

## 홍화종자에서 항산화성 Serotonin계 화합물, N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin의 분리 및 정량분석

이강수 · 김윤희 · 정남진<sup>†</sup>

전북대학교 농업생명과학대학, 전주시 덕진구 덕진동 1가

## Determination and Isolation of Antioxidative Serotonin Derivatives, N-(*p*-Coumaroyl)serotonin and N-feruoylserotonin from Safflower Seeds

Kang-Soo Lee, Yun-Hee Kim, and Nam-Jin Chung<sup>†</sup>

College of Agriculture & Life Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea

**ABSTRACT** In the methanol extract from safflower seeds, two kinds of antioxidant were detected by preparative HPLC [ $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (7.8×300 mm)]. Two unknown compounds were defined as CA and CB which had peaks at 22.1 min and 24.5 min, respectively. Antioxidant activity was measured by their scavenging ability on the stable free radical of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). For bulk extraction of antioxidants, the methanol extract was fractionated with hexan, chloroform, ethyl acetate and butanol. The ethyl acetate fraction showing the highest DPPH radical scavenging activity was further purified by silica gel column chromatography to CA and CB. By NMR analysis, CA and CB were identified as N-(*p*-Coumaroyl)serotonin and N-feruoylserotonin, respectively. The content of N-(*p*-Coumaroyl)serotonin and N-feruoylserotonin were analyzed by reverse phase HPLC using a  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (3.9×300 mm) with linear gradient elution from 10% acetonitrile to 50% acetonitrile for 30min on UV detector at 300 nm. The contents of N-(*p*-Coumaroyl)serotonin and N-feruoylserotonin were 4.11 mg/g DW and 7.29 mg/g DW, respectively, and these two DPPH radical scavengers were detected only in the hull of seeds.

**Keywords** : antioxidant, DPPH radical scavenging activity, N-(*p*-Coumaroyl)serotonin, N-feruoylserotonin, safflower

**홍화**(*Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 일년생 초본으로 꽃과 종자가 다양한 용도로 사용되고 있다. 꽃에는 수용성의 황색색소(safflower yellow)와 불용성의 적색색소(carthamin) 등이 함유되어 있어 천연염료와 식품착색료 등으로 사용되고 왔고, 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 한방약제로도 널리 이용되었다(Kannel *et al.*, 1961; Levy, 1999). 종자는 불포화지방산인 linoleic acid가 70% 이상 함유된 홍화씨유 생산에 이용되고(Noh *et al.*, 1992), 홍화씨유 생산에서 부산물로 얻어지는 홍화씨 유박(oil cake)은 단백질 및 식이성 섬유 등의 급원으로 중요할 뿐만 아니라 lignan, flavonoid와 serotonin류 그리고 이들의 배당체 같은 항암, 항염증 및 항산화성 페놀화합물을 다량 함유하고 있어 최근 새로운 기능성 신소재로써 이용 가능성이 많다(Kim *et al.*, 2003).

홍화종자에는 matairesinol과 8'-hydroxyarctigenin의 lignan과 matairesinol 4-*O*- $\beta$ -D-glucoside와 8'-hydroxyarctigenin 4-*O*- $\beta$ -D-glucoside의 lignan 배당체, acacetin과 luteolin의 flavonoid와 이들의 배당체인 acacetin 7-*O*- $\beta$ -D-glucuronide와 luteolin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, 그리고 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin의 serotonin 유도체와 N-feruoylserotonin-5-*O*- $\beta$ -D-glucoside가 함유되어 있다(Lee, 2005).

N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin은 DPPH radical 소거 활성에 높은 효과(Roh, 2005)와 지질과산화 억제효과(Kang *et al.*, 1999; Lee, 2005)를 보이며, melanin 생성억제와 tyrosinase 저해작용에 의한 미백효과(Roh *et al.*, 1999)뿐만 아니라 에리스타제활성 저해, 섬유아세포 활성 촉진 및 콜라겐 생성 촉진효과에 의한 피부 주름개선에 효

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-63-270-2512  
(E-mail) njchung@chonbuk.ac.kr

<Received October 31, 2007>

능이 있다(Kim *et al.*, 2004). 특히, N-(*p*-Coumaroyl)serotonin은 endotoxin-stimulated human blood monocyte에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하는 항염증작용이 있고, 피부세포 증식 효과가 있다(Takii *et al.*, 1999).

홍화종자에 함유된 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin을 분리·동정하여 표준물질을 만들고 그의 기능성에 대한 연구 보고(Kang *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Lee, 2005; Roh *et al.*, 1999; Roh, 2005)는 많으나, 연구자마다 분리방법과 HPLC를 이용한 단일물질의 검출 결과가 상이하여 홍화종자에서 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin의 실용적 이용을 위한 간편한 추출이나 함유량의 상대적 비교가 쉽지 않다.

따라서 본 연구는 홍화종자에 함유된 DPPH radical 소거 활성물질인 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin을 신속하게 확인하고 항산화물질의 대량추출 및 정제를 위한 분석조건과 함유량을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

홍화 종자는 전북대학교 농장에서 2007년 3월 15일에 파종하고 7월 10일에 수확하였으며, 50°C에서 2일간 건조하여 화합물 성분분석에 이용하였다. 비료는 질소 10 kg/10a, 인산 7 kg/10a, 칼리 7 kg/10a 그리고 퇴비 1,000 kg/10a를 전량 기비로 사용하였고 입모밀도는 40주/m<sup>2</sup>로 재배하였다.

### Preparative HPLC 분획의 DPPH radical 소거 활성 측정

홍화 종자 10 g에 HPLC용 methanol 100 ml를 가하여 50°C에서 24시간 진탕한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여과액을 혼합하여 감압 농축하였다. 농축물을 methanol 10 ml로 용해하여 preparative HPLC(Yong Lin 930D, Korea) 분석에 0.5 ml씩 시료로 사용하였다. Preparative HPLC 분석조건으로 칼럼은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (7.8×300 mm), 파장은 300 nm에서 분석하였다. 이동상의 A용매는 HPLC용 증류수, B용매는 100% HPLC용 methanol 용액을 사용하였고, B용매 35%에서 40%까지 3 ml/min의 유속으로 기울기모드로 분석하였고, 유리튜브에 3 ml씩 분취(GILSON FC 203B)하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다.

DPPH radical 소거 활성도는 0.15 mM DPPH methanol 용액을 튜브당 2 ml를 가하고 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였

으며, 대조구(0.15 mM DPPH methanol 용액)와 시험구와 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

### 항산화성 Serotonin 화합물의 용매 분획에 의한 대량 추출

Preparative HPLC 분석을 통하여 확인한 DPPH radical 소거 활성물질을 용매 분획을 통하여 대량 추출하고자, 홍화 종자 20 g에 HPLC용 methanol 200 ml를 가하여 50°C에서 24시간 진탕한 후 여과지로 여과하였고, methanol 추출물 100 ml에 증류수 20 ml를 가한 다음 hexan 100 ml 씩 2회 처리하여 hexan 분획물을 얻었다. 하층은 감압 농축하여 methanol을 제거한 다음 증류수 50 ml를 가한 다음 chloroform을 50 ml씩 2회 처리하여 chloroform 분획물을 얻었다. 상층 분획물에 ethyl acetate를 50 ml씩 2회 처리하여 ethyl acetate 분획물을 얻었으며, butanol 분획물은 물층에 butanol 50 ml씩 2회 처리하여 얻었다. 용매 분획물은 각각 감압 농축한 다음 methanol 100 ml로 용해하였다.

용매 분획한 시료의 DPPH radical 소거 활성도는 0.15 mM DPPH methanol 용액 2 ml에 분획시료 100  $\mu$ l와 methanol 1900  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

Hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol, 그리고 증류수로 추출한 각각의 용매분획은 preparative HPLC 분석을 통하여 methanol 추출물에서 확인한 두 개의 항산화 물질(CA: 22.1분에 peak를 갖는 항산화물질, CB: 24.5분에 peak를 갖는 항산화 물질)과의 동질성 여부를 확인하였다.

### 항산화성 Serotonin 화합물의 분리 및 동정

홍화종자 10 g의 methanol 추출물을 ethyl acetate 분획하여 감압 농축한 다음 methanol 10 ml에 용해하여 5 ml씩 silica gel column chromatography를 실시하였다. Column은 직경 40 mm, 길이 150 mm의 용기에 silica gel(68-200 mesh) 90 g을 감압으로 채워 제작하였고, 용매는 chloroform(CHCl<sub>3</sub>)과 methanol(MeOH)을 9:1로 혼합하여 이용하였고 300 nm의 파장에서 흡광도를 확인하였다. 용매 이동속도는 10 ml/min으로 하였고 튜브당 5 ml씩 분취(BUCHI Fraction collector C-660)하여 2개의 화합물을 얻었다.

2개의 화합물에 대한 H-NMR(600 MHz)과 C-NMR(150.92 MHz)의 스펙트럼은 600 MHz FT-NMR spectrometer(JNM-ECA 600, Japan)로 상온에서 측정하였으며, 시료용매는 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였고 TMS를 내부표준물질로 하였다.

**항산화성 Serotonin 화합물의 정량**

홍화종자에서 Serotonin 화합물의 정량은 정밀분석 HPLC를 실시하여 측정하였다. 홍화 종자 1 g에 HPLC용 methanol 10 ml를 가하여 50°C에서 48시간 진탕한 후 여과지로 여과하여 안정시킨 후 10 µl씩 분석하였다. 분석조건으로 칼럼은 µ-Bondapak C<sub>18</sub> column(3.9×300 mm), 파장은 300 nm에서 분석하였다. 이동상의 A용매는 100% acetonitrile 용액, B용매는 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하였다. A용매 10%로 분석을 시작하여 30분에 50%까지 기울기모드로 1 ml/min의 속도로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**Preparative HPLC 분획의 DPPH radical 소거 활성 측정**

홍화종자의 메탄올 추출물을 µ-Bondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300 mm)으로 분석한 preparative HPLC 분석 패턴은 Fig. 1과 같다. 1.6분부터 31.6분까지 13개의 반응 피크가 나타났으며 이들 중 22.2분과 24.5분에 검출된 피크가 가장 크게 나타났다.

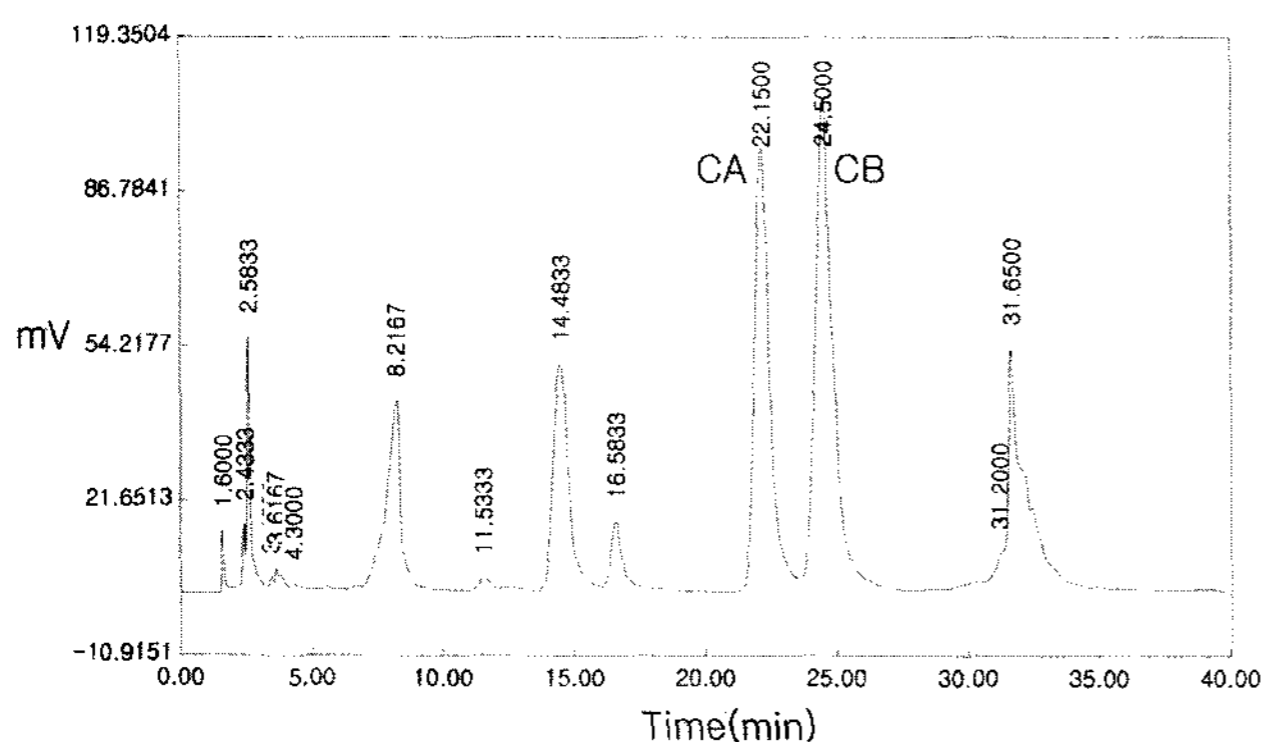
HPLC 분석 조건으로 µ-Bondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300 mm)을 사용한 것은 극성의 차이에 따라 화합물을 분리하여 DPPH radical 소거 활성도를 측정하기 위한 것이었으며, methanol 용매의 경우 초기 농도가 35%보다 높으면 모든 피크들이 나타나는 시간이 빨라져 피크들의 분리가 잘 이루어지지 않았고, 35%보다 낮으면 분석시간이 길어지고 피크가 퍼지는 결과를 보였다. 그림 1에서와 같이 초기의 용매 농도를 35%에서 시작한 경우에는 22.2분 피크와 24.5분 피크의 분리도가 높게 나타났다. UV 파장의 경우, 280 nm에

서는 상대적으로 22.2분 피크와 24.5분 피크가 300 nm에서 보다 작아졌으며, 330 nm에서는 8.3분 피크와 24.5분 피크가 크고 280 nm와 300 nm에서 크게 나타난 22.2분 피크가 작아진 것이 특징적이었으며, 360 nm에서는 8.3분 피크가 크게 나타났다.

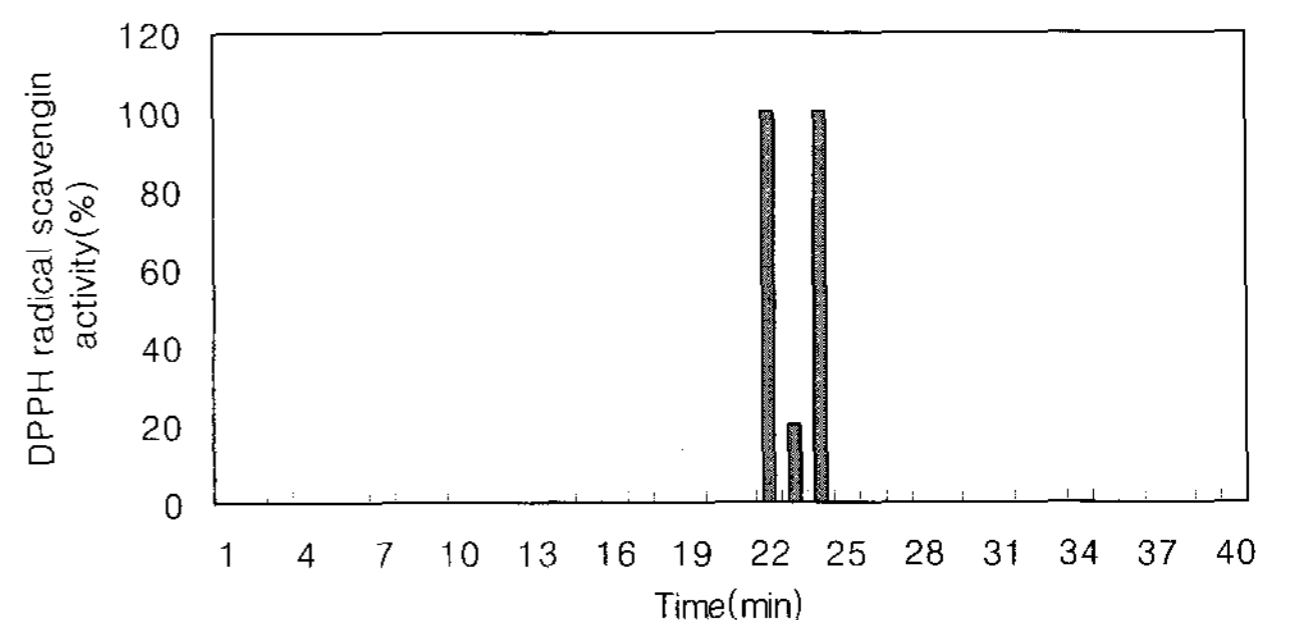
Preparative HPLC를 실시하면서 분당 3 ml씩 분취한 시료의 DPPH radical 소거 활성도는 Fig. 2에서와 같이 22~24분 분획 시료에서 활성이 나타났으며 특히 22분과 24분에 분취한 시료에서 높게 나타났다. 이와 같은 결과에서 DPPH radical 소거 활성도가 높고, 300 nm의 파장에서 흡광도가 높은 화합물은 2종으로 µ-Bondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300 mm)을 이용한 35% methanol분석에서 22.2분과 24.5분에 분리되는 것으로 예상되었다.

홍화 종자에서 DPPH radical 소거 활성도가 높은 화합물은 N-feruoylserotonin과 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin이라는 것은 이미 여러 연구자들에 의하여 보고되어 있으나, HPLC 분석시 두 물질의 분리순서에 대하여는 실험 방법에 따라 일정하지 않다. 즉, Kang *et al.*(1999)은 RCM Prep Nova-Pak C<sub>18</sub> column(25×100 mm), Roh(2005)는 JAIGEL W-252 column(20×500 mm)으로 분리하였을 때 N-feruoylserotonin이 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin 보다 빨리 분리된다고 하였으나 Lee(2005)는 YMC-pack Pro C<sub>18</sub> column(4.6 mm × 250 mm)으로 분리하였을 때 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin이 N-feruoylserotonin보다 빠르다고 하였다. 따라서 본 실험의 22.2분과 24.5분 화합물의 종류를 알기 위해서 정성분석을 실시하였다.

**항산화성 Serotonin 화합물의 용매 분획에 의한 대량 추출**  
Preparative HPLC 분석을 통하여 확인한 CA(22.2분 피



**Fig. 1.** Preparative HPLC chromatogram of the methanolic extract from safflower seeds. HPLC condition: column, µ-Bondapak C<sub>18</sub> column (7.8×300 mm); solvent, 35% methanol; flow rate, 3 ml/min; detection, 300 nm.



**Fig. 2.** DPPH free radical scavenging activity of each fraction by Preparative HPLC. HPLC condition: column, µ-Bondapak C<sub>18</sub> column (7.8×300 mm); solvent, 35% methanol; flow rate, 3 ml/min

크)와 CB(24.5분 피크)의 화합물을 순도 높게 대량 분리하기 위하여 홍화종자의 methanol 추출물을 극성에 따라 용매 분획하여 DPPH radical 소거 활성도와 preparative HPLC 분석을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 용매분획물의 DPPH radical 소거 활성도는 ethyl acetate 분획에서 94.5%, butanol 분획에서 43.4%, 그리고 chloroform 분획에서 14.3%를 나타냈으며 증류수 분획과 hexan 분획에서는 각각 10.6%와 4.3%로 낮게 나타났다.

각 용매분획에서 나타난 항산화물질을 methanol 추출물에서 확인한 CA, CB와 동일한 물질인지를 검정하기 위하여 preparative HPLC로 분석하였다. Methanol 추출물의 CA와 CB의 피크면적을 100% 기준으로 하여 각각의 용매분획의 CA, CB 면적과 비교하였을 경우 ethyl acetate 분획에서 CA의 피크는 81.8%, CB의 피크는 75.1%로 나타났으며, butanol 분획의 CA, CB가 8.3%와 7.8%를 각각 보였으며 chloroform 분획에서는 CB의 피크만 4.2%를 보였다. 이와 같은 결과는 홍화종자에서 DPPH radical 소거 활성을 보이는 화합물은 ethyl acetate 분획으로 분리되는 특성을 보였으며, butanol 분획에서 CA와 CB의 피크가 메탄올 추출물 기준으로 8.3%와 7.8%를 보인 것은 ethyl acetate로 완전히 추출되지 않은 물질이 butanol로 추출된 것으로 생각된다.

#### 항산화성 Serotonin 화합물의 분리 및 동정

Ethyl acetate 분획물을 methanol로 용해하여 silica gel column chromatography를 실시한 결과 300 nm 파장에서 흡광도가 높은 CA와 CB의 2종 화합물을 단 1회에 분리할 수가 있었다. 90% chloroform/methanol 용액을 10 ml/min의 속도로 분리할 때 300 nm에서 흡광도가 높은 2개의 피크가 나타나는데, 동일 피크에 해당하는 분취액을 모아 농축한 다음 소량을 methanol에 용해하여 preparative HPLC를 실시한 결과 CA와 CB가 각각 단일 화합물로 분리되었

고 CB가 CA보다 먼저 분리되었다.

N-feruoylserotonin과 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin를 분리하기 위하여 column 충전제를 달리하거나(Kang *et al.*, 1999; Roh, 2005) 용매의 종류 및 농도를 달리하여(Lee, 2005; Baek *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997) 여러 단계를 거치는 것이 일반적이었으나 Ethyl acetate 분획물을 90% chloroform/methanol 용매를 이용하여 1 ml/min의 속도로 분리할 때 간편하게 2가지 화합물을 분리할 수가 있다.

CA와 CB의 구조를 확인하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 분석을 실시한 결과 Fig. 3, Fig. 4와 Table 2에서와 같이 나타났다.

CA의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 para-substituted benzene의 proton signal[7.38(H-2' & 6'), 6.78(H-3' & 5')]과 δ 7.42(H-7')과 δ 6.41(H-8')의 proton signal로부터 trans olefin 구조를 확인하였고 ABC type의 aromatic proton 유래의 signal [δ 6.95(H-4), δ 6.66(H-6), δ 7.16(H-7)]을 확인하였다. 또한, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 serotonin[δ 124.26(C-2), δ 112.38(C-3), δ 103.51(C-4), δ 151.14(C-5), δ 112.51(C-6), δ 112.65(C-7), δ 133.13(C-8), δ 129.44(C-9), δ 26.49(C-10), δ 41.47(C-11)], *p*-coumaric acid[δ 127.64(C-1'), δ 130.57(C-2'), δ 116.75(C-3'), δ 160.75(C-4'), δ 116.77(C-5'), δ 130.57(C-6'), δ 141.75(C-7'), δ 118.46(C-8')] 및 CO기(δ 169.31) 유래의 signal을 각각 확인할 수 있었다. 모든 spectrum의 특징이 이미 보고된 문헌치(Kang *et al.*, 1999; Lee, 2005; Roh *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997)와 일치하였기에 CA는 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin으로 동정할 수가 있었다.

CB의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 ABC type의 aromatic proton 유래의 signal [δ 6.95(H-4), δ 6.66(H-6), δ 7.16(H-7)]을 확인하였으며, [δ 7.11(H-2'), δ 7.01(H-6'), δ 6.79(H-5')]로부터 1,3,4-trisubstituted benzene을 확인할 수 있었다. δ 7.41(H-7')과 δ 6.43(H-8')의 proton signal로부터 trans olefin 구

**Table 1.** DPPH radical scavenger activity and relative ratio of HPLC peak area in each solvent fraction from safflower seeds

Fraction	DPPH radical scavenger activity (%)	Relative ratio of Preparative HPLC peak area (%)	
		CA (22.2 min peak)	CB (24.5 min peak)
MeOH Extract	94.8	100	100
Hexan Fr.	4.3	0	0
Chloroform Fr.	14.3	0	4.2
Ethyl acetate Fr.	94.5	81.8	75.1
Butanol Fr.	43.4	8.3	7.8
Water Fr.	10.6	0	0



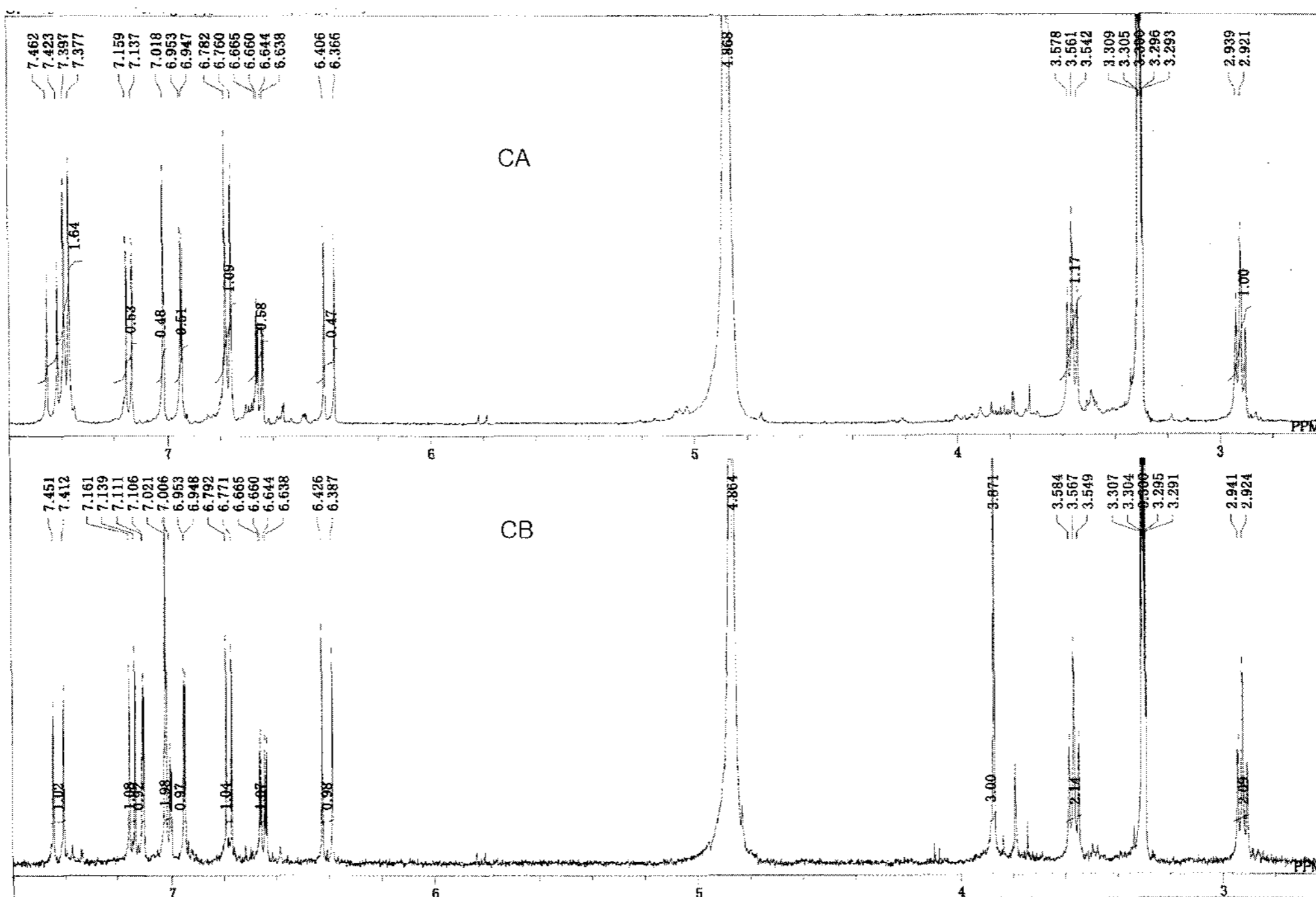


Fig. 3. <sup>1</sup>H-NMR spectra (600.17 MHz) of CA and CB isolated from safflower seeds.

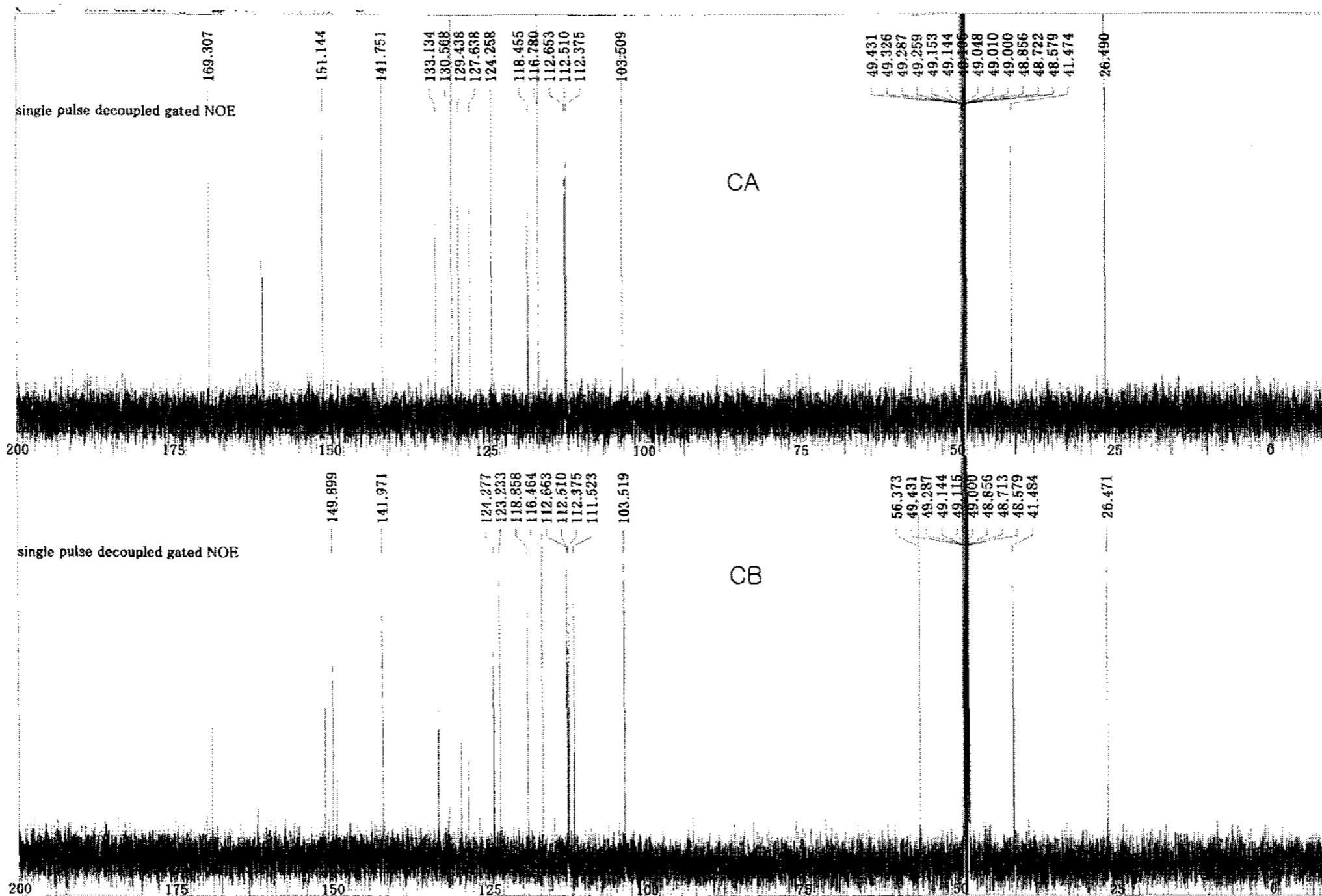


Fig. 4. <sup>13</sup>C-NMR spectra (150.92 MHz) of CA and CB isolated from safflower seeds.

조를, 그리고  $\delta$  3.87의 signal로부터 OCH<sub>3</sub>기의 proton을 각각 확인하였다. 또한, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 serotonin [ $\delta$  124.28(C-2),  $\delta$  112.66(C-3),  $\delta$  103.52(C-4),  $\delta$  151.16(C-5),

$\delta$  112.38(C-6),  $\delta$  112.51(C-7),  $\delta$  133.14(C-8),  $\delta$  129.46(C-9),  $\delta$  26.47(C-10),  $\delta$  41.48(C-11)], ferulic acid [ $\delta$  128.32(C-1'),  $\delta$  111.52(C-2'),  $\delta$  149.27(C-3'),  $\delta$  149.80(C-4'),  $\delta$  116.43

**Table 2.**  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectral data of 2 compounds isolated from the safflower seeds

	$^1\text{H-NMR}$ spectral data (600.17 MHz)		$^{13}\text{C-NMR}$ spectral data (150.92 MHz)	
	CA	CB	CA	CB
2	7.02(s)	7.02(s)	124.26	124.28
3			112.38	112.66
4	6.95(d)	6.95(d)	103.51	103.52
5			151.14	151.16
6	6.66(dd)	6.66(dd)	112.51	112.38
7	7.16(dd)	7.16(dd)	112.65	112.51
8			133.13	133.14
9			129.44	129.46
10	2.92(t)	2.92(t)	26.49	26.47
11	3.56(t)	3.57(t)	41.47	41.48
1'			127.64	128.33
2'	7.38(dd)	7.11(d)	130.57	111.52
3'	6.78(dd)		116.77	149.27
4'			160.75	149.90
5'	6.78(dd)	6.79(d)	116.77	116.46
6'	7.38(dd)	7.01(d)	130.57	123.23
7'	7.42(d)	7.41(d)	141.75	141.97
8'	6.41(d)	6.43(d)	118.46	118.86
CO			169.31	169.22
OCH <sub>3</sub>		3.87		56.37

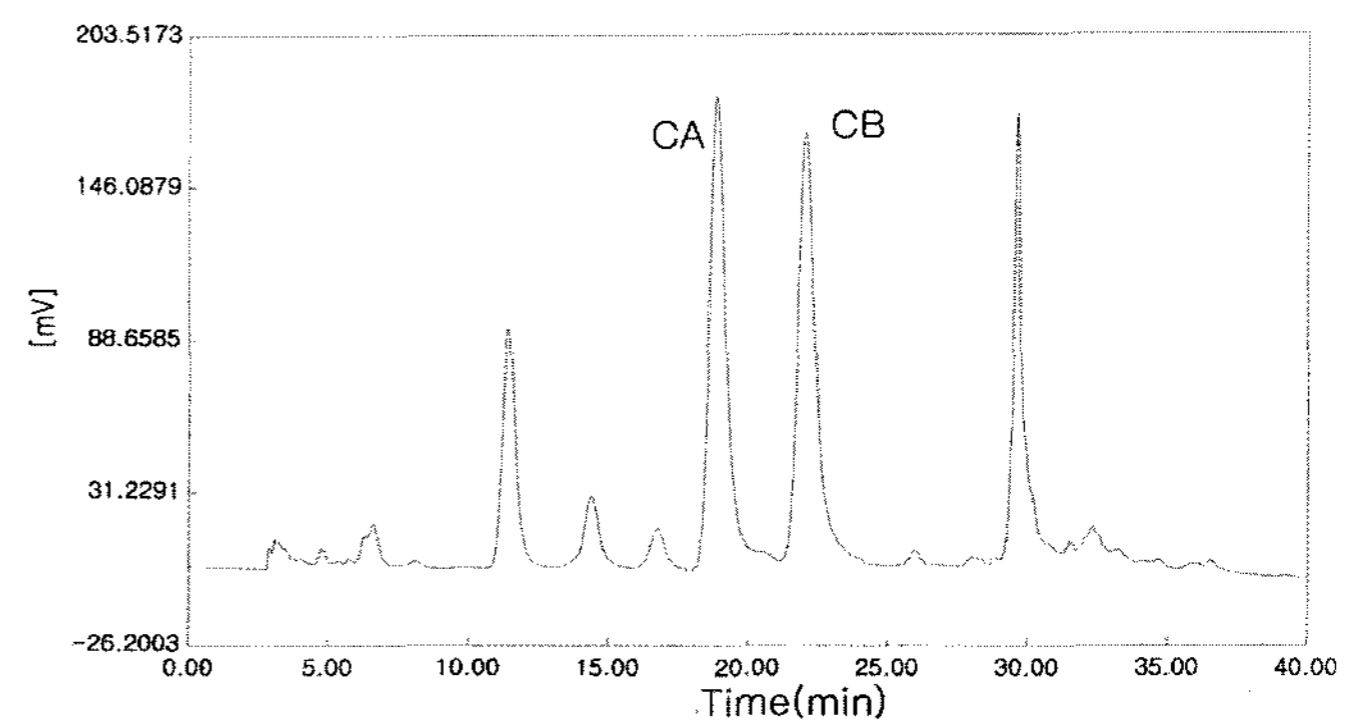
\*Determined in CD<sub>3</sub>OD. s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet.

(C-5'),  $\delta$  123.21(C-6'),  $\delta$  141.96(C-7'),  $\delta$  118.88(C-8')] 및 CO기( $\delta$  169.22)와 OCH<sub>3</sub>기( $\delta$  56.37) 유래의 signal을 각각 확인할 수 있었다. 모든 spectrum의 특징이 기존의 보고(Baek *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1999; Lee, 2005; Roh *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997)와 일치하였기에 CB는 N-ferulo-yserotonin으로 동정하였다.

#### 항산화성 Serotonin 화합물의 정량

홍화종자의 메탄올 추출물을 분석용  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (3.9×300 mm)으로 분리한 결과는 Fig. 5와 같다. 분석용매는 acetonitrile이 methanol보다 300 nm에서 흡광도를 보이는 피크들의 분리도가 더 높아 acetonitrile을 이용하였다. Acetonitrile의 농도를 분석시작 시 10%, 15분에는 15%, 30분에는 50%의 기울기모드로 분석하였을 때 피크들의 분리도가 높았으며 분석시간이 크게 단축되어 18.8분과 22.0분 그리고 29.6분에 300 nm의 흡광도 피크가 높게 분리되었다. 이와 같은 분석 결과는 preparative  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (7.8×300 mm)으로 분석한 결과와 매우 유사한 경향을 보이고 있다.

단일물질로 분리하여 구조를 확인한 N-feruoylserotonin과 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin를 HPLC로 분석하여 비교한



**Fig. 5.** Analysis HPLC chromatogram of the methanolic extract from safflower seeds. HPLC condition: column,  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (3.9×300 mm); linear gradient elution from 10% acetonitrile to 50% acetonitrile for 30 min; flow rate, 1 ml/min; detection, 300 nm.

결과, 18.8분에 나타나는 피크는 CA와 같고 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin으로, 그리고 22.0분에 나타나는 피크는 CB와 같으며 N-feruoylserotonin을 나타내는 피크로 확인되었으며, N-(*p*-Coumaroyl)serotonin이 N-feruoylserotonin보다  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column에서 더 빨리 분리되었다.

홍화 종자를 껍질과 알곡으로 나누어 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin과 N-feruoylserotonin의 함량을 분석한 결과(Table

**Table 3.** Contents of N-(*p*-Coumaroyl) serotonin and N-feruoylserotonin in safflower seeds

Serotonin derivatives	Contents (mg/g seeds)		
	Whole	Hull	Kernel
N-( <i>p</i> -Coumaroyl)serotonin	4.11	4.45	0
N-feruoylserotonin	7.29	8.34	0

3), 전체종자에 함유된 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin은 4.11 mg/gDW, N-feruoylserotonin은 7.29 mg/gDW으로 N-feruoylserotonin의 함량이 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin보다 훨씬 많았으며, 두 물질 모두 종자의 껍질 부위에만 존재하는 것으로 나타났다. 종자 전체를 분석한 것보다 종자 껍질에서 두 가지 화합물 모두 함량이 더 많은 것은 종실에 함유된 화합물이 추출에 영향을 주었기 때문으로 생각된다. 두 물질의 함유량은 Lee(2005), Kim *et al.*(2002, 2003)이 보고한 함량보다 높게 나타났는데, 이는 홍화 종자의 품종 및 생산환경의 차이에 의한 것으로 판단되며, 따라서 홍화종자의 기능성 향상을 위한 품종 및 재배방법 규명을 위한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

### 적 요

홍화종자의 메탄올 추출물에서 preparative HPLC( $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300mm) 분석을 통하여 DPPH radical 소거 활성도가 높은 두 종류의 항산화 물질(CA와 CB)을 확인하였다. 확인된 항산화물질의 대량 추출을 위하여 hexane, chloroform, ethyl acetate 그리고 butanol 등의 유기용매를 이용하였으며 이 중 ethyl acetate 분획에서 DPPH radical 소거 활성이 높은 물질이 추출되었다. Ethyl acetate 분획물을 silica gel chromatography하여 CA와 CB를 분리하였고, <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 분석에 의하여 CA는 N-(*p*-Coumaroyl) serotonin, 그리고 CB는 N-feruoylserotonin으로 동정되었다. 홍화종자에서 N-(*p*-Coumaroyl) serotonin과 N-feruoylserotonin의 함량을  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column(3.9×300 mm)으로 300nm에서 acetonitrile의 용매로 10%에서 분석을 시작하여 30분 동안 50%까지 기울기 모드로 분석한 결과 N-(*p*-Coumaroyl)serotonin의 함량은 4.11 mg/gDW, N-feruoylserotonin의 함량은 7.29 mg/gDW이었으며, 이 두 가지 항산화 물질은 모두 종자껍질에서만 추출되었다.

### 사 사

본 논문은 농촌진흥청 농업특정연구지원사업에 의하여 수행된 연구 결과의 일부입니다.

### 인용문헌

- Baek, N. I., M. H. Bang, J. C. Song, S. Y. Lee, N. K. Park. 1999. N-feruloylserotonin, Antioxidative Component from the seed of *Carthamus tinctorius* L. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42(4) : 366-368.
- Kang, G. H., E. J. Chang, S. W. Choi. 1999. Antioxidative Activity of Phenolic Compounds in Roasted Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds. J. FoodSci. Nutr. 4(4) : 221-225.
- Kim, M. J., J. Y. Kim, S. W. Choi, J. T. Hong, K. S. Yoon. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (I). J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea, 30(1) : 15-22.
- Kim, J. H., J. K. Kim, W. W. Kang, Y. S. Ha, S. W. Choi, K. D. Moon, 2003, Chemical Composition and DPPH Radical Scavenger Activity in Different Sections of Safflower. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(5) : 733-738.
- Kim, J. H., J. K. Kim, W. W. Kang, G. Y. Kim, M. S. Choi, K. D. Moon. 2003. Preparation of Functional Healthy Drinks by Ethanol Extracts from Defatted Safflower Seed Cake. J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr. 32(7) : 1039-1045.
- Kim, J. H., J. H. Park, J. K. Kim, J. M. Lee, K.D. Moon. 2002. Effect of Pretreatment Conditions on Effective Compounds of Extracts from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(3) : 367-372.
- Kannel, W. B., T. R. Dawber, A. Kagan, N. Revostski, J. Strokes. 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience: the Framingham study. Ann Intern Med . 55 : 33-50.
- Lee, J. Y. 2005. Isolation and Identification of Phenolic Compounds from seeds and Leaves of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and Evaluation of Their Biological Activity. The Graduate School, Catholic University of Daegu.
- Levy, R. I. 1999. Cholesterol, lipoprotein, apoprotein and heart disease; present status and future prospects. Clin Chem 27 : 653-662.
- Noh, W. S., J. S. Park. 1992. Lipid composition of Korean safflower seeds. J. Korean Agric. Chem. Soc 35(2) : 110-114.
- Roh, J. S. 2005. Isolation, Identification and Characterization of Antioxidants and Antimelanogenesis Compounds from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds. The Graduate School Yonsei University.
- Roh, J. S., W. S. Sun, S. U. Oh, J. I. Lee, W. T. Oh, J. H. Kim. 1999. In Vitro Antioxidants Activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds. Food Sci. Biotechnol. 8(2)

- : 88-92.
- Takii, T., M. Hayashi, H. Hiroma, T. Chiba, S. Kawashima, H. L. Zhang, A. Nagatsu, J. Sakakibara, K. Onzaki. 1999. Serotonin derivative, N-(*p*-coumaroyl)serotonin, isolated from safflower (*Carthamus tinctorious* L.) oil cake augments the proliferation of normal human and mouse fibroblasts in synergy with basic fibroblast growth factor (bFGF) of epidermal growth factor (EGF). *J. Biochem.* 125 : 910-915.
- Zhang, H. L., A. Nagatsu, T. Watanabe, J. Sakakibara, H. Okuyama. 1997. Antioxidative Compound Isolated from Safflower (*Carthamus tinctorus* L.) Oil Cake. *Chem. Pharm. Bull.* 45(12) : 1910-1914.