

ORIGINAL ARTICLE

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis) 과피의 용매별 추출물의 Flavonoid 함량 및 항산화 활성 비교

진동혁 · 오다영 · 이영근 · 강동수¹⁾ · 김한수*

부산대학교 식품공학과, ¹⁾전남대학교 해양바이오식품학과

Comparison of Flavonoid Content and Antioxidant Activities of Peel Extracts from *Gardenia jasminoides* Ellis by Various Solvents

Dong-Hyeok Jin, Da-Young Oh, Young-Guen Lee, Dong-Soo Kang¹⁾, Han-Soo Kim*

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

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

Abstract

The purpose of this study was to measure the bioactivity and antioxidant activity of peel from *Gardenia jasminoides fructus* Ellis (GJE) in Namhae, Korea, following some established methods. CM (Chloroform:Methanol, 2:1, v/v), 70% ethanol, and n-butanol extracts were collected. Flavonoid content and value as a functional food ingredient of GJE peel was investigated through assessing antioxidant [DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], and hydroxyl radical scavenging activities; superoxide dismutase like ability; ferrous ion-chelating capacity; and tannin content by solvent extraction. Solvent extract antioxidant activities significantly increased ($p < 0.05$) at increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL). GJE peel extracts were less active than the positive control [ascorbic acid, BHA (butylated hydroxyanisole), and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate)]. Based on the results of this study, GJE peel could be used as a natural antioxidant source due to its high antioxidant activity and bioactive compound content.

Key words : *Gardenia jasminoides fructus* Ellis peel, Antioxidant activity, Tannin, Flavonoid

1. 서론

인간수명 연장에 따른 건강에 대한 관심이 증가하여 단순한 영양원이 아닌 기능성을 고려한 기능성 식품에 대한 소비가 증가하고 있으며, 항산화 및 노화방지와 관련된 생리활성물질에 대한 관심과 건강기능식

품에 대한 수요가 높아지고 있다(Kim et al., 2014).

생체 내에서 세포는 호기성 호흡 중 미토콘드리아 내에서 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical (OH)과 같은 Reactive Oxygen Species (ROS)를 유도하는 superoxide를 생성하여 이에 대한 독성에 노출되며, 이를 제거하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione

Received 11 May, 2017; Revised 19 July, 2017;

Accepted 27 July, 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.

peroxidase와 같은 항산화 효소들이 존재한다(Aebi, 1984; Dröge, 2002). 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. 식품으로부터 섭취할 수 있는 항산화효과를 지닌 생리활성물질은 인체에 유해한 활성산소를 제거할 뿐만 아니라 증가하는 것을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Bagchi et al., 1997), 합성 및 천연 항산화제의 건강과 질병 예방에 대한 유의한 효과는 여러 연구 결과로 이를 입증하고 있다(Miller et al., 1993; Serafini and Rio, 2013). 식물체의 경우 이차 대사산물의 방어체계, 효소와 같은 보호기작이 발달되어 있어서 식물체에서 항산화 물질을 탐색, 연구하는 것은 중요한 의미를 지닌다고 한다(Edeoga et al., 2005). 치자는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로 한국을 비롯한 중국, 일본, 대만 등의 기온이 따뜻한 지방에 서식하고 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(Koo et al., 2005). 또한 카로티노이드와 플라보노이드류 같은 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 ROS 및 유리기를 제거할 수 있는 능력과 이에 대한 상호 작용을 통해 생활습관 병을 예방하는 것으로 알려져 있다(Yamauchi et al., 2011). 본 연구에서는 치자 과피의 탄닌 함량 및 chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), 70% 에탄올, n-부탄올 세 가지의 용매로 추출하여 플라보노이드 함량과 항산화 능력, 금속 킬레이트 능력(ferrous chelating activity) 등을 측정하여 치자 과피의 기능성 소재로서 천연 항산화제 등 활용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 시료의 추출

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)는 반 건조 상태로 되어 있는 시료를 경남 남해군 재래시장 약재상에

서 구입하여 치자의 과피를 분리한 후, 자연 건조시켜 분쇄기(HMF-3250S, Han-II Co., Seoul, Korea)에 분쇄하여 분말로 만든 다음 deep freezer (DF-8514, Il-Shin BioBase Co., Daegu, Korea)에 -80°C 로 저장하며 본 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 동결 저장된 치자 과피 분말을 100 g 씩 취해 n-부탄올, 70% 에탄올, chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v) 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, 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 표시하였다(Jin et al., 2016).

2.2. 탄닌과 플라보노이드 함량 측정

치자 과피의 탄닌 함량은 Prussian blue assay (Schofield et al., 2001)를 변형하여 측정하였다. 분말 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(Distilled Water, DW) 50.0 mL를 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 혼합한 뒤 실온에서 1시간 30분 방치한 후, 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 (+)-catechin을 사용하여 시료 g당 mg CE (mg of Catechin Equivalents)로 표시하였다.

플라보노이드 함량 측정은 two complementary colorimetric method를 변형하여 사용하였으며(Meda et al., 2005), 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 퀘르세틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용해 검량선을 작성하여 시료 g 당 mg QE (mg of Quercetin Equivalents)로 계산하였다.

2.3. 항산화능 측정

2.3.1. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 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 IC₅₀을 계산하여 표시하였다(Blois, 1958). 이 때 활성 비교를 위하여 대조구로 합성 항산화제인 BHA (butylated hydroxyanisole, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

2.3.2. ABTS radical 소거활성 측정

ABTS cation decolorization assay에 의한 방법 (Floegel et al., 2011)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(±0.02)이 되도록 메탄올로 희석하였다. 희석된 용액 3.9 mL에 용매별 시료 추출액 0.1 mL를 넣은 후 10분 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 BHA를 사용하였으며 ABTS radical 소거활성은 백분율(%)로 표시하였다.

2.3.3. SOD 유사활성 측정

SOD (superoxide dismutase) 유사활성은 McCord and Fridovich(1969)의 방법을 변형하여 각 용매별 시료 추출물 0.1 mL에 Tris-HCl 완충액(50 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane 완충액 + 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 반응시킨 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 표시하였다.

2.3.4. OH⁻ 소거활성 측정

Hydroxyl radical (OH⁻) 소거능 측정은 deoxyribose

degradation assay (Li, 2013)와 1,10-phenanthroline/ferrous iron (II) oxidation assay (Ming et al., 1996)를 변형하여 사용하였다. 각 농도의 시료 추출물 1.0 mL에 0.75 mM 1,10-phenanthroline 용액 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% hydrogen peroxide 1.0 mL를 순차적으로 가하여 37°C 수조에 60분간 반응시켰다. 대조구로 ascorbic acid를 사용하여 표시하였고, 흡광도는 536 nm에서 측정하여 백분율(%)로 나타내었다.

2.3.5. Ferrous ion-chelating capacity 측정

치자 과피의 각 농도별 추출물에서 ferrous ion chelating activity는 Robu et al.(2012)의 방법을 변형하여 진공농축된 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 과피의 ferrous ion-chelating activity는 백분율(%)로 환산하여 표시하였다.

2.4. 통계 처리

실험 결과는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD (n=3)으로 표시하였다. 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 검정하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수율과 탄닌 및 플라보노이드 함량

치자 과피의 chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), 70% 에탄올 및 n-부탄올에서의 추출 수율은 Table 1과 같다. 각 용매 별 추출 수율은 CM, 70% 에탄올 및 n-부탄올 용매에 대하여 각각 24.44%, 26.95% 및

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

Assays ¹⁾	Values		
	<i>n</i> -BuOH ⁶⁾	70% EtOH ⁷⁾	CM ⁸⁾
Tannin content (mg CE ²⁾ /g DW ³⁾)	1.681±0.013		
Extraction yields (%)	5.13	26.95	24.44
Flavonoid content (mg QE ⁴⁾ /g)	0.550±0.003 ^{a9)}	0.526±0.002 ^b	0.664±0.002 ^c
DPPH (IC ₅₀ ⁵⁾ , mg/mL)	0.537±0.001 ^c	0.521±0.001 ^b	0.428±0.001 ^a
ABTS (IC ₅₀ , mg/mL)	1.074±0.002 ^c	1.049±0.002 ^b	0.767±0.001 ^a
SOD (IC ₅₀ , mg/mL)	1.390±0.001 ^c	1.357±0.005 ^b	1.008±0.007 ^a
OH (IC ₅₀ , mg/mL)	0.560±0.001 ^c	0.544±0.001 ^b	0.448±0.001 ^a
FIC (IC ₅₀ , mg/mL)	0.191±0.002 ^c	0.170±0.002 ^b	0.133±0.001 ^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⁾IC₅₀: half maximal Inhibitory Concentration. ⁶⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ⁷⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁸⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁹⁾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.

5.13%로 나타났으며, 70% 에탄올 추출물에서 수율이 가장 높게 나타났다. 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 과피의 탄닌 함량은 Table 1에서와 같이, 1.681 mg CE (Catechin Equivalent)/g DW (Dry Weight)로 관찰되었다(p<0.05). 탄닌은 식물의 잎, 과실, 뿌리 등에 널리 함유되어 있는 수용성 폴리페놀 구조의 물질이며 단백질과 결합하여 변성을 일으키는 작용과 섭취 시 떫은맛을 나타내는 것으로 알려져 있다(Hagerman et al., 1992; Jackson et al., 1996). 또한 인체에서 고혈압 완화, 항산화, 항암 작용을 하는 것으로 보고되어 있다(Heinonen, 2007). 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(Lee and Lee, 1994). 치자 과피의 탄닌 함량은 0.17% CE 수준으로 앞서 보고된 탄닌 함량과 비교하였을 때 높은 수준은 아니지만 일반적인 수준의 탄닌을 함유하고 있는 것으로 본 실험 결과 확인되었다.

치자 과피의 용매 별 추출물에서의 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 추출물 중 치자 과피의 CM 추출물에서 0.664 mg QE (Quercetin Equivalents)/g으로 가장 높게 나타났으며, *n*-부탄올 추출물에서 0.550

mg QE/g, 70% 에탄올 추출물 0.526 mg QE/g 순으로 관찰되었고 각 추출물은 유의적인 차이가 있는 것으로 동정되었다(p<0.05). 플라보노이드는 Steinmetz and Potter(1991)의 연구에서 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 야채를 섭취 시 만성 질환을 감소시키는 것으로 보고하였으며, 폴리페놀 화합물은 C₃-C₆-C₃의 기본 구조를 이루며 다섯 가지의 구조적 범주(flavones, flavonols, flavanones, flavan-3-ols, anthocyanidins)로 분류되고, 이들 화합물들은 glycosyl, alkoxy, ester화 되어 있다고 알려져 있다(Heim et al., 2002). Chu et al.(2000)은 양배추, 시금치, 양파를 포함한 채소류에서의 플라보노이드 함량은 185.01~426.82 mg/kg로 나타났다고 보고하였으며, 케일 110 mg QE/kg, 브로콜리 30 mg QE/kg으로 보고되어 있다(Hertog et al., 1992). 이에 치자의 플라보노이드 함량은 높은 수준으로 판단되며, 그에 따른 생리활성 효과가 기대된다.

3.2. 항산화능

3.2.1. DPPH radical 소거활성

치자 과피의 각 용매 별 추출물과 대조구인 BHA (Butylated Hydroxy Anisole)의 DPPH radical 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 1, IC₅₀값은 Table

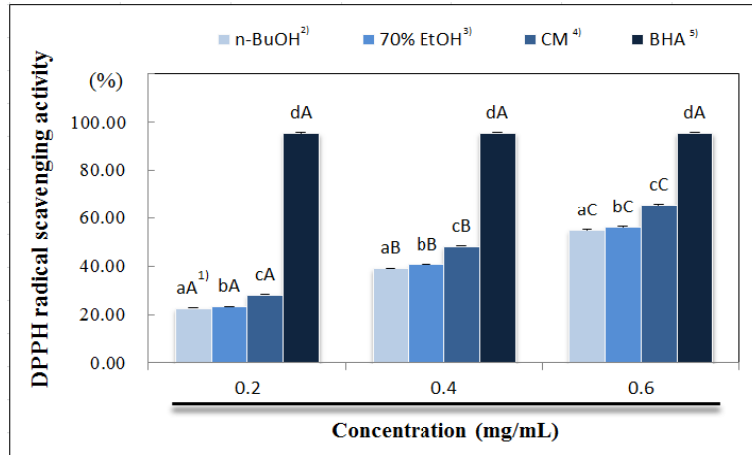


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ³⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁴⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁵⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

1과 같다. 치자 과피의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 유의적으로 DPPH radical 소거능이 증가하였다 ($p<0.05$). 과피의 CM 추출물에서 농도 별로 각각 28.20%, 48.26%, 65.66%, IC₅₀ 0.428 mg/mL로 과피 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며($p<0.05$), 70% 에탄올 추출물에서 23.26%, 40.66%, 56.15%, IC₅₀ 0.521 mg/mL, *n*-부탄올 추출물에서 각 22.63%, 39.16%, 54.98%, IC₅₀ 0.537 mg/mL로 관찰되었다. DPPH radical 용액은 진한 보랏빛 색상을 가지고 있어 약 520 nm를 중심으로 강한 흡광도를 나타내고, 중화될 때 황색 또는 담색이 된다. 이러한 속성은 반응을 시각적 모니터링으로 가능하게 하고, 초기 흡광도에서의 변화로부터 계산할 수 있어 항산화 분석에 사용되고 있다(Villano et al., 2007).

3.2.2. ABTS radical 소거활성

각 용매 별 추출물과 양성대조구인 BHA의 ABTS radical 소거능을 각 농도 별 비교한 결과는 Fig. 2, IC₅₀값은 Table 1과 같다. 과피의 CM 추출물에서 농도 별로 각각 29.17%, 36.73%, 43.80%, IC₅₀ 0.767 mg/mL로 과피 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며

가장 강한 소거능이 관찰되었으며($p<0.05$), 70% 에탄올 추출물에서 25.51%, 31.71%, 36.98%, IC₅₀ 1.049 mg/mL, *n*-부탄올 추출물은 각 25.51%, 31.37%, 36.68%, IC₅₀ 1.074 mg/mL로 나타났다. 70% 에탄올과 *n*-부탄올 추출물은 모든 농도에서 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다($p<0.05$). ABTS에 형성된 양이온 radical은 potassium persulfate에 의하여 산화되어 밝은 청색을 띤 용액이 형성되며, 수소를 공여하는 항산화 활성을 지닌 물질과 반응 시 감소되면서 무색으로 변색된다(Wolfenden and Willson, 1982). 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 보고되어 있다(Walker and Everette, 2009).

3.2.3. SOD 유사활성

SOD (superoxide dismutase) 유사활성은 Fig. 3, IC₅₀값은 Table 1과 같다. 치자 과피의 CM 추출물에서 농도 별로 각각 24.75%, 31.19%, 37.21%, IC₅₀ 1.008 mg/mL로 과피 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며($p<0.05$), 70% 에탄올 추출물 21.64%, 26.91%, 31.40%, IC₅₀

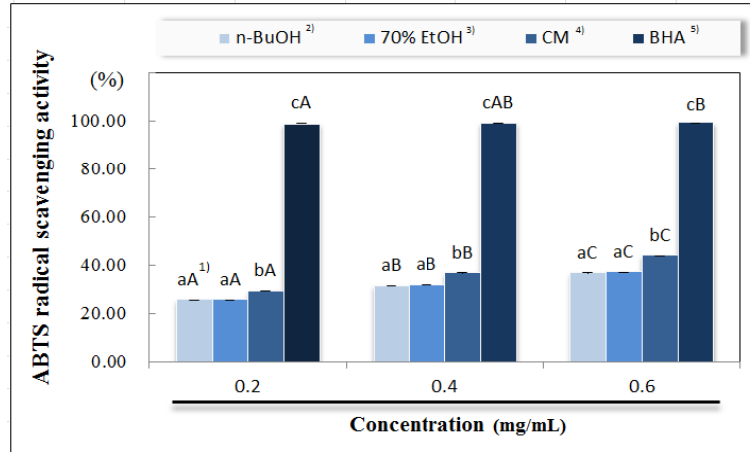


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ³⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁴⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁵⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

1.357 mg/mL, *n*-부탄올 추출물에서 각 21.64%, 26.62%, 31.15%, IC₅₀ 1.390 mg/mL로 관찰되었다 ($p<0.05$). 70% 에탄올 추출물과 *n*-부탄올 추출물 간의 유의적인 차이는 모든 농도에서 보이지 않았다 ($p<0.05$).

3.2.4. OH⁻ 소거활성

치자 과피 추출물과 대조구인 ascorbic acid의 hydroxyl radical (OH) 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과는 Fig. 4, IC₅₀은 Table 1과 같다. 치자 과피의 CM 추출물에서 농도 별로 각각 28.23%, 46.68%,

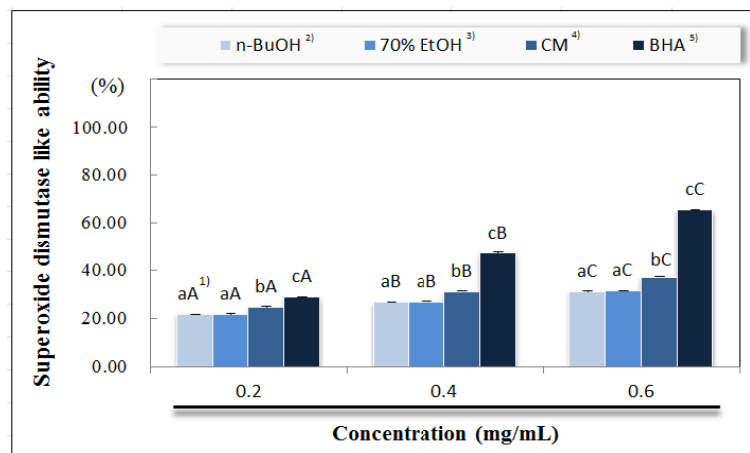


Fig. 3. Superoxide dismutase like ability of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ³⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁴⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁵⁾BHA: butylated hydroxyanisole.

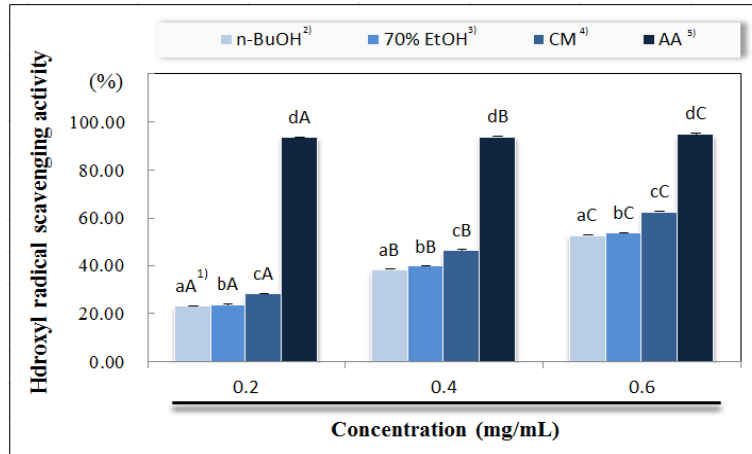


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ³⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁴⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁵⁾AA: Ascorbic Acid.

62.68%, IC₅₀ 0.448 mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 가장 강한 소거능이 관찰되었으며 ($p<0.05$), 70% 에탄올 추출물에서 23.68%, 39.69%, 53.93%, IC₅₀ 0.544 mg/mL, *n*-부탄올 추출물에서 각 23.11%, 38.31%, 52.86%, IC₅₀ 0.560 mg/mL로 관찰

되었다.

3.2.5. Ferrous ion-chelating capacity

치자 과피의 용매 별 추출물과 대조구인 EDTA의 각 농도 별 비교한 ferrous ion-chelating capacity 결과는 Fig. 5와 같고, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 표시

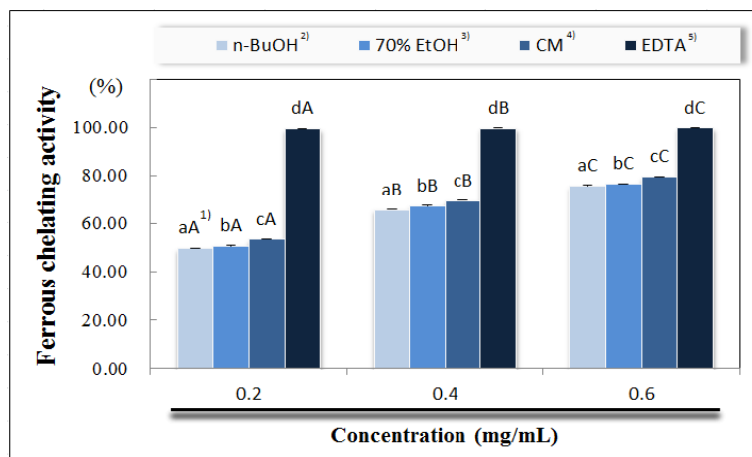


Fig. 5. Ferrous ion-chelating capacity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

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⁾*n*-BuOH: *n*-butanol extract. ³⁾70% EtOH: 70% ethanol extract. ⁴⁾CM: Chloroform:Methanol (2:1, v/v) extract. ⁵⁾EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

하였다. CM 추출물은 농도 별로 각각 53.36%, 69.56%, 79.538%, IC₅₀ 0.133 mg/mL로 유의적인 차이로 추출 용매 중 가장 강한 킬레이트 능력이 관찰되었으며($p < 0.05$), 70% 에탄올 추출물에서 50.66%, 67.35%, 76.47%, IC₅₀ 0.170 mg/mL, *n*-부탄올 추출물에서 각 49.55%, 65.69%, 75.64%, IC₅₀ 0.191 mg/mL로 0.6 mg/mL 농도에서의 70% 에탄올, *n*-부탄올 추출물의 킬레이트 능력은 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다($p < 0.05$). Kostyuk et al.(2004) 과 Mira et al.(2002)의 연구는 lutein, (-)-epicatechin 과 같은 플라보노이드 화합물과 금속이온이 결합한 복합체는 비 복합체 플라보노이드 보다 더 뛰어난 radical 소거능을 가진다고 보고하였다. 치자 과피 CM, 70% 에탄올, *n*-부탄올 추출물의 0.6 mg/mL 농도에서 70% 이상의 높은 ferrous 킬레이트 능력을 가지는 것으로 관찰되어, 금속이온 결합 및 항산화 작용에 대한 시너지 효과가 있을 것으로 추정된다.

4. 결론

치자 과피를 분리하여 탄닌 함량을 알아보고, chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), 70% 에탄올 및 *n*-부탄올의 용매를 사용한 추출물 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)의 용매 별 플라보노이드 함량 및 항산화 활성, 금속 킬레이트 능력 측정을 통하여 치자의 기능성 식품 소재로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 치자 과피의 탄닌 함량은 1.681 mg CE/g DW로 나타났으며, 치자 과피 용매 별 추출 수율은 70% 에탄올 26.95%, CM 24.44%, *n*-부탄올 5.13% 순으로 나타났다. 추출 용매 별 항산화 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 증가할수록 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 대조구로 사용된 ascorbic acid, BHA, EDTA 보다 낮은 활성이 관찰되었다. 플라보노이드 함량(mg QE/g)은 CM, *n*-부탄올 및 70% 에탄올 용매에 대하여 각각 0.664, 0.550 및 0.526 mg QE/g 순으로 관찰되어 모든 추출물에서 항산화 활성이 강한 것으로 나타났으나, 플라보노이드 함량과 달리 CM, 70% 에탄올, *n*-부탄올 추출물 순으로 70% 에탄올 추출물이 *n*-부탄올 보다 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 치자의 주요 성분 중 crocin을 포함한 수용성

카로티노이드가 항산화 활성에 영향을 준 것으로 추정된다. 또한 CM, 70% 에탄올, *n*-부탄올 추출물의 항산화 활성은 모두 높은 수준으로 관찰되었으나, 추출 수율을 감안하였을 때 CM, 70% 에탄올 용매를 사용하여 추출하는 것이 바람직하다고 사료된다. 본 실험 결과 치자 과피는 플라보노이드 화합물을 다량 함유하고 있으며, 이로 인한 높은 수준의 항산화 활성과 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품 및 천연 항산화제로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods enzymol.*, 105, 121-126.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Tran, M. X., Stohs, S. J., 1997, Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 95, 179-189.
- Blois, M. S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Chu, Y. E., Chang, C. L., Hsu, H. F., 2000, Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 561-566.
- Dröge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., Mbaebie, B. O., 2005, Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants, *African J. Biotechnol.*, 4, 685-688.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., Chun, O. K., 2011, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *J. Food Compos. Anal.*, 24, 1043-1048.
- Hagerman, A. E., Robbins, C. T., Weerasuriya, Y., Wilson, T. C., Mc Arthur, C., 1992, Tannin chemistry in relation to digestion, *J. Range Manage.*, 45, 57-62.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584.
- Heinonen, M., 2007, Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - A Finnish perspective, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 684-691.

- Hertog, M. H., Hollman, P. C., Katan, M. B., 1992, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383.
- Jackson, F. S., Barry, T. N., Lascano, C., Palmer, B., 1996, The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes, *J. Sci. Food Agric.*, 71, 103-110.
- Jin, D. H., Kim, H. S., Seong, J. H., Chung, H. S., 2016, Comparison of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachs japonicus* A. Berger extracts, *J. Environ. Sci. Int.*, 25, 695-703.
- Kim, H. S., Kim, M. A., Jang, S. H., 2014, Influences of Korean haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) on lipid concentration in hypercholesterolemia, *J. Environ. Sci. Int.*, 23, 793-800.
- 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.
- Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Strigunova, E. N., Kostyuk, T. V., Afanas'ev, I. B., 2004, Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 428, 204-208.
- Lee, J. H., Lee, S. R., 1994, Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 26, 310-316.
- Li, X., 2013, Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging, *Food Chem.*, 141, 2083-2088.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G., 2005, Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chem.*, 91, 571-577.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407-412.
- Ming, J., Yaxin, C., Jinrong, L., Hui, Z., 1996, 1, 10 - Phenanthroline - Fe²⁺ oxidative assay of hydroxyl radical produced by H₂O₂/Fe²⁺, *Prog. Biochem. Biophys.*, 23, 553-555.
- Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., Jennings, K. R., 2002, Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A Mechanism for their antioxidant activity, *Free Radical Res.*, 36, 1199-1208.
- Robu, S., Aprotosoae, A., Miron, A., Cioancă, O., Stănescu, U., Hăncianu, M., 2012, In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some Lavandula species cultivated in Romania, *Farmacologia*, 60, 394-401.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N., 2001, Analysis of condensed tannins: A Review, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 21-40.
- Serafini, M., Del Rio, D., 2013, Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool?, *Redox Rep.*, 9, 145-152.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. K., 1991, Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology, *Cancer Causes Control*, 2, 325-357.
- Villano, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C., 2007, Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 71, 230-235.
- Walker, R. B., Everette, J. D., 2009, Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1156-1161.
- Wolfenden, B. S., Willson, R. L., 1982, 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.*, 2, 805-812.
- Yamauchi, M., Tsuruma, K., Imai, S., Nakanishi, T., Umigai, N., Shimazawa, M., Hara, H., 2011, Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity, *European J. Pharmacol.*, 650, 110-119.