

꽃향유 전초의 향기성분 분석과 생리활성 평가

정재훈 · 임흥빈*

충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(2005. 7. 12. 접수, 2005. 10. 24 승인)

The chemical composition and biological activities of volatile flavor components of *Elsholtzia splendens*

Jae Hoon Jeong and Heung Bin Lim*

Department of Industrial Plant Science, College of Agriculture, Life & Environment Science,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received July 12, 2005, Accepted October 24, 2005)

요 약 : 향료자원 꽃향유 전초의 향기성분 essential oil, absolute 및 oleoresin을 추출 분리 동정하고, 지질 과산화 억제, 세포독성, 돌연변이유발성 및 거담효과 등의 생리활성을 측정하였다. 꽃향유 전초의 essential oil 수율은 0.28%이었으며, 2-cyclohexen-1-one이 26.81%와 elsholtzia ketone이 13.46%로 가장 많이 함유되어 있었다. 꽃향유 전초의 absolute의 수율은 12.45%이었으며, methyl linolenate가 12.38%이었고, palmitic acid 9.47% 비율로 존재하고 있었다. 꽃향유 전초의 oleoresin의 수율은 9.95%이었으며, 9,12,15-octadecatrienoic acid가 22.15%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었다. 세 방법의 지질과산화 억제활성 시험에서 200 µg/ml 처리했을 때 꽃향유전초의 essential oil과 oleoresin은 지질과산화를 잘 억제하였으나, absolute는 거의 억제하지 못하였다. 꽃향유 전초의 oleoresin은 24시간에서 EC₅₀값이 17.6 µg/ml로 고농도에서만 약간의 세포독성이 있으며, absolute와 oleoresin은 고 농도에서도 돌연변이 유발성과 항균성이 나타나지 않았으나 essential oil은 500 µg이상 처리 시 돌연변이 유발성 뿐만 아니라 항균성도 있는 것으로 나타났다. 꽃향유 전초의 essential oil과 oleoresin은 약간의 거담 효과는 있을 것으로 판단된다.

Abstracts : This study was conducted to investigate the chemical composition of essential oil, absolute and oleoresin isolated from *Elsholtzia splendens* and their biological activities. Yields of essential oil, absolute and oleoresin extracted from *Elsholtzia splendens* were 0.28%, 12.45% and 9.95%, respectively. The major component was 2-cyclohexen-1-one in essential oil, methyl linolenate in absolute and 9,12,15-octadecatrienoic acid in oleoresin. Essential oil and oleoresin showed the inhibitory activities in enzyme-dependent, enzyme-independent and autooxidative lipid peroxidation system. EC₅₀ values in neutral red uptake (NRU) assays for the exposure times of 24 h were 46.4 µg/ml, 681.7 µg/ml and 17.6 µg/ml in essential oil, absolute and oleoresin, and oleoresins showed the cytotoxic effect at the only high dose. Any mutagenic and antibiotic activity did not show in absolute and oleoresin, but, there were mutagenic and antibiotic activities only when treated with

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-261-2521 Fax : +82-(0)43-276-1030

E-mail: heungbin@chungbuk.ac.kr

essential oil 500 µg/ml above in Ames test. Essential oil and oleoresin might be somewhat effective in prolongating the ciliostasis of rat trachea.

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

1. 서 론

방향요법(aromatherapy)은 식물이 갖는 독특한 향의 약리작용을 이용하여 정신적, 정서적 장애를 완화하고 이를 통해 이차적인 신체활성을 꾀하는 요법이다. 이 요법은 자연의학의 한 부분으로서 1970년에 등장하여, 향료산업의 발달과 함께 1990년대에 새로이 각광을 받기 시작하였으며 최근에는 하나의 치료법으로 자리잡고 있다. 또한 식물자원을 이용한 기능성 향료소재 개발은 부가가치가 높을 뿐만 아니라 추출, 분리 및 정제, 정밀 분석기술, 합성기술과 조향 기술 및 생리활성 검증 등이 복합적으로 관련된 정밀화학의 한 분야로 식품, 의약, 화학공업 등 타 산업과 연관성이 많아 과급효과가 크다고 알려지고 있다.^{1,3}

한편 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)는 자생 향료자원으로서 향은 강하고 특이한 방향을 내는 1년생 식물로서 향유(*E. ciliata*)와 생육 습성이 비슷하며, 우리나라 전국 산야에서 흔히 볼 수 있고 9~10월 과실 성숙기에 채취하여 한방에서 전초를 말려 사용한다. 예로부터 꽃향유는 복통 및 설사 때 백편두와 배합하여 사용하고 거담 효과는 물론 이뇨작용, 해열발한작용, 진신부종, 지혈 등에도 효과가 있다고 알려지고 있다.⁴ 30~60 cm정도 자라며 줄기는 사각형이고, 잎은 대생하며 장방형 또는 장추원형으로 끝이 뾰족하고 톱니가 있다. 8~9월에 적자색 꽃이 피며 과실기는 10월이다. 국내에서 자생하는 향유속(*Elsholtzia*)에는 향유(*Elsholtzia ciliata*), 꽃향유(*Elsholtzia splendens*) 애기향유(*Elsholtzia saxatilis*), 가는 잎향유(*Elsholtzia angustifolia*), 흰꽃향유(*Elsholtzia splendens* Nakai) 등이 있으며, 한약재로서 꽃향유와 향유의 지상부가 한약재로서 사용되고 있다.⁴

한편 향유속 식물에 관한 연구는 야생 향유의 꽃, 잎, 줄기 등에 함유된 정유성분 비교 및 조직배양 조건을 달리하여 정유성분을 비교하였고,⁵ 자생 향유를 관상용 화훼로서의 이용가능성을 조사하였으며,⁶ 추출방법을 달리하여 향유의 정유성분을 비교하였고,⁷ 식품 향신료로서 이용하기 위하여 꽃향유 향미유의 관능검사 및 향미 패턴을 비교⁸ 등이 보고되고 있다. 또한 uniconazole 처리가 향유와 꽃향유의 정유성분에 미치는

영향을 조사하였으며,⁹ 온도 및 일장 조건이 꽃향유의 '자향'의 생장과 개화에 미치는 영향을 조사하였고,¹⁰ 적심과 단일처리가 분식 향유와 꽃향유의 생육, 개화에 미치는 영향을 조사하여 보고하고 있다.¹¹ 그리고 중금속으로 오염된 토양에서 꽃향유의 성장률과 구리의 흡착능 비교,^{12,13} 꽃향유의 항염증효과¹⁴와 향유의 향기성분 분석 및 생리활성 검증¹⁵이 최근에 보고되고 있다. 그러나 국내에서 자생하는 꽃향유 전초의 향기성분을 분석하고 그 안전성 및 생리활성을 검증한 예는 거의 없다.

따라서 본 연구는 우리나라 야지에서 흔히 볼 수 있고 한약재로서 사용되고 있는 꽃향유 전초의 향기성분을 essential oil, absolute 및 oleoresin으로 구분하여 추출, 분리, 동정하고, 지질과산화 억제, 세포독성, 돌연변이유발성 및 거담효과 등의 생리활성을 측정하여 담배 및 식품, 의약품, 음료 등의 산업에 향료자원으로서의 활용을 위한 기초 자료를 확보하는데 그 목적이 있다.

2. 실험

2.1. 재료

본 실험에서 사용한 꽃향유(*Elsholtzia splendens*) 전초는 대전대학교 한의과대학 본초학교실의 자문하에 청주 소재 한약전재상에서 구입하였다. 품질이 양호한 것만 선별하여 구입한 두 시료를 분쇄기로 미세하게 분쇄하고 100 mesh 체로 거른 다음 80°C oven에서 48시간 건조시키고 추출 시료로 사용하였다.

2.2. 향기성분 추출 및 분석

2.2.1. Essential oil

정유성분을 추출하기 위하여 건조하고 분쇄된 시료 100 g을 3 l 플라스크에 넣고 증류수 2 l를 가한 다음 Schultz 등의 방법¹⁶에 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 무수 황산나트륨으로 탈수시킨 다음 30°C 이하에서 회전감

압 농축장치를 이용하여 감압농축한 후 N₂ gas로 완전 농축하고, 분석은 농축시료를 diethyl ether로 희석하여 완전히 용해한 후 사용하였다.

2.2.2. Absolute

건조하고 분쇄된 시료 200 g을 3 l 삼각 플라스크에 넣고 추출용매로 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, 분석은 농축시료를 diethyl ether로 희석하여 완전히 용해한 후 사용하였다.

2.2.3. Oleoresin

건조하고 분쇄된 시료 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 분액갈대기에 넣고 diethylether : distilled water(DW) 혼합용액(1:1, v/v) 200 ml를 가한 후 유기층을 분리하였다. 추출한 용매층을 30°C에서 회전감압농축장치를 이용하여 농축한 다음 N₂ gas로 완전 농축하고, 분석은 diethyl ether로 희석하여 완전히 용해한 후 사용하였다.

2.2.4. 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. GC분석은 supelcowax fused silica capillary(60 m×0.25 mm×0.32 μm)를 사용하였으며, GC-MS는 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. Injector와 detector 온도는 250°C로 하였고, carrier gas는 He gas를 사용하여 flow rate 0.5 ml/min로 split mode(split ratio =100:1)에 주입하였으며, ion source temperature는 230°C로 transfer line temperature는 250°C로 하였고, mass selective detector의 ionization voltage는 70 eV로 하였다. 성분동정은 GC-MS 분석에서 얻어진 mass spectrum을 Wiley 275/NIDS library를 통하여 HP-5970 Chemstation data system에서 검색 동정하였다.

2.3. 지질과산화 보호효과 측정

2.3.1. 흰쥐 간 microsome분획 조제

Bansal 등의 방법¹⁷에 따라 microsome 분획은 웅성 sprague-dawley(S. D.) rat(200-220 g)으로부터 간을 분리하여 0.150 M KCl, 0.03 M Hepes 완충용액(pH 7.4)을 35 ml 첨가한 후 균질화시키고, 11,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 그 상등액을 분취하여 38,000 rpm에서 1시간 원심분리한 다음 pellet에 완충용액 7 ml를 첨가하여 균질화시키고 vial에 1 ml씩 분취하였다. 분획된 간 microsome은 Lowry 등의 방법¹⁸에 따라 단백질을 정량하였으며, 사용할 때까지 -80°C deep freezer에 보관하였다.

2.3.2. Ox-brain homogenate 조제

충청북도 가축위생 시험연구소에서 ox-brain을 취한 다음 blood pellet을 제거하기 위하여 생리식염수용액으로 세척하고, 무게를 달아 0.142 M NaCl을 포함한 0.04 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.4)을 1:4비율로 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 등의 방법¹⁸에 따라 실시하였다.

2.3.3. 비효소적 지질과산화 억제 검정

꽃향유 건조에서 분리한 essential oil, absolute와 oleoresin의 비효소적 지질과산화 억제검정은 Wong 등의 방법¹⁹에 준하여 실시하였다. Free radical generator로는 AAPH[2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine)·2HCl]을 사용하였으며 지질의 source로는 웅성 흰쥐 간 microsome 분획을 사용하였다. 즉 웅성흰쥐 간 microsome을 단백질 base로 4 mg/ml로 희석하고, 0.5 M AAPH 200 μl, essential oil, absolute, oleoresin 각각 200 μg/ml되도록 가한 다음, 37°C, 100 rpm에서 1시간 동안 반응시켰다. 상등액 0.134 ml에 20% acetic acid 1 ml, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.15 ml, DW 0.015 ml, 1.2% tiobarbituric acid(TBA) 0.666 ml를 첨가한 후 vortexing하고 끓는 물속에서 30분간 방치하여 발색시켰다. 온도를 실온까지 내린 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 상등액으로 532 nm에서 분광광도계(Beckman DU700)로 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 시료를 녹인 용매인 ethanol을 처리하여 공시료로 사용하였다. 비효소적 지질과산화 억제활성 검정결과는 다음 식으로부터

inhibition(%)을 계산하였다.

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

2.3.4. 효소적 지질과산화 억제검정

효소적 지질과산화 억제검정은 Pederson과 Aust의 방법²⁰에 준하여 실시하였다. 지질의 source는 웅성 흰쥐 간 microsome 분획을 사용하였다. 즉, 단백질 base로 2 mg/ml microsome 250 µl에 최종 농도 0.005 M adenosine 5-diphosphate(ADP), 0.0002 M Fe⁺⁺의 ADP-Fe⁺⁺용액을 67 µl 첨가하고, 0.001 M, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(NADPH) 133 µl, 증류수 217 µl, 시료농도가 200 µg/ml이 되도록 첨가한 후 37°C, 100 rpm에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 시료 67 µl를 취한 후 20% acetic acid 1 ml, 8.1% SDS 0.15 ml, DW 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 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소적 지질과산화 억제활성 검정결과는 inhibition(%)으로 계산하였다.

2.3.5. 자동산화 억제활성 검정

자동산화 억제활성 검정은 Stocks 등의 방법²¹에 준하여 Incubation system으로 하고, 지질의 source는 ox-brain homogenate를 사용하였다. 단백질 1 mg/ml로 희석한 ox-brain 2.4 ml에 시료를 200 µg/ml의 농도가 되도록 처리한 후 60분간 water bath(37°C, 100 rpm)에서 자동산화시켰다. 산화된 시료에 28% trichloroacetic acid(TCA) 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 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자동산화 억제활성 검정결과는 inhibition(%)으로 계산하였다.

2.4. 세포독성 평가

Babich와 Borenfreund의 방법²²을 이용하여 세포주로 BALB/c 3T3 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 분주하여 5% CO₂, 95% air, 상대습도 포화상태인 37°C incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하여 배양하였으며, 대조군은 dimethyl

sulfoxide(DMSO) 1.6% 시료는 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 µl/ml of medium으로(최종 DMSO 농도를 1.6%로 맞추는)시료 당 반복수를 8 well/plate하였다. 시료를 24시간 노출시킨 후 Neutral red uptake 정도를 측정하였다. dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)로 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 대조군(1.6% DMSO 처리군)의 neutral red uptake(NRU)를 100%로 하여 상대적인 값으로 표기하였으며, 회귀분석을 하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.

2.5. 돌연변이 유발성 조사

꽃향유 전초의 essential oil, absolute와 oleoresin 추출물을 DMSO에 녹여 실험에 사용하였으며, 대조군(negative control)은 DMSO만을 사용하였다. 사용된 균주는 Salmonella TA 98 균주로서 한국생명공학연구원 부설 유전자센터에서 구입하였다. 균주의 형질확인인 Maron과 Ames의 방법²³에 준하여 histidine 요구성, rfa 돌연변이, uvr B 돌연변이 및 R-factor시험 등을 정기적으로 실시하였고, 균 배양액 1 ml에 DMSO 90 µl를 가하여 액체 질소 내에 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 0.001 M histidin/biotin solution 10 ml을 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(복귀변이 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.

2.6. 거담효과 측정

2.6.1. 기도조직 적출

기도조직의 적출은 Donnelly 등의 방법²⁴에 준하여 실

시하였다. 즉, 체중 200 mg의 웅성 흰쥐(S.D. rat)를 마취시킨 후 목 부위를 절개하여 조심스럽게 trachea를 적출하고, 횡단면으로 기도조직을 약 1 mm간격으로 잘라 5-7개의 ring 모양의 기도조직을 준비하여 멸균된 생리 식염수에 담그고 사용할 때까지 온도를 25°C로 일정하게 유지하였다.

2.6.2. 담배연기 포집

시험에 사용한 담배는 KT&G 제품 This이었다. 꽃향유 전초의 essential oil, absolute 및 oleoresin 추출물을 DMSO(1 mg/ml)에 녹이고 한개피 당 50 µg이 들어가도록 microsyringe를 이용하여 담배에 주입하고, 평형수분이 13%가 되도록 조화시킨 다음 담배를 연소하였다. 담배연기의 포집은 자동화된 smoking machine으로 30 개 피의 담배를 연소하고 얻은 전 연기를 gas washing bottle을 이용하여 생리식염수로 포집하였다. 이때 This담배의 시료선별은 권련무게는 960±10 mg, 공기회석율은 40±5%로 하였으며, 담배의 연소조건은 CORESTA 표준법에 따라 한 puff당 흡연시간은 2초, 흡입부피는 35 ml로 하였고 흡연주기는 1회 흡연당 60초로 하였다.

2.6.3. 섬모생존시간 측정

한 개의 기도조직의 ring을 다른 petri dish에 옮기고 위에서 포집한 담배연기용액 1.5 ml에 담근 후, TV monitor가 달려있는 독립현미경(Inverted microscope)으로 섬모운동을 관찰하고, 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.

3. 결과 및 고찰

3.1. 향기성분 분석

3.1.1. Essential oil

방향성 성분이 풍부하면서 거담효과가 있다고 알려져 있는 꽃향유 전초를 수집하여 SDE 추출장치로 추출한 essential oil의 수율은 0.28%이었다. 이와 같은 결과는 Jeong과 임이 보고¹⁵한 향유의 essential oil의 수율 0.34%보다는 적은 양이었다. 그러나 Chi 등⁵이 향유를 직접 재배하고 생엽을 재료로 하여 essential oil을 추출했을 때 수율은 꽃에서 1.50%와 잎에서 1.20% 그리고 줄기에서는 1.04%이었다. 꽃향유에서 GC에 의해 약 40 개의 성분이 분리되었으며, 이 중에서 GC/MS를 이용하여 28개의 성분이 동정되었다.

Table 1. Volatile compounds identified from essential oil of *Elsholtzia splendens*

Peak No.	R.T. (min)	Volatile compounds	Peak area (%)
1	18.48	Limonen	1.19
2	18.89	1,8-Cineole	0.29
3	26.78	3-Octanol	0.31
4	29.78	Copaene	0.34
5	31.32	α-Cubebene	0.75
6	32.50	β-Bourbonene	0.68
7	32.73	Camphor	0.80
8	33.35	Linalool	0.60
9	35.83	trans-Caryophyllene	2.20
10	36.40	cis-Dihydrocavone	0.48
11	37.20	Cyclohexanone	0.27
12	37.57	Elsholtzia ketone	13.46
13	38.21	Acetophenone	2.30
14	38.80	α-Humulene	3.43
15	39.28	δ-Cadinene	0.52
16	40.19	Germacrene d	0.63
17	40.55	Craveol	1.72
18	41.29	2-Cyclohexen-1-one	26.81
19	41.85	δ-Cadinene	0.77
20	42.01	α-Amorphene	0.30
21	46.33	Naginata ketone	5.26
22	50.11	Caryophyllene oxide	0.91
23	50.74	Methyl eugenol	0.31
24	54.03	2-Pentadecanone	1.37
25	54.33	Spathulenol	1.04
26	55.79	Eugenol	2.07
27	56.73	2-Methyl-5-vinylphenol	0.66
28	91.95	Palmitic acid	5.67

꽃향유 전초의 essential oil에서 GC/MS로 동정된 성분 결과는 Table 1에 나타내었다. Essential oil을 분석한 결과 ketone 화합물인 2-cyclohexen-1-one이 26.81%로 다른 성분에 비해 가장 많은 비율을 차지하였고, 그 다음은 elsholtzia ketone은 13.46%이었다. 또한 sweet, rose-like의 floral한 향 특성을 나타내는 naginate ketone은 5.26%이었으며, 향특성이, sweet, pungent, cherry-hey로 나타나는 acetophenone은 2.30%이었고, 꽃향유 전초에서도 향유 전초에서와 같이 유기화합물 중에서 ketone 화합물 비율이 상대적으로 높았다.¹⁵ 향유 전초에서는 monoterpene류 화합물이면서 powerful balsamic sweet note의 향 특성이 있는 rosfuran도 11.76% 함유하고 있었으나¹⁵ 꽃향유 전초에서는 거의 검출되지 않았고 장미과 주성분이면서 담배향료로서 사용되고 있으며 floral-soapy, green, musty 향 특성을 갖고 있는 geranial

Table 2. Volatile compounds identified from absolute of *Elsholtzia splendens*

Peak No.	R. T. (min)	Volatile compounds	Peak area (%)
1	18.58	Limonene	0.20
2	18.98	1,8-Cineole	0.51
3	19.84	Furan	0.16
4	24.26	2-Pentanal	0.13
5	30.42	2,4-Heptadienal	0.37
6	31.36	α -Cubebene	0.17
7	32.53	β -Bourbonene	0.50
8	33.30	Linalool	0.57
9	35.81	trans-Caryophyllene	2.18
10	36.38	cis-Dihydrocavone	0.18
11	37.17	Cyclohexanone	0.86
12	37.48	Elsholtzia ketone	4.25
13	38.70	α -Humulene	4.36
14	40.17	Germacrene d	1.27
15	41.29	2-Cyclohexen-1-one	2.20
16	46.17	Naginata ketone	8.66
17	50.12	Caryophyllene oxide	0.49
18	54.05	2-Pentadecanone	0.47
19	54.35	Spathulenol	0.44
20	56.82	Methyl palmitate	0.51
21	80.50	Linoleic acid	1.43
22	92.02	Palmitic acid	9.47
23	98.46	Methyl linolenate	12.38

은 향유에서 0.35% 존재하고 있었으나 꽃향유 전초에서는 검출되지 않은 것도 또한 매우 큰 특징이었다. 한편, 지방산이면서 waxy, sweet한 향 특성을 나타내는 palmitic acid도 5.67%이었으며, 레몬향의 주성분인 limonene이 1.11%, 오렌지와 레몬향이 나는 linalool은 0.60% 비율로 존재하였다. α -Humulene이 3.43%, trans-caryophyllene이 2.20%, germacrene d가 0.63% 비율이었으며 이들은 대부분 sesquiterpene계 향 특징인 pleasant, fresh, citrus, mint 등을 나타낸다고 알려지고 있다.

3.1.2. Absolute

꽃향유의 전초에서 추출한 absolute의 수율은 12.45%이었다. GC에 의해서 absolute는 약 30개의 성분이 분리되었고, 이 중에서 GC/MS에 의해서 23개의 성분이 동정되었으며 그 결과는 Table 2와 같다. Absolute에서 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것은 ester화합물이면서 sweet, body 향특성을 갖는 methyl linolenate가 12.38%이었으며, waxy, sweet, adds body의 향특성을 갖는 지방산인 palmitic acid도 essential oil에서와 달리

Table 3. Volatile compounds identified from oleoresin of *Elsholtzia splendens*

Peak No.	R. T. (min)	Volatile compounds	Peak area (%)
1	38.21	Acetophenone	0.73
2	57.88	Ethyl palmitate	6.61
3	65.08	Ethyl oleate	2.63
4	67.03	Ethyl linoleate	7.67
5	70.11	9,12,15-Octadecatrienoic acid	22.15
6	92.85	Palmitic acid	7.12

9.47% 비율로 존재하고 있었고 향유와 거의 비슷하였 다.¹⁵ Waxy, hardness의 향특성을 갖는 지방산인 linoleic acid는 1.43% 함유되어 있어 유기산과 ester화합물이 가장 많은 비율을 차지하고 있었다. Essential oil에서 많이 존재하는 elsholtzia ketone과 naginata ketone은 absolute에서는 각각 4.25%와 8.66%까지 존재하였다. α -Humulene도 4.36%로 essential oil에서보다 약간 낮았으나 향유의 absolute보다는 훨씬 높은 비율이었다.¹⁵ 또한 ketone화합물이면서 essential oil에서도 존재하는 2-cyclohexen-1-one은 2.20%, 2-pentadecanone이 0.47%로 낮은 수준으로 존재하였다. Aldehyde화합물이면서 essential oil에 존재하지 않는 2-pentanal과 2,4-heptadienal이 미량으로 존재하는 것이 확인되었다. 또한 essential oil에서도 확인되고 있는 limonene, linalool, trans-caryophyllene과 germacrene d도 absolute에서 미량으로 존재하는 것이 확인되었다. Essential oil에 많이 함유된 rosefuran은 absolute에서는 전혀 검출되지 않았으며, absolute에서는 essential oil에서보다 유기산과 ester, 그리고 aldehyde 계통의 화합물이 많이 동정되었다. 이와 같은 결과는 Hong 등이 보고한 결과²⁵와 유사하였다.

3.1.3. Oleoresin

꽃향유 전초에서 추출한 oleoresin의 수율은 9.95%이었다. Oleoresin은 GC에 의해 약 30개의 성분이 분리되었고, 이 중에서 GC/MS에 의해 6개의 성분이 동정되었으며 그 결과는 Table 3과 같다. Oleoresin에서 9,12,15-octadecatrienoic acid가 22.15%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, essential oil과 absolute에서도 존재하는 palmitic acid가 7.12%로 지방산이 상대적으로 높았다. Sweet, smoothing한 향특성을 가진 ethyl palmitate는 6.61%와 sweet, nutty, waxy, flue-cured note한 향특성을 가진 ethyl oleate와 ethyl linoleate는 각각 2.63%와 7.67%로 지방산의 ester화합물도 높은 비율로 존재하였다.

Ketone화합물이면서 sweet, pungent, cherry-hay의 향특성을 갖는 acetophenone은 oleoresin에서도 0.73% 비율로 존재하였다. 향유 전초의 oleoresin에서 존재하는 heptadecane과 hexanoic acid는 꽃향유 전초의 oleoresin에서는 검출되지 않았다.¹⁵

3.2. 지질과산화 보호효과

예전에 향료의 제조 및 기술개발은 향기성분의 추출, key aroma 성분의 분리정제, 합성기술 외에 향료 조합기술, 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 항산화 효과와 거담효과와 같은 생리활성이 있는 다기능성 향료개발에 주력하고 있다.

한방에서 사용되고 약용식물 추출물에 대한 항산화 효과를 screening한 연구는 많이 이루어져 있다.^{26,27} 또한 *in vitro*에서 항산화 효과를 측정하는 방법도 다양하게 이루어지고 있다. 생약재 추출물 혹은 천연물에서 분리한 항산화성 성분이 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical,²⁷ superoxide radical 과 hydroxyl radical을 제거하는 정도²⁸를 측정하거나 불포화 지방산 linoleic acid를 이용하여 과산화지질 저해효과를 측정²⁹하여 항산화 효과를 직접 평가하는 방법이 있다. 또한 지질 source로서 실험동물 간 microsome³⁰이나 ox-brain homogenate³¹를 이용하여 free radical에 의해 지질 과산화를 유도하고 파괴된 지질의 부산물인 malondialdehyde (MDA)를 측정하여 항산화효과를 간접 평가하는 방법이 있다. 그러나 후자의 방법들이 항산화효과를 검정하는데 생체에 적용할 수 있는 더 근접한 방법이라고 인식되고 있다.

지질 source로서는 웅성 흰쥐 간의 microsome과 free radical generator 로서 AAPH를 사용하는 system에 꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin

을 각각 200 μ /ml 처리하여 비효소적 지질과산화 억제 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 비효소적 지질과산화 억제활성은 essential oil에서 58.1 \pm 19.3%이었으며, oleoresin에서 21.2 \pm 4.3%였고, absolute에서는 비효소적 지질과산화 억제활성은 거의 나타나지 않았다.

생약추출물의 효소적 지질과산화 억제활성은 지질 source로서 웅성 흰쥐 간을 사용하여 Fe⁺⁺-ADP/NADPH system과 같은 *in vitro* assay가 일반적으로 이용되고 있다. Fe⁺⁺-ADP/NADPH system에 꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 각각 200 μ /ml 처리하여 얻은 효소적 지질과산화 억제효과는 각각 22.6 \pm 2.8%, 4.6 \pm 3.0% 및 40.7 \pm 6.0%이었다. Absolute는 비효소적 지질과산화에서는 억제활성을 나타내지 않았으나 효소적 지질과산화에서는 낮은 억제활성을 나타내었다.

지질 과산화는 뇌 조직에서 쉽게 일어나는데 incubation system내에서 지질의 source로서 소의 뇌로부터 조제한 homogenate를 이용하여 꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 각각 200 μ /ml 처리하고 얻은 자동산화 억제활성은 각각 40.5 \pm 1.1%, 1.0 \pm 0.1% 및 93.1 \pm 2.6%이었다. 따라서 세 시스템 모두 essential oil과 oleoresin은 200 μ /ml처리농도에서 지질과산화 억제활성은 잘 나타내었으나 absolute는 거의 나타나지 않거나 매우 낮은 수준이었으며, 이와 같은 결과는 향유의 결과와 비슷하였다.¹⁵

3.3. 세포독성

In vitro 세포독성 평가는 실험동물의 사용을 최소화하면서 적은 비용과 시간으로 생약 추출물이나 독성물질이 만성 퇴행성 질환 발병에 risk factor로 작용하는지 미리 예견하고 판단할 수 있으며, 또한 독성물질이 세포와 조직에 작용하여 발암과 염증의 병리학적 진행 과정의 메카니즘을 이해하는데 매우 중요한 수단으로

Table 4. In vitro inhibitory activities by flavor components extracted from *Elsholtzia splendens* in the nonenzymatic, enzymatic and autooxidative lipid peroxidation system

Flavors	lipid proxidation inhibitory activities(%)		
	nonenzymatic	enzymatic	autooxidative
Essential oil	58.1 \pm 19.3	22.6 \pm 2.8	40.5 \pm 1.1
Absolute	NE	4.6 \pm 3.0	1.0 \pm 0.1
Oleoresin	21.2 \pm 4.3	40.7 \pm 6.0	93.1 \pm 2.6

Flavors concentration in each system : 200 μ /ml

NE : No effect

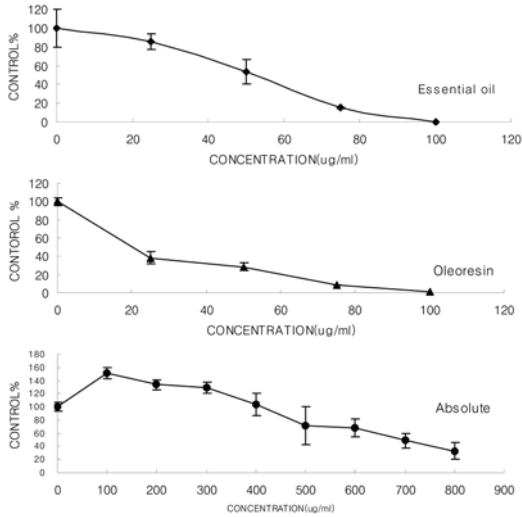


Fig. 1. Concentration-response curve for cytotoxicities of flavor components extracted from *Elsholtzia splendens* against BALB/c 3T3 (◆: essential oil, ▲: oleoresin, ●: absolute).

인식되고 있다. 전 세계적으로 세포독성을 평가하는 방법으로 사용되고 있는 것은 주로 neutral red uptake법, LHD release법, kenacid blue binding법, MTT formation법, XTT formation법, acid phosphatase activity법, surforhodamine B binding법과 resazurin binding법 등이다.³² 이 중에서도 neutral red uptake법은 The European Center for Validation of Alternative Methods(ECVAM), Funds for the Replacement of Animals in Medical

Experiments(FRAME), John's Hopkins Center for Animal Alternatives(CAAT)와 같은 미국이나 유럽의 국제 독성 평가기관에서 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 3T3를 사용하고 꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 처리하여 neutral red uptake방법으로 세포독성을 평가한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조구와 처리구를 비교하여 세포 50% 사멸 농도를 계산한 결과 essential oil의 EC₅₀ 값은 46.4 µg/ml이었다. Absolute는 EC₅₀ 값이 681.7 µg/ml로 고농도에서도 세포독성은 매우 낮거나 거의 없는 것으로 판단된다. 그러나 oleoresin의 EC₅₀ 값은 17.6 µg/ml로 고농도 처리 시에는 세포독성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 따라서 대부분의 국제 독성평가기관에서는 neutral red법으로 24시간에서 EC₅₀값이 25 µg/ml보다 낮은 것은 세포독성의 가능성이 있다³²고 판정함으로써 oleoresin은 고농도에서 약간의 세포독성이 있는 것으로 판단됨으로 향료자원으로서 응용할 때는 주의가 필요하리라 생각된다.

Table 5. Induction of His⁺ revertants TA98 by flavor components extracted from *Elsholtzia splendens*, without (-S₉) and (+S₉) metabolic activation.

Strain	Flavors	S ₉	His ⁺ Revertant colony/plate			
			100 µg	250 µg	500 µg	1000 µg
TA98	Essential oil	-	17±5	18±1	96±19	-
		+	37±4	32±1	77±15	-
	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

- Flavors : (µg/plate) in DMSO

- Strain : *Salmonella typhimurium* TA98

- S₉ : S-9 mixture

- Positive control : - S₉, 4-nitroquinoline(4-NQ), 0.5 µg/plate : 465±36
+ S₉, 2-aminoanthrene(2-AA), 0.5 µg/plate : 888±5

- Negative control : - S₉ : 15±5
+ S₉ : 42±3

3.4. 돌연변이 유발성

Ames test법은 발암성이 있는지 여부를 확인하는 수단으로 식물추출물 또는 새로 합성된 화합물이나 약을 등록하거나 약효를 인정하는 국제기관에서 돌연변이 유발성 검정법으로 사용하고 있으며 매우 sensitive한 방법으로 인정받고 있다.³³ 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 꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute 및 oleoresin을 처리하여 돌연변이 유발성을 검정한 결과는 Table 5와 같다. 시료처리량 대신 용매인 DMSO만을 넣은 음성대조군은 S-mixture 미처리와 처리 시 각각 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 15 ± 5 와 42 ± 3 이었다. S-9 mixture를 처리하지 않고 대표적 발암물질인 4-nitroquinoline(4-NQ)를 처리한 양성대조군의 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 465 ± 36 이었으며, S-9 mixture를 처리하고 대표적 발암물질인 2-aminoanthrene(2-AA)를 처리한 양성대조군의 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수는 888 ± 51 이었다. Absolute와 oleoresin을 plate당 100, 250, 500과 1000 μg 처리하면서 S-9 mixture를 처리했을 때나 처리하지 않았을 때 모두 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수에서 음성대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 essential oil에서 plate에 500 μg 처리 시 S-9 mixture를 처리했을 때나 처리하지 않았을 때 모두 뚜렷하게 복귀돌연변이 콜로니 수는 대조군에 비해 크게 증가하였다. 따라서 absolute와 oleoresin은 고 농도에서도 돌연변이 유발성과 항균성이 나타나지 않았으며 essential oil은 저농도에서는 거의 돌연변이유발성과 항균성이 나타나지 않았으나 plate당 500 μg 이상 처리 시 돌연변이유발성 뿐만 아니라 항균성도 있는 것으로 판단된다.

Table 6. The ciliostasis change of rat trachea by the addition of flavor components of *Elsholtzia splendens* in cigarettes.

Flavors	Ciliostasis time(sec)
Control	624 ± 98
Essential oil	676 ± 146
Absolute	637 ± 120
Oleoresin	687 ± 103

3.5. 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 방법³⁴과 병아리, 햄스터, 토끼, 흰쥐 등의 기도를 적출하여 *in vitro*에서 간접적인 방법으로 조사 평가하는 방법³⁵이 있다. 요사이 는 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.³⁶

꽃향유 전초에서 추출한 essential oil, absolute와 oleoresin의 거담효과를 측정하기 위하여 이들을 상품담배에 주입하여 연소시키고 담배연기를 포집한 다음, 적출한 흰쥐의 기도를 이용하여 섬모생존시간을 평가한 결과는 Table 6과 같다. Essential oil과 oleoresin을 처리한 것은 기도의 섬모생존시간이 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으며 모두 통계적인 유의성은 나타나지 않았으나 essential oil보다는 oleoresin이 기도의 섬모생존시간이 조금 더 길었다. 그러나 absolute의 경우는 섬모생존시간이 대조군과 거의 유사하였다. 따라서 꽃향유 전초의 essential oil과 oleoresin은 약간의 거담효과를 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

국내 자생식물로서 방향성이 뛰어나고, 거담효과 및 이노작용이 있다고 알려진 꽃향유 전초를 이용하여 향기성분을 essential oil, absolute와 oleoresin으로 구분하여 분리하고, 그 화학성분을 분석하였으며, 항산화활성 및 거담효과 등의 생리활성과 세포독성 및 돌연변이유발성 등의 안전성을 검정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 꽃향유 전초의 essential oil, absolute 및 oleoresin의 추출수율은 각각 0.28%, 12.45% 및 9.95%이었으며, 가장 많은 비율을 차지하는 성분은 각각 2-cyclohexen-1-one, linoleic acid 및 ethyl linoleolate이었다.

2. 꽃향유 전초 추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 비효소적, 효소적 그리고 자동산화 지질과산화 억제활성을 검정했을 때 essential oil과 oleoresin은 세 시스템 모두 억제활성을 잘 나타내었으나 absolute는 억제활성이 거의 나타나지 않거나 매우 낮은 수준이었다.

3. Neutral red uptake법으로 세포독성을 평가한 결과 꽃향유 전초의 essential oil과 absolute의 EC₅₀값은 각각 46.4 µg/ml 와 681.7 µg/ml 로 고농도에서도 세포독성은 매우 낮거나 거의 없는 것으로 나타났으나, 꽃향유 전초의 oleoresin의 EC₅₀ 값은 17.6 µg/ml로 고농도 처리 시에는 세포독성이 있는 것으로 나타났다.

4. Ames test 법으로 돌연변이 유발성을 평가한 결과 꽃향유 전초의 absolute와 oleoresin의 경우, 돌연변이 유발성과 항균성은 없는 것으로 나타났으며, essential oil은 500 µg 이상의 농도에서 돌연변이 유발성과 항균성이 있는 것으로 나타났다.

5. 흰쥐의 기도를 이용하여 거담효과를 측정한 결과 꽃향유 전초의 essential oil과 oleoresin은 대조군에 비해 섬모생존시간이 증가되는 경향을 나타내었다.

감사의 글

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

참고문헌

1. A. G. Renwick, *Toxicol Lett.*, **149**, 223-234(2004).
2. R. Filip and G. E. Ferraro, *Eur. J. Nutr.*, **42**(1), 50-54(2003).
3. M. Tellez, R. Estell, E. Fredrickson, J. Powell, D. Wedge, R. Schrader and M. Kobaisy, *J. Chem. Ecol.*, **27**, 2263-2273(2001).
4. D. K. Ahn, "Illustrated book of Korean medicinal herbs". 3rd Ed., 855, *Kyo-Hak Publishing Co.* Korea, 2000.
5. H. J. Chi, S. H. Shin and J. I. Chang, *Kor. J. Pharmacogn.*, **23**, 77-80(1992).
6. K. K. Sohn, J. S. Song, Y. A. Chae and K. S. Kim, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **39**, 809-813(1998).
7. B. K. Lee, J. K. Bang, J. K. Kim, C. B. Park and B. H. Lee, *Kor. J. Intl. Agri.*, **13**, 71-77(2000).
8. M. S. Chung and M. S. Lee, *Kor. J. Soc. Food. Cookery Sci.*, **18**, 455-460(2002).
9. K. H. Sohn, J. S. Song, S. W. Sun and K. S. Kim, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **44**, 961-966(2003).
10. Y. D. Chang, J. S. Song and J. S. Lee, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **44**, 936-938(2003).
11. K. H. Sohn and K. S. Kim, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **44**, 939-946(2003).
12. J. Song, F. J. Zhao, Y. M. Luo, S. P. McGrath and H. Zhang, *Environ. Pollut.*, **128**, 307-315(2004).
13. L. Y. Jiang, X. E. Yang and Z. L. He, *Chemosphere*, **55**, 1179-1197(2004).
14. D. W. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, K. Bae, S. S. Kang and H. P. Kim, *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 232-236(2003).
15. J. H. Jeong and H. B. Lim, *Kor. J. Med. Crop. Sci.*, **12**(6), 463-472(2004).
16. T. H. Schultz, R. A. Flath, T. R. Mon, S. B. Egging and R. Teranishi, *J. Agric. Food. Chem.*, **25**, 446-449(1977).
17. S. K. Bansal, J. Love and H. L. Gurtoo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 268-274(1983).
18. O. H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951).
19. S. F. Wong, B. Halliwell, R. Richmond and W. R. Skowronek, *J. Inorg. Biochem.*, **14**, 127-134(1981).
20. T. C. Pederson and D. S. Aust, *Biochim. Biophys. Acta.*, **385**, 232-241(1975).
21. J. Stocks, J. M. Gutteridge, J. S. Rosemary and T. L. Dormandy, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **47**, 215-222(1974).
22. J. W. Foy, B. R. Bombick, D. W. Bombick, D. J. Doolittle, A. T. Mosberg and J. E. Swauger, *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 237-243(2004).
23. D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215(1983).
24. G. M. Donnelly, H. E. McKean, C. S. Heird and J. Green, *Arch. Environ. Health.*, **28**, 350-355(1974).
25. W. T. Hong, G. M. Go, J. G. Lee, H. J. Jang and J. J. Kwag, *J. Kor. Soc. Tob. Sci.*, **42**, 53-59(2002).
26. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun and H. Corke, *Life Sci.*, **74**, 2157-2184(2004).
27. S. E. Lee, N. S. Seong, J. K. Bang, C. G. Park, J. S. Sung and J. Song, *Kor. J. Med. Crop Sci.*, **11**, 127-134(2003).
28. R. Safitri, P. Tarigan, H. J. Freisleben, R. J. Rumampuk, and A. Murakami, *Biofactors*, **19**, 71-77(2003).
29. S. Piacente, P. Montoro, W. Oleszek and C. Pizza, *J. Nat. Prod.*, **67**, 882-885(2004).
30. D. Rajlakshmi, S. K. Banerjee, S. Soods and S. K. Maulik, *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**, 1681-1686(2003).
31. D. G. Kang, C. Yun and H. S. Lee, *J. Ethnopharmacol.*, **44**, 939-946(2003).

- 87, 231-236(2003).
32. K. P. Putnam, D. W. Bombick and D. J. Doolittle, *Toxicol. In Vitro*, **16**, 599-607(2002).
33. C. Andreoli, D. Gigante and A. Nunziata, *Toxicol. in vitro*, **17**, 587-594(2003).
34. Y. Miyabara, H. Takano, T. Ichinose, H. B. Lim and M. Sagai, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **157**, 1138-1144(1998).
35. B. Petterso, M. Curvall and C. R. Enzell, *Toxicol.*, **23**, 41-55(1982).
36. L. Zhang and M. L. Sanderson, *J. Physiol.*, **15**, 765-776(2003).

K C I