

Purge and Trap Headspace 법에 의한 솔잎(*Pinus densiflora* S.)의 휘발성 성분

† 이재곤 · 이창국 · 장희진 · 곽재진
KT&G 중앙연구원

Volatile Components of Pine Needle(*Pinus densiflora* S.) by Purge and Trap Headspace

† Jae-Gon Lee, Chang-Gook Lee, Hee-Jin Jang and Jae-Jin Kwag
Department of Tobacco Research, KT&G Central Research Institute

Abstract

Volatile components of pine needle(*Pinus densiflora* S.) were isolated by purge & trap headspace technique and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS). And then volatile components were extracted for 2 hr and 20 hr at the two different temperature settings: room temperature and 60°C. A total of 61 volatile components were identified by the four different conditions. These compounds are classified into six categories in terms of chemical functionality: 35 hydrocarbons, 16 alcohols, 4 carbonyls, 2 esters, 1 acid and 3 ethers. The major components were α -pinene(1.5~15.7%), β -myrcene(13.2~15.6%), β -phellandrene(12.0~16.0%) and *cis*-3-hexenol(4.0~18.3%). In the comparison of the four extraction conditions, longer extraction can be effective to extract components that have a high boiling point, but proved useless in obtaining low boiling point components. As a result of these experiments under the four different conditions, the 20 hr extraction at room temperature appeared to be the most optimized condition for the analysis of volatile compounds by using the purge & trap headspace technique.

Key words: pine needle, volatile components, purge & trap headspace, GC-MS.

서론

소나무는 우리나라에서 숲을 구성하는 가장 많은 종이며 솔 향은 솔잎차, 송편 등으로 이용되어 예로부터 우리와 매우 친숙하다. 솔잎은 한의서와 민간요법에 따르면 간장 질환, 신경계 질환, 동맥경화증 등에 효과가 있다고 알려져 왔으며¹⁾ 솔잎의 essential oil은 음료, 제과, 세제, 향장 등에 광범위하게 사용되어지고 있다^{2,3)}. 최근 들어 천연물에 대한 선호도가 증가하

고 있고 향료 부분에 있어서도 천연향의 수요는 점차 증가하고 있는 추세이며 이는 당분간 지속될 전망이다. 또한 식품에 있어서도 전통적인 우리 고유의 것에 대한 관심이 증대되면서 솔잎 음료, 솔잎 차 등이 시판되고 있으나 이러한 제품의 성공 여부는 이들 제품이 가지는 기능성 못지 않게 향기를 발현하는 휘발성 성분도 중요한 역할을 한다. 이와 관련하여 솔잎의 휘발성분에 대한 연구로는 Hong 등⁴⁾이 수증기 증류와 용매 추출에 의해 리기다소나무의 휘발성 성분을 분석

† Corresponding author : Jae-Gon Lee, Dept. of Tobacco Research, KT&G Central Research Institute, Taejon 305-805, Korea.
Tel : 82-42-866-5591, Fax : 82-42-866-5426, E-mail : jgolee@ktng.com

한 바 있고 Woo 등⁵⁾이 초임계 추출과 수증기 증류에 의한 추출법에서 휘발성 성분의 조성에 차이가 있음을 보고한 바 있다. 또한, Roussis 등⁶⁾은 수증기 증류에 의해 그리스산 솔잎 5개 품종의 휘발성 성분 분석에서 품종간 성분의 조성 차이가 상당히 크다고 발표한 바 있다. 일반적으로 식물체에서 휘발성 성분을 추출하는데 사용되는 방법으로는 수증기 증류법이 가장 많이 사용되고 있으나 최근에는 solid phase microextraction (SPME)법⁷⁾과 headspace 법⁸⁾ 등이 많이 사용되고 있다. 수증기 증류법은 소량의 용매로 추출하면서 비교적 향기의 손실이 적은 장점이 있으나 시료를 추출하는 동안 고온을 유지해야 하므로 주요 성분들이 열에 의해 변화될 수 있는 단점이 있다⁹⁾. SPME 법은 유기용매를 사용하지 않고 적은 양의 시료로도 간단하게 전처리 할 수 있어 headspace 법을 대신하여 많이 사용되고 있으나 headspace 법에 비해 효율이 많이 떨어지는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 휘발 성분 추출을 위한 전처리법에서 가장 효율이 좋은 것으로 알려진 headspace 법은 전처리 조건에 따라 dynamic headspace, vacuum headspace, purge & trap headspace로 분류할 수 있으며 이 중 purge & trap headspace 법이 가장 많은 성분을 추출하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 지금까지 솔잎의 휘발성 성분에 관한 연구가 일부 수행되어져 왔지만 이때 사용한 전처리 방법은 대부분 수증기 증류법이며, headspace 법으로는 솔잎 중 chlorinated hydrocarbons 분석에 관해 보고된 바 있으나¹³⁾ 휘발성 성분 분석에 관해서는 아직까지 발표된 바 없다. 그리하여 본 연구에서 솔잎의 휘발성 성분을 효율적으로 분석하기 위해 본 실험실에서 새롭게 직접 제작한 purge & trap headspace 장치(Fig. 1)를 이용하여 솔잎의 휘발성 향기 성분 분석 및 최적조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용한 솔잎(*Pinus densiflora* S.)은 충남 공주 계룡산에서 2004년도 3월 초순에 채취하여 통풍이 잘 되는 그늘에서 3일 동안 건조시킨 후 향기 성분이 휘발되지 않도록 밀봉하여 저온(3°C)에서 보관하면서 휘발성 성분 분석 시료로 사용하였다. 휘발성 성분을 포집하는 흡착제로는 2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide를 base로 하는 Tenax GC에 graphited carbon이 30% 포함된 미국 Altech제 Tenax GR을 사용하였으며 그 외 시험에 사용한 시약은 Aldrich사 제품을 사용하였다.

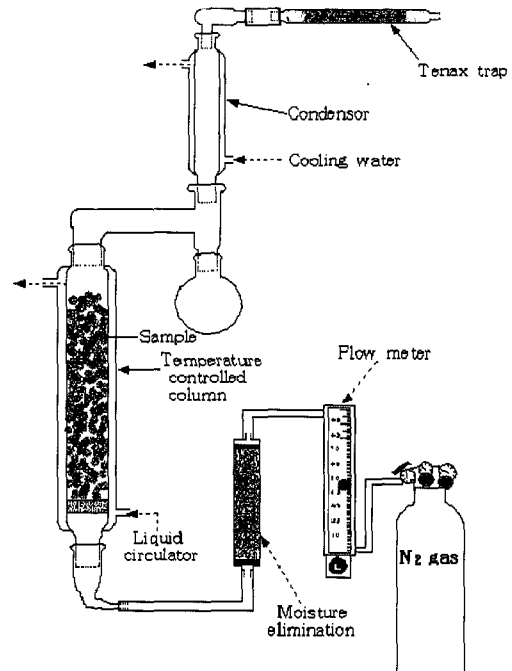


Fig. 1. Schematic diagram of the purge and trap headspace apparatus.

2. 휘발성 성분의 추출

건조된 솔잎 20 g을 본 실험실에서 직접 제작한 purge & trap headspace 장치 (Fig. 1)의 sample column에 넣고 수분을 제거한 질소 기체를 분당 60 ml의 유속으로 불어 넣어 솔잎으로부터 휘발되는 성분을 Tenax GR(1 g)에 흡착시켜 휘발성 성분 분석 시료로 하였다. 이때 사용된 Tenax GR은 사전에 수분 및 기타 오염물질을 제거하기 위해 350°C에서 5시간 동안 질소하에서 건조하였다. 휘발 성분 추출은 sample column의 온도를 실온으로 유지하면서 2시간과 20시간 동안 각각 추출하였고 다음으로 시료를 넣은 column의 외부 층에 독일 Julabo사 냉동정온순환기 F10을 사용하여 60°C의 물을 순환시키면서 2시간과 20시간 동안 각각 추출하였다. 이 때 시료중 수분이 Tenax GR에 흡착되는 것을 막기 위해 cooling condenser(5°C)를 sample column 위에 설치하여 사용하였다.

3. 휘발성 성분의 분석

분리된 휘발성 성분은 미국 Agilent사 모델 6890/5973 GC/MS를 사용하여 분석하였다. GC/MS의 분석 조건으로 column은 Innwax(50 m×0.2 mm i.d) fused silica capillary를 사용하였고 온도는 40°C에서 3분간 유지한 후 220°C까지 2°C/min의 속도로 승온하고 220°C에서 20분간 유지하였다. Injector 및 interface의 온도는 250°C, ionizing voltage는 70 eV로 하였고 운반 기체

로 helium 유량은 0.5 ml/min으로 하였다. Tenax GR에 흡착된 휘발성 성분을 탈착시켜 GC/MS에 주입시키기 위해 일본 Japan Analytical Industry사가 제작한 JHS-100A 모델을 GC에 연결하여 사용하였다. 이때 휘발 성분이 흡착된 Tenax GR을 sample tube(180°C)에 넣고 헬륨으로 10분간 purging하여 휘발 성분을 adsorption tube(-40°C)로 이동시킨 후 358°C에서 5초간 탈착시켜 splitless mode로 GC에 주입하였다. GC/MS에 의해 얻어진 total ion chromatogram에서 각 성분의 mass spectrum을 표준 mass spectrum과 비교하고 표준품과 GC 머무른 시간을 비교하여 성분을 확인하였다.

결과 및 고찰

솔잎(*Pinus densiflora* S.)의 휘발성 성분을 분석하고자 휘발성 향기 성분 분석시 가장 적합한 것으로 알려진^{11,12)} headspace(purge & trap)법을 이용하여 추출온도와 시간을 달리하면서 추출된 휘발 성분의 조성을 분석한 total ion chromatograms(TIC)을 Fig. 2에 나타내었고, 분리된 peak를 GC retention time과 GC/MS로 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에 나타난 바와 같이 4가지 추출조건에 의해

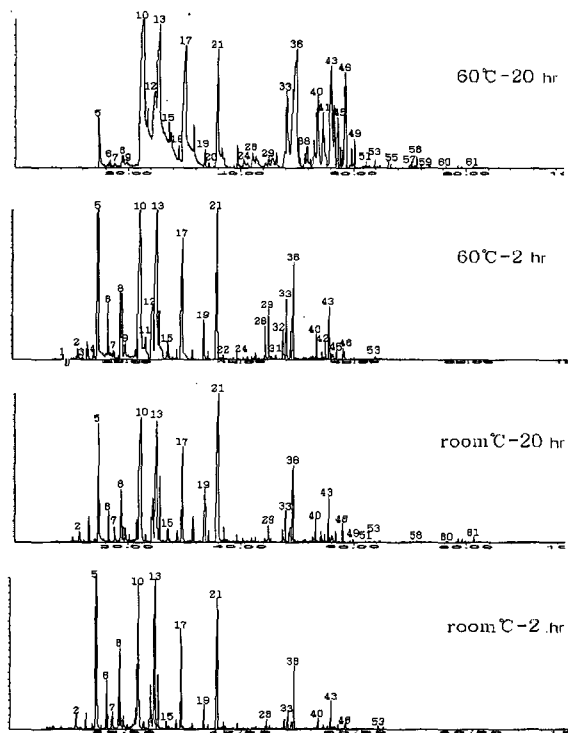


Fig. 2. TIC of volatile components obtained by variation of extraction temperature and time in the purge and trap headspace.

휘발 성분을 분석한 결과 총 61개의 성분을 확인하였다. 확인된 성분을 관능기별로 분류하여 보면 hydrocarbons 35종, alcohols 16종, carbonyls 4종, ethers 3종, esters 2종, acid 1종으로 나타났다. 이러한 관능기 중 가장 많은 것으로 나타난 hydrocarbons류는 주로 tricyclene, pinene, camphene, limonene 등 탄소수 10개인 monoterpene 화합물과 caryophyllene, farnesene, cubebene 등 탄소수 15개인 sesquiterpene 화합물이었으며 이들 monoterpene 화합물이 부드럽고 woody, piney, fruity한 향 특성을 갖는 반면에 sesquiterpene 화합물들은 향이 약한 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 또한 Eskin등은 herb, spicy, citrus한 향 특성을 갖는 식물체에서 독특한 향에 영향을 미치는 것은 hydrocarbons류가 아니고 alcohols과 esters기를 갖는 oxygenated terpene인 것으로 보고한 바 있는데¹⁴⁾ 본 실험에서도 oxygenated terpene 물질인 2-hexenal(2.1~2.8%), 2-pentenol(0.3~1.8%), hexanol(0.4~3.5%), cis-3-hexenol(4.0~18.3%) 등이 상당량 들어있는 것으로 확인되었다. 솔잎에서 확인된 주요 휘발성 성분으로는 α -pinene(1.5~15.7%), β -pinene(0.4~5.4%), β -myrcene(13.2~15.6%), β -phellandrene(12.0~16.0%), cis-3-hexenol(4.0~18.3%), β -caryophyllene(3.6~6.8%) 등이 확인되었다. 이러한 결과는 Petrakis¹⁵⁾ 등이 수증기 증류법에 의한 그리스산 솔잎 5종에서 α -pinene(9.6~21.8%), β -pinene(4.2~26.4%), germacrene D(4.5~19.2%) 등이 주요 성분이라고 보고한 내용과, Woo 등⁵⁾이 한국산 솔잎(이엽송)을 초임계 추출장치로 추출했을 때 α -pinene(5.3~11.7%), β -pinene(10.8~18.5%), β -myrcene(11.5~17.3%), limonene (32.6~43.4%), germacrene D(5.6~11.3%) 등이 주요 성분이며, SDE 장치로 추출했을 때는 α -pinene(12.0%), β -pinene(19.1%), β -myrcene(12.0%), limonene(37.1%) 등이 주요 성분이라고 보고한 내용과 다소 차이가 있는데 이는 성장된 지역 또는 품종간에 따라 성분의 조성 차이가 있으며 시료의 전처리 방법에 따라라도 추출되어지는 성분에 차이가 있기 때문으로 판단된다. 또한 초임계 추출장치에서 총 23개의 성분을 확인하였고 SDE 장치에서 총 28개의 성분을 확인한 반면에 본 실험에 사용한 Purge & Trap headspace장치에서는 총 61개의 성분을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때 지금까지 휘발 성분 분석시 전처리 장치로 많이 사용되어진 SDE 장치에 비해 본 실험에 사용된 Purge & Trap headspace 장치가 휘발성 성분 분석에 효능이 더 좋은 것으로 판단된다. Headspace(purge & trap)법에 의해 솔잎의 휘발성 성분 분석시 최적 조건을 검토하기 위해 실온에서 2시간과 20시간 동안 추출

Table 1. Comparison on volatile components obtained by variation of extraction temperature and time in the purge and trap headspace

Peak No.	RT ¹⁾	Components	Peak area %			
			²⁾ 60°C-20 hr	³⁾ 60°C-2 hr	⁴⁾ room°C-20 hr	⁵⁾ room°C-2 hr
1	10.28	Ethyl acetate	-	0.07	0.23	0.03
2	11.44	Ethanol	-	0.39	0.51	1.06
3	12.25	2-Ethyl furan	-	0.12	0.14	0.08
4	14.28	Tricyclene	-	0.35	0.21	0.49
5	14.97	α -Pinene	1.48	10.02	7.63	15.66
6	16.68	Camphene	0.20	2.0	1.03	2.42
7	17.65	Hexanal	0.21	0.41	0.77	1.17
8	18.90	β -Pinene	0.41	2.52	2.33	5.41
9	19.55	Sabinene	0.38	0.1	0.51	0.73
10	22.23	β -Myrcene	13.24	15.58	13.43	15.63
11	23.10	α -Terpinene	3.57	1.64	0.25	0.58
12	24.31	Limonene	4.77	4.63	3.92	4.47
13	25.08	β -Phellandrene	11.99	16.03	13.62	15.29
14	25.58	2-Hexenal	2.11	2.78	2.79	2.54
15	27.07	γ -Terpinene	1.10	0.54	0.77	0.39
16	28.72	p-Cymene	0.79	0.26	0.46	0.45
17	29.60	α -Terpinolene	9.20	6.80	6.31	6.63
18	31.49	2-Pentenol	1.76	0.30	1.04	0.29
19	33.48	Hexanol	0.36	1.39	3.45	1.09
20	34.23	<i>trans</i> -3-Hexenol	3.54	0.24	0.53	0.21
21	35.77	<i>cis</i> -3-Hexenol	3.97	10.01	18.29	9.31
22	36.92	<i>trans</i> -2-Hexenol	0.55	0.14	0.49	0.29
23	37.22	2,4-Hexadienal	-	-	0.08	0.09
24	39.31	α -Cubebene	0.35	0.10	0.17	0.09
25	40.32	α -Longipinene	0.21	0.08	0.11	0.07
26	40.80	Bicycloelemene	0.63	0.10	0.20	0.09
27	40.97	α -Copaene	0.69	0.20	0.17	0.13
28	41.28	Camphor	0.23	1.03	0.20	0.49
29	42.51	Benzaldehyde	0.27	1.56	0.61	0.20
30	44.31	β -Cubebene	0.21	0.07	0.12	0.07
31	44.88	Ocanol	0.38	0.14	-	-
32	45.31	Junipene	0.59	0.93	0.68	0.40
33	47.39	Bornyl acetate	2.93	1.82	1.13	0.72
34	47.96	β -Elemene	0.79	0.59	0.41	0.21
35	48.51	Thymyl methyl ether	2.22	0.88	0.48	0.34
36	48.74	β -Caryophyllene	6.81	4.67	4.57	3.62
37	49.14	Aromadendrene	0.67	0.05	0.08	0.07
38	49.56	Isoledene	0.32	0.08	0.15	-
39	53.21	β -Farnesene	0.97	0.08	0.19	-
40	54.17	α -Caryophyllene	2.86	0.78	0.99	0.51

Table 1. Continued

Peak No.	RT ¹⁾	Components	Peak area %			
			²⁾ 60°C-20 hr	³⁾ 60°C-2 hr	⁴⁾ room°C-20 hr	⁵⁾ room°C-2 hr
41	54.66	α -Amorphene	2.28	0.19	0.36	0.16
42	54.85	Borneol	-	0.41	0.27	0.10
43	55.45	Germacrene D	4.77	1.63	1.98	1.25
44	56.01	α -Muurolene	1.58	0.24	0.50	0.06
45	56.77	Bicyclogermacrene	0.95	0.23	0.36	0.20
46	57.97	δ -Cardinene	3.44	0.25	0.56	0.21
47	58.15	γ -Cardinene	0.64	0.17	0.37	0.16
48	59.64	Cadina-1,4-diene	0.37	0.04	0.08	-
49	60.16	α -Cadinene	0.48	0.07	1.13	-
50	62.01	<i>trans</i> -Anethole	0.08	-	-	-
51	62.24	<i>cis</i> -Calamenene	0.13	-	0.50	-
52	62.58	Hexanoic acid	0.03	-	0.05	-
53	63.75	Benzyl acetone	0.15	0.08	0.07	0.14
54	64.18	Benzyl alcohol	0.03	-	0.03	-
55	66.62	α -Calacorene	0.09	-	0.06	-
56	70.00	Caryophyllene oxide	0.10	-	-	-
57	70.20	4-Phenyl-2-butanol	0.16	-	-	-
58	71.19	Methyl eugenol	0.15	-	0.03	-
59	72.12	Nerolidol	0.02	-	-	-
60	76.42	Spathulenol	0.04	-	0.04	-
61	81.29	α -Cadinol	0.03	-	0.18	-

¹⁾ : retention time, ²⁾ : 20 hr extraction at 60°C, ³⁾ : 2 hr extraction at 60°C,

⁴⁾ : 20 hr extraction at room temperature, ⁵⁾ : 2 hr extraction at room temperature.

한 것과 60°C에서 2시간과 20시간 동안 각각 추출했을 때 실온에서 20시간 추출시 가장 많은 56개의 성분이 확인되었고, 다음으로 60°C에서 20시간 추출시 55개 성분, 60°C에서 2시간 추출시 49개 성분이 확인되었으며, 실온에서 2시간 추출시 가장 적은 45개의 성분이 확인되었다. 실온에서 2시간 추출과 20시간 추출의 비교에서, 주요 성분으로 확인된 α -pinene, β -pinene, β -myrcene 등의 monoterpenes류의 peak area(%) 값은 추출시간이 20시간으로 길어지면서 감소한 반면에 2-pentenol, hexanol, *cis*-3-hexenol 등의 alcohols류의 peak area(%) 값은 크게 증가하였다. 또한 isoleudene, β -farnesene, α -cadinene 등의 sesquiterpens 화합물은 2시간 추출에서는 확인되지 않았고 20시간 추출에서 새롭게 확인되었다. 이러한 결과로부터 비점이 낮은 monoterpenes 화합물들은 추출시 초기에 주로 추출되어지고 alcohols류와 비점이 높은 sesquiterpens 화합물들은 추출 시간을 길게 했을 때 더 많은 성분이 추출된

다는 것을 알 수 있었다. 60°C에서 2시간 추출과 20시간 추출의 비교에서, 2시간 추출에서 확인된 ethyl acetate, ethanol, 2-ethyl furan, tricyclene 등의 저비점 성분들은 20시간 추출에서 확인되지 않았으며, 반면에 2시간 추출에서 확인되지 않은 고비점 성분들인 *trans*-anethole, caryophyllene oxide, nerolidol 등이 새로이 확인되었다. 이러한 결과는 고온에서 장시간 추출하면 초기에 추출된 저비점 성분들은 일부 손실될 수 있으며, 반면에 고비점 alcohols류와 ethers 성분들은 새로 추출된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 headspace(purge & trap)법에 의해 휘발성 성분 분석시 4가지 추출조건을 종합해 볼 때 고비점 휘발성 성분 분석에는 60°C에서 20시간 추출이 가장 양호하나, 전반적으로 실온에서 20시간 추출이 가장 적합한 조건인 것으로 나타났다.

요 약

솔잎(*Pinus densiflora* S.)의 휘발성 성분을 추출시간과 온도를 달리하면서 headspace(purge & trap)-GC/MS로 분석하여 총 61개의 휘발성 성분을 확인하였다. 확인된 성분을 관능기별로 분류하여 보면 hydrocarbons 35종, alcohols 16종, carbonyls 4종, ethers 3종, esters 2종, acid 1종으로 나타났다. 솔잎에서 확인된 주요 휘발성 성분으로는 α -pinene(1.5~15.7%), β -pinene(0.4~5.4%), β -myrcene(13.2~15.6%), β -phellandrene (12.0~16.0%), *cis*-3-hexenol(4.0~18.3%), β -caryophyllene (3.6~6.8%) 등이 확인되었다. 또한 headspace(purge & trap)법에 의해 솔잎의 휘발성 성분 분석시 최적 조건을 검토하기 위해 실온에서 2시간과 20시간동안 추출한 것과 60°C에서 2시간과 20시간동안 각각 추출했을 때 실온에서 2시간 추출시 가장 많은 56개의 성분이 확인되었고, 실온에서 2시간 추출시 가장 적은 45개의 성분이 확인되었다. 시험조건에 따른 휘발성분 분석에서 비점이 낮은 monoterpenes 화합물들은 추출시 초기에 주로 추출되어 지고 alcohols류와 비점이 높은 sesquiterpenes 화합물들은 추출시간을 길게 했을 때 더 많은 성분이 추출된다는 것을 알 수 있었다. 4가지 추출 조건을 종합해 볼 때 고비점 휘발성 성분 분석에는 60°C에서 20시간 추출이 가장 양호하나, 전반적으로 실온에서 20시간 추출이 가장 적합한 조건인 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Park, JK. Encyclopedia of Chinese medicine, pp. 21-22. Gumpark Publishing Company. 1984 [Kang, YH, Park, YK, Oh, SR and Moon, KD. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27:978- 984. 1995]
2. Arctander, S. Perfume and Flavor Materials of Natural Origin, pp.537-541. Elizabeth, N.J., USA. 1960
3. Leung, AY. Encyclopedia of Common Natural Ingredients, pp.419-420. John Wiley & Sons, Inc. 1996
4. Hong, WT, Go, GM, Lee, JG, Jang, HJ and Kwag, JJ. Volatile compounds of pine needle extracts. *J. of the Korea Society of Tobacco Science* 24:53-59. 2002
5. Woo, GY, Kim, KH, Lee, MJ and Yoon, JR. A comparison of volatile compounds in pine extracts obtained by supercritical fluid extraction with those by simultaneous steam distillation and solvent extraction. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:1268-1274. 1999
6. Roussis, V, Petrakis, PV and Mazemones, BE. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry* 39:357-361. 1995
7. Zhang, ZY and Pawliszyn, J. Solid phase micro-extraction. *Anal. Chem.* 66:843-853. 1994
8. Nunez, A and Maarse, H. Headspace methods for volatile components of grapefruit. *J. Chromatogr.* 21:44-48. 1986
9. Frutos, M, Sanz, J and Martinez, I. Simultaneous distillation extraction method in the qualitative and quantitative GC analysis of cheese volatile components. *Chromatographia.* 25:861-864. 1988
10. Lee, JG, Jang, HJ, Kwag, JJ and Lee, DW. Comparison of the volatile components of Korean ginger by different extraction methods. *Korean J. Food & Nutr.* 13:66-70. 2000
11. Sarrazin, C, Quere, JL, Gretsche, C and Liardon, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. *Food Chemistry* 70:99-106. 2000
12. Reineccius, G. Source Book of Flavors, 2nd ed., pp.24-60. Chapman & Hall Press, New York, USA. 1992
13. Furia, TE and Bellanca, N. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 2nd, pp.45-227. CRC Press, Cleveland, Italy. 1975
14. Eakin, NAM. Terpenoid and Flovanoids, pp.65-93. Academic Press, New York, USA. 1979
15. Petrakis, PV, Tsitsimpikou, C, Tzakou, O and Roussis, V. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavor Fragr. J.* 16:249-252. 2001