

향유와 꽃향유 향기성분의 생리활성 검정

정재훈 · 손형옥¹⁾ · 신한재¹⁾ · 현학철¹⁾ · 이동욱¹⁾ · 임흥빈^{*}
충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과, KT&G 중앙연구원¹⁾
(2005년 6월 3일 접수)

Biological Activity of Flavor Components Extracted from *Elsholtzia ciliata* and *Elsholtzia splendens*

Jae-Hoon Jeong, Hyung-Ok Sohn¹⁾, Han-Jae Shin¹⁾, Hak-Chul Hyun¹⁾, Dong-Wook Lee¹⁾ and
Heung-Bin Lim^{*}

Department of Industrial Crop Science & Technology, Chungbuk National University

¹⁾KT&G Central Research Institute

(Received June 3, 2005)

ABSTRACT : This study was to evaluate the biological activity of flavor components extracted from *E. ciliata* and *E. splendens* in order to survey the possibility applicable to tobacco and food industry. Flavor components were extracted with dividing into three parts; essential oil, absolute, oleoresin. In the nonenzymatic lipid peroxidation system, the inhibition rate(%) of essential oil were $67.3 \pm 20.7\%$, $58.1 \pm 19.3\%$ at the concentration of $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ of *E. ciliata* and *E. splendens*, respectively. The inhibition rate(%) of the oleoresin in *E. ciliata* was higher than one in *E. splendens*. In the enzymatic lipid peroxidation system, the inhibition rate(%) of essential oil and oleoresin was $14.28 \pm 2.38\%$ and $65.93 \pm 0.01\%$, and was $22.58 \pm 2.84\%$ and $40.73 \pm 6.04\%$. The oleoresin of two species were showed above 90% of the inhibition rate(%) against autooxidative lipid peroxidation system. EC_{50} values in neutral red uptake assays 24 h of exposure times were $23.3 \mu\text{g}/\text{mL}$, $341.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $17.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ in essential oil, absolute and oleoresin from *E. ciliata* respectively, and were $46.4 \mu\text{g}/\text{mL}$, $681.7 \mu\text{g}/\text{mL}$, $17.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ in three extractions of *E. splendens*. Oleoresin of two species showed high rate in the cytotoxic effect by neutral red uptake assay. Absolute and oleoresin did not show antibiotic and mutagenic activity. On the contrary, essential oil with over $500 \mu\text{g}/\text{plate}$ showed antibiotic and mutagenic activity in Ames test. Essential oil and oleoresin have a prolongating effect the ciliostasis of rat trachea. This results indicate that flavor components extracted from *E. ciliata* and *E. splendens* can be considered to be toxicological safe and to be the possibility applicable the cigarette, food and drug industry as a flavor for expectoration.

Key word : biological activity, flavor components, *Elsholtzia ciliata*, *Elsholtzia splendens*.

*연락저자 : 361-763 충북 청주시 흥덕구 개신동 12, 충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
*Corresponding author : Department of Industrial Crop Science & Technology, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, 12 Gae-shin dong, Cheongju 361-763 Korea

최근 향료산업은 생활수준의 향상과 건강 중시 사회로의 변화로 인하여 향기 부여 및 악취 제거 뿐만 아니라 향을 통한 생리적, 심리적 치료법인 방향요법(aromatherapy, aromacology)에 이르기까지 생활 곳곳에 다양하게 적용되고 있다. 그리고 향료산업만이 지니고 있는 독특한 감각적·심리적 특성과 고부가가치 산업적 특성으로 인하여 시장성과 가치성이 점차 증가하고 있다.

특히 담배에 있어 향료는 향기를 부여하는 것과 궐련 잎담배의 향각미 결점을 보완하고, 이취미와 자극성을 억제시키는 역할을 하며, 궐련의 물리적 화학적 성질을 보완·향상시켜 궐련의 제조에 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 최근 들어 담배 제조에 사용하는 향료의 안전성 문제가 제기되면서 식품향료와 같이 각종 규제에 의해 향료 사용에 많은 제약을 받고 있으며, 특히 미국과 영국에서는 향료 성분을 크게 positive list, negative list와 mixed system으로 구분하여, 담배향료는 positive list 성분만을 사용하도록 하고 있다. 또한 생체 안정성과 환경 문제 등으로 화학향료에서 천연향료로 변화하는 추세이며, 기능성 향료 개발 측면에서 일반 화학향료보다 가치가 높은 천연향료의 개발이 필요한 실정이다.

국내에서도 자생식물을 이용하여 향료 및 향신료를 개발하고 자생식물의 기능성을 알아보고자 한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 국내 약용식물을 대상으로 정유 및 용매추출물에 대한 생리활성 측정 및 항산화물질 탐색에 대한 연구(Chang, 2002)와 생약재 추출물을 이용한 nicotine 및 dioxine 해독효과에 대한 연구(Park *et al.*, 2003) 등이 보고되고 있다. 이러한 한약재 중에는 진해 및 거담효과가 있는 것으로 알려진 식물이 많이 있으며, 그 중에서 향유(*Elsholtzia ciliata*)는 방향식물로서 거담효과가 있다고 알려져 있다(Miyata, 2003). 또한 향유는 한방에서 거담효과 외에 복통과 설사에 백편두와 배합하여 사용하고, 이뇨작용, 해열발한작용, 진신부종, 지혈 등에도 사용하며 향은 강하고, 특이한 방향이 있다고 알려져 있다(Ahn, 2000). 이러한 향유에 관한 연구는 중국이나 소련(Simonov *et al.*, 1987) 등에서도 보고되고 있다. 국내에서는 향유를 관상용 화

훼로서의 이용가능성에 관한 연구(Sohn *et al.*, 1998), 향유와 향미유의 식품 향신료로서의 이용 연구(Chung *et al.*, 2002) 등이 있다. 또한 최근 중금속 오염 토양에서의 향유의 구리 흡착능에 관한 연구(Jiang *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004)와 향유의 항염증 효과(Kim *et al.*, 2003)에 대하여 보고하고 있다. 한편, 방향식물로서 거담효과가 있다고 알려진 향유와 꽃향유에 대하여 추출 방법별로 essential oil, absolute와 oleoresin으로 구분하여 향기성분을 분리·동정하여 보고한 바 있다(Jeong *et al.*, 2004). 그러나 국내에서 향유와 꽃향유를 추출방법별로 essential oil, absolute와 oleoresin으로 분리하여, 거담제로서 생리활성을 측정하고 안정성을 검정한 예는 전무하다.

따라서 본 연구는 천연향료로서 향유(*Elsholtzia ciliata* (THUNB.) HYLANDER)와 꽃향유(*Elsholtzia splendens* NAKAI)의 essential oil, absolute와 oleoresin이 담배향료 및 식품향료로 이용가능성을 조사하고자 비효소적, 효소적, 자동산화 지질과산화 억제 효과를 검정하고, 세포독성 평가와 돌연변이 유발성 평가 및 거담효과 등 기능성과 안전성에 관련된 생물학적 활성 검정을 실시하였다.

재료 및 방법

시료 채취

본 실험에서 사용한 향유와 꽃향유는 청주 소재 부민약업사에서 구입하였다. 품질이 양호한 것을 선별한 후 분쇄기로 시료를 미세하게 분쇄하고, 100 mesh 체로 거른 다음 추출 시료로 사용하였다.

시료 추출

Essential oil : 정유성분을 추출하기 위하여 분쇄한 시료 건중 100 g에 증류수 2 L를 첨가한 후 Schultz *et al.*(1977)의 방법에 따라 개량된 SDE (Likens-Nikerson type simultaneous steam distillation and extraction)장치를 사용하여 5시간 동안 증류 추출하였다. 추출 용매로는 *n*-pentane : diethylether 혼합용액 100 mL(1:1, v/v)를 사용

하였다. 추출 후 얻은 용매층을 무수황산나트륨으로 탈수시킨 후 30°C에서 회전감압 농축장치(EYELA, Japan)와 N₂ gas로 완전 농축하여 생물학적 활성 검정용 시료로 사용하였다.

Absolute : 시료 건중 200 g에 추출용매로 *n*-hexane 2 L를 첨가한 후 실온에서 5일간 추출하였다. 추출용액을 거름종이로 거른 다음 30°C에서 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하였다. 여기에 ethanol 100 mL를 첨가하여 용해시키고, 알코올 불용성 성분을 제거한 다음 다시 회전감압 농축장치를 이용하여 40°C에서 농축하여 생물학적 활성 검정용 시료로 사용하였다.

Oleoresin : 시료 건중 200 g에 추출용매로 50% ethanol 3 L를 첨가한 후 실온에서 5일간 추출하였다. 추출용액을 거름종이로 거른 다음 회전감압 농축장치를 이용하여 50°C에서 농축하여 생물학적 활성 검정용 시료로 사용하였다.

생리활성 측정

Liver microsome 분획조제 : Bansal *et al.*(1983)의 방법에 따라 microsome 분획은 웅성 sprague-dawley(S.D.) 흰쥐(200~220 g)로부터 liver를 분리하여 150 mM KCl, 30 mM HEPES buffer(pH 7.4)를 35 mL 첨가한 후 균질화시켜 11,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 그 상등액을 분취하여 38,000 rpm에서 1시간 원심분리한 다음 pellet에 7 mL buffer를 첨가하여 균질화시키고 vial에 1 mL씩 분취하였다. 분획된 간 microsome은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 따라 단백질을 정량하였으며, 사용할 때까지 -80°C deep freezer에 보관하였다.

Ox-brain homogenate 조제 : 충청북도 가축위생 시험연구소에서 ox-brain을 취한 다음 blood pellet을 제거하기 위하여 saline용액으로 세척하고, 무게를 달아 0.142 M NaCl을 포함한 40mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 1:4 비율로 첨가하고 균질화하였다. 균질화한 ox-brain을 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리한 다음 그

상등액을 20 mL씩 vial에 담아 사용할 때까지 -80°C deep freezer에 보관하였다. 단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 따라 실시하였다.

비효소적 지질과산화 억제 검정 : 향유와 꽃향유에서 분리한 essential oil, absolute와 oleoresin의 비효소적 지질과산화 억제 검정은 Wong *et al.*(1981)의 방법을 수정하여 실시하였다. Free radical generator는 AAPH[2,2'-azobis(2-methylpropion amidine)·2HCl]을 사용하였으며 지질의 source는 웅성 흰쥐 간 microsome 분획을 사용하였다. 즉 웅성 흰쥐 간 microsome을 단백질 base로 4 mg/mL로 희석하고, 500 mM AAPH 200 μL, essential oil, absolute, oleoresin 각각 50 μg 가한 다음 37°C, 100 rpm에서 1시간 동안 반응시켰다. 상등액 0.134 mL에 20% acetic acid 1 mL, 8.1% SDS(sodium dodecyl sulfate) 0.15 mL, distilled water 0.015 mL, 1.2% TBA(thiobarbituric acid, sigma) 0.666 mL를 첨가한 후 vortexing하고 끓는 물속에서 30분간 방치하여 발색시켰다. 온도를 실온까지 내린 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 상등액으로 분광광도계(DU800, Beckman)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 시료를 용해시킨 ethanol로 처리하였으며, 반응액을 첨가하지 않은 것을 공시료로 사용하였다. 비효소적 지질과산화 억제활성 검정 결과는 다음 식으로부터 inhibition (%)을 계산하였다.

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

효소적 지질과산화 억제 검정 : Pederson *et al.*(1975)의 방법에 준하여 실시하였다. 지질의 source는 웅성 흰쥐 간 microsome 분획을 사용하였다. 즉, 단백질 base로 2 mg/mL microsome 250 μL에 최종 농도 5 mM ADP, 0.2 mM Fe²⁺의 ADP-Fe²⁺용액을 67 μL 첨가하고, 1 mM NADPH(β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 133 μL, 증류수 217 μL, 시료 50 μg을 차례로 첨가한 후 37°C, 100 rpm에서 1시간 동안

반응시켰다. 반응시킨 시료 67 μL 를 취한 후 20% acetic acid 1 mL, 8.1% SDS 0.15 mL, distilled water 0.015 mL, 1.2% TBA 0.666 mL를 첨가한 후 vortexing하고, 끓는 물속에서 30분간 방치하여 발색시켰다. 온도를 실온까지 내린 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 그 상등액을 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 용매 ethanol로 처리하였으며, 반응액을 첨가하지 않은 것을 공시료로 사용하였다. 효소적 지질과산화 억제활성 측정결과는 다음 식으로부터 inhibition(%)을 계산하였다.

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

자동산화 억제활성 측정 : Stocks *et al.*(1974)의 방법에 준하여 incubation system으로 하고, 지질의 source는 ox-brain homogenate를 사용하였다. 단백질 1 mg/mL로 희석한 ox-brain 2.4 mL에 시료를 50 μg 농도로 처리한 후 60분간 water bath (37°C, 100 rpm)에서 자동산화 시켰다. 산화된 시료에 28% TCA(trichloroacetic acid, sigma) 1.25 mL를 첨가한 후 실온에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였으며, 그 상등액을 2.0 mL 취하여 1.2% TBA 0.5 mL를 넣고 15분간 끓는 물에서 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자동산화 억제활성 측정 결과는 다음 식으로부터 inhibition(%)을 계산하였다.

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

세포독성 평가 : Neutral red uptake test(Babich and Borenfreund, 2002)를 이용하였으며, 세포주로 BALB/c 3T3 (BALB/c mouse fibroblast cells)을 ATCC (American Type Culture Collection)에서 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 배양하였

다. 24시간 후 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하여 배양하였으며, 대조군은 DMSO(dimethyl sulfoxide) 1.6%로 시료는 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of medium으로(최종 DMSO 농도를 1.6%로 맞추어)시료 당 반복수를 8 well/plate하였다. 시료를 24시간 노출시킨 후 NRU(neutral red uptake) 정도를 측정하였다. PBS(phosphate buffered saline)로 washing한 후 neutral red medium 처리 하여 3시간 동안 배양(5% CO₂, 95% air, 상대습도 포화상태인 37°C incubator)하고, 0.5% formaldehyde/1% calcium chloride로 고정된 후 acetic acid/ ethanol로 neutral red를 녹여내고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 대조군(1.6% DMSO 처리군)의 NRU를 100%로 하여 상대적인 값으로 표기하였으며, 세포의 사망률과 흡광도의 회귀선 상에서 EC₅₀(effective concentration 50%) 값을 계산하였다.

돌연변이 유발성 측정 : 향유와 꽃향유의 essential oil, absolute와 oleoresin을 DMSO에 녹여 실험에 사용하였으며, 대조군(negative control)은 DMSO만을 사용하였다. 사용된 균주는 *Salmonella* TA 98 균주로서 한국생명공학연구원 부설 유전자센터에서 구입하였다. 균주의 형질확인인은 Maron and Ames(1983)의 방법에 준하여 실시하였고, 균 배양액 1 mL에 DMSO 90 μL 를 가하여 액체질소 내에 보관하며 사용하였으며, 음성 sprague-dawley(S.D.) 흰쥐 간의 S-9 mixture와 cofactor-1은 각각 Molecular Toxicol Inc.와 WAKO Pure Chem Inc. 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(1×10^9 cell/mL) 각 0.1 mL와 S-9 Mixture 50 μL 를 가하여 약 3초간 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 Vogel-Bonner agar plate에 균일하게 도말하였다. Top agar가 굳으면 petri dish를 뒤집어서 37°C, 48시간 배양한 후 생성된 복귀돌연변이 집락 수를 세어 대조군과 비교하였다. S-9 mixture

적용여부와 상관없이 최소 한 개 균주에서 plate 당 복귀돌연변이 집락 수가 현저히 증가하였을 때 양성으로 판정하였다. 또한 기본 성장균층 (background lawn)이 얇아지거나 없어졌을 때 혹은 복귀돌연변이 집락 수가 음성대조군에 비해 현저히 감소하였을 때 항균성이 있다고 판정하였다.

거담효과 측정

기도조직 적출 : Donnelly *et al.*(1974)의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 체중 200 g의 웅성 흰쥐(S.D.)를 마취시킨 후 목 부위를 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.

담배연기 포집 : 시험에는 KT&G 디스 제품을 사용하였다. 향유와 꽃향유의 essential oil, absolute 및 oleoresin 추출물을 DMSO에 녹이고 개피당 50 µg이 들어가도록 microsyringe를 이용하여 담배에 주입하였으며, 평형수분이 13%가 되도록 조화시킨 다음 담배를 연소하였다. 담배연기의 포집은 자동화된 흡연장치로 30개피의 담배를 연소하고 얻은 전 연기를 gas washing bottle를 이용하여 생리식염수로 포집하였다. 이때 디스 담배의 시료 선별은 각초 중량은 960 ± 10 mg, 공기 회석율은 40 ± 5%로 하였으며, 담배의 연소 조건은 CORESTA 표준법에 따라 한 puff당 흡연 시간은 2초, 흡입부피는 35 mL로 하였고 흡연 주기는 1회 흡연당 60초로 하였다.

섬모생존시간 측정 : 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

비효소적 지질과산화 억제활성

천연 carotenoid 화합물과 retinoid 화합물, ubiquinol-10, α -tocopherol 등 노인성 의약품이나 건강식품 들에는 대부분 항산화물질이 함유되어 있는데, 이들 천연 항산화제의 수요는 해마다 급증하고 있으며 새로운 천연 항산화제의 개발이 크게 요구되고 있다(Stanner *et al.*, 2004). 천연 항산화제가 중요시되고 있는 이유는 이들 물질이 생체 내에서 지질과산화 과정 중에 생성되는 free radical 들을 제거하거나 과산화지질 및 산화분해물의 생성을 억제하며 이러한 지질과산화 억제가 궁극적으로 산화 및 발암을 억제할 것으로 기대되고 있기 때문이다(Whiteside *et al.*, 2004). 따라서 항산화활성은 비효소적, 효소적 및 자동산화 지질과산화 억제활성으로 나누어 측정하였다. 일반적으로 항산화물질 선별에는 비효소적 지질과산화 억제활성을 측정하는 Fe^{2+} /ascobate system이나 AAPH와 같은 free radical generator를 이용하는 *in vitro* assay가 사용되고 있다. 지질 source로서 웅성 흰쥐 간의 microsome과 free radical generator로서 AAPH를 사용하는 system에 향유와 꽃향유에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 각각 50 µg 처리하여 비효소적 지질과산화 억제활성을 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같다. 향유와 꽃향유에서 비효소적 지질과산화 억제활성은 essential oils에서 각각 67.3 ± 20.7%와 58.1 ± 19.3%로 향유의 essential oil이 꽃향유보다 지질과산화 억제활성이 높은 경향이였다. Oleoresin에서는 같은 농도에서 향유가 꽃향유보다 통계적으로 유의한 지질과산화 억제활성을 나타내었다($p < 0.01$). 그러나 향유와 꽃향유의 absolute에서는 50 µg 처리농도에서 지질과산화 억제활성이 거의 나타나지 않았다.

효소적 지질과산화 억제활성

생약추출물의 효소적 지질과산화 억제활성은 지질 source로서 웅성 흰쥐 간을 사용하여 Fe^{2+} -ADP/NADPH system과 같은 *in vitro* assay가 일반적으로 이용되고 있다. Fig. 2는 Fe^{2+} -ADP/

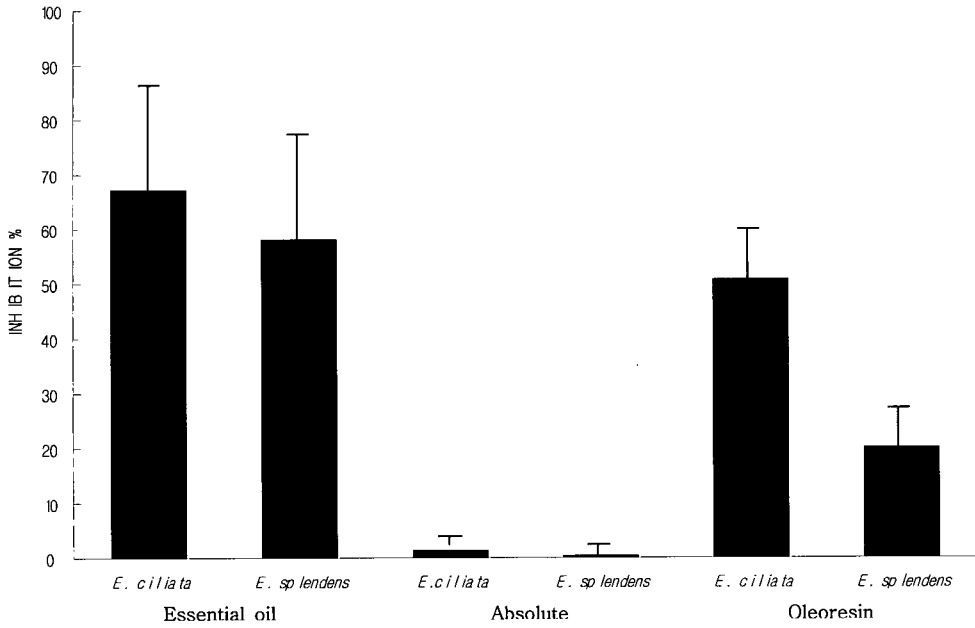


Fig. 1. *In vitro* inhibitory activities of nonenzymatic lipid peroxidation by essential oil, absolute and oleoresin extracted from *E. ciliata* and *E. splendens*.

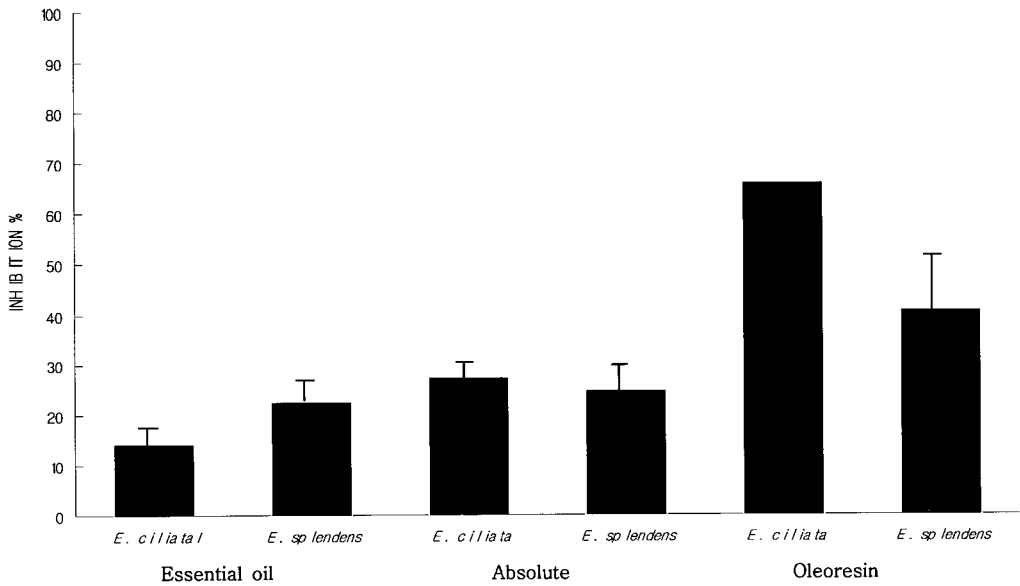


Fig. 2. *In vitro* inhibitory activities of enzymatic lipid peroxidation by essential oil, absolute and oleoresin extracted from *E. ciliata* and *E. splendens*.

NADPH system에 향유와 꽃향유에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 각각 50 μ g 처리하여 효소적 지질과산화 억제효과를 측정하였다. Essential oil의 경우 지질과산화 억제 활성이 향유와 꽃향유에서 각각 $14.28 \pm 2.38\%$ 와 $22.58 \pm 2.84\%$ 로 꽃향유가 향유보다 높았다 ($p < 0.05$). Oleoresin의 경우는 향유와 꽃향유에서 각각 $65.93 \pm 0.01\%$ 와 $40.73 \pm 6.04\%$ 로 비효소적 지질과산화 억제활성 결과와 같이 오히려 향유가 꽃향유보다 높게 나타났다($p < 0.05$). 향유와 꽃향유의 absolute에서는 각각 $27.23 \pm 2.43\%$ 와 $24.65 \pm 2.99\%$ 로 억제활성을 보였으며, 향유와 꽃향유 간에는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

자동산화 억제활성

지질과산화는 뇌 조직에서 쉽게 일어나는데 incubation system내에서 지질의 source로서 소의 뇌로부터 조제한 homogenate를 이용하여 향유와 꽃향유에서 추출한 essential oil, absolute 및

oleoresin을 각각 50 μ g 처리하고 자동산화 억제 활성을 검정한 결과는 Fig. 3과 같다. 향유와 꽃향유에서 자동산화 억제활성은 essential oil에서 각각 $16.36 \pm 4.24\%$ 와 $40.54 \pm 1.12\%$ 로 효소적 지질과산화 억제활성 검정결과와 같이 동일한 농도에서 꽃향유가 향유보다 높았다($p < 0.01$). Absolute의 경우는 향유와 꽃향유의 자동산화 억제활성은 각각 $6.52 \pm 0.09\%$ 와 $1.03 \pm 0.05\%$ 로 모두 낮은 억제활성을 나타내었으나 향유가 꽃향유 보다 같은 농도에서 높게 나타났다($p < 0.01$). Oleoresin에서는 향유와 꽃향유의 자동산화 억제활성이 각각 $95.09 \pm 0.50\%$ 와 $93.07 \pm 2.59\%$ 로 높게 나타났으나 두 그룹 간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

세포독성 평가

Neutral red uptake test방법을 이용하여 세포주로 BALB/c 3T3을 사용하여 향유와 꽃향유에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 처리하여 실시한 세포독성 시험 결과는 Fig. 4와 같다.

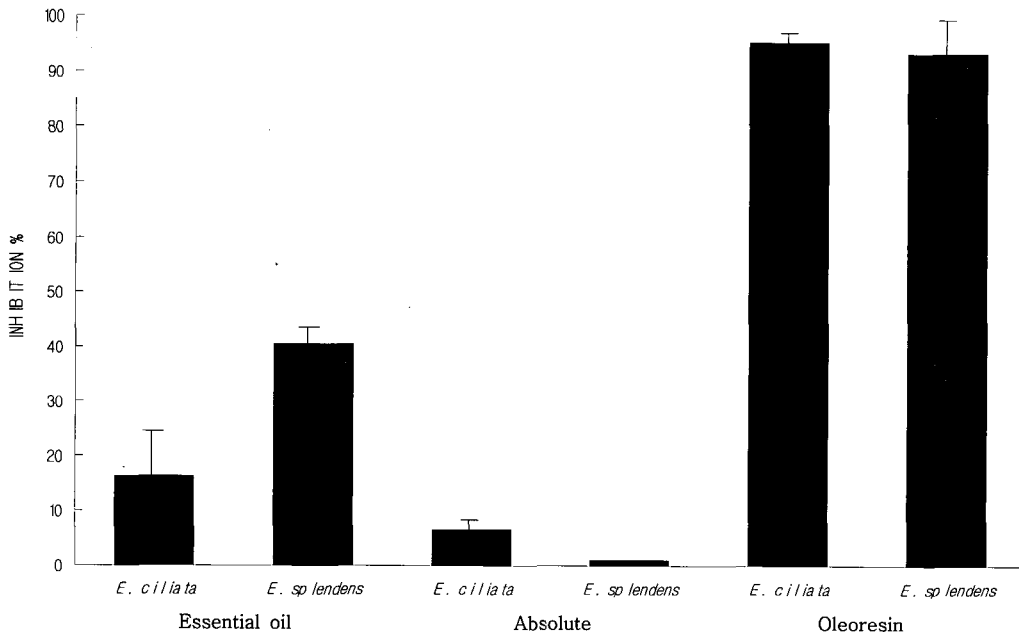
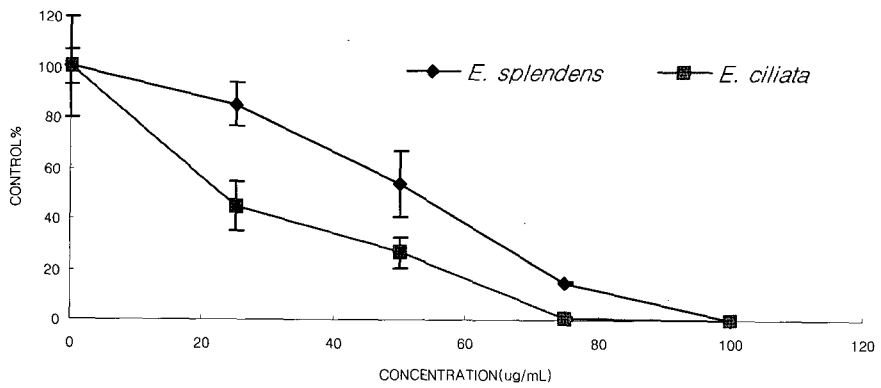
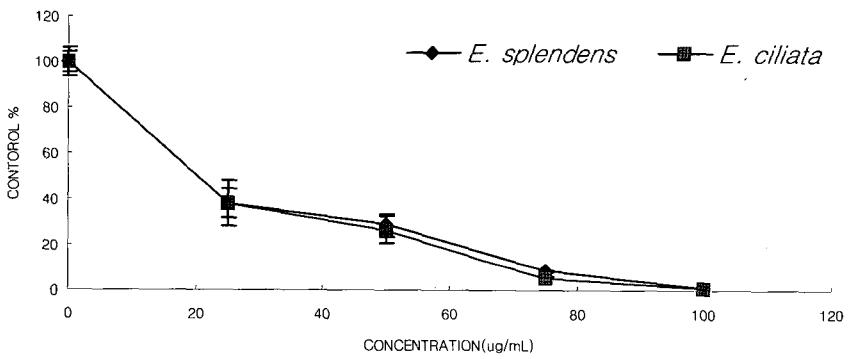


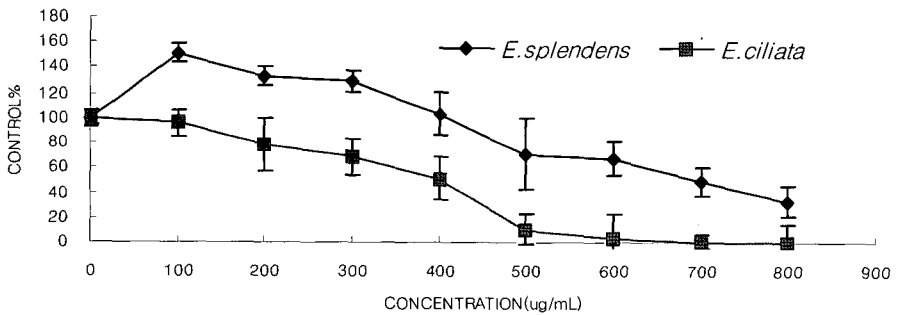
Fig. 3. *In vitro* inhibitory activities of autooxidative lipid peroxidation by essential oil, absolute and oleoresin extracted from *E. ciliata* and *E. splendens*.



Essential oil



Oleoresin



Absolute

Fig. 4. Comparative cytotoxicities of essential oil, absolute and oleoresin extracted from *E. ciliata* and *E. splendens* against BALB/c 3T3.

향유와 꽃향유 향기성분의 생리활성 검정

대조구와 처리구를 비교하여 세포 50% 사멸 농도를 계산한 결과 향유와 꽃향유의 essential oil에서는 고농도로 처리하였을 때 세포독성이 비교적 높은 것으로 나타났으며, 저농도에서 EC₅₀ 값은 향유 23.3 µg/mL, 꽃향유 46.4 µg/mL이었다. Absolute의 경우 고농도에서 세포독성이 낮았으며, EC₅₀ 값은 향유 341.0 µg/mL, 꽃향유 681.7 µg/mL로 나타나 거의 세포독성이 없었다. 그러나 Oleoresin은 향유와 꽃향유의 EC₅₀ 값은 각각 17.2 µg/mL, 17.6 µg/mL이었으며, 고농도 처리 시 세포독성이 비교적 높은 것으로 나타났다.

돌연변이 유발성 검정

균주로서 *Salmonella typhimurium* TA98을 사용하고 향유와 꽃향유에서 추출한 essential oil,

absolute 및 oleoresin을 처리하여 돌연변이 유발성을 검정한 결과는 Table 1과 같다. 시료 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. 향유와 꽃향유의 essential oil, absolute와 oleoresin을 plate당 100, 250, 500과 1000 µg/mL 처리하면서 S-9 mixture를 처리했을 때나 처리하지 않았을 때 모두 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수에서 음성대조군에 비

Table 1. Mutagenicity in the TA 98 strain induced by of essential oil, absolute and oleoresin extracted from *E. ciliata* and *E. splendens*

Species	Sample	S9 mix	Rev./plate				
			100 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	
Control	DMSO	-	15±5				
	DMSO	+	42±3				
	4-nitroquinoline	-	465±36				
	2-aminoanthrene	+	888±51				
<i>E. ciliata</i>	Essential oil	-	20±5	21±2	103±21	-	
		+	29±8	30±2	28±6	34±11	
	Absolute	-	19±4	19±3	22±10	13±2	
		+	34±6	37±8	45±4	39±1	
	Oleoresin	-	22±1	24±6	25±1	20±1	
		+	34±6	37±8	28±4	30±6	
	<i>E. splendens</i>	Essential oil	-	17±3	18±1	96±19	-
			+	37±4	32±1	77±15	8±9
Absolute		-	18±1	23±1	22±10	13±2	
		+	38±4	35±6	45±4	39±1	
Oleoresin		-	22±4	21±1	21±1	25±2	
		+	30±1	32±5	37±4	27±4	

해 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 향유와 꽃향유의 essential oil에서 plate에 500 μg 처리 시 S-9 mixture를 처리하지 않았을 때 복귀돌연변이 콜로니 수는 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 plate에 1000 μg 처리 시에는 항균성도 나타나고 있었다. 따라서 향유와 꽃향유의 absolute와 oleoresin은 고 농도에서도 돌연변이 유발성과 항균성이 나타나지 않았으나 essential oil은 500 μg 이상 처리 시 돌연변이 유발성뿐만 아니라 항균성도 있는 것으로 판단된다.

거담효과 측정

향유와 꽃향유에서 essential oil, absolute와 oleoresin의 거담효과를 측정하기 위하여 담배에 주입하고 연소시킨 후 흰쥐의 기도 섬모독성을 평가한 결과는 Table 2와 같다. 대조군에 비해 향유와 꽃향유에서의 essential oil, absolute와 oleoresin의 섬모생존시간이 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

Table 2. The change of the ciliostasis time with the addition of essential oil, absolute and oleoresin of *E. ciliata* and *E. splendens* in cigarettes

Flavor	Ciliostasis time(sec)	
	<i>E. ciliata</i>	<i>E. splendens</i>
Control	624 \pm 98	624 \pm 98
Essential oil	652 \pm 115	676 \pm 146
Absolute	614 \pm 109	637 \pm 120
Oleoresin	698 \pm 99	687 \pm 103

Essential oil과 absolute의 경우는 섬모생존시간이 꽃향유가 향유보다 증가하는 경향을 나타내었으나 oleoresin의 경우는 향유가 꽃향유보다 증가하는 경향을 보였고, 두 종 모두 oleoresin이 essential oil과 absolute보다 긴 경향을 나타내었다.

결 론

본 연구에서 향유와 꽃향유의 essential oil, absolute 및 oleoresin의 기능성과 안전성에 관련된 생리활성 검정결과는 다음과 같다. 항산화활성 측정 결과 비효소적 지질과산화 억제활성 검정에서 향유와 꽃향유의 essential oil 억제활성은 50 μg 처리 농도에서 높게 나타났다. 효소적 지질과산화 억제활성 검정 결과는 50 μg 처리 농도에서 향유와 꽃향유의 essential oil에서 각각 14.28 \pm 2.38%, 22.58 \pm 2.84%이며, oleoresin은 각각 65.93 \pm 0.01%와 40.73% \pm 6.04%로 유의한 차이를 나타냈다. 또한 자동산화 억제화성 검정 결과 50 μg 처리 농도에서 oleoresin은 향유와 꽃향유의 억제활성이 높게 나타났으며 향유와 꽃향유간에 차이는 없었다. 또한 세포독성 평가 결과 essential oil은 향유와 꽃향유에서 각각 EC₅₀ 23.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 46.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, absolute의 경우 EC₅₀ 값은 향유 341.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 꽃향유 681.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 향유와 꽃향유의 oleoresin EC₅₀ 값은 각각 17.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 17.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타났다. 향유와 꽃향유의 absolute의 경우 세포 독성이 낮으며, 안전성이 있다고 판단된다. 향유와 꽃향유의 돌연변이 유발성 검정 결과 absolute와 oleoresin의 경우 돌연변이 유발성과 항균성이 없는 것으로 나타났으며, essential oil은 500 μg 이상의 농도에서 돌연변이 유발성과 항균성이 있는 것으로 나타났다. 이는 돌연변이 유발성과 항균성이 낮은 것으로 판단되며, 저농도 처리 시 안전성 있는 향료로서 가능성이 있다고 판단된다. 또한 섬모독성을 평가한 결과 향유와 꽃향유의 essential oil, absolute와 oleoresin의 섬모생존시간이 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었다.

따라서 향유와 꽃향유에서 추출한 향기성분들은 독성학적으로 안정하며, 저농도에서 담배, 식품 및 의약품용 거담 향료로서 활용 가능성이 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

Ahn, D. K. (2000) Illustrated book of Korean

- medicinal herbs. 3rd ed. p. 21-31. Kyo-Hak Publishing Co. Korea.
- Babich, H. and Borenfreund, E. (2002) The neutral red cytotoxicity assay. *Neutral Red Assay for Toxicology*. 17: 237-251.
- Bansal, S. K., Love, J. and Gurtoo, H. L. (1983) High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res.* 117: 268-274.
- Chang, I. M. (2002) Current trend of natural products industry and utilization of herbal materials. *Korean J. Crop Sci. Symposium*. 28-37.
- Chung, M. S. and Lee, M. S. (2002) Development of *Elsholtzia splendens* flavored oils and analysis of flavor pattern using electronic nose. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 18(4): 455-460.
- Donnelly, G. M., McKean, H. E., Heird, C. S. and Green, J. (1974) Ciliostasis as a bioassay. *Arch. Environ. Health*. 28: 350-355.
- Jeong, J. H., Lee, J. G., Kwag J. J. and Lim, H. B. (2004) The comparison of flavor components extracted from *Elsholtzia ciliata* and *Elsholtzia splendens*. *J. Korean Society of Tobacco Science*. 26(2): 109-116.
- Jiang, L. Y., Yang, X. E. and He, Z. L. (2004) Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. *Chemosphere*. 55: 1179-1197.
- Kim, D. W., Sohn, K. H., Chang, H. W., Bae, K., Kang, S. S. and Kim, H. P. (2003) Anti-inflammatory activity of *Elsholtzia splendens*. *Arch. Pharm. Res.* 26: 232-236.
- Lowry, O. H., Rosebrough, H. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the foline-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Miyata, T. (2003) Novel approach to respiratory pharmacology-pharmacological of cough, sputum and airway clearance. *Yakugaku zasshi*. 123: 987-1006.
- Park, K. M., Hwang, J. K., Shin, K. M., Kim, H. S. and Song, J. H. (2003) Detoxicating effects of oriental herb extract mixtures on nicotine and dioxin. *Korean J. Food Sci. Tech.* 35(5): 980-987.
- Pederson, T. C. and Aust, D. S. (1975) The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Acta*. 385: 232-241.
- Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B. and Teranishi, R. (1977) Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food. Chem.* 25(3): 446-449.
- Simonov, I. N., Pavlova, T. A., Demyanov, P. I. and Mosk, S. (1987) Accumulation of essential oil in *Elsholtzia patrini* and *Lophanthus anisatus* Izv. *Timiryazevsk. s-kh. Akad.* 2: 195-199.
- Sohn, K. H., Song, J. S., Chae, Y. A. and Kim, K. S. (1998) The Growth and Essential oil *Elsholtzia ciliata* (THUNB.) HYLANDER. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(6): 809-813.
- Song, J., Zhao, F. J., Luo, Y. M., McGrath, S. P. and Zhang, H. (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ Pollut.* 128: 307-315.
- Stanner, S., Hughes, J., Kelly, C. and Buttrics, J. (2004) A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutr.* 7: 407-422.
- Stocks, J., Gutteridge, J. M., Rosemary, J. S. and Dormandy, T. L. (1974) Assay using

- brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clinical Science and Molecular Medicine*. 47: 215-222.
- Whiteside, M. A., Heinburger, D. C. and Johanning, G. L. (2004) Micronutrients and cancer therapy. *Nutr. Rev.* 62: 142-147.
- Wong, S. F., Halliwell, B., Richmond, R. and Skowroneck, W. R. (1981) The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* 14: 127-134.