

HPLC에 의한 산지별 한국산 석류과피 중 항산화화합물의 함량분석

곽혜민 · 정현희 · 송방호¹ · 김종국² · 이진만³ · 허종문 · 송경식*

경북대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부, ¹사범대학 생물교육과, ²생명공학부, ³경북과학대학

Quantitative Analysis of Antioxidants in Korean Pomegranate Husk (*Granati pericarpium*) Cultivated in Different Site

Hye-Min Kwak, Hyun-Hee Jeong, Bang-Ho Sohng¹, Jong-Guk Kim²,
Jin-Man Lee³, Jong-Moon Hur and Kyung-Sik Song*

Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences,
Kyungpook National University, Deagu 702-701 Korea

¹College of Teachers, Kyungpook National University, Deagu 702-701 Korea

²School of Life Sciences & Biotechnology, Kyungpook National University, Deagu 702-701 Korea

³Department of Herb & Food Science, Kyungpook college of Sciences, Chilgok 718-851, Korea

Received September 29, 2005; Accepted October 20, 2005

The quantitative analytical method for major antioxidants, ellagic acid and punicalagin, in pomegranate husk (*Granati pericarpium*) were established by HPLC. The optimal HPLC conditions were as follows: Column; Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm), mobile phase; 1% formic acid in water (A) and 1% formic acid in MeCN (B) (gradient elution of 5% to 100% B for 50 min), flow rate; 0.8 ml/min., detection; UV 254 nm. The optimal pre-treatment conditions for HPLC analysis were as follows: 5 g of pomegranate husk in 100 ml of 95% EtOH, refluxed for 3 h. Under these analytical conditions, punicalagin and ellagic acid contents in Korean pomegranates husks which were cultivated in five different sites were determined. As results, the ellagic acid and punicalagin (as a mixture of α- and β-anomer) contents were the highest in Haepyung pomegranate husk (15.27 μg/mg) and Jangsung pomegranate husk (16.21 μg/mg), respectively.

Key words: antioxidant, ellagic acid, punicalagin, quantitative analysis, pomegranate husk

활성산소는 인체에 해가되는 superoxide anion radical(O₂^{-·}), hydrogen peroxide(H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂)와 같은 산소화합물을 총칭하는 것으로 체내에서 일상적인 대사과정, 즉 전자전달계, peroxysome의 지방산 대사과정, 포식세포(phagocytic cell) 등에서 생성된다.^{1,3)} 산소분자는 2개의 부대전자를 가지나 반응성은 낮아서 대부분은 미토콘드리아의 cytochrome oxidase에 의하여 물로 환원된다. 이 과정에서 전자가 1개, 2개, 3개가 차례로 부가되면서 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical이 생성된다.⁴⁾

활성산소들이 생체 내에서 생성된다는 사실은 1954년 Commoner가 hydroxyl radical을 측정하여 최초로 보고하였고, 1969년 Fridovich에 의하여 SOD(superoxide dismutase)가 발견됨으로서 체내의 superoxide anion생성과 소거에 대한 기작이

밝혀졌다.⁵⁾ 식세포나 대식세포 및 호중구 등은 자체적으로 활성산소를 만들어서 외부세균의 침입에 방어하기도 하지만 체내 활성산소의 과잉은 세포구성성분인 지질, 단백질, 핵산, 당, DNA 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해하기도 하며,⁶⁻⁹⁾ 이로 인하여 암, 신경질환, 동맥경화, 소화기 질환, 자기면역질환 등의 각종 질병과 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾

활성산소에 대한 체내 방어기구로는 SOD, catalase, glutathion peroxidase 등의 효소작용과 저분자의 항산화 물질이나 단백질 등이 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 또한 식이에 의한 천연 항산화제의 섭취는 체내의 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있으며, 식물체의 2차 대사산물인 polyphenol 화합물의 활성산소 소거 활성이 *in vivo*와 *in vitro*에서 확인되고 있으므로 식물에 대한 항산화 물질의 존재 및 함량은 기능성과 관련해서 매우 중요한 논제가 되고 있다.¹⁷⁻²⁰⁾

식물에 대한 항산화 물질은 이미 “프랑스인의 파라독스”로 알려진 적포도주가 그 대표적인 것으로 알려져 왔으나 최근 석

*Corresponding author

Phone: 82-53-950-5715; Fax: 82-53-956-5715

E-mail: kssong@knu.ac.kr

류(Pomegranate, *Punica granatum* L.)에는 천연녹차 또는 홍차나 적포도주에 함유된 항산화제 성분함량이 4배 이상 함유되어 있음이 확인되어 이의 자원화가 새로운 암예방제, 노화방지제, 항동맥경화제, 소염제, 항 당뇨병 및 그 치료제, 폐경기 여성 호르몬 대응 치료제 등의 면에서 등장하게 되었다.²¹⁻²⁴ 또한, 사람이나 생쥐실험에서 석류즙을 매일 복용할 경우에는 동맥경화가 예방되었다는 보고, 석류꽃이나 씨의 추출액은 당뇨에 걸린 쥐에서 혈당량을 저하시켰다는 보고, 또 열매껍질 추출액이 동물의 위궤양치료효과가 있다는 보고가 알려져 있다.^{23,24}

한편, 중동 및 유럽산 석류 중의 항산화물질로서 주로 석류 과육 중의 anthocyanine 계통의 화합물, 석류 과피 중의 ellagic acid, punicalagin 등이 활발히 연구되고 있으나,²⁵ 한국산 석류에 대한 연구는 석류씨 추출물의 항산화 활성,²⁶ 석류 추출물의 암세포 증식억제효과²⁷가 추출물 수준에서 보고되어 있을 뿐이며, 특히 석류의 biomass 중 가장 많은 부분을 차지하며 산업적으로도 이용되고 있는 한국산 석류의 과피에 대한 성분 및 함량에 대한 연구는 없다. 이와 같은 배경에 따라 한국산 석류 과피 중의 항산화 성분 분석에 적합한 HPLC 분석법을 확립하고, 확립된 방법을 이용하여 산지별 석류 과피 중의 항산화 성분을 분석, 정량함으로써 한국산 석류의 항산화 건강기능식품 자원화를 위한 기초자료를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

국내산 산지별 석류의 확보. 경북 의성, 해평, 안동 및 대구, 전남 장성 등 소규모 재배지로부터 5종의 석류를 확보하였다 (2002년 10월 수집).

석류 ethanol 추출물의 HPLC 분석법 확립. HPLC는 Jasco PU-2080+ 펌프 및 MD-2010+ PDA 검출기를 이용하였으며, 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(Agilent, 4.6×250 mm, 5 μm)를 이용하여 석류 과피 중 성분 분석을 하였다. 이 때, mobile phase는 1% formic acid를 함유한 H₂O(A)와 1% formic acid를 함유한 acetonitrile(B)[(B)가 50분 동안 5%에서 100%까지 증가하도록 농도 구배를 줌], flow rate는 0.8 ml/min, detector는 PDA로 측정하여 UV 254 nm에서 peak area 값을 측정하였다.

항산화 물질 표준품 확보 및 standard curve 작성. Poyrazogiu 등²⁸의 여러 문헌 및 HPLC 상에서의 major peak를 분리한 자체 결과²⁹를 토대로 석류 과피 중 주 항산화물질로 ellagic acid(Sigma, USA)와 punicalagin(자체 분리동정, UV 254 nm, HPLC에서 순도 98% 이상)²⁹을 지표 성분으로 정하고, HPLC를 이용하여 확보된 표준품의 standard curve를 작성하였다. HPLC 조건은 석류 ethanol 추출물의 분석에 사용한 것과 동일하며, 표준품을 일정 농도로 희석한 후 HPLC에서 나타난 peak area의 2회 반복 평균값을 취한 후 표준품의 양과 peak area 사이의 상관 관계를 도출하여 검량선을 작성하였다.

최적 전처리 방법 확립. 추출 용매로서는 식품으로 사용된다면 점을 감안하여 ethanol을 사용하였다. 최적 추출 용매를 결정하기 위하여 가장 확보량이 많은 해평산 석류 5g을 서로 다른 농도의 수성 ethanol 100 ml로 3시간 동안 환류추출하거나,

최적 추출 시간을 결정하기 위하여 석류 5g에 대하여 100 ml의 95% 에탄올로 1, 2, 3, 4시간 환류추출 하였다. 위 방법으로 추출한 추출물을 filter paper로 여과 후 여액에 적당량의 ethanol을 가하여 용량을 100 ml로 조절한 다음 이 용액 1 ml를 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과 후 여액 20 μl를 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석법 확립. 석류추출물에 포함된 항산화 화합물들의 최적분석법 확립을 위하여 μ-Bondapak C₁₈(Waters, 3.9×150 mm, 3.9×300 mm), Nova-Pak C₁₈(Waters, 3.9×150 mm), Symmetry C₁₈(3.9×150 mm), Tosoh 80TM(Toshoh, 4.2×150 mm), ZORBAX XDBC18(Agilent, 4.6×150 mm) 등의 column을 비교하였다. 그 결과 ZORBAX XDBC18(Agilent, 4.6×150 mm)을 고정상으로 사용한 경우, 대부분의 주요 peak들이 base line separation을 나타냈으므로 이 column을 이용하여 분석하기로 하였다. 또한 PDA 상에서 주요 peak들의 검출 pattern을 비교한 결과 UV 254 혹은 380 nm에서 측정된 경우보다 254 nm에서 검출하는 것이 주요 peak의 감도가 좋았으며, 기타 화합물의 검출감도도 좋았다(Fig. 1).

항산화 표준품에 대한 standard curve. 각 검량선의 상관관계는 모두 0.991 이상으로 매우 양호하였다. Ellagic acid의 정량곡선은 $Y = 249624.59X + 576222.18$, $r = 0.998$ 이었으며, 수용액 중 α-anomer와 β-anomer로 빠르게 상호전환하는 punicalagin의 정량곡선은 두 isomer를 합한 값으로 정량곡선을 산출하였으며 이 때 $Y = 1816012X - 3526$, $r = 0.997$ 이었다. 여기서 Y는 peak area(punicalagin의 경우 α와 β-anomer의 합)이며 X는 함량(nmole)이다.

최적 전처리조건 확립. 석류의 주요 항산화 물질로 알려진 ellagic acid 및 punicalagin에 대한 최적 추출 조건을 검토하였다. 먼저 ethanol 농도(40-95% 수성 ethanol)에 따른 ellagic acid 및 punicalagin의 추출 효과를 비교한 결과, 화합물의 종류에 따라 많은 차이를 나타내었는데, ellagic acid의 함량에 미치

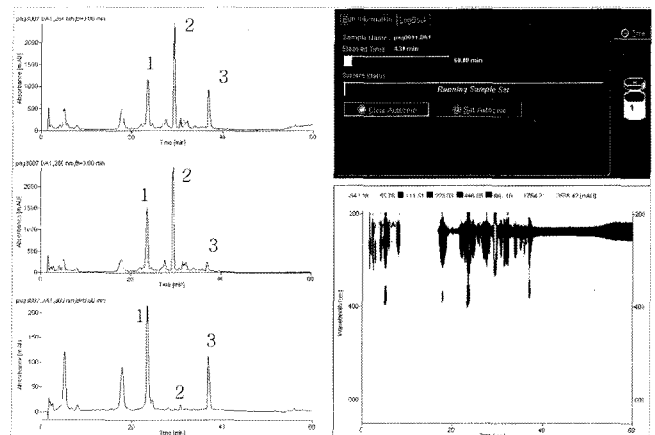


Fig. 1. Typical HPLC chromatogram of pomegranate husk extract (Haepyung). Left; chromatograms under UV 254 (upper), 280 (middle), and 380 nm (lower), respectively. Right; 2-D PDA contour pattern. 1 and 2; punicalagin isomers. 3; ellagic acid.

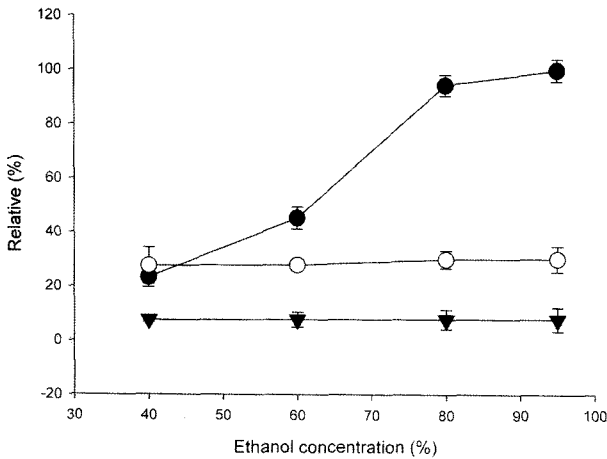


Fig. 2. Effect of ethanol ratio on antioxidants extraction. ○ and ●: punicalagin isomers. ▼: ellagic acid

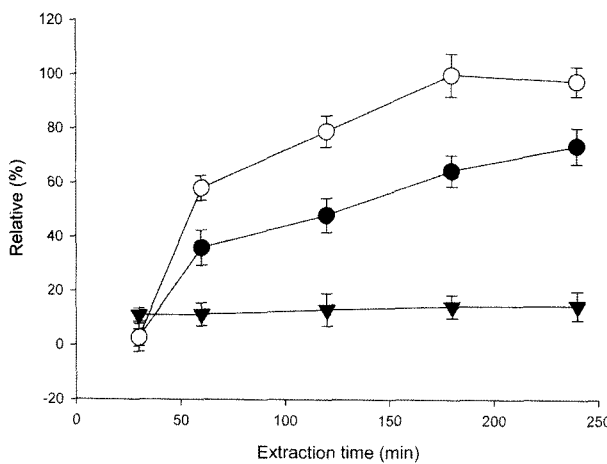


Fig. 3. Effect of heating time on antioxidants extraction. ○ and ●: punicalagin isomers. ▼: ellagic acid

는 영향은 매우 적은 반면, punicalagin의 경우(α - 및 β -anomer의 합)는 ethanol 농도가 높을수록 추출되는 함량이 증가하는 경향을 나타내어 40% ethanol로 추출한 경우에 비하여 95% ethanol로 추출한 경우 약 70% 함량이 증가하였다(Fig. 2). 사용 용매 중 95% ethanol을 사용한 경우가 두 가지 화합물에 대한 추출 효율이 가장 높았으며 경제적인 면을 고려하여 100% ethanol은 실험 대상에서 제외하였다. 이러한 결과에 따라서 이후의 실험은 모두 95% ethanol을 이용하여 추출하였다. 한편 95%의 ethanol으로 추출하고 남은 추출 잔사에 대하여 2차 환류추출한 경우는 두 화합물이 거의 검출되지 않아 추출회수는 1회로 한정하였다(data 미제시).

또한 95% ethanol을 용매로 하여 추출시간에 따른 ellagic acid 및 punicalagin의 추출율을 조사하였다(Fig. 3). 이 경우에도 ellagic acid의 함량에 미치는 영향은 매우 미미하였으나 punicalagin 함량의 경우 추출시간이 길어짐에 따라 추출효율이 증가하다가 3시간 이후에는 함량 증가가 완만하게 나타나, 경제적인 면을 고려한다면 석류 과피로부터 주요 항산화 화합물을 추출하는 데는 3시간 정도가 가장 적당한 것으로 판단되었다.

Table 1. Ellagic acid and punicalagin contents in pomegranate husk cultivated in different district

District	Amount ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	Ellagic acid	Punicalagin
Daegu	6.07	4.06
Jangsung	11.38	16.21
Euisung	11.31	ND ^a
Haepyung	15.27	2.84
Andong	7.71	10.75

^aNot detected

산지별석류과피 추출물 중 항산화성분 함량분석. 상기에서 얻은 최적 추출방법에 따라 산지별로 시료를 조제한 다음, 이들 중 함유된 항산화 성분 ellagic acid와 punicalagin의 함량을 확립된 HPLC 분석 방법에 따라 정량하였다. 그 결과, punicalagin의 함량은 16.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 장성산이 가장 높았으며 ellagic acid의 경우 해평산이 15.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았다(Table 1). 또한 산지별로 석류과피 중 주요 항산화 성분인 ellagic acid와 punicalagin의 함량 차이가 매우 커 국내산 석류를 이용하여 항산화건강기능식품을 개발할 경우, 산지의 선택이 매우 중요한 요소가 될 수 있음을 시사하였다. 한편, 사용한 석류는 대규모 재배지가 아닌 소규모 재배지에서 채집한 것으로 정확한 재배년수를 알 수 없어, 재배년수의 영향도 간과할 수 없으므로 이에 대하여는 추후 보완연구가 필요할 것으로 생각된다.

초 록

한국산 석류 과피 중 주요 성분으로 함유되어 있는 ellagic acid와 punicalagin에 대한 HPLC 정량법을 확립하였다. 확립된 방법은 다음과 같다. 즉 column은 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 \times 150 mm, 5 μm), 이동상은 1% formic acid를 포함하는 순수(A)와 1% formic acid를 함유하는 MeCN(B)을 이용하여(A) 용매가 5%에서 50분 후 100%가 되도록 농도가올기를 주어 용출하며, 이 때 유속은 0.8 ml/min., 검출은 UV 254 nm이다. 석류 과피 중 ellagic acid와 punicalagin 함량을 분석하기 위한 최적 전처리 추출조건을 확립한 결과, 100 ml의 95% ethanol로 5g의 석류 과피를 3시간 환류추출한 경우 상기 항산화 화합물의 추출효과가 가장 좋았다. 확립된 최적 분석 조건을 이용하여 재배지가 다른 국내산 석류 과피 5종 중 함량을 조사한 결과 ellagic acid의 함량은 해평산이 15.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, punicalagin의 함량은 장성산이 16.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았다. 한편 이들의함량은 산지별로 매우 큰 차이를 보여 한국산 석류과피를 건강기능식품 등의 원료로 이용할 경우 산지의 선택이 매우 중요할 수 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 2002년-2004년도 농림부 첨단기술개발과제 사업의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Proctor, P. H. (1992) Free radicals and human disease. In *Handbook of free radicals and antioxidants in medicine*. Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 17.
2. Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commander, N. M. and Vermeulen, N. P. E. (1996) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. *Free Radical Biol. Med.* **26**, 202-226.
3. Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1992) The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* **281**, 77-80.
4. Bengendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferencik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* **65**, 1864-1874.
5. McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
6. Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. (2001) Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 1205-1210.
7. Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I. (1995) Free radicals and antioxidants in food and vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 7-20.
8. Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S. and Hayek, M. (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1462S-1476S.
9. Hamilton, R. J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. B. and Pierce, H. (1997) Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem.* **60**, 193-199.
10. Steinberg, D. (1991) Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* **84**, 1420-1425.
11. Ames, B. M., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7915-7922.
12. Gackowski, D., Kruszewski, M., Jawien, A., Ciecierski, M. and Olinski, R. (2001) Further evidence that oxidant stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.* **31**, 542-547.
13. Fuhrman, B., Volkova, N., Rosenblat, M. and Aviram, M. (2000) Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, camisic acid, or galic. *Antioxidants Redox Signaling* **2**, 491-506.
14. Oyangui, Y. (1989) SOD and active oxygen modulators. Nihon Igakukan, Tokyo, pp. 17.
15. Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S. and Shyur, L. F. (2001) Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3420-3424.
16. Lu, Y., Foo, Y. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* **75**, 197-202.
17. Wang, S. Y. and Jiao, H. (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydrogen peroxide, hydroxly radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5677-5684.
18. Burda, S. and Oleszaw, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2774-2779.
19. Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 937-942.
20. Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. (2001) Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 1205-1210.
21. Singh, R., Murthy, K. C. and Jayaprakasha, G. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*P. granatum*) peel and seed extract using *in vitro* models. *Agric. Food Chem.* **50**, 81-86.
22. Schubert, S. Y., Lansky, E. P. and Neeman, I. (1999) Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* **66**, 11-17.
23. Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. and Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 166-171.
24. Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. and Fuhrman, B. (2000) Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1062-1076.
25. Gil, M. I., Tomás-Bárberan, 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.
26. 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. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**, 171-179.
27. 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. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 80-85.
28. Poyrazoglu, E., Gökmen, V. and Atrik, N. (2002) Organic Acids and Phenolic Compound in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J. Food Compos. Anal.* **15**, 567-575.
29. Kwak, H.-M., Jeon, S.-Y., Sohng, B.-H., Kim, J.-K., Lee, J.-M., Lee, K.-B., Jeong, H.-H., Hur, J.-M. (2005) β -Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate peel. *Arch. Pharm. Res.* submitted.