

ORIGINAL ARTICLE

## 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 종자 추출물의 항산화 활성 및 지질과산화 저해능

강동수<sup>1)</sup> · 진동혁 · 오다영 · 김한수\*

부산대학교 식품공학과, <sup>1)</sup>전남대학교 해양바이오식품학과

### Antioxidant Activities and Lipid Peroxidation Inhibition Ability of *Gardenia jasminoides* Ellis Fructus Seed Extracts

Dong-Soo Kang<sup>1)</sup>, Dong-Hyeok Jin, Da-Young Oh, Han-Soo Kim\*

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

<sup>1)</sup>Department of Marine Bio Food Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate the bioactivity of extracts from the seeds of *Gardenia jasminoides* Ellis fructus (GJE) found in Namhae, Korea. Extraction was performed using three solvents, 70% methanol, Distilled Water (DW), and Ethyl Acetate (EA). We determined the total phenol and phytic acid contents of the extracts to evaluate their nitrogen oxide scavenging activity, antioxidant activity, reducing power, and lipid peroxidation inhibition ability. The phytic acid content of GJE was found to be 1.157 mg PAE (Phytic Acid Equivalent) /g DW. The yields of the three extraction processes were as follows: DW, 36.61%; 70% methanol, 30.10%; and EA, 20.40%. The physiological activities of the extract solvents increased significantly with increasing concentrations (0.2, 0.4, and 0.6 mg/mL) ( $p < 0.05$ ), but were lower than those of ascorbic acid, BHA, and trolox. Total phenol content was the highest in the 70% methanol extract, followed by DW and EA extracts. Further, nitrogen oxide scavenging activity and antioxidant activity were the highest for the 70% methanol extract followed by DW and EA extracts. Based on these results, the bioactivities of the 70% methanol and DW extracts of GJ seeds were excellent. These extracts can be used as natural antioxidants.

**Key words** : *Gardenia jasminoides* seed, Antioxidant activity, Phytic acid, Total phenol

#### 1. 서론

서구화된 식생활과 신체 활동 감소 등으로 심혈관계 질환과 비만, 당뇨 등의 생활습관병 발병이 사회적 문제가 되고 있다. 이에 건강에 대한 관심이 높아짐에

따라 식품은 단순 영양원이 아닌 기능성을 고려하게 되었으며, 기능성 식품에 대한 수요가 증가하고 있다 (Menrad, 2003). 여러 질병의 주된 원인으로 인체 내의 호흡과정 중 발생하는 산화 생성물의 free radical은 Reactive Oxygen Species (ROS)와 Reactive Nitrogen

Received 11 May, 2017; Revised 8 August, 2017;  
Accepted 9 August, 2017

\*Corresponding author: Han-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea  
Phone: +82-55-350-5351  
E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.  
© 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.

Species (RNS)로 다양하게 존재하는 것으로 보고되어 있다(Hwang et al., 2015). 산화질소합성효소에 의하여 생성되는 RNS는 반응성이 큰 nitric oxide, nitrite, peroxy-nitrite를 형성하여 다른 화합물과 신속히 반응하기 때문에 지질 과산화 및 세포막 파괴, DNA 손상 등과 함께 산화에 의해 여러 생성물들을 생성하여 암을 유발하고 노화와 관련하여 생리적 장애를 일으킨다고 알려져 있다(Vanacker et al., 1995). 경남 남해군의 삼자 중 하나인 치자는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로 국내를 비롯한 중국, 일본, 대만 등의 기온이 따뜻한 지역에 자생하고 있다(Koo et al., 2005). 치자의 주요 생리활성물질은 수용성 carotenoids인 crocin으로 알려져 있으며(Pham et al., 2000), Lee et al.(2005)의 연구에서는 crocin과 그 대사산물인 crocetin이 동물 실험에서 췌장의 lipase 활성을 억제하여 지질 흡수를 감소시키는 것으로 보고되고 있어 고지방 식이로 인한 고지혈증(hyperlipidemia)을 개선할 수 있다는 것을 시사하였다.

폴리페놀과 같은 phytochemical은 과일이나 야채와 같은 식물체에 많이 함유되어 있어 생체 내 산화생성물 제거, 유전자 조절, 면역체계 자극과 같은 효과가 있어 그 효과가 주목 받고 있으며, 이러한 페놀 성분을 함유하는 과일이나 야채와 같은 식품으로부터 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kähkönen et al., 2001; Luthria et al., 2015). 국내에는 합성색소를 치자를 활용한 천연색소로 대체하여 이용하기 위한 식품 및 섬유산업에서의 시도와 제품에 첨가 시 변화하는 물성적 특성에 관한 연구 동향이 대다수이며(Shin, 2007), 치자의 crocin 성분에 대한 연구 또한 많이 진행되어 있지만 치자를 용매 별로 추출한 후 총 페놀 함량 측정과 그에 따른 생리활성을 측정하여 비교한 연구는 아직 충분하지 않은 실정이다. 이에, 치자의 천연 항산화제의 가능성을 검토하기 위한 일련의 연구로서, 본 연구에서는 치자 종자의 phytic acid 함량을 측정하고 70% 메탄올, 증류수(Distilled Water, DW) 및 Ethyl Acetate (EA)의 용매 별로 추출하여 총 페놀 함량을 측정한 뒤 질소산화물 소거능, 항산화능, 환원력, 지질과산화 저해를 측정하여 치자 종자의 추출 용매에 따른 생리활성을 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료 및 시료의 추출

본 실험에 사용된 시료인 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)는 경남 남해군에서 2014년 11월에 수확하여 건조 상태로 되어있는 시료를 남해군 소재 재래시장의 약재상에서 2015년 1월에 구입하였다. 구입한 치자의 종자를 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  $-80^{\circ}\text{C}$ 로 저장하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 동결 저장된 치자 종자 분말 100 g씩 취하여 70% 메탄올, Ethyl Acetate (EA) 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하였으며, 증류수(Distilled Water, DW) 추출물은 증류수를 10배 가하여  $70^{\circ}\text{C}$  수조에서 2시간 동안 2회 추출하여 여과(filter paper, Advantec, No.1, Tokyo, Japan)하였다. 각 추출물은 진공회전농축기(Hei-VAP Advantage, Heidolph Co., Germany)를 이용하여  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 실험에 사용하였으며, 시료의 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율(%)로 표시하였다(Jin et al., 2016).

### 2.2. Phytic acid와 총 페놀 함량 측정

치자 종자의 phytic acid 함량은 Khattak et al.(2007)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 분말 0.3 g을 취해 0.2 M HCl 10 mL를 넣고 실온에 60분간 방치하여 추출한 후 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)한 추출액 1.0 mL와 ferric solution (0.02% ammonium iron (III) sulfate dodecahydrate 및 0.2 N HCl) 2.0 mL를 잘 섞어 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액 2.0 mL를 취하였다. 시험관에 2,2'-bipyridine 1.0 g과 thioglycollic acid 1.0 mL를 넣고 증류수로 100 mL 정용하여 만든 2,2'-bipyridine solution 1.0 mL를 가한 뒤 잘 섞어 419 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 phytic acid sodium salt hydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 시료 1 g당 mg PAE (mg of Phytic Acid Equivalents)로

계산하였다. 총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 변형하여 실험하였다(Swain and Hillis, 1959). 시료 추출액 1.0 mL에 증류수 4.0 mL을 넣고, Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0.5 mL를 가한 후, 잘 섞어 3분간 실온에 방치한 뒤 10% sodium carbonate solution 0.5 mL를 첨가하여 실온에 1시간 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 caffeic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 시료 1 g당 mg CAE (mg of Caffeic Acid Equivalents)로 표시하였다.

### 2.3. 생리활성 측정

#### 2.3.1. Nitric oxide radical 소거활성 측정

Nitric oxide radical 소거능은 Beckman and Koppenol(1996)의 방법을 변형하여 측정하였다. 용매별 추출물 각 농도의 시료 2.0 mL에 10 mM sodium nitroferrocyanide (III) dihydrate 및 0.2 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 3.0 mL를 넣어 잘 섞은 후 25°C 수조에서 150분간 반응시켰다. 반응액 0.5 mL와 1% sulfanilamine 및 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mL을 섞어 10분간 방치한 뒤 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 1.0 mL를 가하여 25°C water bath에서 30분간 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

양성대조구는 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였으며, 치자 씨의 NO 소거능은 백분율(%)로 계산하여 표시하였다.

#### 2.3.2. Nitrite 소거활성 측정

Nitrite 소거능은 Kang et al.(1996)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 2.0 mL와 1 mM sodium nitrite 1.0 mL를 혼합하여 0.2 M citrate buffer (pH 2.5) 7.0 mL를 첨가한 후, 37°C로 1시간 동안 반응시켰다. 반응액 1.0 mL에 2% 초산 3.0 mL를 넣은 후, Griess reagent (1% sulfanilic acid 및 30% acetic acid:1% 1-naphthylamine 및 30% acetic acid, 1:1, v/v) 0.4 mL와 15분간 반응시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구로 ascorbic acid를 사용하였으며 백분율(%)로 나타내어 표시하였다.

#### 2.3.3. $\beta$ -carotene bleaching을 이용한 항산화 활성 측정

$\beta$ -carotene 탈색을 이용한 치자 종자의 항산화 활성은 Takada et al.(2006)의 방법을 변형하여 측정하였다. Chloroform 10.0 mL에  $\beta$ -carotene 1 mg을 녹인 용액 1.0 mL를 round-bottomed flask에 넣은 후 linoleic acid 20 mg과 Tween 40 200 mg을 가하여 충분히 혼합하였다. 남아있는 chloroform을 40°C의 진공회전농축기로 제거한 후 남아있는 잔여물을 증류수 100 mL를 넣고 유화시킨 emulsion을 실험직전에 조제하여 사용하였다.  $\beta$ -carotene-linoleic acid emulsion 4.0 mL와 농도별 시료추출물 0.4 mL를 시험관에 넣고 섞은 뒤 470 nm에서 흡광도를 측정 후(t=0 min), 50°C의 수조에서 2시간동안 반응 시켜 470 nm에서 흡광도를 재측정하였다(t= 120 min). 양성대조구로 BHA를 사용하였으며 항산화 활성은 아래 식에 의해 계산하였다.

#### Antioxidant activity (%)

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

A<sub>s</sub> = the absorbance in the presence of sample extract.

A<sub>b</sub> = the absorbance of the blank.

#### 2.3.4. 환원력 측정

치자 종자의 용매별 추출물에 따른 환원력의 측정 은 각 시료 추출 용액 1.0 mL 에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1.5 mL와 1% potassium ferricyanide 1.0 mL를 넣고 50°C의 수조에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합액에 10% trichloroacetic acid 1.5 mL를 가하여 섞은 후 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 분리된 상등액 1.0 mL에 증류수 3.0 mL와 0.1% ferric chloride solution 0.2 mL를 넣어 잘 혼합시켜 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Singhal et al., 2014). 또한 EC<sub>50</sub>은 양성대조구인 BHA를 통하여 계산하였다.

#### 2.3.5. 지질과산화 저해 활성 측정

치자 종자의 각 용매별 추출물에서의 지질과산화 저해 활성은 Siriwardhana et al.(2003)의 방법을 변형

하여 측정하였다. 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL 로 희석한 각 용매별 시료 1.0 mL를 취하여 2.5% linoleic acid emulsion 및 에탄올 2.0 mL와 phosphate buffer (pH 7.0) 10 mL를 가한 후 혼합액이 20 mL가 되도록 증류수로 정용하였다. 빛을 차단한 40°C 수조에 24시간동안 혼합액을 반응시킨 후 반응액 0.1 mL에 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL와 에탄올 3.7 mL, 0.02 M ferrous chloride 및 3.5% HCl 0.1 mL를 가하여 3분간 혼합하여 산화 정도에 따른 흡광도 차이를 500 nm에서 측정하였다. 양성대조구로 BHA를 사용하였으며 백분율(%)로 계산하여 지질과산화 저해능을 나타내었다.

#### 2.4. 통계 처리

실험 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD ( $n=3$ )으로 표현하였다. 또한 실험 결과 값 간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA로 분석 한 뒤  $p<0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 농도 간의 유의성을 검증하였다. 시료 농도 별 결과 값에 대한 IC<sub>50</sub>과 EC<sub>50</sub>은 선형 회귀분석을 통하여 구하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

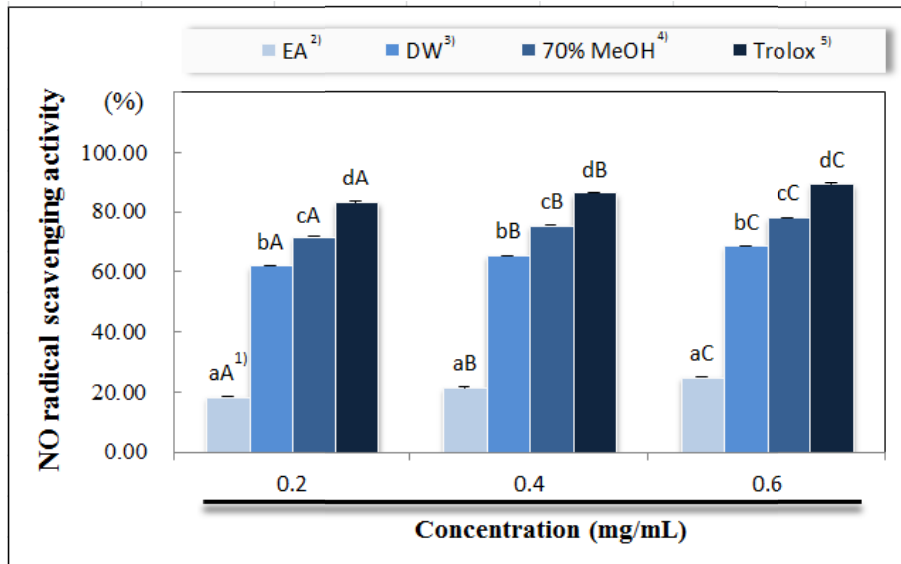
#### 3.1. Phytic acid와 총 페놀 함량 및 수율

치자 종자의 phytic acid 함량은 Table 1에 나타내었으며, 1.157 mg PAE (Phytic Acid Equivalent)/g DW (Dry Weight)로 확인되었다( $p<0.05$ ). Phytic acid는 대부분의 곡물, 견과류, 콩, 종자유, 꽃가루와 포자의 1~5%로 구성된 천연 식물 항산화제로 알려져 있다 (Midorikawa et al., 2001). 또한 아연, 칼슘, 철 이온 킬레이트를 형성하며 철 이온 촉매 산화 반응을 억제하여 종자보존에 강력한 산화방지 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Graf and Eaton, 1990). 실험동물의 혈청 cholesterol 및 triglyceride를 감소시키는 효과와 여러 염증성 장 질환을 예방하며 식품의 변색, 부패, 이수(syneresis) 등을 수반하는 지질 과산화 및 산화적 손상을 억제한다고 알려져 있다 (Yoon et al., 1983; Zhou and Erdman Jr, 1995). 보리의 phytic acid 함량은 0.37%로 알려져 있으며 (Lee, 1989), 두류 품종 중 phytic acid 함량은 mung bean 0.21%, pink bean 0.50%로 보고되고 있다 (Tabekhia and Luh, 1980). 치자 종자의 phytic acid를 백분율로 환산한 함량은 0.12%로 나타나 생리적 활성이 있을 것으로 사료된다. 치자 종자의 용매 별 추출물의 총 페놀 함량은 Table 1에

**Table 1.** Contents of phytic acid, total phenol, IC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> values in the bioactivity evaluation assays of seed from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus

Assays <sup>1)</sup>	Values		
	EA	DW	70% MeOH
Phytic acid content (mg PAE <sup>2)</sup> /g DW <sup>3)</sup> )	1.157±0.471		
Extraction yields (%)	20.40	36.61	30.10
Total phenol content (mg CAE <sup>4)</sup> /g)	10.19±0.08 <sup>a7)</sup>	21.98±0.15 <sup>b</sup>	28.60±0.20 <sup>c</sup>
NO (IC <sub>50</sub> <sup>5)</sup> , mg/mL)	2.103±0.042 <sup>c</sup>	0.026±0.001 <sup>b</sup>	0.005±0.000 <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	3.439±0.014 <sup>c</sup>	2.661±0.008 <sup>b</sup>	2.327±0.030 <sup>a</sup>
BC (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	1.689±0.017 <sup>c</sup>	1.053±0.003 <sup>b</sup>	0.854±0.003 <sup>a</sup>
RP (EC <sub>50</sub> <sup>6)</sup> , mg/mL)	7.517±0.677 <sup>c</sup>	1.418±0.028 <sup>b</sup>	1.153±0.033 <sup>a</sup>
LPI (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	0.657±0.007 <sup>c</sup>	0.333±0.001 <sup>b</sup>	0.169±0.002 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Nitric oxide radical scavenging activity (NO), nitrite scavenging activity (NO<sub>2</sub>), antioxidant activity by β-carotene bleaching assay (BC), Reducing Power (RP), Lipid Peroxidation Inhibition activity (LPI). <sup>2)</sup>PAE: Phytic Acid Equivalents. <sup>3)</sup>DW: Dry Weight. <sup>4)</sup>CAE: Caffeic Acid Equivalents. <sup>5)</sup>IC<sub>50</sub>: half maximal Inhibitory Concentration. <sup>6)</sup>EC<sub>50</sub>: half maximal Effective Concentration. <sup>7)</sup>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



**Fig. 1.** Nitric Oxide (NO) radical scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus. <sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>EA: Ethyl Acetate extract. <sup>3)</sup>DW: Distilled Water extract. <sup>4)</sup>70% MeOH: 70% methanol extract. <sup>5)</sup>Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

나타내었으며, 종자 추출물 중 70% 메탄올 추출물에서 28.60 mg CAE (Caffeic Acid Equivalents)/g으로 가장 높게 나타났으며, 증류수 추출물에서 21.98 mg CAE/g, EA 추출물 10.19 mg CAE/g 순으로 각 추출물에서 유의적인 차이가 관찰되었다( $p<0.05$ ). 페놀 화합물은 항암, 항돌연변이, 항산화능 등 인체 내에서 다양한 생리활성을 가진다고 보고되어 있다(Bravo, 1998). Cai et al.(2004)은 항암에 관련된 112가지 중국 약용작물의 항산화 활성 실험 중 중국산 치자 열매의 주요 페놀 화합물은 주로 phenolic acids (chlorogenic acid), flavones (gardenins)로 구성되어 있으며, 총 페놀 함량은 메탄올 추출물에서 10.0 mg/g, 물 추출물에서 10.8 mg/g으로 보고하였다. 이는 추출 용매와 유전적 요인, 재배 환경과 조건에 때문에 추출된 생리활성 물질 함량의 차이가 나타난 것으로 사료된다. 치자 종자의 70% 메탄올, 증류수 및 Ethyl Acetate (EA)에서의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 각 용매 별 추출 수율은 증류수, 70% 메탄올 및 EA 용매에서 각각 36.61%, 30.10% 및 20.40%로 나타났으며, EA 용매에서 가장 낮게 나타났다.

### 3.2. Nitric oxide radical 소거활성

치자 종자의 용매 별 추출물과 양성대조구 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)의 nitric oxide radical 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 1과 같고, IC<sub>50</sub>값을 구하였다 (Table 1). 치자 종자의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 측정된 결과 농도가 증가함에 따라 nitric acid radical 소거능 또한 유의적으로 증가하였다( $p<0.05$ ). 70% 메탄올 추출물은 농도 별로 71.80%, 75.49%, 78.10%, IC<sub>50</sub> 0.005 mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며( $p<0.05$ ), 증류수 추출물에서 62.03%, 65.56%, 68.58%, IC<sub>50</sub> 0.026 mg/mL, EA 추출물에서 각 18.37%, 21.55%, 25.03%, IC<sub>50</sub> 2.103 mg/mL 순으로 EA 추출물에서 가장 낮은 소거능이 관찰되었다. 양성대조구인 trolox는 각 83.37%, 86.34%, 89.36%로 관찰되었다. 인체 내의 NO 합성효소(EC 1.14.13.39)는 L-arginine을 citrulline과 NO radical로 변환시키며, 생성된 NO radical은 신경 세포와 내피 세포, 간세포 등에서 여러 isoform으로 전환되어 독성을 나타내는

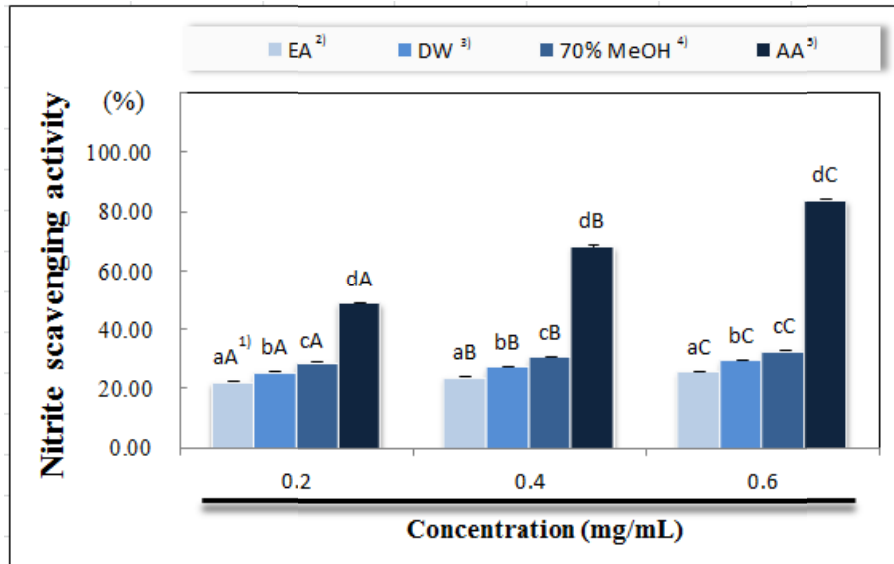


Fig. 2. Nitrite scavenging activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>EA: Ethyl Acetate extract. <sup>3)</sup>DW: Distilled Water extract. <sup>4)</sup>70% MeOH: 70% methanol extract. <sup>5)</sup>AA: Ascorbic Acid.

것으로 알려져 있다(Marietta, 1994). 본 실험 결과 70% 메탄올과 증류수 추출물에서 강한 NO radical 소거능을 가지고 있어 NO radical에 의한 여러 질환 증상을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

### 3.3. Nitrite 소거활성

치자 종자의 각 용매 별 추출물과 양성대조구인 ascorbic acid의 nitrite 소거 활성을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 2이며, IC<sub>50</sub>값은 Table 1과 같다. 치자 종자의 각 용매 별 추출물에서 측정한 결과, 농도가 증가함에 따라 NO<sub>2</sub> 소거 활성이 유의적으로 증가하였다 ( $p<0.05$ ). 70% 메탄올 추출물에서 각 농도 별로 28.77%, 30.81%, 32.76%, IC<sub>50</sub> 2.327 mg/mL로 유의적으로 가장 강한 nitrite 소거활성이 관찰되었으며 ( $p<0.05$ ), 증류수 추출물 25.56%, 27.41%, 29.54%, IC<sub>50</sub> 2.661 mg/mL, EA 추출물 22.16%, 23.83%, 25.60%, IC<sub>50</sub> 3.439 mg/mL 순으로 관찰되었다. 양성대조구인 ascorbic acid는 각 농도 별로 49.07%, 68.51%, 84.01%로 관찰되었다. nitrite는 소변, 타액, 혈장 등을 통해 nitric oxide synthase의 활성 및 산화

질소 radical 생성에 대한 바이오마커로서 임상 화학에서 사용되고 있다(Green et al., 1982).

### 3.4. $\beta$ -carotene bleaching을 이용한 항산화 활성

치자 종자 추출물의  $\beta$ -carotene 탈색을 이용한 항산화 활성의 결과는 Fig. 3이며, IC<sub>50</sub>은 Table 1과 같다. 치자 종자의 용매 별 추출물 각 농도에서 측정한 결과 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -carotene 탈색 저해능이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다( $p<0.05$ ). 추출물 중 70% 메탄올 추출물은 농도 별로 각 20.99%, 28.57%, 39.04%, IC<sub>50</sub> 0.854 mg/mL로 추출 용매 중 가장 강한 탈색 저해능이 관찰되었으며, 증류수 추출물 17.51%, 22.67%, 33.17%, IC<sub>50</sub> 1.053 mg/mL, EA 추출물 10.94%, 16.20%, 21.43%, IC<sub>50</sub> 1.689 mg/mL로 관찰되었다.  $\beta$ -carotene은 일정 온도 이상에서 공기 중에 방치하게 되면 산화가 진행되어 탈색 진행되며, flavonoid나 페놀 화합물과 같은 항산화 효과가 있는 물질과 함께 존재할 경우 탈색의 진행을 어느 정도 억제하게 되므로 이러한  $\beta$ -carotene의 탈색 정도를 이용한 항산화 능력을 분석 방법이 널리 이용되고 있다

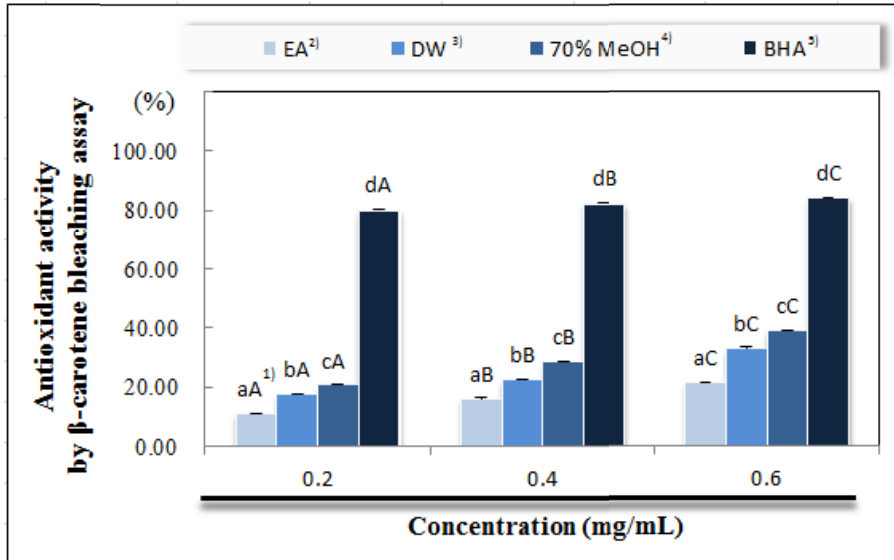


Fig. 3. Antioxidant activity by  $\beta$ -carotene bleaching assay of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>EA: Ethyl Acetate extract. <sup>3)</sup>DW: Distilled Water extract. <sup>4)</sup>70% MeOH: 70% methanol extract. <sup>5)</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

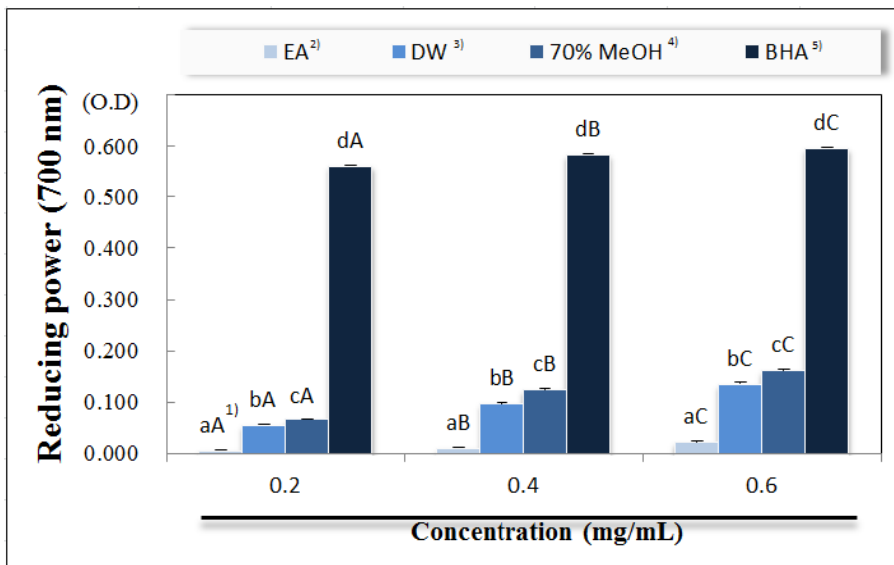


Fig. 4. Reducing power of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>EA: Ethyl Acetate extract. <sup>3)</sup>DW: Distilled Water extract. <sup>4)</sup>70% MeOH: 70% methanol extract. <sup>5)</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

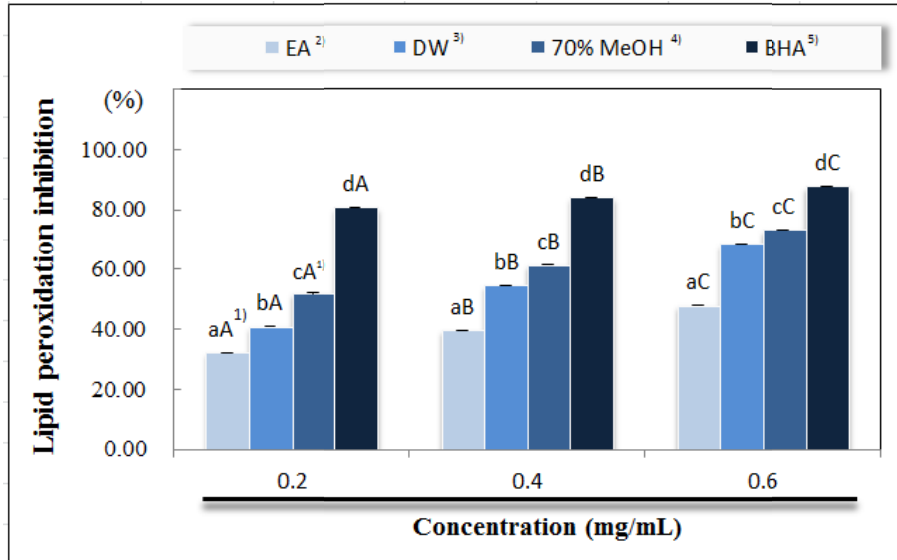


Fig. 5. Lipid peroxidation inhibition activity of various solvent extracts from seed of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>EA: Ethyl Acetate extract. <sup>3)</sup>DW: Distilled Water extract. <sup>4)</sup>70% MeOH: 70% methanol extract. <sup>5)</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

(Pastore et al., 2000).

### 3.5. 환원력

치자 종자 추출물에 대한 환원력은 Fig. 4와 같고,  $EC_{50}$  값을 구하였다(Table 1). 치자 종자의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 환원력을 측정된 결과 농도가 증가함에 따라 유의적으로 흡광도가 증가하였다( $p<0.05$ ). 70% 메탄올 추출물에서 각 농도 별로 0.067, 0.125, 0.163,  $EC_{50}$  1.153 mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 환원력이 관찰되었으며( $p<0.05$ ), 증류수 추출물 0.057, 0.098, 0.136,  $EC_{50}$  1.418 mg/mL, EA 추출물 0.007, 0.012, 0.023,  $EC_{50}$  7.517 mg/mL 순으로 확인되었다. 또한, 양성대조구로 사용된 BHA의 흡광도는 0.563, 0.585, 0.597으로 높은 환원력을 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 총 페놀 함량의 결과와 환원력 분석 결과가 유사한 것으로 나타났으며 총 페놀과 flavonoid 함량에 따라 항산화 활성과 환원력이 증가한다는 연구 보고(Pulido et al., 2000)와 마찬가지로 본 실험에서도 이와 같은 양상이 나타난 것으로 사료된다.

### 3.6. 지질과산화 저해 활성

치자 종자의 각 용매 별 추출물과 대조구인 BHA의 지질과산화 저해능을 각 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 5와 같고,  $IC_{50}$ 값은 Table 1과 같다. 70% 메탄올 추출물에서 농도 별로 각각 52.04%, 61.42%, 73.28%,  $IC_{50}$  0.169 mg/mL, 증류수 추출물 40.88%, 54.55%, 68.60%,  $IC_{50}$  0.333 mg/mL, EA 추출물 32.16%, 39.62%, 47.89%,  $IC_{50}$  0.657 mg/mL 순으로 관찰되었다( $p<0.05$ ), 지질과산화는 자동산화과정(autoxidation) 중 활성이 강한 유리 라디칼들이 서로 중합하여 중간 생성물인 알데하이드류, 케톤류, 산 등의 카보닐 화합물을 형성하는 것으로 알려져 있으며(Banerjee et al., 1999), 유지의 점도 증가와 체내 흡수를 어렵게 하고 필수지방산 함량의 감소가 일어나 영양적 가치를 감소시키는 것으로 보고되고 있다(Yamamoto et al., 1987). 또한 Esterbauer(1993)는 산화된 지질을 실험 동물에게 경구 투여하였을 때 즉상 동맥경화증 위험 증가, 간세포, 림프구 및 여러 유전적 독성을 야기하여 산화된 지질 섭취의 위험성을 시사하였다. 본 실험



결과 치자 씨의 추출물 중 70% 메탄올과 증류수 추출물에서 비교적 높은 지질과산화 저해능이 확인되어 지질 성분에서의 천연 산화방지제로서의 효과가 기대된다.

#### 4. 결론

치자 종자의 phytic acid 함량을 알아보고 70% 메탄올, 증류수(Distilled Water, DW) 및 Ethyl Acetate (EA)의 3가지 용매를 사용한 추출물의 용매 별 총 페놀 함량 및 질소 산화물 소거능, 환원력,  $\beta$ -carotene 탈색을 이용한 항산화력 및 지질과산화 저해능 측정을 통하여 치자 종자의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 치자 종자의 phytic acid 함량을 측정된 결과 1.157 mg PAE/g DW로 나타났으며, 치자 종자의 용매 별 추출 수율은 증류수(36.61%), 70% 메탄올(30.10%), EA(20.40%) 순으로 관찰되었다. 추출 용매 별 생리활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 양성대조구로 사용된 ascorbic acid, BHA, trolox 보다는 각 농도에서 낮은 활성이 관찰되었다. 치자 종자의 총 페놀 함량은 70% 메탄올, 증류수, EA 추출물 순으로 70% 메탄올 추출물에서 28.60 mg CAE/g으로 가장 높았으며, 질소산화물 소거능,  $\beta$ -carotene에서의 항산화력, 환원력 및 지질과산화 저해능에서도 총 페놀 함량의 결과와 마찬가지로 70% 메탄올, 증류수, EA 추출물 순으로 관찰되었다. 이상의 결과를 미루어 볼 때 총 페놀 함량에 증가함에 따라 생리활성 또한 증가하는 것으로 사료되며, 치자 종자의 70% 메탄올과 증류수 추출물에서의 질소산화물 소거능, 항산화능, 지질과산화 저해능이 우수한 것으로 나타나 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 매우 기대된다.

#### REFERENCES

- Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S. T., Chakraborty, A. K., 1999, Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers, *Toxicol. Lett.*, 107, 33-47.
- Beckman, J. S., Koppenol, W. H., 1996, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly, *Amer. J. Physiol.: Cell Physiol.*, 271, C1424-C1437.
- Bravo, L., 1998, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, 56, 317-333.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sci.*, 74, 2157-2184.
- Esterbauer, H., 1993, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *American J. Clin. Nutr.*, 57, 779S-785S.
- Graf, E., Eaton, J. W., 1990, Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radical Biol. Med.*, 8, 61-69.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., 1982, Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, 126, 131-138.
- Hwang, J. S., Lee, B. H., An, X., Jeong, H. R., Kim, Y. E., Lee, I., Lee, H., Kim, D. O., 2015, Total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hookeri*, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 47, 261-266.
- Jin, D. H., Kim, H. S., Seong, J. H., Chung, H. S., 2016, Comparison of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts, *J. Environ. Sci. Int.*, 25, 695-703.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M., 2001, Berry phenolics and their antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4076-4082.
- Kang, Y. H., Park, Y. K., Lee, G. D., 1996, The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 28, 232-239.
- Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S. A., Khattak, M. S., 2007, Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicerarietinum* L.) sprouts, *Food Chem.*, 104, 1074-1079.
- Koo, S. T., Cho, M. S., Park, S. S., Kim, Y. T., Park, K. J., Kim, K. S., Sohn, I. C., 2005, Effect of frutus gardeniae herbal acupuncture on the rat model of ankle sprain pain, *Kor. J. Acupunct.*, 22, 57-74.
- Lee, I. A., Lee, J. H., Baek, N. I., Kim, D. H., 2005, Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the

- fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 2106-2110.
- Lee, W. J., 1989, Phytic acid content and phytase activity of barley, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 18, 40-46.
- Luthria, D. L., Lu, Y., John, K. M., 2015, Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing, and functional properties, *J. Funct. Foods*, 18, 910-925.
- Marietta, M., 1994, Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis, *Cell*, 78, 927-930.
- Menrad, K., 2003, Market and marketing of functional food in Europe, *J. Food Eng.*, 56, 181-188.
- Midorikawa, K., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, S., 2001, Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 552-557.
- Pastore, D., Trono, D., Padalino, L., Simone, S., Valenti, D., Fonzo, N. D., Passarella, S., 2000, Inhibition by  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and  $\beta$ -carotene bleaching activities in durum wheat semolina, *J. Cereal Sci.*, 31, 41-54.
- Pham, T. Q., Cormier, F., Farnworth, E., Tong, V. H., Van Calsteren, M. R., 2000, Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1455-1461.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.
- Shin, H. J., 2007, A trend in research and development of natural gardenia pigments, *Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J.*, 22, 271-277.
- Singhal, M., Paul, A., Singh, H. P., 2014, Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.*, 18, 121-127.
- Siriwardhana, N., Lee, K. W., Jeon, Y. J., Kim, S. H., Haw, J. W., 2003, Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition, *Food Sci. Technol. Int.*, 9, 339-346.
- Swain, T., Hillis, W. E., 1959, The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Sci. Food Agric.*, 10, 63-68.
- Tabekhia, M. M., Luh, B. S., 1980, Effect of germination, cooking, and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans, *J. Food Sci.*, 45, 406-408.
- Takada, H., Kokubo, K., Matsubayashi, K., Oshima, T., 2006, Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by  $\beta$ -carotene bleaching assay, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 3088-3093.
- Vanacker, S. A., Tromp, M. N., Haenen, G. R., Vandervijgh, W. J. F., Bast, A., 1995, Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 755-759.
- Yamamoto, Y., Brodsky, M. H., Baker, J. C., Ames, B. N., 1987, Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 160, 7-13.
- Yoon, J. H., Thompson, L. U., Jenkins, D. J., 1983, The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response, *American J. Clin. Nutr.*, 38, 835-842.
- Zhou, J. R., Erdman Jr, J. W., 1995, Phytic acid in health and disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 495-508.