

완숙된 탱자(*Poncirus trifoliata* Ripe Fruit)의 부위별 생리활성에 관한 연구

이양숙¹ · 윤홍근² · 김남우^{1*}

¹대구한의대학교 한약자원학과, ²대구한의대학교 한방산업대학원

The Physiological Activities of Ripe Fruit of *Poncirus trifoliata*

Yang Suk Lee¹, Hong Gun Yoon² and Nam Woo Kim^{1*}

¹Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

²Graduate School of Oriental Medicine Industry, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Abstract

Ripe fruits of *Poncirus trifoliata* were examined with a view to development of functional foods and physiological activities were assessed. The flavonoid compound of the sarcocarp extract (SC), at 20.39 mg/g, was the highest of all extracts studied, whereas that in fruit juice extract (FJ) was 18.72 mg/g. The total polyphenol content of pericarp ethanol (PE) and water (PW) extracts were 60.54 mg/g and 45.91 mg/g, respectively. The nitrite scavenging ability of PW (2.0 mg/mL) was 52.27% at pH 1.2. The tyrosinase inhibitory activity of PE (2.0 mg/mL) was 23.23%, but SW showed no such activity at any tested concentration. The electron donating abilities of PW, SC, and FJ were greater than 50% when tested at 0.5 mg/mL. Notably, the IC₅₀ of PW was 147.73 µg/mL. Inhibition of xanthine oxidase by PW and SE (0.5 mg/mL) were more than 90%, whereas the IC₅₀ of SC was 18.28 µg/mL. These results indicate that *P. trifoliata* ripe fruits may potentially serve as components of valuable new functional foods.

Key words : *Poncirus trifoliata*, ripe fruit, functional material, physiological activity

서 론

최근 식품관련 산업에서는 자연계에 존재하는 다양한 동·식물 중 한방생약재의 약리학적 효능을 이용하여 기능성 식품 및 제품의 재료나 첨가제로 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(1,2). 약용식물이나 한약재의 약용부위 이외의 버려지는 부산물로부터 기능성을 지닌 물질을 탐색하여 식품이나 식품부재료로 개발하는 것은 자원의 효율적인 이용 측면에서나 새로운 식품자원 개발에 기여할 수 있다는 측면에서도 매우 의미 있는 일이라 할 수 있다.

노화 및 성인질환은 생체내에서 발생된 H₂O₂ (hydrogen peroxide), O₂⁻ (superoxide anion), ¹O₂ (singlet oxygen), OH (hydroxy radical) 등과 같은 반응성 높은 활성산소(reactive oxygen)에 의한 산화적 대사 부산물이 그 원인으로 알려져

있으며(3), 생물체는 이러한 활성산소 상해에 대한 근본적인 자기방어기작을 가지고 있다. 항산화 효과를 지닌 물질은 동·식물에 널리 분포하며 특히 식물체는 자외선에 의한 산화나 자동산화로부터 자신을 보호하기 위하여 폴리페놀류의 항산화 물질을 세포내 함유하며, 특히 플라보노이드류와 산성의 페놀화합물은 항산화, 항알러지, 항암성 등 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있다(4). 이러한 항산화 효과는 약용식물의 종류에 따라 다르며, 약용식물 부위나 추출하는 방법에 따라라도 생리활성 효능에 차이를 나타내는 것으로 보고되어 있다(5).

탱자는 운향과(Rutaceae)에 속하는 낙엽관목인 탱자나무(*Poncirus trifoliata* Rafinesque)의 과실로 4~5월에 개화하며 과실은 10월에 황색으로 착색되고 특유의 향기를 지니고 있으나 강한 신맛으로 귤이나 오렌지, 레몬과 같이 생용하기에는 부적합하다(6). 그러나 한국과 중국을 포함한 동남아시아에서는 미성숙된 탱자를 지실(枳實)이란 명칭의 한약재로 사용하고 있으며, 완숙된 광귤나무(*Citrus*

*Corresponding author. E-mail : tree@dhu.ac.kr
Phone : 82-53-819-1438, Fax : 82-53-819-1440

aurantum var *daidai* Makino)의 과실인 지각(枳殼)의 대용품으로 이용하기도 한다. 한방에서 지실은 체내의 불균형으로 멎쳐진 기를 분산시키는 효능이 있어 오장(五臟)의 기능을 원활하게 하고 기운을 북돋우며 몸을 가볍게 하는 작용을 한다고 하며, 특히 소화기의 기능을 원활하게 해주는 작용이 있어 소화불량, 변비, 부종 및 피부질환 등의 치료에 활용된다(7). 또한 지실에는 hesperidine, naringine 등의 flavonoids 성분(8)과 linalool, camphene 등의 terpene류, 정유성분(9), 다량의 vitamine C와 다양한 종류의 유기산과 유리당이 함유되어 있다(10).

탕자에 관한 연구로는 미성숙 탕자 추출물에서 항염증 활성(11)과 장내세균에 대한 항균활성 및 항과민성 효과(12), 항산화 및 지질 저하효과를 보고한바 있으며(13), Son 등(10)은 멜라닌 색소 억제 물질을 분리 동정하였다. 또한 Chung 등(2004)은 과육의 일반성분 및 아미노산 등을 분석 보고한 바 있으나, 완숙된 탕자의 생리활성에 관한 연구는 미흡하다.

본 연구는 우리나라 및 동양에서 한약재료로 사용되며, 미성숙된 탕자에서 다양한 생리활성을 지닌 것으로 보고된 탕자나무의 완숙 과실인 탕자를 새로운 생리활성 소재로 개발하기 위한 연구의 일환으로 완숙된 탕자에서 과피, 씨, 과육 그리고 과즙을 분리하여 물과 에탄올을 용매로 추출하여 부위별 추출물에 함유된 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 함량, 아질산염 소거, tyrosinase 저해, DPPH radical 소거능 및 xanthine oxidase 저해효과를 측정하여 기능성 소재로서의 이용 가능성에 대해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

재 료

실험 재료인 탕자나무(*Poncirus trifoliata*)의 완숙된 과실(탕자)은 2007년 10월 말~11월 초에 경북 경산시 일대에서 동정 후 채집하였다. 채집된 탕자는 3회 이상 흐르는 물에 세척하고 물기를 제거한 후, 과피(pericarp)와 씨(seed), 과육 착즙 액인 과즙(fruit juice), 그리고 착즙 후 잔사를 과육(sarcocarp)으로 각각 분리하여 추출물 제조를 위한 재료로 사용하였다.

추출물 제조

과피와 씨 추출물

완숙된 탕자의 과피와 씨는 생체 무게 당 5배의 증류수와 70% 에탄올을 넣고 80℃와 60℃로 설정된 환류 추출기(PSWB-4, Changshin, Seoul, Korea)를 이용하여 3시간 동안 추출하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 모아진 과피와 씨의 물과 에탄올 추출물은 filter paper로 여과한 다음 rotatory vacuum evaporator (Eyela 400 series, Tokyo, Japan)

로 감압농축한 후에 동결건조(FD 5510 SPT, ILSINBIOLAB, Kyunggi Yangju, Korea)하여 분말로 제조하였다. 이것을 과피 물 추출물(PW; Pericarp water extract), 과피 에탄올 추출물(PE; Pericarp ethanol extract), 씨 물 추출물(SW; Seed water extract) 그리고 씨 에탄올 추출물(SE; Seed ethanol extract)로 하여 생리활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

과육 및 과즙 추출물

완숙된 탕자에서 과피와 씨를 제거한 과육은 과즙을 얻기 위하여 homogenizer로 같은 다음 3,000 rpm 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층액과 잔사를 분리하였다. 분리된 상층액만을 모아 filter paper로 여과한 다음 동결건조하여 분말로 제조하였으며, 이를 과즙 추출물(FJ; Fresh juice extract)로 사용하였다. 또한 원심분리 후 남은 잔사만을 모아 동결건조하여 분말화하여 생리활성을 측정하기 위한 과육 추출물(SC; Sarcocarp extract)로 하였다.

총 플라보노이드 화합물(Total flavonoid compound) 함량

완숙된 탕자의 부위별 추출물에 함유된 플라보노이드 함량을 알아보기 위하여 Nieva-Moreno 등(15)의 방법을 변형하여 80% 에탄올로 분말화 된 추출물 시료를 일정농도로 희석하여 각각의 시료 0.1 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M의 potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.7 mL를 가하여 25℃에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 spectrophotometer (Shimadzu U-1201, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 quercetin (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO, USA)을 이용하여 최종농도가 0~500 µg/mL의 농도로 위와 동일한 방법으로 측정된 표준곡선으로 탕자 부위별 추출물의 플라보노이드 화합물의 함량을 산출하였다.

총 폴리페놀 화합물(Total polyphenol component) 함량

탕자나무의 완숙 과실인 탕자의 각 부위별 추출물의 폴리페놀 화합물 총량은 Folin-Denis법(16)으로 측정하였다. 각 부위별 추출물을 10 mg/mL의 농도로 증류수에 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하여 10배로 희석한 후 foiln-coachlet's phenol reagent 0.2 mL를 첨가, 희석하여 실온에서 3분간 반응한 뒤, Na₂CO₃ 포화용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수 1.4 mL 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 표준곡선은 tannic acid를 10 mg/mL 농도로 증류수에 녹이고 최종농도가 0~300 µg/mL 용액이 되도록 취하여 같은 방법으로 측정하여 탕자의 부위별 추출물에 함유된 폴리페놀 화합물 함량을 산출하였다.

아질산염 소거능(Nitrite-scavenging ability)

탕자를 과피와 씨, 과육 그리고 과즙으로 부위별로 나누어 추출한 각 추출물의 아질산염 소거 작용은 Kato 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM의 아질산염 용액 2 mL에 일정농도로 희석된 탕자의 부위별 추출물 1 mL를 첨가하고, pH 1.2 (0.1 N HCl)와 pH 3.0 그리고 pH 6.0의 조건을 완충용액으로 0.2 M citrate buffer로 보정한 다음, 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각각 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL를 첨가하였다. 그리고 griess 시약(A:B=1:1, A; 1% sulfanilic acid in 30% acetic acid, B; 1% naphthylamine in 30% acetic acid)을 0.4 mL 첨가하여 혼합한 다음, 실온에서 15분간 반응시켰다. 이 반응액을 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염으로 산출하였다. 대조구는 griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 첨가한 후, 상기와 동일한 방법으로 측정하여 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 표시하여 아질산염 소거효과로 나타내었다. 대조구로는 기존의 항산화제인 ascorbic acid (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO, USA)를 위와 동일한 방법으로 측정하여 비교하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 Yagi 등(18)의 방법에 따라 부위별 탕자 추출물을 일정농도로 희석한 시료액 0.1 mL에 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL, 10 mM L-DOPA(3,4-dihydroxy phenylalanine)을 녹인 기질액 0.2 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome에 대해 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 tyrosinase 저해 활성으로 나타내었다. 대조구로는 ascorbic acid를 추출물과 동일한 농도로 첨가하여 위와 동일한 방법으로 tyrosinase 저해활성을 측정하였다.

DPPH radical 소거능

항산화 활성을 조사하기 위하여 free radical인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)를 사용하여 변형된 Blois (19)의 방법으로 측정하였다. 일정 농도로 희석된 추출물 시료 2 mL에 0.2 mM DPPH 용액(dissolved in 99% ethyl alcohol) 1 mL 가하여 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거능(%)를 나타내었으며, 활성정도를 정확하게 파악하기 위하여 시료 무첨가구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC₅₀ (µg/mL)을 구하였다. 소거효과의 비교를 위하여 기존의 항산화제인 ascorbic acid를 대조구로 측정하였다.

Xanthine oxidase 저해

완숙된 탕자 각 부위별 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte(20)의 방법에 따라 측정 일정농도로 희석된 추출물 시료 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 xanthine(Sigma Chemical Co., USA) 2 mM을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하였다. 여기에 xanthine oxidase(0.2 U/mL; Sigma Chemical Co., ST Louis, MO, USA) 0.1 mL를 가하여 25°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켜 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 표시하였으며, 저해효과를 정확하게 측정하기 활성을 xanthine oxidase의 활성을 50% 저해하는 추출물의 농도를 IC₅₀ (µg/mL)으로 계산하였으며, ascorbic acid를 대조구로 사용하여 비교하였다.

통계처리

탕자의 각 부위별 추출물의 생리활성을 측정한 실험 결과는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 version 17.0의 통계프로그램 SPSS (Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 표시하였고, 각 군간의 평균치의 통계적 유의성 검정은 ANOVA test (one-way analysis of variance test)를 실시하였다. 다군간의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

플라보노이드와 폴리페놀 화합물 함량

플라보노이드는 페놀 화합물 중 하나로 탄소수에 따라 페놀산, 탄닌, 플라보노이드 등의 다양한 물질로 나누어진다. 페놀 화합물은 식물에 존재하는 phenolic hydroxy group을 지닌 방향족 화합물로 다양한 구조와 분자량을 지닌 2차 대사산물로써 항산화, 항균, 항암 등 여러 생리활성을 나타내는 물질로 항산화 활성과 상관성이 있는 것으로 보고되어 있다(21).

완숙된 탕자의 부위별 추출물에 함유된 플라보노이드 함량을 측정한 결과 과육에서 20.39 mg/g로 가장 많은 양을 함유하였으며, 과즙 18.72 mg/g, 과피 12.24~13.60 mg/g, 그리고 씨에서는 2.99~4.12 mg/g 이었다. 부위별 추출물의 폴리페놀 함량은 17.90~60.54 mg/g으로 과피 > 과즙 > 씨 > 과육의 순으로 과피가 과육보다 3~5배 많았으며, 물보다 에탄올을 용매로 사용한 추출물에서 폴리페놀 화합물 함량이 더 높았다. 플라보노이드는 과육과 과즙에서 많았으며, 폴리페놀은 과피 추출물이 더 많은 것으로 분석되었다(Table 1).

Table 1. Contents of the total flavonoid and polyphenol compounds in the various parts extracts of *P. trifoliata* ripe fruit

Components (mg/g)	Pericarp		Seed		Sarcocarp	Fresh Juice
	Water	Ethanol	Water	Ethanol		
Flavonoids	12.24±0.16 ^{1)(d2)}	13.60±0.62 ^c	4.12±0.12 ^c	2.99±0.10 ^f	20.39±0.31 ^a	18.72±0.33 ^b
Polyphenols	45.91±0.99 ^b	60.54±1.30 ^a	17.90±0.03 ^c	19.44±0.04 ^d	12.68±0.15 ^f	22.92±0.15 ^c

¹⁾Value are mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts in a row indicate significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range.

Yu 등(22)은 생대추 과육에서 35.56 mg/g의 플라보노이드와 98.83 mg/g의 폴리페놀을 함유하며 생대추 씨에서는 각각 131.48 mg/g과 138.99 mg/g이라는 결과와 비교하면 탕자 과육과 씨의 플라보노이드와 폴리페놀 화합물의 함량이 낮았다. 그러나 동결건조 된 감귤 과피의 메탄올 추출물은 8.37 mg/g(23), 유자 과피에는 2.94 mg/g의 폴리페놀을 함유한다는 You 등(24)의 결과와 비교하면 완숙된 탕자 과피의 폴리페놀이 감귤과 유자보다 약 5.5~20.5배 이상 많았다. 또한 한약재로 사용되는 산수유는 2.25 mg/g의 플라보노이드와 5.15 mg/g의 폴리페놀을 함유하며, 오미자는 각각 2.94 mg/g와 12.69 mg/g이라는 Kim 등(25)의 보고와 비교하여도 탕자의 플라보노이드와 폴리페놀 화합물의 함량이 높았다.

아질산염 소거능

발암물질인 nitrosamine 생성의 원인물질인 nitrite 소거능력을 완숙된 탕자의 부위별 추출물에 대하여 pH 1.2와 3.0 그리고 6.0의 산성조건에서 농도별(0.5, 1.0, 2.0 mg/mL)로 측정된 결과 pH 1.2의 2.0 mg/mL의 농도에서 21.70~52.27였으며, pH 3.0에서는 13.77~41.17% 그리고 pH 6.0은 3.22~9.52%로 모든 pH 조건에서 과피 물 추출물에서 가장 높은 아질산염 소거율을 보였으며, 다음으로 과피 에탄올 추출물이 비교적 높은 소거율을 나타내었다(Table 2).

부위별로는 과피 > 씨 > 과즙 > 과육의 순이었으며, pH가 낮을수록, 시료의 농도가 증가할수록 아질산염 소거효과가 증가하였다.

완숙된 탕자나무 과실의 부위별 추출물의 아질산염 소거능은 Ahn 등(23)의 감귤 과피의 메탄올 추출물이 pH 1.2에서 34.4%이며, 일부 한약재의 아질산염 소거능을 측정한 Kim 등(26)의 산수유(19.8%), 오미자(27.7%), 목단(14.8%) 등의 결과와 비교하면 부위별로 차이는 있으나 탕자 과육을 제외한 추출물의 아질산염 소거효과가 더 우수하였다. 그러나 유자 착즙액의 아질산염 소거율이 95%이었다는 Shin 등(27)의 결과와 비교하면 탕자 과즙(29.95%)의 아질산염 소거율이 낮았다.

식품에 함유된 nitrate는 유해하지 않으나 nitrate reductase에 의해 아질산염으로 환원되면 독성을 나타낸다. 아질산염은 주로 육가공품의 발색제나 보존제로 사용되며, 일정 농도 이상 섭취시 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하게 되며(28), 이러한 아질산염 소거를 위해서는 전자를 제공하는 환원제가 필요하며, 이러한 작용을 하는 성분은 플라보노이드나 페놀성 화합물이 강한 환원성으로 free radical에 전자를 공여하여 아질산 소거역할을 한다(29). 이는 탕자의 과육과 씨보다는 과피에서 아질산염 소거능이 더 높다는 결과는 flavonoid 화합물의 함량이 가장 많은 과피의 성분이 아질산염을 효과적으로 분해하여

Table 2. Nitrite scavenging abilities of various parts extracts obtained from *P. trifoliata* ripe fruit at pH respectively

Concentration (mg/mL)	Ascorbic acid	Pericarp		Seed		Sarcocarp	Fresh Juice	
		Water	Ethanol	Water	Ethanol			
pH1.2	0.5	89.70±0.74 ^{1)(d2)}	25.53±1.20 ^b	12.70±0.46 ^c	6.77±0.38 ^c	11.39±1.45 ^{cd}	4.74±0.99 ^f	9.85±0.60 ^d
	1.0	94.82±0.94 ^a	33.91±1.28 ^b	25.99±0.59 ^c	13.60±0.22 ^f	18.13±0.10 ^d	9.83±0.21 ^e	16.82±0.91 ^e
	2.0	99.33±0.11 ^a	52.27±0.98 ^b	49.63±0.13 ^c	25.25±0.76 ^e	30.47±0.68 ^d	21.70±0.27 ^f	29.95±0.75 ^d
pH3.0	0.5	78.67±1.11 ^a	11.56±0.62 ^b	9.55±0.43 ^c	2.76±0.39 ^d	11.90±0.73 ^b	2.72±0.91 ^d	4.00±1.13 ^d
	1.0	89.27±0.83 ^a	18.48±0.93 ^b	15.88±0.74 ^c	7.96±1.12 ^e	14.13±0.36 ^d	8.01±0.41 ^c	6.52±1.64 ^f
	2.0	95.27±0.00 ^a	41.17±0.62 ^b	26.53±0.12 ^c	13.87±0.11 ^c	21.20±0.18 ^d	13.77±1.02 ^e	12.60±0.79 ^f
pH6.0	0.5	23.26±0.98 ^a	3.92±1.41 ^c	5.0±0.28 ^c	5.32±0.49 ^c	6.30±0.39 ^b	1.71±0.45 ^d	1.41±0.49 ^d
	1.0	52.33±0.83 ^a	7.17±0.85 ^b	5.43±0.21 ^c	5.71±0.29 ^c	7.19±0.60 ^b	3.06±0.36 ^d	3.48±0.43 ^d
	2.0	70.27±0.72 ^a	9.52±0.41 ^b	6.53±0.21 ^c	6.16±0.42 ^{cd}	8.92±0.92 ^b	3.22±0.18 ^e	4.90±0.59 ^d

¹⁾Value are mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts in a row indicate significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range.

nitrosamine의 생성을 억제하는 것으로 판단된다. 따라서 완숙된 탱자를 단백질 함유 식품과 함께 섭취 및 가공한다면 효과적으로 발암물질인 nitrosamine의 생성을 억제할 수 있을 것이며, 각종 중독 및 암과 같은 질병 예방을 포함한 산화방지 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 tyrosine으로부터 DOPA와 DOPA-quinone으로 전환되는 melanine 색소 생성의 중간단계에 작용하는 효소로 tyrosinase에 대한 저해활성은 생물체를 원료로 사용하는 식품을 비롯한 생물체의 갈변화 현상과 관련하여 식품, 의약품 및 화장품 등의 개발에 적용된다(30). 완숙된 탱자의 tyrosinase의 저해효과를 각 부위별 추출물의 농도에 따라 측정된 결과 2.0 mg/mL의 농도에서 7.28~23.23%로 과피 에탄올 추출물 > 과즙 > 과육 > 씨 에탄올 추출물 > 과피 물 추출물의 순으로 과피의 에탄올 추출물에서 가장 우수한 저해율을 나타내었으나 과피 물 추출물이 가장 낮은 활성을 보였으며, 탱자 씨의 물 추출물은 tyrosinase를 저해하는 효과가 없었다(Table 3).

탱자에 대한 실험결과를 일부 약용식물의 tyrosinase 저해효과를 측정된 Choi 등(31)의 미성숙 탱자의 메탄올 추출물에서 15%, 치자 36%, 그리고 행인에서는 33%라는 보고와 유자(38%), 매실(20%), 무화과(12%) 등의 결과(32)와 비교하면 완숙된 탱자가 치자나 행인, 유자보다는 낮았으나 미성숙된 탱자나 매실, 무화과 보다는 유사하거나 약간 더 높은 저해율을 보여 melanine 생성 억제 및 생물체의 갈변화를 저해하는 화장품이나 식품의 개발에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

DPPH radical 소거능

호기성 생물체의 생명유지에 필요한 산소에 의해 생체내에서 free radical에 의한 산화로 세포가 손상되며, 폐놀성 화합물은 강한 환원성으로 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화 능력을 나타내는 것으로 보고되어 있다(33). DPPH는 매우 안정된 free radical을 갖는 화합물로 항산화물질에 의해 환원되어 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거 작용을 확인하는데 널리

사용되는 물질이다(34). 완숙된 탱자의 부위별 추출물 농도에 따라 DPPH 라디칼 소거효과를 측정된 결과 과피 물 추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 79.20%로 가장 높은 활성을 보였으며, 소거능이 50%가 되는 농도인 IC₅₀에서도 147.73 µg/mL로 과육 물 추출물의 IC₅₀ 966.25 µg/mL보다 약 6.5배 낮은 농도에서도 50%의 소거율을 나타내었으며, 과육(168.32 µg/mL)과 과즙(190.35 µg/mL)에서도 우수한 소거효과를 보였다(Table 4).

본 실험결과를 감귤류 과피의 메탄올 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능이 89.36%이며(23), 산지별 유자 착즙액이 약 80~84%라는 결과(27)와 비교하면 탱자 과피와 과즙은 감귤류 과피와 유자 착즙액과 유사한 활성을 보였다. 또한 일부 약용식물 추출물의 1.0 mg/mL의 농도에서 전자공여능을 측정된 결과 진피 10.2%, 초과 34.9%, 산사 3.8%, 그리고 창이자에서는 6.1%라는 결과(35)와 비교하면 완숙된 탱자 과피는 진피보다는 약 8배 이상, 초과보다는 약 2.5배 이상 높은 활성을 나타내어 탱자 추출물이 기존에 보고된 한약자원보다 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 지닌 것으로 분석되었다. 위와 같은 결과로 탱자 추출물이 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력이 있음이 확인되었으며, 천연 항산화제 및 첨가제로써 이용 가치가 높은 것으로 판단된다.

Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase는 산소를 전자수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid로 산화되는 것을 촉매하는 효소로 혈장 내 증가시 통증을 동반한 통풍을 일으키는 효소이다(36). 그러므로 xanthine oxidase 저해효과는 free radical 생성의 저해와 더불어 항산화, 노화 및 항암 등 생리활성을 평가하는 중요한 지표가 된다. 완숙한 탱자의 부위별 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해효과를 IC₅₀으로 나타낸 결과 18.28 µg/mL~1,266.44 µg/mL으로 과육 추출물이 대조구인 ascorbic acid의 18.68 µg/mL보다 낮은 저해율을 보였으며, 과피의 물과 에탄올 추출물에서도 37.14 µg/mL과 56.08 µg/mL으로 비교적 낮은 농도에서도 우수한 xanthine oxidase 저해활성을 지닌 것으로 분석되었다(Table 5).

Table 3. Tyrosinase inhibition of various parts extracts obtained from *P. trifoliata* ripe fruit

Con. (mg/mL)	Ascorbic acid	Pericarp		Seed		Sarcocarp	Fresh Juice
		Water	Ethanol	Water	Ethanol		
0.5	99.25±0.19 ¹⁾²⁾	-	1.97±0.39 ^d	-	2.22±0.64 ^d	11.54±0.75 ^b	8.07±0.70 ^c
1.0	99.57±0.19 ^a	6.33±0.49 ^d	10.24±0.79 ^e	-	5.31±0.43 ^d	13.33±0.69 ^b	13.80±1.07 ^b
2.0	99.78±0.19 ^a	7.28±0.49 ^e	23.23±1.42 ^b	-	12.96±.37 ^d	21.79±0.60 ^c	21.99±0.54 ^c

¹⁾Value are mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts in a row indicate significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range.

Table 4. DPPH radical scavenging abilities of various parts extracts obtained from *P. trifoliata* ripe fruit

Con. (mg/mL)	Ascorbic acid	Pericarp		Seed		Sarcocarp	Fresh Juice
		Water	Ethanol	Water	Ethanol		
0.1	94.80±0.31 ^{1)a2)}	23.34±3.21 ^b	-	-	7.60±1.07 ^c	21.88±0.30 ^c	11.35±0.58 ^d
0.3	95.11±0.31 ^a	47.60±1.68 ^b	18.04±0.00 ^c	-	21.08±0.54 ^d	46.60±1.08 ^b	33.71±1.38 ^c
0.5	95.51±0.18 ^a	79.20±0.31 ^b	26.71±0.35 ^f	20.30±1.41 ^e	32.39±0.37 ^e	63.04±1.07 ^c	54.13±1.49 ^d
1.0	96.53±0.35 ^a	88.69±0.35 ^b	63.00±1.22 ^d	52.15±0.36 ^e	52.47±1.40 ^e	81.88±1.56 ^c	86.87±0.90 ^b
2.0	96.53±0.18 ^a	89.30±0.31 ^c	71.66±154 ^e	71.27±0.59 ^e	77.86±1.86 ^d	88.28±0.98 ^c	91.95±0.34 ^b
IC ₅₀ (µg/mL)	6.30	147.73	820.89	966.25	938.50	168.32	190.35

¹⁾Value are mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts in a row indicate significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range.

Table 5. Xanthine oxidase inhibition of various parts extracts obtained from *P. trifoliata* ripe fruit

Con. (mg/mL)	Ascorbic acid	Pericarp		Seed		Sarcocarp	Fresh Juice
		Water	Ethanol	Water	Ethanol		
0.1	81.30±1.41 ^{1)ab2)}	25.00±0.00 ^d	73.78±2.83 ^c	15.00±0.00 ^e	2.78±0.00 ^f	86.13±1.63 ^a	10.76±1.32 ^f
0.3	96.75±2.82 ^a	63.89±2.78 ^d	78.69±2.84 ^c	33.33±1.44 ^e	19.44±2.78 ^e	92.56±0.78 ^b	27.54±1.32 ^f
0.5	98.37±1.05 ^a	92.59±1.60 ^b	81.97±2.84 ^c	59.17±2.89 ^d	47.22±2.78 ^e	94.75±1.63 ^b	30.59±1.32 ^f
1.0	99.19±1.41 ^a	94.44±2.78 ^b	86.89±2.84 ^c	80.83±1.44 ^d	75.93±4.24 ^e	97.80±1.63 ^a	38.21±2.29 ^f
2.0	99.39±1.05 ^a	95.37±3.21 ^c	96.72±2.84 ^{bc}	98.33±1.44 ^d	97.22±2.78 ^{ab}	99.83±0.78 ^a	82.46±3.50 ^d
IC ₅₀ (µg/mL)	18.68	37.14	56.08	493.54	548.42	18.28	1,266.44

¹⁾Value are mean±SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts in a row indicate significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range.

부위별 탕자 추출물의 xanthine oxidase 저해율에 대한 결과는 산사자의 물과 에탄올 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 9.6~10.5%이라는 결과(37)와 비교하여 탕자 추출물이 3배~9배 높았다. Hatano 등(38)은 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase 저해효과가 우수하며 경쟁적으로 저해한다고 보고하였다. 또한 Kim 등(11)은 미성숙 탕자에서 항염증 활성을 지닌 것으로 보고한바 있으며, 본 실험에서도 완숙된 탕자 과육의 IC₅₀ 18.28 µg/mL은 천연 항산화제로 알려진 ascorbic acid보다 낮아 완숙된 탕자나무의 과실인 탕자를 이용하여 염증성 질환의 치료와 예방을 위한 의약품의 원료나 기능성 식품 및 제품에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

탕자나무(*Poncirus trifoliata* Rafinesque)는 운향과의 낙엽관목으로 건조된 미성숙 과실은 지실(枳實)이라는 한약 재료로 사용되며, 완숙된 탕자나무의 과실은 지각(枳殼)이란 한약재원의 대용품으로 사용된다. 미성숙된 탕자에 관

해서는 항균, 항산화 및 지질저하 효과가 있다고 보고되어 있으나 완숙된 탕자에 대한 생리활성 효능에 대해서는 연구된 바 없어 이에 본 연구에서는 과피, 과육, 과즙 그리고 씨로 분리하여 물과 에탄올을 용매로 추출하여 생리활성 효능을 측정하였다.

플라보노이드 화합물은 과육에서 20.39 mg/g으로, 과즙 18.72 mg/g를 함유하였으며, 폴리페놀 화합물은 과피의 에탄올 추출물에서 60.54 mg/g, 과피 물 추출물은 45.91 mg/g를 함유하였다. 상이한 농도와 pH 조건에서의 아질산염 소거능을 측정한 결과 pH 1.2의 2.0 mg/mL에서 과피 물 추출물이 52.27%로 가장 낮았다. Tyrosinase 저해율은 과피 에탄올 추출물에서 23.23%였으며, DPPH 라디칼 소거율은 0.5 mg/mL의 농도에서 과피 물 추출물이 약 80%로 IC₅₀은 147.73 µg/mL였다. Xanthine oxidase에 대한 저해효과를 IC₅₀으로 나타난 결과 과육 추출물이 대조군이 ascorbic acid (18.68 µg/mL)보다 낮은 18.28 µg/mL였으며, 과피 추출물에서도 비교적 높은 xanthine oxidase 저해율을 보였다. 이상의 결과 탕자나무의 완숙된 과피는 다량의 생리활성 물질을 함유하며 우수한 아질산염 소거능과 전자공여활성을 나타내며, 과육과 과즙은 플라보노이드 함량이 다른 부위보다

높았고 과육에서는 99% 이상의 xanthine oxidase 저해율을 그리고 과즙에서는 전자공여능이 90% 이상으로 기능성 제품의 개발 가능성을 제시하였다.

참고문헌

1. Lee JR, Jung JD, Lee KI, Song YM, Jin SK, Kim IS, Kim HY, Lee JH. (2003) The effects of emulsion-type sausages containing mulberry leaf and persimmon leaf power on lipid oxidant, nitrite, VBN and fatty acid composition. Korean J. Food. Sci. Ani. Resour., 23, 1-8
2. Bae JK, Park LY, Lee SH. (2008) Effects of *Salicornia herbacea* L. power on making wheat flour bread. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 37, 908-913
3. Hammond B, Kontos A, Hess ML. (1985) Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. Can. J. Physiol. Pharmacol., 63, 173-187
4. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad. Biol. Med., 20, 933-956
5. 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 extracts from Yuza (*Citrus junos* SOEB EX TANAKA). J. Food. Hyg. Safety, 20, 237-243
6. Lee TB. (1993) Illustrated flora of Korea 5th ed. Hyangmoonsa, Seoul, Korea, p.502-503
7. Kim HC. (2004) Herb medicine pharmacology. Jipmoondang, Seoul, Korea, p.270-273
8. Kim TJ, No JY, Ko JS, Rhee JW. (1989) The separation and determination of flavonoid glycosides from *Poncirus trifoliata* Rafia and *Citrus qaurantium* L. J. Anal. Sci. Technol., 2, 301-307
9. Heinrich G, Schultze W, Wegner R. (1980) Compartmentation of mono and sesquiterpene synthesis of essential oil in *Poncirus trifoliata*. Protoplasma, 103, 115-119
10. Chung HS, Lee JB, Seong JH, Choi JU. (2004) Chemical components in peel and flesh of trifoliolate oranges (*Poncirus trifoliata*). Korean J. Food Preserv., 11, 342-346
11. Kim HM, Kim HJ, Park ST. 1999. Inhibition of immunoglobulin E production by *Poncirus trifoliata* fruit extract. J. Ethnopharmacol., 66, 283-288
12. Kim DH, Bae EA, Han MJ. (1999) Anti-helicobacter phylori activity of the metahbolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. Biol. Pharm. Bull., 22, 422-424
13. Lee E. (2006) Antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Poncirus trifoliata*. Korea J. Plant Res., 19, 279-276
14. Son AR, Choi JY, Kim JA, Cho SH, Hua XG, Park SH, Chung SR, Chung TC, Jang DJ, Son JK, Lee SH. (2005) Isolation of melanogenesis inhibitors from Ponciri fructus. Korean J. Pharmacogn., 36, 1-8
15. Nieva-Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol., 71, 109-114
16. A.O.A.C. (2005) Official method of analysis. 18th ed., Association of official analytical chemists. Washington, DC. USA, p.21-22
17. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric. Biol. Chem., 51, 1333-1338
18. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. (1987) Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. Planta Med., 53, 517-519
19. Blois MS. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
20. Stirpe F, Corte ED. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 244, 3855-3861
21. Kandaswami C, Middleton EJ. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In: Free radicals in diagnostic medicine. Armstrong D (de). Plenum Press, New York, USA, p.351-376
22. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. (2006) Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. Korean J. Food Sci. Technol., 38, 128-134
23. Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. (2007) A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the *Citrus unshju* peel extracts. Korean J. Food Culture, 22, 454-461
24. You JM, Park JB, Seoung KS, Kim DY, Hwang IK. (2005) Antioxidant activities and anticancer effect of Yuza. Food Sci. Ind., 38, 72-77
25. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 333-338
26. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. (1995) Antioxidative activity and physiological activity of some

- korean medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 80-85
27. Shin JH, Lee JY, Ju JC, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. (2005) Chemical properties and nitrite scavenging ability of Citron (*Citrus junos*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 34, 496-502
 28. Jakszyn P, Gonzalez CA. (2006) Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. World J. Gastroenterol., 12, 4296-4303
 29. Issa AY, Volate SR, Wargovich M.J. (2006) The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation new directions and perspectives. J. Food Compos. Anal., 19, 405-419
 30. Jimenez M, Hearing VJ. (1987) Mammalian tyrosinase : The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. Int. J. Biochem., 19, 1141-1147
 31. Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. Kor. J. Pharmacogn., 29, 237-242
 32. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DW. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 891-896
 33. Saija A, Trombetta D, Tomaino A, Cascioni RL, Princi P, Iccella N, Bonina F, Castelli F. (1998) In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. Int. J. Pharm., 166, 123-133
 34. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. (2004) Aging of whiskey increases 1,1-phenyl-2-picryl hydrazyl radical scavenging activity. J. Agric. Food Chem., 52, 5240-5244
 35. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 135-140
 36. Storch I, Ferber E. (1988) Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide amino production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. Anal. Biochem., 169, 262-267
 37. An BJ, Kang BY, Lee JT. (2002) Development of cosmetic material from Korean *Crataegi fructus* extract. Korean J. Herbol., 17, 39-50
 38. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Okuda T. (1991) Inhibitory effects of galloylated flavonoids xanthine oxidase. Planta Med., 57, 83-84