

비타민 C가 첨가된 유자 추출물의 항산화능과 암세포 증식억제 상승효과

손미예 · 박석규^{1*}

경상대학교 식품영양학과, ¹순천대학교 식품영양학과

Synergistic Effect of Yuza(*Citrus junos*) Extracts and Ascorbic Acid on Antiproliferation of Human Cancer Cells and Antioxidant Activity

Mi-Yae Shon and Seok-Kyu Park^{1*}

Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-741, Korea

Abstract

To enhance beneficial effects of citron fruits, anticancer and antioxidant activities of citron fruits extracts were assessed with or without ascorbic acid. Total phenolic acids and flavonoids of fruits peels and flesh extracts were determined. Fruits peels contained more phenolic acids and flavonoids than those detected in flesh extracts. Scavenging activities of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals and reducing powers were increased depending on the concentration. The antioxidant activities on oxidation of linoleic acid emulsion incubated at 50°C were increased but the effect was small to that of butylated hydroxy toluene and ascorbic acid. The anti-tumorigenic effects of these compounds were investigated. They were shown to inhibit the in vitro proliferation of four human tumorigenic cell lines, HT-29, MCF-7, DU-145 and HepG2, in a dose-dependent manner. This study demonstrated that the antioxidant and anticancer activities of citron fruits extracts were derived from their phenols and flavonoids.

Key words : antioxidant, anticancer, citron, phenol, flavonoid

서 론

과일과 채소 등의 음식물 섭취는 비타민 C, 비타민 E, 카로티노이드 및 건강에 필수적인 플라보노이드와 같은 중요한 영양소들을 포함하고 있으며, 이런 물질들은 산화물 및 자유라디칼들과 반응하여 체내의 산화적 스트레스를 조절한다(1). 특히 과일의 산화적 스트레스를 억제하는 주요 성분으로는 폴리페놀화합물, 플라보노이드류 등이 보고되고 있으며(2,3), 또한 항산화제인 비타민 C는 세포에 독성을 나타내지 않고 암 예방 효과를 주는 영양소로 인체 내에서 생성되는 자유 라디칼의 위험을 감소시키며 항산화력을 가지고 있다(3). 그리고 in vitro 상에서 대부분의 플라보노이드가 산화현상을 방지하며, 비타민 C의 첨가는 항산

화제의 순수한 항산화력과 성분 간의 상승효과를 측정하는데 중요한 요인이 된다(4).

유자(*Citrus junos*)는 일본과 한국에서만 재배되는 과일이며, 식품 중 가장 오래된 과수로 제주, 고흥, 장흥, 완도, 거제와 남해를 포함한 한반도의 남해안에서 주로 자생하는 감귤류이다. 유자는 신맛과 향이 강하여 주스, 유자청, 식초, 향료, 잼 등과 같은 식품재료에 주로 사용되어 왔으며, 과육과 과피를 모두 이용하는 과일이다.

또한 유자는 한국, 일본 및 중국에서 전통적인 약으로써 사용되어져 왔으며(5,6), 국내 연구로는 주요 성분분석, 착즙방법과 유통가공중의 품질변화 등이 주로 이루어졌으나(7-9), 최근에 유자 추출물의 생리활성에 대한 평가도 활발하게 진행되고 있는데, 그 중에는 세 가지 형태로 함유되어 있는 플라보노이드류의 심혈관계 질환 발생을 감소(10-12)와 수소 이온을 쉽게 이용하여 자유라디칼을 소거함으로써

*Corresponding author. E-mail : bestmeju@sunchon.ac.kr,
Phone : 82-61-750-3652, Fax : 82-61-750-3650

질병에 대한 예방의학적 활성을 가진다는 보고(13,14)가 있다. 그리고 그 외에도 항산화능과 항암효과(15,16), N-nitrosodimethylamine 생성억제능(17,18) 등이 보고되어 있다.

본 실험에서는 남해안 유자의 소비촉진과 부가가치 증진을 위한 일환으로 유자의 생리활성 식품 소재로서 검토하기 위해 비타민 C가 첨가된 유자 추출물의 항산화 효과와 암세포 억제활성에 대한 상승효과를 측정하였다.

재료 및 방법

시 료

본 실험에 사용된 유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)는 경상남도 남해 지역에서 재배되는 적숙기의 황색 생유자를 구입하여 사용하였다. 유자는 과육과 과피로 구분하였으며, 각각을 동결건조기로 건조시킨 후 분쇄하여 -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 과육과 과피의 건조 분말 50 g에 물 500 mL을 넣고 90℃이상에서 8시간 동안 추출하였다. 최종 추출액은 여과한 다음 그 여과액을 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축, 건조하여 무게를 측정하고 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 페놀 분석

총 페놀의 정량은 Folin과 Denis 방법(19)에 따라 시험관에 시료 0.01 g에 Folin-Denis 시약 5 mL을 넣어 혼합한 후, 증류수로 100 mL 정용한 다음 실온에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 caffeic acid를 이용하여 작성하였으며, caffeic acid의 농도는 1~5 mg/100 mL였다.

총 플라보노이드 분석

유자 추출물을 각각 0.01 g을 정평하여 증류수를 가한 후 90℃에서 30분간 추출하였으며, 여과하여 100 mL로 정용하였다. 여과액을 일정량 취하여 시험관에 옮긴 후 diethylene glycol과 NaOH 0.75 mL을 혼합하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 quercetin(Sigma Co., St. Louis, USA)의 농도를 0~0.5 mg범위가 되도록 제조하였으며, 검량선으로부터 시료 추출물의 플라보노이드 함량을 계산하였다(20).

세포 독성 측정

인체암 세포주로 DU-145(전립선암), HT-29(대장암), MCF-7(유방암), HepG2(간암)는 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Invitrogen, CA, USA)와 1% penicillin 및 streptomycin (GIBCO, Invitrogen, CA, USA)이 포함된 DMEM(GIBCO, Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 배양하였다. 유자 추출물

의 세포 독성 실험은 Skehan 등의 방법(21)에 따라 sulforhodamine B(SRB) 시약을 사용하여 실시하였다. 즉 5×10^4 cell/well 농도로 96 well plate에 분주 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양 한 후, 배양에 사용된 배지를 제거하고 새로운 배지 180 μ L와 유자 추출물 20 μ L를 첨가하였다. 첨가한 유자 추출물의 농도는 30, 50, 100 μ g/mL이었으며 여기에 비타민 C 100 μ g을 각각 첨가하여 다시 24시간 배양 한 후 배지를 제거하고 SRB 분석을 실시하였다.

전자공여능 측정

Chu 등의 방법(22)에 따라 유자 용매 추출물의 농도별 희석 용액 0.2 mL에 4×10^{-4} M 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Co., St. Louis, USA)용액 0.8 mL를 가하여 10초간 혼합하고, 상온에서 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화력 측정

유자 추출물의 항산화력은 Hu와 Kitts 등의 방법(23)에 따라 유자 용매 추출물의 농도별 희석 용액에 linoleic acid 유화액 10 mL을 가하여 50℃에서 20, 40, 50분 동안 배양한 후 배양액 0.1 mL을 75% 에탄올, 0.1 mL NH₄SCN(30%), 0.1 mL 20 mM FeCl₂와 혼합하여 500 nm에서 흡광도(Shimadzu UV-Vis spectrophotometer, Osaka, Japan)를 측정하였다. 시간 경과에 따라 MDA(malondialdehyde)의 함량을 흡광도로서 유자 추출물에 의한 그 억제되는 효과를 그래프로 나타내었다.

환원력 측정

유자 추출물의 환원력 측정은 Oyaizu(24) 등의 방법에 따라 시험관에 다양한 농도의 시료에 sodium phosphate buffer(pH 6.4) 2.5 mL와 potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합하여 50℃에서 20분 동안 반응시킨 후 trichloro acetic acid 2.5 mL를 첨가하고, 10분 동안 5,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액 5 mL에 0.1% ferric chloride 1 mL를 가한 후 Spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Osaka, Japan) 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로는 비타민 C를 표준 환원제로 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

유자 추출물 중의 총 페놀과 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 과육과 과피의 추출물 중에 총 페놀 함량은 각각 건물당 97.87 μ g/mg와 121.17 μ g/mg으로서 과피가 과육보다 약 1.24배 높았으며, 총 플라보노이드의 함량은 각각

건물당 0.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 와 0.59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로서 과피가 과육보다 2.11배 높았다. Yoo 등(16)은 완도지역에서 재배된 미숙유자, 황유자, 과숙황유자의 총 페놀 함량을 습식중량으로 각각 과피에서는 246.9 \pm 1.3, 256.1 \pm 2.4, 294.4 \pm 4.1 mg%였으며, 과육에서는 231.5, 229.8, 227.2 mg%로 보고하였다. 즉 총 페놀의 함량은 과피가 과육보다 높았고, 과피는 성숙도가 미성숙과보다 높았으며, 과육은 성숙도에 따라 오히려 그 함량이 약간씩 감소한다고 보고하였다. 이들 결과는 본 실험의 유자 추출물중 과피가 과육보다 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량에서 높은 것과 각각 유사한 것으로 나타났다. 그리고 Goinstein 등(25)은 오렌지, 레몬 등의 감귤류에서 과육과 과피에 함유된 총페놀 함량이 140-200 mg% 범위인 것으로 보고하였으나, Wang 등(26)은 포도와 체리의 총 페놀함량을 각각 190-267, 204-308 mg%로 보고하여 본 실험의 유자보다 높은 함량이었지만, 딸기는 95-120 mg%로 유자보다 약간 낮은 함량으로 보고하였다.

Table 1. Contents of total phenolics and flavonoids in water extracts from citron peel and flesh

| Citron extracts | Dry base ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ⁵⁾ | |
|-------------------|--|--------------------------------|
| | Total phenolics ³⁾ | Total flavonoids ⁴⁾ |
| CFE ¹⁾ | 97.87 \pm 1.95 | 0.28 \pm 0.03 |
| CPE ²⁾ | 121.17 \pm 2.19 | 0.59 \pm 0.01 |

¹⁾Citron flesh extract, ²⁾Citron peel extract

³⁾Total phenol contents based a standard curve generated by caffeic acid.

⁴⁾Total flavonoids contents based a standard curve generated by myricetin.

⁵⁾Contents are represented as the mean \pm SD obtained from three independent experiments performed in duplicate.

전자공여능

유자 추출물의 각 시료 농도별로 비타민 C 첨가에 따른 전자공여능 상승효과를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. 유자 과피의 추출물은 유자 과육의 추출물보다 전자공여능력이 약간 높았으며, 이들 추출물은 그 자체에 비하여 각각 추출물에 비타민 C를 첨가할 경우가 상승효과는 더 크게 나타났는데, 특히 저농도(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 시료보다는 고농도(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 전자공여능이 크게 증가하였는데, 고농도로 추출물만을 첨가한 경우의 20%에 비하여 40% 까지 상승하는 효과를 나타내었다.

Kang 등(27)은 시료 중의 환원력이 높은 phenolic acid, flavonoid 및 기타 phenol성 화합물들에 의하여 전자공여능이 높게 나타난다고 보고하였으며, DPPH radical 소거능이 높으면 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높아 항산화활성 및 활성산소와 같은 자유라디칼의 소거작용 증진으로 인체내 노화를 억제하는 효과가 있을 것으로 알려져 있다(28,29).

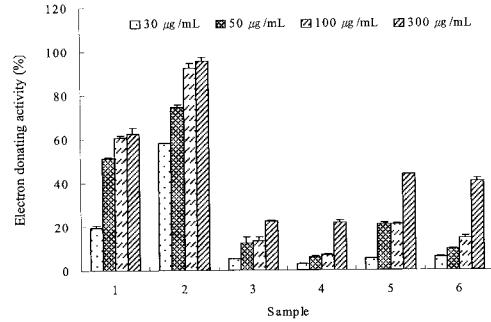


Fig. 1. Electron donating activity of CPE and CFE on DPPH radical.

1, AA; 2, BHT; 3, CPE; 4, CFE; 5, CPE + AA 100 μg ; 6, CFE + AA 100 μg ; CPE, citron peel extract; CFE, citron flesh extract; AA, ascorbic acid. Scavenging activity is represented as the mean \pm SD obtained from three independent experiments performed in three-plicate. AA; ascorbic acid, BHT; butylated hydroxy toluene, CFE; citron flesh extract, CPE; citron peel extract.

항산화능

유자 추출물의 항산화능을 linoleic acid 현탁액의 산화속도를 대상으로 하여 경시적인 변화를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 유자 추출물에 비타민 C가 첨가된 시료는 BHT나 ascorbic acid(AA)보다는 상당히 낮은 항산화능을 나타내었지만, 대조구에 비하여는 항산화능이 높게 나타났다. 유자 과피 추출물의 항산화능은 비타민이 함량이 증가될수록 높았으며, 과육 추출물보다 비슷하거나 약간 높은 활성을 나타내었다. 대조구나 유자 추출물 시료의 항산화능은 BHT나 ascorbic acid보다는 반응시간에 따른 감소의 폭이 크게 나타났다. 과피 추출물 1,000 μg 에 비타민 C 500 μg 를 혼합한 경우의 항산화력은 비타민 C 500 μg 단독만을 첨가한 경우보다 각각 20분 반응에서 2.6배, 40분 1.5배, 60분에는 1.2배가 높았으며, 과육 추출물은 20분 반응에서 1.8배, 40분 1.4배였지만, 60분에서는 비슷하였다. 과피추출물 1000 μg 에 비타민 C 100 μg 첨가한 경우에 항산화력은 대조

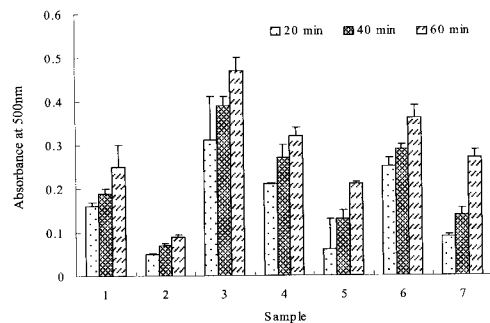


Fig. 2. Inhibitory effect of CPE and CFE on oxidation of linoleic acid emulsion incubated at 50°C.

1, AA 500 μg ; 2, BHT 100 μg ; 3, Control; 4, CPE 1000 μg + AA 100 μg ; 5, CPE 1000 μg + AA 500 μg ; 6, CFE 1000 μg + AA 100 μg ; 7, CFE 1000 μg + AA 500 μg . Absorbance is represented as the mean \pm SD obtained from three independent experiments performed in three-plicate. AA : ascorbic acid, BHT : butylated hydroxy toluene, CFE : citron flesh extract, CPE : citron peel extract.

구에 비하여 20분 반응에 1.5배, 40분 1.4배, 60분에는 1.5배가 높았으며, 과육 추출물은 20분 반응에서 1.2배, 40분 1.4배, 60분에서는 1.3배로 나타났다.

환원능

유자 추출물을 각 시료별로 첨가하여 금속이온을 환원시키는 환원력을 흡광도 수치로 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. 비타민 C는 300 µg/mL 농도에서 흡광도 약 1.35로서 농도 증가에 따른 환원력이 비례관계로서 증가하였으며, 대조구는 일정한 경향이 나타나지 않았다. 유자 과피 및 과육 추출물은 환원력이 아주 낮았지만, 비타민 C를 혼합한 각각의 시료 모두에서 매우 높게 나타났다. 특히 유자 과피 추출물의 30 µg/mL와 50 µg/mL 저농도에서 환원능은 고농도에서와 비슷하게 아주 높게 나타났는데, 이는 유자 과피 및 과육 추출물중의 유효성분과 비타민 C의 상승효과 때문으로 판단된다. 유자 과피 추출물과 비타민 C 100 µg의 혼합첨가는 각각 단독 첨가의 총 환원능에 비하여 강한 상승효과는 아니지만, 30 µg/mL 농도에서 1.21배, 50 µg/mL 1.17배, 100 µg/mL 1.44배 및 300 µg/mL 1.15배를 나타내었는데, 이는 과육 추출물보다는 비교적 높은 효과를 나타내었다.

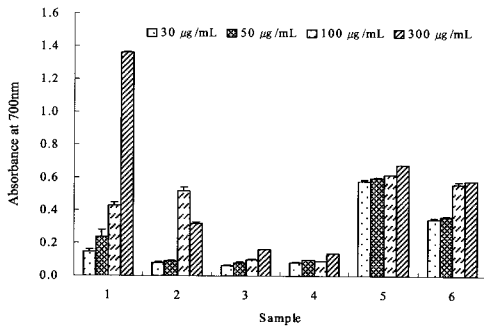


Fig. 3. Effect of CPE and CFE on reducing power. 1, AA ; 2, Control ; 3, CPE ; 4, CFE ; 5, CPE + AA 100 µg ; 6, CFE + AA 100 µg. Absorbance is represented as the mean ± SD obtained from three independent experiments performed in triplicate. AA : ascorbic acid, CFE : citron flesh extract, CPE : citron peel extract.

항암활성

유자 추출물에 비타민 C를 첨가한 시료가 인체암 세포주로 전립선암(Du-145), 간암(HepG2), 대장암(HT-29) 및 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 항암활성의 증진효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. Table에 나타난 바와 같이 시험한 모든 암 세포주는 첨가되는 추출물 농도가 30~100 µg/mL로 높아짐에 따라서 항암활성은 비례적으로 증가되었으며, 특히 유자 과피 추출물의 전립선암 세포주가 30 µg/mL의 16.84%에서 100 µg/mL의 59.80%로 가장 큰 폭으로 3.55배 증가되었다. 그리고 간암 세포주는 유자 과육 및 과피의 추출물에 의하여 다른 암 세포주에 비하여 비교적 항암활성이 높게 나타났으며, 100 µg/mL에서는 각각 63.77%와 73.00%를 나타내었다. 한편 유방암 세포주는 모든 시험농

도에서 유자 과피의 추출물이 과육 추출물보다 항암활성이 모두 높게 나타났으며, 나머지 암 세포주는 대체로 저농도(30 µg/mL)에서는 과육 추출물이 항암활성이 높게 나타났지만 그 보다 높은 농도(100 µg/mL)에서는 오히려 과피 추출물이 높게 나타났다.

Table 2. Anticancer activities of CFE and CPE on proliferation of DU-145, HepG2, HT-29 and MCF-7 cancer cells

| Cancer cells | Samples | Concentration(µg/mL) | | |
|--------------|----------------|----------------------|------------|------------|
| | | 30 | 50 | 100 |
| Du-145 | CFE + AA100 µg | 28.88±2.91 | 36.71±2.33 | 40.55±2.56 |
| | CPE + AA100 µg | 16.84±0.15 | 46.82±2.46 | 59.80±1.28 |
| HepG2 | CFE + AA100 µg | 45.75±1.24 | 58.51±1.11 | 63.77±2.75 |
| | CPE + AA100 µg | 38.54±5.88 | 51.31±2.04 | 73.00±2.54 |
| HT-29 | CFE + AA100 µg | 39.11±2.00 | 49.28±2.59 | 54.99±4.45 |
| | CPE + AA100 µg | 37.08±1.16 | 54.52±6.72 | 58.05±2.41 |
| MCF-7 | CFE + AA100 µg | 35.87±2.78 | 47.41±7.84 | 60.80±4.46 |
| | CPE + AA100 µg | 41.18±1.91 | 56.07±1.64 | 68.25±1.43 |

The SRB assay was used to measure the percentage growth inhibition after 24h exposure to test compounds according to the procedure established by the SRB assay. Percentage inhibition is represented as the mean ±SD obtained from three independent experiments performed in duplicate. CFE : Citron flesh extract, CPE : Citron peel extract.

요 약

유자의 생리활성 식품 소재로서 검토하기 위해 비타민 C가 첨가된 유자 추출물의 항산화 효과와 암세포 억제활성에 대한 상승효과를 측정하였다. 과육과 과피의 추출물 중 총 페놀 함량은 각각 건물당 97.87 µg/mg와 121.17 µg/mg로서 과피가 과육보다 약 1.24배 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 건물당 0.28 µg/mg와 0.59 µg/mg로서 과피가 과육보다 2.11배 높았다. 전자공여능은 유자 과피의 추출물은 유자 과육의 추출물보다 약간 높았으며, 이들 추출물은 그 자체에 비하여 각각 추출물에 비타민 C를 첨가할 경우가 상승효과는 더 크게 나타났는데, 특히 저농도(30 µg/mL) 시료보다는 고농도(300 µg/mL)에서 전자공여능이 크게 증가하였다. 항산화능은 과피 추출물 1,000 µg에 비타민 C 500 µg를 혼합한 경우의 비타민 C 500 µg 단독만을 첨가한 경우보다 각각 20분 반응에서 2.6배, 40분 1.5배, 60분에는 1.2배가 높았다. 환원능은 유자 과피 추출물의 30 µg/mL와 50 µg/mL 저 농도에서 고농도에서와 비슷하게 아주 높게 나타났다. 유자 과피 및 과육의 추출물로 처리한 간암 세포주에서 다른 암 세포주에 비하여 비교적 항암활성이 높게 나타났으며, 100 µg/mL에서는 각각 63.8%와 73%를 나타내었다. 유방암 세포주는 모든 시험농도에서 유자 과피의 추출물이 과육 추출물보다 항암활성이 모두 높게

나타났다. 결론적으로 유자 추출물의 항산화 및 항암활성은 함유되어 있는 페놀과 플라보노이드 성분에 의한 것으로 판단된다.

참고문헌

- Sies, H. and Stanl, W. (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidant. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1315-1321
- Lee, K.W., Lee, H.J., Surh, Y.J. and Lee, C.Y. (2003) Vitamin C and cancer chemoprevention : reappraisal. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 1074-1078
- Wu, F., Tyml, K. and Wilson, JX. (2002) Ascorbate inhibits iNOS expression in endotoxin and IFN gamma-stimulated rat skeletal muscle endothelial cells. *FEBS Lett.*, 520, 122-126
- Kaack, K. and Austed, T. (1998) Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry(*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods Human Nutr.*, 52, 187-198
- Nanba, T. (1980) *The Crude Drugs in Japan, China and the Neighbouring Countries*. Hoikusha Publishing Co., Osaka, Japan, p.261, 264, 265, 268
- Cin Su New Medical College (1977) *The Dictionary of Chinese Medicines*. Shanghai Technologic Publisher, Shanghai, China, Vol. I: p.460, 1141, 1383, 1409, Vol. II: p.1500, 1501, 1504, 1507, 1508, 1517, 1522, 1532, 1679, 1685, 2635, 2636, 2637, 2639, 2640, 2641
- Lee, Y.C., Kim, I.H., Jeong, J.W., Kim, H.K. and Park, M.H. (1994) Chemical characteristics of citron(*Citrus junos*) juices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 552-556
- Jeong, J.W., Kwon, D.J., Hwang, J.B. and Jo, Y.J. (1994) Influence of the extraction method on quality of citron juice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 704-708
- Cha, Y.J., Lee, S.M., Ahn, B.J., Song, N.S. and Jeon, S.J. (1990) Substitution effect of sorbitol for sugar on the quality stability of *Yuja Cheong* (Citron product). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 19, 13-20
- Calabro, M.L., Galtieri, V., Cutroneo, P., Tommasini, S., Ficarra, P. and Ficarra, R. (2004) Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice. *J. Pharmacol. Biomedical Analysis*, 35, 349-363
- Cha, J.Y. and Cho, Y.S. (2001) Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 44, 122-128
- Cha, J.Y., Kim, H.J., Kim, S.K., Lee, Y.J. and Cho, Y.S. (2000) Effects of citrus flavonoids on the lipid peroxidation contents. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, 7, 211-217
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C. and Gaydou, E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxyl flavones. *Free Radical Biology Medicine*, 20, 35-43
- Hertog, M.G., Feskens, J.M., Hollman, C.H., Katan, M.B. and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet*, 342, 1007-1011
- Yoo, K.M. and Hwang, I.K. (2004) In vitro effect of Yuza(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, 339-344
- Yoo, K.M., Park, J.B., Seong, K.S., Kim, D.Y. and Hwang, I.K. (2005) Antioxidant activities and anticancer effects of Yuza (*Citrus junos*). *Food Sci. Industry*, 38, 72-77
- Shin, J.H., Lee, J.Y., Choi, H.S., Jung, K.H. and Sung, N.J. (2004) Screening of effective factor to inhibition of NDMA formation in Yuza. *J. Fd. Hyg. Safety*, 19, 126-131
- Lee, S.J., Choi, S.Y., Shin, J.H., Seo, J.K., Lim, H.C. and Sung, N.J. (2005) The electron donating ability, nitrite scavenging ability and NDMA formation effect of solvent extracts from Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA). *J. Fd. Hyg. Safety*, 20, 237-244
- Folin, O. and Denis, W. (1915) A volumetric method for the determination of phenols(phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.*, 22, 305-308
- A.O.A.C. (1995) *Official Methods of Analysis*. 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC., p.127-130
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, 82, 1107-1112
- Chu, Y.H., Chan, C.L. and Hsu, H.F. (2000) Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant mushrooms(*Agaricus bisporus*). *J. Sci. Food Agric.*, 80, 561-566
- Hu, C. and Kitts, D.D. (2000) Studies on antioxidant activity of *Echinaceae* root extract. *J. Agric. Food Chem.*,

- 48, 1466-1472
24. Oyaizu, M., (1986) Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr.*, 44, 307-315
25. Goinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I. and Trakhtenberg, S. (2001) Composition of some biochemical characteristic of different citrus fruit. *Food Chem.*, 74, 309-315
26. Wang, Y., Hayward, S., Donjacour, A., Young, P., Jacks, T., Sage J., Dahija, R., Cardiff, R., Day, M. and Cunha, G. (2000) Sex hormone - induced carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue. *Cancer Research*, 60, 6008-6017
27. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D. (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 232-239
28. Aoshima, H., Tsunoue, H., Koda, H. and Kiso, Y. (2004) Aging of whisky increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5240-5244
29. Kim, H.K., Kim, Y.E., Do, J.R., Lee, Y.C. and Lee, B.Y. (1995) Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 80-85

(접수 2006년 6월 3일, 채택 2006년 9월 28일)