

향유의 향기성분 분석 및 생리활성 검정

정재훈* · 임흥빈*†

*충북대학교 농과대학

Chemical Composition and Biological Activities of *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander

Jae Hoon Jeong* and Heung Bin Lim*†

*Agricultural College, Chungbuk Natl. Univ., Cheongju 361-763, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the chemical composition of essential oils, absolutes and oleoresins isolated from *Elsholtzia ciliata* and the biological activities of them. Yields of essential oils, absolutes and oleoresins were 0.34%, 11.33% and 15.24%, respectively. The major component was nagine ketone in essential oils, methyl linolenate in absolutes and 9,12,15-octadecatrienoic acid in oleoresins. Essential oils and oleoresins showed the inhibitory activities in enzyme-dependent, enzyme-independent and autooxidative lipid peroxidation systems. EC₅₀ values in neutral red uptake assays 24 h of exposure times were 23.3 µg/ml, 341.0 µg/ml and 17.2 µg/ml in essential oils, absolutes and oleoresins, respectively, and essential oils and oleoresins showed the cytotoxic effect at the only high dose. Absolutes and oleoresins did not show antibiotic and mutagenic activities. On the contrary, essential oils with over 500 µg/plate showed antibiotic and mutagenic activities in Ames test. Essential oils and oleoresins have a prolongating effect the ciliostasis of rat trachea.

Key words : *Elsholtzia ciliata*, volatile flavor components, lipid peroxidation, NRU assay, Ames test, ciliostasis.

서 언

최근 향료과학이 사회 문화적으로 매우 빠르게 확산되고 있다. 향료가 인간의 행동에 영향을 미친다는 것이 밝혀지면서 선진국에서는 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 이는 향료가 가지고 있는 기술집약적 특성, 생활 곳곳에 미치는 다양한 적용분야, 향을 통한 생리적, 심리적 치료법인 방향요법 (aromatherapy, aromacology)에 이르기까지 고부가가치와 시장성이 있기 때문이라고 생각된다. 일반적으로 향료의 개발은 향료자원의 추출, 분석, 확인 및 조합 등을 통한 신제품 개발, 새로운 향기성분의 합성으로 고급향수나 방향제로서 일상 생활용품에 다양하게 적용되고 있으나 최근에는 향료의 기능성과 안전성 연구

에도 많은 노력을 기울이고 있다 (Filip & Ferraro, 2003 ; Tellez et al., 2001 ; Renwick, 2004).

향유 (*Elsholtzia ciliata*)는 꿀풀과 1년생 초본으로서 30~60 cm 정도 자라며 줄기는 사각형이고, 잎은 대생하며 장방형 또는 장추원형으로 끝이 뾰족하고 톱니가 있다. 8~9월에 적자색 꽃이 피며 과실기는 10월이다. 우리나라 전국 산야에서 흔히 볼 수 있으며 9~10월 과실 성숙기에 채취하여 전초를 말려 사용한다. 예로부터 향유는 복통 및 설사 때 백편두와 배합하여 사용하고 거담효과는 물론 이뇨작용, 해열발한작용, 진신부종, 지혈 등에도 효과가 있으며, 향료자원으로서 향은 강하고, 특이한 방향이 있다고 알려져 있다 (Ahn, 2000). 국내에서 자생하는 향유속 (*Elsholtzia*)에는 향유 (*Elsholtzia ciliata*), 꽃향유

† Corresponding author : (Phone) +82-43-261-2521 (E-mail) heungbin@chungbuk.ac.kr

Received August 23, 2004 / Accepted November 6, 2004

(*Elsholtzia splendens*) 애기향유 (*Elsholtzia saxatilis*), 가는잎향유 (*Elsholtzia angustifolia*), 흰꽃향유 (*Elsholtzia splendens* Nakai) 등이 있으며, 한약재로서 향유와 꽃향유의 지상부가 사용되고 있다 (Ahn, 2000).

한편 향유속 식물에 관한 연구는 Chi *et al.* (1992)이 야생 향유의 꽃, 잎, 줄기 등에 함유된 정유성분 비교 및 조직 배양 조건을 달리하여 정유성분을 비교하였고, Sohn *et al.* (1998)은 자생 향유를 관상용 화훼로서의 이용가능성을 조사하였으며, Lee *et al.* (2000)은 추출방법을 달리하여 향유의 정유성분을 비교하였고, Chung & Lee (2002)는 제조한 식품 향신료로서 이용하기 위하여 꽃향유 향미유의 관능검사 및 향미 패턴을 비교하여 보고하고 있다. 또한 Sohn *et al.* (2003)은 uniconazole 처리가 향유와 꽃향유의 정유성분에 미치는 영향을 조사하였으며, Chang *et al.* (2003)은 온도 및 일장 조건이 꽃향유의 '자향'의 성장과 개화에 미치는 영향을 조사하였고, Sohn & Kim (2003)은 적심과 단일처리가 분식 향유와 꽃향유의 생육, 개화에 미치는 영향을 조사하여 보고하고 있다. 그리고 중금속으로 오염된 토양에서 꽃향유의 성장률과 구리의 흡착능 비교 (Song *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004)와 꽃향유의 항염증효과 (Kim *et al.*, 2004)가 최근에 보고되고 있다. 그러나 국내에서 자생하는 향유의 정유성분만을 분석하여 보고한 예는 있으나 안전성과 생리활성을 검증한 예는 거의 없다.

따라서 본 연구는 우리 나라 야지에서 흔히 볼 수 있고 한약재로서 사용되고 있는 향유의 향기성분을 정유성분, absolutes 및 oleoresins으로 구분하여 추출, 분리, 동정하고, 지질과산화 저해효과, 세포독성 평가 돌연변이유발성 검정 및 거담효과 등의 안전성과 생리활성을 측정하여 담배 및 식품, 의약품, 음료 등의 타 산업에의 활용을 위한 기초자료를 확보하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 향유는 충북 청주시 상당구 석교동 한약건재상 (부민약업사)에서 구입하였다. 시료는 한의사의 자문하에 품질이 양호한 것만 선별하여 사용하였으며 믹서기로 미세하게 분쇄하고 100 mesh 체로 거른 다음 80°C oven에서 48시간 건조시키고 건물중을 측정하여 추출 시료로 사용하였다.

2. 향기성분 제조 및 분석

가. 정유성분

정유성분을 추출하기 위하여 분쇄된 시료 건중 100 g을

3 l 플라스크에 넣고 증류수 2 l를 가한 다음 Schultz *et al.* (1977)의 방법에 따라 개량된 SDE (Likens-Nikerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus) 장치를 사용하여 5시간 동안 증류 추출하였다. 추출용매로는 *n*-pentane : diethylether 혼합용액 (1:1, v/v) 100 ml를 사용하였다. 추출 후 얻은 용매층을 무수황산나트륨으로 탈수시킨 다음 30°C 이하에서 회전감압 농축장치를 이용하여 감압농축한 후 N₂ gas로 완전 농축하고 분석용 시료로 사용하였다.

나. Absolutes

시료 건중 200 g을 3 l 삼각 플라스크에 넣고 추출용매로 *n*-hexane 2 l를 가한 후 실온에서 5일간 추출하였다. 추출용액을 거름종이로 거른 다음 30°C에서 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하였다. 여기에 ethanol 100 ml를 넣어 녹이고 알코올 불용성 성분을 제거한 다음 다시 40°C에서 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하고 분석용 시료로 사용하였다.

다. Oleoresins

시료 건중 200 g을 5 l 삼각 플라스크에 넣고 추출용매로 50% ethanol 3 l를 가한 후 실온에서 5일간 추출하였다. 추출용액을 거름종이로 거른 다음 50°C에서 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하였다. 농축된 oleoresin을 5 g 취하여 분액깔대기에 넣고 diethylether : DW 혼합용액 (1:1, v/v) 200 ml를 가한 후 유기층을 분리하였다. 추출한 용매층을 30°C에서 회전감압농축장치를 이용하여 농축한 다음 N₂ gas로 완전 농축하여 분석용 시료로 사용하였다.

라. 향기성분 분석

추출된 시료는 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)를 이용하여 분석하였으며, 이때 GC는 HP-5890 series II와 GC-MS는 HP 5970 mass selective detector (MSD)가 부착된 것을 사용하였다. GC분석의 column은 supelcowax fused silica capillary (60 m × 0.25 mm × 0.32 μm)를 사용하였으며, GC-MS의 column은 Innowax fused silica capillary (60 m × 0.25 mm × 0.32 μm)를 사용하였다. Column 온도는 50°C에서 3분간 유지 후 230°C까지 분당 3°C씩 승온하여 50분간 유지하였다. Inject와 detector 온도는 250°C로 하였고, carrier gas는 He gas를 사용하여 flow rate 0.5 ml/min로 split mode (split ratio=100:1)에 주입하였으며 mass selective detector의 ionization voltage는 70 eV로 하였다. 성분동정은 GC-MS 분석에서 얻어진 mass spectrum

을 Wiley 275/NIDS library를 통하여 HP-5970 Chemstation data system에서 검색 동정하였다.

3. 지질과산화 억제효과 측정

효소적 및 비효소적 지질과산화 억제효과를 측정하기 위하여 지질의 source로서 사용한 microsome 분획은 Bansal *et al.* (1983)의 방법에 따라 웅성 sprague-dawley (S.D.) rat (200~220 g)의 liver로부터 분리하여 조제하였다. 자동 지질과산화 억제효과를 측정하기 위하여 지질의 source로서 사용한 ox-brain homogenate 분획은 충청북도 가축위생 시험연구소에서 ox-brain을 취한 다음, Stocks *et al.* (1974)의 방법에 따라 조제하였다. 간의 microsome 분획과 ox-brain homogenate 분획의 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951) 방법에 따라 정량하였다.

향유에서 분리한 정유성분, absolutes와 oleoresins의 비효소적 지질과산화 억제효과 검정은 Wong *et al.* (1981)의 방법을 약간 수정하여 실시하였으며, free radical generator로는 2,2'-azobis (2-methylpropion-amidine) · 2HCl (AAPH)를 사용하였다. 효소적 지질과산화 억제효과 검정은 Pederson & Aust의 방법(1975)에 따라 NADPH와 ADP-Fe⁺⁺system을 사용하였고, 자동산화 지질과산화 억제효과 억제활성 검정은 Stocks *et al.* (1974)의 방법에 따라 incubation system으로 측정하였다. 지질과산화 억제효과 검정결과는 세 방법 모두 다음 식으로부터 inhibition (%)을 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Control} - \text{Sample}}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

4. 세포독성 평가

Babich & Borenfreund (2002)의 방법을 이용하여 세포주로 BALB/c mouse fibroblasts (3T3)를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. BALB/c 3T3 세포를 well 당 9,000개가 되도록 DMEM (Dulbecco's modified eagle media)으로 희석하여 96 well culture cluster에 분주하고 5% CO₂, 95% air, 상대습도 포화상태인 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하여 배양하였으며, 대조군은 DMSO 1.6% 시료는 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 µl/ml (최종 DMSO 농도를 1.6%로 맞춤)로 시료 당 반복수를 8 well/plate하였다. 시료를 24시간 노출시킨 후 neutral red uptake 정도를 측정하였다. DPBS로 washing한 후 neutral red 처리하여 3시간 배양 (5% CO₂, 95% air, 상대습도 포화상태인 37°C incubator)하고, 0.5% formaldehyde/1% calcium chloride로 고정한

후 acetic acid/ ethanol로 neutral red를 녹여내고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 대조군의 NRU를 100%로 하여 상대적인 값으로 표기하였으며, 회귀분석을 하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.

5. 돌연변이 유발성 측정

향유의 정유성분, absolutes와 oreoresins 추출물을 DMSO에 녹여 실험에 사용하였으며, 대조군 (negative control)은 DMSO만을 사용하였다. 사용된 균주는 *Salmonella* TA 98 균주로서 한국생명공학연구원 부설 유전자센터에서 구입하였다. 균주의 형질확인은 Maron & Ames (1983)의 방법에 준하여 histidine 요구성, rfa 돌연변이, uvr B 돌연변이 및 R-factor시험 등을 정기적으로 실시하였고, 균 배양액 1 ml에 DMSO 90 µl를 가하여 액체 질소내에 보존하며 사용하였으며, 간의 S-9 mixture와 cofactor-1은 각각 Molecular Toxicol(사)와 Wako Pure Chem(사) 제품을 사용하였다.

돌연변이 유발성 검정은 살균한 top agar 100 ml에 1 mM histidin/ biotin solution 10 ml를 가하여 잘 혼합한 후 1 ml씩 시험관에 취하고 DMSO에 녹인 각 추출물과 배양한 균체 현탁액 (1×10⁹ cell/ml) 각 0.1 ml와 S-9 Mixture 50 µl를 가하여 약 3초간 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 Vogel-Bonner agar plate에 균일하게 도말하였다. Agar가 굳으면 뒤집어서 37°C에서 48시간 배양한 후 생성된 revertant colony (복귀돌연변이 콜로니)의 수를 세어 대조군과 비교하였다. S-9 mixture 적용여부와 상관없이 최소 한 개 균주에서 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수가 현저한 증가가 있을 때 양성으로 판정하였다. 또한 기본성장균층 (background lawn)이 없어지거나 없어졌을 때 혹은 콜로니수가 음성대조군에 비해 현저히 감소했을 때 항균성이 있다고 판정하였다.

6. 거담효과 측정

기도조직의 적출은 Donnelly *et al.* (1974)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 체중 200 g의 웅성 흰쥐 (S.D. rat)를 마취시킨 후 목부위를 절개하여 조심스럽게 trachea를 적출하고, 횡단면으로 기도조직을 약 1 mm간격으로 잘라 5~7개의 ring 모양의 기도조직을 준비하여 멸균된 생리식염수에 담그고 사용할 때까지 온도를 25°C로 일정하게 유지하였다. 시험에 사용한 담배는 KT&G 제품 디스이었다. 향유의 정유성분, absolute 및 oleoresin 추출물을 DMSO에 녹여 개피당 50 µg이 들어가도록 microsyringe를 이용하여 담배에 주입하고, 평형수분이 13%가 되도록 조화시킨 다음 담배를 연소하였다. 담배연기의 포집은 자동화된 smoking machine으로 30개피의 담배를 연소하고 얻은

전 연기를 gas washing bottle을 이용하여 생리식염수로 포집하였다. 이때 디스담배의 시료선별은 각초중량은 960 ± 10 g, 공기회석율은 $40 \pm 5\%$ 로 하였으며, 담배의 연소조건은 CORESTA 표준법에 따라 한 puff당 흡연시간은 2초, 흡입부피는 35 ml로 하였고 흡연주기는 1회 흡연당 60초로 하였다. 한 개의 기도조직의 ring을 다른 petri dish에 옮기고 위에서 포집한 담배연기용액 1.5 ml에 담근 후, TV monitor가 달려있는 도립현미경 (Inverted microscope)으로 섬모운동을 관찰하고 Donnelly *et al.* (1974)의 방법에 따라 섬모운동이 멈출 때까지 걸리는 시간을 측정하고 단위는 초로 하였다. 한 종의 담배에 대하여 기도의 위치, 연기포집 등의 순서를 바꾸어 가면서 평균 12~16회 반복 실험하였다.

결과 및 고찰

1. 향기성분 분석

가. 정유성분

방향성 성분이 풍부하면서 있으면서 거담효과가 있다고 알려지고 있는 향유는 꿀풀과 1년생 초본으로서 그 전초를 말려 한약재로 사용되고 있는데 거담제로서 담배 및 식품용 향료자원으로 활용가치가 있는 식물이라고 생각된다. 우리나라 야지에서 흔히 볼 수 있는 향유를 수집하여 SDE 추출장치로 추출한 전초의 정유성분의 수율은 0.34%이었다. 한편 Chi *et al.* (1992)와 Sohn *et al.* (1998)에서 향유를 직접 재배하고 생엽을 재료로 하여 정유성분을 추출했을 때 수율은 꽃에서 각각 1.50%와 8.3%이었으며, 잎에서는 각각 1.20%와 6.9% 그리고 줄기에서는 1.04%와 2.0%이었다. 본 실험결과에서 향유의 정유성분 수율이 낮은 것은 실험재료로서 생엽이 아니라 한약재로 직접 사용하는 건엽을 사용했기 때문이라고 사료된다.

향유의 정유성분에서 GC/MS로 동정된 성분 결과는 표 1에 나타내었다. 향유의 정유성분을 분석한 결과 ketone 화합물이면서 sweet, rose-like 의 floral한 향 특성을 나타내는 naginate ketone이 29.37%와 elsholtzia ketone [3-methyl-1-(3-methyl-2-furanyl)-1-butanone]이 14.37%로 가장 많이 함유되어 있었으며, sweet, pungent, cherry-hey 향 특성을 나타는 acetophenone이 3.78%, 2-cyclohexen-1-one도 3.55%로 ketone 화합물의 비율이 상대적으로 높았다. Monoterpene류 화합물이면서 powerful balsamic-sweet note의 향 특징이 있는 rosefuran도 11.76% 함유하고 있었고 지방산이면서 waxy, sweet한 향 특성을 나타내는 palmitic acid도 3.67% 함유하고 있었다. 장미과의 주성분이면서 담배향료로서 사용되고 있으며 floral-soapy, green, musty 향

특성을 갖고 있는 geranial이 0.35%, 레몬향의 주성분인 limonene이 1.01%, 오렌지와 레몬향이 나는 linalool은 1.67% 비율로 존재하였다. α -Humulene이 5.55%, trans-caryophyllene이 2.53%, germacrene d가 1.55% 비율이었으며 이들은 대부분 sesquiterpene류 화합물로서 terpene계 향 특징인 pleasant, fresh, citrus, mint 등

Table 1. Volatile compounds identified in essential oils extracted from *Elsholtzia ciliata*.

Volatile compounds	R. T. (min.)	Contents (peak area, %)
Limonene	18.48	1.01
1,8-Cineole	18.89	1.84
3-Octanone	20.94	0.30
3-Octanol	26.78	0.40
Rosefuran	27.55	11.76
α -Thujone	28.60	0.64
1-Octen-3-ol	29.25	0.57
Copaene	29.78	0.18
α -Cubebene	31.32	0.21
β -Bourbonene	32.50	0.50
Linalool	33.35	1.67
trans-Caryophyllene	35.83	2.53
cis-Dihydrocavone	36.40	0.53
Cyclohexanone	37.20	2.07
Elsholtzia ketone	37.57	14.37
Acetophenone	38.21	3.78
α -Humulene	38.80	5.60
δ -Cadinene	39.28	0.25
Germacrene d	40.19	1.55
Bicyclohepta-2-ene	40.40	0.35
Craveol	40.55	1.13
Geranial	40.99	0.35
Bicyclogemacrene	41.10	0.23
2-Cyclohexen-1-one	41.29	3.55
δ -Cadinene	41.85	0.46
α -Amorphene	42.01	0.20
Naginata ketone	46.33	29.37
Caryophyllene oxide	50.11	0.57
Methyl eugenol	50.74	0.92
2-Pentadecanone	54.03	0.65
Spathulenol	54.33	0.58
Eugenol	55.79	1.15
2-Methyl-5-vinylphenol	56.73	0.20
Palmitic acid	91.95	3.67

의 방향을 나타낸다고 알려지고 있다. 한편 Chi *et al.* (1992)가 향유 정유성분을 분석한 결과와 함량 비율에서 약간의 차이가 있었지만 rosefuran, elsholtzia ketone과 naginata ketone이 주성분이라고 보고한 결과와 거의 일치하였다. Sohn *et al.* (1998)이 향유의 정유성분은 rosefuran, limonene과 citral carvone이라고 보고한 결과와는 조금 상이하였다. 그러나 정유성분의 함량은 같은 종이라하더라도 정유를 채취한 지역과 재배 환경 및 실험 재료에 따라 달라지리라 예상되며 추출방법에 따라서도 크게 그 함량의 차이는 있으리라 생각된다.

나. Absolutes

향유의 전초 건엽에서 추출한 absolutes의 수율은 11.33%이었다. 향유의 absolutes에서 약 30개의 성분이 분리되었으며, 이 중에서 23개의 성분이 동정되었고 GC/MS로 동정된 성분 결과는 표 2와 같다. 향유의 absolutes에서 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것은

Table 2. Volatile compounds identified in absolutes extracted from *Elsholtzia ciliata*.

Volatile compounds	R. T. (min.)	Contents (peak area, %)
2-Butanal	12.61	0.33
Limonene	18.58	0.18
2-Pentanal	24.26	0.55
Copaene	29.83	0.25
2,4-Heptadienal	30.42	0.86
α -Cubebene	31.36	0.67
β -Bourbonene	32.53	0.50
Camphor	32.76	0.38
trans-Caryophyllene	35.81	1.28
Elsholtzia ketone	37.48	1.25
α -Humulene	38.70	1.49
Germacrene d	40.17	0.25
β -Selinene	40.61	1.25
α -Selinene	40.75	0.49
2-Cyclohexen-1-one	41.29	5.39
Naginata ketone	46.17	0.27
Caryophyllene oxide	50.12	0.67
2-Pentadecanone	54.05	1.19
Spathulenol	54.35	0.73
Methyl palmitate	56.82	1.10
Linoleic acid	80.50	5.17
Palmitic acid	92.02	10.46
Methyl linolenate	98.46	12.07

ester화합물인 sweet, adds body 향특성을 갖는 methyl linolenate가 12.07%이었으며, waxy, sweet, adds body의 향특성을 갖는 지방산인 palmitic acid도 정유성분에서와 달리 10.46% 비율로 존재하고 있었다. Waxy, adds hardness의 향특성을 갖는 지방산인 linoleic acid는 5.17% 함유되어 있어 유기산과 ester화합물이 가장 많은 비율을 차지하고 있었다. 정유성분에서 많이 존재하는 elsholtzia ketone과 naginata ketone은 향유 absolutes에서는 각각 0.27%와 1.25로 상대적으로 적은 비율로 존재하였다. α -Humulene도 1.49%로 정유성분에서보다 상대적으로 그 비율이 낮았으며, ketone화합물인면서 정유성분에서도 존재하는 2-cyclohexen-1-one은 5.39%, 2-pentadecanone이 1.19%로 정유성분보다 더 많은 비율로 존재하였다. Aldehyde화합물인면서 정유성분에 존재하지 않는 2-butenal, 2-pentanal과 2,4-heptadienal이 미량으로 존재하는 것이 확인되었다. 또한 향유의 정유성분에서도 확인되고 있는 limonene, linalool, trans-caryophyllene과 germacrene d도 absolutes에서 미량으로 존재하는 것이 확인되었다. 향유의 정유성분에 많이 함유된 rosefuran은 향유의 absolutes에서는 전혀 검출되지 않았으며, absolutes에서는 정유성분에서보다 유기산과 ester, 그리고 aldehyde 계통의 화합물이 많이 동정되었다. 이와 같은 결과는 Hong *et al.* (2002)이 보고한 결과와 유사하였다.

다. Oleoresins

향유의 전초 건엽에서 추출한 oleoresins의 수율은 15.24%이었다. 향유 oleoresins에서 약 30개의 성분이 분리되었고, 이 중에서 8개의 성분이 동정되었으며 그 결과는 표 3과 같다. 향유의 oleoresins에서 9,12,15-octadecatrienoic acid가 18.62%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 정유성분과 absolutes에서도 존재하는

Table 3. Volatile compounds identified in oleoresins extracted from *Elsholtzia ciliata*.

Volatile compounds	R. T. (min.)	Contents (peak area, %)
Acetophenone	38.21	0.55
Heptadecane	39.08	3.59
Hexanoic acid	44.77	0.78
Ethyl palmitate	57.88	8.96
Ethyl oleate	65.08	3.87
Ethyl linoleate	67.03	9.53
9,12,15-Octadecatrienoic acid	70.11	18.62
Palmitic acid	92.85	5.49

palmitic acid가 5.49%, hexanoic acid가 0.78%로 지방산이 상대적으로 높았다. Sweet, smoothing한 향특성을 가진 ethyl palmitate는 8.96%와 sweet, nutty, waxy, flue-cured note한 향특성을 가진 ethyl oleate와 ethyl linoleate는 각각 3.87%와 9.53%로 지방산의 ester화합물도 높은 비율로 존재하였다. Ketone화합물이면서 sweet, pungent, cherry-hay의 향특성을 갖는 acetophenone은 oleoresins에서도 0.55% 비율로 존재하였으며, 정유성분과 absolutes에서 존재하지 않는 hydrocarbone 화합물 heptadecane도 3.59%비율로 존재하였다.

2. 지질과산화 억제효과

천연 carotenoid 화합물과 retinoid 화합물, ubiquinol-10, α -tocopherol 등 노인성 의약품이나 건강식품들에는 대부분 항산화물질이 함유되어 있는데, 이들 천연 항산화제의 수요는 해마다 급증하고 있으며 새로운 천연 항산화제의 개발이 강하게 요구되고 있다 (Stanner *et al.*, 2004). 천연 항산화제가 중요시되고 있는 이유는 이들 물질이 생체 내에서 지질과산화 과정 중에 생성되는 free radical들을 제거하거나 과산화지질 및 산화분해물의 생성을 억제하며 이러한 지질과산화 억제가 궁극적으로 산화 및 발암을 억제할 것으로 기대되고 있기 때문이다 (Whiteside *et al.*, 2004).

한편, 예전에 향료의 제조 및 기술개발은 향기성분의 추출, key aroma 성분의 분리정제, 합성기술 외에 향료 조합 기술, 정밀분석 기술만 필요로 하였다. 그러나 건강에 대한 관심이 높은 요즘 향료기술 분야의 선진국인 미국, 스위스, 독일, 프랑스, 일본 등에서는 이러한 기술 이외에 여러 가지 인체에 대한 독성평가는 물론 항산화효과와 거담효과와 같은 생리활성이 있는 다 기능성 향료개발에 주력하고 있다.

한방에서 사용되는 약용식물 추출물에 대하여 항산화효과를 screening한 연구는 많이 이루어져 있다 (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). 또한 *In vitro*에서 항산화효과를 측정하는 방법도 다양하게 이루어지고 있다. 생약재 추출물 혹은 천연물에서 분리한 항산화성 성분이 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Lee *et al.*, 2003), superoxide radical 과 hydroxyl radical을 제거하는 정도 (Safitri *et al.*, 2003)를 측정하거나 불포화 지방산 linoleic acid를 이용하여 과산화지질 저해효과를 측정 (Piacente *et al.*, 2004)하여 항산화효과를 직접 평가하는 방법이 있다. 또한 지질 source로서 간 microsome (Rajlakshimi *et al.*, 2003)이나 ox-brain homogenate (Kang *et al.*, 2003)을 이용하여 free radical에 의해 지질과산화를 유도하고 파괴된 지질의 부산물인 MDA를 측정

하여 항산화효과를 간접 평가하는 방법이 있다. 그러나 후자의 방법들이 항산화효과를 검정하는데 생체에 적용할 수 있는 더 근접한 방법이라고 인식되고 있다.

향유에서 추출한 정유성분, absolutes 및 oleoresins을 각각 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리하여 효소적 지질과산화 억제효과, 비효소적 지질과산화 억제효과 및 자동산화지질과산화 억제효과를 측정된 결과는 표 4와 같다. 지질 source로서 흰쥐 간의 microsome과 free radical generator 로서 AAPH를 사용한 비효소적 지질과산화 억제활성은 향유의 정유성분과 oleoresins에서 각각 21.61 ± 2.38 와 $65.00 \pm 6.24\%$ 이었으나 absolutes에서는 억제활성이 나타나지 않았다. 또한 흰쥐 간의 microsome과 Fe^{++} -ADP/NADPH system의 효소적 지질과산화 억제활성에서는 향유의 정유성분, absolutes와 oleoresins이 각각 45.97 ± 3.78 , 1.79 ± 1.08 와 $69.61 \pm 6.83\%$ 이었다. 지질과산화는 뇌 조직에서 쉽게 일어나는데 incubation system내에서 지질의 source로서 소의 뇌 homogenate를 이용하여 측정된 자동산화 지질과산화 억제활성에서 향유의 정유성분, absolutes와 oleoresins은 각각 16.36 ± 1.95 , 6.52 ± 1.30 와 $95.09 \pm 8.79\%$ 이었다. 따라서 세 시스템 모두 향유의 정유성분과 oleoresins을 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리했을 때 지질과산화 억제활성이 잘 나타났으나, absolutes는 거의 나타나지 않거나 매우 낮은 수준이었다.

Table 4. *In vitro* inhibitory activities by essential oils, absolutes and oleoresins extracted from *Elsholtzia ciliata* in the non-enzymatic, enzymatic and autooxidative lipid peroxidation system.

Sample	Inhibitory activities (%)		
	Nonenzymatic	Enzymatic	Autooxidative
Essential oils	21.61 ± 2.38	45.97 ± 3.78	16.36 ± 1.95
Absolutes	-	1.79 ± 1.08	6.53 ± 1.30
Oleoresins	65.00 ± 6.24	69.61 ± 6.83	95.09 ± 8.79

Sample concentration in each system : 200 $\mu\text{g/ml}$.

3. 세포독성

In vitro 세포독성 평가는 실험동물의 사용을 최소화하면서 적은 비용과 시간으로 생약 추출물이나 독성물질이 만성 퇴행성 질환 발병에 risk factor로 작용하는 지 미리 예견하고 판단할 수 있으며, 또한 독성물질이 세포와 조직에 작용하여 발암과 염증의 병리학적 진행과정의 메카니즘을 이해하는데 매우 중요한 수단으로 인식되고 있다. 전 세계적으로 세포독성을 평가하는 방법으로 사용되고 있는 것

은 주로 neutral red uptake법, LFD release법, kenacid blue binding법, MTT formation법, XTT formation법, acid phosphatase activity법, surforhodamine B binding 법과 resazurin binding법 등이다(Putnam et al., 2002). 이중에서도 neutral red uptake법은 ECVAM, FRAME, CAAT와 같은 미국이나 유럽의 국제 독성평가기관에서 사용되고 있는 세포독성 평가방법으로 세포독성물질에 가장 sensitive하게 작용한다고 평가받고 있다. 생체 염료인 neutral red는 살아있는 세포의 막만을 통과하여 세포내 lysosome에 축적하기 때문에 neutral red uptake법은 독성물질을 처리한 후 neutral red를 이용하여 세포의 생존 여부를 검정하여 평가하는 하나의 cell survival/viability chemosensitivity assay법이다. 독성물질이나 외부 이물질이 세포막이나 lysosomal 막의 유동성의 변이를 초래하면 그 세포는 neutral red와 결합하거나 uptake가 일어나지 않게 되는 원리를 이용하는 것이다.

세포주로서 BALB/c 3T3을 사용하고 향유에서 추출한 정유성분, absolutes 및 oleoresins을 처리하여 neutral red uptake방법으로 세포독성을 평가한 결과는 그림 1과 같다. 대조구와 처리구를 비교하여 세포 50% 사멸 농도를 계산한 결과 향유의 정유성분에서는 고농도로 처리하

였을 때 세포독성이 비교적 높은 것으로 나타났으며, EC₅₀ 값은 23.3 µg/ml이었다. Absolutes의 경우는 반대로 고농도에서도 세포독성은 낮았으며, EC₅₀ 값은 341.0 µg/ml로 거의 세포독성은 나타나지 않았다. 그러나 Oleoresins의 EC₅₀ 값은 각각 17.2 µg/ml로 고농도 처리 시에는 세포독성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 따라서 대부분의 국제 독성평가기관에서는 neutral red법으로 24시간에서 EC₅₀ 값이 25 µg/ml보다 낮은 것은 세포독성의 가능성이 있다(Putnam et al., 2002)고 판정된다. 따라서 향유의 정유성분과 oleoresins은 고농도에서 약간의 세포독성이 있는 것으로 판단됨으로 향료자원으로서 응용할 때는 주의가 필요하리라 생각된다.

4. 돌연변이 유발성

환경오염물질이나 식물 추출물이 발암성이 있는 지 여부를 확인하기 위한 수단으로 유전독성 평가를 위한 대표적인 short term bioassay인 Ames test가 주로 이용되고 있다. 이 Ames test법은 전 세계적으로 식물추출물 또는 새로 합성된 화합물이나 약을 등록하거나 약효를 인정하는 국제기관에서 돌연변이 유발성 검정법으로 사용하고 있으며 매우 sensitive한 방법으로 인정받고 있다(Andreoli et al., 2003). 균주로서 다양한 histidine dependent *Salmonella typhimurium*을 사용할 수 있으며, 감도가 높기 때문에 활용범위가 넓은 뿐만 아니라 미량으로 존재하는 발암물질이나 matrix가 복잡한 천연 추출물 시료에 대한 유전독성 평가에도 적합하다.

균주로서 *Salmonella typhimurium* TA98을 사용하고 향유에서 추출한 정유성분, absolutes 및 oleoresins을 처리하여 돌연변이 유발성을 검정한 결과는 표 5와 같다. 시료처리량 대신 용매인 DMSO만을 넣은 음성대조군은 S-mixture 미처리와 처리 시 각각 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 15±5와 42±3이었다. S-9 mixture를 처리하지 않고 대표적 발암물질인 4-nitroquinoline-1-oxide를 처리한 양성대조군의 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 465±36이었으며, S-9 mixture를 처리하고 대표적 발암물질인 2-aminoanthrene을 처리한 양성대조군의 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 888±51이었다. 향유의 absolutes와 oleoresins을 plate당 100, 250, 500과 1000 µg/ml 처리하면서 S-9 mixture를 처리했을 때나 처리하지 않았을 때 모두 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수에서 음성대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 향유의 정유성분에서 plate에 500 µg 처리시 S-9 mixture를 처리하지 않았을 때 뚜렷하게 복귀돌연변이 콜로니 수는 대조군에 비해 뚜렷하게 증가하였다. 또한 plate에 1000 µg 처리시에는 항균성도 나타나고 있었다.

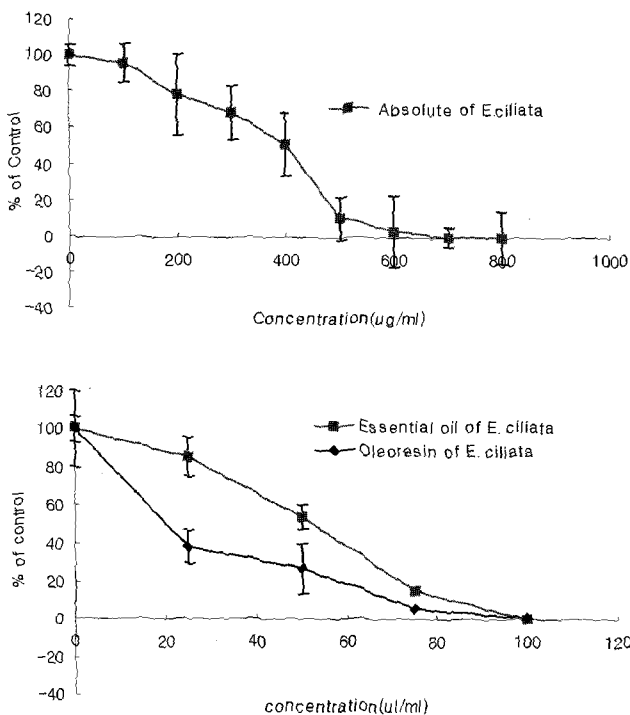


Fig 1. Concentration-dependent curve for cytotoxicities of essential oils, absolutes and oleoresins extracted from *Elsholtzia ciliata* against BALB/c 3T3.

Table 5. Induction of His+revertants TA98 by essential oils, absolutes and oleoresins extracted from *Elsholtzia ciliata*, without (-S9) and with (+S9) metabolic activation.

Strain	Sample	S9	His+revertants colony/plate			
			100 μ g	250 μ g	500 μ g	1000 μ g
TA98	Essential oils	+	20 \pm 5	21 \pm 5	103 \pm 21	-
		-	29 \pm 8	30 \pm 2	28 \pm 6	34 \pm 11
	Absolutes	+	19 \pm 4	19 \pm 3	20 \pm 1	16 \pm 2
		-	34 \pm 6	37 \pm 8	29 \pm 16	29 \pm 1
	Oleoresins	+	22 \pm 1	24 \pm 6	25 \pm 1	20 \pm 1
		-	34 \pm 6	37 \pm 8	28 \pm 4	30 \pm 6

- Sample : (ug/plate) in DMSO.
 - Strain : *Salmonella typhimurium* TA98.
 - Positive control : -S9, 4-nitroquinoline-1-oxide 0.5 μ g /plate : 465 \pm 36 +S9, 2-aminoanthrene 0.5 μ g /plate : 888 \pm 51.
 - Negative control : -S9 : 15 \pm 5, +Sp : 42 \pm 3

따라서 향유의 absolues와 oleoresins은 고 농도에서도 돌연변이 유발성과 항균성이 나타나지 않았으나 정유성분은 500 μ g 이상 처리시 돌연변이 유발성 뿐만 아니라 항균성도 있는 것으로 판단된다.

5. 거담효과

환경 이물질이나 담배연기가 기도의 섬모에 미치는 영향을 측정하는 방법이나 거담효과를 검정하는 것은 독성물질이나 거담제에 실험동물을 폭로시키고, 기도를 절개하여 조직표본을 만들어 기도 조직 손상정도를 직접 조사하여 평가하는 방법 (Miyabara *et al.*, 1998)과 병아리, 햄스터, 토끼, 흰쥐 등의 기도를 적출하여 *in vitro*에서 간접적인 방법으로 조사 평가하는 방법 (Petterso *et al.*, 1982)이 있다. 요사이는 기도 및 기도세포의 cilia beat frequency와 ciliostasis를 측정함으로써 약물을 포함한 chemical agents, virus, mycoplasma가 기도섬모의 기능에 미치는 인자와 가래생성의 메카니즘 및 가래제거에 대해서 연구가 이루어지고 있다 (Zhang & Sanderson, 2003).

향유에서 추출한 정유성분, absolutes와 oleoresins의 거담효과를 측정하기 위하여 이들을 상품담배에 주입하여 연소시키고 담배연기를 포집한 다음, 적출한 흰쥐의 기도를 이용하여 섬모생존시간을 평가한 결과는 표 6과 같다. 대조군에 비해 향유의 정유성분과 oleoresin를 처리한 것은 기도의 섬모생존시간이 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으며 모두 통계적인 유의성은 나타나지 않았으나 정유성분보다는 oleoresins이 기도의 섬모생존시간이 조금 더 길었다. 그러나 absolute의 경우는 섬모생존시간이 대조군과 거의 유사하였다. 따라서 향유의 정유성분과 oleoresins은 약간의 거담효과는 있는 것으로 판단된다.

Table 6. The ciliostasis change of rat trachea by the addition of essential oils, absolutes and oleoresins of *Elsholtzia ciliata* in cigarettes.

Sample	Ciliostasis time (sec.)
Control	624 \pm 98
Essential oils	652 \pm 115
Absolutes	614 \pm 109
Oleoresins	698 \pm 99

적 요

한약재 향유의 정유성분, absolute 및 oleoresin을 추출 분리 동정하고, 지질과산화 억제활성, 세포독성, 돌연변이 유발성 검정 및 거담효과 등의 생리활성을 측정하였다. 향유의 정유성분의 수율은 0.34%이었으며, naginate ketone이 29.37%와 elsholtzia ketone이 14.37%로 가장 많이 함유되어 있었다. 향유의 absolutes의 수율은 11.33%이었으며, methyl linolenate가 12.07%이었고, palmitic acid 10.46% 비율로 존재하고 있었다. 향유의 oleoresins의 수율은 15.24%이었으며, 9,12,15-octadecatrienoic acid가 18.62%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었다. 세 방법의 지질과산화 억제활성시험에서 향유의 정유성분과 oleoresins을 200 μ g/ml의 농도로 처리했을 때 지질과산화를 잘 억제하였으나, absolutes는 같은 농도에서 거의 억제하지 못하였다. 향유의 정유성분과 oleoresins은 24시간에서 EC₅₀값이 25 μ g/ml이하로 고농도에서만 약간의 세포독성이 있으며, 향유의 absolues와 oleoresins은 고 농도에서도 돌연변이 유발성과 항균성이

나타나지 않았으나 정유성분은 500 µg/plate 이상 처리시 돌연변이 유발성 뿐만 아니라 항균성도 있는 것으로 나타났다. 향유의 정유성분과 oleoresins은 약간의 거담효과가 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사한다.

LITERATURE CITED

- Ahn DK** (2000) Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyo-Hak Publishing Co. 3rd. 21-31.
- Andreoli C, Gigante D, Nunziata A** (2003) : A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol. in vitro*, 17:587-594.
- Babich H, Borenfreund E** (2002) The neutral red cytotoxicity assay. *Neutral Red Assay for Toxicology*. 237-251.
- Bansal SK, Love J, Gurtoo HL** (1983) High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117:268-274.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H** (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74:2157-2184.
- Chang YD, Song JS, Lee JS** (2003) Effect of temperature and daylength on growth and flowering of *Elscholtzia splendens* 'Jahyang'. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44:936-938.
- Chi HJ, Shin SH, Chang JI** (1992) Analysis of essential oils from *Elscholtzia ciliata* and the production of essential oils by tissue culture. *Korean J. Pharmacogn.* 23:77-80.
- Chung MS, Lee MS** (2002) Development of *Elscholtzia splendens* -flavored oils and analysis of flavor pattern using electronic nose. *Korean J. Soc. Food. Cookery Sci.* 18:455-460.
- Donnelly GM, McKean HE, Heird CS, Green J** (1974) Ciliostasis as a bioassay. *Arch. Environ. Health*, 28:350-355.
- Filip R, Ferraro GE** (2003) Researching on new species of "Mate" : *Ilex brevicuspis* : phytochemical and pharmacology study. *Eur. J. Nutr.* 42: 50-54.
- Hong WT, Go GM, Lee JG, Jang HJ, Kwag JJ** (2002) Volatile compounds of pine needle (*Pinus rigida* MILLER) extracts. *J. Kor. Soc. Tob. Sci.* 42:53-59.
- Jiang LY, Yang XE, He ZL** (2004) Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elscholtzia splendens*. *Chemosphere* 55:1179-1197.
- Kang DG, Yun C, Lee HS** (2003) Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J. Ethnopharmacol.* 87:231-236.
- Kim DW, Son KH, Chang HW, Bae K, Kang SS, Kim HP** (2003) Anti-inflammatory activity of *Elscholtzia splendens*. *Arch. Pharm. Res.* 26:232-236.
- Lee BK, Bang JK, Kim JK, Park CB, Lee BH** (2000) Chemotaxonomy of essential oils in *Elscholtzia ciliata* and *Agastache rugosa*. *Kor. J. Intl. Agri* 13:71-77.
- Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J** (2003) Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 11:127-134.
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the foline-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maron DM & Ames BN** (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215.
- Miyabara Y, Takano H, Ichinose T, Lim HB, Sagai M** (1998) Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 157:1138-1144.
- Pederson TC, Aust DS** (1975) The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation *Biochim. Biophys. Acta.* 385:232-241.
- Petterso B, Curvall M, Enzell CR** (1982) Effects of tobacco smoke compounds on the ciliary activity of the embryo chicken trachea *in vitro*. *Toxicol.* 23:41-55
- Piacente S, Montoro P, Oleszek W, Pizza C** (2004) *Yucca shidigera* park : phenolic constituents and antioxidant activity. *J. Nat. Prod.* 67: 882-885.
- Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ** (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. In Vitro.* 16:599-607.
- Rajlakshmi D, Banerjee SK, Soods S, Maulik SK** (2003) *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant activity of different extracts of the leaves of *Clerodendron colebrookianum* walp in the rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 55:1681-1686.
- Renwick AG** (2004) Toxicology databases and the concept of thresholds of toxicological concern as used by the JECFA for the safety evaluation of flavouring agents. *Toxicol Lett.* 149:223-234.
- Safitri R, Tarigan P, Freisleben HJ, Rumampuk RJ, Murakami A** (2003) Antioxidant activity *in vitro* of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L. *Biofactors* 19:71-77.
- Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Eggling SB, Teranishi R** (1977) Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food. Chem.* 25:446-449.
- Sohn KH, Kim KS** (2003) Effect of pinching and short-day treatment for height, flowering, and essential oil content of potted *Elscholtzia ciliata* and *E. splendens*. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 44:939-946.
- Sohn KH, Song JS, Chae YA, Kim KS** (1998) The growth and essential oil of *Elscholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 39:809-813.
- Sohn KH, Song JS, Sun SW, Kim KS** (2003) Effects of uniconazole on aromatic compounds of *Elscholtzia ciliata* and *Elscholtzia splendens*. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 44:961-966.
- Song J, Zhao FJ, Luo YM, McGrath SP, Zhang H** (2004) Copper uptake by *Elscholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 128:307-315.

- Stanner S, Hughes J., Kelly C, Buttrics J** (2004) : A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutr.* 7:407-422.
- Stocks J, Gutteridge JM, Rosemary JS, Dormandy TL** (1974) Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Mol. Med.* 47:215-222.
- Tellez M, Estell R, Fredrickson E, Powell J, Wedge, D, Schrader R, Kobaisy M** (2001) Extracts of *Flourensia cernua*(L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *J. Chem. Ecol.* 27:2263-2273.
- Whiteside MA, Heinburger DC, Johaming GL** (2004) Micronutrients and cancer therapy. *Nutr. Rev.* 62:142-147.
- Wong SF, Halliwell B, Richmond R, Skowroneck WR** (1981) The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* 14:127-134.
- Zhang L, Sanderson MJ** (2003) The role of cGMP in the regulation of rabbit airway ciliary beat frequency. *J. Physiol.* 15:765-776.