

유자 용매추출물의 전자 공여능, 아질산염 소거능 및 NDMA 생성 억제능

이수정¹ · 최선영¹ · 신정혜² · 서종권³ · 임현철⁴ · 심낙주^{1†}

¹경상대학교 식품영양학과, ²창신대학 호텔조리제빵과

³진주국제대학교 식품과학부, ⁴영남외식산업 컨설팅

The Electron Donating Ability, Nitrite Scavenging Ability and NDMA Formation Effect of Solvent Extracts from Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)

Soo-Jung Lee¹, Sun-Young Choi¹, Jung-Hye Shin², Jong-Kwon Seo³, Hyun-Cheol Lim⁴, and Nak-Ju Sung^{1†}

¹Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Department of Hotel Curinary & Bakery, Changshin College, Masan 630-522, Korea

³Division of Food Science, Jinju International University, Jinju 663-759, Korea

⁴Yeongnam Food-service Consulting Co., Taegu 706-034, Korea

(Received October 10, 2005; Accepted November 30, 2005)

ABSTRACT – Methanol, ether, ethylacetate and water extracts from flesh and peel of yuza (*Citrus junos*) were investigated to analyze their ability of electron donating, nitrite scavenging and nitrosodimethylamine (NDMA) formation in model system. The electron donating ability of yuza flesh extract, when it added at 10 mg/ml or over, were more than 50%, except ether extract. The high electron donating ability ($99.2 \pm 0.37\%$) was observed in the methanol extract and its effect was similar to BHA and ascorbic acid, when 40 mg/ml of methanol extract was added in reaction solution. Nitrite scavenging ability of all extracts from yuza was increased in proportion to sample concentration and more than 40% when 1 mg/ml sample was added, under pH 1.2. Also nitrite scavenging ability was higher in peel extracts than flesh extracts of yuza. Inhibition ratio of NDMA formation from flesh methanol extract of yuza was $31.7 \pm 1.25\%$, when 40 mg/ml added under pH 1.2. In all samples, inhibition effects were lower than 20%, at pH 4.2 and 6.0.

Key Words: Yuza(*Citrus junos*), Electron Donating Ability, Nitrite Scavenging Ability, Nitrosodimethylamine

다양한 가공 식품의 개발과 더불어 이와 관련된 식품 첨가물의 이용은 필요 불가결한 요소로 인정되고 있으며, 식품 첨가물은 식품의 가공적성 및 기호성 향상, 저장 기간의 연장 등 다양한 잇점을 부여하고 있다.¹⁾ 그러나 인공적으로 만들어진 식품첨가물은 그 유해성 및 안정성이 확보되지 않아 건강의 위해요소로 여겨지고,^{2,3)} 무병장수의 추구는 보다 안전성이 확보된 식품을 섭취하고자 하는 욕구로 이어지고 있으며 이에 따라 인공 식품 첨가물을 천연물질로 대처하기 위한 연구들이 꾸준히 진행되고 있다.^{4,5)} 인체 내 정상적인 대사과정에 의해서도 생성되는 free radical은 세포와 조직에 독성을 일으켜 질병을 유발하므로⁶⁾ 천연 유효물질을 섭취함으로써 산화적 장애 방어 및 노화억제 효과를 유도할 수 있

는 다양한 천연물질 관련 연구들이 진행되고 있다.^{7,8)} 산화성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력을 평가하는 전자공여능은 대표적인 항산화능의 평가방법으로 인정되고 있다.^{9,10)}

한편 아질산염과 N-nitrosodimethylamine (NDMA)은 생체내 암의 발생과 관련된 대표적인 물질로서 과거 수 십년 동안 육제품의 색소 고정, 부패 방지 및 풍미 개선을 위해 사용되어 왔다.¹¹⁾ 아질산염은 산성 조건 하에서 아질산 이온이 되거나 양이온과 반응하여 nitrous acid를 형성하게 되고 이들로부터 생성되는 nitrous anhydride와 강산성 조건 하에서 생성되는 nitrous acidium ion이나 nitrosonium ion으로 전환되어 강력한 니트로화 물질이 됨으로서 체내에서 발암 물질인 N-nitrosamine (NA)의 전구물질이 된다.^{12,13)} NDMA는 식품 중에서 가장 빈번하게 검출되는 nitroso 화합

[†] Author to whom correspondence should be addressed.

물로서 염지 육, 맥주, 가공어류, 향신료, 식용 유지 및 피자 등 광범위한 식품에서 검출이 되고 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾

유자(yuza, *Citrus junos* SIEB ex TANAKA)는 뛰어난 향과 특유의 산미를 지녀 예부터 차로 이용되거나 고급 병과나 떡류에 이용되어 왔으나 근래에 들어서는 대부분이 유자청으로 제조되어 유자차로 소비 되고 있다. 지금까지 유자에 관한 연구는 성분 분석과 착즙 방법 등에 관한 것이 주를 이루었으나,¹⁸⁻²¹⁾ 근래에 들어서 유자의 생리 활성을 연구를 통한 기능성의 규명과 고부가가치를 창출하고자 하는 방향으로 연구가 진행되고 있다.²²⁻²⁴⁾ 이에 본 연구에서도 유자 기능성 규명을 위한 연구의 일환으로 유자 용매 추출물의 항산화 활성과 식품 내 대표적인 발암 물질로 알려져 있는 NDMA의 생성 억제능 및 전구 물질인 아질산염 소거능에 관한 연구를 통하여 유자의 고부가가치 창출에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

유자는 경상남도 남해군 설천면에서 생산된 완숙유자를 사용하였다. 유자는 흐르는 물에 깨끗이 씻은 후 물기를 제거한 다음 4등분하여 과피와 과육으로 분리하고 과육 중의 씨를 제거하였다. 분리된 과피와 과육은 각각 두께 0.5 cm 이하로 세절한 다음 동결 건조하였다. 실험에 사용된 추출용매 및 분석용 시약은 일급 및 특급시약을 사용하였다.

용매 추출물의 제조

동결 건조한 시료 중량에 대하여 12배의 methanol을 가한 후 60°C의 수욕 상에서 환류 냉각시키면서 6시간씩 2회 반복 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 조추출물을 얻었다. 메탄올 조추출물을 10배의 증류수에 녹인 다음 동량의 ether를 가하여 ether와 물 층으로 분리하였다. 물 층에 다시 ethylacetate를 가하여 ethylacetate와 물 층으로 분리한 각 용매 추출물은 회전식 진공증발 농축기로 농축한 후 동결 건조하여 냉동 보관하면서 3차 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

DPPH에 대한 전자 공여능

전자 공여능은 Blois²⁵⁾의 방법을 변형하여 유자 용매 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)에 대한 시료의 환원력으로 측정하였다. 즉 일정한 농도의 methanol, ether, ethylacetate 및 물 추출물 1.0 ml에 1×10^{-4} M DPPH용액 3.0 ml를 가하여 교반한 다음 30분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능

은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다. 대조구인 butylated hydroxyanisole (BHA, Sigma, USA)와 ascorbic acid (Sigma, USA)는 시료와 동일한 농도로 첨가하여 비교하였다.

아질산염 소거능 측정

Kato 등²⁶⁾의 방법에 따라 시료액 1 ml에 1 mM 아질산나트륨(Junsei Chemical, Japan)용액 1 ml를 가한 후, 0.1 N HCl 완충액 및 0.2 M 구연산 완충용액으로 각각 반응용액을 pH 1.2, 4.2 및 6.0으로 조정된 다음 반응용액의 총 부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml를 취하여 2% 초산용액 5 ml, 30% 초산용액으로 조제한 Griess 시약 0.5 ml를 차례로 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계로 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 산출하였다. 아질산염 소거능은 시료의 첨가 전·후에 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로써 나타내었다.

NDMA 생성 억제능 측정

NDMA 생성 억제능은 Helsler와 Hotchkiss²⁷⁾의 방법을 응용하여 100 mM 아질산나트륨 용액 및 시료액 각 1 ml, 200 mM dimethylamine (Lancaster, England)용액 0.5 ml를 차례로 혼합한 후 상기의 완충액으로 각각 pH 1.2, 4.2 및 6.0으로 조정된 다음 총 부피를 10 ml로 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 ammonium sulfamate (Junsei Chemical, Japan)를 가하여 반응을 정지시키고 dichloromethane 1 ml를 첨가하여 반응용액 중에 생성된 NDMA를 추출하여 Gas Chromatography (GC, 5890A, Hewlett-Packard, USA)-Thermal Energy Analyzer (TEA, 543, Thermo Electron Corp., Waltham, MA)에 주입시켜 분석하였다. GC-TEA의 column은 10% carbowax 20 M/80-100 chromosorb WHP로 충전한 glass column을 사용하였고, oven 온도는 130-180°C (5°C/min), injection port, pyrolyzer 및 interface 온도는 각각 180°C, 550°C 및 200°C로 조정하였으며, 압력은 1 mmHg, He가스의 유속은 25 ml/min으로 하였다. 대조구는 시료액 대신 동량의 증류수를 사용하였으며, NDMA 생성 억제능은 대조구에 대한 peak의 백분율(%)로써 환산하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과는 3회 반복 측정 후 평균과 표준편차로 나타내었으며, SPSS 10.0을 이용하여 실험군간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 $p < 0.05$ 수준에서 상호비교하였다.

결과 및 고찰

유자추출물의 전자 공여능

유자 과육 및 과피의 각 용매별 추출물에 대한 전자 공여능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 모든 추출물 시료에서 전자공여능이 나타났으며, 시료의 첨가량이 증가할수록 전자공여능이 유의적으로 상승되었다. 유자과육 추출물의 경우 1 mg/ml 첨가시 10% 미만의 효과가 있었으나, 10 mg/ml 첨가시에는 ether 추출물을 제외한 모든 실험구에서 50%이상의 전자 공여능을 나타내었다. 또한 40 mg/ml의 추출물을 첨가했을 때 메탄올 추출물에서 93.2±0.31%로 가장 높았으며, 다음으로 ethylacetate 추출물에서 90.3±0.18%, 물 추출물에서 88.2±0.20%, ether 추출물에서 80.1±0.23%의 순서로 유의적으로 전자공여능이 높게 나타났다. 과피 추출물은 1 mg/ml 첨가시 12.5±0.25~20.7±0.41%의 전자 공여능을 보여 과육에 비해 약 3배의 효능을 나타내었다. 또한 동일 용매 및 동일 농도의 조건에서 40 mg/ml의 ether 추출물을 제외한 모든 실험구에서 유자 과육에 비해 과피 추출물에서 유의적으로 전자 공여능이 우수하였다.

전자 공여능은 일반적으로 시료의 농도가 상승함에 따라 증가하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ Kwon 등²⁹⁾은 복령의 물 및 ethanol 추출물의 전자 공여능을 측정한 결과 ethanol 추출물에서 효능이 더 우수하다고 보고하였다. 용매를 달리한 대추잎 추출물을 이용한 전자 공여능의 측정에서 ethylacetate 추출물은 85.0%의 효능을 보였는데, 다른 용매추출물에서는 50% 이하의 효과가 나타난 이유로 flavonoid 등과 같은 페놀성 화합물이 ethylacetate에 용해되었기 때문이라고 보고

되어있다.³⁰⁾

유자 용매 추출물의 전자 공여능은 미성숙 유자보다 완숙된 유자에서, 과육보다 과피에서 더 높았으며, 상대적으로 페놀성 화합물의 함량이 더 낮은 클로로포름 추출물이 메탄올 추출물보다 더 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 유자의 항산화 특성은 극성 성분과 함께 비극성 용매에 용출되는 물질이 더 크게 작용한다는 보고도 있다.²³⁾ 본 실험에서 극성과 비극성의 성질을 모두 함유하는 ethylacetate 추출물을 40 mg/ml 첨가시 90% 이상의 높은 전자공여능이 나타난 것도 상기의 보고와 유사한 결과라 판단된다.

유자 추출물의 아질산염 소거작용

유자 과육 및 과피의 methanol, ether, ethylacetate 및 물 추출물에 대한 아질산염 소거작용은 Table 2 및 3에 나타내었다. 반응 용액의 pH가 산성 영역일수록, 시료의 농도가 증가할수록 소거작용은 유의적으로 상승하였다. pH 1.2의 반응 조건에서 유자과육의 아질산염 소거작용은 methanol 추출물의 경우 51.2±0.2~88.7±0.42%, ethylacetate 추출물에서 45.5±0.77~86.1±0.43%, 물 추출물에서 41.5±0.39~85.1±0.58%, ether 추출물에서 46.1±0.69~78.6±0.39%의 순서로 효과가 우수하였다. pH 4.2 및 6.0의 반응 조건에서는 pH 1.2의 소거작용보다는 낮았으나, pH 4.2의 반응 조건에 40 mg/ml의 시료 첨가시 모든 희분에서 46.5±0.32~57.1±0.29%로 40% 이상의 소거작용을 나타내었다.

유자 과피의 pH에 따른 아질산염 소거작용은 과육의 아질산염 소거작용과 유사한 경향이었으며(Table 3), pH 1.2의 반응 조건에서 methanol 추출물을 40 mg/ml 첨가시 92.1±

Table 1. Electron donating ability of different solvent extracts from flesh and peel of yuza (Electron donating ability, %)

Solvent	Concentration (mg/ml)					
	1	5	10	20	40	
Flesh	Methanol	6.1 ± 0.25 ^{1)cA*}	28.4 ± 0.22 ^{dB*}	52.1 ± 0.18 ^{dC*}	79.5 ± 0.20 ^{dD*}	93.2 ± 0.31 ^{dE*}
	Ether	3.5 ± 0.38 ^{aA*}	19.2 ± 0.45 ^{aB*}	38.2 ± 0.34 ^{aC*}	60.2 ± 0.47 ^{aD*}	80.1 ± 0.23 ^{aE}
	Ethyl acetate	6.2 ± 0.21 ^{cA*}	25.2 ± 0.31 ^{cB*}	51.1 ± 0.13 ^{cC*}	74.2 ± 0.29 ^{cD*}	90.3 ± 0.18 ^{cE*}
	water	5.4 ± 0.30 ^{bA*}	24.5 ± 0.14 ^{bB*}	50.2 ± 0.11 ^{bC*}	71.7 ± 0.22 ^{bD*}	88.2 ± 0.20 ^{bE*}
Peel	Methanol	20.7 ± 0.41 ^{cA}	39.7 ± 0.27 ^{cB}	59.7 ± 0.39 ^{dC}	85.6 ± 0.44 ^{dD}	99.2 ± 0.37 ^{dE}
	Ether	12.5 ± 0.25 ^{aA}	28.2 ± 0.46 ^{aB}	45.9 ± 0.38 ^{aC}	75.8 ± 0.20 ^{aD}	80.2 ± 0.39 ^{aE}
	Ethyl acetate	18.7 ± 0.32 ^{bA}	35.6 ± 0.41 ^{bB}	58.6 ± 0.20 ^{cC}	83.2 ± 0.24 ^{cD}	94.1 ± 0.22 ^{cE}
	water	18.2 ± 0.28 ^{bA}	35.2 ± 0.49 ^{bB}	55.2 ± 0.24 ^{bC}	80.2 ± 0.18 ^{bD}	89.2 ± 0.26 ^{bE}
BHA	95.2 ± 0.51 ^A	96.2 ± 0.25 ^B	96.5 ± 0.21 ^B	97.8 ± 0.22 ^C	98.2 ± 0.57 ^C	
Ascorbic acid	62.7 ± 0.35 ^A	82.2 ± 0.28 ^B	95.6 ± 0.30 ^C	98.2 ± 0.24 ^D	99.8 ± 0.26 ^E	

¹⁾ Each value represents mean ± SD of triplicate.

^{abcd} Each value with different superscripts within a column in the different solvent of flesh and peel significantly difference, respectively. at p<0.05

^{A,B,C,D,E} Each value with different superscripts within a row in the same solvent significantly difference at p<0.05

* Significance between the flesh and peel in the same solvent and concentration at p<0.05

Table 2. Nitrite scavenging ability of solvent extracts from flesh of yuza in different pH reaction system
(Nitrite scavenging ability, %)

Solvent	Conc. (mg/ml)	pH condition		
		1.2	4.2	6.0
Methanol	1	51.2 ± 0.20 ^{1)ca}	26.2 ± 0.28 ^{ba}	3.4 ± 0.40 ^{aA}
	5	65.2 ± 0.29 ^{cb}	26.7 ± 0.42 ^{ba}	5.5 ± 0.39 ^{aB}
	10	69.4 ± 0.18 ^{cc}	35.6 ± 0.30 ^{bb}	7.3 ± 0.28 ^{aC}
	20	78.3 ± 0.38 ^{cd}	47.2 ± 0.26 ^{bc}	8.1 ± 0.51 ^{aC}
	40	88.7 ± 0.42 ^{ce}	57.1 ± 0.29 ^{bd}	9.7 ± 0.60 ^{aD}
Ether	1	46.1 ± 0.69 ^{ca}	25.4 ± 0.30 ^{ba}	1.1 ± 0.77 ^{aA}
	5	55.2 ± 0.28 ^{cb}	27.3 ± 0.42 ^{bb}	2.6 ± 0.65 ^{aB}
	10	60.4 ± 0.45 ^{cc}	35.2 ± 0.51 ^{bc}	3.0 ± 0.49 ^{aB}
	20	72.5 ± 0.42 ^{cd}	44.1 ± 0.60 ^{bd}	4.1 ± 0.38 ^{aC}
	40	78.6 ± 0.39 ^{ce}	47.4 ± 0.71 ^{be}	6.1 ± 0.39 ^{aD}
Ethyl acetate	1	45.5 ± 0.77 ^{ca}	21.1 ± 0.59 ^{ba}	3.5 ± 0.52 ^{aA}
	5	48.6 ± 0.85 ^{cb}	27.1 ± 0.45 ^{bb}	5.1 ± 0.60 ^{aB}
	10	62.5 ± 0.65 ^{cc}	35.2 ± 0.43 ^{bc}	5.7 ± 0.75 ^{aB}
	20	78.2 ± 0.55 ^{cd}	42.1 ± 0.38 ^{bd}	7.2 ± 0.58 ^{aC}
	40	86.1 ± 0.43 ^{ce}	48.5 ± 0.39 ^{be}	8.9 ± 0.52 ^{aD}
Water	1	41.5 ± 0.39 ^{ca}	15.2 ± 0.29 ^{ba}	4.2 ± 0.53 ^{aA}
	5	51.3 ± 0.27 ^{cb}	19.2 ± 0.30 ^{bb}	5.3 ± 0.57 ^a
	10	62.1 ± 0.45 ^{cc}	28.3 ± 0.28 ^{bc}	5.3 ± 0.56 ^{aB}
	20	73.2 ± 0.65 ^{cd}	35.1 ± 0.27 ^{bd}	7.9 ± 0.54 ^{aC}
	40	85.1 ± 0.58 ^{ce}	46.5 ± 0.32 ^{be}	8.4 ± 0.59 ^{aC}

¹⁾ Each value represents mean ± SD of triplicate.
^{abcd} Each value with different superscripts within a row in the different pH significantly difference at p<0.05
^{A,B,C,D,E} Each value with different superscripts within a column in the same solvent significantly difference at p<0.05

Table 3. Nitrite scavenging ability of solvent extracts from peel of yuza in different pH reaction system
(Nitrite scavenging ability, %)

Solvent	Conc. (mg/ml)	pH condition		
		1.2	4.2	6.0
Methanol	1	56.1 ± 0.58 ^{1)ca}	27.5 ± 0.22 ^{ba}	11.2 ± 0.24 ^{aA}
	5	61.0 ± 0.24 ^{cb}	28.6 ± 0.37 ^{bb}	11.2 ± 0.15 ^{aA}
	10	74.4 ± 0.31 ^{cc}	41.3 ± 0.29 ^{bc}	12.7 ± 0.38 ^{aB}
	20	81.0 ± 0.40 ^{cd}	49.4 ± 0.24 ^{bd}	13.2 ± 0.20 ^{aC}
	40	92.1 ± 0.22 ^{ce}	55.1 ± 0.34 ^{be}	16.5 ± 0.24 ^{aD}
Ether	1	50.1 ± 0.27 ^{ca}	26.1 ± 0.18 ^{ba}	1.2 ± 0.24 ^{aA}
	5	58.8 ± 0.24 ^{cb}	31.4 ± 0.42 ^{bb}	1.2 ± 0.15 ^{aA}
	10	67.2 ± 0.30 ^{cc}	37.7 ± 0.28 ^{bc}	2.7 ± 0.71 ^{aB}
	20	69.4 ± 0.49 ^{cd}	39.5 ± 0.21 ^{bd}	3.2 ± 0.22 ^{aB}
	40	80.2 ± 0.23 ^{ce}	42.2 ± 0.30 ^{be}	6.0 ± 0.23 ^{aC}
Ethyl acetate	1	57.6 ± 0.48 ^{ca}	25.2 ± 0.25 ^{ba}	1.1 ± 0.44 ^{aA}
	5	65.2 ± 0.60 ^{cb}	28.1 ± 0.20 ^{bb}	4.0 ± 0.25 ^{aB}
	10	71.8 ± 0.22 ^{cc}	41.2 ± 0.21 ^{bc}	4.2 ± 0.29 ^{aB}
	20	82.5 ± 0.31 ^{cd}	48.3 ± 0.49 ^{bd}	5.1 ± 0.37 ^{aC}
	40	89.2 ± 0.24 ^{ce}	51.3 ± 0.52 ^{be}	6.9 ± 0.40 ^{aD}
Water	1	49.2 ± 0.24 ^{ca}	18.3 ± 0.18 ^{ba}	0.9 ± 0.22 ^{aA}
	5	53.4 ± 0.42 ^{cb}	21.4 ± 0.20 ^{bb}	2.1 ± 0.39 ^{aB}
	10	65.1 ± 0.39 ^{cc}	30.2 ± 0.17 ^{bc}	3.5 ± 0.24 ^{aC}
	20	79.2 ± 0.24 ^{cd}	41.1 ± 0.31 ^{bd}	5.8 ± 0.25 ^{aD}
	40	86.1 ± 0.33 ^{ce}	50.2 ± 0.28 ^{be}	5.9 ± 0.35 ^{aD}

¹⁾ Each value represents mean ± SD of triplicate.
^{abcd} Each value with different superscripts within a row in the different pH significantly difference at p<0.05
^{A,B,C,D,E} Each value with different superscripts within a column in the same solvent significantly difference at p<0.05

0.22%로 나타나 유자 과육보다 다소 높은 소거작용을 나타내었다. 반면에 pH 6.0의 반응 조건에서는 유자 과피의 methanol 추출물을 첨가한 경우에만 11.2 ± 0.24~16.5 ± 0.24%였으며 그 외의 용매 추출물에서는 10% 미만의 소거작용을 보였다.

본 실험에서 유자의 아질산염 소거작용은 과육보다는 과피에서, 비극성 용매보다는 극성의 용매에서 다소 우수한 것으로 나타났다. 일본산 무즙의 아질산염 소거작용은 19.9~31.8%였는데, 시료 중에 함유된 phenol 화합물의 영향인 것으로 보고 되어있다.³¹⁾ 5종의 감귤류 주스를 이용하여 아질산염 소거작용을 측정할 결과 pH 2.5의 반응조건에서 50% 이상의 소거작용을 나타내었으며³²⁾ 이들 주스로부터 분리한 ascorbate 및 phenolic 화합물의 아질산염 소거작용은 phenol 화합물에서 75~89.5%의 범위로 ascorbate 화합물보다 우수한 것으로 나타났다.³³⁾ Catechin, chlorogenic acid, morin, luteolin, naringenin 등의 flavonoid는 아질산염 소거

작용이 우수한 것으로 알려져 있는데,³⁴⁾ 감귤류의 과육 및 과피에 함유된 naringin 및 hesperidin 등과 같은 flavonoid 화합물³⁵⁾은 페놀산류에 비해 아질산염 소거작용이 낮다고 한 보고도 있다.²⁸⁾ Kim 등³⁶⁾은 야채 추출물의 아질산염 소거는 야채류에 존재하는 비타민 C, 페놀 화합물 등과 상관 관계가 높으며, 추출 용매와는 관련성이 적다고 하였다. 붉은 보리의 물 및 메탄올 추출물의 아질산염 소거작용은 메탄올 추출물에서 높게 나타났는데 그 이유로 메탄올에 용해되어진 방향족 화합물의 함량이 높았기 때문인 것으로 보고 되었다.³⁷⁾ Shin 등²⁴⁾은 유자를 주스, ascorbate, phenol 및 유기산 획득으로 분리하여 아질산염 소거작용을 측정할 결과 주스>유기산 획득>phenol 획득>ascorbate 획득의 순으로 우수하다고 보고하였다. 이상의 결과로 볼 때 유자 과육 및 과피 추출물의 아질산염 소거작용이 극성이 높은 용매로 추출하였을 때 우수한 것은 아질산염 소거에 효력이 있는 물질인 유기산, 비타민 C, 페놀성 화합물 등의 용출이 극성용매에서

더 효과적이었기 때문이라 판단된다.

유자 추출물의 NDMA 생성 억제 효과

유자 과육 및 과피 용매 추출물의 첨가량 및 반응 용액의 pH에 따른 발암성 NDMA 생성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 1 및 2에 요약하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 NDMA 생성량을 100%로 하였을 때, 시료 첨가구의 NDMA 생성량을 측정하여 NDMA 생성 억제율로 환산하였다.

유자 과육의 용매별 추출물을 농도를 달리하여 첨가하였을 때 pH에 관계없이 시료의 첨가 농도가 높아질수록 NDMA 생성 억제 효과가 유의적으로 증가하였으며(Fig. 1), 메탄올 추출물을 40 mg/ml 첨가시 31.7±1.25%로 가장 높게 나타났다. NDMA 생성 억제 효과는 methanol, ethylacetate, 물, ether 순으로 효과가 좋았다. pH 4.2 및 6.0의 반응 조건에서는 모든 시료 첨가구에서 20% 미만의 억제 효과가 있었으며, pH가 알칼리화 되어짐에 따라 NDMA 생성 억제 효과가 유의적으로 감소되어짐을 알 수

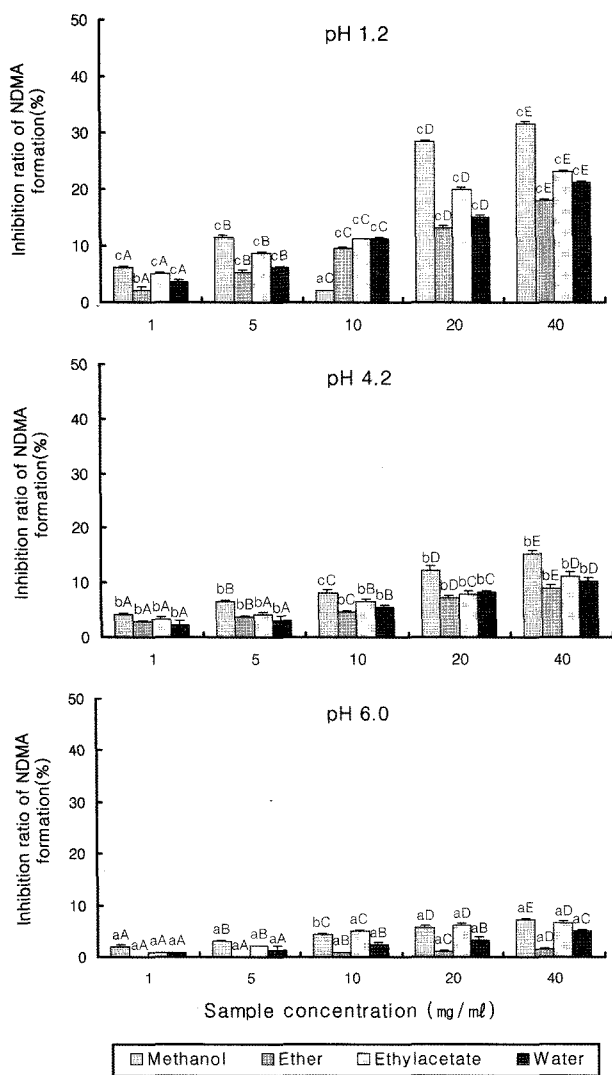


Fig. 1. Inhibition rate of NDMA formation of solvent extracts from yuza flesh in different pH reaction system.
^{abcd} Each value with different superscripts within the different pH significantly difference at p<0.05
^{A,B,C,D,E} Each value with different superscripts within the same solvent significantly difference at p<0.05

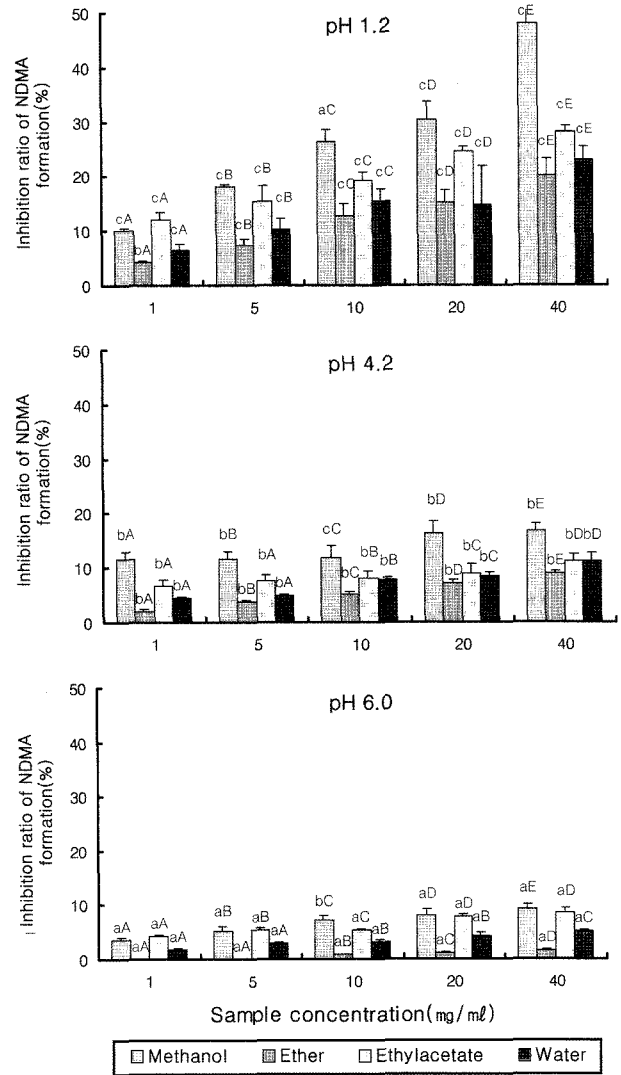


Fig. 2. Inhibition rate of NDMA formation of solvent extracts from yuza peel in different pH reaction system.
^{abcd} Each value with different superscripts within the different pH significantly difference at p<0.05
^{A,B,C,D,E} Each value with different superscripts within the same solvent significantly difference at p<0.05

있었다. 특히, pH 6.0의 반응 조건에서 ether 추출물을 각각 1 및 5 mg/ml 첨가한 경우에는 NDMA 생성 억제 효과가 나타나지 않았다. 유자 과피 추출물의 경우(Fig. 2) pH 1.2의 반응 조건에 40 mg/ml의 시료를 첨가하였을 때 methanol 추출물은 $48.1 \pm 2.56\%$, ethylacetate 추출물은 $28.1 \pm 0.62\%$, 물 추출물은 $23.1 \pm 1.16\%$, ether 추출물은 $20.1 \pm 1.52\%$ 로 과육 추출물에 비해서 다소 높게 나타났다. 그러나 pH 4.2 및 6.0의 반응조건에서는 과육 및 과피 추출물간에 NDMA 생성억제 효과의 차이가 적었다.

Song 등³²⁾은 5종의 감귤류 주스를 NDMA 생성 반응용액에 첨가하였을 때 금귤을 제외한 모든 시료에서 반응계의 pH에 관계없이 NDMA 생성이 촉진되었으며 특히 pH 4.0 및 6.0의 반응계에서는 시료 첨가량이 많아질수록 NDMA의 생성량이 증가되었다고 보고하였다. 또, 이들 주스로부터 ascorbate 및 페놀 화합물을 각각 분리하여 첨가하였을 때, ascorbate 화합물은 NDMA 생성을 촉진시켰으며, 페놀 화합물이 첨가된 경우에는 시료의 첨가량 및 반응용액의 pH가 낮아질수록 NDMA 생성이 감소되어 pH 2.5의 반응 조건에서는 90% 이상의 NDMA 생성 억제 효과가 나타났다고 보고되어 있다.³³⁾ 유자 과육 및 과피를 물과 메탄올로 각각 추출하여 NDMA 생성 억제 효과를 검색한 결과 과육보다 과피 추출물, 물보다 메탄올 추출물에서 다소 효과가 높았는데, 이

는 동일 시료에서 아질산염 소거능과 같은 경향인 것으로 보고 되어 있다.²⁴⁾ 감귤류의 NDMA 생성억제 효과 측정에서 과피를 제거한 감귤류 주스는 과피를 포함하는 금귤 주스에 비해서 NDMA 생성 억제 효과가 낮았다는 보고³²⁾로 볼 때, 본 실험의 유자 과피 추출물에서 NDMA 생성 억제 효과가 높았던 이유도 과피에 NDMA 생성 억제 활성이 있는 물질인 페놀성 화합물 및 식이섬유소가 함유되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 유자 과육 및 과피의 아질산염 소거능과 NDMA 생성 억제 효과를 비교해 볼 때 아질산염 소거능이 NDMA 생성 억제 효과에 비해 우수한 경향으로 나타났다. 이는 반응용액 중에 dimethylamine이 존재할 경우, 아질산염은 시료 중에 함유된 물질보다 DMA와 반응성이 더 크기 때문에 비록 시료 중에 아질산염 소거능이 뛰어난 물질이 존재하더라도 DMA와의 반응으로 인해 NDMA 생성 반응이 우세하여 상대적으로 NDMA 생성 억제 효과가 낮기 때문이라 추정된다. 또 시료 중에 함유된 페놀 화합물의 일부가 아질산염과 반응하여 니트로소화 인자를 생성함으로써 이들 물질이 nitrosamine의 생성 촉매제로 작용할 수 있기 때문에 NDMA 생성 억제 효과가 낮게 나타난 것이라 판단된다.

국문요약

유자를 과육과 과피로 분리하여 methanol, ether, ethylacetate 및 물로 추출하여 전자 공여능, 아질산염 소거능 및 NDMA 생성에 미치는 영향을 검색하였다. 유자 과육 추출물의 경우 10 mg/ml 이상 첨가시 ether 추출물을 제외한 모든 실험구에서 50%이상의 전자 공여능을 나타내었다. 과피 메탄올 추출물을 40 mg/ml 첨가시에는 BHA 및 ascorbic acid의 효능과 유사한 수준인 $99.2 \pm 0.37\%$ 의 전자 공여능이 나타났다. pH 1.2에서 아질산염 소거작용은 1 mg/ml 첨가시 40% 이상의 소거능을 보였으며 시료량이 증가할수록 상승하였다. 또한 과육보다는 과피에서 아질산염 소거능이 다소 우수한 것으로 나타났다. 유자 과육 추출물의 NDMA 생성 억제 효과는 메탄올 추출물을 pH 1.2의 반응 용액에 40 mg/ml 첨가시 $31.7 \pm 1.25\%$ 로 가장 높게 나타났다. pH 4.2 및 6.0의 반응 조건에서는 모든 시료 첨가구에서 20% 미만의 억제 효과가 있었다.

참고문헌

1. 김두진, 김영휘, 김정숙, 배태진, 최형택, 현재석, 홍종만: 식품공학저장학. 지구문화사, pp. 15-18 (2003).
2. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of BHA and BHT. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63 (1975).
3. Waldorop, M.: Firm takes new approach to food additives. *Chem. Eng. News*, 58, 22 (1980).
4. Goldberg, I.: Functional Foods. Chapman & Hall Press. New York, NY, USA. pp. 3-550 (1994).
5. Sadaki, O.: The development of functional foods and materials. *Bioindustry*, 13, 44-50 (1996).
6. Choi, J.S., Jung, J.H., Lee, H.J., Lee, J.H. and Kang, S.S.: A naphthalene glycoside from *Cassia tora*. *Phytochemistry*, 40, 997-999 (1995).
7. Hwang, J.Y., Ham, J.W. and Nam, S.H.: The antioxidant

- activity of Maesil (*Prunus Mume*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 461-464 (2004).
8. Larson, R.A.: The antioxidant of higher [plants. *Phytochemistry*, **27**, 969-978 (1988).
 9. Devy, C. and Gautier, R.: New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 399-405 (1990).
 10. Kim, H.K., Na, G.M., Ye, S.H. and Han, H.S.: Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. *Korean J. Food Culture.*, **19**, 484-490 (2004).
 11. Lijinsky, W.: N-nitrosocompounds in the diet. *Mut. Res.*, **443**, 129-138 (1999).
 12. Challis, B.C. and Challis, J.A.: In the chemistry of amino, nitroso and nitro-compounds and their derivatives. In: Patai, S. ed. *The chemistry of the Amino group*. Wiley Inter Science. New York, USA. p. 1151 (1982).
 13. Fan, T.Y. and Tannenbaum, S.R.: Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite; acceleration by thiocyanate and other anions. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 237 (1973).
 14. Massey, R.C., Crews, C., Dennis, M.J., McWeeny, D.J., Statin, J.R. and Knowles, M.E.: Identification of a major new in volatile N-nitroso compound in smoked bacon. *Analytica Chimica Acta*. **174**, 327-330 (1985).
 15. Havery, D.C., Hotchkiss, J.H. and Fazio, T.: Nitrosamines in malt and beverages. *J. Food Sci.*, **46**, 501-505 (1981).
 16. Huang, D.P., Ho, J.H.C., Webb, K.S., Wood, B.J. and Gough, T.A.: Volatile nitrosamines in salt-preserved fish before and after cooking. *Food and Cosmet. Toxicol.*, **19**, 167-171 (1981).
 17. Siddiqi, M., Tricker, A.R. and Preussmann, R.: The occurrence of preformed N-nitroso compounds in food samples from a high-risk area of esophageal cancer in Kashmir, India. *Cancer Letters*, **39**, 37-43 (1988).
 18. Sen, N.P. and Seaman, S.: An investigation into the possible presence of volatile N-nitrosamines in cooking oils, margarine and butter. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 787-789 (1981).
 19. Lee, Y.C., Kim, I.H., Jeong, J.W., Kim, H.K. and Park, M.H.: Chemical characteristics of citron (*Citrus junos*) juices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 552-556 (1994).
 20. Jeong, J.W., Kwon, D.J., Hwang, J.B. and Jo, Y.J.: Influence of the extraction method on quality of citron juice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 704-708 (1994).
 21. Jeong, J.W., Park, K.J., Jung, S.W. and Kim, J.H.: Changes in quality of citron juice by storage and extraction conditions. *Agric. Chem. Biotechnol.*, **38**, 141-146 (1995).
 22. Cha, J.Y. and Cho, Y.S.: Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **44**, 122-128 (2001).
 23. Yoo, K.M. and Hwang, I.K.: *In vitro* effect of Yuza extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 339-344 (2004).
 24. Shin J.H., Lee J.Y., Choi, H.S., Lee, S.J., Jung, K.H. and Sung, N.J.: Screening of effective factor to inhibition of NDMA formation in yuzu. *J. Fd Hyg. Safety*, **19**, 126-131 (2004).
 25. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1199-1200 (1958).
 26. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Bio. Chem.*, **51**, 1333-1338 (1987).
 27. Helser, M.A. and Hotchkiss, J.H.: Comparison of tomato phenolic acid and ascorbic acid fractions on the inhibition of N-nitroso compound formation. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 129-132 (1984).
 28. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D.: The Nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 232-239 (1996).
 29. Kwon, M.S., Chung, S.K., Choi, J.U., Song, K.S. and Lee, I.S.: Antimicrobial and antitumor activity of triterpenoids fraction from poria cocos wolf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 1029-1033 (1999).
 30. Jin, Q., Park, J.R., Kim, J.B. and Cha, M.H.: Physiological activity of *Zizypus jujuba* leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 593-598 (1999).
 31. Kurechi, T., Kikugawa, K. and Fukuda, S.: Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1265-1269 (1980).
 32. Song, M.H., Shin, J.H., Sung, N.J.: The effect of citrus juice on nitrite scavenging and NDMA formation. *J. Inst. Agri. & Fishery Develop. Gyeongsang Nat'l. Univ.*, **19**, 7-14 (2000).
 33. Song, M.H., Lee S.J., Shin, J.H., Choi S.Y. and Sung N.J.: Effect of the N-nitrosodimethylamine formation in ascorbate and phenolic portion from citrus juice. *Korean J. Food & Nutr.*, **15**, 97-103 (2002).
 34. Lee, J.H. and Choi, J.S.: Influence of some flavonoids on N-nitrosoproline formation *in vitro* and *in vivo*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 266-272 (1993).
 35. Eun, J.B., Jung, Y.M. and Woo, G.J.: Identification and determination of dietary fibers flavonoids in pulp of Korean Tangerine (*Citrus aurantium var.*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 371-377 (1996).
 36. Kim, D.S., Ahn, B.W., Yeum D.M., Lee, D.H., Kim, S.B., and Park, Y.H.: Degradation of Carcinogenic Nitrosamine Formation Factor by Natural Food components 1. Nitrite-scavenging Effects of Vegetable Extracts. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **20**, 463-468 (1987).
 37. Do, J.R.: Biochemical functions of the components of traditional tea materials in Korea. Thesis of Ph. D in National Fish Univ. of Pusan (1992)