



Original Article / 원저

황칠나무(*Dendropanax morbiferus*) 잎 추출물의 LC-MS/MS 분석 및 항산화 효과

김민정^{1,#}, 손재동^{1,#}, 양예진¹, 허지웅¹, 이후장^{1,*}, 박광일^{1,*}

¹경상국립대학교 수의과대학

LC-MS/MS analysis and antioxidant activity of *Dendropanax morbiferus* extract.

Min Jung Kim^{1,#}, Jae Dong Son^{1,#}, Ye Jin Yang¹, Ji Woong Heo¹,
Hu Jang Lee^{1,*}, Kwang Il Park^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objective : The study's objective is to assess the components of *Dendropanax morbifera* (DM) utilizing UPLC-MS/MS and assess their antioxidant properties in order to establish fundamental information for quality control of herbal formulations.

Methods : The DM leaves were ground into powder and extracted with water at 80°C. The extract was subsequently concentrated and subjected to freeze-drying for subsequent analysis. The LC-MS/MS analysis was performed using a 1260 series HPLC system and a 3200 QTrap tandem mass system in positive ion mode, with detection conducted at 280 nm. The Folin-Ciocalteu method was employed to measure the phenolic content, while a colorimetric method using aluminum chloride was used to determine the flavonoid content, with gallic acid and quercetin as standards, respectively. The evaluation of antioxidant activity was conducted through the measurement of DPPH radical scavenging activity, by adding the DPPH solution to the extract and recording the absorbance at 517 nm.

Results : The UPLC-MS/MS analysis identified five polyphenolic compounds in the DM extract, specifically syringin, 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside, shaftoside, rutin, and kaempferol-3-O-rutinoside. The extract was found to contain a total phenolic content of 83.106 ± 0.21 mg GAE/g and a total flavonoid content of 87.963 ± 1.014 mg QE/g. The DM extract demonstrated substantial antioxidant properties, resulting in a reduction of DPPH radicals that was evident at concentrations as low as 40 µg/ml.

© 2024 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : The study determined important polyphenolic compounds in DM and established its considerable antioxidant efficacy. These findings provide evidence for the efficacy of DM in disease prevention related to oxidative stress and establish a foundation for ensuring quality control in herbal preparations.

Key Words : *Dendropanax morbifera*, Crude extract, LC-MS/MS, Antioxidant.

I. 서론

Reactive oxygen species (ROS)은 세포 내에서 대사 과정 중 생성되는 부산물로, 정상적인 세포 기능 유지에 중요한 역할을 하지만, 과도하게 생성될 경우 세포 손상을 유발할 수 있다¹⁾. ROS는 세포막의 지질, 단백질, DNA 등을 손상시켜 세포의 기능을 저하시키며²⁾. 이러한 ROS의 과잉 생성은 암³⁾, 심혈관 질환⁴⁾, 신경 퇴행성 질환⁵⁾ 등의 다양한 질병 발병에 중요한 요인으로 작용한다. 따라서 ROS의 생성을 억제하거나 제거하는 항산화제는 건강 유지와 질병 예방에 있어 매우 중요하다.

항산화제는 활성산소종(ROS)을 중화시켜 산화적 손상을 예방할 수 있는 화합물이다. 그들은 ROS에 전자를 환원시키고 이러한 반응성 분자를 스스로 반응성이 없게 안정화시킴으로써 이를 달성한다^{6,7)}. 물질의 항산화 능력을 평가하는 데 사용할 수 있는 다양한 방법 중 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 및 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid))는 단순성과 효율성으로 인해 널리 인식되고 사용된다. DPPH 분석은 라디칼을 감소시키는 항산화제의 능력을 측정하여 분광광도법을 통해 정량화하는 방법이며, 항산화 능력이 높은 물질은 보라색에서 노란색으로 변화로 유도한다⁸⁾. 이러한 분석은 항산화 잠재력을 정확하게 평가하는 데 중요한 역할을 하므로 산화 스트레스로 인한 손상에 대한 보호 효과를 확인할 수 있다.

이러한 산화적 스트레스에 의한 항산화 방어망의 붕

괴와 미생물로부터 피부를 보호하기 위한 항산화, 항균, 미백 및 항노화 효과를 가진 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있다⁹⁻¹¹⁾. 황칠나무 (*Dendropanax morbifera*, DM)는 아시아 지역에서 오랜 역사와 전통을 가진 약용 식물로, 특히 한국에서 고대로부터 귀한 약재로 사용되어왔다. 황칠나무의 수액은 건강 증진과 질병 치료에 활용되어 왔으며¹²⁾, 최근 들어 그 생리활성 물질에 대한 과학적 연구가 활발히 진행되고 있다^{13,14)}. 이와 같이 황칠나무에 대한 실험적 효능과 임상적 증례보고는 보고가 되었지만, 품질관리를 위한 분석 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 한약제제의 품질관리에 기초 자료를 제공하고자 성분을 대상으로 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI) 방식의 UPLC-QTOF-MS/MS를 이용하여 구조 동정 및 정성 분석하였다. 또한 폴리페놀, 플라보노이드 함량 분석 및 항산화 활성을 측정하여 황칠나무 추출물에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 황칠나무(*Dendropanax morbiferus*, DM) 잎 추출물 제조
황칠나무는 경남 하동군 소재지에서 재배되고 있는 것을 농업회사법인 휴림황칠(주)로부터 제공 받았으며 잎을 본 연구에 사용하였다. 추출물 제조 전 황칠나무 잎을 믹서기에 곱게 분쇄하여 분말 형태로 준비하였다. 열수 추출물 제조는 황칠나무 잎 분말 10 g 에 HPLC 등급의 water 200 mL를 가하고, 80 °C로 설정된 환류 냉각장치에서 분말를 2시간씩 2회 추출을 실시하였다. 감압농축을 한 뒤, 동결건조를 하였다. 실험 사용하기

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Hu-Jang Lee, Departments of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-55-772-2352, E-mail : hujang@gnu.ac.kr

*Corresponding author: Kwang Il Park, Departments of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-55-772-2342, Fax : +82-55-772-2349, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

•Received : August 5, 2024 / Revised : August 12, 2024 / Accepted : August 16, 2024

전까지는 -20°C 에 보관하였다(yield: 21.57%).

2. UPLC-MS/MS 분석 조건

UPLC-MS/MS는 1260 series UPLC system (Shimadzu; Kyoto, Japan) 및 3200 QTrap tandem mass system (Sciex LLC)에서 positive ion mode(spray voltage set at -4.5 kV)에서 수행하였다. ProntoSil C18 컬럼 (길이, 250 mm; 내경, 4.6 mm; 입자 크기, $5\ \mu\text{m}$, Phenomenex Co., Ltd.,

Biochoff Chromatography)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 증류수와 B 용매 0.1% formic acid 포함하는 Acetonitrile이고, 이동상에 사용된 용매 조건은 (10-15)% B에서 (0-10)분, 20% B에서 (10-20)분, 25% B에서 (20-30)분, 40% B에서 (30-40) 분, 70% B에서 (40-50)분, 95% B에서 (50-70) 분 분석을 수행하였다. 분석을 위해 $0.5\ \text{ml}/\text{min}$ 의 유속으로 gradient system을 사용하였고 컬럼 오븐 온도는 35°C , 분석 파장은 280 nm 수행하였다(Table 1).

Table 1. UPLC-QTOF-MS/MS analysis condition.

Instrument	UPLC system 및 3200 QTrap tandem mass system			
Column	Pronto SIL(150*4.6mm, $5\ \mu\text{m}$, 120-5-C18 SH)			
Flow rate	0.5 ml/min			
Inject volume	5 μL			
Oven Temperature	35 $^{\circ}\text{C}$			
Detector	UV-Vis (280nm)			
Mobile phase	A	Water		
	B	ACN		
	Gradient	min	A%	B%
		0	95	10
		10	90	15
		20	80	20
		30	75	25
		40	60	40
50	30	70		
70	5	95		

3. 총 폴리페놀 함량 평가

총 페놀 함량은 Singleton과 Rossi가 설명한 방법을¹⁵⁻¹⁷⁾ 약간 수정하여 결정되었다. Folin-Ciocalteu 시약을 사용하고, 약 0.5mL의 추출물을 Cuvette에 넣고, $2.5\ \text{ml}/\text{min}$ 의 10% Folin-Ciocalteu 시약과 2 ml의 7.5% Na_2CO_3 를 추가하였다. Cuvette은 교반기로 강하게 혼합하고, 혼합물을 30분 동안 방치한 후, 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 총 페놀 함량은 mg GAE/g 추출물로 나타냈다.

4. 총 플라보노이드 함량 평가

총 플라보노이드 함량¹⁸⁾을 평가하기 위해 Aiyegoro와 Okoh¹⁹⁾이 설명한 알루미늄 클로라이드(AlCl_3)를 사용

하는 비색법을 사용하였다. 0.2 ml의 10% AlCl_3 에 0.2 ml의 추출물을 첨가한 후, 연속적으로 0.2 ml의 아세트산 칼륨(CH_3COOK , 1 M)과 1.12 ml의 증류수를 추가하였다. 혼합물을 잘 혼합하고 실온에서 30분 동안 방치한 후, 시약 공백에 대해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 총 플라보노이드 함량은 mg QE/g 추출물로 나타냈다.

5. 항산화 측정

DPPH 측정은 YeJin²⁰⁾등의 논문을 약간 변형하여 수행하였다. DPPH 라디칼 잔여량은 각각의 추출물 ($0-300\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 100 μL 를 96 well plate에 분주하고, DPPH(0.5 mM in ethanol) 용액 50 μL 를 가하여 상

온(25° C)에서 15분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 남아있는 양은 아래 식에 따라 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH Remaining (\%)} = (\text{시료첨가구 OD} * 100) / \text{비첨가구 OD}$$

6. 통계처리

데이터는 GraphPad Prism 버전 5.0 (GraphPad Software, SanDiego, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 결과는 Student's *t*-test 또는 분산 분석(일원 ANOVA, Dunnett, 대조군 비교)을 사용하여 평가된 평균 ± SEM 및 SD로 표시하였다. <0.05의 p-값은 통계적 유의성을 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. DME의 UPLC-MS/MS 분석 결과

DME에 포함된 화합물의 정성적 분석은 LC-MS/MS로 확인하였다. LC-MS/MS 스펙트럼을 기준으로 총 5개의 피크가 확인되었다 (Fig. 1). 280nm 파장에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 통해 얻은 피크에 따라 syringin, 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside, schaftoside, rutin 및 kaempferol-3-O-rutinoside의 페놀 화합물을 확인하였다. 추출물 성분의 잠정적인 동정은 분자량, MS/MS 단편화 및 문헌 데이터를 기반으로 이루어졌다. Table 2에 나열된 것처럼 DME에는 항산화 효과로 알려진 플라보노이드 rutin이 포함되어 있으며, 화합물은 용출 순서 RT(Retention time)에 따라 번호로 나타내었다. 각각의 1, 2, 3, 4, 5 및 6 peak는 m/z 395(C₁₇H₂₄O₉), 627(C₂₆H₃₀O₁₇), 565(C₂₆H₂₈O₁₄), 611(C₂₇H₃₀O₁₆), 289(C₁₅H₁₂O₆), 595(C₂₇H₃₀O₁₅)에서 전구체 이온 [M+H]⁺를 나타냈다.

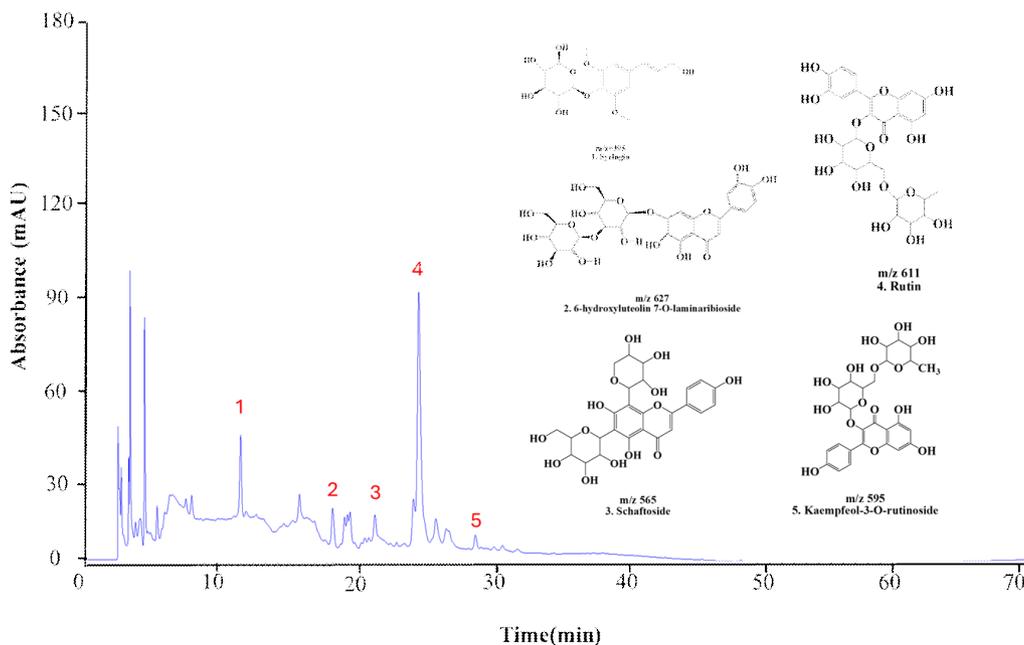


Fig. 1. UPLC chromatogram and structure of the polyphenolic compounds in DME. Syringin (1), 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside (2), Schaftoside (3), Rutin (4) and Kaempferol-3-O-rutinoside (5).

Table 2. Tentative identification of the chemical components of DME obtained from the UPLC-QTOF-MS/MS analysis.

Peak No.	Retention time (min)	Formula	Identification	Experiment Mass (m/z)	MS/MS
1	11.49	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	Syringin ²¹⁾	395.1295	233, · 85
2	18.98	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside ²²⁾	627.2380	465, · 303
3	21.15	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Schaftoside ²³⁾	565.1556	565, · 547, · 445, · 324
4	24.34	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin ²⁴⁾	611.1261	303
5	28.40	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3-O-rutinoside ²⁴⁾	595.2451	287

2. UPLC-QTOF-MS/MS를 이용한 주요 성분의 피크 동정

DME의 성분 구조해석을 위해 LC/ESI+MS/MS를 이용한 positive ion 모드에서 비교하여 동정한 결과 (Fig. 2 and Fig. 3)를 나타내었다. Peak 1에 대해 positive mode에서 [M+H]⁺ 형태로 볼 수 있는 395.1295 m/z를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 233, 185 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다. syringin은 eleutheroside B라고도 하며 항산화 활성, 항균 활성을 나타내는 phenolic glycoside flavonoids 성분으로 알려져 있다²⁵⁾. Peak 2에 대해 positive mode에서 [M+H]⁺ 형태로 볼 수 있는 627.2380 m/z를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 465, 303 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다. 이와 같은 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside는 항산화 관련 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. Peak 3에 대해 positive mode에서 [M+H]⁺ 형태로 볼 수 있는 565.1556 m/z를 precursor ion으로 설정하여 실시한

MS/MS 분석에서 565, 547, 445, 324 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다. 이와 같은 MS spectra는 항염증 활성, 항균 활성, 피부 미백 관련 활성 등을^{27,28)} 가지는 것으로 알려져있는 schaftoside에서 나타나는 것임을 확인하였다. Peak 4에 대해 positive mode에서 [M+H]⁺ 형태로 볼 수 있는 611.1261 m/z를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 303 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다. 이와 같은 MS spectra는 항산화제²⁹⁾ 효능을 가지는 것으로 보고되고 있는 rutin에서 나타나는 것임을 확인하였다. Peak 5에 대해 positive mode에서 [M+H]⁺ 형태로 볼 수 있는 595.2451 m/z를 precursor ion으로 설정하여 실시한 MS/MS 분석에서 287 m/z 등의 product ion이 생성된 것으로 나타났다. 이와 같은 MS spectra는 항동맥경화 활성, 항당뇨 활성, 뇌 보호 효과, 간 보호 효과, 항암 효과, 상처 치유 효과, 심장 보호 효과, 항바이러스 활성, 신장 보호 효과 및 항지방 생성 효과³⁰⁾ 등을 가지는 것으로 보고되고 있는 kaempferol-3-O-rutinoside에서 나타나는 것임을 확인하였다.

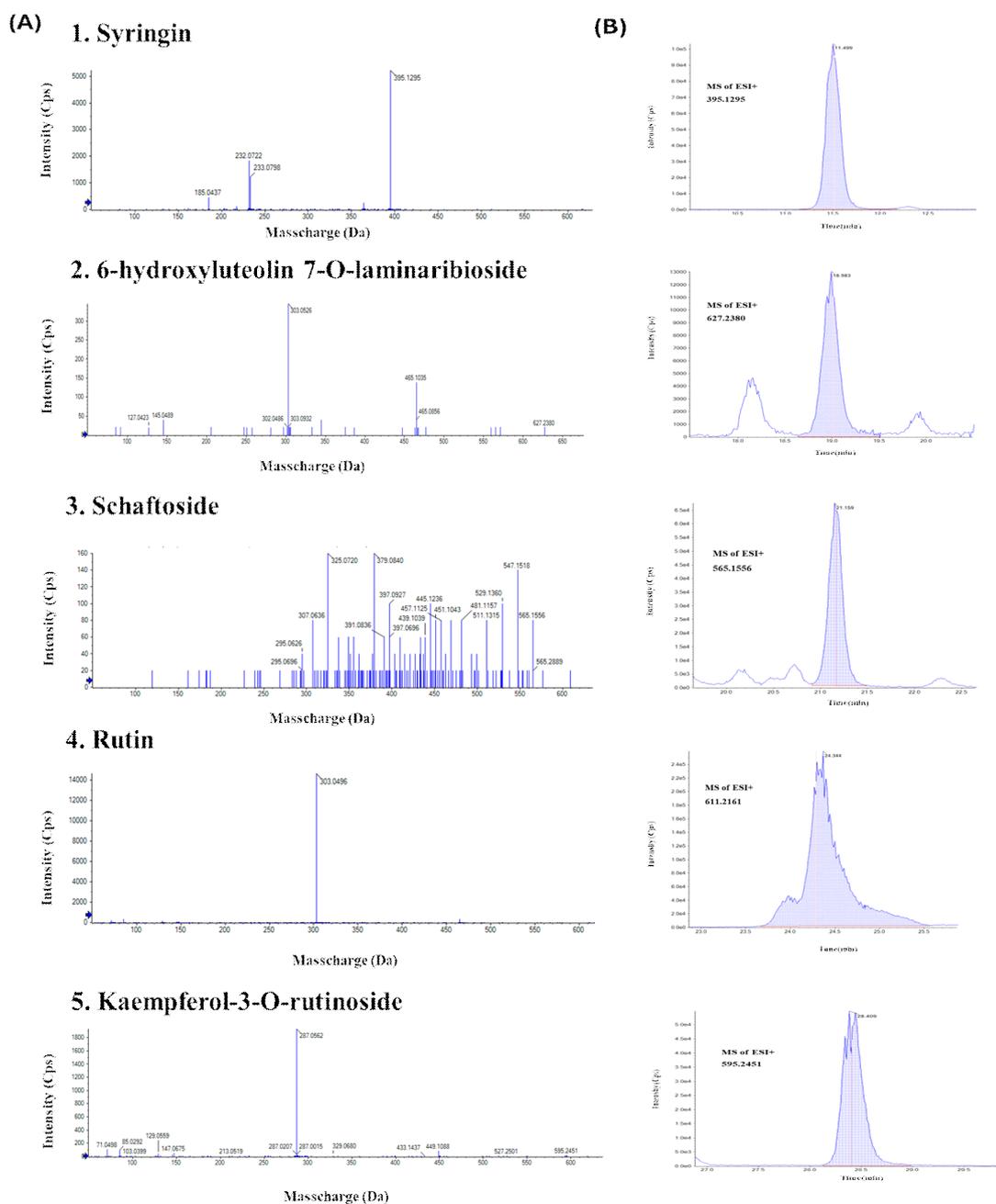


Fig. 2. LC/ESI+MS/MS with its chemical structure of the DME in (A) MS spectrum and (B) MS chromatogram.

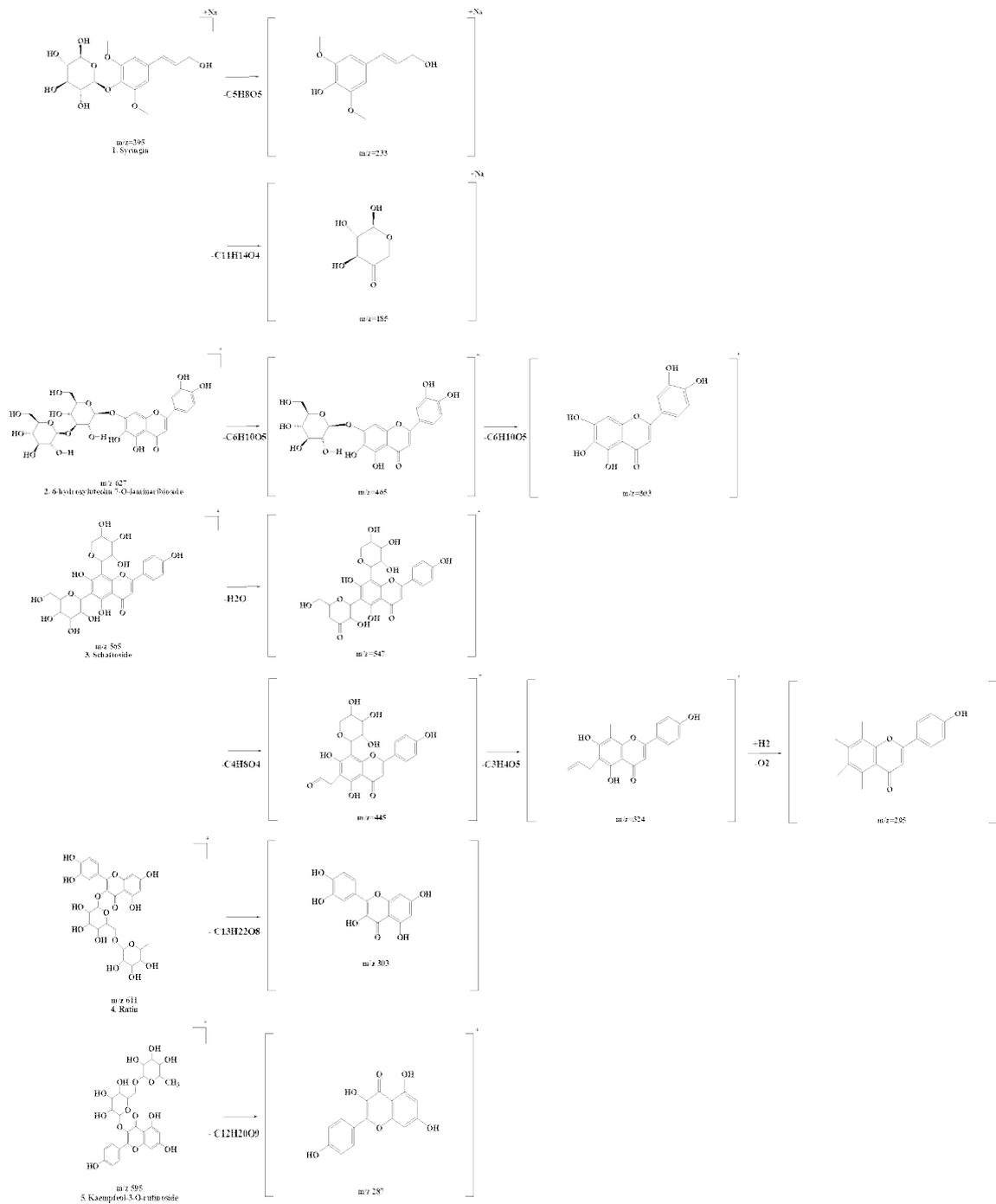


Fig. 3. Fragmentation scheme of compounds contained in DME.

3. DME의 총 페놀화합물 및 플라보노이드 함량 평가

페놀화합물은 다양한 구조와 분자량을 갖고 있으며, 여러 식물에 포함하고 있다. phenolic hydroxyl기가 단백질 등의 분자와 결합함으로써 항염증 효과, 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성을 나타낸다³¹⁾. 폴리페놀의 항산화 효과는 강한 환원력 때문이며 ROS에 의한 세포 손상을 막아주고 박테리아의 성장을 억제하는 것

으로 알려져 있다^{32,33)}. Anthocyanidines, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등의 플라보노이드는 그 구조에 따라 항산화 효과 및 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 본 연구 결과, DME의 열수 추출물의 총 페놀화합물 함량과 플라보노이드 함량은 각각 83.106 ± 0.21 mg GAE/g과 87.963 ± 1.014 mg QE/g (Table 3) 나타났다.

Table 3. Total phenolic and flavonoids contents of DME

DME	Concentration
Total polyphenol (GAE mg/g) ¹	83.106 ± 0.21
Total flavonoid (QE mg/g) ²	87.963 ± 1.014

¹ Total polyphenol content is expressed as gallic acid equivalents (GAE).

² Total flavonoid content is expressed as quercetin equivalent (QE).

4. DME의 항산화 효과 평가

한약제제 및 식품의 항산화 효과를 측정하는 방법은 여러 가지가 있으며 그 결과는 서로 약간의 차이가 있다. DPPH는 비교적 안정한 자유 라디칼로 분자로 구성 되어져 있으며, 소거 능력으로 항산화 활성을 측정하는

데 널리 사용됩니다. 이 방법은 친수성 및 친유성 물질 모두 측정 가능하며, DPPH는 음이온 라디칼을 생성한다²⁷⁾. 황칠 추출물은 $40 \mu\text{g/ml}$ 에서부터 농도 의존적으로 항산화 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

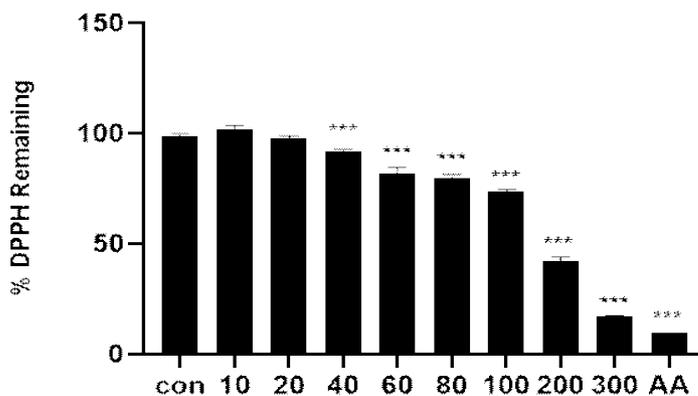


Fig. 4. The Effects of DME on DPPH Radical Remaining. Control: untreated group. Positive control: $100 \mu\text{g/ml}$ ascorbic acid (AA). 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300: treated with various concentrations of DME ($\mu\text{g/ml}$). Means with the same letter within a column are not significantly different at each treated concentration at $***P < 0.01$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.



III. 결론

본 연구에서는 DME를 LC-MS/MS를 이용하여 활성 성분을 확인하고 항산화 효과를 평가하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었습니다.

1. DME는 페놀화합물 성분 중 syringin, 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside, schaftoside, eriodictyol 및 kaempferol-3-O-rutinoside을 가진다.
2. DME는 총 페놀 함량은 83.106 ± 0.21 mg GAE/g로 측정되었으며, 총 플라보노이드 함량은 87.963 ± 1.014 mg QE/g로 나타났다.
3. DME를 처리하였을 때 농도에 따른 라디칼 잔여량을 확인한 결과, DPPH $40 \mu\text{g/ml}$ 부터 유의미하게 남아있는 라디칼 양이 감소하여 항산화 효과를 가진다.

이러한 분석 결과는 향후 DME의 품질관리와 새로운 생리활성 연구를 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되며, DME의 항산화 효능을 통해 산화적 스트레스에 의한 다양한 질환의 초기 단계를 예방하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This research was funded by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) and supported by the Ministry of Education (NRF-2022R1I1A3053818), Republic of Korea.

References

1. Dong H, Ying W, Zhu S. Scutellarein ameliorates inflammation and oxidative stress in L-arginine induced acute pancreatitis in mice through regulating the expression of VEGF. *Molecular & Cellular Toxicology* 2023;1-9.
2. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *BioMed research international*. 2012;2012(1):936486.

3. Atreya R, Neurath, MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2005;28:187-195.
4. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. *Advances in medicine*. 2016;1:9152732.
5. Lee HI, Kim EH, Lee S, Chung MJ. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of isoquercitrin isolated from aster scaber. 2019:1205-1213.
6. Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Juan CA, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Antioxidant Metabolism Pathways in Vitamins, Polyphenols, and Selenium: Parallels and Divergences. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(5):2600.
7. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;(1):9829176.
8. Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y. Based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical Sciences*. 2018;34(7):795-800.
9. Ham SS, Oh DH, Hong JK, Lee JH. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J Food Sci. Nutr*. 1997;2(2):155-161.
10. Sato J, Goto K, Nanjo F, Kawai S, Murata K. Antifungal activity of plant extract against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *Journal Biosci Bioeng*. 2000;90(4):442-446.
11. Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2011;10(4):221-247.
12. Kim K, Yoo HJ, Jung J-H, Lee R, Hyun J-K, Park J-H, Na D, Yeon JH. Cytotoxic Effects of Plant Sap-Derived Extracellular Vesicles on Various Tumor Cell Types. *Journal of Functional Biomaterials*. 2020;11(2):22.
13. Yang YJ, Song, JH, Yang JH, Kim MJ, Kim KY, Kim J K, et al. Anti-Periodontitis Effects of *Dendropanax moribiferus* H.Lév Leaf Extract on Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Molecules*.

- 2023;28(2):849.
14. Heo MG, Byun JH, Kim J, Choung SY. Treatment of *Dendropanax morbifera* leaves extract improves diabetic phenotype and inhibits diabetes induced retinal degeneration in db/db mice. *Journal of functional foods*. 2018;46:136-146.
 15. Makarova K, Sajkowska-Kozielewicz JJ, Zawada K, Olchowik-Grabarek E, Ciach MA, Gogolewski K, Gambin A. Harvest time affects antioxidant capacity, total polyphenol and flavonoid content of Polish St John's wort's (*Hypericum perforatum* L.) flowers. *Scientific reports*. 2021;11(1):3989.
 16. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol*. 1999;299:152-178.
 17. Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2002;6(1):11-1.
 18. Christ B, Müller K. Zur serienmäßigen bestimmung des gehaltes an flavonol-derivaten in drogen. *Archiv der Pharmazie*. 1960;293(12):1033-1042.
 19. Aiyegoro OA, Anthony IO. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(11):4990-5001.
 20. Yang YJ, Kim MJ, Lee HJ, Lee WY, Yang JH, Kim HH, Park KI. *Ziziphus jujuba* Miller Ethanol Extract Restores Disrupted Intestinal Barrier Function via Tight Junction Recovery and Reduces Inflammation. *Antioxidants*. 2024;13(5):575.
 21. Yu H, Fu J, Guo HH, Pan L B, Xu, H, Zhang ZW, Wang Y. Metabolites Analysis of Anti-Myocardial Ischemia Active Components of *Saussurea involucrata* Based on Gut Microbiota-Drug Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(13):7457.
 22. Es-Safi NE, Essassi EM, Massoui M, Banoub J. Mass spectrometry as a powerful analytical technique for the structural characterization of synthesized and natural products. *Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism*. 2011:319-360.
 23. Liu R, Meng C, Zhang Z, Ma H, Lv T, Xie S, Wang C. Comparative metabolism of schaftoside in healthy and calcium oxalate kidney stone rats by UHPLC-Q-TOF-MS/MS method. *Analytical biochemistry*. 2020;597:113673.
 24. Kumar S, Singh A, Kumar B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2017;7(4):214-222.
 25. Seol MK, Bae EY, Cho YJ, Park SK, Kim BO. The anti-oxidant and anti-microbial activities of purified syringin from *Cortex Fraxini*. *Journal of Life Science*. 2020;30(8):695-700.
 26. Es-Safi NE, Khelifi S, Kerhoas L, Kollmann A, El Abbouyi A, Ducrot PH. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. *Journal of natural products*. 2005;68(8):1293-1296.
 27. Woo EH, Woo WS. Flavonoid glycosides from *Melandrium firmum*. *Archives of Pharmacal Research*. 1989;12:223-225.
 28. Kim GW, Choi YH, Kim BL, Kim Y, Seong RS, Han MH, Jeon YG. Determination of Anti-oxidative and Whitening Effects of Complex Extracts Obtained from Sprout *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Cassia nomame* (Sieb.) Honda on Skin. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 2018;16(3):309-320.
 29. Zieliński H, Wiczkowski W, Honke J, Piskuła MK. In vitro expanded bioaccessibility of quercetin-3-rutinoside and quercetin aglycone from buckwheat biscuits formulated from flours fermented by lactic acid bacteria. *Antioxidants*. 2021;10(4):571.



30. Zhou P, Ma YY, Peng JZ, Hu F. Kaempferol-3-O-Rutinoside: A Natural Flavonoid Glycosides with Multifaceted Therapeutic Potential. *Neurochemical Journal*. 2023;17(2):247-252.
31. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 2006;99(1): 191-203.
32. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakisi S. The protective role of polyphenols cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res*. 1992;281(2): 77-80.
33. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol*. 1989;8(4):123-125.