

기체크로마토그래피에 의한 한국산 배초향의 정유 분석과 Cholinesterase 억제활성

최재수¹ · 송병민² · 박희준^{3*}

¹부경대학교 식품영양학과, ²상지대학교 산림과학과, ³상지대학교 제약공학과

Gas Chromatographic Analysis and Cholinesterase Activity of the Essential Oil from Korean *Agastache rugosa*

Jae Sue Choi¹, Byong-Min Song² and Hee-Juhn Park^{3*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 607-737, Korea

²Department of Forest Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

³Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – The herb of *Agastache rugosa* (Lamiaceae) called Korean mint as a spice or Agastache Herba as a crude drug is known to contain highly fragrant volatile substances. This research aimed to establish the quantitative gas chromatography (GC) method on the essential oil of *A. rugosa* using the three standard compounds, estragole, methyleugenol, pulegone, and to find whether the essential oil has anti-Alzheimer's activity. The GC quantification method was established by determining the linearity of calibration curve (R^2), linear range, and both limit-of-detection (LOD) and limit-of-quantification (LOQ). The IC_{50} of the essential oil on the activities of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) were determined to be 69.06 ± 0.26 and 76.71 ± 0.58 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Key words – *Agastache rugosa*, Lamiaceae, Essential oil, Gas chromatography, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase

최근 전세계적으로 2500만 이상의 인구가 치매를 앓고 있으며, 그 중 다수가 Alzheimer's disease에 따른 것이다.¹⁾ 뇌 조직 중 amyloid β -protein(A β)의 증가가 AD 질환에서 인지 기능 감소의 initiator 역할을 하며,²⁾ 이 질환의 진행에는 신경염증(neuroinflammation),³⁾ 산화적 스트레스의⁴⁾ 과정이 주로 관계되고 있다. 최근에는 식물 정유로부터 menthol의 인지 기능 강화 효과,⁵⁾ Amyloid- β 로 유도된 동물 모델에서 *Zataria multiflora* 정유의 인지 기능 회복,⁶⁾ Alzheimer 질환 치유와 관련있는 *Salvia chionantha*의 정유에 의한 항산화 작용과 anti-cholinesterase 작용 등과⁷⁾ 같은 보고가 있기 때문에 정유로부터 인지 기능 강화를 모색하는 연구가 활발하다고 할 수 있다. 그 외에도 정유의 기타 약리작용으로 현재까지 항박테리아 및 항진균 작용^{8,9)} 살충 작용,¹⁰⁾ larvicidal,¹¹⁾ nematicidal 작용¹²⁾ 등의 다양한 생물활성이 보고되고 있다.

Acetylcholine은 뇌내에서 기억에 필요한 신경전달물질로, 치매 질환의 하나인 알츠하이머 질환은 이것의 부족에 따라 기억 장애가 일어나는 질환이다. 그러므로 acetylcholinesterase(AChE) 및 butyrylcholinesterase(BChE) 억제제는 뇌내 ACh를 증가시키므로 이러한 화합물을 식물로부터 검색하여 알츠하이머 질환 치료약물로 개발하려는 사람이 있다.¹³⁾ 그 뿐 아니라 AChE 억제 효과를 나타내는 합성의약품 rivastigmine이 임상적으로 알츠하이머 질환에 유효하다는 보고도 있다.¹⁴⁾ 그러므로 본 연구에서는 Korean mint라 불리는 배초향 정유를 이용하여 알츠하이머 질환의 완화에 이용될 수 있는지를 연구하기 위하여 AChE와 BChE에 대한 저해작용을 연구하였다.

배초향은 꿀풀과(Lamiaceae=Labiatae)에 속하는 다년생 초본식물로서 그 전초는 한방에서 곽향(Agastache Herba)으로 불린다. 또 배초향은 Korean mint로 알려져 있고 향기가 매우 강한 식물이며, 한방에서 곽향은 오심, 구토, 장관질환 등 치료에 사용되어 왔다.¹⁴⁾ 배초향의 정유 성분으로서 estragole(methylchavicol), pulegone, eugenol, methyleugenol

*교신저자(E-mail): hjpark@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0564

등과 같은 성분이 보고되고 있고, 그 성분의 함량은 나라마다 큰 차이가 있다고 한다.^{15,16)} Charles 등은¹⁶⁾ estragole이 46.7-94.6%을 차지한다고 밝힌 바 있고, Li 등은¹⁴⁾ 오히려 methyleugenol이 정유 중 약 50.5%를 차지한다고 밝힌 바 있다.

Korean mint로 세계적으로 알려진 배초향의 정유를 분석하고 그 주요 화합물을 이용한 인지기능 강화효과를 증명한다면, 배초향 정유를 이용하여 인지기능 향상을 위한 향료로서의 중요성을 나타낼 수 있을 것이다. 그러므로, 본 연구에서는 배초향에서 함유되어 있다고 알려진 estragole, pulegone, eugenol, methyleugenol의 표준 화합물을 이용하여 그 절대함량을 측정하였고, AChE와 BChE의 활성에 대한 억제효과를 측정하였다. 본 연구에서는 gas chromatography 분석시 표준품으로 검량선을 작성하고 그 절대함량을 측정하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - 시료는 HP6890 GC(Agilent technologies, USA)와 HP-7683 auto-sampler(Agilent technologies, USA)로 장착된 MSD 5975N (Agilent technologies, USA)과 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 HP-5MS(30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)이었다. Estragole, pulegone, eugenol, methyleugenol의 4종의 시료는 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 분석에 사용하였다. 그 화합물 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

식물재료 - 한국의 강원도 원주에 소재한 천일약업사에서 한국산으로 표시된 곱향(Agastache Herba)을 구입하였다. 이 식물은 상지대학교 산림과학과 송병민 교수에 의해 배초향(Agastache rugosa, Lamiaceae)으로 동정되었고, 이를 충분

히 건조하여 사용하였다. 이 식물의 표본은(natchem-76) 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

정유의 추출: 배초향 300 g을 정유 추출장치에서 3시간 동안 수증기 증류하여 증류물을 얻었다. 이를 diethyl ether로 3회 분획한 다음 Na₂SO₄로 탈수하고 대기압에서 건조시켜서 배초향 정유를 얻었다. 여기서 얻은 정유는 11.3 mL였으며, 평량하였을 때 9.78 g으로 나타나 밀도는 0.865 g/mL로 계산되었다.

표준액과 검액의 제조: 배초향에서 얻은 정유를 평량하고 acetonitrile에 희석하여 표준 화합물 4종(estrageole, pulegone, eugenol, methyleugenol)을 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 농도로 제조하여 검량선 작성을 위한 표준액으로 사용하였다. 내부 표준물질(internal standard)로서 1,4-dimethoxybenzene를 동일한 용매로 5 mg/L 농도를 제조하여 사용하였다. 검액으로서 배초향 정유를 acetonitrile 용매로 20배 희석하여 분석에 사용하였다. 각 농도의 표준액 및 배초향 정유 20배 희석액 40 μL와 내부 표준물질 용액 40 μL를 합하여 총 80 μL를 바이알에 담고 GC-MS에 injection하였다.

Gas Chromatography-mass Spectroscopy(GC-MS)의 측정 - Injection port temperature는 250°C였으며, injection mode는 splitless mode이었고, injection 부피는 1 μL이었다. Carrier gas로서 helium을 1.0 mL/min의 일정한 속도로 흐르게 하였다. 컬럼온도는 프로그램화 하여 승온하는 방법을 사용하였다. 초기에 60°C로 1분간 유지하였으며, 그리고 나서 20°C/min로 130°C까지 승온하였다. 계속하여 5°C/min로 190°C까지 승온하고, 다음으로 20°C/min로 240°C까지 승온한 후 최종온도에서 1분간 유지하였다. 전자충격법(electron impact mode)을 사용한 이온화에너지는 70 eV이었으며, transfer line temperature는 280°C이었다. 그리고, solvent delay time은 2분이었다. Mass spectrometer(MS)는 scan mode로 수행했고, acquisition mode는 40-500 m/z이었다. 분자의 동정은 그 mass spectrum을 내부 라이브러리(Wiley 10th version)을 이용하거나 표준 화합물과 비교하여 확정하였다.

검량선을 작성하기 위하여, GC chromatogram을 얻고 검량선 작성시 내부 표준 화합물의 피크 면적에 대비한 표준 화합물의 피크 면적의 비(y 축)를 factor로 하고, 이를 농도(x 축)에 대해 플롯하여 방정식을 얻었다. Retention time은 GC 측정시 기록하였으며 retention index(RI)는 Kovats equation을 이용하여 구하였다.

Cholinesterase 억제활성 - Cholinesterase 억제활성은 Ellman 등의¹⁷⁾ 방법을 약간 변형하여 측정한다. 즉, ACh과 BCh을 기질로 이용하는 AChE와 BChE의 억제활성을 측정하였다. 100 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0) 140 μL, 시료 20 μL와 AChE(0.36 U) 혹은 BChE(0.36 U) 20 μL를

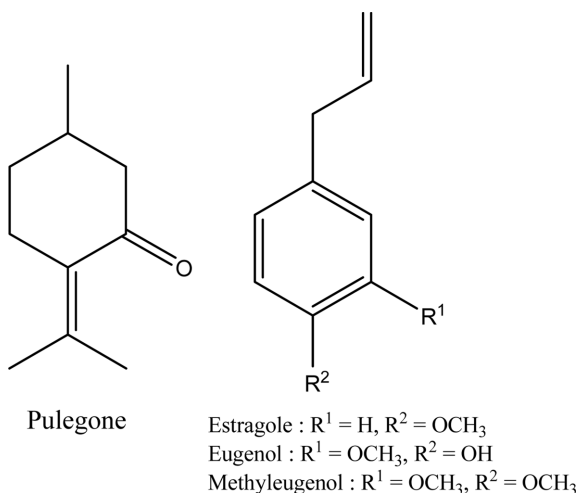


Fig. 1. Structure of pulegone, estragole, eugenol, methyleugenol.

각각 96 well microplate에 넣고 실온에서 15분간 배양한 후에 10 μ l의 DTNB[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 기질인 ACh 혹은 BCh 10 μ l를 넣어 최종적으로 반응액이 200 μ l이 되도록 96 well plate에 넣었다. 이때, DTNB와 기질인 ACh 혹은 BCh를 넣어야 효소반응이 시작되고, ACh 혹은 BCh이 효소적 가수분해에 의해 생성되는 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성되는 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate anion을 microplate reader VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 412 nm에서 15분 후 측정하였다. 각각의 측정 시료의 cholinesterase 억제활성을 IC₅₀ value로 나타내며 이는 기질인 ACh과 BCh의 가수분해를 50% 억제하는 농도를 μ g/ml로 나타낸 값으로 나타낸다. Cholinesterase 억제 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{con}})/A_{\text{std}}] \times 100$$

여기서, A_{sample}는 측정시료를 넣었을 때의 흡광도, A_{con}은 측정시료를 넣고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도, A_{std}는 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도이다.

결과 및 고찰

총 7개 농도로 4종 표준 화합물 용액을 제조하여 GC-MS 측정한 결과를 이용하여 그 검량선을 작성할 수 있었으며, 그들의 slope와 y-intercept를 Table I에 나타내었다. 여기서 y 축은 내부 표준 화합물의 피크 면적에 대비한 표준 화합물의 피크 면적의 비이며, x 축은 표준액의 농도이다. 4종 표준 화합물 모두 R²가 0.9990이상으로 나타나 직선성이 매

우 양호하였으며 직선구간도 모두 2-100 mg/L로 나타났다. 검출한계는 0.5-1.0 mg/L이었으며 정량한계가 2 mg/L로 나타나 감도 또한 양호한 것으로 확인되었다(Table I). 그리고, 표준액과 검액의 TIC(Total ion chromatogram)과 EIC(Extracted ion chromatogram)을 각각 Fig. 2에 나타내었다.

내부 표준물질인 1,4-dimethoxybenzene은 retention time이 4.63 min에 나타나고, 3종의 표준 화합물 estragole, pulegone, methyleugenol은 정유의 10배와 20배 희석액에서도 확인되어 그 retention time이 4.96 min, 5.50 min, 7.76 min 순으로 나타났다. 그러나, 표준 화합물 eugenol은 정유를 2배 희석한 고농도에서도 확인되지 않음으로써, 이 화합물은 배초향 정유에서는 극미량 이하라 할 수 있다. 또한, 3종 표준 화합물의 retention index(RI)도 함께 Table II에 나타내었다. Estragole은 정유 중 3870.7 mg/L으로 매우 고함량으로 나타나는 반면에, 다른 화합물은 이보다 함량이 훨씬 낮았다. 또, Table II에 μ g/g dry weight 단위로도 계산하여 나타내었다.

Li 등은¹⁵⁾ 배초향 정유 중 methyleugenol이 주요 화합물이라 한 반면에, Charles 등은¹⁶⁾ estragole(=methylchavicol)이 주 물질이라 하였다. 본 연구결과로부터 한국산 배초향의 주요 화합물이 estragole로 확인되었으므로 Charles 등의¹⁶⁾ 실험결과와 잘 일치하였다. 그러므로, 배초향 정유는 estragole이 주 효능 물질로 작용할 것으로 예측된다. 그리고, 한국산 배초향에는 eugenol은 확인되지 않고 methyleugenol이 나타났다.

Table III을 보면 배초향 정유는 AChE에 대한 IC₅₀가 69.06 μ g/ml로 나타났다. 그리고 BChE에 대한 억제활성은

Table I. Linearity of standard curves and detection/quantification limits for the standard compounds

Analyte	Liner range (mg/L)	Slope	y-Intercept	R ² range	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Estragole	2 - 100	0.1327 \pm 0.00625 ^a	0.0459 \pm 0.02523 ^a	0.9990 - 0.9994	0.5	2
Pulegone	2 - 100	0.0736 \pm 0.00344	0.0119 \pm 0.01019	0.9991 - 0.9998	0.5	2
Eugenol	2 - 100	0.1011 \pm 0.01397	0.1127 \pm 0.03368	0.9990 - 0.9994	1.0	2
Methyleugenol	2 - 100	0.1448 \pm 0.01458	0.0699 \pm 0.05326	0.9992 - 0.9998	0.5	2

The data were prepared by triplicate experiment (n=3).

^aData represent mean \pm SD

Table II. Content of analytes in the essential oil of *A. rugosa*

Analyte	Retention time (min)	RI	Content	
			mg/L essential oil	μ g/g dry weight
Estragole	4.96	1207	3871 \pm 33.8	148 \pm 1.73
Pulegone	5.50	1254	179.1 \pm 3.80	6.74 \pm 0.16
Eugenol	7.10	1369	ND	ND
Methyleugenol	7.76	1409	134.1 \pm 3.35	5.05 \pm 0.16

ND (not detected)

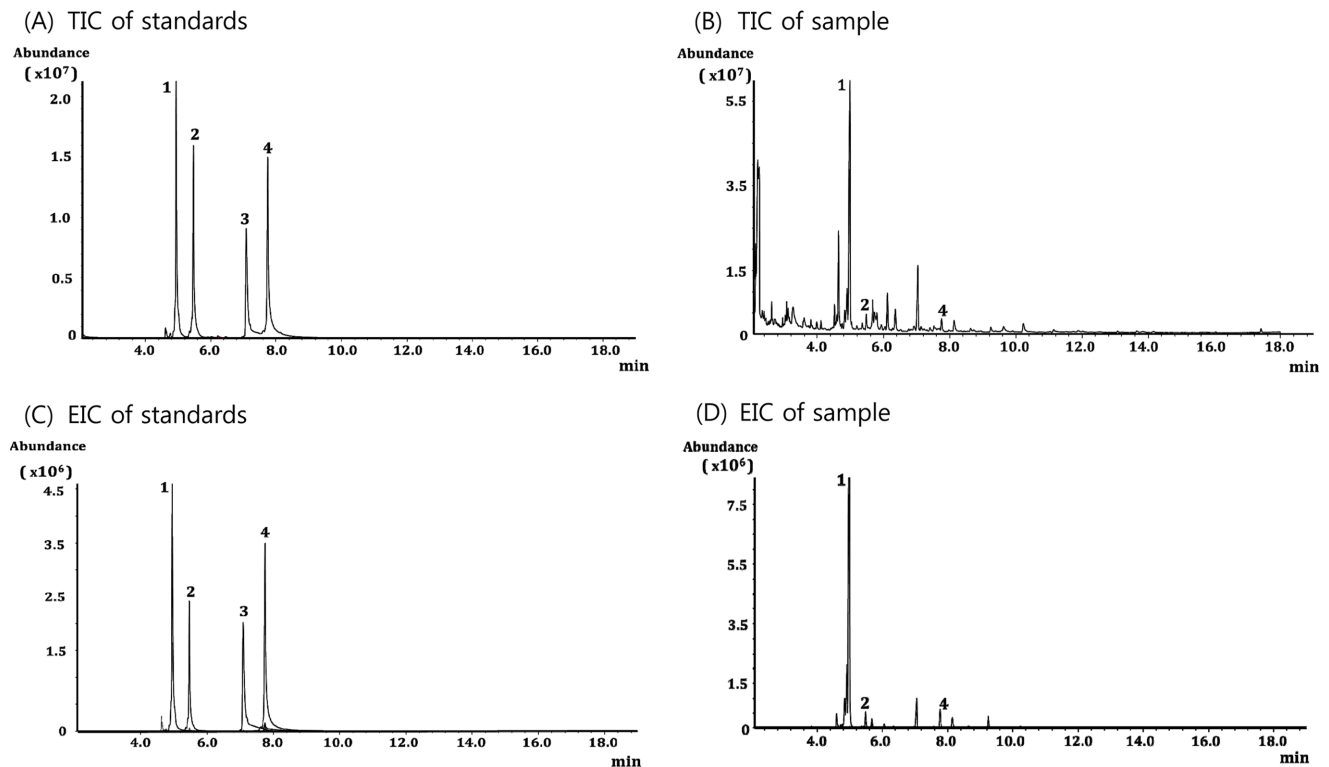


Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) and extracted ion chromatogram (EIC) of standards and sample. 1 (estragole), 2 (pulegone), 3 (eugenol), 4 (methyleugenol). An internal standard (1,4-dimethoxybenzene) was shown at 4.63 min.

Table III. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) values of the essential oil of *A. rugosa* on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activities

Treatment	Essential oil	Berberine
AChE	69.06 ± 0.26	0.14 ± 0.001
BChE	76.71 ± 0.58	3.66 ± 0.02

76.71 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이 IC_{50} 값은 양성 대조군으로 이용된 berberine의 값과 비교해 볼 때 매우 높은 값이다. 그러나 정유는 휘발성일 뿐 아니라 berberine과는 다른 향기성 화합물로서 인지능 개선의 가능성이 있다. 그러므로 배초향 정유는 cholinesterase 작용의 억제에 따라 뇌내에서 ACh의 분해를 막아 그 농도가 증가할 것으로 예측된다. 이에 따라 알츠하이머 질환에 따른 기억력 저하를 막을 수 있을 것으로 예상된다. 배초향 정유의 cholinesterase에 대한 저해활성을 비롯한 중추신경계(CNS)에 대한 활성은 보고된 적이 없다. 이 식물에 함유된 methyleugenol은 흰쥐에서 항우울효과를 나타낸다고 보고된 적이 있다.¹⁸⁾ Methyleugenol과 관련된 화합물인 eugenol은 중추에 대한 효과로서 마취작용과,¹⁹⁾ 당뇨병 흰쥐에서 AChE 활성이 감소되는 현상이 보고된 바 있으나,²⁰⁾ 본 분석결과를 통해 배초향 정유 중 eugenol 성

분은 밝혀지지 않았다.

Seo 등이²¹⁾ Apiaceae 정유의 AChE 억제활성과 그 구성 화합물의 효과를 밝힌 바에 따르면, AChE에 대한 IC_{50} 로서 carvacrol이 57 $\mu\text{g/ml}$, α -pinene이 62 $\mu\text{g/ml}$, β -pinene이 190 $\mu\text{g/ml}$ 로 밝혀진 바 있으므로 그 활성수준을 서로 비교해 볼 수 있다. 그러므로, 본 연구를 통해 배초향 정유는 그것의 AChE와 BChE에 대한 억제활성에 따라 기억력 증강을 위한 목적으로 사용될 수 있을 것이다.

결론

꿀풀과에 속하는 배초향(*A. rugosa*) 전초는 생약 곱향의 기원식물로 이용되기도 하고, 강한 향을 나타내기 때문에 향신료로도 이용된다. 본 연구는 배초향 정유에 대하여 그 표준 화합물 estragole, methyleugenol, pulegone을 이용하여 기체크로마토그래피(GC)에 의한 분석법을 확립할 뿐 아니라 알츠하이머 질환에 유효한가를 확인하는 것을 목적으로 하였다. GC 정량법은 검량선의 직선성(R^2), 직선범위 및 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 결정함으로써 확립되었다. 또, 배초향 정유의 AChE와 BChE에 대한 저해활성은 각각 69.06 ± 0.26 와 76.71 ± 0.58 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 알츠하이머 질환에 유효할 것으로 기대되었다.

인용문헌

1. Qiu, C., Kivipelto, M. and von Strauss, E. (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* **11**: 111-128.
2. Rodrigue, K. M., Kennedy, K. M. and Park, D. C. (2009) Beta-amyloid deposition and the aging brain. *Neuropsychol. Rev.* **19**: 436-450.
3. Akiyama, H., Barger, S. and Barnum, S. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**: 383-421.
4. Moreira, P. I., Duarte, A. I., Santos, M. S., Rego, A. C. and Oliveira, C. R. (2009) An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **16**: 741-761.
5. Bhadania, M., Joshi, H., Patel, P., Venkatrao, H. and Kulkarni, V. H. (2012) Protective effect of menthol on β -amyloid peptide induced cognitive deficits in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **681**: 50-54.
6. Majlessi, N., Choopani, S., Kamalinejad, M. and Azizi, Z. (2012) Amelioration of Amyloid β -Induced Cognitive Deficits by *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil in a rat model of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. & Ther.* **18**: 295-301.
7. Tel, G., Öztürk, M., Duru, M. E., Harmandar, M. and Topçu, G. (2010) Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 3189-3193.
8. Wang, J. H., Zhao, J. L., Liu, H., Zhou, L., Liu, Z. L., Han, J. G., Zhu, Y. and Yang, F. Y. (2010) Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two Valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules* **15**, 6411-6422.
9. Wang, J. H., Xu, L., Yang, L., Liu, Z. L. and Zhou, L. Composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from *Ligusticum sinense* and *L. jeholense* (Umbelliferae) from China. *Rec. Nat. Prod.* **2011**: 314-318.
10. Chu, S. S., Hu, J. F. and Liu, Z. L. (2011) Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activities to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest. Manag. Sci.* **67**: 714-718.
11. Liu, Z. L., He, Q., Chu, S. S., Wang, C. F., Du, S. S. and Deng, Z. W. (2012) Essential oil composition and larvicidal activity of *Saussurea lappa* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **110**: 2125-2130.
12. Bai, C. Q., Liu, Z. L. and Liu, Q. Z. (2011) Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* aerial parts. *E-J. Chem.* **8**: 143-148.
13. Luo, W., Chen, Y., Wang, T., Hong, C., Chang, L. P., Chang, C. C., Yang, Y. C., Xie, S. Q. and Wang, C. J. (2016) Design, synthesis and evaluation of novel 7-aminoalkyl-substituted flavonoid derivatives with improved cholinesterase inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem.* **24**: 672-680.
14. Lai, T. S., Wang, W. F., Yip, B. S., Yang, Y. W., Peng, G. S., Tsai, S. J., Liao, Y. C. and Pai, M. C., (2016) Real-world evaluation of compliance and preference in Alzheimer's disease treatment: an observational study in Taiwan. *Patient Pref. Adherence* **10**: 383-390.
15. Li, H. Q., Liu, Q. Z., Liu, Z. L., Du, S. S. and Deng, Z. W. (2013) Chemical composition and nematicidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. *Molecules* **18**: 4170-4180.
16. Charles, D. J., Simon, J. E. and Widrechner, M. P. (1991) Characterization of essential oil of *Agastache* species. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1946-1949.
17. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
18. Norte, M. C. B., Cosentino, R. M. and Lazarini, C. A. (2005) Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety in rats. *Phytomedicine* **12**: 294-298.
19. Goulet, F., Hélie, P. and Vachon, P. (2010) Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights, *J. Am. Ass. Lab. Animal Sci.* **49**: 460-463.
20. Prasad, S. N., Bharath, M. M. and Muralidhara (2016) Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dysfunctions in the streptozotocin diabetic rat. *Neurochem Int.* **95**: 24-36.
21. Seo, S. M., Jung, C. S., Kang, J., Lee, H. R., Kim, S. W., Hyun J. and Park, I. K. (2015) Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* and formulation development. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 9977-9986.

(2016. 5. 20 접수; 2016. 6. 16 심사; 2016. 6. 17 게재확정)