

HPLC를 이용한 낙지다리 추출물의 (–)-Epicatechin gallate 분석법 개발

권진관* · 정연우* · 서찬곤* · 홍성수* · 최춘환* · 이지은* · 신현탁** · 정수영** · 김진규†

*(재)경기도경제과학진흥원

**국립수목원

(2019년 2월 27일 접수, 2019년 3월 14일 수정, 2019년 3월 19일 채택)

Analytical Method Development of (–)-Epicatechin gallate in *Penthorum chinense* Pursh Extract using HPLC

Jin Gwan Kwon*, Yeon Woo Jung*, Changon Seo*, Seong Su Hong*, Chun Whan Choi*, Ji Eun Lee*,
Hyun Tak Shin**, Su Young Jung**, and Jin Kyu Kim**†

*Gyeonggido Business and Science Accelerator, Gyeonggi-do, Suwon, Yeongtong-gu, Gwanggyo-ro 147, 16229, Korea

**DMZ Botanic Garden, Korea National Arboretum, Gyeonggi-do, Pocheon-si, Gwangneungsumogwon-ro 415, 11186, Korea

(Received February 27, 2019; Revised March 14, 2019; Accepted March 19, 2019)

요약: 본 연구는 낙지다리(*Penthorum chinense* Pursh) 추출물을 기능성 화장품소재로 개발하기 위해 (–)-epicatechin gallate를 지표성분으로 선정하고, 품질관리를 위해 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 분석법을 개발하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Unison US-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm, Imtakt, USA)을 사용하여 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)와 메탄올을 이동상 조건으로 컬럼 온도는 30 °C 에서 유속은 1.0 mL/min 로 검출파장은 280 nm에서 검출하였다. International Conference on Harmonization (ICH) 가이드라인(version 4, 2005)을 근거로 하여 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계를 분석하여 분석방법을 검증하였다. 검출한계 및 정량한계는 각각 0.11 mg/mL 및 0.33 mg/mL로 나타났으며, 검량곡선은 상관계수값이 0.9999로 양호한 직선성을 보였고, 정밀성 분석결과도 0.6% 이하로 확인하였다. 또한, 회수율은 99.51 ~ 101.92% 범위로 정확성이 있음을 알 수 있다. 따라서, 본 분석법은 낙지다리 추출물의 지표성분의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다.

Abstract: This study attempted to establish a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis method for the determination of (–)-epicatechin gallate as a part of the quality control for the development of functional cosmetic materials from *Penthorum chinense* Pursh. HPLC was performed on a Unison US-C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution of 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and methyl alcohol at a flow rate of 1.0 mL/min at 30 °C. The analyte was detected at 280 nm. The HPLC method was performed in accordance with the International Conference on Harmonization (ICH) guideline (version 4, 2005) of analytical procedures with respect to specificity, precision, accuracy, and linearity. The limits of detection and quantitation were 0.11 and 0.33 mg/mL, respectively. Calibration curves showed good linearity ($r^2 > 0.9999$), and the precision of analysis was satisfied (less than 0.6%). Recoveries of quantified compounds ranged from 99.51 to 101.92%. This result indicates that the established HPLC method is very useful for the determination of marker compound in *P. chinense* Pursh extracts.

Keywords: (–)-epicatechin gallate, Functional cosmetic, HPLC, *Penthorum chinense* Pursh, Validation

† 주 저자 (e-mail: jinkyu90@gsa.or.kr
call: 031)888-6130

1. 서 론

최근 고령화와 생활수준 향상으로 노화억제, 건강유지 및 뷰티산업에 대한 관심이 증가하고 있으며 시장규모 또한 급속도로 확대되고 있다. 국내 화장품 시장은 합성 화합물보다는 천연바이오 소재를 활용한 기능성 화장품이 주목 받고 있으며 그 범위가 미백, 주름개선, 자외선 차단, 탈모, 여드름 완화 및 아토피성 피부의 보습 등으로 세분화 및 확대되었다. 이러한 기능성 화장품 범위 확대, 화장품 소재에 대한 안전성 규제 강화, 동물실험 금지 등 화장품 연구 환경 변화로 인해 다양한 천연물 기반의 생물학적 활성을 갖는 유효 성분들이 기능성 화장품 소재로 연구되는 사례가 증가하고 있다[1].

천연물을 사용한 연구에서 식물은 지질학적 위치와 기후상태, 토양의 특성에 따라 추출물의 구성성분 및 함량에 큰 차이가 있다. 그러므로 신뢰할 수 있는 제품 생산을 위해서는 원료 단계에서부터의 품질관리가 매우 중요하며 원료의 기능성과 안전성을 과학적으로 입증하기 위해 지표성분 설정을 통한 품질관리 방법이 유용하게 사용되고 있다[2,3].

지표성분 분석을 위해서는 분석법을 설정하는 과정이 필요하며, 설정된 분석법의 타당성과 재현성 및 신뢰성이 있는 결과를 얻을 수 있는지에 대한 과학적인 검증으로 분석법의 유효성 검증(method validation)이 필요하다[4].

낙지다리(*Penthorum chinense* Pursh)는 돌나물과(Crassulaceae)로 다년생 초본이며 전국적으로 분포하고 습기가 많은 곳에 자생하고 있으며 과거 전초를 건조한 것을 수택란(水澤蘭) 또는 차근채(搯根菜)라하여 이수제습(利水除濕), 거어지통(祛瘀止痛), 강장제(強壯劑) 등에 사용하였다[5].

분리된 성분으로는 neolignan[6], flavonoid[7], ellagictannin[8,9], flavanone[10] 등이 보고 되어있으며, 효능 평가에서는 항산화 활성에 대한 연구결과가 다수 보고되었으며[9,11] 이러한 항산화 효능은 주름 개선, 미백, 보습뿐 아니라 항염, 항균 등 전반적인 기능성에 관여하고 있으며[12-15], 특히 낙지다리에 함유되어 있는 (-)-epicatechin gallate 같은 flavonoid와 tannin 등 polyphenol계열 화합물들은 항산화[16], 미백[17], 콜라겐 분해 억제[18,19]와 피부 노화 예방[20] 등 효능이 있다는 연구결과가 보고되어 있다.

따라서, 본 연구에서는 낙지다리 추출물을 기능성 화장품으로 개발하기 위해 낙지다리 추출물의 (-)-epicatechin

gallate를 지표성분으로 선정하고 이 성분을 이용한 원료 표준화를 위한 효과적인 분석법을 확립하여 그에 대한 분석법 validation을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 낙지다리는 2017년 7월 강원도 양구에서 채취하여 음건한 건조 시료를 국립수목원으로부터 제공받아 사용하였다. 건조된 시료 100 g을 분쇄하여 50% 에탄올(Samchun Pure Chemical, Korea)을 이용하여 상온에서 24 h 동안 침지하여 2회 추출하였다. 추출물은 여과 및 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말(수율: 18.9%)로 제조한 것을 사용하였다. 추출물은 50% 메탄올(Burdick & Jackson, Korea)에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

2.2. 표준용액 조제

HPLC 분석에 사용한 표준품 (-)-epicatechin gallate (Figure 1)은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 표준용액은 (-)-epicatechin gallate 5.0 mg을 50% 메탄올에 녹여 50 mL의 표준원액을 조제하였다.

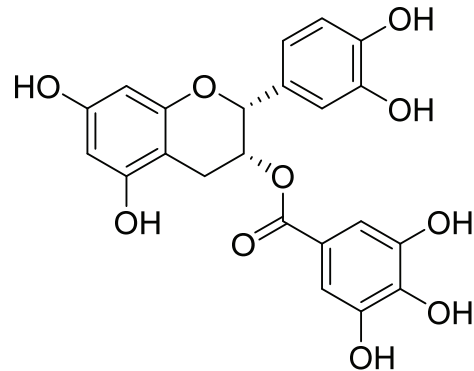


Figure 1. Chemical structure of (-)-epicatechin gallate.

2.3. HPLC 분석

HPLC 1100 (Agilent Technologies, USA) 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Unison US-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm , Intakt, USA)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 (-)-epicatechin gallate 성분이 분리되도록 흘려주었으며 검출파장은 280 nm에서 검출하였다.

Table 1. HPLC Conditions for the Quantitative Analysis of (-)-epicatechin gallate

Items	Conditions			
Instrument	HPLC 1100 series (Agilent Technologies)			
	A: Water (0.05% TFA)			
	B: Methanol			
	Time (min)	% A	% B	
Mobile phase	Gradient	0	80	20
		95	80	20
		96	0	100
		110	0	100
	post time: 10 min			
Column	Unison US-C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm)			
Column temperature	30 °C			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	10 μL			
Detection	UV 280 nm			

2.4. 분석법 검증(method validation)

기능성 화장품 원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 ICH 가이드라인을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S / N = 3.3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S / N = 10)를 분석하여 분석방법을 검증하였다.

2.4.1. 특이성(specificity)

불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼합 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말하는 것으로 확립된 분석법을 통하여 분리된 각각의 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 피크를 검토하여 확인하였으며 Photo diode array (PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는 지도 확인하였다.

2.4.2. 직선성(linearity)

분석대상물질의 농도에 대해 직선적인 측정값을 얻을 수 있는 능력을 말하는 것으로 낙지다리 추출물을 2.4, 4.2, 6, 7.8, 9.6 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 3회 반복 측정하였으며 피크면적과 시료 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R²)값을 이용하

여 직선성을 확인하였다.

2.4.3. 정밀성(precision)

균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 검체를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 말하는 것으로 반복성(repeatability)은 동일시험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장치와 기구 등 동일 조작 조건하에 균일한 검체로부터 얻은 복수의 검체를 짧은 시간차로 반복 분석하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 보기위하여 6회 주입하여 면적과 머무름 시간의 재현성을 확인하였다. 실험실내 정밀성(intermediate precision)은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 동일 실험실내에서 다른 실험일자를 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성으로 상대표준편차(RSD)로 판단하였다. 일내분석(intra-day)는 1일 3구간 진행하였고 일간분석(inter-day)는 1일 1구간으로 3일간으로 나누어 진행하여 변이성을 측정하였다.

2.4.4. 정확성(accuracy)

시료를 3가지 농도(3, 6, 9 mg/mL)로 조제하고 동일한 분석조건으로 6회 반복 주입하여 얻은 결과를 회수율(recovery)로 나타내어 정확성을 확인하였다.

2.4.5. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

시료의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

- 정량한계 (LOQ) = 10 × y 절편의 표준편차/검량성 기울기의 평균값
- 검출한계 (LOD) = 3.3 × y 절편의 표준편차/검량성 기울기의 평균값

3. 결과 및 고찰

3.1. 특이성 검증

불순물, 분해물, 배합성분 등의 공존하는 상태에서 다른 성분의 영향을 받지 않고 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 표준용액과 낙지다리 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 피크가 분리됨을

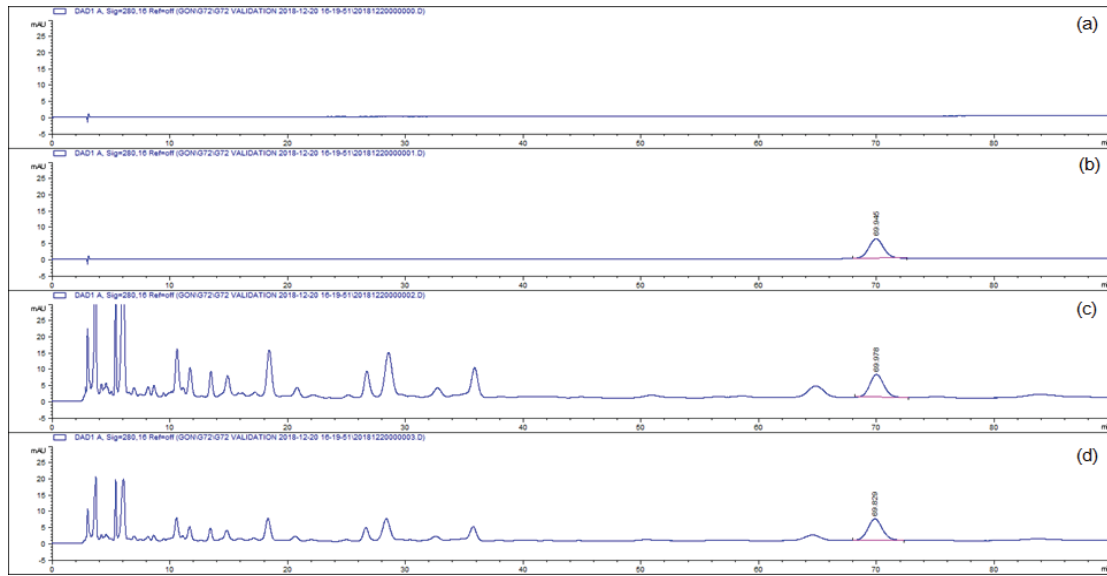


Figure 2. HPLC chromatograms of (-)-epicatechin gallate. (a) blank (50% MeOH), (b) standard solution, (c) *Penthorum chinense* Pursh extract, and (d) recovery test.

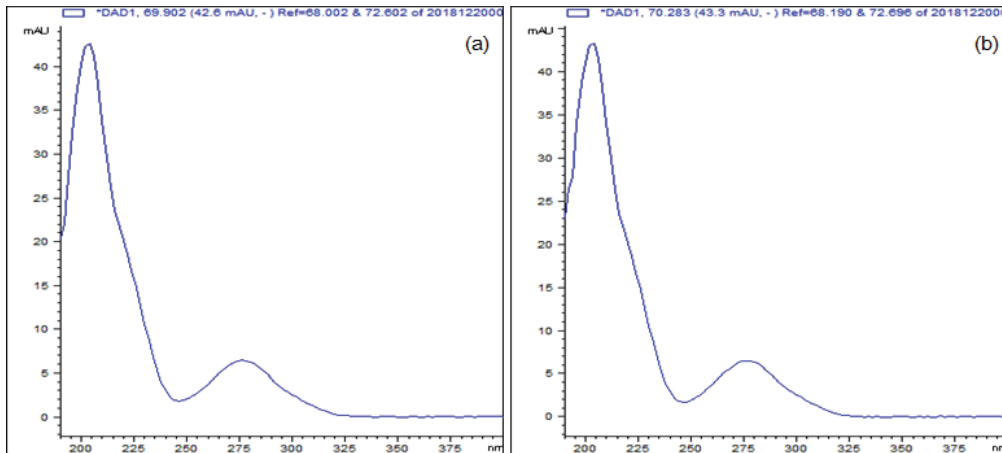


Figure 3. PDA (Photo diode array) spectrum of (-)-epicatechin gallate. (a) standard solution (b) *Penthorum chinense* Pursh extract.

확인한 결과, 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준용액의 피크 유지시간(retention time, RT)과 추출물의 피크 RT가 일치하였다. 또한 blank에서는 표준용액과 겹치는 피크가 없었으며 낙지다리 추출물에 표준용액을 스파이킹하여 시험한 결과 회수율은 100.83%로서 양호한 결과를 얻었다(Figure 2). 또한 표준용액과 낙지다리 추출물의 PDA spectrum 측정에서도 동일한 spectrum을 확인하였다(Figure 3). 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 특이성이 있음을 확인 할 수 있다.

3.2. 직선성 확인

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 크로마토그램에 대한 면적과 낙지다리 추출물의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2)값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 낙지다리 추출물을 2.4, 4.2, 6, 7.8, 9.6 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Figure 4). (-)-Epicatechin gallate의 상관계수(R^2) 값은 0.9999로 양호한 직선성을 나타내었다.

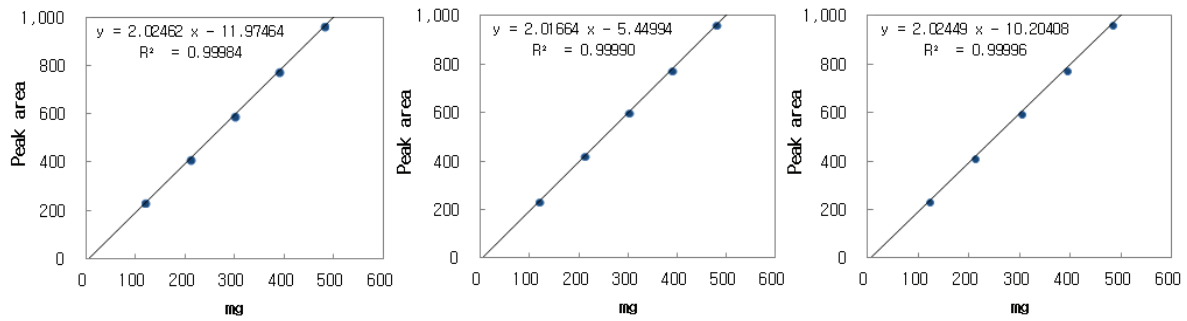


Figure 4. Calibration curves of (-)-epicatechin gallate.

Table 2. Repeatability of (-)-epicatechin gallate Analysis

Parameters		Precision	
		Mean \pm SD	RSD (%)
Concentration (3 mg/mL)	RT (min)	69.997 \pm 0.12	0.17
	Area	295.271 \pm 0.86	0.29
Concentration (6 mg/mL)	RT (min)	69.993 \pm 0.08	0.11
	Area	596.189 \pm 1.05	0.18
Concentration (9 mg/mL)	RT (min)	70.078 \pm 0.14	0.19
	Area	908.055 \pm 5.41	0.60

3.3. 정밀성 확인

3.3.1. 반복성(repeatability)

균질한 검체로부터 다수의 시료를 취해 반복적으로 시험을 실시할 때 각 시험결과의 일치정도를 나타내는 것으로 낙지다리 추출물 3, 6 및 9 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분별 3가지 농도의 피크의 RT 및 피크면적의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 0.11 ~ 0.60%로 나타나 RSD 2% 이하로서 반복성이 있음을 확인하였다(Table 2).

3.3.2. 실험실내 정밀성(intermediate precision)

동일 실험실내에서 다른 실험일을 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 나타내는 것으로 3가지 농도의 intra-day, inter-day의 정밀도를 측정된 결과는 Table 3과 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.17 ~ 0.59%를 나타내었고 inter-day에서는 0.25 ~ 0.45%의 정밀도를 나타내었다.

Table 3. Precision of (-)-epicatechin gallate in *Penthorum chinense* Extract for Validation

	Precision	
	Mean \pm SD	RSD (%)
Intra-day	150.59 \pm 0.43	0.28
	299.42 \pm 0.52	0.17
	453.66 \pm 2.67	0.59
Inter-day	150.11 \pm 0.68	0.45
	302.35 \pm 1.14	0.38
	454.70 \pm 1.14	0.25

Table 4. Accuracy of HPLC Analysis for (-)-epicatechin gallate

Concentration (mg/mL)	Recovery (%)	
	Mean \pm SD	RSD (%)
3	100.06 \pm 0.28	0.28
6	99.81 \pm 0.17	0.17
9	100.81 \pm 0.59	0.59

3.4. 회수율을 이용한 정확성 확인

측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며, 낙지다리 추출물을 가지고 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 회수율은 98.0 ~ 102.0%, RSD는 모두 2.0% 이하로서 정확성을 확인하게 된다.

낙지다리 추출물을 3, 6 및 9 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분 3가지 농도의 회수율은 99.81 ~ 100.81%였으며 RSD는 0.17 ~ 0.59%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다(Table 4).

Table 5. Limit of Detection and Limit of Quantitation of (-)-epicatechin gallate

Instrument	Limit of detection (mg/mL)	Limit of quantitation (mg/mL)
HPLC 1100 series (Agilent Technologies)	0.11	0.33

3.5. 검출한계 및 정량한계 확인

검출한계는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 나타낸다. 낙지다리 추출물의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 각각의 검량선을 작성하여 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 각각의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법 (Standard Deviation of the response and the slope)으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다(Table 5). 직선상의 검출한계(LOD)는 0.11 mg/mL이었으며 정량한계(LOQ)는 0.33 mg/mL로 나타났다.

4. 결 론

본 연구는 HPLC를 이용하여 낙지다리 추출물을 기능성 화장품 원료로 개발하기 위하여 지표성분인 (-)-epicatechin gallate의 분석법 설정과 분석법에 대한 검증을 실시하고자 하였다. 표준용액과 낙지다리 추출물은 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며, 표준용액과 추출물의 피크 유지시간이 일치한 spectrum을 나타내었다. 또한 blank에서 표준용액과 겹치는 피크가 없는 것으로 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9999로 양호한 직선성을 보였으며, 직선상의 검출한계(LOD)는 0.11 mg/mL이었으며 정량한계(LOQ)는 0.33 mg/mL로 나타났다. 낙지다리 추출물을 3, 6 및 9 mg/mL의 세 농도의 회수율은 99.81 ~ 100.81%였으며 RSD는 0.17 ~ 0.59%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다. 정밀성은 0.11 ~ 0.60%의 정밀도(RSD)를, intra-day에서의 정밀도(RSD)는 0.17 ~ 0.59%, inter-day에서는 0.25 ~ 0.45%의 정밀도를 나타내어 낙지다리 추출물의 지표성분 (-)-epicatechin gallate의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 분석법은 낙지다리 추출물의 기능성 화장품 원료 개발을 위한 기초자료로 활용

될 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 논문은 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(2017027A00-1819-BA01)의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

Reference

- H. S. Hwang, Prospects for development of cosmetic industry using natural products in Chungbuk, *International Symposium on Natural Resources Industry & 2018 International Conference of The Plant Resources Society of Korea*, 26, Jecheon-si (2018).
- Z. Fang, C. M. Shen, D. C. Moon, K. H. Son, J. K. Son, and M. H. Woo, Quantitative and pattern recognition analyses for the quality evaluation of magnoliae flos by HPLC, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31**(11), 3371 (2010).
- N. T. Yen, N. V. Thu, B. T. Zhao, J. H. Lee, J. A. Kim, J. K. Son, J. S. Choi, E. R. Woo, M. H. Woo, and B. S. Min, Quantitative determination of compounds from *Akebia quinata* by high-performance liquid chromatography, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **35**(7), 1 (2014).
- Ministry of Food and Drug Safety, The Korean Pharmacopeia, ed. Ministry of Food and Drug Safety, 1366, Shinilbooks, Seoul (2008).
- J. O. Gu, D. J. Lee, Y. I. Gug, and S. U. Cheon, Water and Ruderal Plant Flora of Korea, 101, Resource Association for Research on Plant Protection, Seoul (2010).
- Y. C. He, Y. Zou, C. Peng, J. L. Liu, C. J. He, L. Guo, X. F. Xie, and L. Xiong, Penthorin A and B, two unusual 2,4'-epoxy-8,5'-neolignans from *Penthorum chinense*, *Fitoterapia*, **100**, 7 (2015).
- A. Wang, L. Lin, and Y. Wang, Traditional chinese herbal medicine *Penthorum chinense* Pursh: A phytochemical and pharmacological review, *Am. J.*

- Chin. Med.*, **43**(4), 601 (2015).
8. D. Huang, Y. Jiang, W. Chen, F. Yao, and L. Sun, Polyphenols with anti-proliferative activities from *Penthorum chinense* Pursh, *Molecules*, **19**(8), 11045 (2014).
 9. Q. Lu, M. H. Jiang, J. G. Jiang, R. F. Zhang, and M. W. Zhang, Isolation and identification of compounds from *Penthorum chinense* Pursh with antioxidant and antihepatocarcinoma properties, *J. Agric. Food Chem.*, **60**(44), 11097 (2012).
 10. M. Wang, Y. Jiang, H. L. Liu, X. Q. Chen, X. Wu, and D. Y. Zhang, A new flavanone from the aerial parts of *Penthorum chinense*, *Nat. Prod. Res.*, **28**(2), 70 (2014).
 11. O. L. Aruma, A. Murcia, J. Butler, and B. Halliwell, Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives, *J. Agric. Food Chem.*, **41**(11), 1880 (1993).
 12. J. H. Chung, S. H. Youn, O. S. Kwon, K. H. Cho, J. I. Youn, and H. C. Eun, Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor- β and interferon- γ in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent, *J. Dermatol. Sci.*, **15**(3), 188 (1997).
 13. G. Dannhardt and W. Kiefer, Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects, *Eur J Med Chem.*, **36**(2), 109 (2001).
 14. T. W. Jang, J. S. Choi, H. K. Kim, E. J. Lee, M. W. Han, K. B. Lee, D. W. Kim, and J. H. Park, Whitening activity of *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves according to the ratio of prethanol A in the extracts, *Korean. J. Plant Res.*, **31**(6), 667 (2018).
 15. K. J. Lee, J. R. Lee, M. J. Shin, G. T. Cho, H. S. Lee, K. H. Ma, G. A. Lee, and J. W. Chung, Antioxidant and biological activity in the leaves of Adzuki Bean(*Vigna angularis* L.), *Korean. J. Plant Res.*, **31**(3), 237 (2018).
 16. S. A. Wiseman, D. A. Balentine, and B. Frei, Antioxidants in Tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **37**(8), 705 (1997).
 17. T. Hanamura, E. Uchida, and H. Aoki, Skin-lightening effect of a polyphenol extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit on uv-induced pigmentation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**(12), 3211 (2008).
 18. J. K. Jackson, J. Zhao, W. Wong, and H. M. Burt, The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate, *J Mater Sci Mater Med*, **21**(5), 1435 (2010).
 19. J. Wittenauer, S. Macke, D. Submann, U. S. Weisz, and R. Carle, Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity, *Fitoterapia*, **101**, 179 (2015).
 20. L. Xiang, K. Sun, J. Lu, Y. Weng, A. Taoka, Y. Sakagami, and J. Qi, Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(5), 854 (2011).