



Anti-oxidant activities of ethanol extract and fractions from defatted *Camellia japonica* L. seeds

Weon Pho Park¹ · Nan Kyung Kim¹ · Seok Hee Han¹ · Sanghyun Lee² · Ji Hyun Kim^{1,3} · Jine Shang Choi^{1,4}

동백 유박 에탄올추출물 및 분획물의 항산화 활성

박원표¹ · 김난경¹ · 한석희¹ · 이상현² · 김지현^{1,3} · 최진상^{1,4}

Received: 7 December 2023 / Accepted: 13 December 2023 / Published Online: 21 December 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract The aim of this study was to investigate *in vitro* antioxidant activities of defatted *Camellia japonica* L. seeds (DCJS). The DCJS were extracted using ethanol and then fractionated with butanol (BuOH), ethyl acetate (EtOAc), chloroform, and hexane. To evaluate antioxidant activity of extract and fractions from DCJS, we investigated free radical scavenging activities such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺), hydroxyl radical ([•]OH), and superoxide anion (O₂⁻) radicals. The five extract and fractions of DCJS dose-dependently increased DPPH, ABTS⁺ and O₂⁻ radical scavenging activities. The BuOH fraction of DCJS showed the highest free radical scavenging

activities among other extract and fractions. The contents of total polyphenol and flavonoid in BuOH fraction of DCJS were 23.26 mg GAE/g and 32.39 mg QE/g, respectively. The polyphenol and flavonoids contents of BuOH fraction has highest than other extract and fractions. In addition, BuOH and EtOAc fraction of DCJS contained 102.37 and 165.05 μg/g of camelliaside B, respectively. Therefore, DCJS has higher antioxidant activity and may be useful as a natural antioxidant material.

Keywords Antioxidant · *Camellia japonica* L. · Camelliaside B · Defatted seeds · Free radical

Ji Hyun Kim (✉)
E-mail: jihyunkim@gnu.ac.kr

Jine Shang Choi (✉)
E-mail: jschoi@gnu.ac.kr

¹Department of Food Science, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

²Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

³Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

⁴Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

인체 내에서 생성된 hydroxyl radical ([•]OH), singlet oxide (O₂⁻) 등의 free radical은 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등의 활성산소종 생성을 유도하며, 과도한 활성산소종의 생성은 산화적 스트레스를 일으킨다[1,2]. 산화적 스트레스는 암, 당뇨, 고혈압, 신경퇴행성질환 등의 만성질환 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고됨에 따라, 활성산소종 생성 억제를 위한 항산화제에 관한 연구가 국내외에서 활발히 이루어지고 있다[1,2]. 항산화제는 free radical에 의한 산화반응을 억제하여 활성산소종으로부터 지질, 단백질, DNA 등의 생체 내 분자를 보호한다[3,4]. 특히 천연물 유래 소재에는 폴리페놀, 플라보노이드 등 free radical 소거능을 나타내는 다양한 생리활성물질을 함유하는 것으로 보고됨에 따라, 천연물 유래 소재를 이용한 항산화 효능에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[5,6].

동백나무(*Camellia japonica*)는 동백나무과(Theaceae) 동백나

무(Camelliae)속에 속하는 상록활엽의 소교목으로, 주로 해안과 섬에 분포하는 것으로 알려져 있다[7]. 동백나무는 일본, 중국, 한국에서 위장병, 출혈 및 염증 치료 등을 위한 전통 의학 소재로 이용되어왔으며, 최근에는 식품 및 화장품 소재 등으로 활용되고 있다[7,8]. 동백나무에는 triterpenes, saponins, tannins, quercetin, kaempferol 등의 생리활성물질을 함유하는 것으로 보고되었으며, 항암, 항산화, 항염증, 간 손상에 대한 보호 작용 등의 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다[8-10]. 특히 동백 오일은 미백 활성, 피부 보호 효과, 친식 개선 효과 등 생리활성이 보고되어 다양한 제품 생산의 소재로 활용되고 있다[11-13]. 동백 종자를 이용하여 동백오일을 제조하는 과정에서 생성되는 부산물인 유박에는 glutamic acid, arginine, aspartic acid 등 아미노산 등이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되었다[14]. 또한 동백 유박 추출물로부터 kaempferol oligosaccharide 등 플라보노이드 계열 생리활성성분이 분리되는 것으로 보고되었다[19]. 이 외에도, 동백 유박 추출물의 항균 활성 등 생리활성이 보고됨에 따라 동백 오일을 제조하는 과정에서 생기는 부산물인 동백 유박이 기능성 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 주목받고있다[14]. 또한 동백 오일에 관한 연구는 활발히 이루어진 반면 동백 유박 추출물 및 분획물의 생리활성에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 동백 유박 추출물의 *in vitro* radical 소거능 측정을 통해 항산화 활성을 확인하고, 각 추출물 및 분획물에 함유되어있는 폴리페놀, 플라보노이드, 동백나무의 지표 물질인 camelliaside B 함량 분석을 통해 동백 유박의 항산화 기능성 소재로서 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2-deoxy-D-ribose, hydrogen peroxide solution, 2-thiobarbituric acid (TBA), phenazine methosulfate (PMS), NADH disodium salt, and nitrotetrazolium blue chloride (NBT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 Alfa aesar (Ward Hill, MA, USA)사에서 구입하였으며, potassium persulfate 및 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA는 Daejung Chemical Co., (Shiheung, Korea)에서 구입하였다. Trichloroacetic acid (TCA), sodium carbonate, sodium nitrite, aluminium chloride는 Samchun (Seoul, Korea)사에서, Follin-Ciocaltue's reagent는 Junsei (Tokyo, Japan)사에서, gallic acid는 Kanto (Tokyo, Japan)사에서 각각 구매하여 실험에 사용하였다. Sodium hydroxide는 Duksan Co., (Ansan, Korea)에서, quercetin dihydrate는 Wako (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Camelliaside B는 한국천연물과학기술연구소(Seongnam, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

시료

본 실험에 사용된 동백 유박은 한국동백연구소(Tongyoung, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 동백 유박의 추출물 및 분획

물 조제는 한국천연물과학기술연구소(Seongnam, Korea)에 의뢰하였다. 건조시킨 동백 유박 시료 100 g을 환류 냉각 장치가 부착된 추출 장치를 이용하여 에탄올추출물을 조제하였다. 추출 후 얻은 동백 유박 에탄올추출물은 물에 현탁하여 극성별 유기용매인 hexan, chloroform, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 각각 표준 분획물을 조제하였다. 동백 유박 에탄올 추출물, 부탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, hexan분획물은 각각 11.9, 0.29, 3.51, 1.25, 0.38%의 수율을 나타내었다.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Hatano (1989) 등의 방법을 변형하여 측정하였다[17]. 동백 유박 추출물 및 분획물을 최종 농도가 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 50% ethanol에 희석한 뒤, 이를 96 well plate에 각각 100 μL 씩 분주하였다. 이후, 60 μM DPPH 용액을 각 well 당 100 μL 씩 분주하여 30분간 빛을 차단한 상온에서 방치하여 반응시켰다. 반응액을 분광광도계(Multiskan skyhigh microplate spectrophotometer, Thermo Fisher, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 각 well 당 측정된 흡광도 값을 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = 100 - [(A_s - A_B) \times 100 / A_c]$$

A_s : 농도별 시료를 첨가한 실험군, A_B 는 blank를 첨가한 대조군, A_c 는 시료를 첨가하지 않은 대조군

ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS⁺ radical 소거 활성은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다[18]. 7.4 mM의 ABTS 시약과 2.4 mM potassium persulfate 시약을 혼합하여 24시간 빛을 차단하여 반응시켜 ABTS⁺ radical이 생성되도록 유도하였다. 이후 20 μL 의 증류수와 180 μL 의 ABTS 용액을 96 well-plate에서 혼합하여 10분간 방치한 뒤 600 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 흡광값이 1.0에 수렴하도록 ABTS 용액을 증류수에 희석하여 ABTS working solution을 제조하였다. 동백 유박 추출물 및 분획물을 최종 농도가 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 희석한 뒤, 이들 각 시료 20 μL 와 ABTS working solution 180 μL 를 96-well plate에 각각 분주하고 암소에서 10분동안 반응 시켰다. 이후 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, ABTS⁺ radical 소거능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical scavenging activity (\%)} \\ = 100 - [(A_s - A_B) \times 100 / A_c]$$

A_s : 농도별 시료를 첨가한 실험군, A_B 는 blank를 첨가한 대조군, A_c 는 시료를 첨가하지 않은 대조군

Hydroxyl (OH) radical 소거 활성 측정

OH 소거 활성은 1997년 Chung 등에 따른 방법을 변형하여 측정하였다[19]. 동백 유박 추출물 및 분획물을 최종 농도가 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 PBS에 희석한 뒤, 이를 15 mL tube에 각각 100 μL 씩 분주하였다. 이후, 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA, 10 mM 2-deoxyribose, hydrogen peroxide

각 200 µL씩 첨가하여 빛을 차단 한 뒤, 4시간 동안 37 °C의 incubator에서 반응시켰다. 이 후, 2.8% TCA 1 mL, 1% TBA 1 mL solution을 희석하여 20분 동안 가열한 후 냉각시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\cdot\text{OH radical scavenging activity (\%)} = 100 - [(A_s - A_B) \times 100 / A_c]$$

A_s: 농도별 시료를 첨가한 실험군, A_B는 blank를 첨가한 대조군, A_c는 시료를 첨가하지 않은 대조군

Superoxide (O₂⁻) radical 소거 활성 측정

O₂⁻ radical 소거능은 1972년 Nishikimi 등의 방법을 변형하여 측정하였다[20]. 최종 농도가 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도가 되도록 희석한 동백 유박 추출물 및 분획물 시료 500 µL와 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 100 µL, 0.1 mM PMS 200 µL, 0.5 mM NBT 200 µL, 0.5 mM NADH 400 µL를 각각 혼합한 뒤 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ radical scavenging activity (\%)} = 100 - [(A_s - A_B) \times 100 / A_c]$$

A_s: 농도별 시료를 첨가한 실험군, A_B는 blank를 첨가한 대조군, A_c는 시료를 첨가하지 않은 대조군

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis (1912)의 방법을 일부 변형하여 실험을 진행하였다[21]. 증류수에 농도별로 희석한 동백 유박 추출물 및 분획물 시료 50 µL와 10% Follin-Ciocalteu’s reagent 100 µL, 700 mM sodium carbonate 350 µL를 혼합하여 40분간 반응시켰다. 이후 96 well-plate에 각각 분주한 뒤 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량선을 작성한 뒤 정량하여 gallic acid equivalent (GAE) 함량으로 산출하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법에 따라 실험을 진행하였다[22]. 증류수에 희석된 동백 유박 추출물 및 분획물 시료 125 µL와 5% sodium nitrite 75 µL를 혼합하여 6분간 실온에서 반응시켰다. 이후 10% aluminum chloride 150 µL를 첨가한 후 5분간 반응시켰고 1 N sodium hydroxide 750 µL를 첨가하여 15분간 반응시킨 뒤 96 well-plate에 분주하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 검량선을 작성한 뒤 정량하여 quercetin equivalent (QE) 함량으로 산출하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 통한 camelliaside B 함량 분석

HPLC 분석은 DGU-20A (Shimadzu, Japan) 기기를 사용하여 측정하였으며, 분석에 사용된 조건 및 시간에 따른 이동상 용매의 비율 등 측정 조건은 Table 1과 같다. 역상 칼럼은 C₁₈ column (250×4.6 mm, 5 µm) 칼럼을 사용하였다. 이동상 용매로는 0.01% formic acid와 acetonitrile을 사용하였으며 1.2 mL/min의 유속으로 용매를 주입하였다. Camelliaside B가 peak

Table 1 High-performance liquid chromatography experimental conditions

Parameters	Conditions		
Sample injection volume	10 µL		
Column temperature	35 °C		
Flow rate	1.2 mL/min		
Wavelength	203 nm		
Mobile phase condition	Time (min)	0.01% formic acid (%)	Acetonitrile (%)
	0	100	0
	2	95	5
	10	95	5
	20	90	10
	30	90	10
	40	70	30
	60	0	100

를 나타내는 203 nm에서 peak 면적을 측정하였다. 분석을 위해 camelliaside B를 농도별로 희석하여 측정하였으며 검출된 peak의 면적으로 표준 곡선을 작성하여 유효 물질의 함량을 산출하였다.

통계 분석

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차(n=6)로 나타내었다. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS program (ver. 20; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 구한 후 Duncan’s multiple test (p<0.05)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

동백나무의 잎, 꽃, 뿌리 등 동백나무의 다양한 부위로부터 항산화 활성에 관한 연구가 보고되고 있다[23-26]. 동백나무 잎은 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 HCE 세포 보호 효과가 있는 것으로 보고되었으며, ultra violet (UV)로 유도된 산화적 손상에 대한 HaCaT 각질세포 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다[23,24]. 동백나무 꽃 추출물은 산화적 스트레스로 유도된 인체의 피부세포에서 활성산소종 생성 억제 및 항산화 효소 활성 증가를 나타내었으며, 뇌 손상이 유도된 동물 모델에서 malondialdehyde 함량 감소를 나타내어 항산화 조절을 통한 뇌 보호 효과가 보고되었다[9,25]. 동백나무 뿌리 추출물은 항산화 작용 기전인 nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 신호 조절을 통해 항산화 활성이 있는 것으로 보고되었다[26]. 특히 동백나무의 여러 부위 중 잎, 꽃 등에 대한 항산화 등의 생리활성 연구는 활발히 보고된 반면, 동백 유박 추출물의 생리활성에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 동백 유박 추출물 및 분획물의 *in vitro* radical 소거능 측정을 통해 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 또한 동백 유박 추출물 및 분획물의 폴리페놀, 플라보노이드, camelliaside B 함량을 측정하였다.

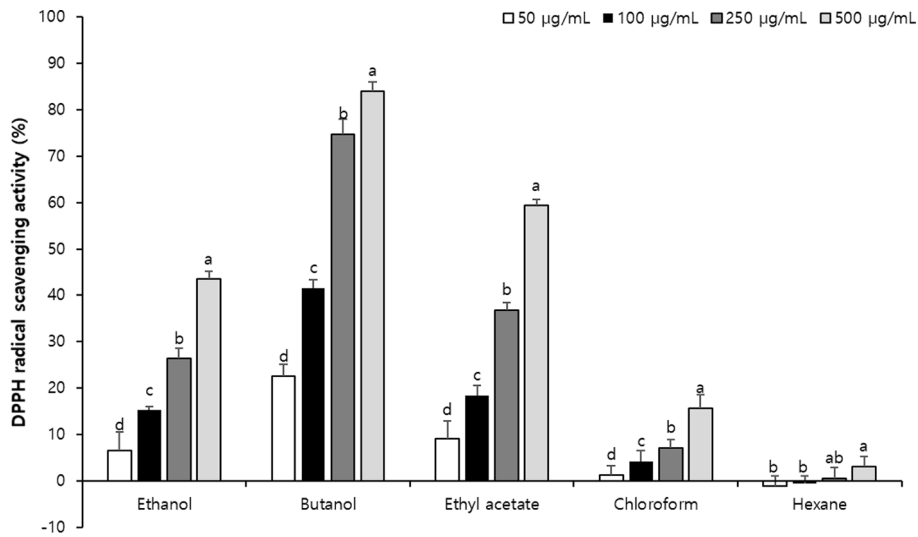


Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds. Values are mean \pm SD ($n=6$). ^{a-d}Different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

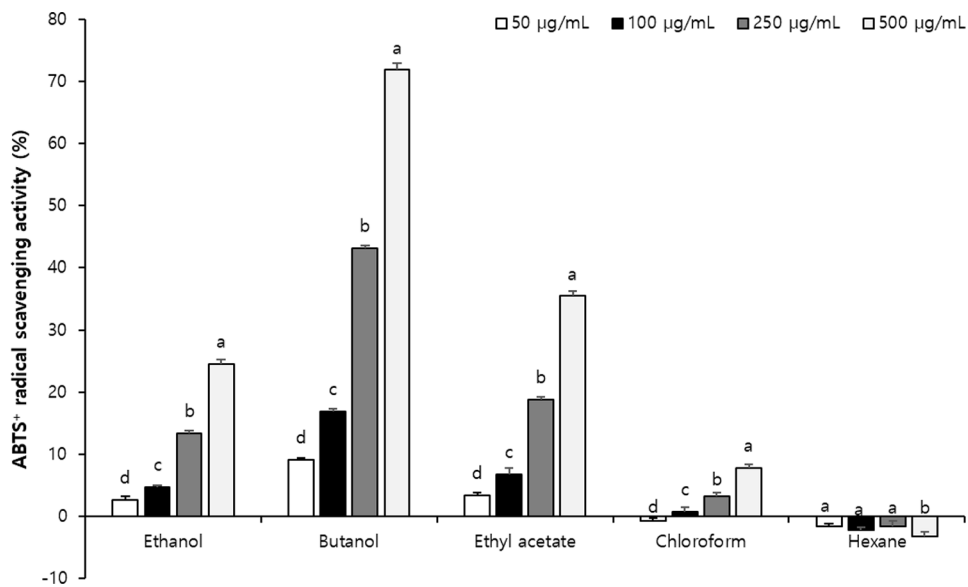


Fig. 2 ABTS⁺ radical scavenging activities of ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds. Values are mean \pm SD ($n=6$). ^{a-d}Different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

DPPH에서 유래된 안정한 형태의 free radical은 항산화제와 반응하여 DPPH-H로환원되면서 보란색에서 노란색으로 색의 변화를 나타냄에 따라, 천연물 유래 소재의 radical 소거능 측정 을 통한 항산화 활성 평가에 널리 사용되고 있다[27]. 본 연구 에서 동백 유박 추출물 및 분획물의 50, 100, 250, 500 µg/mL 의 농도에서 DPPH radical 소거능 측정 결과, 추출물 및 분획 물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1). 특히 부탄올 분획물은 50, 100, 250, 500 µg/mL 의 농도에서 각각 22.53, 41.58, 74.70, 84.04%의 수치를 나타내어, 모든 농도에서 다른 추출물 및 분획물에 비해 DPPH radical 소거능이 높았다. 부탄올 분획물 다음으로 에

틸아세테이트 분획물이 50, 100, 250, 500 µg/mL 의 농도에서 각각 9.19, 18.46, 36.89, 59.33%의 수치를 나타내어 다음으로 높은 DPPH radical 소거활성을 나타냄을 알 수 있었다.

ABTS⁺ radical 소거능은 비교적 안정한 형태의 free radical인 ABTS⁺가 항산화 물질과 반응 시 무색으로 색이 변화되는 원리 를 이용하여 항산화 활성 평가에 널리 이용되는 방법 중 하나 이다[18]. 동백 유박 추출물 및 분획물의 radical 소거능을 확인 하기 위해 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 ABTS⁺ radical 소거능 측정 결과, 헥산 분획물을 제외한 나머지 추출 및 분획물은 농도가 증가함에 따라 ABTS⁺ radical 소거능이 증 가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 특히 부탄올 분획물은 50, 100,

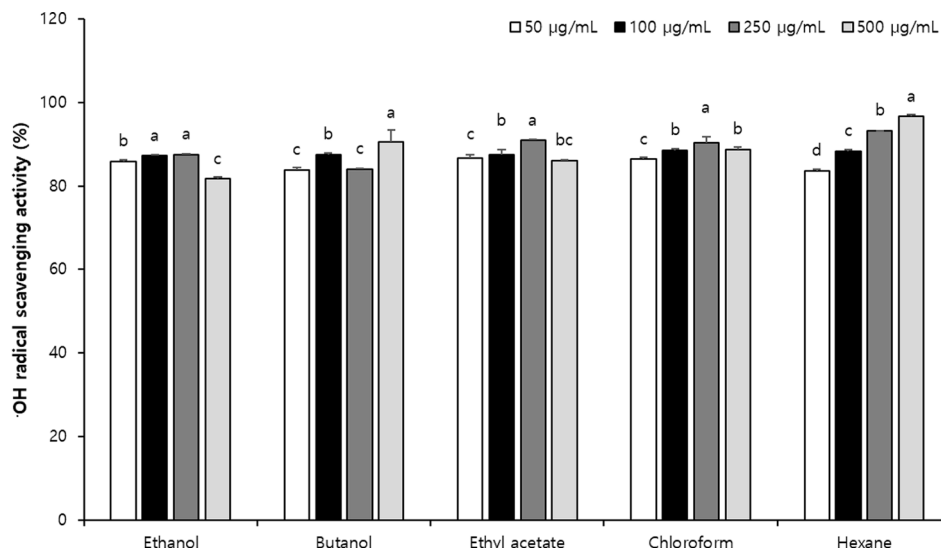


Fig. 3 ·OH radical scavenging activities of ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds. Values are mean ± SD (n=6). ^{a-c}Different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan’s multiple range test

250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 9.11, 16.91, 43.15, 71.81%의 수치를 나타내어, 모든 농도에서 다른 추출물 및 분획물에 비해 ABTS⁺ radical 소거능이 높았다. 부탄올 분획물 다음으로 에틸아세테이트 분획물이 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 3.38, 6.83, 18.81, 35.45%의 수치를 나타내어 다음으로 높은 ABTS⁺ radical 소거활성을 나타냄을 알 수 있었다. DPPH는 free radical 소거능을 측정하는 방법으로 음이온 radical에 대한 저해 활성을 나타내며, ABTS⁺는 cation radical 소거능을 측정하기 위한 방법으로 양이온 radical에 대한 저해 활성을 나타낸다[28,29]. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성은 두 기질과 반응물과의 결합 정도가 다르기 때문에 radical 소거능에 차이가 있으나, 유사한 경향을 나타내는 것으로 보고되었다[28,29]. 본 연구에서도 동백 유박 추출물 및 분획물의 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성에 대한 차이를 나타내지만, 부탄올 분획물이 가장 우수한 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거능을 나타내었으며, 다음으로 에틸아세테이트 분획물이 우수한 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거능을 나타내어 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

활성산소종의 여러 종류 중 ·OH radical은 fenton 반응에 의해 H₂O₂ 또는 peroxytrite의 분해로부터 생성되는 radical의 일종이다[30]. 동백 유박 추출 및 분획물의 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 ·OH radical 소거 활성 측정 결과, 모든 농도의 추출물 및 분획물에서 80% 이상의 ·OH radical 소거 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3). 동백 유박의 에탄올 추출물, 부탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 메틸클로로포름 분획물, 헥산분획물은 500 µg/mL의 농도에서 각각 81.68, 90.54, 86.03, 88.68, 96.60%의 수치를 나타냄을 확인 할 수 있었다. 특히 모든 동백 유박 추출물 및 분획물의 ·OH radical 소거활성이 80% 이상임을 나타내어, 본 연구에서 측정한 DPPH, ABTS⁺, O₂⁻ 등 다른 radical 중에서 ·OH radical 소거 활성이 가장 우수함을 알 수 있었다.

O₂⁻ radical은 가장 초기에 생성되는 활성산소종의 일종으로, catalase와 같은 항산화 효소에 의해 분해되어 반응성이 약한 것으로 알려져 있다[31]. 그러나 transition metals이 존재하는 경우 항산화 효소를 불활성화 시킬 뿐 아니라 직접 생체 분자를 손상시키는 것으로 보고되었다[32]. 동백 유박 추출물 및 분획물의 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 O₂⁻ radical 소거능 측정 결과, 동백 유박 추출물 및 분획물의 농도가 증가함에 따라 O₂⁻ radical 소거능 이 증가하여 농도의존적으로 O₂⁻ radical 소거능 이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). 특히 부탄올 분획물은 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 24.54, 37.68, 47.89, 53.07%의 수치를 나타내었으며, 다른 추출물 및 분획물에 비해 모든 농도에서 가장 높은 O₂⁻ radical 소거능을 나타내었다. 다음으로, 에틸아세테이트 분획물이 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 13.77, 28.01, 41.96, 48.25%의 수치를 나타내어 부탄올 분획물 다음으로 우수한 O₂⁻ radical 소거능을 나타내었다. 또한 본 연구에서 가장 우수한 radical 소거활성을 나타낸 부탄올 분획물의 경우 500 µg/mL의 농도에서 70% 이상의 DPPH, ABTS⁺, ·OH radical 소거 활성을 나타내었으나, O₂⁻ radical 소거능의 경우 53.07%의 수치를 나타내어 다른 radical에 비해 비교적 낮은 radical 소거 활성을 나타내었다.

폴리페놀 화합물은 플라보노이드, 안토시아닌, 탄닌 등을 포함하는 화합물로서, 공통적으로 aromatic ring에 하나 이상의 수산화기(-OH)를 가지고 있다[33]. 폴리페놀 화합물 중 가장 큰 범위를 차지하는 플라보노이드는 C6-C3-C6를 기본 골격으로 하며 단일 화합물 또는 글리코사이드 형태로 다양한 식물에 존재하고 있다[34]. 플라보노이드를 포함한 폴리페놀 화합물은 화합물 내 존재하는 다수의 수산화기가 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특징을 나타내며, 특히 free radical을 소거하는 능력으로 인해 항산화 물질로 알려져 있다[33-35]. 동백 유박 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 Table 2에 나타내었다. 동백 유박 에탄올 추출물, 부탄올 분획물, 에틸아세테이트

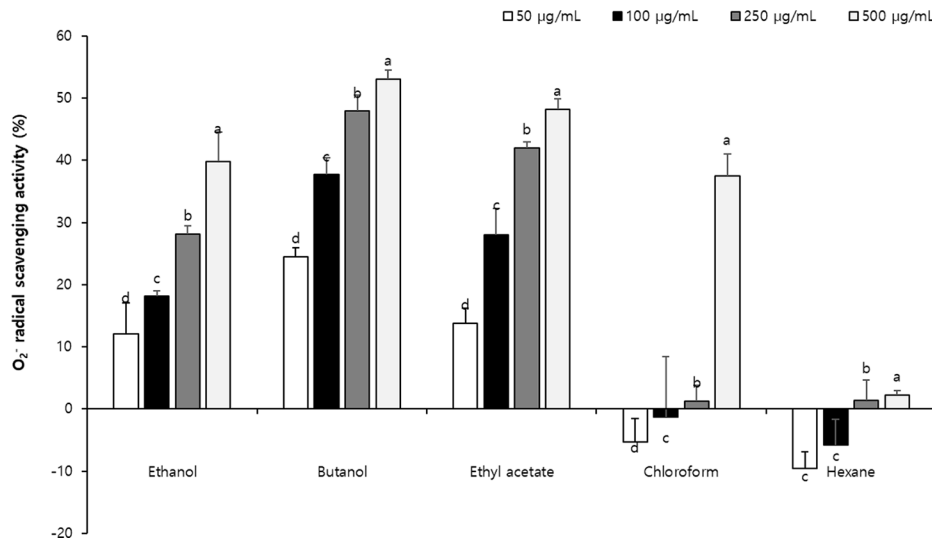


Fig. 4 $O_2^{\cdot-}$ radical scavenging activities of ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds. Values are mean \pm SD ($n=6$). ^{a-d}Different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Table 2 Total polyphenol and flavonoids contents in ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds

Sample	Total polyphenol (100 mg GAE/g)	Total flavonoids (100 mg QE/g)
Ethanol	17.60 \pm 0.17 ^b	7.83 \pm 0.14 ^b
Butanol	23.26 \pm 0.41 ^a	32.39 \pm 0.92 ^a
Ethyl acetate	19.92 \pm 0.42 ^{ab}	5.42 \pm 0.14 ^c
Chloroform	4.17 \pm 0.12 ^c	3.20 \pm 0.16 ^d
Hexane	0.81 \pm 0.12 ^d	0.63 \pm 0.08 ^c

Values are mean \pm SD ($n=6$). ^{a-c}Different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Table 3 Contents of camelliaside B in ethanol extracts and fractions of defatted from *Camellia japonica* L. seeds

Sample	Camelliaside B (μ g/g)
Ethanol	46.55 \pm 2.57 ^c
Butanol	102.37 \pm 7.07 ^b
Ethyl acetate	165.05 \pm 10.35 ^a
Chloroform	ND
Hexane	ND

Values are mean \pm SD ($n=3$). ^{a-c}Different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ND, Not-detected

트 분획물, 클로로포름 분획물, 헥산 분획물은 각각 17.60, 23.26, 19.92, 4.17, 0.81 100 mg GAE/g의 수치를 나타내었다. 특히 부탄올 분획물의 폴리페놀 함량이 가장 높았으며, 다음으로 에틸아세테이트 분획물의 폴리페놀 함량이 높은 것을 알 수 있었다. 동백 유박 에탄올 추출물, 부탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 헥산 분획물의 플라보노이드 함량 측정 결과, 각각 7.83, 32.39, 5.42, 3.20, 0.63 100 mg QE/g의 수치를 나타내었다. 이들 중 부탄올 분획물의 플라보노이드

이드 함량이 가장 우수한 것을 알 수 있었다.

동백나무에는 quercetin, camelliaside, epicatechin, kaempferol 등의 다양한 플라보노이드 성분을 함유하는 것으로 보고되었다 [36]. 특히 동백나무의 종자에는 tsubakiosides A, tsubakiosides B, camelliaside B 등의 kaempferol oligosaccharide 계열의 플라보노이드 성분이 분리되었다[37]. 이들 중 camelliaside B는 차나무과 식물들의 종자 추출물에 함유되어있는 주요 생리활성 물질로 알려져 있으며, 동백나무 종자의 지표물질로서 활용 가능성에 대해서도 보고되었다[38,39]. 본 연구에서 동백 유박 추출물 및 분획물의 HPLC 분석한 chromatogram을 Fig. 5에 제시하였다. 표준화합물의 chromatogram과 비교 분석한 결과, retention time 42.08분에서 camelliaside B가 확인되었으며, 이는 동백 유박 에탄올 추출물, 부탄올 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 retention time도 일치하는 것으로 확인되었다. 동백 유박 추출물 및 분획물이 함유하고 있는 camelliaside B 함량을 HPLC 측정 결과를 통해 산출한 결과, 동백 유박 에탄올 추출물, 부탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물에서 각각 46.55, 102.37, 165.05 μ g의 수치를 나타내었다(Table 3). 반면 동백 유박 클로로포름 및 헥산 분획물에서는 검출되지 않았다. 따라서 에탄올, 부탄올, 에틸아세테이트를 용매로 추출 및 분획 시 camelliaside B가 검출 됨을 알 수 있었으며, 특히 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 camelliaside B 함량을 나타냄을 알 수 있었다. 동백 유박 제조 전 원료인 동백 종실에는 폴리페놀 및 플라보노이드 등 성분 외에도 camellidin, camoreoside 등과 같은 triterpene oligoglycoside-type의 camellia saponin이 함유된 것으로 보고되었다[40,41]. 특히 camellia saponin은 free radical 소거능을 통한 항산화 활성뿐 아니라, 비만 개선, 혈당 조절 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다[42,43]. 또한 동백 종피 메탄올 추출물에는 catechin, epicatechin, caffeine, epigallocatechin, gallic acid 등 친수성 항산화 물질이, 헥산 추출물에는 tocotrienol계열의 친유성 항산화 물질이 검출되었다[44]. 본 연구에서 동백 유박 에틸아세테이트 분

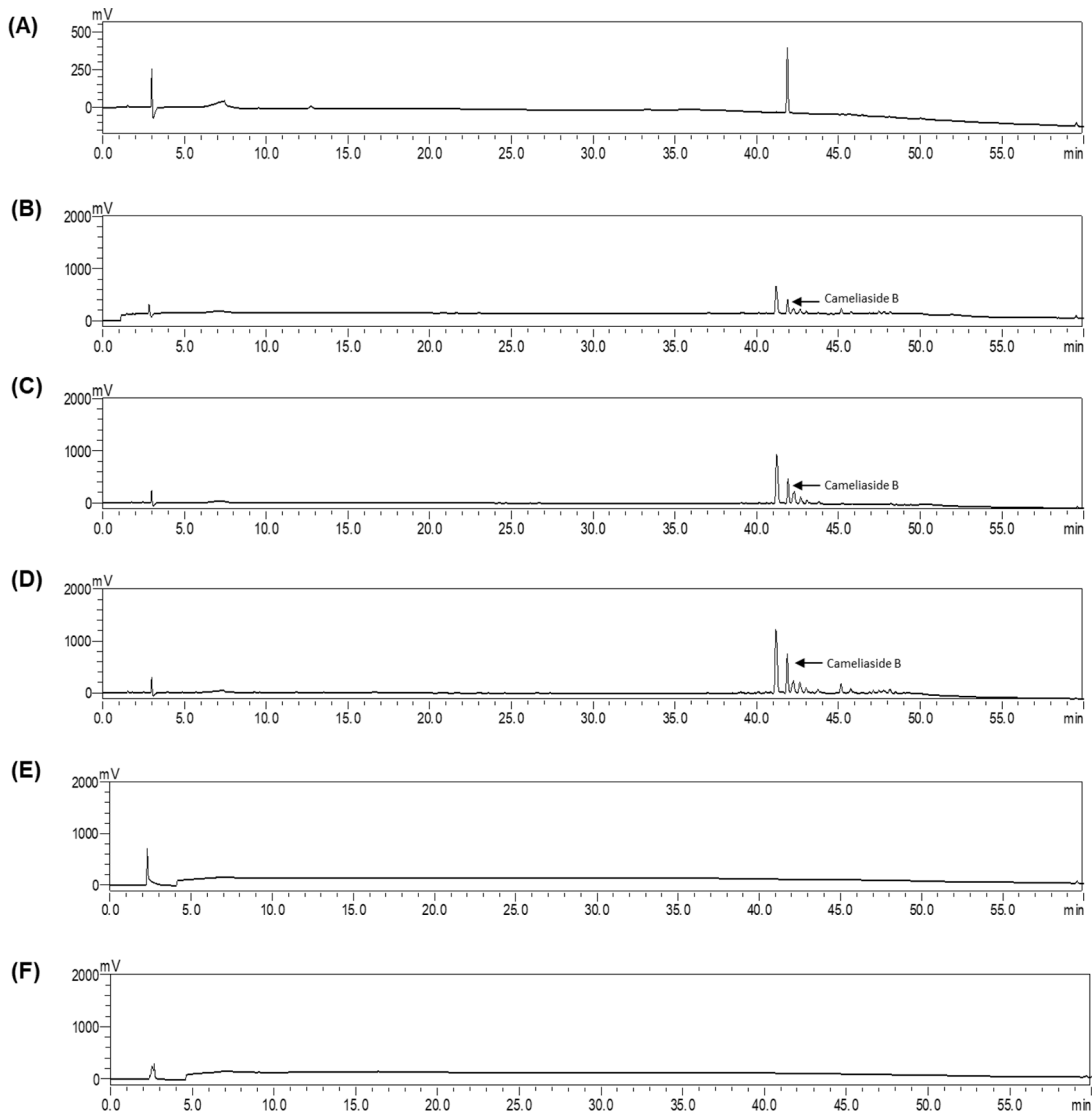


Fig. 5 HPLC chromatograms of camelliaside B (A), ethanol extract (B), butanol fraction (C), ethylacetate fraction (D), chloroform fraction (E), hexane fraction (F) from defatted from *Camellia japonica* L. seeds

획물은 가장 높은 camelliaside B 함량을 나타낸 반면, 부탄올 분획물이 가장 우수한 radical 소거능을 나타내었다. 따라서 동백 종실에 포함된 camelliaside B의 다른 항산화 물질의 극성에 따라, 본 연구의 동백 유박 추출물 및 분획물의 radical 소거 활성에 영향을 주었을 것으로 사료되며, 동백 유박 추출물 및 분획물의 극성별 항산화 화합물에 관한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

초 록

본 연구는 동백나무(*Camellia japonica* L.) 유박 추출물 및 분획물의 *in vitro* 항산화 활성에 대해 조사하였다. 동백나무 유박은 에탄올을 사용하여 추출하였으며, 이 후 부탄올(BuOH), 에

틸아세테이트(EtOAc), 클로로포름 및 헥산을 이용하여 분획물을 조제하였다. 동백 유박 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 평가하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺), hydroxyl radical, superoxide anion (O₂⁻) radical 소거능을 측정하였다. 동백 유박 추출물 및 분획물은 농도 의존적으로 DPPH, ABTS⁺ 및 O₂⁻ radical 소거능을 증가시켜 항산화 활성을 나타내었다. 특히 동백 유박 BuOH 분획물은 다른 추출물 및 분획물에 비해 가장 높은 radical 소거능을 나타내었다. 동백 유박 BuOH 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 23.26 mg GAE/g 및 32.39 mg QE/g이었으며, 이는 다른 추출물 및 분획물보다 높은 수치임을 알 수 있었다. 동백 유박 BuOH 분획물 및 EtOAc 분획물의 camelliaside B 함량은 각각 102.37, 165.05 µg/g임을 확인하여 다른 추출물 및 분획물에 비해 높은

수치를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 동백 유박 추출 및 분획물 중에서 BuOH 분획물 및 EtOAc 분획물은 다른 추출 및 분획물에 비해 radical 소거능이 우수할 뿐 아니라 항산화 물질 함유량이 높아, 항산화 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Keywords 동백 · 유박 · 자유라디칼 · 항산화 · Camelliaside B

References

- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M (2017) Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38(7): 592–607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005
- Jakubczyk K, Dec K, Kaldunska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K (2020) Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski* 48(284): 124–127
- Alkadi H (2020) A review on free radicals and antioxidants. *infect disord drug targets*. 20(1): 16–26. doi: 10.2174/1871526518666180628124323
- Engwa GA, EnNwekegw FN, Nkeh-Chungag BN (2022) Free radicals, oxidative stress-related diseases and antioxidant supplementation. *Altern Ther Health Med* 28(1): 114–128
- Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS (2019) Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem* 178: 687–704. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010
- Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE (2022) Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem* 46(10): e14264. doi: 10.1111/jfbc.14264
- Yoon IS, Park DH, Kim JE, Yoo JC, Bae MS, Oh DS, Shim JH, Choi CY, An KW, Kim EI, Kim GY, Cho SS (2017) Identification of the biologically active constituents of *Camellia japonica* leaf and anti-hyperuricemic effect in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* 39(6): 1613–1620. doi: 10.3892/ijmm.2017.2973
- Yoshikawa M, Morikawa T, Asao Y, Fujiwara E, Nakamura S, Matsuda H (2007) Medicinal flowers. XV. The structures of noroleanane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides with gastroprotective and platelet aggregation activities from flower buds of *Camellia japonica*. *Chem Pharm Bull* 55: 606–612. doi: 10.1248/cpb.55.606
- Piao MJ, Yoo ES, Koh YS, Kang HK, Kim J, Kim YJ, Kang HH, Hyun JW (2011) Antioxidant effects of the ethanol extract from flower of *Camellia japonica* via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes. *Int J Mol Sci* 12(4): 2618–2630. doi: 10.3390/ijms12042618
- Tian W, Zhao J, Choo BK, Kim IS, Ahn D, Tae HJ, Islam MS, Park BY (2021) *Camellia japonica* diminishes acetaminophen-induced acute liver failure by attenuating oxidative stress in mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(40): 57192–57206. doi: 10.1007/s11356-021-14530-0
- Ha SY, Jung JY, Yang JK (2021) *Camellia japonica* essential oil inhibits α -MSH-induced melanin production and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021: 6328767. doi: 10.1155/2021/6328767
- Lee SY, Bae CS, Seo NS, Na CS, Yoo HY, Oh DS, Bae MS, Kwon MS, Cho SS, Park DH (2019) *Camellia japonica* oil suppressed asthma occurrence via GATA-3 & IL-4 pathway and its effective and major component is oleic acid. *Phytomedicine* 57: 84–94. doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.004
- Kim S, Jung E, Shin S, Kim M, Kim YS, Lee J, Park D (2012) Anti-inflammatory activity of *Camellia japonica* oil. *BMB Rep* 45(3): 177–182. doi: 10.5483/BMBRep.2012.45.3.177
- Kang SK, Kim YD, Choi OJ (1998) Proximate, saponin, and amino acid compositions in *Camellia (Camellia japonica L.)* seeds and defatted *Camellia* seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(2): 227–231
- Ko J, Rho T, Yoon KD (2020) Kaempferol tri- and tetrasaccharides from *Camellia japonica* seed cake and their inhibitory activities against matrix metalloproteinase-1 secretion using human dermal fibroblasts. *Carbohydr Res* 495: 108101. doi: 10.1016/j.carres.2020.108101
- Kang SK, Kim YD, Choi OJ (1998) Antimicrobial activity of defatted *Camellia (Camellia japonica L.)* seeds extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(2): 232–238
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 37: 2016–2021
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1231–1237. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Kim JW, Minamikawa T (1997) Hydroxy radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 118–123. doi: 10.1271/bbb.61.118
- Nishikimi M, Appaji N, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46(2): 849–854. doi: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109–114. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00189-0
- Lee HS, Choi JH, Cui L, Li Y, Yang JM, Yun JJ, Jung JE, Choi W, Yoon KC (2017) Anti-inflammatory and antioxidative effects of *Camellia japonica* on human corneal epithelial cells and experimental dry eye: in vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(2): 1196–1207. doi: 10.1167/iovs.16-20634
- Mizutani T, Masaki H (2014) Anti-photoaging capability of antioxidant extract from *Camellia japonica* leaf. *Exp Dermatol* 23: 23–26. doi: 10.1111/exd.12395
- Lu W, Xu L, Wen J (2019) Protective effect of extract of the *Camellia japonica L.* on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 77(1): 39–46. doi: 10.1590/0004-282X20180146
- Kim JH, Yang H, Kim KK (2022) *Camellia japonica* root extract increases antioxidant genes by induction of NRF2 in hela cells. *Plants (Basel)* 11(21): 2914. doi: 10.3390/plants11212914
- Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48(4): 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- Shin JH, Lee HG, Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ (2010) Anti-oxidant activity of solvent fraction from black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(7): 933–940. doi: 10.3746/jkfn.2010.39.7.933
- Kwak CS, Choi HI (2015) *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1439–1449. doi: 10.3746/jkfn.2015.44.10.1439
- Zhao Z (2023) Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions. *Free Radic Biol Med* 208: 510–515. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.013
- Chiste RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E (2015) Superoxide anion radical: generation and detection in cellular and non-cellular systems. *Curr Med Chem* 22(37): 4234–4256. doi:10.2174/0929867322666151029104311
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musilek K (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 90(1): 1–37. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5
- Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols.

- Nutrients 2(12): 1231–1246. doi: 10.3390/nu2121231
34. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B (2022) Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem* 383: 132531. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531
 35. Perron NR, Brumaghim JL (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53(2): 75–100. doi: 10.1007/s12013-009-9043-x
 36. Pereira AG, Garcia-Perez P, Cassani L, Chamorro F, Cao H, Barba FJ, Simal-Gandara J, Prieto MA (2022) *Camellia japonica*: A phytochemical perspective and current applications facing its industrial exploitation. *Food Chem X* 13: 100258. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100258
 37. Ko J, Rho T, Yoon KD (2020) Kaempferol tri- and tetrasaccharides from *Camellia japonica* seed cake and their inhibitory activities against matrix metalloproteinase-1 secretion using human dermal fibroblasts. *Carbohydr Res* 495: 108101. doi:10.1016/j.carres.2020.108101
 38. Sekine T, Arita J, Yamaguchi A, Saito K, Okonogi S, Morisaki N, Iwasaki S, Murakoshi I (1991) Two flavonol glycosides from seeds of *Camellia sinensis*. *Phytochemistry* 30(3): 991–995. doi: 10.1016/0031-9422(91)85293-9
 39. Kang JY, Youn YD, Kim BK (2022) Validation of HPLC-DAD method for quantitative analysis of camelliaside B in *Camellia japonica* seed extract. *J Agric Life Sci* 56(5): 161–169
 40. Nagata T, Tsushida T, Hamaya E, Enoki N, Manabe S, Nishino C (1985) Camellidins, antifungal saponins isolated from *Camellia japonica*. *Agric Biol Chem* 49(4): 1181–1186
 41. Rho T, Choi SJ, Kil HW, Ko J, Yoon KD (2019) Separation of nine novel triterpene saponins from *Camellia japonica* seeds using high-performance countercurrent chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* 30(2): 226–236. doi: 10.1002/pca.2808
 42. Matsuda H, Morikawa T, Nakamura S, Muraoka O, Yoshikawa M (2023) New biofunctional effects of oleanane-type triterpene saponins. *J Nat Med* 77(4): 644–664. doi: 10.1007/s11418-023-01730-w
 43. Hu JL, Nie SP, Huang DF, Li C, Xie MY (2012) Extraction of saponin from *Camellia oleifera* cake and evaluation of its antioxidant activity. *Int J Food Sci Technol* 47(8): 1676–1687
 44. Saenjum C, Pattananandecha T, Nakagawa K (2020) Detection of antioxidant phytochemicals isolated from *Camellia japonica* seeds using HPLC and EPR imaging. *Antioxidants* 9(6):493. doi: 10.3390/antiox9060493