

Liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS)에 의한 당유자 과실의 리모노이드 함량 분석

부경환 · 김하나 · 류기중 · 김연우¹ · 조문제¹ · 김소미*

제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부, ¹제주대학교 의과대학 의학과

Analysis of the Limonoid Contents of *Dangyuja* (*Citrus* spp.) by Liquid Chromatography-mass Spectrometry (LC-MS)

Kyung Hwan Boo, Hana Kim, Key Zung Riu, Youn Woo Kim¹, Moonjae Cho¹ and Somi Kim Cho^{2,*}

College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

¹Department of Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

²The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Received August 3, 2007; Accepted August 30, 2007

The contents of limonin, nomilin and limonin glucoside in different tissues of *dangyuja* (*Citrus* spp.) were measured during fruit growth and maturation by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Both nomilin and limonin contents increased from June, peaked in October and in December, respectively, and then decreased afterwards. In contrast, the content of limonin glucoside increased from October and remained at high levels throughout the maturation. The contents of limonin, nomilin and limonin glucoside in peel decreased gradually throughout the growth and the trends of changes were similar to each other. However, all three limonoid contents in juice sac increased dramatically at the end of fruit maturation. The highest concentration of limonin and nomilin was observed in seed, followed by segment membrane, whereas the highest limonin glucoside concentration was observed in segment membrane, followed by juice sac.

Key words: *citrus*, *dangyuja*, LC-MS, limonin, limonin glucoside, nomilin

서 론

감귤의 쓴맛 성분은 감귤산업에 있어서 큰 문제점 중 하나인데 쓴맛의 대표적인 성분으로는 limonoid 화합물이 잘 알려져 있다.¹⁾ Limonoid 화합물은 triterpene의 유도체로 감귤류에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 화합물의 쓴맛은 감귤류 주스산업에 치명적인 영향을 미치고 있다.²⁾ 다양한 종류의 limonoid 화합물이 감귤류 씨와 과일 조직에서 nomilin을 시작물질로 하여 독립적인 경로에 의해 생합성된다.^{2,3)} 현재까지 감귤류에서는 39종의 aglycone과 21종의 glucoside 형태가 밝혀졌는데, 그 중 limonin과 nomilin의 함량이 가장 높은 것으로 알려져 있다(Fig. 1).⁴⁻⁶⁾

Limonoid 화합물은 다양한 생리활성과 더불어 곤충의 식물 섭식저해활성도 높은 것으로도 잘 알려져 있는데 특히 limonin과 nomilin은 위암, 폐암, 피부암 등을 억제한다는 보고가 있고,

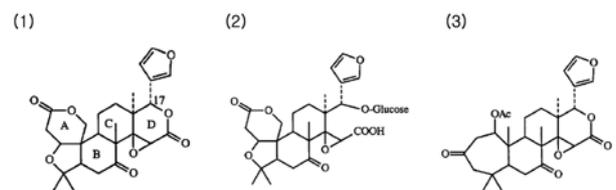


Fig. 1. Important Citrus Limonoids. limonin (1), limonin 17-β-D-glucopyranoside (2), nomilin (3).

최근에는 이 두 화합물과 더불어 limonoid glucoside도 지방암 억제 활성이 높은 것으로 보고되었다.⁷⁻¹⁴⁾ 이로 인해 여러 연구자들이 limonoid 화합물을 제거하지 않고 쓴맛의 문제점을 해결하려는 연구들을 진행하고 있고, 최근에는 limonoid glucosyltransferase를 이용하여 과실 또는 주스의 aglycone 형태를 glucoside 형태로 전환함으로써 감귤의 쓴맛을 해소하려는 연구가 많이 진행되고 있다.^{15,16)}

현재까지 감귤에서 limonoid 화합물에 관한 연구는 화합물의 발굴이나 구조 결정이 주를 이루고 있으며, 과실의 성숙시기나 조직부위별 함량 변화에 관한 연구 보고는 미흡한 실정이다. 특

*Corresponding author

Phone: +82-64-754-3348; Fax: +82-64-756-3351

E-mail: somikim@cheju.ac.kr

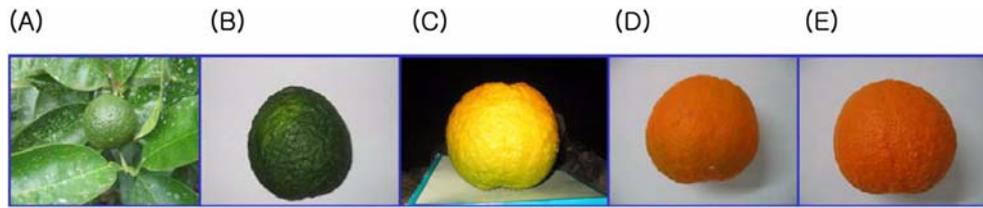


Fig. 2. *Dangyuja* (*Citrus* spp.) fruits in different growth and maturation stages. June (A), October (B), December (C), February (D), and March (E).

히 제주 재래감귤인 당유자는 쓴맛이 강해 생과로 섭취하기 보다는 대부분 고농도의 설탕에 절인 당유자청으로 제조되어 소비되고 있는 감귤류인데, 제주산 당유자의 성숙시기별, 조직부위별 limonoid 화합물 함량에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 limonoid 화합물의 쓴맛 제거와 생리활성 유지를 위한 연구들과 더불어 감귤의 limonoid 함량 변화에 관한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 감귤 과실의 성숙시기별 limonoid 함량 변화와 조직부위별 분포를 알아볼 목적으로 제주산 당유자를 대상으로 limonin, nomilin 및 limonin glucoside 함량을 LC-MS를 이용하여 정량하였다.

재료 및 방법

시료. 본 실험에 사용된 당유자 과실은 제주시내에 위치한 제주특산사의 농장에서 미숙기(6월), 성숙초기(10월), 성숙후기(12월), 완숙초기(2월) 및 완숙후기(3월)에 채취되었다(Fig. 2). 각 시기별 과실은 슬라이스 하였고, 성숙후기 및 완숙기 과실은 peel과 juice sac로 별도 분리하였으며, 완숙후기(3월) 과실은 조직부위별로 flavedo, albedo, segment membrane, juice sac, seed로 분리하여 동결건조 한 후 -80°C 에 보관하면서 분석시료로 이용하였다.

표준품. 분석에 사용한 표준품 중 limonin과 nomilin은 Sigma사(St. Louis, USA)로부터 구입하였고, limonin glucoside는 LKT Laboratories사(St. Paul, MN, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Limonoid 화합물의 추출. 마쇄된 건조시료 0.5 g을 50 ml methylene chloride와 혼합하여 50°C 에서 1시간 동안 환류추출한 후 여과하여 여액을 수거하였다. 잔사는 50°C 에서 30분간 건조한 후 50 ml methanol과 혼합하여 37°C 에서 150 rpm으로 1시간 동안 현탁추출 하였다. 추출액은 여과하여 여액을 수거한 후 감압농축 하였으며, 물과 methylene chloride가 같은 비율로 혼합된 용액 5 ml로 재용해하여 상분리가 될 때까지 실온에 방치하였다. 상분리 후 물층은 $0.22\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과한 후 limonin glucoside 함량 분석의 검액으로 사용하였다. Methylene chloride층은 앞의 methylene chloride 여과액과 혼합한 후 감압농축 하였으며, 건조물은 acetonitrile 2.5 ml로 재용해하여 limonin과 nomilin 함량 분석 검액으로 사용하였다.

LC-MS 분석. 분석에 사용된 HPLC/MS는 Waters사의 2690 XE HPLC가 부착된 ZQ 4000 모델을 사용하였다. 본 실험에서는 limonin과 nomilin을 같은 조건에서 동시분석 하였는데, 이

때 HPLC의 column은 Spherical C_{18} column(3.9 mm I.D. \times 15 cm)을 사용하였고, 이동상은 A: acetonitrile, B: water를 사용하였다. 이동상구배는 A: 10%, B: 90%로 시작하여 50분에 A: 60%, B: 40%, 55분에 A: 90%, B: 10%, 65분에 A: 90%, B: 10%, 70분에 A: 10%, B: 90%, 75분에 A: 10%, B: 90%로 분석하였다. 이동상의 유속은 $0.4\ \text{ml}/\text{min}$ 으로 하였으며, column 온도는 35°C 로 하였다.

Limoin glucoside의 HPLC 조건은 이동상과 이동상 구배조건을 제외하고는 limonin과 nomilin 분석조건과 동일하게 하였다. Limonin glucoside의 HPLC 이동상으로는 A: acetonitrile (0.05% trifluoroacetic acid), B: water(0.05% trifluoroacetic acid)를 사용하였고, 이동상구배는 A: 2%, B: 98%로 시작하여 30분에 A: 30%, B: 70%, 35분에 A: 2%, B: 98%, 38분에 A: 2%, B: 98%로 분석하였다.

Limoin과 nomilin 분석 시 MS 조건은 ES(+) 모드를 사용하여 각각 m/z 471과 515에서 동정하였으며, cone voltage는 30 V, capillary voltage는 4000 V, source 온도는 140°C , desolvation 온도는 400°C , cone gas flow는 15 l/hr, desolvation gas flow는 500 l/hr로 하였다.

Limoin glucoside 분석 시 MS 조건은 ES(-) 모드를 사용하여 m/z 649에서 동정하였으며, cone voltage는 50 V, capillary voltage는 3000 V로 하였고 그 외 조건은 limonin과 nomilin 분석조건과 동일하게 하였다.

표준품은 limonin과 nomilin의 경우 acetonitrile에 녹인 후 각각의 농도가 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 및 $10.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 이 되도록 혼합제조 하였으며, limonin glucoside의 경우 물에 녹인 후 농도가 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 및 $10.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 이 되도록 제조하여 검량선 작성에 사용하였다.

결과 및 고찰

Limonoid 화합물의 HPLC/MS 분석. Limonin과 nomilin의 혼합표준품 및 당유자 과실 추출물을 HPLC/MS로 분석하였을 때의 chromatogram은 Fig. 3에 나타내었다. 이 두 화합물의 표준품은 각각 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 해당하는 m/z 471과 515 peak로 동정되었고, 두 peak의 머무름 시간은 28.76과 33.11 min.으로 확인되었다. 당유자 과실 추출물에서도 표준품의 머무름 시간과 동일한 시간대에 m/z 471과 515 peak가 확인되어 이 두 peak를 기준으로 정량분석 하였다.

Limoin glucoside의 HPLC/MS 분석 chromatogram은 Fig. 4에 나타낸 것과 같으며, 표준품은 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 에 해당하는 m/z 649

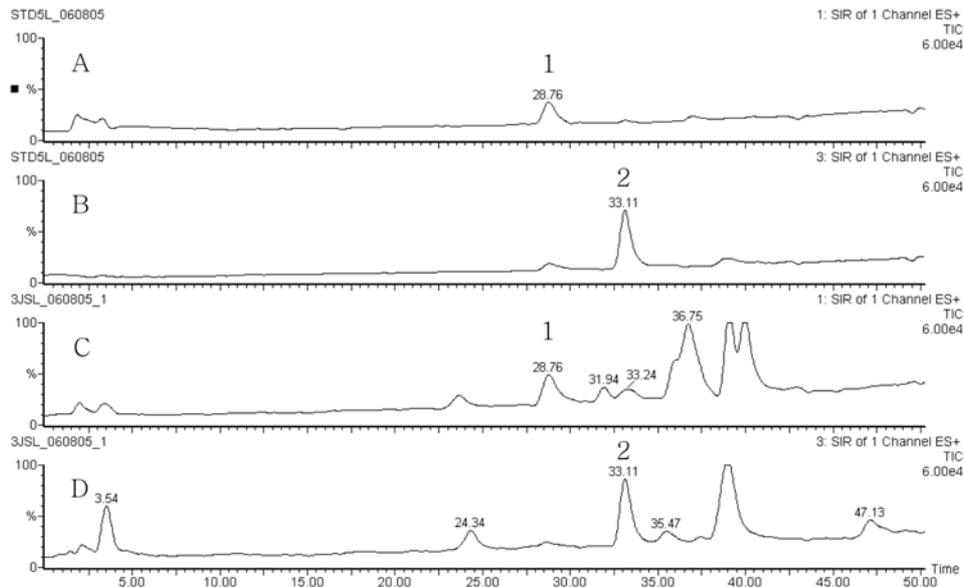


Fig. 3. LC-MS chromatograms of limonin and nomilin. A: m/z 471 ion chromatogram of limonin standard, B: m/z 515 ion chromatogram of nomilin standard, C: m/z 471 ion chromatogram of *dangyuja* extract, D: m/z 515 ion chromatogram of *dangyuja* extract, 1: Limonin, 2: Nomilin.

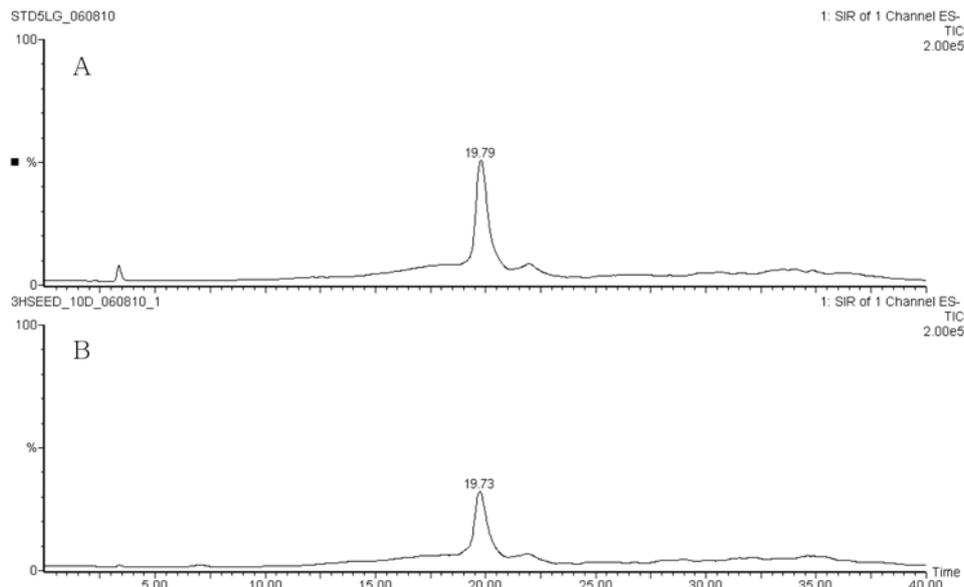


Fig. 4. LC-MS chromatograms of limonin glucoside. A: m/z 649 ion chromatogram of standard, B: m/z 649 ion chromatogram of *dangyuja* extract.

peak로 동정됨을 알 수 있었다. Peak의 머무름 시간은 19.79 min.으로 확인되었는데, 당유자 과일 추출물에서도 표준품의 머무름 시간과 동일한 시간대에 m/z 649 peak가 확인되어 limonin glucoside의 정량분석은 이 peak를 기준으로 하였다.

과실의 성숙시기별 limonoid 화합물의 함량. 당유자 과실을 성숙시기에 따라 미숙기부터 완숙기에 이르기까지 5회에 걸쳐 수확한 후 limonin, nomilin 및 limonin glucoside 함량을 분석한 결과는 Fig. 5에 나타낸 것과 같았다. Limonin의 함량은 미숙기인 6월에 비해 성숙초기인 10월에 급격하게 증가된 것을 알 수 있었으며 성숙후기인 12월에 가장 높아 228.8 $\mu\text{g/g(DW)}$ 으로 나타났다. 그러나 완숙기에 들어서는 함량이 감소하는 경향을 보였으며, 완숙후기인 3월에는 52.5 $\mu\text{g/g(DW)}$ 으로 성숙후

기에 비해 약 4배 정도 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 Savitree jungsakulrujirek 등이 *C. reticulata* 과실의 수확시기에 따른 limonin 함량 변화를 분석한 결과에서 과실이 완숙해감에 따라 limonin 함량이 감소하는 경향을 보인 것과 유사한 결과였으며, 시기별 함량도 유사한 것으로 확인되었다.¹⁷⁾

Nomilin의 함량 역시 미숙기인 6월에 비해 성숙초기인 10월에 급격하게 증가된 것을 알 수 있었는데, 이때의 함량은 408.3 $\mu\text{g/g(DW)}$ 으로 나타났다. 하지만 성숙후기에는 다시 그 함량이 급격하게 감소하였으며 완숙기에 들어서도 지속적으로 감소하여 완숙후기인 3월에는 12.0 $\mu\text{g/g(DW)}$ 으로 과실 중 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다.

Limonic glucoside의 함량 변화는 limonin과 nomilin의 함량

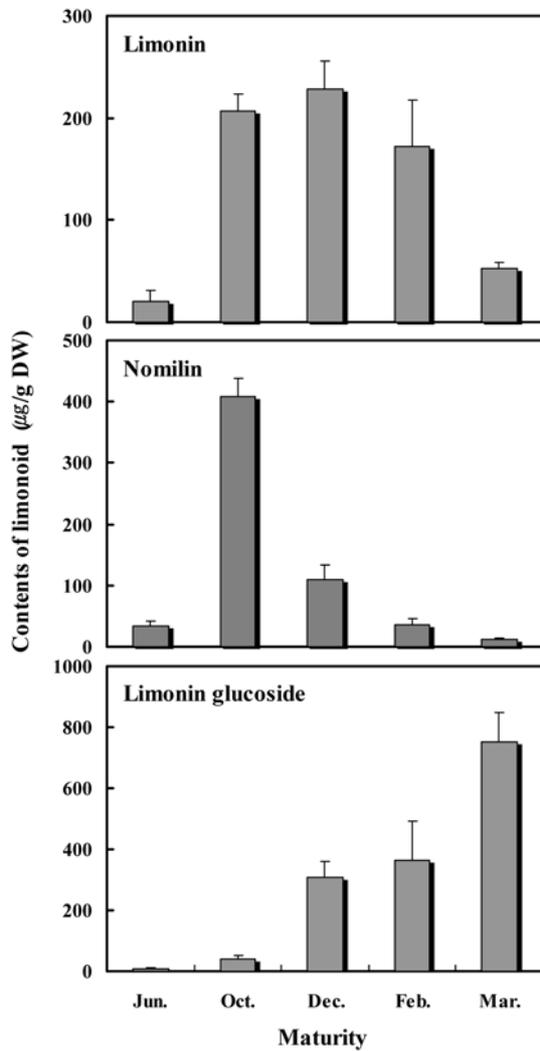


Fig. 5. Limonoid contents of *dangyuja* during fruit growth and maturation.

변화와는 다소 다른 경향을 보였다. Limonin과 nomilin의 함량이 성숙기에 급격하게 증가하였다가 완숙기에는 감소하는 경향과 달리 limonin glucoside의 함량은 과실의 성숙에 따라 지속적으로 증가하여 완숙후기인 3월에는 753.3 µg/g(DW)까지 높아지는 것을 알 수 있었다.

상기 결과들을 종합해 볼 때, 당유자 과실의 성숙초기인 10월까지는 aglycone 형태인 limonin과 nomilin의 함량이 glucoside 형태인 limonin glucoside의 함량 보다 높은 것으로 나타났지만, 완숙기인 2월과 3월에는 과실 내 limonin glucoside 함량이 limonin과 nomilin의 함량보다 높아지는 것을 알 수 있었다. 이는 완숙기 당유자 과실에서 aglycone 형태의 화합물이 glucoside 형태의 화합물로 전환되어 나타나는 결과라고 사료되며, limonin glucoside의 생합성에 있어서 상위 전구물질인 nomilin과 직전 전구물질인 limonin의 함량의 감소시기 또한 이를 뒷받침 해주는 결과라 생각된다.

Peel 및 juice sac의 성숙에 따른 limonoid 화합물 함량. 당유자 과실을 성숙후기인 12월과 완숙기인 2월 및 3월에 채취한 후 peel 및 juice sac의 limonin, nomilin 및 limonin glucoside

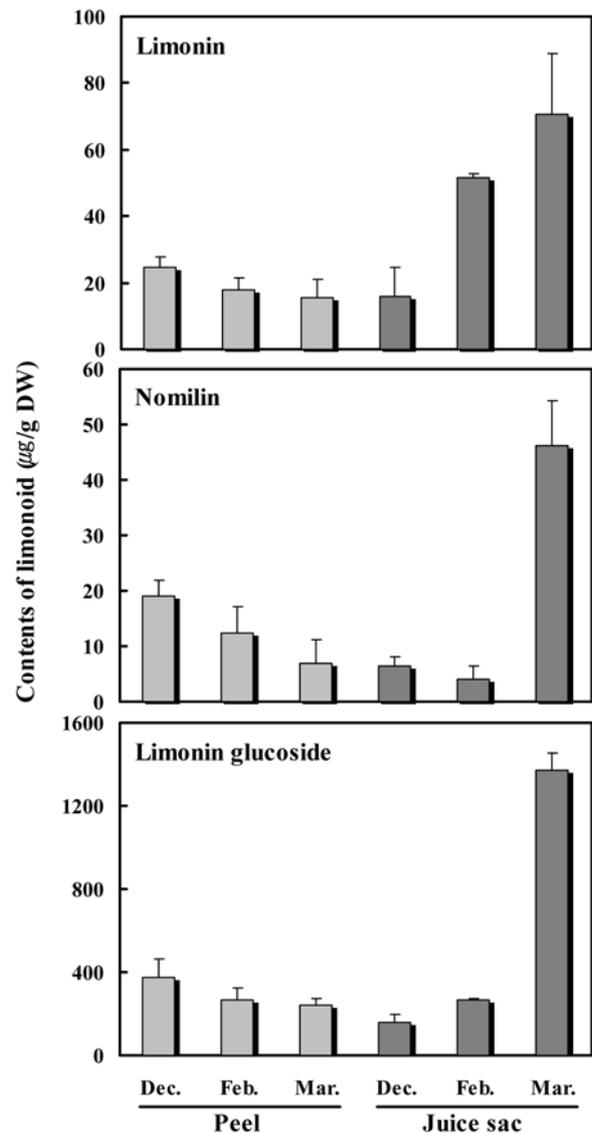


Fig. 6. Contents of limonoid in peel and juice sac of *dangyuja* during fruit growth and maturation.

함량을 분석한 결과, Fig. 6에 나타낸 것과 같이 세 가지 성분 모두 과실이 완숙함에 따라 peel에서의 함량은 감소하는 경향을 보인 반면, juice sac에서의 함량은 증가하는 경향을 보였다. Limonin의 경우 성숙후기인 12월에는 peel에서의 함량이 juice sac에서의 함량보다 다소 높았으나, 완숙기에 들어서는 juice sac에서의 함량이 peel에서의 함량보다 높아진 것을 알 수 있었으며, 완숙후기의 juice sac에서의 함량은 성숙후기의 juice sac에서의 함량에 비해 4배 이상 증가한 70.6 µg/g(DW)으로 나타났다. Nomilin의 경우는 성숙후기와 완숙초기에는 peel에서의 함량이 juice sac에서의 함량보다 높았으나, 완숙후기에는 juice sac에서의 함량이 peel에서의 함량보다 10배가량 높은 46.1 µg/g(DW)이었으며, 이는 완숙초기 juice sac에서의 함량보다도 10배 이상 증가된 것이었다. Limonin glucoside의 경우도 성숙후기에는 peel에서의 함량이 juice sac에서의 함량보다 높았으나, 완숙후기에는 juice sac에서의 함량이 peel에서의 함량보다 6배

Table 1. Contents of limonoid in different tissues of mature dangyuja fruit

Tissue	Contents ($\mu\text{g/g DW}$)		
	Limonin	Nomilin	Limonin-Glucoside
Flavedo	56.4 ± 17.2	3.6 ± 1.6	307.1 ± 34.9
Albedo	25.2 ± 12.4	5.8 ± 2.9	64.9 ± 7.5
Segment membrane	166.8 ± 40.3	163.7 ± 9.4	1829.0 ± 121.6
Juice sac	55.8 ± 15.9	46.1 ± 8.1	1373.0 ± 80.5
Seed	606.0 ± 172.2	1179.0 ± 91.2	397.9 ± 23.3

가량 높은 $1373.0 \mu\text{g/g(DW)}$ 으로 나타났으며, 완숙초기 juice sac에서의 함량보다도 6배가량 증가된 것이었다. 뿐만 아니라 성숙후기와 완숙기의 limonin glucoside 함량은 peel과 juice sac 모두에서 limonin이나 nomilin의 함량보다 높은 것으로 확인되었으며, 완숙후기에는 20배 이상 높은 것으로 확인되었다.

이러한 결과들로 미루어 볼 때, 완숙기 당유자 과실에서 limonin, nomilin 및 limonin glucoside 생합성 또는 축적은 과 피보다 과육에서 더 활발히 진행되는 것으로 판단되었으며, 특히 완숙후기 과육에서는 limonin glucoside의 생합성이 아주 활발해 지는 것으로 사료되었다. Limonin과 nomilin의 경우 성숙 시기별로 다소의 차이는 있었으나 완숙후기를 제외한 모든 시기에서 peel과 juice sac에서의 함량을 합한 값이 같은 시기 통과에서의 함량보다 낮게 나타났다. 이는 limonin과 nomilin이 과실 중 peel과 juice sac 외에 segment membrane에 고농도로 함유되어 있는데서 기인된 결과라고 사료되는데, 감귤류에 따라 다르기는 하지만 *Citrus changshanensis*에서도 limonin과 nomilin의 함량이 다른 과실부위에 비해 segment membrane에 높게 함유된 것으로 보고된 바 있었다.¹⁸⁾

완숙후기인 3월에 채취한 당유자 과실의 조직부위별 limonin, nomilin 및 limonin glucoside의 함량을 분석한 결과, limonin과 nomilin은 씨앗의 함량이 각각 606.0 과 $1179.0 \mu\text{g/g(DW)}$ 으로 가장 높게 나타났고, 다음으로는 segment membrane이 각각 166.8 과 $163.7 \mu\text{g/g(DW)}$ 으로 높게 나타났다. 반면 limonin glucoside는 segment membrane에서의 함량이 $1829.0 \mu\text{g/g(DW)}$ 으로 가장 높은 것으로 확인되었으며, 그 다음은 juice sac에서의 함량이 $1373.0 \mu\text{g/g(DW)}$ 으로 높게 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 Savitree jungsakulrujirek 등¹³⁾이 *C. reticulata* 과실에서 limonin의 분포를 분석한 결과 limonin의 함량이 seed에 가장 높게 함유되어 있는 것으로 보고한 것과 유사하였다. 하지만 그 외 조직부위별 분포는 *C. reticulata* 과실과 상이한 차이를 보였는데, 이는 ChongDe Sun 등¹⁸⁾이 네 종류의 감귤 성숙과에서 limonin과 nomilin의 부위별 함량이 품종 간에 차이를 나타낸다고 보고한 바와 같이 당유자 성숙과의 부위별 limonoid 분포는 품종에 따른 차이에 기인한 것으로 판단되었다.

초 록

Limonoid계 화합물인 limonin, nomilin, limonin glucoside의 함량을 당유자 과실의 성숙시기별 조직부위별로 liquid

chromatography-mass spectrometry(LC-MS)를 이용하여 정량하였다. Nomilin과 limonin의 함량은 6월 미성숙기부터 증가하였으며 nomilin은 10월 성숙기, limonin은 12월 성숙후기에서 그 함량이 최고치를 나타냈으며, 두 가지 화합물 모두 3월 완숙후기에는 함량이 현저하게 감소하였다. 이와 대조적으로 limonin glucoside 함량은 10월 성숙기부터 완숙 후기에 이르기까지 지속적으로 증가하였다. 세 가지 성분 모두 과실이 완숙함에 따라 peel에서의 함량은 감소하는 경향을 보인 반면, juice sac에서의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 완숙후기에 채취한 당유자 과실의 조직부위별 limonin, nomilin 및 limonin glucoside의 함량을 분석한 결과, limonin과 nomilin은 씨앗에서 함량이 가장 높게 나타났고, 다음으로는 segment membrane가 높게 나타났다. 반면 limonin glucoside는 segment membrane에서 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 그 다음은 juice sac에서 함량이 높게 나타났다.

Key words: 리모닌, 노밀린, 리모닌 글루코사이드, LC-MS, 당유자, 감귤류

감사의 글

본 연구는 제주대학교 NURI 아열대생물산업 및 친환경농업 생명산업 인력양성사업단의 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Roy, A. and Saraf, S. (2006) Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 191-201.
- Moriguchi, T., Kita, M., Hasegawa, S. and Omura, M. (2003) Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. *Food Agric. Environment.* **1**, 22-25.
- Endo, T., Kita, M., Shimada, T., Moriguchi, T., Hidaka, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S. and Omura, M. (2002) Modification of limonoid metabolism in suspension cell culture of citrus. *Plant Biotechnol.* **19**, 397-403.
- Ohta, H., Berhow, M., Bennett, R. D. and Hasegawa, S. (1992) Limonoids in seeds of citrus hanaju. *Phytochemistry.* **31**, 3905-3907.
- Hasegawa, S., Berhow, M. A. and Manners, G. D. (2000) Citrus limonoid research: an overview. In *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods*, Berhow, M. A., Hasegawa, S. and Manners, G. D. (eds.) pp. 1-8, Oxford University Press, Washington, DC.
- Kelly, C., Jewell, C. and O'Brien, N. M. (2003) The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin, and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. *Nutrition Research.* **23**, 681-690.
- Jacob, R., Hasegawa, S. and Manners, G. (2000) The potential of citrus limonoids as anticancer agent. *Perishables Handling* **102**, 6-8.
- Lam, L. K. T., Li, Y. and Hasegawa, S. (1989) Effect of citrus

- limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 878-880.
9. Lam, L. K. T. and Hasegawa, S. (1989) Inhibition of benzo(a)pyreneinduced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids. *Nutr. Cancer* **12**, 43-47.
 10. Miller, E. G., Fanous, R., Rivera-Hidalgo, F., Binnie, W. H., Hasegawa, S. and Lam, L. K. (1989) The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* **10**, 1535-1537.
 11. Bentley, M. D., Rajab, M. S., Mendel M. J. and Alford, A. R. (1990) Limonoids model insect antifeedants. *J. Agric. Food. Chem.* **338**, 1400-1403.
 12. Lam, L. K. T., Zhang, H. and Hasegawa, S. (1994) Citrus limonoids reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol.* **48**, 104-108.
 13. Lam, L. K. T., Zhang, J., Hasegawa, S. and Shut, H. A. J. (1994) Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus limonoids. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*. Fruits and Vegetables, Huang, M. T., Osawa, T., Ho, C. T. and Rosen, R. T. (ed.) pp. 209-219, American Chemical Society Symposium Series 546, Washington, DC.
 14. Lam, L. K. T. (1989) The effect of citrus limonoids in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* **10**, 1535-1537.
 15. Omura, M., Kita, M., Endo-Inagaki, T., Moriguchi, T., Matsumoto, R., Suhayda, C. and Hasegawa, S. (2000) Genetic evaluation and modification of the accumulation of limonoids in citrus. In *Citrus Limonoids; Functional Chemicals in Agriculture and Food*, Berhow, M. A., Hasegawa, S. and Manners, G. D. (ed.) pp. 230-237, Oxford University Press, Washington, DC.
 16. Kita, M., Hirata, Y., Moriguchi, T., Endo-Inagaki, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S., Suhayda, C. G. and Omura, M. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoids UDP-glucosyl-transferase in Citrus. *FEBS Lett.* **469**, 173-178.
 17. Jungsakulrujirek, S. and Noomhorm, A. (1998) Effect of harvesting time and fruit size on titratable acidity, soluble solid and distribution of limonin in Thai tangerine juice. *Intl. J. Food Sci. Technol.* **33**, 367-374.
 18. ChongDe Sun, C. D., Chen, K. S., Chen, Y. and Chen, Q. J. (2005) Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry* **93**, 599-605.