생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
32(2) : 93 ~ 97 (2001)

시판 지각으로부터 Hesperidin의 분리 및 함량분석

한두일 · 황방연 · 황석연 · 박정일[1] · 손건호[2] · 이승호[3]
장승엽[4] · 강신정[4] · 노재섭 · 이경순*

충북대학교 약학대학, [1]서울대학교 약학대학, [2]안동대학교 식품영양학과,
[3]영남대학교 약학대학, [4]식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Hesperidin from Aurantii Fructus

Doo Ill Han, Bang Yeon Hwang, Suk Yeon Hwang, Jeong Hill Park[1], Kun Ho Son[2], Seung Ho Lee[3], Seung Yeup Chang[4], Shin Jung Kang[4], Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,
[1]College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,
[2]Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749,
[3]College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, [4]KFDA, Seoul 122-704, Korea

Abstract – Aurantii Fructus has been used in traditional medicine as a digestant, expectorant, and in the treatment of diarrhea, anal prolapse. For the quality control of this crude drug, hesperidin was isolated from the ethylacetate fraction of *Citrus aurantium* (Rutaceae) and identified by the spectroscopic evidences. A quantitative analysis of hesperidin using HPLC method exhibited that the average contents of hesperidin were 2.13±1.16% in 57 samples collected throughout the various regions of Korea.

Key words – Aurantii Fructus, Rutaceae, quantitative analysis, hesperidin, HPLC method.

지각은 한약규격집에 광귤나무 *Citrus aurantium* L. (산초과 Rutaceae)의 채 익지않은 열매를 둘로 쪼갠 것으로 규정되어 있으며, 중국약전에도 동일하게 규정되어 있다. 성숙에 가까운 과실을 칼로 자른 반구형으로 직경은 3~5 cm이다. 표면은 녹갈색 또는 다갈색으로 작은 유점(油點)이 많이 산재하고 약간 융기한 주름 무늬가 있으며 중앙에는 화주(花柱)의 기부 흔적과 원형의 과병 흔적이 뚜렷이 있다. 단면은 황백색이며, 질은 단단하고 속은 황갈색인데 질이 연한 종자가 들어 있다. 향기가 있고 맛은 조금 시면서 쓰다. 외피가 녹갈색으로 과육이 두껍고 질이 단단하며, 향기가 진한 것이 좋은 것이다.[1-3]

지각의 성분에 관한 연구로는 정유를 약 0.3~0.5%를 함유하고 있으며 주성분으로는 hesperidin, hesperitin, neohesperidin, naringin, naringenin, isonaringin 등의 flavanone과 tangeritin, nobiletin, neodiosmin 등의 flavone 그리고 auranetin, quercetin 등의 flavonol type의 flavonoid가 *Citrus aurantium*에서 분리 보고되었고,[4-7] limonoid 성분으로 limonin, obacunone, deacetylnomilin, nomilin, deacetylnomilinic acid, nomilinic acid, isolimonic acid, ichagin, 19-hydroxydeacetylnomilinic acid의 17β-D-glucopyranoside와 isolimonic acid 등이 보고되었다.[8-9] 또한, limonene, citral 등의 정유 및 umbelliferone, aurap-

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

ten, citroptene 등의 coumarin 성분이 보고되었다.[4,10]

현재 시판되고 있는 지각은 그 지표성분에 대한 분석법이 제대로 되어있지 않은 실정으로 활성성분 또는 지표성분의 분석 및 정량법에 대한 검토가 필요하다. 따라서, 지각의 성분중 주성분으로 보고되어 있는 hesperidin을 지표물질로 선정하여, column chromatography를 통한 분리방법을 확립하였다. 또한, 전국 각지에서 구입한 지각에 대하여 지표물질 hesperidin의 확인시험, 건조감량, 회분시험, 정유함량, 묽은에탄올 엑스함량 및 HPLC를 이용한 함량비교 등을 통하여 규격화 및 표준화에 자료를 제공함으로서 우수 한약재의 유통에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구에 사용한 지각은 1998년 전국 각지 57개 지역에서 구입하여 분쇄기로 마쇄하여 세말로 한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 – ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR은 Varian Unity-300 spectrometer를 사용하였고, ESI-MS는 Finnigan Navigator mass spectrometer를 사용하였다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer(Model LE 599, U.K.)를, IR은 FT/IR 300E (JASCO) spectrometer를 사용하여 측정하였다. Column chromatography용 담체는 silicagel(70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F_{254} plate(0.2 mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. 발색시약으로는 5% $FeCl_3$ reagent, 10% vanilline-sulfuric acid를 사용하였다.

확인시험 – 검체 가루 0.5 g에 메탄올 10 m*l*을 넣고 2분간 서서히 끓인 다음 여과한 여액에 금속 마그네슘 소량 및 염산 3-4방울을 넣고 방치할 때 색의 변화를 관찰하였다.

건조감량시험 – 분석용 검체 3 g을 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터(실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 항량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 – 미리 백금제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 3 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500~550°C에서 4시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량(%)으로 하였다.

정유함량 – 분석용 검체 50 g을 경질 유리플라스크에 넣어 400 m*l*의 증류수를 넣은 다음 정유정량 장치를 이용하여 유욕중에서 130~150°C로 5시간동안 가열하여 끓였다. 정량기의 눈금이 있는 관에는 미리 2.0 m*l*의 xylene을 넣어 두었다. 5시간 계속 끓인 다음 가열을 중단하고, 상온에서 1시간 방치한 다음 유층의 상면을 관의 영선까지 저하시켜 상온에서 유량(m*l*)을 재고 xylene양을 빼주어 정유량으로 하였다.

묽은에탄올엑스 함량 – 분석용 검체 약 2.3 g을 정밀하게 달아 적당한 플라스크에 넣고 묽은에탄올 70 m*l*를 넣어 때때로 흔들어 섞어 5시간 침출하였다. 다시 16-20시간 방치한 다음 여과하였다. 플라스크 및 잔류물은 여액이 100 m*l*로 될 때까지 묽은에탄올로 씻었다. 여액 50 m*l*를 수욕상에서 증발건고하고 105°C에서 4시간 건조하여 데시케이터(실리카 겔)에서 식힌 다음 그 무게를 정밀하게 달고 2를 곱하여 묽은에탄올엑스의 양으로 하였다. 건조감량에서 얻은 값에서 건조물로 환산한 검체량에 대한 엑스함량(%)를 산출하였다.

지표성분의 분리정제 – 지각 5 kg을 구입후 정확히 감정하여 세말로 하였다. MeOH(10 L)로 실온에서 3회 반복 추출한 후 여과, 농축하여 MeOH 엑스 1.1 kg을 얻었다. 이것을 EtOAc로 분획한 후 EtOAc층을 CH_2Cl_2→MeOH gradient로 silicagel column chromatography하여 8개의 fraction(Fr. 1~Fr. 8)으로 나누었다. Fr. 3을 CH_2Cl_2→MeOH gradient로 silica gel column chromatography를 반복실시하여 미황색 분말상의 hesperidin 1.2 g을 순수 분리정제하였다. 순수분리된 hesperidin을 silica gel TLC plate에 점적한 후 methylene chloride:methanol=3:1의 전개용매로 전개, 5% $FeCl_3$ 시액에 의하여 R_f 0.45에서 발색되었다.

Hesperidin – yellow needles, mp 258-262°C; UV, λ_{max} (MeOH) nm (log ε): 228 (3.5), 284 (3.6), 328 (3.6); IR, ν_{max}^{KBr} 3480, 2919, 1647, 1609, 1605 cm^{-1}; ESI-MS, *m/z* 611 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR, (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1.09 (3H, d, *J*=6.2 Hz, Rha-CH_3), 2.78 (1H, dd, *J*=17.1, 3.3 Hz, H-3a), 3.25 (1H, m, H-

3b), 3.77 (3H, s, 4'-OCH_3), 4.53 (1H, s, Rha H-1), 4.97 (1H, d, *J*=7.3 Hz, Glc H-1), 5.50 (1H, dd, *J*=12.1, 3.3 Hz, H-2), 6.12 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 6.14 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.90 (1H, dd, *J*=8.0, 1.8 Hz, H-6'), 6.93 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 9.07 (1H, br s, 3'-OH), 12.01 (1H, s, 5-OH); ^{13}C-NMR, (75 MHz, DMSO-d_6) δ: 78.4 (d, C-2), 42.1 (t, C-3), 197.0 (s, C-4), 163.1 (s, C-5), 96.4 (d, C-6), 165.2 (s, C-7), 95.6 (d, C-8), 162.5 (s, C-9), 103.4 (s, C-10), 130.9 (s, C-1'), 114.2 (d, C-2'), 148.0 (s, C-3'), 146.5 (s, C-4'), 112.1 (d, C-5'), 117.8 (d, C-6'), 99.5 (d, Glc-1), 73.0 (d, Glc-2), 76.3 (d, Glc-3), 70.7 (d, Glc-4), 75.6 (d, Glc-5), 66.1 (t, Glc-6), 100.6 (d, Rha-1), 70.3 (d, Rha-2), 69.6 (d, Rha-3), 72.1 (d, Rha-4), 68.3 (d, Rha-5), 17.8 (t, Rha-6), 55.7 (-OCH_3).

HPLC의 분석조건 – HPLC는 YOUNG-LIN HPLC 9600 System으로서 M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-WIN Data System을 사용하였다. column은 TSKgel ODS-120T_M(150×46 mm I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 MeOH:water=40:60을 사용하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 m*l*/min, UV detector의 파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 – 지각을 세말로하여 1.0 g을 정확히 취하고 MeOH 15 m*l*을 가하여 실온에서 24시간 추출하여 여과하고 정확히 15 m*l*로 하였다. 이를 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 – 지각으로부터 순수분리한 hesperidin 10 mg을 MeOH 10 m*l*에 용해하고 이것을 MeOH로 희석하여 0.1 mg/m*l*, 0.01 mg/m*l*로 만들어 검량선용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액을 취하고 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다.

Hesperidin의 함량분석 – 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한 회귀직선 방정식으로부터 각각 hesperidin의 함량을 구하였다. 이 때 hesperidin의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_R은 9.9 min 이었다.

결과 및 고찰

생약규격집에 수재되어 있으며 현재 한방에서 널리 이용되고 있는 지각에 대한 표준화 연구의 일환으로, 지각의 주성분으로 다양한 생리활성이 보고되어 있는 hesperidin을 지표물질로 선정하였다. 표준품 확보를 위하여 지각을 MeOH로 추출한 후, EtOAc와 H_2O로 fractionation하고, EtOAc layer에 대해 column chromatography를 반복 실시하여 지표물질을 순수분리 정제하였다. 순수분리된 물질은 Mg-HCl 반응 및 Molisch 반응에서 양성을 나타내어 flavonoid glycoside로 추정되었다. ^{1}H-NMR spectrum에서는 flavonoid B환의 ABX system이 δ6.90(1H, dd, *J*=8.0, 1.8 Hz), 6.93(1H, d, *J*=1.8 Hz), 6.95(1H, d, *J*=8.0 Hz)에서 나타나는 것으로 보아 3', 4' 위치에 치환기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한, δ6.12(1H, d, *J*=2.1 Hz), 6.14(1H, d, *J*=2.1 Hz)에서 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 전형적인 *m*-coupling이 관찰되었다. Aliphatic field에서는 δ5.50(1H, dd, *J*=12.1, 3.3 Hz)에서 H-2 proton 및 δ2.78(1H, dd, *J*=17.1, 3.3 Hz), 3.25(1H, m)에서 H-3의 methylene proton이 관찰되어 aglycone은 flavanone으로 추정되었다. 또한, δ1.09(3H, d, *J*=6.2 Hz)에서 rhamnose에서 기인하는 methyl 및 δ4.53(1H, s)과 4.97(1H, d, *J*=7.3 Hz)에서 각각 rhamnose 및 glucose의 anomeric proton이 관찰되었다. 또한, ^{13}C-NMR, ESI-MS spectrum 및 산가수분해를 통하여 각각의 당을 확인하였다. 이상의 각종 물리화학적 성상과 spectral data를 문헌과 비교검토하여 hesperidin으로 구조를 동정하였다.[11-12]

전국 각 지역으로부터 구입한 57종의 시료 모두에서 Mg-HCl 반응에 홍색~홍적색을 나타내어 flavonoid 반응에 양성을 나타내었다. 또한 57종의 시료 1.0 g에 메탄올 20 m*l*을 넣고 수욕상에서 5분간 가열하고 식힌 다음 여과한 여액을 silicagel TLC plate에 점적한 후 methylene chloride:methanol=3:1의 전개용매로 전개시킨 후 5% $FeCl_3$ 시액으로 발색시켰을 때 표준품인 hesperidin과 같은 위치에서 오록색의 반점을 나타내었으며 0.45에서 R_f값을 나타내었다. 건조감량 시험에서는 평균 6.62±0.71%(n=57)를 나타내었으며, 시료 모두 12% 이하로 규정에 적합하였다. 회분함량 시험에서는 평균 4.41±1.05%(n=57)를 나타내었으며, 1종의 시료에서 6.6%를 나타내었고 56종의 시료는 모두 규정 6% 이하에 적합하였다. 정유함량 및

Table I. Contents of hesperidin, loss on drying and ash in Aurantii Fructus

Samples	hesperidin (%)	Loss on Drying (%)	Ash (%)	구입처
JK-01	3.223	6.70	3.75	서울
JK-02	2.062	6.37	3.65	서울
JK-03	1.059	7.13	4.45	서울
JK-04	0.749	8.53	4.30	서울
JK-05	0.937	8.30	6.60	서울
JK-06	3.500	6.37	4.15	서울
JK-07	2.059	6.67	4.65	서울
JK-08	4.276	7.67	5.85	서울
JK-09	3.223	7.73	5.45	서울
JK-10	3.549	7.17	4.25	서울
JK-11	1.019	6.60	3.95	서울
JK-12	1.155	6.50	5.70	경기
JK-13	1.225	6.67	5.00	경기
JK-14	1.789	8.23	3.85	경기
JK-15	3.588	7.27	4.40	경기
JK-16	3.056	7.13	5.15	경기
JK-17	0.841	7.33	3.40	경기
JK-18	0.800	7.00	4.80	경기
JK-19	0.675	6.93	3.90	경기
JK-20	1.928	6.20	2.35	경기
JK-21	4.357	6.57	3.10	경기
JK-22	0.647	6.77	3.05	경기
JK-23	0.405	7.73	4.95	경기
JK-24	0.847	5.47	5.50	청주
JK-25	3.052	6.47	4.80	청주
JK-26	4.649	6.03	3.65	대전
JK-27	2.762	6.97	4.65	유성
JK-28	1.192	7.53	2.85	공주
JK-29	1.117	5.90	4.00	충주
JK-30	1.404	6.20	6.00	천안
JK-31	2.208	6.17	5.25	대구
JK-32	0.514	5.47	4.65	대구
JK-33	1.257	6.87	5.50	대구
JK-34	4.767	6.23	5.95	경북
JK-35	4.634	5.67	2.15	경북
JK-36	2.069	6.47	4.10	대구
JK-37	1.308	6.77	4.65	대구
JK-38	0.795	5.80	3.30	광주
JK-39	1.486	6.33	5.10	광주
JK-40	1.182	6.17	4.05	광주
JK-41	2.111	5.83	5.55	광주
JK-42	3.448	6.90	4.95	광주
JK-43	3.331	5.50	5.50	부산
JK-44	1.690	5.57	5.20	부산
JK-45	2.609	6.27	2.15	부산
JK-46	2.995	7.03	5.25	부산
JK-47	3.167	5.50	5.55	부산
JK-48	1.947	5.90	3.30	부산
JK-49	2.097	6.13	4.65	부산
JK-50	2.444	5.90	3.90	부산
JK-51	1.737	6.83	2.50	부산
JK-52	1.527	6.27	5.95	원주
JK-53	2.670	6.50	5.50	춘천
JK-54	2.040	6.33	3.50	영주
JK-55	2.217	7.00	4.40	안동
JK-56	1.631	6.87	3.45	안동
JK-57	2.347	7.03	3.40	안동
Average ±S.D.	2.13±1.16	6.62±0.71	4.41±1.05	

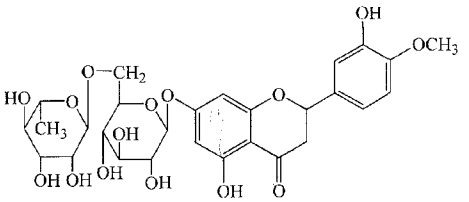

Fig. 1. Chemical structure of hesperidin.

묽은에탄올엑스함량은 각각 0.2 m*l* 이상 및 20% 이상의 기준에 적합하였다.

Hesperidin은 지각의 주성분으로 각종 생리활성이 보고되어 있으며, HPLC를 이용하여 쉽게 정량할 수 있으므로 지표성분으로 설정하여 전국에서 수집된 57종의 지각 시료에 대하여 hesperidin의 함량을 측정하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 MeOH:water=40:60을 사용하였으며, 또한 검출파장으로서는 254 nm를 사용하였다. 이 조건에서 표준품인 hesperidin은 t_R 9.9 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 y=188.67x+66.9(r=0.998)로 나타났으며, 직선성이 인정되었다.

전국각지에서 구입한 57종의 지각(JK01~OS57)에 대해 3회 반복 실험하여 건조중량(g)중의 hesperidin의

함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table I). 지각중의 hesperidin 함량은 평균 2.13±1.16%(n=57)을 나타내었다. 이 결과를 토대로 지각의 표준화를 위해서는 hesperidin의 함량기준을 0.7% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 1998년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 지형준, 이상인(1988) 대한약전외 한약(생약) 규격집 주해서, 553, 한국메디칼인덱스사, 서울.
2. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균(1998) 완역 중약대사전, 5059-5064, 도서출판 정담, 서울.
3. Kim, C. M., Huh, I. O. and Han, D. S. (1979) Studises on the Morphology and the Chemetaxonomy of *Citrus* Plants Native to Je Ju and on its Application (II). *Kor. J. Pharmacog.* **10(2)**: 85-87.
4. Tang, W. and Eisenbrand, G. F. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin, 337-349, Springer-Verlag, Berlin.
5. Del Rio, J. A., Benavente, O., Castillo, J. and Borrego, F. (1992) Neodiosmin, A Flavane Glycoside of *Citrus aurantium*. *Phytochemistry* **31(2)**: 723-724.
6. Satoh, Y., Tashiro, S., Satoh, M., Fujimoto, Y., Xu, J. Y. and Ikekawa, T. (1996) Studies on the Bioactive Constituents of Aurantii Fructus Immaturus. *Yakugaku Zasshi* **116(3)**: 244-250.
7. Tosa, S., Ishihara, S., Toyota, M., Yosida, S., Nakazawa, H. and Tomimatsu, T. (1988) Studies on Flavonoid in Citrus. Analysis of Flavanone Glycoside in the Peel of Citrus by High Performance Liquid Chromatography. *Shoyakugaku Zasshi* **42(1)**: 41-47.
8. Bennett, R. D., Miyake, M., Ozaki, Y. and Hasegawa, S. (1991) Limonoid Glucosides in *Citrus aurantium*. *Phytochemistry* **30(11)**: 3803-3805.
9. Bennett, R. D. and Hasegawa, S. (1980) Isolimonic acid, A New Citrus Limonoid. *Phytochemistry* **19**: 2417-2419.
10. MacLeod, A. J., MacLeod, G. and Subramanian, G. (1988) Volatile Aroma Constituents of Orange. *Phytochemistry* **27(7)**: 2185-2188.
11. Kang, S. S., Kim, J. S., Kim, H. J., Jung, Y. R. and Shin, S. W. (1994) Phytochemical Analysis of Viticis Fructus. *Kor. J. Pharmacogn.* **25(3)**: 214-220.
12. Markham, T. R. and Chari, V. M. (1982) Carbon-13 NMR Spcetroscopy of Flavonoids, *In* Harborne, J. B. and Mabry, T. J. (ed.), The Flavonoids, Advances in Research, 19134, Chapman and Hall, London.

(2001년 3월 20일 접수)