

## Hyphenated-HPLC 기술을 활용한 홍화씨의 항산화 성분 분석

김수진<sup>1,2</sup> · 김상민<sup>1</sup> · 강석우<sup>1</sup> · 엄병헌<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 강릉분원, 천연물소재센터, <sup>2</sup>강릉원주대학교 화학신소재학과

### The Rapid Detection of Antioxidants from Safflower Seeds (*Carthamus tinctorius* L.) Using Hyphenated-HPLC Techniques

Su Jin Kim<sup>1,2</sup>, Sang Min Kim<sup>1</sup>, Suk Woo Kang<sup>1</sup>, and Byung Hun Um<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Science and Technology (KIST) Gangneung Institute

<sup>2</sup>Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Kangneung-Wonju National University

**Abstract** Hyphenated-HPLC techniques combine the separation power of HPLC with the structural and bioactivity information provided by NMR, ESI/MS, and an on-line antioxidant screening system. The major advantages over the traditional off-line techniques are rapidity and efficiency. In this study, we used hyphenated HPLC techniques including on-line HPLC-ABTS, LC-NMR, and LC-MS to directly identify the major antioxidants of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. The results demonstrated that the major antioxidant compounds from on-line HPLC-ABTS analysis were identified as 8'-hydroxyarctigenin-4'-O-β-D-glucoside, N-(p-coumaroyl) serotonin, and N-feruloylserotonin. Among them, N-feruloylserotonin accounted for almost 50% of the ABTS radical scavenging activity of the total extract. The results demonstrate that HPLC hyphenated techniques can be used to rapidly screen and structurally identify antioxidants from crude plant extracts.

**Key words:** antioxidants, *Carthamus tinctorius* L., LC-MS, LC-NMR, on-line HPLC-ABTS system

## 서 론

항산화 물질은 생체내에서 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 감소시켜, 노화를 억제하고, 암, 심장혈관계 질환 등을 예방, 지연시키는 물질로서, 자연계에 널리 분포되어 있는데, 페놀성 화합물, 플라보노이드, 토코페롤, 비타민 C, 셀레늄 등이 대표적인 항산화 물질로 알려져 있다(1). 그러나 효과와 경제성으로 인하여 butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, propyl gallate 등의 합성 항산화제가 상업용 식품에 많이 사용되어 왔으나, 이들이 식품에 첨가되었을 때의 안전성 때문에 그 사용량이 법적으로 규제되었다. 한편 토코페롤과 같은 천연 항산화제는 안전성에 있어서는 매우 뛰어나나 항산화 효과가 비교적 낮고, 가격이 비싸다는 단점이 있다(2). 따라서 최근에는 안전성에 문제가 없고, 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제 소재의 발굴을 위해 각종 생약과 식물 추출물을 대상으로 많은 연구가 이루어지고 있다(3-5).

각종 추출물에 포함되어 있는 미지의 단일 성분의 분리과 구조 분석 및 규명은 천연물의 연구에 있어 필수적이고, 각종 크로마토그래피 분리 기술과 분광학적 검출 시스템의 결합은 이러한 연구에 있어 강력한 기능을 발휘하여 왔다. 일반적으로 단일 성

분의 분리에 제일 먼저 시도되는 기술은 HPLC(high-performance liquid chromatography)이고, 미지 물질의 구조 해석에 유용한 기능을 발휘하는 분광학적 기술은 자외선 분석법(ultraviolet spectroscopy, UV), 질량 분석법(mass spectrometry, MS)과 핵자기공명 분석법(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)이다. 따라서 HPLC와 이들 분광학적 기술의 결합(hyphenation)은 천연물의 분리과 구조 해석에 있어 매우 중요한 정보를 제공할 수 있는 기술이라 할 수 있다. 약용식물 연구 분야에 있어서도, HPLC와 UV, MS, NMR이 결합된 LC-MS, LC-NMR 등이 단일 성분의 구조 규명을 위한 유용한 기술이 되었고, 이를 활용한 많은 연구들이 보고되고 있는 실정이다(6-8). 그 외에도 HPLC와 결합된 분광학적 기술로는 LC-IR, LC-CD 등이 있다. 최근에는 이들 기술이 한 차원 더 결합된 LC-MS-NMR 등의 기술도 등장하여 천연물의 구조 해석에 매우 유용한 도구로 사용되고 있다(9,10).

천연 항산화제의 연구에 있어, 천연물의 구조 해석 뿐만 아니라 항산화 활성을 검색하는 데에도 hyphenated-HPLC 기술이 적용되고 있다. 일반적으로 천연물에서 분리된 단일 물질의 항산화 활성을 측정하는 방법으로 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))나 DPPH((1,1)-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 같은 물질의 라디칼을 소거하는 방법이 사용되는데(11), 이러한 방법을 사용하기 위해서는 단일 물질을 분리해야 하는 번거로운 작업을 수행해야 하고 많은 시간이 소요된다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 HPLC의 분리기술과 라디칼 소거 반응을 결합시킨 온라인 항산화 분석 장치(on-line antioxidant assay system)가 개발되었다(12). 온라인 항산화 분석 장치는 HPLC에 결합된 항산화 분석 방법에 따라 크게 세 가지 종류로 나눌 수 있는데, singlet oxygen, hydrogen peroxide 또는 superoxide anion 등의 활성 산소 기질과의 반응을 이용하는 방법, DPPH나 ABTS와 같이 상대적

\*Corresponding author: Byung-Hun Um, Korea Institute of Science and Technology (KIST) Gangneung Institute, Gangneung, Gangwon 210-340, Korea

Tel: 82-33-650-3601

Fax: 82-33-650-3629

E-mail: albertum@kist.re.kr

Received February 22, 2010; revised March 22, 2010;

accepted March 22, 2010

으로 안정한 라디칼을 만들 수 있는 반응 시약을 이용하는 방법, 그리고 colorimetric 분석방법이나 amperometric 분석 방법 등의 전기화학적 분석 방법을 이용하는 방법 등이다(13). 이러한 분석 기술을 활용하면, HPLC에 의해서 분리된 각각의 단일 성분군에 대해서 라디칼 소거 활성을 동시에 측정할 수 있어, 항산화 물질을 선별하는데 분석 시간을 크게 단축시킬 수 있다. 또한 정량 분석법을 적용하여 각 항산화 물질의 정량적인 라디칼 소거활성을 측정할 수 있어 정량화된 각 화합물의 라디칼 소거활성 값을 얻을 수 있다. 최근에는 HPLC와 항산화 분석장치, NMR 등이 하나로 결합된 triple hyphenated-HPLC 분석 시스템을 활용한 항산화 성분의 분석 방법도 개발되었다(14).

홍화(Safflower, *Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 일년생 초목으로서, 홍화꽃은 수용성의 황색색소와 불용성의 적색색소를 함유하고 있어 예로부터 염료로 사용되어 왔으며, 아울러 한방에서 어혈, 통경 및 고지혈증 치료제로서 홍화당, 황혈통경당 등의 처방제로 널리 이용되어 왔고(15), 홍화씨는 한국, 중국 및 일본 등지에서 진정 및 보혈 등의 약용으로 사용되어 왔으며 특히 미국 및 인도에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 유용한 식물종자이다(16). 본 연구에서는 앞서 언급한 여러 기술 중 온라인 항산화 분석 장치인 on-line HPLC-ABTS 분석 시스템을 활용하여 홍화씨로부터 항산화 물질을 검출하였고, LC-ESI/MS 및 LC-NMR을 사용하여 항산화 물질의 구조를 빠르게 규명하여, 이들 hyphenated-HPLC 방법이 항산화 물질의 선별 및 구조 규명에 매우 강력한 도구가 될 수 있음을 증명하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

2006년 강원도 양양에서 채취한 홍화씨의 기름을 짜고 남은 홍화씨 탈지 분말 100 g을 실험재료로 사용하였다. ABTS, potassium persulfate는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. HPLC에 사용된 methanol, acetonitrile, water 등은 Fisher Scientific(Pittsburgh, PA, USA)에서, 분석용 용매들은 Daejung Chemicals(Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 추출 및 농축

홍화씨 탈지 분말 100 g에 메탄올 500 mL를 가한 후 3시간 동안 초음파추출을 3회 반복 수행하였다. 추출 용액을 진공농축기를 사용하여 감압 농축하여 메탄올 추출물 18.42 g을 얻었다. 메탄올 추출물을 온라인 항산화 분석 시스템, LC-NMR과 LC-MS에 적용하여 홍화씨 성분 연구에 사용하였다.

### 온라인 항산화 분석

홍화씨 메탄올 추출물 10 mg을 메탄올 1 mL에 녹인 후 10 L를 온라인 항산화 분석에 사용하였다. 항산화 분석시스템은 binary pump, diode array detector(DAD)로 구성된 Agilent 1200 HPLC system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 pump, UV-Vis detector로 구성된 ABTS 시약을 공급하는 펌프 시스템, 그리고, passive splitter, reaction loop로 구성된 라디칼 소거 반응이 이루어지는 반응 오븐이 결합되어 완성되었다(Fig. 1a). ABTS 시약은 2 mM ABTS, 3.5 mM potassium persulfate가 되도록 물에 녹인 후, 이 용액을 갈색병에 8배 희석한 후 상온에서 12시간 반응시켜 ABTS 라디칼이 만들어지도록 하였다. 컬럼은 YMC Hydrosphere C<sub>18</sub> [150×4.6 mm 5 μm i.d.(YMC Inc., Wilmington, NC, US)] 컬럼을 사용하였다. HPLC 이동상 용매는 acetoni-

trile과 water을 사용하였고, 이동상의 조건은 0.4 mL/min의 유속에서 24% acetonitrile isocratic 조건으로 60분간 수행하였다. ABTS 시약은 0.2 mL/min 유속으로 공급되었고, HPLC에 의해 분리된 성분은 320 nm에서, ABTS 라디칼의 감소는 734 nm에서 검출되었다. 분리된 각 성분의 항산화 정량은 734 nm에서 감소된 면적을 기준으로 Trolox를 사용하여 10-400 μM 범위에서 정량곡선을 작성한 후 분리된 각 성분의 면적을 사용하여 TE(Trolox Equivalent)값으로 표현하였다.

### LC-NMR 분석

홍화씨 메탄올 추출물 50 mg을 메탄올 1 mL에 녹인 후 0.45 μm membrane 필터를 사용하여 정제한 용액을 LC-NMR 시료로 사용하였다. Varian HPLC-NMR system(Agilent Technologies)은 ProStar 410 autosampler, ProStar 210 pumps, DAD detector로 구성된 HPLC 시스템에 proton enhanced cold-probe가 장착된 Varian 500 MHz NMR spectrophotometer가 연결되어 완성되었다. HPLC 분석에는 YMC Hydrosphere C<sub>18</sub>[150×4.6 mm I.d., 5 μm particle size,(YMC Inc., Wilmington, NC, US)] 컬럼이 사용되었고, 검출은 210 nm에서 수행되었다. 이동상 용매는 acetonitrile과 D<sub>2</sub>O가 사용되었고, 0.4 mL/min 유속으로 24% acetonitrile isocratic 조건에서 60분간 분석되었다. 이동상 용매인 물과 acetonitrile의 <sup>1</sup>H-NMR 피크를 억제하기 위해 Varian WET1d pulse program을 사용하였고, Relaxation time(d1)은 1초, Number of transients(nt)은 4초에서 분석이 수행되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 stop-flow mode에서 측정되었다.

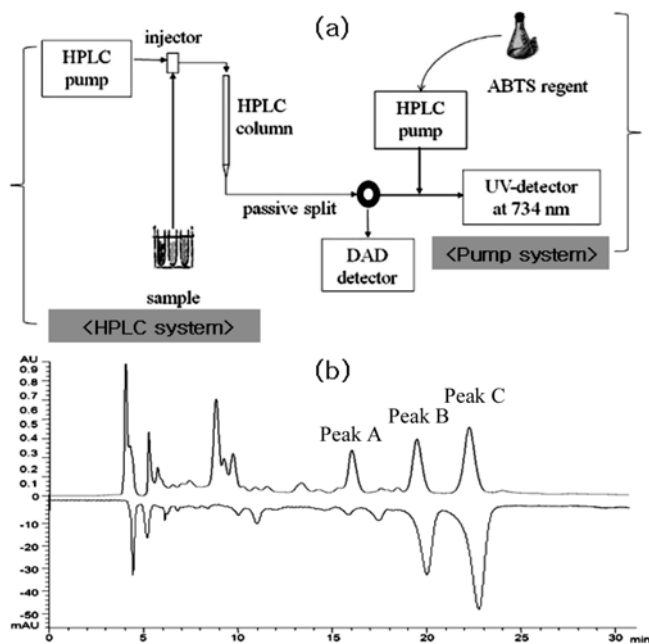
### LC-MS 분석

홍화씨 메탄올 추출물 10 mg을 메탄올 1 mL에 녹인 후 0.45 μm membrane 필터를 사용하여 정제한 용액을 LC-MS 시료로 사용하였다. Varian HPLC-MS system은 ProStar 410 autosampler, 2개의 ProStar 210 pumps로 구성된 HPLC 시스템에 1200L quadrupole mass spectrometer가 장착된 LC-MS를 사용하였다. 시료의 이온화는 ESI(electron spray ionization) 방법을 사용하였다. HPLC 분석에는 LC-NMR과 같은 조건에서 수행되었다. Mass spectrometer는 positive 모드에서 mass range=m/z 150-1000; needle=5000 V; shield=600 V; nebulizing gas pressure(N<sub>2</sub>)=60 psi; drying gas(N<sub>2</sub>) flow rate=20 psi; drying temperature=300°C 조건에서 분석되었다.

## 결과 및 고찰

### 온라인 항산화 장치를 통한 항산화 물질 탐색 및 항산화 정량

홍화씨 메탄올 추출물로부터 온라인 항산화장치를 통하여 항산화 물질을 탐색하였다(Fig. 1). 온라인 항산화 분석에서 항산화 분석을 위하여 사용된 방법은 ABTS 라디칼 소거활성법이다. HPLC에 의해 분리된 각각의 단일 성분은 컬럼을 통과하고 난 후 펌프 시스템에 의해 공급된 ABTS 라디칼 시약과 반응 오븐에서 라디칼 소거 반응이 이루어진 후 UV-visible 검출기에 의해서 라디칼의 감소량이 측정되게 된다(Fig. 1a). 한편, 본 실험에 사용된 온라인 항산화 분석 장치에는 라디칼 시약으로 ABTS 대신 DPPH 라디칼 또한 사용될 수 있다. 하지만 반응 속도가 빠른 ABTS 라디칼과는 달리, DPPH 라디칼의 반응 속도는 화합물에 따라서 매우 다르다고 알려져 있는데, 비타민 C의 경우는 EC<sub>50</sub> 농도에서 동적평형상태(steady state)로 도달하는 시간이 1.15분인데 반해 rutin의 경우 103분이 걸린다(17). 경우에 따라서는 ABTS



**Fig. 1. The schematic diagram of on-line HPLC-ABTS system (a) and its chromatogram from the methanol extract of the defatted safflower seeds (b).** The HPLC chromatogram of the extract was detected at 320 nm for phenolic compounds and the ABTS radical scavenging activity of each compound was expressed as negative peaks at 734 nm.

라디칼과는 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH와는 전혀 반응하지 않을 수도 있다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 다양한 페놀성 성분이 포함되어 있는 것으로 알려진 홍화씨 추출물의 분석에 라디칼 시약으로 ABTS를 사용하였다. Fig. 1b에는 온라인 항산화 분석 장치에 의한 홍화씨 추출물의 라디칼 소거 활성 결과가 나타나 있다. 홍화씨 추출물에는 ABTS 라디칼을 감소시키는 많은 화합물이 있는 것으로 보아 다종의 항산화 물질을 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 실제로 홍화로부터는 많은 항산화 물질이 분리되어 보고되었다(18-20). 특히 Kim 등(19)은 홍화씨로부터 분리한 12종의 페놀성 성분들에 대해 라디칼 소거 활성을 측정하여 보고한 바 있고, Chung 등(20)은 홍화로부터 다종의 플라보노이드 화합물을 분리하여 그들의 항산화 활성을 측정하였다. 본 연구의 HPLC 조건에서는 화합물 A-C가 순수한 단일 성분으로 분리가 되었고, 이들 성분은 ABTS 라디칼 소거활성을 보여 항산화 성분인 것을 확인할 수 있었다. 특히 화합물 B와 C의 경우는 매우 강한 라디칼 소거능을 보여 홍화씨 추출물의 항산화 기능에 있어서 매우 중요한 위치를 차지한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이들 세 성분의 라디칼 소거능이 추출물의 총 라디칼 소거능에서 차지하는 비율을 측정하기 위해 항산화 정량 분석을 실시하였다(Table 1). 항산화 정도를 표현하기 위해서 본 실험에서는 수용성 항산화 화합물인 Trolox를 10-400  $\mu\text{M}$  농도 범위에서 온라인 항산화 분석을 실시하여 정량 곡선을 작성한 후, 홍화씨 추출물의 각 화합물의 항산화 정도를 TE(Trolox Equivalent)값으로 표현하였다. 우선 홍화씨 추출물의 총 항산화 정도는 527.4 TE/0.1mg였고, 화합물 A-C의 항산화 값은 각각 0.31, 131.6, 260.6 TE/0.1mg이었다. 항산화도가 가장 큰 화합물은 화합물 C로써, 총 항산화도의 약 49.4%에 해당하였다. 화합물 B는 약 25% 정도의 항산화도를 가지고 있어, 화합물 B와 C의 항산화도 합계는 전체의 약 75%에 해당하였다. 한편 화합물

**Table 1. Relative antioxidant activity of each compound in the defatted safflower seed extract by on-line HPLC-ABTS analysis**

Compound	Total <sup>1)</sup>	A	B	C
TE value <sup>2)</sup>	527.4	0.31	131.6	260.6
(%) <sup>3)</sup>	(100)	(0.1)	(24.9)	(49.4)

<sup>1)</sup>Total: Total methanol extract of the defatted safflower seed.

<sup>2)</sup>TE value: Trolox Equivalent value in 0.1 mg methanol extract of the defatted safflower seed injected to on-line HPLC-ABTS analysis.

<sup>3)</sup>Relative ABTS radical scavenging activity of each compound in the study.

A의 경우 항산화도가 전체의 약 0.1% 정도로서, HPLC 크로마토그램에서 피크의 면적으로 판단했을 경우 화합물 B와 C에 비슷한 면적을 가지면서 홍화씨 추출물에서 상대적으로 낮은 항산화도를 나타내는 것으로 판단할 수 있었다. 하지만 본 실험에서 수행한 항산화 정량값은 총 항산화도에서 각 화합물이 차지하는 상대적인 비율만을 비교한 것으로, 각 화합물의 절대적인 정확한 항산화도를 얻기 위해서는 각 화합물의 분자량에 따른 정확한 몰 농도를 구한 후에 Trolox 값과 비교하여 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity) 값을 구하여야 하므로, 추출물에 존재하는 각 화합물의 정확한 양을 분석해야 가능하다(21). 따라서 화합물 A가 총 항산화도에서 차지하는 비율이 상대적으로 낮더라도, 화합물 A의 절대적 항산화도가 낫다고 판단하기에는 무리가 있다.

#### LC-NMR를 통한 각 화합물의 구조 규명

온라인 항산화 분석 장치를 통하여 단일 물질로 분리되고, 항산화 활성을 가지고 있는 화합물 A-C에 대해서, 빠르게 구조를 규명하기 위해서 우선 LC-NMR 분석을 수행하여 <sup>1</sup>H-NMR 데이터를 얻었다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼 화합물 A-C의 <sup>1</sup>H-NMR 데이터에서는 효과적으로 용매 피크가 억제되어 화합물의 수소 피크들이 잘 나타나 있는 것을 알 수 있었다.

우선 화합물 A의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 살펴보면(Fig. 2a),  $\delta$  2.77, 2.54 ppm과  $\delta$  3.15, 2.98 ppm에서 각각 double doublet과 two doublet으로 나타난 수소 피크를 확인하였다. 또한  $\delta$  4.99 ppm에서 anomeric proton 피크를 확인하였으며, 이 때 coupling constant가  $J=7.6$ 인 것으로 보아  $\beta$ 형의 당이 결합하고 있음을 추정하였다. 또한  $\delta$  3.45와  $\delta$  4.11 ppm 사이에서 당에 결합하고 있는 수소 피크들을 확인하였고, 피크들이 분리되는 양상으로 보아 결합하고 있는 당이 glucose일 것으로 추정하였다. 그 외 3개의 methoxyl(-OCH<sub>3</sub>)기의 피크들( $\delta$  3.82,  $\delta$  3.80,  $\delta$  3.79 ppm)을 확인하였다. 이상의 결과와 홍화씨로부터 보고된 화합물의 문헌치와 비교하여 볼 때, 화합물 A는 8'-hydroxyarctigenin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside로 구조 동정되었다(19). 화합물 B의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 2b)에서 AA' BB' type의 aromatic 수소 유래의 피크 [ $\delta$  7.31 ppm(1H, *d*,  $J=8.6$  Hz, H-2',6'),  $\delta$  6.89 ppm(1H, *d*,  $J=8.5$  Hz, H-3',5')]와 ABC type의 수소 피크 [ $\delta$  7.04 ppm(1H, *d*,  $J=2.3$  Hz, H-4),  $\delta$  6.76 ppm(1H, *dd*,  $J=2.3, 8.6$  Hz, H-6),  $\delta$  7.49 ppm(1H, *d*,  $J=8.6$  Hz, H-7)]로부터 벤젠의 존재를 확인할 수 있었다. 나머지 피크들과 문헌치와 비교한 결과 유사하였기에 화합물 B는 N-(*p*-Coumaroyl) serotonin으로 동정하였다(22). 화합물 C의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 2c)에서는 ABC type의 aromatic 수소 유래의 피크 [ $\delta$  7.04 ppm(1H, *d*,  $J=2.2$  Hz, H-4),  $\delta$  6.76 ppm(1H, *dd*,  $J=2.3, 8.6$  Hz, H-6),  $\delta$  7.31 ppm(1H, *d*,  $J=8.7$  Hz, H-7)]과 [ $\delta$  7.19 ppm(1H, *s*, H-2'),  $\delta$  6.90 ppm(1H, *d*,  $J=8.2$  Hz, H-5'),  $\delta$  7.10 ppm(1H, *d*,  $J=8.2$  Hz, H-6')]로부터 벤젠의 존재를 확인할 수 있었으며,  $\delta$  7.37 ppm(1H, *d*,  $J=15.7$  Hz)과  $\delta$  6.42 ppm(1H, *d*,  $J=15.7$

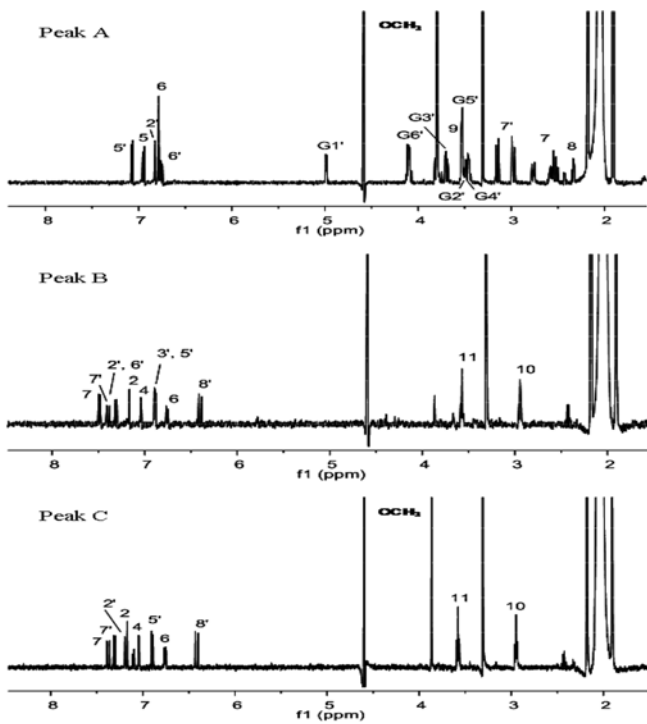


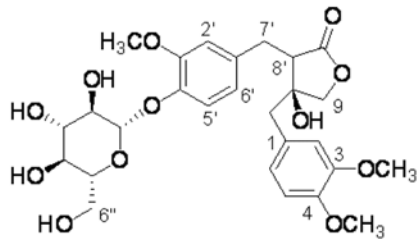
Fig. 2.  $^1\text{H-NMR}$  chromatogram of peak A-C from stop-flow LC-NMR spectroscopy.

Hz)의 수소 피크로부터 *trans*-olefin 구조를, 그리고  $\delta$  3.87 ppm의 피크로부터 methoxyl(-OCH<sub>3</sub>)기의 수소를 확인하였다. Spectrum의 나머지 부분도 이미 보고된 문헌치와 유사하였기에 화합물 C는 *N*-feruloylserotonin으로 동정하였다(23). 각 화합물의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 데이터를 Table 2에 정리하였고, 각 화합물의 구조를 Fig. 3에 나타내었다. 본 실험에서 규명된 세 가지 물질, 8'-hydroxyaragenin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside(A), *N*-(*p*-Coumaroyl) serotonin(B), *N*-feruloylserotonin(C) 화합물은 이미 여러 연구에 의해 탈지 홍화씨로부터 분리 및 구조 규명이 되었고, 그 생리적 효과도 조사되었다(24,25). 특히 본 연구에 의해서 밝혀진 것처럼 serotonin 유도체는 강한 항산화 능력으로 인해 low-density lipoprotein(LDL) 산화를 저해하여 동맥경화(Atherosclerosis)를 저해하는 것으로 보고되었다(26). 또한 탈지 홍화씨에는 본 실험에서 규명된 serotonin 화합물 외에 *N*-(*p*-Coumaroyl) serotonin-5-O- $\beta$ -D-glucoside, *N*-feruloylserotonin-5-O- $\beta$ -D-glucoside 등의 serotonin 배당체 등도 분리, 보고되었다(19).

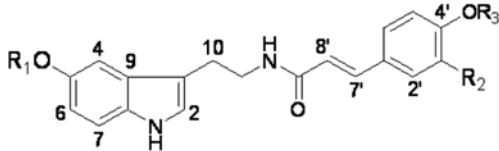
LC-NMR은 이상에서 볼 수 있는 것처럼 식물 추출물과 같은 혼합물로부터 HPLC를 사용하여 단일 물질로 분리한 후, 각 단일 화합물의 구조를 분석할 수 있는 매우 강력한 도구가 될 수 있다. 하지만, 현재까지의 기술로는 극복 되어야 할 몇 가지의 단점이 존재한다. 그 중 첫 번째는, NMR 신호는 화합물의 농도에 비례하여 증가하기 때문에 혼합물에 포함된 단일 물질의 NMR 데이터를 얻을 수 있는 농도가 LC-MS와 같은 다른 분석 기기에 비해 훨씬 높다는 것이다. 따라서 분석 가능한 NMR 신호를 얻

Table 2.  $^1\text{H NMR}$  data from stop-flow LC-NMR of the defatted Safflower seeds

Position	A	B	C
$^1\text{H-NMR}$			
2	6.78(d, $J=6.69$ Hz)	7.16(s)	7.17(s)
4		7.04(d, $J=2.36$ )	7.04(d, $J=2.23$ )
5	6.95(d, $J=8.76$ Hz)		
6	6.78(d, $J=6.69$ Hz)	6.76(dd, $J=2.33, 8.68$ )	6.76(dd, $J=2.34, 8.66$ )
7	2.54(dd, $J=3.89, 13.57$ Hz) 2.77(dd, $J=4.44, 13.15$ Hz)	7.49(d, $J=8.67$ )	7.31(d, $J=8.70$ )
8	2.51(d, $J=12.94$ Hz)		
9	3.53(m)		
10		2.94(t, $J=6.66$ )	2.95(t, $J=6.87$ )
11		3.57(t, $J=6.94$ )	3.58(t, $J=6.85$ )
2'	6.82(d, $J=1.8$ )	7.31(d, $J=8.66$ )	7.19(s)
3'		6.89(d, $J=8.51$ )	
5'	7.07(d, $J=8.38$ )	6.89(d, $J=8.51$ )	6.90(d, $J=8.25$ )
6'	6.75(d, $J=8.32$ )	7.31(d, $J=8.66$ )	7.10(d, $J=8.26$ )
7'	2.98(d, $J=13.88$ ) 3.15(d, $J=13.92$ )	7.39(d, $J=15.86$ )	7.37(d, $J=15.74$ )
8'		6.40(d, $J=15.74$ )	6.42(d, $J=15.79$ )
OCH <sub>3</sub>	3.82, 3.80, 3.79		3.87
Glucose			
1'	4.99(d, $J=7.61$ )		
2'	3.49(m)		
3'	3.69(m)		
4'	3.45(m)		
5'	3.51(m)		
6'	4.09(d, $J=5.37$ ) 4.11(d, $J=4.80$ )		



8'-hydroxyarctigenin-4'-O-β-D-glucoside (compound A)



*N*-(*p*-coumaroyl) serotonin : R1=H, R2=H, R3=H (compound B)  
*N*-feruloylserotonin : R1=H, R2=OCH<sub>3</sub>, R3=H (compound C)

**Fig. 3.** Chemical structures of compound A-C from the defatted safflower seeds.

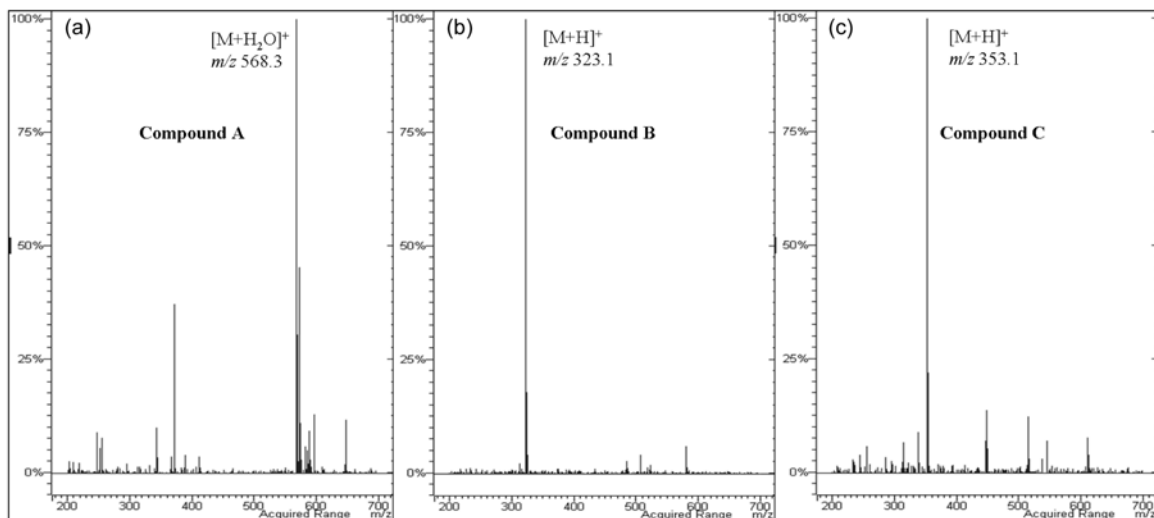
기 위해서 혼합물의 농도를 높여야 하고, 그렇게 되면 HPLC 컬럼의 분리능이 떨어져 단일 물질을 많이 분리할 수 없는 결과가 초래된다(24). 본 실험에서는 이러한 단점을 극복하고자, NMR 프로브(probe)로 proton enhanced cold probe를 사용하였다. 두 번째 단점으로는 화합물의 구조 해석에 매우 중요한 탄소 NMR을 측정할 수 없다는 것이다. 현재까지는 LC-NMR을 활용하여 COSY, HMBC와 같은 2D NMR을 측정할 수 있지만, 혼합물에 포함되어 있는 탄소 NMR을 측정하기에는 단일 물질의 농도를 높일 수 있는 한계가 있기 때문에 탄소 NMR을 측정하고 있지 않는 실정이다(27). 따라서 현재까지의 기술로는 LC-NMR의 단독 사용만으로는 미지 화합물 구조를 완벽하게 규명하기에는 어려움이 따르고, LC-MS 등의 다른 분석 기기의 도움이 필요한 실정이다. 만약 이러한 단점들이 극복될 수 있다면 LC-NMR은 어떠한 분석 기기보다 천연물의 구조 해석에 있어 유용한 도구가 될 수 있을 것이다.

### LC-MS를 통한 분자량 확인

앞서 LC-NMR을 통해 규명된 화합물에 대한 추가적인 정보를 얻고자 LC-MS를 통하여 각 화합물의 분자량을 확인하였다(Fig. 4). HPLC 분석에는 LC-NMR과 같은 조건을 사용하였고, 이온화는 ESI 방법을 사용하여 positive mode에서 측정하였다. 화합물 A의 경우(Fig. 4a) parent ion으로  $m/z$  568을 보여 주었고, 이는  $[M+H_2O]^+$ 에 해당되는 것으로 8'-hydroxyarctigenin-4'-O-β-D-glucoside의 분자량인 550과 일치하는 결과를 얻었다. MS spectrum에서 보인  $m/z$  371의 fragment는  $[M+H-H_2O-162(\text{hexose})]^+$ 에 해당하는 것으로 한 분자의 glucose 그룹이 떨어진 것을 확인할 수 있었다. 화합물 B의 MS spectrum에서는(Fig. 4b) parent ion으로  $m/z$  323을 보여주었는데, 이는  $[M+H]^+$ 에 해당되는 것으로 화합물 B의 분자량이 322임을 확인하였고, 이는 보고된 문헌치와 일치하였다(22). 화합물 C의 경우는(Fig. 4c) 화합물 B의 구조와의 차이가 단지 methoxyl(-OCH<sub>3</sub>)기가 더 있는 것이고, 따라서 화합물 B와의 분자량 차이가 30이 나는데, 화합물 C의 MS spectrum에서  $m/z$  355의 parent ion 피크를 보여주어 예상했던 결과와 일치하는 결과가 얻어져, 화합물 C의 구조를 *N*-feruloylserotonin으로 확인할 수 있었다.

### 요 약

본 연구에서는 세 종류의 hyphenated-HPLC 기술을 활용하여 홍화씨로부터 3종의 항산화 화합물의 구조를 규명하였다. 우선 온라인 항산화 분석 장치를 통하여 홍화씨 추출물로부터 ABTS 라디칼 소거활성을 가지는 성분을 검색 및 항산화 정량을 수행한 후, 단일 물질로 분리되고, 항산화 활성을 가지는 세 가지 화합물에 대해서 구조 규명을 시도하였다. 우선 LC-NMR을 이용하여 stop-flow mode에서 이들 세 가지 화합물에 대해 <sup>1</sup>H-NMR spectrum데이터를 얻은 결과 각 화합물은 8'-hydroxyarctigenin-4'-O-β-D-glucoside, *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin, *N*-feruloylserotonin으로 확인되었다. 그리고 LC-ESI-MS를 활용하여 각 화합물에 대한 분자량에 대한 정보를 얻어 LC-NMR에서 규명된 화합물이 정확함을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 기존의 탐색방법인 여러 크로마토그래피 방법이나 preparative HPLC 등



**Fig. 4.** LC-ESI/MS chromatogram of compound A-C at positive mode from the defatted safflower seeds.

을 이용하여 활성물질을 분리하고 off-line NMR, MS 등을 활용하여 구조를 규명하는 방법에 비하여, hyphenated-HPLC 방법을 활용하여 혼합물 상태인 추출물을 분리하지 않고 신속하게 단일 성분의 구조를 규명하고, 또한 각각의 성분에 대한 항산화도를 측정할 수 있다는 장점이 있음을 증명하였다. 이는 천연물 또는 식품 분야의 연구에 있어 추출물의 항산화 성분을 분석하고 그 구조를 신속 간편하게 확인할 수 있으므로 항산화 성분 탐색 및 변이 연구에 매우 유용하리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RT105-01-02)지원으로 수행되었음.

## 문헌

- Kalt W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J. Food Sci.* 70: 11-19 (2005)
- Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanism of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53: 75-100 (2009)
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338 (2004)
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78: 2872-2888 (2006)
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Agr. Food Chem.* 63: 1035-1042 (2000)
- Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Le PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SA, Arnason JT. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochem. Analysis* 18: 161-169 (2007)
- Kim CY, Lee HJ, Lee EH, Jung SH, Lee DU, Kang SW, Hong SJ, Um BH. Rapid identification of radical scavenging compounds in blueberry extract by HPLC coupled to an on-line ABTS based assay and HPLC-ESI/MS. *Food Sci. Biotechnol.* 17: 846-849 (2008)
- Volger B, Klaiber I, Roos G, Walter CU, Hiller W, Sandor P, Kraus W. Combination of LC-MS and LC-NMR as a tool for the structure determination of natural products. *J. Nat. Prod.* 61: 175-178 (1998)
- Lin Y, Schiavo S, Orjala J, Vouros P, Kauts R. Microscale LC-MS-NMR platform applied to the identification of active cyanobacterial metabolites. *J. Agr. Food Chem.* 80: 8045-8054 (2008)
- Kang SW, Kim MC, Kim CY, Jung SH, Um BH. The rapid identification of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* by LC-NMR and LC-MS. *Chem. Pharm. Bull.* 56: 1452-1454 (2008)
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agr. Food Chem.* 54: 1151-1157 (2006)
- Dapkevicius A, van Beek TA, Niederlinder HA. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *J. Chromatogr. A* 912: 73-82 (2001)
- Niederlinder HA, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1210: 121-134 (2008)
- Pukalskas A, van Beek TA, de Waard P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts. *J. Chromatogr. A* 1074: 81-88 (2005)
- Palter R, Lundin RE, Fuller G. A new steroid from safflower. *Phytochemistry* 11: 819-822 (1972)
- Palter R, Lundin RE, Haddon WF. A cathartic lignan glycoside isolated from *Carthamus tinctorius*. *Phytochemistry* 11: 2871-2874 (1972)
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.* 53: 1841-1856 (2005)
- Kim JH, Kim JK, Kang WW, Ha YS, Choi SW, Moon KD. Chemical compositions and DPPH radical scavenger activity in different sections of safflower. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 733-738 (2003)
- Kim EO, Oh JH, Lee SK, Lee JY, Choi SW. Antioxidant properties and quantification of phenolic compounds from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 71-77 (2007)
- Chung SH, Moon YJ, Kim SG, Kim KY, Lee KT, Kim HK, Whang WK. Isolation of flavonoids from Carthami Flos and their antioxidative activity. *Yakhak Hoeji* 52: 241-251 (2008)
- Stewart AJ, Mullen W, Crozier A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 52-60 (2005)
- Niwa T, Etoh H, Shimizu A, Shimizu Y. *cis-N-(p-Coumaroyl)serotonin* from Konnyaku *Amorphophallus Konjac* K. Koch. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64: 2269-2271 (2000)
- Jin Q, Yue J, Shan L, Tao G, Wang X, Qiu A. Process research of macroporous resin chromatography for separation of *N-(p-coumaroyl)serotonin* and *N-feruloylserotonin* from Chinese safflower seed extracts. *Sep. Purif. Technol.* 62: 370-375 (2008)
- Kang GH, Chang EJ, Choi SW. Antioxidant activity of phenolic compounds in roasted safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *J. Food Sci. Nutr.* 4: 221-225 (1999)
- Cho SH, Park YY, Yoon JY, Choi SW, Ha TY. The effect of polyphenols from safflower seed on HMG-CoA reductase (HMGR) activity, LDL oxidation and Apo A1 secretion. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38:279-283 (2006)
- Koyama N, Kuribayashi K, Seki T, Kobayashi K, Furuhashi Y, Suzuki K, Arisaka H, Nakano T, Amino Y, Ishii K. Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Agr. Food Chem.* 54: 4970-4976 (2006)
- Wolfender JL, Ndjoko K, Hostettmann K. The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochem. Analysis* 12: 2-22 (2001)