J=9.0$ Hz (8.60 Hz))*
	7.49 d-like	(2H, d-like $J=9.0$ Hz (9.15 Hz))*
8	2.10 s	(3H, s)

δ in ppm from TMS (coupling constants (J) in Hz are given in parentheses).

s ; singlet, d ; doublet, d-like ; doublet-like .

*Values were considered to be equal to the theoretical 9.0 Hz.

APAP として吸収され APAP-S へと代謝抱合されること (27) が報告されている。しかしながら、APAP-S の生理作用や薬効などに着目した研究例はほとんどない。一方、フラボノイドの硫酸化がその生物活性を低下させるだけでなく (28, 29)、硫酸化される位置によっては弱いながらも活性が維持される場合など (30-32)、硫酸化される水酸基と生物活性との関連性についても注目が集まっている (25, 33, 34)。現状では各種の硫酸体の入

手が容易ではない場合も多く、研究者ごとに個々の化合物について有機合成 (35-37) や酵素化学的な手技に基づく合成が行われている (31, 32)。したがって、APAP のみならず様々な硫酸化代謝物の生理機能や有効性について明らかにしていくためにも、包括的な硫酸体合成法の確立と導入、続く代謝物レベルでの機能性研究が急務である。

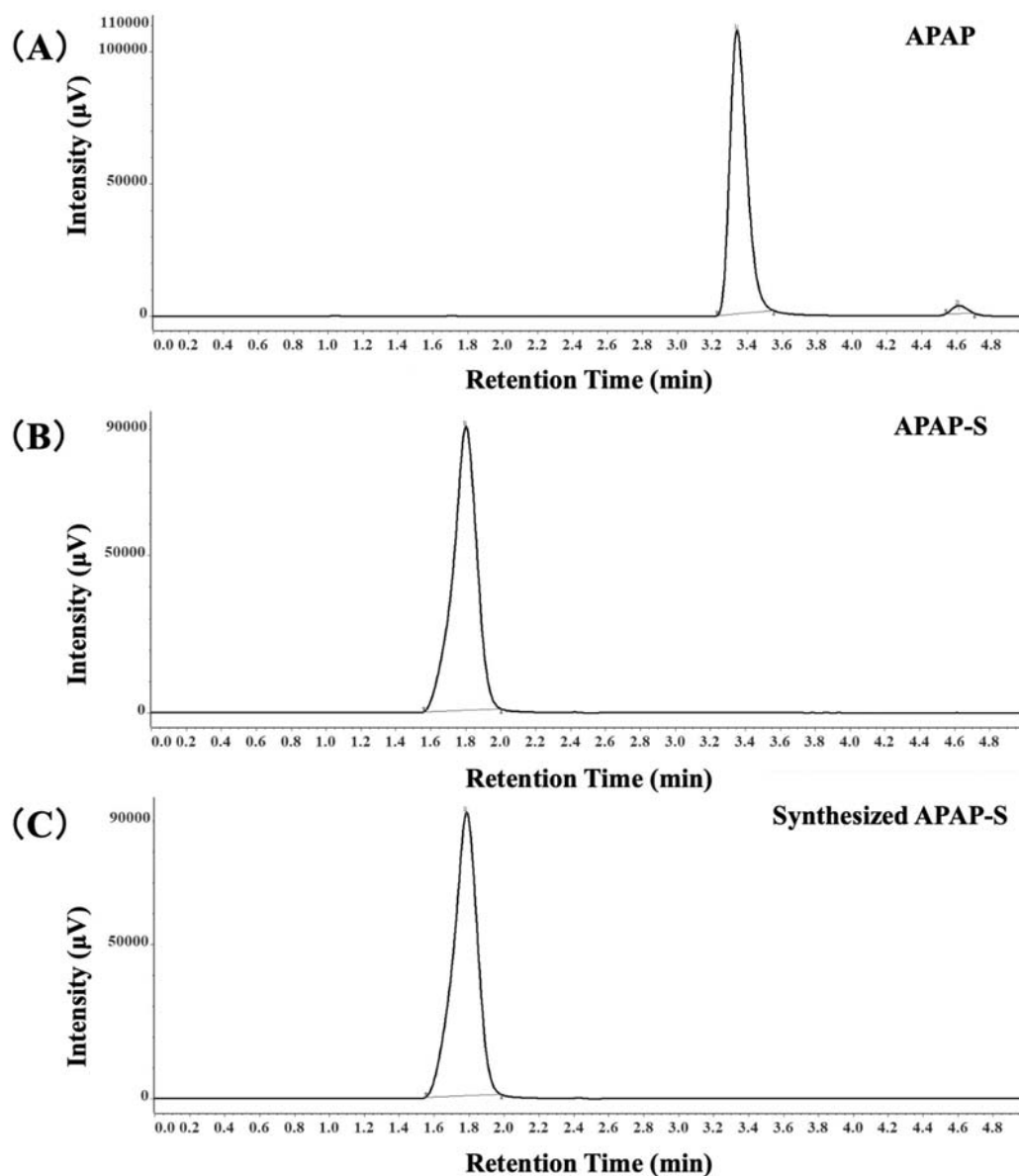


Fig. 4. HPLC chromatograms of standards of APAP (A) and APAP-S (B), and the synthesized APAP-S (C). A 10- μL aliquot of 0.1 mM sample each was applied to HPLC. Detection was performed at 241 nm. The retention times for APAP and APAP-S were 3.34 and 1.80 min, respectively.

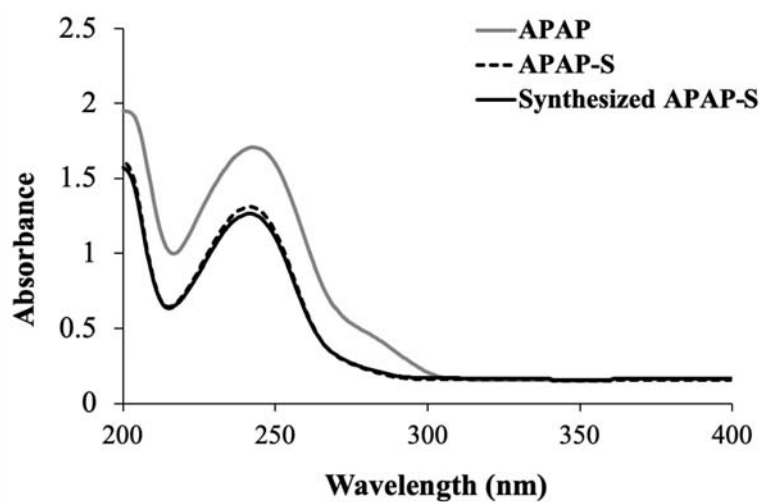


Fig. 5. UV spectrum of the synthesized APAP-S with standards of APAP and APAP-S at 0.03 mg/mL ranging from 200 nm to 400 nm.

まとめ

以上より、既存の Tyr-S 合成法を利用して、1 g の APAP から 91.1 mg の APAP-S 様の生成物を結晶として得ることができ、モル換算で 5.11% の収率を得た。続く $^1\text{H-NMR}$ および UV 吸収スペクトル等の真正性の検証結果より、生成物が高純度の APAP-S であることが確認できた。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会 JSPS の科研費基盤研究 (C) (JP20K05881) の助成を受けて実施されたものです。

要 約

硫酸化は生体外異物や薬物の不活化ならびに排泄を担う主要な代謝経路の 1 つであり、細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素が重要な役割を担っている。しかしながら十分量の様々な硫酸化代謝物の入手が容易ではないことから、これら最終産物が有する生理機能の有無については完全には明らかになっていない。そこで本研究では既存のチロシン硫酸体 (tyrosine *O*-sulfate) 合成法を利用して、解熱鎮痛薬である acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol; APAP) を濃硫酸と反応させることで APAP 硫酸体 (acetaminophen *O*-sulfate; APAP-S) の合成と分離精製が可能か検証を行った。APAP はチロシン同様に単純なモノフェノール構造を有し、体内では硫酸化されるため選択した。その結果、1 g の APAP から 91.1 mg の生成物が結晶として得られ、モル換算で 5.11% の収率を得た。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定により APAP-S の各プロトンに由来するシグナルが認められ、生成物は APAP-S であることが支持された。さらに UV 吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度より、標品を基準とした際の APAP-S 生成物は 97.0% の純度であることが判明した。

引用文献

- 1) Mulder, G.J. and Jakoby, W.B., 1990, Sulfation. in Conjugation Reactions in Drug Metabolism (Mulder, G.J. ed.), Taylor and Francis, London, pp.107-161.
- 2) Falany, C.N. and Roth, J.A., 1993, Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. in Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man (Jeffery, E.H. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.101-115.
- 3) Weinshilboum, R. and Otterness, D., 1994, Sulfotransferase enzymes. in Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity (Kaufmann, F.C. ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.45-78.
- 4) Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y. and Liu, M.-C., 2017, Biosci. Biotechnol. Biochem. **81**, 63-72.
- 5) DeBaun, J.R., Smith, J.Y., Miller, E.C. and Miller, J.A., 1970, Science **167**, 184-186.
- 6) Yi, L., Dratter, J., Wang, C., Tunge, J.A. and Desaire, H., 2006, Anal. Bioanal. Chem. **386**, 666-674.
- 7) Jozwiak-Bebenista, M. and Nowak, Z.J., 2014, Acta Pol. Pharm. **71**, 11-23.
- 8) Ohashi, N. and Kohno, T., 2020, Front. Pharmacol. **11**, 580289. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>
- 9) Nagatome, M., Kondo, Y., Kadowaki, D., Saishyo, Y., Irikura, M., Irie, T. and Ishitsuka, Y., 2018, Heliyon **4**, e00521. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00521>
- 10) Studenberg, S.D. and Brouwer, K.L. 1993, J. Pharmacokinet. Biopharm. **21**, 175-194.
- 11) Sawamoto, T., Kurosaki, Y., Sasaki, K., Kimura, T. and Nakayama, T., 1997, Int. J. Pharm. **146**, 181-191.
- 12) Ohkawa, Y., Kiyohara, Y., Asoh, T., Maeda, H., Kurumi, M., Sasaki, K., Kurosaki, Y., Matsumura, M. and Nakayama, T., 2001, Biol. Pharm. Bull. **24**, 1404-1410.
- 13) Jevons, F.R., 1963, Biochem. J. **89**, 621-624.
- 14) Yamamoto, A., Liu, M.-Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Saeki, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. 2015, Biochem. J. **158**, 497-504.
- 15) Weber, C.C., Kulkarni, S.A., Kunov-Kruse, A.J., Rogers, R.D. and Myerson, A.S., 2015, Cryst. Growth Des. **15**, 4946-4951.
- 16) Yasuda, S., Idell, S. and Liu, M.-C., 2007, Biochem. J. **401**, 497-503.
- 17) Feigenbaum, J. and Neunberg, C.A., 1941, J. Am. Chem. Soc. **63**, 3529-3530.
- 18) Rose, F.A. and Powell, G.M., 1963, Biochem. J. **87**, 541-545.
- 19) Tudball, N., Noda, Y. and Dodgson, K.S., 1965, Biochem. J. **95**, 678-682.
- 20) Nakayama, T., Sawamoto, T., Kurosaki, Y. and Kimura, T., 1995, Int. J. Pharm. **121**, 55-63.

- 21) Winum, J.Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J.L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. 2003, *J. Med. Chem.* **46**, 2197–2204.
- 22) Sugahara, S., Fukuhara, K., Tokunaga, Y., Tsutsumi, S., Ueda, Y., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2018, *J. Toxicol. Sci.* **43**, 213–221.
- 23) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1023–1029.
- 24) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *J. Toxicol. Sci.* **45**, 569–579.
- 25) Beekmann, K., Actis-Goretta, L., van Bladeren, P.J., Dionisi, F., Destailats, F. and Rietjens, I.M., 2012, *Food Funct.* **3**, 1008–1018.
- 26) Bougie, D. and Aster, R., 2001, *Blood* **97**, 3846–3850.
- 27) Sawamoto, T., Kurosaki, Y., Kimura, T. and Nakayama, T., 1996, *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 77–82.
- 28) Roubalová, L., Purchartová, K., Papoušková, B., Vacek, J., Křen, V., Ulrichová, J. and Vrba, J., 2015, *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 5402–5409.
- 29) Rimbach, G., Weinberg, P.D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M.G., Ewins, B.A., Turner, R., Minihane, A.M., Botting, N., Fairley, B., Matsugo, S., Uchida, Y. and Cassidy, A., 2004, *Biochim. Biophys. Acta.* **1670**, 229–237.
- 30) Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A.M. and Santos-Buelga, C., 2011, *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 103–111.
- 31) Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C.S., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P. and Křen, V., 2017, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2231. doi: 10.3390/ijms18112231.
- 32) Kanova, K., Petraskova, L., Pelantova, H., Rybkova, Z., Malachova, K., Cvacka, J., Kren, V. and Valentova, K., 2020, *J. Agri. Food Chem.* **68**, 11197–11206.
- 33) Sak, K., 2017, Chapter 6 -Anticancer action of sulfated flavonoids as Phase II metabolites. in *Food Bioconversion, Handbook of Food Bioengineering* (Grumezescu, A.M. and Holban A.M. eds.), Academic Press, MA, United States, pp.207–236.
- 34) Shimohira, T., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Liu, M.-C., Suiko, M. and Sakakibara, Y., 2017, *J. Biosci. Bioeng.* **124**, 84–90.
- 35) Simpson, L.S. and Widlanski, T.S., 2006, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1605–1610.
- 36) Gomes, V.P., Torres, C., Rodríguez-Borges, J.E. and Paiva-Martins, F., 2015, *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9565–9571.
- 37) Almeida, A.F., Santos, C.N. and Ventura, M.R., 2017, *J. Agric. Food Chem.* **65**, 6460–6466.