

## Analysis of volatile compounds and metals in essential oil and solvent extracts of Amomi Fructus

Sam-Keun Lee<sup>★</sup>, Chul Hun Eum<sup>1</sup> and Chang-Gue Son<sup>2</sup>

*Department of Applied Chemistry, Daejeon University, 62, Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Korea*

<sup>1</sup>*Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, Daejeon 34132, Korea*

<sup>2</sup>*Liver & Immunology Research Center, Oriental Hospital of Daejeon University  
176-9, Daeheung-ro, Jung-gu, Daejeon 34929, Korea*

(Received November 3, 2015; Revised November 13, 2015; Accepted November 13, 2015)

## 사인으로부터 추출한 정유와 용매 추출물의 휘발성 물질 및 금속성분 분석

이삼근<sup>★</sup> · 음철현<sup>1</sup> · 손창규<sup>2</sup>

대전대학교 응용화학과, <sup>1</sup>한국지질자원연구원 지질자원분석센터,

<sup>2</sup>대전대학교 한의과 대학

(2015. 11. 3. 접수, 2015. 11. 13. 수정, 2015. 11. 13. 승인)

**Abstract:** Amomi Fructus with anti-oxidative activity was chosen and essential oil was obtained by SDE (simultaneous distillation extraction), and 39 constituents were determined by GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry). Major components were camphor, borneol acetate, borneol, D-limonene and camphene. Three solvent extracts such as hexanes, diethyl ether and methylene chloride from Amomi Fructus were obtained. These were analyzed by GC-MS and 4 more constituents were identified in addition to 39 components discovered in essential oil. Five major components such as camphor, borneol acetate, borneol, D-limonene and camphene were also detected, however the relative peak percents of those components were different from those of constituents in essential oil. To estimate the kind and the amount of materials evaporated at certain temperature and conditions from essential oil and solvent extracts, dynamic headspace apparatus was used and materials evaporated and trapped at certain conditions were analyzed by GC-MS. Recovery yield of SDE method from Amomi Fructus was measured by using camphor and standard calibration solution of camphor methanol solution and, the yield was 82.0%. Content of Hg was measured by mercury analyzer and contents of Cd, Pb, Cr, Mn, Co, Ni, Cu and Zn in Amomi Fructus, essential oils and solvent extracts were determined by ICP-MS (Inductively coupled plasma-mass spectrometer). Pb, Cd and Hg were measured in the concentration of 0.72 mg/kg, <0.10 mg/kg and 0.0023 mg/kg, respectively and these were below permission level of purity test. Contents of Mn, Cu and Zn in Amomi Fructus were 213 mg/kg, 8.29 mg/kg and 31.0 mg/kg, respectively and which were relatively

<sup>★</sup> Corresponding author

Phone : +82-(0)42-280-2423 Fax : +82-(0)42-280-2425

E-mail : lsk236@dju.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

higher than other metals such as Cr, Co and Ni. Metals such as Mn (0.65 ~ 9.08 mg/kg), Cu (1.16 ~ 4.40 mg/kg) and Zn (1.10 ~ 3.80 mg/kg) in essential oil and solvent extracts were detected. At this point it is not clear that the metals were cross-contaminated in the course of treating Amomi Fructus or metals were contained in Amomi Fructus. The influence evaluation toward biological model study of these metals in essential oil and solvent extracts will be needed.

**요약:** 한약재 중 항산화 작용이 있다고 알려진 사인(Amomi Fructus)을 SDE (simultaneous distillation extraction) 방법으로 정유(essential oil)를 추출하고 GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry)를 이용하여 39 개의 성분을 규명하였으며, 주요 성분은 camphor, borneol acetate, borneol, D-limonene 및 camphene이었다. 유기용매 3 가지(헥세인, 디에틸 에터 및 다이클로로메테인)를 이용하여 얻은 용매 추출물에서 정유성분 이외에 추가로 4 개의 성분을 규명하였으며, 주요 5 개 성분은 동일하였으나 상대적인 면적 비율은 차이가 있었다. 특정온도와 휘발 조건에서 정유와 용매 추출물에서 휘발하는 물질들의 종류와 상대적인 비율을 측정하기 위하여 dynamic headspace를 이용하여 특정 조건에서 휘발하는 물질들을 트랩에 포집한 후 GC-MS로 분석하였다. 사인으로부터 SDE 방법에 의해 정유를 추출하는 방법의 회수율을 장뇌(camphor)를 이용하여 측정하였으며, 장뇌의 회수율은 82.0% 이었다. 사인에서 Hg의 함량은 수은 분석기로 측정하였으며, Cd, Pb, Cr, Mn, Co, Ni, Cu 와 Zn은 ICP-MS (Inductively coupled plasma-mass spectrometer)로 측정하였다. 사인에서 Pb, Cd 및 Hg이 각각 0.72 mg/kg, <0.10 mg/kg 및 0.0023 mg/kg 검출되었으며, 이는 순도시험 허용기준치 이하의 값들이었다. 사인에서 Cr, Mn, Co, Ni, Cu와 Zn의 함량을 조사한 결과 Mn (213 mg/kg), Cu (8.29 mg/kg) 및 Zn (31.0 mg/kg)등이 비교적 높은 함량으로 검출되었으며, 정유와 용매 추출물에서도 Mn (0.65~9.08 mg/kg), Cu (1.16~4.40 mg/kg) 및 Zn (1.10~3.80 mg/kg)이 검출되었다. 이들 금속성분이 사인에서 기인하는 것인지 아니면 유통과정이나 취급과정에서 오염된 것인지의 여부 규명이 필요하며, 또한 이런 금속들이 생물학적 활성 연구에 어떤 영향 주는지도 규명할 필요가 있다.

**Key words:** Amomi Fructus, simultaneous distillation extraction, essential oil, solvent extraction, dynamic headspace/GC-MS

## 1. 서 론

한약물을 이용하여 뇌에 특이적인 항산화 소재개발을 연구하는 연구가 다방면에서 연구되고 있다. 일반적인 열수 한약 추출물은 뇌 조직에 작용하는 과정에서 뇌혈관 장벽(blood-brain barrier)을 투과하기 어려운 제한적 특징을 갖고 있다. 이런 단점은 한약재의 정유 성분 위주의 방향성 한약물을 비강 내에 직접 투여 함으로서 극복할 수 있다고 알려져 있다.<sup>1-5</sup> 한약재 중에서 정유 물질들의 성분 분석은 주로 GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry)를 이용하며 이루어지며,<sup>6-7</sup> GC에 시료를 주입하는 방법은 정유를 직접 주입하는 방법을 비롯해서 다양한 방법들이 목적에 따라 보고되어 있다. 휘발성 물질을 함유하는 액체나 고체 시료를 용기에 넣은 뒤 시료 상층부에 휘발한 물질을 트랩에 포집한 뒤 열탈착해서 GC-MS에 주입하는 방법이 주종을 이루고 있으며, 여기에는

SPME (solid-phase micro-extraction), LPME (liquid-phase micro-extraction), purge and trap 방법 및 dynamic headspace purge and trap 등 다양한 방법들이 보고되어 있다.<sup>8-11</sup> 정유 성분을 추출한 후 이를 가지고 생물학적 효능을 연구할 목적으로 사용하기 위해서는 일정 양이 필요하며 이런 목적으로 사용되는 방법에는 증기 증류(steam distillation, SD),<sup>12</sup> 동시 증류추출(simultaneous distillation extraction, SDE),<sup>13</sup> 마이크로파 추출(microwave-assisted extraction, MAE),<sup>14</sup> 용매 추출(solvent extraction, SE),<sup>15</sup> 가온수 추출(superheated water extraction, SWE)<sup>16</sup> 및 초임계유체추출(supercritical fluid extraction, SFE)<sup>17</sup> 등이 있다. 약재 정유 추출물의 화학적 조성은 약재의 생산지, 같은 종내에서 변이성, 재배 조건, 수확시기, 저장시간 및 가공방법과 같은 변수에 따라 차이가 있다는 것이 보고 되었으며,<sup>18-19</sup> 같은 약재의 경우에도 생물학적 활성을 가지는 물질의 양과 종류는 추출 방법에 따라 달라진다. 또한 동

일한 약제일지라도 추출방법에 따라 정유 성분의 종류와 양이 다를 것이며, 동일한 재료에 대해서 동일한 방법으로 얻은 정유라 할지라도 생물학적 활성 연구에 적용하는 방법에 따라 유효 성분이 다를 것이다. 예를 들어 정유를 특정 용매로 희석한 희석액을 그대로 사용하는 경우와 정유를 상온에서 질소와 같은 불활성 기체로 휘발시켜 사용하는 경우의 적용되는 유효 성분이 다를 것이다.

본 연구에서는 녹각사(*Amomum villosum* Loureiro var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen)나 양춘사(*Amomum villosum* Loureiro)의 열매 또는 씨 덩어리인 사인(Amomi Fructus)의 정유 물질을 질소 분위기에서 SDE 방법으로 추출하고 사인으로부터 용매추출법(사용한 용매는 헥세인, 디에틸 에터 및 다이클로로메테인)으로 추출물을 얻었다. 추출물 중 각각의 휘발성 성분들을 GC-MS를 이용하여 규명하고자 하였으며, 60 °C에서 휘발하는 성분들의 상대적인 비율을 dynamic headspace purge and trap을 이용하여 비교하였다. 또한 사인, 정유 및 용매 추출물의 수은 농도를 수은 측정기로 측정하였고, Cd, Pb, Cr, Mn, Co, Ni, Cu와 Zn의 농도는 ICP-MS를 이용하여 측정하여 결과를 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 시약

사인은 중국산으로 4 °C에서 냉장 보관한 후 사용하였으며 분쇄한 후 체눈 크기가 1.18 mm인 체로 걸러 사용하였다. 사용한 물은 탈 이온수를 사용하였으며, 헥세인, 디에틸 에터 및 다이클로로메테인은 대정화급의 EP급을 구매한 후 사용 직전에 증류하여 사용하였다. 무수황산나트륨(99%)은 Junsei사 제품을,

장뇌(camphor, 순도 96%)는 시그마-알드리치사 그리고 세라이트는 동양제철화학의 Celite 545를 각각 사용하였다. 금속 전처리에 사용한 HNO<sub>3</sub> (70-75%)은 동우화인켐사 제품을 그리고 HClO<sub>4</sub> (GR급, 60%)는 일본 Junsei사 제품을 사용하였다.

### 2.2. 정유와 용매추출 및 휘발성 물질 분석

SDE 방법으로 정유를 얻기 위하여 분쇄한 사인 60.0 g을 플라스크에 넣은 후 탈 이온수 800 mL를 첨가하고 다른 플라스크에는 헥세인 50 mL를 넣은 후 SDE장치에 연결하고 질소 분위기에서 6 시간 동안 가열하여 정유 성분을 헥세인 층으로 이동 시켰다. 이 용액을 무수황산나트륨으로 12 시간 건조한 후 여과하고 회전증발기를 이용하여 헥세인을 제거하여 연한 노란색의 정유 물질을 얻었다. 동일 실험을 3번 실시하여 Table 1에 정리하였다. 정유 1 µL에 40 µL의 헥세인을 가하여 얻은 희석액 1 µL를 GC-MS에 직접 주입하여 분석하였다. 또한 dynamic headspace의 분석 전용 용기(20 mL)에 정유 1 µL를 넣은 후 60 °C에서 10분간 헬륨으로 휘발성 물질을 모은 다음 GC-MS로 분석하였다. Fig. 1에 분석 과정을 정리하였다.

용매 추출물은 분쇄한 사인 30.0 g을 삼각플라스크에 넣고 헥세인, 디에틸 에터 혹은 다이클로로메테인 150 mL를 넣은 후 12 시간 방치한 후 초음파로 20 분간 처리하였다. 이 용액을 1 시간 동안 상온에서 자석교반기를 이용하여 잘 혼합하고 여과 보조제인 세라이트를 이용하여 여과한 후 50 mL의 해당 용매로 세라이트 층을 세척하였다. 각 용액을 무수황산나트륨으로 12 시간 건조시키고 여과한 다음 회전증발기를 이용하여 용매를 제거하여 3 가지의 진한 노란색의 추출액인 HX-EXT(헥세인 추출물), ETHER-EXT(디에틸 에터 추출물) 및 MC-EXT(다이클로로

Table 1. Amount of essential oil and solvent extracts by SDE, HX-EXT (hexanes extraction), ETHER-EXT (diethyl ether extraction) and MC-EXT (methylene chloride extraction) from Amomi Fructus

No	Extraction	Used g of Amomum villosum Loureiro	Essential oil or extracts, g (recovery yield, %)
1	SDE	60.0 g	0.579 g (0.97±0.11%)
2	HX-EXT	30.0 g	0.442 g (1.47±0.20%)
3	ETHER-EXT	30.0 g	0.553 g (1.84±0.16%)
4	MC-EXT	30.0 g	0.711 g (2.34±0.17%)
5	SDE	After HX-EXT, 30 g	0.0423 g (0.14±0.02%)
6	SDE	After ETHER-EXT, 30 g	0.0251 g (0.08±0.10%)
7	SDE	After MC-EXT, 30 g	0.0167 g (0.06±0.13%)
8	HX-EXT	After SDE, 60 g	0.0055 g (0.01±0.12%)

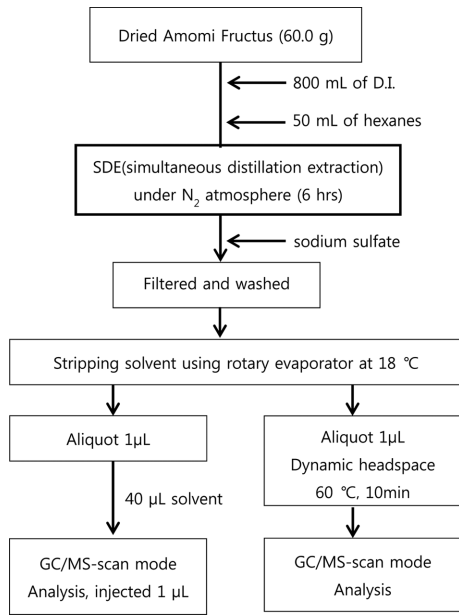


Fig. 1. Overall analytical procedure for SDE from Amomi Fructus.

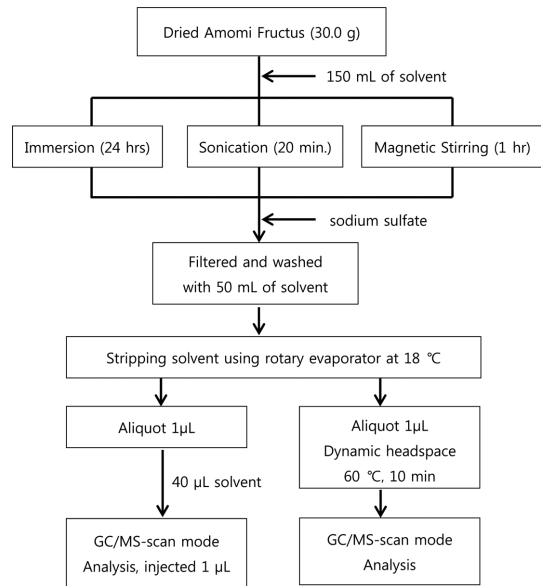


Fig. 2. Overall analytical procedure for solvent extraction from Amomi Fructus (used solvent: hexanes, diethyl ether, methylene chloride).

메테인 추출물)을 각각 얻었다. 동일 실험을 3번 실시하여 Table 1에 정리하였다. 정유 1 µL에 40 µL의 헥세인을 가하여 희석한 용액 1 µL를 GC-MS에 직접 주입하여 분석하였다. 또한 dynamic headspace의 전용 용기(20 mL)에 정유 1 µL를 넣은 후 60 °C에서 10분간 헬륨으로 휘발성 물질을 트랩으로 포집한 후 GC-MS로 분석하였다. Fig. 2에 분석 과정을 정리하였다.

**2.3. SDE 방법의 장뇌(camphor) 회수율 및 장뇌 표준용액 제조**

분쇄한 사인 40.0 g과 장뇌 0.027 g을 플라스크에 넣은 후 탈 이온수 600 mL를 첨가하고 다른 플라스크에는 헥세인 40 mL를 넣은 후 SDE 장치에 연결하고 질소 분위기에서 6 시간 동안 가열하여 정유 성분을 헥세인 층으로 이동 시켰다. 이 용액을 무수황산나트륨으로 12 시간 건조한 후 여과하고 회전증발기를 이용하여 헥세인을 제거한 후 연한 노란색의 정유 물질을 얻었다. 정유 1 µL에 40 µL의 헥세인을 가하여 희석한 용액 1 µL를 GC-MS에 직접 주입하여 얻은 TIC (total ion chromatogram)에서 장뇌의 양을 장뇌의 표준용액을 만들어 정량하였다. 장뇌의 표준원액 (2,000 mg/L)을 메탄올로 희석한 후 500 mg/L 농도의 표준용액을 제조하였으며 이를 이용하여 검정곡선을 작성하고 시료 분석 시 사용하였다.

**2.4. 용매 추출 후 남은 사인으로부터 정유 추출**

위의 2.2. 방법으로 헥세인, 디에틸 에터 혹은 다이클로로메테인을 사용하여 용액 추출물을 회수한 후 남은 사인을 상온에서 12 시간 방치하여 용매를 제거하고 플라스크에 넣었다. 탈 이온수 600 mL를 첨가하고 다른 플라스크에는 헥세인 40 mL를 넣은 후 SDE 장치에 연결하고 질소 분위기에서 6 시간 동안 가열하여 정유 성분을 헥세인 층으로 이동 시켰다. 이 용액을 무수황산나트륨으로 12 시간 건조하고 회전증발기를 이용하여 헥세인을 제거하여 각각의 연한 노란색 정유 물질을 얻었다. 정유 1 µL에 40 µL의 헥세인을 가하여 희석한 용액 1 µL를 GC-MS에 직접 주입하여 휘발하는 물질들을 분석하였다.

**2.5. GC-MS와 Dynamic headspace purge and trap**

GC-MS에 희석한 정유를 직접 주입한 경우 Table 2 과 같은 조건으로 GC-MS를 이용하여 분석하였다. Dynamic headspace를 이용한 경우 정유 1 µL를 20 mL 전용 용기에 넣은 후 휘발성 성분들을 Table 3과 같은 조건으로 포집한 후 Table 2와 같은 조건으로 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 성분 분석은 Wiley7Nist05 질량 스펙트럼 데이터와 보고된 자료들을 비교해서 결

Table 2. GC-MS conditions

Gas Chromatography	Agilent 7890A
Column Temp	50 °C for 0 min 8 °C/min to 200 °C for 0 min. 10 °C/min to 270 °C for 5 min. 20 °C/min to 300 °C for 10 min.
Column	HP-5MSI (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) Split ratio : 10 : 1
Mass Spectrometer	Agilent 5975C
Ion source temp	230 °C
Injector temp	250 °C
Scan range	50-550 m/z

Table 3. Dynamic headspace conditions

Dynamic head space	HT-3(Teledyne Tekmar)
Platen/sample temp.	60 °C
Transfer line temp	230 °C
Valve oven temp.	63 °C
Sweep flow rate	50 mL/min
Sweep flow time	10 min.
Dry purge	0 min.
Desorb temp.	225 °C
Trap bake temp.	230 °C
Trap bake flow	450 mL/min.

정하였다.<sup>20-21</sup> 정유에 함유된 각 성분의 상대적인 비율은 GC-MS에서 얻은 TIC에서 해당 피크 면적을 전체 피크 면적의 합을 나누어 계산하였다.

### 2.6. 사인과 정유 및 용매 추출물의 중금속 농도 측정

수는 분석기(MA-2, Nippon instrument, Japan일본)로 표준물질(1000 μg/mL, Waco)을 측정하여 검정곡선을 그린 후 시료 약 0.05 g의 무게를 정확히 측정한다. 다음 수은분석기에 넣고 가열기화금아말감법으로 수은을 분석하였다. 사인, 정유 및 용매 추출물의 Cd, Pb, Cr, Mn, Co, Ni, Cu 와 Zn의 농도는 시료 약 0.1 g의 무게를 정확히 측정한다. 다음 질산과 과염소산을 이용하여 분해하고 Table 4와 같은 조건으로 ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometer)를 이용하여 측정하였다. 이들 중금속의 농도는 표준물질 (10 μg/mL, AccuStandard®)을 측정하여 검정곡선을 그린 후 결정하였다.

Table 4. ICP-MS conditions

ICP-MS	ELAN DRC II (Perkin Elmer)
RF power	1250 W
Calibration standard 2	10 μg/mL, AccuStandard®
Plasma Ar gas flow	18 L/min
Auxiliary Ar gas flow	1.2 L/min
Neubilizer Ar gas flow	0.9 L/min
Neubilizer	Meinhard type(quartz)
Spray chamber	Cyclonic
Interface cones	Platinum
Lens voltage	8 V
Dwell time	50 ms
replicate	3
Detector mode	Dual

### 3. 결과 및 고찰

사인 60.0 g을 SDE 방법으로 정유성분 0.579 g을 얻을 수 있었으며(Table 1), 정유 1 μL에 40 μL의 헥세인을 가하여 희석한 용액 1 μL를 GC-MS에 직접 주입하여 얻은 TIC에서 Wiley7Nist05 질량 스펙트럼 데이터와 문헌 비교를 통해 정유 성분을 분석하였다. 정유에서 39 개의 성분을 규명하였으며(Table 5와 Fig. 3), 주요 성분 5 개와 상대적 면적 비율(해당 피크 면적을 전체 피크 면적으로 나눈 값)은 다음과 같았다(camphor (CP, 32.3%), borneol acetate (BA, 20.2%), borneol (BO, 8.02%), D-limonene (LM, 4.54%) 그리고 camphene (CAP, 3.35%)). 각 피크의 상대적 면적 비율에 대한 상대표준편차(relative standard deviation)의 범위는 2.10%~11.2% 이었다. 사인을 SDE 방법으로 추출하여 성분을 분석한 보고는 없으며, 사인으로부터 가압열수추출(pressurized hot water extraction) 방법으로 정유를 추출하고 이를 headspace-SPME (solid phase micro-extraction)으로 성분을 분석한 보고는 있었다.<sup>20-21</sup> 이 결과와 본 연구에서 활용한 SDE 방법으로 얻은 정유의 성분을 비교하면 위에서 언급한 5 종류의 주요 성분은 동일하였으나 상대적 면적 비율이 달랐으며 다른 성분의 경우는 많은 차이가 있었다.<sup>20-21</sup>

사인 30.0 g에 헥세인, 다이에틸 에터 혹은 다이클로로메테인을 첨가하여 얻은 용매 추출물의 양은 각각 0.442 g (1.47%), 0.553 g (1.84%) 및 0.711 g (2.34%) 이었다(Table 1). 각 추출물 1 μL에 40 μL의 해당 용매를 가하여 희석한 용액 1 μL를 GC-MS에 직접 주입하여 얻은 TIC를 Wiley7Nist05 질량 스펙트

Table 5. Relative contents of volatile constituents in essential oil, HX-extracts, ETHER-extracts and MC-extracts in Amomi Fructus by analyzing TIC obtained from GC-MS

No.	Retention time(min)	Compound	Relative contents (%)			
			SDE	HX-extracts	ETHER- extracts	MC-extracts
1	4.96	$\alpha$ -Pinene	0.61	0.01	0.02	0.06
2	5.22	Camphene	3.35	0.06	0.11	0.30
3	5.68	$\beta$ -Pinene	0.03	0.01	0.02	0.04
4	5.87	$\beta$ -Myrcene	1.60	0.05	0.06	0.16
5	6.58	D-Limonene	4.54	0.09	0.17	0.46
6	6.64	Cineole	0.71	0.03	0.03	0.06
7	7.64	Terpinolen	0.16	0.01	0.01	0.01
8	7.95	Linalool	2.01	0.33	0.27	0.30
9	8.82	Camphor	32.3	6.95	6.19	7.61
10	8.96	Isobornyl alcohol	0.14	0.03	0.03	0.03
11	9.16	Borneol	8.02	3.39	2.73	2.82
12	9.29	4-Terpineol	0.19	0.03	0.03	0.03
13	9.51	$\alpha$ -Terpineol	0.56	0.10	0.08	0.09
14	11.22	Borneol acetate	20.2	4.56	3.71	4.17
15	12.22	$\alpha$ -Terpineolacetate	2.16	0.59	0.51	0.49
16	13.40	$\alpha$ -Santalene	0.92	0.41	0.39	0.37
17	13.45	$\beta$ -Caryophyllene	1.88	0.84	0.64	0.66
18	13.83	$\beta$ -Santalene	0.31	0.19	0.16	0.15
19	13.88	$\beta$ -Farnesene	0.32	0.33	0.25	0.33
20	13.93	$\beta$ -Sesquiphellandrene	0.36	0.44	0.32	0.34
21	13.98	$\alpha$ -Caryophyllene	0.31	0.22	0.18	0.17
22	14.10	Aromadendrene	0.18	0.13	0.11	0.13
23	14.29	$\alpha$ -Longipinene	0.31	0.14	0.11	0.11
24	14.34	$\alpha$ -Curcumene	0.32	0.27	0.23	0.21
25	14.40	$\beta$ -Cubebene	0.33	0.32	0.23	0.21
26	14.64	$\alpha$ -Muurolene	0.71	0.50	0.43	0.36
27	14.75	$\beta$ -Bisabolene	1.59	1.60	1.22	1.07
28	14.86	$\tau$ -Cadinene	0.66	0.87	0.75	0.68
29	15.01	$\delta$ -Cadinene	1.51	0.97	0.80	0.43
30	15.10	$\alpha$ -Patchoulene	0.40	0.38	0.33	0.16
31	15.22	$\alpha$ -Muurolene	0.20	0.18	0.20	0.13
32	15.38	Elemol	0.27	0.43	0.35	0.22
33	15.53	Nerolidol	0.72	0.84	0.72	0.59
34	15.96	Cubenol	0.22	1.11	0.92	0.84
35	16.76	$\tau$ -Muurolol	1.01	0.72	0.70	0.65
36	16.96	$\tau$ -Cadinol	1.44	1.15	0.86	0.98
37	17.13	b-Bisabolol	2.13	2.06	1.76	1.46
38	17.52	$\alpha$ -Santalol	1.55	0.74	0.72	0.52
39	18.16	Xanthorrhizol	0.68	0.85	0.51	0.64
40	19.06	Nootkatone	-	1.44	1.60	2.02
41	20.85	Hexadecanoic acid	-	5.54	5.10	3.66
42	22.74	Oleic Acid	-	11.1	14.6	11.2
43	35.22	$\tau$ -Sitosterol	-	2.62	2.17	2.49

럼 데이터와 문헌 비교를 통해 성분을 분석한 결과, 정유 성분에서 규명한 39개 성분 이외에 nootkatone,

hexadecanoic acid, oleic acid 및  $\tau$ -sitosterol을 추가로 규명하였으며, 3개의 용매 추출물의 주요 성분 5개와

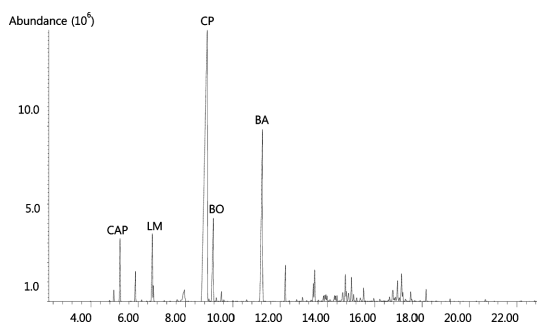


Fig. 3. Total ion chromatogram of the essential oil from Amomi Fructus (CP: camphor, BA: borneol acetate, BO: borneol, LM: D-limonene, CAP: camphene).

상대적 면적 비율은 다음과 같았다(camphor (CP, 6.19%~7.16%), borneol acetate (BA, 3.71~4.56%), borneol (BO, 2.73~3.39%), D-limonene (LM, 0.09~0.46%) 그리고 camphene (CAP, 0.06~0.30%). 각 피크의 상대적 면적 비율에 대한 상대표준편차의 범위는 3.23%~12.6% 이었다. 정유와 용액 추출물의 TIC에서 주요성분 5 개 (camphor, borneol acetate, borneol, D-limonene, camphene)의 상대적 면적 비율(상대표준편차: 4.15%~13.2%)을 계산하여 Fig. 4에 나타내었다. 정유의 경우 주요 물질의 상대적인 면적 비율이 용액 추출물의 상대적인 면적 비율보다 큰 이유는 GC-MS 분석 조건 (Table 2)에서 휘발하는 양이 상대적으로 많았기 때문이며, 용액 추출물의 경우 GC-MS 분석 조건에서 휘발하지 않는 양이 작을 뿐 아니라 전혀 휘발하지 않는 양도 많았을 것으로 판단된다. 특정온도와 휘발 조건에서 정유와 용매 추출물로부터 휘발하는 물질들의 종류와 상대적인 비율을 측정하기 위하여 dynamic

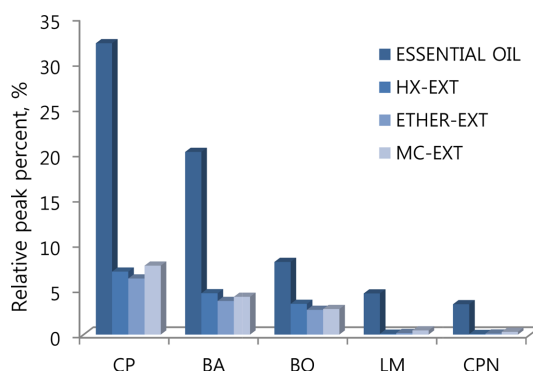


Fig. 4. Relative peak percent of five compound (CP: camphor, BA: borneol acetate, BO: borneol, LM: D-limonene, CAP: camphene) in essential oil and solvent extracts (HX-EXT: hexanes extracts, ETHER-EXT: diethyl ether extracts, MC-EXT: methylene chloride extracts) obtained from Amomi Fructus by direction injection into GC-MS.

headspace를 이용하여 특정 조건에서 휘발하는 물질들을 트랩에 포집한 후 GC-MS로 분석하였다.

정유와 용매 추출물의 각 1  $\mu$ L를 dynamic headspace 전용 용기에 주입하고 60  $^{\circ}$ C에서 10분간 휘발하는 물질을 포집한 후 GC-MS로 분리한 TIC에서, 정유 시료에서 가장 많은 양의 휘발성 물질이 검출되었으며, 다이클로로메테인 추출물(MC-EXT)의 경우가 다음으로 많았으며 다이에틸 에터 추출물(ETHER-EXT)이 다음으로 많았고 헥세인 추출물(HX-EXT)에서 가장 적은 양의 휘발성 물질이 양이 검출되었다. 이들 시료의 TIC에서 전체 피크의 면적 비율은 다음과 같았다; SDE:HX-EXT:ETHER-EXT:MC-EXT=6.1:1.0:1.1:1.7. Dynamic headspace를 이용하여 얻은 정유와 용매

Table 6. Relative contents of volatile constituents of essential oil, HX-extracts, ETHER-extracts and MC-extracts by analyzing TIC obtained from dynamic headspace-GC-MS

No.	Retention time (min)	compound	Relative contents (%)			
			SDE-HX	HX-EXT	ETHER-EXT	MC-EXT
1	4.96	$\alpha$ -Pinene	2.94	0.86	1.12	1.93
2	5.22	Camphene	9.71	3.63	6.76	12.9
3	5.68	$\beta$ -Pinene	0.67	0.33	0.33	0.59
4	5.87	$\beta$ -Myrcene	8.63	2.83	3.82	6.58
5	6.58	D-Limonene	41.6	7.99	12.8	24.7
6	8.82	Camphor	12.9	50.9	50.1	32.7
7	9.16	Borneol	1.86	4.80	3.79	2.55
8	11.22	Borneol acetate	5.54	12.9	10.4	8.22
9	13.45	$\beta$ -Caryophyllene	0.63	1.29	0.72	0.60
10	14.75	$\beta$ -Bisabolene	-	0.52	0.41	0.45

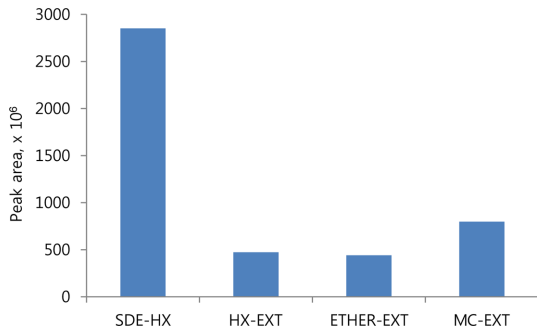


Fig. 5. Summation of total peak area in TIC for four samples (essential oil, HX-EXT: hexanes extracts, ETHER-EXT: diethyl ether extracts and MC-EXT: methylenechloride extracts), respectively.

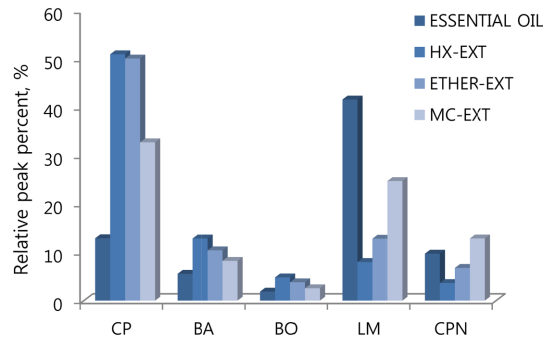


Fig. 6. Relative peak percent of five compound (CP: camphor, BA: borneol acetate, BO: borneol, LM: D-limonene, CAP: camphene) in essential oil and solvent extracts (HX-EXT: hexanes extracts, ETHER-EXT: diethyl ether extracts, MC-EXT: methylene chloride extracts) obtained from Amomi Fructus by dynamic headspace-GC-MS.

추출물의 성분과 상대적인 면적 비율을 Table 6에 나타내었으며 각 피크의 상대적인 면적 비율에 대한 상대표준편차(relative standard deviation)의 범위는 3.82%~13.2% 이었다. 정유와 용매 추출물의 주요 성분 5개(camphor, borneol acetate, borneol, D-limonene, camphene)의 상대적인 면적 비율을 Fig. 6에 나타내었다. 정유를 GC-MS에 직접 주입하여 얻은 경우(Table 5)와 dynamic headspace를 이용하여 60 °C에서 10분간 휘발하는 물질을 포집한 후 GC-MS로 분석한 경우를 비교하면 검출된 성분의 양에서 많은 차이가 있었다. 직접 주입한 경우 가장 많은 성분이 camphor로 상대적 면적 비율이 32.3%인 반면 dynamic headspace를 이용하여 분석한 경우 가장 많은 성분은 D-limonene으로 상대적인 비율이 41.6% 이었다. 용매 추출물의 성분을 dynamic headspace이용하여 분석한 결과 가장 성분이 많은 것은 camphor (32.7%~50.9%)이었으며 두 번째로 성분이 많은 성분은 D-limonene (7.99%~24.7%)이었으며 가장 적게 검출된 것은  $\beta$ -pinene (0.33%~0.59%)이었다. 이런 결과는 dynamic headspace를 이용하여 휘발하는 온도와 포집하는 시간과 같은 휘발조건을 변경하면 각 조건에서 휘발하는 물질의 종류와 상대적인 양을 예상 할 수 있으며, 이는 휘발조건에 따른 휘발성 물질의 종류와 양을 측정할 수 있다는 측면에서 생물학적 활성 연구에 중요한 자료가 될 수 있다.

용매 추출 후 회수한 사인을 SDE-HX 방법으로 정유 성분을 재추출한 결과 소량이지만 정유를 추가로 얻을 수 있었다(Table 1). 헥세인으로 추출한 후 남아 있는 사인으로부터 정유의 회수율은 0.14%이었으며, 다이에틸 에터 추출 후와 다이클로로메테인 추출 후

회수한 사인으로부터의 회수율은 각각 0.08%와 0.06% 이었다. 이렇게 얻은 각 정유 1  $\mu$ L에 40  $\mu$ L의 헥세인을 가하여 희석한 용액 1  $\mu$ L를 GC-MS에 직접 주입하여 얻은 크로마토그램을 분석한 결과 구성성분과 함량이 용매 추출과정을 거치지 않은 사인에서 SDE 방법으로 얻은 정유의 구성성분과 함량이 거의 동일하였다. 또한 사인을 SDE 방법으로 추출한 다음 사인과 물의 혼합물에 헥세인을 넣어 헥세인 추출물을 추출한 결과 소량의 고형성 물질을 얻었으며 회수율은 0.01% 이었다(Table 1). 따라서 사인에서 정유 성분만을 얻을 목적이라면 SDE 방법이 용매 추출법보다 효율적임을 알 수 있었다. 사인을 SDE 방법으로 정유를 추출하는 방법의 회수율은 사인 40.0 g에 장뇌 0.027 g을 넣은 후 SDE 방법으로 정유 성분을 얻어 장뇌의 회수율을 측정된 결과 82.0% (0.0212 g)이었다. 회수율 계산은 SDE 방법의 정유 회수율 0.97% (Table 1)과 장뇌 회수율이 같다고 가정하고 계산하였으며 장뇌 표준용액(농도 500 mg/L)을 사용하여 검정 곡선을 그린 후 농도 계산에 사용하였다.

분석실험실 수준의 청결성을 유지하지 않고 일반적인 생물학적 활성을 연구하는 실험실 수준으로 초차기구들을 관리할 경우 사용하는 기기와 초차 용기로부터 금속 성분의 오염이 예상된다. 오염 정도를 측정하기 위하여 사인 원재료와 위의 실험 방법으로 얻은 정유와 용매 추출물에 대한 중금속 성분을 측정하였다. 사인과 정유 및 용매 추출물의 중의 Hg는 수은 분석기(MA-2, 일본)로 측정하였으며, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd 및 Pb는 ICP-MS로 측정하였다(Table 7).



Table 7. Determination of metals in essential oil, HX-extracts, ETHER-extracts and MC-extracts by mercury analyzer and ICP-MS

	Concentration, mg/kg								
	Hg*	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb
SDE-HX	<0.001	0.30	0.65	<0.10	<0.10	1.16	1.10	<0.10	0.18
HX-EXT	0.0023	0.32	6.30	<0.10	<0.10	4.40	3.80	<0.10	0.53
ETHER-EXT	<0.001	0.34	2.22	<0.10	<0.10	2.60	1.90	<0.10	0.18
MC-EXT	<0.001	0.47	9.08	<0.10	0.19	3.43	2.86	<0.10	0.43
Amomi fructus	0.0023	0.40	213	0.14	0.70	8.29	31.0	<0.10	0.72

\*: Mercury analyzer

사용한 탈 이온수와 용매 추출법에 사용한 3개의 용매에서는 위의 금속 함량들이 검출한계 이하로 검출되었다. 본 연구에서 사용한 사인에서는 Pb, Cd 및 Hg 이 0.72 mg/kg, <0.10 mg/kg 및 0.0023 mg/kg 이 검출되었으며 이는 순도시험 허용기준치 이하의 값들이다. 중국산 사인 및 한약재의 부위별에 대해서 금속 성분에 대한 보고가 있으며,<sup>22</sup> 중국산 사인에 대한 As, Pb, Cd 및 Hg 성분 분석 보고에 의하면 이들 성분이 각각 0.095 mg/kg, 0.044 mg/kg, 4.18 mg/kg 및 0.002 mg/kg 이 검출되었다.<sup>23</sup> 사인, 정유 및 3개의 용매 추출물에 대해서 Cr, Mn, Co, Ni, Cu 및 Zn의 함량을 추가로 검사하였으며, 사인에서 Mn (213 mg/kg), Cu (8.29 mg/kg) 및 Zn (31.0 mg/kg)이 비교적 높은 함량으로 검출되었고 정유와 용매 추출물에서도 Mn (0.65~9.08 mg/kg), Cu (1.16~4.40 mg/kg) 및 Zn (1.10~3.80 mg/kg) 검출되었다. 이들 금속성분들이 취급과정에서 오염된 것인지 아니면 사인에서 기인하는 것인지에 대한 자세한 조사가 필요하며, 특히 사인에서 검출된 Mn, Cu 및 Zn과 같은 금속이 원재료인 사인에서 기인하는 것인지 아니면 유통과정이나 취급과정에서 오염된 것인지, 또한 이런 금속들이 생물학적 활성 연구에 어떤 영향 주는지도 규명할 필요가 있다.

#### 4. 결 론

한약재 사인에서 휘발성 물질을 이용한 생물학적 모델 연구에는 일정한 규모의 양이 필요하며, 실험 결과 SDE 방법과 유기용매 추출법 모두 이 목적에 적합함을 알 수 있었다. 정유와 용매 추출액의 GC-MS에 의한 구성 성분은 정유에서 휘발성 물질의 양이 상대적으로 많았으며, 용매 추출액에서는 분자량이 크거나 비점이 높은 물질들이 많이 검출되었으며 일부 물질들은 분석 조건에서 휘발하지 않은 것으로 판단

된다. Dynamic headspace를 이용하여 휘발하는 온도와 시간과 같은 휘발조건을 변경하여 GC-MS로 분석하면 각 조건에서 휘발하는 물질의 종류와 상대적인 양을 예상 할 수 있으며, 이는 휘발조건에 따른 휘발성 물질의 종류와 양을 측정할 수 있다는 측면에서 생물학적 활성 연구에 중요한 자료가 될 수 있다. SDE 방법으로 사인의 정유 회수율을 장뇌를 이용하여 검사한 결과 82.0%로 우수한 편이었으며, 휘발성 성분이 유효 성분인 경우의 모델 연구에서는 정유 추출방법인 SDE 방법이 선호되나, 용매 추출물에는 정유 성분 이외에 다른 성분이 존재하므로 경우에 따라서는 용매 추출물이 활성 연구에 적합할 수 있다. 사인과 정유 및 용매 추출액에 대해서 Hg, Cd 및 Pb의 함량은 모두 순도시험 허용기준치 이하로 검출되었다. 그러나 사인, 정유 및 3개의 용매 추출물에 대해서 추가로 검사한 Cr, Mn, Co, Ni, Cu 및 Zn의 농도를 살펴보면 사인에서 Mn (213 mg/kg), Cu (8.29 mg/kg) 및 Zn (31.0 mg/kg)이 비교적 높은 함량으로 검출되었으며 정유와 용매 추출물에서도 비교적 높은 양의 이들 금속들이 검출되었다. 이들 금속성분의 출처에 대한 규명이 필요하며 이들 금속들의 생물학적 활성 연구에 어떤 영향을 주는지도 규명할 필요가 있다.

#### 감사의 글

이 연구는 미래창조과학부 한국연구재단(과제번호: 2015003195)의 연구비로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

#### References

1. M. Takahashi, A. Yamanaka, C. Asanuma, H. Asano, T. Satou and K. Kokike, *Nat. Prod. Commun.*, **9**(7),

- 1023-1026 (2014).
2. T. Satou, S. Murakami, M. Matsuura, S. Hayashi and K. Koike, *Nat. Prod. Commun.*, **5**(1), 143-146 (2010).
  3. L. Lucian, O. Cioanca and M. Hancianu, *Phytomedicine*, **19**(6), 529-534 (2012)
  4. L. R. Chioca, V. D. C. Antunes, M. M. Ferro, E. M. Losso and R. Andreatini, *Life Sci.*, **92**(20-21), 971-975 (2013).
  5. B. S. Koo, S. I. Lee, J. H. Ha and D. U. Lee, *Bio. Pharm. Bull.*, **27**(4) 515-519 (2004).
  6. V. K. Agnihotri, S. G. Agarwal, P. L. Dhar, R. K. Thappa Baleshwar, B. K. Kapahi, R. K. Saxena and G. N. Qazi, *Flavour Fragrance J.*, **20**(6), 607-610 (2005).
  7. Y. Zhang and Z. Z. Wang, *Pharm. Biomed. Anal.*, **47**(1), 213-217 (2008).
  8. S. Cuia, S. Tan, G. Ouyang, S. Jiang and J. Pawliszyn, *J. Chromatog. B*, **877**(20-21), 1901-1906 (2009).
  9. E. E. Stashenko and J. R. Martinez, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**(2), 235-242 (2007).
  10. S. Y. Oh, H. D. Shin, S. J. Kim and J. Hong, *J. Chromatogr. A*, **1183**(1-2), 170-178 (2008).
  11. M. S. Kim, T. W. Kang, H. Pyo, J. Yoon, K. Choi and J. Hong, *J. Chromatogr. A*, **1208**(1-2), 25-33 (2008).
  12. M. Benzo, G. Gilardoni, C. Gandini, G. Caccialanza, P. V. Finzi, G. Vidari, S. Abdo and P. Layedra, *J. Chromatogr. A*, **1150**(1-2), 131-135 (2007).
  13. A. Chaintreau, *Flavour Fragrance J.*, **16**(2), 136-148 (2001).
  14. P. Tatke and Y. Jaiswal, *Res. J. Med. Plants*, **5**(1), 21-31(2011).
  15. C. Gherman, M. Culea and O. Cozar, *Talanta*, **53**(1), 253-262 (2000).
  16. Z. O. Mustafa and H. Hilal, *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**(7-8), 1127-1133 (2004).
  17. J. L. Hendrick, J. M. Leah and L. T. Taylor, *Microchim. Acta.*, **108**(3-6), 115-132 (1992).
  18. N. K. Dubey, R. Kumar and P. Tripathi, *Curr. Sci.*, **86**(1), 37-41 (2004).
  19. M. M. W. B. Hendriks, L. C. Juarez, D. D. Bont and R. D. Hall, *Anal. Chim. Acta.*, **545**(1), 53-64 (2005).
  20. C. Deng, N. Yao, A. Wang and X. Zhang, *Anal. Chim. Acta.*, **536**(1-2), 237-244 (2005).
  21. C. Deng, A. Wang, A. Shen, D. Fu, J. Chen and X. Chang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**(2), 326-331 (2005).
  22. D.-G. Kim, K.-S. Kim, S.-D. Lee, K. Jung and S-k. Park, *Anal. Sci. Technol.*, **27**(2), 114-120 (2014).
  23. W. H. Cho, Y. Y. Cha, T. H. Baik, B. W. Kim, S. G. Lee, J. S. Yoo, Y. J. Sohn and S. H. Sun, *Korean J. Oriental. Physiology & Pathology*, **25**(3), 489-495 (2011).