

감귤 과즙의 플라보노이드 조성 특성

양영택¹ · 김호방² · 이상현³ · 박영철^{1*}

¹제주특별자치도 농업기술원, ²(주)바이오메딕 생명과학연구소, ³중앙대학교 식물생명공학과

Composition Characteristics of Flavonoids in Citrus Juice

Young Taek Yang¹, Ho Bang Kim², Sanghyun Lee³, and Young Chul Park^{1*}

¹Jeju Special Self-Governing Province Agricultural Research and Extension Services, Jeju 63556, Korea

²Life Sciences Research Institute, Biomedic Co. Ltd., Bucheon 14548, Korea

³Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

*Corresponding author: pyc1970@korea.kr

Abstract

Flavonoids in juice of 67 citrus genetic resources were analyzed using LC-MS/MS, in order to increase utilization of genetic resources as both breeding and functional materials. Analytical condition was established for ten kinds of flavonoid components known to exist in citrus fruits such as hesperidin by LC-MS/MS, and the analytical method was verified through specificity, linearity, and detection limit. In citrus juice at 80% coloring stage, content of hesperidin and narirutin were generally high, but in sour orange and grapefruit, naringin contents was higher than hesperidin. Total flavonoid content was high in ‘Hayaka’, ‘Sanguinelli’, ‘Grapefruit’, ‘Morita navel’, ‘Kinokuni’ and ‘Mihocore’. And ‘Dangyuja’, ‘Jigak’ and ‘Byungkuy!’ which are Jeju native citrus, has specifically high content of certain flavonoids. These resources could be used as not only sources of functional materials but also breeding materials.

Additional key words: analytic method, breeding material, functional material, Jeju native citrus, LC-MS/MS

서 언


감귤은 국내는 물론 전세계에서도 가장 많이 생산되는 과일로 과즙이 많고 풍미가 독특하여 생과일 뿐만 아니라 음료의 재료로 널리 이용되고 있다. 과일에는 식품학적으로 중요한 당과 유기산을 함유할 뿐만 아니라, 생리적으로 중요한 비타민, 플라보노이드 등을 많이 함유하고 있다.

감귤에는 60여 종이 플라보노이드가 flavone, flavanone, polymethoxy flavone 형태로 존재하며 (Horowitz and Gentili, 1977), 과즙 중에는 44종의 플라보노이드가 존재하는 것으로 보고 되었는데, 감귤 종류에 따라 성분과 함량 조성에 차이를 보인다고 하였다(Gattuso et al., 2007; Piao et al., 2011). Flavanone은 과피의 안쪽 흰색 부위인 알베도(albedo) 층에 가장 많고, flavone은 과피의 황색 부분인 플라베도(flavedo) 층에 많이 분포한다(Nogata et al., 2006). Polymethoxy flavone은 감귤 특이 플라보노

Received: April 19, 2019

Revised: July 11, 2019

Accepted: July 29, 2019

 OPEN ACCESS



HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY
37(5):651-662, 2019
URL: <http://www.hst-j.org>

pISSN : 1226-8763

eISSN : 2465-8588

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2019 Korean Society for Horticultural Science.

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자 사업단, 과제번호: 213007-05-3-WTP31)에 의해 수행되었음.

이드로 과피의 정유에서 주로 검출된다(Gattuso et al., 2007; Han et al., 2010). 국내산 감귤의 플라보노이드 함량에 대한 연구로는 제주 재래귤(Kim et al., 2009), 만감류(Lee and Kang, 1997), 온주밀감(Kim et al., 2001; Park et al., 2015; Han et al., 2019), 감귤 착즙박(Yang et al., 2008), 부지화(Han et al., 2012) 등이 보고 되고 있다.

플라보노이드의 효능에는 항산화 작용(Mokbel and Hashinaga, 2006; Mumivand et al., 2017), 항암작용(Yoshimizu et al., 2004), 순환기계 질환의 예방(Benavente-Garcia and Castillo, 2008), 면역증강 작용(Park et al., 2008), 모세혈관 강화 작용(Son et al., 1992), 기억증강 작용(Kim et al., 2016), 신경세포 보호 효과(Kim et al., 2019), 당뇨 합병증 개선효과(Lee et al., 2018) 등이 보고 되고 있다. 특히 Polymethoxy flavone 중 sinensetin과 nobiletin은 인간의 적혈구 응집과 혈구침전의 비율을 감소시키는 작용을 하며(El-Shafae, 2002), tangeretin은 백혈병 세포의 성장을 저해하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Hirano et al., 1995).

본 연구는 감귤류의 식용 부위인 과즙 중 플라보노이드의 분석법을 확립하고 함량 분석을 통하여 기능성 및 육종 소재로써 감귤 유전자원의 활용 가치를 높이고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

제주특별자치도농업기술원에 보존 중인 감귤류 중 온주밀감(*Citrus unshiu* Marc.)을 제외한 유전자원 67개를 대상으로 하였다(Table 1). 시료는 농업과학기술 연구조사분석기준에 따라(RDA, 2012) 자원별 성숙기로 판단하는 착색이 80%되는 시기에 나무의 중간 높이에서 사방으로 달린 열매를 5과씩 채취하여 과피를 제거한 후 과육 부위를 착즙하였고, 착즙액을 -50°C에서 냉동 보관하면서 플라보노이드 분석용 시료로 사용하였다.

Table 1. Citrus genetic resources used in this study

Taxon	Plant name	IT No. ^z	Abbr.
Grapefruit	Golden Special	233903	GF01
	Grapefruit	234069	GF02
	P. Star ruby	256264	GF03
Mandarin	Gamja	233657	MA01
	Kinokuni	233670	MA02
	Yosida ponkan	234077	MA03
	Nova	233768	MA04
	Dongjungkyul	233658	MA05
	Ponkan	233839	MA06
	Byungkyul	233687	MA07
	Binkyul	233672	MA08
	Orlando	233765	MA09
	Inchangkyul	234072	MA10
	Nagano No.3	282104	MA11
	Page	233823	MA12
	Kousyun ponkan	233898	MA13

^zPlant germplasm's accession number in National Agrobiodiversity Center in Korea.

Table 1. Citrus genetic resources used in this study (Continued)

Taxon	Plant name	IT No. ^z	Abbr.
Pomelo	Dangyuja	234071	PO01
	Matou	282108	PO02
	Sadugam	233688	PO03
	Hyuganatsu	234009	PO04
	Hassaku	233664	PO05
	Benihassaku	233718	PO06
Sour orange	Kawano	234068	SS01
	Shinamanatsu	233679	SS02
	Tachibana orange	233680	SS03
	Joadung	233655	SS04
	Jigak	233656	SS05
	Natsudaidai	233682	SS06
	Hwangkum hakyul	233684	SS07
Sweet orange	Yoshida navel	234053	SW01
	Oomishima navel	234056	SW02
	Valencia late	233732	SW03
	Shirayanagi navel	233726	SW04
	Fukuichi navel	234055	SW05

^zPlant germplasm's accession number in National Agrobiodiversity Center in Korea.

표준품 및 시약

플라보노이드의 표준품 중에서 hesperidin(Hes), neohesperidin(Neh), naringin(Nag), diosmin(Dio), nobiletin(Nob), tangeretin(Tan)은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을, narirutin(Nar), eriocitrin(Eri), neoeriocitrin(Nee), sinensetin(Sin)은 ChromaDex(USA) 제품을 구입하여 사용하였다(Fig. 1). 추출 및 분석 시약으로 methanol과 water는 Burdick & Jackson (USA) 제품을, ammonium formate와 formic acid은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

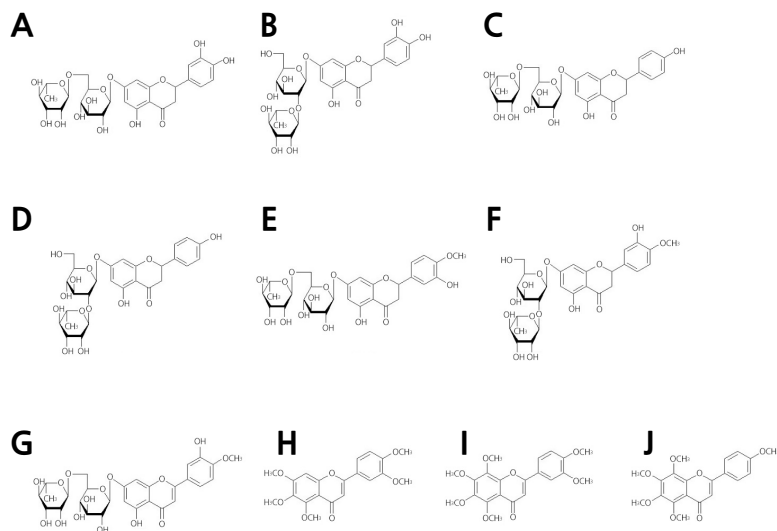


Fig. 1. Chemical structures of 10 flavonoid standards. Eriocitrin (A), Neoeriocitrin (B), Narirutin (C), Naringin (D), Hesperidin (E), Neohesperidin (F), Diosmin (G), Sinensetin (H), Nobiletin (I), and Tangeretin (J).

Table 3. Flavonoid standard groups, retention time, precursor and product ions in this analysis by LC-MS/MS

Flavonoids	Analytic group ^z	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions D1/D2 ^y (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy D1/D2 (eV)
Hes	A	5.06	ESI+ → 611.0	303.0/152.9	23	20/47
Neh	B	5.23	ESI+ → 611.0	303.0/152.9	25	20/45
Nar	A	4.77	ESI+ → 581.1	273.0/418.0	23	23/13
Nag	B	4.92	ESI+ → 581.1	273.0/152.9	23	20/43
Dio	A	5.86	ESI+ → 609.0	301.0/200.9	27	30/30
Eri	A	4.32	ESI+ → 597.2	289.0/153.0	25	23/45
Nee	B	4.40	ESI+ → 597.2	289.0/153.0	25	15/45
Tan	A	12.63	ESI+ → 374.0	344.0/182.9	40	30/45
Sin	B	10.28	ESI+ → 373.1	343.1/152.9	45	30/40
Nob	A	11.21	ESI+ → 403.1	372.9/182.9	40	33/45

^zTwo mixed standard solution was prepared and used for analysis in order to optimize the chromatogram identification and quantification in the light of isomers.

^yD1: target ion, D2: qualitative ion.

분석법의 유효성 검증

LC-MS/MS를 이용한 플라보노이드 분석법은 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection), 정량한계(limit of quantification)를 구하여 유효성을 검증하였다. 특이성은 플라보노이드 각각의 성분별 표준용액의 크로마토그램과 질량 스펙트럼(mass spectrum)으로 확인하였다. 직선성은 5mM ammonium formate와 0.1% formic acid을 함유하는 80% methanol을 사용하여 각각의 성분 별로 0.2 - 20.0mg·L⁻¹ 수준이 되도록 조제한 표준용액을 LC-MS/MS로 분석하여 얻어진 각각의 피크면적으로부터 표준 검량선을 작성하였다. 분석 물질의 검출과 정량이 가능한 최저농도를 확인하기 위해 의약품 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인(KFDA, 2004)을 적용하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 구하였다. 검출한계는 LOD = 3.3 × σ/S 식을, 정량한계는 LOQ = 10 × σ/S 식을 이용하였다. 기울기 S는 검량선으로부터 구하였으며, 회귀직선에서 y 절편의 표준편차를 σ로 활용하였다.

결과 및 고찰

플라보노이드 분석법 확립

감귤류에 함유하는 플라보노이드 성분을 분석하기 위하여 특이성과 선택성이 탁월한 LC-MS/MS를 이용하여 신속하고 효율적인 다성분 동시 분석법을 확립하고자 하였다. Hesperidin 등 각각의 플라보노이드 성분에 대하여 표준용액을 ESI mode에서 tuning을 실시하여 질량 스펙트럼을 모니터링하면서 모분자의 이온화 및 질량분석기의 최적 MRM 조건을 설정하였다. MS scan에서는 모분자의 이온화를 최적화하는 precursor ion의 capillary voltage와 cone voltage 조건을, daughter scan에서 fragmentation을 유도하여 product ion의 최적 collision energy를 설정하였다. Product ion으로 정량이온(target ion)은 D1, 정성이온(qualitative ion)은 D2로 표시하였다. 대부분의 플라보노이드 성분은 ESI positive와 negative mode에서 모두 이온화되는 특성을 보였으나, 본 연구에서는 감도가 양호한 ESI positive를 선정하였고, 이온화 특성인 adduct는 [M + H]⁺ 형태로 검출됨을 확인하였으며, Table 3에 최적 분석조건을 요약하여 나타내었다. 그리고 hesperidin과 neohesperidin인 경우는 서로 구조 이성질체로 MRM 조건이 같기 때문에 이들 성분의 정량을 위해서 Table 3의 질량분석기 분석조건에서 물질분리가 이루어

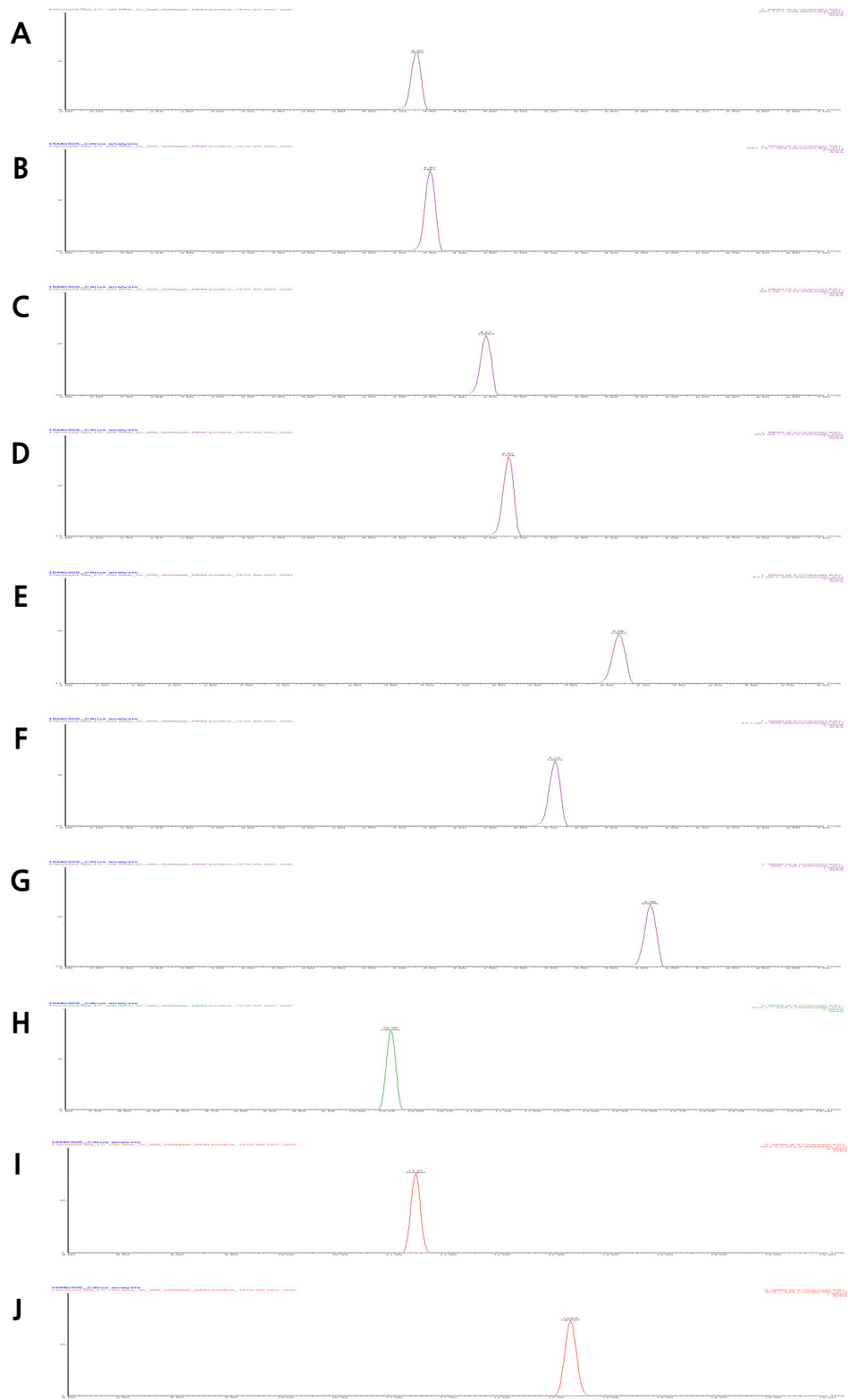


Fig. 2. UPLC-MS/MS chromatograms of 10 flavonoid standards. Eri (A), Nee (B), Nar (C), Nag (D), Hes (E), Neh (F), Dio (G), Sin (H), Nob (I), and Tan (J).

Table 4. Linear equation, determination coefficient, LOD and LOQ of flavonoids in LC-MS/MS analysis²

Flavonoids	Linear equation	Determination coefficient (R ²)	LOD ^y (µg·mL ⁻¹)	LOQ ^y (µg·mL ⁻¹)
Hes	y = 2496.4x + 59.1	0.9976	0.0709	0.2148
Neh	y = 4339.2x + 84.2	0.9895	0.0876	0.2654
Nar	y = 3429.8x + 287.6	0.9985	0.0404	0.1225
Nag	y = 1302.4x + 196.4	0.9931	0.1778	0.5388
Dio	y = 18510.9x - 659.9	0.9951	0.0217	0.0659
Eri	y = 1501.6x + 44.1	0.9992	0.0207	0.0626
Nee	y = 849.7x + 5.09	0.9984	0.0893	0.2706
Tan	y = 385268.0x + 6161.0	0.9906	0.0095	0.0289
Sin	y = 575440.0x + 6145.0	0.9945	0.0114	0.0345
Nob	y = 1002155.0x + 4320.0	0.9982	0.0048	0.0146

²Instrument linearity range: 0.1 - 10 µg·mL⁻¹.

³Mean value from 3 measurements, LOD: Limit of detection, LOQ: limit of quantitation.

어질 수 있는 분석 컬럼과 이동상의 기울기 조건 등 UPLC의 최적 분석조건을 Table 2와 같이 설정할 수 있었다. 설정된 LC-MS/MS의 분석조건에서 hesperidin 등 감귤에 함유하는 10 종의 플라보노이드 표준용액의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 머무름 시간(retention time)이 각각 다른 시간대에 검출되어 물질 분리능은 적합하다고 판단 되었으며, LC-MS/MS의 이온화 조건 및 MRM 특성과 크로마토그램을 통하여 분석법의 특이성을 확인할 수 있었다. LC-MS/MS 분석시, 선택성과 특이성을 지닌 MRM 조건으로 모니터링 하므로 물질분리가 중요하지 않지만, MRM 조건이 같은 이성질체인 경우 물질분리가 필요한 것으로 사료된다. 구조이성질체인 eriocitrin(Eri)과 neoeriocitrin(Nee)은 분리도 1.5 이상의 뚜렷한 분리가 이루어지지 않았으나, Figs. 2 and 3에 제시한 바와 같이 Eri와 Nee의 머무름 시간은 각각 4.30과 4.40으로 두 물질의 정성적 확인과 정량에 적합한 물질분리가 이루어졌다고 판단된다. Medina-Remón et al.(2011)은 감귤류 3 종의 착즙액의 플라보노이드 조성 및 함량 분석을 위하여 정성적으로는 UPLC/PDA를, 정량적으로는 LC-MS/MS를 이용하여 동시 신속 분석법을 제시하였는데, 본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 정성과 정량을 모두 수행하였고, 정성적 분석 결과는 제시한 방법과 차이가 없었다.

감귤에 함유하는 플라보노이드 성분의 검량선 작성을 위하여 혼합 표준용액을 조제하여 LC-MS/MS로 분석을 실시하였다. Hesperidin 등 10 종 성분의 검량선, 직선성, 검출한계 및 정량한계를 Table 4에 나타내었다. 표준용액을 0.2 - 20.0 µg·mL⁻¹의 농도 수준에서 분석대상 플라보노이드 성분의 검량선을 작성하였을 때에 결정계수(R²) 값이 0.9895 - 0.9992 범위로 직선성이 양호하였다. 10 종의 플라보노이드 성분의 검출한계는 0.0048 - 0.1778 µg·mL⁻¹였고, 정량한계는 0.0146 - 0.5388 µg·mL⁻¹ 범위였다. Medina-Remón et al.(2011)은 결정계수가 R² > 0.99이고, 검출한계와 정량한계가 각각 0.23과 0.77 이하로 낮아 분석법의 유효성이 인정된다고 하였다. 이상의 결과로, 플라보노이드의 분석법을 확립하고, 유효성을 검증할 수 있었으며, 감귤 과즙의 플라보노이드 함량을 분석하는데 적합한 것으로 확인되었다.

감귤 과즙의 플라보노이드 특성

감귤 유전자원에 대하여 대표적인 기능성 물질인 플라보노이드 성분의 함량 및 조성 특성을 파악하여 기능성 소재 및 육종 자원으로 활용하고자 앞서 확립한 LC-MS/MS의 분석조건에서 다성분 동시 분석법으로 플라보노이드 분석을 실시하였다. 플라보노이드 함량 및 조성 분석결과 대표적인 감귤 품종에 대한 크로마토그램을 제시하였다(Figs. 3 and 4). 80% 착색기에 수집한 67개 유전자원들의 과즙에 함유하는 플라보노이드 조성과 함량은 Table 5에 나타내었으며, 정량한계 미만으로 검출된 것

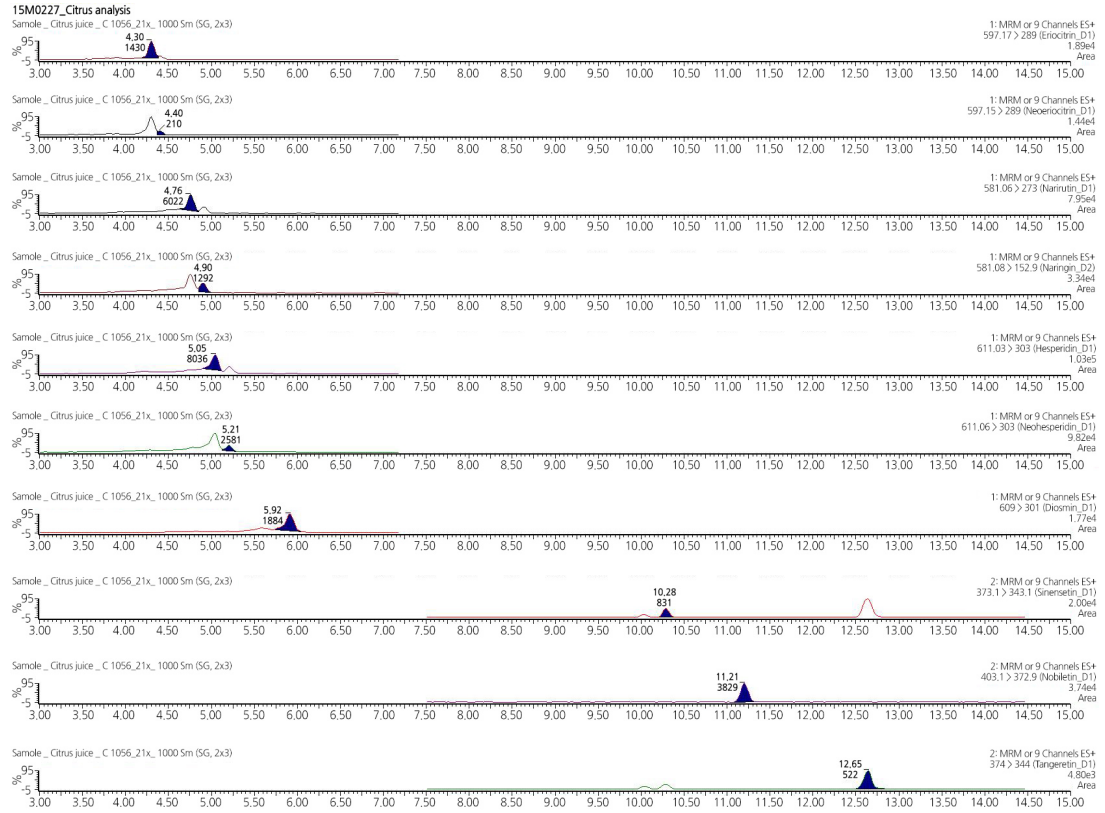


Fig. 3. UPLC-MS/MS chromatograms of citrus juice (PA02).



Fig. 4. UPLC-MS/MS chromatograms of citrus juice (TA10).

은 불검출(ND: not detected)로 표시하였다. 80% 착색기 만감류의 과즙에는 온주밀감보다 neohesperidin과 neoericiotin 등 2 종이 더 많은 10 종이 분석되었다(Park et al., 2015). Hesperidin과 narirutin 성분 함량이 많은 특성을 보여 대표적인 플라보노이드 성분으로 확인 되었다. 또한, 감귤에서 특이적으로 나타나며, 기능성 활성이 높다고 알려진 polymethoxy flavone인 sinensetin, tangeretin, nobiletin 성분들도 전체적으로 함유하는 특성을 보였다. 품종에 따라 플라보노이드 및 그 이성질체의 함량과 조성이 다르게 나타나는 특성이 있었으며, 만다린, 스위트오렌지와 이들이 교잡에 의해 파생된 탄귤류는 hesperidin, narirutin, eriocitrin 각각의 이성질체인 neohesperidin, naringin, neoericiotin을 함유하지 않았고, 사우어오렌지와 자몽류는 naringin 함량이 hesperidin 함량보다 높게 나타나(Table 5), Gattuso et al.(2007)이 스위트오렌지류, 만다린류, 레몬류는 hesperidin이 가장 많고, 자몽류는 naringin이 가장 많다고 보고한 결과와 일치하였다.

Table 5. Mean values of flavonoid content in juice of 67 citrus germplasms analyzed by LC-MS/MS (Unit: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FW)

Accession ^z	Hes	Neh	Nar	Nag	Eri	Nee	Dio	Sin	Tan	Nob
GF01	168.14	94.31	23.93	111.50	0.82	5.04	30.06	0.04	0.17	0.20
GF02	60.89	15.46	387.37	2553.60	0.78	1.50	10.89	0.11	1.02	1.50
GF03	46.79	15.53	296.13	743.39	ND ^y	ND	6.44	0.08	0.22	0.39
MA01	106.57	ND	23.82	ND	7.02	ND	14.09	0.02	0.24	0.24
MA02	2377.30	ND	87.19	ND	1.91	ND	424.95	0.31	1.68	4.01
MA03	1090.45	ND	19.53	ND	2.43	ND	150.13	0.15	0.88	1.64
MA04	428.50	ND	14.18	ND	0.89	ND	76.60	0.11	0.12	0.25
MA05	325.43	ND	56.38	ND	0.80	ND	44.80	0.87	0.19	1.06
MA06	1485.18	ND	55.81	ND	2.77	ND	265.48	0.49	5.46	7.58
MA07	656.84	ND	104.81	ND	78.75	ND	117.41	0.99	11.61	15.27
MA08	461.93	ND	12.24	ND	0.63	ND	82.57	0.03	0.08	0.40
MA09	907.55	ND	39.55	ND	0.62	ND	162.23	0.14	0.51	0.76
MA10	195.26	ND	63.10	ND	45.36	ND	26.88	0.28	1.29	2.74
MA11	1258.02	ND	32.22	ND	1.63	ND	224.88	0.22	1.38	1.79
MA12	1277.53	ND	32.36	ND	3.79	ND	228.36	0.67	0.23	0.56
MA13	1345.28	ND	36.99	ND	1.02	ND	185.21	1.88	11.70	19.46
PO01	64.61	154.37	78.35	201.39	15.98	35.21	8.54	0.22	2.52	3.78
PO02	11.58	3.57	19.19	638.68	ND	5.62	1.59	0.03	0.07	0.07
PO03	9.75	ND	140.46	ND	7.60	ND	1.74	0.04	0.22	0.52
PO04	298.15	ND	45.11	ND	0.69	ND	53.29	0.02	0.08	0.20
PO05	113.51	41.04	88.71	139.74	0.70	1.34	15.63	0.06	0.10	0.15
PO06	139.21	79.14	80.43	227.45	1.11	3.27	24.89	0.01	0.17	0.14
SS01	43.44	26.09	42.09	162.09	ND	ND	5.74	0.04	0.91	0.61
SS02	84.87	ND	176.86	362.03	ND	ND	11.22	0.01	0.31	0.22
SS03	86.91	29.47	77.76	189.36	ND	ND	11.97	0.02	0.26	0.20
SS04	155.59	93.06	24.42	270.09	ND	148.73	20.57	0.12	0.49	0.69
SS05	231.27	ND	36.95	203.66	ND	138.16	41.34	0.01	0.15	0.29
SSP6	93.32	41.29	57.29	340.10	ND	1.74	16.68	0.01	0.80	0.53
SS07	127.36	40.47	65.55	161.42	ND	ND	16.84	0.02	0.54	0.26

^zSee Table 1. Taxon of accession GF01 - 03: grapefruit, MA01 - 13: mandarin, PO01 - 06: pomelo, SS01 - 07: sour orange, SW01 - 10: sweet orange, PA01 - 08: papeda, TA01 - 17: tangor, TG01 - 03: tangelo

^yND: not detected.

Table 5. Mean values of flavonoid content in juice of 67 citrus germplasms analyzed by LC-MS/MS (Unit: $\mu\text{g mL}^{-1}$ FW) (Continued)

Accession ²	Hes	Neh	Nar	Nag	Eri	Nee	Dio	Sin	Tan	Nob
SW01	462.71	ND	65.80	ND	1.77	ND	63.70	2.19	0.51	2.91
SW02	622.73	ND	50.34	ND	3.76	ND	111.32	0.29	0.21	0.67
SW03	595.40	ND	30.50	ND	0.59	ND	106.43	4.75	1.64	6.59
SW04	502.97	ND	85.39	ND	1.19	ND	69.25	0.90	0.14	0.99
SW05	640.21	ND	93.52	ND	2.80	ND	88.14	1.65	0.28	1.97
SW06	2353.98	ND	160.68	ND	10.85	ND	420.78	0.98	0.59	1.98
SW07	2463.87	ND	178.87	ND	5.15	ND	440.43	2.82	0.79	4.59
SW08	1011.36	ND	167.06	ND	3.76	ND	139.24	4.30	1.58	7.41
SW09	484.23	ND	80.93	ND	1.92	ND	66.67	1.13	0.57	2.41
SW10	760.91	ND	36.34	ND	0.94	ND	104.76	1.41	0.73	2.20
PA01	103.73	9.63	27.02	15.70	ND	ND	18.54	0.01	0.02	0.05
PA02	125.37	17.92	52.80	31.06	27.28	4.98	16.58	0.04	0.03	0.11
PA03	73.50	9.21	15.42	14.87	10.95	ND	13.14	0.01	0.03	0.03
PA04	273.76	33.07	125.58	60.68	0.54	1.86	37.69	0.34	0.13	0.55
PA05	331.14	30.86	107.97	59.32	2.16	ND	43.78	0.07	0.16	0.50
PA06	95.43	8.59	30.01	15.11	ND	ND	17.06	0.01	0.01	0.01
PA07	293.15	37.09	122.30	65.06	1.22	2.13	40.36	0.35	0.17	0.54
PA08	338.44	22.31	154.47	58.22	0.51	2.37	60.50	0.02	0.27	0.27
TA01	1160.54	ND	52.38	ND	2.45	ND	153.44	0.07	0.25	0.50
TA02	116.94	ND	19.64	ND	0.60	ND	20.90	0.02	0.10	0.15
TA03	475.58	ND	83.34	ND	1.70	ND	65.47	0.05	0.19	0.37
TA04	391.24	ND	72.87	ND	3.81	ND	53.86	0.01	0.05	0.07
TA05	2091.63	ND	406.36	ND	3.53	ND	373.89	0.13	0.45	1.12
TA06	295.85	ND	102.70	ND	1.09	ND	40.73	0.31	0.12	0.25
TA07	50.32	ND	64.73	6.81	2.29	ND	6.93	0.36	0.04	0.29
TA08	799.74	ND	80.33	ND	1.36	ND	142.96	0.07	0.47	0.53
TA09	745.00	ND	120.83	ND	1.54	ND	98.50	0.13	0.15	0.25
TA10	2647.84	ND	299.25	ND	4.56	ND	350.09	0.17	1.10	2.11
TA11	644.56	ND	45.88	ND	2.85	ND	115.22	0.08	0.11	0.67
TA12	739.35	ND	122.28	ND	9.60	ND	101.79	0.12	0.30	1.34
TA13	577.20	ND	76.21	ND	2.72	ND	76.32	0.28	0.12	0.31
TA14	469.25	ND	54.03	ND	1.07	ND	64.60	0.59	0.57	1.16
TA15	1102.56	ND	55.56	ND	2.06	ND	197.09	0.13	0.40	0.91
TA16	490.24	ND	44.84	ND	0.51	ND	87.63	0.02	0.47	0.52
TA17	380.56	ND	44.84	ND	1.50	ND	52.39	0.24	0.30	0.81
TG01	630.94	ND	32.47	ND	1.08	ND	86.86	0.07	0.22	0.47
TG02	877.20	ND	75.37	ND	1.78	ND	115.98	0.08	1.41	1.55
TG03	294.73	ND	115.96	ND	3.29	ND	40.58	0.08	0.21	0.31

²See Table 1. Taxon of accession GF01 - 03: grapefruit, MA01 - 13: mandarin, PO01 - 06: pomelo, SS01 - 07: sour orange, SW01 - 10: sweet orange, PA01 - 08: papeda, TA01 - 17: tangor, TG01 - 03: tangelo

³ND: not detected.

총 플라보노이드 함량은 ‘조향’(TA10) 품종에서 가장 높았고, ‘상귀넬리’(SW07), ‘그레이프프루트’(GF02), ‘삼전네블’(SW06), ‘기주밀감’(MA02), ‘미호콜’(TA05)이 다른 품종에 비해 매우 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량이 높은 이들 품종과 더불어 neohesperidin 함량이 가장 높은 ‘당유자’(PO01)와 neoeriocitrin 함량이 가장 높은 ‘좌등’(SS04) 등도 특유의 플라보노이드를 이용 또는 연구하는데 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 육종 소재로도 이용가치가 있는 것으로 사료된다. 특히 제주 재래귤인 ‘병굴’(MA07)은 항암활성과(Miyata et al., 2008), 알츠하이머병 개선(Onozuka et al., 2008)에 효과가 있는 nobiletin과 파킨슨병 치료에 효과를 기대하고 있는(Datla et al., 2001) tangeretin 함량이 높아 현재까지 활용도가 낮은 재래귤의 이용 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대된다. Rhyu et al.(2002)이 고감도 감미료 NHP-DC의 전구물질인 neohesperidin 함량이 높은 ‘당유자’, ‘지각’(SS05) 등은 상업적 활용가능성이 높다고 하였는데, 본 연구에서도 비슷한 결과를 보였다.

초 록

기능성 및 육종 소재로써 감귤 유전자원의 활용 가치를 높이고자, LC-MS/MS를 이용하여 감귤 67개 유전자원의 과즙 중 플라보노이드 함량을 분석하였다. LC-MS/MS 분석을 위하여 hesperidin 등 감귤에 있다고 알려진 10 종의 플라보노이드 성분의 분석조건을 설정하였고, 특이성, 직선성, 검출한계 등 유효성 검증을 통하여 분석법을 정립하였다. 80% 착색기 감귤 과즙에는 일반적으로 hesperidin과 narirutin 성분 함량이 높았으나, 사우어오렌지와 자몽에서는 naringin 함량이 hesperidin 함량보다 높았다. 총 플라보노이드 함량은 ‘조향’, ‘상귀넬리’, ‘그레이프프루트’, ‘삼전네블’, ‘기주밀감’, ‘미호콜’에서 높게 나타났다. 또한 제주 재래귤인 ‘당유자’, ‘지각’, ‘병굴’ 등은 일부 플라보노이드 성분 함량이 특이적으로 높았다. 따라서 이들 자원들은 기능성 소재뿐만 아니라 육종 소재로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

추가 주요어 : 분석법, 육종 소재, 기능성 소재, 제주 재래귤, LC-MS/MS

Literature Cited

- Benavente-Garcia O, Castillo J (2008) Update on uses and properties of Citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 56:6185-6205. doi:10.1021/jf8006568
- Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT (2001) Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 12:3871-3875. doi:10.1097/00001756-200112040-00053
- El-Shafae AM (2002) Bioactive polymethoxyflavones and flavanone glycosides from the peels of *Citrus deliciosa*. *Zhonghua Yao Xue Zhi* 54:199-206
- Gattuso G, Barreca D, Gargiull, C, Leuzzi U, Caristi C (2007) Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 12:1641-1673. doi:10.3390/12081641
- Han S, Kim HM, Lee JM, Mok S-Y, Lee S (2010) Isolation and identification of polymethoxyflavones from the hybrid *Citrus*, Hallabong. *J Agric Food Chem* 58:9488-9491. doi:10.1021/jf102730b
- Han S, Kim HM, Lee S (2012) Simultaneous determination of polymethoxyflavones in *Citrus* species, Kiyomi tangor and Satsuma mandarin, by high-performance liquid chromatography. *Food Chem* 134:1220-1224. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.187
- Han SH, Kang SB, Moon YJ, Moon BY (2019) Changes in fruit quality, antioxidant activity, and flavonoid content with limited irrigation after full bloom of early-maturing 'Harye' Satsuma mandarin in a plastic greenhouse. *Hortic Sci Technol* 37:10-19. doi:10.12972/kjhst.20190002
- Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K (1995) Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer* 72:1380-1388. doi:10.1038/bjc.1995.518
- Horowitz RM, Gentili B (1977) Flavonoid constituents of citrus. *In* S Nagy, PE Shaw, MK Veldhuis, eds, *Citrus Science and Technology*, Vol 1. AVI Publishing Co Inc, Westport, CT, pp 397-426
- KFDA (2004) Analytical method guideline about validation of drugs and etc, Korea Food and Drug Administration. pp 1-18
- Kim JH, Lee J, Lee S, Cho EJ (2016) Quercetin and quercetin-3-β-d-glucoside improve cognitive and memory function in Alzheimer's

- disease mouse. *Appl Biol Chem* 59:721-728. doi:10.1007/s13765-016-0217-0
- Kim JH, Lee S, Cho EJ, Kim HY (2019) Neuroprotective effects of kaempferol, quercetin, and its glycosides by regulation of apoptosis. *J Korea Acad-Ind Coop Soc* 20:286-293
- Kim YC, Koh KS, Koh JS (2001) Changes of some flavonoids in the peel of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) harvested during maturation. *Agric Chem Biotechnol* 44:143-146
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon WJ, Kim SH (2009) Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr* 42:278-290. doi:10.4163/kjn.2009.42.3.278
- Lee CH, Kang YJ (1997) HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. *Korean J Post-harvest Sci Technol Agri Prod* 4:181-187
- Lee J, Lee DG, Rodriguez JP, Park JY, Cho EJ, Jacinto SD, Lee H (2018) Determination of flavonoids in *Acer okamotoanum* and their aldose reductase inhibitory activities. *Hortic Environ Biotechnol* 59:131-137. doi:10.1007/s13580-018-0014-2
- Medina-Remón A, Tulipani S, Rotchés-Ribalta M, Mata-Bilbao MDL, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM (2011) A fast method coupling ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection for flavonoid quantification in citrus fruit extracts. *J Agric Food Chem* 59:6353-6359. doi:10.1021/jf200625z
- Miyata Y, Sato T, Imada K, Dobashi A, Yano M, Ito A (2008) A citrus polymethoxy-flavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 366:168-173. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.100
- Mokbel MS, Hashinaga F (2006) Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chem* 94:529-534. doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.042
- Mumivand H, Babalar M, Tabrizi L, Craker LE, Shokrpour M, Hadian J (2017) Antioxidant properties and principal phenolic phytochemicals of Iranian tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) accessions. *Hortic Environ Biotechnol* 58:414-422. doi:10.1007/s13580-017-0121-5
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishil T, Yano M, Ohta H (2006) Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:178-192. doi:10.1271/bbb.70.178
- Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, et al. (2008) Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Therap* 326:739-744. doi:10.1124/jpet.108.140293
- Park JH, Kang BW, Kim JE, Seo MJ, Lee YC, Lee JH, Joo WH, Choi YH, Lim HS, et al. (2008) Effect of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on antioxidant and immune activity. *J Life Sci* 18:403-408. doi:10.5352/JLS.2008.18.3.403
- Park YC, Yang YT, Kim JY, Lee CH, Kang SH, Kang JH (2015) Characteristics of flavonoids in juice and cluster analysis of satsuma mandarin germplasms. *Korean J Plant Res* 28:16-25. doi:10.7732/kjpr.2015.28.1.016
- Piao X-L, Wu Q, Han S, Kim HY, Lee S (2011) Simultaneous determination of flavone glycosides in the fruit of *Citrus paradise* and *C. grandis* by HPLC-PDA. *Nat Prod Sci* 17:337-341
- RDA (2012) Standard of analysis and survey for agricultural research. pp 619-668
- Rhyu MR, Kim EY, Bae IY, Park YK (2002) Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *Korean J Food Sci Technol* 34:132-135
- Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS (1992) Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 21:136-142
- Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS (2008) Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake. *Korean J Food Preserv* 15:94-98
- Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, et al. (2004) Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: Antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther* 1:95-101. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02082.x