

碩士學位論文

감귤 과피에서 flavonoids 성분의
HPLC 분석 및 항산화 효과



濟州大學校 大學院

化 學 科

高 受 延

2005年 8月

碩士學位論文

감귤 과피에서 flavonoids 성분의
HPLC 분석 및 항산화 효과



濟州大學校 大學院

化 學 科

高 受 延

2005年 8月

감귤 과피에서 flavonoids 성분의 HPLC 분석 및 항산화 효과

指導教授 姜 昌 禧

高 受 延

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함
2005年 8月

高受延의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

2005年 8月

HPLC Analysis and Antioxidant Effect of Flavonoids extracted from Citrus Peels

Su-Youn Ko

(Supervised by professor Chang-Hee Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
NATURAL SCIENCE

2005. 8.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 론	1
II. 실 험	3
1. Flavonoid의 추출	3
2. 폴리페놀 화합물의 함량분석	3
3. Flavonoids 함량 분석	4
1) 표준시약 조제 및 시료의 전처리	4
2) HPLC의 검출과장 선택	4
3) HPLC 분석 조건	5
4. 항산화 실험	6
1) DPPH radical 소거 활성 측정	6
2) Nitric oxide 소거 활성 측정	7
3) Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성 측정	7
5. 산화적 스트레스에 대한 보호효과	7
1) 세포배양	7
2) 세포내에서의 ROS 측정	8
III. 결과 및 고찰	9
1. Flavonoid 추출 및 총폴리페놀화합물 함량	9
2. Flavonoid의 HPLC 분석	10
1) HPLC의 검량선 및 재현성 조사	10
2) Flavonoid 함량 분석 결과	13
3. 항산화 실험	16
1) Flavonoid 표준 물질의 항산화 실험	16
(1) DPPH radical 소거 활성	16

(2) Nitric oxide 생성 저해 활성	17
(3) Xathnine oxidase 억제 활성	18
(4) Superoxide 소거 활성	18
2) 제주산 감귤 과피 추출물의 항산화 실험	22
(1) DPPH radical 소거 활성	22
(2) Nitric oxide 생성저해 활성	22
(3) Xanthine oxidase 억제 활성	22
(4) Superoxide 소거 활성	23
5. HepG2 세포에서의 항산화 활성	24
IV. 결 론	28
V. 참 고 문 헌	30

ABSTRACT

In this study, the HPLC conditions were investigated to quantitatively determine flavonoids in ethanol extracts from Jeju citrus peels. In addition, antioxidant activity of those extracts was evaluated using various methods. Described below is the summary of the experimental results.

The concentrations of total polyphenolics in extracts of citrus peel were determined by colorimetric methods. In the results, the polyphenol concentrations of ethanol were 7.25% for *Citrus unshiu*, 11.04% for *C. Jinjihyang*, 7.86% for *C. hassku* Hort, and 16.73% for *C. unshiu*(Unripe Citrus) respectively. The total polyphenol contents showed big differences depending on the citrus species and the harvesting times, and were decreased in accordance with later harvesting time.

Based on the flavonoids analysis from citrus peels, the followings were determined to be the major components; rutin hydrate 0.24 mg/g and hespeidin 43.80 mg/g for *C. hassku* Hort, ferulic acid 0.73 mg/g and hesperidin 5.57 mg/g for *C. jinjihyang*, naringin 47.68 mg/g for *C. Unshiu*, rutin hydrate 0.82 mg/g and ferulic acid 2.78 mg/g, hesperidin 8.40 mg/g for premature *C. Unshiu*. In addition, naringenin, hesperetin and tangeretin were detected as the minor component for above 4 citrus species. Naringin in *C. unshiu*, and hesperidin in *C. hassku* Hort, *C. jinjihyang*, *C. premature C. unshiu* were identified to be present in considerable amount. On the other hand, quercetin was not detected in this study.

By the examination of antioxidative activity using eight flavonoid standards, higher activities of DPPH radical scavenging, superoxide scavenging, and xanthin oxidase inhibition were observed in rutin hydrate, ferulic acid, naringin, quercetin and hesperetin. On the other hand, hesperidin and tangeretin showed lower activities compared to other flavonoids.

In general, the extracts of Jeju citrus peels showed higher activities against antioxidative examination such as DPPH radical and superoxide scavenging,

nitric oxide inhibition, xanthin oxidase inhibition. Higher activities were observed especially when the extract contained wider range of flavonoid species.

By the examination of antioxidative test on HepG2 cells, the extract of *C. unshiu* peel showed ROS scavenging activity. The extract of *C. jinjhyang* as well showed considerable activities concentration dependant manner. By the combination of above results, Jeju citrus peels were considered to have preventive effects for the chronic disease associated with ROS attack. Especially, peels of *C. Jinjihyang*, *C. hassku* Hort, and premature *C. unshiu* are expected to be applicable as the ingredients of functional foods related to antioxidative properties.



List of Table

Table 1. HPLC instrumental conditions for flavonoid analysis.	5
Table 2. Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution.	5
Table 3. Mean and relative standard deviation(RSD) of peak area and retentiotime for HPLC analysis of flavonoids.	11
Table 4. Flavonoid contents in peel extracts of four citrus species, determined by HPLC analyses.	14
Table 5. Antioxidant activity of flavonoids using stable radical scavenging effect.	19
Table 6. Antioxidant activity of extracts from citrus peel using stable radical scavenging effect	24



List of Figure

Figure 1. Maximum UV-Visible absorption wavelengths of each flavonoid compound.	4
Figure 2. HPLC chromatogram for flavonoid analyses.	6
Figure 3. Concentrations of total polyphenolic compounds in ethanol extracts from four citrus species.	10
Figure 4. Calibration curves for HPLC analyses..	12
Figure 5. HPLC chromatogram of H1.	14
Figure 6. HPLC chromatogram of K1.	15
Figure 7. HPLC chromatogram of I1.	15
Figure 8. HPLC chromatogram of M1.	16
Figure 9. Dose-dependent scavenging effect on DPPH Radical by flavonoids.	20
Figure 10. Dose-dependent scavenging effect on nitric oxide by flavonoids.	20
Figure 11. Dose-dependent scavenging effect on xanthine oxidase by flavonoids.	21
Figure 12. Dose-dependent scavenging effect on superoxide by flavonoids.	21
Figure 13. Effect of ethanol extract from citrus- H1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells.	26
Figure 14. Effect of ethanol extract from citrus- I1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells	26
Figure 15. Effect of ethanol extract from citrus-M1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells.	27
Figure 16. Effect of ethanol extract from citrus-K1 on the intracellular ROS content	



I. 서론

감귤에 많이 함유되어 있는 polyphenol 류는 두 개 이상의 벤젠고리에 수산기가 결합된 화학 구조를 갖고 있는 성분의 총칭으로 flavonoids, phenolic acids, coumarins, lignans 등이 포함된다.⁴¹⁾ Flavonoids는 일반적으로 benzo- π -pyrene 구조에 의해 특징 지워지는 폐놀성 화합물이며, 각각 다른 flavonoids는 flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, catechins, 그리고 anthocyanidins 등으로 분류된다.¹²⁾ 현재까지 감귤류를 포함한 citrus fruit으로부터 약 60여종의 flavonoid가 분리되었으며, 새로운 생리활성 성분이 계속해서 발견되고 있다.⁴⁶⁾ Citrus fruits에는 rutin, deosmine과 같은 일반적인 flavonoid와 hesperidin, naringin과 같은 citrus fruit 특유의 flavonoid, 그리고 채소나 과일에서는 보고되지 않은 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin과 같은 flavonoid가 함유되어 있다. 최근 tangeretin이 암세포의 침윤 및 전이 방지, 암세포의 apoptosis 유도, 백혈병 세포의 분화 촉진 등에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.¹³⁾ 또한 감귤류 flavonoid의 기능성에 대한 연구 결과, 항산화 작용, 고지혈증 억제작용, 중성지방 합성 효소인 phosphatidate phosphohydrolase 활성 억제, 지방간 억제작용 등이 보고되고 있다.

이밖에도 감귤에는 carotenoids, vitamin C 및 vitamin E가 풍부하다. Hwang 등³¹⁾의 연구에 의하면 *Citrus unshiu* Marc.종 감귤의 총 carotenoids 함량은 과피는 7.0 mg/(mg/100g), 과육은 1.5 mg/(mg/100g)이며, 총 carotenoids에 대한 개별 carotenoid들의 조성 함량(%)은 과피의 경우 violaxanthin 30%, β -cryptoxanthin 20%, β -carotene 1% 등으로 나타났다. β -cryptoxanthin은 포도나 레몬, 오렌지에는 거의 포함되어 있지 않는 성분이라고 한다. Crystal 등⁴⁸⁾의 carotenoids 섭취와 폐암과의 상관관계를 알아본 cohort study에서 β -cryptoxanthin을 하루 56 μ g 이상 섭취한 사람들은 그렇지 않은 사람에 비해 폐암에 걸릴 확률이 22% 감소한다고 보고하였다.

특히, 감귤류 과피의 주성분중 하나인 flavonoids는 심장순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증, 항바이러스작용, 모세혈관 강화작용 등에 대한 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{47,10,16,17,19,21,23,27)} 예를 들어, 헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 모세혈관 강화,

투과성(Permeability) 감소, 혈압 강하, 혈중 콜레스테롤 강하, 항혈소판 응집 (Antiplatelet aggregation), 항염증 및 항바이러스 활성을 가진다고 알려져 있고,⁴⁵⁾ 바 이오플라보노이드는 항산화, 혈압강하, 항암 및 항바이러스 작용을 한다고 알려져 있다.⁴⁹⁾ 또 나린제닌 및 나린진은 콜레스테롤 강하, 항암 및 항위궤양 (알콜로부터 보호) 작용을 한다고 알려져 있다.⁴⁴⁾ 또한, 감귤의 과피와 씨에는 리모노이드계 물질이 존재 하는데 이들이 항암활성을 갖고 있다는 사실도 밝혀져 있다.⁴⁰⁾

그 외에도 감귤 과피에서 essential oils은 hydrocarbones (terpenes), oxygen (alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, esthers, lactones), 그리고 sulfur(sulfides, disulfides, trisulfides) 등의 유기물을 포함하고 있다.⁷⁾ 이러한 감귤의 정유는 감귤 과피의 flavedo zone에 있으며, flavedo zone은 천연 wax 층으로 덮인 유실(油室)을 포함 하는 매우 compact한 구조를 보여 준다.¹⁵⁾ 동일 감귤 종 내에서도 기후, 풍토, 과실의 속도, 저장기간 등에 따라 성분의 변화가 있으며,³⁸⁾ 살균, 살충 효과 같은 다양한 생물 활성을 가지고 있다.¹⁵⁾

본 연구는 제주산 감귤류에 함유된 flavonoid 성분들을 추출하여 flavonoid의 종류와 함량을 분석하고, 또한 이들의 항산화 효과를 파악하기 위한 목적으로 수행되었다. 이를 위해 항산화능의 변화가 어떠한 기능성을 나타내는지에 대해 세포 수준에서 비교, 관찰함으로써 감귤 과피가 항산화, 항노화 효과와 관련된 기능성 식품 원료로 활용 가능한지를 다각적으로 검토하였다.

II. 실험 방법

1. Flavonoid의 추출

Flavonoid 성분을 추출하기 위하여 사용된 제주산 감귤류는 온주밀감(*Citrus unshiu*), 진지향(*C. unshiu* x (*C. sinensis* x *C. unshiu*)), 팔삭(*C. hassku* Hort.), 온주 미성숙과(*C. unshiu* ; Unripe Citrus) 4종으로, 시료로 사용한 감귤류는 각각 I-1(진지향), M-1(팔삭), K-1(온주 미성숙과), H-1(온주 밀감)로 코드화 하였다.

감귤 과피 중의 flavonoid 류는 감귤 과피를 동결건조 후 분쇄기로 갈아 미세분말로 만든 후 이를 70% 에탄올로 실온에서 1주일 간 침적 시켜 추출하였다. 침적 후 잔사를 제거한 여액은 감압 및 진공건조를 거쳐 농축시켰고, 동결 건조기를 사용하여 잔여 수분을 제거한 후 최종적으로 분말시료를 얻어 내어 시료로 사용하였다.

2. 폴리페놀화합물 함량의 분석

폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형시켜 측정하였다.²⁸⁾ 먼저 폴리페놀 화합물 함량 정량을 위한 검량선을 tannic acid (Sigma) 표준용액을 사용하여 작성하였다. 검량선 작성용 표준용액은 tannic acid 1 mg을 50% 메탄올용액 1 mL에 녹여 먼저 저장용액(stock solution)을 조제하고, 이를 최종농도가 0, 32.5, 75, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 묽혀 사용하였다. 그리고 UV-Visible spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 시료의 폴리페놀 화합물 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 먼저 감귤과피 추출물을 1 mg/mL 농도로 ethanol:PBS의 비율이 1:1인 용매에 녹인 다음, 이 용액 0.2 mL를 시험관에 취하여 증류수로 2 mL로 희석하였다. 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma)를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분 간 실온에 방치하였다. 이 용액에 2 M Na_2CO_3 용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고, 다시 증류수로 4 mL가 되도록 묽히고 실온에서 1시간 방치한 후 상등액을 취하여, 이 용액의 흡광도를 725 nm에서 위와 동일한 방법으로 측정하고, 앞에서 작성한 검량선으로부터 폴리페놀 화합물 함량을 측정하였다.

3. Flavonoid 함량 분석

1) 표준시약 조제 및 시료의 전처리

Flavonoids 분석을 위해 온주밀감, 진지향, 온주 미성숙과, 팔삭 4종을 과육과 과피로 분리한 후 동결 건조하고, 이중 건조된 과피를 70 % EtOH로 추출한 후 농축하였다. 각각의 농축된 시료 1 g을 10 mL의 MeOH로 녹인 후, 0.45 μ m syringe filter (MFS, MFS-25, 25 mm)로 입자를 거르고, 여액을 flavonoid 분석용 시료로 이용하였다. HPLC 분석용 표준물질로는 Sigma사의 rutin hydrate, ferulic acid, naringin, hesperidin, quercetin, naringenin, hesperetin 특급 시약을 사용하였고, tangeretin은 Wako사 특급시약을 사용하였다.

2) HPLC의 검출 파장 선택

HPLC 분석에서 flavonoid 함량 분석을 위한 검출파장은 분석감도를 높이기 위하여, 사전에 UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 각 flavonoids 표준물질의 최대흡광파장을 측정된 후 이 파장을 선택하였다(Figure 1). 이 때 각 flavonoid 표준물질의 흡수파장은 rutin hydrate 255 nm, ferulic acid 320 nm, naringin과 hesperidin 280 nm, quercetin 357 nm, naringenin과 hesperetin 287 nm, 그리고 tangeretin은 287 nm이었다.

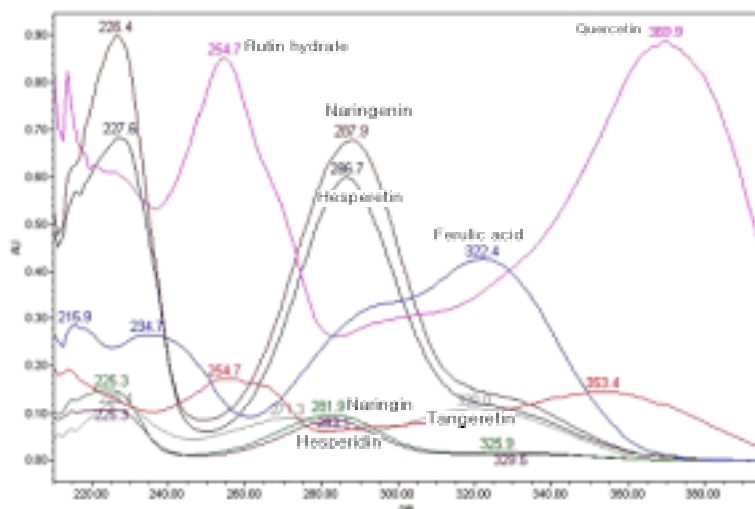


Figure 1. Maximum UV-Visible absorption wavelengths of each flavonoid compound.

3) HPLC 분석 조건

감귤과피의 70% EtOH 추출물 중 flavonoid 류 성분 분석에는 Waters사의 HPLC (waters 2695)를 이용하였다. HPLC 분석에서 용리액은 acetonitrile 1,000 mL에 acetic acid 5 mL를 혼합한 용액과 초순수 1,000 mL에 acetic acid 5 mL를 혼합한 용액 두 종류를 사용하였고, 기울기 용리법으로 분리하였다. 이때 flavonoid 성분 분석을 위한 HPLC 기기조건을 Table 1에 나타내었고, 이동상의 기울기 용리 조건을 Table 2에 수록하였다. 또 이러한 분석조건으로 분리된 8종의 flavonoid 표준물질의 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다.

Table 1. HPLC instrumental conditions for flavonoid analysis.

HPLC	Waters Alliance system, Waters 2695
Column	Atlantis dC-18 (3.9 × 150 mm ID. 5
Detector	um)Photodiode array Detector
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μ l
Column Temp	25 $^{\circ}$ C
Sample Temp	10 $^{\circ}$ C

Table 2. Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution.

Program order	Time(min)	Acetonitrile(%)	Water(%)
1	0	20	80
2	10	20	80
3	11	45	55
4	16	45	55
5	17	75	25
6	20	75	25
7	21	20	80
8	22	20	80

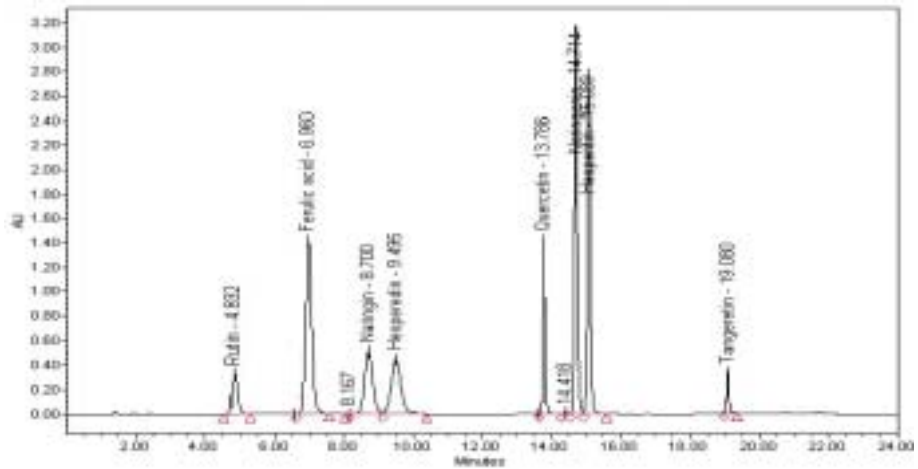


Figure 2. HPLC chromatogram for flavonoid analyses.

4. 항산화 실험



1) 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다.⁹⁾ 즉, 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료 각각을 96 well plate에 100 μ l씩 분주하고 0.4 mM DPPH용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 대조군으로는 ascorbic acid, butylated hydroxy anisole(BHA), trolox를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 아래의 식으로부터 산출하였고, DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료별로 3회 반복 실험 후 평균값을 구하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sampl}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A_{sample} = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

A_{control} = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

2) Nitric oxide 소거 활성 측정

자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거 활성을 검색하였다.^{26,42)} 10 mM SNP 용액 200 μ l에 시료를 농도별로 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess시약 [2.5% (v/v) phosphoric acid에서 1% (w/v) sulfanilamide와 0.1% (w/v) naphylethylenediamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 nitric oxide 소거활성을 산출하였다. Nitric oxide 소거활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

3) Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성 측정

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다.¹⁴⁾ 반응액은 각 농도별 각 시료와 0.5 mM xanthine, 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 μ l로 용해한 1 mM EDTA를 준비하였고, 이때 enzyme으로 50 mU/ml xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였다.

5. 산화적 스트레스에 대한 보호 효과

1) 세포배양

본 연구에서는 간세포주인 HepG2 세포를 사용하였으며, 세포는 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's minimal essential medium(D-MEM)을 사용하여 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 배양기에서 배양하였고, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

2) 세포내에서의 ROS 측정

감귤 과피 에탄올 추출물들은 여러 농도(62.5, 125, 250, 500, 1000 ug/ml)에 따라 처리하여 분획물의 항산화 활성(anitoxidant activity)을 검증하였다.

먼저 HepG2 간세포주를 영양결핍배지에서 24 시간동안 배양한 후에 각각의 분획물들을 1시간동안 전처리하고, 그 다음으로 H_2O_2 (5 mM)를 처리하였다. 과산화수소(hydrogen peroxide) 처리 후 15분 후에 세포내 활성산소물질 (reactive oxygen species, ROS)의 함량변화를 측정하였다.

형광표지인자인 H_2DCFDA (2'-7'-dichlorofluoresin diacetate)를 사용하여 세포내에 과산화수소(hydrogen peroxide)가 있을 경우에 발광하는 형광의 세기를 ROS의 지표로 간주하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Flavonoid 추출 및 총 폴리페놀화합물 함량

본 연구에서 flavonoid 추출을 위해 사용한 감귤류 시료는 농약 처리를 하지 않은 감귤류, 또는 인체에 무해한 저공해 농약이나 생물학적 방제제를 이용한 감귤류이며, 이 감귤의 과피를 사용하였다. 시료용 감귤 과피는 완숙과인 팔삭, 진지향, 온주밀감, 적과 시기(7월경)의 시료인 온주 미성숙과를 사용하였다. 이들 4종의 감귤 과피를 사용하여 앞에서 기술한 방법으로 추출한 조추출물 상에서의 수율은 온주밀감(H1)이 31%, 진지향(I1)이 29%, 팔삭(M1)은 32%, 온주 미성숙과(M1)는 약 15%이었다.

페놀성 물질은 식물계에서 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질이 있으며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 갖는다.⁵²⁾ 본 연구에서는 tannic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하고, 이로부터 위의 4종 제주산 감귤 과피의 조추출물 중 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 그 결과를 Figure 3에 나타내었다.

결과에서 보는 바와 같이 총 폴리페놀 함량은 온주밀감이 7.25%, 진지향이 11.04%, 팔삭이 7.86%, 온주 미숙과가 16.73%로 나타났으며, 그 중 가장 높은 폴리페놀 함량을 보인 품종은 온주 미성숙과였다. 그러나 이러한 총 폴리페놀 함량은 품종과 수확시기에 따라 다소 큰 차이를 보였는데, 대체적으로 수확시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 보였다. 특히 온주밀감의 경우 수확시기가 늦어짐에 따라 미숙과에 비해 17% ~ 5.66% 정도 낮은 함량을 나타내었다.

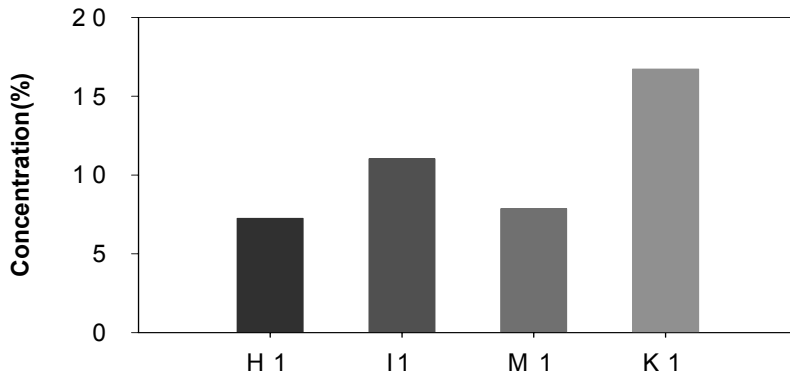


Figure 3. Concentrations of total polyphenolic compounds in ethanol extracts from four citrus species.

2. Flavonoid의 HPLC 분석



1) HPLC의 검량선 및 재현성 조사

HPLC에 의한 flavonoid 류 정량분석을 위해 작성한 검량선을 Figure 4에 나타내었다. 이때 표준용액의 농도 범위는 rutin hydrate, naringin, hesperidin은 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml, ferulic acid, quercetin, naringenin, hesperitin은 각각 0.01, 0.1, 0.5 mg/ml, tangeretin은 각각 0.001, 0.01, 0.05, 0.1mg/mL이다. 결과에서 보는 것처럼 각 flavonoid의 HPLC 분석 검량선은 0.9994 ~ 1 범위로 높은 상관성을 나타내었다.

또 각 flavonoid 표준용액 중 0.5 mg/mL의 농도를 기준으로 5회에 걸쳐 반복 분석한 상대표준편차를 Table 3에 수록하였다. 표에서 보는 바와 같이 피크면적의 상대표준편차는 tangeretin이 0.59 %로 가장 작고 ferulic acid가 1.81 %로 가장 큰 것으로 조사되었다. 또한 머무름 시간의 상대표준편차는 tangeretin이 0.05 %로 가장 작고 naringin이 1.20 %로 가장 큰 값을 보였다. 이처럼 flavonoid 표준용액을 사용하여 HPLC 분석에서의 농도와 머무름 시간에 대한 재현성을 측정해 본 결과 모든 성분들이 대체적으로 양호한 결과를 나타내는 것으로 조사되었다.

Table 3. Mean and relative standard deviation(RSD) of peak area and retention time for HPLC analysis of flavonoids.

	Peak area		Retention time(min)	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
Rutin hydrate	18.0×10^5	1.39	4.823	0.77
Ferulic acid	52.3×10^5	1.81	6.922	0.72
Naringin	15.5×10^5	1.45	8.609	1.20
Hesperidin	14.8×10^5	0.72	9.421	0.99
Quercetin	32.4×10^5	0.81	13.788	0.07
Naringenin	36.5×10^5	0.84	14.715	0.09
Hesperetin	35.8×10^5	1.12	15.091	0.09
Tangeretin	4.5×10^5	0.59	19.081	0.05



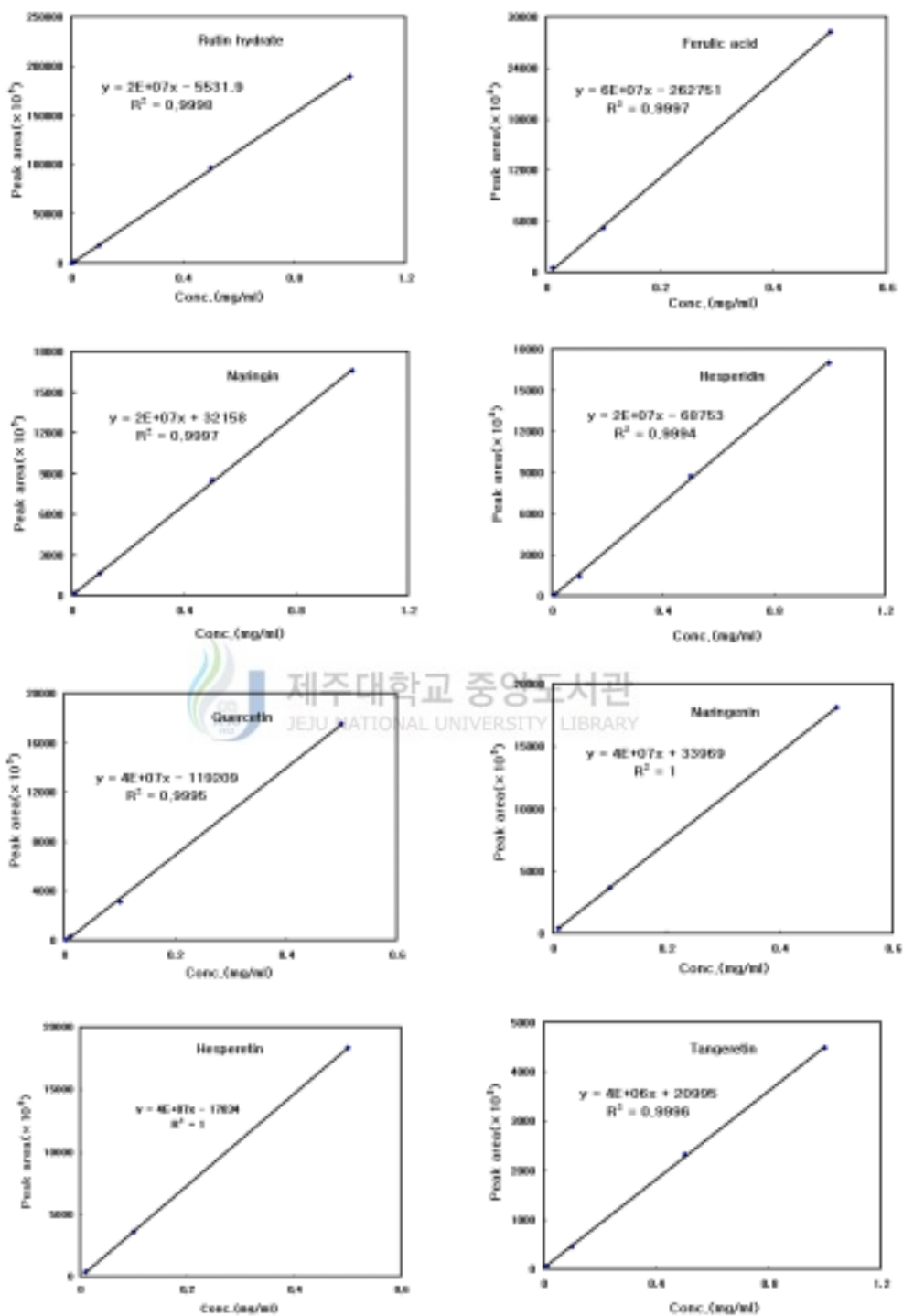


Figure 4. Calibration curves for HPLC analyses.

2) Flavonoid 함량 분석 결과

감귤 과피에 비교적 다량으로 함유되어 있다고 보고된 flavonoid 성분은 rutin hydrate, ferulic acid, naringin, hesperidin, quercetin, naringenin, hesperetin, tangeretin 등이다. 본 연구에서도 이들 8종의 flavonoid를 중심으로 감귤 과피 중의 함량을 HPLC로 분석하였다. 4종의 제주산 감귤 과피에서 flavonoid의 함량을 분석한 결과를 Table 4에 요약하였다. 또 HPLC 분석 시 이들 시료들의 chromatogram을 Figure 5 ~ Figure 8에 나타내었다.

분석 결과에서 보인 바와 같이 감귤 과피에서 추출한 조추출물 중의 flavonoid 함량을 비교해 보면, rutin hydrate는 진지향이나 온주밀감에서는 극미량으로 검출되었으나, 팔삭에서는 0.24 mg/g, 온주 미성숙과에서 0.82 mg/g으로 이들 2종에 상대적으로 많은 양이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 또 ferulic acid는 진지향에서 0.73 mg/g, 온주 미성숙과에서 2.78 mg/g으로 온주 미성숙과에서 가장 높게 검출되었으며, naringin은 온주밀감에서만 47.68 mg/g로 아주 높은 함량을 나타내었다. Hesperidin 분석 결과에서는 진지향에서 5.57 mg/g, 온주 미성숙과에서 8.40 mg/g의 함량을 보인 반면, 팔삭에서는 43.80 mg/g로 가장 높게 함유량을 나타내었다. 또한 naringenin의 함량을 보면, 팔삭에서 0.08 mg/g, 진지향에서 0.08 mg/g, 온주밀감에서 0.01 mg/g, 온주 미성숙과에서 0.71 mg/g의 함량을 나타내어 대체적으로 모든 감귤류에서 낮은 편이나 온주 미성숙과에서는 비교적 높은 농도를 나타내었다. 그리고 hesperetin 성분은 팔삭에서 0.20 mg/g, 진지향에서 0.07 mg/g, 온주밀감에서 0.24 mg/g, 온주 미성숙과에서 0.18 mg/g의 함량을 나타내었고, tangeretin은 팔삭에서 0.18 mg/g, 온주밀감에서 0.46 mg/g, 온주 미성숙과에서 0.25 mg/g으로 대체적으로 비슷한 수준의 함량을 보였으나, 진지향에서는 0.93 mg/g으로 상대적으로 높은 함량을 보였다. 반면에 quercetin의 경우 모든 감귤류에서 검출한계 이하의 농도를 보이는 것으로 조사되었다.

Table 4. Flavonoid contents in peel extracts of four citrus species, determined by HPLC analyses.

Code	Flavonoid contents (mg/g)							
	RT (255nm)	FA (320nm)	NG (280nm)	HD (280nm)	QC (357nm)	NGN (287nm)	HT (287nm)	TG (320nm)
M1	0.24	-	-	43.80	-	0.08	0.20	0.18
I1	-	0.73	-	5.57	-	0.08	0.07	0.93
H1	-	-	47.68	-	-	0.01	0.24	0.46
K1	0.82	2.78	-	8.40	-	0.71	0.18	0.25

RT : Rutin hydrate, FA : Ferulic acid, NG : Naringin, HD : Hesperidin, QC : Quercetin, NGN : Naringenin, HT : Hesperetin, TG : Tangeretin

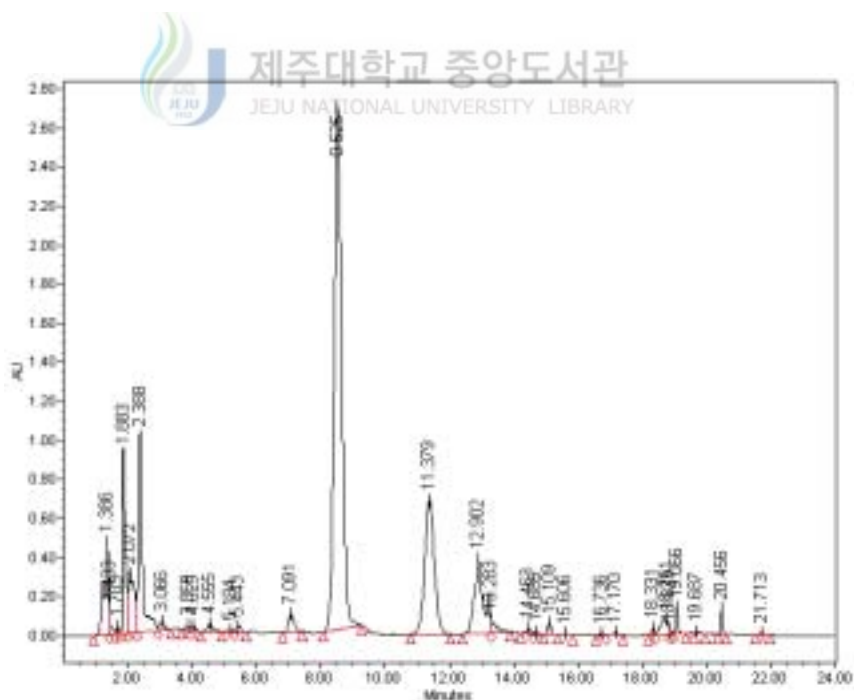


Figure 5. HPLC chromatogram of H1

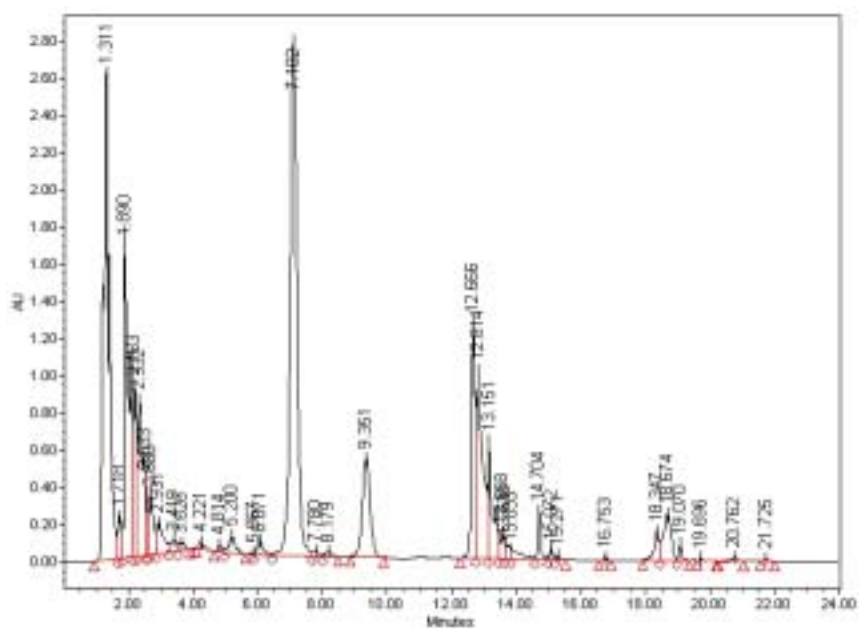


Figure 6. HPLC chromatogram of K1

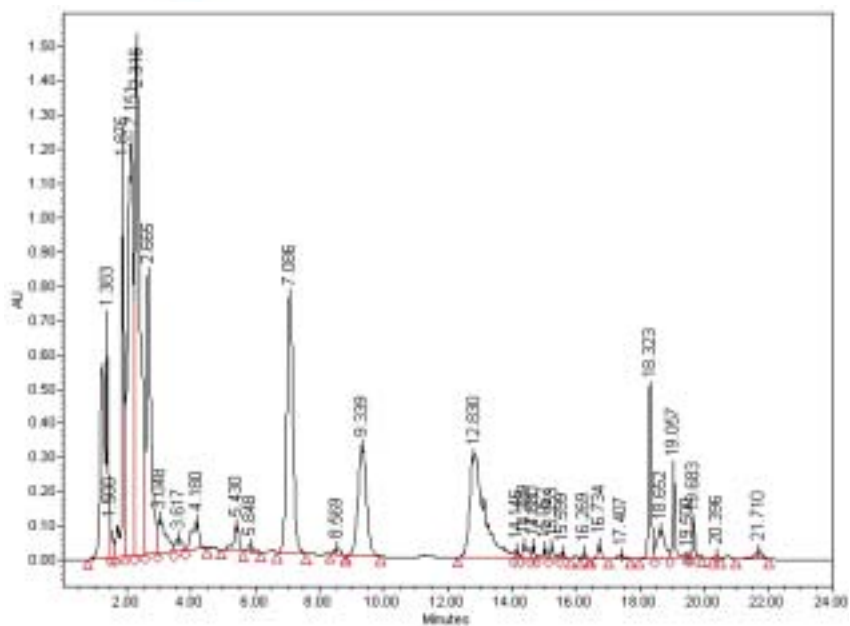


Figure 7. HPLC chromatogram of I1

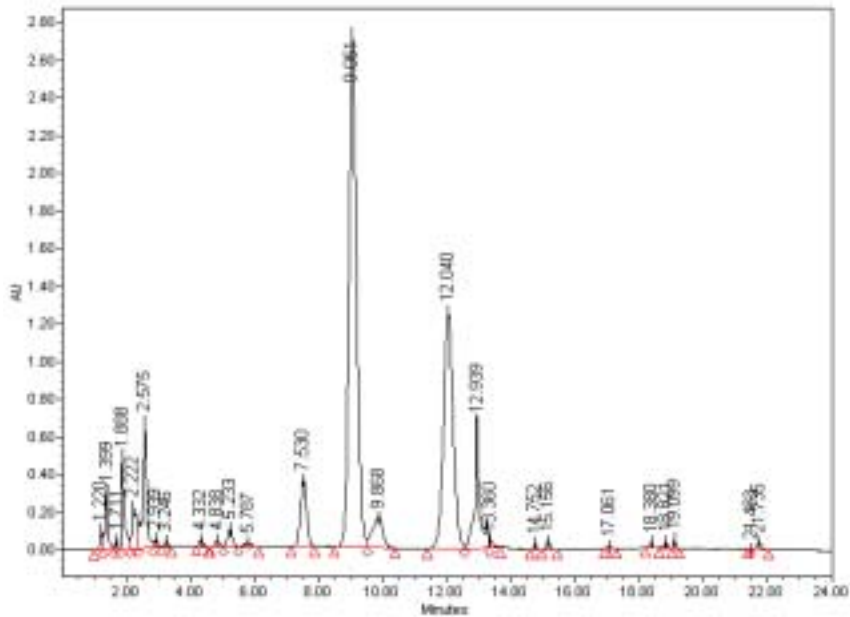


Figure 8. HPLC chromatogram of M1



3. 항산화 활성

1) Flavonoid 표준물질의 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine(μ -phenylenediamine, μ -aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다.⁹⁾

8종의 flavonoid 표준물질을 시료로 사용하여 DPPH의 free radical 소거 활성법으로 항산화 활성을 측정한 결과를 Table 5와 Figure 9에 나타내었다. 결과에서 보듯이 각 flavonoid의 IC₅₀ 값은 rutin hydrate가 22.4 μ M, ferulic acid가 107.8 μ M, quercetin이 18.7 μ M, naringenin이 132.2 μ M, hesperetin이 409.5 μ M로 나타났으며, 비교적 높은 radical 소거 활성을 보이는 것으로 조사되었다. 특히, 비교 대상인 이들 flavonoid들 중 rutin hydrate와 quercetin은 대조군으로 사용한 ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), trolox와 거의 동등한 수준의 높은 DPPH의 free radical 소거 활성을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 naringin, hesperidin, tangeretin의 경우는 IC₅₀ 값이 1,000 μ M 이상으로 DPPH의 free radical 소거 활성이 그리 높지 않은 것으로 확인되었다.

(2) Nitric oxide 생성저해 활성

질소산화물(NO)은 활성종으로서 세포독성이 강하며 다량의 NO가 생성되면 nitroization, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 특히 대식세포가 활성화 되면서 생성되는 NO는 주위조직에 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 NO의 반감기는 6 ~ 10초로 대단히 짧기 때문에 실질적으로 직접적으로 검출하는데 많은 어려움이 따른다. 때문에 대부분의 NO 측정을 위한 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 nitrite, nitrate를 측정하는 간접적인 방법으로 이루어지고 있다.⁵²⁾

본 연구에서 flavonoid의 nitric oxide 생성저해 활성은, nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 아질산염(nitrite)의 양을 측정하는 방법으로 nitric oxide 소거활성을 산출하였다. 이러한 방법으로 각 시료의 마우스 간균질화물에 대한 지질과산화물생성 저해 활성 결과를 Table 5에 나타내었다. 측정 결과, 각 flavonoid의 IC₅₀ 값은 모두 1,000 μ M 이상으로 나타났고, 본 연구에서 이용된 8종 flavonoid의 경우, nitric oxide 생성저해 활성이 그다지 높지 않은 것으로 평가되었다. 그러나 Figure 10의 결과에서 보듯이 이들 flavonoid 중 rutin hydrate의 경우는 다소나마 농도 의존적으로 nitric oxide 생성저해 활성이 증가하는 경향을 보이는 것으로 조사되었다.

(3) Xanthine oxidase 억제 활성

Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Uric acid의 축적은 고요산혈증과 통풍을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 uric acid 형성의 억제제가 이들 질환을 위한 치료 물질로서 유용할 것이다. 더욱이 xanthine oxidase에 의해 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래한다.¹⁴⁾ 따라서 산소 유리기의 자유기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것이다. 통풍은 이러한 uric acid의 수치가 높아지면서 일어나며, 이들이 결정체를 이루어 관절에 흡착하면 염증을 유발하고, 심한 경우 신장이나 심장 등에 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다. Xanthine oxidase 저해제는 통풍, 신장결석, 허혈, 심근증을 일으키는 요산혈증에 대한 치료제로 사용되어 왔으며 통풍치료에 사용되는 물질로는 allopurinol, alloxanthine 등이 알려져 있다.

Flavonoid의 xanthine oxidase 활성 억제에 대한 결과를 Table 5에 나타내었다. 각 flavonoid의 IC₅₀ 값은 rutin hydrate가 12.0 μM, ferulic acid가 622.3 μM, quercetin이 3.92 μM, naringenin이 305.0 μM, hesperetin이 285.5 μM로 나타났으며, 비교적 높은 xanthine oxidase 활성 억제를 나타내었다. 특히, Figure 11과 Table 5에서 보는 바와 같이 rutin hydrate, quercetin의 경우 대조군으로 사용한 allopurinol과 유사한 xanthine oxidase 활성 억제를 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 DPPH free radical 소거활성에서와 마찬가지로 naringin, hesperidin, tangeretin 성분들의 경우, IC₅₀ 값이 1,000 μM 이상으로 활성 억제 효과가 그다지 크지 않은 것으로 조사되었다.

(4) Superoxide 소거 활성

정상적인 oxidative phosphorylation 과정 동안에 소모되는 전체 산소의 0.4 ~ 4 % 정도는 free radical superoxide($\cdot\text{O}_2^-$)로 전환되며, 생성된 $\cdot\text{O}_2^-$ 는 다른 reactive oxygen species(ROS)로 전환되어 직접적 또는 간접적으로 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 정상적으로는 $\cdot\text{O}_2^-$ 는 내인성 항산화 방어기전에 의해 superoxide dismutase (SOD)에 의해 빠르게 과산화수소로 전환된다.¹⁸⁾ 그러나 이 내인성 항산화 방어체계가

세포내 산화-환원 균형을 유지하는 데에 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스트레스가 일어나게 되며, 이 산화스트레스는 직접적으로 세포내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포손상을 일으키는데 중요한 역할을 한다.

이를 확인하기 위하여 본 연구에서는 앞에서 제시한 8종의 flavonoid 표준물질을 시료로 superoxide radical 소거활성 실험을 수행하였고, 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 각 flavonoid의 IC₅₀ 값은 rutin hydrate가 505.2 μM, ferulic acid가 197.2 μM, naringin이 217.8 μM, quercetin이 31.8 μM, naringenin이 285.9 μM, hesperetin이 153.1 μM로 나타나 대체적으로 이들 성분들은 활성이 양호한 것으로 나타났다. 그러나 xanthine oxidase 활성 억제 실험에서와 마찬가지로 hesperidin과 tangeretin의 경우에는 IC₅₀ 값이 1,000 μM 이상으로 나타나 활성이 낮은 것으로 조사되었다(Table 5와 Figure 12).

Table 5. Antioxidant activity of flavonoids using stable radical scavenging effect.

Flavonoids & Compounds	^{a)} IC ₅₀ (uM)			
	DPPH scavenging	Superoxide scavenging	Nitric oxide scavenging	Xanthine oxidase inhibition
Rutin hydrate	22.4±1.10	505.2±3.2	> 1,000	12.0±84.9
Ferulic acid	107.8±0.68	197.2±0.5	> 1,000	622.3±46.7
Hesperidin	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
Naringin	> 1,000	217.8±10.2	> 1,000	> 1,000
Quercetin	18.7±1.45	31.8±1.4	> 1,000	3.92±0.45
Naringenin	132.2±16.4	285.9±22.1	> 1,000	305.0±5.7
Hesperetin	409.5±7.3	153.1±12.5	> 1,000	285.5±18.4
Tangeretin	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
Ascorbic acid	55.6±1.91	> 1,000	> 1,000	152.5±12.3
Trolox	58.4±0.88	978.2±3.2	> 1,000	422.4±45.9
^{b)} BHA	78.8±0.2	> 1,000	> 1,000	^{c)} NA
Allopurinol		4.7±1.4		6.12±0.5

^{a)} IC₅₀ values were calculated from regression lines using seven different concentrations in triplicate experiments.

^{b)} Butylated hydroxy anisol

^{c)} NA : not available method

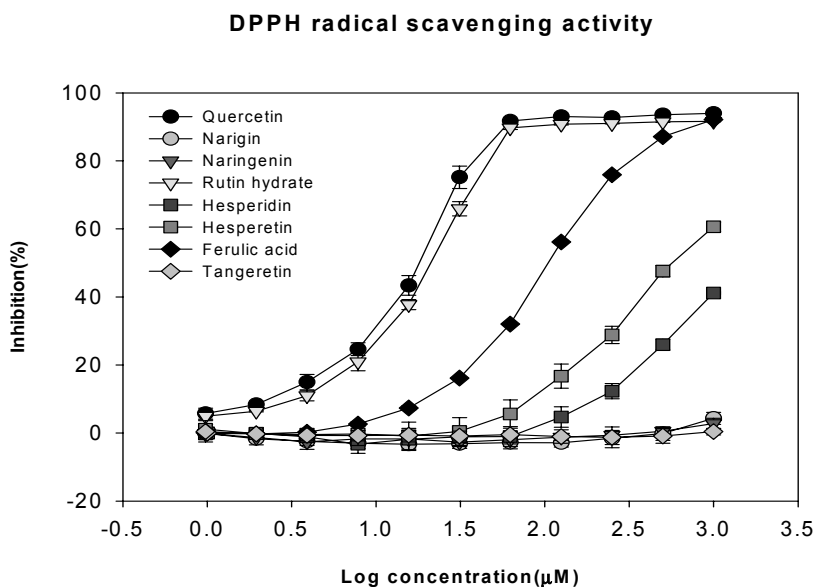


Figure 9. Dose-dependent scavenging effect on DPPH Radical by flavonoids.

The data represent the mean S.D. of three determinations.

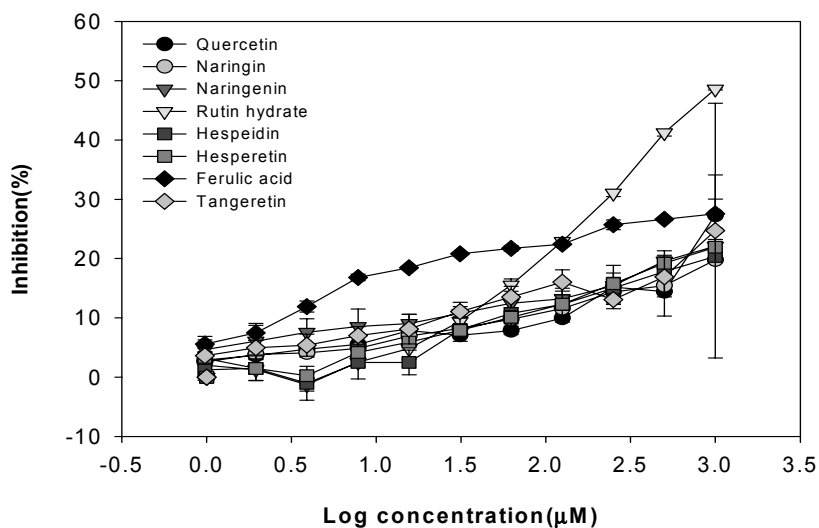
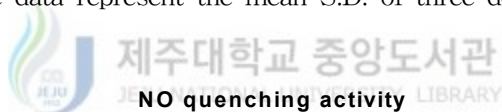


Figure 10. Dose-dependent scavenging effect on nitric oxide by flavonoids.

The data represent the mean S.D. of three determinations

Uric acid scavenging activity

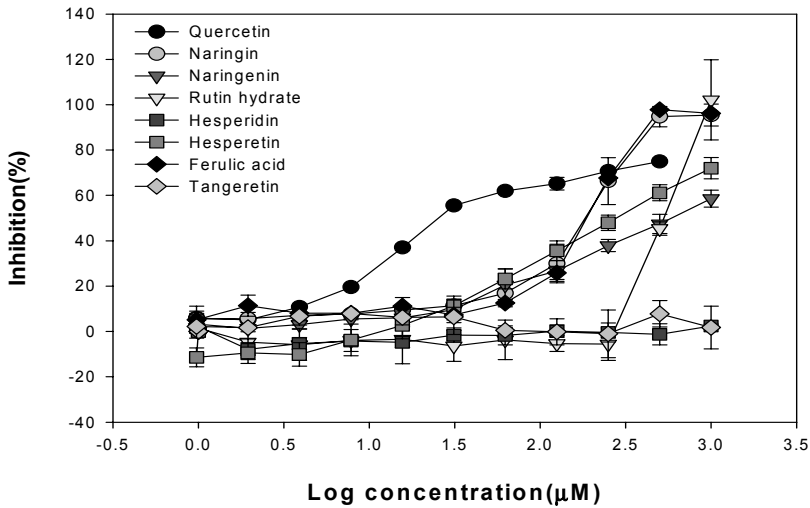


Figure 11. Dose-dependent inhibition effect on Xanthine oxidase by flavonoids.

The data represent the mean S.D. of three determinations.

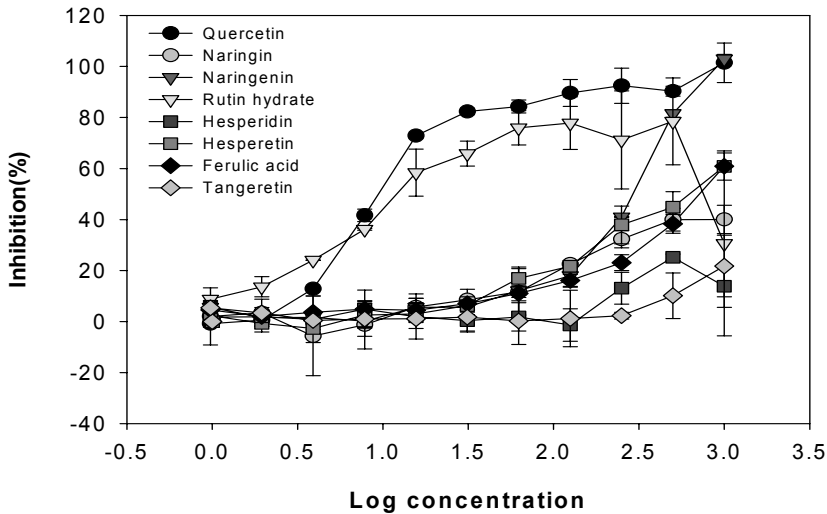


Figure 12. Dose-dependent scavenging effect on superoxide radical by flavonoids.

The data represent the mean S.D. of three determinations.

2) 제주산 감귤과피 추출물의 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

앞에서 flavonoid 표준물질을 사용했을 때와 동일한 방법으로, 제주산 감귤 과피 추출물을 시료로 사용하여 DPPH radical 소거 활성법으로 항산화 활성을 측정하였다. 그리고 그 결과를 Table 6에 수록하였다. 결과에서 보듯이, 측정 대상인 4종의 제주산 감귤의 IC₅₀ 값은 진지향이 104.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 온주 미성숙과가 132.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 온주 밀감이 215.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 비교적 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮은 팔삭 609.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 순으로 조사되었다. 이러한 결과는 비교물질로 사용한 BHA나 trolox와 같이 아주 좋은 소거 활성을 나타내지는 않았지만, 단일 물질이 아닌 감귤 과피의 조추출물임을 감안한다면 충분히 소거 활성이 있고, 특히 진지향의 경우 우수한 소거 활성을 보인다고 판단되어 진다.



(2) Nitric oxide 생성저해 활성

감귤과피 추출물 시료의 nitric oxide 생성저해 활성은 앞에서와 동일한 방법으로 nitric oxide를 생성하는 sodium nitroprusside(SNP)를 사용하여 아질산염의 양으로 nitric oxide 소거활성을 산출하였다.

각 시료의 마우스 간균질화물에 대한 지질과산화물생성 저해 활성 결과를 Table 6에 나타내었다. 측정 결과, 각 감귤류의 IC₅₀ 값은 온주 미성숙과가 214.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 팔삭이 785.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 진지향이 957.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났고, 특히 온주 미성숙과인 경우 실험에 사용된 감귤류 중 가장 좋은 활성을 보였으나 온주 밀감의 경우 IC₅₀ 값이 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 넘어 비교적 nitric oxide 소거 활성을 보이지 않았다.

그러나 BHA나 trolox가 nitric oxide 소거 활성이 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 넘는 것으로 보아 실험에서 연구된 감귤 과피의 조추출물은 nitric oxide 소거 활성이 비교적 좋은 것으로 판단되어 진다.

(3) Xanthine oxidase 억제 활성

Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다 따라서 최종적으로 발생하는 uric acid의 양을 정량하여 xanthine oxidase의 저해 효과를 알아보았다.

제주산 감귤 과피 에탄올 추출물 시료의 xanthine oxidase 활성 억제에 대한 결과를 Table 6에 나타내었다. 실험 결과, IC₅₀ 값은 온주 미성숙과가 189.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 진지향이 243.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 온주 밀감이 278.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 마지막으로 팔삭이 457.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 온주 미성숙과가 가장 높은 xanthine oxidase 활성 억제를 나타냈으며 온주밀감과 진지향에서도 비교적 높은 활성 억제력을 보여주었다. xanthine oxidase 활성 억제가 가장 좋았던 온주미성숙과에서의 IC₅₀ 값은 189.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, xanthine oxidase 활성 억제에 대한 이들의 활성 순서는 DPPH radical 소거 활성 순서와는 달리 온주미성숙과 > 진지향 > 온주밀감 > 팔삭 순이었다.



(4) Superoxide 소거 활성

제주산 감귤과피 에탄올 추출물 시료의 Superoxide radical 소거활성에 대한 결과를 Table 6에 나타내었다. 실험 결과, IC₅₀ 값은 온주 미성숙과가 67.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 온주 밀감이 109.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 진지향이 197.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 마지막으로 팔삭이 241.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 낮은 소거 활성을 나타내었다. 이들의 활성은 온주미성숙과 > 온주밀감 > 진지향 > 팔삭 순이었다.

특히 온주 미성숙과인 경우는 항산화의 활성이 좋기로 알려진 trolox의 IC₅₀ 값 59.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 비교적 동등한 superoxide 소거 활성을 갖는 것으로 조사되었다.

Table 6. Antioxidant activity of extracts from citrus peel using stable radical scavenging effect.

	^{a)} IC ₅₀ (μ g/ml)			
	DPPH scavenging	Superoxide scavenging	Nitric oxide scavenging	Xanthine oxidase inhibition
I1	104.4 \pm 15.8	197.1 \pm 84.9	957.5 \pm 40.0	243.7 \pm 125.7
M1	609.8 \pm 84.2	241.4 \pm 77.0	785.5 \pm 50.0	457.4 \pm 14.9
K1	132.2 \pm 16.4	67.1 \pm 16.9	214.8 \pm 23.0	189.5 \pm 16.2
H1	215.2 \pm 10.6	109.5 \pm 18.4	> 1000	278.7 \pm 12.8
Trolox	11.2 \pm 0.6	59.5 \pm 15.5	> 1000	144.7 \pm 0.6
^{b)} BHA	6.8 \pm 0.0	NA	> 1000	^{c)} NA
Allopurinol		1.2 \pm 0.8		1.6 \pm 0.1
Quercetin		1.4 \pm 0.9(μ M)	> 1000(μ M)	3.2 \pm 0.2(μ M)

^{a)} IC₅₀ values were calculated from regression lines using seven different concentrations in triplicate experiments.

^{b)} Butylated hydroxy anisol

^{c)} NA : not available method

5. HepG2 세포에서의 항산화 활성

의학의 발달 및 영양상태 개선 등으로 우리나라의 평균수명이 10년 전에 비해 5세 이상 증가하여 75.55세에 이르고 있다.⁴⁾ 그리고 65세 이상의 노년인구 또한 전체 인구의 7.5%로 이제 단순히 오래 사는 것만이 아니라 건강하고 행복하게 사는 것이 사람들의 주된 관심사가 되고 있다⁵⁾. 그러나 이러한 평균수명 연장과 함께 비만 및 당뇨병, 악성 신생물, 뇌혈관 질환, 심장질환 등의 만성 퇴행성 질환도 증가하고 있으며, 이러한 만성 퇴행성 질환들은 자유기에 의한 산화적 손상과 관련 있다는 연구들이 보고되고 있다.⁶⁾ 인간의 세포는 산화된 식품의 섭취와 산소 호흡으로 인한 생체 내 대사과정 중에 발생된 여러 종류의 유리 radical, 오염물질 및 광선조사 등과 같은 다양한 산

화적 스트레스(oxidative stress)에 직면하고 있으며, 산화적 손상 (oxidative damage)을 유발하는 것으로 보고되고 있다.²⁹⁾ 따라서 세포내에서의 항산화 활성을 증가시키기 위한 연구는 이러한 산화적 손상 및 스트레스에 대한 생체내의 방어 시스템을 보호하고, 균형을 유지하여, 산화적 손상이 원인이 되는 각종 질환을 예방하기 위하여 필요하다. 본 연구에서는 제주산 감귤 과피 추출물을 시료로 이러한 항산화 활성을 조사하였다.

온주밀감을 포함한 제주산 감귤 과피 추출물의 항산화 활성(antioxidant activity)을 평가하기 위한 목적으로, 이들 시료를 사람의 간세포주의 일종인 HepG2 세포주에 처리하여 세포의 생존 능력을 조사하였다. 이를 위해 감귤 과피 에탄올 추출물들을 다양한 농도군(62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$)에 따라 처리하여 항산화 활성을 검증하였다.

먼저 HepG2 간세포주를 영양결핍 배지에서 24시간 동안 배양한 후에 각각의 추출물을 1시간동안 37°C, 5% CO₂에서 방치하고, 다시 H₂O₂ (5 mM)를 가하여 15분 후에 세포내 활성산소물질 (reactive oxygen species, ROS)의 함량 변화를 측정하였다. 다음으로 형광표지 인자인 H₂DCFDA(2'-7'-dichlorofluoresin diacetate)를 사용하여 세포내에 과산화수소(hydrogen peroxide)가 있을 경우에 발광하는 형광의 세기를 ROS의 지표로 간주하였다. 이러한 측정 결과를 Figure 13 ~ 16 나타내었다. 그림에서 보듯이 감귤 과피 에탄올 추출물들은 HepG2 세포에서 의미 있는 ROS 소거능을 나타내었으며, 온주밀감과 온주 미성숙과는 서로 유사한 ROS 소거능을 보였고, 팔삭과 진지향 과피 추출물은 농도 의존적인 ROS 소거능을 보였다. 특히 HepG2 세포에서의 ROS 소거 활성은 진지향 과피 추출물에서가 가장 두드러진 효과를 나타내었다 .

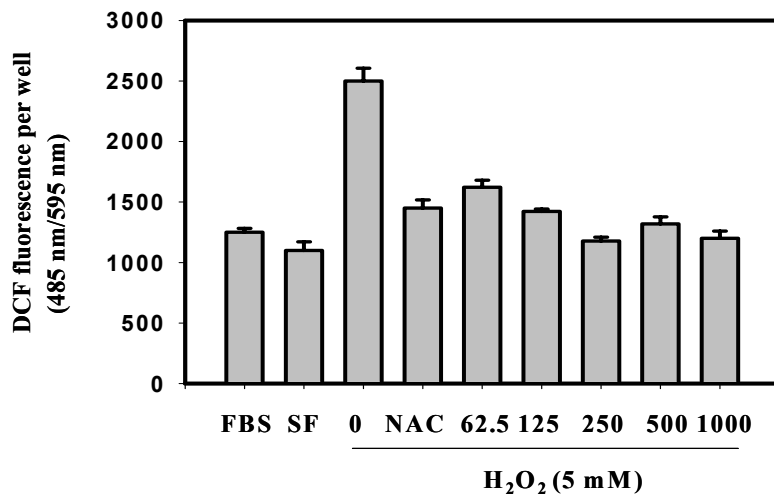


Figure 13. Effect of ethanol extract from citrus-H1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells. FBS(10 %), SF(serum-free media), N(N-acetylcysteine 1mM). H1: *C. Unshiu*.

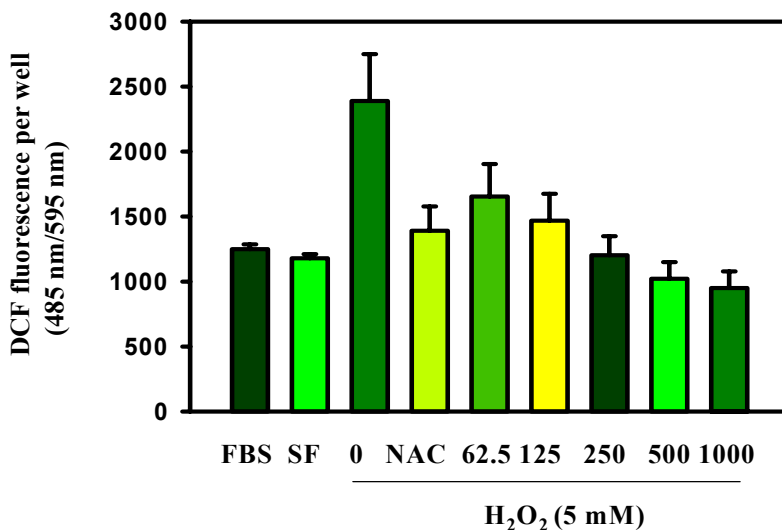


Figure 14. Effect of ethanol extract from citrus-II on the intracellular ROS content in HepG2 cells. FBS(10 %), SF(serum-free media), N(N-acetylcysteine 1mM). II: *C. unshiu* x (*C. sinensis* x *C. unshiu*)

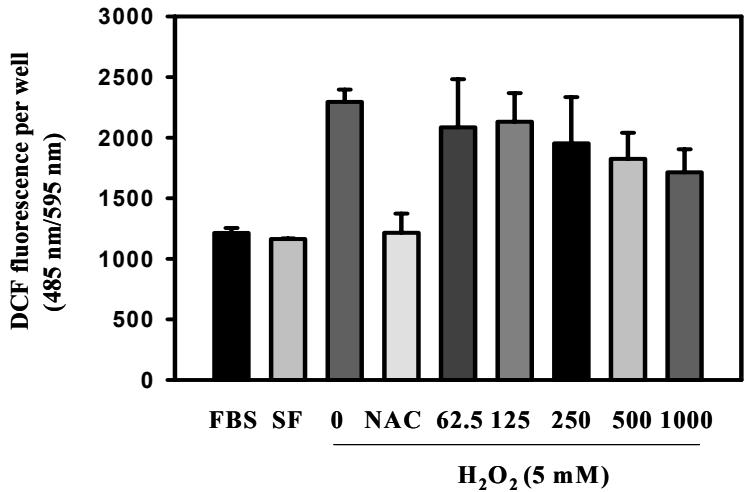


Figure 15. Effect of ethanol extract from citrus-M1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells. FBS(10 %), SF(serum-free media), N(N-acetylcysteine 1mM). M1: *C. Hassku* Hort.

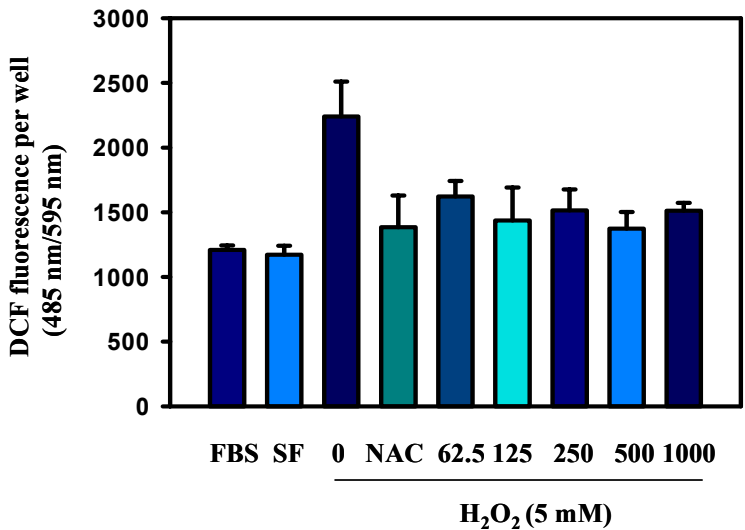


Figure 16. Effect of ethanol extract from citrus-K1 on the intracellular ROS content in HepG2 cells. FBS(10 %), SF(serum-free media), N(N-acetylcysteine 1mM). K1: *C. Unshiu*(Unripe Citrus).

IV. 결 론

제주산 감귤 과피 중의 flavonoid 함량을 측정하기 위한 HPLC 분석 조건을 검토하고, 다양한 방법으로 이들 flavonoid의 항산화 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 제주산 감귤 과피 조추출물의 총폴리페놀 함량은 온주밀감이 7.25 %, 진지향이 11.04 %, 팔삭이 7.86 %, 온주 미숙과가 16.73 %로, 온주 미성숙과가 가장 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 또 총폴리페놀 함량은 품종과 수확시기에 따라 큰 차이를 보였고, 대체적으로 수확시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 나타내었다.
2. 4종의 제주산 감귤 과피 중의 flavonoid 함량을 분석한 결과, 팔삭에는 rutin hydrate 0.24 mg/g, hespeidin 43.80 mg/g, 진지향에서 ferulic acid 0.73 mg/g, hesperidin 5.57 mg/g, 온주 밀감에서 naringin 47.68 mg/g, 온주 미성숙과에서 rutin hydrate 0.82 mg/g, ferulic acid 2.78 mg/g, hesperidin 8.40 mg/g의 함량을 보였다. 또 실험에 사용한 제주산 감귤 과피에서는 naringenin, hesperetin, tangeretin이 미량이지만 모두 검출되었고, naringin은 온주밀감, hesperidin은 팔삭, 진지향, 온주 미성숙과에서 다량 함유되어 있음을 알 수 있었으며, quercetin은 4종류 모두에서 검출되지 않았다.
3. 8종의 flavonoid 표준물질을 사용하여 항산화 활성을 비교한 결과는 다음과 같다.
 - 1) DPPH radical 소거활성 효과를 측정한 결과, IC₅₀ 값은 quercetin이 18.7 $\mu\text{g/ml}$, rutin hydrate이 22.4 $\mu\text{g/ml}$, ferulic acid가 107.8 $\mu\text{g/ml}$, naringenin이 132.2 $\mu\text{g/ml}$, hesperetin이 409.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, quercetin이 비교적 좋은 라디칼 소거활성 효과를 나타내었다.
 - 2) Nitric oxide 생성 저해 활성을 측정한 결과 flavonoid 8종 모두에서 IC₅₀ 값이 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 이상을 나타내었고, rutin hydrate의 경우에만 비교적 농도 의존적으로 nitric oxide 생성저해 활성을 갖고 있는 것으로 조사되었다.
 - 3) Superoxide 저해 활성 측정에서는 quercetin이 31.8%로 8종 flavonoid 성분 중 가장 높게 나타났고, 이어 ferulic acid 197.2% hesperetin 153.1% 순으로 나타났다.

- 4) Xanthin oxidase 저해 활성을 측정한 결과 flavonoid의 IC₅₀ 값은 rutin hydrate 가 12 µg/ml, quercetin 3.92 µg/ml로 비교적 좋은 효과를 보였다. 반면에 ferulic acid가 622.3 µg/ml, naringenin이 305.0 µg/ml, hesperetin이 285.5 µg/ml의 값을 보였고, naringin, hesperidin, tangeretin 성분들은 1,000 µg/ml 이상으로 활성 억제 효과가 그다지 크지 않은 것으로 나타났다.
- 5) 이상과 같이 8종 flavonoid의 항산화 효과를 비교해 본 결과, rutin hydrate, ferulic acid, naringin, quercetin, hesperetin 등이 DPPH에 의한 수소공여능 측정과 superoxide의 소거 활성, xanthine oxidase 활성억제 효과가 높게 나타났다. 반면에 hesperidin, tangeretin은 다른 flavonoid에 비해 비교적 항산화능이 낮은 것으로 조사되었다.
4. 감귤 과피 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과 4종의 제주산 감귤 과피 추출물들은 DPPH의 수소공여능 측정에서는 진지향 > 미성숙과 > 온주밀감 > 팔삭, superoxide의 소거 활성은 온주미성숙과 > 온주밀감 > 진지향 > 팔삭의 순이었다. 또 nitric oxide생성 저해 활성은 온주미성숙과 > 팔삭 > 진지향 순이나 온주 밀감의 경우 IC₅₀ 값이 1,000을 넘는 것으로 보아 저해 활성이 낮은 것으로 판단된다. 또한 xanthine oxidase 활성 억제 효과는 온주미성숙과 > 진지향 > 온주밀감 > 팔삭 순으로 전반적으로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또 항산화 효과는 온주 밀감과 같이 특정 flavonoid 함량이 높은 경우보다는 flavonoid 함량이 낮지만 다양한 종류의 flavonoid 성분을 골고루 함유했을 때 비교적 좋은 항산화 효과가 나타남을 알 수 있었다.
5. 제주산 감귤 과피 추출물의 HepG2 세포에서의 항산화 활성을 측정한 결과, ROS 소거능을 나타내었고, 진지향 과피 추출물에서 농도 의존적으로 현저한 항산화 활성을 보였다. 이러한 결과를 통해 제주산 감귤 과피는 활성산소종 등 자유기에 의해 발생하는 여러 만성질환 발병을 지연시키거나 예방하는데 효과가 있고, 특히 팔삭, 진지향, 온주 미성숙과의 감귤 과피는 항산화 효과와 관련된 기능성 식품원료로서의 활용이 가능할 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. 김동훈. 2001. 식품화학. 탐구.
2. 농림부. 연도별 과수 생산량. 2002.
3. 제주도 감귤출하 연합회. 감귤 유통처리 분석. 2000.
4. 통계청. 사회통계국 인구분석과. 생명표. 1999.
5. 통계청. 장래인구 추계. 2001.
6. 한국 영양학회, 2000, 7th Revision. p316-317.
7. Ames B. N., *Free Radical Res.* 1989, *Commun* 7: 121-128.
8. Baublis A. J., Lu C, Clydesdale F. M., Decker E. A.. *J Am Col Nutr.* 2000, 19: 308-312.
9. Blois, M. S. *Nature* 1958, 26: 1199-1200.
10. Bok S. H., Shin Y. W., Bae K. H., Jeong T. S., Kwon Y. K., Park Y. B., Choi M. S. *Nutr Res.* 2000, (7): 1007-1015.
11. Branien A. L., *J Am Oil Chem Soc* 1975, 52: 59-63.
12. Catherine Felgines, Odile Texier, Christine Morand, Claudine Manach, Augustin Scalbert, Françoise Rgerat, Christian Rmsy. *Am J Clin Nutr* 2000, 279: G1148-G1154.
13. Cha J. Y., Kim S. Y., Jeong S. J. and Cho Y. S., *Kor. J. Life Science.* 1999, 9: 389-394.
14. Cheng, Z. J., S. C. Kuo, S. C. Chan, F. N. Ko, and C. M. Teng. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998. 1392: 291-299.
15. Chfer M., Gonzlez-martnez C., Chiralt A., Fito P.. *Food Research International*, 2003, 36: 35-41.
16. Chung S. K., Kim S. H., Choi Y. H., Song E. Y., Kim S. H., *Food Industry and Nutrition.* 2000, aug 5(2): 42-52.
17. Cook N. C., Samman. S. J., *Nutr Biochem.* 1996, 7: 66-76.

18. David, A. W., James, B. M., *Free Rad. Biol. Med.* 1998.
19. Damon P, Flandre O. Michel F, perdrix L. Lavrid C. A.crastes de pualet. *Arzneimittel Forschung.* 1987, 37: 1449-1153.
20. Elegbede J. A., maltzman T. H., Elson C. E., Gould M. N. *Carcinogenesis*, 1993, 14: 1221-1223.
21. Emim JA, Oliviera AB, Lapa AJ. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46: 118-122 .
22. Fennema OR. *Food Chemistry.* 1996. 3rd edition, New York, Marcel Decker, Inc.
23. Galley P. and Thiollet M. *Int. Angiol.*, 1993, 12: 69-72.
24. Gil M. I., Toms-Barbern F. A., Hess-Pierce B. H., Kader A. A.. *J Agric Food Chem.* 2002, 50: 4976-498.
25. Giri, RK, Parija, T, and Das, BR. *Oncol Rep*, 1999, 6: 1123-1127.
26. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., *Biochem.* 1982, 126, 131-136.
27. Guengerich, F. P. and Kim, D. M. 1990, *Carcinogenesis*, 11: 2275-2279 .
28. Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, 58, 966-968.
29. Halliwell B, Muricia MA, Chirico S, Aruoma OI. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995. 35: 7-20.
30. Hardcastle, IR., Rowlands, MG., Barber, AM., Grimshaw, RM., Mohan, MK., et al. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57: 801-809.16. Hertog M. G., L., Resken E. J. M., Hollman P. C .H., Katan M. B., kromhout,D. *Lancet* 1993, 342: 1007-1011.
31. Hea-Jeng Whang, Kwang-Ro Yoon. *Food Sci. Technol* , 1995, 7(6): 950-957.
32. Hiroyuki Kohno, Miki Taima, Takashi Sumida, Yoshihiro Azuma, Hiroshi Ogawa, Takuji Tanaka. *Cancer Lett* 2001, 174: 141-150.
33. Iman A. Hakim, Robin B. Harris, Cheryl Ritenbaugh. *Nutrition and Cancer*, 2000, 37(20: 161-168.)
34. Jeong T. S., Choi M. S., Park Y. B., Bok S. H.. *Food indus. & Nutr* 1996, 5(2): 21-26.

35. Karmen Voda, Bojana Boh, margareta Vrtaenik, Franc Pohleven. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, pp1-9.3. Kim K. B. and Lee B. M., *Cancer Lett.* 1997, 113: 205-212.
36. Kawamori, T., Tanaka, T., Hirose, M., Mori, H. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 369-372.6. Kim S. M., Cho Y. S., Sung S. K., *Kor J Soc Food Sci Technol.* 2001, 33: 626-632.
37. Kritchevsky D, Story J.A. CRC Press, Boca Raton, 1993, pp163-178.
38. Kimball, D.A. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 1991, pp73-101.
39. Korycka-Dahl M, Richardson T, Hicks CL. *J. Food Prot.* 1979, 42: 867-871.
40. Lam, L.K.T. et al., *In Food Phytochemicals for Cancer Prevention*, 1993, Vol. I, Huang, M. T., O. Osawa, C. T. Ho, R. Rosen(ed). ACS Symposium series No. 546.
41. Laura Bravo. *Nutrition Reviews* 1998, 56(11): 317-333.
42. Marcocci L., Maguire J. J., Droy-Lefaix M. T., Packer L., *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 1994, 201, 748-755.
43. Marie-Laure Lota, Dominique de Rocca Serra, Flix Tomi, Joseph Casanova. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29: 77-104.
44. Martin M. J. et al., *Pharmacol.* 1994, 49, 144-150.
45. Meyer, O. C., *Angiology.* 1994, 45, 579-584.
46. Mouly P., arzouyan P.M., Gaydou C.G., , Estienne E.M. , J.M. *J. Agric. Food. Chem.* 1994, 42: 70-79.
47. Ok S. H., Lee S. H., Park Y. B., Bae K. H., Son K. H., Jeong T. S., Choi M. S., *J Nutr.* 1999, 129(6): 1182-1185.
48. Rystal N. Holick, Dominique S. Michaud, Rachael Stolzenberg- Solomon, Susan T. Mayne, Pirjo Pietinen, Philip R. Taylor, *Am J Epidemiol* , 2002, (6) 536-547.
49. Saija, A., et al., *Free Radical Biol.* 1995, Med., 19, 481-486.
50. Sun Y. , *Free Radical Biol.* 1990, Med 8: 583-599.
51. Yano, H., Tatuta, M., Iishi, H., Baba, M., Sakai, N., et al. *Int J Cancer*,

1999, 82: 665-668.

52. Yinrong Lu and L. Yeap Foo. Food chemistry. 2001, 75, 197-202.



감사의 글

대학원을 시작하고 처음 학교를 밟을 때 두근거렸던 생각이 납니다.
처음에는 무엇이든지 열심히 할 수 있을거라고, 모두 다 해낼 수 있을거라고 막연히 자신감을 갖고 시작을 했습니다. 하지만 처음의 다짐과 같이 열심히 또는 모두 다 했는지 조금은 후회가 되기도 합니다.
하지만 마음적으로 정신적으로 모두들 후원해 주시고 이끌어 주셔서 이렇게 졸업을 하게 되었습니다.
감사합니다.
항상 어디로 튈지 모르는 저를 걱정해주신 강창희 교수님 정말 감사드립니다. 이하 화학과 교수님들 모두 감사드립니다.
그리고 우리 분석방 식구들... 잘해주지도 못하고 챙겨주지도 못했지만 그래도 분석방 식구들이 있어서 많은 힘이 되었습니다.
실험을 할 수 있도록 많이 도와주신 TIC에 계시는 김세제 소장님, 그리고 항상 따뜻이 대해 주었던 TIC 식구들 정말 감사합니다.
마지막으로 하늘에 계시는 우리 아빠...
힘들때 항상 이겨낼 수 있도록 지켜봐 주신거 다 알고 있어요.. 사랑합니다.
우리 엄마, 오영희 사모님!
철없는 저를 지금껏 키워주시고 이끌어 주셔서 정말 감사합니다. 사랑해요~!!!
그리고 내동생들... 옆에 있어줘서 정말 고맙다.
모두들 감사하고 사랑합니다.