

Original article

Antiglycative effect of extract and phenolic compounds from holy basil (*Ocimum tenuiflorum*)

Kento Kunihiro^{1,2)}, Tai Kaneshima³⁾, Takao Myoda³⁾

1) Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, Hokkaido, Japan

2) Albion Co. Ltd., Tokyo, Japan

3) Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Hokkaido, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9 (3): 175-185

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

ホーリーバジル (*Ocimum tenuiflorum*) の抽出物とフェノール化合物の抗糖化作用

國廣建斗^{1,2)}、金嶋 泰³⁾、妙田貴生³⁾

1) 東京農業大学大学院 生物産業学研究科

2) 株式会社アルビオン

3) 東京農業大学 生物産業学部 食香粧化学科

抄録

【目的】 糖化反応は、蛋白質のアミノ基に糖が結合し、糖化中間体を介して終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) を形成する。AGEsは炎症や蛋白質の機能異常を誘発し、糖尿病や皮膚の老化の原因となる。本研究の目的は、ホーリーバジル (*Ocimum tenuiflorum*) 葉エキスの抗糖化作用を評価し、これらの作用に関与する化合物を同定することである。

【方法】 ホーリーバジルの乾燥葉を熱水抽出することにより、粗抽出物を得た。粗抽出液の総ポリフェノール量、総フラボノイド量、抗酸化活性を測定した。また、粗抽出物から各種クロマトグラフィーを用いてフェノール化合物を単離した。蛍光性 AGEs, *N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML), 3-deoxyglucosone (3-DG), glyoxal (GO) および methylglyoxal (MGO) の生成に対する粗抽出物と単離化合物の影響について検討した。

【結果】 ホーリーバジルの粗抽出物は、ポリフェノールを豊富に含んでおり、そのほとんどがフラボノイドであった。粗抽出物から単離された luteolin 5-*O*-glucoside (**1**), luteolin 7-*O*-glucuronide (**2**), (-)-rabdosiin (**3**), apigenin 7-*O*-glucuronide (**4**), rosmarinic acid (**5**), globoidnan A (**6**), salvianolic acid A (**7**) は、蛍光性 AGEs, CML, 3-DG, GO, MGO の生成を阻害することが確認された。特に、化合物 **3**, **5**, **6**, **7** は強力な抗糖化活性を有する化合物であった。また、粗抽出物は高い抗酸化活性を示した。

連絡先：金嶋 泰
東京農業大学 生物産業学部 食香粧化学科
〒099-2493 北海道網走市八坂196
TEL: 0152-48-3871 FAX: 0152-48-2531
e-mail: tk203897@nodai.ac.jp
共著者：國廣建斗, k_kunihiro@albion.co.jp;
妙田貴生, t1myouda@nodai.ac.jp

Glycative Stress Research 2022; 9(3): 175-185
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

【結論】 ホーリーバジルのフェノール化合物は、抗糖化作用を有する活性成分であることが示された。これらのポリフェノールの抗糖化作用の機序の一つは、ホーリーバジルの抗酸化作用と関連している可能性がある。

KEY WORDS: 抗糖化作用、終末糖化産物 (AGEs)、ホーリーバジル (*Ocimum tenuiflorum*)、ポリフェノール

はじめに

糖化は、蛋白質、脂質、核酸中の還元糖とアミノ基との非酵素的反応であり、終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) を生成する¹⁾。N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) などのAGEsの真皮組織への蓄積は、皮膚における糖化ストレスに影響を及ぼす。AGEsはまた、コラーゲン蛋白質と結合して皮膚に一部蓄積される。コラーゲン中のアミノ酸であるリジンとアルギニンがAGEsに糖化修飾を受け、糖化したコラーゲン間で架橋を形成する可能性が示唆されており、コラーゲンの糖化は、皮膚の弾力性の低下やシワの形成など、皮膚の老化を誘発する²⁾。糖化は、酸化ストレスに関連した老化現象であり、糖尿病合併症、動脈硬化、神経障害、アルツハイマー病とも関連がある^{3,4)}。さらに、生体内の糖化反応が引き起こす疾患は、活性酸素による酸化ストレスや炎症ストレスに起因し、蛋白質の構造・機能変化、細胞機能障害、アポトーシス、臓器傷害などを誘発する⁵⁾。このように、糖化は様々な疾患や老化と関連している。したがって、糖化を抑制することは、老化防止や恒常性維持のために重要である。

Labiatae科に属する*Ocimum*属は、30種以上からなり、熱帯・亜熱帯地域に分布している。ホーリーバジル (別名: カミメボウキ、神目箒、学名: *Ocimum tenuiflorum*) は、インドやスリランカで伝統的に様々な病気の治療に使われてきた。この植物は、ハーブティーや乾燥粉末が、風邪、頭痛、咳、心臓病、皮膚病などに対する民間療法として用いられている⁶⁾。先行研究では、ホーリーバジル葉から得た精油が強力な抗酸化活性を示すことが示唆されている⁷⁾。また、ホーリーバジルはサポニン、フラボノイド、タンニンなどの多くの不揮発性化合物を含む⁸⁾。Zhaoらは、プロトシアニン、縮合型タンニン、フラボノイドなどのポリフェノールが抗糖化活性に重要な役割を果たすことを示した⁹⁾。ホーリーバジルは、ルテオリン (luteolin)、アピゲニン (apigenin)、オリエンチン (orientin)、オイゲノール (eugenol)、コーヒー酸 (caffeic acid)、ロスマリン酸 (rosmarinic acid) などのフェノール化合物が主な生理活性成分として報告されていることから、高い糖化抑制効果が期待できる^{10,11)}。本研究では、ホーリーバジル葉抽出物の抗糖化作用を評価し、フェノール化合物の定量、抗酸化活性、蛍光性AGEs、CML、糖化中間体の生成について検討することとした。

材料と方法

1) 化学物質および試薬

没食子酸 (gallic acid)、メタノール (MeOH)、Folin-Ciocalteu 試薬、水酸化ナトリウム (NaOH)、(+)-カテキン、亜硝酸ナトリウム、三塩化アルミニウム、酢酸、酢酸ナトリウム三水和物、メタノール-*d*₄ (MeOD)、過硫酸カリウム、アセトニトリル、ギ酸、ロスマリン酸 (rosmarinic acid)、サルビアンリオン酸 A (salvianolic acid A)、グルコース、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、アミノグアニジン (aminoguanidine)、2,3-ブタンジオン (2,3-butanedione)、過塩素酸、炭酸水素ナトリウム、2,3-ジアミノナフタレン (2,3-diaminonaphthalene)、酢酸エチル、グリオキサール (glyoxal: GO)、メチルグリオキサール (methylglyoxal: MGO) およびエタノール (EtOH) は富士フィルム和光純薬 (大阪) から購入した。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、bovine serum albumin (BSA) は Sigma Aldrich (St. Louis, USA) より、3-デオキシグルコソソ (3-deoxyglucosone: 3-DG) は同仁化学研究所 (熊本) より、ルテオリン 5-*O*-グルコシド (luteolin 5-*O*-glucoside)、ルテオリン 7-*O*-グルクロニド (luteolin 7-*O*-glucuronide)、アピゲニン 7-*O*-グルクロニド (apigenin 7-*O*-glucuronide) はナミキ商事 (東京) より、(-)-rabdosin は MedChemExpress (NJ, USA) より入手した。

2) 実験方法

UVスペクトルはJasco V-570 UV/Vis spectrometer (Jasco, 東京) で解析した。¹H NMRおよび¹³C NMRスペクトルは、ECZ-600スペクトロメーター (日本電子、東京) で、それぞれ600 MHzおよび125 MHzで記録した。ケミカルシフトはppm、カップリングコンスタントはHzで記載した。比旋光度は、Jasco P-1030装置を用いて測定した。HPLCはMD-2010フォトダイオードアレイ検出器とAtlantis T3カラム (3 μm, 150 mm × 4.6 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA) を備えたJasco LC-2000 Plus HPLCシステムを使用して、アセトニトリル-水-ギ酸溶媒系で分析を行った。マススペクトルは、Agilent 1200 Infinity HPLCおよびAgilent 6540 Agilent Ultra-High-Definition Accurate-Mass Q-TOF LC/MS装置を組み合わせたLC-

TOF-MSを用いて測定を行った。なお、マススペクトルは、ネガティブエレクトロスプレーイオン化 (ESI) モードで記録した。分取HPLCは、LC-8Aポンプ (島津製作所、京都)、Jasco UV-4570検出器、Inertsil ODS-4カラム (3 μm , 250 mm \times 20 mm i.d., GLサイエンス、東京)を用いて実施した。移動相として、0.1%酢酸を含む20%~27%アセトニトリルを使用し、6.0 mL/minの流速で溶出した。なお、検出波長は280 nmとした。

3) 植物材料と抽出

ホーリーバジル (*Ocimum tenuiflorum*) の生葉は、スリランカ伝統植物研究所 (Negombo, Sri Lanka) で採取された。苗は、現地の農業省傘下である Department of Agriculture (Peradeniya, Sri Lanka) から購入し、Industrial Technology Institute (Colombo, Sri Lanka) にて種の同定を行った。その後、少なくとも6ヶ月間栽培した。採取した葉は洗浄し、25°C、湿度50%~70%の条件で2週間乾燥した。ホーリーバジルの乾燥葉 (50 g) を蒸留水 (500 mL) で100°C、1時間抽出した後、抽出液をろ過、濃縮、凍結乾燥し、粗抽出物 (11.6 g) を得た。

4) 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール量は、Folin-Ciocalteu法を用いて測定した¹²⁾。粗抽出物を50% MeOHで0.5 mg/mLに調製し、試料溶液とした。試料溶液 (20 μL) に1 N Folin-Ciocalteu試薬 (40 μL) を混合した。次に、1N NaOH (100 μL) を加え、15分間反応させた後、20,000 \times g、4°Cで5分間遠心分離を行った。上清を96ウェルプレートに分注し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax i3x, Molecular Devices, CA, USA) を用いて734 nmの吸光度を測定した。総ポリフェノール量は、mg gallic acid equivalents/g sampleとして表した。測定は3連で行った。

5) 総フラボノイド含量の測定

総フラボノイド含量は、塩化アルミニウム比色分析法を用いて測定した¹³⁾。粗抽出物を50% MeOHで0.5 mg/mLに調製し、試料溶液とした。試料溶液 (125 μL) に5%亜硝酸ナトリウム (40 μL) および蒸留水 (625 μL) を加えて混合し、5分間反応させた。次に、10%塩化アルミニウム (250 μL) を添加し、6分間反応させた後、1 N NaOH (250 μL) および蒸留水 (140 μL) を添加した。混合物をボルテックスで攪拌し、マイクロプレートリーダーを用いて510 nmにおける吸光度を測定した。総フラボノイド量は、mg (+)-catechin equivalents/ g sampleとして表した。測定は3連で行った。

6) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性

DPPHラジカル消去活性は、既報の通り測定した⁷⁾。粗抽出物を50% MeOHで1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、試料溶液とした。試料溶液 (40 μL) に100 mM酢酸バッファー (40 μL ,

pH 5.5) を加え、ここにEtOHで調製した0.5 mM DPPH・溶液 (20 μL) を加えた。反応混合物を攪拌し、30°Cの暗所で30分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて517 nm (A_{517}) における吸光度を測定した。DPPHラジカル消去活性は、以下の式で算出した。

DPPHラジカル消去活性 (%)

$$= [(A_{517} (\text{対照}) - A_{517} (\text{試料})) / A_{517} (\text{対照})] \times 100$$

IC₅₀ 値 (50% 阻害濃度) は、試料濃度に対する減少率から算出した。測定は3連で行った。没食子酸とアスコルビン酸は陽性対照として使用した。

7) 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ラジカル消去活性

ABTSラジカル消去活性は、既報の通り測定した⁷⁾。7 mM ABTS・溶液 10 mLと140 mM過硫酸カリウム176 μL を混合し、25°Cの暗所で12~16時間静置した後、EtOHで30倍に希釈し、このABTS・溶液の734 nmにおける吸光度が約0.700であることを確認した。

粗抽出物を50% MeOHで1~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、試料溶液とした。試料溶液 (20 μL) にABTS・溶液 (200 μL) を添加した。混合物を攪拌し、37°Cで4分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて734 nm (A_{734}) における吸光度を測定した。ABTSラジカル消去活性は、以下の式で算出した。

ABTSラジカル消去活性 (%)

$$= [(A_{734} (\text{対照}) - A_{734} (\text{試料})) / A_{734} (\text{対照})] \times 100$$

IC₅₀ 値は、試料濃度に対する減少率から算出した。測定は3連で行った。没食子酸とアスコルビン酸は陽性対照として使用した。

8) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性

SOD様活性は、SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いて、プロトコルにしたがって評価した。粗抽出物を50% MeOHで1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、試料溶液とした。試料溶液 (20 μL) にWST working solution (200 μL) とenzyme working solution (20 μL) を混合した。混合液は攪拌し、37°Cで20分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて450 nm (A_{450}) における吸光度を測定した。SOD様活性は、以下の式で算出した。

阻害率 (%)

$$= [(A_{450} (\text{対照}) - A_{450} (\text{試料})) / A_{450} (\text{対照})] \times 100$$

IC₅₀ 値は、試料濃度に対する減少率から算出した。測定は3連で行った。没食子酸とアスコルビン酸は陽性対照として使用した。

9) フェノール化合物の単離

粗抽出物 (8.0g) を少量の蒸留水に溶解後、平衡化済みの DIAION HP-20 カラム (三菱ケミカル、東京; 35 g; 330 mm × 30 mm i.d.) に供し、H₂O-MeOH 溶媒系 (300 mL) で順次溶出し、H₂O Fr. (5.40 g)、50% MeOH Fr. (1.84 g)、100% MeOH Fr. (0.50 g) の3つの画分を得た。50% MeOH Fr. (1.0 g) は、H₂O-MeOH 混合液 (100:0、75:25、50:50、25:75、0:100 v/v; 200 mL) を用いて Sephadex LH-20 カラム (Cytiva Sweden AB, Uppsala, Sweden; 25 g; 300 mm × 30 mm i.d.) によりさらに分離した。得られた 25~100% MeOH Fr. を 20%~27% アセトニトリルに溶解し、可溶部を分取 HPLC に供して、7種類のフェノール化合物を単離した。化合物 **1** (6.1 mg) は 75% MeOH Fr. から、化合物 **2** (66.3 mg)、**3** (7.1 mg)、**4** (6.8 mg) および **5** (23.8 mg) は 25% MeOH Fr. から、化合物 **6** (6.2 mg) および **7** (3.5 mg) は 100% MeOH Fr. から単離した。単離した各化合物の純度は HPLC で確認した。粗抽出物から得られた化合物 **1**~**7** (Fig. 1) の構造を LC-TOF-MS および NMR スペクトルで推定し、極大吸収および比旋光度を測定した。また、単離化合物と標準物質の HPLC クロマトグラムを比較することで同定とした。

10) 糖化蛋白質の調製

糖化蛋白質の調製は、既報の方法に従って行った¹⁴⁾。BSA-グルコース糖化モデルを用いて、ホーリーバジルの粗抽出物とそこから単離された化合物の糖化への影響を検討した。0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2) で 100 mg/mL に調製したグルコース溶液に最終濃度 10 mg/mL になるように BSA を添加し、60°C で 7 日間インキュベートした (溶液 A)。リファレンスは、グルコースを含まない 10 mg/mL BSA 溶液とした (B 液)。粗抽出物および単離化合物の効果を明らかにするため、グルコース存在下または非存在下で、各濃度に調製した試料を反応混合物に添加した (それぞれ C 液および D 液)。反応混合物は分析に使用するまで -20°C に保存した。なお、アミノグアニジン は陽性対照として用いた。

11) 蛍光性 AGE の測定

AGE 生成は、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、励起波長 370 nm、発光波長 440 nm で測定した¹⁵⁾。粗抽出物、単離化合物、アミノグアニジンの蛍光 AGE 生成に対する阻害活性は以下の式で算出し、試料濃度に対する阻害活性から IC₅₀ 値を求めた。

蛍光 AGE 生成抑制活性 (%)

$$= \{ (\text{溶液 A} - \text{溶液 B}) - (\text{溶液 C} - \text{溶液 D}) \text{ の 蛍 光 度 } \} / (\text{溶液 A} - \text{溶液 B}) \text{ の 蛍 光 度} \times 100$$

12) CML の測定

CML は非蛍光性 AGE であり、糖化反応の最も豊富な生成物の一つである。反応混合物中の CML は、CircuLex

CML/N^ε-(carboxymethyl) lysine ELISA Kit (医学生物学研究所、東京) を用いて、プロトコルに従って定量を行った。試料溶液は、反応液を 0.1 M PBS で 250 倍に希釈したものを使用した。CML 含量は、試料無添加の対照と比較した CML 生成率で示した。

13) AGEs 中間体の測定

AGEs の中間体として 3-DG, GO, MGO を既報の通り HPLC-UV システムで測定した¹⁶⁾。反応混合物 50 μL に 5 μg/mL 2,3-butanedione 6 μL を内部標準として加え、ここに蒸留水 75 μL を加えた。混合物をボルテックスした後、125 μL の 6.0% 過塩素酸を加え、12,000 × g で 10 分間遠心分離した。上清に 125 μL の飽和炭酸水素ナトリウムと 12.5 μL の 1 mg/mL 2,3-diaminonaphthalene を添加した。この反応液を 4°C で一晩インキュベートした。翌日、反応液に酢酸エチル 0.5 mL を加えて液液分配し、1,000 × g で 10 分間遠心分離した。上清を 1.5 mL エッペンチューブに分注し、窒素下で濃縮した。その後、100 μL の MeOH を加え、分析に供した。3-DG, GO, MGO は、Inertsil ODS-3 カラム (5 μm, 150 mm × 4.6 mm i.d., GLサイエンス) を用いた HPLC で分析した。グラジエント条件は、溶離液 A に精製水を、溶離液 B に 100% アセトニトリルを使用し、55 分間で 10%~41.4% アセトニトリル濃度となるように設定した。流速は 1.0 mL/min、検出波長は 268 nm とした。

統計解析

すべての統計解析は GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。数値は平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。統計解析は、グループ間の統計的比較のために一元配置分散分析に続いて Tukey 試験を用いて行い、 $p < 0.05$ の値は有意であることを示した。

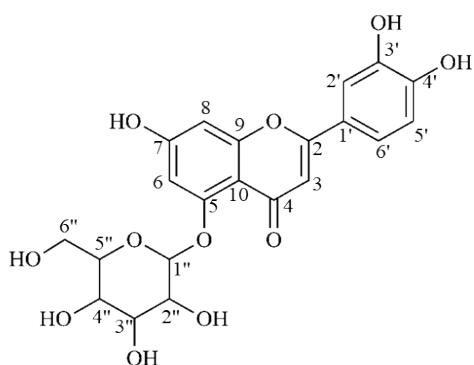
結果

総ポリフェノール量および総フラボノイド量

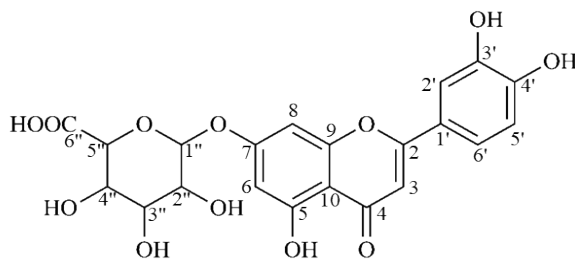
総ポリフェノール量および総フラボノイド量は、それぞれ 214.5 ± 8.0 mg gallic acid equivalents/g extract および 146.6 ± 4.6 mg catechin equivalents/g extract であった。この結果から、ホーリーバジル粗抽出物中のポリフェノールの約 70% はフラボノイドであることが示された。

抗酸化活性

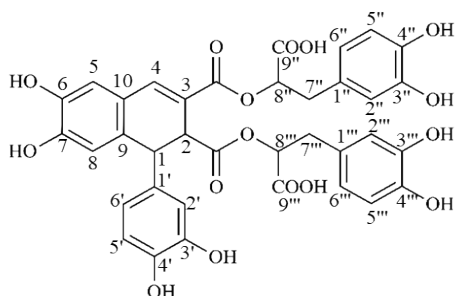
粗抽出物の抗酸化作用を Table 1 に示した。粗抽出物は DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性、SOD 様活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 36.6 ± 0.2 μg/mL, 172.1 ± 6.5 μg/mL, 39.5 ± 3.6 μg/mL であった。粗抽出物とアス



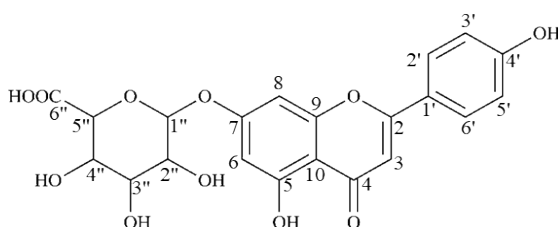
Luteolin 5-*O*-glucoside (1)



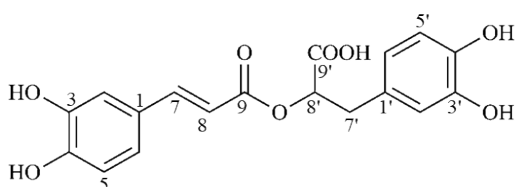
Luteolin 7-*O*-glucuronide (2)



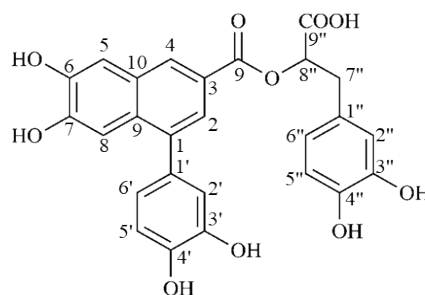
(-)-Rabdosiin (3)



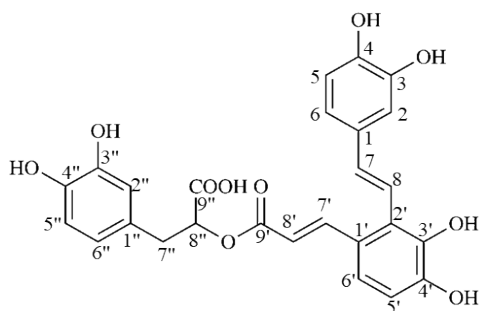
Apigenin 7-*O*-glucuronide (4)



Rosmarinic acid (5)



Globoidnan A (6)



Salvianolic acid A (7)

Fig. 1. Chemical structures of the phenolic compounds isolated from holy basil.

Table 1. Antioxidant activity of the crude extract of holy basil.

Sample	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ ; µg/mL)	ABTS radical cation scavenging activity (IC ₅₀ ; µg/mL)	SOD-like activity (IC ₅₀ ; µg/mL)
Crude extract	36.6 ± 0.2 ^c	172.1 ± 6.5 ^c	39.5 ± 3.6 ^c
Gallic acid	3.5 ± 0.6 ^a	12.4 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.3 ^a
Ascorbic acid	11.8 ± 1.0 ^b	61.8 ± 9.5 ^b	179.0 ± 1.9 ^b

Values represent mean ± SD from three independent experiments, and means within columns with the same superscript letters are not significantly different ($p < 0.05$). DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); SOD, superoxide dismutase; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; SD, standard deviation.

コルビン酸の抗酸化活性を比較すると、DPPHおよびABTSラジカル消去活性のIC₅₀値は約1/3で、SOD様活性は約4.5倍高い値であった。

単離化合物の構造解析

ホーリーバジルの粗抽出物をDIAION HP-20カラムおよびSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより分画し、分取HPLCによる分離精製でluteolin 5-*O*-glucoside (**1**), luteolin 7-*O*-glucuronide (**2**), (-)-rabdosiin (**3**), apigenin 7-*O*-glucuronide (**4**), rosmarinic acid (**5**), globoidnan A (**6**), salvianolic acid A (**7**)を単離した (Fig. 2)。これらの化合物は、文献値¹⁷⁻²³⁾と比較することにより同定した。また、単離化合物の実測値は、Supplemental dataに記載した。化合物**1, 2, 3, 4, 5**は様々な植物から発見されているが、化合物**6, 7**はホーリーバジルから初めて報告された。

蛍光性AGEsの生成に対する阻害活性

蛍光性AGEsの生成に対するホーリーバジルの粗抽出物と単離化合物の阻害活性をTable 2に示した。粗抽出物および単離化合物は、いずれも蛍光性AGEsの生成を阻害した。これらの阻害活性は陽性対照として用いたアミノグアニジンより強いものであった。特に、化合物**3, 5, 6, 7**は、蛍光性AGEsの生成を顕著に抑制した。

CMLおよびAGE中間体生成に対する阻害活性

非蛍光性AGEsの生成に対する阻害活性を調べるために、AGEsの一つであるCML量をELISA法で測定した。Fig. 3に示すように、ホーリーバジルの粗抽出物と単離化合物は、CMLの生成を抑制した。粗抽出物、化合物**1, 2, 4**におけるCML生成の阻害率は10%~20%程度であった。一方、化合物**3, 5, 6, 7**は、粗抽出物や化合物**1, 2, 4**以上の強力なCML形成阻害活性を示した。

次に、ホーリーバジルの粗抽出物と単離化合物のAGE中間体形成に対する影響を評価した (Fig. 4)。HPLC-UV分析から、糖化反応により3-DG, GO, MGOの3種類の中

体が生成していることが確認された。粗抽出物および単離化合物は、いずれも3-DG, GO, MGOの生成を抑制した。特に、化合物**3, 5, 6, 7**はAGE中間体の生成を有意に抑制した。粗抽出物は3-DG生成に対して約30%の阻害活性を示し、化合物**1, 2, 4**では約50%、化合物**3, 5, 6, 7**では約70%の高い阻害活性であった。GOとMGOにおいては、粗抽出物および化合物**1, 2, 4**は40%~50%の阻害活性を、化合物**3, 5, 6, 7**は60%~70%と強力なAGE中間体生成阻害活性を示した。

考察

生体内の糖化ストレスは老化や生活習慣病の原因の一つであり、糖化によるAGEs生成は酸化反応と関連している。アミノグアニジンはAGEs生成を抑制するが、摂取することで貧血、肝障害、ビタミンB6欠乏などの副作用が生じる²⁴⁾。そこで、薬草からluteolin, cyanidin 3-*O*-galactoside, rhodanthone Bなどの新しい抗糖化成分が単離されてきた²⁵⁻²⁷⁾。

ホーリーバジルは、「ハーブの女王」、「比類なきもの」、「アーユルヴェーダにおける自然界の母なる薬草」とも呼ばれ、伝統医薬において重要なハーブである²⁸⁾。ホーリーバジルは、インドやスリランカでは薬用植物として3000年以上の歴史があり、潜在的に機能性を有するハーブである。本研究では、抗糖化作用を指標に、ホーリーバジルの生理機能を評価した。ホーリーバジルの熱水抽出物は強い抗糖化活性を示し、この抽出物には、luteolin 5-*O*-glucoside (**1**), luteolin 7-*O*-glucuronide (**2**), (-)-rabdosiin (**3**), apigenin 7-*O*-glucuronide (**4**), rosmarinic acid (**5**), globoidnan A (**6**), salvianolic acid A (**7**)といったポリフェノールが含まれていた。なお、化合物**6, 7**はホーリーバジルから初めて単離、同定された。これらの成分は、いずれも抗糖化効果の活性成分であることが確認された。特に、化合物**3, 5, 6, 7**は、化合物**1, 2, 4**といった配糖体より強い抗糖化活性を示した。

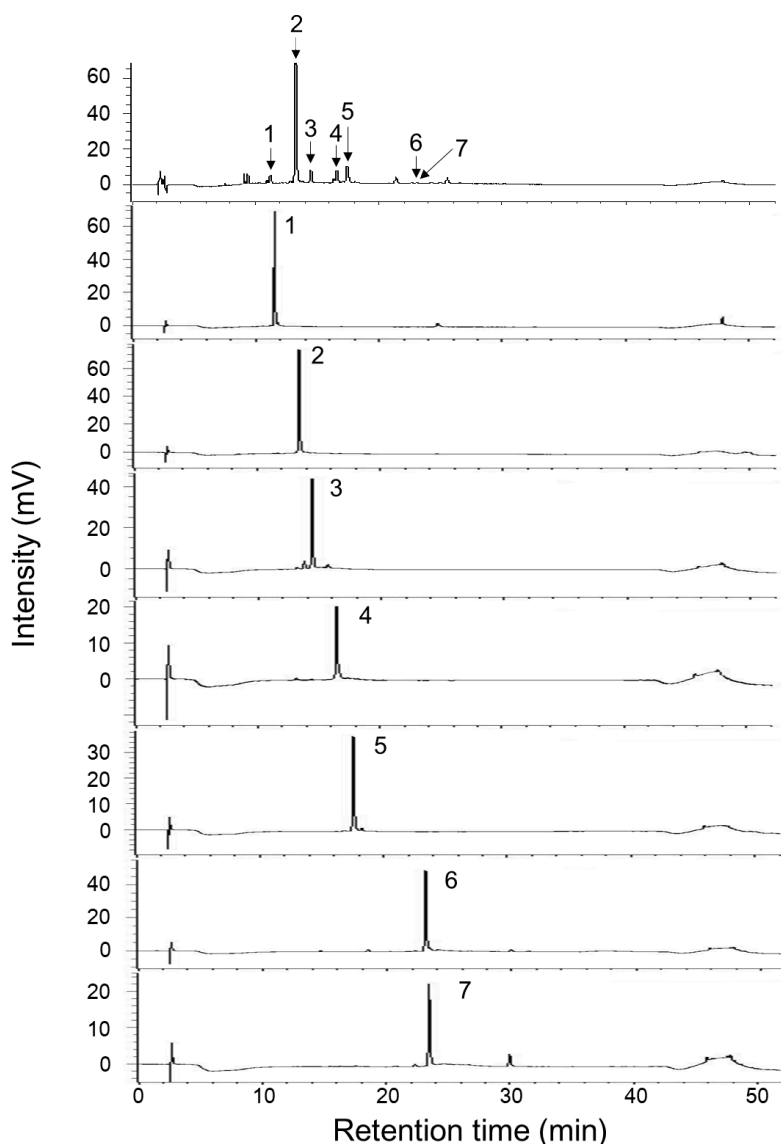


Fig. 2. HPLC chromatogram of the phenolic compounds isolated from the crude extract of holy basil.

Detection: PDA detector (280 nm); gradient condition: 5% ~ 100% acetonitrile containing 0.1% formic acid. 1: Luteolin 5-*O*-glucoside (1), 2: Luteolin 7-*O*-glucuronide (2), 3: (-)-Rabdosiin (3), 4: Apigenin 7-*O*-glucuronide (4), 5: Rosmarinic acid (5), 6: Globoidnan A (6), 7: Salvianolic acid A (7). HPLC, high-performance liquid chromatography; PDA, photodiode array.

Supplementary data

Spectroscopic data of compounds 1–7

Luteolin 5-*O*-glucoside (1): yellow amorphous powder; UV (MeOH) λ_{\max} = 248, 346 nm; HR-ESI-MS m/z 447.0945 [$M-H$]⁻, *calcd.* for C₂₁H₂₀O₁₁, 448.1018; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.37 (dd, 1H, J = 7.6, 2.0 Hz, H-6'), 7.35 (brs, 1H, H-2'), 6.89 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.81 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-6), 6.69 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-8), 6.52 (s, 1H, H-3), 4.83 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1''), 3.94 (dd, 1H, J = 12.0, 1.4 Hz, H-6'' α), 3.75 (dd, 1H, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6'' β), 3.58–3.60 (m, 1H, H-2''), 3.42–3.50 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 180.4 (C-4), 165.3 (C-7), 164.4 (C-2), 160.7 (C-9), 160.1 (C-5), 150.8 (C-4'), 147.0 (C-3'), 123.5 (C-1'), 120.1 (C-6'), 116.8 (C-5'), 114.0 (C-2'), 109.2 (C-10), 106.5 (C-3), 105.1 (C-1''), 104.9 (C-6), 99.3 (C-8), 78.6 (C-5''), 77.3 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 62.5 (C-6''). The above data were in consistency with the reported values of Luteolin 5-*O*-glucoside (Sevindik *et al.*, 2015).

Luteolin 7-*O*-glucuronide (**2**): yellow amorphous powder; UV (MeOH) λ_{\max} = 253, 266, 347 nm; HR-ESI-MS m/z 461.0729 [M-H]⁻, *calcd.* for C₂₁H₁₈O₁₂, 462.0798; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.43 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-6'), 7.41 (s, 1H, H-2'), 6.90 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.82 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-8), 6.60 (s, 1H, H-3), 6.49 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-6), 5.10 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1''), 3.93 (d, 1H, J = 9.0 Hz, H-5''), 3.53–3.57 (m, 3H, H-2'', H-3'', H-4''); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 184.1 (C-3), 175.0 (C-6''), 166.9 (C-2), 164.9 (C-7), 162.8 (C-5), 159.0 (C-9), 151.2 (C-4'), 147.1 (C-3'), 123.5 (C-1'), 120.5 (C-6'), 116.8 (C-5'), 114.3 (C-2'), 107.2 (C-10), 104.1 (C-3), 101.6 (C-1''), 101.4 (C-6), 96.1 (C-8), 77.5 (C-3''), 76.6 (C-5''), 74.5 (C-2''), 73.3 (C-4''). The above data were in consistency with the reported values of luteolin 7-*O*-glucuronide (Bhatarrai *et al.*, 2019).

(-)-Rabdosiin (**3**): light brown amorphous powder; UV (MeOH) λ_{\max} = 255, 285, 345 nm; $[\alpha]_D$ = -37.6 (c = 0.50, MeOH), HR-ESI-MS m/z 717.1475 [M-H]⁻, *calcd.* for C₃₆H₃₀O₁₆, 718.1549; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.58 (s, 1H, H-4), 6.79 (s, 1H, H-5), 6.74 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-2''), 6.68 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H-2'''), 6.66 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-5'''), 6.64 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-5''), 6.60 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.55 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-6''), 6.50 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-6'''), 6.49 (s, 1H, H-8), 6.35 (d, 1H, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.33 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-2'), 5.04 (dd, 1H, J = 7.9, 4.8 Hz, H-8'''), 4.97 (dd, 1H, J = 6.9, 4.8 Hz, H-8''), 4.44 (brs, 1H, H-1), 3.88 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H-2), 3.03 (dd, 1H, J = 14.5, 4.1 Hz, H-7'''), 2.98 (dd, 1H, J = 13.8, 3.8 Hz, H-7'''), 2.91–2.96 (m, 2H, H-7''); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 174.3 (C-9'''), 173.7 (2-COO-), 173.5 (C-9''), 168.0 (3-COO-), 149.1 (C-7), 146.1 (C-3''), 146.0 (C-3'''), 145.9 (C-4'''), 145.4 (C-6), 145.1 (C-4''), 145.1 (C-3'), 144.8 (C-4'), 140.9 (C-4), 136.8 (C-1'), 131.4 (C-9), 129.6 (C-1''), 129.5 (C-1'''), 124.7 (C-10), 122.0 (C-6'''), 121.4 (C-6''), 120.5 (C-3), 119.9 (C-6'), 117.7 (C-2''), 117.6 (C-2'''), 117.5 (C-8), 117.3 (C-5), 116.4 (C-5''), 116.3 (C-5'''), 116.3 (C-5'), 115.6 (C-2'), 75.7 (C-8''), 75.7 (C-8'''), 49.9 (C-2), 46.1 (C-1), 38.1 (C-7''), 37.7 (C-7'''). The above data were in consistency with the reported values of (-)-rabdosiin (Ozgen *et al.*, 2010).

Apigenin 7-*O*-glucuronide (**4**): yellow amorphous powder; UV (MeOH) λ_{\max} = 235, 265, 340 nm; HR-ESI-MS m/z 445.0765 [M-H]⁻, *calcd.* for C₂₁H₁₈O₁₁, 446.0841; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.87 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H-2', H-6'), 6.92 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H-3', H-5'), 6.81 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-8), 6.64 (s, 1H, H-3), 6.48 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H-6), 5.13 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1''), 4.03 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H-5''), 3.53–3.60 (m, 3H, H-2'', H-3'', H-4''); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 184.1 (C-4), 175.6 (C-6''), 166.8 (C-2), 164.6 (C-7), 162.9 (C-5), 162.9 (C-4'), 159.0 (C-9), 129.7 (C-2'), 129.7 (C-6'), 123.1 (C-1'), 117.0 (C-3'), 117.0 (C-5'), 107.2 (C-10), 104.1 (C-3), 101.4 (C-1''), 101.2 (C-6), 96.0 (C-8), 77.3 (C-3''), 76.6 (C-5''), 74.4 (C-2''), 73.1 (C-4''). The above data were in consistency with the reported values of apigenin 7-*O*-glucuronide (Moussaoui *et al.*, 2010).

Rosmarinic acid (**5**): brown amorphous solid; UV (MeOH) λ_{\max} = 235 and 330 nm; HR-ESI-MS m/z 359.0776 [M-H]⁻, *calcd.* for C₁₈H₁₆O₈, 360.0845; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.54 (d, 1H, J = 15.8 Hz, H-7), 7.03 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-2), 6.95 (dd, 1H, J = 8.3, 2.0 Hz, H-6), 6.77 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 6.74 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H-2'), 6.68 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-5'), 6.61 (dd, 1H, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6'), 6.26 (d, 1H, J = 16.5 Hz, H-8), 5.17 (dd, 1H, J = 8.3, 4.1 Hz, H-8'), 3.09 (dd, 1H, J = 14.5, 4.1 Hz, H-7' α), 2.99 (dd, 1H, J = 14.5, 8.3 Hz, H-7' β); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 173.7 (C-9'), 168.5 (C-9), 149.7 (C-4), 147.7 (C-7), 146.8 (C-3), 146.1 (C-3'), 145.2 (C-4'), 129.4 (C-1'), 127.2 (C-1), 123.1 (C-6), 121.8 (C-6'), 117.6 (C-2'), 116.5 (C-5), 116.3 (C-5'), 115.2 (C-2), 114.5 (C-8), 74.8 (C-8'), 37.9 (C-7'). The above data were in consistency with the reported values of rosmarinic acid (Sevindik *et al.*, 2015).

Globoidan A (**6**): light brown amorphous powder; UV (MeOH) λ_{\max} = 261 and 318 nm; HR-ESI-MS m/z 491.0987 [M-H]⁻, *calcd.* for C₂₆H₂₀O₁₀, 492.1062; ¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ 8.24 (brs, 1H, H-4), 7.62 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H-2), 7.26 (s, 1H, H-8), 7.24 (s, 1H, H-5), 6.87 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.86 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.79 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-2''), 6.75 (dd, 1H, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.68 (dd, 1H, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6''), 6.65 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-5''), 5.24 (dd, 1H, J = 9.6, 3.4 Hz, H-8''), 3.16 (dd, 1H, J = 13.4, 3.4 Hz, H-7''), 3.05 (dd, 1H, J = 14.5, 9.6 Hz, H-7''); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 174.2 (C-9''), 168.4 (C-9), 150.2 (C-7), 148.3 (C-6), 146.2 (C-4'), 146.1 (C-3'), 145.9 (C-3''), 145.2 (C-4''), 140.0 (C-1), 133.8 (C-1'), 131.9 (C-8a), 130.3 (C-1''), 129.8 (C-4a), 129.4 (C-4), 125.1 (C-3), 124.4 (C-2), 122.4 (C-6'), 121.9 (C-6''), 118.0 (C-2'), 117.6 (C-2''), 116.4 (C-5''), 116.3 (C-5'), 112.4 (C-5), 109.4 (C-8), 76.0 (C-8''), 38.2 (C-7''). The above data were in consistency with the reported values of globoidan A (D'Urso *et al.*).

Salvianolic acid A (7): yellow amorphous powder; UV (MeOH) $\lambda_{\text{ma}} = 227$ and 287 nm; HR-ESI-MS m/z 493.1147 $[\text{M-H}]^-$, *calcd.* for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$, 494.1220; ^1H NMR (600 MHz, MeOD): δ 8.02 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.12 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, H-8), 7.10 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-6'), 7.03 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.86 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 6.74 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-5'), 6.73 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-5), 6.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2''), 6.65 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.62 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5''), 6.54 (dd, 1H, $J = 8.3, 1.4$ Hz, H-6''), 6.29 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.12 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.7$ Hz, H-8''), 3.06 (dd, 1H, $J = 14.5, 3.4$ Hz, H-7''), 2.92 (dd, 1H, $J = 13.8, 9.0$ Hz, H-7''); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): δ 175.5 (C-9''), 168.9 (C-9'), 148.2 (C-4'), 146.9 (C-7'), 146.7 (C-4), 146.4 (C-3), 146.0 (C-3''), 145.0 (C-4''), 144.4 (C-3'), 137.8 (C-7), 131.4 (C-1), 130.0 (C-1''), 128.2 (C-2'), 126.2 (C-1'), 122.0 (C-6''), 120.6 (C-8), 120.4 (C-6), 120.1 (C-6'), 117.3 (C-2''), 116.5 (C-5''), 116.3 (C-5), 116.1 (C-8'), 114.7 (C-5'), 114.0 (C-2), 76.3 (C-8''), 38.2 (C-7''). The above data were in consistency with the reported values of salvianolic acid A (Zhou *et al.*, 2014).

Table 2. Inhibitory activity against fluorescent AGE formation.

Sample	IC ₅₀ value (mg/mL)	IC ₅₀ value (mM)
Crude extract	0.37 ± 0.02 ^b	–
Luteolin 5- <i>O</i> -glucoside (1)	0.22 ± 0.02 ^c	0.49 ± 0.05 ^b
Luteolin 7- <i>O</i> -glucuronide (2)	0.25 ± 0.01 ^c	0.55 ± 0.01 ^b
(–)-Rabdosiin (3)	0.15 ± 0.01 ^d	0.21 ± 0.02 ^c
Apigenin 7- <i>O</i> -glucuronide (4)	0.23 ± 0.01 ^c	0.52 ± 0.02 ^b
Rosmarinic acid (5)	0.07 ± 0.01 ^e	0.20 ± 0.04 ^c
Globoidnan A (6)	0.08 ± 0.01 ^e	0.16 ± 0.02 ^c
Salvianolic acid A (7)	0.09 ± 0.01 ^e	0.18 ± 0.03 ^c
Aminoguanidine	0.49 ± 0.04 ^a	6.74 ± 0.58 ^a

Values represent mean ± SD from three independent experiments, and means within columns with the same superscript letters are not significantly different ($p < 0.05$). AGE, advanced glycation end product; SD, standard deviation.

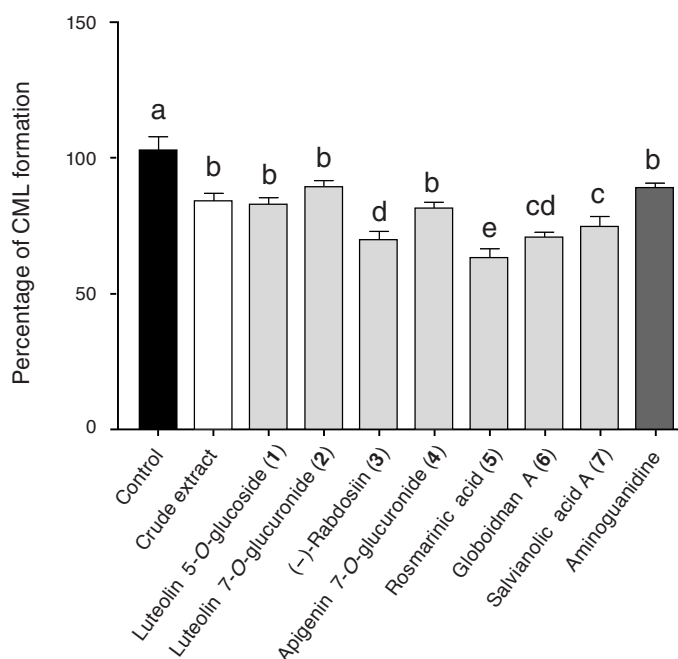


Fig. 3. Effects of the crude extract of holy basil and the phenolic compounds isolated from it on the formation of CML.

Extract and isolated compounds with indicated percentages were introduced into the BSA-glucose model and incubated at 60°C for seven days. CML was quantified using ELISA. Data were calculated as the percentage of CML formation compared to that of controls without sample addition and are presented as mean ± SD (n = 8). Bar with different letters (a–e) differ ($p < 0.05$). CML, N^ε-(carboxymethyl) lysine; ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay; SD, standard deviation.

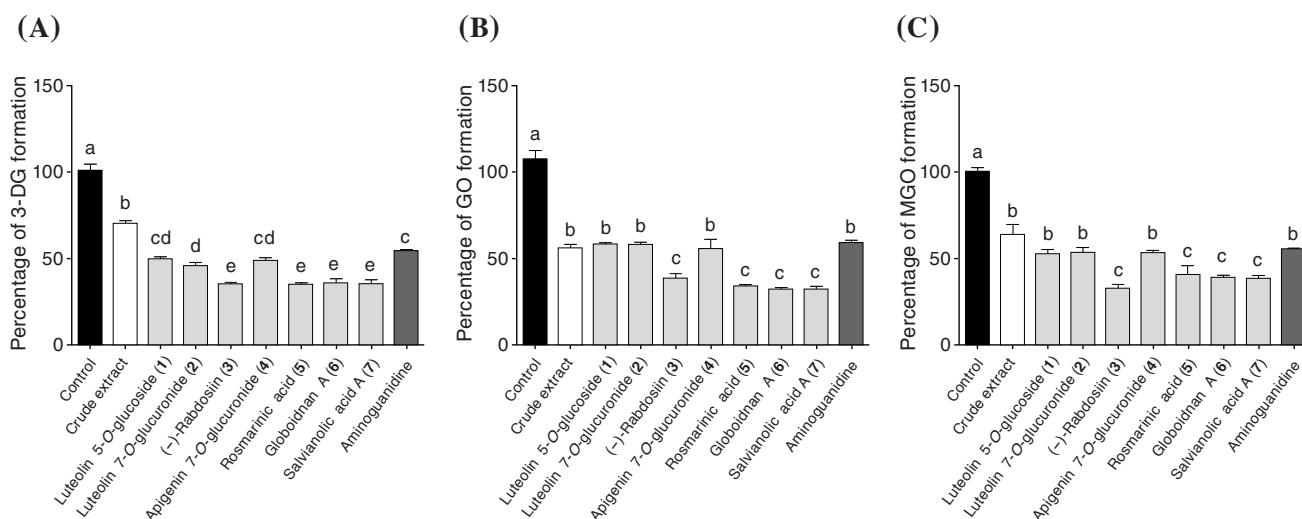


Fig. 4. Effects of the crude extract of holy basil and the phenolic compound isolated from it on the formation of AGE intermediate.

Extract and isolated compounds with indicated percentages were introduced into the BSA-glucose model and incubated at 60°C for seven days. The AGE intermediates were detected using a HPLC-UV system: (A) 3-DG, (B) GO, and (C) MGO. Data were calculated as the percentage of AGE intermediate formation compared to that of controls without sample addition and are presented as mean \pm SD ($n = 3$). Different letters (a - e) for the same method represent statistically significant differences between samples ($p < 0.05$). AGE, advanced glycation end product; BSA, bovine serum albumin; HPLC, high-performance liquid chromatography; UV, ultra violet; 3-DG, 3-deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal; SD, standard deviation.

Yangらは²⁹⁾、BSA-グルコースモデルにおいて、kaempferolがkaempferol配糖体よりも強い糖化阻害活性を示すと報告しており、我々の結果と一致する。生体内における糖化のメカニズムとして、GO、3-DG、MGOなどのジカルボニル誘導体の代謝によるAGEsの蓄積が挙げられる^{3,30)}。AGEsのうち、GOを前駆体とする分子内Cannizzaro反応とSchiff塩基やAmadori化合物の酸化的開裂によって生成するCMLは、糖尿病や高い酸化ストレスを有する患者で検出されている³¹⁾。そこで、ホーリーバジルの粗抽出物と単離化合物の糖化反応に対する影響を調べたところ、GOの生成は有意に抑制されることが確認された。この結果は、GO形成の阻害がその後の代謝を妨げることにより、CML蓄積の抑制につながったことを示唆するものであった。

先行研究では、抗糖化機構としてフリーラジカル消去作用の関与が提案されている³²⁾。ホーリーバジルの粗抽出物は、DPPHおよびABTSラジカルを消去し、またSOD様活性を示した。これらの結果は、ホーリーバジルの抗酸化作用がAGEs生成抑制に有用であることを示唆している。一方、酸化ストレスは、生体内におけるAGEの形成・蓄積のメカニズムにおいて重要な役割を担っており、いくつかの疾患の進行の重要な要因として関与すると考えられている。組織内に酸化ストレスが存在すると、糖化反応が加速されて、老化が促進する³³⁾。強力な抗酸化活性を有するホーリーバジルの抽出物が、加齢に伴う糖化を抑制する有効な成分になる可能性が示唆されたが、生体内での抗糖化機構を解明するためにはさらなる研究が必要である。

結論

本稿では、ホーリーバジルの抽出物およびそこから単離されたフェノール化合物のBSA-グルコース系に対する抗糖化作用について報告した。ホーリーバジルの粗抽出物はポリフェノールを豊富に含み、その中に含まれるluteolin 5-*O*-glucoside (1)、luteolin 7-*O*-glucuronide (2)、(-)-rabdosiin (3)、apigenin 7-*O*-glucuronide (4)、rosmarinic acid (5)、globoidnan A (6)、salvianolic acid A (7)は蛍光AGEs、CMLおよび糖化反応中間体の生成を顕著に抑制することが示された。特に、化合物3、5、6、7がホーリーバジルの強力な抗糖化活性成分として特定できた。このようなホーリーバジルの機能特性は、化粧品、サプリメント、医薬品の開発などに有益である可能性が示唆された。

謝辞

本研究を支援してくださった金城綾乃氏に謝意を表す。本研究の発表にあたり、公益財団法人 医食同源生薬研究財団 (東京都中央区) より支援を受けた (IDF#221001)。

利益相反申告

著者らは、本論文の内容に直接関連する利益相反はない。

参考文献

- 1) Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation-endproducts: a review. *Diabetologia*. 2001; 44: 129-146.
- 2) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med*. 2011; 8: 23-29.
- 3) Ahmed N. Advanced glycation end products: Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67: 3-21.
- 4) Takedo A, Yasuda T, Miyata T, et al. Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*. 1996; 221: 17-20.
- 5) Uribarri J, Cai W, Peppas M, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: Two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62: 427-433.
- 6) Cohen MM. Tulsi – *Ocimum sanctum*: A herb for all reasons. *J Ayurveda Integr Med*. 2014; 5: 251-259.
- 7) Kunihiro K, Kikuchi Y, Nojima S, et al. Characteristic of aroma components and antioxidant activity of essential oil from *Ocimum tenuiflorum* leaves. *Flavour & Fragrance J*. 2022; 37: 210-218.
- 8) Pattanayak P, Behera P, Das D, et al. *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4: 95-105.
- 9) Zhao L, Zhu X, Yu Y, et al. Comprehensive analysis of the anti-glycation effect of peanut skin extract. *Food Chem*. 2021; 362: 130169.
- 10) Venuprasad MP, Kandikattu HK, Razack S, et al. Chemical composition of *Ocimum sanctum* by LC-ESI-MS/MS analysis and its protective effects against smoke induced lung and neuronal tissue damage in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017; 91: 1-12.
- 11) Kusindarta DL, Wihadmadyatami H, Haryanto A. The analysis of hippocampus neuronal density (CA1 and CA3) after *Ocimum sanctum* ethanolic extract treatment on the young adulthood and middle age rat model. *Vet World*. 2018; 11: 135-140.
- 12) Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299: 152-178.
- 13) Yao X, Zhu L, Chen Y, et al. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. *Food Chem*. 2013; 139: 59-66.
- 14) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 135-148.
- 15) Shin S, Son D, Kim M, et al. Ameliorating effect of *Akebia quinata* fruit extracts on skin aging induced by advanced glycation end products. *Nutrients*. 2015; 7: 9337-9352.
- 16) Takabe W, Yagi M, Ichihashi M, et al. Anti-glycative effect of palladium and platinum nanoparticle solution. *Glycative Stress Res*. 2016; 3: 222-228.
- 17) Sevindik HG, Ozgen U, Atila A, et al. Phytochemical studies and quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid and luteolin 5-O- β -D-glucopyranoside on *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2015; 63: 720-725.
- 18) Bhatarrai G, Seong SH, Jung HA, et al. Isolation and quantitative analysis of BACE1 inhibitory compounds from *Cirsium maackii* flower. *Nat Prod Sci*. 2019; 25: 326-333.
- 19) Ozgen U, Sevindik H, Kazaz C, et al. A new sulfated alpha-ionone glycoside from *Sonchus erzincanicus* Matthews. *Molecules*. 2010; 15: 2593-2599.
- 20) Flegkas A, Milosević Ifantis T, Barda C, et al. Antiproliferative activity of (-)-rabdosiin isolated from *Ocimum sanctum* L. *Medicines (Basel)*. 2019; 6: 37.
- 21) Moussaoui F, Zellagui A, Segueni N, et al. Flavonoid constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and their antimicrobial activity. *Rec Nat Prod*. 2010; 4: 91-95.
- 22) D'Urso G, Masullo M, Seigner J, et al. LC-ESI-FT-MSn metabolite profiling of *Symphytum officinale* L. roots leads to isolation of comfrey A, an unusual aryl naphthalene lignan. *Int J Mol Sci*. 2020; 21: 4671.
- 23) Zhou W, Xie H, Xu X, et al. Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial activities. *J Funct Foods*. 2014; 6: 492-498.
- 24) Yagi M, Sakiyama C, Miyata Y, et al. Antiglycative effect of genipin and crocetin. *Glycative Stress Res*. 2021; 8: 156-161.
- 25) Yagi M, Nomoto K, Hori M, et al. The effect of edible purple Chrysanthemum extract on advanced glycation end products generation in skin: A randomized controlled clinical trial and *in vitro* study. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 61-74.
- 26) Takabe W, Yamaguchi T, Hayashi H, et al. Identification of antiglycative compounds in Japanese red water pepper (red leaf variant of the *Persicaria hydropiper* sprout). *Molecules*. 2018; 23: 2319.
- 27) Ohno R, Moroishi N, Sugawa H, et al. Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity. *J Clin Biochem Nutr*. 2015; 57: 27-32.
- 28) Rastogi S, Kalra A, Gupta V, et al. Unravelling the genome of Holy basil: An "incomparable" "elixir of life" of traditional Indian medicine. *BMC Genomics*. 2015; 16: 413.
- 29) Yang R, Wang WX, Chen HJ, et al. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers. *J Food Drug Anal*. 2018; 26: 252-259.
- 30) Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 458: 221-226.
- 31) Takeuchi M, Makita Z. Alternative routes for the formation of immunochemically distinct advanced glycation end-products *in vivo*. *Curr Mol Med*. 2001; 1: 305-315.
- 32) Wu CH, Huang SM, Lin JA, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct*. 2011; 2: 224-234.
- 33) Kim CS, Park S, Kim J, et al. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2017; 21: 55-61.