

## 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)로부터 활성물질의 분리

백남인\* · 김용희 · 안은미 · 방면호 · 남지연<sup>1</sup> · 권병목<sup>1</sup>

경희대학교 산업대학 생명자원과학부 및 생명자원과학연구원, <sup>1</sup>한국과학기술연구원 생명공학연구소

**초 록** : 홍화 MeOH 추출물의 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 배당체를 분리, 정제하였다. 화합물의 화학구조를 HMBC를 포함한 NMR, MS, IR과 같은 기기분석 결과와 산 가수분해반응을 이용하여 결정, 각각 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol 및 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol로 동정하였다. 각 화합물은 Grb2-Shc 결합저해 활성(IC<sub>50</sub>: 43, 47  $\mu$ g/ml)을 나타내었다.(1998년 3월 11일 접수, 1998년 4월 20일 수리)

### 서 론

식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 300여종 약재의 MeOH 추출물에 대하여 여러 가지 항암관련 활성을 검색한 결과 홍화의 추출물에서 암세포의 형성에 관련있는 Ras 단백질 활성화의 전단계를 차단함으로써 항암활성을 나타내는 Grb2-Shc 결합저해활성이 뚜렷하게 나타났다.

홍화는 1년생 초본식물인 잇꽃(*Carthamus tinctorius*)의 꽃을 말린 것으로, 예로부터 어혈 등의 치료 및 적황색염료 물질의 추출에 이용되어 왔다.<sup>1)</sup> 평활근수축 및 확장작용, 혈액응고 억제작용 등에 관한 연구보고가 있으며,<sup>2)</sup> 적색물질인 carthamin 관련 화합물,<sup>3)</sup> 황색색소인 safflower yellow 관련 화합물<sup>4)</sup>외에도, polyacetylene<sup>5)</sup> 및 steroid<sup>6)</sup> 등이 분리되었다.

홍화로부터 활성분체를 규명하기 위하여 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 각 분획은 다시 column chromatography 하여 소분획으로 나누었다. 각 분획 및 소분획에 대하여 활성을 추적해가며 column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 화합물을 분리, 정제하였다. 분리한 물질에 대하여 HMBC와 같은 2D-NMR 기법 등을 포함한 물리화학적 데이터의 해석과 산 가수분해 반응을 이용하여 화학구조를 결정하였고, Grb2-Shc 결합저해 활성도 측정하였다.

### 재료 및 방법

#### 기기 및 시약

Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck)을, TLC는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였고, 활성 검정용 시약은 Amersham사 제품을 구입하여 사용하였다. <sup>1</sup>H-(400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz), DEPT 및 HMBC spectra는 Bruker ARX 400으로 측정하였고, IR spectrum은

찾는말 : 홍화, flavonoid 배당체, kaempferol 배당체, Grb2-Shc 결합저해  
\*연락처

Perkin-Elmer Model 599B로 측정하였으며, FAB/MS는 VG ZAB-SE4F로 측정하였다.

#### 식물시료

경동시장에서 한국산(용인) 홍화를 구입한 후, 생명공학연구소 이형규 박사에게 의뢰하여 동정하였으며, 표본시료는 경희대학교(수원) 천연물화학실 시료실에 보관되어 있다.

#### 활성물질의 분리

홍화 3 kg에 80% MeOH 수용액 5 l를 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여액을 합하여 감압 농축하였다. 농축물을 물(1 l)과 EtOAc(1 l $\times$ 2)로 분배추출하였고, 물층은 다시 *n*-BuOH(700 ml $\times$ 2)로 분배, 추출하였다.

*n*-BuOH 추출물을 silica gel(200 g) column chromatography(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=65:35:10, 아래층)를 실시하여, 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=6:4:1)로 확인하여 유사한 분획끼리 합하고, 농축하여 8개의 분획물을 얻었다. 그 중 5번째 분획을 다시 silica gel(120 g) column chromatography(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=65:35:10, 아래층)를 이용하여, 5개의 소분획을 얻었다. 2번째 소분획으로부터 silica gel(50 g) column chromatography(*n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O=15:15:4, 윗층)하여 flavonoid 화합물 (1)을 263 mg 분리, 정제하였다.

Flavonoid 화합물(1, 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol): White powder(EtOH-H<sub>2</sub>O), IRv(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3320, 3025, 2964, 1695, 1630, pos. FAB/MS(*m/z*) 595 [M+1]<sup>+</sup>, HR pos. FAB/MS: Found, 595.1658; Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub>, 595.1662, <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ) 7.95(1H $\times$ 2, d, *J*=8.9 Hz, H-3',5'), 6.78(1H $\times$ 2, d, *J*=8.9 Hz, H-2',6'), 6.29(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.10(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.03(1H, d, *J*=8.9 Hz, H-1"), 4.69(1H, br. s, H-1"), 3.70-3.18(sugar moieties), 1.02(3H, d, *J*=6.2 Hz, H-6"). <sup>13</sup>C-

NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>c</sub>) 179.68(C-4), 166.29(C-7), 163.25(C-5), 161.77(C-4'), 159.72(C-9), 158.81(C-2), 135.83(C-3), 132.67(C-2',6'), 123.04(C-1'), 116.43(C-3',5'), 105.96(C-10), 104.95(C-1''), 102.71(C-1'''), 100.28(C-6), 95.23(C-8), 78.44(C-3''), 77.49(C-5'''), 76.04(C-2''), 74.20(C-4'''), 72.60(C-3'''), 72.37(C-2''), 71.74(C-4''), 70.01(C-5'''), 68.88(C-6''), 14.49(C-6''').

위에서 얻은 4번째 소분획을 다시 silica gel(50 g) column chromatography(*n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O=15:15:4, 윗층)를 이용하여 flavonoid 화합물 (2)을 723 mg 분리, 정제하였다.

Flavonoid 화합물 (2, 3-*O*-[β-D-glucopyranosyl(1→2) β-D-glucopyranosyl] kaempferol: White powder(EtOH-H<sub>2</sub>O), IRv(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3325, 3020, 2965, 1699, 1628, pos. FAB/MS (*m/z*) 611 [M+1]<sup>+</sup>, HR pos. FAB/MS: Found, 611.1620; Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub>, 611.1611, <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) 7.93(1H×2, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.80(1H×2, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.27(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-8), 6.08(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6), 5.29(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1''), 4.67(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1'''), 3.68-3.20(sophorosyl moieties). <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>c</sub>) 179.94(C-4), 166.14(C-7), 163.32(C-5), 161.78(C-4'), 159.30(C-9), 158.74(C-2), 135.25(C-3), 132.62(C-2',6'), 123.11(C-1'), 116.53(C-3',5'), 106.10(C-10), 104.96(C-1''), 101.42(C-1'''), 100.17(C-6), 95.04(C-8), 82.74(C-2''), 78.45(C-3''), 78.42(C-5'''), 78.15(C-3'''), 78.09(C-5'''), 75.78(C-2''), 71.59(C-4'''), 71.38(C-4''), 62.97(C-6'''), 62.70(C-6'').

#### 화합물 1 및 2의 산가수분해

화합물 1 및 2의 각각 10 mg을 3 ml MeOH에 녹이고 1% HCl/MeOH 1 ml를 가한 후, 2시간 환류하였다. 반응액에 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 적당량을 가하여 중화시킨 후, 여과하고, 감압 농축하였다. 농축물을 silica gel(50 g) column chromatography(CHCl<sub>3</sub>-MeOH=10:1)로 정제하여 kaempferol을 각각 (3) 3.2 및 3.6 mg씩 얻었다. 3: White powder(CHCl<sub>3</sub>-EtOH), <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD, δ) 8.01(1H×2, d, *J*=8.5 Hz, H-3',5'), 6.86(1H×2, d, *J*=8.5 Hz, H-2',6'), 6.34(1H, br. s, H-8), 6.17(1H, br. s, H-6).

#### Grb2-Shc 결합저해 활성 검정

활성검정에 필요한 시약은 Koh<sup>9</sup> 등의 방법을 따라 제조하였다. Anti-GST 6 μg, GST-Grb2 재조합 단백질 1 μg, <sup>3</sup>H-phosphopeptide 0.1 μCi, A-SPA bead 10 μl, 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4, 250 mM NaCl, 0.1% BSA) 및 5% 활성검정용 시료가 함유된 DMSO 용액을 96-well plate에 가한 후 실온에서 45분간 진탕반응하였다. 반응이 끝난 후, 액체 섬광 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 DMSO 용액만을 가하여 동일한 방법으로 수행하였으며, blank는 GST-Grb2 재조합 단백질을 첨가하지 않고 측정하였다. Grb2-Shc 결합 저해율은 다음과 같이 계산하였다. % Inhibition=100×[1-{Sample(cpm)-Blank(cpm)} / {Control(cpm)-Blank(cpm)}].

## 결과 및 고찰

천연자원으로부터 항암관련 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 각종 약재의 MeOH 추출물에 대하여 여러 가지 활성을 검색한 결과 홍화의 추출물에서 Grb2-Shc 결합저해 활성이 뚜렷하게 나타났다. 홍화의 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 그 중에서 *n*-BuOH 층에 활성이 집중되었다. *n*-BuOH 추출물을 silica gel TLC 상에서 전개하고 자외선 조사시의 흡수특성과 10% 황산수용액 분무 후, 가열 시 황색으로 발색하는 점으로부터 flavonoid 화합물이 주성분인 것으로 판명되었다. 용매를 변화시켜가며 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, *n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O) silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 배당체인 화합물 1과 2를 분리, 정제하였다.

화합물 2, White powder(EtOH-H<sub>2</sub>O)는 IR spectrum에서 수산기(3325 cm<sup>-1</sup>) 및 벤젠환(1628 cm<sup>-1</sup>)의 흡수 peak가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)에 있어서 para-치환 벤젠환의 특징적인 signal인 δ7.93(1H×2, d, *J*=8.8 Hz), δ6.80(1H×2, d, *J*=8.8 Hz) 및 meta-coupling을 하는 4치환 벤젠의 2개의 proton signal [δ6.27(1H, d, *J*=1.8 Hz), δ6.08(1H, d, *J*=1.8 Hz)]이 관측되어 flavonoid 골격의 존재가 추정되었다. 또한 2개의 anomeric proton signal [δ5.29(1H, d, *J*=7.5 Hz), δ4.67(1H, d, *J*=7.2 Hz)]과 δ3.68-3.20에서 oxy-methine 또는 oxy-methylene signal이 다수 관측되어 2분자의 당으로 이루어진 배당체임이 판명되었다. <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)에 있어서 비당부 탄소의 chemical shift로부터 flavonol 화합물 중 kaempferol인 것으로 판명되었고, 이 사실은 산가수분해 하였을 때 kaempferol과 glucose가 얻어진 점으로부터도 확인되었다. 또한 FAB/MS로부터 분자량이 610으로 판명되어 화합물 2는 kaempferol에 2분자의 glucose가 결합한 구조로 밝혀졌다. 2분자의 glucose는 chemical shift를 소상히 검토한 결과 sophorose 구조를 갖는 것으로 추정되었다. 한편 HMBC(Fig. 2) spectrum 상에서 peak a(C-3/H-1'')로부터 kaempferol의 3번 수산기에 glucopyranose가 결합해 있고, peak b(C-2''/H-1''')로부터 그 당의 2번 수산기에 다른 1분자의 glucopyranose가 결합하고 있는 것을 확

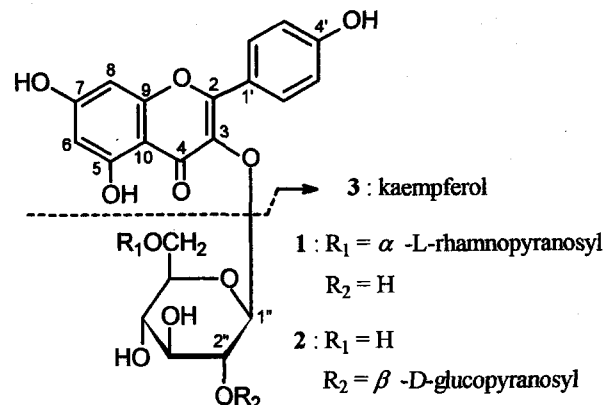


Fig. 1. Chemical structures of flavonoids isolated from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L..

인하였다. 2분자의 D-glucopyranose는 <sup>1</sup>H-NMR에서 anomeric signal의 coupling constant가 각각 7.5 Hz 및 7.2 Hz였으므로 모두 β-configuration을 갖는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 2의 화학구조는 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2) β-D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정되었다. 화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR에 있어서의 H-3',5', H-2',6', H-8과 H-6, H-1"과 H-1"'의 관별은 HMBC(Fig. 2)로부터 확인하였다.

화합물 1, White powder(EtOH-H<sub>2</sub>O)의 경우도 IR spectrum에서 수산기(3320 cm<sup>-1</sup>) 및 벤젠환(1630 cm<sup>-1</sup>)의 흡수 peak가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 및 <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)로부터 비당부는 화합물 2와 유사하였으나 당부분의 signal이 다르게 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 2개의 anomeric signal [δ5.03 (1H, d, J=8.9 Hz), δ4.69(1H, br. s)] 및 doublet methyl signal [δ1.02(3H, d, J=6.2 Hz)] 이 관측되어 2분자의 당중 1개는 6-deoxy 당이며, 또한 1C conformation을 취하고 있는 것으로 판명되었다. 산기수분해 했을 때, kaempferol과 glucose 및 rhamnose가 얻어졌고, FAB/MS로부터 분자량이 594로 결정되어, 화합물 1은 kaempferol에 1분자의 glucose와 rhamnose가 결합한 배당체임이 판명되었다. DEPT spectrum으로부터 D-glucopyranose의 6번 methylene 탄소의 chemical shift가 68.88 ppm으로 확인되어, L-rhamnopyranose가 D-glucopyranose의 6번 수산기에 결합하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이상의 결과로부터 화합물 1의 화학구조는 3-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6) β-D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정되었다.

한편, 화합물 1 및 2에 대하여 Grb2-Shc 결합저해활성을

측정한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 각각 43과 47 μg/ml로 나타났다. Nam 등<sup>10)</sup>이 *Streptomyces*속으로부터 분리한 actinomycin C<sub>2</sub>나 VII에 비하면 활성이 다소 약하였으나, Grb2-Shc 결합저해활성을 갖는 천연물 유래의 활성물질에 관한 연구결과가 극히 적은 현실점에서, 본 연구결과가 관련 연구의 활성화에 기여하리라고 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산기술개발사업과 관련하여 생명공학연구소로부터 지원받은 위탁과제 연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Shanghai Science & Technology Press (1985) Encyclopedia of Chinese Drugs, Vol. 1, 1360-1362. Shogakukan, Tokyo, Japan.
2. Takahashi, Y., N. Miyasaka, S. Tasake, I. Miura, S. Urano M. Ikura, K. Hikichi, T. Matsumoto and M. Wada (1982) Constitution of two coloring matters in the flower petals of *Carthamus tinctorius* L.. *Tetrahedron Lett.* **23**, 5163-5166.
3. Kim, J-B., M.-H. Cho, T.-R. Hahn and Y.-S. Paik (1996) Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius*. *Agri. Chem. Biotechnology* **39**(6), 501-505.
4. Onodera, J-i., H. Obara, M. Osone, Y. Maruyama and S. Sato (1981) The structure of safflomin-A, a component of safflower yellow. *Chem. Lett.*, 433-436.
5. Takahashi, Y., K. Saito, M. Yanagiya, M. Ikura, K. Hikichi, T. Matsumoto and M. Wada (1984) Chemical constituent of safflor yellow B, a quinochalcone C-glycoside from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L.. *Tetrahedron Lett.* **23**, 2471-2474.
6. Onodera, J-i., H. Obara, R. Hirose, S. Matsuba, N. Sato, S. Sato and M. Suzuki (1989) The structure of safflomin C, a constituent of safflower. *Chem. Lett.*, 1571-1574.
7. Binder, R. G., R. E. Lundin, S. Kint, J. M. Klisiewicz and C. W. Jr. Anthony (1978) Polyacetylenes from *Carthamus tinctorius*. *Phytochemistry* **17**, 315-317.
8. Palter R., R. E. Lundin and G. Fuller (1972) A new steroid from safflower. *Phytochemistry* **11**, 819-822.
9. Koh, W. S., S. Y. Yoon, E. K. Lee, B. M. Kwon, J. W. Kim and M. Y. Han (1997) A screening method for SH2 domain ligands and blockers using a solid phase binding. *Cancer Letters* **120**, 1-7.
10. Nam, J.-Y., Y.-K. Kwon, K.-H. Son, S.-U. Kim, M.Y. Han, S.H. Bok and B.-M. Kwon (1998) Actinomycin C<sub>2</sub> and VII inhibitors of Grb2-Shc interaction produced by *Streptomyces* sp. A1525. *J. Antibiotics*, in submission.

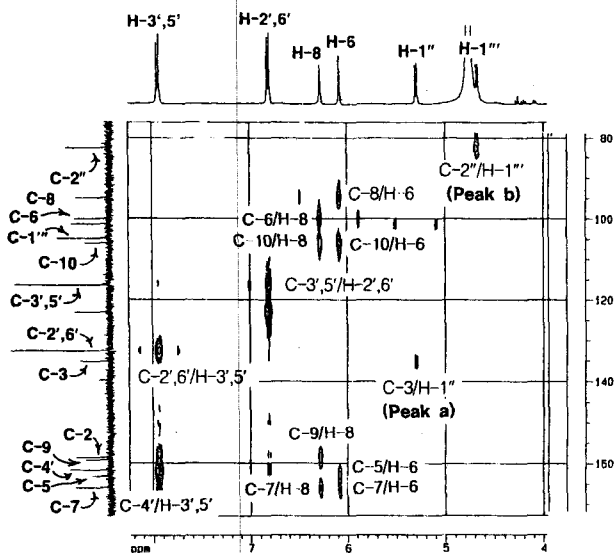


Fig. 2. HMBC spectrum of compound 2 isolated from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L. (CD<sub>3</sub>OD).

---

**Isolation of Biologically Active Compounds from the Flower Petals of *Carthamus tinctorius* L.**

Nam-In Baek\*, Yung-Hee Kim, Eun-Mi Ahn, Myun-Ho Bang, Ji-Youn Nam<sup>1</sup> and Byung-Mok Kwon<sup>1</sup>(*Kyung Hee University, College of Industry, Department of Life Sciences & Resources, Institute of Life Sciences & Resources, Suwon, 1 Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon, Korea*)

**Abstract** : The MeOH extracts obtained from the flower petals of *Carthamus tinctorius* were solvent-fractionated with EtOAc, *n*-BuOH, and H<sub>2</sub>O, successively. From the *n*-BuOH extract 2 flavonoid compounds were isolated through the repeated silica gel column chromatographies. From not only the results of physico-chemical data including HMBC but also the adaptation of acid hydrolysis, the chemical structures of the compounds were determined as 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol and 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol. The compounds exhibited IC<sub>50</sub> values in Grb2-Shc activity to be 43 and 47  $\mu$ g/ml, respectively.

---

**Key words** : *Carthamus tinctorius*, flavonoid glycoside, kaempferol, Grb2-Shc interaction inhibitor

\*Corresponding author