

남해산 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 씨 추출물의 항산화 능 및 생리활성에 미치는 영향

진동혁 · 김한수[†] · 이영근 · 오다영

부산대학교 식품공학과

(2017년 5월 2일 접수: 2017년 6월 20일 수정: 2017년 6월 29일 채택)

Effect on Antioxidant Ability and Physiological Activities from Seed Extract of *Gardenia jasminoides* Ellis in Namhae Korea

Dong-Hyeok Jin · Han-Soo Kim[†] · Young-Guen Lee · Da-Young Oh

Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea
(Received May 2, 2017; Revised June 20, 2017; Accepted June 29, 2017)

요약 : 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus, GJE) 씨에서의 70% 에탄올, CM (chloroform:methanol, 부피 비 2:1(CM)) 및 노르말 부탄올 추출 용매별 flavonoid 함량 및 항산화 능, 금속 킬레이트 능력 측정을 통하여 치자 씨의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토한 결과, 치자 씨의 proanthocyanidin 함량은 건조 무게(g) 중 카테킨(catechin) 당량으로 계산하여 70.035 ± 0.772 mg으로 나타났으며, 추출 수율은 CM (36.39%), 70% 에탄올(27.32%), 노르말 부탄올(26.23%) 순으로 나타났다. 추출 용매별 항산화 능은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며 ($p < 0.05$), 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 보다는 낮은 활성이 확인되었다. Flavonoid 함량(mg)은 시료 g 당 케르세틴(querceetin) 당량으로 계산하여 70% 에탄올(0.830), CM (0.752), 노르말 부탄올(0.105) 순으로 확인되었으며, 항산화 능 분석 실험과 금속 킬레이트 능력 실험에서도 이와 유사한 양상으로 동정되어 모든 분석에서 70% 에탄올과 CM 추출물이 강한 생리활성을 나타내었다. 따라서 치자 씨의 용매별 flavonoid 함량에 따라 항산화 능 및 금속 킬레이트 능력이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이에, 치자 씨는 proanthocyanidin과 flavonoid 화합물을 다량 함유하고 있으며, 높은 항산화 능 과 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 있을 것으로 추정된다.

주제어 : 치자 씨, 항산화 능, 과산화물불균등화 효소, 프로안토시아니딘, 플라보노이드

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

Abstract : The purpose of this study was to measure the antioxidant and physiological activities of seed from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus (GJE) in Namhae Korea. We determined proanthocyanidin. GJE seed were extracted by 70% ethanol, chloroform:methanol, 2:1 volume ratio (CM) and *n*-butanol of three solvents. To investigate by the solvent extract of flavonoid content and value as a functional food ingredient of GJE seed through various antioxidant activities were performed. Solvent extract antioxidant activity of increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL) were significantly increased ($p < 0.05$). The content of proanthocyanidin in GJE seed was 70.035 ± 0.772 mg catechin equivalents/g dry weight. As a result of bioactivity assay, by a solvent of seed were found that the relationship with the increase of flavonoid content increased bioactivities. The antioxidant activity of the extract from the other except for the *n*-butanol extract on seed was observed at a high level. The results suggest that *Gardenia jasminoides* Ellis fructus seed can be used as a natural antioxidant.

Keywords : seed of *Gardenia jasminoides* Ellis fructus, antioxidant activity, superoxide dismutase, proanthocyanidin, flavonoid

1. 서론

서구화된 식생활과 스트레스, 환경, 신체 활동 감소 등으로 인한 이상지질혈증(dyslipidemia), 고혈압과 같은 심혈관계 질환과 비만, 당뇨 등 생활습관병 발병이 사회적 문제가 되고 있으며 [1,2], 건강의 중요성에 따라 식품은 단순한 영양원이 아닌 기능성을 고려한 건강기능식품으로, 이에 대한 대중의 관심이 높아지고 있으며, 소비가 증가하고 있는 실정이다[3]. 여러 질병의 주된 원인으로 인체 내의 호흡과정 중 발생하는 산화 생성물의 자유 라디칼은 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^- \cdot$), 단일항 산소분자(1O_2), 수산화 라디칼($\cdot OH$), 과산화수소(H_2O_2) 등의 활성산소로 다양하게 존재하며, 그 자체로 불안정한 상태이며, 홀 전자 형태로 존재하므로 그 안정성을 확보하기 위해 반응성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다[4]. 이처럼 활성산소는 높은 반응성에 의해 자외선, 약물, 환경오염물질과 같은 외부요인에 의해 몸 안에서 활성산소가 증가할 경우 세포막 파괴, DNA 손상 등과 함께 산화적 스트레스를 받아 세포내 단백질, 지질이상에 의한 불특정 생성물들을 생성하여 암을 유발하고 노화와 관련해 생리적 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다 [5]. 이러한 활성산소에 효과적인 생리활성물질 중 flavonoid는 1980년대 초부터 많은 관심을 받아왔으며[6], flavonoid를 함유하고 있는 야채를 섭취 시 만성 질환을 감소시키는 것으로 보고하

였다[7]. 식물체에서 5,000개 이상의 다양한 flavonoid가 존재하는 것으로 알려져 있으며[8], 국내외에서 flavonoid가 건강에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되고 있다[9,10]. 경남 남해군의 유자, 비자와 더불어 삼자 중 하나인 치자는 꼭두서니과(*Rubiaceae*)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로 국내를 비롯한 중국, 일본, 대만 등의 기온이 따뜻한 지방에 자생하고 있다. 한방에서는 소변을 잘 나오게 하여 열을 제거하고 화를 가라 앉혀 피를 맑게 하며, 지혈, 진정, 염증 완화 등의 작용이 있다고 한다. 또한 geniposide, β -carotene, crocin, quercetin, shanzhiside 등 여러 생리활성물질을 함유하고 있어 이러한 천연 화합물들은 체내에서 활성산소 및 자유 라디칼을 제거할 수 있는 능력과 이에 대한 상호 작용을 통해 생활습관병을 예방하는 것으로 알려져 있다[11,12].

이에, 본 연구에서는 고부가가치의 건강기능식품 및 대체의약 개발 등의 목적으로 치자 씨의 proanthocyanidin 함량을 측정하여 70% 에탄올, chloroform:methanol, 부피비 2:1(CM) 및 노르말 부탄올의 용매별로 추출한 뒤, flavonoid 함량을 측정하고, 4가지의 항산화능 시험과 금속킬레이트 능력을 측정하여 치자 씨의 추출 용매에 따른 항산화능을 확인하여 향후 천연 항산화제의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

경남 남해군 소재 약재상에서 구입한 치자 (*Gardenia jasminoides* Ellis)의 씨를 분리한 뒤 자연 건조시켜 분쇄기(HMF-3250S, Han-Il Co., Seoul, Korea)에 분쇄한 분말을 초저온 냉동고(DF-8514, Il-Shin BioBase Co., Daegu, Korea)에 -80°C로 저장하며 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. Proanthocyanidin 함량 측정

치자 씨의 proanthocyanidin 함량은 바닐린(vanilin) 측정법을 변형하여 측정하였다[13]. 시료 분말 0.03 g에 메탄올 2.0 mL를 넣어 혼합한 후 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)한 뒤 1% 바닐린/메탄올 (w/v) 2.0 mL를 넣고 25% 황산/메탄올 2.0 mL를 가하여 섞은 후 30°C 수조에서 15분간 방치한 뒤 메탄올 1.0 mL를 넣고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 (+)-카테킨(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하였으며 검량선을 작성하여 치자 씨에서의 proanthocyanidin 함량을 산출하였고 시료 g 당 카테킨 당량(mg)으로 나타내었다.

2.3. 시료의 추출

동결 저장된 치자 분말 100 g 씩 취하여 70% 에탄올, CM 및 노르말 부탄올 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하였다. 각 추출물은 진공회전농축기(Hei-VAP Advantage, Heidolph Co., Germany)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 시료 추출물을 얻었으며, 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율(%)로 표시하였다[14].

2.4. Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량 측정은 two complementary colorimetric method를 변형하여 사용하였으며[15], 시료 추출액 0.5 mL에 10% aluminium nitrate 0.5 mL와 1 M potassium acetate 0.5 mL를 넣은 뒤, 80% 에탄올 2.0 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 40분간 실온에 방치하여 반응시킨

후 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 이 때 표준물질인 케르세틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용해 검량선을 작성하여 시료 g 당 케르세틴 당량(mg)으로 계산하였다.

2.5. 항산화 능 실험 방법

2.5.1. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성은 각 용매별 시료 추출물 0.2 mL와 0.2 mM DPPH in 80% 메탄올 2.8 mL를 혼합하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 1에 백분율로 나타내었으며, 그에 따른 저해농도(inhibitory concentration 50, IC₅₀)를 계산하여 Table 1에 표시하였다[16]. 이 때 활성 비교를 위하여 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 양성대조군으로 사용하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

2.5.2. ABTS radical scavenging activity 측정

ABTS cation decolorization assay에 의한 방법[17]을 변형하여 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼을 이용한 항산화 능 측정을 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)의 비율로 섞어 16시간 동안 암소에 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후, 735 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액 3.9 mL에 시료 추출액 0.1 mL를 넣은 후 10분 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 BHA를 사용하였으며 ABTS 라디칼 소거 활성은 Fig. 2에 백분율(%)로 나타내었다.

2.5.3. Superoxide dismutase (SOD) like ability 측정

SOD 유사활성은 McCord & Fridovich의 방법[18]을 변형하여 시료 0.1 mL에 Tris-HCl buffer 50 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer + 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) disodium salt dihydrate (pH 8.5) 3.0 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 넣어 25°C 수조에서 10분 동안 반응 시킨 뒤, 1.0 N 염산 1.0 mL로 반응을 정지시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편, IC₅₀은 양성대조군으로 BHA를 사용하여 산출하였다.

2.5.4. Hydroxyl radical (\cdot OH) scavenging activity 측정

수산화 라디칼 소거능 측정은 deoxyribose degradation assay [19]와 1,10-phenanthroline/ferrous iron (II) oxidation assay [20]를 변형하여 사용하였다. 각 농도의 시료 1.0 mL에 0.75 mM 1,10-phenanthroline solution 및 에탄올 1.0 mL와 0.75 M PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) 2.0 mL, 증류수 1.0 mL, 0.75 mM ferrous sulfate 1.0 mL, 0.032% 과산화수소 1.0 mL를 순차적으로 가하여 37°C 수조에 60 분간 반응시켰다. 양성대조군은 BHA를 사용하여 표시하였고, 흡광도는 536 nm에서 측정하여 Fig. 4에 백분율(%)로 나타내었다.

2.6. Ferrous ion-chelating capacity 측정

치자 씨의 각 농도별 추출물에서 ferrous ion chelating activity는 Robu 등의 방법[21]을 변형하여 시료 1.0 mL에 2 mM iron (II) chloride tetrahydrate 0.1 mL과 5 mM ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt) 0.2 mL, 에탄올

3.0 mL을 가하여 잘 섞은 후 실온에 10분간 반응시켜 Fe²⁺-ferrozine complex를 형성시킨 뒤 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 EDTA disodium salt dihydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였고 치자 씨에서의 ferrous ion-chelating activity는 백분율(%)로 환산하여 Fig. 5에 나타내었다.

2.7. 통계 처리

실험 결과치는 3회 반복 측정하여 평균값(mean)±표준편차(standard deviation, SD) ($n=3$)으로 표현하였다. 또한 실험 결과값에 대한 유의성 검정은 일원 분산분석(one-way ANOVA)으로 분석한 뒤 확률 5%미만($p<0.05$) 수준에서 던칸의 다중범위테스트(Duncan's multiple range test)에 의하여 각 농도 간의 유의적인 차이를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Proanthocyanidin 함량

치자 씨의 proanthocyanidin 함량은 Table 1에 나타내었으며 건조 무게(g) 중 카테킨(catechin) 당량으로 계산하여 70.035 ± 0.772 mg으로 관찰

Table 1. Contents of proanthocyanidin, flavonoid and IC₅₀ values in the antioxidant activity evaluation assays of seed from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus

Assays ¹⁾	Values		
	<i>n</i> -Butanol	CM	70% Ethanol
Proanthocyanidin content (mg CE ²⁾ /g DW ³⁾	70.035 ± 0.772		
Extraction yields (%)	26.23	36.39	27.32
Flavonoid content (mg QE ⁴⁾ /g)	$0.105 \pm 0.002^{a5)}$	0.752 ± 0.003^b	0.830 ± 0.003^c
DPPH (IC ₅₀ , mg/mL)	3.908 ± 0.016^c	0.944 ± 0.001^b	0.535 ± 0.006^a
ABTS (IC ₅₀ , mg/mL)	17.659 ± 1.648^b	1.225 ± 0.007^a	1.201 ± 0.006^a
SOD (IC ₅₀ , mg/mL)	7.201 ± 0.029^b	1.570 ± 0.002^a	1.556 ± 0.017^a
OH ⁻ (IC ₅₀ , mg/mL)	4.058 ± 0.012^c	0.982 ± 0.001^b	0.558 ± 0.007^a
FIC (IC ₅₀ , mg/mL)	2.395 ± 0.019^b	0.290 ± 0.004^a	0.277 ± 0.006^a

¹⁾DPPH radical scavenging activity (DPPH), ABTS radical scavenging activity (ABTS), superoxide dismutase like ability (SOD), hydroxyl radical scavenging activity (OH⁻), ferrous ion-chelating capacity (FIC). ²⁾CE: catechin equivalents. ³⁾DW: dry weight. ⁴⁾QE: quercetin equivalents. ⁵⁾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.

되었다. Proanthocyanidin은 식물에 자연적으로 존재하는 flavonoid 고분자 착화합물로서 식물의 씨앗, 포도와 같은 베리류를 포함한 일부 과일과 씨에 풍부하며 구조적인 특징으로 폴리페놀(polyphenol)을 가지고 있어 인체 내에서 금속이온 및 단백질과 복합체를 형성하며[22], 안정적인 환원제로 작용하여 강력한 항산화 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[23]. Carpenter 등은 슈퍼푸드로 알려진 크랜베리의 proanthocyanidin 함량이 재배지 마다 다르지만 Mullica Queen과 Early Black 품종에서 48~82 mg/g의 proanthocyanidin이 함유되어 있다고 보고하였다[24], 이에 본 실험에서의 치자 씨는 proanthocyanidin의 함량이 많다고 알려진 크랜베리와 비교하였을 때 이와 비슷한 수준으로 확인되어 이로 인한 생활습관병 예방 및 노화방지 등의 유익한 생리활성 효과가 기대된다.

3.2. 수율

치자 씨의 70% 에탄올, CM 및 노르말 부탄올에서의 용매별 추출 수율은 CM에서 36.39%, 70% 에탄올에서 27.32%, 노르말 부탄올은 26.23%로 CM에서 추출 수율이 가장 높게 나타났다(Table 1).

3.3. Flavonoid 함량

용매별 추출물에서의 flavonoid 함량은 Table 1에 나타내었으며, 70% 에탄올 추출물이 시료 g 당 케르세틴(querceetin) 당량으로 계산하여 0.830 ± 0.003 mg으로 유의적으로 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), CM 추출물은 0.752 ± 0.003 mg, 노르말 부탄올 추출물은 0.105 ± 0.002 mg 순으로 노르말 부탄올 추출물이 가장 낮은 결과치가 나타났다. 각 용매 추출물에서의 flavonoid 함량은 각각 유의적인 차이가 있는 것으로 관찰되었다($p < 0.05$) Chu 등의 연구에서는 양배추, 시금치, 양파를 포함한 여러 가지 채소류에서의 flavonoid 함량은 185.01~426.82 mg/kg으로 보고하였으며[25], Andarwulan 등의 연구에는 국화 52.19 mg/100 g, 양파 486 mg/kg, 케일 110 mg/kg, 브로콜리 30 mg/kg으로 보고하였다[26]. 따라서 치자 씨의 flavonoid 함량은 높은 수준으로 판단되며 그에 따른 생리활성 효과가 있을 것으로 추정된다.

3.4. DPPH radical scavenging activity

치자 씨의 각 용매별 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 및 IC_{50} 값은 Fig. 1과 Table 1에 표시하였으며, 70% 에탄올 추출물에서 농도 별(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)로 각각 $21.93 \pm 0.19\%$, $40.53 \pm 0.14\%$, $54.49 \pm 0.19\%$, IC_{50} 0.535 ± 0.006 mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며($p < 0.05$), CM 추출물에서 각각 $13.25 \pm 0.19\%$, $23.26 \pm 0.12\%$, $32.97 \pm 0.45\%$, IC_{50} 0.944 ± 0.001 mg/mL, 노르말 부탄올 추출물은 $3.07 \pm 0.22\%$, $5.40 \pm 0.19\%$, $8.14 \pm 0.19\%$, IC_{50} 3.908 ± 0.016 mg/mL 순으로 노르말 부탄올 추출물에서 유의적으로 가장 낮은 소거능이 확인되었다($p < 0.05$). 양성대조군인 BHA는 각 농도에서 $95.56 \pm 0.07\%$, $95.60 \pm 0.07\%$, $95.64 \pm 0.00\%$ 의 높은 활성을 보였다.

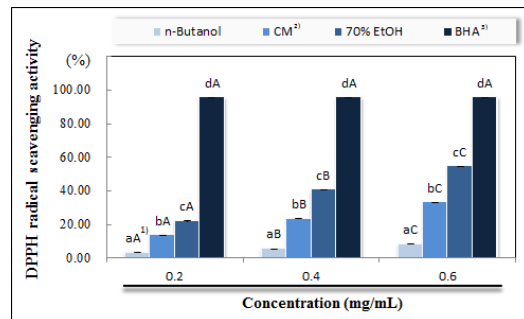


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾CM: chloroform:methanol (2:1, v/v).

³⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

DPPH는 안정된 자유 라디칼을 가지며 수소 공여를 통해 산화되어 소거되며 이 과정에서 진한 보라색에서 황색으로 정색 반응하는 것으로 알려져 있다[27]. 치자 용매 별 추출물의 항산화능은 양성대조군인 BHA보다 낮았으나 70% 메탄올 추출물에서 비교적 높은 활성이 관찰되었으며, 사용된 추출용매의 극성에 의해 생리활성물질이 용해되는 정도가 달라 항산화능의 차이가 나타난다는 보고[28]와 같이 본 실험에서도

용매에 따른 치자의 geniposide, crocin, carotenoid와 같은 생리활성물질 추출 정도가 달라 용매별 DPPH 활성 차이가 나타난 것으로 사료된다.

3.5. ABTS radical scavenging activity

치자 씨의 각 용매별 추출물과 양성대조군인 BHA의 ABTS 라디칼 소거능을 각 농도별로 비교한 결과를 Fig. 2에 표시하였으며, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 각 시료는 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 70% 에탄올 추출물 25.32±0.17%, 29.66±0.17%, 35.27±0.17%, IC₅₀ 1.201±0.006 mg/mL, CM 추출물 24.00±0.08%, 28.34±0.17%, 34.24±0.17%, IC₅₀ 1.225±0.007 mg/mL, 노르말 부탄올 추출물에서 11.76±0.01%, 11.95±0.08%, 12.63±0.29%, IC₅₀ 17.659±1.648 mg/mL 순으로 노르말 부탄올 추출물에서 유의적으로 가장 낮은 소거능이 관찰되었으며($p < 0.05$), 70% 에탄올, CM 추출물에서의 IC₅₀은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

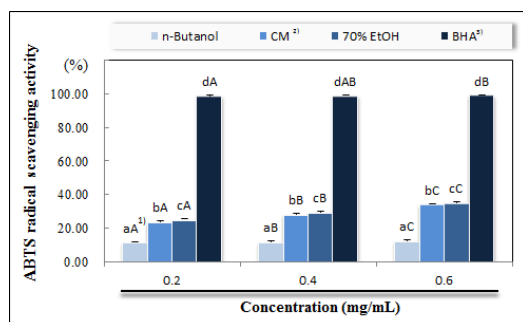


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means±standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). ³⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

3.6. SOD like ability

치자 씨 추출물의 SOD 유사활성은 Fig. 3에 표시하였으며, IC₅₀을 구하여 Table 1에 나타내었

다. 70% 에탄올 추출물 21.47±0.14%, 25.17±0.14%, 29.94±0.14%, IC₅₀ 1.556±0.017 mg/mL, CM 추출물 20.35±0.07%, 24.04±0.14%, 29.07±0.14%, IC₅₀ 1.570±0.002 mg/mL, 노르말 부탄올 추출물 16.07±0.07%, 16.45±0.14%, 18.02±0.12%, IC₅₀ 7.201±0.029 mg/mL 순으로 나타났으며, 70% 에탄올과 CM 추출물에서의 IC₅₀은 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다($p < 0.05$). 양성대조군인 BHA는 각 농도에서 28.78±0.72%, 47.34±0.26%, 65.57±0.19%로 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성이 큰 폭으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. SOD는 적혈구에서 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼에 촉매 작용하여 분해하는 효소($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$), 세포를 산화적 손상으로부터 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[18]. Marklund & Marklund는 자동산화의 속도는 pH가 증가함에 따라 증가하는데 pH 9.1의 높은 알칼리에서도 자동산화는 90% 이상 SOD에 의해 억제된다고 보고하여 SOD의 산화억제 능력 이 매우 뛰어나다는 것을 시사하였다[29].

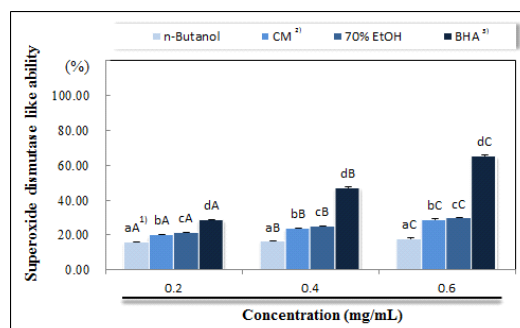


Fig. 3. Superoxide dismutase like ability of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹⁾The values are means±standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²⁾CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). ³⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

3.7. Hydroxyl radical (•OH) scavenging activity

치자 씨의 각 용매별 추출물과 양성대조군인

ascorbic acid의 수산화 라디칼 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었고, IC₅₀을 구하여 Table 1에 나타내었다. 70% 에탄올 추출물에서 농도별로 각각 22.46±0.18%, 39.57±0.13%, 52.41±0.18%, IC₅₀ 0.558±0.007 mg/mL로 추출 용매 중 유의적으로 가장 강한 소거능이 관찰되었으며($p<0.05$), CM 추출물 14.48±0.18%, 23.68±0.11%, 32.62±0.41%, IC₅₀ 0.982±0.001 mg/mL, 노르말 부탄올 추출물 5.12±0.20%, 7.26±0.18%, 9.78±0.18%, IC₅₀ 4.058±0.012 mg/mL 순으로 노르말 부탄올 추출물에서 유의적으로 가장 낮은 소거능이 확인되었다($p<0.05$). 양성대조군인 ascorbic acid는 각 농도에서 93.58±0.01%, 93.93±0.20%, 95.03±0.18%로 강한 수산화 라디칼 소거능이 관찰되었다. 본 실험에서 용매별 추출물의 DPPH 소거능을 포함한 다른 항산화 능 분석 실험의 결과를 비교하였을 때, 같은 시료에서의 항산화 능 결과의 정도 차이는 있지만 그 결과는 매우 유사하다는 Elfalleh 등의 보고[30]와 유사하게 각 실험에서 70% 에탄올, CM, 노르말 부탄올 추출물 순으로 항산화 능이 확인되었다.

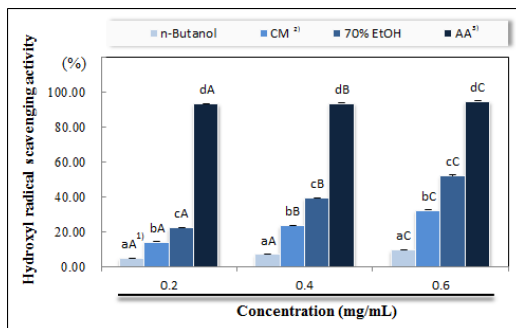


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹The values are means±standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). ³AA: ascorbic acid.

3.8. Ferrous ion-chelating capacity

치자 씨의 각 용매별 추출물과 양성대조군인 EDTA의 각 농도별로 비교한 ferrous ion-chelating capacity 결과는 Fig. 5에 나타내었

며, IC₅₀을 구하여 Table 1에 나타내었다. 치자 씨의 ferrous ion-chelating capacity 및 IC₅₀은 CM 추출물 44.28±0.19%, 59.52±0.12%, 69.96±0.03%, IC₅₀ 0.277±0.006 mg/mL, 70% 에탄올 추출물 43.37±0.12%, 58.80±0.09%, 69.19±0.12%, IC₅₀ 0.290±0.004 mg/mL, 노르말 부탄올 추출물 12.03±0.10%, 14.51±0.12%, 19.01±0.12%, IC₅₀ 2.395±0.019 mg/mL 순으로 노르말 부탄올 추출물에서 유의적인 차이를 보이며 킬레이트 능력이 낮게 관찰되었다($p<0.05$). 본 실험에서 양성대조군으로 사용된 EDTA는 각 농도에서 99% 이상의 매우 강한 ferrous ion-chelating capacity을 보여 주었다. Flavonoid 화합물의 화학구조는 각종 산화 작용의 촉매 역할을 하는 금속이온과 결합하여 산화 반응을 상당히 줄일 수 있다는 것으로 알려져 있다[31]. Mira 등의 연구는 lutein, taxifolin, (-)-epicatechin 등 flavonoid 화합물과 금속이온이 결합한 복합체가 비 복합체 flavonoid보다 더 뛰어난 라디칼 소거능을 가진다고 보고하였다 [32]. 이에 CM과 70% 에탄올 추출물 0.6 mg/mL 농도의 시료는 70%에 가까운 ferrous ion-chelating capacity을 가지는 것으로 확인되어, 치자 씨 추출물의 금속이온 결합 및 그에 따른 항산화 작용에 대한 시너지 효과가 있을 것으로 판단된다.

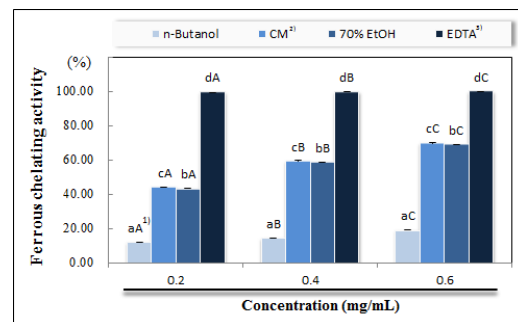


Fig. 5. Ferrous ion-chelating capacity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

¹The values are means±standard deviation ($n=3$). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. ²CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). ³EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

4. 결론

본 실험은 치자 씨에서의 proanthocyanidin 함량을 알아보고, 70% 에탄올, CM 및 노르말 부탄올 용매를 사용한 추출물의 용매별 flavonoid 함량 및 항산화 능, 금속 킬레이트 능력 측정을 통하여 치자 씨의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토하기 위하여 실험을 수행하였다. 치자 씨의 proanthocyanidin 함량은 건조 무게(g) 중 카테킨(catechin) 당량으로 계산하여 70.035 ± 0.772 mg으로 나타났으며, 추출 수율은 CM (36.39%), 70% 에탄올 (27.32%), 노르말 부탄올 (26.23%) 순으로 나타났다. 추출 용매별 항산화 능은 농도 (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며 ($p < 0.05$), 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid, BHA, EDTA 보다는 낮은 활성이 관찰되었다. Flavonoid 함량(mg)은 시료 g당 케르세틴(querceetin) 당량으로 계산하여 70% 에탄올 (0.830), CM (0.752), 노르말 부탄올 (0.105) 순으로 확인되었으며, 항산화 능 분석 실험과 금속 킬레이트 능력 실험에서도 이와 비슷한 양상으로 동정되어 모든 분석에서 70% 에탄올과 CM 추출물이 강한 생리활성을 나타내었다. 이상의 결과를 미루어 볼 때 치자 씨의 용매별 flavonoid 함량에 따라 항산화 능 및 금속 킬레이트 능력이 증가하는 것으로 사료된다. 따라서 치자의 씨는 proanthocyanidin과 flavonoid 화합물을 다량 함유하고 있으며, 높은 항산화 능 과 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 있을 것으로 추정된다.

References

1. S. Klein, D. B. Allison, S. B. Heymsfield, D. E. Kelley, R. L. Leibel, C. Nonas, R. Kahn, "Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association", *Obesity*, **Vol.15**, No.5 pp.1061-1067, (2007).
2. T. A. Pearson, G. A. Mensah, R. W. Alexander, J. L. Anderson, R. O. Cannon, M. Criqui, Y. Y. Fadl, S. P. Fortmann, Y. Hong, G. L. Myers, S. C. Smith, K. Taubert, R. P. Tracy, F. Vinicor, N. Rifai, "Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association", *Circulation*, **Vol.107**, No.3 pp.499-511, (2003).
3. K. Menrad, "Market and marketing of functional food in Europe", *J. Food Eng.*, **Vol.56**, No.2 pp.181-188, (2003).
4. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, 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).
5. J. S. Hwang, B. H. Lee, X. An, H. R. Jeong, Y. E. Kim, I. Lee, H. Lee, 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. W. Bors and M. Saran, "Radical scavenging by flavonoid antioxidants", *Free Radical Res. Commun.*, **Vol.2**, No.4 pp.289-294, (1987).
7. K. A. Steinmetz and J. D. Potter, "Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology", *Cancer Causes Control*, **Vol.2**, No.5 pp.325-357, (1991).
8. J. M. Harnly, R. F. Doherty, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. Bhagwat, S. Gebhardt, "Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts", *J. Agric. Food Chem.*, **Vol.54**, No.26 pp.9966-9977, (2006).
9. Y. D. Kim, W. J. Ko, K. S. Koh, Y. J. Jeon and S. H. Kim, "Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during

- maturation”, *Korean J. Nutr.*, **Vol.42**, No.3 pp.278–290, (2009).
10. L. Sampson, E. Rimm, P. C. Hollman, J. H. de Vries, M. B. Katan, “Flavonol and flavone intakes in US health professionals”, *J. American Diet. Assoc.*, **Vol.102**, No.10 pp.1414–1420, (2002).
 11. H. J. Koo, K. H. Lim, H. J. Jung, E. H. Park, “Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin”, *J. Ethnopharmacol.*, **Vol.103**, No.3 pp.496–500, (2006).
 12. M. Yamauchi, K. Tsuruma, S. Imai, T., Nakanishi, N. Umigai, M. Shimazawa, H. Hara, “Crocin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity”, *European J. Pharmacol.*, **Vol.650**, No.1 pp.110–119, (2011).
 13. B. Sun, J. M. Ricardo-da-Silva, I. Spranger, “Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins”, *J. Agric. Food Chem.*, **Vol.46**, No.10 pp.4267–4274, (1998).
 14. D. H. Jin, J. H. Seong, Y. G. Lee, D. S. Kim, H. S. Chung, H. S. Kim, “Antioxidant activity and effective compounds of black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) extracted by different solvents”, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **Vol.33**, No. 3 pp.474–482, (2016).
 15. A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, O. G. Nacoulma, “Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity”, *Food Chemistry*, **Vol.91**, No. 3 pp.571–577, (2005).
 16. M. S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, **Vol.181**, pp.1199–1200, (1958).
 17. A. Floegel, D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo, O. K. Chun, “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods”, *J. Food Compos. Anal.*, **Vol.24**, No.7 pp.1043–1048, (2011).
 18. J. M. McCord and I. Fridovich, “Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein”, *J. Biol. Chem.*, **Vol.244**, No.22 pp.6049–6055, (1969).
 19. X. Li, “Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging”, *Food Chem.*, **Vol.141**, No.3 pp.2083–2088, (2013).
 20. J. Ming, C. Yaxin, L. Jinrong, Z. Hui, “1, 10-Phenanthroline-Fe²⁺ oxidative assay of hydroxyl radical produced by H₂O₂/Fe²⁺”, *Prog. Biochem. Biophys.*, **Vol.6**, (1996).
 21. S. Robu, A. Aprotosoiaie, A. Miron, O. Cioancă, U. Stănescu, M. Hăncianu, “*In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania”, *Farmacía*, **Vol.60**, No.3 pp.394–401, (2012).
 22. D. Bagchi, M. Bagchi, S. J. Stohs, D. K. Das, S. D. Ray, C. A. Kuszynski, S. S. Joshi, H. G. Pruess, “Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention”, *Toxicol.*, **Vol.148**, No.2 pp.187–197, (2000).
 23. C. Santos-Buelga and A. Scalbert, “Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health”, *J. Sci. Food Agric.*, **Vol.80**, No.7 pp.1094–1117, (2000).
 24. J. L. Carpenter, F. L. Caruso, A. Tata, N. Vorsa, C. C. Neto, “Variation in proanthocyanidin content and composition among commonly grown North American cranberry cultivars (*Vaccinium macrocarpon*)”, *J. Sci. Food Agric.*, **Vol.94**, No.13 pp.2738–2745, (2014).
 25. Y. H. Chu, C. L. Chang, H. F. Hsu, “Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity”, *J. Sci. Food Agric.*, **Vol.80**, No.5 pp.561–566, (2000).

26. N. Andarwulan, R. Batari, D. A. Sandrasari, B. Bolling, H. Wijaya, "Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia", *Food Chem.*, **Vol.121**, No.4 pp.1231-1235, (2010).
27. V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, "Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method", *LWT-Food Sci. Technol.*, **Vol.30**, No.6 pp.609-615, (1997).
28. V. Vaithyanathan and S. Mirunalini, "Assessment of anticancer activity: A comparison of dose-response effect of ethyl acetate and methanolic extracts of *Pergularia daemia* (Forsk)", *Oral Sci. Int.*, **Vol.13**, No.1 pp.24-31, (2016).
29. S. Marklund and G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase", *European J. Biochem.*, **Vol.47**, No.3 pp.469-474, (1974).
30. W. Elfalleh, N. Nasri, N. Marzougui, I. Thabti, A. M'rabet, Y. Yahya, B. Lachiheb, F. Guasmi, A. Ferchichi, "Physico-chemical properties and DPPH-ABTS scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes", *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **Vol.60**, No.2 pp.197-210, (2009).
31. J. H. Medina, H. Viola, C. Wolfman, M. Marder, C. Wasowski, D. Calvo, A. C. Paladini, "Overview—flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands", *Neurochem. Res.*, **Vol.22**, No.4 pp.419-425, (1997).
32. L. Mira, M. Tereza Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. Helena Florêncio, K. R. Jennings, "Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity", *Free Radical Res.*, **Vol.36**, No.11 pp.1199-1208, (2002).