pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 2, pp. 39~45 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.2.39

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

오크라 분말의 Quercetin-3-o-Gentiobioside 및 Isoquercitrin의 분석법 개선 및 검증

한웅호[1] · 최선일[1] · 문효[1] · 이세정[1] · 진희구[2] · 오현지[2] · 조세행[3,4] · 이부용[2] · 이옥환[1]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2]차의과학대학교 식품생명공학과
[3]㈜씨스팡, [4]연세중앙내과의원

Improvement and Validation of an Analytical Method for Quercetin-3-o-gentiobioside and Isoquercitrin in *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Xionggao Han[1], Sun-Il Choi[1], Xiao Men[1], Se-jeong Lee[1], Heegu Jin[2], Hyun-Ji Oh[2], Sehaeng Cho[3,4], Boo-Yong Lee[2], Ok-Hwan Lee[1]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, CHA University, Seongnam, Korea*
[3]*Syspang Co. Ltd, Seoul, Korea*
[4]*Yonsei Medical Clinic, Seoul, Korea*

(Received February 25, 2022/Revised March 25, 2022/Accepted March 30, 2022)

ABSTRACT - This study aimed to investigate the validation and modify the analytical method to determine quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin in *Abelmoschus esculentus* L. Moench for the standardization of ingredients in development of functional health products. The analytical method was validated based on the ICH (International Conference for Harmonization) guidelines to verify the reliability and validity there of on the specificity, linearity, accuracy, precision, detection limit and quantification limit. For the HPLC analysis method, the peak retention time of the index component of the standard solution and the peak retention time of the index component of *A. esculentus* L. Moench powder sample were consistent with the spectra thereof, confirming the specificity. The calibration curves of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin showed a linearity with a near-one correlation coefficient (0.9999 and 0.9999), indicating the high suitability thereof for the analysis. *A. esculentus* L. Moench powder sample of a known concentration were prepared with low, medium, and high concentrations of standard substances and were calculated for the precision and accuracy. The precision of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin was confirmed for intra-day and daily. As a result, the intra-day precision was found to be 0.50-1.48% and 0.77-2.87%, and the daily precision to be 0.07-3.37% and 0.58-1.37%, implying an excellent precision at level below 5%. As a result of accuracy measurement, the intra-day accuracy of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin was found to be 104.87-109.64% and the daily accuracy thereof was found to be 106.85-109.06%, reflecting high level of accuracy. The detection limits of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin were 0.24 μg/mL and 0.16 μg/mL, respectively, whereas the quantitation limits were 0.71 μg/mL and 0.49 μg/mL, confirming that detection was valid at the low concentrations as well.

*Correspondence to: Dr. Ok-Hwan Lee, Professor
Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6456 Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

From the analysis, the established analytical method was proven to be excellent with high level of results from the verification on the specificity, linearity, precision, accuracy, detection limit and quantitation limit thereof. In addition, as a result of analyzing the content of *A. esculentus* L. Moench powder samples using a validated analytical method, quercetin-3-*o*-gentiobioside was analyzed to contain 1.49±0.01 mg/dry weight g, while isoquercitrin contained 1.39±0.01 mg/dry weight g. The study was conducted to verify that the simultaneous analysis on quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin, the indicators of *A. esculentus* L. Moench, is a scientifically reliable and suitable analytical method.

Key words: *Abelmoschus esculentus* L. Moench, Quercetin-3-*o*-gentiobioside, Isoquercitrin, HPLC-PDA, Method validation

오크라(*Abelmoschus esculentus* L. Moench)는 쌍떡이피 식물 이판화군 아욱과 식물로 원산지는 아프리카 북동부이며 열대 및 아열대지역에서 주로 재배되는 식물로서 최근 한국 남부지방에서도 일부 재배되어 식품 원재료 및 건강기능식품 소재로써의 관심도가 점차 증가되고 있다[1,2].

오크라는 항고지혈증, 항당뇨, 항산화 및 신경보호 활성과 같은 다양한 생리활성에 대한 연구가 보고되었으며[3-7] 오크라에 함유된 식이섬유, 비타민, β-카로틴, *p*-쿠마르산(*p*-coumaric acid), 페롤산(ferulic acid), 시나프산(sinapic acid), 카테킨(catechin), 퀘르세틴(quercetin) 및 그 유도체와 같은 페놀 화합물이 포함되어 있다[8,9]. 오크라의 함유된 다양한 유용성분들 중에서 다양한 생리활성을 기인하는 성분으로는 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin으로 알려져 있다[10,11].

현대인은 건강에 대한 관심이 높아 건강기능식품의 시장규모도 점차 성장하고 있으며 다양한 소재를 이용한 건강기능식품의 개발이 필요한 실정에서 우수한 생리적 기능성을 근거로 하여 오크라를 이용한 건강기능식품의 개발시 원료의 표준화를 위한 지표성분의 선정과 분석방법 및 분석법의 유효성 검증에 대한 연구가 필요하다. 또한 천연물의 기능성 원료 인정을 위해서는 과학적으로 원료의 기능성 및 안전성을 입증해야 하기 때문에 원료에 대한 표준화가 필요하다[12]. 표준화란 원료에 함유된 지표성분을 이용하여 기능성 원료의 생산부터 제조 공정에 대한 기술 및 정보를 관리하는 품질관리법으로써 천연물질에 함유되어 있는 활성 성분의 변화를 최소화시켜 품질을 일정하게 유지한다. 그리하여 공인된 분석법 또는 정밀한 분석법을 사용하여 지표성분의 확인을 통한 기능성 원재료의 기능성이 일정하게 유지되는 것을 확인하여야 하며, 기준 규격을 설정하기 위해 분석법의 신뢰성 및 타당성이 검증되어야 한다[13]. 현재 오크라의 유용성분에 대한 일부 분석결과들이 보고되고는 있으나[14-17], 이들 논문에서는 분석법에 대한 정확성 및 정밀성, 회수율 등의 유효성 검증이 실시되지 않아 분석법의 신뢰성을 확보하기 힘들다. 또한 검출한계와 정량한계에 대한 정보가 부족하여 분석범위 설정이 힘든 실정이다.

따라서 본 연구에서는 오크라를 이용하여 건강기능식품 소재 개발시 원료 표준화에 필요한 지표성분 2종(quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin)에 대한 분석법 개선 및 유효성 검증을 실시하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 오크라 분말은 Syspang Co., Ltd. (Seoul, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 생오크라를 선별한 후 5 mm의 크기가 되도록 절단한 오크라를 상온수(20°C)에서 침지 및 정제하여 오크라의 유리당과 쓴맛 등의 이미를 제거하였다. 이 후 70°C에서 5시간동안 열풍건조하여 건조된 오크라를 분쇄기를 사용하여 40 mesh로 분쇄하여 오크라 분말을 제조하였다. 표준물질 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin, 분석에 사용한 acetic acid, hydrochloric acid등의 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 acetonitrile, methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Quercetin-3-o-gentiobioside 및 isoquercitrin 분석

Quercetin-3-O-gentiobioside 및 isoquercitrin의 HPLC 분석을 위하여 Wu 등[10]의 분석방법을 변형하여 최적 분석방법 확립을 실시하였으며, 두 개의 표준물질을 동시분석하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)가 장착된 Waters 2695 Separation Module HPLC system을 사용하였고, 분석을 위한 이동상 조건은 Table 1과 같으며 분석 컬럼은 Capcell pak C_{18} (250×4.6 mm, 5 μm, Osaka Soda, Osaka, Japan)을 사용하였다.

표준용액 및 시험용액의 조제

Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin 표준물질을 각각 10 mg을 칭량한다. 그리고 10 mL 정용플라스크를 이용하여 1000 μg/mL의 농도가 되도록 methanol로 표선까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin stock solution을 이용하여 각각 5 mL씩 혼합하여 500 μg/mL 농도의 standard mixture를 제조하고 이를 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL이 되도록 methanol로 희석하여 사

용하였다. 시험용액은 오크라 분말 250 mg을 취한 뒤 25 mL 정용플라스크를 이용하여 10,000 μg/mL의 농도가 되도록 70% acidified methanol (0.1% Hcl, v/v)로 표선까지 채운 뒤 초음파진탕기로 30 min 동안 처리한 후, 원심분리하여 상층액을 0.45 μm syringe filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

지표성분 분석법 유효성 검증

ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인을 근거로 하여 분석법의 유효성 검증(Method validation)은 개발된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 분석하여 유효성을 확인하였다[18-20].

특이성

2종의 표준물질(quercetin-3-*o*-gentiobioside, isoquercitrin) 및 오크라 분말을 HPLC-PDA로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 quercetin-3-*o*-gentiobioside, isoquercitrin의 머무름 시간을 확인하였으며 동일한 spectrum을 나타내는지 photodiode-array (PDA) spectrum을 통해 확인하였다.

직선성

표준물질을 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 7 point 농도로 제조하여 HPLC-PDA를 이용하여 3회 반복 측정했으며, 표준물질의 peak에 대한 면적과 농도비의 관계를 표시하는 검량선을 작성하고 작성한 검량선으로부터 얻어진 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 오크라 분말 시료에 표준용액 quercetin-3-*o*-gentiobioside, isoquercitrin mixture을 2.5, 5, 10 μg/mL의 농도씩 각각 첨가해 일내(intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 HPLC-PDA를 이용하여 하루 동안에 3회 반복 분석하였으며, 일간(inter-day) 정밀성 및 정확성은 3일간 반복하여 확인하였다. 분석하여 얻어진 peak의 머무름 시간(retention time)과 PDA spectrum을 비교하여 표준물질을 정성 분석하였고 표준용액으로 작성한 검량선에 농도별로 제조한 시험용액의 peak 면적을 대입하여 quercetin-3-*o*-gentiobioside와 isoquercitrin의 농도를 계산하였다.

각 결과 값의 표준편차를 결과 값의 평균으로 나눈 비인 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 일내 및 일간 정밀성을 확인했으며, 정확성은 다음 식을 이용하여 첨가한 농도에 대비하여 회수된 농도를 계산함으로서 recovery (%)을 구해 정확성을 확인하였다.

Table 1. HPLC conditions of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin analysis for *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Instrument	Conditions		
Column	Capcell pak C_{18} UG120 (5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm)		
Column temp.	25°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[1] (%)	B[2] (%)
	0	95	5
	5	95	5
	50	80	20
	55	95	5
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector (254 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	55 min		

[1] 0.5% acetic acid in Water
[2] Acetonitrile

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_f - C_u)}{C_a} \times 100$$

C_f: Concentration of spiked sample
C_u: Concentration of sample
C_a: Concentration of standard

검출한계 및 정량한계

Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 검량선의 기울기와 표준편차를 근거하여 다음 식을 이용하여 확인하였다.

Limit of detection (LOD) Limit of quantification (LOQ)

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad \text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

σ: The standard deviation of the response
S: The slope of the calibration curve

Results and Discussion

Quercetin-3-o-gentiobioside 및 isoquercitrin의 크로마토그램

오크라 분말에 함유된 지표성분 2종(quercetin-3-*o*-gentiobioside, isoquercitrin)을 동시분석하기 위하여 기존의 보고된 Wu 등[10]의 품종별 오크라 중 6종 페놀 화합물 성분 동시분석법을 재현한 결과, 분석시간이 길고 연속 측정할시 압력의 안정화 시간이 길어지는 문제점을 발견하여 최적 분석조건 위해 기기조건을 일부 개선하였다 (Table 1).

HPLC-PDA를 이용하여 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin 표준물질에 대한 최대흡수 파장을 검토하였다. 그 결과, quercetin-3-*o*-gentiobioside은 209 nm, 255 nm, 355.1 nm에서 최대흡수파장을 나타내었으며, isoquercitrin은 210.2 nm, 255 nm, 353.9 nm에서 최대흡수파장을 나타내었다(Fig. 1). 동시분석에 최적인 파장 값을 확인하기 위해 각 물질의 최대흡수파장에 따른 두 물질의 peak 면적을 비교한 결과, 209, 210.2 nm에서 최대 peak 면적값을 나타냈으나, 저파장대역이기에 간섭물질로 인해 안정적인 peak를 얻기 위해서는 동시분석을 위한 최적분석파장은 254 nm로 설정하였다.

특이성 확인

특이성은 추출물, 불순물, 분해물 등이 혼합되어 있는 시료에서 선택적으로 분석대상물질을 측정할 수 있는 능력을 말하며 분석대상물질이 기타 물질들과의 간섭 없이 분리되는 결과로 특이성을 확인한다. 표준용액과 오크라 분말 시료의 chromatogram을 비교하여 quercetin-3-*o*-gentiobioside과 isoquercitrin의 peak가 분리됨을 확인한 결과 Fig. 2와 같다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin은 모두 다른 물질의 간섭 없이 분리되었다. 또한 각 지표물질의 표준용액과 오크라 분말 시료에서 머무름 시간(Retention time, RT)이 일치하는 것을 확인하였다. 또한 PDA spectrum 결과에서도 표준용액과 시험용액 모두에서 동일한 spectrum을 나타내어 분석법의 특이성을 확인할 수 있다(Fig. 1).

검량선을 이용한 직선성 확인

Quercetin-3-*o*-gentiobioside과 isoquercitrin 표준용액을 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 표준검량선은 각각 y=15292.24-3762.28, y=17980.04-8592.08으로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 quercetin-3-*o*-gentiobioside에서 0.9999, isoquercitrin에서 0.9999로 우수한 직선성을 보였다(Fig. 3).

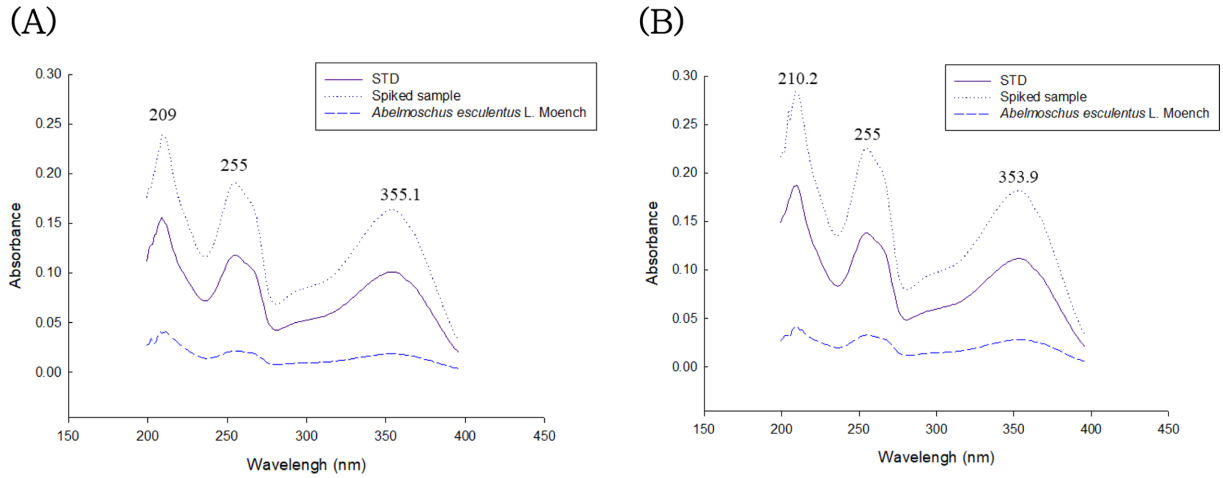

Fig. 1. PDA spectrums of quercetin-3-*o*-gentiobioside (A) and isoquercitrin (B) in STD, Spiked sample and *Abelmoschus esculentus* L. Moench.

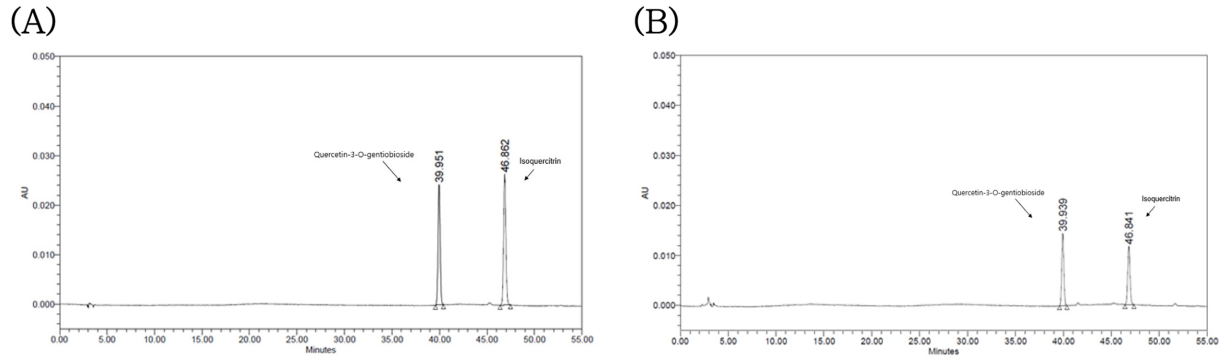

Fig. 2. HPLC chromatograms of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin. Standard (A), *Abelmoschus esculentus* L. Moench (B).

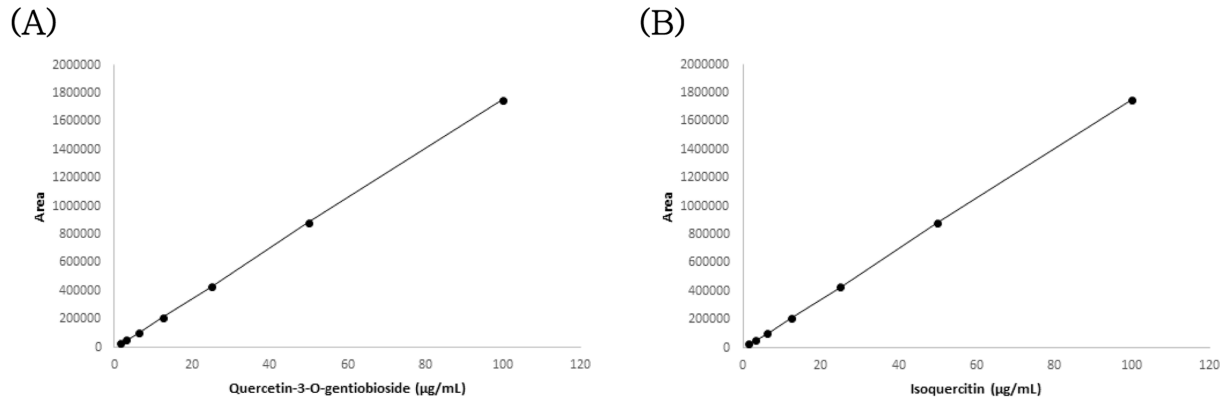

Fig. 3. Calibration curve of quercetin-3-*o*-gentiobioside (A) and isoquercitrin (B) standard solution.

정밀성 및 정확성

정밀성이란 오크라 분말 시료를 일정한 조건에서 분석하였을 때 각 측정 값 사이의 근접성을 말하며 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 확인하였다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 정밀성은 Table 2와 같이 일내(intra-day) 정밀성에서 각각 0.50-1.48%, 0.77-2.82%를 나타내었고 일간(inter-day) 정밀성에서는 0.07-3.37%, 0.58-1.37%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타내었다.

정확성은 회수율을 측정하여 그 결과로 나타내었으며(Table 2), 농도를 알고 있는 오크라 분말 시료에 표준용액을 각각 저농도(2.5 μg/mL), 중농도(5 μg/mL), 고농도(10 μg/mL)로 첨가한 뒤 HPLC-PDA로 분석하여 검출되는 농도를 측정하였다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 일간 정확성은 106.69-111.08%, 106.85-109.06%를 나타내었으며, 일내 정확성은 104.87-109.64%, 108.50-109.70%로 우수한 정확성을 나타내었다.

검출한계 및 정량한계

ICH 가이드라인에 근거하여 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 분석한 검출한계와 정량한계의 결과는 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin에서 검출한계 값은 각각 0.24 μg/mL, 0.16 μg/mL로 측정 되었으며 정량한계 값은 각각 0.71 μg/mL, 0.49 μg/mL로 나타났다.

이상의 결과를 통해 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin은 HPLC-PDA를 이용해 동시분석이 가능하며 정량분석이 가능한 것으로 나타났다(Table 3).

오크라 분말의 quercetin-3-o-gentiobioside 및 isoquercitrin 함량분석

확립된 분석법을 이용하여 오크라 분말 내 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같이, quercetin-3-*o*-gentiobioside은 1.49±0.01 mg/dry weight g, isoquercitrin은 1.39±0.01 mg/dry weight g의 함량을 함

Table 2. Precision and accuracy of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin analysis for *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Analytes		Concentration (μg/mL)	Mean±SD (μg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
Quercetin-3-*o*-gentiobioside	Intra-day	2.5	2.62±0.04[1)]	1.48	104.87
		5	5.48±0.05	0.93	109.64
		10	10.92±0.06	0.50	109.20
	Inter-day	2.5	2.67±0.09	3.37	106.69
		5	5.38±0.01	0.10	107.57
		10	11.11±0.01	0.07	111.08
Isoquercitrin	Intra-day	2.5	2.74±0.08	2.82	109.70
		5	5.43±0.07	1.37	108.50
		10	10.91±0.08	0.77	109.11
	Inter-day	2.5	2.73±0.04	1.37	109.06
		5	5.34±0.07	1.26	106.85
		10	10.79±0.06	0.58	107.88

[1)] Value are mean±SD in triplicate (n=3)

Table 3. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin analysis for *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Analytes	Range (μg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R^2)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Quercetin-3-*o*-gentiobioside	1.56-100	15292.24	-3762.28	0.9999	0.24	0.71
Isoquercitrin	1.56-100	17766.27	-5817.99	0.9999	0.16	0.49

Table 4. Content of quercetin-3-*o*-gentiobioside and isoquercitrin in *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Compounds (mg/dry weight g)			
Sample	Analytes	Mean±SD	Total
Abelmoschus esculentus L. Moench powder	Quercetin-3-*o*-gentiobioside	1.49±0.01	2.88±0.01
	Isoquercitrin	1.39±0.01	

유하고 있는 것으로 분석되었다. 이 결과는 Wu 등[10]의 다양한 오크라 품종별 페놀성화합물 연구에서 보고된 quercetin-3-*o*-gentiobioside 0.65-1.71 mg/dry weight g, isoquercitrin 0.38-1.07 mg/dry weight g와 비교하였을 때 보다 높은 isoquercitrin의 함량을 보였다. 이는 오크라의 품종 및 산지에 의한 지표성분 함량 차이가 있는 것을 설명하며 분석법 확립을 통한 원료의 표준화에 대한 중요성을 보여준다.

Acknowledgement

이 논문은 한국연구재단의 재원(NRF-2017R1D1A3B06028469) 및 2021년도 교육부의 재원(NRF-2021R1A6A1A03044242)과 한국연구재단의 4단계 두뇌한국21 사업(4단계 BK21 사업)(4299990913942)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 오크라를 이용하여 건강기능식품 개발 시 원료의 표준화를 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 지표성분 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 기존 보고된 분석법을 개선하고 분석법에 대한 유효성 검증을 실시하였다. 분석법의 유효성 검증은 ICH 가이드라인에 근거하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 통해 신뢰성 및 타당성을 검증하였다. HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액의 지표성분 피크 머무름 시간과 오크라 분말 시료의 지표성분 피크 머무름 시간 및 spectrum의 확인결과 모두 일치하므로 특이성을 확인하였다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 검량선은 1에 가까운 높은 상관계수 값(0.9999, 0.9999)으로 우수한 직선성을 확인할 수 있었으며 분석에 적합함을 알 수 있었다. 농도를 알고 있는 오크라 분말 시료에 표준물질을 저, 중, 고농도로 제조한 후 첨가하여 정밀성 및 정확성을 계산하였다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 정밀성은 일내, 일간 정밀성으로 확인하였으며, quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 일내 정밀성은 각각 0.50-1.48%, 0.77-2.82% 수준으로 확인되었으며, 일간 정밀성은 0.07-3.37%, 0.58-1.37% 수준으로 5% 이하의 우수한 정밀성을 보였다. 정확성 측정결과 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 일내 정확성은 104.87-109.64%, 108.50-109.70%를 나타내었으며, 일간 정확성은 106.69-111.08%, 106.85-109.06% 수준으로 우수한 정확성을 나타내었다. Quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 검출한계는 각각 0.24 μg/mL, 0.16 μg/mL이었고 정량한계는 0.71 μg/mL, 0.49 μg/mL로 나타내어, 낮은 농도에서도 검출이 가능함을 확인하였다. 확립된 분석법은 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계에 대한 분석법 검증 결과가 모두 우수한 분석법임을 증명하였다. 또한 검증된 분석법을 이용하여 오크라 분말 시료 중 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 함량분석 결과, quercetin-3-*o*-gentiobioside은 1.49±0.01 mg/dry weight g, isoquercitrin은 1.39±0.01 mg/dry weight g의 함량을 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 본 연구는 HPLC-PDA를 이용한 오크라의 지표성분인 quercetin-3-*o*-gentiobioside 및 isoquercitrin의 동시 분석방법이 과학적으로 신뢰성이 있는 적합한 분석방법임이 검증되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Xionggao Han https://orcid.org/0000000250577401
Sun-Il Choi https://orcid.org/0000000174006286
Xiao Men https://orcid.org/0000000311015796
Se-Jeong Lee https://orcid.org/0000000187387559

Heegu Jin https://orcid.org/0000000241014017
Hyun-Ji Oh https://orcid.org/0000000246912772
Sehaeng Cho https://orcid.org/0000000238342263
Boo-Yong Lee https://orcid.org/0000000273481859
Ok-Hwan Lee https://orcid.org/0000000168553136

References

1. Panneerselvam, K., Ramachandran, S., Sabitha, V., Naveen, K.R., Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of Abelmoschus esculentus (L.) Moench. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Bioallied Sci*., **3**, 397-402 (2011).
2. Xia, F., Zhong, Y., Li, M., Chang, Q., Liao, Y., Liu, X., Pan, R., Antioxidant and Anti-Fatigue Constituents of Okra. *Nutrients*, **7**, 8846-8858 (2015).
3. Yuan, K., Liao, H., Dong, W., Shi, X., Liu, H., Analysis and comparison of the active components and antioxidant activities of extracts from *Abelmoschus esculentus* L. *Pharmacogn. Mag.*, **8**, 156-161 (2012).
4. Graham, J.O., Agbenorhevi, J.K., Kpodo, F.M., Total phenol content and antioxidant activity of okra seeds from different genotypes. *Am. J. Food Nutr.*, **5**, 90-94 (2017).
5. Karim, M., Islam, M., Sarkar, S., Murugan, A., Makky, E., Rashid, S., Yusoff, M., Anti-amylolytic activity of fresh and cooked okra (*Hibiscus esculentus* L.) pod extract. *Biocatal. Agric. Biotechnol*., **3**, 373-377 (2014).
6. Tongjaroenbuangam, W., Ruksee, N., Chantiratikul, P., Pakdeenarong, N., Kongbuntad, W., Govitrapong, P., Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochem. Int.*, **59**, 677-685 (2011).
7. Daliu, P., Annunziata, G., Tenore, G.C., Santini, A., (2020). Abscisic acid identification in Okra, *Abelmoschus esculentus* L.(Moench): Perspective nutraceutical use for the treatment of diabetes. *Nat. Prod. Res.*, **34(1)**, 3-9 (2020).
8. Arapitsas, P., (2008). Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. *Food Chem.*, **110(4)**, 1041-1045 (2008).
9. Xia, F., Zhong, Y., Li, M., Chang, Q., Liao, Y., Liu, X., Pan, R., Antioxidant and anti-fatigue constituents of okra. *Nutrients*, **7(10)**, 8846-8858 (2015).
10. Wu, D. T., Nie, X. R., Shen, D. D., Li, H. Y., Zhao, L., Zhang, Q., Qin, W., Phenolic compounds, antioxidant activities, and inhibitory effects on digestive enzymes of different cultivars of okra (*Abelmoschus esculentus*). *Molecules*, **25(6)**, 1276 (2020).
11. Xia, F., Li, C., Zhao, N., Li, H., Chang, Q., Liu, X., Pan, R., Rapid determination of active compounds and antioxidant activity of okra seeds using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Molecules*, **23(3)**, 550 (2018).
12. Kim Y.H., Bae D.B., Park S.O., Lee S.H., Cho O.H., Lee O.H.. Method validation for the determination of eleutherosides and β-glucan in *Acanthopanax koreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **42**, 1419-1425 (2013).
13. KFDA. 2008. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration, Korea. p 1-146.
14. Lin, Y., Lu, M.F., Liao, H.B., Li, Y.X., Han, W., Yuan, K., Content determination of the flavonoids in the different parts and different species of *Abelmoschus esculentus* L. by reversed phase-high performance liquid chromatograph and colorimetric method. *Pharmacogn. Mag.*, **10(39)**, 278 (2014).
15. Lu, Y., Demleitner, M.F., Song, L., Rychlik, M., Huang, D., Oligomeric proanthocyanidins are the active compounds in *Abelmoschus esculentus* Moench for its α-amylase and α-glucosidase inhibition activity. *J. Funct. Foods,* **20**, 463-471 (2016).
16. Romdhane, M.H., Chahdoura, H., Barros, L., Dias, M.I., Corrêa, R.G., Morales, P., Ferreira, I.C., Chemical composition, nutritional value, and biological evaluation of Tunisian okra pods (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Molecules*, **25(20)**, 4739 (2020).
17. Sami, R., Alshehry, G., Ma, Y., Abdelazez, A., Benajiba, N.J.J.O.F., Evaluation of some specific components existences in okra (*Abelmoschus esculentus* L.(Moench)) cultivated from different areas. *J. Food Nutr. Res.,* **7**, 155-161 (2019).
18. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology* Q2(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, p 1-13.
19. Lee, J., Park, J., Lee, J., Suh, H. J., Lee, C., Optimization of analytical method for annatto pigment in foods. *J. Food Hyg. Saf.*, **36(4)**, 298-309. (2021).
20. Hwang, K. H., Choi, W. H., Hu, S. J., Hwang, K. M., Improvement of analysis methods for fatty acids in infant formula by gas chromatography flame-ionization detector. *J. Food Hyg. Saf.*, **36(1)**, 34-41. (2021).