

석류 잎 추출물의 항염 및 항산화 활성

최유정^{1,*} · 조정욱² · 김형주^{3,†}

¹건국대학교 생물공학과, 대학원생

²건국대학교 생물공학과, 대학원생

³건국대학교 생물공학과, 교수

(2024년 5월 23일 접수; 2024년 6월 16일 수정; 2024년 6월 18일 채택)

Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of Pomegranate Leaf Extract

Yu-Jeong Choi^{1*} · Jeong-Wook Jo² · Hyung-Joo Kim^{3†}

¹Graduate student, Department of Biological Engineering, Graduate School of Konkuk University

²Graduate student, Department of Biological Engineering, Graduate School of Konkuk University

³Professor, Department of Biological Engineering, Graduate School of Konkuk University

(Received May 23, 2024; Revised June 16, 2024; Accepted June 18, 2024)

요약 : 본 연구에서는 석류의 항산화 및 항염 효과를 평가하고, 이를 통해 석류 잎 추출물이 항노화 화장품 소재로서 활용될 가능성을 확인하고자, 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물(Ethyl acetate fraction of ethanolic extract of Punica granatum leaf : EFP)의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 항염 및 항산화 활성을 평가하여, 석류 잎의 유익한 성분과 피부 개선 가능성을 탐구하였다. 실험 결과 EFP의 총 폴리페놀 함량은 871.6 ± 16.3 mg gallic acid/g, 플라보노이드 함량은 36.6 ± 0.3 mg quercetin/g으로 나타났다. ABTS 라디칼 소거활성을 평가에서는 EFP가 농도 의존적으로 항산화능을 보였고, EC₅₀ 수치는 $24.62 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 피부 세포독성 실험에서 EFP는 $50 \mu\text{g/mL}$ 이하 농도에서 높은 세포 생존율을 보였으며, 이는 세포 독성이 거의 없음을 시사한다. NO 생성 억제 실험에서는 EFP가 낮은 농도에서도 효과적으로 NO 생성을 억제하였으며, $6 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 거의 완전히 억제되었다. 이러한 결과는 항산화와 항염 효과를 지닌 천연 화장품 소재로 활용 가능성을 기대할 수 있다.

주제어 : 석류, 분획물, 항노화, 항산화, 항염

Abstract : This study aims to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum*) leaves and to explore the potential of pomegranate leaf extract as an anti-aging cosmetic ingredient. The ethyl acetate fraction of ethanolic extract of pomegranate leaf (EFP) was assessed for its total polyphenol and flavonoid contents, as well as its antioxidant and anti-inflammatory activities. The beneficial components and skin improvement potential of pomegranate leaves were investigated. The results showed that the total polyphenol content of EFP

[†]Corresponding author
(E-mail: hyungkim@konkuk.ac.kr)

was 871.6 ± 16.3 mg gallic acid/g, and the flavonoid content was 36.6 ± 0.3 mg quercetin/g. In the ABTS radical scavenging assay, EFP exhibited a dose-dependent antioxidant activity with an EC50 value of 24.62 ± 0.48 $\mu\text{g/mL}$. In the skin cell cytotoxicity assay, EFP demonstrated high cell viability at concentrations below 50 $\mu\text{g/mL}$, indicating minimal cytotoxicity. In the nitric oxide (NO) production inhibition assay, EFP effectively inhibited NO production even at low concentrations, with near-complete inhibition at 6 $\mu\text{g/mL}$. These results suggest that EFP has the potential to be utilized as a natural cosmetic ingredient with antioxidant and anti-inflammatory properties.

Keywords : Pomegranate, fraction, anti-aging, antioxidant, anti-inflammatory

1. 서론

노화는 유기체 내에서 산화-항산화 방어 시스템의 균형이 깨지면서 나타나는 현상이다. 이 불균형은 세포와 조직에 손상을 주어 노화속도를 가속화 하고 다양한 노화 질환을 유발할 수 있다 [1,2]. 피부는 외부 환경과 직접 접촉하는 위치에 있기 때문에 여러 가지 주요 노화 유형을 경험한다. 노화는 크게 유전적 요인과 호르몬 변화에 따른 내인성 노화와 외부 환경적 요인에 의해 가속화되는 외인성 노화로 구분된다[3,4]

내인성 노화는 신체가 점차 성장하면서 자연스럽게 발생하는 생물학적 현상으로, 이 과정에서 피부의 구조와 기능이 서서히 변화하는 것이 특징이다[5]. 반면, 외인성 노화는 화학물질, 환경오염 등 외부 스트레스 요인들에 의해 촉진된다. 외인성 노화에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 자외선(Ultraviolet Radiation, UVR)으로, 자외선은 피부 세포의 DNA에 심각한 손상을 입히고, 산화 스트레스를 증가시켜 조기 노화를 초래할 수 있다[6]. 또한, 흡연, 식습관, 화학 물질 노출, 신체적 외상과 같은 생활 방식도 외인성 노화에 기여하여 주름, 탄력성 손실, 색소 변화 등의 가지적 징후를 야기한다[7].

노화는 연령이 증가함에 따라 자연스럽게 진행되며, 개인에 따라 진행 속도가 다르다.

이 과정에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이라는 반응성 화학 물질들이 중요한 역할을 한다. ROS는 세포에 손상을 주어 노화를 가속화하며, 연구에 따르면 이러한 산화 스트레스가 다양한 건강 문제를 유발할 수 있다 [8,9]. 항산화제는 ROS로 인한 산화 반응을 중화시키는 데 중요한 역할을 하며, 산화제를 안정된 분자로 전환하여 자유 라디칼 반응을 제거한다.

이 과정은 세포의 노화와 질병 발생을 줄이는 데 중요한데, 이는 항산화 효소와 소분자 항산화제 간의 상호 작용을 통해 이루어진다[10,11].

만성 염증은 노화와 밀접하게 관련되어 있으며, 장기간에 걸친 저강도의 염증 반응이 노화 과정을 가속화하고 다양한 연령 관련 질병의 위험을 증가시킨다[12,13]. 이러한 현상은 "염증성 노화"(inflammaging)라고 불리며, 이는 노화와 만성 질환의 발생에 중대한 역할을 한다[14]. 만성 염증은 비정상적인 염증 반응이 장기간 지속되어 세포와 조직에 지속적인 손상을 입히고, 이로 인해 다양한 연령 관련 질병이 발생하거나 악화되는 과정으로 만성 염증은 과도한 체중, 지속적인 스트레스, 불건강한 식습관 등 여러 외부 요인에 의해 촉발될 수 있다[15].

한편 석류(石榴; *Punica granatum* L.; pomegranate)는 아프가니스탄과 이란에 자생하는 나무로, 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다[16]. 석류의 열매와 나무의 다양한 부위에는 여러 종류의 설탕, 유기산, 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌, 지방산, 알칼로이드, 비타민 등이 포함된 대사산물이 존재한다. 특히 석류 씨에 포함된 estradiol, puniceic acid, estrogen, β -sitosterol의 생리활성과 섭취 효과가 연구되었으며[17], 과일에 함유된 플라보노이드는 강력한 항산화 활성을 지니며, 심장병과 암을 예방하는 잠재적인 영양 보충제로서 효소 억제 효과도 가지고 있다[18]. 게다가 석류 내피에 폴리페놀, 플라보노이드, 파이토에스트로겐과 같은 기능성 성분이 풍부하고 항산화 능력이 더 높게 나타나기도 했다[19]. 이에 따라 석류를 활용한 화장품 소재에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있으며, 현재까지 대부분의 석류 연구는 석류의 다양한 부위 즉, 과피, 씨, 열매 등에 초점을 맞추어, 주로

항산화 및 항균효과에 대한 효능을 검증하였다 [20-22]. 하지만 석류 잎에 대한 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 석류 잎의 에틸아세테이트 분획물을 사용하여 항산화 및 항염 효과를 평가하고, 이를 통해 석류 잎 추출물이 항노화 화장품 소재로서 활용될 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 석류 잎의 에틸아세테이트 분획물을 사용하여 폴리페놀 및 플라보노이드의 전체 함량 측정과 ABTS radical 소거능을 통해 항산화 효능을 평가하였으며, nitric oxide(NO) 생성 억제제를 통해 항염 효과를 평가하였다.

본 연구는 석류 잎이 가진 유익한 화학 성분들과 그 항산화 및 항염 메커니즘을 깊이 있게 이해하는데 기여할 것이며, 이는 석류 잎의 실제 응용 가능성을 탐색하는 데 중요한 기초 자료가 될 것으로 기대한다.

2. 실험

2.1. Punica granatum leaf 추출물 및 분획물 제조

본 연구에 사용한 시료는 충청북도 청주시에서 자생하는 석류나무 잎을 구입하여, 잎을 선별하고 건조시킨 후 보관하여 실험재료로 사용하였다. 석

류 잎 추출물은 먼저 70% 에탄올 1 L에 건조된 석류 잎 100 g을 넣어 50°C로 가열해 24시간 추출하였다. 추출액은 거즈를 이용해 걸러내어 석류 잎을 제거하였으며, 감압농축을 통해 용매를 제거하였다. 그 후 동결건조를 실시하여 남은 용매를 제거 후 물 100 mL를 이용해 재용해 하였다. 재용해된 추출물은 동량의 헥세인, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 순차적 혼합 및 분리 과정을 거쳤으며, 이때 얻어진 각각의 용매에 따른 추출물의 양과 비율은 Table 1과 같다.

그리고 나서 실험을 위해 각 추출물의 100 ml 당 함유된 플라보노이드 양과 이를 1g 당 함유하는 플라보노이드 양으로 환산한 값을 Table 2와 같이 측정해 비교하였다. 본 연구에서는 플라보노이드 수율이 $36.6 \pm 0.3\%$ 로 우수한 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물(Ethyl acetate fraction of ethanolic extract of Punica granatum leaf : EFP)을 사용하여 실험을 진행하였다.

2.2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 평가

총 폴리페놀 함량 분석은 Singleton et al. (1999)이 제안한 Folin-Ciocalteu(FC) 방법을 이용해서 진행하였다[23]. 실험에는 Folin-ciocalteu 시약 (phenol reagent, Junsei, Japan)과 10 % Na₂CO₃를 사용하였다. Folin-ciocalteu 시약 1

Table 1. Yield of Punica granatum leaf fractions

Solvent	Extract (mg/mL)	Yield(%)
Ethanol	17.1	42.75
Hexane	1.91	5.73
Chloroform	0.81	2.43
Ethyl acetate	2.04	6.12
Butanol	2.58	7.74
Water	6.36	19.08

Table 2. Flavonoid concentration in Punica granatum leaf fractions

Solvent	Flavonoid (mg Quercetin/mL)	S.D	Flavonoid(mg Quercetin/g)	S.D
Hexane	16.2	0.8	8.5	0.4
Chloroform	27.6	0.5	34.5	0.6
Ethyl acetate	91.6	0.7	36.6	0.3
Butanol	27.5	0.7	7.8	0.2
Water	37.7	0.7	6.0	0.1

mL와 희석된 시료 1 mL를 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후, 10 % Na₂CO₃ 1 mL를 추가하여 발색시켰다. 발색이 완료된 시료 200 μ L를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader(synergy HT, Biotek, USA)로 740 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 gallic acid standard curve를 바탕으로 환산을 실시하였다.

총 플라보노이드 함량 분석은 Cornard & Merlin(2002)의 방법을 이용해서 진행하였다[24]. 실험에 앞서 10% AlCl₃를 제조했으며 10% AlCl₃ 1 mL와 희석된 시료 1 mL를 혼합하여 15분간 반응시켰다. 반응이 완료된 시료 200 μ L를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader (synergy HT, Biotek, USA)로 405 nm 파장에서 흡광도를 측정해 시료의 플라보노이드 농도를 측정하였다. 결과는 quercetin standard curve를 바탕으로 환산을 실시하였다.

2.3. ABTS 라디칼 소거능을 이용한 항산화능 측정 (ABTS assay)

각 용매로 추출한 추출물 및 분획물의 항산화 활성은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼 소거 활성을 평가하여 측정하였다.

ABTS 시약(Sigma, USA)은 70% 에탄올 용액에 녹인 후, ammonium persulfate를 2.45mM가 되도록 첨가해 8시간 동안 발색을 유도하였다. 이후, 740 nm 파장에서 흡광도가 1.00이 도달하도록 희석해 사용하였다. 시료는 70% 에탄올 용액으로 희석하여 다양한 농도의 용액을 제조하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL와 희석 시료 0.2 mL를 혼합하여 20분간 반응시킨 후, 반응이 끝난 시료 100 μ L를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader(Synergy HT, Biotek, USA)를 이용해 740 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 실험 방법은 Re et al.(1999)[25]의 방법을 변형하여 사용하였다.

2.4. Raw 264.7에 대한 세포 독성 측정 (MTT assay)

본 연구에서 염증 억제 효과를 평가하기 위해 Raw 264.7 (한국세포주은행)을 사용하였으며, 실험에 앞서 세포 독성 실험을 진행하였다. 세포 배양 배지로 DMEM broth (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GE healthcare, USA)를 사용했으며, 여기에 10% FBS (fetal bovine serum,

Sigma, USA) 첨가해 제조하였고, 항생물질로는 Penicillin-Streptomycin (100X) (Sigma, USA)을 사용하여 제조하였다. 시료는 0.22 μ m syringe filter (whatman, UK)를 통해서 제균한 후 DMEM broth에 희석해 처리하였다.

먼저 Raw 264.7을 상기 배지를 사용하여 전배양한 뒤, cell scraper를 이용하여 dish에서 떼어낸 후, 96 well plate에 well 당 5.0 \times 10⁴ cell을 주입해 24시간 동안 배양하였다. 세포가 부착된 것이 확인되면 상층액을 제거한 후, 시료가 포함된 DMEM을 100 μ g/mL를 기준으로 여러 농도로 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 뒤, MTT 용액(5 mg/mL) 100 μ L를 첨가하여 온도 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 농도 5%의 조건에서 3시간 동안 MTT를 결정화시켰다. 그리고 나서 각 well에 생성된 결정이 제거되지 않게 상층액을 제거한 후 결정을 DMSO로 녹인 후 540 nm 파장에서의 흡광도를 측정해 세포의 생존율을 계산하였다.

2.5. Raw 264.7에 대한 nitric oxide 생성 억제 효과 측정

본 연구에서 염증 억제 효과를 평가하기 위해 Raw 264.7 (한국세포주은행)을 사용하였다. 세포 배양 배지로 MTT assay에서 사용한 배지와 동일한 배지를 사용하였으며 Punica granatum 추출물은 0.22 μ m syringe filter (whatman, UK)를 통하여 제균한 후 DMEM broth에 희석해 처리하였다.

Raw 264.7을 먼저 상기 배지를 사용하여 전배양한 뒤, cell scraper를 이용하여 dish에서 떼어낸 후, 96 well plate에 well 당 1.0 \times 10⁴ cell을 주입해 24시간 동안 배양하였다. 세포의 부착된 것이 확인되면 상층액을 제거한 후, Lipopolysaccharides (LPS) 1 μ g/mL 및 시료가 포함된 DMEM을 100 μ g/mL를 기준으로 여러 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액 100 μ L와 griess 시약 100 μ L를 반응시켜 30분간 반응시켰다. 그 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 계산하였다.

2.6. 통계처리

본 연구에서 수집된 자료의 분석을 위하여 통계 분석 프로그램 Minitab 18.1 (Minitab, LLC, USA)을 이용하였다.

모든 실험은 3회 반복 수행하였으며, 기술통계

를 실시하여 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 도출하였으며, 각 군의 비교를 위하여 Student's t-test를 시행하였다. 이때 통계학적인 유의성 검증은 유의수준 $p \leq .05$ 를 기준 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

페놀 화합물 또는 폴리페놀은 식물계에서 가장 널리 분포된 물질 중 하나로, 8,000개 이상의 구조가 알려져 있다. 이들은 식물의 2차 대사산물로, 하나 이상의 하이드록실기를 가진 방향족 고리를 포함한다[26]. 최근 연구에 따르면 페놀릭 화합물은 비타민 C, E, 및 카로티노이드보다 강력한 항산화제로 입증되었다. 식물 성분의 생리적 기능으로는 항돌연변이, 항종양, 암 예방, 항산화, 콜레스테롤 저하, 정장 작용 등 다양한 효과를 가진다고 보고되었다[27]. 특히, 식물은 외부 자극 및 광합성 과정에서 발생하는 활성산소종에 의한 산화적 손상으로부터 보호하기 위해 플라보노이드, 안토시아닌, 탄닌, 카테킨 등의 폴리페놀 화합물을 다량 함유하고 있다. 이러한 산화방지 물질은 산화적 스트레스를 유발하는 자유라디칼의 생성을 지연시키거나 억제한다[28]. 플라보노이드는 활성산소종을 효과적으로 제거하여 높은 항산화 능력을 가지며[29], 폴리페놀과 같이 항바이러스, 항염증, 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있다[30].

본 연구에서 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 분석한 결과, Table 4에 나타난 바와 같이 폴리페놀의 양은 871.6 ± 16.3 mg/g로 확인되었다. 이는 배초향[31], 방석나물[32], 제주 자생 조록나무[33]의 용매별 분획물과 비교할 때 매우 높은 폴리페놀 함량을 보였다.

이러한 결과는 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 높은 항산화 활성을 지니고 있음을 시사한다. 기존 연구들과 비교해 볼 때, 석류 잎의 폴리페놀 함량은 배초향, 방석나물 및 제주 자생 조록나무에 비해 월등히 높아 더 뛰어난 항산화 효과를 기대할 수 있다. 한편, 플라보노이드의 농도는 36.6 ± 0.3 mg quercetin/g으로 나타났으며, 이는 머루과피[34], 칠면초[35]의 플라보노이드 함량보다도 높은 수치였다. 이러한 결

과는 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 우수한 항산화 활성을 지니고 있음을 확인할 수 있다.

3.2. ABTS Radical 소거활성

ABTS는 ammonium persulfate 또는 hydrogen peroxide에 의해 산화되면 파란색을 띠며 740 nm에서 높은 흡광도를 나타낸다. 항산화 물질이 수소 이온을 공여하여 ABTS 라디칼을 소거하면 청록색이 탈색되고 흡광도가 감소하는데, 이 원리를 이용하여 항산화 효과를 평가한다[25].

본 연구에서는 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 항산화능을 ABTS 라디칼 소거법을 통해 평가하였다. 결과는 Table 3에 나타난 바와 같이, 200 μ g/mL 농도에서 $98.7 \pm 0.8\%$, 100 μ g/mL 농도에서 $93.2 \pm 2.3\%$, 50 μ g/mL 농도에서 $78.9 \pm 1.1\%$, 25 μ g/mL 농도에서 $50.2 \pm 3.9\%$, 12.5 μ g/mL 농도에서 $24.5 \pm 2.4\%$, 6.3 μ g/mL 농도에서 $8.0 \pm 2.2\%$, 3.1 μ g/mL 농도에서 $1.7 \pm 1.2\%$, 1.6 μ g/mL 농도에서 $0.6 \pm 0.6\%$ 의 소거능을 나타내었다. 이를 토대로 EC₅₀를 계산한 결과 EC₅₀은 $24.62 \pm 0.48 \mu$ g/mL로 나타났으며, 비교대상인 ascorbic acid의 EC₅₀은 $5.38 \pm 0.35 \mu$ g/mL로 확인되었다.

국내산 석류 내피 추출물(KPE)의 에틸아세테이트 분획물이 100 μ g/mL에서 98.13%의 소거능을 보여 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 실험 결과와 유사한 항산화 활성을 보였다[37]. 이는 석류 추출물이 다양한 조건에서 강력한 항산화 효능을 가질 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 석류 잎 추출물이 항산화제로서 활용될 가능성을 보여준다.

3.3. Raw 264.7에 대한 세포 독성 (MTT assay)

본 연구에서 Raw 264.7의 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물에 대한 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 100 μ g/mL 농도에서 $87.2 \pm 1.2\%$, 50 μ g/mL 농도에서 $93.7 \pm 1.9\%$, 25 μ g/mL 농도에서 $96.8 \pm 1.3\%$, 13 μ g/mL 농도에서 $97.3 \pm 0.6\%$, 6 μ g/mL 농도에서 $97.4 \pm 0.7\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 이는 50 μ g/mL 이하 농도에서는 Raw 264.7 세포에 대해 높은 생존율을 보여 세포 독성이 거의 없음을 의미하며, 농도에 따른 세포 독성을 평가하는 데 중요한 정보를 제공한다. 이러한 결과는 안전한 사용 농도를 결정하는 데 도움이 된다.

Table 3. ABTS radical scavenging activity of EFP

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Radical scavenging rate(%)	S.D
200	98.7	0.8
100	93.2	2.3
50	78.9	1.1
25	50.2	3.9
12.5	24.5	2.4
6.3	8.0	2.2
3.1	1.7	1.2
1.6	0.6	0.6

Table 4. Total phenolic contents and total flavonoid contents of Punica granatum extract

	Concentration (mean \pm S.D)
TPC	871.6 \pm 16.3 mg gallic acid/g
TFC	36.6 \pm 0.3 mg quercetin/g

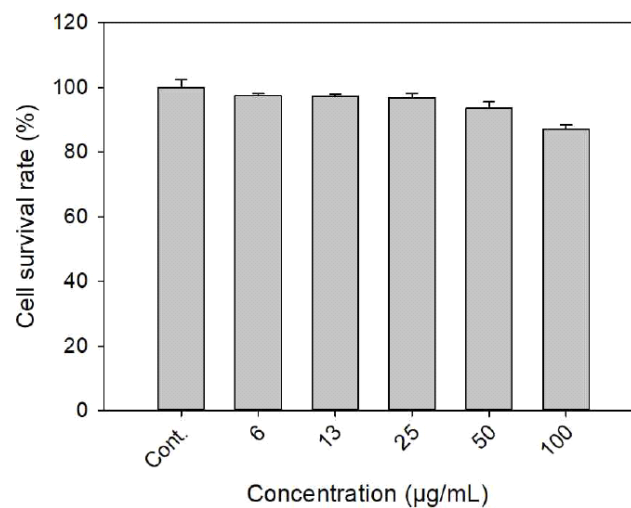


Fig. 1. Cell viability of Raw 264.7 cells treated with various concentrations of EFP.

또한, 본 연구에서 통계적으로 유의미한 독성이 관찰되었지만, ISO 10993-5 및 식품의약품안전처의 '의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격'에 따르면 세포 생존율이 80% 이상일 경우 독성이 없는 것으로 판단한다. 이러한 기준에 따라, 세포독성이 없다고 확인된 6-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 실험을 진행하였다.

3.4. Raw 264.7에 대한 nitric oxide(NO) 생성 억제 효과

Raw 264.7 세포는 LPS로 자극을 받았을 때, 염증 매개물질인 NO의 생산이 증가한다. 이는 염증이 발생한 조직 주변에서 NO 생성이 급격히 늘어나 초기 염증을 유발하고 악화시키는 역할을 한다[38].

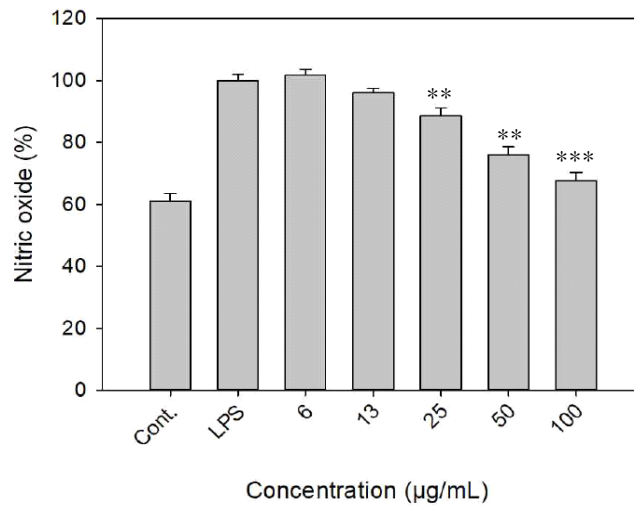


Fig. 2. NO production inhibition in LPS-stimulated Raw 264.7 cells treated with various concentrations of EFP; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

따라서, 본 연구에서는 LPS로 자극받은 Raw 264.7 세포에서 nitric oxide(NO) 생성 억제 효과를 평가하기 위해 다양한 농도의 시료를 처리하였다. 그 결과, 각 농도에서 NO 생성 억제율을 측정하여 아래와 같은 결과는 Fig. 2와 같다. 100µg/mL 농도에서 $67.6 \pm 2.7\%$, 50µg/mL 농도에서 $76 \pm 2.6\%$, 25µg/mL 농도에서 $88.6 \pm 2.5\%$, 13µg/mL 농도에서 $96.0 \pm 1.4\%$, 6µg/mL 농도에서 $101.7 \pm 1.9\%$ 의 NO 생성 억제율을 나타내었다. 이 결과는 시료가 낮은 농도에서도 효과적으로 NO 생성을 억제할 수 있음을 시사한다. 특히, 6µg/mL 농도에서 NO 생성이 거의 완전히 억제된 것은 시료가 염증 반응을 조절하는 데 유용할 수 있음을 의미한다. 결론적으로, 본 연구는 시료가 다양한 농도에서 NO 생성을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었으며, 특히 저농도에서의 강력한 억제 효과는 시료의 잠재적인 치료적 가치를 제시한다.

4. 결론

최근 천연물을 활용한 화장품 소재에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[37,38,39].

본 연구에서는 석류 잎 에탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물(Ethyl acetate fraction of

ethanolic extract of Punica granatum leaf : EFP)의 항산화 활성, 세포 독성 및 염증 매개물질인 nitric oxide(NO) 생성 억제 효과를 평가하였다. 실험 결과 EFP의 총 폴리페놀 함량은 871.6 ± 16.3 mg gallic acid/g으로 나타났으며, 플라보노이드 함량은 36.6 ± 0.3 mg quercetin/g으로 확인되었다. ABTS 라디칼 소거능 실험에서는 EFP는 농도 의존적으로 항산화능이 증가하였고, EC₅₀ 수치는 24.62 ± 0.48 µg/mL로 나타났다. 항염 활성을 평가하기 위해 수행한 피부 세포독성 실험에서는, EFP는 50µg/mL 이하의 농도에서 Raw 264.7 세포에 대해 높은 생존율을 보였다. 이는 세포 독성이 거의 없음을 의미하며, ISO 10993-5 및 식품의약품안전처의 '의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격'에 따라, 6-100 µg/mL 농도에서 안전한 사용이 가능함을 시사한다. NO 생성 억제 효과 실험에서는 EFP가 낮은 농도에서 효과적으로 NO생성을 억제하였다. 특히, 6µg/mL 농도에서 NO 생성이 거의 완전히 억제되어 염증 반응 조절에 유용할 수 있음을 보여준다. 이러한 결과는 EFP가 피부 개선을 위한 천연 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높음을 시사한다. 특히, 화장품 산업에서는 자연 유래 성분에 대한 수요가 높아지는 만큼, EFP는 항산화와 항염의 유망한 후보가 될 수 있다. 향후 연구에서는 석류 잎 분획물의 다양한 생리활

성을 더욱 깊이 있게 탐구하여, 석류 잎의 구체적인 기능성을 밝히고, 이를 통해 다양한 응용 분야에서의 활용 가능성을 모색할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 산림청의 산림기반 사회문제해결 실증기술개발(R&D) 사업(과제번호: 2022431B10-2324-0802)과, 농촌진흥청의 농업정책지원기술개발사업(과제번호: PJ0161852023)의 지원에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

References

1. H. Pratsinis, D. Kletsas, "Special Issue : Anti-Aging Properties of Natural Compounds", *Cosmetics*, Vol.6, No.4 pp. 67, (2019).
2. D. Verhaegen, K. Smits, N. Osório, A. Caseiro, "Oxidative Stress in Relation to Aging and Exercise", *Encyclopedia*, Vol.2, No.3 pp. 1545-1558, (2022).
3. P. K. Mukherjee, N. Maity, N. K. Nema, B. K. Sarkar, "Bioactive compounds from natural resources against skin aging", *Phytomedicine*, Vol.19, No.1 pp. 64-73, (2011).
4. D. J. Tobin, "Introduction to skin aging", *Journal of tissue viability*, Vol.26, No.1 pp. 37-46, (2017).
5. H. J. Lee, Y. J. Hong, M. R. Kim, "Structural and functional changes and possible molecular mechanisms in aged skin", *International journal of molecular sciences*, Vol.22, No.22 pp. 12489, (2021).
6. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, J. J. Voorhees, "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging", *Archives of dermatology*, Vol.138, No.11 pp. 1462-1470, (2002).
7. A. Vierkötter, J. Krutmann, "Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations", *Dermato-endocrinology*, Vol.4, No.3 pp. 227-231, (2012).
8. Y. S. Lee, Y. S. Bang, S. J. Seo, "Anti-aging and Antioxidant Activity of Smilax china Roots Extract", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.19, No.4 pp. 313-324, (2023).
9. Y. U. Jeong, H. Lee, H. Park, K. M. Kim, S. Kim, Y. J. Park, "Studies on Antioxidant, Anti-inflammation and Tyrosinase Inhibitory Activities of Melissa officinalis Extracts and Their Fractions", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.44, No.4 pp. 465-475, (2018).
10. E. D. Lephart. "Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms", *Ageing research reviews*, Vol.31, pp. 36-54, (2016).
11. H. Zhao, Z. Wang, F. Ma, X. Yang, C. Cheng, L. Yao. "Protective effect of anthocyanin from Lonicera caerulea var. edulis on radiation-induced damage in mice", *International journal of molecular sciences*, Vol.13, No.9 pp. 11773-11782, (2012).
12. C. Franceschi, J. Campisi, "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases", *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, Vol.69, Suppl 1 pp. S4-S9, (2014).
13. P. L. Minciullo, A. Catalano, G. Mandraffino, M. Casciaro, A. Crucitti, G. Maltese, G. Basile, "Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity", *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, Vol.64, No.2 pp. 111-126, (2016).
14. C. Franceschi, M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani, G. De Benedictis, "Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence", *Annals of the new York Academy of Sciences*, Vol.908, No.1 pp. 244-254, (2000).
15. S. N. Park, O. H. Lee, "Antioxidant and

- Anti-Inflammatory Activity of Brachythecium populeum Extract", *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, Vol.55, No.3 pp. 174-183, (2023).
16. L. Zhang, Y. Gao, Y. Zhang, J. Liu, J. Yu, "Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves", *Scientia Horticulturae*, Vol.123, No.4 pp. 543-546, (2010).
 17. J. H. Koh, M. O. Hwang, J. S. Moon, S. Y. Hwang, J. Y. Son, "Antioxidative and Antimicrobial Activities of Pomegranate Seed Extracts", *Korean Journal of Food and Cookery Science*, Vol.21, No.2 pp. 171-179, (2005).
 18. E. Shaygannia, M. Bahmani, B. Zamanzad, M. Rafieian-Kopaei, "A review study on Punica granatum L", *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, Vol.21, No.3 pp. 221-227, (2016).
 19. S. Y. Jin, "Study on Antioxidant Activities of Extracts from Different Parts of Korean and Iranian Pomegranates", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.8 pp. 1063-1072, (2011).
 20. S. H. Kim, "A Literature Review about Physiological Activities of Ten Fruits presented in Buddhist Ritual", PhD thesis, Kyonggi University, (2021).
 21. B. K. Roh, J. Y. Kim, J. Y. Kim, "Antioxidant Activities of Punica granatum Extracts", *Journal of the society of cosmetic scientists of korea*, Vol.31, No.2 pp. 207-212, (2005).
 22. E. A. Kim, "The functional characteristics of Hibiscus sabdariffa L. and Punica granatum L. as ingredients for beverage", PhD thesis, Dankook University, (2017).
 23. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagen", *Methods in Enzymology*, Vol.299, pp. 152-178, (1999).
 24. J. P. Cornard, J. C. Merlin, "Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)", *Journal of inorganic biochemistry*, Vol.92, No.1 pp. 19-27, (2002).
 25. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, No.9-10 pp. 1231-1237, (1999).
 26. N. E. S. Urquiaga, F. Leighton, "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress", *Biological research*, Vol.33, No.2 pp. 55-64, (2000).
 27. S. O. Lee, H. J. Lee, M. H. Yu, H. G. Im, I. S. Lee, "Total Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Vegetables produced in Ullung Island", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.37, No.2 pp. 233-243, (2005).
 28. Y. H. Pyo, T. C. Lee, L. Logendra, R. T. Rosen, "Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts", *Food chemistry*, Vol.85, No.1 pp. 19-26, (2004).
 29. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee, B. H. Lee, "Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.44, No.3 pp. 337-342, (2012).
 30. B. M. Kim, Y. E. Han, H. J. Lee, "Antioxidant and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction of the *Agastache rugosa* extract", *Korean journal of food science and technology*, Vol.49, No.3 pp. 331-337, (2017).
 31. J. H. Park, J. A. Lee, "Anti-oxidant, anti-inflammatory, and skin protective effects of the crude extract and its fractions from *Suaeda australis*", *Journal of Health and Beauty*, Vol.17, No.2 pp. 82-94, (2023).

32. H. R. Kim, G. N. Park, B. K. Jung, W. J. Yoon, Y. H. Jung, K. S. Chang, "Antioxidant Activity of Solvent Fractions from *Distylium racemosum* in Jeju", *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, Vol.48, No.2 pp. 62-67, (2016).
33. S. Y. Choi, H. S. Cho, N. J. Sung, "The Antioxidative and Nitrite Scavenging Ability of Solvent Extracts from Wild Grape (*Vitis Coignetia*) Skin", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.35, No.8 pp. 961-966, (2006).
34. K. S. Lee, J. C. Gim, S. M. Son, K. Y. Lee, "Antioxidative Effect of Suaeda japonica Ethanol Extract and Solvent Partitioned Fractions", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.6 pp. 804-808, (2011).
35. S. Y. Jin, "Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Pomegranate Endocarp", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.12 pp. 1635-1641, (2011).
36. Y. Yamamoto, P. He, T. W. Klein, H. Friedman, "Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production", *Journal of Endotoxin Research*, Vol.1, No.3 pp. 181-187, (1994).
37. Y. J. Jo, J. S. Hyun, C. Y. Kim, N. H. Lee, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Constituents from the Extracts of *Hydrangea macrophylla* Flowers", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.5 pp. 1356-1365, (2020).
38. J. M. Hyun, Y. J. Jo, Y. B. Kim, S. M. Park, K. S. Yoon, N. H. Lee, "Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of Flavonoids extracted from *dendranthema indicum* flowers in Jeju Island", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.36, No.4 pp. 1259-1267, (2019).
39. S. S. Nam, K. S. Ko, "Antioxidants of apple leaf extract", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.5 pp. 1116-1124, (2020).