측백나무속(*Thuja*)의 잎에 함유된 Monoterpenoids 분석을 통한 종간의 화학분류학적 연구

조 규 갑 · 김 종 희*
경남대학교 자연과학대학 생명과학부

적 요: 본 실험에서는 *Thuja*속 7종(*Thuja orientalis*, *T. orientalis* 'Avrea Nana', *T. orientalis* cv. *compacts*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim')의 침엽에 함유된 monoterpenenoids를 GC-MS로 분석하여 종간을 비교하였다. 분석결과 총 30종류의 성분이 검출되었는데 그 중 α-pinene, camphene, sabinene, myrcene, limonene, bonyl acetate, γ-terpinene, α-terpinenyl acetate는 7종 식물 모두에서 검출되었다. *Thuja*속 7종에서 추출된 monoterpenenoids는 종간에 차이가 나타났으며 *Thuja orientalis* 'Avrea Nana'(11 Compounds)는 가장 적은 성분이 나타났고 *Thuja occidentalis* 'Pumila'(26 Compounds)는 가장 많은 종류의 성분이 검출되었다. 검출된 성분을 토대로 종간의 유사성을 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 프로그램으로 분계분석을 하였다. 분계도는 4가지 형태가 나타났고 *Thuja occidentalis*와 *Thuja occidentalis* 'Boothii'가 가장 유사한 유연관계를 보였다.

검색어: 분계도, 측백나무속, GC-MS, Monoterpenoids, PAUP

서 론

*Thuja*속은 측백나무과(Cupressaceae)에 속하는 식물군으로 동아시아와 북아메리카에 6～7종이 분포하고 일본이 원산으로 우리나라에는 20세기 초에 들어와 2종 1변종이 자생하며 1종은 북아메리카에서 도입되어 정원수나 조림용으로 식재되고 있다(김 등 1997). 최근에는 인위적인 교배와 외국으로부터 도입된 다양한 특성을 지닌 변종들이 있는데 이들 잎에서 얻어지는 essential oils은 향료, 살충제, 의약품, 방향제 등에 이용되고 관상용 및 약용으로도 이용되고 있다(이 1999). 더우기 이들 식물은 내한성이 강한 상록수이고 병충해 및 공해에 강하며(조 1989) 우리나라 기후와 토질에 잘 적응되어 비교적 번식과 재배가 용이한 식물이다.

측백나무속 침엽에 함유된 essential oils에 대해서는 정량분석(Laurence 1998, Chizzola 등 2003), 향균작용(길 1993, 이 1999, 서 등 2003)에 관한 연구가 수행된 바 있다.

최근에는 식물에 함유된 essential oils을 분석하여 chemotype을 결정하는 연구가 활발히 진행되고 있는데 Cavaleiro 등(2001)은 *Juniperus phoenicea*(*J. p.* var. *phoenicea*, *J. p.* var. *turbinata*, *J. p.* ssp. *eumediterranea*)를 PCA(Principal Components extraction) 방법에 의해서 3가지 형태로 분류하였고 Adams(2001)는 Armenia, Turkmenistan, Pakistan, Kazakstan에 서식하는 향나무속 4종(*J. excelsa*, *J. polycarpos*, *J. seravschanica*, *J. turcomanica*)을 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) 방법에 의해서 4집단으로 구분하는 화학적 분류를 하였다. 그러나 이에 대한 연구들은 대부분 외국에 자생하는 식물이고 한국에 서식하는 *Thuja*속에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구는 한국에 서식하는 *Thuja*속 7종의 침엽이 생산하는 monoterpenoids 성분을 정량, 정성 분석하여 종간의 차이를 밝히는데 연구의 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

연구에 사용된 수종은 충남 태안군 소원면 소재 천리포 수목원과 경남 진주시 반성면 소재 경남수목원 내에 식재된 20～40년생의 *Thuja*속 중 *T. orientalis*, *T. orientalis* 'Avrea Nana', *T. orientalis* cv. *compacts*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim' 7종을 2003년 8월중에 채취하여 실험에 사용하였다(Table 1).

침엽의 채취

공시재료 채취목 높이 2 m에서 가지 끝으로부터 30 cm 길이로 가지를 절단하고 수종별로 구분하여 비닐봉지에 잘 봉한 후 ice box에 넣어 실험실까지 운반한 다음 monoterpene 추출 전까지 냉동보관하였으며 가능한 한 보관시간을 최소화 하였다. 냉동 보관된 침엽을 약 2 cm 길이로 절단하고 절단한 침엽 3 g에 pure sand를 첨가한 다음 1% tetradecane 0.1 ml를 internal standard로 추출하였다. 추출액을 $NaSO_4$로 여과시켜 질소가스 약 1 ml로

* Corresponding author; Phone: 82-55-249-2242, e-mail: biokim@kyungnam.ac.kr

Table 1. Collection location of *Thuja* species

Korean name	Science name	Locality
측백나무	*Thuja orientalis*	경상남도수목원
측백나무 품종	*Thuja orientalis* 'Avrea Nana'	천리포수목원
둥근측백	*Thuja orientalis* cv. *compacts*	경상남도수목원
서양측백	*Thuja occidentalis*	경상남도수목원
서양측백 품종	*Thuja occidentalis* 'Boothii'	천리포수목원
서양측백 품종	*Thuja occidentalis* 'Pumila'	천리포수목원
서양측백 품종	*Thuja occidentalis* 'Tiny Tim'	천리포수목원

농축시킨다.

Monoterpenoids의 분석

추출액 1 ㎕를 내경 0.23 mm, 길이 30 cm인 HP-5MS capillary column이 내장된 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer; HP 5890Ⅱ-HP 5972MSD)를 이용하여 monoterpenoids를 분석하였다. 이때 GC-MS의 분석조건은 injector 온도가 220℃이고 detector의 온도는 320℃, carrier gas는 헬륨가스를 사용하여 1.8 ml/min의 flow rate로 하였다. 초기 oven 온도는 37℃에서 5분간 유지하고 180℃까지는 분당 5℃ 비율로 증가시키며, 300℃까지는 분당 20℃ 비율로 증가시켰다(Kim and Langenheim 1994). 물질의 동정은 MS의 Wiley library와 standard의 retention time과의 일치로 확인하였다.

분계도 작성

*Thuja*속 중 *T. orientalis*, *T. orientalis* 'Avrea Nana', *T. orientalis* cv. *compacts*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim' 7종을 ingroup으로 설정하였고 outgroup으로 *Pinus rigida*를 설정하여 분계도를 작성하였다. 분계분석은 와그너의 최소가정의 원리(Wagner parsimony)를 토대로 monoterpenoids 함량이 0.05% 이상 함유된 성분을 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony : ver 3.0) 프로그램(1990)으로 분석하였다. 분계도의 안정성을 조사하기 위해서는 최소가정의 분계도보다 더 긴 분계도를 찾아내고 이들의 완전 일치 분계도를 그려 Bremer support를 측정하였다.

결과 및 고찰

수종별 monoterpened의 분석

조사한 *Thuja*속 7종에서 분석된 monoterpenoids 성분 중 0.05% 이상 함유된 것을 나타내었다(Table 2).

정성분석 결과 monoterpenoid의 조성은 11종류(*T. orientalis* 'Avrea nana')에서 26종류(*T. occidentalis* 'Pumila')로 수종별 차이가 나타났으나 α-pinene, camphene, sabinene, myrcene, limo-

Table 2. Percentage components of leaf monoterpenoids in 7 *Thuja* species. *T. orientalis*(1), *T. orientalis* 'Avrea Nana'(2), *T. orientalis* cv. *compacts*(3), *T. occidentalis*(4), *T. occidentalis* 'Boothii'(5), *T. occidentalis* 'Pumila'(6), *T. occidentalis* 'Tiny Tim'(7). Only compounds found at levels >0.05% are included. Components that tend to separate the species are highlighted in boldface.

Monoterpenes	1	2	3	4	5	6	7
Thujene	0.00	0.00	0.00	0.50	0.60	0.54	0.45
α-Pinene	**10.91**	**13.24**	**14.01**	**4.56**	**2.85**	**3.38**	**3.29**
Camphene	**0.44**	**2.22**	**0.94**	**1.10**	**0.08**	**2.28**	**2.39**
Sabinene	**1.09**	**1.32**	**0.96**	**9.85**	**8.17**	**6.38**	**6.52**
Myrcene	**0.85**	**2.38**	**0.87**	**3.13**	**3.51**	**3.42**	**3.43**
Phellandrene	0.16	0.00	0.26	0.09	0.18	2.23	0.14
δ-3-carene	**4.99**	**18.83**	**11.36**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
α-Terpinene	0.00	0.00	0.00	0.21	0.37	0.34	0.23
Limonene	**1.51**	**5.50**	**0.15**	**2.13**	**1.84**	**2.38**	**2.15**
γ-Terpinene	0.09	0.12	0.07	0.27	0.41	0.34	0.27
Trans-sabinene hydrate	0.00	0.00	0.18	0.05	0.29	0.05	0.00
Terpinolene	**1.95**	**4.23**	**2.34**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
Fenchone	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**5.56**	**5.92**	**9.01**	**9.30**
α- Thujone	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**13.12**	**17.62**	**16.02**	**9.99**
β-Thujone	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**6.69**	**8.66**	**4.38**	**4.67**
Exo-methyl-camphenilol	0.00	0.00	0.00	0.26	0.20	0.45	2.77
Endo borneol	0.15	0.00	0.00	0.19	0.30	0.21	0.14
Cis-isopulegone	0.00	0.00	0.00	0.22	0.28	0.33	0.32
p-Cymen-8-ol	0.00	0.00	0.00	0.09	0.05	0.05	0.06
α-Terpineol	0.00	0.00	0.00	0.29	0.15	0.17	0.18
Trans-carveol	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.05	0.05
6-Octen-1-ol	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00
Pulegone	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.16	0.28
Carvacrol methyl ether	0.00	0.00	0.00	0.14	0.18	0.15	0.00
Bonyl acetate	**0.25**	**0.19**	**0.10**	**0.73**	**2.51**	**1.81**	**2.18**
Sabinyl acetate	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.05	0.06
α-Terpinene	0.09	0.05	0.07	0.00	0.00	0.07	0.05
α-Terpinenyl acetate	**0.68**	**1.22**	**0.19**	**1.25**	**0.12**	**2.06**	**1.86**
Undecane	0.08	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Geranyl acetate	0.00	0.00	0.00	0.26	0.14	0.56	0.25
Total(%)	**23.24**	**49.30**	**31.58**	**50.87**	**54.84**	**56.87**	**51.03**
Compound no.	**14**	**11**	**14**	**25**	**25**	**26**	**24**

nene, γ-terpinene, bonyl acetate, α-terpinenyl acetate는 조사 수종 모두에서 검출되었다. *T. orientalis*, *T. orientalis* 'Avrea Nana', *T. orientalis* cv. *compacts*에 존재하는 성분이 *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim'에서는 검출되지 않은 것은 δ-3-carene, terpinolene이며 그 반대로 *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim'에만 검출된 성분은 thujene, α-terpinene, fenchone, α-thujone, β-thujone, exo-methyl-camphenilol, cis-isopulegone, p-cymen-8-ol, α-terpineol, sabinyl acetate, geranyl acetate이었다. *T. orientalis*에서 검출된 14종류는 길(1993)의 23종류, 서 등(2003)의 21종류, Chizzola 등(2003)의 17종류보다 적었으며 이들 연구와 공통적으로 존재하는 것은 α-pinene, camphene, sabinene, myrcene, limonene, γ-terpinene이었다.

Monoterpenoids 함유량은 23.24%에서 56.87%까지 다양하였고 α-pinene(2.85%～14.01%), sabinene(0.96%～9.85%)은 조사 수종에서 비교적 다량이었다.

각 수종별 주요 함유량은 α-pinene(2.85%～14.01%), camphene (0.08%～2.39%), sabinene(0.96%～9.85%), myrcene(0.85%～3.43%), limonene(0.15%～5.50%), γ-terpinene(0.07%～0.41%), bonyl acetate (0.10%～2.51%), α-terpinenyl acetate(0.12%～2.06%)로 종간 뚜렷한 차이가 나타났다.

수종별 monoterpenoids 함량을 보면 *T. orientalis*에서는 α-pinene(10.91%), δ-3-carene(4.99%)의 함량이 높게 나타났고, *T. orientalis* 'Avrea Nana'는 δ-3-carene(18.83%), α-pinene(13.24%), limonene(5.50%)이 주요 성분이었다. 이것은 서 등(2003)이 분석한 자료와 일치하였으나 Laurence 등 (1998)이 중국에서 분석한 α- pinene(35.7%), camphene(16.4%), α-thujone(9.5%)과 차이가 있었다. 이러한 차이는 식물이 서식하는 환경적 차이 때문인 것으로 생각된다. *T. orientalis* cv. *compacts*는 α-pinene(14.01%), δ-3-carene(11.36%)의 함량이 높았고 terpinolene(2.34%)은 중간 정도로 나타났다. *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim'에서는 α-thujone (13.13%, 17.62%, 16.02%, 9.99%), sabinene(9.85%, 8.17%, 6.38%, 6.52%), fenchone(5.56%, 5.92%, 9.01%, 9.30%), β-thujone(6.69%, 8.66%, 4.38%, 4.67%)이 높게 나타났다.

Monoterpeneds의 분석을 이용한 종간의 분계분석

Monoterpenoids를 정성분석하여 종간의 계통분류학적 관계(전 1987)와 chemotype (Salgueiro *et al*. 2000)를 결정한 바 있는데, 본 연구에서도 *Thuja*속의 monoterpenoids의 차이를 이용하여 종간의 차이를 결정하는 의미 있는 결과가 나왔다.

*Thuja*속 7종에서 분석한 30 monoterpenoids를 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony : ver 3.0) 프로그램으로 수종들의 화학적 차이를 분석한 결과 4가지의 군으로 분류할 수 있었다(Fig. 1).

제Ⅰ군(*T. orientalis*)은 α-pinene의 함량이 높고 δ-3-carene이 중간 정도로 나타났고 화분립의 크기와 표면무늬(김 등 1997)의 연구에서도 다른 종과 달랐다. 제Ⅱ군(*T. orientalis* 'Avrea Nana')은 δ-3-carene, α-pinene, limonene의 함량이 높고 terpinolene, myrcene, camphene이 중간 정도로 나타났다. 제Ⅲ군(*T. orientalis* cv. *compacts*)은 α-pinene, δ-3-carene의 함량이 높고 terpinolene이 중간 정도로 나타났다. 형태학적으로 *T. orientalis*와 *T. occidentalis*는 가도관의 직경, 벽후, 방사조직의 높이가 종간의 차이가 없어 계통분류 기준으로서 가치가 없다고 하였으나(박 1983) 화분형태적으로(김 1997)차이가 있고 monoterpenoids의 구성에서도 차이가 있어 monoterpenoids의 성분분석으로도 두 종을 구분할 수 있었다.

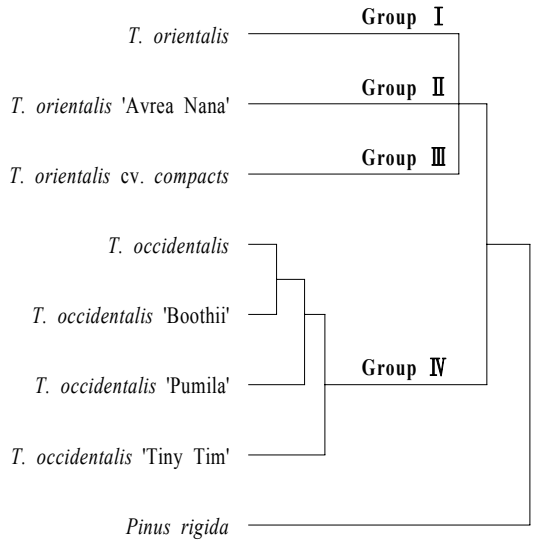

Fig. 1. The most parsimonious cladogram from leaf monoterpenoids.

제Ⅳ군(*T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim')에는 3가지의 subgroup으로 세분화되었으며 α- thujone, fenchone, sabinene, β-thujone의 함량이 높고 α-pinene, myrcene, limonene이 중간 정도로 나타났으며 잎의 끝이 갑자기 뾰족해져 다른 3가지의 군과는 잎의 형태와 화학성분에서 많은 차이가 있었다. 특히 *T. occidentalis*과 *T. occidentalis* 'Boothii'는 조사한 수종 중 monoterpenoids의 구성과 성분함량에서 가장 유사한 자매군으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, *Thuja* 속의 분류학적 연구가 형태적(김 1997), 해부학적(박 1983), 계절적(Yatagai *et al*. 1995), 진화학적(Yu 1997) 관점으로 연구되어 왔으나 monoterpenoids의 함량 차이(Cavaleiro *et al*. 2001, Salgueiro *et al*. 2000, Thompson *et al*. 2003)와 diterpene의 지리적 차이(Takahashi *et al*. 2001)를 이용하여 chemotype을 정할 수 있다는 것을 제시한 것처럼 monoterpenoids의 함량을 이용하여 *Thuja*속을 화학적으로 분류하여 종간의 차이를 4그룹으로 결정할 수 있었다.

그러나 이러한 결과를 좀 더 뒷받침하기 위해서는 조사 종에 대한 형태학적, 해부학적, 유전학적 연구와 계절, 지리적 연구가 추가되어야 할 것이다.

인용문헌

김영두, 조현서, 추갑철. 1997. 한국산 측백나무과의 화분분류학적 연구. J. Agic. Tech. Res. Inst. 10: 135-147.

길봉섭. 1993. 측백나무에 들어 있는 생장억제물질의 작용. 한생태지 16: 181-190.

박상진. 1983. 한국산 나자식물에 대한 계통분류학적 연구. Annual Report of Bio. Res. 4: 161-180.

서원택, 양재경, 강병국, 박우진, 홍성철, 강영민. 2003. 서양측백나무 잎으로부터 식물정유 추출 및 생리활성. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11: 364-370.

이근광. 1999. 측백나무(*Thuja orientalis*)와 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)정유 (Essential oil)의 항균력 검색. 한국미용학회지 5: 567-577.

전승훈. 1987. Monoterpene 성분에 의한 분비나무와 구상나무의 분류학적 연구. 서울대학교 석사학위논문. 23 p.

조무형. 1989. 원색한국식물도감. 아카데미 서적. pp. 47-49.

Adams. R. 2001. Geographic variation in leaf essential oils and RAPDs of *Juniperus polycarpos* K. Koch in central Asia. Biochem. System. Ecol. 29: 609-619.

Cavaleiro, C., S. Rezzi, L. Salgueiro, A. Bighelli, J. Casanova and A.P. Cunha. 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oils of *Juniperus phoenicea* var. *tubinata* from Portugal. Biochem. System. Ecol. 29: 1175-1183.

Chizzola, R., W. Hochsteiner and S. Hajek. 2003. GC analysis of oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twing in the Rusitec system. Res. Veter. Sci. 1-6.

Kim J.H. and J.H. Langenheim. 1994. The effect of *Pseudotsuga menziesii* monoterpenoids on nitrification. Korean J. Ecol. 17: 251-260.

Laurence, G.G., Z.L. Hu and E. Zavarin. 1998. Foliage terpenoids of *Chinese cupresus* species. Biochem. System. Ecol. 26: 899-913.

Salgueiro, L.R., R. Vila, X. Tomas, S. Canigueral, C. Proenca and A. Adzet. 2000. Chemotaxonomic study on *Thumus villosus* from Portugal. Biochem. System. Ecol. 28: 471-482.

Swofford, D. 1991. Phylogenetic analysis using parsimony. version Illinois Natural History Survey. Champaign.

Takahashi, K., S. Nagahama, T. Nagashima and H. Suenaga. 2001. Chemotaxonomy on leaf constituents of *Thujopsis dolabrata*. Biochem. System. Ecol. 29: 839-848.

Thompson, J.D., J. Chalchat, A. Michet, Y. Linhart and B. Ehlers. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. J. Chem. Ecol. 29: 859-880.

Yatagai, M., M. Ohira, T. Ohira and S. Nagai. 1995. Seasonal variations of terpene emission from trees and influence of temperature light and contact stimulation on terpene emission. Chemosphere. 30: 1137-1149.

Yu, Z. 1997. Late quaternary paleoecolog of *Thuja* and *Juniperus* at crawford lake Ontario, Canada: pollen, stomata and macrofossils. Rev. Paleobat. Palyn. 96: 241-254

(2004년 4월 6일 접수; 2004년 5월 4일 채택)

Systematics of *Thuja* Based on Leaf Monoterpenoids

Jo, Gyu-Gap and Jong-Hee Kim*

Department of Biological Sciences, Kyungnam University, Kyungnam, 631-701, Korea

ABSTRACT : The compositions of the leaf monoterpenoids in 7 species of *Thuja* (*Thuja orientalis*, *T. orientalis* 'Avrea Nana', *T. orientalis* cv. *compacts*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim') were analyzed by GC-MS and compared between species. These *Thuja* contains 30 compounds and α-pinene, camphene, sabinene, myrcene, limonene, bonyl acetate, γ-terpinene, α-terpinenyl acetatee are occurred in these all species. Compounds in these leaf extracts are remarkably different between species. The simplest monoterpenoid (11 compounds) was found in *T. orientalis* 'Avrea Nana' the most complex monoterpenoid was in *T. occidentalis* 'Pumila'(26 compounds). Based on these data, similarities are computed using presence/absence matching by PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony). It appears that four taxa are present within these *Thuja* plants. The minimum spanning network reveals that *Thuja occidentalis* and *Thuja occidentalis* 'Boothii' were the most similar compounds.

Key words : GC-MS, Monoterpenoids, PAUP, Systematics, *Thuja*