J Korean Soc Food Sci Nutr
40(8), 1063~1072(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.8.1063

국내산과 이란산 석류 부위별 추출물의 항산화 활성

진 소 연
숙명여자대학교 전통문화예술대학원 전통식생활문화전공

Study on Antioxidant Activities of Extracts from Different Parts of Korean and Iranian Pomegranates

So-Yeon Jin

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

Abstract

This study analyzed the functional components and antioxidant activities of pomegranate juice and pomegranate husk, endocarp and seed extracts by comparing Korean and Iranian pomegranates. Korean pomegranate husk (KPH) had the highest total polyphenol content among the pomegranate extracts, and total phytoestrogen content was highest in Korean pomegranate endocarp (KPE). Iranian pomegranate endocarp (IPE) and Iranian pomegranate husk (IPH) showed the highest flavonoid levels. Overall, Korean pomegranate had more functional components than those in Iranian pomegranate. KPE had the highest DPPH radical scavenging activity and superoxide dismutase like-activity among all of the extracts, and KPH had the highest nitrite scavenging activity. IPE showed the highest superoxide anion scavenging activity. The $ABTS^+$ assay also indicated that IPH had the highest antioxidant activities. This study also showed that the more total polyphenols, flavonols, and phytoestrogens the pomegranate contained, the higher antioxidant activities. A positive correlation was observed between total polyphenol, flavonol and phytoestrogen levels and antioxidant activities. Korean pomegranates contained more functional components and had higher antioxidant activity than those of Iranian pomegranates. Additionally, pomegranate endocarp and seed extracts were better than pomegranate juice in terms of functional components and antioxidant activity. These results suggest that pomegranate husk, endocarp and seed extracts as well as pomegranate juice may have value as natural antioxidants with their high quality functional components and antioxidant activity.

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

서 론

석류(*Punica granatum* L.)는 석류나무의 열매로 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다. 석류는 주로 과즙으로 착즙하여 주스나 과즙농축액, 차, 잼 등으로 가공하는데 착즙 시 껍질이나 씨는 사용하지 않기 때문에 석류의 가식비율은 20~30%로 폐기율이 매우 높은 과일이다. 예로부터 석류 열매 안에는 많은 씨가 들어 있어 다산을 상징하며 석류나무의 수피, 잎, 과피에는 ellagigitannins와 gallotanin이 풍부하고, 잎에는 apogenin, lutein 등이 배당체로 함유되어 있다(1). 석류나무의 뿌리(root), 석류나무의 껍질(bark), 석류열매의 껍질(peel, 과일의 30% 이상)인 외피(husk)와 내피(endocarp), 석류 열매의 씨(seed), 씨를 덮고 있는 가식부분(aril, 주스의 원료)에서 항산화·항암 물질과 에스트로겐 대응 성분 및 여러 생리활성물질이 약 90여종 이상 보고되었다(2). 국내에서 생산되는 석류는 생산량도 많지 않고 당도가 낮아 주로 약용으로 사용하고 있는데 전라남도 고흥에서 2002년부터 본격적으로 재배가 이루어지고 있다. 그러나 대부분의 석류 제품들은 미국이나 이란에서 수입한 석류를 사용하고 있다. 국내에서 석류에 대한 연구는 석류의 암세포 증식억제에 대한 연구(3)와 석류에서 phytoestrogen 활성 물질 분리(1), 석류씨 추출물의 항산화효과 및 식물성 에스트로겐 활성(4,5), 기능성 화장품의 원료로서 사용하기 위한 석류 추출물의 항노화 작용에 관한 연구(6), 석류피로부터 면역 억제 활성을 갖는 물질의 분리(7), 석류로부터 β-secretase(BACE1) 저해제의 탐색(8) 등에 관한 보고가 이루어졌으나 국내산과 이란산 석류의 부위별 항산화 활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 들어 천연물에서의 항산화 연구가 활발하게 진행되고 있는데 항산화물질은 유지 식품의 산화 억제뿐 아니라

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

인체 내에서 노화 억제, 항암 등 생리활성 기능이 입증되면서 식품 그 자체보다도 생리기능에 더 많은 관심이 쏠리고 있다(9). 따라서 본 연구에서는 국내산과 이란산 석류의 과즙 및 착즙 시 부산물로 버려지는 외피와 내피, 씨의 폴리페놀, 플라보노이드, 식물성 에스트로겐 등의 기능성 성분을 분석하고 6가지의 분석방법에 의해 항산화능을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 석류는 전라남도 고흥에서 수확한 국내산 석류와 이란에서 수입된 Omid Nikan Co.(Tehran, Iran)의 이란산 석류를 외피와 내피, 씨로 분리하여 사용하였다. 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 과육은 마쇄하여 과즙과 씨로 분리하고, 과즙은 착즙액을 80°C 수욕상에서 40분간 살균하여 여과한 후 Rotary evaporator (N-1000, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 65 Brix로 농축하여 시료로 사용하였다. 석류의 외피와 내피, 씨는 예비 실험을 통해 항산화능이 가장 높게 측정되는 온도를 설정하였다. 석류 외피와 내피의 경우에는 강제순환건조기(Forced convection oven, Jeio Tech, Seoul, Korea)를 이용하여 40°C에서 15시간 동안 건조하고 씨의 경우에는 100°C에서 30분 동안 건조시킨 뒤 분쇄하여, 시료의 3배 분량의 70% 에탄올을 가하여 80°C 수욕상에서 환류 냉각하면서 3시간 3회 반복 추출 여과한 후, 여액을 Rotary evaporator(N-1000, EYELA Co.)로 50°C에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다.

총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법(10)에 준하여 측정하였다. 증류수로 희석한 석류 추출물 0.2 mL에 10% Folin-Ciocalteau 0.4 mL을 넣고 3분 후에 10% sodium carbonate(Na_2CO_3) 0.8 mL을 혼합하고 1시간 방치한 다음 Spectrophotometer(V-530, Jasco, Tokyo, Japan)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다.

총 플라보노이드 함량

석류의 총 플라보노이드 함량은 Davis 변법(11)에 준하여 시료용액 1 mL에 diethylene glycol 10 mL과 1 N NaOH 1 mL을 혼합한 뒤 30°C에서 60분간 유지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin의 검량선을 이용하여 플라보노이드 함량을 계산하였다.

Phytoestrogen 함량 측정

Phytoestrogen의 함량 분석은 Lee 등(12)의 방법을 응용하여 분석하였다. 표준품은 estriol, estrone, β-estradiol, 17α-estradiol 4종으로 표준용액은 0.01 g을 정확히 칭량한 다음 메탄올로 1 μg/mL가 되게 만들어 냉장 보관하여 사용하였다. 유도체화 시약은 MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyl-trifloroacetamide)와 trimethylchlorosilane(TMCS)을 구입하여 MSTFA와 TMCS를 100:1(v/v)의 비율로 섞은 혼합용액을 사용하였다. 시료의 전처리와 분석방법은 Yang 등(13)의 방법을 참고하였다. 즉, 석류 추출물 25 mg에 Internal standard d4-17-estradiol 10 μg/mL을 넣고 55°C에서 3시간 hydrolysis 시킨 후 diethylether 5 mL을 넣고 10분간 흔든 후 유기 용매층을 취하여 evaporation 시킨 후 MSTFA/TMCS의 100:1 혼합물 50 μL을 가하고 60°C에서 30분간 반응시켜 TMS ester 유도체를 만든 후 이를 GC에 2 μL 주입하였다. 사용한 분석기기는 Hwelett-Packard 5890 PLUS Gas Chromatography에 direct interface로 연결된 5890 mass selective detector(MSD)를 사용하였다. 분리관은 Ultra-2(길이 25 mm, 내경 0.20 mm, film thickness 0.33 μm을 사용하였으며 분리관의 온도는 180°C에서 260°C까지 20°C/min으로 올리고 6분간 머문 후 다시 2°C/min으로 275°C까지 올려 8분간 유지시킨 다음 15°C/min으로 300°C까지 상승시켜 10분간 유지시켰다. Injector 온도는 300°C, detecter 온도는 300°C 이동상 기체 헬륨의 유속은 0.85 mL/min, 주입방법은 split mode(ratio 1:12)로 설정하였다. 이온화에 사용한 전자에너지는 70 eV였고 전처리된 시료들을 분석하기 위해 질량 스펙트럼상의 특성이온만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring(SIM) 방법을 이용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois(14)의 방법에 의해 비교, 분석하였다. 시료 4 mL에 DPPH solution(1.5×10^{-4} M) 1 mL을 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 UV/VIS Spectrophotometer (V-530, Jasco)로 흡광도를 측정하였으며 따로 공시험을 하여 대조구의 흡광도를 같은 조건에서 측정하였다. 다양한 농도에서 시료와 양성대조군의 DPPH 라디칼 소거능을 구한 뒤, DPPH 라디칼의 50%를 소거할 때의 추출물의 농도를 IC_{50}값으로 나타내었다.

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Gudrun(15)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(16)과 Zhao 등(17)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 2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; $ABTS^+$)의 색을 띤 양이온 라디칼의 감소에 근거하여 항산화력을 검사하고자 하는 시료와 같은 효과를 내는 수용성 비타민 E의 유사물인 Trolox의 총량(mM)으로 항산화능을 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 Re 등(18)과 Siddhuraju(19)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 측정하였다. 시료와 똑같은 효과를 내는 Trolox의 총량(mM)으로 항산화력을 측정하였다.

환원력 측정

환원력은 Oyaizu(20)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 원심분리한 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(21)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 1:1비율로 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)를 이용하여 평균(mean)과 표준편차(S.D)로 표시하였다. 실험군 간의 유의성 검증을 위하여 ANOVA로 분석하였으며 사후검증으로 α=0.05 수준에서 던컨의 다중회귀 분석(Duncan's multiple range test)을 실시하였다. 페놀성 물질의 함량과 항산화능과의 관련성은 단순회귀분석과 상관분석을 실시하여 검토하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

산지별 석류의 부위별 폴리페놀의 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 석류의 각 부위 중 국내산 외피(Korean pomegranate husk; KPH)의 폴리페놀의 함량이 210.67 mg/g으로 가장 높았고, 그 다음으로 이란산 외피(Iranian pomegranate husk; IPH)가 159.67 mg/g으로 측정되었고, 국내산 내피(Korean pomegranate endocarp; KPE)와 이란산 내피(Iranian pomegranate endocarp; IPE)의 폴리페놀 함량은 비슷하였다.

총 플라보노이드 함량

산지별 석류의 부위별 석류의 플라보노이드의 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 석류의 각 부위 중 이란산 내피와 이란산 외피의 플라보노이드의 함량이 가장 높았고, 그 다음으로 국내산 내피와 국내산 외피의 플라보노이드 함량은 비슷하였다.

Phytoestrogen 함량

식물체에서 발견되는 에스트로겐성 물질을 phytoestrogen이라고 하며 항암작용과 심장병에 효과가 있는 곡물, 과일, 채소들이 대부분 phytoestrogen을 포함하고 있다. 석류나 콩과류에서 발견되는 phytoestrogen의 주성분은 isoflavones와 lignans 등의 페놀성 화합물이며(22), 이들 페놀성 물질은

Table 1. Total polyphenol contents of pomegranate extract

Sample[1)]	Polyphenol contents (mg/g)
IPH	159.67±5.77[b2)]
IPE	131.00±3.61[c]
IPS	9.72±0.55[d]
IPJ	3.39±0.17[d]
KPH	210.67±8.08[a]
KPE	126.00±1.73[c]
KPS	10.29±1.00[d]
KPJ	3.34±0.04[d]

[1)]IP and KP stand for Iranian pomegranate and Korean pomegranate, respectively. H, E, S, and J stand for husk, endocaerp, seed and juice, respectively.

[2)]Values with different letters are significantly different at the 5% level by multiple comparison test.

Table 2. Total flavonoid contents of pomegranate extract

Sample[1)]	Flavonoid contents (mg/100 g)
IPH	317.33±11.32[a2)]
IPE	326.47±21.19[a]
IPS	15.00±1.10[ef]
IPJ	4.49±0.86[f]
KPH	171.80±7.72[c]
KPE	231.80±10.48[b]
KPS	54.61±5.66[d]
KPJ	25.20±2.27[e]

[1)]All abbreviations are the same as in Table 1.
[2)]Values with different letters are significantly different at the 5% level by multiple comparison test.

phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 항산화효과 등의 다양한 생리활성 기능도 갖고 있다(23).

최근에는 석류의 에스트로겐 및 항에스트로겐 효과에 대한 연구들이 이루어지고 있는데 석류에 들어있는 phytoestrogen은 두류에 들어있는 isoflavone류와는 달리 인체에서 분비되는 여성호르몬과 구조가 거의 동일한 에스트로겐 계열의 estrone, estrial, estradiol 등이 함유되어 있다(22-25).

본 실험에서는 산지별 석류의 부위별 phytoestrogen 함량을 측정하기 위하여 석류에 주로 들어있는 4종의 에스트로겐 함량을 분석하였다. 석류의 부위별 에스트로겐 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 측정된 에스트로겐의 총 함량은 국내산 외피는 76.87 μg/mL, 내피는 96.04 μg/mL, 씨는 35.57 μg/mL로 나타났고, 이란산은 외피 49.51 μg/mL, 내피 85.43 μg/mL, 씨 43.05 μg/mL로 총 에스트로겐의 함량은 두 종류 모두 내피, 외피, 씨의 순서로 높게 나타났다. 또한 전반적으로 이란산에 비해 국내산 석류의 에스트로겐 함량이 높게 나타났다.

DPPH 라디칼 소거활성

석류 열매의 부위별 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 실험 결과 국내산 내피의 항산화 활성이 가장 높게 측정되었다. IC_{50}은 검체 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도로 같은 조건에서 실험한 비타민 C의 IC_{50}은 2.30 μg/mL으로 국내산

Table 3. Total phytoestrogen content of various pomegranate extract

Sample[1)]	Phytoestrogen contents (μg/mL)			
	Estrone	α-Estradiol	β-Estradiol	Estriol
IPH	15.50	6.25	6.78	20.98
IPE	22.47	9.63	11.13	42.20
IPS	17.59	5.13	5.84	7.01
IPJ	7.59	15.07	2.20	1.88
KPH	19.09	20.13	19.23	18.42
KPE	22.47	24.26	25.99	23.32
KPS	17.63	13.14	0.96	11.32
KPJ	7.59	8.98	1.59	0.46

[1)]All abbreviations are the same as in Table 1.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of pomegranate extract

Sample[1)]	Inhibitory activity (%)[2)]	IC_{50}[3)] (μg/mL)
IPH	62.01±1.25[d4)]	8.43
IPE	71.19±0.95[c]	7.04
IPS	31.05±0.87[e]	94.26
IPJ	4.43±0.27[h]	838.67
KPH	80.84±1.49[b]	5.95
KPE	83.11±0.95[a]	5.67
KPS	27.42±0.24[f]	95.99
KPJ	7.99±1.55[g]	288.55
Vitamin C	95.64±0.45	2.30

[1)]All abbreviations are the same as in Table 1.
[2)]Concentration: 10 μg/mL.
[3)]IC_{50}: Inhibitory activity is expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.
[4)]Values with different letters are significantly different at the 5% level.

석류내피의 항산화 활성인 5.67 μg/mL과 비슷한 값을 나타내어 천연 항산화제로서 항산화능이 매우 우수함을 알 수 있다. 각 시료의 항산화능을 살펴보면 내피, 외피, 씨, 과즙의 순서로 항산화능이 우수하였고 이는 내피와 외피 추출물에 함유된 식물성 에스트로겐 등의 페놀성 화합물 및 플라보노이드류에 의해 항산화효과가 나타났음을 알 수 있다.

SOD 유사활성

부위별 석류 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 석류 에탄올 추출물의 SOD 유사활성은 추출물의 농도 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL로 증가할수록 항산화능도 유의적으로 증가하는 경향을 보였다($p \leq 0.05$). 실험 결과 국내산 내피의 항산화 활성이 가장 높게 측정되었다. 전반적으로 석류 외피와 내피는 DPPH 라디칼 소거능에서 높은 활성을 보였고 석류 씨는 SOD 유사활성에서 보다 높은 항산화 효과를 보였다.

Superoxide anion 소거활성

Superoxide anion 라디칼은 다른 유해 활성산소의 전구물질로 작용하므로 이 라디칼을 직접 소거할 수 있는 물질의 탐색은 항산화제 개발에 효과적인 방법으로서 많이 사용되고 있다. 부위별 석류 추출물의 superoxide anion 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 실험 결과 이란산 석류 내피와 국내산 석류 내피 추출물의 superoxide anion 소거활성이 가장 높게 측정되었고 이란산 석류 외피와 국내산 석류 외피의 활성은 비슷한 수준이었다. 그 다음으로 이란산 석류 씨와 국내산 씨의 순으로 나타났다. Superoxide anion 소거활성의 결과를 DPPH 라디칼 소거활성과 SOD 유사활성 실험 결과와 비교했을 때 각 시료의 항산화 활성의 순위는 비슷한 경향을 띠고 있으나 시료간의 차이가 크게 나지 않았다. IC_{50}은 검체 농도에 따른 superoxide anion 라디칼 소거능 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도로 tannic acid의 IC_{50}은 111.68 μg/mL로 국내산 석류 내피의 IC_{50}값인 90 μg/

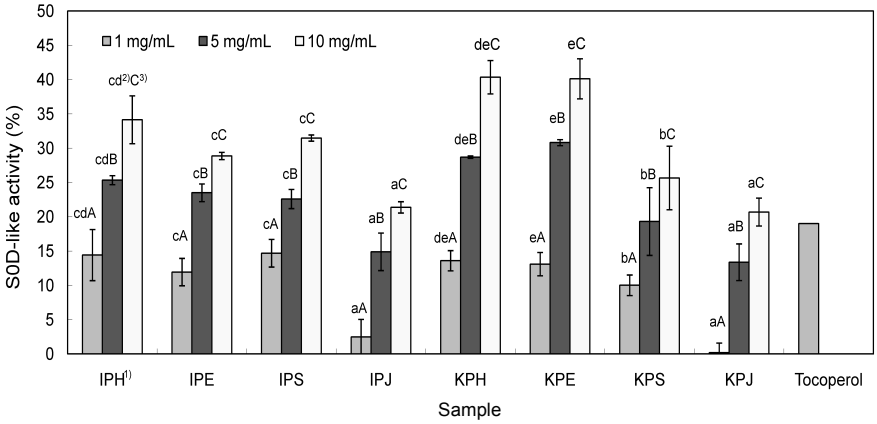

Fig. 1. SOD-like activities of pomegranate extract. [1]All abbreviations are the same as in Table 1. [2]Values with different small letters are significantly different at the 5% level among various pomegranate extract. [3]Values with different capital letters are significantly different at the 5% level among various concentration.

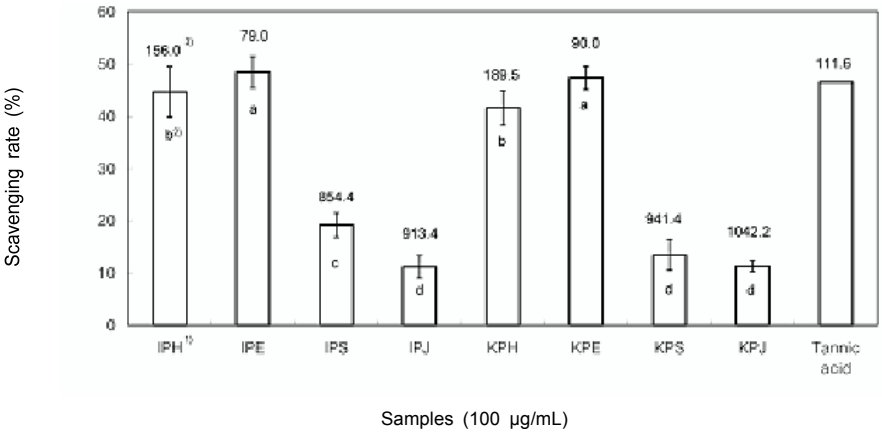

Fig. 2. Superoxide anion scavenging activity of pomegranate extract. [1]All abbreviations are the same as in Table 1. [2]Values with different letters are significantly different at the 5% level. [3]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.

mL과 이란산 석류 내피의 IC_{50}값인 79 μg/mL보다도 높은 값을 나타내어 석류 내피 추출물의 항산화능이 매우 우수함을 알 수 있다.

$ABTS^+$ 소거활성

$ABTS^+$ 라디칼 소거능 역시 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용하는 방법으로, 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS 라디칼을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다(26). 부위별 석류 추출물의 $ABTS^+$ 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 실험 결과 석류 씨 추출물에서는 활성이 측정되지 않았다. DPPH 라디칼 소거능에서는 국내산 석류 내피가 가장 높은 활성을 보이는데 비해 $ABTS^+$ 소거활성에서는 이란산 석류 외피의 항산화능이 가장 높게 측정되었으며 그 다음으로는 국내산 석류 내피가 높은 항산화능을 나타내었으며, 이란산 석류 내피와 국내산 석류 외피는 비슷한 활성을 보였다. IC_{50}은 검체 농도에 따른 $ABTS^+$ 라디칼 소거능 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도로 이란산 석류 외피, 국내산 석류 내피, 국내산 석류 외피, 이란산 석류 내피의 순서로 높게 나타났다. 이 같은 결과는 라디칼이라는 점에서는 같으나 DPPH의 경우 자유 라디칼이지만 ABTS는 양이온 라디칼이라는 점에서 또는 페놀 물질의 종류가 다름에 따라 두 기질에 결합하는 정도가 다르며 결국 라디칼을 제거하는 능력이 차이가 나는데 기인하는 것으로

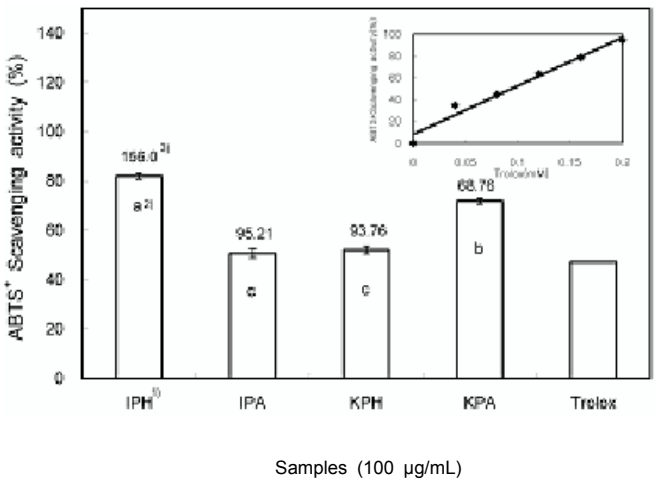

Fig. 3. $ABTS^+$ radical scavenging activity of pomegranate extract. [1]All abbreviations are the same as in Table 1. [2]Values with different letters are significantly different at the 5% level. [3]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.

사료된다.

환원력

항산화 활성의 발현은 시료가 지질과산화에 관련된 효소의 활성을 저해하는 경우나 각종 반응성 산소라디칼(reactive oxygen species; ROS)을 소거하는 경우에 일어나게 된

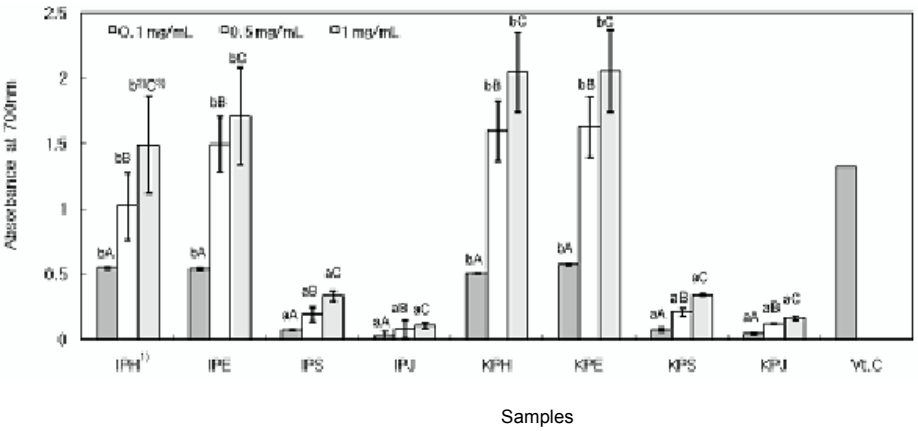

Fig. 4. Reducing power of pomegranate extract. [1)]All abbreviations are the same as in Table 1. [2)]Values with different small letters are significantly different at the 5% level among various pomegranate extract. [3)]Values with different capital letters are significantly different at the 5% level among various concentration.

다. 특히 ROS는 지질과산화뿐 아니라 세포핵 내에서 DNA의 산화적 손상을 유발시켜 정상세포를 형질 변환된 암세포로 변형시킨다. 이 과정에서 자유 라디칼의 발생을 차단시킬 수 있는 능력인 추출물의 환원력을 측정하였다. 부위별 석류 에탄올 추출물의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 측정 결과 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL의 농도에서 추출물의 농도가 증가할수록 환원력도 유의적으로 증가하는 경향을 보였다($p<0.05$). 국내산 석류 내피의 환원력이 0.1 mg/mL에서 0.575, 1 mg/mL에서 2.05로 가장 높게 측정되었고 국내산 외피의 환원력이 0.1 mg/mL에서 0.501로, 1 mg/mL에서 2.04로 측정되었다. Vitamin C는 0.1 mg/mL에서 1.322를 기록하여 석류 추출물이 vitamin C에 버금가는 높은 환원력을 갖는 것으로 보인다.

아질산염 소거능

부위별 석류 에탄올 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5는 1 mg/mL의 농도로 pH 1.2 조건에서 아질산염 소거능을 측정한 값이다. 아질산염 소거능은 국내산 석류 외피 추출물에서 가장 높게 나타났고, 그 다음으로는 이란산 석류 외피 추출물, 국내산 내피 추출물 순이었다. IC_{50}은 검체 농도에 따른 아질산염 소거능 변화

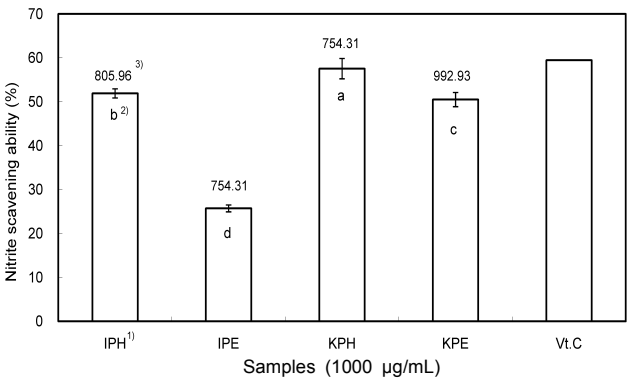

Fig. 5. Nitrite-scavenging activity of pomegranate extract. [1)]All abbreviations are the same as in Table 1. [2)]Values with different letters are significantly different at the 5% level. [3)]IC_{50}: Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration which is obtained by interpolation from concentration-inhibition curve.

곡선으로부터 아질산염을 50% 소거시키는 농도로 국내산 석류 외피의 IC_{50}값은 754.31 μg/mL이었고, 그 다음으로 높은 활성을 보인 이란산 석류 외피의 IC_{50}은 805.96 μg/mL을 나타냈으며 국내산 석류 내피의 992.93 μg/mL로 측정되었다. 그 외의 시료는 IC_{50}값이 1000 μg/mL 이상이었다. 아질산염 소거능에서는 다른 항산화 실험과는 달리 석류 내피 추출물보다 외피 추출물의 항산화능이 높게 나타났다. 석류씨 에탄올 추출물의 항산화효과를 연구한 Yu(4)의 연구에서 이란산 석류씨의 아질산염 소거능은 1 mg/mL에서 21.8%의 활성을 나타내 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

페놀성 물질과 항산화 활성과의 관련성

실험에 사용한 8종의 석류 추출물의 페놀성 물질인 총 폴리페놀과 총 플라보노이드, 식물성 에스트로겐의 함량과 항산화 활성과의 관련성을 검토해 보았다. 식물에 존재하는 많은 phytochemical 중 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드류는 여러 식품에 널리 분포되어 있으며 천연 항산화제로써 작용할 수 있다는 연구들이 보고되었고(27-29), 에스트로겐 활성이 보고된 phytochemical에는 isoflavone을 비롯한 일부 flavonoid들이 다수 포함되어 있다(30-32). 이러한 여성호르몬은 강력한 항산화제로 알려져 있는데(33), 플라보노이드의 구조 변형에 따른 항산화 및 에스트로겐 활성변화 연구도 진행되고 있다(34). 분석 결과 석류의 폴리페놀 함량이 높은 경우 플라보노이드 및 식물성 에스트로겐의 함량도 많았다. 석류의 총 폴리페놀의 양과 추출물의 항산화 활성과의 관련성을 비교한 결과(Fig. 6) 폴리페놀의 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거능이 높아 양의 상관관계를 나타내었으며(R^2=0.82) Sánchez 등(35)의 연구결과와 유사하였다. 또한 SOD 유사활성, superoxide anion, 환원력, 아질산염 소거능의 경우도 각각 R^2=0.60, R^2=0.88 R^2=0.87, R^2=0.71로 양의 상관관계를 나타내었다. $ABTS^+$ 소거능(R^2=0.07)의 경우는 내피와 외피를 제외하고는 항산화활성이 측정되지 않아 상관관계가 나타나지 않았다.

석류의 총 플라보노이드의 양과 추출물의 항산화활성과의 관련성을 비교한 결과(Fig. 7) 플라보노이드의 함량이 증가할수록 항산화활성이 높아 양의 상관관계를 나타내었다.

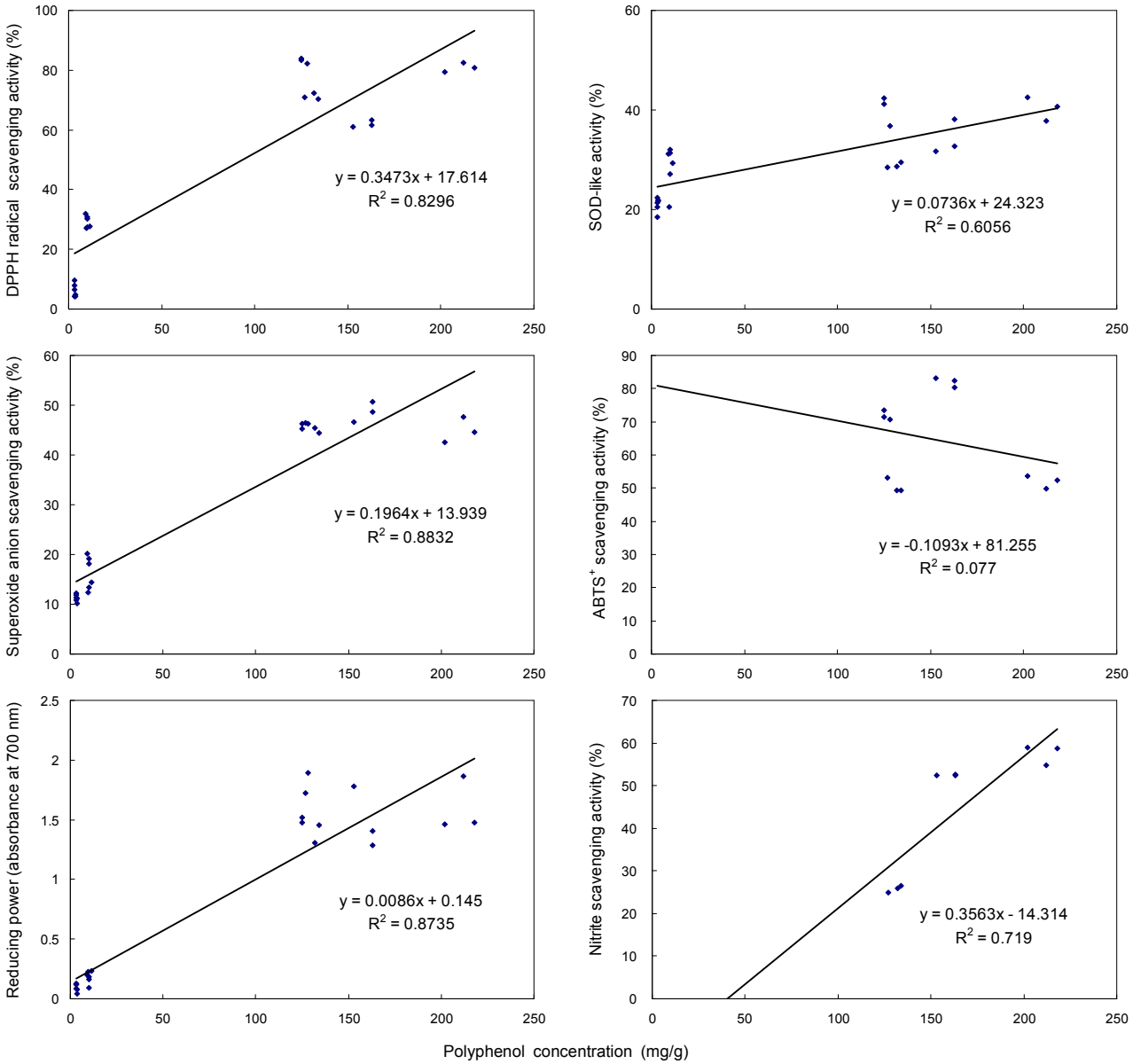

Fig. 6. Relationship between antioxidant activities and total polypenol content of pomegranate extract.

Superoxide anion 소거능에서 플라보노이드의 함량과 가장 큰 상관성을 보였고(R^2=0.86), 환원력(R^2=0.80)과 DPPH 라디칼 소거능(R^2=0.68)의 순서로 상관성을 보였다. SOD 유사활성의 경우 비교적 낮은 상관성(R^2=0.31)을 보였다. 아질산염 소거능(R^2=0.43)과 ABTS 소거활성(R^2=0.08)의 경우는 내피와 외피를 제외하고는 항산화 활성이 측정되지 않아 상관관계가 나타나지 않았다.

석류의 식물성 에스트로겐의 양과 추출물의 항산화 활성과의 관련성을 비교한 결과(Fig. 8) 식물성 에스트로겐의 함량이 증가할수록 항산화 활성이 높아 양의 상관관계를 나타내었다. 식물성 에스트로겐의 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거능이 높아(R^2=0.82) Kim 등(36)의 연구결과와 유사하였다. 또한 SOD 유사활성, superoxide anion, 환원력의 경우도 각각 R^2=0.54, R^2=0.69, R^2=0.74로 양의 상관관계를 나타내었다. 아질산염 소거능(R^2=0.10)와 $ABTS^+$ 소거활성(R^2=0.23)의 경우는 내피와 외피를 제외하고는 항산화 활성이 측정되지 않아 상관관계가 나타나지 않았다.

요 약

이란산과 국내산 석류를 착즙하여 과즙과 부산물로 버려지는 외피, 내피, 씨의 4부분으로 나누어 기능성 성분과 항산화능을 분석하였다. 석류 부위별 추출물의 기능성 성분 중 총 페놀 함량은 국내산 석류 외피가 210 mg/g±8.08로 가장 높았고, 플라보노이드의 함량은 이란산 석류 내피와 이란산 석류 외피가 가장 높았다. Phytoestrogen 함량은 이란산에

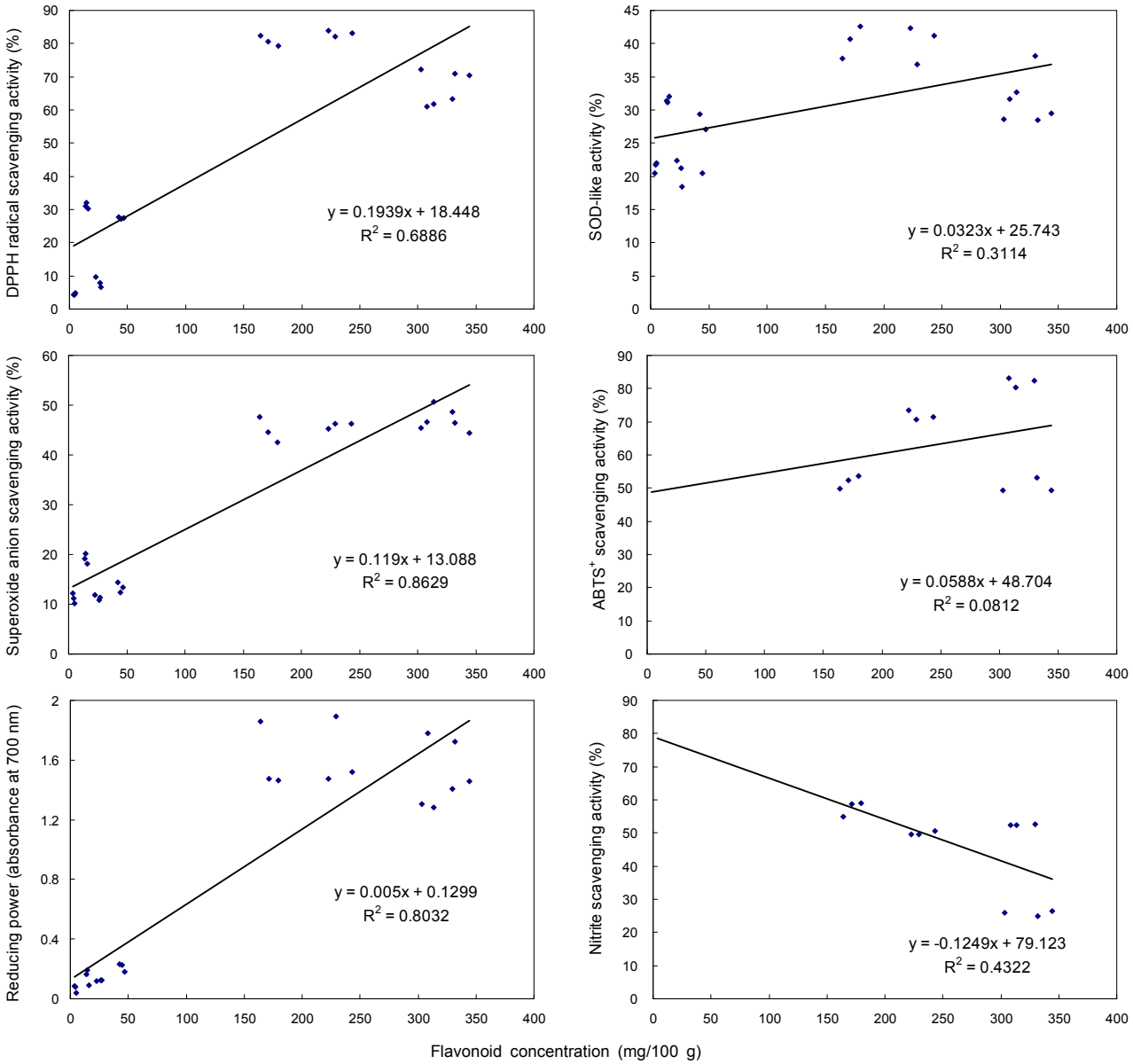

Fig. 7. Relationship between antioxidant activities and total flavonoid content of pomegranate extract.

비해 국내산 석류 내피에서 96.04 μg/mL로 가장 높게 측정되어 전반적으로 이란산 석류보다 국내산 석류의 기능성 성분의 함량이 높았다. 부위별 석류 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성과 SOD 유사활성, 환원력은 국내산 석류 내피의 활성이 가장 높았고 superoxide anion 소거활성에서는 이란산 석류 내피의 활성이 가장 높았다. $ABTS^+$ 소거활성에서는 이란산 석류 외피의 항산화능이 가장 높게 측정되었고, 아질산염 소거활성은 국내산 석류 외피추출물이 가장 높았다. 또한 석류의 총 폴리페놀, 플라보노이드, 식물성 에스트로겐의 양이 높을수록 항산화성이 높아 양의 상관관계를 나타냈다. 이상의 결과에 따르면, 기능성 성분은 국내산 석류에서 함량이 높았고 항산화활성은 각 항산화 측정 방법에 따라 조금씩 차이가 있지만 대체적으로 국내산 석류의 항산화능이 높게 분석되었다. 또한 부위별로 비교해 본 결과 석류는 과즙보다 껍질과 씨 부분 특히 내피에 기능성 성분의 함량이 많고 항산화 활성도 높게 나타났다. 따라서 과즙 착즙 시 버려지는 부산물인 석류의 외피와 내피는 기능성 성분 및 항산화성이 우수하여 식품의 산화방지를 위한 천연 항산화제로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Bae SY. 2004. Identification of linoleic acid and conjugated linolenic acid as phytoestrogenic components from *Punica grenatum* (pomegranate). *MS Thesis*. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
2. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. 2005.

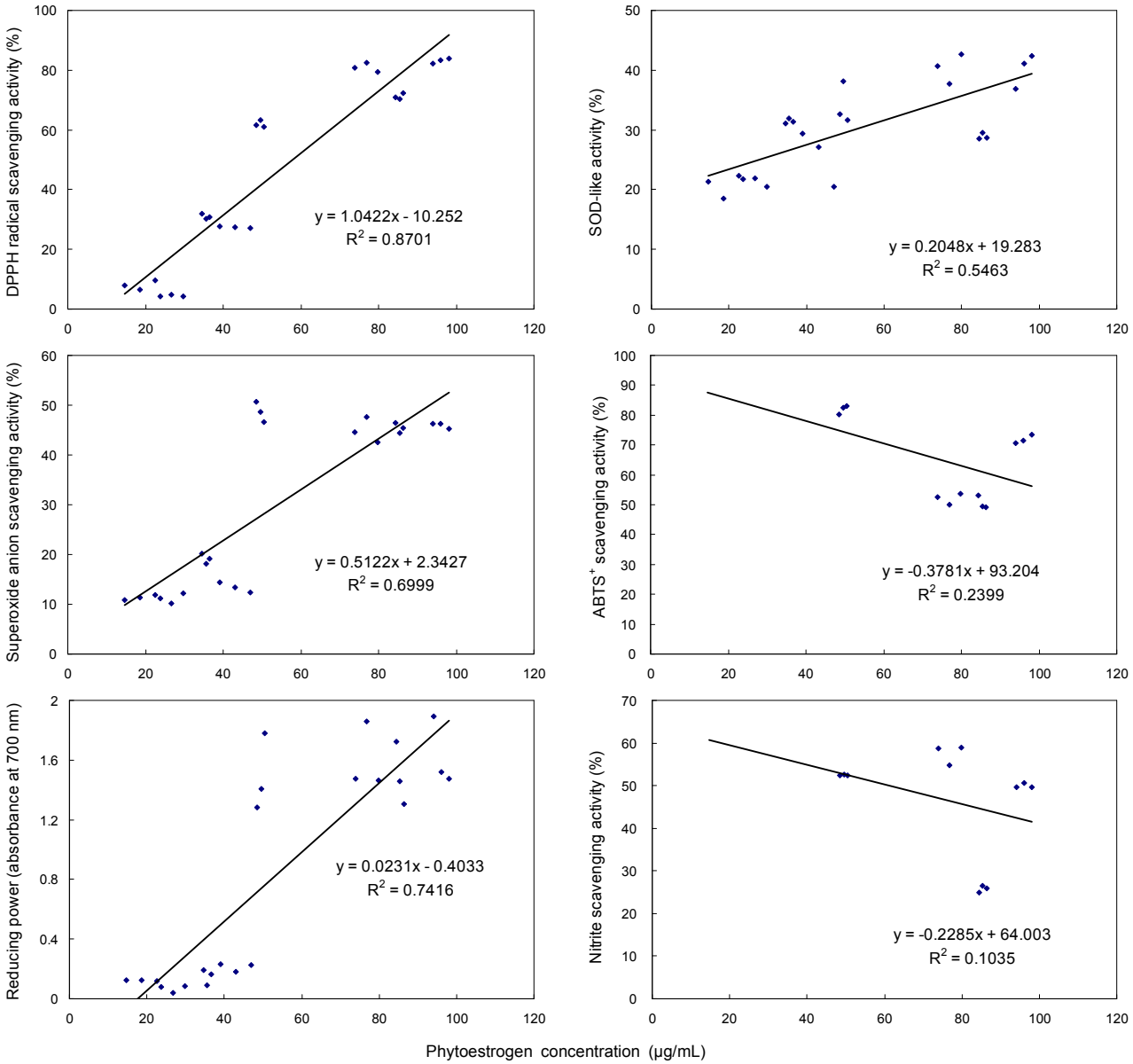

Fig. 8. Relationship between antioxidant activities and total phytoestrogen contents of pomegranate extract.

Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™. *Invest New Drugs* 23: 121-122.

3. 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.
4. Yu HK. 2006. Antioxidative effects and phytoestrogenic activities of ethanol extracts from pomegranate seeds. *PhD Dissertation*. Chung-Ang University, Gyeonggi, Korea.
5. 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.
6. Roh BK. 2005. Anti-oxidant and anti-aging activities of *Punica granatum* extracts. *MS Thesis*. Chung-Ang University, Gyeonggi, Korea.
7. Hyun PM. 2005. Purification and structural determination of punicalagin with immune suppressive activity from granati pericarpium. *MS Thesis*. Daejeon University, Daejeon, Korea.
8. Kwak HM. 2006. β-Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate peel. *MS Thesis*. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
9. Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Kor J Food Sci Tech* 28: 83-89.
10. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungastic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
11. Ko SH, Kim SI, Han YS. 2008. The quality characteristics of yogurt add supplemented with low grade dried-persimmon extracts. *Kor J Food Cookery Sci* 24: 735-741.
12. Lee SH, Jung BH, Kim SY, Chung BC. 2004. Determination of phytoestrogens in traditional medicinal herbs using gas chromatography mass spectrometry. *J Nutr Biochem* 15:

452-460.
13. Yang YJ, Lee SH, Chung BC. 1999. Profiling of urinary environmental estrogens by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Science & Technology* 12: 265-272.
14. Blois MS. 1958. Antioxidants determination by the use a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
15. 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.
16. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radicals scavenging activity of mushroom polysaccharide extract. *J Life Science* 60: 763-771.
17. 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.
18. 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.
19. Siddhuraju P, Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea seed extracts. *Food Chem* 101: 10-19.
20. 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.
21. Kato H, Lee IE, Chyen N, Kim SB, Hayase F. 1987. Uninhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
22. Aviram M, Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *J Atherosclerosis* 158: 195-198.
23. Takahara U. 1985. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin. *Phytochemistry* 24: 1443-1446
24. Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol* 92: 93-101.
25. Choi DW, Kim JY, Choi SH, Jung HS, Kim HJ, Cho SY, Kang CS, Chang SY. 2006. Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. *J Food Chemistry* 96: 562-571.
26. Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanol and hot water extraction. *Food Chem* 114: 717-726.
27. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi MH. 1996. Varietal differences in the phenolic contents and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44: 33-41.
28. Bors W, Saran M. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 2: 289-294.
29. Fitzpatrick DF, Hirschfiel SL, Coffey RG. 1993. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *J Physiol* 265: 774-778.
30. Miksicek RJ. 1993. Commonly occuring flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharm* 44: 37-43.
31. Breinholt V, Larsen JC. 1998. Detection of week estrogenic flavonoids using a recombinant yeast stain and a modified MCF-7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol* 11: 622-629.
32. Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, McLachlan JA. 2000. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding dependent and independent mechanisms. *Nutr Cancer* 38: 229-244.
33. Sack MN, Rader DJ, O'Cannon RO. 1994. Estrogen and inhibition of oxidant of low-density lipoproteins in postmenopausal woman. *Lancet* 343: 269-270.
34. Rosenberg RSZ, Jenkins DJA, Diamandis EP. 2000. Antiandrogen activity of flavonoids. *Clin Biochem* 33: 238.
35. Sánchez CS, González AMT, García-Parrilla MC, Granados JJQ, López Martínez MC. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta* 593: 103-107.
36. Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY. 2004. A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 16-21.

(2011년 4월 14일 접수; 2011년 7월 4일 채택)