

감귤류와 한국산 청피에 함유된 Methoxylated Flavonoids의 분석과 정량적 분포

백순옥*, 복진영*, 천현자**, 정승일**, 한완수***, 김일광**

원광대학교 화학과

*한국인삼연초연구소

**원광대학교 한의학 전문대학원

***목원대학교 화학과

(2001. 6. 26 접수)

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

S. O. Baik*, J. Y. Bock*, H. J. Chun**, S. I. Jeong**, W. S. Han***, I. K. Kim**

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

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon City

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

***Chemistry Dept., Mokwon Univ., Daejeon City

(Received June 26, 2001)

요 약 : 감귤류와 한국산 청피에 함유된 methoxylated flavonoids (sinensetin, nobiletin, tangeretin)를 HPLC, mass, 그리고 NMR로 분리하고 분석하였다. Methoxylated flavonoids는 Chung-pi(I)과 Chung-pi(II)에 가장 풍부하게 함유되었다. 한국산 밀감에서 얻어진 Chung-pi(I),(II)의 methoxylated flavonoids 함유량은 밀감성숙도에 따라 증가하였으며, 10월 중순이후에는 서서히 감소하였다.

Abstract : Methoxylated flavonoids (sinensetin, nobiletin, and tangeretin) were isolated and identified by preparative HPLC, mass and NMR. Chung-pi(I) and Chung-pi(II) contained methoxylated flavonoids most richly. Methoxylated flavonoids in Chung-pi obtained from Korean Milgam increased with fruit maturity, while contents of the methoxylated flavonoids gradually decreased after mid of October.

Key words : methoxylated flavonoids, analysis of Citruses, Chung-pi

1. 서 론

Citrus 속 식물의 재배가 가장 오래된 나라는 중국으로 B.C 300-400년경으로 거슬러 올라간다. Citrus 속

의 여러 가지 품종이 약용으로 사용되고 있으며, 30여 종 이상이 한국, 중국, 일본, 대만 등의 문헌에 기록되어 있다.¹⁻³ Citrus 속 식물은 온주밀감을 포함하여 오렌지, 레몬, 자몽, 유자, 금귤 등 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있으며, 성분조사 및 생리활성에 관한 연구가 활발하다. 식용으로 사용되는 Citrus의 과육을 제외한 과피는 한방에서 오래전부터 생약으로 사용되어

★ Corresponding author

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

E-mail : ilkim@wonkwang.ac.kr

왔다.^{4,5}

생약으로 사용되는 과피의 명칭은 진피, 청피, 지각 등으로 다양하며 채취시기에 따라 이름과 용법이 다르다. 청피(*Pericarpium Citri Nobilis*)는 *Citrus* 속의 미성숙한 과실의 과피를 채취하여 햇볕에 말린 것으로 약재로 사용하는데, 쓰고 신맛이 있으며 주로 간과 담경에 작용한다. Yun⁶ 등은 지실에서 얻은 ponciarin의 항염작용에 대하여 조사하였고, Yu⁷ 등은 5-hydroxytryptophan의 설사억제효능에 대하여 보고한 바 있다. Chun⁸과 Ho⁹ 등은 미성숙한 *Citrus* 성분에서 항알러지 효과를 보았으며, Yum 등¹⁰은 대식세포의 활성을 증가시키는 결과를 얻었고, Eun¹¹ 등은 복강 대식세포의 phagocytic 효과를 보고한 바 있으며, Kim¹² 등은 진피와 청피중의 glycosides를 분리정량한 바 있다.

본 연구에서는 제주도에서 재배되는 한국 제주산 *Citrus* 들을 생약재제로 개발하기 위하여 국내산 청피로부터 유효성분의 일종인 methoxylated flavonoids를 분리하여 화학구조를 밝히고, 청피 종류별, 성숙정도별로 함량을 비교하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

시료 : 국내에서 시판중인 한국산 *Citrus* 속 과일(영귤, 밀감, 지각, 지실 등)들을 구입하고 과피를 벗겨 잘 말려서 청피시료로 하였다. 청피의 추출 및 유효성분의 분리에 사용된 용매는 특급시약을 구입하여 사용하였고, nobiletin, sinensetin의 표준품은 Sigma 제품을, tangeretin은 Estrasynthese 제품을 사용하였다. 얇은막크로마토그래피(TLC)에서는 Merck 제 TLC판용, 컬럼크로마토그래피에서는 Merck제 실리카겔(70-230 mesh)과 Pharmacia Biotech제 Sephadex(LH-20)를 사용하였다.

동물 : 체중 200 ± 10 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐를 실험실 환경에 2주일 이상 충분히 적응 시킨 후 사용하였다.

기기 : High performance liquid chromatograph(HPLC)는 Dionex LC20, nuclear magnetic resonance spectrometer(NMR)는 Brüker AM300, gas chromatograph-mass spectrometer(GC/MS)는 Varian Mat 212, deep freezer는 Hetofrig CL410을 각각 사용하였다.

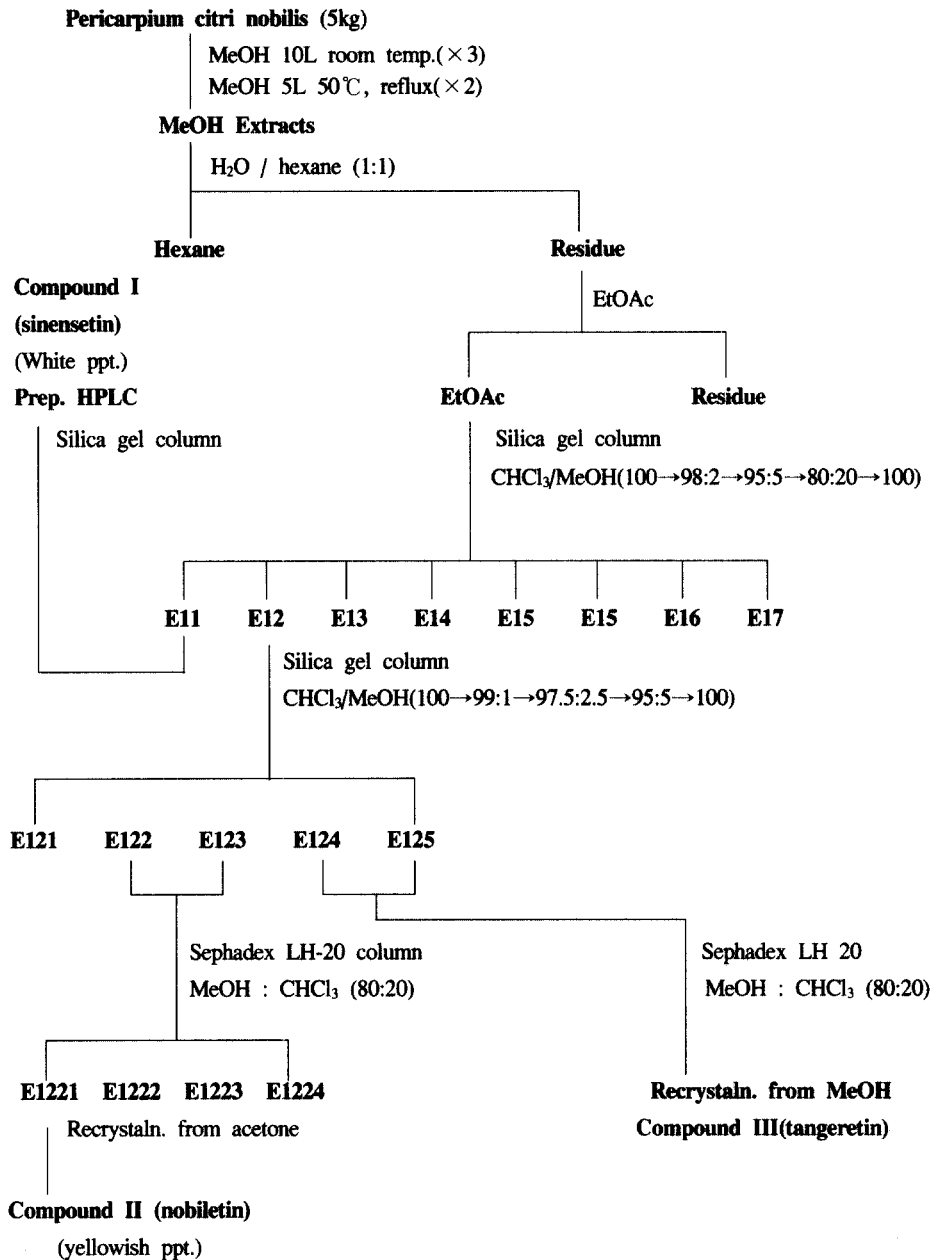
2.2. 실험방법

유효성분의 분리 : 청피 5kg을 믹서로 분쇄한 후 실온에서 methanol(MeOH) 10 L로 24시간씩 3회 추출한 것과 잔사를 reflux하여 2회 추출한 것을 합해서 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 이것을 물에 현탁시킨 후 hexane으로 추출하여 hexane층을 제거한 후 EtOAc로 다시 추출하여 EtOAc층을 얻었다. (Fig.2). EtOAc층을 실리카겔 컬럼에 흡착시킨 후 순차적으로 용리액을 통과시켜 각성분을 분리하였다. 이 때 용리 조건은 CHCl_3 (E-11), 2% MeOH in CHCl_3 (E-12), 5% MeOH in CHCl_3 (E-13, E-14), 8% MeOH in CHCl_3 (E-15), 20% MeOH in CHCl_3 (E-16), MeOH(E-17)의 순서로 용리하여 E11부터 E17까지 7개의 분액을 얻었다. 이 분액들은 TLC로 확인하여 비슷한 물질들을 함유하도록 나누었다. 용출액의 유속은 2 mL/min이었으며 각 용리액의 부피는 2L였다.

가장 처음 분액인 E11을 다시 실리카겔 컬럼에 흡착시키고 CHCl_3 , 1% MeOH in CHCl_3 , 2% MeOH in CHCl_3 , 3% MeOH in CHCl_3 , 5% MeOH in CHCl_3 로 재 용리하였다. 그 중 1% MeOH와 2% MeOH 분액을 합하고 Prep. HPLC를 행하여 순수화합물을 확인하였다 (compound I). 이때의 HPLC의 조건은 다음과 같다. 컬럼; C_{18} , 250×6 mm, eluent ; MeOH-5% + acetic acid (65 : 35), flow rate; 3 mL/min, detector; UV 330 nm.

E12 분액도 실리카겔 컬럼에 흡착시키고 재분리하였다. 분리 조건은 CHCl_3 , 1% MeOH in CHCl_3 , 2% MeOH in CHCl_3 , 5% MeOH in CHCl_3 , MeOH 순서로 용리하여 E121부터 E125까지의 5개의 분액을 얻었다. 이때의 유속은 1mL/min이었다. 이 중 E122분액과 E123분액을 합한 후 다시 Sephadex LH-20 컬럼에서 CHCl_3 /MeOH (20 : 80)으로 분리하고 아세톤으로 재결정하여 미황색의 침상결정 (compound II)을 얻었다. 같은 방법으로 E124와 E125을 합하고 용매로 MeOH/ CHCl_3 (80:20) 용매로 Sephadex LH-20 컬럼에서 정제한 후 메탄올로 재결정하여 미황색의 침전 (compound III)을 얻었으며, 이들 과정을 Scheme 1에 정리하였다.

Flavonoids의 분석 : 동결건조한 과피를 믹서로 분쇄하여 2 g을 취한 다음 MeOH로 24 hr reflux하면서 3회 추출한다. 추출액을 합하여 50 mL로 맞춘 다음 0.45 μm 막을 통과시켜 HPLC의 분석시료로 하였다.



Scheme 1. Separation and isolation process of active compounds from *Pericarpium Citri Nobilis*.

이 때의 분석조건은 Tsuchida^{2,3} 등이 사용한 방법으
로 하였으며 그 조건은 다음과 같다.

HPLC : Dionex LC20

Column : C₁₈ (150 × 6mm id)

Eluent : 0.05M sodium diphosphate (pH 2.4) :

Acetonitrile : MeOH (15 : 8 : 2)

Flow rate : 1.0 mL/ min

Detector : U.V 230 nm (methoxylated flavonoid),
284nm (glycosided flavonoids)

Column temp. : 35°C

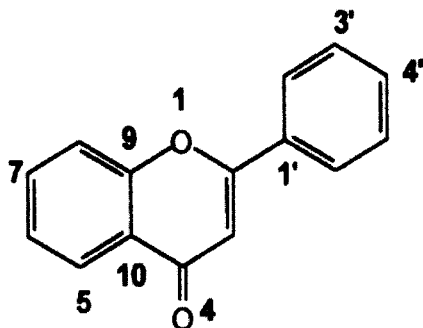
3. 결과 및 고찰

3.1. 청피의 유효성분의 구조 확인

3.1.1 화합물 I의 구조 확인

Tsuchida 등⁴의 방법에 따라 E11분액에서 정제하여 얻어진 화합물 I은 흰색 침전이고, 녹는점은 175°C이었다. 이 화합물은 FeCl₃에 음성인 것으로 보아 phenolic OH기를 포함하지 않으며, UV에서 $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$ 가 243, 268, 330 m이었으므로 flavonoids로 추정하였다.

일반적으로 flavonoid의 기본구조는 다음 Scheme 2와 같다.



Scheme 2. The basic structure of flavonoids.

먼저 화합물 I의 저 분리능 전자충격 이온화 질량 스펙트럼으로부터 372 amu의 분자이온과 341, 313 amu의 토막 이온들을 볼 수 있었다. 또한 고 분리능 질량 스펙트럼으로부터 분자 이온의 측정 값은 372.1204 amu로 이론 값인 372.1209 amu와 0.5 amu의 차이로 일치하였다. 이들의 자료로부터 이 화합물의 분자식은 C₂₀H₂₀O₇로 확인되었고, 불포화도가 11임을 알 수 있었다.

DMSO-*d*₆ 용매로 화합물I에 대하여 측정한 ¹H 및 ¹³C의 NMR 스펙트럼과 HMBC결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 5개의 methoxy ($\delta=3.76, 3.79, 3.88, 3.84, 3.95$ ppm), 1개의 doublet doublet olefin 수소 ($\delta=7.6$ ppm, dd, $J=7.8, 2.4$ Hz), 2개의 doublet olefin 수소 ($\delta=7.5, 7.1$ ppm) 및 2개의 singlet olefin 수소 ($\delta=6.8, 7.2$ ppm)등 모두 20개의 수소를 볼 수 있었다. 또한 ¹³C 스펙트럼으로부터 20개의 탄소를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

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

No.	δ c'	δ H(H, multi., J)	HMBC
2	160.300		
3	106.405	6.8 (H, s)	C10, C1', C2
4	175.694		
5	151.557		
6	139.754		
7	157.428		
8	97.364	7.2 (H, s)	C10,C1,C6,C7
9	153.944		
10	112.047		
3'	55.89	3.88 (3H, s)	C3'
4'	55.71	3.84 (3H, s)	C4'
5	61.85	3.79 (3H, s)	C5
6	60.99	3.76 (3H, s)	C6
7	56.48	3.95 (3H, s)	C7
1'	123.153		
2'	109.192	7.5 (H, d, 2.4Hz)	C6',C4', C2'
3'	149.019		
4'	151.684		
5'	111.675	7.1 (H, d, 7.8Hz)	C3',C1'
6'	119.462	7.6 (H, dd, 7.8,2.4 Hz)	C2',C4',C2

DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) 45, 90 및 135도의 스펙트럼들을 Fig. 1에 각각 나타내었으며, 이들의 자료들로부터 ¹³C 스펙트럼에 나타난 20개의 탄소 중에 4급 탄소가 10개, CH가 5개, CH₂는 없으며, CH₃가 5개라는 것을 알 수 있었다. 이 중 175.69 ppm 카르보닐, 55.71, 56.48, 55.90, 60.99 및 61.85 ppm은 methoxy, 139-158 ppm은 산소가 치환된 이중결합이 존재하는 것을 의미하며, 이들의 결과로부터 methoxy기가 5개, carbonyl이 한 개 및 산소가 존재하는 것을 알 수 있었다.

화합물 I의 평면 구조는 2차원 NMR 스펙트라의 해석으로부터 추정하였다¹³. Fig. 2의 H-H COSY (carbon-hydrogen correlation spectroscopy) 스펙트럼에서 보듯이 7.6 ppm의 수소와 7.1 ppm의 수소는 서로 coupling 하고 있는 것으로 보아 두 수소가 인접하고 있다는 것을 보여주었다. 또한 7.6 ppm 수소의 coupling 상수가 7.8 와 2.4 Hz로 나타났다. 이들의 결과는 7.8 Hz의 경우 7.6ppm 수소는 7.1 ppm의 수소와 ortho coupling을 하고 있으며, 2.4 Hz의 경우는 7.5 ppm의 수소와 meta coupling을 하고 있음을 의미한다.

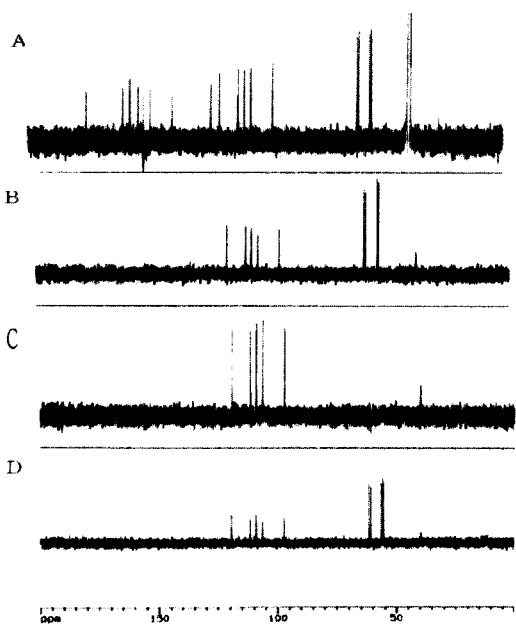


Fig. 1. (A) ¹³C and (B) DEPT 45 (C) 90 (D) 135 spectra of compound I.

이런 사실들로부터 이 구조는 tri-substituted phenyl 구조를 갖는다고 추정하였다. 또한 NOESY(nuclear overhauser effect spectroscopy)스펙트럼으로부터 7.1 ppm 수소는 3.84 ppm의 methoxy기의 수소 그리고 7.5 ppm의 수소는 3.88 ppm의 methoxy기의 수소와 공간적으로 인접하여 있음을 알았다. 이런 결과들로부터 Scheme 3과 같은 부분 구조를 예상하였다.

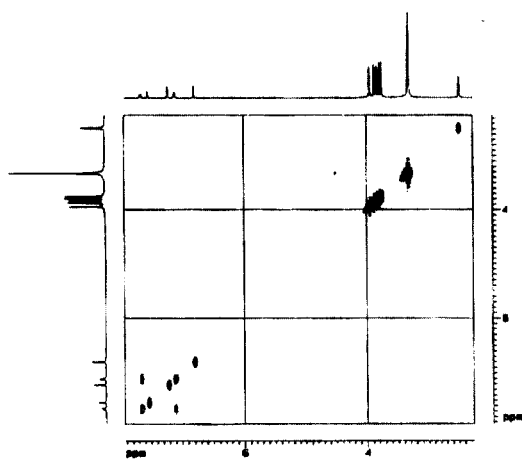
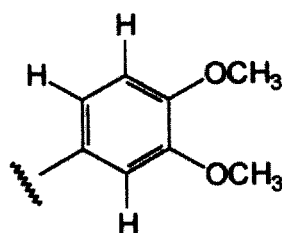
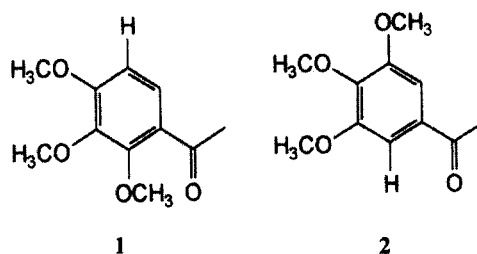


Fig. 2. H-H COSY spectrum of compound I.



Scheme 3. Plane partial structure of unit A in compound I.

다음으로 7.2 및 6.8 ppm에서 나타난 2개의 olefin 수소들은 서로 coupling을 하지 않으므로 전혀 인접해 있지 않다는 것을 의미한다. 7.2 ppm의 수소는 3.95 ppm의 methoxy기 수스와 NOE의 관계를 나타내는 것을 NOESY 스펙트럼으로 부터 관측하였다. 그러므로 3개의 methoxy는 서로 인접하여 있어야 하고, 하나의 수소는 scheme 4에 나타낸 바와 같은 2가지 부분 구조를 가져야만 한다. 만약 2의 구조라면 7.2 ppm의 수소로부터 carbony기가 HMBC (heteronuclear multiple bond correlation)상에 분명히 존재하여야 한다. 그러나 Table 1에서 보여주듯이 HMBC의 결과는 7.2 ppm 수소의 이웃에 카르보닐 탄소가 존재하지 않는 것을 보여주었다. 그러므로 7.2 ppm에서 관측된 수소의 위치는 구조 2 보다는 1에 가까운 것을 알 수 있었다.



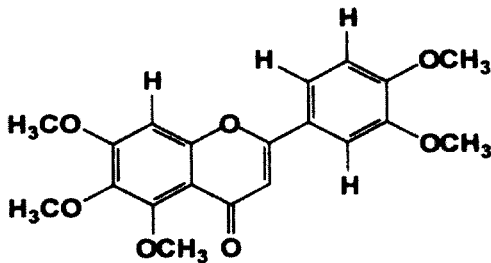
Scheme 4. Plane partial structure of unit B in compound I.

마지막 하나 남은 6.8 ppm의 수소는 HMBC의 결과로부터 C10에 결합하고 있는 α, β-unsaturated ketone의 존재를 확인하게 되었다. 그런데 위에서 설명한 바와 같이 2개의 치환 phenyl기의 존재와 α, β-unsaturated ketone기에 의한 불포화도는 10이므로 Scheme 4에서 화합물 1의 불포화도 11을 만족하기 위하여는 또 다

른 하나의 ring이 존재하여야 한다는 것을 시사해 주고 있다.

즉 α , β -unsaturated ketone기의 160.30 ppm인 β -탄소가 C9인 153.94 ppm에 결합하고 있음을 추정할 수 있게 된다. 이것은 7개의 산소가 치환된 올레핀 탄소 중 5개의 methoxy와 결합하는 탄소를 제외하면 산소 치환된 올레핀 탄소가 2개 남게 되는데 이 두 탄소가 한 산소를 사이에 두고 결합하면서 환을 이루는 것으로 추정된다.

끝으로 위의 두 unit A와 B의 연결은 HMBC의 결과에서 보는 바와 같이 6.8 ppm의 수소가 123.153 ppm인 1'탄소, 7.6 ppm의 수소가 160.300 ppm인 3번 탄소 및 7.5 ppm의 수소가 109.192 ppm인 2'번 탄소와 HMBC관계를 갖는 것으로 부터 두 골격이 탄소 C2와 C1'로 연결된다는 것을 알 수 있었다. 또한 6.8 ppm 수소는 7.5 ppm의 수소와 NOE의 관계를 갖는 것으로 보아 6.8 ppm의 수소는 C3에 결합된 것임을 다시 확인하였다. Fig. 1~2와 Table 1에 나타난 ^1H , ^{13}C , DEPT 45, 90, 135, H-H COSY, NOESY 및 HMBC 스펙트럼을 종합하여 추정된 결과 Citrus에 존재하는 compound I은 다음 Scheme 5의 구조를 가진 sinensetin으로 확인되었다



Scheme 5. Proposed structure of sinensetin (compound I).

3.1.2 화합물 II의 구조 확인

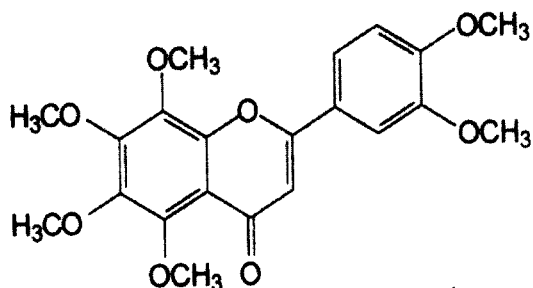
분액 E1221에서 얻어진 compound II의 mp는 137-138 °C 이었다. UV 스펙트럼에서 245, 269, 330 nm에서 흡수극대를 보이고, IR에서 1620 (phenyl ketone), 1600 (phenyl), 1520 cm^{-1} 을 관찰할 수 있어서 flavonoids로 추정되었다. IR에서 hydroxyl 기가 보이지 않아 phenolic OH기가 없는 것으로 생각되었고, FeCl_3 반응에 음성이어서 위 추정을 뒷받침하였다. 질량 스펙트럼에서 m/z 402 (M^+)를 관찰할 수 있어서 이 화합물의 조성식을 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 로 추정하였다. Compound

II의 ^1H , ^{13}C NMR과 HMBC의 결과를 Table 2에 정리하였다. Table 2의 ^1H -NMR 스펙트럼에서 3.82(6H)와 3.76, 3.85, 3.95, 4.02ppm (각 3H)으로부터 methoxy 기가 6개인 것을 알 수 있었다. 6.8 (1H, s), 7.1 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.5 (1H, d, $J=2.0$ Hz) 및 7.6 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz) ppm으로부터 방향족 수소의 수가 4개 있는 것을 알 수 있었다. Coupling constant 값으로부터 7.1 과 7.6 ppm은 서로 *o*-coupling하고 7.6 ppm은 7.5 및 7.1 ppm과 각각 *o*, *m*-coupling 하는 것을 알 수 있었다. 또한, 11.0 ppm 이상의 저자장에서 피크가 관찰되지 않아 flavonoids 골격의 5번 위치의 OH가 치환되어 있다고 추정할 수 있었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 175.926 ppm으로 보아 carbonyl기가 1개 있으며, 산소와 결합한 방향족 탄소수가 8개 (137.718 - 160.376 ppm), 그이외의 방향족 탄소가 6개 (106.343 - 123.175 ppm)임을 알 수 있었다. 또한, ^1H -NMR에서 추정된 $-\text{OCH}_3$ 의 탄소를 55.72-61.97 ppm에서 6개를 확인할 수 있었다.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound II

No	δ_c	δ_H (H, mult., J)	HMBC
2	160.376		
3	106.343	6.8 (H s)	C3, C2, C1', C10
4	175.926		
5	151.823		
6	137.718		
7	147.225		
8	151.026		
9	147.582		
10	114.323		
5-OCH ₃	61.47	3.82 (3H)	C5
6-OCH ₃	61.88	3.95 (3H)	C6
7-OCH ₃	61.97	3.76 (3H)	C7
8-OCH ₃	61.59	4.02 (3H)	C8
4'-OCH ₃	55.77	3.82 (3H)	C4'
5'-OCH ₃	55.72	3.85 (3H)	C5'
1'	123.175		
2'	119.413	7.6 (H, dd, 8.5, 2.0 Hz)	C6', C2
3'	111.894	7.1 (H, d, 8.5 Hz)	C1', C4'
4'	143.587		
5'	149.067		
6'	108.928	7.5 (H, d, 2.0 Hz)	C2, C2'

이상의 결과를 종합하면 이 화합물은 flavonoid 골격에 -OCH₃가 6개 치환되어 있고, 그중 1개는 5번 위치에 존재한다. Flavone 골격에 존재하는 4개의 수소 중 7.1 (1H, *d*, *J*=8.5 Hz), 7.4 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz) 및 7.6 (1H, *dd*, *J*=8.5, 2.0 Hz) ppm의 피크는 coupling 값 및 흡수 범위를 고려할 때 flavonoids의 B-ring의 2', 5', 6' 위치에 있는 것으로 추정되며 6.8 (1H, *s*) ppm은 A 또는 B ring에 독립되어 있는 것으로 추정된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 compound II는 이미 보고된¹⁴⁾ nobiletin의 물리화학적, 분광학적 결과와 비교한 결과가 잘 일치하므로 Scheme 6과 같이 4',5',5,6,7,8-hexa-methoxyflavone (nobiletin)으로 확인되었다.



Scheme 6. Proposed structure of nobiletin (compound II).

3.1.3 화합물 III의 구조확인

분액 E124와 E125에서 얻어진 compound III의 녹는 점은 155-156.5 °C이었고, UV 스펙트럼의 270, 322 nm에서 흡수극대를 보였으며, IR에서 1620 (phenyl ketone), 1600 (phenyl), 1520 cm⁻¹을 관찰할 수 있어서 flavonoids로 추정되었다. 이 화합물은 FeCl₃ 반응에 음성이고, IR에서 hydroxyl기가 보이지 않아 phenol성 OH기가 없는 것을 확인할 수 있었다.

Compound III의 ¹H, ¹³C NMR 및 HMBC의 결과를 Table 3에 정리하였다. Table 3의 ¹H-NMR spectrum에서 각각 singlet인 3.76, 3.82, 3.83, 3.90, 4.0 ppm(each, 3H)으로부터 phenyl ring에 결합한 -OCH₃가 5개인 것을 알 수 있었다. 6.7(1H, *s*), 7.1(2H, *d*, *J*=8.9 Hz) 및 7.9(2H, *d*, *J*=8.9Hz) ppm으로부터 방향족 수소의 수가 7개 있는 것을 알 수 있었고, coupling constant 값으로부터 7.1과 7.9 ppm은 서로 *o*-coupling하는 것으로 생각된다. 또한, 11.0 ppm 이상의 저자장에서 피크가 관찰되지 않아 flavonoid 골격의 5번 위치

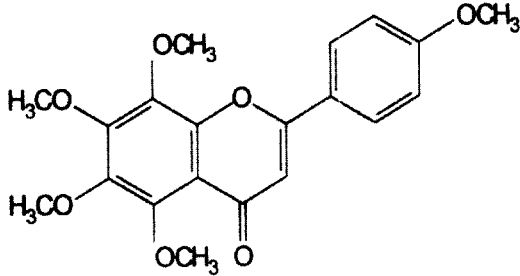
OH기가 치환되어 있다고 추정할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 175.9 ppm으로 보아 carbonyl기가 1개 있으며, 산소와 결합한 방향족 탄소수가 7개 (137.802-160.476 ppm), 그이외의 방향족 탄소가 5개임을 알 수 있었다. 또한, ¹H-NMR에서 추정한 -OCH₃의 탄소에 대하여 55.57-61.98 ppm에서 5개를 확인할 수 있었다. MS 스펙트럼에서 m/z 372 (M⁺)를 관찰할 수 있어서 이 화합물의 조성식을 C₂₀H₂₀O₇로 추정하였다.

Table 3. ¹H and ¹³C data of compound III

No	δ c	δ H (H, mult., J)	HMBC
2	160.476		
3	106.111	6.7 (H)	C4, C5,C1,C1',
4	175.873		
5	151.021		
6	143.641		
7	147.589		
8	137.802		
9	147.210		
10	114.354		
5-OCH ₃	61.49	4.00 (3H)	C5
6-OCH ₃	61.59	3.82 (3H)	C6
7-OCH ₃	61.98	3.76 (3H)	C7
8-OCH ₃	61.93	3.94 (3H)	C8
4'-OCH ₃	55.57	3.83 (3H)	C4'
1'	123.118		
2'	127.825	7.9 (2H, <i>d</i> , 8.9 Hz)	C4', C1
3'	114.735	7.1 (2H, <i>d</i> , 8.9 Hz)	C1', C4'
4'	151.753		
5'	162.078	7.1(2H, <i>d</i> , 8.9 Hz)	
6'	114.775	7.9 (2H, <i>d</i> , 8.9 Hz)	

이상의 결과를 종합하면 이 화합물은 flavonoid 골격에 -OCH₃가 5개 치환되어 있고, 그중 1개는 5번 위치에 존재한다. Flavonoid 골격에 존재하는 수소 중 4개는 각각 2개씩 동일한 환경에 위치하며 이들 두쌍들은 서로 *o*-coupling 할 수 있는 위치에 있고 1개의 수소는 독립되어 있다. 이상으로 보아 이 화합물은 flavonoid의 B-ring의 2', 3', 5', 6'의 수소가 유리한 상태인 것으로 생각되고, 1개의 수소가 A 또는 C-ring에 존재하는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 이미 보고된¹⁴⁾ tangeretin의 분광학적 결과와 비교

검토한 결과 compound III은 다음 Scheme 7과 같이 4',5,6,7,8-penta-methoxyflavone (tangeretin)으로 확인되었다.



Scheme 7. Proposed structure of Tangeretin (compound III).

3.2. Citrus 속 과피의 flavonoids의 함량 비교

3.2.1 Citrus 속 과피의 methoxylated flavonoids 함량

청피 및 우리나라에서 시판되고 있는 Citrus 속 과일의 과피에 대한 methoxylated flavonoids 함량을 분석하여 비교한 결과를 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Amount of polymethoxylated flavonoids of immature and mature peels Citrus species

Citrus	Compound(RT)		
	Sinensetin	Nobiletin	Tangeretin
Chung-pi 1	1322.8	1562.2	849.1
Chung-pi 2	191.8	1852.6	502.0
Orange	136	91	19.8
Citron	-	2.9	6.9
Milgam	24.0	135	112
Zamong	486	90.7	52.5
Gigak	14.3	73.1	5.3

Table 4의 내용을 보면, 청피에서의 methoxylated flavonoids의 주성분은 nobiletin 이었다. 이 결과는 Tsuchida 등²이 발표한 결과와 함량의 차이는 있지만 일치한 결과를 보였다. 그러나 Citrus종에 따라 자몽과 같이 nobiletin이 아닌 sinensetin이 주성분인 품종도 있었다. 같은 청피라 하더라도 nobiletin과 sinensetin의 함량차이가 많이 나는 것으로 보아, 천물을 제약화합

경우에는 그 시료의 원산지나 성분조성자료의 기초연구가 필수적인 것으로 사료된다.

과피가 아닌 주스에서의 결과도 많이 발표되어 있는데, Wilfried 등^{15,16}이 발표한 것을 보면 *C. sinensis* 종의 주스에서 nobiletin 함량이 가장 높은 것으로 보아 주스나 과피 모두에서 주성분이 nobiletin임을 알 수 있었다.

다음에 많이 들어있는 성분은 methoxy기가 5개 있는 sinensetin과 tangeretin이었다. 이 두 화합물도 시료에 따라 함량차이가 컸으나 청피에 상당량 포함되어 있는 것으로 나타났다. 이 결과도 Tsuchida^{2,3} 결과와 일치하였다.

오렌지는 *Citrus sinensis*속에 속해있는 과일로써 그 과피에 포함되어있는 polymethoxylated flavonoids는 sinensetin이 가장 많으며 nobiletin, tangeretin의 순서이다.

유자의 학명은 *Citrus junos Sieb.*이고 이 과피에는 아주 미량의 nobiletin과 tangeretin이 포함되어있었다. 이 결과는 Takahashi의 결과와 다른데, 오렌지와 마찬가지로 재배환경과 토양에 따른 차이일 것으로 사료된다.

한국에서 재배한 온주밀감의 학명은 *Citrus unshiu Marc.*이고 주성분은 nobiletin과 tangeretin이었으며 적은 양의 sinensetin이 들어있었다.

자몽은 *Citrus paradisi*종으로 본 실험결과와 Takahashi의 결과가 가장 많이 다른 것으로 나타났다. 본 실험에서는 sinensetin이 주성분으로 나타났으나 Takahashi는 nobiletin으로 보고하였으며, 또 sinensetin의 함량과 tangeretin의 함량도 많은 차이가 났다.

지각은 Citrus속이 아니고 *Poncirus*속으로 분류하지만 옛부터 Citrus속 식물과 같이 취급하였으며, 여기에도 nobiletin과 tangeretin이 약간 함유된 것으로 나타났다.

3.2.2 재배 기간별 methoxylated flavonoids 함량

밀감이 어느 정도의 크기로 성숙된 시기인 8월부터, 과피의 색이 완전히 변한 10월 말까지 약 10일 간격으로 시료를 채취하여 분석한 methoxylated flavonoids 함량의 분석결과를 Table 5에 나타내었다.

Sinensetin의 경우 검출된 flavonoids 중에 가장 적은 양을 함유하고 있었으며 성숙과정 중의 변화도 별로 없는 것으로 나타났다.

Nobiletin은 청피의 주성분으로 되어있으며 9월 20일까지는 증가하였으나 그 이후로 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 Takahashi 등^{2,3}의 결과와 비슷한 경향

을 보였는데, 일본의 경우 *C. unshiu*는 10월 1일까지는 *nobiletin*의 양이 증가하다가 12월 1일 측정했을 때 급격히 줄어들었으며, *C. reticulata*의 경우는 8월 18일 까지 증가하다가 10월 1일부터는 감소하는 것으로 나타났다. 날짜의 차이는 있지만 *nobiletin*의 경우 성숙초기에는 증가하다가 일정기간이 지나면 감소하는 경향은 본 실험결과와 일치하였다.

Table 5. Amount of methoxylated flavonoids of immature peels of *Citrus unshiu*(*Chungpi*) during the maturity

Date of collection	Compound		
	Sinensetin	Nobiletin	Tangeretin
Aug. 24	6.94	64.0	37.6
Sep. 10	11.4	95.5	60.3
Sep. 20	13.3	109.8	50.3
Sep. 30	7.54	61.6	44.2
Oct. 10	14.7	78.2	69.6
Oct. 20	6.68	39.0	36.2
Oct. 30	10.7	44.8	10.8

*Tangeretin*는 *nobiletin*과 마찬가지로 측정 초기에는 증가하다가 10월 10일이 지나면서 줄어들었다. 이 경우도 품종간의 차이는 있지만 성숙정도에 따라 처음에는 증가하다가 감소하는 *Takahashi*의 결과와 일치하였다.

이와 같은 결과로 볼 때 *Citrus* 과피의 모든 methoxylated flavonoids는 과피의 색이 청색일 때 가장 많은 양을 함유하였고, 성숙되어 과피색이 변화함에 따라 methoxylated flavonoids의 함량도 줄어들었다.

4. 결 론

청피와 *Citrus* 속 과일에 함유된 methoxylated flavonoids (*sinensetin*, *nobiletin*, *tangeretin*)를 Prep-HPLC와 고성능 NMR방법으로 분리하고 확인하였다.

Methoxylated flavonoids는 청피에 가장 많이 들어 있었으며, 밀감, 오렌지, 자몽 등에도 상당량 함유되었다. 청피, 밀감, 자몽, 그리고 지각은 *nobiletin*, *sinensetin*, *tangeretin*의 순으로 많이 함유하였다. 영귤의 경우에는 methoxylated flavonoids를 전혀 함유하지 않았다.

한국산 밀감에서 재배시기별 methoxylated flavonoids 함량은 다소 차이는 있지만 성숙도에 따라 10월 중순까지 증가하였으나, 그 이후 점차 줄어드는 경향을 보였다.

References

- 1) T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, N. Hitomi, N. Kosaka, E. Shikano, M. Okada, K. Komatsu and T. Namba, *Natural Medicines*, **50**, 114 (1966)
- 2) 왕육생, “중약 약리와 응용”, 인민위생출판사, 1155 (1984)
- 3) T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, N. Hitomi, N. Kosaka, M. Okada, K. Komatsu and T. Namba, *Natural Medicines*, **51**, 205 (1967)
- 4) 한국생약학교수협의회, “본초학”, 서울, 428 (1995)
- 5) 신민교, “원색임상본초학”, 서울남산당, 380 (1986).
- 6) H. G. Yun, D. H. Kim, N. J. Kim and N. D. Hong, *J. Pharm. Soc. Korea*, **36**, 548 (1992).
- 7) J. S. Yu, H. W. Seo, D. K. Song, Y. H. Kim and J. S. Jung, *J. Biopharm*, **26**, 355 (1995)
- 8) Y. T. Chun and U. Sankawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 314 (1989)
- 9) C. Ho, E. J. Choi, G. S. Yoo, K. M. Kim, and S. Y. Ryu, *Planta Med.*, **64**, 577 (1998)
- 10) J. Y. Yum, J. S. Eun, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 173 (1998)
- 11) J. S. Eun, D. K. Kim, J. N. So and O. P. Zee, *J. Pharm. Soc. Korea*, **42**, 567 (1998)
- 12) T. J. Kim, J. S. Rhee and K. M. Lee, *Anal. Sci. & Tech.*, **4**, 191-195(1991)
- 13) T. J. Kim, M. H. Jung and K. B. Lee, *Anal. Sci. & Tech.*, **5**, 96A-113A(1992)
- 14) H. Wagner and V. M. Chari, *Tetrahedron Letters*, **21**, 1799 (1976)
- 15) C. O. Wilfried and C. M. Detavernier, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1633 (1997)
- 16) C. O. Wilfried, J. O. Sigrid, C. M. Detavernier, and A. Huyghebaert, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2183 (1994)