

감나무 잎으로부터 분리된 플라보노이드의 동시 정량분석

김가람 · 김은남 · 정길생*

계명대학교 약학대학

Simultaneous Quantitative Analysis of Flavonoids Isolated from the Leaves of *Diospyros kaki*

Ga-Ram Kim, Eun-Nam Kim, and Gil-Saeng Jeong*

College of Pharmacy, Keimyung University, Daegu, Dalgubeol-daero 1095, (42601), Korea

Abstract – The leaves of *Diospyros kaki* Thunb. were used to treat heart disease and hypotension in traditionally East Asia. The purpose of this study is to simultaneously quantitative analyze the content of flavonoids in leaves of *D. kaki*. The isolated flavonoids from the leaves of *D. kaki*, and the structure of the isolated flavonoids were analyzed based on ¹H and ¹³C NMR spectrum compared to literature data. Simultaneous quantitative analysis of the isolated flavonoids was validated using high performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that the calibration curves of the flavonoid compounds were confirmed that they have a large linearity with a correlation coefficient (R^2) of 0.99. In the intra-day and inter-day analysis, accuracy and precision of five compounds were measured that accuracy was 94.39 to 114.47% and precision was less than 3.00%. Content analysis showed hyperoside ($1.30 \pm 0.09\%$), astragalinal ($0.81 \pm 0.06\%$), trifolin ($1.58 \pm 0.07\%$), quercetin ($0.13 \pm 0.02\%$) and kaempferol ($1.33 \pm 0.25\%$).

Keywords – HPLC, Flavonoid, Quantitative analysis, *Diospyros kaki* Thunb.

감나무(*Diospyros kaki* Thunb.)는 열대 및 온대 지역에 널리 분포하고 있는 감나무(Ebenaceae)과의 낙엽교목(落葉喬木)이며,^{1,2)} 동아시아에서 수백 년 동안 재배되어왔다.³⁾ 중국에서는 건조한 감나무 잎을 ‘Shi ye’라 하며^{2,4)} 중국 약전에 ‘Shi ye’로 제조된 뇌심청편(腦心淸片)이 뇌 경화증과 심장질환의 예방 및 치료를 위해 사용된 기록이 있다.⁴⁾ 또한, 일본의 전통 의학에서는 저혈압 치료제로 사용되었다.⁵⁾ 현재 감나무 잎은 다양한 건강기능식품으로 개발되고 있으며, 이노제, 지혈 이외에도 기침, 뇌동맥 경화증 등을 치료하고 산모의 건강을 증진시키는데 사용되었다.^{4,5)} 또한 최근에 알려진 감나무 잎을 이용해 만들어진 건강식품은 항산화, 노화 방지 및 항암, 항균 등 뛰어난 활성을 나타내고 있다.⁶⁻⁸⁾

이미 많은 연구에서 플라보노이드는 항염증, 간 보호, 항균, 항종양, 항산화와 같은 활성에 대한 효과와 더불어 허혈, 우울증 및 치매와 같은 질병을 치료하는데 사용될 수 있어 건강에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{9,10)}

특히 감나무 잎에 함유된 플라보노이드 중 hyperoside, astragalinal, quercetin 그리고 kaempferol은 항산화 효과와 항염증 효과를 나타내며,¹¹⁻¹⁸⁾ hyperoside, trifolin은 항암 효과를 나타낸다.¹⁹⁻²¹⁾ 또한, quercetin은 골 관절염 개선,²²⁾ 동맥 경화증 억제,²³⁾ kaempferol의 경우 항알레르기,²⁴⁾ 고지혈증 치료제²⁵⁾ 등 많은 연구가 진행되어왔다.

감나무 잎 추출물의 다양한 생리활성과 천연 성분에 대한 연구결과가 보고된 바 있으나, 플라보노이드 성분의 정량 시험법이나 함량 분석법에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 감나무 잎 추출물에 함유된 5종의 플라보노이드 화합물(hyperoside, astragalinal, trifolin, quercetin, kaempferol)을 지표성분으로 선정하고 이를 분리하여 구조를 확인하였으며, HPLC-UV로 정량분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 감나무 잎은 대구약령시장에서 구입하였으며, 계명대학교 정길생 교수가 동정하였다. 표본은 계명대학교 약학대학 생약학연구실에 보관하였다

*교신저자(E-mail): gsjeong@kmu.ac.kr

(Tel): +82-82-53-580-6649

(KMU-2019-0711).

기기 및 시약 – 본 실험에서 지표물질 추출을 위해 사용된 ethanol, *n*-hexane, chloroform과 ethyl acetate는 대정화금(Siheung, Korea)사 제품을 사용하였다. 함량분석을 위해 Shimadzu(Tokyo, Japan)사의 HPLC-UV system을 사용하였으며, 컬럼은 Shiseido(Tokyo, Japan)사의 C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피에 사용한 충전제는 Merk(NJ, USA)사의 70-230 mesh silica gel을 사용하였다. 구조 규명을 위해 NMR(nuclear magnetic resonance) spectrum은 Jeol(Tokyo, Japan)사의 JNM-ECZ500S 모델을 사용하였다. NMR 용매 CD₃OD는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 화합물의 분자량을 측정하기 위해 Agilent 6120 series ESI-MS(Electrospray ionization mass spectrometry)를 사용하였다.

지표성분 분리 – 건조된 감나무 잎 2.5 kg을 100% ethanol로 65°C에서 3시간 열수 추출 후 여과 및 감압 농축을 하여 ethanol 추출물(177.2 g)을 얻었다. 그 후 ethanol 추출물을 증류수로 현탁시켜 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate로 계통 분획하여 각각 23.7 g, 50.1 g, 10.0 g의 분획물을 얻었다. 그 후 ethyl acetate 분획 10.0 g에 대해 CHCl₃:MeOH (40:1-10:1) 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획(Fr.1~Fr.5)을 얻었다. 그 후 소분획 Fr.1과 2에 대해 Sephadex LH-20(MeOH:H₂O = 4:6)을 이용하여 각각 화합물 1(hyperoside, 10.8 mg), 2(astragalinal, 10.7 mg)을 얻었으며, 동일한 조건으로 Fr.3에서 화합물 3(trifolin, 23.7 mg), Fr.4와 5에서 각각 화합물 4(quercetin, 181.5 mg), 5(kaempferol, 250.0 mg)을 얻었다.

1. **Hyperoside** – Yellow powder; ESI-MS: *m/z* 463.1 [M-H]⁻ (C₂₁H₂₀O₁₂), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.82 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-2'), 7.57 (1H, dd, *J*=8.4, 2.2 Hz, H-6'), 6.85 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.31 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 5.16 (1H, d, *J*=7.7 Hz, Gal, H-1), 3.86 (1H, dd, *J*=4.4, 3.7 Hz, Gal, H-4), 3.67 (1H, dd, *J*=9.5, 7.7 Hz, Gal, H-2), 3.65 (2H, dd, *J*=5.5 Hz, Gal, H-6 b), 3.59 (1H, d, *J*=5.5 Hz, Gal, H-6 a), 3.50 (1H, dd, *J*=9.5, 4.4 Hz, Gal, H-3), 3.46 (1H, m, Gal, H-5). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 178.0 (C-4), 164.4 (C-7), 161.7 (C-5), 157.8 (C-2), 157.3 (C-9), 148.1 (C-4'), 144.8 (C-3'), 134.2 (C-3), 121.8 (C-1'), 121.8 (C-6'), 116.2 (C-2'), 114.6 (C-5'), 104.2 (C-10), 102.9 (Gal, C-1), 98.5 (C-6), 93.3 (C-8), 77.1 (Gal, C-5), 76.8 (Gal, C-3), 74.4 (Gal, C-2), 69.9 (Gal, C-4), 61.2 (Gal, C-6).

2. **Astragalinal** – Yellow powder; ESI-MS: *m/z* 447.2 [M-H]⁻ (C₂₁H₂₀O₁₁), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 8.07 (2H, dd, *J*=11.4, 2.8 Hz, H-2', H-6'), 6.88 (2H, dd, *J*=9.7,

2.7 Hz, H-3', H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.25 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glc, H-1), 3.77 (1H, dd, *J*=12.0, 4.2 Hz, Glc, H-6 b), 3.58 (1H, dd, *J*=12.0, 4.5 Hz, Glc, H-6 a), 3.48 (1H, d, *J*=11.4 Hz, Glc, H-3), 3.41 (1H, d, *J*=11.4 Hz, Glc, H-2), 3.28 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glc, H-5). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 178.4 (C-4), 164.7 (C-7), 161.7 (C-2), 160.3 (C-5), 157.7 (C-9), 157.2 (C-4'), 134.2 (C-3), 131.0 (C-2', C-6'), 121.3 (C-1'), 114.8 (C-3', C-5'), 104.7 (C-10), 103.6 (Glc, C-1), 98.6 (C-6), 93.4 (C-8), 75.8 (Glc, C-5), 73.7 (Glc, C-3), 71.7 (Glc, C-2), 68.7 (Glc, C-4), 60.6 (Glc, C-6).

3. **Trifolin** – Yellow powder; ESI-MS: *m/z* 447.2 [M-H]⁻ (C₂₁H₂₀O₁₁), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 8.02 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2', H-6'), 6.85 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', H-5'), 6.38 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, *J*=7.5 Hz, Gal, H-1), 3.81(1H, d, *J*=3.5 Hz, Gal, H-4), 3.79(1H, dd, *J*=9.6, 7.9 Hz, Gal, H-2), 3.67(1H, dd, *J*=11.1, 6.1 Hz, Gal, H-6 a), 3.52(1H, m, Gal, H-3), 3.51(1H, m, Gal, H-6 b), 3.42(1H, t, *J*=6.1 Hz, Gal, H-5). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 178.2 (C-4), 164.6 (C-7), 161.8 (C-5), 160.3 (C-4'), 157.2 (C-2, C-9), 134.1 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 121.4 (C-1'), 114.7 (C-3', C-5'), 104.4 (C-10), 102.7 (Gal, C-1), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8), 77.1 (Gal, C-5), 76.7 (Gal, C-3), 74.4 (Gal, C-2), 70.0 (Gal, C-4), 61.3 (Gal, C-6).

4. **Quercetin** – Yellow powder; ESI-MS: *m/z* 301.1 [M-H]⁻ (C₁₅H₁₀O₇), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.70 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2'), 7.61 (1H, dd, *J*=8.4, 2.1 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.47 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 176.0 (C-4), 164.2 (C-7), 161.2 (C-9), 156.9 (C-5), 147.4 (C-4'), 146.6 (C-1), 144.9 (C-1'), 135.9 (C-3), 122.8 (C-1'), 120.3 (C-6'), 114.9 (C-5'), 114.6 (C-2'), 103.2 (C-10), 97.9 (C-6), 93.0 (C-8).

5. **Kaempferol** – Yellow powder; ESI-MS: *m/z* 285.1 [M-H]⁻ (C₁₅H₁₀O₆), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 8.08 (2H, d, *J*=11.5, 2.8 Hz, H-2', H-6'), 6.90 (2H, dd, *J*=9.8, 2.7 Hz, H-3', H-5'), 6.38 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.16 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 176.0 (C-4), 164.3 (C-7), 161.2 (C-9), 159.2 (C-4'), 156.9 (C-5), 146.7 (C-2), 135.8 (C-3), 129.3 (C-2', 6'), 122.4 (C-1'), 115.0 (C-3', 5'), 103.2 (C-10), 97.9 (C-6), 93.1 (C-8).

표준용액 및 분석시료 조제 – 실험에 사용된 지표물질 hyperoside, astragalinal, trifolin, quercetin 및 kaempferol을 1 mg으로 칭량하여 methanol로 각각 1 mg/ml의 농도로 조제한 후 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μg/ml으로 계열 희석

Table I. HPLC conditions for quantitative analysis

Parameters	Conditions		
Analytical column	Shiseido C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)		
HPLC	Shimadzu HPLC system		
Detector	Diode Array detector (375 nm)		
	Solvent A : 0.1% formic acid in water		
	Solvent B : Acetonitrile		
	Final time (min)	Solvent	
		A (%)	B (%)
Mobile phase	0	78	22
	10	78	22
	20	70	30
	22	55	45
	50	10	90
	60	78	22
Flow rate	1.0 ml/min		
Column oven temperature	30°C		
Injection volume	10 μl		
Run time	60 min		

하여 검량선 표준용액으로 사용하였다. 분석시료는 감나무 잎 ethanol 추출물 10 mg을 칭량 후 methanol 1 ml에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 사용하였다.

HPLC 분석조건 - 감나무 잎의 hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin 및 kaempferol의 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table I과 같이 설정한 후 이 조건에 따라 분석을 진행하였다. HPLC 분석을 위한 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)을 사용하였으며, 분리능을 높이기 위해 water에 0.1% formic acid를 첨가하였고, 기울기 용리 조건을 바꿔주었다. 컬럼은 Shiseido(Tokyo, Japan)사의 C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, column oven temperature는 30°C, flow rate는 1.0 ml/min로 구성되었다. UV파장은 375 nm에서 분석하였다.

직선성 평가 - 직선성 평가를 위해 hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin 및 kaempferol의 표준물질을 methanol에 녹여 혼합한 후 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μg/ml의 농도로 계열 희석 하여 HPLC 분석에 사용하였다. 분석결과를 바탕으로 5개의 표준물질에 대한 검량선을 작성하였고, 회귀직선방정식은 $y=ax+b$ (a: 직선의 기울기, b: y절편, x: 시료의 농도, y: peak의 면적)의 형태로 작성하였다. 검량선을 바탕으로 상관계수(R^2) 값을 구하였고, 직선성은 검량선의 R^2 값을 통해 판단하였다.

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 측정 - 분석하는 대상물질의 검출과 정량이 가능한 최소 농도를 확인하기 위해 아래에 표기된 식에 따라 검출한계(LOD)와 정량한계

(LOQ)를 측정하였다.

$$LOD = 3.3 \times (\alpha/\beta)$$

$$LOQ = 10 \times (\alpha/\beta)$$

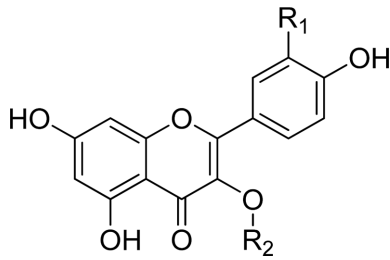
(α : 표준편차, β : 검량선의 기울기)

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) 평가 - 5가지 지표물질에 대한 정량분석의 타당성을 검증하기 위해 반복실험을 진행하였다. Intra-day test는 직선성이 확인된 3개의 농도에서 하루 이내에 3회 반복 측정된 결과를 상대표준편차를 구하여 평가하였다. Inter-day test는 앞서 말한 test와 같은 3개의 농도로 3회 반복 측정된 결과를 통해 상대표준편차를 구하여 평가하였다. 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 평가하였고, RSD% 값이 3.00%이내인 경우 우수한 정밀성을 가지는 것으로 판단하였다.

함량분석 - 감나무 잎으로부터 분리한 flavonoid 계열의 화합물 5종에 대해 HPLC-UV를 이용해 함량분석을 실시하였다. 표준용액의 chromatogram으로부터 피크 면적값을 구하여 hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin, kaempferol에 대한 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 감나무 잎의 ethanol 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획물에서 플라보노이드 계열의 화합물인



Compound	R ₁	R ₂
A	OH	galactose
B	H	glucose
C	H	galactose
D	OH	H
E	H	H

Fig. 1. Structures of hyperoside (A), astragalín (B), trifolin (C), quercetin (D) and kaempferol (E).

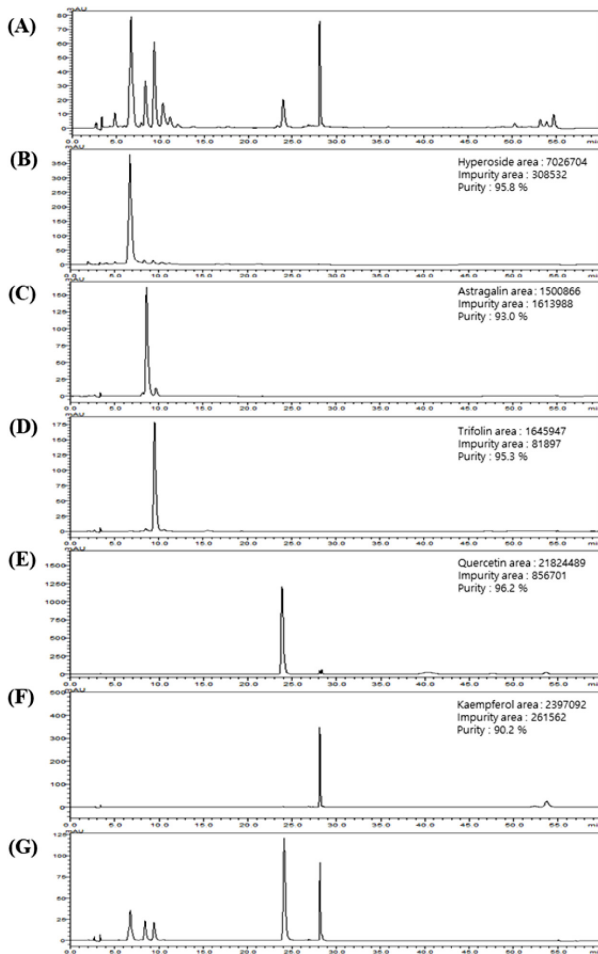


Fig. 2. HPLC chromatogram of the leaves of *D. kaki* ethanol extracts (A), hyperoside (B), astragalín (C), trifolin (D), quercetin (E), kaempferol (F) and 5 mixture standard (G).

hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin, kaempferol을 분리하여 지표물질로 사용하였다(Fig. 1). 분리된 플라보노이드 계열 화합물 5종의 질량분석 문헌과²⁶⁾ ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum의 결과를 이미 보고된 문헌과 비교하여 hyperoside,²⁷⁾ astragalín,²⁸⁾ trifolin,²⁹⁾ quercetin,³⁰⁾ kaempferol로³¹⁾ 동정하였다. 분리된 지표물질을 각각 methanol에 용해 시킨 후 HPLC-UV로 측정된 결과 5종의 화합물 중 3종(hyperoside, trifolin, quercetin)의 순도는 95% 이상이며 astragalín과 kaempferol은 각각 93%와 90.2%의 순도를 나타내었으며, 피크 머무름 시간은 각각 hyperoside(7.0분), astragalín(8.7분), trifolin(9.8분), quercetin(25.0분), kaempferol(28.4분)에서 검출되었다(Fig. 2). 감나무 잎 ethanol 추출물과 지표물질의 chromatogram을 비교하여 다른 성분들에 간섭이 없음을 확인하였다(Fig. 2). 또한 지표물질 5종의 검량선 면적으로부터 회귀직선방정식을 얻었으며, R²값은 각각 0.9981, 0.9991, 0.9990, 0.9997, 0.9996로 우수한 직선성을 나타냈다(Fig. 3). 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 hyperoside가 0.69, 2.10 µg/ml, trifolin이 0.68, 2.07 µg/ml, astragalín이 0.69, 2.08 µg/ml, quercetin이 0.70, 2.12 µg/ml, kaempferol이 0.69, 2.10 µg/ml로 확인되었다(Table II). 직선성이 확인된 농도인 15, 45, 150 µg/ml를 기준으로 Intra-day, Inter-day test를 3회 반복하여 진행되었으며, 상대표준편차(RSD%)값을 구하여 정밀성을 판단하였다. 그 결과 상대표준편차 값이 Intra-day와 Inter-day 모두 3.00% 이하로 우수한 결과를 얻었다. 정확성 결과에서는 intra-day는 각각 hyperoside가 97.23~110.18%, astragalín이 99.42~105.44%, trifolin이 101.26~104.77%, quercetin이 98.08~101.35% 그리고 kaempferol 97.88~101.86%의 범위를 나타냈으며,

Table II. Calibration curves, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of five compounds

Compounds	Linear range (µg/ml)	Regression equation	R ²	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Hyperoside		y=13587x+31482	0.9981	0.69	2.10
Astragalín		y=7722.7x+17742	0.9991	0.68	2.07
Trifolin	5~300	y=7299.4x+15078	0.9990	0.69	2.08
Quercetin		y=41997x+3886.9	0.9997	0.70	2.12
Kaempferol		y=14294x+1826.9	0.9996	0.69	2.10

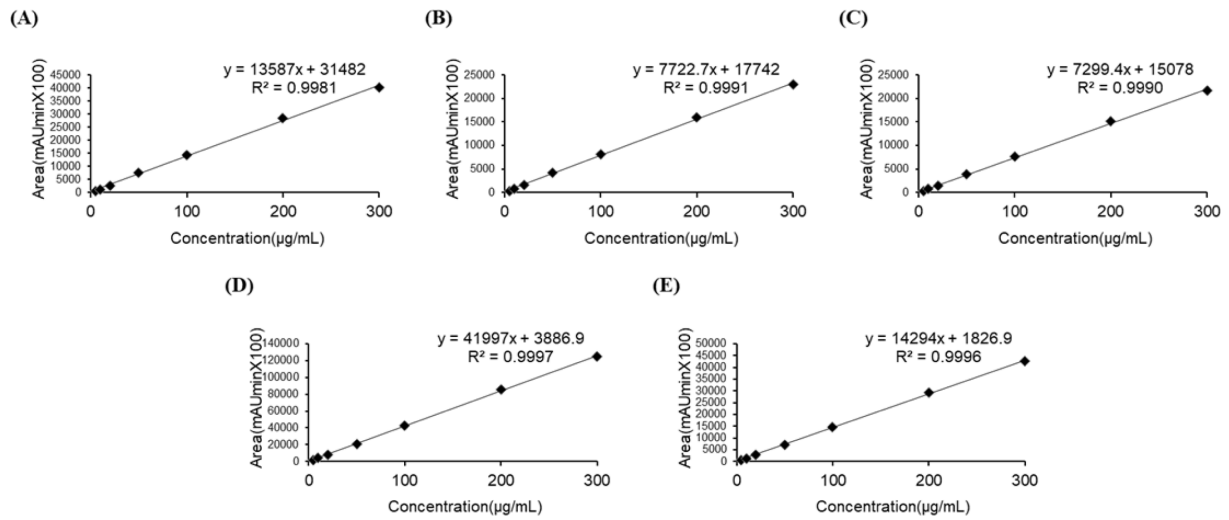


Fig. 3. Calibration curve of hyperoside (A), astragalín (B), trifolin (C), quercetin (D) and kaempferol (E).

Table III. Precision and accuracy results of compounds hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin and kaempferol (n=3)

Compound	Concentration (µg/ml)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Mean±SD (µg/ml)	RSD(%)	Accuracy(%)	Mean±SD (µg/ml)	RSD(%)	Accuracy(%)
Hyperoside	15	14.58±0.18	1.22	97.23	14.16±0.19	1.31	94.39
	45	49.58±0.38	0.76	110.18	51.51±0.89	1.74	114.47
	150	153.79±2.34	1.52	102.53	167.25±0.91	0.55	111.50
Astragalín	15	14.91±0.09	0.60	99.42	14.27±0.31	2.16	95.15
	45	47.45±0.29	0.61	105.44	49.53±1.44	2.92	110.07
	150	151.43±4.08	2.70	100.95	167.93±3.85	2.29	111.96
Trifolin	15	15.19±0.19	1.23	101.26	14.61±0.35	2.43	97.43
	45	47.15±0.28	0.59	104.77	49.78±1.47	2.96	110.61
	150	152.57±2.74	1.79	101.71	168.85±4.05	2.40	112.57
Quercetin	15	15.13±0.09	0.57	100.86	16.40±0.08	0.49	109.34
	45	44.13±0.21	0.47	98.08	46.72±0.03	0.06	103.82
	150	152.02±2.52	1.66	101.35	157.86±1.12	0.71	105.24
Kaempferol	15	15.28±0.10	0.66	101.86	16.04±0.35	2.18	106.93
	45	44.05±0.34	0.76	97.88	46.87±0.19	0.40	104.15
	150	151.08±2.52	1.66	100.72	157.94±1.00	0.63	105.29

Table IV. The contents of hyperoside, trifolin, astragalín, quercetin and kaempferol in the leaves of *D. kaki* ethanol extract samples (n=3)

Sample	Contents (%w/w)				
	Hyperoside	Astragalín	Trifolin	Quercetin	Kaempferol
EtOH extract	1.30±0.09	0.81±0.06	1.58±0.07	0.13±0.02	1.33±0.25

inter-day는 hyperoside가 94.39~114.47%, astragalín이 95.15~111.96%, trifolin이 97.43~112.57%, quercetin이 103.82~109.34%, kaempferol이 104.15~106.93%의 범위를 나타냈다(Table III). 본 연구에서 HPLC-UV를 이용한 분석법을 바탕으로 감나무 잎으로부터 분리한 5가지 지표물질들을 분리

하여 함량을 분석하였다. 그 결과 hyperoside는 1.30±0.09%, astragalín은 0.81±0.06%, trifolin은 1.58±0.07%, quercetin은 0.13±0.02%, kaempferol은 1.33±0.25%로 확인되었다(Table IV).

본 연구에서는 감나무 잎의 ethanol 추출물로부터 NMR

과 LC/MS 분석을 통해 hyperoside, astragalín, trifolin, quercetin, kaempferol 5종의 플라보노이드를 구조동정 하였으며, 검증된 분석법을 통해 정량분석 하였다. 결과적으로, 향후 감나무 잎의 성분과 관련된 기초연구자료의 기반이 될 수 있을 것이라 생각된다.

인용문헌

- Kim, J. H., Park, Y. J., Jo, N. S., Kim, D. K., Kim, S. H. and Shin, T. Y. (2014) Acute oral toxicity of the bark of *Diospyros kaki* in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 181-185.
- Chen, G., Xue, J., Xu, S. X. and Zhang, R. Q. (2007) Chemical constituents of the leaves of *Diospyros kaki* and their cytotoxic effects. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **9**: 347-353.
- Hossain, A., Moon, H. K. and Kim, J. K. (2018) Antioxidant properties of Korean major persimmon (*Diospyros kaki*) leaves. *Food Sci. Biotechnol.* **27**: 177-184.
- Xie, C., Xie, Z., Xu, X. and Yang, D. (2015) Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *J. Ethnopharmacol.* **163**: 229-240.
- Funayama, S. and Hikino, H. (1979) Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **27**: 2865-2868.
- Hwang, Y. H., Ha, H. I., Kim, R. J., Cho, C. W., Song, Y. R., Hong, H. D. and Kim, T. S. (2018) Anti-osteoporotic effects of polysaccharides isolated from persimmon leaves via osteoclastogenesis inhibition. *Nutrients* **10**: 901.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food chem.* **89**: 569-575.
- Attar, A. and Yapaoz, M. A. (2018) Biosynthesis of palladium nanoparticles using *Diospyros kaki* leaf extract and determination of antibacterial efficacy. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **48**: 629-634.
- Sun, L., Yu, D., Wu, Z., Wang, C., Yu, L., Wei, A. and Wang, D. (2019) Comparative transcriptome analysis and expression of genes reveal the biosynthesis and accumulation patterns of key flavonoids in different varieties of *Zanthoxylum bungeanum* leaves. *Food Chem.* **67**: 13258-13268.
- Shang, Y. Y., Ma, Y. J., Zhang, L., Wang, L. J., Wu, X. F. and Liu, X. P. (2018) Flavonoids extracted from leaves of *Diospyros kaki* regulates RhoA activity to rescue synapse loss and reverse memory impairment in APP/PS1 mice. *Neuroreport.* **29**: 564-569.
- Kwon, S. H., Lee, S. R., Park, Y. J., Ra, M. J., Lee, Y. J., Pang, C. H. and Kim, K. H. (2019) Suppression of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by hyperoside via activation of Nrf2/HO-1 signaling in dopaminergic neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 5832.
- Fan, H. H., Zhu, L. B., Li, T., Zhu, H., Wang, Y. N., Hu, B. L., Huang, C. P., Zhu, J. H. and Zhang, X. (2017) Hyperoside inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells via p38 and NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* **50**: 14-21.
- Kim, Y. H., Choi, Y. J., Kang, M. K., Park, S. H., Antika, L. D., Lee, E. J., Kim, D. Y. and Kang, Y. H. (2017) Astragalín inhibits allergic inflammation and airway thickening in ovalbumin-challenged mice. *Food Chem.* **65**: 836-845.
- Li, F., Liang D., Yang, Z., Wang, T., Wang, W., Song, X. Guo, M., Zhou, E., Li, D., Cao, Y. and Zhang, N. (2013) Astragalín suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model. *Int. Immunopharmacol.* **17**: 478-482.
- Vásquez-Espinal, A., Yañez, O., Osorio, E., Areche, C., García-Beltrán, O., Ruiz, L. M., Cassels, B. K. and Tiznado, W. (2019) Theoretical study of the antioxidant activity of quercetin oxidation products. *Front. Chem.* **7**: 818.
- Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L. and Xiong, L. (2019) Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264.7 cells: in vitro assessment and a theoretical model. *Biomed. Res. Int.* **2019**: 1-8.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S. and Arora, S. (2008) Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Toxicol. In Vitro* **22**: 1965-1970.
- Chen, X., Qian, J., Wang, L., Li, J., Zhao, Y., Han, J., Khan, Z., Chen, X., Wang, J. and Liang, G. (2018) Kaempferol attenuates hyperglycemia-induced cardiac injuries by inhibiting inflammatory responses and oxidative stress. *Endocrine* **60**: 83-94.
- Boukes, G. J. and van de Venter, M. (2016) The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* **83**: 617-626.
- Guo, W., Yu, H., Zhang, L., Chen, X., Liu, Y., Wang, Y. and Zhang, Y. (2019) Effect of hyperoside on cervical cancer cells and transcriptome analysis of differentially expressed genes. *Cancer Cell Int.* **19**: 235.
- Kim, M. J., Kwon, S. B., Kim, M. S., Jin, S. W., Ryu, H. W., Oh, S. R. and Yoon, D. Y. (2016) Trifolin induces apoptosis via extrinsic and intrinsic pathways in the NCI-H460 human non-small cell lung-cancer cell line. *Phytomedicine* **23**: 998-1004.
- Zhang, J., Yin, J., Zhao, D., Wang, C., Zhang, Y., Wang, Y. and Li, T. (2019) Therapeutic effect and mechanism of action of quercetin in a rat model of osteoarthritis. *J. Int. Med. Res.* **0**: 1-9.
- Cao, H., Jia, Q., Yan, L., Chen, C., Xing, S. and Shen, D. (2019) Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced raw264.7 macrophage foam cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 6093.

24. Oh, H. A., Han, N. R., Kim, M. J., Kim, H. M. and Jeong, H. J. (2013) Evaluation of the effect of kaempferol in a murine allergic rhinitis model. *Eur. J. Pharmacol.* **718**: 48-56.
25. Hoang, M. H., Jia, Y., Lee, J. H., Kim, Y. J. and Lee, S. J. (2019) Kaempferol reduces hepatic triglyceride accumulation by inhibiting Akt. *J. Food Biochem.* **43**: 13034.
26. Huang, S. W., Wang, W., Zhang, M. Y., Liu, Q. B., Luo, S. Y., Peng, Y., Sun, B., Wu, D. L. and Song, S. J. (2016) The effect of ethyl acetate extract from persimmon leaves on Alzheimer's disease and its underlying mechanism. *Phytomedicine* **23**: 694-704.
27. Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C. and Hennebelle, T. (2013) Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2013**: 1-11.
28. Fatemeh, G. H. and Masoud, S. D. (2017) Isolation and identification of astragaloside and 2-methoxy tyrosol from the bulbs of *Allium paradoxum*. *J. Herbm. Pharmacol.* **6**: 114-118.
29. Lavoie, S., Côté, I., Pichette, A., Gauthier, C., Ouellet, M., Nagau-Lavoie, F., Mshvildadze, V. and Legault, J. (2017) Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of extracts from *Cornus canadensis*. *BMC Complement Altern. Med.* **17**: 123.
30. Roh, H. J., Noh, H. J., Na, C. S., Kim, C. S., Kim, K. H., Hong, C. Y. and Lee, K. R. (2015) Phenolic compounds from the leaves of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. and their whitening activities. *Biomol. Ther.* **23**: 283-289.
31. Luyen, B. T. T., Thao, N. P., Tai, B. H., Dat, L. D., Kim, J. E., Yang, S. Y., Kwon, S. U., Lee, Y. M. and Y. H. (2015) Soluble epoxide hydrolase inhibitory activity from *Euphorbia supina* rafin. *Nat. Prod.* **21**: 176-184.

(2020. 5. 15 접수; 2020. 6. 6 심사; 2020. 6. 12 게재확정)