생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
35(4) : 288 ~ 292 (2004)

가스 크로마토그래피 분석과 세포독성에 의한 계피 정유의 품질평가

박희준[1]* · 정현주[1] · 정원태[2] · 최종원[3] · 남정환[4] · 이경태[4] · 권병목[5]
[1]상지대학교 자원식물학과, [2]일양약품 중앙연구소, [3]경성대학교 약학대학,
[4]경희대학교 약학대학, [5]생명공학연구소 항생물질연구실

Quality Evaluation of the Cinnamon Essential Oils Based on Gas Chromatographic Analysis and Cytotoxicity

Hee-Juhn Park[1]*, Hyun-Ju Jung[1], Won-Tae Jung[2], Jongwon Choi[3], Jung-Hwan Nam[4], Kyung-Tae Lee[4], and Byung-Mok Kwon[5]
[1]Department of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
[2]Central Research Institute, Il-Yang Pharmaceutical Company, Yongin 449-900, Korea
[3]College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
[4]College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea
[5]Bioproducts RG, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea

Abstract – To evaluate the quality of the crude drugs using three kinds of Cinnamomum Cortex (CC), Vietnamese CC (VCC, the stem bark of *Cinnamomum obtusifolium*), periderm-peeled Chinese CC (PPCC, periderm-peeled stem bark of *C. cassia*), Chinese CC (CCC, stem bark of *C. cassia*) and a Cinnamomi Ramulus (CR, the twig of *C. cassia*), the four essential oils were prepared by steam distillation method. Cinnamaldehdye (CNA) and an unknown substance tentatively named hydroxy-cinnamaldehdye (HCNA) were detected in the four essential oils by gas chromatography-mass spectrometry, the contents of which are significantly different one another. Vietnamese CC had the highest content of HCNA whereas CR had the highest CNA content and the lowest HCNA. Vietnamese CC exhibited the greatest cytotoxic activity against the cancer cell lines, A549, HepG-2, HL-60, P-388, U-937, and KB and CR the lowest cytotoxicity. Contents of CNA and HCNA in CCC and PPCC are positioned between VCC and CR. These results suggest that measurement of HCNA and cytotoxicity may determine the quality of CC and CR.

Key words – Cinnamomum, cinnamaldehyde, hydroxycinnamaldehyde, quality evaluation, GC-MS, cytotoxicity

녹나무과(Lauraceae)의 계피나무(*Cinnamomum cassia* Blume) 또는 그 동속식물의 수피를 계피라 하여 널리 약용되고 있다.[1] 계피는 온중보양(溫中補陽), 산한지통(散寒止痛)의 효능을 갖는 것으로 전통적으로 알려져 있으며 이는 소화를 돕고, 신체허약, 해열 및 진통의 작용을 가지는 것을 나타내고 있다. 감기약, 소화약, 혈액순환약, 월경통약 등으로서 다른 약과 함께 배합되어 사용되는 예가 많다.[2,3]

계피나무의 수피를 계피라고 하지만 나무의 아랫 부분의 두터운 계피를 특히 육계라 하여 흔히 좋은 품질의 계피인 것으로 인식되고 있다. 수피를 제거한 목질부를 계심이라고 하고, 잔가지를 세절한 것을 계지라 하여 구별하고 있지만 약용도는 유사하다.[1]

Cinnamomum속 식물로서 이러한 목적을 위하여 세계적으로 유통되는 것에는 실론계피(*C. zeylanicum* Nees), 베트남계피(안남계피, *C. obtusifolium* Nees), 자바계피(*C. buramanni*), 일본계피(*C. sieboldii*) 등이 있는데 그 중 실론계피, 안남계피는 품질이 우수하다고 하며 다른 두 가지는 이에 비해 품질이 떨어진다고 한다.[3]

계피의 성분으로서 정유를 약 1 – 3%를 함유하여 phenylpropanoid계의 성분인 cinnamaldehyde를 주성분으로 하고 그 외 cinnamyl acetate, phenylpropyl acetate, cinnamic acid, salicylaldehyde 등을 함유한다. 그 외에 diterpene인 cinnzeylanine, cinnzeylanol, cinncassinol A, B, $C_{1\text{-}2}$, $D_{1\text{-}4}$가 분리되었으며 탄닌으로서 (–)-epicatechin, procyanidin B_2,

*교신저자(E-mail) : hjpark@mail.sangji.ac.kr
(FAX) : 033-730-0564

B_5, C_1, cinnamtannin $A_{2\text{-}4}$ 등이 함께 알려졌다.[3]

계피 정유성분의 하나인 cinnamaldehyde는 항진균작용,[4] apoptosis 유도작용,[5] 간-약물 대사계효소에 대한 작용,[6] 돌연변이 억제작용,[7] nitric oxide synthase에 대한 억제작용[8] 등이 알려져 있을 뿐 아니라 용매추출물의 효과에 대한 것도 다수 알려져 있다. 권 등은 cinnamaldehyde보다 세포독성이 강한 2-hydroxycinnamaldehyde를 계피로부터 분리하였으며 그 apoptosis 기전을 보고하였다.[9,10]

이러한 측면에서 저자들은 시중에서 유통되고 있는 계피를 수거하여 그 품질의 우수성을 입증할 수 있는 근거를 마련하고자 실험에 착수하였다. 유계피(중국산 계피의 주피를 벗긴 것), 중국산 계피, 베트남산 계피, 계지로부터 정유를 수증기증류법으로 추출하고 이를 GC-MS에 의해 추적할 뿐 아니라 암세포에 대한 세포독성을 비교하여 품질을 입증하기 위한 기초자료를 마련하였으므로 이를 보고한다.

재료 및 방법

기기 및 시약 – 세포주 A549, HepG-2, HL-60, P-388, U-937, KB는 한국 세포주 은행에서 공급받았으며 fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640, penicillin/streptomycin은 Gibco사의 것을 사용하였다. 그 외 정유추출시 사용된 용매 등은 일급시약을 사용하였다. Gas chromatography는 Varian 3400을 사용하였으며 이의 검출기로서 mass spectrometer는 Finnigan Mat TSQ-700을 사용하였다.

식물재료 및 수증기 증류 – 강원도 원주시 단계동의 천일약업사(대표: 황인구)에서 의뢰하여 유통되는 유계피, 중국산계피, 베트남산 계피, 육계, 계지 등을 구입하였다. 각 재료 500 g씩을 수증기증류장치에서 8시간씩 증류하였고 증류물을 동량의 diethyl ether로 3회 분획추출하였으며 분획물을 무수황산나트륨으로 탈수하였다. 그 후 에테르 가용부를 40°C에서 증발시키고 잔류물을 수거하고 평량하였으며 그 수득량은 Table I에 나타내었다.

세포배양 – A549, HepG-2, HL-60, P-388, U-937, KB 세포들은 각각 10% Fetal bovine serum, penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100 unit/ml)을 함유한 RPMI1640 배지에 suspension시킨 뒤 5%의 CO_2를 함유하며 37°C로 유지하는 인큐베이터에서 배양하였다.

세포독성 측정 – 이미 보고된 방법에 따라[11] MTT assay 법에 의하여 A549, HepG-2, HL-60, P-388, U-937, KB의 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다. 세포주들을 96 microtiter plate에 이식한 다음 하룻밤 incubation하였다. 얻어진 시료인 정유를 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹이고 단계적으로 희석하여 사용하였다. 이식 후 24시간이 지난 후 100 μl new media와 시료들을 가한 다음 48시간 incubation하였다. 세포주들을 한 번 세정한 후 5 mg/ml의 MTT 농도를 가지는 50 μl FBS-free medium을 가하였다. 37°C에서 4시간 incubation한 후 배지를 제거하였고 세포주에 형성된 formazan blue는 50 μl DMSO를 가하여 이탈시켰다. 최종적으로 540 nm에서 optical density를 측정하였다.

GC-MS-다음과 같은 조건에서 GC-MS 분석을 시행하였다. Column {DB-1 (length 30 meters, i.d. 0.25 mm, film thickness 0.25 μm, J&W Scientific, USA)}, Column temp. program {init. temp. 50°C (3 min), temp. increase velocity (8°C/min), final temp. 250°C (10 min)}; solvent cut (3 min); temp. program {injector (250°C), transfer line (250°C), ion source (150°C), manifold (70°C)}, detector {Electron Impact-Quadrupole 1 (EI energy 70 eV); carrier gas {He (99.99%), flow rate (1.5 ml/min)}.

결과 및 고찰

한국의 시장에 유통되고 있는 4가지 계피의 정유를 추출하여 생리활성과 품질을 평가하고자 하였다. 계피의 전통적 약용도와 최근까지 과학적으로 밝혀진 생리활성을 조사하면 cinnamaldehyde를 비롯한 정유성분일 것으로 추론된다. 그러나 최근에 권 등이 밝힌 2-hydroxycinnamaldehyde의 활성[10]과 저자 등이 규명한 간-약물 대사계에 대한 효과[6]를 관찰하면 계피 정유에서 cinnamaldehyde보다 강한 생리활성물질이 함유되어 있을 가능성이 충분히 예견되어 왔다. 그러므로 본 연구를 통하여 4가지 Cinnamomum 속 식물재료의 정유에 대한 분석과 아울러 세포독성을 조사하고자 하였다.

한국에서 시판 중인 베트남 계피(*C. obtusifolium*), 유계피(*C. cassia*의 수피의 주피를 벗긴 것), 중국산계피(*C. cassia*의 수피) 및 계지(중국산 계피나무의 잔가지)에서 얻어진 정유의 수득률은 각각 1.37%, 1.54%, 1.32%, 1.26%로 나타났는데 그 차이가 크지 않았으나 계지의 함유량이 가장 낮은 것으로 나타났다. 4가지 시료의 gas chromatogram을 Fig. 1에 나타내었듯이 피크 면적이 넓은 두 피크가 관찰되는데 그 mass spectrum에서 보는 바와 같이 cinnamaldehyde와 hydroxycinnamaldehyde로 추측되었다. Fig. 2에서 보듯이 CNA의 분자이온이 *m/z* 132.1에서 69%의 상대강도(relative intensity)로 나타나며 $[M\text{-}H]^+$가 base peak로 나타나 cinnamaldehyde임을 알 수 있었으며 저자들이 소지하고 있는 시료와 동일한 retention time에서 피크가 확인되었으므로 cinnamaldehyde의 피크임을 알 수가 있었다. 15.74분에서 나타나는 피크의 mass chromatogram은 Fig. 2에서 나타내었듯이 *m/z* 148에서 상대강도 3%로서 분자이온이 나타나며 aldehyde의 특징적인 $[M\text{-}H]^+$가 base peak로 나타나 hydroxycinnamaldehye로 추정되었다. 그러나 HCNA는 권병목 박사에게서 제공받은 화합물인 2-hydroxycinnamaldehyde

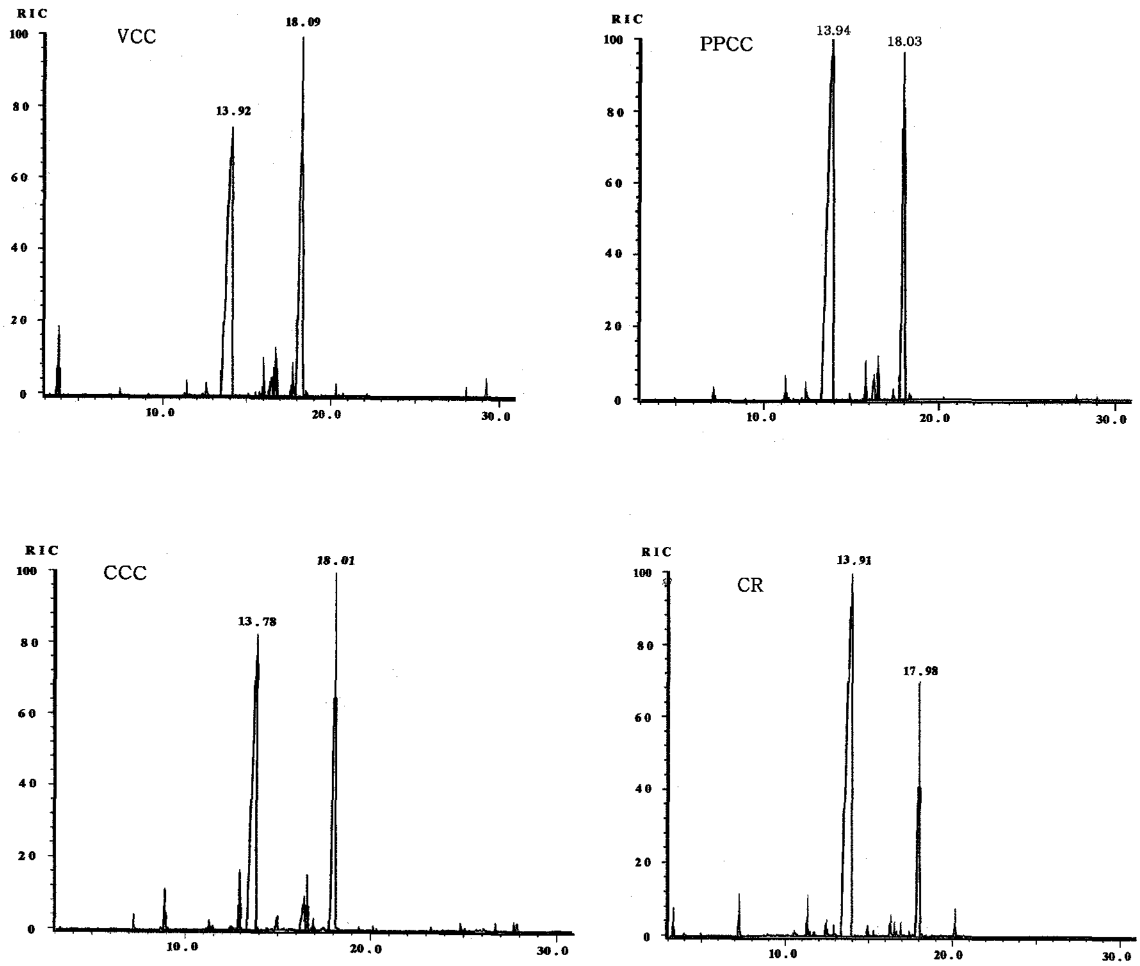

Fig. 1. GC chromatograms of the essential oils extracted from the 4 different *Cinnamomum* species plant materials. (VCC from the stem bark of Vietnamese *C. obtusifolium*, PPCC from the periderm peeled Cortex of Chinese *C. cassia*, CCC from China *C. cassia*, stem bark, CR from the twig of Chinese *C. cassia* China).

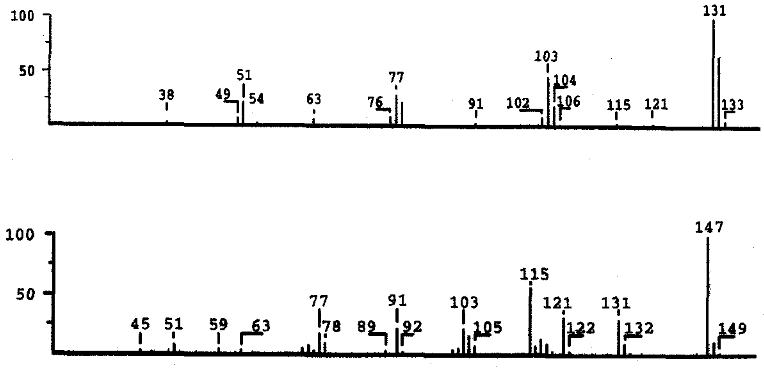

Fig. 2. Mass spectra of CNA (upper) and HCNA (down).

과의 GC 비교에서 일치하지 않았으므로 수증기 증류시 생성된 2-hydroxy-cinnamaldehyde의 이성체일 것으로 생각되었다. 2-hydroxycinnamaldehdye가 계피 정유 중에 TLC 및 GC에서 일치하지 않았으므로 정유 중의 HCNA는 추출시에 이차적으로 생성된 화합물일 가능성이 있는 것으로 추측되었다. 권 박사가 계피에서 분리한 화합물은 상온에서 추출한 화합물이었으므로 추출시의 변화가 예상되었다.

Table I에 CNA와 HCNA의 함량을 각각 표시하였듯이 시료간의 함량이 크게 다른 것으로 나타났다. 즉, CNA는 계지에서 가장 많으며 HCNA는 베트남 계피에서 가장 많은

Table I. Content of cinnamaldehyde (CNA) and hydroxycinnamaldehyde (HCNA) in the essential oils extracted from the *C. cassia* plants

Origin	Extracted essential oil (g)	CNA (mg/g)[2)]	2-HCNA (mg/g)[2)]	2-HCNA/CNA[3)]	CNA+2-HCNA (mg/g)[2)]
Vietnam (VCC)	16.4 (1.37%)[1)]	5.95	7.56	1.27	13.51
Yugyepi (PPCC)	18.5 (1.54%)	9.10	6.09	0.67	15.19
Chinese (CC-C)	15.8 (1.32%)	6.22	6.70	1.08	12.92
Gyeji (CR)	15.2 (1.26%)	12.0	0.42	0.04	12.42

[1)]Value in the parenthesis represents the extraction percentage. [2)]Unit means the constituents mass (mg)/the plant material mass (g). [3)]the mass ratio of HCNA against CNA. Data on HCNA/CNA and CNA+HCNA were obtained by calculated. Yugyepi (PPCC) is the periderm-peeled stem bark of *C. cassia.*

Table II. IC_{50}s and the order of activity potency of the essential oils obtained from the *C. cassia* of 4 habitats on tumor cell growth

Origin	IC_{50} (μg/ml)[a]					
	A549	HepG-2	HL-60	P-388	U-937	KB
Vietnam (VCC)	17.1[b] (1)	6.4 (1)	0.4 (1)	2.4 (1)	7.3 (1)	30.7 (1)
Yugyepi (PPCC)	18.2 (2)	7.3 (2)	2.4 (2)	3.0 (2)	14.3 (2)	57.7 (4)
Chinese (CCC)	28.7 (3)	7.4 (3)	3.4 (3)	5.0 (3)	14.5 (3)	55.3 (3)
Gyeji (CR)	43.4 (4)	9.3 (4)	5.3 (4)	13.6 (4)	15.7 (4)	53.0 (2)

[a]IC_{50} is defined as the concentration which resulted in a 50% decrease in cell number.
[b]The values represent the mean of three independent experiments.
Values in the parentheses mean the potency order.

것으로 나타났다. HCNA와 CNA의 비율, 즉 HCNA/CNA 베트남 계피가 가장 높았으며 다음으로 중국산 계피, 유계피, 계지의 순으로 나타났다. 계지에서 HCNA/CNA의 비율이 아주 낮아서 주로 CNA가 많은 것은 흥미롭다. CNA와 HCNA의 합, 즉 CNA+HCNA에서는 유계피가 가장 높은 함량을 보였으며 나머지는 유사하게 나타났다.

CNA와 2-hydroxycinnamaldehyde의 항암효과를 위주로 하여 생리활성이 보고되고 있고 CNA의 활성보다 2-hydroxy-cinnamaldehyde의 활성이 더욱 강한 것으로 보고되고 있기 때문에[10,11] 계피정유의 품질에 대한 평가가 새로이 정립되어야 한다. HCNA와 CNA는 모두 α,β-unsaturated aldehyde를 가지고 있을 뿐 아니라 벤젠고리와 인접하고 있기 때문에 친핵성물질과의 반응성이 우수한 것으로 예측된다. 더구나 이러한 구조가 Michael addition을 할 것으로 예측되며[6)] 이러한 화학적 특성이 세포내 glutathione의 고갈을 유도하며 나아가 산화적 스트레스에 의한 세포독성 및 apoptosis 유도능을 나타내는 것으로 인정되고 있다.[5)]

이러한 가정하에서 계피정유의 수득량이 중요한가, HCNA/CNA가 중요한지 HCNA+CNA가 중요한지에 대한 이해가 필요한데 그것은 두 화합물 모두 생리활성에 기여하기 때문이다. 그러므로 6종의 암세포주에 대한 생리활성을 조사하여 Table II에 나타내었다. Table II의 괄호안의 숫자는 세포독성 강도의 순서를 나타낸 것이다. A549, HepG-2, HL-60, P-388, U-937 등의 세포주에서는 모두 베트남 계피, 유계피, 중국산 계피, 계지의 순서로 나타났다. 특히 베트남산 계피는 HL-60 세포주에서 0.4 μg/ml의 농도에서 IC_{50}치가 나타나 이 세포주에서 강한 효과를 나타내는 물질임을 알 수가 있었다. 한편 KB 세포주에서는 유계피와 중국산 계피의 IC_{50}가 각각 57.7 μg/ml와 55.3 μg/ml로 나타났으나 그 차이가 크지 않았다. 이상과 같이 4종 정유의 세포독성은 베트남 계피, 유계피, 중국 계피, 계지의 순서로 나타난 바 품질의 지표가 될 것으로 예상되었다. 이러한 평가는 유통되고 있는 계피의 품질 우수성과 어느 정도 관련이 있는 것으로 생각되었다.

이상과 같은 관점에서 세포독성능에는 정유의 CNA가 유효물질인 것으로 알려져 왔지만 CNA보다도 HCNA를 더 중요하게 보아야 할 것으로 제시되었다. 두 화합물 모두 생리활성을 나타내고 있으므로 이들 정유의 세포독성의 측정이 그 품질 우수성을 가장 잘 반영하는 것으로 제시되었다. 특히 이화학적 품질평가로서 HCNA의 함유량 혹은 HCNA/CNA의 수치가 품질 평가를 위하여 응용될 수 있으리라 보이며 CNA의 함량으로서는 그 품질을 대표할 수가 없는 것으로 결론지을 수 있었다.

사 사

본 연구는 2003학년도 상지대학교 교수연구비에 의해서 수행되었습니다.

인용문헌

1. 지형준, 이상인 (1988) 대한약전외 한약규격집, 460-461, 한국메디칼인덱스사, 서울.
2. 하연석 (1986) 도해식 한방처방의 구성과 해설, 45-46, 약업신문사, 서울.
3. 한대석 (2001) 생약학, 110-113, 동명사, 서울.
4. Bang, K. H., Lee, D. W., Park, H. M., and Rhee, Y. H. (2000) Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**: 1061-1063.
5. Ka, H., Park, H. J., Jung, H. J., Choi, J. W., Cho, K. S., Ha, J., and Lee, K. T. (2003) Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett.* **196**: 143-152.
6. Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., and Park, H. J. (2001) Constituents of the Essential Oil of the *Cinnamomum cassia* Stem Bark and Biological Properties. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 418-423.
7. Sharma, N., Trikha, P., Athar, M., and Raisuddin, S. (2001) Inhibition of benzo[a]pyrene- and cyclophoshamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutation. Res.* **480**: 179-188.
8. Lee, H. S., Kim, B. S., and Kim, M. K. (2002) Suppression effect of *Cinnamomum cassia* bark-derived component on nitric oxide synthase. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7700-7703.
9. Jeong, H. W., Han, D. C., Son, K. H., Han, M. Y., Lim, J. S., Ha, J. H., Lee, C. W., Kim, K. M., Kim, H. C., and Kwon, M. B. (2003) Antitumor effect of the cinnamaldehyde derivative CB403 through the arrest of cell cycle progression in the G2/M phase, *Biochem. Pharmacol.* **65**: 1343-1350.
10. Lee, C. W., Hong, D. H., Han, S. B., Park, S. H., Kim, H. K., Kwon, B. M., and Kim, H. M. (1999) Inhibition of human tumor growth by 2'-hydroxy- and 2'-benzoyloxycinnamaldehyde. *Planta Med.* **65**: 263-266.
11. Denizot, F. and Lang, R. J. (1996) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immun. Methods* **89**: 271-277.

(2004년 7월 19일 접수)