

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. *compacta*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim')의 침엽에 함유된 monoterpenoids를 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 monoterpenoids는 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 앞에서 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. polycarpus*, *J. seravschanica*, *J. turcomanica*)을 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) 방법에 의해서 4

집단으로 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. *compacta*, *T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim' 7종을 2003년 8월 중에 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 monoterpenoid 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 Na₂SO₄로 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	<i>Thuja orientalis</i>	경상남도수목원
측백나무 품종	<i>Thuja orientalis</i> 'Avrea Nana'	천리포수목원
등근측백	<i>Thuja orientalis</i> cv. <i>compacta</i>	경상남도수목원
서양측백	<i>Thuja occidentalis</i>	경상남도수목원
서양측백 품종	<i>Thuja occidentalis</i> 'Boothii'	천리포수목원
서양측백 품종	<i>Thuja occidentalis</i> 'Pumila'	천리포수목원
서양측백 품종	<i>Thuja occidentalis</i> 'Tiny Tim'	천리포수목원

농축시킨다.

Monoterpenoids의 분석

추출액 1 μ l를 내경 0.23 mm, 길이 30 cm인 HP-5MS capillary column이 내장된 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer; HP 5890 II-HP 5972MSD)를 이용하여 monoterpenoids를 분석하였다. 이때 GC-MS의 분석조건은 injector 온도가 220°C이고 detector의 온도는 320°C, carrier gas는 헬륨가스를 사용하여 1.8 ml/min의 flow rate로 하였다. 초기 oven 온도는 37°C에서 5분간 유지하고 180°C까지는 분당 5°C 비율로 증가시키며, 300°C까지는 분당 20°C 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. *compacta*, *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 추정하였다.

결과 및 고찰

수종별 monoterpenoid의 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. *compacta*(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
ν -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
ρ -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. *compacta*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 다양이었다.

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 함유량을 보면 *T. orientalis*에서는 α -pinene(10.91%), δ -3-carene(4.99%)의 함유량이 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. *compacta*는 α -pinene(14.01%), δ -3-carene(11.36%)의 함유량이 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).

제 I군(*T. orientalis*)은 α -pinene의 함유량이 높고 δ -3-carene이 중간 정도로 나타났고 화분립의 크기와 표면무늬(김 등 1997)의

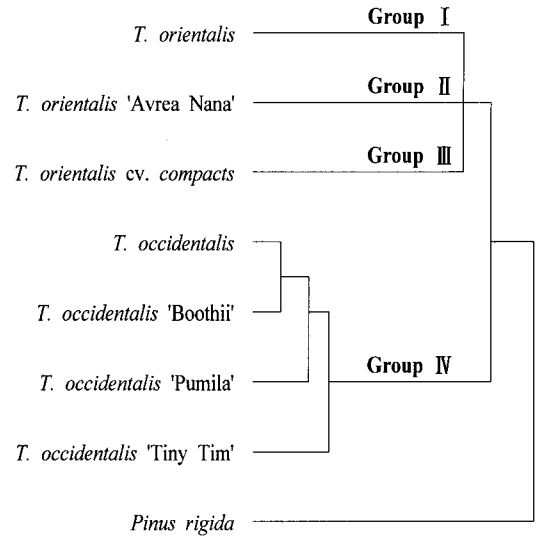


Fig. 1. The most parsimonious cladogram from leaf monoterpenoids.

연구에서도 다른 종과 달랐다. 제 II군(*T. orientalis* 'Avrea Nana')은 δ -3-carene, α -pinene, limonene의 함유량이 높고 terpinolene, myrcene, camphene이 중간 정도로 나타났다. 제 III군(*T. orientalis* cv. *compacta*)은 α -pinene, δ -3-carene의 함유량이 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) 화학형태적으로(김 1997)차이가 있고 monoterpenoids의 구성에서도 차이가 있어 monoterpenoids의 성분분석으로도 두 종을 구분할 수 있었다.

제 IV군(*T. occidentalis*, *T. occidentalis* 'Boothii', *T. occidentalis* 'Pumila', *T. occidentalis* 'Tiny Tim')에는 3가지의 subgroup으로 세분화되었으며 α -thujone, fenchone, sabinene, β -thujone의 함유량이 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. Agric. 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 polycarpus* 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* twigs 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 cupressus* 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 paleoecology of *Thuja* and *Juniperus* at Crawford Lake Ontario, Canada: pollen, stomata and macrofossils. Rev. Paleobot. 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. *compacta*, *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, bornyl acetate, γ -terpinene, α -terpinenyl acetate are occurred in these all species. Compounds in these leaf extracts are remarkably different between species. The simplest monoterpene (11 compounds) was found in *T. orientalis* 'Avrea Nana' the most complex monoterpene 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*