

HPLC 및 HPLC/MS를 이용한 유자 씨앗 중 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 분석

우강용^{1*} · 김재이² · 김민철¹ · 장덕규¹

¹경남대학교 식품생명공학부

²부산지방식품의약품안전청

Determination of Flavonoid and Limonoid Compounds in Citron (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka) Seeds by HPLC and HPLC/MS

Kang-Lyung Woo^{1*}, Je-I Kim², Min-Chul Kim¹ and Duck-Kyu Chang¹

¹Division of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

²Busan Regional Food and Drug Administration, Busan 608-080, Korea

Abstract

Flavonoid and limonoid compounds were determined by HPLC on the methanol and ethanol extracts from citron seeds. The quantities of the compounds in these categories were higher in the ethanol extract than methanol extract. The types of these compounds were detected in larger numbers in the ethanol extract. The content of limonin was the largest in both methanol and ethanol extract among the detectable compounds; 140.34 mg/100 g and 170.98 mg/100 g, respectively, and the contents of other compounds, caffeic acid, naringin, lutein, nomilin, were found in large amount in this order. The molecular weights of forty two compounds in ethanol extract were determined with mass spectrums and extracted ion current chromatograms by HPLC/MS.

Key words: citron seed, flavonoid and limonoid compounds, HPLC/MS

서 론

유자는 우리나라 남해안 지방에서 나는 감귤류의 일종으로 주로 유자청 제조에 이용되고 있다. 유자는 전체과일의 약 10~15%정도가 씨앗으로 유자청 제조 시 부산물로 나오는 씨앗들은 전량 폐기처분되고 있다. 감귤류의 과일이나 씨앗에는 상당량의 플라보노이드 및 리모노이드 화합물들이 존재하며 이 화합물들의 정량분석을 위하여 HPLC를 이용한 방법들이 연구되어왔다(1-5). 감귤류의 플라보노이드 화합물들은 과일 내에서 일어나는 이차 대사산물로 그 화학적 특성은 bezo- γ -pyrene 유도체로 주로 flavanone과 flavone에 속하는 화합물들이다(6,7). 감귤류에 가장 많이 존재하는 플라보노이드 화합물로 hesperetin과 naringenin을 들 수 있는데 이들은 과일껍질, 조식씨앗 등에 glucoside형태인 hesperidin 및 naringin 등과 함께 존재한다(8). 감귤류에 존재하는 플라보노이드 화합물을 분류하여보면 flavanone류에 속하는 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, eriocitrin, narinutin과 flavone류에 속하는 tangeritin, nobiletin, luteolin 그리고 flavonol류인 quercetin, rutin, quercetrin, kaempferol 등과 anthocyanin 계통에 속하는 cyanidin

3-glucoside, cyanidin 3,5-glucoside, delphinidin 3-glucoside, delphinidin 3,5-glucoside, cyanidin 3-(4"-acetyl)-glucoside 등이 보고되고 있다(2). 이들 중 naringin은 주로 자몽에 많이 함유되어있고 narirutin, hesperidin은 sweet orange, eriocitrin, hesperidin은 레몬에 많은 것으로 보고되고 있다(2,9). Anthocyanin 계통의 플라보노이드는 blood orange라고 하는 적색감귤류(예: Moro)에서만 볼 수 있다(10). 리모노이드 화합물 역시 이차대사산물이며 triterpene 유도체로 주로 성숙한 과일이나 씨앗 중에 존재하는데 38개의 리모노이드 aglycone 즉 23개의 neutral limonoid와 15개의 acidic limonoid가 분리되었고(11), 최근에는 36개의 aglycone과 20개의 glucoside 형태의 리모노이드가 분리되었다(12). 이들 리모노이드 화합물은 실제로 감귤류 내에서 aglycone형태나 glucoside형태로 존재하는데 가장 많이 존재하는 것은 limonin과 nomilin으로 알려져 있고(3,4) 특히 감귤류의 씨앗은 이들 리모노이드 화합물이 매우 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있고 aglycone형태가 glucoside형태보다 훨씬 많은 것으로 보고되고 있다(13,14). 감귤류의 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 생리활성효과도 많은 연구가 진행되고 있는데 naringenin과 hesperetin이 ER-

*Corresponding author. E-mail: klwoo@mail.kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2688. Fax: 82-55-249-2995

human breast cancer cell을 저해효과(15,16) 마우스에서 유방 지방종양의 발현을 억제하였고 이들 종양의 림프절전이나 폐 전이를 저해하였다는 보고도 있다(17,18).

그 외에도 감귤류 플라보노이드가 종양생성 촉진제의 활성을 억제하였다는 보고(19)와 암조직 내에 들어오는 치료약을 조직 밖으로 펌프질하여 내보내는 암세포의 약에 대한 저항성 유전자의 활성도 억제한다는 보고도 있다(20). 플라보노이드 화합물이 혈중 cholesterol의 함량을 저하시킨다는 연구결과(21,22)와 감귤 플라보노이드가 비타민과 같은 작용으로 항바이러스, 항세균, 항곰팡이 작용을 한다는 연구결과도 있다(23). 감귤류 리모노이드 화합물 특히 limonin과 nomilin이 위암(24-26), 폐암, 피부암(25-27) 등을 억제한다는 보고가 있고 최근에는 유방암을 효과적으로 억제한다는 연구결과도 발표되고 있다(28).

감귤류에 존재하는 플라보노이드 및 리모노이드 화합물이 생리활성효과가 매우 높다는 것은 위에서 예시한 것 이외에도 수없이 많은 연구결과들이 발표되고 있다. 특히 씨앗에는 이들 물질이 과피나 조직보다 훨씬 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 자몽은 씨앗이 전체과일의 2%정도에 불과하지만 우리나라에서 생산되는 유자는 씨앗이 전체의 10~15%로 자몽에 비하여 5배 이상의 씨앗을 함유하고 있으나 적절한 이용방법이 개발되지 않아 매년 다량의 씨앗이 유자청을 만드는 과정에서 폐기되고 있다. 우리나라 식품공전에 천연물 식품첨가물로 자몽씨앗 추출물이 들어있다. 이 물질이 매년 항산화제 식품첨가물로 다량 수입되는 점을 감안할 때 우리나라 유자씨앗을 이용한 식품첨가물개발은 시급하다 할 것이며 유자씨앗에 들어 있는 생리활성물질의 추출이용 또한 앞으로 중요한 연구과제가 될 수 있을 것이다. 이러한 연구 개발은 서구의 자몽에 대한 개발에 비하여 훨씬 경쟁력이 있을 것으로 판단된다. 그러기 위하여서는 유자씨앗에 들어있는 플라보노이드 및 리모노이드 화합물을 정량 정성할 필요가 있다.

본 연구는 유자씨앗을 이용한 천연식품 첨가물제조 및 항암물질 추출연구를 위한 기초조사로 수행되었다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 유자씨앗은 경남 거제 일원에서 수확되는 유자로 유자청 제조 시 부산물로 나오는 유자씨앗을 물로 잘 세척한 후 이를 그늘에서 말려 수분함량을 5%정도로 조절하여 사용하였다. 자몽씨앗은 시중에서 구입한 자몽으로부터 분리하여 유자씨앗과 같이 처리하여 분석하였다. 몇 가지 aromatic acid류 및 플라보노이드 표준품, 즉 *p*-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, chlorogenic acid, tannic acid, *p*-coumaric acid, coumarin(cinnamic acid), 7-amino-4-methyl coumaric

acid, trans-coumaric acid(*t*-cinnamic acid), perilic acid, coumarin 35, carvone, limonene, lutein, naringin, hesperidin, quercetin dihydrate, luteolin, naringenin, kaemferol, hesperetin, flavone, flavanone, 리모노이드 표준품인 limonin과 nomilin 그리고 HPLC 분석용매 acetonitrile 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 분석시약은 특급시약을 사용하였다.

플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 추출

플라보노이드 및 리모노이드 추출은 Ohta와 Hasegawa (14)의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 즉 유자씨앗 및 자몽씨앗 각 10 g씩을 믹서기에 넣고 *n*-hexane을 씨앗 무게의 2배량을 가하여 약 30분간 간 후 여과하여 여액을 모으고 잔사에 다시 *n*-hexane을 가하여 위와 같은 방법으로 3회 더 반복하여 씨앗 중 지방을 추출하였다. 지방을 추출하고 남은 잔사를 50°C에서 건조하여 *n*-hexane을 제거 후 추출용매(methanol, ethanol)를 잔사의 5배량을 가하여 약 5시간 역류 증류한 후 여과하였다. 잔사를 동일 추출용매로 잘 세척하여 여액과 합하여 100 mL로 정용하여 HPLC와 HPLC/MS를 이용한 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 정량 및 정성 분석에 이용하였다.

HPLC에 의한 정량

HPLC는 Spectra 200 programmable wavelength UV 검출기가 장착된 Spectra Physics 8800 ternary pump HPLC (San Jose, California, USA)를 사용하였다. 검출과장은 210 nm를 사용하였다. Column은 Nova-Pak C₁₈ column(300×3.9 mm I.D., 4 μm dimethyloctadecylsilyl-bonded amorphous silica, Waters Co., Milford, MA)을 사용하였고 용매 조성은 A: 3 mM phosphoric acid/(H₂O 90:acetonitrile·10), B: 3 mM phosphoric acid/(H₂O 30:acetonitrile 70), C: 3 mM phosphoric acid/acetonitrile로 하였다. 용매구배는 A: 100%, B: 0%, C: 0%로 시작하여 5 min에 A: 88%, B: 12%, C: 0%, 10 min에 A: 75%, B: 25%, C: 0%, 15 min에 A: 65%, B: 35%, C: 0%, 20 min에 A: 55%, B: 45%, C: 5%, 25 min에 A: 45%, B: 45%, C: 20%, 30 min에 A: 20%, B: 50%, C: 30%, 35 min에 A: 5%, B: 30%, C: 65%, 40 min에 A: 0%, B: 0%, C: 100%로 하여 분석하였다. 용매 흐름속도는 1.2 mL/min으로 하였고 column온도는 30°C로 고정하여 분석하였다. 표준품은 methanol에 녹여 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL 및 5 mg/mL로 만들어 검량선을 작성하여 정량하였다.

HPLC/MS에 의한 정성

LC-ESI-MS는 HP-1100 HPLC(Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)에 장착된 Quattro LC triple quadrupole tandem mass spectrometer(Waters Co., Milford, MA)을 사용하였고 ion source온도는 70°C, capillary voltage는 3700 V, cone voltage는 30 V, gas온도는 200°C, nebulizer gas flow는 90 L/hr, desolvation gas flow는 646 L/hr로 하여 분석하였다.

분석에 사용한 column과 용매, 용매구배 등은 HPLC를 이용한 정량분석 시와 동일하게 수행하였으나 HPLC분석 시 용매에 첨가된 인산은 acetic acid로 대체하였다.

결과 및 고찰

유자씨앗의 추출물로부터 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 분석

Fig. 1에 감귤류에 많은 플라보노이드, 리모노이드 및 aromatic acid 표준품과 유자씨앗으로부터 methanol과 ethanol로 추출한 추출물의 HPLC에 의한 분석크로마토그램을 나타내었다. Methanol로 추출한 경우보다 ethanol로 추출한

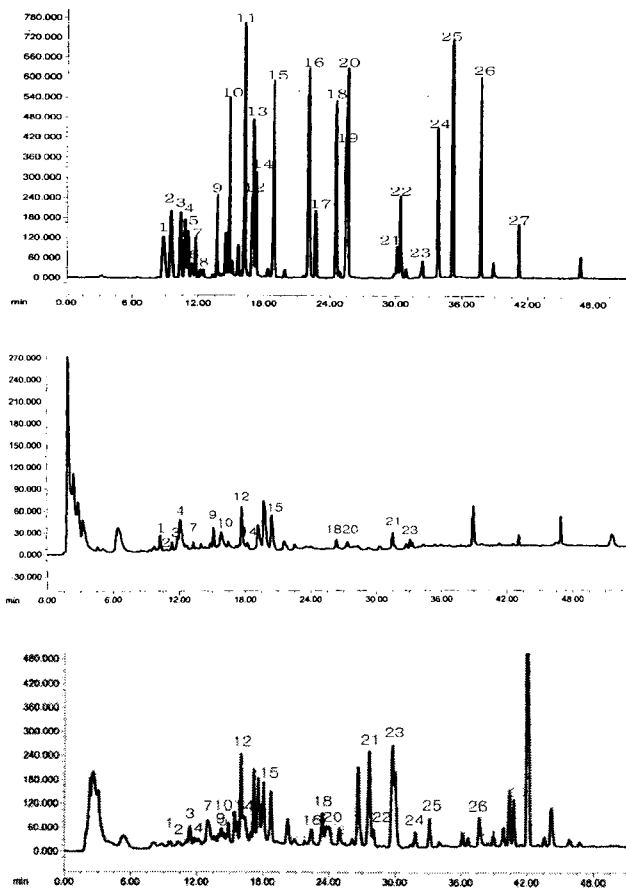


Fig. 1. HPLC chromatograms of flavonoid and limonoid compounds of standard, methanol and ethanol extracts from citron seed.

Upper: standard compound. Middle: methanol extract.

Under: ethanol extract.

1: *p*-Hydroxybenzoic acid, 2: Gentisic acid, 3: Vanillic acid, 4: Caffeic acid, 5: Syringic acid, 6: Chlorogenic acid, 7: Tannic acid 1, 8: Tannic acid 2, 9: *p*-Coumaric acid, 10: Lutin, 11: 7-Amino-4-methyl coumaric acid, 12: Naringin, 13: Ghost peak, 14: Hesperidin, 15: Coumarin (cinnamic acid), 16: Quercetin dihydrate + Luteolin, 17: trans-Coumaric acid (*t*-cinnamic acid), 18: Naringenin, 19: Kaemferol, 20: Hesperetin, 21: Limonin, 22: Carvone + Perilic acid, 23: Nomilin, 24: Flavone, 25: Flavanone, 26: Coumarin 35, 27: Limonene.

경우가 훨씬 많은 종류의 peak들이 나타났다. 특히 머무름 시간이 증가할수록 methanol추출에 비하여 더 많은 peak들이 나타났다. 이는 ethanol이 methanol보다 극성이 낮은 용매임을 감안하면 당연한 결과이다. 즉 methanol보다 ethanol이 극성이 낮은 물질을 많이 추출함을 알 수 있다. Ethanol추출의 경우 약 48개의 peak를 얻을 수 있었다. 각 peak의 동정은 시료에 개별 표준품을 첨가하는 방법과 LC/MS spectrum과 ion current chromatogram 등을 확인하여 동정하였다.

HPLC에 의한 정량 분석

Table 1에 HPLC로 분석한 유자씨앗 중 각 화합물의 함량을 자몽씨앗과 비교하여 나타내었다. Aromatic acid류들은 methanol이나 ethanol추출 간에 큰 차이를 나타내지 않았으나 플라보노이드 및 리모노이드 화합물은 ethanol추출의 경우 훨씬 높게 나타났다. 특히 lutin, hesperidin, naringenin, limonin 등이 높게 나타났고 quercetin dihydrate, luteolin, *t*-coumarin, flavone, flavanone, coumarin 35 등은 methanol추출 시는 없었으나 ethanol추출 시 상당량 추출되었다. 추출용매에 관계없이 가장 높은 함량을 보인 것은 limonin으로 methanol추출시 140.34 mg/100 g, ethanol추출 시에 170.98 mg/100 g로 나타났고 그 다음이 caffeic acid, naringin, lutin, nomilin 등의 순으로 나타났다. Methanol이나 ethanol추출 시 모두 자몽씨앗에 비하여 거의 모든 화합물이 상당히 높게 나타났고 특히 플라보노이드(lutin, naringin, naringenin, hesperetin) 및 리모노이드(limonin, nomilin)의 함량은 월등히 높게 나타났다.

Table 1. The contents of aromatic acid, flavonoid and limonoid compounds in the citron seed (mg/100 g)

(Dry matter base)

Compounds	Extraction solvents			
	Methanol		Ethanol	
	Citron	Grapefruit	Citron	Grapefruit
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	14.59	2.94	15.45	2.84
Genistic acid	1.54	2.98	1.88	1.98
Vanilic acid	13.54	5.12	15.45	4.97
Caffeic acid	98.36	2.54	102.76	3.54
Tannic acid	13.84	9.77	17.99	10.56
<i>p</i> -Coumaric acid	38.26	-	45.35	-
Lutin	34.88	2.45	65.12	12.20
7-Amino-4-methyl coumarin	trace	-	3.56	-
Naringin	97.72	17.99	100.43	66.76
Hesperidin	10.82	23.45	21.78	20.84
Coumarin	13.97	-	17.91	-
Quercetin dihydrate + Luteolin	-	-	5.78	1.45
<i>t</i> -Coumarin	-	-	7.89	3.54
Naringenin	10.76	1.76	16.12	9.88
Hesperetin	7.55	2.88	10.67	3.75
Limonin	140.34	8.79	170.98	56.75
Nomilin	41.40	3.22	45.36	20.54
Flavone	-	-	10.32	-
Flavanone	-	-	7.54	-
Coumarin 35	-	-	9.66	3.12

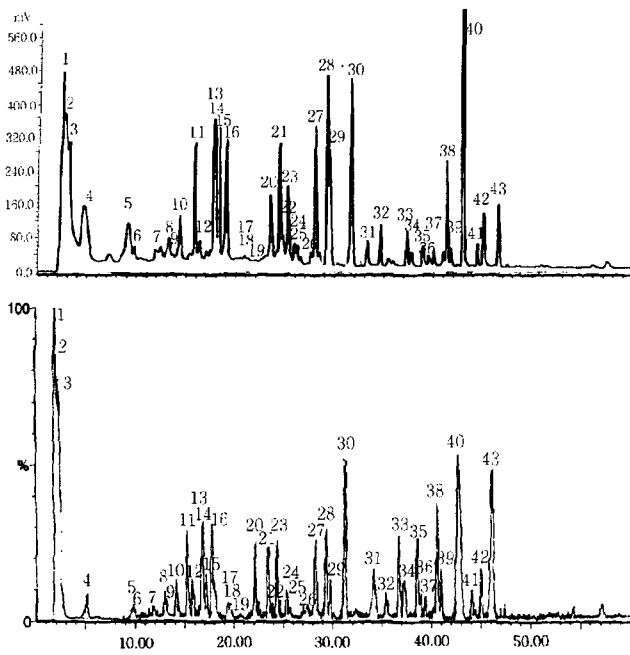


Fig. 2. Simultaneous LC/UV chromatogram (upper) and total ion chromatogram of LC/MS (under) of the ethanol extracts from citron seeds. Peak assignments are listed in Table 2.

HPLC/MS에 의한 정성 분석

Fig. 2에 ethanol 추출물에 대한 HPLC chromatogram과 HPLC/MS에 의한 total ion chromatogram(TIC)을 비교하여 나타내었다. 총 40개의 peak들에 대하여 분자량 측정이 가능하였다. HPLC chromatogram과 TIC가 비교적 잘 일치하였다.

Table 2에 각 peak에 대한 [M+H]⁺와 정성된 화합물명을 타내었다. 표준물질의 머무름 시간으로 정성된 *p*-hydroxy

Table 2. Peak assignment for the analysis of the 95% ethanol extractor from fermented citron seeds

Peak	t _R (min, TIC)	[M+H] ⁺	Identification
1	2.16	287	Unable
2	2.36	287	Unable
3	2.59	287	Unable
4	5.23	427	Unable
5	9.92	169	Vanillic acid
6	10.05	181	Caffeic acid
7	11.98	-	Tannic acid ¹⁾
8	13.07	165	<i>p</i> -Coumaric acid
9	13.20	-	Unable
10	14.21	665	Lutin
11	15.43	581	Naringin
12	15.87	611	Hesperidin
13	16.80	663	Unable
14	16.95	607	Unable
15	17.31	147	Coumarin
16	17.99	607	Unable
17	19.48	-	Unable
18	19.76	-	Unable
19	20.69	339	Quercetin dihydrate
20	22.21	505	Unable
21	23.31	273	Naringenin
22	23.90	258	Unable
23	24.41	303	Hesperetin
24	25.50	353	Unable
25	25.62	295	Unable
26	27.51	487	Unable
27	28.23	473	Unable
28	29.44	471	Limonin
29	29.78	-	Perillic acid + carvone
30	31.23	515	Nomilin
31	34.01	223	Flavone
32	35.51	225	Flavanone
33	36.88	301	Hispidulin
34	37.20	301	Methoxyflavone derivative
35	38.68	286	Coumarin
36	38.99	277	Unable
37	39.35	295	Unable
38	40.60	355	Flavanone derivative
39	41.03	263	Flavanone derivative
40	42.60	143	Unable

¹⁾Only by standard t_R.

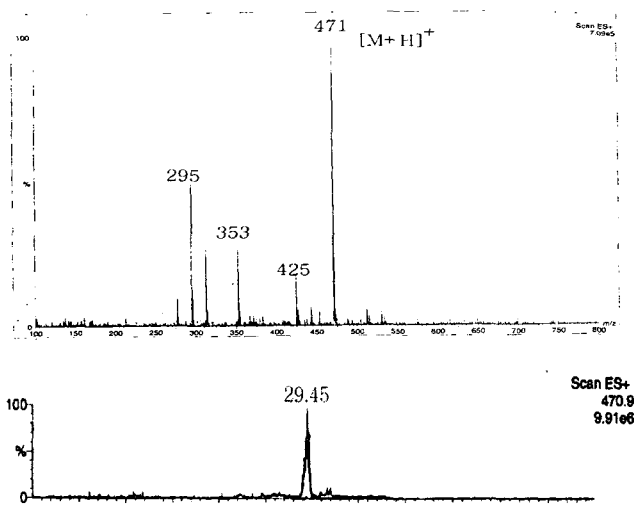


Fig. 3. m/z spectrum of the peak number 28 in total ion chromatogram from LC/MS in Fig. 2 (above) and extracted ion current chromatogram of m/z 471 (under). m/z 471 was limonin, [M+H]⁺.

benzoic acid와 gentistic acid는 HPLC/MS로 정성할 수가 없었고 나머지 표준물질로 정성된 peak들은 HPLC/MS에 의한 정성결과와 잘 일치하였다. 본 연구에서는 표준물질의 HPLC/MS spectrum을 얻어 시료의 spectrum과 비교하여 확인하지 않고 시료의 각 peak에 대한 HPLC/MS spectrum과 TIC의 각 peak의 extracted ion current chromatogram으로 동정하였다. Fig. 3에 TIC 중 28번 peak의 mass spectrum과 m/z 471에 해당하는 extracted ion current chromatogram을 나타내었다. 여기서 TIC상의 28번 peak 머무름 시간은 29.44 min(Table 2)이고 extracted ion current chromatogram상의 471 m/z이온의 머무름 시간은 29.45 min (Fig. 3)으로 서로 일치하고 있다. Mass spectrum에서 471이 가장 큰 m/z이며(Fig. 3) Fig. 3 이외의 모든 extracted ion current chromatogram에서 29.4 min대에 471이외의 다른

mass를 가진 m/z 이온은 나타나지 않으므로 이 이온은 [limonin aglycone+H]⁺로 판단되었다. 그러므로 TIC상의 29.44 min에 나타난 peak는 limonin으로 판단할 수 있었다.

Fig. 4에 limonin의 mass spectrum에 나타난 m/z 295, 313.3, 353의 extracted current ion chromatogram을 나타내었다. 29.4 min대의 peak들은 limonen의 fragmentation들이고 25.5 min대에 3개의 peak가 나타나고 있는데 이는 TIC 중의 25.50 min에 나타난 24번 peak도 m/z 295, 313.3, 353의 fragmentation으로 파괴된다는 것을 의미한다. 24번 peak는 표준물질이 없는 peak로 분자량을 예측하려면 우선 24번 peak의 mass spectrum을 보아야 할 것이다. Fig. 5에 TIC에서 24번 peak의 mass spectrum을 나타내었다. 이 mass spectrum에는 353보다 큰 m/z 즉 455, 533, 596 등이 보이지만 total ion chromatogram상의 모든 peak들에 대한 extracted current chromatogram에서 353보다 큰 m/z 값을 갖는 이온이 이 머무름 시간에는 나타나지 않으므로 353을 이 peak의 분자량으로 규정한 것이다. 이상과 같은 방법으로 표준물질이 있는 것과 없는 peak들에 대하여 분자량을 결정하여 나타낸 것이 Table 2이다.

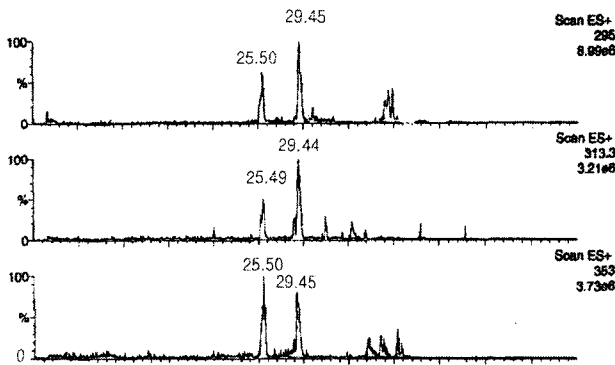


Fig. 4. Extracted ion current chromatograms of peak number 28 in total ion chromatogram (Fig. 2). Chromatograms were recorded at m/z 353, 313, 295 corresponding to m/z of aglycone of limonin.

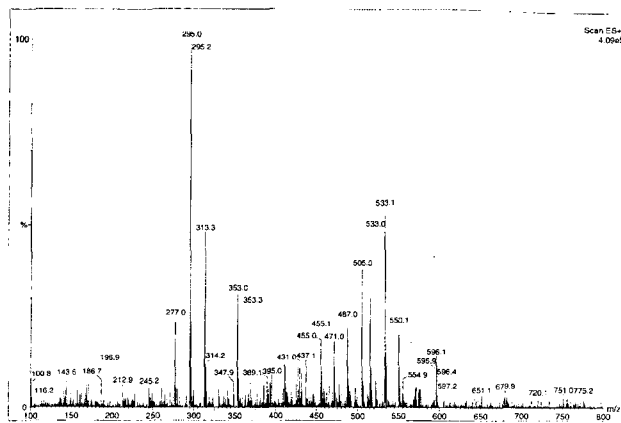


Fig. 5. m/z spectrum of peak number 24 (retention time 25.50 min) in total ion chromatogram from LC/MS.

요 약

유자씨앗 중의 플라보노이드 및 리모노이드 화합물을 methanol 및 ethanol로 추출 HPLC로 정량한 결과 ethanol추출의 경우가 거의 모든 화합물에서 높게 나타났고 화합물의 종류도 더 많이 검출되었다. Limonin이 methanol 추출의 경우 140.34 mg/100 g, ethanol 추출의 경우 170.98 mg/100 g으로 개별화합물 중 가장 높은 함량을 나타내었고 그다음 이 caffeic acid, naringin, lutein, nomilin 등의 순으로 높았다. HPLC/MS에 의하여 약 42가지 화합물의 분자량 측정이 가능하였으며 mass spectrum과 extracted current ion chromatogram으로 분자량 측정이 가능하였다.

감사의 글

본 연구는 경남대학교 연구기금의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Rouseff RL. 1988. Liquid chromatographic determination of naringin and hesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice. *J Assoc Anal Chem* 71: 798-802.
- Park GL, Avery SM, Byers JL, Nelson DB. 1983. Identification of bioflavonoid from citrus. *Food Technol* 37: 98-105.
- Herman Z, Fong CH, Ou P, Hasegawa S. 1990. Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *J Agric Food Chem* 38: 1860-1861.
- Hasegawa S, Bennett RD, Verdon CP. 1980. Limonoids in citrus seeds: Origin and relative concentration. *J Agric Food Chem* 28: 922-925.
- Shaw PE, Wilson CW. 1984. A rapid method for determination of limonin in citrus juices by high performance liquid chromatography. *J Food Sci* 49: 1216-1218.
- Cook N, Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76.
- Girard B, Mazza G. 1998. Functional grape and citrus products. In *Functional Foods*. Mazza G, ed. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster. p 155-191.
- Horowitz RM, Gentili B. 1977. Flavonoid constituents of citrus. In *Citrus Science and Technology*. Nagy S, Shaw PE, Veldhuis MK, eds. AVI Publishing Company Inc., Westport, CT.
- Rouseff RL. 1988. Liquid chromatographic determination of naringin and hesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice. *J Assoc Anal Chem* 71: 798-802.
- Mazza G, Miniati E. 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetable and grains*. CRC Press, Boca Raton, FL. p 211-212.
- Hasegawa S, Miyake M, Ozaki Y. 1994. Biochemistry of citrus limonoids and their anticarcinogenic activity. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Fruit and Vegetables*. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT, eds. American Chemical Society Symposium Series 546, Washington, DC. p 198-208.
- Hasegawa S, Herman Z. 1992. Biochemistry of limonoids in citrus. In *Secondary Metabolite Biosynthesis and Metabolism*. Petroski RJ, McCormick SP, eds. Plenum Press,

- New York.
13. Ozaki Y, Fong CH, Herman Z, Maeda H, Miyake M, Ifuku Y, Hasegawa S. 1991. Limonoid glucosides in citrus seeds. *Agric Biol Chem* 55: 137-141.
 14. Ohta H, Hasegawa S. 1995. Limonoids in Pummelos [*Citrus grandis* (L.) Osbeck]. *J Food Sci* 60: 1284-1285.
 15. Guthrie N, Moffat M, Chambers AF, Spence JD, Carrol KK. Inhibition of proliferation of human breast cancer cells by naringenin, a flavonoid in grape fruit. *Natl Forum Breast Cancer*. p. 118 (Abstract).
 16. Guthrie N, Gapor A, Chambers AF, Carrol KK. 1997. Palm oil tocotrienols and plant flavonoids act synergically with each other and with tamoxifen in inhibiting proliferation and growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF human breast cancer cells in culture. *Asia Pac J Clin Nutr* 6: 41-45.
 17. Guthrie N, Chambers AF, Carrol KK. 1997. Effects of orange juice, grapefruit juice and their constituent flavonoids on the growth of a human breast cancer cell line in nude mice. Abstract PW 10.8 presented at 16th Int. Cong Nutr. p 66.
 18. Guthrie N, Kurowska EM. 2001. Anticancer and cholesterol-lowering activities of citrus flavonoids. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Wildman REC, ed. CRC Press, Boca Raton. p 123-126.
 19. Fujiki H, Horiuchi T, Ymashita K, Haki H, Hiratta Y, Sugimura T. 1986. Inhibition of tumor promotion by flavonoids. In *Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. Cody V, Middleton E, Haeborne JB, eds. Alan R Liss Inc., New York, NY. p 429-440.
 20. Kioka N, Hosokawa N, Komano T, Hirayoshi K, Nagata K, Ueda K. 1992. Quercetin, a bioflavonoid, inhibit the increase of human multidrug resistance gene (MDRI) expression caused by arsenite. *FEBS Lett* 301: 307-309.
 21. Kurowsaka EM, Hrabek-Smith JM, Carroll KK. 1989. Compositional changes in serum lipoproteins during developing hypercholesterolemia induced in rabbits by cholesterol-free semipurified diets. *Atherosclerosis* 78: 159-165.
 22. Kurowska EM, Borradaile NM. 2000. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juice in rabbits. *Nutr Res* 20: 121-129.
 23. Huet R. 1982. Constituants des agrumes à effet pharmacodynamique: les citroflavonoïdes. *Fruits* 37: 267-271.
 24. Lam LKT, Hasegawa S. 1989. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids. *Nutr Cancer* 12: 43-47.
 25. Lam LKT, Zhang J, Hasegawa S. 1994. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol* 48: 104-108.
 26. Lam LKT, Zhang J, Hasegawa S, Shut HAJ. 1994. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus limonoids. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Fruit and Vegetables*. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT, eds. American Chemical Society Symposium Series 546, Washington, DC. p 209-219.
 27. Lam LKT. 1989. The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* 10: 1535-1537.
 28. Guthrie N, Chambers AF, Carrol KK. 1997. Inhibition of MDA-MB-435 estrogen receptor-negative human breast cancer cells by citrus limonoids. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38: 113-114 (Abstract 759).

(2005년 10월 27일 접수; 2006년 3월 3일 채택)