J Korean Soc Food Sci Nutr
40(12), 1635~1641(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.12.1635

석류 내피 용매별 추출물의 항산화 활성

진 소 연
숙명여자대학교 전통문화예술대학원 전통식생활문화전공

Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Pomegranate Endocarp

So-Yeon Jin
Dept. of Traditional Dietary Life Food, Graduate School, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract

This study was designed to investigate antioxidant activities of pomegranate endocarp extracts. Pomegranate endocarp extract contains the highest antioxidant function compared to pomegranate extracts from other parts. Pomegranate endocarp extract was fractionated with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol extract, and water, followed by evaluation for antioxidant activity. During this experiment, various antioxidant tests such as nitrite scavenging activity, reducing power, superoxide anion scavenging activity, $ABTS^+$ scavenging activity, SOD like-activity, and DPPH radical scavenging activity were conducted on the CH_2Cl_2, EtOAc, BuOH, H_2O fractions of pomegranate endocarp extract. Results showed that the ethyl acetate fraction contained the highest DPPH radical scavenging activity among the samples. For SOD like-activity, the dichloromethane fraction had the highest antioxidant activity. For superoxide anion scavenging activity, the ethyl acetate fraction had the highest antioxidant activity. In the $ABTS^+$ scavenging activity test, the ethyl acetate fraction IC_{50} was 39.26 μg/mL, whereas that of the butanol fraction was 40.95 μg/mL. In testing reduction power at 0.1 mg/mL, the O.D. of the ethyl acetate fraction was highest at 1.404 and showed higher activity than ascorbic acid at 1.332. The results of the nitrite scavenging activity test were very similar to those of the SOD like-activity test. These results suggest that pomegranate endocarp extract may have value as a natural antioxidant.

Key words: pomegranate, *Punica granatum* L., pomegranate endocarp extracts, antioxidant activity

서 론

식품산업이 발달하면서 가공식품과 이를 위한 식품첨가물의 이용이 증가되고 있다. 특히 식품의 산화를 방지하기 위하여 지금까지 수많은 항산화 물질들이 개발 및 이용되어 왔는데 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)이나 butylated hydroxy toluene(BHT) 등은 가격이 저렴하고 우수한 항산화력을 나타내는 반면 과잉섭취 시 독성이 우려되어 사용이 기피되고 있기(1) 때문에 화학적 합성 첨가물에 대한 일반인들의 안전성에 대한 염려가 높아지고 있다. 식품 중에 존재하는 대표적인 천연 항산화제로는 ascorbic acid 및 tocopherol, phenol성 화합물, flavone 유도체, carotenoids, glutathion, 아미노산 등이 밝혀져 있다(2). 그러나 tocopherol 같은 천연물은 안전성이 우수하여 사용에 관한 법적 규제가 없으나 가격이 비싸고 항산화효과가 제한적이므로 다양하게 이용하기에는 한계가 있다(3). 때문에 천연물질 중에서도 가격이 저렴하면서도 항산화효과가 우수한 천연항산화제를 탐색하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있는데 국내에서 지금까지 보고된 천연 항산화제로는 대두(4), 쑥(5), 냉이(6) 등과 같은 식용으로 쓰이는 식물이나 녹차, 목단피, 작약, 홍화씨 등과 같은 생약재에서 항산화 물질을 탐색하는 연구가 이루어지고 있다(7).

석류(pomegranate; *Punica granatum* L.)는 석류나무의 열매로 아프가니스탄과 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다. 최근 들어 식물성 에스트로겐과 같은 석류의 기능성 성분이 주목받으면서 석류의 성분분석과 생리활성 및 특성 그리고 섭취효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(8-14). 석류는 크게 단맛이 나는 감류와 신맛이 나는 산류로 나뉘는데 이란 또는 터키에서 수입되는 석류는 껍질이 얇고 그 열매는 검붉은 색을 띄며 단맛을 지닌 감류에 속한다. 반면 예로부터 우리나라에서 재배되는 석류는 껍질이 두껍고 열매는 선홍색을 띄며 신맛을 지닌 산류에 속하는데 한방에서는 석류나무와 열매의 각 부위에 따라 약용으로 사용하였다(15). 최근 석류의 건강기능성이 주목을 받으면서 미국에서 석류 주스의 섭취가 급격히 증가하고 있는데 석류의 가식비율은 20~30%로 미국의 캘리포니아주에서만 주스 착즙 후 버려지는 석류부산물의 양이 연간 3.3만 톤에 달하며 이는 매년 증가추세에 있다(16,17). 국

E-mail: soyeonny@hanmail.net
Phone: 82-2-2077-7473, Fax: 82-2-2077-7140

내에서도 2002년부터 전라남도 고흥에서 본격적으로 석류를 재배하고 있는데 국내산 석류도 대부분 생과보다는 주로 착즙한 주스의 형태로 가공하고 있는데 착즙 시 나오는 껍질이나 씨는 부산물로 폐기하고 있다. 석류의 부위별 성분 및 항산화능을 비교한 연구 결과(18-20) 주로 섭취하는 석류 과즙보다 껍질과 씨 부분 특히 내피에 폴리페놀, 플라보노이드, phytoestrogen과 같은 기능성 성분과 항산화능이 높게 나타났다. 때문에 이와 같은 석류 부산물을 기능성 식품소재로 활용하고자 하는 연구가 진행되고 있다(21).

따라서 본 연구에서는 석류의 부위별 추출물 중 기능성 성분과 항산화능이 가장 높으나 주스 착즙 후 버려지는 국내산 석류 내피의 최적 추출조건 및 추출용매에 따른 수율을 조사하였다. 또한 이 추출물을 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획한 후 항산화능을 평가하였다. 이를 통해 석류 내피 추출물의 천연항산화제로서의 가치를 확인하고 물질 분리와 같은 후속 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 석류는 전라남도 고흥에서 수확한 석류를 사용하였다. 실험에 사용한 국내산 석류의 크기는 8~10 cm, 무게는 23~29 g이었다. 외피는 주황색과 선홍색을 띄고 있으며 내피는 엷은 노란색으로 이란산에 비해 내피부분이 두꺼웠다. 실험에 사용된 표준물질과 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을, 추출을 위한 용매는 특급시약을 사용하였다.

추출물 제조

석류를 세척한 후 외피와 내피, 과육으로 분리한 후 실험을 통해 항산화능이 가장 높게 측정되는 온도를 설정하였다. 시료를 고온에서 건조할 경우 건조시간이 짧아 경제성이 있지만 항산화 성분의 경우 온도에 민감하게 반응할 수 있기 때문에 100°C에서 30분 간격으로 120분까지 석류 내피를 건조하여 40°C에서 15시간 동안 건조한 시료와의 DPPH 항산화 활성을 비교하였다(Table 1). 이 실험 결과를 토대로 시료를 강제순환건조기(Forced convection oven, Jeio Tech, Seoul, Korea)를 이용하여 40°C에서 15시간 동안 건조시킨 뒤 분쇄하였다. 석류의 주요 항산화 물질인 페놀성 물질은 물보다는 methanol에 잘 용출되는데 식품인 점을 고려하여 석류 추출용매로 ethanol을 선택하였다. 건조된 시료의 3배 분량의 70% 에탄올을 가하여 80°C 수욕상에서 환류냉각하면서 3시간 3회 반복 추출 여과한 후, 여액을 Rotary evaporator (N-1000, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 50°C에서 감압 농축하여 추출물을 얻었으며 추출물의 수율은 13.74%였다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of the various drying conditions

Treatment	Inhibitory activity (%)[1)]
Raw	94.131±2.31[b2)]
100°C 30 min	94.798±1.67[b]
100°C 60 min	94.625±0.50[b]
100°C 90 min	94.211±1.54[b]
100°C 120 min	94.771±0.70[b]
40°C 15 hr	95.558±0.84[a]

[1)]Concentration: 100 μg/mL.
[2)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

에탄올 추출물의 분획물 제조

Fig. 1의 방법대로 국내산 석류 내피 에탄올 추출물을 얻은 다음 증류수에 현탁한 후 hexane을 가하여 분획한 후 여과, 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 dichloromethane 추출물, ethyl acetate 추출물, butanol 추출물, 물 추출물을 얻었다(21).

DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois(22)의 방법에 의해 비교, 분석하였다. 각 추출물을 에탄올에 용해시켜 농도별로 제조한 시료 4 mL에 DPPH solution(1.5×10^{-4} M) 1 mL을 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/VIS Spectrophotometer(Jasco V-530, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였으며 따로 공시험을 하여 대조구의 흡광도를 같은 조건에서 측정하였다.

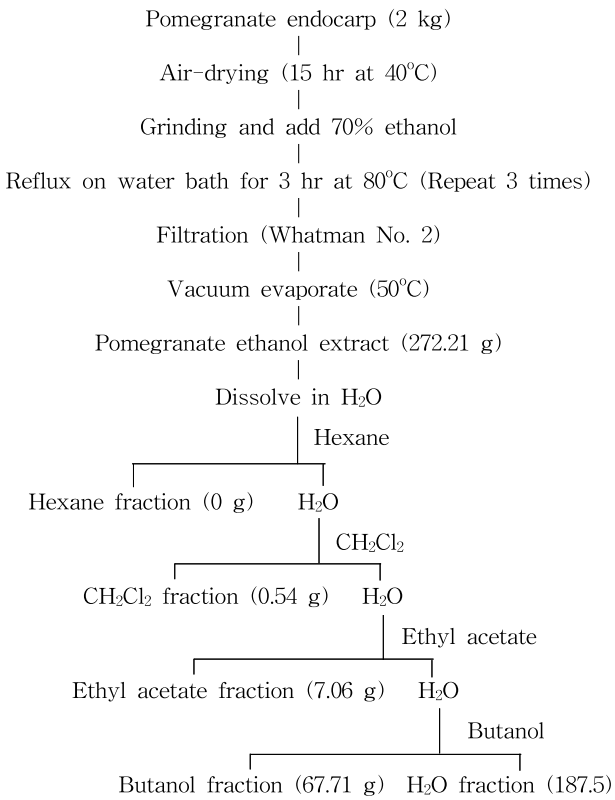

Fig. 1. Preparation of pomegranate endocarp solvent extracts.

다양한 농도에서 시료와 양성대조군의 DPPH 라디칼 소거능을 구한 뒤, DPPH 라디칼의 50%를 소거할 때의 추출물의 농도를 IC_{50}값으로 나타내었다.r

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Gudrun(23)의 방법을 응용하여 실시하였다. 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer(50 mM tris+10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

Superoxide anion 소거활성 측정

Superoxide anion 소거활성은 Liu 등(24)과 Zhao 등(25)의 방법에 준하여 측정하였다. 150 μM NBT(nitroblue tetrazolium) 0.75 mL에 468 μM NADH(nicotinamide adenine dinucleotide) 0.75 mL와 sample 0.3 mL을 첨가하고 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 최종부피(final volume) 3 mL을 채운 다음 60 μM PMS(phenazine methosulfate) 0.75 mL을 첨가하여 5분 후에 실온에서 560 nm로 흡광도를 측정하였다.

$ABTS^+$ 소거활성 측정

$ABTS^+$ 소거활성은 Re 등(26)과 Siddhuraju와 Becker(27)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 증류수에 용해한 $ABTS^+$ 7.0 mM에 증류수에 용해한 potassium persulfate 2.45 mM을 넣고 12~16시간 동안 암소에 방치하여 734 nm에서 흡광도가 0.700±0.02가 되도록 ethanol로 희석(30°C)한 다음 $ABTS^+$ solution 900 μL에 에탄올에 용해한 샘플 100 μL을 첨가하여 30°C에서 734 nm 흡광도 변화를 1분 간격으로 측정(1~6분간)하고 표준물질로 trolox를 사용하였다. 시료와 똑같은 효과를 내는 trolox의 총량(mM)으로 항산화력을 측정하였다.

환원력 측정

환원력은 Oyaizu(28)의 방법에 준하여 측정하였다. 증류수에 용해한 시료 2.5 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL과 1% potassium ferricyanide($K_3Fe(CN)_6$) 2.5 mL을 각각 혼합하고 혼합물을 50°C 수욕조(water bath)에서 20분간 반응시킨 다음 10% trichloroacetic acid(TCA; CCl_3COOH, w/v) 2.5 mL을 첨가하여 반응액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상등액 5 mL을 증류수 5 mL에 혼합한 다음 0.1% ferric chloride($FeCl_3 \cdot H_2O$) 1 mL 첨가하고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Kato 등(29)의 방법을 변형하여 측정하였다. 아질산나트륨(1 mM $NaNO_2$; sodium nitrite) 용액 1 mL에 시료 1 mL을 섞고 0.1 N HCl(pH 1.2)를 사용하여 반응용액의 부피를 10 mL로 조정(D.W 첨가)한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 test tube에 1 mL씩 취한 다음 2% 초산용액(acetic acid) 5 mL을 첨가하고 사용 직전에 조제한 Griess(30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것) 시약 0.4 mL을 가하여 잘 혼합한 후 15분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신에 증류수 0.4 mL을 가하여 상기의 방법으로 실시하고 positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다.

통계처리

모든 자료의 통계처리는 SAS package(version 8.12, Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)를 이용하여 평균(mean)과 표준편차(SD)로 표시하였다. 실험군 간의 유의성 검증을 위하여 ANOVA로 분석하였으며 사후검증으로 α=0.05 수준에서 던컨의 다중회귀 분석(Duncan's multiple range test)을 실시하였다.

결과 및 고찰

추출조건 및 수율

석류 내피 에탄올 추출물의 항산화 활성성분이 주로 어떠한 층에 있는지 살펴보기 위해 석류 추출물을 용매 극성도에 따라 비극성용매인 hexane으로부터 극성이 큰 물(water)까지 순차적으로 용매추출 한 분획물의 수율은 Table 2와 같다. 추출수율이 갖는 의미는 아무리 천연 추출물의 항산화성이 높게 인정된다 하더라도 추출수율이 낮으면 생산효율이 낮아 경제성이 떨어지기 때문에 중요한 요인이다.

위와 같이 계통적 추출법으로 물질을 추출하면 석류에 있는 유기화합물 중에서 비극성물질로부터 차차 극성이 큰 원자단을 가진 물질 순으로 추출되어 나온다. Hexane 층에는 주로 지방, 납, 수지, 정유, chlorophyll 등이 추출되며, CH_2Cl_2 층에는 주로 탄성 gum 같은 물질이 용출되며, ethyl acetate 층에서는 saponin, 당, 배당체, 유기산, tannin, alkaloid 등이 추출되며, H_2O 층에서는 tannin, 배당체, 당, 점액, 단백질, 염류 등이 용출된다(21). 이 방법으로 추출할 때 추출성분이 어느 분획에 완전히 분리되는 것은 아니지만 이러한 과정은 식물 재료에 들어있는 어느 특정한 성분을 예비적으로 알아내려는 기본과정이며, 소량의 검체에 대하여 몇 개의 분획으로 나누어 유효 성분이 어느 분획에 들어있는가를 확인함과

Table 2. Extraction yield of pomegranate endocarp extracted by various solvent

Sample	Yield (%)
Water fraction	68.90
Butanol fraction	24.87
Ethyl acetate fraction	2.59
Dichloromethane fraction	0.19
Hexane fraction	0

Table 3. DPPH radical scavenging activity of fractions from pomegranate endocarp

Sample	Inhibitory activity (%)[1)]	IC_{50}[2)] (μg/mL)
Water fraction	17.93±1.36[c3)]	15.91
Butanol fraction	85.23±0.84[b]	2.88
Ethyl acetate fraction	90.49±0.04[a]	2.40
Dichloromethane fraction	24.31±1.13[c]	9.76
Ascorbic acid	92.38	2.30

[1)]Concentration: 5 μg/mL.
[2)]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.
[3)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

동시에 그 화학적 성질을 추정하고, 다음 성분의 추출·정제·구조연구의 바탕이 된다.

석류 내피 에탄올 추출물의 경우 비극성 용매인 hexane 층에서는 물질이 분리되지 않았고 dichloromethane 층에서는 소량 분리되었다. 극성이 커질수록 수율이 높아져 물(water) 분획의 수율이 68.94%로 가장 높게 나타났으며 butanol 분획의 수율은 24.89%, ethyl acetate 분획이 2.59%, dichloromethane 분획이 0.18%로 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 석류 내피 추출물은 비극성 층보다는 극성 층에서 추출물의 수율이 높게 나타남을 알 수 있었다.

DPPH 라디칼 소거활성

석류 내피 추출물의 분획별 항산화 활성은 Table 3과 같다. Ethyl acetate 분획물은 5 μg/mL에서 90.49±0.04%의 활성을 보여 분획 중 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. 그 다음은 butanol 분획물로 같은 농도에서 85.23±0.84의 항산화 활성이 측정되었다. Ethyl acetate 분획물의 IC_{50}은 2.40 μg/mL로 대조군인 ascorbic acid의 IC_{50}인 2.30 μg/mL로 유사한 값을 나타내었다. 눈개승마(30)와 생강(31)의 용매별 분획물 중 ethyl acetate 분획물이 대조군인 ascorbic acid와 유사한 활성을 보여 가장 우수한 전자공여능을 나타내었다는 보고와 비슷하였다.

SOD 유사활성

석류 내피 추출물의 분획별 SOD 유사활성은 Fig. 2와 같다. SOD 유사활성은 추출물의 농도 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL에 따라 추출물의 농도가 증가할수록 SOD 유사활성도 유의적으로 증가하는 경향을 보였다($p \leq 0.05$).

SOD 유사활성에서는 DPPH 라디칼 소거능에서 가장 활성이 높았던 ethyl acetate 분획물의 활성이 1 mg/mL에서 8.65±1.42%로 가장 낮았고, DPPH 라디칼 소거능에서 활성이 비교적 낮았던 dichloromethane 분획물의 활성은 같은 농도에서 42.88±0.66%로 월등히 높았다. Butanol 분획물은 15.43±0.85%, water 분획물의 활성은 12.81±0.68%로 butanol 분획물의 활성이 조금 더 높았다. 대조군으로 사용된 tocopherol은 1 mg/mL의 농도에서 19.1%의 활성을 보였다.

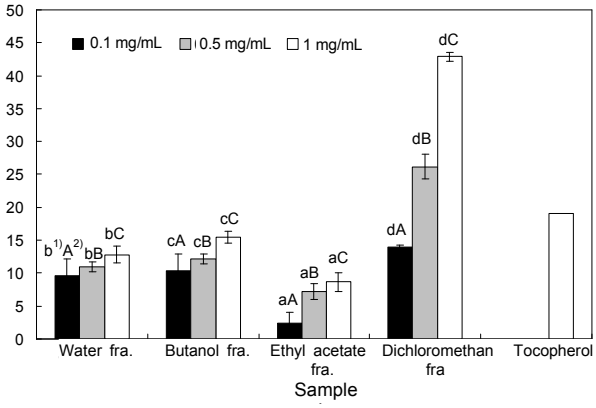

Fig. 2. SOD-like activities of extract of Korean pomegranate endocarp. [1)]Values with different small letters are significantly different at the 5% level among various fraction. [2)]Values with different capital letters are significantly different at the 5% level among various concentration.

이는 1 mg/mL 농도에서 표준물질인 BHT와 같은 수준의 SOD 유사활성을 나타낸 조릿대 잎의 dichloromethane 분획이 12.1%, ethyl acetate 분획이 14.5%, butanol 분획이 14%의 활성을 보인 것과 유사한 결과를 나타냈다(32). 백지(33)의 환류 물 추출물이나 환류 에탄올 추출물이 1 mg/mL의 농도에서 1.29%에서 8.48%의 SOD 유사활성을 보인 결과와 비교해 석류 내피 추출물의 SOD 유사활성은 비교적 높은 편이라고 생각된다. Calliste 등(34)의 연구에 의하면 효소계 시스템인 SOD 유사활성이 비효소계 시스템인 DPPH radical 소거능에서의 라디칼 소거능이 차이를 보인다고 보고하였다. 석류 내피 추출물의 경우 분획별로 추출된 항산화 물질의 종류가 다른 것에서 기인한 것으로 여겨지며 향후 물질 분리와 같은 후속연구가 필요할 것으로 여겨진다.

Superoxide anion 소거활성

석류 내피 추출물 분획별 superoxide anion 소거활성은 Table 4와 같다. Ethyl acetate 분획물은 시료 농도 100 μg/mL에서 65.23%의 활성을 보여 시료 중 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. 그 다음은 butanol 분획물로 같은 농도에서 56.42%의 항산화 활성이 측정되었다. Dichloromethane 분

Table 4. Superoxide anion scavenging activity on extract of pomegranate endocarp

Sample	Inhibitory activity (%)[1)]	IC_{50}[2)] (μg/mL)
Water fraction	13.87±1.76[d3)]	307.3
Butanol fraction	56.42±0.98[b]	61.91
Ethyl acetate fraction	65.23±2.06[a]	58.94
Dichloromethane fraction	53.02±1.3[c]	72.25
Tannic acid	46.14±0.67	111.68

[1)]Concentration: 100 μg/mL.
[2)]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.
[3)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

Table 5. ABTS$^+$ scavenging activity on extract of pomegranate endocarp

Sample	Inhibitory activity (%)[1)]	IC_{50}[2)] (μg/mL)
Water fraction	20.80±0.69[c3)]	253.01
Butanol fraction	98.86±0.08[a]	40.95
Ethyl acetate fraction	98.13±0.09[a]	39.26
Dichloromethane fraction	28.87±0.57[b]	242.02
Trolox	55.71±2.45	32.53

[1)]Concentration: 100 μg/mL.
[2)]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.
[3)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

획물은 53.02%, water 분획물은 13.87%의 활성을 나타냈고, 같은 농도에서 tannin acid는 46.14%의 활성을 나타냈다. 전통식품소재의 superoxide anion의 소거활성을 측정한 Lim과 Ryu의 연구(35)에서 오가피 13.5%, 결명자 17.1%, 복분자 13.2%, 감초 35.6%, 생강 9.0%, 무 20.9%의 소거효과를 보였다는 보고와 비교할 때, 본 연구에서 측정된 석류 내피 추출물은 이들에 비하여 그 효과가 높다고 평가할 수 있으며 활성이 가장 높은 ethyl acetate과 butanol 분획물의 IC_{50}은 각 65.23 μg/mL과 72.25 μg/mL로 111.68 μg/mL인 tannin acid보다도 항산화능이 우수하게 나타났다.

ABTS$^+$ 소거활성

국내산 석류 내피 추출물(KPE)의 분획별 ABTS$^+$ 소거활성은 Table 5와 같다. Butanol 분획물과 ethyl acetate 분획물이 시료 농도 100 μg/mL에서 98.86%, 98.13%의 활성을 보여 시료 중 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. 그 다음은 dichloromethane 분획물로 같은 농도에서 28.87%의 항산화 활성이 측정되었다. Water 분획물은 20.80%의 활성을 나타냈다. 국내산 산채류의 물 및 메탄올 추출물에 대한 항산화 활성 조사한 연구(36)에서 100 μg/mL에서 가장 높은 활성을 보인 돌단풍은 53.0%의 라디칼 소거활성을, 기린초와 광대싸리는 각각 37.0%, 35.0%의 소거활성을 나타내 석류 내피의 ABTS$^+$ 소거활성은 상대적으로 우수하게 나타났다. 가장 높은 활성을 보인 ethyl acetate와 butanol 분획의 IC_{50}은 각 39.26 μg/mL, 40.95 μg/mL로 대조군인 trolox의 32.53 μg/mL와 유사하게 나타났다.

환원력

국내산 석류 내피 추출물의 분획별 환원력은 Fig. 3과 같다. 환원력은 추출물의 농도 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL에 따라 추출물의 농도가 증가할수록 환원력도 유의적으로 증가하는 경향을 보였다($p \leq 0.05$). 환원력에서는 100 μg/mL에서 ethyl acetate 분획물의 흡광도가 1.404로 가장 높았고, butanol 분획물은 0.951, dichloromethane 분획물은 0.457, water 분획물은 0.384로 나타났다. 같은 농도에서 ascorbic acid는 1.332로 흡광도가 1.404로 측정된 ethyl acetate 분획

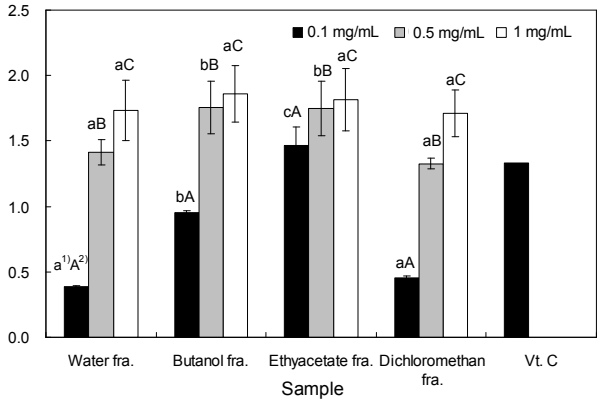

Fig. 3. Reducing power on extract of pomegranate endocarp.
[1)]Values with different small letters are significantly different at the 5% level among various fraction. [2)]Values with different capital letters are significantly different at the 5% level among various concentration.

물의 항산화능은 ascorbic acid보다 더 높은 것으로 나타났다.

Heo와 Wang(37)은 민들레를 지상부와 뿌리로 나누어 메탄올과 물로 추출하고 두 농도(100 μg/mL 및 500 μg/mL)에서 환원력을 측정한 결과 메탄올 추출물의 100 μg/mL 농도에서 지상부가 0.09, 뿌리가 0.02로 나타난 반면, 물 추출물에서는 0.00~0.03으로 낮게 나타났다고 보고하여 상대적으로 석류 내피 추출물의 항산화능이 높은 것을 알 수 있다.

아질산염 소거능

석류 에탄올 추출물의 분획별 아질산염 소거능은 1 mg/mL의 농도에서 측정하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다.

분획별 아질산염 소거능은 전반적으로 SOD 유사활성 결과와 비슷한 경향으로 나타났는데, DPPH radical 소거능에서 비교적 활성이 낮았던 dichloromethane 분획물의 활성이 81.80%로 높았다. Ethyl acetate 분획물은 57.16%, butanol 분획물은 47.76%로 나타나 이 두 분획의 활성은 비슷한 수준이었고 water 분획물은 16.78%로 가장 낮은 활성을 보였다. 다른 연구 결과와 비교하여 보면 부위별 꽈리 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 Chung(38)의 연구에서 시료추출물의 농도 1 mg/mL에서 81.53~86.95%의 활성을 보였다고

Table 6. Nitrite-scavenging activity of pomegranate endocarp

Sample	Inhibitory activity (%)[1)]	IC_{50}[2)] (μg/mL)
Water fraction	16.78±7.52[c3)]	4567.61
Butanol fraction	47.76±7.13[b]	1085.91
Ethyl acetate fraction	57.16±5.10[b]	846.23
Dichloromethane fraction	81.80±5.34[a]	115.54
Ascorbic acid	61.64±1.64	209.47

[1)]Concentration: 1000 μg/mL.
[2)]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.
[3)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

보고하였으며, Bae 등(39)은 비파 부위별 용매추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과 메탄올 추출물이 헥산, 클로로포름 및 물 추출물보다 높은 소거능을 나타내었고 부위별로는 씨를 제거한 과실이 86%, 종자 84%, 잎 60%, 과피 57%, 과육35%의 소거능을 각각 나타내었다고 보고하여 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

IC_{50}은 검체 농도에 따른 아질산염 소거능 변화 곡선으로부터 아질산염을 50% 소거시키는 농도를 표시한 것으로 dichloromethane 분획물은 115.54 μg/mL로 209.47 μg/mL인 ascorbic acid보다도 낮은 농도에서 높은 활성을 나타내 dichloromethane 분획물의 아질산염 소거능이 매우 우수함을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 가식부위가 20~30%로 과즙 착즙 시 주로 버려지고 있으나 석류의 부위별 추출물 중 가장 항산화성이 우수한 천연식품 소재인 석류 내피를 에탄올로 추출하여 천연항산화제로서의 활용 가능성을 조사하였다. 석류 내피 추출물을 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 항산화능을 분석하였다. 각 측정 방법 별로 항산화 활성에 있어 약간의 차이를 보였으나 전반적으로 ethyl acetate 분획의 항산화능이 높게 측정되었다. DPPH 라디칼 소거활성 측정 결과 ethyl acetate와 butanol 분획물에서 IC_{50}이 각각 2.40 μg/mL, 2.88 μg/mL로 기준 물질인 ascorbic acid와 유사한 항산화 활성을 나타내는 것으로 나타났다. Superoxide anion 소거활성에서 ethyl acetate과 butanol 분획물의 IC_{50}은 각각 58.94 μg/mL, 61.91 μg/mL로 기준물질인 tannin acid보다 항산화능이 우수하였다. $ABTS^+$ 소거활성에서 ethyl acetate와 butanol 분획물의 IC_{50}은 각각 39.26 μg/mL, 40.95 μg/mL로 나타났으며 환원력을 측정한 결과 ethyl acetate 분획물(0.1 mg/mL)의 흡광도가 1.404로 기준물질인 ascorbic acid보다 활성이 높게 측정되었다. SOD 유사활성과 아질산염 소거능에서는 유사한 결과를 나타냈는데 SOD 유사활성은 42.88±0.66%(dichloromethane), 15.43±0.85%(butanol), 12.82±0.68%(water)이었으며 아질산염 소거능에서 dichloromethane 분획물의 IC_{50}은 115.54 μg/mL로 기준물질인 ascorbic acid보다 높게 나타났다. 따라서 본 연구결과 석류 내피 추출물은 높은 항산화 활성을 가지고 있으며, 폐자원으로써 버려지는 석류 내피는 식품첨가물 등의 기능성 소재로의 이용가능성이 있을 것으로 여겨진다.

문 헌

1. Yang GH, Choi SY. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol* 14: 283-288.
2. Ames BN, Saul RL. 1987. Oxidative DNA damage, cancer and aging, oxygen and human disease. *Ann Inter Med* 107: 536-539.
3. Cort WM. 1974. Antioxidant activity of tocopherols, ascobyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J American Oil Chemists' Society* 51: 321-325.
4. Bae EA, Moon GS. 1997. A study on the antioxidative of Korean soybeans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 203-208.
5. Cha BC, Lee HW, Lee E, Choi MY, Rhim TJ, Park HJ. 1997. Antioxidant effect of domestic plants. *Kor J Pharmacol* 28: 15-20.
6. Kwak JH, Kweon MH, Ra KO, Sung HC, Yang HC. 1996. Purification and physicochemical properties of superoxide anion radical scavenger from *Capsella bursa-pastoris*. *Kor J Food Sci Technol* 28: 184-189.
7. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
8. Bae SY. 2004. Identification of linoleic acid and conjugated linolenic acid as phytoestrogenic components from *Punica grenatum*. *MS Thesis.* Kyungpook National University, Daegu, Korea.
9. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. 2005. Pomegranatepure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel ™. *Invest New Drugs* 23: 121-122.
10. Shim SM, Choi SW, Bae SJ. 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.
11. Yu HK. 2006. Antioxidative effects and phytoestrogenic activities of ethanol extracts from pomegranate seeds. *PhD Dissertation.* Chung-Ang University, Gyeonggi, Korea.
12. Koh JH, Hwang MO, Moon SJ, Hwang SY, Son JY. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 171-179.
13. Roh BK. 2005. Anti-oxidant and anti-aging activities of *Punica granatum* extracts. *MS Thesis.* Chung-Ang University, Gyeonggi, Korea.
14. Kwak HM. 2006. β-Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate peel. *MS Thesis.* Kyungpook National University, Daegu, Korea.
15. Lee YE, Hong SH. 2003. *Herbal food material science.* Kyomunsa, Seoul, Korea. p 82.
16. Zhongli P, Wenjuan Q, Haile M, Griffiths GA, Tara MH. 2011. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason Sonochem* 19: 365-372.
17. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 80: 393-397.
18. Jin SY. 2011. Study on antioxidant activities of extracts from different parts of Korean and Iranian pomegranates *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1063-1072.
19. Yunfeng Li, Changjiang G, Jijun Y, Jingyu W, Jing X, Shuang C. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 96: 254-260.
20. Ulrike AF, Reinhold C, Dietmar RK. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS^n. *Food Chem* 127: 807-821.
21. Woo WS. 2001. *Methods for natural products chemistry.*

Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 12.
22. Blois MS. 1958. Antioxidants determination by the use a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
23. Marklund S, Gudrun M. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *J Biochem* 47: 469-474.
24. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radicals scavenging activity of mushroom polysaccharide extract. *J Life Science* 60: 763-771.
25. Zhao GR, Xiang ZJ, Ye TX, Yuan YJ, Guo ZX. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *J Food Chem* 99: 767-774.
26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved $ABTS^+$ radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
27. Siddhuraju P, Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea seed extracts. *Food Chem* 101: 10-19.
28. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions; antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese J Nutrition* 44: 307-315.
29. Kato H, Lee IE, Chyen N, Kim SB, Hayase F. 1987. Uninhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
30. Kim MS, Kim KH, Jo JE, Choi JJ, Kim YJ, Kim JH, Jang SA, Yook HS. 2011. Antioxidative and antimicrobial activities of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Hara extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 47-55.
31. Bang MH, Song JC, Kim SL, Hur HS, Baek NI. 2001. Isolation of natural antioxidant from the root of *Zingiber officinale* R. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 202-205.
32. Ju MJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK. 2009. Physiological activities of mistletoe extracts from *Viscum album* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 529-534.
33. Lee YS, Jang SM, Kim NW. 2007. Antioxidant activity and physiological function of the *Angelica dahurica* roots. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 20-26.
34. Calliste CA, Trouilla P, Allais DP, Simon A, Duroux JL. 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J Agric Food Chem* 49: 3321-3327.
35. Lim BG, Ryu BH. 2004. Screening of antioxidative compounds toward human low density lipoprotein (LDL) from useful plants. *Korean J Food Nutr* 17: 138-146.
36. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 29-36.
37. Heo Sl, Wang MH. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* 39: 255-259.
38. Chung HJ. 2010. Antioxidative activities of different part extracts of *Physalis alkekengi* var. *francheti*. *Korean J Food Preserv* 17: 867-873.
39. Bae YI, Jeong CH, Shim KH. 2002. Nitrite-scavenging and antimutagenic effects of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica*, Lindl.). *Korean J Food Preserv* 9: 92-96.

(2011년 9월 2일 접수; 2011년 10월 19일 채택)