pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 5, pp. 431~437 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.5.431

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

건강기능식품 프랑스해안송껍질추출물 중 UPLC-MS/MS를 이용한 Ferulic acid, Caffeic acid, Catechin, Taxifolin 동시분석법 개발 연구

오재명[1] · 김지안[1] · 허수정[1] · 최윤희[1] · 오금순[2]*
[1]식품의약품안전처 영양기능연구팀, [2]식품의약품안전처 첨가물기준과

Development of Simultaneous Analysis of Ferulic Acid, Caffeic Acid, Catechin and Taxifolin from Health Functional Food *Pinus Pinaster* Bark Extract by UPLC-MS/MS

Jae-Myoung Oh[1], Ji An Kim[1], Soo Jung Hu[1], Yoon Hee Choi[1], Keum Soon Oh[2]*
[1]*Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation*
[2]*Food Additives Standard division, Ministry of Food and Drug Safety, Cheong-ju, Korea*

(Received August 27, 2019/Revised September 16, 2019/Accepted September 17, 2019)

ABSTRACT - This study was conducted to develop a simultaneous analysis method for ferulic acid, caffeic acid, catechin and taxifolin from Health Functional Food (HFF) *Pinus Pinaster* bark extract. The simultaneous analytical method for ferulic acid, caffeic acid, catechin and taxifolin is carried out using UPLC-MS/MS. The method validation was performed to determine selectivity, linearity, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and precision for ferulic acid, caffeic acid, catechin and taxifolin. LC-MS/MS method was established using an Acquity UPLC BEH C_{18} Column and was applied for these 4 compounds. Product-ion traces, at m/z 194.2 → 133, 180.2 → 135, 290.3 → 245, 304.3 → 248, were used for quantitative analysis of ferulic acid, caffeic acid, catechin and taxifolin, respectively. Excellent linearity (r^2=0.999) was observed for ferulic acid, caffeic acid, catechin and taxifolin in the concentration range (50-2500 mg/L). The observed recoveries of these 4 compounds were found to be between 84.9 and 104.9%, while precision was between 1.20 and 4.43% relative standard deviation (% RSD).

Key words : Health functional food, *Pinus pinaster* Bark, Ferulic acid, Caffeic acid, Catechin, Taxifolin

프랑스해안송은 소나무과로 지중해 연안에서 손상되지 않은 자연환경 아래 농약 및 비료를 사용하지 않고 자라는 나무로 알려져 있다. 또한, 소나무 껍질은 다른 식물과 달리 계절의 변화에 영향을 그다지 받지 않는 이상적인 식물자원으로 사용되고 있으며, 프랑스해안송껍질은 이미 전 세계적으로 여러 만성과 변성질환을 위한 한방치료 또는 영양보충제로 사용되고 있다.

이러한 프랑스해안송껍질추출물은 수많은 페놀 성분을 함유하고 있어 자연 항산화제로 알려져 있다[1-4]. 프랑스해안송껍질추출물은 65-75%의 procyanidins와 25-35%의 ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin 등의 페놀성분으로 이루어져 있다.

특히, ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin과 같은 페놀 성분들은 항염증[3-5], 항암[2], 항박테리아[6], 알러지[7]에 효과가 있다고 보고되고 있으며, 강한 항산화활성을 나타낸다고 한다. 추출물 중 8-10%를 차지하는 catechin은 플라보노이드계 중 플라반-3-올에 속하며 식물 2차 대사체로 항산화 활성을 가지고 있다[8]. 추출물의 약 1% 포함되어 있는 taxifolin은 플라보노이드계 중 플라보놀에 속하고 중국 나무, 시베리아 낙엽송, 밀크씨슬 추출물인 실리마린에 함유되어 있으며 쿼세틴과 비슷한 구조를 가지고 있으나 독성이 적고 변이가 적다는 특징이 있어 항암효과, 콜라겐의 피부섬유 생성, 멜라닌 생성을 억제하여 미백효과가 있다는 연구결과가 발표되고 있다[9,10]. Caffeic acid는 페놀산 중 계피산의 일종으로 커피, 허브, 와인 등에 포함되어 있으며 항염증, 항산화, 항암작용을 한다는 연구결과

*Correspondence to: Keum Soon Oh, Osong Health Technology Administration complex, 187, Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 28159, Korea
Tel: 82-43-719-2501, Fax: 82-43-719-2500
E-mail: gs9705@korea.kr

가 발표되고 있다[11,12]. Ferulic acid도 페놀산 중 계피산의 일종으로 식물 세포벽에 발견되는 페놀성 파이토케미칼에 속한다. 밀, 보리에서 발견되어 진균성 질병을 억제하는 효과가 있다고 한다[13,14].

프랑스해안송껍질추출물은 '인체에 유해한 활성산소를 제거하는데 도움을 줄 수 있음', '혈액의 흐름을 방해할 수 있는 혈소판응집을 억제하는데 도움을 줄 수 있음', 그리고 '갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음'의 기능성을 인정받았으며, 안전성과 기능성을 확보할 수 있는 하루 섭취량은 프랑스해안송껍질추출물로서 50-300 mg이다[15].

미국약전 시험법, Yesil-Celidtas 등의 연구 모두 프랑스해안송껍질추출물 중 ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin에 대한 동시분석법으로 메탄올로 용해하여 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 정성분석하는 방법이다[1,16,17]. 그러나 다른 건강기능식품 기능성 원료 혹은 부원료가 복합되어 제조된 경우 원료의 지표성분이 다른 성분들의 영향을 받아 스펙트럼 확인에 의한 정성분석이 어려울 수 있다. 또한 분석 시 시료량, 전처리 용매 농도가 다양하여 최적의 분석 조건을 확립할 필요가 있다.

Materials and Methods

시약 및 재료

Catechin과 caffeic acid 표준품은 Sigma사(St.Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 ferulic acid과 taxifolin 표준품은 AK scientific (Union City, CA, USA)로부터 구입하였다. 또한, 개미산은 Sigma사 (St.Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 메탄올과 아세토니트릴은 Merck사(Whitehous station, NJ, USA)로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였으며, 시료 전처리와 이동상에 사용되는 물은 증류수(distilled water)를 사용하였다. 시료는 프랑스해안송껍질추출물을 기능성 원료로 사용한 건강기능식품 3건을 인터넷을 통해 구입하였다.

표준용액 조제

Ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin을 각각 적절히 취하여 50% 메탄올에 녹여 1,000 mg/L의 농도가 되도록 한 액을 표준원액으로 하고 50% 메탄올로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L의 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 하였다.

최적분석조건 확립

개별인정형으로 인정받은 프랑스해안송껍질추출물 중 ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin 시험법은 시료를 100% 메탄올에 용해하여 액체크로마토그래피/자외부흡광도를 이용하여 분석하는 방법으로 전처리 조건을 변화시켜 최적의 표준화된 전처리 방법을 확립하고자 하였다. 우선 시료량 비교를 위해 시료 채취량을 2.5, 5, 10, 20, 40 mg 으로 하여 비교 실험하였으며, 용매로 사용되는 메탄올의 농도를 50%, 80%, 100%로 달리하여 비교 실험하였다.

밸리데이션 방법

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 머무름 시간 및 product ion을 확인하였다. 직선성은 시료에서 각 4가지 성분이 검출되는 농도범위를 중간값으로 설정하여 총 6개의 농도 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L로, 표준용액만을 이용하여 산출하였고, 실험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3반복 실험을 수행하였다. 정확도는 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 확인하였고, 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 0.5배와 2배를 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 검출한계와 정량한계의 경우 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y절편 값을 이용하여, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 정밀도는 시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, Repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본시료를 선정하였으며, 시료 5 mg, 10 mg, 20 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 마지막으로 실험실간 정밀도(Reproducibility)를 확인하기 위하여 2개 실험실에서 표본시료를 5회 반복 측정하였다.

기기조건

Ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin 분석을 위해 Xevo TQ-S MS/MS(Waters, Milford, MA, USA)가 장착된 Acquity H-class UPLC(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Acquity UPLC® BEH C_{18}(Waters, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm)이었으며, 이동상으로는 Table 1과 Table 2와 같이 0.1% 개미산이 포함된 증류수와 아세토니트릴을 사용하여 0.5 mL/min 유속으로 하였으며(Table 1), 모니터 이온은 Table 2와 같다.

Results and Discussion

최적분석조건 확립

개별인정형 기능성 원료 시험법과 USP 시험법[18]에서 시료량은 각 2 mg, 20 mg이었다. 이에 시료량을 2.5, 5, 10, 20, 40 mg로 하여 시료량 설정을 검토하였다. Catechin과 ferulic acid은 시료량 10 mg에서 각각의 함량 분석 값의 RSD(%)가 가장 낮았고 caffeic acid과 taxifolin은 시료량 5 mg에서 각각의 함량 분석 값의 RSD(%)가 가장 낮았다. 이에 5-10 mg 사이의 시료량 설정이 적합한 것으로 판단되었다. 단, 건강기능식품의 경우 기능성 원료뿐만 아니라

Table 1. Analytical parameters of LC-MS/MS for catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in sample

Parameters	Conditions		
Instrument	LC Acquity HPLC(Waters, Milford, MA, USA), MS/MS: Xevo TQ-S(Waters, Milford, MA, USA)		
Column	Acquity UPLC® BEH C_{18} (2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.7 μm)		
Column temp.	40°C		
Flow rate	0.5 mL/min		
Injection volume	1 μL		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water, B: 100% acetonitrile		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	92	8
	1.8	88	12
	4.1	76	24
	6.8	70	30
	7.1	92	8
	8	92	8
Ion mode	ESI, Negative		
Analysis mode	MRM		
Capillary voltage	2.0 kV		
Desolvation temperature	400°C		

Table 2. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in ESI negative

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
Catechin	290	245, 203	20	14, 20
Caffeic acid	180	135, 90	20	14, 18
Ferulic acid	194	133, 178	30	28, 30
Taxifolin	304	284, 125	30	10, 24

Table 3. Comparison of analysis results by sample amount (Based on total procyanidin content)

Compound	Sample amount (mg)				
	2.5	5	10	20	40
Catechin	26.1±3.3	23.6±3.1	22.2±0.5	21.7±3.3	21.7±1.2
Caffeic acid	3.2±4.8	2.7±2.2	2.5±2.8	2.7±4.3	2.8±4.5
Ferulic acid	3.1±3.2	3.0±2.9	2.7±1.9	2.6±3.4	2.9±3.1
Taxifolin	24.0±2.1	220±1.9	19.9±2.2	19.8±1.9	201±2.7

다양한 원료가 복합된 제품으로도 제조되기 때문에 시료량의 설정 시 지표성분을 기준으로 설정하는 것이 적절하다. 프랑스해안송껍질추출물의 지표성분은 ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin 및 총 procyanidin이 있으나 ferulic acid, caffeic acid, catechin, taxifolin은 확인시험인 관계로 총 procyanidin을 기준으로 설정하였다. 총 procyanidin은 프랑스해안송껍질추출물에 약 700 mg/g 존재하기 때문에 총 procyanidin으로 3.5-7.0 mg을 취하는 것을 선택하였다(Table 3).

개별인정형 기능성 원료 시험법과 USP 시험법에서 전처리 용매로 100% 메탄올을 사용하였으나 참고문헌에서는 50% 메탄올을 사용하여 시료를 용해하였다. 이에 메탄올의 비율을 50%, 80%, 100%로 달리하여 원료에 들어

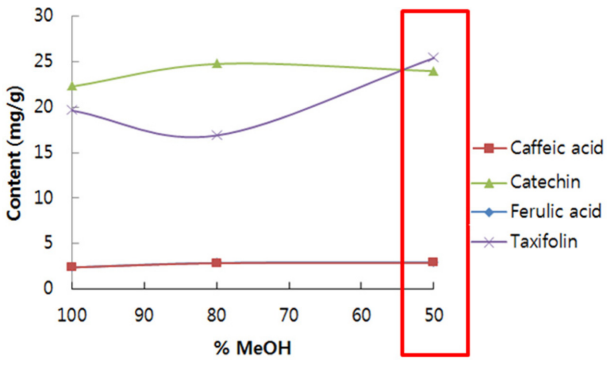

Fig. 1. Chromatogram of catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in standard.

있는 각 4가지 성분들의 함량을 비교하였다. 그 결과 50% 메탄올에서 상대적으로 가장 높은 함량을 나타내어 전처리 용매로 50% 메탄올을 선택하였다(Fig. 1).

밸리데이션 및 적용성

특이성

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 머무름

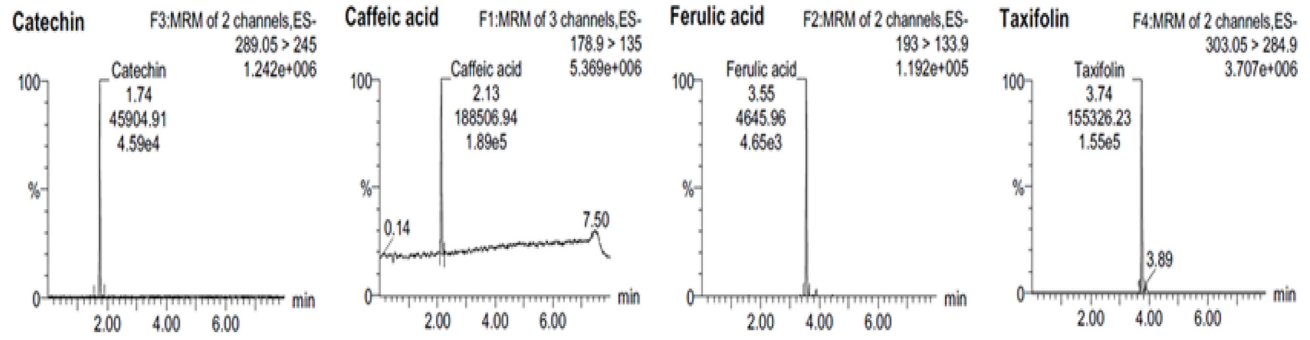

Fig. 2. Chromatogram of catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in standard.

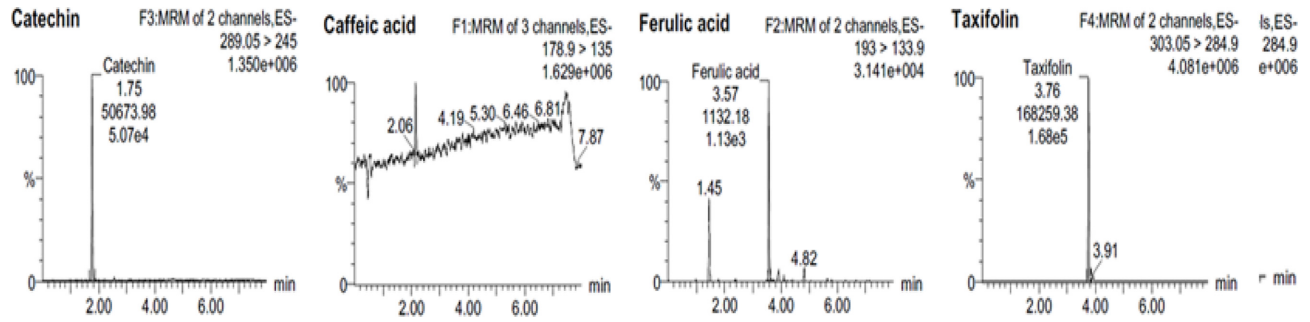

Fig. 3. Chromatogram of catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in sample.

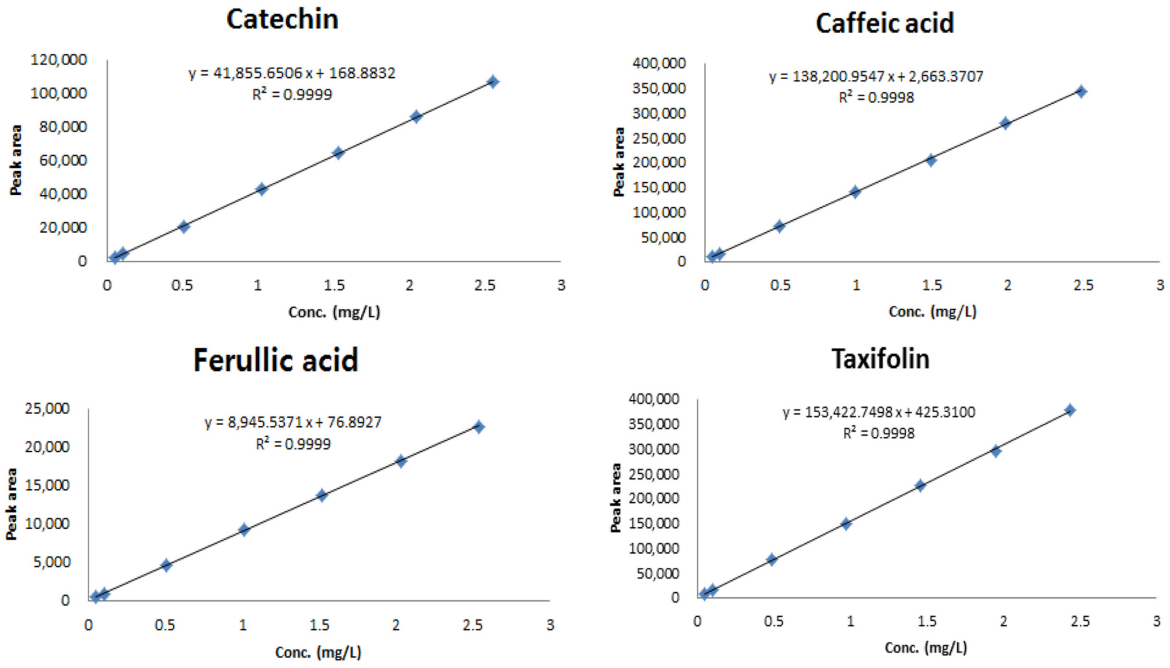

Fig. 4. Calibration curves of catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin.

시간 및 product ion을 확인하였다. Fig. 2와 Fig. 3은 표준용액과 시험용액을 분석한 크로마토그램이며 동일한 위치에서 단일 피크가 형성되는지 확인하였다. 그 결과 표준용액과 시료에서 지표성분인 catechin 1.74분, caffeic acid 2.13분, ferulic acid 3.55분, taxifolin 3.74분에서 일치함을 확인할 수 있었다.

직선성

시료에서 각 4가지 성분이 검출되는 농도범위를 중간값으로 설정하여 총 6개의 농도 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L 대한 직선성을 검토하였다. 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3반복 실험을 수행하였다. 실험결과 검량선의 상관계수(R^2)는 0.999이상의 높은 유의수준을 보였다(Fig. 4).

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y절편 값을 이용하여, 검량선 y절편 값의 표준편차에 3배를 곱한 값을 기울기 평균값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 평균값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. Catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin의 검출한계는 각각 0.07 mg/L, 0.1 mg/L, 0.06 mg/L, 0.05 mg/L이었으며, 정량한계는 각각 0.2 mg/L, 0.3 mg/L, 0.2 mg/L, 0.2 mg/L으로 나타났다.

정확도

표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 확인하였고, 검출되는 농도 범위를 중간값으로 설정하여 0.5배와 2배를 설정하여 진행하였다. 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였고, catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin에 대한 회수율은 각각 97.2-103.0%, 94.1-101.4%, 91.4-98.5%, 95.3-96.5%로 나타났다(Table 4).

정밀도

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도(반복성, Repeatability)를 확인하기 위하여 1개의 표본시료를 선정하였으며, 시료 5 mg, 10 mg, 20 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. Catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin에 대한 상대표준편차(%RSD)는 각각 2.32-3.54%, 0.47-1.05%, 1.52-3.25%, 1.31-3.07%,로 나타났다(Table 5).

실험실간 정밀도(Reproducibility)를 확인하기 위하여 표본시료로 5회 반복 측정했다. Catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin에 대한 재현성의 상대표준편차를 확인한 결과 각각 14.61%, 2.62%, 5.02%, 7.98%로 나타났다(Table 6).

Table 4. Accuracy of analytical method for catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in sample

	Treatment	Spiked concentration (mg/L)		
		5.00	10.00	15.00
Catechin	1	4.85	10.07	14.12
	2	5.05	9.91	15.01
	3	5.33	10.44	14.83
	4	5.27	10.48	14.58
	5	5.24	10.53	14.38
	Measured mean(mg/L)	5.15	10.29	14.58
	RSD(%)	3.79	2.70	2.39
	Recovery mean(%)	103.0	102.9	97.2

	Treatment	Spiked concentration (mg/L)		
		0.50	1.00	1.50
Caffeic acid	1	0.49	0.95	1.48
	2	0.52	0.93	1.45
	3	0.50	0.94	1.38
	4	0.52	0.97	1.43
	5	0.50	0.92	1.38
	Measured mean(mg/L)	0.51	0.94	1.42
	RSD(%)	3.01	2.01	3.16
	Recovery mean(%)	101.4	94.1	95.0

	Treatment	Spiked concentration (mg/L)		
		1.00	2.00	3.00
Ferulic acid	1	0.90	1.81	3.04
	2	0.88	1.88	2.82
	3	0.96	1.86	2.96
	4	0.94	1.91	3.11
	5	0.93	1.69	2.86
	Measured mean(mg/L)	0.92	1.83	2.96
	RSD(%)	3.67	4.61	4.09
	Recovery mean(%)	92.1	91.4	98.5

	Treatment	Spiked concentration (mg/L)		
		5.00	10.00	15.00
Taxifolin	1	4.73	9.56	14.11
	2	4.70	9.45	14.43
	3	4.89	9.44	14.41
	4	4.91	9.70	14.60
	5	4.88	9.53	14.37
	Measured mean(mg/L)	4.82	9.53	14.38
	RSD(%)	2.07	1.09	1.24
	Recovery mean(%)	96.5	95.3	95.9

Table 5. Repeatability of analytical method for catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in sample

	Treatment	Sample contents (mg)		
		5	10	20
Catechin	1	20.20	21.83	19.70
	2	19.68	20.10	21.07
	3	20.96	20.19	20.07
	4	20.58	20.16	19.49
	5	20.35	20.54	20.15
	Analytes mean (mg/g)	20.35	20.56	20.09
	SD	0.47	0.73	0.61
	RSD(%)	2.32	3.54	3.03
Caffeic acid	1	2.69	2.73	2.73
	2	2.75	2.71	2.75
	3	2.71	2.73	2.70
	4	2.75	2.72	2.71
	5	2.70	2.75	2.75
	Analytes mean (mg/g)	2.72	2.73	2.73
	SD	0.03	0.01	0.02
	RSD(%)	1.05	0.47	0.79
Ferulic acid	1	2.17	1.89	1.84
	2	2.32	1.94	1.89
	3	2.21	1.87	1.86
	4	2.35	1.83	1.91
	5	2.27	1.89	1.90
	Analytes mean (mg/g)	2.26	1.88	1.88
	SD	0.07	0.04	0.03
	RSD(%)	3.25	2.00	1.52
Taxifolin	1	22.10	19.76	19.25
	2	21.17	19.18	19.37
	3	20.28	19.73	18.77
	4	21.03	19.81	18.88
	5	21.08	19.96	19.01
	Analytes mean (mg/g)	21.13	19.69	19.06
	SD	0.65	0.30	0.25
	RSD(%)	3.07	1.52	1.31

Table 6. Reproducibility of analytical method for catechin, caffeic acid, ferulic acid and taxifolin in sample

	Treatment	Sample contents (mg)	
		1	2
Catechin	1	22.26	28.93
	2	21.18	28.34
	3	21.87	28.77
	4	21.78	29.21
	5	22.01	28.77
	Analytes mean (mg/g)	25.31	
	SD	3.70	
	RSD(%)	14.61	
Caffeic acid	1	2.73	2.61
	2	2.71	2.56
	3	2.73	2.59
	4	2.72	2.62
	5	2.75	2.62
	Analytes mean (mg/g)	2.66	
	SD	0.07	
	RSD(%)	2.62	
Ferulic acid	1	1.89	1.98
	2	1.94	2.00
	3	1.87	2.12
	4	1.83	2.09
	5	1.89	2.06
	Analytes mean (mg/g)	1.97	
	SD	0.99	
	RSD(%)	5.02	
Taxifolin	1	19.76	22.97
	2	19.18	22.49
	3	19.73	22.87
	4	19.81	23.09
	5	19.96	22.95
	Analytes mean (mg/g)	21.28	
	SD	1.70	
	RSD(%)	7.98	

Table 7. Results of application of health functional foods in circulation about analytical method

Sample	Form	Compound	Standard	Result
1	Tablet	Catechin	Verification	Verification
		Caffeic acid	Verification	Verification
		Ferulic acid	Verification	Verification
		Taxifolin	Verification	Verification
2	Tablet	Catechin	Verification	Verification
		Caffeic acid	Verification	Verification
		Ferulic acid	Verification	Verification
		Taxifolin	Verification	Verification
3	Capsule	Catechin	Verification	Verification
		Caffeic acid	Verification	Verification
		Ferulic acid	Verification	Verification
		Taxifolin	Verification	Verification

적용성

수거한 건강기능식품에 대하여 확립된 catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin 동시시험법(안)을 이용하여 지표성분의 함유량에 대한 적용성 검토를 수행하였다. 그 결과 총 3건의 프랑스해안송껍질추출물 유통제품에서 catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin 모두 확인되었다. 이와 같이 확립된 시험법의 적합성 검토한 결과, 유통되고 있는 프랑스해안송껍질추출물 건강기능식품은 기준규격에 적합함을 확인하였다(Table 7).

Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(17161미래사058)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 건강기능식품 프랑스해안송껍질추출물 중 catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin에 대한 동시분석법을 개발하는 연구이다. 최적분석조건을 확립하기 위해 시료 채취량, 용매 조건을 비교 검토하였으며, UPLC-MS/MS를 이용하여 각 4개 성분에 대한 정확한 분석 및 분석시간의 효율성도 향상하였다. 분석 시 사용한 컬럼은 Acquity UPLC BEH C_{18}이며, 정량이온으로 catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin 각각 133, 135, 245 및 248을 선정하였다. 확립된 시험법에 대해 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성 등의 밸리데이션을 수행하였다. 4개 성분 모두 50-25000 mg/L 농도에서 결정계수(R2) 0.999이상으로 높은 직선성을 확인하였다. 또한 회수율은 84.9-104%이었고, 정밀성은 1.2-4.3%의 RSD를 확인하였다. 개발된 시험법은 프랑스해안송껍질추출물 중 catechin, caffeic acid, ferulic acid, taxifolin 분석을 위한 시험법으로 활용되기에 적합한 것으로 판단된다.

References

1. Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, I., Sevimli, C., Korkmaz, K. S., Bedir, E., Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus species*. *J. Sci. Food Agri.*, **89(8)**, 1339-1345 (2009).
2. Iravani, S., Zolfaghari, B., Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res. Pharm. Sci.*, **6(1)**, 1-11 (2011).
3. Tumen, I., Akkol, E.K., Tastan, H., Suntar, I, Kurtca, M., Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine(*Pinus pinaster* Ail). *J. Ethnopharmacol.*, **211**, 235-246 (2018).
4. Iravani, S., Zolfaghari, B., Phytochemical analysis of *Pinus eldarica* bark. *Res. Pharm. Sci.*, **9(4)** 243-350 (2014)
5. Basholli-Salihu, M., Schuster, R., Hajdari, A., Mulla, D., Viernstein, D., Mustafa, B., Mueller, M., Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus spp. Pharm. Biol.*, **55(1)**, 1553-1560 (2017).
6. Curkovic-Perica, M., Hrenovic, J., Kugler, N., Goic-Barisic, I., Tkalec, M., Antibacterial acivity of *Pinus pinaster* bark extract and its components against multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Croat. Chem. Acta*, **88**, 133-137 (2015)
7. Ross, S.M., Allergic Rhinitis: A proprietary extract of *Pinus pinaster* Aiton(Pycnogenol) is found to improve the symptoms associated with allergic rhinitis. *Holist. Nurs. Pract.*, **30(5)**, 301-304 (2016).
8. Koch, W., Kukula-Koch, W., Glowniak, K., Catechin composition and antioxidant activity of black teas in realtion to brewing time. *J. AOAC Int.*, **100(6)**, 1694-1699 (2017).
9. Zhou, W., Guo, Z., Taxofolin inhibits the scar cell carcinoma growth by inducing apoptosis, cell cycle arrest and suppression of PI3K/AKT/mTOR pathway. *J. Buon.*, **24(2)**, 853-858 (2019).
10. Diwaka, G., Rano, J., Scholten J.D., Inhibition of elanin production by a combination of Siberian larch and pomegranate fruit extracts. *Fitoterapia*., **83(6)**, 989-995 (2012)
11. Li, Y., Liu, L.H., Yu, X.Q., Zhang, Y.X., Yang, J.W., Hu, X.Q., Zhang, H.B., Transglyxosylation improved caffeic acid phenethyl ester anti-inflammatory activity and water solubility by *Leuconostoc mesenteoides* dextransucrase. *J. Agric. Food Chem.*, **67(16)**, 4505-4512 (2019)
12. Li, Y., Zhu, Y., Liang, R., Yang, C., Synthesis and antioxidant properties of caffeic acid corn bran arabinoxylan esters. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **39(4)**, 402-410 (2017)
13. Gelinas, P., Mckinnon, C.M., Effect of wheat variety, farming site, and bread-baking on total phenolics. *Int. J. food Sci. and Tech*, **41**, 329-332 (2006)
14. Quinde-Zxtell, Z., Baik, B.K., Phenolic compounds of barley grain and their implication in food product discoloration. *J. Agric. Food Chem.*, **54(26)**, 9978-9984 (2006)
15. Ministry of Food and Drug safety, Information of functional ingredients, Retrieved from https://www.foodsafetykrea.go.kr/potal/board/board.do?menu-grp=MENU-NEW01menu_no=2660
16. Iravani, S., Zolfaghari, B., Phytochemical analysis of Pinus eldarica bark. *Res. Pharm. Sci.*, **9(4)**, 243. (2014).
17. de Almeida, P. A. D., Bhering, C. A., Alves, M. C., de Oliveira, M. A., Raposo, N. R., Ferreira, A. O., Brandao, M. A., Development, optimization and validation of an HPLC-PDA method for quantification of taxifolin in the bark extract of Pinus pinaster. *J. Brazil. Chem. Soci.*, **27(9)**, 1648-1656 (2016).
18. The United States Pharmacopeia(USP): available at www.uspnf.com