

감귤류와 한국산 청피에 함유된 Glycosided Flavonoids의 분석과 정량적 분포

백순옥*, 복진영*, 천현자**, 정승일**, 백승화**, 오해범[†], 김일광**

원광대학교 자연과학대학 화학과

*한국인삼연초연구원

**원광대학교 한의학 전문대학원

[†]우석대학교 자연과학대학 화학과

(2001. 6. 26 접수)

Analysis and Quantitative Distribution of Glycosided Flavonoids in Citruses and Korean Chung-pi

S. O. Baik*, J. Y. Bock*, H. J. Chun**, S. I. Jeong**, S. H. Baek*, H. B. Oh[†], I. K. Kim**

Chemistry Dept., Wonkwang Univ., Iksan City, 570-749, Korea

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon City

**Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang Univ., Iksan City, 570-749

[†]Chemistry Dept., WooSeok Univ., Jeonju City

(Received June 26, 2001)

요 약 : 감귤류와 한국산 청피에 함유된 glycosided flavonoids (naringenin, naringin, narirutin, hesperidin, hesperetin)를 HPLC, UV, 그리고 NMR로 분리하고 분석하였다. Glycosided flavonoids의 함량을 감귤종류와 성숙도에 따라 비교하였다. 청피의 주성분은 hesperidin이었고, narirutin, hesperetin도 상당량 들어있었다. 지실의 주성분은 naringin, narirutin, naringenin이었고, 지각의 주성분은 narirutin, hesperidin이었다. 밀감과 오렌지의 주성분은 narirutin, hesperidin이었으며, glycosided flavonoids의 함량은 감귤의 성숙도에 따라 감소하였다.

Abstract : Glycosided flavonoids (naringenin, naringin, narirutin, hesperidin, and hesperetin) in Citrus and Korean Chung-pi were isolated and analyzed with HPLC, GC-mass, UV and high resolution NMR. Contents of glycosided flavonoids were compared according to kinds of Citrus and fruit ripening periods. Major compound of Korean Chung-pi was hesperidin and minors were narirutin and hesperetin. Major compounds of Gisil were naringin, narirutin, naringenin and were narirutin, hesperidin in Gigak. Major compounds of milgam and orange were narirutin, hesperidin and the contents of glycoside flavonoids decreased according to the age of maturity.

Key words : glycosided flavonoids, Citruses, Chung-pi, analysis

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)63-850-6227, Fax : +82+(0)63-841-4893

E-mail : ilkim@wonkwang.ac.kr

1. 서 론

식용으로 사용되는 Citrus 속 식물에는 밀감, 오렌지, 레몬, 자몽, 유자 등이 있다. Citrus 속 식물의 껍피는 오래전부터 한방에서 생약으로 사용되어 왔으며^{1,2}, 주된 향기성분인 limonene, citronelle, flavonoid 등은 생리활성이 있는 물질로 알려져, 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다^{3,6}.

Citrus 속의 flavonoids는 flavonone 류와 glycoside 류, 그리고 polymethoxy 류의 세가지로 크게 나눌 수 있다⁷⁻¹¹. 미성숙한 Citrus 속 과일의 껍질을 채취하여 햇볕에 말린 것을 청피라 하며, 생약재로 사용한다. 청피의 맛은 시고, 쓰고, 무독하며, 주로 간과 담경에 작용한다¹².

Chun¹³ 등은 미성숙한 Citrus 성분에서 항알러지 효과를 보고하였으며, Eun¹⁴ 등은 복강 대식세포의 탐식 작용 활성효과를 보고하였다. Dakeshi 등¹⁵은 청피, 진피, 지실 등의 물 추출물로부터 항 serotonin 작용과 교감신경 작용물질인 synephrine의 존재를 확인하였다. Han 등¹⁶은 청피에서의 기관지 평활근의 이완효과를 보고하였고, Bocco 등¹⁷은 감귤의 페놀성 조성물이 항산화효과가 있음을 보고하였으며, Kim¹⁸ 등은 진피와 청피에 함유된 glycosides를 분리 정량한 바 있다.

본 연구에서는 Citrus 속을 한방약재로 개발하기 위하여 Citrus와 국내산 청피에 함유된 glycosided flavonoids의 분리 및 성분분석을 수행하였으며, Citrus의 종류와 성숙도에 따른 성분분포를 조사하였다.

2. 실험

2.1. 재료

청피는 원광대학교 부속한방병원에서 정선하여 구입한 것을 사용하였고, 시기별 밀감은 제주도 재배농가에서 8월 중순부터 10일 간격으로 채취하여 사용하였으며, 시기별 청피는 시기별 밀감의 껍질을 벗긴 후 냉동건조시켜 사용하였다. Citrus 속 과일 중에 영귤, 밀감, 유자, 지각, 지실 등은 한국산을 사용하였으나 한국산과 비교하기 위해 선택한 오렌지, 레몬 그리고 자몽은 시판중인 미국산을 구입하여 사용하였다.

2.2. 사용기기

고성능 액체 크로마토그래프(HPLC)는 Dionex LC20,

핵자기공명 분광기(NMR)는 Bruker AM300, 기체 크로마토그래프와 질량분석 분광기(GC-mass)는 Varian Mat 212를 사용하였다. 시료의 파냉각을 위하여 Hetofrig CL410, FTS system을 사용하였다

2.3. 시약

추출 및 분리에 사용된 methanol(MeOH), ethylacetate (EtOAc), 그리고 완충용액 등은 시약 1급, 혹은 특급을 구입하여 그대로 사용하였다. Naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin 표준품은 Sigma 제품, narirutin 등은 Estrasynthese 제품, 실리카겔 (70~230 mesh)은 Merck 제품, Sephadex LH-20은 Pharmacia Biotech 제품을 각각 사용하였다.

2.4. 청피로부터 유효성분의 분리

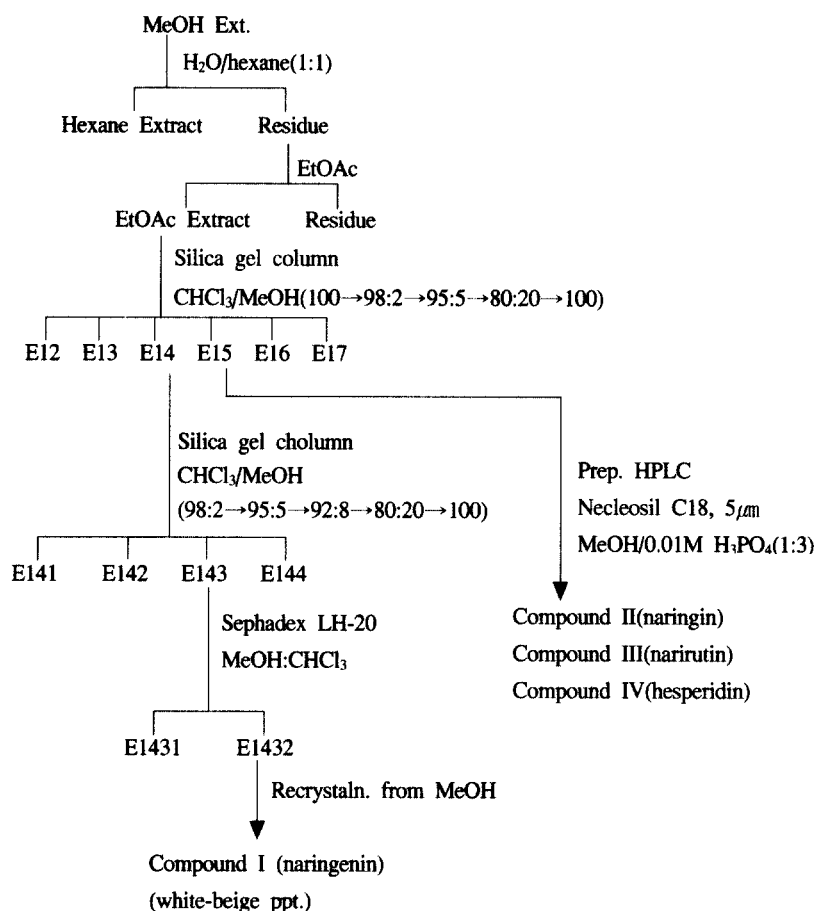
청피 5 kg을 믹서로 분쇄한 후 MeOH 10 L로 24시간씩 3회 추출한 것과 잔사를 reflux하여 2회 추출한 것을 합해서 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 이것을 물에 현탁시킨 후 hexane으로 추출하여 hexane 층을 제거한 후 Scheme 1의 분리과정에 따라 EtOAc로 다시 추출하여 EtOAc층을 얻었다. EtOAc층을 실리카겔 칼럼에 흡착시킨 후 순차적으로 용리액을 통과시켜 각 성분을 분리하였다.

이 때 용해조건은 ① CHCl₃(E-11) ② 2 % MeOH in CHCl₃(E-12) ③ 5 % MeOH in CHCl₃(E-13, E-14) ④ 8 % MeOH in CHCl₃(E-15) ⑤ 20% MeOH in CHCl₃(E-16) ⑥ MeOH(E-17)의 순서로 용리하여 E11부터 E17까지 7개의 분획을 얻었다. 용출액의 유속은 2mL/min 이었으며 각 용리액의 부피는 2 L였다.

Fig. 1에서 분리한 E14 분액을 실리카겔 카럼을 통과시켜 E143 분액을 얻고, Sephadax LH-20으로 정제 한 다음 E1432분액을 메탄올로 재결정하여 compound I(white-beige색 침전물)을 얻었다.

E15의 분리는 Prep. HPLC로 하였다. Nucleosil C₁₈, 5 μ m, 250 \times 10mm 칼럼을 사용하였으며, 용리액은 MeOH와 0.01M 인산(1:3) 혼합액을 사용하였다. Detector는 UV 280nm, 용출속도는 5mL/min 이었다.

여기서 유효성분 compound II(naringin), compound III(narirutin) 및 compound IV(hesperidin)을 Scheme 1과 같이 분리하였다.



Scheme 1. Separation and isolation process of glycosided flavonoids from Citrus sample.

2.5. 유효성분의 당 분석

각 분리된 glycosided flavonoids를 가수분해하여 구성당의 조성을 조사하였다. 즉, 각각의 시료 50mg을 취하여 2mL의 0.5M 염산을 가하여 100℃에서 1시간 동안 가열하였다. 이 용액을 농축한 후 물을 가하고 EtOAc로 추출한 다음 물 층을 당 분석시료로 사용하였다.

당의 분석은 Satoh¹⁹의 방법을 참고하여 수행하였으며, 분석조건은 다음과 같다.

HPLC : Waters

Column : Nucleosil-NH₂ 7 µL (250×10nm id)

Eluent : Acetonitrile : H₂O (85:15)

Detector : RI

Flow rate : 1.0mL

2.6. Citrus 속 과피의 glycosided flavonoids 분석

동결건조한 과피를 믹서로 분쇄하여 2g을 취한 다음 MeOH로 24시간 reflux하면서 3회 추출하였다. 추출액을 합하여 50mL로 맞추고 다음 0.25µm 막을 통과시켜 HPLC의 분석시료로 하였다. 이 때의 분석조건은 다음과 같다.

HPLC : Dionex LC20

Column : C₁₈ (150 × 60nm)

Eluent : 0.05M sodium dihydrogen phosphate (pH 2.4) : MeOH(65:35)

Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV(λ max) 284nm

Column temp. : 40℃

3. 결과 및 고찰

3.1. 화합물 I 구조 확인

Compound I 은 노란색 침전으로 얻어졌고, 녹는점이 250-251°C이었다. 이 화합물은 FeCl₃에 양성으로 반응하였으므로 phenolic OH기가 존재하는 화합물인 것을 알 수 있었고, UV λ_{max}(MeOH)는 286nm와 326nm로 나타나 전형적인 flavonoids 구조와 유사한 것으로 추정되었다.

이 물질의 저분리능 전자충격 이온화 질량 스펙트럼으로부터 분자이온이 272 amu와 120, 153, 179amu의 토막 이온들을 볼 수 있었고, 고분리능 질량 스펙트럼으로부터 분자 이온의 측정값은 272.0688amu로 이론 값인 272.0685amu와 0.3amu의 차이로 일치하였다. 그러므로 이 화합물의 분자식은 C₁₅H₁₂O₅이고, 불포화도가 10임을 알 수 있었다.

DMSO-d₆를 용매로 사용하여 측정한 ¹H 및 ¹³C의 NMR 스펙트럼과 HMBC 결과를 Table 1에 정리하였다. Table 1의 ¹H 스펙트럼에서 3개의 doublet의 olefin 수소 (δ=5.4 ppm, dd, J=2.4, 12.7Hz, δ=3.2ppm, dd, J=12.9, 17Hz, 2.7ppm, dd, J=2.7, 17Hz), 4개의 doublet olefin 수소 (δ=7.2ppm) 및 1개의 singlet 수소 (δ=12.1ppm)등을 볼 수 있었다.

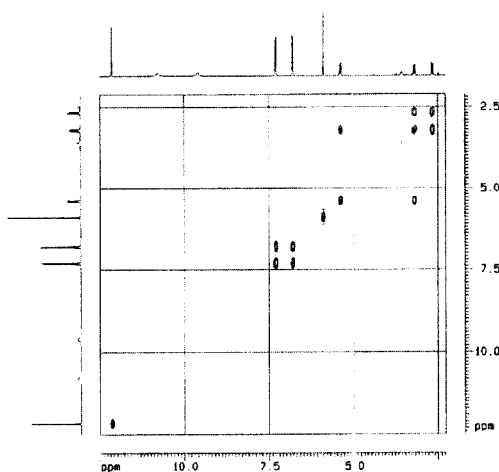


Fig. 1. H-H COSY spectrum of compound I.

¹³C 스펙트럼에 나타난 13개의 탄소 중에 4급 탄소가 7개, CH가 5개, CH₂는 1개, CH₃는 없었으며, 이 중 195.364ppm은 카르보닐, 128.402 및 115.338ppm의 상대

감도가 큰 것으로 보아 이들 봉우리는 각각 2개의 CH가 존재하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 ¹³C 스펙트럼에서 탄소의 수는 모두 15개임을 알 수 있다. 또한 157, 163 및 166ppm은 산소가 치환된 이중결합이 존재하는 것을 알 수 있다. 이들의 결과로부터 carbonyl이 한 개 및 4개의 산소가 존재하는 것을 알 수 있었다.

Table 1. ¹H and ¹³C NMR data of compound I (naringenin)

No.	δ c'	δ _H (H, multi., J)	HMBC
2	78.57	5.5(H, dd, 2.4, 12.7Hz)	C2'
3	42.126	3.2(H, dd, 12.9, 17Hz)	C3
4	196.364		
5	163.655		
6	95.99	5.9 (2H)	C5, C6, C7
7	166.777		
8	95.14		
9	163.047		
10	106.975		
1'	128.993		
2'	128.402	6.8(2H, d, 8.3Hz)	C4', C1', C5
3'	115.338	7.3(2H, d, 8.3Hz)	C4', C2', C2
4'	157.863		
5'	115.338	6.8(2H, d, 8.3Hz)	
6'	128.402	7.3(2H, d, 8.3Hz)	

화합물 I의 평면 구조는 2차원 NMR 스펙트럼의 해석으로부터 추정하였다²⁰. Fig. 1의 H-H COSY (carbon-hydrogen correlation spectroscopy) 스펙트럼에서 보듯이 7.3ppm의 2개의 수소와 6.8ppm의 2개의 수소는 서로 coupling하고 있는 것으로 보아 근접하고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 7.3ppm의 2개의 수소는 128.402ppm의 탄소와 6.8ppm의 2개의 수소는 115.338ppm의 탄소와 결합하고 있으며, 이들의 적분값 및 CH의 상대감도로부터 이들은 대칭구조를 하고 있음을 알 수 있다. 한편 Fig. 1의 12.1 및 5.9ppm에서 나타난 3개의 olefin 수소들은 서로 coupling을 하지 않으므로 전혀 인접해 있지 않으며, 12.1ppm의 수소는 강력한 수소결합에 의해 낮은 자장쪽으로 shift하기 때문에 구조 중에 카르보닐의 산소와 OH기가 존재한다는 것을 알 수 있었다. 다음으로 5.9ppm의 2개의 수소는 Fig. 2에 나타난 HMQC의 결과로부터 95.138과 95.999의 두 carbon과 결합하고 있는 것을 알 수 있었다. 만일 5.9ppm의 2개의 수소가 인접하여 있다면

H-H COSY 스펙트럼에서 coupling을 하여야하는데 전혀 coupling이 일어나지 않았으며, HMBC의 결과로부터 5.9ppm의 수소는 carbonyl 기와 전혀 long range 관계를 갖지 않는 것을 볼 수 있었다. Fig. 1에 나타난 H-H COSY 스펙트럼으로부터 5.4ppm의 수소와 3.2, 2.7ppm의 수소가 서로 coupling 하는 것을 볼 수 있다. 이런 사실로부터 5.4ppm의 수소와 3.2 및 2.7ppm의 수소는 서로 인접한 것을 알 수 있었다.

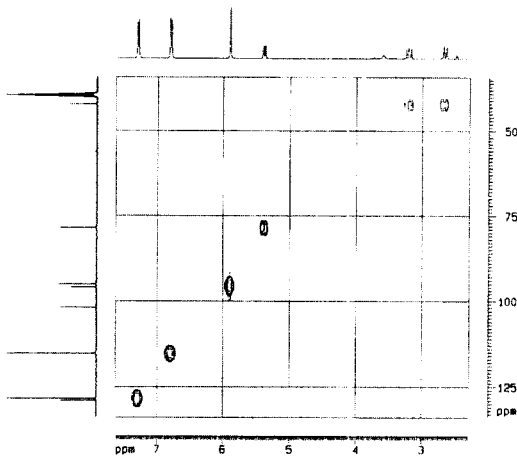


Fig. 2. HMBC spectrum (C-H Correlation) of compound I.

또한 Fig. 2의 HMBC의 결과로부터 78.572ppm의 carbon은 5.4ppm의 수소, 42.126ppm의 carbon은 3.2 및 2.7ppm의 수소와 결합하고 있다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 2개의 치환 phenyl 기 및 6개의 이중결합이 존재하므로 9개의 불포화도를 갖는 것을 알 수 있었다. 그러므로 10개의 불포화도를 만족하기 위해서는 1개의 ring 구조가 더 있어야만 한다. HMBC결과를 보면 5.4ppm의 수소가 CO와 3.2 및 2.7ppm의 수소가 CO와 각각 long range 관계를 갖는다. 끝으로 3.2 및 5.4ppm의 수소가 128.993ppm인 1번 탄소, 7.3ppm의 수소가 78.572ppm인 2번 탄소와 HMBC관계를 갖는 것으로부터 두 골격이 탄소 C2와 C1'로 연결되는 것을 알 수 있었다. 또한 5.4ppm 수소는 7.3ppm의 수소와 또 3.2 및 2.7ppm의 수소가 각각 7.3ppm의 수소와 NOE의 관계를 갖는 것으로 보아 구조를 다시 확인할 수 있었다.

이상의 결과들로부터 compound I은 Scheme 2의 A 구조를 가진 naringenin으로 확인할 수 있었다.

3.2. 화합물 II의 구조 확인

Compound II는 prep.-LC 의 두 번째 분액으로써 m.p가 171°, UV에서 λ_{max} 가 285, 340nm 이었고 FeCl₃에 양성반응을 보여 flavonoid 류로 추정되었다.

¹H NMR 스펙트럼 결과 12.02ppm(1H, s)에서 flavone 골격의 5번 위치에 OH가 결합한 것을 알 수 있었고, 3.1-5.3ppm사이에 많은 피크가 있었다. Table 2에 ¹³C-NMR data를 정리하였다. ¹³C에도 당 분자에서 특징적으로 나타나는 anomeric 탄소를 생각되는 97.46과 100.555ppm의 두 피크가 있으며, 60-80ppm 사이에 9개의 피크가 있는 것으로부터 2개의 당을 가진 배당체 구조인 것을 알 수 있었다.

구성당의 종류를 알아보기 위하여 이 화합물을 염산으로 가수분해시켜 표준품과 비교 조사해 본 결과 D-glucose 와 L-rhamnose 가 결합되어 있음을 알 수 있었다.

가수분해에서 얻은 비당부의 ¹H, ¹³C-NMR 스펙트럼을 naringenin 표준품의 스펙트럼과 비교하여 동일함을 확인할 수 있었다. 즉, ¹³C-NMR의 data를 naringenin 과 비교하여 보면 flavonoid 골격의 A ring 탄소값인 78.79, 42.14, 197.333, 164.879, 96.44ppm 등 2C-6C까지의 값을 이 화합물에서도 발견할 수 있었으며, C ring의 탄소값인 128.707, 128.602, 115.397, 157.950, 115.397, 128.602의 값도 이 화합물에서 같이 나타났다. 이상의 결과에서 이 화합물은 aglycon이 naringenin 이고 D-glucose와 L-rhamnose가 결합되어 있는 flavonoid 배당체 화합물로 추정할 수 있었다. 그러므로 ¹³C-NMR의 피크 중 18.18ppm은 L-rhamnose 6' 탄소에 기인하는 것임을 알 수 있었다.

당이 결합된 위치는 naringenin표준품의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 비교해본 결과 7C의 값이 naringenin은 166.777ppm 이었으나 여기에서는 그 부분의 피크는 보이지않고 대신 glycosidation shift의 피크가 171.488ppm에 있었다. 다른 탄소는 이런 현상을 보이지 않으므로 당은 한곳에 모두 결합되어 있음을 추정할 수 있었고 결합된 부분이 7C의 위치라는 것을 알 수 있었다. 한편 각 당의 절대 배치는 L-rhamnose의 경우 ¹H-NMR 스펙트럼에서 anomeric proton의 chemical shift가 5.4ppm 으로 α -결합을 하고 있는 것으로 추정되었고, D-glucose의 anomeric proton signal의 coupling constant 값이 7.9Hz로 보아 β -결합을 하고 있는 것을 알 수 있었다. 이미 보고된 naringin²¹의 NMR스펙트

럼과 면밀히 비교 검토한 결과 이 화합물의 결과와 일치하였으며, 또한 표준품과 비교확인하여 compound II는 Scheme 2의 B구조를 가진 naringenin으로 추정할 수 있었다.

Table 2. ¹³C data of compound II (naringin)

No.	δ c	No.	δ c
2	78.79	Glu-1	97.46
3	42.14	2	76.30
4	197.333	3	77.27
5	164.879	4	69.75
6	96.44	5	76.99
7	171.488	6	60.61
8	95.28	Rhm-1	100.555
9	163.090	2	70.53
10	103.480	3	70.63
1'	128.707	4	71.99
2'	128.602	5	68.45
3'	115.397	6	18.18
4'	157.950		
5'	115.397		
6'	128.602		

3.3. 화합물 III의 구조 확인

Compound III은 prep.-LC 의 첫번째 분획으로써 UV가 284, 332nm에서 극대흡수를 보였고 FeCl₃에 양성반응을 보여 flavonoid 류로 추정되었다.

이 화합물의 ¹H-NMR 스펙트럼은 naringenin과 매우 유사하여 4ppm 전후에서 많은 피크가 있었다. Table 3에 ¹³C-NMR data를 정리하였다. ¹³C에도 당의 존재에 따라 특징적으로 나타나는 anomeric 탄소로 생각되는 98.43과 100.641 ppm의 두 피크가 나타나 있고, 59-80ppm 사이에 9개의 피크가 있는 것으로부터 2개의 당을 가진 배당체인 것으로 추정하였다.

구성당의 종류를 알아보기 위하여 이 화합물을 염산으로 가수분해시켜 표준품과 비교 조사해 본 결과 D-glucose 와 L-rhamnose 가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 그러므로 ¹³C-NMR의 peak 중 17.89 ppm은 L-rhamnose 6' 탄소에 기인하는 것임을 알 수 있었다.

가수분해에서 얻은 비당부의 ¹H, ¹³C-NMR 스펙트럼을 compound III의 스펙트럼과 소상히 비교한 결과 잘 일치하여 비당부는 naringenin으로 확인하였다. 이

상의 결과로 이 화합물은 naringenin에 D-glucose와 L-rhamnose 가 결합되어 있는 flavonoid배당체 화합물로 추정할 수 있었다.

당이 결합된 위치는 naringenin²²의 ¹³C- NMR 스펙트럼을 비교해본 결과 7C의 값이 naringenin은 166.777ppm 이었으나, 이 화합물의 스펙트럼에서는 165.174ppm에서 glycosidation shift를 보였고 다른 탄소는 이런 현상이 안보여 당은 한곳에 모두 결합되어 있음을 추정할 수 있었으며, 결합된 부분이 7C의 위치라는 것을 알 수 있었다. 한편 각 당의 절대 배치는 L-rhamnose의 경우 ¹H-NMR 스펙트럼에서 anomeric proton의 chemical shift가 5.3ppm 으로 α-결합을 하고 있는 것으로 추정되었고, D-glucose의 anomeric proton signal의 coupling constant 값이 7.8Hz로 보아 β-결합을 하고 있는 것을 알 수 있었다. Narirutin 표준품의 NMR 스펙트럼등 분광학적 자료와 이 화합물에서 얻은 자료를 비교 검토한 결과 동일한 물질로 확인하여 Compound III은 Scheme 2의 C구조를 가진 narirutin 으로 동정하였다.

Table 3. ¹³C NMR data of compound III (narirutin)

No.	δ c	No.	δ c
2	78.63	Glu-1	98.43
3	42.12	2	73.02
4	196.304	3	76.31
5	165.116	4	69.65
6	96.45	5	75.58
7	165.174	6	59.85
8	95.56	Rhm-1	100.641
9	163.047	2	70.33
10	103.333	3	70.74
1'	128.626	4	72.13
2'	128.466	5	68.38
3'	115.252	6	17.89
4'	157.842		
5'	115.252		
6'	128.466		

3.4. 화합물 IV의 구조 확인

Compound IV는 prep.-LC의 세번째 분획으로써 m.p가 259-260 °C, 228, 284, 332nm에서 극대흡수를 보였

으며, FeCl₃에 양성반응을 보여 flavonoid 류로 추정되었다.

Table 4에 이 화합물의 ¹³C-NMR data를 정리하였다. ¹H, ¹³C-NMR스펙트럼 양상은 naringin과 매우 유사하였으나 ¹H-NMR 스펙트럼에서 3.66(3H, s) 및 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 55.90ppm의 피크가 특징적으로 다른 점이었다. 이들은 phenyl ring에 결합한 -OCH₃의 특징적인 피크이므로 naringenin이나 narirutin과 매우 유사한 구조로서 단지 구조에 -OCH₃ 기가 하나 추가된 것으로 추정할 수 있었다. 또 3'탄소에 결합된 수소와 methoxy 기가 NOESY 관계를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 6.8-6.9ppm 사이에 3개의 proton 피크를 보였고, 4'탄소의 δ가 148.191인 것으로부터 hydroxyl 기가 있을 것이라는 가정이 가능했으며, 이 화합물은 scheme 2의 E와 같은 hesperetin의 구조를 기본으로 하고 있는 것을 알 수 있었다.

Table 4. ¹³C NMR data of compound IV(hesperidin)

No.	δ c	No.	δ c
2	78.62	Glu-1	99.70
3	42.22	2	73.22
4	197.220	3	76.51
5	163.295	4	69.87
6	96.85	5	75.77
7	165.356	6	66.27
8	95.85	Rhm-1	100.804
9	162.759	2	70.53
10	103.593	3	70.99
1'	131.071	4	72.36
2'	118.255	5	68.57
3'	112.190	6	18.07
4'	148.191	4'-OCH ₃	55.90
5'	146.634		
6'	114.368		

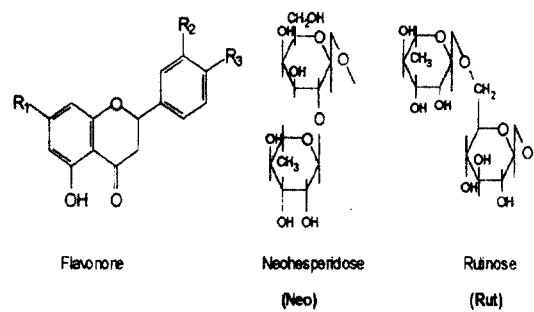
또한 4ppm 전후에 많은 피크가 있고, ¹³C에도 당에서 기인하여 특징적으로 나타나는 anomeric 탄소로 생각되는 99.70과 100.804 ppm의 두 피크가 나타나 있으며, 59-80ppm 사이에 9 개의 피크가 있는 것으로 보아 2개의 당을 가진 배당체인 것으로 추정하였다. 구성당 종류 및 비당부의 구조를 알아보기 위하여 이 화합물을 염산으로 가수분해시켜 얻어진 당류를 표준품과 비교 조사해 본 결과 D-glucose 와 L-rhamnose가

결합되어 있음을 알 수 있었다. 그러므로 ¹³C-NMR의 피크 중 18.07ppm은 L-rhamnose 6' 탄소에 기인하는 것임을 알 수 있었다.

이상의 결과로 이 화합물은 hesperetin에 D-glucose와 L-rhamnose 가 결합되어 있는 flavonoid배당체 화합물로 추정할 수 있었다. 한편 각 당의 절대배치는 L-rhamnose의 경우 ¹H-NMR 스펙트럼에서 anomeric proton의 chemical shift가 5.3ppm으로 α-결합을 하고 있는 것으로 추정되었고, D-glucose의 anomeric proton 피크의 coupling constant 값이 7.8Hz로 보아 β-결합을 하고 있는 것을 알 수 있었다. Hesperidin 표준품의 NMR 스펙트럼 등 분광학적 자료와 이 화합물에서 얻은 자료를 비교 검토한 결과 compound IV는 Scheme 2의 D구조를 가진 hesperidin과 동일한 물질임을 확인하였다.

3.5. Citrus와 청피에 함유된 glycosided flavonoids의 분포

Citrus와 청피에 들어있는 glycosided flavonoids에 대한 함량은 Table 5에 정리하였으며, 그 구조는 다음 Scheme 2에 나타내었다.



Compound	R1	R2	R3
A. Naringenin	OH	-	OH
B. Naringin	.O.Neo	-	OH
C. Narirutin	.O.Rut	-	OH
D. Hesperidin	.O.Rut	OH	OCH ₃
E. Hesperetin	OH	OH	OCH ₃

Scheme 2. The structures of glycosided flavonoids.

Narirutin은 naringenin골격에 rutinose의 당이 붙어있는 배당체의 구조를 갖는 화합물이다. Narirutin은 제

주도에서 재배한 밀감과 지각에 가장 많이 들어있었고, 오렌지와 지실에도 상당량 들어있었다. 청피의 경우 함량이 높지 않은 이유는 열매가 완전히 성숙되기 전에 채취하기 때문이다.

Table 5. Amounts of glycosided flavonoids of immature and mature peels Citrus species

Compound (RT) species	(mg /g)				
	Narirutin (8.00min)	Naringin (9.55min)	Hesperidin (11.50min)	Naringenin (33.65min)	Hesperetin (49.15min)
Chung-pi 1	0.92	0.23	4.99	0.12	0.22
Chung-pi 2	4.91	0.076	8.11	0.40	0.23
Orange	29.7	4.80	38.6	0.69	0.11
Lemon	2.90	trace	12.9	-	-
Citron	0.49	0.21	14.8	-	-
Milgam	65.6	trace	38.3	-	trace.
Zamong	6.0	38.5	-	trace	-
Gigak	85.4	1.94	49.0	-	trace
Gisil	21.9	105.7	-	14.6	-

Naringenin 골격에 neohesperidose을 가진 naringin과 rutinose기와 methoxy기를 가진 hesperidin은 naringenin과 hesperetin을 출발물질로 하여 enzyme에 의해 생성된다.¹⁹ 그렇기 때문에 청피에서 보다는 완숙한 과일의 과피인 지실과 지각에서 함량이 훨씬 많은 것으로 나타났다.

Glycosided flavonoids의 출발물질인 naringenin과 hesperetin의 함량은 완숙된 과일의 과피에서는 거의 볼 수 없었으며, 오렌지와 지실에 가장 많이 들어있었고, 청피에서 약간 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 Takahashi⁴⁶의 결과와 거의 일치하였다.

3.6. 재배기간별 glycosided flavonoids 함량

Citrus의 완숙기간에 따라 glycosided flavonoids의 함량 변화를 조사하여 Table 6에 나타내었다. 전반적으로 완숙기에 도달할수록 함량이 줄어들었으며, 출발물질인 naringenin 및 hesperetin은 거의 검출되지 않았다. 일본산 Citrus에 대한 Tsuchida⁴⁶의 결과와 비슷하게 naringin은 미량이었으며, hesperidin이 주성분이었고, narirutin이 두 번째로 많은 양을 함유하였다.

Table 6. Amounts of glycosided flavonoids of immature peel of Citrus unshiu in cultivated periods (mg /g)

Compound date of collection	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperetin
Aug. 24	2.97	-	6.80	0.012	-
Sep. 10	3.01	-	7.00	-	trace
Sep. 20	2.57	-	6.09	-	trace
Sep. 30	2.42	-	4.98	-	trace
Oct. 10	2.15	trace	4.38	-	trace
Oct. 20	1.83	trace	3.59	-	-
Oct. 30	1.75	trace	4.25	-	-

4. 결 론

1. Glycosided flavonoids인 narirutin(naringenin -7-rutinoside), naringin(naringenin-7-neohesperidose), hesperidin(hesperetin-7-rutinoside), naringenin, 그리고 hesperetin을 분리하고 확인하였다.
2. Glycosided flavonoids의 경우는 청피에서는 hesperidin이 주성분이고 narirutin과 naringin 및 naringenin과 hesperetin은 미량 함유하고 있었다. 지실의 주성분은 naringin이고 narirutin, naringenin의 순서이었다. 지각의 주성분은 narirutin이었고, hesperidin도 상당량 함유하고 있었다.
3. 영귤, 오렌지, 밀감에는 narirutin의 함량이 가장 많았고 hesperidin, naringin의 순서였다. 레몬과 유자의 경우 hesperidin이 주성분이고 narirutin과 naringin은 미량이었다.
4. Glycosided flavonoids의 함량은 Citrus의 완숙기간에 따라 점점 감소하였다.

References

1. M. Calomme, L. Pieters, A. Vlietinck, and D.V. Berghe, *Planta Med.*, **62**, 222-226 (1996).
2. T. Yamanishi, A. Kobayashi, Y. Mikumo, Y. Nakasone, M. Kita and S. Hattori, *Agric. Biol. Chem.*, **32**(5), 593-598 (1968).
3. S.A. El-Nawawi, *Carbohydrate Polymers*, **27**, 1-4 (1995).
4. T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, N. Hitomi, N. Kosaka, M. Okada, K. Komatsu and T.

- Namba, *Natural Medicines*, **51**(2), 84-91 (1997).
5. T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, *Natural Medicines*, **51**(3), 205-223 (1997).
 6. T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, *Natural Medicines*, **50**(2), 114-127 (1996).
 7. W.C. Ooghe and C.M. Detavernier, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1633-1637 (1997).
 8. W.C. Ooghe, S.I. Ooghe, C.M. Detavernier and A. Huyghevaert, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2183-2190 (1994).
 9. R.L. Rouseff, S.F. Martin and C.O. Youtsey, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1027-1030 (1987).
 10. M. Bar-peled, R. Fluhe and J. Guessel, *Plant Physiol.*, **103**, 1377-1384 (1993)
 11. P. Mouly, E.M. Gaydou and A. Auffray, *J. Chromatography A*, **800**, 171-179 (1998)
 12. M.G. Shin, "원색임상본초학", 서울, 영림사, 644-646 (1994).
 13. Y.T. Chun and U. Sankawa, *Shoyakugaku Zasshi.*, **43**(3), 314-323 (1989).
 14. J. Eun, D. Kim, J. So and D. Zee, *J. Pharm. Soc. Korea*, **42**(6), 567-570 (1998).
 15. K. Dakeshi, *J. Biopharm.*, **33**(2), 146-149 (1979).
 16. J. Han et al, *J. Kor. Oriental Med.*, **17**(2), 296-302 (1996).
 17. A. Vocco, M. Cuvelier, H. Richaed and C. Berset, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2123-2129 (1998).
 18. T. J. Kim, J. S. Rhee and K. M. Lee, *Anal. Sci. & Tech.*, **4**, 191-195 (1991)
 19. Y. Satoh, S. Tashiro, M. Satoh, Y. Fugimoto, Jing-Ya Xu and T. Ikekawa, *Yakugaku Zasshi*, **116**(3), 244-250 (1996).
 20. T. J. Kim, M. H. Jung and K. B. Lee, *Anal. Sci. & Tech.*, **5**, 96A-113A (1992)
 21. K. R. Markham and B. Ternai, *Tetrahedrn*, **32**, 2607-2612 (1976).
 22. H. Wagner and V. M. Chari, *Tetrahedron Letters*, **21**, 1799-1802 (1976).