

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析  
天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明  
天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析  
ピメンタ抽出物に関する検討

分担研究者 好村守生 松山大学薬学部 助教  
天倉吉章 松山大学薬学部 准教授

研究要旨

既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤ピメンタ抽出物の品質規格作成に供する基礎的な研究の一環として、含水エタノール（50%、80%）またはエタノールを用いた抽出エキスを作成し、それらの抗酸化能を ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法で評価した。その結果、80%エタノール抽出エキスに最も強い活性を認めたため、抗酸化活性を指標としたその詳細な成分精査を行い、1種の文献未記載の化合物 [(2S)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol 1-O-(6'-O-galloyl)-β-D-glucoside] を含む 15種の化合物 [eugenol, thymol, gallic acid, ellagic acid, syringic acid, vanillin, pimentol, (4R)-, (4S)-α-terpineol 8-O-(6'-O-galloyl)-β-D-glucoside, (4R)-, (4S)-α-terpineol 8-O-[(2"-O-galloyl)-α-L-arabinosyl]-(1→6)-β-D-glucoside, casuarinin, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose, penta-O-galloyl-β-D-glucose] を単離し、その構造を明らかにした。これらの化合物を標準試料とした HPLC による各抽出エキス（50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、エタノール抽出物）との直接比較から、80%エタノール抽出物の主構成成分は eugenol 及び thymol であり、これらが本添加物の抗酸化活性に大きく寄与していることが示唆された。一方で、80%エタノール抽出エキスの酢酸エチル分画物も強い抗酸化活性を示し、それには galloylglucose 等の加水分解性タンニンを含むポリフェノール類を豊富に認めたことから、これらが有する強い抗酸化活性もピメンタ抽出物の機能に寄与していると考えられた。

研究協力者  
吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

多くの天然添加物は植物からの抽出物であり、抽出方法によってエキス中の含有成分比が大きく異なる。酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているピメンタ抽出物では、その製法は「フトモモ科ピメンタ

(*Pimenta dioica* MERRILL) の果実よりエタノールで抽出し、濃縮して得られたもの」であり、その有効成分としてオイゲノール及びチモールが挙げられる。これらの成分はエタノールによって大部分が抽出液中に溶出されると推察されるが、一方でピメンタ果実には強い抗酸化能を有する加水分解性タンニン類の存在が報告されているため、それらを含めた抽出条件の検討が酸化防止剤として

の機能により高い付加価値を与えると考えられる。

既存添加物名簿記載のピメンタ抽出物の製法条件は現状では限定的であり、酸化防止剤としてより効果が期待される抽出方法を検討することで、その価値を高めるとともに、含有する成分を明らかにすることで品質規格を作成するための基礎的なデータ収集を目的とした検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料及び試薬

原料となるピメンタ果実は長岡香料株式会社より恵与いただいたものを抽出に使用した。

分離、精製に使用したカラム充填剤は Diaion HP-20 (三菱化学), Toyopearl HW-40 (東ソー), YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

ORAC 測定に使用した AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride] は和光純薬工業株式会社製を、Fluorescein sodium salt 及び trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) は Sigma-Aldrich 社製を用いた。

ジオール化に用いた 4-methylmorpholine *N*-oxide (NMO) 及び四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>, micro-capsulated) は和光純薬工業株式会社製を使用した。

### 2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム (島津製作所) を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2 (2.0 I.D.×150 mm) (ワイエムシィ), カラム温度: 40°C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 280 nm, 試料注入量: 3 µL, 移動相: (A)0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1: 1) 及び(B)メタ

ノール[濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%), 30→50 min (B: 50→60%), 50→75 min (B: 0%)].

キラル HPLC 分析は、カラム: chiralpak IA (4.6 I.D.×150 mm) (DAICEL), カラム温度: 35°C (CO 631A, GL Sciences), 流速: 1.0 mL/min (PU-2080 plus, JASCO), 測定波長: 254 nm (UV-2075 plus, JASCO), 移動相: *n*-ヘキサン: 2-プロパノール (9: 1) で行った。

蛍光測定に使用したマイクロプレートリーダーは SpectraMax M2 (Molecular Devices 社製) を用い、励起波長: 485 nm, 測定波長: 520 nm で開始から 2 分毎に 90 分後まで測定を行った。

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として acetone-*d*<sub>6</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> を用いた。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [acetone-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: 2.04 ppm, <sup>13</sup>C: 29.8 ppm), MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm, <sup>13</sup>C: 49.0 ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: 2.50 ppm, <sup>13</sup>C: 39.5 ppm)] を基準とした。

高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し、測定溶媒に MeOH あるいはアセトニトリルを用いた。

### 3. 抗酸化活性

抗酸化活性は ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法により評価した。測定方法は以下のとおり。

マイクロプレートの各ウェルに試料溶液 20 µL または trolox 標準溶液 (6.25~50 µM), 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 µL を加え、37°C で 15 分加温した。予め 37°C に加温した 75 mM リン酸緩衝液で 31.7 mM AAPH を調製し、各ウェルに 75 µL を加えて攪拌、37°C でインキュベートしながら 2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光強度 (励

起波長: 485 nm, 測定波長: 520 nm) を測定した。0 分の蛍光強度値( $f_0$ )を 1 とした各時間の相対強度から area under the curve (AUC) を算出し, それぞれの値から blank の値を差し引いた後 (net AUC<sub>trolox</sub>, net AUC<sub>sample</sub>), trolox 標準溶液から得た 2 次回帰式から trolox 相当量[ $\mu\text{mol TE (trolox equivalent)/g}$ ] を算出した。

各試料 2 回以上測定を行い, その平均値を活性値とした。

#### 4. 抽出エキスの調製

*Pimenta dioica* の果実粉砕物 1 g を 50% エタノール, エタノール 各 10 mL で 48 時間冷浸抽出を行い, ろ過, 濃縮後, 凍結乾燥して分析及び抗酸化活性試験に供した。

#### 5. 化合物の単離

*Pimenta dioica* の果実粉砕物を 80% エタノールで 48 時間冷浸抽出し, ろ過, 濃縮後, *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, *n*-ブタノールで順次抽出を行い, 各抽出物を得た。得られた各分画濃縮物のうち酢酸エチル分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW-40, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS-AQ] による分離精製を繰り返すことで化合物の単離を行った。得られた各化合物については順相, 逆相 HPLC での標品との直接比較あるいは文献値との NMR データ等の比較によって同定した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. 抗酸化能の評価

50% エタノール抽出物, 80% エタノール抽出物, エタノール抽出物についてその抗酸化活性を ORAC 法で評価した結果, 80% エタノール抽出物に最も強い活性 (8,580  $\mu\text{mol TE/g}$ ) を認めた (図 1)。そのため, ピメンタ抽出物中の主要な抗酸化成分探索の目的で, 80% エタノール抽出物について *n*-ヘキサ

ン, 酢酸エチル, *n*-ブタノールで順次溶媒抽出を行い, 同様に ORAC の測定を行った。

その結果, *n*-ヘキサン分画物 (19,458  $\mu\text{mol TE/g}$ ), 酢酸エチル分画物 (9,754  $\mu\text{mol TE/g}$ ) に強い活性を認めた (図 2) ため, これらについての詳細な成分探索を行った。

#### 2. 抽出エキスの成分精査

*Pimenta dioica* 果実粉砕物 570 g を 6 L の 80% エタノールで 48 時間冷浸抽出し, ろ過, 約 1 L まで濃縮後, *n*-ヘキサン (6 L), 酢酸エチル (6 L), *n*-ブタノール (6 L) で順次抽出を行い, 各抽出物を得た。得られた各分画濃縮物 [*n*-ヘキサン分画物 (27.3 g), 酢酸エチル分画物 (10.8 g), *n*-ブタノール抽出物 (8.3 g), 水分画物 (20.4 g)] のうち *n*-ヘキサン分画物について, 標準品との HPLC による直接比較によって eugenol (1), thymol (2) を同定した。また, 酢酸エチル分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW-40, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS-AQ] による分離精製を繰り返し, 単離した化合物について NMR データ, マススペクトル等の詳細な解析を行い, それぞれ gallic acid (3) (19.1 mg), ellagic acid (4) (127.2 mg), syringic acid (5) (4.7 mg), vanillin (6) (11.0 mg), pimentol (7) (266.3 mg), (4*R*)-, (4*S*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (8: 2.1 mg, 9: 25.4 mg), (4*R*)-, (4*S*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-[(2"-*O*-gallyl)- $\alpha$ -L-arabinosyl]- (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside (10: 7.6 mg, 11: 10.9 mg), 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (12) (16.0 mg), penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (13) (31.1 mg), casuarinin (14) (16.7 mg), (2*S*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (15) (12.5 mg) と同定した。各化合物の構造を図 3 に示す。また, 化合物 15 は文献未記載の化合物であったため, その構造決定の詳細について次項に示す。

Syringic acid (5):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.32 (2H, s, H-2, 6), 3.88 (6H, s, -OMe).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 170.0 (C-7), 148.9 (2C, C-3, 5), 141.8 (C-4), 122.0 (C-1), 108.4 (2C, C-2, 6), 56.8 (2C, -OMe).

Vanillin (6):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 9.74 (1H, s, -CHO), 7.43 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 7.42 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6), 6.93 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 3.91 (3H, s).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 192.9 (C-7), 154.7 (C-4), 149.7 (C-3), 130.7 (C-1), 127.9 (C-6), 116.3 (C-5), 111.3 (C-2), 56.4 (-OMe).

Pimentol (7):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.09 (2H, s, galloyl-H), 5.74 (1H, m, H-8), 4.87-4.90 (2H, m, H-9), 4.73 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, Glc H-1), 4.58 (1H, dd,  $J = 2.0, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.45 (1H, dd,  $J = 6.5, 12.0$  Hz, Glc H-6), 3.78 (3H, s, -OMe), 3.71 (1H, ddd,  $J = 2.0, 6.5, 9.0$  Hz, Glc H-5), 3.49-3.52 (2H, m, Glc H-2, 3), 3.44 (1H, m, Glc H-4), 3.01 (1H, m, H-7).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 168.3 (galloyl C-7), 149.5 (C-5), 146.7 (C-3), 146.5 (2C, galloyl C-3, 5), 139.9 (galloyl C-4), 139.0 (C-8), 135.6 (C-4), 132.6 (C-1), 121.3 (galloyl C-1), 115.6 (C-9), 111.6 (C-2), 110.2 (2C, galloyl C-2, 6), 108.6 (C-6), 104.1 (Glc C-1), 77.4 (Glc C-2), 75.8 (Glc C-5), 74.8 (Glc C-3), 71.8 (Glc C-4), 64.8 (Glc C-6), 56.7 (-OMe), 40.7 (C-7). HR-ESI-MS: 493.1352 ( $[\text{M-H}]^-$ ), Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ : 493.1352)

(4*R*)- $\alpha$ -Terpineol 8-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (8):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.06 (2H, s, galloyl-H), 5.30 (1H, br s, H-2), 4.50 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, Glc H-1), 4.47 (1H, dd,  $J = 2.0, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.34 (1H, dd,  $J = 6.0, 11.5$  Hz, Glc H-6), 3.53 (1H, m, Glc H-5), 3.38 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, Glc H-3), 3.33 (overlapped, Glc H-4), 3.18 (1H, dd,  $J = 7.5, 9.0$  Hz, Glc H-2), 1.97-2.16 (2H,

m, H-3, 5), 1.88 (1H, m, H-6), 1.75-1.85 (2H, m, H-4, 6), 1.56 (3H, s, H-7), 1.17 (1H, m, H-5), 1.16 (3H, s, H-9), 1.15 (3H, s, H-10).

(4*S*)- $\alpha$ -Terpineol 8-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (9):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.06 (2H, s, galloyl-H), 5.27 (1H, br s, H-2), 4.50 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, Glc H-1), 4.47 (1H, dd,  $J = 2.0, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.34 (1H, dd,  $J = 6.5, 12.0$  Hz, Glc H-6), 3.54 (1H, ddd,  $J = 2.0, 6.5, 9.0$  Hz, Glc H-5), 3.39 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, Glc H-3), 3.33 (overlapped, Glc H-4), 3.18 (1H, dd,  $J = 7.5, 9.0$  Hz, Glc H-2), 1.97-2.02 (2H, m, H-3, 5), 1.88 (1H, m, H-6), 1.79 (1H, m, H-6), 1.67 (1H, m, H-4), 1.48 (3H, s, H-7), 1.18 (1H, m, H-5), 1.18 (3H, s, H-9), 1.14 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 168.4 (galloyl C-7), 146.4 (2C, galloyl C-3, 5), 139.8 (galloyl C-4), 134.8 (C-1), 121.7 (galloyl C-1), 121.4 (C-2), 110.3 (2C, galloyl C-2, 6), 98.5 (Glc C-1), 81.2 (C-8), 78.2 (Glc C-3), 75.3 (Glc C-2), 75.1 (Glc C-5), 72.0 (Glc C-4), 65.3 (Glc C-6), 45.0 (C-4), 31.9 (C-6), 28.1 (C-3), 25.2 (C-10), 25.0 (C-5), 23.4 (C-7), 22.9 (C-9).

(4*R*)- $\alpha$ -Terpineol 8-*O*-[(2''-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-arabinosyl]-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside (10):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.05 (2H, s, galloyl-H), 5.29 (1H, br d, H-2), 5.19 (1H, s, Ara H-1), 5.15 (1H, dd,  $J = 0.5, 2.0$  Hz, Ara H-2), 4.44 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc H-1), 4.06 (2H, m, Ara H-3, 4), 4.00 (1H, dd,  $J = 2.0, 11.5$  Hz, Glc H-6), 3.81 (1H, m, Ara H-5), 3.69 (1H, dd,  $J = 5.0, 12.0$  Hz, Ara H-5), 3.62 (1H, dd,  $J = 7.0, 11.5$  Hz, Glc H-6), 3.41 (1H, ddd,  $J = 2.0, 7.0, 9.0$  Hz, Glc H-5), 3.3 (overlapped, Glc H-3), 3.23 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, Glc H-4), 3.12 (1H, dd,  $J = 8.0, 9.0$  Hz, Glc H-2), 1.99 (1H, m, H-3), 1.90-1.91 (2H, m, H-5, 6), 1.83 (1H, m, H-6), 1.68 (1H, m, H-3), 1.58 (3H, s, H-7), 1.55 (1H, m, H-4), 1.14 (3H, s, H-10),

1.12 (1H, m, H-5), 1.10 (3H, s, H-9). <sup>13</sup>C-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 167.4 (galloyl C-7), 146.6 (2C, galloyl C-3, 5), 140.2 (galloyl C-4), 134.7 (C-1), 121.8 (C-2), 120.9 (galloyl C-1), 110.3 (galloyl C-2, 6), 107.8 (Ara C-1), 98.4 (Glc C-1), 85.7 (2C, Ara C-2, 4), 78.3 (Glc C-3), 77.4 (Ara C-3), 76.8 (Glc C-5), 75.3 (Glc C-2), 72.2 (Glc C-4), 68.0 (Glc C-6), 62.8 (Ara C-5), 45.2 (C-4), 32.0 (C-6), 27.9 (C-3), 25.0 (C-10), 24.4 (C-5), 23.7 (C-7), 23.6 (C-9). HR-ESI-MS: *m/z* 599.2333 ([M-H]<sup>-</sup>, Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>14</sub>: 599.2345).

(4*S*)-α-Terpineol 8-*O*-[(2''-*O*-galloyl)-α-L-arabinosyl]-(1→6)-β-D-glucoside (11): <sup>1</sup>H-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.05 (2H, s, galloyl-H), 5.28 (1H, br s, H-2), 5.17 (1H, s, Ara H-1), 5.14 (1H, dd, *J* = 0.5, 2.0 Hz, Ara H-2), 4.45 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Glc H-1), 4.08 (2H, m, Ara H-3, 4), 4.00 (1H, dd, *J* = 2.0, 11.5 Hz, Glc H-6), 3.78 (1H, m, Ara H-5), 3.69 (1H, dd, *J* = 5.0, 12.0 Hz, Ara H-5), 3.62 (1H, dd, *J* = 6.5, 11.5 Hz, Glc H-6), 3.41 (1H, ddd, *J* = 2.0, 6.0, 9.0 Hz, Glc H-5), 3.3 (overlapped, Glc H-3), 3.13 (1H, dd, *J* = 7.5, 9.0 Hz, Glc H-2), 1.85-1.95 (4H, m, H-3, 5, 6, 6), 1.69 (1H, m, H-3), 1.56 (3H, s, H-7), 1.56 (1H, m, H-4), 1.14 (1H, m, H-5), 1.13 (6H, s, H-9, 10). <sup>13</sup>C-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 167.4 (galloyl C-7), 146.6 (2C, galloyl C-3, 5), 140.2 (galloyl C-4), 134.7 (C-1), 121.9 (C-2), 120.9 (galloyl C-1), 110.3 (2C, galloyl C-2, 6), 107.7 (Ara C-1), 98.5 (Glc C-1), 85.8 (Ara C-4), 85.7 (Ara C-2), 81.1 (C-8), 78.2 (Glc C-3), 77.4 (Ara C-3), 76.7 (Glc C-5), 75.3 (Glc C-2), 72.0 (Glc C-4), 68.0 (Glc C-6), 62.7 (Ara C-5), 45.2 (C-4), 32.1 (C-6), 28.0 (C-3), 25.0 (2C, C-5, 10), 23.6 (C-7), 23.1 (C-9). HR-ESI-MS: 599.2362 ([M-H]<sup>-</sup>, Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>14</sub>: 599.2345).

1,2,3,6-Tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose (12): <sup>1</sup>H-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.12, 7.03, 7.02, 6.93

(each 2H, s, galloyl-H), 6.09 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Glc H-1), 5.57 (1H, dd, *J* = 8.5, 9.0 Hz, Glc H-3), 5.43 (1H, dd, *J* = 8.5, 9.5 Hz, Glc H-2), 4.60 (1H, dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, Glc H-6), 4.51 (1H, dd, *J* = 4.5, 12.0 Hz, Glc H-6), 4.01 (1H, ddd, *J* = 2.0, 4.5, 9.5 Hz, Glc H-5), 3.96 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, Glc H-4).

Penta-*O*-galloyl-β-D-glucose (13): <sup>1</sup>H-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.11, 7.05, 6.98, 6.95, 6.90 (each 2H, s, galloyl-H), 6.23 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, Glc H-1), 5.90 (1H, t, *J* = 10.0 Hz, Glc H-3), 5.62 (1H, t, *J* = 10.0 Hz, Glc H-4), 5.58 (1H, dd, *J* = 8.5, 10.0 Hz, Glc H-2), 4.52 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, Glc H-6), 4.41 (1H, m, Glc H-5), 4.38 (1H, dd, *J* = 4.0, 10.5 Hz, Glc H-6).

Casuarinin (14): <sup>1</sup>H-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.07 (2H, s, galloyl-H), 6.81, 6.50, 6.37 (each 1H, s, HHDP-H), 5.51 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, Glc H-1), 5.44 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, Glc H-4), 5.37 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, Glc H-3), 5.30 (1H, dd, *J* = 3.0, 8.5 Hz, Glc H-5), 4.90 (1H, dd, *J* = 3.0, 13.0 Hz, Glc H-6), 4.69 (1H, dd, *J* = 2.0, 5.0 Hz, Glc H-2), 4.05 (1H, d, *J* = 13.0 Hz).

(2*S*)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)-β-D-glucoside (15): [α]<sub>D</sub> -3.8° (*c* = 1.0, EtOH). <sup>1</sup>H-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.08 (2H, s, galloyl-H), 6.77 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 6.66 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.61 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 4.51 (1H, dd, *J* = 2.0, 11.5 Hz, Glc H-6), 4.38 (1H, dd, *J* = 6.0, 11.5 Hz, Glc H-6), 4.29 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, Glc H-1), 3.93 (1H, ddd, *J* = 3.0, 7.0, 10.0 Hz, H-8), 3.83 (1H, dd, *J* = 3.0, 10.0 Hz, H-9), 3.55 (1H, ddd, *J* = 2.0, 6.0, 8.0 Hz, Glc H-5), 3.36-3.40 (3H, m, H-9, Glc H-3, 4), 3.26 (1H, m, Glc H-2), 2.70 (1H, dd, *J* = 7.0, 14.0 Hz, H-7), 2.62 (1H, dd, *J* = 7.0, 14.0 Hz, H-7). <sup>13</sup>C-NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>)

$\delta$ : 168.4 (galloyl C-7), 148.7 (C-3), 146.5 (2C, galloyl C-3, 5), 145.9 (C-4), 139.9 (galloyl C-4), 131.1 (C-1), 123.0 (C-6), 121.4 (galloyl C-1), 116.1 (C-5), 114.1 (C-2), 110.2 (2C, galloyl C-2, 6), 105.0 (Glc C-1), 77.8 (Glc C-3), 75.5 (Glc C-5), 75.2 (Glc C-2), 74.6 (C-9), 73.0 (C-8), 71.7 (Glc C-4), 64.8 (Glc C-6), 56.4 (-OMe), 40.3 (C-7). HR-ESI-MS: 511.1455 ([M-H]<sup>-</sup>), Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub>: 511.1457).

### 3. 化合物 15 の構造解析

化合物 15 は淡黄色無晶形粉末として得られ, HR-ESI-MS の測定の結果から分子量は C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>13</sub> であることが示された.

<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (図 4) では芳香族プロトン領域に galloyl 基由来の 2H-singlet が 1 本, ABX 系シグナルが 1 組, 脂肪族プロトン領域にはメトキシ基由来の 3H-singlet が 1 本, グルコース 1 組のシグナルに加えて 3 スピン系のシグナルが観察された. 脂肪族プロトン領域のシグナルについては, グルコース 6 位のプロトンが大きく低磁場シフトしていることが <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H correlation spectroscopy (COSY) (図 5) から示されたことから, この位置に galloyl 基が結合していると推察された. また, <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (図 6) では脂肪族領域にグルコース, メトキシ由来のシグナルに加えて 3 本のシグナルが観察され, それらは heteronuclear single quantum coherence (HSQC) (図 7) からメチレン×2, メチン×1 であることが明らかとなった. 以上の情報を考え合わせ, 本化合物は 15 に示す構造であると推察された.

さらに構造の確証を得るため heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) の測定を行った結果, 図 8 に示す相関が観察されたことから, galloyl 基及びアグリコンとグルコースとの結合位置に矛盾が無いことが明らかになった.

また, 7 位の立体については, アグリコン

を合成しそれと比較することで決定した. まず eugenol (1) をマイクロカプセル化四酸化オスミウム(OsO<sub>4</sub>), 及び 4-methylmorpholine *N*-oxide (NMO) 存在下で反応させることでラセミ体のジオール化物 [3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol] に誘導した. 反応物をシリカゲルで精製後, キラルカラムを用いた HPLC 分取で光学分割を行い, それぞれの旋光度 [(*R*)-体: [α]<sub>D</sub>+20.2°, (*S*)-体: [α]<sub>D</sub>-23.4°] を文献値 [(*R*)-体: [α]<sub>D</sub>+18°, (*S*)-体: [α]<sub>D</sub>-23°] と比較することで (*R*)-体, (*S*)-体の 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol を得た. これらと 15 の酵素分解物とをキラル HPLC 分析で直接比較することで 7 位の立体を (*S*) 配置であると決定した.

### 4. 抽出エキスの分析

50%エタノール抽出物, 80%エタノール抽出物, エタノール抽出物の各 10 mg を 1 mL のメタノールに溶解させフィルター (0.22 μm) 処理後, HPLC 分析によって図 9 (a~c) に示すクロマトグラムを得た. 各抽出物について, 成分精査で得た下記 15 種の化合物を標準試料として直接比較を行った結果, いずれの抽出物においても eugenol (1), thymol (2), pimentol (7) を主構成成分として認めた. しかしながら, 80%エタノール抽出物では eugenol (1) 含量が他と比較して顕著に多く, また ORAC 法での抗酸化能評価において最も強い活性を示したため, これらが本エキスの強い抗酸化活性に寄与していると考えられた. 一方, エタノール抽出物では 80%エタノール抽出物と比較して eugenol (1) 含量は微少であったが, 他の抽出物と比べ pimentol (4) を多く認めた.

1: eugenol

2: thymol

3: gallic acid

4: ellagic acid

- 5: syringic acid
- 6: vanillin
- 7: pimentol
- 8: (4*R*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside
- 9: (4*S*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside
- 10: (4*R*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-[(2"-*O*-gallyl)- $\alpha$ -L-arabinosyl]-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside
- 11: (4*S*)- $\alpha$ -terpineol 8-*O*-[(2"-*O*-gallyl)- $\alpha$ -L-arabinosyl]-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoside
- 12: 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose
- 13: penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose
- 14: casuarinin
- 15: (2*S*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside

#### D. 結論

ピメンタ抽出物の ORAC 法を指標とした抗酸化能評価の結果、80%エタノール抽出物に最も強い活性 (8,580  $\mu\text{mol TE/g}$ ) を認めた。また、80%エタノール抽出物の詳細な成分精査を行い、1種の文献未記載の化合物 [(2*S*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside] を含む計 15種の化合物を単離し、構造を明らかにした。得られた各化合物を標準試料として各抽出エキス (50%エタノール抽出物, 80%エタノール抽出物, エタノール抽出物) との HPLC による直接比較を行った結果、先の抗酸化能評価で最も強い活性を示した 80%エタノール抽出物の主構成成分は eugenol (1) 及び thymol (2) であった。これらはピメンタ抽出物の有効成分とされている化合物であるが、酸化防止剤としてのピメンタ抽出物のより効果的、効率的な調製方法として、これらがエキス中により保持される条件、例えば 80%エタノール抽出などが好ましいと考えられる。一方、今回の検討で、eugenol (1) を含まない酢酸エチル分画物にも強い抗酸化活性

を認めたことから、その全体への寄与は定かではないものの、ピメンタに含まれるポリフェノール類も本抽出エキスの強い抗酸化活性に影響を与えている可能性が示唆された。

#### E. 参考文献

- Kikuzaki H., Hara S., Kawai Y., Nakatani N., Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*, *Phytochemistry* 52, 1307-1312, 1999
- Kikuzaki H., Sato A., Mayahara Y., Nakatani N., Galloylglucosides from berries of *Pimenta dioica*, *J. Nat. Prod.* 63, 749-752, 2000
- Ou B., Hampsch-W. M., Prior L. R., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619-4626, 2001
- Huang D., Ou B., Hampsch-W. M., Flanagan A. J., Prior L. R., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.* 50, 4437-4444, 2002
- Kikuzaki H., Miyajima Y., Nakatani N., Phenolic glycosides from berries of *Pimenta dioica*, *J. Nat. Prod.* 71, 861-865, 2008

#### F. 研究業績

##### 1. 論文発表

現在のところなし

##### 2. 学会発表

- 1) 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志: 天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析. 日本生薬学会第 56 回年会 (2009.10)
- 2) 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志:

フトモモ科植物の成分研究, オールスパ  
イス (*Pimenta dioica*) の抗酸化成分.  
日本薬学会第 130 年会 (2010.3)

- 3) Yoshida T., Yoshimura M., Amakura Y.,  
Polyphenols in myrtaceous plants:  
Polyphenolic compounds in clove and  
pimento and their antioxidative activities,  
7<sup>th</sup> Tannin Conference, Berlin (2010.8),  
[発表予定]

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし



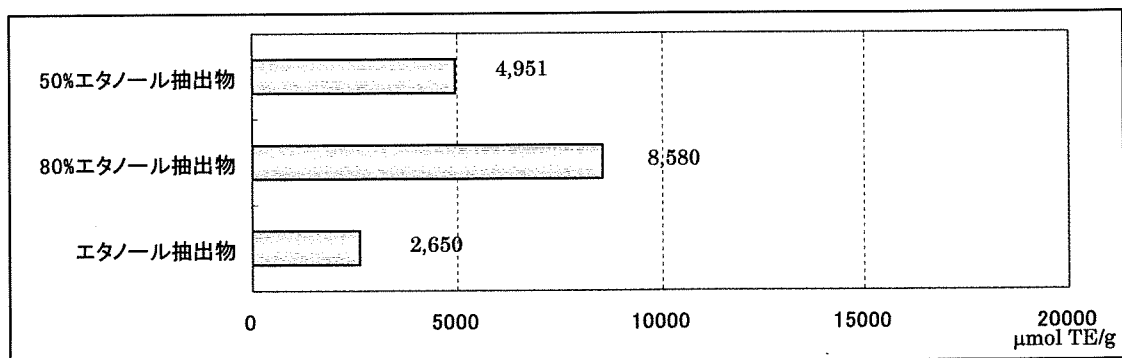


図 1. ピメンタ抽出エキスの ORAC 値

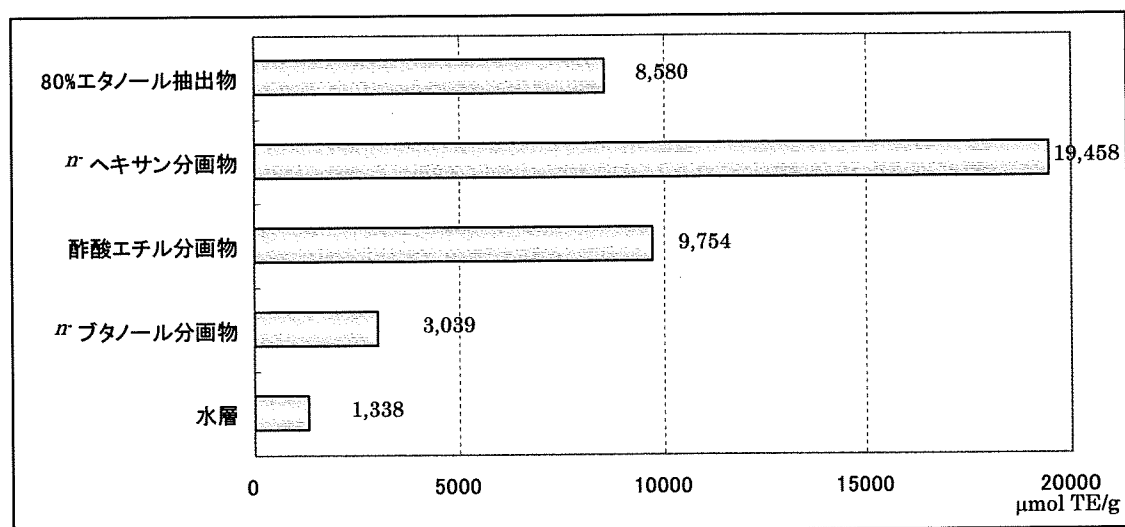


図 2. ピメンタ 80%エタノール抽出エキス分画物の ORAC 値

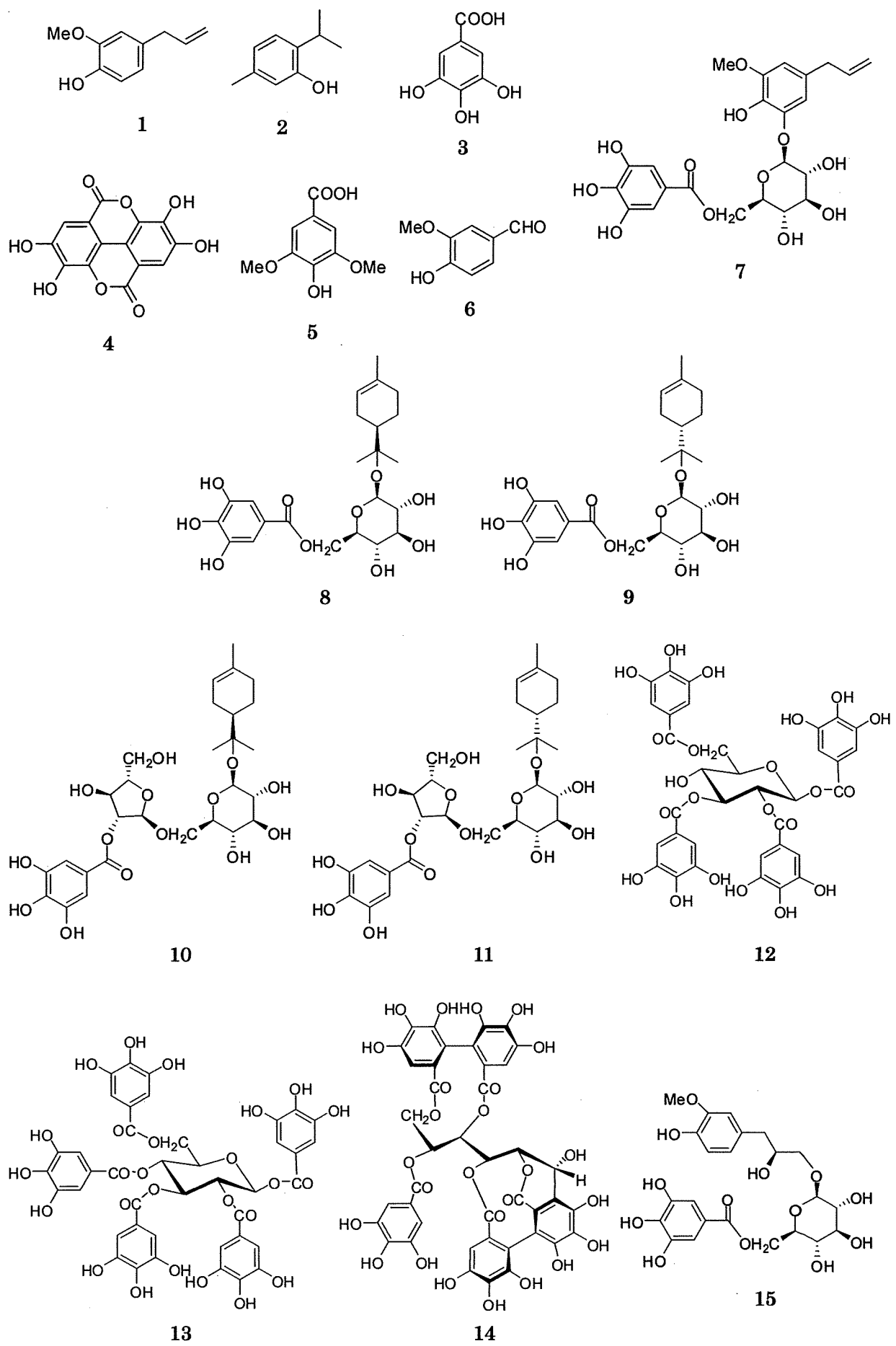


図 3. 化合物 1~15 の化学構造

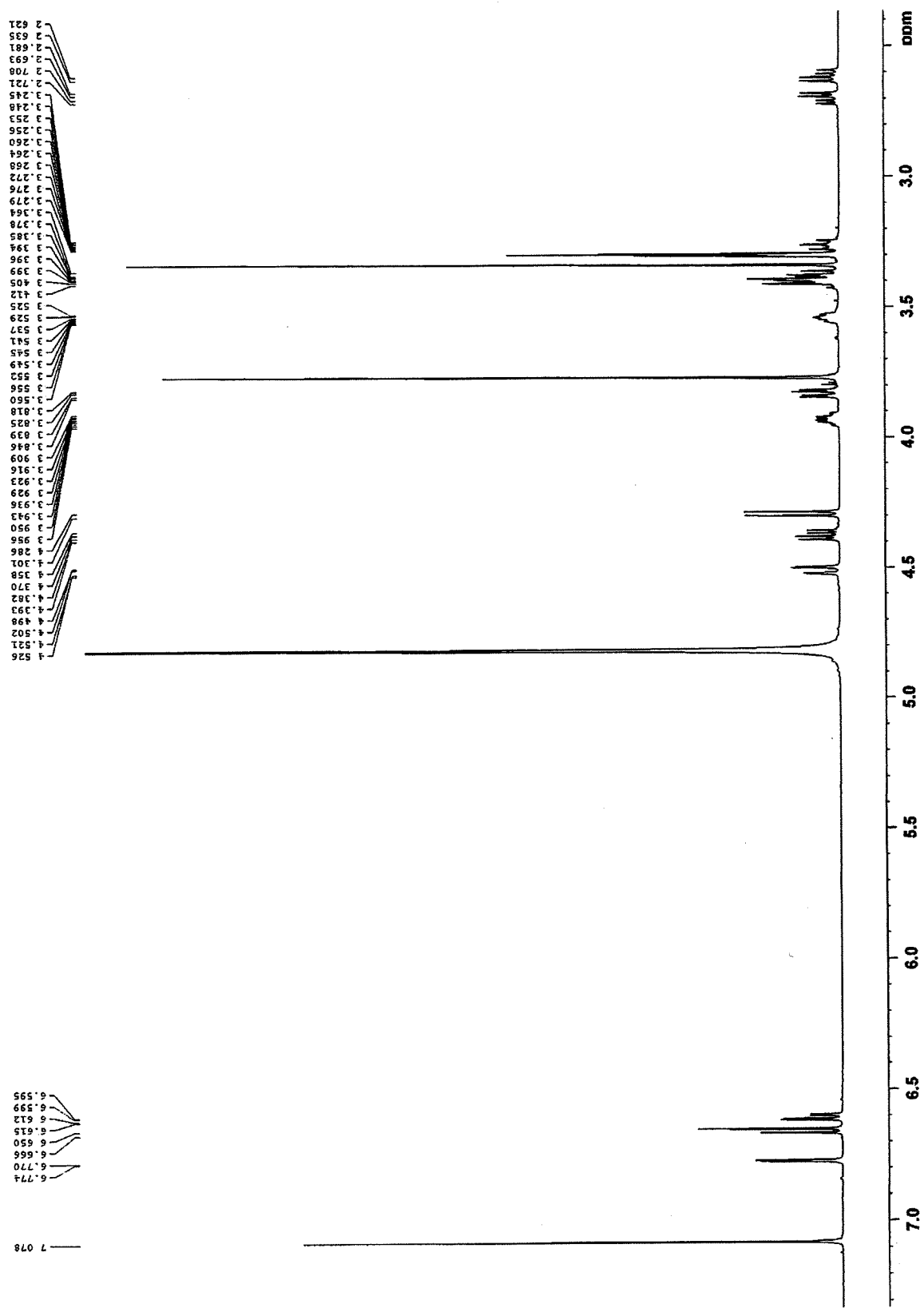


图 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of (2*S*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)-β-D-glucoside (15)



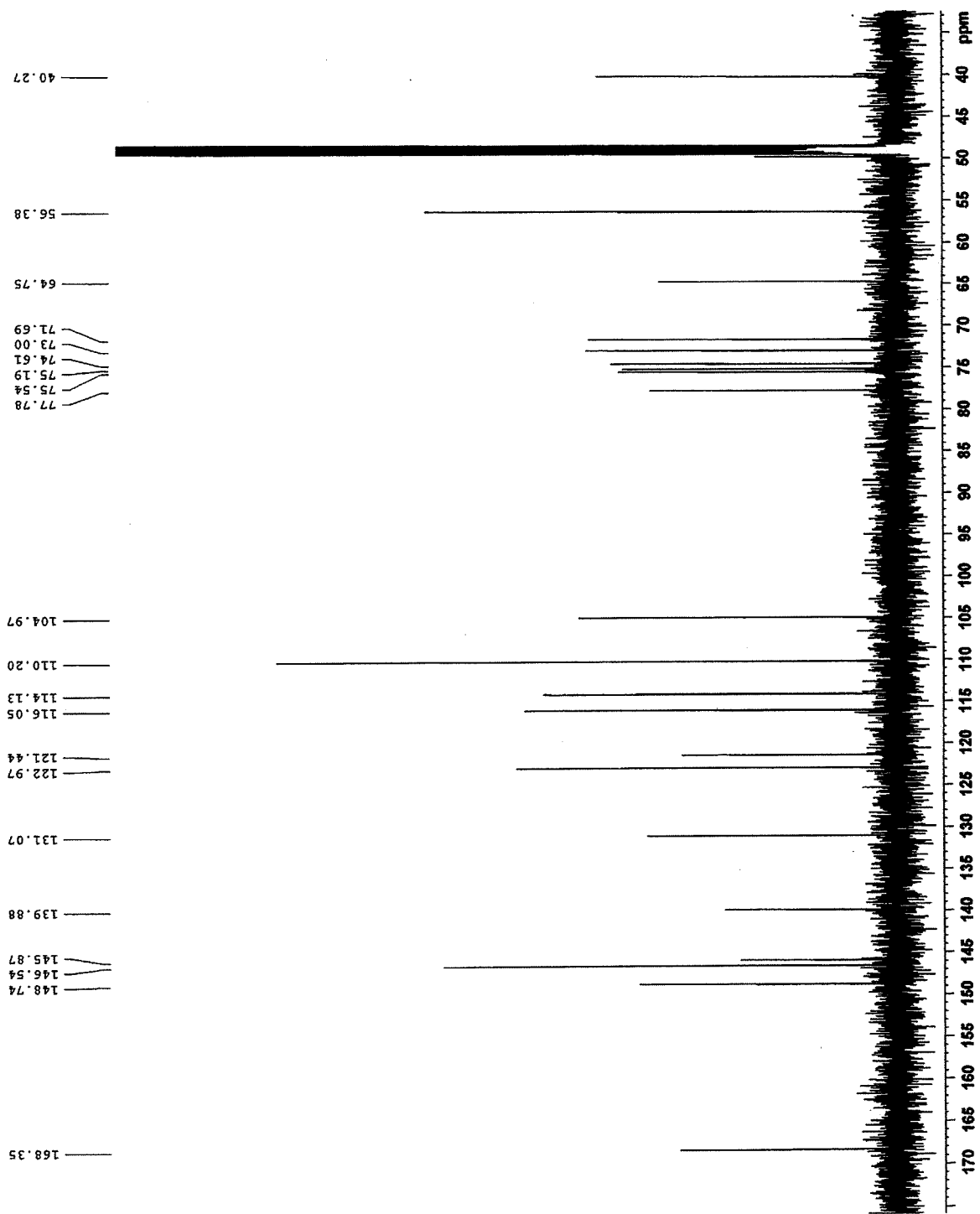


图 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图 of (2*S*)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)丙烷-1,2-二醇 1-*O*-(6'-*O*-没食子酰)- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (15)

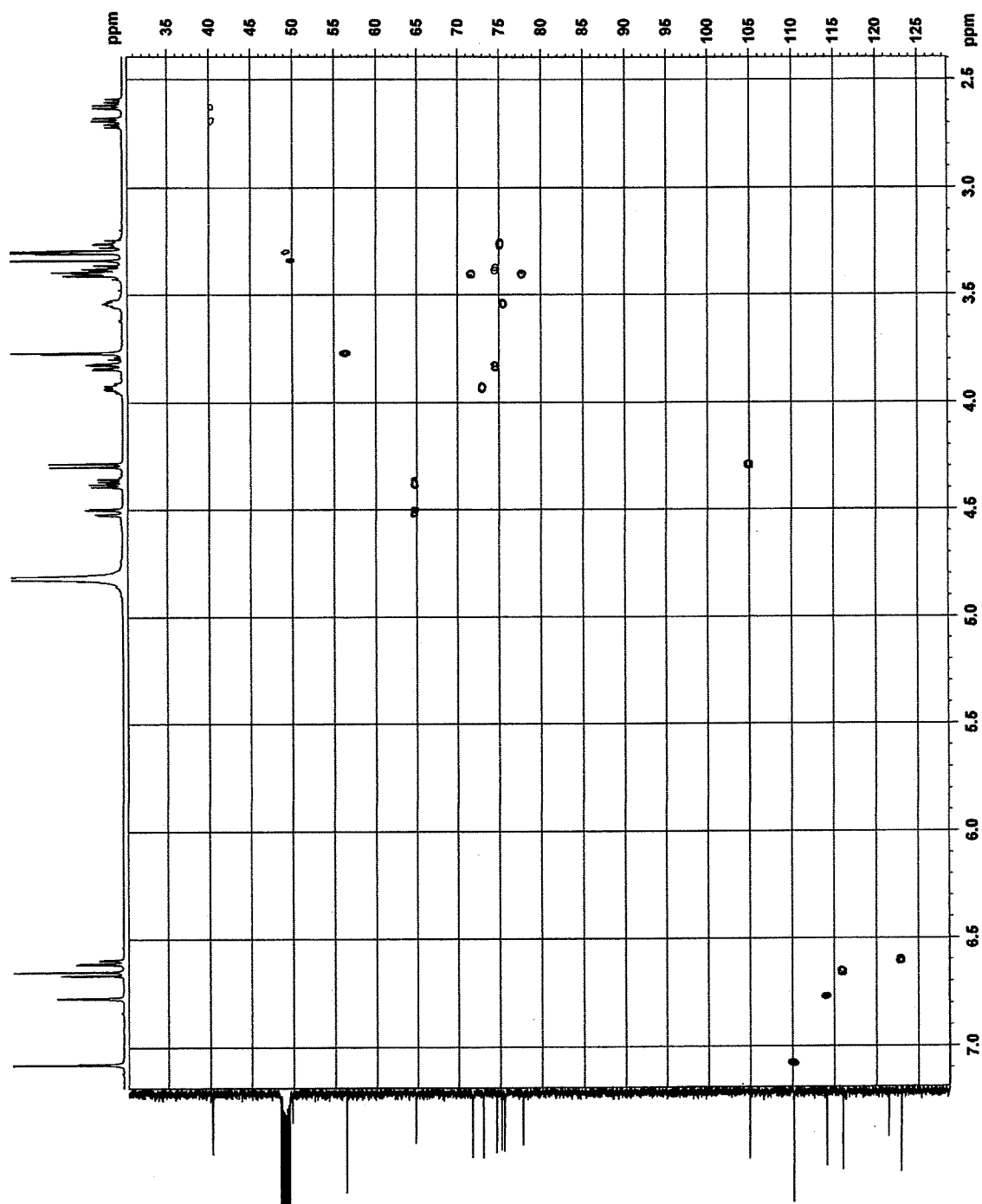


图 7. HSQC correlations of (2*S*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-diol 1-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (15)

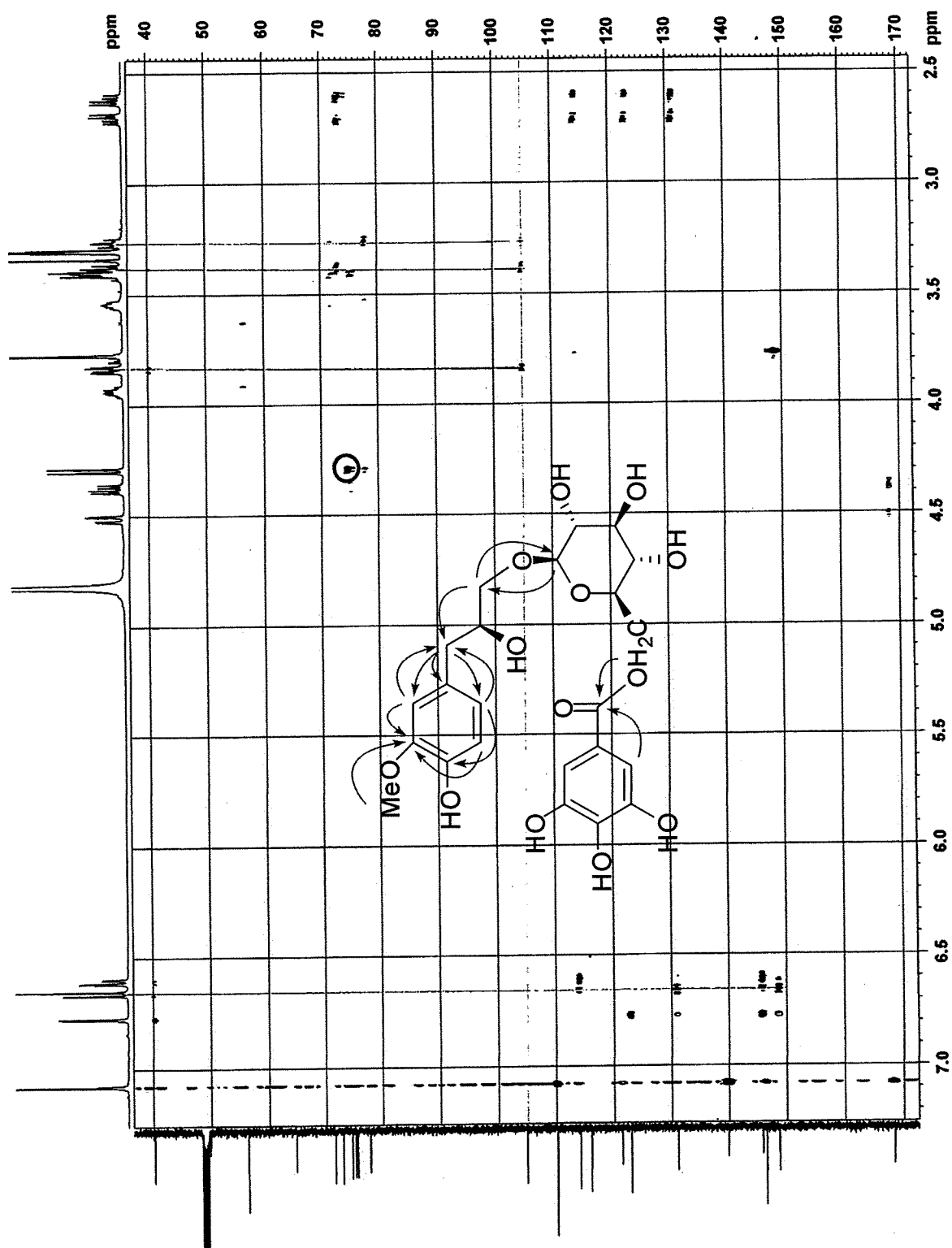


图 8. HMBC correlations of (2S)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-diol 1-O-(6'-O-galloyl)-β-D-glucoside (15)

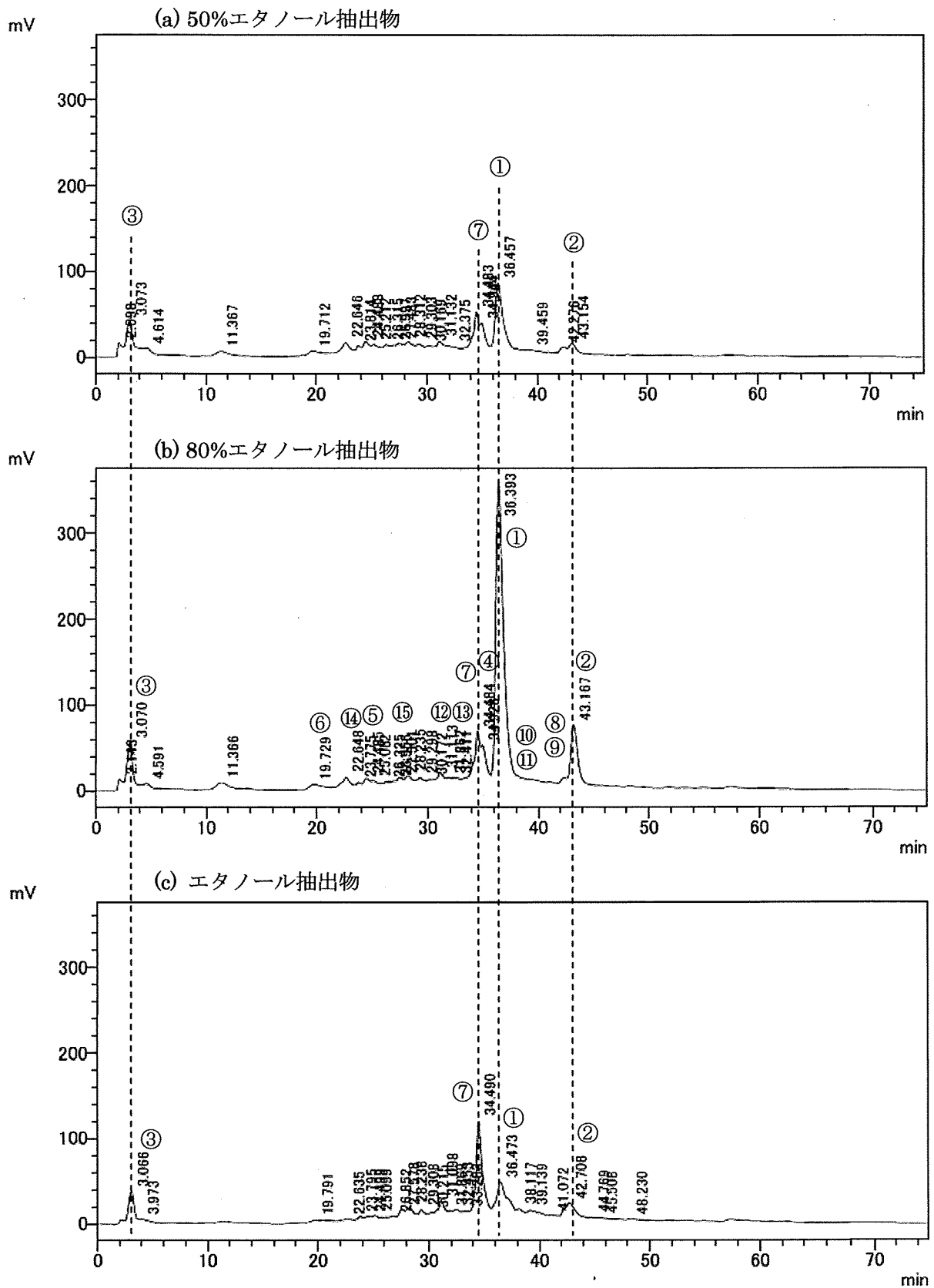


図 9. ピメンタ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 280 nm)  
 (a) 50%エタノール抽出物, (b) 80%エタノール抽出物, (c) エタノール抽出物  
 [クロマトグラム中の数字は化合物番号を示す]



既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析  
天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明  
天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析  
クローブ抽出物に関する検討

分担研究者 好村守生 松山大学薬学部 助教  
天倉吉章 松山大学薬学部 准教授

研究要旨

酸化防止剤のクローブ抽出物は既存添加物名簿において「フトモモ科チョウジ (*Syzygium aromaticum* MERRILL et PERRY) のつぼみ、葉または花より、エタノールまたはアセトンで抽出して得られたもの、または水蒸気蒸留により得られたもの」とされ、その調製に複数の方法が認められている。本研究ではチョウジのつぼみを異なる条件（アセトン、50%エタノール、80%エタノール、エタノール、水蒸気蒸留）で抽出し、それらの抗酸化活性の違いを体系的に理解するため、ORAC法(oxygen radical absorbance capacity)を指標として検討を行った。その結果、チョウジ水蒸気蒸留物及び80%エタノール抽出物に顕著な活性を認めた。これら抽出エキスの詳細な成分精査を行った結果、本抽出エキスの主構成成分はeugenolおよびacetyleneugenolであり、抗酸化活性がその含量に依存していると考えられた。また、80%エタノール抽出物の詳細な成分精査から、文献未記載の1種の化合物 [6'-O-acetylisobiflorin] とともに16種の既知化合物 [eugenol, acetyleneugenol, eugenol 4-O-(6'-O-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside, gallic acid, ellagic acid, 3,3',4-tri-O-methylgallate, biflorin, isobiflorin, isorhamnetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside, quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucuronide 6"-methyl ester, 1,2,3-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, strictinin, casuarictin, tellimagrandin I, tellimagrandin II] を単離し、それぞれの構造を明らかにした。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

天然添加物の含有成分比はエキス調製方法によって大きく異なる。酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているクローブ抽出物は「フトモモ科チョウジ (*Syzygium aromaticum* MERRILL et PERRY) のつぼみ、葉または花より、エタノールまたはアセトンで抽出して得られたもの、または水蒸気蒸留

により得られたもの」とされ、その有効成分としてオイゲノールが挙げられるが、その調製方法及び使用部位には幅があり、これらの全てのエキスが同等の活性を有するとは考えにくい。また、一方でチョウジには強い抗酸化活性を有する加水分解性タンニンの存在が報告されているため、それらを含めた抽出条件の検討を行うことで酸化防止剤としての機能をより高めることが可能であるとともに、抽出エキス中に含まれる抗酸化性成分を明らかにすることで品質の安定化にも

寄与することができると考えられる。本研究ではそのための基礎的なデータ収集を目的として検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料及び試薬

原料となるチョウジのつぼみ及びチョウジの水蒸気蒸留物は長岡香料株式会社より恵与いただいたものを使用した。

分離、精製に使用したカラム充填剤はDiaion HP-20 (三菱化学), Toyopearl HW-40 (東ソー), YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また、分取 TLC には Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 1 mm (Merck 社製) を用いた。

ORAC 測定に使用した AAPH [2,2'-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride] は和光純薬工業株式会社製を、Fluorescein sodium salt 及び trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) は Sigma-Aldrich 社製を用いた。

### 2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム (島津製作所) を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2 (2.0 I.D.×150 mm) (ワイエムシィ), カラム温度: 40°C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 280 nm, 試料注入量: 3 µL, 移動相: (A)0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1: 1) 及び(B)メタノール[濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%), 30→50 min (B: 50→60%), 50→75 min (B: 0%)]

蛍光測定に使用したマイクロプレートリーダーは SpectraMax M2 (Molecular Devices 社製) を用い、励起波長: 485 nm, 測定波長: 520 nm で開始から 2 分毎に 90 分後まで測定を行った。

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・

バイオスピン社製) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として acetone-*d*<sub>6</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> を用いた。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [acetone-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: 2.04 ppm, <sup>13</sup>C: 29.8 ppm), MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm, <sup>13</sup>C: 49.0 ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: 2.50 ppm, <sup>13</sup>C: 39.5 ppm)] を基準とした。

高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し、測定溶媒に MeOH あるいはアセトニトリルを用いた。

### 3. 抗酸化活性

抗酸化活性は ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法により評価した。測定方法は以下のとおり。

マイクロプレートの各ウェルに試料溶液 20 µL または trolox 標準溶液 (6.25~50 µM), 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 µL を加え、37°C で 15 分加温した。予め 37°C に加温した 75 mM リン酸緩衝液で 31.7 mM AAPH を調製し、各ウェルに 75 µL を加えて攪拌、37°C でインキュベートしながら 2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光強度 (励起波長: 485 nm, 測定波長: 520 nm) を測定した。0 分の蛍光強度値 (*f*<sub>0</sub>) を 1 とした各時間の相対強度から area under the curve (AUC) を算出し、それぞれの値から blank の値を差し引いた後 (net AUC<sub>trolox</sub>, net AUC<sub>sample</sub>), trolox 標準溶液から得た 2 次回帰式から trolox 相当量 [µmol TE (trolox equivalent)/g] を算出した。

各試料 2 回以上測定を行い、その平均値を活性値とした。

### 4. 抽出エキスの調製

*Syzygium aromaticum* のつぼみ粉碎物 1 g を 50% エタノール, エタノール, アセトン各 10 mL で 48 時間冷浸抽出を行い、ろ過、濃

縮後、凍結乾燥して分析及び抗酸化活性試験に供した。

## 5. 化合物の単離

*Syzygium aromaticum* のつぼみ粉砕物を 80%エタノールで 48 時間冷浸抽出し、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出を行い、各抽出物を得た。得られた各分画濃縮物のうち酢酸エチル分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW40, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS-AQ] による分離精製を繰り返し化合物の単離を行った。得られた各化合物については順相、逆相 HPLC での標品との直接比較あるいは文献値との NMR データ等の比較によって同定した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 抗酸化能の評価

50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、エタノール抽出物、アセトン抽出物、水蒸気蒸留物についてその抗酸化活性を ORAC 法で評価した結果、水蒸気蒸留物 (29,559  $\mu\text{mol TE/g}$ ) 及び 80%エタノール抽出物 (15,639  $\mu\text{mol TE/g}$ ) に強い活性を認めた (図 1)。そのため、クローブ抽出物中の主要な抗酸化成分探索の目的で、80%エタノール抽出物について *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次溶媒抽出を行い、同様に ORAC の測定を行った。その結果、*n*-ヘキサン分画物 (25,975  $\mu\text{mol TE/g}$ )、酢酸エチル分画物 (9,383  $\mu\text{mol TE/g}$ ) に強い活性を認めた (図 2) ため、これらについての詳細な成分探索を行った。

### 2. 抽出エキスの成分精査

*Syzygium aromaticum* つぼみ粉砕物 570 g を 6 L の 80%エタノールで 48 時間冷浸抽出し、ろ過、約 1 L まで濃縮後、*n*-ヘキサン (6 L)、酢酸エチル (6 L)、*n*-ブタノール (6 L) で順

次抽出を行い、各抽出物を得た。得られた各分画濃縮物 [*n*-ヘキサン分画物 (100.7 g)、酢酸エチル分画物 (44.7 g)、*n*-ブタノール抽出物 (17.5 g)、水分画物 (24.4 g)] のうち *n*-ヘキサン分画物について、分取 TLC を行い eugenol (1) (307.9 mg) 及び acetyleneugenol (2) (33.5 mg) を得た。また、酢酸エチル分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW40, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS-AQ] による分離精製を繰り返し、単離した化合物について NMR データ、マススペクトル等の詳細な解析を行った結果、それぞれ gallic acid (3) (65.2 mg), ellagic acid (4) (5.23 g), 3,3',4-tri-*O*-methyl ellagic acid (5) (2.1 mg), biflorin (6) (18.9 mg), isobiflorin (7) (33.0 mg), eugenol 4-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (8) (13.7 mg), isorhamnetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside (9) (8.4 mg), quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronide 6"-methyl ester (10) (20.1 mg), 1,2,3-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (11) (6.2 mg), 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (12) (24.6 mg), strictinin (13) (5.8 mg), casuarictin (14) (19.7 mg), tellimagrandin I (15) (235.1 mg), tellimagrandin II (16) (123.2 mg), 6'-*O*-acetylisobiflorin (17) (16.2 mg) と同定した。各化合物の構造を図 3 に示す。また、化合物 17 は文献未記載の化合物であったため、その構造決定の詳細について次項に示す。

Acetyleneugenol (2):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 6.94 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.93 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.76 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6), 5.98 (1H, m, H-8), 5.10 (1H, m, H-9), 5.03 (1H, m, H-9), 3.78 (3H, s, -OMe), 3.37 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-7).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 169.0 (ester carbonyl), 152.1 (C-3), 139.8 (C-1), 139.3 (C-4), 138.4 (C-8), 123.4 (C-5), 121.1 (C-6), 116.1 (C-9), 113.7 (C-2), 56.1 (-OMe), 40.5 (C-7), 20.5 (acetyl methyl).

3,3',4-Tri-*O*-methylellagic acid (5):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.61, 7.52 (each 1H, s), 4.06, 4.04, 4.00 (each 3H, s, -OMe).

biflorin (6):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13.40 (1H, s, 5-OH), 6.37 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, d,  $J$  = 0.5 Hz, H-3), 4.56 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, Glc H-1), 4.01 (1H, t,  $J$  = 10.0 Hz, Glc H-2), 3.68 (1H, d,  $J$  = 10.5 Hz, Glc H-6), 3.4 (overlapped, Glc H-6), 3.11-3.20 (3H, m, Glc H-3, 4, 5), 2.35 (3H, s, 2-Me).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 182.0 (C-4), 167.5 (C-2), 163.3 (C-7), 160.7 (C-5), 156.7 (C-8a), 108.8 (C-6), 107.9 (C-3), 103.1 (C-4a), 93.4 (C-8), 81.6 (Glc C-5), 79.0 (Glc C-3), 73.0 (Glc C-1), 70.6 (Glc C-4), 70.2 (Glc C-2), 61.5 (Glc C-6), 19.9 (2-Me).

Isobiflorin (7):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13.01 (1H, s, 5-OH), 6.24 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, d,  $J$  = 0.5 Hz, H-3), 4.63 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, Glc H-1), 3.87 (1H, t,  $J$  = 10.0 Hz, Glc H-2), 3.69 (1H, br d,  $J$  = 10.5 Hz, Glc H-6), 3.42 (1H, m, Glc H-6), 3.20-3.20 (3H, m, Glc H-3, 4, 5), 2.34 (3H, s, 2-Me).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 182.1 (C-4), 167.4 (C-2), 162.7 (C-7), 160.5 (C-5), 156.3 (C-8a), 107.6 (C-3), 104.5 (C-8), 103.6 (C-4a), 98.5 (C-6), 81.4 (Glc C-5), 78.6 (Glc C-3), 73.1 (Glc C-1), 71.0 (Glc C-2), 70.5 (Glc C-4), 61.4 (Glc C-6), 19.8 (2-Me).

Eugenol 4-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -D-glucoside (8):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.07 (2H, s, galloyl-H), 6.97 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-5), 6.75 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, H-2), 6.53 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 8.5 Hz, H-6), 5.89 (1H, m, H-8), 4.99-5.04 (2H, m, H-9, 9), 4.80 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, Glc H-1), 4.54 (1H, dd,  $J$  = 2.5, 12.5 Hz, Glc H-6), 4.42 (1H, dd,  $J$  = 6.5, 12.5 Hz, Glc H-6), 3.80 (3H, s, -OMe), 3.69 (1H, ddd,  $J$  = 2.5, 6.5, 9.5 Hz, Glc H-5), 3.45 (1H, t,  $J$  = 9.5 Hz, Glc H-4), 3.50-3.53 (2H, m, Glc H-2, 3), 3.25 (2H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-7).  $^{13}\text{C-NMR}$

(MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 168.2 (galloyl C-7), 150.6 (C-3), 146.5 (2C, galloyl C-3, 5), 146.0 (galloyl C-4), 139.9 (C-1), 138.9 (C-4), 136.6 (C-8), 122.3 (galloyl C-1), 121.4 (C-6), 118.4 (C-5), 115.9 (C-9), 114.0 (C-2), 110.3 (2C, galloyl C-2, 6), 103.1 (Glc C-1), 77.83 (Glc C-2), 75.7 (Glc C-3), 74.9 (Glc C-5), 71.9 (Glc C-4), 64.8 (Glc C-6), 56.7 (-OMe), 40.7 (C-7).

Isorhamnetin 3-*O*-glucoside (9):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.91 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-2'), 7.57 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 8.5 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6), 5.39 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, Glc H-1), 3.73 (1H, dd,  $J$  = 2.5, 11.5 Hz, Glc H-6), 3.55 (1H, dd,  $J$  = 5.5, 11.5 Hz, Glc H-6), 3.42-3.48 (2H, m, Glc H-2, 3), 3.30 (overlapped, Glc H-4), 3.23 (1H, ddd,  $J$  = 2.5, 5.5, 10.0 Hz, Glc H-5).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 179.4 (C-4), 166.0 (C-7), 163.1 (C-8a), 158.7, 158.5 (each 1C, C-2, 5), 150.1 (C-3'), 148.4 (C-4'), 135.4 (C-3), 123.8 (C-6'), 123.1 (C-1'), 116.0 (C-5'), 114.4 (C-2'), 105.8 (C-4a), 103.7 (Glc C-1), 99.9 (C-6), 94.7 (C-8), 78.5 (Glc C-5), 78.1, 75.9 (Glc C-2, 3), 71.5 (Glc C-4), 62.6 (Glc C-6), 56.8 (-OMe).

Quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronide 6''-methylester (10):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.56 (2H, m, H-2', 6'), 6.83 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-5'), 6.36 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6), 5.21 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, GlcA H-1), 3.76 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, GlcA H-5), 3.56 (1H, dd,  $J$  = 9.0, 10.0 Hz, GlcA H-4), 3.51 (1H, dd,  $J$  = 7.5, 10.0 Hz, GlcA H-2), 3.45 (1H, dd,  $J$  = 9.0, 10.0 Hz, GlcA H-3).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 179.2 (C-4), 170.7 (GlcA C-6), 166.1 (C-7), 163.0 (C-5), 159.4 (C-2), 158.4 (C-8a), 149.9 (C-3'), 145.9 (C-4'), 135.5 (C-3), 123.5, 122.9 (C-1', 6'), 117.3 (C-5'), 115.9 (C-2'), 105.6 (C-4a), 104.8 (GlcA