

## Anti-oxidant and $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Activity of Extracts or Fractions from *Diospyros lotus* L. Leaves and Quantitative Analysis of Their Flavonoid Compounds

Seon-Young Kim<sup>1\*</sup>, Sang Jun Kim<sup>1</sup>, Ji-Ae Kim<sup>1</sup>, Da Hye Kim<sup>1</sup>, Seol Hwa Kwak<sup>1</sup>, Chang Ho Chung<sup>1</sup>, In Hwa Jeon<sup>2,3</sup>, Seon Il Jang<sup>2,3</sup> and Seung-Il Jeong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju, Jeonbuk 560-360, Korea

<sup>2</sup>AtoQ&A Incooperation, Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea

<sup>3</sup>Department of Healthcare & Science, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea

Received April 29, 2014 / Revised August 27, 2014 / Accepted September 11, 2014

Persimmon leaves were commonly consumed as beverages, but were also used as popular folk medicine in Asia. The purpose of this work was to assess the biological activities of *Diospyros Lotus* L. extracts (DLLE). Various solvent extracts, including *n*-Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, and *n*-BuOH fractions, were obtained from the methanol extract of *Diospyros Lotus* L. leaves. The increasing interest in the powerful biological activity of plant phenolics and flavonoids outlined the necessity for determining their content in medicinal herbs. In this study, the total polyphenol and flavonoid contents (TPC and TFC) in the EA fraction were higher than those of other fractions. The biological activities of DLLE were tested using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity assay, as well as superoxide dismutase (SOD) activity as an anti-oxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity as an anti-diabetic effect. The EA fraction with high TPC and TFC values showed the highest anti-oxidant effect and high  $\alpha$ -glucosidase inhibition. The EA fractions were further purified into eight fractions using open column chromatography. Higher anti-oxidant and anti- $\alpha$ -glucosidase activity were observed in polar fractions. The content of the flavonoids, including quercetin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside, myricetin, luteolin, and kaempferol, were analyzed in effective fractions using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results suggest that DLLE have anti-oxidative and anti-diabetic effects and thus, have the potential as anti-diabetic materials and as a source for natural health products.

**Key words** : Antidiabetes, antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase, *Diospyros lotus*, natural health products

### 서론

식생활의 서구화로 인해 비만인구의 증가로 당뇨병자는 전 세계적으로 급격히 증가하는 추세이며 2030년에는 당뇨 환자는 366억명까지 증가할 것으로 추산되고 있다[24]. 당뇨병은 인슐린 작용이나 분비 이상 등으로 발생하는 만성적 대사장애 증후군으로 오랜 기간 꾸준히 관리하여야 하기 때문에 의약품에 의한 단기적인 치료보다는 식이조절, 운동 및 건강기능식품 등을 통한 예방의학적 차원에서 관리가 중요하다. 당뇨병은 1형(인슐린 의존형)과 2형(인슐린 비의존형)으로 나눌 수 있으며, 현재 당뇨 환자의 90% 정도가 제2형에 해당한다[11]. 2형 당뇨병은 주로 약물요법으로 치료하는데, 혈당 강하제를

이용하여 탄수화물을 포도당으로 분해하는 효소인  $\alpha$ -glucosidase의 체내 탄수화물 분해속도를 조절하여 급격한 혈당 상승을 막는 방법이다. Acarbose는 현재 시중에서 가장 많이 사용되는  $\alpha$ -glucosidase 저해제로서 제2형 당뇨 치료제이다[9, 15]. 하지만, 의약품 저해제의 장기 복용 시 복부팽만감, 구토, 설사 등의 부작용이 발생한다고 보고되었다[25]. 이러한 부작용을 극복하기 위해 천연소재를 이용하는 당뇨병 예방 및 치료 보조제의 연구 개발이 꾸준히 요구되고 있다[21].

한국, 일본 및 중국을 비롯한 동아시아 국가에 널리 재배되고 있는 고욤나무(*Diospyros lotus*, L.) 잎은 차의 원료로 오래 전부터 한방 및 민간에서 이용되어 왔으며, 화학적 성분으로는 지방산, 당, 플라보노이드 및 휘발성 성분이 보고되었다[1, 3, 4, 7]. 최근의 고욤나무 열매 추출물에서 진정작용, 항당뇨, 항암, 항균효능, 항산화효능, 용혈작용, 신경보호 능이 세포 및 동물실험을 통해 확인되었다[5, 12, 18, 20, 28]. 고욤 잎 추출물에서는 항알러지 및 항가려움증 및 항산화, 항염증, 간보호 능에 대한 효능이 보고되었다[17, 22, 24]. 하지만 고욤잎 추출(DLLE) 및 분획물에 대한 항산화 및 항당뇨 효능에 대한 보고는 없다. 또한, 산화스트레스(oxidative stress)는 안정적인 상

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-711-1000, Fax : +82-63-711-1051

E-mail : seon02@jbmi.re.kr (Seon-Young Kim)

sijeong@jbmi.re.kr (Seung-Il Jeong)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

태에서 활성산소의 생성이 증가되는 것을 말하며 이는 유리 라디칼 생성이 증가하거나 항산화 방어기전이 저하된 경우에 발생한다. 활성산소에 의한 산화적스트레스는 당뇨 및 당뇨 합병증의 진행에 중요한 역할을 하며, 산화적스트레스에 의해 단백질, 지방 및 DNA의 변성을 유도하며 이는 세포손상 및 변이 또는 발암인자를 유발하기도 한다[11, 16, 29].

본 연구에서는 DLLE와 용매의 극성을 이용한 분획물, column chromatography를 활용한 부분 정제물에 대한 항산화활성 및  $\alpha$ -glucosidase 억제효능을 비교 분석하였다. 또한 활성이 우수한 분획 및 정제물에서 대표적으로 밝혀진 플라보노이드류 중 quercetin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside, myricetin, luteolin, kaempferol 의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

추출에 사용한 고욤잎은 전라북도 진안군 부귀면 수향리 신기마을에서 재배되는 나무로부터 채취하였으며, 고욤나무의 품종의 동정은 마을주민부터 조사하고, 각 면의 농촌지도사로부터 확인하였으며, 최종적으로 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수님으로부터 동정을 받았다. 표본 시료(E-5-15)는 전주대학교 대체건강관리학부 연구실에 보관하였다. 채취된 고욤잎은 신선한 물로 세척한 후 5분간 증기로 찌고 실온에서 건조한 뒤 40°C에서 12시간 동안 건조하였다.

### 시약

본 실험에 사용한  $\alpha$ -glucosidase, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), gallic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), quercetin, quercetin-3-O-rutinoside, myricetin, luteolin, kaempferol 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Open column chromatography 용 충진물질인 silica gel 은 Kieselgel 60 (Merck, Germany)를 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC) 는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 와 RP-18<sub>254s</sub> (Merck)를 사용하였고, 실험에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 추출 및 분획

건조된 고욤잎을 분말로 만든 후 420 g을 10배 가량의 methanol과 혼합하여 상온에서 12시간 동안 추출하였다. 추출 완료 후 Whatmann (filter papers 5, 110 mm)로 여과한 뒤 여액을 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 추출물(76.85 g)을 얻었다. 추출물을 증류수와 methanol 혼합액(9:1)에 현탁시킨 후 같은

양의 *n*-hexane (Hx), chloroform ( $\text{CHCl}_3$ , C), ethyl acetate (EtOAc, EA) 및 *n*-butanol (BuOH, Bu)로 순서로 용매 분획하여 Hx 분획 2.58 g, C 분획 0.24 g, EA 분획 5.80 g, Bu 분획 10.80 g을 각각 얻었다. 항산화 및  $\alpha$ -glucosidase 활성이 우수한 EA 분획 5 g을 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 부분 정제분획(Fr. 1~8)을 얻었다. 부분 정제된 분획물의 활성을 측정된 뒤 효능이 우수한 분획에서 플라보노이드류 화합물을 함량을 분석하였다.

### 총 페놀 및 플라보노이드 함량

총 페놀 화합물 함량은 Folin-Denis 방법[13]을 변형하여 측정하였으며, 각 추출 및 분획물을 1 mg/ml 농도로 조제한 후, 시료액 24  $\mu\text{l}$ 에 증류수 72  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고, Folin-ciocalteu reagent 24  $\mu\text{l}$ 를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  24  $\mu\text{l}$ 와 증류수 56  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 1시간 30분간 암소 방치한 후 725 nm (Perkin Elmer, Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter)에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용한 표준 곡선으로부터 양을 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등[30]의 변형된 방법에 따라 측정하였다. 시료액 75  $\mu\text{l}$ 에 증류수 50  $\mu\text{l}$ 와 5%  $\text{NaNO}_2$  용액 7.5  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 뒤 5분간 방치한 뒤, 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  수용액 15  $\mu\text{l}$ 를 가하여 6분간 반응시켰다. 6분 후 1N-NaOH 수용액 50  $\mu\text{l}$ 를 가하고 10분간 상온에서 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준액과 비교하여 함량을 계산하였다.

### 항산화 효능

항산화 효능은 Arnao [2]의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH에 대한 수소공여능은 시료액 100  $\mu\text{l}$ 와 DPPH 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 분광광도계(Perkin Elmer, Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter)로 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리라디칼 소거효과를 다음과 같이 계산하여 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료액의 흡광도} - \text{공시험액의 흡광도}) / \text{무첨가액의 흡광도}] \times 100$$

ABTS라디칼 소거능은 7.4 mM ABTS 용액에 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 암소에서 약 12시간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이  $1 \pm 0.1$ 가 되도록 조절된 ABTS solution을 사용하였다. ABTS solution 285  $\mu\text{l}$ 를 취하여 각 농도별 시료 15  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 라디칼의 소거능을 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료액의 흡광도} - \text{공시험액의 흡광도}) / \text{무첨가액의 흡광도}] \times 100$$

SOD (superoxide dismutase) 유사 활성은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였으며 결과는 추출물 첨가구와 무첨가구를 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

**α-Glucosidase 저해 활성 측정**

α-Glucosidase 저해 활성을 측정하기 위하여 Tibbot 등의 방법[27]에 따라 반응 혼합액은 50 mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 p-nitrophenol-α-D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 기질을 만들었다. 기질 50 μl 와 효소액 25 μl를 혼합하고 대조구에는 증류수 25 μl, 반응구에는 시료 (0.1 mg/ml) 25 μl을 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N-NaOH 25 μl를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol (PNP)은 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 양은 표준물질 p-nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식으로 저해율을 구하였다. Acarbose (1.0 mg/ml)을 양성 대조구로 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - \text{반응구의 PNP 생성량} / \text{대조구의 PNP 생성량}) \times 100$$

**세포생존율 측정(MTT assay)**

추출물 및 분획물의 세포독성 유무를 판단하기 위해 HEK-293T cells (American Type Culture Collection, USA)를 사용하여 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 하였으며, 세포배양을 위해 10% FBS (fetal calf serum, Thermo Scientific, USA)와 antibiotic-antimycotic을 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Scientific)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 96 well microplate에 1×10<sup>4</sup> cells이 되도록 분주하여 48시간 동안 배양하였다. HEK-293T cell에 추출물을 100 μg/ml의 농도로 처리하고 48시간 후 5 mg/ml의 MTT 용액 10 μl를 첨가하고 4시간 추가 배양 후 침전물을 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 가하여 용해시킨 뒤 ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구의 흡광도를 기준으로 생존율을 산출하였다.

**플라보노이드 화합물의 HPLC 분석**

분석을 위한 검액을 제조하기 위해 DLLE<sub>M</sub>와 각 DLLE<sub>EA</sub>를 취하고, 또한 분리정제 과정을 통한 고유향의 EA fraction (Fr)으로서 Fr 7과 8을 취하여 70% MeOH aqueous solution (v/v)을 이용 재용해하였다. 원심분리 후 상등액을 0.45 μm filter로 여과하고 검액으로 사용하였다. 이 중 15 μl를 HPLC에 주입하여 분석을 진행하였다.

HPLC 분석기기는 Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, column은 Phenomenex Gemini NX C18 (4.6×150 mm, 3 μm), 온도는 30 °C로 하였다. 검출기는 Agilent DAD를 사용하였고, wave-

length는 254 nm로 하였다. 유속은 0.6 ml/min, 15 μl를 injection volumn으로 설정하였다. 이동상은 0.5% formic acid 수용액(A)과 acetonitrile (B)로 5% B-3 min, 10% B-8 min, 10% B-12 min, 15% B 15 min, 15% B-20 min, 40% B-27 min, 40%-B 32 min, 65% B-39 min, 65% B-43 min, 30% B-48 min, 10%-B 50 min까지 gradient 조건으로 분석하였다. External standard는 quercetin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside, myricetin, luteolin, kaempferol을 사용하였으며 각각의 표준물질의 정성 및 정량은 retention time과 고유의 표준품과 비교하여 검량선으로부터 DLLE<sub>M</sub>와 DLLE<sub>EA</sub> 분획물 및 silica column chromatography를 이용한 fraction의 함량 결과를 얻었다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 ANOVA (one-way analysis of variance) 및 Student's t-test를 사용하였으며 p<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**고유향 추출 및 분획**

건조한 고유향 420 g을 분쇄하여 methanol (5 l)에 12시간 이상 침적시킨 후 여과, 감압하여 건고물을 수득율 18.30%로 얻었다. 추출물을 증류수와 methanol 혼합액(9:1)에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 단계적으로 분획한 결과 n-hexane (Hx), CHCl<sub>3</sub>, EtOAc (EA) 및 n-BuOH (Bu) 분획물을 각각 0.61, 0.06, 1.38, 2.57%의 수율로 얻었다(Table 1).

**고유향 추출 및 분획물의 총 폴리페놀(total polyphenols, TPC), 플라보노이드(total flavonoids, TFC) 함량**

페놀성 화합물은 활성산소를 제거하여 산화 방지 및 항암, 항염증 및 항알레르기 등 다양한 생리활성 효과가 있음이 알려져 있다. 또한 플라보노이드는 다양한 분야에서 생리학적 약리학적 효능이 보고되었다. 현재까지 보고된 대표적인 효능

Table 1. Total polyphenol and flavonoid content (TPC and TFC) in the extract and fractions of *Diospyros lotus* L. leaves (DLL)

Sample*	Extraction yield (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
DLLE <sub>M</sub>	18.30	98.54±5.08*	298.59±4.52
DLLE <sub>Hx</sub>	0.61	26.50±0.40	267.93±3.99
DLLE <sub>C</sub>	0.06	37.01±1.07	214.04±0.23
DLLE <sub>EA</sub>	1.38	324.30±7.16	298.50±5.46
DLLE <sub>Bu</sub>	2.57	168.58±2.11	324.34±2.89

\*M, methanol; Hx, n-hexane; C, chloroform; EA, ethyl acetate; Bu, n-butanol; GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent. \*Values represent means ± SD (n=3).

으로 항알러지, 항염증, 항산화, 항균, 항바이러스 등의 효능을 비롯하여 암세포의 증식억제, 당뇨 및 심혈관질환, 고지혈증 등의 만성질환의 효능이 보고되었다. 플라보노이드가 다량 함유된 천연소재의 항산화 효능을 포함한 질병 예방 및 치료효능이 있는 것으로 알려졌다[6, 10, 14, 19]. 따라서 고음압 추출물 및 분획물의 TPC 및 TFC 함량을 비교 분석하였다. 결과는 Table 1에 나타내었다. 추출물과 분획물에서 TPC와 TFC 함량을 비교한 결과 TFC의 경우 DLLE의 CHCl<sub>3</sub> 분획을 제외하고 전체적으로 유사한 결과를 나타낸 반면 TPC는 DLLE의 EA 분획물에서 324.30±7.16 mg GAE/g 으로서 가장 많은 함량으로 확인되었다.

**고음압 추출 및 분획물의 라디칼 소거능**

항산화 활성을 평가하는 방법으로 DPPH, ABTS, SOD activity를 이용하였다. DPPH는 진한 자주색을 띠며 화학적으로 안정화된 수용성 자유기로서 항산화제, 방향족 아민 물질을 검색하는데 이용되고 있다. DLLE 추출 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 1A에서 나타내었다. 혈장에서 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS 라디칼 소거활성법은 양성대조구인 trolox와 비교하여 나타낼 수 있으며 *in vivo* 및 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 사용되고 있다. ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하면 생성되는 ABTS radical (ABTS<sup>+</sup>)은 시료의 항산화력에 의해 소거되어 특유의 청록색이 탈색되는 것을 측정하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정할 수 있다. 각 추출물과 분획물의 결과는 Fig. 1B에서 나타내었다.

SOD는 인체 내에서 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 정상 상태의 O<sub>2</sub>로 전환시키는 역할을 한다. SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 물질로 superoxide의 반응성을 억제한다. 각 분획물의 SOD 유사활성을 비교한 결

과는 Fig. 1C에 나타내었다.

DLLE의 라디칼 소거활성을 vitamin C 및 trolox와 비교한 결과 *n*-Hx, CHCl<sub>3</sub> 추출물을 제외한 MeOH, EA, *n*-BuOH 추출물에서 우수한 활성을 나타내었고, EA 추출물이 두 가지 방법 모두에서 가장 우수한 효능을 보였다. 또한, SOD 유사활성 비교결과 또한 EA 분획물이 가장 우수한 활성을 보이는 것으로 나타났다. TPC, TFC 함량 분석결과와도 유사한 경향을 보이는 것으로 확인할 수 있다.

**고음압 EA 분획물의 open column chromatography fraction (Fr)의 TPC, TFC 및 라디칼 소거능**

고음압 분획물 중 가장 우수한 라디칼 소거능을 나타낸 EA 분획물의 추가 분리 정제를 위해 silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> : MeOH =100:0 → 0:100, gradient)을 활용하여 8개의 fraction (EA-Fr 1-8)을 얻었으며, 각 fraction TPC와 TFC를 분석한 결과 TPC는 EA-Fr 5~8에서 높은 함량으로 분석되었고, TFC는 EA-Fr 1~3, EA-Fr 6에서 높게 확인되었다(Table 2).

각 fraction의 라디칼 소거능활성과 SOD 유사활성은 EA-Fr 6~8이 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 2). 전체적으로 TPC 및 TFC 함량이 높고 라디칼 소거능이 우수한 분획물은 EA-Fr 7로 가장 우수한 항산화능을 가지는 것으로 판단 할 수 있었다. 특히, 고음압에 함유되어 있는 페놀성 화합물의 성분이 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성에 주요한 영향을 미치는 것으로 확인할 수 있다. 이는 고음압 EA-Fr과 항산화 활성과의 상관관계를 회귀분석을 통하여 분석한 결과 TPC와 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 SOD 유사활성간의 상관계수(R<sup>2</sup>) 값이 >0.8 로서 페놀성 화합물과 라디칼 소거능의 유의성을 추측할 수 있었다(Fig. 3).

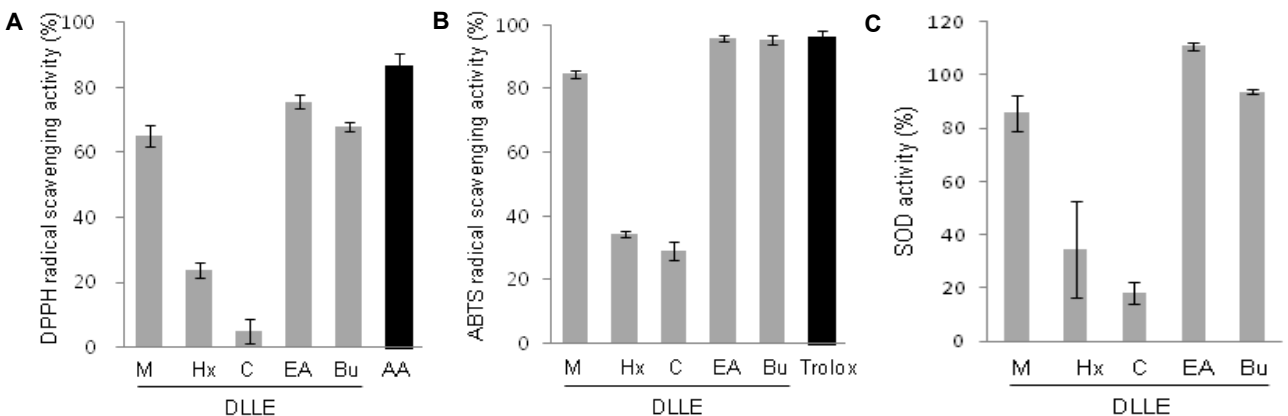


Fig. 1. Radical scavenging activity of *Diospyros lotus* L. leaves (DLL) methanol extracts and solvent fractions. (A) DPPH radical scavenging activity and (B) ABTS radical scavenging activity. M, methanol; Hx, *n*-Hexane; C, chloroform; EA, ethyl acetate; Bu, *n*-butanol; AA, ascorbic acid. Data represent the mean ± SD of at least three independent experiments.

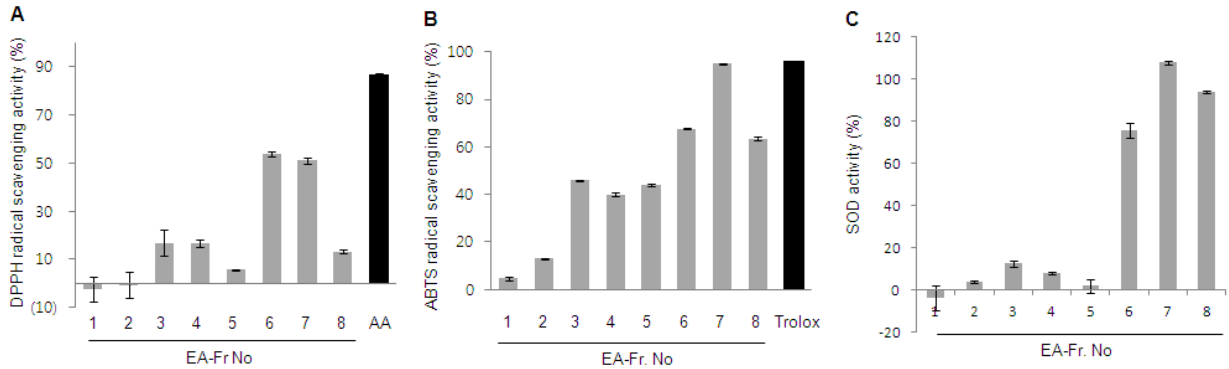


Fig. 2. Antioxidant effect of DLLE<sub>EA</sub> silica column fractions. (A) DPPH radical scavenging activity (B) ABTS radical scavenging activity (C) SOD activity of DLLE<sub>EA</sub>-Fr. Data represent the mean ± SD of at least three independent experiments.

Table 2. TPC and TFC in the EA column fractions of *Diospyros lotus* L. leaves (DLL)

EA <sub>Fr</sub> No	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
1	7.20±1.18*	181.76±9.13
2	16.79±0.26	161.04±7.97
3	57.95±1.40	190.36±9.34
4	49.00±0.34	110.57±4.28
5	103.02±1.78	86.49±2.58
6	204.87±1.84	198.16±4.45
7	255.65±1.39	72.63±1.30
8	125.42±1.27	73.29±1.56

GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent. \*Values represent means ± SD (n=3).

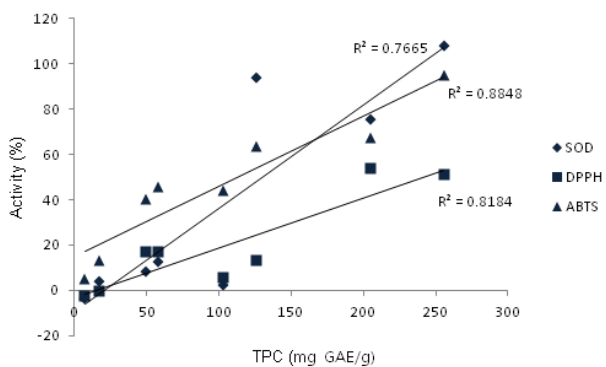


Fig. 3. Relationship between DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and SOD activity of DLLE<sub>EA</sub>-Fr, and their content in total phenolic compounds. Solid lines represent linear regression curves. The regression coefficient ( $R^2$ ) and the equation of curves are given.

**고음압 추출물과 분획물의 α-glucosidase 저해 활성**

α-Glucosidase는 체내 소화의 마지막 과정에서 탄수화물을 포도당으로 전환시켜 혈중 glucose를 증가시킴으로 당뇨를 유발한다. 이러한 효소의 억제제는 탄수화물 소화 흡수를 지연

시켜 식후 혈당증가를 억제한다. 당생성의 metabolism에 활성 산소의 증가는 생체내 oxidative stress를 유발한다. 고음압 추출물과 분획물 및 부분 정제물의 α-glucosidase 저해 활성을 측정 한 결과는 Fig. 4A에 나타내었다. 각 용매별 분획물 중 CHCl<sub>3</sub> fraction을 제외한 대부분의 분획에서 저해활성이 높은 것으로 확인되었다. 양성 대조군인 acarbose의 저해 활성이 83.03%인 것에 비해 MeOH 추출물은 92.07%, EA 분획물은 90.60%, n-BuOH 분획물은 96.61% 로서 양성 대조군에 비해 매우 높은 저해 활성을 보였다. Silica column chromatog-

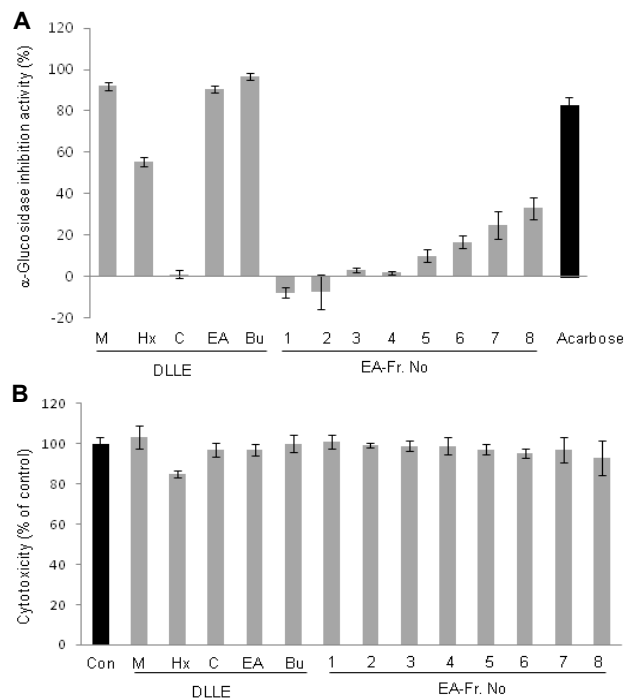


Fig. 4. α-Glucosidase activity inhibition and cytotoxicity of extracts or fractions from DLL. (A) α-Glucosidase inhibition effect. (B) Cytotoxicity of extracts or fractions from DLL in HEK-293T cells. Data represent the mean ± SD of at least three independent experiments.

raphy를 통해 부분 정제한 Fr에서는 추출물이나 분획물에 비해 저해 활성이 낮게 보여졌지만 극성이 증가함에 따라 저해 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. 각 추출물과 분획물, 부분 정제물의 세포독성 유무를 HEK-293T cells에서 확인하였다. 결과, 분획물중 n-Hx 분획물에서 약간의 세포독성이 있는 것으로 나타났으나, MeOH 추출물과 다른 용매 분획 및 부분 정제물에서는 독성이 없음을 확인할 수 있었다. 고용인 MeOH 추출물과 EA 분획물 및 부분 정제물 중 EA-Fr 7과 8의 플라보

노이드 함량을 HPLC로 분석하고자 하였다.

**플라보노이드류 화합물의 HPLC 분석법 validation**

시료의 분석은 (재)전주생물소재연구소에서 확립된 방법으로 HPLC를 이용하였으며 각 시료의 standard solution 및 sample extracts에서 검출된 표준성분의 chromatogram 결과는 Fig. 5A에서 나타낸 바와 같다. 각 표준성분의 분석법 확립을 위하여 intra-day 및 inter-day의 accuracy (%) 및 precision

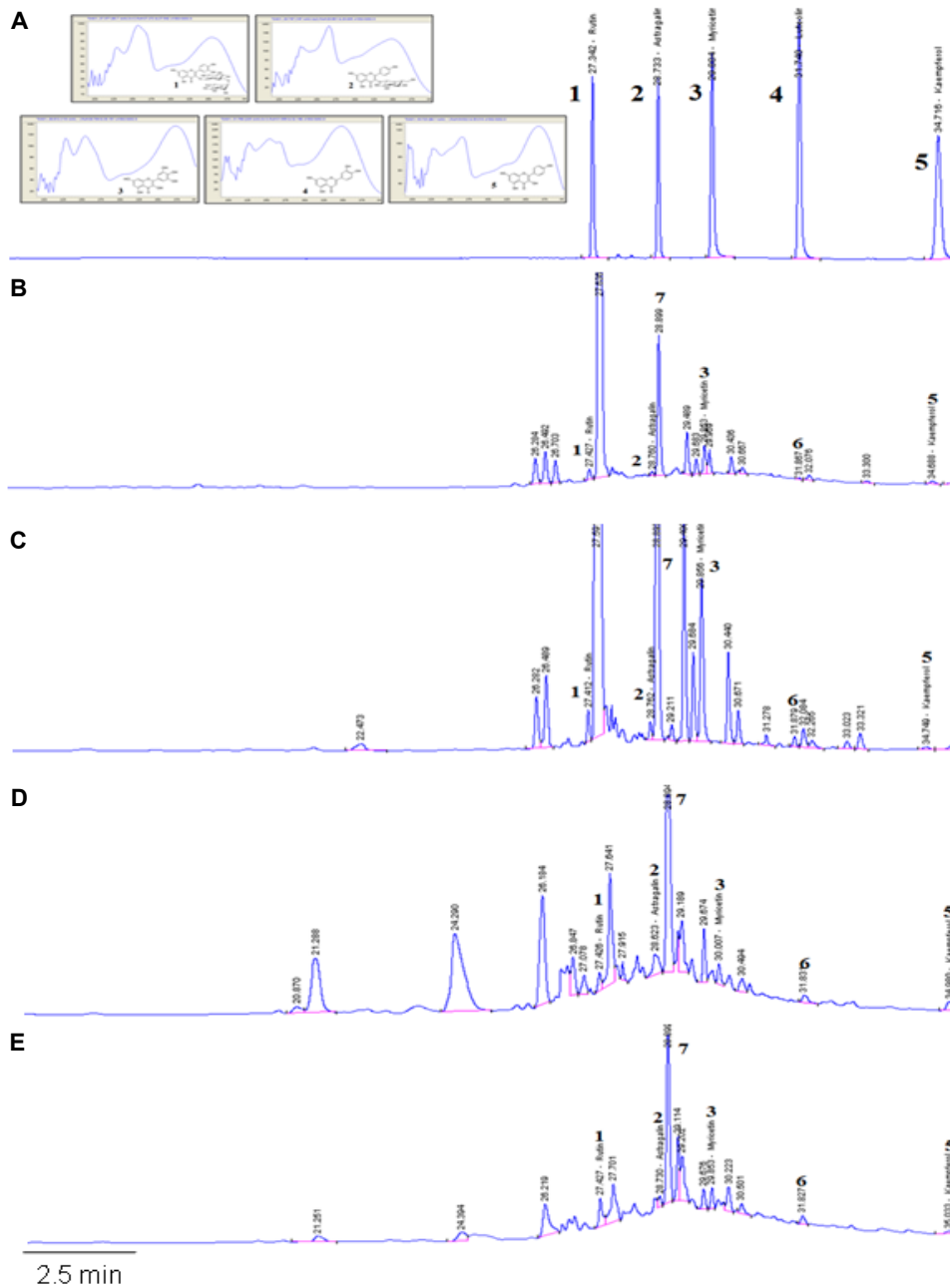


Fig. 5. Representative HPLC chromatogram of (A) standard flavonoid compounds. (B) methanol extract of DLL. (C) EA fraction of DLLE. (D) DLLE<sub>EA</sub>-Fr 7 and (E) DLLE<sub>EA</sub>-Fr 8. 1: Quercetin-3-O-rutinoside; 2: Kaempferol-3-O-glucoside; 3: Myricetin; 4: Luteolin; 5: Kaempferol; 6: Quercetin; 7: Unknown.

(%)을 수행하였으며, standard solution 중 성분별 검량선 확인 결과 linearity ( $R^2 \geq 0.99$ )는 유의하였다(Table 3). 확립된 분석

법에 대한 intra-day 및 inter-day에 대한 RE (%)는 table 3과 4에서 보듯이, 10% 이하로 ICH guide line에 만족하고, QC에

Table 3. Accuracy (%) of calibration curve in inter-day by HPLC

Compound	Administrated Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Acquired results ( $\mu\text{g/ml}$ )	Accuracy (%)	RE (%)
Quercetin-3-O-rutinoside (1)	0.5	0.53	105.97	5.97
	1	1.00	100.26	0.26
	2	1.95	97.56	-2.44
	5	4.64	92.73	-7.27
	10	10.11	101.07	1.07
	20	20.04	100.18	0.18
Kaempferol-3-O-glucoside(2)	0.5	0.51	101.71	1.71
	1	1.01	100.50	0.50
	2	1.98	99.11	-0.89
	5	4.64	92.88	-7.12
	10	10.08	100.79	0.79
	20	20.04	100.22	0.22
Myricitin (3)	0.5	0.58	116.20	16.20
	1	1.00	100.48	0.48
	2	1.90	95.11	-4.89
	5	4.54	90.72	-9.28
	10	9.99	99.89	-0.11
	20	20.13	100.63	0.63
Luteolin (4)	0.5	0.55	110.70	10.70
	1	1.00	100.46	0.46
	2	1.92	95.95	-4.05
	5	4.58	91.65	-8.35
	10	10.05	100.49	0.49
	20	20.08	100.40	0.40
Kaempferol (5)	0.5	0.55	110.81	10.81
	1	1.01	100.51	0.51
	2	1.93	96.45	-3.55
	5	4.56	91.30	-8.70
	10	10.07	100.74	0.74
	20	20.07	100.36	0.36

Table 4. Precision (%) of QCs (LLOQ, LQC, MQC and HQC) in intra-day by HPLC

Compound	Sample ID	Administrated Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Acquired results ( $\mu\text{g/ml}$ )	RE (%)	CV (%)
Quercetin-3-O-rutinoside (1)	LLOQ	0.5	0.52	4.45	2.88
	LQC	1	0.92	-7.81	12.01
	MQC	5	5.03	0.55	0.39
	HQC	10	10.03	0.31	0.44
Kaempferol3-O-glucoside (2)	LLOQ	0.5	0.51	2.89	4.03
	LQC	1	0.90	-9.92	13.03
	MQC	5	5.03	0.56	0.31
	HQC	10	10.01	0.08	0.37
Myricitin (3)	LLOQ	0.5	0.59	18.03	7.26
	LQC	1	0.97	-2.64	8.48
	MQC	5	4.86	-2.87	1.59
	HQC	10	9.87	-1.33	0.66
Luteolin (4)	LLOQ	0.5	0.59	17.79	2.94
	LQC	1	0.93	-6.63	11.88
	MQC	5	4.94	-1.11	0.22
	HQC	10	9.98	-0.24	0.43
Kaempferol (5)	LLOQ	0.5	0.59	18.95	1.58
	LQC	1	0.93	-6.59	10.26
	MQC	5	4.97	-0.66	0.77
	HQC	10	10.07	0.69	0.67



Table 5. Precision (%) of QCs (LLOQ, LQC, MQC and HQC) in inter-day by HPLC

Compounds	Sample ID	Administrated Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Acquired results ( $\mu\text{g/ml}$ )	RE (%)	CV (%)
Quercetin-3-O-rutinoside (1)	LLOQ	0.5	0.53	5.42	1.00
	LQC	1	0.97	-2.76	5.99
	MQC	5	5.12	2.39	0.23
	HQC	10	10.09	0.90	1.00
Kaempferol 3-O-glucoside (2)	LLOQ	0.5	0.52	3.17	2.17
	LQC	1	0.96	-4.47	5.80
	MQC	5	5.10	2.08	0.11
	HQC	10	10.05	0.49	0.84
Myricetin (3)	LLOQ	0.5	0.60	19.04	2.03
	LQC	1	1.02	2.23	4.51
	MQC	5	4.95	-1.04	1.35
	HQC	10	9.96	-0.45	0.43
Luteolin (4)	LLOQ	0.5	0.59	18.74	2.49
	LQC	1	0.99	-0.52	5.55
	MQC	5	5.07	1.33	0.24
	HQC	10	10.06	0.61	0.69
Kaempferol (5)	LLOQ	0.5	0.59	18.43	1.61
	LQC	1	0.99	-1.40	5.09
	MQC	5	5.06	1.22	0.39
	HQC	10	10.16	1.57	0.68

Table 6. Regression equations and correlation coefficient ( $r^2$ ) values of each component

Compounds*	$y=ax + b$		Correlation Coefficient( $r^2$ )	Detection (nm)	Range ( $\mu\text{g/ml}$ )	$t_R$ (min)
	Slope ( $a$ )	CV (%)				
1	48.560	0.66	0.99942	254	0.5 ~ 20	27.4
2	48.671	0.66	0.99949			28.8
3	71.211	2.43	0.99911			29.9
4	90.447	0.73	0.99932			31.7
5	77.397	0.91	0.99931			34.7

\*1, Quercetin-3-O-rutinoside; 2: kaempferol-3-O-glucoside; 3, myricetin; 4: luteolin; 5, kaempferol.

대한 precision (%) 항목중 LLOQ ( $\leq 20\%$ )의 RE (%) 및 CV (%)는 결과치에서 20% 이하였으며, LQC, MQC 및 HQC에 대한 RE (%) 및 CV (%)는 10% 이하로 15% 이하이어야 한다는 기준에 만족하였다(Table 5~7).

#### 고음압 추출물 및 활성 분획물에서 플라보노이드류 화합물의 정량

확립된 분석법에 의한 각 성분 확인 결과, quercetin-3-O-rutinoside (1)은 rutin으로서 peak retention time (RT)은 약 27.4 min이었고, kaempferol 3-O-glucoside (2)는 astragalinoside로서 RT는 약 28.8 min, myricetin (3)은 약 29.9 min, luteolin (4)은 약 31.7 min이었고, kaempferol (5)은 약 34.7 min이었다(Fig 5A). 각 성분의 UV detection은 254~370 nm에서 peak resolution 및 selectivity를 고려하여 선정하였고, quantitation은 254 nm에서 수행하였다. 표준성분의 selectivity는 각 성분의 HPLC-DAD spectrum으로 각각 확인하였다. 고음압 추출물

및 EA 분획물의 HPLC chromatogram은 Fig 5B와 C에서 제시하였다. Open column chromatography를 이용하여 분리한 EA<sub>Fr</sub> 7과 8을 포함한 정량 결과는 Table 8에서 나타내었다. 해당 성분에 대한 분석 결과 luteolin (4)은 검출되지 않았다. 고음압의 MeOH 추출물과 EA 분획물에서는 myricetin의 함량이 각각 2.21  $\mu\text{g/mg}$ , 27.15  $\mu\text{g/mg}$  으로서 분석 대상 화합물 중 가장 많은 양 존재하는 것으로 확인된 반면 EA-Fr 7과 8에서는 kaempferol-3-O-glucoside와 quercetin-3-O-rutinoside의 함량이 각각 7.67  $\mu\text{g/mg}$ , 6.26  $\mu\text{g/mg}$ 으로 다른 분석 대상 화합물에 비해 2배 이상 많은 것으로 분석되었다. 이는 EA 분획물의 극성 용매에 의해 분리된 fraction에 sugar가 결합된 플라보노이드의 함량이 증가함에 따른 결과일 것으로 해석할 수 있다.

각 분획물과 분리 정제물의 주요한 성분으로 분석된 myricetin, kaempferol-3-O-glucoside 및 quercetin-3-O-rutinoside 은 플라보노이드류 화합물로서 플라보노이드류의 항당뇨 효



Table 7. Accuracy (%) of calibration curve in intra-day by HPLC

Compound	Administrated Conc. (µg/ml)	Acquired results (µg/ml)	Accuracy (%)	RE (%)
Quercetin-3-O-rutinoside (1)	0.5	0.53	106.66	6.66
	1	0.97	97.39	-2.61
	2	1.99	99.27	-0.73
	5	5.03	100.69	0.69
	10	9.99	99.89	-0.11
	20	20.00	99.99	-0.01
Kaempferol 3-O-glucoside (2)	0.5	0.50	100.30	0.30
	1	0.99	98.99	-1.01
	2	2.03	101.28	1.28
	5	5.01	100.24	0.24
	10	10.02	100.16	0.16
	20	19.99	99.93	-0.07
Myricetin (3)	0.5	0.52	103.47	3.47
	1	0.91	91.13	-8.87
	2	1.97	98.32	-1.68
	5	4.91	98.17	-1.83
	10	9.92	99.23	-0.77
	20	20.07	100.34	0.34
Luteolin (4)	0.5	0.54	108.81	8.81
	1	0.96	96.28	-3.72
	2	1.96	98.00	-2.00
	5	4.96	99.29	-0.71
	10	9.98	99.82	-0.18
	20	20.02	100.11	0.11
Kaempferol (5)	0.5	0.54	108.35	8.35
	1	0.98	97.75	-2.25
	2	1.97	98.35	-1.65
	5	4.94	98.84	-1.16
	10	9.94	99.44	-0.56
	20	20.05	100.23	0.23

Table 8. Contents (µg/mg) of standard components in MeOH extracts or EA fractions of DLL

Sample	Acquired results (µg/mg)				
	1	2	3	4	5
DLLE <sub>M</sub>	1.28	0.47	2.21	N.D.	0.53
DLLE <sub>EA</sub>	5.78	3.56	27.15	N.D.	0.90
DLLE <sub>EA</sub> -Fr 7	3.22	7.67	2.51	N.D.	2.21
DLLE <sub>EA</sub> -Fr 8	6.26	2.05	2.29	N.D.	0.67

1, Quercetin-3-O-rutinoside; 2, kaempferol-3-O-glucoside; 3, myricetin; 4, luteolin; 5, kaempferol.

능은 잘 알려져 있다. Matsuoka [26] 그룹은 고욤잎의 주성분으로 분석된 플라보노이드류의 항당뇨 효능, 특히 α-glucosidase 억제능은 myricetin (IC<sub>50</sub> = 5 µM)이 가장 우수한 것으로 보고하였고, kaempferol-3-O-glucoside 및 quercetin-3-O-rutinoside의 aglycone인 quercetin (IC<sub>50</sub> = 7 µM), kaempferol

(IC<sub>50</sub> = 12 µM)순으로 억제활성을 보이는 것으로 보고하였다. 각 플라보노이드 구조 중 B ring (side aromatic ring)의 3번 위치에 hydroxyl group이 치환된 유도체(myricetin, quercetin)가 보다 우수한 α-glucosidase 활성 억제를 나타내는 것으로 확인되었다[26]. 이러한 결과들을 종합하면 플라보노이드류 중 플라보놀 성분이 다량 포함된 추출물 및 분획물에서 항당뇨 효능이 우수할 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서 함량 분석에 사용된 플라보노이드류 화합물 이외에 고욤나무 추출물이나 EA 분획물의 주성분으로 확인된 7번 peak은 HPLC 상에서 주요 성분으로서 추가 연구를 통해 분리정제 및 구조동정을 하고자 한다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 2013년도 지역특화산업육성사업 기술개발(R&D) 사업(R0002271)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### References

- Ahmet, F. A. and Kadioglu, A. 1998. Nonvolatile acid compositional during fruit development of *Diospyros lotus* L. *Turk J Botany* **22**, 69-72.
- Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* **73**, 239-244.
- Ayaz, F. A. and Kadioglu, A. 1999. Fatty acid compositional change in development Persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit. *N Z J Crop Horti Sci* **27**, 257-261.
- Ayaz, F. A., Kadioglu, A. and Hayirlioglu, S. 1995. Determination of some mono- and disaccharides in the fruits of *Diospyros lotus* L. using gas chromatography. *Turk J Botany* **19**, 493-495.
- Azadbakht, M., Hossesinimehr, S. J., Shokrzadeh, M., Habibi, E. and Ahmadi, A. 2011. *Diospyros lotus* L. fruit extract protects G6PD-deficient erythrocytes from hemolytic injury *in vitro* and *in vivo* prevention of favism disorder. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **15**, 1270-1281.
- Babu, P. V. A., Liu, D. and Gilbert, E. R. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* **24**, 1777-1789
- Bhakuni, D. S., Satish, S., Shukla, Y. N. and Tandon, J. S. 1971. Chemical constituents of *Diospyros buxifolia*, *D. tomentosa*, *D. ferra*, *D. lotus*, *Rhus parviflora*, *Polygonum recumbens*, 8. *Balantites aegyptiaca* and *Pyrus pashia*. *Phytochemistry* **10**, 2829-2831.
- Campbell, L. K., White, J. R. and Campbell, R. K. 1996. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* **30**, 1255-1262.
- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R. G., Pizzolatti, M. G. and Silva, F. R. 2008. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini*

- Rev Med Chem* **8**, 1429-1440.
11. Chandie Shaw, P. K., Baboe, F. and van Es, L. A., van der Vijver, J. C., van de Ree, M. A., de Jonge, N. and Rabelink, T. J. 2006. South-Asian type 2 diabetic patients have higher incidence and faster progression of renal disease compared with Dutch-European diabetic patients. *Diabetes Care* **29**, 1383-1385.
  12. Ertuğrul, G., Coşkun, M., Sevinç, M., Yelimliş, B., Ertuğrul, F. and Toydemir, T. 2012. A rare cause of gastrointestinal phytobezoars: *Diospyros lotus*. *World J Emerg Surg* **19**, 1-6.
  13. Folin, O. and Danis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239-249.
  14. Friedman, M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* **51**, 116-134.
  15. Holman, R. R., Cull, C. A. and Turner, R. C. 1999. A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (UK Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care* **22**, 60-64.
  16. Jee, S., Ohrr, H. and Yun, J. 2005. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA* **293**, 194-202.
  17. Kim, H. S., Jeon, I. H., Mok, J. Y., Kan, H. J. Shin, J. H., Park, Y. K., Jeong, S. I. and Jang, S. I. 2013. Anti-allergy and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* L. leaf extract. *Korean J Pharmacogn* **44**, 60-69.
  18. Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N. G. and Menichini, F. 2009. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum Nutr* **64**, 264-270.
  19. Lotito, S. B. and Frei, B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* **41**, 1727-1746.
  20. Moghaddam, A. H., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bigdellou, R., Mohammadzadeh, S. and Ebrahimzadeh, M. A. 2012. Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol Pharm* **69**, 687-692.
  21. Nahar, L., Nasrin, F., Zahan, R., Haque, A., Haque, E. and Mosaddik, A. 2014. Comparative study of antidiabetic activity of *Cajanus cajan* and *Tamarindus indica* in alloxan-induced diabetic mice with a reference to *in vitro* antioxidant activity. *Pharmacognosy Res* **6**, 180-187.
  22. Navavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Fazelian, M. and Eslami, B. 2009. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieriana* growing in Iran. *Pharmacogn Mag* **5**, 122-126.
  23. Rathmann, W. and Giani, G. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 2568-2569.
  24. Said, A., Hawas, U. W., Nofal, S. M., Rashed, K. and Huefner, A. 2009. Pharmacological studies on the aqueous methanolic extract of *Diospyros lotus* leaves. *Res J Phytochem* **3**, 1-12.
  25. Standl, E. and Schnell, O. 2012. Alpha-glucosidase inhibitors 2012-cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diab Vasc Dis Res* **9**, 163-169.
  26. Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. and Matsuoka, T. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* **52**, 149-153.
  27. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative  $\alpha$ -glucosidase gene from berley. *Plant Mol Biol* **30**, 229-241.
  27. Uddin, G., Rauf, A., Siddiqui, B. S., Muhammad, N., Khan, A. and Ali Shah, S. U. 2014. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. *Phytotherapy* **21**, 954-959.
  28. Yfjord, J. and Bodvarsdottir, S. 2005. Genomic instability and cancer: networks involved in response to DNA damage. *Mutat Res* **592**, 18-28.
  29. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* **64**, 555-559.

## 초록 : 고욤잎 추출물과 분획물의 항산화 및 $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 및 플라보노이드 화합물의 정량

김선영<sup>1\*</sup> · 김상준<sup>1</sup> · 김지애<sup>1</sup> · 김다혜<sup>1</sup> · 광설화<sup>1</sup> · 정창호<sup>1</sup> · 전인화<sup>2,3</sup> · 장선일<sup>2,3</sup> · 정승일<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup>전주생물소재연구소, <sup>2</sup>㈜아트규엔에이, <sup>3</sup>전주대학교 보건관리학과)

고욤잎은 주로 음료로 소비되지만 아시아 지역에서는 민간약품으로서 사용되었다. 본 연구의 목적은 고욤나무 잎 추출물의 생리 효능을 평가하고자 하였다. *n*-Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc (EA), *n*-BuOH을 포함한 다양한 용매 분획을 고욤잎의 MeOH 추출물로부터 얻었다. 식물성 페놀과 플라보노이드의 함량은 강력한 생물학적 활성과 의약소재 결정에서의 필요성이 증가하고 있다. 본 연구에서, EA 분획의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 다른 분획에 비해 높았다. 고욤잎 추출물의 생리 효능으로서 항산화 효능은 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 SOD 활성을 통하여 확인하였고, 항당뇨 효능은  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제를 통해 확인하였다. 높은 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 보인 EA 분획에서 높은 항산화 활성과  $\alpha$ -glucosidase 억제활성을 보였다. EA 분획은 컬럼 크로마토그래피로 추가 정제하여 8개의 분획을 얻었다. 극성이 높은 분획물에서 항산화 효능 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 높게 확인되었다. 효능이 높게 확인된 분획 및 정제물에서 quercetin-3-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside, myricetin, luteolin, kaempferol을 포함한 플라보노이드 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 이러한 결과는 고욤잎 추출물이 항산화 및 항당뇨 효능을 가지며 천연 건강 제품의 소재로서 가능성을 제시하는 것이다.