
碩士學位論文

HPLC에 의한 柑橘類 FLAVONOIDS
分析法에 관한 研究

濟州大學校 大學院

食品工學科



1994年 12月

HPLC에 의한 柑橘類 FLAVONOIDS 分析法에 관한 研究

指導教授 姜 永 周

李 昌 煥

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

1994年 12月

李昌煥의 工學碩士學位 論文을 認准함.



審査委員長

河 璉 桓

委 員

任 尚 彬

委 員

姜 永 周

濟州大學校 大學院

1994年 12月

**HPLC Analysis of Some Flavonoids
in Citrus Fruits**

Chang-Hwan Lee

(Supervised by professor Yeung-Joo Kang)



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING**

**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND
TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1994. 12.

目 次

Summary	1
I. 緒 論	3
II. 材料 및 方法	6
1. 재료	6
1) 표준품 및 시약	6
2) 감귤시료	7
2. 실험방법	8
1) 장치	8
2) HPLC의 검출과장 선택	8
3) 이동상의 선택	8
4) 표준품의 용해 및 안정성을 위한 용매 선정	10
5) 재현성	10
6) 검량선	11
7) 감귤과피에서 flavonoids의 추출	11
8) 첨가회수율	11
9) 주스의 전처리	11
III. 結果 및 考察	12
1. HPLC의 검출과장 선택	12
2. 이동상의 선택	13

3. 표준품의 용해 및 안정성을 위한 용매 선정	21
4. 재현성	23
5. 검량선	24
6. 감귤과피에서 flavonoids의 추출	24
7. 첨가회수율	28
8. 감귤주스 및 감귤과피 중의 flavonoids 함량	29
IV. 要 約	34
V. 參考文獻	36



Summary

New HPLC method was developed for determination of some flavonoids such as naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, quercitrin, naringenin, hesperetin and apigenin and their contents in citrus juice and citrus peel from citrus varieties grown in Cheju.

Detection was at 280nm and reversed phase μ -Bondapak C-18 column was used. Better resolution among flavonoids was observed in pH 4.0 or less in 50% methanol with acetic acid. Water/methanol/acetic acid as the mobile phase was better than water/acetonitrile/acetic acid. The stability of standard flavonoids solution by solvent was examined in pH 12 adjusted by 1N-sodium hydroxide solution, methanol and 20% n,n-dimethylformamide in methanol (20% DMF), respectively. Flavonoids was more stable in 20% DMF than any other solvents. Standard flavonoids solution was injected three times consecutively and the reproducibility was 0.24 to 3.56%. Correlation coefficient of the calibration curve, with 5, 10, 20, 40 μ l of standard solution, was 0.9946 to 0.9999. The extraction efficiency of hesperidin from citrus peel was evaluated with different extraction method such as reflux, ultra-sonicating method, using three solvents (aqueous solutions with pH12 adjusted by 1N-sodium hydroxide, methanol and 20% DMF), respectively. The reflux for 4 hour in 20% DMF was the most efficient of the tested methods and solvents.

Flavonoids were determined in citrus juice. Naringin was 30.2~68.2mg/100ml in Dangyooja, Natsudaidai and Kinkôji. Hesperidin were 85.6mg/100ml in Sankyool and 18.1mg/100ml in Hungjin and Sanbôkan. Neohesperidin was 10.5~25.3mg/100ml in Dangyooja, Natsudaidai and Kinkôji. Rutin in Navel-orange and Hungjin, and quercitrin in Hungjin and

Meiwae Kumquat, and naringenin in Sudachi were 2.00mg/100ml or less.

Flavonoids were determined in citrus peel. Naringin was 100~110mg/g for Naringin in Dangyooja and Natsudaikai. Hesperidin was 129~242mg/g in Hungjin, Sankyool and Sanbôkan. Neohesperidin was 34.4~87.9mg/g in Sudachi, Dangyooja, Natsudaikai and Kinkôji. Rutin in Sanbôkan, and quercitrin in Iyo and Natsudaikai, and naringenin in Navel-orange, Dangyooja, Natsudaikai and Kinkôji, and hesperetin in Dangyooja, Natsudaikai and Kinkôji were 2.00mg/g or less.



I. 緒 論

제주도의 감귤은 품종도 다양할뿐더러 생산량도 1988년 412,660 M/T에서 1992년 718,700 M/T으로 계속 증가 추세에 있다(제주도, 1993). 이들 감귤류의 주성분으로는 식품학적으로 중요한 당 및 유기산과 생리적으로 중요한 비타민 및 flavonoids가 있다. 감귤류의 flavonoids성분으로는 naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin, hesperetin, narirutin, nobiletin, tangeretin, sinensetin, natsudadain, didymin, poncirin, eriocitrin, 5,7,4'-tri-methoxylated flavone, sudachitin, 5,6,7,4'-tetra-methoxylated flavone, 5'-desmethoxy nobiletin, 4'-methoxylated flavone, 3',4'-di-methoxylated flavone등이 보고되고 있다(Harborne과 Mabry, 1982; 神谷과 江崎, 1971).

Flavonoids는 생리적인면에서 중요한 성분인데 이에 관한 연구로 Matsubara 등(1985)은 온주밀감피의 열수 추출물로부터 혈압을 저하시키는 물질인 narirutin과 rarcissin을 분리하여 이들은 flavonoids 배당체임을 확인하였으며, Iio 등(1984)은 flavonoids가 충치를 예방하는 효과가 있음을 보고하였다. 한과 유(1988)는 감귤피에서 추출한 한국산 천연 naringin의 항균작용을 보고하였으며, Francis등(1989)은 flavonoids가 aflatoxin B1의 돌연변이성을 억제한다고 보고하였다.

한편, flavonoids는 식품학적으로 중요하여 감귤 가공제품에 문제점을 가지고 있다. 특히 감귤과피 flavonoids중 naringin은 쓴 맛을 내므로(Horoitz와 Gentili, 1969) 감귤의 품질저하 원인이 되며, Olson 등(1979)은 naringinase를 이용하여 grape fruit 주스의 쓴 맛을 제거할 수 있다고 보고하였고, Matthews 등(1990)은 styrene-divinylbenzene resin을 사용하여 감귤주스의 limonin과 naringin을 제거할 수 있음을 보고하였다. 감귤류 flavonoids중 또 다른 주요성분으로서 hesperidin은 과육에 함유된 물에 난용성물질로 juice 제조 후 시간 경과에 따라 백탁을 발생시키므로 감귤주스의 품질저하 원인이

된다. 따라서 최근에는 hesperidinase를 사용하여 hesperidin을 용해성이 높은 hesperidin-7-glucoside로 분해하여 백탁을 방지하고 있다(增川 등, 1985).

Flavonoids 분석법으로는 Davis법, 자외부 흡광광도법, 박층크로마토그래피법(Tatum과 Berry, 1973), HPLC법, GC법(Casteele 등, 1976) 등이 있다. Davis법은 간단 신속하고 비용이 저렴하여 총 flavonoids를 대략적으로 정량하는데 적합하나 비선택적인 단점이 있고, 박층크로마토그래피법은 정성 및 정량에 적합하지만 시간이 많이 들며 개개의 성분을 정량하는데 어려움이 있다. 또한 GC법은 trimethyl-silyl(TMS) 유도체화를 시키므로 정밀성이 떨어진 다. 따라서 지금까지 개개의 flavonoids를 정량하는데는 HPLC법이 가장 정확한 방법으로 알려지고 있다(Ting과 Rouseff, 1986).

감귤류중 flavonoids의 HPLC에 의한 분석방법들을 보면, Rouseff(1988)는 오렌지주스와 grapefruit주스를 구별하기 위해서 C-18칼럼과 이동상 water/acetonitrile/acetic acid(79.5/20/0.5, v/v)를 사용하여 narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin을 정량분석하였는데, 이 방법은 hesperetin 및 apigenin을 분석할 수 없는 단점이 있다. Perfetti 등(1988)은 오렌지주스 위화품을 구별하기 위하여 C-18칼럼과 용매로서 0→10분 사이에 20%B→50%B (A: acetic acid/methanol/water = 1/5/94; B: acetic acid/acetonitrile = 1/99) gradient를 사용하여 narirutin, hesperidin, didymin을 정성분석하였는데 이 방법은 carotenoids를 hexane으로 분획한 후 methoxylated flavonoids를 methylene chloride로 재분획하는 전처리 과정때 문에 회수율이 나빠지므로 정량분석에 적용하기가 어렵다. Park 등(1983)은 C-8칼럼과 0→45분 사이에 A→B (A: methanol/acetonitrile/0.5% acetic acid = 5/10/85; B: methanol/0.5% acetic acid = 95/5) gradient를 사용하여 오렌지 과피에서 naringenin-7 β -rutinoside-4'-glucoside, eriocitrin, naringenin-7 β -rutinoside, hesperidin, isosakuranetin-7- β -rutinoside, sinensetin, nobiletin, tangeretin을 분석하였다. 이 방법은 알칼리에서 hesperidin을 추출하고 산으로 재결정하는 과정이 있어서 여러가지 성분을 동시에 정성할 수 있는 장점이 있으나, 산, 알칼리처리에 의하여 정량분석한

결과는 flavonoids가 변화될 가능성이 높다. 增川 등(1985)은 온주밀감 중 hesperidin등의 효소 분해물을 정량하기 위하여 hesperidinase로 처리한 후 hesperidin, narirutin, hesperetin-7-glucoside, naringenin-7-glucoside, hesperetin, naringenin을 정량분석하였는데, flavonoids는 알칼리용액에서 오래 방치하면 분해되므로 표준액 및 검액조제에 NaOH수용액을 사용한 이 방법은 정량분석 결과가 부정확할 소지가 있다.

지금까지 보고된 flavonoid의 HPLC 분석방법들은 유사한 성질의 그룹별로 분석되고 있으며, naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, quercitrin, naringenin, hesperetin, apigenin들을 동시에 분석한 방법은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 감귤류 flavonoids중 다량성분으로 존재하면서 식품학적으로 중요한 naringin, hesperidin, neohesperidin과 미량성분인 rutin, quercitrin, naringenin, hesperetin, apigenin 성분들을 HPLC에 의해서 동시에 정량분석할 수 있는 최적조건을 규명하고, 이 방법에 의해서 제주도산 감귤류 주요품종 11종의 flavonoids를 분석하여 함량을 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 표준품 및 시약

HPLC분석에 사용된 표준품으로서 naringin(GR, N0073), hesperidin(GR, H0049), rutin(GR, R0035), quercitrin(GR, F0013), naringenin(GR, N0072) 및 hesperetin(GR, H0721)은 Tokyo Chemical Ins.(Japan) 제품을, neohesperidin(GR, N-1887)과 apigenin(GR, A-3145)은 Sigma Co. 제품을 사용하였으며, HPLC 분석조건 검토 및 감광류 flavonoids 분석을 위한 표준품의 농도는 Table 1과 같다. 실험에 사용된 methanol, acetonitrile, water는 HPLC용을 사용하였으며, acetic acid, meta-phosphoric acid, n,n-dimethylformamide는 특급을 사용하였다.

Table 1. Concentration of flavonoids for HPLC analysis

Flavonoids	Abbreviations	Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Naringin	(NG)	74
Hesperidin	(HD)	82
Neohesperidin	(NHD)	76
Rutin	(RT)	184
Quercitrin	(QCT)	116
Naringenin	(NGN)	54
Hesperetin	(HT)	46
Apigenin	(AG)	120

2) 감귤시료

제주도산 감귤류중에 생산량이 가장 많은 興津早生温州(*C. unshiu* CV. *OKISTU*), 金橘子(*C. obovoidea* HORT. ex *TAKAHASHI*), 金柑(*Fortunella crassifolia* SINGLE) 등은 서귀포시 도순동에서, 수다찌(*C. sudachi* HORT. ex *SHIRAI*)는 서귀포시 하원동에서, 夏橘(*C. natsudaikai* HAYATA)과 三寶柑(*C. sulcata* HORT. ex *TANAKA*)은 남제주군 남원읍 신예리에서, 네이블 오렌지(*C. sinensis* OSBECK)와 伊豫柑(*C. iyo* HORT. ex *TANAKA*)은 남제주군 안덕면 화순리에서, 酸橘(*C. nippokoreana* TANAKA)은 남제주군 성산읍 삼달리에서, 唐柚子(*C. grandis* OSBECK)는 북제주군 애월읍 남읍리에서, 柚子(*C. junos* SIEB. *TANAKA*)는 서귀포시 하효동에서 채취하였다(Table 2).

Table 2. Sampling regions and scientific name of citrus varieties

Common or Local name		Scientific name*	Sampling regions
Yooja	(YJ)	<i>C. junos</i> SIEB. <i>TANAKA</i>	Hahyo Seogwipo
Iyo	(IY)	<i>C. iyo</i> HORT. ex <i>TANAKA</i>	Hwasun Andeok
Navel Orange	(NO)	<i>C. sinensis</i> OSBECK	Hwasun Andeok
Hungjin	(HJ)	<i>C. unshiu</i> CV. <i>OKISTU</i>	Dosun Seogwipo
Sudachi	(SC)	<i>C. sudachi</i> HORT. ex <i>SHIRAI</i>	Hawon Seogwipo
Meiwa Kumquat	(MK)	<i>Fortunella crassifolia</i> SINGLE	Dosun Seogwipo
Sankyool	(SK)	<i>C. nippokoreana</i> TANAKA	Samdalri Songsan
Dangyooja	(DJ)	<i>C. grandis</i> OSBECK	Napup Aewol
Natsudaikai	(ND)	<i>C. natsudaikai</i> HAYATA	Shinyeeri Namwon
Kinkôji	(KK)	<i>C. obovoidea</i> HORT. ex <i>TAKAHASHI</i>	Dosun Seogwipo
Sanbôkan	(SB)	<i>C. sulcata</i> HORT. ex <i>TANAKA</i>	Shinyeeri Namwon

() abbreviations

* 金(1988); 岩崎(1966)

감귤들은 완전히 익은 것을 산지에서 감귤나무의 동서남북 및 상하의 6방향에서 15~20개를 채취하여 실험에 사용할 때까지 비닐포장하여 7℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 장치

Pump(Waters 510), injector(Waters U6K), μ -Bondapak C₁₈ column (3.9mm I.D. × 300mm L., 10 μ m), turnable absorbance detector(Waters 486), data module(Waters 746), automated gradient controller로 구성된 High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometer(Hewlett Packard 8452A), 원심분리기(Hanil Industrial Co. H50A-8), Ultrasonic(Branson 1210R-DTH) 및 Homogenizer(NIS AM-7)를 사용하였다.

2) HPLC의 검출파장 선택

각각의 표준품을 methanol에 용해하여 200 μ g/ml 용액을 조제한 후 Spectrophotometer로 scanning하여 흡광도가 높은 파장을 선택하였다.

3) 이동상의 선택

이동상의 pH에 따른 flavonoids의 분리효과를 살피기 위하여 50% methanol에 초산을 가하여 각각 pH를 3.5, 4.0, 4.5, 7.0으로 조정하여 이동상으로 하고, 1.5ml/min 유속으로 표준액을 10 μ l 주입하여 분석하였다. 이 예비실험에서의 결과를 바탕으로 모든 이동상 1000ml에 초산 5ml를 첨가하였고, 이동상으로서 acetonitrile/water/acetic acid 및 methanol/water/acetic acid 조성에 대하여 검토하였으며, 이동상의 조성은 Table 3과 같다.

이 실험에서 얻은 결과에 따라 이동상으로 F를 선택하여 Table 4와 같은 HPLC 분석조건을 설정하였다.

Table 3. Composition of HPLC mobile phase

Time(min)	Mobile Phase						
	A	B	C	D	E	F	
0	CH ₃ CN/HAc(1000/5)	20		0		8	
	CH ₃ OH/HAc(1000/5)		40		0		15
	H ₂ O/HAc(1000/5)	80	60	100	100	92	85
15	CH ₃ CN/HAc(1000/5)	20				8	
	CH ₃ OH/HAc(1000/5)		40				15
	H ₂ O/HAc(1000/5)	80	60			92	85
20	CH ₃ CN/HAc(1000/5)	20				15	
	CH ₃ OH/HAc(1000/5)		40				30
	H ₂ O/HAc(1000/5)	80	60			85	70
50	CH ₃ CN/HAc(1000/5)	20		100		30	
	CH ₃ OH/HAc(1000/5)		40		100		60
	H ₂ O/HAc(1000/5)	80	60	0	0	70	40

A,B : Isocratic analysis

C,D : Linear gradient analysis

E,F : Linear gradient analysis from 15 to 50 min

Table 4. Analytical conditions for flavonoids by HPLC

Instrument : Waters Associates HPLC system (Detector Model 486)
 Column : μ -Bondapak C-18 (3.9mm I.D. \times 300mm L., 10 μ m)
 Detector wavelength : 280nm
 Flowrate : 2.0 ml/min
 Injection volume : 10 μ l
 Column Temp. : Room Temp.

Mobile Phase

Time(min)	Methanol/Acetic acid(1000/5)	H ₂ O/Acetic acid(1000/5)
0	15	85
15	15	85
20	30	70
50	60	40

4) 표준품의 용해 및 안정성을 위한 용매선정

표준용액 조제 후 분석시까지의 안정성을 검토하기 위해서 표준품을 1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액 40ml에 용해하고 12.5% meta-phosphoric acid를 가하여 pH 7.6으로 조정된 후 물을 가하여 50ml로 정용하여 Table 1과 같은 농도로 하였다. 한편, 위와 동일한 표준품을 취하여 각각 methanol, 20% DMF(n,n-dimethylformamide와 methanol을 20:80의 부피비로 혼합)에 용해시켜 Table 1과 같은 농도로 하여 표준액으로 하였다. 이 세가지 표준용액을 냉장 저장하면서 0, 4, 24, 60시간 간격으로 Table 4와 같은 조건에서 분석하여 용해가 쉽고 안정성 있는 용매를 선택하였다.

5) 재현성

20% DMF에 용해한 표준액 10 μ l를 HPLC로 3회 분석하여 재현성을 측정하였다.

6) 검량선

20% DMF에 용해한 표준액 5, 10, 20, 40 μ l를 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다.

7) 감귤과피에서 flavonoids의 추출

홍진조생온주를 박피하고 껍질을 가지고 15,000rpm에서 15분간 균질화하고 1g을 취하여 1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액, methanol, 20% DMF를 각각 20ml씩을 가하여 30분, 1, 4, 6, 8시간 초음파진탕 또는 2, 4, 6, 8시간 수욕상 환류추출하였다. 추출액을 냉각한 후 Whatmann no. 1 여과지로 여과하고 동일한 용매로 세척하여 넣어 25ml로 하였다. 이 액을 0.45 μ m filter로 여과하여 분석하였다.

8) 첨가회수율

홍진조생온주의 과피를 균질화한 것 1g을 취하여 표준액 10ml 및 20% DMF 10ml를 가하여 수욕상에서 4시간 환류추출하고 Whatmann no. 1 여과지로 여과하고 20% DMF로 세척한 후 25ml로 정용하였다. 이 액을 0.45 μ m filter로 여과하여 분석하였다.

9) 주스의 전처리

시료를 박피한 후 종실을 제거하고 쥬스기(마마전기)를 사용하여 착즙하고 3000rpm에서 10분 동안 원심분리(Hanil Industrial Co. H50A-8)한 후 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액을 Whatmann no. 1 여과지로 여과한 후 0.45 μ m filter로 여과하여 HPLC로 즉시 분석하였다.

III. 結果 및 考察

1. HPLC의 검출파장 선택

지금까지 보고된 문헌에 의하면 HPLC에 의하여 flavonoids의 분석시 검출파장은 254nm(허와 고, 1990), 280nm(Rouseff, 1988; Perfetti 등, 1988; Velloglu와 Mazza, 1991; Park 등, 1983; Galensa와 Herrmann, 1980; 이 등, 1987; 원 등, 1986), 283nm(增川 등, 1985) 및 313nm(Ting 등, 1979)이었다. 따라서 이들 파장에서 8종의 flavonoids 표준용액(200 μ g/ml)에 대하여 spectrophotometer로 scanning한 결과 흡광도는 Table 5와 같다.

Table 5. Absorbance of several standard flavonoid solutions with different wavelength

	254nm	280nm**	283nm**	313nm
Naringin	0.221	2.178	2.291	0.512
Hesperidin	0.234	2.243	2.345	0.556
Neohesperidin	0.195	2.004	2.114	0.457
Rutin	1.020	2.791	2.534	1.706
Quercitrin	0.620	2.663	2.550	2.017
Naringenin	0.279	2.205	2.364	2.494
Hesperetin	0.236	1.930	2.149	2.499
Apigenin	0.500	2.552	2.604	2.490

** high significance($\alpha=0.01$)

Table 5에서와 같이 quercitrin, naringenin, hesperetin 및 apigenin의 흡광도는 313nm에서 높게 나타났으나 모든 성분에 대해서 280nm 및 283nm에서 흡광도가 높게($\alpha=0.01$) 나타났으며, 254nm에서는 흡광도가 낮게 나타났다. 280nm 및 283nm에서 유의차는 인정되지 않았으나, 280nm 고정파장형 검출기도 사용할 수 있도록 하기 위하여 280nm를 검출파장으로 선택하였다.

2. 이동상의 선택

현재 주로 사용되고 있는 HPLC 역상칼럼에 의한 flavonoids 분석에서는 이동상으로서 water/acetonitrile/acetic acid(Rouseff, 1988; Perfetti 등, 1988), water/methanol/formic acid(Velloglu와 Mazza, 1991), water/acetonitrile/methanol/acetic acid(Park 등, 1983), water/methanol(허와 고, 1990; 원 등, 1986) 및 water/acetonitrile(이 등, 1987)을 사용하고 있다. 따라서 water/methanol/acetic acid 및 water/acetonitrile/acetic acid의 조합에 대하여 검토할 필요가 있다.

pH와 retention time과의 관계로부터 pH가 분리에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. Naringenin과 hesperetin은 pH 4.5 이하에서 분리가 시작되어 pH 4.0 이하에서 완전히 분리가 되었는데 이러한 결과는 이온쌍크로마토그래피의 원리에 의해 분리가 촉진된 것으로 추정된다. 다른 성분들은 pH가 낮을수록 머무름시간이 빨라지는 효과는 있었으나 분리에 영향이 없었다. 이동상에 따른 flavonoids 각 성분들의 머무름 시간은 Table 6과 같고 chromatogram은 Fig. 2~7과 같다. 이동상 A의 경우 rutin 성분의 분리는 잘 되었으나, naringenin과 hesperidin, neohesperidin과 quercitrin이 겹쳐서 나타나며 naringenin, hesperetin 및 apigenin성분의 머무름시간이 너무 길고 피크가 broad해져 정량분석이 곤란하였다. 이동상 B의 경우 neohesperidin, rutin, quercitrin 및 naringenin의 분리는 잘 되었으나, naringenin과 hesperidin이 겹쳐서 나타나며 hesperetin 및 apigenin성분의 머무름시간이 너무 길어졌다. 반면에 이동상 C의 경우는 naringenin과 hesperidin, neohesperidin과 quercitrin, 및 hesperetin과 apigenin의 peak가 겹쳐서 나타났다. 이동상 D의 경우는

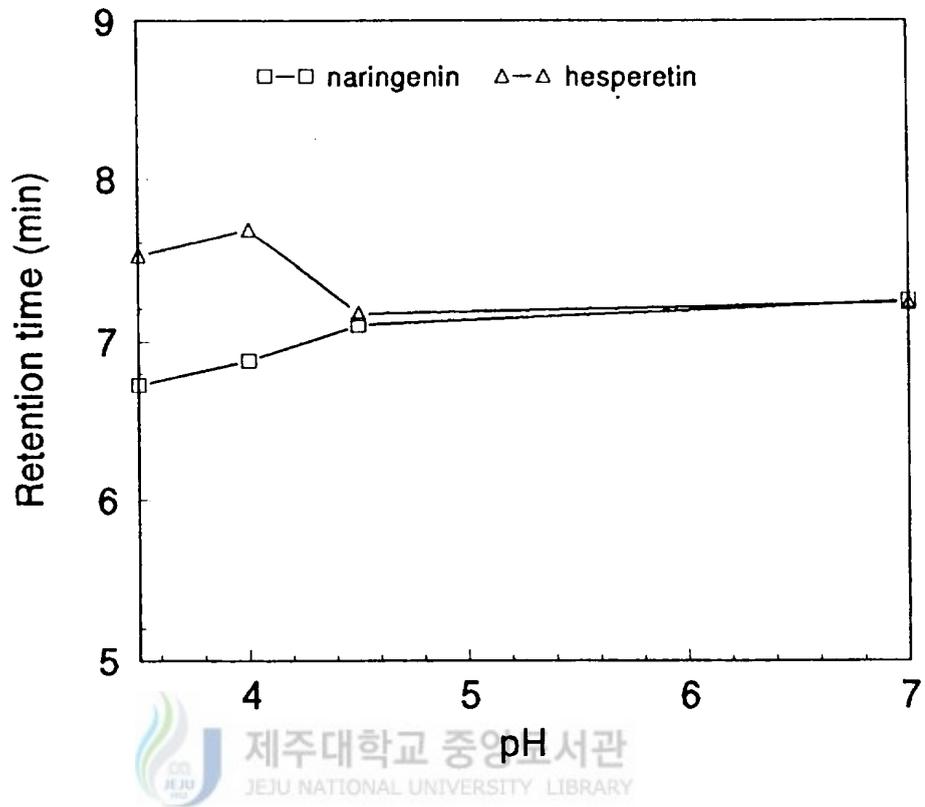


Fig. 1. Retention time of naringenin and hesperetin with pH.

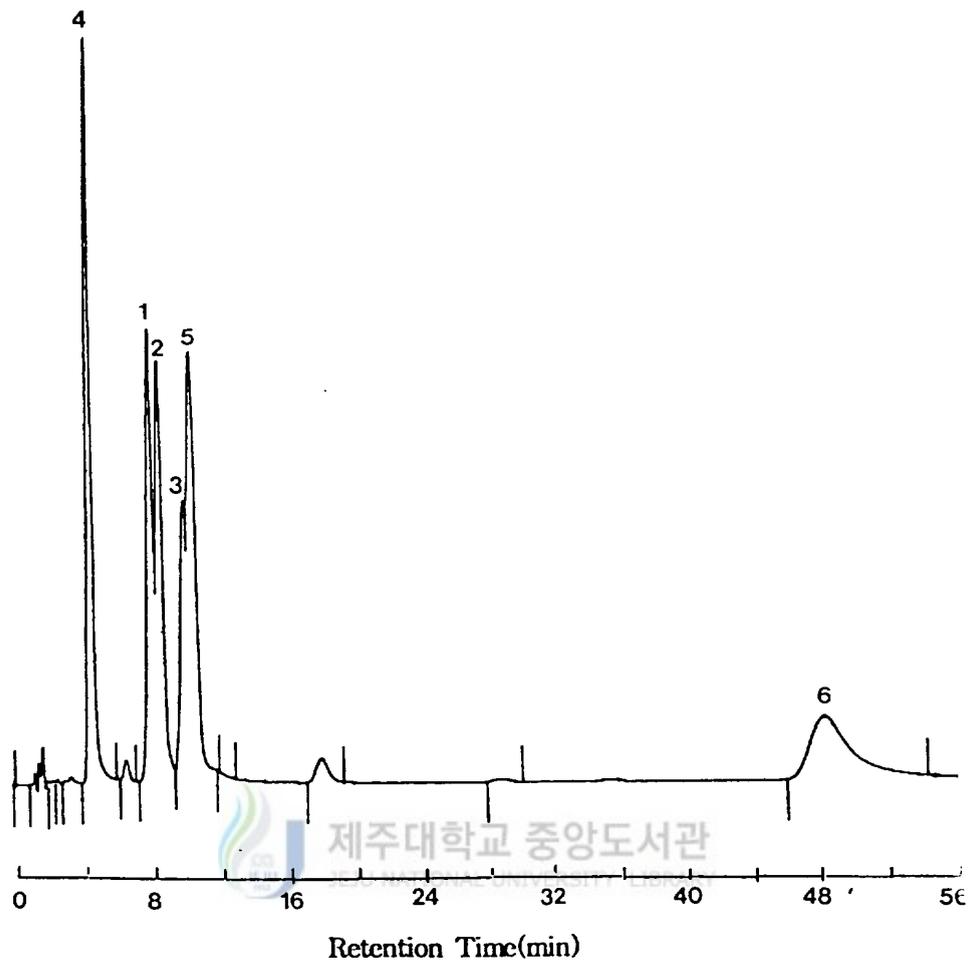


Fig. 2. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase A

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin
5. Quercitrin, 6. Naringenin

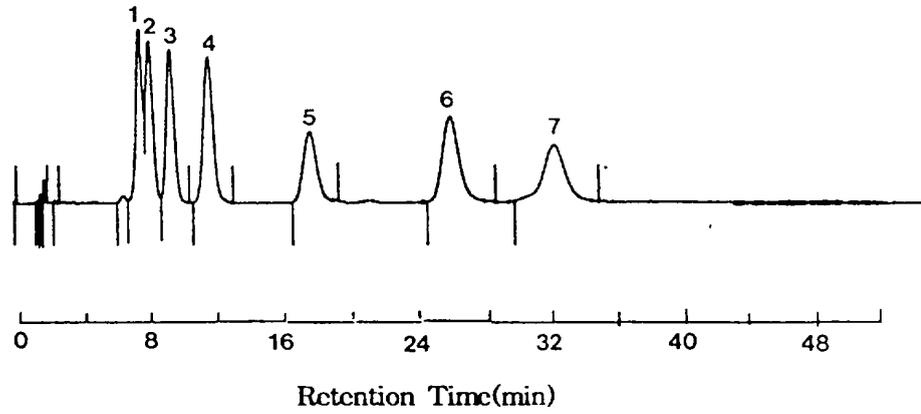


Fig. 3. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase B

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin

5. Quercitrin, 6. Naringenin, 7. Hesperetin





Fig. 4. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase C

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin
5. Quercitrin, 6. Naringenin, 7. Hesperetin, 8. Apigenin

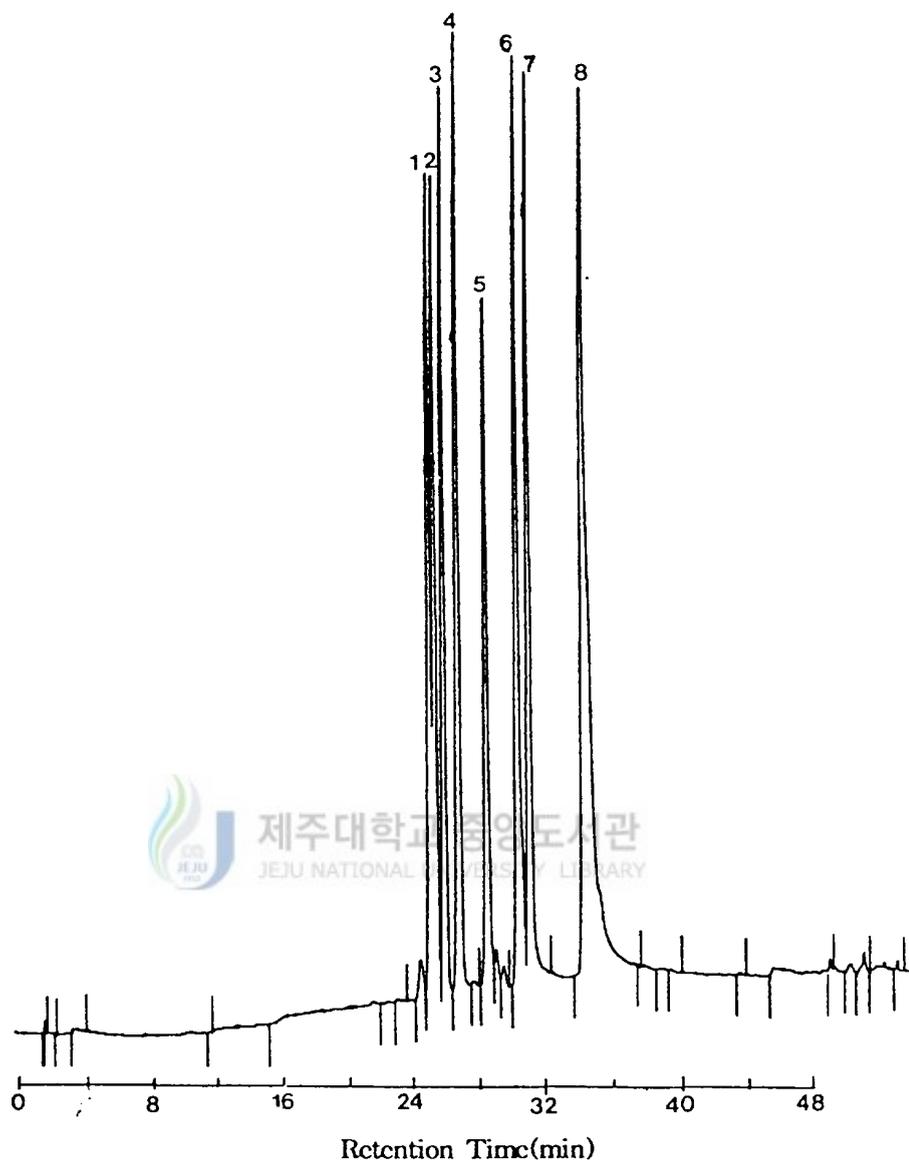


Fig. 5. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase D

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin
5. Quercitrin, 6. Naringenin, 7. Hesperetin, 8. Apigenin

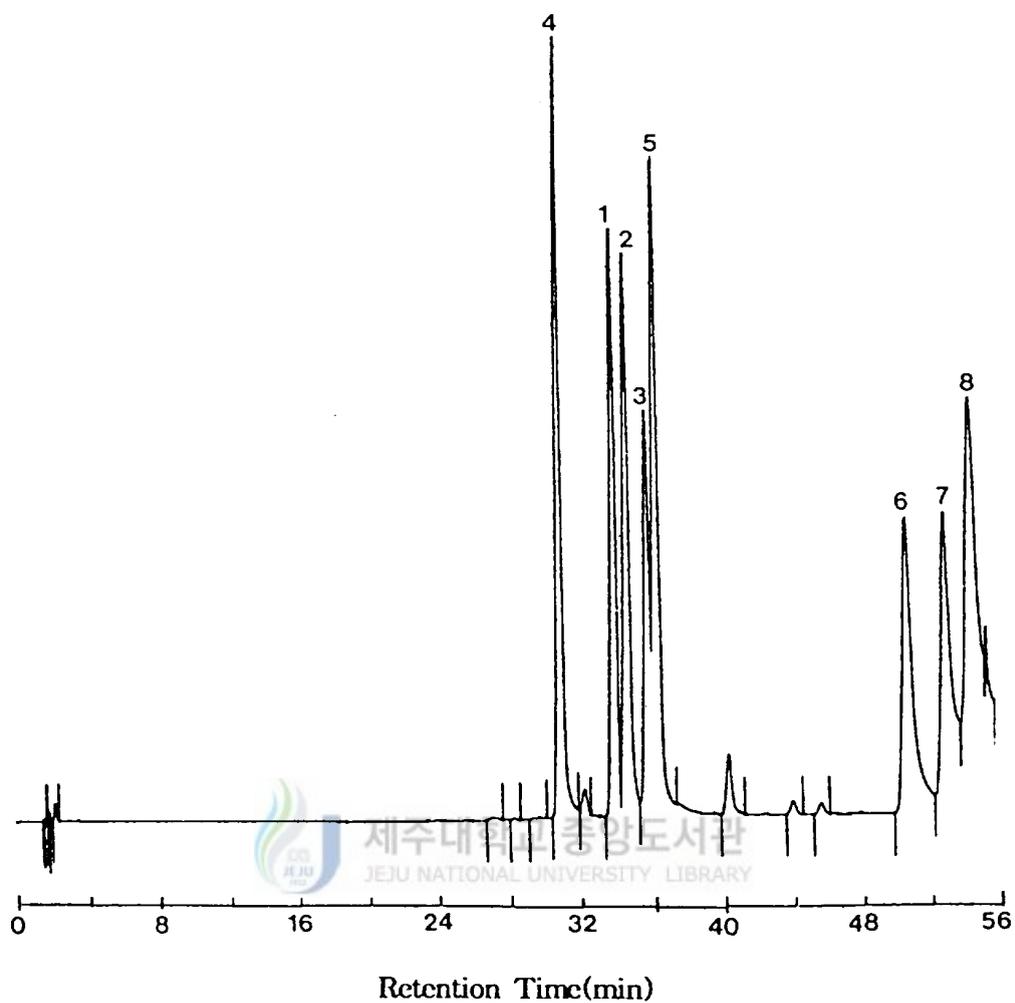


Fig. 6. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase E

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin
5. Quercitrin, 6. Naringenin, 7. Hesperetin, 8. Apigenin

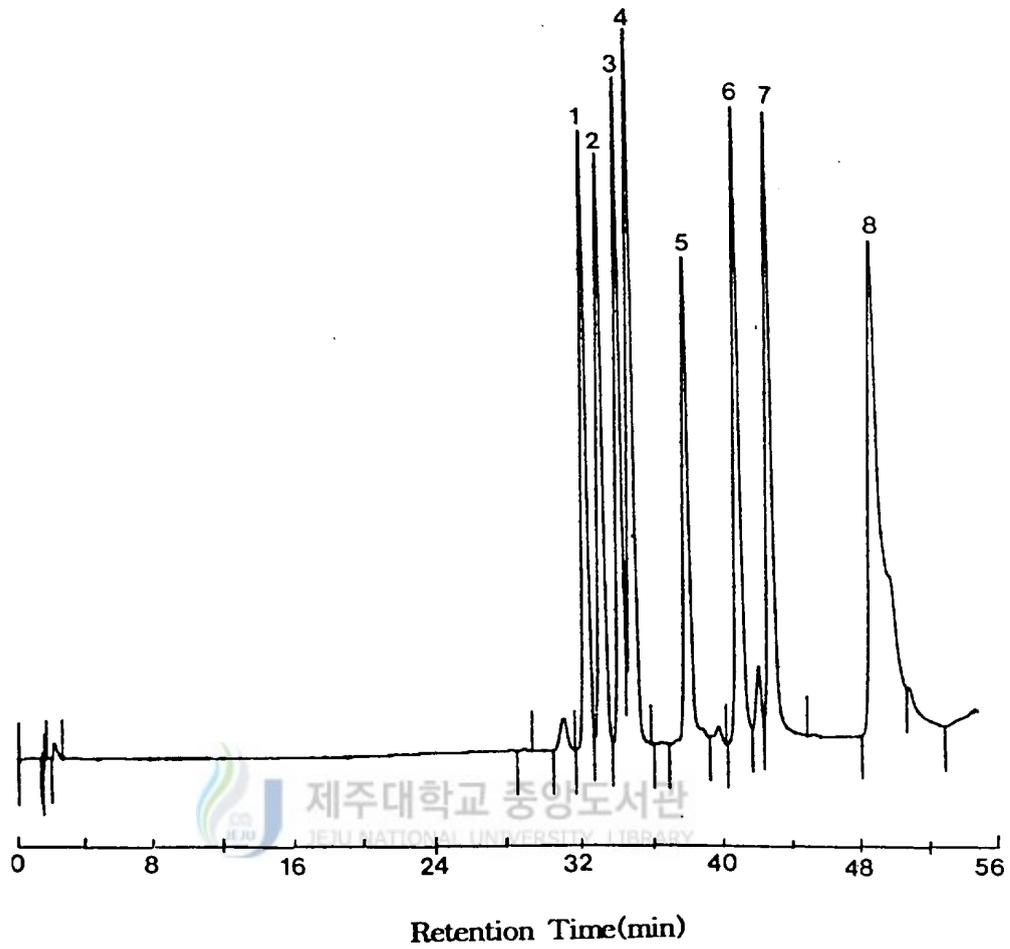


Fig. 7. HPLC chromatogram of flavonoids with mobile phase F

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin, 4. Rutin
5. Quercitrin, 6. Naringenin, 7. Hesperetin, 8. Apigenin

naringin과 hesperidin의 피크가 분리되지 않았으며, 이동상 E를 사용한 경우에는 neohesperidin과 quercitrin의 피크가 분리되지 않았으나 이동상 F를 사용한 경우에는 각 flavonoids 성분들의 분리가 다른 이동상에 비해 우수하게 나타나 본 실험에서 최적 이동상으로 선택하였다.

Table 6. Retention time of flavonoids on six mobile phases

Mobile phase*	Retention time (min)					
	A	B	C	D	E	F
Naringin	8.10	7.69	16.02	25.53	34.03	32.14
Hesperidin	8.65	8.26	16.16	25.87	34.72	33.02
Neohesperidin	10.16	9.48	16.58	26.43	35.81	34.08
Rutin	14.59	11.65	14.83	27.32	31.04	34.72
Quercitrin	10.61	17.73	16.58	29.03	36.31	37.84
Naringenin	48.48	25.95	22.06	30.88	50.52	40.83
Hesperetin	-	32.27	22.59	31.57	52.81	42.72
Apigenin	-	-	22.59	34.78	54.32	48.72

* : See Table 3 for the names of mobile phases

- : Not detected until 55 min

3. 표준품의 용해 및 안정성을 위한 용매선정

표준품을 1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액, methanol 및 20% DMF에 각각 용해하여 0, 4, 24, 60시간 후 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. Naringin, hesperidin, neohesperidin, quercitrin, naringenin, hesperetin은 모든 용매에서 시간경과에 따른 함량변화가 95~105% 범위로 안정하였다.

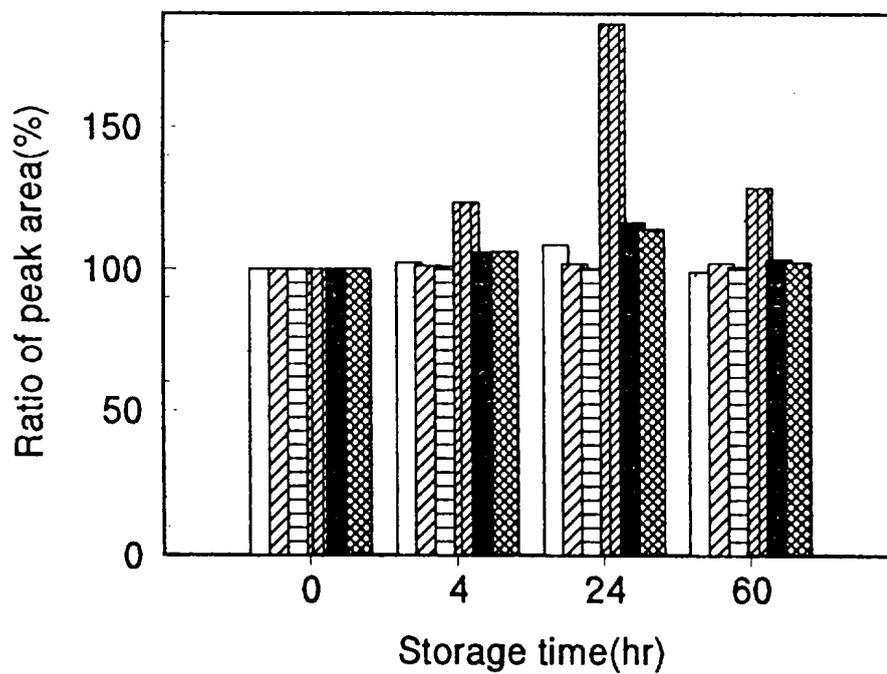


Fig. 8. Ratio of peak area for flavonoids in different solvents with storage time

- RT in NaOH solution
- RT in methanol
- RT in 20% DMF
- AG in NaOH solution
- AG in methanol
- AG in 20% DMF

Rutin은 methanol과 20% DMF에서 안정하였으나 NaOH수용액에서 불안정하여 증가하다가 감소하는 경향을 보였으며, apigenin은 모든 용매에서 급격히 증가 후 감소하는 경향을 보여 매우 불안정하였으며, NaOH수용액, methanol, 20% DMF의 순서로 불안정하였다. 전체적으로 볼 때 20% DMF, methanol, NaOH수용액의 순서로 안정성이 우수하였으며, NaOH수용액에서는 용해가 용이한 반면에 분해가 쉬워 분해물질로 추정되는 물질이 검출되었다. 이는 알칼리수용액에서 분해한다는 Horowitz와 Gentili(1969)의 보고와 일치하였다. 따라서 표준용액은 20% DMF에 용해하여 사용하였다.

4. 재현성

20% DMF에 용해한 표준액 10 μ l를 3회 분석한 결과는 Table 7과 같다.

Table 7. Reproducibility of peak area and retention time in flavonoids analysis

	Peak area		Retention time(min)	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
Naringin	1197957	0.26	32.14	0.14
Hesperidin	1264464	0.32	33.02	0.11
Neohesperidin	1322857	0.39	34.08	0.12
Rutin	1571250	0.36	34.72	0.13
Quercitrin	1164247	0.24	37.84	0.11
Naringenin	1453688	0.40	40.83	0.09
Hesperetin	1448621	0.54	42.72	0.06
Apigenin	2686304	3.56	48.72	0.04

Table 7에서와 같이 peak area의 상대표준편차(RSD)는 quercitrin 0.24%에서 apigenin 3.56% 범위로 나타났으며, 머무름시간의 상대표준편차는 apigenin 0.04%에서 naringin 0.14% 범위로서 양호한 결과를 나타내었다. Rouseff(1988)는 peak area의 상대표준편차가 naringin 0.47~1.06%, neohesperidin 0.40~1.27%의 범위이고 머무름시간의 상대표준편차가 naringin 0.27~1.08%, neohesperidin 0.034~0.92%의 범위라고 보고하였는데, 본 실험에서는 peak area의 상대표준편차가 naringin 0.26%, neohesperidin 0.39%이었고 머무름시간의 상대표준편차가 naringin 0.14%, neohesperidin 0.12%로 나타나 재현성이 우수하였다. 그러나 apigenin에서 peak area의 상대표준편차는 3.56%로서 가장 재현성이 나쁘게 나타났는데, 이는 위의 표준용액 안정성과도 일치하는 것으로 apigenin의 불안정성 때문으로 생각된다.

5. 검량선

20% DMF에 용해한 표준액 5, 10, 20, 40 μ l를 HPLC로 분석한 검량선은 Fig. 9와 10과 같다. 검량선의 상관계수(R)는 0.9946~0.9999범위로서 Rouseff(1988)가 보고한 0.999와 비슷한 결과를 나타내었다.

6. 감귤과피에서 flavonoids의 추출

시료로부터 flavonoids를 추출하는데는 NaOH수용액(增川 등, 1985; 이 등, 1987; Ting 등, 1979) 또는 methanol(Perfetti 등, 1988; Velloglu와 Mazza, 1991; 원 등, 1986)을 사용하여 진탕추출을 하거나 수욕상 환류 추출을 하고 있다. Methanol의 경우는 hesperidin의 용해도가 낮은 문제가 있고, NaOH수용액은 flavonoids의 분해 가능성이 있다.

홍진조생온주 과피를 시료로 하고, 1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액, methanol 및 20% DMF를 추출 용매로하여 0.5, 1, 4, 6, 8시간 초음파 진탕 또는 2, 4, 6, 8시간 수욕상 환류추출을 한 결과는 Fig. 11과 같다. 그림에서와 같이 초음파진탕 보다는 수욕상 환류추출이 우수하였으며, 추출용매로서는

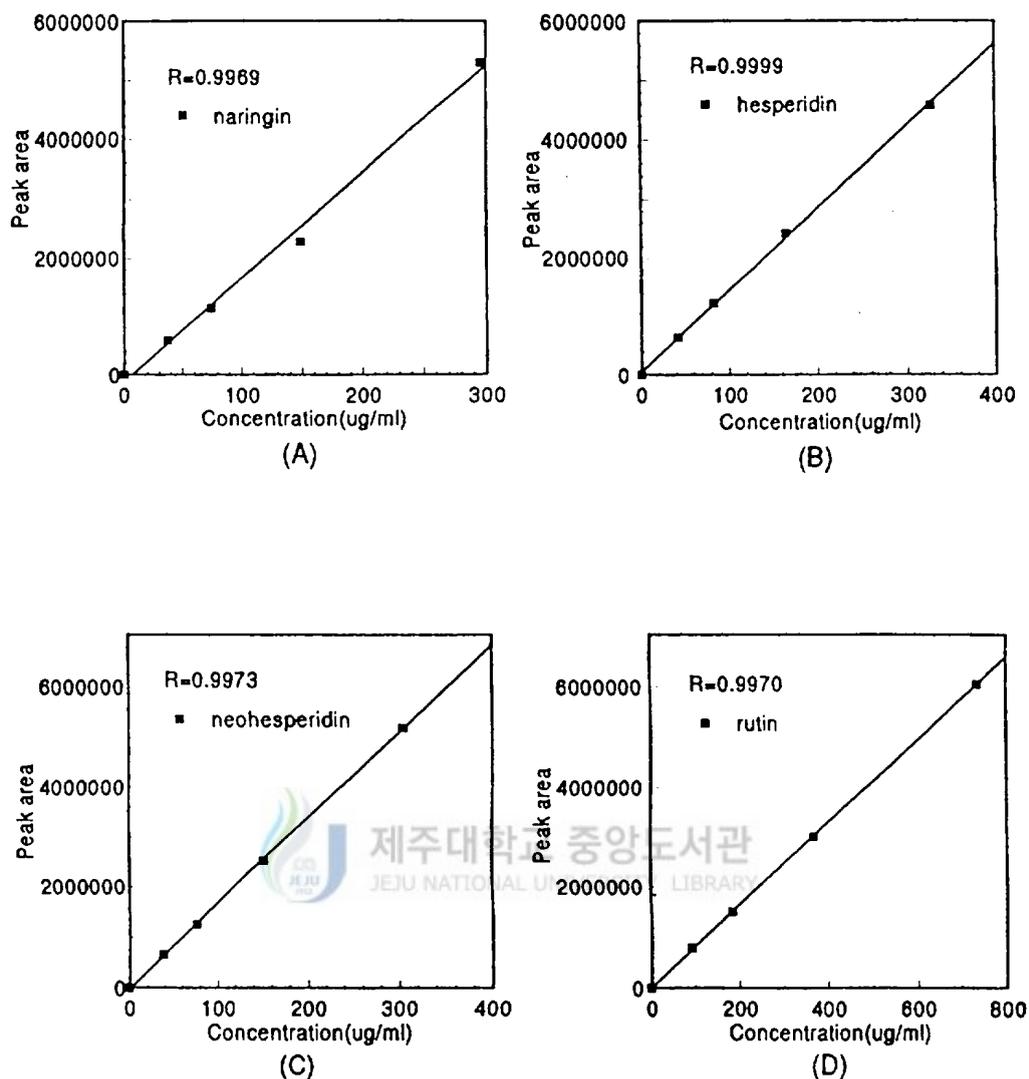


Fig. 9. Standard curves for naringin(A), hesperidin(B), neohesperidin(C) and rutin(D) by HPLC

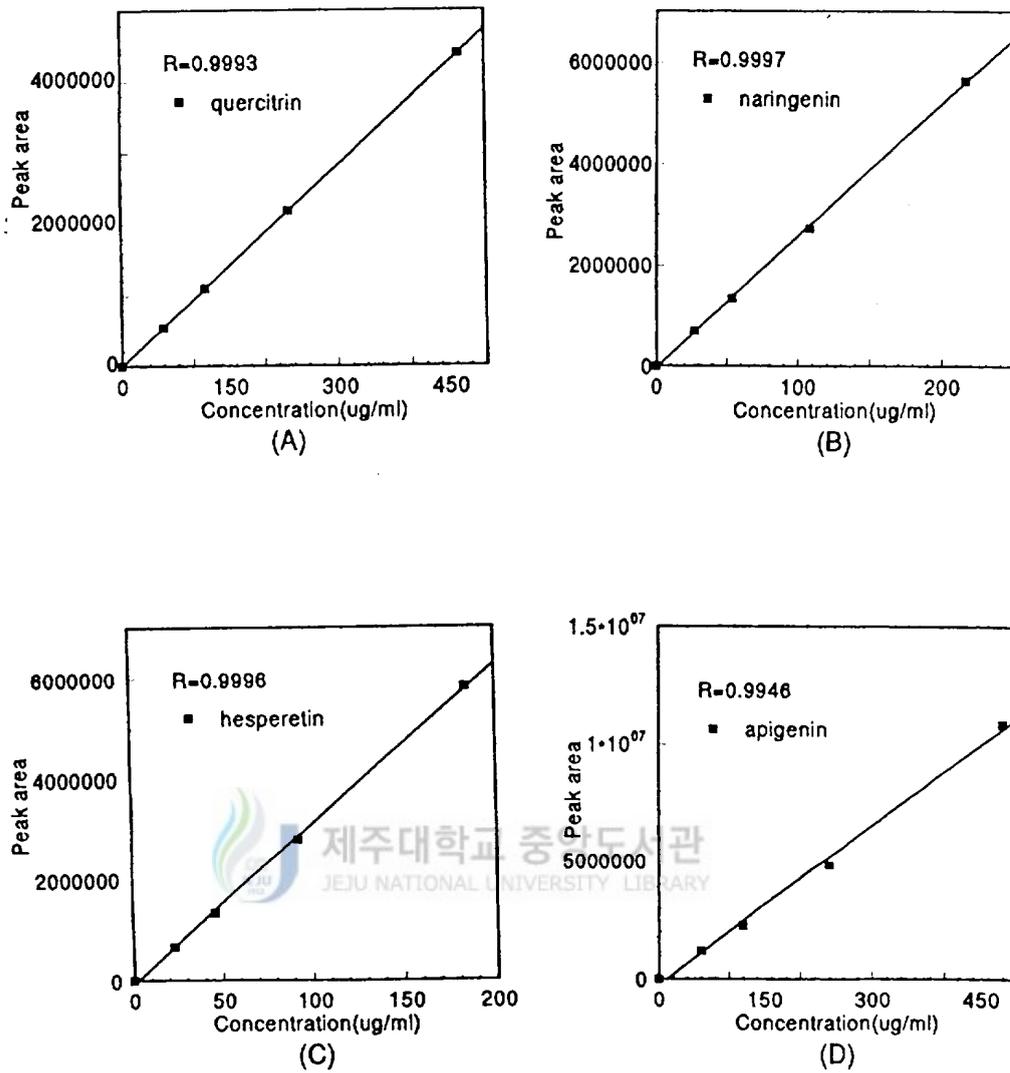


Fig. 10. Standard curves for quercitrin(A), naringenin(B), hesperetin(C) and apigenin(D) by HPLC

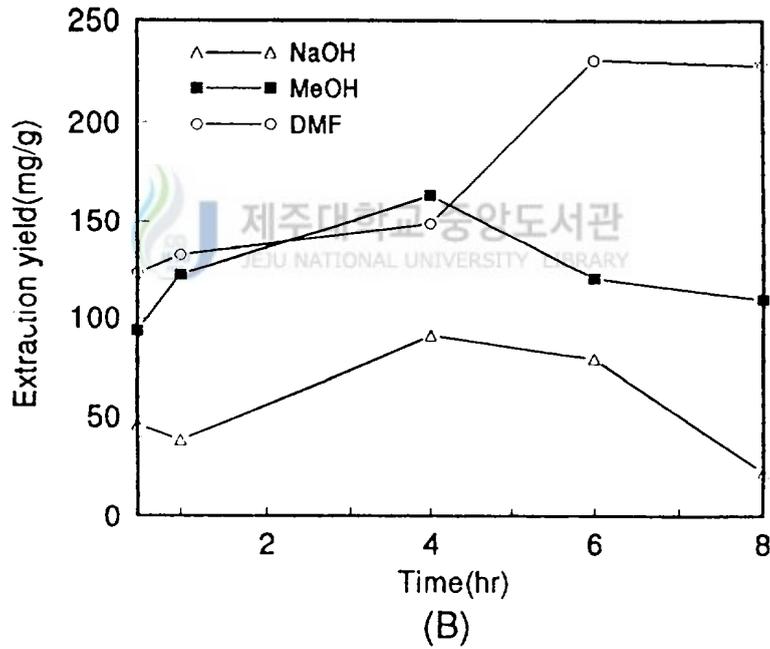
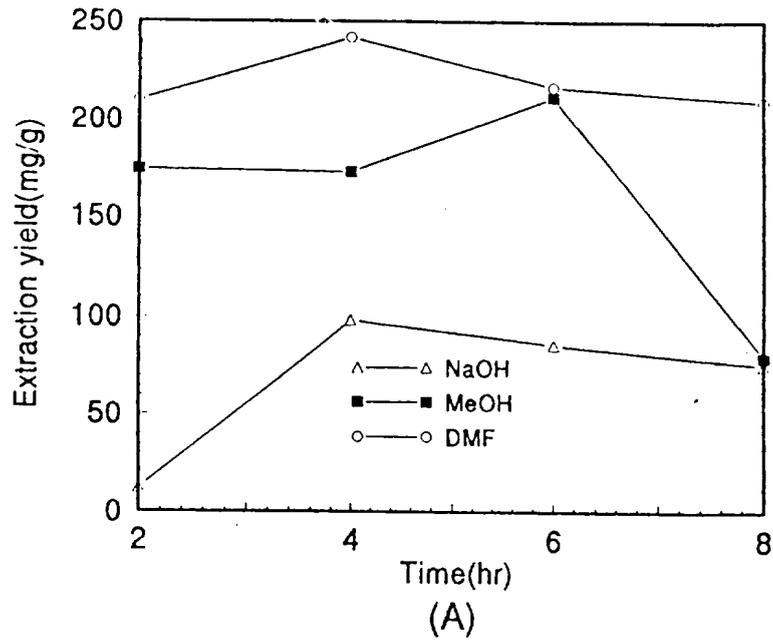


Fig. 11. Extraction yield of hesperidin in citrus peel by refluxing(A) and sonicating extraction(B)

1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액보다는 methanol이 우수하였고 methanol보다는 20% DMF가 우수하였다. 시간별로는 20% DMF에서는 4시간 환류추출한 경우에, 1N-NaOH로 pH 12로 조정된 수용액에서는 4시간 환류추출한 경우가 각각 추출효율이 우수하였다. Methanol에서는 6시간 환류추출한 경우에 추출효율이 가장 우수하여 원 등(1986)의 보고와 일치하였으나, 20% DMF에서 4시간 환류추출한 경우가 추출효율이 더 우수하였다. 따라서 본 실험에서는 안정성이 우수한 물론 추출효율이 높은 20% DMF에서 4시간 추출한 결과를 선택하였다.

7. 첨가회수율

홍진조생온주 과피를 시료로 하여 첨가회수율을 측정된 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Recovery of flavonoids extracted from citrus peel by reflux

	added(μg)	recovered(μg)	recovery(mean \pm SD %)
naringin	580	473.6	85.7 \pm 2.49
hesperidin	700	637.7	91.1 \pm 5.28
neohesperidin	660	622.8	94.4 \pm 4.54
rutin	144	133.9	93.0 \pm 6.06
quercitrin	800	1066	130.0 \pm 14.7
naringenin	440	359.0	85.6 \pm 2.60
hesperetin	440	474.2	107.8 \pm 1.29
apigenin	880	686.4	78.0 \pm 7.11

회수율은 78.0~130.0%이었으며, quercitrin과 apigenin을 제외하면 회수율이 85.0~110.0%범위로 우수하였다. Quercitrin의 경우 회수율이 130.0%로 높

게 나타난 것은 머무름시간이 quercitrin과 유사한 물질이 검출된 것으로 보이며 apigenin의 경우 회수율이 78.0%로 낮은 것은 수욕상 4시간 환류추출과정에서 고온에 의해 분해된 것으로 추정된다. 増川 등(1985)은 Satsuma mandarin juice에서 회수율이 hesperidin 102.4~105.8%, hesperetin 96.3~98.1%로 보고하였으며, Rouseff(1988)는 오렌지 주스에서의 회수율이 naringin 97~102%, neohesperidin 93~98%로 보고하였는데, 본 실험에서 회수율이 naringin 85.7%, hesperidin 91.1%, neohesperidin 94.4% 및 hesperetin 107.8%로 저조한 이유는 실험방법상의 차이로서 가열하는 과정중에 분해가 된 것으로 추정된다.

8. 감귤주스 및 감귤과피 중의 flavonoids 함량

감귤주스 및 감귤과피 중의 flavonoids를 분석한 HPLC chromatograms은 Fig. 12에 나타내었으며, flavonoids의 함량은 Table 9에 나타내었다. Flavonoids의 함량은 분석방법, 시료의 전처리, 감귤의 수확시기에 크게 영향을 받는다. 분석방법에 따른 함량변화를 보면 福谷과 宮本(1983)은 Hassaku juice중 naringin이 Davis법으로는 41mg/100ml이나 HPLC법에서는 12mg/100ml, Natsudaidai juice중 naringin이 Davis법으로는 55mg/100ml이나 HPLC법에서는 29mg/100ml로 Davis법이 HPLC법보다 약 2배 이상 높게 나타난다. 시료의 전처리에 따른 함량변화를 보면 추출에 의한 경우(이 등, 1987)가 주스를 여과하여 직접 분석한 경우(이 등, 1979)보다 2배 이상 높게 나타나며, 수확시기가 늦어질수록 함량은 감소하였다(福谷과 宮本, 1983).

감귤주스 중의 naringin 함량은 하귤 68.2mg/100ml, 당유자 42.5mg/100ml 및 금귤자에서 30.2mg/100ml로 높게 나타났고, 유자 및 수다찌는 8.00mg/100ml내외였으며, 이예감, 네블, 흥진, 금감, 산귤 및 삼보감에서는 검출되지 않았다. 이 결과는 福谷과 宮本(1983)이 natsdaidai에서 50mg/100g으로 보고한 점과 비슷하였으며, 福谷과 宮本(1983)이 이예감과 네블에서, 이 등(1987)과 増川 등(1985)이 온주에서 naringin이 검출되지 않았다는 보고와 일치하였다.

감귤주스 중의 hesperidin 함량은 산귤에서 85.6mg/100ml로 다른 품종에 비

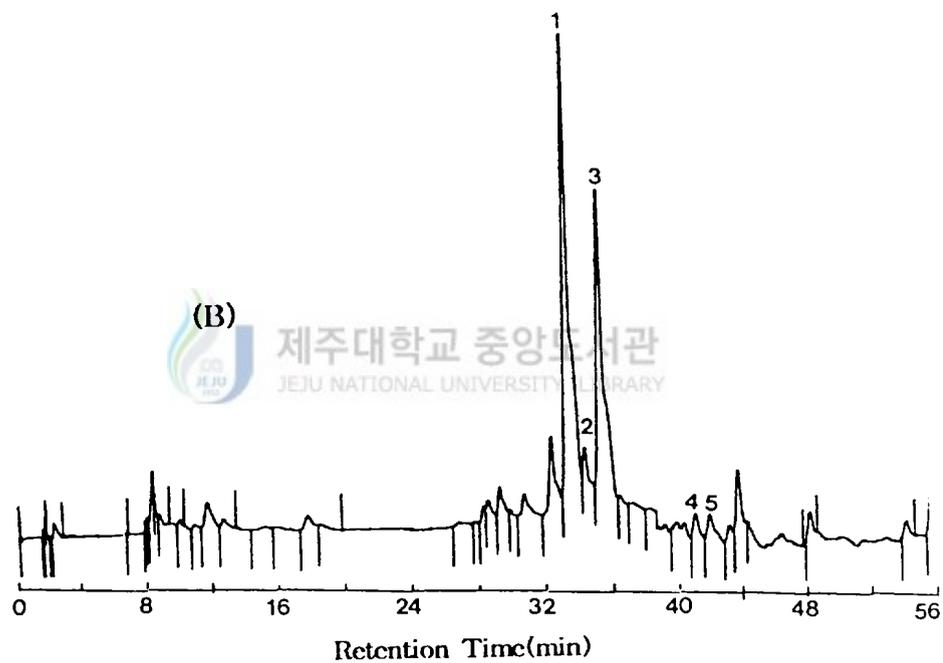
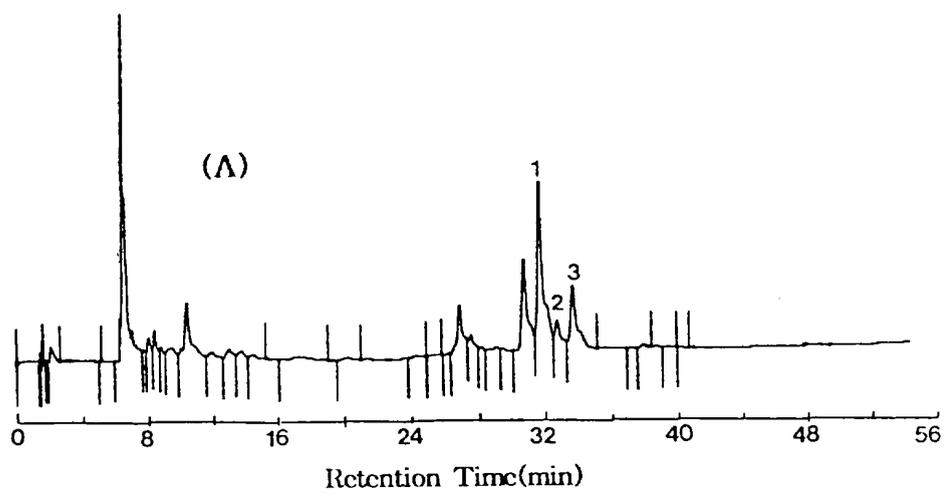


Fig. 12. HPLC chromatograms of juice(A) and peel(B)
of Kinkôji

1. Naringin, 2. Hesperidin, 3. Neohesperidin
4. Naringenin, 5. Hesperetin

Table 9. Composition of flavonoids in citrus juice and citrus peel

Citrus varieties**	Flavonoids*							
	NG	HD	NHD	RT	QCT	NGX	HT	
Juice (mg/100ml)	YU	8.02	9.03	4.28	ND	ND	ND	ND
	IY	ND	6.60	ND	ND	ND	ND	ND
	NO	ND	10.4	ND	0.52	ND	ND	ND
	HJ	ND	18.1	ND	1.81	0.53	ND	ND
	SC	7.89	7.49	5.04	ND	ND	0.08	ND
	MK	ND	2.67	ND	ND	0.53	ND	ND
	SK	ND	85.6	ND	ND	ND	ND	ND
	DJ	42.5	ND	25.3	ND	ND	ND	ND
	ND	68.2	ND	15.7	ND	ND	ND	ND
	KK	30.2	1.13	10.5	ND	ND	ND	ND
	SB	ND	17.9	ND	ND	ND	ND	ND
Peel (mg/g, dry basis)	YU	16.9	28.3	19.3	ND	ND	ND	ND
	IY	ND	116	ND	ND	1.24	ND	ND
	NO	ND	112	ND	ND	ND	2.67	ND
	HJ	ND	242	ND	ND	ND	ND	ND
	SC	16.3	55.9	42.9	ND	ND	ND	ND
	MK	ND	2.98	1.47	ND	ND	ND	ND
	SK	ND	129	ND	ND	ND	ND	ND
	DJ	100	ND	87.9	ND	ND	0.29	0.28
	ND	110	ND	34.4	ND	1.42	0.20	0.30
	KK	58.5	6.22	35.1	ND	ND	0.53	0.44
	SB	ND	164.8	ND	1.08	ND	ND	ND

* See Table 2 for the names of flavonoids.

** See Table 1 for the names of citrus varieties.

ND: Not detected

하여 가장 높게 나타났으며, 홍진 및 삼보감은 18mg/100ml 내외로서 함량이 높았으며, 유자, 이에감, 네블 및 수다찌는 6~10mg/100ml 범위이었다. 한편 금감과 금귤자에서는 3.00mg/100ml이내로서 함량이 가장 낮았으며, 당유자 및 하귤에서는 검출되지 않았다. 이 결과와 飯野 등(1982)이 Satsuma mandarin juice에서 hesperidin 함량을 47~71mg/100ml로 보고한 것과 차이가 큰 것은 분석방법(인도페놀법)상의 차이이며, 小川 등(1990)이 hesperidin 함량을 네블오렌지주스 34~58mg/100g, 이에감주스 26~51mg/100g, 수다찌주스 3~7mg/100g, 유자주스 11~17mg/100g로 보고한 것과 차이가 있는 것은 주스분석 시에 小川 등(1990)은 여과과정 이전에 NaOH로 flavonoids를 용해시킨 과정상의 차이로 생각된다. 또 増川 등(1985)이 Satsuma mandarin juice에서 hesperidin 함량을 73.5mg/100ml로 보고한 것보다 함량이 낮은 것은 본 실험에서 주스를 여과하여 직접 분석하였지만, 増川 등(1985)은 주스를 NaOH수용액으로 추출하여 분석하였기 때문인 것으로 추정된다. 한편 이 등(1979)이 감귤주스 중의 hesperidin 함량을 홍진 26mg/100ml로 보고한 것과 함량이 가장 비슷하였는데 이는 주스를 여과하여 HPLC로 분석한 점이 동일하기 때문인 것으로 생각된다. 감귤주스 중의 neohesperidin 함량은 당유자에서 25.3mg/100ml로서 가장 높았고, 하귤 및 금귤자는 10~16mg/100ml 범위였으며, 유자 및 수다찌는 5mg/100ml 내외를 나타낸 반면 이에감, 네블, 홍진, 금감, 산귤 및 삼보감에서는 검출되지 않았다. 감귤주스 중의 rutin은 홍진조생온주와 네블오렌지에서 0.52~1.81mg/100ml, quercitrin은 홍진과 금감에서 0.53mg/100ml, naringenin은 수다찌에서 0.08mg/100ml로 함량이 매우 낮았는데, 이는 Simon 등(1992)이 오렌지 주스에서 rutin 함량을 0.3~1.22mg/1ℓ로 보고한 결과와 비슷하였다.

감귤피 중의 naringin 함량은 하귤에서 110mg/g, 당유자에서 100mg/g이 검출되어 다른 품종보다 높게 나타났으며, 금귤자는 유자 및 수다찌보다 함량이 높았다. 福谷과 宮本(1983)은 natsdaidai의 감귤피 중 naringin의 함량이 567mg/100g이라고 보고하였는데 이 실험에서 naringin의 함량이 매우 높게 나타난 것은 건조물 기준으로 함량을 계산하였기 때문이다. 감귤피 중의

hesperidin 함량은 홍진에서 242mg/g으로 유자, 금감 및 금귤자보다 함량이 높게 나타났으며, 이예감, 네블, 산귤 및 삼보감은 112~165mg/g 범위를 보여 함량이 높은 편이었다. 한편 유자에서는 28.3mg/g, 수다찌에서는 55.9mg/g으로 함량이 낮았고 당유자 및 하귤에서는 검출되지 않았다. 増川 등(1985)은 시판되는 Satsuma mandarin 과피의 hesperidin 함량을 1341~2174mg/100g으로 보고하였는데, 이 실험에서 hesperidin의 함량이 매우 높게 나타난 것은 추출 방법상의 차이와 건조물 기준으로 함량을 계산하였기 때문이다.

감귤피 중의 neohesperidin 함량은 당유자에서 87.9mg/g으로서 다른 품종보다 함량이 높았고, 유자, 수다찌, 하귤 및 금귤자에서는 19.3~42.9mg/g으로 함량이 높은 편이었고, 금감에서는 1.47mg/g으로서 함량이 매우 낮았으며, 이예감, 네블, 홍진, 산귤 및 삼보감에서는 검출되지 않았다. 감귤피 중의 rutin은 삼보감에서 1.08mg/g, quercitrin 은 이예감과 하귤에서 1.24~1.42mg/g, naringenin은 네블, 당유자, 하귤 및 금귤자에서 0.2~2.67mg/g, hesperetin은 당유자, 하귤 및 금귤자에서 0.28~0.44mg/g이 검출되어 함량이 매우 낮았다.

전체적으로 볼 때 감귤피중 naringin, hesperidin 및 neohesperidin의 함량이 모든 품종에서 90% 이상을 나타내었으며, 세가지 성분만을 살펴볼 때 이예감, 네블, 홍진, 금감, 산귤 및 삼보감에서는 hesperidin이, 유자, 수다찌, 및 금귤자는 naringin, hesperidin, neohesperidin이, 당유자 및 하귤은 naringin과 neohesperidin이 주종을 이루었다.

IV. 要約

감귤류 flavonoids 중 다량으로 존재하면서 식품학적으로 중요한 naringin, hesperidin, neohesperidin과 미량성분인 rutin, quercitrin, naringenin, hesperetin, apigenin들을 HPLC에 의해서 동시에 정량분석할 수 있는 최적조건을 규명하고, 이 방법에 의해서 제주도산 감귤류 주요품종 11종의 flavonoids 함량을 주스와 감귤과피 각각에 대해서 측정하였다.

검출파장 280nm 및 μ -Bondapak C-18 역상 칼럼을 사용할 때 이동상은 pH 4.0 이하에서 flavonoids의 분리가 향상되었으며, water/acetonitrile/acetic acid보다는 water/methanol/acetic acid의 분리능력이 우수하였다. 표준품을 용해하는데 사용한 용매로는 20% DMF(n,n-dimethylformamide : methanol = 20:80 v/v)가 methanol 및 NaOH수용액보다 용해도가 크고 시간경과에 따른 함량변화가 작았다. 20% DMF에 용해한 표준액 10 μ l를 3회 분석한 상대표준편차는 0.24%~3.56%범위이었고, 검량선의 상관계수는 0.9946~0.9999 범위이었다. 감귤피에서 hesperidin의 추출효율은 20% DMF의 경우가 methanol 및 NaOH 수용액보다 좋았으며, 수육상 환류추출이 초음파진탕 추출보다 우수하였으며, flavonoids의 첨가회수율은 78.0~130.0% 범위를 나타내었다.

감귤주스 중의 flavonoids 함량은 당유자, 하귤 및 금귤자에서 naringin이 30.2~68.2mg/100ml, neohesperidin이 10.5~25.3mg/100ml, 산귤에서 hesperidin이 85.6mg/100ml, 홍진 및 삼보감에서 hesperidin이 17.1~18.9mg/100ml이었다. Rutin은 네블과 홍진에서, quercitrin은 홍진, 금감에서, naringenin은 수다찌에서 검출되었으나 그 함량이 2.00mg/100ml이내였다.

감귤피 중의 flavonoids 함량은 당유자 및 하귤에서 naringin이 100~110mg/g, 홍진, 산귤 및 삼보감에서 hesperidin이 129~242mg/g, 수다찌, 당유자, 하귤 및 금귤자에서 neohesperidin이 34.4~87.9mg/g내외로서 주스에 비하여 그 양이 매우 많았다. Rutin은 삼보감에서, quercitrin은 이예감과 하귤에

서, naringenin은 네블, 당유자, 하귤 및 금귤자에서, hesperetin은 당유자, 하귤 및 금귤자에서 검출되었으나 그 함량이 2.00mg/g이내였다.

V. 參考文獻

Castele, K.V., H.D. Pooter and C.F. Van Summe, 1976. Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. *J. chromatogr.*, 121, 49-63.

제주도, 1993. 제주통계년보. p.96.

Francis, A.R., T.K. Shetty and R.K. Bhattacharya, 1989. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: in vitro effect of plant flavonoids. *Mutation Research*, 222, 393-401.

福谷敬三, 宮本 等, 1983. 柑橘果實の 苦味物質の 含量と時期別變化. 日本食品工業學會誌, 30(11), 642-649.

Galensa, R. and K. Herrmann, 1980. Analysis of flavonoids by High performance liquid chromatography. *J. chromatogr.*, 189, 217-224.

한성순, 유일준, 1988. 한국산 천연 Naringin의 항균작용 및 안전성에 관한 연구, 한국균학회지, 16(1), 1-8.

Harborne, J. B. and T.J. Mabry, 1982, The flavonoids. Chapman and Hall Ltd., New York, pp.189-632.

Horowitz, R.M. and B. Gentili, 1969. Taste and structure in phenolic glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, 17(4), 696-700.

허인옥, 고경수, 1990. 감귤속 식물의 성분 분류학적 연구. 제주대학교 논문집, 30, 75-81.

岩崎藤助, 1966. 칸킥츠栽培法 : 種類ならびに品種. 朝倉書店, pp.78-89.

Iio M., M. Masaru, T. Iwanami and Y. Yoshikatsu., 1984. Flavonoid as a possible preventive of dental carries. *J. Agric. Biol. Chem.*, 48(8), 2143-2145.

神谷眞太郎, 江崎幸子, 1971. 柑橘フラボノイド化學の最近の進歩. 日本食品工業學會誌, 18(1), 38-49.

金漢鏞, 1988. 濟州 在來 柑橘(*Citrus spp.*)의 分類와 有用形質 및 遺傳標識에 關한 研究. 全南大學校 博士學位論文, 7-8.

이현유, 석호문, 남영중, 정동효., 1987. 한국산 감귤주스의 이화학적 성상. 한국식품과학회지, 19, 338-345.

飯野久榮, 太田英明, 渡邊敦夫, 大谷敏郎, 木村 進, 1982. 温州ミカン用試作搾汁機によるミカン果汁の品質. 日本食品工業學會誌, 29(5), 283-289.

増川健二, 小松廣由, 藤村紀夫, 福山 司, 福島正範, 石川 勉, 1985. 高速液體クロマトグラフィホーによる温州ミカン中のヘスペリジン及びその酵素分解物の定量. 日本食品工業學會誌, 32(12), 864-869.

Matsubara, Y., H. Kumamoto, Y. Lizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake and K. Yokoi, 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in citrus unshiu peelings. *J. Agric. Biol. Chem.*, 49(4), 909-914.

Mattews, J.W., R.L. Rouseff, M. Manlan and S.I. Norman, 1990. Removal of limonin and naringin from citrus juice by styrene-divinyl benzene resins. *Food Tech.*, 44(4), 130-132.

小川浩史, 福久一馬, 福本治次, 福谷敬三, 1990. 温州ミカン透明果汁の製造に関わるヘスペリジンの變動. *日本食品工業學會誌*, 37(3), 214-219.

Olson, A.C., G.M. Gray and D.G. Guadagni, 1979. Naringin bitterness of grapefruit juice debittered with naringinase immobilized in a hollow fiber. *J. Food. Sci.*, 44, 1358-1361.

Park, G.L., S.M. Avery, J.L. Byers and D.B. Nelson, 1983. Identification of bioflavonoids from citrus. *J. Food Technol.*, December, 98-105.

Perfetti, G.A., F.L. Joe, T. Fazio and S.W. Page., 1988. Liquid chromatographic methodology characterization of orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(3), 469-473.

이종욱, 신두호, 윤인화, 한판주, 1979. 한국산 감귤류의 가공특성에 관한 연구. *한국농화학회지*, 32(1), 28-31.

Rouseff, R.L., 1988. Liquid chromatographic determination of naringin and neohesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 7(4), 798-802.

Simon, B.F., J. Perez-Ilzarbe, T. Hernandez, C. Gomez-cordoves, and I. Estrella, 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices., *J. Agric. Food. Chem.*, 40(9), 1531-1535.

Tatum, J. H., and R. BERRY, 1973. Method for determining naringin content in grapefruit juice. *J. Food Sci.*, 38, 340-341.

Ting, S.V., R.L. Rouseff, M.H. Dougherty and J.A. Attaway, 1979. Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 44(1), 69-71.

Ting, S.V., R.L. Rouseff, 1986. Citrus fruits and their products. Marcel Dekker, New York, p.109.

Velloglu, Y.S. and G. Mazza, 1991. Characterization of flavonoids in petals of rosa damascena by HPLC and spectral analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 39(3), 463-467.

원도희, 이송득, 조정희, 강신정, 노희원, 정기숙, 황영식, 1986. 진피, 횡실 및 그 함유제제의 분석법, 국립보건원보, 23, 561-569.



謝 辭

이 논문이 완성되기까지 끊임없는 지도와 편달을 하여주신 姜永周 지도교수님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 가운데서도 본 논문을 자상하게 교열하여 주신 河雛桓 교수님, 任尙彬 교수님, 학위과정중 따뜻한 격려를 주신 宋大鎭 교수님, 그리고 여러면에서 가르침을 주신 金在河 교수님, 金洙賢 교수님, 高榮煥 교수님께 깊이 감사드립니다.

본 연구가 이루어지도록 기회를 주시고 지원하여 주신 제주도보건환경연구원 高容九 원장님을 비롯한 모든 직원들께도 감사드립니다.

끝으로 어려운 여건 속에서도 정신적으로 도움을 주신 부모님과 지성으로 내조해 온 사랑하는 아내에게 이 작은 논문을 드립니다.

