

## 유자씨 추출물의 생리활성과 암세포 성장 억제효과

이윤정<sup>1</sup> · 황인국<sup>1</sup> · 정은미<sup>1</sup> · 김현영<sup>1</sup> · 박의석<sup>2</sup> · 우관식<sup>3</sup> · 정현상<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품공학과

<sup>2</sup>(주)미드미

<sup>3</sup>국립식량과학원 기능성작물부

## Physiological Activity and Antiproliferation Effects of Citron Seed Extracts on Cancer Cells

Yoon Jeong Lee<sup>1</sup>, In Guk Hwang<sup>1</sup>, Eun Mi Joung<sup>1</sup>, Hyun Young Kim<sup>1</sup>,  
Eui Seok Park<sup>2</sup>, Koan Sik Woo<sup>3</sup>, and Heon Sang Jeong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

<sup>2</sup>Metome Food Co. Ltd., Chungbuk 363-883, Korea

<sup>3</sup>Div. of Functional Cereal Crop, National Institute of Crop Science, RDA, Gyeongnam 627-803, Korea

### Abstract

This study was carried out to investigate the total polyphenol, total flavonoid content, antioxidant activity, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and anti-proliferation activity of the citron seed. The citron seed were separated to hull and embryo, and extracted with n-hexane and 70% ethanol. Antioxidant activity of ethanol extract was higher than that of n-hexane extract. IC<sub>50</sub> value for DPPH radical scavenging activity of ethanol extract of hull (CSE1) and embryo (CSE2) were 3.18 and 8.43 mg/mL, and those of total antioxidant activity were 19.96 and 11.28 mg AA eq/g, respectively. ACE inhibitory activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity on CSE1 showed the highest values of 31.61 and 45.17%, respectively. Antiproliferation effects on the MCF7, HepG2, H460, HCT-116, and PC3 cell line showed the highest values of 14.09, 19.12, 12.29, 9.78, and 9.12% in extract concentration of 5 mg/mL, respectively. These results suggested that citron seed can be used for development of functional food material which have biological activities.

**Key words:** citron seed, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, antiproliferation activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

### 서 론

유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)는 운향과의 상록 관목으로서 원산지는 중국이지만 현재 우리나라에서는 제주도를 포함하여 고흥, 완도, 장흥 등 남해안 일대에서 자생하는 것으로 연 평균기온 15°C 전후의 해양성기후에서 잘 생육한다(1). 유자는 풍부한 비타민 C와 무기질 및 약 4% 정도의 구연산을 함유하는 알칼리성 과실로서 액즙이 풍부하고 향기가 좋아서 산미료로써 요리에 사용되거나 유자청 제조에 대부분 이용되고 있으나 신맛으로 인하여 생식용으로는 거의 이용되지 않고 있는 실정이다(2,3). 현재 국내 유자는 고흥을 중심으로 전남 해안지역일대가 전체 생산량의 약 70%를 차지하고 있다(4). 그러나 현재 유자의 이용은 주로 과육 및 과피를 사용하여 유자청으로 제조되어 유자차로 소비되고 있어(5,6) 유자 중량의 14~16%를 차지하고 있는

유자씨는 연간 1,800톤 이상 발생되고 있는 실정으로(7) 유자씨를 활용할 수 있는 다양한 방법이 모색되어야 할 것이다.

유자에 대한 연구로는 유자오일에 함유되어 있는 limonene, g-terpinene 및 myrcene 등과 같은 monoterpene hydrocarbon류의 휘발성분에 대한 연구(8), 유자 과피 오일의 독특한 방향성분이 6-methyl-5-hepten-2-ol 및 dimethyl trisulfide임을 확인한 연구(9), 유자 과피 추출물의 항산화 및 면역 활성 연구(10), 유자용매 추출물의 암세포 억제효과 및 항산화 활성 연구(11) 그리고 일본산 유자씨에 함유된 limonoid를 분석한 연구(12) 등과 같이 주로 유자과피에 대한 일반 성분 및 향에 관하여 이루어져 있어 유자씨의 기능성 성분 및 생리활성에 관한 연구는 미미한 실정이다. 특히 유자씨를 종피와 배유로 분리하여 생리활성을 밝힌 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 유자씨의 기능성 성분 및 생리활성을 평가하기 위하여 유자청 제조 후 폐기되어지는 유자

\*Corresponding author. E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr  
Phone: 82-43-261-2570, Fax: 82-43-271-4412

씨를 종피와 배유로 분리하여 그 각각의 유효 성분을 추출하고, 추출물의 다양한 기능성을 평가하여 유자씨의 새로운 기능성식품 소재로서 활용할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 유자씨는 2008년 10월 전라남도 고흥에서 생산된 유자의 과피와 과육을 제거한 것으로 (주)미드미(Cheongwon, Korea)에서 제공받아 수세 건조한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유자씨는 종피와 종피를 제거한 배유부분으로 분리하여 18 mesh로 분쇄(Blixer® 4 mono, Robot-Coupe, Bourgogne, France)한 다음 시료로 사용하였다.

### 추출 및 용매분획

분쇄된 유자씨의 종피와 배유부분은 각각 10배량의 n-hexane을 가하여 400 rpm에서 3시간, 3회 반복 교반 추출하였으며, 남은 잔사는  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 진공건조 하여 n-hexane을 제거한 후 10배량의 70% ethanol을 가하여 1시간씩 3회 반복 초음파 추출하였다. 종피 n-hexane 추출물을 CSH1, 배유 n-hexane 추출물을 CSH2, 종피 ethanol 추출물을 CSE1 그리고 배유 ethanol 추출물을 CSE2로 명명하였다. 각각의 추출물은 여과한 후 감압농축기(Rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 추출용매를 제거하였다. 용매분획은 우수한 생리활성을 나타낸 ethanol 추출물을 증류수에 용해한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 순으로 순차 분획하였으며 이들 분획물들을 질소 농축 및 감압 농축하여 분말형태로 제조하여 실험에 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 측정

총 폴리페놀함량은 Dewanto 등(13)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 즉, 각 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100  $\mu\text{L}$ 를 가하였다. 30분 후, 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고, 표준물질로 garlic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량은 시료 100 g 중의 mg garlic acid로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Zia 등(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 총 플라보노이드 함량은 추출물 250  $\mu\text{L}$ 에 증류수 1 mL와 5%  $\text{NaNO}_2$  75  $\mu\text{L}$ 를 가한 다음, 5분 후 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  150  $\mu\text{L}$ 를 가하여 6분 방치하고 1 N NaOH 500  $\mu\text{L}$ 를 가하였다. 11분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였고, 표준물질로

(+)-catechin hydrate(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량은 시료 100 g 중의 mg (+)-catechin hydrate로 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거활성 측정

처리조건별 유자씨 추출물의 DPPH radical 소거활성(Electron donating ability, EDA)은 Choi 등(15)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH(Sigma-Aldrich) 용액(99% ethanol에 용해) 0.8 mL를 가한 후, vortex mixer로 10초간 진탕하고 30분 후에 분광광도계 spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정할 때 셀에 분주되는 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 ethanol만의 흡광도를 측정하여 보정해 주었고, 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 구하였으며, 추출물의 EDA(%) 값을 50% 감소시키는  $\text{IC}_{50}$ (Inhibition concentration)으로 표시하였다.

### 총 항산화력 측정

처리조건별 유자씨 추출물의 총 항산화력은  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  cation decolorization assay 방법(16)에 의하여 측정하였다. 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 몰 흡광계수( $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  용액 1 mL에 추출액 50  $\mu\text{L}$ 를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 60분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 L-ascorbic acid를 동량 첨가하였다. 총 항산화력은 AEAC(L-ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, mg AA eq/g)로 표현하였다.

### ACE(Angiotensin Converting Enzyme I) 저해능 측정

각각의 추출물에 대한 ACE 저해능은 Kwon 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. Positive control로는 Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor(Sigma-Aldrich) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용하였다. 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 0.2 mU ACE 정제효소액 80  $\mu\text{L}$ 와 5 mM HHL(Hippuryl-His-Leu) 기질 100  $\mu\text{L}$ 를 가한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 방치한 다음 1 M HCl 250  $\mu\text{L}$ 를 가하여 반응을 정지시킨 후 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filters(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과한 다음 HPLC(Younglin ACME 9000 system, Anyang, Korea)로 분석하였다. Column은 Nova-pak C18(3.9 mm  $\times$  150 mm, 4  $\mu\text{m}$ , Waters Corp., Milford, MA), mobile phase는 A를 10 mM phosphoric acid(pH 2.5), B를 Methanol로 사용하여 A:B의 초기 비율을 100:0으로 시작하여 8분에 40:60, 13분에 0:100, 18분에 100:0의 비율로 단계적인 gradient system을 사용하였다. Flow rate는 0.8 mL/min의 유속으로 흘러주었고, injection

volume는 20  $\mu$ L, detector는 UV-detector(228 nm)를 사용하여 측정하였다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제활성 측정

각각의 추출물에 대한  $\alpha$ -glucosidase 억제활성은 Kim (18)의 방법에 의하여 측정하였다. 조효소를 추출하기 위해서 0.1 g의 rat intestinal acetone powder에 3 mL의 0.9% NaCl을 첨가하여 균질화 시켰다. 기질( $p$ -NPG)은 0.1 M phosphate buffer에 5 mM의 농도로 희석하여 사용하였으며, positive control으로는 acarbose 1 mg/mL로 사용하였다. 적당히 희석한 시료 50  $\mu$ L에 조효소 추출액 100  $\mu$ L를 혼합하여 37°C, 10분간 전 배양을 실시한 다음  $p$ -NPG 50  $\mu$ L 첨가하여 37°C, 25분간 후 배양을 시켰다. 후 배양 후 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mL을 첨가하였으며, 405 nm의 흡광도에서 활성을 측정하였다. 또한  $\alpha$ -glucosidase 억제율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase 억제율}(\%) = \left( 100 - \frac{S - C_2 - C_3}{C_1 - C_3} \right) \times 100$$

여기서 S는 시료+효소+기질 반응물의 흡광도,  $C_1$ 은 control,  $C_2$ 는 색보정, 그리고  $C_3$ 는 buffer의 흡광도이다.

#### MTT assay에 의한 암세포증식 억제효과

본 실험에서 사용한 암세포는 HCT 116(colorectal carcinoma: KCLB 10247), NCI-H460(lung large cell carcinoma: KCLB 30177), HepG2(liver hepatoblastoma KCLB 88065), MCF-7(mammary gland adenocarcinoma: KCLB 30022) 및 PC-3(prostate adenocarcinoma: KCLB 21435)이었으며, 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 U/mL penicillin G, 50  $\mu$ g/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640과 DMEM(Gibco Co., New York, USA) 배지를 사용하여 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양 하였다. 암세포에 대한 암세포 성장억제 효과를 측정하기 위해 Ishiyama 등(19)의 방법에 따라 MTT assay로 실험하였다.  $1 \times 10^5$  cell/well 농도로 96 well plate에 100  $\mu$ L 분주 후 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , incubator에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지

를 제거하고 배지에 일정 농도로 희석된 추출물을 100  $\mu$ L를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT시약을 well당 100  $\mu$ L씩 분주한 다음 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , incubator에서 4시간 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100  $\mu$ L를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(ELx808, Bio-tek<sup>®</sup> Inc., Highland Park, USA)를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정 군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였으며, Pearson 상관관계분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

#### 추출수율

유자씨 추출물의 추출수율은 Table 1과 같다. 종피 n-hexane 추출물(CSH1), 배유 n-hexane 추출물(CSH2), 종피 ethanol 추출물(CSE1) 및 배유 ethanol 추출물(CSE2)에 대한 추출수율은 각각 4.86, 32.40, 8.40 및 18.79%이었다. 종피는 ethanol 추출물이 더 높은 추출수율을 나타내었고, 배유는 n-hexane 추출물이 더 높은 추출수율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 유자씨를 종피와 배유로 분리하지 않고 유자씨 전체를 ethanol 추출하였을 때, Woo 등(20)이 보고한 19.22~21.49%와 Kwon 등(21)이 보고한 9.82%와 비교해 볼 때 본 실험에서의 ethanol 추출수율(종피+배유)은 27.19%로 높은 추출수율을 나타내었다. 또한 유자씨 종피 ethanol 추출물에 대한 용매분획물의 추출수율은 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 층에서 각각 2.72, 11.62, 8.05, 20.90 및 56.42%로 나타났다(Table 2).

#### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고

Table 1. Extraction yield, total phenolic, flavonoid content, DPPH radical scavenging activity ( $\text{IC}_{50}$ ), and total antioxidant activity (AEAC) of citron seed extracts

	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)	$\text{IC}_{50}$ (mg/mL)	AEAC (mg AA eq/g)
CSH1 <sup>1)</sup>	4.86	15.64 $\pm$ 0.90 <sup>a2)</sup>	ND <sup>3)</sup>	—	—
CSH2	32.40	52.85 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	ND	—	—
CSE1	8.40	201.84 $\pm$ 3.60 <sup>c</sup>	45.64 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	3.18 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	19.96 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
CSE2	18.79	246.31 $\pm$ 14.17 <sup>d</sup>	28.90 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	11.28 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>CSH1: n-hexane extract of citron seed hull, CSH2: n-hexane extract of citron seed embryo, CSE1: ethanol extract of citron seed hull, CSE2: ethanol extract of citron seed embryo.

<sup>2)</sup>Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>ND: not detected.

산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(-OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 총치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(22). 유자씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 CSE1 및 CSE2가 각각 201.84 및 246.31 mg/100 g로 높았으며(Table 1) 이러한 결과는 유자씨를 종피와 배유로 분리하지 않고 전체를 ethanol 추출하였을 때 4.03~5.67 mg/g의 함량을 나타낸 Woo(20) 등의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 종피보다는 배유 추출물에서 높은 함량을 보였지만 플라보노이드 함량은 배유보다 종피에서 높은 함량을 나타내었다(Table 1). Park 등(10)은 유자와 탕자 과피 추출물의 총 폴리페놀 함량을 각각 75와 61 mg/100 g, 플라보노이드 함량을 각각 42와 34 mg/100 g로 보고하였는데 본 실험에 사용한 유자씨가 유자와 탕자 과피에 비해 더 많은 총 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

DPPH 라디칼소거능에 의한 항산화활성 및 총 항산화력

라디칼소거능은 phenolic acid와 flavonoids 등 페놀성 물질에 의한 항산화 작용의 지표이며 환원력이 큰 물질일수록 전자공여능이 높아진다고 알려져 있다(23). 유자씨 추출물에 대한 DPPH 라디칼소거능(IC<sub>50</sub>)과 총 항산화력(AEAC)을 측정된 결과는 Table 1과 같다. CSE1의 라디칼소거능(IC<sub>50</sub>)은 3.18 mg/mL로 Lee 등(24)이 보고한 유자 과육 추출물 1 mg/mL의 농도에서 10% 미만의 활성을 보인 것과 과피 추출물 1 mg/mL의 농도에서 12.5~20.7% 범위의 활성을 보였다는 연구와 비교해 볼 때 과육과 과피 추출물보다 유자씨 추출물이 더 높은 라디칼소거능을 나타내었다. 가장 높은 라디칼소거능을 나타낸 CSE1에 대한 용매분획물의 라디칼소거능(EDA(%))을 측정된 결과 2 mg/mL의 농도에서 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 층의 EDA(%) 값은 각각 15.59, 21.95, 73.81, 31.96 및 55.27%로 ethyl acetate 층이 가장 높은 항산화력을 나타내었다(Table 2).

CSE1 및 CSE2의 총 항산화력(AEAC)을 측정된 결과 각각 19.96 및 11.28 mg AA eq/g으로(Table 1) 배유보다 종피 추출물에서 총 항산화력이 높게 나타났다. 가장 높은 총 항

산화력을 보인 CSE1에 대한 용매분획물의 총 항산화력(AEAC)은 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 층에서 각각 5.61, 19.29, 56.64, 13.92 및 39.18 mg AA eq/g으로(Table 2) DPPH 라디칼소거능의 결과와 유사하였다. 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 총 항산화력의 상관관계를 분석한 결과 총 폴리페놀과 총 항산화력 사이에는 0.85(p<0.01), 플라보노이드와 IC<sub>50</sub>값 사이에는 0.71(p<0.01)의 높은 상관관계를 보였다. 또한 IC<sub>50</sub>값과 총 항산화력의 상관관계를 분석한 결과 -0.526의 음의 상관관계를 보였다(data not shown).

ACE(Angiotensin Converting Enzyme I) 저해활성

ACE는 불활성형의 angiotensin-I(decapeptide)의 C 말단에 존재하는 His-Leu를 절단하여 혈관벽 수축작용을 하는 angiotensin-II(octapeptide)를 생성하고 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화 시키는 효소이다(25). ACE 저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 angiotensin-II의 생성 저해, aldosterone 분비감소, 혈관확장제인 bradykinin의 증가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 sodium의 배설을 촉진함으로써 혈압을 낮추어 줄 수 있다(26). 유자씨 추출물은 1 mg/mL의 농도에서 ACE저해활성을 보였으며 CSE1에서 31.61%로 나타나 가장 높은 활성을 보였다. 이 값은 다른 추출물과 비교해보았을 때 약 2배 정도 높은 활성을 나타내었다(Table 3).

α-Glucosidase 억제활성

α-Glucosidase는 소장 상피세포의 brush-border membrane에 존재하는 효소로서 이당류나 다당류를 탄수화물이 소화 흡수되기 위한 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. α-Glucosidase에 대한 저해능은 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성 측정법으로 이용된다. 유자씨 추출물은 10 mg/mL의 농도에서 α-glucosidase 억제활성을 보였으며 CSE1에서 45.17%로 나타나 가장 높은 활성을 보였다(Table 3).

Table 3. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and α-glucosidase inhibitory activity of citron seed extracts<sup>1)</sup>

	ACE inhibitory activity (%)	α-Glucosidase inhibitory activity (%)
CSH1	18.09±0.76 <sup>b</sup>	27.05±2.37 <sup>a</sup>
CSH2	16.80±0.89 <sup>ab</sup>	32.33±0.73 <sup>b</sup>
CSE1	31.61±1.3 <sup>c</sup>	45.17±0.53 <sup>c</sup>
CSE2	15.54±1.22 <sup>a</sup>	35.30±2.67 <sup>b</sup>
ACE inhibitor	46.37±1.70	-
Arcabose	-	43.67±1.49

<sup>1)</sup>See the Table 1. The concentrations of citron seed extract on ACE inhibitory activity and α-glucosidase inhibitory activity were 1 and 10 mg/mL, respectively. The concentration of ACE inhibitor and α-glucosidase inhibitor were 5 μg/mL and 1 mg/mL, respectively.

Table 2. Extraction yields, DPPH radical scavenging activity (EDA%) and total antioxidant activity (AEAC) of solvent fractions of ethanol extract of citron seed hull (CSE1)

Solvent fractions	Extraction yield (%)	EDA (%) <sup>1)</sup>	AEAC (mg AA eq/g)
Hexane	2.72	15.59±0.86 <sup>a</sup>	5.61±0.40 <sup>a</sup>
Chloroform	11.62	21.95±0.47 <sup>b</sup>	19.29±0.74 <sup>c</sup>
Ethyl acetate	8.05	73.81±1.25 <sup>e</sup>	56.64±1.19 <sup>e</sup>
Buthanol	20.90	31.96±0.50 <sup>c</sup>	13.92±1.32 <sup>b</sup>
Water	56.42	55.27±0.90 <sup>d</sup>	39.18±1.63 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>The concentrations of ethanol extracts of citron seed hull were 2 mg/mL.

### MTT assay에 의한 암세포증식 억제효과

유자씨 추출물에 대한 유방암세포(MCF-7 cell) 증식억제를 측정된 결과(Fig. 1) CSH1, CSH2, CSE1 및 CSE2 모두 저농도(0.32~1.25 mg/mL)에서는 유방암세포의 증식을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. CSE1과 CSH1은 2.5 mg/mL의 농도에서 각각 83.74%와 69.79%의 유방암세포 생존율을 보였지만 5 mg/mL의 고농도에서는 각각 14.09%와 48.54%로 증식억제에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이에 반해 CSH2 및 CSE2는 5 mg/mL의 고농도에서도 유방암세포의 증식을 억제하지 못하였다. 간암세포(Hep-G2 cell) 증식억제를 측정된 결과 CSE1은 저농도(0.32~2.5 mg/mL)에서는 간암세포의 증식억제효과가 작았지만 고농도인 5 mg/mL에서는 19.12%로 높은 증식억제효과를 나타내었다. CSH1도 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 각각 71.23%와 48.95%로 간암세포 증식을 억제하는 것으로 나타났지만 CSH2와 CSE2는 5 mg/mL의 고농도에서는 간암세포의 증식을 억제하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 폐암세포(NCI-H460 cell) 증식억제를 측정된 결과 CSE1은 저농도(0.32~1.25 mg/mL)에서는 폐암세포의 증식을 억제시키지 못하였지만

Fig. 1. Antiproliferation effects of citron seed extracts on the human breast cancer cells (MCF-7). Different letters on the bars of same items indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Fig. 2. Antiproliferation effects of citron seed extracts on the human liver cancer cells (HepG2). Different letters on the bars of same items indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

2.5 mg/mL의 농도에서는 78.43%, 5 mg/mL의 농도에서는 12.29%로 폐암세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. CSH1은 0.63~2.5 mg/mL의 농도에서 71.09~75.70%의 생존율을 보여 증식억제효과가 낮았지만 5 mg/mL의 고농도에서는 22.22%로 높은 성장억제효과를 나타내었다. CSE2와 CSH2는 5 mg/mL의 고농도에서 60.46%와 50.15%의 생존율을 보여 배양 추출물 중에는 폐암세포의 증식을 억제하는 유효성분이 적은 것으로 판단되었다(Fig. 3). 대장암세포(HCT-116 cell) 증식억제율은 CSE1의 경우 저농도에서는 증식억제효과가 낮았지만 2.5 mg/mL의 농도에서는 63.27% 그리고 5 mg/mL의 농도에서는 9.78%로 증식억제효과가 급격하게 증가하였다. CSH1은 농도 의존적인 경향을 보이지 않았지만 0.32~2.5 mg/mL의 농도에서 67.13~77.84%의 생존율을 나타내었고 5 mg/mL의 고농도에서는 16.14%로 높은 증식억제 효과를 나타내었다. CSE2은 고농도인 5 mg/mL의 농도에서 52.97%의 생존율을 보였고, CSH2은 2.5와 5 mg/mL의 농도에서 각각 56.84%와 39.57%의 생존율을 보였다. 가장 뚜렷한 대장암세포 증식억제효과를 보이는 5 mg/mL의 농도에서 비교해 보았을 때 ethanol 추출물이 높은 증식억제효과를 보였으며, 배유보다는 종피에서 그 효과가 높게 나타났다(Fig. 4). 전립선암세포(PC-3 cell) 증식억제를 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 CSE1은 저농도(0.32~0.63 mg/mL)에서는 증식억제효과가 작았지만 1.25 mg/mL의 농도에서는 59.00%, 5 mg/mL의 농도에서는 9.12%로 매우 높은 증식억제효과를 나타내었다. CSH1은 0.63~2.5 mg/mL의 농도에서 47.14~56.79%의 생존율을 나타내었으며, 5 mg/mL의 농도에서는 26.30%의 생존율을 보여 높은 증식억제효과를 나타내었지만 종피 ethanol 추출물(CSE1)보다는 낮게 나타났다. CSE2는 저농도에서는 증식억제효과가 낮았지만 1.25~2.5 mg/mL의 농도에서는 57.46~62.49% 그리고 5 mg/mL의 고농도에서는 31.56%의 생존율을 보여 증식억제효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 CSH2도 저농도에서는 증식억제효과가 낮았지만 고농도인

Fig. 3. Antiproliferation effects of citron seed extracts on the human lung cancer cells (NCI-H460). Different letters on the bars of same items indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

세포에 대한 증식억제효과는 모든 암세포에 대하여 5 mg/mL의 농도에서 종피 ethanol 추출물(CSE1)이 가장 높은 암세포 증식억제효과를 보였다.

## 문 헌

**Fig. 4. Antiproliferation effects of citron seed extracts on the human colon cancer cells (HCT-116).** Different letters on the bars of same items indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

**Fig. 5. Antiproliferation effects of citron seed extracts on the human prostate cancer cells (PC-3).** Different letters on the bars of same items indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

5 mg/mL의 농도에서는 24.01%의 생존율을 나타내었다. 전립선암세포 증식억제효과는 CSE1가 가장 높았고 그 다음으로 CSH2, CSH1, CSE2 순이었다.

## 요 약

유자씨 종피와 배유부분에 대한 n-hexane 및 ethanol 추출물에 대한 항산화활성, ACE 저해활성,  $\alpha$ -glucosidase 억제활성 및 항암활성을 살펴보았다. 항산화활성은 종피 n-hexane 추출물(CSH1), 배유 n-hexane 추출물(CSH2), 종피 70% ethanol 추출물(CSE1) 및 배유 70% ethanol 추출물(CSE2) 가운데 CSE1이 가장 높은 활성을 나타내었으며, CSE1의 용매분획물 가운데 ethylacetate 층이 2 mg/mL의 농도에서 라디칼소거능이 73.81% 그리고 총항산화력이 56.64 mg AA eq/g으로 우수한 항산화활성을 나타내었다. 또한 ACE 저해활성과  $\alpha$ -glucosidase 억제활성도 CSE1이 각각 31.63% 및 45.17%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 각각의 추출물에 대한 유방암, 간암, 폐암, 대장암 및 전립선암

1. Doosan World Encyclopedia CD-ROM. 1996.
2. Jeong JW, Lee YC, Lee KM, Kim IH, Lee MS. 1998. Manufacturing condition of oleoresin using citron peel. *Korean J Food Sci Technol* 30: 139-145.
3. Jeong JW, Lee YC, Kim IH, Kim JH, Lee KM. 1997. Technological development for processing, utilization and storage of domestic citrons. Korea Food Research Institute G1229-0822.
4. Jeong JW, Lee YC, Kim JH, Kim OW, Tnahmgung B. 1996. Cooling properties and quality changes during storage of citron (*Citrus junos*). *Korean J Food Sci Technol* 28: 1071-1077.
5. Kim YT. 1996. Main composition analysis of citron (*Citrus junos* Seib.) and production of their juice and vinegar. MS Thesis. Gyeongsang National University, Gyeongnam, Korea.
6. Nam HW, Hyun YH. 2003. Drying of citron juice from by-product of citron tea manufacturing. *Korean J Food Nutr* 16: 334-339.
7. Jenog JY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Park ES, Jeong HS. 2008. Optimization of extraction conditions for limonin and nomilin in citron seed. *Korean J Food Sci Technol* 40: 540-544.
8. Njoroge SM, Ukeda H, Sawamura M. 1996. Change in the volatile composition of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) cold-pressed oil during storage. *J Agric Food Chem* 44: 550-556.
9. Song HS, Sawamura M, Ito T, Kawashimo K, Ukeda H. 2000. Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. *Flavour Frag J* 15: 245-250.
10. Park JH, Kang BW, Kim JE, Seo MJ, Lee YC, Lee JH, Joo WH, Choi YH, Lim HS, Jeong YK, Lee BK. 2008. Effect of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on antioxidant and immune activity. *J Life Sci* 18: 403-408.
11. Yoo KM, Hwang IK. 2004. *In vitro* effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 36: 339-344.
12. Hashinaga F, Herman Z, Hashegawa S. 1990. Limonoids in seeds of yuza (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 380-382.
13. Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
14. Zia Z, Tang M, Wo J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
15. Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
16. Bektas T, Dimitra D, Atalay S, Munevver S, Moschos P. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem* 90: 333-340.
17. Kwon YI, Vatter DA, Shetty K. 2006. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and

- hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr* 15: 107-118.
18. Kim HY. 1997. *In vitro* inhibitory activity on rat intestinal mucosa  $\alpha$ -glucosidase by rice hull extract. *Korean J Food Sci Technol* 29: 601-608.
  19. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Bilp Pharm Bull* 19: 1518-1520.
  20. Woo KS, Jeong JY, Hwang IG, Lee YJ, Lee YR, Park HJ, Park ES, Jeong HS. 2009. Antioxidant activity of ethanol extraction on citron seed by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 384-390.
  21. Kwon OC, Shin JH, Kang MJ, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. 2006. Antioxidant activity of ethanol extract from citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) seed. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 294-300.
  22. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother Res* 1: 44-47.
  23. Shin JH, Lee JY, Ju JC, Lee SJ, Cho HS, Sang NJ. 2005. Chemical properties and nitrate scavenging ability of citron (*Citrus junos*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 496-502.
  24. Lee SJ, Choi SY, Shin JH, Seo JK, Lim HC, Sung NJ. 2005. The electron donating ability, nitrite scavenging ability and NDMA formation effect of solvent extract from Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA). *J Fd Hyg Safety* 20: 237-243.
  25. Noh H, Song KB. 2001. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenathe javanica*. *Agric Chem Biotechnol* 44: 98-99.
  26. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ, Cho KH. 1997. K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin and trypsin. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Kim SH* 7: 230-234.

(2009년 8월 21일 접수; 2009년 9월 29일 채택)