

동과 추출물(HR1901-W)의 지표성분 2-Furoic acid 분석법 개발 및 검증

최선일¹, 한웅호¹, 문효¹, 이세정¹, 박미혜¹, 이옥환², 양정모³, 최예은³, 조주현^{4*}

¹강원대학교 농업생명과학대학 식품환경융합학과 식품생명공학 대학원생,

²강원대학교 농업생명과학대학 식품환경융합학과 식품생명공학 교수, ³하람 중앙연구소 연구원, ⁴하람 중앙연구소 연구소장

Development and Validation of an Analytical Method for 2-Furoic Acid in *Benincasa hispida* Extracts (HR1901-W)

Sun-Il Choi¹, Xiongao Han¹, Xiao Men¹, Se-Jeong Lee¹, Mi-Hye Park¹, Ok-Hwan Lee², Jung-Mo Yang³, Ye-Eun Choi³, Ju-Hyun Cho^{4*}

¹Graduate Student, Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Professor, Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

³Researcher, Haram Central Research Institute, Cheongju 28160, Korea

⁴Chief Executive Officer, Haram Central Research Institute, Cheongju 28160, Korea

*Corresponding author: Ju-Hyun Cho (E-mail: dusvnd608@hanmail.net)

ABSTRACT

Received: 6 August 2021

Revised: 15 October 2021

Accepted: 18 October 2021

As interest and demand for functional foods increase, standardization becomes important to manage the quality of raw materials and products. Analytical methods for the standardization of bioactive compounds must be created in tandem with the development of functional foods. Therefore, the aim of this study was to validate an analytical method for the determination of 2-furoic acid in *Benincasa hispida* extract (HR1901-W). The 2-furoic acid analysis method was validated by evaluating the linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ), using a high-performance liquid chromatography – photodiode array spectrum. Our results showed that the correlation coefficients of the calibration curve for 2-furoic acid was 0.9999. Furthermore, the LOD and LOQ for 2-furoic acid were 0.10 µg/mL and 0.32 µg/mL, respectively. The range of inter-day and intra-day precision values (RSDs, relative standard deviation) for 2-furoic acid were 0.13% – 0.56% and 0.27% – 0.33, respectively, and the inter-day and intra-day accuracy values (recovery) were 98.47% – 102.74% and 98.77% – 102.72%, respectively. In addition, the content of 2-furoic acid in HR1901-W was found to be 412.39 ± 0.91 µg/dry weight in grams. These results indicate that the analytical method used in this study should be appropriate for the quantitative analysis of 2-furoic acid in HR1901-W and considered for use as basic data for the standardization of HR1901-W.

Keywords: 2-Furoic acid, *Benincasa hispida*, High-performance liquid chromatography, Method validation, Photodiode array spectrum



서론

동과(*Benincasa hispida* cong.)는 박과(*Cucurbitaceae*)에 속하는 한해살이 덩굴 식물로 인도, 일본, 중국, 영국, 말레이시아 및 한국의 전라도 일부 지역 등 아시아지역과 열대 저지대의 중간 건조 지역에서 재배되고 있으며 (Mohammad et al., 2019), 주로 아시아 국가에서 식용 및 약용 목적으로 이용되는 채소작물이다(Park and Lee, 2020; Lim et al., 2003). 동과는 형태는 타원형이며 보통 10 kg 이하의 동과를 이용하며, 현재 식품의약품안전처에서 제공하는 식품원료목록에는 껍질을 제외한 동과 열매 및 씨앗이 등재되어있다(You and Jun, 2012). 동과는 인디언 원주민의 위궤양 민간요법에 이용되었으며, 동의 보감에 의하면 살찐 사람이 국이나 나물을 만들어서 먹으면 살이 빠지며 특히 변비 방지와 콜레스테롤 저하에 효과적이라고 보고되었다(Grover et al., 2001; Kim, 2004). 뿐만 아니라 동과는 휘발성 오일(volatile oils), 플라보노이드, 페놀화합물, 식물성 단백질, 필수 미네랄 및 비타민 등 다양한 영양소를 함유한 것으로 알려져있으며, 항비만, 항염증, 항산화, 항궤양, 항우울, 지사, 해열 등의 효능이 보고되어 천연물을 활용한 기능성 식품소재로서의 활용가치가 높음을 시사한다(Lim, 2012; Gill et al., 2010).

최근 고령화 사회로의 가속화와 코로나19(COVID-19)의 발생과 확산으로 질병 예방에 도움을 주는 천연물을 활용한 건강기능식품에 대한 관심이 증대되고 있다(Ahn et al., 2017; Choi, 2020a). 이에 따라 기능성 원료 및 제품의 품질을 관리하기 위한 표준화 및 규격화는 매우 중요한 부분을 차지하며 유효성분 및 지표성분의 기능성과 안정성에 대한 연구가 필요하다(Cho et al., 2017). 표준화는 원료로부터 최종제품까지의 제조공전 전반에 걸쳐 일관된 품질을 생산할 수 있는 우수제조공정 규범을 말하며, 이때 지표성분의 표준화 방법이 가장 일반적으로 사용된다(Jeon et al., 2011). 지표성분은 원료 중에 함유되어 있는 화학적으로 규명된 성분 중에서 품질관리의 목적으로 정한 성분이다(Ong, 2004). 이러한 지표성분은 원료 또는 제조 방법에 따라 특이적으로 존재하거나 차별적인 함량 변이를 갖는 성분의 특이성, 함량 차이나 존재 유무 등에 따라 기능에 관여하는 성분의 대표성, 열, 빛, 습도 등의 일반적인 보관 조건에서 안정성이 높은 성분의 안정성, 범용화된 분석 기기를 통해 분석 가능한 성분의 용이성 등을 고려하여 선정된다. 따라서 지표성분의 선정 및 분석은 공인된 방법 또는 정밀한 분석 방법을 이용해야 하며 기준규격의 설정을 위해 타당성과 신뢰성이 검증되어야 한다(Choi et al., 2017; Kim et al., 2013).

동과추출물(HR1901-W)의 지표성분인 2-furoic acid은 콜레스테롤 저감, 혈당 조절, 체지방 감소 등의 효능이 보고되었으며(Hall et al., 1985; Hall et al., 1993; Sajadi et al., 1984), 본 연구에서는 HR1901-W의 지표성분인 2-furoic acid의 분석법을 개발 및 유효성 검증(method validation)을 하기 위해 고속액체크로마토그래프(High-performance liquid chromatography, HPLC)와 UV 또는 가시광선 범위의 빛을 흡수하는 원리(Swartz, 2010)를 이용하는 PDA검출기(Photodiode array detector, PDA)를 사용하였다. HR1901-W의 지표성분인 2-furoic acid는 5-원 방향족(2-furyl)에 카르복실산기가 결합된 구조이며 2-furyl의 최대흡수 파장은 220 nm 부분으로 본 연구에서는 UV 200 nm - 800 nm의 파장구간을 검출할 수 있는 detector를 사용하여 2-furoic acid를 분석하였다. 현재 동과에서 2-furoic acid를 정량 분석하기 위한 HPLC 분석방법은 보고된 바 없으므로 HR1901-W의 표준화 및 규격화를 위한 분석법 개발 및 유효성 검증이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 HR1901-W의 지표물질인 2-furoic acid을 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계 측정을 통한 유효성 검증 및 확립된 분석을 이용한 HR1901-W의 2-furoic acid 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용한 동과는 하람(Cheongju, Korea)에서 제공받았으며, 동과열매 중 껍질과 씨앗을 제외한 과육 부분을 사용하였다. 동과 시료 30 g에 3 L의 증류수를 가하여 100°C에서 4시간 동안 환류추출하였다. 추출물을 여과 후 농축하였으며 동결건조기(Ilshinbiobase Co., Ltd, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 동결건조물(HR1901-W)로 제조한 뒤 실험에 사용하였다(수율 4.6%). 표준물질 2-furoic acid(CAS: 88-14-2; ≥98%)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용한 메탄올(≥99.9%) 및 이동상(B)으로 사용된 acetonitrile(≥99.9%)은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 이동상(A)인 Trifluoroacetic acid(≥99%)는 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

2-Furoic acid 분석

2-Furoic acid 분석은 Waters 2695 separation module HPLC system과 Waters 996 photodiode array detector (Waters Co., Milford, MA, USA)가 결합된 HPLC기기를 통해 검출되었으며, Osaka soda Capcell Pak C18 UG120 column(Shiseido, 4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Tokyo, Japan)으로 분리하였다. 2-Furoic acid 분석조건은 Table 1과 같으며 시료의 주입량은 20 μL, 유속은 1.0 mL/min, Column 온도는 30°C 유지되었으며, 2-furoic acid의 최대흡수파장에서 최적 peak 면적 값을 나타내는 최적분석파장 254 nm로 설정하여 분석하였다. 이동상으로는 이동상(A) 0.1% Trifluoroacetic acid in distilled water(v/v)와 이동상(B) acetonitrile을 sonicator로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건(gradient system)을 이용하여 분석하였다.

표준용액 및 시험용액의 조제

Table 1. HPLC(High-performance liquid chromatography-photodiode array spectrum) conditions of 2-furoic acid analysis for *Benincasa hispida* extracts

Instrument	Conditions		
Column	Shiseido C18 (5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm)		
Column temp.	30°C		
	Time (min)	Solvent A ¹⁾	Solvent B ²⁾
	0	90	10
Mobile phase (Gradient)	5	90	10
	15	70	30
	20	90	10
	25	90	10
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector (254 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 μL		
Run time	40 min		

¹⁾Solvent A, water (0.1% Trifluoroacetic acid)

²⁾Solvent B, Acetonitrile

2-Furoic acid 표준물질을 10 mg 취하여 10 mL 정용플라스크를 이용해 1,000 µg/mL의 농도가 되도록 메탄올로 표선까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 stock solution을 이용하여 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 50.00 µg/mL가 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 동결건조된 시료를 500 mg을 칭량한 후 25 mL 정용플라스크를 이용해 20,000 µg/mL의 농도가 되도록 메탄올로 표선까지 채운 뒤, 이를 0.45 µm, PVDF syringe filter(Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 했다.

분석법의 유효성 검증

분석법 유효성 검증은 의약품 등 시험 시험방법 밸리데이션 가이드라인(KFDA, 2015)을 근거로 하여 개발된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 이용하여 분석법의 유효성을 검증하였다.

특이성

표준물질 2-furoic acid 및 HR1901-W 를 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 2-furoic acid가 선택적인 분리 여부를 확인했으며 photodiode array(PDA) spectrum을 확인하여 동일한 spectrum을 나타내는지 확인하였다.

직선성

표준물질 2-furoic acid를 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 50.00 µg/mL의 농도로 제조해 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정했으며, 표준물질의 peak에 대한 면적과 농도비로 작성된 검량선으로부터 얻어진 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

지표성분 2-furoic acid의 함량을 알고 있는 HR1901-W 에 표준용액 2-furoic acid를 2.5, 5, 10 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 정밀성 및 정확성 분석을 1일-3회 분석하는 일내(Intra-day)분석 및 1일-1회 분석을 3일간 분석하는 일간(Intra-day)분석으로 검증되었으며 분석하여 얻어진 peak 면적의 검량선을 이용하여 2-furoic acid의 농도를 계산하였다. 일내 및 일간 정밀성은 각 결과 값의 표준편차를 결과 값의 평균으로 나눈 비인 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)을 이용하여 나타냈으며, 정확성은 첨가한 농도에 대한 회수된 농도를 formula(I)을 이용하여 회수율로 나타냈다. Formula(I): $\text{Recovery}(\%) = [(C_f - C_u)/C_s] \times 100$; C_f : Concentration of spiked sample; C_u : Concentration of sample; C_s : Concentration of standard.

검출한계 및 정량한계

지표성분 2-furoic acid의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 각각 formula(II) 과 formula(III)을 이용하여 나타냈다. Formula(II): $LOD = 3.3 \sigma/S$ and Formula(III): $LOQ = 10 \sigma/S$; σ : The standard deviation of the response; S : The slope of the calibration curve.

결과 및 고찰

특이성 검토

특이성(specificity)이란 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석 대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다(Marin et al., 2002). 2-Furoic acid 표준용액과 표준용액이 첨가된 HR1901-W 를 Capcell Pak C18 column을 사용하여 분리하였다. 2-Furoic acid 표준용액과 HR1901-W, 표준용액이 첨가된 HR1901-W의 chromatogram을 비교하여 2-Furoic acid가 분리되는지를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 2-Furoic acid 표준용액의 피크 머무름 시간과 HR1901-W의 피크 머무름 시간이 일치하였다. 뿐만 아니라 UV 200 nm - 400 nm의 파장구간에서 최대흡수파장을 조사한 결과 동일한 최대흡수파장(252.7 nm)과 spectrum을 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 2). 본 분석법을 통해 확인한 2-furoic acid의 spectrum 및 최대흡수 파장은 Ortu and Caboni, 2017의 연구와 유사한 결과를 확인하였다.

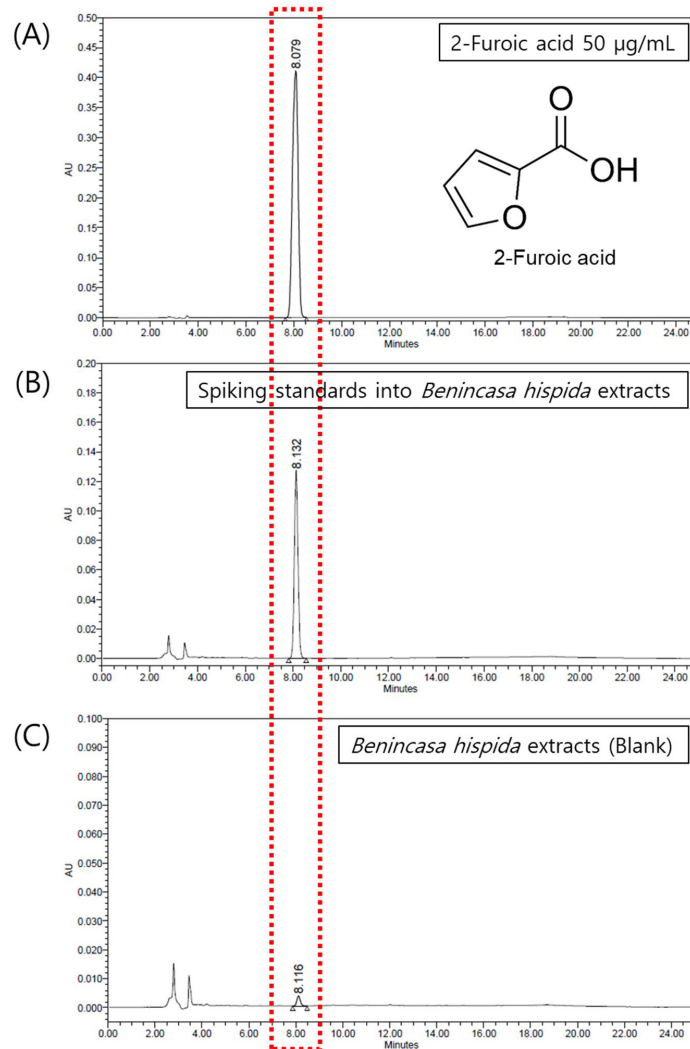


Fig. 1. HPLC(High-performance liquid chromatography-photodiode array spectrum) chromatograms of 2-furoic acid (50 µg/mL) (A), 2-furoic acid (10 µg/mL) spiked (B), and *Benincasa hispida* extract sample (C).

직선성 검토

직선성(linearity)은 시료 중 일정 범위 내에서 분석 대상물질의 양에 비례하는 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하며, 분석된 결과에 따라 y축을 peak 면적, x축을 표준용액의 농도($\mu\text{g/mL}$)로 하여 작성된 calibration curve의 R^2 값으로 직선성을 확인하였다(Choi et al., 2020b). 또한 2-Furoic acid 표준용액을 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과, 2-Furoic acid의 표준검량선은 $y = 134300.80x - 7214.71$ 로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 1.0000로 나타나 우수한 직선성을 보였다(Fig. 3).

정밀성 검토

정밀성(precision)은 균질한 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 말한다(Franeta et al., 2002). HR1901-W 에 표준용액을 각각 저농도(2.5 $\mu\text{g/mL}$),

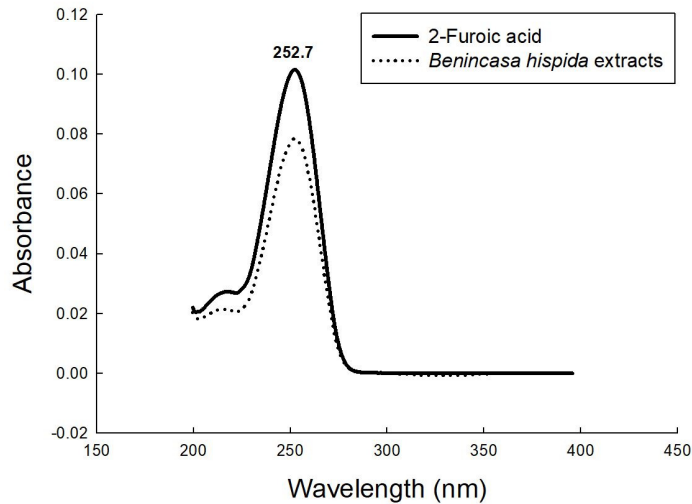


Fig. 2. PDA spectrum of the *Benincasa hispida* extracts spiked with 2-furoic acid.

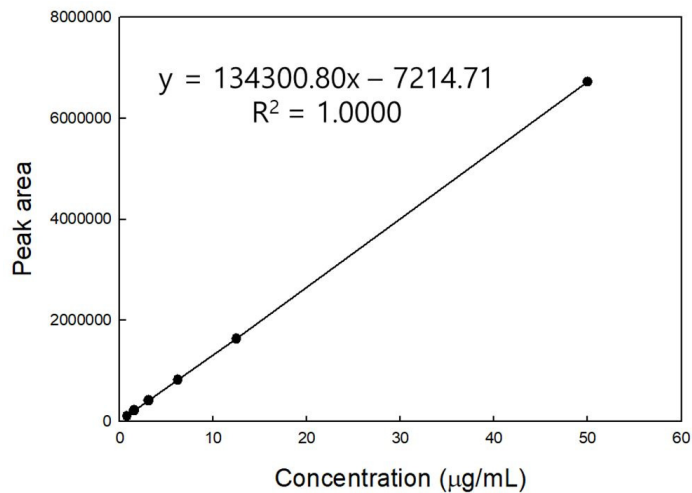


Fig. 3. Calibration curve of the 2-furoic acid standard solution.

Table 2. Precision and accuracy of 2-furoic acid analysis

Matrix	Analytes	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Recovery (%)	
<i>Benincasa hispida</i> extracts	2-Furoic acid		2.5	2.54 \pm 0.01	0.56	101.58
		Intra-day	5	5.14 \pm 0.01	0.13	102.74
			10	9.85 \pm 0.01	0.14	98.47
		Inter-day	2.5	2.54 \pm 0.01	0.27	101.52
			5	5.14 \pm 0.02	0.33	102.72
			10	9.88 \pm 0.03	0.28	98.77

중농도(5 $\mu\text{g/mL}$), 고농도(10 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가한 뒤 HPLC로 분석했을 때, 상대표준편차(RSD)로 확인하였다. Intra-day, inter-day의 정밀도를 측정한 결과는 Table 2와 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.13% - 0.56%를 나타냈으며, inter-day의 정밀도는 0.27% - 0.33%를 나타내었다.

정확성 검토

정확성(accuracy)은 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며 회수율(recovery)로 나타낸다(Bressolle et al., 1996). 정확한 농도의 표준용액(2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 HR1901-W 를 HPLC로 분석하였으며 측정된 회수율은 Table 2에 나타내었다. Intra-day, inter-day의 정확성을 측정한 결과, intra-day에서의 정확성은 98.47% - 102.74%를 나타냈으며, inter-day의 정확성은 98.77% - 102.72%를 나타내어 80% - 120% 분석오차를 만족하였다.

검출한계 및 정량한계

검출한계(limit of detection)란 시료 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 정량한계(limit of quantitation)란 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 시료 중 분석대상물질의 최소량을 말한다(Vial and Jardey, 1999). 본 연구에서 사용한 2-furoic acid 분석을 위한 HPLC 분석법의 검출한계는 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었으며 정량한계는 0.32 $\mu\text{g/mL}$ 으로 계산되었다(Table 3). 이러한 결과는 Ortu and Caboni(2017)의 연구에서 시럽, 와인, 빵에서의 2-furoic acid의 검출한계 및 정량한계 보다 낮게 나타났으나 이는 사용한 기기, 분석조건의 차이에 의한 것으로 사료된다.

동과 추출물(HR1901-W)의 2-Furoic acid 함량 분석

유효성이 검증된 분석법을 이용하여 HR1901-W 내 2-furoic acid의 함량을 분석한 결과 $412.39 \pm 0.91 \mu\text{g/dry weight g}$ 의 수준으로 나타났다(Table 4). 이러한 결과는 검출한계 및 정량한계 보다 이상의 값으로 나타나, 본 분석법을 이용하여 동과에서의 2-Furoic acid 분석이 가능할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 동과의 유용성분 및 지표성분으로 2-Furoic acid을 선정 시 본 연구의 분석법 유효성 검증을 통한 원료 표준화가 가능할 것으로 사료된다.

동과의 항비만, 항염증, 항산화 등의 다양한 효능은 다량 함유된 triterpenes, phenols, sterols, glycosides 등과 같은 생리활성 물질에 의한 것으로 보고되었다(Zaini et al., 2011). 특히 Fatariah et al.(2014)과 Busuioc et al.(2020)의 보

Table 3. Correlation coefficients of the calibration curves, and the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the 2-furoic acid analysis

Analytes	Range (µg/mL)	Slope	Intercept	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
2-Furoic acid	0.78 – 50	134300.80	- 7214.71	1.0000	0.10	0.32

Table 4. Content of 2-furoic acid in Benincasa hispida extracts

Analytes	Sample	Mean ± SD (mg/g)	RSD (%)
2-Furoic acid	<i>Benincasa hispida</i> extracts	0.41 ± 0.00	0.23

고에 의하면 동과는 높은 수준의 총 페놀함량을 보이며 그중 gallic acid의 함량이 가장 높았다. 하지만 본 연구에서는 HR1901-W 피크 중 gallic acid 표준물질과 동일한 머무름 시간을 보였지만 PDA-spectrum의 모양 및 최대흡수파장 영역이 상이하여 gallic acid는 검출되지 않았다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 HR1901-W 에 특이적으로 함유되어있는 2-Furoic acid를 지표성분으로 선정하였으며, HPLC-PDA를 이용하여 분석법 유효성 검증을 하였다. 하지만 2-Furoic acid는 지표성분뿐만 아니라 유효성분으로써 생리활성을 나타내는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구의 목적은 예로부터 식용 및 약용으로 사용된 동과를 건강기능식품으로서 표준화를 위한 지표성분 분석법 개발 및 검증하였다. 본 연구에서는 HR1901-W의 지표성분으로 2-furoic acid를 선정하였으며 HPLC-PDA로 분석하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계 측정을 통한 유효성 검증을 하였다. 개발된 분석법을 통하여 2-furoic acid를 분석하였을 때, HR1901-W 내 다른 물질들과의 간섭이 분리되고 표준물질의 머무름 시간의 일치 크로마토그램을 통해 확인하였으며, PDA-spectrum을 확인하여 동일한 형태의 흡수파장과 최대흡수파장을 확인하였다. 2-furoic acid의 검량선은 상관계수 0.9999로 나타나 분석에 적합함을 나타내었으며, 저농도, 중농도, 고농도의 2-furoic acid를 HR1901-W 에 첨가하여 정밀성은 RSD(%)로 정확성은 recovery(%)로 평가하였다. 2-furoic acid의 일간 및 일내 정밀성은 0.13%–0.56% 및 0.27%–0.33%로 나타났으며 일간 및 일내 정확성은 98.47%–102.74% 및 98.77%–102.72%로 우수한 정밀성 및 정확성을 나타냈다. 2-furoic acid의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.10 µg/mL 및 0.32 µg/mL로 나타나 저농도에서도 검출이 가능함을 확인하였다. 뿐만 아니라 HR1901-W 중 2-furoic acid의 함량을 분석한 결과, 검출한계 및 정량한계 이상의 0.41 ± 0.00 mg/dry weight g으로 분석되었다. 따라서 분석법 유효성 검증 결과, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계 측정을 통해 우수한 분석법임을 검증하였으며, HR1901-W의 표준화 및 규격화를 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

사사

본 논문은 2020년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업 지원(S3004427)과 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2021R1A6A1A03044242) 및 4단계 두뇌한국21 사업(4299990913942)으로 지원된 연구임.

인용문헌(References)

- Ahn, E. M., Choi, S. A., Choi, J. Y. (2017) HPLC analytical method validation of *Aralia elata* extract as a functional ingredients. *Korean J Food Preser* 24:795-801.
- Bressolle, F., Bromet-Petit, M., Audran, M. (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* 686:3-10.
- Busuioc, A. C., Botezatu, A. V. D., Furdui, B., Vinatoru, C., Maggi, F., Caprioli, G., Dinica, R. M. (2020) Comparative study of the chemical compositions and antioxidant activities of fresh juices from romanian cucurbitaceae varieties. *Molecules* 25:5468.
- Cho, B. Y., Park, M. R., Lee, J. H., Ra, M. J., Han, K. C., Kang, I. J., Lee, O. H. (2017) Standardized *Cirsium setidens* Nakai ethanolic extract suppresses adipogenesis and regulates lipid metabolisms in 3T3-L1 adipocytes and C57BL/6J mice fed high-fat diets. *J Med Food* 20:763-776.
- Choi, S. H., Yoo, C. K., Hwang, J. H., Lee, G. B., Lee, Y. J., Lee, B. Y., Lee, O. H. (2017) Modification and validation of analytical method for oxypaeoniflorin and paeoniflorin in Moutan cortex radices extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:1091-1096.
- Choi, S. W. (2020a) Non-destructive sensing technology using terahertz wave for in-situ leak detection of food packaging. *Korean J Food Sci Anim Resour* 9:13-17.
- Choi, Y. E., Choi, S. I., Han, X., Men, X., Jang, G. W., Kwon, H. Y., Park, B. W., Kim, J. J., Lee, O. H. (2020b) Validation of analytical method for platycoside e and platycodin D in fermented platycodon grandiflorum root extract. *J Agri Life Environ Sci* 32:116-126.
- Fatariah, Z., Zulkhairuazha, T. Y. T. G., Rosli, W. W. (2014) Quantitative HPLC analysis of gallic acid in *Benincasa hispida* prepared with different extraction techniques. *Sains Malays* 43:1181-1187.
- Franeta, J. T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., Vladimirov, S. (2002) HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco* 57:709-713.
- Gill, N. S., Dhiman, K., Bajwa, J., Sharma, P., Sood, S. (2010) Evaluation of free radical scavenging, anti-inflammatory and analgesic potential of *Benincasa hispida* seed extract. *Int J Pharmacol* 6:652-657.
- Grover, J. K., Adiga, G., Vats, V., Rathi, S. S. (2001) Extracts of *Benincasa hispida* prevent development of experimental ulcers. *J Ethnopharmacol* 78:159-164.
- Hall, I. H., Williams Jr, W. L., Rhyne, K. A., Knowles, M. (1985) The hypolipidemic activity of furoic acid and furylacrylic acid derivatives in rodents. *Pharmaceutical Research* 2:233-238.
- Hall, I. H., Wong, O. T., Reynolds, D. J., Chang, J. J. (1993) Hypolipidemic effects of 2-Furoic acid in sprague-dawley rats. *Archiv der Pharmazie* 326:15-23.
- Jeon, S. Y., Jeong, E. J., Baek, J. H., Cha, Y. J. (2011) Analytical method validation of quercetin in Changnyeong onion extract as a functional ingredient for functional health food. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:565-569.
- Korea Food & Drug Administration (KFDA). (2015) Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Korea Food & Drug Administration, Osong, Korea.
- Kim, M. W. (2004) Effects of *benincasa hispida* seed supplementation on glyceogen status and lipid peroxidatin in streptozotecin-induced diabetic rats. *J Nutr Health* 37:865-871.
- Kim, Y. H., Bae, D. B., Park, S. O., Lee, S. J., Cho, O. H., Lee, O. H. (2013) Method validation for the determination of eleutherosides and β -glucan in *Acanthopanax koreanum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:1419-1425.
- Lim, S. J., Jeong, J. G., Kim, M. W., Choi, S. S., Han, H. K., Park, J. E. (2003) Effects of *Benincasa hispida* intake on blood glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 36:335-343.
- Lim, T. K. (2012) Edible medicinal and non-medicinal plants. Vol. 1, pp. 285-292. Modified Stems, Roots, Bulbs.

Springer, Heidelberg, Germany.

- Marin, A., Garcia, E., Garcia, A., Barbas, C. (2002) Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *J Pharml Biomed Anal* 29:701-714.
- Mohammad, N. A., Anwar, F., Mehmood, T., Hamid, A. A., Muhammad, K., Saari, N. (2019) Phenolic compounds, tocochromanols profile and antioxidant properties of winter melon [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] seed oils. *J Food Meas Charact* 13:940-948.
- Ong, E. S. (2004) Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B* 812:23-33.
- Ortu, E., Caboni, P. (2017) Levels of 5-hydroxymethylfurfural, furfural, 2-furoic acid in sapa syrup, Marsala wine and bakery products. *Int J Food Prop* 20:S2543-S2551.
- Park, G. R., Lee, J. A. (2020) Anti-oxidant, anti-inflammatory and Whitening effect of *Benincasa hispida* seed extract. *J Convergr Inf Technol* 10:249-256.
- Sajadi, Z., Abrishami, M. M., Chapman Jr, J. M., Hall, I. H. (1984) Synthesis and evaluation of the antitumor properties of esters of 2-furoic acid and 2-furylacrylic acid. *J Pharm Sci* 73:266-267.
- Swartz, M. (2010) HPLC detectors: a brief review. *J Liq Chrom Relat Technol* 33:1130-1150.
- Vial, J., Jarde, A. (1999) Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Anal Chem* 71:2672-2677.
- You, Y. H., Jun, W. J. (2012) Effects of fractions from *Benincasa hispida* on inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:895-900.
- Zaini, N. A. M., Anwar, F., Hamid, A. A., Saari, N. (2011) Kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.]: A potential source for valuable nutrients and functional foods. *Food Res Int* 44:2368-2376.