



유자 과피 추출물의 성분 분석 및 항산화능 평가

김종표¹, 윤한울¹, 이규성¹, 김주경², 정희진^{3,*}

¹홍익대학교 바이오화학공학과 대학원생, ²서울대학교 바이오엔지니어링 협동과정 대학원생,
³홍익대학교 바이오화학공학과 조교수

Characterization and Evaluation of Antioxidant Property of Yuza (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) Peel Extract

Jong Pyo Kim¹, Hanool Yun¹, Gyu Seong Lee¹, Joo Kyung Kim² and Hee-Jin Jeong^{3,*}

¹Department of Biological and Chemical Engineering, Hongik University, Sejong 30016, Korea,

²Interdisciplinary Program in Bioengineering, Seoul National University, Seoul 08826, Korea,

³Department of Biological and Chemical Engineering, Hongik University, Sejong 30016, Korea

(Received June 23, 2021; Revised July 6, 2021; Accepted July 8, 2021)

In the current study, peel extract from *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka (*C. junos*) was characterized and its antioxidant efficiency was investigated. The main constituent of the *C. junos* peel extract was quantified using high-performance liquid chromatography. Results showed that two types of flavonoid, viz. hesperidin and naringin, were mainly contained in the *C. junos* peel extract. To evaluate the antioxidant effect of *C. Junos* peel extract, we quantitatively analyzed the content of total polyphenol (8.05 ± 1.05 mgGAE/g) and total flavonoid (0.93 ± 0.87 mgQE/g) in the peel extract. Results confirmed that the extract had the scavenging ability of both DPPH (10.57 ± 0.75 g/L) and ABTS (1.82 ± 0.11 g/L) radicals. These results showed that the *C. junos* peel extract is a natural antioxidant and can be used to synthesize novel beauty products and cosmetic materials.

Keywords : Antioxidant efficiency, Beauty product, *Citrus junos* Peel, Cosmetic material, HPLC assay

서론

최근 화장품과 같은 미용품에 대한 소비자의 성향에 목적성, 기능성이 중시됨에 따라 피부 주름방지, 미백, 보습 등 다양한 효능을 가진 소재에 대한 관심이 증가 되고 있다(Jang & Lee, 2021). 이에 따라 천연자원을 활용한 기능성 화장품 원료 개발의 필요성이 더욱 높아지고 있다(Lim et al., 2016). 국내에서는 주로 질병 예방 및 치료 목적의 천연물을 사용하여 항산화,

항노화, 미백 기능을 증가시킬 수 있는 고기능성 화장품 소재가 개발되고 있는데, 그중에서 항산화제는 활성산소와 반응함으로써 활성산소에 의한 피부 및 생체의 산화적 손상 및 피부 노화가 억제 또는 최소화되는 것을 원리로 한다(Min & Jhoo, 2013). 고전적으로 butylated hydroxytoluene(BHT) 및 butylated hydroxyanisole(BHA)와 같은 페놀계 합성 항산화제가 사용되고 있다(Choe & Yang, 1982). 하지만 이들 합성 항산화제의 경우 체내에 흡수된 후 발암성 물질로 변화되거나 독성물질로 전환되는 등의 인체 독성을 나타내어 발암 및 심혈관 계열에 부작용을 유발하는 것으로 알려져 이들의 사용이 점차 규제되고 있으며, 안전성이 확보된 천연물 유래 항산화제의 개발이 요구되고 있다(Osawa et al., 1986; Farag et al., 1990; Seog et

* 본 연구는 2020년 삼양이건장학재단 학술연구 지원 사업에 의해 이루어 졌음. 실험 방법에 대한 자문을 주신 강지훈 박사님께 감사의 말씀을 드립니다.

* Correspondence to: Hee-Jin Jeong, Department of Biological and Chemical Engineering, Hongik University, C306, Sejong-ro, Sejong 30016, Korea. E-mail: heejinjeong@hongik.ac.kr

al., 2002)

유자 (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka. *C. junos*)는 국내 생산량의 60%가 한국 고흥에서, 그밖에는 제주, 장흥, 완도, 거제, 남해를 포함한 남해안에서 자생하고 있으며, 전 세계적으로 유자를 생산하는 국가인 한국, 일본, 중국 중에서 한국산 유자의 향이 우수함이 알려져 있어 국내에서 생산한 유자를 유럽, 동남아 등 해외시장에 활발히 수출하고 있다(Jin et al., 2008; Lee et al., 2010; Moon et al., 2014). 특히, 자몽, 감귤, 오렌지와 같은 감귤류의 경우 주로 과육만이 이용되는 것과 달리 유자는 과육과 더불어 과피에도 조지방, 조섬유, 니아신, 비타민 B1, 비타민 C, 구연산, 리모넨, 펙틴 등 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있음이 밝혀졌고 향미가 좋아 과육뿐만 아니라 과피 또한 음용 차 및 식품 재료로 사용되고 있다(Park et al., 2001; Lee et al., 2005; Shin & Lee., 2008; Vieira et al., 2018). 이에 따라 유자 주스 생산을 위한 식품 가공 측면에서의 연구가 이루어지고 있으며, 최근 들어 유자가 갖는 면역기능 향상 등의 의약품 관련 연구도 진행되고 있다(Yang et al., 2015).

유자는 미용 측면에서도 긍정적인 효능을 나타냄이 알려져 있는데, 피부와 머리카락을 구성하는 콜라겐의 필수 구성성분인 판토텐산이 함유되어 있어 체내 지질의 분해를 통해 피부의 유분을 제거할 수 있다는 가능성이 제시되었다(Wang et al., 2020). 또한, 유자에 함유된 코엔자임A는 세포의 대사과정에 참여하는 조효소 중 하나로, 피부와 점막 형성 및 기능 유지에 중요한 역할을 수행하며 상피세포의 성장과 발달에 유효하다(Albert et al., 1980). 이러한 유자 내 함유성분인 판토텐산과 코엔자임A 성분들이 모발과 건강, 피부 트러블 완화에 도움을 주며 피부의 노화 예방에도 긍정적으로 작용할 수 있다(Albert et al., 1980; Wang et al., 2020).

유자과실 중에는 과즙이 18%로 적은 함량을 차지하기 때문에 유자를 가공할 때 다량의 고흥 잔재(껍질(과피) 45%, 흰색 속껍질 20%, 씨 15%, 기타 2%)가 발생하게 된다. 이러한 잔여물의 일부는 사용되고 있지만 그대로 방치할 경우 곰팡이가 발생하기 쉽고, 신맛이 강하며, 건조하기 위한 비용이 많이 소요되기 때문에, 고흥 잔재의 대부분은 산업폐기물로 처리되고 있는 실정이다(Woo et al., 2009). 이 중에서 유자 과피는 항알레르기 작용을 나타냄이 알려져 있지만, 씨는 반드시 유효하지 않음이 마우스 실험으로 증명된바 있으며, 씨의 추출물에는 리모노이드 유도체가 많기 때문에 쓴맛이 강하여 상품적으로는 결함을 나타낸다(Woo et al., 2006). 유자 과피의 경우에는 유자차로 소비되는 유자청 및 유자 착즙액 가공에 이용되고 있으나 그 이외에는 대부분이 폐기처분 되고 있기 때문에 그 활용에 관한 연구가 필요하다(Lee et al., 1987; Kim et al., 2010).

본 연구는 유자 과피를 선택적으로 추출하여 유자 과피의 성분 분석 및 항산화 활성을 분석하여 유자를 활용한 항노화 기능

성 화장품 등의 미용 소재로의 활용 가능성을 검토하고, 유자의 이용률 및 유자 가공 시 폐기되는 유자 과피의 활용도를 높일 수 있는 기초자료를 제시할 수 있음을 목표로하였다.

재료 및 방법

1. 기기 및 시약

1) 실험기기

유자 과피 추출에는 교반기(MS300HS, Coretech, Suntec, Singapore), 감압농축기(Eyela, N-1300, Tokyo, Japan), 동결건조기(Gyrozen, Hypercool HC4055, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 항산화 평가에는 분광광도계(Human Corporation, X-ma 1200v, Seoul, Korea), 흡광도측정기(Thermo, Multiskan Go, Waltham, USA)를 사용하였다. 유자 과피 성분 분석에는 Agilent 1260 Infinity diode-array detector HPLC(Agilent Technologies, California, USA)를 사용하였다.

2) 시약

Gallic acid, foline & Ciocalteu's phenol reagent, aluminum nitrate, sodium chloride는 Samchun Pure Chemical(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt)는 Alfa Aresa(Haverhill, USA)에서 구입하여 사용하였다. Butylated hydroxytoluene, L-ascorbic acid, quercetin dihydrate은 대정화금(Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였다. sodium carbonate와 potassium persulfate는 Junsei(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. Potassium acetate는 Ishizu Pharmaceutical(Osaka, Japan)의 제품을 사용하였다. Ethanol은 Duksan Pure Chemicals(Ansan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. HPLC grade water, HPLC grade methanol, HPLC grade acetonitrile은 Avantor(Radnor, USA)에서 구입하여 사용하였다. 0.2 μ m PVDF filter는 GVS(Bologna, Italy)에서 구입하여 사용하였다. 유자는 전남 고흥(전남 고흥군 두원면 연강예회길 에덴식품 영농조합법인)에서 재배 후 분말처리 된 유자 과피 냉동 분말을 2020년 9월 26일 구입하여 사용하였다.

2. 유자 과피 추출물 제조

전남 고흥군 에덴식품 영농 조합 법인을 통하여, 자체 수확한 국내산 무농약 유자 과피를 세척한 후 동결건조 후 미세하게 분쇄한 유자 분말을 확보하였다. 건조된 유자 과피 20 g에 70%

Table 1. Mobile phase consisted of solvent A and solvent B for HPLC analysis

| Time (min) | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
|------------|---------------|---------------|
| 0 | 0 | 100 |
| 3 | 85 | 15 |
| 5 | 60 | 40 |
| 8 | 25 | 75 |
| 13 | 55 | 45 |
| 15 | 80 | 20 |
| 17 | 100 | 0 |
| 18 | 100 | 0 |

에탄올 200 mL를 가한 다음 상온에서 24시간 동안 spin bar를 사용하여 교반기에서 혼합하여 유자 과피 에탄올 추출물을 제조하였다. 감압농축기를 이용해서 65℃에서 30–60분 동안 감압농축하여 에탄올을 제거한 후 보존을 위하여 동결건조기를 이용해서 액체 상태의 추출물을 동결건조하여 분말상태로 제조하여 -80℃에 보관하였다. 냉동 보관한 시료는 성분분석 및 항산화 실험시 메탄올 또는 증류수에 녹여 사용하였다.

3. 유자 과피 성분 분석

1) HPLC 분석

유자 과피의 주성분 분석은 Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6×150 mm 5 μm(Agilent, USA)가 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하였다. 용매 조성은 A: 0.1% formic acid를 포함하는 HPLC grade water, B: HPLC grade acetonitrile로 하였다. 용매 구배는 Table 1에 제시한 비율에 따라 분석하였다. 용매 흐름 속도는 1.0 mL/분으로 하였고, 검출파장은 280 nm로 하였다. 200 mg/L, 2000 mg/L의 유자 과피 추출물과 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm의 검량시료(Hesperidin, Naringin, Phroletin)는 80% (v/v) HPLC grade methanol에 녹여 제조한 후 0.2 μm PVDF filter로 여과하여 사용하였다. 스펙트럼상의 시간과 280 nm에서의 intensity값을 추출한 후 OpenChrom Data Analysis System을 이용하여 스펙트럼을 재구성하여 나타내었다.

2) Naringin 및 hesperidin 함량

유자 과피 추출물을 증류수에 용해하여 20, 40, 60, 80, 100 g/L 으로 제조한 다음 각 농도의 유자용액 6 μL을 diethylene glycol 용액 100 μL 및 4 N NaOH 2 μL를 순차적으로 가하여 혼합한 후 실온에 10분 동안 방치하였다. 그 다음 420 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정하였고, 그 후 추가적으로 20분 동안 방치한 다음 360 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정

하였다. 표준물질로 메탄올에 용해 시킨 1, 3, 10, 30, 100 g/L의 naringin 및 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 g/L의 hesperidin을 사용하여 각각 반응 10분 후의 420 nm 파장에서의 흡광도, 반응 30분 후의 360 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성함으로써 유자 용액에 존재하는 naringin 및 hesperidin의 비율을 계산하였다.

4. 항산화 활성 측정

1) 총 polyphenol 함량

유자 과피 추출물을 증류수에 용해하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g/L 으로 제조한 다음 각 농도의 유자 용액 33 μL을 phenol reagent 33 μL과 혼합한 후 실온에 5분 동안 방치하였다. 그 후 증류수로 용해한 10%(w/v) sodium carbonate 용액을 33 μL 추가한 후 실온에 1시간 동안 방치하여 반응시켰다. 최종적으로 700 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 메탄올에 용해 시킨 0.01, 0.033, 0.1, 0.33, 1, 3.3, 10 g/L의 galic acid를 사용하여 검량선을 작성하여 유자 추출물 용액 내 총 polyphenol 함량을 계산하여 mgGAE/g단위로 표시하였다.

2) 총 flavonoid 함량

10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g/L의 유자용액 10 μL에 증류수로 용해한 10%(w/v) aluminum nitrate 2 μL과 1 M potassium acetate(pH 7.5) 2 μL를 혼합한 후 실온에서 40분 동안 방치하여 반응시켰다. 그다음 405 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 메탄올에 용해 시킨 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10 g/L의 quercetin을 사용하여 검량선을 작성하여 유자 용액 내 총 flavonoid 함량을 계산하여 mgQE/g단위로 표시하였다.

3) DPPH radical 소거능

0.01, 0.033, 0.1, 0.33, 1, 3.3, 10, 33, 100 g/L 의 유자 용액 10 μL에 메탄올로 용해한 0.2 mM 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 90 μL를 혼합한 후 실온에서 30분 동안 빛을 차단하여 방치하여 반응시켰다. 그 다음 490 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 증류수로 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 g/L로 용해한 BHT와 증류수로 0.003, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3 g/L로 용해한 L-ascorbic acid를 사용하였다. 시료 무첨가군(증류수 10 μL을 유자 용액 또는 대조군 용액 대신 사용한 용액)의 흡광도를 측정 후 다음 식을 바탕으로 DPPH radical 소거능을 백분율로 표시하였고 GraphPad Prism 9.0 소프트웨어를 사용하여 sigmoidal curve를 작성하여 IC₅₀ 값을 산출하였다.

$\text{Inhibition}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{시료무첨가군의 흡광도}) \times 100$

4) ABTS radical 소거능

7.4 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.45 mM photassium persulfate을 증류수에 용해한 후 실온의 암소에 24시간 동안 방치하여 ABTS cation radical을 형성시킨 후 734 nm 파장에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 0.033, 0.1, 0.33, 1, 3.3, 10, 33, 100 g/L의 유자 용액 5 μL 에 ABTS 용액 95 μL 을 혼합한 후 실온의 암소에 30분 동안 방치하여 반응시켰다. 그 다음 700 nm 파장에서의 반응물의 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 증류수로 0.33, 0.1, 0.3, 1 g/L로 용해한 BHT과 증류수로 0.1, 0.33, 1, 3.3, 10, 30, 100 g/L로 용해한 L-ascorbic acid를 사용하였다. 시료 무첨가군(증류수 5 μL 을 유자 용액 또는 대조군 용액 대신 사용한 용액)의 흡광도를 측정 후 다음 식을 바탕으로 ABTS radical 소거능을 백분율로 표시하였고 GraphPad Prism 9.0 소프트웨어를 사용하여 sigmoidal curve를 작성하여 IC_{50} 값을 산출하였다.

$\text{Inhibition}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{시료무첨가군의 흡광도}) \times 100$

5. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 모두 3회 반복 측정하여 평균값(average) 및 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, GraphPad Prism 9.0 프로그램을 사용하여 검량선을 작성하였다.

결과 및 고찰

1. 유자 과피 추출

유자 과피 추출물을 감압농축하여 에탄올을 제거하여 흑갈색의 고점성 액체를 얻었다. 보존을 위하여 액체 상태의 추출물을 동결건조하여 분말 형태로 제조하였고, 동결건조후의 질량 측정값을 에탄올 추출전의 유자 과피 분말의 질량과 비교하여 수율을 계산하고(동결건조후 질량/추출전 질량 \times 100) 이를 혼합 시간에 따라 비교한 결과, 24시간 동안 혼합한 경우와 3시간 동안 혼합한 경우의 수율이 각각 37%, 36%임을 알 수 있었고, 유사한 값을 나타내었기 때문에 혼합 시간이 상대적으로 짧은 3시간을 유자 과피 추출에 적합한 시간으로 결정하였다.

2. 유자 과피 주성분 분석

유자 과피 추출물에 포함된 주성분을 파악하기 위하여 2000 mg/L 및 200 mg/L 농도의 유자샘플의 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과 2000 mg/L(Fig. 1A)과 200 mg/L(Fig. 1B)의 유자 샘플에서 각각 8.082분, 8.075분에서 가장 높은 피크를 나타내었으며, 이는 standard로 사용한 hesperidin의 최대 피크 검출 시각(200 ppm, 100 ppm, 50 ppm의 hesperidin에서 각각 8.088분, 8.083분, 8.087분)과 유사하였다(Fig 1C, 1E, 1G). 8.082분에서 검출된 2000 mg/L 유자샘플의 최대 피크 강도는 170.63 mAU였으며, 이를 세종류의 농도가 다른 hesperidin의 피크 강도(200 ppm: 327.45 mAU, 100 ppm: 174.43 mAU, 50 ppm: 92.60 mAU)를 바탕으로 작성한 검량선(Fig 1I)에 대입하여 농도 환산을 수행한 결과, 본 피크에 해당하는 함유물이 100% hesperidin이라 하였을 경우 유자 과피 2000 mg/L에는 99.03 ppm의 hesperidin이 함유되어 있음을 알 수 있었고 이는 유자 과피 1 mg 당 hesperidin 49.5 μg 의 함유량(49.5 mg/g)으로 계산할 수 있었다. 또한 hesperidin과 같이 flavonoid 계열의 화합물인 naringin을 동일한 조건에서 분석한 결과, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm의 naringin의 피크는 각각 8.056분, 8.055분, 8.055분에서 검출되었다(Fig 1D, 1F, 1H, 1I). 이는 유자 과피 추출물에서 가장 높은 피크가 검출된 8.082분(1000 mg/L), 8.075분(200 mg/L)과 유사하였으나, 상기한 hesperidin의 검출 시간을 고려하면 naringin은 유자 과피 추출물에 포함되어 있지 않거나, hesperidin과 혼합되어 존재하되 그 상대적인 양은 naringin 보다 hesperidin이 많음이 예상되었다.

이를 확실히 하고자, 본 연구에서는 유자 과피에 존재하는 hesperidin 및 naringin의 함량을 Davis변법에 따라 산출하였다(Davis, 1947; Lee et al., 2017). Hesperidin 및 naringin의 반응후 흡광도를 바탕으로 한 검량선을 작성하고 농도별 유자 과피 추출물의 반응후 흡광도를 측정하여 각 농도별 유자 과피 추출물 내에 존재하는 hesperidin 및 naringin의 함유량을 mgHE(hesperidin equivalent)/L 및 mgNE(naringin equivalent)/L 단위로 산출하였다. mgHE/L(Fig. 2A) 및 mgNE/L(Fig. 2B) 단위 산출값과 유자 과피 추출물의 농도(g/L)를 직선 함수로 나타내어 얻은 기울기 값을 계산하였고, 최종적으로 유자 과피 추출물 내에 존재하는 hesperidin 및 naringin의 함유량은 각각 399.12 ± 15.76 mgHE/g, 7.79 ± 0.50 mgNE/g로 hesperidin과 naringin이 51:1의 비율로 존재함을 알 수 있었다(Fig. 2C, 2D). 이를 바탕으로 상기한 HPLC 결과값을 고려하면 유자의 최대 검출 피크에 해당하는 함유물이 100% hesperidin이라 하였을 경우에 계산된 49.5 mg/g 중에서 실제로 hesperidin은 48.6 mgHE/g가, naringin은 0.9 mgNE/g가 함유되어 있다고 사료되었다.

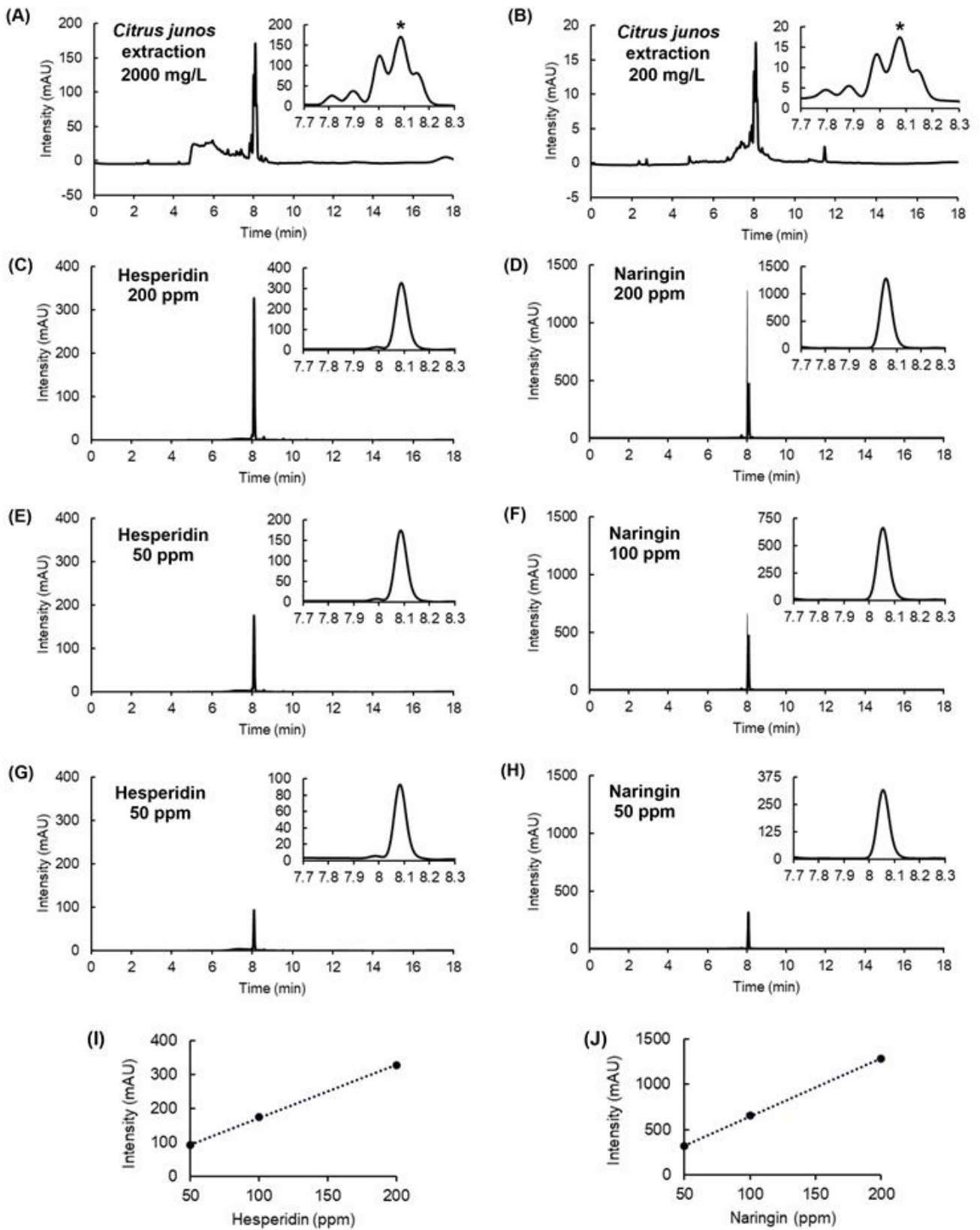


Figure 1. Quantification of a main constituent of *C. junos* peel extract using HPLC. (A) HPLC chromatogram of 2000 mg/L *C. junos*, (B) HPLC chromatogram of 200 mg/L of *C. junos*, (C) HPLC chromatogram of 200 ppm hesperidin, (D) HPLC chromatogram of 200 ppm naringin, (E) HPLC chromatogram of 100 ppm hesperidin, (F) HPLC chromatogram of 100 ppm naringin, (G) HPLC chromatogram of 50 ppm hesperidin, (H) HPLC chromatogram of 50 ppm naringin, (I) Titration curve of hesperidin, (J) Titration curve of naringin. * indicates the highest peak among the peaks of *C. junos* peel extract sample.

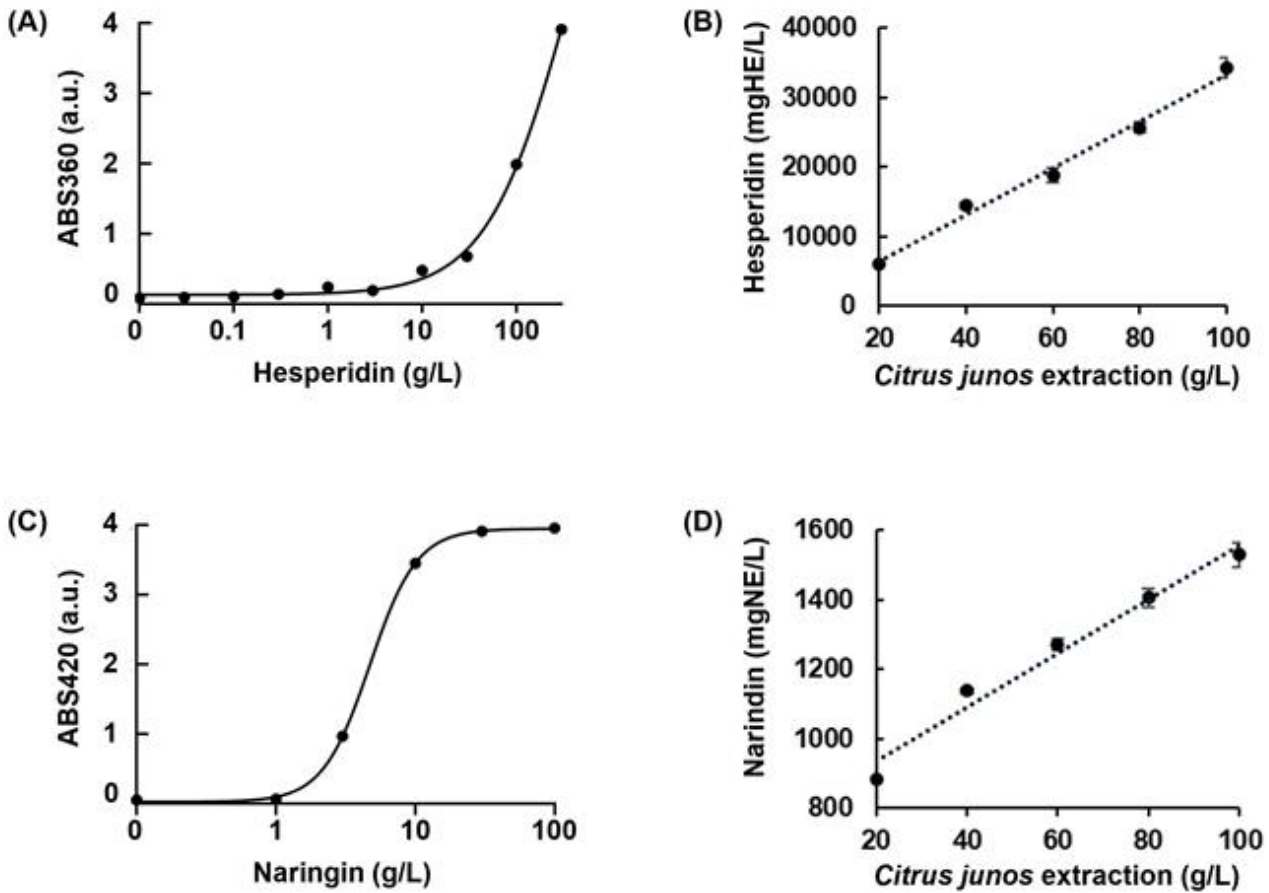


Figure 2. Quantification of hesperidin and naringin in *C. junos* peel extract. (A) Titration curve of hesperidin, (B) Hesperidin concentration in various concentration of *C. junos*, (C) Titration curve of naringin, (D) Narindin concentration in various concentration of *C. junos*.

또한, flavonoid 계열의 화합물인 phroletin을 동일한 조건에서 HPLC를 이용한 분석을 수행한 결과, 200 ppm(Fig. 3A), 100 ppm(Fig. 3B), 50 ppm(Fig. 3C)의 phroletin의 피크는 각각 9.541분, 9.540분, 9.540분에서 검출되어 본 유자 과피 추출물에 phroletin은 포함되어 있지 않음을 알 수 있었다.

3. 항산화 활성

1) 총 polyphenol 함량

Polyphenol은 벤젠 고리에 hydroxyl group을 가지고 있는 phenol group이 두 개 이상 결합 된 화합물로 이러한 phenol group의 화학 구조는 환원 특성을 유발하여 항산화제 및 자유라디칼 제거제 역할을 한다. Polyphenol은 식물의 2차 대사산물로 식물체 내에서 항산화 작용을 함이 알려져 있는데, 일상 생활에서 접할 수 있는 polyphenol의 공급원은 차, 녹차, 홍차, 우롱차 등 모두 catechin류의 polyphenol 함량이 높아 뛰어난 항산화 효과를 나타낸다(Komes et al., 2010). 차 외에도 polyphenol 함량이 높은 작물은 포도로, 특히 과피의 색이

진할수록 polyphenol 함량이 높다(Kaplan & Naida, 2014). Flavonoid는 polyphenol의 주요 group으로 식물체 내의 polyphenol의 대부분은 flavonoid 형태로 존재한다. Flavonoid는 항산화뿐 아니라 항염증, 라디칼 소거, 콜라게나아제 억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 특성으로 인해 화장품의 주요 성분으로 주목받고 있다(Kim et al., 2010).

본 연구에서는 유자 과피 추출물 내에 함유되어 있는 polyphenol 함량을 평가하기 위하여 제조한 유자 과피 추출물의 흡광도를 측정하고, 그 값을 각 농도별 galic acid의 흡광도를 측정하여 작성한 검량선(Fig. 4A)에 적용하여 mgGAE/L 단위로 환산하였다. 그 후 mgGAE/L단위 값을 각 유자 과피 추출물의 농도(g/L 단위)와의 함수로 나타낸 후 그래프의 기울기 값을 계산하여 최종적으로 유자 과피 추출물에 포함된 총 polyphenol 함량이 8.05 ± 1.05 mgGAE/g임을 알 수 있었다(Fig. 4B).

이 값은 선행 논문에서 연구된 70% 에탄올로 추출한 유자 과피의 polyphenol 함량에 해당하는 6.1 ± 0.01 mgGAE/g 보다 다소 높은 값을 나타내었으며(Lee & Lee, 2017a), 이는 유자의

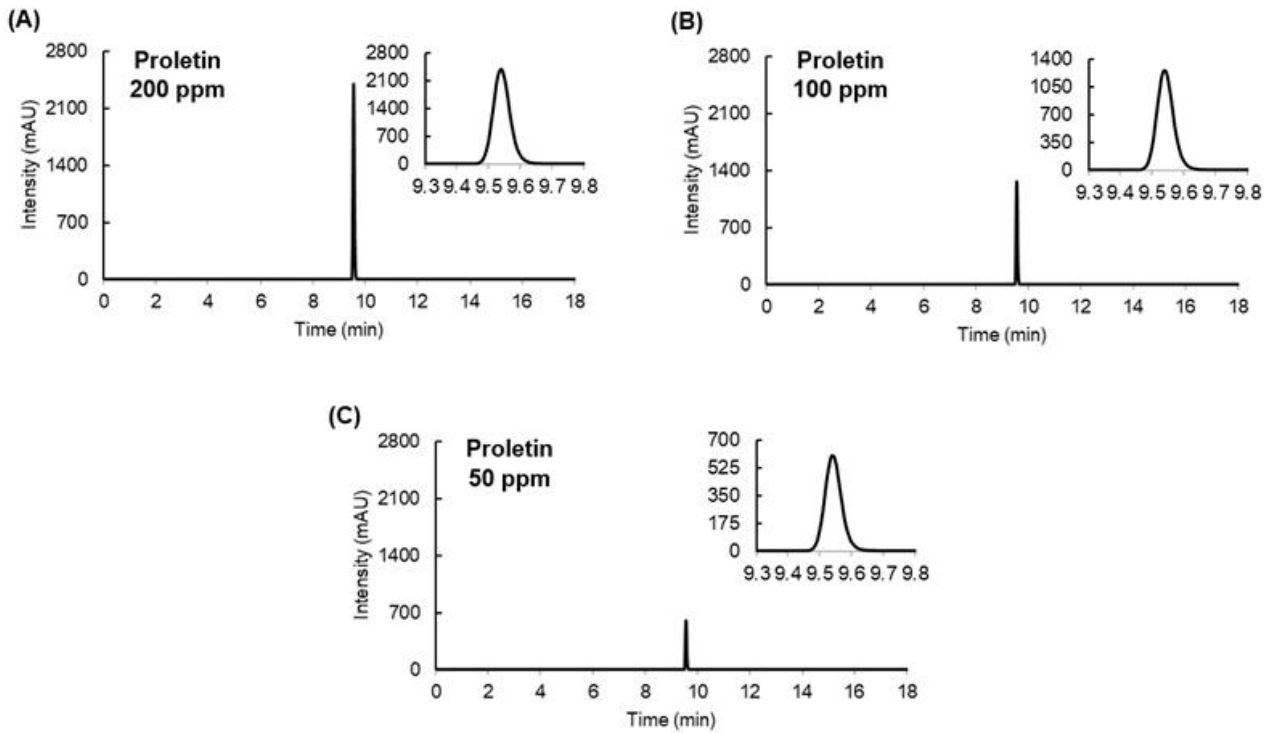


Figure 3. Spectrum of various concentration of proletin for the quantification of proletin in *C. junos* peel extract. (A) HPLC chromatogram of 200 ppm proletin, (B) HPLC chromatogram of 100 ppm proletin, (C) HPLC chromatogram of 50 ppm proletin.

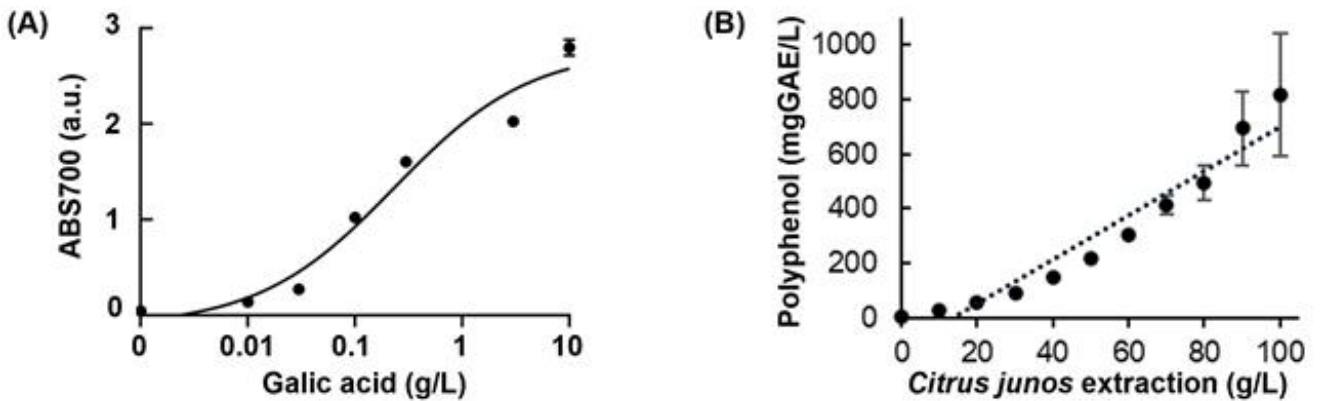


Figure 4. Quantification of the contents of total polyphenol in *C. junos*. (A) Titration curve of gallic acid, (B) Amount of total polyphenol in various concentration of *C. junos*.

산지 및 추출법의 차이에 기인한 것으로 사료된다(Shin et al., 2008). 또한 유자 과피에 포함된 polyphenol 함량은 유자 과즙의 70% 에탄올 추출물에 포함된 polyphenol 함량에 해당하는 7.8 ± 0.08 mgGAE/g(Lee & Lee, 2017b) 보다 다소 높음을 확인할 수 있었으며, 유자 씨앗의 70% 에탄올 추출물에 포함된 polyphenol 함량에 해당하는 246.31 ± 14.17 mgGAE/g(Lee et al., 2009)보다는 낮음을 알 수 있었다 이는 과피 및 과즙보다 씨앗에 polyphenol 함량이 높은 것을 나타내었으나, 유자 한

개당 함유되어 있는 씨앗의 양이 과피 및 과즙보다 상대적으로 적은 것을 고려하였을 때 상업적 이용가치 면에서는 과피 및 과즙이 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다.

2) 총 Flavonoid 함량

Flavonoid는 polyphenol의 주요 성분이며 생체내 산화 기능을 억제시키는 작용을 하는 성분으로 항산화력을 나타내는 주요 지표이다(Kim & Lee, 2016). 본 연구에서는 유자 과피 추

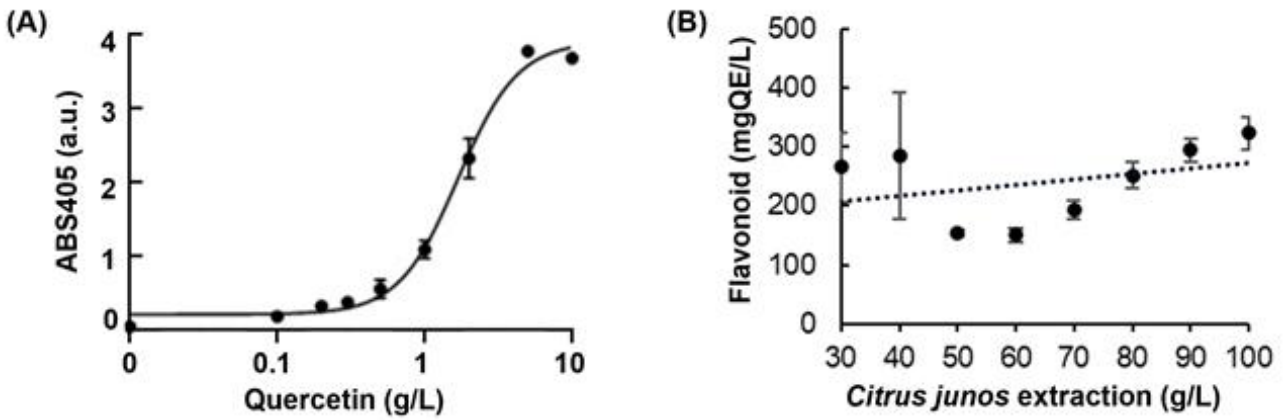


Figure 5. Quantification of the contents of total flavonoid in *C. junos*. (A) Titration curve of quercetin, (B) Amount of total flavonoid in various concentration of *C. junos*.

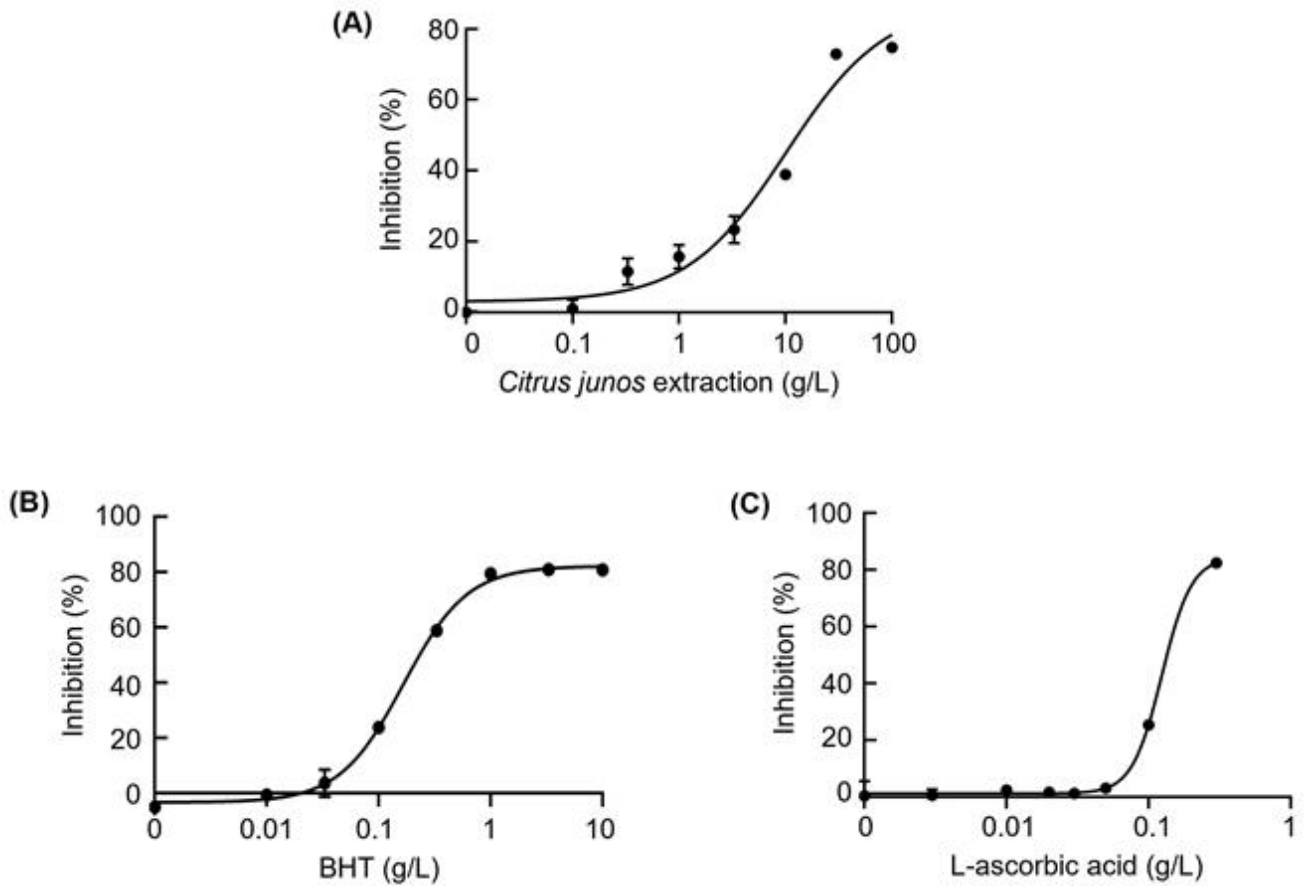


Figure 6. DPPH radical scavenging activity of *C. junos* (A), (B) BHT, and (C) L-ascorbic acid.

출물에 포함된 총 flavonoid 함량을 Moreno방법에 의해 측정하였는데(Moreno et al., 2000), 유자 과피 추출물의 흡광도를 측정하고, 그 값을 각 농도별 Quercetin의 흡광도를 측정하여 작성한 검량선에 적용하여 mgQE/L로 환산하였다(Fig 5A). 그 결과 흡광도가 검량선 범위보다 낮아 환산이 불가하였던 10 g/

L 및 20 g/L를 제외한 농도의 유자 과피 추출물의 mgQE/L 단위 값을 각 유자 과피 추출물의 농도(g/L 단위)와의 함수로 나타낸 후 그래프의 기울기 값을 계산하여 최종적으로 유자 과피 추출물에 포함된 총 flavonoid 함량이 0.93 ± 0.87 mgQE/g,임을 알 수 있었다(Fig 5B). 이는 선행 연구에서 70% 에탄올로 추

출한 유자 과피에 포함된 총 flavonoid 함량에 해당하는 8.0 ± 0.00 mgQE/g 보다는 낮은 함량이었으나, 60 g/L 이상의 유자 과피 추출물에서 flavonoid 함량이 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다(Lee & Lee, 2017a).

3) DPPH radical 소거능

Radical 소거능은 항산화의 주요 지표로서 항산화 성능 테스트에 사용된다. DPPH는 안정적인 free radical 분자로 구성된 어두운 색의 결정성 분말로 수용성이다. 수용액 상태에서 517 nm의 빛을 흡수하는 적자색의 화합물로 항산화 물질과 결합하게 되면 radical이 소실되어 적자색이 사라져서 517 nm에서 흡광도가 줄어드는 특성을 이용하여 radical 소거능 확인 실험에 사용된다.

본 연구에서는 다양한 농도의 유자 과피 추출물을 DPPH 용액과 혼합하여 흡광도를 측정하고, 그 값을 시료 무첨가군의 흡광도 값과 비교하여 DPPH radical 소거능의 IC_{50} 값을 산출하였다. 그 결과 50%의 radical 소거율을 보이는 유자 과피 추출물의 IC_{50} 값은 10.57 ± 0.75 g/L임을 알 수 있었다(Fig. 6A). 이

같은 본 연구에서 대조군으로 사용한 합성 항산화제 BHT의 IC_{50} 값인 0.17 ± 0.01 g/L(Fig. 6B) 및 천연 항산화제 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값인 0.12 ± 0.01 g/L(Fig. 6C)과 비교하였을 때 높은 값을 나타내어 상대적으로 낮은 radical 소거능을 갖는다는 것을 알 수 있었다. 선행연구 결과와 비교하였을 때, 유자씨의 에탄올 추출물의 IC_{50} 값인 8.43 g/L 보다 다소 높은 값을 나타내었고, 유자 과즙에 포함된 IC_{50} 값의 경우 10 g/L에서도 radical 소거능이 확인 되지 않은 점과 비교하였을 때 유자 과피는 유자 씨 및 유자 과즙보다 radical 소거능이 높음을 알 수 있었다(Lee et al., 2009; Lee & Lee, 2017b).

4) ABTS radical 소거능

ABTS와 potassium persulfate를 반응시키면 ABTS radical이 생성되며 청록색의 색상을 띠게 된다. ABTS radical이 항산화 물질과 반응하여 radical이 소실되면 청록색이 탈색되어 점차 투명해지고 특정 파장에서 흡광도의 변화를 관찰할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 본 연구에서는 유자 과피의 ABTS radical 소거능을 측정하였다.

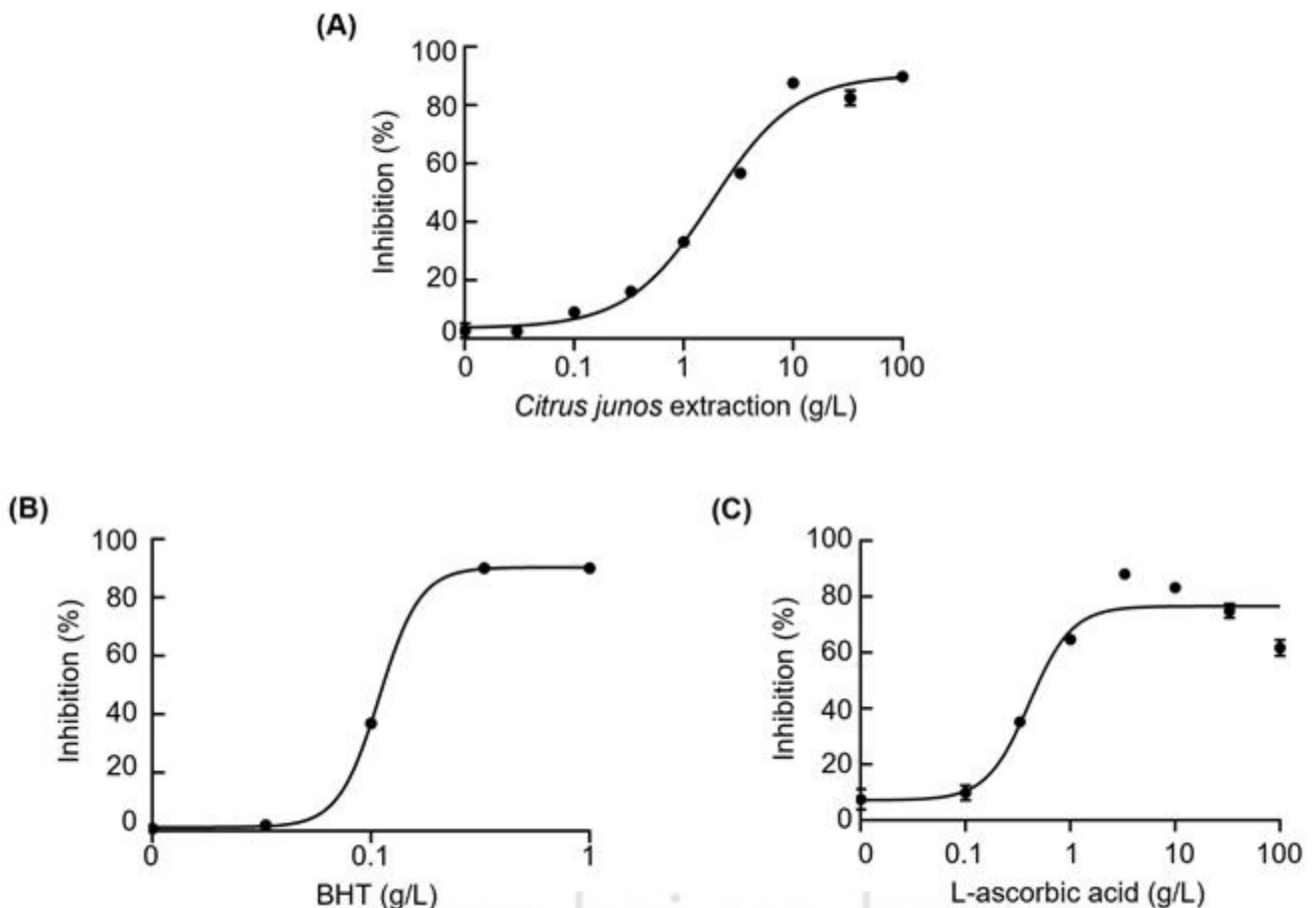


Figure 7. ABTS radical scavenging activity of (A)*C. junos*, (B)BHT, and (C)L-ascorbic acid.

다양한 농도의 유자 과피 추출물을 ABTS 용액과 혼합하여 흡광도를 측정 한 후, 그 값을 시료 무첨가군의 흡광도 값과 비교하여 ABTS radical 소거능의 IC₅₀ 값을 산출하였다. 그 결과 유자 과피 추출물의 IC₅₀ 값은 1.82±0.11 g/L임을 알 수 있었다 (Fig. 7A). 이 값은 본 연구에서 대조군으로 사용한 합성 항산화제 BHT의 IC₅₀ 값인 0.11±0.00 g/L (Fig. 7B) 및 천연 항산화제 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값인 0.04±0.01g/L (Fig. 7C)와 비교하였을 때 다소 높은 값이었지만, 유자 과피 농도가 높아짐에 따라 소거 활성이 높아지는 것을 알 수 있었다. ABTS radical 소거능의 경우 선행 논문에서 탱자의 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 10 g/L에서 측정이 되지 않았으며 감귤의 IC₅₀ 값은 3.1224 g/L로 확인되었고 (Lee & Lee, 2017a), 유자 과즙의 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값 또한 10 g/L에서 측정이 되지 않았다 (Lee & Lee, 2017b). 이와 비교 했을 때 본 연구에서의 유자 과피 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거능의 경우 높은 ABTS Radical 소거능을 나타냄을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 유자 과피를 70% 에탄올 용액으로 상온에서 추출한 후 HPLC로 주성분 분석을 행하였으며, 총 polyphenol 및 flavonoid 함량을 측정하고 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 확인하여 유자 과피 에탄올 추출물의 항산화 활성을 확인하였다.

상온에서 3시간이라는 쉽고 빠른 조건에서 높은 수율로 유자 과피 추출물을 얻을 수 있음을 알 수 있었고, 이는 화장품 산업 등에서 상용화 할 때 신속하게 전처리 하는데 있어서 유리한 조건이라 사료된다.

유자 과피 추출물의 주성분 분석을 위해 HPLC 분석을 수행하였고 추출물의 주요 피크가 hesperidin 및 naringin의 피크에 해당하며 이들 성분이 51:1의 비율로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 추출물이 함유하고 있는 주요 flavonoid 화합물이 hesperidin과 naringin이라는 것을 알 수 있었다. Hesperidin은 비타민P에 해당하며 지질과산화물 형성을 억제하며 노화 지연 등의 항산화 효과, 항염증 효과 등을 나타내기 때문에 이러한 분야에 유자 과피가 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 유자 과피 추출물의 총 polyphenol 함량은 8.05±1.05 mgGAE/g으로 선행 논문들과 유사한 값을 나타내었다. 총 flavonoid 함량은 0.93±0.87 mgQE/g로 선행 논문 보다 낮은 값을 나타내었으나, 유자농도가 높아짐에 따라 존재하는 flavonoid 함량값이 높아짐을 확인하였다. 이는 본 연구에서 추출한 유자 과피 추출물이 화장품 소재 개발 영역에서 우수한 polyphenol 공급원으로 사용 될 수 있음을 시사하였다. DPPH

radical 소거능과 ABTS radical 소거능 모두 유자 과피 추출물에서 농도 의존적인 증가를 확인할 수 있었다. DPPH radical 소거능에서는 10.57±0.75 g/L의 농도에서 50%의 소거율을 확인할 수 있었으며, ABTS radical 소거능에서는 1.82±0.11 g/L의 농도에서 50%의 소거율이 확인되었고 이는 유자 씨앗 및 과즙보다 높은 수치임을 알 수 있었다.

본 연구결과에서 나타낸 유자의 주성분 분석 및 항산화 효과 검증 결과를 바탕으로 유자가 천연 항산화제로 사용되어 화장품 소재 및 샴푸, 두피개선제 등의 미용소재로 활용되어 고부가 가치를 창출할 수 있는 상품화로 연계될 수 있음이 기대된다.

참 고 문 헌

- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J: Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci USA 77 : 3957-3961, 1980. doi: 10.1073/pnas.77.7.3957.
- Choe SY, Yang KH: Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Korean J Food Sci Technol 14 : 283-288, 1982.
- Davis WB: Determination of flavanones in citrus fruits. Anal Chem 19 : 476-478, 1947. doi: 10.1021/ac60007a016.
- Farag RS, Ali MN, Taha SH: Use of some essential oils as natural preservatives for butter. J Am Oil Chem Soc 67 : 188-191, 1990. doi: 10.1007/BF02539623.
- Jang MA, Lee JM: Reserach on domestic and international industrial trends of functional cosmetics. J Korean Appl Sci Tech 38 : 618-627, 2021. doi: 10.12925/jkocs.2021.38.2.618. (Korean)
- Jin TY, Wang MH, Yin Y, Eun JB: Effect of *Citrus junos* peel on the quality and antioxidant activity of traditional rice wine, Jinyangju. J Korean Soc Food Sci Nutr 37 : 76-82, 2008. doi: 10.3746/jkfn.2008.37.1.76. (Korean)
- Kaplan M, Najda A: Antioxidant activity of vine fruits depending on their colouring. Chemija 25 : 51-55, 2014.
- Kim DS, Kim DH, Oh MJ, Lee KG: Antiaging and whitening activities of ethanol extract of yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) by-product. J Soc Cosmet Sci Korea 36 : 137-143, 2010. doi: 10.12925/jkocs.2018.35.3.797. (Korean)
- Kim MJ, Lee JN: A study on *Peucedanum japonicum* Thunberg

- extract on anti-oxidation and cell activities as cosmetic additive. *J Korean Soc Cosmetol* 22 : 1135-1143, 2016. (Korean)
- Komes D, Horzic D, Belscak A, Ganic KK, Vulic L: Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int* 43 : 167-176, 2010. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.022.
- Lee HY, Kim YM, Shin DH, Sun BK: Aroma components in Korean citron (*Citrus medica*). *Korean J Food Sci Technol* 19 : 361-365, 1987. (Korean)
- Lee JE, Kim KM, Kim JS, Kim GC, Choi SY, Kim SB: Chemical compositions and antioxidant activities depending on cultivation methods and various parts of yuzu. *Korean J Food Preserv* 24 : 802-812, 2017. doi: 10.11002/kjfp.2017.24.6.802. (Korean)
- Lee JR, Jung JD, Hah YJ, Lee JW, Lee JI, Lee JD, Park GB, Kwak SJ: Effects of addition of citron peel powder on the proximate composition, minerals, vitamin A, C content and fatty acid composition of emulsion-type sausage. *J Anim Sci Technol* 47 : 99-106, 2005. doi: 10.5187/JAST.2005.47.1.099. (Korean)
- Lee SH, Lee MS: The study of antioxidant and antimicrobial effects on the skin extracts of *Citrus junos*, *Poncirus trifoliata*, *Jeju citrus*. *J Kor Soc B&A* 18 : 127-140, 2017a. doi: 10.5762/KAIS.2017.18.4.67. (Korean)
- Lee SH, Lee MS: The Study of physiological and antimicrobial activities on the *Citrus junos* extracts with its textures and skin. *J Korea Acad Industr Coop Soc* 18 : 67-74, 2017b. doi: 10.5762/KAIS.2017.18.4.67. (Korean)
- Lee SJ, Shin JH., Kang MJ, Jeong CH, Ju JC, Sung NJ: Physicochemical properties, free sugar and volatile compounds of Korean citrons cultivated in different areas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39 : 92-98, 2010. doi: 10.3746/jkfn.2010.39.1.092. (Korean)
- Lee YJ, Hwang IG, Joung EM, Kim HY: Physiological activity and antiproliferation effects of citron seed extracts on cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38 : 1672-1678, 2009. doi: 10.3746/jkfn.2009.38.12.1672. (Korean)
- Lim SH, Lee EH, Park DH: Effectiveness assessment of water-extract of some esculent plants based on functional compounds and physiological activity. *J Korean Soc Cosmetol* 22 : 653-659, 2016 (Korean).
- Min KC, Jhoo JW: Antioxidant activity and inhibitory effect of *Taraxacum officinale* extracts on nitric oxide production. *Korean J Food Sci Technol* 45 : 206-212, 2013. doi: 10.9721/KJFST.2013.45.2.206.
- Moon SY, Ko EY, Assefa AD, Park SW: HPLC method validation of naringin determination in goheung yuzu extract as a functional ingredient. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43 : 1737-1741, 2014. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.11.1737. (Korean)
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro R, Vattuone MA: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71 : 109-114, 2000. doi: 10.1016/S0378-8747(99)00189-0.
- Osawa T, Namiki M: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agr Biol Chem* 45 : 735-539, 1981. doi: 10.1080/00021369.1981.10864583.
- Park SM, Lee HH, Jang HC, Kim IC: Extraction and physicochemical properties of the pectin in citron peel. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30 : 569-573, 2001. (Korean)
- Seog HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS, Lee YT: Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34 : 889-892, 2002. (Korean).
- Shin JH, Lee SJ: Antioxidant activity of hot-water extract from yuzu (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) peel. *J Life Sci* 18 : 1745-1751, 2008. doi: 10.5352/JLS.2008.18.12.1745. (Korean)
- Vieira AJ, Beserra FP, Souza MC, Totti BM, Rozza AL: Limonene : aroma of innovation in health and disease. *Chem Biol Interact* 283 : 97-106, 2018. doi: 10.1016/j.cbi.2018.02.007.
- Wang Z, Nan W, S Huazhe: Pantothenic acid promotes dermal papilla cell proliferation in hair follicles of American minks via inhibitor of DNA Binding 3/Notch signaling pathway. *Life Sci* 252 : 1-8, 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117667.
- Woo KL, Kim JI, Kim MC, Chang DK: Determination of flavonoid and limonoid compounds in citron *Citrus junos* sieb. et Tanaka seeds by HPLC and HPLC/MS. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35 : 353-358, 2006. doi: 10.3746/jkfn.2006.35.3.353. (Korean)
- Woo KS, Jeong JY, Hwang IG, Lee YJ, Lee YR, Park HJ, Park ES, Jeong HS: Antioxidant activity of ethanol extraction on citron seed by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38 : 384-390, 2009. doi: 10.3746/jkfn.2009.38.3.384. (Korean)
- Yang JY, Jeon H, You YH, Kim JY, Choi HK, Choi KC, Jun WJ, Yoon HG: *Citrus* ethanol extracts promotes innate immune response by activating NF-kB. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44 : 1256-1263, 2015. doi: 10.11002/kjfp.2019.26.2.194. (Korean)