

HPLC-UVD를 이용한 수련(*Nymphaea tetragona* Georgi)의 Ellagic Acid 정량 분석

이동영¹ · 정은주² · 전병주³ · 성상현^{1*}

¹서울대학교 약학대학, ²경남과학기술대학교 생명자원과학대학 농학·한약자원학부,
³주엘컴사이언스 생명과학연구소

Quantitative Analysis of Ellagic Acid in *Nymphaea tetragona* Georgi Root by HPLC-UVD

Dong Young Lee¹, Eun Ju Jeong², Byung Ju Jeon³ and Sang Hyun Sung^{1*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, College of Life Sciences and Natural Resources,
Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

³Institute for Life Science, Elcomscience Co. Ltd., Gwanakro-1, Gwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

Abstract – A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitation of ellagic acid in *Nymphaea tetragona* was developed for the quality control of functional cosmetic ingredient, the extract of *N. tetragona*. Separation and quantitation were successfully achieved with a Kromasil C18 column (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm, i.d.) by isocratic elution of a mixture of acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid and water containing 0.03% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 ml/min. The UV detector was used for the detection and the wavelength for quantitation was set at 254 nm. The presence of ellagic acid in the extract was determined by comparison of retention time and spiking with authentic standard. Analytical results showed good linearity ($R^2 = 0.99996$) in relatively wide concentration ranges. The R.S.D. for precision test was less than 3.0%. Recovery of the compound was 98.55~101.72% with R.S.D values less than 4.0%. In conclusion, this method has been successfully applied to the determination of ellagic acid in *N. tetragona*.

Key words – *Nymphaea tetragona*, HPLC-UVD, Ellagic acid, Quantitative analysis

수련(睡蓮, *Nymphaea tetragona* Georgi)은 국내에 널리 자생하고 있는 수련과(Nymphaeaceae)의 다년생 수생초본으로, 잎은 말발굽 모양이고 여름철에 흰 꽃이 피는 것이 특징이다. 전통의학에서는 수련의 꽃을 수련(睡蓮) 혹은 서련(瑞蓮)이라고 하여 해열의 목적으로 사용하였으며, 뿌리와 줄기를 천식 및 폐질환에 사용하였다. 또한 전초는 진정, 지혈, 지사, 항궤양 등의 목적에 사용하였다.¹⁾

수련의 성분에 관한 연구로는 뿌리에서 가수분해형 탄닌(hydrolysable tannin)과 그 구성성분인 geraniin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG), ellagic acid가 분리 보고 되었고²⁻⁴⁾ 생리 활성에 관한 연구로는 geraniin, PGG에 의한 방사선 방호효과(radioprotective)가 보고 되었다.⁴⁻⁶⁾ 또한

수련 뿌리의 70% EtOH 추출물은 피부 노화 방지에 뛰어난 활성을 지닌 것으로 보고 되었다.⁷⁾

피부는 연령이 증가함에 따라 두께가 감소하고, 주름이 증가하며 탄력이 감소한다. 이는 체내의 각종 호르몬의 분비와 피부 세포들의 활성이 저하되어 피부를 구성하는 단백질들의 생합성이 감소하게 되어서 나타나는 현상이다. 특히 피부 내에서 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), elastase 등의 생합성이 증가하여 피부를 구성하는 collagen, hyaluronic acid, elastin 등의 단백질이 분해된다. 또한 자외선에 노출되면 자유 라디칼 및 유해 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)과 같은 산화적 스트레스에 의해 주름이 생기고 피부를 두꺼워지게 하여 피부의 노화를 더욱 가속화 시키게 된다.⁸⁻¹⁰⁾

수련의 추출물은 현재 피부 노화를 지연시키기 위한 기능성 화장품의 원료로 사용되고 있다. 이는 수련 추출물이

*교신저자(E-mail): shsung@snu.ac.kr
(Tel): +82-2-880-7859

MMP-1 억제 활성, elastase 억제 활성, 높은 항산화 효과 등의 기전을 통해 뛰어난 피부 노화 방지 작용을 가지기 때문이다.⁷⁾ 특히 수련의 구성 성분 중 ellagic acid는 피부에 대하여 MMP-1과 염증성 cytokine의 분비를 억제하고 피부 구성 단백질인 collagen의 분해를 억제하여 피부의 노화를 지연시키는 활성이 탁월한 것으로 보고되어 있다.^{11,12)} 따라서 ellagic acid는 수련 추출물의 피부 노화 억제활성의 주요 활성성분으로 추정된다. HPLC를 이용한 ellagic acid의 분석은 기존에 많이 연구 되어 왔으나^{13,14)} 수련에 대한 ellagic acid의 함량 분석 연구는 아직까지 이루어지지 않은 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 수련에서 분리한 ellagic acid를 이용하여 각 부위별 ellagic acid의 함량을 HPLC-UV 분석법을 이용하여 수행하였다.

재료 및 방법

기기 및 재료 - HPLC 기기는 P680 HPLC pump와 UVD 340U detector, ASI-100으로 구성된 Dionex사의 HPLC 시스템(Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. 분석용 컬럼으로는 Kromasil (Bohus, Sweden) C18 column (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm, i.d.)을 사용하였다. 분석에 사용한 용매는 JT Baker사의 HPLC급 용매를 사용하였다. 화합물 분리에 사용한 MPLC는 Grace사의 Reveleris X2 flash chromatography system (Deerfield, IL, USA)를 사용하였고 컬럼은 Reveleris flash cartridge C18 (120 g)을 사용하였다. 또한 preparative HPLC로는 Waters사의 delta prep system (Milford, MA, USA)을 사용하였고 컬럼으로는 Kromasil (Bohus, Sweden) C18 column (10 μ m, 250 mm \times 21.2 mm, i.d.)을 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 Kieselgel 60 RP-18 F254s glass plate를 사용하였다. 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

식물재료 - 수련은 서울대학교 약학대학 시흥 약초원에서 채집하여 사용하였다. 채집한 수련은 각 부위별로 흙을 씻어내고 동결 건조한 후 이를 파쇄하여 실험에 사용하였다. 그 표본은 현재 서울대학교 약학대학 약초원에 보관 중이다.

Ellagic Acid의 분리 - Ellagic acid는 수련의 뿌리 부위를 이용하여 다음의 과정을 통하여 분리하였다. 건조된 수련의 뿌리 500 g을 80% MeOH 4 L씩 3 회 반복하여 초음파 추출하였다. 이를 진공농축기를 이용하여 감압 하에 농축한 결과 추출물 82 g을 얻었다. 이를 증류수 1 L에 녹인 후 분획 깔때기를 이용하여 차례대로 CHCl_3 , n-BuOH를 각각 1 L씩 3 회 반복하여 분획하였다. n-BuOH층을 농축하여 얻은 7.8 g 중 5 g을 RP-MPLC를 이용하여 전개용매를 MeOH-H₂O (1:9) - MeOH-H₂O (4:6)의 용매 기울기로 60 분간 20 ml/min의 유속으로 유출하여 총 9 개의 소분획을 얻었고 이 중 8 번째 소분획을 전개용매로 MeCN과 H₂O (0.1%

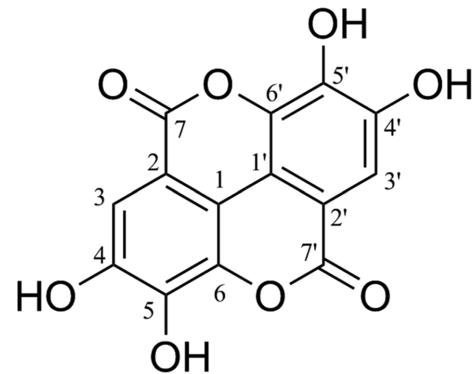


Fig. 1. Structure of ellagic acid isolated from *N. tetragona*.

Table I. ¹H-NMR (CD₃OD/DMSO-*d*₆, 400 MHz) and ¹³C-NMR(CD₃OD/DMSO-*d*₆, 100 MHz) data of ellagic acid isolated from *N. tetragona*

Number	¹ H	¹³ C
1, 1'		113.6
2, 2'		108.8
3, 3'	7.62 (2H, s)	111.6
4, 4'		148.7
5, 5'		140.4
6, 6'		108.8
7, 7'		161.3

formic acid)를 1:3으로 섞은 용매를 사용하여 preparative-HPLC로 정제한 결과 무정형의 분말인 화합물 1 (230 mg)을 수득하였다. 그리고 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrum을 측정하여 문헌치와 비교하여 ellagic acid임을 확인한 후 이를 정량분석을 위한 지표물질로 이용하였다(Fig. 1, Table I).¹⁵⁾

표준액과 검액의 제조 - ellagic acid를 MeOH에 녹여서 400 μ g/ml의 standard stock solution을 제조하였다. 이를 이용하여 200 μ g/ml ~ 12.5 μ g/ml의 농도에 이르는 일곱 농도의 working standard solution을 제조하여 실험에 사용하였다.

동결건조된 수련의 뿌리, 잎, 줄기를 정확히 1.00 g 칭량하여 MeOH 50 ml과 함께 round bottom flask에 넣고 2시간 가량 환류추출 하였다. 이 추출액을 syringe filter (0.20 μ m, Satorius stedim, regenerated cellulose)로 여과한 것을 HPLC 분석용 검액으로 사용하였다.

HPLC 조건 - HPLC 이동상은 A, B 두 용액계를 사용하였다. A 용액은 0.03% phosphoric acid 수용액이었고, B 용액은 0.1%의 trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 MeCN을 사용하였다. 이동상은 25분간 A:B=84:16의 조건으로 25분간 isocratic한 조건으로 용리하였다. 컬럼의 온도는 40°C, 이동상의 흐름속도는 1.00 ml/min이었고, 검출파장은 ellagic acid의 최대 흡광 파장인 254 nm를 사용하였다. Injection volume은 10 μ l로 하였다.

분석 방법의 검증(Validation) – HPLC 분석법의 재현성 및 정확도를 검증하기 위해 ICH (International Conference on Harmonization)의 가이드라인에 기초하여 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection) 및 정량한계(LOQ, limit of quantitation) 측정, 반복실험을 통한 정밀성(precision) 평가, 회수율(recovery) 시험을 통한 정확성(accuracy) 평가를 실시하였다.

결과 및 고찰

분석조건의 확립 – 수련 뿌리에 함유된 ellagic acid의 분석법을 확립하기 위해 다양한 용매 조성 및 과정에 대한 분석 실험을 수행하였다. 이동상의 조건에서는 물의 경우 formic acid 보다 phosphoric acid를 사용하는 것이 더 높은 분리능을 얻을 수 있었으며, 유기 용매의 경우에는 MeOH 보다 MeCN을 사용하는 것이 더 높은 분리능을 얻을 수 있었다. 또한 MeCN에 0.1% TFA를 첨가하여 분리능을 높일 수 있었다. 측정 파장의 경우 ellagic acid의 최대 흡광 파장인 254 nm로 측정하였다(Fig. 2).

직선성, 검출한계 및 정량한계 – 분석된 결과에 따라 y 축을 피크면적, x 축을 ellagic acid 용액의 농도(µg/ml)로 하여 calibration curve를 작성하였다. 작성된 curve를 통하여 지표성분의 R² 값을 확인한 결과 그 값이 0.99996으로 매우 좋은 직선성을 나타내었다. 직선상의 검출한계 및 정량한계는 각각 3.51 ng과 10.62 ng으로 미량의 경우에도 검출 및 정량이 가능함을 확인 하였다(Table II).

정밀성 및 정확성 평가 – 분석법의 정밀성을 평가하기 위해 직선성을 확인한 구간에서 세 농도를 기준으로 intra-day 및 inter-day 실험을 5회 반복 측정하여 정밀성을 평가하였다. 그 결과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)가 각각 intra-day 실험에서 1.19~2.79%, inter-day 실험에서 0.64~0.75%로 모두 3% 이내로 우수한 정밀성을 나타내었다. 또한 정확성을 확인하기 위해 회수율 시험을 세 구간에 서 수행한 결과 회수율이 98.55%~101.16%, RSD 값이

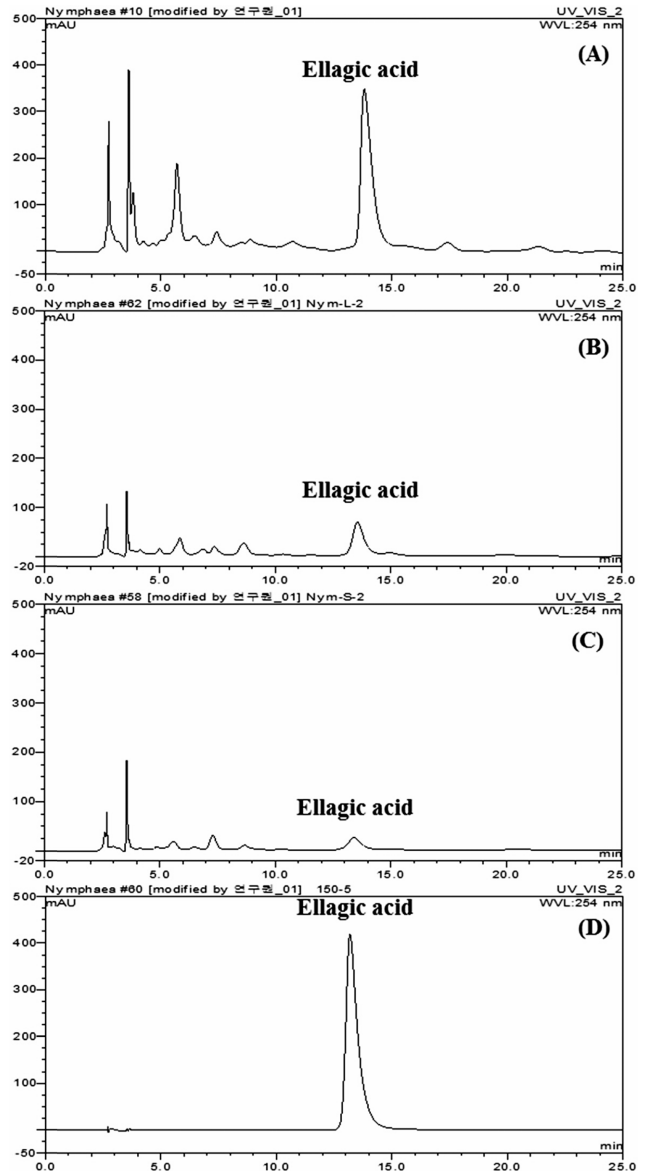


Fig. 2. HPLC chromatograms of MeOH extract from: (A) root, (B) leaves, (C) stems of *N. tetragona* and (D) the standard compound, ellagic acid at 254 nm.

Table II. Calibration curve, linearity, limit of detection(LOD) and limit of quantitaion(LOQ) of ellagic acids by HPLC-UVD

Compound	Linear range (µg/ml)	Regression equation	R2	LOD (ng)	LOQ (ng)
Ellagic acid	12.50 ~ 200.00	y = 1.68x - 0.60	0.99996	3.51	10.62

Table III. Precision and accuracy of analytical results

Compound	Precision				Accuracy			
	Intra-day		Inter-day		Spiked amount (µg)	Measured amount (µg)	Accuracy (%)	RSD (%)
	Spiked conc. (µg/ml)	RSD (%)	Spiked conc. (µg/ml)	RSD (%)				
Ellagic acid	150.00	2.79	200.00	0.75	1.04	1.03	98.55	3.30
	50.00	1.19	100.00	0.64	0.97	0.99	101.72	1.05
	25.00	2.20	75.00	1.23	0.90	0.89	101.16	3.15

1.05%~3.30%의 범위로 나타났다. 이상의 정밀성 및 정확성 시험을 통해 본 분석법이 유의성이 있음을 확인하였다(Table III).

수련의 부위별 Ellagic Acid 함량 분석 - 확립된 분석법을 이용하여 수련의 각 부위 별 ellagic acid의 함량을 분석하였다. 분석 결과 평균적으로 뿌리에는 ellagic acid가 5.94 ± 0.29 mg/g, 잎에는 1.13 ± 0.02 mg/g, 줄기에는 0.52 ± 0.02 mg/g 이 함유되어 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 피부 노화 방지에 효과가 있는 수련으로부터 주요 활성 성분으로 추측되는 ellagic acid의 분석법을 개발하고자 하였다. 수련의 뿌리로부터 ellagic acid를 분리하였고, HPLC-UVD법을 이용하여 수련 추출물 내 ellagic acid의 함량평가를 수행하였다. 확립된 분석법은 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정밀성, 정확성 시험을 통해 충분히 유의성이 있음을 확인하였다. 그리고 위 분석법을 이용하여 수련에 함유된 ellagic acid의 함량을 분석한 결과, 뿌리에는 5.94 mg/g, 잎에는 1.13 mg/g, 줄기에는 0.52 mg/g의 ellagic acid가 함유되어 있는 것으로 나타나 뿌리 부위에 가장 많은 양의 ellagic acid가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서 검증한 ellagic acid의 분석법은 기능성 화장품의 원료로 많이 사용되고 있는 수련의 품질 관리에 효율적으로 사용이 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발및제품화지원사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다(HI11C2164).

인용문헌

1. 문관심 (1999) 약초의 성분과 이용, 258. 일월서각, 서울.
2. Kurihara, H., Kawabata, J. and Hatano, M. (1993) Geraniin, a hydrolyzable tannin from *Nymphaea tetragona* Georgi (Nymphaeace). *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1570-1571.
3. Yoko, N. and Munio, K. (1965) A constituent of the rhizomes of Nymphaeaceae species. *Nippon Kagaku Zasshi* **86**: 313-315.
4. Bing, S. J., Kim, M. J., Park, E., Ahn, G., Kim, D. S., Ko, R. K., Lee, N. H., Shin, T., Park, J. W. and Jee, Y. (2010) 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose protects splenocytes against radiation-induced apoptosis in murine splenocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1122-1127.
5. Bing, S. J., Ha, D., Kim, M. J., Park, E., Ahn, G., Kim, D. S., Ko, R. K., Park, J. W., Lee, N. H. and Jee, Y. (2013) Geraniin down regulates gamma radiation-induced apoptosis by suppressing DNA damage. *Food. Chem. Toxicol.* **57**: 147-153.
6. Kang, K. A., Lee, I. K., Zhang, R., Piao, M. J., Kim, K. C., Kim, S. Y., Shin, T., Kim, B. J., Lee, N. H. and Hyun, J. W. (2011) Radioprotective effect of geraniin via the inhibition of apoptosis triggered by γ-radiation-induced oxidative stress. *Cell Biol. Toxicol.* **27**: 83-94.
7. Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., Yang, H. C., Park, S. H., Ko, K. I., Lee, S. H., Kim, K. H., Lee, N. H., Kim, J. M. and Son, K. H. (2007) Inhibitory effects of natural products of Jeju island on elastase and MMP-1 expression. *J. Cosmet. Sci.* **58**: 19-33.
8. Brenneisen, P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinase : from induction via signaling to initial events. *Ann. N Y Acad. Sci.* **973**: 31-43.
9. Emerit, I. (1992) Free radicals and aging of the skin. *EXE.* **62**: 328-341
10. Puizinia-Ivic, N. (2008) Skin aging. *Acta Dermatoveenerol Alp Panonica Adriat.* **17**: 47-54.
11. Bae, J. Y., Choi, J. S., Kang, S. W., Lee, Y. J., Park, J. and Kang, Y. H. (2010) Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.* **19**: 182-190.
12. Hseu, Y. C., Chou, C. W., Senthil Kumar, K. J., Fu, K. T., Wang, H. M., Hsu, L. S., Kuo, Y. H., Wu, C. R., Chen, S. C. and Yang, H. L. (2012) Ellagic acid protects human keratinocytes (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and NrF-2 antioxidant genes. *Food Chem. Toxicol.* **50**: 1245-1255.
13. Upadhyay, H. C., Verma, R. K. and Srivastava, S. K. (2013) Quantitative determination of bioactive 4-hydroxy-α-tetralone, tetralone-4-O-β-D-glucopyranoside and ellagic acid in *Ammannia baccifera* (Linn.) by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **51**: 21-25.
14. Braunberger, C., Zehl, M., Conrad, J., Fischer S., Adhami, H. R., Beifuss, U. and Krenn, L. (2013) LC-NMR, NMR, and LC-MS identification and LC-DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltata*. *J. Chromatogr. B* **932**: 111-116.
15. Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Chaar, J. S. and Marangoni, S. (2008) Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. *Toxicol.* **52**: 655-666.

(2014. 2. 14 접수; 2014. 3. 11 심사; 2014. 3. 17 게재확정)