Microbiol. Biotechnol. Lett. (2017), 45(4), 311–315
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1710.10001
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

화살나무(*Euonymus alatus*)로 부터 α-glucosidase 저해 물질의 분리 및 동정

김신덕*
서경대학교 화학생명공학과

Received: October 16, 2017 / Revised: December 19, 2017 / Accepted: December 19, 2017

Isolation and Characterization of α-glucosidase Inhibitors from *Euonymus alatus*

Shin-Duk Kim*
Department of Chemical and Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 02713, Republic of Korea

α-glucosidase inhibitory compounds (1–4) in a 50% methanol extract of *Euonymus alatus* were isolated by activity-based fractionations and the structures determined on the basis of chemical and spectral characterization techniques such as ^{1}H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^{1}H–^{1}H correlation spectroscopy (COSY), and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC). The compounds 1–4 belong to flavonols and exhibited potent inhibitory activities against α-glucosidase, with IC_{50} values of 25.3, 17.1, 47.3, and 35.1 μM, respectively. All the isolated compounds were more potent than the positive control acarbose. This is the first report describing the potential hypoglycemic effect of *Euonymus alatus* through α-glucosidase inhibition and identification of its active components.

Keywords: α-glucosidase inhibitor, flavonol, flavonol glycoside, *Euonymus alatus*

소장의 미세 융모 표면에 위치한 α-glucosidase 효소는 탄수화물 소화에 필수적인 역할을 한다. 섭취된 모든 탄수화물은 소장에서 흡수되기 위해서는 α-glucosidase에 의해 단당류로 분해되어야 하므로 α-glucosidase 활성 저해는 탄수화물의 소화 흡수를 지연시켜 식후 혈당 상승을 억제함으로써, type II 인슐린 비 의존성 당뇨병과 비만 치료 등에 효과가 있다[1]. 또한 α-glucosidase 저해제는 항바이러스 효과[2]와 항암[3] 등의 다수의 활성을 나타내는 것으로 보고되어 다중 질병 치료제[4]로서 뿐만 아니라, 최근 치료 보조제로서 사회적 관심이 높아진 기능성 식품 소재를 개발하려는 목적으로 천연물 기원의 α-glucosidase 효소 저해제에 대한 연구가 국내뿐만 아니라 국외에서도 활발히 진행되고 있다[5, 6].

이미 안전성이 확보된 생약들을 대상으로 하여 α-glucosidase 효소 저해 물질을 탐색하는 과정에서 화살나무 추출물로부터 강한 활성 물질을 분리하였다. 예로부터 화살나무는 민간에서 진통제, 구충제, 지혈제 등으로 사용되었을 뿐만 아니라 혈당을 낮추고 당뇨병에 효험이 있다고 알려졌으나[7], 아직 활성물질에 대한 구체적인 보고는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 화살나무의 혈당 강하 기능의 유효 성분을 동정하기 위해서 화살나무 가지로부터 α-glucosidase 저해 활성 물질을 분리하여 구조 결정 및 특성 조사를 실시하였다.

화살나무 가지를 경동 한약제 시장에서 잘게 잘린 형태로 구입하여 실험에 사용하였다. 화살나무 가지(1 kg)을 50% 메탄올 용액(4 L)으로 상온에서 48시간씩 3회 교반 추출한 추출액을 rotary evaporator (EYELA, Japan)로 감압 농축한 후 증류수에 현탁시켜 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol를 이용하여 순차적으로 용매 추출하였다. 모든 용매 추출 분획에서 α-glucosidase 저해 활성을 나타냈으나, 그 중에서 가장 강한 활성을 보이는 n-butanol 층 (13.5 g)으로부터 chromatography 방법을 사용하여 activity-based fractionation에 의해 활성물질을 분리하였다. n-butanol 층을 감압 농축하여 silica gel column chromatography (silica gel 60, 4.5 × 50 cm, Merck, Germany)를 chloroform: methanol (10:0–

***Corresponding author**
Tel: +82-2-940-7171, Fax: +82-2-919-0345
E-mail: sdkim@skuniv.ac.kr
© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

2:8) 용매 조건으로 실시하여 활성 분획 F3와 F6을 획득하였다. 활성 분획 F3 (2.3 g)을 다시 silica gel column chromatography (3 × 40 cm)을 CH_3Cl:MeOH (2:1)로 실시하여 활성이 있는 분획을 모아 감압 농축한 다음 CH_2Cl_2:MeOH (7:3)을 용매로 하여 Sephadex LH-20 (Pharmacia, Sweden) column chromatography을 행한 후 HPLC (Waters, MA, USA, C_{18} μBondapak, MeOH:CH_3CN:H_2O = 40:15:45, UV 254 nm detection)에 의해 활성 물질 compound 1 (t_R 11.6 min, 35 mg)과 compound 2 (t_R 10.1 min, 87 mg)을 분리하였다. 활성 분획 F6 (1.9 g)을 한번 더 chloroform: methanol (10:5–5:10, stepwise elution)을 용매로 하여 silica gel column chromatography을 실시하여 얻은 활성 분획을 감압 건조시킨 다음, 70% methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography을 행하여 활성 peak을 얻었으며 최종 분리과정으로 HPLC (Waters, C_{18} μBondapak, CH_3CN:H_2O:TFA = 30:70:1, isocratic solvent system, UV 254 nm)을 행하여 compound 3 (t_R 33.1 min, 15.3 mg)와 compound 4 (t_R 38.0 min, 9.7 mg)를 각각 분리하였다. 분리한 활성 물질의 순도는 여러 solvent system에서 수행된 TLC plate (silicagel 60 G F_{254}, Merck) 상에 single band와 HPLC의 단일 peak로 확인하였다. Compound 1–4은 노란색의 무정형 가루 형태로 모두 UV 254 nm 또는 365 nm에서 흡수를 보이고 ferric chloride spray 시 blue-black 색을 나타내어 flavonoids임을 알 수 있었다[8].

α-glucosidase 저해 활성 검정은 이미 보고된 바대로 4-nitrophenol-α-D-glucopyranoside (Sigma-Aldrich, USA)를 기질로 사용하여 4-nitrophenol의 생성을 microplate reader model 550 (Bio-Rad, USA)으로 측정하였다[9]. 96 well plate에 phosphate buffer (25 mM, pH 6.8) 25 μl, 시료 20 μl, yeast α-glucosidase (Sigma-Aldrich, 1 U/ml) 10 μl, 기질(20 mM) 20 μl을 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 뒤 1 N NH_4OH 50 μl을 첨가하여 반응을 종료시킨 후 405 nm에서 방출된 p-nitrophenol 양을 흡광계수 16,300 $M^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 계산하였다. α-glucosidase 저해 활성은 (1 – B/A) × 100, A는 시료 대신 buffer를 첨가한 대조구의 p-nitrophenol 생성량, B는 시료 첨가 후 생성된 p-nitrophenol 양을 나타내며, 시료 농도에 따른 저해율의 분석에 의해 IC_{50} (50% 효소 활성 저해에 필요한 시료 양)을 결정하였다. 분리한 compound 1–4의 IC_{50} 값은 각각 25.3 μM, 17.1 μM, 47.3 μM와 35.1 μM로 모두 acarbose (115 μM) 보다 강한 활성을 나타내었다(Table 1). Positive control로 사용한 acarbose와 활성 비교에 사용된 myricetin과 apigenin 등의 모든 제품들은 Sigma-Aldrich 회사에서 구매하여 사용하였다.

활성물질 compound 1–4의 구조는 UV spectrum (Shimadzu model UV-160, Japan), HRFAB-MS (JEOL JMS-AX505 HA, Japan), ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D COSY (Brucker AV 500, USA) spectra 등을 근거로 결정하였다, compound 내 glycone moiety는 아래와 같이 산 가수분해 후 TLC을 실시하여 확인하였다. 시료(1–2 mg)을 2 N HCl 1 ml에 녹여 95℃에서 2시간 반응시킨 후 감압 건조하고 증류수 1 ml을 더해 ethyl acetate로 추출하였다. ethyl acetate층을 농축하여 TLC (silica gel 60 RP-18 $F_{254\ S}$, Merck, methanol: H_2O = 1:1)을 행하여 aglycone부분을 확인하고, 물 층은 Na_2CO_3로 중화시킨 후 n-butanol:acetone:pyridine:H_2O (2:2:1:1, v/v/v/v) 용매계에서 Sigma-Aldrich에서 구입한 glucose, galactose, Xylose, arabinose와 fructose 등의 표준 당 시료와 함께 TLC (silica gel 60 F_{254}, Merck)을 행한 후 aniline phthalate reagent로 발색하여 동정하였다,

Table 1. α-glucosidase inhibition by compounds 1–4.

Compound	IC_{50} (μM)
Compound 1	25.3 ± 0.9
Compound 2	17.1 ± 2.1
Compound 3	47.3 ± 1.9
Compound 4	35.1 ± 2.8
acarbose	115 ± 3.9
myricetin	6.5 ± 0.91
apigenin	> 500

Values are expressed as the means of triplicate reactions ± standard deviation.

활성 compound 1은 HRFAB-MS에서 *m/z* 287.23 $[M+H]^+$ ion peak와 NMR data에 의해서 분자식이 $C_{15}H_{10}O_6$로 동정되었다. ^1H NMR spectrum에서 aromatic methane signal δ 8.06 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, H-2', H-6')와 6.89 (2H, d, *J* = 9.2, H-3', H-5')는 ring B의 1', 4'-disubstituted와 δ 6.36 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8)과 6.16 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6) signal들은 ring A의 특징적인 meta coupled pattern을 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 15개의 carbon signal이 확인되었으며, DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) ^{13}C NMR 실험에 의해 carbon의 multiplicity, 즉 methyl, methylene, methine과 quarternary carbon 등을 확인하였다. δ 178.0 peak는 conjugated ketone function이고 oxygenated quaternary carbon인 δ 164.2 (C-7), 161.1 (C-5), 159.5 (C-4'), 156.7 (C-9), 147.2 (C-2) 와 134.0 (C-3), 2 quaternary carbons δ 122.0 (C-1')와 103.5 (C-10), 그리고 6 methine carbon δ 129.9 (C-2'/6') 115.4 (C-3'/5'), 99.1 (C-6)와 93.9 (C-8)으로 모든 carbon peak의 배정이 이루어졌다(Table 2). 이상의 spectral 결과와 문헌 상의 data와 비교하여 Compound 1은 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (kaempferol)로 동정되

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1710.10001

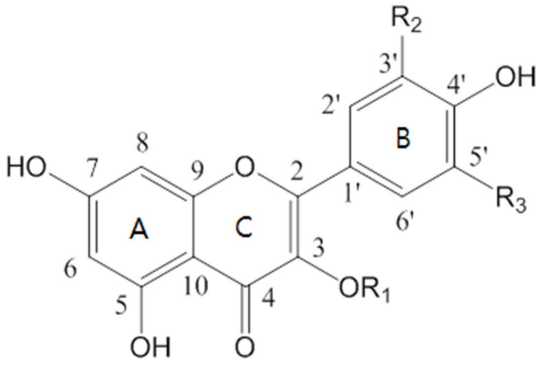
Table 2. ^{13}C (DMSO-d_6) NMR spectral data (δ value, ppm).

Carbon	Compound			
	1	2	3	4
2	147.2	147.1	147.1	147.1
3	134.0	134.1	134.0	134.0
4	178.0	177.9	177.9	177.9
5	161.1	161.5	161.5	161.5
6	99.1	99.3	99.2	99.3
7	164.2	164.3	164.4	164.4
8	93.9	94.0	94.0	94.0
9	156.7	156.6	156.7	156.6
10	103.5	103.3	103.4	103.4
1’	122.0	122.1	122.6	122.7
2’	129.9	115.4	115.4	115.4
3’	115.4	145.4	145.5	145.5
4’	159.5	149.0	148.6	148.6
5’	115.4	115.4	115.4	115.3
6’	129.9	121.1	122.4	122.0
1”			104.3	108.0
2”			75.6	79.2
3”			78.2	79.6
4”			71.1	85.8
5”			78.0	61.5
6”			62.5	
COO				170.4
CH_3				20.9

었다[10].

Compound 2는 HRFAB-MS에서 *m/z* 303.236 $[M+H]^+$ ion peak와 NMR data에 의해 분자식이 $C_{15}H_{10}O_7$ 임을 알 수 있었으며, UV absorption spectrum에서 λ 256 nm (band B)와 λ 372 nm (band A)의 최대 흡수를 보여 compound 2 역시 flavonol compound로 추정되었다. ^1H NMR spectrum 상의 두 doublet proton signal δ 6.13 (1H, d, J = 2.1 Hz)와 δ 6.35 (1H, d, J = 2.1 Hz)는 A ring의 H-8와 H-6이고, δ 7.53 (1H, d, J = 2.0 Hz), δ 6.84 (1H, d, J = 8.5)와 δ 7.52 (1H, dd, J = 2.0, 8.5)의 3 proton signals는 각각 B ring의 H-2’, H-5’, H-6’으로 A ring의 5와 7 그리고 B ring의 3’과 4’ carbon이 hydroxylate 되어 있음을 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 δ 145.4와 δ 149.0은 benzene B ring의 hydroxyl group을 갖는 carbon signal C-3’와 C-4’이고, A ring의 oxygenated quaternary carbon인 δ 164.3 (C-7), δ 161.5 (C-5), 156.6 (C-9)임을 확인할 수 있었다(Table 2). 이상의 ^1H와 ^{13}C NMR spectra 분석과 문헌 상의 data와 비교한 결과 compound 2는 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one (quercetin)으로 동정되었다[10].

Compound 3의 경우 TLC plate (silica gel 60 RP-18 F_{254}, MeOH:H_2O = 1:1, rf 0.5)와 HPLC (C_{18} Bondapak, CH_3CN:H_2O = 2:8 (v/v), UV 254 detection, t_R 32 min)에서 single peak로 분리되었으며, UV 254와 352 nm에서 최대 흡수를 보여 flavonoid 물질임을 시사하였다. HRFAB-MS spectrum에서 *m/z* 465.38 $[M+H]^+$ ion peak와 NMR data 등에 의해 분자식 $C_{21}H_{20}O_{12}$이 밝혀졌다. ^1H NMR spectrum에서 compound 2와 같이 A ring의 H-6와 H-8의 meta-coupled pattern과 B ring의 1’, 3’, 4’-trisubstitution 구조가 확인되어 quercetin을 포함하고 있음을 알 수 있었으며, 그 외에 anomeric proton signal δ 5.10과 δ 3.8–3.4의 midfield signals 들, 그리고 ^{13}C NMR spectrum의 δ 104.3의 anomeric methine carbon과 δ 78.2–62.5 ppm 사이의 5개 signal들에 의해 sugar moiety 존재가 확인되어 quercetin glycoside임을 알 수 있었다(Table 2). FAB-MS spectrum의 molecular ion에서 162 mass unit의 loss와 DEPT에서 δ 62.5 signal이 CH_2을 나타내어 glycone 부분이 hexose 임을 확인하였으며, 또한 acid hydrolysis 후 실시한 TLC 분석에 의해서도 aglycone moiety는 quercetin, glycone은 glucose (rf 0.44) 임이 확인되었다. Glucose anomeric proton δ 5.10 (H-1”)과 δ 134.0 (C-3) 간의 HMBC correlation에 의해 quercetin의 C-3에 glycosylate 되었으며, anomeric proton의 $^3J_{\text{H-1”, H-2”}}$ coupling constant (J = 7.5 Hz)에 의해 β-linkage임을 알 수 있었다. 당의 configuration은 $^3J_{\text{H-2”, H-3”}}$와 $^3J_{\text{H-3”, H-4”}}$ coupling constant (8–9 Hz)와 NOESY spectra에 의해 D form [11]으로 확인되어 compound 3 구조는 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl β-D-glucopyranoside (quercetin-3-*O*-β-D-glucopyranoside)로 밝혀졌다[12].



Compound	R1	R2	R3
Compound 1	H	H	H
Compound 2	H	OH	H
Compound 3	β-glucopyranose	OH	H
Compound 4	α-(3”-O-acetyl)-arabinofuranose	OH	H

Fig. 1. Structures of the active compounds 1–4 isolated from *Euonymus alatus*.

Compound 4는 HRFAB-MS에서 m/z 477.1016 $[M+H]^+$ peak와 NMR data에 의해 분자식 $C_{22}H_{21}O_{12}$으로 확인되었다. ^1H NMR spectrum에서 δ 6.19 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 7.48 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.55 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6') peak 등에 의해 compound 4 역시 quercetin moiety를 포함하고 있음을 알 수 있었다. anomeric proton δ 5.27 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-1")과 다른 glycosidic protons 4.44 (m, H-2") 4.81 (d, J = 3.8, H-3"), 3.70 (d, J = 3.8, H-4")와 3.42 (2H, m, H-5") 이외에 methyl proton signal δ 1.88 (s, 3H)과 ^{13}C NMR spectrum에서 δ 20.9 (CH_3)와 170.4 (COO) signal 등에 의해서 glycone moiety가 acetylated arabinofuranoside이며 acetyl group의 위치는 H-3" (δ 4.81)와 acetoxyl carbonyl carbon (δ 170.4)의 HMBC cross peak에 의해 C-3"로 밝혀졌다. Quercetin의 glycosylation 위치는 anomeric proton δ 5.27 (H-1")과 δ 134.0 (C-3) 간의 HMBC long range correlation으로 C-3임을 알 수 있었고 coupling constant J = 1.4에 의해서 α-anomeric configuration이 확인되었다. 또한 compound 4을 산 가수분해 후 0.02 N sodium methoxide로 처리하여 deacetylation을 행한 다음 표준 당 시료와 함께 실시한 TLC에서도 glycone moiety는 arabinose (rf 0.53)로 확인되었다. 따라서 compound 4의 구조는 quercetin-3-*O*-α-3"-acetyl-arabinofuranoside로 결정되었다[13].

본 연구에서 activity-based fractionation에 의해 화살나무 가지로부터 α-glucosidase 저해 활성물질을 분리하였고, ^1H, ^{13}C NMR, DEPT, 2D NMR과 MS spectrum 등과 문헌 상의 data을 근거로 하여 compound 1 (Kaempferol), compound 2 (quercetin), compound 3 (quercetin-3-*O*-β-glucopyranoside), compound 4 (quercetin-3-*O*-α-3"-acetyl-arabinofuranoside)의 구조를 결정하였다(Fig. 1). 화살나무의 butanol 용매 추출 층에서 분리한 활성물질 1, 2, 3과 4는 모두 5,7-dihydroxy flavonol 물질이다. 다양한 천연물 소재에서 flavonol 물질의 분리가 이루어졌으며, flavonol compound의 α-glucosidase 저해 활성과 항산화 작용 등에 관해 다수의 연구가 보고된 바 있다[14]. 그러나 화살나무의 α-glucosidase 효소 저해의 유효성분으로서는 보고된 바가 없다. 또한 compound 4의 경우는 acetylglycosyl 기를 포함하는 드문 flavonoids로 화살나무 성분으로 본 연구에서 처음 보고되었다.

Flavonoid 물질의 경우 A ring의 hydroxyl 기가 α-glucosidase enzyme의 tyrosine, tryptophan과 수소결합을 형성하여 enzyme의 2차 구조의 변화를 유발시켜 active site에 기질 결합을 제한함으로써 enzyme 활성을 저해한다고 알려졌지만[15, 16], 본 연구 결과에 의하면 A ring 뿐만 아니라 B ring의 OH기 수도 중요하다. B ring에 1개의 OH기를 갖는 kaempferol 보다 2개 OH기를 포함하는 quercetin이 강한 활성을 나타냈으며 3개의 OH기를 포함하는 myricetin과 비교한 결과 myricetin이 가장 강한 활성을 나타내어 활성의 세기가 myricetin, quecetin, kaempferol 순으로 나타났다. 또한 C ring의 hydroxyl function은 활성에 영향하지 않는 것으로 보고된 바 있으나, kaempferol 활성이 apigenin에 비해 크게 나타나 C ring의 3-free OH 기는 활성을 증가시키나, compound 3와 compound 4와 같이 C-3번 위치에 당 등의 bulky group의 치환은 enzyme binding site에의 결합을 저해함으로써 활성이 감소되는 것으로 추정된다(Table 1).

α-glucosidase 저해제인 acarbose, voglibose 그리고 miglitol 등이 당뇨치료제로 시판되고 있으나 복부 팽만과 설사 등의 부작용으로 인해 사용에 제한이 있으므로 부작용이 해결된 새로운 치료제 개발이 시급한 실정이다[17]. 본 연구에서는 당뇨 치료제 개발 목적으로 혈당강하 효과가 있다고 알려져 오랫동안 민간요법으로 사용되어 안전성이 확보된 화살나무 가지로부터 α-glucosidase 저해물질을 분리하였다. 분리한 활성물질 Compound 1, 2, 3와 4 모두는 yeast α-glucosidase에 대해 강한 저해 활성을 나타냈으나, β-glucosidase, α-mannosidase, β-galactosidase 등의 다른 glycosidase에는 전혀 활성을 나타내지 않았다(data not shown). 식후 혈당강하 작용에 의해 개발된 당뇨병 치료제의 경우 임상적으로 상용되는데 있어 최대 걸림돌은 독성이며, 독성 문제 해결을 위한 방안은 glycoprotein processing glycosidase에는 활성이 없고, 소장 내 α-glucosidase에 대해 특이적 저해 활성을 갖는 물질의 선발이다[18]. 이상의 결과를 종합해보면 본 연구에서 분리한 α-glucosidase 저해 물질, compound 1-4는 당뇨병 치료제로의 개발 가능성이 높다고 판단된다.

요 약

화살나무 가지로부터 activity based fractionation에 의해 α-glucosidase 저해 활성 물질 compound 1–4을 분리하였고, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H–^1H COSY와 HMBC 등의 spectral data에 의해 구조를 결정하였다. Compound 1–4는 모두 flavonol 물질로 α-glucosidase에 대해 IC_{50} 값이 각각 25.3, 17.1, 47.3과 35.1 μM로 positive control로 사용한 acarbose 보다 강한 활성을 나타내었다. 화살나무의 혈당 저하 기능의 유효성분으로 처음 동정된 Compound 1–4는 α-glucosidase에만 특이적 활성을 갖는 물질로 당뇨병 치료제로의 개발 가능성이 높은 물질로 사료된다.

Acknowledgments

This research was supported by Seokyeong University in 2015.

Conflict of Interest

The author has no conflict of interest to declare.

References

1. Heacock PM, Hertzler SR, Williams JA, Wolf BW. 2005. Effects of a medical food containing an herbal α-glucosidase inhibitor on postprandial glycemia and insulinemia in healthy adults. *J. Am. Diet. Assoc.* **105**: 65-71.
2. Chapel C, Garcia C, Roingeard P, Zitzmann N, Dubuisson J, Dwek A, *et al.* 2006. Antiviral effect of α-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of the hepatitis C virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **87**: 861-871.
3. Goss PE, Baker MA, Carver JP, Dennis JW. 1995. Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. *Clin. Cancer Res*. **1**: 935-944.
4. Asano N. 2003. Glycosidase inhibitors: Update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **13**: 93R-104R.
5. Yang Z, Wang Y, Wang Y, Zhang Y. 2012. Bioassay-guided screening and isolation of α-glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*. *Food Chem*. **131**: 617-625.
6. Wang SM, Han JJ, Ma K, Jin T, Bao L, Pei Y, *et al*. 2014. New α-glucosidase inhibitors with p-terphenyl skeleton from the mushroom *Hydnellum concrescens*. *Fitoterapia* **98**: 149-155.
7. Park SH, Ko SK, Chung SH. 2005. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol*. **102**: 326-335.
8. Markham KR. 1982. *Techniques of flavonoid identification*, pp. 23-29. Academic Press, London.
9. Kim S. 2013. α-Glucosidase inhibitor from *Buthus martensi Karsch*, *Food Chem.* **136**: 297-300.
10. Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem*. **51**: 571-581.
11. Agrawal PK. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochem*. **31**: 3307-3330.
12. Harborne JB, Williams CA. 1994. Flavone and flavonol glycosides, pp 290-295. *In* Harborne JB (ed), The Flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London.
13. Madikizela B, Aderogba M, Staden JV. 2013. Isolation and characterization of antimicrobial constituents of *Searsia chirindensis L*. (Anacardiaceae) leaf extracts. *J. Ethnopharmacol*. **150**: 609-613.
14. Toda M, Kawabata J, Kasai T. 2000. α-Glucosidase inhibitors from clove (*Syzgium aromaticum*). *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **64**: 294-298.
15. Niwa T, Doi U, Osawa T. 2003. Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against α-glucosidase. *J. Agric. Food Chem*. **51**: 90-94.
16. Peng X, Zhang G, Liao Y, Gong D. 2016. Inhibitory kinetics and mechanism of Kaemferol on α-glucosidase. *Food Chem*. **190**: 207-215.
17. Asano N. 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **13**: 93R-104R.
18. Jacob GS. 1995. Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **5**: 605-611.