

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 껍질 용매 별 추출물의 지질과산화 저해 및 질소산화물 소거능

진동혁 · 오다영 · 정현식 · 이영근 · 성종환 · 김한수[†]

부산대학교 식품공학과

(2017년 5월 2일 접수: 2017년 6월 18일 수정: 2017년 6월 21일 채택)

Evaluation of Lipid Peroxidation Inhibition and Nitrogen Oxide Scavenging Activity from Peel of *Gardenia jasminoides* Ellis Fructus Extracted by Various Solvents

Dong-Hyeok Jin · Da-Young Oh · Hun-Sik Chung · Young-Guen Lee
Jong-Hwan Seong · Han-Soo Kim[†]

Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea
(Received May 2, 2017; Revised June 18, 2017; Accepted June 21, 2017)

요약 : 치자 껍질의 70% methanol, ethyl acetate (EA) 및 distilled water (DW)의 용매 별 추출물의 total phenol 함량 및 질소 산화물 소거능, 환원력, β -carotene 탈색을 이용한 항산화력 및 지질과산화 저해능 측정을 통하여 치자의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토한 결과, anthocyanin 함량은 3.519 ± 0.635 mg/100 g DW로 나타났으며, 용매 별 추출 수율은 DW (39.87%), 70% methanol (36.26%), EA (2.88%) 로 관찰되었다. 추출 용매 별 항산화 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며 control로 사용된 ascorbic acid, BHA, trolox 보다는 낮은 활성이 확인되었다. 치자 껍질의 total phenol 함량은 EA, 70% methanol, DW 추출물 순으로 EA 추출물에서 26.59 ± 0.20 CAE (caffeic acid equivalents) mg/g으로 가장 높았으며, Nitric oxide (NO) radical 소거능에서는 70% methanol (70.32~76.15%), DW (52.66~59.31%), EA (34.65~46.98%) 추출물 순으로 나타났다. Nitrite (NO₂) 소거능은 70% methanol (34.57~39.33%), DW (32.53~38.47%), EA (27.59~32.62%) 순으로 관찰되었다. β -carotene 탈색 저해능은 DW (41.55~50.97%), 70% methanol (23.37~44.80%), EA (13.37~25.24%) 순으로 동정되었다. Reducing power (optical density)는 70% methanol (0.044~0.127), DW (0.033~0.099), EA (0.026~0.097) 순으로 확인되었다. 지질과산화 저해능은 껍질 추출물 중 70% methanol (56.51~76.21%), EA (54.59~63.34%), DW (47.92~61.11%) 순으로 관찰되었다($p < 0.05$). 이에, 치자 껍질은 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

주제어 : 치자 껍질, 추출 용매, 항산화 활성, 안토시아닌, 총 페놀

[†]Corresponding author
(E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr)

Abstract : The aim of this study was to investigate the bioactivity and antioxidant activity of peel from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus (GJE). We were separated into GJE peel. After that, we determined anthocyanin. GJE peel were extracted by 70% methanol, distilled water (DW) and ethyl acetate (EA) three solvents. To investigate by the solvent extract of total phenol content and value as a functional food ingredient of GJE peel through nitrogen oxide scavenging activity, antioxidant activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition were performed. Solvent extract bioactivity of increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL) were significantly increased ($p < 0.05$). GJE peel extracts showed lower activity than positive control (ascorbic acid, BHA, trolox). The total phenol contents of GJE peel extracts were highest in EA extract. However, the order of total phenol content of the solvent in the GJE peel and the results of analysis of various physiological activities were inconsistent. Considering the extraction yield and various physiological activities, it is expected to be effective when extracted from 70% methanol and DW extract. The results suggest that GJE peel is highly expected to be useful as a functional foods and natural antioxidant.

Keywords : Peel of *Gardenia jasminoides* Ellis fructus, Solvent extracts, Antioxidant activity, Anthocyanin, Total phenol

1. 서론

식품의 다양성과 계절의존성 감소로 인한 가격 안정화의 결과, 식품 소비와 공급량 증가 등 많은 변화를 가져왔다[1]. 식품은 단순한 영양원이 아닌 기능성을 고려하게 되어 건강의 중요성과 인간수명 연장에 따라 건강기능식품에 대한 관심과 소비가 증가하는 추세이다[2].

산화질소합성효소에 의해 생성되는 reactive nitrogen species (RNS)는 nitric oxide ($\text{NO} \cdot$), nitrite (NO_2^-), peroxyxynitrite (ONOO^-)를 형성하여 이러한 free radical을 가진 물질은 불안정하고 홀수 전자를 가지므로 반응성이 매우 높은 것으로 알려져 있다[3,4]. Reactive oxygen species (ROS)와 RNS는 그 안정성을 확보하기 위해 필요한 전자를 포착하여 다른 화합물과 신속히 반응하기 때문에 지질 과산화 및 연쇄 반응을 개시하여 여러 산화생성물들을 생성하여 암을 유발하고 노화와 관련하여 생리적 기능 장애를 일으킨다고 알려져 있다[5]. 식물체의 경우 2차 대사산물의 방어체계, 효소와 같은 보호 기전이 발달되어 있어서 식물체에서 항산화 물질을 탐색, 연구하는 것은 중요한 의미를 지닌다고 한다[6]. 치자는 꼭두서니과(*Rubiaceae*)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로 국내를 비롯한 중국, 일본, 대만 등의 기온이 따뜻한 지

역에 자생하고 있다. 치자의 주요 생리활성물질은 수용성 carotenoids인 crocin으로 알려져 있으며, crocin과 그 대사산물인 crocetin이 동물 실험에서 췌장의 lipase 활성을 억제하여 지질 흡수를 감소시키는 것으로 보고되고 있어 고지방 식이로 인한 고지혈증(hyperlipidemia) 등을 개선 할 수 있다는 것을 시사하였다[7]. 따라서, 본 연구는 치자 껍질의 anthocyanin 함량을 측정하고 70% methanol, distilled water (DW) 및 ethyl acetate (EA)의 용매 별로 추출하여 total phenol 함량을 측정 후 질소산화물 소거능(nitric oxide scavenging activity, nitrite scavenging activity), 항산화능(antioxidant activity by β -carotene bleaching assay), 환원력(reducing power), 지질 과산화 저해(lipid peroxidation inhibition)를 측정하여 추출 용매에 따른 생리활성을 비교하여 생활습관병 예방과 건강기능 식품 개발의 목적으로 이들의 소비 효율성을 높이고 이에 대한 기초 자료를 제시함으로써 고부가 가치의 천연 항산화제의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 시료인 치자(*Gardenia*

jasminoides Ellis)는 경상남도 남해군에서 2014년 11월에 수확하여 반 건조 상태로 되어있는 시료를 남해 소재 약재상에서 2015년 1월에 구입하였다. 구입한 치자의 껍질을 분리한 뒤 자연 건조시켜 분쇄기(HMF-3250S, Han-II Co., Seoul, Korea)에 분쇄하여 분말로 만든 다음 deep freezer (DF-8514, Il-Shin BioBase Co., Daegu, Korea)에 -80°C 로 저장하여 실험에 사용하였다.

2.2. 시료의 추출

시료의 추출은 동결 저장된 치자 껍질 분말 100 g 씩 취하여 70% methanol, ethyl acetate (EA) 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간 씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하였고, distilled water (DW) 추출물은 70°C 에서 2시간씩 2회 추출하여 여과(filter paper, Advantec, No.1, Tokyo, Japan)하였다. 각 추출물은 rotary vacuum evaporator (Hei-VAP Advantage, Heidolph Co., Germany)를 이용하여 40°C 에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 실험에 사용하였으며, 시료의 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율(%)로 나타내었다[8].

2.3. Anthocyanin 함량 측정

치자 껍질의 anthocyanin 함량은 pH-differential method를 사용하여 측정하였다[9]. 건조된 치자 껍질 분말 0.2 g에 methanol-1M HCl (85:15, v/v) 15.0 mL를 가하여 30분 동안 혼합한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하여 분석 시료로 사용하였다. 시료 1.0 mL에 0.025 M potassium chloride buffer (pH 1.0) 3.0 mL를 가하고 또 다른 시험관에 시료 1.0 mL와 0.4 M sodium acetate buffer (pH 4.5) 3.0 mL를 가한 후 암실에 20분간 방치하여 UV/Vis spectrophotometer (SP-200, Analytik Jena Co., Jena, Germany)를 사용하여 510 nm 및 700 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 치자 껍질의 anthocyanin 함량은 cyanidin-3-glucoside의 몰 흡광계수($\epsilon=26,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 mg/100 g DW (dry weight)로 계산하여 나타내었다.

2.4. Total phenol 함량 측정

Total phenol 함량은 Folin-Denis 방법을 변형

하여 실험하였다[10]. 시료 추출액 1.0 mL에 증류수 4.0 mL을 넣고, Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0.5 mL를 가한 후, 잘 섞어 3분간 실온에 방치한 뒤 10% sodium carbonate solution 0.5 mL을 첨가하여 실온에 1시간 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 caffeic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 시료 1 g당 mg CAE (mg of caffeic acid equivalents)로 나타내었다.

2.5. Nitric oxide (NO) radical scavenging activity 측정

Nitric oxide (NO) radical 소거능은 Rao (1997)의 방법을 변형하여 측정하였다[11]. 용매 별 추출물 각 농도의 시료 2.0 mL에 10 mM sodium nitroferricyanide (III) dihydrate 및 0.2 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 3.0 mL를 넣어 잘 섞은 후 25°C water bath에서 150분간 반응시켰다. 반응액 0.5 mL와 1% sulfanilamine 및 2% H_3PO_4 1.0 mL을 섞어 10분간 방치한 뒤 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 1.0 mL를 가하여 25°C water bath에서 30분간 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control은 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였으며, 치자 껍질의 NO 소거능은 백분율(%)로 계산하여 표시하였다.

2.6. Nitrite (NO_2) scavenging activity 측정

Nitrite 소거능은 Lim 등[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 2.0 mL와 1 mM sodium nitrite 1.0 mL를 혼합하여 0.2 M citrate buffer (pH 2.5) 7.0 mL를 첨가한 후, 37°C 로 1시간 동안 반응시켰다. 반응액 1.0 mL에 2% acetic acid 3.0 mL를 넣은 후, Griess reagent (1% sulfanilic acid in 30% acetic acid:1% 1-naphthylamine 및 30% acetic acid, 1:1, v/v) 0.4 mL와 15분간 반응시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 BHA를 사용하였으며 백분율(%)로 나타내었다.

2.7. β -carotene bleaching을 이용한 antioxidant activity 측정

β -carotene 탈색을 이용한 치자 껍질의 항산화

활성은 Kato 등[13]의 방법을 변형하여 측정하였다. Chloroform 10.0 mL에 β -carotene 1 mg을 녹인 용액 1.0 mL를 round-bottomed flask에 넣은 후 linoleic acid 20 mg과 Tween 40 200 mg을 가하여 충분히 혼합하였다. 남아 있는 chloroform을 40°C에서 rotary vacuum evaporator로 제거한 후 잔여물을 증류수 100 mL를 넣고 유화시킨 emulsion을 실험 직전에 조제하여 사용하였다. β -carotene-linoleic acid emulsion 4.0 mL와 농도별 시료추출물 0.4 mL를 시험관에 넣고 섞은 뒤 470 nm에서 흡광도를 측정한다(t=0 min), 50°C의 water bath에서 2시간 동안 반응 시켜 470 nm에서 흡광도를 재측정하였다(t= 120 min). Positive control로 BHA를 사용하였으며 항산화 활성은 아래 식에 의해 계산하였다.

Antioxidant activity (%)=

$$\left(1 - \frac{A_s(t=0) - A_s(t=120)}{A_b(t=0) - A_b(t=120)}\right) \times 100$$

A_s = the absorbance in the presence of sample extract.

A_b = the absorbance of the blank.

2.8. Reducing power 측정

치자 껍질의 용매별 추출물에 따른 reducing power의 측정은 각 시료 추출 용액 1.0 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1.5 mL와 1% potassium ferricyanide 1.0 mL를 넣고 50°C의 water bath에서 20분간 반응 시켰다. 반응시킨 혼합액에 10% trichloroacetic acid 1.5 mL를 가하여 섞은 후 3,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 분리된 상등액 1.0 mL에 증류수 3.0 mL와 0.1% ferric chloride solution 0.2 mL를 넣어 잘 혼합시켜, 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다[14]. 또한 EC_{50} 은 positive control인 BHA를 통하여 계산하였다.

2.9. Lipid peroxidation inhibition activity 측정

치자 껍질의 각 용매별 추출물에서의 지질과산화 저해 활성은 Siriwardhana 등[15]의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL로 희석한 각 용매별 시료 1.0 mL를 취하여 2.5% linoleic acid emulsion 및 ethanol 2.0 mL와 phosphate buffer (pH 7.0) 10 mL를 가한 후 혼합액이 20 mL가 되도록 증류수로 정

용하였다. 빛을 차단한 40°C water bath에 24시간 동안 혼합액을 반응시킨 후, 반응액 0.1 mL에 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL와 ethanol 3.7 mL, 0.02 M ferrous chloride 및 3.5% HCl 0.1 mL를 가하여, 3분간 혼합하여 산화 정도에 따른 흡광도 차이를 500 nm에서 측정하였다. positive control로 BHA를 사용하였으며 백분율(%)로 계산하여 지질과산화 저해능을 나타내었다.

2.10. 통계 처리

실험 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean \pm SD ($n=3$)으로 표시하였다. 실험 결과값 간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의한 각 농도 간의 유의성을 검정하였다. 시료 농도 별 결과값에 대한 IC_{50} 과 EC_{50} 은 선형 회귀분석을 통하여 구하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수율

치자 껍질의 70% methanol, distilled water (DW) 및 ethyl acetate (EA)에서의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 각 용매 별 추출 수율은 70% methanol에서 36.26%, DW 39.87%, EA 2.88%로 DW에서 추출 수율이 가장 높게 나타났다.

3.2. Anthocyanin 함량

치자 껍질의 anthocyanin 함량은 Table 1과 같이 3.519 ± 0.635 mg/100 g DW (dry weight)로 관찰되었다. Anthocyanin은 적색과 자색 등 식물체의 수용성 천연 색소로 식물이 씨앗 및 열매를 분산 시키는데 중요한 역할을 하며, 자외선 조사에 의한 손상을 보호하고 벌과 나비 같은 꽃가루 매개자를 끌어들이는 역할을 한다고 알려져 있다[16]. 또한 식물에서 유래한 anthocyanin은 인체 내의 다양한 생리활성 중 시각과 뇌 기능의 향상, 비만과 당뇨의 관리, 심혈관계 질환 예방, 종양, 노화방지, 항암, 항염, DNA 손상 방지 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 이와 관련된 연구가 진행되고 있다[17]. 본 실험에서 치자

Table 1. Contents of anthocyanin, total phenol, IC₅₀ and EC₅₀ values in the bioactivity evaluation assays of peel from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus

Assays ¹⁾	Values		
	EA	DW	70% methanol
Anthocyanin content (mg/100 g DW ²⁾)	3.519±0.635		
Extraction yields (%)	2.88	39.87	36.26
Total phenol content (mg CAE ³⁾ /g)	26.59±0.20 ^{c4)}	18.61±0.08 ^a	24.13±0.27 ^b
NO (IC ₅₀ , mg/mL)	0.687±0.012 ^c	0.135±0.007 ^b	0.006±0.000 ^a
NO ₂ (IC ₅₀ , mg/mL)	1.966±0.077 ^c	1.377±0.014 ^a	1.518±0.097 ^b
BC (IC ₅₀ , mg/mL)	1.425±0.019 ^c	0.547±0.002 ^a	0.698±0.003 ^b
RP (EC ₅₀ , mg/mL)	1.717±0.065 ^c	1.798±0.040 ^b	1.407±0.059 ^a
LPI (IC ₅₀ , mg/mL)	0.265±0.006 ^c	0.113±0.016 ^b	0.087±0.005 ^a

¹⁾Nitric oxide radical scavenging activity (NO), nitrite scavenging activity (NO₂), antioxidant activity by β -carotene bleaching assay (BC), reducing power (RP), lipid peroxidation inhibition activity (LPI). ²⁾DW: dry weight. ³⁾CAE: caffeic acid equivalents. ⁴⁾The values are means±SD ($n=3$). Values with the different letters in the same row are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

껍질은 anthocyanin 성분을 함유하고 있는 것으로 확인되어 그에 따른 여러 생리활성 효과가 기대된다.

3.3. Total phenol 함량

치자 껍질의 용매 별 추출물에서 total phenol 함량은 Table 1에 나타내었으며, 껍질 추출물 중 EA 추출물 26.59±0.20 mg CAE/g, 70% methanol 추출물 24.13±0.27 mg CAE/g, DW 추출물 18.61±0.08 mg CAE/g 순으로 DW 추출물에서 유의적인 차이를 보이며 낮은 값이 관찰되었다($p<0.05$). Phenolic 화합물은 항암, 항돌연변이, 항산화능 뿐 아니라, 단백질과 같은 고분자 물질과 결합하기도 하여 종양증식의 개시, 촉진 및 진행을 억제하며, 골수성 백혈병 세포를 사멸시키는 역할을 하는 등 인체 내에서 다양한 생리활성을 가진다고 보고되어있다[18]. Cai et al.(2004)은 항암에 관련된 112가지 중국 약용작물의 항산화 활성 실험 중 중국산 치자 열매의 주요 phenolic 화합물은 주로 phenolic acids (chlorogenic acid), flavones (gardenins)로 구성되어 있으며 total phenol 함량은 methanol 추출물에서 10.0 mg/g, 물 추출물에서 10.8 mg/g으로 보고하였다[19]. 본 실험 결과는 이보다 높은 수치의 phenol 함량이 확인 되었으며,

품종 요인과 재배 환경 조건에 따라 이와 같은 차이가 나는 것으로 판단된다.

3.4. Nitric oxide (NO) radical scavenging activity

치자 껍질의 용매 별 추출물과 positive control인 trolox의 nitric oxide (NO) radical 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 1과 같으며, IC₅₀값은 Table 1에 표시하였다. 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 측정 한 결과, 농도가 증가함에 따라 NO radical 소거능 또한 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 70% methanol 추출물 70.32±0.09%, 73.44±0.31%, 76.15±0.09%, IC₅₀ 0.006±0.000 mg/mL, DW 추출물에서 52.66±0.23%, 55.53±0.09%, 59.31±0.27%, IC₅₀ 0.135±0.007 mg/mL, EA 추출물 34.65±0.39%, 41.81±0.41%, 46.98±0.35%, IC₅₀ 0.687±0.012 mg/mL 순으로 추출물 중에서는 EA 용매 추출물에서 가장 낮은 활성과 높은 IC₅₀ 값이 관찰되었다. Positive control인 trolox는 각 83.37±0.23%, 86.34±0.15%, 89.36±0.09%로 확인되었으며, trolox는 산화적 스트레스 손상을 감소시키는 생리생화학적 용도로 사용되는 항산화제이며, 항산화 성분 측정 시 항산화 능력에

대한 기준으로도 사용된다고 알려져 있다[20]. 질소산화물 중 nitric oxide radical (NO)는 신경전달, 종양 세포의 면역 및 염증반응 과정에 관련이 있다고 보고되어 있다[21]. NO 합성효소 (EC 1.14.13.39)는 L-arginine을 citrulline과 NO radical로 변환시키며, 생성된 NO radical은 신경세포와 내피 세포, 간세포 등에서 여러 iso-form으로 전환되어 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[22].

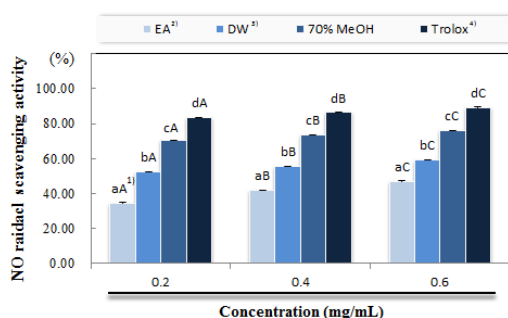


Fig. 1. Nitric oxide (NO) radical scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means \pm standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾EA: ethyl acetate.

³⁾DW: distilled water. ⁴⁾Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

3.5. Nitrite (NO₂) scavenging activity

치자 껍질의 각 용매 별 추출물과 positive control인 ascorbic acid의 nitrite (NO₂) 소거 활성을 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 표시하였다. 치자 껍질의 각 용매 별 추출물을 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 NO₂ 소거 활성이 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 70% methanol 추출물 34.57 \pm 0.21%, 36.20 \pm 0.08%, 39.33 \pm 0.21%, IC₅₀ 1.518 \pm 0.097 mg/mL, DW 추출물 32.53 \pm 0.21%, 35.48 \pm 0.08%, 38.47 \pm 0.21%, IC₅₀ 1.377 \pm 0.014 mg/mL, EA 추출물 27.59 \pm 0.16%, 30.72 \pm 0.16%, 32.62 \pm 0.31%, IC₅₀ 1.966 \pm 0.077 mg/mL 순으로 추출물 중에

서는 EA 용매 추출물에서 유의적으로 낮은 활성과 높은 IC₅₀결과치가 관찰되었다($p<0.05$). 70% methanol 추출물에서의 nitrite 소거 활성은 각 농도에서 DW 추출물 보다 높았으나 IC₅₀은 DW 추출물 보다 유의적으로 약한 것으로 관찰되었다($p<0.05$). 이는 농도 간의 소거 활성 증가 폭이 DW 추출물 보다 낮기 때문인 것으로 사료된다. Positive control인 ascorbic acid는 각 농도 별로 49.07 \pm 0.21%, 68.51 \pm 0.08%, 84.01 \pm 0.21%로 확인되었다. 아질산염은 nitric oxide synthase의 활성 및 산화질소 radical 생성에 대한 바이오마커로서 임상 화학에서 자주 사용되고 있다[23].

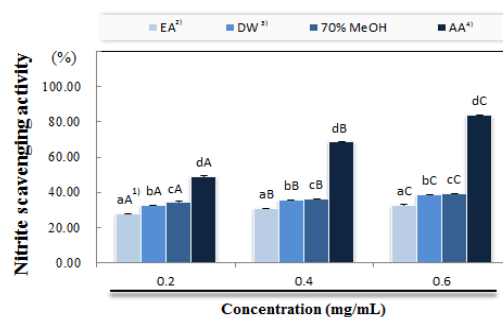


Fig. 2. Nitrite (NO₂) scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means \pm standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾EA: ethyl acetate.

³⁾DW: distilled water. ⁴⁾AA: ascorbic acid.

3.6. β -carotene bleaching을 이용한 antioxidant activity

치자 껍질의 각 용매 별 추출물과 control인 BHA에서의 각 농도 별 β -carotene 탈색을 이용한 항산화 활성의 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, IC₅₀은 Table 1과 같다. 치자 껍질의 용매 별 추출물의 각 농도에서 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 β -carotene 탈색 저해능이 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다($p<0.05$). DW 추출물 41.55 \pm 0.20%, 47.10 \pm 0.12%, 50.97 \pm 0.34%, IC₅₀ 0.547 \pm 0.002 mg/mL, 70% methanol 추출물에서 23.37 \pm 0.09%, 33.86 \pm

0.19%, $44.80 \pm 0.11\%$, IC_{50} 0.698 ± 0.003 mg/mL, EA 추출물은 $13.37 \pm 0.04\%$, $20.16 \pm 0.04\%$, $25.24 \pm 0.04\%$, IC_{50} 1.425 ± 0.019 mg/mL로 추출물 중 EA 용매 추출물에서 가장 낮은 탈색 저해능과 높은 IC_{50} 결과치가 관찰되었다. β -carotene은 일정 온도 이상에서 공기 중에 방치하게 되면 산화가 진행되어 탈색 진행되며, flavonoid나 phenolic 화합물과 같은 항산화 효과가 있는 물질과 함께 존재할 경우 탈색의 진행을 어느 정도 억제하게 되므로 이러한 β -carotene의 탈색 정도를 이용한 항산화 능력 분석 방법이 널리 이용되고 있다[24].

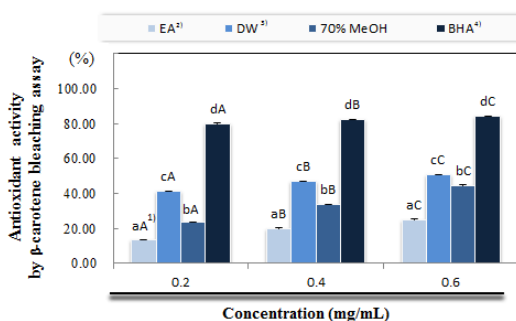


Fig. 3. Antioxidant activity by β -carotene bleaching assay of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means \pm standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾EA: ethyl acetate.

³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

3.7. Reducing power

각 용매 별 추출물과 positive control인 BHA의 환원력을 각 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었고, EC_{50} 값을 구하여 Table 1에 표시하였다. 치자 껍질의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 환원력을 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 유의적으로 흡광도가 증가하였다($p<0.05$). 껍질 용매 별 추출물의 환원력은 70% methanol 추출물 0.044 ± 0.001 , 0.096 ± 0.001 , 0.127 ± 0.001 , EC_{50} 1.407 ± 0.059 mg/mL, DW 추출물에서 0.033 ± 0.001 ,

0.072 ± 0.001 , 0.099 ± 0.001 , EC_{50} 1.798 ± 0.040 mg/mL, EA 추출물 0.026 ± 0.001 , 0.070 ± 0.001 , 0.097 ± 0.001 , EC_{50} 1.717 ± 0.065 mg/mL 순으로 DW 추출물과 EA 추출물 0.6 mg/mL 농도에서의 환원력과 그에 따른 EC_{50} 에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다 ($p<0.05$). Senevirathne 등[25]은 nitric oxide 소거능의 결과와 환원력 실험의 결과는 신뢰구간 95%의 유의적인 관계가 있는 것으로 보고하였다. 또한 total phenol, flavonoid 함량이 높아짐에 따라 항산화 활성이 증가한다고 알려져 있다 [26], 반면 본 실험에서의 total phenol 함량은 EA 추출물에서 가장 높게 나타났으나 질소산화물 소거능 및 환원력은 EA 추출물 보다 70% methanol 추출물과 DW 추출물에서 우세하게 나타났다. 이러한 결과는 치자의 주요 생리활성성분 중 수용성 carotenoid 인 crocin과 본 실험에서 측정된 치자 껍질 분말의 anthocyanin 및 그 밖의 flavonoid 성분이 70% methanol 및 DW 용매에 추출되어 영향을 준 것으로 사료된다.

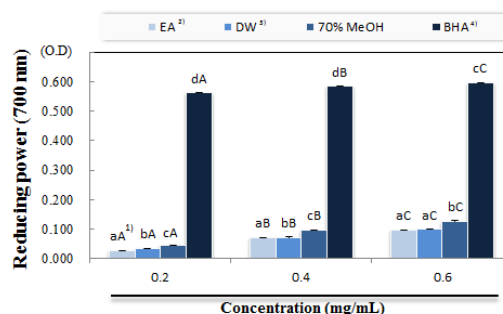


Fig. 4. Reducing power of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means \pm standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾EA: ethyl acetate.

³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

3.8. Lipid peroxidation inhibition activity

치자 껍질의 각 용매 별 추출물과 positive control인 BHA의 지질과산화 저해능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 5와 같으며, IC_{50} 값은

Table 1에 나타내었다. 70% methanol 추출물에서 각 농도 별로 $56.51 \pm 0.32\%$, $63.51 \pm 0.16\%$, $76.21 \pm 0.31\%$, IC_{50} 0.087 ± 0.005 mg/mL으로 확인되었으며, EA 추출물 $54.59 \pm 0.28\%$, $56.89 \pm 0.16\%$, $63.34 \pm 0.28\%$, IC_{50} 0.113 ± 0.016 mg/mL, DW 추출물 $47.92 \pm 0.37\%$, $54.37 \pm 0.26\%$, $61.11 \pm 0.16\%$, IC_{50} 0.265 ± 0.006 mg/mL 순으로 추출물 중 DW 추출물에서 유의적으로 낮은 저해능과 높은 IC_{50} 이 관찰되었다($p < 0.05$). 지질 과산화는 자동산화과정 (autoxidation) 중 초기반응($RH \rightarrow R \cdot + H \cdot$), 연쇄반응($R \cdot + O_2 \rightarrow RO_2 \cdot$), 종결반응($R \cdot + R \cdot \rightarrow RR$, $R \cdot + ROO \cdot \rightarrow ROOR$, $ROO \cdot + ROO \cdot \rightarrow ROOR + O_2$)을 통해 활성이 강한 free radical들이 서로 중합하여 중간생성물인 aldehyde류, ketone류, 산 등의 carbonyl 화합물을 형성하는 것으로 알려져 있으며[27], 유지의 점도 증가와 체내 흡수를 어렵게 하고 필수지방산 함량의 감소가 일어나 영양적 가치를 감소시키는 것으로 보고되고 있다[28]. 또한 Esterbauer (1993)는 산화된 지질을 실험동물에게 경구 투여하였을 때 죽상 동맥경화증 위험 증가, 간세포, 림프구 및 여러 유전적 독성을 야기하여 산화된 지질 섭취의 위험성을 시사하였다[29]. 본 실험 결과, 치자 껍질의 추출물 모두에서 높은 지질과산화 저해능

이 확인되어 지질 성분에서의 천연산화방지제로서의 효과가 기대된다.

4. 결론

치자 껍질의 anthocyanin 함량을 알아보고 70% methanol, ethyl acetate (EA) 및 distilled water (DW)의 3가지 용매를 사용한 추출물의 용매 별 total phenol 함량 및 질소 산화물 소거능, 환원력, β -carotene 탈색을 이용한 항산화력 및 지질과산화 저해능 측정을 통하여 치자의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

치자 껍질의 anthocyanin 함량을 측정한 결과 3.519 ± 0.635 mg/100 g DW로 나타났으며, 치자 껍질의 용매 별 추출 수율은 DW (39.87%), 70% methanol (36.26%), EA (2.88%) 로 관찰되었다. 추출 용매 별 항산화 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며 control로 사용된 ascorbic acid, BHA, trolox 보다는 낮은 활성이 확인되었다. 치자 껍질의 total phenol 함량은 EA, 70% methanol, DW 추출물 순으로 EA 추출물에서 26.59 ± 0.20 CAE mg/g으로 가장 높았으며, Nitric oxide (NO) radical 소거능에서는 70% methanol (70.32~76.15%), DW (52.66~59.31%), EA (34.65~46.98%) 추출물 순으로 나타났다. Nitrite (NO_2) 소거능은 70% methanol (34.57~39.33%), DW (32.53~38.47%), EA (27.59~32.62%) 순으로 관찰되었다. β -carotene 탈색 저해능은 DW (41.55~50.97%), 70% methanol (23.37~44.80%), EA (13.37~25.24%) 순으로 동정되었다. Reducing power (optical density)는 70% methanol (0.044~0.127), DW (0.033~0.099), EA (0.026~0.097) 순으로 확인되었다. 지질과산화 저해능은 껍질 추출물 중 70% methanol (56.51~76.21%), EA (54.59~63.34%), DW (47.92~61.11%) 순으로 관찰되었다($p < 0.05$). 이상의 결과, 치자 껍질의 용매 별 total phenol 함량 순과 질소산화물 소거능, 환원력, 항산화능, 지질과산화 저해능 분석에서의 결과는 일치하지 않고 지질과산화 저해능을 제외한 모든 분석에서 EA 추출물이 가장 낮은 활성을 보였다. β -carotene 탈색 저해능 분석에서는 다른 분석에서와는 다르게 70% methanol 추출물

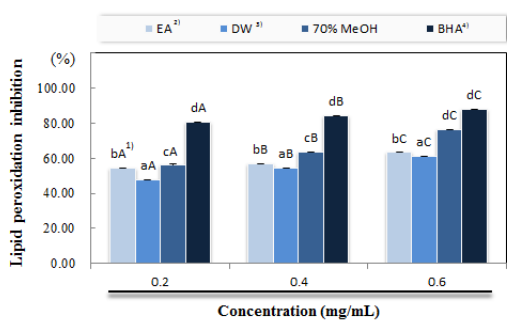


Fig. 5. Lipid peroxidation inhibition activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means \pm standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾EA: ethyl acetate.

³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

이 DW 추출물 보다 낮은 결과가 관찰되었다. 이는 치자 껍질의 수용성 carotenoid인 crocin이 70% methanol과 DW 용매에 추출되어 영향을 준 것으로 추정된다. 본 실험 결과 치자의 껍질은 질소산화물 소거능, 항산화능, 지질과산화 저해능이 우수하여 본 실험에서 측정된 anthocyanin 및 phenolic 성분 뿐만 아니라 여러 유익한 생리활성물질들을 가지고 있는 것으로 생각되며, 추출수율과 여러 생리활성을 고려하였을 때 70% methanol과 DW 추출물에서 추출하였을 때 효과가 좋을 것으로 생각되며, 그에 따른 기능성 식품 및 천연항산화제로서의 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

References

1. J. Kearney, "Food consumption trends and drivers", *Philosoph. Transact. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, Vol.365, No.1554 pp.2793-2807 (2010).
2. K. Menrad, "Market and marketing of functional food in Europe", *J. Food Eng.*, Vol.56, No.2 pp.181-188 (2003).
3. B. Halliwell, J. M. Gutteridge and C. E. Cross, "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?", *J. Lab. Clinic. Med.*, Vol.119, No.6 pp.598-620 (1992).
4. N. Hogg, V. M. Darley-Usmar, M. T. Wilson and S. Moncada, "Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide". *Biochemical Journal*, Vol.281, No.2 pp.419-424 (1992).
5. J. S. Hwang, B. H. Lee, X. An, H. R. Jeong, Y. E. Kim, I. Lee, H. Lee and D. O. Kim, "Total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hookeri*", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.47, No.2 pp.261-266 (2015).
6. H. O. Edeoga, D. E. Okwu and B. O. Mbaebie, "Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants", *African J. Biotechnol.*, Vol.4, No.7 pp.685-688 (2005).
7. I. A. Lee, J. H. Lee, N. I. Baek and D. H. Kim, "Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin", *Biol. Pharm. Bull.*, Vol.28, No.11 pp.2106-2110 (2005).
8. D. H. Jin, H. S. Kim, J. H. Seong and H. S. Chung, "Comparison of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts", *J. Environ. Sci. Int.*, Vol.25, No.5 pp.695-703 (2016).
9. T. Fuleki and F. J. Francis, "Quantitative methods for anthocyanins", *J. Food Sci.*, Vol.33, No.3 pp.266-274 (1968).
10. T. Sun and C. T. Ho, "Antioxidant activities of buckwheat extracts", *Food Chem.*, Vol.90, No.4 pp.743-749 (2005).
11. M. N. A. Rao, "Nitric oxide scavenging by curcuminoids", *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol.49, No.1 pp.105-107 (1997).
12. J. A. Lim, Y. S. Na and S. H. Baek, "Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.36, No.2 pp.306-310 (2004).
13. S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh and N. Miwa, "Highly hydroxylated or γ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and β -carotene bleaching assay", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol.19, No.18 pp.5293-5296 (2009).
14. M. Singhal, A. Paul and H. P. Singh, "Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives", *J. Saudi Chem. Soc.*, Vol.18, No.2 pp.121-127 (2014).
15. N. Siriwardhana, K. W. Lee, Y. J. Jeon, S. H. Kim and J. W. Haw, "Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition", *Food Sci.*

- Technol. Int.*, Vol.9, No.5 pp.339-346 (2003).
16. T. A. Holton and E. C. Cornish, "Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis", *The Plant Cell*, Vol.7, No.7 pp.1071 (1995).
 17. Z. Lin, J. Fischer and L. Wicker, "Intermolecular binding of blueberry pectin-rich fractions and anthocyanin", *Food Chem.*, Vol.194, pp.986-993 (2016).
 18. A. Sgambato, R. Ardito, B. Faraglia, A. Boninsegna, F. I. Wolf and A. Cittadini, "Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage", *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, Vol.496, No.1 pp.171-180 (2001).
 19. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun and H. Corke, "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer", *Life Sci.*, Vol.74, No.17 pp.2157-2184 (2004).
 20. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. "Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biol. Med.*, Vol.26, No.9 pp.1231-1237 (1999).
 21. S. R. M. J. Moncada, R. M. L. Palmer and E. Higgs, "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology", *Pharmacol. Rev.*, Vol.43, No.2 pp.109-142 (1991).
 22. S. H. Snyder and D. S. Bredt, "Biological roles of nitric oxide", *Sci. American*, Vol.266, No.5 pp.68-77 (1992).
 23. H. Moshage, B. Kok, J. R., Huizenga and P. L. Jansen, "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation", *Clin. Chem.*, Vol.41, No.6 pp.892-896 (1995).
 24. D. Pastore, D. Trono, L. Padalino, S. Simone, D. Valenti, N. Di Fonzo and S. Passarella, "Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -carotene bleaching activities in durum wheat semolina", *J. Cereal Sci.*, Vol.31, No.1 pp.41-54 (2000).
 25. M. Senevirathne, S. H. Kim, N. Siriwardhana, J. H. Ha, K. W. Lee and Y. J. Jeon, "Antioxidant potential of ecklonia cava on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition", *Food Sci. Technol. Int.*, Vol.12, No.1 pp.27-38 (2006).
 26. O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu and L. Saso, "Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry", *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, Vol.1721, No.1 pp.174-184 (2005).
 27. E. N. Frankel, "Lipid oxidation", *Prog. Lipid Res.*, Vol.19, No.1 pp.1-22 (1980).
 28. Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker and B. N. Ames, "Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, Vol.160, No.1 pp.7-13 (1987).
 29. H. Esterbauer, "Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products", *American J. Clin. Nutr.*, Vol.57, No.5 pp.779S-785S (1993).