pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 5, pp. 413~420 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.5.413

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

UHPLC-MS/MS를 이용한 과일류 중 클로로젠산 및 알부틴 동시분석법 개발

최영주* · 전종섭 · 김운호 · 정유정 · 류지은 · 최종철 · 채경석 · 이진희 · 도영숙 · 박용배 · 윤미혜
경기도보건환경연구원 안양농수산물검사소

Method Development for Determination of Chlorogenic Acid and Arbutin Contents in Fruits by UHPLC-MS/MS

Young-Ju Choi*, Jong-Sup Jeon, Woon-Ho Kim, You-Jung Jung, Ji-Eun Ryu, Jong-Chul Choi, Kyung-Suk Chae, Jin-Hee Lee, Young-Sook Do, Young-Bae Park, Mi-Hye Yoon
Anyang Agricultural and Fishery Products Inspection Center, Gyeonggi province Institute of Health and Environment, Anyang, Korea

(Received July 1, 2019/Revised August 16, 2019/Accepted August 29, 2019)

ABSTRACT - In this study, a sample preparation method and a simultaneous determination method by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for 9 isomers of chlorogenic acid and arbutin in fruits were developed. The samples were extracted using 90% methanol (pH 3.0), with the solutions being shaken and then sonicated for 10 min each. After centrifugation at 4,000 rpm for 10 min, the extraction was concentrated under a vacuum at 40°C using a vacuum evaporator. The residue was dissolved in 5 mL of 5% methanol and filtered through a 0.45 μm membrane before UHPLC-MS/MS analysis. The separations were performed on a C18 column with gradient elution of water (containing 0.1% formic acid) and methanol (containing 0.1% formic acid). The specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, and precision of the proposed methods were also evaluated.

Key words : Chlorogenic acid, Arbutin, Fruit, UHPLC-MS/MS

식생활에서 쉽게 접할 수 있는 기능성물질인 polyphenol은 노화 및 천식, 고혈압, 심혈관질환, 당뇨를 예방하고 항암 작용과 콜레스테롤을 낮추는 역할을 한다[1-10].

Polyphenol은 flavonoids와 non-flavonoids로 나눠지는데 non-flavonoids에 속하는 cinnamic acid와 chalcone에 각각 chlorogenic acid, arbutin이 속해져 있다[11]. Chlorogenic acid는 항암작용을 하고 LDL (Low density lipoprotein) 및 총콜레스테롤의 산화를 줄여 심혈관질환을 감소시키고, 최근에는 비만률을 감소시킨다는 연구보고가 있었다[12-14]. 그리고 chlorogenic acid는 주로 체리, 복숭아, 사과, 배, 고구마, 당근, 아로니아, 블루베리, 커피 등에 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[15-17].

Arbutin은 탁월한 미백작용으로 화장품의 원료로 사용되고, 비뇨기계 질병을 치료하는데 효과적이며, 배, 월귤나무, 블루베리 잎에 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[18-25].

*Correspondence to: Young-Ju Choi, Anyang Agricultural and Fishery Products Inspection Center, Gyeonggi province Institute of Health and Environment, Anyang 14104, Korea
Tel: 82-31-290-6644, Fax: 82-31-421-5452
E-mail: yjchoi131@gg.go.kr

국외에서는 chlorogenic acid와 arbutin에 대해서 채소류, 과일류, 차 등을 대상으로 광범위하게 연구[16,26]를 진행하고 있는 반면에, 국내에서는 배[27,28]와 커피[17]에 대해서만 연구되고 있다. 특히 배의 chlorogenic acid 함량연구의 경우 미성숙과의 함량, 배의 부위별 함량, 추출 조건에 따른 함량 변화 등이 연구되었으나, 이 외 다른 식품에 대해서 국내에서 진행된 연구가 많이 부족한 실정이다.

기존 연구[29,30]에서는 chlorogenic acid와 arbutin 분석 기기로 HPLC, LC-MS를 사용하면서 chlorogenic acid의 이성질체를 다양하게 분석하지 않았다면, 본 연구에서는 chlorogenic acid 9개의 이성질체와 arbutin을 ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)를 이용하여 동시분석법을 확립하고자 하였다.

Materials and Methods

재료

시료는 배, 아로니아, 사과, 블루베리를 선정하였고, 경

기도 지역 내 대형유통매장 및 농산물도매시장에서 구입하여 사용하였다. 구입한 시료는 분석전인 2018년도 까지 냉장 보관하였다.

시약 및 기기

Chlorogenic acid의 이성질체 중 식품과 관련된 9종[17]과 arbutin을 대상물질로 선정하여 분석하였다.

사용한 표준품으로 3-caffeoylquinic acid(이하 3-CQA, CAS Number: 906-33-2, Purity: ≥95%), arbutin(CAS Number: 497-76-7, Purity: ≥98%)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 5-caffeoylquinic acid(이하 5-CQA, CAS Number: 327-97-9, Purity: ≥97%)은 Carl Roth GmBH(Karlsruhe, Germany)에서 구입하였다. 3-Feruloylquinic acid(이하 3-FQA, CAS Number: 1899-29-2, Purity: ≥98%), 4-feruloylquinic acid(이하 4-FQA, CAS Number: 2613-86-7, Purity: ≥98%), 5-feruloylquinic acid(이하 5-FQA, CAS Number: 40242-06-6, Purity: ≥98%)는 Chem faces(Hubei, China)사의 시약을 사용하였고, 4-caffeoylquinic acid(이하 4-CQA, CAS Number: 905-99-7, Purity: 98%), 3,4-dicaffeoylquinic acid(이하 3,4-diCQA, CAS Number: 14534-61-3, Purity: 98%), 3,5-dicaffeoylquinic acid(이하 3,5-diCQA, CAS Number: 2450-53-5, Purity: 98%), 4,5-dicaffeoylquinic acid(이하 4,5-diCQA, CAS Number: 57378-72-0, Purity: 98%)는 Biopurify Phytochemicals(Sichuan, China)사의 시약을 사용하였다.

전처리 과정 및 UHPLC-MS/MS 분석에는 methanol (J.T Baker, Griesheim, Germany), formic acid (Wako, Osaka, Japan)를 사용하였고, 정제수는 초순수제조기 Nanopure Diamond UV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)의 비저항을 18.0 MΩ으로 정제하여 사용하였다. 진탕기는 MMV-1000W (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 초음파 추출기 B8510E-DTH (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Texas, USA)를 사용하였다. 고속원심분리기는 Combi-514R (Hanil Scientific Inc, Gimpo, Korea)를 사용하였고, syringe filter(Whatman, Maidstone, UK)는 PTFE (Polytetrafluoroethylene)재질의 13 mm, 0.45 μm규격을 사용하였다.

표준액 조제

표준품을 Methanol에 녹여 200-1000 μg/mL의 범위로 표준원액을 조제하였다. 혼합표준용액은 5% methanol로 희석하여 냉장 보관하였다.

시료 전처리 과정

과일의 갈변에 관련이 있는 polyphenol oxidase는 polyphenol 함량에 영향을 준다는 연구보고[31]가 있어, polyphenol oxidase의 영향을 감소시키기 위해 시료를 금속과 닿지 않도록 플라스틱 칼과 플라스틱 강판을 가지고 분쇄한 후 채취하였다. 시료량, 추출 용매 종류, 추출 용매의 pH, 진탕시간, 초음파 추출시간 등을 고려하여 시료 전처리법을 확립하였다. 시료 2 g을 채취하여 90% methanol (pH 3.0)을 넣어 50 mL로 정용하였다. 그 후 10분간 300 rpm으로 진탕하고, 초음파추출기에 얼음을 넣어 10°C 이하로 온도를 낮춘 상태에서 10분간 초음파 추출 하였다. 그리고 10분간 원심분리(4,000 rpm, 4°C) 후 상층액 5 mL을 취하여 40°C에서 농축하였다. 잔류물은 5 mL의 5% methanol로 재용해하여 syringe filter로 여과한 후 UHPLC-MS/MS로 분석하였다.

Table 1. UHPLC-MS/MS analysis conditions of arbutin and chlorogenic acids

Parameters	Conditions							
Column	Syncronis C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm particle size, Thermo Scientific)							
Mobile phase	A: water(in 0.1% formic acid) B: methanol(in 0.1% formic acid)							
Gradient	Time(min)	0	1	5.5	7	10	12	13	15
	A(%)	95	95	65	65	45	20	95	95
	B(%)	5	5	35	35	55	80	5	5
	Curve	0	6	6	10	6	6	6	6
Column flow rate	0.4 mL/min							
Injection volume	5 μL							
Column temp.	40°C							
Ionization mode	Negative ion electrospray							
Source temp.	120°C							
Desolvation temp.	350°C							
Collision gas flow(N_2)	0.15 mL/min							

Table 2. MS/MS parameters of arbutin and chlorogenic acids

Compounds	Cone voltage	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	
			Quantification (CE)	Confirmation (CE)
3-CQA	42	353.266	191.050(20)	179.030(20)
4-CQA	32	353.160	172.938(18)	178.915(16)
5-CQA	32	353.224	190.934(16)	84.858(44)
3-FQA	34	367.224	193.023(16)	133.966(34)
4-FQA	42	367.224	191.009(14)	172.947(20)
5-FQA	36	367.224	190.946(14)	192.915(26)
3,4-diCQA	56	515.287	173.002(30)	178.979(30)
3,5-diCQA	38	515.287	353.069(16)	190.998(30)
4,5-diCQA	50	515.287	353.071(18)	173.002(28)
Arbutin	38	271.224	107.988(20)	160.941(8)

기기분석 방법

Waters triple quadrupole universal detector (Waters, Milford, MA, USA)를 부착한 Waters acquity UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다. Column 등 분석조건은 Table 2와 같다. 용매조성은 선행연구[30]를 참고하여 Acquity UHPLC Columns Calculator (Waters, version 1.1.1) 프로그램을 사용하여 용매조성을 만들었다(Table 1).

MS/MS의 이온화방법은 ESI (Electrospray ionization)방식을 선택하였고, 10개 물질 모두 negative모드에서 이온화가 잘 되었다. Masslynx 4.1 software의 Intelli Start 프로그램을 사용하여 물질당 3-5개 정도의 이온 값을 찾고, 그 중 이온 세기가 큰 이온을 정량이온(quantification ion)으로 선택하고, 두 번째 크기가 큰 이온을 정성이온(confirmation ion)으로 선택하였다(Table 2).

유효성 확인

분석방법에 대한 유효성을 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계로 각각 확인하였다[32-34].

Results and Discussion

시료 전처리

Chlorogenic acids 중에서 대표 물질인 5-CQA와 arbutin을 기준으로 시료 전처리 추출효율을 확인하였다. 시료량을 1-4 g까지 1 g단위로 구분하여 비교 실험한 결과 2 g의 추출효율이 높았다. 선행연구[28,30]에서는 chlorogenic acid, arbutin을 추출하기 위해 사용한 methanol이나 ethanol을 용매로 비교한 결과 methanol의 추출효율이 높은 것으로 확인되어 methanol의 농도를 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%로 비율을 달리하여 비교한 결과, 90% methanol의 추출효율이 높은 것으로 나타났다. arbutin이 산성 상태에서

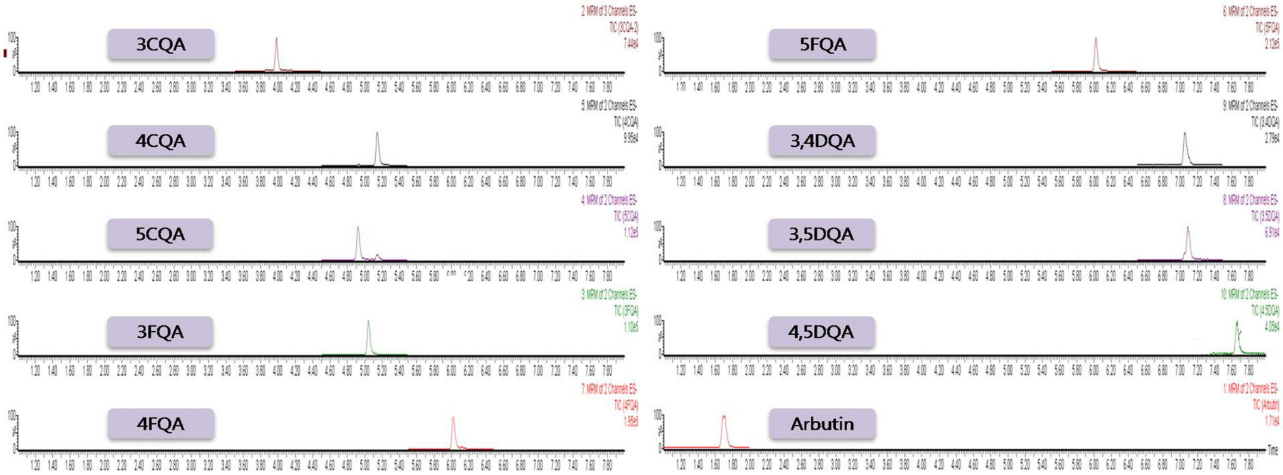

Fig. 1. UHPLC-MS/MS chromatograms of target compounds.

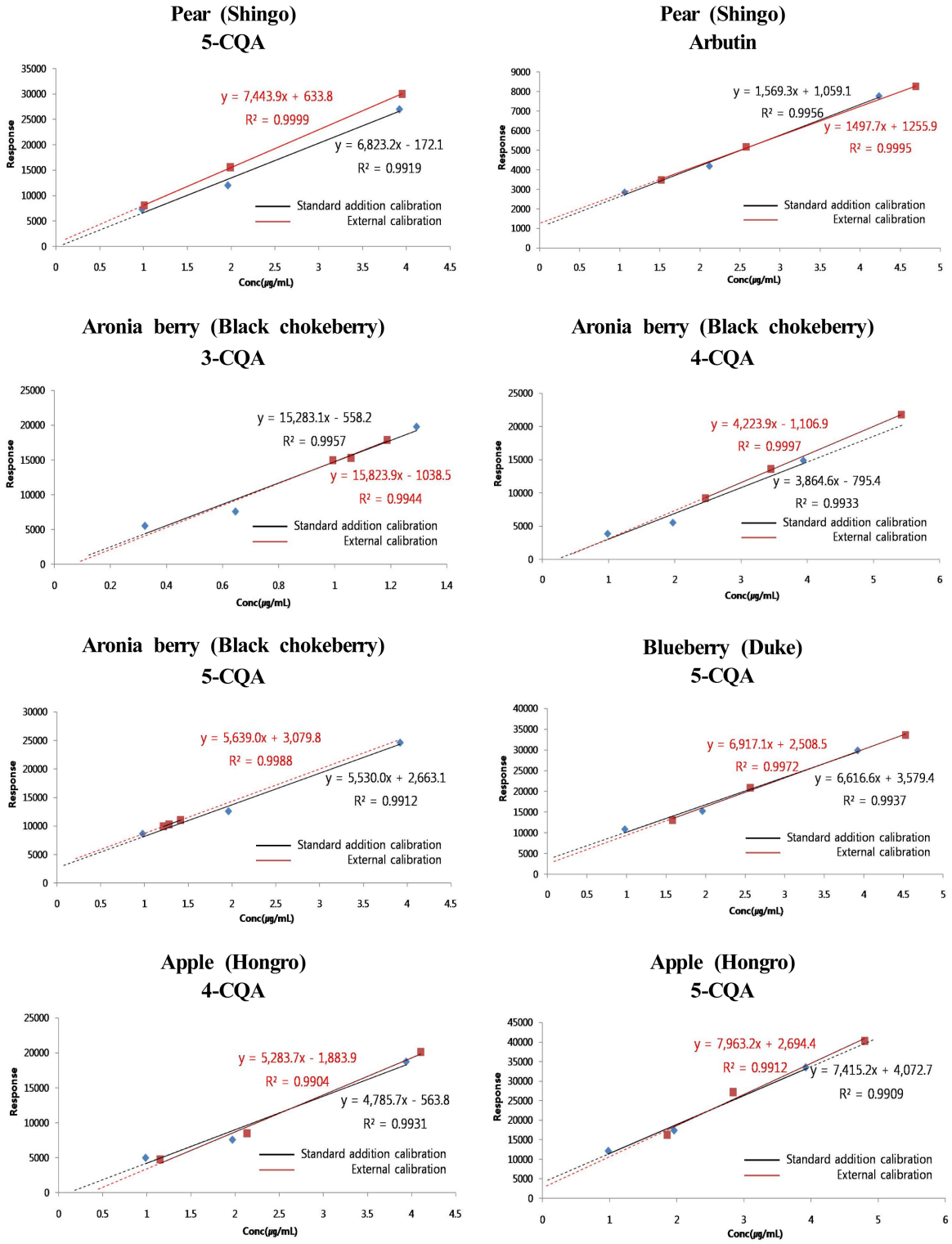

Fig. 2. Comparison of standard addition calibration and external calibration curves obtained for each compound during the matrix effect procedure.

안정하다는 연구[27] 결과가 있어 formic acid를 추출 용매에 첨가하여 pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0으로 수소이온농도를 변경하여 비교한 결과 pH 3.0에서 추출 효율이 높았다. 위의 연구결과를 통해 최종적으로 추출 용매는 pH 3.0으로 맞춘 90% methanol로 선정하였다. 진탕 시간은 5분, 10분, 30분으로 구분하여 비교한 결과 10분

Table 3. Results of the method validation study of the tested compounds

Compounds	Linear range (μg/mL)	Regression equation	R^2	Residual range (%)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
3-CQA	0.03 - 3.23	y = 3709.7X + 525.3	0.9869	5.0 - 19.6	0.08	0.23
4-CQA	0.05 - 3.94	y = 4367.2X + 323.5	0.9959	0.3 - 16.2	0.07	0.20
5-CQA	0.05 - 3.92	y = 10126.1X + 53.4	1.0000	0.3 - 4.9	0.04	0.12
3-FQA	0.05 - 4.90	y = 6024.1X + 810.8	0.9937	1.9 - 12.1	0.12	0.36
4-FQA	0.02 - 2.25	y = 8580.6X + 298.4	0.9981	0.0 - 7.0	0.05	0.14
5-FQA	0.03 - 3.43	y = 4510.9X + 44.6	1.0000	0.0 - 0.8	0.10	0.29
3,4-diCQA	0.05 - 3.92	y = 1400.0X + 74.9	0.9999	3.1 - 12.5	0.13	0.39
3,5-diCQA	1.01 - 4.06	y = 2356.1X + 835.6	0.9869	1.4 - 18.4	0.23	0.69
4,5-diCQA	0.05 - 3.96	y = 1883.6X + 79.4	0.9999	3.0 - 11.9	0.19	0.59
Arbutin	0.05 - 4.23	y = 1303.3X + 55.7	0.9998	1.2 - 4.9	0.14	0.44

Table 4. Recovery, intraday precision, and interday precision of the tested compounds

Compounds	Concentration(μg/mL)	Recovery (%)	Intraday precision	Interday precision
			RSD (%)	RSD (%)
3-CQA	0.3	112.8	2.7	3.4
	0.6	97.5	2.0	2.8
	1.3	116.9	1.0	3.3
4-CQA	1.0	109.6	1.1	3.1
	2.0	118.3	2.1	2.5
	4.0	120.3	0.8	0.8
5-CQA	1.0	115.3	1.9	2.0
	2.0	120.3	2.2	1.2
	4.0	119.1	1.4	2.7
3-FQA	0.5	108.2	0.8	1.9
	1.0	105.3	1.1	1.5
	2.0	104.4	1.4	2.3
4-FQA	0.2	101.4	1.8	2.4
	0.5	107.0	1.2	1.3
	1.0	104.6	0.4	1.5
5-FQA	0.3	105.6	1.9	0.7
	0.7	117.0	2.9	2.8
	1.4	107.0	2.5	1.5
3,4-diCQA	1.0	76.8	1.2	2.7
	2.0	109.8	3.2	5.4
	4.0	104.3	2.4	1.1
3,5-diCQA	1.0	63.0	4.0	2.3
	2.0	97.0	3.9	2.4
	4.0	98.3	3.0	1.3
4,5-diCQA	1.0	48.1	7.9	6.7
	2.0	69.2	3.2	7.2
	4.0	77.7	3.4	2.0
Arbutin	1.1	80.8	1.2	0.0
	2.1	79.3	2.4	1.3
	4.2	88.5	1.5	1.8

간 진탕한 경우 추출 효율이 높았다. 저온 상태에서 chlorogenic acid와 arbutin의 초음파 추출 시 온도별 비교 연구[30]에서 저온(10°C 이하)의 상태에서 초음파추출을 하는 것이 추출 효율이 높은 것으로 확인되어 저온(10°C 이하) 상태에서 초음파추출시간을 10분, 20분, 30분으로 구분하여 비교한 결과 10분에서 추출 효율이 높았다. syringe filter는 methanol과 formic acid에 모두 사용 가능한 PTFE 재질로 선택하여 전처리를 하였다.

유효성 확인

특이성(Specificity)

Standard와 blank 시료의 chromatogram을 확인한 결과 불순물 등의 방해되는 물질이 없는 것을 확인하였다(Fig. 1).

직선성(Linearity)

직선성의 지표로 R^2, residual range, 그리고 matrix effect를 확인하였다(Table 3, Fig. 2). Residual range는 SANTE[32]기준으로 모두 ± 20% 범위 내에서 확인이 되었다. Matrix effect[33]는 standard addition method를 사용하여 neat standard와 sample의 기울기 차가 ± 10% 이내인 것을 확인하였다.

검출한계 및 정량한계(LOD & LOQ)

10가지 물질을 3개의 농도별로 5회씩 주입하여 구한 표준편차(σ)와 선형검정곡선을 작성하여 구한 기울기(m)를 가지고 검출한계(limit of detection, LOD)를 3.3 σ/m으로 계산하여 0.04-0.23 μg/mL 값을 얻었다. 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 10 σ/m으로 계산하여 0.12-0.69 μg/mL 값을 얻었다(Table 3).

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)

정확성의 지표인 회수율은 48.1-120.3%로 시료의 함량 분석 결과에는 검출되지 않았던 3,5-diCQA, 4,5-diCQA를 제외하고 다른 물질들은 AOAC 기준인 75-120% (1 μg/mL)[34]범위 내에서 확인되었다(Table 4). 선행연구는 chlorogenic acid[16]와 arbutin[27]의 회수율이 70.0%, 60.0%로 나타난 반면, 본 연구에서 구한 회수율은 AOAC 기준 내에서 확인되었다.

정밀성을 intraday precision, interday precision로 나눠 실험한 결과 0.4-7.9% intraday precision, 0.0-7.2% interday precision로 AOAC기준인 8% (1 μg/mL)[34]범위 내에서 확인되었다.

본 연구를 통해 확립된 UHPLC-MS/MS를 이용한 chlorogenic acid와 arbutin 동시분석법은 기존에 제시되었던 각각의 분석법과 비교하였을 때, 높은 재현성을 보이며 정성, 정량분석에 대한 자료를 제공하였다. 본 연구 수행 결과를 활용하여 다양한 식품 안에 포함된 chlorogenic acid와 arbutin의 함량을 확인해 볼 수 있을 것으로 기대된다.

국문요약

본 연구에서는 chlorogenic acid 이성질체 9종과 arbutin을 분석하기 위하여, 전처리 과정과 UHPLC-MS/MS 동시분석 조건을 확립하였다.

UHPLC-MS/MS에서 C18 column을 사용하여 15분 동안 분석할 수 있는 용매 조성을 만들고, 10가지 물질에 대한 정량, 정성 이온을 선택하여 negative 모드에서 분석하는 동시분석법을 확립하였고 과일류를 대상으로 추출, 진탕추출, 초음파 추출, 원심분리, 농축 등의 과정을 거치는 전처리법을 개발하였다.

기기분석과 전처리법에 대한 유효성은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 그리고 검출한계 및 정량한계 등을 통하여 확인하였다. 회수율은 48.1-120.3%, intraday precision (RSD)는 0.4-7.9%, interday precision (RSD)는 0.0-7.2%로 확인되었다. 따라서, 본 연구에서 확립한 동시분석방법은 과일류 중 chlorogenic acid와 arbutin을 효과적으로 분석하는데 유용할 것으로 사료된다.

References

1. Nobile, V., Michelotti, A., Cestone, E., Caturla, N., Castillo, J., Benavente-García, O., Pérez-Sánchez, A. Micol V., Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (Citrus paradisi) Polyphenols. *Food. Nutr. Res*., **60(1)**, 31871 (2016).
2. Shaw, O.M., Hurst, R.D. and Harper, J.D., Boysenberry ingestion supports fibrolytic macrophages with the capacity to ameliorate chronic lung remodeling. *Am. J. Physiol. Lung cell Mol. Physiol*., **311(3)**, L628-L638 (2016).
3. Gamboa-Gómez, C.I., González-Laredo, R.F, Gallegos-Infante, J.A., Larrosa Pérez, M. del M., Moreno-Jiménez, M.R., Flores-Rueda, A.G. and Rocha-Guzmán, N.E., Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Eucalyptus camaldulensis and Litsea glaucescens infusions fermented with kombucha consortium. *Food. technol Biotechnol.*, **54(3)**, 367-374 (2016).
4. Reboredo-Rodríguez, P., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., Salvaor, M.D., Cancho-Grande, B. and Fregapane, G., State of the art on functional virgin olive oils enriched with bioactive compounds and their properties. *Int. J. Mol. Sci*., **18(3)**, 668 (2017).
5. Umeno, A., Horie, M., Murotomi, K., Nakajima, Y. and Yoshida, Y., Antioxidative and antidiabetic effects of natural Polyphenols and isoflavones. *Molecules*. **21(6)**, 708 (2016).
6. Omodanisi, E.I., Aboua, Y.G. and Oguntibeju, O.O., Assess-

ment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of Moringa oleifera in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. *Molecules*., **22(4)**, 439 (2017).

7. Nagulapalli Venkata, K.C., Swaroop, A., Bagchi, D. and Bishayee, A., A small plant with big benefits: Fenugree (Trigonella foenum-graecum Linn) for disease prevention and health promotion. *Mol. Nutr. Food Res*., **61(6)**, 1600950 (2017).
8. Odongo, G.A., Schlotz, N., Herz, C., Hanschen, F.S., Baldermann, S., Neugart, S., Trierweiler, B., Frommherz, L., Franz, C.M.A.P, Ngwene, B., Luvonga, A.W., Schreiner, M., Rohn, S. and Lamy, E., The role of plant processing for the cancer preventive potential of Ethiopian kale (Brassica carinata). *Food Nutr. Res*., **61(1)**, 1271527 (2017).
9. Luo, J., Wei, Z., Zhang, S., Peng, X., Huang, Y., Zhang, Y. and Lu, J., Phenolic Fractions from Muscadine Grape "Noble" Pomace can Inhibit Brast Cancer Cell MDA-MB-231 Better than those form European Grape "Cabernet Sauvignon" and S-PhaseArrest and Apoptosis. *J. food sci*., **82(5)**, 1254-1263 (2017).
10. Jia, M., Ren, D., Nie, Y. and Yang, X., Beneficial effects of apple peel Polyphenols on vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food funct.*, **8(3)**, 1282-1292 (2017).
11. De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E. and Gonzalez-Aguilar, G.A., Fruits and vegetables Phytochemicals*:* Chemistry, Nutritional Value and Stability. 1rd edition. Blackwell Publishing (2009).
12. Mori, H., Tanaka, T., Shima, H., Kuniyasu, T. and Takahashi, M., Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer letters*., **30(1)**, 49-54 (1986).
13. Hemmerle, H., Burger, H-J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P.W., Paulus, E. and Herling, A.W., Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Med. chem.,* **40(2)**, 137-145 (1997).
14. Hsu, C.L., Huang, S.L. and Yen, G.C., Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J. Agric. food chem.*, **54(12)**, 4191-4197 (2006).
15. Kim, D.O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S. and Lee, C.Y., Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells. *J. Agric. Food Chem.,* **53(26)**, 9921-99727 (2005).
16. Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K., Simultaneous determination of all Polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Food Sci. Agri. Chem.*, **51(3)**, 571-581 (2003).
17. Jeon, J.S., Kim, H.T, Jeong, I.H., Hong, S.R., Oh, M.S., Park, K.H., Shim, J.H. and Abd El-Aty, A.M., Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *J chromatogr.*, **1064**, 115-123 (2017).
18. Couteau, C. and L.J. Coiffard., Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Il Farmaco*., **55(5)**, 410-413 (2000).
19. Rychlinska, I. and S. Nowak., Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca*., **40(2)**, 109-113 (2012).
20. Carmen, P., L. Vlase, and M. Tamas., Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of Bergenia crassifolia (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.,* **37(1)**, 129-132 (2009).
21. Kwiecień, I., Szopa, A., Madej, K. and Ekiert, H., Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in in vitro cultures of Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott. *Acta. Biochim. Pol.*, **60(4)**, (2013).
22. Schindler, G., Patzak, U., Brinkhaus, B., Nieciecki, A.V., Witting, J., Krähmer, N., Glöckl, I. and Veit, M., Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of Arctostaphylos uvae ursi Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *J. Clinical Pharmacology*., **42(8)**, 920-927 (2002).
23. Sasaki, C., Ichitani, M., Kunimoto, K.K., Asada, C. and Nakamura, Y., Extraction of arbutin and its comparative content in branches, leaves, stems, and fruits of Japanese pear Pyrus pyrifolia cv. Kousui. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **78(5)**, 874-877 (2014).
24. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. and Codina, C., A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (Arctostaphylos uva-ursi) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis: An International J. Plant Chem. and Biochem. Tec.,* **12(5)**, 336-339 (2001).
25. Thongchai, W., Liawruangrath, B. and Liawruangrath, S., High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts. *J. cosmetic sci*., **58(1)**, 35-44 (2007).
26. Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C. and Shahidi, F., Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. food chem*., **49(3)**, 1410-1416 (2001).
27. Cho, J.Y., Park, K.Y., Lee, K.H., Lee, H.J., Lee, S.H., Cho, J.A., Kim, W.S., Shin, S.C., Park, K.H. and Moon, J.H., Recovery of arbutin in high purity from fruit peels of pear (Pyrus pyrifolia Nakai). *Food Science and Biotechnology.,* **20(3)**, 801-807 (2011).
28. Lee, S.W., Lee, Y.G., Cho, J.Y., Kim, Y.C., Lee, S.H., Kim, W.S. and Moon, J.H., Establishment of a simple method for purification of high purity chlorogenic acid from immature fruit of pear (Pyrus pyrifolia Nakai). *J. Korean Soc. Appl. Biol. chem*., **58(3)**, 335-341 (2015).
29. Luo, XL., Li, N., Xu, M., Zhu, HT., He, P., Ding, Y., Zhao, P., Zhang Y.J., HPLC Simultaneous determination of arbutin, chlorogenic acid and 6'-O-caffeoylarbutin in different parts

of Vaccuinium dunalianum Wight. *J. the Nat. Product res.*, **29(20)**, 1963-1965 (2015)
30. Cui, T., Nakamura, K., Ma, L., Li, J.Z. and Kayahara, H., Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear. *J. Agric. food chem.,* **53(10)**, 3882-3887 (2005).
31. Ranadive, A.S. and Haard, N.F., Changes in Polyphenolics on ripening of selected pear varieties. *J. Sci. food agric*., **22(2)**, 86-89 (1971).
32. SANTE/EU, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. 1-41 (2017).
33. AOAC, Guidelines for Single Laboratory Validation(SLV) of Chemical Methods for Metals in Food. 1-46.
34. AOAC, Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 1-32 (2013).