

석류 phytoestrogen 성분의 추출특성 분석

김성호¹ · 김인호² · 강복희² · 차태양² · 이진형 · 김종명 · 임순옥 ·
송경식³ · 송방호⁴ · 김종국 · 이진만^{1,*}

경북대학교 미생물학과, ¹경북과학대학 약용식품과/바이오건강산업연구소,
²경북과학대학/바이오건강산업연구소, ³경북대학교 농업생명과학대학, ⁴경북대학교 생물교육과

Analysis of Extraction Characteristics of Phytoestrogen Components from *Punica granatum* L.

Seong Ho Kim¹, In Ho Kim², Bok Hee Kang², Tae Yang Cha², Jin Hyung Lee, Soon-Ok Rim, Kyung-Sik Song³, Bang-Ho Song⁴, Jong-Guk Kim and Jin Man Lee^{1,*}

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Department of Herb & Food Science, Kyungpook College of Science, Chilgok 718-851, Korea

²Department of Bio-Health Industrial Institute, Kyungpook College of Science, Chilgok 718-851, Korea

³College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁴Department of Biology Education, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 6, 2005; Accepted September 13, 2005

The optimization of extraction conditions of phytoestrogen from pomegranate by hot water was conducted by analyzing the extraction characteristics. The purpose of this study was effective utilization of bioactive components of pomegranate, and the analyzing was performed with response surface methodology (RSM). This study established 10 sections based on the central composite design with the independent variables of extraction temperature (60, 70, 80, 90, 100°C) and extraction time (1, 2, 3, 4, 5 hr) to predict the optimal conditions for extraction of the effective components. The dependent variables were measured for extracted materials, those were, the major components such as chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol and 17- β -estradiol content, and regression analysis was performed by SAS program, and optimal conditions for each characteristics were predicted, and the characteristics of extraction were analyzed by response surface methodology. It was found that chlorogenic acid, kaempferol, and 17- α -estradiol content were greatly affected by extraction temperature. However, 17- β -estradiol content was affected significantly by extraction time. Regression formulas for each variable were elicited from this study, and the chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol and 17- β -estradiol content depending on response surface methodology factor were superimposed. It was shown that optimal temperature and extraction time were 98~100°C and 3~5 hrs, respectively.

Key words: pomegranate, phytoestrogen, extraction condition, RSM

서 론

석류(*Punica granatum* L.)는 석류과에 속한 낙엽소목으로서 예로부터 열매와 줄기껍질과 뿌리의 껍질을 건조하여 한약재로 많이 쓰여 왔으며, 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다. 현재는 아열대 및 열대 각지에 널리 퍼져 있는 식물로써 일찍이 강장제로 알려져 왔으며, 특히 고혈압과 동맥경화 예방에 효과를 나타낸다. 또한 춘충의 구제, 설사, 이

질, 구내염, 장출혈에 효과가 있는 것으로 알려져 왔으며, 동의 치료에서는 탄닌이 많아 수렴성 건위약으로 쓰여왔다^{1,2)}.

석류의 약효에 있어서 주요한 유효성분은 alkaloid인 isopelletierine이며, 그 외 tannin인 punicalin, punicalagin 등과 inuline, mannitol, sorbitol, malic acid 등이 알려져 있으며 이러한 함량은 나무 품종 및 그 부위에 따라 각각의 양이 다르다^{3,4)}.

국내에서 생산되는 석류는 생산량도 많지 않고 당도가 낮아 과일 그대로 또는 일부 차나 음료 등에 사용되고 있고 대부분 국내의 석류기호제품들은 일본이나 미국 및 이란에서 수입한 원료를 주로 사용하고 있다. 국내에서 석류에 대한 연구는 석류씨 중의 punicic acid, estrogen, estradiol, β -sitosterol의 생리

*Corresponding author
Phone: 82-54-972-9543; Fax: 82-54-979-9220
E-mail: jmlee@kbcs.ac.kr

활성 및 섭취효과에 대한 연구⁵⁾와 미생물의 생육억제 효과⁶⁾ 그리고 석류추출물의 항산화 및 항균활성⁷⁾에 대한 보고와 최 등⁸⁾의 phyto 에스트로겐류에 관한 연구 등이 있다. 국외에서의 석류에 대한 연구는 일본, 이스라엘 및 이집트 등지에서 석류의 성분에 대한 연구가 계속 진행되고 있다^{9,10)}.

석류에 함유된 천연 에스트로젠은 섭취 후 체내에서 적합한 여성 호르몬으로 전환되며, 석류 씨앗 1 kg 속에 17 mg 정도의 식물성 estrogen이 함유되었다는 연구결과가 보고된 이래 최근 영국, 스웨덴, 일본 등의 중년 여성들에게 석류가 아주 귀중한 생명의 과실로 인정받고 있다. 우리나라에서도 estrogen이 많이 함유된 석류요법으로 여성호르몬을 복용하고자 하는 수요가 점차 늘고 있다. 따라서 석류의 천연 estrogen 대응 제재 및 건강 기능 식품으로서의 활용을 위한 기초 연구로 석류의 주요성분을 효율적으로 추출하고자 반응표면 분석에 의해 각 성분의 추출특성을 분석하고 최적 추출조건을 확립하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용된 석류(*Punica granatum* L.)는 2002년 9월부터 11월 초순까지 대구 및 경북일대의 농가에서 수확된 것을 직접 구매하여 석류를 부위별[과육(씨앗), 과피]로 분리하여 40°C에서 열풍건조 후 분쇄한 것을 실험에 사용하였다.

일반성분 분석. 석류의 일반성분으로서 수분과 회분 함량은 AOAC¹³⁾법에 준하여 105°C 상압건조법과 직접회화법을 각각 사용하여 측정하였다. 조단백질은 자동질소분해증류장치(Kjeldahl automatic distillation unit, J. P. Selecta. s. a. Co. Spain)에 의해, 조지방은 용매자동회수지방추출장치(Del-gras, J. P. Selecta. s. a. Co. Spain)를 사용하여 측정하였다.

추출조건 최적화를 위한 실험설계. 추출조건의 최적화를 위한 실험설계는 중심합성계획법¹⁴⁾에 의하여 실시하였고, 반응표면 회귀분석을 위하여 SAS(statistical analysis system) program¹⁵⁾을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수(Xn)는 추출온도(60~100°C, X₁) 및 추출시간(1~5 hr, X₂)이며, 실험설계는 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부호화하여 실험값을 Table 1에 나타내었다. 석류의 유효성분에 관련된 종속변수(Yn)로는 chlorogenic acid

Table 1. Level of extraction conditions

Extraction condition	-2	-1	0	1	2
X1 Temp. (°C)	60	70	80	90	100
X2 Time (hr)	1	2	3	4	5

(Y₁), kaempferol(Y₂), 17-α-estradiol(Y₃) 및 17-β-estradiol(Y₄)로 각각 나타내었다. 이때 두 가지의 추출조건에 따른 2차 회귀모형식은 식 (1)과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} \quad (1)$$

여기서 Y는 석류 추출물의 각 유효성분 함량, X₁ 및 X₂는 추출조건, b₀, b₁, b₂, b₁₂, b₁₁, b₂₂는 회귀계수이다.

원료의 처리 및 추출방법. 건조된 석류 전체부위를 추출원료로 사용하였으며, 추출방법은 열수추출로 건조 석류 10 g을 기준으로 20배의 물을 가해 각 조건에 따라 추출하였다.

유효성분함량 분석. 석류의 주요성분으로서 chlorogenic acid, kaempferol, 17-α-estradiol 및 17-β-estradiol의 분석은 각각 추출물 20 ml를 취하여 methanol 100 ml로 80°C에서 2시간 환류 냉각추출하고 여과 후 감압농축하여 methanol로 재용해시켜 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 Table 2의 조건에 따라 HPLC를 이용하여 분석하였다^{16,17)}. Chlorogenic acid, kaempferol, 17-α-estradiol 및 17-β-estradiol(Sigma, USA)의 동정은 표준품의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 값을 환산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

일반성분. 본 실험에 사용된 석류의 일반성분은 Table 3과 같이 수분 76.60%, 조단백질 0.82%, 조지방 0.54%, 조회분 0.74% 그리고 탄수화물 함량이 21.30%로 나타났다.

추출조건에 따른 주요성분 변화 특성 분석. 중심합성계획법에 의한 10구간의 추출조건에서 추출실험을 실시하고, 이때 얻어진 추출물에 대하여 chlorogenic acid, kaempferol, 17-α-estradiol 및 17-β-estradiol 함량 변화는 Table 4에 나타내었다. 주요성분 함량은 각각 58.72~64.78 mg%, 0.037~0.051 mg%, 0.0312~0.0417 mg% 및 0.0238~0.0300 mg%였다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고, 종속변수 즉, 각 주요성분에 대한 회귀식을 얻었다. 또한 이들의 contour map 및 3차원 반응표면은 추출온도 및 추출시간을 독립변수로 하여 Fig. 1, 2, 3 및 4에 각각 나타내었다.

Chlorogenic acid 함량 변화. 각 조건의 추출물에서

Table 3. Proximate compositions of pomegranate (unit: %)

Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash	Carbohydrate
76.60	0.82	0.54	0.74	21.30

Table 2. Operating conditions of HPLC for the analysis of chlorogenic acid, kaempferol, 17-α-estradiol and 17-β-estradiol

Items	Conditions		
	Chlorogenic acid	Kaempferol	17-α-estradiol 17-β-estradiol
Column	Spherisorb ODS (4.6 mm×250 mm)	XTerra RP18 (30 mm×250 mm)	Spherisorb ODS (4.6 mm×250 mm)
Column temp.	35°C	35°C	40°C
Mobile phase	Acetonitrile : water (1% H ₃ PO ₄) = 15 : 85	Acetonitrile : water (0.5% H ₃ PO ₄) = 50 : 50	Acetonitrile : water = 60 : 40 (pH 3 in acetic acid)
Flow rate	0.6 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Detector	UV 220 nm	UV 254 nm	UV 254 nm

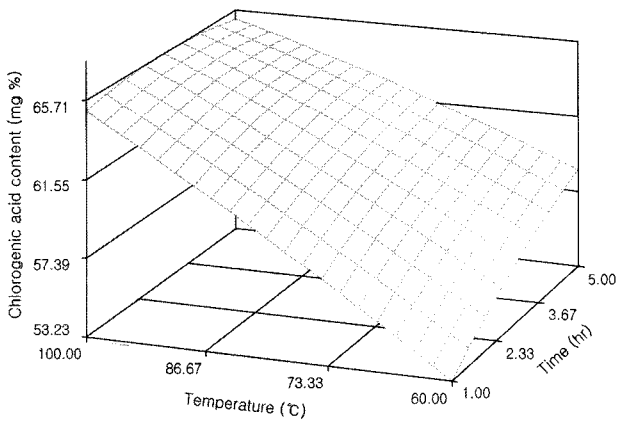
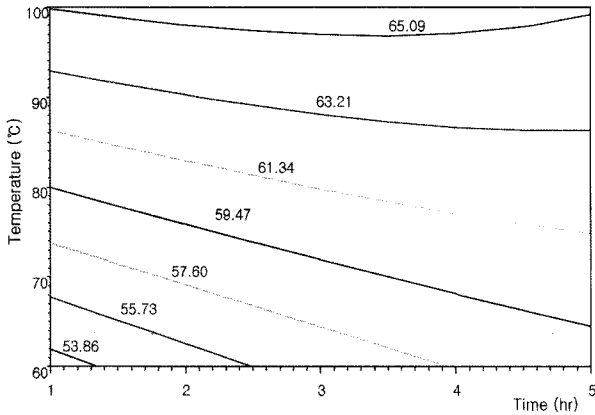


Fig. 1. Contour (top) and response surface plots (bottom) of chlorogenic acid contents in pomegranate.

chlorogenic acid 함량 변화는 Table 4와 같다. 그리고 최적 추출조건과 contour map 및 반응표면은 Fig. 1에 나타내었으며, 이들의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{CA} = 26.683006 + 0.455595X_1 + 4.141607X_2 - 0.000778X_1X_2 - 0.033250X_1^2 - 0.134018X_2^2$$

추출조건별 chlorogenic acid 함량에 대한 회귀식의 R²는 0.9061로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 능선분석(ridge analysis)을 행한 결과, 최대값은 65.70 mg%로 예측되었고, 이때 추출조건은 추출온도 99.99°C 및 추출시간 3.01 hr이었다(Table 5). Chlorogenic acid 함량에 대한 추출조건은 주로 추출온도에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 추출시간의 영향은 거의 없는 것으로 나타났다(Table 6).

Kaempferol 함량 변화. 추출조건별 추출물의 kaempferol 함량은 Table 4와 같고, 그 결과의 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{KC} = -0.035592 + 0.001274X_1 + 0.015673X_2 - 0.000005982X_1X_2 - 0.00005X_1^2 - 0.001473X_2^2$$

Kaempferol 함량에 대한 R²는 0.9374로 5% 이내에서 유의수준이 인정되었다. 추출 후 kaempferol 함량에 대한 추출조건에 대한 영향은 Table 5와 같이 추출온도 및 추출시간에 대해 10% 이

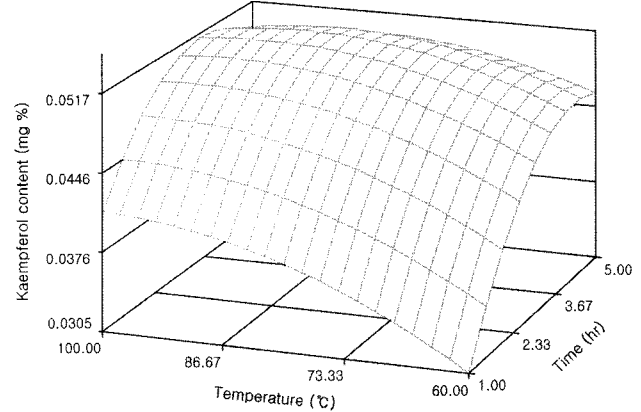
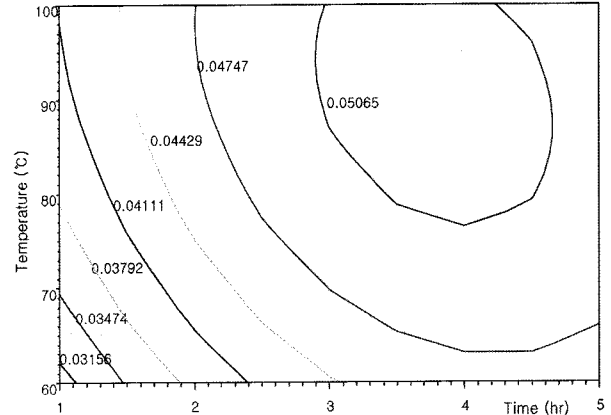


Fig. 2. Contour (top) and response surface plots (bottom) of kaempferol contents in pomegranate.

내의 유의성이 인정되어 두 가지 조건 모두에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 추출온도보다는 추출시간에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 6). Kaempferol 함량 변화에 준하여 각각의 최적 조건을 구하고자 능선분석을 행하여 본 결과, Table 5와 같이 최대값은 0.051 mg%이었고, 이때의 요인 변수들의 값은 추출온도 98.40°C, 추출시간 3.78 hr이었다. 이 결과는 높은 온도와 장시간에서의 추출은 상대적으로 kaempferol 함량이 낮아지는 것으로 나타났다.

17- α -estradiol 함량 변화. 추출조건에 따른 17- α -estradiol 함량은 Table 4에 나타내었고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\alpha_{EC}} = -8.267262 + 0.276810X_1 + 6.295952X_2 - 0.000332X_1X_2 - 0.039500X_1^2 - 0.308214X_2^2$$

각 실험구에서 얻어진 17- α -estradiol 함량에 대한 회귀식의 R²는 0.9130으로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점이므로 능선분석을 한 결과 최대값은 0.0409 mg%이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 99.29°C, 추출시간 3.53 hr이었다(Table 5).

Fig. 3과 같이 17- α -estradiol 함량은 추출온도와 추출시간이 증가할수록 점진적으로 증가하였다. 17- α -estradiol 함량에 대한 추출조건의 영향을 살펴보면 Table 6에서 보는 바와 같이 추출

Table 4. Experimental data on chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol and 17- β -estradiol contents of pomegranate under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Exp. No.	Extraction conditions		Major component contents (mg %)			
	Temperature (°C)	Time (hr)	Chlorogenic acid	Kaempferol	17- α -estradiol	17- β -estradiol
1	90	4	64.68	0.051	0.0417	0.0300
2	90	2	63.14	0.048	0.0367	0.0277
3	70	4	61.59	0.050	0.0394	0.0297
4	70	2	58.72	0.045	0.0312	0.0257
5	80	3	60.54	0.049	0.0355	0.0274
6	80	3	60.54	0.049	0.0355	0.0274
7	100	3	65.72	0.051	0.0402	0.0305
8	60	3	55.59	0.043	0.0315	0.0238
9	80	5	61.36	0.050	0.0381	0.0292
10	80	1	59.50	0.037	0.0292	0.0217

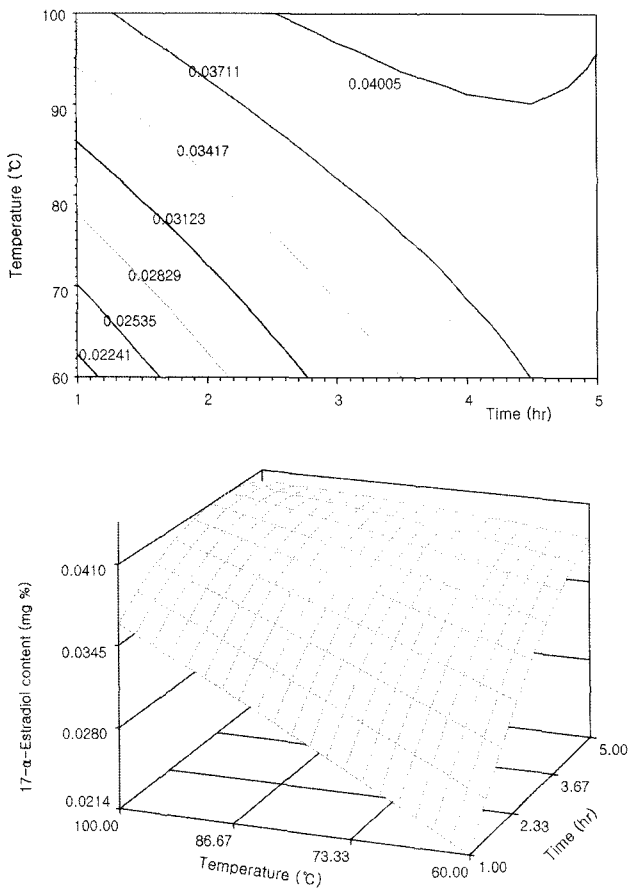


Fig. 3. Contour (top) and response surface plots (bottom) of 17- α -estradiol contents in pomegranate.

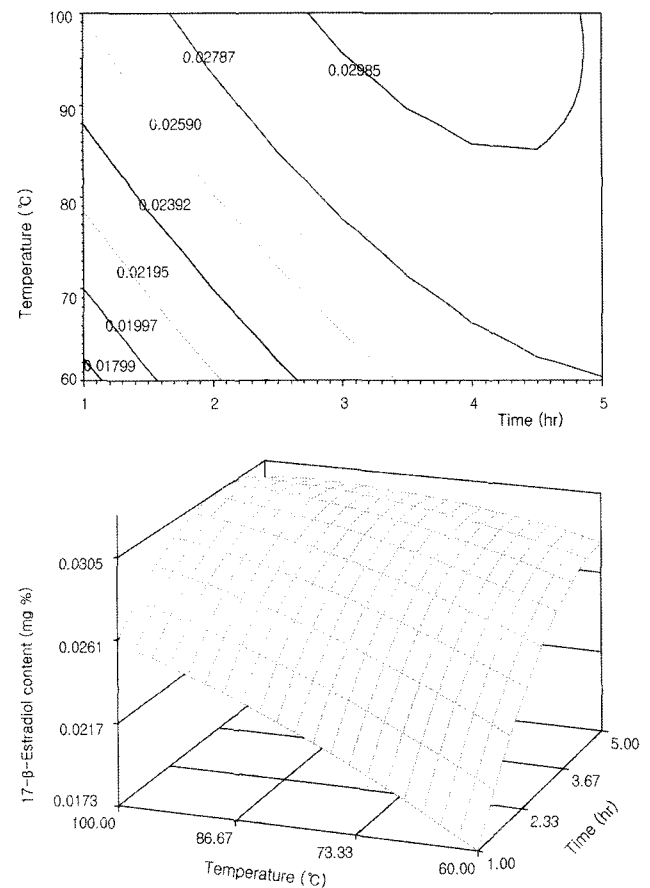


Fig. 4. Contour (top) and response surface plots (bottom) of 17- β -estradiol contents in pomegranate.

시간에 영향이 가장 크게 나타났으며, 다음으로 추출온도에 영향을 받는 것으로 나타났다.

17- β -estradiol 함량 변화. Table 4는 추출조건에 따른 17- β -estradiol 함량을 나타내었고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\beta_{EC}} = -7.014524 + 0.266619X_1 + 4.351905X_2 - 0.000864X_1X_2 - 0.021000X_1^2 - 0.296429X_2^2$$

회귀식에서 R^2 는 0.8872로, 유의성은 5% 이내의 유의수준에

서 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점으로 최대값은 0.0305 mg%이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 98.71°C, 추출시간 3.71 hr이었다(Table 5). Fig. 4와 같이 추출시간이 길어질수록 17- β -estradiol 함량은 증가하는 경향이였으며, Table 6에서 17- β -estradiol 함량에 대한 추출조건의 영향은 추출시간에 많은 영향을 받는 것으로 나타났다.

최적 추출조건의 예측. 석류의 주요성분의 최적 추출조건을 설정하기 위하여 각 조건별 추출물의 chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol 및 17- β -estradiol 함량에 대한 contour map를

Table 5. Predicted levels of optimum conditions for extraction condition of pomegranate by the ridge analysis

Responses	R ²	Pro>F	Temp.(°C)	Time(hr)	Maximum (mg %)	Morphology
Chlorogenic acid	0.9061	0.0350	99.99	3.01	65.70	Saddle point
Kaempferol	0.9374	0.0161	98.40	3.78	0.051	Maximum
17- α -estradiol	0.9130	0.0303	99.29	3.53	0.0409	Saddle point
17- β -estradiol	0.8872	0.0495	98.71	3.71	0.0305	Maximum

Table 6. Regression analysis for regression model of chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol and 17- β -estradiol contents in extraction conditions of pomegranate

Extraction conditions	F-Ratio	Chlorogenic acid	Kaempferol	17- α -estradiol 17- β -estradiol
Temperature (°C)	11.82**	4.81*	5.46*	3.47
Time (hr)	1.14	15.94**	8.66**	7.17**

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level; ***Significant at 1% level

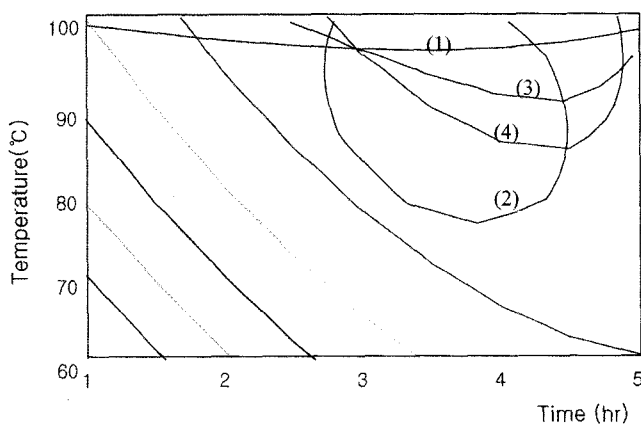


Fig. 5. Superimposed contour map for optimization of chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol and 17- β -estradiol contents in pomegranate. (1) Chlorogenic acid contents, (2) Kaempferol contents, (3) 17- α -estradiol contents, (4) 17- β -estradiol contents.

Table 7. Optimum extraction condition for response variables yielding the optimum response by superimposing contour maps

Extraction conditions	Range of predicted condition
Temperature (°C)	98~100
Time (hr)	3~4

superimposing하여 최적 범위를 예측하였다(Fig. 5). Chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol 및 17- β -estradiol 함량이 일치하는 범위는 추출온도 98~100°C, 추출시간 3~4 hr로 나타났다 (Table 7).

초 록

건강기능성식품의 원료로 이용되고 있는 석류의 주요성분에 대한 효율적인 이용을 위하여 반응표면분석에 의하여 각 성분의 열수 추출조건을 분석하여 최적 추출조건을 확립하였다. 주요성분의 최적 추출조건 예측을 위하여 추출온도(60~100°C), 추출시간(1~5 hr)을 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 10구의 추출조건을 설정하였다. 각 추출물의 주요성분 함량 즉, chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol 및 17- β -estradiol 함량을 측정하여 SAS program에 의해 회귀분석을 하여 각각

의 특성을 분석하였다. 그 결과 chlorogenic acid, kaempferol 및 17- α -estradiol 함량은 주로 추출온도에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 17- β -estradiol 함량은 추출시간에 영향을 받는 것으로 나타났다. 각 변수에 대한 회귀식을 도출하여 공정인자별 석류 추출물의 chlorogenic acid, kaempferol, 17- α -estradiol 및 17- β -estradiol 함량에 대한 최적 추출조건을 superimpose한 결과 추출온도 98~100°C, 추출시간 3~4 hr로 각각 예측되었다.

Key words: 석류, phytoestrogen, 추출조건, 반응표면분석

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발과제의 연구비 지원으로 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahn, D. G. (1999) In Korean herbs flora. Kyohaksa, Seoul.
- Shim, S. M., Choi, S. W. and Bae, S. J. (2001) Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 80-85.
- Wynder, E. L. and Gori, G. B. (1997) Contribution of environment to cancer medicine. *J. Nat'l. Cancer Inst.* **58**, 826-832.
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H. and Sugimura, T. (1992) Food-derived and carcinogens. *Cancer Res.* **52**, 2092-2096.
- Junko, M. O., Yoko, O. H., Hideyuki, Y. H. and Hiroyuki. Y. (2004) Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* **92**, 93-101.
- Wynder, E. L. and Gori, G. B. (1977) Contribution of environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 826-832.
- Koh, J. H., Hwang, M. O., Moon, J. S., Hwang, S. Y. and Son, J. Y. (2005) Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* **21**, 171-179.

8. Choi, O. K., Chung, K. S., Cho, G. S., Hwang, M. O. and Yoo, Y. S. (2002) Proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian black pomegranate extract and its products. *Korean J. Food & Nutr.* **15**, 119-125.
9. Kaplan, M., Haydk, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J. and Aviram, M. (2001) Pomegranate juice supplementation to atherosclerosis. *J. Nutr.* **131**, 2082-2089.
10. Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. and Tonogai, Y. (2000) High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. chromatogr. A.* **27**, 87-93.
11. De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J. C. (2000) Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5331-5337.
12. Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. and Kader, A. A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4581-4589.
13. AOAC (1990) In *Official Methods of Analysis* p. 70 15th ed. Association of Official Analytical chemists, Washington D. C.
14. Wanasundara, P. D. J. P. D. and Shahidi, F. (1996) Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *J. Food Sci.* **6**, 604-607.
15. SAS institute, Inc. (1998) In SAS/STAR User's Guide Version 6 pp. 1475-1478. 4th ed. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
16. Ahn, J. K., Lee, W. Y., Oh, S. J. and Park, Y. H. (2000) The contents of chlorogenic acid and eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms. *J. Korean For. Soc.* **89**, 216-222.
17. Hur, J. M., Lee, J. H., Choi, J. W., Hwang, G. W., Chung, S. K., Kim, M. S. and Park, J. C. (1998) Effect of methanol extract and kaempferol glycosides from *armoracia rusticana* on the formation of lipid peroxide in bromobenzene-treated rats in vitro, *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 231-236.