

유자씨에 함유된 limonin 및 nomilin의 추출 조건 최적화

정지영 · 우관식¹ · 황인국 · 이연리 · 박의석² · 정헌상*

충북대학교 식품공학과, ¹농촌진흥청 국립식량과학원, ²(주)미드미

Optimization of Extraction Conditions for Limonin and Nomilin in Citron Seed

Ji Young Jeong, Koan Sik Woo¹, In Guk Hwang, Youn Ri Lee, Eui Seok Park², and Heon Sang Jeong*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

¹National Institute of Crop Science, Rural Development Administration

²Metome Food Co. Ltd.

Abstract In this study, response surface methodology was employed in order to optimize the limonin and nomilin extraction conditions from citron seed. The independent variables were extraction temperature, extraction time, and shaking velocity. The yield of limonin and nomilin increased with increased extraction temperature and time. The extraction effects on the limonin and nomilin were higher at extraction temperature ($p < 0.01$). The predicted extraction conditions were validated through actual experiments. The predicted conditions were as follows: 49.7°C of extraction temperature, 3.3 hr of extraction time, and 400.6 rpm of shaking velocity for the maximum limonin contents (353.9 mg/100 g) and 50.3°C, 3.5 hr, and 399.9 rpm for the maximum nomilin contents (214.5 mg/100 g). The experimental values of limonin and nomilin contents at the predicted conditions were 338.8 and 219.5 mg/100 g, respectively. The predicted values at the optimized conditions were acceptable when compared to the experimental values.

Key words: citron seed, extraction, limonin, nomilin, response surface methodology

서 론

감귤류에 속하는 유자는 제주를 포함해서 고흥, 거창, 완도, 고성, 장흥, 강진, 남해 등 남해안 일대에만 자생하며, 비타민 C와 무기질이 풍부하고 약 4% 정도의 구연산을 함유하고 있다(1). 유자는 액즙이 풍부하고 향기가 좋아서 산미료로써 요리에 사용되거나 유자청 제조에 대부분 이용되고 있으나, 신맛으로 인하여 생식용으로는 거의 이용되지 않고 있다. 현재 국내 유자는 고흥을 중심으로 전남 해안지역일대가 전체 생산량의 약 70%를 차지하고 있다(2). 그러나 현재 유자의 이용은 과육과 과피만을 사용하기 때문에 국내에서 연간 1,800톤 이상 발생하는 유자씨의 활용방안에 대한 연구가 필요한 실정이다.

유자씨에 포함된 기능성 물질로는 bioflavonoid와 limonoid 등이 대표적이며, bioflavonoid는 flavonoid에 속하는 flavanone으로서 hesperidin, naringin, neohesperidin, quercetin, eriocitrin, narirutin, nobiletin, tangeretin 등이 알려져 있다(3). Limonoid 화합물은 이차대사산물이며 triterpene 유도체로 주로 성숙한 과일이나 씨앗 중에 존재하는데 38개의 limonoid aglycone, 즉 23개의 neu-

tral limonoid와 15개의 acidic limonoid가 분리되었고, 최근에는 36개의 aglycone과 20개의 glucoside 형태의 limonoid가 분리되었다(4). 이들 limonoid 화합물은 실제로 감귤류 내에서 aglycone 형태나 glucoside 형태로 존재하는데 가장 많이 존재하는 것은 limonin과 nomilin으로 알려져 있고(5), 특히 감귤류의 씨앗은 limonoid 화합물이 매우 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, aglycone 형태가 glucoside 형태보다 훨씬 많은 것으로 보고되고 있다(6,7). Limonin은 화학적으로 limonoids의 일종으로 단독으로 존재하는 limonoid aglycone과 limonoid A-ring lactone의 17번 위치에 D-glucose가 β -glucosidic bond로 결합된 limonoid glucoside 형태가 있다(8). 씨에 존재하는 limonoid aglycone은 limonic acid A-ring lactone과 같은 monolactone과 limonin과 같은 dilactone의 두 종류가 있다(9). Hasegawa 등(5)에 따르면 limonoid aglycones는 신선한 citrus seed의 약 1% 정도의 중량을 차지한다고 보고하였다. Limonoid 화합물은 생체내의 제 1차적 해독물질인 glutathion-S-transferase의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(10), 항암효과(11,12), 혈중 cholesterol 저하효과(13), 항산화작용(14-16) 등의 생리활성 효과가 있다고 알려져 있다.

유자씨는 유자 전과의 14-16% 정도의 중량비율을 차지하고 있으며(14), limonin과 nomilin과 같은 limonoid 화합물은 높은 항산화활성과 항암활성 등의 생리활성을 가지고 있음에도 불구하고 유자청 제조시 부산물로서 전량 폐기되고 있는 실정이다. 유자씨의 limonoid 화합물에 대한 연구로는 Hashinaga 등(17)의 유자씨에 함유된 limonoid를 분석한 연구와 limonoid 화합물을 분리 및 정제한 연구(18), HPLC로 플라보노이드 및 limonoid 화합물을 정량한 연구(19) 등 이에 대한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본

*Corresponding author: Heon Sang Jeong, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungcheongbuk-do 361-763, Korea

Tel: 82-43-261-2570

Fax: 82-43-271-4412

E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

Received June 6, 2008; revised August 1, 2008;

accepted August 1, 2008

연구에서는 유자 가공품 제조시 부산물로 생산되어 폐기되고 있는 유자씨를 재활용하여 식품소재로 활용할 수 있는 기초자료로 제공하고자 산업적으로 사용할 수 있는 용매추출을 이용하여 유자씨의 limonin과 nomilin에 대한 최적추출조건을 반응표면분석을 통하여 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용한 유자씨는 2006년 고흥에서 수확한 유자를 과피 및 과육을 제거한 것을 (주)미드미에서 제공받아 이를 수세 건조한 후 수분함량을 평균 $10 \pm 0.5\%$ 로 조절하여 -20°C 의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유자씨는 분쇄기로 분쇄하여 18 mesh 체를 통과시켜 균일한 입자 크기로 만들어 추출에 사용하였으며, 지용성 성분을 제거하기 위하여 5배량의 hexane을 가하여 30분 동안 진탕추출하고 남은 잔사를 50°C 에서 감압 건조하여 hexane을 완전히 제거한 후 추출시료로 사용하였다.

Limonic 및 nomilin 함량 측정

Limonic 및 nomilin 함량은 추출시료를 여과시켜 HPLC(Waters 2695, Waters, New Castle, DE, USA)로 분석하였다. Limonic 및 nomilin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 표준물질을 각각 10, 20 및 30 mg/L의 농도로 조제하였으며, column은 X terra C₁₈ (4.6 mm×150 mm, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 사용하였고 이동상은 acetonitrile:10 mM acetic acid(4:6, v/v)를 1 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 검출기는 UV(210 nm)로 하였고 주입량은 10 μL 로 하였다.

추출 용매에 따른 limonic 및 nomilin 함량

Limonic 및 nomilin의 추출에 미치는 추출용매의 영향을 살펴보기 위하여 탈지된 유자씨에 ethanol, methanol, acetone 및 acetonitrile 용매를 각각 10배량을 첨가하여 40°C , 400 rpm에서 3시간 교반 추출하였으며, 추출물을 여과한 후 감압농축기(rotary vacuum evaporator, Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축물을 100 mL로 정용하여 HPLC로 limonic 및 nomilin 함량을 측정하였다.

추출 용매량에 따른 추출 수율

Limonic 및 nomilin의 추출에 미치는 추출 용매량의 영향을 살펴보기 위하여 위에서 선정된 추출용매를 1:5(w/v)부터 5배씩 증가시켜 1:30(w/v)까지 첨가한 다음 40°C , 400 rpm에서 3시간 추출한 다음 여과 및 농축한 후 100 mL로 정용하여 HPLC로 분석하였다.

추출용매 농도에 따른 추출 수율

Limonic 및 nomilin의 추출에 미치는 에탄올 농도의 영향을 살펴보기 위하여 에탄올 농도를 95, 80, 60 및 40%로 조절한 다음 20배량을 첨가하고 40°C , 400 rpm에서 3시간 추출하였다. 추출물은 여과 및 농축한 후 100 mL로 정용하여 HPLC로 분석하였다.

추출 조건 실험 설계

유자씨의 limonic 및 nomilin의 최적추출조건을 선정하기 위하여 추출온도, 추출시간 및 교반속도를 3개의 주요 독립변수로 설정하고 중심합성계획법에 따라 Table 1과 같이 5단계로 부호화하여 16개의 구간으로 설계 하였다. 독립변수(X_n)를 추출온도(30, 40, 50, 60, 70°C ; X_1), 추출시간(1, 2, 3, 4, 5 시간; X_2) 및 교반

속도(200, 300, 400, 500, 600 rpm; X_3)로 하였으며, 종속변수(Y_n)은 limonic 및 nomilin 함량으로 하였다.

통계분석

통계분석은 SAS program(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 반응 모형은 다중 회귀 분석을 통해 이차다항 회귀 곡선식(quadratic canonical polynomial model)으로 나타내었다. 반응표면분석에서는 반응 변수에 대한 기본 model을 second order designs에 의해 표현하였다.

결과 및 고찰

추출 용매에 따른 limonic 및 nomilin 함량

추출 용매가 유자씨의 limonic 및 nomilin의 추출에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 사용한 추출용매별 추출 수율은 Fig. 1과 같다. Limonic 함량은 추출용매인 methanol, ethanol, acetonitrile 및 acetone 별로 각각 241.5, 203.4, 177.5 및 199.4 mg/100 g을 나타내었으며, nomilin 함량은 각각 135.9, 130.7, 117.2 및 113.4 mg/100 g을 나타내었다. Woo 등(18)은 methanol, acetone, acetonitrile 용매에 따른 유자과육의 limonoid 화합물의 추출량은 limonic은 methanol에 의하여 가장 많이 추출되었으며, nomilin은 acetone에 의하여 가장 많이 추출되는 것으로 보고하였다. Woo 등(19)은 유자씨를 methanol과 ethanol로 추출하여 HPLC로 정량한 결과 limonic이 methanol 추출의 경우 140.3 mg/100 g, ethanol 추출의 경우 171.0 mg/100 g으로 함유되어 있는 것으로 보고하였다. Choi 등(14) 또한 유자씨에서 methanol, 70% ethanol 및 물로 추출하였을 경우 limonoid 화합물은 methanol 추출물의 경우 23.5 및 14.2 mg/g으로 높은 함량을 보이는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 methanol 추출에서 가장 높은 limonic 및 nomilin 함량을 나타내었지만, 향후 식품소재 및 적용가능성을 고려하여 ethanol을 추출 용매로 선정하였다.

최적 용매 첨가량에 따른 limonic 및 nomilin 함량

Limonic 및 nomilin의 추출 수율에 미치는 용매 첨가량의 영향을 살펴보기 위하여 추출 용매로 선정한 ethanol을 각각 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 및 1:30 (w/v)으로 첨가하여 추출 수율을 비교하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Limonic 함량은 용매 첨가량 1:5에서 1:20까지는 증가하다 그 이후부터는 증가 폭이 감소되었으며, nomilin 함량은 1:20부터 증가 폭이 감소되는 경향

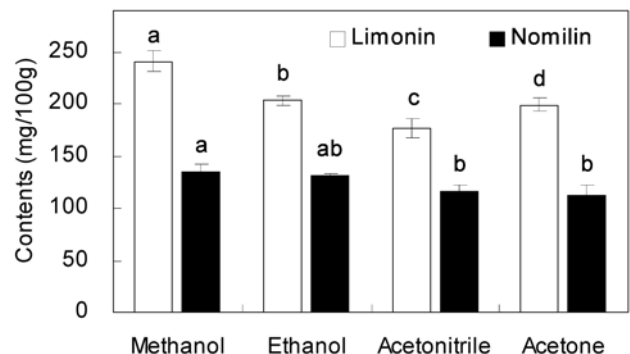


Fig. 1. Extraction yields of limonic and nomilin from citron seed with various extraction solvents. Solvent ratio per sample, 1:10 (w/v); extraction temperature, 40°C ; extraction time, 3 hr; shaking velocity, 400 rpm

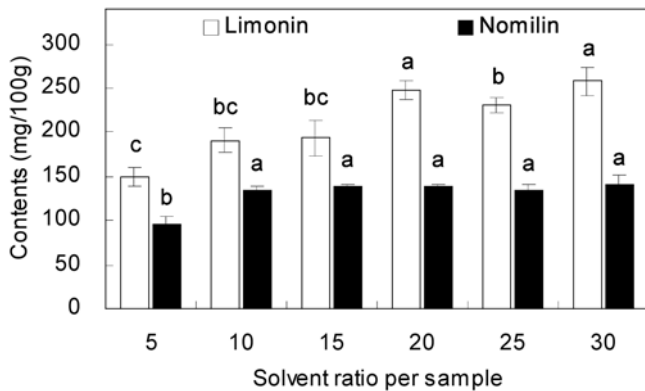


Fig. 2. Extraction yields of limonin and nomilin from citron seed with extraction solvent ratio per sample. Extraction solvent, 80% ethanol; extraction temperature, 40°C; extraction time, 3 hr; shaking velocity, 400 rpm

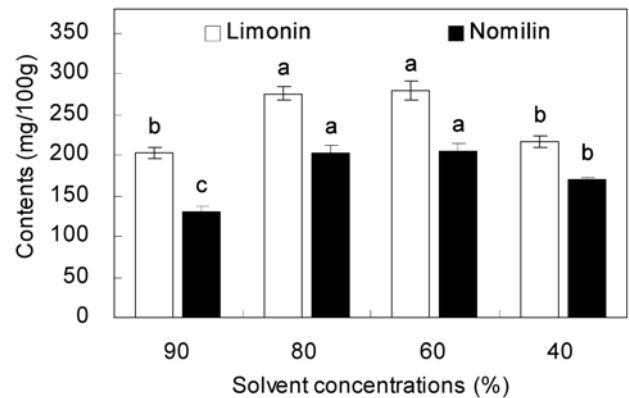


Fig. 3. Extraction yields of limonin and nomilin from citron seed with various solvents concentrations. Solvent ratio per sample, 1:20 (w/v); extraction temperature, 40°C; extraction time, 3 hr; shaking velocity, 400 rpm

을 나타내었다. 따라서 두 유효 성분의 추출용이성과 용매사용량에 따른 효율적인 면을 고려해볼 때 20배의 용매첨가량이 적당하다고 판단되었다.

추출 용매의 농도에 따른 limonin 및 nomilin 함량

Limonin 및 nomilin의 추출에 미치는 추출용매 농도의 영향을 살펴보기 위하여 ethanol 농도를 95, 80, 60 및 40%로 조절한 후 추출한 결과는 Fig. 3과 같다. 95% ethanol 추출 시 limonin 및 nomilin은 각각 202.3 및 131.1 mg/100 g의 함량을 나타내었지만, 60% ethanol 추출 시에는 각각 279.2 및 204.2 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. Park 등(20)의 연구에 의하면 천연물의 에탄올 추출시 에탄올 농도가 수율에 큰 영향을 미친다고 보고하였는데 본 실험에서도 ethanol 농도에 따라 많은 차이를 나타내었다. Choi 등(14) 유자씨에서 70% ethanol 추출의 경우 13.8 및 8.0mg/g이 추출되는 것으로 보고하였으며, Woo 등(19)은

ethanol 추출의 경우 171.0 mg/100 g으로 함유되어 있는 것으로 보고하여 methanol 추출보다 높은 함량을 보이는 것으로 보고하였는데 본 연구에서는 60% ethanol 추출이 높은 함량을 보여 추출 용매의 농도는 60%로 결정하였다.

중심합성계획법에 의한 limonin 및 nomilin 함량

유자씨로부터 limonin 및 nomilin 추출 조건의 최적화를 위하여 추출용매는 ethanol, 추출용매의 농도는 60% 그리고 용매첨가량은 20배로 결정한 다음 추출온도, 추출시간 및 교반속도를 변수로 하여 중심합성계획법으로 16구간의 추출조건을 설정하여 추출 조건에 따른 limonin 및 nomilin 함량을 측정하여 Table 1과 Fig. 4 및 5에 나타내었다. 추출조건별 limonin과 nomilin 함량을 측정하여 limonin은 315.8-408.2 mg/100 g 범위에 있었으며, nomilin은 191.0-233.0 mg/100 g 범위로 나타났다. Herman 등(9)은 sour orange, cleopatra mandarin, nova tangerine 및 rio red

Table 1. Experimental combinations and limonin and nomilin contents of citron seed at various extraction conditions

Exp. No	Independent variables			Response variables	
	Extraction temp. (°C)	Extraction time (hr)	Shaking (rpm)	Limonin contents (mg/100 g)	Nomilin contents (mg/100 g)
1	30 (-2) ¹⁾	3 (0)	400 (0)	334.2±10.5	200.1±3.6
2	40 (-1)	2 (-1)	300 (-1)	315.8±13.9	191.0±5.8
3	40 (-1)	2 (-1)	500 (+1)	336.7±0.6	199.2±6.3
4	40 (-1)	4 (+1)	300 (-1)	344.8±15.5	209.9±13.3
5	40 (-1)	4 (+1)	500 (+1)	333.8±4.5	210.3±8.0
6	50 (0)	1 (-2)	400 (0)	346.7±18.0	215.7±10.5
7	50 (0)	3 (0)	200 (-2)	354.4±18.0	219.5±2.1
8	50 (0)	3 (0)	400 (0)	361.0±13.6	219.8±10.5
9	50 (0)	3 (0)	400 (0)	361.0±13.6	219.8±10.5
10	50 (0)	3 (0)	600 (+2)	359.1±25.1	220.3±7.4
11	50 (0)	5 (+2)	400 (0)	356.9±5.6	221.2±2.7
12	60 (+1)	2 (-1)	300 (-1)	408.2±17.2	233.0±3.4
13	60 (+1)	2 (-1)	500 (+1)	386.5±14.5	215.9±15.3
14	60 (+1)	4 (+1)	300 (-1)	358.1±21.1	217.4±10.2
15	60 (+1)	4 (+1)	500 (+1)	343.5±25.8	212.0±15.4
16	70 (+2)	3 (0)	400 (0)	337.9±14.6	214.1±2.0

Results were expressed as the average of triplicate samples with mean±SD.

¹⁾Coded values

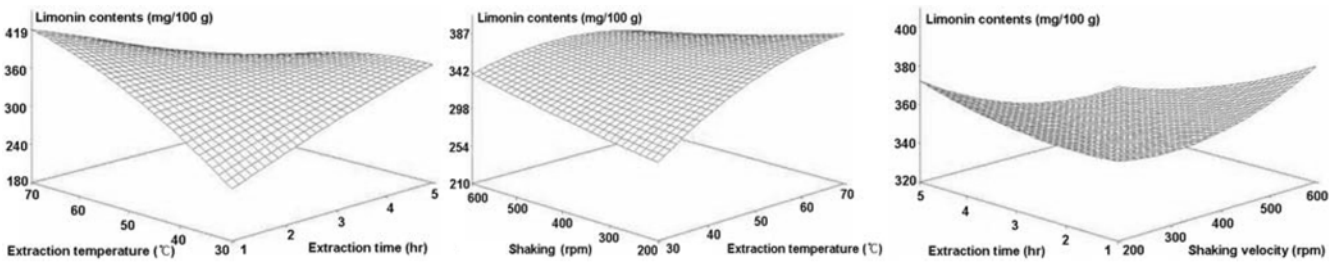


Fig. 4. Response surface for the effects of extraction conditions on limonin contents of citron seed.

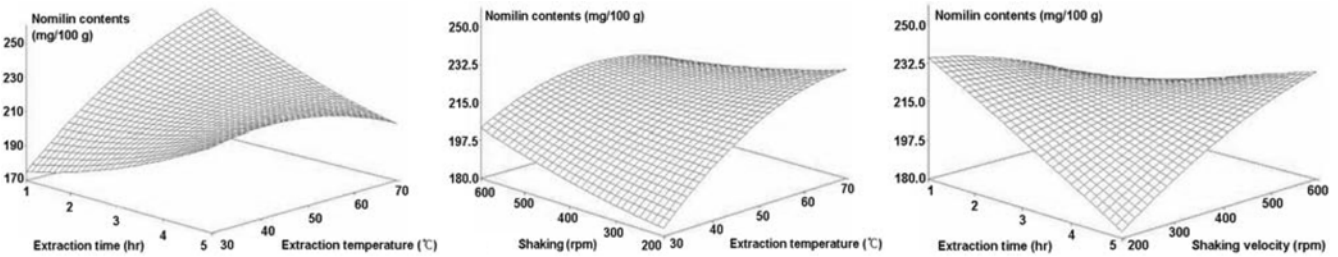


Fig. 5. Response surface for the effects of extraction conditions on nomilin contents of citron seed.

grapefruit에서 limonin의 함량이 각각 116.7, 211.9, 282.2 및 616.6 mg/100 g이 포함되어 있는 것으로 보고하였는데 본 연구에서는 60°C, 2시간, 300 rpm 구간에서 408.2 mg/100 g으로 비교적 높은 함량을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

Limonin 추출에 대한 통계분석 결과는 Table 2 및 3에서 보는 바와 같이 추출온도의 영향이 가장 큰 것으로 나타났으며(F-value: 8.04, $p < 0.001$), 그 다음으로 추출시간 (F-value: 3.74, $p < 0.01$)에 의하여 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타났으며, 교반속도에 대해서는 유의성이 없었다. 반응표면 분석결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 추출온도와 시간의 증가에 따라 limonin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 장시간 추출시에는 교반속도의 증가에 따라 오히려 증가 폭이 감소되는 경향을 나타내었다. Nomilin 추출에 대한 통계분석 결과 추출온도의 영향이 가장 큰 것으로 나타났으며(F-value: 24.84, $p < 0.001$), 그 다음으로 추출시간(F-value: 6.67, $p < 0.001$)에 의하여 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타났으며, 교반속도에 대해서는 유의성이 없었다. 반응표면 분석결과는 Fig 5에서 보는 바와 같이 단시간의 추출에서는 추출 온도와 속도의 증가에 따라 유의적으로 nomilin 함량이 증가하였으며, 추출온도 50°C 이후부터는 그 증가 폭이 감소되는 경향을 나타내었다.

Table 2. Analysis of variance for limonin and nomilin contents of citron seed extracts

	Parameters ¹⁾	df	Sum of squares	F-value
Limonin contents	Extraction temperature (°C)	4	3,259	8.04*** ¹⁾
	Extraction times (hr)	4	1,515	3.74**
	Shaking velocity (rpm)	4	271	0.67
Nomilin contents	Extraction temperature (°C)	4	3,457	24.84***
	Extraction times (hr)	4	928	6.67***
	Shaking velocity (rpm)	4	282	2.02

¹⁾** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

최적 추출 조건의 예측

유자씨의 limonin 및 nomilin의 최적추출조건을 결정하기 위하여 추출조건별 limonin 및 nomilin 함량에 대해 반응표면분석을 실시하고 최적 추출조건을 예측하였다. 유자씨 추출물의 추출 조건에 대한 통계분석결과, 반응표면에서 정상점이 모두 안장점으로 나타났다. 따라서 능선분석을 실시하여 최적 조건을 산출하고 이상의 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 각각의 종속변수에 대한 최적조건 범위에서 추출하여 예측된 값들과 비교해본 결과는 Table 4와 같다. 본 연구에서는 예측 값과 limonin은 유의성이 있는 범위에서 낮게 측정되었으며, nomilin은 유의성이 없는 범위에서 유사한 수치로 측정되었다. 따라서 유자씨 limonin의 최적 추출 조건은 추출온도 49.7°C, 추출시간 3.3 hr, 교반속도 400.6 rpm에서 353.9 mg/100 g으로 나타났으며, nomilin은 추출온도 50.3°C, 추출시간 3.5 hr, 교반속도 399.9 rpm에서 214.5 mg/100 g으로 나타났다.

Table 3. Regression coefficients of the second order polynomials for limonin and nomilin contents

Parameters ¹⁾	df	Limonin		Nomilin	
		Parameter estimate	T-value	Parameter estimate	T-value
Intercept	1	358.55	46.64*** ²⁾	212.36	94.27***
X ₁	1	10.78	3.71***	7.24	8.50***
X ₂	1	-2.90	-1.00	-0.33	-0.38
X ₃	1	-1.06	-0.36	0.49	0.57
X ₁ ×X ₁	1	-5.25	-1.81	-1.68	-1.97
X ₂ ×X ₁	1	-14.92	-3.63***	-5.37	-4.46***
X ₂ ×X ₂	1	-1.31	-0.45	1.99	2.34*
X ₃ ×X ₁	1	-5.76	-1.40	-2.21	-1.83
X ₃ ×X ₂	1	-3.12	-0.76	1.32	1.09
X ₃ ×X ₃	1	-0.07	-0.02	1.53	1.79

¹⁾X₁, extraction temperature (°C); X₂, extraction times (hr); X₃, shaking velocity (rpm)

²⁾* $p < .05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Table 4. Predicted and experimental values on the response variable of optimum condition

Parameters	Optimum values	
	Experimental values	Predicted values (saddle point)
Extraction temperature (°C)	50.0	49.7
Extraction times (hr)	3.3	3.3
Shaking velocity (rpm)	400.0	400.6
Limonin contents (mg/100 g)	338.8	353.9
Extraction temperature (°C)	50.0	50.3
Extraction times (hr)	3.5	3.5
Shaking velocity (rpm)	400.0	399.9
Nomilin contents (mg/100 g)	219.5	214.5

요 약

유자씨의 limonin 및 nomilin에 대한 최적 추출조건을 선정하기 위하여 추출온도(30-70°C; X₁), 추출시간(1-5 hr; X₂) 및 교반속도(200-600 rpm; X₃)를 독립변수로 중심합성계획법에 따라 실험설계한 각각의 추출조건에서 limonin 및 nomilin 함량을 측정하였다. Limonin 및 nomilin 추출 조건의 최적화를 위하여 추출용매는 ethanol, 추출용매의 양은 20배 그리고 추출용매 농도는 60%로 선정하였다. Limonin 및 nomilin 추출에 미치는 추출조건의 영향은 추출온도가 가장 컸으며($p < 0.01$) 그 다음으로는 추출시간으로 나타났다. 반응표면분석결과 최적 추출조건은 limonin에서는 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 각각 49.7°C, 3.3 hr 및 400.6 rpm으로 나타났으며, 이때의 추출량은 353.9 mg/100 g이었다. Nomilin은 각각 50.3°C, 3.5 hr 및 399.9 rpm이었으며, 추출량은 214.5 mg/100 g이었다. 동일조건에서의 실험값은 limonin 및 nomilin이 각각 338.8 및 219.5 mg/100 g으로 예측값과 실험값이 유사하여 최적화할 수 있었다.

문 헌

- Nam HW, Hyun YH. Drying of citron juice from by-product of citron tea manufacturing. Korean J. Food Nutr. 16: 334-339 (2003)
- Jeong JW, Lee YC, Kim JH, Kim OW, Tnahngung B. Cooling properties and quality changes during storage of citron (*Citrus junos*). Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1071-1077 (1996)
- Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoid. Korean J. Food Nutr. 129: 1182-1185 (1999)
- Hasegawa S, Miyake M, Ozaki Y. Biochemistry of citrus limonoids and their anticarcinogenic activity. pp. 198-208. 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, USA (1994)
- Hasegawa S, Bennett RD, Verdon CP. Limonoids in citrus seeds: origin and relative concentration. J. Agr. Food Chem. 28: 922-925 (1980)
- Ozaki Y, Fong CH, Herman Z, Maeda H, Miyake M, Ifuku Y, Hasegawa S. Limonoid glucosides in citrus seeds. Agr. Biol. Chem. Tokyo 55: 137-141 (1991)
- Ohta H, Hasegawa S. Limonoids in pummelos (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). J. Food Sci. 60: 1284-1285 (1995)
- Vikram A, Jayaprakasha GK, Patil BS. Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 590: 180-186 (2007)
- Herman Z, Fong CH, Hasegawa S. Analysis of limonoids in citrus seeds. pp. 361-375. In: Seed Analysis. Modern Methods of Plant Analysis. Linskens HF, Jackson JF (eds). Springer, New York, NY, USA (1992)
- Lam LKT, Li Y, Hasegawa S. Effects of citrus limonoids on glutathione-S-transferase activity in mice. J. Agric. Food Chem. 37: 878 (1989)
- Kelly C, Jewell C, O'Brien NM. 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. Nutr. Res. 23: 681-690 (2003)
- Lam LKT, Zhang J, Hasegawa S. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. Food Technol. 48: 104-108 (1994)
- Kurowska EM, Borradaile N, Meade M, Spence JD, Carroll KK. Cholesterol-lowering effects of dietary citrus juice and their flavonoids. Studies in rats, mice and rabbits. Atherosclerosis 134: 33-37 (1997)
- Choi I, Choi S, Nam B, Kim Y, Choi H. Contents of polyphenols and limonoids in citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seed extracts and their antioxidant properties. Food Sci. Biotechnol. 17: 373-378 (2008)
- Giamperi L, Flaternale D, Bucchini A, Ricci D. Antioxidant activity of *Citrus paradise* seeds glyceric extract. Fitoterapia 75: 221-224 (2004)
- Yoo KM, Lee KW, Park JB, Lee HJ, Hwang IK. Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of citron (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. J. Agr. Food Chem. 52: 5907-5913 (2004)
- Hashinaga F, Herman Z, Hasegawa S. Limonoids in seeds of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). Nippon Shokuhin Kogyo Gakk. 37: 380-382 (1990)
- Woo KL, Ha JU, Woo DK. Quantitative determination, separation and purification of limonoid compounds from citron [*Citrus junos*(L.)]. The Research Institute of Engineering Technology Kyungnam University. Masan, Korea. Theses Collection 15: 363-372 (1997)
- Woo KL, Kim JI, Kim MC, Chang DK. Determination of flavonoid and limonoid compounds in citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seeds by HPLC and HPLC/MS. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 353-358 (2006)
- Park NJ, Kwon JH, Kim HK. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1189-1196 (1998)