J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 1, pp. 79~82 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

속보 (Short Communication)

LC/MS/MS를 이용한 석류추출물 중의 에스트로겐 분석

금은주[1] · 권도형[1] · 신혜승[2]*
[1]한일양행 중앙연구소, [2]국립한경대학교 한경분석센터

Analysis of Estrogen in Pomegranate Extract by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Eun Joo Kum[1], Do Hyeong Kwon[1], and Hye Seoung Shin[2]*
[1]*Research center of Hanil, Anseong City Gyeonggi-do, Korea*
[2]*Analysis center of Hankyung, Hankyung University, Anseong City, Gyeonggi-do, Korea*
(Received March 9, 2010/Revised March 13, 2010/Accepted March 16, 2010)

ABSTRACT - The pomegranate (*Punica granatum)*, especially its fruit, possesses a vast ethnomedical history and represents a phytochemical reservoir of heuristic medical value. The tree and fruit can be divided into several anatomical compartments, and the fruit juice, peel and oil are known to be weakly estrogenic and heuristically of interest for treatment of menopausal symptoms and sequellae. In this study, analysis of estrogen in pomegranate extract was carried out with LC/MS/MS. Three batches of pomegranate extract samples were used to analysis the target compounds (estrogen). The contents of estrogen derivatives in the samples were 38.6 ppb of estriol, 83.5 ppb of estrone, and 10.9 ppb of estradiol. This result suggests that the pomegranate extract can used for treatment of menopause symptoms in the woman.

Key words : pomegranate, estrogen, LC/MS/MS

석류(*Punica granatum* L.)는 석류과에 속한 낙엽소목으로서 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이며, 현재는 아열대 및 열대 각지에 널리 퍼져 있는 식물이다. 열매, 줄기껍질과 뿌리의 껍질은 고혈압과 동맥경화 예방에 사용되었으며[1], 이질, 장염, 항산화[2,3], 항염증, 항암[4] 효능 등 임상적 효능이 보고되었다. 뿐만 아니라 국내외 보고된 논문에는 석류 중에 estrone, estradiol, punicic acid, β-sitosterol 등의 여러 생리활성 물질에 관한 연구[5], phytoestrogen성 물질 분석에 관한 연구[6]와 안면홍조 및 우울증 개선에 관한 갱년기 증상 개선효능에 관한 연구[7,8]등이 있다.

일반적으로 에스트로겐류는 estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3) 로 나누며 그 구조는 Fig. 1과 같다. 에스트로겐성 물질의 분석에 사용되는 방법은 Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)와 high performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)법이 있으나, 시료에서의 미량 존재로 인해 복잡한 전처리, 다량의 시료 필요, 검출 한계 등의 문제에 직면하였다[9,10]. 따라서 본 연구는 LC-MS/MS를 이용하여 석류추출물 중의 에스트로겐성 물질을 분석하고자 하였으며, 소량의 시료를 사용하여 간편하고 정확하게 정량하는데 목적이 있었다.

실험에 사용된 석류추출물은 한일양행에서 제조한 것을 사용하였으며, 석류 과실은 껍질을 제거 한 후 분쇄기로 조분쇄하여 씨를 제거하여 압착하였으며, 주정과 물로 추출하였다. 추출 된 시료는 농축 후 95% 주정으로 정제하여 65brix로 농축 후 실험에 사용하였다. 본 연구에 사용된 LC/MS는 시료 자동주입기(Agilent 1200 series G1313A, Autosampler)가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 series HPLC를 사용하였으며, 분리된 각 물질의 분자량 확인을 위해 Agilent 6410 Triple-quadrupole tandem LC/MS/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 에스트로겐 분석을 위해 시료는 추출, 정제, 농축하였으며, LC/MS/MS ESI negative mode에서 Extend C18 컬럼을 이용하여 분석을 실시하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

고체상 추출법에 사용한 카트리지는 Oasis HLB (200 mg, 6cc)와 Oasis MCX (150 mg, 6cc) 카트리지를 Waters사 (Milford, Massachusetts, USA)에서 구입하여 사용하였으며

*Correspondence to: Hye Seoung Shin, Analysis center of Hankyung, Hankyung University, Anseong City, Gyeonggi-do, Korea
Tel: 82-31-670-5484
E-mail : clarashin@paran.com

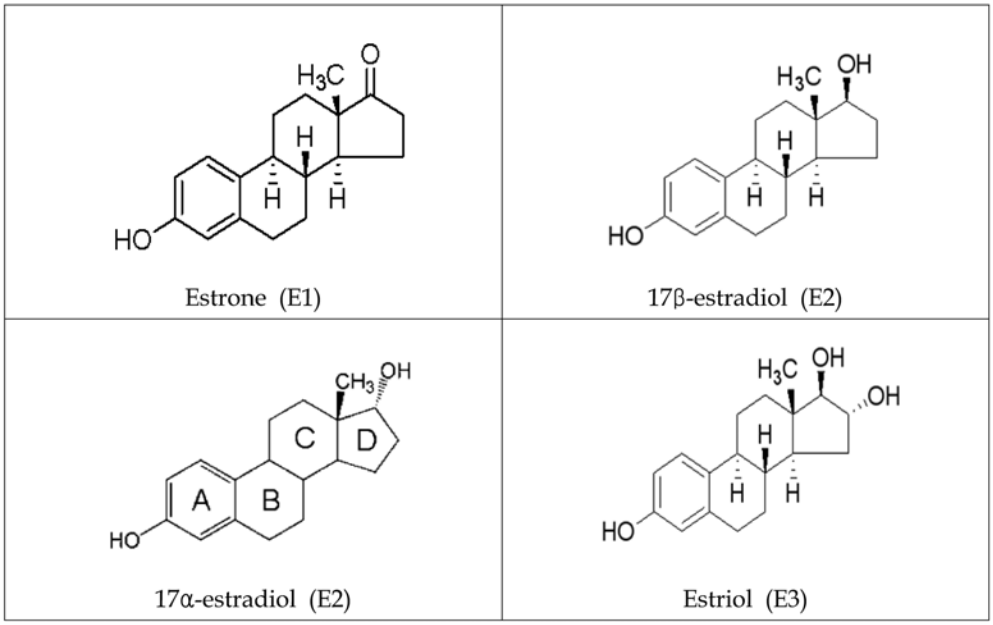

Fig. 1. Structures of estrogen.

Table 1. LC/ESI-MS/MS operating parameters for estrogen

Parameters	Conditions
Column	Agilent Extend C_{18} column, 2.1 mm ×50 mm, 1.8 μm particle size
Mobile phase	A : 0.1% NH_3 in Water B : Acetonitrile
Gradient	Time(min) 0 3 10 12 21.1 Solvent B(%) 10 20 50 10 10
Column folw rate	0.3 mL/min
Injection volumn	5 μl
Column temperature	40°C
Ionization mode	negative ion electrospray
Capillary voltage	4.00 kV
Gas temperature	350°C
Gas flow	8 L/min(nitrogen)
Nebulizer	35psi

vacuum manifold는 Supelco사 (Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다. 시험에 사용된 estrone, 17α-estradiol, 17β-estradiol, estriol 표준품은 Sigma사로부터 구입하였으며, 메탄올, 아세토나이트릴, 아세톤 등의 용매는 J.T.Baker사(NJ, USA)의 시약을 사용하였고, 암모니아는 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다. 표준용액은 메탄올을 이용하여 농도비에 맞게 메탄올로 희석하여 사용하였다.

추출이 완료된 시료 1 ml를 취하여 NaCl 0.2~0.3 g 정도를 첨가한 후 5 ml의 메탄올과 6N HCI을 첨가하여 50°C 수용액에서 20분간 산 가수분해하였다. 산 분해 후 Na_2SO_4를 약 0.5 g 첨가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과하였다. 추출과 농축을 위하여 Sep-Pak C_{18} 카트리지를 이용하여 시료를 용출시킨 후 이 용액을 다시 질소농축기로 농축하였다. 메탄을 500 μl로 잔사를 녹여 0.22 μm syringe filter를 가지고 여과시킨 후 2 ml 갈색 vial에 옮겨 LC/ESI-MS/MS로 분석하였다.

물질의 정량을 위해 표준물질 estrone, estradiol, estriol의 종류별로 표준 곡선을 작성하였으며, 각 표준곡선의 상관계수 R^2=0.999 이상으로 나타났으며 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 석류과육추출물 3개 롯트 시료 중의 에스트로겐을 정량한 결과, 평균 함량은 estrone 83.5ppb, estradiol 10.9ppb 및 estriol 38.6ppb으로 검출되었다. 또한 estrone의 retention time은 7.49분, 17α-estradiol은 6.90분, β-estradiol은 7.11분 그리고 estriol은 3.14분으로 나타났으며 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 표준물질 4종과 석류추출물을 분석한 결과, 사용한 용매 조건에 의해 물질의 분리는 확연히 나타났으며, 시료에 따라 함량에는 차이가 나타났으나, 석류과육추출물이 에스트로겐류 물질을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다. 과거에는 석류 과육 중 에스트로겐류의 유무에 관해 논란이 있었으며 일부 논문에서는 석류과육 중에는 에스트로겐류가 없는 것으로 발표한 바 있다[1,11]. 그러나 최등의 논문에서는 석류추출물에 0.15ppm의 에스트라디올이 존재한다고 보고하였으며[6], Arao 등의 논문에서는 BG1Luc4E 세포에서 ERα, ERβ 활성을 측정한 결과, 석류주스가 대조군 대비 3.12배의 에스트로겐 활성을 나타낸다고 보고하였다[12]. 최 등의 논문에서는 Yeast estrogen receptor를 이용하여 석류과육의 에스트로겐 활성의 측정 결과, 대조군 대비 5%의 에스트로겐 활성을 나타내었다[13]. 또 다른 보고에 의하면 석류주스를 11일간 매일 226 g 섭취한 폐경기 여성의 혈청 내 에스트

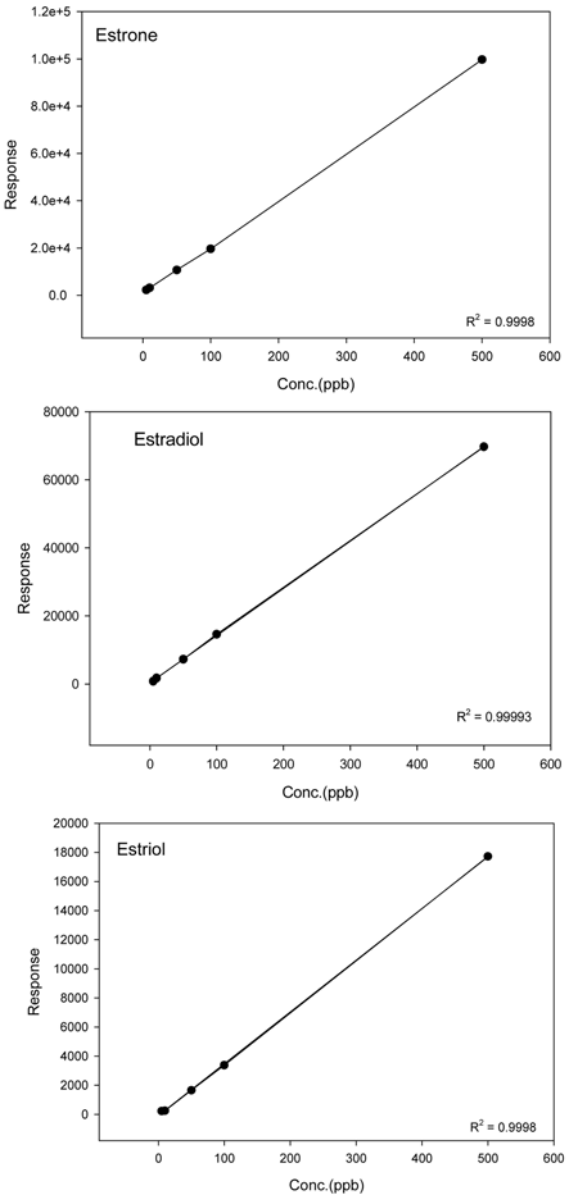

Fig. 2. Standard curve of estrogen.

론 양은 증가하였다고 보고하였다[14]. 또한 Seeram 등은 석류주스를 1주간 섭취한 폐경기 여성의 에스트론 함량이 유의적으로 증가하였다고 보고하였다[15]. 이러한 결과의 차이는 실험에 사용된 과실의 품종, 숙성정도, 분석물질의 추출 및 정제 공정, 분석시료의 전처리 과정, 분석 방법 및 기기 감도 등 다양한 원인에 의해 나타나는 것으로 생각된다. 본 연구에 사용한 석류추출물은 과육 중의 에스트로겐 성분을 최대화하기 위하여 주정을 이용한 정제과정을 거쳤으며, 분석 시에 산가수분해와 Sep-pak 여과 과정을 거쳐 좀 더 간편한 분석법을 시도하였다. 기존의 에스트로겐 분석방법 중 GC-MS를 이용한 방법은 hydroxyl기를 유도체화 해야 하는 번거로움이 있었으며, LC를 이용한 분석방법의 경우 물질의 정성분석이 불가능하여 정확

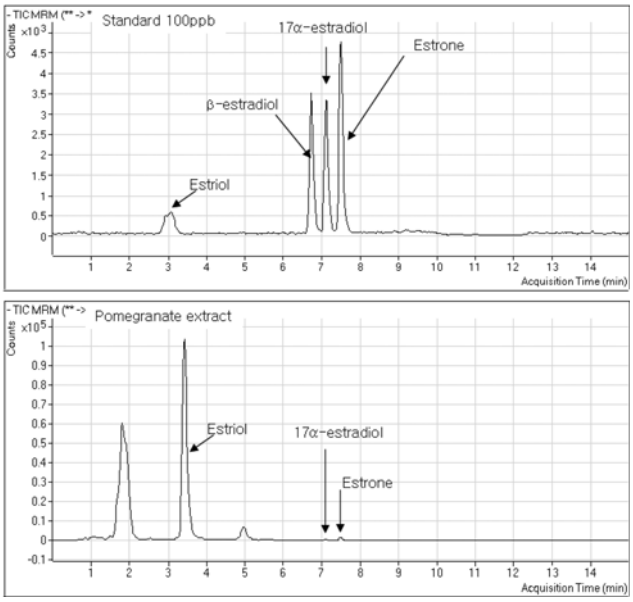

Fig. 3. Chromatogram of pomegranate extract and standard.

한 분석이 불가능하였다. 이에 본 연구는 석류추출물 중의 estrone, estradiol 그리고 estriol 3가지 물질을 LC-MS-MS를 이용하여 동시 분석 및 정량, 정성분석 하였으며, 유도체화 과정을 거치지 않고 신속한 전처리를 통해 에스트로겐류 물질을 분석하는데 의의가 있다고 하겠다.

요 약

석류는 오래전부터 임상치료 및 식품원료로 사용되었으며 많은 피토에스트로겐 성분을 함유하고 있다. 그 성분으로는 에스트론, 에스트라디올, 에스트리올, 베타-시토스테롤, 엘라그산 등이 있으며 이러한 성분으로 인해 과즙, 껍질, 오일 등은 약한 에스트로겐 활성을 나타낸다고 보고되었으며, 이로 인해 석류는 여성 갱년기 치료용 원료로 많이 사용되고 있다. 그러나 에스트로겐 성분의 존재 유무에 대한 견해의 차이가 나타나고 있어 본 연구는 LC/MS/MS를 이용하여 석류추출물 중의 에스트로겐 분석을 통해 이를 확인하고자 하였으며, 간편하고 정확한 분석법을 모색하고자 하였다. 3개 롯트 시료의 에스트로겐을 분석한 결과, 에스트론 83.5ppb, 에스트라디올 10.9ppb 및 에스트리올 38.6ppb로 검출되었다.

참고문헌

1. Choi, D.W., Kim, J.Y., Choi, S.H., Jung, H.S., Kim, H.J., Cho, S.Y., Kang, C. S. and Chang, S.Y.: Identification of steroid hormones in pomegranate *(Punica granatum)* using HPLC and GC-mass spectromerty. *Food Chem*. **96**, 562-571 (2006).
2. Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Piearce, B., Holcroft

D.M. and Kedar A.A.: Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4581-4589 (2000).
3. Seeram, N.P., Adams L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G. and Heber D.: In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination of other polyphenols. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 360-367 (2005).
4. Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed J.D. and Mukhtar, H.: Anthocyanins and hydrolyzable tannins rich pomegranate fruit extract modulates MAPKs and NF-kB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer* **113**, 423-433 (2004).
5. Lansky, E.P. and Newman R.A.: *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. ethnophar.* **109**, 177-206 (2007).
6. Choi, O.K., Chung K.S., Cho, G.S. Hwang, M.O. and Yoo, Y.S.: Proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian black pomegranate extract and its products. *Korean J. Food and Nutr.* **15**(2), 119-125 (2002).
7. Okamoto J.M., Hamamoto, Y.O., Yamoto, H. and Yoshimura, H.: Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* **92**, 93-101 (2004).
8. Lee, Y.H., Hyun, S.H. and Choung, S.Y.: Effects of singled and mixed pomegranate on postmenopausal symptoms in ovariectomized rat. *Yakhak Hoeji* **50**(3), 177-183 (2006).
9. Adlercreutz, H., Markkanen H. and Watanabe, S.: Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* **342**, 1209-1210 (1993).
10. Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G. and Hase, T.: Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in Plasma of omnivorous and vegetarian women by Isotope dilution gas ghromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Lab. Invest.* **53**, 5 (1993).
11. Kim, S.H., Kim, I.H., Kang, B.H., Cha, T.Y., Lee, J.H., Rim, S.O., Song, K.S., Song, B.H., Kim, J.G. and Lee, J.M.: Analysis of extraction characteristics of phytoestrogen components from *Punica granatum L. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**(4), 352-357 (2005).
12. Arao Y, Kanamori N, Kikkawa E, Otsuka H, Arimoto Y, Ikeda K, Inakuma T. and Kayama F.: A two-step screening method, using estrogen receptor-mediated trans activation, to measure estrogenicity in edible plants. *Food Chem.* **104**, 1288-1294 (2007).
13. Choi, S.Y., Lim, S.H., Kim, J.S., Ha, T.Y., Kim, S.R., Kang, K.S. and Hwang, I.K.: Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Korean J. food. Sci. Technol.* **37**(4), 549-556 (2005).
14. Sturgeon S.R., Ronnenberg A.G.: Pomegranate and breast cancer: possible mechanisms of prevention. Nutrition Reviews **68**(2), 122-128 (2009).
15. Seeram N.P., Schulman R.N., Heber D, eds. Pomegranate-Ancient Roots of Modern Medicine. Boca Roton, FL: *Taylor & Francis* (2006).