

이란산 흑석류씨 추출물의 에스트로젠 활성 및 생리활성물질

김혁화 · 고종호*

한국폴리텍 바이오대학 바이오식품과

Estrogenic activity and Physiological Active Components of Iranian Black Pomegranate Seed Extracts

Hyuk-Hwa Kim and Jong-Ho Koh*

*Department of Bio-Food Technology, Korea Bio Polytechnic College

Abstract

This study was investigated on estrogenic activities and physiological active components of water extracts, ethanol extracts and oil of pomegranate seed. The extraction yields of water extract(PE-HW), 50% ethanol extract(PE-ET50), 80%ethanol extract(PE-ET80), 95%ethanol extract(PE-ET95), and fine oil of pomegranate seed were 28.5%, 14.5%, 13.2%, 12.3%, and 4.0%, respectively. The total ellagic acid contents of PE-HW, PE-ET50, PE-ET80 and PE-ET95 analyzed by HPLC were 195.0, 486.0, 399.4 and 251.4 $\mu\text{g/g}$. After hydrolytic treatment by hydrochloride, total ellagic acid contents of acidified PE-HW, acidified PE-ET50, acidified PE-ET80, and acidified PE-ET95 were 550.0, 1474.1, 1166.8, and 694.1 $\mu\text{g/g}$, respectively. In estrogenic evaluation by β -galactosidase assay, 17β -estradiol(E2) showed strong activity at 10^{-9}M , whereas all extracts and oil of pomegranate seed showed no significant results at 1.00 mg/ml. Daidzein and genestein was not detected in seed.

Keywords: pomegranate seed, estrogenic activity, ellagic acid, punicic acid

서 론

석류(*Punica granatum* Linne)는 석류과(*Punicaceae*)에 속하는 낙엽활엽 교목으로 석류과실의 껍질은 석류피(石榴皮, *Granati Pericarpium*), 석류씨는 석류자(石榴子, *Granati Semen*)라고 한다. 석류의 줄기 및 과피는 독성 및 부작용이 각각 class 3 과 class 2d로 평가되어 있으나, 석류자(石榴子)는 한방 원료로 생약 규격집에 등재되어 있으며 독성은 없다. 석류과실은 장과(漿果)의 노란 갈색에서 보라 빛 붉은 색이고, 지름이 5~12 cm이고, 껍질은 미끄럽고 가죽 같은 특성을 갖고 있으며, 많은 씨는 분홍색에서 보라 빛의 붉은 다즙성의 약간 신맛이 있는 과육으로 싸여 있다(Tous & Ferguson, 1996).

석류는 고대 이집트, 바빌론, 인디아 및 페르시아(현 이란)에서 재배되었고, 16세기에 멕시코와 미국 캘리포니아로 전도와 함께 전해졌다. 이란산 석류는 가장 오랫동안 알려진 식용과실 중의 하나로 지중해 국가를 비롯하여 인디아, 미국 캘리포니아, 중국, 일본 및 러시아에서 집중적으로 재배 소비되고 있다. 일본에서는 자구로(*Jakuro*)로 알려져 있고, 중국 실크로드를 통해서 평안시대(平安時代)에 전해졌다고 한다. 중국에는 한대(漢代)이후에 전해졌고, 고대 그리스의 의학의 아버지 히포크라테스가 저술한 의학서, 파피루스에 기록된 이집트의 의학서, 중국의 한방서, 인도 최고의 의학서인 आयुर्वेद에도 소개되어 있다. 석류과실의 주스함량이 높고 더 짙은 붉은 색일 때에 석류씨는 더욱 단단하고 작아서 석류과일을 그대로 식용하기가 곤란하다. 산업적으로는 석류피를 기계적으로 제거하고 석류씨가 함유된 상태로 압착 여과한 후 석류 농축액으로 가공되어 유통되고 있다.

Corresponding author: Jong-Ho Koh, Bio-Food Department of National Korea Bio Polytechnic College 315-1, Daehakro Ganggyeong-eup, Nonsan-si, Chungnam 320-905, Korea.
Phone: +82-31-746-7354, Fax: +82-31-746-7350
E-mail: gobells@dreamwiz.com

Fig. 1에서와 같이 석류씨 중의 estrogen, estradiol, β -sistosterol, punicic acid 및 ellagic acid의 생리활성이 보고되면서 석류씨에 대한 많은 연구들이 발표되고 있다(Junko et al., 2004; Seeram et al., 2005). 석류나 콩과류에서 발견되는 phytoestrogens의 주성분은 isoflavones와 lignans 등의 페놀성 화합물(Aviram & Dornfeld, 2001)이며, 이들 페놀성 화합물은 천연의 성호르몬과 공통성을 갖는 구조를 가지고 있으며, 심장혈관질환, 골다공증, 암 등의 만성질환에 대해서 예방효과가 있다고 보고되고 있다(Poyrazoglu et al., 2002; Goldfen & Monroe, 1997). Das et al.(2001)은 streptozotocin 유도 비만 쥐의 저혈당 활성의 실험에서 혈당수치의 현저한 감소가 있었다고 보고하였다. 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 2차 대사산물의 하나로서 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 항산화 효과를 비롯한 다양한 생리활성 기능을 나타내고 있다(Husain et al., 1987; Takahara, 1985). 석류를 비롯한 식물체에서 발견되는 ellagic acid는 폴리페놀 4개의 링으로 구성되어 있으며, 식물체 내에서는 전구물질인 ellagitannin 형태로 Fig. 2과 같이 존재한다.

Seeram et al.(2005)은 석류주스로부터의 punicalagin, ellagic acid 및 a total tannin extract에 의한 항산화 활성 및 apoptosis 활성을 보였다고 보고하였다. 또한 석류씨 오일 중에 다량 함유되어 있는 punicic acid와 같은 conjugated fatty acid는 항산화 및 항암 작용에 효과적인 물질이라고 보고되고 있으며(Longtin, 2003), 이 생리활성 물질을 이용한 새로운 기능성 식품에 대한 지속적인 연구가 진행되고 있다(Suzuki et al., 2001; Schubert et al., 1999).

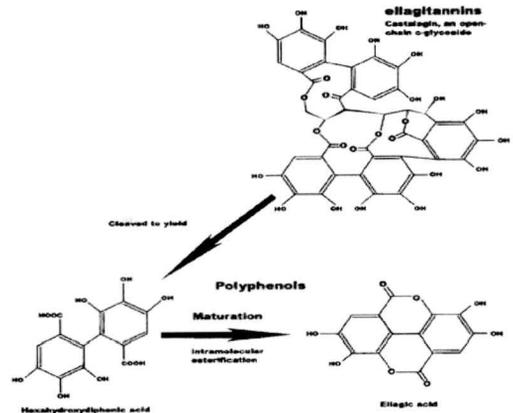


Fig 2. Structure of ellagitannin and ellagic acid.

일반적으로 식물성 천연물들의 생리활성은 추출 방법, 추출조건 등에 따라 유효물질의 함량 및 함유 패턴에 차이가 있다. 국내에서는 식품원료의 추출용매로는 물, 에탄올 및 헥산으로 한정되어 있어, phytoestrogens 및 활성물질이 함유되어 있다고 알려져 있는 석류씨의 추출물에 대하여 생리활성 및 물질의 탐색이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 이란산 흑석류씨의 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 오일에 대한 에스트로젠 활성 및 생리활성 물질에 대하여 탐색 하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용된 석류씨는 이란산 흑석류로부터

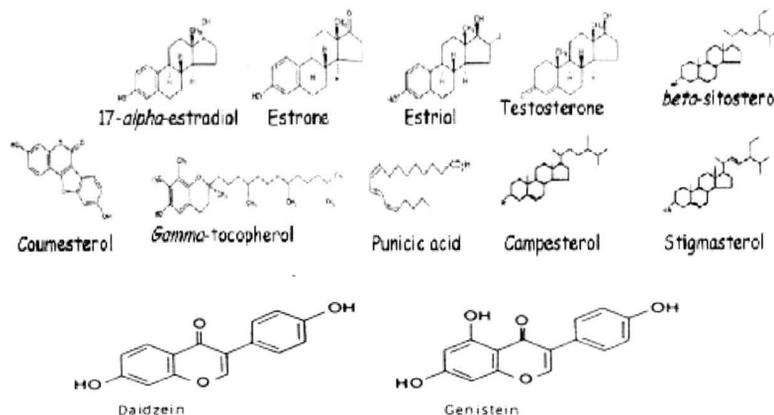


Fig 1. Compound known in pomegranate seed, daidzein and genestein.

얻었으며, 건조된 석류씨를 약 20~30 mesh로 분쇄 (IKA M20, IKA, Germany)하여 석류씨 추출물을 제조하는데 사용하였다.

추출물의 제조 및 수율측정

석류씨의 물 또는 에탄올 추출물의 시료는 조분쇄된 석류씨 건조물 1 Kg에 대하여 물 또는 에탄올을 사용하여 5 L로 조정후 100°C의 가열조건으로 8시간동안 환류 냉각하여 10,000×g로 15분간 원심분리(Hitachi-CR 21, Japan)한 후 동결건조하여 제조하였다. 열수로 추출한 시료는 석류씨 열수추출물(pomegranate seed extract with hot water, PE-HW)으로, 50% 에탄올로 추출한 시료는 석류씨 50% 에탄올추출물(50% ethanol로 처리한 pomegranate seed extract, PE-ET50), 80% 에탄올 및 95% 에탄올로 추출한 시료는 각각 석류씨 80% 에탄올추출물(ethanol로 처리한 pomegranate seed extract, PE-ET80) 및 석류씨 95% 에탄올추출물(ethanol로 처리한 pomegranate seed extract, PE-ET95)으로 명명하였다. PE-HW, PE-ET50, PE-ET80 및 PE-ET95에 대하여 염산 가수분해 처리를 한 시료는 각각 석류씨 열수추출 염산가수분해물(acidified PE-HW), 석류씨 50% 에탄올추출 염산가수분해물(acidified PE-ET50), 석류씨 80% 에탄올추출 염산가수분해물(acidified PE-ET80) 및 석류씨 95% 에탄올추출 염산가수분해물(acidified PE-ET95)로 하였다.

석류씨 오일은 건조 석류씨를 압출 방식의 착유기(NEW KJ 900, Ijogigong, Korea)로 압착하여 얻은 정제하기전의 석류씨 오일은 석류씨 정제전 오일(PE-raw oil)로, 또한 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취처리를 하여 정제한 석류씨 오일은 석류씨 정제후 오일(PE-fine oil)로 하여 사용하였다.

염산가수분해는 시료 250 mg에 대하여 0.1 N HCl 200 mL을 첨가하여 90°C에서 6시간 가수분해 시킨 후 실온에서 냉각한 다음 1 N NaOH로 중화시키고 250 mL로 조정하여 분석에 사용하였다.

추출수율은 추출전의 건조 석류씨의 중량에 대한 추출물의 중량 백분율로 계산하였으며, 시료는 -40°C로 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

Ellagic acid 분석

석류씨의 지표성분으로 알려진 ellagic acid 함량의 변화를 살펴보기 위하여 처리 조건별 시료를 Bianco et al.(1998)의 방법에 준하여 0.1% HCl 메탄올로 처리하여 90°C에서 6시간동안 추출한 후,

2,000×g에서 15분간 원리분리하고 상등액을 취하여 syringe filter(0.45 μm)로 여과한 후 HPLC(Youngin Sci., Korea)로 분석하였으며, 표준물질로는 ellagic acid(Aldrich Co., USA)를 사용하였다. Column은 Supelco/C₁₈(4.6×15 cm), detector는 UV 254 nm, 이동상은 H₂O-Acetic acid(A; 98:2, v/v)과 MeOH-Acetic acid(B; 98:2, v/v)으로 A비율을 99%로 5분간 유지하고 45분에 40%로 변화시키고 50분까지 flow rate을 1.0 mL/min으로 하였고, injection volume은 20 L로 하여 3회 반복 측정하였다.

재조합효모(Recombinant yeast)

CUP1 metallothionein promoter와 hER 유전자를 포함하는 vector와 reporter system으로 estrogen response element, β-gal 유전자를 안정적으로 발현하는 *Saccharomyces cerevisiae* ER+LYS 8127 (YER)은 한국식품연구원에서 공여 받았다. 효모 유지는 성장배지(3.35 g/ml yeast nitrogen base(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2% dextrose (Sigma, USA), 30 μg/ml L-lysine HCl(Sigma, USA), 35 μg/ml L-histidine-HCl(Sigma, USA)에서 Gaido et al.(1997)의 방법에 따라 하였으며, 효모의 보관은 20% glycerol(Sigma, USA)을 함유한 성장배지에서 -80°C이하 조건으로 하였다.

재조합 효모법을 이용한 에스트로젠 활성의 측정

효모의 배양은 성장배지에 접종한 후 200 rpm으로 교반되는 항온배양기에서 실시하였다. 배양된 각 효모를 적정 희석한 후, 500 μM CuSO₄(Sigma, USA)을 첨가하여 50 mL 코니칼 튜브에 분주한 후 Yeast Estrogen Receptor(YER)에는 각각 시료가 0.1%가 되도록 하였으며, 대조군으로는 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma, USA)을 사용하였다. 18시간동안 진탕배양한 후 각 튜브의 배양액을 동일한 농도로 조정 한 후 96 Well microtiter plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 100 μ씩 분주하였다. 각 well에 2 mg/ml o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (Sigma, USA), 50mM β-mercaptoethanol(Sigma, USA), 25U/g/ml zymolyase 20T(Seigagaku, Tokyo, Japan)를 포함하는 Z원충용액을 100 μ씩 분주하고 20분 후 발색 정도를 Microplate reader(Nunc, Roskilde, Denmark)을 이용하여 405 nm와 595 nm에서 측정하는 효모 에스트로젠 리셉터(Yeast Estrogen Receptor, YER) 분석을 하였다.

Daidzein 및 Genistein 분석

석류씨의 피토에스트로젠성 성분으로 알려진 Daidzein 및 Genistein의 총 함량을 분석은 Lee et al.(2002)의 방법에 준하여 1g 시료에 20 mL 96% 에탄올과 5N HCl을 가하고 10분간 초음파 처리를 한 후, 환류냉각기에서 3시간 동안 가열 가수분해 하여 이 때 에탄올의 산화방지를 위하여 BHT를 0.05%첨가하였다. 96%에탄올을 가하여 최종부피를 50 mL로 조정하고, 2,000×g에서 15분간 원리분리하고 상등액을 취하여 syringe filter(0.45 µm)로 여과한 시료를 HPLC(Youngin Sci., Korea)로 분석하였다. 표준물질로는 Daidzein 및 Genistein(Sigma Co., USA)의를 사용하였다. Column은 Supelco/C₁₈(4.6×15 cm), detector는 UV 260 nm, 이동상은 10% Acetic acid(Mobile Solvent A)과 Acetonitrile(Mobile Solvent B)을 77:23의 비율로 시작하여 8분 후에 30:70으로 선형구배가 되도록 변화시키고 12분 동안 77:23의 비율로 유지하였다. flow rate는 0.8 mL/min으로 하였고, injection volume은 10 L로 하여 3회 반복 측정하였다.

지방산 분석

석류씨 기름의 지방산조성을 분석하기 위한 전처리 는 AOAC(1995)법에 따라 행하였다. 즉, 시료를 삼각플라스크에 0.15~0.2 g 정도 취한 다음 0.5 N NaOH/methanol을 4 mL를 가한 후 환류 냉각하면서 10분간 가열하였다. 다음으로 14% BF₃/methanol 5 mL 가하고 2분간 반응시킨 다음 hexane 5 mL를 가하고 1분간 가열하였다. 반응 후 삼각플라스크를 분리 냉각시키고, 이를 test tube에 옮겨 포화 식염수를 가하고 hexane층을 분취하여 가스크로마토그래피에 주입하여 분석하였다(Koh et al., 2005). 사용한 칼럼은 SUPELCOWAX™-10(0.32 mm i.d.×60 m×0.25 µm film thickness, U.S.A), 검출기는 FID이

고, 온도는 주입기 240°C, 검출기 250°C, 오븐 180°C/1min-3°C/min-240°C/15min, 운반기체는 헬륨, 주입량은 1 µl이었다.

통계학적 분석

각 실험군 간의 활성비교는 Student t-test로 통계 처리하여 p<0.05수준에서 대조군에 대해 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율

제조된 석류씨의 열수추출물(PE-HW)의 추출수율은 28.5%이었고, 50%에탄올추출물(PE-ET50), 80% 에탄올추출물(PE-ET80), 및 95%에탄올추출물(PE-ET95)의 추출수율은 각각 14.5%, 13.2%, 및 12.3%을 나타내었다. 석류씨 10 Kg을 착유하여 500g의 석류오일(PE-raw oil)을 얻은 후, 인산수용액으로 탈검처리를 하고 NaOH수용액으로 처리한 후 탈산처리 및 활성탄으로 탈색하고 나서 탈취과정을 거쳐 400g의 정제유(PE-fine oil)을 얻었다.

Ellagic acid 함량

Singh et al.(2002)는 석류씨 및 석류피를 ethyl acetate, methanol 및 물로 추출하여 항산화 활성을 조사하여 메탄올에 의한 석류피 추출물의 경우가 beta-carotene-linoleate 및 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)의 항산화 model systems 모델 시스템으로 평가하여 가장 높은 항산화 활성이 보였지만, 석류씨 추출물은 항산화 활성은 낮았다고 평가하였다. El-Toumy & Rauwald(2003)은 석류로부터 3-O-methyllellagic acid 및 4,4'-O-dimethyllellagic acid를 포함해서 새로운 2개의 ellagic acid rhamnosides, 3-O-methyllellagic acid 4-O-alpha-L-rhamnopyranoside 및 3,4'-O-dimethyllellagic acid를 분리하였다.

Table 1. Contents of total ellagic acid in pomegranate seed extracts determined by HPLC

Sample	Whole seed	PE-HW ¹⁾	PE-ET50 ²⁾	PE-ET80 ³⁾	PE-ET95 ⁴⁾	PE-raw oil
Contents(mg/g)	26.3	195.0	486.0	399.4	251.4	n.d.
Sample		acidified ⁵⁾	acidified	acidified	acidified	PE-fine oil
Contents(mg/g)		PE-HW	PE-ET50	PE-ET80	PE-ET95	n.d.

1)Pomegranate seed extract with hot water

2)Pomegranate seed extract with 50% ethanol

3)Pomegranate seed extract with 80% ethanol

4)Pomegranate seed extract with 95% ethanol

5)Hydrolytic treatment with HCl

Ellagic acid를 HPLC로 분석한 결과 Fig. 3과 같이 RT 27분에서 표준물질 ellagic acid가 검출되었으며, 동일 조건에서의 석류씨 추출물에서도 ellagic acid가 검출되었다. 석류씨 추출물의 총ellagic acid 함량의 분석결과는 Table 1에서와 같이 석류씨는 총 ellagic acid 함량이 26.3 µg/g이었다. PE-HW, PE-ET50, PE-ET80 및 PE-ET95의 총ellagic acid 함량은 각각 195.0, 486.0, 399.4 및 251.4 µg/g이었으며, 산처리한 후인 acidified PE-HW, acidified PE-ET50, acidified PE-ET80 및 acidified PE-ET95의 총 ellagic acid 함량은 각각 550.0, 1474.1, 1166.8 및 694.1 µg/g이었다. 또한 PE-raw oil 및 PE-fine oil에서는 ellagic acid가 검출한계 이하였다. Lee et al.(2004)는 총 ellagic acid 함량 분석에서 석류추출물의 경우 33.9~1611 µg/g, 석류주스농축액의 경우 11~16.9 µg/g의 결과를 확인했다.

에스트로젠 활성

석류씨 추출물을 대상으로 0.01, 0.05, 0.10, 0.50

및 1.00 mg/mL의 농도에서 에스트로젠 활성을 호모 에스트로젠 리셉터(Yeast Estrogen Receptor, YER) 분석방법으로 실시하였다. YER 분석에서는 17β-estradiol(E2) 및 에스트로젠성 물질이 재조합 호모(Saccharomyces cerevisiae ER+LYS 8127) 내로 유입되어 expression vector에 의하여 발현된 호르몬 수용체와 결합하고, 이 후에 receptor vector에서 β-galactosidase의 발현을 유도하는 측정으로 진행된다. 에스트로젠 활성은 β-galactosidase의 발현 여부 즉, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG)가 β-galactosidase에 의해 전환되어 형성된 o-nitrophenol의 황색 발현으로 검출된다. E2는 양성 대조군으로 사용되며 10⁻⁹M에서 최대의 에스트로젠 활성을 나타내었다. 석류씨 추출물의 경우 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 및 1.00 mg/mL농도에서의 에스트로젠 활성을 E2의 최대 에스트로젠 활성과 비교하여 Table 2에 나타내었다. 에스트로젠 활성이 있는 경우 흡광도는 0.20~0.50이상의 발색을 보인다. 산기수분해한 석류씨 추출물 1.00 mg/mL농도에서도 의미 있는 흡광도는

Table 2. Estrogenic activities of Pomegranate seed extracts determined by yeast estrogen receptor assay

Sample(mg/ml)		Absorbance	Sample(mg/ml)		Absorbance
Vehicle		0.056±0.002	17β-estradiol(E2) 10 ⁻⁹ M		0.601±0.020
PE-HW	0.01	0.055±0.001	acidified PE-HW	0.01	0.078±0.005
	0.05	0.055±0.001		0.05	0.059±0.002
	0.10	0.055±0.002		0.10	0.060±0.002
	0.50	0.056±0.002		0.50	0.066±0.002
	1.00	0.055±0.002		1.00	0.059±0.001
PE-ET50	0.01	0.053±0.001	acidified PE-ET50	0.01	0.058±0.002
	0.05	0.055±0.001		0.05	0.058±0.001
	0.10	0.054±0.001		0.10	0.057±0.002
	0.50	0.058±0.001		0.50	0.058±0.001
	1.00	0.055±0.001		1.00	0.058±0.001
PE-ET80	0.01	0.055±0.001	acidified PE-ET80	0.01	0.059±0.002
	0.05	0.056±0.001		0.05	0.058±0.001
	0.10	0.057±0.003		0.10	0.059±0.002
	0.50	0.055±0.001		0.50	0.057±0.001
	1.00	0.056±0.001		1.00	0.059±0.001
PE-ET95	0.01	0.056±0.001	acidified PE-ET95	0.01	0.057±0.001
	0.05	0.055±0.001		0.05	0.056±0.002
	0.10	0.055±0.002		0.10	0.057±0.001
	0.50	0.059±0.002		0.50	0.056±0.002
	1.00	0.057±0.002		1.00	0.056±0.001
PE-raw oil	0.01	0.056±0.003	PE-fine oil	0.01	0.054±0.003
	0.05	0.054±0.003		0.05	0.055±0.003
	0.10	0.055±0.003		0.10	0.054±0.005
	0.50	0.054±0.003		0.50	0.053±0.002
	1.00	0.060±0.003		1.00	0.055±0.002

나타내지 않아 에스트로젠 활성이 관찰되지 않았다. 이란산 흑석류씨 추출물의 경우 에스트로젠 활성을 나타내기 위해서 상당히 높은 농도가 필요하거나 혹은 에스트로젠 화합물질이 함유되어 있지 않을 가능성 등에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

일본 및 미국에서는 석류씨추출물을 함유하는 제품이 다양하게 소개되고 있다. 일본의 페르시아자 구로익기스 제품은 피토에스트로겐이 풍부하게 함유된 100% 천연제품이라고 소개하고 있다. 에스트로젠 함량은 제품 100 g당 735 pg으로 설명하고 있다. Moneam et al.(1988)은 HPLC분석법으로 100g의 석류씨 추출물에 estrone 1.09 mg, coemestrol 0.036 mg이었다고 보고하였다. 또한 Kim et al. (2002)는 석류씨에 Fig. 3에서와 같이 17- α -estradiol, estrone, estriol, β -sitosterol 등의 피토에스트로젠 물질이 함유되어 있다고 보고하였다. Isafumi & June(2001)는 난소 절제된 쥐를 대상으로 석류농축액이 estrogen receptor binding(ER)에 대해 17 β -estradiol과 결합하여 MCF-7(human ER-positive cell)의 증식을 자극하였고 난소 절제된 쥐의 자궁 무게의 증가를 유발하였다고 하였다. Choi et al. (2002)은 이란산 흑석류 농축액 및 함유제품에서 2,3-di-MeO-estradiol이 0.04 ppm, quercetin 9,75 ppm, 그리고 17- β estradiol이 0.15 ppm이 검출되었다고 하였다. van-Elswijk et al.(2004)은 석류씨 오일 및 석류피 등을 대상으로 mass spectrometry 융합형 온라인 생화학적 검출방법(LC-BCD-MS)으로 에스트로젠성 물질을 확인한 후 on-line beta-estrogen

receptor (ER) 분석법으로 활성을 검토하여 석류피에서 luteolin, quercetin 및 kaempferol의 피토에스트로젠성 물질을 확인하였다. 그러나 Choi et al.(2005)은 HPLC 및 GC-mass spectrometry에 의한 석류의 steroid hormones 분석을 실시하여 estrone, β -estradiol 등의 물질이 검출되지 않았다고 보고하였다.

Daidzein 및 Genistein 함량

Daidzein 및 genistein 표준물질을 HPLC로 분석 실시한 결과 daidzein 및 genistein의 RT는 각각 7.42분 및 10.33분이었으나, 석류씨의 물 및 에탄올 추출물 및 오일의 경우에는 daidzein 및 genistein의 RT 부근에 일치하는 뚜렷한 peak는 검출되지 않았다.

Choi et al.(2002)은 이란산 흑석류 농축액 및 함유제품에서 daidzein 23.72ppm, genistein 0.29ppm이 검출되었다고 보고하였다.

지방산 함량

석류씨 오일에는 일반적으로 종자유에서 검출되지 않는 4개의 peak가 검출되었으며, 이들의 함량은 65.0%이었다. 오일의 주성분은 punicic acid로 함량은 약 47%이었으며 linoleic acid는 8.2%이었다.

Melgarejo et al.(1995) 및 Takagi(1966)은 석류씨 기름의 지방산 조성을 분석한 결과, conjugated octadecatrienoic acid를 분리 동정하였으며, 이들 중 punicic acid(99-cis, 11-trans, 13-cis)의 함량이 65.3%에 이른다고 보고하였다. 따라서 석류씨 기름의 미지의 지방산은 다양한 생리활성을 나타내는 linoleic acid의 기하학적 이성질체로 사료된다. Conjugated octadecatrienoic acid는 항산화작용을 비롯하여 항암 작용, 항동맥경화증 및 면역증진 효과가 있는 것으로 알려져 있어 새로운 기능성 소재로서 이용할 수 있을 것으로 기대된다(Longtin, 2003; Nugteren & Christ, 1987; Suzuki et al., 2001).

요 약

본 연구에서는 석류씨의 물 추출물, 에탄올 추출물 및 오일의 에스트로젠성 활성 및 생리활성 성분에 대하여 조사하였다. 석류씨의 열수 추출물(PE-HW), 50%에탄올 추출물(PE-ET50), 80%에탄올 추출물(PE-ET80), 95%에탄올 추출물(PE-ET95) 및 오일 추출물(PE-raw oil)의 추출수율은 각각 28.5%,

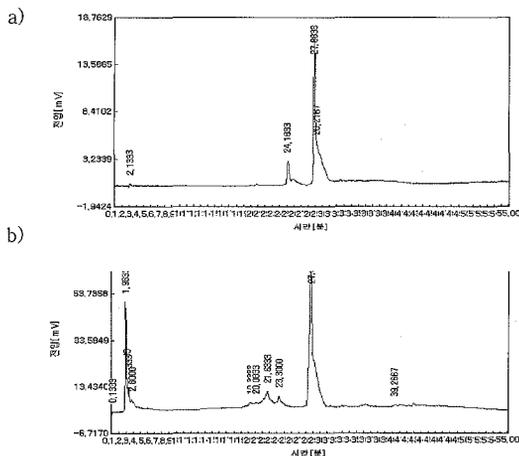


Fig 3. Pattern of ellagic acid of pomegranate seed determined by HPLC.

a) ellagic acid standard b) pomegranate seed

14.5%, 13.2%, 12.3% 및 4.0%이었다. 또한 각각의 Ellagic acid 함량을 HPLC로 분석한 결과 PE-HW, PE-ET50, PE-ET80 및 PE-ET95의 총ellagic acid 함량은 각각 195.0, 486.0, 399.4 및 251.4 µg/g이었으며, 산처리한 후인 acidified PE-HW, acidified PE-ET50, acidified PE-ET80 및 acidified PE-ET95의 총 ellagic acid 함량은 각각 550.0, 1474.1, 1166.8 및 694.1 µg/g이었다. β-galactosidase 분석법에 의한 에스트로젠성 활성은 표준물질인 17β-estradiol(E2)는 10⁻⁹ M에서 뚜렷한 활성을 보였지만, 석류씨의 각 추출물 및 오일에서는 1.00 mg/mL에서도 활성을 보이지 않았다.

참고문헌

- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. U.S.A.
- Aviram M and Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* **158(1)**: 195-198
- Bianco MA, Handaji A and Savolainen H. 1998. Quantitative analysis of ellagic acid in hard wood samples. *The Science of the Total Environment* **222**: 123-126
- Choi DW, Kim JY, Choi SH, Jung HS, Kim HJ, Cho SY, Kang CS and Chang SY. 2005. Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. *Food Chemistry* **96(2)**: 254-260
- Choi OK, Chung KC, Cho GS, Hwang MO and Yoo YS. 2002. proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian Black pomegranate extract and its products. *Korean J. Food & Nutri.* **15(2)**: 119-125
- Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Saha BP and Pal M. 2001. Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother Res.* **15(7)**: 628-9
- El-Toumy SA and Rauwald HW. 2003. Two new ellagic acid rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. *Planta Med.* **69(7)**: 682-4
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Protier CJ and McDonnell DP. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**: 205-212
- Goldfien A and Monroe SE. 1997. In *Basic & clinical endocrinology*, 5th ed. (Greenspan, FS and Strewler, GJ ed) Appleton Lange Company, London, Pp474-477
- Husain SR, Cillard J and Cullard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.* **26**: 2489-2491
- Isafumi M and June Ohnishi. 2001. An estrogen-like activity in pomegranate Juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kagaku Kaishi* **48(2)**: 146-149
- Junko MO, Yoko OH, Hideyuki YH and Hiroyuki Y. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology* **92(1)**: 93-101
- Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, Poirier D, Nicholls P, Kirby A, Jiang W, Mansel R, Ramachandran C, Rabi T, Kaplan B and Lansky E. 2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **71**: 203-217
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY and Son JY. 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of pomegranate seed extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* **21(2)**: 71-179
- Lee JH, Kim SD, Lee JY and Kim HS. 2004. Quantitation of ellagic acid in concentrated pomegranate extracts and their juices. *Food Sci. Biotechnol.* **13(3)**: 381-383
- Longtin, R. 2003 The pomegranate : nature's power fruit. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**: 346-348
- Melgarejo P, Salazar DM and Amoros A. 1995. Total Lipids Content and Fatty Acid Composition of Seed Oils from Six Pomegranate Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **69(2)**: 253-256
- Moneam NM, el Sharaky AS, Badreldin MM. 1998. Oestrogen content of pomegranate seeds. *J Chromatogr.* **22;438(2)**: 438-42
- Myung HL, Park YH, Oh HS and Kwak TS. 2002. Isoflavone Content in soybean and its processed products. *Korean J. Food Sci Technol.* **34(3)**: 365-369
- Nugteren, DH and Christ-Hazelhof, E. 1987. Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **33**: 403-417
- Poyrazoglu E, Gokmen V and Artik, N. 2002 Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **15(5)**: 567-575
- Schubert SY, Lansky EP and Neeman I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* **66**: 11-17
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, and Heber D. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **16(6)**: 360-367
- Singh RP, Chidambara Murthy KN and Jayaprakasha GK. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate

- (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric Food Chem.* **50(1)**: 81-6
- Suzuki R, Noguchi R, Ota T, Abe M, Miyashita K and Kawada T. 2001. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids* **36**: 477-482
- Takagi, T. 1966. Stearic configurations of parinaric and punicic acid, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* **43**: 249
- Takahara, U. 1985 Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin. *Phytochemistry* **24**: 1443-1446
- Tous, J and Ferguson L. 1996. Mediterranean fruits. Janick(ed) Press in new crops. ASHS Press, Arlington, VA. Pp416-430
- van-Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H and van der Greef J. 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* **65(2)**: 233-41

(접수 2007년 10월 11일, 채택 2007년 10월 30일)