

紅花(*Carthamus tinctorius* L.)씨의 항산화활성 물질, N-feruloylserotonin

백남인* · 방면호¹ · 송정춘¹ · 이상양¹ · 박남규¹

경희대학교 생명과학부 및 생명자원과학연구원, ¹농촌진흥청 작물시험장

(1999년 7월 2일 접수, 1999년 8월 13일 수리)

서 론

재료 및 방법

항산화제는 식품의 가공 또는 저장중에 산화에 의한 품질저하를 예방하기 위하여 사용되며, 생체내에서는 노화 촉진의 가장 중요한 요인인 산화작용을 지연시킴으로서 노화를 억제하기 위한 목적으로 섭취되어 왔다. 국내산 생약으로부터 안전하고 효과적인 항산화 성분을 분리할 목적으로 우리 나라에서 자생하고 있는 생약 38종을 수집, 추출하고 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성을 검토하였다. DPPH는 비교적 안정한 radical로, MeOH(methanol)용액은 보라색을 띠는데, 항산화활성을 갖는 물질과 만나면 색이 소실된다. 식물 추출물의 항산화활성을 간단하게 측정할 수 있을 뿐만 아니라 실제 항산화활성효과도 연관성이 매우 높다. 위의 방법을 적용하여 활성이 특히 강한 13종의 생약을 선별하였으며, 그 중에서 작약뿌리로부터 DPPH radical 소거활성을 갖는 tannin과 proanthocyanidin을 분리, 보고한 바 있다.¹⁾ 이어서 높은 항산화활성을 보인 홍화씨로부터 활성본체를 규명하고자 하였다. 본 실험에서는 홍화씨 추출물에 대하여 활성을 추적해가며 용매추출 및 분획, column chromatography를 통해 활성물질을 분리하였고, 분리한 물질에 대하여 IR(infrared spectroscopy), NMR(nuclear magnetic resonance), MS(mass spectrometry)등의 spectrum data를 해석하여 활성원인 물질의 구조를 확인하였으며, 상용 항산화제와의 항산화활성도 비교하였다.

잇꽃이라고도 불리는 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 여러해살이 풀로, 7~8월에 적황색의 꽃이 피며, 9~10월에 결실한다.²⁾ 꽃은 천연색소로서 오래 전부터 사용되어 왔으며,³⁾ safflower yellow, carthamin등의 색소물질과 여러 가지 지방산의 glyceride가 주성분으로 함유되어 있다.⁴⁾ 홍화씨에는 다가 불포화지방산(linoleic acid)이 75%나 함유되어 있어, 혈중지질과 콜레스테롤 농도를 저하시켜 동맥경화, 고지혈증, 고혈압 등의 순환기질환의 치료에 탁월한 효과를 보이며, 골다공증, 관절염, 진경약, 콜레스테롤 저하제의 원료로 사용되기도 하였다.⁴⁾

활성 측정용 식물체 추출물의 제조 및 DPPH를 이용한 전자공여능 (Electron Donating Ability, EDA) 측정

시료의 추출, 농축, 용매분획 및 DPPH radical 소거능의 측정은 전보¹⁾와 동일한 방법으로 하였다. EDA는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

$$EDA(\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

홍화씨의 추출 및 용매분획

60°C에서 열풍건조한 홍화씨 5 kg에 80% MeOH 수용액 8 l를 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여액을 합하여 감압 농축하였다. 농축물을 물(1.5 l)과 EtOAc(ethyl acetate, 1.5 l×2)로 분배 추출하였고, 물층은 다시 n-BuOH(1-butanol, 1 l×2)로 분배 추출 하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc 분획(22 g), n-BuOH 분획(54 g) 및 물분획(41 g)을 얻었다.

활성 물질의 분리

EtOAc 추출물을 silica gel(500 g) column chromatography (n-hexane:EtOAc = 10:1→5:1→3:1→2:1)를 실시하여, 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(thin layer chromatography, chloroform(CHCl₃): ethanol(EtOH) = 10:1)로 확인하여 유사한 분획끼리 합하고, 농축하여 9개의 분획물(CTE1~CTE9)을 얻었다. 각 분획들에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하고 결과 활성이 있는 것으로 확인된 8번째 분획(CTE8)을 다시 silica gel(200 g) column chromatography(CHCl₃:EtOH = 20:1→15:1→10:1→5:1)하여 9개의 소분획(CTE8-1~CTE8-9)을 얻었다. 그 중에서 활성이 확인된 6번째 소분획(CTE8-6)으로부터 silica gel(120 g) column chromatography(CHCl₃:MeOH = 7:1)하여 4개의 소분획(CTE8-6-1~CTE8-6-4)을 얻었다. 그 중 활성이 확인된 2번째 소분획(CTE8-6-2)을 다시 silica gel(80 g) column chromatography(CHCl₃:MeOH = 10:1)하여 항산화활성을 나타낸 분획 CTSE-8-6-2(100.1 mg)을 분리, 정제하였다.

CTSE-8-6-2(N-feruloylserotonin) colorless crystals(MeOH-CHCl₃), mp 118-119°C, EI/MS (m/z): 352 (M⁺), 323, 177,

찾는말 : 항산화물질, DPPH 라디칼 소거활성, 홍화씨, N-feruloylserotonin

*연락처

176, 159, 146. IR_v(KBr, max)cm⁻¹: 3396, 3185, 1662, 1605, 1590. ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): 169.16 (C-9), 151.05 (C-5), 149.63 (C-4), 149.15 (C-5'), 141.94 (C-7'), 133.05 (C-7a), 129.39 (C-1'), 128.27 (C-3a), 124.28 (C-2), 123.14 (C-2), 118.89 (C-8'), 116.41 (C-3'), 112.69 (C-6), 112.48 (C-7), 112.40 (C-3), 111.58 (C-6'), 103.58 (C-4), 54.34 (-OCH₃), 41.42 (C-9), 26.37 (C-8). ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.45 (1H, d, J=15.9 Hz, H-7'), 7.18 (1H, d, J=8.8 Hz, H-3'), 7.07 (1H, d, J=2.4, H-4), 7.03 (1H, s, H-2), 7.01 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6'), 6.99 (1H, dd, J=8.2, 2.4 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, J=8.2 Hz, H-7), 6.70 (1H, dd, J=2.2, 8.8 Hz, H-2'), 6.41 (1H, d, J=15.9 Hz, H-8'), 3.83 (3H, s, -OCH₃), 3.58 (2H, t, J=7.3 Hz, H-9), 2.93 (2H, t, J=7.3 Hz, H-8).

N-feruloylserotonin 및 상용 항산화제의 DPPH radical 소거활성 비교

N-feruloylserotonin 및 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), α-tocopherol을 각각 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM이 되도록 시험관에 첨가한 후, MeOH 1 ml로 용해하고 동일한 방법으로 DPPH radical 소거활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

홍화씨로부터 얻어진 MeOH추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, n-BuOH 및 물로 순차 분획하였다. 각 분획에 대하여 DPPH radical 소거법으로 전자공여능을 측정한 결과 EtOAc추출물과 n-BuOH추출물에서 효과가 확인되었고, 농도가 증가함에 따라 그 효과도 비례적으로 상승하였다.

EtOAc 추출물을 silical gel column chromatography를 이용하여 몇 개의 분획으로 나누었으며, 각 분획에 대하여 DPPH radical 소거법을 이용하여 활성분획을 구명하였고, 활성분획을 다시 silical gel column chromatography를 반복하여 활성물질 을 추적하였다(Table 1). 처음 분획단계에서 얻어진 9개의 분획

Table 1. Electron donating ability of several fractions obtained from EtOAc extract through silica gel column chromatography (Unit : %)

1st fractionation		2nd fractionation		3rd fractionation	
Fr. ^a	EDA(%)	Fr. ^a	EDA(%)	Fr. ^a	EDA(%)
CTS-E-1	30	CTS-E-8-1	31.7	CTS-E-8-6-1	28.9
CTS-E-2	3.0	CTS-E-8-2	9.7	CTS-E-8-6-2	91.5
CTS-E-3	2.9	CTS-E-8-3	20.1	CTS-E-8-6-3	6.6
CTS-E-4	4.1	CTS-E-8-4	35.9	CTS-E-8-6-4	9.0
CTS-E-5	4.7	CTS-E-8-5	46.9		
CTS-E-6	37.5	CTS-E-8-6	89.6		
CTS-E-7	43.4	CTS-E-8-7	73.1		
CTS-E-8	92.8	CTS-E-8-8	9.7		
CTS-E-9	77.3	CTS-E-8-9	7.9		

^aConcentration : 2 mg/ml.

중에서 8번 분획(CTS-E-8)에 활성이 집중되었고(2 mg/ml일 때 EDA값이 92.8%), 2번째 분획단계에서 얻어진 9개의 분획중에서는 6번(CTS-E-8-6, 89.6%), 7번(CTS-E-8-7, 73.1%) 분획에서 활성이 나타났다. 3번째 단계에서 분리한 4개의 물질중에서 2번 물질(CTS-E-8-6-2, 91.5%)에 활성이 집중되었으며, TLC (CHCl₃: MeOH = 7 : 1)로 전개하였을 때 단일성분으로 확인되었다.

CTS-8-6-2(무색 결정, mp 118-119°C)는 silica gel TLC 상에서 전개하고 10% 황산으로 분무, 가열시 청록색으로 발색되었다. IR spectrum(KBr)으로부터 hydroxy(3396 cm⁻¹)와 amide기(1662 cm⁻¹)의 존재가 추정되었으며, 분자량은 EI/MS의 molecular ion peak(M⁺, 352)로부터 352로 결정되었다. ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) spectrum에서 1,2,4-삼치환 benzene이 2단위 존재하는 것[δ7.18 (d, J=8.8 Hz), δ7.01 (d, J=2.2 Hz), δ6.70 (dd, J=2.2, 8.8 Hz)], [δ7.07 (d, J=2.4 Hz), δ6.99 (dd, J=8.2, 2.4 Hz), δ6.81 (d, J=8.2 Hz)]을 알 수가 있었다. 한편, aromatic singlet(δ7.03, 1H, s) signal도 관측되어, indole 구조의 존재가 예측되었다. 또한 trans-coupling하는 2개의 olefine methine (δ7.45, 6.41, each 1H, both d, J=15.9 Hz)과 1개의 methoxyl (δ3.83, 3H, s) signal도 관측되었으며, vicinal coupling하는 2개의 methylene signal 중 (δ3.58, 2.93, each 2H, both t, J=7.3 Hz) 저자장의 signal은 chemical shift로부터 nitrogen이 결합하고 있는 것으로 추정되었다. 이상의 결과로부터 CTS-8-6-2는 serotonin과 페놀산이 ester 결합한 화합물로 추정되었다. ¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) spectrum에서는 모두 20개의 signal이 관측되었다. 산소와 결합한 1개의 olefine 4급탄소(δ151.05)와, 탄소 또는 질소와 결합한 3개의 olefine 4급탄소(δ133.05, 128.27, 112.40) 및 4개의 olefine methine(δ123.14, 112.69, 112.48, 103.58) signal의 chemical shift로부터 indole 구조의 존재가 확인되었고, 여기에 N-ethylene signal(δ41.42, 26.37)이 관측되어 serotonin의 존재도 확인되었다. 또한 1,2,4-삼치환 benzene 구조에서 2개는 산소로(δ149.63, 149.15), 1개는 탄소로(δ129.39) 치환되어 있다는 점과, vicinal coupling하고있는 2개의 olefine-methine 탄소의 chemical shift(δ141.94, 118.89)와 1개의 methoxyl기 (δ54.34) signal로부터 phenol산은 ferulic acid로 추정되었다. Amide 탄소는 δ169.16에서 관측되었으며, EI/MS spectrum의 m/z 146, 177 fragment ion peak(Fig. 1)의 존재로부터, 이 화합물을 serotonin과 ferulic acid가 탈수하여 ester 결합을 형성한 N-feruloylserotonin⁵⁾으로 동정하였다.

한편, 홍화씨에서 분리한 항산화활성 물질인 N-feruloyl-

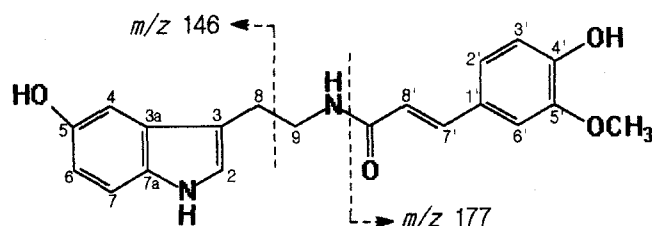


Fig. 1. EI/MS fragmentation of N-feruloylserotonin.

serotonin을 현재 널리 사용되고 있는 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성항산화제인 BHT 및 BHA와 그 활성을 비교하였다. 각 물질의 IC_{50} 값을 보면, α -tocopherol이 $10.0 \mu\text{g/ml}$, BHT가 $12.2 \mu\text{g/ml}$, BHA가 $7.4 \mu\text{g/ml}$ 인데 비해, N-feruloyl-serotonin이 $6.6 \mu\text{g/ml}$ 로, 어떤 상용 항산화제보다 높은 활성을 나타내었다. 추후에 항산화 활성과 관련된 유지저장시험, 효소를 이용한 활성 검정 및 동물적용 실험 등 여러 가지 방법을 검토하여 항산화제로서의 이용가능성을 확인코자 한다.

참고문헌

1. Bang, M. -H., Song, J. -C., Lee, S. -Y., Park, N. -K. and Baek, N. -I. (1999) Isolation and structure determination of antioxi-

dants from the root of *Paeonia lactiflora*. *Hanguk Nongwhahak Hoechi* **42**, 170-175.

2. Lee, T. B. (1989) Illustrated flora of Korea, Hyangmunsa, Seoul, Korea.
3. Kim, J. -B., Cho, M. -H., Hahn, T. -R. and Paik, Y. -S. (1996) Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **39**, 501-505.
4. Namba, T. (1986) Coloured illustrations of wakan-yaku, 1st ed., Vol. 2, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japan.
5. Sakamura, S., Terayama, Y., Kawakatsu, S., Ichihara, A. and Saito, H. (1980) Conjugated serotoninins and phenolic constituents in safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.), *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2951-2954.

N-feruloylserotonin, Antioxidative Component from the Seed of *Carthamus tinctorius* L.

Nam-In Baek*, Myun-Ho Bang¹, Jung-Choon Song¹, Sang-Yang Lee¹ and Nam-Kyu Park¹(*Department of Life Science and Institute of Life Science & Resources, Kyunghee University; ¹National Crop Experiment Station, RDA, Suwon, Korea*)

Key words : *Carthamus tinctorius*, antioxidant, DPPH radical scavenging activity, N-feruloylserotonin

*Corresponding author