

탱자(*Poncirus trifoliata*)의 향기성분 분석에 관한 연구

오창환·김정한·김경례*·안혜준**

연세대학교 식품공학과, *성균관대학교 제약학과

**롯데중앙연구소

Flavor Components of *Poncirus trifoliata*

Chang-Hwan Oh, Jung-Han Kim, Kyoung-Rae Kim* and Hey-Joon Ahn**

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

*Department of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon

**Lotte R & D Center, Seoul

Abstract

The essential oil was prepared by a gas co-distillation method from flavedo of *Poncirus trifoliata* and was analyzed by GC/retention index (RI) and GC/MS. The essential oil prepared by a gas co-distillation gave a whole fragrance of *Poncirus trifoliata*. The identification of the flavor components was performed by multi-dimensional analysis using GC/RI and GC/MS. GC/RI and GC/MS were complementary to each other. In applying GC/RI for identification, it was more effective when two columns of different polarities were used. Thirty volatile flavor constituents were identified in *Poncirus trifoliata*. Limonene, myrcene, β -caryophyllene, trans- β -ocimene, β -pinene, 3-thujene and 7-geranyloxycoumarin were the major constituents and cis-3-hexenyl acetate, n-hexyl acetate, 2-methyl acetophenone, elixene and elemicine had not been reported earlier as citrus components.

Key words: *Poncirus trifoliata*, gas co-distillation, GC/retention index, multi-dimensional analysis

서 론

감귤류의 향기성분에 관한 연구는 1958년 Bernhard⁽¹⁾가 lemon oil로부터 gas partition chromatography를 이용해 5개의 향기물질들을 밝혀낸 것을 시작으로 1979년 Philip E. Shaw⁽²⁾가 감귤류를 총 망라한 "감귤류 정유성분에 관한 정량적 고찰"이라는 연구에 이르기까지 수많은 연구가 이루어져 왔으나 감귤류의 한 종류인 탱자(Trifoliolate Orange)에 관한 연구는 1966년 Scora⁽³⁾ 등이 식물학적 분류를 위해 탱자의 정유성분을 분석했을 뿐 별다른 연구가 이루어져 있지 않다. 탱자의 학명은 *Poncirus trifoliata*로서 국내에서는 경기 이남지역에 널리 분포하고 있으며 감귤류 중 수성과 내성이 가장 강한 것으로 보고되어 있다⁽⁴⁾.

탱자는 주로 한약재로 쓰이며 특히 향기가 좋아 옛부터 유자와 함께 거실의 공기를 향기롭게 하는데 써왔다고 한다. 천연물의 향기성분을 분석하기 위해서는 먼저 시료의 전처리 과정이 필요하다. 천연물에서의 향기성분 추출은 그 방법에 따라 성분의 차이를 보일 수도 있으며 분석기기에 적합해야 한다는 문제 때문에 상당히 중요한 과정이다. 향기성분의 분리농축에는 압착, 원심분리, 액체-액체 추출법⁽⁵⁾, steam distillation⁽⁶⁾, vacuum distillation⁽⁷⁾, simultaneous distillation extraction⁽⁸⁾, 침지법⁽⁹⁾, 액체-고체 추출법⁽¹⁰⁾ 그리고 head space condensation⁽¹¹⁾ 등이 있으나 어느 한 가지 방법만으로 향기성분을 분석한다는 것은 매우 어려운 일이다. Head space condensation 방법은 휘발 성분만을 잡아낼 수 있으나 이 방법을 쓰려면 head space sampler 또는 흡착관을 heat desorption 해줄 수 있는 보조장치가 필요하다. Steam distillation은 높은 온도와 공기접촉에 의한 산화에 따른 artefact가

Corresponding author: Jung-Han Kim, Department of Food Engineering, Yonsei University, Shinchon-dong 134, Seodaemun-gu, Seoul 120-749

문제되지만 Jennings 등⁽¹¹⁾에 의하면 steam distillation 한 시료의 chromatogram 이 neat sample의 chromatogram 과 가장 유사하였다고 한다. 본 연구에서는 추출방법을 비교한 후 가장 적합한 시료 전처리 과정으로 gas co-distillation 방법⁽³⁾을 선택하였으며 탱자 향기성분의 분리와 확인에는 GC/MS와 GC/Retention Index (RI) 방법을 사용하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 탱자(*Poncirus trifoliata*)는 전라남도 화순에서 1987년 10월 초에 채취한 것으로 흐르는 물에 여러번 씻은 후 껍질(peel) 부분 중 겉 껍질(flavedo)만을 벗겨내고 냉동고(-20°C)에서 사용할 때까지 보관하였다.

향기성분의 추출

냉동고에서 보관중이던 탱자의 겉 껍질 50g을 상온에서 녹인 후 잘게 썰어 둥근 플라스크에 넣고 증류수 350ml를 함께 넣었다. 시료가 든 둥근 플라스크를 Fig. 1의 장치로 맞춘 후 열을 가하지 않은 상태에서 10분간 질소를 흘려주었다. 장치가 모두 질소로 채워진 후 교반시키면서 플라스크에 열을 가하기 시작하였다. 이때 질소의 유속은 12.6ml/min이었다. Distillate가 나오기 시작한 후 40분 동안 gas co-distillation하였다. 회수된 distillate 40ml 중 20ml를 염화나

트륨으로 포화시켜 분액깔때기에 넣은 후 dichloromethane 각 30ml로 3회 추출(총 90ml)하고 무수 황산마그네슘으로 탈수시킨 후 2ml까지 진공 농축하여 GC에 주입하였다.

시료의 분리와 확인

RI를 이용한 탱자 향기성분의 분리 및 확인에는 HP5895A Workstation이 장비된 HP5890A GC (Hewlett-Packard, U. S. A)를 사용하였으며 GC/MS는 HP5790A GC와 VG12-250(England)를 사용하였다. Column은 HP-1(25m×0.2mm I. D×0.11μm)과 FFAP(25m×0.2mm I. D×0.33μm)를 사용하였으며 HP-1의 경우 oven 온도를 50°C에서 2분간 유지시킨 후 280°C까지 분당 2°C의 속도로 올려서 유지시켰으나 FFAP의 경우에는 한계온도 문제로 180°C까지만 올려서 유지시켰으며 split ratio는 공히 30:1로 하였다. GC/MS의 경우 column은 OV-1(50m×0.2mm I. D×0.33μm)이며 oven 온도는 50°C(5분간 유지)에서 140°C(4분간 유지)까지 분당 4분의 속도로 올린 후 200°C(5분간 유지)까지는 분당 8°C의 속도로 올리고 280°C까지는 분당 3°C로 상승시킨 후 유지시켰다. Carrier gas는 He을 썼고 electron impact(EI) mode를 썼으며 ionization energy는 700eV였다. Source temperature는 180°C 그리고 interface temperature는 250°C였다. MS에 대한 정성은 NBS library와 비교하여 수행하였다.

결과 및 고찰

정유 추출방법의 비교

기기분석에 적합한 시료의 전처리 방법을 알아보기 위해 액체-액체 추출법과 원심분리법, 침지법 그리고 gas co-distillation 방법을 비교해 본 결과 gas co-distillation 방법을 제외한 나머지 방법들로 얻은 정유들은 탱자 향기를 가지고 있었으나 황색을 띄고 있었으며 이러한 색소성분은 GC에 주입하고 나면 injection port의 glass liner에 packing되어 있는 silanized glass wool에 걸은 황색의 이물질로 남았다. 이러한 물질들은 고온에서 pyrolysis를 일으키면서 서서히 column 내로 유입되어 column을 오염시키고 불순물 peak를 유발시키게 된다는 점에서 매우 바람직하지 못하다. Gas co-distillation 방법에서는 시료가 고온에서 공기와의 접촉으로 일으킬 수도 있는 산

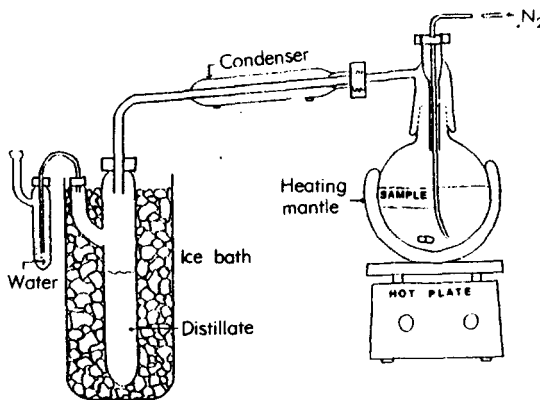


Fig. 1. Gas co-distillation apparatus.

Table 1 The identified chemicals in *Poncirus trifoliata* by GC/retention index and GC/MS

GC No.	MW	Chemical name	Structure	GC/RT	GC/MS
1	116	ethyl butanoate		++	
2	136	α -pinene		+	+
3	136	sabinene			+
4	136	β -pinene		+	+
5	136	β -myrcene		+	+
6	144	ethyl-n-hexanoate		++	+
7	136	3-thujene			+
8	142	cis-3-hexenyl acetate		++	+
9	144	n-hexyl acetate		+	
10	154	1,8-cineol		++	
11	136	limonene		+	+
12	136	cis- β -ocimene		+	+
13	136	trans- β -ocimene		+	+
14	154	linalool		+	+
15	134	2-methyl acetophenone		+	+
16		unknown			
17	142	unknown			
18	172	ethyl octylate		++	
19	156	decanal		++	
20		unknown			
21	204	δ -elemene			+
22	196	neryl acetate		++	
23	196	geranyl acetate		+	+
24	204	β -elemene			+
25	204	β -caryophyllene		+	+
26	204	C15H24 (elemene isomer)			
27	204	α -humulene			+
28	204	β -farnesene			+
29	204	β -cubebene			+
30	204	C15H24 (elemene isomer)			
31		unknown			
32	204	α -farnesene		+	+
33	204	elixene			+
34	208	elemicine			+
35	206	scoparone			+
36	298	7-geranyloxycoumarin			+

++ Identified by HP-1 column & FFAP column.

MW = Molecular weight.

화반응을 배제하기 위해 distillation 하는 동안 계속해서 질소를 흘려준 결과 이취를 전혀 느낄 수 없는 증류액을 얻을 수 있었다. 이런 방법으로 얻은 정유는 탱자의 향을 그대로 가지고 있을 뿐 아니라 무색 투명하여 GC에도 무리를 주지않아 분석에 적합했다.

향기성분의 확인

Retention index (RI)와 mass spectrum 으로 확인

한 탱자의 성분들을 Table 1에 나타내었다. 총 30개의 향기성분을 확인하였는데 그 중 RI와 mass spectrum으로 확인한 것은 14개, RI만으로 확인한 것은 5개 그리고 mass spectrum만으로 확인한 것은 11개였다. RI만으로 확인한 성분 수가 mass spectrum으로 동정한 성분 수보다 적은 것은 단향의 부족으로 인해 성분 분석에 충분한 retention index library를 만들 수 없었기 때문이었다. RI만으로 확인된 5개의 성

분들은 FFAP column을 이용해서 얻은 RI 값으로 재 확인된 것들이다. Sprouse 등⁽¹²⁾은 RI 값 뿐만 아니라 두 column에서의 peak 크기를 비교했는데 본 실험에서도 peak 17은 nonanol로 예상되었으나 FFAP column에서의 nonanol 예상 peak (Fig. 3)가 HP-1 column에서의 peak 17 (Fig. 2)에 비해 훨씬 큰 peak로 나타났으므로 peak 17은 nonanol이 아닌 것으로 판명되었다. Mass spectrum을 이용하여 정성할 경우에는 특히 isomers의 구분과 homologues의 구분이 어려운데 실제로 peak 12와 13의 경우 두 peak 모두 MS library searching으로는 trans- β -ocimene으로 나타났으나 RI를 비교해 본 결과 peak 12는 cis- β -ocimene으로 밝혀졌다 (Fig. 4). 이상에서 보듯이 어느 한 방법만으로 정성을 행하기 보다는 GC/RI와 GC/MS 등을 상호 보완적으로 이용하는 것이 훨씬 효율적이었으며 RI만을 이용할 경우라도 극성이 다른 두가지 이상의 column을 함께 사용하면 높은 신뢰도의 결과를 얻을 수 있었다.

탱자의 향기성분

1966년 Scora 등⁽⁹⁾은 *Poncirus trifoliata*의 분류학적 연구를 위해 탱자의 휘발성 성분 약 29개 정도를 밝혀놓았으나 당시의 분석은 packed column으로 행하여졌으며 그 확인 방법도 spiking에만 의존한 것이었다. 본 실험에서는 30개의 성분이 확인되었으며 (Table 1) limonene, myrcene, β -caryophyllene, trans- β -ocimene, β -pinene, 3-thujene, 7-geranyl oxycoumarin 등이 major peak들로 확인되었다 (Fig. 2). 확인한 30개의 성분들 중 terpene류가 16개로 대부분을 차지했으며 그 중 Heinrich 등⁽¹³⁾이 탱자의 외과피(exocarp)에 풍부하다고 한 monoterpene류(C₁₀H₁₆)는 8개였으며 limonene과 myrcene의 peak들이 큰 peak들로 관찰되었다 (Fig. 2). Heinrich 등⁽¹⁴⁾에 의하면 5월에서 6월에 걸쳐 탱자의 껍질에서 myrcene의 양이 줄어들며 따라 limonene의 양은 증가함으로써 결국 monoterpene은 계속 일정한 양을 유지한다고 하였다. 감귤류에 널

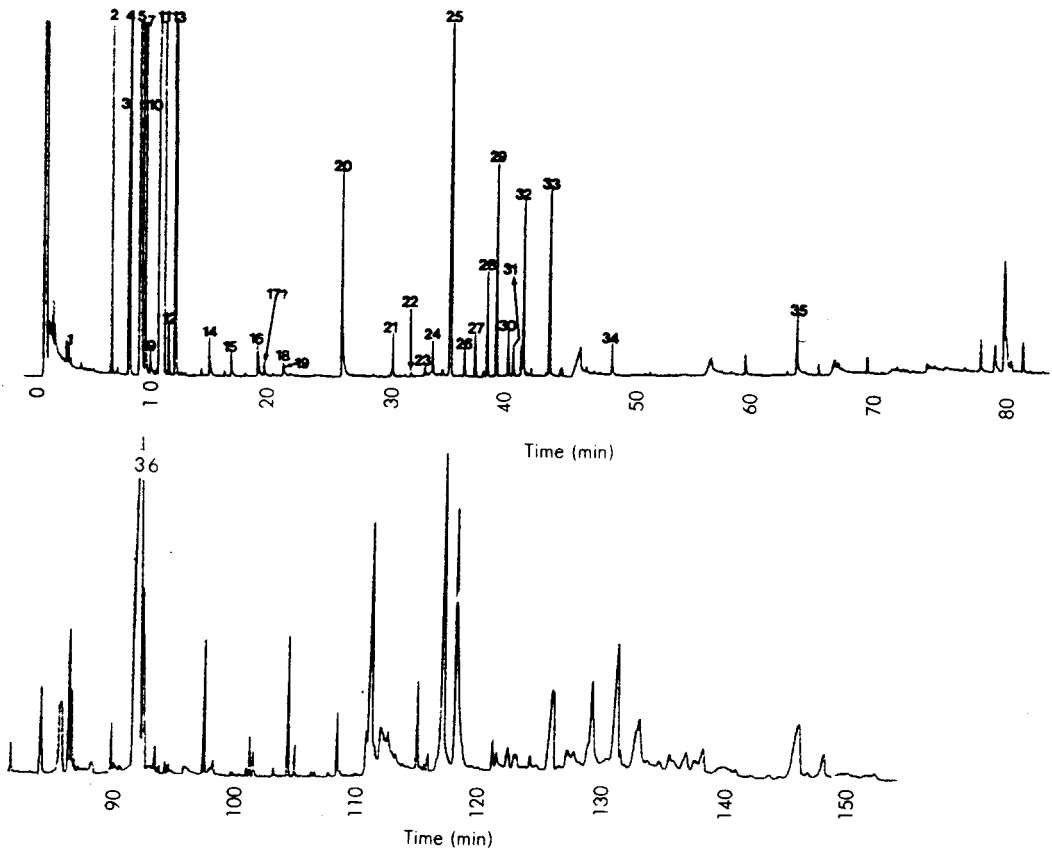


Fig. 2. GC chromatogram of *Poncirus trifoliata* by HP-1 column.

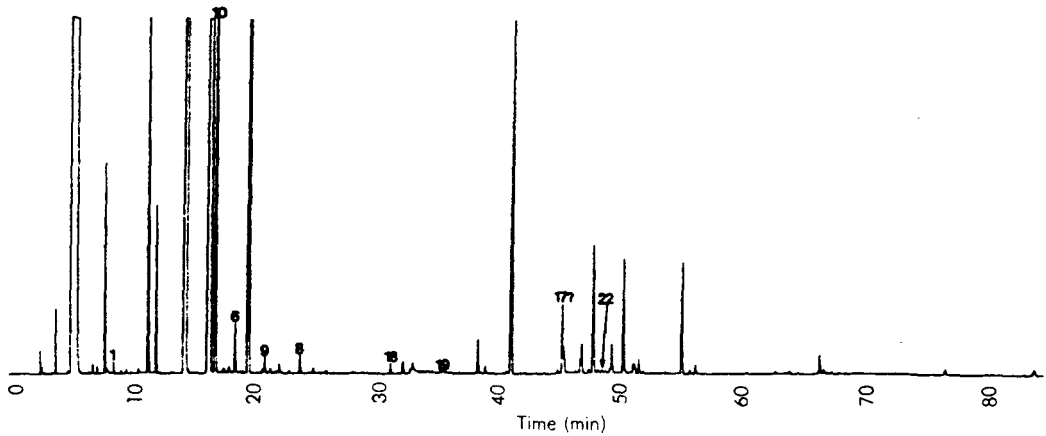


Fig. 3. GC chromatogram of *Poncirus trifoliata* by FFAP column.

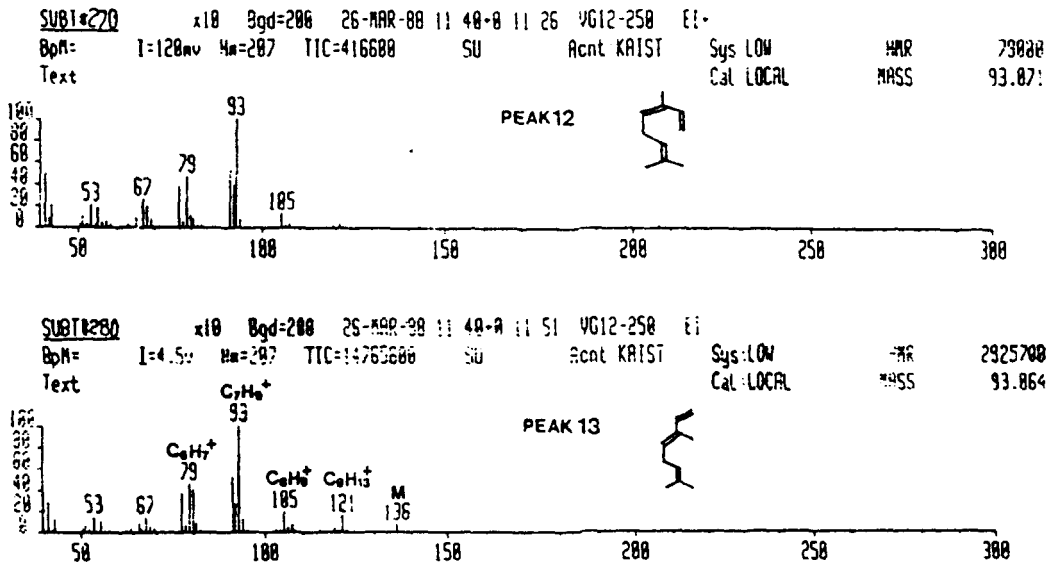


Fig. 4. Mass spectrum of peak 12 & 13 in *Poncirus trifoliata*.

리 분포하는 alcohol류 중 대표적인 linalool이 14번 peak로 정성되었는데 linalool은 Valencia Orange 등에서 숙성됨에 따라 그 양이 감소된다고 알려져 있으나⁽¹⁵⁾ Heinrich 등⁽¹³⁾에 의하면 탱자의 경우 숙성됨에 따라 linalool의 양은 오히려 증가했다고 한다. Sesquiterpene(C₁₅H₂₄)류는 주로 탱자의 내과피(endocarp)에 존재한다고 하는데⁽¹³⁾ 본 실험에서는 8개를 확인하였다(Table 1). 그 중 가장 큰 peak인 β -caryophyllene은 향긋한 나무향을 주며 오래 지속됨으로써 cinnamic aldehyde와 같은 휘발성 성분들에 대해 고착제역할도 한다고 하며⁽¹⁶⁾ Heinrich 등⁽¹⁴⁾

에 의하면 계절이 지날수록 그 양이 줄어들었다고 한다. 본 실험에서 확인된 성분 중 α -pinene, β -myrcene, linalool, cineol, decanal, neryl acetate 그리고 geranyl acetate 등은 Scora 등⁽⁸⁾이 확인한 성분들이었으며 나머지 22개의 성분들 중 cis-3-hexenyl acetate, n-hexyl acetate, 2-methyl acetophenone, elixene 그리고 elemicine 등은 이제까지 감귤류에서는 발견되지 않았던 성분들이다.

요 약

탱자(*Poncirus trifoliata*)의 향기성분을 분석하기 위해 gas co-distillation 방법으로 정유를 추출한 후 GC/retention index(RI)와 GC/MS를 이용해 multi-dimensional analysis를 행하였다. Gas co-distillation 방법으로 탱자의 향도 그대로 지니며 기기분석에 적합한 정유를 얻을 수 있었다. 향기성분의 확인작업에는 GC/RI와 GC/MS를 상보적으로 사용한 multi-dimensional analysis가 효과적이었으며 GC/RI로만 확인할 경우 극성이 다른 두 가지 column을 사용해서 신뢰도를 높일 수 있었다. 탱자에 다량 함유되어 있는 향기성분들은 limonene, myrcene, β -caryophyllene, trans- β -ocimene, β -pinene, 3-thujene, 7-geranyloxycoumarin 등으로 밝혀졌으며 확인된 30개의 성분 중 cis-3-hexenyl acetate, n-hexyl acetate, 2-methyl acetophenone, elixene 그리고 elemicine 등은 이제까지 감귤류에서는 발견되지 않았던 새로운 성분들이다.

감사의 글

본 실험에 많은 도움을 아끼지 않으신 KAIST의 노진용씨께 깊은 사의를 표하는 바입니다.

문헌

- Bernhard, R.A.: Examination of lemon oil by gas chromatography. *Food Res.* **23**, 213 (1958)
- Philip E. Shaw: Review of quantitative analyses of citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **27**(2), 246 (1979)
- Scora, R., England, A.B. and Bitters, W.P.: The essential oils of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and its selections in relation to classification. *Phytochemistry*, **5**, 1139 (1966)
- 문교부(편): 한국동식물 도감 식물편(화훼류 II), **6**, 493(1966)
- Mannheim, C.H. and Passy, N.: Aroma recovery and retention in fruit juices. *Flavours*, November/December, 323 (1975)
- Eric D. Lund and William L. Bryan: Composition of lemon oil distilled from commercial mill waste. *J. Food Sci.*, **41**, 1194 (1976)
- Kemp, T.R., Knavel, D.E. and Stoltz, L.P.: 3,6-Nonadien-1-ol from *Citrullus Vulgaris* and *Cucumis Melo*. *Phytochemistry*, **13**, 1167 (1974)
- Godefroot, M., Sandra, P. and Verzele, M.: New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **203**, 325 (1981)
- Hirozo Kusunose and Masayoshi Sawamura: Aroma constituents of some sour citrus oils. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **27**(10), 517 (1980)
- Thomas H. Parliment: Concentration and fractionation of aromas on reverse phase adsorbents. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 836 (1981)
- Walter G. Jennings and Mehrzad Filsoof: Comparison of sample preparation techniques for GC analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **25**(3), 440 (1977)
- James F. Sprouse and Antonio Varano: Development of a GC retention index library. *Int. Lab.*, November, 54 (1984)
- Heinrich, G., Schultze, W. and Wegner, Renate: Compartmentation of mono- and sesquiterpene synthesis of essential oils in *Poncirus trifoliata*. *Protoplasma*, **103**(2), 115 (1980)
- Heinrich, G., Pfab, I., Plawer, J., Wegener, R. and Schultze, W.: Compartmentation of the biosynthesis of the essential oil in *Poncirus* and *Monarda*. In *Aetherische Oele*, *Ergeb. Int. Arbeitstag.*, Stuttgart, Fed. Rep. Ger., p. 198 (1982)
- Kefford, J.F. and Chandler, B.V.: In *The Chemical Constituents of Citrus Fruits*, C.O. Chichester, E.M. Mark and G.F. Stewart (ed), Academic Press, New York, p.91 (1970)
- Arctander, S.: In *Perfume and Flavor Chemicals*, Montclair, N.J., Vol 1, 584 (1969)

(1989년 6월 15일 접수)