

柑橘屬植物의 成分分類學的 研究

許仁玉* · 高京秀**

A Chemotaxonomic Study on the Citrus Plants

Huh In-ok*, Ko Kyung-soo**

Summary

25th Citrus species and 3rd other species were studied on the composition of their Flavonoid compounds to identify relationships, their taxonomical position and strain of native Citrus. These plant were grouped into 5 alliences based on the quantitative analysis Flavonoids by HPLC, which were nearly identical to the subgenus rank by Tanaka and Huh.

The Flavonoid patterns of HPLC are classified into 5 allience closely related to their mophological system.

序 論

柑橘屬植物의 分類는 A. Gullaumin(1917)이 人爲의 分類方法을 試圖한 以來 田中(1929)가 自然分類法에 의거 A. Engler의 世界植物分科總覽 第2版(1931)에 登載되면서 부터 世界的으로 認定받게 되었다.

田中는 1941년에 28種, 1954年 145種, 1961年 157種을 順次的으로 發表하여 1966년에는 園藝種을 포함하여 2亞屬7區 28亞區로 區分, 159種으로 分類하여 報告하였으며 Swingle(1943)은 2亞屬 16種으로 大別하여 報告하였다.

이들 두 學說은 현재까지도 論爭의 對象이 되고 있으며 Hodgson(1967)에 中間學術을 提唱하여 Swingle의 16種에 田中の 25種을 추가하여 41種으로 報告하였으나 學術的으로 根據가 不足하다 하여 認

定을 받지 못하고 있다.

한편, 柑橘屬植物은 多胚性이어서 突然變異를 일으키기 쉽고 種間 및 屬間交雜으로 인한 變種出現 頻度가 커서 形質이 다른 新種으로 分化하는 特性을 지니고 있어 外部形態만으로는 分類하기 어려운 問題點을 지니고 있다하겠다.

이와같은 특성과 研究者들간에 見解差 그리고 分類方式과 體系를 補完하기 위해서 1966年 國際園藝學會에서는 Chromatography에 의한 成分 分類法 導入에 대해서 檢討하기에 이르렀다.

Citrus屬 植物의 成分分類學的 研究에 대해서는 Kariyon, Matsuno(1954) 및 Keffort(1959)가 Hesperidine群과 Naringine群으로 分類하였으며 Horowitz(1961)는 Neohesperidin群과 Rutioside群으로 나누었고 Pieringer等(1964), Kesterson等(1964) 및 Macleod(1966)는 Citrus屬 植物의 果皮와 葉에서 얻은 種間的 差異를 比較하였다.

* 自然科學大學 敎授 ** 自然科學大學 講師

Nishiura等(1969)은 Citrus屬 植物의 成熟果에 含
 有된 Flavonoid 成分을 檢索하여 Hesperidine群,
 Neohesperidine群, Naringine群, Isonaringine群으
 로 나누었으며, Kamiya와 Esaki(1971)는 Flavonoid
 系 成分組合에 準하여 Rutinoside와 Neohesperidi-
 ne로 大別하고 다시 13個群으로 나누었다. 그의
 Tatum과 Berry(1978)가 fat acid 成分을 相互比較하
 여 外部形態의인 分類方法을 補完한다면 種分類들
 보다 確實히 할 수 있음을 示唆하고 있다.

한편 筆者等은 前報에서(1982) Citrus屬의 代表
 種과 濟州島在來橘等 35種의 果實을 MeOH 可溶性
 成分을 分劃하고 그 組成을 TLC로 檢索하여 이들
 成分間에 의한 種間的 類緣關係를 確認한 바 있으
 며 許, 金(1985)은 Citrus屬 52種과 在來橘 8種의
 葉을 Chloroform으로 抽出하여 GLC(Gas Liquid
 Chromatography)로 檢索하여 種間的 成分相을 檢
 討하였다.

本 實驗에서는 田中, Swingle의 分類體系에 근거
 를 두어 代表中에서 Citrus屬에서 18種, 濟州島在
 來橘 7種 및 金柑屬, Poncirus屬 및 原始柑橘類인
 Sebelinia 屬植物 各 1種의 效果를 供試하여 標品
 Flavonoid를 利用, HPLC(High Performance
 Liquid Chromatography)로 分析하고 種間 및 屬間
 의 類緣關係를 確認하고 成分分類의 妥當성과 현재
 까지 未分類된 濟州島在來橘의 分類上의 位置와 名
 命을 위한 基礎資料로 삼고져 本 實驗을 實施하였
 다.

材料 및 方法

本 實驗에 사용된 Rutaceae科 28種 (Table 1)은
 1987年 6월에 果實을 採取하여 그 果皮을 충분히
 陰乾 시킨다음 細切하여 試料로 하였다.

1) 粗 Flavonoid의 調製

완전히 乾燥된 試料 1g을 Ethylacetate 20ml로
 水浴上에서 2시간 加熱振蕩하여 抽出하고 그 殘渣
 는 같은 方法으로 3회 抽出하였고 全抽出物은 35℃
 에서 減壓濃縮하여 粗 Flavonoid로 하였다.

2) 標品の 調製

標品 Flavone 3종류와 Flavonol 1종류 (Fig. 1)는
 각각 2~3mg을 精密히 달아 10ml 質量 flask에서
 MeOH로 溶解시켜 標準液으로 하였다.

3) 分析試料의 調製

粗 Flavonoid의 分劃은 MeOH 1ml에 녹여 ODS-
 S(TOYOSODA製)에 通過시키고, ODS-S에 1ml
 MeOH로 再抽出하여 얻은 全液을 濃縮한 후, HPLC用
 MeOH 1ml로 溶解시켰다. HPLC에 注入하는 量은
 分析試料로 調製된 粗 Flavonoid의 分劃중 2~10
 μl를 HPLC에 注入하여 定量하였다. (Chart. 1)

4) HPLC의 分析

crushed raw material

extd. with hot AcOEt, 20ml×3
 AcOEt evapd. in vacuo
 added MeOH 2ml

MeOH soln.

purified with ODS-S
 MeOH evapd. in cenf. evaporator
 added MeOH 1ml

crude Flavonoid

Chart 1. Separation of Crude Flavonoid from
Citrus spp

器機는 TOSO의 HPLC를 使用하여 아래와 같은
 條件下에서 實施하였다.

Column : ODS80TM (ID3.9×L250mm)

移動相 : 65% MeOH 流速 : 0.8ml/min

檢出 : Uv 254/nm 感度 : 0.16AUFS

結果 및 考察

Table 1. Sampling sites and dates of the *Citrus* plants examined

Tanaka's	systems (1966)	Species (abbre)	Locality	date
<i>Citrus</i>				Jun. 1987
	<i>Archicitrus</i>			"
		<i>Limonellus</i>	<i>C. aurantifolia</i> (CAU)	Japan
		<i>Citrophorum</i>	<i>C. limon</i> (CLI)	"
			<i>C. medica</i> (CME)	"
		<i>Cephalocitrus</i>	<i>C. grandis</i> (CGR)	"
			<i>C. hatsaku</i> (CHA)	"
		<i>Aurantium</i>	<i>C. aurantium</i> (CAG)	"
			<i>C. natsudaikai</i> (CNA)	"
			<i>C. sulkata</i> (CSU)	"
			<i>C. sinensis</i> (CSI)	"
			<i>C. iyo</i> (CIY)	"
	<i>Natacitrus</i>	<i>Osmocitrus</i>		"
			<i>C. yako</i> (CYS)	"
			<i>C. sudachi</i> (CSU)	"
			<i>C. raritachibana</i> (CKA)	"
		<i>Acrumen</i>	<i>C. unshiu ohungdo</i> (CUS)	"
			<i>hunggin</i> (CHU)	"
			<i>C. tangerin</i> (CTA)	"
			<i>C. tachibana</i> (TAC)	"
			<i>C. kinokuni</i> (CKI)	"
<i>Fortunella</i>				
<i>Poncirus</i>			<i>F. japonica</i> (FJA)	"
<i>Seberenia</i>			<i>P. trifoliata</i> (PTR)	"
<i>Native</i>			<i>seberenia</i> (SEB)	"
			<i>C. * sankyul</i> (CSA)	Cheju
			<i>C. * dangjingkyul</i> (CDN)	"
			<i>C. * flatymoma</i> (CPL)	"
			<i>C. * junos</i> (CJU)	"
			<i>C. * chungkyul</i> (CCH)	"
			<i>C. * dangkyul</i> (CDA)	"
			<i>C. * farantium</i> (CFA)	"

필자등은 前報(1982, 1985)에서 Flavonoid系列이 Citrus屬 植物分類의 指標物質로서 적용가능한 것으로 檢討한 바 있으며, 本 實驗에서는 Flavone 3 種類와 Flavonol 1種類(Fig.1)을 재료물질로 하여 HPLC로 定量함으로서 Rutaceace科의 屬間 및 種間的 相互關係를 比較檢討하였다.

標品으로 供試된 Flavone 3種과 Flavonol 1種의

HPLC에 의해 분리된 Chromatogram은 Fig.3이고, Citrus屬 植物에서 抽出된 Flavonoid 含有층에서의 Chromatogram은 Fig.4과 같다.

標品 A는 전술된 조건하에서 22分, B는 11分, C는 19分과 D는 18分대에서 용이하게 분리되었고, 이들 標品の calibration curve를 작성한 결과는 Fig.2와 같다. 이를 토대로하여 供試된 Citrus屬植物

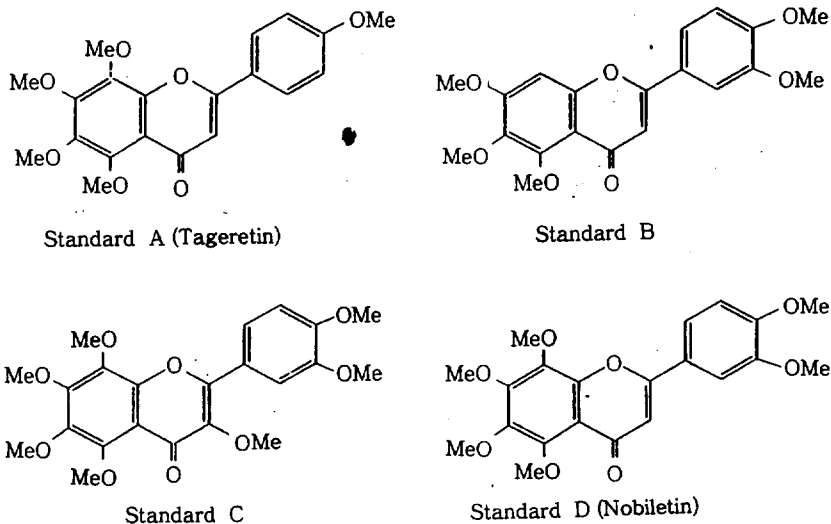


Fig. 1. Standard of Flavonoids.

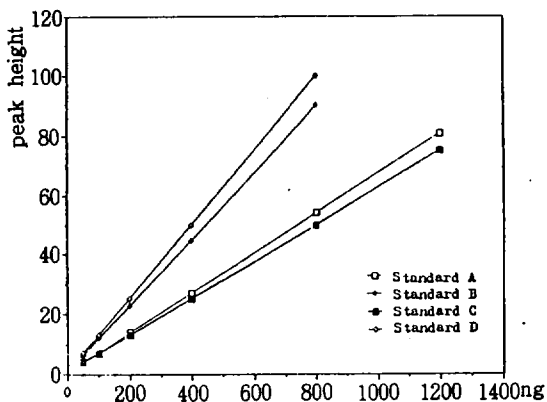


Fig. 2. Calibration Curve of Flavonoids

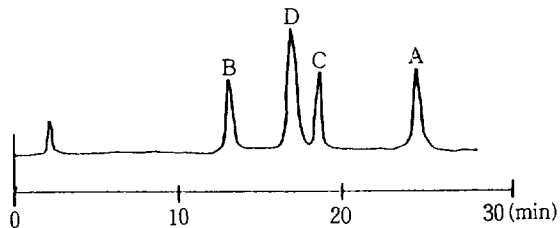


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard flavonoids

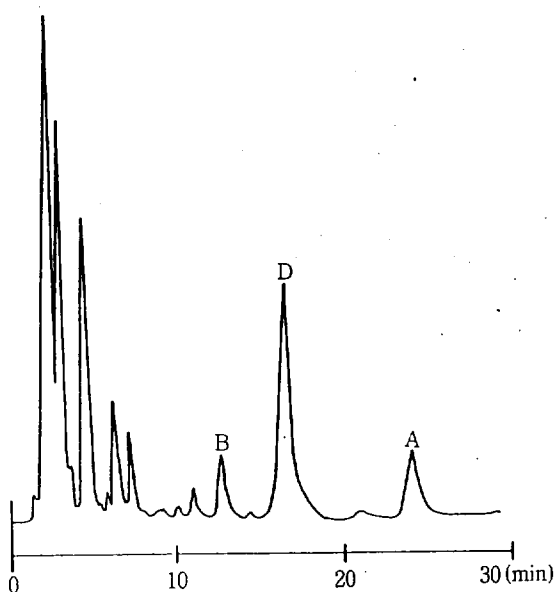


Fig. 4. HPLC chromatogram of EtOAc fraction in the *Citrus canaliculata*.

25種과 유연속인 Fortunella, Poncirus 및 Seberenia에 함유된 Flavonoid의 種類別 含量은 Table 2에

서처럼, 4종의 Flavonoid系 物質이 거의 檢出되지 않은 Poncirus Fortunella, Seberenia屬과 Citrus屬에서 *C. lime*, *C. limon*, *C. sudachi*이고, 30ng/sample 1g 이하로 소량 檢출된 것은 *C. grandis*, *C. hatsaku*, *C. medica*, *C. yaku*였다. 또한, Flavonoid中 Flavonol의 含量은 Archicitrus에서 주

Table 2. Contents of flavonoids in *Citrus spp.*

Sample	Contents of flavonoids (ng/Dried sample 1g)				Total
	Standard A	Standard C	Standard C	Standard D	
<i>C. aurantifolia</i>	0	0	0	0	0
<i>C. limon</i>	0	0	0	0	0
<i>C. medica</i>	4	10	8	1	25
<i>C. grandis</i>	9	0	0	14	21
<i>C. hatszaku</i>	4	0	21	4	29
<i>C. aurantium</i>	21	15	0	147	184
<i>C. natsudaidai</i>	59	0	8	30	97
<i>C. sulcata</i>	29	0	83	22	134
<i>C. sinensis</i>	17	94	34	99	244
<i>C. iyo</i>	35	17	66	115	233
<i>C. yako</i>	0	4	15	0	19
<i>C. sudachi</i>	0	0	0	0	0
<i>C. karaitachibana</i>	236	292	0	292	820
<i>C. unshiu hunggin</i>	14	10	21	31	72
<i> chungdo</i>	17	29	57	44	147
<i>C. tangerin</i>	700	60	0	700	1460
<i>C. tachibana</i>	443	133	0	913	1489
<i>C. kinokuni</i>	590	89	9	673	830
<i>F. crassifolia</i>	0	2	0	43	45
<i>P. trifoliata</i>	0	0	0	0	0
<i>seberenia</i>	0	0	0	0	0
<i>C. * Sankyul</i>	133	7	0	65	205
<i>C. * Dangjungkyul</i>	26	2	0	23	51
<i>C. * Platymoma</i>	317	27	0	382	726
<i>C. * Junos</i>	59	6	0	113	176
<i>C. * Chungkyul</i>	29	10	0	71	110
<i>C. * Dangjuja</i>	82	11	5	140	238
<i>C. * Farantium</i>	20	2	0	37	59

로 檢出되었으며 Metacitrus中 *C. unshiu*와 *C. kinokuni*에서 檢出되었다.

제주도 재래감귤중에서는 *C. sankyul*, *C. dangjungkyul*, *C. chungkyul* 및 *C. aurantium*이 Metacitrus와 같이 flavonol이 없고 Flavone의 함량이 50ng 이상 검출되었으며 *C. dangjuja*가 Archicitrus와 같이 flavonol을 함유하는 형상을 보였다.

이상의 結果를 군간의 특징과 외부형태학적인 분류체계를 비교하여 고찰해 보면 다음과 같다.

1) *C. daidai*, *C. natsudaidai*, *C. iyo*, *C. sulcata*, *C. sinensis*군.

이 군은 Flavonoid의 함량이 100~250ng을 함유하며, 特히 Flavonol을 10~70ng 함유하는 group으로서 田中(1966)의 Aurantium절에 속하며, Swingle (1943)은 Aurantium hybrid로 나누는 種으로서 金과 許(1985)의 결과와 일치하였다.

2) *C. kinokuni*, *C. platymoma*, *C. tangerin*, *C. tachibana*, *C. kakai tachibana*군.

이 군은 Flavonoid의 함량이 700~1500ng 함유하는 group으로서 田中(1965)가 Metacitrus中 Acrumen절에 속하며, Swingle(1943)이 "reticulite cloue"로 分類한 種들이다. 이는 金과 許(1985), 高等(1982)의 成分分類에서의 같은 group으로 한 점과 본 결과는 일치하였다.

2) *C. unshiu*의 정도와 흥진은 金과 許(1985)가 CHCl₃ 분획에서 60%의 수준에서 유연관계를 보고하였고, 본 結果에서도 Flavonoid의 Total 含量이 80ng과 150ng이고 그중 Flavonol의 분포하는 점등이 매우 유사하게 보였으며 특히 Metacitrus中 Os-mocitrus의 Euosmocitrus 아절과 Pseudoacrumen으로 구분하는 田中(1965)와는 일치하는 점이였다.

4) 제주도 재래귤의 分類에 대해서는 田中(1966)

과 병귤은 *C. Platymama*로 유자는 *C. junos*, 지각은 *C. auratium*, 그리고 산귤은 *C. tachibana*로 명명하고 있으나 동정귤(Dongjungkual), 청귤(chungkyul) 및 당유자(Dongyaja)는 아직 分類되지 않고 있다.

田中(1924)과 *C. tachibana*로 보고한 제주도 산귤은 과실의 중량이 30g인데 비해 6g으로 기재되어 있는 점과 같이 外部形態學的으로 다름은 前報에서 許(1978), 金과 許(1979)가 보고한 바 있다.

本 實驗의 結果에서는 *C. tachibana*가 총 Flavonoid 含量이 1489ng인데 비해 *C. sankyul*은 205ng인 점은 전술한 田中の 分類와는 다르며 또한 *C. nipokoreana*가 총 Flavonoid 含量이 820ng인 점등으로 보아 *C. sankyul*은 *C. nipokoreana*와 유사하며 *C. tachibana*와는 조금은 먼 관계에 있는 것으로 보였다(Table 3.).

Table 3. Contents of Flavonoids in *Citrus spp.*

Sample	Contents of Flavonoids (ng/Dried sample 1g)				
	Standard A	Standard C	Standard C	Standard D	Total
<i>C. nipokoreana</i>	236	296	0	292	820
<i>C. tachibana</i>	443	133	0	913	1489
<i>Sankyul</i>	133	7	0	65	205

*C. junos*에 대해서는 Swingle과 田中가 分類상의 견해를 달리하고 있다. 또한, 田中가 Metacitrus로 分類한 것과는 달리 金과 許(1985)는 성분상의 Pattern으로 Archicitrus의 Aurantium區에 높은 유연관계를 보고하고 있다. 본 結果에서도 총 flavonoid 含量이 *C. junos*가 178ng을 함유하는 것과 *C. daidai*가 83ng의 분포를 보이며 특히 nobilitin 含量에서 유사한 것으로 보아 *C. junos*는 Archicitrus에 속하는 것으로 사료되었다. 또한 명명이 되지 않고 있는 *C. dongjungkyul*, *C. chungkyul*, *C. sankyul* 및 *C. auranticum*은 Flavonoid을 함유하고 있지 않는 점등으로 보아 Metacitrus와 유사하였고, *C. dangyaja*는 Flavonol을 다소 함유하며 총 Flavonoid함량이 240ng인 것으로 보아 Archicitrus의 Pattern과 유사하였다.

5) Citrus屬과 유연속인 Fortunella, Poncirus 및

Seberenia屬 植物은 Flavonoid가 거의 檢出되지 않은 점은 Citrus屬 식물에 비해 10~15배 이하의 수준에서 다름을 시사하여 속간 검색에 중요한 key로서 Flavonoid 定量은 성분분류학적 의미를 갖게 되었다. 또한, Citrus屬 중에서 Archicitrus가 Flavonoid 함량이 적고, 다음으로 Metacitrus가 그 함량이 많은 점등은 他屬間과 유연관계의 검토에 큰 의의가 있다고 하겠다.

그러나 Citrus屬 中에서 과실이 산도가 높은 *C. lime*, *C. limon* 및 *C. sudachi*에서는 거의 檢出되지 않은 점은 예외적이었으나, 이는 Chalcone-Flavone- Isomerase가 산성조건 하에서는 그 효소활성이 저하된다는 보고(Sanwaka, 1989)와 관련성이 있는 것으로 사료된다.

이상과 같이 볼때 Flavone 3종류와 Flavonol 1종류를 지표성분으로 한 성분분류학적 연구는 외부형

태학적 연구보고인 田中の 小種的인 분류나 Swingle의 大種的인 분류체계를 檢討하는데 그 의의가 있다고 思料되며 앞으로 Citrus屬 식물에서 다른 Fl

avonoid의 분포를 검토하여 이들의 각 생합성 경로에 의한 연구가 계속되어야 할 것으로 보인다.

參 考 文 獻

- Britsch, L.W. Heller and H. Grisebach. 1981. *Z. naturforsch.* 36C1 742.
- Hodgson, R.W., 1967. Horticultural varieties of Citrus. I the Citrus Industry, W. Reuther, H. J. Webber and L.D. Batchelor eds. pp.431~488. Univ. Calif. Washington D.c.
- Horowitz, R.N., 1961. Its Biochemistry and Physiology. In the orange, W.B. Sinclair ed. pp.334~372. Univ. Calif. Washington D.C.
- Huh, I.O. and D.L. Kim, 1985. 클로로포름 可溶性 成分에 依한 Citrus屬 植物의 成分 分類學的 研究. 濟州大學校論文集, 20: 113~126.
- 岩政 正男. 1976. 柑橘の品種. 靜柑連.
- Kamiya, S. and S. Esaki, 1971. Recent advances in the chemistry of the Citrus flavonoids. *J. Jap. Soc. Food. Sci.*, 18(1): 38~49.
- Keffore, J. E., 1959. The chemical constituents of Citrus fruits. *Advan. Food. Res.*, 9: 285~372.
- Kesteson, J.W., A.P. Pieringer, G. J. Edwards and R. Hendreckson, 1964. Application of gas liquid chromatography to the Citrus leaf oils for the identification of kinds of Citrus. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 84: 198~199.
- Ko, W.Z., I. O. Huh and C. M. Kim, 1982. 濟州産 柑橘屬 植物의 成分 分類學的 研究. 韓國 植物學會誌. 25: 9~19.
- Kreuzalev, F. and K. Hahlbrock, 1975. *Eur. J. biochem.*, 56: 205.
- Macleod, W. D., W. H. Mcfadden and N. M. Buiques, 1966. Lemon oil analysis. 2. gas liquid chromatography on a temperature programmed long, open-tubular column. *J. Food. Sci.*, 31: 591.
- Nishiura, M., S. esaki, 1969. Flavonoids in Citrus and related genera, Part I. *Biol. Chem.*, 33(8): 1109~1118.
- Pieringer, A. P., G. J. Edwards and R. W. Wolford, 1964. The identification of Citrus species and varieties by instrumental analysis of Citrus leaf oils. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 84: 204.
- Saitoh, T., S. Shibata, U. Sankawa, T. Furuya and S. Ayabe, 1980. *Tett. Lett.*, 4463.
- Sangawa, U., J. Hakamazuga, 1989. *Chem. Pharm. bull.*, 12: 1430~1434.
- Tatum, J. H. and R. E. Berry, 1978. Flavonoids of the Citrus cultivar calamodion and synthetic 2; B-dihydroxy chalcones. *Phytochem.*, 17: 447~449.
- Yuichiro Tanaka, 1948. Iconograph of Japanese Citrus fruits.