

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis) 씨 에틸 아세테이트, 물 및 메탄올 추출물의 플라보노이드 함량 및 항산화 활성

진동혁 · 오다영 · 강동수¹ · 이영근 · 김한수[†]

부산대학교 식품공학과, ¹전남대학교 해양바이오식품학과
(2017년 10월 28일 접수: 2017년 12월 4일 수정: 2017년 12월 10일 채택)

Flavonoid Content and Antioxidant Activities of *Gardenia jasminoides* Ellis Seed Extracts Produced by Ethyl Acetate, Distilled Water and Methanol

Dong-Hyeok Jin · Da-Young Oh · Dong-Soo Kang¹
Young-Geun Lee · Han-Soo Kim[†]

Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

¹Department of Marine Bio Food Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

(Received October 28, 2017; Revised December 4, 2017; Accepted December 10, 2017)

요약 : 치자 씨의 에틸 아세테이트, 증류수 및 70% 메탄올(v/v)의 3가지 용매를 사용한 추출물의 용매 별 플라보노이드 함량 및 항산화 활성, 금속 킬레이트 능력 측정을 통하여 치자의 기능성 식품 재료로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 치자 씨의 탄닌 함량은 1.517 ± 0.003 mg CE/g (mg of catechin equivalents) 건조 중량 으로 나타났으며, 치자 씨 용매 별 추출 수율은 증류수 (36.61%), 70% 메탄올(30.10%), 에틸아세테이트(20.40%) 순으로 나타났다. 추출 용매 별 항산화 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 양성대조구로 사용된 ascorbic acid, BHA, EDTA 보다 낮은 활성이 관찰되었다. 플라보노이드 함량(mg QE/g, mg of quercetin equivalents)은 70% 메탄올(0.799), 증류수(0.565), 에틸 아세테이트(0.117) 순으로 관찰되었으며, 항산화 활성은 대부분의 분석에서 용매 별 플라보노이드 함량 순과 비슷한 양상으로 나타났지만 ABTS 라디칼 소거능과 SOD 유사활성은 증류수 추출물이 70% 메탄올 추출물의 항산화 활성 보다 높은 것으로 나타났다. 치자 씨의 각 용매별 수율과 항산화 활성을 비교하였을 때, 증류수와 70% 메탄올 용매를 사용하여 추출 이용하는 것이 바람직하다고 생각된다. 본 실험 결과 치자 씨는 플라보노이드 화합물을 다량 함유하고 있으며 그로 인한 높은 수준의 항산화 활성과 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 매우 기대된다.

주제어 : 치자 씨, 항산화 활성, 탄닌, 플라보노이드, 금속 킬레이트

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

· **Abstract** : The purpose of this study was to measure the bioactivity and antioxidant activity of seed from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus (GJE). We determined tannin content (1.517 ± 0.003 mg CE/g, mg of catechin equivalents). The extraction yields of the GJE seed solvent were distilled water (DW) 36.61%, 70% methanol 30.10% and ethyl acetate (EA) 20.40%. The antioxidant activities of the extracts were significantly increased (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL). Flavonoid contents (mg QE/g, mg of quercetin equivalents) were observed in the order of 70% methanol (0.799), DW (0.565) and EA (0.117). Antioxidant activities (DPPH, OH⁻, ferrous ion-chelating capacity) were similar to the flavonoid content of each solvent. But ABTS scavenging activity and SOD like ability of DW extract were higher than 70% methanol extract. Comparing the yield and the antioxidant activity of each solvent of GJE seed, it seems to be preferable to use DW and 70% methanol solvent for extraction. As a result of this experiment, it has high antioxidant activity and physiological activity, which is expected to be highly valuable as a functional food and a natural antioxidant.

Keywords : Seed of *Gardenia jasminoides* Ellis fructus, Antioxidant activity, Tannin, Flavonoid, Metallic chelate

1. 서론

현대 사회는 서구화된 식생활과 스트레스, 신체 활동 감소 등으로 인한 심혈관계 질환과 비만, 당뇨와 같은 여러 생활습관병 발병이 증가하고 있다. 인간수명 연장에 따른 건강에 대한 관심이 증가하여 단순한 영양원이 아닌 기능성을 고려한 기능성 식품에 대한 소비가 증가하고 있으며, 그 중 항산화 및 노화방지와 관련된 생리활성물질에 대한 관심과 건강기능식품에 대한 수요가 높아지고 있다[1]. 생체 내에서 세포는 호기성 호흡 중 미토콘드리아 내에서 과산화수소(H₂O₂), 수산화 라디칼(OH⁻)과 같은 reactive oxygen species (ROS)를 유도하는 슈퍼옥사이드를 생성하여 이에 대한 독성에 노출되며, 이를 제거하는 초과산화물 불균등화 효소($2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), 카탈라아제($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), 글루타티온 과산화효소($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$)와 같은 항산화 효소들이 존재한다[2]. 이러한 방어체계는 병적인 상태에서 약화되어 ROS에 대한 방어 과정 사이의 불균형이 생기면 산화생성물의 과잉 축적을 초래하여 지질 과산화 및 산화 스트레스의 원인이 되어 세포막이나 세포 내 분자의 산화적 변형을 일으키므로 이들 방어 체계만으로는 한계가 있다[3]. 이에 식품으로부터 섭취할 수 있는 여러 항산화 효과를 지닌 생리활성물질은 인체에 유해한 활성 산소를 제거할 뿐만 아니라

증가하는 것을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[4], 합성 및 천연 항산화제의 건강과 질병 예방에 대한 유의한 효과는 여러 연구 결과로 이를 입증하고 있다[5,6]. 식물체의 경우 이차대사산물의 방어체계, 효소와 같은 보호 메커니즘이 발달되어 있어서 식물체에서 항산화 물질을 탐색, 연구하는 것은 중요한 의미를 지닌다고 한다[7]. 이러한 식물체 중에서 우리나라 남해군의 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 심장, 간장, 폐장, 위장, 삼초경(三焦經)에 효과가 있어 소변을 잘 나오게 하여 열을 제거하며, 지혈, 진정, 염증 완화 등의 작용이 있다고 한다[8]. 또한 치자에는 카로티노이드류와 플라보노이드류와 같은 생리활성물질을 다량 함유하고 있어 ROS 및 자유 라디칼을 제거 할 수 있는 능력과 이에 대한 상호 작용을 통해 생활습관병을 예방하는 것으로 알려져 있다[9]. 본 연구에서는 치자씨의 탄닌 함량 측정 및 에틸 아세테이트, 증류수 및 70% 메탄올 세 가지 용매로 추출하여 플라보노이드 함량을 측정하고, 항산화 능력(DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, superoxide dismutase like ability, hydroxyl radical scavenging activity), 금속 킬레이트 능력(ferrous chelating activity)을

측정하여 치자 씨의 추출 용매에 따른 수율과 항산화능력을 비교하여 생활습관병 예방과 건강기능 식품 개발의 목적으로 이들 소비 효율성을 높여 고부가 가치의 기능성 소재로서 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)는 경상남도 남해군에서 2014년 11월에 수확하여 반 건조 상태로 되어있는 시료를 남해 소재 약재상에서 2015년 1월에 구입하였다. 치자 씨를 분리한 뒤 자연 건조시켜 분쇄기(HMF-3250S, Han-Il 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 씨 분말을 100 g 씩 취해 70% 메탄올, 에틸 아세테이트 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan) 하였다. 증류수 또한 10배 가하여 70°C 수조에 2시간 씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.1, Tokyo, Japan) 하였다. 각 추출물들은 진공회전농축기(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[10].

2.3. 탄닌 함량 측정

치자 씨의 탄닌 함량은 Prussian blue assay [11]를 변형하여 측정하였다. 시료 0.06 g에 메탄올 6.0 mL를 넣고 30분간 방치하고 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)한 뒤, 여과액 2.0 mL에 증류수 50.0 mL을 가하여 실험에 사용할 추출 용액을 조제하였다. 조제한 추출 용액 2.0 mL에 0.1 M ferric chloride 1.0 mL와 8.0 mM potassium ferricyanide 1.0 mL를 가하여 충분히 섞은 뒤 실온에서 1시간 30분 방치한 후, 720 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 표준물질

로는 (+)-catechin을 사용하여 시료 g당 mg CE (mg of catechin equivalents)로 나타내었다.

2.4. 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드 함량 측정은 two complementary colorimetric method를 변형하여 사용하였으며[12], 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 quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용해 검량선을 작성하여 시료 g 당 mg QE (mg of quercetin equivalents)로 계산하였다.

2.5. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성은 각 용매 별 시료 추출물 0.2 mL와 0.2 mM DPPH 및 80% 메탄올 2.8 mL를 혼합하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었으며, 그에 따른 IC_{50} 계산하여 표시하였다[13]. 이 때 활성 비교를 위하여 대조로 합성 항산화제인 BHA (butylated hydroxyanisole, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

2.6. ABTS radical scavenging activity 측정

ABTS cation decolorization assay에 의한 방법[14]을 변형하여 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical을 이용한 항산화력 측정을 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)의 비율로 섞어 16시간 동안 암소에 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후, 735 nm에서 흡광도 값이 $0.70(\pm 0.02)$ 이 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액 3.9 mL에 시료 추출액 0.1 mL를 넣은 후 10분 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 BHA를 사용하였으며 ABTS radical 소거 활성은 백분율로 나타내었다.

2.7. Superoxide dismutase (SOD) like ability 측정

SOD 유사활성은 McCord & Fridovich(1969)의 방법[15]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 HCl 1.0 mL로 반응을 정지시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 나타내어 계산하였으며 이를 통해 IC₅₀을 구하였다 대조구로 BHA를 사용하여 나타내었다.

2.8. Hydroxyl radical (OH⁻) scavenging activity 측정

Hydroxyl radical 소거능 측정은 deoxyribose degradation assay [16]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 60분간 반응시켰다. 대조로 ascorbic acid를 사용하여 표시하였고, 흡광도는 536 nm에서 측정하여 백분율로 나타내었다.

2.9. Ferrous ion-chelating capacity 측정

치자 씨의 각 농도별 추출물에서 ferrous ion chelating activity는 Robu et al.(2012)의 방법 [17]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. 대조구로 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였고 치자 씨의 ferrous ion-chelating activity는 백분율로 환산하여 나타내었다.

2.10. 통계 처리

실험 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD (n=3)으로 표현하였다. 또한 실험 결과 값 간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석 한 뒤 p<0.05 수준

에서 던칸의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)에 의하여 각 농도 간의 유의성을 검증하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수율

치자 씨의 70% 메탄올, 증류수 및 에틸 아세테이트의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 각 용매 별 추출 수율은 증류수 36.61%, 70% 메탄올 30.10%, 에틸 아세테이트 20.40%로 증류수 추출물에서 수율이 가장 높게 나타났다.

3.2. 탄닌 함량

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 씨의 탄닌 함량은 Table 1에서와 같이 1.517±0.003 mg CE (catechin equivalent)/g DW (dry weight)로 관찰되었다(p<0.05). 탄닌은 식물의 잎, 과일, 뿌리 등에 널리 함유되어 있는 수용성 폴리페놀 구조의 물질이며 단백질과 결합하여 변성을 일으키는 작용과 섭취 시 떫은맛을 나타내는 것으로 알려져 있다[18]. 또한 인체에서 고혈압 완화, 항산화, 항암 작용을 하는 것으로 보고되고 있다[19]. 국내 자생하는 식물의 탄닌 함량 중 밤 속껍질 10.96% CE, 수수 1.00% CE, 감 잎 0.26% CE, 메밀 0.26% CE, 살구 씨 0.01% CE, 도토리 0.009% CE, 도라지 0.002% CE 등으로 함유되어 있다고 보고하였다[20]. 치자 씨의 탄닌 함량은 0.17% CE 수준으로 앞서 언급한 탄닌 함량과 비교하였을 때 높은 수준은 아니지만 일반적인 수준의 탄닌을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

3.3. 플라보노이드 함량

치자 씨의 용매 별 추출물의 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 추출물 중 70% 메탄올 추출물 0.799±0.002 mg QE (quercetin equivalents)/g으로 가장 높게 나타났으며, 증류수 추출물에서 0.565±0.001 mg QE/g, 에틸 아세테이트 추출물 0.117±0.001 mg QE/g 순으로 관찰되었으며 각 추출물의 플라보노이드 함량은 유의적인 차이가 있는 것으로 관찰되었다(p<0.05). 플라보노이드는 Steinmetz & Potter

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

Assays ¹⁾	Values		
	EA ⁵⁾	DW ⁶⁾	70% Methanol
Tannin content (mg CE ²⁾ /g DW ³⁾)	1.517±0.003		
Extraction yields (%)	20.40	36.61	30.10
Flavonoid content (mg QE ⁴⁾ /g)	0.117±0.001 ^{a7)}	0.565±0.001 ^b	0.799±0.002 ^c
DPPH (IC ₅₀ , mg/mL)	6.501±0.007 ^c	0.889±0.003 ^b	0.572±0.007 ^a
ABTS (IC ₅₀ , mg/mL)	10.618±0.246 ^b	0.996±0.003 ^a	1.171±0.005 ^a
SOD (IC ₅₀ , mg/mL)	6.022±0.006 ^c	1.322±0.004 ^b	1.556±0.017 ^a
OH ⁻ (IC ₅₀ , mg/mL)	6.676±0.027 ^c	0.925±0.003 ^b	0.596±0.008 ^a
FIC (IC ₅₀ , mg/mL)	2.157±0.022 ^c	0.209±0.001 ^b	0.143±0.002 ^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⁾EA: ethyl acetate. ⁶⁾DW: distilled water. ⁷⁾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.

(1991)의 연구에서 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 야채를 섭취 시 만성 질환을 감소시키는 것으로 보고하였으며[21], 폴리페놀 화합물로 C₆-C₃-C₆의 기본 구조를 이루며 다섯 가지의 구조적 범주(flavones, flavonols, flavanones, flavan-3-ols, anthocyanidins)로 분류되며, 이들 화합물들은 글리코실, 알콕시기, 에테르화 되어 있다고 알려져 있다[22]. Chu et al.(2000)은 양배추, 시금치, 양파를 포함한 여러 가지 채소류에서의 플라보노이드 함량은 185.01~426.82 mg/kg로 나타났다고 보고하였다[23], 이에 치자의 플라보노이드 함량은 높은 수준으로 판단되며 그에 따른 생리활성 효과가 기대된다.

3.4. DPPH radical scavenging activity

치자 씨의 각 용매 별 추출물과 양성대조구인 BHA (butylated hydroxy anisole)의 DPPH radical 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었으며, 그에 대한 IC₅₀값은 Table 1에 나타내었다. 치자 씨의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 측정된 결과 농도가 증가함에 따라 유의적으로 DPPH radical 소거능이 증가하였다(*p*<0.05). 70% 메탄올 추출물에서 농도 별로 각각 20.76±0.00%, 38.25±0.26%, 51.45±0.19%, IC₅₀ 0.572±

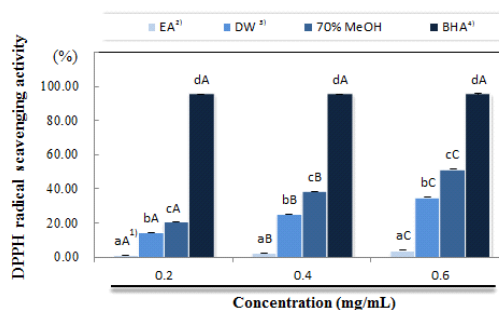


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾EA: ethyl acetate. ³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

0.007 mg/mL로 씨 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며 (*p*<0.05), 증류수 추출물에서 14.37±0.47%, 25.33±0.26%, 34.93±0.58%, IC₅₀ 0.889±

0.003 mg/mL, 에틸 아세테이트 추출물에서 각 $0.87 \pm 0.07\%$, $2.37 \pm 0.07\%$, $3.99 \pm 0.07\%$, IC_{50} 6.501 ± 0.007 mg/mL로 관찰되었다. DPPH radical 용액은 진한 바이올렛 색상을 가지고 있어 약 520 nm를 중심으로 강한 흡광도를 나타내며, 중화될 때 황색 또는 담색이 된다. 이러한 속성은 반응을 시각적 모니터링을 가능하게 하고, 초기 흡광도에서의 변화로부터 계산 할 수 있어 항산화 분석에 주로 사용되고 있다[24]. 실험결과 용매 별로 DPPH 소거능의 명확한 차이가 있었으며, 이는 추출 용매의 극성에 의해 생리활성물질이 용해되는 정도가 달라 항산화능의 차이가 나타난다는 보고와 유사한 것으로 나타났다[25].

3.5. ABTS radical scavenging activity

치자 씨의 용매 별 추출물과 양성대조구인 BHA의 ABTS radical 소거능을 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 2에 표시하였으며, IC_{50} 값을 구하여 Table 1에 표시하였다. 증류수 추출물에서 농도 별로 각각 $28.00 \pm 0.01\%$, $34.00 \pm 0.01\%$, $38.98 \pm 0.15\%$, IC_{50} 0.996 ± 0.003 mg/mL, 70% 메탄올 추출물에서 $25.32 \pm 0.08\%$, $29.85 \pm 0.08\%$, $35.56 \pm 0.08\%$, IC_{50} 1.171 ± 0.005 mg/mL로 증류수와 70% 메탄올 추출물의 IC_{50} 값은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다

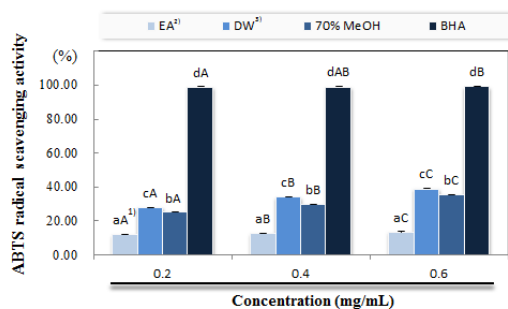


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾EA: ethyl acetate. ³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

($p < 0.05$). 에틸 아세테이트 추출물은 $11.95 \pm 0.08\%$, $12.49 \pm 0.15\%$, $13.41 \pm 0.22\%$, IC_{50} 10.618 ± 0.246 mg/mL로 추출 용매 중 가장 낮은 활성이 관찰되었다. ABTS에 형성된 양이온 라디칼은 potassium persulfate에 의해 산화되어 밝은 청색을 띤 용액이 형성되며, 수소를 공여하는 항산화 활성을 지닌 물질과 반응 시 감소되면서 무색으로 변색된다[26]. ABTS 변색 반응은 항산화제의 항산화력과 농도 및 양에 비례하며, 수용성 및 지용성 물질에 모두 적용 가능하다는 점에서 항산화 활성 측정 시에 많이 이용되고 있는 것으로 알려져 있다[27].

3.6. Superoxide dismutase (SOD) like ability

SOD 유사활성은 Fig. 3에 표시하였으며, IC_{50} 값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 증류수 추출물에서 농도 별로 각각 $23.80 \pm 0.07\%$, $28.82 \pm 0.07\%$, $33.10 \pm 0.12\%$, IC_{50} 1.322 ± 0.004 mg/mL로 씨 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 강한 소거능이 관찰되었으며($p < 0.05$), 70% 메탄올 추출물 $22.72 \pm 0.07\%$, $25.33 \pm 0.07\%$, $30.19 \pm 0.07\%$, IC_{50} 1.556 ± 0.017 mg/mL, 에틸 아세테이트 추출물에서 각 $16.32 \pm 0.07\%$, $16.78 \pm 0.12\%$, $18.65 \pm 0.33\%$, IC_{50} 6.022 ± 0.006 mg/mL로 관찰되었다($p < 0.05$). 양성대조구인 BHA는 각 농도에서 $28.78 \pm 0.72\%$, $47.34 \pm 0.26\%$, $65.57 \pm 0.19\%$ 로 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성이 큰 폭으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. SOD는 적혈구에서 슈퍼옥사이드 라디칼에 촉매 작용하여 분해하는 효소로, 세포를 산화적 손상으로부터 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[28]. Marklund & Marklund (1974)는 자동산화의 속도는 pH가 증가함에 따라 증가하는데 pH 9.1의 높은 알칼리에서도 자동산화는 90% 이상 SOD에 의해 억제된다고 보고하여 SOD의 산화억제능력이 매우 뛰어나다는 것을 시사하였다[29]. DPPH에서의 결과와는 달리 ABTS와 SOD에서는 증류수 추출물이 70% 메탄올 추출물 보다 높은 활성을 보여주었으며, 이는 치자의 주요 성분 중 수용성 카로티노이드인 크로신과 본 실험에서 측정된 탄닌이 항산화 활성에 영향을 준 것으로 추정되며, DPPH, ABTS, SOD의 활성 차이는 각 분석에 생리활성물질의 종류에 따라 영향을 주는 정도가 다르다는 연구 보고[30]가 있어 본 실험에서도 이러한

차이가 관찰된 것으로 생각된다.

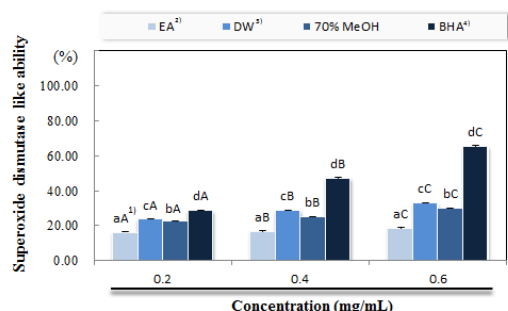


Fig. 3. Superoxide dismutase like ability of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾EA: ethyl acetate. ³⁾DW: distilled water. ⁴⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

3.7. Hydroxyl radical (OH⁻) scavenging activity

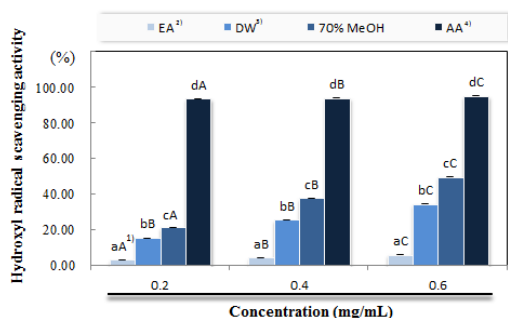


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾EA: ethyl acetate. ³⁾DW: distilled water. ⁴⁾AA: ascorbic acid.

치자 씨 추출물과 대조구인 ascorbic acid의 수산화 라디칼(OH⁻) 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었으며, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 70% 메탄올 추출물 21.39 \pm 0.01%, 37.55 \pm 0.30%, 49.62 \pm 0.18%, IC₅₀ 0.596 \pm 0.008 mg/mL, 증류수 추출물에서 각 15.51 \pm 0.43%, 25.59 \pm 0.24%, 34.42 \pm 0.53%, IC₅₀ 0.925 \pm 0.003 mg/mL, 에틸 아세테이트 추출물 3.06 \pm 0.11%, 4.47 \pm 0.07%, 5.96 \pm 0.07%, IC₅₀ 6.676 \pm 0.027 mg/mL 순으로 에틸아세테이트 추출물에서 유의적으로 가장 낮은 소거능이 관찰되었다($p<0.05$). 양성대조구인 ascorbic acid는 각 농도에서 93.58 \pm 0.01%, 93.93 \pm 0.20%, 95.03 \pm 0.18%로 강한 OH⁻ 소거능이 관찰되었다.

3.8. Ferrous ion-chelating capacity

치자 씨의 용매 별 추출물과 대조구인 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)의 각 농도 별로 비교한 ferrous ion-chelating capacity 결과는 Fig. 5에 나타내었고, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 70% 메탄올 추출물에서 각 농도 별로 52.47 \pm 0.07%, 68.17 \pm 0.03%, 77.43 \pm 0.06%, IC₅₀ 0.143 \pm 0.002 mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 높게 관찰되었으며($p<0.05$),

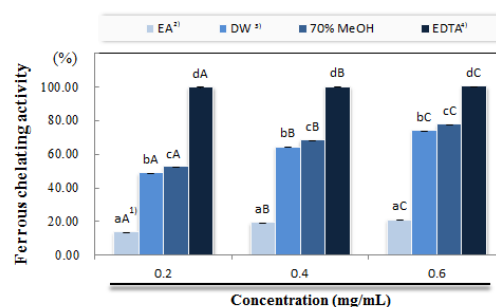


Fig. 5. Ferrous ion-chelating capacity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾EA: ethyl acetate. ³⁾DW: distilled water. ⁴⁾EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

증류수 추출물 48.49±0.15%, 64.04±0.12%, 73.77±0.07%, IC₅₀ 0.209±0.001 mg/mL, 에틸 아세테이트 추출물에서 13.30±0.06%, 18.93±0.12%, 20.67±0.12%, IC₅₀ 2.157±0.022 mg/mL 순으로 에틸아세테이트 추출물에서 유의적인 차이를 보이며 킬레이트 능력이 낮게 관찰되었다($p<0.05$). Mira et al.(2002)의 연구는 lutein, (-)-epicatechin과 같은 플라보노이드 화합물과 금속이온이 결합한 복합체는 비 복합체 플라보노이드 보다 더 뛰어난 라디칼 소거능을 가진다고 보고하였다[31]. 이에 치자 씨 70% 메탄올, 증류수 추출물의 0.6 mg/mL 농도에서 70% 이상의 높은 ferrous chelating 능력을 가지는 것으로 관찰되어 금속이온 결합 및 그에 따른 항산화 작용에 대한 시너지 효과가 기대된다.

4. 결론

치자 씨를 분리하여 탄닌 함량을 알아보고, 70% 메탄올, 증류수 및 에틸 아세테이트의 3가지 용매를 사용한 추출물의 용매 별 플라보노이드 함량 및 항산화 활성, 금속 킬레이트 능력 측정을 통하여 치자의 기능성 식품 재료로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 치자 씨의 탄닌 함량은 1.517±0.003 mg CE/g DW로 나타났으며, 치자 씨 용매 별 추출 수율은 증류수 36.61%, 70% 메탄올 30.10%, 에틸 아세테이트 20.40% 순으로 나타났다. 추출 용매 별 항산화 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며($p<0.05$), 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid, BHA, EDTA 보다 낮은 활성이 관찰되었다. 플라보노이드 함량 (mg QE/g)은 70% 메탄올(0.799), 증류수(0.565), 에틸 아세테이트(0.117) 순으로 관찰되었으며, 항산화 활성은 대부분의 분석에서 용매 별 플라보노이드 함량 순과 비슷한 양상으로 나타났다지만 ABTS radical 소거능과 SOD 유사활성은 증류수 추출물이 70% 메탄올 추출물의 항산화 활성 보다 높은 것으로 나타났다. 치자 씨의 각 용매별 수율과 항산화 활성을 비교하였을 때, 증류수와 70% 메탄올 용매를 사용하여 추출 이용하는 것이 바람직하다고 생각된다. 본 실험 결과 치자 씨는 플라보노이드 화합물을 다량 함유하고 있으며 그로 인한 높은 수준의 항산화 활성과 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품 및 천연

항산화제로서의 가치가 매우 클 것으로 판단된다.

References

1. H. S. Kim, M. A. Kim and S. H. Jang, "Influences of Korean Haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) on Lipid Concentration in Hypercholesterolemia", *J. Environ. Sci. Int.*, Vol.23, No.5 pp. 793-800, (2014).
2. H. Aebi, "[13] Catalase *in vitro*", *Methods enzymol*, Vol.105, pp. 121-126, (1984).
3. W. Droge, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiol. Rev.*, Vol.82, No.1 pp. 47-95, (2002).
4. D. Bagchi, A. Garg, R. L. Krohn, M. Bagchi, M. X. Tran and S. J. Stohs, "Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*", *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, Vol.95, No.2 pp. 179-189, (1997).
5. N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner, "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates", *Clin. Sci. (London, England: 1979)*, Vol.84, No.4 pp. 407-412, (1993).
6. M. Serafini and D. Del Rio, "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?", *Redox Rep.*, Vol.9, No.3 pp. 145-152, (2013).
7. 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).
8. S. T. Koo, M. S. Cho, S. S. Park, Y. T. Kim, K. J. Park, K. S. Kim and I. C. Sohn, "Effect of frutus gardeniae herbal acupuncture on the rat model of ankle

- sprain pain”, *Korean J. Acupunct.*, Vol.22, No.2 pp. 57–74, (2005).
9. M. Yamauchi, K. Tsuruma, S. Imai, T. Nakanishi, N. Umigai, M. Shimazawa and H. Hara, “Crocein 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).
 10. D. H. Jin, H. S. Kim, J. H. Seong and H. S. Chung, “Comparison of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachs japonicus* A. Berger extracts”, *J. Environ. Sci. Int.*, Vol.25, No.5 pp. 695–703, (2016).
 11. P. Schofield, D. M. Mbugua and A. N. Pell, “Analysis of condensed tannins: a review”, *Anim., Feed Sci. Technol.*, Vol.91, No.1 pp. 21–40, (2001).
 12. A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo and 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).
 13. M. S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, Vol.181, No.3 pp. 1199–1200, (1958).
 14. A. Floegel, D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo and 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).
 15. 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).
 16. 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).
 17. S. Robu, A. Aprotosoaie, A. Miron, O. Cioanca, U. Stanescu and M. Hancianu, “*In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania”, *Farmacia*, Vol.60, No.3 (2012).
 18. A. E. Hagerman, C. T. Robbins, Y. Weerasuriya, T. C. Wilson and C. Mc Arthur, “Tannin chemistry in relation to digestion”, *J. Range Manage.*, Vol.45, pp. 57–62, (1992).
 19. M. Heinonen, “Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective”, *Mol. Nutr. Food Res.*, Vol.51, No.6 pp. 684–691, (2007).
 20. J. H. Lee and S. R. Lee, “Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods”, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.26, No.3 pp. 310–316, (1994).
 21. K. A. Steinmetz and J. K. Potter, “Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology”, *Cancer Causes Control*, Vol.2, No.5 pp. 325–357, (1991).
 22. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya, “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”, *J. Nutr. Biochem.*, Vol.13, No.10 pp. 572–584, (2002).
 23. Y. E. Chu, C. L. Chang and H. F. Hsu, “Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity”, *J. Sci. Food Agric.*, Vol.80, No.5 pp. 561–566, (2000).
 24. D. Villano, M. S. Fernández-Pachón, M. L. Moyá, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla, “Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical”, *Talanta*, Vol.71, No.1 pp. 230–235, (2007).
 25. 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).

26. B. S. Wolfenden and R. L. Willson, "Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)", *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, Vol.2, No.7 pp. 805-812, (1982).
27. R. B. Walker and J. D. Everette, "Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.57, No.4 pp. 1156-1161, (2009).
28. 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).
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. S. Dudonne, X. Vitrac, P. Coutiere, M. Woillez and J. M. Mérillon, "Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.57, No.5 pp. 1768-1774, (2009).
31. L. Mira, M. Tereza Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. Helena Florencio and 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).