

국내산 유자씨박 (*Citrus junos* seed shell) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 평가

김아영* · 정효진 · 박수남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소
(2017년 5월 8일 접수: 2017년 6월 3일 수정: 2017년 6월 8일 채택)

Antioxidant activities of *Citrus junos* seed shell extract and fractions cultivated in Korea

A Young Kim* · Hyo Jin Jeong · Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and
Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
(Received May 8, 2017; Revised June 3, 2017; Accepted June 8, 2017)

요약 : 본 연구에서는 건조된 유자씨박 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 제조하고, 이들의 항산화능을 평가하였다. 유자씨박 추출물 및 분획물의 수율은 각각 5.1 및 0.9%로 나타났다. 1,1-Phenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 시험법에서 자유 라디칼 소거 활성(FSC₅₀)은 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 각각 512.1 및 514.0 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈다. 라디칼 소거활성은 (+)- α -tocopherol(9.0 $\mu\text{g/mL}$)보다는 비교적 낮았다. Fe³⁺-EDTA계를 이용한 총 항산화능 평가에서 유자씨박 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 OSC₅₀은 242.9 및 86.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 유자씨박 에틸아세테이트 분획은 70% 에탄올 추출물 보다 높은 총 항산화능을 보였지만, 대조군인 L-ascorbic acid (1.7 $\mu\text{g/mL}$)보다 낮게 나타났다. ¹O₂로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과(τ_{50})에서, 70% 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적인 세포 보호 효과를 보였다. 유자씨박 에틸아세테이트 분획은 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 39.8 min으로 (+)- α -tocopherol (36.1 min)과 유사한 세포 보호 활성을 나타냈다. 그러나 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 농도가 증가함에 따라 낮은 세포 보호 효과를 나타냈다. 결과적으로, 유자씨박 에틸아세테이트 분획물이 라디칼 소거활성이 아닌 총 항산화 활성을 통해 낮은 농도에서는 세포 보호 효과를 나타냈으나 높은 농도에서는 세포 보호 효과가 농도 의존적으로 나타나지 않았다.

주제어 : 유자씨박, 활성산소, 항산화 활성, 세포보호 효과

Abstract : In the present study, 70% ethanol extract, the ethyl acetate fraction were prepared from citron (*Citrus junos*)seed and their antioxidative ability was evaluated. The yields of extract and fractions were 5.1 and 0.9% per dried powder, respectively. In the 1,1-Phenyl-2-picrylhydrazyl

†Corresponding author
(E-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

(DPPH) radical test, free radical scavenging activities (FSC₅₀) of 70 % ethanol extract, ethyl acetate fraction were 512.1 and 514.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Evaluation of total antioxidant capacities (OSC₅₀) using Fe³⁺ + -EDTA system. Their OSC₅₀ of ethyl acetate fraction were 86.5 $\mu\text{g/mL}$. this antioxidant capacities higher than that of 70% ethanol extract. but lower than that of L-ascorbic acid (1.72 $\mu\text{g/mL}$), known as a prominent water soluble antioxidant. The cellular protective effects on the ¹O₂-induced cellular damage of rabbit erythrocytes were evaluated and the results showed that the extract was lower than (+)- α -tocopherol and low concentration of ethyl acetate fraction was similar to (+)- α -tocopherol. but not at high concentrations of ethyl acetate fraction. it was able to induce cellular damage at high concentration.

Keywords : Citrus junos seed, reactive oxygen species, antioxidative activity, cellular protective effect

1. 서론

피부는 표피, 진피, 피하조직의 3개의 층으로 나뉘어져 신체의 전신을 둘러싸고 있다. 털, 피부샘, 손톱과 같은 부속기관들이 피부 조직에 존재한다. 이러한 피부는 자외선이나 미생물과 같이 해로운 외부 환경에 직접 노출되기 때문에 이로부터 피부를 보호하기 위한 방어 역할을 담당하기도 한다. 또한 피부는 외부 환경의 변화를 감지하는 지각작용, 호르몬과 같은 스테로이드나 비타민 등의 물질들이 생체내로 흡수하는 다양한 생리기능도 가지고 있다. 피부는 내인적 및 외인적 인자들에 의해 피부 노화가 일어난다. 특히 자외선에 의한 광노화는 피부노화의 가장 큰 원인 중 하나이다. 피부가 지속적으로 자외선에 노출되면 피부내에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과잉으로 발생하고 이들 ROS는 피부에 산화적 스트레스를 야기시켜서 효소적 또는 비효소적 항산화제를 감소시킨다. 이어서 생체내 지질, DNA, 단백질 등의 생체 분자들을 손상 및 파괴시킬 뿐만 아니라 세포외 기질 단백질들을 분해시키는 matrix metalloproteinases (MMPs)를 발현시킴으로써 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합이 일으켜 피부노화를 가속화시킨다[1-3].

산화적 스트레스를 야기하는 활성산소종으로는 singlet oxygen(¹O₂), superoxide anion radical (O₂^{•-}), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 있고 그 외에 자동산화반응을 통해 이차적으로 생성된 peroxy radical (LOO·), alkoxyl radical(LO·), hypochlorous acid(HOCl), nitric oxide(NO·) 등이 있다. 대부

분의 ROS는 체내에 존재하는 효소적 항산화제에 의해 소거되거나 반응성이 큰 ¹O₂의 경우 생체내 효소계에 의해 제거되지 않으며 또한 ROS 사이의 상호 전환반응을 통해 O₂^{•-}, H₂O₂ 및 ·OH 등을 생성하여 비극성의 세포막의 지질 과산화반응을 개시함으로써 세포를 손상시킴으로써 광노화의 주된 원인이 되기도 한다[4-6]. ROS의 산화력을 억제하는 항산화제는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 나눌 수 있다. 효소적 항산화제로 superoxidedismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase가 있고 비효소적 항산화제로는 α -tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, ubiquinol, flavonoid 등이 있다. 이들은 지질과산화 반응에 대하여 화학적 소거 및 물리적 소광을 통해 singlet oxygen을 감소시키며 개시작용을 하는·OH를 소거함으로써 자동산화반응으로 이어지는 개시반응을 억제한다. 또한 일부의 플라보노이드와 같은 항산화제들은 Fenton 반응을 촉매하는 Fe²⁺, Cu⁺의 전이금속과 결합함으로써 라디칼을 생성시키는 반응 억제시키기도 한다. 특히 과잉의 ROS가 체내에 존재하면 효소적 항산화제도 손상을 입을 수 있으며 비효소적 항산화제의 고갈도 쉽게 나타날 수 있다. 따라서 외부에서 비효소적 항산화제의 적절한 보충은 자외선으로부터 피부 세포 보호 및 광노화 억제에 꼭 필요한 것으로 간주되고 있다. 비효소적 항산화제는 주로 광합성을 하는 식물에 의해 합성되며 항산화 작용이 있는 천연 식물 추출물들은 식품 및 화장품 등 다양한 분야에서 항산화제로 종종 사용되고 있다.[7-14]

유자(*Citrus junos*)는 운향과 귤속에 속하는 반교목성으로 중국의 사천성, 호북성, 운남성 및 티

베트 등지에 야생하며 우리나라에는 신라시대에 중국으로부터 전래되어 현재 남해안에 걸쳐 재배되어 오고 있다. 유자는 주로 설탕으로 당 절임한 청의 형태로 제조되어 차, 드레싱 소스, 식초 등으로 사용된다. 유자의 알려진 성분으로는 caffeic acid, tannic acid 등의 페놀성 화합물과 rutin, hesperidin, naringenin과 같은 플라보노이드류, limonoid류 및 vitamin C가 함유되어 있는 것으로 알려졌다.[15-18] 특히 함유량이 비교적 많은 limonoid의 경우 위암, 유방암, 간암 등에 있어서 항암효과가 있다고 보고되고 있다 [19-20]. 유자의 총 중량 중 15%에 이르는 씨는 대부분 폐기 처분되는 실정이다. 이들 유자씨나 유자씨박을 활용하여 식품 및 화장품에서 응용 연구나 생리활성 연구는 국내외적으로 보고된바가 거의 없다[21].

따라서 본 연구에서는 유자씨박 추출물 및 분획물에 대하여 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종에 대한 총항산화능, 1O_2 으로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호효과를 측정함으로써 *in vitro*에서 유자씨박 추출물의 항산화능을 조사하고 항노화 화장품 소재로서 응용 가능성이 있는지를 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였고, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), luminol, heparin, 광증감제로 사용된 rose bengal, free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, H_2SO_4 그리고 에탄올(EtOH), 메

탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 유자씨박은 대봉엘에스(주)로부터 제공받아 사용하였다.

2.2. 유자씨박의 추출/분획 및 수율

유자씨박 200 g 을 70% 에탄올 2 L에 침적시키고 24 h 동안 교반하여 추출 하였다. 70% 에탄올 추출물 1 L를 40 °C에서 감압 증류하여 추출물 파우더(수율 5.1%)를 얻었다. 남은 70% 에탄올 추출물은 감압 증류하여 수증만 남긴 후, 이를 에틸아세테이트와 1: 1 비율로 3번 추출하였다. 망초산(Na_2SO_4)를 이용하여 물을 제거하고 감압 증류하여 에틸아세테이트 분획 파우더(수율 0.9 %)를 얻었다.

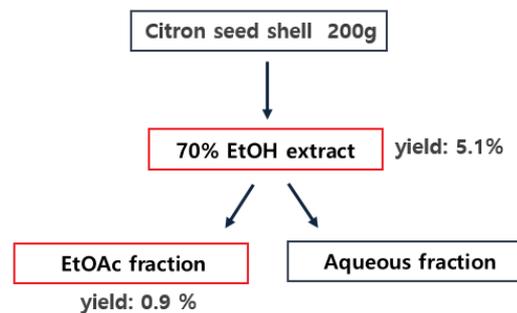


Fig. 1. Manufacturing process of 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction from *Citrus junos* seed shell and their yield.

2.3. 유자씨박 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 유자씨박 추출물의 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH 시험법을 이용하여 측정하였다. 0.2 mM의 DPPH 시약, 에탄올 그리고 특정 농도의 추출물 또는 분획물을 1 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 10 min 동안 방치 후, UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 유자씨박 추출물 및 분획물

의 자유라디칼 소거 활성 정도는 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 blank, 시료를 넣지 않은 것을 대조군(control)으로 하여 계산하였다.

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = \left\{ 1 - \frac{(A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}})}{A_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

$A_{\text{experiment}}$ 는 실험군의 흡광도(absorbance), A_{blank} 는 blank의 흡광도, A_{control} 는 control의 흡광도를 의미한다. 농도에 따라 각각 세 번씩 측정하였으며, 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging concentration, FSC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)를 구하여 비교하였다.

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2 와 같은 활성산소종을 생성시키며 철이나 구리 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 $\cdot\text{OH}$ 를 생성시키는데 중요한 역할을 한다. 이 실험에서는 활성산소에 의해 루미놀이 발광하는 현상을 이용하여 활성산소 저해 활성을 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 특정 농도의 유자씨박 추출물 또는 분획물을 50 μL 첨가한 후, 2.5 mM EDTA 40 μL , 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL , 35 mM 루미놀 80 μL 를 넣고 혼합시킨 뒤 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소종 생성을 위해 150 mM H_2O_2 40 μL 를 첨가하였으며, 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 추출물 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)은 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 H_2O_2 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식을 통해 저해율을 계산하였으며, 활성산소 소거 활성의 크기는 저해율이 50%가 되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

$$\text{ROS scavenging (\%)} = \left\{ \frac{(CPM_{\text{control}} - CPM_{\text{experiment}})}{(CPM_{\text{control}} - CPM_{\text{blank}})} \right\} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

실험에 사용된 적혈구는 건강한 성인으로부터 채혈 한 후 heparin이 첨가된 시험관에 넣어 4 °C의 냉장고에 보관 하고 12 h 이내에 실험에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 혈장을 제거한 뒤 남은 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.6 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이 되도록 제조하였으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL로 이었다.

2.4.2. 유자씨박 추출물 및 분획의 세포 보호 효과 측정

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물과 분획물 용액을 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (14 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광 조사하였다. 광조사는 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 내부를 검게 칠한 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 일렬로 배열한 후 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 유자씨박 추출물 및 분획물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50} 이 30.1 min 으로 오차 범위 \pm 0.1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호

하게 나타났다. 광 증감제로 사용된 rose bengal 을 첨가하고 광조사를 하지 않은 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우, 모두 암반응 120 min 까지 거의 용혈이 일어나지 않았다. 모든 실험은 상온에서 진행하였으며 3회 반복하여 평균하였다.

$$\text{Protective effect} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 유자씨박 추출물의 항산화 활성

3.1.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

홀수 전자를 가지고 있는 라디칼은 에너지가 높고 불안정하다. 이는 반응성이 높아 생체 내에서 연쇄적인 산화반응을 일으켜 세포 및 조직들에 손상을 일으킨다. 라디칼 연쇄반응에 의한 지질과산화는 피부노화를 가속화 시키는 주요 원인으로 밝혀진다. 라디칼은 다른 물질로부터 전자를 받아 환원됨으로써 연쇄적 산화반응이 종결될 수 있다. 따라서 라디칼을 환원시킬 수 있는 환원력은 연쇄반응에 의한 손상을 차단시켜 피부 세포를 보호할 수 있는 주요한 활성이다. 이러한 항산화제의 환원력은 라디칼 소거 활성을 통해 확인할 수 있다. 유자씨박 추출물 및 분획물의 라디칼 소거 활성을 DPPH 라디칼을 이용하여 측정하였다. Table 1은 유자씨박의 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 그리고 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol의 라디칼 소거 활성을 측정을 측정한 결과이다. 라디칼 소거 활성은 50%의 라디칼을 소거하는 시료의 농도 (FSC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)로 나타내었다. 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획의 라디칼 소거활성은 각각 512.1, 514.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 비교 대조군으로 쓰인 (+)- α -tocopherol 보다 라디칼 소거활성이 낮았으며 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 라디칼 소거활성이 유사하게 나타났다. (Table 1).

Table 1. Free Radical Scavenging Abilities of *Citrus junos* Seed Shell Extract and Fraction

Extract and Fraction	FSC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
70% EtOH	512.1 \pm 48.7
EtOAc	514.0 \pm 22.0
(+)- α -Tocopherol	9.0 \pm 0.4

Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free Radical. (70% EtOH : 70% ethanol extract, EtOAc : ethyl acetate fraction.)

3.1.2. 루미놀 발광법을 이용한

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

생체 내에는 주요한 생리작용에 관여하는 철 (Fe)과 구리(Cu)와 같은 전이금속 이온들이 존재한다. 자외선에 의해 생성된 활성산소 중 하나인 과산화수소(H₂O₂)는 생체 내 이온 상태의 이들 전이금속의 촉매작용에 의한 Fenton 반응을 경유하여 하이드록실 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥사이드 라디칼(O₂ \cdot^-)과 같은 여러 가지 ROS를 생성시킬 수 있다. 루미놀은 활성산소에 의해 산화되어 높은 에너지의 들뜬 상태가 되었다가 바닥상태로 떨어지게 되면서 발광(420 - 450 nm)하는 특성을 가지는 물질이다. 본 연구에서는 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계를 이용하여 활성산소를 발생시키고 이것으로 인한 루미놀의 화학적 발광 정도를 통해 시료의 활성산소 소거 능력을 확인하였다. 이는 다양한 ROS가 관여하는 반응으로 그 결과를 총 항산화능으로 명명하였으며 유자씨박으로 부터 얻은 추출물 및 분획물의 ROS 소거 활성은 50%의 활성산소를 소거하는 농도(OSC₅₀)로서 Table 2에 나타내었다. 유자씨박의 에틸아세테이트 추출물은 총 항산화능(OSC₅₀)이 86.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 70% 에탄올 추출물 (242.9 $\mu\text{g/mL}$)보다 약 2.8배 큰 활성을 나타내었다. 라디칼 소거활성과는 차이가 있는 것으로 나타났다. 이는 에틸아세테이트 분획에 항산화 활성이 큰 물질이 더 함유되어 있는 것으로 판단된다.

Table 2. ROS Scavenging Ability of *Citrus junos* Seed Extract and Fractions (total antioxidant capacity)

Extract and Fraction	OSC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
70% EtOH	242.9 \pm 11.7
EtOAc	86.5 \pm 1.8
L-Ascorbic acid	1.7 \pm 0.1

Data is indicated as the concentration required for 70% scavenging of ROS. (70% EtOH: 70% ethanol extract, EtOAc: ethyl acetate fraction.)

3.2. ¹O₂으로 유도된 세포 파괴에 대한 세포보호 효과

세포보호 효과의 결과는 시료를 각각 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 적혈구가 50% 용혈 되는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 나타내었다 (Table 3). 대조군으로는 약 30.3 min에서 50%의 적혈구가 파괴되는 것으로 측정되었으며 70% 에탄올 추출물은 모든 농도에서 비교물질인 (+)- α -tocopherol 보다 약간 낮은 세포보호 효과를 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물은 저 농도군인 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 (+)- α -tocopherol 보다 약간 높은 세포보호 효과를 나타내었으며 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 유사한 세포보호 효과를 가졌다. 70% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획에서 더 높은 세포보호 효과를 보이는 이유는 유자씨박 추출물 및 분획의 TLC 분석을 통해 확인하였다. 이는 에틸아세테이트 분획에서 (+)- α -tocopherol과 naringin의 증가에 의

한 것으로 사료 된다(data not shown). 그러나 에틸아세테이트 고 농도군인 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포보호 효과가 감소하였다. 이를 직접 확인하기 위해 적혈구에 로즈벵갈 및 광조사를 처리하지 않고 유자씨박 분획만을 처리하여 적혈구의 용혈 정도를 확인하였다(Fig. 2.). 에틸아세테이트 분획 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 뒤 75분경과 후에는 각각 65%, 86% 용혈된 것을 확인하였다.

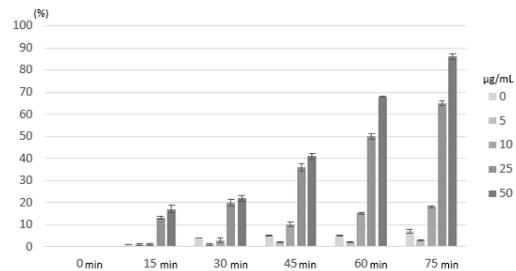


Fig. 2. Effects of EtOAc fraction from *Citrus junos* seed shell on rose-bengal sensitized photohemolysis of erythrocytes.

4. 결론

- 1) 유자씨박 추출물 및 분획 의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과, 70% 에탄올 추출물 (512.1 $\mu\text{g/mL}$), 에틸아세테이트 분획 (514.0 $\mu\text{g/mL}$)로 나타내어졌다. 유자씨박 추출물 및 분획은 비교물질인 (+)- α -tocopherol (9.0 $\mu\text{g/mL}$) 보다 낮은 자유

Table 3. Relative Cellular Protective Effects of *Citrus junos* Seed Shell Extract/Fraction and (+)- α -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Erythrocytes

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	τ_{50} (Half time of hemolysis ¹⁾)			
	5	10	25	50
70% EtOH	27.0 (\pm 0.7)	27.5 (\pm 1.0)	31.7 (\pm 2.7)	38.0 (\pm 3.2)
EtOAc	39.8 (\pm 0.1)	35.2 (\pm 0.4)	23.9 (\pm 0.4)	9.1 (\pm 0.3)
(+)- α -Tocopherol	36.1 (\pm 0.4)	37.7 (\pm 0.3)	40.2 (\pm 0.5)	43.6 (\pm 0.9)

¹⁾Control, $\tau_{50} = 30.3 \pm 0.3$ min

라디칼 소거 활성을 보였다. 유자씨박은 자유라디칼 소거활성 효과가 없음을 확인하였다.

- 2) 유자씨박 추출물 및 분획의 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC₅₀)은 70% 에탄올 추출물 (242.9 $\mu\text{g/mL}$) 및 에틸아세테이트 분획(86.5 $\mu\text{g/mL}$)로 나타내어졌으며 에틸아세테이트 분획이 약 2.8배 높은 소거활성을 나타냈다. 이는 에틸아세테이트 분획 과정에서 플라보노이드가 많이 나온 것으로 추측된다.
- 3) 유자씨박 추출물 및 분획의 ¹O₂으로 유도된 적혈구 세포의 파괴에 대한 세포보호효과 (τ_{50})는 70% 에탄올추출물에서 농도의존적인 결과가 나타내어졌으며 비교물질인 (+)- α -tocopherol 과 비교하여 낮은 활성이 나타났다. 에틸아세테이트 분획은 저 농도군인 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 (+)- α -tocopherol 보다 약간 높은 세포보호 활성이 나타났다. 하지만 농도가 진해질수록 낮은 세포보호 효과가 나타났으며 적혈구에 에틸아세테이트 분획만을 농도별로 처리해 보았을 때 시간이 지날수록 적혈구가 용혈 되는 현상을 관찰하였다.

본 연구를 통해 유자씨박 추출물 및 분획은 비교물질에 비해 대체로 낮은 항산화 활성이 있음을 확인하였으며 유자씨박 추출물 및 분획은 자유라디칼 소거활성능 보다 총 항산화능이 높다는 것을 확인하였다. 활성산소로 유도된 적혈구 세포 손상에 대한 보호 효과 확인 결과 에틸아세테이트 분획의 저 농도군인 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 (+)- α -tocopherol 보다 높은 보호 효과가 나타났다. 이는 유자씨박의 총 항산화 활성에 의한 것이라 추측된다. 또한 에틸아세테이트 분획 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상 처리하였을 때 큰 용혈 촉진 작용을 나타냈다. 이는 유자씨박 추출물 및 분획에 존재하는 성분 중에는 계면활성제 역할을 하는 성분이 들어 있어 세포막 지질을 교란시킴으로써 높은 농도에서 용혈을 촉진시키는 작용이 있지 않나 추론된다. 보다 구체적인 메커니즘 연구가 필요해 보인다.

감사의 글

이 연구는 2017년 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. D. Harman, "Free radical theory of aging", *Mutation Research*, 275, 257 (1992).
2. T. Finkel and N. J. Holbrook, "oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", *Nature*, 408, 239 (2000).
3. H. Sies, "Oxidative stress : oxidants and antioxidants", *Experimental Physiology*, 82, 291 (1997).
4. C. Schweitzer and R. schmidt, "Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen", *Chem. Rev.*, 103, 1685 (2003).
5. H. Barry, "Reactive oxygen species in living systems". *Am J Med*, 91, S14 (1991).
6. Girotti, Albert W. "Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems". *J. lipid research*, 39, 1529 (1998).
7. J. Pincemail, J. Defraigne, "Potentiel thérapeutique du coenzyme Q10, Vaisseaux", *J Cardiologie* 20(1), 57, (2008)
8. G. W. Burton, "Antioxidant action of carotenoids", *Amer. Inst. Nutr.* 119(1), 109 (1989).
9. K. Haila, "Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation *in vitro*", *Helsingin yliopiston verkkojulkaisu*, 1-64.(1999).
10. C. D. Putnam, A. S. Arvai, Yves Bourne, and John A. Tainer, "Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism", *J. Mol. Biol.*, 296, 295 (2000).

11. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933 (1996).
12. R. Yamauchi, "Vitamin E: mechanism of its antioxidant activity", *Food Sci. Technol. Int.*, 3(4), 301 (1997).
13. A. T. Diplock, "Antioxidants and free radical scavengers", *New Comprehensive Biochemistry*, 28, 113 (1994).
14. S. N. Park, "Skin aging and antioxidant", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 23(1), 75 (1997).
15. Y. H. Lee and J. H. Na, "Citron tea exports state and quality standardization", *Food Sci. Ind.* 45(3), 44 (2012).
16. S. Y. Kim and K. S. Shin, "Evaluation of physiological activities of the citron", *Prev. Nutr. Food Sci.* 18(3), 196 (2013).
17. O. C. Kwon, J. H. Shin, M. J. Kang, S. J. Lee, S. Y. Choi, and N. J. Sung, "Antioxidant activity of ethanol extracts from citron(*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) See", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35(3), 294 (2006).
18. K. L. Woo, J. I. Kim, M. C. Kim, and D. K. Chang, "Determination of flavonoid and limonoid compound in citron (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka) seeds by HPLC and HPLC/MS", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35(3), 353 (2006).
19. Q. Tian, E. G. Miller, H. Ahmad, L. Tang, and B. S. Patil, "Differential inhibition of human cancer cell proliferation by Citrus limonoids", *Nutrition and Cancer*, 40(2), 180 (2001).
20. K. N. C. Murthy, G. K. Jataprakasha, V. Kumar, K. S. Rathore, and B. S. Patil, "Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis", *J. Agric. Food chem.* 59, 2314 (2011).
21. I. W. Choi, "Development of processed Yuja(*Citrus junos*) seed products", *Korea Food Research Institute*, 1-103. (2007).