

## イチゴ葉に含まれる生理活性物質

大原 祐美\*・河越 義晴\*\*・鎌田 靖志\*\*・野崎 勝則\*\*・  
森本 正則\*・駒井 功一郎\*

(\*近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻、\*\*プラーナ株式会社)

### **Biologically active substances in leaves of *Fragaria × ananassa***

Yumi OHARA\*, Yoshiharu KAWAGOE\*\*, Yasushi KAMATA\*\*, Katsunori NOZAKI\*\*,  
Masanori MORIMOTO\*, Koichiro KOMAI\*

*\*Department of Applied Biological Chemistry, Graduate school of Agriculture, Kinki  
University, Nara 631-8505, Japan*

*\*\*Plahna Co., Ltd. 3-4-5, Tanaka Minatoku Osaka city, Osaka, 552-0005, Japan*

#### Synopsis

This paper showed that the results of isolation and identification of the biological active components in the extract obtained from strawberry leaves (*Fragaria × ananassa* cv. Ama-Ou) after harvesting of their fruits.

The tyrosinase inhibition was evaluated for potential human skin whitening, and super oxide dismutase (SOD) mimic activity was evaluated for potential antioxidation in the human body. Moreover, hyaluronidase inhibition,  $\alpha$ -glucosidase inhibition and melanin biosynthesis inhibition test used by using B16 mouse melanoma cell line, were carried out evaluated in this experiment.

The 50% ethanol extract from strawberry leaves showed both of tyrosinase and hyaluronidase inhibition, and SOD mimic activity. Following active compounds were isolated by silica gel column chromatography and HPLC using tyrosinase inhibitory activity bioassay guided fractionation. These active compounds identified the tannin, agrimoniin and flavonoid glucosides, quercetin-3-O-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-disaccharide, but this compound was not totally elucidated the chemical structure.

Though, three isolated active ingredients in the 50% ethanol extract, did not show the cell propagation activity against NB1RGB cell line, all compounds showed both of antioxidant and melanin biosynthetic inhibitory activity in this study. Especially, agrimoniin was a strong tyrosinase and hyaluronidase inhibitor in them.

These facts suggested that the strawberry leaves 50% ethanol extract was utilized as food adduct and cosmetic material from natural resources.

## 緒言

オランダイチゴ (*Fragaria × ananassa*) は、バラ科オランダイチゴ属の多年生草本で、その可食部である果実は古くから食用され、抗ガン作用や抗炎症作用の機能をもつことが報告されている<sup>1)</sup>。さらに、肌の着色に関わるメラニン生成抑制成分として知られるエラグ酸を含み、化粧品原料としても利用されている<sup>2)</sup>。しかし、可食部である果実に比べ、その葉部の有効利用に関する研究はほとんどなく、未利用資源のままである。この葉部には、タンニンやフラボノイドなどのポリフェノール成分が多く含有されており、解明されていない生理活性を有することが推察される。そこで、本研究では、オランダイチゴの葉部に注目し、そこに含まれる有用機能成分を探索することによって、未利用資源の有効利用についての知見を得ることを目的とした。

機能評価は、美白効果をチロシナーゼ阻害活性、抗酸化作用をSOD様活性、保湿効果をヒアルロニダーゼ阻害活性試験として実施した。また、*in vitro*で行うチロシナーゼ阻害活性試験より *in vivo*に近いマウス由来B16メラノーマ細胞を用いたメラニン合成抑制試験、ヒト新生児由来線維芽細胞NB1RGBを用いた細胞増殖活性試験についても併せて実施し、化粧品への適応性について検討した。さらに、近年、生活習慣病が問題になっていることから $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験ならびに脂質蓄積抑制活性試験についても実施した。

## 材料および方法

### 1. オランダイチゴ葉部からの活性成分の抽出ならびに単離・同定

福岡県産オランダイチゴ、品種(甘王)の果実収穫後の乾燥葉(87.6g)を50%エタノール(1.8 l)で3日間常温にて抽出した。抽出液は吸引ろ過(桐山製作所, No. 5C, 150 $\phi$ mm)を行った。抽出残渣は、再度同様の操作を行った。その後、抽出液を減圧濃縮し、先の抽出物とまとめ、オラ

ンダイチゴ葉50%エタノール抽出物(35.2g, 収率40.2%)を得た。得られた抽出物(20.4g)を水と酢酸エチルにて液液分配後、それぞれを減圧濃縮し、水画分(11.4g)と酢酸エチル画分(2.6g)を得た。次に、水画分をDIAION HP-20カラムクロマトグラフィー(三菱化学)を用いて分画を行い、水とメタノール混合溶媒を溶出液としてメタノールの含有率を変化させながら、水溶出画分(3.9g)、25%メタノール溶出画分(1.9g)、50%メタノール溶出画分(1.3g)、75%メタノール溶出画分(134.0mg)、メタノール溶出画分(33.9mg)の5画分に分画した。さらに、25%メタノール溶出画分(866.9mg)をHPLCを用いて精製を行い、compound 1(44.8mg, 収率0.22%)、2(11.9mg, 収率0.06%)、3(34.8mg, 収率0.17%)をそれぞれ単離した(Fig. 1)。

HPLC分取条件は次の通りである。HPLC(Shimadzu Class VP HPLC system)、カラム(Imtakt Unison US-C18 20 $\times$ 150mm)、カラム温度(40 $^{\circ}$ C)、移動相(0.05%ギ酸:18%アセトニトリル)、流速(10ml/min)、検出波長(210nm、254nm)。

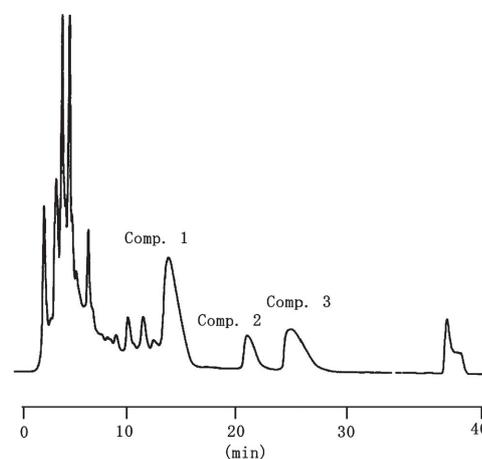


Fig. 1 HPLC profile of 25% MeOH fraction at 210 nm

### 2. チロシナーゼ阻害活性試験

メラニンは、チロシンからL- $\beta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)alanine (L-DOPA)、DOPAキノンを経て生合成される。この初期反応であるチロシンからL-DOPAは酸化還元酵素チロシナーゼ(EC 1.14.18.1)により触媒される。DOPAキノン以降の生合成反応は自動酸化により反応が進むため、メラニン生成を抑制し美白効果を得るた

めにはチロシナーゼ阻害することが重要になる。

試料溶液 (100  $\mu$ l) と 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8 株式会社ヤトロン, 400  $\mu$ l) を混合し、マッシュルーム由来チロシナーゼ懸濁液 (30unit, SIGMA, 60  $\mu$ l) を加え、37 $^{\circ}$ C の恒温槽で 20 分間静置した。その後、基質として 2mM L-DOPA (Wako, 440  $\mu$ l) を加え 37 $^{\circ}$ C、5 分間反応させた (S)。同時に試料溶液を添加しないもの (C)、チロシナーゼを添加しないもの (S-BI)、試料溶液、チロシナーゼともに添加しないもの (C-BI) として、反応生成物である DOPA キノンの吸収波長 475nm の吸光度を測定し、式 1 に従ってチロシナーゼ阻害率を算出した。サンプル、チロシナーゼおよび L-DOPA は 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解させたものを用いた。なお C-BI は吸光度測定のためのブランク溶液 (対照液) として使用した。

$$\text{チロシナーゼ阻害率 (\%)} = \frac{C - (S - S-BI)}{C} \times 100 \quad (\text{式1})$$

### 3. SOD 様活性試験<sup>3, 4)</sup>

SOD 様活性は株式会社同仁化学研究所の SOD Assay Kit-WST (WST-1 法) を用いて測定した。本試験系では、キサンチンとキサンチンオキシダーゼにより、活性酸素の一つであるスーパーオキシドラジカルが発生する。発生したスーパーオキシドラジカルは発色試薬であるテトラゾリウム塩 (WST-1) と反応し、高水溶性ホルマザンである WST-1 ホルマザンを形成し黄色く発色する。反応溶液中に SOD 様の物質が存在すると、WST-1 ホルマザンの生成は抑制され、スーパーオキシドラジカルの一部は  $H_2O_2$  と  $O_2$  に不均一化されることから、WST-1 ホルマザンに起因する吸光度を測定することで SOD 様活性を評価する。

96 wells plate に試料溶液 (20  $\mu$ l) と発色試薬 (テトラゾリウム塩 WST-1, キサンチン, 200  $\mu$ l) を加えプレートミキサーで 1 分間攪拌し、さらにキサンチンオキシダーゼ (20  $\mu$ l) を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間酵素反応させた (S)。その後、マイクロプレートリーダーで 450nm における吸光度を測

定した。同時に試料溶液を添加しないもの (C)、キサンチンオキシダーゼを添加しないもの (S-BI)、試料溶液、酵素溶液ともに添加しないもの (C-BI) とした。得られた吸光度を式 2 に従って算出し、SOD 様活性とした。なお、試料は蒸留水に溶解した。

$$\text{SOD 様活性 (\%)} = \frac{\{(C - C-BI) - (S - S-BI)\}}{C - C-BI} \times 100 \quad (\text{式2})$$

### 4. ヒアルロニダーゼ阻害活性試験<sup>5)</sup>

肌の保湿成分として重要なヒアルロン酸は生体内酵素であるヒアルロニダーゼ (EC 3. 2. 1. 35) により、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンに分解される。ヒアルロン酸の分解を抑制し肌の保湿効果を維持するためには、ヒアルロニダーゼの働きを阻害することが重要になる。

試料溶液 (200  $\mu$ l) とヒアルロニダーゼ (400unit, SIGMA, 100  $\mu$ l) を混合し 37 $^{\circ}$ C、20 分間反応させた。ヒアルロニダーゼ活性化剤として compound 48/80 (SIGMA, 200  $\mu$ l) を加え 37 $^{\circ}$ C、20 分間インキュベート後、基質としてヒアルロン酸ナトリウム溶液 (500  $\mu$ l) を加えて 37 $^{\circ}$ C、40 分間インキュベートした。反応停止液として 0.4N NaOH (200  $\mu$ l) を加え氷上に静置した。ホウ酸水溶液 (200  $\mu$ l) を加えて 100 $^{\circ}$ C で 3 分間処理した後、氷上へ移した。発色試薬である p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (p-DAB) 溶液 (Wako, 600  $\mu$ l) に反応溶液 (140  $\mu$ l) を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた後、585nm における吸光度を測定した (S)。同時に、試料溶液を添加しないもの (C)、酵素溶液を添加しないもの (S-BI)、試料溶液、酵素溶液ともに添加しないもの (C-BI) を設定した。ヒアルロニダーゼ阻害率は式 3 に従い算出した。なお C-BI は吸光度の測定ブランクとして使用した。なお、試料は 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解させたものを使用した。また、ヒアルロニダーゼ、compound 48/80 およびヒアルロン酸ナトリウムは 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解させ、それぞれの処理濃

度を400unit/ml、0.5mg/ml、0.4mg/mlとしたものを用いた。0.4N NaOHは蒸留水に溶解させたものを用い、ホウ酸溶液はホウ酸4.95gを蒸留水50mlに溶解させ、1N NaOHにてpH 9.1に調整後、蒸留水を加えて100mlとしたものを用いた。また、p-DAB溶液はp-DAB (10g)、10N 塩酸溶液 (12.5ml) および酢酸 (87.5ml) を混合し、使用直前に酢酸で10倍希釈した。

ヒアルロニダーゼ阻害率(%) =

$$C - (S - S - BI) / C \times 100 \quad (\text{式3})$$

### 5. $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験<sup>6)</sup>

$\alpha$ -グルコシダーゼとは、 $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解し、 $\alpha$ -glucoseを生成する酵素である。小腸内に存在するこの酵素によって、デンプンなどの多糖類が分解され、単糖となり血液中に吸収される。

本試験で、基質として用いたp-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) は $\alpha$ -グルコシダーゼにより分解され、グルコースとp-ニトロフェノールを生成する。そこで、PNPGの反応生成物であるp-ニトロフェノールの吸収波長405nmにおける吸光度を測定し、p-ニトロフェノールの生成阻害から $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害率を求めた。

市販ラット小腸アセトンパウダー (SIGMA社) 0.1gに、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 3.0mlを加え、氷上でソニケーション (10秒×20回, SONIFIER 450, Beckman) を行った後、11000rpm、4℃、15分間遠心分離を行い、上清をリン酸緩衝液にて1.2  $\mu$ g/ml/minとなるタンパク量に酵素溶液を調製した。

任意の濃度に調製した試料溶液 (50  $\mu$ l) に酵素溶液 (100  $\mu$ l) を加え、5分間、37℃でプレインキュベートを行った後、基質として1.5mM PNPG (100  $\mu$ l) を加え、15分間インキュベートを行った。この時、ブランクには同量のリン酸緩衝液を加えた。その後、100℃のヒートブロックで加熱失活させて酵素反応を停止させた。5分後ヒートブロックから取り出し、6000rpm、4℃で5分間遠心分離を行った後、上清を405nmにおけ

る吸光度を測定した。なお、検定試料はリン酸緩衝液 (pH 6.8) で溶解し、試験に用いた。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害率は検定試料を処理しなかったものをcontrol (C)、検定試料を処理したものをsample (S) とし、式4に従い算出した。

$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害率(%) =

$$C - S / C \times 100 \quad (\text{式4})$$

### 6. マウス由来B16メラノーマ細胞を用いた細胞毒性試験

メラニン合成抑制試験に用いる試料濃度を決定するため、事前に細胞毒性試験を実施した。

96 wells plate (CORNING) に5% FBS-MEMで $5 \times 10^4$  cells/mlに調製したB16メラノーマ細胞の懸濁液を200  $\mu$ lずつ播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。24時間後、培地を取り除き、5% FBS-MEM (100  $\mu$ l) を添加した。その後、任意の濃度に調製した試料溶液 (100  $\mu$ l) を加えた (Sample・S)。60-72時間培養後、培地を除去し、終濃度が0.25mg/mlとなるように培地に溶解した3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) 溶液 (200  $\mu$ l) を加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で3時間培養後、MTT溶液を除去し、Dimethylsulfoxide (DMSO) (生化学用, Wako, 100  $\mu$ l) を加えて色素を抽出した。抽出液は、マイクロプレートリーダーで570nmにおける吸光度を測定した。試料溶液を加えなかったものをControl (C) として、式5に従い阻害率を求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = 100 - (S / C \times 100) \quad (\text{式5})$$

### 7. マウス由来B16メラノーマ細胞を用いたメラニン合成抑制試験<sup>7)</sup>

5% FBS-MEMで $5 \times 10^4$  cells/mlに調製したB16メラノーマ細胞の懸濁液を組織培養用シャーレ ( $\phi$  60mm, NUNCLON) に5ml播種し、24時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。その後、培地をメラニン合成促進物質であるテオフィリンを含む (培地100mlあたり50mMテオ

フィリン溶液 (4ml) を添加し 5% FBS-MEM と任意の濃度に調製した試料溶液を全量 5ml となるように交換し、60-72 時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。培養後、培地を捨て、PBS (-) 250 μl × 2 回で細胞を洗浄し残った培地を完全に取除いた。そこへ 0.85 N KOH (500 μl) を加え、細胞を融解することでメラニンの抽出を行い、抽出液を回収後、PBS (-) (500 μl) で洗浄し、先の抽出液と合わせてメラニン抽出液 (Sample・S) とし、吸光度で 405nm における吸光度を測定し、メラニン量とした。試料溶液を添加しなかったものを Control (C) として比較することで、メラニン合成抑制率を算出した (式 6)。

$$\text{メラニン合成抑制率(\%)} = \frac{(C - S)}{C} \times 100 \quad (\text{式 6})$$

#### 8. ヒト新生児由来線維芽細胞 NB1RGB を用いた細胞増殖活性試験

96 wells plate (CORNING) に 5% FBS-MEM で  $2.5 \times 10^4$  cells/ml に調製した NB1RGB 細胞の懸濁液を 200 μl ずつ播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。24 時間後、培地を取り除き、0.5% FBS-MEM (100 μl) を添加した。その後、任意の濃度に調製した試料溶液 (100 μl) を加えた (Sample・S)。5 日間培養後、培地を除去し、終濃度が 0.25mg/ml となるように培地に溶解した MTT 溶液 (200 μl) を加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 時間培養後、MTT 溶液を除去し、DMSO (100 μl) を加えて色素を抽出した。抽出液は、マイクロプレートリーダーで 570nm における吸光度を測定した。試料溶液を加えなかったものを Control (C) として、式 7 に従い阻害率を求めた。ポジティブコントロール (PC) には、5% FBS-MEM を用いた。

$$\text{細胞増殖率(\%)} = S/C \times 100 \quad (\text{式 7})$$

#### 9. マウス胎児由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた脂質蓄積抑制試験

試験には、10% FBS-DMEM、分化誘導培

地、成熟促進培地の 3 種を用いた。分化誘導培地は、10% FBS-DMEM に 0.25 μM dexamethasone (Dex)、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、10 μg/ml insulin を、成熟促進培地は、10% FBS-DMEM に 10 μg/ml insulin を加えたものを調製した。

24 wells plate (CORNING) に 10% FBS-DMEM で  $3.0 \times 10^4$  cells/ml に調製した 3T3-L1 細胞の懸濁液を 1ml ずつ播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 日間培養した。その後、脂肪細胞への分化を誘導するため培地を分化誘導培地に交換し、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。2 日後、任意の濃度に調製した試料溶液を含む成熟促進培地に交換し、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6 日間培養した。任意の濃度に調製した試料溶液を含む成熟促進培地は、2 日間毎に培地交換を行った。

Oil Red O 染色法による脂質蓄積抑制活性は株式会社プライマリーセルの Lipid Assay Kit を用いて測定した。Oil Red O は、親油性の赤色色素で脂肪細胞内に蓄積された脂肪を染色し、さらに有機溶媒を用いて色素を抽出することにより脂肪量を定量することができる。

Lipid Assay Kit (プライマリーセル) には、固定液、Oil Red O 原液、抽出液が含まれる。Oil Red O 原液を 6:4 の割合で蒸留水と混和し、室温で 10~15 分間静置し 0.8 μm シリンジフィルターにてろ過した。培養液を除去後、各 well に固定液 (500 μl) を添加し、室温で 1 時間固定した後、蒸留水 500 μl で洗浄した。洗浄後、Oil Red O 液 500 μl を加え、室温にて静置する。15 分後、Oil Red O 液を除去し、水 (500 μl) にて 3 回以上着色が認められなくなるまで洗浄し、乾燥させ、観察した。次に、色素を抽出するため抽出液 (500 μl) を添加し、室温にて 1 時間プレートミキサーにて攪拌後、540nm における吸光度を測定した。脂質蓄積抑制活性は式 8 に代入し算出した。

$$\text{脂質蓄積抑制率(\%)} = \frac{(C - B) - (S - B)}{(C - B)} \times 100 \quad (\text{式 8})$$

## 10. ポリフェノール成分の定量<sup>8)</sup>

イチゴの葉部には、タンニンやフラボノイドに分類されるポリフェノール成分が多く含有されていることが報告されている<sup>1)</sup>ことから、Folin-Denis法により定量した。

Folin-Denis法とは、ポリフェノールの還元性を利用してアルカリ性でリンタンゲステン、モリブデン酸を還元して生じる青色の色素を比色定量するものである。

タンゲステン酸ナトリウム (12.5g)、リンモリブデン酸 (2.5g)、リン酸 (6.25ml)、水 (94ml) を2.5時間還流煮沸し、冷却後、水を加えて500mlとし、Folin試薬を調製した。任意の濃度に調製した検液 (5ml) にFolin試薬 (5ml) を加えてよく混和し、3分後に10%炭酸ナトリウム水溶液 (5ml) を加え振とうした後、1時間室温に放置した。その後760nmの吸光度を測定した。試料のポリフェノール含有量は加水分解性タンニンである代表的な没食子酸を用いた検量線から求めた没食子酸当量とした。

## 11. 活性成分の定量分析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、イチゴ葉50% エタノール抽出物から単離・同定した化合物を定量した。分析条件は、HPLC (Shimadzu Class VP HPLC system)、カラム (Imtakt Unison UK-C18 4.6 × 150mm)、カラム温度 (40℃)、移動相 (0.05%ギ酸:18%アセトニトリル)、流速 (1ml/min)、検出波長 (210nm, 330nm)。

イチゴ葉50% エタノール抽出物より単離・同定した各化合物を用いて検量線を作成した。イチゴ葉50% エタノール抽出物をHPLCにて定量を行い、イチゴ葉50%エタノール抽出物1g中の含有量を算出した。

## 結 果

### 1. 有効成分の単離・同定

得られた3種の化合物について、核磁気共鳴スペクトル (NMR)、質量スペクトル (MS) を用

いた構造解析を行い、compound 2を agrimoniin、compound 3を quercetin-3-O-D-glucuronide と同定した。

#### 1-1 Compound 1

前報で compound 1 は compound 3 (quercetin-3-O-D-glucuronide) にさらに4糖類が結合した化合物であると推定したが<sup>9)</sup>、さらに詳しく構造解析を行ったので報告する。

Compound 1 の<sup>13</sup>C-NMR を compound 3 の<sup>13</sup>C-NMR と比較すると、67.3, 71.7, 77.6, 82.4, 101.7ppm以外のピークがほぼ、compound 3 と一致した。また、ESI-MSMS より中性フラグメント 303, 176, 132 の部分構造が存在し、それらは compound 1 の<sup>13</sup>C-NMR が compound 3 の<sup>13</sup>C-NMR に類似していることを考慮に入れると、それぞれ、303 (quercetin + H<sup>+</sup>) , 176 (glucuronic acid - H<sub>2</sub>O) , 132 (糖 - H<sub>2</sub>O) であると考えられる。この132 (糖 - H<sub>2</sub>O) は、5炭糖の分子量と一致する。以上の事より、compound 1 は、compound 3 (quercetin-3-O-D-glucuronide) にさらに5炭糖が結合した化合物であると推測した。5炭糖には、xylose、arabinose、lyxose など様々あるが、xylose および arabinose は配糖体として多くの植物体に含まれていることが報告されている<sup>10)</sup> ことから、このどちらかではないかと考えられる。また、quercetin 3-O-xylosyl glucoside<sup>11)</sup> など他の2糖をもつ化合物の多くがC2"に結合していることから、compound 1 も quercetin-3-O-D-glucuronide のC2"位に結合しているのではないかと思われる。

ESI-MS : ion at m/z=

611.1803 [M+H]<sup>+</sup>, 479.1318, 303.0862

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) : 3.17-3.94 (9H, m, sugar), 4.75 (1H, anomeric proton), 5.59 (1H, anomeric proton), 6.17 (1H, brs), 6.36 (1H, brs), 6.86 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.60 (1H, s), 7.62 (1H, d, J=8.0 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) : 67.3, 71.7, 73.4, 75.5, 77.6, 77.7, 78.4, 82.4, 95.4, 100.6, 101.7, 106.0,

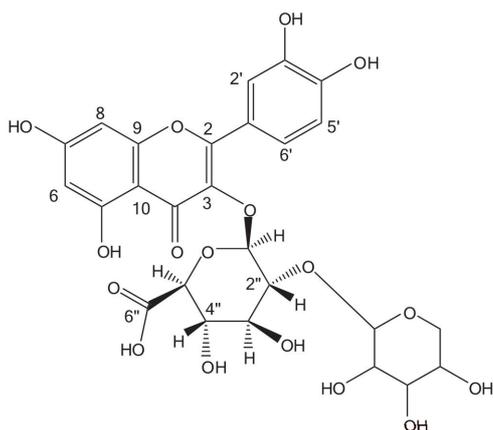


Fig. 2. Presumptive structure of compound 1.

106.5, 116.8, 118.0, 123.8, 124.3, 135.6, 146.8, 150.5, 159.1, 159.2, 163.8, 166.5, 172.9, 180.0.

### 1-2 Agrimoniin

前回の報告では同定には至らなかったが、より詳細な構造解析を行い既存の文献値<sup>12)</sup>と分析値を比較した結果、compound 2を agrimoniin と同定した (Fig. 3)。

MALDI-TOFMS (Matrix :  $\alpha$ -CHCA), Positive mode :  $m/z=1895[M+Na]^+$

$^1H-NMR(CD_3COCD_3)\delta(ppm)$  : 3.69 (1H, d,  $J=13.5$  Hz), 3.79(1H, d,  $J=13.5$  Hz), 4.50(1H, dd,  $J=6.0, 10.0$  Hz), 4.65(1H, dd,  $J=6.0, 10.0$  Hz), 5.11-5.59 (8H, m), 6.33(1H, s), 6.34(1H, s), 6.43(1H, s), 6.54(1H, d,  $J=3.9$  Hz), 6.56(1H, d,  $J=3.9$  Hz), 6.59(1H, s), 6.60(1H, s), 6.64(1H, s), 6.65(1H, s), 6.92(1H, d,  $J=1.9$  Hz), 7.31(1H, s), 7.40(1H, d,  $J=1.9$  Hz).

$^{13}C-NMR(CD_3OD)\delta(ppm)$  : 64.5, 69.8, 70.4, 72.2,

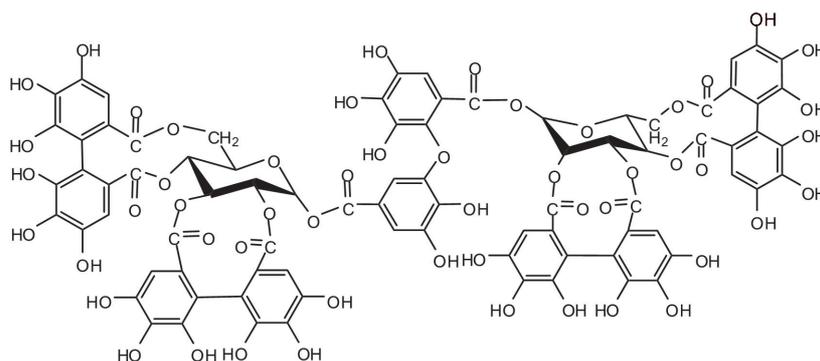


Fig. 3 Agrimoniin in strawberry leaves.

72.4, 75.8, 77.2, 77.4, 92.2, 92.7, 108.3, 108.6, 109.0, 109.1, 109.3, 109.6, 109.7, 111.1, 112.5, 113.3, 115.7, 115.9, 115.9, 116.2, 116.3, 116.7, 117.1, 117.3, 117.7, 120.9, 126.3, 126.6, 126.8, 127.0, 127.2, 127.5, 138.0, 138.0, 138.2, 138.3, 138.4, 138.5, 141.2, 142.0, 143.1, 145.1, 145.5, 145.5, 145.6, 145.8, 146.5, 146.5, 146.6, 146.6, 146.7, 148.1, 149.1, 166.2, 166.4, 169.8, 169.9, 170.3, 170.5, 170.7, 171.2, 171.4.

### 1-3 Quercetin-3-O-D-glucuronide

FAB-MS、 $^1H-NMR$ 、 $^{13}C-NMR$ の各スペクトルデータおよび文献値<sup>13)</sup>により compound 3を quercetin-3-O-D-glucuronide と同定した (Fig. 4)。

FAB-MS (グリセロール)  $m/z=479[M+H]^+$

$^1H-NMR(CD_3OD)\delta(ppm)$  : 3.43-3.77(4H, m, C2'', C3'', C4'', C5''), 5.33(1H, d,  $J=7.4$  Hz, C1''), 6.19(1H, d,  $J=1.8$  Hz, C6), 6.38(1H, d,  $J=1.8$  Hz,

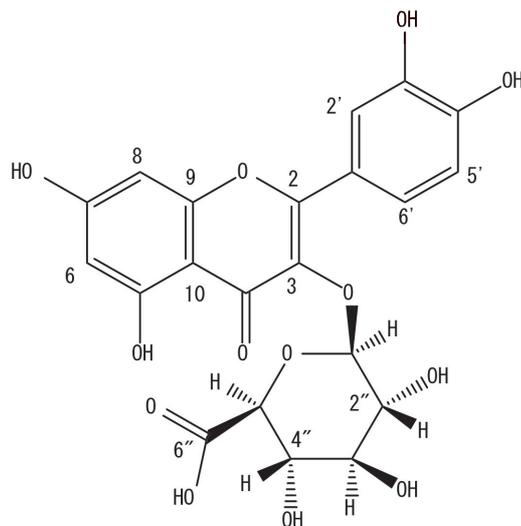


Fig. 4. Quercetin-3-O-D-glucuronide in strawberry leaves.

C8), 6.84(1H, d,  $J=9.0$  Hz, C5'), 7.62(2H, C2' C6').

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ (ppm) : 73.6(C4''), 76.2(C2''), 77.8(C5''), 78.4(C3''), 95.5(C8), 100.7(C6), 105.0(C1''), 106.4(C10), 116.8(C5'), 118.0(C2'), 123.6(C1'), 124.3(C6'), 136.2(C3), 146.7(C3'), 150.7(C4'), 159.2(C9), 159.8(C2), 163.8(C5), 166.8(C7), 173.1(C6''), 180.0(C4).

## 2. チロシナーゼ阻害活性、SOD様活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

オランダイチゴ葉50% エタノール抽出物は81.1%のチロシナーゼ阻害活性、97.0%のヒアルロニダーゼ阻害活性、99.5%のSOD様活性とすべての評価試験で、それぞれの活性指標物質と比べ高活性を示した。これまでにオランダイチゴ葉にはフラボノイドやタンニンが豊富に含まれていることが報告されており<sup>1)</sup>、このことから多くのSOD様活性物質を有することが予想されるが、本研究では試験方法が比較的容易なチロシナーゼ阻害活性を指標として活性化合物の精製を実施した (Table 1)。

単離・同定した化合物については、すべての評価試験を行った。なお、活性指標物質としてチロシナーゼ阻害活性には $\beta$ -arbutin、SOD様活性およびヒアルロニダーゼ阻害活性には (+)-catechinを用いた (Table 2-4)。

その結果、単離した3種のポリフェノール成分は、SOD様活性を示した。また、加水分解性タンニンである agrimoniin は、高いチロシナーゼ阻害活性およびヒアルロニダーゼ阻害活性を示した。

Table 1. Inhibitory activity of tyrosinase by each fraction from 50% EtOH extract

Sample		Inhibitory activity(%)
Crude extract	50% EtOH extract	81.1
Liq-Liq Partition	Aqueous fraction	79.5
	EtOAc fraction	47.8
HP-20 C.C.	Aqueous fraction	20.1
	25% MeOH fraction	87.8
	50% MeOH fraction	75.5
	75% MeOH fraction	55.1
	MeOH fraction	18.2

Conc. of tested sample; 5 mg/ml. (n=3)

Table 2. Inhibitory activities of tyrosinase of isolated compounds

Sample	Inhibitory activity(%)
Compound 1	Inactive
Agrimoniin	69.7
Quercetin-3-O-D-glucuronide	Inactive
$\beta$ -Arbutin*	14.5

\* Arbutin was used as a positive control. (n=3) Conc. of tested sample; 1 mg/ml (\*5 mg/ml).

Table 3. SOD mimic activities of isolated compounds

Sample	IC <sub>50</sub> 値( $\mu\text{M}$ )
Compound 1	9.9
Agrimoniin	0.3
Quercetin-3-O-D-glucuronide	13.6
(+)-Catechin*	6.3

\* (+)-Catechin was used as a positive control. (n=3) Conc. of tested sample; 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Table 4. Inhibitory activities of hyaluronidase of isolated compounds

Sample	Inhibitory activity(%)
Compound 1	33.9
Agrimoniin	82.4
Quercetin-3-O-D-glucuronide	48.1
(+)-Catechin*	77.9

\* (+)-Catechin was used as a positive control. (n=3) Conc. of tested sample; 1 mg/ml.

## 3. 細胞毒性、メラニン合成抑制活性、細胞増殖活性

細胞毒性試験を行った結果、イチゴ葉50% エタノール抽出物は3  $\mu\text{g/ml}$ 、compound 1は1.5  $\mu\text{M}$ 、agrimoniinは12.5  $\mu\text{M}$ 、quercetin-3-O-D-glucuronideは1.5  $\mu\text{M}$ 、活性指標物質である $\alpha$ -arbutinは1mMで細胞毒性を考慮した最大濃

Table 5. Inhibitory activities of strawberry leaves 50% EtOH extract

Sample	Conc.	Inhibitory activity(%)
50% EtOH extract	3.0 $\mu\text{g/ml}$	28.8
Compound 1	1.5 $\mu\text{M}$	28.5
Agrimoniin	12.5 $\mu\text{M}$	89.1
Quercetin-3-O-D-glucuronide	1.5 $\mu\text{M}$	42.9
$\alpha$ -Arbutin *	1.0 mM	50.6

\*  $\alpha$ -Arbutin was used as a positive control. (n=3)

度であることが示された。そこで、メラニン合成抑制試験ではそれぞれの検定試料をこれらの処理量以下で検定した。その結果、agrimoniinが最も高いメラニン合成抑制活性を示した (Table 5)。

細胞増殖活性試験では50% エタノール抽出物および単離した化合物のすべてにおいて活性を示さなかった。

#### 4. $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性、脂質蓄積抑制活性

イチゴ葉50% エタノール抽出物において $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験を行った結果、処理濃度1mg/mlで13.3%と活性を示さなかった。今回、50%エタノール抽出物が活性を示さなかったため単離した化合物を用いた $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験は実施しなかった。

イチゴ葉50% エタノール抽出物において脂質蓄積抑制活性試験を行った結果、処理濃度25  $\mu\text{g/ml}$ で3T3-L1前駆脂肪細胞の継代数が6回目の時の試験では20.8%、7回目では33.9%と脂質蓄積抑制活性を示したが、8回目以降では、全く活性を示さなかった。

#### 5. ポリフェノール成分の定量、含有量

イチゴ葉50% エタノール抽出物1g中に203mgのポリフェノールが含有されていることが認められた。また、単離した化合物を指標としたイチゴ葉の品質評価を行う目的で、HPLCによる定量を行った (Fig. 5)。その結果、イチゴ葉50% エタノール抽出物1g中に compound 1は21.9mg、agrimoniinは32.2mg、quercetin-3-O-D-glucuronideは17.8mg含まれていた。

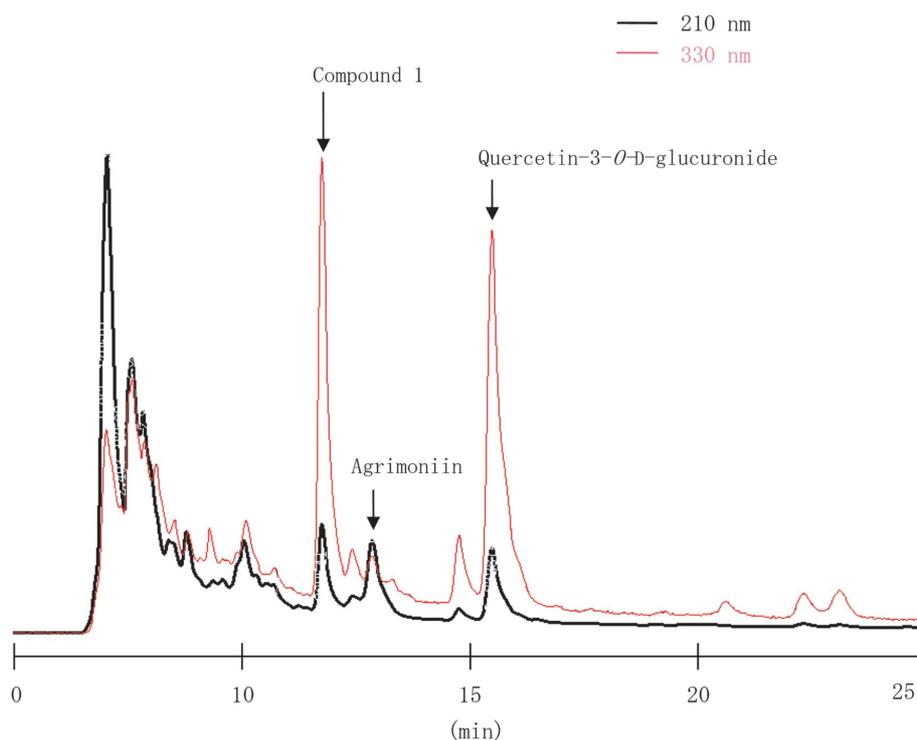


Fig. 5. HPLC profile of strawberry leaves 50% EtOH extract

## 考 察

オランダイチゴ葉50% エタノール抽出物から単離同定したうちの3種のポリフェノールの1つである quercetin-3-O-D-glucuronide は既知であった<sup>14)</sup>。しかし、agrimoniin は、本報告が初めてである。今回、同定に至らなかった compound 1 に関しては、今後さらなる構造解析を進める必要がある。

これら3種のポリフェノール成分は、抗酸化活性およびメラニン合成抑制活性を示した。また、加水分解性タンニンである agrimoniin には高いチロシナーゼ阻害活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性が認められた。チロシナーゼ阻害物質として、agrimoniin はこれまでに反応速度解析による阻害機構は非拮抗阻害であることが報告されている<sup>15)</sup>。しかし、ヒアルロニダーゼ阻害活性においての詳細な阻害形式については明らかとなっていないため、今後反応速度解析による阻害機構の解明が期待される。しかし、高活性を示した agrimoniin のようなタンニン類は、化学的に不安定であり、細胞毒性が高いことから、商品化する際の取り扱いや使用量に注意する必要がある。

イチゴ葉50%エタノール抽出物1g中には、203mgのポリフェノール成分が含有されていることが認められ、今回単離した化合物以外にも多数のポリフェノール成分が含まれている。ポリフェノール成分には、これまでに抗ウイルスや抗菌活性など様々な生理活性が報告されていることから、今後、これらの成分を明らかにすることで新たな知見が得られるかもしれない。

これら3種の化合物は、いずれも水やアルコールに比較的溶けやすいことから、お茶や、健康飲料としての利用も可能である。また現状ではイチゴ葉は、果実を収穫した後の農業廃棄物であることから、廃棄物の有効利用という観点でも、本研究の成果は環境にやさしい技術開発の一助になると考える。

## 引用文献

- 1) 山田 修平ら：イチゴのポリフェノール成分, 日本食品化学学会誌, **5**, 201-205 (1998)
- 2) 立花 新一, 田中 良昌：エラグ酸のメラニン生成抑制効果, *Fragr. J.*, **9**, 37-42 (1997)
- 3) Ishiyama, M.: Technical Information, *Dojin News*, **82**, 10 (1996)
- 4) Ukeda, H.: Detection of Superoxide Anion with WST-1 and Its Application. *Dojin News*, **96**, 1 (2000)
- 5) 前田 有美恵ら：抗炎症剤、抗アレルギー剤及び漢方エキス製剤の hyaluronidase 阻害作用, 静岡県衛生環境センター報告, **30**, 41-45 (1987)
- 6) 青木 智恵：マメ科タマリンド果実に含まれる糖類分解酵素阻害活性物質, 近畿大学大学院農学研究科平成19年度修士論文 (2007)
- 7) 永井 勉：高い肌質改善効果が期待できる新素材, *Fragr. J.*, **32**, 79-83 (2004)
- 8) 篠原和毅ら：食品機能研究法, 光琳, 318-322 (2000)
- 9) 大原 祐美ら：イチゴ葉に含まれる美肌増進物質, 近畿大学資源再生研究所報告, **6**, 37-42 (2008)
- 10) 三橋 博ら：天然物化学, 南江堂, 70 (1989)
- 11) Guanghou Shui *et al.*: An Improved Method for the Analysis of Major Antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn, *J. Chromatogr. A.*, **1048**, 17-24 (2004)
- 12) Takuo Okuda *et al.*: Tannins of Rosaceous Medicinal Plants. I. Structures of Potentillin, Agrimonic Acids A and B, and Agrimoniin, a Dimeric Ellagitannin. *Chem. Pharm. Bull.*, **32** (6), 2165-2173 (1984)
- 13) K. R. Price *et.al.*: Composition and Content of Flavonol Glycosides in Green Beans and Their Fate during Processing. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4898-4903 (1998)
- 14) 寺西正裕ら：イチゴ葉の抗酸化作用及び抗アレルギー作用, 生薬学雑誌, **61** (1), 18-23

(2007)

- 15) Isao Kubo *et al.*: Tyrosinase Inhibitors from Bolivian Medicinal Plants, *J. Nat. Prod.*, **58** (5), 739–743 (1995)