

감귤류 과피로부터 고감미도감미료 Neohesperidin-dihydrochalcone 제조기술 개발

Development of the intense sweetener
neohesperidin-dihydrochalcone with Korean citrus

연구 기관
한국식품개발연구원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “감귤류 과피로부터 고감미도감미료 Neohesperidin-dihydrochalcone 제조 기술 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 12 월 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 류 미 라

세부연구책임자 : 류 미 라

연 구 원 : 김 현 구

연 구 원 : 박 용 곤

연 구 원 : 이 혜 숙

연 구 원 : 김 은 영

협동연구기관명 : 한국과학기술연구원

협동연구책임자 : 유 경 호

참 여 기 업 : 플러스월드(주)

여 백

요 약 문

I. 제목

감귤류 과피로부터 고감미도감미료 Neohesperidin-dihydrochalcone
제조 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

Neohesperidin dihydrochalcone (NHP-DC)은 sucrose보다 약 1800배 단맛이 강한 고감미도감미료로 맛의 질이 sucrose와 매우 유사할 뿐 아니라 다른 고감미도감미료와의 상승효과 및 flavor modifier로서의 작용이 뛰어나 사용량 증가가 예상되는 소재로 천연 flavonoid naringin 또는 neohesperidin으로부터 제조될 수 있다.

본 연구는 국내산 감귤류로부터 naringin 또는 neohesperidin 활용소재를 개발하고 이로부터 NHP-DC 제조 기술 확립을 목적으로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. “NHP-DC 소재 탐색 및 중간체 분리” 분야 (주관연구기관)

- Neohesperidin 및 Naringin 소재 선발
 - Flavonoids 함량 분석법 확립
 - 국내산 감귤류의 flavonoids 함량 분석
 - 국내산 감귤류의 숙기별 flavonoids 함량 변화 분석
- Neohesperidin 추출 및 분리법 확립
 - 당유자 과피로부터 Neohesperidin 추출법 확립
 - Neohesperidin 분리법 확립
 - Neohesperidin 대량 생산 공정 도출

2. “고감미도감미료 NHP-DC 제조 공정 개발” 분야 (협동연구기관)

- 모델계에서의 NHP-DC 제조법 확립
 - 공지 NHP-DC 합성방법들에 대한 다각적 비교 검토

- 시판 naringin을 이용한 반응중간체 합성
- 반응 중간체로부터 최종목적물질 NHP-DC 합성
- NHP-DC 제조 조건 확립
 - Naringin으로부터 NHP-DC 제조 조건 확립
- NHP-DC 대량합성방법 도출 및 공정개선
 - 각 합성방법에 대한 경제성 검토
 - 공업적으로 유리한 합성방법 도출 및 원가, 수율 및 순도개선 연구

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. “NHP-DC 소재 탐색 및 중간체 분리” 분야 (주관연구기관)

국내산 감귤류로부터 NHP-DC 제조 원료로 활용가능한 naringin 및 neohesperidin 소재를 탐색하였다. 국내산 감귤류 27종 중 ‘문단’에서 Naringin 함량이 높았으며 제주 재래감귤 ‘당유자’, ‘지각’, ‘편굴’에서 neohesperidin 함량이 높았다. 특히 당유자 미숙과 (diameter 7.60 ± 1.77 mm)의 neohesperidin 함량이 33% (dry weight basis)에 이르러 지금까지 보고된 어떤 품종보다 높은 것으로 나타나 neohesperidin의 대량 추출에 유용한 소재로 확인되었다. Neohesperidin 분리법으로는 지금까지 알려진 알칼리용액 또는 용매추출 후 chloroform 계에서 결정을 석출시키는 방법보다 용매추출 후 nonionic polymeric adsorbent로 농축시킨 후 HPLC로 분리하는 공정이 적합한 것으로 확인하고 80% 이상의 회수율을 나타내는 농축물 형태의 중간소재 제조 공정 및 이 농축물로부터 Preparative HPLC를 이용한 neohesperidin 분리 공정을 확립하였다.

2. “고감미도감미료 NHP-DC 제조 공정 개발” 분야 (협동연구기관)

본 연구는 출발물질로서 Naringin hydrate나 협동연구기관인 한국식품연구원에서 개발한 국내산 감귤류에서 추출이 가능한 Neohesperidine을 사용하여 최종목적물인 고감미도 감미제로 사용되고 있는 Neohesperidine dihydrochalcone을 높은 수율과 순도로 얻을 수 있었다. 특히,

Neohesperidine을 출발물질로 하는 경우에는 one pot reaction으로 반응단계를 축소할 수 있으며, 제조공정의 단순화 등으로 원가절감의 효과를 얻을 수 있어서 산업화에 유리한 것으로 판단된다.

향후 본 연구 결과들을 토대로 보다 높은 량의 neohesperidin을 함유하는 농축물 제조 기술을 확립하고 대량 분리 공정의 cost 절감을 위한 개선책을 모색한다. 동시에 실용화·산업화 측면에서 환원반응시의 환원제 사용의 최소화, 반응시간, 결정화, 재결정화 등의 반응조건을 최적화하고 산업화 시에 발생할 수 있는 제반 문제점들을 검토한 후 산업화를 추진할 계획이다.

여 백

SUMMARY

Neohesperidin dihydrochalcone (NHP-DC) is an intense sweetener, 1800 times sweeter than sucrose. It also contributes flavor enhancing and modifying properties. NHP-DC has been recently authorized in the European Union as an intense sweetener in a wide range of energy-reduced or non-added-sugar foodstuffs, and also as a flavor enhancer in an additional number of foods at concentrations below the sweetness threshold.

Naringin and neohesperidin can be chemically converted into NHP-DC. An analytical method to detect and quantify flavonoid has been developed and 27 kinds of Korean Citrus have been determined in research searching for citrus species with high naringin and neohesperidin contents. The cultivar Dangyooja (*Citrus grandis Osbeck*) of the local citrus spp. of Cheju has a higher neohesperidin content than the 'Afin' and 'Bouquet de Fleur' varieties of *Citrus aurantium* L. which is currently being used for the commercial acquirement of this flavonoid. Neohesperidin extraction solution has high viscosity due mainly to the pectin and saccharides. Therefore, the hot 80% methanol neohesperidin extraction process had to be supplemented by nonionic polymeric adsorbent purification. Eluted neohesperidin solution was chromatographed on HPLC for neohesperidin purification.

The target molecule of this research, NHP-DC as an intensive sweetener, was prepared via the sequential reactions starting from naringin hydrate or neohesperidine. Especially, the preparation of NHP-DC using neohesperidine as a starting material gave the excellent

yield and high purity. In this case, the simplification of synthetic process by one-pot reaction would be attribute to achieve the industrialization owing to the reduction of cost.

For the purpose of industrialization of NHP-DC, further research based on these results should be focused on the neohesperidin concentrate and purification process and the reaction condition, recrystallization, yield, and purity of NHP-DC.

CONTENT

Chapter 1. Introduction	17
Part 1. The objective of this study	17
Chapter 2. Screening of the high flavonoid citrus and development of the flavonoid concentrate process for NHP-DC preparation	20
Part 1. Screening of the high flavonoid citrus species	20
1. Introduction	20
2. Materials and Methods	22
A. Materials	22
B. Condition of flavonoids extraction	23
C. Analysis of flavonoid contents	23
3. Results and Discussion	26
A. Condition of flavonoids extraction	26
B. Contents of flavonoid in mature citrus fruits	28
C. Changes of flavonoid contents according to maturity	35
D. Optimal harvest date of <i>Dangyooja</i> and <i>Jikak</i> for neohesperidin extraction	45
Part 2. Neohesperidin extraction and crystallization	50
1. Introduction	50
2. Materials and Methods	52
A. Samples	52
B. Alkali extraction	52
C. Solvent extraction	52
D. Preparation of neohesperidin concentrate	52

E. Separation of neohesperidin by HPLC	53
3. Results and Discussion	54
A. Neohesperidin crystallization from alkali extract	54
B. Neohesperidin crystallization from solvent extract	54
C. Preparation of neohesperidin concentrate	55
1) Optimal condition for neohesperidin extraction	55
2) Preparation of neohesperidin concentrate	55
D. Separation of neohesperidin by HPLC	56
1) Separation of neohesperidin by analytical HPLC	56
2) Separation of neohesperidin by preparative HPLC	60
E. Scheme of neohesperidin mass production	64
Part 4. Conclusion	66
Chapter 3. Development of NHP-DC Preparation Process	67
Part 1. Introduction	67
1. Preparation of NHP-DC from Naringin Hydrate	69
A. TRIAL A (stepwise reaction)	71
B. TRIAL B (succesive reaction)	73
C. TRIAL C (succesive reaction)	74
D. TRIAL D (succesive reaction)	75
2. Preparation of NHP-DC from Neohesperidine	76
Part 2. Experimental	79
1. Materials and methods	79
2. Preparation of NHP-DC from Naringin Hydrate	80
A. TRIAL A (stepwise reaction)	80
B. TRIAL B (succesive reaction)	81
C. TRIAL C (succesive reaction)	83

D. TRIAL D (succesive reaction)	85
3. Preapration of NHP-DC from Neohesperidine	86
A. Experimental II (II-1, II-2, II-3) & III (III-1, III-2, III-3) & IV (IV-1) (by use of 10% Pd/C)	86
B. Experimental V (V-1, V-2, V-3, V-4) (by use of Raney-Ni)	86
Part 3. Result and discussion	87
1. Preparation of NHP-DC from Naringin Hydrate	87
2. Prepration of NHP-DC from Neohesperidine	91
3. Cryatallization and Recrystallization of NHP-DC	96
Part 4. Conclusion	98
References	99

여 백

목 차

제 1 장 서 론	17
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	17
제 2 장 “Neohesperidin-dihydrochalcone 소재탐색 및 중간체 분리” 분야	20
제 1 절 Neohesperidin 및 Naringin 소재 선별 및 함량 분석법 확립	20
1. 서 설	20
2. 실험재료 및 방법	22
가. 시료	22
나. Flavonoids 추출조건 검토	23
다. Flavonoids 함량 분석	23
3. 결과 및 고찰	26
가. Flavonoids 추출조건 검토	26
나. 감귤류 속과의 flavonoids 함량	28
다. 감귤류의 속기에 따른 flavonoids 함량 변화	35
라. Neohesperidin 추출을 위한 당유자 및 지각의 적정 수확기 분석	45
제 2 절 Neohesperidin 추출 및 결정화 공정 확립	50
1. 서 설	50
2. 실험재료 및 방법	52
가. 시료	52
나. 알칼리 추출법	52
다. 용매 추출법	52
마. Neohesperidin 분리용 농축물 제조	52
라. HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리	53

3. 결과 및 고찰	54
가. 알칼리 용액 추출에 의한 neohesperidin의 석출	54
나. 용매 추출에 의한 neohesperidin의 석출	54
다. Neohesperidin 원료 농축물 제조	55
1) Neohesperidin의 적정 추출 배율	55
2) Neohesperidin 농축물의 제조	55
라. HPLC에 의한 neohesperidin의 분리	56
1) 분석용 HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리	56
2) Preparative HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리	60
마. Neohesperidin 대량생산을 위한 System의 설계	64
제 4 절 결론	66
제 3 장 “NHP-DC 제조 공정개발” 분야	67
제 1 절 서 설	67
1. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	69
가. TRIAL A (stepwise reaction)	71
나. TRIAL B (succesive reaction)	73
다. TRIAL C (succesive reaction)	74
라. TRIAL D (succesive reaction)	75
2. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	76
제 2 절 실험 내용	79
1. 시약 및 기기	79
2. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	80
가. TRIAL A (stepwise reaction)	80

나. TRIAL B (succesive reaction)	81
다. TRIAL C (succesive reaction)	83
라. TRIAL D (succesive reaction)	85
3. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	86
가. 실험 II (II-1, II-2, II-3) & III (III-1, III-2, III-3) & IV (IV-1) (10% Pd/C 사용)	86
나. 실험 V (V-1, V-2, V-3, V-4) (Raney-Ni 사용)	86
제 3 절 결과 및 고찰	87
1. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	87
2. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성	91
3. 환원반응 혼합물로 부터 Neohesperidin-dihydrochalcone (NHP-DC)의 결정화 및 재결정화	96
4절 결 론	98
참 고 문 헌	99

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

▶ Neohesperidin dihydrochalcone (NHP-DC)이란 ?

NHP-DC는 흰색 결정의 분말성상을 띄는 매우 안정한 flavonoid의 dihydrochalcone으로 (Fig 1) sucrose보다 1500~1800배 단맛이 강한 고감미도감미료 (高甘味度甘味料, intensive sweetener)로써 1963년 Horowitz & Gentili에 의해 최초로 보고되었으며 현재 EU Membership States, Argentina, Switzerland 및 Chequia에서 식품에의 사용이 승인되어 있다 (Bar et al. 1990). 특히 NHP-DC는 sugar alcohol 및 다른 고감미도감미료와 혼합 사용 시 극히 저 농도(5 ppm)에서 뛰어난 상승효과를 나타낼 뿐 아니라 flavor modifier로 작용하여 cost 절감 및 다른 감미료의 섭취 감소를 유도할 수 있으며 또한 맛의 질이 sucrose와 매우 유사한 장점을 지닌다 (Lindley et al. 1991).

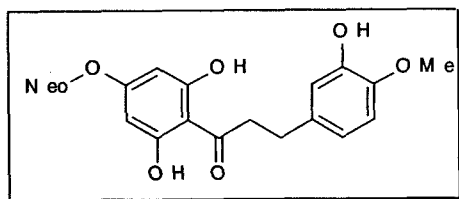


Fig 1. NHP-DC

▶ NHP-DC 제조 및 개발현황

비슷한 구조의 flavonoid 및 flavonoid chalcone은 많은 식물체에서 발견되고 있는데 반해 NHP-DC는 지금까지 자연계에서 발견된 보고가 없으며 naringin 또는 neohesperidin으로부터 제조 생산되고 있다. 특히 naringin은 상업적 이용이 가능한 정도의 많은 양이 생산되나 neohesperidin은 상업적으로 유용하지 못하여 naringin을 출발물질로 neohesperidin을 거쳐 NHP-DC로 변환시키는 방법이 일찍부터 보고되었다 (Horowitz & Gentili, 1963). 주된 합성 과정은, naringin을 알칼리 및 고온에서 phloracetophenone 4'- β -neohesperidoside로 분해하고 다시 알칼리 조건에서 isovanillin과 축합시켜 neohesperidin chalcone을 생성시킨 후 cyclize하여 neohesperidin을 생성시키고 이를 hydrogenation시키는 것으로 구성되어 있다 (Krebechek et al. 1968).

▶ NHP-DC의 시장성

NHP-DC는 감미료 및 flavor modifier로서의 특성이 뛰어나면서도 불구하고 제조기술의 상업화 및 적용기술의 불충분으로 식품산업에 널리 이용되지 못하였으나 최근 상업화 및 이용 기술이 향상되어 광범위한 식품에의 적용법이 확립되어 있다. NHP-DC는 1998년 현재 450\$/kg에 판매되고 있는 고부가가치 소재로 특히 최근 저칼로리 고감미도 감미료의 식품 및 의약품, 치약 등의 비식품 소재에서의 적용시장이 급증하고 있어 국내에서의 적용여건이 조성되면 수입가능성이 극히 높은 소재로 평가된다.

NHP-DC의 시장규모를 현재 널리 사용되고 있는 고감미감미료, Aspartame과 비교 예측 시, 일본은 1996년 현재 사용량이 연간 180-190톤에 이르며, 1997년 현재 사용되는 품목이 409종에 이른다. 국내시장규모는 약 60톤 (1997년)이며 적용 품목도 제한적이나 일본에서의 Aspartame 시장 및 적용 품목이 비교적 최근에 (1995 또는 1996년) 급격히 증가한 것으로 미루어 국내시장의 빠른 성장이 예측된다.

▶ 본 연구개발의 목적

국내에서 생산되는 감귤류로부터 천연 flavonoid, naringin 또는 neohesperidin 활용소재를 개발하고 이로부터 NHP-DC 제조 기술을 확립하는 것을 본 연구의 목적으로 한다.

▶ 연구개발의 범위

1. “NHP-DC 소재 탐색 및 중간체 분리” 분야 (주관연구기관)

- Neohesperidin 및 Naringin 소재 선별
 - Flavonoid 함량 분석법 확립
 - 국내산 감귤류의 flavonoid 함량 분석
 - 국내산 감귤류의 속기별 flavonoid 함량 분석
- Neohesperidin 추출 및 분리법 확립
 - 당유자과피로부터 Neohesperidin 추출법 확립
 - Neohesperidin 분리법 확립
 - Neohesperidin 대량 생산 공정 도출

2. “고감미도감미료 NHP-DC 제조 공정 개발” 분야 (협동연구기관)

- 모델계에서의 NHP-DC 제조법 확립
 - 공지 NHP-DC 합성방법들에 대한 다각적 비교 검토
 - 시판 naringin을 이용한 반응중간체 합성
 - 반응 중간체로부터 최종목적물질 NHP-DC 합성
- NHP-DC 제조 조건 확립
 - Naringin으로부터 NHP-DC 제조 조건 확립
- NHP-DC 대량합성방법 도출 및 공정개선
 - 각 합성방법에 대한 경제성 검토
 - 공업적으로 유리한 합성방법 도출 및 원가, 수율 및 순도개선 연구

제 2 장 “Neohesperidin-dihydrochalcone 소재탐색 및 중간체 분리” 분야

제 1 절 Neohesperidin 및 Naringin 소재 선별 및 함량 분석법 확립

1. 서 설

우리나라는 기상적, 지리적으로 감귤재배지 중 최북단에 위치하고 있어 내한성이 강한 만다린계의 온주밀감(溫州蜜柑)이 감귤 생산의 주종을 이루며 (Lee, et al., 1987), 전체 생산량의 70% 정도를 차지하고 있다. 따라서 지금까지 국내산 감귤류를 이용한 NHP-DC 제조 또는 원료 flavonoid의 탐색연구는 전무한 실정이다.

NHP-DC 제조에는 neohesperidin 또는 naringin 모두가 출발물질로 이용될 수 있다. Neohesperidin은 hydrogenation 공정만으로 NHP-DC로 제조될 수 있으나 neohesperidin을 다량 함유하는 품종이 드물며 또한 상업적 이용이 가능한 소재로 개발되어 있지 않은 실정이다. 이에 비해 naringin으로 NHP-DC를 제조하기 위해서는 우선 알칼리 및 고온에서의 분해, 알칼리 조건에서의 축합, cyclize 및 hydrogenation 공정을 거쳐야 하나 naringin은 grapefruit의 주된 flavonoid로 다량 존재하며 이미 상업적 이용이 가능한 소재로 개발되어 있어 NHP-DC 제조 소재로 유용한 것으로 보고되고 있다 (Krbecek, et al., 1968). 현재 neohesperidin 추출에 이용되고 있는 품종은 Spain의 sour orange ‘Afin’과 ‘Bouquet de Fleur’로 이 품종의 미숙과 (diameter 8-1mm)에 각각 27.2, 29.3% (dry weight basis), 숙과 (diameter 40-45mm)에는 각각 1.0, 3.7% 함유되어 있으며 또한 naringin은 *Citrus paradisi* 미숙과에 75% (Keterson and Hendrickson,

1953), grape fruit cultivar 'Issac' 미숙과에 88% 함유된 것으로 보고되고 있다 (Ortuno, et al., 1997).

국내산 감귤류의 naringin 및 neohesperidin 함량으로는 하밀감 속과 과피의 naringin 함량이 3.03% (dry weight basis) (장 등 1977), 지실과 지각의 naringin 함량이 각각 1.09~3.06%, 2.83~4.25%, neohesperidin은 각각 0.05이하~0.09%와 3.01~4.84% 함유되어 있다 (김 등 1989). 과즙보다 과피 중의 함량이 월등히 높고 미숙과일 때 그 함량이 높으나 착색이 진행됨에 따라 점차적으로 감소하는 경향을 보이며 과피내 naringin 함량은 지각이 9월 하순에서 1월 중순까지 7.51%에서 4.31%로, 당유자가 3.52%에서 2.46%로, 스타치가 4.59%에서 2.20%로, 병균이 3.65%에서 1.74%로, 궁천조생이 5.20%에서 1.68%로 감소하였다 (송 등 1998).

본 연구에서는 국내산 감귤류로부터 경쟁력 있는 NHP-DC 제조 소재를 탐색하기 위하여 품종별 flavonoids 함량을 분석하고 및 각 품종의 숙기에 따른 flavonoids 함량 변화를 분석하였다.

2. 실험재료 및 방법

가. 시료

감귤류 속과의 flavonoids 함량 분석시료로는 1998년 제주도 농업기술원에서 1월 수확한 당유자 (*Dangyooja, Citrus grandis Osbeck*), 진귤 (*Jinkyool, Citrus sunki Hort. ex Tanaka*), 지각 (*Jikak, Citrus aurantium Linn*), 감자 (*Kamja, Citrus benikoji Hort. ex Tanaka*), 편귤 (*Pyunkyool, Citrus tangerina Hort. ex Tanaka*), 동정귤 (*Dongjeongkyool, Citrus erythrosa Hort. ex Tanaka*)의 향토재래귤류 6종, 홍진조생 (*Okitsu Early, Citrus unshiu Marc.*), 대진4호 (*Ootsu No.4, Citrus unshiu Marc.*), 남감4호 (*Nankan No.4, Citrus unshiu Marc.*)의 온주밀감류 3종, 백유네블 (*Sirayanagl, Citrus sinensis Osbeck*), 청가네블 (*Seike, Citrus sinensis Osbeck*), 길전네블 (*Yosida, Citrus sinensis Osbeck*)의 네블오렌지류 3종 및 기타만감류인 스위트스프링 (*Sweetspring, Citrus unshiu × Citrus hassaku*), 팔삭 (*Hassaku, Citrus hassaku Hort. ex Tanaka*), 황금하귤 (*Natsumikan, Citrus natsudaidai Hayata*), 승산이에감 (*Katsuyama Iyokan, Citrus iyo Hort. ex Tanaka*), 궁내이에감 (*Miyauchi Iyokan, Citrus iyo Hort. ex Tanaka*), 청견 (*Kiyomi, Citrus unshiu × Citrus sinensis*), 레몬 (*Lemon, Citrus limon Burm. f.*), 영귤 (*Sudachi, Citrus iyo Hort. ex Tanaka*), 유자 (*Yuzu, Citrus junos Sieb. ex Tanaka*), 문단 (*Pummelo, Citrus grandis Osbeck*)의 10종, 총 22품종을 사용하였다.

속기에 따른 flavonoids 함량 변화 분석을 위해 당유자, 지각, 편귤 및 사두감 (*Sadukam, Citrus pseudogulgul Hort. ex Tanaka*), 궁천조생 (*Miyagawa Wase, Citrus unshiu Marc.*), 병귤 (*Byungkyool, Citrus platymamma Hort. ex Tanaka*), 빈귤 (*Binkyool, Citrus leiocarpa Hort. ex Tanaka*) 및 홍귤 (*Hongkyool, Citrus tachibana Tanaka*)의 8품종에 대

해 2차 생리낙과 종료후인 1999년도 8월 초순부터 20일 간격으로 5차례, 이후 30일 간격으로 2차례 총 7차례에 걸쳐 제주도 농업기술원에서 채취하였다.

Neohesperidin 추출을 위한 당유자 및 지각의 적정 수확시기 분석을 위한 시료로는 2000년 제주도 농가에서 재배되고 있는 당유자, 지각을 대상으로 과실이 형성되기 시작하는 초기단계의 시료를 6월 하순부터 10일 간격으로 7회, 이후 20일 간격으로 4회 채취하였다.

당유자 완숙과피는 제주도 농가로부터 직접 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 과육을 제거한 과피를 사용하였고 과육과 과피를 분리할 수 없는 초기 미숙과에 대해서는 과실전체를 사용하였다. 모든 시료는 상온에서 송풍 건조한 후 분쇄기 (HANIL FM-680T)로 분쇄하여 -20℃ 냉동고에 보존하며 사용하였다.

나. Flavonoids 추출조건 검토

시료 감귤류 내의 flavonoids의 추출조건을 결정하기 위하여 추출배율 및 온도에 따른 차이를 비교하였다. 추출배율을 결정하기 위하여 시료의 10배와 200배의 물로 추출하여 flavonoids 함량의 차이를 검토하였으며, 추출 시의 온도를 0, 4, 20, 40, 60, 90℃로 달리하여 flavonoids의 추출온도를 검토하였다.

다. Flavonoids 함량 분석

각 시료 건조 분말에 200배량의 N,N-dimethylformamide (DMF)을 첨가하여 90℃에서 10분간 추출하고 상정액을 분리하였다. 이 조작을 3회 반복 실시하고 혼합한 추출액을 micro filter (0.45 μ m, Lida Co. Kenosha USA)로 여과하여 RP-HPLC (Jasco Co. Tokyo, Japan)로 분석하였다. 분석 column은 Capcell pak C₁₈ UG120 (ϕ 4.6×250mm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였으며 시료 5 μ l를 주입 후 이동상은 0.5% acetic acid/water:

0.5% acetic acid/methanol (70:30)로 methanol 함량 gradient로 용출시켰다. 유속은 1ml/min, column의 온도는 35℃로 유지하였고, UV 280 nm에서 검출하였다. 추출 및 분석에 사용한 DMF와 methanol은 HPLC 등급을 사용하였으며 acetic acid는 특급을 사용하였다. Flavonoids standard 중 naringin, hesperidin, neohesperidin은 Sigma 사 (St. Louis, USA), eriocitrin, narirutin, didymin, sinensetin, 6-methoxyflavone, tangeretin은 Extrasynthese 사 (Lyon, Genay-France)로부터 구입하여 사용하였다. 각 standard의 retention time은 eriocitrin 11.69, narirutin 15.27, naringin 16.35, hesperidin 16.96, neohesperidin 17.87, didymin 22.81, sinensetin 30.52, 6-methoxyflavone 36.05, tangeretin 36.23분으로 나타났고, 이 분석조건에서 감귤류의 major flavonoids인 naringin, hesperidin, neohesperidin의 retention time이 서로 1분 이상의 차이를 나타내며 구분되어 용출되었다 (Fig 2).

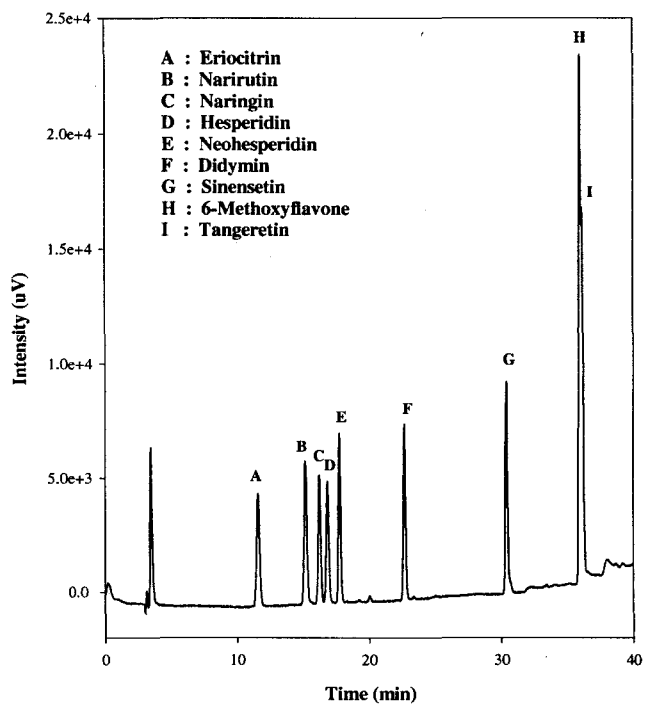


Fig. 2. Chromatogram of flavonoids standard.

3. 결과 및 고찰

가. Flavonoids 추출조건 검토

Flavonoids의 분석을 위한 추출용매로는 dimethyl sulfoxide(DMSO) (Ortuno et al. 1997, Vandercook, 1989), 끓는 물(Calvarano, et al., 1996), methanol(Berhow, 1991), DMF/methanol(20/80, v/v, 은종방 등, 1996), DMSO/methanol(1/1, v/v, Manthey and Grohmann, 1996, Bar-Peled et al., 1993) 및 DMF (Robards 등, 1997)를 사용한 연구결과들이 보고되었고 용매별로 큰 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 hesperidin이 물에 대한 용해성이 낮은 등 각 flavonoid의 추출 특성을 고려할때 DMF에 의한 추출율이 비교적 높은 경향을 보였다 (Robards 등, 1997).

본 연구에서는 시료의 추출조건을 결정하기 위하여 당유자 과피를 이용하여 용매의 배율 및 온도에 따른 추출율의 차이를 비교 검토하였다.

시료에 각각 10배, 200배의 물을 가하여 90℃에서 10분간 추출한 결과 배율이 증가함에 따라 naringin, neohesperidin, eriocitrin, narirutin 및 didymin의 추출율이 다소 향상되었으며 hesperidin의 추출율은 추출배율에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 (Table 1). 또한 추출용매를 물 또는 N,N-dimethylformamide (DMF)로 사용 시 DMF에 의한 추출율이 다소 향상되는 것으로 나타났다 (data was not shown).

추출온도에 따른 차이를 알아보기 위하여 시료에 200배의 물을 가한 후 0, 4, 20, 40, 60, 90℃에서 10분간 추출 시 모든 flavonoids의 추출율은 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table 2). Robards 등 (1997)은 온도가 증가함에 따라 flavonoids의 추출율이 증가하며, 특히 DMF 추출의 경우 hesperidin의 추출율이 현저히 증가한다고 하였다. 본 연구에서 당유자를 이용한 추출 시 온도에 따른 추출율의 현저한 차이는 나타나지 않았으나 flavonoids 추출용매로는 시료의 200배양의 DMF, 추출온도 및 시간은 90℃, 10분간으로 하였다.

Table 1. Contents of flavonoid according to solvent extraction ratio.

Extraction ratio	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neo-hesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavanone	Tange-retin
10	-	-	2.25	0.15	2.12	-	-	-	-
200	0.05	0.09	2.51	0.14	2.75	0.11	-	-	-

Table 2. Contents of flavonoid according to temperature.

Temperature (°C)	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neo-hesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavanone	Tange-retin
0	0.06±0.00	0.09±0.01	2.58±0.15	0.14±0.01	2.80±0.16	0.11±0.01	-	-	-
4	0.06±0.00	0.09±0.00	2.51±0.13	0.14±0.01	2.73±0.16	0.10±0.01	-	-	-
20	0.06±0.00	0.09±0.00	2.56±0.07	0.14±0.00	2.80±0.04	0.11±0.00	-	-	-
40	0.06±0.00	0.09±0.00	2.61±0.06	0.14±0.00	2.82±0.06	0.11±0.00	-	-	-
60	0.06±0.00	0.09±0.01	2.61±0.18	0.14±0.01	2.83±0.17	0.11±0.01	-	-	-
90	0.05±0.00	0.09±0.00	2.51±0.11	0.14±0.01	2.75±0.12	0.11±0.00	-	-	-

나. 감귤류 속과의 flavonoids 함량

우리나라에서 생산되는 감귤류의 flavonoids 함량에 대한 기초자료 제공을 위해 연구 출발 시점에서 확보 가능한 속과를 대상으로 flavonoids 함량을 분석하였다. 22종 감귤류 속과 과피의 flavonoids 분석 결과 flavanone glycoside가 대부분을 차지하며 그 중에서도 당유자, 지각, 편귤, 팔삭, 황금하귤, 문단의 6종을 제외한 나머지 16종에서는 hesperidin 이 주된 flavanone으로 나타났다. Naringin 및 neohesperidin의 함량은 hesperidin과는 다른 경향을 나타내어 hesperidin 함량이 3.5% (dry weight basis)를 넘는 온주밀감류, 네블오렌지류, 송산이예감, 궁내이에감, 청견, 동정귤, 스위트스프링의 12품종에서는 거의 검출되지 않았다 (Table 3).

속과에서의 함량 분석 결과 naringin 추출소재로 활용 가능한 품종으로는 '문단'이 naringin 함량이 4.4%로 가장 높은 동시에 naringin 이외의 flavonoids가 거의 검출되지 않아 (Fig. 3) naringin의 분리가 비교적 용이한 소재로 기대되었다. '지각' 또한 naringin 함량이 3.6%로 높았으며 '지각'은 neohesperidin의 함량 또한 22품종 중 두번째로 높은 1.8%를 나타내어 (Fig 4) naringin 및 neohesperidin 모두를 다량 함유하는 소재로 활용 가능할 것으로 예측되었다. '팔삭'과 '황금하귤'에서도 naringin 함량은 2% 이상으로 비교적 높게 나타나 활용 가능할 것으로 예상되었다. Neohesperidin 추출 소재로는 '당유자' (Fig 5), '지각', '편귤' (Fig 6)이 각각 약 2.2%, 1.8%, 1.0%로 현재 neohesperidin의 대량제조에 사용되고 있는 sour orange 'Bouquet de Fleur' 속과의 3.7%에는 미치지 못하나 'Afin' 속과의 1.0% 보다는 많거나 같은 양으로 평가되어 활용가능성이 예측되었다.

'Bouquet de Fleur' 속과에서의 neohesperidin 함량은 약 3.7%로 'Afin' 속과 1.0%의 3.7 배에 이르렀으나 미속과에서는 각각 29.3%, 27.2%로 거의 동일한 양을 나타내어 본 실험결과 속과에서의 neohesperidin 함

량이 2.2%, 1.8%, 1.0%를 나타낸 '당유자', '지각', '편굴' 미숙과에서의 neohesperidin 함량이 이들 품종에 필적할 가능성이 기대된다. 특히 '당유자' 및 '지각'은 제주 재래품종으로 활용 시 파급효과가 클 것으로 예상된다. 또한 당유자 과피는 현재 한약재로도 사용되고 있어 온주밀감이 거의 대부분인 우리나라 감귤농가에서 일부 계약 재배되고 있는 품종으로 원료 공급면에서도 비교적 용이할 것으로 추정된다.

Naringin과 neohesperidin 외의 flavanone 중 narirutin은 모든 품종에서 검출되었으나 당유자, 지각, 진굴, 편굴, 동정굴, 레몬, 문단, 팔삭 및 황금하귤은 약 0.2% 이하로, 그 외 12종에서는 0.4%이상 함유되어 있었으며 특히 온주밀감류와 네블오렌지류에서의 함량이 높았다. Eriocitrin은 17 품종에서 검출되었으나 감자, 동정굴, 레몬, 영굴의 4품종에서 약 0.2~1.0%로 함량이 높은 편이었고 나머지 품종에서는 0.1% 이하로 매우 소량 함유되어 있는 것으로 나타났다. Didymin은 14품종에서 검출되었으나 narirutin과 마찬가지로 온주밀감류와 네블오렌지류에는 약 0.2% 정도 함유되어 있으나 그 외 향산감귤류 및 기타 만감류에는 0.1% 이하로 소량으로 검출되었다. Flavanone glycoside인 sinensetin, 6-methoxyflavone 과 tangeretin중 6-methoxyflavone은 진굴에서 약 0.3% 나타난 것을 제외하고 나머지 16품종에서 0.1% 이하로 극히 소량 검출되었으며 sinensetin과 tangeretin은 거의 모든 품종에서 검출되지 않았다.

Table 3. Quantitation of flavonoids in twenty-two *Citrus* peels grown in Korea.

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
Satsuma mandarin									
<i>Okitsu Early</i>	0.06±0.00	1.38±0.09	0.06±0.03	6.31±0.48	0.07±0.04	0.26±0.02	-	0.04±0.02	-
<i>Ootsu No.4</i>	0.03±0.00	1.23±0.07	-	5.84±0.37	-	0.20±0.01	-	0.01±0.00	-
<i>Nankan No.4</i>	0.03±0.01	0.83±0.13	-	5.44±0.53	-	0.14±0.03	-	0.01±0.00	-
Sweet orange									
<i>Sirayanagi</i>	-	0.46±0.01	-	4.47±0.29	-	0.23±0.03	-	0.01±0.00	-
<i>Seike</i>	0.03±0.00	0.57±0.07	-	4.61±0.74	-	0.18±0.17	-	0.02±0.02	-
<i>Yosida</i>	0.03±0.01	0.42±0.03	-	5.23±0.73	-	0.23±0.03	-	0.01±0.00	-
Local <i>Citrus</i> spp. of Cheju									
<i>Dangyooja</i>	0.08±0.01	0.13±0.02	2.08±0.17	0.16±0.01	2.15±0.17	-	-	0.03±0.01	-
<i>Jinkyool</i>	0.05±0.01	0.09±0.10	-	2.20±0.15	-	0.03±0.01	0.07±0.05	0.33±0.02	-
<i>Jikak</i>	0.05±0.01	0.12±0.09	3.64±0.13	0.08±0.04	1.81±0.09	0.16±0.00	-	0.01±0.00	-
<i>Karnja</i>	0.16±0.04	0.40±0.09	0.07±0.02	0.97±0.22	0.06±0.02	0.07±0.01	-	0.04±0.01	-
<i>Pyunkyool</i>	-	0.03±0.00	0.90±0.19	0.07±0.01	1.01±0.21	-	-	0.06±0.01	-
<i>Dangjeongkyool</i>	0.35±0.05	0.10±0.02	-	4.84±0.41	-	-	-	0.07±0.02	-
Other late maturing <i>Citrus</i> varieties									
<i>Katsuyama hyokan</i>	0.04±0.03	0.94±0.08	-	4.03±1.05	0.04±0.02	0.07±0.04	-	0.03±0.03	-
<i>Myauchi hyokan</i>	0.04±0.00	1.33±0.22	-	3.67±0.44	-	0.12±0.01	-	0.02±0.00	-
<i>Kiyomi</i>	0.08±0.02	0.97±0.12	0.02±0.00	6.12±1.04	0.02±0.00	0.12±0.02	-	0.01±0.00	-
<i>Lemon</i>	0.95±0.04	0.04±0.00	-	1.99±0.20	-	-	-	-	-
<i>Sudachi</i>	0.26±0.03	0.69±0.07	0.45±0.14	1.10±0.32	0.49±0.03	-	-	-	-
<i>Yuzu</i>	-	0.39±0.05	0.22±0.02	0.55±0.08	0.21±0.02	-	-	-	-
<i>Pummelo</i>	0.01±0.00	0.02±0.01	4.40±0.63	0.04±0.05	0.03±0.02	0.01±0.00	-	-	-
<i>Sweetspring</i>	0.06±0.01	0.93±0.11	-	3.55±0.45	-	0.09±0.01	-	0.02±0.00	-
<i>Hassaku</i>	-	0.10±0.01	2.90±0.35	0.10±0.03	0.88±0.12	-	-	0.02±0.00	-
<i>Natsumikan</i>	-	0.14±0.03	2.12±0.51	0.10±0.03	0.85±0.19	-	-	-	-

Data are means of three independent samples ±SD.

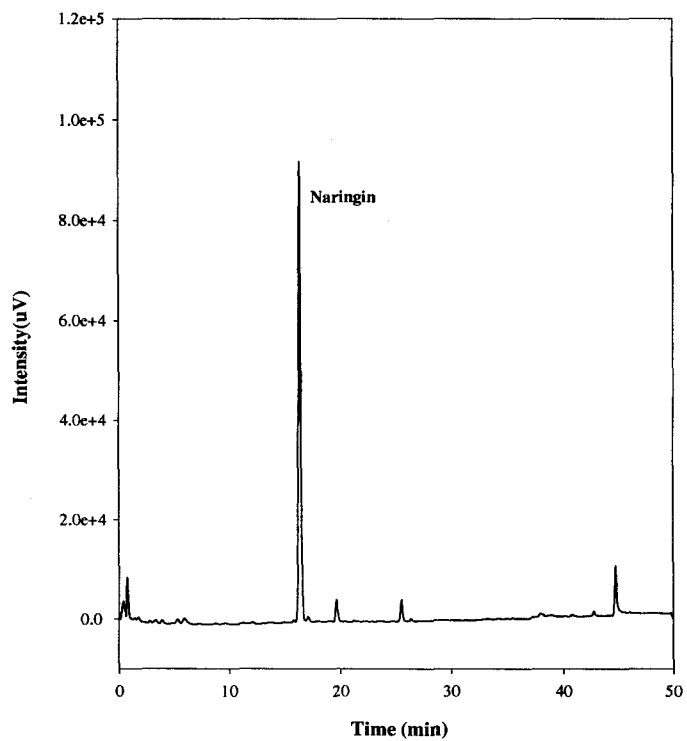


Fig. 3. Chromatogram of citrus peel flavonoids : *Mundan*.

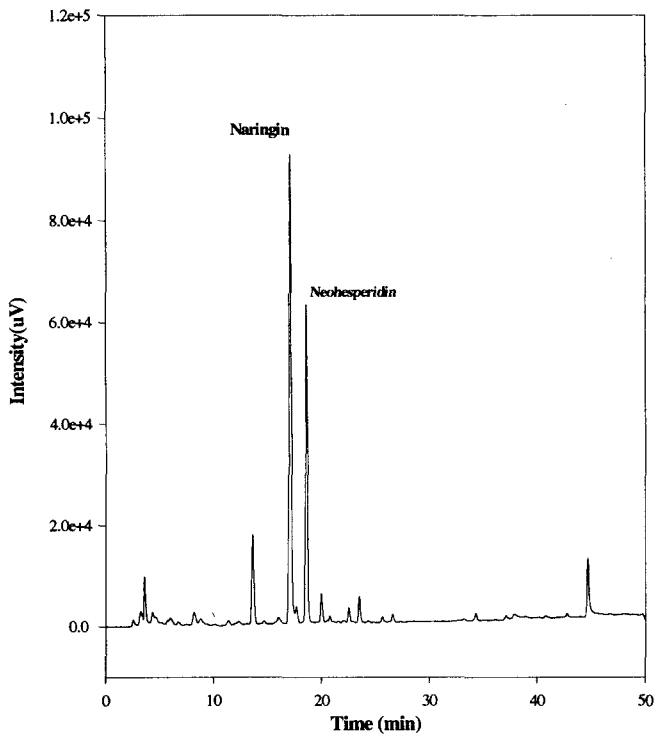


Fig. 4. Chromatogram of citrus peel flavonoids : *Jikak*.

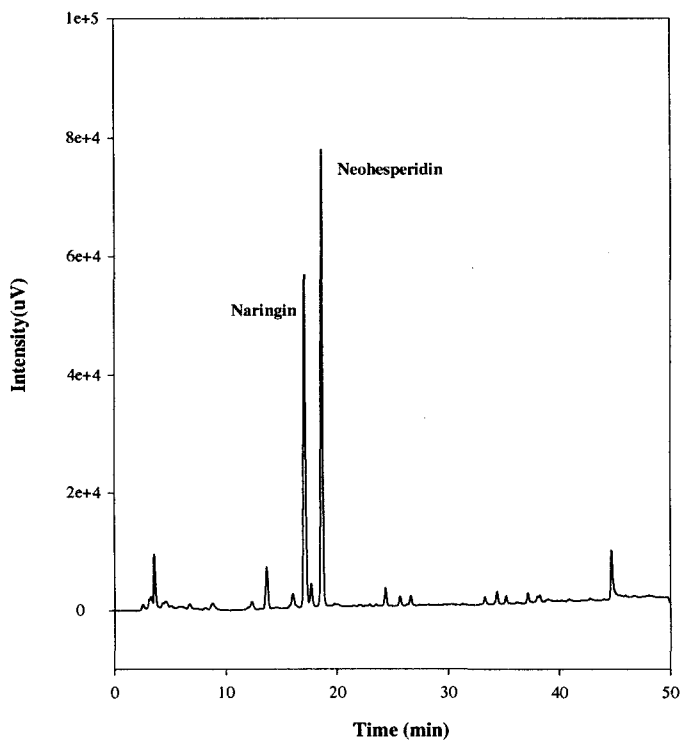


Fig. 5. Chromatogram of citrus peel flavonoids : *Dangyooja*.

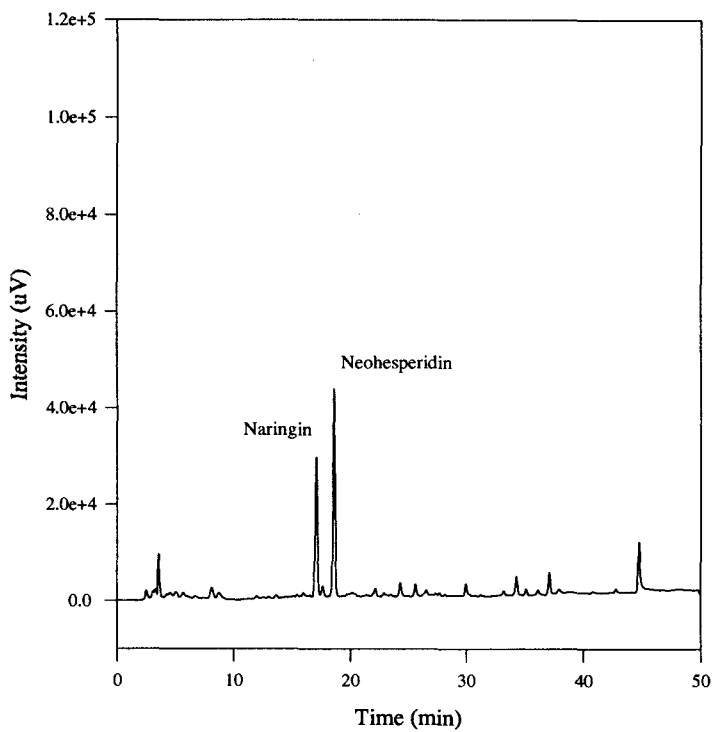


Fig. 6. Chromatogram of citrus peel flavonoids : *Pyunkyool*.

다. 감귤류의 숙기에 따른 flavonoids 함량 변화

국내산 감귤류에서 neohesperidin의 함량이 높을 것으로 기대되는 품종이 발견됨에 따라 NHP-DC 제조를 위한 원료물질로써 neohesperidin의 활용이 가능할 것으로 예상하고 적절한 소재 선발 및 그 활용 가능성을 확인하였다.

감귤류의 flavonoids는 대부분 과실이 미성숙한 상태에서 빠르게 합성되고 침착되며 (Maier, 1979), 숙성에 따라 함량이 점차 감소하는 것으로 알려져 있다 (Rouseff, 1980). 따라서 숙과에서의 neohesperidin 함량이 높은 당유자, 지각, 편귤과 숙과의 분석이 이루어지지 않은 사두감, 궁천조생, 병귤, 빈귤 및 홍귤의 8품종에 대해 숙기에 따른 flavonoids 함량 변화를 분석하였다.

2차 생리낙과 종료후인 8월부터 7차에 걸쳐 시료를 수집하여 분석한 결과 모든 감귤류에서 1차 수확한 미숙과 과피에서의 flavonoids 함량이 가장 많았고 수확시기가 늦어질수록 함량이 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 4~Table 10). 숙과 분석결과와 같이 미숙과에서의 neohesperidin 함량이 높게 나타났으며 나머지 5품종 중 neohesperidin을 다량 함유하는 소재는 발견되지 않았다.

특히 '당유자'는 모든 수확기의 시료에서 neohesperidin의 함량이 다른 flavonoids 류에 비해 현저히 높게 나타났으며 1차 수확 시기로부터 20일이 경과한 2차 수확 시에는 약 43%의 급격한 감소가 일어났고 그 이후 5차 수확 시까지는 거의 변화가 없다가 6차 수확 시인 12월에 다시 이전의 약 50%가 감소하여 총 감소량은 1차 수확 시의 약 60%로 나타났다. 그 이외의 flavonoids 또한 1차 수확 시기에 비해 2차 수확 시 약 30~40%의 급격한 감소가 일어난 후 큰 변화 없이 약간씩 감소하여 최종 7차 수확 시에는 초기의 약 65%수준까지 감소하여 neohesperidin함량의 변화와 유사한 경향을 나타내었다.

'지각'은 1차 수확 시 neohesperidin의 함량이 조사한 8품종 중 가장

높은 5.58%를 나타내었으며 naringin의 함량 또한 5.57%로 neohesperidin과 거의 같은 양을 나타내었다. Neohesperidin의 함량은 2차 수확 시 당유자와 마찬가지로 약 43%가 감소하였으나 그 이후 당유자와는 달리 계속적으로 감소하여 3차 수확 시기부터는 당유자보다 함량이 낮아졌으며, 최종적으로는 1차 수확시의 약 73%까지 감소되는 것으로 나타났다. 반면 naringin은 3차 수확 시까지는 neohesperidin의 함량변화와 유사한 경향을 나타내며 감소하였으나 그 이후에는 거의 감소하지 않아 최종적으로는 1차 수확 시의 약 50%만이 감소하여 조사한 8품종 중 함량이 가장 높았다. 그 외 hesperidin과 didymin은 1차 수확 시에 비해 3차 수확 시 함량이 약 50%정도 감소하였으며, 소량 함유된 eriocitrin과 narirutin은 숙기에 따른 함량의 변화가 크게 나타나지 않았다. 김 등(1989)은 시판 지각의 숙과에 naringin 2.83~4.25%, hesperidin 0.19~0.73%, neohesperidin은 3.01~4.84% 함유되어 있다고 보고하였으며 이를 본 실험의 7차 수확 시의 시료와 비교 시 naringin의 함량은 유사하고, hesperidin과 neohesperidin은 약간 높은 함량을 나타낸 것으로 보인다. 또한 당유자나 지각의 7차 수확 시의 flavonoids의 함량을 전년도의 숙과에서의 함량과 비교 시 전년도에 비해 전체적인 함량이 적은 것으로 나타나 감귤류의 flavonoids 함량이 재배연도에 따른 기후 등에 의해 차이를 나타낸 것으로 추정되었다.

‘편굴’ 또한 1차 수확 시기에 neohesperidin의 함량이 가장 높았으며 2차 수확 시기에 1차의 약 40%정도 감소한 이후는 7차 수확 시까지 큰 변화가 없어 당유자와 지각에 비해서는 수확시기에 따른 차이를 나타내는 경향이 확실치 않았다. Naringin의 함량 또한 수확시기에 따라 함량이 차이가 났으며 그 외 다른 flavonoids류는 함량이 적어서 변화의 경향을 확실하게 알기가 어려웠다.

당유자, 지각, 편굴 이외의 5종의 감귤류는 모두 hesperidin이 주된 flavonoid로 이 중 사두감은 다른 모든 품종에 비해 narirutin의 함량이 약 9.4%로 현저히 높았으며, 궁천조생과 빈굴은 hesperidin, 홍굴은

tangeretin의 함량이 높았다. 이들 flavonoids류 또한 1차 수확기에 함량이 높고 점차 감소하는 경향은 유사한 것으로 나타났다.

국내산 감귤류 총 27종의 분석 결과 neohesperidin 소재로 적용가능할 것으로 예측된 당유자, 지각, 편귤로 특히 미숙과에서의 함량이 높은 당유자와 지각이 neohesperidin 소재로 적합할 것으로 예상되었다. 그러나 '당유자' 및 '지각' 1차 수확시료의 neohesperidin 함량은 각각 5.07%, 5.58%로 현재 neohesperidin의 산업화에 이용되는 'Afin'과 'Bouquet de Fleur' 미숙과의 27.2%와 29.3% 보다는 훨씬 낮은 양으로 나타났다. 그러나 '당유자' 및 '지각'의 neohesperidin 함량은 1차 수확시기로부터 20일이 경과한 2차 수확 시에는 약 40~43%의 급격한 감소가 일어난 것으로 미루어 보다 이른 시기의 미숙과에는 'Afin'과 'Bouquet de Fleur'의 미숙과 함량에 필적하는, 상업적 활용이 가능할 정도의 양이 함유되어 있을 가능성이 예상되었다.

Table 4. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.8.9)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.06±0.00	0.29±0.01	2.84±0.01	0.64±0.00	5.07±0.04	0.03±0.00	-	-	0.06±0.00
<i>Jikak</i>	0.05±0.00	0.04±0.00	5.57±0.12	0.22±0.03	5.58±0.11	0.52±0.01	-	-	-
<i>Pyunkyool</i>	0.06±0.00	0.04±0.00	0.90±0.07	0.67±0.08	2.67±0.11	0.05±0.00	0.03±0.00	-	0.34±0.05
<i>Sadukam</i>	0.20±0.01	9.38±0.19	-	4.81±0.17	-	0.38±0.01	-	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	0.12±0.01	3.29±0.20	0.05±0.00	17.70±0.19	0.08±0.00	0.58±0.01	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.25±0.01	0.53±0.03	-	4.76±0.21	-	0.05±0.00	0.05±0.01	-	0.38±0.03
<i>Binkyool</i>	0.07±0.01	0.38±0.07	-	11.63±0.56	0.03±0.00	0.12±0.01	0.04±0.01	-	0.40±0.07
<i>Hongkyool</i>	0.25±0.00	0.21±0.02	-	7.34±0.48	0.03±0.00	0.11±0.01	0.16±0.01	-	1.33±0.13

Data are means of four independent samples ± SD

Table 5. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.8.31)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.07±0.01	0.23±0.01	1.91±0.10	0.33±0.02	2.89±0.15	-	-	-	0.12±0.01
<i>Jikak</i>	0.05±0.00	0.06±0.00	3.30±0.14	0.21±0.01	3.20±0.13	0.42±0.01	-	-	0.02±0.02
<i>Pyunkyool</i>	-	0.22±0.16	0.56±0.02	0.22±0.02	1.58±0.04	0.05±0.00	0.03±0.00	-	0.31±0.01
<i>Sadukam</i>	0.13±0.00	2.95±0.10	-	1.52±0.23	-	0.09±0.00	0.02±0.00	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	0.09±0.00	1.06±0.00	-	10.01±0.28	0.07±0.00	0.21±0.01	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.26±0.01	0.39±0.01	-	3.76±0.16	0.03±0.00	0.04±0.00	0.05±0.00	-	0.55±0.02
<i>Binkyool</i>	0.04±0.00	0.14±0.01	-	7.72±0.15	-	0.08±0.00	0.03±0.00	-	0.18±0.04
<i>Hongkyool</i>	0.26±0.01	0.10±0.06	-	3.48±0.07	0.03±0.00	0.05±0.00	0.22±0.02	-	1.73±0.14

Data are means of four independent samples ± SD

Table 6. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.9.20)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.07±0.00	0.25±0.03	1.88±0.13	0.52±0.09	2.96±0.18	0.03±0.00	0.02±0.00	-	0.16±0.02
<i>Jikak</i>	-	-	2.53±0.26	0.10±0.02	2.11±0.25	0.39±0.07	-	-	0.01±0.01
<i>Pyunkyool</i>	-	0.04±0.01	0.36±0.09	0.30±0.06	0.66±0.13	0.04±0.02	0.03±0.01	-	0.24±0.11
<i>Sadukam</i>	0.17±0.03	2.76±0.49	0.05±0.00	1.67±0.29	0.06±0.01	0.14±0.02	0.02±0.00	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	0.07±0.01	1.36±0.32	-	7.84±0.03	0.03±0.00	0.28±0.06	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.23±0.06	0.24±0.01	-	3.60±0.64	-	-	-	-	0.44±0.08
<i>Binkyool</i>	-	0.11±0.02	-	9.20±0.22	-	0.07±0.01	-	-	0.09±0.04
<i>Hongkyool</i>	0.21±0.01	0.04±0.00	-	5.25±0.47	0.05±0.04	0.06±0.01	0.12±0.02	-	1.13±0.26

Data are means of four independent samples ± SD

Table 7. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.10.7)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.04±0.00	0.17±0.00	2.24±0.09	0.24±0.01	2.71±0.09	-	-	-	0.05±0.01
<i>Jikak</i>	0.04±0.00	-	2.48±0.13	0.08±0.00	1.80±0.11	0.38±0.03	-	-	-
<i>Pyunkyool</i>	-	0.03±0.00	0.84±0.03	0.06±0.00	1.05±0.05	0.03±0.00	-	-	0.19±0.01
<i>Sadukam</i>	0.13±0.01	3.23±0.04	-	1.27±0.01	-	0.14±0.00	-	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	0.06±0.00	2.00±0.03	-	8.59±0.11	-	0.41±0.01	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.20±0.00	0.28±0.01	-	1.71±0.04	-	0.04±0.00	0.04±0.01	-	0.38±0.01
<i>Binkyool</i>	-	0.11±0.01	0.06±0.01	9.04±0.28	0.06±0.00	0.09±0.01	0.02±0.00	-	0.21±0.04
<i>Hongkyool</i>	0.18±0.00	0.05±0.01	-	4.19±0.29	-	0.06±0.01	0.10±0.01	-	0.95±0.06

Data are means of four independent samples ± SD

Table 8. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.10.29)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.08±0.02	0.11±0.00	1.82±0.06	0.15±0.00	2.91±0.07	0.02±0.00	-	-	0.04±0.00
<i>Jikak</i>	0.04±0.00	0.02±0.00	2.47±0.09	0.06±0.00	1.76±0.07	0.29±0.01	-	-	-
<i>Pyunkyool</i>	-	0.04±0.00	0.72±0.05	0.08±0.01	0.99±0.06	0.01±0.00	0.01±0.00	-	0.14±0.01
<i>Sadukam</i>	0.17±0.01	3.83±0.19	-	1.52±0.07	0.03±0.00	0.15±0.01	0.02±0.00	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	0.05±0.00	1.32±0.07	-	6.49±0.37	-	0.25±0.02	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.23±0.00	0.29±0.00	-	1.92±0.04	-	0.03±0.00	0.04±0.00	-	0.22±0.02
<i>Binkyool</i>	-	0.08±0.00	-	8.05±0.46	0.03±0.00	0.08±0.00	-	-	0.04±0.01
<i>Hongkyool</i>	0.16±0.01	0.03±0.00	-	3.14±0.19	-	0.03±0.00	0.10±0.01	-	0.63±0.04

Data are means of four independent samples ± SD

Table 9. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.12.2)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.08±0.00	0.09±0.01	1.33±0.07	0.11±0.00	1.67±0.09	0.01±0.00	-	-	-
<i>Jikak</i>	0.05±0.00	-	2.31±0.06	-	1.29±0.03	0.32±0.00	-	-	-
<i>Pyunkyool</i>	-	0.04±0.00	1.10±0.01	0.05±0.00	1.89±0.02	0.02±0.00	-	-	0.11±0.01
<i>Sadukam</i>	0.10±0.00	1.80±0.08	-	0.57±0.03	-	0.05±0.00	-	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	-	0.72±0.03	-	4.49±0.12	-	0.17±0.01	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.21±0.01	0.19±0.00	-	1.04±0.02	-	-	0.01±0.01	-	0.21±0.02
<i>Binkyool</i>	-	-	-	5.87±0.13	-	0.02±0.00	-	-	0.09±0.01
<i>Hongkyool</i>	0.14±0.02	-	-	2.94±0.01	-	0.03±0.00	0.06±0.00	-	0.44±0.03

Data are means of four independent samples ± SD

Table 10. Contents in the flavonoid in Korea *Citrus* peel (Date harvested 99.12.28)

Sample	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
<i>Dangyooja</i>	0.10±0.00	0.08±0.00	1.58±0.22	0.09±0.00	1.90±0.06	-	-	0.04±0.00	-
<i>Jikak</i>	0.10±0.00	0.03±0.00	2.86±0.07	0.04±0.00	1.47±0.02	0.33±0.00	-	0.02±0.00	-
<i>Pyunkyool</i>	0.05±0.00	-	0.59±0.02	0.10±0.00	1.65±0.05	0.01±0.00	-	0.07±0.00	-
<i>Sadukam</i>	0.17±0.01	3.19±0.12	-	0.90±0.04	-	0.10±0.00	-	-	-
<i>Miyagawa Wase</i>	-	1.46±0.08	-	4.15±0.19	-	0.28±0.01	-	-	-
<i>Byungkyool</i>	0.28±0.00	0.29±0.00	-	1.44±0.01	-	-	-	0.11±0.00	-
<i>Binkyool</i>	-	-	-	5.41±0.13	-	0.06±0.00	-	0.10±0.00	-
<i>Hongkyool</i>	0.15±0.01	-	-	1.73±0.08	0.04±0.00	0.03±0.01	-	0.34±0.02	-

Data are means of four independent samples ± SD

라. Neohesperidin 추출을 위한 당유자 및 지각의 적정 수확기 분석

Neohesperidin 함량이 최고에 달하는 당유자 및 지각의 수확시기를 분석하기 위하여 과실이 형성되는 6월 하순부터 시료를 채취하여 함량의 변화를 분석하였다.

‘당유자’는 6월 하순에 채취한 시료에서 neohesperidin의 함량이 33% (dry weight basis)에 이르러 전년도의 1차 수확기 8월 초순에 비해 6배 이상 높은 함량을 나타내었다 (Table 11). 이 것은 현재 neohesperidin의 대량생산에 이용되는 스페인산 sour orange ‘Afin’과 ‘Bouquet de Fleur’ 미숙과의 27.2%, 29.3% 보다 높은 것으로 현재까지 보고된 것 중 가장 높은 것으로 파악된다. 또한 neohesperidin의 함량은 2차 수확 시 26%로 10일 사이에 약 21%가 감소되었으며 이후에도 계속 직선적인 감소를 보였으며 6차 수확 시까지 초기의 약 80%로 감소되었으며 그 이후 감소비율이 점차 낮아졌다 (Fig. 7). 전년도 미숙과의 1차 분석 시기와 같은 8월 초순의 neohesperidin함량은 6.57%로 전년도 결과 5.07%에 비해 높은 것으로 나타났으나 이러한 차이는 재배 시의 기상조건이나 토양 등의 농업환경적인 요인이나 감귤 개체간의 내부적인 요인에 의한 것으로 사료된다. 10월 10일 경부터는 2.85%로 전년도 같은 시기의 2.71%와 비슷한 수준을 나타내었다.

‘지각’ 또한 1차 수확 시 neohesperidin 29.33%로 전년도의 1차 분석 시기인 8월 초순에 비해 약 5배 높아 (Table 12) ‘Afin’과 ‘Bouquet de Fleur’ 미숙과와 거의 같은 수준의 함량을 나타내었다. 숙성 시기에 따른 변화 또한 당유자와 유사하여 6차 수확 시까지 직선적으로 감소하여 초기의 약 75%를 나타내었고 그 이후에는 감소율이 둔화되었다 (Fig. 8)

국내산 감귤류 27품종에대한 3년에 걸친 neohesperidin의 분석 결과 제주재래품종인 당유자와 지각 초기미숙과의 neohesperidin 함량이 지금까지 보고된 다른 어떤 품종보다 높은 것으로 나타나 산업적 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

Table 11. Changes in the flavonoids of *Dangyooja* grown over a four month period.

Date harvested	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy-flavone	Tangeretin
00. 6.22	-	0.36±0.02	4.65±0.23	4.26±0.25	33.05±1.47	-	-	-	-
00. 7. 1	-	0.40±0.00	6.62±0.09	3.16±0.04	25.53±0.36	-	-	-	-
00. 7.10	0.04±0.00	0.34±0.14	9.22±0.47	2.17±0.06	18.41±1.04	0.03±0.01	-	-	-
00. 7.19	0.02±0.00	0.66±0.01	8.46±0.22	1.57±0.03	12.72±0.27	0.01±0.00	0.01±0.00	-	-
00. 7.29	0.06±0.00	0.52±0.00	5.08±0.09	1.04±0.03	7.87±0.26	-	0.01±0.00	-	-
00. 8. 7	0.08±0.01	0.48±0.02	5.08±0.20	0.70±0.02	6.57±0.14	-	0.01±0.00	-	-
00. 8.16	0.06±0.00	0.39±0.01	3.99±0.18	0.47±0.02	4.64±0.10	-	0.01±0.00	-	-
00. 8.30	0.05±0.00	0.24±0.01	3.05±0.05	0.41±0.02	4.40±0.10	-	0.01±0.00	-	-
00. 9.19	0.07±0.00	0.28±0.01	3.48±0.14	0.41±0.02	4.61±0.22	0.01±0.00	0.01±0.00	-	-
00.10.10	0.07±0.00	0.16±0.00	1.57±0.03	0.28±0.01	2.85±0.04	0.01±0.00	0.01±0.00	-	-
00.10.30	0.12±0.01	0.22±0.00	1.95±0.05	0.32±0.01	2.84±0.09	0.01±0.00	0.01±0.00	-	-

Data are means of four independent samples ± SD

Table 12. Changes in the flavonoids of *Jikak* grown over a four month period.

Date harvested	Flavonoid contents (g/100g dry weight)								
	Eriocitrin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin	Didymin	Sinensetin	6-Methoxy -flavone	Tange -retin
00. 6.22	0.04±0.01	0.01±0.00	11.51±0.39	0.32±0.01	29.33±0.77	-	-	-	-
00. 7. 1	0.04±0.00	0.04±0.00	16.59±0.33	0.24±0.00	21.04±0.29	-	-	-	-
00. 7.10	0.03±0.01	0.03±0.00	17.99±0.55	0.16±0.02	17.56±1.76	0.43±0.06	-	-	-
00. 7.19	0.02±0.00	0.47±0.01	14.40±0.21	0.03±0.00	12.23±0.14	0.40±0.01	-	-	-
00. 7.29	0.03±0.00	0.02±0.00	10.24±0.41	0.02±0.00	8.41±0.37	0.41±0.02	-	-	-
00. 8. 7	0.05±0.00	0.02±0.00	9.86±0.41	-	7.11±0.34	0.39±0.02	-	-	-
00. 8.16	0.04±0.00	0.02±0.00	8.37±0.35	-	5.88±0.19	0.37±0.01	-	-	-
00. 8.30	0.04±0.00	0.02±0.01	6.56±0.13	-	4.56±0.14	0.33±0.01	-	-	-
00. 9.19	0.05±0.00	0.01±0.00	6.12±0.31	-	4.39±0.22	0.33±0.03	-	-	-
00.10.19	0.04±0.00	0.02±0.00	4.99±0.19	-	3.12±0.12	0.26±0.01	-	-	-
00.10.30	0.05±0.00	0.02±0.01	3.95±0.12	-	2.94±0.14	0.27±0.01	-	-	-

Data are means of four independent samples ± SD

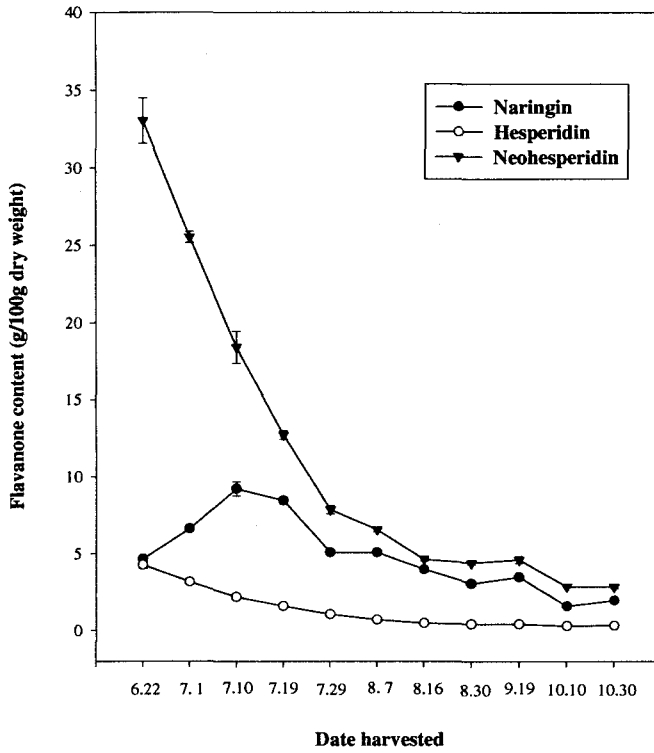


Fig 7. Changes in the flavonoids of *Dangyooja*.

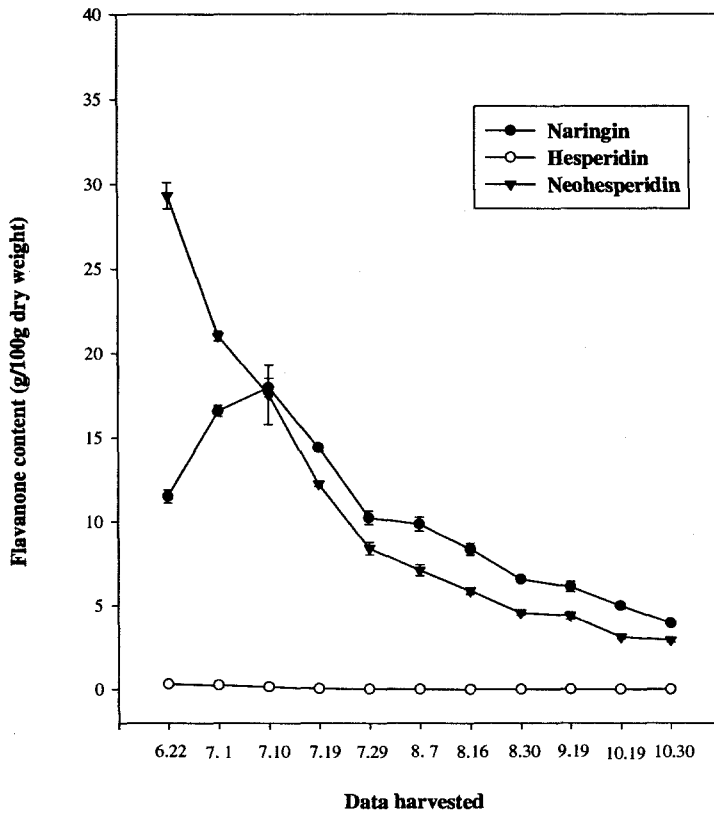


Fig 8. Changes in the flavonoids of *Jikak*.

제 2 절 Neohesperidin 추출 및 결정화 공정 확립

1. 서설

Neohesperidin의 결정화에 대한 보고는 극히 드물며 적용 가능한 방법으로 '알칼리 용액' 또는 '80% 메탄올' 추출 후 chloroform 계에서 결정을 석출시키는 방법이 보고되어 있다. 알칼리용액 추출 (野村男次 1973)은, 과피 건조 분말을 NaOH 용액에 (pH 11~12) 약 1시간 교반 침적시킨 후 압착하여 추출액을 분리하고 염산으로 중화 (pH 6.5) 시킨 후 감압 농축시킨다. 다시 염산으로 pH 4.5로 조정하고 냉장고 (0℃)에서 10일 정도 방치하면 회수율 약 5% 정도의 회백색 침전물인 naringin hydrolate가 석출된다. 이때 알칼리성용액을 산성화시켜도 neohesperidin은 석출되지 않으므로 이 원리를 이용하여 naringin과 neohesperidin을 분리 할 수 있다. Naringin hydrolate를 분리한 잔액을 ethyl acetate로 반복 추출하여 추출액을 감압농축하면 시럽상이 되고 이 시럽에 chloroform을 첨가하여 냉장고에서 10~20일간 방치하면 회백색 침상 결정이 석출되며 이것이 용점 240℃, 수율 약 3%의 neohesperidin인 것으로 보고되어 있다.

용매 추출법은 과피 건조분말에 약 3배량의 80% methanol을 첨가하여 2~3회 반복하여 가열 추출한 후 분리한 추출액을 감압 농축하여 시럽상이 된 농축액을 chloroform을 첨가하여 용해시킨 후 저온에서 10일 정도 방치하면 결정이 석출되며 이 결정을 분리하여 80% 메탄올로 재결정하면 회수율 약 7%의 침상결정으로서의 neohesperidin이 얻어지는 것으로 보고되어 있다.

Flavonoid의 산업적 이용을 위한 대량 추출법으로는 Calvarano 등 (1996)이 이탈리아 레몬 일종인 'Bergamot' peels의 산업적 이용을 위하여 이로부터 naringin을 추출하는 방법을 보고하였다. 즉, naringin이 hesperidin에 비해 hot water에 용해도가 좋은 점을 이용하여 hot water로 추출 후 이를 ultrafiltration 하고 다시 이를 macroporous cross-linked

polystyrene인 Amberlite XAD 16 resin에 흡착시켜 hot water에 함께 용출된 sugars, acids, pectins, minerals 등과 분리가 가능하며 이때의 회수율은 약 92.6~95.3%에 이른다고 하였다.

본 연구에서는 우선 '알칼리용액' 및 '80% 메탄올' 추출 후 chloroform 계에서의 neohesperidin의 석출 가능성을 검토하였으며 neohesperidin의 대량 추출을 위해 Amberlite XAD 16 column chromatography의 적용 가능성을 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

가. 시료

제주도 농가에서 구입한 당유자 완숙과피를 상온에서 송풍 건조한 후 분쇄기 (HANIL FM-680T)로 분쇄하여 -20°C 냉동고에 보존하며 사용하였다.

나. 알칼리 추출법

당유자 과피 건조분말을 4배량의 0.1 N NaOH (pH 11~12) 용액에 약 1시간 교반 침적 시킨 후 원심분리 ($7,700 \times g$, Sorvall RC 5C Plus, USA)하여 추출액을 분리하였다. 이 추출액을 HCl로 pH 6.5까지 중화시킨 후 약 1/3 량이 될 때까지 감압 농축시켰다. 이 농축액의 pH를 4.5로 조정하고 0°C 에서 10일 정도 방치하여 naringin hydrolate의 석출을 유도하였다. 잔액을 ethyl acetate로 추출하여 감압농축한 시럽에 chloroform을 첨가하여 냉장고에서 10~20일간 방치하면서 회백색 침상 결정 neohesperidin의 석출을 유도하였다.

다. 용매 추출법

당유자 과피 건조분말에 10배량의 55~60% methanol을 첨가하여 90°C 에서 교반하며 3회 반복 추출한 후 원심분리 ($7,700 \times g$, Sorvall RC 5C Plus, USA)하여 분리한 추출액을 4°C 에 하룻밤 방치하였다. 이때 응고되는 pectin을 제거하고 추출액은 감압 농축하였다. 시럽 상이 된 농축액을 chloroform으로 용해시켜 저온에서 10일 정도 방치하며 neohesperidin 결정의 석출을 유도하였다.

라. Neohesperidin 분리용 농축물 제조

당유자 과피 건조 분말에 50배량의 80% methanol을 가하여 환류냉각법으로 90°C 에서 1시간 씩 2회 반복추출 하였다. 추출한 시료를 원심분리

(7,700 x g, Sorvall RC 5C Plus, USA) 한 후 상장액을 YM10 membrane (MW 10,000 cut off, Amicon Co., USA)으로 4℃, 60psi에서 ultrafiltration하여 분자량 10,000이상의 획분을 제거하였다. 여과액을 감압 농축한 후 nonionic polymeric adsorbent인 Amberlite XAD-16 (Sigma Co., USA)의 column (φ4.1 x 30 cm)에 흡착시키고 흡착된 flavonoid는 ethanol로 용출시켰다.

마. HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리

Amberlite XAD-16 column chromatography로 분리된 flavonoid 획분을 감압 농축한 후 분석용 HPLC를 이용하여 실험실내에서의 분리를 시도하였으며 이 때의 분리조건을 Prep-HPLC에 적용시켜 neohesperidin의 분리를 시도하였다. 이때 분석용 HPLC에의 분리조건과 산업화를 위한 Prep-HPLC에 서의 분석조건은 Table 13에 나타내었다.

Table 13. Condition of HPLC for crystallization of neohesperidin.

	Laboratory condition	Preparative HPLC
Column	Capcell pak C ₁₈ UG120 (φ4.6 x 250 mm)	Capcell pak C ₁₈ UG80 (φ10 x 65 cm)
Mobile phase	17~40% Acetonitrile	25% CH ₃ CN
Gradient	Isocratic	Isocratic
Flow rate	1 ml/min	500 ml/min
Detection	UV 280 nm	UV 280 nm

3. 결과 및 고찰

가. 알칼리 용액 추출에 의한 neohesperidin의 석출

시료로 사용한 당유자 속과과피에는 naringin과 neohesperidin이 약 1:1의 비율로 존재하여, 당유자 알칼리 추출액의 산성화 과정에서의 naringin hydrate 석출에 의한 neohesperidin과의 분리를 시도하였다. 본 실험에서는 시간의 경과에 따라 naringin hydrate로 추정되는 회백색 침전이 극히 소량 석출되었다. 침전을 제거한 잔액을 ethyl acetate로 반복 추출한 후 농축한 시럽상의 추출물에 chloroform을 첨가하여 0℃에서 30일 이상 방치하면서 회백색 침상 결정 neohesperidin의 석출을 유도하였으나 결정은 생기지 않았다. 동일한 실험을 3회 이상 반복하였으나 문헌상의 결과를 반영할 수 있는 결과를 얻기 어려웠다. Pratter (1981)는 알칼리 추출법을 통한 naringin 석출법이 수율이 적고 어려워 이 방법은 science 라기 보다 'Art'에 가깝다 라고 표현하며 이 방법의 어려움을 지적하였다. 본 연구 결과 역시 이 방법이 산업화를 위한 대량 석출법으로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

나. 용매 추출에 의한 neohesperidin의 석출

Nishiura 등 (1969)과 野村男次 (1973)의 80% 메탄올 추출법에 따라 neohesperidin의 석출을 시도하였다. 그러나 실험결과 시럽상의 농축액은 chloroform에 잘 용해되지 않았을 뿐 아니라 2주 이상 경과하여도 결정의 석출이 나타나지 않았다. 이 실험 역시 3회 이상 반복 실시하였으나 neohesperidin 결정의 석출은 유도되지 않았다.

이상과 같이 pH 조정에 의한 naringin 결정석출 후 neohesperidin의 결정 유도 또는 용매추출물로부터의 neohesperidin 결정 석출 방법 모두 소재의 대량추출법으로 적용하기는 어려운 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 지금까지 보고된 방법이 약 30년 전에 개발된 방법이

며 현재 column chromatography에 의한 물질의 분리 기술에 엄청난 진보가 이루어졌으며 실제 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)에 의한 물질의 대량 분리 생산 기술이 산업화에 적용되고 있는 실정에 착안하여 neohesperidin의 분리에 '용액으로 부터의 결정 석출법'이 아닌 HPLC에 의한 분취를 시도하였다.

다. Neohesperidin 원료 농축물 제조

1) Neohesperidin의 적정 추출 배율

HPLC에 적용할 수 있는 중간소재로서의 neohesperidin 농축물 제조를 위하여 우선 당유자 건조과피의 환류냉각법에 의한 추출율을 검토하였다. 시료무게의 10배, 20배, 30배, 50배로 추출배율을 달리하여 80% methanol을 넣고 추출한 결과 용매량이 가장 많은 50배 추출시의 neohesperidin 추출율이 가장 높았다 (Table 14).

Table 14. NHP concentration of *Dangyooja* according to extraction ratio.

Extraction ratio	10	20	30	50
NHP concentration	2g/100g	1.9g/100g	1.9g/100g	2.8g/100g

2) Neohesperidin 농축물의 제조

시료무게의 50배량의 80% methanol로 추출 후 원심분리하여 감압농축한 neohesperidin 추출액을 냉장 보관하면 pectin으로 추정되는 침전이 발생하며 이 침전은 원심분리하여 다시 제거하였다. 회수율을 높이기 위해서 원심분리한 침전물을 1회 반복하여 원심분리하고 생성된 상정액을 1회 원심분리한 상정액과 합하여 다음단계의 실험에 사용하였으며 이 용액의 neohesperidin 농도는 3.44 mg/ml이었다. 이 용액을 다시 ultrafiltration 하여 분자량 10,000이상의 물질을 제거하였으며 이때의 neohesperidin 회

수율은 약 87%에 달하였다. 이 용액을 다시 감압농축시킨 후 Amberlite XAD-16 column ($\phi 4.1 \times 30.3$ cm)에 흡착시키고 흡착 획분을 60% ethanol로 용출 시켰다. Calvarano 등 (1996)은 naringin을 30% ethanol로 용출시켰으나 본 실험에서는 30% ethanol을 이용 시 neohesperidin의 용출에 재현성이 없어 60% ethanol을 용출 용매로 선택하였다. 용출된 이 용액을 다시 감압 농축하여 중간 소재인 neohesperidin 농축액 'Extract-I(Ext-I)'을 제조하였다. Ext-I의 neohesperidin 농도는 30.0 ± 6.3 mg/ml, 건물중량비로는 21.0 ± 3.6 % (w/w)에 달하였으며 이는 초기 환류냉각 추출액을 원심분리 한 후와 비교 시 회수율이 약 86%에 이르렀다.

라. HPLC에 의한 neohesperidin의 분리

1) 분석용 HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리

대량분리시의 분리조건 설정을 위해 우선 Ext-I을 이용하여 분석 HPLC system에서의 분리조건을 검토하였다. 당유자 속과과피는 naringin과 neohesperidin을 거의 동량 함유하고 있어 이들의 적절한 분리 조건설정이 중요하며 동시에 1회 분취에 필요한 분리시간은 가능한 한 짧은 조건이 경제적이다. 분리 시스템의 단순화를 위하여 용출조건은 isocratic 용출로 하고 우선 acetonitrile 17% (Fig. 9), 30% (Fig. 10), 40% (Fig. 11)에서의 용출상태를 비교하였다.

17% acetonitrile로 분리 시 naringin과 neohesperidin은 완전히 분리되었으나 neohesperidin의 용출시간이 약 50분으로 용출시간이 너무 길었고, 40% acetonitrile을 사용 시는 분석시간은 짧아지나 naringin과 neohesperidin의 분리도가 떨어졌으며 30% acetonitrile의 경우 naringin과 neohesperidin을 분리 분취가 가능하였으며, 용출시간 역시 약 20~25분 경으로 비교적 적절하였다. 따라서 대량 분취용 HPLC에 적용하기 적절한 neohesperidin 용출 용매로는 acetonitrile 농도 30% 전후가 적합할 것으로 예측되었다.

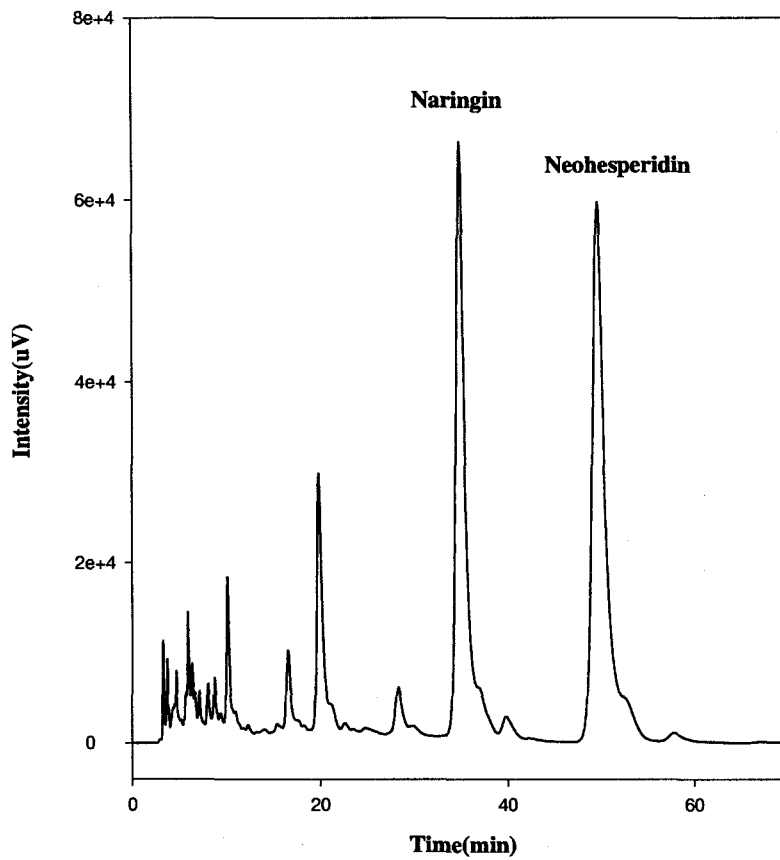


Fig. 9. Chromatogram of Extract-I on HPLC.
Mobile phase : 17% acetonitrile

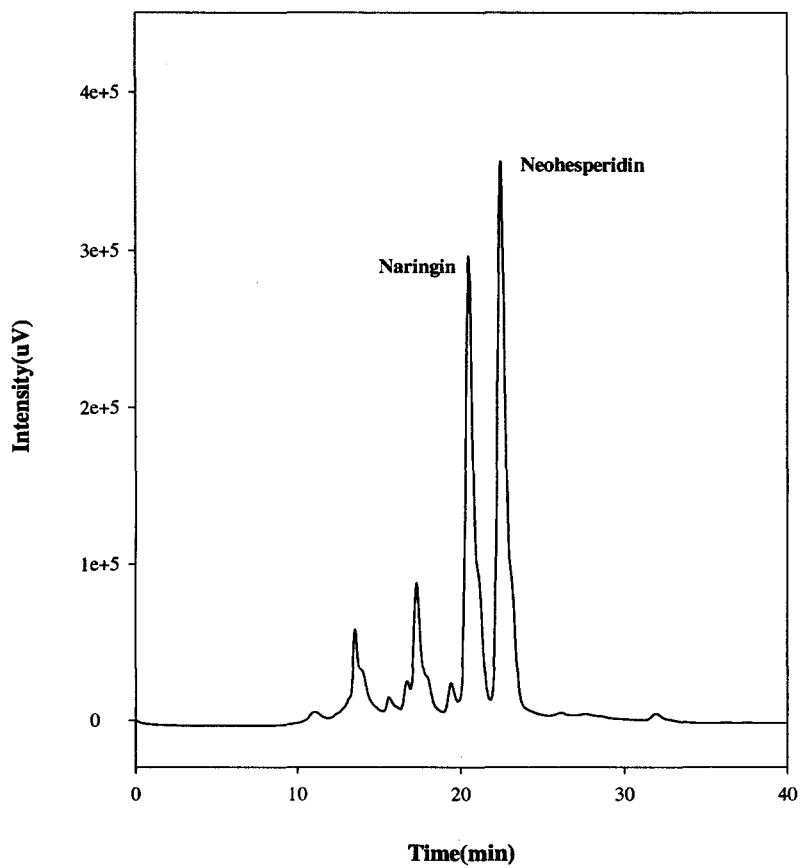


Fig. 10. Chromatogram of Extract-I on HPLC.
Mobile phase : 30% acetonitrile

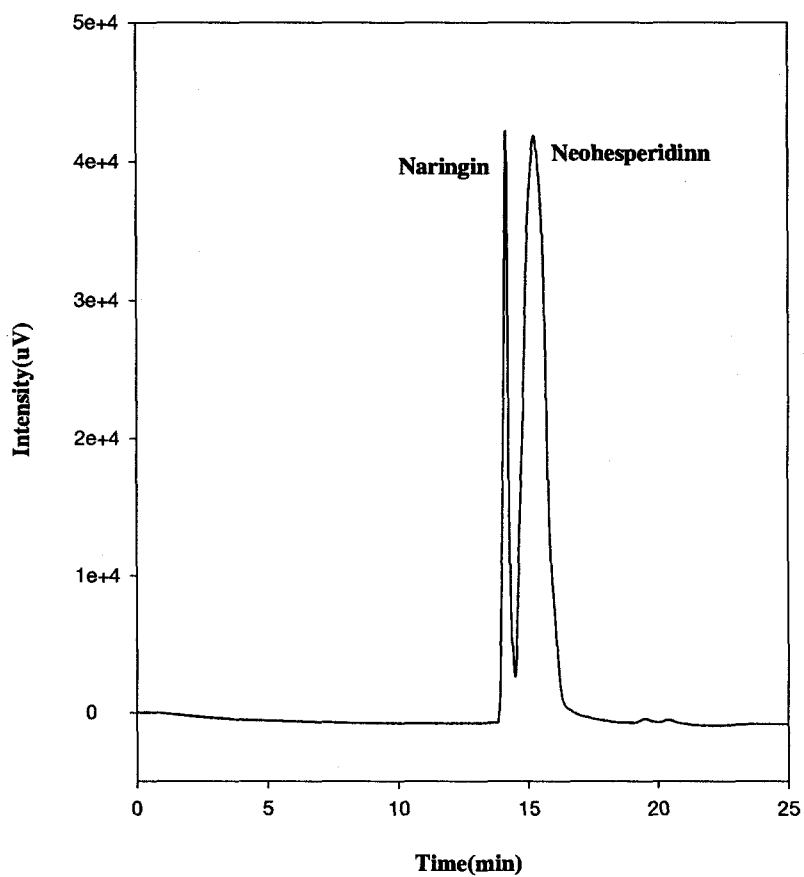


Fig. 11. Chromatogram of Extract-I on HPLC.
Mobile phase : 40% acetonitrile

2) Preparative HPLC를 이용한 neohesperidin의 분리

HPLC에 의한 neohesperidin 분리 방법의 산업화 가능성을 확인하기 위하여 현재 소재의 분리에 Prep-HPLC system을 활용하고 있는 'B 사'의 협조를 Ext-I으로부터의 neohesperidin 분취 가능성을 검토하였다.

용출용매를 25% acetonitrile로하고 pressure를 4.5 MPa (Fig. 12), 4.8 MPa (Fig. 13)로 하였을 때 각각의 조건에서 naringin과 neohesperidin의 분리도는 4.5 MPa의 경우가 약간 더 나았으나 neohesperidin의 용출시간은 각각 22분~27분, 20분~25분으로 후자의 경우가 약간 빨랐다.

4.8 MPa 조건하에서 분취한 neohesperidin 획분의 순도를 HPLC로 확인한 결과 neohesperidin 이외의 불순물이 거의 혼재되지 않은 것으로 확인되었다 (Fig. 14). HPLC에서 얻어진 neohesperidin은 한국과학기술연구소의 협조를 얻어 IR recording 및 ^1H NMR 분석한 결과 시약 authentic과 동일한 것으로 나타났다.

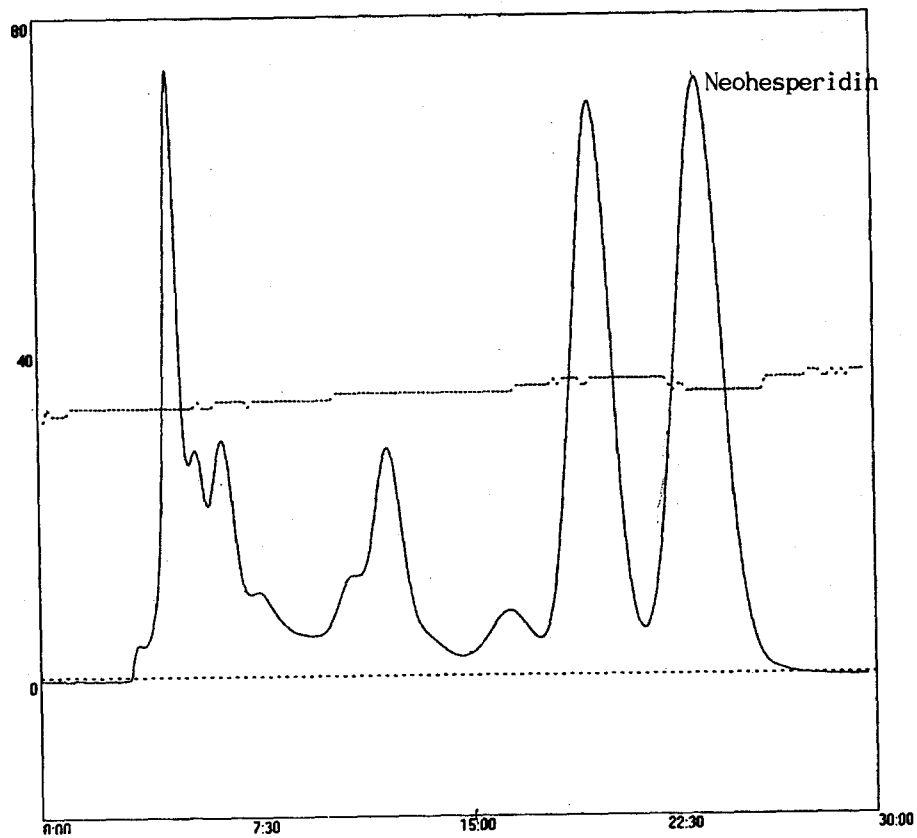


Fig. 12. Chromatogram of Extract-I on prep-HPLC.
Pressure : 4.5 MPa

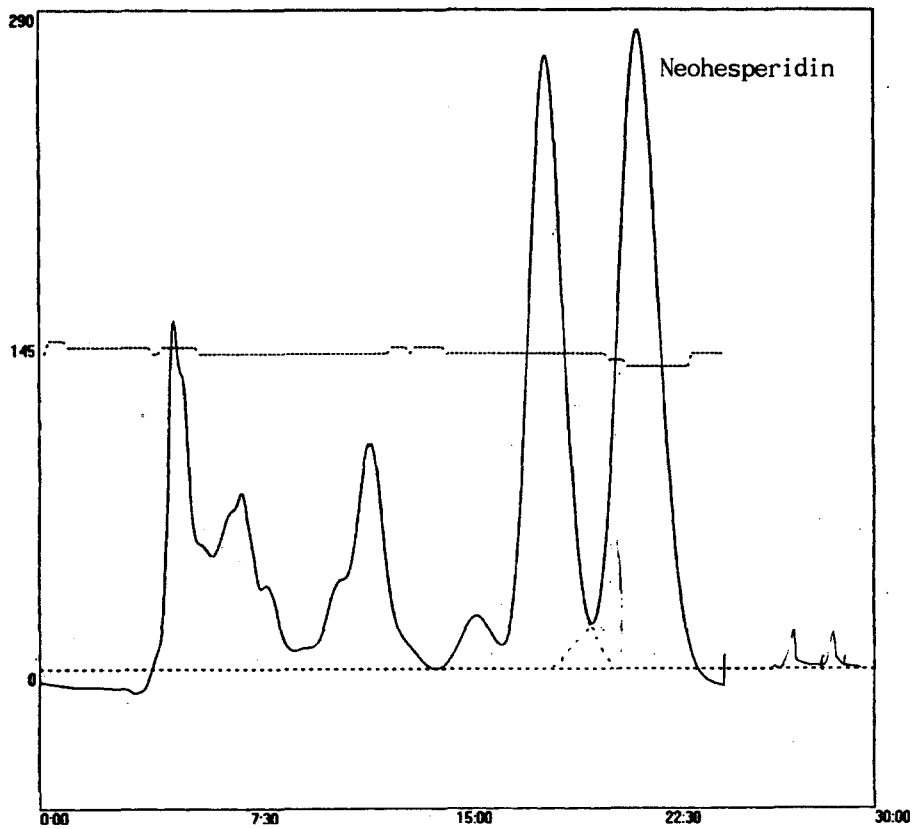


Fig. 13. Chromatogram of Extract-I on prep-HPLC.
Pressure : 4.8 MPa

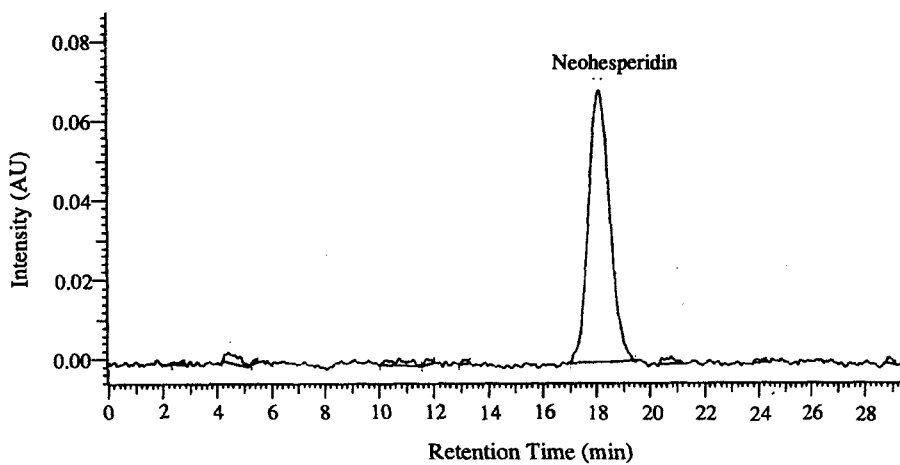


Fig. 14. Chromatogram of the resulting fraction by preparative HPLC.

다. Neohesperidin 대량생산을 위한 System의 설계

실험결과를 바탕으로 neohesperidin 대량생산을 위한 system의 설계를 'B'사에서 사용하고 있는 Prep-HPLC를 기준으로 설계하였다.

중간소재 Ext-I에 neohesperidin 이외의 물질이 거의 동량 이상 혼재되어 있는 점을 감안하여 분리용 column은 pre column (Capcell Pak C₁₈ UG80 column ϕ 5x25 cm)과 분리용 본 column (Capcell Pak C₁₈ UG80 column ϕ 10x100 cm) 2개로 구성하는 것이 바람직할것으로 추정되었으며 이동상 용매로는 40% methanol 또는 25~30% acetonitrile을 사용할 경우 1회 분석 cycle을 30분 이내로 단축 가능할 것으로 예상되었다. Neohesperidin 약 30.0mg/ml을 포함하는 중간소재 Ext-I을 이 조건하에서 1회 injection 량을 50ml로 하였을 경우 1일 10시간 가동으로 하루에 약 30g의 생산이 가능한 것으로 추정되었다.

전체 scheme은 Fig 14에 나타내었다.

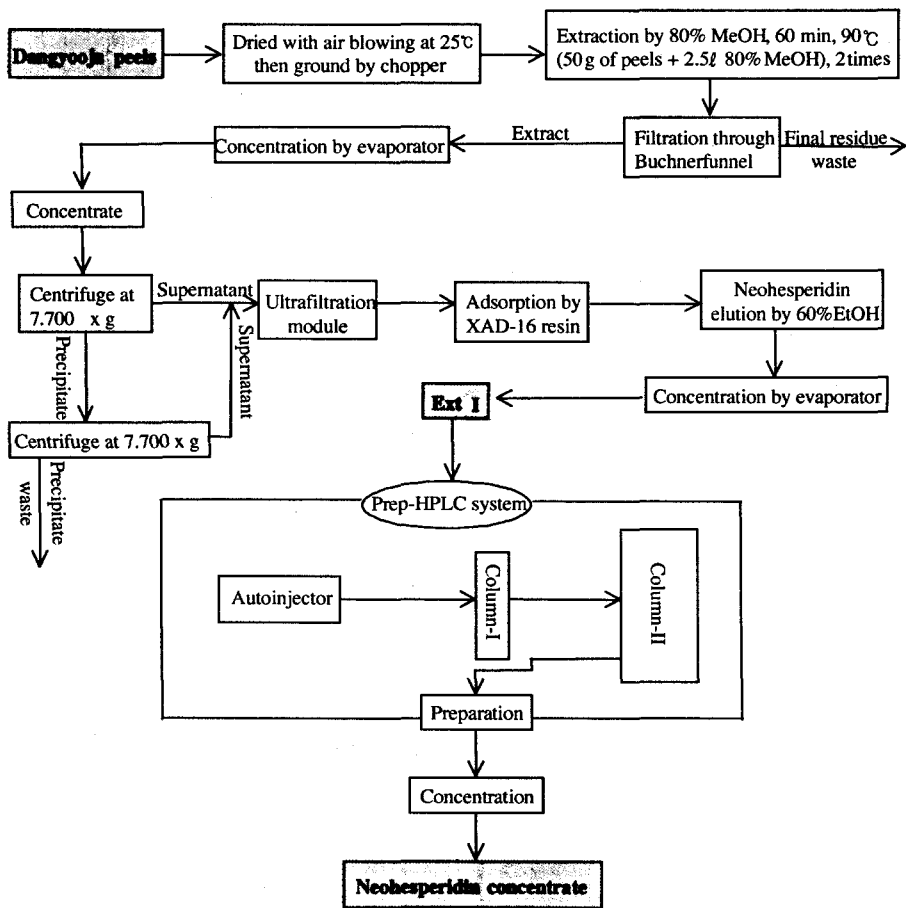


Fig. 14. Scheme of neohesperidin mass production plan.

제 4 절 결 론

국내산 감귤류로부터 NHP-DC 제조 원료 naringin 및 neohesperidin 소재를 탐색하였다. 국내산 감귤류 27종 중 제주 재래감귤 ‘당유자’, ‘지각’, ‘편귤’에 neohesperidin이 많이 함유되어있으며 특히 당유자 미숙과 (diameter 7.60 ± 1.77 mm)의 neohesperidin 함량은 33% (dry weight basis)에 이르러 지금까지 보고된 어떤 품종보다 높은 것으로 나타나 neohesperidin의 대량 추출에 유용한 소재로 확인되었다. Neohesperidin 분리법으로는 지금까지 알려진 알칼리용액 또는 용매추출 후 chloroform 계에서 결정을 석출시키는 방법보다 용매추출 후 nonionic polymeric adsorbent로 농축시킨 후 HPLC로 분리하는 공정이 적합한 것으로 확인하고 80% 이상의 회수율을 나타내는 중간소재를 제조 공정 및 이 농축물로부터 Preparative HPLC를 이용한 neohesperidin 분리 공정을 확립하였다.

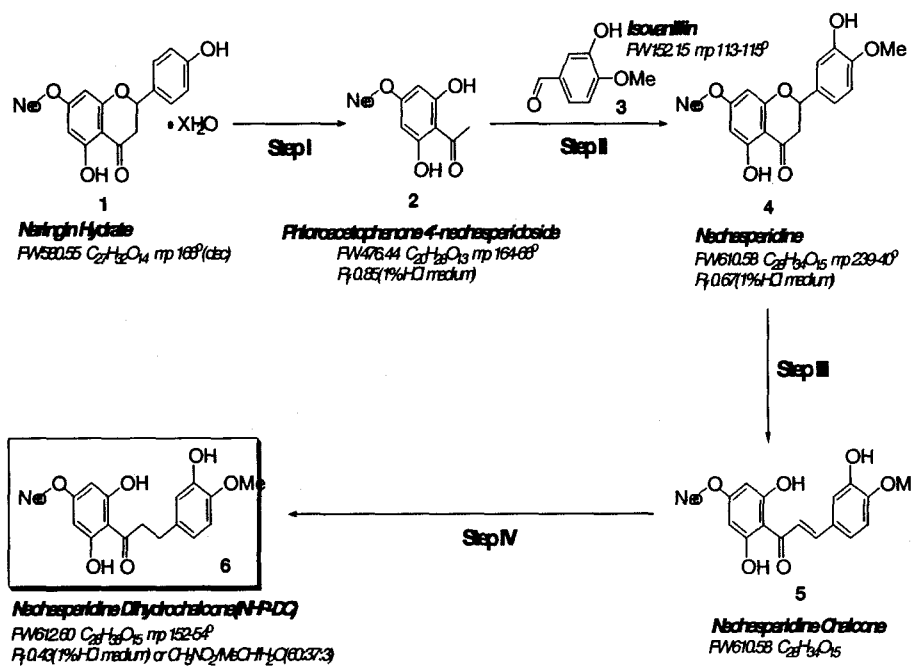
제 3 장 “NHP-DC 제조 공정개발” 분야

제 1 절 서 설

본 연구에서는 Neohesperidine dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성방법 도출 및 공정 개선을 위한 목적으로 실험을 진행하였다.

- 각 합성방법에 대한 경제성 검토
- 공업적으로 유리한 합성방법 도출 및 원가, 수율 및 순도 개선 연구

최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (NHP-DC) (6)을 합성하기 위하여 출발물질인 naringin (1)을 고온의 알칼리 용액에서 phloroacetophenone 4'- β -neohesperidoside (2)로 분해한 후 다시 알칼리 조건에서 isovanillin (3)을 가하여 축합시켜서 반응중간체인 Neohesperidine (4)를 합성하였다. 이어서 Neohesperidine (4)를 염기하에서 가수분해하여 enone 형태를 갖는 Neohesperidine chalcone (5)으로 변환시킨 후 Pd/C이나 Raney-Ni 등을 이용한 환원반응을 통해 carbonyl group은 보존시키면서 이중결합만을 선택적으로 환원시켜서 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 합성한다(Scheme1).



Scheme 1

1. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

Naringin (1)은 감귤류의 중요한 flavonoid 구조로서 상업적인 유용성이 있을 만큼 많은 양이 존재하는 물질이며 Neohesperidine (4)은 특정의 품종인 seville (bitter) orange의 미숙과에서 발견되는 성분이다. 본 연구에서는 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (NHP-DC, 6)를 합성하기 위하여 상업적으로 구매가 가능한 naringin (1)과 Neohesperidine (4)을 출발물질로 하여 각각 연구를 진행하였다.

Step II의 축합반응을 이용한 Neohesperidine (4) 합성의 경우 30% 이상의 염기 농도 하에서 반응할 경우 수율이 좋은 것으로 나타났다. 염기로서는 NaOH와 KOH가 주로 사용되어지나, LiOH 같은 다른 종류의 염기가 사용될 수도 있다.

반응 온도의 경우 최종목적물의 수율이나 반응을 완결하는 시간에 영향을 끼치는 요인으로서 그 범위는 60-160 °C 정도로 한정되어 있다. 또한 반응시간에 있어서는 다소의 차이가 있으나 상기의 온도하의 특정한 물질들의 반응에서 2분에서 15분 가량을 반응시간으로 언급되어 있으나 일부 방법에서는 축합 반응시 isovanillin (3)을 60 °C에서 장시간 첨가한 경우도 있는데 실험결과 장시간에 걸쳐 소량씩 가하는 방법이 좋은 수율을 나타내었다.

Neohesperidine (4)은 산과 염기 조건에서 Fig. 8과 같이 평형구조를 이루고 있다.

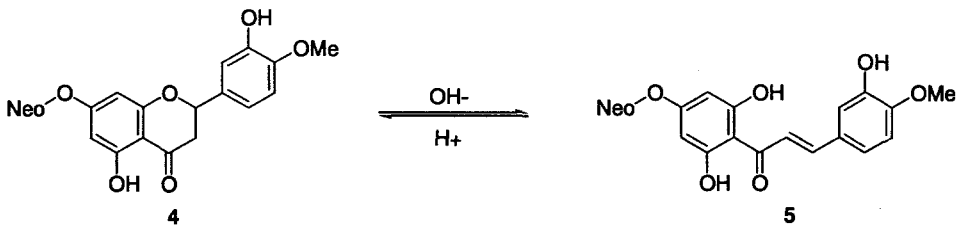


Fig. 13

Neohesperidine chalcone (5)은 highly conjugated 평면구조를 가지며 오렌지색을 띠고 있는데 이 구조의 불포화 이중결합을 환원시키면 색을 띠지 않는 dihydrochalcone의 구조가 된다. Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 합성하기 위한 환원반응은 수율 및 반응성 면에서 좋은 것으로 알려져 있으며 주로 Pd/C, Raney-Ni에 의한 수소화반응 등을 이용하고 있다. 이 환원반응시 carbonyl group은 환원시키지 않고 불포화 이중결합만을 선택적으로 환원시킬 수 있는 선택적 환원제의 사용이 요구된다. 최종목적물인 NHP-DC (6)는 냉수에서는 L 당 0.4-0.5 g의 용해도를 가지나 온수에서는 큰 용해도를 나타낸다. 이 밖에 ethanol, acetone, 묽은 알칼리 용액에 대해 큰 용해도를 가지나 ether, ethyl acetate, n-hexane, 묽은 무기산에는 불용성의 성질을 나타낸다. 따라서 최종목적물을 재결정할 경우 위의 용매를 적절히 선택하는 것이 중요하다. NHP-DC는 또한 실온에서 pH 2 이상의 강산 조건에서도 어느 정도 안정한 것으로 보고된 바 있다.

본 실험에서는 이미 특허에 언급된 공지의 방법과 이와 연관된 개선된 방법으로 원하는 화합물들을 효과적으로 합성하고자 하였다. 특히 본 실험에서는 앞에서 언급한 바와 같이 분해 및 축합 반응에서의 KOH, NaOH의 농도, 반응온도, 반응시간, pH 조절, purification 및 recrystallization 등

의 조건이 중요한 반응 영향 요인으로 작용하므로 이들 조건에 유의하여 수율과 함량, 그 밖의 사항을 개선코자 하였다.

다음의 TRIAL A, B, C, D는 본 연구에서 시도한 반응단계별과 연속반응의 반응조건, 수율 및 기타 분석결과들을 나타낸 것이다.

가. TRIAL A (stepwise reaction)

■ Step I

방법 1 Naringin hydrate (1, 4.85 g, 8.35 mmol)
KOH (4.7 g, 83.5 mmol), H₂O (40 mL)
1.25 h, rt / 1.25 h, reflux / 6N HCl
• Yield: 2.49 g (62.5%; yellowish white solid)
• mp: 136-140 °C (lit. 164-166 °C)
• R_f (n-BuOH:AcOH:H₂O:EtOAc=1:1:1:1) 0.68

방법 2 Naringin hydrate (1, 4.85 g, 8.35 mmol)
NaOH (1.8 g, 45.0 mmol), H₂O (15 mL)
3 h, reflux / 10% HCl
• Yield: 2.71 g (68.0%; yellowish white solid)
• mp: 140-144 °C (lit. 164-166 °C)
• IR: 3390 (-OH), 1634 (-C=O) cm⁻¹
• HPLC retention time: 2.98 (87.2%)

■ **Step II**

방법 1 Phloroacetophenone 4'-neohesperidoside (**2**, 2.62 g, 5.5 mmol)

KOH (6.7 g, 119.0 mmol), H₂O (10 mL)

Isovanillin (**3**, 1.4 g, 9.2 mmol, 1.7 eq)

1.5 h, 60 °C / conc. HCl

- 여분의 isovanillin (**3**) 제거: *n*-BuOH로 수회 세척
- Yield: 1.35 g (40.1%; pale yellow solid)
- mp: 199-202 °C (lit. 239-240 °C)
- R_f (*n*-BuOH:AcOH:H₂O:EtOAc=1:1:1:1) 0.67

방법 2 Phloroacetophenone 4'-neohesperidoside (**2**, 2.0 g, 4.19 mmol)

KOH (5.0 g, 89.1 mmol), H₂O (10 mL)

Isovanillin (**3**, 1.59 g, 10.5 mmol, 2.5 eq)

15 min, 100 °C / 10% HCl

- 여분의 isovanillin (**3**) 제거: *n*-BuOH로 수회 세척
- Yield: 1.04 g (42.0%; pale yellow solid)
- mp: 197-202 °C (lit. 239-240 °C)
- IR: 3422 (-OH), 1636 (-C=O) cm⁻¹
- HPLC retention time: 3.50 (79.0%)

나. TRIAL B (successive reaction)

■ Step I - Step II

방법 1 Naringin hydrate (1, 4.85 g, 8.35 mmol)
NaOH (1.8 g, 45.0 mmol), H₂O (15 mL)
3 h, reflux / KOH (5.0 g, 89.1 mmol)
Isovanillin (3, 1.59 g, 10.5 mmol, 1.25 eq), MeOH (10 mL)
1.5 h dropwise, 100 °C / 10% HCl

- 여분의 isovanillin (3) 제거: *n*-BuOH로 수회 세척
- Yield: 1.81 g (35.5%; pale yellow solid)
- R_f (*n*-BuOH:AcOH:H₂O:EtOAc=1:1:1:1) 0.45
- HPLC retention time: 3.51 (75.1%)

방법 2 Naringin hydrate (1, 4.85 g, 8.35 mmol)
NaOH (1.8 g, 45.0 mmol), H₂O (15 mL)
3 h, reflux / MeOH (10 mL), KOH (5.0 g, 89.1 mmol)
Isovanillin (3, 1.59 g, 10.5 mmol, 1.25 eq)
15 min dropwise, 100 °C / 10% HCl

- 여분의 isovanillin (3) 제거: *n*-BuOH로 수회 세척
- Yield: 2.33 g (45.7%; pale yellow solid)
- mp: 199-204 °C (lit. 239-240 °C)
- IR: 3424 (-OH), 1636 (-C=O) cm⁻¹
- HPLC retention time: 3.48 (88.4%)

방법3 Naringin hydrate (1, 4.85 g, 8.35 mmol)
NaOH (1.8 g, 45.0 mmol), H₂O (15 mL), n-BuOH (60 mL)
1 h, rt / 3 h, 100 °C / KOH (5.0 g, 89.1 mmol)
Isovanillin (3, 1.59 g, 9.20 mmol, 1.1 eq) in MeOH (10mL)
1.5 h dropwise, 60 °C / 10% HCl

- 여분의 isovanillin (3) 제거: n-BuOH로 수회 세척
- Yield: 2.33 g (62.0%; pale yellow solid)

다. TRIAL C (succesive reaction)

■ *Step III - Step IV*

방법 1 Neohesperidine (4, 1.00 g, 1.64 mmol), 2N NaOH (20 mL)
10% Pd/C (0.30 g), H₂, 3h, rt, 60 psi
5% HCl

- Yield: 0.80 g (80.0%; yellow solid)
- HPLC Retention time: 4.41 (81.0%)

방법 2 Neohesperidine (4, 0.100 g, 0.16 mmol), 2N NaOH (1 mL)
Raney-Ni (0.05 g), H₂, 14 h, rt, 1 atm
5% HCl

- Yield: 0.093 g (93.0%; pale yellow solid)
- HPLC retention time: 3.92 (90.6%)

라. TRIAL D (successive reaction)

▣ Step I - Step IV

Naringin hydrate 5.0 g (1, 97%, 4.85 g, 8.35 mmol)

NaOH (1.8 g, 45.0 mmol), H₂O (15 mL), n-BuOH (60 mL)

3 h, 100 °C

MeOH (10mL), KOH (5.0 g, 89.1 mmol)

Isovanillin (3, 1.59 g, 9.20 mmol, 1.1 eq), 1.5-2 h dropwise,
60 °C

10% HCl

10% Pd/C (0.30 g), H₂, 3h, rt, 60 psi

5% HCl

- Yield: 3.3 g (65.0%: pale yellow solid)
- mp: 140-144 °C (lit. 152-154 °C)
- HPLC Retention time: 4.38 (79.0%)

2. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

앞서 살펴본 바와 같이 Naringin (1)을 출발물질로하여 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (NHP-DC, 6)을 합성하는 연구를 수행해 본 결과 여러단계의 반응을 거칠 뿐 아니라 축합 반응시 첨가되는 Isovanillin (3)의 소요비용 및 여분의 Isovanillin의 제거와 반응중간체인 Neohesperidine (4) 수득에 대한 좋지 않은 재현성 등을 고려하여 당해년도에서는 출발물질로서 Naringin을 이용하는 대신 국내산 감를류에서 추출된 Naringin과 Neohesperidine의 1:1 혼합물로부터 분리된 Neohesperidine을 출발물질로 하여 연구를 진행하였다.

본 실험에서는 이미 특허에 언급된 공지의 방법과 새로운 방법을 모색하여 보았으며결정화 방법의 다양한 시도를 통하여 원하는 화합물들을 효과적으로 얻고자 하였다. 이 실험에서 가장 중요한 문제점은 alkaline solution내에서 얻어진 Neohesperidine chalcone (5)의 enone 형태에서 carbonyl group은 손상하지 않고 불포화 이중결합만을 선택적으로 환원하여 목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 합성하는 방법을 강구하는 것과 반응 후 혼합물로부터 물에 대한 낮은 용해도를 이용한 저온 결정법 및 물과 섞이지 않는 적절한 용매를 이용한 추출방법을 통하여 목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 결정화하는 문제이다.

환원반응시 carbonyl group은 손상하지 않고 불포화 이중결합만을 선택적으로 환원할 수 있는 가능성 있는 방법들로는 다음의 방법들을 들수 있으나, neohesperidine (4)로부터 가수분해에 의해 얻어진 neohesperidine chalcone (5)이 알칼리 수용액상에 존재하므로 환원제의 사용에 상당한 제약이 따를것으로 예상된다.

■ α, β -Unsaturated ketones으로부터 saturated ketones의 선택적 환원방법

1. Cat. hydrogenation

Catalysts: Pt, PtO, Pt/C, Pd/C, Rh/C, Ph(PPh₃)Cl

2. Ni-Al alloy in 10% aq. NaOH & Zn-reduced Ni in aq. medium

3. Electrolysis in a neutral medium using copper or lead cathods

4. LiAlH₄, CuI in THF, 0°C

5. Potassium-graphite clathrate C₈K

6. Biochemical reduction using microorganism

7. Baker's yeast

다음의 내용들은 합성된 반응중간체 및 최종목적물의 구조확인 및 순도 측정을 위한 참고자료이며, 최종목적물인 NHP-DC의 사용 허용내역을 포함한다.

■ Specifications of NHP-DC

1. Appearance: White, crystalline powder

2. Assay: min. 95%(area% in HPLC, dried product)

3. By-products: max. 3% Naringin-dihydrochalcone(HPLC)

max. 2% others(Neohesperidine, Isovanillin etc.),

<1% each

4. Heavy metals: max. 20ppm

산업화를 목적으로 할 때 중요시해야 할 사항은 추출된 Naringin과 Neohesperidine의 1:1 혼합물로 부터 반응중간체인 Neohesperidine (NHP, 4)을 순수하게 분리하는 공정과 이로부터 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (NHP-DC, 6)을 합성하기 위한 방법으로서 공업적으로 저렴하며 재생이 용이한 선택적인 환원제인 Raney-Ni의 사용에 있어서의 사용량 및 반응조건 등을 최적화하는 공정 및 환원반응 후 최종목적물의 결정화 시 낮은 효율과 장기간의 시간을 요하는 공업화시에 단점을 가진 문헌에 알려진 저온 결정법 대신 최종목적물을 용이하게 얻을 수 있는 결정화법 및 순도를 높일 수 있는 재결정법을 찾는 것이다.

제 2 절 실험 내용

1. 시약 및 기기

실험에 사용된 Naringin hydrate (97%)는 Acros의 제품을 이용하였고 KOH, NaOH는 대정 화학 제품을 이용하였다. 또한 여분의 반응물질을 제거하기 위한 용매로 사용한 n-butanol은 日本國 藥理 제품을 이용하였다. 반응의 진행정도와 생성된 양을 측정은 varian HPLC 9010 pump system과 varian 9050 UV detector를 사용하였다. 표준물질로 Neohesperidine, Neohesperidine dihydrochalcone은 Sigma제품을 이용하였다. 이들의 HPLC 조건과 각 물질의 물리적 성질을 각각 Table 12 , Table 13에 정리하였다.

녹는점 측정은 Thomas Hoover capillary melting point apparatus를 사용하였고 구조 분석을 위해 Perkin-Elmer FT-IR system을 사용하였다.

Table 12. HPLC Condition

	HPLC Condition
Detector λ	282 nm (254 nm)
Column	Capcell UG 120A 5 mm \varnothing 46 mm x 250 mm
Elution Condition	Acetonitrile : Water = 3/7
Flow Rate	1 mL/min
Injection Volume	10 μ L
Column Temp.	30 $^{\circ}$ C

Table 13. Physical Data of Naringin, Neohesperidine, Neohesperidine dihydrochalcone (NHD-DC)

Physical Data	Naringin hydrate	Neohesperidine	NHD-DC
F. W.	580.55	610.58	612.30
Mol. Formula	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅
Melting Point	166°C (dec.)	239-240°C	152-154 °C
Rf	0.68 (1% HCl)	0.67 (1% HCl)	0.43 (1% HCl)
Color	Yellow powder	White powder	White powder

2. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

가. TRIAL A (stepwise reaction)

Step I: Phloracetophenone 4-β-neohesperidoside (2)의 합성

방법 1: 질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 KOH 4.7 g (83.5 mmol)이 증류수 40 mL에 용해된 용액에 가한 다음 1.25시간 동안 실온에서 교반한 후 1.25시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10 g을 첨가하고 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 6N HCl로 pH 6으로 조절한 후 3시간 가량 0-5 °C에서 방치한 다음 생성되는 고체를 여과 및 건조한다. 생성된 고체를 온수에서 재결정하여 노랑 색의 고체 2.49 g (62.5%)를 수득한다.

방법 2: 질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 NaOH 1.8 g (45 mmol)이 증류수 15 mL에 용해된 용액에 가한 다음 3시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10 g을 첨가하고 n-butanol로 수회 세척한다. 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 10% HCl로 pH 6으로 조절한 후 3시간 가량 0-5 °C에서 방치한 다음 생성되는 고체를 여과 및 건조한다. 생성된 고체를 온수에서 재

결정하여 노랑 색의 고체 2.7 g (68%)를 수득한다.

m. p. : 140-144 °C (lit. 164-166 °C)

HPLC Retention time : 2.98 (87.2%)

Step II: Neohesperidine (4)의 합성

방법 1: 질소기류하에서 phloroacetophenone 4- β -neohesperidoside (2) 2.62 g (5.5 mmol)을 KOH 6.7 g (119.0 mmol)이 증류수 10 mL에 용해된 용액에 가한 다음 60 °C에서 가열환류한다. 반응혼합물에 isovanillin (3) 1.40 g (9.2 mmol, 1.7 eq)을 가한 후 약 1.5시간 동안 동온도에서 교반한다. 가열기를 제거한 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 ice-bath에서 냉각한다. n-Butanol 40 mL로 수회 세척한 후 0-10 °C에서 conc. HCl로 pH 6으로 조절한 다음 0-5 °C에서 18시간 방치한다. 생성된 고체를 여과하고 건조한 후 온수에서 재결정하여 연노랑색의 고체 1.35 g (40.1%)을 수득한다.

방법 2: 질소기류하에서 phloroacetophenone 4- β -neohesperidoside (2) 2.0 g (4.19 mmol)을 KOH 5.0 g (89.1 mmol)이 증류수 10 mL에 용해된 용액에 가한 다음 100 °C에서 가열환류한다. 반응혼합물에 isovanillin (3) 1.59 g (10.5 mmol, 1.25 eq)를 가한 후 약 15분간 교반한다. 가열기를 제거한 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 ice-bath에서 냉각한다. n-Butanol 40 mL로 수회 세척한 후 0-10 °C에서 10% HCl로 pH 6으로 조절한 다음 0-5 °C에서 18시간 방치한다. 생성된 고체를 여과하고 건조한 후 온수에서 재결정하여 연노랑 색의 고체 1.04 g (17.2 mmol, 42%)을 수득한다.

m. p. : 197-202 °C (lit. 239-240 °C)

HPLC Retention time : 3.50 (79%)

나. TRIAL B (succesive reaction)

Step I-Step II: Naringin hydrate (1)로부터 Neohesperidine (4)의 합성

방법 1: 질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 NaOH 1.8 g (45 mmol)이 증류수 15 mL에 용해된 용액에 가한 다음 3시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 n-butanol로 수회 세척한다. 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 KOH 5.0 g (89.1 mmol)을 첨가한 후 100 °C에서 가열환류한다. 이어서 isovanillin (3) 1.59 g (10.5 mmol, 1.25 eq)를 MeOH 10 mL에 용해시킨 용액을 약 1.5시간에 걸쳐 서서히 적가한다. 가열기를 제거한 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 ice-bath에서 냉각한다. n-Butanol 40 mL로 수회 세척한 후 0-10 °C에서 10% HCl로 pH 6으로 조절한 다음 0-5 °C에서 18시간 방치한다. 생성된 고체를 여과하고 건조한 후 온수에서 재결정하여 연노랑 색의 고체 1.81g (2.96 mmol, 35.5%)를 수득한다.

HPLC Retention time : 3.51 (75.1%)

방법 2: 질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 NaOH 1.8 g (45 mmol)이 증류수 15 mL에 용해된 용액에 가한 다음 3시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 n-butanol로 수회 세척한다. 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 MeOH 10 mL, KOH 5.0 g (89.1 mmol)을 첨가한 후 100 °C에서 가열환류한다. 이어서 isovanillin (3) 1.59 g (10.5 mmol, 1.25 eq)를 가한 후 약 15분간 교반한다. 가열기를 제거한 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 ice-bath에서 냉각한다. n-Butanol 40 mL로 수회 세척한 후 0-10 °C에서 10% HCl로 pH 6으로 조절한 다음 0-5 °C에서 18시간 방치한다. 생성된 고체를 여과하고 건조한 후 온수에서 재결정하여 연노랑 색의 고체 2.33 g (3.81 mmol, 45.7%)를 수득한다.

m. p. : 199 - 204 °C (lit. 239-240 °C)

HPLC Retention time : 3.48 (88.4%)

방법 3: 질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 NaOH 1.8 g (45 mmol)이 증류수 15 mL에 용해된 용액에 가하고 n-BuOH 60mL를 가한다음 100 °C에서 3시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 n-butanol로 수회 세척한다. 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 MeOH 10 mL, KOH 5.0 g (89.1 mmol)을 가한다. 60 °C에서 가열교반하면서 isovanillin (3) 1.59 g (10.5 mmol, 1.25 eq)를 1시간 30분에서 2시간에 걸쳐서 서서히 가한 후 약 15분간 교반한다. 가열기를 제거하고 얼음 10 g을 첨가한 후 ice-bath에서 냉각한다. 0-10 °C에서 10% HCl로 pH 6으로 조절한 다음 n-Butanol 40 mL로 수회 세척한 후 0-5 °C에서 18시간 방치한다. 생성된 고체를 여과하고 건조한 후 온수에서 재결정하여 연노랑 색의 고체 3.16 g (5.18 mmol, 62.0%)를 수득한다.

다. TRIAL C (succesive reaction)

Step I-Step II: Neohesperidine (4)로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (6)의 합성

방법 1: Neohesperidine (4) 1.00 g (1.64 mmol)을 2N NaOH 20 mL에 용해시킨 다음 10% Pd/C 300.0 mg를 가한 후 H₂ 60psi하에서 3hr가량 수소화 반응을 하였다. 10 °C이하로 냉각한 다음 5% HCl로 pH 9로 조절한 후 촉매를 여과하고 다시 5% HCl로 pH 6으로 조절한다. 0-5 °C에서 12시간 방치한 후 생성된 고체를 여과하고 건조하여 노란색의 고체 0.80 g (80.0%)을 얻었다.

HPLC Retention time: 4.41 (81.0%)

방법 2: Neohesperidine (4) 0.100 g (0.16 mmol)을 2N NaOH 1 mL에 용해시킨 다음 Raney-Ni 0.05 g를 첨가한 후 반응혼합물을 상압하에서 14시간

동안 수소화반응을 한다. 여과한 다음 여액을 냉각 교반시키면서 5% HCl을 가하여 pH 6으로 조절한다. 생성된 노란색의 맑은 용액을 0-5 °C에서 48시간 방치한 후 감압여과한다. 생성된 고체를 냉각수로 세척한 후 건조하여 얻은 노란색의 고체 0.093 g (93.0%)을 얻었다.

HPLC Retention time : 3.92 (90.6%)

라. TRIAL D (succesive reaction)

Step I-Step II: Naringin hydrate (1)로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (6)의 합성

질소 기류하에서 naringin hydrate (1) 5.0 g (97%, 4.85 g, 8.35 mmol)을 NaOH 1.8 g (45 mmol)이 증류수 15 mL에 용해된 용액에 가하고 n-BuOH 60mL를 가한다음 100 °C에서 3시간 동안 가열환류한다. 냉각 후 얼음 10.0 g을 첨가하고 n-butanol로 수회 세척한다. 60 °C가 넘지 않는 온도에서 진공증류로 반응혼합물의 양을 1/3로 줄인 다음 MeOH 10 mL, KOH 5.0 g (89.1 mmol)을 가한다. 60 °C에서 가열교반하면서 isovanillin (3) 1.59 g (10.5 mmol, 1.25 eq)를 1시간 30분에서 2시간에 걸쳐서 서서히 가한 후 약 15분간 교반한다. 가열기를 제거하고 얼음 10 g을 첨가한 후 ice-bath에서 냉각한다. n-Butanol 40mL로 수회 세척하고 2N NaOH 50mL에 용해한 다음 10% Pd/C 0.9g를 가하고 H₂ 60psi하에서 3hr가량 수소화반응을 하였다. 10 °C 이하로 냉각하고 5% HCl로 pH 9로 맞춘 다음 촉매를 여과한 후 다시 5% HCl로 pH 6으로 조절한다. 0-5 °C에서 12시간 방치한 후 생성된 고체를 여과하고 건조한 다음 온수로 재결정하여 연노랑 색의 고체 3.3 g (5.43 mmol, 65.0%)을 얻었다.

m. p. : 140 - 144 °C (lit. 152-154 °C)

HPLC Retention time : 4.38 (79.0%)

3. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

가. 실험 II (II-1, II-2, II-3) & III (III-1, III-2, III-3) & IV (IV-1) (10% Pd/C 사용)

시약용 또는 분리용 또는 혼합용 (Naringin+Neohesperidine)의 Neohesperidine 1.00 g (1.64 mmol)을 2N NaOH 4.92 mL-20.0 mL에 용해시킨 다음 10% Pd/C (60.0 mg-300.0 mg)를 가한 후 H₂ 1atm 또는 50-60psi 하에서 3-15 hr 가량 수소화반응을 하였다. 10 ℃이하로 냉각한 다음 5% HCl로 pH 9로 조절한 후 촉매를 여과하고 다시 5% HCl로 pH 6으로 조절한다. 0-5 ℃에서 12시간 방치한 후 생성된 고체를 여과하고 건조시키거나 ethyl acetate 또는 MIBK 또는 MEK로 추출하여 목적물을 수득한다.

나. 실험 V (V-1, V-2, V-3, V-4) (Raney-Ni 사용)

시약용 또는 혼합용 (Naringin+Neohesperidine)의 Neohesperidine 1.00 g-5.00 g (1.64 mmol- 8.20 mmol)을 2N NaOH 4.76 mL-23.8 mL에 용해시킨 다음 Raney-Ni 63.5 mg-317.5 mg을 첨가한 후 반응혼합물을 상압하에서 15 시간 동안 수소화반응을 한다. 여과한 다음 여액을 냉각 교반시키면서 5N HCl을 가하여 pH 6으로 조절한다. 생성된 노란색의 맑은 용액을 0-5 ℃에서 48시간 방치한 후 감압여과한다. 생성된 고체를 냉각수로 세척한 후 건조하여 노란색 또는 옅은 노란색의 고체를 얻는다. 재결정화를 위해 얻어진 고체를 소량의 hot water에 용해시킨 다음 0-5 ℃에서 48시간 방치한 후 감압여과하고 냉각수로 세척, 건조 시켜서 거의 흰색의 고체상태로서 목적물을 수득한다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Naringin으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

본 실험에서는 기존의 합성 방법에서의 염기의 농도, 반응시간, 반응온도, pH, 결정화 방법, 재결정 방법 등에서 수율 및 함량 등의 물리적인 성질을 개선코자 하였다. 반응의 진행도와 순도는 authentic compound로서 Sigma Co.에 구입한 Neohesperidine (4)과 NHP-DC (6)를 standard 물질로 하여 시간별로 HPLC를 이용하여 측정하였으며 이를 통해 적절한 반응시간 및 반응 온도 등의 반응조건을 검토하고자 하였다.

먼저 Step I의 염기에 의한 naringin (1)의 분해 반응의 경우 KOH보다는 NaOH에 의한 반응이 좀 더 빨리 진행되는 점을 볼 수 있었고, 반응 시간은 3-3.5시간 정도였다. Phloro- acetophenone 4'-neohesperidoside (2)를 산성화하여 고체화할 경우의 pH는 5.5-6정도가 적합하였으며 이때 5-10%사이의 염산을 사용하였다. Step II의 Neohesperidine (4)을 합성하기 위한 축합반응의 경우 그 반응성은 첨가되는 benzaldehyde 유도체에 따라서 차이가 있다고 보고되어 있으나 본 실험에서 사용된 isovanillin (3)의 경우 2-2.5 당량의 반응량과 100 °C에서 약 5-15분 정도의 반응시간이 가장 좋은 결과를 나타내었다. 여분의 isovanillin을 제거하는 방법으로서 n-BuOH를 사용한 세척방법은 여분의 물질 제거에는 효과적인 것으로 여겨진다.

NHP-DC (6)의 합성시 Pd/C 및 Raney-Ni을 사용하여 선택적 환원반응을 거쳐 최종 물질을 합성할 수 있었으나 순도 및 수율면에서 약산 저조하였다. 다른 환원방법으로서 Zn dust/ glacial acetic acid 방법은 pH 2 정도의 강산성에서 1시간 동안 가열환류 시키는 방법으로 Neohesperidine chalcone (5)나 NHP-DC (6)의 decomposition이 우려된다.

■ 구조 확인 방법

가. IR spectra

-OH 3400 cm^{-1} ; -C=O $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$

나. Melting points ($^{\circ}\text{C}$) & UV spectra [UV maxima (nm/log ϵ)]

Compounds	mp	λ_{max}
Naringin 1	170-171	283/4.20
Neohesperidin 4	239-240	283/4.20
Neohesperidine chalcone 5	232-233	369/4.19
Neohesperidine dihydrochalcone 6	152-153	281/4.26

다. Thin-layer chromatography

- Silica gel plates, visualized under UV light(375nm)
- Developed with H_2O -saturated n-butanol

라. ^1H - & ^{13}C -NMR spectra

마. LC MS & FAB-MS

■ HPLC Condition & Elution Retention Time

Condition

λ 282nm

Flow rate : 1mL/min

Column : Capcell UG(C_{18}) 120 Å $5\mu\text{m}$ 46mm ϕ x 250mm

Mobile phase : acetonitrile : distilled water = 3/7

Retention time

Standard material

Naringin : 3.31 (97%)

Neohesperidine : 3.50 (90 % ↑)

Neohesperidine dihydrochalcone : 4.41

4-Hydroxybenzaldehyde : 4.49

Isovanillin : 4.34 (99%)

본 연구의 TRIAL A는 각 반응단계별로 반응을 검토한 것으로서, Step I에서 Naringin hydrate (1)로 부터 87.2%의 순도를 가지는 Phloroacetophenone 4'-neohesperidose (2)를 68.0%의 수율로 합성하였으며, Step II에서는 화합물 2로부터 79%의 순도를 가지는 Neohesperidine (4)를 42.0%의 수율로 합성하였다.

한편, TRIAL B는 중간체인 화합물 2를 분리하지 않고 Naringin hydrate (1)로부터 Neohesperidine (4)를 연속적인 반응으로 합성하기 위한 시도로서, 방법 2를 통하여 88.4%의 순도를 가지는 화합물 4를 45.7%의 수율로 합성하였다. 이는 공지의 방법 (*J. Agri. Food. Chem.* 1968, 16, 108)에서의 수율 32% 보다 우수한 결과를 나타내었다. 그 밖의 시도한 방법들은 용매를 2 phase인 H₂O+MeOH 및 H₂O+n-PrOH 등을 사용하는 방법들을 검토하였으나 위와 유사한 결과를 나타내었다.

TRIAL C는 염기 가수분해에 의한 중간체인 Neohesperidine hydrochalcone (5)를 분리하지 않고 Neohesperidine (4)으로부터 palladium/C이나 Raney-Ni 등을 환원제로 사용하여 carbonyl group을 보존한 채 불포화 이중결합만을 선택적으로 환원시켜서 neohesperidine dihydrochalcone (6)를 연속적인 반응으로 합성하였다. 환원 방법 1과 방법 2를 통하여 원하는 화합물 6을 80% 이상의 높은 수율로 합성하였다. 이 경우 순도를 높이기 위한 재결정시 수율 감소를 개선하는 것이 중요하다.

반응 중간체들인 Phloroacetophenone 4'-neohesperidose (2), Neohesperidine (4) 및 Neo-hesperidine hydrochalcone (5)들을 분리하지 않고 출발물질인 Naringin hydrate (1)로부터 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)를 연속적인 반응으로 합성하는 실험을 TRIAL D로 시도하였으며 65%의 높은 수율로 원하는 화합물 6을 합성하였다. 이 경우 Isovanillin을 1.5-2시간에 걸쳐서 서서히 가하는 것과 여분의 Isovanillin을 n-BuOH로 제거하는 것이 중요한 요인이 되며, 재현성이 적다는 것이 큰 단점으로 작용한다.

2. Neohesperidine으로부터 Neohesperidine Dihydrochalcone (NHP-DC)의 합성

본 연구에서는 출발물질로서 Neohesperidine (4)을 이용하여 Neohesperidine chalcone (5)을 거쳐 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 합성하는 방법들을 검토하였으며, 얻어진 반응혼합물로부터 최종목적물을 결정화하는 연구를 중점적으로 시도하였다.

출발물질로는 상호간의 비교검토를 위하여 Sigma Co.에 구입한 시약과 국내산 감귤류에서 분리한 Neohesperidine 및 Naringin과 Neohesperidine의 혼합물을 사용하였으며, 합성방법은 공지의 Pd/C이나 Raney-Ni을 사용하는 방법외에 새로운 선택적 환원방법을 시도하여 보았다. 최종목적물의 결정화 방법으로는 여러 가지 단점을 지닌 기존의 저온 결정법 대신 공업적으로 유리한 용매를 이용한 추출방법 등을 검토하고자 하였다. 반응의 진행여부는 수득한 화합물의 $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ spectra를 authentic sample의 $^1\text{H NMR}$ spectra와의 비교분석을 통하여 확인하였다.

Pd/C과 Raney-Ni의 비교실험 결과 Pd/C의 경우에는 과량을 사용함에도 불구하고 상당량의 출발물질이 미반응 상태로 존재하였으며 결정화시에도 어려움이 있었으나, Raney-Ni을 사용한 경우에는 완전히 최종목적물인 NHP-DC로 환원반응이 진행되었으며, methylethylketone으로의 추출에 의한 결정화 또한 우수하게 진행되어 거의 정량적으로 crude한 상태로 얻어졌다. 또한, 출발물질인 Neohesperidine (4)으로부터 최종목적물인 Neohesperidine dihydrochalcone (6)을 합성하기 위한 방법으로서 공업적으로 유리한 선택적인 환원제인 Raney-Ni의 사용에 있어서의 사용량 및 반응조건 등을 최적화하는 것과 반응혼합물로부터 최종목적물의 결정을 용이하게 얻을 수 있는 결정화법 및 순도를 높일 수 있는 재결정법에 중점을 두고 연구를 진행하였다.

출발물질인 Neohesperidine (4)으로부터 최종목적물인 Neohesperidine

dihydrochalcone (6)을 합성하는 방법으로 Pd/C 및 Raney-Ni 등의 선택적인 환원제를 이용하는 공지의 방법과 가격이 저렴하며 공업적으로 유리한 sodium hydrosulfite의 사용을 검토하였다.

매우 저렴한 가격으로 인하여 공업화에 유리할 것으로 예상되는 sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)의 반응성을 검토해 보기 위하여 sodium dithionite, NaOH 및 NaHCO_3 의 당량, 농도, 반응온도 등의 반응조건을 변화시켜 가면서 실험을 진행한 결과 원하는 NHP-DC (6)를 얻을 수 없었다. 그 밖에 carbonyl group은 손상하지 않고 불포화 이중결합만을 선택적으로 환원할 수 있는 가능성 있는 방법들로는 아래의 방법들을 들수 있으나, Neohesperidine (4)로부터 가수분해에 의해 얻어진 Neohesperidine chalcone (5)이 알칼리 수용액상에 존재하므로 금속 환원제의 사용에 상당한 제약이 따를 것으로 보인다. Zinc/acetic acid를 사용하는 방법은 공업적으로는 유리하나 Neohesperidine chalcone (5)이 pH 2 정도의 acetic acid 상에서 분해가 일어날 가능성이 있는 동시에 이와 같은 산성 용액속에서 가역반응에 의해 ring-closure되어 Neohesperidine (4)으로 되돌아갈 것으로 예상된다.

☞ *a, \beta*-Unsaturated ketones으로부터 saturated ketones의 선택적 환원방법

1. Cat. hydrogenation
Catalysts: Pt, PtO, Pt/C, Pd/C, Rh/C, Ph(PPh_3)Cl
2. Ni-Al alloy in 10% aq. NaOH & Zn-reduced Ni in aq. medium
3. Electrolysis in a neutral medium using copper or lead cathods
4. LiAlH_4 , CuI in THF, 0°C
5. Potassium-graphite clathrate C_8K
6. Biochemical reduction using microorganism
7. Baker's yeast

1. 선택적인 환원제로서 sodium hydrosulfite의 사용방법

실험 No.	사용 NHP	xN NaOH	Na ₂ S ₂ O ₄	Rxn Temp	Rxn Time	HPLC	비 고
실험 I	I-1	시약용 0.1 g	2N 0.72 mL	250.7 mg	rt	15 h	small amt. Not good
	I-2	시약용 0.1 g	2N 1.44 mL	250.7 mg	rt	15 h	small amt. Not good
	I-3	시약용 0.1 g	2N 2.16 mL	250.7 mg	rt	15 h	small amt. Not good
	I-4	시약용 0.1 g	1N 2.88 mL	250.7 mg	reflux	15 h	small amt. Not good
	I-5	시약용 0.1 g	2N 1.44 mL	250.7 mg	reflux	15 h	small amt. Not good

앞서 기술한 바와 같이 enone의 선택적인 환원제로서 금속 촉매의 사용은 가격면에서나 공정면에서 여러가지 난점을 지니고 있다. 본 실험에서는 일반적인 enone의 선택적인 환원제로서 용매가 물인 경우에도 사용 가능한 sodium hydrosulfite을 사용하여 반응을 진행시켰다.

용매로는 1N 또는 2N NaOH를 사용하였으며 반응온도를 실온에서부터 가열환류까지 변화시켜 가면서 반응을 진행시키고 반응진행 정도를 reverse column의 HPLC로 authentic sample과 비교해 본 결과 최종목적물로의 반응은 약간 진행되었으나 상당량의 미반응물이 존재하였다.

2. 선택적인 환원제로서 10% Pd/C의 사용방법

실험 No.	사용 NHP	2N NaOH	10% Pd/C	Pressure	Rxn Time	Crystn	¹ H NMR	비 고	
실험 II	II-1	시약용 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	1 atm	15 h	0-5 °C, 2 day, grey solid	NHP	No Rxn
	II-2	분리용 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	1 atm	15 h	0-5 °C, 2 day, white solid	NHP	No Rxn
	II-3	혼합물 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	1 atm	15 h	0-5 °C, 2 day, no solid	Naringin+ NHP	No Rxn
실험 III	III-1	시약용 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	50 psig	5h	EtOAc 추출, white solid	NHP/NHP -DC=1/3.2	Not accomplished
	III-2	분리용 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	50 psig	5h	EtOAc 추출, white solid	NHP/NHP -DC=1/3.1	Not accomplished
	III-3	혼합물 1.0 g	4.92 mL	60.0 mg	50 psig	5h	MIBK 추출, yellow solid	Complicated mixture	Not good
실험 IV	IV-1	시약용 1.0 g	20.0 mL	300.0 mg	60 psig	3 h	MEK 추출, yellow solid	NHP/NHP -DC=1/3.8	Not accomplished

1963년도에 보고된 미국특허 3,087,821에 보고된 실험 내용에 의거하여 실험 II에서와 같이 2N NaOH용액으로 Neohesperidine (4)을 Neohesperidine chalcone (5)으로 가수분해한 후 1 atm하에서 환원반응을 진행하였으나 전혀 반응이 진행되지 않았다. 따라서, 실험 II에서는 *J. Agri. Food. Chem.* (1968, 16, 108) 및 일본특허 50-154261(1975)에서와 같이 50 psig에서 환원반응을 시도한 결과 실험 III-1과 실험 III-2의 경우에 ¹H NMR spectra를 분석해 본 결과 최종목적물로의 반응은 75% 정도 진행되었으며 25% 정도가 미반응의 출발물질로서 존재하였다. 출발물질로서 Naringin (1)과 Neohesperidine (4)의 혼합물을 사용한 실험 III-3의 경우에는 여러 가지의 복잡한 혼합물의 형태로 나타났다.

실험 IV에서는 반응을 완결시키기 위하여 과량의 alkaline 용액과 Pd/C 을 사용하여 60 psig에서 반응을 진행해 본 결과 실험 III에서 보다는 약간 더 반응이 진행되어 80%의 진행률을 나타내었으나 여전히 20% 정도가 미반응으로 남아있었다.

3. 선택적인 환원제로서 Raney-Ni의 사용방법

실험 No.	사용 NHP	2N NaOH	Raney-Ni	Pressure	Rxn Time	Crystn / Yield	¹ H NMR	비 고
실험 V	V-1 시약용 1.00 g	4.76 mL	63.5 mg (alloy. 127.0 mg)	1 atm	15 h	MEK 추출, pale yellow solid, 0.99 g / 99.0%	only NHP-DC (약간 impure)	Accomplished
	V-2 시약용 1.00 g	20.0 mL	300.0 mg (alloy. 600.0 mg)	1 atm	15 h	물 제거, EtOH 용해후 NaCl제거, pale yellow solid, 0.75 g / 75.0%	only NHP-DC (pure)	Accomplished
	V-3 시약용 5.00 g	23.8 mL	317.5 mg (alloy. 635.0 mg)	1 atm	15 h	MEK 추출, pale yellow solid, 4.82 g / 96.2%	only NHP-DC (pure)	Accomplished
	V-4 혼합용 5.00 g	23.8 mL	317.5 mg (alloy. 635.0 mg)	1 atm	15 h	MEK 추출, yellow solid, 2.30 g / 92.0%	N H P - D C major (very impure)	Not good

공업적인 환원방법으로는 Pd/C 보다는 Raney-Ni이 가격도 저렴하고 반응종료 후 re-activation을 통하여 재생이 가능하므로 보다 유리한 방법이라고 할 수 있다. 실험 V-1은 미국특허 3,947,405(1976)에 의거하여 Raney-Ni을 촉매량 만큼 사용하여 반응을 진행시켰으며, 그 결과 Pd/C의 경우에서와는 달리 최종목적물로의 반응이 완전히 진행되었으며 crude 상태의 수율도 거의 정량적으로 얻어졌다.

실험 V-2에서는 새로운 결정화법의 시도로서 pH 6 상태의 반응혼합물의 물을 완전히 제거한 후 ethanol을 소량 가하여 NHP-DC를 용해시킨 다음 중화 시에 생성된 NaCl을 여과하여 제거하였다. 이어서 여액을 완전히 제거하여 최종목적물을 수득하였으나 이 경우 약간의 NHP-DC가 ethanol에 용해되어 실험 V-1에서 보다 순도는 약간 높으나 저조한 수율을 나타내었다.

실험 V-3과 실험 V-4는 실험규모를 크게 한 것으로 실험 V-3의 경우에 실험 V-1에서와 마찬가지로 촉매량의 Raney-Ni로도 최종목적물로의 환원반응이 완결되었으나, Naringin (1)과 Neohesperidine (4)의 혼합물을 사용한 실험 V-4의 경우에는 환원된 혼합물인 Naringin-DC와 NHP-DC로부터 MEK를 추출용매로 사용하여 원하는 최종목적물인 NHP-DC를 major 화합물로 얻을 수 있었으나 여러 가지 불순물을 포함하고 있어서 좋은 방법이라고 할 수 없다.

3. 환원반응 혼합물로 부터 Neohesperidin-dihydrochalcone (NHP-DC)의 결정화 및 재결정화

본 연구에서 중요한 연구중의 하나는 환원반응 후의 반응혼합물에서 최종목적물인 NHP-DC를 높은 수율과 순도로서 얻어내는 것이다. 문헌이나 특허상에 알려진 저온(0-5 °C)에서 장기간 방치하여 결정화하는 방법은 시간적 및 기술적으로 공업화에 적당치 않으며 수율 또한 저조한 방법이다. 따라서, 본 연구에서는 반응혼합물과 섞이지 않으면서 NHP-DC에 대한 우수한 추출력을 지닌 용매를 얻기 위하여 여러 가지 용매를 이용하여 NHP-DC의 결정화에 대한 연구를 진행하였다.

실험 No.	결정화 방법 및 추출 Solvent	비 고
실험 VI	VI-1	0-5 °C, 2 days 2 day 방치 후 소량의 solid 생성, seeding 후에 장기간 방치한 경우에도 동일
	VI-2	Ethyl acetate 추출력은 약하나 순수한 white solid 수득 가능
	VI-3	Dichloromethane 거의 추출이 되지 않음
	VI-4	Methylethylketone 추출력은 우수하나 약간 불순한 yellow solid가 수득됨
	VI-5	Methylisobutylketone Methylethylketone 보다 추출력이 열등함

Ethylacetate의 경우 순수한 상태로 최종목적물인 NHP-DC를 수득할 수 있었으나 추출력이 매우 약하였으며, dichloromethane의 경우에는 거의 추출이 이루어지지 않았다. 가장 좋은 추출력을 나타낸 용매는 methylethylketone이었으며 ¹H NMR 상으로 약간 불순하였으나 거의 정량적으로 최종목적물을 수득할 수 있었다. 결정화에 의해 얻어진 crude한 최종목적물은 순수한 상태로 얻기 위해서는 어차피 다시 재결정을 거쳐야 하므로 이 용매의 경우에 매우 우수한 것으로 평가된다. Methylethylketone의 경우에는 methylethylketone 보다 열등한 추출력을 보여주었다.

실험 No	사용 NHP	Crystn / Yield	¹ H NMR	HPLC	Rerystn / Yield	¹ H NMR	HPLC	비고	
실험 VII	VII-1	시약용 5.00 g	MEK 추출, pale yellow solid, 4.82 g / 96.2%	only NHP-DC (pure)	Purity 97.8%	냉장고 방치, 거의 white solid, 4.29 g / 85.8%	only NHP-DC (Very pure)	Purity 98.9% (시약용 NHP-DC Purity 97.1%)	Very good
	VII-2	혼합용 5.00 g	냉장고에 방치 no solid, MEK 추출, yellow solid, 2.30 g / 92.0%	NHP-DC major (very impure)	-	냉장고에 방치 no solid, NHP-DC seeding 후에도 no solid	-	-	Not good

실험 VII-1의 경우 MEK 추출에 의해 매우 높은 수율로서 얻어진 NHP-DC는 ¹H NMR 분석 결과 순수하였으며 HPLC 분석상으로 97.8%의 높은 순도를 나타내었다. 이는 현재 시약으로 판매 중인 NHP-DC의 순도인 97.1% 보다 우수한 것이다. 이렇게 얻은 NHP-DC를 hot water에서 재결정화한 결과 매우 높은 순도(HPLC purity: 98.9%)로서 최종목적물인 NHP-DC를 거의 흰색의 고체 상태로 얻을 수 있었다.

실험 VII-2는 Naringin (1)과 Neohesperidine (4)의 혼합물을 환원반응 시킨 것으로서, 생성된 Naringin-DC와 NHP-DC의 혼합물로부터 MEK로 추출하여 원하는 NHP-DC 만을 major product로 얻을 수 있었으나 반응혼합물 및 생성혼합물의 side products로 인하여 ¹H NMR 분석 결과 매우 불순하였다. 이의 재결정화를 위하여 hot water에 용해시킨 후 냉장고에 방치하였으나 결정이 생성되지 않아서 NHP-DC로 seeding해 보았으나 역시 결정이 생성되지 않았다.

4절 결 론

본 연구는 출발물질로서 Naringin hydrate나 협동연구기관인 한국식품 연구원에서 개발한 국내산 감귤류에서 추출이 가능한 Neohesperidine을 사용하여 최종목적물인 고감미도 감미제로 사용되고 있는 Neohesperidine dihydrochalcone을 높은 수율과 순도로 얻을 수 있었다. 특히, Neohesperidine을 출발물질로 하는 경우에는 one pot reaction으로 반응단계를 축소할 수 있으며, 제조공정의 단순화 등으로 원가절감의 효과를 얻을 수 있어서 산업화에 유리한 것으로 판단된다. 향후 본 연구 결과를 토대로 하여 실용화·산업화의 측면에서 환원반응시의 환원제 사용의 최소화, 반응시간, 결정화, 재결정화 등의 반응조건을 최적화하고 산업화 시에 발생할 수 있는 제반 문제점들을 검토한 후 산업화를 추진할 계획이다.

참 고 문 헌

野村男次. (1973) 夏ミカンからの ナリソキシ, 小オヘスヘリシソの抽出分離と 新甘味料の製造. 食品工業 7下 : 121-125

寺田一萬士 (1974) 柑橘類果皮の分理と果皮成分の抽出. 食品工業 10下 : 81-87

Bar, A., Borrego, F., Benavento, O., Castillo, J. and del Rio, J. A. (1990) Neohesperidin dihydrochalcone: properties and applications. *Food Sci. Technol.* **23**, 371-376

Bar-Peled, M., Fluhr, R., Gressel, J. (1993) Juvenile-specific localization and accumulation of a rhamnosyltransferase and its bitter flavonoid in foliage, flowers, and young citrus fruits. *Plant Physiol.* **103**, 1377-1384

Berhow, M.A., Bennett, R.D., Kanes, K., Poling, S.M., Vandercook, C.E. (1991) A malonic acid ester derivative of naringin in grapefruit. *Phytochemistry* **30**, 4198-4200

Braddock, R. J. (1995) By-products of citrus fruit. *Food Tech.* **49**, 74-77

Calvarano, M., Postorino, E., Gionfriddo, F., Calvarano, I., Bovalo, F. (1996) Naringin extraction from exhausted Bergamot peels. *Perfumer & Flavorist* **21**, 1-4

Canales, I., Borrego, F., and Lindley, M. G. (1992) Neohesperidin dihydrochalcone stability in aqueous buffer solutions. *J. Food Sci.* **57**, 589-591

Chang, H.N., Nam, K.E. and Hur, J.W. (1977) Studies on the utilization of Korean citrus peel waste. *Korean J. Food Sci. Tech.* **4**, 251-254

El-Nawawi. S.A. (1995) Extraction of citrus glucosides. *Carbo. Poly.* **27**, 1-4

Eun, J.B., Jung, Y.M., Woo, G.J. (1996) Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 371-377

Furia, T. E. *CRC Handbook of food additives*. 2nd Ed. Vol. 2, pp 200-216.

Gabor, M. (1986) Anti-inflammatroy and anti-allergic properties of flavonoids. in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*; Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., Beretz, A., Eds.; Progress in Clinical and Biological Research 213; Alan R. Liss Inc.: New York, pp 471-480

Herman, Z., Fong, C. H., Ou, P., and Hasegawa, S. (1990) Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **38**,

1860-1861

Hertog, M.G.L, Feskeens, E.J.M., Hollman, C.H., Kata, M.B. and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: de Zutphen elderly study. *Lancet* **342**, 1007-1011

Horowitz, R.M. (1961) The citrus flavonoids. In *the Orange. Its Biochemistry and Physiology*, Sinclair, W.B., Ed., University of California, Division of Agricultural Science: LA, CA, pp.334-372

Horowitz, R. M. and Gentili, B. (1963) Dihydrochalcone derivatives and their use as sweetening agents. U.S. Patent 3,087,821

Huet, R. (1982) Constituents of Citrus fruits with pharmacodynamic effect: Citroflavonoids. *Fruits* **37**, 267-271

Inaba, N., Ayano, S., Ozaki, Y., Miyake, M., Maeda, H., and Ifuk, Y. (1993) Extraction and recovery of hesperidin from peel residue of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) using enzyme. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **40**, 833-840

Inaba, N., Miyake, M., Maeda, H., and Ifuku, Y. (1993) Enzymatic concentration hesperidin in peel residue of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **40**, 867-871

Inglett, G. E., Krbecek, L., Dowling, B., and Wagner, R. (1969)

Dihydrochalcone sweeteners-Sensory and stability evaluation. *J. Food Sci.* **34**, 101-103

Keterson J.W., Hendrickson, R. (1953) The glucosides of citrus. *Fla. State Hortic. Soc.* **65**, 223-226

Kim, T.J., No, J.Y., Ko, J.S. and Rhee, J.S. (1989) The separation and determination of flavonoid glycosides from *Poncirus trifoliata rafia* and *Citrus aurantium L.* *J. Korean Soc. Anal. Sci.* **2**, 301-307

Koh, J.S. and Kim, S.H. (1995) Physicochemical properties and chemical compositions of citrus fruits produced in Cheju. *Agric. Chem. & Biotechnol.* **38**, 541-545

Krebechek, L., Inglett, G., Holik, M., Dowling, B., Wagner, R., and Riter, R. (1968) Dihydrochalcone, Synthesis of potential sweetening agents. *J. Agr. Food Chem.* **16**, 108-112.

Lee, H.Y., Seog, H.M., Nam, Y.J. and Chung, D.H. (1987) Physico-chemical properties of Korean Mandarin (*Citrus reticula*) orange juices. *Korean J. Food Sci. Technol.* **19**, 338-345

Lindley, M. (1991) Implications of current developments in EC sweetener legislation. *Brit. Food J.* **93**, 18-20

Lindley, M. G., Beyts, P. K., Canales, I., and Borrego, F. (1993) Flavor modifying characteristics of the intense sweetener

neohesperidin dihydrochalcone. *J. Food Sci.* **58**, 592-594

Lindley, M.G., Borrego, F., Canales, I. (1991) A technical re-appraisal of the intense sweetener neohesperidin dihydrochalcone. In : *FIF 91 Conference Proceedings* pp.48-51

Lino, K., Ohta, H., Watanabe, A., Ohtani, T., and Kimura, S. (1982) Quality of satsuma mandarin juice extracted by the new type extractor. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **29**, 283-289

Maeda, H., Takahashi, Y., Miyake, M., and Ifuku, Y. (1985) Changes in hesperidin content of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) juice during processing. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **32**, 202-207

Maier, V. P. (1969) Proceedings First International Citrus Symposium, (Chapman, H.D., ed.) Vol. 1, p.235. Univ. Calif. Riverside, Riverside, CA.

Manthey, J.A. and Grohmann, K. (1996) Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 811-814

Montijano, H., Borrego, F., Canales, I., and Tomas-Barberan, F. A. (1997) Validated high-performance liquid chromatographic method for quantitation of neohesperidine dihydrochalcone in foodstuffs. *J. Chromato. A.* **758**, 163-166

Montijano, H., Coll M. D., and Borrego, F. (1996) Assessment of neohesperidine DC stability during pasteurization of juice-based drinks. *Inter. J. Food Sci. Tech.* **31**, 397-401

Nishiura, M. Esaki, S., Kamiya, S. (1969) Flanonoids in Citrus and related Genera part I. Distribution of flavonoid glycosides in Citrus and Poncirus. *Agr. Biol. Chem.* **33**, 1109-1118

Ogawa, H., Fukuhisa, K., Fukumoto, H., and Fukutani, K. (1990) Changes in soluble hesperidin content in clarified satsuma mandarin juice. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **37**, 214-219

Ooghe, W.C., Ooghe, S.J., Detavernier, C.M., Huyghebaert, A. (1994) Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2183-2190

Ortuno, A., Reynaldo, I., Fuster, M. D., Botia, J., Puig, D. G., Sabater, F., Lidon, A. G., Porrás, I., and Del Río, J. A. (1997) Citrus cultivars with high flavonoid contents in the fruits. *Scientia Horticulturae* **68**, 231-236

Pratter, P. J. (1980/1981) Neohesperidin dihydrochalcone: an updated review on a naturally derived sweetener and flavor potentiator. *Perfumer & Flavorist* **5**, 12-18

Riter, R. (1968) Dihydrochalcone, Synthesis of potential sweetening agents. *J. Agr. Food Chem.* **16**, 108-112

Robards, K., Li, X., Antolovich, M., Boyd, S. (1997) Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. *J. Sci Food Agric.* **75**, 87-101

Ruseff, R. L. (1980) *Citrus Nutrition and Quality*. pp.83-108, Am. Chem. Soc.

Song, E.Y., Choi, Y.H., Kang, K.H. and Koh, J.S. (1998) Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin, inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 306-312

Son, H.S., Kim, H.S., Kwon, T.B., and Ju, J.S. (1992) Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in citrus sinensis. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 136-142

Tomas-Barberan, F. A., Borrego, F., Ferreres, F., and Lindley, M. G. (1995) Stability of intense sweetener neohesperidine dihydrochalcone in blackcurrant jams. *Food Chem.* **52**, 263-265

Vandercook, C.E. and Tisserat, B. (1989) Flavonoid changes in developing lemons grown *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry* **28**, 799-803