

치자의 항산화 활성 및 활성성분의 분리

양혜정 · 박미정¹ · 이흠숙*

서울과학기술대학교 식품공학과, ¹서울과학기술대학교 안경광학과

Antioxidative Activities and Components of *Gardenia jasminoides*

Hye-Jung Yang, Mijung Park¹, and Heum Sook Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

¹Department of Visual Optics, Seoul National University of Science and Technology

Abstract From the total methanolic extract of *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae), various antioxidative characteristics were identified in terms of nitrite scavenging ability, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical cation inhibition, superoxide dismutase (SOD)-like activity, and elongation effect of lipid peroxidation using Rancimat. After successive partitioning with n-hexane, chloroform, n-butanol, and water, potent nitrite scavenging abilities were shown in the n-butanol fraction and water fraction, and IC₅₀ values were 183 ppm and 194 ppm, respectively. As for ABTS radical cation inhibition, the chloroform fraction was most potent and its IC₅₀ was 159 ppm. SOD-like activity was slightly low in all of the fractions. The elongation effect of lipid peroxidation also increased dose-dependently and the antioxidative index (AI) of the total methanolic extract was 2.93 in 1000 ppm, which was more effective than 1.66 of butylated hydroxy anisol in the same concentration. The compounds I and II were isolated through silica gel column chromatography of the active fractions, and identified as geniposide and crocin, respectively, by ¹H-NMR spectral data. The IC₅₀ values for the nitrite scavenging abilities of geniposide and crocin were 940 ppm and 77 ppm, respectively. In ABTS radical cation inhibition, the IC₅₀ values of geniposide and crocin were 684 ppm and 549 ppm, respectively. And the EC₅₀ value for SOD-like activity of crocin was 259 ppm, which was much smaller than 453 ppm by the positive control, chlorogenic acid. The EC₅₀ value of geniposide could not be identified.

Keywords: *Gardenia jasminoides*, geniposide, crocin, antioxidant activities, antioxidative index

서 론

호기성 생명체의 산소는 생명유지를 위한 에너지 생산과정에 중요한 작용을 하나 그 일부는 각종 물리, 화학, 환경적인 요인 및 산화스트레스 등에 의하여 반응성이 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변화하여 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical을 발생시켜 암, 퇴행성질환 및 심혈관계 질환 등 여러 질환의 직간접적인 원인이 되고 있다(1). 생체내에는 활성산소종의 상해를 입은 단백질과 유전자 등을 보수하는 메커니즘과 ROS의 활동을 막아주는 superoxide dismutase, catalase, peroxide 등의 항산화 효소 및 vitamin C, vitamin E, glutathione, ubiquinone 등과 같은 항산화 물질이 존재하고 있으나 활성산소종의 생성과 방어 시스템 사이의 불균형이 발생하면 생체 내 분자들의 산화를 초래하여 지질과산화 및 단백질, 세포막, DNA, 효소와 T세포 등 면역계 인자의 손상을 초래하여 노화를 비롯한 각종 성인병을 유발한다고 알려져, 활성 산소종을 억제하고 조절

할 수 있는 항산화 물질의 연구에 대한 관심이 증가하고 있다(2).

최근 항산화력이 우수한 각종 소재들이 지속적으로 개발되고 있으나 항산화 효소는 단백질로 구성되어 온도 및 pH에 의한 영향을 받아 응용하기 어렵고, 합성 항산화제의 경우에는 변이원성 및 독성이 지적되면서(3), 보다 안전하고 산화적 스트레스에 의한 질환의 예방 및 억제에 대한 방어 기능이 우수한 천연물을 이용한 항산화 물질들이 기대되고 있다. 특히 천연물은 오랜 기간 각종 민간약 분야에 활용되어 왔으므로 천연물로부터 항산화 작용이 있는 식품 자원을 분리하여 이용하기 위한 노력이 시도되고 있다(4).

치자(*Gardenia jasminoides*)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 상록활엽 관목으로 한방에서 소염, 해열, 이뇨, 지혈, 진정, 이담, 혈압강하제로 사용되어 왔다. 치자의 황금색 색소는 식용 및 염료로서 오랫동안 이용되어온 색소로 carotenoid계의 crocetin의 COOH기에 여러 가지 당이 결합된 배당체로 구성되어 있으며, 그 중 crocetin digentiobioside인 crocin이 주성분으로 알려져 있다(5-7). 또한, iridoid 화합물인 genipin, geniposide, geniposidic acid, gardenoside, gardoside, shanzhiside, methyl deacetyl asperuloside 등과 flavonoids 계열의 gardanin, 항염 활성성분인 quinic acid와 그 유도체, vanillic acid 4-O-β-D-(6'-sinapoyl) glucopyranoside, caffeic acid 등이 함유되어 있다고 보고되었다(8,9).

치자 추출물은 피부미백효과, monoamine oxidase(MAO) 저해 및 anti-inflammatory 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(10,11). 특히 치자의 geniposide는 혈청 triglyceride, 인지질, 지질과산화물,

*Corresponding author: Heum Sook Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea

Tel: 82-2-970-6436

Fax: 82-2-976-6460

E-mail: heum@snut.ac.kr

Received May 27, 2010; revised October 7, 2010;

accepted October 18, 2010

간 triglyceride, 유리지방산 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 값을 감소시킨다고 보고되어 있으며(6), 담즙 분비 촉진작용도 보고되어 있다(12). 그밖에 crocin이 pancreatic lipase의 활성을 차단하여 low density lipoprotein(LDL)과 very low density lipoprotein(VLDL)의 수치를 낮추고, 대장에서의 지방 배설을 촉진함으로써 혈중지질의 양을 감소시킨다고 보고되었다(13-15).

본 연구에서는 *in vitro* 항산화 활성을 간편하게 측정하는 방법으로 그 활성을 측정하여 치자의 식품 염료 및 항산화 식품으로서의 가능성에 대하여 알아보았다. 치자의 총 메탄올 추출물로부터 극성이 다른 여러 분획물들로 제조하여 nitrite 소거작용을 이용하여 발암 전 단계의 억제작용을 탐색하였고, ABTS radical cation 저해작용과 SOD 유사활성을 측정하여 그 항산화 활성을 살펴보았으며, 유지 산화 지연효과도 측정하였다. 또한, 활성이 있는 분획의 주성분을 정제, 분리하여 ¹H-NMR을 이용하여 그 화학적 구조를 동정하고 표준품의 data와 비교함으로써 그 구조를 밝혔으며, 분리된 순수 물질의 활성을 각각 측정하여 항산화 기능성 식품 및 첨가제로서의 개발 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 치자는 전남 해남군 소재로 건조 상태인 것을 서울 경동시장 한약 건재상에서 2006년 9월에 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기

항산화 활성 측정용 시약으로 chlorogenic acid, ascorbic acid, peroxidase, naphthylamine, pyrogallol, cacodylic acid, tris-base와 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Sodium nitrite, sulfanilic acid, sodium phosphate buffer, hydrogen peroxide 및 dimethyl sulfoxide는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)의 것을 사용하였다. 치자의 농축을 위하여 evaporator(EYELA Unitrap UT-1000, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 추출 및 컬럼크로마토그래피용 용매는 1급 시약(Daejung Chemical, Seoul, Korea)을 1차 증류하여 사용하였고 분석을 위한 기타 시약 모두 1급 이상의 등급을 사용하였다. 컬럼크로마토그래피를 위한 silica gel은 Sigma Chemical(70-230 mesh)에서, 박층크로마토그래피용은 precoated TLC plates(Whatman Inc., Piscataway, NJ, USA)를 사용하였으며 박층크로마토그래피 발색시약인 anisaldehyde는 Fluka Co.(Buchs, Switzerland) 제품을 사용하였다. 흡광도 측정기기로는 UV Spectrometer(Shimadzu UVPC-2101, Kyoto, Japan), UV lamp (Spectroline ENE-260C, Westbury, NY, USA)와 ELISA Reader (Molecular Devices Thermomax microplate reader, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였고, 구조분석을 위한 기기로 NMR(Bruker AMX 500 spectrometer[500 MHz], Ettlingen, Germany)을 사용하였다. 또한, 유지 산화 지연효과를 측정하기 위한 기기로 Rancimat(Metrohm 679, Herisau, Switzerland)을 이용하였다.

치자의 추출 및 분획

건조한 치자 200 g을 잘게 분쇄하여 그 분말을 80% 메탄올(MeOH)로 30°C, 6시간씩 4회 sonication하여 추출한 후 여과하여 추출액을 모으고 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 총 메탄올 추출물(total MeOH extract) 68.7 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 용매극성에 따라 순차적으로 추출하여 헥

산(n-hexane) 분획물 3.72 g, 클로로포름(CHCl₃) 분획물 2.03 g, 부탄올(n-BuOH) 분획물 27.48 g과 물(H₂O) 분획물 30.02 g을 얻어 이들 각 분획으로 nitrite 소거작용, ABTS radical cation 저해작용과 SOD 유사활성을 실험하였고, 양성대조군으로 chlorogenic acid와 vitamin C를 시료추출물과 같은 농도별로 제조하여 저해작용을 비교, 측정하였다. 또한 총 메탄올 추출물을 농도별로 희석하여 Rancimat을 이용한 유지 산화 지연효과를 측정하였다.

Nitrite 소거작용 측정

각 시료의 nitrite 소거작용은 Kato 등의 방법(16)에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 시료 추출물 0.1 g을 가한 후 0.1 N HCl과 0.2 M citric acid를 혼합하여 만든 완충액으로 pH를 1.5로 조절하여 반응용액을 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL와 Griess 시약(30% HCl으로 제조한 1% naphthylamine과 1% sulfanilic acid의 1:1 혼합액) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계를 이용하여 생성되는 azo화합물의 흡광도를 520 nm에서 측정하여 잔존하는 nitrite량을 비교하였다. 대조구로는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였으며, nitrite 소거작용은 화합물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 차이에 의한 백분율로 나타내었다.

ABTS radical cation 저해작용 측정

ABTS radical cation 저해작용 측정 실험은 Djeridane 등과 Ozcan Erel의 방법(17,18)을 변형하여 실험하였다. 증류수에 녹인 5 mM ABTS 용액 60 µL에 peroxidase 100 µL를 넣고 NaH₂PO₄와 Na₂HPO₄를 혼합하여 만든 50 mM sodium phosphate buffer 용액(pH 7.4) 1920 µL를 첨가하여 진탕한 후 각 시료 추출물을 20 µL씩 넣어 섞어준 후 1 mM H₂O₂ 용액 200 µL를 첨가하여 ABTS가 ABTS⁺로 변하면서 발현되는 청색이 시료 추출물 내의 항산화 물질에 의하여 감소되는 정도를 25°C, 734 nm에서 측정하였다. 대조구로는 시료대신 sodium phosphate buffer를 첨가하여 흡광도를 측정하였으며, 흡광도는 1분간 측정하되 결과치는 30초 후의 흡광도로 하였다.

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund 등의 방법(19)에 따라 측정하였다. 추출한 시료 20 g에 50 mM Tris-cacodylic acid buffer(TCB, pH 8.2) 20 mL를 가한 후 2분간 균질화시키고 4°C에서 원심분리(12,000×g, 30분) 하였다. 이 상등액의 pH를 8.2로 조정하고 TCB를 이용하여 50 mL로 정용한 것을 시료액으로 하였다. 시료액 0.9 mL를 취하여 24 mM pyrogallol 50 µL를 가한 후 420 nm에서 2분간의 흡광도 증가율을 측정하였다. 대조구는 시료대신 TCB 0.9 mL를 취하여 동일한 방법으로 흡광도 증가율을 측정하였다.

유지산화 지연효과 측정

Rancimat을 이용하여 유지의 산화 지연효과를 측정한 방법은 Chon 등의 방법(20)으로 temperature 130°C, conductivity range 20 us/cm, chart speed 1 cm/hr, cell constants(C)=0.82/cm⁻¹, measuring time=10 hr로 조건을 맞추고 측정하였다. Reaction vessel에 치자 총 메탄올 추출물을 농도별로 제조하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석시킨 시료용액과 가공되지 않은 palm oil을 혼합하여 2.5 g을 취한 후 130°C로 맞춘 aluminum heating block 상에서 시간당 20 L의 공기를 주입하며 산화시켰다. 이 때 발생하는

휘발성 산화 생성물을 70 mL 증류수가 들어있는 absorption vessel 에 이행시켜 전기전도도의 변화에 따라 자동적으로 산출된 유도 시간으로 항산화 정도를 측정하였다. 대조구로는 시료를 넣지 않은 순수한 DMSO 0.5 g에 유지 2 g을 가하여 같은 방법으로 실시하였으며, 각각의 plot된 유도시간을 이용하여 sample의 antioxidative index(AI, 항산화제를 첨가한 유지의 산화 유도시간/항산화제를 첨가하지 않은 유지의 산화 유도시간) 값을 구하여 비교하였다. 또한, butylated hydroxy anisole(BHA)을 양성 대조군으로 이용하여 그 최종농도가 1000 ppm이 되도록 제조한 후 유지 산화유도 지연 시간을 측정하여 치자의 유지 산화 지연효과를 비교하였다.

Compound I과 compound II의 분리

치자의 부탄올 분획물을 클로로포름과 메탄올의 혼합용매를 사용하여 칼럼크로마토그래피를 수행하였다. 유출 용매는 클로로포름:메탄올(10:1)의 혼합용매를 시작으로 극성을 증가시키면서 순차적으로 용매를 유출시켜 TLC로 확인하면서 동일색의 형광을 가지며 Rf값이 같은 성분을 함유하는 6개의 소분획으로 분리하였다. 6개의 소분획 중 소분획 II를 silica gel로 충전시킨 후 클로로포름:메탄올(9:1) 용매계에서 재 분리하여 흰색의 분말을 얻었다. 이 분말을 클로로포름:메탄올(3:1) 용매계에서 TLC로 확인한 결과 Rf값 0.55의 anisaldehyde 발색시 황자색, long wave에서 blue형광, short wave에서 검게 보이는 단일물질로 확인되었다(compound I). 또한, 물 분획을 부탄올:아세트산:물(5:1:0.5) 용매계로 TLC를 이용하여 비교하면서 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과 클로로포름:메탄올(5:1)에서 4개의 소분획을 얻었고 그 중 세 번째 소분획을 다시 클로로포름:메탄올:물(1:1:0.5)로 확인한 결과 Rf값 0.21의 short wave에서 검게 보이는 단일물질을 얻었다(compound II). 이 물질을 ¹H-NMR spectra를 이용하여 그 구조를 동정하였다(50 MHz, 용매 DMSO-d₆).

Compound I의 구조 확인

Compound I은 anis-aldehyde 발색시 황자색이며, uv-lamp로 조사시 long wave에서 푸른 형광을 보였다. 이 물질은 그 발색 양상과 ¹H-NMR spectra의 특징적인 δ3.70에서의 singlet, δ4.30에서

의 J=14.4의 doublet과 δ5.16에서의 J=7.55의 anomeric proton의 존재로 치자에서 분리되어온 iridoid 계통의 배당체임을 추측할 수 있었다. ¹H-NMR spectra의 정밀 분석결과와 발표된 문헌치를 비교하여 geniposide로 동정하였다(21)(Table 1, Fig. 1).

¹H NMR spectra(CD₃OD, 500 MHz): δ2.08(1H, m, H-6α), 2.71(1H, dd, J=7.65, 9.5, H-9), 2.81(1H, m, H-6β), 3.21(1H, m, H-5), 3.70(3H, s, COOMe), 4.30(2H, d, J=14.4, H-10), 4.70(1H, d, J=7.9, H-1), 5.16(1H, d, J=7.55, H-1'), 5.79(1H, br, s, H-7), 7.50(1H, d, J=0.85, H-3)

Compound II의 구조 확인

Compound II는 클로로포름:메탄올:물(1:1:0.5)용매계에서 RF값 0.21로 short wave에서 검게 보이는 순수 물질이었다. 이 물질의 ¹H-NMR spectra로 δ2.01에서의 두 개의 methyl singlet, δ6.49-δ7.43에서의 conjugated polyene의 존재를 예측할 수 있었으며 전체적인 peak type은 분자내의 symmetric two-fold axis가 존재함을 보여주었다. 또한 δ3.09-δ4.30에서의 많은 proton들과 δ4.32와 δ5.53에서의 두 개의 anomeric proton으로 disaccharide임을 알 수 있었다. 발표된 문헌치와 ¹H-NMR의 정밀 비교결과, 이 물질은 crocin으로 동정하고 authentic sample과 동일한 기기를 사용하여 ¹H-NMR spectra를 측정 비교하여 crocin으로 확정하였다(22)(Table 2, Fig. 1).

¹H NMR spectra(CD₃OD, 500 MHz): δ2.01(3H, s, H-22), 2.01(3H, s, H-21), 4.09(2H, d, J=8.25, OH4.58, s, H-12), 4.32(1H, d, J=7.75, H-7), 5.53(2H, d, J=7.5, H-1), 6.49(1H, m, H-19), 6.65(1H, dd, J=11.35, 15, H-16), 6.75(1H, d, J=14.59, H-17), 6.83(1H, m, H-20), 7.43(1H, d, J=11.1, H-15)

통계처리

각 시료들의 실험 결과들은 mean±SD치로 표시하였고 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구(blank control)와 비교하여 “student t-test”에 의하여 판정하였으며 p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

Table 1. ¹H-NMR chemical shift values of geniposide and compound I

Position	Geniposide (CD ₃ OD) 500 MHz	Compound I (CD ₃ OD) 500 MHz
H-1	4.70* (d***, J=7.9**)	4.70 (d, J=7.9)
2		
3	7.50 (d, J=1)	7.50 (d, J=0.85)
4		
5	3.21 (m)	3.21 (m)
6α	2.10 (m)	2.08 (m)
6β	2.80 (m)	2.81 (m)
7	5.79 (m)	5.79 (s)
8		
9	2.71 (br.t, J=7.6)	2.71 (dd, J=7.5, 9.5)
10	4.30 (d, J=14.2)	4.30 (d, J=14.4)
OCH ₃	3.70 (s)	3.70 (s)
H-1'	5.16 (d J=7.6)	5.16 (d, J=7.55)

*Chemical shift values are given in δ (ppm).
 **J means coupling constant.
 ***s, d, br.t, t, q and m in parenthesis represent singlet, doublet, broad triplet, triplet, quartet, and multiplet respectively.

Table 2. ¹H-NMR chemical shift values of crocin and compound II

Position	Crocin (DMSO/D ₂ O 500 MHz)	Compound II (CD ₃ OD 500 MHz)
H-1	5.47* (d***, J=8.2**)	5.53 (d, J=7.5)
2-6		
7	4.28 (d, J=8.0)	4.32 (d, J=7.75)
8-11		
12	3.52 (dd, J=6.0, 12.8), 3.74 (br.dd, J=12.8, 1.9)	OH 4.58 (s), 4.09 (d, J=8.25)
13,14		
15	7.42 (d, J=11.6)	7.43 (d, J=11.1)
16	6.69 (dd, J=11.6, 14.5)	6.65 (dd, J=11.35, 15)
17	6.85 (d, J=14.5)	6.75 (d, J=14.59)
18		
19	6.58 (m)	6.49 (m)
20	6.88 (m)	6.83 (m)
21	1.98 (s)	2.01 (s)
22	2.00 (s)	2.01 (s)

*Chemical shift values are given in δ (ppm).
 **J means coupling constant.
 ***s, d, br.t, t, q and m in parenthesis represent singlet, doublet, broad triplet, triplet, quartet, and multiplet respectively.

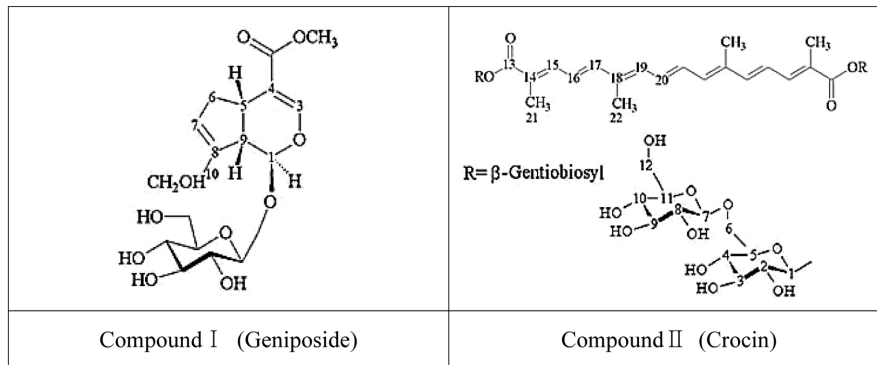


Fig. 1. Structures of compound I and II.

결과 및 고찰

치자 fraction의 Nitrite 소거작용

총 메탄올 추출물은 1000 ppm에서 89.2%의 nitrite 소거작용을 나타내었으며, IC₅₀값은 180 ppm이었다. hexan 분획을 제외한 나머지 분획은 대부분 농도가 높아질수록 소거활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. hexan 분획은 31.25 ppm에서 50%의 소거작용을 보이는 것을 시작으로 농도가 높아질수록 실험 용액이 점점 탁해짐을 육안으로 확인할 수 있었고 흡광도도 다소 불규칙하였다. 클로로포름 분획은 500 ppm에서 80.2%의 높은 소거활성을 보였으나 1000 ppm의 더 높은 농도에서 활성이 증가하지 않았으며 IC₅₀값은 336 ppm이었다. 부탄올 분획과 물 분획은 1000 ppm에서 각각 97.8%, 94.2%의 높은 소거능을 보였으며 IC₅₀값 또한 183 ppm, 194 ppm으로 총 메탄올 추출물의 IC₅₀값과 유사하여 이들이 치자의 nitrite 소거작용의 주 활성 분획물임을 알 수 있었다 (Table 3). 같은 조건에서 양성 대조군으로 사용한 chlorogenic acid와 vitamin C의 IC₅₀값은 각각 15 ppm과 13 ppm으로 치자 추출물 및 분획물의 활성은 이에 미치지 못했다(Fig. 2).

치자 fraction의 ABTS radical cation 저해작용 측정

치자 총 메탄올 추출물은 250 ppm부터 저해활성이 상승하여 1000 ppm에서 93.6%의 저해작용을 보였고 hexan 분획에서는 모든 농도에서 저해 효과가 나타나지 않았다. 클로로포름 분획에서는 500 ppm에서 94.9%의 높은 저해활성을 보였으며 IC₅₀값은 159 ppm으로 분획 중 가장 낮은 IC₅₀값을 나타내었다. 부탄올 분획 역시 농도 증가에 따라 저해활성이 증가하는 양상을 보였으며 500 ppm에서 96.3%의 저해활성을 나타내 총 추출물 포함 모든 분획물 중 최대 활성을 나타냈다. 물 분획은 1000 ppm에서도 계속 저해활성이 증가되어 1000 ppm에서는 78.6%였으나 1500 ppm

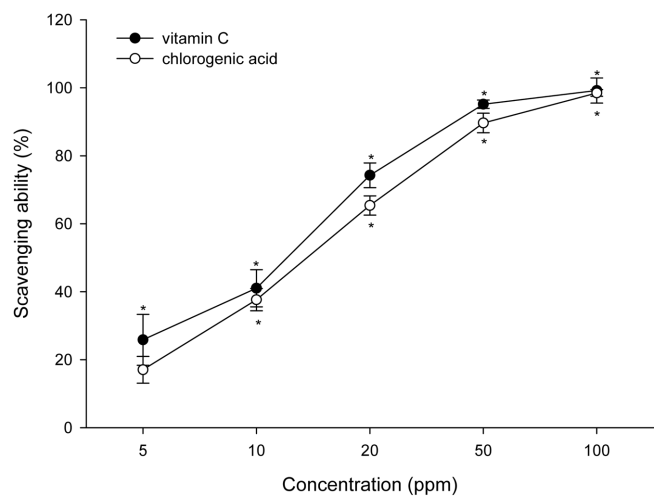


Fig. 2. Nitrite scavenging abilities of positive controls. The values represent mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control (p<0.05)

에서 96.2%의 최고 저해활성을 보임을 확인할 수 있었다(Table 4). 양성 대조군으로 사용한 chlorogenic acid와 vitamin C는 50 ppm과 20 ppm에서 각각 95.9%, 96.6%의 최고의 저해활성을 보였고 이들의 IC₅₀ 값은 각각 17 ppm, 12 ppm으로 측정되었다(Fig. 3).

치자 fraction의 SOD 유사활성 활성

SOD 유사활성은 nitrite 소거작용과 ABTS radical cation 저해작용에 비하여 상대적으로 높은 농도에서 활성이 나타났다. 총 메탄올 추출물이 1000 ppm에서 99.8%로 가장 높은 활성을 보였

Table 3. Nitrite scavenging abilities of various fractions from *Gardenia jasminoides*

Concentration (ppm)	Fractions (%)				
	Total MeOH	n-Hexane	CHCl ₃	n-BuOH	H ₂ O
31.25	30.1±6.5	50.4±5.4*	9.9±4.3	21.8±7.0	27.5±6.1
62.5	33.6±6.1*	24.2±1.9*	12.8±2.1	31.5±4.8*	32.0±4.2*
125	34.6±1.9*	21.8±3.5	19.8±6.2	38.5±5.6*	41.0±7.7
250	54.8±2.7*	-	33.7±9.2	60.0±1.9*	66.6±1.9*
500	69.1±2.6*	-	80.2±7.6*	92.9±1.1*	88.2±2.7*
1000	89.2±7.3*	-	76.4±13.5*	97.8±1.1*	94.2±7.2*

Each value represents mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control (p<0.05)

Table 4. ABTS radical cation inhibition of various fractions from *Gardenia jasminoides*

Concentration (ppm)	Fractions (%) ¹⁾				
	Total MeOH	n-Hexane	CHCl ₃	n-BuOH	H ₂ O
31.25	8.5±4.9	4.8±1.6	6.7±1.6	4.6±1.3	4.3±1.5
62.5	12.8±4.3	3.9±0.6*	16.0±1.3*	10.0±1.7	8.8±1.6
125	16.9±0.5*	5.6±0.6*	31.8±1.5*	29.4±2.9*	12.3±1.4*
250	44.6±1.6*	10.5±1.5	65.4±1.3*	64.8±2.9*	19.0±1.6*
500	79.4±0.5*	14.9±1.5*	94.9±0.0*	96.3±0.1*	42.6±1.7*
1000	93.6±0.0*	17.1±1.6*	-	95.9±0.1*	78.6±1.5*
1500	-	-	-	-	96.2±0.0*

¹⁾Each value represents mean±SD (n=3).

*Significantly different from the values of blank control (p<0.05)

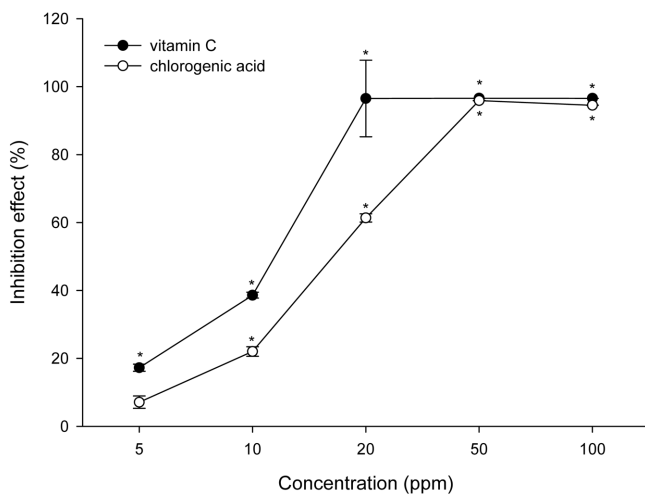


Fig. 3. ABTS radical cation inhibition of positive controls. The values represent mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control (p<0.05)

으나 hexan 분획과 클로로포름 분획은 2000 ppm에서도 활성을 보이지 않았다. 부탄올 분획은 2000 ppm에서 50.1%의 활성이 나타났고 물 분획은 500 ppm부터 활성이 증가하여 2000 ppm에서 93.8%의 활성을 보여 분획물 중 가장 우수한 SOD 유사활성을 보였다(Table 5). 총 메탄올 추출물의 EC₅₀값은 323 ppm으로 분획 중에서 가장 높은 활성을 나타내어 양성 대조군인 chlorogenic acid의 EC₅₀값 453 ppm보다도 높은 유사활성이 확인되었다. 같은 조건에서 vitamin C의 EC₅₀값은 22 ppm이었다(Fig. 4).

SOD 유사활성은 총 메탄올 추출물에 비하여 분획물에서의 활

성이 더 낮았다. 이러한 결과는 치자의 SOD 유사활성이 한 종의 주된 활성성분에 기인하지 않고 적은 양의 몇 종의 활성물질에 의해서 활성이 나타나며, 분획 과정 중에 이들이 흩어지면서 활성이 약해져 나타나는 경우라고 사료된다.

Rancimat을 이용한 유지산화 지연효과 측정

가공하지 않은 palm oil을 이용하여 치자의 총 메탄올 추출물 125-1000 ppm의 산화 유도시간을 측정하여 AI값을 산출하였다. 130°C에서 시료를 첨가하지 않은 유지는 4.28시간에 산화되었으나 치자의 총 메탄올 추출물을 첨가하여 측정한 결과, 최종농도가 1000 ppm이 되도록 한 유지에서 12.53시간, 500 ppm의 유지 10.05시간, 250 ppm의 유지 7.75시간, 125 ppm의 유지에서 6.24시간에 산화되어 그 AI값이 각각 2.93, 2.35, 1.81 및 1.46으로 인공항산화제 BHA 1000 ppm 첨가 유지의 AI값 1.66에 비하여 치자 총 메탄올 추출물의 유지 산화 지연 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Table 6).

Compound I과 II의 Nitrite 소거작용

치자에서 분리한 compound I과 II의 nitrite 소거작용을 확인한 결과 compound I은 1000 ppm에서 53.0%의 nitrite 소거작용을 나타냈으며 compound II는 같은 농도에서 93.4%를 나타내었다. 양성 대조군으로 사용한 chlorogenic acid와 vitamin C의 IC₅₀값은 각각 13 ppm과 15 ppm이었으며, compound I의 IC₅₀값은 940 ppm, compound II는 77 ppm임을 확인하였다. Compound II는 비록 양성 대조군 보다 nitrite 소거활성이 뛰어나지는 않으나 우수한 활성을 가지고 있었으며 치자 추출물의 nitrite 소거작용을 나타내는 주 활성성분 중의 하나임을 알 수 있었다(Fig. 5, Fig. 2).

Table 5. SOD-like activities of various fractions from *Gardenia jasminoides*

Concentration (ppm)	Fractions (%) ¹⁾				
	Total MeOH	n-Hexane	CHCl ₃	n-BuOH	H ₂ O
50	13.0±1.2*	7.3±1.6*	8.7±2.4*	1.0±7.8	4.8±5.0
100	17.3±5.5*	4.0±1.6*	9.2±1.0*	6.2±3.3*	6.2±2.8*
200	20.8±2.1*	5.9±2.0*	8.4±6.5*	5.2±3.3	9.4±2.5*
500	67.8±6.8*	10.7±2.7*	10.5±3.2*	7.9±5.9	18.7±7.8*
1000	99.8±0.2*	10.1±1.9*	15.4±2.0*	13.3±5.7*	64.5±5.0*
2000	99.3±1.4*	19.1±2.8*	23.7±7.0*	50.1±9.4*	93.8±2.4*

¹⁾Each value represents mean±SD (n=3).

*Significantly different from the values of blank control (p<0.05)

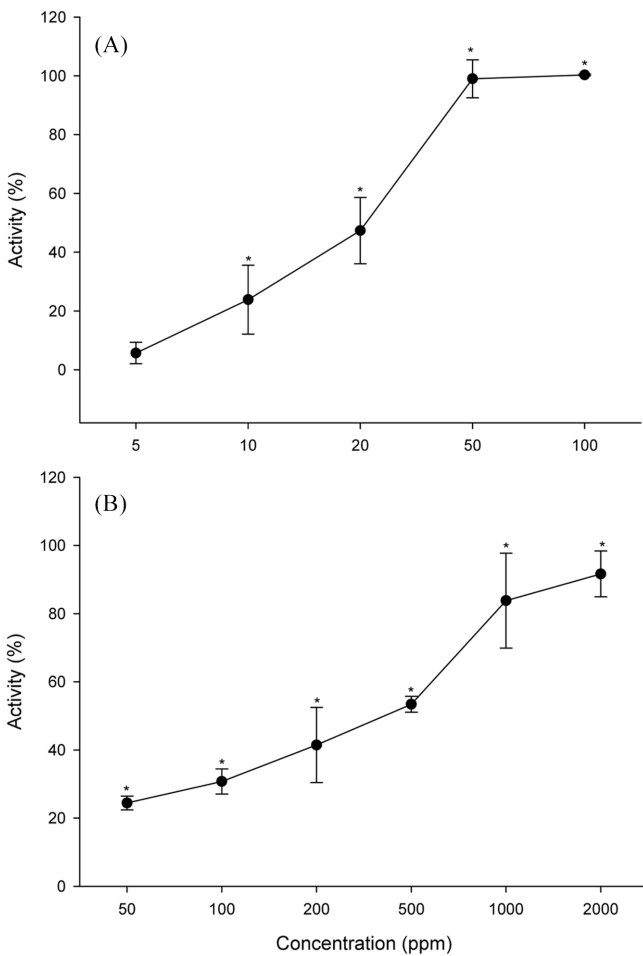


Fig. 4. SOD-like activities of positive controls. (A) vitamin C (B) chlorogenic acid. Each value represents mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control ($p < 0.05$)

Table 6. Induction time and AI values by rancimat method

Concentration (ppm)	Induction time (hr)*	AI**
Control (palm oil)	4.28±0.29	-
G. jasminoides 125	6.24±0.27*	1.46
250	7.75±0.35*	1.81
500	10.05±0.31*	2.35
1000	12.53±0.65*	2.93
BHA 1000	7.12±1.25*	1.66

Each value represents mean±SD (n=3).

*Significantly different from the control (palm oil) values ($p < 0.05$)

**AI (Antioxidative index)=Induction time of palm oil added *G. jasminoides*/ Induction time of palm oil

Compound I과 II의 ABTS radical cation 저해작용 측정

Compound I의 ABTS radical cation 저해작용 측정 시 1000 ppm에서도 저해활성이 상승함을 확인하여 2000 ppm까지 농도를 높여 측정한 결과, 1500 ppm에서 80.9%의 저해활성을 보였고 2000 ppm에서도 유사한 활성을 보임을 알 수 있었다. Compound II는 1500 ppm에서 99.9%의 높은 저해활성을 보였고 2000 ppm에서도 역시 유사하였다. IC₅₀값은 compound I이 684 ppm, compound II가 549 ppm으로 compound II의 저해활성이 강함을 알 수 있었다(Fig. 6, Fig. 3).

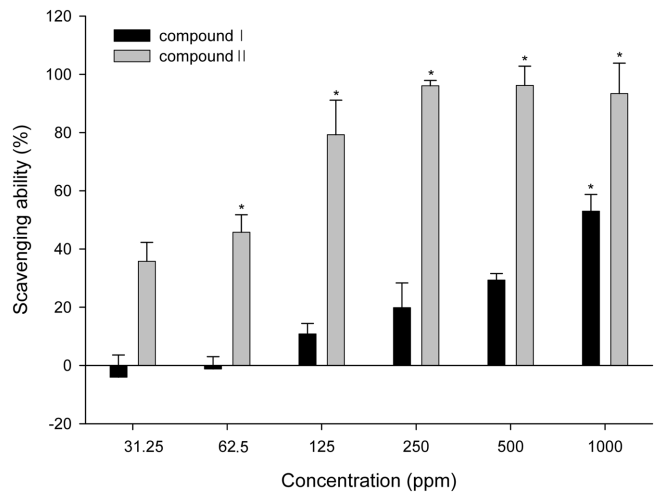


Fig. 5. Nitrite scavenging abilities of compound I and II. The values represent mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control ($p < 0.05$)

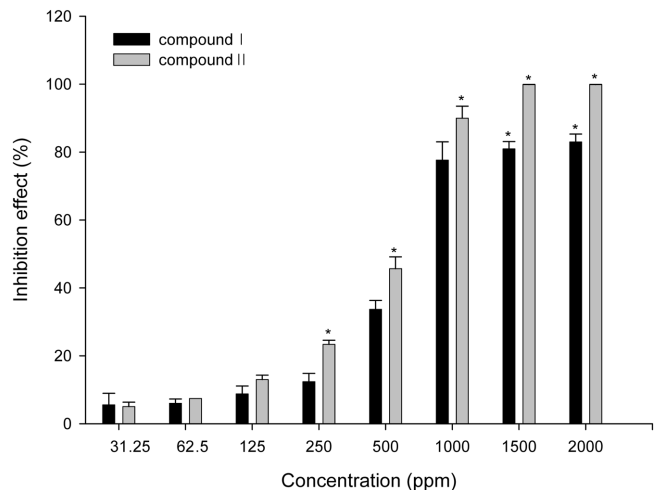


Fig. 6. ABTS radical cation inhibition of compound I and II. The values represent mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control ($p < 0.05$)

Compound I과 II의 SOD 유사활성

Compound I과 compound II의 SOD 유사활성을 측정한 결과 compound I은 2000 ppm에서도 활성을 보이지 않았으나 compound II는 용매 분획물들의 유사활성보다 더욱 우수하여 총 메탄올 추출물의 500 ppm의 67.8% 보다 높은 87.5%를 나타내었다. Compound I의 EC₅₀값은 측정할 수 없었으나 compound II의 EC₅₀은 259 ppm으로 양성대조군인 chlorogenic acid의 EC₅₀값 453 ppm에 비하여 그 활성이 높았다(Fig. 7, Fig. 4).

요 약

치자의 항산화 활성과 유지산화 지연효과를 측정하고 활성을 보인 분획에서 주성분인 geniposide와 crocin을 분리하고 그 구조를 확인하였다. 여러 분획 중 부탄올 분획과 물 분획의 항산화성이 가장 우수함을 확인하고 그 분획의 주성분으로 분리된 geniposide와 crocin의 단일물질로서의 항산화력을 측정 비교한 결과, crocin의 항산화력이 더 강함을 알 수 있었다. 특히 SOD 유사활

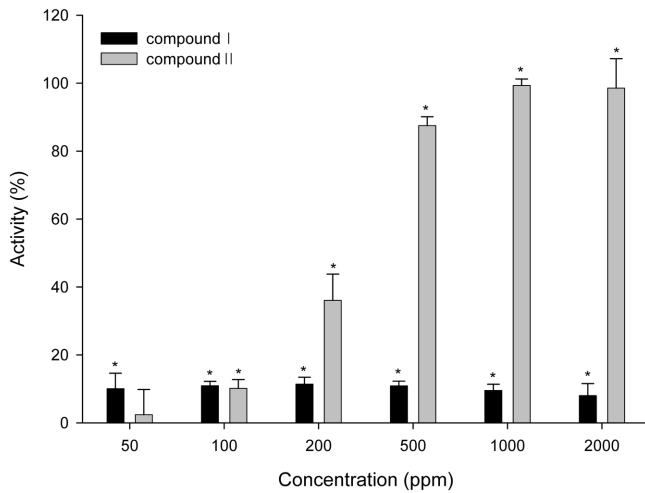


Fig. 7. SOD-like activities of compound I and II. The values represent mean±SD (n=3). *Significantly different from the values of blank control ($p < 0.05$)

성 시험에서 여러 분획의 활성이 총 메탄올 추출물보다도 낮음에 비하여 crocin 단일 물질은 양성 대조군 chlorogenic acid의 EC₅₀ 값 453 ppm에 비하여 절반정도 낮은 EC₅₀ 값 259 ppm으로 매우 높은 활성을 보였다. 유지 산화 지연효과도 치자의 총 메탄올 추출물 250 ppm 이상의 농도에서의 AI값은 BHA 1000 ppm에서의 AI값 1.66 보다 큰 1.81 이상임을 보여 유지 산화 지연효과가 우수함을 나타내었다. 이 논문의 연구결과로 치자의 항산화 기능성 식품 및 첨가제로서의 개발가능성이 확인되었다고 사료된다.

문 헌

- Lee SW. Functional foods and immunotherapy. *Food World* 8: 44-45 (2001)
- Shin YJ. Antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from Dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf and root. MS thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (2007)
- Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 328-333 (2006)
- Omaye ST, Reddy KA, Cross CE. Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J. Toxicol. Env. Health* 3: 829-836 (1977)
- Jeong HS, Park KH. Storage stability of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 106-109 (1999)
- Han YN, Oh HK, Hwang KH, Lee MS. Antioxidant components of Gardenia fruit. *Korean J. Pharmacogn.* 25: 226-232 (1994)
- Lee CB. Illustrated Flora of Korea. Hyangmun Sa, Seoul, Korea. p. 694 (1985)
- Shin YW, Kim DW, Kim NJ. Studies on the processing of crude drugs (VII)- on the constituents and biological activities of *Gardeniae fructus* by processing. *Korean J. Pharmacogn.* 34: 45-54 (2003)
- Kim HJ, Kim EJ, Seo SH, Shin CG, Jin C, Lee YS. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardeniae Fructus*. *J. Nat. Prod.* 69: 600-603 (2006)
- Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 437-440 (2004)
- Hwang KH, Park TK. Inhibitory activity of the fruit extract of *Gardenia jasminoides* on monoamine oxidase. *Korean J. Pharmacogn.* 38: 108-112 (2007)
- Lee DU, Park CH, Kang SI, Min EG, Han YN, Lee CK. Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Korean J. Pharmacogn.* 29: 204-208 (1998)
- Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rat: crocin inhibits pancreatic lipase. *Eur. J. Pharmacol.* 543: 116-122 (2006)
- Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J. Agr. Food Chem.* 23: 7302-7306 (2005)
- Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Tong VH, Van MR. Antioxidant properties of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J. Agr. Food Chem.* 48: 1455-1461 (2000)
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agr. Biol. Chem.* 51: 1333-1338 (1987)
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouma D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660 (2006)
- Ozcan Erel. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37: 277-285 (2004)
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical on the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 468-474 (1974)
- Chon SU, Kim YM, Han SK, Choi SK. Antioxidative effects of several compositae plants. *Korean J. Plant Res.* 17: 14-19 (2004)
- Cameron DW, Feutrill GI, Perlmutter P, Sasse JM. Iridoids of *Garrya elliptica* as plant growth inhibitors. *Phytochem.* 23: 533-535 (1984)
- Choi HJ, Park YS, Kim MG, Kim TK, Yoon NS, Lim YJ. Isolation and characterization of the major colorant in Gardenia fruit. *Dyes Pigments* 49: 15-20 (2001)