

최 종
연구보고서

재래감귤 당유자의

기능성 소재 활용기술 개발

Development of technology to industrialize the
nutraceutical compounds from a local citrus
species, dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck)

제 주 대 학 교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “재래감귤 당유자의 기능성 소재 활용기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 제주대학교
총괄연구책임자 : 김 소 미
세부연구책임자 : 유 은 숙
연 구 원 : 이 혜 자
연 구 원 : 강 경 진
연 구 원 : 김 윤 정
연 구 원 : 문 정 용
연 구 원 : 김 하 나
위탁연구기관명 : 이화여자대학교
위탁연구책임자 : 김 영 석
연 구 원 : 김 세 영
연 구 원 : 박 민 경
참여연구기관명 : (주) 바이오벨류
참여기업연구원 : 문 선 태

요 약 문

I. 제 목

재래감귤 당유자의 기능성 소재 활용기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종 목표는 제주도 재래감귤 중 당유자의 생리활성과 그 성분을 규명하고, 기능성식품 소재 개발에 대한 가능성을 제시함으로써, 당유자 소비 확대를 유발하고 감귤의 고소득대체작목으로 개발하는 데에 있음.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적인 측면

○ 재래감귤류는 한방학적 효과가 탁월하여 한방의 생약으로 이용되고 있으나, 재래 감귤의 성분 분석 및 평가를 통한 기능성 연구가 아직 체계화되어 있지 않음.

○ 재래감귤 중 당유자는 제주도 고유의 약용과일로 타지역산 유자에 비하여 유리당 함량이 2배가 되고, 비타민C 함량이 귤이나 레몬보다 4배 이상 들어 있다는 점 외에도, 구전되어 오는 자료와 제주도내 문헌 (제주감귤과주요품종, 제주감귤농업협동조합)에 의하면 당유자의 산업적 가치에 대해 재조명이 필요함.

2) 경제·산업적인 측면

○ 제주도내 전체가구의 19%, 제주도내 농가의 93%가 감귤농업에 종사하고 있어, 감귤산업은 도내 고용효과가 매우 큰 제주도의 기간산업이라고 할 수 있음.

○ 최근 감귤경쟁력의 하락은 직접적인 제주경제 침체 원인으로 작용하고 있으며 감귤원 폐원 등의 고육지책을 모색하고 있으나, 근본적인 해결책을 모색해야 하는 상황.

○ 시장의 개방화에 따라 경합 과일의 증가, 과일 소비성향, 품질 및 가격 경

쟁력 약화 등에 따라 10년 후에도 지속 가능한 감귤산업을 기대하기 어려움. 따라서 감귤의 기능성 규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품 소재, 산업소재로의 활용가치 증대가 요구됨.

3) 사회·문화적인 측면

- 최근 우리나라는 고령화 사회로 바뀌고 있으며 이에 따라 건강한 삶과 질적인 향상을 추구하는 사회적 요구가 증대하고 있음.
- 근래 과일 소비성향이 기능성에 대한 인식이 높아지면서 재래감귤에 대한 수요가 증가하는 추세이나, 재래감귤 당유자는 제주도에서는 한약재로 오래 전부터 사용되어온 약용과일임에도 불구하고 이에 대한 체계적인 연구 미비와 홍보부족으로 황금작물로 지목을 받지 못함.
- 따라서 소비자 기호에 맞는 기능성 감귤 가공식품 개발을 위해 재래감귤 기능성 성분에 대한 체계적인 특성과 생리활성에 대한 기작 규명이 필요함.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 제주 재래감귤인 당유자의 기능성 규명을 위해 시기별, 부위별로 각각 과일과 잎에 대해 계통별 용매추출을 수행하고 다양한 용매 분획물을 확보한 후 각 분획물의 생리활성을 탐색한다.

1. 당유자의 기능성 규명을 위한 생리활성 검사

- 기존문헌 특허분석을 통한 토종감귤 당유자의 기능성 조사한다.
- 시기별, 부위별 다양한 추출물을 확보하고 당유자 조추출물에 대해 항산화, 항염증, 항암효능 등의 다양한 생리활성을 탐색한다.

2. 당유자의 부위별, 시기별 추출물의 생리활성 성분 분석

- 생리활성 보유한 당유자 부위별 추출물의 활성 성분 도출하기 위한 계통적 용매 추출을 실시하고 각 분획물의 생리 활성을 탐색한다.
- 활성 성분 규명을 위한 당유자의 전처리 조건 및 HPLC 분석 조건 확립을 통하여 flavonoid 및 limonoid 성분을 분석한다.
- LC/MS, GC/MS 분석 조건을 최적화하고 생리활성 보유한 용매분획물의 조성을 규명한다.

3. 당유자의 생리활성 성분을 활용한 가공제품 개발

- 당유자 추출물 함유한 건강음료 개발을 위한 생과즙 함유 시제품을 제작하

고 소비자의 기호도를 조사한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 당유자의 전처리 조건 및 HPLC 분석조건 확립

○ 유의수준 0.05에서 ANOVA를 실시한 결과, 미숙과와 과즙의 hesperidin, neohesperidin, naringin 세 성분의 함량은 과피 및 통과에서의 함량과 Duncan 및 Tukey의 방법에서 유의적으로 차이가 나타났다. 3종류의 flavonoids 모두 성숙과 보다 미숙과에서 높게 나타났다. 당유자에는 세 가지의 flavonoid 중 neohesperidin의 함량이 다른 두 물질보다 많이 들어있음을 알 수 있다.

○ 메탄올 추출물의 계통적 추출 분획물에 대한 flavonoid를 분석한 결과, butanol 분획물에서 naringin과 neohesperidin이 각각 221.277mg/L, 400.629mg/L로 높게 나왔으며, hexane 분획물에서는 neohesperidin을 제외한 나머지 성분은 검출되지 않았으며, neohesperidin 역시 가장 낮게 정량되었다. Hesperidin은 butanol 분획물과 methanol 분획물에서 비슷한 양으로 정량되었다.

2) 당유자의 염증억제 효과

○ RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 당유자 미숙과 및 당유자 잎추출물을 처리하여 확인해 본 결과, 헥산 분획물과 chloroform 분획물에서 IL-6, iNOS 그리고 COX-2 발현을 억제함을 확인하였다.

○ 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 IFN- γ 로 자극을 주고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과 EtOAc 분획물에서 TARC 및 MDC 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

3) 당유자의 항산화 효과

○ 당유자 미숙과 추출물에 대한 항산화효능을 DPPH로 측정해 본 결과 부탄올 분획물과 물 분획물이 가장 높은 항산화 효능을 나타냈으며, 부탄올 분획물은 산화 스트레스에 의한 HepG2세포의 세포독성과 활성산소의 발생 양을 감소시켰다.

4) 당유자의 항암 효과

○ 당유자 미숙과 핵산 분획물의 경우 human U937 leukemia cells에서, 당유자 잎의 경우에는 chloroform 분획물이 human U937 leukemia cells과 Hela 세포에 대해서 세포사멸효과를 나타냈다.

2. 활용에 대한 건의

○ 재래감귤의 가치를 밝혀냄으로써 감귤소득을 증가할 수 있는 고소득 작목으로서 당유자의 산업적 가치가 높다고 사료되며 이에 따라 지속가능한 제주도 감귤산업을 기대할 수 있음.

○ 당유자의 기능성규명에 따르면 미성숙과와 잎의 항산화효능이 매우 탁월했으며 이는 기능성 식품 소재뿐 아니라 화장품소재를 비롯한 기타 산업소재로의 활용이 가능함.

○ 감귤 대체작물로서의 당유자는 종자종묘 산업에 활용 가능함.

SUMMARY

The flavonoid contents of *dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) were measured during fruit growth and maturation by HPLC and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The contents of flavonoids in peel decreased gradually throughout the growth and the highest concentration hesperidin, neohesperidin, naringin was observed in immature fruits. Among the sequential solvent fractions obtained from crude extracts, hexane and chloroform fractions showed potential inhibitory activity on the mRNA expression of IL-6, iNOS and COX-2 at the concentration of 100 ug/mL in RAW264.7 cells. EtOAc fraction showed inhibitory activity on the thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in HaCaT cells.

Crude extract of young *dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruit was investigated for its antioxidant activity as measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Among the samples, including 4 Citrus species and various solvent-extracted-fractions of young *dangyuja* fruit, the water-extracted fraction (WF) and butanolextracted fraction (BF) showed the greatest DPPH free radical scavenging activity. WF and BF were further examined for their antioxidant activities by three different in vitro assays. The cell viability tests using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay showed that both fractions significantly reduced H₂O₂-induced cytotoxicity in HepG2 cells dose-dependently. Generation of the reactive oxygen species (ROS) was also reduced in cells pretreated with both fractions. In addition, BF showed a higher level of lipid peroxidation inhibitory capacity than water fraction in H₂O₂-treated HepG2 cells. Taken together, these results indicate that young *dangyuja* fruit can be used as an easily accessible source of natural antioxidants.

The antioxidant activities of the extracts of *Citrus grandis* Osbeck leaves were also evaluated. The highest phenolic content was obtained from the

ethyl acetate fraction (EF) (202.1 ± 0.8 mg GAE/g dried extract) and it exhibited the highest 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. The cytoprotective effects of EF on oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in a human hepatoma cell line, HepG2 cells, were investigated to understand the intracellular antioxidant mechanisms. Treatment of HepG2 cells with EF prior to oxidative stress was found to inhibit reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation, and DNA damage in a dose-dependent manner. GC-MS studies on EF resulted in tentative identification of 19 compounds representing 94.3% of the total content. Taken together, these results demonstrated that EF has excellent antioxidant activities and thus *C. grandis* Osbeck leaves have great potential as a source for natural antioxidant which can be applied in food products.

The study was carried out to examine the anti-proliferative effects of the various solvent fractions of the immature *dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruit on cancer cell lines. The human U937 leukemia (U937) cells were the most susceptible to the hexane fraction of immature *dangyuja* (HFID) and their growth was inhibited in a dose-dependent manner (IC_{50} =ca. 60 μ g/mL). With the HFID, apoptosis-related experiments, (a) Annexin V staining; (b) DNA fragmentation (c) reverse transcription-polymerase chain reaction of BCL-2 and BAX gene; (d) Western blot analysis of Bcl-2, Bax, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and Caspase-3 expressions; (d) Caspase-3 activity assay, were carried out on U937 cells. IDH- induced cell death was characterized by morphological changes of chromatin condensation and apoptotic body formation. The molecular mechanism behind IDH induced apoptosis of U937 cells might be via mitochondria-mediated signaling pathway, as demonstrated by increases in the ratio of BAX/BCL-2 gene and Bax/Bcl-2 protein expression. Furthermore, proteolytic cleavages of caspase-3 and PARP, casapse-3 activity in the IDH - treated cells were significantly increased compared with those in control group.

GC and GC-MS analysis of IDH showed that major constituents of the IDH fraction were rich in steroids and coumarins, particularly -sitosterol (17.5%), 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl) coumarin (6.8%), stigmasterol (3.8%),

campesterol (3.4%). Taken together, the results of our studies present the first evidence of IDH as an apoptosis inducer in U937 cells and these findings may open interesting perspectives to the strategy in human leukemia cancer treatment.

여 백

p. 10-12

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성 ----- 17

1. 기술적 측면
2. 경제·산업적 측면
3. 사회·문화적 측면

제 2절 연구개발의 목표 및 범위 ----- 19

1. 연구 개발 목표
2. 연구 내용 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내의 관련기술의 현황 ----- 22

제 2절 앞으로의 전망 ----- 23

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 당유자의 전처리 조건 및 HPLC 분석조건 확립 ----- 24

제 2절 메탄올 추출물의 계통적 추출 분획물에 대한 flavonoids 및 limonoids
분석 ----- 27

1. Flavonoids 분석
2. Limonoids 분석

제 3절 미지의 성분 분자구조 규명 -----	35
1. LC-MS를 이용한 미지의 Flavonoids 및 Limonoids 성분 분자구조 규명	
2. 당유자의 휘발성 향기 성분 동정 및 정량	
제 4절 당유자 미성숙과 추출물의 기능성 탐색 -----	44
1. 시료 확보	
2. 미성숙 분획물의 염증인자 억제효과	
3. 미성숙 분획물의 항산화 효능	
4. 골다공증 억제 효능	
5. 숙취제거 효능	
6. 당유자 미성숙 핵산 분획물의 암세포의 사멸 효능	
제 5절 성숙과의 부위별 (통과, 과피, 내피) 계통적 추출 분획물 확보 및 생리활성 평가 -----	67
1. 계통적 용매 분획물 확보	
2. 염증억제효능 평가	
제 6절 당유자 잎 추출물의 생리활성 탐색 -----	76
1. 계통적 용매 분획물 확보	
2. 당유자 잎의 염증인자 억제효과	
3. 당유자 잎 CHCl ₃ 분획물의 암세포의 사멸 효과	
4. 당유자 잎 ethyl acetate 분획물의 항산화효능	
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1절 평가의 착안점 및 달성도 -----	108
1. 연구평가의 착안점	
2. 연구개발 목표의 달성도	
제 2절 관련분야의 기여도 -----	111
1. 기대효과	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 연구성과 활용	112
1. 산업재산권	
2. 학술지 게재	
3. 학술대회 발표	
4. 산업체 이전활용 계획	

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 기능성 식품으로서의 감귤	122
1. 주요 성분의 이용 가능성	
제 2절 감귤의 기능성 성분 이용기술	123
1. 과피 함유 기능성 성분의 이용	
2. 기능성 성분 연구 동향	
3. 국내외 감귤 관련 특허	
4. 이용방안	
제 7 장 참고문헌	127

여 백

제 1장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

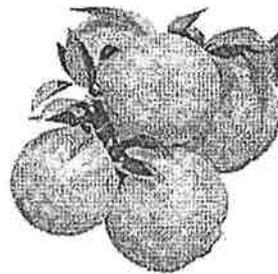
1. 기술적 측면

자연계에 존재하고 있는 천연물, 식품 중에는 생리활성 효과와 치료효과를 나타내는 성분들이 많이 존재하여 이들을 대상으로 인체의 기능을 조절하는 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, 제주자생식물에 대한 생리활성물질 탐색 또한 활발히 이루어지고 있으나 산업화 가능한 지역특화작물의 발굴과 이를 이용한 신소재 개발에 대한 체계적인 연구가 시급함.

감귤은 항암, 항산화, 고혈압 예방 기능 등 기능성 성분을 보유하고 있어 고부가가치산업으로의 발전 가능성이 매우 높으며 특히 재래감귤류는 한방학적 효과가 탁월하여 한방의 생약으로 이용되고 있으나, 재래감귤의 성분 분석 및 평가를 통한 기능성 연구가 아직 체계화되어 있지 않음.

재래감귤 중 당유자는 제주도 고유의 약용과일로 타지역산 유자에 비하여 유리당 함량이 2배가 되고, 비타민C 함량이 귤이나 레몬보다 4배 이상 들어 있다는 점 외에도, 구전되어 오는 자료와 제주도내 문헌(제주감귤과 주요 품종, 제주감귤 농업협동조합)에 의하면 당유자의 산업적 가치에 대해 재조명할 필요가 충분함.

당유자(唐柚子), *Citrus grandis* OSBEK는 일명 "탱유지"로 불리는 제주도에만 자생되는 재래귤로서 초겨울부터 동지섣달 정초 사이에 누렇게 무르익는 종류로 제주산 귤 중에서 크기가 가장 큼. 당유자는 고대로부터 사용되어 왔으며, 옛 문헌 세종실록지리지 등에 의하면 유자(柚子)라 기록되었지만, 현재는 ①당유자(唐柚子)와 ②유자(柚子)로 양분화 된 것으로 생각되어지며 일부 구전에 따르면 '위암 등에 당유자, 유자과즙을 다려서 복용하면 효과가 있다'고 전해지고 있음.



당유자 고유의 씹쓸한 맛은 열매자체의 성분인 리모노이드계 화합물에 기인한 것이며 다른 감귤류보다 많이 함유되어 있어서 한방 건강차로 특이한 맛을 내는 등 다른 과실에는 찾아볼 수 없는 독특한 맛과 향기는 기능성 소재 및 건강식품으로 개발 가능성이 매우 높으나, 당유자청 제조에 국한된 가공제품의 한계를 나타내고 있음.

2. 경제·산업적 측면

제주도내 전체가구의 19%, 제주도내 농가의 93%가 감귤농업에 종사하고 있어, 감귤산업은 도내 고용효과가 매우 큰 제주도의 기간산업이라고 할 수 있으나 최근 감귤경쟁력의 하락은 직접적인 제주경제 침체 원인으로 작용하고 있으며 감귤원 폐원 등의 교육지책을 모색하고 있으나, 근본적인 해결책을 모색해야 하는 상황.

최근 감귤 주스 시장의 급성장에 따라 가공량이 증가하고 있으나 현재 감귤 가공회사에는 고부가가치 기능성 감귤 가공제품이 아닌 단순 가공 제품을 주로 생산하고 있어서 수익성이 미약함.

시장의 개방화에 따라 경합 과일의 증가, 과일 소비성향, 품질 및 가격 경쟁력 약화 등에 따라 10년 후에도 지속 가능한 감귤산업을 기대하기 어려움. 따라서 감귤의 기능성 규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품 소재, 산업소재로의 활용 가치 증대가 요구됨.

최근 기능성성분을 함유한 건강식품의 수요가 날로 증가하고 건강을 위한 국내 외적 관심 고조로 인해 향후 시장의 발전 가능성이 아주 높아있는 실정에서 약용과일인 당유자의 생리활성 성분을 이용한 가공식품개발로 농가소득증대 모색이 필요함.

제주도는 미래 성장 동력산업으로 바이오산업을 선정하고 「제주생물산업발전 10개년계획」을 수립한 바 있으며 제주감귤의 기능성규명 연구를 통한 소비확대 및 기능성 소재개발을 통해 감귤산업 부가가치를 2배 이상 창출하고자 함.

3. 사회·문화적 측면

농축산물의 개방화, 글로벌화의 추세와 함께 중국 저가 농산물의 유입으로 제주 농축산물의 국제 경쟁력을 강화 할 필요성 대두하고 있으며 감귤원 폐원정책 추진에 따른 고소득 대체의 전략 작목으로서 제주의 특화된 품종 개발 및 발굴이 필요함.

제주지역은 감귤 과다 생산에 의한 가격의 하락으로 감귤을 대체할 수 있는 새

로운 대체작물을 찾아 감귤에 종사하고 있는 농민을 다른 작물로 전환시켜야 되는 절박한 실정이며, 근래 과실 소비성향이 기능성에 대한 인식이 높아지면서 재래감귤에 대한 수요가 증가하는 추세이므로 재래감귤 가공제품개발을 위한 기초적인 특성연구가 필요함.

재래감귤 당유자는 한약재로 오래 전부터 사용되어온 약용과일로서, 두꺼운 과육과 내피 및 종자 등에 함암물질인 리모노이드류가 다량 함유되어 있어 발암억제 효능이 탁월할 것으로 예상되나, 당유에 대한 체계적인 연구 미비와 홍보부족으로 황금작물로 지목을 받지 못함.

기침, 감기, 천식, 기관지염, 간 해독 등에 민간요법으로 제주 토종감귤인 당유자가 오랫동안 상용되어 왔음에도 불구하고 이들 효능에 대한 체계적인 연구 미비로 인해 제주도내 당유자를 이용한 특산가공식품업체는 당유자청과 같은 단순가공에만 제품이 국한되어 있는 형편임.

따라서 소비자 기호에 맞는 기능성 감귤 가공식품 개발을 위해 재래감귤 기능성 성분에 대한 체계적인 특성과 생리활성에 대한 기작 규명이 필요함.

제 2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발목표

본 연구의 최종목표는 당유자의 기능성 규명을 통한 당유자 소비확대 및 고소득대체작목으로 개발하는데 있으며 연구개발 목표는 당유자의 기능성 규명을 위한 생리활성 검사, 당유자 부위별 기능성 성분의 효율적인 추출 기술개발, 당유자의 생리활성 성분을 활용한 가공제품의 개발에 있음.

- 기존문헌 특허분석을 통한 토종감귤 당유자의 기능성 조사
- 시기별, 부위별 다양한 추출물의 확보
- 당유자 추출물(뿌리, 줄기, 잎사귀, 꽃, 미숙과, 성숙과, 종자, 과육, 과피 등)에 대한 기능성 규명
- 당유자 부위별 추출물의 생리활성 성분 도출
- 당유자 활성성분의 효율적인 활용을 위한 추출법 확립
- 당유자 추출물 함유한 다기능 각테일 건강음료 개발 (시제품 제작)

2. 연구내용 및 범위

구분	비고	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (’05 -)	위 탁 기 관	당 유 자 조추출물 의 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과피, 과육 등) 당유자 시료 확보 ○ HPLC, LC-MS를 통한 당유자 부위별 추출물의 성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 시료전처리 과정 및 추출과정의 확립 - 분석 조건 최적화 ○ HPLC, LC- MS를 이용한 성숙과와 미숙과 당유자의 Flavonoid 및 Limonoid 성분 분석
	주 관 기 관	당 유 자 조추출물 의 기능 성 탐색 (염증억 제효능, 항 산화 효 능, 항암 효능 등)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(뿌리, 줄기, 잎사귀, 꽃, 과피, 과육 등) 당유자 조추출물 확보 ○ 염증억제효능 측정 <ul style="list-style-type: none"> - Macrophage 세포주에서 염증성 cytokine(TNF-α, IL-1, IL-6)생성 억제 평가 - Macrophage 세포주에서 COX2생성 억제 평가 ○ 항산화 효능 <ul style="list-style-type: none"> - DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색 - NO assay ○ 골다공증 억제 효능 <ul style="list-style-type: none"> - Osteoclast 선조세포에서 osteoclast 분화유도 cytokine 억제효과 평가 - Human osteoblast (MG-63 cell)에서 osteoclast 분화유도 cytokine 억제 평가 ○ 항암효능평가 (<i>in vitro</i>)

구분	비고	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2,3 차 년 도 (‘06 - '08)	위 탁 기 관	당 유 자 추출물의 생리활성 성분규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과피, 과육 등) 당유자 시료확보 ○ HPLC, LC-MS를 통한 당유자 부위별 추출물의 성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 시료전처리 과정 및 추출과정의 확립 - 분석 조건 최적화 ○ HPLC, LC- MS를 이용한 성숙과와 미숙과 당유자의 Flavonoid 및 Limonoid 성분 분석
	주 관 기 관 / 참 여 기 업	계 통 적 용 매 분 획 물 의 효 능 평 가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 메탄올 추출물의 계통적 추출 방법에 의한 hexane, ethylacetate, butanol, 물 분획물 확보 ○ 각 분획물에 대한 염증억제효능 측정 <ul style="list-style-type: none"> - Macrophage 세포주에서 염증성 cytokine (TNF-α, IL-1, IL-6) 생성 억제 평가 - Macrophage 세포주에서 COX-2생성 억제 평가 ○ 각 분획물에 대한 항산화 효능 <ul style="list-style-type: none"> - DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색 - NO assay ○ 각 분획물에 대한 골다공증 억제 효능 <ul style="list-style-type: none"> - Osteoclast 선조세포에서 osteoclast 분화유도 cytokine 억제효과 평가 - Human osteoblast (MG-63 cell)에서 osteoclast 분화유도 cytokine 억제 평가 ○ 항암효능 <ul style="list-style-type: none"> - 암세포주에 대한 세포사멸효능을 측정
		당 유 자 생리활성 성분 함 유 가공 제품 개 발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당유자 추출물 함유 건강음료 개발 (시제품 제작)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 관련기술의 현황

주요국의 감귤관련 기술 개발 동향은 아래 표1에 나타난 바와 같으며, 감귤류의 기능성 관련된 국내 특허 동향은 아래 표2에 나타난 바, 전반적으로 심혈관 질환의 예방 및 치료를 위한 효능 분야에 관련된 연구가 주를 이루고 있음.

Table 1. 감귤관련 기술 개발 동향

국가	기술개발 동향
일본	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 온주밀감 품종개발에서 오렌지 대체를 위한 중간잡종 신품종 육성 강화 ▪ 생명공학 이용 연구(온주밀감 cDNA Library 구축, 감귤류 유전자 기능성 성분 연구 등) ▪ 품질 향상을 위한 다공질필름 피복재배 기술 실용화 ▪ 생력화를 위한 적과제 상용화 및 병해충 종합방제 기술 연구 ▪ 친환경 저투입지속적 농업(LISA) 감귤원 재배 체계 개발 ▪ 과실 생리 연구(당 및 산, 호르몬 등)
미국	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 교배육성에서 생명공학 기술을 이용한 신품종육성 연구 강화 ▪ 생명공학 이용 연구(3배성 배유조직의 조직배양에 의한 3배체 유기, CTV coat protein 유전자, 식물유래 살충 유전자 전환 연구) ▪ 감귤원 관리 기술(시비, 농약 살포, 관수 및 수확 등)의 기계화에서 무인 자동화 연구 강화 ▪ 친환경 저투입지속적 농업(LISA) 감귤원 재배 체계 개발 ▪ 과실의 당 및 산 대사생리 기초 연구
중국	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 품종육성 연구는 도입품종 선발 연구 위주 ▪ 주 재배 품종은 온주밀감에서 내불오렌지로 품종 갱신 확대 추진
스페인	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 교배 및 이조변이 육종: 고품질, 다수성 및 왜성 대목 육성 연구 ▪ 생력화 재배 이용 기술 개발(약제 적과 및 기계시비, 점적관비 등) ▪ 과실의 발육 대사에 관한 연구 ▪ 과실의 품질 향상 연구 ▪ 과실종합생산(INM, IPM)에 관한 연구

온주밀감의 성분 및 약리활성에 관한 연구에 비해 재래감귤에 대한 연구는 미비하여, 유자즙의 생리활성 물질 분석 (리모닌의 함량이 18.5 ppm/100mL, 노미린의 함량은 2.5 ppm/100mL)은 보고된 바 있으나 (1995, 경남대학교, 우강용박사), 1980년 한국생약학회지에 게재된 “당유자의 성분 연구”에서 플라보노이드계

3성분과 에스테르계 1성분만이 보고되었으며, 재래감귤의 각 부위별 추출물에 대한 생리활성 물질 연구는 아직 미진한 상태임.

현재까지 감귤에서 limonoid 화합물에 관한 연구는 화합물의 발굴이나 구조 결정이 주를 이루고 있으며, 과실의 성숙시기나 조직부위별 함량 변화에 관한 연구 보고는 미흡한 실정이며, 특히 제주 재래감귤인 당유자는 쓴맛이 강해 생과로 섭취하기 보다는 대부분 고농도의 설탕에 절인 당유자청으로 제조되어 소비되고 있는 감귤류인데, 제주산 당유자의 성숙시기별, 조직부위별 limonoid 화합물 함량에 관한 연구는 보고된 바가 없음.

제 2절 앞으로의 전망

지난 수년간 바이오식품분야의 특허출원 추세가 급격하게 증가하였으나 2004년 1월 새로 공포된 법령에 의해 고시된 엄격한 관리체계가 더욱 강화될 것으로 예상되며, 이에 따라 새로운 건강기능성 식(의)약품 소재의 발굴과 상품 개발을 위해서는 과학적으로 그 효능과 안전성이 확보되어야 할 것임.

제주도의 고유생물자원을 외부 유출로부터 보호하고 이들의 기능성과 효능을 규명하여 산업화에 활용하는 것이 제주도 바이오식품 연구개발의 지향점이 되어야 할 것임.

당유자가 지닌 기능성 성분과 이들이 지닌 생리활성에 대한 분석결과를 이용하여 당유자를 이용한 다양한 기능성식품제조 및 기능성소재 개발이 이루어질 것이며, 재래감귤의 기능성 규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품 소재, 산업소재로의 활용가치가 증대되어 감귤산업의 고부가가치 산업화가 이루어질 것으로 전망됨.

과잉 생산되고 당유자를 비롯한 재래감귤이 제주지역의 새로운 농업 소득 작물로 개발될 수 있을 것으로 전망됨.

Table 2. 감귤류의 기능성 관련된 국내 특허 동향

특허명	활성성분	효능
비타민씨와 감귤추출 농축액을 활성성분으로서 포함하는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴코에이 환원효소 활성 저해제 조성물	비타민씨, 헤스페리딘, 나린진	고지혈증 예방
감귤류 과피 추출물, 이로부터 분리 정제된 헤스페리딘 또는 나린진을 포함하는 심혈관 질환 예방 및 치료제 조성물	헤스페리딘, 나린진	심혈관 질환 예방
나린진 또는 나린제닌을 포함하는 아실 코에이:콜레스테롤-오-아실 트랜스퍼레이즈 저해제 조성물	나린진, 나린제닌	심혈관계 질환의 예방 및 치료
네오헤스페리딘하이드로칼콘을 포함하는 동맥경화증, 고지혈증, 간질환, 고혈당증의 예방 및 치료용 조성물	네오헤스페리딘, 디하이드로칼콘	동맥경화증, 고지혈증, 간질환, 고혈당증의 예방 및 치료
감귤류과피 추출액을 포함하는 아실코에이:콜레스테롤-오르토-아실 트랜스퍼레이즈 저해제 조성물		심혈관계 질환의 예방 및 치료제
대추 추출물 및 감귤류 과피 추출물을 포함하는 지질대사개선 및 혈압 강하용 조성물		간 질환, 고혈압증, 동맥경화증, 고지혈증 및 압 예방
나린진 또는 나린제닌을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물	나린진, 나린제닌	혈소판 응집 억제
인삼 및 감귤류 과피 유래 물질을 포함하는 건강증진용 식품조성물	감귤류 과피 유래의 플라보노이드	동맥경화증, 고지혈증, 중풍, 당뇨, 암, 간질환 등 예방 및 뇌혈관 강화
헤스페리딘을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물	헤스페리딘, 나린진	심혈관 질환의 예방 및 치료

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 당유자의 전처리 조건 및 HPLC 분석조건 확립

하귤류인 당유자는 7월과 1월에 각각 그 미숙과와 성숙과 시료를 확보하였다. 미숙과는 직경 4cm 내외의 것을 제주도 제주시내의 제주특산에서 수확하였고, 성숙과는 미숙과와 동일한 장소에서 낙과를 제외하고 직경 12cm 정도의 것을 수확하였다.

수확한 시료의 보관 및 전처리 과정은 다음과 같다. 수확한 시료는 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하였다. 미숙과는 과실의 크기가 작고 과피가 차지하는 비율이 높아서, 과육과 과피를 분리하지 않고, 통과 형태로 두께 0.3 cm로 slice하여 -70℃ deep freezer에서 3일간 동결한 후, 72시간 동결건조 하였다. 물로 2회 세척한 성숙과의 1/2은 Lemon Squeezer를 이용하여 과즙과 과피를 얻었고, 1/2은 통과 상태에서 두께 0.3cm으로 slice 하였다. 동결건조의 조건은 미숙과와 동일하게 72시간동안 동결건조 하였다. 동결건조 후 각 sample의 수분함량을 측정한 결과 미숙과는 수분함량이 약 75.13%, 통과 형태의 성숙과는 80.38%로 나타났으며, 과즙과 과피는 각각 88.65%, 75.36%의 수

분을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

당유자의 flavonoid 분석을 위해서는 HPLC system은 Waters(Milford, MA)의 600 pump를 사용하였으며, 2487 UV-vis detector를 이용하여 280nm의 파장에서 flavonoids를 검출하였다. 분석에는 Waters의 sunfire™ C-18 column(4.6×150mm, 3.5µm)이 사용되었다. Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 hesperidin, neohesperidin, naringin의 3가지 standard를 사용하여 peak의 분리를 위해 기존 연구를 토대로 하여 flavonoid 분석에 적합한 mobile phase 조건을 확립하였다. 손흥수등의 연구에서 사용한 2.5% acetic acid: methanol: acetonitrile (35:5:10)을 isocratic elution으로 분석한 결과 hesperidin peak과 neohesperidin peak의 분리가 이루어지지 않았다. 은종방(1996) 등의 연구에서 수행된 방법인 0.5% acetic acid methanol과 0.5% acetic acid water를 사용하여 5-60분간 선형 기울기 분석방법을 이용한 것에서도 isomer인 hesperidin과 neohesperidin 두 물질의 분리는 이루어지지 않았다. Rouseff 등의 연구에서 사용된 79.5% water, 20% acetonitrile 와 0.5% glacial acetic acid의 조건에서도 분리가 적절히 이루어지지 않았다. Kanaze 등의 연구에서 수행된 방법인 water: tetrahydrofuran : acetic acid(77:21:2)을 isocratic elution으로 분석한 결과 3개의 standard peak이 분리되었으며 아래 확립된 추출조건을 토대로 각각의 sample을 injection한 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

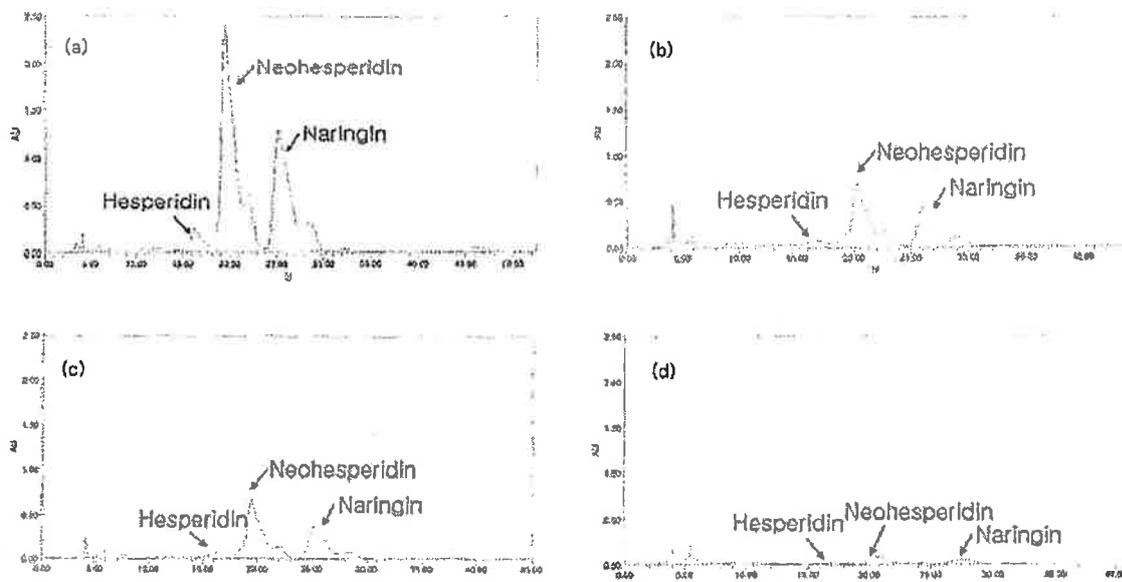


Figure 1. HPLC Chromatograms of *Citrus grandis* (a) immature fruit, (b) mature fruit, (c) peel of mature fruit, (d) flesh of mature fruit.

Citrus를 이용하여 flavonoid를 분석한 은종방, Xian-guo, He, 최영훈 등의 연구를 토대로 20% DMF methanol, 80% ethanol, water를 추출용매로 선정하였다. 추출 조건은 동결 건조된 당유자를 각각 분쇄기(epia power mixer JW-2300, 리빙하이테크, 한국)로 마쇄한 후 0.5mm 체로 분말화 하였다. 분말화한 당유자 시료 1g에 50mL의 20% DMF methanol, 80% ethanol, water를 각각 넣고 2시간동안 60℃에서 추출하였다. 추출 후 vacuum oven을 이용하여 농축하고 각 추출물에 20mL methanol을 넣어 최종 volume을 20mL로 맞추었다. 확립된 mobile phase 조건으로 각 추출물을 20μL씩 injection한 결과 80% ethanol을 이용한 추출법이 다른 추출법에 비해 hesperidin, neohesperidin의 추출효율이 높게 나타났다. 20% DMF methanol을 사용한 경우 80% ethanol을 사용한 추출물에 비해 약 90%정도의 추출 효율을 보였으며, water를 사용한 추출물은 ethanol을 추출용매로 사용한 sample의 70%정도의 추출율을 보였다. 따라서 동일한 sample에 대한 추출효율이 높은 80% ethanol을 추출용매로 선정하였다.

2005년 7월에 수확된 미숙과, 2006년 1월에 수확된 성숙과, 과피, 과즙을 각각 확립된 추출조건 및 분석조건을 이용하여 3회씩 injection한 후 standard curve를 이용하여 분석한 결과는 Table 1과 같다. 3반복 결과를 토대로, 유의수준 0.05에서 ANOVA를 실시한 결과, 미숙과와 과즙의 hesperidin, neohesperidin, naringin 세 성분의 함량은 과피 및 통과에서의 함량과 Duncun 및 Tukey의 방법에서 유의적으로 차이가 나타났다. 3종류의 flavonoids 모두성숙과 보다 미숙과에서 높게 나타났다. 이는 과실이 숙성함에 따라서 생리활성의 중요한 성분이 감소하는 것을 보여주며 이러한 연구결과는 기존의 류미라 등의 연구결과와 일치한다. 당유자에는 세 가지의 flavonoid 중 neohesperidin의 함량이 다른 두 물질보다 많이 들어있음을 알 수 있다. 이는 Kawaii 등의 연구에서 약 30여종의 citrus를 대상으로 flavonoids의 함량을 조사한 결과, neohesperidin의 함량이 높게 검출된 Bergamot, Red Blush, Natsudaidai 건조된 시료 100g 당 1.60g, 1.58g, 1.58g와 비교해보아도 상당히 높은 수준이었다.

Table 3. Hesperidin, neohesperidin, and naringin contents of *Citrus grandis* Osbeck

	미숙과	성숙과	성숙과 과피	성숙과 과즙
Hesperidin	1.22 ^{c)}	0.15 ^{b)}	0.15 ^{b)}	0.09 ^{a)}
Neohesperidin	4.14 ^{c)}	2.37 ^{b)}	2.31 ^{b)}	1.11 ^{a)}
naringin	3.12 ^{c)}	1.39 ^{b)}	1.48 ^{b)}	0.44 ^{a)}

당유자의 limonoid 분석을 위해서 flavonoids 분석시와 동일한 HPLC system과 column이 사용되었으며, 210nm에서 limonoid 성분을 검출하였다. Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 limonin과 nomillin standard가 peak의 분리정도 확인 및 정량을 위해 사용되었다. Limonoid 성분의 정성 및 정량을 위한 mobile phase의 조건을 확립하기 위해 water와 acetonitrile을 사용하여 0min. water:ACN=90:10, 70min. water:ACN=10:90, 75min. water:ACN=10:90, 80min. water:ACN=0:100, 90min. water:ACN=90:10, 100min. water:ACN=90:10의 gradient 조건을 사용하였다. 이를 통해 nomillin과 limonin peak를 분리하였다.

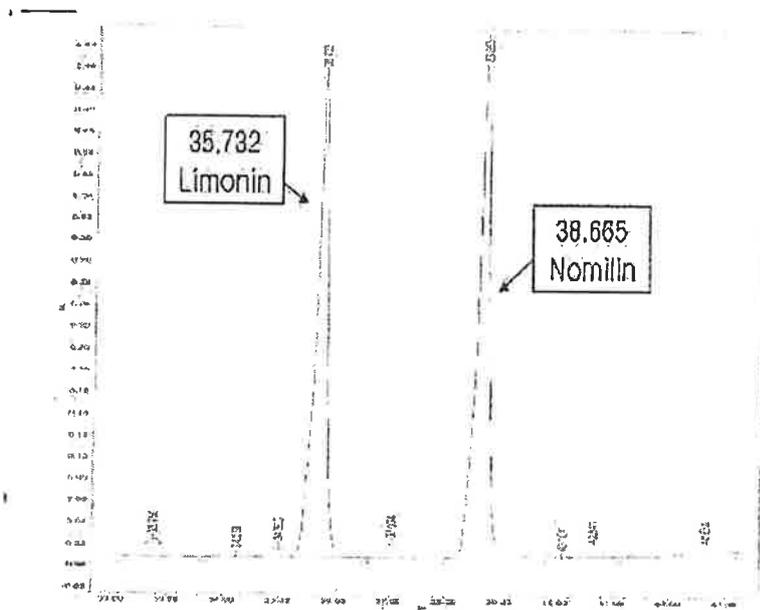


Figure 2. HPLC Chromatogram of limonoids standard

제 2절 메탄올 추출물의 계통적 추출 분획물에 대한 flavonoids 및 limonoids 분석

1. Flavonoids 분석

당유자의 미숙과와 성숙과의 flavonoids 및 limonoids 성분을 분석한 1차년도와 2차년도의 결과는 표 4와 같다.

Table 4. The contents of flavonoids and limonoids in different tissues of Dangyuja.

	Flavonoids			Limonoids	
	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Limonin	Nomilin
Immature	49.00 ¹⁾ ³⁾ ±0.27	17.61 ^{d)} ± 0.33	60.88 ^{f)} ±0.67	0.48 ^{d)} ± 0.01	0.57 ^{d)} ± 0.00
Mature	10.01 ^{d)} ± 0.10	0.51 ^{b)} ± 0.012	17.76 ^{d)} ±0.37	0.08 ^{b)} ± 0.00	0.13 ^{b)} ± 0.00
Pulp	2.73 ^{b)} ± 0.13	0.02 ^{a)} ± 0.00	2.99 ^{b)} ±0.04	nd ^{a)}	0.03 ^{a)} ± 0.00
Peel	8.66 ^{c)} ± 0.20	0.66 ^{b)} ± 0.02	13.85 ^{c)} ±0.21	0.13 ^{c)} ± 0.00	0.25 ^{c)} ± 0.00
Albedo	21.01 ^{e)} ±0.69	1.76 ^{c)} ± 0.14	31.86 ^{e)} ±1.14	0.003 ^{a)} ± 0.00	0.03 ^{a)} ± 0.00
Flavedo	3.41 ^{b)} ± 0.04	0.53 ^{b)} ± 0.10	12.35 ^{c)} ±0.29	0.14 ^{c)} ± 0.0	0.25 ^{c)} ± 0.00
Seed	Trace ^{a)}	Trace ^{a)}	Trace ^{a)}	3.47 ^{e)} ± 0.02	2.65 ^{e)} ± 0.05

1)mg/g on dry weight

2)Mean values for all determinations based on n=3.

3)Data are means of independent samples ± S.D. The data showed significant differences at the level of P<0.05

1차년도 실험결과 미숙과에서 가장 많은 양의 flavonoids가 검출되었으며, limonoids의 경우 seed에 많이 함유되어 있었다. 2차년도 과제인 당유자 분획물의 flavonoids 성분을 분석하기 위해 당유자 미숙과를 8월에 채취하여 동결건조한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 분말 시료 (84.98g)를 80% methanol로 2회 추출 후 여과하여 감압 농축하여 용매를 증발시켰다. 여기에서 얻은 methanol 추출물 (34.47g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획(0.46g), chloroform 분획 (0.88g), ethylacetate 분획(2.30g) butanol 분획(15.17g)을 얻어 시료로 사용하였다.

당유자의 flavonoids 분석을 위해 HPLC system으로 Waters(Milford,MA)의 600 pump를 사용하였으며, 2487 UV-vis detector를 이용하여 285nm의 파장에서 flavonoids를 검출하였다. 분석에는 Waters의 SunfireTM C-18 column(4.6x250mm,5µm)이 사용되었다. 1차년도 실험 결과를 바탕으로 methanol을 추출용매로 선정하였고, 2차년도에는 이를 일부 보완하여 resolution을 증대시켜 실험을 진행하였다. mobile phase 조성은 methanol(A), 0.01M phosphoric acid(B)를 사용하여 0-2min, 20% A in B, 2-50min, 20-45% of A in B, 50-55min 45-50% of A in B, 55-65min A in B, 65-70min A in B의 조성으로 gradient를 주었다. Sigma(St.Louis,MO, USA)에서 구입한 hesperidin, neohesperidin, naringin의 3가지 표준물질을 사용하여 standard curve를 작성하였다(Fig.3).

2차년도에 확립된 추출조건 및 분석조건을 이용하여 3회씩 injection한 후

standard curve를 이용하여 분석하였으며 분석한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4, Fig. 5에 나타내었다.

Table 5. The contents of flavonoids in *Citrus grandis* Osbeck fractioned by butanol, hexane, and methanol

	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin
Butanol	225.131 ^(c) 1) 2) ±6.716	23.399 ^(b) ±0.648	406.849 ^(c) ±11.335
Hexane	Trace ^(a)	Trace ^(a)	1.899 ^(a) ±0.025
Methanol	144.971 ^(b) ±0.393	22.728 ^(b) ±0.030	233.378 ^(b) ±0.572

1) Mean values for all determinations based on n=3.

2) Data are means of independent samples ± S.D. The data showed significant differences at the level of P<0.05

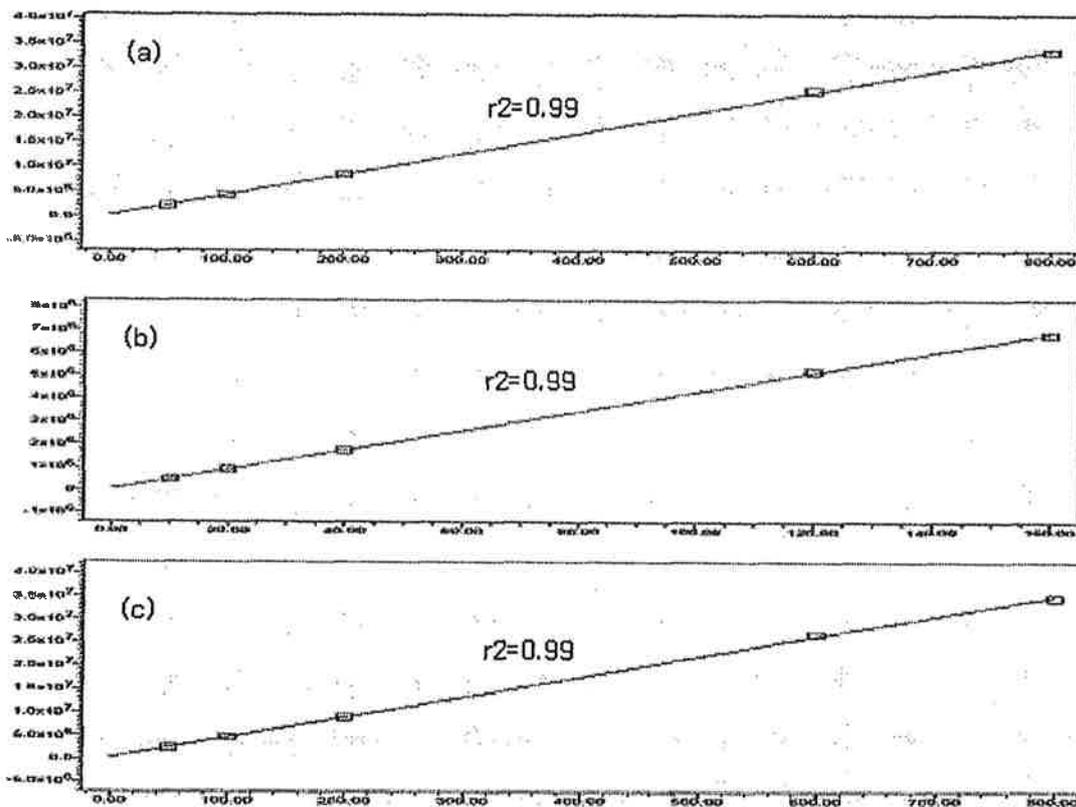


Figure 3. Standards curves of flavonoids in methanol fraction and butanol fraction. (a) naringin, (b) hesperidin, (c) neohesperidin

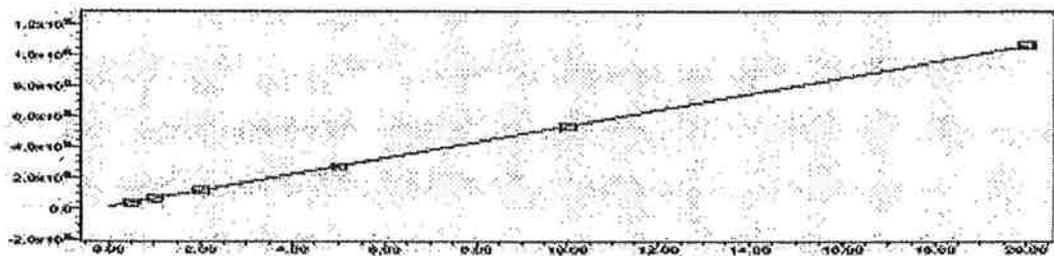
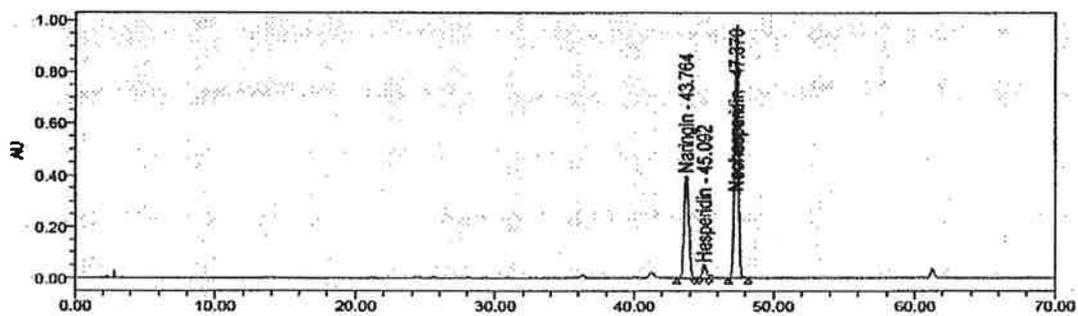
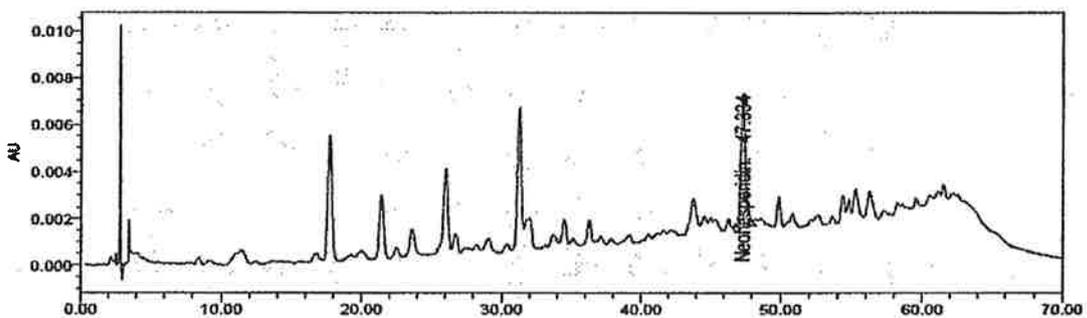


Figure 4. Standards curve for neohesperidin in hexane fraction

(a)



(b)



(c)

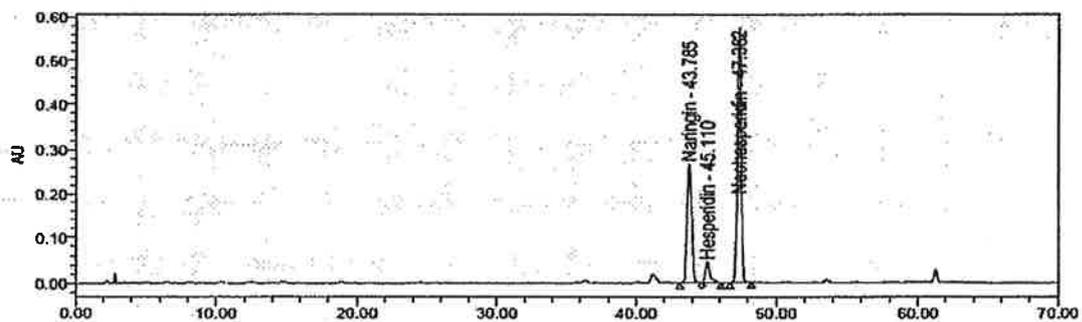


Figure 5. HPLC chromatograms of immature *Citrus grandis* Osbeck. (a) butanol fraction, (b) hexane fraction, (c) methanol fraction

그 결과 butanol 분획물에서 naringin과 neohesperidin이 각각 221.277mg/L, 400.629mg/L로 높게 나왔으며, methanol 분획물은 naringin과 neohesperidin이 각각 144.989mg/L, 233.264mg/L로 정량 되었다. 그리고 hexane 분획물에서는 neohesperidin을 제외한 나머지 성분은 검출되지 않았으며, neohesperidin 역시 1.899mg/L로 가장 낮게 정량되었다. Hesperidin은 butanol 분획물에서 24.148mg/L, methanol 분획물에서는 22.733mg/L으로 비슷한 양으로 정량되었다. Methanol 및 butanol 추출물의 flavonoids 성분 분석 후, LC/MS/MS를 이용하여 미지의 peak를 동정하였다. 그 결과, 1차년도 실험을 통해 밝혀진 hesperidin, neohesperidin, naringin (Fig. 6) 외에 neoeriocitrin이 확인되었다 (Figure 7)

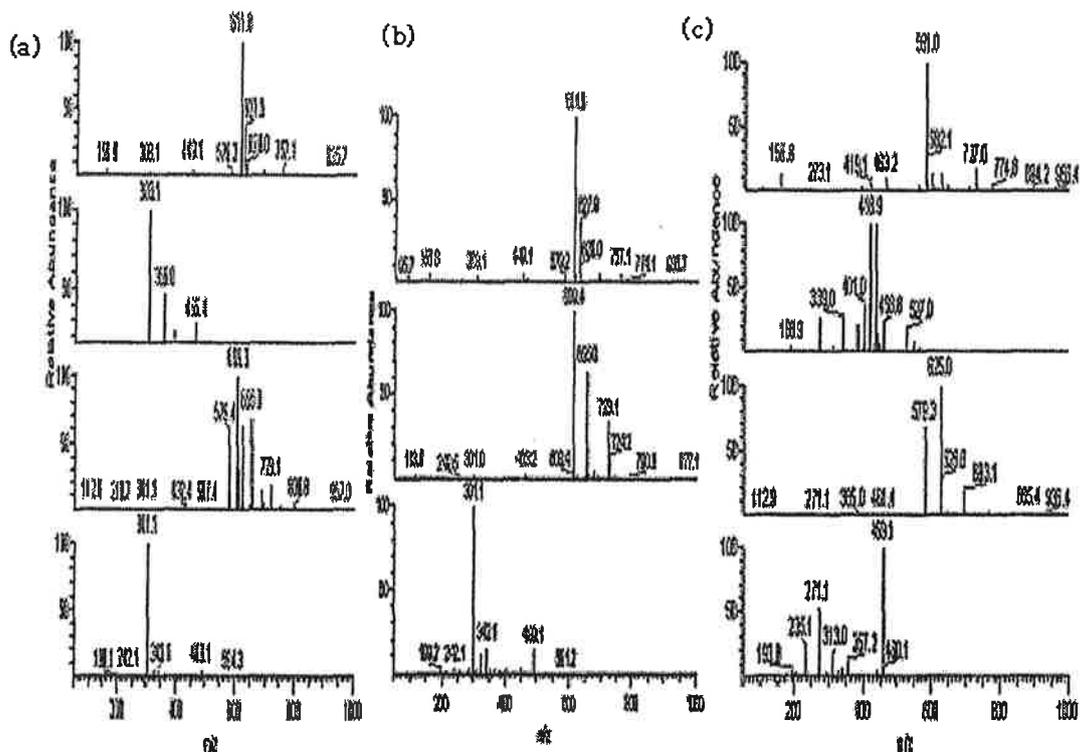


Figure 6. Mass spectra of flavonoids from *Citrus grandis* Osbeck (a) hesperidin, (b) neohesperidin, (c) naringin

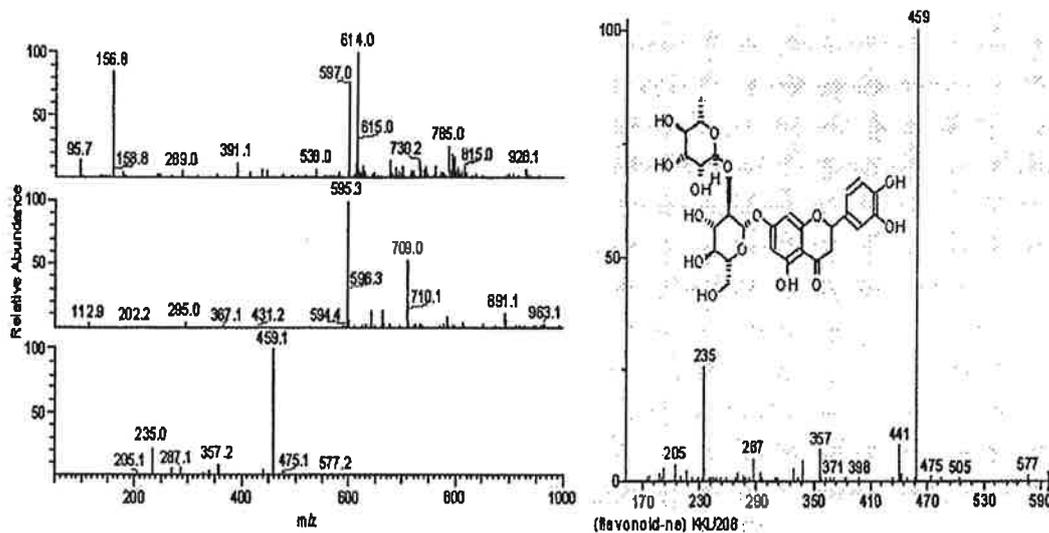


Figure 7. Mass spectra and chemical structure of neoeriocitrin from *Citrus grandis* Osbeck

2. Limonoids 분석

분말 시료(84.98g)에서 얻은 80% methanol 추출물(34.47g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획물, butanol 분획물을 얻어 실험에 사용하였다. 당유자의 limonoids 분석을 위해서 Summit HPLC system (Dionex, USA) UV detector를 이용하여 210nm 파장에서 limonoids 성분을 검출하였다. 분석 시에는 Shim-pack prep ODS C18 (H)KIT-column (4.6×260mm, 3.5 μ m)이 사용 되었다. 그리고 Sigma(St.Louis, MO, USA)에서 구입한 limonine과 nomilin 표준물질이 peak의 분리정도 확인 및 정량을 위해 사용되었다. Limonoids 성분의 정성 및 정량을 위한 mobile phase의 조건을 확립하기 위해 water와 acetonitrile을 이용한 0min A:B=90:10, 61min. A:B=10:90, 71min. A:B=0:100, 81min. A:B=10:90, 91min. A:B=90:10, 120min. A:B=90:10의 gradient조건을 사용하였다. Nomilin과 limonene 성분을 동정하기 위하여 0.2 mg/mL의 표준물질을 사용하여 peak 머무름 시간을 비교하였다. 분석한 결과는 Fig 9와 같다.

Table 6. Limonin in *Citrus Grandis* Osbeck fractioned by butanol, hexane and methanol(mg/L)

	Limonin	Nomilin
Butanol	2.782 ^{1),2)} ±0.119 ^{b)}	trace
Hexane	trace ^{a)}	trace
Methanol	13.092±0.327 ^{c)}	trace

1) Mean values for all determinations based on n=3.

2) Data are means of independent samples ± S.D. The data showed significant differences at the level of P<0.05

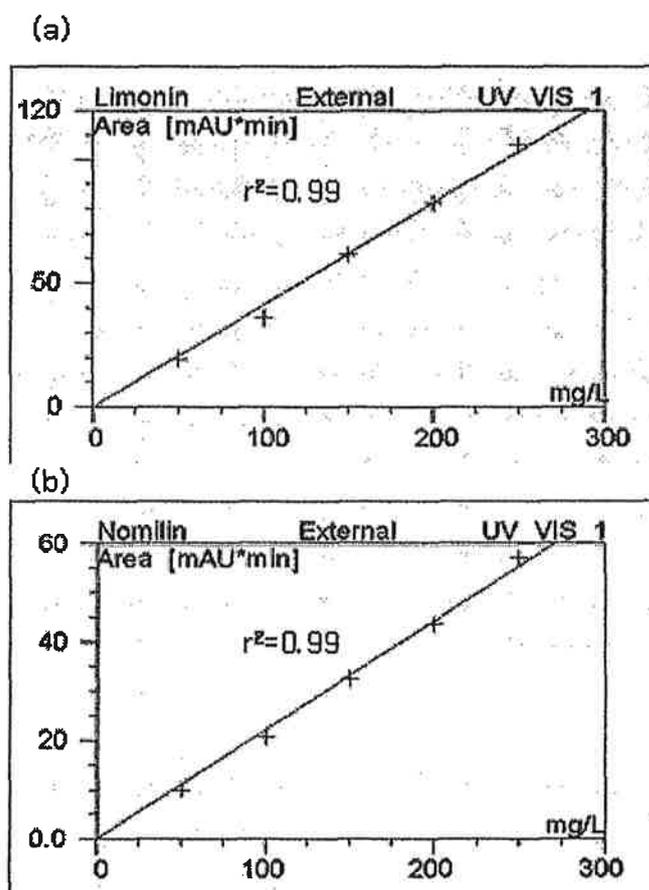


Figure 8. Standards curves of limonoids in methanol, butanol and Hexane fraction. (a) limonin (b) nomilin

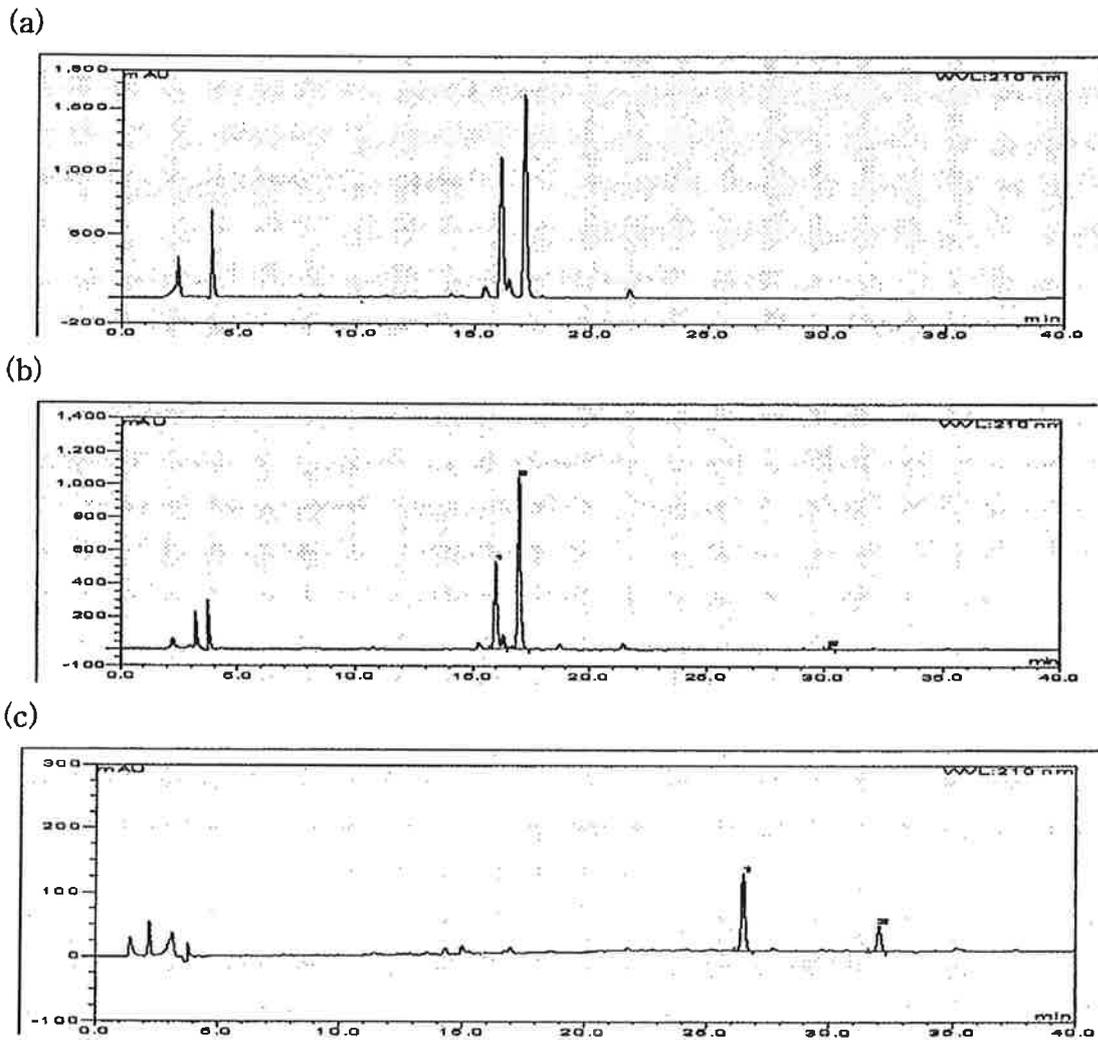


Figure 9. HPLC chromatograms of immature *Citrus grandis* Osbeck. (a) methanol extract, (b) butanol extract, (c) hexane extract

Limonin성분은 limonoid 성분의 일종으로 감귤류 내에 많이 함유되어 있고 후미에 쓴맛을 내는 주성분이나 항암성 등 약리적 효능 때문에 높은 관심을 받고 있다. Limonoid는 butanol 분획물 내 2.782mg/L, methanol 분획물 내 13.092mg/L 검출되었고 nomilin 성분은 검출되지 않았으며 hexane 분획물에서는 limonin, nomilin이 극소량으로 함유되어 있어서 검출되지 않았다. ANOVA 분석 결과 각 분획물별 limonin 함량은 유의적인 차이를 보였다.

제 3절 미지의 성분 분자구조 규명

1. LC-MS를 이용한 미지의 flavonoids 및 limonoids 성분 분자구조 규명

당유자 분획물의 flavonoids 및 limonoids 성분의 동정 및 분자구조 규명을 위해 LC-ESI-MS를 이용하여 분석하였다. LC(Varian 212)의 분석 조건에서 column(varian, chromsep 150*2.0mm Pursuit XRs-3 μ m-C)을 사용 하였으며 mobile phase의 조성은 water+0.1% formic acid(A), acetonitrile+0.1% formic acid를 사용하여 0-2min 90%A in B, 2~10min 90-60%A in B, 10-20min 60-30%A in B, 20-25min 30-10%A in B, 25~33min 10-90%A in B의 조성으로 gradient를 주었다.

Mass Set Points (Varian 500-MS)의 분석조건은 Sprayshield는 Voltage (+):600.0 volts. Voltage (-): -600.0 volts이며 nebulizer gas는 air를 이용하였다. Nebulizer pressure는 35.0 psi, drying gas pressure:10.0 psi, drying gas temperature: 300 $^{\circ}$ C capillary voltage는 80.0 volts, needle voltage (+): 5000 volts, needle voltage (-): -5000 volts이었다. Mass range는 100-1000(m/z) 이었 으며, 분석결과에 대한 total ion chromatograms는 Fig 10과 같다. LC-ESI-MS를 이용한 methanol 추출물 및 butanol 추출물 분석결과를 table 7와 table 8에 나타내 었다.

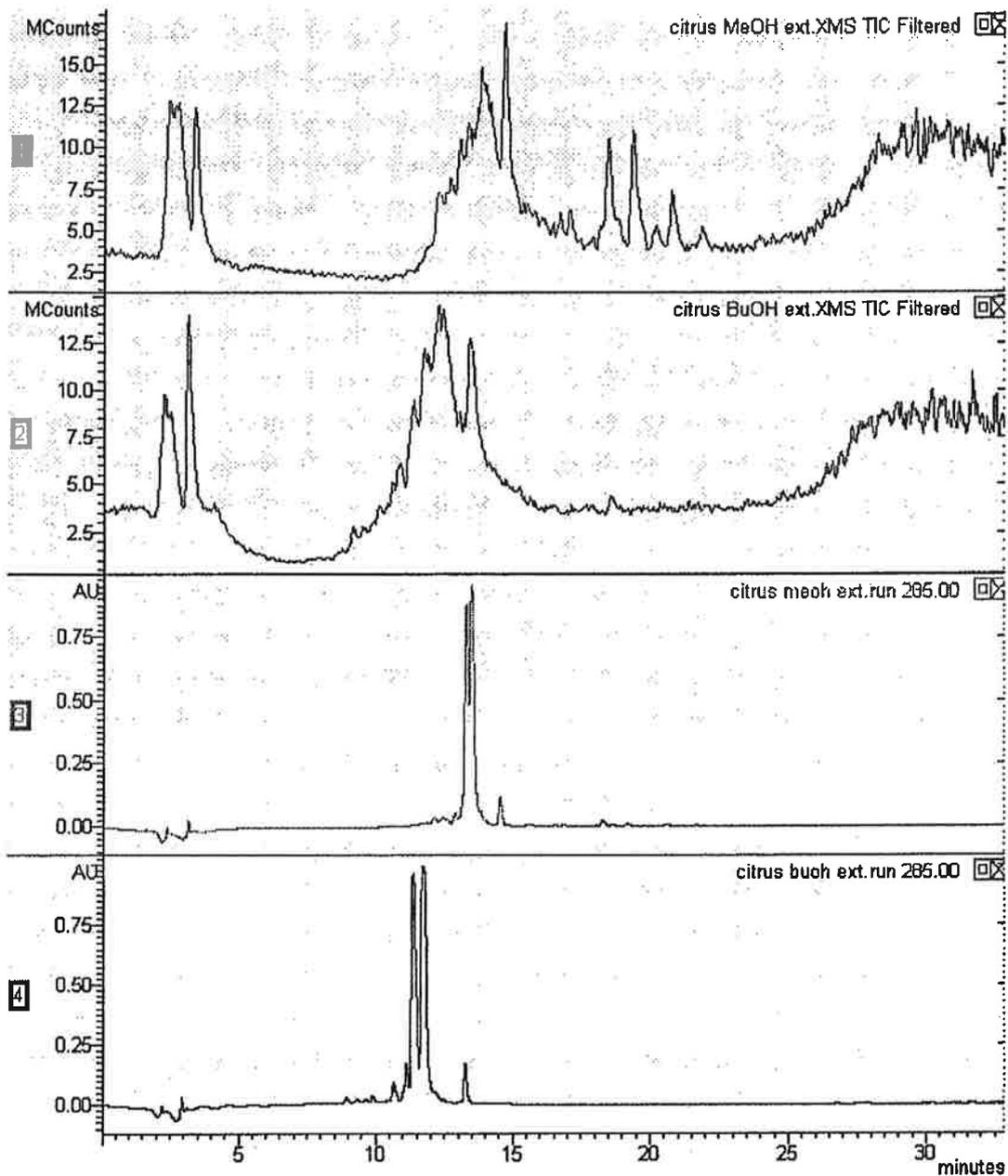


Figure 10. LC-MS total ion Chromatograms of immature *Citrus grandis* Osbeck. (1) methanol extract.xms tic filtered, (2) butanol extract.xms tic filtered, (3) methanol extract(285), (4) butanol extract(285)

Table 7. Components found in methanol fraction

R.T.	Compounds	Molecular fomula	M.W.	Fragmentation pattern	확인 여부
2.4	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342	341;179;89	추정
2.6			192	191;173;127;111;93;85	
3.0			318	317;225;207;165;125	
3.3	Byakangelicin	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	334	333;287;196;125	추정
3.4	Phlorin;O-D-Glucopyranoside	C ₁₂ H ₁₆ O ₈	288	333[M-H+formic acid]; 287; 196; 125	추정
12.6	4',5,7,8-Tetrahydroxyflavone; 7,8-Di-Me ether	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	313; 295; 191	추정
	p-Mentha-1,8-dien-6-ol; (4R,6S)-form, O-b-D-Glucopyranoside	C ₁₆ H ₂₆ O ₆	314		추정
	7-[(6-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,7- octadienyl)oxy]-2H-1-benzopyran -2-one	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	314		추정
12.8	Citroside A; 5-O-D-Glucopyranoside	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	386	385; 233;191	추정
12.9	1(109)-Abeo-7-acetoxyobacun-9(11)-ene; 7a-form	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	496	495;449;427;287;265	추정
13.0	3',5'-Di-D-glucopyranosylphloretin	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	598	597;477;460;241	추정
13.1	Neoeriocitrin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596	595; 459; 357;235	확인
13.2	Hesperetin :7-O-[-L-Rhamnopyranosyl-(12) -[-L-rhamnopyranosyl-(16)] -D-glucopyranoside]	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756	755;489;301	추정

Table 8. Components found in butanol fraction

R.T	Compounds	Molecular formula	M.W.	Fragmentation pattern	확인 여부
2.5	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1] benzopyran-7-one; 4-O-(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl), 9-Me ether	C ₂₂ H ₂₄ O ₅	368	367;307;277;205;187	추정
2.5			192	191;173;127;111;93;85	추정
2.3	Sucrose		342	341;179;143	추정
3.1	Byakangelicin		334	333;287;265	추정
19.1	1-Hexanol; O-b-D-Glucopyranoside	C ₁₂ H ₂₄ O ₆	264	263;248;176;147;133;12	추정
	4',5,6,7,8-Pentahydroxyflavone; 6,7,8-Tri-Me ether	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344	343;181;137;109	추정
9.1	3-Methylpentacosane	C ₂₆ H ₅₄	366	365;03;297;262	추정
	Bufotenine; O-b-D-Glucopyranoside	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆			추정
13.4	3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone; 7-O-[a-L-Rhamnopyranosyl-(1)-b-D-glucopyranoside]		594	593;473;285	추정
	Didymin				추정
	Poncirin				추정
10.0			626	625;597;299	추정
10.5			784	783;681;621;559;477;315	추정
12.0	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610	609;301	확인
10.7	3',5'-Di-D-glucopyranosylphloretin	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	598	597;477;387;357	추정
10.9	Neohesperidin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596	595;459;357;235	확인
11.2	Hesperetin :7-O-[-L-Rhamnopyranosyl-(12)-[-L-rhamnopyranosyl-(16)]-D-glucopyranoside]	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756	755;489;301	추정
11.5	Naringin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	580	579;459;357;339;271;235	확인
14.4			840	839;693;664;553;263	추정
14.4			870	869;553;495;407;263	추정
25.0	Diosmin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608	607;299;284	확인

2차년도에 동정된 flavonoid와 limonoid 외에도 LC/MS/MS를 통해 neoeriocitrin이 동정되었는데 이 화합물은 다른 flavonoid와 마찬가지로 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 Natsudaidai orange, sour orange나 lime에서 동정된 바 있다. 3차년도에는 LC/MS를 이용하여 수행한 결과 butanol 분획물에서 diosmin이 동정되었는데 이 역시 항산화 효과가 있다고 알려져 있으며 양약에서는 치질이나 정맥혈류 개선에 사용되고 있다. 이 외에도 추가적으로 phlorin, 4',5',7',8'-tetrahydroxyflavone, citroside A, didymin, hesperetin 등의 다수의 flavonoid류가 당유자 내 존재 가능성이 있는 화합물로 추정되었다.

2. 당유자의 휘발성 향기 성분 동정 및 정량

당유자(*Citrus grandis* Osbeck)의 휘발성 향기성분을 분석하기 위해 과피와 과육을 각각 분리하여 SAFE(Solvent assisted flavor evaporation)을 사용하여 추출한 후 gas chromatograph/mass spectrometer(GC/MS)로 분석하였다. 하귤류인 당유자는 직경 12cm 내외의 것을 제주도 제주시에 위치한 제주 특산에서 2007년 1월에 수확한 것을 본 실험에 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 heptadecane은 Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA), 추출용매인 methylene chloride는 J.T. Backer (Phillipsburg, NJ, USA) 에서 구입하여 사용하였다. 시료는 농약 및 기타 불순물들의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하고 물기를 제거한 후 -70°C deep freezer에서 보관 하였다. 시료 처리 직전에 4°C로 유지된 냉장고에서 2시간 동안 해동시킨 후 과실을 과도로 Cubic(1cm×1cm)모양으로 슬라이스 하였다. 그 후 과도로 과피와 과육을 분리하여 액체질소로 동결 시킨 후 blender (HMC-400T, Hanil electron Co., Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄 하였으며, 70g씩 채취하여 실험에 사용하였다. 앞에서 얻은 시료 70g과 재증류한methylene chloride (J.T.backer, USA) 140mL에 내부표준물질로 0.1mL heptadecane (1,000ppm in methylene chloride, w/v)을 혼합하여 500rpm에서 60분간 stirring 하면서 용매추출을 시행하였다. 그 후 Whatman No.41 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, UK)로 추출물을 여과하고 무수 sodium sulfate(Na_2SO_4)를 사용하여 수분을 제거 하였다. 얻어진 당유자 과피와 과육의 추출물에서 SAFE법을 이용하여 휘발성 성분만을 분리하였다. 유기 용매 추출물을 40°C, 200rpm로 유지된 1L 둥근 플라스크에 한 방울씩 떨어뜨려 고르게 분산시키며, 10-5torr의 고진공 영역에서 액체질소에 담가진 trap에 휘발성 성분들이 포집되도록 하였다. 이러한 SAFE를 이용한 추출법 90분 동안 수행되도록 하였으며 포집된 휘발성 성분들과 유기용매는 질소가스를 이용하여 최종 0.1mL까지 농축하였으며 1 μ L를 GC/MS에 주입시켰다. Agilent 6890 gas chromatograph에 연결된 mass selective detector (5975 mass selective detector,

Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 DB-5 capillary column (30 m length × 0.25 mm i.d., 0.25 film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 장착하여 휘발성 성분들의 분석에 사용하였다. 이동상 기체로는 0.8mL/min의 일정한 유량으로 He이 사용되었고, mass spectrum은 70eV에서 electron ionization mode(EI) 방식에 의해 얻어졌다. 시료의 주입량은 1μL였으며, splitless mode를 사용하였다. GC oven 온도는 40°C 에서 6분 유지시킨 뒤 200°C까지 4°C/min 증가시켰으며, 200°C 에서 10분간 유지시켜 총 56분의 시간이 소요되었다 GC 주입기와 검출기 온도는 각각 200°C와 250°C, mass scan range는 40~550 a.m.u으로 설정하였다. 휘발성 성분들의 잠정적인 동정을 위해 mass spectral data와 retention index (RI)를 이용하였다. Mass spectral data는 on-computer library (Wiley 275 mass spectral database, Hewlett-Packard Co.)나 manual interpretation에 의해 확인하였고 휘발성 성분들의 RI는 n-paraffins C7-C22의 머무름 시간과 비교하여 구하였다. 각 휘발성 성분들의 정량은 GC-MS total ion chromatogram 상에서 상대적인 peak area [(peak area of individual compound/ peak area of n-decane) × 100]에 의해 구하였다.

당유자의 과피와 과육의 휘발성성분을 SAFE(solvent assisted flavor evaporation)로 추출한 후 GC-MS로 분석하였다. 그 결과 Table 9과 Fig 11에서 보는 것과 같이 당유자의 과피에는 24개의 휘발성 향기성분들이 분석 되었고, Table 10 에서 보는 것과 같이 과육에는 총16개의 성분들이 분석 되었다. 과피와 과육 모두 limonene이 주요 성분이었고 각각 전체성분의 60%, 73%를 차지하였다. Limonene은 향긋한 향기를 주는 감귤류의 중요한 향기성분으로 대부분의 감귤류에 상당량 포함되어 있는데 sweet orange에 83~97% 함유되어 있고, mandarin에 65-94% 함유되어 있다는 보고와 비슷한 경향이였다.

Table 9. Volatile compounds in dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) peel.

NO	Volatile components	RI ^(a)	Relative peak area (%) ^(b)
ALCOHOL			
1	Linalool	1101	3.83±0.08
2	α-Terpineol	1190	3.01±0.14
3	(Z)-Piperitol	1178	0.76±0.02
4	Citronellol	1175	0.39±0.04
ALDEHYDE			
5	Hexanal	792	0.16±0.02
6	2-Hexenal	849	0.47±0.04
7	Citronellal	1154	3.34±0.04
8	Citral	1240	1.62±0.01
9	(E)-Geranial	1260	0.14±0.01
10	Geranial	1269	2.21±0.01
TERPENE HYDROCARBONS			
11	α-Pinene	931	12.73±0.34
12	Myrcene	1003	396.64±14.91
13	β-Phellandrene	1006	1.59±0.44
15	1,3,7-Octatrien	1055	9.34±0.20

(a) Relative retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

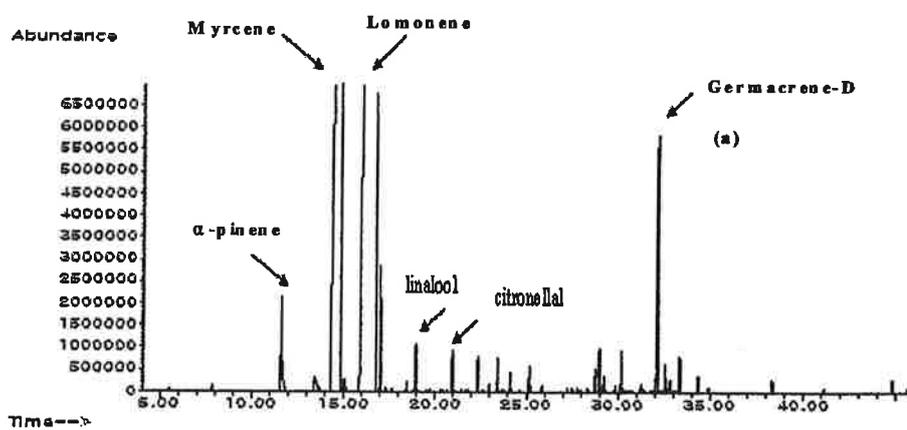
(b) Relative peak areas compared to that of internal standard (0.1 μL of 1000ppm heptadecane).

Table 10. Volatile compounds in dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) flash.

NO	Volatile components	RI ^(a)	Relative peak area(%) ^(b)
ALCOHOL			
1	Linalool	1009	0.07±0.07
ALDEHYDE			
2	Citronellal	1152	0.06±0.01
TERPENE CARBON			
4	Myrcene	993	26.5±0.54

(a) Relative retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

(b) Relative peak areas compared to that of internal standard (0.1 μ L of 1000 ppm heptadecane)



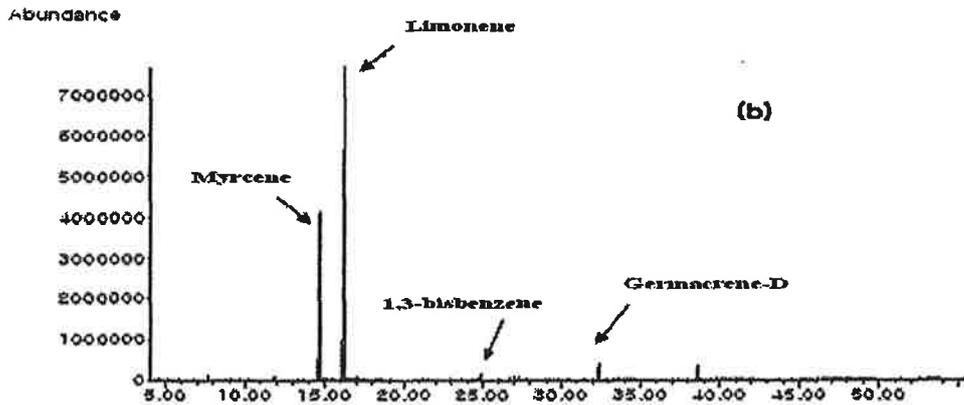


Figure 11. GC/MS total ion chromatograms of volatile compounds in dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) (a) peel and (b) flash

향추출물 회석분석법(AEDA)를 이용하여 당유자의 향기활성 성분을 분석한 결과는 Table 11 과 12에 나타내었다. Methylene chloride 용매 추출하여 얻은 농축액을 methylene chloride를 이용해 3배수로 단계별로 회석하였으며, 회석된 추출액의 향이 감지되지 않을 때까지 sniffing test를 계속 진행하는 방법으로 향의 상대적인 강도를 측정하여 과피에서 10개 과육에서 4개의 향기활성성분을 검출할 수 있었다. 전체적인 향의 특성은 강한 파인애플 향이 나는 geranial와 감귤류 향이 나는 terpiolene, 그리고, geranial acetate(자몽)이 주를 이루었고, FD factor가 높은 향기활성 성분들로는 geranial(Log3 FD factor 6, 파인애플향), α -pinene (Log3 FD factor 5, rancid), citroneallal(Log3 FD factor 5, 허브향), terpiolene(Log3 FD factor 4, 소나무 향), Nerol(Log3 FD factor 4, 자몽향), hexanal(Log3FD factor 4, 풀향) 등으로 밝혀졌다.

향기활성성분의 분석을 통해 GC-MS에서는 동정되지 않았던 과피 내 α -pinene, geranial acetate, nerol과 과육 내 β -phellandrene을 동정할 수 있었다.

Table 11. Aroma-active compounds in dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) peel.

NO	Compounds	RI ^{a)}	Odor descriptions ^{b)}	Log ₃ FD factor ^{c)}
1	Hexanal	735	풀향	4
2	α -Pinene	1035	소나무향	5
3	Myrcene	1058	향긋한 향	3
4	β -Phellandrene	1098	후추향	4
5	Limonene	1122	달콤한 오렌지	3
6	Citronellal	1211	허브향	5
7	Geranial	1217	파인애플향	6
8	Gernal acetate	1363	자몽	1
9	α -copaene	1382	달콤한 오렌지	1
10	Nerol	1485	자몽	4

a) Retention index determined using n-paraffins C7-C22 as references.

b) Aroma description assigned during AEDA.

c) Log₃ (flavor dilution factor).

Table 12. Aroma-active compounds in dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) flash.

NO	Compounds	RI ^{a)}	Odor descriptions ^{b)}	Log ₃ FD factor ^{c)}
1	α -Pinene	1030	소나무향	2
2	Myrcene	1085	향긋한 향	2
3	β -Phellandrene	1108	후추향, 달콤한향	1
4	Limonene	1164	오렌지향	1

a) Retention index determined using n-paraffins C7-C22 as references.

b) Aroma description assigned during AEDA.

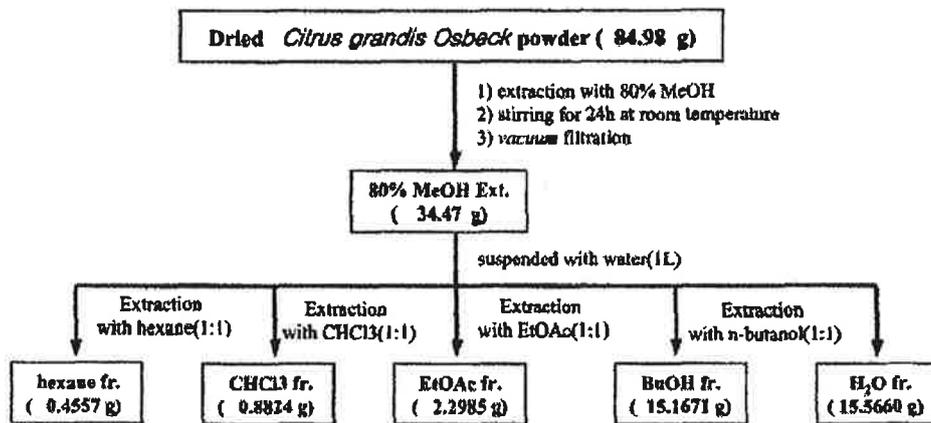
c) Log₃ (flavor dilution factor).

제 4절 당유자 미성숙과 추출물의 기능성 탐색

1. 시료 확보

제주도에서 재배되고 있는 당유자 미숙과를 8월에 채집하여 동결건조 한 후 마

쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료 (84.98 g)를 80% methanol (MeOH) 로 2회 교반 추출 후 여과하여 감압 농축하여 용매를 증발시켰다. 여기에서 얻은 MeOH 추출물 (34.47 g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획 (0.46 g), chloroform 분획 (0.88 g), ethylacetate (EtOAc) 분획 (2.30 g), butanol (n-BuOH) 분획 (15.17 g), H₂O 분획 (15.57 g)을 얻어 실험시료로 사용하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Citrus grandis* Osbeck.

2. 미성숙 분획물의 염증인자 억제 효과

RAW264.7 세포 (1.5×10^6 cells/mL)에 시험 약물과 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, MTT assay 방법을 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, 모든 분획물에서 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 12-a).

LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. 변형된 인간각질형성 세포인 HaCaT 세포에 IFN- γ (10ng/mL)로 케모카인을 유도하고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과, 모든 분획물에서 대조군 흡광도와 대비하여 30% 이하로 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 13).

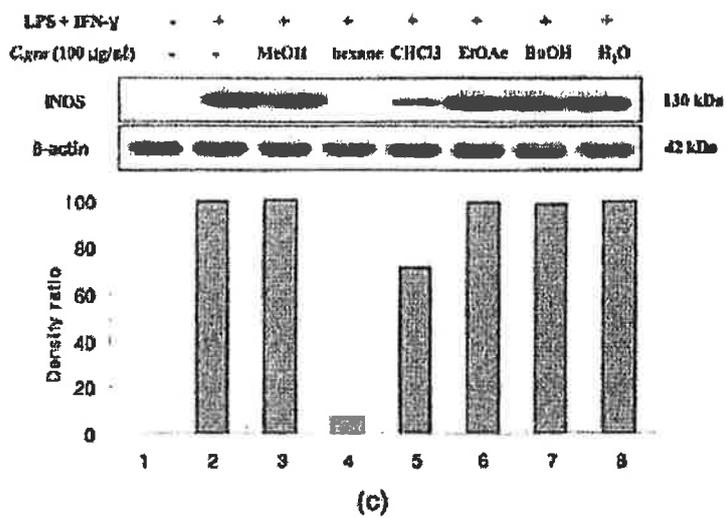
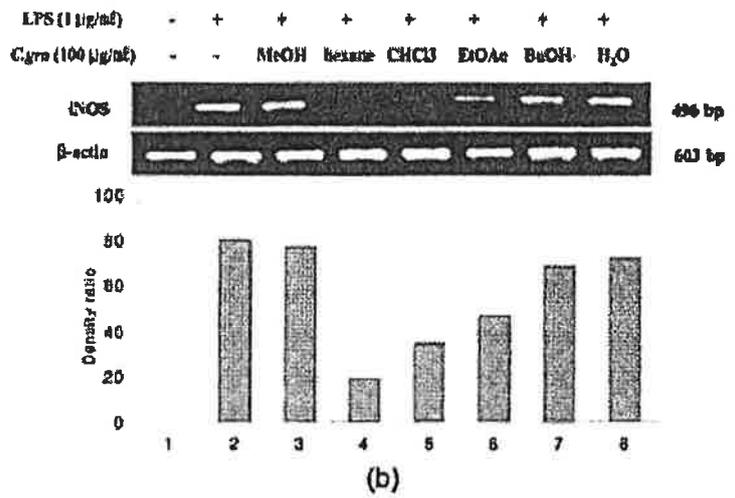
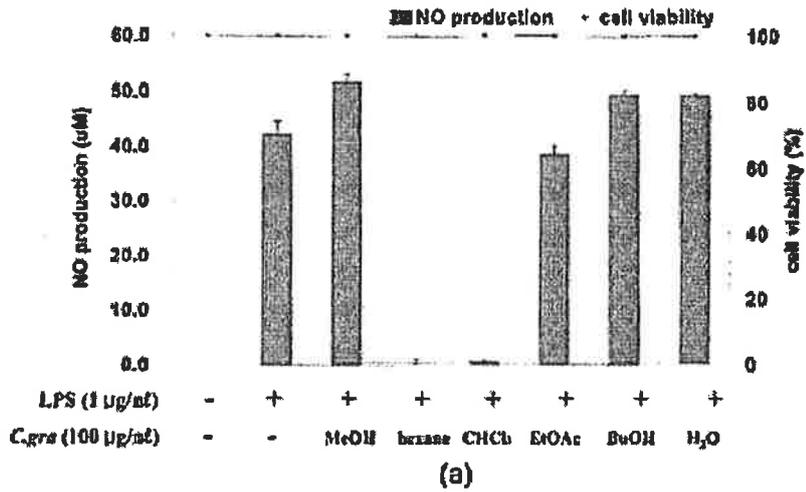


Figure 12. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C.*

grandis on the nitric oxide production and iNOS expression in RAW264.7 cells. (a). The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence of *C. grandis* (100 μ g/mL). Cell viability was determined using MTT method. (b) The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence of *C. grandis* (100 μ g/mL). (c) The protein level of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence of *C. grandis* (100 μ g/mL).

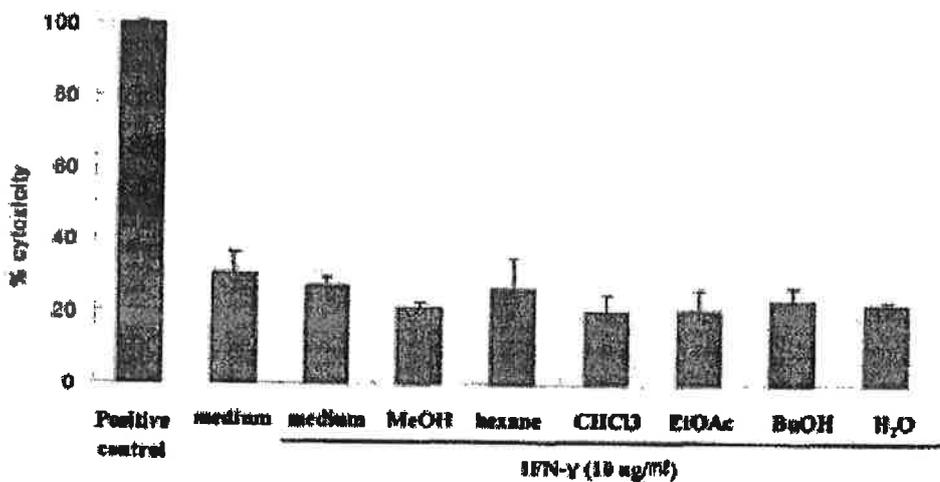


Figure 13. Cytotoxicity effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the LDH release in HaCaT cells. The activity of LDH in the medium was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL). Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments.

1) Nitric Oxide 생성 억제 효과

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 당유자 미숙과 추출물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 실험결과 hexane 분획물 및 chloroform 분획물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 12-a).

2) iNOS 발현에 미치는 영향

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간동안 다량의 nitric oxide(NO)를 생성하며, 생성도니 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.

RAW264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 당유자 추출물에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 iNOS는 현저히 증가하였으며, 당유자 분획물을 처리한 결과 hexane 분획물과 chloroform 분획물이 iNOS의 mRNA 발현을 강하게 억제하였다 (Fig. 13-b). 또한, LPS (1 μ g/mL) 및 INF- γ (50ng/mL)를 사용하여 단백질 발현에 대한 억제정도를 immunoblotting을 통해 알아보았다. 그 결과 단백질 수준에서도 hexane 및 chloroform 분획물이 LPS 및 INF- γ 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 12-c). 이러한 결과는 NO의 생성억제가 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

3) COX-2 발현에 미치는 영향

다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 있는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용하며, 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다. 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)로 자극을 주고 당유자 추출물을 처리하여 확인한 결과, hexane 분획물에서 강한 억제 효과를 보였으며, chloroform 분획물에서는 약한 억제 활성을 보였다 (Fig. 14).

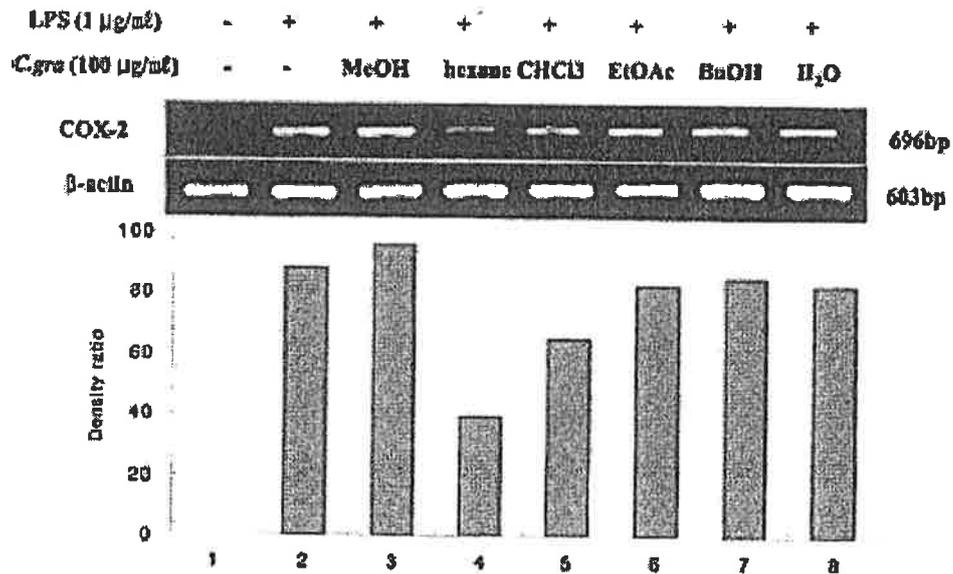


Figure 14. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4) Interleukin-6 생성에 미치는 영향

Pro-inflammatory cytokine인 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다. RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 당유자 추출물을 처리하여 IL-6 생성에 대한 억제 효과를 조사하였다. 당유자 추출물을 처리한 결과 hexane 분획물과 chloroform 분획물에서 강한 억제 효과를 보였다 (Fig. 15).

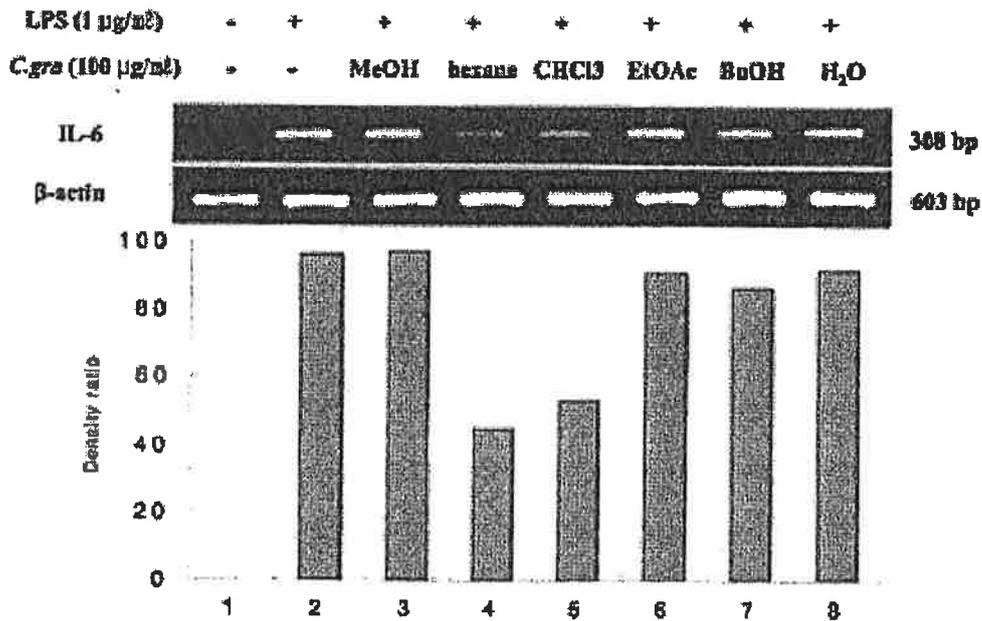
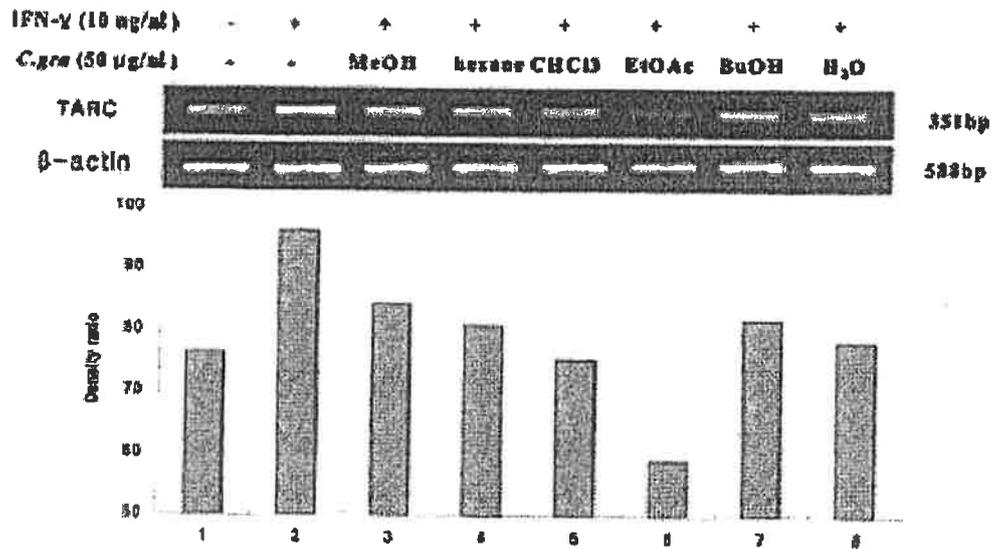


Figure 15. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of IL-6 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

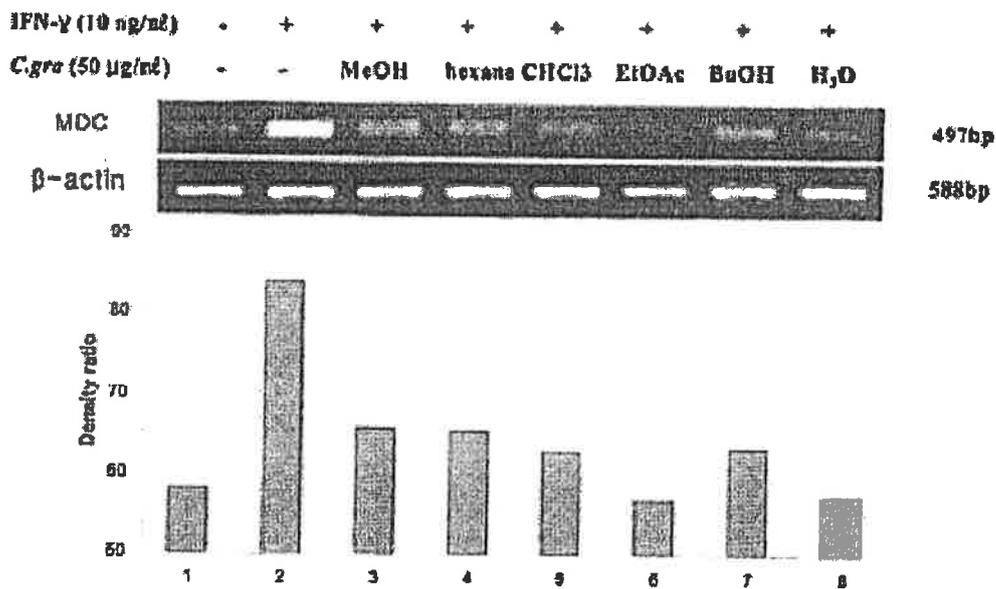
5) TARC 및 MDC 생성에 미치는 영향

각질형성세포는 다양한 사이토카인 (cytokine)과 세포 유착분자 (cell adhesion molecule : CAM)를 통해서 T 림프구와 상호작용을 통하여 여러 가지 피부 질환의 면역 반응에 관여하게 된다. 이러한 반응은 T 림프구에서 분비하는 INF- γ 등의 염증성 사이토카인에 의해서 활성화되며, 최근 INF- γ 가 각질형성세포에서 면역활성 인자로 알려진 TARC 및 MDC 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다. 변형된 각질형성 세포인 HaCaT 세포에 INF- γ (10ng/mL)로 케모카인을 유도하고, 당유자 미숙과 추출물을 처리한 결과, EtOAc 분획물에서 TARC 발현을 현저히 억제시켰으며 (Fig. 16-a), MDC 발현에도 강한 억제 활성을 보였다 (Fig. 16-b).

위의 결과에서 조 추출물 (MeOH ext.)에서 염증성 인자에 대한 억제 활성은 없었으나, 조 추출물로부터 얻은 hexane, chloroform 분획물에서 IL-6, iNOS 그리고 COX-2에 대한 활성을 나타내었으며, EtOAc 분획물에서는 TARC 및 MDC에 활성을 나타내어 활성이 특정 분획으로 집중됨을 확인하였다.



(a)



(b)

Figure 16. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* on the mRNA expression of TARC and MDC in HaCaT cells. The mRNA expression of TARC and MDC were determined from 24 hr culture of cell stimulated with IFN- γ (10ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

3. 미성숙 분획물의 항산화 효능

1) HepG2 세포주에서 DPPH를 이용한 항산화능 측정

DPPH는 화학적으로 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로서 항산화성이 있는 물질과 만나면 전자를 내주어 radical이 소거되어 색이 변한다. 다양한 감귤류 및 당유자 추출물에 DPPH를 처리하여 그 소거능을 520nm에서 측정하였다. 실험결과 당유자 과실 추출물 중에서는 미성숙과에서 높은 radical 소거능을 나타냈으며, 여러 분획별로 비교한 결과 water 분획물과 butanol 분획물에서 농도 의존적으로 높은 radical 소거능을 나타냈다(Fig. 17-18). 또한 당유자 잎 추출물에서는 ethyl acetate 분획물에서 높은 radical 소거능을 나타내었으며, 이를 농도별로 확인한 결과 농도 의존적으로 radical 소거능을 가졌다(Fig. 19).

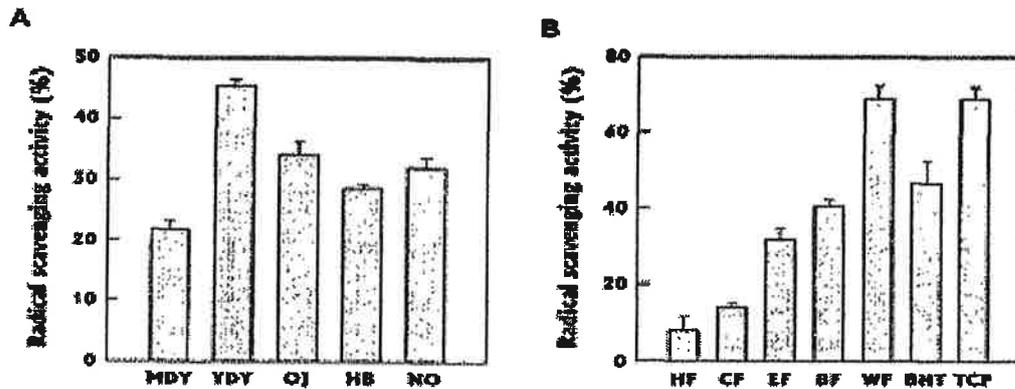


Figure 17. The effects of total extracts from *Citrus* fruits (A) and various solvent-extracted fractions from YDY (B) on scavenging DPPH free radicals. All the extracts, butylated hydroxytoluene, and α -tocopherol were added at 0.5 mg/mL. Values are means \pm SD(n=3). (A) MDY mature *C. grandis* Osbeck; YDY young *C. grandis* Osbeck; OJ *C. unshiu* Marc., HB;[(*C. unshiu* Marc. \times *C. sinensis* Osb.) \times *C. reticulata* Bla.], and NO, *C. sinensis* (B) HF, hexane; CF, chloroform-; EF, ethyl acetate-; BF, butanol-; WF, water extracted fractions; BHT, butylated hydroxytoluene; and TCP, α -tocopherol.

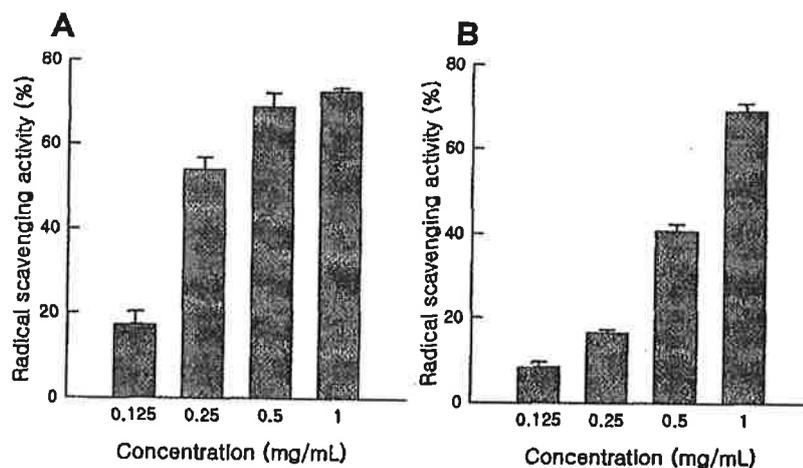


Figure 18. Antioxidant activity of water fraction (A) and butanol fraction (B) at various concentrations as measured by free radical scavenging effects. Values are means SD (n=3).

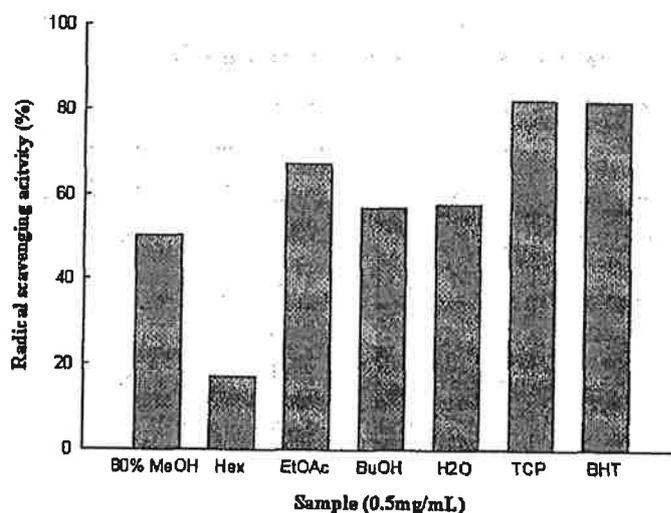


Figure 19. The effects of various solvent-extracted fractions from *dangyuja* on scavenging DPPH free radicals. All the extracts, butylated hydroxytoluene, and -tocopherol were added at 0.5 mg/mL. Values are means SD (n=3). BHT: butylated hydroxytoluene, and TCP: -tocopherol.

2) HepG2 세포 내 ROS 소거능 측정

ROS (Reactive Oxygen Species)는 free radical을 가져 안정되지 못한 상태를 말하며, 그로 인해 강한 활성을 가진다. ROS의 생성은 DCFH-DA법을 이용하여 측정했다. 형광탐색자인 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며, 세포 내의 esterase에 의해 비형광인 DCFH로 전환된다. ROS의 존재 시 기질인 DCFH가 ROS와 반응하여 생성되는 DCF의 형광도를 측정하여 ROS의 생성을 측정한다. 실험 결과, HepG2 배양에 있어서 H₂O₂ 또는 t-BOOH에 의해 유도된 ROS 생성이 당유자 미성숙과의 water 분획물, butanol 분획물(Fig. 20) 그리고 당유자 잎의 ethyl acetate 분획물에 의해 감소되었다 (Fig. 21).

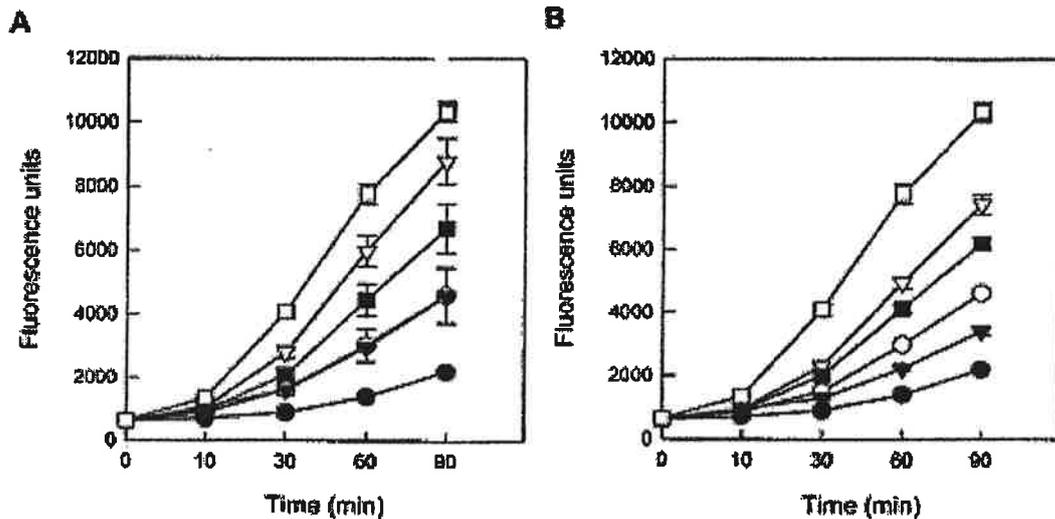


Figure 20. Effect of young dangyuja fruit extracts on H₂O₂-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in HepG2 cells. Water fractions (A) and butanol fractions (B) and then incubated with 1mM H₂O₂ for the indicated period of time. Values are presented as means ± SD(n=4). □, 1mM H₂O₂ only; ▽, 62.5 ug/mL; ■, 125 ug/mL; ○, 250 ug/mL; ▼, 500 ug/mL; ●, unstressed control.

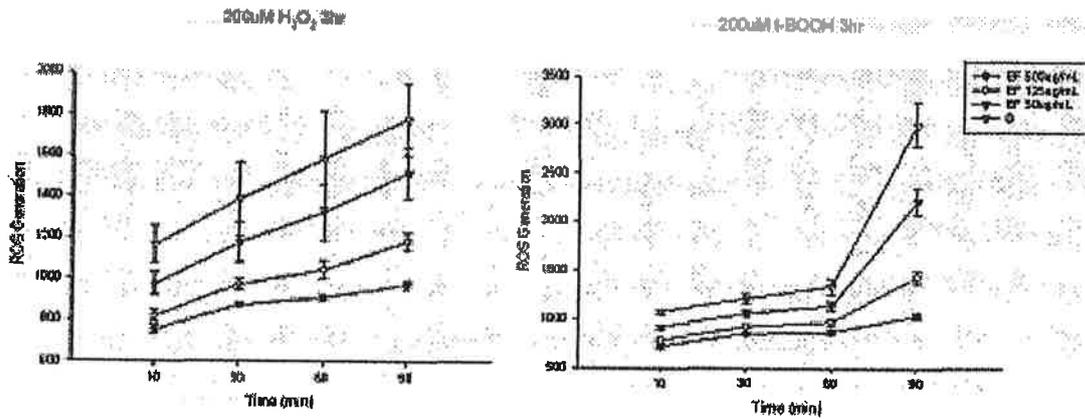


Figure 21. Effect of *dangyuja* leaf extracts on H₂O₂ and t-BOOH induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in HepG2 cells. Cultures were treated for 30 min with the noted concentrations of EtOAc-extracted fractions and then incubated with 200uM H₂O₂ or t-BOOH for the indicated period of time. Values are presented as means ± SD (n=4)

3) Lipid peroxidation inhibitory capacity

96 well-microtit plate에 HepG2 세포주를 배양한 후 당유자 미숙과 부탄올분획과 물층 분획을 농도별로 1시간 반응시킨 후 1 mM 농도의 과산화수소를 1 시간 동안 처리한다. Lipid peroxides가 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)을 형성함으로써 분홍색을 나타내는 성질을 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

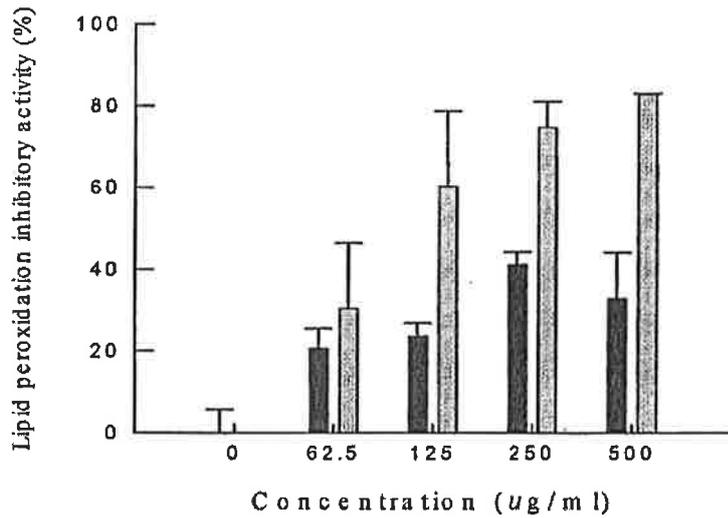


Figure 22. Lipid peroxidation inhibitory activity of young Danyuza fruit extracts against H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells. Each experiment was performed at least 4 times and values are expressed at average percent change from control \pm S.D. Black and grey bar indicated the noted concentrations of water fractions and butanol fractions, respectively.

4. 골다공증 억제 효능

조골세포주인 MG-63세포에 IL-1 β 로 골다공증성 인자인 IL-6 발현을 자극하고 미성숙과 조추출물 및 용매분획을 처리한 결과 당유자 시료의 IL-6 발현 억제 활성이 다소 미약하였다 (Fig 23).

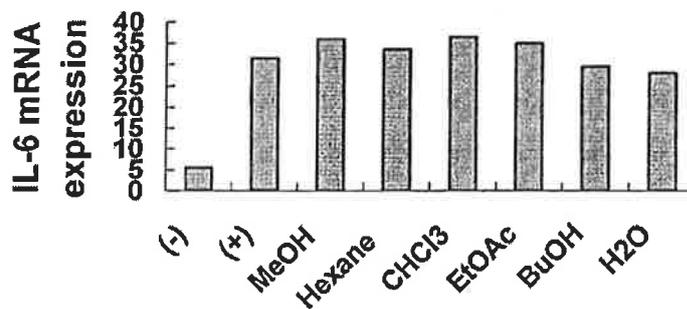
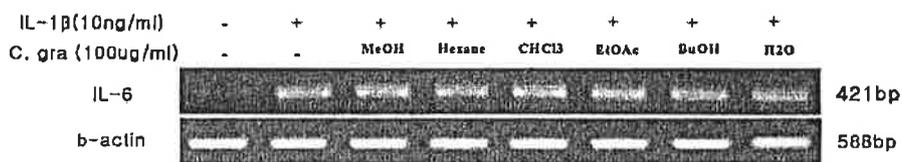


Figure 23. The inhibitory effects of *C. gra* crude extract and solvent fractions on IL-6 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4×10^5 cells/mL) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated by IL-1 β (10 ng/mL) in the presence of *C. gra* crude extract and solvent fractions (100 μ g/mL).

5. 숙취제거 효능

숙취는 술을 마신 후에 나타나는 두통, 설사, 식욕부진, 오심, 구토, 오한, 식은땀을 뜻하며 객관적인 증상으로는 인식, 운동 능력 저하, 혈액학적 변화 및 호르몬 변화로 정의할 수 있다(Wiese JG. et al., 2000). 체내의 알코올은 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의해 아세트알데히드가 되고 다시 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 산화되어 acetic acid로 되고 일부는 노나 CO₂로 배설된다. 알코올은 섭취량에 따라 간 대사에 여러 가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 알코올 그 자체보다도 산화과정에서 생성된 아세트 알데히드와 NADH가 간세포에 손상을 가져오게 된다. 체내에 과량의 알코올이 섭취된 경우 알코올의 분해산물로 생성된 아세트알데히드는 뇌로 전해져 많은 유해화합물로 바뀌어 맥박의 증가나 발한, 홍조, 오심, 구토 등의 증상을 초래할 수 있다. 간에서 알코올의 대사율은 ADH와 ALDH의 활성에 영향을 주는 요인들에 의해 조절된다. 따라서 본 연구에서는 당유자의 알코올 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 S9 rat liver homogenate를 효소원으로 사용하여 ADH의 활성을 측정하였다.

1) ADH의 활성 측정 방법 (*in vitro*)

ADH의 활성 측정은 Blandino의 방법 (Bostian. et a., 1978)을 변형하여 측정하였으며, 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성 속도를 지표로 사용하였다. 반응액의 조성은 증류수 1.4mL, 1.0M Tris-HCl Buffer (pH 8.8) 0.75mL, 20mM NAD⁺ 0.3mL, ethanol 0.3mL, sample 0.1mL의 혼합액과 효소원 0.15 mL를 유리튜브에 넣어 총 3mL이 되도록 조절하여 37°C에서 5분간 preincubation 한 후, 5분간 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였다. 시료의 ADH 활성은 control에 대한 상대 활성(%)으로서 측정하였다.

2) ADH 활성 측정 결과

① 성숙과의 ADH활성

성숙과에서의 ADH활성을 측정한 결과 1 mg일 때는 control에 비하여 약간 상승(102%) 하였으나, 0.1 mg일 때는 오히려 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 우리가 흔히 섭취하는 것은 성숙과인데 성숙과의 조리과정 즉 끓이거나, 꿀에 재우는 등의 과정을 통하여 숙취해거 효과가 증가되는지에 대한 조사가 다음년도에 되어져야 할 것으로 사료된다.

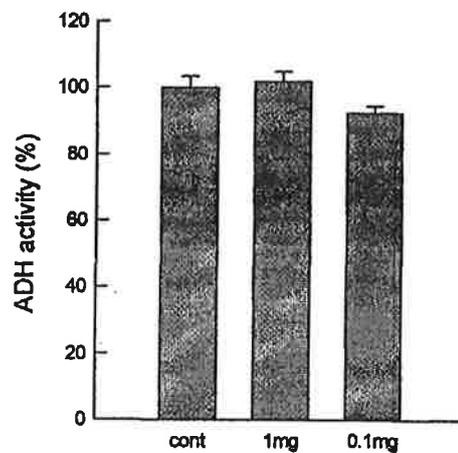


Figure 24. Effect of adult Danyuza fruit extracts on ADH activity. Each experiment was performed at least 3 times and values are expressed at average percent change from control \pm S.D.

② 미성숙과의 ADH활성

미성숙과에서의 ADH 활성을 측정한 결과 control에 비하여 126 %라는 월등한 효과가 나타났다. 이는 성숙과보다 미성숙과에 숙취해소에 좋은 생리활성 성분이 함유되어있다고 사료된다.

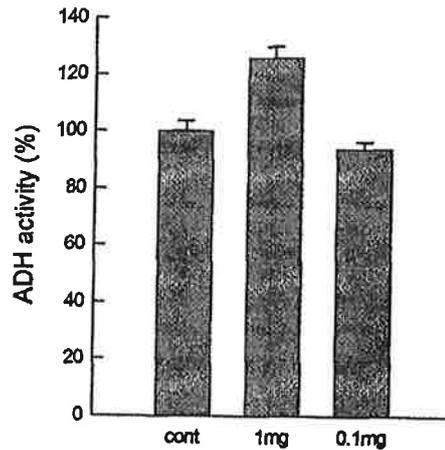


Figure 25. Effect of young Danyuza fruit extracts on ADH activity. Each experiment was performed at least 3 times and values are expressed at average percent change from control \pm S.D.

6. 당유자 미성숙 핵산 분획물의 암세포의 사멸 효능

1) 미성숙 당유자과의 용매분획에 따른 U937 세포의 생존률 분석 - MTT 분석

MeOH가 함유된 배지에 미성숙 당유자과의 핵산 분획, CHCl_3 분획, 에탄올 아세테이트 분획, 부탄올 분획 및 H_2O 분획을 각각 첨가하되, 상기 각각의 용매 분획의 농도는 25, 50, 100 및 $200\mu\text{g/mL}$ 로 하여, 조직구 림프종 세포인 U937 세포를 4일 동안 배양한 다음, MTT(Sigma, USA) 0.1mg 을 각각의 웰에 첨가하고 4시간 동안 37°C 에서 추가로 배양하였다. 배양 후, 웰을 실온에서 20분 동안 2500rpm 으로 원심분리하고, 배양액은 제거하고, 형성된 포마르잔(formazan) 결정을 DMSO 150 mL 에 용해시킨 다음, Micro reader(Sunrise, 호주)를 이용하여 540nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

MTT 분석 결과, 미성숙 당유자과의 핵산 분획 및 CHCl_3 을 첨가한 배지에서 배양된 U937 세포 생존률이 급격히 감소하였으며, 이로 인해 당유자과의 핵산분획(이하, HFYD) 및 CHCl_3 분획이 U937 세포의 사멸을 유발한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 26).

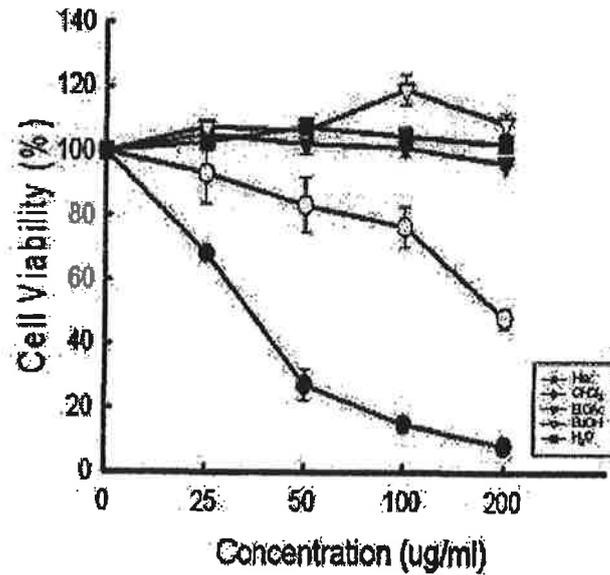


Figure 26. Viability of U-937 cells treated with immature dangyuja fruits

2) HFYD에 의한 세포 생존률 분석-MTT 분석

U937, HCT-15, Hep-G2, MCF-7, NCI-H460 및 SNU-16 세포의 생존률에 대하여 HFYD가 미치는 영향을 MTT 분석으로 조사하였다.

대수기(exponential phase)의 상기 암세포를 각각 수집하여, 각각의 웰(well)(약 10^4 - 10^5 세포/ $180\mu\text{L}$ 웰)로 옮겨 담았다. 상기 암세포마다 HFYD를 각각 25, 50, 100 및 $200\ \mu\text{g/mL}$ 로 첨가한 후, 4일 동안 배양한 다음, MTT(Sigma, USA) 0.1mg 을 각각의 웰에 첨가하고 4시간 동안 37°C 에서 추가로 배양하였다.

암세포 배양 후, 웰을 실온에서 20분 동안 2500rpm 으로 원심분리하고, 배양액은 제거하고, 형성된 포마르잔(formazan) 결정을 DMSO $150\ \text{mL}$ 에 용해시킨 다음, Micro reader(Sunrise, 호주)를 이용하여 540nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

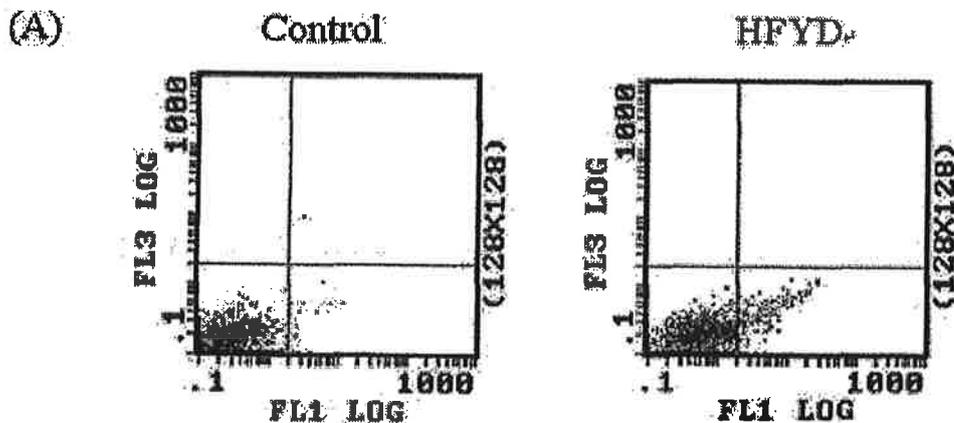
표 1에 나타난 바와 같이, MTT 분석 결과, HFYD가 첨가된 배지에서 배양된 세포의 생존율은 세포 종류에 따라 다르게 나타났고, 그에 따라, IC_{50} (세포 생존률 50%일 때 HFYD의 농도) 수치도 확연히 다르며, 특히 HFYD는 U937에 대하여 가장 독성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Table 13. Inhibitory effects of HFYD on the growth of human cancer cells

세포명	특징	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
U937	조직구 림프종 세포	59.57
HepG2	간모세포종 세포	131.45
HeLa	자궁암 세포	286.52
HCT-15	대장암 세포	86.55
MCF-7	유방암 세포	143.76
NCI-H460	폐암 세포	72.67
SNU-16	위암 세포	90

3) 세포사멸 소체 관찰

U937 세포를 1.0×10^5 세포/mL 농도로 24 웰 플레이트로 옮겼다. 플레이팅 후 16시간 뒤, 상기 세포를 3시간 동안 HFYD로 처리하고, 16시간 경과 후, DNA-특이적 형광 염료인 10mg/mL Hoechst 33342 1.5 μL 를 각 웰의 용액 1.5mL에 첨가한 다음, 상기 웰 플레이트를 37°C에서 10분 동안 배양하였다. 상기 형광 염료로 염색된 세포를 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 관찰하였다. 관찰 결과, HFYD 처리하여 배양한 U937 세포에 세포사멸 소체가 형성된 것을 확인하였으며, 이로 인해 HFYD가 U937 세포의 사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 27-B).



(B)

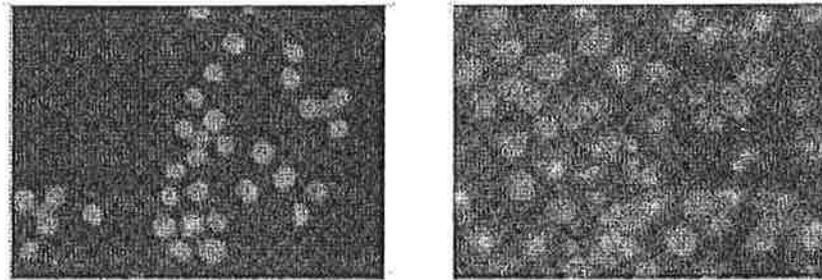


Figure 27. The apoptotic patterns of U937 cells treated with immature dangyuja hexane fraction (IDH). (A) Dot-plot of Annexin V-FITC vs. propidium iodide, apoptotic cells (%) are localized in the lower right quadrant. U937 Cells were treated with HFYD 60 g/mL for 3 h, 6 h and then incubated with annexin V-FITC and propidium iodide. (B) Morphological changes (magnification: 200x), cells were treated with DMSO alone or 60 g/mL of HFYD for 16h and then stained with Hoechst 33342 and examined by fluorescence microscope.

4) DNA 분절현상 관찰

U937(1×10^5 cells/mL)을 24시간 동안 0, 25, 50, 100 및 200 μ g/mL의 HFYD로 처리한 다음, 게놈 DNA를 DNA 정제키트(Wizard Genomic DNA purification kit, Promega, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA 4mg을 전기영동하여 확인하였다.

그 결과, 세포사멸의 특징인, 뉴클레오솜 내의 DNA 파괴로 인한 전형적인 사다리 패턴(ladder pattern)를 확인할 수 있었고, 상기 결과는 HFYD가 U937 세포의 세포사멸을 유도한다는 것을 나타낸다 (Fig. 28).

0 25 50 100 200 (μ g/ml)

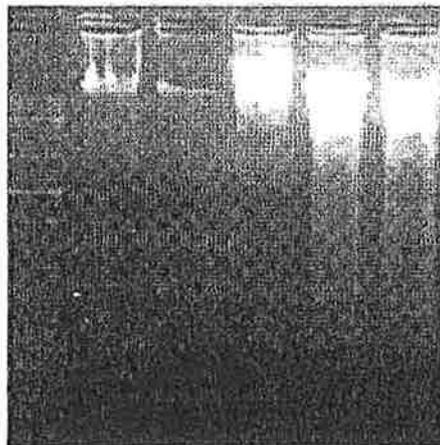


Figure 28. Effect of immature dangyuja hexane fraction (IDH) on DNA fragmentation detected by agarose gel electrophoresis. U937 cells were treated with the different concentration during 24 h. Genomic DNA was extracted using a genomic DNA extraction kit, and DNA was electrophoresed on a 1.8% agarose gel and visualized under ultraviolet light.

5) 포스파티딜세린 외부화(Phosphatidylserine Externalization) 분석

U937 세포(2×10^5 세포/mL)를 3시간 동안 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 HFYD로 처리하고, Annexin V-결합 완충액(10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl 및 5 mM CaCl_2) $100 \mu\text{L}$ 에 현탁한 다음, Annexin V-FITC(BD Bioscience, NJ, USA) 및 형광물질인 프로피디움 아이오다이드(PI: propidium iodide)를 첨가하여 최종 농도 $5 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 하였다. 이후, 상기 세포를 암실에서 실온하에 15분 동안 배양하고, 바인딩 버퍼 $300 \mu\text{L}$ 로 희석한 다음, EPICS-XL FACScan flow cytometer(Coulter, Miami, FL, USA)를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 수행하였다.

이때, Annexin V에 대해서는 양성(positive)이지만 PI 형광에 대해서는 음성(negative)을 나타내는 세포가 세포사멸 세포이다 (Zhong WB *et al.*, *Anticancer Drugs* 14, 211:217, 2003).

유세포 분석 결과, HFYD를 처리한 U937 세포에서의 세포사멸 세포의 비율은 HFYD를 처리를 하지 않은 대조군보다 증가하였고 (Fig. 27-A), 결국, HFYD는 U937 세포의 세포사멸에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

6) HFYD 처리에 의한 Bcl-2 및 Bax의 발현 변화분석

HFYD 처리한 U937 세포를 수확하여, 세포사멸 관련 유전자인 Bcl-2 및 Bax의 발현을 RT-PCR로 측정하였다.

RNA를 TRI-zol(Invitrogen, USA)을 사용하여 세포에서 추출하였다. 상기 RNA의 흡광도는 Sambrook 등에 의한 방법(Sambrook JE *et al.*, *In Molecular Cloning Laboratory Manual(2nd ed.)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America, 7:8, 1989)으로 측정하였다.

PCR 반응은 하기 프라이머를 사용하여 수행하였다. Bcl-2의 프라이머(서열번호 1 및 서열번호 2) 및 Bax의 프라이머(서열번호 3 및 서열번호 4)를 이용하여 수행하였고, 대조군인 GAPDH의 증폭을 위하여(서열번호 5 및 서열번호 6의 프라

이머)를 사용하였다.

서열번호 1: 5'-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3'
서열번호 2: 5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'
서열번호 3: 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'
서열번호 4: 5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'
서열번호 5: 5'-GAAGGTGA AGGTCGGAGTC-3'
서열번호 6: 5'-GAAGATGGTGATGGGA TTTC-3'

상기 Bcl-2, Bax 및 GAPDH의 증폭된 분획의 단편을 전기영동으로 관찰하였으며, 단편의 크기는 각각 292 bp(Bcl-2), 364 bp(Bax) 및 226 bp(GAPDH)이었다. 항세포사멸 단백질(antiapoptotic protein)인 Bcl-2의 발현은 시간의 경과에 따라 점진적으로 감소하고, 세포사멸유도 단백질(pro-apoptotic protein)인 Bax의 발현은 변화가 없음을 관찰하였다 (Fig. 29).

결국, HFYD는 항세포사멸 단백질인 Bcl-2의 발현을 억제함으로써, 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

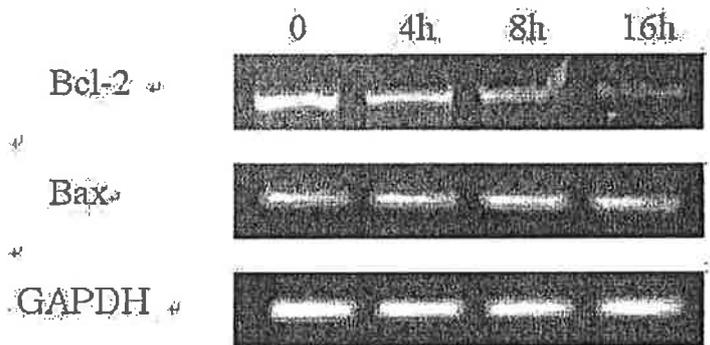


Figure 29. Effect of IDH on gene expression of Bcl-2 and Bax. Expression of GAPDH was used as an internal control. U937 cells treated IDH (60µg/mL) for time course (A). U937 cells treated IDH(24hr) for dose dependent (B).

7) 웨스턴 블랏(western blot) 분석을 이용하여 HFYD 처리한 Bcl-2 및 Bax의 발현 관찰

HFYD 처리한 세포를 수집하여 차가운 PBS로 두 번 세척한 후, 세포용해 완충액(lysis buffer) [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM

dithiothreitol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin] 에 용해시키고 30분 동안 냉장 상태로 두었다. 이후, 세포 용해물을 20분 동안 4°C에서 12,000 RPM으로 원심분리하고, 상층액의 세포 용해물(단백질 30-50 μg)의 분해를 8-12% SDS-폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동시킨 후, 겔 상의 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인(BIO-RAD, HC, USA)으로 트랜스퍼시켰다. 5% 탈지 건조유제(nonfat dried milk)를 이용하여 비특이적 부위를 차단한 후에, 상기 멤브레인을 일차 항체인 카스파제 3(primary antihuman caspase 3) 항체, 폴리 ADP 리보실 폴리머라제(PARP: Poly ADP Ribosyl Polymerase) 항체, Bcl-2 항체 및 Bax 항체(Cell signaling, MA, USA)를 이용하여 반응시키고, 퍼옥시다제가 접합된 이차 항체(1:5000, Vector, CA, USA)로 추가로 반응시켰다. 상기 PVDF 멤브레인을 X선 필름에 노출시키고, 상기 단백질 밴드를 관찰하였다.

그 결과, 항세포사멸 단백질(antiapoptotic protein)인 Bcl-2의 발현은 시간의 경과에 따라 점진적으로 감소하고, 세포사멸유도 단백질(pro-apoptotic protein)인 Bax의 발현은 변화가 없음을 확인하였다 (Fig. 30). 결국, HFYD는 항세포사멸 단백질인 Bcl-2의 발현을 억제함으로써, 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

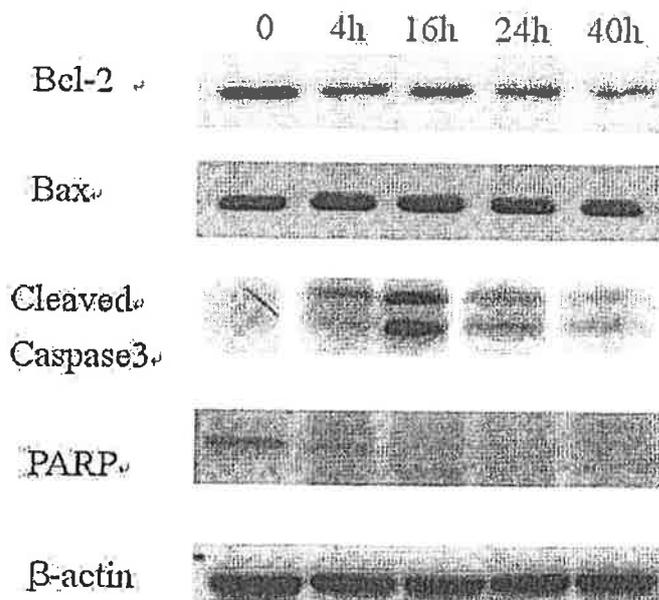


Figure 30. Western blotting analysis of Bcl-2, Bax, activation of Caspase-3 and cleaved of PARP in IDH treated U937 cells. U937 cells were cultured with IDH at 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the 24 h. Cells were lyzed with lysis buffer and protein was subjected to SDS-PAGE. The gel was transferred to a PVDF

membrane and the membrane was incubated with anti Bcl-2, -Bax,-Cleaved Caspase 3 and PARP as primary antibodies and then goat anti Rabbit IgG conjugated with horse radish peroxidase as a secondary detection antibody.

8) 카스파제-3(caspase-3) 활성 변화분석

U937 세포를 24시간 동안 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 HFYD로 처리한 후 세포 용해 완충액에 용해시켜 혼합물을 생성시켰으며, 이때, 기질은 DEVD-pNA(*p*-nitroanyline)를 사용하였다. 상기 혼합물을 37°C의 습한 상태에서 밤새 배양한 후, 방출된 pNA의 농도를 측정하였다.

그 결과, HFYD의 농도가 증가할수록, 방출된 pNA의 농도가 증가하여, pNA를 분해하는 효소인 카스파제-3의 활성이 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 31).

HFYD의 농도가 증가함에 따라 카스파제-3의 활성도 증가하며, 이때, 카스파제-3은 단백질 분해를 통하여 세포사멸을 촉진하는 효소이므로, 결국, HFYD는 카스파제-3의 활성을 증가시켜 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

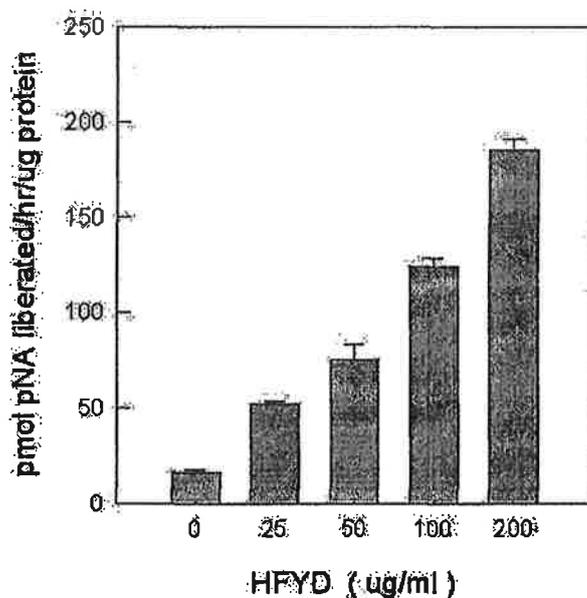
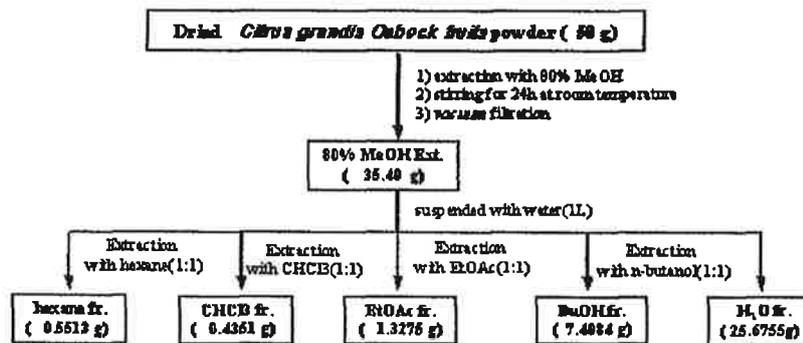


Figure 31. Dose-dependent caspase-3 activity in U937 cells treated with IDH. The rate of DEVD-pNA cleavage was measured at 405 nm. IDH was treated at 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Results are presented as mean \pm SE. The experiments were done in triplicate. * $P < 0.05$ compared with control.

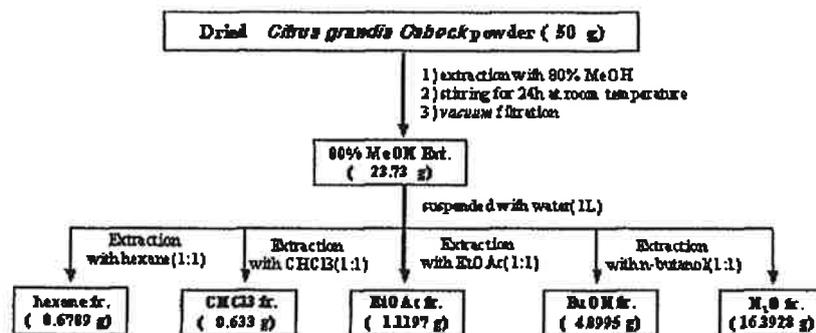
제 5절 성숙과 부위(통과, 과피, 내피)별 분획물 확보 및 생리활성 평가

1. 계통적 용매 분획물 확보

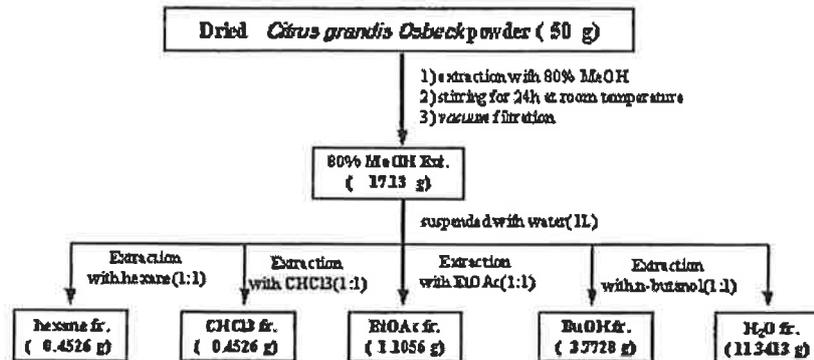
당유자의 부위별 활성을 비교하기 위하여 성숙과의 통과, 과피, 내피에 대한 조추출물(80% MeOH 분획)을 얻고 이에 순차적으로 Hex, CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O를 처리하여 각 용매에 대한 가용분획을 얻었다.(Scheme 2-4)



Scheme 2. Systematic purification using solvent partitioning from *Citrus grandis* Osbeck fruits.



Scheme 3. Systematic purification using solvent partitioning from pericarp of *Citrus grandis* Osbeck peels.



Scheme 4. Systematic purification using solvent partitioning from *Citrus grandis* Osbeck endodermis.

2. 염증억제효능 평가

1) iNOS 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 당유자 부위별 시료에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 iNOS는 현저히 증가하였으며, 당유자의 잎, 통과, 외피, 내피 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 잎과 통과의 chloroform 분획물이 iNOS 발현을 억제하였으며, 과피의 hexane 분획은 활성농도에서 세포독성을 나타내었다 (Figure 32-34).

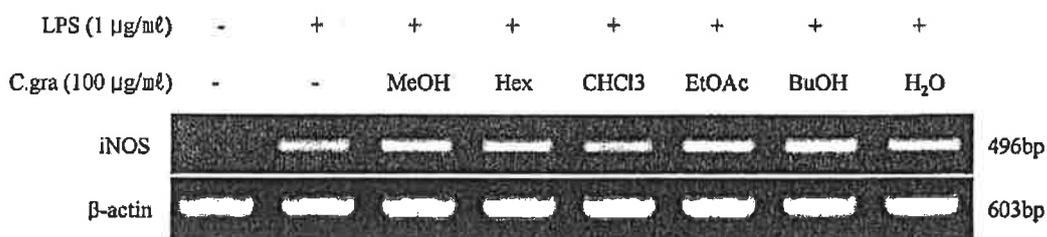


Figure 32. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruits on the mRNA expression of iNOS in RAW264.7 cells. The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

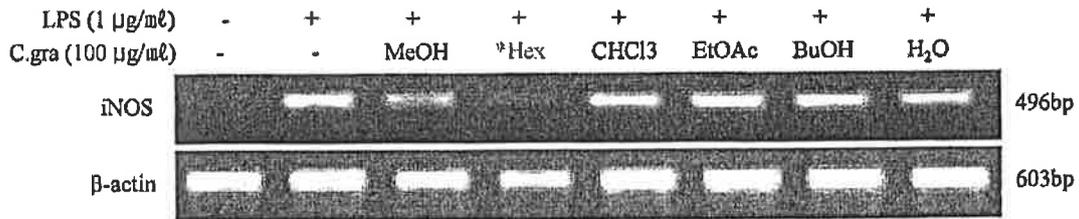


Figure 33.. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of iNOS in RAW264.7 cells. The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
*cytotoxicity

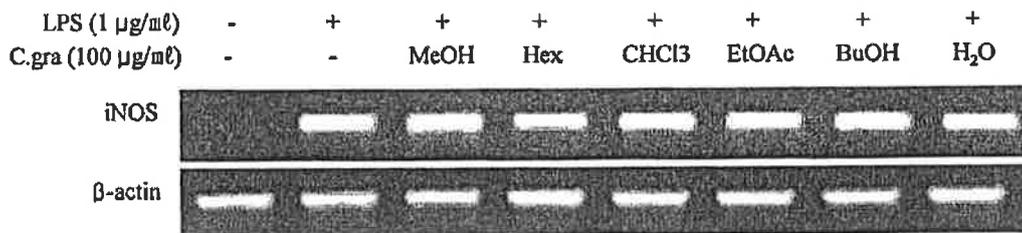


Figure 34.. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit endodermis on the mRNA expression of iNOS in RAW264.7 cells. The mRNA expression of iNOS was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2) Cox-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 당유자 부위별 시료에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아 보았다. LPS 에 의해 COX-2는 현저히 증가하였으며, 당유자의 통과, 외피, 내피 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 과피의 hexane 분획물이 COX-2 발현을 억제하였으며, 과피의 경우 활성을 보이는 농도에서 세포독성을 나타내었다. (Figure 35-37).

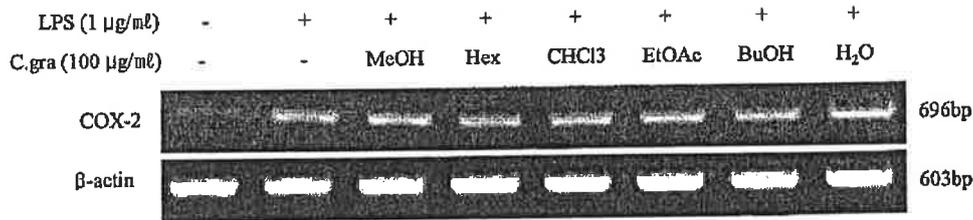


Figure 35. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruits on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL).

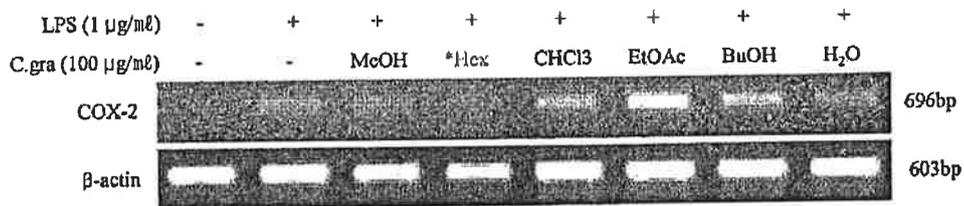


Figure 36. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL). *cytotoxicity

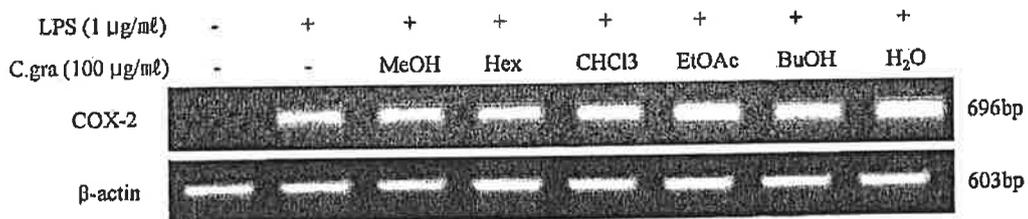


Figure 37. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit endodermis on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL).

3) Interleukin-6 생성에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)를 사용하여 IL-6의 생성을 유도한 후 당유

자 부위별 시료에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS 에 의해 COX-2는 현저히 증가하였으며, 당유자의 통과, 과피, 내피 분획물을 100µg/mL 농도로 처리하였을 때 통과와 EtOAc 분획, 과피의 hexane, chloroform 분획물이 IL-6 발현을 억제하였으나, hexane 분획은 활성농도에서 독성을 나타내었다. (Figure 38-40).

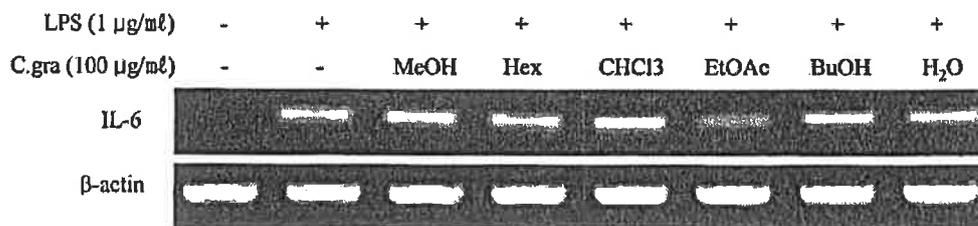


Figure 38. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruits on the mRNA expression of IL-6 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL).

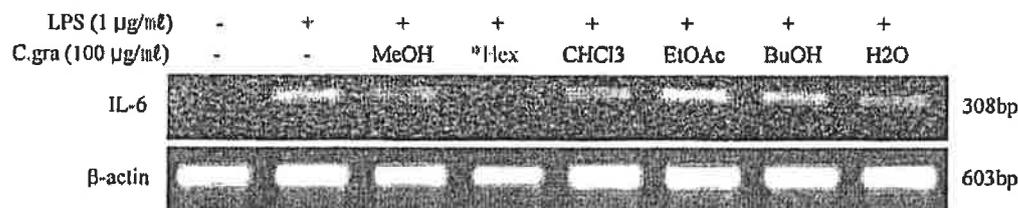


Figure 39. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of IL-6 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL).

*cytotoxicity

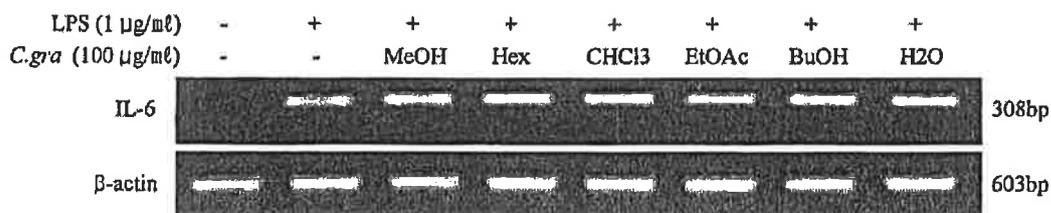


Figure 40. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit endodermis on the mRNA expression of IL-6 in RAW264.7 cells. The mRNA expression of IL-6 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* (100 µg/mL).

g/mL).

4) MDC 및 TARC 생성에 미치는 영향

각질형성 세포인 HaCaT 세포에 IFN- γ (10 ng/mL)로 케모카인을 유도하고, 당유자 부위별 시료에 의한 케모카인의 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. 당유자의 통과, 과피, 내피 분획물을 50 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 잎의 EtOAc 분획분획물이 MDC 및 TARC 발현을 강하게 억제하였다. (Figure 41-46).

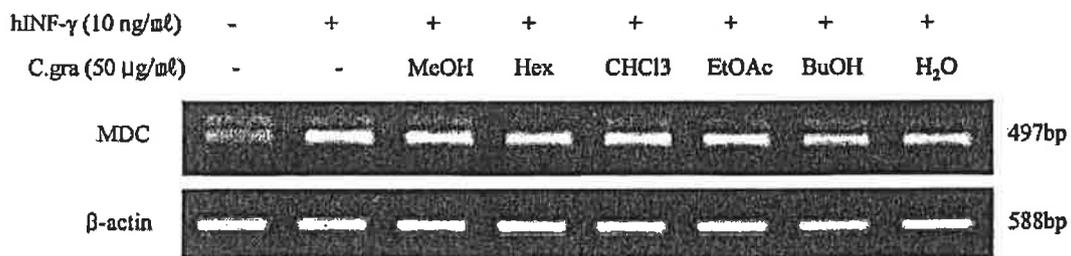


Figure 41. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruits on the mRNA expression of MDC in HaCaT cells. The mRNA expression of MDC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

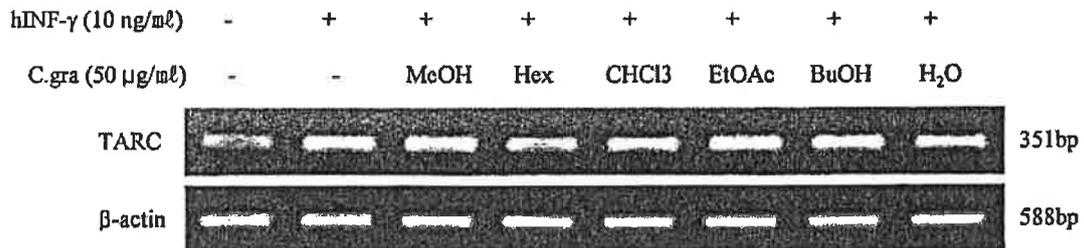


Figure 42. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of TARC in HaCaT cells. The mRNA expression of TARC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

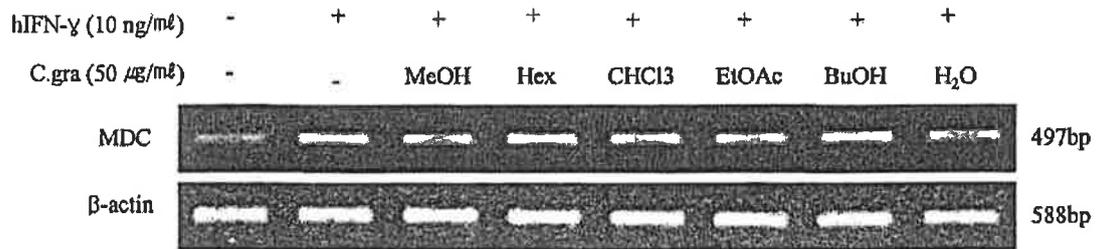


Figure 43. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of MDC in HaCaT cells. The mRNA expression of MDC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

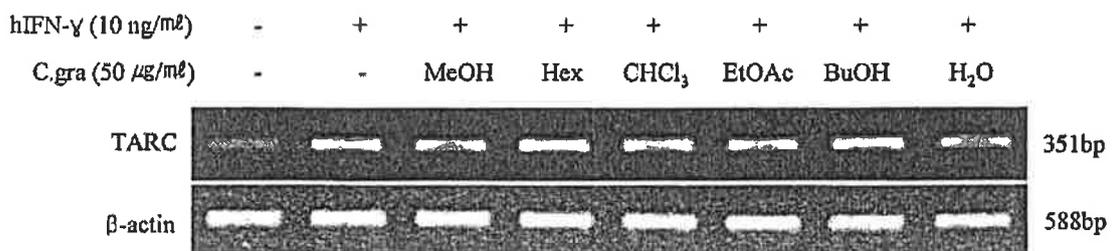


Figure 44. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the mRNA expression of TARC in HaCaT cells. The mRNA expression of TARC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

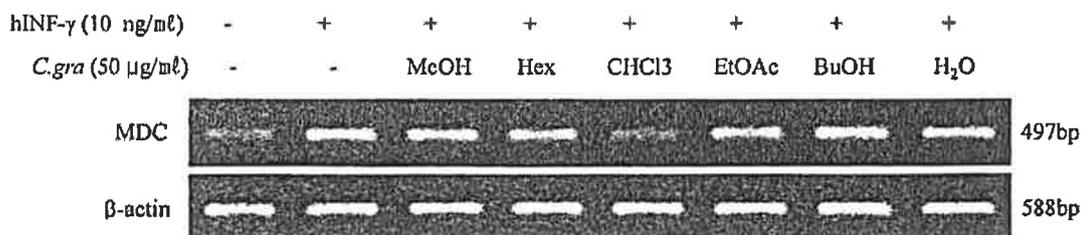


Figure 45. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit endodermis on the mRNA expression of MDC in HaCaT cells. The mRNA expression of MDC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

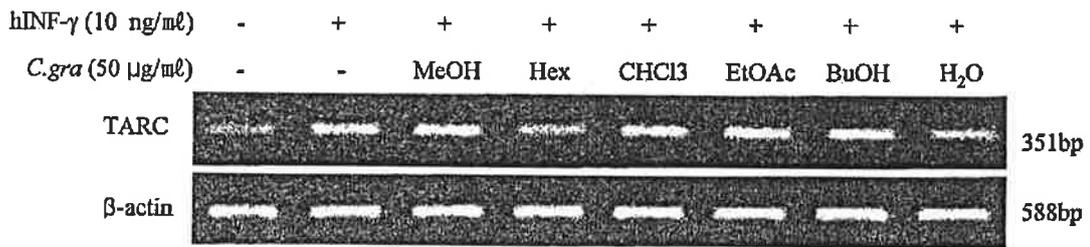


Figure 46. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit endodermis on the mRNA expression of TARC in HaCaT cells. The mRNA expression of TARC determined from the 24 hr culture of cells stimulated with IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *C. grandis* (50 μ g/mL).

5) Nitric oxide 생성억제 효과

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 당유자 부위별 추출물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 실험결과 과피의 hexane 분획물과 chloroform 분획물에서 높은 NO 생성 억제효과를 나타내었으나 hexane 분획물의 경우 활성농도에서 세포독성을 나타내었다 (Fig.47-49).

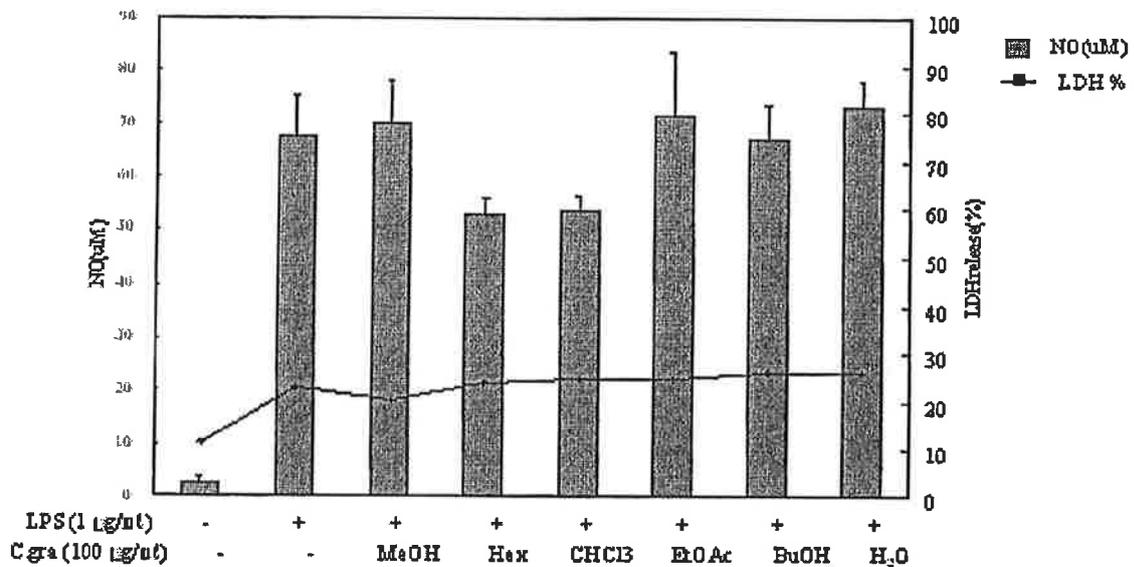


Figure 47. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruits on the nitric oxide production in RAW264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells

stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g/mL}$). Cytotoxicity was evaluated from LDH release at the same condition.

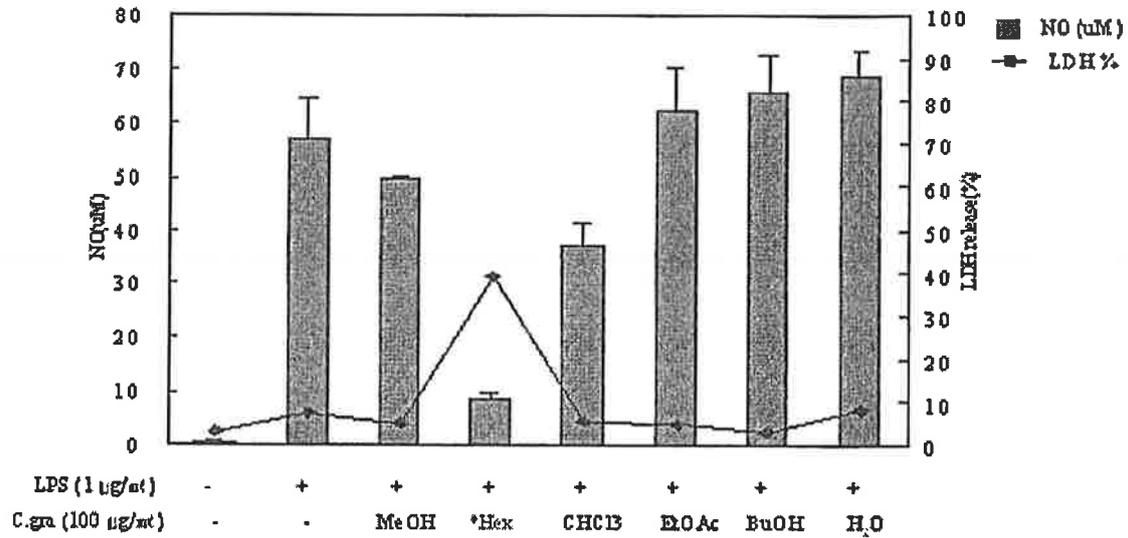


Figure 48. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C. grandis* fruit peels on the nitric oxide production in RAW264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g/mL}$). Cytotoxicity was evaluated from LDH release at the same condition. *cytotoxicity

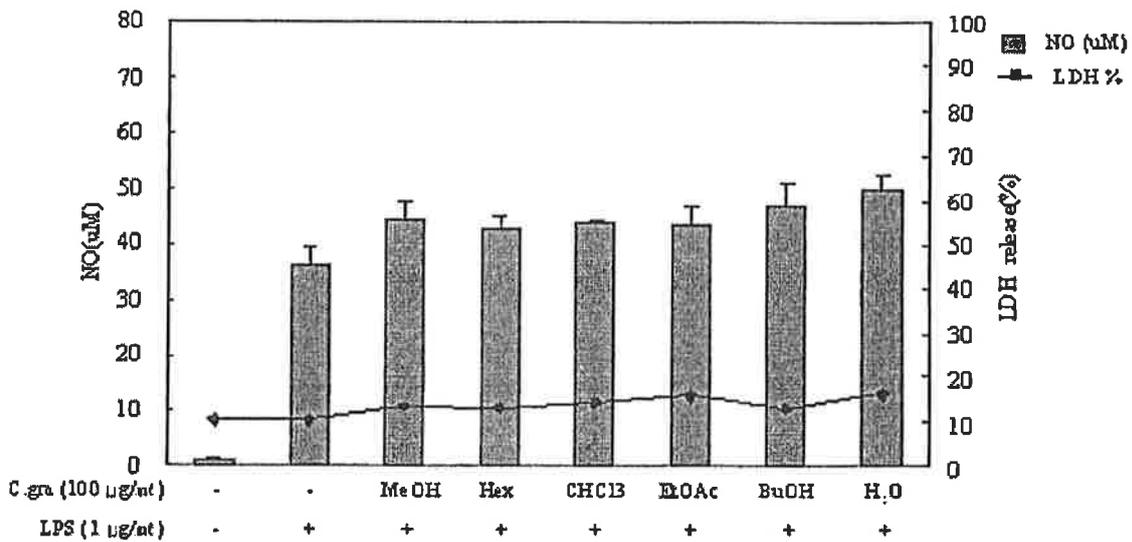


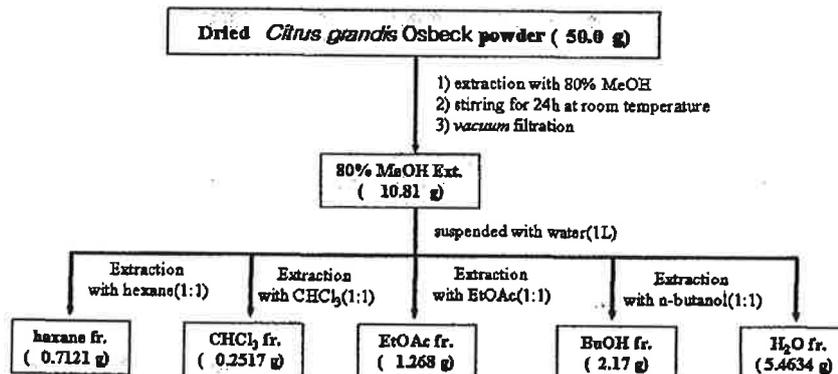
Figure 49. Inhibitory effect of crude extract and solvent fractions of *C.*

grandis fruit endodermis on the nitric oxide production in RAW264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity was evaluated from LDH release at the same condition.

제 6절 당유자 잎의 생리활성 탐색

1. 계통적 용매 분획물 확보

당유자 잎에 대한 조추출물(80% MeOH 분획)을 얻고 이에 순차적으로 hexane(Hex), chloroform(CHCl_3), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH), H_2O 를 처리하여 각 용매에 대한 가용분획을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 5. Systemtic purification using solvent partitioning from *Citrus grandis* Osbeck leaves

2. 당유자 잎의 염증인자 억제효과

1) Nitric oxide 생성 억제 효과

체내 염증 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 당유자 잎 추출물의 효과를 조사하였다. RAW 264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 당유자 잎 분획물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 동시처리 하고, 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다.

그 결과 LPS에 의해 NO의 생성은 현저하게 증가 하였으며, 당유자 잎 분획물을 처리하였을 때 CHCl_3 분획물이 NO의 생성을 강하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었으며, Hex 분획물은 세포독성이 강하게 나타난 것으로 보아 NO의 억제가 세포 성장 억제에 의한 것으로 사료된다. 또한 당유자 잎 분획물의 농도별 처리에서 NO의 생성이 농도 의존적으로 억제되는 효과를 보였다.(Fig. 50-51).

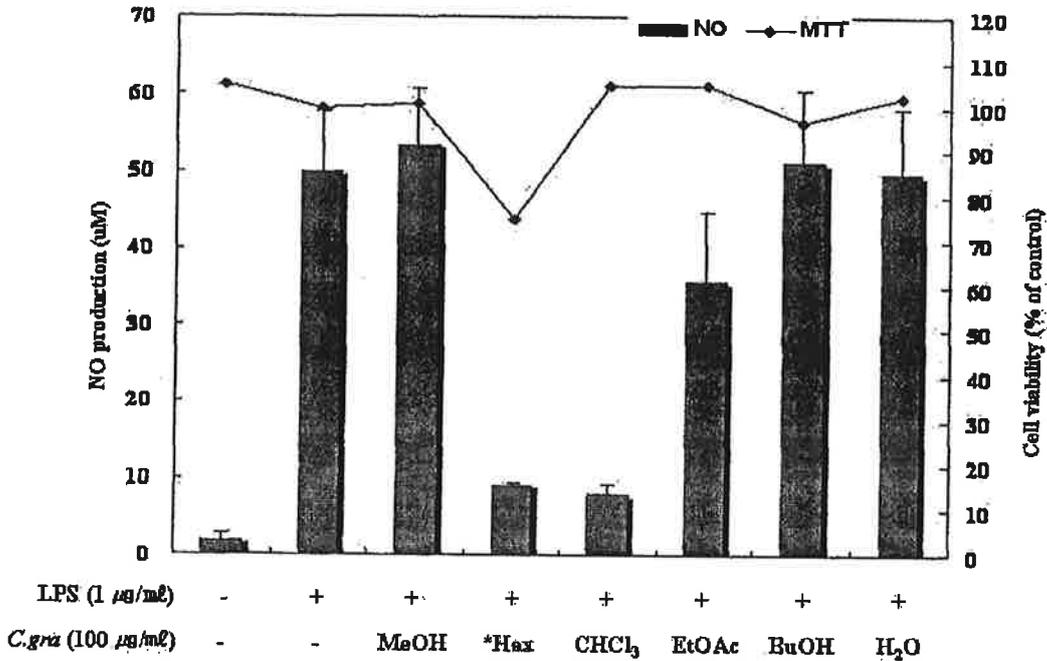


Figure 50. Effect of crude extract and solvent fractions from *C. grandis* Osbeck leaves on the nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells (1.5×10^5 cells/mL) stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. grandis* leaves (100 µg/mL). Cell viability was determined from 24hr culture of cells stimulated with LPS in the presence of *C. grandis* leaves. * Hex: cytotoxicity.

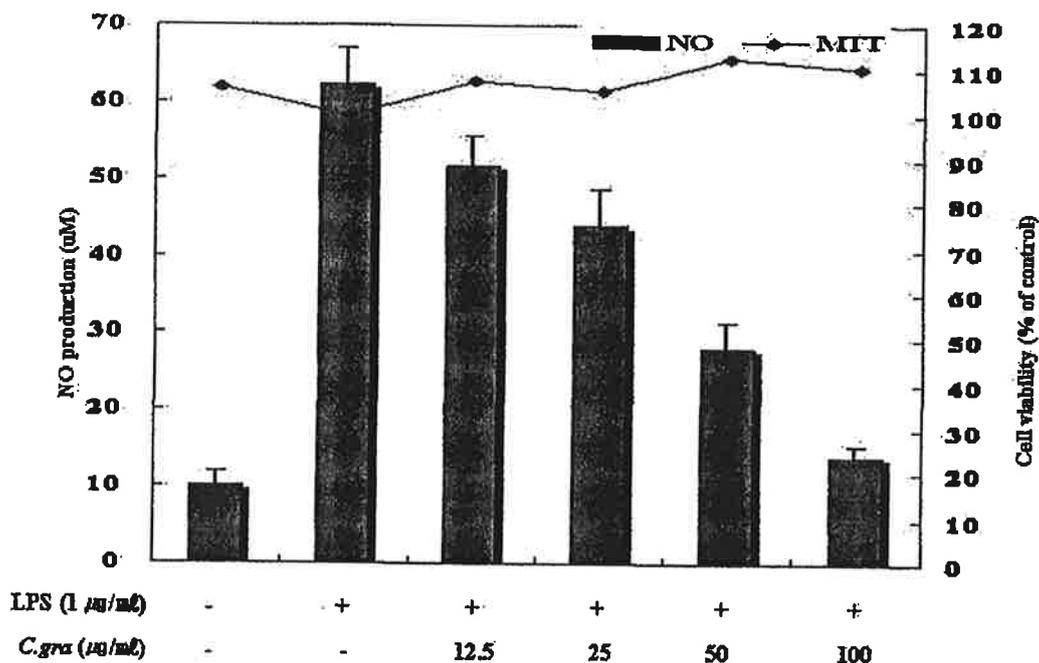


Figure 51. Effect of CHCl_3 fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed culture medium of cells (1.5×10^5 cells/mL) stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves ($12.5, 25, 50, 100 \mu\text{g/mL}$). Cell viability was determined from the 24hr culture of cells stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves.

2) iNOS 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 당유자 잎 추출물에 의한 mRNA expression과 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 iNOS는 현저히 증가하였으며, 당유자 잎 분획물을 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 잎의 CHCl_3 분획물이 iNOS 발현을 억제하였으며, hexane 분획물은 독성에 의한 발현 억제가 나타났다. 또한 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 $12.5, 25, 50, 100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하여 iNOS의 mRNA 발현 억제 정도와 단백질 발현 억제 정도를 확인한 결과 mRNA와 단백질의 발현이 모두 농도의존적으로 억제되었음을 확인할 수 있었다. (Figure 52-54).

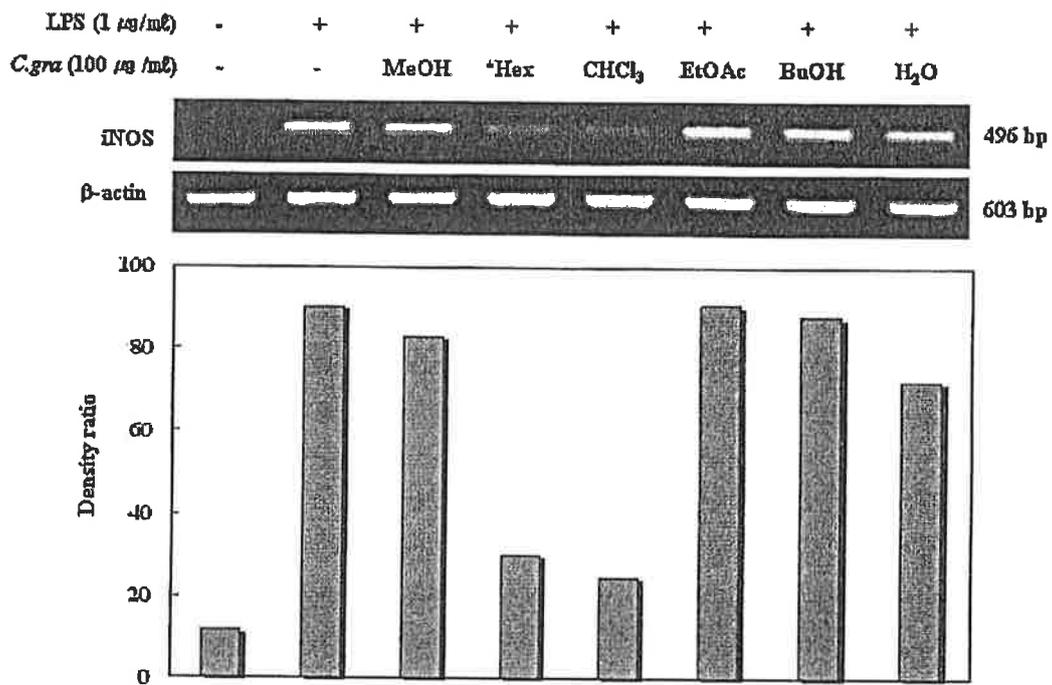


Figure 52. Effect of crude extract and solvent fractions from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24hr. The mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR.

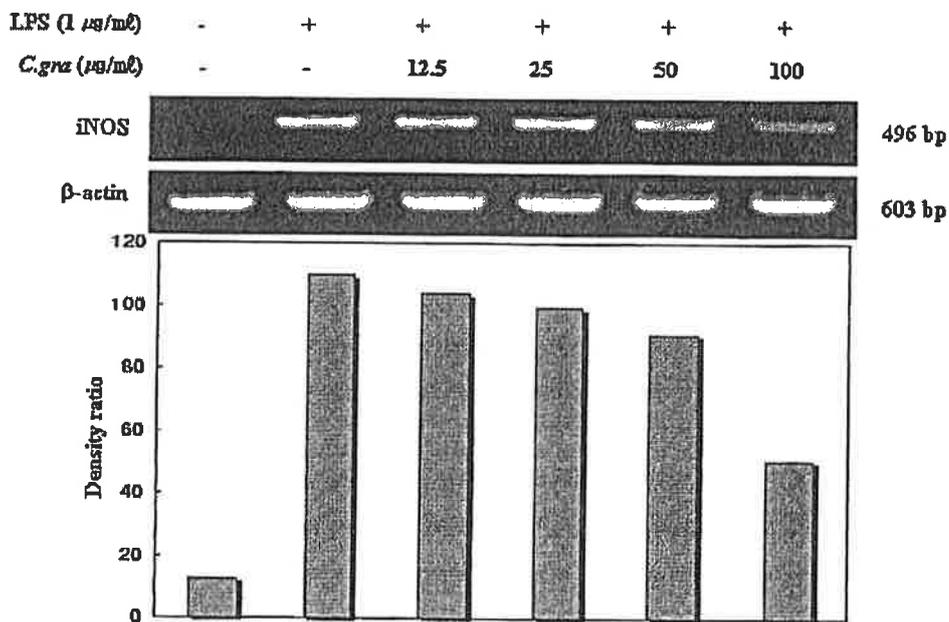


Figure 53. Effects of CHCl₃ fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, 100 μ g/mL) for 24hr. The mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR.

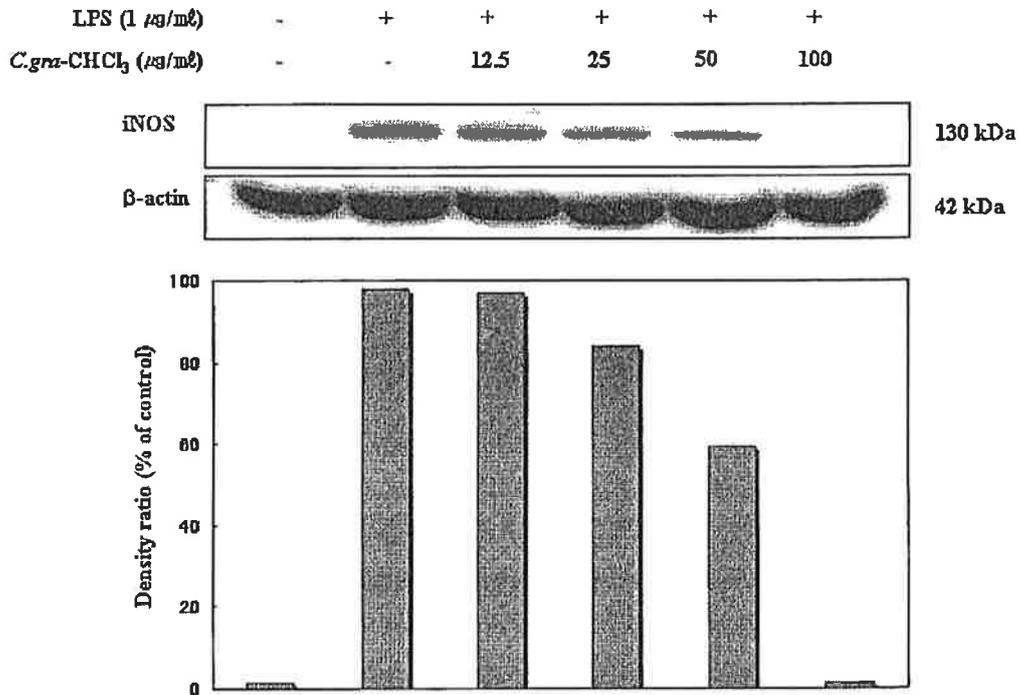


Figure 54. Effects of CHCl₃ fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the activation of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, 100 μ g/mL) for 24hr. Whole-cell lysate (25 μ g) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of iNOS was determined by western blotting.

3) COX-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 당유자 잎 추출물에 의한 mRNA expression의 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 COX-2는 현저히 증가하였으며, 당유자 잎 분획물을 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 억제효과가 미약하였고, CHCl₃을 농도별로 처리한 결과에서도 억제정도가 나타나지 않았다 (Figure 55-56).

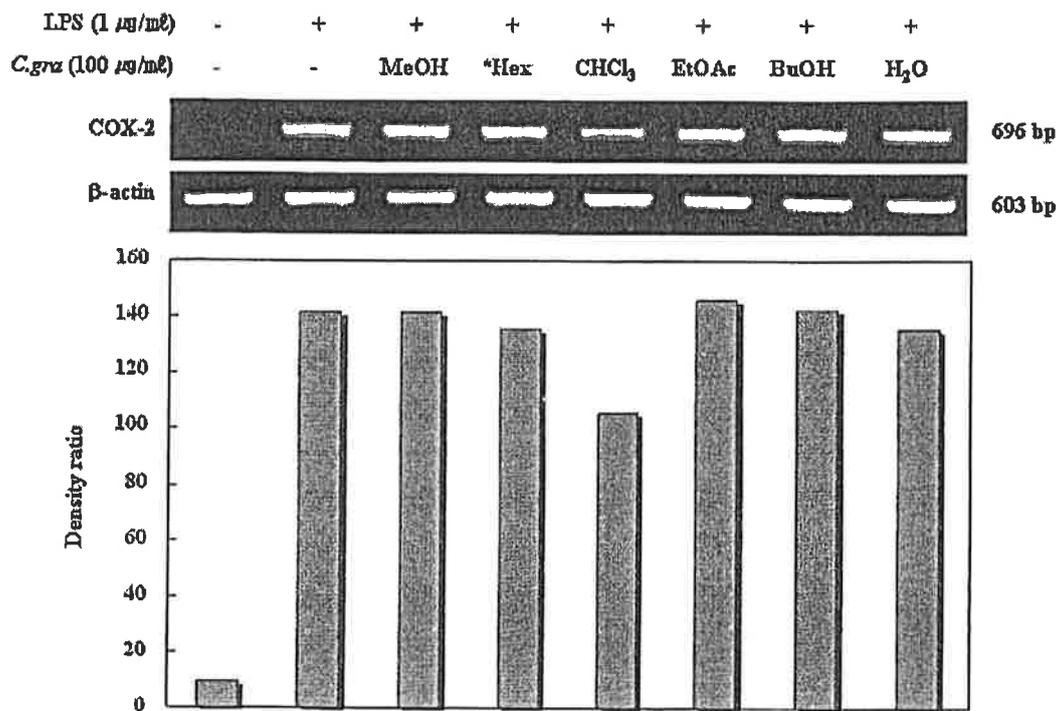


Figure 55. Effect of crude extract and solvent fractions from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mRNA expression of COX-2 was determined by RT-PCR.

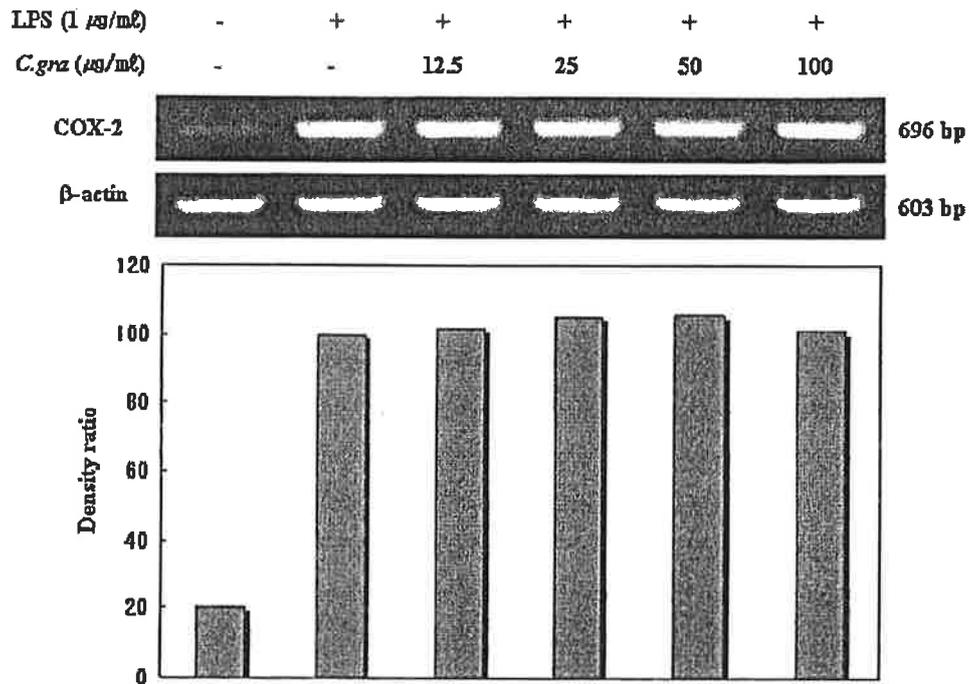


Figure 56. Effect of CHCl_3 fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mRNA expression of COX-2 was determined by RT-PCR.

4) Interleukin-6 (IL-6) 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 IL-6의 생성을 유도한 후 당유자 잎 추출물에 의한 mRNA expression의 저해정도를 RT-PCR로 확인하고 ELISA로 IL-6의 생성량을 정량하였다. LPS에 의해 IL-6는 현저히 증가하였으며, 당유자 잎 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 CHCl_3 분획물에서 약간의 억제 농도를 나타냈다. 또한, 당유자 잎을 농도별로 처리한 결과에서도 mRNA의 발현억제와 IL-6의 생성이 억제되었다. (Figure 57-59).

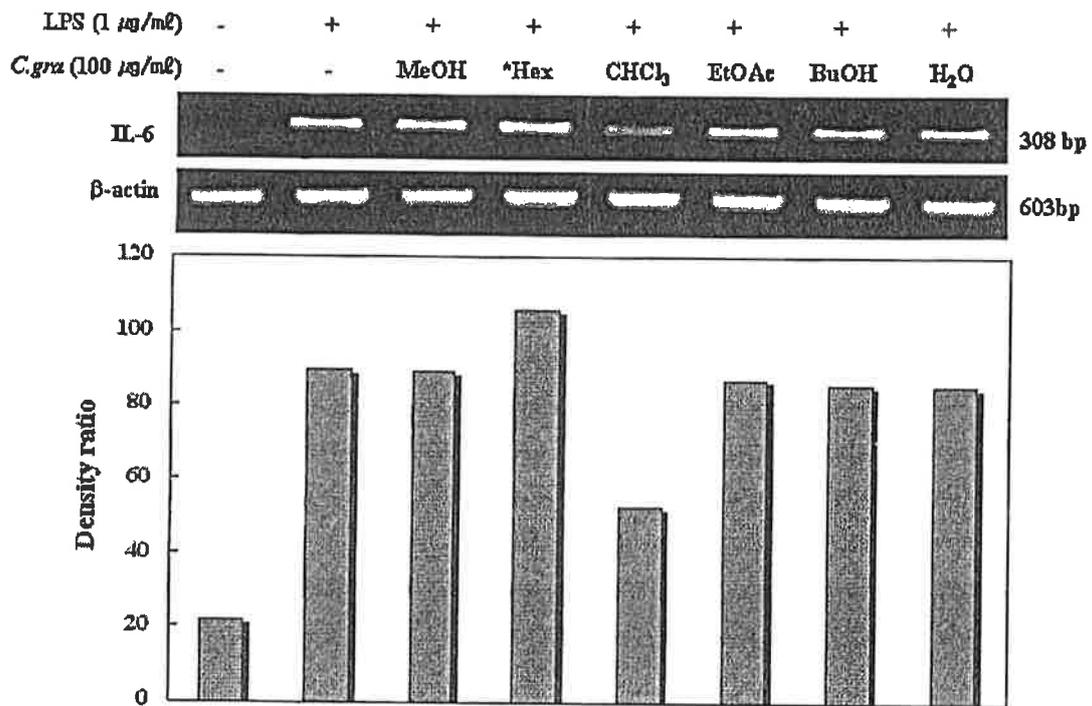


Figure 57. Effect of crude extract and solvent fractions from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mRNA expression of IL-6 was determined by RT-PCR.

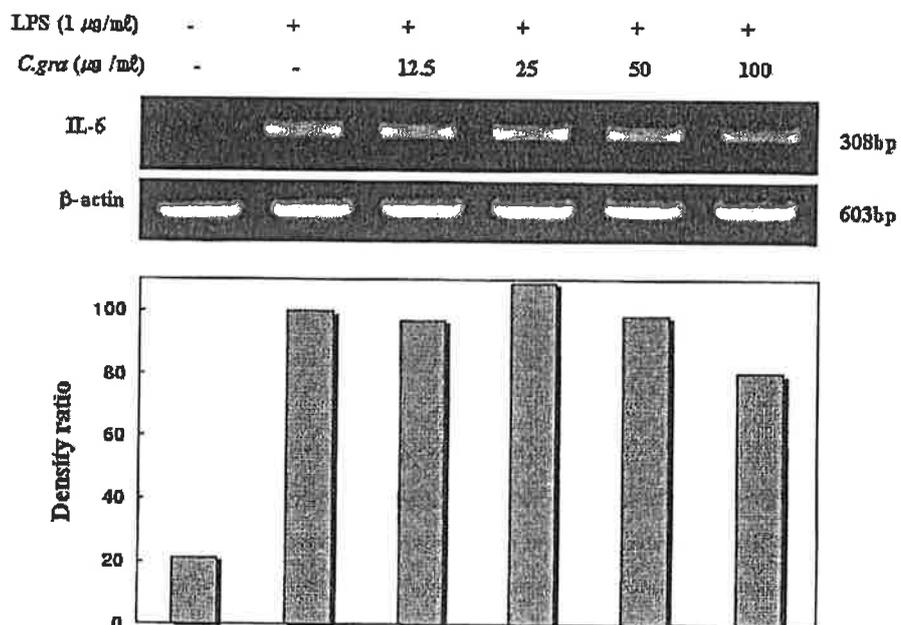


Figure 58. Effect CHCl_3 fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, $100 \mu\text{g/mL}$). The mRNA expression of IL-6 was determined by RT-PCR.

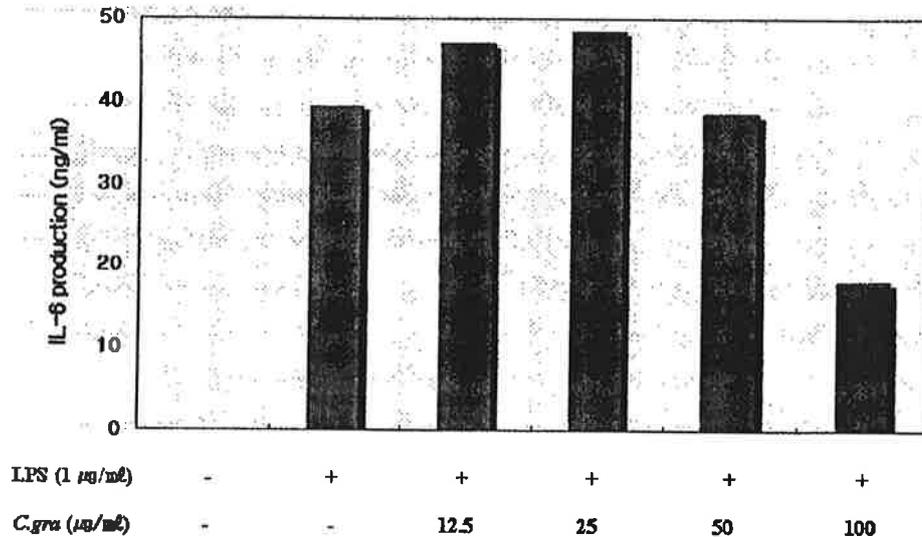


Figure 59. Effects of CHCl_3 fraction from *C. grandis* leaves on the IL-6 production in RAW 264.7 cells. The production of IL-6 were determined by ELISA methods from the medium of RAW 264.7 cells (3.5×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, $100 \mu\text{g/mL}$).

5) TNF- α 생성에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 사용하여 TNF- α 의 생성을 유도한 후 당유자 잎 추출물에 의한 mRNA expression의 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS에 의해 TNF- α 는 현저히 증가하였으며, 당유자 잎 분획물을 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 mRNA 발현 억제가 나타나지 않았고, CHCl_3 을 농도별로 처리한 결과에서도 억제가 나타나지 않았다 (Figure 60-61).

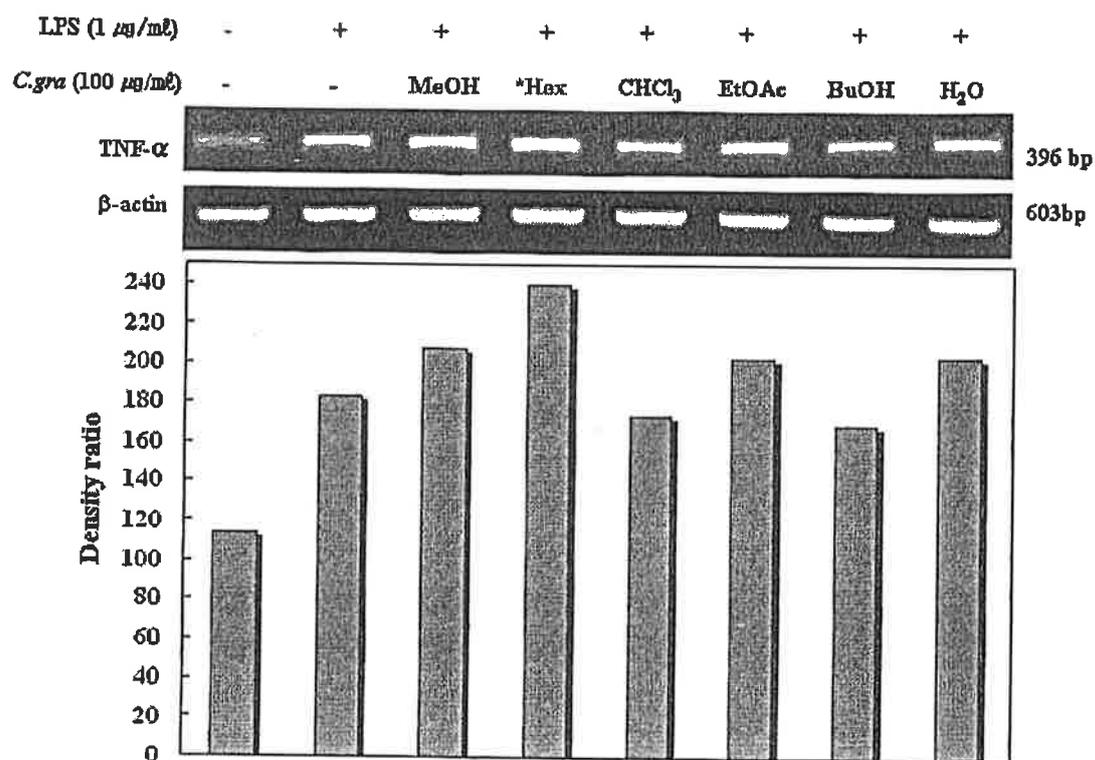


Figure 60. Effect of crude extract and solvent fractions from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of TNF- α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mRNA expression of TNF- α was determined by RT-PCR.

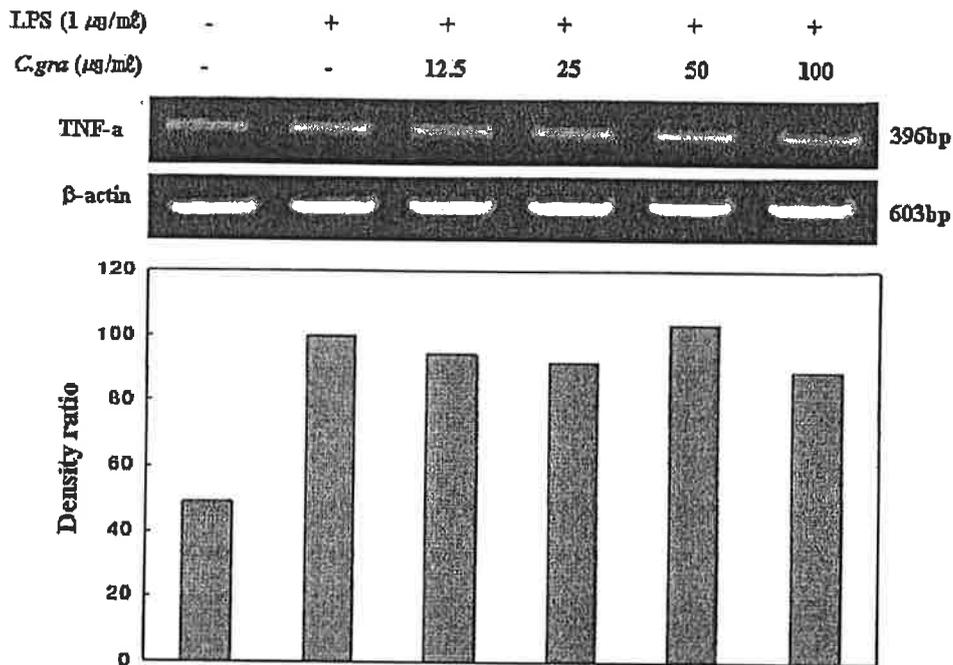


Figure 61. Effect CHCl_3 fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the mRNA expression of TNF- α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mRNA expression of TNF- α was determined by RT-PCR.

6) 당유자 잎 CHCl_3 분획물에 의한 JNK 활성 억제 효과

RAW 264.7 세포 (1.0×10^6 cells/mL)를 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)와 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 농도별 (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 JNK의 인산화 억제정도를 western blot을 통하여 확인하였다. JNK는 LPS로 자극 후 30분에 인산화가 가장 많이 증가하였다. 그리고 SP600125 (JNK inhibitor)와 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 농도별로 처리한 결과, 당유자 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 JNK의 인산화 억제가 SP600125의 효과와 비슷한 정도로 나타났다 (Figure 62).

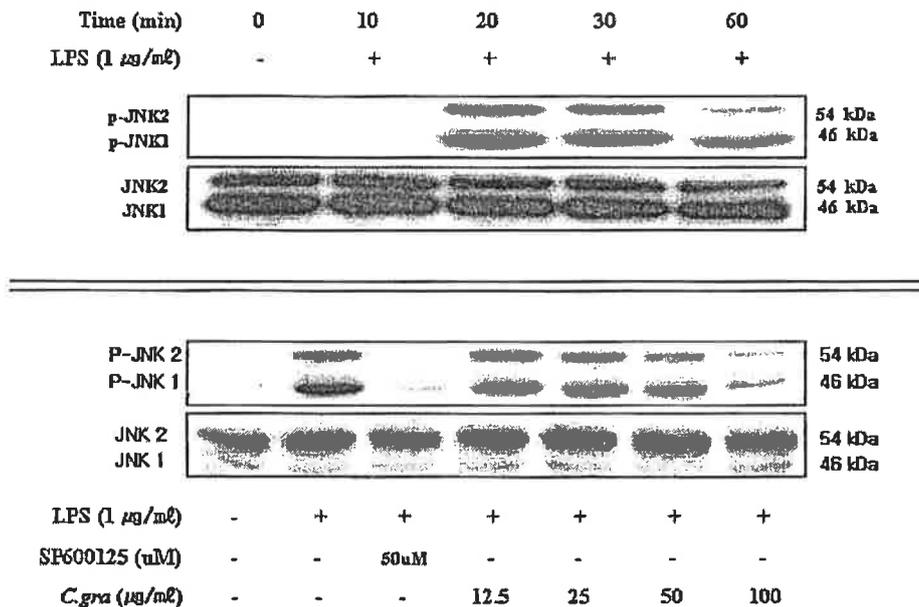


Figure 62. Effect CHCl_3 fraction from *C. grandis* Osbeck leaves on the activation of JNK 1/2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/mL) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for indicate times (upper panel). RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/mL) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of *C. grandis* leaves (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or SP600125 (50 μM) for 30 minutes (low panel). Whole-cell lysate (25 μg) were prepared and the protein level was subjected to 12% SDS-PAGE, and expression of Phospho-JNK and JNK were determined by western blotting.

7) 결과 요약

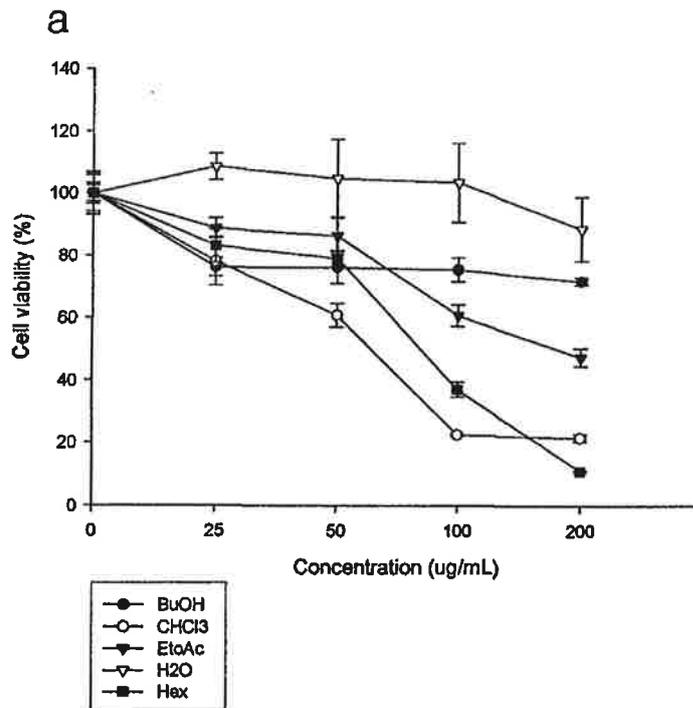
당유자 잎 조추출물 및 용매 분획을 제조하였으며 얻어진 분획으로 생리활성을 평가하였다. 당유자 잎의 CHCl_3 분획은 NO 생성 및 iNOS와 IL-6의 mRNA 발현을 농도의존적으로 억제하였다. 또한, IL-6의 생성을 ELISA 방법으로 측정한 결과 IL-6 생성이 억제되었다. 또한 LPS 자극에 의해 활성화되는 신호전달체계에서 JNK(1/2)의 인산화를 농도의존적으로 억제한 것으로 보아, 당유자 잎의 CHCl_3 분획에 의한 NO, iNOS, IL-6억제효과는 JNK(1/2) 인산화 억제에 일부 기인한 것으로 여겨진다. LPS 자극에 의해 활성화되는 다른 분자적 메커니즘에 관여하는 인자에 대한 CHCl_3 분획의 효과를 연구 중에 있다.

3. 당유자 잎 CHCl_3 분획물의 암세포의 사멸 효과

1) 당유자 잎 CHCl_3 분획물의 SNU-16 위암세포사멸 효과

① 당유자 잎 분획물들의 세포 성장에 미치는 영향 (Fig. 63)

당유자 잎 분획물들이 세포의 사멸을 유도하는지를 알아보기 위해 우선 MTT assay를 통하여 세포 성장률을 측정하였다. 당유자 잎 분획물들을 SNU-16 세포에 농도별 (0-200 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과 CHCl_3 분획물을 처리한 군의 IC_{50} 값 (92.15 $\mu\text{g/mL}$)이 가장 낮았고 여러 종류의 세포들에서 CHCl_3 분획물을 처리한 결과 SNU-16 세포에서 가장 좋은 세포 성장 억제 효능을 보였다. 그리고 정상 세포인 CCD-25Lu (lung fibroblast cell) 세포에서는 독성을 보이지 않았다. 이 결과 당유자 잎 분획물 중 CHCl_3 분획물이 정상세포에는 영향을 주지 않고 암세포를 특이적으로 성장 억제하는 것을 볼 수 있었다.



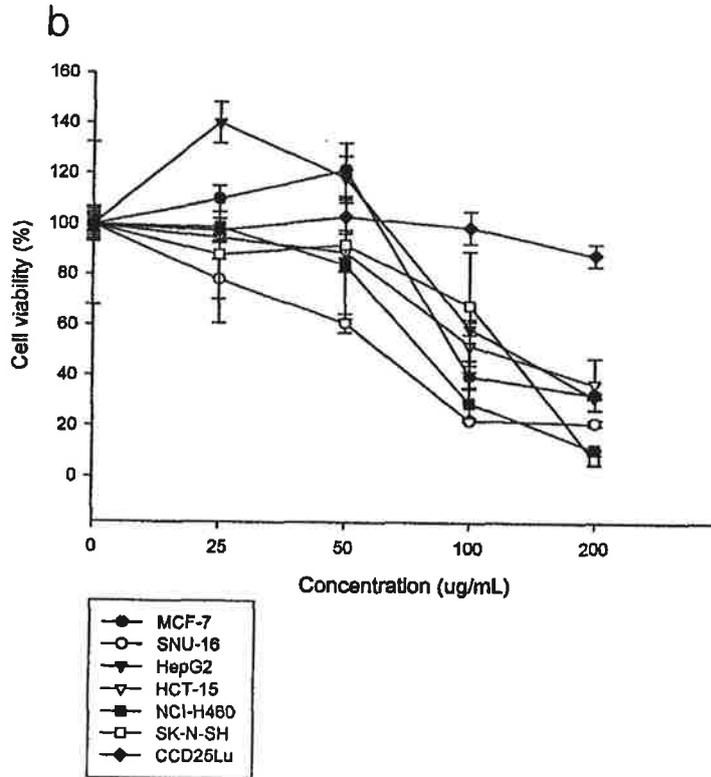


Figure. 63. A : Viability of SNU-16 cells treated with dangyuja leaf extracts. B : Effect of the Chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL) extracts on viability of cancer cell lines. Viability was determined by MTT assay. Untreated cells were used control. Values are presented as mean \pm SD (n=4).

② 당유자 잎 CHCl_3 분획물에 의한 세포의 DNA fragmentation (Fig. 64-65)

Fig. 64에서는 CFDL을 SNU-16 세포에 농도별 (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 24 시간 뒤에 DNA를 추출 한 뒤 DNA 아가로스 전기영동을 한 결과 apoptosis의 특징 중의 하나인 DNA가 180-200 bp 단위로 절단이 되는 것을 확인 할 수 있었다.

Fig. 65에서는 comet assay 방법으로 CFDL을 SNU-16 세포에 처리하여 손상된 세포로부터 DNA damage를 전기영동으로 확인한 것이다. Apoptosis가 진행 되면 손상 받은 DNA는 이를 인식하지 못하고 repair되지 못한다. DNA가 손상을 받아 절단이 되어 작은 절편일수록 핵으로부터 멀리 이동하게 되어 혜성의 꼬리 모양을 하게 된다.

이 결과 CFDL이 DNA 손상과 절단을 일으켜 세포의 apoptosis를 유도 할 수 있을 것이라고 생각될 수 있다.

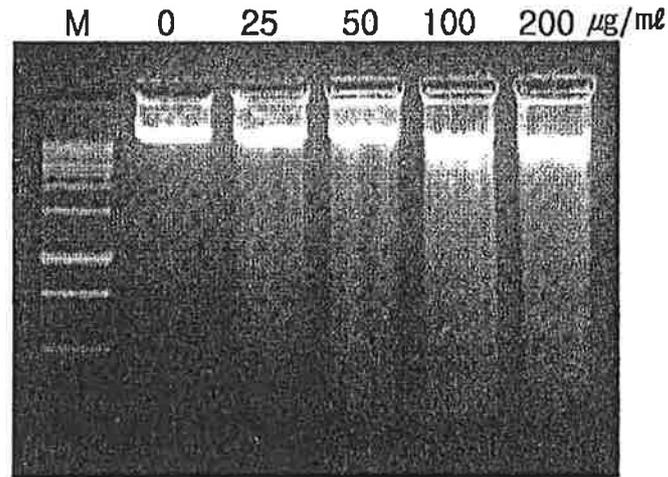


Figure. 64. Genotoxicity induced by Chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL) in SNU-16 cells. The cells were treated with the different concentration (25-200 µg/mL) during 24 h. DNA extracted was subjected to DNA agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light.

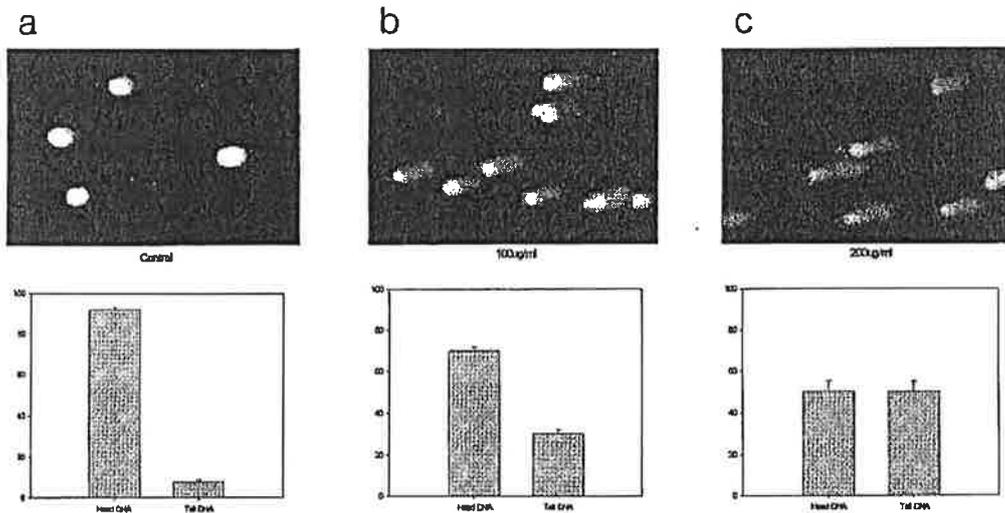


Figure. 65. (a) Representative comet images from untreated control SNU-16 cell. (b, c) Chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL)-treated SNU-16 cells at 100 or 200 µg/mL. DNA was stained with ethidium bromide.

③ 당유자 잎 CHCl_3 분획물에 의한 세포의 morphology와 cell-cycle의 변화 (Fig. 66-67)

Fig. 66에서는 apoptosis의 대표적인 특징 중의 하나인 DNA condensation을 확

인하기 위해 CFDL을 농도별 (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 SNU-16 세포에 처리하여 24시간 후 Hoechst 33342로 염색하여 형광 현미경으로 관찰 한 것이다. 그 결과 CFDL을 처리하지 않은 것 (a)에 비하여 CFDL 분획물을 처리한 세포 (b-e)에서의 응축 (apoptotic body)이 더 잘 확인 되었다.

Fig. 67에서는 CFDL 분획물 처리 후 cell cycle을 PI 염색을 통하여 flow cytometry로 확인 한 결과이다. (A)는 분획물을 농도별로 처리 한 결과 농도 의존적으로 apoptotic ratio (Sub-G1)가 증가 증가함을 보였고 (B)에서는 CFDL 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 시간별로 확인 한 것이다. 확인 결과 시간이 지남에 따라 Sub-G1기의 ratio가 증가함을 볼 수 있었다.

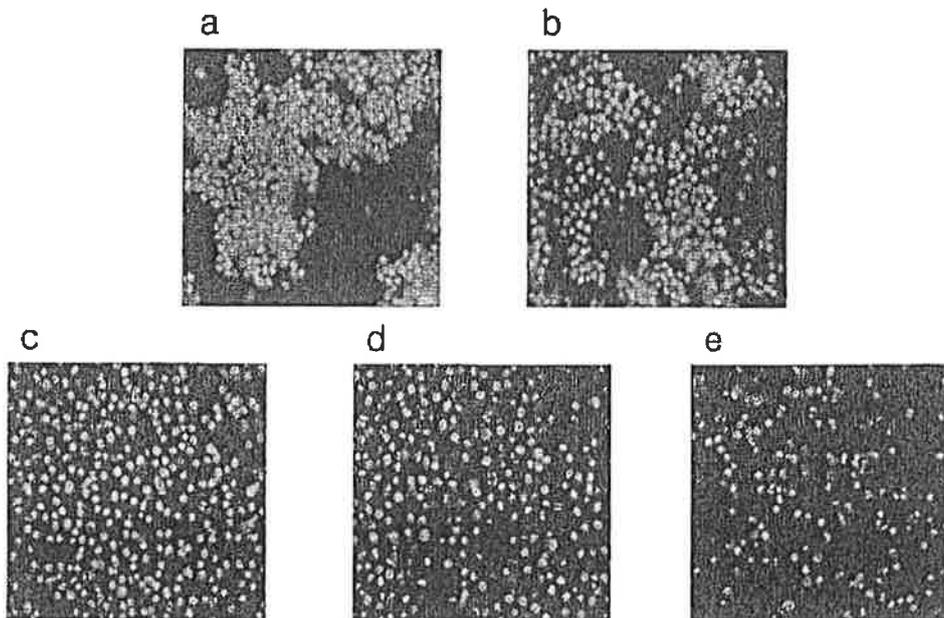
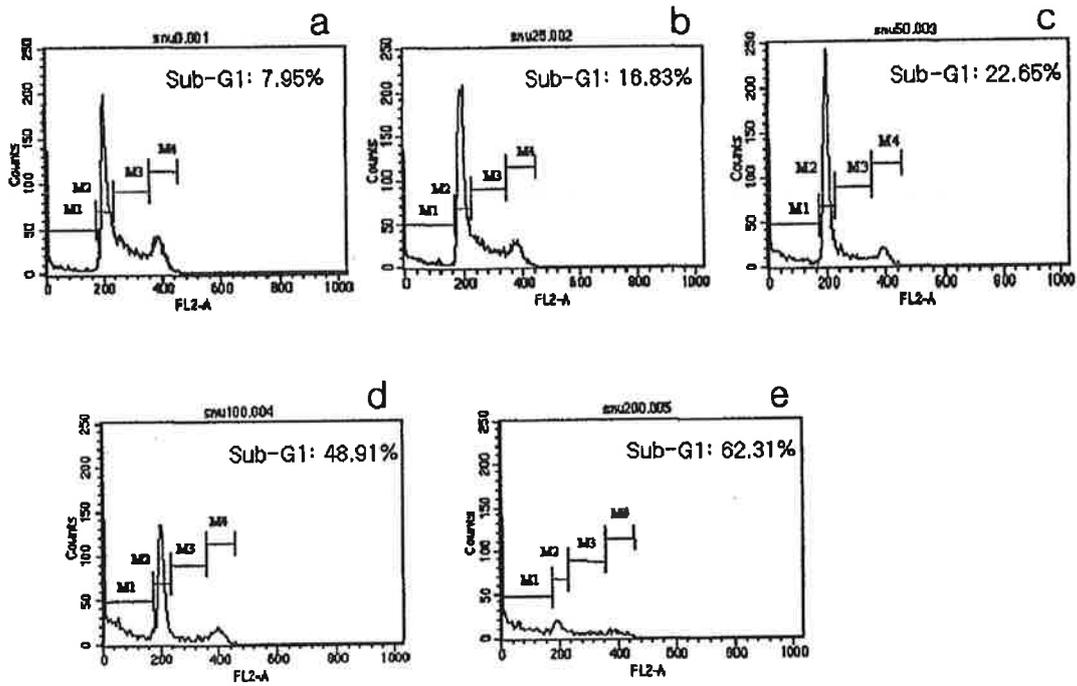


Figure. 66. Chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL) induces apoptotic cell death in SNU-16. Cells were treated in the absence (a) or 25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b, c, d, e) of CFDL for 24 h. The cells were stained with Hoechst 33342 and examined by fluorescence microscope.

(A)



(B)

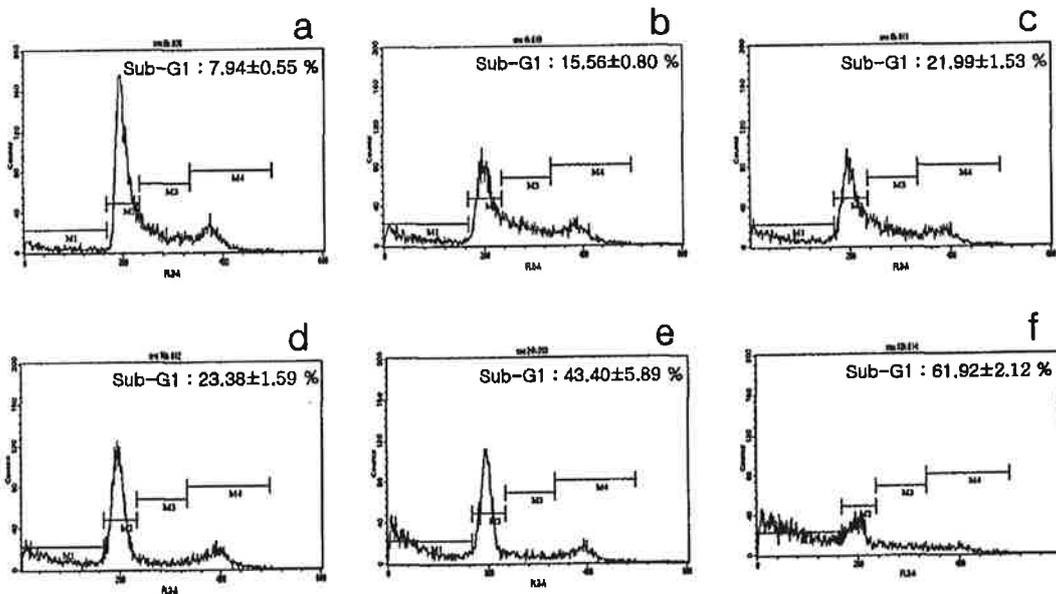


Figure. 67. Determine of apoptotic ratio (Sub-G1 ratio) in Chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL)-treated SNU-16 cells by flow cytometric analysis. (A) SNU-16 cells were treated with various concentrations (a : untreated, b : 25 µg/mL c : 50 µg/mL, d : 100 µg/mL, e : 200 µg/mL) of CFDL for 24 h.

(B) SNU-16 cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CFDL for indicated time (a : 0 h, b : 4 h, c : 8 h, d : 16 h, e : 24 h, f : 32 h).

④ 당유자 잎 CHCl_3 분획에 의한 apoptosis 관련 단백질들의 발현 양상 (Fig. 68-69)

Fig. 68의 (A)에서는 CFDL을 SNU-16 세포에 농도 의존적 (0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 처리하여 24시간 후 단백질들의 발현을 western blot 방법을 사용하여 확인하였다. 그 결과 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현 양이 감소하는 반면에 pro-apoptotic protein인 Bax는 증가하였고 이로 인하여 미토콘드리아 membrane potential이 감소하게 되고 Bcl-2, Bax 양의 불균형으로 미토콘드리아 내의 cytochrome c가 방출되게 된다. 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 caspase-9과 함께 결합하여 apoptosome을 형성하고 이는 caspase-7, 3들을 활성화 하고 활성화 된 caspase-3는 DNA repair에 사용되는 PARP를 절단하여 불활성화 시킴으로써 결국 cell death를 유발하게 된다. 그림 (A)에서 보는바와 같이 CFDL 농도가 증가 할수록 apoptosis로 더 잘 진행됨을 알 수 있었다. (B)는 CFDL을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하여 시간별로 단백질 발현 양을 확인 한 것이다. (A)에서와 같이 시간이 지남에 따라 단백질의 발현 양상이 apoptosis로 진행되는 것을 알 수 있었다.

Fig. 69는 pro-apoptotic protein인 caspase-3 활성을 측정한 결과이다. caspase-3 activity assay kit를 사용하여 405nm에서 측정한 결과 농도가 증가 할수록 caspase-3 활성도 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 이 결과 apoptosis 과정에서 중요하게 작용하는 caspase-3 protein이 CFDL에 의해 활성화 되고 이로 인해 apoptosis 과정을 유도 할 수 있다는 것을 증명하였다.

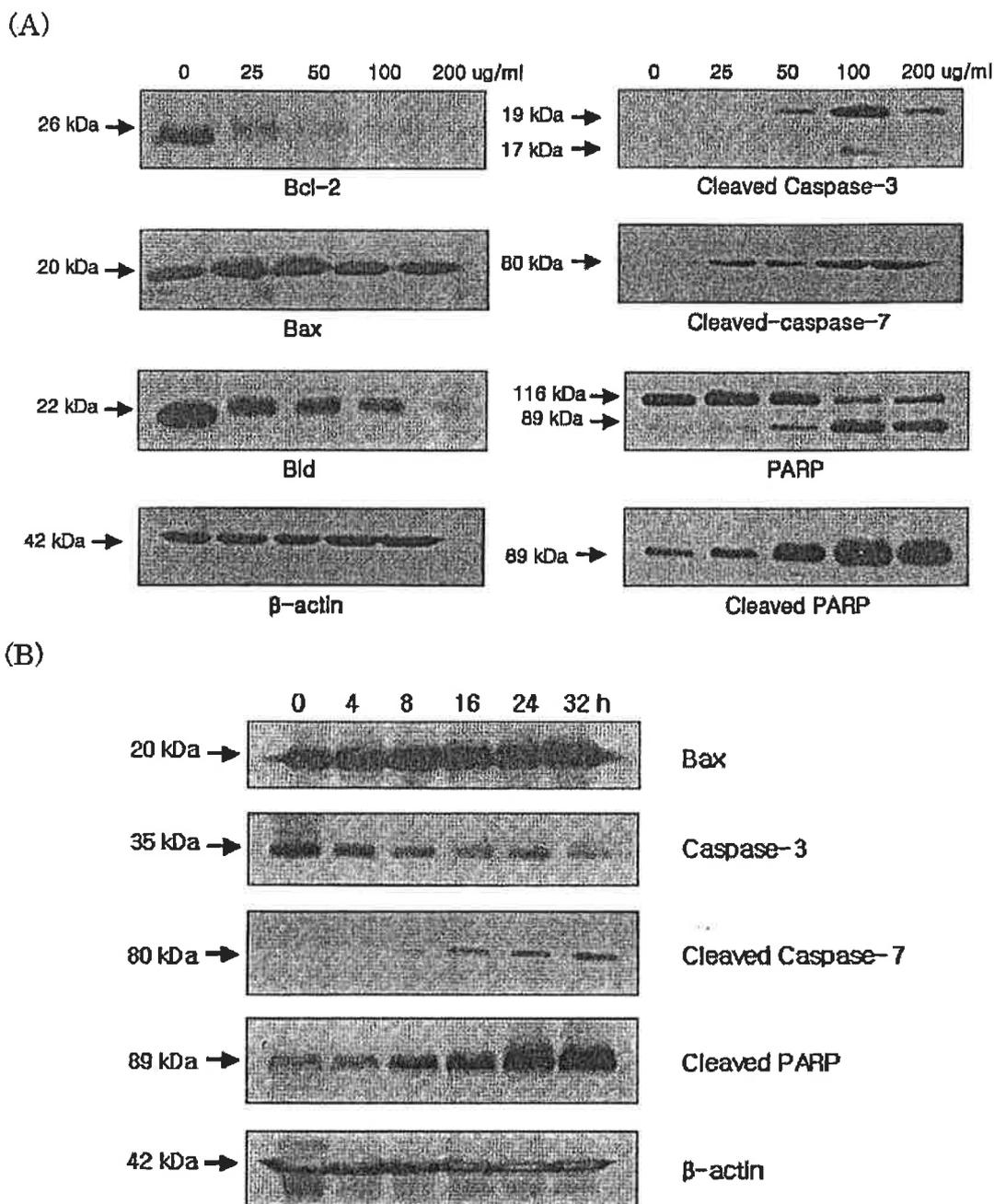


Figure 68. Effect of chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL) on apoptosis-related proteins in SNU-16 cells by Western blot analysis. (A) Effect of dose-dependent (0 - 200 µg/mL) CFDL on the expressions of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. (B) Effect of time-dependent (0 - 32 h) CFDL on the expressions of apoptosis related proteins. β-actin was used as an internal control to normalize the amounts of proteins loaded in

each lane.

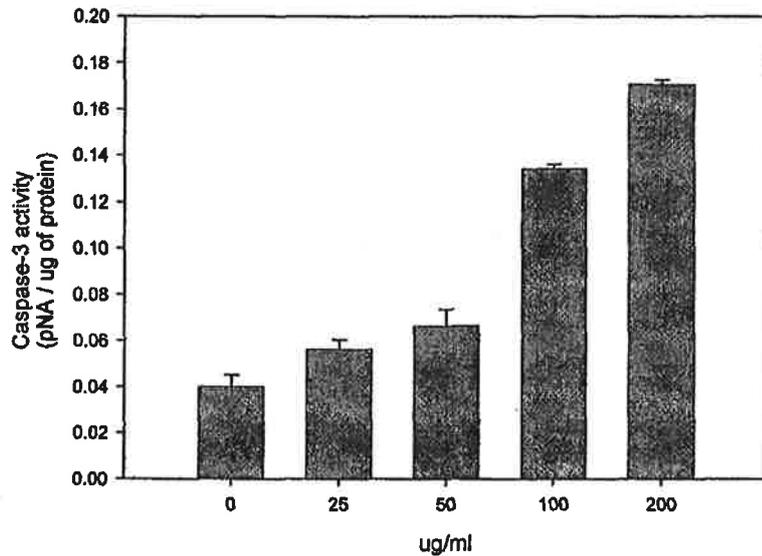


Figure 69. Dose-dependent caspase-3 activity in SNU-16 cells treated with chloroform extract of Dangyuja leaf (CFDL). The rate of DEVD-pNA cleavage was measured at 405 nm. CFDL was treated at 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The experiments were done in triplicate.

⑤ 결과 요약

당유자 잎 조추출물로부터 얻어진 분획물들을 세포에 처리하여 apoptosis를 유도함으로써 항암 효과가 높은 치료제 개발 및 당유자 잎의 활용을 높이기 위해 위 실험들을 행하였다. 그 결과 우선 MTT assay를 통하여 여러 분획물들 중에서 Chloroform 분획물과 Hexane 분획물이 SNU-16 세포의 성장 억제 능력이 있음을 보였다. 그 중 IC_{50} 값이 더 낮은 Chloroform 분획물을 선택하여 이후 실험들을 행하였다. 당유자 잎 CHCl_3 분획물(이하 CFDL)을 처리한 SNU-16 세포에서는 apoptosis의 대표적인 특징들이 나타났는데 일정한 크기의 DNA fragmentation이 일어났고 comet assay로 DNA damage 또한 확인 할 수 있었다. 그리고 세포주기를 확인한 결과 apoptotic ratio (Sub-G1)가 농도, 시간 의존적으로 증가함을 볼 수 있었다. Western blot 방법으로 apoptosis 관련 단백질인 Bcl-2, Bax, Caspase-3/7, PARP등의 발현 양상을 농도, 시간별로 확인하였다. 또한 DNA repair에 관여하는 PARP를 절단하여 불활성화 시키는 caspase-3의 활성을 측정하였다. 그 결과 CFDL을 세포에 처리하면 농도 그리고 시간 의존적으로 세포 사멸을 유도 할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

2) 당유자 잎 CHCl₃ 분획물의 HeLa 세포사멸 효과

① Cytotoxicity effect of CHCl₃ fraction in human cell line HeLa cells

당유자 잎의 분획물 중 HeLa cell의 세포사멸효과를 나타낸 CHCl₃ 분획물을 이용하여 세포 생존성 및 세포독성을 MTT assay로 확인하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium salt MTT를 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 방법으로 살아있는 세포의 수가 많을수록 생성되는 formazan crystal의 양이 많아져 흡광도가 높게 측정된다. HeLa 세포에 당유자 잎 CHCl₃ 분획물을 농도별로 처리하였다. 72시간동안 배양한 후, 생성된 crystal의 양을 측정하였다.

CHCl₃ 분획물을 처리한 결과, 세포의 생존율이 100 µg/mL의 농도에서부터 감소하기 시작하였으며, 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 70.).

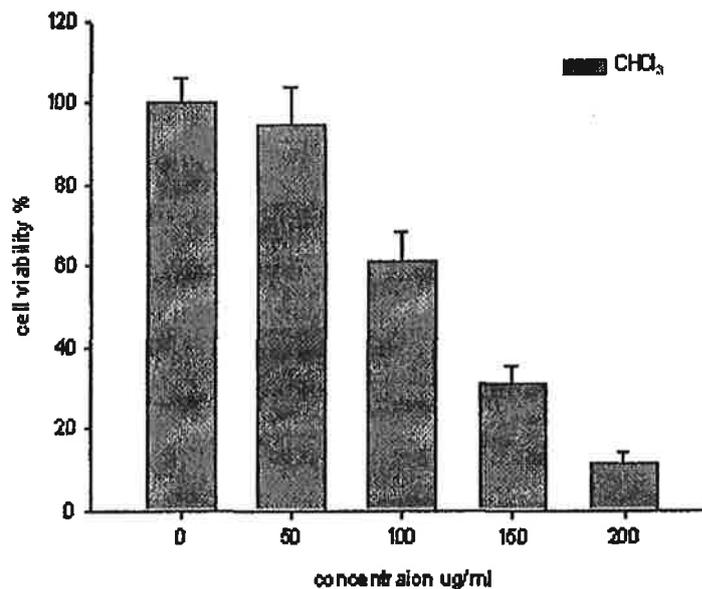


Figure 70. Effect of CHCl₃ fraction from Dangyuja leave on the viability of HeLa cells. Cells were treated for 72 hours in the presence of CHCl₃ fraction in the medium. Cell viability was determined by MTT assay.

② DNA fragmentation assay

Apoptosis에 의한 세포 죽음은 nucleosome 사이의 linker region에서 핵의 double strand DNA가 절단되어 180~200 base pair 길이의 배수로 절단된 조각이 만들어진다. 이는 agarose gel에서 특징적인 ladder pattern의 band로 나타난다. 이러한 양상은 necrosis에서 나타나는 무작위적인 DNA분해에 의한 diffuse

smear patten과 비교된다. HeLa 세포에 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 DNA를 추출한 후 전기영동을 하여 DNA fragmentation을 확인하였다. 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 DNA의 ladder pattern을 확인할 수 있었으며, 당유자 잎 CHCl_3 분획물에 의해 HeLa 세포에 apoptosis가 유도되었음을 확인하였다. (Fig. 71.)

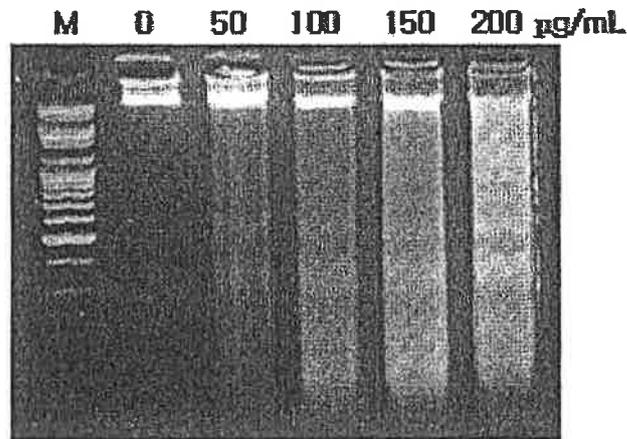


Fig. 71. DNA fragmentation of HeLa cells treated CHCl_3 fraction. HeLa cells were incubated with 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CHCl_3 fraction for 24 hours. Ladder pattern reflecting the presence of DNA fragment were viewed on gel stained ethidium-bromide

③ Effect of CHCl_3 fraction on the cell morphology

Hoechst 33342 staining은 Hoechst 33342라는 형광 dye가 세포막을 통과하여 minor groove DNA strand에 결합하여 밝은 푸른색의 형광을 나타내 세포내의 핵을 염색시킨다. 세포내에서 apoptosis가 일어나게 되면 염색체의 응축과 함께 핵의 쪼개짐 등 핵의 형태적 변화가 나타난다. HeLa 세포에 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 24시간동안 처리하여 Hoechst 33342로 염색한 후, 형광현미경을 이용하여 핵의 morphology를 확인하였다. 그 결과 아무것도 처리하지 않은 비처리구(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비하여 CHCl_3 분획물을 처리한 처리구에서 핵의 응축 및 쪼개짐 등을 관찰할 수 있었고, 분획물의 농도가 증가할수록 그 현상은 두드러졌다(화살표). 이런 결과를 얻음으로써 당유자 잎 CHCl_3 분획물이 HeLa 세포에 apoptosis를 유도하였음을 확인하였다. (Fig. 72)

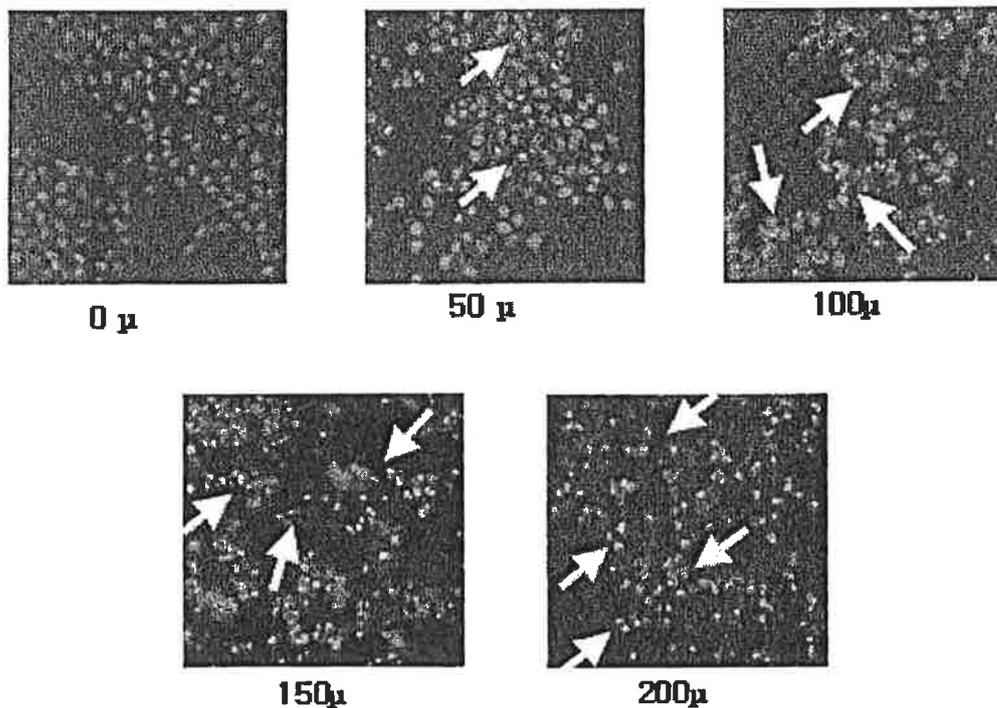


Fig. 72. Morphological change of HeLa cells after CHCl_3 fraction treatment for 24 hours followed Hoechst 33342 staining. Arrows indicate apoptotic bodies of nuclear fragmentation.

④ Western blot

당유자 잎 CHCl_3 분획물을 농도별로 24시간 처리한 HeLa 세포에서 단백질을 얻은 후 western blot analysis를 이용하여 pro-survival protein과 pro-apoptotic protein을 항원-항체반응으로 발현 양상을 확인하였다. Caspase series와 PARP는 당유자 잎 CHCl_3 분획물을 고농도로 처리할수록 full length는 감소하면서 Cleaved form을 형성하였고, pro-survival protein인 Bcl-2와 Bid는 감소하는 경향을 보였다. 이것으로 HeLa 세포에서 당유자 잎 CHCl_3 분획물이 농도 의존적으로 apoptosis를 일으키는 것을 확인하였다. (Fig. 73)

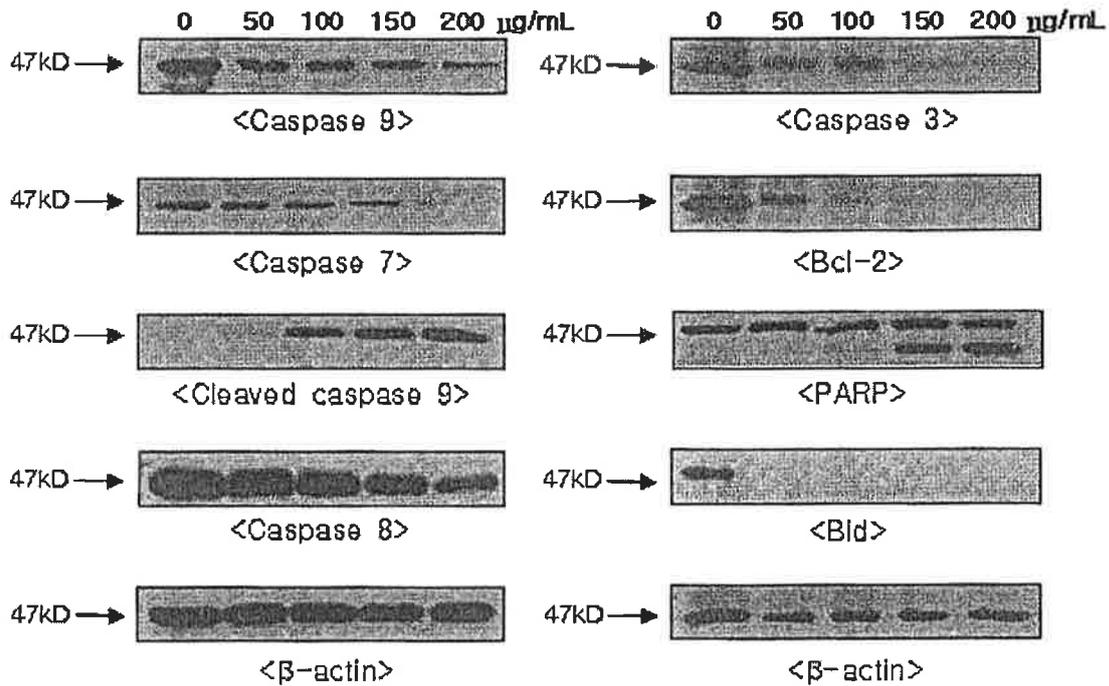
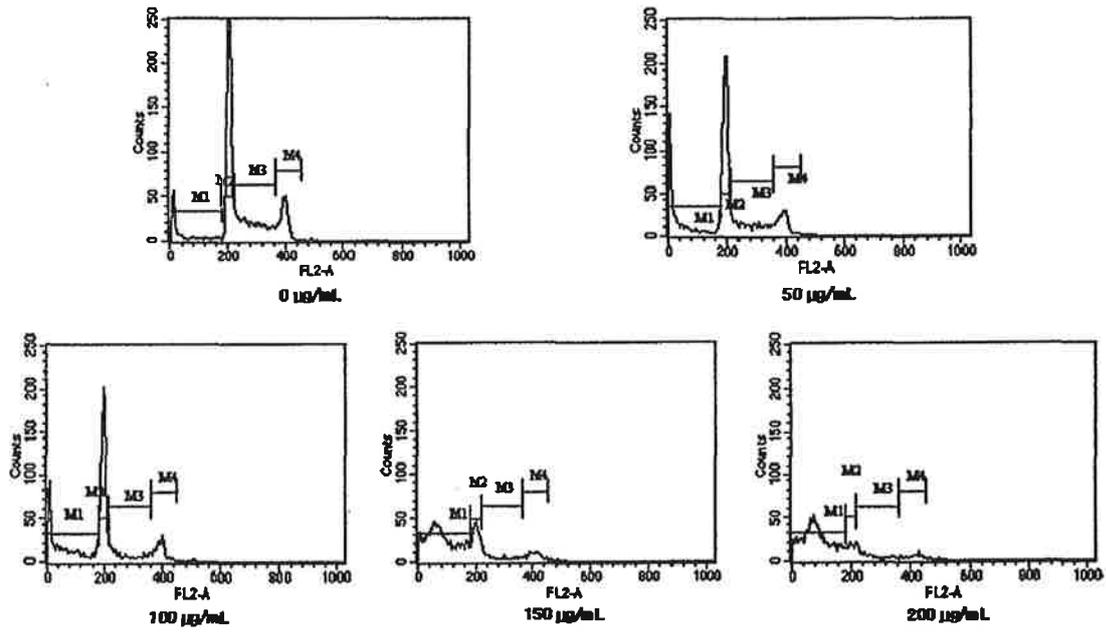


Fig. 73. Western blot analysis of protein extract obtained from HeLa cells treated with CHCl_3 fraction 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Total protein extracts were prepared after treatment for 24 hours, and analyzed with antibodies to caspase-9, caspase-8, casapase-7, caspase-3, Bcl-2, Bid, PARP and β -actin.

⑤ Dose- and Time-dependent effect of CHCl_3 fraction on cell cycle distribution

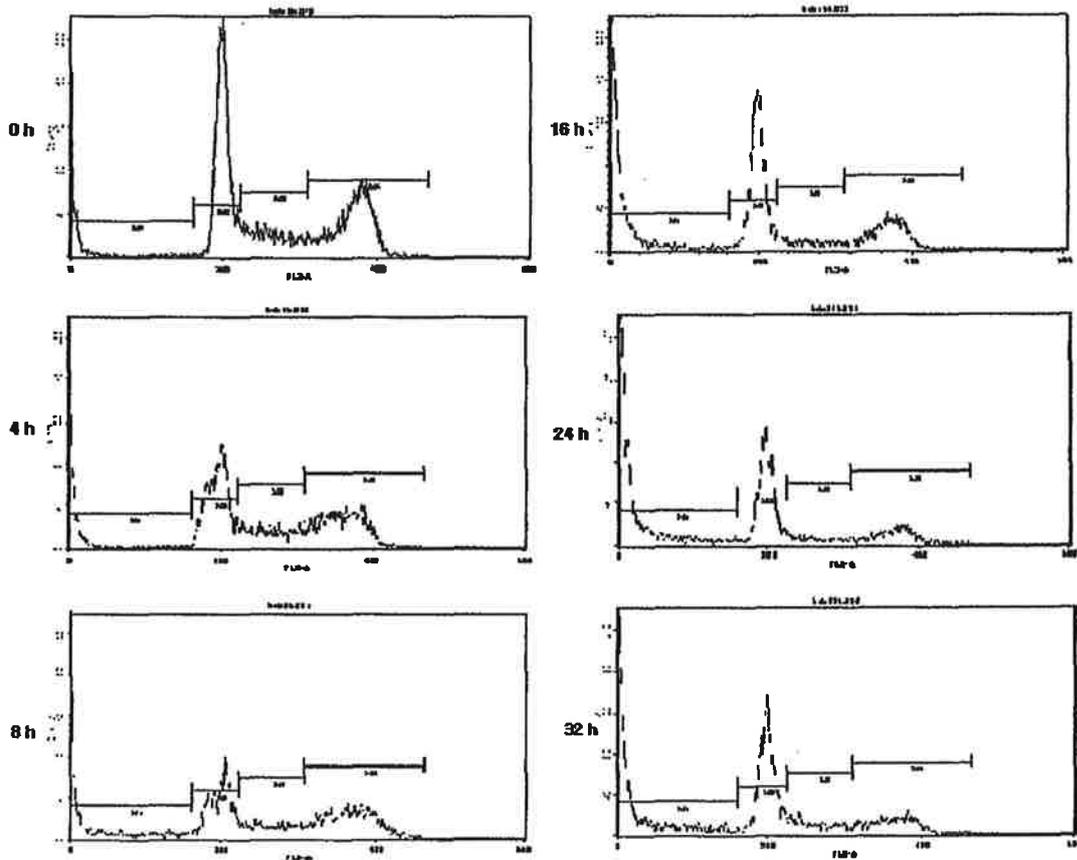
FACS는 한 종류의 세포를 형광물질인 PI로 DNA를 염색한 후, 가는 관을 통해 흘러면서 형광 유무 및 강도에 따라 세포를 분류 또는 세어주는 것으로 세포내의 DNA양을 정량하여 세포주기 분포를 확인하는 방법이다. 보통 cell cycle phase는 G1, S, G2/M phase가 있는데, FACS에서 sub G1은 apoptosis라 불리는 곳으로 이미 죽은 세포를 뜻한다. 즉, sub G1의 ratio가 높을수록 apoptosis가 유발되었음을 알 수 있다. HeLa 세포에 농도, 시간별로 당유자 앞 CHCl_3 분획물을 처리하였다. (A)는 처리시간을 24시간으로 고정하여 CHCl_3 분획물을 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였고, (B)는 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 고정하고 시간을 0, 4, 8, 16, 24, 36시간으로 처리하였다. 그 결과 고농도일수록, 처리시간이 길수록 sub G1 phase가 증가하였고, 이로써 apoptosis가 유발되었음을 확인하였다. (Fig. 74.)

(A)



concentration	sub G1(%)
0 µg/mL	7.32
50 µg/mL	25.5
100 µg/mL	30.54
150 µg/mL	67.03
200 µg/mL	77.46

(B)



Hours	sub G1(%)
0	2.48
4	5.97
8	15.29
16	31.95
24	40.55
36	54.67

Fig. 74. Dose-(A) and time-(B)dependent effect of CHCl_3 fraction on cell cycle distribution. (A). HeLa cells were treated with different concentration of CHCl_3 fraction for 24 hours analyzed by flow cytometry. (B). HeLa cells

were treated with 100 μ g/mL for 0, 4, 8, 16, 24, 32 hours. It analyzed by flow cytometry. The table indicated sub G1 ratio.

⑥ RT-PCR analysis of mRNA for BAX, Bcl-2

HeLa 세포에 HeLa 세포에 당유자 잎 CHCl₃ 분획물을 농도별로 24시간 처리하여 BAX와 Bcl-2 유전자의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. BAX의 mRNA의 발현의 증감은 변함이 없었으나, Bcl-2 유전자는 mRNA 수준에서의 발현이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 75).

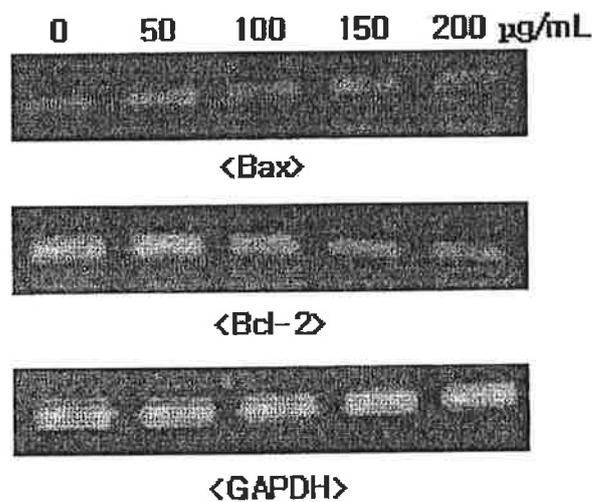


Fig. 75. Effect of CHCl₃ fraction on the mRNA expression of HeLa cells. HeLa cells were treated CHCl₃ fraction 0, 50, 100, 150, 200 μ g/mL respectively. The mRNA expression of HeLa cells was determined by RT-PCR.

⑦ 결과요약

MTT assay를 통하여 다양한 당유자 잎 분획물들 중 효과가 가장 좋았던 CHCl₃ fraction을 선별한 후, 세포 생존성 및 세포독성을 확인하였는데, 농도 의존적으로 cell viability(%)가 감소하였다. 당유자 잎 CHCl₃ fraction을 농도별로 24시간 처리한 후, 100 μ g/mL의 농도에서부터 DNA의 laddering과 핵의 morphology 변화를 확인하였다

Caspase series와 PARP는 당유자 잎 CHCl₃ fraction을 고농도로 처리할수록 단백질 발현양의 감소와 cleaved form(caspase 7, PARP)을 확인하였다.

FACS-PI를 통해 Cell cycle과 apoptosis의 관계를 알아보았는데, 당유자 잎 CHCl₃ fraction을 처리하지 않은 세포에 비해 고농도로 처리할수록 subG1 phase의 %가 증가하여 apoptosis가 유도되었음을 확인 할 수 있었다.

이 결과들을 종합하였을 때, 당유자 잎 CHCl₃ fraction은 HeLa cell에 대하여 Apoptosis를 유도하여 항암효과를 가지고 있음을 확인하였다.

4. 당유자 잎 ethyl acetate 분획물의 항산화효능

1) 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량

건조한 당유자 잎의 계통별 용매 분획물에 대해 대표적 항산화 성분들인 페놀성 화합물들의 함량을 분석하기 위해 folin ciocalteu assay를 사용하여 gallic acid와 비교분석하였다. 폴리페놀의 경우에는 에틸아세트 층이 202.1 mg gallic acid/g dried sample에 해당하는 농도로 함량이 가장 높았으며, 플라보노이드는 클로로포름 층이 가장 높은 농도(44.9 mg CE/g dried sample)로 함유하고 있는 것으로 분석되었다 (Table 14).

Table 14. Total phenolic and flavonoid contents of crude extracts and their derived fractions from the leaves of *dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck)

Sample	Total phenolic content (mg/g)*	Total flavonoid content (mg/g)#
ME	73.7 ± 1.3 ^a	2.1 ± 0.7 ^a
HF	72.3 ± 0.2 ^a	21.1 ± 0.7 ^c
CF	110.9 ± 2.4 ^b	44.9 ± 1.8 ^f
EF	202.1 ± 0.8 ^d	29.1 ± 0.5 ^e
BF	138.8 ± 0.3 ^c	26.2 ± 0.9 ^d
WF	75.8 ± 1.2 ^a	5.2 ± 0.3 ^b

* Values and # values expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per g of dried extract and mg catechin equivalents (CE) per g of dried extract respectively. Data represent means ± SD of three independent experiments performed in triplicate.

2) DPPH 자유라디칼 소거능

당유자 잎 추출물의 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 측정하였고 그 결과 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 나타내었으며 약 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 소거능의 순서는 다음과 같다. (Fig 76)

BF (71.92%) > EF (71.86%) > WF (57.56%) > ME (38.68%) > HF (16.79%) > CF (14.04%). 이 중 BF와 EF가 가장 우수한 라디칼 소거능을 나타냈으며 EF 분획물에 대해 HepG2 세포주에서의 항산화 효능에 대해 조사하였다.

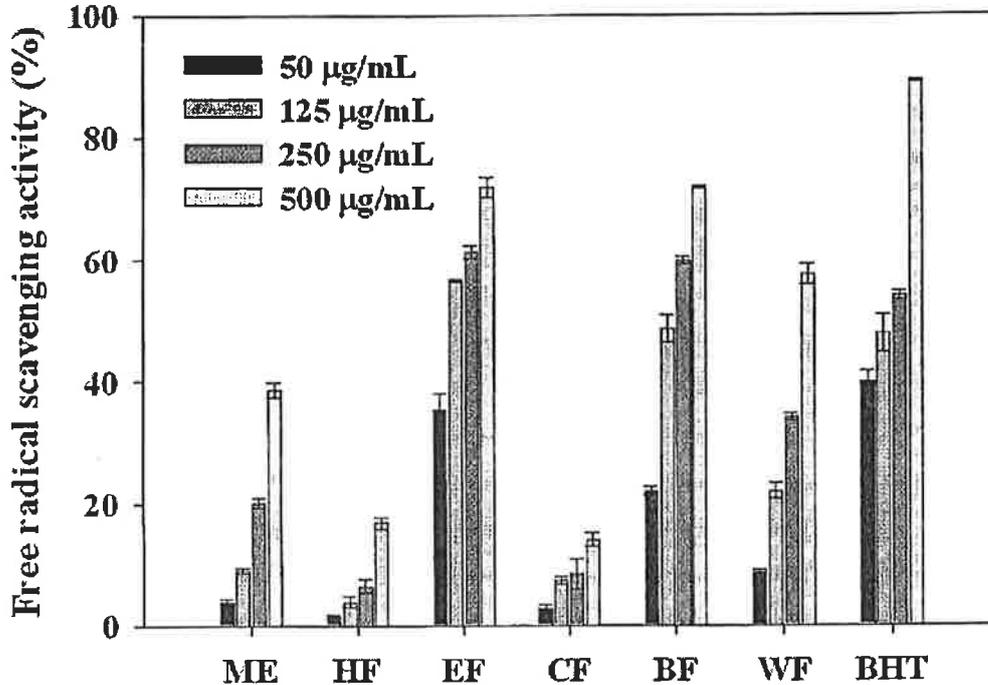


Figure 76. DPPH radical scavenging activity of extracts of dangyuja leaves. All extracts were added at 50500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. ME: 80% methanol extract, HF: n-hexane; EF: ethyl acetate; CF: chloroform; BF: butanol; WF: water-extracted fractions; BHT: butylated hydroxytoluene. Values are means \pm SD (n=3).

3) 당유자 잎 EF이 *t*-BHP에 유도된 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향

살아있는 세포 내의 ROS수준을 측정하면 산화손상의 정도를 알 수 있으며 *t*-BHP와 같은 산화제에 노출되면 세포는 DCFH를 산화시켜 형광을 띠는 DCF로 전환되는데 Fig. 77에서 나타난 바와 같이 세포를 EF로 전처리한 후 *t*-BHP를 처리하게 되면 ROS 생성이 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 EF가 HepG2 세포에서 *t*-BHP에 의해 발생하는 ROS의 생성을 저해함을 잘 나타낸다.

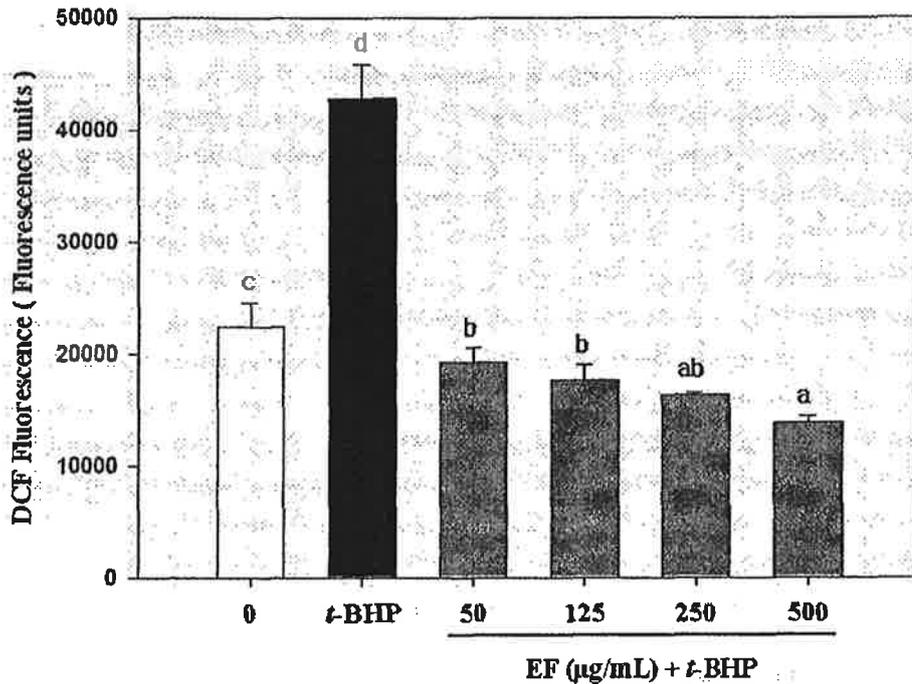


Figure 77. Protective effects of EF treatment on *t*-BHP-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 50–500 µg/mL EF for 1 h prior to the addition of 200 µM *t*-BHP for 3 h. The level of intracellular ROS was then determined using the peroxide-sensitive fluorescent probe DCFH-DA. Values are presented as means ±SD (n=4).

4) 지질산화 억제능

96 well-microtit plate에 HepG2 세포주를 배양한 후 당유자 잎 에틸 아세테이트 추출물을 농도별로 1시간 반응시킨 후 200 µM 농도의 과산화수소를 1 시간 동안 처리하고, Lipid peroxides가 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)을 형성함으로써 분홍색을 나타내는 성질을 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 당유자 잎 EF 분획물을 50 µg/mL 농도로 전처리했을 때 50% 이상의 지질 산화 저해 활성이 나타났으면 이는 녹차의 생리활성 성분인 카테킨의 그것과 유사한 활성이다.

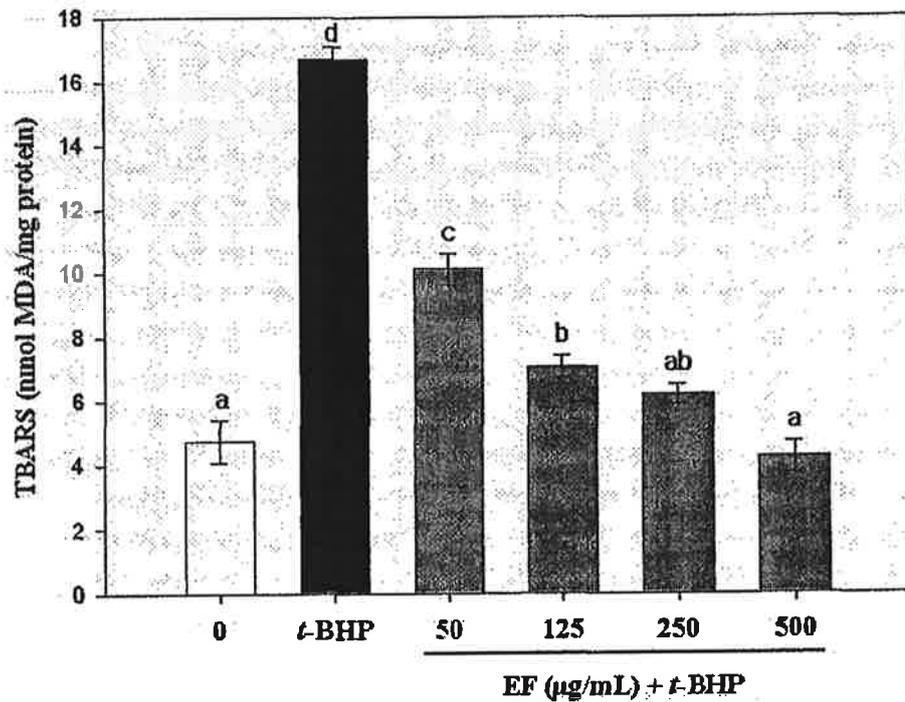


Figure 78. The effects of EF treatment on lipid peroxidation in HepG2 cells after t-BHP induced oxidative stress. Cultures were pre-treated with EF at the indicated concentrations for 1 h and subsequently submitted to t-BHP 200 μ M for 3 h. The concentration of TBARS was expressed as nmol MDA per mg protein. Values are presented as means \pm SD (n=3).

5) DNA 손상과 세포 죽음 억제 효능

산화스트레스에 의한 DNA 손상 및 세포죽음 억제능 사전 연구에서 200 μ M t-BHP를 HepG2 세포에 한 시간 동안 처리하면 DNA 손상에 의한 세포 죽음을 유발한다고 잘 알려져 있어 당유자 및 EF분획을 전처리한 세포의 DNA 손상 여부를 Comet assay를 이용하여 측정하였다. Fig. 79에서 나타난 바와 같이 전처리한 분획물의 농도 의존적으로 DNA손상이 감소하였으며, 이는 MTT assay에서도 EF를 처리한 세포의 죽음이 현저하게 농도 의존적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 80)

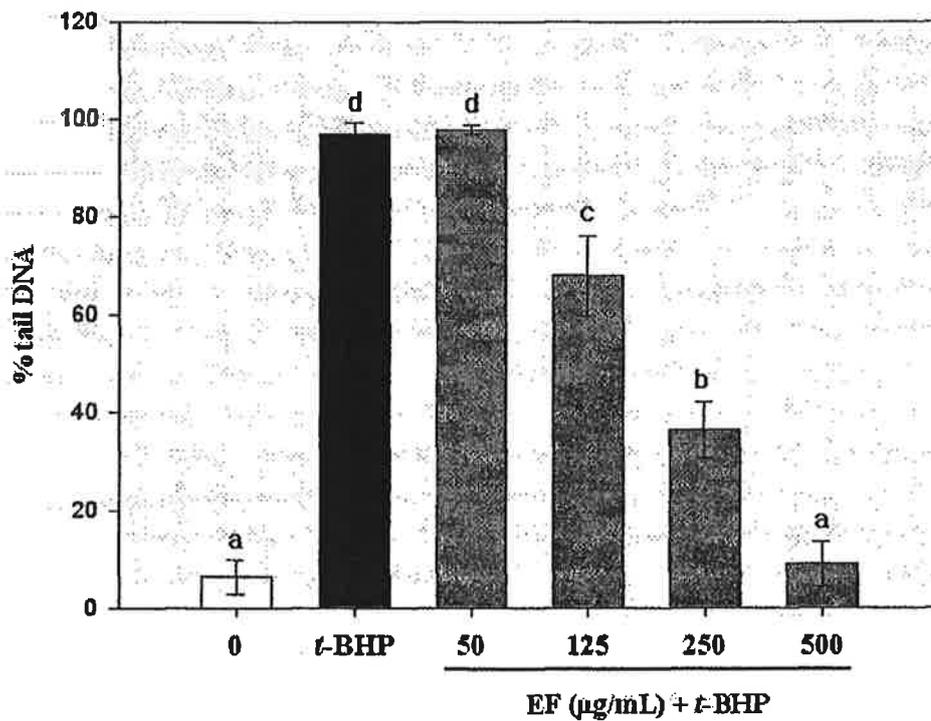


Figure 79. Graphical representation of the Comet assay. Cells were treated with the indicated amount of EF for 1 h prior to incubation with 200 μ M t-BHP for 3 h. One hundred cells were analyzed per experimental point in each of the three independent experimental cultures. DNA damage is expressed as the mean \pm SD (n=3) of the percent DNA migrated in the tail of the comet (percent DNA in tail).

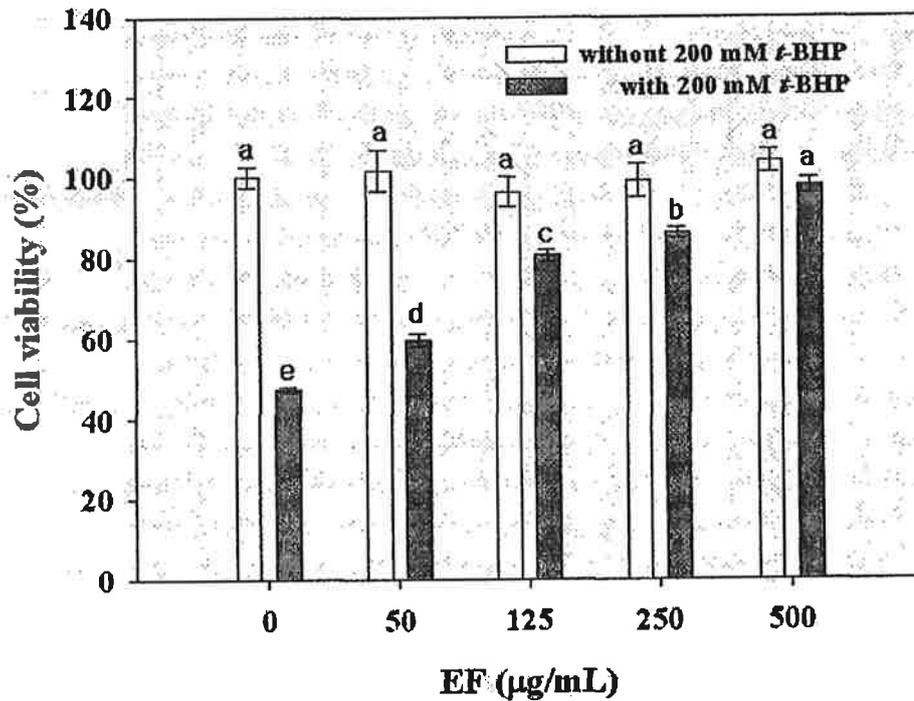


Figure 80. Protective effects of EF on t-BHP-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Cultures were treated for 1 h with the indicated concentrations of EF and then incubated with 200 µM t-BHP for 3 h. Viability as determined by MTT reduction. Values are presented as means ±SD (n=3).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 평가의 착안점 및 달성도

1. 연구평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점
1차 연도	2005 - 2006	당유자 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과육, 과피) 조추출물의 제조 및 성분 분석	10 %	○ 당유자 시료 확보 - 시기별(미숙과, 성숙과) - 부위별(과육, 과피)
			20 %	○ 당유자 조추출물 확보 - 추출용매 및 분석조건의 타당성
			20 %	○ 당유자의 전처리 조건 및 HPLC 분석 조건 확립
			25 %	○ 당유자 조추출물의 flavonoid 및 limonoid 성분 분석
	25 %	○ 당유자 조추출물의 기능성 탐색 - in vitro 및 세포수준에서 평가		
2차 연도	2006 - 2007	당유자 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과육, 과피) 분획물의 제조	20 %	○ 분획물의 확보 - 계통적 추출방법의 분획물 제조 용이성 및 효율성
		당유자 분획물의 효능평가	25 %	○ 메탄올 분획물의 생리활성 평가법의 재현성 (숙취제거 효능, 염증억제효능)
	25 %		○ 메탄올 분획물의 생리활성 평가법의 재현성 (항산화 효능, 골다공증 억제효능 등)	
	30 %	○ 메탄올 추출물의 계통적 추출 분획물의 HPLC 분석 조건 최적화 flavonoid 성분의 정성적, 정량적 분석 향상		
3차 연도	2007 - 2008	당유자 추출물의 생리활성 성분 규명	25 %	○ 생리활성 효능 평가의 재현성
		당유자 유래 생리활성 후보 물질군의 효능 검증	25 %	○ 생리활성 후보 물질군의 확보 정도
			25 %	○ LC-MS, NMR을 이용하여 미지의 물질 분자구조 규명
		당유자 생리활성 성분 함유 가공 제품 개발	25 %	○ 당유자 추출물 함유 기능성 건강음료 제작
최종 연도	2008	당유자 생리활성 성분 함유 가공 제품 개발	50 %	○ 관련 기술 특허출원
		당유자 추출물 함유한 건강음료 개발	50 %	○ 기업체 기술이전

2. 연구개발 목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
○ 당유자 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과육, 과피) 분획물의 제조	▷ 당유자잎, 성숙과의 통과, 과피, 내피에 대한 조추출물(80% MeOH 분획)을 얻고 이에 순차적으로 Hex, CHCl ₃ , EtOAc, BuOH, H ₂ O를 처리하여 각 용매에 대한 가용분획을 얻음	100
○ 당유자 시기별, 부위별 용매분획물의 효능평가	▷ 염증억제효능 평가 - RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)를 사용하여 COX-2의 생성을 유도한 후 당유자 부위별 시료에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 평가 - RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)를 사용하여 IL-6의 생성을 유도한 후 당유자 부위별 시료에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 평가 - 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 아토피 염증성 chemokine 억제효과 평가 ▷ 항산화효능 평가 - Macrophage 세포주에서 NO 생성 억제 평가 - HepG2 세포주에서 활성산소 생성능 저해 효과 - HepG2 세포주에서 DPPH assay 및 radical scavenging activity ▷ 성숙과의 숙취제거 효능 평가 - 마우스 섭취용 당유자 에탄올, 열수 추출물 시료 확보 - 시료 및 알콜 투여 후 마우스 혈액 내 알콜농도 측정	100
○ 당유자 시기별(미숙과, 성숙과), 부위별(과육, 과피) 분획물의 성분 분석	- HPLC에 의한 flavonoid 분석조건을 새로이 확립하여 활성이 높은 분획물에 대한 정량 분석 - LC/MS/MS를 이용한 미지의 성분 정성도 분석완료, 다른 분획물에 대한 정량분석은 진행 중	100

제 2절 관련분야의 기여도

1. 기대효과

- 감귤소득을 증가할 수 있는 고소득 작목으로서 재래감귤의 가치를 밝혀냄으로써 지속가능한 감귤산업을 기대
- 도내 농가소득 증대 및 종자종묘 산업 육성에 기여
- 재래감귤의 기능성규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품소재, 산업소재로의 활용가치 증대
- 감귤주스나 당유자청 제조시 발생하는 이용부산물의 재활용에 따른 환경오염 방지에도 기여

1) 기술적 측면

- 저이용 감귤자원인 재래감귤의 고부가가치화 가공기술기반 구축에 기여.
- 당유자를 이용한 생리활성 성분 분리·정제 기술 확립.
- 감귤유래 photochemical 소재로부터 기능성식품 및 제약분야의 활용기술 확보로 해외 의존도 탈피.

2) 경제·산업적 측면

- 당유자의 산업적 활용은 온주밀감, 감자 등에 치중하고 있는 제주재배 농작물을 다양화할 수 있으며, 평당 10,000원 내외의 농가소득을 올릴 수 있는 고소득 작물로 자리 잡음으로써 제주 경제와 산업에 큰 기여.
- 1995~2005년 사이에 1인당 감귤 소비량은 연평균 1.40% 증가할 것으로 전망, 국내 감귤 수요는 해외 수입이 자유화되고 국내 대체과일 공급량이 늘기 때문에 증가세가 둔화될 것으로 예상되나
- 본 연구개발사업의 수행으로 소비자의 기호도(안전성 및 기능성 과실 선호)에 맞는 당유자와 같은 재래감귤의 수요가 증가할 것으로 예상되어 농가소득 증대에 기여.
- 재래감귤의 기능성 소재로서의 활용가치를 부각시킴으로써, UR 협상결과 1997년 이후부터 오렌지 농축주스의 수입이 전면 개방되어 철수 위기에 있는 제주감귤 가공업체 활성화에 기여.

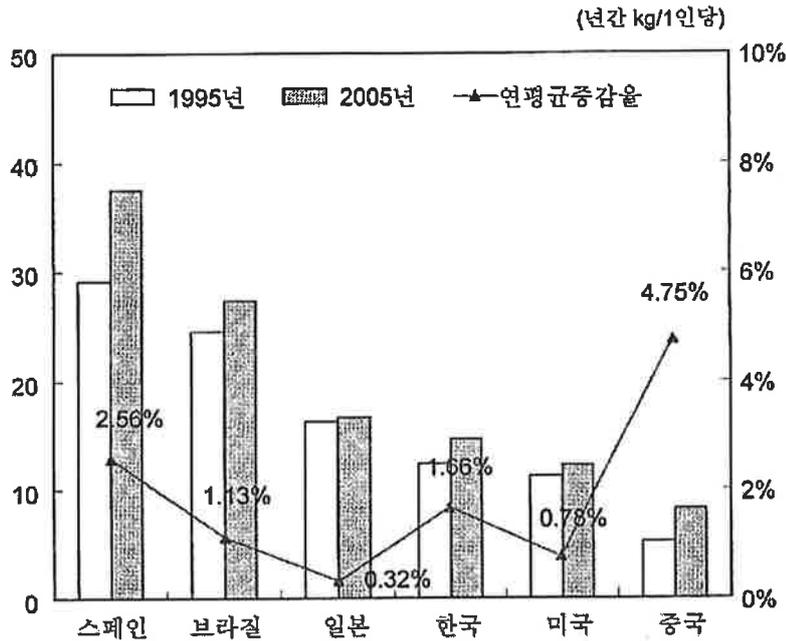


Figure 81. 주요국의 1인당 감귤(Citrus) 소비 현황 및 전망

○ 감귤유래 Phytochemicals로부터 항콜레스테롤제나 골다공증 억제 효능 성분
 발굴은 현재 건강 기능식품첨가물 수입으로 소비되는 외화 낭비를 줄일
 수 있으며 국내 소재산업의 육성을 유도.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1절 연구성과 활용

1. 산업재산권

본 연구과제 수행을 통해 2건의 국내 특허를 출원하였으며 향후 등록시킴으로
 써 참여기업인 (주)바이오벨류에게 우선적으로 기술 이전할 계획임.

별첨; 특허 출원서

특허출원 현황

구분 (발명특허, 실용신안 등)	명칭(기술명)	출원국가	출원번호 (출원일)	출원인	비고
특허	당유자 미성숙과 추출물 또는 당유자잎 추출물을 함유하는 항암용 약학조성물	한국	10-2007-00 31515	제주대학교산 학협력단	
특허	당유자잎 추출물 및 이를 함유하는 항염증용 약학 조성물	한국	10-2007-00 55233	제주대학교산 학협력단	

2. 학술지 게재

본 과제로부터 얻어진 학술적 정보를 SCI급 학술잡지 및 국내잡지에 투고하여
출판됨으로써 연구 성과를 국내외에 확산, 홍보함.

별첨 : 게재 학술지

학술지 게재 현황

연구자	논문제목	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관	SCI게재여 부
Hee-Kyoung Lim, Eun-Sook Yoo, Jeong-Yong Moon, You-Jin Jeon, Somi K.Cho	Antioxidant Activity of Extracts from <i>Dangyuja</i> (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) Fruits Produced in Jeju Island	식품과학회 지	15(2)	2006	Food Science and Biotechnolo gy	SCIE
이혜자, 강경진, 윤원중, 강희경, 김영석, 김소미, 유은숙	RAW 264.7 및 HaCat Cell에서 당유자 미숙과의 염증억제 효과	생약학회지	37(2)	2006	Kor. J. Pharmacogn	학진등재
Yunjung Kim, Moonjae Cho and Somi K. Cho	<i>In vitro</i> antioxidant and cytoprotective activities of the extract of <i>Citrus grandis</i> Osbeck leaves	식품과학회 지		2008, 4	Food Science and Biotechnolo gy	투고 (submissio n #E2008-04 -031)

3. 학술대회 발표

본 과제로부터 얻어진 학술적 정보를 국내외 국제 학술대회에 발표함으로써 연구 성과를 홍보에 힘씀.

학술대회 발표 현황

국내

발표자	논문제목	학술대회명	년, 월	장소, 국명	비고
Se Young Kim, Won-Young Jung, Young-Suk Kim, Somi Kim Cho	Determination of limonoids in dangyuja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck)	2006 한국식품과학회 제 73차 학술대회 및 정기총회	2006, 6	Jeju ICC, 한국	
Hee-Kyoung Lim, Eun-Sook Yoo, Jeong-Yong Moon, You-Jin Jeon, and Somi K. Cho	Antioxidant Activity of Extracts from <i>Dangyuja</i> (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) Fruits Produced in Jeju Island	2006 한국식품과학회 제 73차 학술대회 및 정기총회	2006, 6	Jeju ICC, 한국	
Hee-Kyoung Lim, Jeong-Yong Moon, and Somi K. Cho	The Hexane fraction of Young <i>Dangyuja</i> (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) Fruits Induces Apoptosis in U937 Cells	2006 한국식품과학회 제 73차 학술대회 및 정기총회	2006, 6	Jeju ICC, 한국	
김윤정, 김소미	Antioxidant Activity of Extracts from <i>dangyuja</i> (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) leaf produced in Jeju Island	2006년도 한국응용생명화학회 추계 국제학술대회	2006, 10	경주, 한국	
문정용, 김하나, 김소미	The Chloroform Fraction of <i>dangyuja</i> leaf induces Apoptosis in a Human Gastric Carcinoma Cell Line, SNU-16	2006년도 한국응용생명화학회 추계 국제학술대회	2006, 10	경주, 한국	
김윤정, 김소미	Antioxidant Activity of Extracts from <i>dangyuja</i> (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) leaf Produced in Jeju Island	2007년도 한국응용생명화학회 추계 국제학술대회	2007, 10	경주, 한국	
문정용, 김하나, 김소미	The Chloroform Fraction of <i>Dangyuja</i> leaf Induces Apoptosis in HeLa	2007년도 한국응용생명화학회 추계 국제학술대회	2007, 10	경주, 한국	

국제

발표자	논문제목	학술대회명	년, 월	장소, 국명	비고
Se Young Kim, Young-Suk Kim, Somi Kim Cho	Determination of flavonoids in dangyooja(<i>Citrus grandis</i> Osbek)	232nd American Chemical Society National Meeting & Exposition	2006, 9	San Francisco, 미국	
김윤정, 문정용, 김소미	Antioxidant and Anticancer Activity of Extracts from Dangyuja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) leaf Produced in Jeju Island	ICoFF2007 (International Conference on Food Factors for Health Promotion)	2007, 11	교토, 일본	
김하나, 김소미	Immature Dangyuja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) Fruit Induces antiproliferation and Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through activation of caspase-3	ICoFF2007 (International Conference on Food Factors for Health Promotion)	2007, 11	교토, 일본	
문정용, 김하나, 김윤정, 김소미	Induction of apoptosis by the Chloroform extract of Dangyuja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) leaf in SNU-16 human gastric cancer cells	ICoFF2007 (International Conference on Food Factors for Health Promotion)	2007, 11	교토, 일본	
양은진, 강경진, 이혜자, 윤원종, 강희경, 김소미, 유은숙	Anti-inflammatory effect of <i>Citrus grandis</i> Osbeck leaves in RAW264.7 and HaCaT cells	ICoFF2007 (International Conference on Food Factors for Health Promotion)	2007, 11	교토, 일본	

4. 산업체 이전활용 계획

1) 산업체 이전 및 실용화

성과물은 개발 즉시 특허를 출원하여 독점적인 지적재산권을 확보하며, 참여업체에 이전하고 참여업체는 1년차에는 개발결과를 즉시 산업화할 수 있는 시설 및 준비를 완료하며, 2년차에 개발에 직접 참여하게 되며, 3차년도 과제 종료와 동시에 시작품을 제작하고 시장에 진출할 수 있도록 한다.

2) 상품화:

본 발명은 미성숙 당유자과 추출물 또는 당유자 잎 추출물을 함유하는 항암제 조성물을 제공하는 효과가 있다. 본 발명의 미성숙 당유자과 추출물 또는 당유자 잎 추출물을 함유하는 항암제 조성물을 이용하면, 천연 식품 추출물을 항암제 조성물로 사용함으로써 독성이 없는 안전한 항암제로 사용할 수 있고, 상기 추출물에 다양한 용매 분획을 처리하여 암의 종류에 따라 특이적인 항암제를 개발할 수 있다. 참여기업은 제조가격, 생산비용 등을 감안하여 재래감귤 생과일 음료와 고기능, 다기능 당유자 추출물 함유 건강음료를 생산하여 다양한 제품으로 상품화한다.

3) 현장보급방안:

재래감귤 당유자 재배농가와 계약재배를 통해 다량으로 원료를 확보할 수 있는 계획을 수립하며, 연구팀은 농가가 안정적으로 재배할 수 있는 기술을 지도함으로써 원료생산, 기술개발, 생산, 시장 확보를 유기적으로 확보한다.

4) 추가 기술 개발

- 당유자의 생리활성 성분이 강화된 기능성 음료 개발을 시도하여 시제품을 제작하였으나 당유자 특유의 리모노이드계 화합물과 나린진계 화합물이 다량 함유되어 있어 쓴 맛으로 인해 소비자들의 반응이 기대에 미치지 못함.
- 제주 당유자차는 맛과 향이 강하면서 건강 기능식품으로서의 개발 가치는 우수한 평가를 받았음에도 불구하고 당유자차 특유의 쓴맛 때문에 소비자들이 구매하는데 부담을 느낀다는 의견이 대다수였다. 당유자 과즙이나 잎녹즙을 함유한 음료 개발 시 소비자들의 기호도 검사가 마케팅 전략에 매우 중요하

며 당유자 고유의 쓴 맛을 감소하기 위한 기술이 추가로 개발되어야 할 것으로 예상된다.

- 또한 본 연구를 통해 *in vitro* 효능에 관련된 기초 결과는 매우 안정적으로 확보되었으나, 기능성 식품 신소재 개발을 위해서 동물 및 인체 실험 연구가 추가적으로 진행된다면 기능성식품의 상품화가 용이할 것으로 사료되며 이는 농민 소득 증대로 이어질 것으로 판단된다.

Antioxidant Activity of Extracts from *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Fruits Produced in Jeju Island

Hee-Kyoung Lim, Eun-Sook Yoo, Jeong-Yong Moon¹, Yoo-Jin Jeon², and Soan K. Cho^{1,3*}

Department of Medicine, Cheju National University, Jeju, Jeju 690-756, Korea

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju, Jeju 690-756, Korea

²Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju, Jeju 690-756, Korea

³The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju, Jeju 690-756, Korea

생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
37(2): 74 ~ 80 (2006)

RAW 264.7 및 HaCaT Cell에서 담유자 미숙과의 염증억제 효과

이혜자¹ · 감경진¹ · 윤원홍¹ · 감희경¹ · 김영석² · 김소미³ · 유은숙^{1*}

¹제주대학교 의과대학 약리학교실, ²이화여자대학교 식품영양학과, ³제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

Anti-inflammatory Effect of Unripe Fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCaT Cells

Hye-Ja Lee¹, Gyeong-Jin Kang¹, Weon-Jong Yoon¹, Hee-Kyoung Kang¹,
Young-Suk Kim², So-Mi Kim³, and Eun-Sook Yoo^{1*}

¹Department of Pharmacology, College of Medicine, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

²Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Sodaemun-gu, Seoul, Korea

³Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

Induction of apoptosis by the chloroform extract of *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) leaf in SNU-16 human gastric cancer cells

Sori K. Cho, Jeongyeon Moon, Yurjung Kim, Hans Kim, Jungso Jung
Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University

Citrus grandis Osbeck has been used by traditional healers for treating rheumatoids and rheumatism in Korea. In this study, investigations were conducted to examine the anti-proliferative effects of *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) leaf on several cell lines. Among them, SNU-16 human gastric cancer cells were the most susceptible to the chloroform fraction of *Danggyuja* leaf (CFDL) and their growth was inhibited in a dose-dependent manner. With the CFDL, apoptosis-related experiments, (a) DNA fragmentation, (b) RT-PCR transcription-polymerase chain reaction of BCL-2 and BAX genes; (c) western blot analysis of Bcl-2, Bax, PARP, and Caspase-3; (d) Caspase-3 activity assay, were carried out on SNU-16 cells. Our results revealed that treatment with CFDL increased the apoptosis of SNU-16 cells with typical apoptotic characteristics. This effect of CFDL on SNU-16 cells might be via mitochondria-mediated signaling pathway, as demonstrated by increases in the ratio of BAX/BCL-2 gene and Bax/Bcl-2 protein expression. Furthermore, proteolytic cleavages of Caspase-3 and PARP, Caspase-3 activity in the CFDL-treated cells were significantly increased compared with those in control group. Thus, our data present the first evidence of CFDL as an apoptosis inducer in SNU-16 cells and these findings may open interesting perspectives to the efficacy in human gastric cancer treatment.

Immature *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Fruit Induces Anti-proliferation and Apoptosis in Human Leukemia U937 Cells through Activation of Caspase-3

Ji E. Park¹, Jih Y. Kim², Heo K. Lim², Young H. Kim², Hans Kim², So W. Kim¹, Moon J. Cho^{2*}

¹Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Chonju National University, Gwangju, In the Tochi, Inc. Araidoong, Jeju Special Self-Governing Province, Korea; ²Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University

China fruits have been known to reduce the proliferation and induce apoptosis of many cancer cells. In this study, investigations were conducted to examine the anti-proliferative effects of the immature *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruit on several cell lines. Among them, human U937 leukemia (U937) cells were the most susceptible to the hexane fraction of young *Danggyuja* fruits (HFYD) and their growth was inhibited in a dose-dependent manner (IC50 = 40 mg/ml). With the HFYD, apoptosis-related experiments, (a) Annexin V staining; (b) DNA fragmentation; (c) RT-PCR of Bcl-2 and Bax gene; (d) Western blot analysis of Bcl-2, Bax, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and Caspase-3 activity assay, were carried out on U937 cells. Our results revealed that 16-h treatment with HFYD (100 mg/ml) increased the apoptosis of U937 cells with typical apoptotic characteristics. We observed the down-regulation of Bcl-2 expression and proteolytic cleavages of caspase-3 and PARP, caspase-3 activity in the HFYD-treated cells were significantly increased compared with those in control group. Taken together, these results indicated that the anti-proliferative effect of HFYD was associated with the induction of apoptotic cell death through regulation of several major growth regulatory gene products, and HFYD may have therapeutic potential in human leukemia treatment.

Antioxidant Activity of Extracts from *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Leaf Produced in Jeju Island

Yurjung Kim¹, Jeongyeon Moon² and Sori K. Cho^{2*}

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Chonju National University 198-756, Korea

Chloroform extract of *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) leaf was investigated for its antioxidant activity measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Among the various solvent-extracted fractions of *Danggyuja* leaf, the ethyl acetate-extracted fraction (EF) showed the greatest DPPH free radical scavenging activity. EF was further screened for antioxidant activities by several *in vitro* assays. We observed that generation of the reactive oxygen species (ROS) was reduced in cells pretreated with EF fraction. The total activity and the mRNA expression of antioxidant enzymes, Glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR) were also measured. The results indicate that the ethyl acetate-extracted fraction (EF) *Danggyuja* leaf extracts upregulate antioxidant enzymes and can be used as an easily accessible source of natural antioxidants. (SRAA)

The Chloroform Fraction of *Danggyuja* Leaf Induces Apoptosis in a Human Gastric Cancer Cell Line, SNU-16G

Jeongyeon Moon¹, Hans Kim² and Sori K. Cho^{2*}

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Chonju National University 198-756, Korea

We examined the cytotoxic activity of *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) leaf extracts on a SNU-16 cell line using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and investigated whether the mechanism involves induction of apoptosis. It was found that the chloroform fraction of *Danggyuja* leaf extracts inhibit growth of SNU-16 cell in a dose-dependent manner, which was accompanied with induction of apoptotic bodies and DNA fragmentation. The results of western blot analysis suggested that the anti-proliferative effects of *Danggyuja* leaf extracts were associated with the induction of apoptotic cell death through regulation of several gene products such as Bcl-2, Bax, Caspase, and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP).

Antioxidant and Anticancer Activity of Extracts from *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Leaf Produced in Jeju Island

Yurjung Kim¹, Jeongyeon Moon², Jeongsook Lee²

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University

Antioxidant flavonoid compounds play an important role in inhibiting and scavenging free radicals, thus providing protection to humans against several diseases. We report the antioxidant and anticancer activities of crude extracts from *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) leaves, which is a *Citrus* plant native to Jeju, Korea. Among the various solvent-extracted fractions of *Danggyuja* leaves, the ethyl acetate-extracted fraction (EF) showed the greatest 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. The EF showed significant antioxidant activity and a cytotoxic effect against leukemia cells (U937). Moreover, we investigate the cytotoxic effect against leukemia cells (U937). Moreover, we investigate the cytotoxic effect against leukemia cells (U937). Moreover, we investigate the cytotoxic effect against leukemia cells (U937). The EF significantly reduced U937 cell proliferation and apoptosis was significantly induced by downregulated DNA fragmentation and induced body apoptosis. All together, these results imply that EF of *Danggyuja* leaf extracts may have anticancer activity through the antioxidant activity and apoptosis-inducing effect.

Antioxidant Activity of Extracts from *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Fruits Produced in Jeju Island

Hee-Kyoung Lim¹ and Eun-Sook Yoo Dept. of Nutrition, Chonju National University Jeong-Yeong Moon Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University, You-In Jeon Faculty of Applied Marine Science, Chonju National University, Sori K. Cho Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University, The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University

Chloroform extract of young *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruit was investigated for its antioxidant activity as measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Among the samples, including *Citrus* species and various solvent-extracted fractions of young *Danggyuja* fruits, the hexane-extracted fraction (HF) and hexane extracted fraction (HF) showed the greatest DPPH free radical scavenging activity. HF and HF were further screened for their antioxidant activities by several *in vitro* assays. The cell viability assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay showed that leaf fractions significantly reduced MTT-reduced cytotoxicity in U937 cells dose-dependently. Components of the fraction oxygen species (ROS) was also reduced in cells pretreated with leaf fractions. In addition, HF showed a higher level of total polyphenolic antioxidant capacity than HF in U937-treated U937 cells. Taken together, these results indicate that young *Danggyuja* fruit can be used as an easily accessible source of natural antioxidants.

The Hexane Fraction of Young *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) Fruits Induces Apoptosis in U937 Cells

Hee-Kyoung Lim¹ Dept. of Nutrition, Chonju National University, Jeong-Yeong Moon and Sori K. Cho Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University, Sori K. Cho The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chonju National University

We investigated whether the various solvent fractions of young *Danggyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruits induced cell death on human leukemia U937 cells. It was found that the hexane fraction of young *Danggyuja* fruits (HFYD) could induce cell growth of U937 cells in a dose-dependent manner, which was associated with morphological change and apoptotic cell death such as formation of apoptotic bodies and DNA fragmentation. Cytotoxicity of HFYD was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. It exhibited antiproliferative effects against U937 cells (IC50 = 60 µg/ml). We observed the down-regulation of Bcl-2 expression and proteolytic activation of caspase-3 in HFYD-treated U937 cells. Moreover, HFYD did not affect the pro-apoptotic Bax expression. Taken together, these results indicated that the anti-proliferative effects of HFYD were associated with the induction of apoptotic cell death through regulation of several major growth regulatory gene products such as Bcl-2, Bax, Caspase-3 and PARP, and HFYD may have therapeutic potential in human leukemia treatment.

첨부(특허출원증)



방 식 심 사 관	담 양	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2007.08.05

【발명의 구분명칭】 당유자 잎 추출물 및 이를 함유하는 항염증용 약학 조성물

【발명의 영문명칭】 Extract of Citrus grandis Osbeck Leaves and
Anti-inflammatory Pharmaceutical Composition Containing
the Same

【출원인】

【영칭】 제주대학교 신약협력단

【출원인코드】 2-2004-016727-0



방 식 심 사 관	담 양	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2007.03.30

【발명의 구분명칭】 당유자 미성숙과 추출물 또는 당유자잎 추출물을 함유하는

항암용 약학조성물

【발명의 영문명칭】 Pharmaceutical Composition for Anticancer Comprising
Extracts of Young Dangyuja Fruit or Leafs of Dangyuja

【출원인】

【영칭】 제주대학교 신약협력단

【출원인코드】 2-2004-016727-0

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제1절 기능성 식품으로서의 감귤

최근 세계 각국의 연구 프로젝트에서 감귤류는 기능성 성분의 보물창고로 알려지고 있고 소비자의 요구도 기능성 성분을 함유한 건강식품이 선호도가 높아지고 있다. 감귤은 매우 광범위한 유전적 다양성을 갖고 있어서 품종, 계통별로 이러한 기능성 성분의 함량차이도 많다고 볼 수 있겠으나 실제로는 그렇지 않다. 단지 미확인 유용성분이 온주밀감보다는 유자에서 발현될 확률이 더욱 높은 편이다. 지금까지 유용성분으로 확인되어 연구개발단계에 있는 종류로는 테르페노이드, 플라보노이드, 카로티노이드(β -Carotene), 리모노이드 등이 생리활성 및 항산화 활성에 대해 검토단계에 있고 효소활성저해작용을 하는 안지오텐신 등에 대해 많은 후속연구가 진행되고 있다.

1. 주요 성분의 이용 가능성

1) 정유성분

감귤류의 과피에 flavedo라고 하는 황색부분을 보면 정유를 함유한 원모양의 유실(油室)이 있는데 여기에 포함되어 있는 oil성분이 정유이다. 주성분은 (R)-Limonene이고 정유가 70~90%를 점유하고 있다. (R)-Limonene에는 중추신경이 흥분을 진정시키는 작용이 있고, 쥐에 발암성분을 투여하면 폐종양, 또는 위에 암을 유발하는데 사전에 Lemon油나 감귤류의 油를 투여하면 암발생을 억제한다.

2) 플라보노이드

쓴맛을 내는 Hesperidin, Naringin에도 항암효과가 보고되어 있으며 간이식을 한 쥐의 생존율을 높이는 작용이 있고 쥐의 백혈병세포를 정상세포로 변화시킨다고 한다.

3) 리모노이드

감귤류의 쓴맛이 주원인이기 때문에 품질상으로는 바람직하지 못한 성분이지만 리모넨이나 노미린에 발암억제 작용이 있다는 것이 알려지고 있다.

4) 카로티노이드

녹황색채소나 과일에 많은 성분으로 β -카로틴 외에 α -카로틴이나 β -크립트키산틴도 항암 물질이라는게 밝혀지고 있다.

Table 15. 일본에서 연구 중인 성분별 기능성 물질

기능성 물질	역 할
테르페노이드	암발생억제, 체내 독소제거, 항산화활성
카로티노이드	암발생억제, 성인병발생억제
(β -carotene)	활성산소 제거작용
플라보노이드	암발생억제, 모세혈관 강화작용
리모노이드	종양발생억제(폐, 위)
시네후린	교감신경흥분작용, 염증억제

제2절 감귤의 기능성 성분 이용기술

1. 과피 함유 기능성성분의 이용

최근 식품의 기능성성분에 관한 것이 화제가 되고 있다. 야채 주스 중에서 당근 주스가 갑자기 인기를 끌게 되었는데 그 이유는 당근 주스에 함유된 β -카로틴이 몸에 좋다고 하는 정보가 소비자들에게 널리 알려졌기 때문이라고 생각된다. 이러한 예와 같이 감귤에 부가가치 부여 및 직접 혹은 간접적으로 감귤류의 수요 개척을 위해 감귤류의 기능성성분을 분명히 밝힐 필요가 있다. 더욱이 이 결과를 육종소재의 선발의 정보로서 feed-back하는 것으로서 기능성이 풍부한 감귤을

만들어 내는 것과 연결될 수 있을 것이다.

2. 기능성성분 연구 동향

최근 세계 각국의 연구 프로젝트에서 감귤류는 기능성성분의 보물창고로 알려져 있고 또한 여러 가지 기능을 가진 식물성분이 보고되고 있다. 밀감은 매우 광범위한 유전적 다양성을 가지고 있으나 밀감과 식물전반에 걸쳐서 기능성성분 등의 유전적 변이에 관해서 상세하게 검토되어 있다고는 할 수 없다. 그런데 일본 과수시험장 흥진지장에서는 감귤류의 유전자원과 관련된 기능성 성분을 다수 보고하고 있으며 동시에 동아시아의 감귤류 보존 센터로서의 역할을 하려고 현재에도 세계 각국으로부터 유전자원 수집을 계속수행하고 있다. 이와 같은 풍부한 유전자원을 실험재료로의 이용성에 대한 이점을 살리고 중요한 기능성성분의 함량이나 기능성과 관계가 깊은 생리활성에 대한 밀감과 식물에 있어서 변동 조사에 역점을 두고 있는 실정이다

1) 감귤류의 과피와 과실은 옛날부터 한방의 처방에 진피, 귤피, 지실, 지각의 이름으로 사용되어진 생약이다. 감귤에서 유래된 생약의 약리작용의 하나로 교감신경흥분작용이 있는데 그 활성본체가 시네후린이라는 것이 확인되어 감귤류 생약작용 간단한 설명이 가능하게 되었다. 또한 시네후린은 염증원인이 되는 물질인 로이코트리엔의 작용을 억제하는 것이 보고되고 있다. 이러한 점을 생각하면 시네후린 함량에 대해 계절변동에 따라 감귤 과피 중에 함유량을 조사할 필요가 있다.

2) 현재 검토 중인 기능성평가

① 항산화작용성분

항산화활성이 높은 여러 종류의 감귤류에 관해서 활성의 본체를 밝히기 위하여 분리, 정제 등으로 활성본체를 밝히고 유연 화합물의 탐색, 고함량 품종의 분석 등에 적용한다. 현재추세는 천연의 항산화제개발.

② 안지오텐신 변환효소(ACE)저해

혈압 조절제(혈압강하제)로서 ACE를 저해하는 것으로 혈압을 낮추는 것이 가능하고 실제로서의 ACE저해제가 사용되고 있다. 감귤 과피 물질의 ACE에 대하여 저해작용 검토 결과 여러 종류의 감귤류 과피 물질의 활성을 인정되었다.

③ 휘부린 용해작용

몸에는 혈액의 응고와 이것을 제어 용해하는 기능이 있다. 혈전용해제로 감귤류 과피 추출액 중 혈전용해작용이 인정되고 있기 때문에 검토 중.

④ 치료시나제 저해작용

피부노화증에 관계하는 효소로 치료시나제가 있다. 치료시나제 저해제는 美白果 등을 기대되고 화장품등으로 사용되어지고 있으며 감귤류 과피에 많이 함유된 제해제에 대해 현재 평가 검토 중에 있다.

⑤ HIV-1 프로테아제저해작용

에이즈 바이러스 증식에 관여하는 효소로서 HIV-1 프로테아제가 있다. 이 효소를 저해하는 것에 의해 에이즈 바이러스의 증식이 저해되는 것이 아닌가 하고 생각된다. 감귤과피의 HIV-1 프로테아제 저해제 활성에 관해서 현재 평가 검토를 하고 있다.

3. 국내외 감귤관련특허

1) 의약 조형에 관한 특허건수가 537건으로 가장 많았으며 그 외에 음료, 저장, 효소 등의 순으로 타나남. (Micropatent사의 국제특허 DB 및 Aureka 프로그램 이용분석)

2) 감귤의 쓴맛 관련특허 천여 건을 검색해 본 결과 감귤의 쓴맛에 관련된 특허는 아래 표와 같으며 주로 이온교환수지나 실리카겔, 합성흡착제를 이용하여 쓴맛을 유발하는 성분을 흡착·제거시키는 방법이 주요 기술임.

1. EHIMEKEN SEIKA NOUGIYOU KIYODOU KUMIAI RENGOKAI :

To prepare a citrus fruit drink having improved quality and good flavor, by treating a citrus fruit drink with an ion exchange resin to remove one or two or more of organic acids, bitter substances and cationic substances selectively.

2. NIIMOTO SABUROU et al.:

To obtain a fruit drink with little bitterness by easy operation, by adsorbing limonoid substances which are bitter components contained in a fruit drink on silica gel to remove the substances.

3. IFUKU YASUSHI et al.:

The juice of citrus fruits are treated with a synthetic adsorbent to remove hesperidin to prevent the pulp in the juice from precipitating and give a juice whose turbidity and carotinoid are maintained, resulting in stabilized quality and good smell and taste.

4. 이용방안

감귤류에 함유된 기능성성분은 과피 그 자체, 추출 엑기스 또는 간단한 분획조작을 가하는 것만으로 제품화가 가능할 것이지만 맛있고 경쟁력 있는 기능성소재로 개발되기 위해서 기능성성분이 해야 할 역할의 정확한 분석 연구가 우선 실행되어야 하며 또한 대부분의 감귤유래 생리활성성분들이 지닌 쓴 맛을 해소하기 위한 기술도 개발되어야 한다고 판단된다.

제 7 장 참고문헌

- 1) 감귤의 bioflavonoids 분리, 정제 및 혈압강하효과, 손홍수 · 김현숙 · 권태봉 · 주진순, 한국영양 식량학회지, Vol.21 No.2, pp136-142(1992)
- 2) Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in Citrus, Russell L. Rouseff, Shirley F. Martin, and Charles O. Youtsey, Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol.35 No.6, pp1027-1030(1987)
- 3) Simultaneous reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, Feras I. Kanaze, Chrysi Gabrieli, Eugene Kokkalou, Manolis Georgarakis, Ioannis Niopas, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol.33, pp243-249(2003)
- 4) 감귤과육 및 과피의 식이섬유와 플라보노이드 검색 및 정량, 은종방 · 정영민 · 우건조, 한국식품과학회지, Vol.28 No.2, pp371-377(1996)
- 5) High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange(Citrus aurantium L.), Xian-guo He, Li-zhi Lian, Loanalysis of sour orange(Citrus aurantium L.), Xian-guo He, Li-zhi Lian, Long-ze Lin, Mattew W.Bernart, Journal of Chromatography A, Vol791, pp124-137(1997)
- 6) 감귤 과피 내의 플라보노이드 추출법의 최적화 및 HPLC에 의한 분리동정, 최영훈 · 송은영 · 김승화 · 강성구 · 정순경 · 이창후, 원예과학기술지 포스터발표(2000)
- 7) 제주재래종 감귤류 미숙과의 neohesperidin, naringin 및 hesperidin 함량, 류미라 · 김은영 · 배인영 · 박용곤, 한국식품과학회지, Vol.34 No.1, pp132-135(2002)
- 8) HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from Citrus juices, S. Kawaii, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano, Journal of Agricultural and Food chemistry, Vol.47 pp128-135(1999)
- 10) Acree T.E, Am H, Flavornet. <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/>. Cornell University, Geneva, USA.(1997)

- 11) 정진웅, 이영철, 이경미, 김인환, 이미순, 유자과피를 이용한 Oleoresin의 제조조건, 한국식품과학회지, 30(1),p 145~156.(1999)
- 12) Change of Flavonoids in the Peel of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation, Young-Chun Kim, Kyung-Soo Koh and Jeong-sam Koh, Food Science Boitechnology vol.10,No.5 pp.483-487
- 13) HPLC 및 HPLC/MS를 이용한 유자 씨앗 중 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 분석, 우강용, 김재이, 김민철, 장덕규, 한국식품영양과학회지 35(3),353-358(2006)
- 14) 제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화, 송은영, 최영훈, 강경희, 고정삼, KOREAN J.FOOD SCI. TECHNOL.vol.30, No. 2, pp 306-312 (1998)
- 15) Phenols in Citrus Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in Citrus Peel, John A. Manthey and Karel Grohmann, J.Agric.Food Chem. 2001, 49, 3268-3273
- 16) Chemical Constituents of the Fruit of *Citrus junos*, Eun Jung Cho, Xianglan Piao, Longzhu Piao, Huishan Piao, Man Ki Park, Bak Kwang Kim and Jeong Hill Park, Natural Product Sciences 6(4) : 179-182 (2000)
- 17) Variation in Major Antioxidants and Total Antioxidant Activity of Yuzu(*Citrus junos Sieb ex Tanaka*) during Maturation and between Cltivars, Kyung Mi Yoo, Ki Won Lee, Jae Bok Park, Hyong Joo Lee, and In Kyeong Hwang, J.Agric.Food Chem. 2004,52, 5907-5913
- 18) Antioxidant Activity and Phenolic Compositon of Citrus Peel and Seed Extracts, Alessandra Bocco, Marie-Elisabeth Cuvelier, Hubert Richard, and Claudette Berset, j. Agric.Food Chem. 1998, 46, 2123-2129
- 19) Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic. Biol. Med. 29: 222-230 (2000)
- 20) Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. Food Chem. Toxicol. 1995. 33: 601-617 (1995)
- 21) Lopaczynski W, Zeisel SH. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. Nutr. Res. 21: 295-307 (2001)
- 22) Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative

- stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 28: 771-799 (2004)
- 23) Ballinger SW. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 1278-1295 (2005)
 - 24) Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 496: 171-180 (2001)
 - 25) Barlow SM. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants*. pp. 253-307. Barking, England: Elsevier Science Publishers Ltd. (1990)
 - 26) Madhavi DL, Salunkhe DK. In D. L. Madhavi, SS. Deshpande, & D. K. Salunkhe (Eds.), *Food antioxidants* (pp. 267-359). NY, USA: Marcell Dekker. (1996)
 - 27) Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408: 239-247 (2000)
 - 28) Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1-10 (2003)
 - 29) Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 575-586 (2004)
 - 30) Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4581-4589 (2000)
 - 31) Singh RP, Murthy KN, Jayaprakasha GK. Chidamabara antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.* 50: 81-86 (2002)
 - 32) Jayaprakasha GK, Tamil Selvi A, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 36: 117-122 (2003)
 - 33) Gorinstein S, Milena C, Machackova I, Haruenkit R, Park YS, Jung ST, Yamamoto K, Ayala AL, Katrich E, Trakhtenberg S. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chem.* 84: 503-510 (2004)
 - 34) Sun CD, Chen KS, Chen Y, Chen QJ. Contents and antioxidant capacity

- of limonin and nomilin in different tissues of citrusfruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chem.* 93: 599-605 (2005)
- 35) Mokbel MS, Hashinaga F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chem.* 94: 529-534 (2006)
 - 36) Lim HK, Yoo ES, Moon JY, Jeon YJ, Cho SK. Antioxidant activity of extracts from dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju Island. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 312-316 (2006)
 - 37) Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 79: 2056-2068 (2006)
 - 38) Alía M, Ramos S, Mateos R., Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212: 110-118 (2006)
 - 39) Kim HY. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local *Citrus* spp. in Cheju and the genetic markers among them. PhD thesis, Chonnam National University (1988)
 - 40) Cheung LM, Cheung PC, Ooi VE. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 81: 249-255 (2003)
 - 41) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559 (1999)
 - 42) Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200 (1958)
 - 43) Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 612-616 (1999)
 - 44) Datta L, Babbar P, Srivastava T, Sinha S, Chattopadhyay P. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 148-157 (2002)
 - 45) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358 (1979)
 - 46) Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay:

- guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221 (2000)
- 47) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119: 203-210 (1989)
 - 48) Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152-159 (1997)
 - 49) Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *J. Agric. Food Chem.* 50: 1379-1382 (2002)
 - 50) Veglioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117 (1998)
 - 51) Jayaprakasha GK, Patil BS. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem.* 101: 410-418 (2007)
 - 52) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
 - 53) Alía M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L. Response of the antioxidant defense system to tert-Butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19: 119-128 (2005)
 - 54) Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH:-NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 272: 1286-1294 (1997)
 - 55) Amoroso S, Gioielli A, Cataldi M, Di Renzo G, Annunziato L. In the neuronal cellline SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{2+} increase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1452: 151-160 (1999)