

감귤과피로부터 발암 promotion 억제활성성분의 분리

윤창훈* · 좌승미

제주대학교 자연과학대학 식품영양학과

Isolation of the Anti-tumor Promoters from Citrus Peels

Chang-Hoon Yoon* and Seung-Mi Jwa

Department of Food Science and Nutrition, Jeju National University, Jeju city, Jeju-do 690-756, Korea

Received April 29, 2004; Accepted December 30, 2005

This study was carried out to isolate the possible anti-tumor promoters from the citrus peel (*Citrus natsudaidai* Hayata). We fractionated the cold-pressed oil of citrus peel by column chromatography, HPLC and TLC. The analysis on column chromatography yielded seven peaks (F-I~F-VII), all of which showed single spot on TLC analysis (R_f for F-I~VIII; 0.31, 0.13, 0.13, 0.78, 0.79, 0.69 and 0.84). Among the seven fractions, three fractions (F-I, -II and F-IV) were re-analyzed on HPLC, also showing single peak except for one fraction (F-IV) which was divided two peaks. The retention times (R_t) of F-I and F-II was 3 min. and 2.5 min., respectively, but these of two peaks from F-IV were 2 min. and 4.5 min., respectively. Since the area of the latter peak (4.5 min.) was very smaller than that of the former one (2 min.), it is considered that the latter one did not appear on TLC analysis. The inhibitory effect on tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced Epstein-Barr virus activation in Raji cells was tested for the seven fraction obtained. It decreased in order of F-VI (82.3±1.3%) > F-I (80.4±1.6%) > F-II (77.2±0.9%) > F-III (75.0±1.2%) > F-IV (74.1±1.0%) > F-V (71.0±1.1%) > F-VII (70.2±1.2%). These results imply that some constituents contained in citrus peels have the inhibitory activity of TPA-induced tumor promotion.

Key words: citrus peels, Raji cells, anti-tumor promoters

서 론

과일이나 야채에는 고혈압, 비만, 당뇨병과 같은 생활습관병을 예방한다든지 암의 발생을 억제하는 성분이 있다고 밝혀지고 있다. 따라서 의약품을 사용하지 않고, 생활습관, 특히 식생활을 개선함으로써 이와 같은 질병을 예방해야 한다는 소리가 높아지고 있다.

오렌지, 자몽, 레몬 등의 감귤류에는 비타민, 무기질, 섬유질 등이 풍부하게 함유되어 있어 생활습관병의 방지에 유효한 건강보조 식품이라는 인식이 확산되어 가고 있다. 또한 많은 역학조사나 동물실험의 결과로 감귤류에는 암 예방 성분이 존재한다는 것이 시사되어 있는데,¹⁾ 현재까지 알려진 성분으로는 flavonoid, coumarin, carotenoid, limonoid 등이 있다. flavonoid에는 유방암세포의 증식을 억제하는 효과가 있고, coumarin중의 auraptene은 하밀감, 팔삭, 자몽 등의 과피나 시판오렌지주스에도 함유되어 있는데, 이것은 *in vitro* 실험에서 항발암(抗發

癌) promotor 활성이, 또 동물실험에서는 피부암,²⁾ 구강암, 대장암³⁾에 대한 억제활성이 있다는 것이 밝혀졌다. 그리고 온주 밀감인 경우 carotenoid 함량의 절반이상이 β-cryptoxanthin인데, 이것은 β-carotene 보다 몇 배 강한 항발암 promotor 작용을 가지고 있다고 보고되었다.⁴⁾ 최근, limonine과 nomiline 등의 limonoid에는 GST(glutathione S-transferase)의 유도효과(즉 발암 물질해독효과)가 있다고 알려졌다.⁵⁾

그러나 감귤을 시료로 하여 항암활성성분의 분리를 목적으로 한 실험에서는, 위에서 언급한 auraptene의 경우를 제외하고는 주로 감귤의 과육성분을 재료로 한 연구가 이루어졌고, 과피성분에 대한 연구는 손 등⁶⁾이 flavonoids의 혈압강하효과를 조사한 것 외에는 별로 찾아볼 수 없다.

한편, 암의 발생기구는 현재까지 여러단계로 진행된다는 이른바 「발암다단계설」⁷⁾이 널리 받아들여지고 있다. 즉, initiation → promotion → progression 의 3단계를 거친다는 것이다. 그런데 발암억제의 측면에서 수행된 많은 연구의 결과, initiation과정은 불가역적이기 때문에 이미 initiator의 작용을 받은 세포는 효과가 없는 것으로 생각되어지고 있다. 그러나 promotion과정은 가역적이며, promotor의 장기간에 걸친 연속적 작용이 요구된다. 그러므로 이 promotion 단계를 도중에서 억제시킬 수 있

*Corresponding author

Phone: 82-64-754-3552; Fax: 82-64-725-2539

E-mail: chyoon@cheju.ac.kr

다던 다음단계로 이행하지 않게 되어 암화를 예방할 수 있다고 시사되어 있으며, 발암의 예방적 관점에서 식품성분에 의한 promotion 단계의 억제에 관한 연구가 주목을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 지금까지 별로 조사되지 않았던 감귤의 과피 중에 함유된 정유성분에 착안하여, 이것을 분리·정제하여 promotion 단계의 억제를 평가할 수 있는 검정법을 이용하여 항암활성여부를 조사하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에서 사용한 하귤(*Citrus natsudaidai* HAYATA)은 1998년 9월 하순 제주도 서귀포시 하호에서 채취하였고, 껍질을 벗겨서 과피만을 사용하였다. Human B-lymphoblastoid cell(Africa의 Burkitt종양환자로부터 얻어진 것임, 통상 "Raji cell"이라고 부름)은 日本 近畿大學 生物理工學部 生體機能工學 研究室 村上 明(Akira Murakami) 박사 group으로부터 제공받았다. 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, RPMI 1640 배지는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서, fetal bovine serum(FBS)은 JRH Biosciences(Lenexa, KS, USA)에서 구입하였다. 1차항체인 상인두암환자(上咽頭癌患者)의 혈청은 상기의 Murakami 박사 group으로부터 제공받았고, 2차항체는 fluorescein isothiocyanate(FITC)-labelled anti-human IgG(γ -chain; Dako, Glostrup, Denmark)를 0.2% Na₂S₂O₃를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)으로 30배 희석해서 사용하였다. 그리고 기타의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

활성성분 분리. 하귤의 과피(5kg)를 FMC In-line Citrus Juice Extractor(FMC Corporation, Chicago, IL)로 cold-press하여 착즙한 것 중에서 20m를 여과하여 column chromatography 용 시료로 사용하였다. Wakogel C-200으로 충전한 glass column(2 × 60 cm)를 사용했는데, 용출액으로는 *n*-hexane : ethyl acetate를 75 : 25 (300 ml), 70 : 30 (100 ml), 65 : 35 (100 ml), 60 : 40 (100 ml), 50 : 50 (500 ml)의 비율로 각각 혼합하여 stepwise gradient가 되도록 하였다. 여기에서 용출된 각 분획에 대하여 TLC(Kieselgel 60F₂₅₄, Merck, Germany)분석을 하였는데, 이때 전개액은 *n*-hexane : ethyl acetate(5 : 1)을 사용하였다. 그리고 column chromatography에서 얻어진 각 분획에 대하여 다음과 같은 조건에서 HPLC 분석을 하였다. HPLC는 Spectrasystem(Spectra-physics Co., USA)을, column은 Versapack C₁₈(4.1 mm × 250 mm)을, 이동상은 75% MeOH를, 유속은 1.0 ml/min., 검출파장은 320 nm를 사용하였다.

Epstein-Barr virus(EBV)활성화 억제실험. 본 실험에서 항암 효과성분의 활성을 검정하기 위하여 이용된 EBV활성화 억제 실험방법은 Itoh 등⁸⁾에 의해서 확립된 것이며, promotion 단계의 억제활성여부를 판정할 수 있는 간이검정법이다. Raji cell은 FBS, penicillin 및 Streptomycin을 각각 11%, 100 U/ml 및 72 U/ml 농도를 함유한 RPMI 1640배지에서 배양했다. Raji cell을 5 × 10⁵개 함유한 상기 배양액 1ml에 TPA와 *n*-butyrate의 최종농도가 각각 50 nM, 3 mM이 되도록 가한 후, 시료를 최종농도가 200 μg/ml 되도록 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양했다. 세포독성을 조사하기 위해 배양액의 일부

(50 μl)를 trypan blue로 염색하여 총세포수(500개)에 대한 사멸 세포의 수를 현미경으로 계측하였다.

남아있는 상기배양액을 원심분리(1,500 rpm, 5분)하여 침전속의 세포를 현탁하여 slide glass 위에 상인두암 환자의 혈청(EVB조기항원 함유)으로 처리한 후 FITC로 형광표시된 anti-human IgG(2차항체)로 처리하여 형광현미경으로 관찰했다.

평가방법은 항원유도물질(TPA, *n*-butyrate)만을 가했을때의 유도율(X%)을 구하고

$$X = \frac{\text{형광을 내는 세포수}}{\text{전(全) 세포수}} \times 100$$

그리고, 같은 처리 방법에서 시료를 가했을때 유도율(Y%)을 구한 다음 X 및 Y를 이용하여 EBV-EA유도 억제율(Z%)을 다음과 같이 구했다.

$$Z = \frac{(X - Y)}{X} \times 100$$

결과 및 고찰

활성성분 분리. 하귤과피를 cold-press하여 얻어진 액즙을 앞에서 기술한 조건에서 column chromatography를 실시한 결과를 Fig. 1에 나타냈는데, 비교적 깨끗이 분리된 7개의 peak를 얻을 수 있었다(F-I-F-VII분획). 각각의 분획의 단일성분여부를 확인하기 위하여 TLC분석을 한 결과는 Fig. 2와 같다. F-I-F-VII분획 모두에서 각각 단일반점만을 나타냈고, 각각의 R_f값은 0.31, 0.13, 0.13, 0.78, 0.79, 0.68, 0.84이었다. F-II와 F-III의 R_f값(0.13)을 제외하면 각각 다른 값을 나타내고 있어, 각 분획이 각각 다른 성분이라고 추정되며, 따라서 시료는 여러 가지의 성분으로 구성되어 있다는 것을 시사하는 것이다.

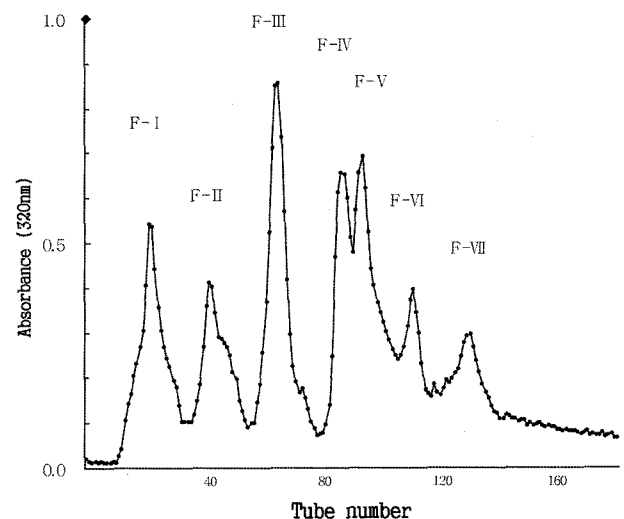


Fig. 1. Column chromatography of cold-pressed oil from citrus peels. Cold-pressed oil from citrus peels was chromatographed on Wakogel C-200 column (2 × 60 cm) at the flow rate of 1 ml/min. Each fraction was collected with 5 ml/tube. Elution solvent was the mixture of *n*-hexane and ethyl acetate. Stepwise gradient conditions were described in materials and methods.

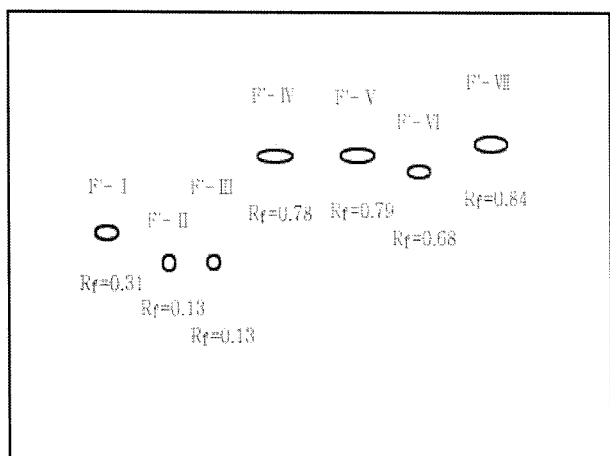


Fig. 2. TLC chromatograms of F-1-F-VII shown in Fig. 1. The TLC was developed with using the mixture of n-hexane and ethyl acetate (5 : 1).

이들 7개의 분획 중에서 Rf값의 차이가 큰 것을 3개(F-I (0.31), F-II(0.13), F-IV(0.78))를 선택하여 HPLC분석을 한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. F-I 및 F-II는 역시 모두 하나의 peak로 나타났고, retention time은 F-I이 3분, F-II는 2분 30초로 근소한 시간차이를 나타냈다. 그러나 F-IV는 2개의 peak로 나누어졌으며, 각각의 retention time은 2분과 4.5분이었다. 따라서 F-I과 F-II는 단일성분이라는 것이 재확인되었지만, F-IV는 2개의 성분이 혼합된 것이라고 생각되었다. 그렇지만 4분에 나타나는 peak는 매우 미량이어서 앞서 TLC분석(Fig. 2)에서 나타나지 않았던 것으로 여겨진다.

감귤류를 cold-press하여 얻어지는 정유성분은 그의 대부분이 과피에 존재하는데, 사냥(juice sacs)에도 전체 정유함량의 0.005% 정도 함유되어 있다. 과피정유와 juice정유의 조성은 서로 비슷하지만 동일한 것은 아니다. cold-press에 의한 정유성분은 휘발 성분과 비휘발성분으로 나뉘어지는데, 비휘발성분이 orange에는 1%, 자몽이나 lime에는 7% 이상 함유되어 있다.^{9,10,11)}

Komatsu 등¹³⁾은 일찍이(1930년) 하귤의 정유성분을 분석하였는데, 비휘발성성분에서 umbelliferone, auraptene, 4-ethoxycoumarin, tribromoauraptene, dibromoauraptene 등 5개의 coumarin 유도체를 분리할 수 있었다. 이 가운데 auraptene 이 하귤의 독특한 향기를 나타내는 주요한 성분이라는 것이 밝혀졌다. Nomura¹⁴⁾는 같은 하귤의 정유성분에서 coumarin유도체인 umbelliferone, auraptene 및 psoralen 유도체인 bergaptol 도 분리하였다. 미국산의 orange에 있어서는, Hunter 등¹²⁾은 비휘발성 성분의 주된 것은 coumarin류와 flavonoid류이고 그 외 미량성분으로써 waxes, carotenoids, tocopherols, 지방산, sterol 등이 있다고 보고하였으며, Stanley 등¹⁵⁾은 Seville(bitter) orange 를 분석한 결과 2개의 coumarin 유도체(osthol, auraptenol)와 한 개의 psoralen 유도체(bergapten)으로 구성되었다고 보고했다.

Nakatani 등¹⁶⁾은 감귤가공공장에서 팔삭(감귤품종명)을 착즙하여 주스를 만드는 과정에서 생기는 현탁액(emulsion fraction)을 원심분리에 의해 정유성분을 분리했다. 이것을 column chromatography(고정상: silica gel, 이동상: benzene 및 benzene 과 acetone 혼합액)로 분석한 바, benzene부분에서 무색의 정유성분이, 혼합액부분에서 무색의 결정이 분리되었는데, 정유성분은 MS, NMR, IR 및 UV분석에 의해 7-Geranyloxy coumarin (auraptene)으로 동정했다. 이 auraptene은 팔삭이외에도 하밀감(*Citrus aurantium*) 및 자몽(*Citrus paradisi*)에도 존재한다는 것이 이미 밝혀져 있다.¹⁷⁾

Akira 등²⁾은 하귤과피를 cold-press하여 얻어진 정유성분을 silica gel을 이용하여 column chromatography로 분리하고 재차 HPLC(column : μ Bondasphere C₁₈)로 분리를 시도하여 2개의 물질을 얻었으며 이것들을 auraptene과 umbelliferone으로 동정했다.

앞서 언급한 바와 같이 본 실험의 시료로 사용한 제주산 하귤 과피의 정유성분은 HPL분석에서 7개의 분획으로 나뉘어졌다. 이 사실은 하귤의 정유성분이 여러 가지의 성분으로 구성되어 있다는 것을 시사하는 것이다. 일본산 감귤을 사용해서 얻어진 Komatsu 등¹³⁾, Nomura¹⁴⁾ 및 Nakatani 등¹⁶⁾의 결과와 미국산 감귤로부터 얻어진 Hunter 등¹²⁾ 및 Stanley 등¹⁵⁾의 결과를

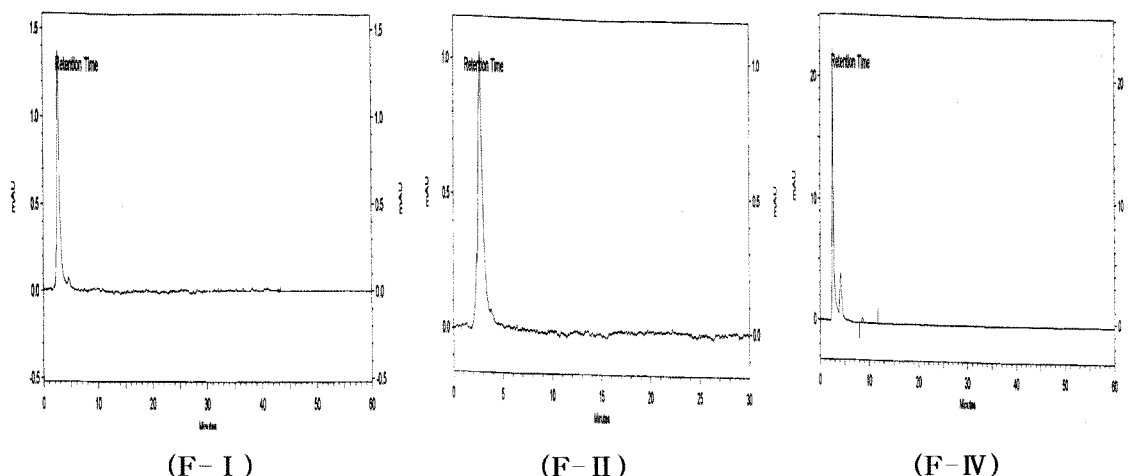


Fig. 3. HPLC chromatograms of F-I, F-II & F-IV shown in Fig. 1. Samples was chromatographed on Versapack C₁₈ column (4.1 × 250 mm) at the flow rate of 1.0 ml/min with elute solution of 75% MeOH. Detection was performed at 320 nm. HPLC was performed as described in Materials and Methods.

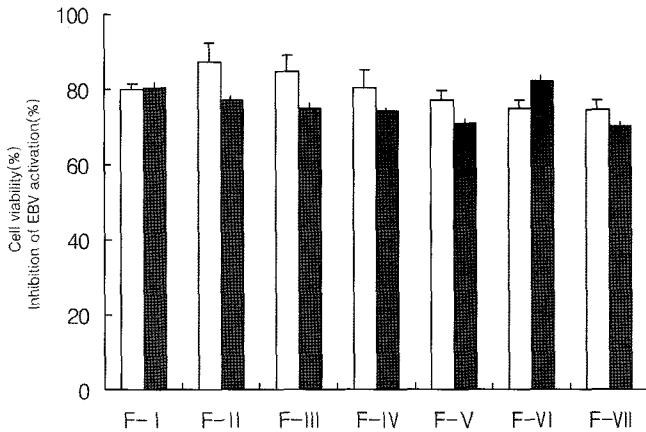


Fig. 4. Cell viability and inhibitory effect on EBV activation by TPA. All data are means \pm SEM. □: Cell viability, ■: Inhibition of EBV activation.

종합해보면 감귤류 과피의 정유성분은 coumarin류, psoralen류, flavonoid류 및 기타 미량 성분 등으로 구성되어 있다는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 얻어진 7개의 분획도 그의 성분은 coumarin류, psoralen류 또는 flavonoid류에 속하는 물질이라고 추정되지만, 향후 이들 물질에 대한 구조동정이 필요하다고 생각된다.

EBV활성화 억제효과. Fig. 1에서 얻어진 분획(F-I~VII)에 대한 EBV-EA유도억제율을 조사하기 위해 앞서 시료의 세포에 대한 독성여부를 조사한 결과는 Fig. 4에 제시했는데, 세포생존율은 74.5 ± 2.6 ~ $87.4 \pm 5.1\%$ 이었다. 또한 Fig. 4에는 각분획의 EBV-EA유도억제율도 나타났다. 7개의 분획중에서 억제율이 가장 높았던 것은 F-VI($82.3 \pm 1.3\%$)이었고 그다음으로 F-I($80.4 \pm 1.6\%$) > F-II($77.2 \pm 0.9\%$) > F-III($75.0 \pm 1.2\%$) > F-IV($74.1 \pm 1.0\%$) > F-V($71.0 \pm 1.1\%$) > F-VII($70.2 \pm 1.2\%$)의 순으로 나타났다. 모두 70% 이상으로 억제활성이 매우 높게 나타났다.

Murakami 등²⁾은 본 실험에서와 같은 방법으로 auraptene 및 umbelliferone의 EBV활성화억제에 대해서 조사한 바, auraptene의 경우 그의 농도 $1 \mu\text{M}$ 에서 약 10%, $10 \mu\text{M}$ 에서 약 36%, $100 \mu\text{M}$ 에서 89%의 억제율을 관찰할 수 있었다. 이것에 반하여 umbelliferone의 경우는 $100 \mu\text{M}$ 에서 약 20% 정도의 억제율 밖에 나타나지 않았다고 보고하고 있다. 이것을 본 실험결과와 비교하면, Fig. 4에서 알 수 있듯이 본 실험에서 분리된 7개의 분획의 억제율이 70% 이상을 나타내고 있어서, 억제활성이 높은 물질이라는 것을 알 수 있다. Feuer 등^{18,19)}은 발암물질인 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene(DMBA)를 쥐에 투여하여 유선암을 유발시킬 경우, coumarin 또는 그의 관련물질(umbelliferone, scopoletin, limettin)이 저해효과를 나타냈다고 보고하였으며, Wattenberg 등²⁰⁾도 benzo[α]pyrene(B[α]p)에 의한 쥐의 위암이 coumarin투여로 억제된다고 보고한 바 있다.

Tanaka 등³⁾은 azoxymethane(AOM)에 의한 쥐의 대장암의 경우, auraptene 100 ppm 투여시 58%가, 500 ppm 투여시 65%가 억제된다고 밝혔다. 그리고 Nishino 등²¹⁾은 쥐의 피부에 initiator로 DMBA를, promoter로 TPA를 처리했을 경우, coumarin 관련물질인 pd-II(+)-anomalin, (+)-praepratorinB가 항발암

promotion활성을 가진다고 하였다. auraptene은 위와 같은 항암 활성뿐만아니라, 경련을 진정시키는 효과,²²⁾ 쥐심근세포의 박동 유발,²³⁾ 토끼혈소판의 응집저해 또는 ATP방출 저해작용 등²⁴⁾ 다양한 생리활성을 가진다고 보고되었다.

현재 우리나라의 과일생산량 중에서 으뜸을 차지하고 있는 감귤은 가공용 특히 주스용으로 많이 소비되는데, 착즙시 과육을 이용하고, 과피는 폐기하고 있는 실정이다. 앞서 언급한 바와 같이 과육뿐만 아니라 과피에도 본 연구에서 확인된 바와 같이 발암 promotion에 대한 억제 활성 이외에 많은 생리활성 물질이 많이 포함되어 있다고 알려졌다. 또한 고대부터 감귤의 과피를 진피(陳皮)라고 하여 한약재로 사용하여 왔다는 점을 감안한다면, 이러한 유용한 성분을 포함한 물질의 활용방안을 모색하는 것도 자원활용의 차원에서 바람직한 일이라고 생각된다. 앞으로 더욱 감귤류 유래의 생리활성물질에 대한 연구를 통하여 유용한 성분을 찾아내어 감귤의 판매를 촉진하는 계기가 되게함과 동시에 분리·추출하여 건강을 증진시키는 식품의 첨가제로써 활용할 수 있도록 하여야 한다고 생각한다. 이러한 관점에서 본 실험에서 분리된 7개의 분획을 동정하기 위하여 연구를 계속 수행하고 있다.

요 약

하귤(*Citrus natsudaidai* Hayata)의 과피를 cold-press하여 얻어진 정유성분을 column chromatography, HPLC 및 TLC로 분리·정제하여 각 분획에 대하여 EBV활성화에 대한 억제효과를 측정하였다.

Column chromatography로 정유성분의 분리를 시도하여 7개의 peak(F-I~VII)를 얻을 수 있었다. 이것들을 TLC로 분석한 결과, 각각 단일 반점만을 나타냈으며 R_f값은 0.31, 0.13, 0.13, 0.78, 0.79, 0.69, 0.84이었다. 7개의 peak중에서 F-I, II 및 F-IV 등 3개의 peak에 대하여 HPLC분석을 한 결과 F-I 및 F-II는 단일 peak이며 retention time은 F-I이 3분, F-II는 2.5분이었다. 그러나 F-IV는 2개의 peak가 나타났으며 retention time은 각각 2분과 4.5분이었다. 4.5분에 나타난 peak는 극히 적은 면적으로 보아 극소량의 물질이어서 앞서의 TLC분석에서 나타나지 않았던 것으로 생각된다.

F-I~F-VII에 대한 EBV활성화에 대한 억제효과 측정은 Raji cells를 이용하여 간접형광 항체법으로 실시했다. 억제율은 F-VI가 $82.3 \pm 1.3\%$ 으로 가장 높았으며 다음이 F-I($80.4 \pm 1.6\%$) > F-II($77.2 \pm 0.9\%$) > F-III($75.0 \pm 1.2\%$) > F-IV($74.1 \pm 1.0\%$) > F-V($71.0 \pm 1.1\%$) > F-VII($70.2 \pm 1.2\%$)의 순으로 모두 70% 이상의 억제율을 나타냈다. 이상의 결과는 하귤과피에는 발암 promotion 억제활성성분이 존재한다는 것을 시사한 것이다.

Key words: 감귤과피, Raji cells, 발암 promotion 억제활성

참고문헌

- Murakami, A., Ohigashi, H., and Koshimizu, K (1999) Chemoprevention: Insight into biological mechanism and

- promising food factors. *Food Rev. Int.* **15**, 335-395.
2. Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei H., Nakamura Y., Ohto, Y., Ohigashi H. and Koshimizu, K. (1997) Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res* **88**, 443-452.
 3. Tanaka T., Kawabata K., Kakumoto M., Hara A., Murakami A., Kuki W., Takahashi Y., Yonei H., Maeda M., Ota T., Odashima S., Yamane T., Koshimizu K. and Ohigashi H. (1998) Citrus auraptene exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: The inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes, *Cancer Res.* **58**, 2550-2556.
 4. Sumida, T (2000) The physiological functions of fruit juices. *Food Industry Shokuhin Kogyo.* **43**, 27-34.
 5. Miller, E. G., Fanous, R., Rivera-Hidalgo, F., Binnie, W. H., Hasegawa, S. and Lam, L.K.T. (1989) The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch. *Carcinogenesis.* **10**, 1535-1537.
 6. Son, H. S., Kim, H. S., Kwon T. B. and Ju, J. S. (1992) Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in citrus sinensis. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 136-142.
 7. Berenblum, I. (1941) The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* **1**, 44-48.
 8. Itoh, Y., Yanase, S., Fujita, T., Harayama, T. and Imanaka, H. (1981) A short-term in vitro assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein Barr virus. *Cancer Lett.* **13**, 29-37.
 9. Shaw, P. E., (1977) Essential oils. In *Citrus Science and Tech.*, Vol. 1, eds. Nagy, S., Shaw, P. E. and Veldhuis, M. K., AVI, Westport, Connecticut.
 10. Kirchner, J. G. (1961) Oils in peel, juice sac and seed. In *The Orange*, ed. Sinclair, W., Univ. of California Press, Riverside.
 11. Wolford, R. W., Kesterson, J. W. and Attaway, J. W. (1971) Physicochemical properties of citrus oils from Florida, *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1097-1105.
 12. Hunter, G. L. K. and Brogden, W. B. Jr. (1966) Analysis of cold-pressed range oil paraffin waxes. *Phytochemistry* **5**, 807-809.
 13. Komatsu, S. and Tanaka, S. (1930) Studies on the constituents of orange oil. *J. Chem. Soc. Jpn.* **51**, 478-491.
 14. Nomura, D. (1950) Coumarin derivatives of Citrus aurantium natsudaikai. *J. Japan. Chem.* **4**, 561-565.
 15. Stanley, W. L. and Jurd, L. (1971) Citrus coumarins. *J. Agri. Food Chem.* **19**, 1106-1110.
 16. Nakatani N., Yamada Y. and Fuwa H. (1987) 7-Geranyloxy coumarin from juice oil of Hassaku (Citrus hassaku) and antimicrobial effects of related coumarins. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 419-423.
 17. Fischer, J. F. and Trama, L. A. (1979) High-performance liquid chromatographic determination of some coumarins and psolarens found in citrus peel oils. *J. Agri. Food Chem.* **27**, 1334-1339.
 18. Feuer G. and Kellen, J. A., (1974) Inhibition and enhancement of mammary tumorigenesis by 7,12-dimethylbenz[α]anthracene in the female Sprague Dawley. *Int. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 62-69.
 19. Feuer, G., Kellen, J. A. and Kovacs, K. (1976) Suppression of 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene-induced by coumarin in the rat. *Oncology.* **33**, 35-39.
 20. Wattenberg, L. W., Lam, K. K. T. and Fladmoe, A. V. (1979) Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and α -angelicalactone. *Cancer Res.* **39**, 1651-1654.
 21. Nishino, H., Okuyama, T., Tanaka, T., Shibata, S., Tokuda, H., Tahayasu, J., Hasegawa, T., Nishino, A., Uema, H. and Iwashima, A. (1990) Studies on the anti-tumor-promoting activity of naturally occurring substances, IV. Pd-II[(+) anomalin, (+) praeurptorin B], seselin-type coumarin, inhibits the promotion of skin tumor formation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 7,12-dimethylbenz[d]anthracene-initiated mice. *Carcinogenesis* **11**, 1557-1561.
 22. Yamada, Y., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1987) Spasmolytic activity of geranyloxy coumarin-related compounds. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1711-1713.
 23. Kakiuchi, N., Senaraten, L. R., Hung, S. L., Yang, X. W., Hattori, M., Pilapitiya, U. and Namba, T. (1991) Effects of constituents of Beli(Aegle marmelos) on spontaneous beating and calcium-paradox of myocardial cells. *Planta Med.* **57**, 43-46.
 24. Chen, I. S., Lin, Y. C., Tsai, I. L., Teng, C. M., Ko, F. N., Oshikawa, T. and Ishii, H. (1995) Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* **39**, 1091-1097.