

석류 추출물의 항산화 작용

노 보 경[†] · 김 지 영 · 김 주 연*

중앙대학교 병태생리학, *서경대학교 미용예술학과
(2005년 5월 15일 접수, 2005년 6월 16일 채택)

Anti-oxidant Activities of *Punica granatum* Extracts

Bo Kyung Roh[†], Jee Young Kim, and Ju Youn Kim*

The Condition Physiology Classroom, Chungang University, 221, Heukseok 1-dong, Dongjak-gu Seoul 156-756, Korea

*Department of Beauty art school, Seokyeong University

(Received May 15, 2005; Accepted June 16, 2005)

요약: 강한 천연 생리활성물질인 폴리페놀과 탄닌을 다량 함유한 석류를 노화방지제 및 기능성화장품의 화장품 원료로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자, 과즙과 과피 및 종자유로 나누어 분리추출한 후, DPPH radical과 superoxide의 소거작용, 세포내 H₂O₂와 hydroperoxide 및 superoxide 생성 억제작용에 미치는 영향에 관하여 실험하여 항산화 작용을 비교 평가하였다. 석류과 피 메탄올 추출액은 전반적으로 가장 유의성 있는 항산화 작용을 보였다. 자체적인 항산화 작용 뿐만 아니라 세포내에서 free radical이 생성되는 것을 억제하는 작용도 있는 것으로 여겨지며, 석류과즙 농축액은 free radical을 소거하는 항산화 작용이 있으며, 또한 석류 종자유는 강한 hydroperoxide 생성 억제효과를 나타내어, 특히 hydroxy기를 가진 readical의 생성을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료된다. 이상과 같은 결과로 보아, 석류의 과즙보다는 과피의 추출물이 항산화 작용이 더 뛰어난 것을 알 수 있었으므로 피부미용에 관련된 건강보조식품 개발시 과피성분을 함유한 추출물을 원료로 사용하는 것이 효과적이라고 사료되며, 특히 피부 주름 방지제 등과 같은 기능성 화장품을 개발하고자 할 때는 석류 종자유를 화장품 원료로 하여 개발하는 것이 더 효과적이라고 사료된다.

Abstract: Pomegranate (*Punica granatum* L.) which is very rich in polyphenols and tannins was recently reported its anti-oxidant activities and phytoestrogenic activities in vivo test and many clinical studies, but the effects of them on the skin have not been reported. The experiments were carried out in vitro to determine anti-oxidant activities of pomegranate extracts on DPPH radical scavenging assay, NBT/Xanthine Oxidase-superoxide scavenging assay, silica-induced intracellular H₂O₂, hydroperoxide and superoxide generation assay in RAW 264.7 cells. It showed that the methanolic extract of dried pomegranate peels have the most significant anti-oxidant activities on free radical scavenging assay and inhibitory activities on silica-induced intracellular free radical generation in RAW 264.7 cells. The concentrated juice of pomegranate showed only DPPH radical scavenging activities and inhibited hyaluronidase activity. Moreover, pomegranate seed oil inhibited specially silica-induced intracellular hydroperoxide generation in RAW 264.7 cells. These results suggest that the methanolic extract of dried pomegranate peels and pomegranate seed oil have more anti-oxidant activity than concentrated juice of pomegranate. Thus the extracts of pomegranate peels and seed oil could be developed cosmetic ingredients for anti-aging.

Keywords: anti-oxidant activities, phytoestrogenic, pomegranate, anti-aging

1. 서 론

대부분의 여성들이 나이가 들면서 여성호르몬의 기능이 감퇴됨과 동시에 생체리듬이 흐트러지면서 육체 및 정신적 변화와 여러 가지 피부기능의 감퇴로 인하여 피

부 노화, 민감, 위축, 주름 등이 유발되므로 많은 정신적 고민이 축적되고 있어 이를 예방하기 위하여 천연물에서 건강보조식품이나 화장품들을 개발하려는 많은 연구가 진행되고 있다.

피부노화를 지연시키고, 억제하기 위해서는 생체내 뿐만 아니라 피부에서 과잉의 활성산소류 생성을 억제하고, 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 시스템이

† 주 저자 (e-mail: caurrr@hanmail.net)

화장품의 처방에 반드시 포함되어야 한다[1]. 따라서 최근에는 석류와 같이 항산화작용이 있는 생약에서 노화방지제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

석류(Pomegranate)는 등글고 끝에 꽃받침 열편이 있으며 9~10월에 황색 또는 황적색으로 익는 지름 6~8 cm인 종자(種子)로서 식용으로 하고 과피(果皮)와 근피(根皮)는 약용으로 한다[2,3]. 또한 석류는 예로부터 강장제로 알려져 왔으며, 특히 고혈압과 동맥경화 예방에 좋은 효과를 나타낸다고 보고되어 있다. 열매와 줄기껍질과 뿌리의 껍질을 건조하여 사용하면 혼중의 구제 및 장출혈의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 탄닌이 많으므로 수렴성 건위약으로 쓰인다. 설사와 복통의 치료에도 쓰이며, 임상적 보고에 의하면 세균성 이질과 아메바성 이질에 유효하고, 장염·기관지염·다발성종기에도 소염 효과가 탁월하다고 보고되었다[4]. 또한 석류가 강한 항산화작용[5,6]과 항염[7], 항중식[8] 및 항종양[7] 효과를 보인다고 보고하고 있다.

따라서 천연물을 이용한 피부미용에 관련된 건강보조식품과 기능성 화장품을 개발하고자 석류(*Punica granatum* L.)에서 추출한 주스, 과피 및 종자유 추출물의 항산화 및 항노화 효과에 대하여 실험하였다. 석류의 항산화 및 항노화 효과는 free radical 자체의 소거능을 알아보기 위해 DPPH radical과 superoxide의 소거작용 측정, 세포내 free radical 생성 억제작용을 알아보기 위해 silica로 자극시킨 세포내에서의 H₂O₂와 hydroperoxide 및 superoxide 생성 억제작용 측정 등을 실험하여 석류가 항산화 작용이 있음을 알 수 있어 이를 보고하는 바이다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 재료 및 시약

석류(Pomegranate, *Punica granatum* L.)는 주식회사 기아무역에서 판매하는 이란산 석류(12.5 kg)를 구입하였으며, 그 과피(1.71 kg)는 건조 후 무수메탄올로 추출하여 메탄올 추출액(897 g)을 제조하였고 과즙(4000 mL; 4.2416 kg)은 감압농축하여 과즙 농축액(740 g; 수분함량 79.55% (w/w)%)을 제조하였으며 종자(349 g)는 냉압착법(cold-pressing)을 이용하여 종자유(35.6 g)를 얻었다. 대조약물로 사용된 L-ascorbic acid, allopurinol 및 protease inhibitor cocktail은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다. 기타 시약들도 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다.

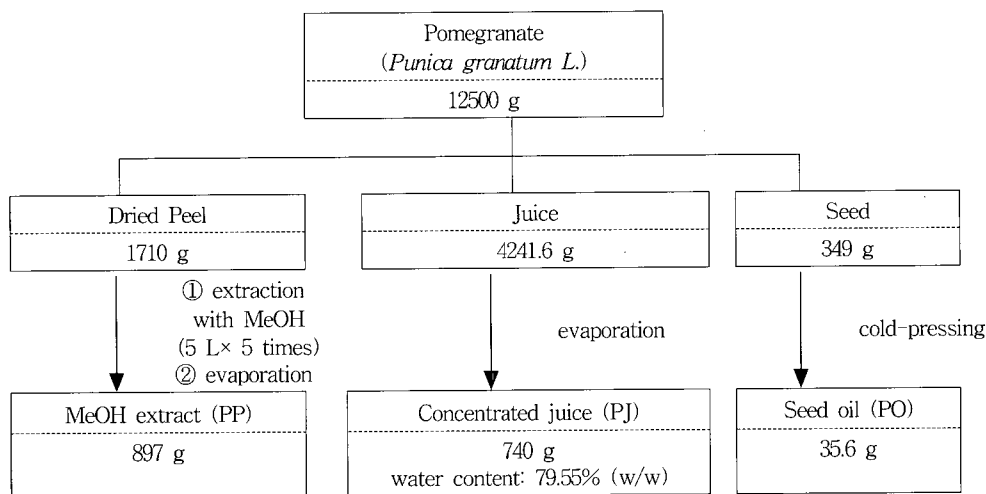
2.1.2. 세포배양

RAW 264.7 (macrophage) 세포는 서울대학교 세포주은행으로부터 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin/streptomycin (100 IU/50 µg/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지 중에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. DPPH 라디칼 소거작용 측정

DPPH 라디칼은 매우 안정한 자유 라디칼(free radical)이다. 이 라디칼을 소거하는 정도로서 항산화 작용을 평가하였다.



Scheme 1. The producing process of extracts of pomegranate.

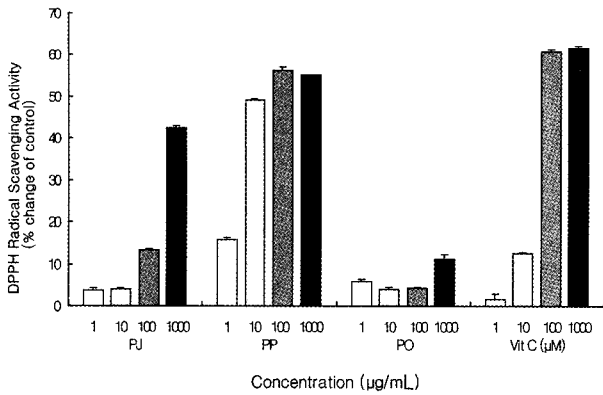


Figure 1. Anti-oxidant activities of pomegranate extracts in the DPPH.

Radical scavenging activity assay.

PJ : Concentrated juice of pomegranate

PP : Methanol extract of pomegranate

PO : Seed oil of pomegranate

Vit C : L-Ascorbic acid

Results are means ± SD from 6 separate experiments.

Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01

2.2.2. 세포내 H₂O₂ 생성 측정

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)가 RAW 264.7 세포내로 들어가서 세포내 생성된 산소라디칼(ROS)에 의해 산화되어 deacetylation되면서 생성되는 DCF가 형광을 내는 물질로 전환되는 반응을 이용하여 형광도를 측정하였다.

2.2.3. 세포내 Hydroperoxide 생성 측정

Dihydrorhodamine (DHR)이 RAW 264.7 세포내로 들어가서 세포내 생성된 hydroperoxide에 의해 산화되어 형광을 나타내는 물질인 rhodamine 123으로 전환되는 반응을 이용하여 형광도를 측정하였다.

2.2.4. NBT/XO (Superoxide 소거작용) 측정

Hypoxanthine을 분해하여 uric acid와 superoxide를 생성시키는 xanthine oxidase의 작용을 nitroblue tetrazolium (NBT)를 이용하여 측정하였다. 이때 생성되는 superoxide를 소거하는 작용으로서 항산화 작용을 평가하였다.

2.2.5. 세포내 Superoxide 생성 측정

세포 내에서 생성되는 superoxide를 측정하기 위해 superoxide에 의해 ethidium이 되면 형광을 내는 물질로 전환되는 dihydroethidium (DHE)를 이용하였다.

2.3. 통계처리

실험 결과는 4번의 실험으로부터 평균치를 얻어 Mean ± S.E.로 표기하였으며, 통계처리는 Student's unpaired t-

test에 의하여 one-and two-way analysis of variance를 이용하여 분석하였고, p < 0.05일 때 유의성이 있는 차이가 있다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거작용

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 석류 추출물의 항산화 작용을 측정한 결과, 석류과피 메탄올 추출액은 1, 10, 100 µg/mL의 농도에서 농도에 비례하는 항산화 작용을 보였고, 석류과즙 농축액은 10, 100, 1000 µg/mL 농도에서 농도에 비례하는 항산화 작용을 보였다. 그러나 석류 종자유에서는 농도에 비례하는 억제작용이 없었다 (Figure 1).

석류 추출물의 동일 농도에서 효능을 비교할 때, 석류과피 메탄올 추출액이 가장 강한 DPPH radical 소거작용을 나타내었다. 1 µg/mL 농도에서의 석류과피 메탄올의 DPPH radical 소거작용은 15.76 ± 0.55% (p < 0.01)로서 대조약물인 L-ascorbic acid와 µg/mL 농도와 µM 농도에서 비교할 때 1 µM 농도에서의 L-ascorbic acid의 DPPH radical 소거작용(1.66 ± 1.19%, p < 0.05)보다 9.5배 정도 강하였다. 또한 1 µg/mL 농도에서의 석류과즙 농축액의 DPPH radical 소거작용은(3.85 ± 0.52%, p < 0.05)은 1 µM 농도에서의 L-ascorbic acid의 DPPH radical 소거작용(1.66 ± 1.19%, p < 0.05)보다 2.3배 정도 강하였다. 그러나 다른 석류 추출물의 항산화 작용에 비하여 석류 종자유의 항산화 작용은 미약하였다.

이상과 같이 석류 추출물의 DPPH free radical 소거작용을 이용하여 알아본 항산화작용은 일반적으로 각 부위별 추출물에서 유의성 있는 효과를 보였으며, 특히 free radical 소거능을 나타내는 석류의 항산화 효능물질은 석류과피에 함유되어 있음을 보여주고 있다(Figure 1).

3.2. 세포내 H₂O₂ 생성 억제작용

1 mg/mL의 농도로 처치한 silica는 RAW 264.7 macrophage 세포에서 H₂O₂ 생성을 2.4배 정도 증가시켰다.

Silica를 처치한 대조군과 비교하여 보았을 때, 석류과피 메탄올 추출액이 100 µg/mL의 농도에서 유의성 있는 억제작용을 보였다(40.49 ± 11.66%, p < 0.05) (Figure 2). 또한 대조약물인 L-ascorbic acid은 100 µM의 농도에서 41.54 ± 6.23% (p < 0.05)의 유의성 있는 억제 작용을 나타내었다. 이때 100 µg/mL 농도에서의 석류과피 메탄올의 세포내 H₂O₂ 생성 억제작용을 대조약물인 L-ascorbic acid와 µg/mL 농도와 µM 농도에서 비교할 때 100 µM 농도에서의 L-ascorbic acid의 세포내 H₂O₂ 생성 억제작용과 유사한 효과를 나타내었다.

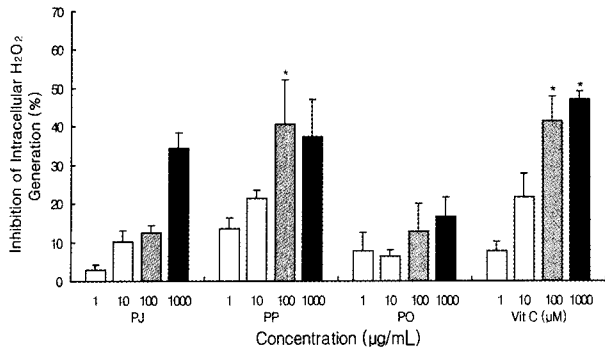


Figure 2. Inhibitory activities of pomegranate extracts on silica-induced intracellular H_2O_2 generation in RAW 264.7 cells.

PJ : Concentrated juice of pomegranate

PP : Methanol extract of pomegranate

PO : Seed oil of pomegranate

Vit C : L-Ascorbic acid

Results are means \pm SD from 6 separate experiments.

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

그러나 석류과즙 농축액과 석류 종자유는 유의성 있는 억제작용을 보이지 않았다.

이상과 같이 석류 추출물은 일반적으로 silica에 의해 유도된 세포내 H_2O_2 생성 억제작용에 별다른 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있다(Figure 2).

3.3. 세포내 Hydroperoxide 생성 억제작용

1 mg/mL의 농도로 처리한 silica는 RAW 264.7 macrophage 세포에서 hpdperoxide 생성을 3.3배 정도 증가시켰다.

Silica를 처리한 대조군과 비교하여 보았을 때, 석류 종자유가 1 μ g/mL의 농도에서 유의성 있는 농도의존적 억제작용을 보였으며($19.23 \pm 1.58\%$, $p < 0.01$), 이때 석류 종자유 세포 내 hydroperoxide 생성 억제작용은 대조약물인 L-ascorbic acid와 μ g/mL 농도와 μ M 농도를 비교할 때 1 μ M 농도에서의 L-ascorbic acid의 세포 내 hydroperoxide 생성 억제작용($5.76 \pm 0.87\%$)보다 1.5배 정도 강하였다.

또한 석류과피 메탄올 추출액은 10 μ g/mL의 농도에서 유의성 있는 농도의존적 억제작용을 보였으며($10.76 \pm 1.04\%$, $p < 0.01$), 이때 석류 종자유 세포 내 hydroperoxide 생성 억제작용은 대조약물인 L-ascorbic acid와 μ g/mL 농도와 μ M 농도에서 비교할 때 10 μ M 농도에서의 L-ascorbic acid의 세포 내 hydroperoxide 생성 억제작용($16.76 \pm 2.15\%$, $p < 0.01$)보다는 미약하였다. 그러나 석류과즙 농축액은 유의성 있는 억제작용을 나타내지 않았다.

이상과 같이 석류 추출물 중 석류 종자유와 석류과피 메탄올 추출액은 일반적으로 silica에 의해 유도된 세포

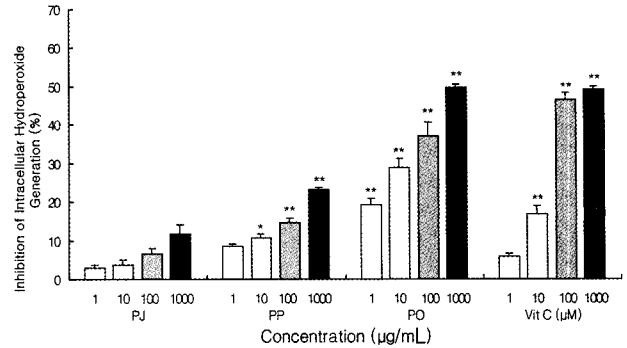


Figure 3. Inhibitory activities of pomegranate extracts on silica-induced intracellular hydroperoxide generation in RAW 264.7 cells.

PJ : Concentrated juice of pomegranate

PP : Methanol extract of pomegranate

PO : Seed oil of pomegranate

Vit C : L-Ascorbic acid

Results are means \pm SD from 6 separate experiments.

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

내 hydroperoxide의 생성을 농도의존적으로 유의하게 억제하였고 석류 추출물의 동일 농도에서 효능을 비교할 때 특히 석류 종자유에서 강한 억제작용을 나타낸 것으로 보아, 세포 내 hydroperoxide의 생성을 억제하는 석류의 항산화 효능물질은 석류 종자유와 석류과피 메탄올 추출액에 함유된 물질임을 알 수 있다(Figure 3).

3.4. Xanthine Oxidase 활성 억제작용

Xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide의 소거반응을 이용하여 석류 추출물의 항산화 작용을 측정된 결과, 석류과피 메탄올 추출물과 석류과즙 농축액은 유의성 있는 항산화 작용을 나타내었다(Figure 4).

석류 추출물의 동일 농도에서 효능을 비교할 때, 석류과피 메탄올 추출액이 가장 강한 superoxide 소거작용을 보였다. 석류과피 메탄올 추출액은 10 μ g/mL의 농도에서 양성 대조군에 비해 16.65%의 유의성 있는 superoxide 소거작용을 보였으며($p < 0.01$), 그 소거작용은 농도의존적으로 나타났다. 또한 석류과즙 농축액은 1000 μ g/mL의 농도에서 양성 대조군에 비해 18.89%의 유의성 있는 superoxide 소거작용을 보였으며($p < 0.01$). 이들의 소거작용을 대조약물인 allopurinol과 μ g/mL 농도와 μ M 농도에서 비교할 때 10 μ M 농도와 1000 μ M 농도에서의 allopurinol의 superoxide 소거작용보다는 미약하였다(각각 59.09%와 97.23, $p < 0.01$).

그러나 석류 종자유에서는 유의성 있는 억제작용을 나타내지 않았다.

이상과 같이 석류 추출물의 superoxide의 소거반응을 이용하여 알아본 항산화작용은 일반적으로 석류과피 메

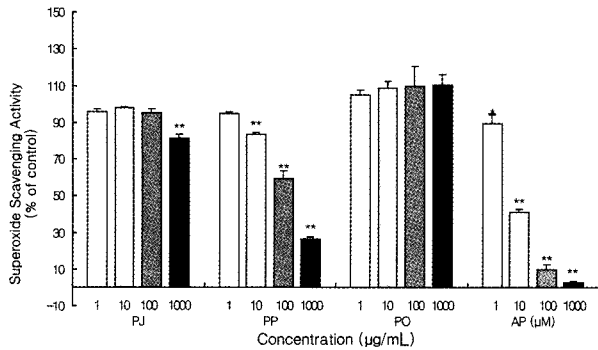


Figure 4. Anti-oxidant activities of pomegranate extracts in NBT/Xanthine oxidase assay.

PJ : Concentrated juice of pomegranate
 PP : Methanol extract of pomegranate
 PO : Seed oil of pomegranate
 AP : Allopurinol
 Results are means ± SD from 6 separate experiments.
 Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01

탄을 추출액이 유의성 있는 농도의존적 효과를 보였으며, 특히 superoxide의 소거반응 나타내는 석류의 항산화 효능물질은 석류과피의 메탄올 가용성분임을 보여주고 있다(Figure 4).

3.5. 세포내 Superoxide 생성 억제작용

1 mg/mL의 농도로 처리한 silica는 RAW 264.7 macrophage 세포에서 superoxide 생성을 1.9배 정도 증가시켰다.

석류 추출물의 동일 농도에서 효능 비교시, 석류과피 메탄올 추출액이 가장 강한 세포내 superoxide 생성 억제작용을 보였다. Silica를 처리한 대조군과 비교하여 보았을 때, 석류과피 메탄올 추출액은 10 µg/mL의 농도에서 유의성 있는 농도의존적 억제작용을 보였으며(31.68 ± 7.41%, p < 0.05), 그 억제작용을 대조약물인 L-ascorbic acid와 µg/mL 농도와 µM 농도에서 비교할 때, 10 µM 농도에서의 L-ascorbic acid의 세포내 hydroperoxide 생성 억제작용(27.30 ± 3.45%, p < 0.05)보다 1.2배 정도 강하였다.

또한 석류과즙 농축액은 1000 µg/mL에서 유의성 있는 억제작용을 보였으며(33.71 ± 8.75%, p < 0.05), 그 억제작용을 대조약물인 L-ascorbic acid와 µg/mL 농도와 µM 농도에서 비교할 때, 1000 µM 농도에서의 L-ascorbic acid의 세포 내 hydroperoxide 생성 억제작용(47.18 ± 2.68%, p < 0.01)보다는 미약하였다.

석류 종자유는 10 µg/mL의 농도에서 유의성 있는 억제효과를 나타내었지만(24.93 ± 4.86%, p < 0.05), 다른 농도에서는 억제효과를 보이기는 하였으나 유의성을 나타내지는 않았다.

이상과 같이 silica에 의한 세포 내 superoxide의 생성 억제작용을 이용하여 알아본 항산화작용은 일반적으로 석

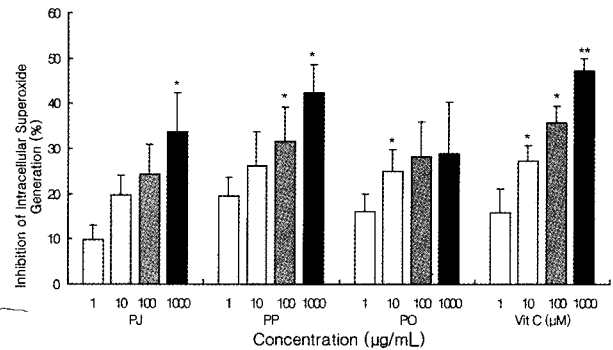


Figure 5. Inhibitory activities of pomegranate extracts on silica-induced intracellular superoxide anion generation in RAW 264.7 cells.

PJ : Concentrated juice of pomegranate
 PP : Methanol extract of pomegranate
 PO : Seed oil of pomegranate
 Vit C : L-Ascorbic acid
 Results are means ± SD from 6 separate experiments.
 Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01

류과피 메탄올 추출물이 일반적으로 유의성 있는 효과를 보였으며, 특히 세포내 superoxide의 생성 억제작용을 나타내는 석류의 항산화 효능물질은 석류과피에 함유되어 있음을 보여주고 있다(Figure 5).

4. 결 론

석류(Pomegranate, *Punica granatum* L.)는 생리활성이 강한 천연성분인 폴리페놀과 탄닌을 많이 함유하고 있어 예로부터 민간요법 및 전통요법의 치료제로 사용되어 왔으며, 최근에는 항산화 및 항암 작용에 관한 연구가 활발히 진행 중이다. 따라서 본 연구에서는 석류를 과즙의 농축액, 과피의 메탄올 추출액, 종자유로 각각 나누어, DPPH radical과 superoxide의 소거작용 측정, 세포내 H₂O₂와 hydroperoxide 및 superoxide 생성 억제작용 측정 등을 실험하여 항산화 작용을 비교 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 석류과피 메탄올 추출액은 전반적으로 가장 유의성 있는 항산화작용을 보였다. DPPH radical 소거작용과 xanthine oxidase에 의한 superoxide 소거작용 뿐만 아니라 silica에 의해 생성된 세포내 H₂O₂와 hydroperoxide 및 superoxide의 생성을 유의하게 억제하는 작용으로 미루어 보아, free radical을 소거하는 항산화 작용뿐만 아니라 세포 내에서 free radical이 생성되는 것을 억제하는 작용도 있는 것으로 여겨진다.

2) 석류과즙 농축액은 유의성 있는 DPPH radical 소거작용과 xanthine oxidase에 의한 superoxide 소거작용을 보였으나 silica에 의한 세포 내에서의 H₂O₂와 superoxide

생성 억제작용은 나타나지 않은 것으로 보아, free radical을 소거하는 항산화 작용은 있으나 세포 내에서 free radical의 생성을 억제하는 작용은 미약한 것으로 사료된다.

3) 석류 종자유는 DPPH radical 소거작용이 있고, silica에 의해 세포내 생성되는 라디칼 중 hydroperoxide의 생성을 강하게 억제하는 효과를 보인 점으로 미루어 보아 유리 라디칼 중 특히 hydroxy기를 가진 readical의 생성을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

따라서 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 석류는 과피의 추출물이 과즙보다 항산화작용이 더 강한 것으로 보아, 약효성분은 과피에 존재하며 메탄올 가용성분일 것으로 사료된다. 특히 피부 주름 방지제 등과 같은 기능성 화장품 개발하고자 할 때는 석류 종자유를 화장품 원료로 하여 개발하는 것이 더 효과적이라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 박수남, Skin aging and reactive oxygen species, 논문집, 서울산업대학교 (1992).
2. 박미라, 석류가 갱년기 장애를 유도한 흰 쥐의 혈중 지질 및 결합조직의 collagen 함량에 미치는 영향, 신라대학교 대학원 (2002).
3. 심선미, 석류 추출성분의 항발암 활성 및 Phytoestrogen 효과, 신라대학교 대학원 (2001).
4. 최원균, 이란산 흑석류 농축액과 그 제품의 성분 및 함유된 Phyto 에스트로겐효과, *한국식품영양학회지*, **2**, 119 (2002).
5. M. I. Gil, F. A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pearce, D. M. Holcroft, and A. A. Kedar Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.*, **10**, 4581 (2000).
6. S. Y. Schubert, I. Neeman, and N. Resnick. A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants, *FASEB J.*, **16**, 1931 (2002).
7. F. Afaq, M. Saleem, C. Krueger, J. Reed, and H. Mukhtar, Anthocyanins and hydrolyzways tannins in pomegranate skin fruit extract modulates MAPKs and NF-kB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice, *Int. J. Cancer (In Press)* (2004)
8. S. Kawai and E. P. Lansky. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells, *J. Med. Food*, **7**, 13 (2004).