

碩士學位論文

감귤과피로부터 발암 promotion  
억제 활성성분의 분리



제주대학교 중앙도서관  
濟州大學校 大學院

食品營養學科

左 勝 婁

110 791

2001 年 6 月

# 감굴 과피로부터 발암 promotion 억제 활성성분의 분리

指導教授 尹彰焄

左勝婭

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함.



2001 年 6 月  
제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

左勝婭의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

김영호 (인)

委  
員

員

尹彰焄 (인)

委  
員

員

김정호 (인)

濟州大學校 大學院

2001 年 6 月

**Isolation of the anti-tumor promoters from  
Citrus fruits peels**

**Seung-Mi Jwa**

**(Supervised by professor Chang-Hoon Yoon)**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

**2001. 6.**

# 목 차

<b>SUMMARY</b> .....	<b>i</b>
List of tables .....	<b>ii</b>
List of figures .....	<b>iii</b>

<b>I. 서론</b> .....	<b>1</b>
--------------------	----------

## **제 1 장. Chloroform 추출에 의한 활성 성분의 분리**



<b>II. 실험재료 및 방법</b> .....	<b>6</b>
----------------------------	----------

<b>1. 실험재료</b> .....	<b>6</b>
----------------------	----------

- 1) 시료
- 2) cell
- 3) 시약

<b>2. 실험방법</b> .....	<b>8</b>
----------------------	----------

- 1) Chloroform 추출에 의한 활성성분의 분리
- 2) EBV-EA 유도 억제 활성 검정
  - (1) 검정을 위한 세포주 배양
  - (2) 세포수 계수
  - (3) 시료의 독성검사
  - (4) 간접형광항체 실험

**III. 결과 및 고찰 ..... 13**

**1. 활성성분의 분리 ..... 13**

**2. EBV-EA 유도 억제 활성 검정 ..... 18**

**IV. 요약 ..... 22**

**제 2 장. Column chromatography에 의한  
활성성분의 분리**

**II. 실험재료 및 방법 ..... 24**

**1. 실험재료 ..... 24**

- 1) 시료
- 2) cell
- 3) 시약

**2. 실험방법 ..... 25**

- 1) Column chromatography에 의한 활성  
성분의 분리
- 2) HPLC에 의한 Re-chromatography
- 2) EBV-EA 유도 억제 활성 검정
  - (1) 검정을 위한 세포주 배양
  - (2) 세포수 계수
  - (3) 시료의 독성검사
  - (4) 간접형광항체 실험

<b>Ⅲ. 결과 및 고찰</b> .....	<b>28</b>
1. 활성성분의 분리 .....	<b>28</b>
2. EBV-EA 유도 억제 활성 검정 .....	<b>32</b>
<b>Ⅳ. 요약</b> .....	<b>36</b>
<b>Ⅴ. 참고문헌</b> .....	<b>37</b>



## SUMMARY

This study was carried out to isolate the possible anti-tumor promoters from the peels of citrus fruits(*Citrus natsudaidai* Hayata).

The active constituents from the citrus peels were isolated by the two ways, one with chloroform and HPLC, the other with column chromatography and HPLC. The activity of anti-tumor promoters were estimated as inhibitors of tumor promoter, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced Epstein-Barr virus(EBV) activation in Raji cells.

The fractionations obtained with chloroform and HPLC showed 17 peaks, four of which exhibited significant inhibitory effects(71~77%) on EBV activation. The other fractionations obtained with column chromatography and HPLC showed 7 peaks, which also exhibited significant inhibitory effects(70~80%) on EBV activation. These results indicate that some constituents isolated here from the citrus peels might have the inhibitory activity of tumor promotion.

## List of tables

### Chapter 1. List of tables

Table 1. The operating conditions of 1st HPLC  
for CHCl<sub>3</sub> extracts ..... 9

Table 2. The operating conditions of 2nd HPLC  
for CHCl<sub>3</sub> extracts ..... 9

Table 3. Cell density and cell viability ..... 18



### Chapter 2. List of tables

Table 1. Elute composition of stepwise  
gradient chromatography of cold-  
pressed juice from citrus peels.....25

Table 2. The operating conditions of HPLC  
analysis.....26

Table 3. Cell density and cell viability ..... 33



# List of figures

## Introductory remarks

Figure 1. Two-stage carcinogenesis on mouse  
skin ..... 5

## Chapter 1. List of figures



Figure 1. Handling procedure in 24 holes cell  
well.....11

Figure 2. HPLC separation of  $\text{CHCl}_3$  extracts  
from *C. natsudaidai* Hayata ..... 13

Figure 3. Re-chromatography of F- I shown  
in Fig. 2 .....15

Figure 4. Re-chromatography of F-II shown in Fig. 2 .....	15
Figure 5. Re-chromatography of F-III shown in Fig. 2 .....	16
Figure 6. Re-chromatography of F-IV shown in Fig. 2 .....	16
Figure 7. TLC chromatograms of F- I ~F-IV shown in Fig. 2.....	17
Figure 8. Fluorescence microscopic appearance of EBV-EA induced cells, (×200) .....	21
Figure 9. Cell viability and EBV-EA inhibitory activity of F- I ~F-IV shown in Fig. 2.....	21

## Chapter 2. List of figures

- Figure 1. Column chromatography of cold-pressed  
juice from citrus peels..... 28
- Figure 2. TLC chromatograms of F'- I ~F'-VII  
shown in Fig. 1..... 29
- Figure 3. Re-chromatography of F'- I shown  
in Fig. 1..... 30
- Figure 4. Re-chromatography of F'- II shown  
in Fig. 1..... 31
- Figure 5. Re-chromatography of F'-IV shown  
in Fig. 1..... 31
- Figure 6. Fluorescence microscopic appearance  
of EBV-EA induced cells, ( $\times 200$ ).....35



Figure 7. Cell viability and EBV-EA inhibitory activity of F'-I ~F'-VII shown in

Fig. 1 ..... 35



# I. 서 론

암은 현대 의학의 가장 큰 당면과제로서, WHO의 보고에 의하면, 환경성 요인으로 인한 암 발생률이 85%에 달하고 있다. 환경성 발암인자 중에서 특히 식품이 차지하는 비율이 큰 것으로 알려져 있다(황운경 등 1998).

식품 성분 중에는 발암물질로 알려져 있는 것이 있는 반면, 암의 발생률을 낮추는 발암억제 물질로 알려져 있는 것도 있다(Wattenberg, 1985; Sir, 1992).

Carotene이 풍부한 녹황색 야채나 유채과의 야채(양배추, 브로콜리, cauliflower 등)를 매일 섭취하면 암에 쉽게 걸리지 않는다는 것이 미국과학 아카데미에서 발행한 「식품, 영양과 암」에 관한 특별위원회 보고서(1982)에서도 언급하고 있다.

우리나라의 식생활과 유사한 일본에서 행해진 식생활과 암의 발생을 연관해서 비교한 역학조사에서도 나타난 바와 같이 흡연자도 녹황색 야채를 매일 섭취하면 폐암이나 자궁암에 걸릴 위험이 훨씬 줄어든다고 한다. 이른바 독성제거와 같은 작용이 녹황색 야채에 있다고 하는 것이다(Akira 등 1996; Samuel, 1993; Yang 등 1992).

이와 같이 역학조사에서 야채류에 암 발생 억제 효과가 있다는 사실이 알려지면서 실험적으로 이를 증명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Sheela 등 1994; Pool-Zobel 등 1997; William 등 1993; Takuji 등 1994; Luigi 등 1997; Winfred, 1991; Gilbert 등 1994; Jin 등 1998; Hiroshi 등 1992; Akira 등 1993; Wolterbeek 등 1994; Micaiki 등 1992; Peto 등 1981).

정상적인 세포가 암화(癌化)하는 과정은 2단계로 이루어진다고 알려져 있다(대한병리학회, 1991).

제 1 단계는 initiator로 불리우는 발암물질 및 변이원성 물질에 의해 세

포의 유전자가 수복 불가능한 상처를 입고 돌연변이를 일으키는 과정으로 암화의 방아쇠가 당겨지는 개시(initiation)단계이다. 제 2 단계는 이 세포가 다시 promoter라고 불리우는 화학물질에 의해 반복자극을 받고 암화가 점점 진행되는 과정으로 촉진(promotion)단계이다.

Initiation 작용을 받은 세포는 초기에는 주위의 정상세포 또는 기타 작용으로 활동이 억제되어 이른 바 휴면상태에 있다고 생각된다. 그러나 promoter의 반복자극이나 기타 작용으로 정상세포의 상태에 변화가 일어나면 급격히 자기증식을 시작하는 기구를 가지고 있다.

암화가 제 2 단계를 거쳐 일어난다는 것은 mouse를 이용한 실험에서 증명되고 있다(Fig. 1). 종양은 initiator 또는 promoter 단독으로는 발생하지 않으며(Fig. 1의 (a),(b)), initiator 도포 후 promoter를 연속적으로 도포하면 종양이 발생하게 된다(Fig. 1의 (c)). 그러나 이를 역(逆)으로 하여 promoter를 연속적으로 도포한 후에 initiator를 도포하면 종양은 발생하지 않는다(Fig. 1의 (d)). 또한 initiator를 도포하고 일정기간 후에 promoter를 연속적으로 도포하면 피부에 종양이 발생한다(Fig. 1의 (e)). 이 사실은 initiator 작용이 세포에 기억되어 잠재적 종양세포의 상태로 정지되어 있다고 생각할 수 있다. 즉 initiation 과정은 불가역적(irreversible) 과정인데 반해, promotion 과정은 가역적(reversible) 과정이며, 세포가 암화되기까지는 promoter의 장기간에 걸친 연속적 작용이 요구된다는 것을 의미한다. 따라서 가역적 과정인 promotion 단계에서 암화를 차단할 수 있다고 생각되는 것이다(Fig. 1의 (f)).

평균수명이 긴 인간의 경우에 발암기구는 보다 복잡한 다단계 발암의 양상을 띄고 있지만 기본적으로는 위에서 언급한 2단계의 과정을 거쳐서 암화가 진행된다고 보아도 좋겠다.

최근 야채류나 과일류가 나타내는 발암억제 효과를 조사하는 방법으로써 initiation 과정의 억제를 측정하는 방법이 많이 이용되고 있다. 그러나 사람인 경우 성인이 되기 전까지 오랜 기간동안 initiator에 의한 불가역적

인 반응으로 잠재적 종양세포를 지니게 되는 경우가 많다고 생각된다. 여기에 일상생활에서 promoter가 될 수 있는 물질이 체내에 연속적으로 들어온다면 암화가 될 가능성은 매우 높아지게 된다. 그러므로 암예방의 관점에서 promotion 과정을 억제할 수 있는 물질을 찾아내는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 시료의 promotion 억제 활성을 측정할 수 있는 방법을 이용하게 되었다.

어떤 물질이 발암 promotion 억제 활성 여부를 판단하는데는 mouse 피부 암 시험으로 조사할 수 있다. 그러나 여기에는 다량의 시료와 장기간을 요하기 때문에 간이 단기 검정법이 필요하게 된다. 이 검정법은 발암 virus의 하나인 Epstein-Barr virus(EBV)에 감염한 환자의 B-림파구(Raji 세포)를 사용하는 것이다.

이 B-림파구는 promoter인 물질과 접촉하면 EBV(Tukei 등 1978; Louise 등 1995; Harald 등 1970; Jean 등 1975; Allan 등 1992; Wolfgang 등 1991; Ming 등 1994)가 활발히 활동을 시작해서 조기항원(early antigen)이라고 불리는 단백질을 생성한다는 것이 알려져 있다. 이 조기 항원이 유도되는 것과 promotion 활성 사이에는 매우 높은 상관관계가 있고, 조기 항원 유도 활성으로부터 promotion 유도 활성을 예측할 수 있다고 알려져 있다.

따라서 이 방법에서는 promotion을 억제하는 물질을 가하면 promoter에 의한 조기항원 유도가 억제된다고 생각하고 있다.

이와 같은 단기 검정법으로 많은 녹황색 야채나 과일이 promotion 억제 활성을 가지고 있다는 것이 보고되고 있다(Takao 등 1995; Yoshimasa 등 1996; Akira 등 1993; Hajime 등 1992; Akira 등 1992).

감귤류는 제주도 농업의 주종을 이루는 과일로서(제주감귤농업협동조합, 2000), 많은 생리활성 물질이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는데(손과 김, 1998; 우, 1997; Yoshiaki 등 1997; 농촌진흥청 제주감귤연구소, 1997; 양, 1992), 발암 억제 활성도 그 가운데 하나이다(Takuji 등 1998; Takuji

등 1997; Takuji 등 1994; Yingna 등 1997).

감귤성분중에서 발암억제와 관련해서 지금까지 알려진 것은 terpene류, flavon류, coumarin류, psoralen류 등이 있다(Akira 등 1997).

Hasegawa 등(1994)과 Lam 등(1994)은 감귤 과피의 limonoid가 항암효과가 있음을 밝히고, in vitro에서 위암, 폐암, 피부암, 구강암등의 세포 증식을 억제하는 것으로 보고하였다.

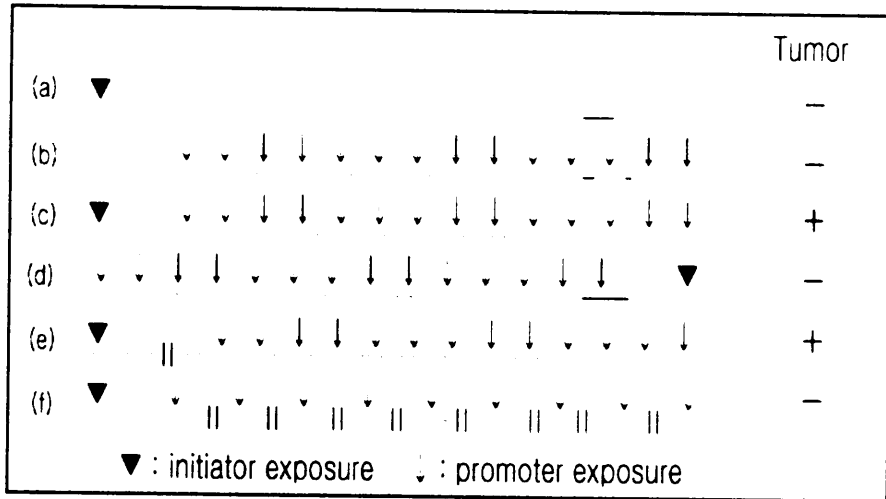
Akira 등(1995)은 감귤(*Citrus hystrix*)잎에서 분리해 낸 glyceroglycolipid가 강력한 promotion 억제활성을 나타냈다고 보고하였다.

감귤과피의 정유성분 역시 여러 가지의 생리활성을 나타낸다. 정유성분이 항균성을 가지는 것은 오래전부터 알려졌으며(Nobuyuki 등 1981; Jeongmok 등 1995; 김, 1999; Nobuji 등 1987), 정유성분중 d-limonene은 쥐의 유방암을 억제한다는 보고가 있다(Jill 등 1992; Pamela 등 1991; Michael 등 1994; Toshihiro 등 1996).

이와 같이 감귤과피에는 유용한 생리활성물질이 많기 때문에 기능성 식품 소재 또는 기능성 물질의 급원으로서 이용 가치가 높지만, 대부분 과육만이 이용될 뿐 엄청난 양의 과피는 버려지고 있다.

따라서 본 연구에서는 과피중에 정유성분이 풍부하게 함유되어 있는 하귤 (*Citrus natsudaoidai* Hayata)에 착안하여 과피에서 분리해 낸 성분의 발암 promotion 억제 활성이라는 암 예방의 새로운 관점에서 감귤의 기능성 소재로서의 이용 가능성을 탐색하였다.





**Figure 1. Two-stage carcinogenesis on mouse skin**(小清水 弘, 1989)

- (a) 동물의 털을 깎은 mouse 피부에 dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene(DMBA, 변이원성 물질, initiator)을 도포하지만 initiator만으로는 피부에 아무런 변화도 일어나지 않는다.
- (b) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, croton oil의 피부 염증 성분, promoter의 대표적인 것)만을 주 2회 이상 연속적으로 도포해도 종양은 생기지 않는다.
- (c) initiator를 1회 도포하고 난 후 1주일 후에 같은 부위에 promoter를 연속적으로 바르면 피부에 종양이 생기기 시작한다.
- (d) 도포의 순서를 역(逆)으로 해서 먼저 promoter를 연속적으로 피부에 바르고, 이어서 initiator를 도포해도 종양은 생기지 않는다.
- (e) initiator를 1회 도포하고 일정기간 후에 promoter를 연속적으로 도포하면 피부에 종양이 생긴다.
- (f) initiator 도포후에 promoter의 연속적인 작용이 차단되면 피부에 종양은 발생하지 않는다.

# 제 1 장. Chloroform 추출에 의한 활성성분의 분리

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시료

1998년 9월 12일 서귀포시 하효에서 채취한 하귤(*Citrus natsudaidai* Hayata)을 사용하였다. 하귤나무에서 하귤의 채취는 나무의 동서남북 4방향과 높이에 따라 상중하 3위치에서 중간크기의 하귤을 선택하였다.

#### 2) Cell

Africa의 Burkitt종양환자로부터 얻어진 B임파구(human B-lymphoblastoid cell, "Raji cell"이라고 함)는 일본 近畿大學 生物理工學部 生体機能工學 研究室 村上 明(Murakami Akira)박사로부터 제공받았다.

#### 3) 시약

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)는 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)에서, RPMI 1640 배지는 GibcoBRL(Grand Island, N.Y., U.S.A.)에서, Fetal Bovine Serum(FBS)는 JRH Biosciences(U.S.A.)에서 구입하였다. 1차 항체인 High-titer early antigen(EA)-positive sera는 상인두암환자(上咽頭癌患者)의 혈청으로서 상기의村上 明(Murakami Akira) 박사에게서 제공받았다. 2차 항체인 Fluorescein isothiocyanate[FITC]-labelled anti-human IgG는 Dako Co. Ltd.(Glostrup, Denmark)에서 구입하였는데,

0.2%  $\text{NaN}_3$ 를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)로 30배 희석해서 사용하였다. Thin layer chromatography 분석을 위한 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>는 Merck Co. Ltd. (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 그리고 기타의 모든 시약은 특급을 사용하였다.



## 2. 실험방법

### 1) Chloroform 추출에 의한 활성성분의 분리

채취한 하귤의 과피(5kg)를 깨끗이 씻어 농촌진흥청 제주감귤연구소(남제주군 하례리 소재)에서 FMC In-line Citrus Juice Extractor(FMC Corporation Chicago, IL, U.S.A.)로 cold-press한 후 추출용 시료로 사용하였다. 즉, cold-press한 액즙중에서 50ml를 취하여 Chloroform( $\text{CHCl}_3$ ) 200ml를 가하고 교반하면서 3시간 추출한 후 rotary evaporator로 감압, 농축(30℃ 이하)하였다.

농축된 시료는 High-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 활성성분의 분리를 시도하였다. 첫 번째 분석 조건은 <Table 1>과 같으며, 여기에서 얻어진 각각의 peak에 대해서 <Table 2>와 같은 조건으로 재차 분석하였다.

또한 각각의 peak에 대하여 Thin layer chromatography(TLC)로 분석하였다. 전개액은 n-hexane:ethyl acetate(5:1)를 사용하였으며, 형성되는 chromatogram의 확인은, 자외선등(Ultra lum, Inc.)하에서 반점 식별 후  $R_f$  값을 계산하였다.

**Table 1. The operating conditions of 1st HPLC for CHCl<sub>3</sub> extracts**

<b>Items</b>	<b>Conditions</b>
Column size	21.5 mmID × 30.0 cmL
Column type	TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>
Column temperature	room temp.
Mobile phase	90% MeOH in H <sub>2</sub> O
Flow rate	6.0ml/min
Detection	UV <sub>254nm</sub>
Injection volume	100μl
Pressure	14.00kg/cm <sup>2</sup>

\* HPLC : Tosoh Corp., Japan (ETC SC-8010)

**Table 2. The operating conditions of 2nd HPLC for CHCl<sub>3</sub> extracts**

<b>Items</b>	<b>Conditions</b>
Column size	4.6 mmID × 15.0 cmL
Column type	TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>
Column temperature	room temp.
Mobile phase	90% MeOH in H <sub>2</sub> O
Flow rate	1ml/min
Detection	UV <sub>254nm</sub>
Injection volume	10μl
Pressure	146.00kg/cm <sup>2</sup>

\* HPLC : Tosoh Corp., Japan (ETC SC-8010)

## 2) EBV-EA 유도 억제 활성 검정

### (1) 검정을 위한 세포주 배양

분리된 성분의 발암억제 활성을 검정하기 위하여 Raji cell은 다음과 같은 배지를 사용하여 배양하였다. 즉, RPMI 1640 10.4g(1ℓ 용), NaHCO<sub>3</sub> 2.0g, Penicillin 62.5mg, Streptomycin 100mg을 혼합한 다음 증류수를 넣고 magnetic stirrer로 교반하면서 용해시킨 후 FBS 110ml를 가하고 최종적으로 증류수를 가하여 1ℓ로 하였다. membrane filter(0.2μm)로 여과하였고, 배지의 pH는 1N HCl를 사용하여 6.8~7.4로 유지시켰다. 세포 배양하기 전에 배지의 오염여부를 확인하였다(CO<sub>2</sub> incubator, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 1주간 배양).

### (2) 세포수 계수

배양한 세포수를 측정하기 위하여 세포배양액 50μl를 원심분리관에 넣고 Trypan blue 염색액 50μl를 가해서 vortex한 후 이것을 소량(20~50μl)취하여 EtOH로 살균해 둔 Bürker Türk형 계수판에 흘려 넣어 현미경으로 계수하였다(대물렌즈: ×10). 계수판내에서 3개의 선으로 둘러싸인 기본구획(1mm × 1mm, 4군데)내의 생존세포수(무색) 및 사멸세포수(Trypan blue로 청색으로 염색된 것)를 계수하였다. 배양 후의 생존 세포밀도(W) 및 세포 생존률(V)은 다음식에 의해 구하였다. 기본구획내의 평균세포수(계수한 4군데의 평균)를 X로 하면 기본 구획의 체적은 0.1mm<sup>3</sup>이므로

$$W = 2 \times X \times 10^4 \text{ (개/ml)}$$

$$V(\%) = \frac{M}{(M + N)} \times 100$$

(M : 기본구획내의 생존세포수 합계,

N : 기본구획내의 사멸세포수 합계)

(3) 시료의 독성검사

이 검정에서 1개의 시료에는  $5 \times 10^5$ 개 정도의 세포가 필요하다. 배양한 세포수가  $X$ (평균세포수)  $\times 10^5$ 개/ml이 되었다고 하면, 가령  $n$ 개의 시료와  $c$ 개의 control을 실험할 경우  $5 \times 10^5 \times (n+c)/X \times 10^5 = 5(n+c)/X$ 이 되고,  $5(n+c)/X$ ml의 세포배양액은 배양 flask로부터 15ml들이 원심분리관으로 옮긴 다음, 원심분리(1,500rpm, 5분)하여 배지의 상청을 경사법으로 제거하고 새로운 배지 (n+c)ml를 가하여 조정한다. 24 holes cell well에 생육(culture) control로써 세포배양액 1ml를 가하고, 나머지 배양액에는 n-butyrate(n-BA)  $6 \times (n+c-1)$   $\mu$ l, TPA  $10 \times (n+c-1)$   $\mu$ l를 가하여, 이것들의 최종농도가 각각 3mM, 50nM이 되도록 했다.

각각의 cell well에는 시료용액 5  $\mu$ l를 넣었고, induction control에는 시료용액 대신에 시료 용해제(90% MeOH)를 5  $\mu$ l 넣었다. 다음에 시료용액을 넣은 cell well과 induction control에 위의 배양액(n-butyrate와 TPA를 넣은 배양액)을 각각 1ml씩 가한 다음, 멸균 알루미늄 호일로 싸서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 48시간 배양했다. 꺼낸 후 배양액의 세포밀도와 세포 생존율을 측정했다.

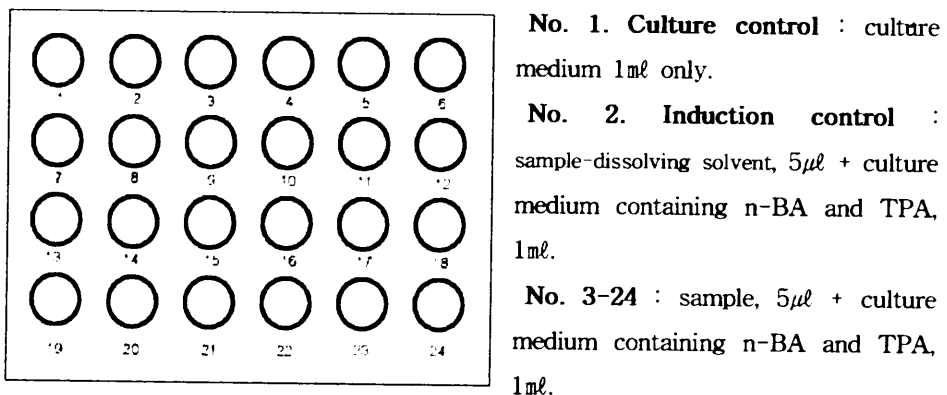
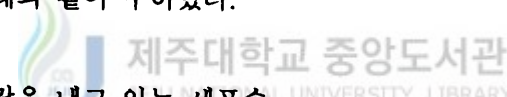


Figure 1. Handling procedure in 24 holes cell well

#### (4) 간접형광항체실험

도말표본을 만들기 위해 앞의 실험에서 세포 생존률 50%이상의 것을 원심 분리(1,500rpm, 5분)하여 상청을 소량만 남기고 제거한 후 vortex로 교반했다. 이것을 micropipette으로 slide glass위에 10 $\mu$ l 떨어뜨리고 desiccator에서 15분간 건조시켰다. 그리고 acetone으로 10분간 고정한 후 실온에서 건조시켰다. 여기에 1차 항체를 가한 후 37 $^{\circ}$ C, 40분간 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 후 PBS로 10분간 진탕세척하였다. 다음에 2차 항체를 가하여 위와 같은 조건에서 배양한 후 PBS로 10분간 진탕세척하였다. glycerol:PBS(1:1)를 slide glass에 40 $\mu$ l 떨어뜨리고 cover glass를 씌워서 형광현미경(Olympus Co., Japan)으로 관찰했다. 1개의 표본에서 세포를 500개 이상 계수하여 평가하였다.

평가방법은 induction control에서는 조기항원유도물질만을 가했을때의 유도율(X%)를 아래와 같이 구하였다.


$$X = \frac{\text{형광을 내고 있는 세포수}}{\text{전세포수}} \times 100$$

그리고 같은 방법으로 시료를 가했을 때의 유도율(Y%)를 구한 다음, X 및 Y를 이용하여 EBV-EA 유도 억제율(Z%)을 아래와 같이 구하였다.

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



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 활성성분의 분리

하귤 과피를 FMC In-line Citrus Juice Extractor로 cold-press하여 얻어진 즙을 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ )으로 추출하여 <Table 1>조건에서 HPLC 분석한 결과는 <Fig. 2>와 같다.

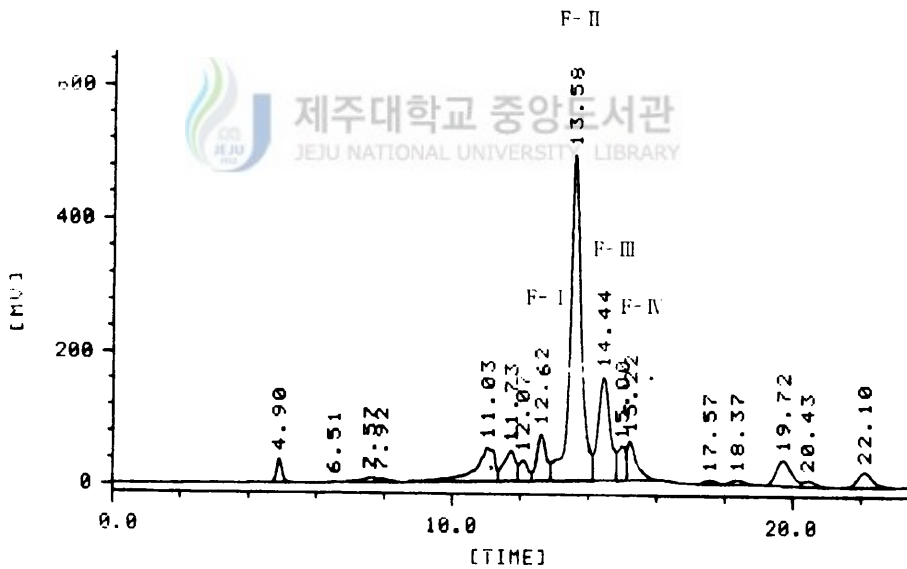


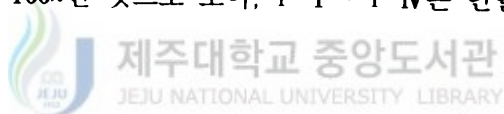
Figure 2. HPLC separation of  $\text{CHCl}_3$  extracts from *C. natsudaidai* Hayata

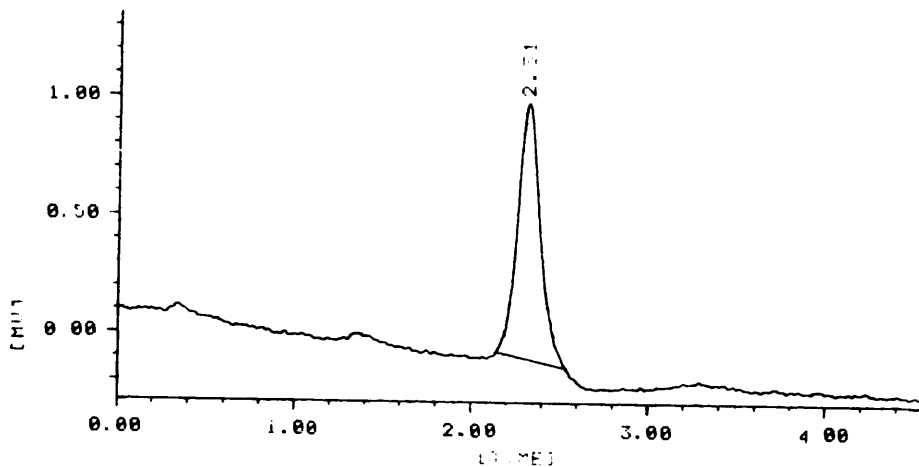
\*  $\text{CHCl}_3$  extracts were chromatographed on a TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>(21.5mmID×30.0 cmL) using methanol-water(9:1, v/v) at the flow rate of 6ml/min(see the materials and methods for detailed information).

HPLC chromatogram상에서 17개 peak가 나타났으며, 각 peak의 retention time( $t_R$ )은 4.90, 6.51, 7.57, 7.92, 11.03, 11.73, 12.07, 12.62, 13.58, 14.44, 15.00, 15.22, 17.57, 18.37, 19.72, 20.43, 22.10 이었다. 이 17개 peak중 Area %가 높은 네 개의 peak( $t_R=12.62, 13.58, 14.44, 15.00$ , 이하 각각 F-I, F-II, F-III, F-IV라고 함)에 대해서 단일 성분 여부 확인을 위하여 <Table 2>에 제시된 조건에서 재차 HPLC 분석을 시도했다. 그 결과는 <Fig. 3~6>에 나타냈다.

1차 분석에서 F-I, F-II, F-III, F-IV의 retention time은 각각 12.62, 13.58, 14.44, 15.00 이었지만, 재차 분석 결과에서는 각각 2.31, 2.30, 2.22, 2.27로 2분대의 거의 비슷한 시간대에 나타났다.

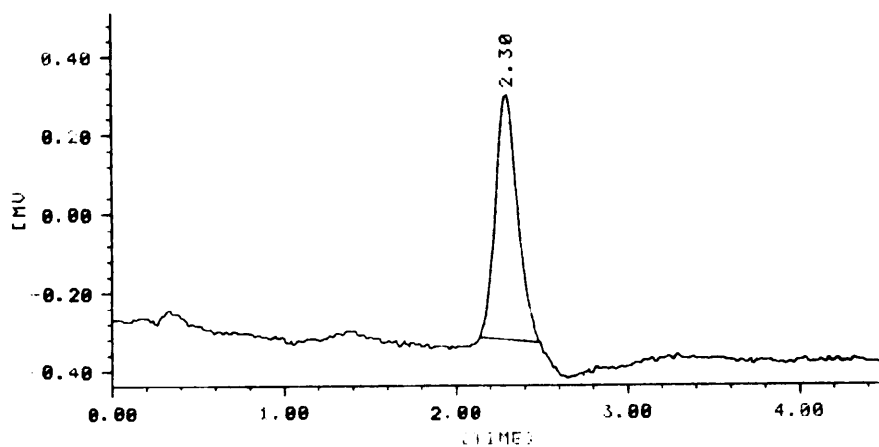
이와 같이 1차분석과 재차분석 결과에서 retention time의 차이는 사용한 column size와 flow rate이 달랐기 때문이라 생각되며, 그러나 재차분석시의 Area %는 각각 100%인 것으로 보아, F-I ~ F-IV는 단일성분이라고 추정된다.





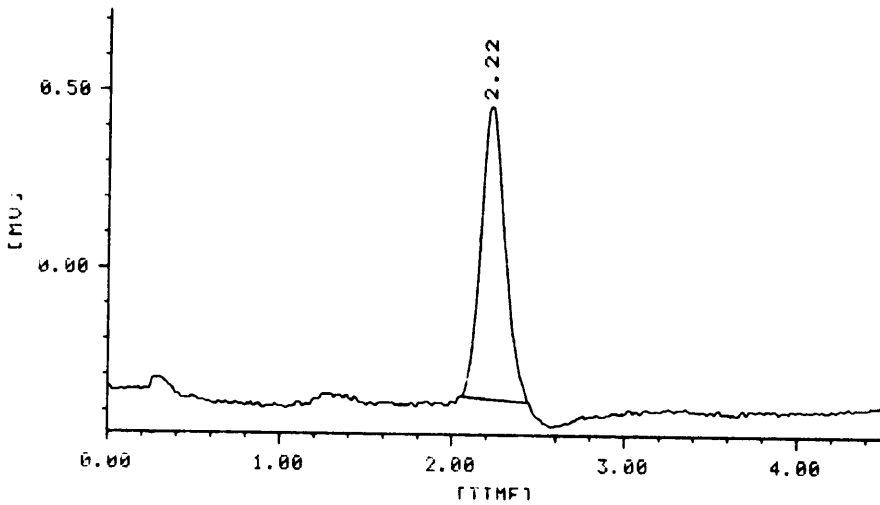
**Figure 3. Re-chromatography of F-I shown in Fig. 2**

\* F-I fraction obtained in Fig. 2 was re-chromatographed on a TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>(4.6mmID×15.0cmL) using methanol-water(9:1, v/v) at the flow rate of 1 ml/min(see the materials and methods for detailed information).



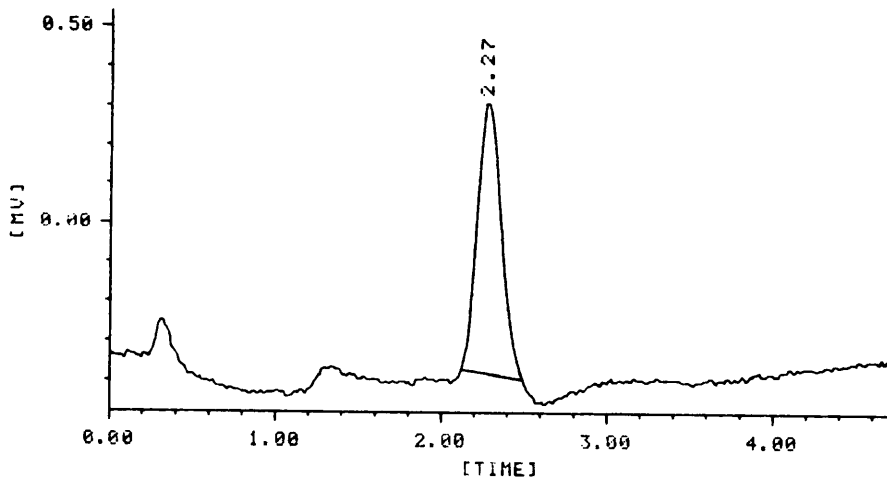
**Figure 4. Re-chromatography of F-II shown in Fig. 2**

\* F-II fraction obtained in Fig. 2 was re-chromatographed under the same condition as shown in Fig. 3.



**Figure 5. Re-chromatography of F-III shown in Fig. 2**

\* F-III fraction obtained in Fig. 2 was re-chromatographed under the same condition as shown in Fig. 3.



**Figure 6. Re-chromatography of F-IV shown in Fig. 2**

\* F-IV fraction obtained in Fig. 2 was re-chromatographed under the same condition as shown in Fig. 3.

F-I ~ F-IV의 네가지 성분에 대한 TLC 분석 결과는 <Fig. 7>에 나타냈다.

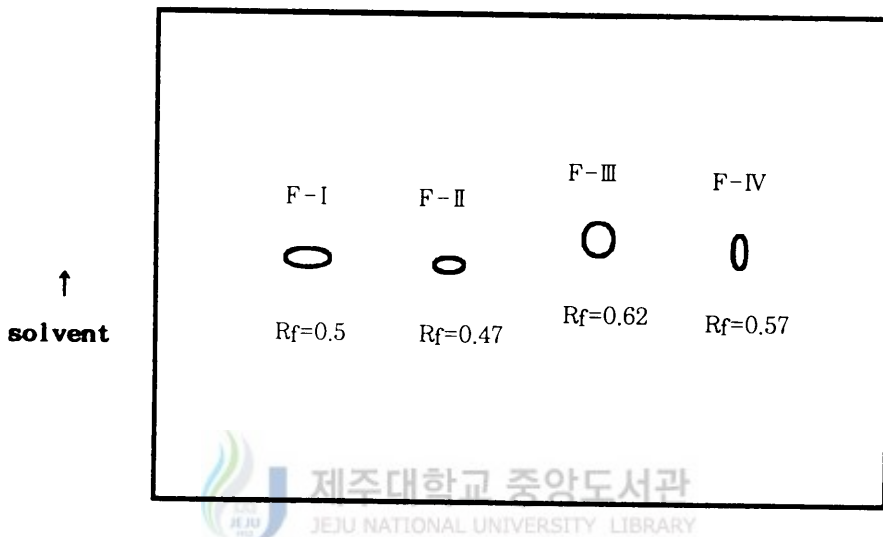


Figure 7. TLC chromatograms of F-I ~F-IV shown in Fig. 2

\* solvent : n-hexane:ethyl acetate=5:1

F-I ~F-IV의 TLC Rf값은 각각 0.5, 0.47, 0.62, 0.57이었다.

상기의 HPLC 결과에서도 네가지 성분이 단일 성분이라고 추정되었는데, TLC상에 각각 단일 반점으로 나타난 것은 이들 네가지 성분이 각각 단일 성분이라는 것을 뒷받침해 준다.

Akira 등(1997)은 하굴 과피를 클로로포름(CHCl<sub>3</sub>)으로 추출한 후 HPLC 분석(column:  $\mu$ Bondasphere C<sub>18</sub>, 3.9mmID×15cmL, mobile phase:75% MeOH in H<sub>2</sub>O, flow rate:1.0ml/min, detection:320nm)을 통해 네 개의 분획을 얻었다. 네 개의 분획에 대해서 여러 가지의 분석법(자외선 분광, 적외선 분광, 핵자기 공명, 질량 분석)을 이용하여 각각 psoralen계인 isoimperatorin과 5[(3,7-dimethyl-6-epoxy-2-octenyl)oxy]psoralen, coumarin계인

auraptene과 epoxyauraptene으로 동정했다.

본 실험에서 얻어진 주된 4개의 분획이 위에서 동정된 4개의 성분과 동일한지의 여부는 알 수 없다. 향후 여러 가지의 분석법을 이용하여 동정할 필요가 있겠다.

## 2. EBV-EA 유도 억제 활성 검정

시료의 EBV-EA 유도 억제에 대한 활성을 조사하기에 앞서 시료의 세포에 대한 독성여부를 조사한 결과는 <Table 3>에 제시했다. 세포밀도는  $5 \times 10^5$  개/㎖ 정도이었고, 세포 생존율은 70%이상 나타냈다.

이 실험에서는 promoter로서 TPA를 사용하였으나, Teleocidine B-4를 promoter로 사용한 다른 실험(카와키시, 1997)에서는 세포밀도는  $5 \times 10^5$  개/㎖로 본 실험과 비슷하지만, 세포 생존율은 90% 정도로 본 실험보다는 높은 생존율을 나타냈다.

Table 3. Cell density and cell viability

	Cell density(W, 개/㎖)	Cell viability(V, %)
Culture control	$5.35 \times 10^5$	78.5
Induction control	$5.15 \times 10^5$	74.7
F-I	$5.05 \times 10^5$	79.2
F-II	$5.10 \times 10^5$	81.3
F-III	$5.05 \times 10^5$	80.1
F-IV	$4.95 \times 10^5$	79.7

F-I ~F-IV 성분의 EBV-EA 유도 억제 활성을 검정하기 위해서 간접형광항체 실험의 결과는 <Fig. 8>과 <Fig. 9>에 나타내었다.

<Fig. 8>에서 보이는 바와 같이 형광을 띤 세포는 EBV-EA가 유도된 세포를 말한다. 전체 세포중에서 형광을 띤 세포를 계수하여 EBV-EA 유도 억제율을 구한 결과는 <Fig. 9>에 나타냈다.

F-I ~F-IV 네가지 성분중에서 억제 활성이 가장 높은 것은 F-IV 성분(77%)이었고, 그 다음 F-II(73%), F-III(72%), F-I(71%)순으로 나타났다.

시료의 활성기준을 어디에다 둘 것인가 결정하는 것은 어려운 일이지만, 시료농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 70%이상의 억제율이 관측된 경우는 그 시료의 생리활성이 존재하는 것으로 간주하고 있다(카와키시, 1997).

따라서, 본 실험의 결과에서도 F-I ~F-IV 네가지 성분 모두 70%이상의 억제율을 보이고 있으므로 생리활성이 있는 것으로 여겨진다.

위에서 언급한 바 있는 Akira 등(1997)이 얻은 4개 분획에 대한 EBV-EA 유도 억제 활성 검정에서는 시료농도에 비례해서 억제활성이 증가했으며, 시료 100 $\mu\text{M}$ 농도에서 4개의 분획 모두 90% 정도의 저해율을 나타냈다. 본 실험에서는 70%정도이었고, 이는 Akira 등(1997)의 결과보다 낮았지만, 성분이 다르기 때문에 낮은 것인지 시료의 농도가 다른데 기인하는지 명확하게 알 수 없다.

본 실험과 같이 EBV-EA 유도 억제 활성 검정을 이용하여 측정된 각종 식물의 발암 promotion 억제 활성을 보면, Takao 등(1995)은 *Cayaponia tayuya*(Cucurbitaceae)에서 분리한 성분이 70%이상의 세포생존율을 보였으며, 이들 중 13가지 성분에서 87%이상의 EBV-EA 유도 억제율을 나타내는 것으로 보고하였다. Akira 등(1993)은 태국에서 식용하는 식물중 45종이 70%이상의 세포생존율을 나타내며, 이들중 31종에서 70%이상의 EBV-EA 유도 억제율을, 나머지 31종이 30%이상의 약한 활성을 가지는 것으로 보고하였다. Akira 등(1995)은 *Citrus hystrix*의 잎에서 분리한 성분이 시료 농도 5 $\mu\text{M}$ 에서 70%이상의 세포생존율과 90%이상의 EBV-EA 유도 억제율을 가지는 것으로 보고하였으며, Yoshimasa 등(1996)은 *Neptunia oleracea*의 잎에서 분리한 성분이 5 $\mu\text{M}$ 에서 70%이상의 세포생존율을, 50~60%의 EBV-EA 유도 억제

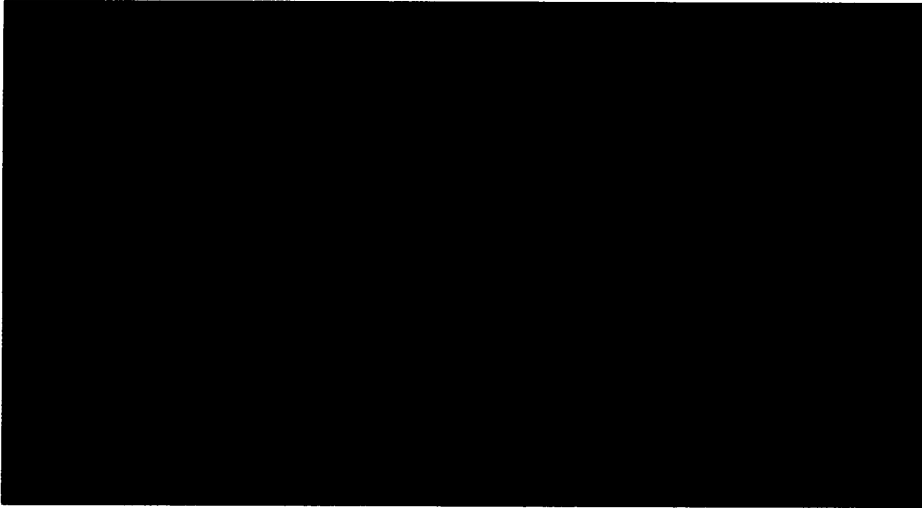
율을 가지는 것으로 보고하였다.

본 실험에서 하갈 과피로부터 분리된 성분 F- I ~F-IV의 세포생존율은 70%이상이었으며, EBV-EA 유도 억제율도 71~77%로, 위의 연구 결과들에서와 마찬가지로 매우 활성이 높은 것으로 나타났기 때문에, 앞으로 이와 관련된 상세한 연구가 더 진행되어야 하겠지만 기능성 소재로서의 이용가능성은 높다고 생각되어진다.



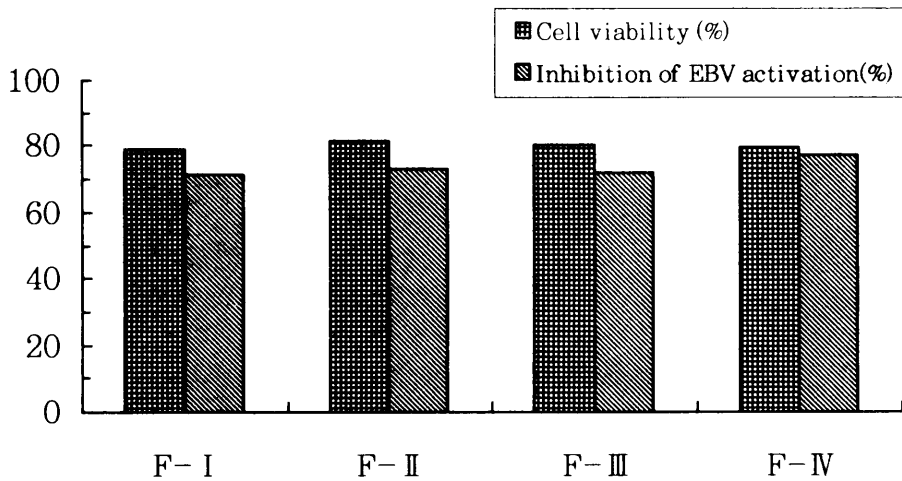
제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY





**Figure 8. Fluorescence microscopic appearance of EBV-EA induced cells, ( $\times 200$ )**

\* EBV-EA induced cells show bright fluorescence.



**Figure 9. Cell viability and EBV-EA inhibitory activity of F-I ~F-IV shown in Fig. 2**

## IV. 요 약

하귤(*Citrus natsudaidai* Hayata) 과피에서 분리해 낸 성분의 발암 promotion 억제 여부를 알아보기 위해서 EBV-EA 유도 억제 활성 실험을 수행하였다.

하귤 과피는 FMC In line Citrus Juice Extractor로 cold-press하여 얻어진 즙을 chloroform( $\text{CHCl}_3$ )으로 추출한 후, 1차 HPLC 분석(column: 21.5mm ID  $\times$  30.0cmL, mobile phase: 90% MeOH in  $\text{H}_2\text{O}$ , flow rate: 6.0ml/min, detection: UV<sub>254nm</sub>)을 시도하였는데, 그 결과, 17개 peak( $t_R$ =4.90, 6.51, 7.57, 7.92, 11.03, 11.73, 12.07, 12.62, 13.58, 14.44, 15.00, 15.22, 17.57, 18.37, 19.72, 20.43, 22.10)가 나타났다. 이들 중 Area %가 높은 4가지 성분( $t_R$ =12.62, 13.58, 14.44, 15.00)을 2차 HPLC 분석(column: 4.6mm ID  $\times$  15.0cmL, mobile phase: 90% MeOH in  $\text{H}_2\text{O}$ , flow rate: 1ml/min, detection: UV<sub>254nm</sub>)한 결과 각각 단일 peak로 나타났으며, area %도 100%인 것으로 보아 단일 성분으로 생각되었다( $t_R$ =2.31, 2.30, 2.22, 2.27; area %=100).

F-I ~F-IV의 TLC 분석에서,  $R_f$ 값은 각각 0.5, 0.47, 0.62, 0.57이었으며, TLC상에 각각 단일 반점만을 형성하였기 때문에 단일 성분임을 확인하였다.

F-I ~F-IV의 EBV-EA 유도 억제 활성은 Raji cell을 이용하여 간접형광항체법으로 실시했다. F-I ~F-IV의 세포생존율은 70%이상(74~81%)을 보였으며, F-I ~F-IV 네가지 성분중에서 EBV-EA 유도 억제 활성이 가장 높은 것은 F-IV(77%)성분이었고, 그 다음이 F-II(73%), F-III(72%), F-I(71%)로 나타났다.

이 실험에서 하귤 과피에서 분리해 낸 성분 F-I ~F-IV의 EBV-EA 유도 억

제 활성은 매우 높은 것으로 나타났으며, 따라서 기능성 소재로서의 이용 가능성이 기대된다.



## 제 2 장. Column chromatography에 의한 활성성분의 분리

### II. 실험재료 및 방법

#### 1. 실험재료

##### 1) 시료

시료는 제 1 장 II. 1의 1)과 동일한 것을 사용하였다.

##### 2) Cell

Cell은 제 1 장 II. 1의 2)와 동일한 것을 사용하였다.

##### 3) 시약

시약은 제 1 장 II. 1의 3)과 동일한 것을 사용하였다.



## 2. 실험방법

### 1) Column chromatography에 의한 활성성분의 분리

제 1 장 II. 2. 1)란에서 cold-press로 얻어진 액즙중에서 20ml를 여과하여 column chromatography용 시료로 사용하였다. wakogel C-200으로 충전한 glass column(60×2cm)을 사용하였는데, 용매로는 n-hexane:ethyl acetate를 <Table 1>과 같은 비율로 흘리면서 분리 시도하였다.

Table 1. Elute composition of stepwise gradient chromatography of cold-pressed juice from citrus peels

	n-hexane : ethyl acetate	elute volume(ml)
1)	75 : 25	300
2)	70 : 30	100
3)	65 : 35	100
4)	60 : 40	100
5)	50 : 50	500

glass column에서 나오는 용리액은 fraction collector(Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan)를 이용하여 수집하였다.

수집된 각 fraction에 대해서는 분광광도계(Kontron Co., Switzerland)를 이용하여 파장 320nm에서 Optical density(이하 O.D.)를 측정하였다.

column chromatography의 결과 얻어진 각 peak에 대하여 제 1 장과 동일한 방법으로 TLC 분석을 하였다.

## 2) HPLC에 의한 Re-chromatography

Column chromatography로 분리된 각 분획에 대하여 HPLC 분석을 하였다.  
HPLC 분석 조건은 <Table 2>와 같다.

**Table 2. The operating conditions of HPLC analysis**

Items	Conditions
Column size	250mmL×4.1mmID
Column type	Versapack C <sub>18</sub>
Mobile phase	75% MeOH in H <sub>2</sub> O
Flow rate	1.0ml/min
Detection	UV <sub>320nm</sub>
Injection volume	10μl

\* HPLC : Spectra-Physics Co., U.S.A. (spectrasystem).

## 2) EBV-EA 유도 억제 활성 검정

### (1) 검정을 위한 세포주 배양

검정을 위한 세포주 배양은 제 1 장 II. 2. 2)의 (1)과 같은 방법을 사용하였다.

### (2) 세포수 계수

세포수는 제 1 장 II. 2. 2)의 (2)와 같은 방법으로 계수하였다.

(3) 시료의 독성검사

시료의 독성검사는 제 1 장 II. 2. 2)의 (3)과 같은 방법을 사용하였다.

(4) 간접형광항체실험

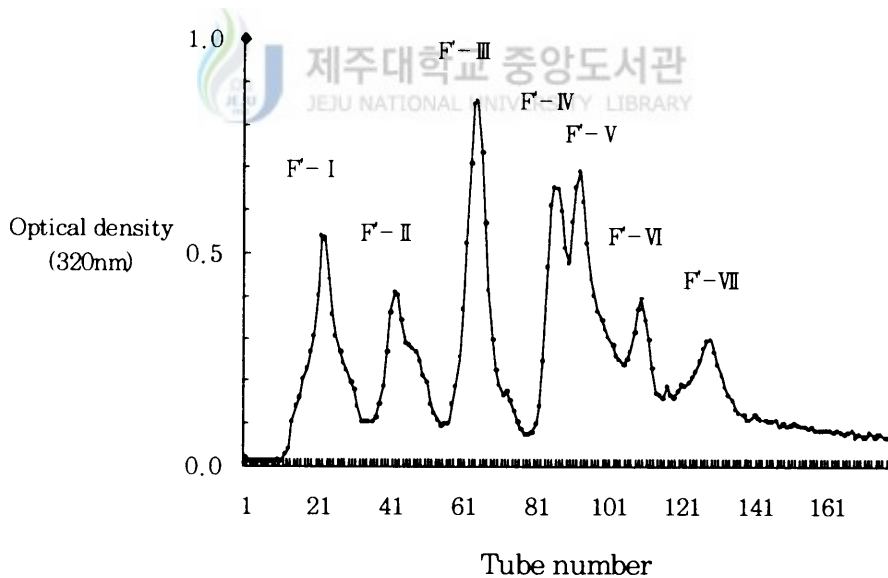
간접형광항체실험은 제 1 장 II. 2. 2)의 (4)와 같은 방법으로 실시되었다.



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 활성성분의 분리

하귤 과피를 cold-press하여 얻어진 액즙을 column chromatography하였다. <Fig. 1>는 column chromatography의 결과를 나타낸 것인데, 7개의 peak(이하 각각 F'-I, F'-II, F'-III, F'-IV, F'-V, F'-VI, F'-VII이라 함)가 나타났다.



**Figure 1. Column chromatography of cold-pressed juice from citrus peels**

\* Cold-pressed juice was chromatographed on glass column(filled with Wakogel C-200) at the flow rate of 1ml/min. Each fraction was collected 5ml/test tube.



이들 F'-I ~ F'-VII에 대한 TLC 분석 결과는 <Fig. 2>과 같다.

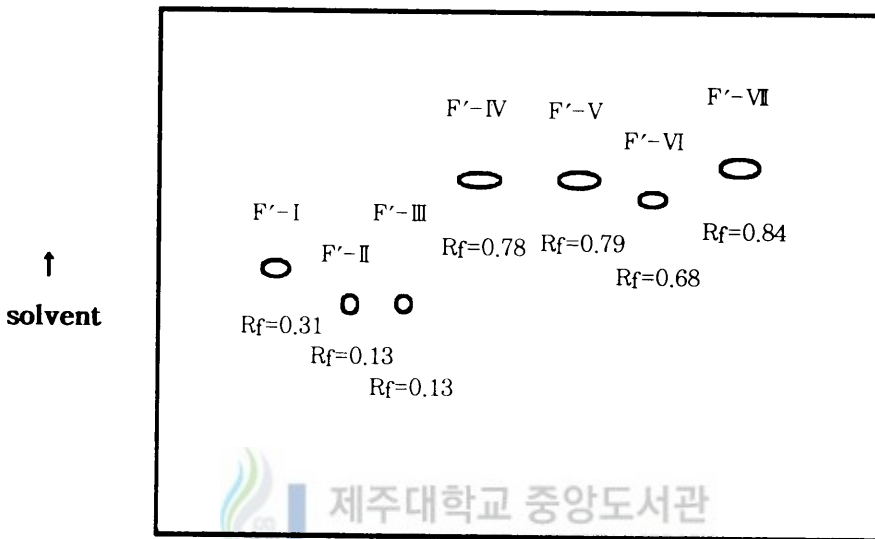


Figure 2. TLC chromatograms of F'-I ~ F'-VII shown in Fig. 1

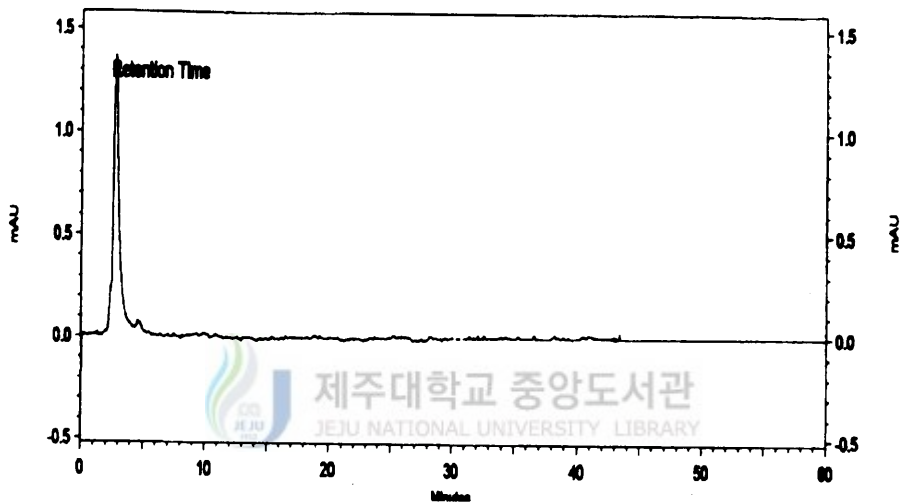
\* solvent : n-hexane:ethyl acetate=5:1

F'-I ~ F'-VII의  $R_f$ 값은 각각 0.31, 0.13, 0.13, 0.78, 0.79, 0.68, 0.84였으며, 각각 단일 반점만을 형성하였다. 따라서 7개의 성분이 단일성분이라고 추정된다.

제 1 장 <Fig. 2>에서 chloroform으로 추출했을 경우 17개의 peak가 나타났는데 여기에서 chloroform을 사용하지 않았을 때는 7개의 성분밖에 나타나지 않았다. 제 1 장 <Fig. 2>의 결과와 여기에서의 결과를 비교할 때, 서로 대응되는 peak가 어떤 것인지에 대해서는 더 상세한 연구가 필요하다고 생각된다.

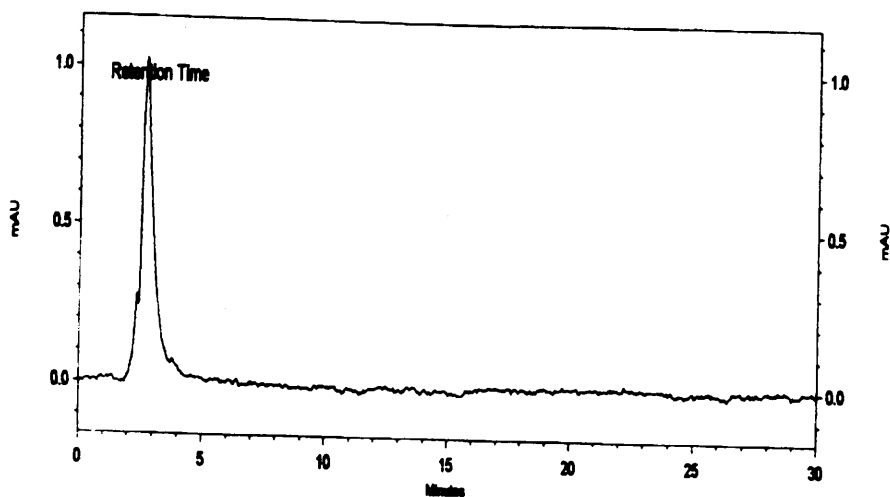
위의 7개의 peak(F'-I ~ F'-VII)중에서 3개의 peak(F'-I, F'-II, F'-IV)

를 선택하여, HPLC를 이용하여 재차 분석을 시도한 결과는 <Fig. 3~5>에 나타냈다.



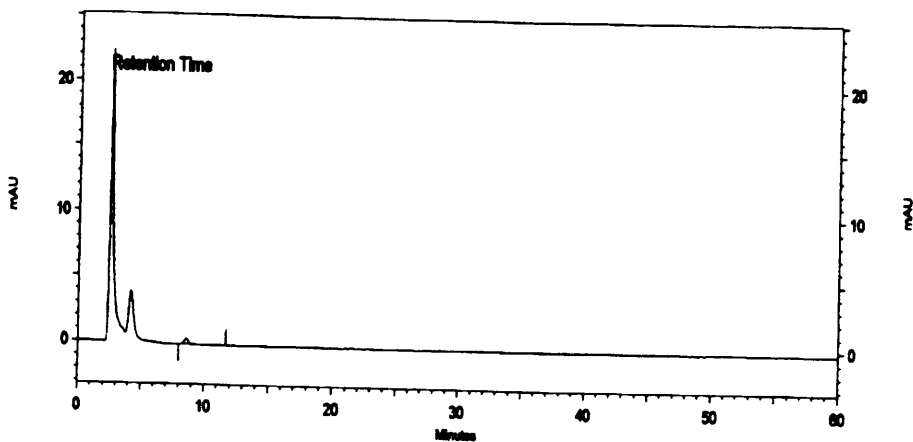
**Figure 3. Re-chromatography of F'-I shown in Fig. 1**

\* F'-I fraction obtained in Fig. 1 was re-chromatographed on a Versapack C<sub>18</sub>(4.1mmID×250mmL) using methanol-water(7.5:2.5, v/v) at the flow rate of 1ml/min(see the materials and methods for detailed information).



**Figure 4. Re-chromatography of F'-II shown in Fig. 1**

\* F'-II fraction obtained in Fig. 1 was re-chromatographed under the same condition as shown in Fig. 3.



**Figure 5. Re-chromatography of F'-IV shown in Fig. 1**

\* F'-IV fraction obtained in Fig. 1 was re-chromatographed under the same condition as shown in Fig. 3.

F'-I, F'-II의 retention time은 모두 2분대이며, 또한 하나의 peak로 나타난 것과 TLC의 결과를 연결하여 생각하면 단일 성분이라고 판단된다. 그러나 F'-IV은 re-chromatography 결과 2분대, 4분대, 8분대의 3개의 peak로 나타나 3개의 성분이 혼합되어 있다고 생각이 되지만 두 개의 peak는 극도의 미량이어서, 앞서 TLC 분석에서도 나타나지 않았던 것으로 여겨진다.

## 2. EBV-EA 유도 억제 활성 검정

시료의 EBV-EA 유도 억제에 대한 활성을 조사하기에 앞서 시료의 세포에 대한 독성여부를 조사한 결과는 <Table 3>에 제시했다. 세포밀도는  $5 \times 10^5$  개/㎖ 정도이었고, 세포 생존율은 65~77%로 나타났다. 특히 시료 F'-II 및 F'-III를 첨가해서 배양한 것의 세포 생존율은 다른 것들의 세포 생존률보다 다소 높았다.

여기에서 분리한 성분 F'-I ~F'-VII의 세포생존율(65~77%)은 제 1 장에서 chloroform추출로 분리한 성분 F-I ~F-IV의 세포생존율(74~81%)보다 다소 낮았다.

**Table 3. Cell density and cell viability**

	Cell density(W, 개/ml)	Cell viability(V, %)
Culture Control	$5.15 \times 10^9$	70.8
Induction control	$5.25 \times 10^9$	66.6
F'-I	$5.30 \times 10^9$	65.0
F'-II	$5.85 \times 10^9$	77.3
F'-III	$5.05 \times 10^9$	76.2
F'-IV	$5.25 \times 10^9$	71.4
F'-V	$4.90 \times 10^9$	71.4
F'-VI	$5.30 \times 10^9$	68.8
F'-VII	$4.95 \times 10^9$	69.6

F'-I ~ F'-VII 성분의 EBV-EA 유도 억제 활성을 검정하기 위해서 간접형 광항체 실험의 결과는 <Fig. 6>과 <Fig. 7>에 나타내었다.

<Fig. 6>은 EBV-EA 유도 세포가 형광을 띄고 있는 모양이며, 전체 세포중에서 이처럼 형광을 띄고 있는 세포를 계수하여 EBV-EA 유도 억제율을 구한 결과는 <Fig. 7>과 같다.

F'-I ~ F'-VII 7가지 성분중에서 유도 억제 활성이 가장 높은 것은 F'-VI 성분(80.7%)이었고, 그 다음 F'-I(80.5%), F'-II(76.3%), F'-III(75%), F'-IV(73.4%), F'-V(72.1%), F'-VII(70.7%)순으로 나타났다.

따라서, 제 1 장의 결과에서도 70%이상을 나타냈지만 여기에서도 F'-I ~ F'-VII 일곱가지 성분 모두 70%이상의 억제율을 보이고 있으므로 매우 생리

활성이 높은 것으로 여겨진다.

Akira 등(1997)은 하귤 과피를 cold-press하여 silica gel로 충전한 column chromatography(n-hexane:ethyl acetate, stepwise method)로 분석하고 나서 재차 HPLC(column:  $\mu$ Bondasphere C<sub>18</sub>, 19mmID×150mmL)로 분석한 결과 주된 2개의 peak를 얻었고, 이것은 auraptene과 umbelliferone으로 동정했다. 이들의 EBV-EA 유도 억제율(%)은 100  $\mu$ M에서 auraptene은 89%로 높은 활성을 나타낸 반면, umbelliferone은 20%로 매우 약한 활성을 나타냈다.

본 실험에서 얻어진 peak들은 약 70~80%정도의 억제율(활성)을 나타내었는데, 이것은 auraptene의 값과 비교하면 낮지만, umbelliferone과 비교하면 높은 값을 나타내고 있다.

제 1 장에서 얻어진(chloroform으로 추출한 것의) 17개의 peak가 제 2 장에서 얻어진(chloroform 불사용) 7개의 peak와 비교할 때 서로 대응되는 peak가 어느 것인지는 확실하 모르지만, 앞으로 더 상세히 연구할 필요가 있다고 사료된다.

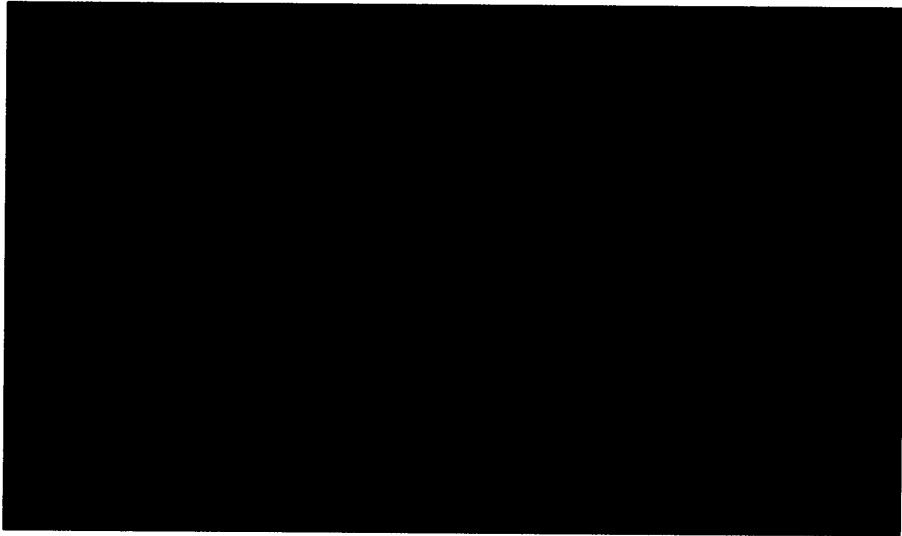


Figure 6. Fluorescence microscopic appearance of EBV-EA induced cells, ( $\times 200$ )

\* EBV-EA induced cells show bright fluorescence.

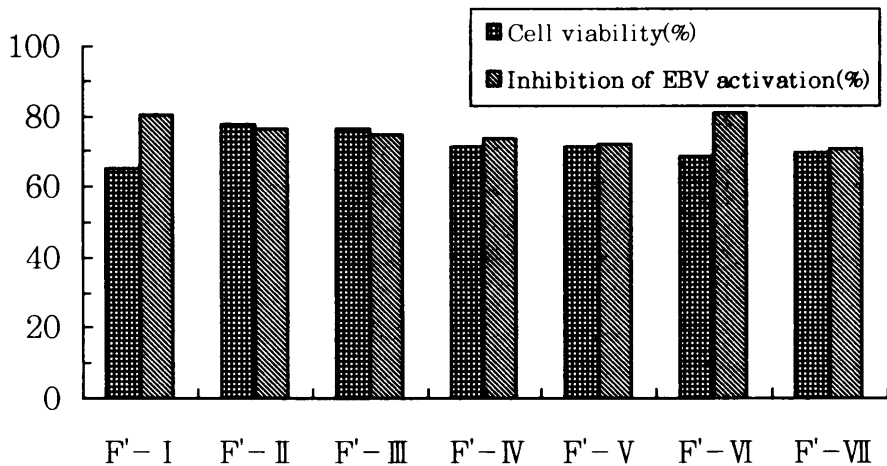


Figure 7. Cell viability and EBV-EA inhibitory activity of F'-I ~F'-VII shown in Fig. 1

## IV. 요약

하귤(*Citrus natsudaidai* Hayata) 과피를 cold-press해서 얻어진 액즙을 column chromatography와 HPLC 및 TLC로 분리하여 EBV-EA 유도 억제 활성 실험을 수행하였다.

액즙 20ml를 Column chromatography를 이용하여 분리 시도하였는데, 그 결과 7개의 peak(F'-I ~F'-VII)가 나타났다.

F'-I ~F'-VII에 대하여 제 1 장과 동일한 방법으로 TLC 분석한 결과 R<sub>f</sub>값은 각각 0.31, 0.13, 0.13, 0.78, 0.79, 0.68, 0.84였으며, 단일 반점만을 형성하였다.

F'-I ~F'-VII 중 F'-I, F'-II, F'-IV에 대하여 HPLC(column, 250mmL × 4.1mmID; mobile phase, 75% MeOH in H<sub>2</sub>O; detection, UV<sub>320nm</sub>; flow rate, 1 ml/min)에 의한 재차 chromatography를 하였는데 그 결과, F'-I, F'-II는 하나의 peak를 나타냈고, retention time은 2분대였다. F'-IV는 세 개의 peak가 나타났으며, retention time은 2분대, 4분대, 8분대였다. 2분대 peak외의 두 개의 peak는 극소량이어서 앞서 수행되었던 TLC 분석에서는 나타나지 않았던 것으로 생각된다.

제 1 장과 동일한 방법으로 수행되었던 EBV-EA 유도 억제 활성 검정에서, F'-I ~F'-VII의 세포생존율은 65~77%로 나타나, 제 1 장의 F-I ~F-IV의 세포생존율(74~81%)보다 다소 낮은 결과를 보였다.

또한 F'-I ~F'-VII의 EBV-EA 유도 억제율은, F'-VI가 80.7%로 가장 높았고, 그 다음이 F'-I(80.5%), F'-II(76.3%), F'-III(75%), F'-IV(73.4%), F'-V(72.1%), F'-VII(70.7%)순으로 나타났다. 여기에서, EBV-EA 유도 억제율은 70~80%로, 제 1 장의 chloroform추출에 의해 분리한 성분 F-I ~F-IV의 EBV-EA 유도 억제율(71~77%)과 비교할 때 비슷한 값을 나타냈다.



## V. 참고 문헌

- Akira, K., Hajime, O., Akira, M., Jiwajinda, S. and Koichi, K. 1993. 1'-Acetoxychavicol acetate as a potent inhibitor of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation from *Languas galanga*, a traditional Thai condiment. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(8):1344-1345
- Akira, M., Akira, K., Yoshimasa, N., Hajime, O. and Koichi, K. 1993. Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from Thailand, and identification of an active constituent, Cardamonin, of *Boesenbergia pandurata*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(11):1971-1973
- Akira, M., Hajime, O. and Koichi, K. 1996. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: A strategy for cancer chemoprevention. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(1):1-8
- Akira, M., Shizuko, T., Hajime, O., *et al.* 1992. Chalcone tetramers, Lophirachalcone and Alatachalcone, from *Lophira alata* as possible anti-tumor promoters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(5):769-772
- Akira, M., Wataru, K., Yasuo, T., *et al.* 1997. Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88:443-452
- Akira, M., Wataru, K., Yasuo, T., *et al.* 1997. Possible anti-tumor promoters from the peel oil of *Citrus natsudaidai* HAYATA(Natsumikan):

isoprenyloxylated coumarins and psoralens. *일본농예화학회 발표*

Akira, M., Yoshimasa, N., Koichi, K. and Hijime, O. 1995. Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. *J. Agric. Food Chem.*, 43:2779-2783

Allan, H., Sheila, W., Ernesto, D., *et al.* 1992. Herbal medicine use, Epstein-Barr virus, and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.*, 52:3048-3051

Georgy, K. and Eva, K. 1985. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature*, 315(16):190-195

Gilbert, S. O., Gary, G., Mark, T., *et al.* 1994. The  $\beta$ -carotene and retinol efficacy trial(CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and abestos-exposed workers. *Cancer Res.*, 54:2038s-2043s

Harald, Z. H., George, K., Werner, H., *et al.* 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, 228:1056-1058

Hasegawa, S., Miller, E. G., Gonzales-Sanders, A. P., Couvillion, A. M., Wight, J. M., Lam, L. K. T., and Sunahara, G. I. 1994. Inhibition of oral carcinogenesis by green coffee beans and limonoid glucosides. In "Food phytochemicals for cancer prevention I" eds. M.-T. Huang, T. Osawa, C.-T. Ho, and R. T. Rosen. ACS symposium series 546, *American*

*Chemical Society*, Washington, DC., pp.220-229.

Hijime, O., Yasushi, S., Kanoko, Y., Isamu, U. and Koichi, K. 1992. Possible anti-tumor promoting properties of marine algae and in vivo activity of Wakame seaweed extract. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(6):994-995

Hiroshi, M., Takato, K., Takaaki, A. and Ritsu, Y. 1992. High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: suppression of tumor promotion in the Epstein-Barr virus/B-lymphocyte system and scavenging of alkyl peroxide radicals by various vegetable extracts. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83:923-928

Jean, H. J., Jose, M., Eric, S. H. 1975. Persistence of CMV genome in lymphoid cells after congenital infection. *Nature*, 258:432-433

Jill, D. H., Mary, J. L., Lindstrom and Michael, N. G. 1992. Limonene-induced Regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 52:4021-4026

Jin, M. K., Shunichi, A., Dae, J. K., *et al.* 1998. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis*, 19(1):81-85

Jeongmok, K., Maurice, R., Marshall and Cheng-i, W. 1995. Antibacterial activity of some essential oil compounds against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 43:2839-2845

Lam, L. K. T., Zhang, J., Hasegawa, S. and Schut, H. A. J. 1994.

- Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus limonoids. In "Food phytochemicals for cancer prevention I" eds. M.-T. Huang, T. Osawa, C.-T. Ho, and R. T. Rosen. ACS symposium series 546, *American Chemical Society*, Washington, DC. pp.209-219.
- Louise, G. L., Diana, M. B., Ian, S. F., and Beverly, E. G. 1995. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: A breast cancer study. *Cancer Res.*, 55:39-45
- Luigi, M., De, L., karolina, K. and Fausto, A. 1997. The role of vitamin A in differentiation and skin carcinogenesis. *Nutr. Biochem.*, 8:426-437
- Michael, N. G., Cynthia, J. M., Rong, Z., *et al.* 1994. Limonene chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct in situ transfer of v-Ha-ras. *Cancer Res.*, 54:3540-3543
- Michiaki, M., Hoyoku, N., Yoshiro, S., Junko, T., Teiko, H., Harukuni, T., *et al.* 1992. Potent preventive action of  $\alpha$ -carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by  $\alpha$ -carotene than by  $\beta$ -carotene. *Cancer Res.*, 52:6583-6587
- Ming, X. W., Jean-Claude, M., Gisele, D., Francoise, B. and Tadamasa, O. 1994. Expression and Tumorigenicity of the Epstein-Barr virus BARF1 gene in human louckes B-lymphocyte cell line. *Cancer Res.*, 54:1843-1848

Nobuji, N., Yasumasa, Y. and Hidetsugu, F. 1987. 7-Geranyloxycoumarin from juice oil of Hassaku(Citrus hassaku) and antimicrobial effects of related coumarins. *Agric. Biol. Chem.*, 51(2):419-423

Nobuyuki, K., Makoto, M., Ryuichiro, K. and Yoshimasa, T. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.*, 45(4):945-952

Pamela, L. C., Rebekah, R. C., Zhibin, R., Charles, E. E. and Michael, N. G. 1991. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogenesis d-limonene and its metabolites. *J. Biol. Chem.*, 266:17679-17685

Peto, R., R. Doll, J. D. Buckley and M. B. Sporn. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature*, 290:201-208

Pool-Zobel, B. L., A. Bub, H. Muller, I. Wollowski and G. Rechkemmer. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9):1847-1850

Samuel, B. 1993. Perspectives on cancer in Japan and United States. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84:821-830

Sheela, S., Jill, D. S., Gray, J. K. and Vernon, E. S., 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.*, 54:5848-5855

Sir, R. D. 1992. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.*, 52:2024s-2029s

Takao, K., Midori, T., Mutsuo, K., *et al.* 1995. Inhibitory effects of Cucurbitane Triterpenoids on Epstein-Barr Virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor II. *Biol. Pharm. Bull.*, 18(2):284-287

Takuji, T., Kunihiro, K., Mikio, K., *et al.* 1998. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis*, 19(3):425-431

Takuji, T., Kunihiro, K., Mikio, K., *et al.* 1998. Citrus auraptene exerts dose-dependent chemoprevention 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

Takuji, T., Kunihiro, K., Mikio, K., *et al.* 1997. Citrus auraptene inhibits chemically induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 18(11):2155-2161

Takuji, T., Hiroki, M., Kunihiro, K., *et al.* 1997. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*, 18(5):957-965

Takuji, T., Hiroki, M., Kunihiro, K., *et al.* 1997. Modulation of *N*-methyl-*N*-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumourigenesis by

dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination. *Carcinogenesis*, 18(4):761-769

Takuji, T., Hiroki, M., Masami, O., *et al.* 1994. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: Comparison with the protective effect of  $\beta$ -carotene. *Cancer Res.*, 54:4653-4659

Takuji, T., Yukio, M., Masumi, S., Toshihiro, K., Ataru, O. and Hideki, M. 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, 15(1):15-19

Toshihiro, K., Takuji, T., Yoshinobu, H., Masami, O. and Hideki, M. 1996. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*, 17(2):369-372

Tukei, P. M., Bornkamm, G. W., Feorino, P., Henle, W., *et al.* 1978. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature*, 274:756-761

Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, 45:1-8

William, J.B., Jun-Yao, L., Philip, R., *et al.* 1993. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.*,

85(18):1483-1491

Winfred, F. M. 1991. Studies evaluating antioxidants and  $\beta$ -carotene as chemopreventives. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:305S-313S

Wolfgang, J., Raymond, V., Christine, M.-H., Helga, M., Iris, M. and Hans, W. 1991. Expression of class I major histocompatibility complex antigens in Epstein-Barr virus-carrying lymphoblastoid cell lines and Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.*, 51:27-32

Wolterbeek, A. P. M., A. A. J. J. L. Rutten and V. J. Feron. 1994. High survival rate of hamsters given intratracheal instillations of benzo[ $\alpha$ ]pyrene and ferric oxide and kept on a high  $\beta$ -carotene diet. *Carcinogenesis*, 15(1):133-136

Yingna, C., Heather, K., Dennis, J., Adam, D., Samantha, B., Wayne, I. and John, D. 1997. Effect of naturally occurring coumarins on the formation of epidermal DNA adducts and skin tumors induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis*, 18(8):1521-1527

Yingna, C., Wanda, B.D., Mike, A.S. and John, D. 1997. Inhibitory effects of naturally occurring coumarins on the metabolic activation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in cultured mouse keratinocytes. *Carcinogenesis*, 18(1):215-222

Yong, X., Chi-Tang, H., Shantu, G., Amin, C. H. and Fung-lung, C. 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J Mice by green tea and its major polyphenol as



antioxidants. *Cancer Res.*, 52:3875-3879

Yoshiaki, M., Kanefumi, Y., Yasujiro, M. and Toshihiko, O. 1997. Isolation of C-Glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 45:4619-4623

Yoshimasa, N., Akira, M., Koichi, K. and Hajime, O. 1996. Identification of pheophorbide  $\alpha$  and its related compounds as possible anti-tumor promoters in the leaves of *Neptunia oleracea*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(6):1028-1030

\* 국문 문헌

김유경. 1999. 학위논문. 온주밀감 과피로부터 정유의 추출·분석 및 항균 활성. 76 pp.

농촌진흥청 제주감귤연구소. 1997. 감귤 가공산업 육성을 위한 심포지움. 158 pp.

대한병리학회. 1991. 병리학. 고문사, pp.239-256

손정숙, 김미경. 1998. Hesperidin과 Naringin이 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 31(4):687-696

양영환. 1992. 감귤류 자료 모음집. 디딤돌, p.93

우원식. 1997. 천연물화학연구법. 서울대학교 출판부, pp.77-79

제주감귤농업협동조합. 2000. 제주감귤과 주요 품종. 145 pp.

카와키시 순로. 1997. 식품중의 생체기능조절물질연구법. 한림원, pp.39-43

황윤경, 김동청, 황우익, 한용봉. 1998. 쑥(*Artemisia princeps Pampan*) 추출 성분의 암세포 증식 억제효과. 한국영양학회지, 31(4):799-808

\* 일문 문헌

小清水 弘一. 1989. 野菜と 健康



## 감사의 글

계절의 추이를 느낄 겨를도 없이 바빠 지내왔던 대학원 석사과정을 이 조그마한 논문과 함께 마무리하려고 합니다.

먼저, 실험의 기초적인 것부터 자상하게 가르쳐 주셨으며, 미흡한 저를 학문의 길로 안내해 주셨고 이 논문이 완성되기까지 학문적 조언과 지도를 해주신 윤창훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

논문의 심사를 위하여 자상한 조언을 아끼지 않으셨던 고양숙 교수님과 양양한 교수님께 감사드립니다. 그리고, 늘 따스하게 지켜봐 주시고 격려해 주셨던 강정숙 교수님, 신동범 교수님, 홍양자 교수님께 감사드립니다.

많은 시간 같이 밤새며 실험해주었던, 후배지만 배울 점이 많았던 양희에게 서면으로나마 고마움을 전합니다. 자기 일처럼 논문 실험을 도와주었던 정예에게도 고마운 마음 전하며, 많은 도움을 주었던 후배 민숙, 지영에게도 고마움을 전합니다.

상사와 동료로서 격려의 말을 아끼지 않으셨던 신수범 교장선생님, 좌승원 교감선생님, 영양사 선생님들께 감사드립니다.

무엇보다도 이 논문이 완성되는 날까지 끝없는 믿음과 사랑으로 지켜봐 주셨던 부모님께 사랑과 감사의 마음 드립니다. 사랑하는 승훈오빠, 정옥언니, 승호오빠, 희심언니께 감사의 마음 드립니다. 그리고 하늘나라에 있는 승희언니에게도 사랑의 마음 전합니다.

그리고 끝으로 격려의 말을 아끼지 않았던 친구, 명희, 옥자, 병호에게도 고맙다는 인사 전합니다.

이 논문을 사랑하는 아버지, 어머니께 바칩니다.