

## 감귤 과피의 페놀성 화합물 함량과 항산화 활성

황준호<sup>1,2</sup> · 박경열<sup>3</sup> · 오유성<sup>1</sup> · 임상빈<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 생물학과

<sup>2</sup>제주대학교 생명과학기술혁신센터

<sup>3</sup>제주대학교 식품생명공학과

## Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Citrus Peels

Joon-Ho Hwang<sup>1,2</sup>, Kyeong-Yeol Park<sup>3</sup>, You-Sung Oh<sup>1</sup>, and Sang-Bin Lim<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology, <sup>2</sup>Biotechnology Regional Innovation Center, and

<sup>3</sup>Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

### Abstract

The peel from seven types of citrus was extracted with 80% methanol, and their phenolic compound content, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), inhibitory activities of nitric oxide (NO), and reactive oxygen species (ROS) production induced by LPS and t-BHP in LPS-activated RAW 264.7 cells were measured. Total phenolic content was high in Yungkyool, Cheonhyehyang, and Jinkyool (30.6, 30.2, and 28.2 mg GAE/g, respectively), while total flavonoid content was high in Yungkyool and Jinkyool (30.3 and 25.5 mg RE/g, respectively). ORAC was the highest at 1,076 mM TE/g in Yungkyool, followed by Cheonhyehyang (1,012), Jinkyool (984), and Hallabong (914). High inhibitory activity against NO production was shown in Cheonhyehyang, Yungkyool, and Jinkyool with IC<sub>50</sub> values of 215.3, 259.2, and 328.9 µg/mL, respectively. LPS-induced ROS production was inhibited by 16.4% and 12.8% in Hallabong and Jinkyool, while t-BHP-induced ROS production was inhibited by 28.7%, 26.1%, and 26.6% in Jinkyool, Hallabong, and Cheonhyehyang, respectively. Correlation coefficients between total phenolic, total flavonoid content, and ORAC were 0.884 and 0.855. Inhibitory activity against NO production showed higher correlation with total phenolic content than total flavonoid content. It was concluded that citrus peels had potent antioxidant activities and could be used as natural antioxidants in the food and pharmaceutical industries.

**Key words:** citrus peel, phenolic compounds, antioxidant activity, antiinflammatory effect

### 서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 superoxide anion( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peroxy radical( $\text{ROO}\cdot$ ), hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ) 등 여러 종류의 free radical로 이루어져 있으며, 체내 호흡을 통한 에너지 생성 과정에서 필연적으로 발생되지만 이러한 활성산소가 순간적으로 대량 생성되거나 만성적으로 생성 되면 세포와 반응하여 세포 조직에 손상을 일으키게 된다 (1). 생체 내에서 대식세포는 다량의 활성산소를 생성하며, 이는 염증 반응의 중요한 인자로 세포 손상을 유발하는 매개자이며, 내독소 혈증(endotoxemia)을 일으키고(2,3) 다양한 세포 스트레스 반응에 관여하며, 세포의 산화환원성(cellular redox status)이 염증과 관련된 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 조절한다(4). 활성산소에 의한 세포 손상의 예로는 DNA 변성, 세포막 손상, 단백질 변성 등이 있는데(5), 생체는 활성산소로부터 세포 손상을 방지하고 항상성을 유지하기 위하

여 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등과 같은 항산화 효소를 분비한다. 비효소적 항산화 물질에는 L-ascorbic acid, tocopherol과 같은 천연 항산화제와 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제가 있는데(1), 합성 산화제는 높은 활성과 경제성이 있으나 독성이 있어서 고농도로 투여할 경우 간 손상 및 암을 유발하는 것으로 알려져 있다 (6). 따라서 천연의 물질로부터 독성이 없으면서 높은 항산화능을 가지는 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다.

감귤은 운향과(Rutaceae) 감귤속(*Citrus*)의 식용 식물로 폴리페놀류와 비타민류 등 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 과육보다 과피에 생리활성물질을 많이 함유하고 있다(7). 특히 과피에 함유되어 있는 carotenoids와 bioflavonoids는 항염, 항암, 항산화 등 다양한 생리적 작용을 나타낸다고 보고되어 있다(8). 지금까지 감귤류의 항산화 활성에 대한 연구는 주로 온주밀감에 대한 것이 대부분이며, 제주재래종 감귤에 대한 연구로는

\*Corresponding author. E-mail: sblim@jejunu.ac.kr  
Phone: 82-64-754-3617, Fax: 82-64-755-3601

당유자, 사두감, 홍귤, 동정귤, 지각, 진귤, 빈귤, 인창귤 등에 불과하다(9-11).

따라서 본 연구에서는 감귤 7종을 대상으로 과피를 메탄올로 추출하여 총페놀과 총플라보노이드의 함량을 측정하였고, 유해산소 흡수능력(oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 분석을 통한 free radical 소거능과 RAW 264.7 murine macrophage를 이용한 활성산소와 nitric oxide (NO)의 생성 저해능을 평가함으로써 감귤 과피 추출물이 천연 항산화제로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 재료는 Table 1에 나타내었으며, 영귤(*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai), 천혜향(((*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*) × (*C. reticulata* × *C. sinensis*)), 청견(*C. unshiu* Marc. × *C. sinensis* (L.) Osb.), 한라봉((*C. unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osb.) × *C. reticulata* Blanco), 진귤(*C. sunki* Hort. ex Tanaka), 운주밀감(*Citrus unshiu* Marc.)은 제주하나로마트에서 구입하였으며, 수입산 네이블오렌지(*C. sinensis* Osb. forma Navel)는 이마트에서 구입하여 사용하였다. 추출용 시료는 감귤을 수돗물로 2~3번 씻은 후 과피를 분리하고 동결건조 하여 사용하였다. 양성대조군으로는 quercetin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

### 추출물의 제조

과피 동결건조물 10 g에 80% 메탄올 50 mL를 가하여 상온에서 24시간 동안 추출한 후 상층액을 회수하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 상층액을 감압농축하고 동결건조하여 과피 추출물을 얻었다. 분석용 시료는 동결건조 과피 추출물을 에탄올과 PBS 혼합용액(1:1)에 녹인 후 0.45 µm syringe filter(Millipore Co., Billerica, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

### 총페놀 함량 측정

동결건조 과피 추출물의 총페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다(12). 시료 용액(1 mg/mL) 100 µL와 증류수

900 µL를 혼합하고, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 여기에 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 300 µL를 가하여 혼합한 다음 증류수를 가하여 2 mL로 조정하였다. 이 용액을 상온에서 2시간 동안 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 검량선과 비교하여 총페놀 함량을 mg gallic acid equivalents(GAE)/g으로 나타내었다.

### 총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드의 함량은 Chang 등(13)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료용액을 각각 1 mg/mL의 농도가 되게 증류수에 희석한 후 200 µL를 취하고 여기에 에탄올 800 µL와 5% NaNO<sub>2</sub> 60 µL를 첨가하여 균질하게 혼합한 후 5분간 실온에서 반응시키고 10% AlCl<sub>3</sub>을 60 µL 첨가하여 실온에서 다시 5분간 반응시켰다. 그 후 1 M NaOH 용액을 400 µL 첨가하여 1분간 상온에서 반응시키고 증류수 500 µL를 가하여 균질화시킨 후 200 µL를 취하여 96 well plate에 분주하여 Microplate Reader(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 시료의 총플라보노이드 함량은 mg rutin equivalents(RE)/g으로 나타내었다.

### 유해산소 흡수능력(ORAC) 측정

항산화 활성은 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율로 측정하였는데, 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 유해산소 흡수능력(ORAC)을 측정하였다(14). 본 실험에서 표준용액의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer (0.075 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0.075M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=61.5:38.5(v/v))를 사용하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액으로는 trolox(Sigma-Aldrich Co.)에 인산완충액을 가해 각각 1.65, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 µM 농도로 희석하여 사용하였다. Fluorescent 표준용액은 Ou 등(15)의 방법에 따라 fluorescein sodium salt(Sigma-Aldrich Co.)를 75 mM phosphate buffer에 가하여 78 nM 농도로 제조하였다. 항산화 활성의 측정은 감귤과피 추출물과 표준용액 100 µL에 fluorescent 표준용액 50 µL를 가하고, 과산화 라디칼 유발물질인 AAPH를 인산완충액에 가해 34 mM로 희석한 후 50 µL를 가하여 반응시킨 후 FLUOstar OPTIMA(BMG Labtech, Inc., Offenburg, Germany)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 1시간 동안 3분마다 흡광도를 측정하였다.

ORAC는 trolox 표준곡선으로부터 산출하였는데, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{AUC (area under the curve)} = 1 + (f_1/f_0) + (f_2/f_0) + (f_3/f_0) + \dots + (f_{19}/f_0) + (f_{20}/f_0)$$

$$\text{Relative ORAC value} = [(\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}) / (\text{AUC}_{\text{trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}})]$$

Table 1. Citrus species investigated in this study

Scientific name	Korean name
<i>C. unshiu</i> Marc.	Onjumilgam
<i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka	Jinkyool
<i>C. sinensis</i> Osb. forma Navel	Navel orange
<i>C. sudachi</i> Hort. ex Shirai	Yungkyool
<i>C. unshiu</i> Marc. × <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	Cheungkyoun
( <i>C. unshiu</i> Marc. × <i>C. sinensis</i> Osb.) × <i>C. reticulata</i> Blanco	Hallabong
(( <i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i> ) × <i>C. reticulata</i> ) × ( <i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i> )	Cheonhyehyang

$-AUC_{blank}] \times (\text{molarity of trolox/gram of sample})$

분석하였다.

**세포독성과 nitric oxide(NO) 생성 저해능 측정**

**결과 및 고찰**

실험에 사용한 세포는 murine macrophage cell line RAW 264.7로 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL penicillin-streptomycin(Gibco Inc., Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

NO 생성 저해능은 RAW 264.7 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 조절한 후 96 well plate에 접종하고 여러 농도의 시료로 1시간 동안 처리한 후 lipopolysaccharide(LPS) 100 ng/mL를 가하여 24시간 배양한 후 생성된 NO를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 (1%(w/v) sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphyl)ethylenediamine(Sigma-Aldrich Co.) in 2.5(v/v) phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)의 검량선과 비교하여 환산하였다 (16).

세포독성 평가는 WST-1(EZ-CyTox enhanced cell viability assay kit, Daeil Lab Service, Seoul, Korea) 방법을 이용하여 세포 생존율을 3회 반복 측정하였으며, 각 시료의 농도에 대한 흡광도를 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 세포독성 정도를 평가하였다.

**LPS와 t-BHP에 의한 활성산소의 생성 저해능 측정**

활성산소의 생성 저해능은 Kimura 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 12-well plates(SPL, Inc., Seoul, Korea)에서 RAW 264.7 murine macrophage cell이 5×10<sup>5</sup> cells/mL가 되도록 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포배양액을 1% FBS가 포함된 PBS 완충용액으로 교체하여 25 µM H<sub>2</sub>DCFDA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 30분간 처리한 후 DMEM high glucose 배지로 교체한 후 각 시료를 500 µg/mL로 1시간 동안 전처리 하였다. 이후 자극제인 200 µM tert-butyl hydroperoxide(t-BHP, Sigma-Aldrich Co.)로 30분간 처리한 세포와 LPS로 24시간 동안 처리한 세포를 fluorescence activated cell sorter(FACS, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 활성산소를 발현하는 세포를 측정하였다.

**통계분석**

모든 데이터는 평균±표준편차로 표기하였고, 각 군의 차이는 분산분석, 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)으로, 상관관계 지수는 피어슨 상관계수(Pearson correlation coefficient)에 의해 유의성 검정을 실시하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였고 모든 통계자료는 SPSS program(ver. 12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여

**총페놀 및 총플라보노이드 함량**

식품이나 체내 생체막에 존재하고 있는 지질은 활성산소에 의해 산화되어 식품의 품질변화나 생체노화를 일으키는 것으로 알려져 있는데, 이러한 산화를 방지하기 위하여 천연 항산화제인 페놀성 화합물이 널리 이용하고 있다(18). 동결건조 감귤 과피의 80% 메탄올 추출물 중의 페놀성 화합물 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 총페놀 함량은 영귤, 천혜향, 진귤이 각각 30.6, 30.2, 28.2 mg GAE/g으로 높은 값을 나타내었고, 그 다음으로 한라봉, 청건, 온주밀감, 네이블오렌지가 각각 23.6, 22.2, 20.4, 17.5 mg GAE/g 순으로, 네이블오렌지가 가장 낮은 값을 나타내었다. Park 등(19)도 한라봉, 천혜향, 청건, 진지향 과피를 메탄올로 추출하여 총페놀 함량이 23.4~42.3 mg GAE/g임을 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

감귤 과피의 80% 메탄올 추출물 중의 총플라보노이드 함량은 영귤과 진귤이 각각 30.3과 25.5 mg RE/g으로 가장 높았고, 그 다음으로 한라봉, 천혜향, 온주밀감, 네이블오렌지, 청건이 각각 17.4, 16.9, 16.1, 9.3, 9.1 mg RE/g으로, 네이블오렌지와 청건이 가장 낮은 값을 나타내었다. Ghasemi 등(20)은 네이블오렌지, 발렌시아오렌지, 레몬, 그레이프프루트 등 13종의 감귤 과피에 대한 총플라보노이드 함량을 분석하여 0.3~31.1 mg quercetin/g이라고 보고하였는데, 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 플라보노이드는 페놀계 화합물로 감귤에서 그 종류와 함량은 품종에 따라 다르며 (7), 항암, 항염, 항고혈압, 항균, 항산화 등 여러가지 생리적 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(21).

**유해산소 흡수능력(ORAC)**

항산화능 측정방법 중의 하나인 유해산소 흡수능력 분석법은 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자 전달과 관련하여 항산화 물질의 free radical 소거 능력을

**Table 2. Total phenolics and total flavonoids contents, and antioxidant activity of methanol extracts from citrus peels**

Citrus species	Total phenolics (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)	ORAC (mM TE/g)
Onjumilgam	20.4±8.8 <sup>b1)</sup>	16.1±1.6 <sup>b</sup>	766.9±40.5 <sup>b</sup>
Jinkyool	28.2±4.3 <sup>d</sup>	25.5±1.6 <sup>d</sup>	984.4±52.7 <sup>cd</sup>
Navel orange	17.5±4.4 <sup>a</sup>	9.3±1.2 <sup>a</sup>	613.3±47.2 <sup>a</sup>
Yungkyool	30.6±7.5 <sup>c</sup>	30.3±5.8 <sup>c</sup>	1076.2±68.1 <sup>d</sup>
Cheungkyoun	22.2±8.1 <sup>c</sup>	9.1±1.6 <sup>a</sup>	626.6±27.3 <sup>a</sup>
Hallabong	23.6±6.0 <sup>c</sup>	17.4±1.6 <sup>c</sup>	914.7±42.0 <sup>c</sup>
Cheonhyehyang	30.2±9.0 <sup>c</sup>	16.9±3.3 <sup>c</sup>	1012.9±62.0 <sup>cd</sup>

<sup>1)</sup>Mean±SD (n=3).

<sup>a-c</sup>Values with different letters in the column are not significantly different at p<0.01 according to Duncan's multiple range test.

측정하는 방법이다(22). 이 방법은 식품 내에 존재하는 친수성 성분과 친유성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지고 있다. 또한 항산화 대조물질로 수용성 비타민 E를 사용하고 형광 물질을 결합시킴으로써 반응 강도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이기도 하다(23).

감귤 과피의 80% 메탄올 추출물의 유해산소 흡수능력을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 영귤이 1076 mM TE/g으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 그 다음이 천혜향(1012), 진귤(984), 한라봉(914), 온주밀감(766), 청견(626), 네이블오렌지(613) 순으로 페놀성 화합물 함량이 높은 감귤 과피 추출물이 유해산소 흡수능력이 높았다. Cai 등(24)도 중국내 자생하는 약용식물 112종의 추출물에서 총페놀 함량과 항산화 활성과는 매우 유의적인 상관관계를 나타낸다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다.

감귤 과피에 의한 유해산소 흡수능력에 관한 연구로는 Kim 등(25)이 당유자 과피 추출물의 유해산소 흡수능력은 21.8  $\mu$ M TE/2  $\mu$ g De(Dangyuja extract)라고 보고하였고, Khan(26)은 당귤 과피를 80% 에탄올로 추출한 경우 509 mM/100 g FW(fresh weight)라고 보고하였다.

#### 세포 독성 및 NO 생성 저해능

염증반응은 조직에 상처나 감염이 일어날 경우 신체를 보호하기 위한 기전이며, free radical, cytokine 등의 자극성 물질에 대한 방어 반응으로 알려져 있다(27). 실험에 사용한 대식세포주는 LPS로 자극을 받으면 염증성 cytokine(pro-inflammatory cytokine)을 방출하게 되고 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현을 유도하며 NO를 생성하여 염증반응을 매개하게 된다(28). 특히 NO는 그 자체로서도 염증과 세포 손상을 유발할 뿐만 아니라 활성산소종인 superoxide와 결합시 반응성이 더욱 강한 peroxynitrite의 형태로 전화되어 세포 과피를 유발하게 된다(29).

본 연구에서는 감귤 과피 추출물이 염증 매개체인 NO의 생성 저해와 세포독성 여부를 측정하기 위하여 대식세포주를 LPS로 자극한 후 각 시료의 NO 생성 저해능을 분석하여 NO 생성을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었고, 또한 WST-1을 이용한 세포독성을 분석하여 50% 세포독성을 나타내는 농도인 CC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다. 또한 세포

독성은 적으면서 NO 생성 저해능이 높은 추출물을 선별하기 위해 selectivity index(SI=CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>)도 산출하였다(Table 3).

감귤 과피 추출물의 세포독성을 분석한 결과 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대하여 1,000  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서는 모든 시료에서 독성이 관찰되지 않았다. NO 생성 저해능(IC<sub>50</sub>)은 천혜향이 215.3  $\mu$ g/mL로 가장 높았으며, 그 다음으로 영귤(259.2), 진귤(328.9), 한라봉(500.7), 네이블오렌지(583.1), 청견(607.2), 온주밀감(805.3) 순이었다. Choi 등(7)은 제주 자생 감귤 과피를 70% 에탄올로 추출하여 RAW 264.7 세포주에서 NO 생성 저해능(IC<sub>50</sub>)을 분석한 결과 진귤이 580.9, 한라봉이 815.9  $\mu$ g/mL로 본 연구에서의 NO 생성 저해능보다 약 1.6배 낮았으며, 총플라보노이드 함량보다는 nobiletin과 tangeretin 같은 성분이 NO 생성 저해에 보다 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 그런데 본 연구에서도 영귤이 가장 높은 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량을 보였으나 천혜향이 가장 높은 NO 생성 저해능을 나타낸 것은 이러한 특정 플라보노이드 성분들에 의한 것으로 추정되며 추후 개별 플라보노이드 성분에 대한 정량분석이 필요하다.

각 시료의 SI는 NO 생성 저해능(IC<sub>50</sub>)이 가장 높은 천혜향이 4.64로 가장 높았으며, 영귤(3.85), 진귤(3.04), 한라봉(1.99), 네이블오렌지(1.71), 청견(1.64), 온주밀감(1.24) 순으로 양성대조군으로 사용한 quercetin(6.15)보다는 낮은 값을 보였다.

#### LPS와 t-BHP에 의한 활성산소의 생성 저해능

본 연구에 사용한 RAW 264.7 macrophage는 LPS로 자극하면 염증 반응과 함께 NADPH oxidase를 활성화하여 활성산소를 생성하는 반면(30), t-BHP로 자극하면 미토콘드리아의 cytochrome C 또는 C1에 의해 대사되어 t-butoxyl, t-butylperoxyl 및 methyl radicals 등을 생성하여 세포 내 oxidative stress를 유발한다(31). 또한 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide와 t-BHP로 oxidative stress를 줄 경우 t-BHP의 자극에 의해서만 antioxidant enzyme이 증가한다(32). 즉 세포는 외부 자극에 대한 방어체계로서 antioxidant enzyme이 생성되어 세포내에서 생성되는 활성산소를 제거한다. 따라서 세포를 LPS와 t-BHP로 자극하여 활성산소의 생성을 유발시킨 후 시료의 처리에 따른 활성산소 생성량의

Table 3. Inhibitory activity of methanol extracts from citrus peels on NO production and cell cytotoxicity in LPS-activated RAW 264.7 cells

Citrus species	50% Cytotoxic concentration (A) (CC <sub>50</sub> , $\mu$ g/mL)	50% Inhibitory concentration of NO production (B) (IC <sub>50</sub> , $\mu$ g/mL)	Selectivity index (SI=CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
Onjumilgam	>1000	805.3 $\pm$ 1.6 <sup>1)</sup>	1.24
Jinkyool	>1000	328.9 $\pm$ 2.6	3.04
Navel orange	>1000	583.1 $\pm$ 5.6	1.71
Yungkyool	>1000	259.2 $\pm$ 10.6	3.85
Cheungkyoun	>1000	607.2 $\pm$ 12.0	1.64
Hallabong	>1000	500.7 $\pm$ 1.5	1.99
Cheonhyehyang	>1000	215.3 $\pm$ 6.3	4.64
Quercetin (positive control)	>20	3.25 $\pm$ 0.02	6.15

<sup>1)</sup>Mean  $\pm$  SD (n=3).

변화를 측정하였다.

감귤 과피 추출물이 LPS와 t-BHP에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정한 결과는 Fig. 1과 2와 같다. Raw 264.7 세포를 500 µg/mL의 감귤 과피 추출물로 전처리한 다음, LPS와 t-BHP로 처리하여 세포내 활성산소의 형성을 유도한 후 유동세포분석기로 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(H<sub>2</sub>DCFDA)에 의한 형광광도를 측정하였다. H<sub>2</sub>DCFDA는 세포막의 소수성 부분을 통과하여 세포내로 이동할 수 있으며(33), endogenous esterase에 의해 H<sub>2</sub>DCFDA의 아세트 잔기가 가수분해되어 형광을 가지지 않고 세포막을 통과할 수 없는 H<sub>2</sub>DCF로 변형되어 세포내에 저장되게 되는데, 이 H<sub>2</sub>DCF는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응하여 형광을 띠는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)을 형성하며, 488 nm의 excitation과 530 nm의 emission peak를 나타낸다(34).

LPS(Fig. 1)와 t-BHP(Fig. 2)로 처리한 세포에서는 음성대조군에 비하여 활성산소 생성을 유도하는 것으로 나타났는데, LPS와 t-BHP를 단독 처리한 군의 경우 음성대조군에 비하여 M1 범위 내에 위치하는 그래프가 오른쪽으로 각각 56.7%와 50.2% 이동되었다. 이는 형광값 증가를 의미하며 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 ·OH 수준이 증가되었음을 나타낸다.

LPS의 자극에 의해 24시간 동안 생성된 활성산소(Fig. 1)는 LPS 단독처리군에서는 56.7% 증가한 반면, LPS와 시

료를 동시에 처리한 실험군에서는 한라봉이 40.3%, 진귤이 43.9%, 천혜향 51.4%만이 증가하였는데, 이는 LPS에 의해 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 ·OH 수준을 한라봉이 16.4%, 진귤이 12.8%, 천혜향이 5.3% 저해하였음을 의미한다.

t-BHP의 자극에 의해 30분 동안 생성된 활성산소(Fig. 2)는 t-BHP 단독처리군에서는 50.2% 증가한 반면, t-BHP와 시료를 동시에 처리한 실험군에서는 진귤이 21.5%, 한라봉이 24.1%, 천혜향이 23.6%만을 증가시켰으므로 가장 높은 활성산소 생성 저해능을 보였는데, 이는 t-BHP로 인하여 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 ·OH 수준을 진귤, 한라봉, 천혜향이 각각 28.7, 26.1, 26.6% 저해함을 나타낸다. 진귤, 한라봉, 천혜향이 LPS와 t-BHP로 처리한 모든 세포에서 활성산소 생성 저해능이 가장 높았다.

특히 영귤은 t-BHP에 의한 활성산소의 생성을 효과적으로 저해했으나 LPS에 의한 활성산소의 생성을 저해하지 못하는 것으로 나타났는데, 이는 LPS와 t-BHP에 의한 활성산소 생성 기전의 차이에 의한 것으로 추정되나 추후 추가적인 연구가 필요하다. 한편 양성대조군으로 사용한 quercetin은 LPS와 t-BHP에 의한 활성산소 생성량이 각각 23.0%와 3.7%로 세포 내에서 활성산소의 생성을 효과적으로 저해하는 것으로 나타났는데, 플라보노이드의 한 종류인 quercetin은 NF-κB의 활성을 억제하고 세포내에서 활성산소의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다(35).

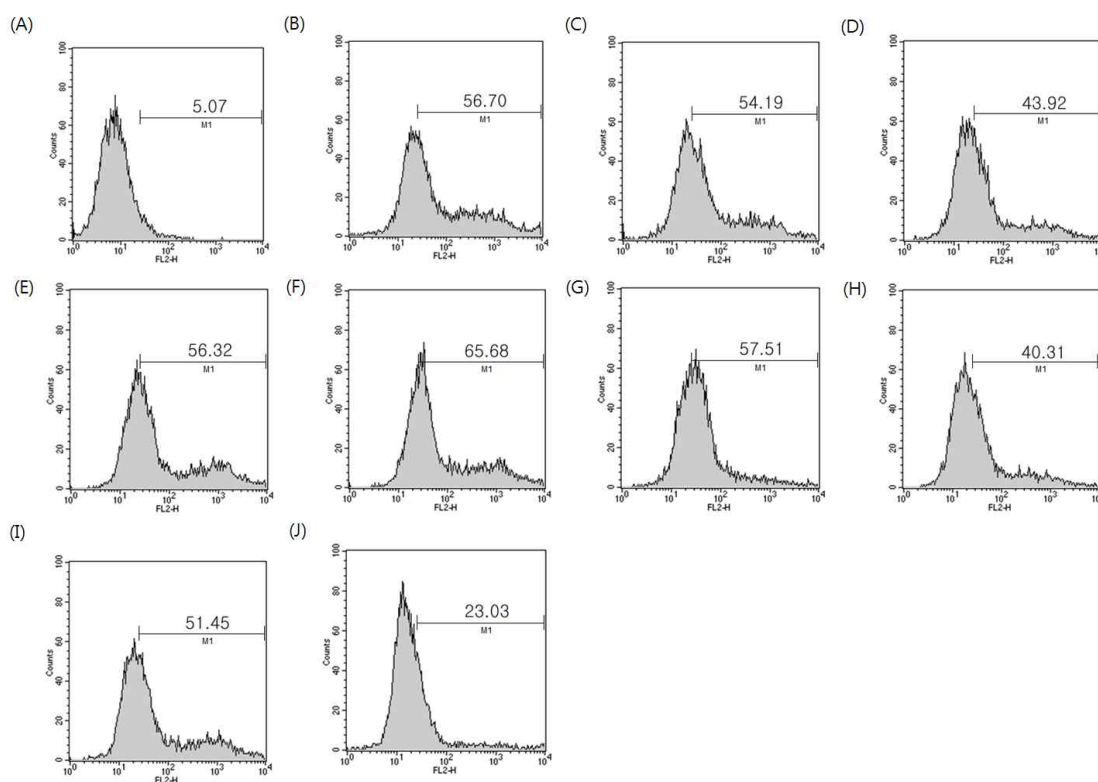
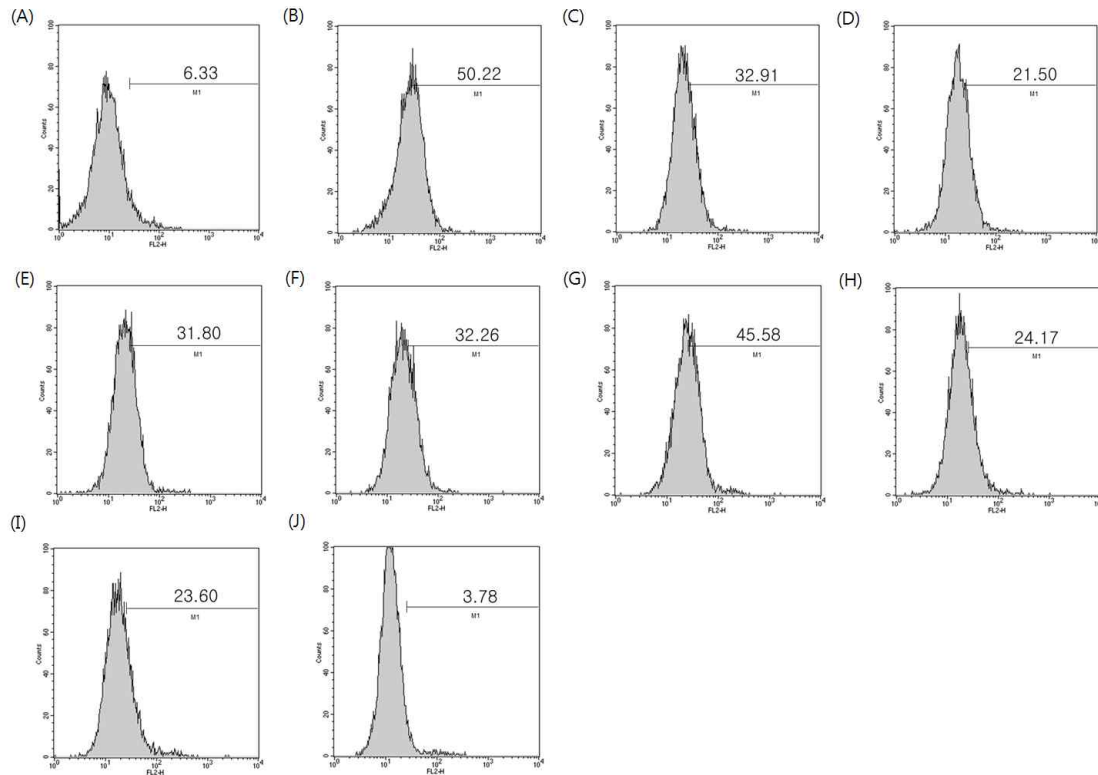


Fig. 1. ROS production induced by LPS in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (100 ng/mL) for 24 hr with and without pretreatment of methanol extracts from citrus peels for 1 hr. (A) Negative control, (B) t-BHP only, (C) Onjumilgam, (D) Jinkyool, (E) Navel orange, (F) Yungkyool, (G) Cheungkyoun, (H) Hallabong, (I) Cheonhyehyang, (J) Quercetin (positive control).



**Fig. 2.** ROS production induced by t-BHP in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with t-BHP (200 μM) for 30 min with and without pretreatment of methanol extracts from citrus peels for 1 hr. (A) Negative control, (B) t-BHP only, (C) Onjumilgam, (D) Jinkyool, (E) Navel orange, (F) Yungkyool, (G) Cheungkyoun, (H) Hallabong, (I) Cheonhyehyang, (J) Quercetin (positive control).

페놀성 화합물 함량과 항산화 활성 사이의 상관관계 분석  
 유해산소 흡수능력(ORAC) 분석을 통한 감귤 과피 추출  
 물의 항산화 능력과 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 저해  
 능, t-BHP와 LPS에 의한 활성산소 생성 저해능이 총페놀  
 및 총플라보노이드 함량과의 상관관계를 분석하기 위해  
 SPSS12를 이용하여 피어슨 상관계수(Pearson correlation  
 coefficient)를 산출하였다(Table 4). 페놀성 화합물 함량과  
 항산화 활성과의 상관관계를 보면 총페놀과 ORAC 간의 상  
 관계수는 0.884이고 총플라보노이드와 ORAC 간의 상관계  
 수는 0.855로, ORAC에 의한 항산화 활성은 총페놀 및 총플  
 라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다.  
 페놀성 화합물 함량과 NO 생성 저해능과의 상관관계를 보  
 면 총페놀 및 총플라보노이드 함량과 NO 생성 저해능 간의  
 상관계수는 각각 0.921과 0.683으로 NO 생성 저해능도 총페

놀 및 총플라보노이드 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로  
 나타났다.

한편 LPS에 의한 활성산소 생성 저해능은 총페놀 및 총플  
 라보노이드와의 상관계수가 각각 0.008과 -0.032를 나타내  
 어 총페놀 및 총플라보노이드 함량은 LPS에 의한 활성산소  
 생성 저해능과는 무관한 것으로 나타났다. 그러나 t-BHP에  
 의한 활성산소 생성 저해능은 총페놀 및 총플라보노이드와  
 의 상관계수가 각각 0.432와 0.475로 낮은 편이지만, LPS에  
 의한 활성산소 생성 저해능과의 상관관계보다는 높은 편이  
 었다.

**요 약**

감귤 7종을 대상으로 과피를 80% 메탄올로 추출하여 총

**Table 4.** Correlation between total phenolics and total flavonoids content, and antioxidant activity of methanol extracts from citrus peels

	Total phenolics	Total flavonoids	ORAC	NO production	ROS production by t-BHP	ROS production by LPS
Total phenolics	1					
Total flavonoids	0.772*	1				
ORAC	0.884*	0.855*	1			
NO production	0.921*	0.683*	0.817*	1		
ROS production by t-BHP	0.432*	0.475	0.660*	0.462	1	
ROS production by LPS	0.008	-0.032	0.156	-0.115	0.612*	1

\*p<0.01.

페놀과 총플라보노이드 함량을 측정하였고, 유해산소 흡수 능력(ORAC) 분석을 통한 free radical 소거능, RAW 264.7 murine macrophage를 이용한 NO 생성 저해능, LPS와 t-BHP 자극에 의한 활성산소 생성 저해 활성을 분석하였다. 총페놀 함량은 영귤, 천혜향, 진귤이 각각 30.6, 30.2, 28.2 mg GAE/g으로 높은 값을 나타내었고, 총플라보노이드 함량은 영귤과 진귤이 각각 30.3와 25.5 mg RE/g으로 높은 값을 나타내었다. ORAC 분석을 통한 free radical 소거능은 영귤이 1076 mM TE/g으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 그 다음이 천혜향(1012), 진귤(984), 한라봉(914) 순이었다. 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 의한 NO 생성 저해능(IC<sub>50</sub>)은 천혜향이 215.3 µg/mL로 가장 높았으며, 그 다음으로 영귤(259.2), 진귤(328.9) 순이었다. LPS 자극에 의한 활성산소 생성은 한라봉이 16.4%, 진귤이 12.8% 저해하였고, t-BHP 자극에 의한 활성산소 생성은 진귤, 한라봉, 천혜향이 각각 28.7, 26.1, 26.6% 저해하였다. 총페놀과 ORAC 간의 상관관계수는 0.884이고 총플라보노이드와 ORAC 간의 상관관계수는 0.855로, ORAC에 의한 항산화 활성은 총페놀 및 총플라보노이드의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 총페놀 및 총플라보노이드 함량과 NO 생성 저해능 간의 상관관계수는 각각 0.921과 0.683으로 NO 생성 저해능도 총페놀 및 총플라보노이드 함량과 밀접한 관계가 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 고부가식품산업 전문인력양성 교육사업비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.
- Pattanaik U, Prasad K. 1996. Endotoxemia and oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 793: 506-510.
- Forman HJ, Dorio RJ, Skelton DC. 1987. Hydroperoxide-induced damage to alveolar macrophage function and membrane integrity: alterations in intracellular-free Ca<sup>2+</sup> and membrane potential. *Arch Biochem Biophys* 259: 457-465.
- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. 2005. Redox regulation of NF-κB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 7: 395-403.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Gaunt IF, Feuer G, Fairweather FA, Gilbert D. 1965. Liver response tests. IV. Application to short-term feeding studies with butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Food Cosmet Toxicol* 3: 433-443.
- Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* 30: 772-778.
- Erlund I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin, dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 24: 851-874.
- Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 462-469.
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr* 42: 278-290.
- Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. 2007. A study on the anti-oxidative and antimicrobial activities of the *Citrus unshiu* peel extracts. *Korean J Food Culture* 22: 454-461.
- Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol* 18: 445-450.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50: 4437-4444.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
- Amano F, Noda T. 1995. Improved detection of nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. *FEBS Lett* 368: 425-428.
- Kimura K, Ito S, Nagino M, Isobe K. 2008. Inhibition of reactive oxygen species down-regulates protein synthesis in RAW 264.7. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 272-275.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
- Park GH, Lee SH, Kim HY, Jeong HS, Kim EY, Yun YW, Nam SY, Lee BJ. 2011. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J Fd Hyg Safety* 26: 355-360.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 22: 277-281.
- Benavente-Garcia O, Castillo J. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 56: 6185-6205.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* 51: 3273-

- 3279.
24. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
  25. Kim GN, Shin JG, Jang HD. 2009. Antioxidant and anti-diabetic activity of *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chem* 117: 35-41.
  26. Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier A, Dangles O, Chemat F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem* 119: 851-858.
  27. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
  28. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
  29. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244-4250.
  30. Uchikura K, Wada T, Hoshino S, Nagakawa Y, Aiko T, Bulkley GB, Klein AS, Sun Z. 2004. Lipopolysaccharides induced increases in fas ligand expression by kupffer cells via mechanisms dependent on reactive oxygen species. *American J Physiol: Gastrointest Liver Physiol* 287: 620-626.
  31. Kennedy CH, Church DF, Winston GW, Pryor WA. 1992. Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radical Biol Med* 12: 381-387.
  32. Mario M, Sonia R, Raquel M, Laura B, Lusi G. 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol* 19: 119-128.
  33. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130: 1910-1917.
  34. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. 1994. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55: 253-258.
  35. Ciz M, Pavelkova M, Gallova L, Kralova J, Kubala L, Lojek A. 2008. The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by murine macrophages RAW 264.7. *Physiol Res* 57: 393-402.

(2012년 9월 17일 접수; 2012년 11월 14일 채택)