

층꽃나무 (*Caryopteris incana* Miq.) 정유의 성분 분석과 세포 독성 평가

김 성 문*

강원대학교 자원생물환경학과

Composition and Cell Cytotoxicity of Essential Oil from *Caryopteris incana* Miq. in Korea

Songmun Kim*

Department of Biological Environment, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received June 9, 2008; Accepted September 16, 2008

The essential oil was obtained from the aerial part of *Caryopteris incana* Miq. by steam distillation, samples were collected by headspace (HS) and solid-phase microextraction (SPME) methods, and the compositions of the essential oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The fragrance of the essential oil was fougere and woody. There were sixty-nine constituents in the essential oil: 28 carbohydrates, 22 alcohols, 7 acetates, 7 ketones, 3 aldehydes, and 2 others. Major constituents were 4,6,6-trimethyl [1*S*-(1 α ,2 β ,5 α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol (11.8%), tau-cadinol (9.4%), myrtenyl acetate (9.2%), pinocarpone (7.0%), 1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene (6.3%), δ -3-carene (6.2%). By SPME extraction, forty-nine constituents were identified: 22 hydrocarbons, 16 alcohols, 6 acetates, 3 ketones, and 2 ethers. Major constituents of the SPME-extracted sample were δ -3-carene (12.6%), (-)-myrtenyl acetate (11.2%), 6,6-dimethyl-2-methylene-bicyclo [3.1.1] heptan-3-ol (10.9%), pinocarpone (9.3%). By HS extraction, ten constituents were identified: 5 hydrocarbons, 2 amines, 1 alcohol, and 2 others. Major constituents of the HS-extracted sample were (Z)-2-fluoro-2-butene (34.9%), δ -3-carene (6.9%), 6-(4-chlorophenyl)tetrahydro-2-methyl-2H-1,2-oxazine (5.9%). The IC₅₀ value (0.011 μ g/mg) in MTT assay using HaCaT keratinocyte cell line was lower than those of commercially-selling rosemary and tea tree, suggesting more toxicological studies are needed for commercial use of the essential oil of *Caryopteris incana* Miq.

Key words: *Caryopteris incana*, essential oil, GC-MS, headspace, solid-phase microextraction, cell cytotoxicity

서 론

식물에 함유되어 있는 정유(essential oil)는 식물체내에서 생합성된 휘발성 화합물의 복합체로서, 병해충과 같은 외부의 해로부터 식물을 방어하거나 혹은 수정을 위하여 매개체를 유인하기 위한 목적으로 생합성 된다고 알려져 있다. 식물 정유는 물, 증기, 건조 또는 압착에 의하여 추출되는데, 정유가 가지고 있는 독특한 향취 때문에 천연향료산업계에서 화장품향료와 식품향료로 널리 활용되고 있다.¹⁾

향료산업의 규모는 전세계적으로 약 150억 유로 정도로 추산되고 있으며, 유럽, 아프리카, 중동시장이 36%를, 북미시장이 32%를, 아시아, 태평양지역시장이 26%를, 그리고 남아메리카시장이 6%를 차지하고 있는데, 현재 중국, 인도, 러시아, 중앙아

메리카의 시장이 확장되고 있어서 향후에는 더 커질 것이라 예상되고 있다.²⁾ 향료 중에서도 천연향료-특히 식물향료는 웰빙과 로하스 생활양식의 확산으로 많은 산업제품-의료용품, 가정용품, 보안용품, 환경 및 위생용품, 공업용품, 사료용품에 활용될 것이 기대된다.

국내에는 185과 1,065속 4,596종의 자생식물이 서식하는 것으로 알려져 있으며, 아직까지 알려지지 않은 것까지 포함하면 약 6,000종 이상이 될 것이라 추정되고 있다.³⁾ 현재까지 국내 자생식물로부터 얻어진 향료에 함유되어 있는 화학성분에 대한 연구는 많이 이루어졌으나^{4,5,9)} 상업화된 예는 거의 없는 실정이다.

층꽃나무(Blue spirea 혹은 incana bluebeard)는 마편초과(Verbenaceae)의 아관목(亞灌木) 또는 다년초로 우리나라, 중국, 타이완, 일본에 걸쳐 널리 분포하고 있다. 우리나라에서는 주로 산과 들에 서식하고 있으며 줄기는 30~60 cm 정도로 곧게 자라며, 길이 3~6 cm 정도 자라는 잎은 난형 혹은 긴타원형으로 대생한다. 꽃은 자주색 또는 흰색으로 7~9월에 취사화서로 달리고, 화서는 층층으로 배열되며, 검은색을 띠는 열매는 9-10월

*Corresponding author

Phone: +82-33-250-6447; Fax: +82-33-241-6640

E-mail: skim5@kangwon.ac.kr

에 삭과로 열린다. 우리나라에서 층꽃나무는 주로 관상용, 절화용, 조경용으로 활용되고 있을 뿐 다른 용도로는 활용되고 있지 못하고 있다.⁶⁾

저자들은 천연향료 개발을 위하여 층꽃나무로부터 정유를 추출하였고, 정유에 함유된 휘발성성분을 분석하였으며, 정유가 세포에 미치는 영향을 구명하였다.

재료 및 방법

식물 시료. 식물시료인 층꽃나무는 강원도 춘천시 신북읍 천전리 소재 강원대학교 부속농장에서 2007년 9월 중순 채취되었으며, 한국식물도감을 참조하여 분류하였고⁸⁾ 강원도농업기술원 노희선 박사에게 재확인 받았다. 채집된 층꽃나무는 4°C의 아이스박스에 담아 가급적 빠른 시간 내에 실험실로 운반한 후 정유추출에 사용되었다.

정유 추출. 정유추출은 최 등(2008)의 방법에 따라 수행되었다.⁹⁾ 수증기 증류장치인 EssenLab(Hanil LabTech, Korea)의 수증기 발생부위에 2/의 증류수를 넣고, 정유 발생부위에 층꽃나무 지상부위 2kg을 넣은 후, 냉각관에는 4°C의 냉각수가 지속적으로 흘러 수증기에 모이도록 하였다. 수증기 발생부위의 온도를 110°C로 2시간 동안 유지시키면서 발생한 수증기가 정유 발생부위를 통과하면서 층꽃나무에 함유되어 있는 정유를 발생시켰다. 발생한 정유는 냉각관에서 응축된 후 수증기에서 증류수층과 정유층으로 분류되었다. 정유층에 함유되어 있는 물을 제거하기 위하여 정유층을 sodium sulfate가 담겨 있는 삼각깔대기에 통과시킨 후, 성분 분석시까지 4°C의 냉장고에서 보관하였다.

정유 분석. 추출된 층꽃나무 정유의 향기성분은 polydimethylsiloxane(PDMS) fiber가 장착된 solid phase microextraction (SPME) 장치에 흡착된 다음, gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)로 분석되었다. 수증기 증류장치를 이용하여 추출된 층꽃나무 정유 1 ml를 headspace glass vial(20 ml)에 가한 후, vial을 실리컨 septum으로 밀봉하였다. SPME needle를 vial 내로 삽입하여 60°C에서 30분간 흡착시켰다. SPME 장치에 흡착된 향기성분은 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)로 분석되었다. 사용한 GC는 Varian사의 CP-3800이었으며, MS는 Varian사의 1200L이었다. GC와 MS의 작동조건은 Table 1에 나타내었으며, 성분분석은 Wiley 275 Library, NIST Library의 mass spectrum data를 이용하였다. Headspace glass vial(20 ml)에 층꽃나무 정유 1 ml를 가한 후, headspace autosampler(Varian Combi PAL Headspace)를 사용하여 80°C에서 30분간 평형화시켰다. 향기성분은 headspace용 syringe로 포집하고 GC-MS로 분석하였다.

독성 평가. 독성평가 실험은 최 등(2008)의 방법에 따라 수행되었다.⁹⁾ 정유의 독성평가를 위한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 각질형성세포인 HaCaT cell(Keratinoxyte, Human)이었다. 세포배양에 필요한 trypsin-EDTA는 GibcoBRL(USA) 제품을 사용하였으며, 세포독성 실험에 사용한 MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 시약은 Sigma(USA) 제품,

Table 1. Analytical conditions of GC-MS for volatile composition in essential oil extracted from *Caryopteris incana* in Korea

GC	CP-3800 Varian
Column temperature	VF-5MS 30 m capillary column (0.25 mm)
Oven temperature	50°C (5 min) → 250°C (4 min), 4°C/min
Injector temperature	250°C
MS	1200L Quadrupole, Varian
Ionization voltage	70eV
Carrier gas	He (1 ml/min)

formazan 검출에 사용한 isopropanol 및 HCl은 Merck(USA) 제품이었다. 사람유래의 각질형성세포(HaCaT cell)를 배양접시에 접종한 후, penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100 µg/ml), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 37°C, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다. HaCaT 세포를 96 well plate에 1×10⁵/ml의 농도로 희석하여 100 µl씩 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지 90 µl씩을 각 well에 넣어 주었다. 최종농도 0.11~0.0055%의 농도가 되도록 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 희석한 시료를 10 µl씩 처리하였다. 24시간 배양 후 PBS를 이용하여 5 mg/ml의 농도로 녹여져 있는 MTT 시약을 20 µl씩 넣어주고 4시간 배양하였다. MTT 시약과 시료가 포함된 배지를 모두 제거하고 각 well에 acid isopropanol(0.04 N HCl in iso-propanol) 100 µl를 첨가하여 30분간 교반한 후, Victor31420 Multilabel Counter(Perkin Elmer, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 층꽃나무 잎의 향취가 독특하다는 정보를 강원도 농업기술원의 노희선박사로부터 얻은 후 서식지 층꽃나무 잎의 향취를 먼저 확인한 다음 수행되었다.

층꽃나무 잎에 함유된 정유 함량은 0.03%로, 국내 자생식물인 망초(*Erigeron canadensis* L.)(0.33%),⁵⁾ 긴병꽃풀(*Glenchoma hederacea* var. *longituba* Nakai)(0.15-0.22%),⁷⁾ 더위지기(0.50%, 미발표자료)의 정유 함량과 비교하여 매우 낮았으며, 강원대학교 향수개발동아리 Rose of Sharon 정회원 5명이 관능평가한 정유의 향취는 fougere, woody이었다. 그리고 정유를 10% 희석한 희석액의 향취는 woody, green이었다. 이러한 결과를 바탕으로 층꽃나무 정유는 푸제아 또는 우디 계열의 향료 제품 개발에 활용될 수 있다고 판단되며, 또한 정유를 희석시에는 그린 계열의 향료 제품 개발에도 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

층꽃나무 잎을 증류추출(steam distillation)하여 얻은 정유를 GC-MS로 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. Steam distillation법으로 추출된 층꽃나무 정유에는 총 69종의 화학구조 확인성분(93.63%)과 18종의 화학구조 미확인성분(6.37%)이 함유되어 있었다. 정유에 함유되어 있는 화학구조 확인성분을 구조별로 분류하면 탄화수소가 28종, 알코올이 22종, 아세테이트가 7종, 케톤이 7종, 알데히드가 3종, 기타가 2종이었다. 그리고 주된 성분은 4,6,6-trimethyl [1S-(1α,2β,5α)]-bicyclo[3.1.1]

Table 2. Volatile composition of the essential oil from *Caryopteris incana*. The essential oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry

Classification	Compound Name	R.T*	Content (%)	
Hydrocarbon	1-Hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene	25.686	6.39	
	δ-3-Carene	5.560	6.29	
	(Z)-2-Fluoro-2-butene	1.632	3.19	
	cis-Calamenene	27.010	1.50	
	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	25.283	1.03	
	β-Cadinene	24.240	0.96	
	α-Cubebene	23.044	0.89	
	Cadina-1,4-diene	27.461	0.88	
	Verbenene	5.851	0.74	
	Sabinene	7.239	0.69	
	L-Linalool	8.788	0.58	
	Germacrene-D	19.994	0.57	
	1-Methyl-2-(1-methylethyl)-benzene	7.092	0.51	
	E,E-2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	6.701	0.44	
	α-Copaene	19.409	0.41	
	Caryophyllene oxide	29.967	0.35	
	Cadalene	34.780	0.34	
	4,7-Dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	28.189	0.32	
	α-Calacorene	27.884	0.30	
	Camphene	5.802	0.21	
	d,l-Limonene	7.182	0.14	
	γ-Terpinene	7.795	0.14	
	Tricyclene	5.366	0.10	
	7-Propylidene-bicyclo[4.1.0]heptane	9.500	0.09	
	α-Terpinene	6.925	0.08	
	Aromadendrene	31.538	0.08	
	2,4-Thuiadien	5.666	0.06	
	Isolodene	24.376	0.05	
	Acetate	Myrtenyl acetate	17.171	9.25
		trans-Pinocarveyl acetate	15.767	1.10
		Sabinyl acetate	15.405	0.68
		Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-trimethyl-acetate	15.262	0.30
		Myrtenyl acetate	28.749	0.18
2-Cyclohexen-1-ol,2-methyl-5-(1-methyl)-acetate		17.386	0.12	
Alcohol	trans-Pinocarvyl acetate	13.444	0.09	
	4,6,6-Trimethyl [IS-(1α,2β,5α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	10.389	11.81	
	tau-Cadinol	26.838	9.49	
	β-Copaen-4-α-ol	39.075	4.15	
	Myrtenol	12.015	4.07	
	Cubenol	33.243	3.68	
	1-Octen-3-ol	6.227	2.52	
	t-Muurolol	33.420	2.50	
	Decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-cycloprop[e]azulen-4-ol	31.256	1.76	
	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	11.099	1.60	
	Decahydro-1,1,4,7-tetranethyl-4aH-cycloprop[e]azulen-4a-ol	29.381	0.59	
	2,3,4,7,8,8a-Hexahydro-3,8,8-trimethyl-1H-3a,7-methano azulene-6-methanol	33.611	0.48	
	2-Methylene-6,6-dimethyl-bicyclo[3.2.0]heptan-3-ol	10.721	0.42	
	3-Octanol	6.487	0.30	
	Veridiflorol	30.678	0.29	
	Arthole	7.953	0.25	
	Isocurcumenol	36.214	0.21	
	4-Methyl-1-(1-methyl)-(1α,2β,5α)3-cyclohexen-1-ol	11.375	0.18	
	1,2,3,4,4a,7,8,8a-Octahydro-1,6 dimethyl-4-(1-methyl) ethyl-1-naphthalenol	33.513	0.17	
	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	55.944	0.13	
p-Menth-4(8)-en-9-ol	8.464	0.12		
p-Cymen-8-ol	11.600	0.12		
Carveol	12.699	0.07		

Table 2. Continued

Classification	Compound Name	R.T*	Content (%)
Ketone	Pinocarpone	10.951	7.05
	Longipinocarpone	32.773	0.42
	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	43.419	0.28
	2,6,6-Trimethyl(1.α.,2.β.,5.α.)bicyclo[3.1.1]heptan-3-one	11.304	0.23
	2,3,3-Trimethyl-2-(3-methyl)-cyclohexanone	31.414	0.20
	4,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one	12.386	0.15
	4,4-Dimethylcyclohexadienone	7.871	0.05
Aldehyde	2,2,3-Trimethyl-3-Cyclopentene-1-acetaldehyde	9.629	0.30
	5-Isopropenyl-2-methyl-cyclopent-1-enecarboxaldehyde	6.772	0.13
	4-(10methyl-ethyl)-Benzaldehyde	13.647	0.08
Others	1,3-Dienyl-3-oxatricyclo[5,1,0,0,(24)]-octane	34.214	0.55
	Tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan	32.929	0.10
Unknown		-	6.37

Table 3. Volatile composition of the essential oil from *Caryopteris incana* by solid-phase microextraction method. The volatile components were extracted by solid-phase microextraction and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry

Classification	Compound Name	R.T*	Content (%)	
Hydrocarbon	δ-3-Carene	5.523	12.61	
	1-Hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene	26.509	4.55	
	δ-Cadinene	26.662	3.18	
	cis-Calamenene	26.835	0.99	
	α-Cubebene	23.001	0.76	
	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	25.217	0.76	
	2-β-Pinene	6.236	0.75	
	β-Cadinene	24.182	0.64	
	1-Methyl-2-(1-methylethyl)-benzene	7.074	0.61	
	Sabinene	7.222	0.56	
	Germactene-D	19.949	0.53	
	E,E-2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	6.686	0.46	
	α-Copaene	19.364	0.34	
	Cadina-1,4-diene	27.347	0.34	
	2,2,3-Tri-3-cyclopentene-1-acetaldehyde	9.607	0.21	
	Camphene	5.791	0.20	
	γ-Terpinene	7.782	0.16	
	Ethenyl-benzene	8.576	0.15	
	α-Calacorene	27.808	0.14	
	α-Terpinene	6.911	0.09	
	1,2,3,4-Tetrahydro-2,5,6-trimethyl-naphthalene	28.124	0.07	
	α-Pinene	5.654	0.05	
	Acetate	(-)-Myrtenyl acetate	17.027	11.2
		trans-Pinocarveyl acetate	15.71	1.06
		Sabinyl acetate	15.355	0.65
		cis-Endobicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-trimethyl-acetate	15.228	0.34
		Neryl acetate	7.17	0.17
(-)-trans-Pinocarveyl acetate		13.408	0.09	

hept-3-en-2-ol, tau-cadinol, myrtenyl acetate, pinocarpone, 1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene, δ-3-carene 이었으며, 각각의 함량은 11.8, 9.4, 9.2, 7.0, 6.3, 6.2%이었다.

층꽃나무 정유를 SPME에 흡착시킨 다음 GC-MS로 분석한 결과, MS로 구조확인성분은 49종(79.94%), 구조미확인성분은 10종(20.06%)이었다(Table 3). SPME법으로 추출된 성분 중 구조확인된 것들을 화학구조별로 분류하면 탄화수소가 22종(44.9%), 알코올이 16종(32.7%), 아세테이트가 6종(12.2%), 케

톤이 3종(6.1%), 에테르가 2종(4.0%)이었으며, 주성분은 δ-3-carene(12.6%), (-)-myrtenyl acetate(11.2%), 6,6-dimethyl-2-methylene-bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol(10.9%), pinocarpone(9.3%), myrtenol(4.7%), 1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene(4.5%), 4,6,6-trimethyl-[1S-(1α,2β,5α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol(3.5%), δ-cadinene(3.1%), 1-octen-3-ol(2.8%)이었다.

정유를 headspace에 흡착시킨 다음 GC-MS로 분석한 결과는

Table 3. Continued

Classification	Compound Name	R.T*	Content(%)
Alcohol	6,6-Dimethyl-2-methylene-bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol	10.17	10.99
	Myrtenol	11.92	4.77
	4,6,6-Trimethyl-[is-(1 α ,2 β ,5 α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	10.255	3.55
	1-Octen-3-ol	6.187	2.80
	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	11.019	1.83
	trans-Verbenol	5.840	1.04
	Cubenol	33.131	0.71
	L-Linalool	8.747	0.56
	2-Methylene-6,6-dimethyl-bicyclo[3.2.0]heptan-3-ol	10.600	0.42
	β -Copaen-4- α -ol	38.943	0.35
	3-Octanol	6.466	0.32
	α -Cadinol	33.239	0.27
	4-Methyl-1-(1-methylethyl)-3-Cyclohexen-1-ol	11.321	0.22
	Palustrol	29.309	0.18
	p-Cymen-8-ol	11.530	0.11
	(S)-(-)-(4-Isopropenyl-1-cyclohexenyl)methanol	17.321	0.10
	Ketone	Pinocarvone	10.843
2,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]heptan-3-one		11.247	0.21
4,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one		12.332	0.16
Ether	Arthole	7.936	0.25
	2-Propylmethyl ether	2.342	0.10
Unknown	-	-	20.06

Table 4. Volatile composition of essential oil from *Caryopteris incana* by headspace method. The volatile components were extracted by headspace and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry

Classification	Compound Name	R.T*	Content(%)
Hydrocarbon	(z)-2-Fluoro-2-butene	1.579	34.93
	δ -3-Carene	5.523	6.95
	2- β -Pinene	6.254	0.55
	Camphene	5.805	0.43
	Sabinene	6.132	0.14
Alcohol	trans-Verbenol	5.857	0.24
Amine	Dipropylfluoroamine	2.330	0.43
	Heptacosfluorotributylamine	1.474	0.09
Others	6-(4-chlorophenyl)Tetrahydro-2-methyl-2H-1,2-oxazine	2.097	5.99
	Chlorfenapyr	4.811	0.64
Unknown	-	-	49.61

Table 4에 나타내었다. Headspace법을 이용하여 분석한 정유에는 구조확인 성분이 10종(50.39%), 구조미확인 성분이 9종(49.61%)이 함유되어 있었다. 구조확인성분을 화학구조별로 분류하면 탄화수소 5종, 아민 2종, 알코올 1종, 기타 2종이었으며, 주된 성분으로는 (Z)-2-fluoro-2-butene(34.9%), δ -3-carene(6.9%), 6-(4-chlorophenyl)tetrahydro-2-methyl-2H-1,2-oxazine(5.9%)을 들 수 있다. Headspace법으로 추출된 정유의 성분은 실제 시료에서 느낄 수 있는 관능적 특성과 가장 유사하다는 보고로 미루어⁸⁾ 층꽃나무 정유의 향취에 직접적으로 영향을 주었을 것이라 판단된다.

Headspace법으로 추출된 정유의 성분 수는 steam distillation 법과 SPME법으로 추출된 정유의 성분 수와 비교하여 훨씬 적었는데, 그 이유는 headspace 흡착시 일정온도에서 휘발되기 쉬운 성분들만이 추출되었기 때문이라 판단된다.⁷⁾ 그리고 steam distillation법과 SPME법으로 추출하였을 때 검출된 acetate류,

ketone류, aldehyde류, ether류는 headspace법으로 추출하였을 때에는 검출이 되지 않았는데, 이러한 성분들은 실험조건에서는 휘발되지 않는 성질을 가졌기 때문이라 추론된다.

층꽃나무 정유 성분을 steam distillation법, SPME법, headspace법으로 추출하여 분석한 결과 추출방법에 따라 성분 및 함량에 있어 차이가 있었다. 이러한 성분 및 함량간의 차이는 분석방법간의 차이에 기인되는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ SPME 분석방법의 경우 휘발성성분을 흡착-탈착하는 과정이 포함되어 있고, 흡착제의 종류에 따라 분석성분과 그 함량의 차이가 심한 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 정유에 가장 많이 함유된 4,6,6-trimethyl [IS-(1 α ,2 β ,5 α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol과 tau-cadinol은 SPME법과 headspace법으로 추출하였을 때에는 전혀 검출되지 않았는데, 그 원인으로는 성분들이 SPME fiber에 흡착되지 않았거나 혹은 실험조건(온도)에서 휘발되지 않았다는 것을 들 수 있다. 이들 성분은 headspace법으로 추출시에는 전혀 검

출되지 않았기에 실제 향취에는 영향을 미치지 않았을 것이라 판단된다.

Germacrene-D는 steam distillation법과 SPME법으로 추출하였을 때 그 함량은 각각 0.57%와 0.53%이었으나, headspace법으로 추출하였을 때에는 전혀 검출이 되지 않았다. 이러한 결과는 sesquiterpene인 germacrene-D가 headspace법으로 추출하였을 때에는 휘발하지 않았기 때문일 것이라 추론된다. 본 연구에서는 germacrene-D의 열분해산물인 γ 또는 δ -cadinene, α -arophane, α 또는 γ -muurolane이 검출되지 않았는데,⁹⁾ 이는 정유를 100°C 이하의 온도에서 생산하였기 때문이라 판단된다.

(Z)-2-Fluoro-2-butene은 steam distillation법으로 추출시 3.19% 함유되어 있었으나, SPME법으로 추출시에는 전혀 검출되지 않았고, headspace법으로 추출시에는 34.93%가 검출되었다. (Z)-2-Fluoro-2-butene이 SPME법으로 추출시에는 전혀 검출되지 않은 이유는 향료성분이 polydimethylsiloxane(PDMS) fiber에 전혀 흡착되지 않는 화학적 성질을 갖고 있기 때문이라 할 수 있다. (Z)-2-Fluoro-2-butene이 headspace법으로 추출시에는 아주 높은 함량을 보였던 이유는 실험조건(온도)에서 그 어떠한 성분보다도 강하게 휘발이 이루어졌기 때문이라 추론되며, 이러한 이유로 인해서 향취에도 영향을 주었을 것이라 판단된다.

2- β -Pinene은 소나무 정유에서 발견되는 대표적인 탄화수소 성분으로서 minty하거나 coniferous한 향취를 나타낸다. 2- β -Pinene은 steam distillation법으로 추출하였을 때에는 검출되지 않았으나, SPME법과 headspace법으로 추출하였을 때에는 각각 0.75%와 0.55%가 검출되었다. 실제 steam distillation법으로 층꽃나무를 추출하였을 때 2- β -pinene은 실제 0.05% 이하로 함유되어 있었을 것이라 판단되며, SPME법과 headspace법으로 추출시에 검출이 된 것으로 판단된다. 2- β -Pinene은 대표적인 woody계열의 성분으로 알려져 있는데, 층꽃나무 향료의 woody한 향취는 비록 일부이기는 하지만 2- β -pinene에 기인된 것이라 추론된다.

Steam distillation법, SPME법, headspace법으로 층꽃나무의 휘발성 향기성분을 추출, 분석하였을 때, 분석된 성분간에는 커다란 차이가 있었다. Steam distillation법으로 추출시에는 4,6,6-trimethyl [1S-(1 α ,2 β ,5 α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, SPME법으로 추출시에는 δ -3-carene, 그리고 headspace법으로 추출시에는 (Z)-2-Fluoro-2-butene의 함량이 가장 높았다. Steam distillation법으로 정유를 추출한 경우 가장 많은 성분들이 동정되었고, 기 보고된 열유도 화합물이 검출되지도 않았으며, 무엇보다도 층꽃나무로부터 유기용매를 사용하지 않는 친환경적인 방법으로 대량의 정유 채수가 가능하다고 판단된다.

층꽃나무 정유가 HaCaT 각질형성세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 위하여 HaCaT 세포의 배양배지에 층꽃나무로부터 추출한 정유를 첨가할 경우 수용성의 배양배지에 지용성의 층꽃나무 정유가 골고루 분산 혼합되지 못하는 문제를 해결하기 위한 실험을 실시하였고, 정유와 dimethyl sulfoxide(DMSO)의 혼합비율을 1:10으로 하였을 때 최적의 효과를 거두었는데, 이러한 결과는 최 등(2008)의 결과와 비교하여⁷⁾ 동일하였다.

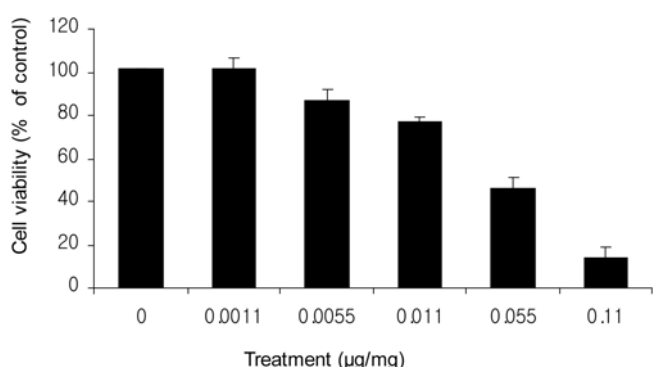


Fig. 1. Effect of essential oil from Korean blue spirea (*Caryopteris incana* Miq.) on survival rate of HaCaT keratinocyte cell line. Means and standard errors are based on data from three replicates.

본 실험에서 사용된 HaCaT 세포는 0.0011 µg/ml의 층꽃나무 정유를 첨가하였을 경우 정상적인 생육을 보였으며 세포의 생육은 정유의 농도가 증가할 수록 감소하는 경향을 보였다($y = -17.2 \ln(x) - 27.99$, $R^2 = 0.949$). 층꽃나무 정유의 HaCaT 세포에 미치는 IC₅₀ 값은 0.0108 µg/mg이었는데(Fig. 1), 이 값은 긴병꽃풀 정유의 IC₅₀ 값(0.026 µg/mg)과⁷⁾ 망초 정유의 IC₅₀ 값(0.027 µg/mg)과⁵⁾ 비교해 볼 때 높았다. 그리고 층꽃나무 정유의 IC₅₀ 값은 상업적으로 널리 사용되고 있는 rosemary와 tea tree 정유의 IC₅₀ 값과 비교해도 높았다.⁷⁾ 이러한 결과를 바탕으로 층꽃나무 정유는 피부에 독성을 나타내는데 대한 후속 연구가 진행되어야만 향후 향장품 등의 원료로 활용될 수 있을 것이라 판단된다.

초 록

층꽃나무 지상부위 정유의 화학성분 구명을 위하여 수증기증류법으로 정유를 얻고, 이를 solid-phase microextraction(SPME)와 headspace(HS)법으로 흡착시킨 다음 GC-MS로 분석하였다. 향취가 fougere, woody한 층꽃나무 정유에는 탄화수소 28종, 알코올 22종, 아세테이트 7종, 케톤 7종, 알데히드 3종, 기타 2종 등 총 69종의 화학성분이 함유되어 있었으며, 다함량 성분은 4,6,6-trimethyl [1S-(1 α ,2 β ,5 α)]-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol(11.8%), tau-cadinol(9.4%), myrtenyl acetate(9.2%), pinocarvone(7.0%), 1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene(6.3%), δ -3-carene(6.2%)이었다. SPME법으로 흡착 후 분석한 시료에는 탄화수소 22종, 알코올 16종, 아세테이트 6종, 케톤 3종, 에테르 2종 등 총 49종의 화학성분이 검출되었는데, 다량 함유된 성분으로는 δ -3-carene(12.6%), (-)-myrtenyl acetate(11.2%), 6,6-dimethyl-2-methylene-bicycol [3.1.1] heptan-3-ol(10.9%), pinocarvone(9.3%)이었다. 그리고 HS법으로 흡착한 다음 분석한 정유에는 탄화수소 5종, 이민 2종, 알코올 1종, 기타 2종 등 총 10종의 화학성분이 검출되었는데, 다량 함유된 성분은 (Z)-2-fluoro-2-butene(34.9%), δ -3-carene(6.9%), 6-(4-chlorophenyl) tetrahydro-2-methyl-2H-1,2-oxazine(5.9%)이었다. HaCaT 각질형성세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 실

시한 결과 층꽃나무 정유의 IC₅₀값은 0.011 µg/mg으로 시판 중인 로즈마리 정유나 차나무 정유의 IC₅₀값보다 낮았는데, 이러한 결과는 층꽃나무 정유의 상업화를 위해서 더 많은 독성시험이 요구된다는 것을 시사한다.

Key words: 세포독성, 정유, 층꽃나무, *Caryopteris incana*, GC-MS, headspace, solid-phase microextraction.

감사의 글

본 연구는 홍천메디칼허브연구소의 예산 지원으로 이루어졌으며, 세포독성평가 실험 중 일부는 강원대학교 농업과학연구소의 기기를 사용하여 수행되었음.

참고문헌

1. Baser, K. H. C. and Demirci, F. (2007) Chemistry of essential oils. In *Flavors and Fragrances*, R. G. Berger (ed) pp. 43-86. Springer.
2. Guentert, M. (2007) The flavour and fragrance industry-Past, present and future, In *Flavors and Fragrances*, R. G. Berger (ed) pp. 1-24. Springer.
3. Kim, S. (2006) Search for Korean native plants with herbicidal composition. *Kor. J. Weed Sci.* **26**, 225-245.
4. Park, Y. H., Choi, H. J., Wang, H. Y., Kim, H. Y., Heo, S. J., Kim, K. H., Kim, Y. N. and Kim, S. (2007) Volatile components of *Erigeron canadensis* L. in Korea. *The Korean Soc. of Weed Sci.* **27**, 268-274.
5. Choi, H. J., Wang, H. Y., Kim, Y. N., Heo, S. J., Kim, N. K., Jeong, M. S., Park, Y. H. and Kim, S. (2008) Composition and cytotoxicity of essential oil extracted by steam distillation from horseweed (*Erigeron canadensis* L.) in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 55-59.
6. Lee, T. B. (2003) Coloured flora of Korea. vol. 2. Hyangmun-sa, pp. 112.
7. Lee, Y. S. (2006) Development of aroma oil from Gangwon native plants. MSc Thesis, Kangwon National University.
8. Acree, T. E. (1997) GC/olfactometry. *Anal. Chem. News Features.* **68**, 170-175.
9. Lee, M. J., Lee, Y. B., Yang, J. Y., Kwon, H. S., and Yoon, J. (1998) Isolation and identification of volatile compounds extracted from twigs of *Pinus densiflora* with Lickens-Nickerson apparatus. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 568-573.
10. Isadora, V. A., Vinogorova, V. T., and Rafalowski, K. (2003) HS-SPME analysis of volatile organic compounds of coniferous needle litter. *Atmospheric Environ.* **37**, 4646-4650.