

## 남해산 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis fructus) 껍질의 생리활성 및 지질과산화 저해 활성에 미치는 영향

진동혁 · 오다영 · 강동수<sup>1</sup> · 이영근 · 김한수<sup>†</sup>

부산대학교 식품공학과, <sup>1</sup>전남대학교 해양바이오식품학과  
(2018년 2월 28일 접수: 2018년 3월 19일 수정: 2018년 03월 23일 채택)

### Effects of *Gardenia jasminoides* Ellis Peel Extract in Namhae Korea on the Bioactivity Compounds and Lipid Peroxidation Inhibition Activity

Dong-Hyeok Jin · Da-Young Oh · Dong-Soo Kang<sup>1</sup> · Young-Geun Lee · Han-Soo Kim<sup>†</sup>

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

(Received February 28, 2018; Revised March 19, 2018; Accepted March 23, 2018)

**요약** : 치자 껍질의 phytic acid 함량과 CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), *n*-부탄올 및 70% 에탄올을 사용한 추출물의 용매(3가지) 별 총 페놀 함량 및 항산화 활성 능력 등을 통하여 치자 껍질의 효용 가치를 검토한 결과, phytic acid 함량은  $4.966 \pm 0.996$  mg PAE/g DW (dry weight)로 나타났으며, 용매 별 생리 활성은 농도(0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 높아질수록 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid, BHA, trolox 보다는 각 농도에서 낮은 활성이 관찰되었다. 치자 껍질의 총 페놀 함량은 CM, *n*-부탄올, 70% 에탄올 추출물 순으로 CM 추출물에서  $39.74 \pm 0.15$  mg CAE/g으로 가장 높았으며, nitric oxide (NO) 라디칼 소거능과 지질과산화 저해능은 용매 별로 CM > 70% 에탄올 > *n*-부탄올, nitrite (NO<sub>2</sub>) 소거능은 *n*-부탄올 > CM > 70% 에탄올,  $\beta$ -carotene 탈색 저해능과 환원력은 CM > *n*-부탄올 > 70% 에탄올 순의 활성이 나타났다. 이상의 결과, 치자 껍질의 용매 별 총 페놀 함량 순과 항산화력, 환원력은 일치 하였으며, 질소산화물 소거능과 지질과산화 저해능 분석에서는 일치하지 않은 것으로 확인되었다. 이는 질소산화물 소거능과 지질과산화 저해능은 페놀 성분 보다 다른 생리활성물질이 더 큰 영향을 주는 것으로 추정된다.

이에, 치자 껍질은 질소산화물 소거능, 항산화능 및 지질과산화 저해능 등이 우수한 것으로 나타나 기능성 식품 소재로서의 가치가 있는 것으로 판단된다.

**주제어** : 치자 껍질, 항산화 활성, 총 페놀, 지질과산화 저해능, 환원력

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr)

**Abstract** : The object of this study was to measure the bioactivity and lipid peroxidation inhibition activity of peel from *Gardenia jasminoides* Ellis fructus (GJE) in Namhae Korea. The amount of phytic acid was also determined. Extraction was performed using three solvents, CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), *n*-butanol and 70% ethanol. To investigate by the solvent extract of total phenol content and value as a functional food ingredient of GJE peel through nitrogen oxide scavenging activity, antioxidant activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition were performed. The bioactivities of the extract solvents increased significantly with increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL,  $p < 0.05$ ). The total phenol contents of GJE peel extracts were highest in CM ( $39.74 \pm 0.15$  mg CAE/g) extract. The order of total phenol contents, antioxidant activity and reducing power of the solvents in the GJE peel were the same, in the analysis of nitrogen oxides scavenging activity and lipid peroxidation inhibition, it was confirmed the results were inconsistent. As a result, the GJE peel showed excellent bioactivities. Considering the extraction yield and various physiological activities, it is considered that efficiency is better when extracted from CM and 70% ethanol extracts.

**Keywords** : Peel of *Gardenia jasminoides* Ellis fructus, Antioxidant activity, Total phenol, Lipid peroxidation inhibition activity, Reducing power

## 1. 서론

서구화된 식생활과 신체 활동 감소 등으로 심혈관계 질환 및 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[1]. 질병의 주된 원인으로 인체 내의 호흡과정 중 발생하는 산화 생성물의 유리기는 reactive oxygen species (ROS)와 reactive nitrogen species (RNS)로 다양하게 존재하는 것으로 보고되어 있다[2]. 특정 산화질소 합성효소에 의해 생성되는 RNS는 반응성이 큰 nitric oxide ( $\text{NO} \cdot$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), peroxy nitrite ( $\text{ONOO}^-$ )를 형성하여 다른 화합물과 신속히 반응하기 때문에 지질 과산화 및 세포막 파괴, DNA 손상 등과 함께 산화에 의해 여러 생성물들을 생성하여 암을 유발하고 노화와 관련해 생리적 장애를 일으킨다고 알려져 있다[3]. 꼭두서니과(*Rubiaceae*)에 속하는 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)는 국내를 비롯한 중국, 일본, 대만 등 기온이 따뜻한 지방에 자생하고 있다[4]. 치자의 주요 생리활성물질은 수용성 카로티노이드인 crocin으로 알려져 있으며[5], crocin과 그 대사산물인 crocetin은 동물 실험에서 췌장의 lipase 활성을 억제하여 지질 흡수를

감소시키는 것으로 보고되고 있어 고지방 식이로 인한 고지혈증(hyperlipidemia) 등을 개선할 수 있다고 한다[6]. 총 페놀과 같은 phytochemical은 과일이나 야채와 같은 식물체에 많이 함유되어 있어 생체 내 산화 생성물 제거, 유전자 조절, 면역체계 자극과 같은 효과가 있어 그 효과가 주목받고 있으며, 이러한 페놀 성분을 함유하는 과일이나 야채와 같은 식품으로부터 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[7,8]. 치자는 합성색소를 천연색소로 대체하여 이용하기 위한 식품과 섬유산업에서의 시도 및 제품에 첨가 시 변화하는 물성적 특성에 관한 연구 동향이 대다수이며[9], 치자의 crocin 성분에 대한 연구 또한 많이 진행되어 있지만 치자 껍질을 용매 별 추출한 후 총 페놀 함량과 생리활성을 측정하여 비교한 연구는 미미한 실정이다. 이에, 본 연구는 치자 껍질의 phytic acid 함량을 측정하고 CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), *n*-부탄올 및 70% 에탄올의 용매 별로 추출하여 총 페놀 함량을 측정한 뒤 질소산화물 소거능(nitric oxide scavenging activity, nitrite scavenging activity), 항산화능(antioxidant activity by  $\beta$ -carotene bleaching assay), 환원력(reducing power), 지질 과산화 저해(lipid peroxidation inhibition)를 측정하여 치자 껍질의 추출 용매에 따른 생리활성을 비교하여 건강기능성 식품 개발의 목적으로

기초자료를 제시함으로써, 고부가 가치 천연 향산 화제의 이용 가능성을 검토하고자 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

경남 남해군 소재 약재상에서 2015년 1월에 구입한 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 껍질을 분리한 후 자연 건조시켜 분쇄기(HMF-3250S, Han-II Co., Seoul, Korea)에 분쇄하여 분말로 만든 다음 초저온 냉동고(DF-8514, Il-Shin BioBase Co., Daegu, Korea)에  $-80^{\circ}\text{C}$ 로 저장하며 본 실험에 사용하였다.

### 2.2. Phytic acid 함량 측정

치자 껍질의 phytic acid 함량은 Khattak et al.(2007)의 방법을 변형하여 측정하였다[10]. 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 원심분리 하여 상등액 2.0 mL를 취하였다. 각 시험관에 2,2'-bipyridine 1.0 g과 thioglycolic 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.

### 2.3. 시료의 추출

동결 저장된 치자 껍질 분말 100 g 씩 취하여 CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), n-부탄올, 70% 에탄올 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하였다. 각 추출물은 진공회전농축기(Hei-VAP Advantage, Heidolph Co., Germany)를 이용하여  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 시료 추출물을 얻었으며, 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율(%)로 표시하였다.

### 2.4. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis` 방법을 변형하여 실험하였다[11]. 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 mL을 첨가하여 실온에 1 시간 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 나타내었다.

### 2.5. Nitric oxide (NO) radical 소거 활성 측정

Nitric oxide (NO) radical 소거능은 Beckman and Koppenol (1996)의 방법을 변형하여 측정하였다[12]. 용매별 추출물 각 농도의 시료 2.0 mL에 10 mM sodium nitroferricyanide (III) dihydrate in 0.2 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 3.0 mL를 넣어 잘 섞은 후  $25^{\circ}\text{C}$  수조에서 150분간 반응시켰다. 반응액 0.5 mL와 1% sulfanilamine 및 2%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.0 mL을 섞어 10분간 방치한 뒤 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 1.0 mL를 가하여  $25^{\circ}\text{C}$  수조에서 30분간 방치하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구는 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였으며, 치자 껍질의 NO 소거능은 백분율로 계산하여 표시하였다.

### 2.6. Nitrite ( $\text{NO}_2$ ) 소거 활성 측정

Nitrite 소거능은 Kang et al.(1996)의 방법을 변형하여 측정하였다[13]. 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,  $37^{\circ}\text{C}$ 로 1시간 동안 반응시켰다. 반응액 1.0 mL에 2% acetic acid 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 백분율로 나타내어 표시하였다.

## 2.7. $\beta$ -carotene bleaching을 이용한

### 항산화 활성 측정

$\beta$ -carotene 탈색을 이용한 치자 껍질의 항산화 활성은 Takada et al.(2006)의 방법을 변형하여 측정하였다[14]. 클로로포름 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 클로로포름을 40°C의 진공 회전농축기로 제거한 후 남아있는 잔여물을 증류수 100 mL를 넣고 유허시킨 emulsion을 실험직 전에 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 2시간 동안 반응 시켜 470 nm에서 흡광도를 재측정하였다( $t=120$  min). 양성대조구로 BHA를 사용하였으며 항산화 활성은 아래 식에 의해 계산하였다.

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

$A_s$  = the absorbance in the presence of sample extract.

$A_b$  = the absorbance of the blank.

## 2.8. 환원력 측정

치자 껍질의 용매별 추출물에 따른 환원력 측정은 각 시료 추출 용액 1.0 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1.5 mL와 1% potassium ferricyanide 1.0 mL를 넣고 50°C의 수조에서 20분간 반응 시켰다. 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[15]. 또한  $EC_{50}$ 은 양성대조구인 BHA를 통하여 계산하였다.

## 2.9. 지질과산화 저해 활성 측정

치자 껍질의 각 용매별 추출물에서의 지질과산화 저해 활성은 Siriwardhana et al.(2003)의 방법을 변형하여 측정하였다[16]. 0.2 mg/mL, 0.4

mg/mL, 0.6 mg/mL로 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 24시간 동안 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 백분율로 계산하여 지질과산화 저해능을 나타내었다.

## 2.10. 통계 처리

실험 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )으로 표시하였다. 또한 실험 결과 값 간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA로 분석한 뒤  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 농도 간의 유의성을 검증하였다. 시료 농도 별 결과 값에 대한  $IC_{50}$ 과  $EC_{50}$ 은 선형 회귀분석을 통하여 구하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Phytic acid 함량

치자 껍질의 phytic acid 함량은 Table 1에 나타내었으며,  $4.966 \pm 0.996$  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[17]. 또한 아연, 칼슘, 철 이온 킬레이트를 형성하며 철 이온 촉매 산화 반응을 억제하여 종자보존에 강력한 산화방지 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[18]. 실험동물의 혈청 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키는 효과와 여러 염증성 장 질환을 예방하며 식품의 변색, 부패, 이수(syneresis) 등을 수반하는 지질 과산화 및 산화적 손상을 억제한다고 알려져 있다[19,20].

보리의 phytic acid 함량은 0.37%로 알려져 있으며[21], 두류 품종 중 phytic acid 함량은 mung bean 0.21%, pink bean 0.50%로 보고되고 있다[22]. 치자 껍질의 phytic acid를 백분율

로 환산하여 비교해 보았을 때 치자 껍질의 phytic acid 함량은  $0.50 \pm 0.10\%$ 로 곡류나 두류와 비슷한 수준의 phytic acid를 함유하는 것으로 나타났다.

### 3.2. 수율

치자 껍질의 CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), *n*-부탄올 및 70% 에탄올의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 각 용매 별 추출 수율은 70% 에탄올에서 26.95%, CM 24.44%, *n*-부탄올 5.13%로 *n*-부탄올 에서 추출 수율이 가장 낮게 나타났다.

### 3.3. 총 페놀 함량

치자 껍질의 용매 별 추출물에서의 총 페놀 함량은 Table 1과 같다. 껍질 추출물 중 CM 추출물에서  $39.74 \pm 0.15$  mg CAE (caffeic acid equivalents)/g으로 가장 높게 나타났으며 *n*-부탄올 추출물에서  $31.54 \pm 0.35$  mg CAE/g, 70% 에탄올 추출물  $28.73 \pm 0.27$  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[23]. Cai et al.(2004)은 항암에 관련된 112 가지 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[24]. 이는 추출 용매와 유전적 요인, 재배 환경과 조건에 때문에 추출된 생리활성물질 양에 차이가 나타난 것으로 사료된다.

### 3.4. Nitric oxide (NO) radical 소거 활성

치자 껍질의 용매 별 추출물과 양성대조구인 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)의 nitric oxide (NO) radical 소거능을 각 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었고, IC<sub>50</sub>값을 구하여 Table 1에 표시하였다. 치자 껍질의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 NO radical 소거능이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). CM 추출물은 농도 별로  $76.77 \pm 0.35\%$ ,  $80.66 \pm 0.31\%$ ,  $83.62 \pm 0.18\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.001 \pm 0.000$  mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 강한 소거능이 관찰되었으며( $p < 0.05$ ), 70% 에탄올 추출물에서  $76.77 \pm 0.35\%$ ,  $80.66 \pm 0.31\%$ ,  $83.62 \pm 0.18\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.003 \pm 0.000$  mg/mL, *n*-부탄올 추출물에서 각  $72.72 \pm 0.09\%$ ,  $75.54 \pm 0.32\%$ ,  $79.48 \pm 0.32\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.005 \pm 0.000$  mg/mL 순으로 관찰

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

Assays <sup>1)</sup>	Values		
Phytic acid content (mg PAE <sup>2)</sup> /g DW <sup>3)</sup> )	4.966 ± 0.996		
	70% Ethanol	<i>n</i> -Butanol	CM
Extraction yields (%)	26.95	24.44	5.13
Total phenol content (mg CAE <sup>4)</sup> /g)	$28.73 \pm 0.27^{a5)}$	$31.54 \pm 0.35^b$	$39.74 \pm 0.15^c$
NO (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	$0.005 \pm 0.000^c$	$0.003 \pm 0.000^b$	$0.001 \pm 0.000^a$
NO <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	$1.470 \pm 0.013^c$	$0.567 \pm 0.049^a$	$1.052 \pm 0.027^b$
BC (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	$0.722 \pm 0.003^c$	$0.652 \pm 0.001^b$	$0.483 \pm 0.003^a$
RP (EC <sub>50</sub> , mg/mL)	$1.130 \pm 0.006^c$	$1.034 \pm 0.001^b$	$0.845 \pm 0.003^a$
LPI (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	$0.072 \pm 0.005^c$	$0.059 \pm 0.004^b$	$0.047 \pm 0.001^a$

<sup>1)</sup>Nitric oxide radical scavenging activity (NO), nitrite scavenging activity (NO<sub>2</sub>), antioxidant activity by  $\beta$ -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>The values are means  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Values with the different letters in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.

되었다.

양성대조구인 trolox는 각  $83.37 \pm 0.23\%$ ,  $86.34 \pm 0.15\%$ ,  $89.36 \pm 0.09\%$ 로 확인되었다. 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 것으로 알려져 있다[25]. 본 실험 결과 치자 껍질의 각 용매 추출물은 모두 강한 NO radical 소거능을 가지고 있어 NO radical에 의한 여러 질환 증상을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

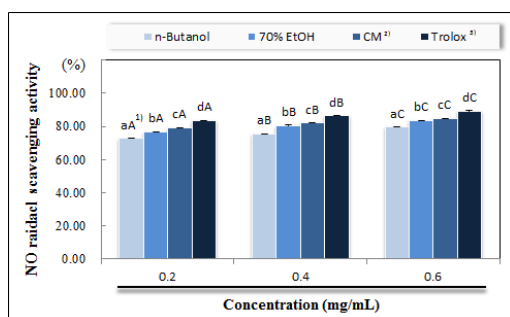


Fig. 1. Nitric oxide (NO) radical scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1</sup>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. <sup>2</sup>CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). <sup>3</sup>Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

### 3.5. Nitrite (NO<sub>2</sub>) 소거 활성

치자 껍질의 각 용매 별 추출물과 양성대조구인 ascorbic acid의 nitrite (NO<sub>2</sub>)소거 활성을 각 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, IC<sub>50</sub>값을 구하여 Table 1에 표시하였다. 치자 껍질의 각 용매 별 추출물에서 농도가 증가함에 따라 NO<sub>2</sub> 소거 활성이 유의적으로 증가하였다 ( $p<0.05$ ). *n*-부탄올 추출물에서 각 농도 별로  $41.01 \pm 0.36\%$ ,  $47.30 \pm 0.08\%$ ,  $50.20 \pm 0.16\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.567 \pm 0.049$  mg/mL로 유의적으로 강한 NO<sub>2</sub> 소거 활성이 관찰되었으며( $p<0.05$ ), CM 추출물  $36.70 \pm 0.16\%$ ,  $39.24 \pm 0.24\%$ ,  $43.04 \pm$

$0.27\%$ , IC<sub>50</sub>  $1.052 \pm 0.027$  mg/mL, 70% 에탄올 추출물  $36.11 \pm 0.27\%$ ,  $38.06 \pm 0.08\%$ ,  $40.51 \pm 0.16\%$ , IC<sub>50</sub>  $1.470 \pm 0.013$  mg/mL 순으로 확인되었다. 양성대조구인 ascorbic acid는 각 농도 별로  $49.07 \pm 0.21\%$ ,  $68.51 \pm 0.08\%$ ,  $84.01 \pm 0.21\%$ 로 측정되었다. NO<sub>2</sub>는 소변, 타액, 혈장 등을 통해 nitric oxide synthase의 활성 및 산화질소 radical 생성에 대한 바이오 마커로서 임상 화학에서 사용되고 있다[26].

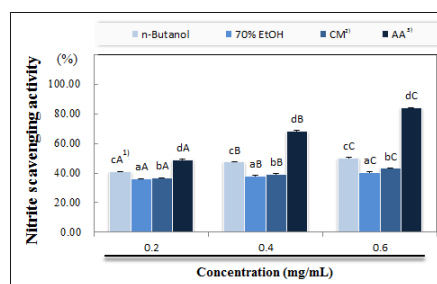


Fig. 2. Nitrite (NO<sub>2</sub>) scavenging activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1</sup>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. <sup>2</sup>CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). <sup>3</sup>AA: ascorbic acid.

### 3.6. $\beta$ -carotene bleaching을 이용한

#### 항산화 활성

치자 껍질 추출물의  $\beta$ -carotene 탈색을 이용한 항산화 활성의 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, IC<sub>50</sub>은 Table 1과 같다. 치자 껍질의 용매 별 추출물 각 농도에서 측정한 결과 농도가 증가함에 따라  $\beta$ -carotene 탈색 저해능이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다( $p<0.05$ ). 추출물 중 CM 추출물은 농도 별로 각  $41.65 \pm 0.25\%$ ,  $48.63 \pm 0.37\%$ ,  $52.78 \pm 0.68\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.483 \pm 0.003$  mg/mL로 추출 용매 중 강한 탈색 저해능이 관찰되었으며, *n*-부탄올 추출물  $38.52 \pm 0.22\%$ ,  $43.22 \pm 0.04\%$ ,  $48.82 \pm 0.09\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.652 \pm 0.001$  mg/mL, 70% 에탄올 추출물  $23.37 \pm 0.09\%$ ,  $33.86 \pm 0.19\%$ ,  $44.80 \pm 0.11\%$ , IC<sub>50</sub>  $0.722 \pm 0.003$  mg/mL로 관찰되었다.  $\beta$ -carotene은 일정 온도 이상에서 공기 중에 방치

하게 되면 산화가 진행되어 탈색 진행되며, 플라보노이드나 페놀 화합물과 같은 항산화 효과가 있는 물질과 함께 존재할 경우 탈색의 진행을 어느 정도 억제하게 되므로 이러한  $\beta$ -carotene의 탈색 정도를 이용한 항산화 능력 분석 방법이 널리 이용되고 있다[27].

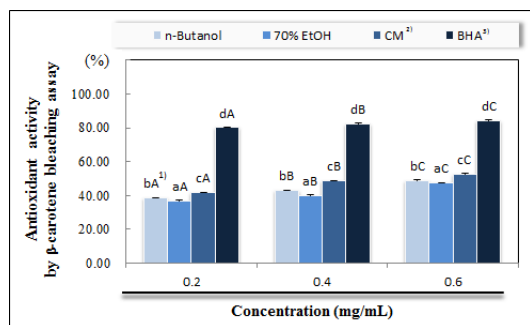


Fig. 3. Antioxidant activity by  $\beta$ -carotene bleaching assay of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). <sup>3)</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

### 3.7. 환원력

치자 껍질 추출물에 대한 환원력은 Fig. 4에 나타내었고,  $EC_{50}$  값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 치자 껍질의 각 용매 별 추출물 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도에서 환원력을 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 유의적으로 흡광도가 증가하였다( $p<0.05$ ). CM 추출물에서 각 농도 별로  $0.079 \pm 0.002$ ,  $0.151 \pm 0.001$ ,  $0.214 \pm 0.001$ ,  $EC_{50}$   $0.845 \pm 0.003$  mg/mL로 추출 용매 중 유의적인 차이를 보이며 강한 환원력이 관찰되었으며 ( $p<0.05$ ), *n*-부탄올 추출물  $0.061 \pm 0.002$ ,  $0.118 \pm 0.001$ ,  $0.175 \pm 0.002$ ,  $EC_{50}$   $1.034 \pm 0.001$  mg/mL, 70% 에탄올 추출물  $0.057 \pm 0.001$ ,  $0.113 \pm 0.002$ ,  $0.160 \pm 0.002$ ,  $EC_{50}$   $1.130 \pm 0.006$  mg/mL 순으로 확인 되었다. 또한 양성대조구로 사용된 BHA의 흡광도는  $0.563 \pm 0.002$ ,  $0.585 \pm 0.001$ ,  $0.597 \pm 0.001$ 으로 높은 환원력을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 총 페놀 함량의 결과와

환원력 분석 결과 유사한 것으로 나타났으며, 총 페놀과 플라보노이드 함량에 따라 항산화 활성과 환원력이 증가한다는 연구 보고[28]와 유사한 경향으로 나타났다.

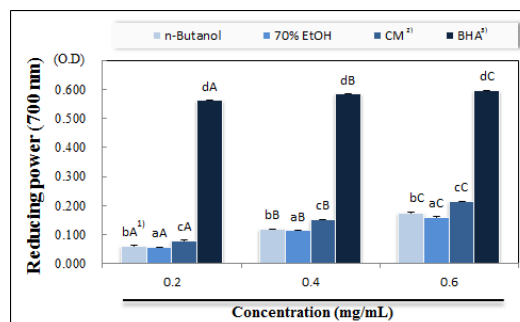


Fig. 4. Reducing power of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1)</sup>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. <sup>2)</sup>CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). <sup>3)</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

### 3.8. 지질과산화 저해 활성

치자 껍질의 용매 별 추출물과 대조구인 BHA의 지질과산화 저해능을 농도 별로 비교한 결과를 Fig. 5에 나타내었고,  $IC_{50}$  값을 구하여 Table 1에 표시하였다. CM 추출물에서 농도 별로 각각  $58.74 \pm 0.06\%$ ,  $67.00 \pm 0.21\%$ ,  $79.70 \pm 0.06\%$ ,  $IC_{50}$   $0.047 \pm 0.001$  mg/mL, 70% 에탄올 추출물  $57.80 \pm 0.26\%$ ,  $64.73 \pm 0.26\%$ ,  $78.62 \pm 0.10\%$ ,  $IC_{50}$   $0.072 \pm 0.005$  mg/mL, *n*-부탄올 추출물  $57.90 \pm 0.10\%$ ,  $64.49 \pm 0.28\%$ ,  $77.32 \pm 0.22\%$ ,  $IC_{50}$   $0.059 \pm 0.004$  mg/mL로 70% 에탄올과 *n*-부탄올 추출물의 0.2 mg/mL와 0.4 mg/mL 농도의 지질과산화 저해능은 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다( $p<0.05$ ), 지질과산화는 자동산화과정(autoxidation) 중 활성이 강한 유리기들이 서로 중합하여 중간생성물인 알데하이드류, 케톤류, 산 등의 카보닐 화합물을 형성하는 것으로 알려져 있으며[29], 유지의 점도 증가와 체내 흡수를 어렵게 하고 필수지방산 함량의 감소가 일어나 영양적 가치를 감소시키는 것으로 보고되어 있다[30]. 또한, Esterbauer (1993)는 산화된 지

질을 실험동물에게 경구 투여하였을 때 죽상 동맥경화증 위험 증가, 간세포, 림프구 및 유전적 독성을 야기하여 산화된 지질 섭취의 위험성을 시사 하였다[31]. 본 실험 결과 치자 껍질의 추출물 모두에서 높은 지질과산화 저해능이 확인되어 지질 성분에서의 천연산화방지제로서의 효과가 기대된다.

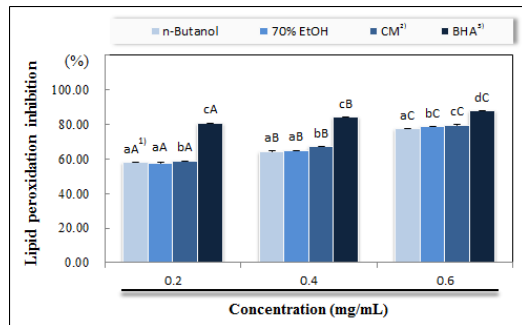


Fig. 5. Lipid peroxidation inhibition activity of various solvent extracts from peel of *Gardenia jasminoides* fructus.

<sup>1</sup>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. <sup>2</sup>CM: chloroform:methanol (2:1, v/v). <sup>3</sup>BHA: butylated hydroxyanisole.

#### 4. 결론

치자 껍질의 CM (chloroform:methanol, 2:1, v/v), *n*-부탄올 및 70% 에탄올의 3가지 용매를 사용한 추출물의 용매 별 총 페놀 함량 및 질소산화물 소거능, 환원력,  $\beta$ -carotene 탈색을 이용한 항산화력 및 지질과산화 저해능 등을 측정하였다. 치자 껍질의 추출 수율은 70% 에탄올 (26.95%), CM (24.44%), *n*-부탄올(5.13%) 순으로 관찰되었다. 추출 용매 별 생리활성은 농도 (0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)가 높아질수록 유의적으로 증가하였으나( $p<0.05$ ), 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid, BHA, trolox 보다는 각 농도에서 낮은 활성이 관찰되었다. 치자 껍질의 총 페놀 함량은 CM, *n*-부탄올, 70% 에탄올 추출물 순으로 CM 추출물에서  $39.74 \pm 0.15$  mg CAE/g으로 가장 높았으며, nitric oxide (NO) 라디칼 소거능

과 지질과산화 저해능은 용매 별로 CM > 70% 에탄올  $\geq$  *n*-부탄올, nitrite (NO<sub>2</sub>) 소거능은 *n*-부탄올 > CM > 70% 에탄올,  $\beta$ -carotene 탈색 저해능과 환원력은 CM > *n*-부탄올 > 70% 에탄올 순의 활성을 보였다. 이상의 결과, 치자 껍질의 총 페놀 함량 결과와 항산화력 및 환원력 등은 유사하게 나타났다. 따라서 치자 껍질은 질소산화물 소거능, 항산화능, 지질과산화 저해능이 우수한 것으로 확인되어 기능성 식품 소재로서의 가치가 클 것으로 사료된다.

#### References

1. K. Menrad, "Market and marketing of functional food in Europe", *J. Food Eng.*, Vol.56, No.2 pp. 181-188, (2003).
2. J. S. Hwang, B. H. Lee, X. An, H. R. Jeong, Y. E. Kim, I. Lee, H. Lee, D. O. Kim, "Total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hookeri*", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.47, No.2 pp. 261-266, (2015).
3. S. A. Vanacker, M. N. Tromp, G. R. Haenen, W. J. F. Vandervijgh, A. Bast, "Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.214, No.3 pp. 755-759, (1995).
4. S. T. Koo, M. S. Cho, S. S. Park, Y. T. Kim, K. J. Park, K. S. Kim, I. C. Sohn, "Effect of fructus gardeniae herbal acupuncture on the rat model of ankle sprain pain", *Korean J. Acupunct.*, Vol.22, No.2 pp. 57-74, (2005).
5. T. Q. Pham, F. Cormier, E. Farnworth, V. H. Tong, M. R. Van Calsteren, "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.*, Vol.48, No.5 pp. 1455-1461, (2000).
6. I. A. Lee, J. H. Lee, N. I. Baek, D. H. Kim, "Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia*



- jasminoides* and its metabolite crocetin”, *Biol. Pharm. Bull.*, Vol.28, No.11 pp. 2106–2110, (2005).
7. M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, M. Heinonen, “Berry phenolics and their antioxidant activity”, *J. Agric., Food Chem.*, Vol.49, No.8 pp. 4076–4082, (2001).
  8. D. L. Luthria, Y. Lu, K. M. John, “Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing, and functional properties”, *J. Funct. Foods*, Vol.18, pp. 910–925, (2015).
  9. H. J. Shin, “A trend in research and development of natural gardenia pigments”, *KSBB Journal*, Vol.22, No.5 pp. 271–277, (2007).
  10. A. B. Khattak, A. Zeb, N. Bibi, S. A. Khalil, M. S. Khattak, “Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicerarietinum* L.) sprouts”, *Food Chem.*, Vol.104, No.3 pp. 1074–1079, (2007).
  11. T. Swain, W. E. Hillis, “The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents”, *J. Sci. Food Agric.*, Vol.10, No.1 pp. 63–68, (1959).
  12. J. S. Beckman, W. H. Koppenol, “Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly”, *American J. Physiol.: Cell Physiol.*, Vol.271, No.5 pp. C1424–C1437, (1996).
  13. Y. H. Kang, Y. K. Park, G. D. Lee, “The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds”, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.28, No.2 pp. 232–239, (1996).
  14. H. Takada, K. Kokubo, K. Matsubayashi, T. Oshima, “Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by  $\beta$ -carotene bleaching assay”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.70, No.12 pp. 3088–3093, (2006).
  15. M. Singhal, A. Paul, H. P. Singh, “Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives”, *J. Saudi Chem. Soc.*, Vol.18, No.2 pp. 121–127, (2014).
  16. N. Siriwardhana, K. W. Lee, Y. J. Jeon, S. H. Kim, J. W. Haw, “Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition”, *Food Sci. Technol. Int.*, Vol.9, No.5 pp. 339–346, (2003).
  17. K. Midorikawa, M. Murata, S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Kawanishi, “Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.288, No.3 pp. 552–557, (2001).
  18. E. Graf, J. W. Eaton, “Antioxidant functions of phytic acid”, *Free Radical Biol. Med.*, Vol.8, No.1 pp. 61–69, (1990).
  19. J. H. Yoon, L. U. Thompson, D. J. Jenkins, “The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response”, *American J. Clin. Nutr.*, Vol.38, No.6 pp. 835–842, (1983).
  20. J. R. Zhou, J. W. Erdman Jr, “Phytic acid in health and disease”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol.35, No.6 pp. 495–508, (1995).
  21. W. J. Lee, “Phytic acid content and phytase activity of barley”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.18, No.1 pp. 40–46, (1989).
  22. M. M. Tabekhia, B. S. Luh, “Effect of germination, cooking, and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans”, *J. Food Sci.*, Vol.45, No.2 pp. 406–408, (1980).
  23. L. Bravo, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”, *Nutr. Rev.*, Vol.56, No.11 pp. 317–333, (1998).
  24. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, “Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with

- anticancer", *Life Sci.*, Vol.74, No.17 pp. 2157-2184, (2004).
25. M. Marietta, "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis", *Cell*, Vol.78, No.6 pp. 927, (1994).
26. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids", *Anal. Biochem.*, Vol.126, No.1 pp. 131-138, (1982).
27. D. Pastore, D. Trono, L. Padalino, S. Simone, D. Valenti, N. Di Fonzo, S. Passarella, "Inhibition by  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and  $\beta$ -carotene bleaching activities in durum wheat semolina", *J. Cereal Sci.*, Vol.31, No.1 pp. 41-54, (2000).
28. R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.48, No.8 pp. 3396-3402, (2000).
29. B. D. Banerjee, V. Seth, A. Bhattacharya, S. T. Pasha, A. K. Chakraborty, "Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers", *Toxicol. Lett.*, Vol.107, No.1 pp. 33-47, (1999).
30. Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames, "Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, Vol.160, No.1 pp. 7-13, (1987).
31. H. Esterbauer, "Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products", *American J. Clin. Nutr.*, Vol.57, No.5 pp. 779S-785S, (1993).