



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 8월

박사학위 논문

질량분석기를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 성분 프로파일 분석

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 경 인

질량분석기를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 성분 프로파일 분석

Compound profile analysis of *Dendropanax morbifera*
leaf extracts using tandem mass spectrometer

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 과학 과

이 경 인

질량분석기를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 성분 프로파일 분석

지도교수 최 철 희

이 논문을 이학 박사학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 경 인

이경인의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 성 철 (인)

위 원 동신대학교 교수 표 병 식 (인)

위 원 조선대학교 부교수 최 철 응 (인)

위 원 목포대학교 교수 김 현 정 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 철 희 (인)

2023년 6월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables	I
List of Figures	II
ABBREVIATIONS	V
ABSTRACT	VI

제1장 황칠나무 잎 추출물의 radical 소거 활성 성분 분석

1.1 서론	1
1.1.1 황칠나무(<i>Dendropanax morbifera</i> Lev.)	1
1.1.2 항산화 활성	2
1.1.3 액체크로마토그래피 활용 radical 소거능 측정	3
1.1.4 Radical 소거 활성 성분의 질량분석	3
1.2 재료 및 방법	5
1.2.1 황칠나무 잎 추출물	5
1.2.2 시약 및 표준품	5
1.2.3 분석 기기	5
1.2.4 Online LC-DPPH radical 소거능 측정 system	6
1.2.5 Radical 소거 활성 성분의 MS 분석	6
1.3 결과 및 고찰	8

1.3.1 Online LC-DPPH radical 소거능	8
1.3.2 주요 활성 peak의 LC-MS/MS 분석 조건 설정	11
1.3.3 LC-MS/MS 활용 radical 소거 활성 성분 분석	28
1.4 결론	33
참고문헌	34
제2장 LC-MS/MS를 활용한 황칠나무 잎 추출물의	
성분 profile 분석	49
2.1 서론	49
2.1.1 황칠나무 잎의 활성 성분	49
2.1.2 성분 profile 분석의 활용	51
2.1.3 Tandem mass spectrometer	51
2.2 재료 및 방법	53
2.2.1 황칠나무 잎 추출물	53
2.2.2 시약 및 표준품	53
2.2.3 분석 기기	53
2.2.4 성분 profile 분석	54
2.3 결과 및 고찰	55
2.3.1 LC-UVD를 활용한 일반 성분 profile 분석 결과	55
2.3.2 질량분석기를 활용한 profile 분석 대상 성분 확인	60
2.3.3 LC-MS/MS MRM mode 성분 profile 분석 조건 설정 ...	87

2.3.4 LC-MS/MS 활용 성분 profile 비교 분석 결과	94
2.4 결론	105
참고문헌	106
제3장 GC-MS/MS를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 지용성 성분 분석	123
3.1 서론	123
3.1.1 지용성 성분의 특성 및 분석	123
3.1.2 기체크로마토그래피-질량분석기의 활용	125
3.2 재료 및 방법	126
3.2.1 황칠나무 잎 지용성 추출물	126
3.2.2 시약 및 표준품	126
3.2.3 분석 기기	126
3.2.4 Scan 및 MRM mode GC-MS/MS 분석	127
3.3 결과 및 고찰	128
3.3.1 GC-MS를 활용한 황칠나무 잎 지용성 추출물 분석	128
3.3.2 GC-MS/MS 활용 triterpenoid 분석	139
3.4 결론	143
참고문헌	144

List of Tables

Table 1-1. Compound information of radical scavenging active peaks of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	10
Table 1-2. MRM conditions of radical scavenging active compounds of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	31
Table 2-1. Compound profile peak data of LC-UVD chromatogram of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	57
Table 2-2. Assignment of identified compounds in LC-MS/MS chromatograms of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	64
Table 2-3. MRM conditions for compound profile analysis of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	88
Table 2-4. Comparative analysis of MRM mode LC-MS profile of plant leaf extracts	100
Table 3-1. Compound information of lipophilic compounds of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	130
Table 3-2. GC-MS analysis results of lipophilic compounds of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	138
Table 3-3. MRM conditions of triterpenoid compounds of <i>D. morbifera</i> leaf extracts	141

List of Figures

Figure 1-1. <i>D. morbifera</i> tree and leaves	1
Figure 1-2. Scheme of general tandem mass spectrometer system	4
Figure 1-3. Scheme of online LC-DPPH radical scavenging ability measurement system	7
Figure 1-4. LC-MS profiles and radical scavenging effects obtained from <i>D. morbifera</i> leaf extracts	9
Figure 1-5. LC-MS/MS analysis results of the major active peak a	13
Figure 1-6. LC-MS/MS analysis results of the major active peak b	14
Figure 1-7. LC-MS/MS analysis results of the major active peak c	15
Figure 1-8. LC-MS/MS analysis results of the major active peak d	17
Figure 1-9. LC-MS/MS analysis results of the major active peak e	18
Figure 1-10. LC-MS/MS analysis results of the major active peak f	19
Figure 1-11. LC-MS/MS analysis results of the major active peak g	21
Figure 1-12. LC-MS/MS analysis results of the major active peak h	22
Figure 1-13. LC-MS/MS analysis results of the major active peak i	23
Figure 1-14. LC-MS/MS analysis results of the major active peak j	25
Figure 1-15. LC-MS/MS analysis results of the major active peak k	26
Figure 1-16. LC-MS/MS analysis results of the major active peak l	27
Figure 1-17. MRM condition setting process of MS/MS	29

Figure 1-18. Example of MRM condition setting process 30

Figure 1-19. MRM mode LC-MS/MS chromatogram of major active compounds of *D. morbifera* leaf extracts 32

Figure 2-1. Chemical structure of typical compounds present in leaves of *D. morbifera* 50

Figure 2-2. UV detector chromatogram of *D. morbifera* leaf extracts 56

Figure 2-3. ESI mode total ion chromatogram of *D. morbifera* leaf extracts 61

Figure 2-4. Scan data review for molecular weight determination 63

Figure 2-5. Structures of apigenin derivatives 72

Figure 2-6. Estimable structures of unidentified apigenin derivatives 75

Figure 2-7. Structures of caffeic acid derivatives 77

Figure 2-8. Structures of quercetin derivatives 78

Figure 2-9. Structures of other flavonoid 80

Figure 2-10. Structures of triterpenoids 82

Figure 2-11. Structures of other identified compounds 84

Figure 2-12. Comparison of results by compound profile analysis method of *D. morbifera* leaf extracts 93

Figure 2-13. Comparison of LC-MS/MS MRM mode analysis results of plant leaf extracts 95

Figure 3-1. Analytical compounds for LC-MS and GC-MS 124

Figure 3-2. GC-MS total ion chromatogram of *D. morbifera* leaf extract 129

Figure 3-3. Product ion scan process for setting MRM mode conditions of
GC-MS/MS 140

Figure 3-4. MRM mode GC-MS/MS chromatogram of triterpenoid compounds
of *D. morbifera* leaf extracts 142

ABBREVIATIONS

CE : Collision energy

DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

ESI : Electro-spray ionization

FooDB : Compound database of <http://foodb.ca>

GC : Gas chromatograph

LC : Liquid chromatograph

LMSD : Lipidmaps structure database of <http://lipidmaps.org>

m/z : Mass to charge

MRM : Multiple reaction monitoring

MS : Mass spectrometer

RT : Retention time

SIM : Selected ion monitoring

STD : Standard materials

UVD : Ultraviolet detector

ABSTRACT

Compound profile analysis of *Dendropanax morbifera* leaf extracts using tandem mass spectrometer

Kyoun-In Lee

Advisor: Prof. Cheol-Hee Choi MD/PhD

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Chosun University

Compound profile is a kind of quantitative analysis method that uses a liquid chromatograph (LC) equipped with an ultraviolet detector (UVD) to manage the peak pattern of a chromatogram obtained as a result of analyzing a plant extract. It has been used for the purpose of quality control of herbal medicines for which index compounds have not been established. The information that can be confirmed as a result of the compound profile is limited and is not suitable for qualitative analysis. Additional information such as the molecular weight of each peak can be obtained by using LC-mass spectrometer (MS) applied to the compound profile analysis, and information that can be used to estimate the molecular structure can be obtained through LC-MS/MS analysis.

About 20 kinds of active compounds present in *Dendropanax morbifera* leaves, which are known to have various physiological activities, have been reported through various studies. However, these compounds have not been analyzed at the same time, and information on their compounds is still insufficient compared to the number of compounds actually present in *D. morbifera* leaves. In this study, the MS compound profile of the compounds present in the leaf extract of *D. morbifera* was prepared using LC-MS to compensate for the disadvantages of the compound profile using LC-UVD.

First, the online LC-DPPH radical scavenging activity was measured to prepare the antioxidant activity compound profile present in the leaf extract of

D. morbifera. Based on the retention time of the active compound peak identified as the measurement result, LC-MS and MS/MS analysis were performed. Qualitative analysis of the active peak was conducted through MS data review of various literatures and standard compound analysis. Twelve radical scavenging active compound peaks were identified as 5-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid), 3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid), orientin, hesperidin, hyperoside, rutin, isoquercitrin, azelaic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid A), 3,4-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid B), caffeic acid dimer.

In the MS compound profile analysis of the leaf extract of *D. morbifera*, which was additionally conducted, 95 compounds were reviewed. The compounds identified as having the highest number in the MS compound profile were ones containing apigenin as an aglycone, and there were a total of 19 apigenin derivative compounds whose structures could be confirmed or estimated. In addition, 6 caffeic acid derivatives, including caffeic acid and chlorogenic acid, were identified, and 5 quercetin-related compounds, including quercetin and its derivatives, were identified in the MS compound profile. Flavonoids such as hesperidin and naringin and various phenolic acid structure compounds were identified, and 8 types of hydroxy fatty acid structure compounds were identified. In order to be used in the study of the activity of *D. morbifera* leaves, the main physiological activity fields being studied for each compound were additionally confirmed through literature review.

LC-MS/MS analysis conditions of multiple reaction monitoring (MRM) mode were set for selective analysis of radical scavenging active compounds and MS compound profile. As a result of MRM mode analysis of the compounds of the leaf extract of *D. morbifera*, clear and precise results were obtained compared to the general LC-UVD compound profile analysis. In a comparative analysis with 11 leaf extracts of other plants, 28 compounds specifically identified in *D. morbifera* leaf extract were identified.

In general, it is known that gas chromatograph (GC) analysis is more advantageous than LC analysis for lipophilic compounds. In addition, using the

library search tool of GC-MS has the advantage of being able to perform qualitative analysis without standard compound analysis. As a result of the scan mode analysis of GC-MS of the lipophilic extract of *D. morbifera* leaf, 20 peaks were detected. MS spectra of each peak were identified by library search, and 17 compounds except for 3 peaks were identified. Dendropanoxide was identified as the compound expected to have the highest content, and the contents of β -amyrin and α -amyrin were also relatively high. There were a number of triterpenoid-related compounds known to have various physiological activities, and MRM analysis conditions of GC-MS/MS were set for the compounds.

Through this study, the existence of a number of active-related compounds that had not been identified in studies related to *D. morbifera* leaves was confirmed. In addition, the MS compound profile analysis method used in the study is useful for studying plant extracts in which numerous compounds are mixed, and the set MRM mode analysis conditions can also be used for studying the compounds of other plant extracts.

제1장 황칠나무 잎 추출물의 radical 소거 활성 성분 분석

1.1 서론

1.1.1 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)

황칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)는 우리나라를 포함하여 동남아시아 등에 약 30여 종이 분포하고 있는 두릅나무과에 속하는 아열대성 상록활엽교목이며, 우리나라에서는 기후가 비교적 온난한 전라남도과 경상남도의 해안 지역과 제주도 등에서 자생 및 재배되고 있다.^{1,2)}



Figure 1-1. *D. morbifera* tree and leaves.

황칠나무와 관련하여 가장 빈번하게 연구되고 있는 부위인 잎의 생리활성으로서 여러 식물 소재에서 일반적으로 다뤄지고 있는 항산화 활성이 있으며,³⁻¹⁰⁾ 암세포에 대한 증식 억제 등 항암 관련 활성을 가지는 것으로 보고 되고 있다.^{9,11-17)} 인지장애나 기억력 개선 등 뇌 기능 관련 활성과¹⁸⁻²⁴⁾ 뇌신경세포 보호 효과에 대한 보고 또한 꾸준히 이루어지고 있다.²⁵⁻³⁰⁾ 다양한 형태의 항염증 활성과^{4,31-37)} 항당뇨 관

려는 활성을 나타내는 것으로 확인 되었으며,^{1,38-41)} 알코올 대사 및 숙취 해소와 함께 간 기능 관련 연구도 진행 되었다.^{6,10,42-48)} 콜레스테롤 억제나 고지혈증 개선과 함께⁵⁰⁻⁵⁴⁾ 항혈전 및 고혈압 개선에 대한 효과,^{55,56)} 그리고 심근세포 보호 활성을 나타내는 것으로 보고되기도 하였다.^{57,58)} 미백이나 보습 등 피부 관련 활성과^{7,59-61)} 아토피와 같은 피부질환 개선 효과가 있으며,^{62,63)} 탈모방지 및 육모 관련 연구도 이루어졌다.^{60,64)} 또한 항균이나 면역 관련 활성과^{4,65-67)} 항통풍 효과,^{68,69)} 신장 보호 효과 연구도 보고 되었다.^{70,71)} 이 밖에도 항노화 활성이나³⁾ 여성 갱년기 증상 개선,⁷²⁾ 항과골세포 생성 및 골다공증 개선,^{73,74)} 그리고 위암 등의 원인이 될 수 있는 *Helicobacter pylori*에 의한 위상피세포의 interleukin-8 및 혈관내피성장인자 생성 억제 효과⁴⁹⁾ 등이 알려져 있다. 이와 같이 다양한 생리활성을 나타내는 황칠나무 잎은 뿌리 및 줄기 부위와 함께 식품 원료로서 사용이 가능하여 관련된 기능성 제품의 개발에 활용도가 높은 소재라고 할 수 있다.²⁵⁾

1.1.2 항산화 활성

항산화 활성은 여러 가지 생리활성 중에서도 항균 활성이나 피부 미백, 항염증 활성 등 다양한 생리활성과 관련성이 높은 것으로 알려져 있으므로 다양한 천연물 관련 연구에서 기본적으로 다루지고 있다.⁷⁵⁻⁷⁸⁾ 여러 항산화 활성 연구에는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 제어에 대한 내용을 포함하고 있으며, 이러한 ROS에는 hydroxyl radical, superoxide anion 등의 free radicals 들이 있다. ROS의 작용으로 나타나는 다양한 결과물들은 피부노화나 염증반응, 암 등의 각종 질환을 일으키는 원인이 되기도 한다.⁷⁹⁻⁸¹⁾ ROS에 대응하기 위한 항산화제로서 butylated hydroxytoluene (BHT)나 butylated hydroxyanisole (BHA)와 같은 합성 항산화제가 식품첨가물 등으로 상업적으로 많이 사용되고 있으나 최근에는 식물 추출물과 같은 천연물로부터 항산화 활성을 가지는 소재를 찾기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.^{82,83)}

1.1.3 액체크로마토그래피 활용 radical 소거능 측정

항산화 활성을 측정하는 다양한 방법 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능은 비교적 단시간에 측정이 가능하며, 비타민 C (ascorbic acid)와 같은 대조군을 이용하여 결과의 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 식물 추출물 시료의 항산화 활성 측정에 가장 일반적으로 활용되고 있다.⁸⁴⁻⁸⁶⁾ 일반적으로 spectrophotometer나 micro-plate reader와 같은 분광학적 장비를 이용하는 DPPH radical 소거능 측정 실험법에서는 수십~수백 μM 농도의 DPPH radical 용액을 사용하여 시료 용액과 일정 비율로 혼합하여 일정 시간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 최종 소거능을 산출한다. 이때 시료가 추출물이나 분획물 등 여러 성분이 혼합된 형태일 경우 특정 성분의 활성이라기보다는 다양한 성분의 병합적인 효과인 경우가 대부분이며, 활성을 가지는 성분의 함량이 낮을 경우 활성 자체가 미약하게 나타나게 됨으로써 활성 성분의 존재가 무시될 가능성도 있다.⁸⁷⁾

한편, 액체크로마토그래프(liquid chromatograph; LC)를 이용하여 추출물의 성분을 최대한 분리시킨 후 항산화 활성을 측정하기 위한 radical 용액과 반응시킬 수 있다면 분리된 물질의 개별적인 radical 소거 활성을 측정할 수 있게 된다. 특히, DPPH radical과 같이 LC의 이동상으로 적용될 수 있는 methanol을 용매로 사용하는 측정의 경우 다른 활성에 비해 비교적 용이하게 online LC-DPPH radical 소거능 측정 시스템을 구축할 수 있다. 최근 들어 LC 분석 장비를 기반으로 한 시스템을 실시간 물질 분리 및 항산화 활성 연구가 다양한 시료를 대상으로 국내외에서 진행되고 있다.⁸⁷⁻⁸⁹⁾

1.1.4 Radical 소거 활성 성분의 질량분석

일반적으로 식물 추출물 등 천연물 연구에 가장 많이 활용되는 분석 장비인 LC는 분석 대상 성분의 표준품 확보가 필수적이며, 동일한 분석 조건 내에서 머무름 시간이나 peak 형태 등이 일치하는지가 정성분석의 기준이 된다. 그러나 식물 추출물은 최소 수 백가지 이상의 성분이 혼합된 형태이므로 분석을 수행하기 전에 모

든 성분에 대한 정성분석의 완료나 표준품의 확보는 현실적으로 불가능하다. 이러한 부분을 보완할 수 있는 분석장비인 질량분석기(mass spectrometer; MS)는 일반적인 LC 조건에서 분리된 미지의 성분에 대한 분자량이나 구조를 추정할 수 있는 data를 확보할 수 있으며, 이를 활용하여 식물 추출물 성분 연구에서 기초적인 정성분석에 유용하게 활용될 수 있다.⁸⁰⁾ MS 장비 중에서도 Figure 1-2와 같이 triple quadrupole 구조를 가지고 있으므로 tandem MS로 불리는 MS/MS는 일반적인 MS에서 수행될 수 있는 scan 및 selected ion monitoring (SIM) mode 분석과 함께 특정한 모분자(precursor ion)로부터 생성되는 특정한 조각 이온(product ion)을 선택적으로 검출하는 multiple reaction monitoring (MRM) 또는 selected reaction monitoring (SRM) mode 분석이 가능한 질량분석 장비이다.⁸¹⁾

Online LC-DPPH radical 소거능 측정 결과로 확인된 활성 성분 peak의 머무름 시간을 기준으로 DPPH radical 용액의 공급을 정지한 상태에서 동일한 LC 분리 조건을 적용한 MS 분석을 실시하면 각 활성 peak에 대한 분자량 정보를 확인할 수 있다. 확인된 모분자량을 기준으로 precursor ion을 고정한 후 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시함으로써 해당 성분의 분자 구조를 추정할 수 있는 조각난 ion (fragment ion 또는 product ion)들을 검출한 data를 확보할 수 있다. 분석 결과로 얻은 모분자와 조각 ion들 정보와 함께 기존 연구들에서 확인된 성분 정보 등을 종합적으로 검토하여 기초적인 정성분석 결과를 도출할 수 있게 되며, 해당 성분들에 대한 선택적 분석을 위한 MRM 조건의 설정도 가능하다.

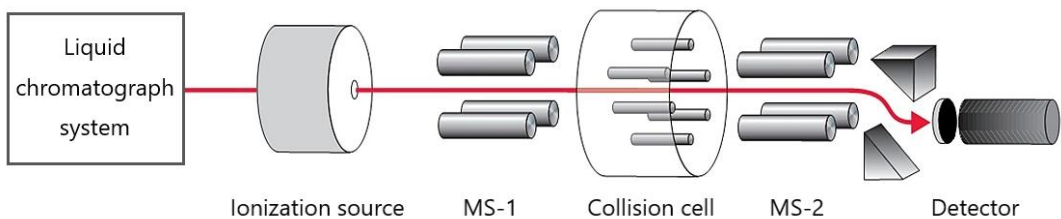


Figure 1-2. Scheme of general tandem mass spectrometer system.

1.2 재료 및 방법

1.2.1 황칠나무 잎 추출물

Radical 소거능 측정을 위한 황칠나무 잎 추출물은 사전 연구를 통해 가장 항산화 활성이 우수한 것으로 확인된 methanol 추출을 기준으로 제조하였다. 건조 후 blender를 사용하여 직경 3 mm 이하로 잘게 분쇄한 황칠나무 잎 50 g에 methanol 500 mL를 혼합한 후 180 rpm의 진탕기에서 3 일간 추출을 실시하였다. 추출액은 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 측정 및 분석용 시료로 사용하였다.

1.2.2 시약 및 표준품

분리 및 분석을 위한 이동상 용매는 LC grade의 water와 methanol을 사용하였으며, 시료 추출은 99% methanol을 사용하였다. DPPH는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 분석 방법 적정성 검토 및 정성 분석을 위한 표준품으로서 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, rutin, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

1.2.3 분석 기기

황칠나무 잎 추출물에 존재하는 항산화 활성 성분을 분석하기 위하여 LC-30A (Shimadzu, Kyoto, Japan) 액체크로마토그래피와 연동된 LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 삼중 사중극자 질량분석기(triple quadrupole mass spectrometer)를 사용하였다. Radical 용액을 공급하기 위해 추가로 LC-20AD pump (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 설치하여 시스템을 구성하였으며, 분리용 column으로는 Kinetex C18 (2.1 mm \times 150 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였

다. Radical 소거능 측정을 위한 검출기로서 SPD-10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

1.2.4 Online LC-DPPH radical 소거능 측정 system

DPPH radical 용액 조제 시 기본적으로 methanol과 같은 알코올 용매를 사용하는 특성을 반영하여 분석용 이동상은 0.1% formic acid (A)와 methanol (B)을 사용하였으며, 유속은 0.25 mL/min으로 유지하였다. 이동상은 초기 5 분까지 2% B, 5 분에서 60 분까지 40% B가 되도록 하였고, 60 분에서 105 분까지 100% B가 되도록 하여 111 분까지 유지한 후 다시 2% B로 낮춰서 120 분간 측정하였다. 시료 주입량은 10 μ L, column oven은 40 $^{\circ}$ C를 유지하였으며, column 분리 단계 이후에 DPPH radical 용액을 공급하기 위한 pump를 추가하였다. 전체적인 시스템의 구성은 Figure 1-3과 같이 구성되었으며, column에서 분리된 시료액과 radical 용액이 혼합된 이후 radical 소거 반응을 위한 reaction tubing을 1 m 길이로 추가하였다. DPPH radical 용액은 methanol에 50 μ M 농도로 용해시킨 후 차광용기에 보관하면서 사용하였으며, 유속은 0.15 mL/min으로 유지하면서 검출기 파장은 517 nm로 설정하였다. 소거 활성 성분과 radical 용액이 반응하여 흡광도가 낮아지는 DPPH radical 소거 반응 특성을 반영하여 검출기의 극성(polarity)을 negative mode로 설정하였다.

1.2.5 Radical 소거 활성 성분의 MS 분석

Figure 2-1에 제시한 측정 시스템 중 DPPH radical 용액의 공급을 정지한 상태에서 동일한 LC 분리 조건을 적용하여 각 활성 peak 머무름 시간을 기준으로 질량분석을 실시하였다. 활성 성분의 질량분석의 이온화 방식은 가장 일반적으로 사용되고 있는 electro-spray ionization (ESI) mode를 사용하였다. Collision-induced dissociation gas로서 99.999% argon을 270 kPa의 압력으로 공급하였으며, nebulizing gas, drying gas, 그리고 heating gas는 각각 3 ℓ /min, 10 ℓ /min, 10

l/min 의 유속으로 공급하였다. Interface와 desolvation line, 그리고 heat block 온도는 각각 $300^{\circ}C$, $250^{\circ}C$, $350^{\circ}C$ 로 설정하였으며, scan 범위는 $100\sim 1,000 m/z$ 를 적용하였다. Positive와 negative mode에서 total ion scan을 실시한 후 확인된 ion spectrum을 바탕으로 모분자량을 검토하였다.

Precursor ion과 product ion 확인 분석 결과를 바탕으로 radical 소거 활성 성분의 신속하고 정확한 분석을 위한 multiple reaction monitoring (MRM) mode 분석에는 동일한 이동상과 유속을 적용하였으며, 초기 5분까지 2% B, 5분에서 60분까지 40% B가 되도록 하였고, 60분에서 65분까지 100% B가 되도록 하여 71분까지 유지한 후 다시 2% B로 낮춰서 80 분간 분석을 실시하였다. 시료 주입량은 $1 \mu l$ 로 설정하였다.

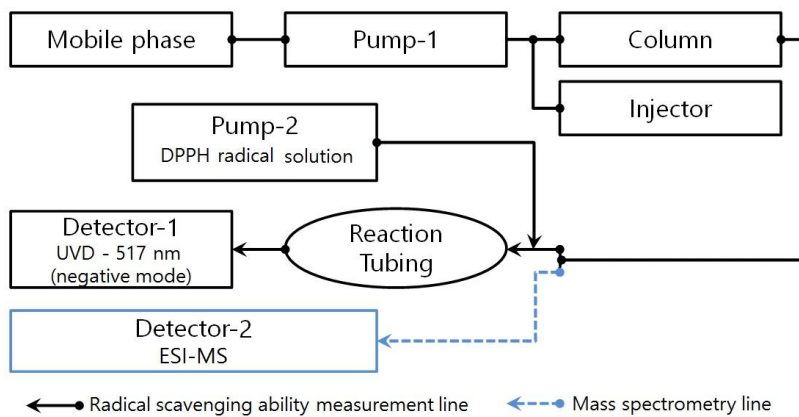


Figure 1-3. Scheme of online LC-DPPH radical scavenging ability measurement system.

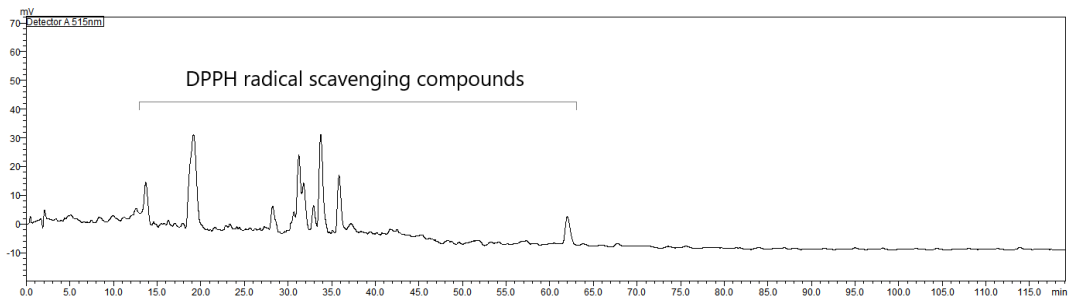
1.3 결과 및 고찰

1.3.1 Online LC-DPPH radical 소거능

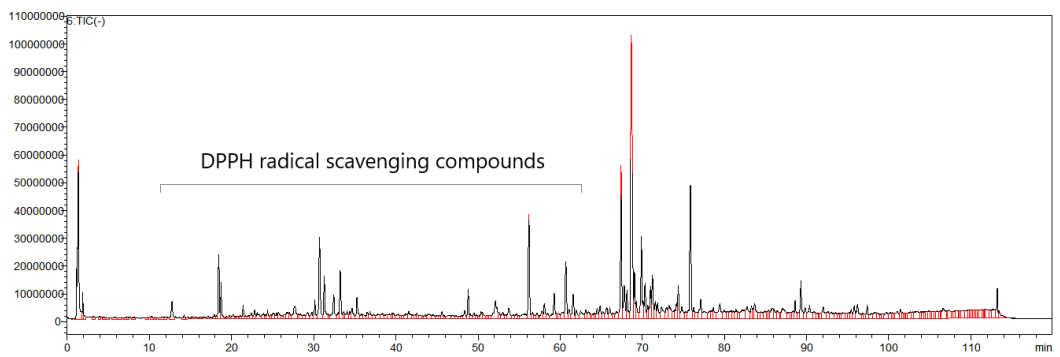
황칠나무 잎 추출물을 대상으로 Figure 1-3과 같은 시스템을 활용한 online LC-DPPH radical 소거능을 측정한 결과에서 Figure 1-4와 같이 다수의 radical 소거 활성 peak를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 활용된 측정 시스템의 결과에서 peak를 나타낸 것은 해당 머무름 시간에 radical 소거 활성을 가지는 성분이 분리되어 나왔음을 의미하며, peak의 면적이 클수록 radical 소거 활성이 상대적으로 강한 성분이거나 함량이 높을 수 있음을 의미한다.

동일한 LC 분리조건을 적용하여 실시한 MS 분석에서 확인된 peak의 머무름 시간과 Figure 1-4에 제시된 결과에서 DPPH radical 소거 활성을 나타낸 peak의 머무름 시간을 대조하여 Table 1-1에 제시한 이온화 특성을 가지는 12 종의 활성 성분을 확인하였다.

[A]



[B]



[C]

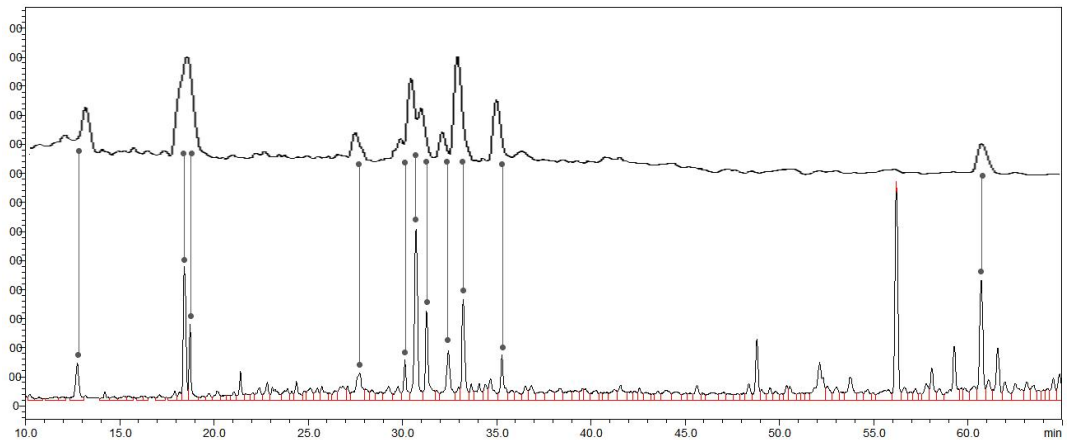


Figure 1-4. LC-MS profiles and radical scavenging effects obtained from *D. morbifera* leaf extracts. A; DPPH radical scavenging effect, B; negative mode LC-MS scan profile, C; peak conformation of active compounds.

Table 1-1. Compound information of radical scavenging active peaks of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Retention time (min)	positive mode (<i>m/z</i>)	negative mode (<i>m/z</i>)
a	12.75	355.1(+H) 377.1(+Na)	353.1(-H)
b	18.43	355.1(+H) 377.1(+Na)	353.1(-H)
c	18.72	355.1(+H) 377.1(+Na)	353.1(-H)
d	27.62	449.1(+H)	447.1(-H)
e	30.13	611.1(+H) 633.1(+Na)	609.1(-H)
f	30.67	465.1(+H) 487.1(+Na)	463.1(-H)
g	30.75	611.1(+H) 633.1(+Na)	609.1(-H)
h	31.29	465.1(+H) 487.1(+Na)	463.1(-H)
i	32.44	-	187.1(-H)
j	33.23	517.1(+H) 539.1(+Na)	515.1(-H)
k	35.37	517.1(+H) 539.1(+Na)	515.1(-H)
l	60.70	359.1(+H) 381.1(+Na)	357.1(-H)

1.3.2 주요 활성 peak의 LC-MS/MS 분석 조건 설정

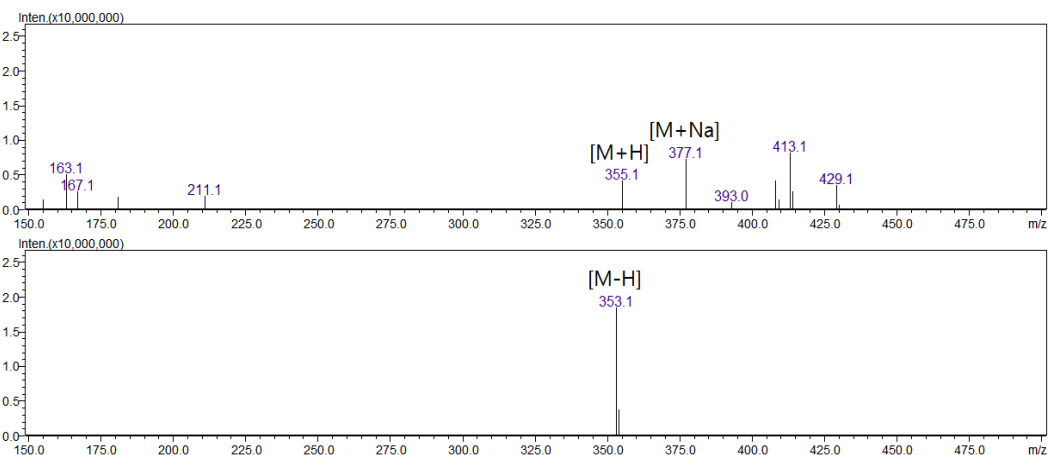
ESI 이온화 장치를 기반으로 하는 질량분석기에서는 Table 1-1에 제시한 것과 같이 positive mode에서 나타나는 모분자량 패턴인 $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ 와 negative mode에서 나타나는 모분자의 형태 $[M-H]^-$ 를 상호 대조하여 모분자량을 추정할 수 있게 된다. 일반적으로 열수나 에탄올 추출물처럼 다른 용매에 비해 극성도가 높은 식물 추출물 중에 존재하는 radical 소거 활성 성분은 phenolic acid 계열의 분자처럼 구조 내에 hydroxyl group (-OH)을 포함하는 경우가 많아서 negative mode 질량분석 결과에서 positive mode보다 단순한 모분자량 패턴을 가진다.^{75,90)}

Table 1-1에 제시된 각 활성 peak의 모분자량을 정보를 기준으로 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시하였다. 황칠나무 잎 추출물의 성분 profile 분석 조건 설정과 마찬가지로 확인된 모분자량을 기준으로 negative mode에서 precursor ion을 고정한 후 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시하였으며, 여러 fragment ion들 중 특징적인 product ion과 감도가 우수한 collision energy 등 세부 조건을 검토한 후 성분별 MRM 분석 조건으로 설정하면 일반적인 LC 분석보다 신속하고 정밀도 등이 우수한 결과를 얻을 수 있다. Figure 1-4에 제시된 결과에서 DPPH radical 소거 활성을 나타낸 peak의 머무름 시간과 LC-MS에서 확인된 peak의 머무름 시간을 대조하여 확인된 각 peak의 분자량을 확인하기 위하여 검토한 positive 및 negative mode에서의 MS spectra를 Figure 1-5부터 Figure 1-16에 제시하였다. 12종의 각 활성 성분 peak에 대한 감도 특성이 우수한 것으로 확인된 negative mode의 precursor ion에서 생성되는 product ion scan을 위한 MS/MS 분석 결과를 추가로 제시하였다.

활성 성분 peak a에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 353.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 191, 179, 135 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인할 수 있다(Figure 1-5). 이와 같은 MS spectra가 기존의 문헌을 참고하여 caffeoylquinic acid 계열의 성분에서 나타나는 전형적인 형태임을 알 수 있었다.⁹¹⁾

활성 성분 peak b와 c에서도 ion들의 강도가 다르게 나타났지만, 전반적으로 활성 성분 peak a와 유사한 양상의 product ion이 생성됨을 확인하였다(Figure 1-6, 1-7). Caffeoylquinic acid 계열에서 일반적으로 나타날 수 화학구조와 기존 문헌 등을 검토하여 세 가지 활성 성분 peak가 서로 다른 위치에 caffeoyl기를 포함하는 caffeoylquinic acid임을 추정하였으며, 해당 성분의 표준품을 확보한 후 분석 결과를 검토한 결과, a, b, c peak가 각각 5-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid), 3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid)임을 확인하였다.^{92,93)} Chlorogenic acid로 대표되는 caffeoylquinic acid 성분들은 다양한 연구에서 항산화 활성과 함께 항염증 활성, 항균 활성 등을 나타내는 것으로 보고되었다.^{91,92, 94-96)}

[A]



[B]

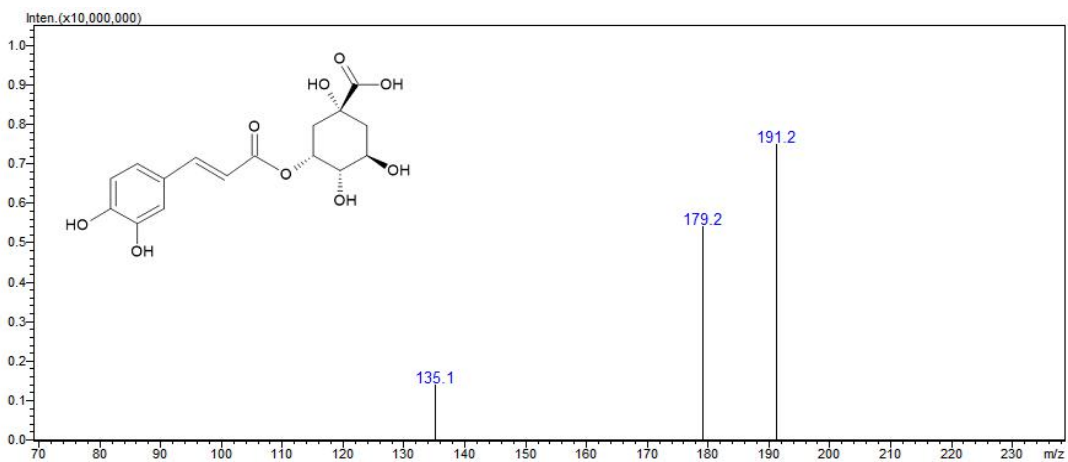
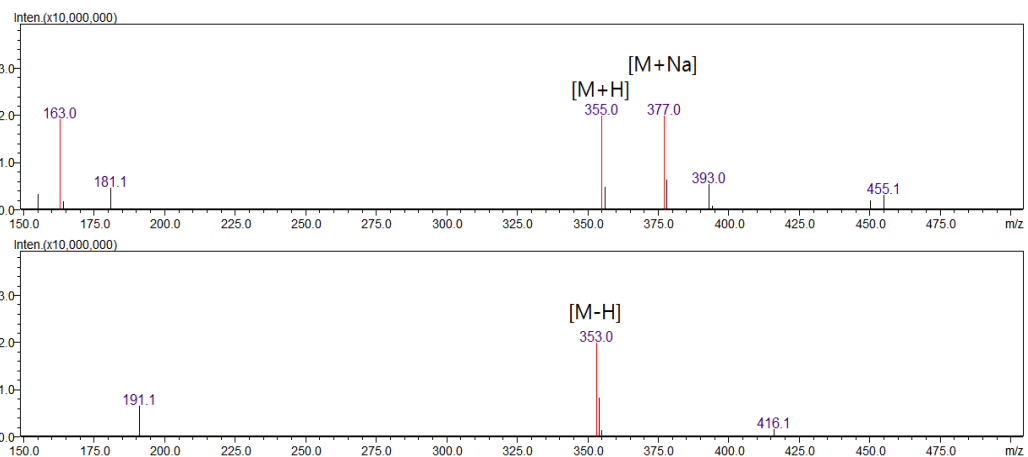


Figure 1-5. LC-MS/MS analysis results of the major active peak a.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 353.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

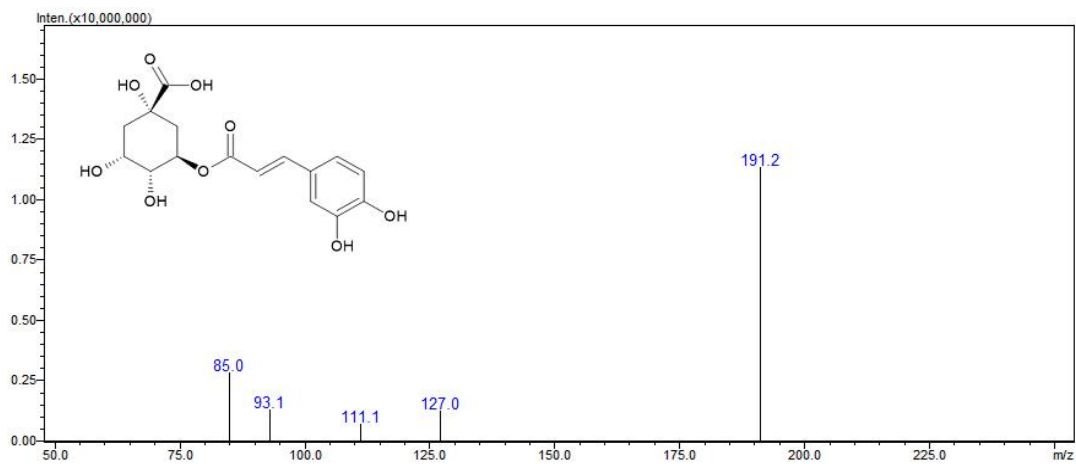
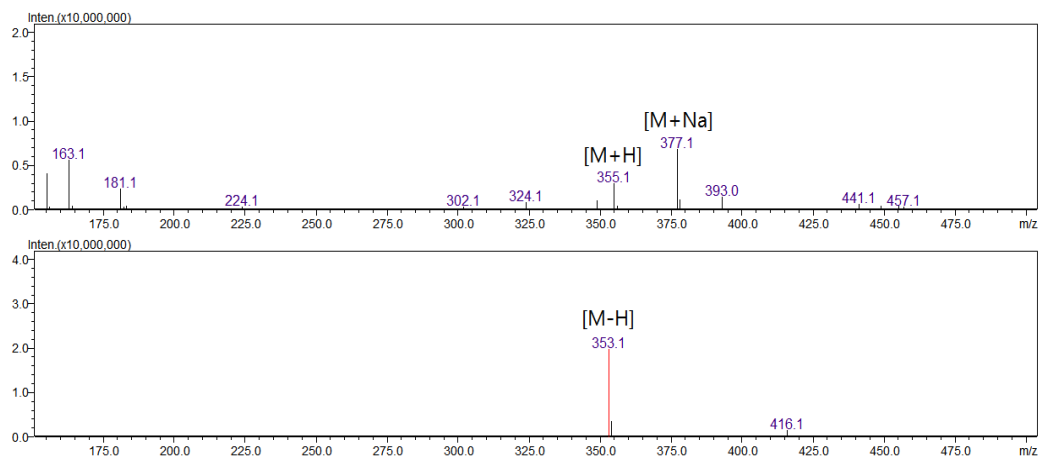


Figure 1-6. LC-MS/MS analysis results of the major active peak b.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 353.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

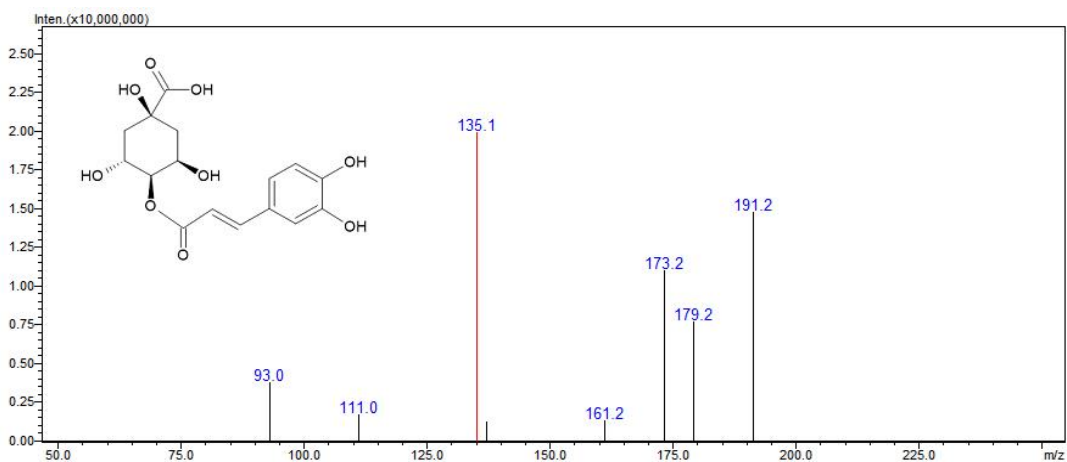


Figure 1-7. LC-MS/MS analysis results of the major active peak c.

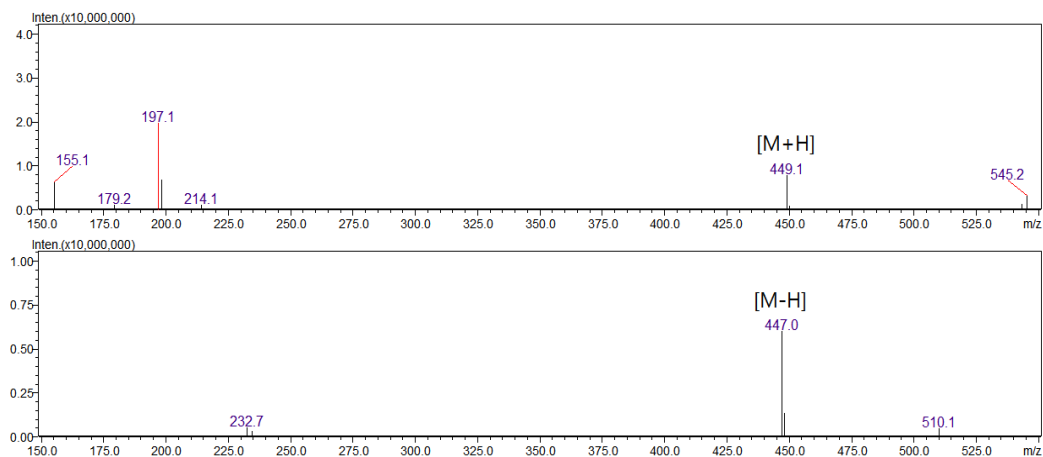
A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 353.1 m/z ([M-H]⁻).

활성 성분 peak d에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 447.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 357, 327 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인할 수 있다(Figure 1-8). 이와 같은 결과는 기존 연구 보고에서 밝힌 orientin 구조에서 나타나는 MS spectra 형태임을 알 수 있었다.⁹⁷⁾ Orientin은 항산화 활성 외에도 항노화, 항바이러스 및 항균 활성, 항염증 활성 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고 되었다.^{98,99)}

Peak e의 negative mode MS 분석 결과를 바탕으로 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 609.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하였으며, MS/MS 분석에서 301, 300, 271 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인하였다(Figure 1-9). 이와 같은 MS spectra는 분자 내에 quercetin 구조를 포함하는 hesperidin이나 rutin과 같은 flavonoid 화합물에서 나타나는 전형적인 형태이며, 표준품을 대조 분석한 결과 hesperidin임을 확인하였다.¹⁰⁰⁾ Hesperidin은 감귤류 식물에 풍부하게 함유된 것으로 보고되는 성분으로서 항산화 활성, 항염증 활성, 항암 및 항당뇨 활성 등의 다양한 활성을 가지는 것으로 알려져 있는 성분이다.¹⁰¹⁾

Peak f의 $[M-H]^-$ 형태인 463.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 분석한 negative mode MS/MS 분석에서 301, 300, 271 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인할 수 있었다(Figure 1-10). 이는 분자 구조 내에 quercetin을 포함하는 flavonoid에서 나타나는 형태로서 hyperoside에서 나타나는 형태임을 확인하였다.^{99,102)} 다양한 식물에 존재하는 것으로 알려진 hyperoside는 항염증 활성, 항바이러스 활성, 항통증 효과, 심혈관계 질환 개선 및 간보호 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰³⁾

[A]



[B]

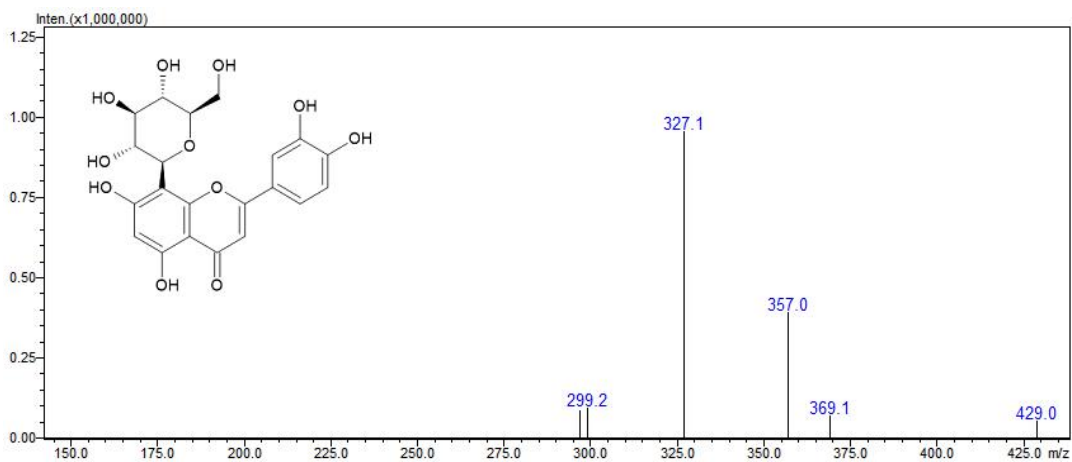
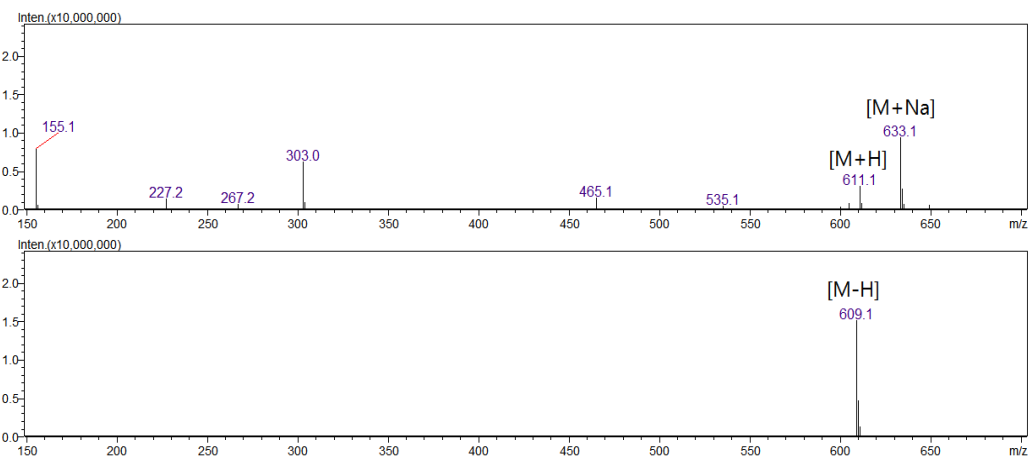


Figure 1-8. LC-MS/MS analysis results of the major active peak d.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 447.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

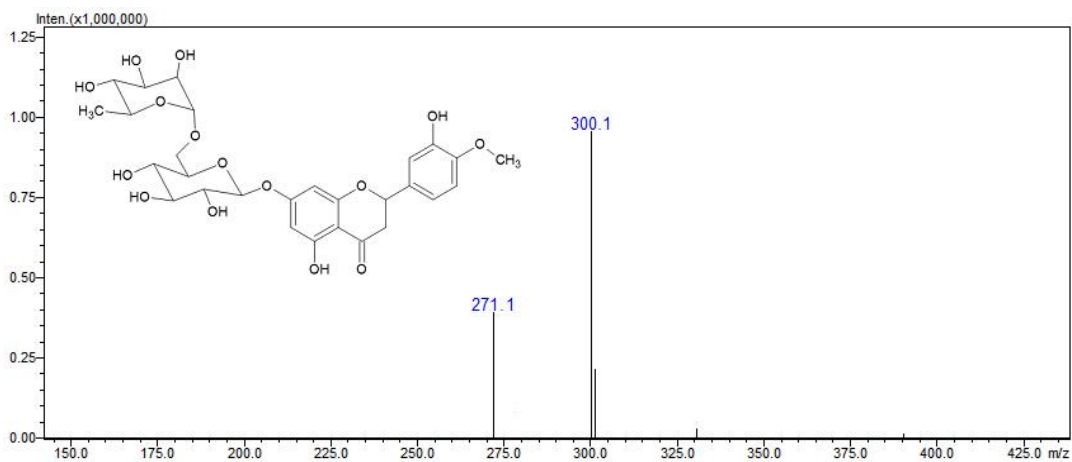
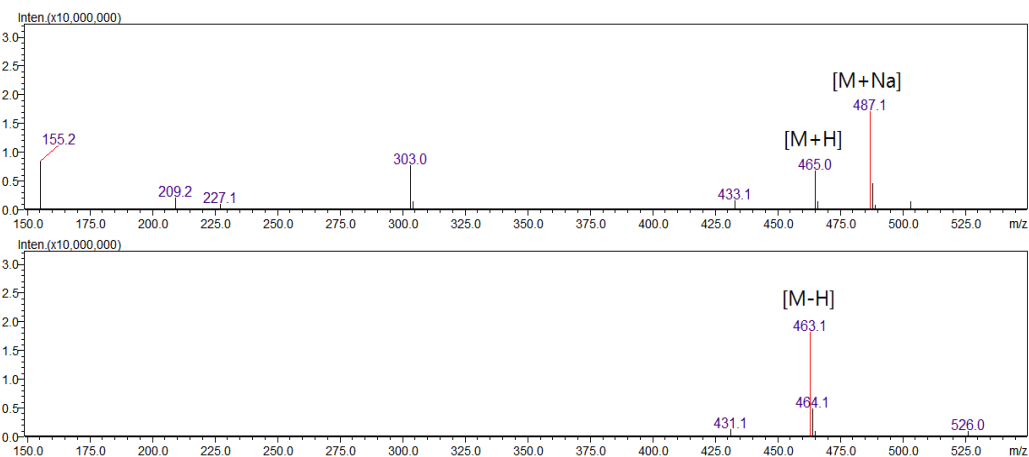


Figure 1-9. LC-MS/MS analysis results of the major active peak e.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 609.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

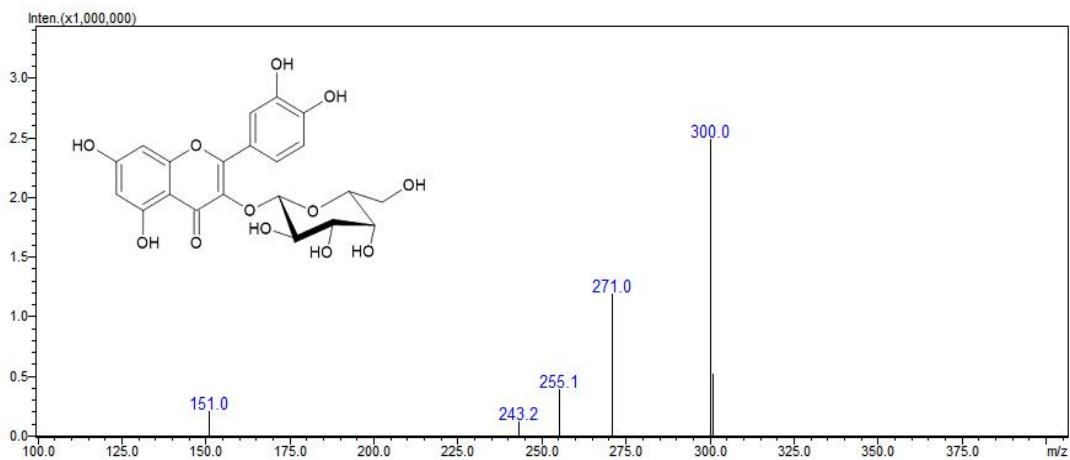


Figure 1-10. LC-MS/MS analysis results of the major active peak f.

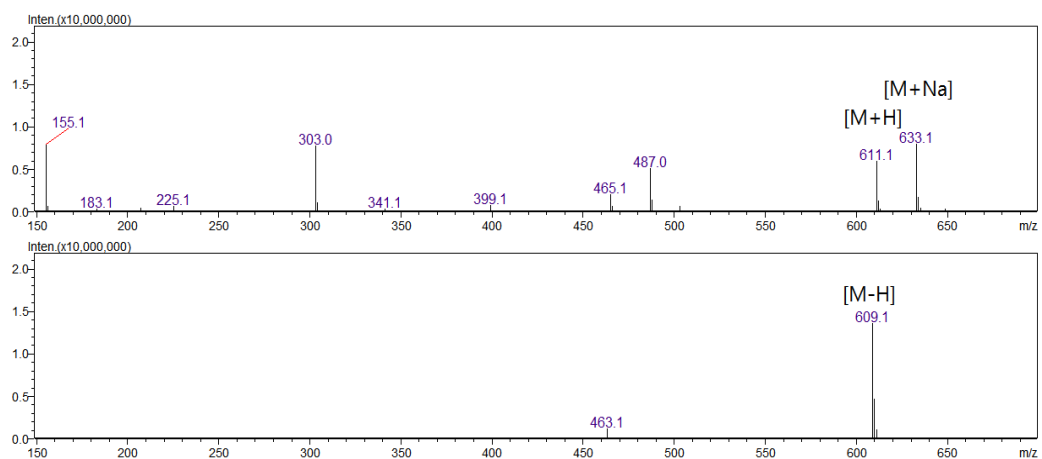
A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B;
 MS/MS spectra of 463.1 m/z ($[M-H]^-$).

활성 성분 peak g에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 609.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 301, 300, 271 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인하였다(Figure 1-11). 이와 같은 MS spectra는 분자 내에 quercetin 구조를 포함하는 rutin과 같은 flavonoid 화합물에서 나타나는 전형적인 형태이며, 표준품을 대조 분석한 결과 rutin임을 확인하였다.⁹⁹⁾ Rutin은 다양한 식물에 존재하는 flavonoid 성분으로서 항산화 활성, 항염증 활성, 항고혈압 및 뇌졸중 예방 효과, 콜레스테롤 저하 효과 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁴⁾

Peak h에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 463.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 301, 300, 271, 151 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다(Figure 1-12). 이는 quercetin에 당이 결합된 구조의 flavonoid에서 나타나는 형태로서 isoquercitrin에서 나타나는 결과임을 확인하였으며, 표준품 대조 분석을 통해서 추가 확인을 실시하였다.¹⁰²⁾ Isoquercitrin은 항산화 활성, 피부 미백 및 항주름 효과, 항균 활성 등을 나타내는 flavonoid 성분으로 알려져 있다.¹⁰⁵⁾

Peak i에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 187.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 169, 125, 97 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다(Figure 1-13). 이와 같은 MS spectra는 항염증 활성, 항균 활성, 피부 미백 관련 활성 등을 가지는 것으로 보고되고 있는 azelaic acid에서 나타나는 것임을 확인하였다.^{106,107)}

[A]



[B]

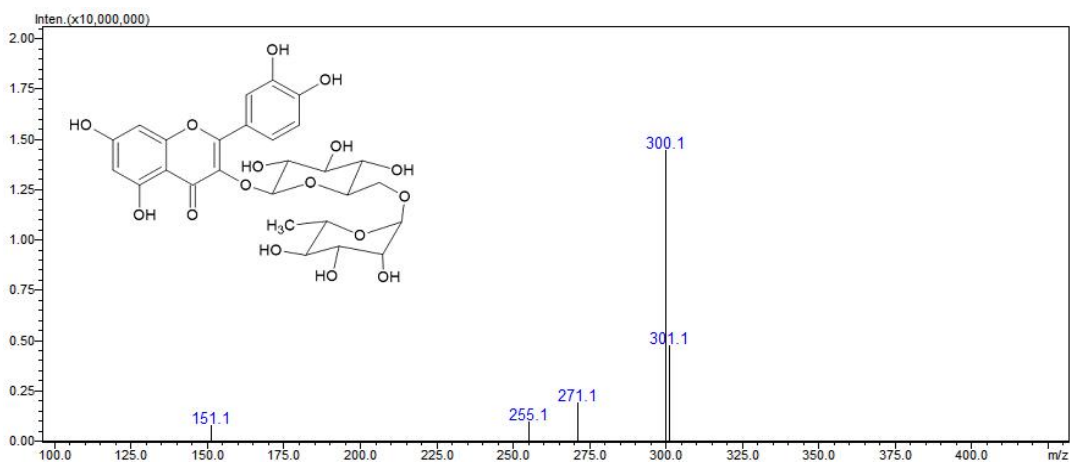
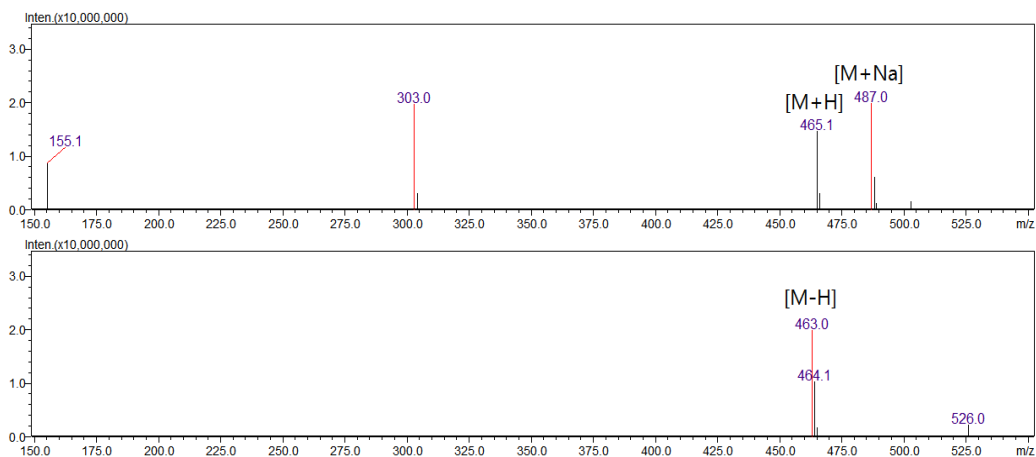


Figure 1-11. LC-MS/MS analysis results of the major active peak g.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 609.1 m/z ([M-H]⁻).

[A]



[B]

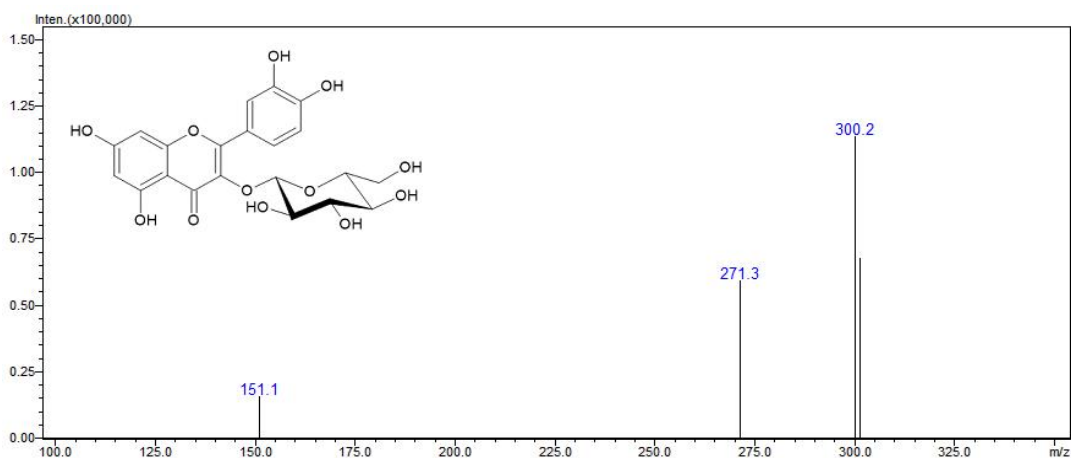
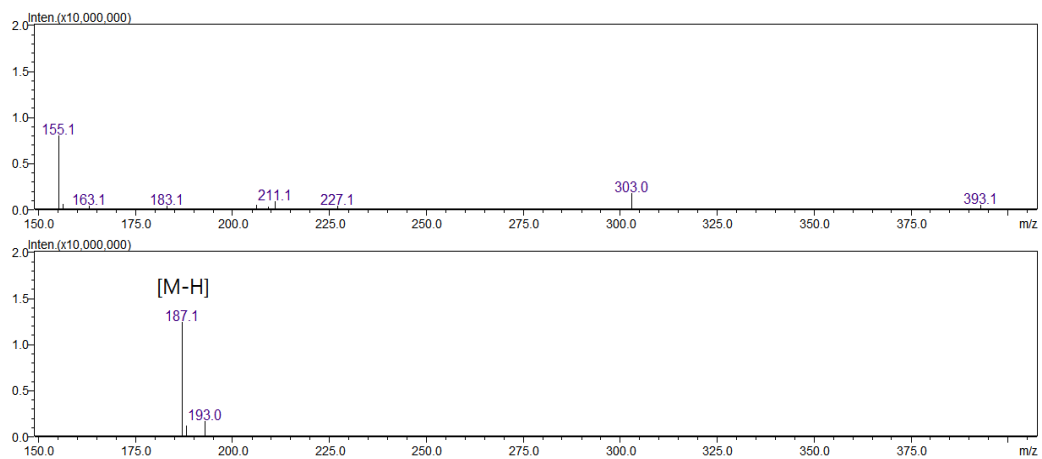


Figure 1-12. LC-MS/MS analysis results of the major active peak h.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B;
 MS/MS spectra of 463.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

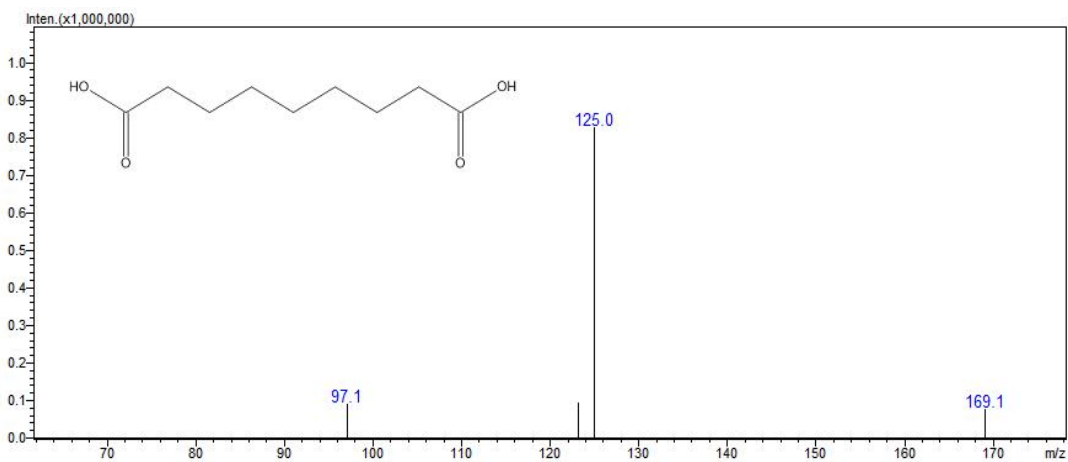


Figure 1-13. LC-MS/MS analysis results of the major active peak I.

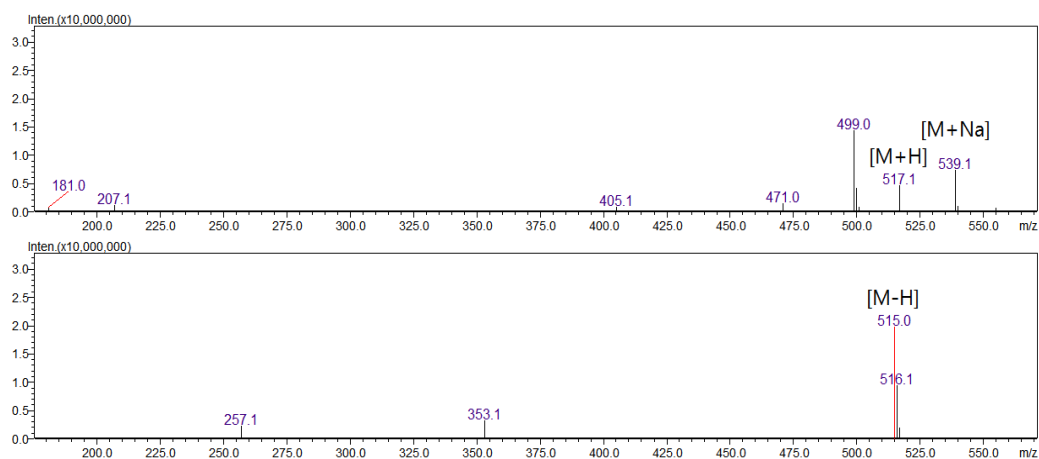
A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B;
 MS/MS spectra of 187.1 m/z ($[M-H]^-$).

활성 성분 peak j에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 515.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 353, 191, 179 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인하였다(Figure 1-14). 이와 같은 MS spectra는 caffeoyl group 2개와 quinic acid가 결합된 형태의 dicaffeoylquinic acid 구조에서 나타나는 형태임을 알 수 있었다.⁹⁰⁾

Peak k의 MS/MS 분석 결과에서 peak j와 유사하게 negative mode의 515.1 m/z precursor ion으로부터 353, 179, 173 m/z 등의 product ion이 생성됨에 따라 dicaffeoyl quinic acid 구조임을 추정할 수 있었다(Figure 1-15). 기존 연구들을 검토하여 활성 peak j, k가 각각 3,5-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid A)와 3,4-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid B)임을 확인하였으며, 표준품 대조분석을 통하여 추가적인 확인을 실시하였다.¹⁰⁸⁾ 2종의 성분을 포함한 dicaffeoylquinic acid 화합물들은 항산화 활성과 함께 신경보호 효과, 항염증 활성, 암세포 억제 효과, 항당뇨 효과 등을 나타내는 것으로 보고 되었다.^{90,109)}

Peak l에 대해 negative mode에서 $[M-H]^-$ 형태로 볼 수 있는 357.1 m/z 를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 179, 148, 135 m/z 등의 product ion이 생성된 것을 확인하였다(Figure 1-16). 이러한 ion 패턴은 2개의 caffeic acid 분자가 결합된 caffeic acid dimer에서 확인되는 것으로 보고되고 있으며, phenolic acid인 caffeic acid의 유도체 특성으로 인해 항산화 활성을 나타내는 것으로 판단된다.^{110,111)}

[A]



[B]

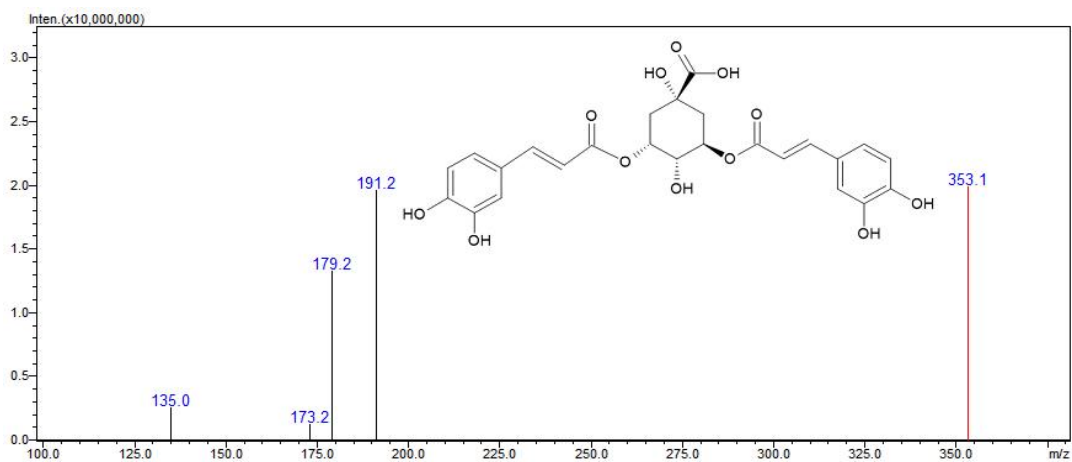
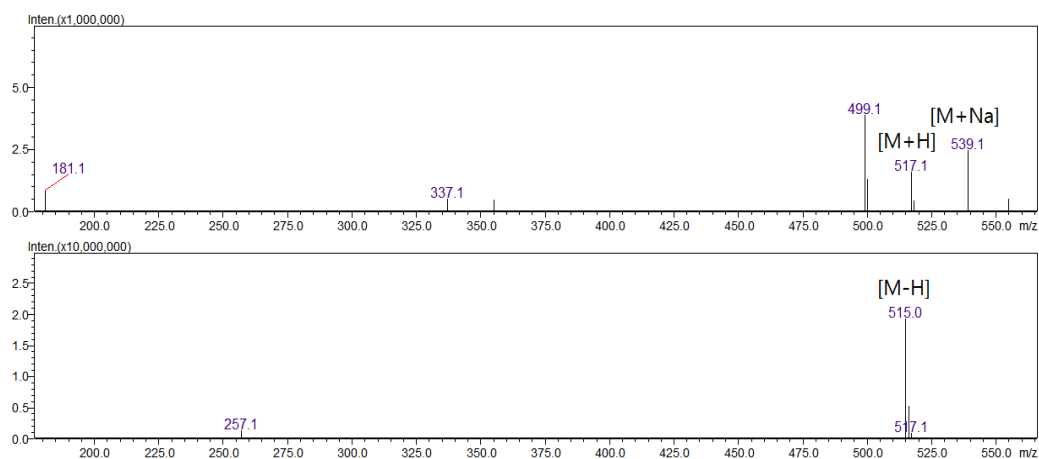


Figure 1-14. LC-MS/MS analysis results of the major active peak j.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 515.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

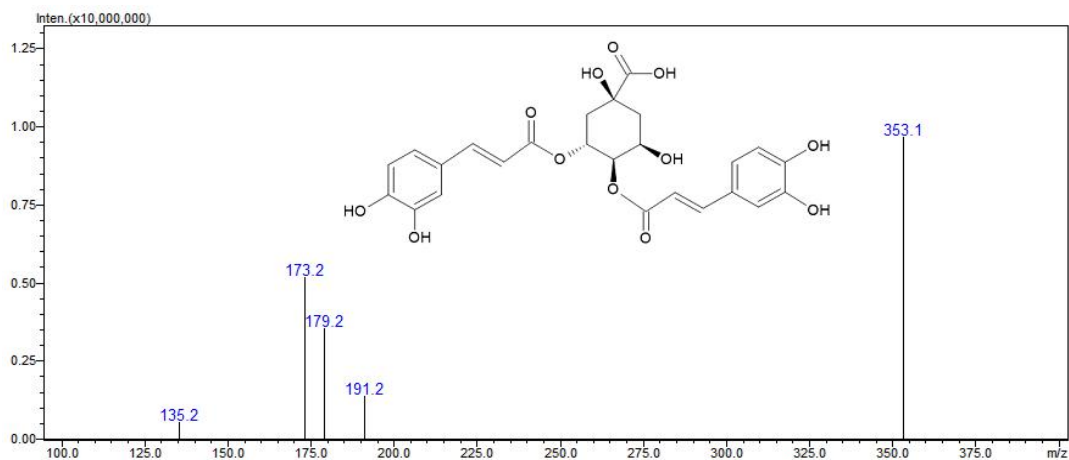
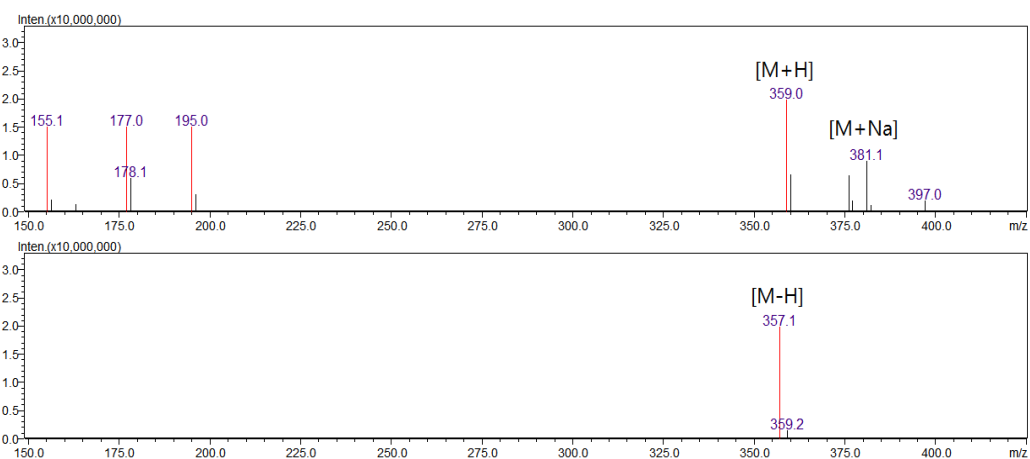


Figure 1-15. LC-MS/MS analysis results of the major active peak k.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 515.1 m/z ($[M-H]^-$).

[A]



[B]

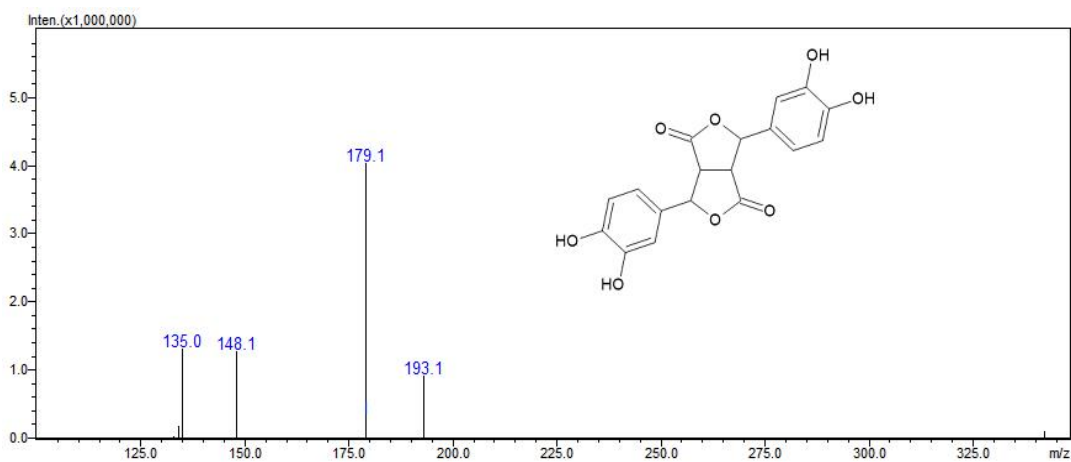


Figure 1-16. LC-MS/MS analysis results of the major active peak 1.

A; positive (top) and negative (bottom) mode MS spectra, B; MS/MS spectra of 357.1 m/z ($[M-H]^-$).

1.3.3 LC-MS/MS 활용 radical 소거 활성 성분 분석

확인된 DPPH radical 소거 활성 성분의 선택적이고 비교 정량 분석이 가능하도록 MS 및 MS/MS 질량분석 결과를 바탕으로 각 활성 성분에 대한 multiple reaction monitoring (MRM) mode LC-MS/MS 분석 조건을 설정하였다. 조건 설정의 과정은 Figure 1-17과 1-18에서 제시한 원리와 과정을 기준으로 진행하였으며, 최종적으로 Table 1-2와 같이 DPPH radical 소거 활성 성분에 대한 MRM 조건을 설정하였다.

설정된 MRM mode 분석 방법의 유용성을 확인하기 위해 황칠나무 잎 추출물에 대한 분석을 실시하였으며, 그 결과를 Figure 1-19에 제시하였다. Caffeic acid dimer (peak 1)의 머무름 시간을 기준으로 online LC-DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 분석 방법보다 짧은 80 분간 실시한 분석에서도 각 활성 성분의 검출이 정상적으로 이뤄졌으며, 머무름 시간이 겹치더라도 분석이 가능한 MRM mode 분석을 이용하면 분석 시간을 80 분 이하로 줄이더라도 황칠나무 잎에 존재하는 radical 소거 활성 성분 분석에 문제가 없을 것으로 판단된다. 또한 분석 대상 성분을 제외한 성분에 대한 검출이 배제되므로 일반적인 LC 분석의 자외선 (ultraviolet; UV) 검출기를 적용한 chromatogram에 비해 간결하고 명확한 비교가 가능하였다.

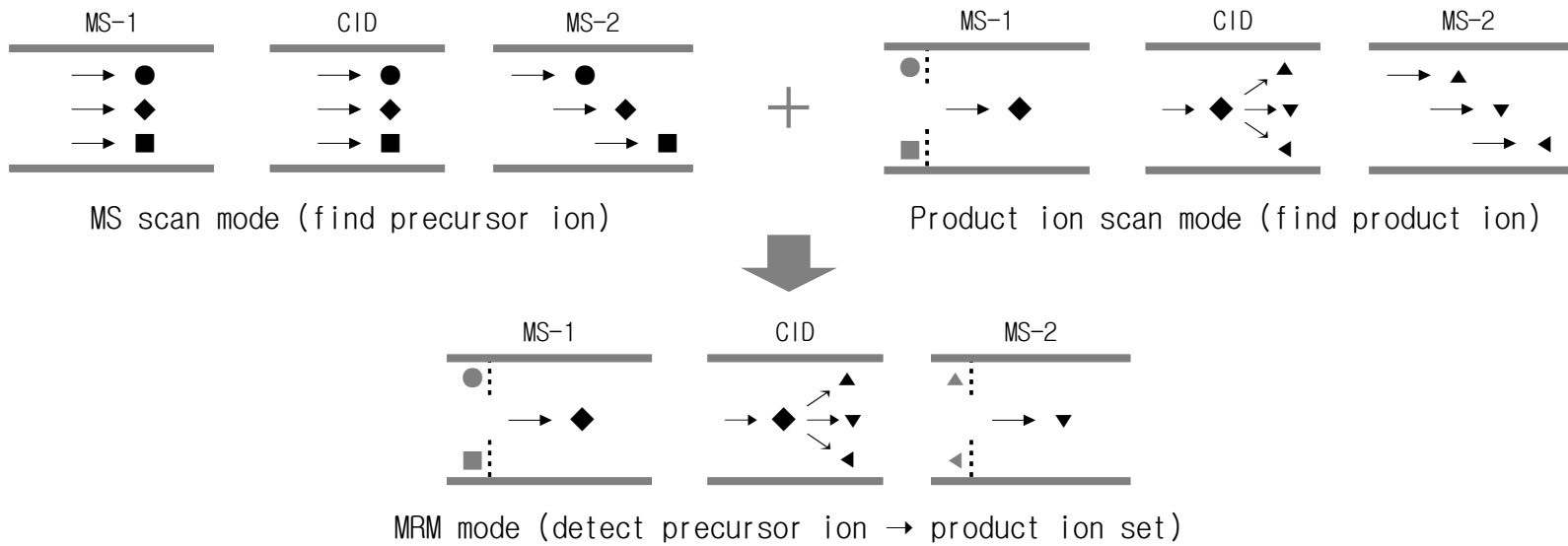


Figure 1-17. MRM condition setting process of MS/MS.

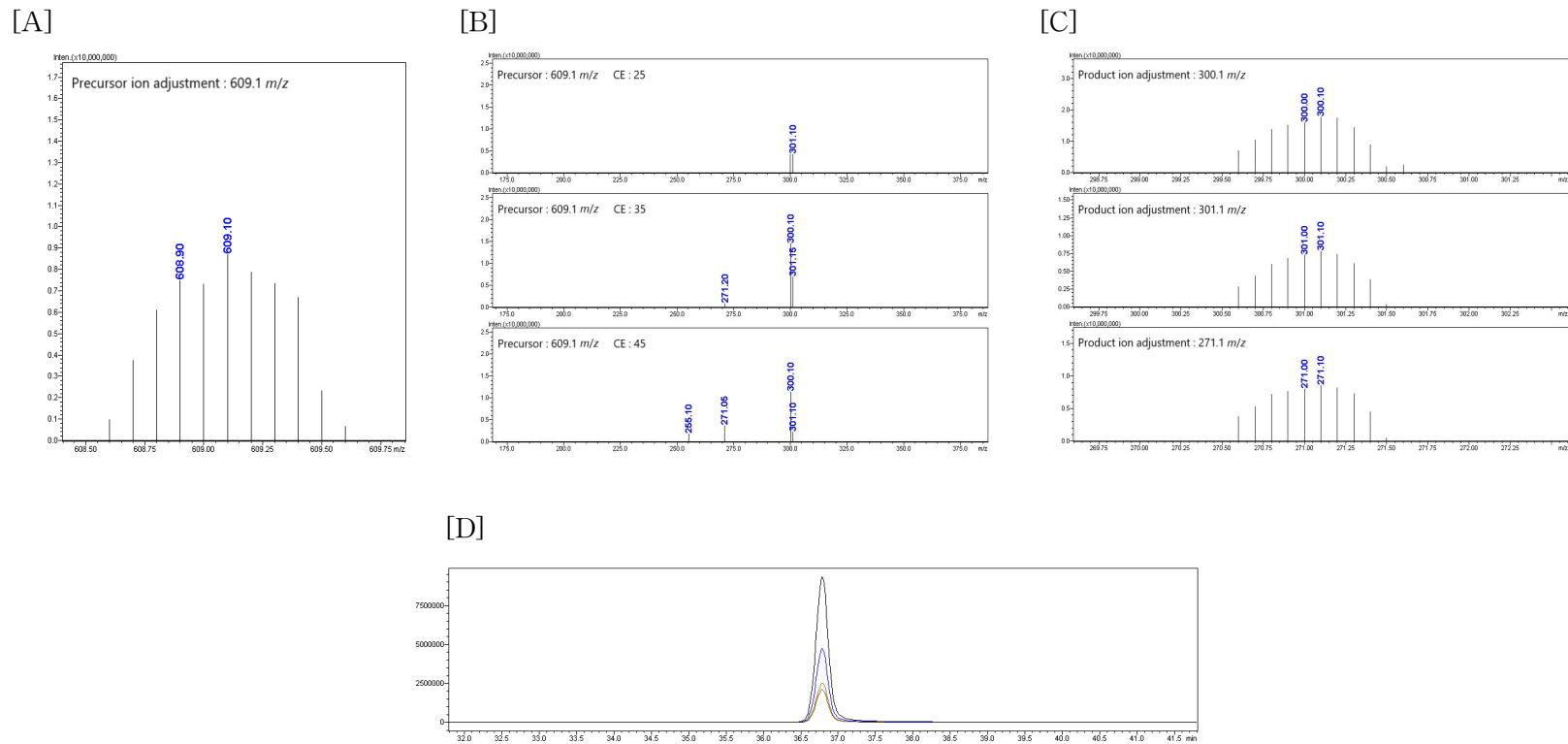


Figure 1-18. Example of MRM condition setting process. A; precursor ion adjustment, B; product ion scan (MS/MS), C; product ion adjustment, D; final MRM mode chromatogram.

Table 1-2. MRM conditions of radical scavenging active compounds of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Retention time (min)	Compounds	transition (m/z)		ESI polarity
			Precursor	Product	
a	12.75	Neochlorogenic acid	353.1	191.1 179.0	-
b	18.43	Chlorogenic acid	353.1	179.2 191.0	-
c	18.72	Cryptochlorogenic acid	353.1	191.1 135.0	-
d	27.62	Orientin	447.1	327.1 357.0	-
e	30.13	Hesperidin	609.1	300.1 271.1	-
f	30.67	Hyperoside	463.1	300.0 271.0	-
g	30.75	Rutin	609.1	300.0 271.1	-
h	31.29	Isoquercitrin	463.1	300.1 271.1	-
i	32.44	Azelaic acid	187.1	125.0 169.1	-
j	33.23	Isochlorogenic acid A	515.1	353.1 271.0	-
k	35.37	Isochlorogenic acid B	515.1	353.1 179.1	-
l	60.70	Caffeic acid dimer	357.1	179.1 135.1	-

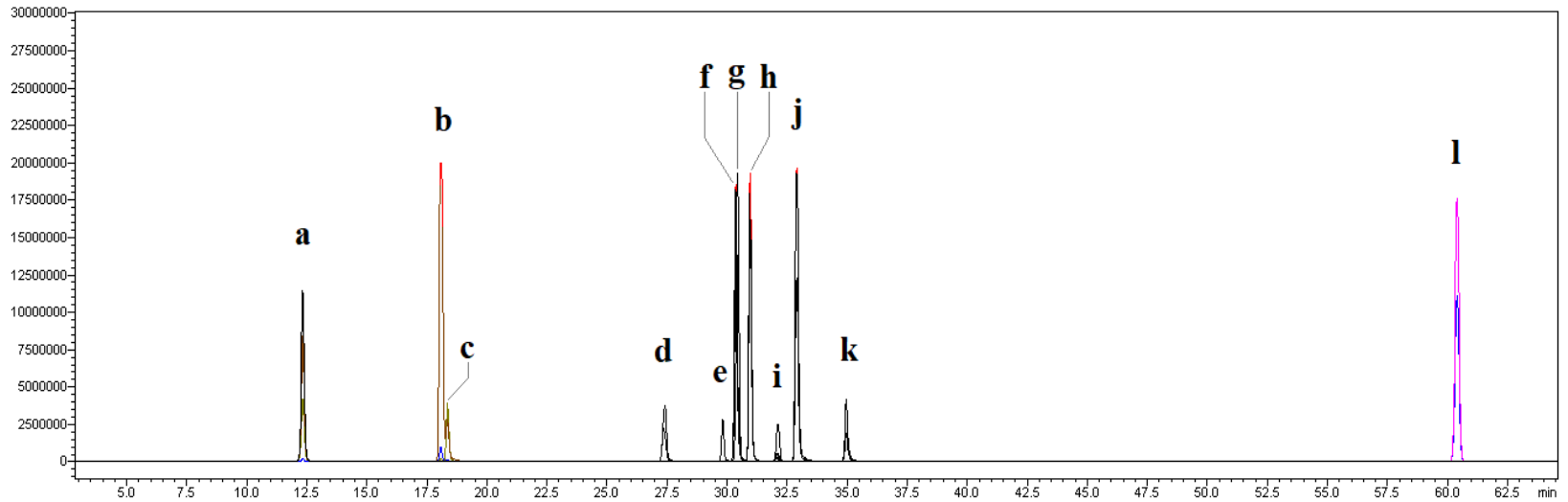


Figure 1-19. MRM mode LC-MS/MS chromatogram of major active compounds of *D. morbifera* leaf extracts.
 a; neochlorogenic acid, b; chlorogenic acid, c; cryptochlorogenic acid, d; orientin, e; hesperidin, f; hyperoside,
 g; rutin, h; isoquercitrin, i; azelaic acid, j; isochlorogenic acid A, k; isochlorogenic acid B, l; caffeic acid
 dimer.

1.4 결론

황칠나무 잎 추출물에 존재하는 항산화 활성 성분의 탐색을 위하여 online LC-DPPH radical 소거능 측정을 실시하였으며, 측정 결과로 확인된 활성 성분 peak의 머무름 시간을 기준으로 MS 및 MS² 분석을 실시하였다. 각종 문헌의 MS data와 표준품 대조 분석 등을 통해 활성 성분에 대한 기초적인 정성분석을 진행하였으며, 12종의 radical 소거 활성 성분 peak가 각각 5-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid), 3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid), orientin, hesperidin, hyperoside, rutin, isoquercitrin, azelaic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid A), 3,4-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid B), caffeic acid dimer 등으로 확인되었다.

MS 분석 결과를 바탕으로 확인된 모분자량을 기준으로 negative mode에서 precursor ion을 고정한 후 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시하였으며, 여러 fragment ion들 중 특징적인 product ion과 감도가 우수한 collision energy 등 세부 조건을 검토한 후 성분별 MRM mode의 MS/MS 분석 조건으로 설정하였다. 설정된 MRM mode 분석 방법의 유용성을 확인하기 위해 황칠나무 잎 추출물에 대한 분석을 실시하였으며, Figure 1-19와 같이 설정된 분석 방법의 유용성을 확인하였다. 이와 같은 online LC-DPPH radical 소거능 측정과 LC-MS/MS를 활용한 성분 분석 방법은 황칠나무 잎 추출물 뿐만이 아니라 다른 식물 소재의 항산화 활성 관련 연구나 성분 분석에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. An NY, Kim JE, Hwang DY and Ryu HK. (2014). Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille in streptozotocin-induced diabetes model. *Journal of Nutrition and Health*. 47:394-402.
2. Lee SG, Lee SH and Park EJ. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. *Korean Journal of Food & Cookery Science*. 31:515-523.
3. Kim JS and Lee HH. (2021). Analysis of antioxidant, anti-aging activities and marker components in *Dendropanax morbifera* Leveille from different areas. *Journal of Investigative Cosmetology*. 17:435-445.
4. Jang JY. (2020). Verification of physiological activities of *Dendropanax morbiferus* leaf ethanol extract as cosmetic ingredient. *Journal of Korean Society of Beauty and Art*. 21:25-37.
5. Youn JS, Kim YJ, Na HJ, Jung HR, Song CK, Kang SY and Kim JY. (2019). Antioxidant activity and contents of leaf extracts obtained from *Dendropanax morbifera* LEV are dependent on the collecting season and extraction conditions. *Food Science and Biotechnology*. 28:201-207.
6. Jung KI, Jung HN and Choi YJ. (2022). Antioxidant, alcohol metabolizing enzyme, and hepatoprotective activities of *Dendropanax morbifera* water extract. *Journal of Life Science*. 32:348-354.
7. Park SA, Park J, Park CI, Jie YJ, Hwang YC, Hyun Kim YH, Jeon SH, Lee HM, Ha JH, Kim KJ and Park SN. (2013). Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 41:407-415.
8. Nakamura M, Ra JH and Kim JS. (2016). The comparative analysis of antioxidant and biological activity for the *Dendropanax morbifera* LEV. leaves extracted by different ethanol concentrations. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 136:1285-1296.

9. Hyun TK, Kim MO, Lee H, Kim Y, Kim E and Kim JS. (2013). Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Leveille. Food Chemistry. 141:1947-1955.
10. Jung KI, Jung HN and Choi YJ. (2022). The antioxidant, alcohol metabolizing enzyme, and hepatoprotective activities of *Dendropanax morbifera* vinegar with traditional fermentation methods. Journal of Life Science. 32:290-297.
11. Jung GH, Kim SH, Woo JS, Yoo ES, Lee JH, Han SH, Jung SH, Kim SM, Kim EG, Shin MJ, Cho HM and Jung JY. (2021). Apoptosis induction by *Dendropanax morbiferus* leaves extract in human breast cancer cells SK-BR-3 through MAPK pathway. Journal of Life Science. 31:827-833.
12. Park SY, Hwang KT, Na JR, Lee KH, Jeong ES and Kim SO. (2018). Triterpenoids from the leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and lung A549 cancer cells. Korean Journal of Food Preservation. 25:471-481.
13. Yang SA, Garcia CV and Lee JW. (2017). Volatile compounds and antiproliferative effects of *Dendropanax morbifera* on HepG2 cells. Journal of Life Science. 27:561-566.
14. Kim HJ, Park YS, Kim JH, Moon JH, Lee SS, Suh SS, Jeong HY, Cho JY and Kim SH. (2022). Inhibitory effects of acetyloctadecadienediynoic acid isolated from leaves of *Dendropanax morbiferus* on viability and self-renewal activity of Glioma stem-like cells. Journal of Medicinal Food. 25:963-970.
15. Kim MO, Kang MJ, Lee SU, Kim DY, Jang HJ, An JH, Lee HS, Ryu HW and Oh SR. (2021). Polyacetylene (9Z,16S)-16-hydroxy-9,17-octadecadiene-12,14-diyonic acid in *Dendropanax morbifera* leaves. Food Bioscience. 40:100878. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100878>.
16. Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Lee TK, Lee SH, Kim GY and Choi YH. (2013). Induction of human leukemia U937 cell apoptosis by an ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Lev. through the caspase-

- dependent pathway. *Oncology Reports*. 30:1231–1238.
17. Yu HY, Jin CY, Kim KS, Lee YC, Park SH, Kim GY, Kim WJ, Moon HI, Choi YH and Lee JH. (2012). Oleifolioside A mediates caspase-independent human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis involving nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:5400–5406.
 18. Lee KY, Jung HY, Yoo DY, Kim WS, Kim JW, Kwon HJ, Kim DW, Yoon YS, Hwang IK and Choi JH. (2017). *Dendropanax morbifera* Léveille extract ameliorates D-galactose-induced memory deficits by decreasing inflammatory responses in the hippocampus. *Laboratory Animal Research*. 33:283–290.
 19. Kim JH, Bae DH, Lee U and Ho Jin Heo HJ. (2016). Ameliorating effect of water extract from *Dendropanax morbifera* Lev. on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 48:275–283.
 20. Kim WS, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Hahn KR, Kwon HJ, Yoo MY, Lee SH, Nam SM, Yoon YS, Kim DW and Hwang IK. (2019). Leaf extracts from *Dendropanax morbifera* Léveille mitigate mercury-induced reduction of spatial memory, as well as cell proliferation, and neuroblast differentiation in rat dentate gyrus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 19:94. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2508-6>.
 21. Kim MJ, Park SY, Lee SH, Kim YJ, Kim YJ, Jun WJ and Yoon HG. (2019). Ameliorative effects of *Dendropanax morbifera* on cognitive impairment via enhancing cholinergic functions and brain-derived neurotrophic factor expression in β -amyloid-induced mice. *Journal of Medicinal Food*. 22:587–593.
 22. Park SY, Karthivashan G, Ko HM, Cho DY, Kim JS, Cho DJ, Ganesan P, Kim IS and Choi DK. (2018). Aqueous extract of *Dendropanax morbiferus* leaves effectively alleviated neuroinflammation and behavioral impediments in MPTP-induced Parkinson's mouse model. *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity. 2018:3175214. <https://doi.org/10.1155/2018/3175214>.
23. Kim JM, Park SK, Guo TJ, Kang JY, Ha JS, Lee DS, Lee U and Heo HJ. (2016). Anti-amnesic effect of *Dendropanax morbifera* via JNK signaling pathway on cognitive dysfunction in high-fat diet-induced diabetic mice. *Behavioural Brain Research*. 312:39-54.
 24. Kim WS, Yim HS, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Choi JH, Yoon YS, Kim DW and Hwang IK. (2016). *Dendropanax morbifera* Léveille extract ameliorates cadmium-induced impairment in memory and hippocampal neurogenesis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:452. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1435-z>.
 25. Kim JM, Park SK, Guo TJ, Kang JY, Ha JS, Lee DS, Kwon OJ, Lee U and Heo HJ. (2016). Neuronal cell protective effect of *Dendropanax morbifera* extract against high glucose-induced oxidative stress. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 45:938-947.
 26. Park HJ, Kim HN, Kim CY, Seo MD and Baek SH. (2021). Synergistic protection by isoquercitrin and quercetin against glutamate-induced oxidative cell death in HT22 cells via activating Nrf2 and HO-1 signaling pathway: Neuroprotective principles and mechanisms of *Dendropanax morbifera* leaves. *Antioxidants*. 10:554. <https://doi.org/10.3390/antiox10040554>.
 27. Shim HJ, Park SW, Lee JW, Park HJ, Baek SH, Kim EK and Yu SW. (2016). Extracts from *Dendropanax morbifera* leaves have modulatory effects on neuroinflammation in microglia. *The American Journal of Chinese Medicine*. 44:119-132.
 28. Kim WS, Kim DW, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Kim DW, Choi JH, Moon SM, Yoon YS and Hwang IK. (2015). Antioxidant effects of *Dendropanax morbifera* Léveille extract in the hippocampus of mercury-exposed rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:247. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0786-1>.
 29. Kim WS, Kim DW, Yoo DY, Jung HY, Nam SM, Kim JW, Hong SM, Kim DW, Choi JH, Moon SM, Yoon YS and Hwang IK. (2014).

- Dendropanax morbifera* Léveille extract facilitates cadmium excretion and prevents oxidative damage in the hippocampus by increasing antioxidant levels in cadmium-exposed rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14:428. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-428>.
30. Park SE, Sapkota K, Choi JH, Kim MK, Kim YH, Kim KM, Kim KJ, Oh HN, Kim SJ and Kim S. (2014). Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. *Neurochemical Research*. 39:707-718.
 31. Kim KJ, Youn JS, Kim YJ and Kim JY. (2020). Comparisons of the anti-inflammatory activity of *Dendropanax morbifera* LEV leaf extract contents based on the collection season and concentration of ethanol as an extraction solvent. *Applied Sciences*. 10:8756. <https://doi.org/10.3390/app10238756>.
 32. Lee JW, Ryu HW, Lee SU, Son TH, Park HA, Kim MO, Yuk HJ, Ahn KS and Oh SR. (2017). Protective effect of polyacetylene from *Dendropanax morbifera* Leveille leaves on pulmonary inflammation induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. *Journal of Functional Foods*. 32:358-366.
 33. Akram M, Kim KA, Kim ES, Syed AS, Kim CY, Lee JS and Bae ON. (2016). Potent anti-inflammatory and analgesic actions of the chloroform extract of *Dendropanax morbifera* mediated by the Nrf2/HO-1 pathway. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 39:728-736.
 34. Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM and Kim JS. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*. 74:263-270.
 35. Lee JW, Kim KS, An HK, Kim CH, Moon HI and Lee YC. (2013). Dendropanoxide Induces autophagy through ERK1/2 activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. *PloS ONE*. 8:e83611. <https://doi.org>

/10.1371/journal.pone.0083611.

36. Yu HY, Kim KS, Lee YC, Moon HI and Lee JH. (2012). Oleifolioside A, a new active compound, attenuates LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression through the downregulation of NF- κ B and MAPK activities in RAW 264.7 macrophages. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012:637512. <https://doi.org/10.1155/2012/637512>.
37. Chung IM, Song HK, Kim SJ and Moon HI. (2011). Anticomplement activity of polyacetylenes from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille. Phytotherapy Research. 25:784-786.
38. Kim MJ, Kang YJ, Lee DE, Kim S, Lim SH and Lee HJ. (2021). Anti-diabetic effects of aqueous extract of *Dendropanax morbifera* Lev. leaves in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. Korean Journal of Veterinary Research. 61:e38.
39. Heo MG, Byun JH, Kim J and Choung SY. (2018). Treatment of *Dendropanax morbifera* leaves extract improves diabetic phenotype and inhibits diabetes induced retinal degeneration in db/db mice. Journal of Functional Foods. 46:136-146.
40. Richa S, Kim JY and Kim HS. (2017). Protective effect of *Dendropanax morbifera* on the diabetes-induced renal damage. Toxicology Letters. 280:S215. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.591>.
41. Moon HI. (2011). Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Human & Experimental Toxicology. 30:870-875.
42. Park SH, Jae-Yeul Lee JY, Jhee KH and Yang SA. (2020). Protective effect of *Dendropanax morbifera* leaf extract on CCl₄-induced oxidative damage in HepG2 cells. Journal of Life Science. 30:370-378.
43. Na JR, Kim E, Park SY, Lee KH, Jeong ES, Kim JS, Kim YJ and Kim SO. (2018). Eliminatory effect of mixture including hot water extract of *Dendropanax morbifera* Lev. on alcohol-induced blood alcohol concentration and hangover in rat. Journal of Chitin and Chitosan. 23:267-276.

44. Bae DH, Kim JH, Lee SY, Choi EJ, Jung MA, Jeong CS, Na JR, Kim JJ and Kim SO. (2015). Hepatoprotective effects of aqueous extracts from leaves of *Dendropanax morbifera* leveille against alcohol-induced hepatotoxicity in rats and *in vitro* anti-oxidant effects. Food Science and Biotechnology. 24:1495-1503.
45. Park YJ, Kim DM, Choi HB, Jeong MH, Kwon SH, Kim HR, Kwak JH and Chung KH. (2022). Dendropanoxide, a triterpenoid from *Dendropanax morbifera*, ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells through autophagy inhibition. Nutrients. 14:98. <https://doi.org/10.3390/nu14010098>.
46. Eom TK, Kim KC and Kim JS. (2020). *Dendropanax morbifera* leaf polyphenolic compounds: Optimal extraction using the response surface method and their protective effects against alcohol-induced liver damage. Antioxidants. 9:770. <https://doi.org/10.3390/antiox9090770>.
47. Yang HY, Kim KS, Lee YH, Park JH, Kim JH, Lee SY, Kim YM, Kim IS, Kacew S, Lee BM, Kwak JH, Yoon KS and Kim HS. (2019). *Dendropanax morbifera* ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via TGF- β 1/Smads pathways. International Journal of Biological Sciences. 15:800-811.
48. Kim HS, Yang HY and Kim KS. (2017). *Dendropanax morbifera* ameliorates on thioacetamide-induced hepatic fibrosis. Toxicology Letters. 280:S132. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.366>.
49. Kim G, Kim JE, Kang MJ, Jang AR, Kim YR, Kim SO, Chang KT, Hong JJ and Park JH. (2017). Inhibitory effect of 1-tetradecanol on *Helicobacter pylori*-induced production of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in gastric epithelial cells. Molecular Medicine Reports. 16:9573-9578.
50. Youn JS, Kim MS, Na HJ, Jung HR, Song CK, Kang SY and Kim JY. (2018). Screening test for *Dendropanax morbifera* Leveille extracts: in vitro comparison to ox-LDL-induced lipid accumulation, ethanol-induced fatty liver and HMG-CoA reductase inhibition. Journal of Applied Biological

- Chemistry. 61:1-8.
51. Tan XT and Ryu HK. (2015). Effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on lipid profiles in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 44:641-648.
 52. Song JH, Kim HH, Jeong MS, Kong MJ, Choi HK, Jun WJ, Kim YJ and Choi KC. (2021). In vivo evaluation of *Dendropanax morbifera* leaf extract for anti-obesity and cholesterol-lowering activity in mice. *Nutrients*. 13:1424. <https://doi.org/10.3390/nu13051424>.
 53. Kang MJ, Kwon EB, Ryu HW, Lee SH, Lee JW, Kim DY, Lee MK, Oh SR, Lee HS, Lee SU and Kim MO. (2018). Polyacetylene from *Dendropanax morbifera* alleviates diet-induced obesity and hepatic steatosis by activating AMPK signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 9:537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00537>.
 54. Song JH, Kang HB, Kim JH, Kwak SM, Sung GJ, Park SH, Jeong JH, Kim HH, Lee JM, Jun WJ, Kim YJ and Choi KC. (2018). Antiobesity and cholesterol-lowering effects of *Dendropanax morbifera* water extracts in mouse 3T3-L1 cells. *Journal of Medicinal Food*. 21:793-800.
 55. Jo YB and Lee JH. (2016). A study on the effect of the *Dendropanax morbifera* extract on anti-hypertensive. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society*. 17:708-715.
 56. Choi JH, Kim DW, Park SE, Lee HJ, Kim KM, Kim KJ, Kim MK, Kim SJ and Kim S. (2015). Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 120:181-186.
 57. Lim LJ, Ju SJ and Song HS. (2019). *Dendropanax morbifera* extract protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibition of reactive oxygen species generation and calcium perturbation. *Natural Product Sciences*. 25:136-142.
 58. Sun S, Li T, Jin L, Piao ZH, Liu B, Ryu YH, Choi SY, Kim GR, Jeong JE, Wi AJ, Lee SJ, Kee HJ and Jeong MH. (2018). *Dendropanax morbifera*

- prevents cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting the Sp1/GATA4 pathway. *The American Journal of Chinese Medicine*. 46:1021-1044.
59. Im DY and Lee KI. (2016). Melanin production inhibitory activity of the *Dendropanax morbifera* leaf extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 47:18-23.
 60. Lee SY, Choi EJ, Bae DH, Lee DW and Kim SO. (2015). Effects of 1-tetradecanol and β -sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 41:73-83.
 61. Park SA, Lee HM, Ha JH, Jeon SH and Park SN. (2014). Inhibitory effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on melanogenesis through down-regulation of tyrosinase and TRP-2. *Applied Chemistry for Engineering*. 25:468-473.
 62. Lee MH, Kwon HO, Park SJ, Lee DS, Kim HS, Kim E, Kim YJ and Lee JM. (2019). Immunomodulatory effects of *Dendropanax morbifera* leaf water extract in NC/Nga mice as models for atopic dermatitis. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 48:915-921.
 63. Choo GS, Lim DP, Kim SM, Yoo ES, Kim SH, Kim CH, Woo JS, Kim HJ and Jung JY. (2019). Anti-inflammatory effects of *Dendropanax morbifera* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages and in an animal model of atopic dermatitis. *Molecular Medicine Reports*. 19:2087-2096.
 64. Park TH, Park SH, Lee JY, Yang SA and Jhee KH. (2019). The effect of fermented extracts of Korean *Dendropanax morbifera* Levéille on hair growth. *Journal of Life Science*. 29:455-460.
 65. Lee JY, Park TH, Park SH, Yang SA and Jhee KH. (2019). The antimicrobial activity of fermented extracts from Korean *Dendropanax morbifera*. *Journal of Life Science*. 29:29-36.
 66. Park JU, Kang BY and Kim YR. (2018). Ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbifera* leaves increases T cell growth by upregulating

- NF-AT-mediated IL-2 secretion. *The American Journal of Chinese Medicine*. 46:453-467.
67. Park JU, Kang BY, Lee HJ, Kim S, Bae D, Park JH and Kim YR. (2017). Tetradecanol reduces EL-4 T cell growth by the down regulation of NF- κ B mediated IL-2 secretion. *European Journal of Pharmacology*. 799:135-142.
68. Lee DH, Kim JK, Han YJ and Park KI. (2021). Antihyperuricemic effect of *Dendropanax morbifera* leaf extract in rodent models. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 2021:3732317. <https://doi.org/10.1155/2021/3732317>.
69. Cho SS, Song SH, Choi CY, Park KM, Shim JH and Park DH. (2018). Optimization of the extraction conditions and biological evaluation of *Dendropanax morbifera* H. Lev as an anti-hyperuricemic source. *Molecules*. 23:3313. <https://doi.org/10.3390/molecules23123313>.
70. Park YJ, Kim KS, Park JH, Lee SH, Kim HR, Lee SH, Choi HB, Cao S, Kumar V, Kwak JH and Kim HS. (2020). Protective effects of dendropanoxide isolated from *Dendropanax morbifera* against cisplatin-induced acute kidney injury via the AMPK/mTOR signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 145:111605. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111605>.
71. Kim ES, Lee JS, Akram M, Kim KA, Shin YJ, Yu JH and Bae, ON. (2015). Protective activity of *Dendropanax morbifera* against cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney & Blood Pressure Research*. 40:1-12.
72. Oh GH, Sung-moon Oh SM, Lee SS, Kim JH, Oh JE, Park YJ and Kim JE. (2019). Effects of *Dendropanax morbifera* extracts on postmenopausal syndrome in ovariectomized rats. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 51:361-368.
73. Kim EH, Jo CS, Ryu SY, Kim SHwan and Lee JY. (2018). Anti-osteoclastogenic diacetylenic components of *Dendropanax morbifera*. *Archives of Pharmacal Research*. 41:506-512.

74. Yang DU, Siddiqi MH, Ahn SE, Kang SR, Noh HY and Yang DC. (2018). In vitro evaluation of the potential therapeutic role of *Dendropanax morbifera* extract in ameliorating osteoporosis and resultant bone impairment using MC3T3-E1 cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 54:346 - 354.
75. Im DY and Lee KI. (2020). LC-MS/MS screening method for radical scavenging active compounds in extracts of *Ulmus pumila* cortex. Journal of Life Science. 30:956-964.
76. Kim SM, Kim AY and Lee KI. (2020). Nitric oxide production inhibitory effects of three caffeoylquinic acids isolated from hot water extract of *Eriobotrya japonica* L. leaves. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 28:245-253.
77. Yoo NH, Kim HK, Lee CO, Park JH and Kim MJ. (2019). Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extracts obtained from different parts of *Cononeaster wilsonii* Nakai. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 27:194-201.
78. Song JH and Lee SR. (2015). Anti-oxidant and inhibitory activity on NO production of extract and its fractions from *Rosa davurica* Pall. leaves. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:20-26.
79. Lee KW, Kim DY and Lee MY. (2015). Quality characteristics of *Gastrodia elata* extract glutinous rice porridge jochung and principal component analysis of antioxidant activity. Journal of the East Asian Society of Dietary Life. 25:1018-1028.
80. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 39:44-84.
81. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS and Lele RD. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Journal of Association of Physicians of India. 52:794-804.

82. Kim AY, Pyo BS, Kim SM, Park MJ, Lee SS and Lee KI. (2019). Radical scavenging effects of 10 plant essential oils and active compound screening analysis. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 27:427-435.
83. Kim HG, Kang SM, Park DJ, Yong SH, Yang WH, Park JH, Yu CY, Solomon T and Choi MS. (2018). Effects of blending oil and antioxidants to prevent rancidity of sancho oil. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 26:455-463.
84. Cha BC. (2015). Changes in the constituents and antioxidant activity in accordance with the processing conditions of *Citrus unshiu* Markovich. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 46:23-30.
85. Kim NY, Park DS and Lee HY. (2015). Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:37-42.
86. Li H and Jeong JM. (2015). Antioxidant activities of various berries ethanolic extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:49-56.
87. Im DY, Pyo BS, Kim SM and Lee KI. (2017). Measurement of the anti-oxidative properties of extract from medicinal plants using an on-line HPLC-DPPH assay. *Journal of Life Science*. 27:44-49.
88. Inoue K, Baba E, Hino T and Oka H. (2012). A strategy for high-speed countercurrent chromatography purification of specific antioxidants from natural products based on on-line HPLC method with radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 134:2276-2282.
89. Zhang H, Xi W, Yang Y, Zhou X, Liu X, Yin S, Zhang J and Zhou Z. (2015). An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of Citrus fruits. *Food Chemistry*. 172:622-629.
90. Lee KI, Pyo BS, Choi CH and Cha SW. (2022). Radical scavenging active compound screening analysis in extract of *Coffea arabica* L. leaves. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 30:264-277.
91. Bajko E, Kalinowska M, Borowski P, Siergiejczyk L and Lewandowski W. (2016). 5-*O*-Caffeoylquinic acid: a spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT-Food Science and Technology*.

- 65:471-479.
92. Chen X, Ma Z and Kitts DD. (2018). Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chemistry*. 249:143-153.
 93. Zhang H, Xi W, Yang Y, Zhou X, Liu X, Yin S, Zhang J and Zhou Z. (2015). An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of Citrus fruits. *Food Chemistry*. 172:622-629.
 94. Gao X, Zhang S, Wang L, Yu L, Zhao X, Ni H, Wang Y, Wang J, Shan C and Fu Y. (2020). Anti-inflammatory effects of neochlorogenic acid extract from mulberry leaf (*Morus alba* L.) against LPS-stimulated inflammatory response through mediating the AMPK/Nrf2 signaling pathway in A549 cells. *Molecules*. 25:1385. <https://doi.org/10.3390/molecules25061385>.
 95. Kim MN, Choi SY, Lee PJ and Hur JY. (2015). Neochlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced activation and proinflammatory responses in BV2 microglial cells. *Neurochemical Research*. 40:1792-1798.
 96. Kim SH, Park SY, Park YL, Myung DS, Rew JS and Joo YE. (2017). Chlorogenic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-1 β expression by inhibiting JAK2/STAT3 activation in RAW264.7 cells. *Molecular Medicine Reports*. 16:9224-9232.
 97. Zhang S, Xie Y, Wang J, Geng Y, Zhou Y, Sun C and Wang G. (2018). Simultaneous determination of six bioactive components of total flavonoids of *Scorzonera austriaca* in rat tissues by LC-MS/MS: application to a tissue distribution study. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 28:156 - 164.
 98. Lam KY, Ling APK, Koh RY, Wong YP and Say YH. (2016). A review on medicinal properties of orientin. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1155/2016/4104595>.
 99. Zhu S, Yan H, Niu K and Zhang S. (2015). Simultaneous determination of seven components from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by LC-MS/MS. *Journal of Chromatographic Science*, 53:909 - 914.
 100. Souilah N, Bendif H, Ullah Z, Hamel T, Djarri L, Öztürk M, Ertas A, Akkal S, Medjroubi K and Mustafa AM. (2021). LC-MS/MS simultaneous

- determination of 37 bioactive compounds in *Bunium crassifolium* Batt. and its biological activities. *Journal of Research in Pharmacy*. 25:450-463.
101. Kim JH, Li L, Kim MS, Cho EJ, Kim HY and Choi JS. (2022). Hesperidin and hesperetin protect against oxidative stress on hepatic toxicity in rats. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research*. 22:1-10.
 102. Zhou C, Liu Y, Su D, Gao G, Zhou X, Sun L, Ba X, Chen X and Bi K. (2011). A sensitive LC - MS - MS method for simultaneous quantification of two structural isomers, hyperoside and isoquercitrin: application to pharmacokinetic studies. *Chromatographia*. 73:353 - 359.
 103. Oh JM, Lee HJ, Bahn KN, Seo IW, Lee YJ, Lee JH, Park JM and Kang TS. (2015). Development of analytical methods of hyperoside from *Rosa canina* L. *Journal of food hygiene and safety*. 30:173-177.
 104. Gim SW, Chae KS, Lee SJ, Kim KD, Moon JH and Kwon JW. (2020). Main constituents and bioactivities of different parts of aronia (*Aronia melanocarpa*). *Korean journal of food science and technology*. 52:226-236.
 105. Kim HS. (2021). Physiological activities of ethanol extract of *Allium tuberosum* root. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 53:160-164.
 106. Zhang X, Liang C, Li C, Bu M, Bu L, Xiao Y, Sun H and Zhang L. (2018). Simultaneous qualitative and quantitative study of main compounds in *Commelina communis* Linn. by UHPLC - Q-TOF-MS-MS and HPLC - ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 56:582 - 594.
 107. Schulte BC, Wu W and Ted Rosen T. (2015). Azelaic acid: evidence-based update on mechanism of action and clinical application. *Journal of Drugs in Dermatology*. 14:964-968.
 108. Chen X, Ma Z and Kitts DD. (2018). Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chemistry*. 249:143-153.
 109. Lee DH, Lee HD, Kwon HJ, Lee HL, Hwang GS, Choi SY, Kim HY, Lee SH and Kang KS. (2022). Insulin secretion and α -glucosidase inhibitory effects of dicaffeoylquinic acid derivatives. <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00688-9>.

110. Theerasin S and Baker AT. (2009). Analysis and identification of phenolic compounds in *Dioscorea hispida* Dennst. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 2:547-560.
111. Ağalar HGD, Çiftçi GA, Göger F and Kırmıer N. (2017). Activity guided fractionation of *Arum italicum* Miller tubers and the LC/MS-MS profiles. Records of Natural Products. 12:64-75.

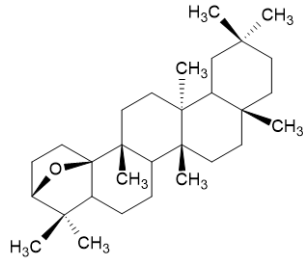
제2장 LC-MS/MS를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 성분 profile 분석

2.1 서론

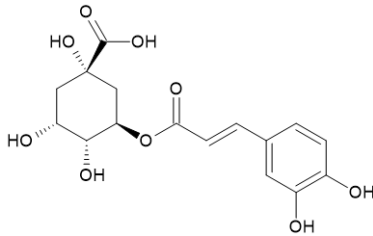
2.1.1 황칠나무 잎의 활성 성분

황칠나무 잎에 존재하는 것으로 알려진 성분 중 triterpenoid 구조를 가진 dendropanoxide가 가장 많은 연구 보고에서 다뤄지고 있다.¹⁻⁶⁾ 다음으로는 chlorogenic acid와 rutin으로 많은 연구에서 황칠나무 잎의 활성 성분 중 함량이 상대적으로 높은 것으로 기술하고 있다.⁷⁻¹³⁾ 지용성 활성 성분으로는 β -sitosterol과^{1,2,14)} 1-tetradecanol,¹⁴⁻¹⁶⁾ 그리고 (9z,16s)-16-hydroxy - 9,17-octadeca-diene-12,14-diyonic acid¹⁷⁻¹⁹⁾ 등의 성분이 상대적으로 높은 빈도로 연구되어 왔다. Catechin, hesperidin, quercetin, isoquercitrin, myricetin과 같은 flavonoid와^{7,9,12,20,21)} ferulic acid, caffeic acid, resveratrol과 같은 polyphenol 성분들이^{9,22)} 활성에 기여하는 성분으로 보고되고 있다. 이외에도 salicylic acid, α -amyrin, β -amyrin, stigmasterol, friedelin, oleifolioside A 등의 성분들이 황칠나무 잎에 존재하는 것으로 알려져 있다.^{1,2,7,12,23-26)}

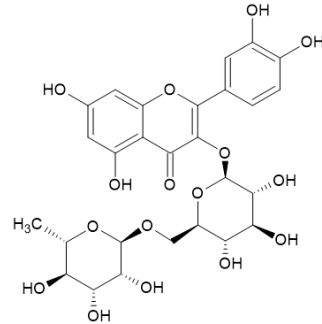
이와 같이 황칠나무 잎에 존재하는 활성 성분이 각종 연구보고를 통해 20여 종이 다뤄져 왔지만 해당 성분들이 동시에 분석된 바는 없으며, 실제 황칠나무 잎에 존재하는 성분 수에 비하면 아직까지 성분에 대한 정보는 부족하다고 할 수 있다. 이는 특정 생리활성의 결과로부터 물질을 분리하여 활성을 재검증하고 구조를 동정하는 전통적인 연구 과정으로 인해 목적하는 생리활성 성분만을 제한적으로 추적하기 때문으로 판단된다.



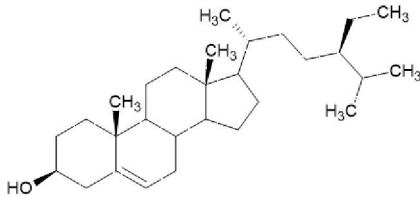
dendropanoxide



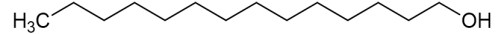
chlorogenic acid



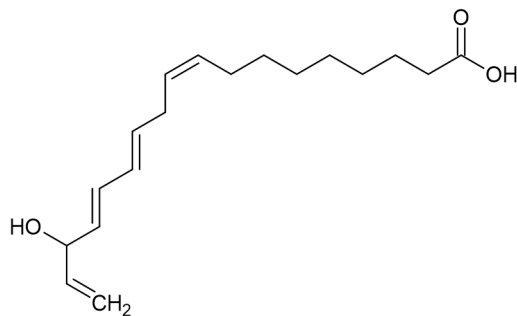
rutin



β -sitosterol



tetradecanol



(9z,16s)-16-hydroxy-9,17-octadeca-diene-12,14-dienoic acid

Figure 2-1. Chemical structure of typical compounds present in leaves of *D. morbifera*.

2.1.2 성분 profile 분석의 활용

국내에서 다양하게 이용되고 있는 생약과 같은 식물 추출물에는 매우 다양한 화합물들을 포함하고 있으며, 일반적으로 각 구성 성분 전체에 대한 화학적 구조 및 성질을 완전히 규명하는 것은 매우 어려운 것으로 받아들여지고 있다. 또한, 구성 성분 중 주요 활성 성분이 밝혀지고 그 성분과 활성 간의 상관관계가 어느 정도 나타나는 경우도 있지만 성분과 활성의 상관관계를 명확히 밝힐 수 없는 경우가 많다. 이러한 특성을 가지는 식물 추출물과 같은 천연물 분석 분야에서 활용되는 방법이 성분 profile 분석이며, 일반적으로 자외선 검출기(ultraviolet detector; UVD)와 연동된 액체크로마토그래피(liquid chromatography; LC) 장비를 사용하여 분석 조건 등을 설정한다.²⁷⁾ 이러한 성분 profile 분석은 지표성분이나 유효성분을 특정하기 어려운 생약과 같은 천연물 시료의 분석이나 물질 분리 조건 설정 등을 위한 단계에서 유용하게 활용될 수 있다.

2.1.3 Tandem mass spectrometer

한편, 식물 추출물은 최소 수 백가지 이상의 성분이 혼합된 형태로서 분리 방법을 최적화한다고 하더라도 추출물에 존재하는 모든 성분을 완벽하게 분리하는 것은 일반적인 LC 시스템에서는 한계가 있다. 또한 성분마다 검출 특성 또한 다양하여 가장 보편적으로 사용되는 자외선이나 형광 검출기, 굴절률 검출기 등으로 확인이 어려운 경우가 빈번히 발생하게 되며, 분석에 필수적인 표준품을 사전에 모두 확보하기는 현실적으로는 어렵다. 이러한 부분을 보완할 수 있는 검출장비로서 활용도가 높아지고 있는 질량분석기(mass spectrometer; MS)는 구성 성분이 다양하여 일반적인 LC 조건에서 완벽한 분리가 쉽지 않고 미지의 성분에 대한 사전적인 표준품 확보가 어려운 식물 추출물 연구에서 기초적이며, 예비적인 정성분석의 도구로서 유용하게 활용될 수 있다.²⁸⁾

MS 장비 중에서도 정성 및 정량분석 목적으로 triple quadrupole 구조를 가지고 있어 tandem MS로도 불리우는 LC-MS/MS는 일반적인 LC-MS에서 수행될 수 있는 scan 및 selected ion monitoring (SIM) mode 분석과 함께 특정한 모분자

(molecular ion 또는 precursor ion)로부터 생성되는 특정한 조각 이온(product ion)을 선택적으로 검출하는 multiple reaction monitoring (MRM) 또는 selected reaction monitoring (SRM) mode 분석이 가능한 질량분석 장비이다.³⁰⁾ MRM이나 SRM mode 분석을 수행하면 설정된 조건을 만족하는 product ion만을 검출하는 특성으로 인해 일반적인 LC 분석에서 나타나는 인접한 방해성분의 영향을 최소화할 수 있으며, 머무름 시간(retention time)이 겹치는 성분 에 대해서도 분석이 가능하다.^{28,29)}

이와 같은 특징을 가지고 있는 LC-MS/MS의 MRM mode의 분석 기술은 다양한 유해물질의 동시다성분 분석에 이용되고 있으며, 분석 대상 성분의 표준품이 확보된 경우 한번의 분석에 수백 종 이상의 성분을 동시에 분석하는 것도 가능하다.³⁰⁻³³⁾ 생약과 같은 식물 추출물 분석에 MS/MS를 활용한 연구로서 인삼류의 19종 또는 26종의 ginsenoside 동시분석이나 부자와 인삼을 주원료로 하는 탕약 중에 함유된 ginsenoside류와 alkaloid류를 동시에 분석하는 연구 등이 있다.³⁴⁻³⁶⁾

이와 함께 다양한 천연물의 연구가 축적됨에 따라 각종 식물 성분에 대한 정보가 비약적으로 증가되었으며, LC 기반의 활성성분 분리 시스템과 함께 MS와 같은 정성적인 기능이 강화된 분석 장비의 보급이 증가됨에 따라 표준품이 확보되지 않는 경우에도 식물 추출물의 성분 분석을 사전적으로 수행하여 주요 성분의 활성을 역으로 추정하는 연구가 증가되고 있다.³⁷⁻⁴³⁾

2.2 재료 및 방법

2.2.1 황칠나무 잎 추출물

성분 profile 분석을 위한 황칠나무 잎 추출물은 각종 연구 및 제품 개발 연구에
 서 인체 적용이나 활성면에서 우수한 것으로 알려진 ethanol 추출을 기준으로 제조
 하였다. 건조 후 blender를 사용하여 직경 3 mm 이하로 잘게 분쇄한 황칠나무 잎
 50 g에 ethanol 500 mL를 혼합한 후 180 rpm의 진탕기에서 3일간 추출을 실시하
 였다. 추출액은 0.45 μ m의 syringe filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

2.2.2 시약 및 표준품

분리 및 분석을 위한 이동상 용매는 LC grade의 water와 methanol을 사용하였
 으며, 시료 추출은 95% ethanol을 사용하였다. 분석 방법 적정성 검토 및 정성 분
 석을 위한 표준품으로서 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 5-
 caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, caffeic
 acid, hesperidin, quercetin, rutin 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서
 구입한 것을 사용하였다.

2.2.3 분석 기기

질량분석기를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 성분 profile 분석을 위해서 LC-30A
 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 액체크로마토그래프와 연동된 LCMS-8050 (Shimadzu,
 Kyoto, Japan) 삼중사중극자 질량분석기(triple quadrupole mass spectrometer)를
 사용하였으며, 일반적인 LC-UVD를 적용한 성분 profile 비교 분석을 위한 검출기
 로서 SPD-10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 분리용 column으로는
 Kinetex C18 (2.1 mm \times 150 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사

용하였다.

2.2.4 성분 profile 분석

분석용 이동상은 0.1% formic acid (A)와 methanol (B)을 사용하였으며, 유속은 0.2 mL/min으로 유지하였다. 이동상은 초기 5 분까지 5% B, 5 분에서 40 분까지 40% B, 40 분에서 50 분까지 70% B, 50 분에서 65 분까지 77% B, 65 분에서 68 분까지 84% B, 68 분에서 98 분까지 100% B가 되도록 하여 110분까지 유지한 후 다시 5% B로 낮춰서 120 분간 분석을 실시하였다. 시료 주입량은 2 μ L, column oven은 40°C를 유지하였으며, 성분의 질량분석의 이온화 방식은 가장 일반적으로 사용되고 있는 electro-spray ionization (ESI) mode를 사용하였다. Collision-induced dissociation gas로서 99.999% argon을 270 kPa의 압력으로 공급하였으며, nebulizing gas, drying gas, 그리고 heating gas는 각각 3 ℓ /min, 10 ℓ /min, 10 ℓ /min의 유속으로 공급하였다. Interface와 desolvation line, 그리고 heat block 온도는 각각 300°C, 250°C, 350°C로 설정하였으며, scan 범위는 100~1,000 m/z 를 적용하였다. Positive와 negative mode에서 total ion scan을 실시한 후 확인된 ion spectrum을 바탕으로 모분자량을 검토하였다.

황칠나무 잎 추출물의 radical 소거 활성 성분 분석 조건 설정과 마찬가지로 확인된 모분자량을 기준으로 precursor ion을 고정한 후 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시하였으며, 여러 fragment ion들 중 특징적인 product ion과 감도가 우수한 collision energy 등 세부 조건을 검토한 후 성분별 MRM mode 분석 조건으로 설정하였다.

2.3 결과 및 고찰

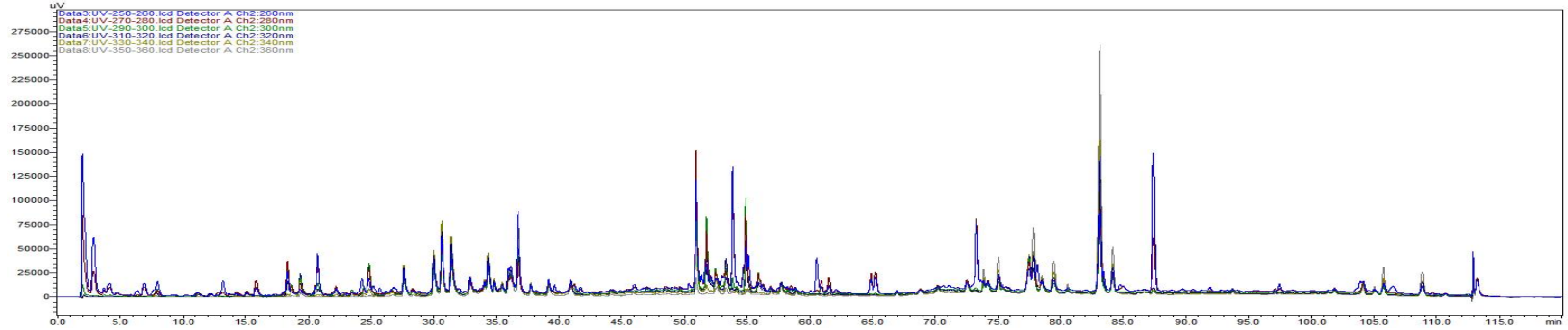
2.3.1 LC-UVD를 활용한 일반 성분 profile 분석 결과

성분 프로파일(profile) 분석법은 대한민국약전에 등록되어있는 분석방법으로서 주로 지표성분이 설정되지 못한 생약 또는 한약재의 품질관리 등을 목적으로 이용되고 있으며, UVD와 연동된 LC를 사용하여 특정 성분의 분석이 아닌 추출물 시료의 분석 결과로 얻어진 크로마토그램 상의 peak 패턴을 일정하게 관리하도록 하는 일종의 정량 분석법이다. 이러한 성분 profile은 포함된 성분의 특성 상 UV 흡광성이 없는 성분이거나 미량 성분의 경우 무시될 수 있으며, 단순한 크로마토그램의 패턴의 일관성만을 확인할 수 있으므로 성분을 정성적으로 분석하는 방법으로 적합하지 않다.

Figure 1-4에 제시한 LC-UVD 분석 결과와 같이 본 연구의 분석 대상인 황칠나무 잎 추출물도 일반적인 식물 추출물과 마찬가지로 수 많은 성분이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 다양한 과장별 성분 profile 분석 data 중 성분 peak의 다양성과 감도 등을 검토한 후 Figure 1-5와 같이 280 nm에서의 분석 결과를 바탕으로 성분 peak의 면적을 산출하였으며, Table 1-2에 제시된 바와 같이 178 종의 peak를 확인하였다.

한편, 일반적인 LC-UVD 분석에서는 정성 및 정량 분석의 기준이 되는 표준품을 동일한 분석 조건에서 분석함으로써 유효한 결과임을 확인할 수 있다. 그러나 표준품과의 대조 분석이 없는 성분 profile 분석은 Table 1-2와 같이 각 성분 peak의 머무름 시간(retention time)과 peak area 등만 확인할 수 있으므로 성분 peak의 패턴 확인 외에는 정성적인 분석으로서 활용하기 어렵다.

[A]



[B]

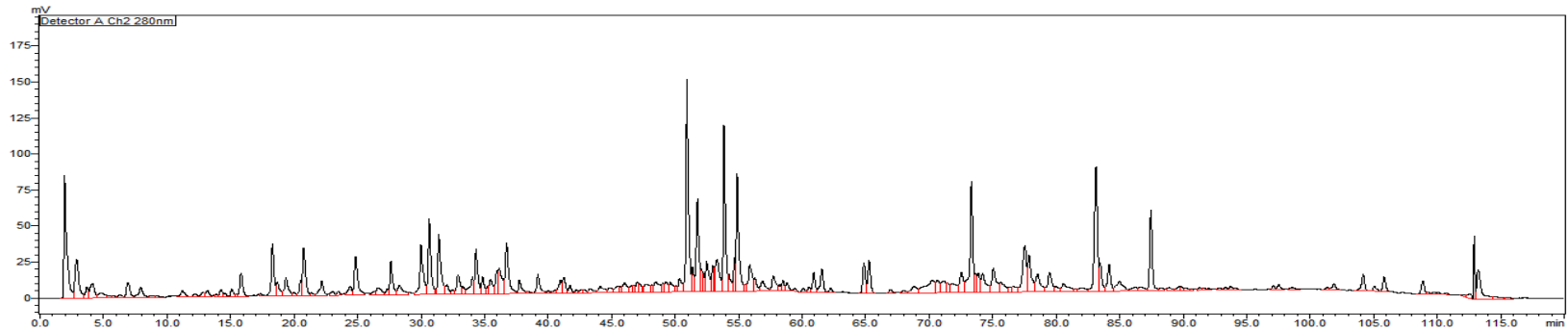


Figure 2-2. UV detector chromatogram of *D. morbifera* leaf extracts. A; 260~360 nm (overlapping mode), B; 280 nm.

Table 2-1. Compound profile peak data of LC-UVD chromatogram of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %	Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %
1	1.93	1,315,898	3.51	31	22.19	207,156	0.55
2	2.90	590,823	1.57	32	23.05	56,535	0.15
3	3.70	121,777	0.32	33	23.47	46,322	0.12
4	4.13	244,942	0.65	34	24.42	129,229	0.34
5	4.78	116,140	0.31	35	24.85	519,319	1.38
6	5.51	32,000	0.09	36	26.35	47,285	0.13
7	5.73	32,657	0.09	37	26.58	144,833	0.39
8	6.31	45,065	0.12	38	27.34	57,468	0.15
9	6.93	211,632	0.56	39	27.62	347,408	0.93
10	7.94	166,611	0.44	40	28.30	204,736	0.55
11	8.85	30,377	0.08	41	29.99	639,640	1.71
12	9.22	22,593	0.06	42	30.64	795,380	2.12
13	11.21	102,960	0.27	43	31.40	706,612	1.88
14	12.20	44,414	0.12	44	32.03	114,996	0.31
15	12.85	66,691	0.18	45	32.47	50,852	0.14
16	13.19	78,121	0.21	46	32.90	266,173	0.71
17	13.87	22,743	0.06	47	33.32	75,671	0.20
18	14.24	80,426	0.21	48	34.04	232,112	0.62
19	14.54	31,700	0.08	49	34.33	481,892	1.28
20	15.09	79,243	0.21	50	34.84	186,833	0.50
21	15.43	21,041	0.06	51	35.28	59,651	0.16
22	15.83	274,849	0.73	52	35.47	176,730	0.47
23	17.36	31,515	0.08	53	35.97	209,941	0.56
24	18.30	542,784	1.45	54	36.15	371,726	0.99
25	18.68	184,089	0.49	55	36.73	668,530	1.78
26	19.36	268,903	0.72	56	37.75	164,729	0.44
27	20.01	38,084	0.10	57	38.38	30,381	0.08
28	20.51	124,651	0.33	58	39.20	233,014	0.62
29	20.76	552,628	1.47	59	40.00	31,222	0.08
30	21.35	33,987	0.09	60	40.57	33,326	0.09

Table 2-1. Continued

Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %	Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %
61	40.97	151,592	0.40	93	53.10	91,340	0.24
62	41.24	191,788	0.51	94	53.31	488,503	1.30
63	41.72	78,384	0.21	95	53.85	1,376,293	3.67
64	42.21	31,379	0.08	96	54.22	177,837	0.47
65	42.66	40,104	0.11	97	54.67	208,598	0.56
66	42.81	30,084	0.08	98	54.88	1,153,073	3.07
67	43.29	74,083	0.20	99	55.48	47,016	0.13
68	44.10	142,657	0.38	100	55.89	397,633	1.06
69	44.83	83,307	0.22	101	56.29	137,153	0.37
70	45.46	104,960	0.28	102	56.91	178,577	0.48
71	45.72	38,986	0.10	103	57.73	228,319	0.61
72	46.01	173,782	0.46	104	58.22	47,927	0.13
73	46.62	74,515	0.20	105	58.50	95,709	0.26
74	46.76	59,165	0.16	106	58.80	91,609	0.24
75	47.02	98,328	0.26	107	59.45	24,509	0.07
76	47.21	73,247	0.20	108	60.08	46,828	0.12
77	47.44	26,562	0.07	109	60.55	51,583	0.14
78	47.70	165,032	0.44	110	60.92	191,990	0.51
79	48.17	63,248	0.17	111	61.55	272,045	0.73
80	48.48	211,190	0.56	112	62.25	52,458	0.14
81	49.04	85,998	0.23	113	64.87	308,427	0.82
82	49.27	129,966	0.35	114	65.28	345,642	0.92
83	49.63	134,655	0.36	115	66.95	46,860	0.12
84	50.09	53,234	0.14	116	68.01	45,077	0.12
85	50.35	185,821	0.50	117	68.80	157,812	0.42
86	50.93	1,919,645	5.12	118	70.22	427,624	1.14
87	51.37	194,916	0.52	119	70.65	201,684	0.54
88	51.76	942,962	2.51	120	71.17	197,816	0.53
89	52.06	146,315	0.39	121	71.42	119,432	0.32
90	52.21	113,869	0.30	122	71.84	202,761	0.54
91	52.48	396,533	1.06	123	72.53	306,655	0.82
92	52.97	182,330	0.49	124	73.33	1,195,305	3.19

Table 2-1. Continued

Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %	Peaks	Retention time (min)	Peak area	Area %
125	73.65	144,015	0.38	152	90.68	24,963	0.07
126	73.87	181,967	0.49	153	91.31	31,578	0.08
127	74.21	354,702	0.95	154	91.60	30,104	0.08
128	75.05	403,421	1.08	155	91.98	27,478	0.07
129	75.64	201,896	0.54	156	92.88	34,827	0.09
130	76.46	62,426	0.17	157	93.33	33,529	0.09
131	76.63	102,983	0.27	158	93.75	40,897	0.11
132	77.54	688,849	1.84	159	94.12	24,826	0.07
133	77.86	492,742	1.31	160	97.11	47,613	0.13
134	78.53	318,835	0.85	161	97.52	66,514	0.18
135	79.48	319,561	0.85	162	98.55	54,819	0.15
136	79.99	78,929	0.21	163	101.36	29,619	0.08
137	80.59	206,218	0.55	164	101.88	76,396	0.20
138	81.55	36,418	0.10	165	104.18	203,126	0.54
139	82.03	94,072	0.25	166	105.05	60,583	0.16
140	83.15	1,468,718	3.92	167	105.83	159,525	0.43
141	83.47	270,449	0.72	168	108.88	164,663	0.44
142	84.18	323,716	0.86	169	109.31	25,331	0.07
143	84.99	256,894	0.68	170	109.72	30,971	0.08
144	86.21	85,788	0.23	171	110.10	21,721	0.06
145	86.66	82,167	0.22	172	110.72	22,899	0.06
146	87.46	779,551	2.08	173	112.13	31,321	0.08
147	88.25	47,737	0.13	174	112.56	72,346	0.19
148	88.89	50,606	0.13	175	112.92	291,041	0.78
149	89.71	60,047	0.16	176	113.23	516,577	1.38
150	89.87	34,110	0.09	177	114.57	71,541	0.19
151	90.19	31,949	0.09	178	115.40	29,782	0.08
				amount		37,515,134	100

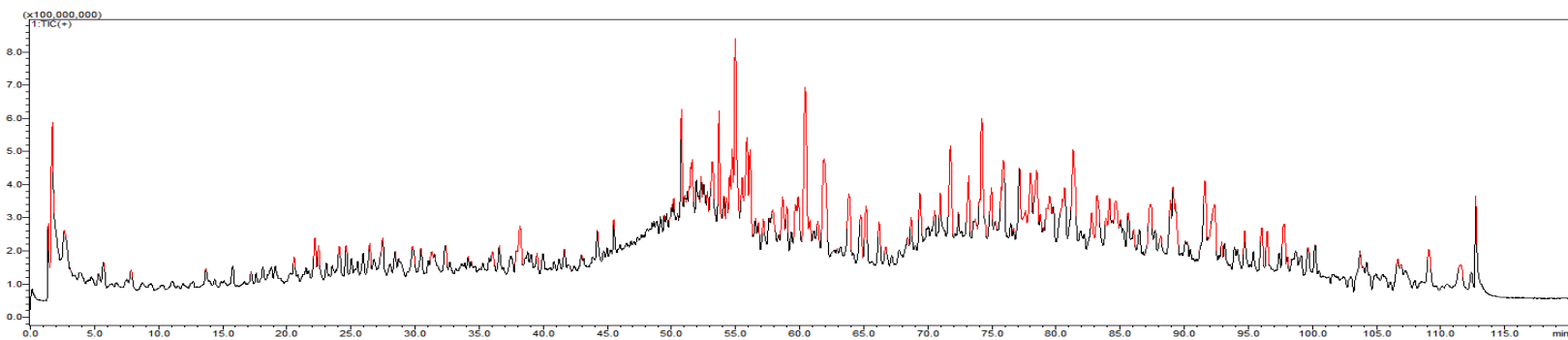
2.3.2 질량분석기를 활용한 profile 분석 대상 성분 확인

최근 식물 추출물과 같이 최소 수 백가지 이상의 성분이 혼재되어 있는 분석 및 연구에서 MS의 활용도가 높아지고 있다. 이는 MS가 분자량이나 분자 구조를 추정할 수 있는 ion spectrum을 제공하므로 일반적인 LC나 기체크로마토그래프(gas chromatograph; GC) 분석에서 필수적으로 요구되는 표준품이 없이도 일정 수준의 정성 분석이 가능하기 때문이다.

LC-MS의 가장 일반적인 이온화 장치로 알려진 ESI 장치로 이온화시킨 후 황칠 나무 잎 추출물을 분석한 결과에서 Figure 1-5와 같이 total ion chromatogram (TIC)을 얻을 수 있었다. 이온화되는 극성(polarity)에 따라 positive mode와 negative mode의 두 가지 data를 확인하였으며, LC-UVD를 활용한 성분 profile 분석 결과에서 확인된 주요 peak의 머무름 시간을 기준으로 질량분석 결과를 우선 검토하였다. 또한 LC-UVD 분석 결과에서는 peak가 약하거나 없었던 머무름 시간에 확인된 MS peak에 대해서도 추가적으로 검토를 실시하였다.

ESI 이온화 장치를 기반으로 하는 LC-MS에서는 일반적으로 positive mode에서 나타나는 모분자량 패턴인 $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ 와 negative mode에서 나타나는 모분자의 형태인 $[M-H]$ 를 상호 대조하여 모분자량을 추정할 수 있게 된다.^{28,29)} 본 연구에서는 두 가지 극성 중 감도가 우수한 극성 mode를 중심으로 MS/MS 분석을 실시하였으며, 성분 특성에 따라서 positive 또는 negative mode에서만 모분자 ion 형태를 나타내는 경우에도 해당 극성 mode에서 MS/MS 분석을 진행하였다.

[A]



[B]

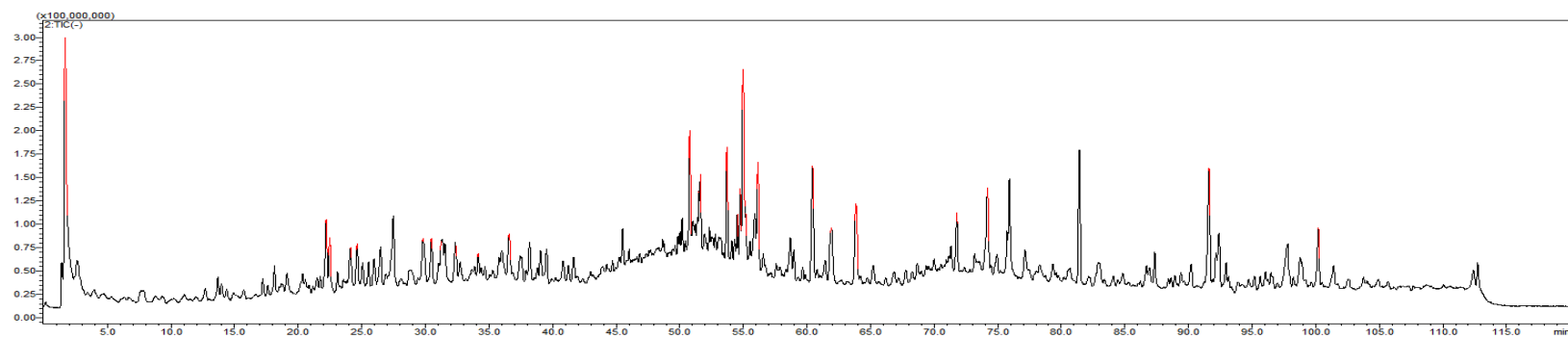


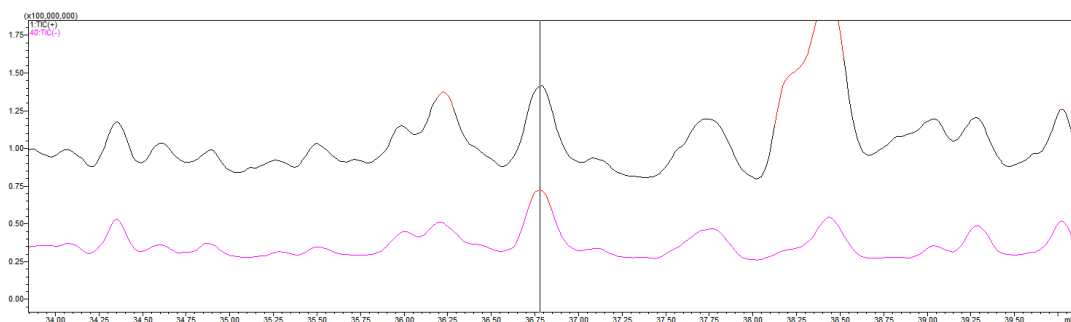
Figure 2-3. ESI mode total ion chromatogram of *D. morbifera* leaf extracts. A; positive mode, B; negative mode.

Figure 2-4에 머무름 시간 36.5 ~ 37 분 위치에 나타난 MS peak의 모분자량 검토 과정 예시를 제시하였다. Positive mode spectra를 보면 $[M+H]^+$ 와 $[M+Na]^+$ 의 형태로 볼 수 있는 611.1과 633.1 m/z 가 존재함을 확인하였고, negative mode spectra에서는 $[M-H]^-$ 로 볼 수 있는 609.1 m/z 가 명확하게 확인되었다.

이러한 결과를 바탕으로 해당 MS peak의 모분자량을 610으로 판단할 수 있게 되며, 이후 positive나 negative mode에서 $[M+H]^+$ 나 $[M-H]^-$ 로 확인된 611.1과 609.1 m/z 를 precursor ion으로 설정한 후 제1장 Figure 1-17의 과정과 같이 MS/MS 분석에 해당하는 product ion scan을 실시함으로써 추가적인 분자구조 정보를 얻을 수 있게 된다.

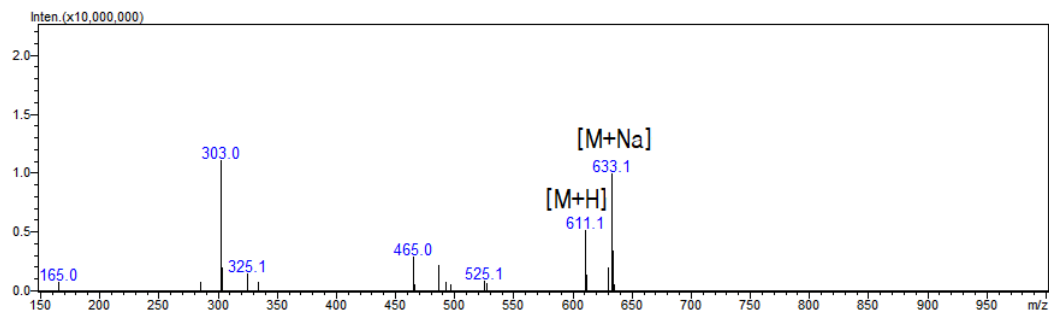
Scan mode의 TIC에서 상대적으로 MS peak 크기가 크면서 모분자량 확인이 용이한 peak들을 중심으로 상기의 과정을 수행하였으며, Table 2-2와 같이 95종의 peak에 대한 MS profile data를 확보하였다. 각각의 MS data는 표준품(standard; STD)이 확보된 성분에 대해서는 대조 분석을 통하여 성분 동정을 완료하였으며, 표준품이 확보되지 못한 성분에 대해서는 각종 연구 문헌 및 database를 활용하여 성분 동정을 실시하였다.

[A]



[B]

Event#: 1 Q3 Scan(E+)



[C]

Event#: 40 Q3 Scan(E-)

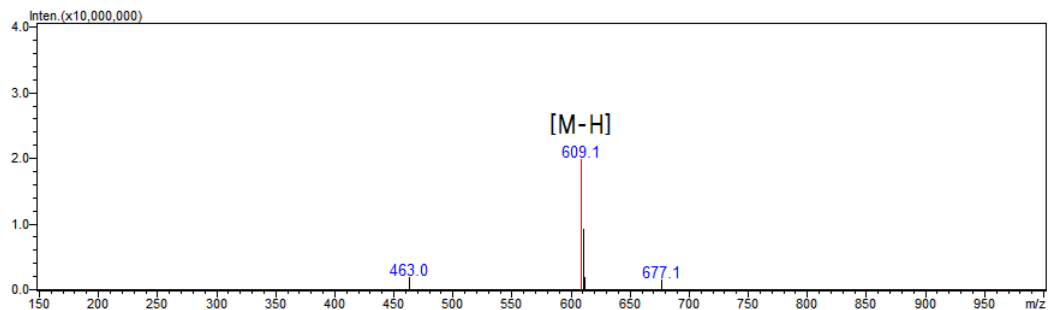


Figure 2-4. Scan data review for molecular weight determination. A; total ion chromatogram(partially enlarged), B; positive mode MS spectra, C; negative mode MS spectra.

Table 2-2. Assignment of identified compounds in LC-MS/MS chromatograms of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
1	Quinic acid	1.74	191.1	-	-	127, 93, 87	44
2	Guanosine	3.89	282.1	284.1	+	152, 135, 110	45
3	Dihydroxybenzoyl hexoside	7.50	315.1	-	-	153, 152, 108	46
4	Neochlorogenic acid	11.99	353.1	-	-	191, 179, 135	STD ¹⁾
5	(unidentified)	12.00	-	443.0	+	317, 149, 123	
6	(unidentified)	12.75	491.2	-	-	191, 149, 119, 89	
7	(unidentified)	13.73	477.2	-	-	431, 293, 233, 125	
8	(unidentified)	13.94	447.1	-	-	152, 108	
9	4-Hydroxybenzoic acid glucoside	15.68	299.1	-	-	137, 93	47
10	Caffeoyl diglucoside	17.05	503.1	-	-	341, 179, 135	48
11	(unidentified)	17.26	457.2	-	-	411, 279, 161, 101	
12	Coumaroyl glucoside	18.15	325.1	-	-	163, 119	49
13	Caffeic acid	18.48	179.1	181.1	-	135, 134, 107, 89	STD
14	(unidentified)	18.42	431.2	-	-	299, 191, 149, 119, 59	
15	(unidentified)	18.64	473.2	-	-	179, 135	

¹⁾ STD; standard analysis.

Table 2-2. Continued

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (<i>m/z</i>)	
16	Chlorogenic acid	19.22	353.1	355.1	-	191, 127, 85	STD ¹⁾
17	Cryptochlorogenic acid	19.48	353.1	-	-	191, 179, 173, 135	STD
18	Feruloyl glucoside	22.09	355.2	-	-	193, 178, 149, 134	49
19	Benzyl alcohol hexose pentose 1	22.27	401.1	-	-	269, 161, 101	50
20	Benzyl alcohol hexose pentose 2	22.60	401.1	-	-	269, 161, 131, 113	50
21	(unidentified)	23.22	431.2	-	-	321, 179, 119, 89	
22	(unidentified)	23.70	563.3	-	-	517, 311, 293, 221, 149	
23	Roseoside	23.96	385.2	-	-	223, 205, 161, 153	52, 53
24	Citroside A	24.25	385.2	-	-	223, 205, 161, 153	53
25	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	24.36	337.1	339.1	-	191, 119, 93	44, 64
26	<i>p</i> -Coumaric acid	24.73	163.1	165.1	-	119, 117, 93, 65	STD
27	(unidentified)	24.73	431.2	-	-	225, 179, 161, 119, 89	
28	(unidentified)	25.16	431.2	-	-	385, 367, 327, 315, 161	
29	(unidentified)	25.22	563.3	-	-	517, 293, 233, 205, 149	
30	(unidentified)	26.04	461.2	-	-	415, 269, 161, 101	

¹⁾ STD; standard analysis.

Table 2-2. Continued

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
31	(unidentified)	26.19	563.3	-	-	517, 499, 459, 447, 315	
32	(unidentified)	26.57	427.2	-	-	381, 249, 161, 101	
33	5-Feruloylquinic acid	26.81	367.1	-	-	191, 134, 93	54, 64
34	4- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	27.23	337.1	-	-	191, 127, 85	44, 64
35	Naringenin hexoside	27.40	433.1	-	-	271	51
36	Vicenin 2	27.60	593.1	595.1	-	503, 473, 383, 353, 297	55, 56
37	(unidentified)	28.89	431.2	-	-	225, 179, 119, 89	
38	(unidentified)	29.84	439.2	-	-	393, 191, 149, 131	
39	Vicenin 1	29.90	563.1	565.1	-	503, 473, 443, 383, 353	55, 56
40	Piceatannol 3-glucoside	30.03	405.2	407.2	-	243, 225, 199, 183, 139	73
41	Isorientin	30.58	447.1	449.1	-	357, 327, 299, 285	45
42	Isoschaftoside	30.57	563.1	565.1	-	503, 473, 443, 383, 353	55, 63
43	Schaftoside	31.43	563.1	565.1	-	473, 443, 383, 353	55, 56, 63
44	Orientin	31.60	447.1	449.1	-	357, 327, 299, 285	56, 63
45	(unidentified)	32.58	463.2	-	-	417, 255, 161, 45	

Table 2-2. Continued

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
46	Vitexin	32.90	431.1	433.1	-	341, 311, 283	45, 63
47	Vicenin 3	33.34	563.1	565.1	-	473, 443, 383, 353	55, 56
48	Vitexin 2''-O-rhamnoside	33.79	577.2	579.2	-	413, 311, 293	45
49	Apigenin hexosyl pentoside 1	34.08	563.1	565.1	-	473, 443, 383, 353, 293	57
50	Apigenin hexosyl pentoside 2	34.37	563.1	565.1	-	473, 443, 383, 353, 325	57
51	Apigenin 6,8-di-pentoside 1	34.88	533.2	535.2	-	473, 443, 383, 353, 325	57
52	Isovitexin	35.28	431.1	433.1	-	341, 311, 283	45, 63
53	Apigenin 6,8-di-pentoside 2	35.52	533.2	535.2	-	473, 443, 383, 353, 297	57
54	Apigenin hexosyl pentoside 3	35.63	563.1	565.1	-	473, 443, 383, 353, 297	57
55	Isoquercitrin	35.94	463.1	465.1	-	301, 300, 271, 255	STD ¹⁾
56	Isochlorogenic acid A	35.98	515.1	-	-	353, 191, 179, 135	STD
57	Isovitexin 2''-O-rhamnoside	36.02	577.2	579.2	-	457, 413, 341, 323, 293	45
58	Vitexin 2''-O-xyloside	36.05	563.1	565.1	-	443, 413, 383, 341, 311	55
59	Hesperidin	36.21	609.1	611.1	-	301, 300, 271	58
60	Naringin	36.44	579.1	-	-	459, 271, 151	STD

¹⁾ STD; standard analysis.

Table 2-2. Continued

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
61	Hyperoside	36.68	463.1	465.1	-	301, 300, 271	59, 60
62	Rutin	36.90	609.1	611.1	-	301, 300, 271, 255	STD ¹⁾
63	Apigenin 6,8-di-pentoside 3	36.96	533.2	535.2	-	473, 443, 383, 353, 325	57
64	Apigenin 6,8-di-pentoside 4	37.81	533.2	535.2	-	473, 443, 383, 353, 325	57
65	Azelaic acid	38.35	187.1	-	-	125, 123, 97	61, 62
66	Quercetin 3-arabinoside	38.41	433.1	-	-	301, 300, 271, 255	65
67	Apigenin 6,8-di-pentoside 5	39.25	533.2	535.2	-	473, 443, 383, 353, 325	57
68	Isochlorogenic acid B	39.95	515.1	-	-	353, 191, 179, 173, 135	STD
69	Rhoifolin	40.89	577.2	579.2	-	269	63
70	Nicotiflorin	41.03	593.2	595.1	-	285, 284, 255, 227	65
71	(unidentified)	41.84	243.1	-	-	199, 183, 181, 139, 59	
72	Matairesinol	43.38	357.1	359.1	+	341, 137, 122, 103, 94	66
73	Dihydroactinidiolide	44.40	-	181.1	+	163, 135, 117, 107, 85	63
74	Quercetin	45.21	301.1	-	-	179, 151, 121, 107	STD
75	Caffeic acid dimer	50.85	357.1	359.1	-	179, 148, 135	67, 68

¹⁾ STD; standard analysis.

Table 2-2. Continued

Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
76	Trihydroxy-hexadecanoic acid	50.90	303.1	-	-	285, 247, 205, 133, 125	LMSD ¹⁾
77	Hydroxy-hexadecanedioic acid	51.72	301.2	303.2	-	283, 257, 167, 149, 133	LMSD, FooDB ²⁾
78	Dihydroxy-hydroperoxy-octadecenoic acid	53.83	345.2	-	-	327, 303, 285, 175, 133	LMSD
79	Hydroxy-docosaheptaenoic acid	54.90	343.2	345.2	-	325, 301, 283, 173, 149	LMSD, 69
80	Dihydroxy-hexadecanoic acid	55.15	287.1	289.2	-	269, 231, 225, 189, 187	LMSD, 75
81	10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol	56.30	289.2	291.2	-	271, 231, 227, 189, 187	70
82	Hydroxy-octadecatrienoic acid	58.92	293.1	-	-	275, 183, 171, 121	LMSD, 69, 75
83	Hydroxy-octadecadiene-12,14-diyneic acid	60.67	287.2	289.2	-	269, 243, 231, 213, 189	LMSD, 78
84	(unidentified)	64.14	617.4	-	-	319, 297, 279, 183	
85	(unidentified)	69.02	577.3	-	-	299, 165, 149	
86	Tamarixetin 3,7-di-rhamnoside 1	73.94	-	609.2	+	591, 559, 531	71, 72
87	(unidentified)	74.31	649.3	651.3	+	633, 573, 545, 517, 487	
88	Tamarixetin 3,7-di-rhamnoside 1	75.10	-	609.2	+	591, 559, 531, 515, 485	71, 72
89	(unidentified)	75.16	557.3	-	-	287, 269, 243, 231, 189	
90	(unidentified)	78.61	-	593.2	+	533, 505, 461, 433	

¹⁾ LMSD; lipidmaps structure database (<https://lipidmaps.org>), ²⁾ FooDB; compound database(<https://foodb.ca>).

Table 2-2. Continued

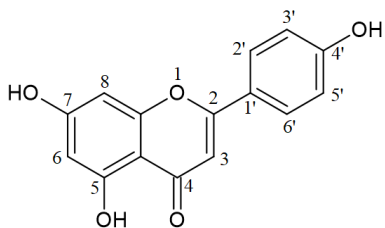
Peaks	Compound name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²		References
					Polarity	Product ions (m/z)	
91	Dendropanoxide	89.38	-	409.4*	+	285, 229, 215, 203, 177	74
92	Lupeol	90.48	-	409.4*	+	271, 259, 203, 137, 109	STD ¹⁾
93	β-Amyrin	91.88	-	409.4*	+	285, 271, 259, 231, 177	76,77
94	α-Amyrin	92.66	-	409.4*	+	285, 271, 259, 231, 137	STD
95	β-Sitosterol	93.44	-	397.4*	+	287, 175, 161, 147, 135	STD

*M-H₂O+H

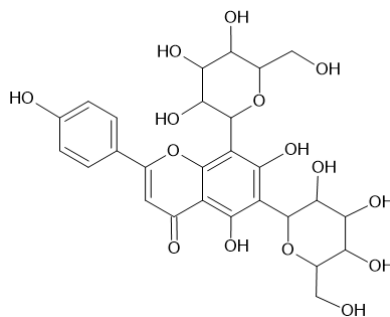
¹⁾ STD; standard analysis.

황칠나무 잎 추출물의 MS profile 분석 결과에서 가장 많은 수를 가진 것으로 확인된 성분은 apigenin을 aglycone으로 포함하는 성분들이었으며, 구조가 확인되거나 추정 가능한 apigenin 유도체 성분은 총 19종이었다. Apigenin은 다양한 식물에서 발견되는 flavonoid 성분이며, 낮은 독성과 다양한 생리활성을 나타내는 4',5,7-trihydroxy flavone 구조를 가진다(Figure 2-5). 여러 연구에서 항산화, 항염증, 면역 관련 활성 등이 보고되고 있으며, Alzheimer나 Parkinson 질환 관련 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{79,80)} 또한 항균이나 다양한 항암 활성 관련 효과도 보고되고 있으며, 이러한 활성들이 apigenin 뿐만 아니라 여러 형태의 유도체에서도 나타나는 것으로 보고되고 있다.⁸¹⁻⁸⁴⁾

개별 성분에 대한 연구에서 vitexin (peak 46)이나 isovitexin (peak 52)은 항산화, 항암, 항염증, 신경보호 효과 등 다양한 생리활성과 함께 당뇨 질환 개선 효과도 나타내는 것으로 보고되고 있으며,^{85,86,95)} schaftoside (peak 43)는 항염증 및 면역조절 효과, 뇌혈관 질환 개선, SARS-CoV-2 virus에 대한 효과 등이 연구되었다.⁸⁷⁻⁸⁹⁾ Isoschaftoside (peak 42) 역시 항염증 관련 활성과 함께 비알콜성 지방간 질환 개선 효과가 보고되고 있으며,^{90,91)} vicenin 2 (peak 36)는 항산화 및 항염증 활성과 항생제 내성세균에 대한 항균활성 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁹²⁻⁹⁴⁾ Vicenin 1 (peak 39)과 vicenin 3 (peak 47)은 각각 당뇨 관련 증상과 골관절염 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 보고되고 있다.^{95,96)}

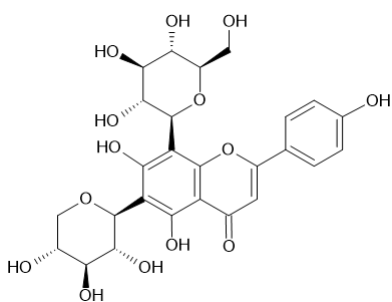


Apigenin



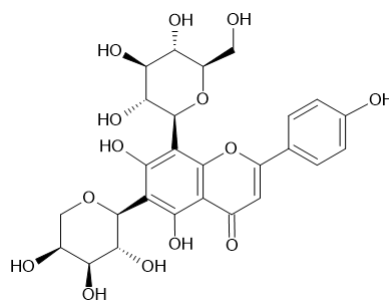
Peak 36

Vicenin 2 (apigenin 6,8-di-glucoside)



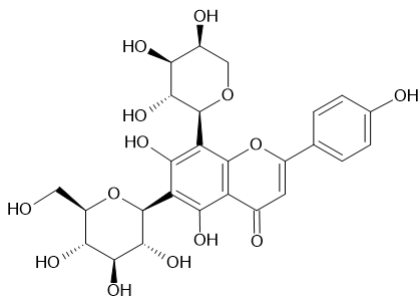
Peak 39

Vicenin 1 (apigenin 6-xyloside-8-glucoside)



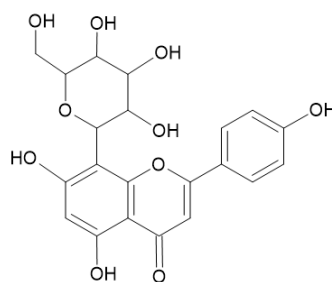
Peak 42

Isoschaftoside (apigenin 6-arabinoside-8-glucoside)



Peak 43

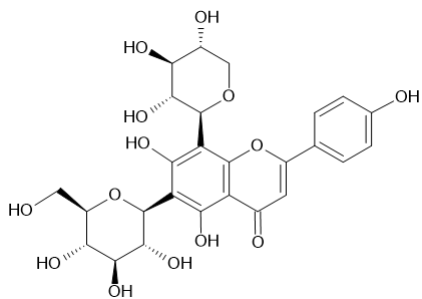
Schaftoside (apigenin 6-glucoside-8-arabinoside)



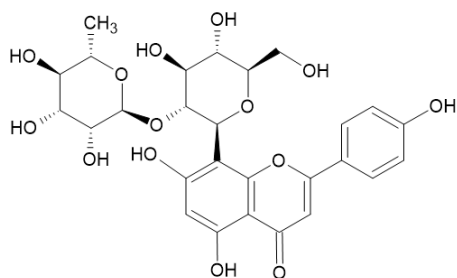
Peak 46

Vitexin (apigenin 8-glucoside)

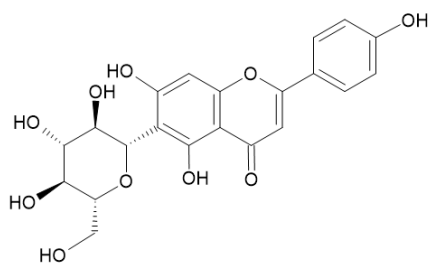
Figure 2-5. Structures of apigenin derivatives.



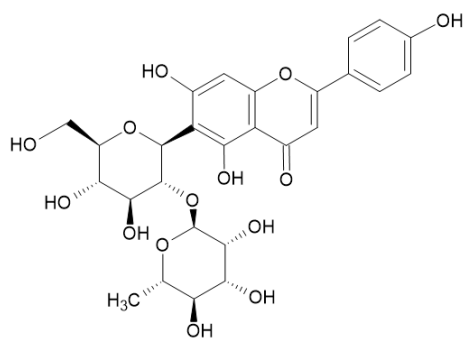
Peak 47
 Vicenin 3 (apigenin
 6-glucoside-8-xyloside)



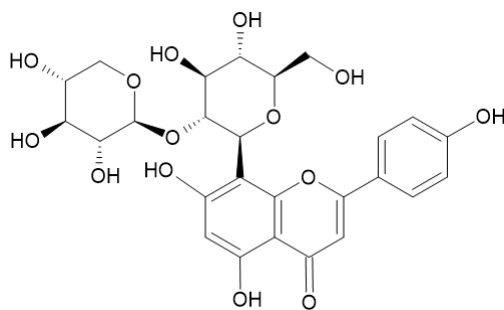
Peak 48
 Vitexin 2''-O-rhamnoside



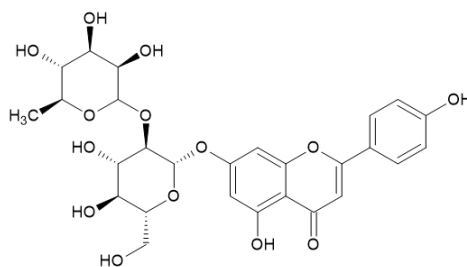
Peak 52
 Isovitexin (apigenin 6-glucoside)



Peak 57
 Isovitexin 2''-O-rhamnoside



Peak 58
 Vitexin 2''-O-xyloside

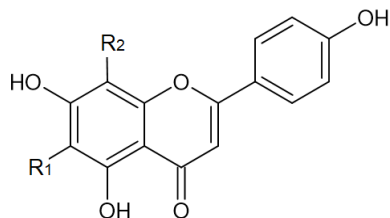


Peak 69
 Rhoifolin (apigenin
 7-neohesperidoside)

Figure 2-5. Continued.

이와 같이 다양한 생리활성을 나타내는 apigenin 관련 성분이 황칠나무 잎 추출물에서 확인된 연구는 지금까지 없었으며, 19종에 이를 만큼 다양한 apigenin 유도체가 황칠나무 잎에서 발견된 결과는 황칠나무를 대상으로 하는 다양한 연구의 기초 자료로서 활용될 수 있을 것이다.

한편, 기존 문헌 대조를 통해 Figure 2-5와 같이 vitexin 등 11종의 apigenin 유도체에 대한 구조 확인을 수행하였지만, apigenin에 hexose와 pentose가 각각 1분자씩 결합된 형태로 추정되는 peak 49, 50, 54와 apigenin에 pentose가 2분자 결합된 형태로 추정되는 peak 51, 53, 63, 64, 67 등 8종에 대한 구조 확인은 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다(Figure 2-6).

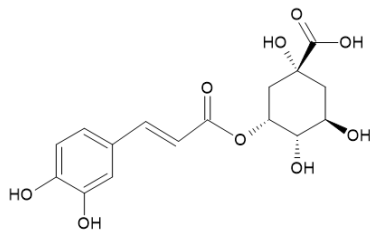


Peaks	R ₁	R ₂
49, 50, 54 (Apigenin hexosyl pentoside)	glucose	pentose (arabinose, ribose, xylose)
	pentose (arabinose, ribose, xylose)	glucose
51, 53, 63, 64, 67 (Apigenin 6,8-di-pentoside)	pentose (arabinose, ribose, xylose)	pentose (arabinose, ribose, xylose)

Figure 2-6. Estimable structures of unidentified apigenin derivatives.

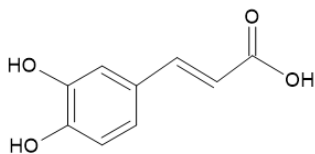
DPPH radical 소거 활성 성분에 대한 분석을 수행하였던 제1장의 내용에서 확인된 12종의 활성 성분에는 chlorogenic acid 등 6종의 caffeic acid 유도체들이 포함되어 있었는데, MS profile 분석에서도 이들 6종의 성분들과 caffeic acid (peak 13)가 확인되었다(Figure 2-7). Caffeic acid 1분자와 quinic acid가 결합된 형태인 3종의 caffeoylquinic acid (peak 4, 16, 17)는 여러 연구를 통하여 뛰어난 항산화 활성과 함께 항염증 관련 활성 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾ Caffeic acid 2분자와 quinic acid가 결합된 형태인 2종의 dicaffeoylquinic acid (peak 56, 68) 역시 항산화 활성을 가지는 성분이며, α -glucosidase 저해 효과를 나타내는 것으로 보고되는 성분이다.^{101,102)}

한편, quercetin과 이를 기본구조로 하는 유도체들도 확인되었는데, DPPH radical 소거 활성 성분으로 확인되었던 isoquercitrin, hyperoside, rutin 등 3종을 포함하여 총 5종의 quercetin 관련 성분이 MS profile에서 확인되었다(Figure 2-8). Quercetin (peak 74)은 전형적인 flavonoid 성분으로서 항산화, 항염증, 항바이러스 활성 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁰³⁾ Isoquercitrin (peak 55)은 항산화 활성, 피부 미백 및 항주름 효과, 항균 활성 등을 나타내는 성분이며,¹⁰⁴⁾ hyperoside (peak 61)는 항염증 활성, 항바이러스 활성, 항통증 효과, 심혈관계 질환 개선 및 간보호 효과 등이 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁰⁵⁾ 또한 rutin (peak 74)은 항산화 활성, 항염증 활성, 항고혈압 및 뇌졸중 예방 효과, 콜레스테롤 저하 효과 등을 나타내는 성분이다.¹⁰⁶⁾



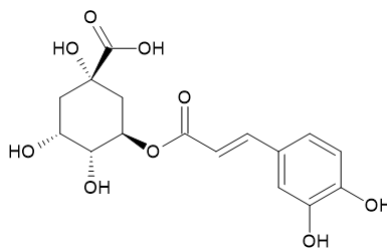
Peak 4

Neochlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)



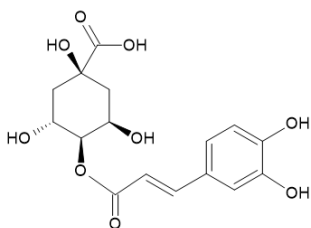
Peak 13

Caffeic acid



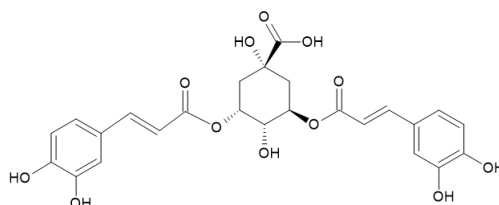
Peak 16

Chlorogenic acid
(3-caffeoylquinic acid)



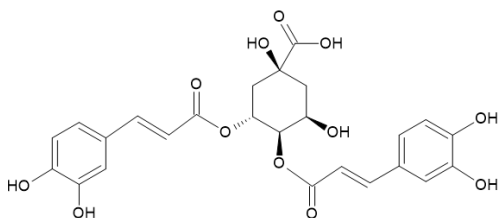
Peak 17

Cryptochlorogenic acid
(4-caffeoylquinic acid)



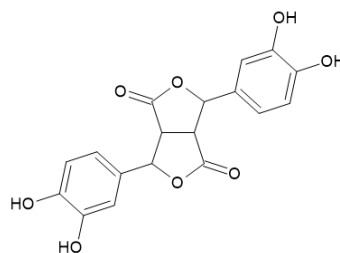
Peak 56

Isochlorogenic acid A
(3,5-dicafeoylquinic acid)



Peak 68

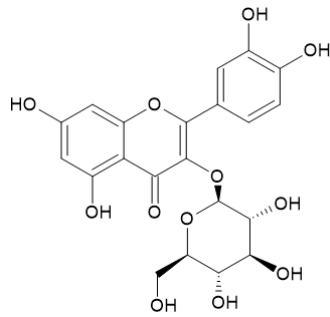
Isochlorogenic acid B
(3,4-dicafeoylquinic acid)



Peak 75

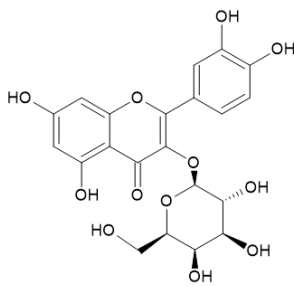
Caffeic acid dimer

Figure 2-7. Structures of caffeic acid derivatives.



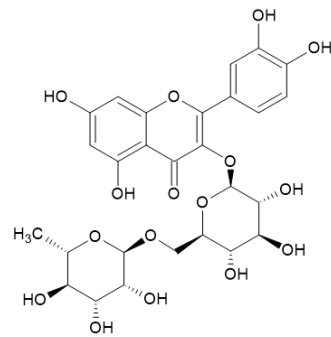
Peak 55

Isoquercitrin (quercetin-3-glucoside)



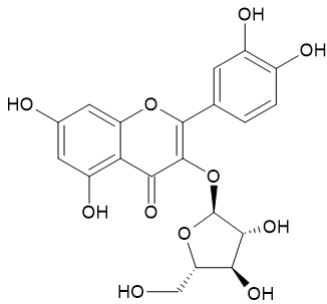
Peak 61

Hyperoside (quercetin-3-galactoside)



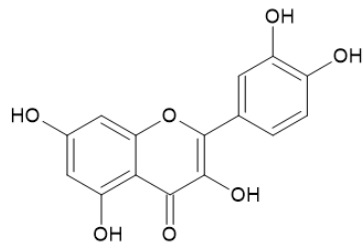
Peak 62

Rutin (quercetin rutinoside)



Peak 66

Quercetin 3-arabinoside



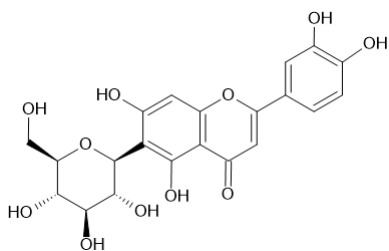
Peak 74

Quercetin

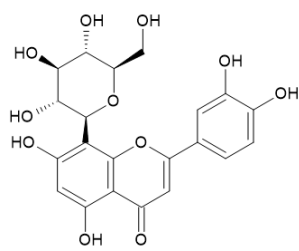
Figure 2-8. Structures of quercetin derivatives.

그 밖의 flavonoid 성분으로서 Figure 2-9와 같은 성분들이 확인되었다. Luteolin 구조에 glucose가 결합된 형태인 orientin (peak 44)은 항생제 내성세균에 대한 항균활성, 항염증 활성, 항암 활성 등을 나타내는 것으로 보고되고 있으며,^{94,109,110)} 동일한 구조를 가지는 isorientin (peak 41)은 항염증 활성과 함께 혈압이나 인지장애 관련 질환 등에 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.^{109,111,112)}

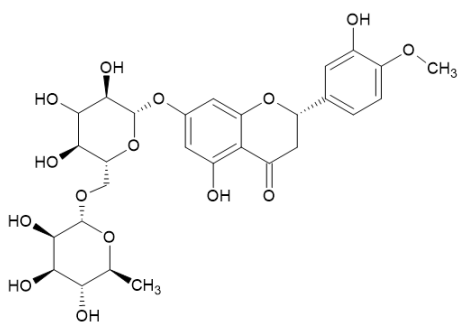
Hesperidin (peak 59)은 항산화 활성, 항균 활성, 항염증 활성, 항암 관련 활성 등을 나타내는 성분이며,^{113,114)} naringin (peak 60)은 hesperidin과 마찬가지로 항산화 활성 등 다양한 활성과 함께 Alzheimer와 Parkinson 질환 관련 활성도 가지는 것으로 보고되고 있다.^{114,115)} Nicotiflorin (peak 70)은 항생제 내성세균에 대한 항균활성이나 당뇨 관련 활성 등이 연구되고 있는 성분이다.^{94,95)}



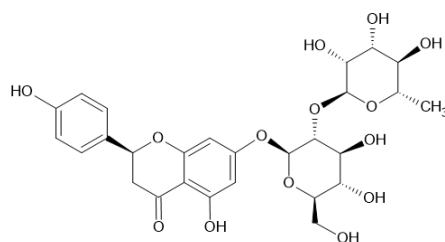
Peak 41
Isoorientin (luteolin 6-glucoside)



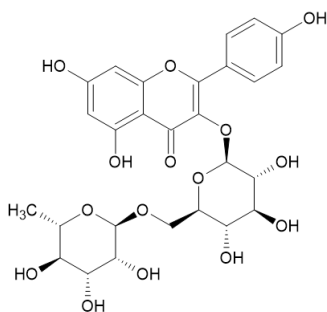
Peak 44
Orientin (luteolin 8-glucoside)



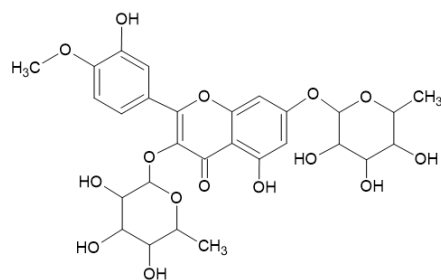
Peak 59
Hesperidin (hesperitin 7-rutinoside)



Peak 60
Naringin (naringenin
7-neohesperidoside)



Peak 70
Nicotiflorin (kaempferol 3-rutinoside)

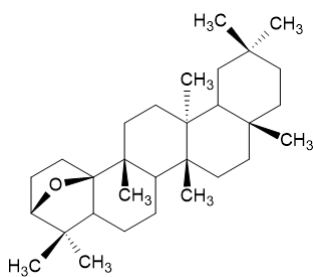


Peak 86, 88
Tamarixetin 3,7-di-rhamnoside

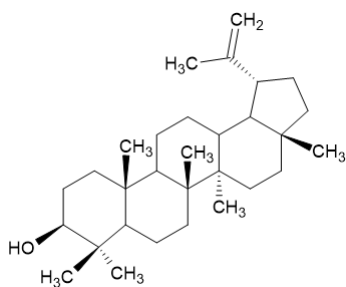
Figure 2-9. Structures of other flavonoids.

황칠나무와 관련된 다양한 연구에서 다뤄졌었던 dendropanoxide를 포함한 triterpenoid 계열의 성분 5종이 MS profile에서 확인되었다(Figure 2-10). 상대적으로 지용성이 강한 이들 성분들은 분석 후반부에 해당하는 80 분 이후에 머무름 시간을 형성하였다.

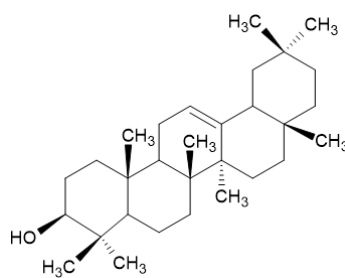
Dendropanoxide (peak 91)는 여러 연구를 통하여 파골세포 생성 억제 효과, 암세포에 대한 세포독성, 간 섬유화 개선 효과, 신장 손상 보호 효과, 항당뇨 활성 등의 활성을 가지는 것으로 보고되는 성분이다.¹⁻⁶⁾ α -Amyrin (peak 94)과 β -amyrin (peak 93)은 항염증 효과, 간이나 위와 같은 소화기관 보호 효과, 고지혈증이나 고혈당 억제 효과 등을 나타내는 성분으로 알려져 있다.¹⁰⁷⁾ Lupeol (peak 92)에 대한 연구에서는 항염증, 항균 활성 등과 함께 뇌신경보호 효과, 항암 효과 등이 제시되어 왔다.¹⁰⁸⁾ β -Sitosterol (peak 95)은 dendropanoxide와 유사한 활성 연구가 수행되었으며,^{1,2)} 피부 미백 및 탈모 억제 효과와 전립선 비대증 관련 효과에 대한 보고가 있었다.^{14,116)}



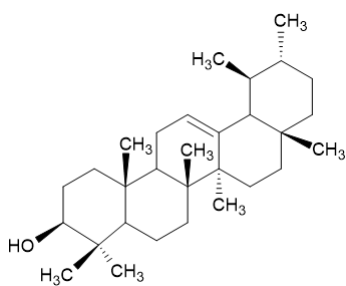
Peak 91
Dendropanoxide



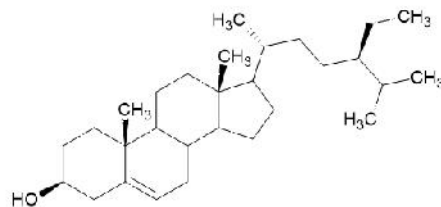
Peak 92
Lupeol



Peak 93
 β -Amyrin



Peak 94
 α -Amyrin



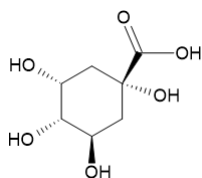
Peak 95
 β -Sitosterol

Figure 2-10. Structures of triterpenoids.

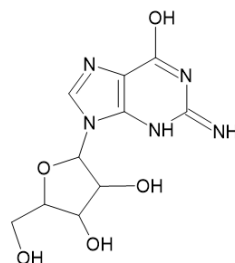
p-Coumaric acid (peak 26)는 항산화 활성이 높은 phenolic acid 성분으로서 항균활성, 항염증 활성, 항당뇨 및 항암 활성 등 다양한 생리활성을 나타내는 성분으로 알려져 있다.^{117,118)} 분자 구조 내에 coumaric acid 구조를 포함하고 있는 4-*p*-coumaroylquinic acid (peak 34)와 5-*p*-coumaroylquinic acid (peak 25)는 여러 연구에서 항산화 활성이나 항바이러스 관련 활성 등이 있는 것으로 보고되고 있다.^{119,120)}

Roseoside (peak 23)는 항산화 활성, melanin 합성 저해를 통한 피부 미백 관련 활성, 고혈압 억제 효과와 관련된 보고가 있었다.^{121,122)} Roseoside와 유사한 구조를 가지는 sesquiterpenoid 성분인 citroside A (peak 24)는 항염증 활성과 관련된 여러 연구가 수행되었다.^{123,124)}

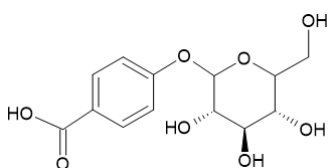
Matairesinol (peak 72)은 다양한 항산화 활성과 함께 체장암 관련 항암 보조 효과를 나타내는 것으로 보고되는 성분이며,^{125,126)} azelaic acid (peak 65)는 다양한 세균에 대한 항균활성, 항염증 관련 활성, 피부 미백 관련 활성 등을 나타내는 것으로 알려진 성분이다.¹²⁷⁾



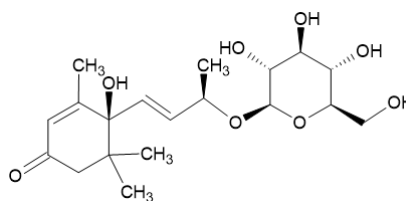
Peak 1
Quinic acid



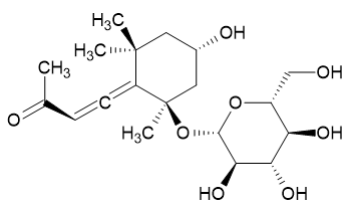
Peak 2
Guanosine



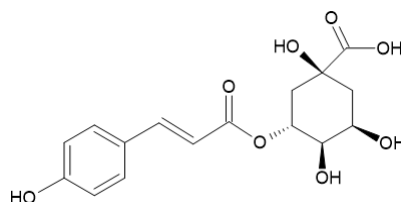
Peak 9
4-Hydroxybenzoic acid glucoside



Peak 23
Roseoside

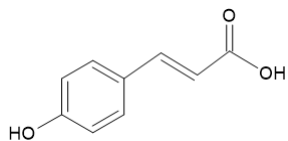


Peak 24
Citroside A

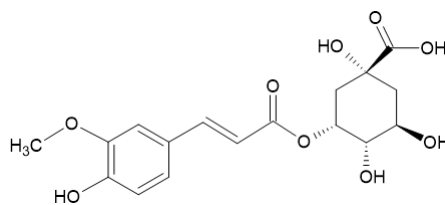


Peak 25
5-*p*-Coumaroylquinic acid

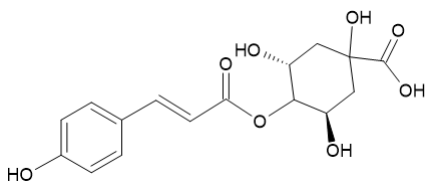
Figure 2-11. Structures of other identified compounds.



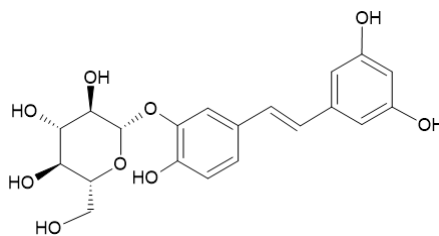
Peak 26
p-Coumaric acid



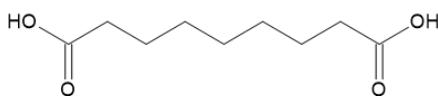
Peak 33
5-Feruloylquinic acid



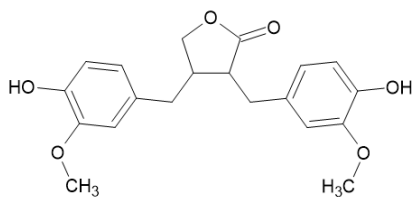
Peak 34
4-*p*-Coumaroylquinic acid



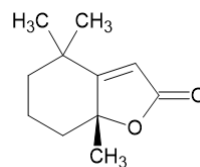
Peak 40
Piceatannol 3-glucoside



Peak 65
Azelaic acid



Peak 72
Matairesinol



Peak 73
Dihydroactinidiolide

Figure 2-11. Continued.

Caffeic acid나 coumaric acid와 같은 phenolic acid 구조를 포함하는 성분으로서 dihydroxybenzoyl hexoside (peak 3), caffeoyl diglucoside (peak 10), coumaroyl glucoside (peak 12), feruloyl glucoside (peak 18), benzyl alcohol hexose pentose (peak 19, 20) 등의 성분들이 MS profile 분석 결과에서 검토되었으며, 해당 성분들에 대한 정확한 구조를 확인하기 위해서 추가적인 연구가 이루어질 필요가 있다.

또한, 분자 구조에 이중결합 (C=C)이나 삼중결합 (C≡C)을 포함하고 hydroxy (-OH) 기를 하나 이상 가지고 있는 hydroxy-fatty acid 계열로 추정되는 성분이 8종을 확인하였다. 관련 연구 문헌과 lipid 성분 관련 database를 참조하여 trihydroxy-hexadecanoic acid (peak 76), hydroxy-hexadecanedioic acid (peak 77), dihydroxy-hydroperoxy-octadecenoic acid (peak 78), hydroxy-docosahexaenoic acid (peak 79), dihydroxy-hexadecanoic acid (peak 80), 10,17-octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol (peak 81), hydroxy-octadecatrienoic acid (peak 82), hydroxy-octadecadiene-12,14-diyneic acid (peak 83) 등의 성분 추정 결과를 도출하였다. 이들 성분 중 10,17-octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol (peak 81)은 melanin 생성을 억제함으로써 피부 미백 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있으며,⁷⁰⁾ hydroxy-octadecadiene-12,14-diyneic acid (peak 83)는 항보체(anti-complementary) 활성을 나타내는 성분으로 밝혀졌다.⁷⁸⁾

2.3.3 LC-MS/MS MRM mode 성분 profile 분석 조건 설정

LC-MS/MS는 모분자량으로부터 확인되는 precursor ion과 이로부터 생성되는 product ion 조건을 조합한 MRM mode의 분석을 수행할 수 있다. 이와 같은 선택적 검출 방법은 식물 추출물과 같이 최소 수 백가지 이상의 성분이 혼재되어 있는 분석에서 인접 성분의 방해를 최소화할 수 있으며, 머무름 시간이 겹치는 성분까지도 구분하여 분석이 가능하다. 결과적으로 일반적인 LC-UV-D 장비의 성분 profile 분석 결과에 비해, 정성 분석과 시료 간 비교 정량 분석에서 활용도가 높은 분석 결과를 얻을 수 있다.

LC-MS 및 MS/MS 분석 결과에서 검토된 Table 2-2의 MS profile 자료를 바탕으로 각 peak의 성분별 MRM mode 분석 조건을 설정하였다. 설정 과정은 제1장의 Figure 1-18에 제시한 radical 소거 활성 성분의 MRM mode 분석 조건 설정과 동일한 절차를 거쳤으며, peak 또는 성분별로 감도가 우수한 극성(polarity)을 기준으로 설정하였다.

이러한 검토 및 설정 과정의 적용이 가능한 MS peak들에 대한 MRM 분석 조건 검토 결과를 Table 2-3에 제시하였다. 성분 특성으로 인한 예외적인 경우를 제외하고 각 peak 또는 성분별로 3가지의 MRM transition 조건을 기본적으로 설정하여 보다 정확한 정성 분석의 도구로 활용하고자 하였다.

Table 2-3. MRM conditions for compound profile analysis of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Retention time (min)	ESI Polarity	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)		
				1	2	3
1	1.74	-	191.1	85.1	111.1	93.1
2	3.89	+	284.1	152.1	135.1	110.1
3	7.50	-	315.1	108.0	152.0	153.0
4	11.99	-	353.1	191.1	179.1	135.1
5	12.00	+	443.1	317.1	149.1	-
6	12.75	-	491.2	89.1	149.1	59.1
7	13.73	-	477.2	431.2	293.2	233.1
8	13.94	-	447.1	152.1	108.0	109.2
9	15.68	-	299.1	137.0	93.0	-
10	17.05	-	503.1	179.2	135.1	341.1
11	17.26	-	457.2	411.3	279.3	101.1
12	18.15	-	325.1	119.0	163.1	-
13	18.48	-	431.2	89.1	149.1	119.1
14	18.42	-	179.1	135.1	107.1	-
15	18.64	-	473.2	179.2	135.1	-
16	19.22	-	353.1	191.1	85.1	127.1
17	19.48	-	353.1	173.1	135.1	179.1
18	22.09	-	355.2	193.1	134.1	178.1
19	22.27	-	447.2	401.2	269.2	161.1
20	22.60	-	447.1	401.1	269.1	161.1
21	23.22	-	431.2	179.2	119.1	89.1
22	23.70	-	563.2	311.1	149.1	89.0
23	23.96	-	431.2	385.2	161.1	153.1
24	24.25	-	431.2	385.2	161.1	153.1
25	24.36	-	337.1	191.2	93.0	119.1

Table 2-3. Continued

Peaks	Retention time (min)	ESI Polarity	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)		
				1	2	3
26	24.73	-	163.1	119.1	93.1	117.1
27	24.73	-	431.2	179.3	89.1	45.0
28	25.16	-	431.2	385.2	431.2	315.1
29	25.22	-	563.3	517.2	149.1	205.2
30	26.04	-	461.2	415.2	269.2	161.1
31	26.19	-	563.3	517.2	499.2	447.2
32	26.57	-	427.2	381.2	249.2	101.1
33	26.81	-	367.1	191.2	134.1	93.1
34	27.23	-	337.1	191.2	85.0	93.0
35	27.40	-	479.3	433.2	271.3	99.1
36	27.60	-	593.2	353.1	383.1	473.1
37	28.89	-	431.2	179.1	225.2	119.1
38	29.84	-	439.2	393.3	149.1	89.1
39	29.90	-	563.1	503.1	473.1	353.1
40	30.03	-	405.2	243.2	183.2	139.2
41	30.58	-	447.1	327.1	357.1	133.1
42	30.57	-	563.1	353.1	383.1	297.1
43	31.43	-	563.1	473.1	443.1	353.1
44	31.60	-	447.1	327.1	357.1	133.1
45	32.58	-	463.2	417.3	161.2	45.1
46	32.90	-	431.2	311.1	283.1	117.1
47	33.34	-	563.1	473.1	443.1	383.1
48	33.79	-	577.2	413.1	293.1	311.1
49	34.08	-	563.1	473.1	443.1	353.1
50	34.37	-	563.1	473.1	443.1	353.1

Table 2-3. Continued

Peaks	Retention time (min)	ESI Polarity	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)		
				1	2	3
51	34.88	-	533.2	443.1	353.1	383.1
52	35.28	-	431.1	341.1	311.1	283.1
53	35.52	-	533.2	443.1	353.1	383.1
54	35.63	-	563.1	473.1	443.1	353.1
55	35.94	-	463.1	300.1	301.2	271.1
56	35.98	-	515.1	353.1	191.1	179.1
57	36.02	-	577.2	413.1	293.1	457.1
58	36.05	-	563.1	413.1	341.1	293.1
59	36.21	-	609.1	300.1	301.1	271.1
60	36.44	-	579.1	271.2	151.1	459.1
61	36.68	-	463.1	300.0	271.0	301.0
62	36.90	-	609.1	300.1	301.1	271.1
63	36.97	-	533.2	443.1	353.1	383.1
64	37.81	-	533.2	443.1	353.1	383.1
65	38.35	-	187.2	125.0	97.1	123.0
66	38.41	-	433.1	300.1	301.1	271.1
67	39.25	-	533.2	443.1	353.1	383.1
68	39.95	-	515.1	353.1	173.1	179.1
69	40.89	-	577.2	269.1	-	-
70	41.03	-	593.2	285.1	255.1	227.1
71	41.84	-	243.2	183.2	139.2	181.3
72	43.38	+	359.1	137.1	341.1	122.1
73	44.40	+	181.2	163.2	135.2	-
74	45.21	-	300.9	151.0	179.1	107.1
75	50.85	-	357.1	135.0	342.1	179.1

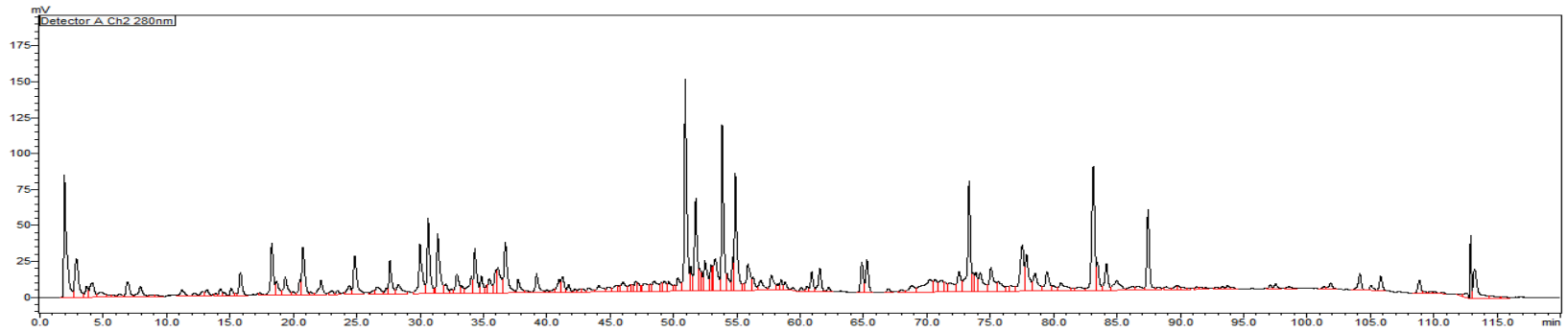
Table 2-3. Continued

Peaks	Retention time (min)	ESI Polarity	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)		
				1	2	3
76	50.90	-	303.1	133.1	285.1	205.1
77	51.72	-	301.2	167.1	283.2	133.0
78	53.83	-	345.2	303.2	59.0	285.2
79	54.90	-	343.2	301.2	173.1	325.2
80	55.15	-	287.2	231.2	225.2	269.2
81	56.30	-	289.2	271.2	231.2	227.2
82	58.92	-	293.1	275.1	171.1	121.1
83	60.67	-	287.2	189.2	231.2	243.2
84	64.14	-	617.5	297.4	183.3	223.3
85	69.02	-	577.3	299.1	165.1	-
86	73.94	+	609.2	591.3	559.3	531.3
87	74.31	+	651.3	633.3	573.3	487.2
88	75.10	+	609.3	591.2	531.2	559.2
89	75.16	-	557.3	287.2	189.1	231.2
90	78.61	+	593.2	533.2	460.2	461.2
91	89.38	+	409.4	137.2	231.2	271.3
92	90.48	+	409.4	137.2	109.1	259.3
93	91.88	+	409.4	137.2	231.2	271.3
94	92.66	+	409.4	137.2	231.2	271.3
95	93.44	+	397.4	161.2	135.1	147.2

설정이 완료된 MRM 조건을 적용하여 황칠나무 잎 추출물을 분석한 결과 Figure 2-12 (B)와 같이 MRM mode MS profile을 확인할 수 있었다. 또한 성분 profile 분석에서 일반적으로 사용되고 있는 검출기인 UVD를 적용하여 동일한 분리 조건에서 수행한 LC-UVD 비교 분석 결과를 Figure 2-12 (A)에 추가로 제시하였다.

LC-UVD 분석 결과에 비하여 명확해진 peak들을 MRM mode MS profile chromatogram에서 확인할 수 있었으며, 또한 머무름 시간이 유사하거나 중복이 되는 성분들의 분석이 가능한 MRM mode의 분석 특성으로 인해 95종의 MS profile peak의 개별적인 확인이 가능하였다. 이와 같은 특성으로 인해 LC-UVD에서는 단일 peak로 나타난 경우라도 MS profile에서는 2~4개의 성분이 유사한 머무름 시간에 겹쳐져 있는 경우가 있음을 확인하였다.

[A]



[B]

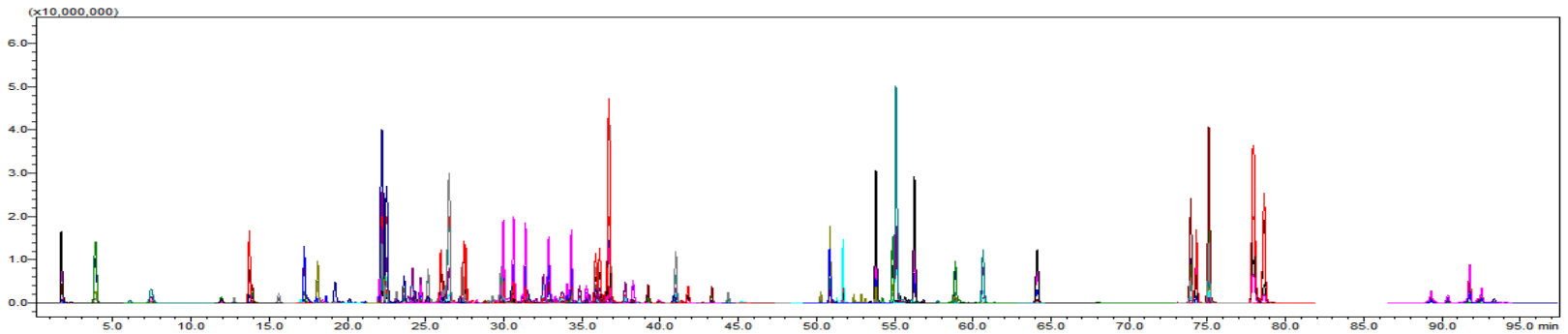


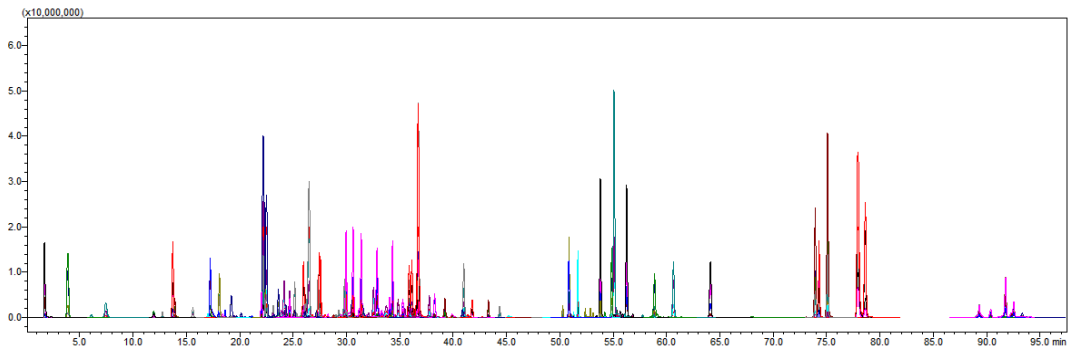
Figure 2-12. Comparison of results by compound profile analysis method of *D. morbifera* leaf extracts.
 A; LC-UVD 280 nm, B; LC-MS/MS MRM mode.

2.3.4 LC-MS/MS 활용 성분 profile 비교 분석 결과

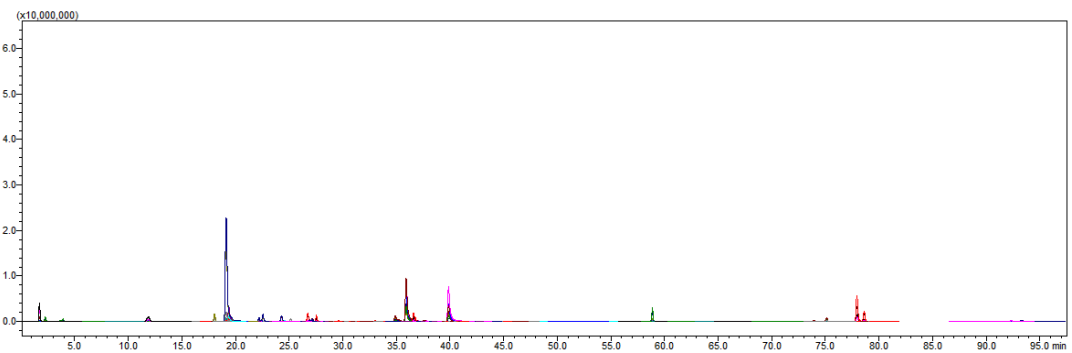
설정된 MRM mode MS profile 분석 조건의 유용성을 검토하기 위해 국내에서 자생 또는 재배되고 있는 식물의 잎 추출물을 제조하여 비교 분석을 실시하였다. 황칠나무(*Dendropanax morbifera*; A) 잎 추출물과 동일한 추출 조건을 적용하여 커피나무(*Coffea arabica*; B), 뽕나무(*Morus alba*; C), 감나무(*Diospyros kaki*; D), 대나무(*Bambusa bambos*; E), 포포나무(*Asimina triloba*; F), 헛개나무(*Hovenia dulcis*; G), 드릅나무(*Aralia elata*; H), 음나무(*Kalopanax septemlobus*; I), 무환자나무(*Sapindus mukorossi*; J), 산사나무(*Crataegus pinnatifida*; K), 꾸지뽕나무(*Maclura tricuspidata*; L) 등 11종의 식물 잎 추출물을 분석하였다.

각 추출물별 MRM mode LC-MS/MS chromatogram을 Figure 2-13과 같이 확인할 수 있었으며, 황칠나무 잎 추출물의 MS profile의 일부 성분들이 각각의 추출물에서 검출되었다. 각 MS profile 성분을 비교하기 위하여 황칠나무 잎 추출물의 성분별 peak area를 기준으로 환산한 상대 함량 산출 결과를 Table 2-4에 제시하였다.

[A]



[B]



[C]

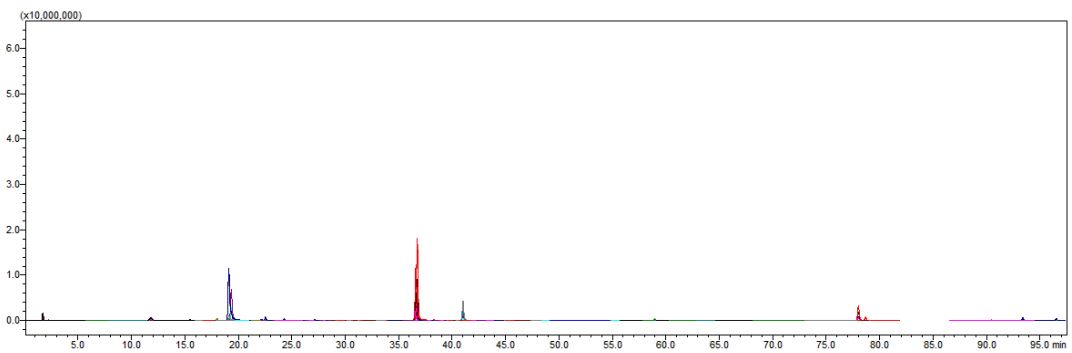
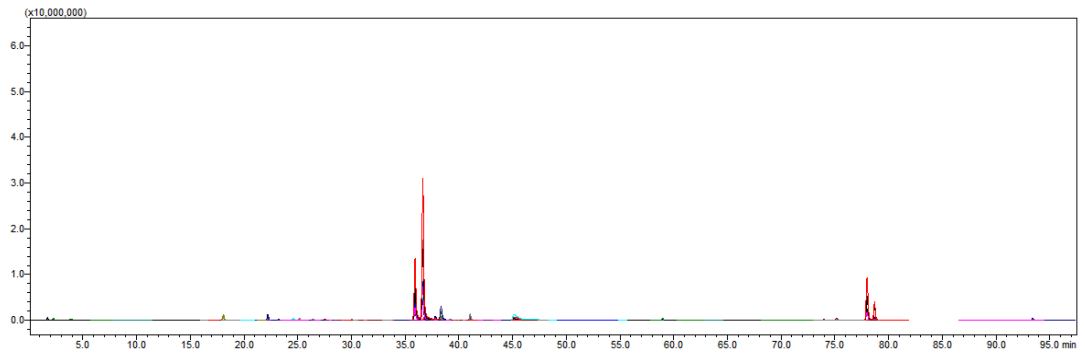
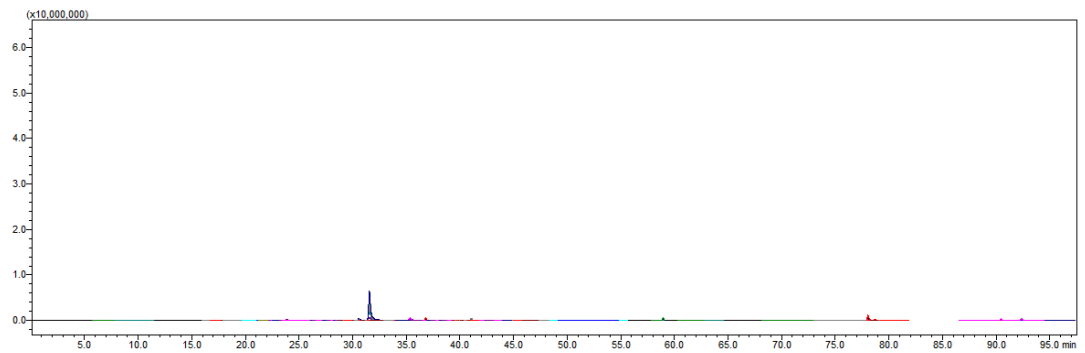


Figure 2-13. Comparison of LC-MS/MS MRM mode analysis results of plant leaf extracts. A; *Dendropanax morbifera*, B; *Coffea arabica*, C; *Morus alba*.

[D]



[E]



[F]

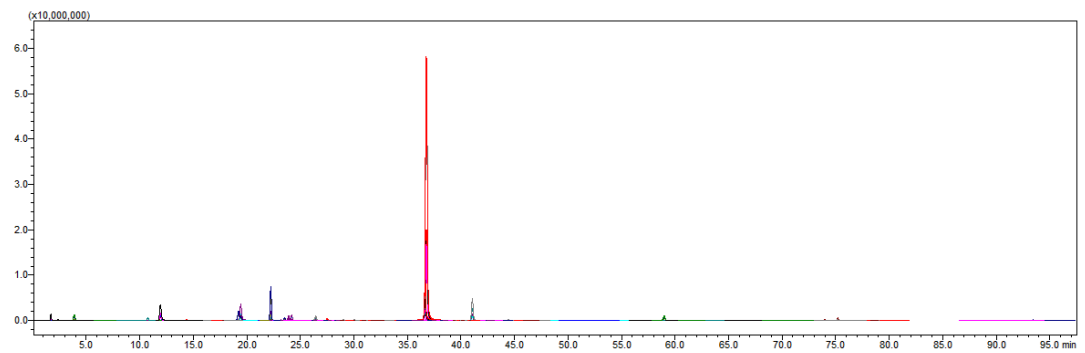
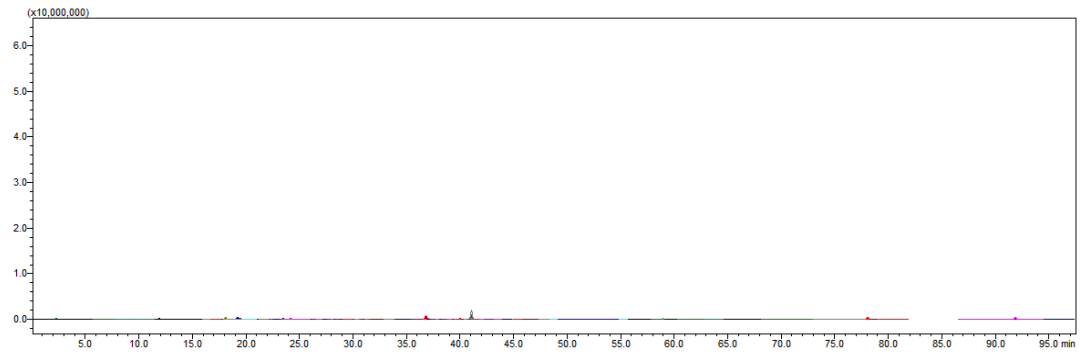
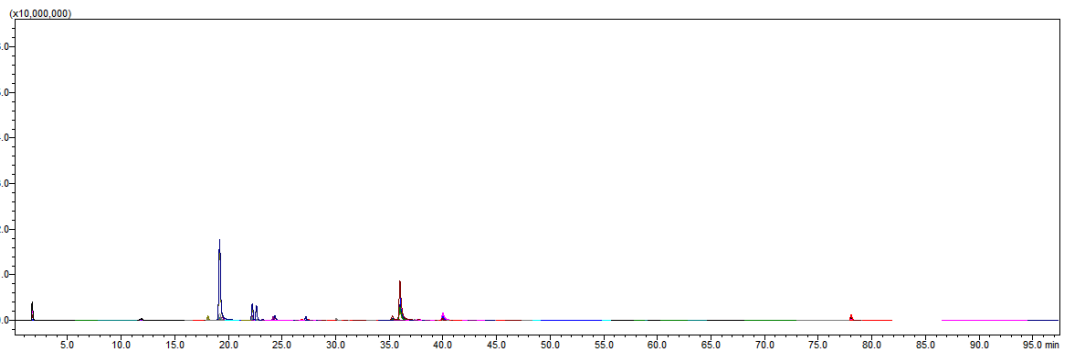


Figure 2-13. Continued. D; *Diospyros kaki*, E; *Bambusa bambos*, F; *Asimina triloba*.

[G]



[H]



[I]

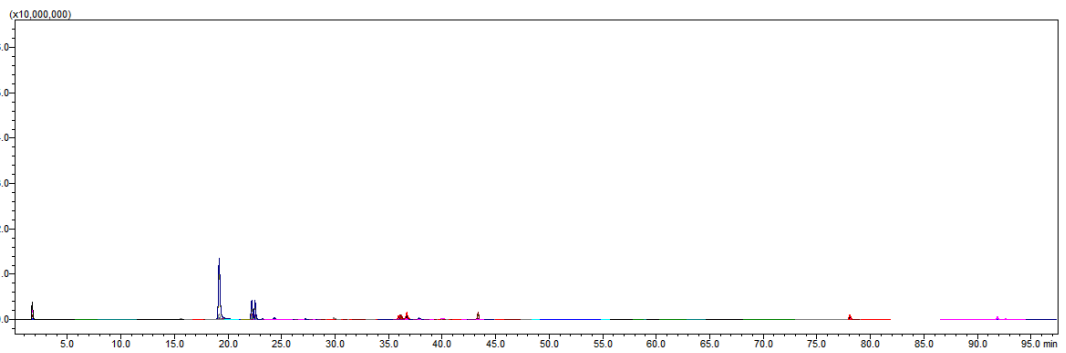
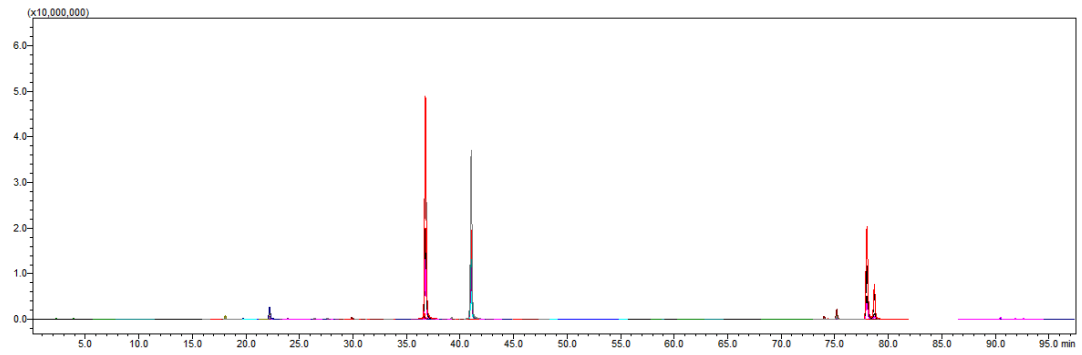
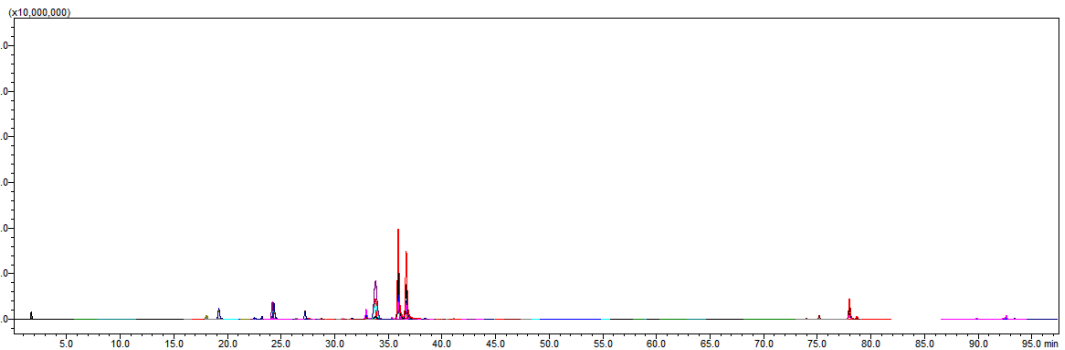


Figure 2-13. Continued. G; *Hovenia dulcis*, H; *Aralia elata*, I; *Kalopanax septemlobus*.

[J]



[K]



[L]

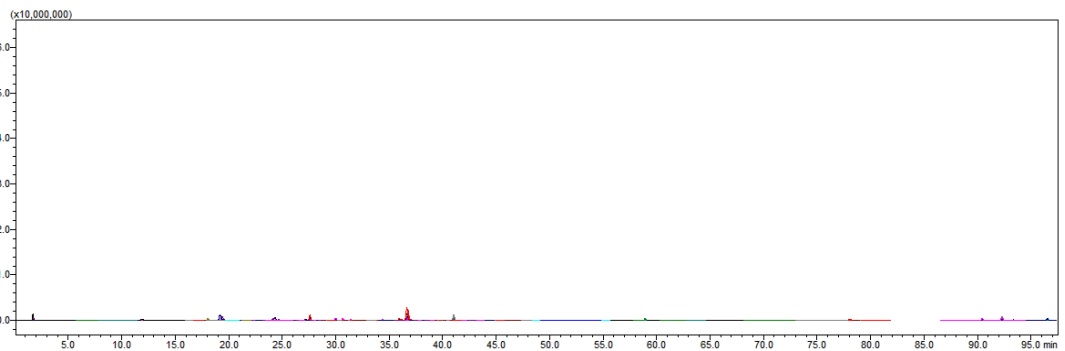


Figure 2-13. Continued. J; *Sapindus mukorossi*, K; *Crataegus pinnatifida*, L; *Maclura tricuspidata*.

Table 2-4에 제시한 바와 같이 다른 식물의 잎 추출물(B ~ L) 분석 결과에서 황칠나무 잎 추출물(A)에서 확인된 각 성분의 peak 면적 대비 1% 이하 수준으로 나타나 황칠나무 잎 추출물 특이적 성분으로 판단할 수 있는 성분으로서 naringin hexoside (peak 35), piceatannol 3-glucoside (peak 40), vicenin 3 (peak 47), apigenin hexosyl pentoside 1 (peak 49), apigenin hexosyl pentoside 3 (peak 54), isovitexin 2''-O-rhamnoside (peak 57), vitexin 2''-O-xyloside (peak 58), naringin (peak 60), apigenin 6,8-di-pentoside 3 (peak 63), caffeic acid dimer (peak 75) 등 10종의 phenolic acid 유도체와 flavonoid 성분들이 확인되었다.

또한 trihydroxy-hexadecanoic acid (peak 76), hydroxy-hexadecanedioic acid (peak 77), dihydroxy-hydroperoxy-octadecenoic acid (peak 78), hydroxy-docosa hexaenoic acid (peak 79), dihydroxy-hexadecanoic acid (peak 80), 10,17-octa decadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol (peak 81) 등 6종의 hydroxy fatty acid 계열의 성분이 황칠나무 잎 추출물에서 특이적으로 검출되는 것으로 확인되었다. 한편, 황 칠나무 잎 추출물의 특이적 성분이지만 본 연구의 MS profile 설정 단계에서 성분 에 대한 정성 분석이 이루어지지 못한 peak 6, 7, 11, 15, 28, 30, 31, 45, 71, 83, 84, 89 등 12종은 추가적인 연구를 통하여 동정이 필요한 성분으로 확인되었다.

황칠나무 잎 추출물을 포함하여 6종 이상의 추출물에서 5% 이상의 상대적인 peak 면적을 나타낸 성분으로는 quinic acid (peak 1), neochlorogenic acid (peak 4), coumaroyl glucoside (peak 12), chlorogenic acid (peak 16), cryptochlorogenic acid (peak 17), benzyl alcohol hexose pentose 2 (peak 21), 5-*p*-coumaroylquinic acid (peak 25), 5-feruloylquinic acid (peak 33), 4-*p*-coumaroylquinic acid (peak 34), hyperoside (peak 61), isochlorogenic acid B (peak 68), nicotiflorin (peak 70), β -sitosterol (peak 95) 등 14종으로 나타났다. 이들 성분의 경우 본 연구에서 설정 한 분석방법을 해당 식물 추출물의 연구에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2-4. Comparative analysis of MRM mode LC-MS profile of plant leaf extracts

Peaks	Plant leaf extracts ¹⁾											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	100	25.20 ²⁾	9.51	3.57	0.50	6.22	0.59	24.33	21.57	0.12	8.95	6.97
2	100	- ³⁾	-	-	-	7.70	-	-	-	-	-	-
3	100	0.02	1.41	0.08	0.35	1.19	0.75	0.05	0.09	0.44	0.34	1.29
4	100	225.84	125.73	0.87	15.98	452.47	31.75	78.57	26.94	-	4.94	40.08
5	100	-	-	1.51	-	0.77	-	0.38	-	-	-	-
6	100	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-
7	100	0.32	-	-	-	0.23	-	-	-	-	-	-
8	100	0.15	-	-	0.76	1.03	-	-	0.32	-	0.54	-
9	100	1.38	0.90	1.20	0.51	0.96	0.06	7.53	18.96	0.65	0.30	1.90
10	100	0.79	-	-	-	-	-	-	1.12	-	-	-
11	100	0.14	0.07	0.98	-	0.50	-	0.17	0.28	0.07	-	-
12	100	19.18	4.37	14.06	0.20	0.79	5.22	11.32	1.37	8.93	10.91	4.78
13	100	29.24	-	9.85	-	3.15	-	3.11	-	0.74	-	-
14	100	4.99	4.15	1.65	-	7.19	0.93	1.92	1.67	-	1.93	-
15	100	0.67	-	0.05	-	-	-	0.18	0.13	-	-	-
16	100	594.07	274.46	3.17	2.98	61.14	9.90	397.71	296.04	0.10	57.07	34.87
17	100	710.64	1,454.36	16.19	30.15	769.06	53.63	208.55	71.84	0.11	18.71	183.21
18	100	1.03	0.14	0.22	0.40	1.90	0.64	0.59	-	2.05	0.92	0.13
19	100	2.06	0.72	2.97	0.02	16.99	0.03	8.92	10.70	6.38	0.08	0.28
20	100	0.36	0.04	0.11	-	-	0.22	-	8.46	0.62	0.83	-

¹⁾ A, *Dendropanax morbifera*; B, *Coffea arabica*; C, *Morus alba*; D, *Diospyros kaki*; E, *Bambusa bambos*; F, *Asimina triloba*; G, *Hovenia dulcis*; H, *Aralia elata*; I, *Kalopanax septemlobus*; J, *Sapindus mukorossi*; K, *Crataegus pinnatifida*; L, *Maclura tricuspidata*. ²⁾ Values are expressed as percentages for each compound based on peak area of *D. morbifera* leaf extract (A). ³⁾ Not detected.

Table 2-4. Continued

Peaks	Plant leaf extracts ¹⁾											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
21	100	0.09 ²⁾	1.80	1.33	0.09	13.78	9.05	16.10	6.29	5.27	1.24	1.96
22	100	- ³⁾	0.14	1.14	-	0.06	-	0.02	-	0.55	-	-
23	100	0.51	0.40	3.47	20.23	68.27	0.28	4.34	1.41	13.81	-	0.68
24	100	0.39	1.36	0.04	0.45	13.47	2.33	11.44	0.77	0.11	47.92	4.73
25	100	47.78	14.39	1.70	0.18	2.98	3.59	37.92	16.71	0.04	133.84	27.45
26	100	8.17	2.60	22.54	1.27	2.06	0.52	0.43	0.16	0.61	5.71	0.40
27	100	0.10	0.04	0.01	0.02	0.64	0.02	-	0.15	0.03	0.30	2.37
28	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	100	7.16	1.20	5.31	0.05	0.17	0.01	0.03	0.02	0.57	1.01	0.04
30	100	0.43	0.04	0.48	-	-	0.01	0.04	0.03	-	0.17	0.14
31	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	100	0.21	0.13	0.82	-	2.67	-	0.38	0.22	0.57	0.70	0.02
33	100	271.59	3.28	-	3.10	7.71	0.25	40.54	9.91	-	5.31	6.59
34	100	41.53	16.27	1.02	0.20	1.08	3.24	58.35	18.30	-	126.15	18.65
35	100	0.13	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	100	11.52	0.04	-	0.29	0.03	0.18	-	-	0.39	1.86	10.20
37	100	-	-	-	-	3.37	-	-	-	-	11.61	0.95
38	100	0.57	0.13	1.88	-	2.32	0.09	5.27	5.51	3.29	2.47	0.04
39	100	0.08	-	-	0.15	-	-	-	-	0.03	-	2.48
40	100	0.09	0.02	0.01	0.00	0.01	-	0.22	0.01	0.00	-	-

¹⁾ A, *Dendropanax morbifera*; B, *Coffea arabica*; C, *Morus alba*; D, *Diospyros kaki*; E, *Bambusa bambos*; F, *Asimina triloba*; G, *Hovenia dulcis*; H, *Aralia elata*; I, *Kalopanax septemlobus*; J, *Sapindus mukorossi*; K, *Crataegus pinnatifida*; L, *Maclura tricuspidata*. ²⁾ Values are expressed as percentages for each compound based on peak area of *D. morbifera* leaf extract (A). ³⁾ Not detected.

Table 2-4. Continued

Peaks	Plant leaf extracts ¹⁾											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
41	100	- ³⁾	-	-	12.77 ²⁾	-	-	-	-	-	3.09	-
42	100	0.07	0.03	0.01	0.80	0.00	-	-	0.00	0.40	0.72	2.54
43	100	0.06	0.02	-	1.34	-	-	-	-	0.42	0.63	0.99
44	100	0.09	0.03	0.01	12.46	-	0.05	-	-	0.01	2.94	-
45	100	0.16	0.09	0.04	0.02	-	0.02	0.09	-	0.03	-	-
46	100	0.28	0.05	0.02	0.57	0.02	0.01	0.00	0.00	0.04	16.76	0.50
47	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18	-
48	100	0.04	-	-	-	-	-	-	0.01	-	341.27	-
49	100	0.08	0.07	-	0.77	0.03	-	-	-	0.23	0.14	-
50	100	0.08	0.04	-	0.22	-	-	-	-	0.03	0.02	1.19
51	100	0.11	0.03	0.03	1.03	-	-	-	-	-	0.04	1.06
52	100	0.64	0.10	0.06	18.18	0.04	0.06	0.02	0.01	0.13	12.14	0.90
53	100	0.09	-	-	11.59	0.02	-	-	-	-	0.08	1.05
54	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	100	-	-	115.69	0.05	-	0.75	1.47	9.11	-	174.02	3.51
56	100	300.80	1.78	0.10	0.06	0.04	0.05	264.94	44.23	0.05	0.02	0.31
57	100	0.10	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02
58	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	100	0.18	-	0.94	-	-	0.87	0.09	7.52	-	12.94	1.70
60	100	0.12	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04

¹⁾ A, *Dendropanax morbifera*; B, *Coffea arabica*; C, *Morus alba*; D, *Diospyros kaki*; E, *Bambusa bambos*; F, *Asimina triloba*; G, *Hovenia dulcis*; H, *Aralia elata*; I, *Kalopanax septemlobus*; J, *Sapindus mukorossi*; K, *Crataegus pinnatifida*; L, *Maclura tricuspidata*. ²⁾ Values are expressed as percentages for each compound based on peak area of *D. morbifera* leaf extract (A). ³⁾ Not detected.

Table 2-4. Continued

Peaks	Plant leaf extracts ¹⁾											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
61	100	20.80 ²⁾	120.88	309.38	0.78	85.09	1.51	0.98	16.59	11.73	144.96	28.24
62	100	2.53	38.87	1.59	1.42	124.79	1.88	- ³⁾	0.60	103.60	1.83	4.89
63	100	0.26	-	-	0.66	-	-	-	-	-	-	-
64	100	0.12	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	1.15
65	100	5.46	4.94	4.87	5.37	5.58	4.67	4.83	5.48	4.69	4.23	4.86
66	100	0.05	-	526.81	0.14	2.08	0.53	1.85	15.55	0.92	39.60	1.37
67	100	0.08	0.02	-	0.28	-	-	-	-	-	0.02	1.19
68	100	1,253.84	27.26	0.76	0.81	0.72	0.94	256.09	51.52	0.36	0.27	12.49
69	100	0.12	0.04	0.04	0.02	-	0.06	0.02	0.01	0.11	-	-
70	100	0.52	37.69	11.69	4.08	43.21	19.34	0.01	0.26	314.27	1.47	11.08
71	100	0.09	0.04	0.04	0.03	0.13	0.01	0.01	-	0.05	0.02	0.01
72	100	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	45.10	0.03	0.02	0.02
73	100	2.06	0.55	0.71	0.80	8.85	0.33	0.77	1.63	1.77	1.26	0.57
74	100	0.48	-	609.50	1.01	0.34	-	0.35	5.52	0.19	-	2.05
75	100	0.09	0.05	0.02	0.02	-	0.01	0.01	-	-	-	0.02
76	100	0.07	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
77	100	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00
78	100	0.07	0.07	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
79	100	0.09	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
80	100	0.12	0.10	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

¹⁾ A, *Dendropanax morbifera*; B, *Coffea arabica*; C, *Morus alba*; D, *Diospyros kaki*; E, *Bambusa bambos*; F, *Asimina triloba*; G, *Hovenia dulcis*; H, *Aralia elata*; I, *Kalopanax septemlobus*; J, *Sapindus mukorossi*; K, *Crataegus pinnatifida*; L, *Maclura tricuspidata*. ²⁾ Values are expressed as percentages for each compound based on peak area of *D. morbifera* leaf extract (A). ³⁾ Not detected.

Table 2-4. Continued

Peaks	Plant leaf extracts ¹⁾											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
81	100	0.06 ²⁾	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	- ³⁾	0.00
82	100	19.92	2.77	2.98	3.92	12.71	0.94	0.25	0.30	0.72	0.80	2.56
83	100	0.04	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-
84	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	100	13.09	-	-	11.12	31.70	-	0.26	-	0.36	-	0.10
86	100	1.20	0.17	0.65	0.07	0.63	0.02	0.04	0.08	2.45	0.76	0.04
87	100	0.33	0.32	0.31	0.02	0.13	0.00	0.08	0.16	1.19	0.35	0.01
88	100	2.25	0.32	1.33	0.17	1.37	0.04	0.09	0.19	5.59	1.85	0.11
89	100	0.13	0.05	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
90	100	12.39	6.82	20.97	2.53	0.13	1.02	2.89	2.41	48.70	9.78	0.75
91	100	2.10	-	-	-	0.43	0.98	2.05	0.28	-	2.74	-
92	100	-	6.16	1.17	16.50	-	1.93	-	0.39	21.19	1.56	20.45
93	100	-	0.49	1.33	1.21	-	5.05	-	6.58	2.09	1.15	1.04
94	100	-	3.51	4.57	3.19	-	-	-	4.86	7.18	24.52	1.55
95	100	25.68	37.41	34.34	6.52	10.25	8.36	0.15	1.12	10.16	20.40	9.73

¹⁾ A, *Dendropanax morbifera*; B, *Coffea arabica*; C, *Morus alba*; D, *Diospyros kaki*; E, *Bambusa bambos*; F, *Asimina triloba*; G, *Hovenia dulcis*; H, *Aralia elata*; I, *Kalopanax septemlobus*; J, *Sapindus mukorossi*; K, *Crataegus pinnatifida*; L, *Maclura tricuspidata*. ²⁾ Values are expressed as percentages for each compound based on peak area of *D. morbifera* leaf extract (A). ³⁾ Not detected.

2.4 결론

황칠나무 잎에 존재하는 활성 성분이 각종 연구 보고를 통해 20여 종이 다뤄져 왔지만 동시에 해당 성분들이 분석된 바는 없으며, 실제 황칠나무 잎에 존재하는 성분 수에 비하면 현재까지 성분에 대한 정보는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 기존의 UVD를 적용한 LC 성분 profile의 단점을 보완할 수 있도록 분자량이나 분자 구조에 대한 정보를 얻을 수 있는 LC-MS/MS를 활용하여 다양한 황칠나무 잎 추출물 성분의 MS profile을 작성하고자 하였다.

황칠나무 잎 추출물의 MS profile 분석 결과로 확인된 95종의 peak에서 가장 많은 수를 가진 것으로 확인된 성분은 apigenin을 aglycone으로 포함하는 성분들이었으며, 구조가 확인되거나 추정 가능한 apigenin 유도체 성분은 총 19종이었다. 또한 caffeic acid와 chlorogenic acid 등 6종의 caffeic acid 유도체들이 포함되어 있었으며, quercetin과 이를 기본구조로 하는 유도체 등 총 5종의 quercetin 관련 성분이 MS profile에서 확인되었다. 이 밖에도 hesperidin이나 naringin 등과 같은 flavonoid와 다양한 phenolic acid 계열의 성분들이 확인되었으며, 기타의 성분으로 8종의 hydroxy fatty acid 계열의 성분이 확인되었다. 황칠나무 잎의 활성 연구나 개별 성분의 활성 관련 검토에 활용될 수 있도록 각 성분들에 대한 문헌 검토를 통해 성분별로 다뤄지고 있는 주요 생리활성 분야를 추가로 확인하였다.

황칠나무 잎 추출물의 성분에 대한 MRM mode 분석 조건을 적용하여 분석한 결과에서 기존의 성분 profile 분석에 비하여 명확하고 정밀한 결과를 얻을 수 있었으며, 다른 식물의 잎 추출물 11종과 비교 분석한 결과에서 황칠나무 잎 추출물에서 특이적으로 확인되는 성분 28종을 확인하였다. 이와 같은 MS profile 분석 방법은 다양한 성분이 혼재되어 있는 식물 추출물의 일반적인 LC-UVD 분석에서 나타날 수 인접 성분 간의 방해 문제나 UV 흡광성 문제 등을 극복하는 방안이 될 수 있으며, 설정된 MRM mode 분석 조건은 다른 식물 추출물의 성분 연구에도 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Kim EH, Jo CS, Ryu SY, Kim SHwan and Lee JY. (2018). Anti-osteoclastogenic diacetylenic components of *Dendropanax morbifera*. Archives of Pharmacal Research. 41:506-512.
2. Park SY, Hwang KT, Na JR, Lee KH, Jeong ES and Kim SO. (2018). Triterpenoids from the leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and lung A549 cancer cells. Korean Journal of Food Preservation. 25:471-481.
3. Park YJ, Kim DM, Choi HB, Jeong MH, Kwon SH, Kim HR, Kwak JH and Chung KH. (2022). Dendropanoxide, a triterpenoid from *Dendropanax morbifera*, ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells through autophagy inhibition. Nutrients. 14:98. <https://doi.org/10.3390/nu14010098>.
4. Park YJ, Kim KS, Park JH, Lee SH, Kim HR, Lee SH, Choi HB, Cao S, Kumar V, Kwak JH and Kim HS. (2020). Protective effects of dendropanoxide isolated from *Dendropanax morbifera* against cisplatin-induced acute kidney injury via the AMPK/mTOR signaling pathway. Food and Chemical Toxicology. 145:111605. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111605>.
5. Lee JW, Kim KS, An HK, Kim CH, Moon HI and Lee YC. (2013). Dendropanoxide Induces autophagy through ERK1/2 activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. PloS ONE. 8:e83611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083611>.
6. Moon HI. (2011). Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Human & Experimental Toxicology. 30:870-875.
7. Kim JS and Lee HH. (2021). Analysis of antioxidant, anti-aging activities

- and marker components in *Dendropanax morbifera* Leveille from different areas. *Journal of Investigative Cosmetology*. 17:435-445.
8. Youn JS, Kim YJ, Na HJ, Jung HR, Song CK, Kang SY and Kim JY. (2019). Antioxidant activity and contents of leaf extracts obtained from *Dendropanax morbifera* LEV are dependent on the collecting season and extraction conditions. *Food Science and Biotechnology*. 28:201-207.
 9. Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM and Kim JS. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*. 74:263-270.
 10. Choi JH, Kim DW, Park SE, Lee HJ, Kim KM, Kim KJ, Kim MK, Kim SJ and Kim S. (2015). Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 120:181-186.
 11. Park SE, Sapkota K, Choi JH, Kim MK, Kim YH, Kim KM, Kim KJ, Oh HN, Kim SJ and Kim S. (2014). Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. *Neurochemical Research*. 39:707-718.
 12. Jeong JH, Kim JS and Lee HH. (2021). Analysis of antioxidant activities and marker components of *Dendropanax morbifera* Leveille according to extraction solvents. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*. 22:718-729.
 13. Choi HJ, Park DH, Song SH, Yoon IS and Cho SS. (2018). Development and validation of a HPLC-UV method for extraction optimization and biological evaluation of hot-water and ethanolic extracts of *Dendropanax morbifera* leaves. *Molecules*. 23:650. <https://doi.org/10.3390/molecules23030650>.
 14. Lee SY, Choi EJ, Bae DH, Lee DW and Kim SO. (2015). Effects of 1-tetradecanol and β -sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 41:73-83.

15. Park JU, Kang BY, Lee HJ, Kim S, Bae D, Park JH and Kim YR. (2017). Tetradecanol reduces EL-4 T cell growth by the down regulation of NF- κ B mediated IL-2 secretion. *European Journal of Pharmacology*. 799:135-142.
16. Kim G, Kim JE, Kang MJ, Jang AR, Kim YR, Kim SO, Chang KT, Hong JJ and Park JH. (2017). Inhibitory effect of 1-tetradecanol on *Helicobacter pylori*-induced production of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in gastric epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*. 16:9573-9578.
17. Kim MO, Kang MJ, Lee SU, Kim DY, Jang HJ, An JH, Lee HS, Ryu HW and Oh SR. (2021). Polyacetylene (9Z,16S)-16-hydroxy-9,17-octadecadiene-12,14-diyonic acid in *Dendropanax morbifera* leaves. *Food Bioscience*. 40:100878. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100878>.
18. Kang MJ, Kwon EB, Ryu HW, Lee SH, Lee JW, Kim DY, Lee MK, Oh SR, Lee HS, Lee SU and Kim MO. (2018). Polyacetylene from *Dendropanax morbifera* alleviates diet-induced obesity and hepatic steatosis by activating AMPK signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 9:537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00537>.
19. Lee JW, Ryu HW, Lee SU, Son TH, Park HA, Kim MO, Yuk HJ, Ahn KS and Oh SR. (2017). Protective effect of polyacetylene from *Dendropanax morbifera* Leveille leaves on pulmonary inflammation induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. *Journal of Functional Foods*. 32:358-366.
20. Park HJ, Kim HN, Kim CY, Seo MD and Baek SH. (2021). Synergistic protection by isoquercitrin and quercetin against glutamate-induced oxidative cell death in HT22 cells via activating Nrf2 and HO-1 signaling pathway: Neuroprotective principles and mechanisms of *Dendropanax morbifera* leaves. *Antioxidants*. 10:554. <https://doi.org/10.3390/antiox10040554>.
21. Lee KH, Na HJ, Song CK, Kang SY and Kim SO. (2018). Quercetin quantification in a Jeju *Dendropanax morbifera* Lev. extract by varying different parts, harvest times, and extraction solvents. *Korean Journal of Food Preservation*. 25:344-350.

22. Zhang M, Bu T, Liu S and Kim SA. (2021). Optimization of caffeic acid extraction from *Dendropanax morbifera* leaves using response surface methodology and determination of polyphenols and antioxidant properties. *Horticulturae*. 7:491. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110491>.
23. Kim HJ, Park YS, Kim JH, Moon JH, Lee SS, Suh SS, Jeong HY, Cho JY and Kim SH. (2022). Inhibitory effects of acetyloctadecadienediynoic acid isolated from leaves of *Dendropanax morbiferus* on viability and self-renewal activity of Glioma stem-like cells. *Journal of Medicinal Food*. 25:963-970.
24. Yu HY, Kim KS, Lee YC, Moon HI and Lee JH. (2012). Oleifolioside A, a new active compound, attenuates LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression through the downregulation of NF- κ B and MAPK activities in RAW 264.7 macrophages. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:637512. <https://doi.org/10.1155/2012/637512>.
25. Yu HY, Jin CY, Kim KS, Lee YC, Park SH, Kim GY, Kim WJ, Moon HI, Choi YH and Lee JH. (2012). Oleifolioside A mediates caspase-independent human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis involving nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:5400-5406.
26. Chung IM, Song HK, Kim SJ and Moon HI. (2011). Anticomplement activity of polyacetylenes from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille. *Phytotherapy Research*. 25:784-786.
27. Guidelines for establishing compound profiles for herbal medicine. (2016). National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.
28. Lee KI, Pyo BS, Choi CH and Cha SW. (2022). Radical scavenging active compound screening analysis in extract of *Coffea arabica* L. leaves. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 30:264-277.
29. Im DY and Lee KI. (2020). LC-MS/MS screening method for radical scavenging active compounds in extracts of *Ulmus pumila* cortex. *Journal of Life Science*. 30:956-964.

30. Na ES, Kim SS, Hong SS, Kim KJ, Lee YJ, Lee BC and Lee SK. (2020). Development of multi-residue analytical method for 261 pesticides in herbal medicines using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *The Korean Journal of Environmental Agriculture*. 39:142-169.
31. Kwon JE, Shin DS, Kang HS, Suh JH, Lee GY and Lee EJ. (2022). Simultaneous determination of 80 unapproved compounds using HPLC and LC-MS/MS in dietary supplements. *Mass Spectrometry Letters*. 13:58-83.
32. Sim YE, Kim JW, Ko BJ and Kim JY. (2022). Rapid and simple LC-MS/MS determination of urinary ethyl glucuronide, naltrexone, 6 β -naltrexol, chlordiazepoxide, and norchlordiazepoxide for monitoring alcohol abuse. *Journal of Analytical Science and Technology*. 13:6. <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00315-8>.
33. Choi YH, Ahn WS, Kim JE and Kim DH. (2022). Validation of simultaneous mycotoxin analysis method in pet food using LC-MS/MS. *Korean Journal of Veterinary Service*. 45:237 - 242.
34. Wang HP, Zhang YB, Yang XW, Zhao DQ and Wang YP. (2016). Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS. *Journal of Ginseng Research*. 40:382-394.
35. Guo N, Liu M, Yang D, Huang Y, Niu X, Wu R, Liu Y, Ma G and Dou D. (2013). Quantitative LC-MS/MS analysis of seven ginsenosides and three *aconitum* alkaloids in Shen-Fu decoction. *Chemistry Central Journal*. 7:165.
36. Lee JH, Han HJ, Yuan X, Park EY, Lee JH and Kim JH. (2021). A rapid, simultaneous and quantitative analysis of 26 ginsenosides in white and red *Panax ginseng* using LC-MS/MS. *Applied Biological Chemistry*. 64:13. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00588-w>.
37. Lee JE, Ahn JH, Kim DS, Kim SS, Park SM, Yun SH, Han SG and Kim HJ. (2022). LC/MS-based metabolomic analysis of peels from Citrus varieties. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 51:150-161.
38. Zhu Z, Li R, Qin W, Zhang H, Cheng Y, Chen F, Chen C, Chen L and Zhao Y. (2022). Target engagement of ginsenosides in mild cognitive

- impairment using mass spectrometry-based drug affinity responsive target stability. *Journal of Ginseng Research*. 46:750-758.
39. Kim CW, Park JM, Lee HY, Hwang DY, Park SH and Lee HS. (2022). Evaluation of the EtOAc extract of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) as a potential skincare cosmetic material for acne vulgaris. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32:594-601.
 40. Kim MS, Jin JB, Lee JH, An HS, Pan CH and Park JS. (2021). Rapid separation of *Capsicum annuum* L. leaf extract using automated HPLC/SPE/HPLC coupling system (Sepbox system) and identification of α -glucosidase inhibitory active substances. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 64:25-32.
 41. Park SK. (2022). Antioxidant activities of bioactive compounds isolated from *Rheum emodi* wall (Himalayan Rhubarb) based on LC-DAD-ESI/MS and preparative LC/MS system. *Preventive Nutrition and Food Science*. 27:223-233.
 42. Kang KB, Lee DY and Sung SH. (2021). LC-MS/MS-based comparative investigation on chemical constituents of six *Aster* species occurring in Korea. *Natural Product Sciences*. 27:257-263.
 43. Park DW, Shin HJ, Byun YJ and Lee KY. (2021). Bioassay-coupled LC-QTOF MS/MS to characterize constituents inhibiting nitric oxide production of *Thuja orientalis*. *Natural Product Sciences*. 27:293-299.
 44. Elsadig Karar MG and Kuhnert N. (2016). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (Crataegutt Tropfen). *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.4172/2572-0406.1000102>.
 45. Rukdee N, Rojsanga P and Phechkrajang CM. (2015). Development and validation of LC-MS/MS method for quantitative determination of adenosine, guanosine, xanthine and uric acid in widely consumed vegetables in Thailand. *Natural Product Communications*. 10:1435-1437.
 46. Razgonova M, Zakharenko A, Pikula K, Manakov Y, Ercisli S, Derbush I,

- Kislin E, Seryodkin I, Sabitov A, Kalenik T and Golokhvast K. (2021). LC-MS/MS screening of phenolic compounds in wild and cultivated grapes *Vitis amurensis* Rupr. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26123650>.
47. de Souza TA, Rodrigues GCS, de Souza PHN, Abreu LS, Pereira LCO, da Silva MS, Tavares JF and Scotti MT. (2023). Mass spectrometry-based investigation of sugarcane exposed to five different pesticides. *Life*. <https://doi.org/10.3390/life13041034>.
48. Zhang Y, Xiong H, Xu X, Xue X, Liu M, Xu S, Liu H, Gao Y, Zhang H and Li X. (2018), Compounds identification in semen *Cuscutae* by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCs) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*. <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1199>.
49. Tsugawa H, Nakabayashi R, Mori T, Yamada Y, Takahashi M, Rai A, Sugiyama R, Yamamoto H, Nakaya T, Yamazaki M, Kooke R, Bac-Molenaar JA, Oztolan-Erol N, Keurentjes JJB, Arita M and Saito K. (2019). A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. *Nature Methods*. 16(4):295-298.
50. Bystrom LM, Lewis BA, Brown DL, Rodriguez E and Obendorf RL. (2008). Characterisation of phenolics by LC - UV/Vis, LC - MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry*. 111:1017 - 1024.
51. Bystrom LM, Lewis BA, Brown DL, Rodriguez E and Obendorf RL. (2008). Characterisation of phenolics by LC - UV/Vis, LC - MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry*. 111:1017-1024.
52. Pan SP, Pirker T, Kunert O, Kretschmer N, Hummelbrunner S, Latkolik SL, Rappai J, Dirsch VM, Bochkov V and Bauer R. (2019). C13 Megastigmane derivatives from *Epipremnum pinnatum*: β -Damascenone inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines and leukocyte adhesion molecules as well as NF- κ B signaling. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01351>.

53. El-Hawary SS, Mohammed R, El-Din ME, Hassan HM, Ali ZY, Rateb ME, Nagggar EMBE, Othman EM and Abdelmohsen UR. (2021). Comparative phytochemical analysis of five Egyptian strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) and antidiabetic potential of Festival and Red Merlin cultivars. RSC Advances. <https://doi.org/10.1039/d0ra10748d>.
54. Baeza G, Sarriá B, Bravo L and Mateos R. (2016). Exhaustive qualitative LC-DAD-MSn analysis of Arabica green coffee beans: Cinnamoyl-glycosides and cinnamoylshikimic acids as new polyphenols in green coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64:9663-9674.
55. Zhou C, Luo Y, Lei Z and Wei G. (2018). UHPLC-ESI-MS analysis of purified flavonoids fraction from stem of *Dendrobium denneatum* Paxt. and its preliminary study in inducing apoptosis of HepG2 cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://doi.org/10.1155/2018/8936307>.
56. Zhou C, Xie Z, Lei Z, Huang Y and Wei G. (2018). Simultaneous identification and determination of flavonoids in *Dendrobium officinale*. Chemistry Central Journal. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0403-8>.
57. Cao J, Yin C, Qin Y, Cheng Z and Chen D. (2014) Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. Journal of Mass Spectrometry. 49:1010-1024.
58. Souilah N, Bendif H, Ullah Z, Hamel T, Djarri L, Öztürk M, Ertas A, Akkal S, Medjroubi K and Mustafa AM. (2021). LC-MS/MS simultaneous determination of 37 bioactive compounds in *Bunium crassifolium* Batt. and its biological activities. Journal of Research in Pharmacy. 25:450-463.
59. Zhu S, Yan H, Niu K and Zhang S. (2015). Simultaneous determination of seven components from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by LC-MS/MS. Journal of Chromatographic Science, 53:909 - 914.
60. Zhou C, Liu Y, Su D, Gao G, Zhou X, Sun L, Ba X, Chen X and Bi K. (2011). A sensitive LC - MS - MS method for simultaneous quantification of

- two structural isomers, hyperoside and isoquercitrin: application to pharmacokinetic studies. *Chromatographia*. 73:353 - 359.
61. Zhang X, Liang C, Li C, Bu M, Bu L, Xiao Y, Sun H and Zhang L. (2018). Simultaneous qualitative and quantitative study of main compounds in *Commelina communis* Linn. by UHPLC - Q-TOF-MS-MS and HPLC - ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 56:582 - 594.
 62. Schulte BC, Wu W and Ted Rosen T. (2015). Azelaic acid: evidence-based update on mechanism of action and clinical application. *Journal of Drugs in Dermatology*. 14:964-968.
 63. Zengin G, Mahomoodally MF, Sinan KI, Ak G, Etienne OK, Sharmeen JB, Brunetti L, Leone S, Simone SCD, Recinella L, Chiavaroli A, Menghini L, Orlando G, Jekó J, Cziáky Z and Ferrante C. (2021). Chemical composition and biological properties of two *Jatropha* species: Different parts and different extraction methods. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox10050792>.
 64. Li Y, Liu Y, Liu R, Liu S, Zhang X, Wang Z, Zhang J and Lu J. (2015). HPLC-LTQ-orbitrap MSⁿ profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules. *Analytical methods : Advancing Methods and Applications*. 7:7511-7526.
 65. Kumar S, Singh A and Kumar B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 7:214-222.
 66. Mornar A, Buhač T, Klarić D A, Klarić I, Sertić M, and Nigović B. (2020). Multi-targeted screening of phytoestrogens in food, raw material, and dietary supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*. 13:482-495.
 67. Theerasin S and Baker AT. (2009). Analysis and identification of phenolic compounds in *Dioscorea hispida* Dennst. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2:547-560.
 68. Ağalar HG, Akalın Çiftçi G, Göger F and Kırmır N. (2017). Activity guided

- fractionation of *Arum italicum* Miller tubers and the LC/MS-MS profiles. Records of Natural Products. 12:64-75.
69. Fu J, Schoeman JC, Harms AC, van Wietmarschen HA, Vreeken RJ, Berger R Cuppen BVJ, Lafeber FPJG, van der Greef J and Hankemeier T. (2016). Metabolomics profiling of the free and total oxidised lipids in urine by LC-MS/MS: application in patients with rheumatoid arthritis. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 408:6307-6319.
 70. Park JU, Yang SY, Guo RH, Li HX, Kim YH and Kim YR. (2020). Anti-Melanogenic Effect of *Dendropanax morbiferus* and Its Active Components via Protein Kinase A/Cyclic Adenosine Monophosphate-Responsive Binding Protein- and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Microphthalmia-Associated Transcription Factor Downregulation. Frontiers in Pharmacology. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00507>.
 71. Sugimoto S, Yamano Y, Khalil HE, Otsuka H, Kamel MS and Matsunami K. (2017). Chemical structures of constituents from the leaves of *Polyscias balfouriana*. Journal of Natural Medicines. 71:558-563.
 72. Gupta Bhowon M, Chua LS, Jawaheer S, Soodhowa AD and Laullo SJ. (2022). Morphology, biological and chemical profiling of three *Polyscias* species, endemic to Mauritius. International Journal of Plant Based Pharmaceuticals. 2:239-251.
 73. Ye M, Han J, Chen H, Zheng J and Guo D. (2007). Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 18:82-91.
 74. Park YJ, Kim DM, Choi HB, Jeong MH, Kwon SH, Kim HR, Kwak JH and Chung KH. (2021). Dendropanoxide, a triterpenoid from *Dendropanax morbifera*, ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells through autophagy inhibition. Nutrients. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/1/98>.
 75. Sánchez-Arévalo CM, Iborra-Clar A, Vincent-Vela MC and Álvarez-Blanco S. (2022, August). Exploring the extraction of the bioactive content from the

- two-phase olive mill waste and further purification by ultrafiltration. LWT. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113742>.
76. Falev DI, Kosyakov DS, Ul'yanovskii NV and Ovchinnikov DV. (2020). Rapid simultaneous determination of pentacyclic triterpenoids by mixed-mode liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460458>.
 77. Voronov IS, Falev DI, Faleva AV, Ul'yanovskii NV and Kosyakov DS. (2023). Determination of Pentacyclic Triterpenoids in Plant Biomass by Porous Graphitic Carbon Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules28093945>.
 78. Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH and Lee HK. (2004). Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. *Journal of Ethnopharmacology*. 90:403–408.
 79. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, Souto EB, Novellino E, Antolak H, Azzini E, Setzer WN and Martins N. (2019). The therapeutic potential of apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1305>.
 80. Ali F, Rahul NF, Jyoti S and Siddique YH. (2016). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*. 20:1197–1238.
 81. Yoon JH, Kim MY and Cho JY. (2023). Apigenin: A therapeutic agent for treatment of skin inflammatory diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1498>.
 82. Nozhat Z, Heydarzadeh S, Memariani Z and Ahmadi A. (2021). Chemoprotective and chemosensitizing effects of apigenin on cancer therapy. *Cancer Cell International*. <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02282-3>.
 83. DeRango-Adem EF and Blay J. (2021). Does oral apigenin have real potential for a therapeutic effect in the context of human gastrointestinal and other cancers? *Frontiers in Pharmacology*. <https://www.frontiersin.org/articles/>

- 10.3389/fphar.2021.681477.
84. Wang M, Firrman J, Liu L and Yam K. (2019). A review on flavonoid apigenin: Dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota. *BioMed Research International*. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/7010467>.
 85. Abdulai IL, Kwofie SK, Gbewonyo WS, Boison D, Puplampu JB and Adinortey MB. (2021). Multitargeted effects of vitexin and isovitexin on diabetes mellitus and its complications. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2021/6641128>.
 86. He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX and Peng BW. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*. 115:74–85.
 87. Ong WY, Herr DR, Sun G. Y and Lin TN. (2022). Anti-inflammatory effects of phytochemical components of *Clinacanthus nutans*. *Molecules*. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/11/3607>.
 88. Zhang L, Wu M and Chen Z. (2022). Schaftoside improves cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy and reducing apoptosis and inflammation through the AMPK/mTOR pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 31:1343 - 1354.
 89. Yi Y, Zhang M, Xue H, Yu R, Bao YO, Kuang Y, Chai Y, Ma W, Wang J, Shi X, Li W, Hong W, Li J, Muturi E, Wei H, Wlodarz J, Roszak S, Qiao X, Yang H and Ye M. (2022). Schaftoside inhibits 3CLpro and PLpro of SARS-CoV-2 virus and regulates immune response and inflammation of host cells for the treatment of COVID-19. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 12:4154-4164.
 90. Guan S, Sun L, Wang X, Huang X, and Luo T. (2022). Isoschaftoside inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglia through regulation of HIF-1 α -mediated metabolic reprogramming. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2022/5227335>.
 91. Su Y, Kang Y, Yi J, Lin Q, Zhang C, Lin Z, and Liu J. (2022).

- Isoschaftoside reverses nonalcoholic fatty liver disease via activating autophagy in vivo and in vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2022/2122563>.
92. Kim MK, Yun KJ, Lim DH, Kim J and Jang YP. (2016). Anti-inflammatory properties of flavone di-C-glycosides as active principles of *Camellia Mistletoe*, *Korthalsella japonica*. *Biomolecules & Therapeutics*. 24:630–637.
 93. Marrassini C, Saint Martin EM, Alonso MR, and Anesini C. (2023). Vicenin-2 and vitexin participate in the in vitro modulation of the anti-inflammatory and antioxidant activities exerted by two *Urtica circularis* extracts. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. 22:48–58.
 94. Nouri F, Taherkhani A, Abdollahian A, Hazhirkamal M and Taheri M. (2023). Identification of potential inhibitors for beta-lactamase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from flavonoids using a computational drug discovery approach. *Letters in Drug Design & Discovery*. 20:1086–1097.
 95. Kim HM, Dong Gu Lee DG and Lee SH. (2015). Plant-derived molecules from *Saussurea grandifolia* as inhibitors of aldose reductase. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 58:365 - 371.
 96. Chen YY, Yan XJ, Jiang XH, Lu FL, Yang XR and Li DP. (2021). Vicenin 3 ameliorates ECM degradation by regulating the MAPK pathway in SW1353 chondrocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 22:1792–0981.
 97. Bajko E, Kalinowska M, Borowski P, Siergiejczyk L and Lewandowski W. (2016). 5-*O*-Caffeoylquinic acid: a spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT-Food Science and Technology*. 65:471–479.
 98. Gao X, Zhang S, Wang L, Yu L, Zhao X, Ni H, Wang Y, Wang J, Shan C and Fu Y. (2020). Anti-inflammatory effects of neochlorogenic acid extract from mulberry leaf (*Morus alba* L.) against LPS-stimulated inflammatory response through mediating the AMPK/Nrf2 signaling pathway in A549 cells. *Molecules*. 25:1385. <https://doi.org/10.3390/molecules25061385>.

99. Kim MN, Choi SY, Lee PJ and Hur JY. (2015). Neochlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced activation and proinflammatory responses in BV2 microglial cells. *Neurochemical Research*. 40:1792-1798.
100. Kim SH, Park SY, Park YL, Myung DS, Rew JS and Joo YE. (2017). Chlorogenic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-1 β expression by inhibiting JAK2/STAT3 activation in RAW264.7 cells. *Molecular Medicine Reports*. 16:9224-9232.
101. Lee KI, Pyo BS, Choi CH and Cha SW. (2022). Radical scavenging active compound screening analysis in extract of *Coffea arabica* L. leaves. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 30:264-277.
102. Lee DH, Lee HD, Kwon HJ, Lee HL, Hwang GS, Choi SY, Kim HY, Lee SH and Kang KS. (2022). Insulin secretion and α -glucosidase inhibitory effects of dicaffeoylquinic acid derivatives. <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00688-9>.
103. Wang G, Wang Y, Yao L, Gu W, Zhao S, Shen Z, Lin Z, Liu W and Yan T. (2022). Pharmacological activity of quercetin: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2022/3997190>.
104. Kim HS. (2021). Physiological activities of ethanol extract of *Allium tuberosum* root. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 53:160-164.
105. Oh JM, Lee HJ, Bahn KN, Seo IW, Lee YJ, Lee JH, Park JM and Kang TS. (2015). Development of analytical methods of hyperoside from *Rosa canina* L. *Journal of food hygiene and safety*. 30:173-177.
106. Gim SW, Chae KS, Lee SJ, Kim KD, Moon JH and Kwon JW. (2020). Main constituents and bioactivities of different parts of aronia (*Aronia melanocarpa*). *Korean journal of food science and technology*. 52:226-236.
107. Nogueira AO, Oliveira YIS, Adjafre BL, de Moraes MEA and Aragão GF. (2018). Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum*: a literature review. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 33:4-12.

108. Sharma N, Palia P, Chaudhary A, Shalini, Verma K and Kumar I. (2020). A review on pharmacological activities of lupeol and its triterpene derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 10:325-332.
109. Ong WY, Herr DR, Sun GY and Lin TN. (2022). Anti-inflammatory effects of phytochemical components of *Clinacanthus nutans*. *Molecules*. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/11/3607>.
110. Abusaliya A, Ha SE, Bhosale PB, Kim HH, Park MY, Vetrivel P and Kim GS. (2021). Glycosidic flavonoids and their potential applications in cancer research: a review. *Molecular & Cellular Toxicology*. 18:9-16.
111. Ra JE, Woo SY, Jin H, Lee MJ, Kim HY, Ham H, Chung IM and Seo WD. (2020). Evaluation of antihypertensive polyphenols of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings via their effects on angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. *Applied Biological Chemistry*. 63:1-9.
112. Ko YH, Kwon SH, Lee SY and Jang CG. (2019). Isoorientin improves scopolamine-induced cognitive impairments by restoring the cholinergic system, antioxidant defense, and p-CREB/BDNF signaling in the hippocampus and frontal cortex. *Archives of Pharmacal Research*. 42:722-731.
113. Pyrzynska K. (2022). Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients*. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/12/2387>.
114. Alam F, Mohammadin K, Shafique Z, Amjad ST and Asad MHH. (2021). Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: A review. *Phytotherapy Research*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.7261>.
115. Poudineh M, Ghotbi T, Azizi F, Karami N, Zolfaghari Z, Gheisari F, Hormozi M and Poudineh S. (2022). Neuropharmaceutical properties of naringin against Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Galen Medical Journal*. <https://www.gmj.ir/index.php/gmj/article/view/2337>.
116. Wilt TJ, Ishani A, MacDonald R, Stark G, Mulrow CD and Lau J. (1999). Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/>

- 14651858.CD001043.
117. Kiliç I and Yeşiloğlu Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 115:719–724.
 118. Sharma S, Khatkar A and Kakkar S. (2021). A review: *p*-Coumaric acid, a medicinally important phenolic acid moiety. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 11:120–129.
 119. Jose S, Gupta M, Sharma U, Quintero–Saumeth J and Dwivedi M. (2022). Potential of phytochemicals from *Brassica oleracea* targeting S2-domain of SARS-CoV-2 spike glycoproteins: Structural and molecular insights. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132369>.
 120. Kiselova–Kaneva Y, Galunska B, Nikolova M, Dincheva I and Badjakov I. (2022). High resolution LC–MS/MS characterization of polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity of *Sambucus ebulus* fruit tea traditionally used in Bulgaria as a functional food. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130759>.
 121. Zhang J, Koike R, Yamamoto A, Ukiya M, Fukatsu M, Banno N, Miura M, Motohashi S, Tokuda H and Akihisa T. (2013). Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Passiflora edulis*. *Chemistry & Biodiversity*. 10:1851–1865.
 122. Hong EY, Kim TY, Hong GU, Kang HN, Lee JY, Park JY, Kim SC, Kim YH, Chung MH, Kwon YI and Ro JY. (2019). Inhibitory effects of roseoside and icariside E4 isolated from a natural product mixture (No-ap) on the expression of angiotensin II receptor 1 and oxidative stress in angiotensin II-stimulated H9C2 cells. *Molecules*. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/414>.
 123. Qiu L, Zhao F, Liu H, Chen L, Jiang Z, Liu H, Wang N, Yao X and Qiu F. (2008). Two new megastigmane glycosides, physanosides A and B, from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, and their effect on NO release in macrophages. *Chemistry & Biodiversity*. 5:758–763.
 124. Guo R, Liu Y, Pan J, Guan W, Yang BY and Kuang HX. (2019). A new

- sesquiterpenoid with cytotoxic and anti-inflammatory activity from the leaves of *Datura metel* L. Natural Product Research. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2019.1590715>.
125. Yamauchi S, Sugahara T, Nakashima Y, Okada A, Akiyama K, Kishida T, Maruyama M and Masuda T. (2006). Radical and superoxide scavenging activities of matairesinol and oxidized matairesinol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70:1934-1940.
126. Lee W, Song G and Bae H. (2022). Matairesinol induces mitochondrial dysfunction and exerts synergistic anticancer effects with 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells. *Marine Drugs*. <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/8/473>.
127. Brian C. Schulte BSE, Wesley Wu MD, and Ted Rosen MD. (2015). Azelaic acid: Evidence-based update on mechanism of action and clinical application. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2015;14(9):964-968.

제3장 GC-MS/MS를 활용한 황칠나무 잎 추출물의 지용성 성분 분석

3.1 서론

3.1.1 지용성 성분의 특성 및 분석

식물 중에 존재하는 지용성 성분은 hydro-carbon 뿐만이 아니라 지방산 등 지질 계열의 성분과 terpenoid와 같은 화합물 등이 해당하며, 물이나 주정과 같은 용매에는 제한적으로 추출되는 특성을 가진다. 다만 주정과 같은 알코올류에는 물과 같이 극단적으로 극성이 강한 용매에 비해 상대적으로 지용성 성분이 높게 추출되기도 한다. 이러한 지용성 성분들은 일반적으로 성분 분석에 사용되는 액체크로마토그래프(liquid chromatograph; LC) 장비에서 분석이 이루어지는 성분도 있지만 기체크로마토그래프(gas chromatograph; GC) 장비로 분석하는 것이 용이한 경우가 많다. Figure 3-1에 나타낸 것과 같이 GC 기반의 질량분석기(mass spectrometer; MS)의 분석 대상 성분은 LC 기반의 분석 대상 성분에 비해 분자량(molecular weight; MW)이 상대적으로 작으며(MW 600 이하), 휘발성(volatile)과 함께 고온에서 열안정성을 가지는 성분이어야 한다. 다만 trimethylsilyl 유도체화 등의 전처리 방법을 활용하여 GC에서 분석이 어려운 수용성 성분의 분석을 수행할 수도 있다.^{1,2)}

황칠나무의 지용성 성분에 대한 GC 기반의 분석 연구로는 상록활엽수의 정유성분에 대한 연구와 황칠나무 잎, 가지 및 수액의 휘발성 성분에 대한 분석, 그리고 전통 칠 유래의 성분에 대한 연구 등에서 일부 다뤄졌었지만 LC 기반의 분석장비에서 수행된 것이 비해 적은 상황이다.³⁻⁵⁾

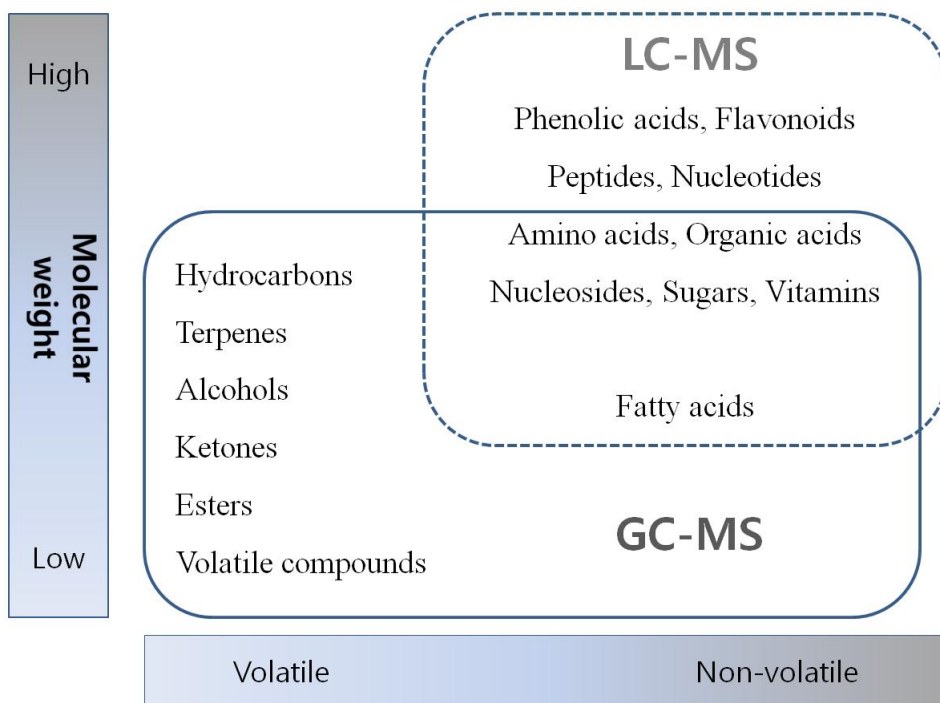


Figure 3-1. Analytical compounds for LC-MS and GC-MS.

3.1.2 기체크로마토그래피-질량분석기의 활용

기체크로마토그래피-질량분석기(gas chromatograph mass spectrometer; GC-MS)를 활용한 분석은 전 세계적으로 통용되는 성분별 library를 활용할 수 있기 때문에 미지의 성분에 대한 정성 분석에 있어서 큰 이점을 제공한다.^{2,6)}

Triple quadrupole 구조를 기반으로 하는 범용의 GC-MS/MS는 기존의 GC-MS에서 수행될 수 있는 scan 및 selected ion monitoring (SIM) mode 분석 뿐 만이 아니라 특정 precursor ion으로부터 생성되는 product ion을 선택적으로 추적하여 검출하는 multiple reaction monitoring (MRM) mode 분석이 가능한 질량분석 장비로서,⁸¹⁾ 유사한 원리가 적용된 LC-MS/MS에 비해 초기 도입 비용 및 운용 기술적인 면에서 유리한 것이 일반적이다. 기존에는 GC-MS/MS의 scan data가 일반 GC-MS에 비해 library와 대조하는데 다소 어려운 문제가 일부 있었으나 기술의 발달로 인해 scan data의 library 검색에서도 큰 차이를 나타내지 않게 되었다.

한편, GC-MS/MS의 MRM mode 분석 역시 LC-MS/MS와 마찬가지로 설정된 조건을 만족하는 product ion만을 검출하는 특성으로 인해 일반적인 GC 분석에서 나타날 수 있는 인접한 방해성분의 영향을 적게 받으며, 머무름 시간이 겹치는 성분에 대한 분석도 가능하게 된다.

3.2 재료 및 방법

3.2.1 황칠나무 잎 지용성 추출물

황칠나무 잎에 존재하는 지용성 성분을 분석하기 위한 추출물은 *n*-hexane을 용매로 하여 제조하였다. 건조 후 blender를 사용하여 직경 3 mm 이하로 잘게 분쇄한 황칠나무 잎 50 g에 *n*-hexane 500 mL를 혼합한 후 180 rpm의 진탕기에서 5일간 추출을 실시하였다. 추출액은 0.2 μ m의 syringe filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

3.2.2 시약 및 표준품

분리 및 분석을 위한 이동상 기체는 99.999% 순도를 사용하였으며, 시료 추출은 *n*-hexane을 사용하였다. 분석 방법 적정성 검토 및 정성 분석을 위한 표준품으로서 α -amyrin, β -sitosterol, stigmasterol 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

3.2.3 분석 기기

황칠나무 잎 추출물의 지용성 성분 분석을 위한 GC-MS/MS는 TQ-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 활용하였다. 성분 분리를 위한 column은 DB-5MS (0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m thickness)를 사용하였으며, 이동상 gas는 He을 1.17 mL/min의 유속으로 설정하여 분석을 실시하였다. Injection port 온도는 250 $^{\circ}$ C로 설정하였으며, split (10:1) mode로 1 μ L의 시료를 injection 하였다. Column oven은 150 $^{\circ}$ C에서 3분간 유지한 후 300 $^{\circ}$ C까지 분당 3 $^{\circ}$ C씩 승온하여 7분간 유지하였다.

질량분석기의 ion source와 interface 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C와 250 $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 분석 초반에 5분의 solvent cut time을 적용하였다. 검출감도 최적화를 위하여

tuning을 실시한 후 detector voltage를 0.95 kV로 설정하여 분석을 실시하였다.

3.2.4 Scan 및 MRM mode GC-MS/MS 분석

Scan mode의 GC-MS 분석은 scan speed 2,500으로 40~650 m/z 범위에서 분석을 실시하였다. 정성분석(qualitative analysis)을 위한 library는 NIST 11 및 11s를 사용하였으며, similarity 85% 이상 성분으로서 조각 ion 패턴과 retention index 등을 참조하여 결과를 도출하였다.

확인된 성분 중 생리활성이 높을 것으로 기대되는 성분을 대상으로 프로파일 분석의 판별성과 정확성을 높이기 위한 MRM mode 분석 조건을 추가적으로 설정하였다. Scan mode 분석 결과에서 확인된 각 성분의 분자량에 해당하는 precursor ion을 지정한 후 MS/MS의 product ion scan 분석을 실시하였으며, 여러 fragment ion들 중 특징적인 product ion과 감도가 우수한 collision energy를 성분별 MRM 조건으로 설정하였다.

3.3 결과 및 고찰

3.3.1 GC-MS를 활용한 황칠나무 잎 지용성 추출물 분석

황칠나무 잎 지용성 추출물을 GC-MS의 scan mode 분석을 실시한 결과 Figure 3-2와 같은 total ion chromatogram (TIC)을 얻을 수 있었다. 일정 수준 이상의 감도를 나타낸 성분의 peak를 기준으로 총 20종의 성분이 확인되었으며, 각 peak의 MS spectra를 Table 3-1에 제시하였다. 성분에 대한 검토는 library 검색에서 85% 이상의 similarity를 가진 성분을 대상으로 하였다. α -Amyrin, β -amyrin, β -sitosterol 등의 성분은 표준품을 확보하여 대조분석을 수행하여 정성분석의 정확성을 높였으며, dendropanoxide는 library 검색 결과보다 황칠나무 관련 기존 연구보고의 data를 참조하였다.⁷⁾

Table 3-2에 나타낸 바와 같이 검출된 20종의 peak 중 3종을 제외한 17종의 성분이 확인되었으며, 특히 triterpenoid 계열 및 전구체 성분이 다수 존재함을 알 수 있었다.⁶⁾ 한편, 제2장의 LC-MS profile에서 확인된 triterpenoid 성분보다 GC-MS 분석 결과에서 확인된 triterpenoid 성분의 종류가 다양하게 나타났는데, 이는 추출에 사용된 용매의 극성 차이가 주요 요인이며, squalene과 같이 GC 기반의 분석에서만 확인되는 성분 특성 등이 추가적인 요인으로 작용된 것으로 판단된다.

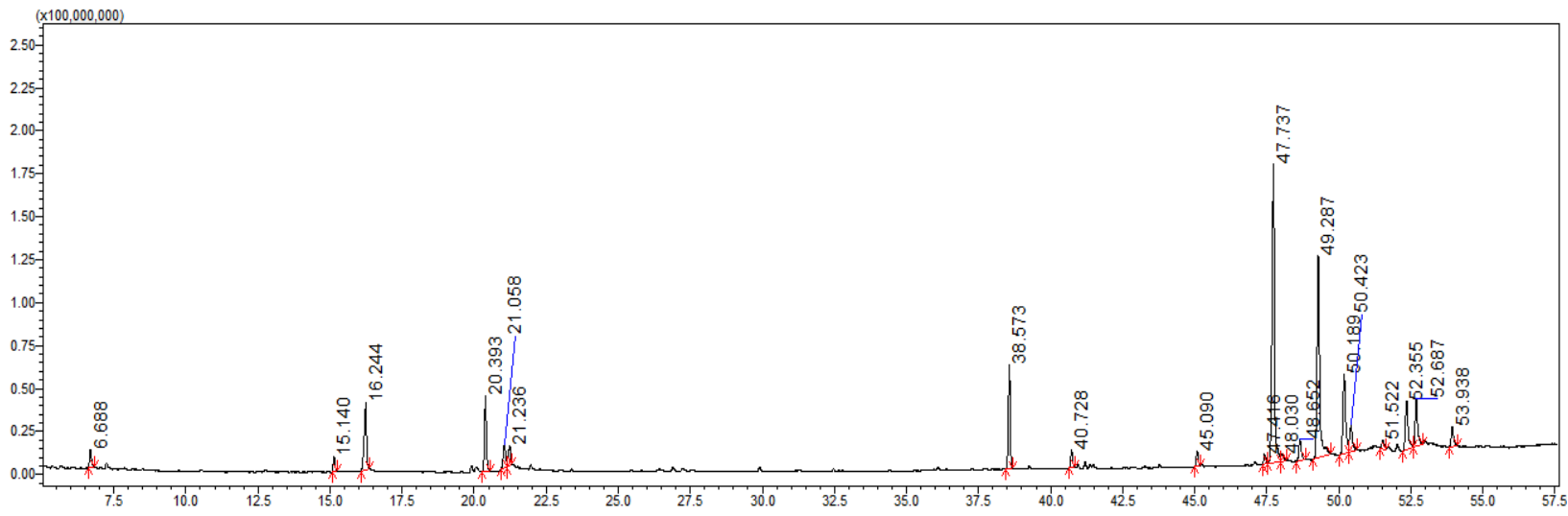


Figure 3-2. GC-MS total ion chromatogram of *D. morbifera* leaf extract.

Table 3-1. Compound information of lipophilic compounds of *D. morbifera* leaf extracts

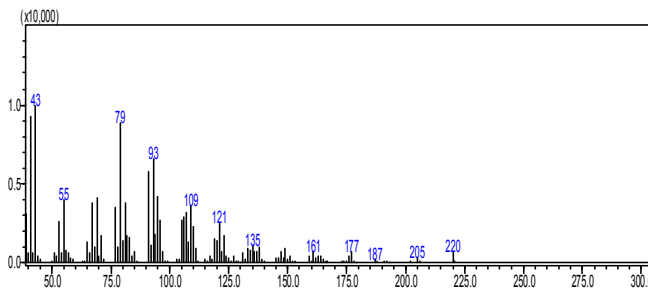
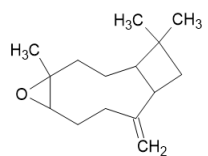
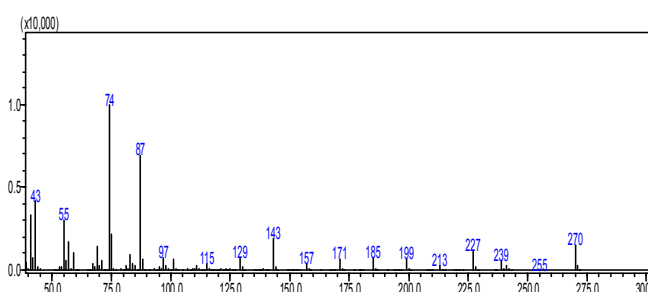

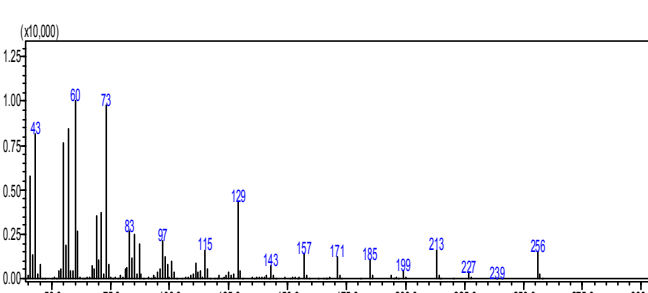
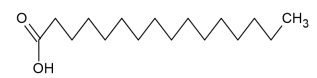
Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
1	Caryophyllene oxide	220	C ₁₅ H ₂₄ O
			
2	<i>n</i> -Hexadecanoic acid methyl ester	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
			
3	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
			

Table 3-1. Continued

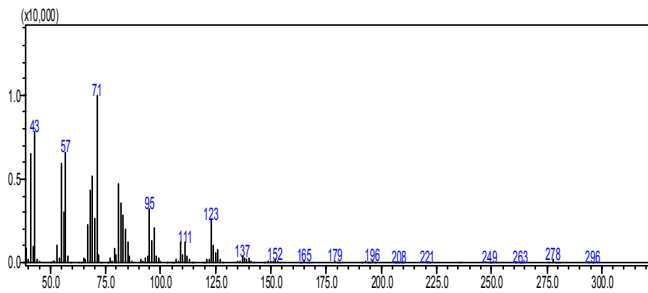
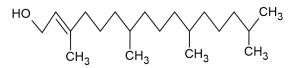
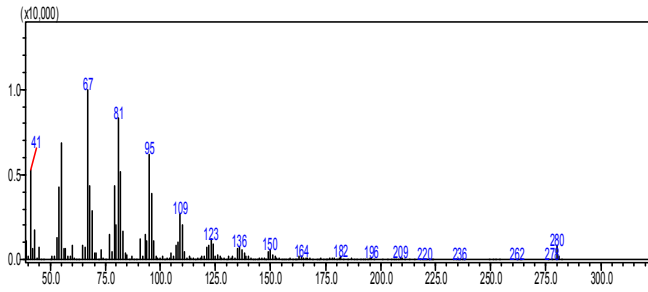
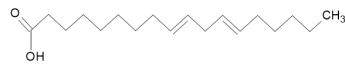
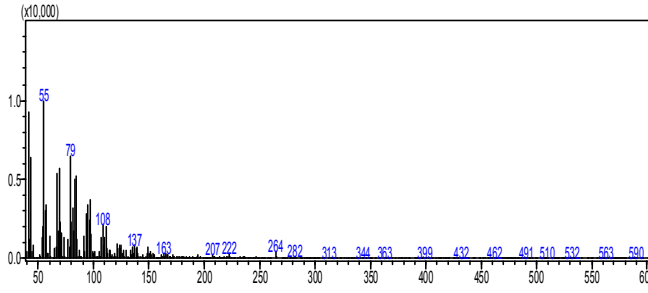
Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
4	Phytol	296	C ₂₀ H ₄₀ O
			
5	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
			
6	unknown	-	-
		-	

Table 3-1. Continued

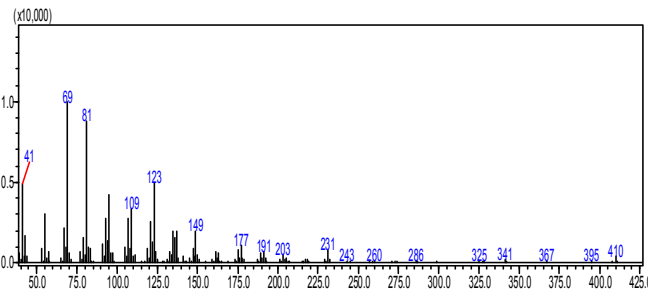
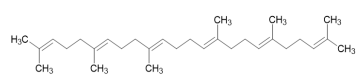
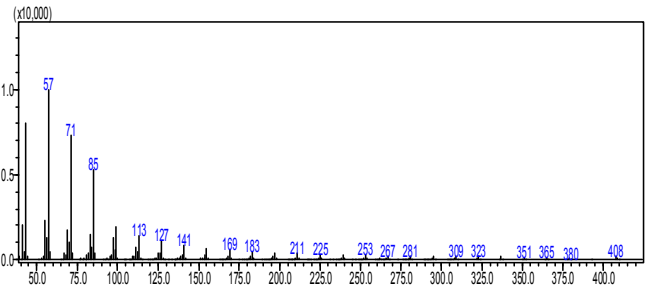

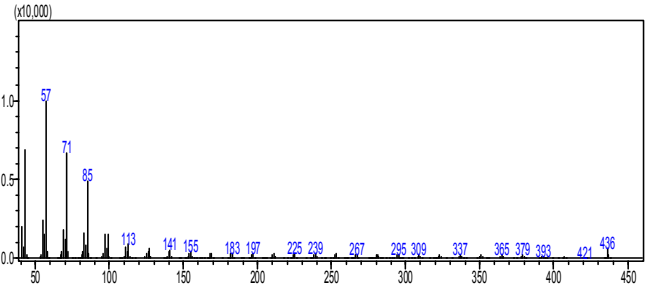

Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
7	Squalene	410	C ₃₀ H ₅₀
			
8	<i>n</i> -Nonacosane	408	C ₂₉ H ₆₀
			
9	<i>n</i> -Hentriacontane	436	C ₃₁ H ₆₄
			

Table 3-1. Continued

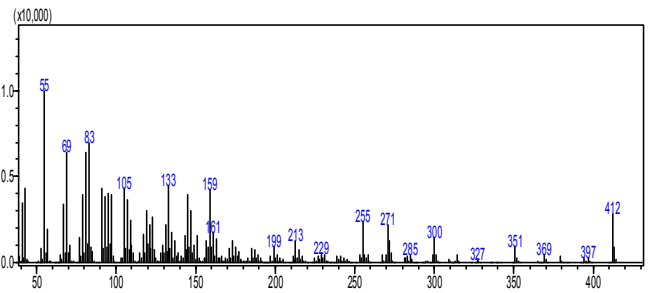
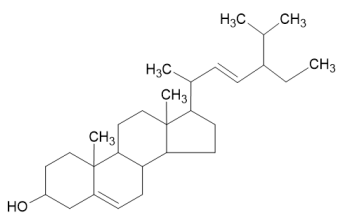
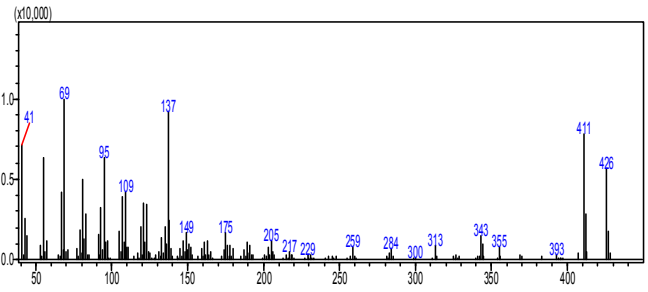
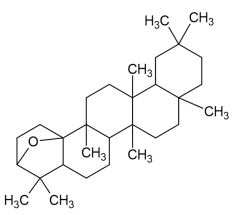
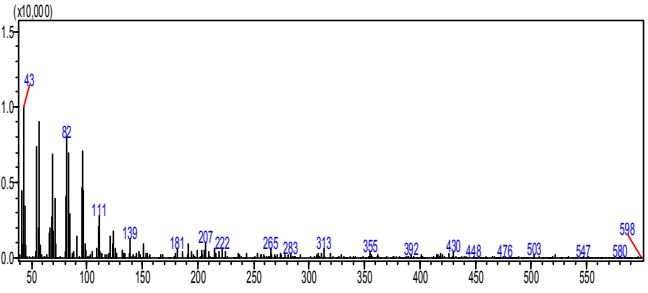
Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
10	Stigmasterol	412	C ₂₉ H ₄₈ O
			
11	Dendropanoxide	426	C ₃₀ H ₅₀ O
			
12	unknown	-	-
		-	

Table 3-1. Continued

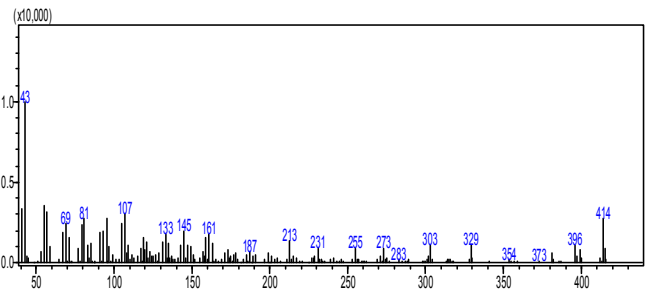
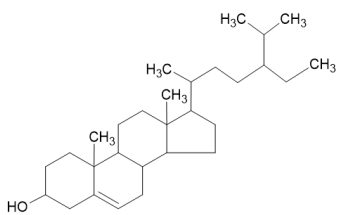
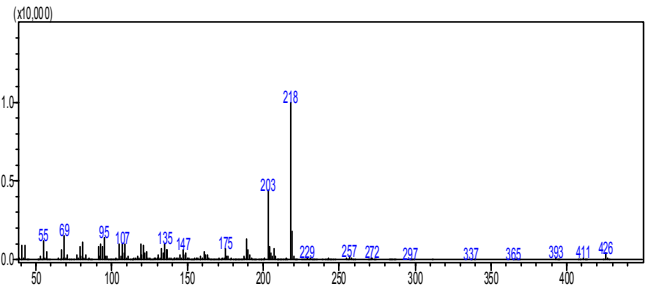
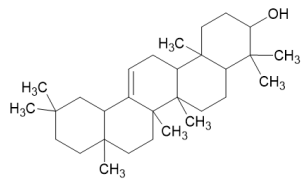
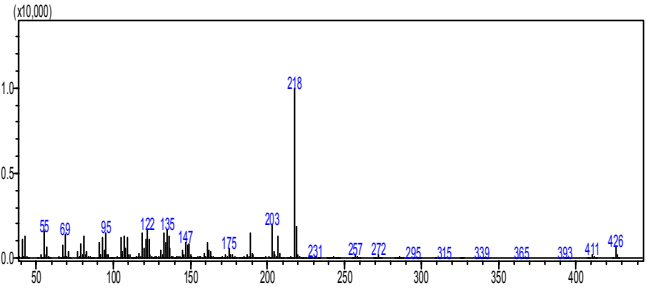
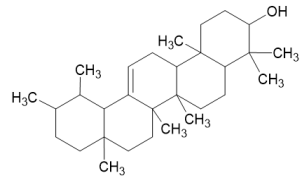
Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
13	β -Sitosterol	414	$C_{29}H_{50}O$
			
14	β -Amyrin	426	$C_{30}H_{50}O$
			
15	α -Amyrin	426	$C_{30}H_{50}O$
			

Table 3-1. Continued

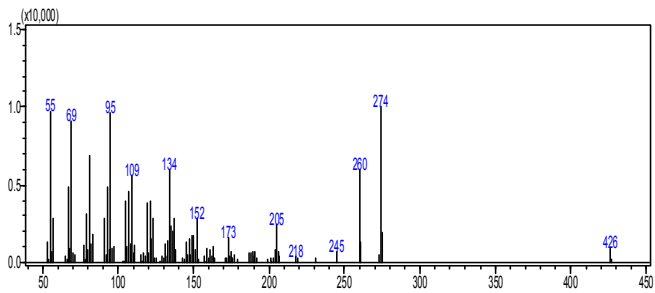
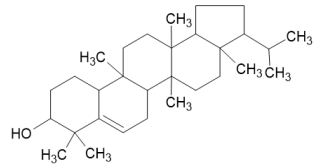
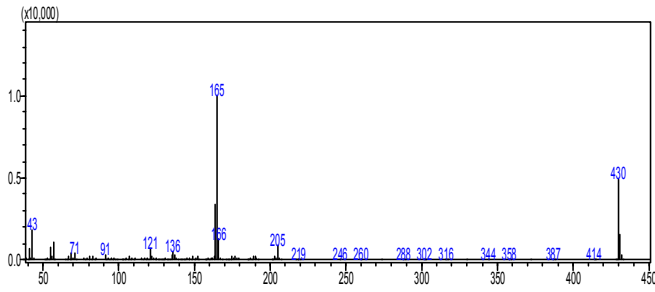
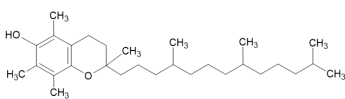
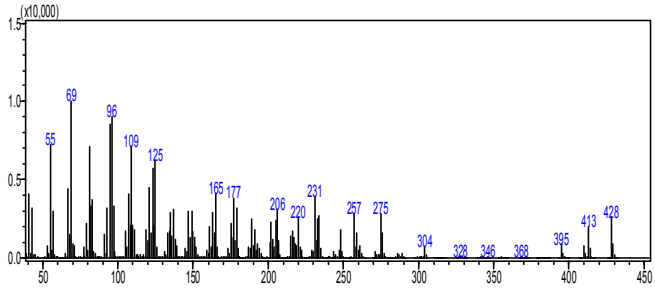
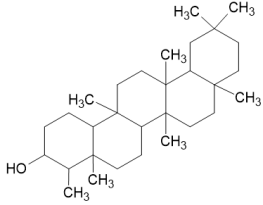
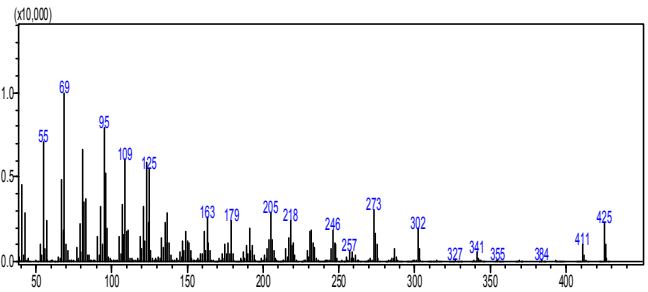
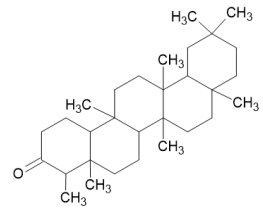
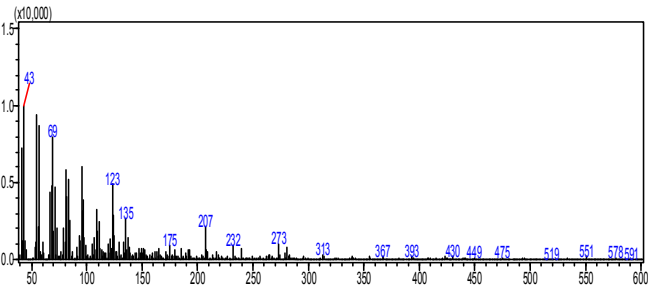
Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
16	Simiarenol	426	C ₃₀ H ₅₀ O
			
17	α-Tocopherol	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
			
18	Friedelinol	428	C ₃₀ H ₅₂ O
			

Table 3-1. Continued

Peak	Compound name	Molecular weight	Formula
19	Friedelin	426	C ₃₀ H ₅₀ O
			
20	unknown	-	-
		-	

구조가 확인된 17종의 성분 중에는 dendropanoxide가 전체 TIC의 peak area 합계에서 차지하는 비율이 26.64%로서 가장 높게 나타났다. 성분별로 분자 구조에 따라 질량분석기에서 검출되는 감도가 다르기 때문에 실제 함량에 정비례하지 않는다고 하더라도 유사한 구조를 가지는 triterpenoid 성분들 중에서는 가장 높은 함량을 가지는 것으로 판단할 수 있었다. 다음으로는 β -amyrin과 α -amyrin이 각각 19.90%와 8.03%의 peak area 비율을 나타냈으며, 다른 cyclic 구조를 가진 triterpenoid 성분의 전구체 역할을 하는 것으로 알려진 squalene이 7.26%로 비교적 높은 peak area 비율을 나타냈다.^{8,9)}

또한 α -, β -, γ -, δ -tocopherol의 합성에 관련된 phytol이 5.56%의 peak area 비율을 나타냈으며,¹⁰⁾ amyrin과 유사한 구조를 가지는 triterpenoid인 friedelinol과 friedelin이 각각 4.97%와 4.41%의 peak area 비율을 나타냈다. Dendropanoxide, α - 및 β -amyrin, friedelinol, friedelin, simiarenol 등의 triterpenoid 성분들의 peak area 합계는 전체 TIC peak area의 69.47%로 나타남에 따라 황칠나무 잎의 지용성 추출물의 주된 성분군임을 알 수 있었다.

Dendropanoxide는 골다공증과 관련된 파골세포의 생성 억제 효과, 암세포에 대한 세포독성, 간 섬유화 개선 효과, 신장 손상 보호 효과, 항당뇨 활성 등 다양한 생리 활성을 가지는 것으로 보고되었다.¹¹⁻¹⁶⁾ 구조적으로 매우 유사한 α -amyrin과 β -amyrin은 중추 및 말초 신경계나 위장관의 보호 효과, 항염증 관련 활성, 고지혈증이나 고혈당 억제 효과 등이 알려져 있으며,¹⁷⁾ α -amyrin은 만성 및 급성 백혈병 세포에 대한 세포독성을 나타내는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾

Friedelinol은 여러 가지 암에 대한 항암 관련 효과가 보고되고 있으며,^{18,19,20)} friedelin 역시 항암 활성과 관련된 혈관신생 억제 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.²¹⁾ β -Sitosterol은 암세포에 대한 세포독성, 항파골세포 효과 등의 연구가 수행되었으며,^{11,12)} 피부 미백 효과와 탈모 관련 효과, 전립선 비대증 관련 효과에 대한 보고가 있었다.^{22,23)}

Table 3-2. GC-MS analysis results of lipophilic compounds of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Retention time (min)	Compounds	Similarity	Peak area	Area %
1	6.69	Caryophyllene oxide	95	50,202,997	1.32
2	15.14	Hexadecanoic acid methyl ester	96	35,170,350	0.93
3	16.24	Hexadecanoic acid	96	220,435,297	5.80
4	20.39	Phytol	97	211,119,632	5.56
5	21.06	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	95	79,811,900	2.10
6	21.24	unknown	-	74,428,996	1.96
7	38.57	Squalene	90	275,650,001	7.26
8	40.73	Nonacosane	96	46,208,695	1.22
9	45.09	Hentriacontane	94	41,279,560	1.09
10	47.42	Stigmasterol	90	30,319,746	0.80
11	47.74	Dendropanoxide	91	1,013,245,314	26.64
12	48.03	unknown	-	27,921,829	0.73
13	48.65	β -Sitosterol	90	76,370,648	2.01
14	49.29	β -Amyrin	85	755,981,589	19.90
15	50.19	α -Amyrin	88	305,111,355	8.03
16	50.42	Simiarenol	85	102,794,226	2.71
17	51.52	α -Tocopherol	90	25,697,662	0.68
18	52.36	Friedelinol	87	188,688,623	4.97
19	52.69	Friedelin	91	167,450,193	4.41
20	53.94	unknown	-	71,412,922	1.88
amount				3,799,301,535	100

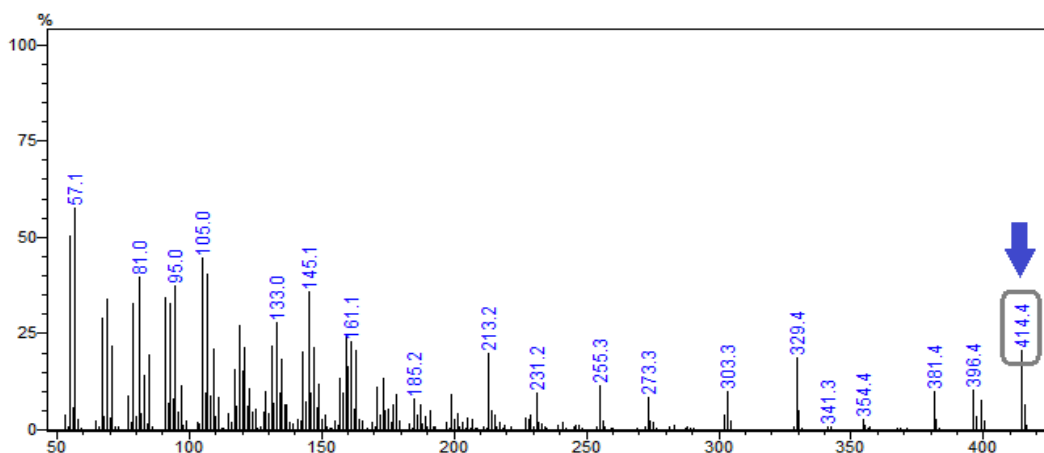
3.3.2 GC-MS/MS 활용 triterpenoid 분석

GC-MS 분석 결과에서 확인된 황칠나무 잎 지용성 추출물의 성분 중 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려진 triterpenoid 성분들에 대한 MRM mode 분석 조건을 검토하였다.

Figure 3-3의 예시는 황칠나무 잎 지용성 추출물에 존재하는 것으로 확인된 β -sitosterol의 MRM 조건 설정을 위한 과정이다. 즉, GC-MS scan mode 분석 결과에서 확인된 β -sitosterol의 모분자량 414.4 m/z 를 precursor ion으로 설정한 후 MS/MS 분석을 통해 414.4 m/z 로부터 생성된 product ion들 중 감도가 높은 329.3 m/z 나 396.4 m/z , 또는 231.1 m/z 를 선택하게 된다. 이와 같은 과정으로 triterpenoid 관련 성분 10종의 MRM 분석 조건을 Table 3-3에 제시하였다.

설정된 성분별 MRM 조건을 적용하여 황칠나무 잎 지용성 추출물을 GC-MS/MS로 분석한 결과, Figure 3-4와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었다. 본 연구에서 활용한 MRM mode의 질량분석을 수행하면 설정된 조건을 만족하는 product ion만을 검출하는 특성으로 인해 일반적인 GC 분석에서 나타나날 수 있는 인접한 방해성분의 영향을 최소화할 수 있으며, 머무름 시간이 겹치는 성분에 대해서도 분석이 가능하게 된다. 또한 제한된 조건의 ion만을 선택적으로 검출하게 되므로 검출 감도가 높아지게 되어 미량의 성분을 분석하는 경우에도 우수한 결과를 나타내게 된다.

[A]



[B]

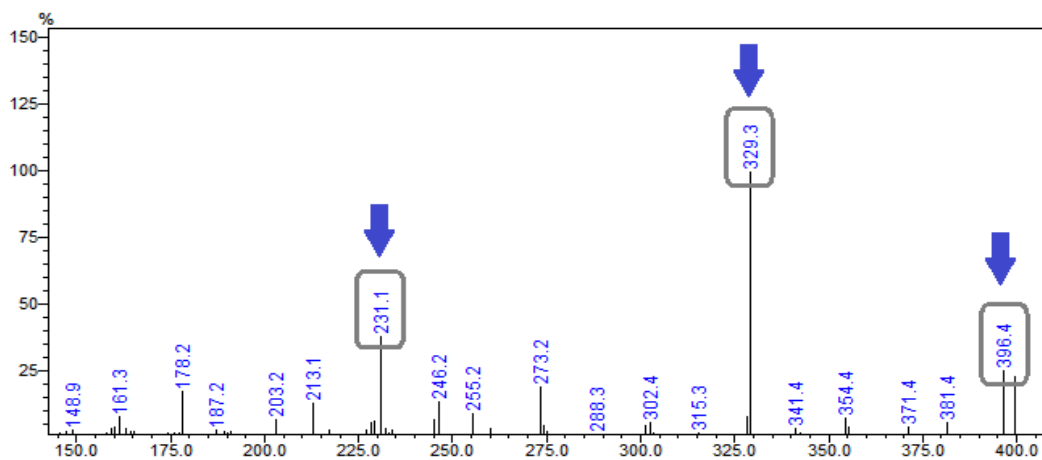


Figure 3-3. Product ion scan process for setting MRM mode conditions of GC-MS/MS. A; Full scan mode data of β -sitosterol, B; product ion scan data from precursor ion 414.4 m/z of β -sitosterol.

Table 3-3. MRM conditions of triterpenoid compounds of *D. morbifera* leaf extracts

Peaks	Compounds	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy
a	Squalene	38.57	410.4	395.3 367.3	10 15
b	Stigmasterol	47.42	412.4	394.2 379.2	10 15
c	Dendropanoxide	47.74	426.4	411.3 137.1	10 15
d	β -Sitosterol	48.65	414.4	396.4 329.3	15 15
e	β -Amyrin	49.29	426.4	411.4 218.3	10 20
f	α -Amyrin	50.19	426.4	411.4 218.3	10 15
g	Simiarenol	50.42	426.4	411.4 203.2	10 20
h	α -Tocopherol	51.52	430.4	165.1 205.2	20 15
i	Friedelinol	52.36	428.4	413.4 275.4	10 15
j	Friedelin	52.69	426.4	411.4 341.4	10 10

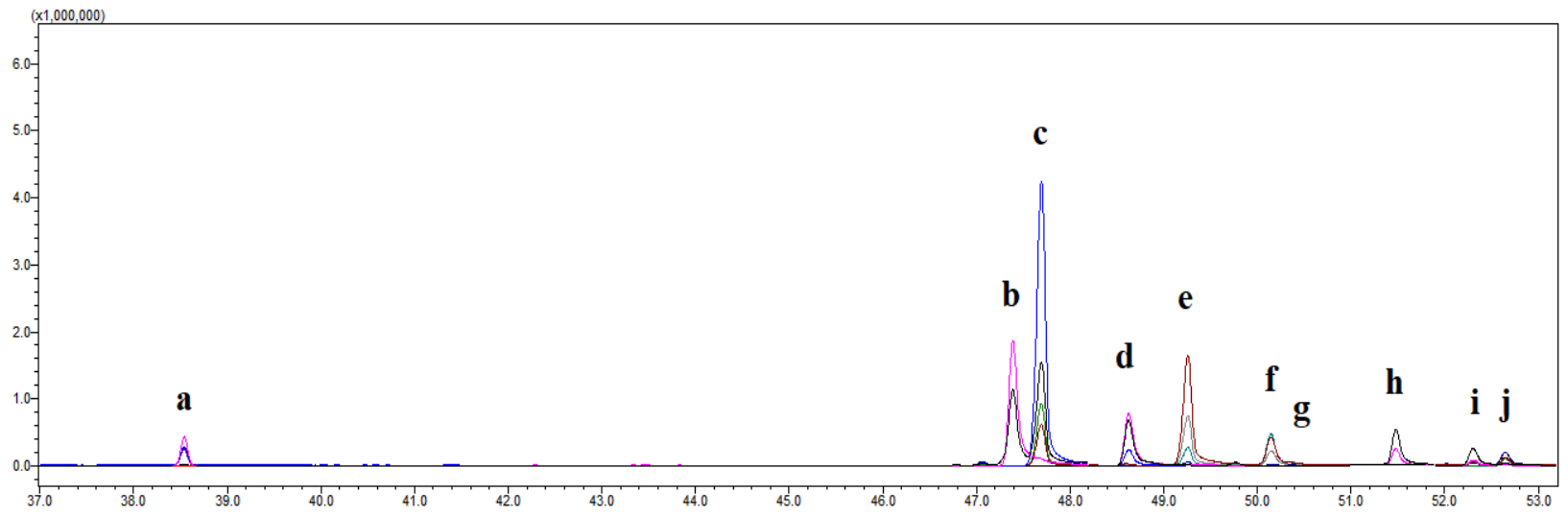


Figure 3-4. MRM mode GC-MS/MS chromatogram of triterpenoid compounds of *D. morbifera* leaf extracts.
 a; squalene, b; stigmasterol, c; dendropanoxide, d; β -sitosterol, e; β -amyrin, f; α -amyrin, g; simiarenol,
 h; α -tocopherol, i; friedelinol, j; friedelin.

3.4 결론

일반적으로 지용성 성분은 LC 장비의 분석보다 GC 장비의 분석이 더 유리한 것으로 알려져 있다. 황칠나무 잎 지용성 추출물을 GC-MS의 scan mode 분석을 실시한 결과에서 20종의 성분이 확인되었으며, 각 peak의 MS spectra를 library 검색을 통해 3종을 제외한 17종의 성분이 확인하였다. 가장 함량이 높을 것으로 기대되는 성분으로서 다양한 생리활성 연구에서 다뤄지고 있는 dendropanoxide가 확인되었으며, β -amyrin과 α -amyrin의 함량도 상대적으로 높게 나타났다.

황칠나무 잎 지용성 추출물의 성분 중 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려진 triterpenoid 성분 및 전구체 성분이 다수 존재하였으므로 해당 성분들에 대한 MRM 분석 조건을 검토하였다. 설정된 조건을 만족하는 product ion만을 검출하는 특성으로 방해성분의 영향을 최소화할 수 있으며, 머무름 시간이 겹치는 성분에 대해서도 분석이 가능하게 된다. 또한 제한된 조건의 ion만을 선택적으로 검출하게 되므로 검출 감도가 높아지게 될 것으로 판단된다. 이러한 분석 방법은 황칠나무 잎을 활용한 연구에서 조건 또는 시료별 특정 성분의 함량을 비교하는 방법으로 적용될 수 있으며, 다른 식물 추출물의 연구에도 정성 또는 비교 정량 분석의 방법으로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Park SE, Yoo SA, Seo SH, Lee KI, Na CS and Son HS. (2016). GC-MS based metabolomics approach of Kimchi for the understanding of *Lactobacillus plantarum* fermentation characteristics. *LWT-Food Science and Technology*. 68:313-321.
2. Im DY and Lee KI. (2017). Antioxidative activity and tyrosinase inhibition effect of fractions from the extract of *Inonotus obliquus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 48:46-50.
3. Yang SA, Garcia CV and Lee JW. (2017). Volatile compounds and antiproliferative effects of *Dendropanax morbifera* on HepG2 cells. *Journal of Life Science*. 27:561-566.
4. Shin JH and Ahn YG. (2013). Identification of the derivated species from traditional coating films. *The Korean Journal of Community Living Science*. 24:243-249.
5. Lim SS, Lee YS, Kim HM, Ahn YH, Shin KH and Lee SH. (2008). GC/MS analysis of volatile constituents from broad-leaved indeciduous trees. *Korean Journal of Plant Resources*. 21:237-248.
6. Shibuya M, Sagara A, Saitoh A, Kushiro T and Ebizuka Y. (2008). Biosynthesis of baccharis oxide, a triterpene with a 3,10-oxide bridge in the A-ring. *Organic Letters*. 10:5071 - 5074.
7. Park YJ, Kim DM, Choi HB, Jeong MH, Kwon SH, Kim HR, Kwak JH and Chung KH. (2021). Dendropanoxide, a triterpenoid from *Dendropanax morbifera*, ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells through autophagy inhibition. *Nutrients*. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/1/98>.
8. Singh B and Sharma RA. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*. 5:129 - 151.
9. Busta L, Serra O, Kim OT, Molinas M, Peré-Fossoul I, Figueras M and Jetter R. (2020). Oxidosqualene cyclases involved in the biosynthesis of

- triterpenoids in *Quercus suber* cork. Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64913-5>.
10. Shutu X, Dalong Z, Ye C, Yi Z, Shah T, Ali F, Qing L, Zhigang L, Weidong W, Jiansheng L, Xiaohong Y and Jianbing Y. (2012). Dissecting tocopherols content in maize (*Zea mays* L.), using two segregating populations and high-density single nucleotide polymorphism markers. BMC Plant Biology. <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-12-201>.
 11. Kim EH, Jo CS, Ryu SY, Kim SHwan and Lee JY. (2018). Anti-osteoclastogenic diacetylenic components of *Dendropanax morbifera*. Archives of Pharmacal Research. 41:506-512.
 12. Park SY, Hwang KT, Na JR, Lee KH, Jeong ES and Kim SO. (2018). Triterpenoids from the leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and lung A549 cancer cells. Korean Journal of Food Preservation. 25:471-481.
 13. Park YJ, Kim DM, Choi HB, Jeong MH, Kwon SH, Kim HR, Kwak JH and Chung KH. (2022). Dendropanoxide, a triterpenoid from *Dendropanax morbifera*, ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells through autophagy inhibition. Nutrients. <https://doi.org/10.3390/nu14010098>.
 14. Park YJ, Kim KS, Park JH, Lee SH, Kim HR, Lee SH, Choi HB, Cao S, Kumar V, Kwak JH and Kim HS. (2020). Protective effects of dendropanoxide isolated from *Dendropanax morbifera* against cisplatin-induced acute kidney injury via the AMPK/mTOR signaling pathway. Food and Chemical Toxicology. 145:111605. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111605>.
 15. Lee JW, Kim KS, An HK, Kim CH, Moon HI and Lee YC. (2013). Dendropanoxide Induces autophagy through ERK1/2 activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. PloS ONE. 8:e83611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083611>.
 16. Moon HI. (2011). Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of

- Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Human & Experimental Toxicology*. 30:870-875.
17. Nogueira AO, Oliveira YIS, Adjafre BL, de Moraes MEA and Aragão GF. (2018). Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum*: a literature review. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 33:4-12.
 18. Gonçalves Pereira RC, Gontijo Evangelista FC, Santos Júnior VS, Paula Sabino A, Gonçalves Maltarollo V, Freitas RP and Pains Duarte L. (2020). Cytotoxic activity of triterpenoids from *Cheilochlinium cognatum* branches against chronic and acute leukemia cell lines. *Chemistry & Biodiversity*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202000773>.
 19. Zhang J, He Y, Zhou Y, Hong L, Jiang Z, Zhao Y and Pan Z. (2022). Epifriedelinol ameliorates DMBA-induced breast cancer in albino rats by regulating the PI3K/AKT pathway. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 257:283-289.
 20. Yang J, Fa J and Li B. (2017). Apoptosis induction of epifriedelinol on human cervical cancer cell line. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 14:80-86.
 21. Toledo CR, Pereira VV, Duarte LP, Sousa GF and Silva-Cunha A. (2021). Anti-angiogenic activity and safety of intraocular application of triterpenes. *Documenta Ophthalmologica*. 143:259 - 270.
 22. Lee SY, Choi EJ, Bae DH, Lee DW and Kim SO. (2015). Effects of 1-tetradecanol and β -sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 41:73-83.
 23. Wilt TJ, Ishani A, MacDonald R, Stark G, Mulrow CD and Lau J. (1999). Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD.001043>.