

## 홍화의 플라보노이드 성분 분리 및 항산화 활성

정성희 · 문예지 · 김성건 · 김경영 · 이경태 · 김호경\* · 황완근<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학, \*한국한의학연구원

(Received March 3, 2008; Revised June 16, 2008)

## Isolation of Flavonoids from Carthami Flos and their Antioxidative Activity

Sung Hee Chung, Ye Ji Moon, Sung Gun Kim, Kyoung Young Kim, Kyoung Tae Lee,  
Ho Kyoung Kim\* and Wan Kyunn Whang<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

\*Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** — In this study, isolation of antioxidative compounds was performed for development of anti-oxidizing agent. CHCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 30%, 60% MeOH, MeOH fractions were examined antioxidative activity by DPPH method, TBARS assay, and SOD like activity. It was revealed that 30%, 60% MeOH fractions had significant antioxidative activity. From 30%, 60% MeOH fraction, nine compounds were isolated and elucidated kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (I), quercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (II), quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranoside(rutin) (III), 6-hydroxykaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (IV), kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranoside (V), kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (VI), luteolin (VII), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (VIII), apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside (IX) through physicochemical data and spectroscopic methods (Negative FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR). Entirely, all compounds had similar antioxidative activity, but more OH group had more antioxidative activity.

**Keywords** □ Carthami flos, antioxidative effect

홍화(紅花, *Carthami Flos*)는 국화과(Compositae)에 속하는 잇꽃 *Carthamus tinctorius* L.의 꽃이 필 때의 관상화를 그대로 또는 황색색소의 대부분을 제거하고, 압축해서 관상으로 한 것을 약용으로 한다. 홍람(紅藍), 홍화(紅花), 잇꽃, 잇나물이라고도 한다. 높이는 1m 내외이다. 잎은 어긋나고 넓은 바소꼴이며, 텁니꼴이 가시처럼 생긴다. 꽃은 7~8월에 피고 양경퀴같이 생겼으나붉은 빛이 도는 노란색이고 가지 끝에 1개씩 달린다. 총포는 잎같은 포로 싸이고 가장자리에 가시가 있다. 열매는 수과로서 길이 6mm이며 윤기가 있고 짙은 관모가 있다. 종자는 흰색이다. 꽂반침 중앙에 1.5~3 cm 크기의 관상화(管狀花)가 뭉쳐서 핀다.<sup>1,3)</sup>

처음에는 선황색이다가 3~4일이 지나면 주황색으로 변한 후 다시 2~3일이 지나면 선홍색이 되며 그대로 방치하면 검붉은색으로 변하여 마지막에는 흑갈색이 되므로 꽂으로서의 이용가치

를 잃게 된다.<sup>4)</sup>

홍화는 본초강목에서 혈액순환을 좋게 하고 통증을 제거한다고 언급되어 있어 혈행 장해, 통경액, 맹증, 갱년기 장해, 특히 산전 산후의 부인병에 정혈제로 널리 쓰였으며 한방에서 뇌일혈 후의 반신불수에 중요하게 쓰인다고 알려졌으며 완하 작용, 발한 작용, 하열(下熱)작용이 있으며 히스테리컬한 기분을 진정시키는 효과가 있다고 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

경동 시장 등 약재 시장에서도 국산 홍화는 거의 전무한 실정이며 중국산 수입에 의존하고 있다. 또한 홍화는 개화시기에 그 색이 황색이나 일정 시기가 지나면 홍색으로 변하는 특성이 있어 홍화 색소의 시기에 따른 변화가 크며 이에 대한 채집 시기의 명확한 가이드라인이 없어 채집 시기가 일정치 않고 이에 따라 채집 시기가 혼동되고 있는 문제점이 있다. 또한 홍화 색소의 여러 조건(온도, 빛, pH 등)에 대한 불안정성이 선행 연구를 통해 보고된 바 있어 본 연구에서 홍화의 색소 이외의 재현성 있는 성분을 지표 성분으로 한 홍화 유통품의 함량분석을 통해 홍화의 유효성을 연구하고자 하였다. 또한 홍화의 메탄올 엑스의

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-825-5611  
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

세부 분획을 activity guided fractionation 방법에 따라 DPPH radical에 대한 scavenging activity 측정<sup>7)</sup>과 LDL의 lipid peroxidation을 이용한 TBARS assay<sup>8)</sup>와 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성<sup>9-14)</sup>을 통해 항산화 활성의 약리학적 효과를 연구 검토 하였으며, 활성분획으로부터 각종 column chromatography를 실시하여 9종의 성분을 단리, 그 구조를 규명하고, 각 성분에 대한 항산화 효과를 통해 의약품 자원으로서의 개발 가능성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 흥화(Carthami flos)는 한국, 중국, 일본에서 유통되는 것을 지역별로 총 6점(중국-운남성, 신강성, 일본유품, 경남 산청, 경북 의성, 경동시장 중국산 유품)을 수집하여 중앙대학교 약품자원식물학교실에서 식물학적 감정을 거친 후 사용하였으며 성분 분리와 활성 연구에 사용된 것은 중국 운남성 산 흥화 5 kg을 재료로 사용하였다.

### 기기 및 시약

UV/VIS 분석기기로는 Human TU-1800PC(Korea)를 사용하였고, Centrifuge는 Centrikon T-1180(Italy)를 사용하였다. FAB-MS spectrometer 측정에 사용된 것은 VG 70-VSEQ(England)이고 Source는 ionized by 35 keV Cs<sup>+</sup> ion beam을 Matrix는 glycerol을 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrometer는 Varian Gemini 2000, 500 MHz(USA)를, <sup>13</sup>C-NMR spectrometer는 Varian Gemini 2000, 125 MHz(USA)를 사용하였다. TLC 확인시험에는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merck, Germany), Kieselgel RP-18 F<sub>254</sub>(Merck, Germany)를 사용하였고 column Chromatography에 사용한 Gel은 Amberlite XAD-2(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Sephadex LH-20(25~100 μm, Pharmacia, Sweden), ODS gel(400~500 mesh, Waters, U.S.A.), MCI gel CHP20P(75~150 μm, Mitsubishi, Japan)를 사용하였다. 항산화능 측정을 위한 시약으로는 L-Ascorbic acid, Human plasma LDL, 1,1,3,3-Tetraethoxypropane, Trichloroacetic acid(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Thiobarbituric acid(Fluka Chemika, Germany), Ethylenediaminetetraacetic acid-2Na, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl을 사용하였다.

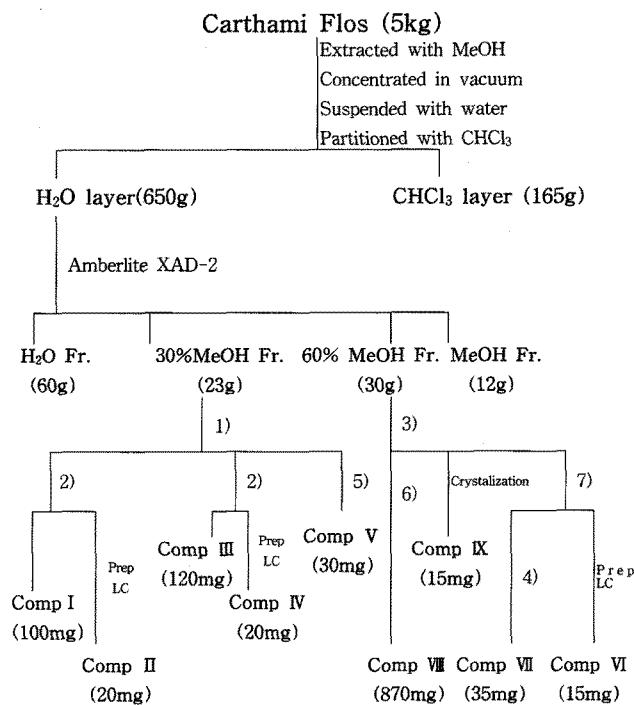
### 시약의 제조

0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 DPPH 39.4 mg을 ethanol에 용해시켜 1000 mL 되도록 용시 조제하였다. Phosphate buffered saline(PBS: pH 7.4)은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.58 g, NaCl 8.77 g, NaNO<sub>3</sub> 0.20 g에 중류수를 가하여 1000 mL 되도록

조제하였다. 1 mM CuSO<sub>4</sub> 용액은 CuSO<sub>4</sub> 0.025 g에 중류수를 가하여 100 mL 되도록 조제하였다. 1 mM EDTA 용액은 EDTA-2Na 0.029 g에 중류수를 가하여 100 mL 되도록 조제하고 1% TBA 시액은 Thiobarbituric acid 1 g에 0.05 N NaOH를 가하여 100 mL 되도록 조제하였다. 25% TCA 시액은 Trichloroacetic acid 25.0 g에 중류수를 가하여 100 mL 되도록 조제하였으며, 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액은(TBARS 시험용 MDA 표준용액) 0.022 g을 PBS에 가해 10 mL 되도록 한 후 이 용액의 0.1 mL를 취하여 PBS로 희석시켜 100 mL 되도록 하며 용시 조제하였다.

### 추출 및 분리

흥화 5 kg에 MeOH를 가하여 상온에서 2주일간 3회 추출한 다음 갑암 농축하여 엑스를 얻었으며 이 MeOH 추출물을 중류수에 혼탁시킨 후 CHCl<sub>3</sub>을 가하여 진탕 반복추출하고, 분액깔때 기에서 분획하여 CHCl<sub>3</sub>층과 수층을 분취한 후 이를 갑암농축하여 CHCl<sub>3</sub> 엑스 163 g을 얻었으며 남은 물층(650 g)을 Amberlite XAD-2를 이용하여 column chromatography를 실시하여 물 분획물 60 g, 30% MeOH 분획물 23 g, 60% MeOH 분획물 30 g, MeOH 분획물 12 g을 각각 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1 – Extraction and isolation of the components from Carthami flos. 1) SephadexLH-20C.C., 20% MeOH. 2) SephadexLH-20C.C., 30% MeOH. 3) SephadexLH-20C.C., 50% MeOH. 4) SephadexLH-20C.C., 60% MeOH. 5) ODS, 40% MeOH. 6) ODS, 60% MeOH. 7) MCI, 50% MeOH.

### 항산화능 실험

**DPPH를 이용한 항산화능 측정** – 본 실험에 사용 된 DPPH(Diphenylpicryl hydrazyl)의 hydrazyl은 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃는 것을 이용하였다.

Hatano 등의 방법에 의하여<sup>7)</sup> 각 fraction 및 단일 물질별 농축 건조물을 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 ppm(99.5% ethanol)의 6가지 농도로 조제한 용액 0.1 ml(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH용액(99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm(99.5% ethanol)의 6가지 농도로 용시 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC<sub>50</sub>(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 μl 농도)로 나타내었다. 이후 효과가 좋은 fraction과 단일물질 등은 농도를 낮게(25, 50, 100, 200, 500 ppm) 하여 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

### TBARS assay를 이용한 LDL 지질과산화에 미치는 영향

Human plasma LDL(400 μg 단백질, Sigma), 1 mM CuSO<sub>4</sub> 16 μl, 농도별로 조제한 각 시료(25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm) 100 μl에 PBS(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 ml가 되도록 하였다. Vortex mixer로 혼화하여 37°C 수욕 상에서 4시간 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μl를 첨가하여 산화를 중지시켰다. 산화된 LDL 용액에 25% trichloroacetic acid 1 ml를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상동액에 1% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하여 95°C에서 발색시킨 후 냉각시켰다. 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. MDA 표준시료로는 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용하였다.<sup>8)</sup>

$$\text{MDA 농도(nM/ml)} = (f/F) \times 10$$

F : 표준시료의 흡광도(532 nm)

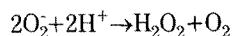
f : 검체의 흡광도(532 nm)

각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu<sup>2+</sup>에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억제하는데 필

요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)을 측정하였다.

**Pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 측정** – Superoxide dismutase(SOD)는 인체 내에서 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 정상 상태의 O<sub>2</sub>로 전환시키는 역할을 한다.

-CuZn-SOD/Mn-SOD/Extracellular SOD



SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 pytochemical에 속하며 superoxide의 반응성을 억제한다. 따라서 이 SOD 유사물질을 섭취하면 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장해를 방어하고 노화억제 효과를 기대할 수 있다. SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용한 Markland의 방법(1974)으로 측정하였다.<sup>9)</sup> 즉, 50 mM Tris-HCl buffer 2.8 ml과 15 mM의 pyrogallol 0.1 ml를 혼합하여 5°C에서 5분간 전반응시킨 후 시료 0.1 ml를 가하여 25°C에서 10분간 반응시키고, 1 M HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 후 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. tris-HCl buffer가 아닌 중류수를 첨가한 것을 대조군으로 하였다. 양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 125, 250, 500, 1000 ppm(99.5% ethanol)의 4가지 농도로 조제하여 측정하였다.

$$\text{SOD 유사 활성 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{A}{B} \right\} \times 100$$

A : tris-HCl buffer에 시료 가한 후 incubation 후의 흡광도

B : 대조군의 incubation 후의 흡광도

### 성분의 분리 및 구조 확인

**Compound I** – FAB-MS(*m/z*): 563[M-H]<sup>-</sup>, 447[M-Glc-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm 7.98(2H, d, J=8.75 Hz, H-2',6'), 6.88(2H, d, J=8.75 Hz, H-3',5'), 6.40(1H, d, J=1.9 Hz, H-6), 6.19(1H, d, J=1.9 Hz, H-8), 5.31(1H, d, J=7.5 Hz, Glc anomeric H), 4.37(1H, d, J=3.4 Hz, Rha anomeric H), <sup>13</sup>C-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm.

**Compound II** – FAB-MS(*m/z*): 463[M-H]<sup>-</sup>, 301[M-Glc-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm 7.71(1H, d, J=2.1 Hz, H-2'), 7.55(1H, dd, J=2.1, 8.7 Hz, H-6'), 6.90(1H, d, J=8.7 Hz, H-5'), 6.76(1H, d, J=2.1 Hz, H-6), 6.41(1H, d, J=2.1 Hz, H-8), 5.07(1H, d, J=7.5 Hz, Glc anomeric H), <sup>13</sup>C-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm.

**Compound III** – FAB-MS(*m/z*): 609[M-H]<sup>-</sup>, 447[M-Glc-H]<sup>-</sup>, 301[M-Rha-Glc-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H-NMR: DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm 6.38(1H, d, J=1.95 Hz, H-6), 6.18(1H, d, J=1.95 Hz, H-8), 6.84(1H, d, J=8.15 Hz, H-5'), 7.54(2H, d, J=8.7 Hz, H-6',2'), 5.34(1H, d,

$J=6.6$  Hz, Glc anomeric H), 4.37(1H, s, Rha anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

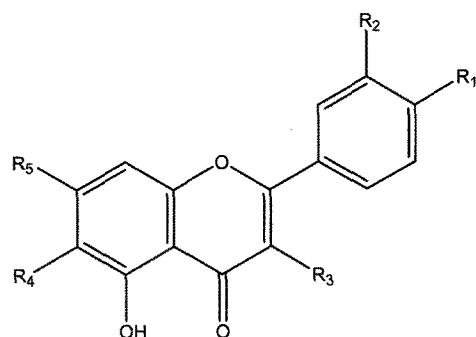
**Compound IV** – FAB-MS( $m/z$ ): 463[M-H]<sup>-</sup>, 301[M-Glc-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 7.97(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.80(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3', 5'), 5.80(1H, s, H-8), 5.3(1H, d,  $J=7.45$  Hz, Glc anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

**Compound V** – FAB-MS( $m/z$ ): 609[M-H]<sup>-</sup>, 429[M-Glc-H]<sup>-</sup>, 249[M-Glc-Glc-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 8.04(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.90(2H, d,  $J=8.85$  Hz, H-3', 5'), 6.39(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-8), 6.16(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-6), 5.70(1H, d,  $J=7.1$  Hz, Glc anomeric H), 4.60(1H, d,  $J=7.85$  Hz, Glc anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

**Compound VI** – (-)FAB-MS( $m/z$ ): 447[M-H]<sup>-</sup>, 285[M-Glc-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 8.02(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.88(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.35(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-8), 6.15(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-6), 5.44(1H, d,  $J=7.5$  Hz, Glc anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

**Compound VII** – (-)FAB-MS( $m/z$ ): 285[M-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 7.42~7.40(2H, m, H-5', H-6'), 6.90(1H, d,  $J=8.25$  Hz, H-2'), 6.67(1H, s, H-3), 6.45(1H, d, H-6), 6.20(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

**Compound VIII** – (-)FAB-MS( $m/z$ ): 463[M-H]<sup>-</sup>, 301[M-Glc-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 7.56(1H, dd,  $J=1.95$ , 8.47 Hz, H-6'), 7.72(1H, d,  $J=1.95$  Hz, H-2'), 6.9(1H, d,  $J=8.48$  Hz, H-5'), 6.77(1H, d,  $J=1.86$  Hz, H-8), 6.42(1H, d,  $J=$



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Compound I	OH	H	O-Rha-Glc	H	OH
Compound II	OH	OH	OH	H	O-Glc
Compound III	OH	OH	O-Rha-Glc	H	OH
Compound IV	OH	H	O-Glc	OH	OH
Compound V	OH	H	O-Glc-Glc	H	OH
Compound VI	OH	OH	H	H	OH
Compound VII	OH	H	O-Glc	H	OH
Compound VIII	OH	OH	O-Glc	H	OH
Compound IX	OH	H	H	H	O-GlcUA

Fig. 1 – Structure of compound I~IX.

1.89 Hz, H-6), 5.1(1H, d,  $J=7.5$  Hz, Glc anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

**Compound IX** – (-)FAB-MS( $m/z$ ): 445[M-H]<sup>-</sup>, 269[M-GlcUA-H]<sup>-</sup>,  $^1\text{H}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm 7.96(2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-2', 6'), 6.95(2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-3', 5'), 6.87(1H, s, H-8), 6.86(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 6.47(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-3), 5.27(1H, d,  $J=7.1$  Hz, GlcUA anomeric H),  $^{13}\text{C}$ -NMR: DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm.

## 결 과

### 분획별 활성 실험의 결과

**DPPH를 이용한 항산화능 측정** – 홍화의  $\text{H}_2\text{O}$  분획물, 30% MeOH 분획물, 60% MeOH 분획물, MeOH 분획물,  $\text{CHCl}_3$  분획물을 농도별로(500~3000 ppm) 조제하여 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 홍화의 radical scavenging activity는 우수

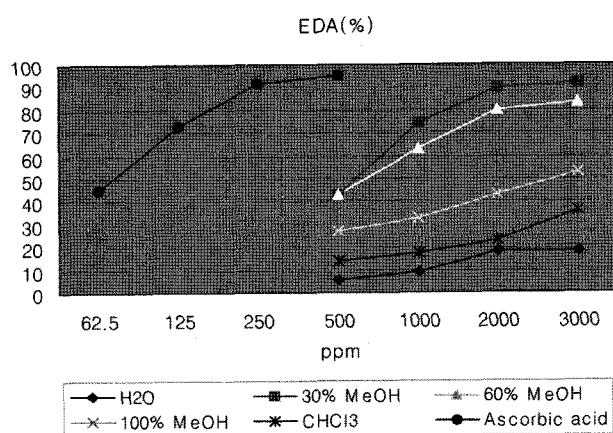


Fig. 2 – The radical scavenging activities of fractions from carthami flos on DPPH.

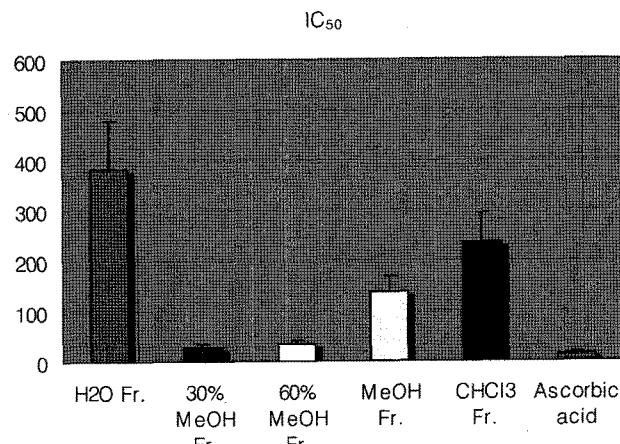


Fig. 3 – IC<sub>50</sub> values of fractions from carthami flos on DPPH method.

하였으며 대조약물인 ascorbic acid와 비교하였을 때 30% MeOH 분획, 60% MeOH 분획, MeOH 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획, H<sub>2</sub>O 분획 순으로 활성이 나타났으며, 특히 30% MeOH 분획 및 60% MeOH 분획이 DPPH에 의한 radical scavenging activity가 우수하였다(Fig. 2). 특히 IC<sub>50</sub>의 경우를 보면 30% MeOH 분획 (27.9±5.07 µg/ml)과 60% MeOH 분획(32.7±0.29 µg/ml)보다도 우수한 radical scavenging activity를 나타내었다(Fig. 3).

**LDL 산화에 대한 억제효과 측정** – 홍화의 각 분획들을 250~2000 ppm의 4가지 농도에 대하여 LDL 지질과산화에 대한 억제 활성을 실험한 결과 대조약물인 ascorbic acid와 비교하였을 때 60% MeOH 분획, 30% MeOH 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획, MeOH 분획, H<sub>2</sub>O 분획 순으로 활성이 나타났으며 순으로 LDL에 대한 과산화지질 억제효과가 우수하였으며 DPPH를 이용한 항산화 활성 시험에서와 같이 60% MeOH 분획, 30% MeOH 분획에서 과산화지질 억제 활성이 높게 나타났다. 또한 IC<sub>50</sub>의 경우 60% MeOH 분획(2.3±0.75 µg/ml)과 ascorbic acid(8.9±1.28 µg/ml)보다는 약 하지만 과산화지질 억제작용을 나타내었다(Fig. 4).

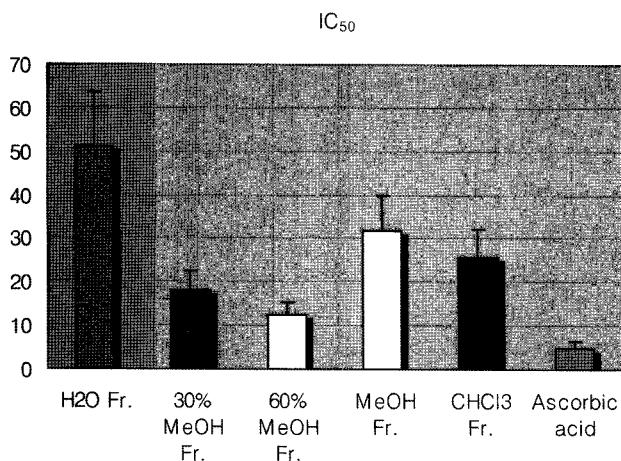


Fig. 4 – IC<sub>50</sub> value of fractions from carthami flos on Cu<sup>2+</sup>-induced LDL lipid peroxidation.

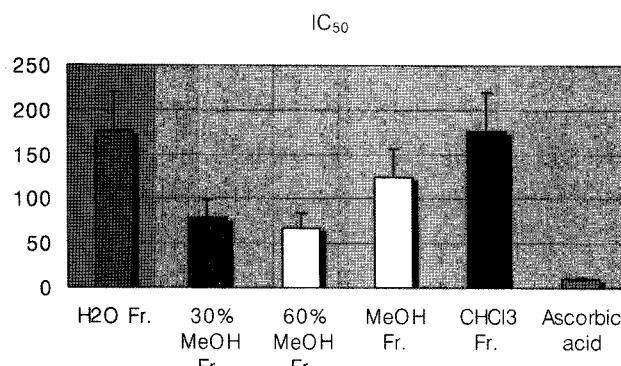


Fig. 5 – IC<sub>50</sub> values of fractions from carthami flos on SOD like activity.

**Pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 측정** – 홍화의 30% MeOH과 60% MeOH 분획을 각 500, 1000, 2000, 3000 ppm의 4가지 농도로 조제하고 양성 대조군인 Ascorbic acid는 125, 250, 500, 1000 ppm의 4가지 농도로 조제하여 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성을 실시한 결과 DPPH, TBARS assay를 통한 항산화 실험과 유사하게 60% MeOH(IC<sub>50</sub> 66.6±1.52 µg/ml), 30% MeOH(IC<sub>50</sub> 78.8±9.04 µg/ml)의 활성이 가장 좋았으며, CHCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O 분획에서는 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 5).

#### 활성분획에서 분리된 물질의 확인 동정

**Compound I** – Compound I은 암황색 분말로서 flavonoid 정색반응인 FeCl<sub>3</sub>에 양성을 나타내었다. Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 593에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 447에서 rhamnose가 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었고, m/z 285에서 glucose와 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR Spectrum에서 δ 7.98 ppm에서 관찰되는 J=8.75 Hz의 doublet signal은 H-2'과 H-6'의 두 개 signal이 합쳐져 나온 것으로 보이고 δ 6.88 ppm의 J=8.75 Hz의 doublet은 H-5'과 H-3'이 합쳐져 나온 signal로 확인하였다. 또한 H-8, 6의 signal은 각각 δ 6.40 ppm과, δ 6.19 ppm에서 meta coupling에 의한 doublet(J=1.9 Hz)으로 관찰되었다. δ 5.31 ppm에서 J=7.5Hz(β 체) 인 glucose의 anomeric proton<sup>1</sup> 관찰되었고 δ 4.37 ppm에서 doublet(J=3.4 Hz)의 rhamnose의 anomeric proton<sup>1</sup> 관찰되었다. δ 0.98 ppm에서 rhamnose의 CH<sub>3</sub>에 의한 proton signal<sup>1</sup> 관찰되었다.

<sup>13</sup>C-NMR에서는 kaempferol과 비교했을 때 C-3<sup>1</sup> δ 133.2 ppm으로 3 ppm 정도 고자장으로 shift, C-2<sup>1</sup> δ 156.6 ppm으로 약 9 ppm 정도 저자장으로 shift 된 것이 관찰되어 C-3 carbon에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다. δ 177.4 ppm에서 C-4의 carbonyl<sup>1</sup>을 관찰할 수 있었다. 또한 δ 101.3 ppm에서 glucos의 anomeric carbon의 peak를, δ 100.83 ppm에서 rhamnose의 anomeric carbon의 signal을 관찰할 수 있었다. δ 17.75 ppm에서는 rhamnose의 6번 CH<sub>3</sub>의 carbon signal을 관찰할 수 있었다. 또한 δ 66.9 ppm에서 glucose의 6번 carbon<sup>1</sup> 6 ppm 정도 저자장으로 shift된 것을 관찰할 수 있는데 이것으로 rhamnose와 glucose가 1→6 결합을 함을 알 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound I을 kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.

**Compound II** – Compound II는 황색의 분말로 FeCl<sub>3</sub> 반응에 양성이며, Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 463에서 [M-H]<sup>-</sup>, m/z 301에서 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관

찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum 중에서 δ 7.71 ppm(H, d, J=2.1 Hz)에서 H-2'의 signal을 관찰할 수 있었고 H-6'과의 meta-coupling으로 인해 J=2.1 Hz인 doublet으로 나타났다. δ 7.55 ppm에서는 H-6'의 signal을 관찰할 수 있었는데 이는 H-2'과 H-5'과의 meta coupling과 ortho-coupling을 통해 각각 J=2.1 Hz와 J=8.7 Hz의 double-doublet으로 나타났다. δ 6.90 ppm에서는 H-5'의 doublet peak(J=8.7 Hz)가 관찰되었는데 이는 H-6'과의 ortho-coupling에 의해 갈라져 나타난 것이다. δ 6.76 ppm과 δ 6.41 ppm에서는 H-8과 H-6의 signal을 관찰할 수 있는데 이들은 서로 ortho-coupling에 의해 J=2.1 Hz로 갈라져 나타났다. 또한 δ 5.07 ppm에서 J=7.5 Hz인 doublet signal을 확인할 수 있었는데 이는 glucose의 anomeric proton의 signal로 β체로 결합되어 있음을 알 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 quercetin과 비교했을 때 C-7이 162.76 ppm으로 1.0 ppm가량 고자장으로 shift되었고 C-6(98.8 ppm)과 C-8(93.8 ppm)이 1 ppm 정도 저자장으로 C-10(104.2 ppm)이 약 2 ppm 정도 저자장으로 shift된 것이 관찰되므로 C-7 carbon에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고, 176.08 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다. 또한 99.97 ppm에서 glucose의 anomeric carbon의 signal을 관찰 할 수 있었다.

이상의 기기분석과 각종 기기분석 및 문헌파의 비교를 통하여 compound II는 quercetin 7-O-β-D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.

**Compound III** – Compound III는 미황색의 분말로  $\text{FeCl}_3$  반응에 강한 양성이며, Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 609에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 447[M-Glc-H]<sup>-</sup>, m/z 301[M-Glc-Rha-H]<sup>-</sup>에서 각각 hexose 및 methyl pentose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있어 flavonol 모핵에 1개의 methylpentose와 1개의 hexose가 결합된 화합물로 추정할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum 중에서 aromatic field의 δ 6.38 ppm(1H, d, J=1.95 Hz), δ 6.18 ppm(1H, d, J=1.95 Hz)에서 flavonoid A ring의 H-6 및 H-8의 전형적인 meta coupling이 관찰되었고, δ 6.84 ppm(1H, d, J=8.15 Hz)에서 H-5'을 δ 7.54 ppm(2H, d, 8.7 Hz)에서 H-6'과 H-2의 겹쳐진 signal을 확인할 수 있었으며, glucose의 anomeric proton이 δ 5.34 ppm에서 J=6.6 Hz의 doublet으로, rhamnose의 anomeric proton이 δ 4.37 ppm에서 singlet으로 나타나므로 각각 β 및 α 결합을 하고 있음을 보여주며, δ 0.9 ppm에서 rhamnose의  $\text{CH}_3$ 기를 확인할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum과 같이 비교하여 볼 때 C-3이 고자장으로 shift되어 있는 것으로 보아 glucose가 quercetin의 3-OH에 직접 결합되어 있으며 rhamnose가 glucose에 결합되어 있음

을 알 수 있었다. 이들 두 당 사이의 결합 위치를 결정하기 위하여 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 측정하여 δ 101.2 ppm에서 glucose의 anomeric carbon signal을, δ 100.8 ppm에서 rhamnose의 anomeric carbon signal을 확인할 수 있었으며, 이들 당은 rutinose임을 확인할 수 있었다. δ 17.8 ppm에서 rhamnose의 6번 carbon을 확인하였다. 또한 δ 177.4 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 추정할 수 있었고, δ 144.8 ppm에서 C-3의 carbon signal, δ 148.5 ppm에서 C-4의 carbon signal이 각각 확인되어 C-3' 및 C-4' 위치에 proton이 hydroxyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 기기분석 결과와 문헌파의 비교로 compound III은 Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside(Rutin)으로 확인, 동정하였다.

**Compound IV** – Compound IV는 암황색 분말로  $\text{FeCl}_3$  반응에 양성 반응을 나타내어 폐놀성 화합물로 추정할 수 있었다. Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 463에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 301[M-Glc-H]<sup>-</sup>로, m/z 301에서 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR Spectrum에서 δ 7.97 ppm(2H, d, J=8.8 Hz)에서 H-2'과 H-6'이 겹쳐진 signal로 확인이 되었고 δ 6.8 ppm(2H, d, J=8.8 Hz)에서 H-3'과 H-5' 또한 겹쳐진 signal로 확인이 되었다. δ 5.3 ppm에서 doublet(J=7.45 Hz)로 β체인 glucose의 anomeric proton을 확인할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR에서는 kaempferol과 비교했을 때 C-3이 δ 132.8 ppm으로 3 ppm 정도 고자장으로 shift되어 관찰되므로 C-3 carbon에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인 할 수 있었다. δ 177 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다. 또한 δ 98.9 ppm에서 glucose의 anomeric carbon의 peak를 관찰할 수 있었으며 compound VI인 kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside와 비교 시 MS 데이터에서 16 정도 차이가 있어 hydroxyl기가 더 붙어 있는 것으로 추정할 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌파의 비교를 통하여 compound IV를 6-hydroxy kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosid로 확인 동정하였다.

**Compound V** – Compound V은 미황색의 분말로  $\text{FeCl}_3$  반응에 양성 반응을 나타내어 폐놀성 화합물로 추정하였다. Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 609에 M-H의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었고 m/z 429에서 glucose가 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었고, m/z 249에서 glucose와 glucose가 함께 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 8.04 ppm에서 관찰되는 J=8.8 Hz의 doublet signal은 H-2'과 H-6'의 두 개 signal이 합쳐져 나온 것으로 보이고 δ 6.90 ppm의 J=8.85 Hz의 doublet은 H-5'과 H-

3<sup>o</sup>이 합쳐져 나온 signal로 확인하였다. 또한 H-8, 6의 signal은 각각 δ 6.39 ppm과, δ 6.16 ppm에서 doublet으로 관찰되었다. δ 5.70 ppm에서 J=7.1 Hz(β체)인 glucose의 anomeric proton이 관찰되었고 δ 4.60 ppm에서 J=7.85 Hz(β체)인 glucose의 anomeric proton<sup>o</sup>] doublet으로 관찰되었다.

<sup>13</sup>C-NMR에서는 kaempferol과 비교했을 때 C-3<sup>o</sup>] δ 132.8 ppm으로 3 ppm 정도 고자장으로 shift되어 관찰되므로 C-3 carbon에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다. δ 177 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다. 또한 δ 103.6 ppm과 δ 98.9 ppm에서 glucose의 anomeric carbon의 peak를 관찰할 수 있었으며 δ 82.3 ppm에서 glucose의 2번 carbon<sup>o</sup>] 10 ppm 정도 저자장으로 shift 되는 것을 관찰할 수 있어 두 개의 glucose 가 1→2 결합을 하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound V를 kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)β-D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.

**Compound VI** – Compound VI은 황갈색의 분말로 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254 nm)로 쪼였을 때 강한 UV 흡수 패턴을 보였으며 10% 황산 분무 가열시 황색으로 발색되었고 FeCl<sub>3</sub> 양성반응으로 flavonoid 화합물로 추정하였다. Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 447에서 M-H의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었고 m/z 285에서 glucose가 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 8.02 ppm에서 관찰되는 doublet signal은 J=8.8 Hz로 H-2'과 H-6'의 signal이 나타난 것이고 δ 6.88 ppm의 2H의 signal은 H-3'과 H-5'의 signal로 판단되었다. δ 6.35 ppm과 δ 6.15 ppm의 signal은 H-8과 H-6의 signal로 상호 meta-coupling에 의한 doublet으로 J=1.9 Hz로 관찰되었다. δ 5.44 ppm의 doublet(J=7.5 Hz) signal은 glucose의 anmeric proton의 signal로 β체임을 알 수 있었다.

또한 <sup>13</sup>C-NMR에서는 kaempferol과 비교했을 때 C-3이 δ 133.1 ppm으로 3 ppm 정도 고자장으로 shift되어 관찰되므로 C-3 carbon에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고 δ 177.2 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다. 또한 δ 101.0 ppm에서 glucose의 anomeric carbon signal을 관찰할 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound VI를 kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.

**Compound VII** – Compound VII은 황색의 분말로 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색에서 황색을 보였으며 FeCl<sub>3</sub> 반응에 양성을 나타내어 폐놀성 화합물임을 추정하였다. Negative FAB-Mass spectrum에서 m/z 285에서 M-H의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 7.42~7.40 ppm에서 2H의 적분치를 갖는 multiplet signal은 H-2',6'<sup>o</sup>]며, 이 중 H-6'은 δ 6.90 ppm에서 J=8.3 Hz을 갖는 doublet signal인 H-5'과 ortho coupling을 하는 것으로 관찰되었다. δ 6.45 ppm과 δ 6.20 ppm에서 보이는 singlet signal은 각각 H-6과 H-8로 관찰되었다.

또한 <sup>13</sup>C-NMR에서는 δ 181.6 ppm에서 C-4의 carbonyl기를 동정할 수 있었고, δ 145.7 ppm과 δ 149.7 ppm에서 C-3', C-4'의 peak를 확인하여 C-3', C-4'의 위치의 proton<sup>o</sup>] hydroxyl기로 치환되었음을 알 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound VII을 luteolin으로 확인 동정하였다.

**Compound VIII** – 황색 분말로 FeCl<sub>3</sub> 반응과 Mg+HCl 반응에 강한 양성을 나타내고, Negative FAB-MS spectrum에서 m/z=463에 M-H의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며 m/z=301에서 hexose가 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 6.42(1H, d, J=1.9 Hz)ppm 및 δ 6.77(1H, d, J=1.9 Hz)ppm에서 H-6과 H-8<sup>o</sup>] meta coupling을 나타내었으며 δ 6.9(1H, d, J=8.48 Hz)ppm에서 H-5<sup>o</sup>] H-6'과 ortho coupling함을 관찰하였다. δ 7.56(1H, dd, J=1.95, 8.47 Hz)ppm에서 H-6'의 proton<sup>o</sup>] H-2', H-5'과 각각 meta, ortho coupling 하여 double doublet으로 관찰되었고, δ 7.72(1H, d, J=1.95 Hz)ppm에서 H-2'의 proton signal<sup>o</sup>] H-6'과 meta coupling 하고 있음을 확인하였다. δ 5.1(1H, d, J=7.5 Hz)ppm에서 glucose의 anomeric proton<sup>o</sup>] 관찰되었다.

<sup>13</sup>C-NMR에서는 quercetin과 비교했을 때 C-2가 9.9 ppm, C-4가 2.1 ppm 저자장으로 shift 되어 관찰되었고, C-3<sup>o</sup>] 1.8 ppm 고자장으로 shift되어 관찰되므로 C-3에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것으로 확인할 수 있었다. δ 176.0 ppm에서 C-4의 carbonyl 기를 관찰할 수 있었고 δ 101.8 ppm에서 당의 anomeric carbon<sup>o</sup>] 보이며 δ 77.2 ppm에서 60.6 ppm까지 당에 의한 5개의 carbon을 관찰할 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound VIII을 quercetin 3-O-β-D glucopyranoside로 확인 동정하였다.

**Compound IX** – Compound IX는 암황색의 분말로써 FeCl<sub>3</sub> 반응에 강한 양성이며, Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 445에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 269에서 glucuronic acid가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum 중에서 δ 7.96 ppm(2H, d, J=8.6 Hz)에서 H-2'과 H-6'의 겹쳐진 signal을 확인할 수 있었으며, δ 6.95 ppm(2H, d, J=8.6 Hz)에서 H-3'과 H-5'의 겹쳐진 signal을 확인할 수 있었고, δ 6.87 ppm에서 singlet으로 H-3을 확인하였고

$\delta$  6.86 ppm(1H, d,  $J=2.0$  Hz)과  $\delta$  6.47 ppm(1H, d,  $J=2.0$  Hz)로 관찰됨에 따라 H-6<sup>o</sup> | H-8<sup>o</sup>과 meta coupling<sup>o</sup> 이루어진 것을 확인하였고  $\delta$  5.27 ppm에서 glucuronic acid의 anomeric proton signal<sup>o</sup> doublet으로  $J=7.1$  Hz를 나타냄으로서  $\beta$  결합하고 있음을 확인할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum을 apigenin과 비교하여 보았을 때  $\delta$  182.3 ppm로 carbon signal<sup>o</sup> 관찰됨에 따라 C-4의 carbonyl<sup>o</sup>를 추정 할 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 H-6과 H-8<sup>o</sup> meta coupling과  $\delta$  162.5 ppm에서 C-7의 치환으로 인하여 upfield shift된 signal을 관찰할 수 있었다. 이 위치에서 당시 결합됨을 추정할 수가 있으며  $\delta$  75.6 ppm,  $\delta$  75.3 ppm,  $\delta$  72.8 ppm,  $\delta$  71.2 ppm의 4개의 carbon signal<sup>o</sup> 관찰되었고,  $\delta$  99.3 ppm에서 anomeric carbon signal<sup>o</sup>,  $\delta$  170.1 ppm에서 1개의 -COOH carbon signal<sup>o</sup> 관찰되어 결합된 당을 glucuronic acid로 추정 할 수 있었다. 또한  $\delta$  161.3 ppm에서 C-4'의 carbon signal이 확인되어 proton<sup>o</sup> hydroxy<sup>o</sup>로 치환되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound IX을 분자식  $C_{21}H_{18}O_{11}$ 인 apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside로 확인 동정하였다.

#### 화합물의 활성 실험 결과

분리된 성분의 항산화 활성 – 흥화의 각각의 분획물에 대해 항산화 활성 실험 결과 우수한 활성을 보인 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획에서 분리한 9개 compound의 항산화 활성 측정을 위해 DPPH법에 의한 각각의 radical scavenging activity와 LDL의 지질과산화에 대한 억제 효과와 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성을 측정하였다.

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – 각 compound를 4가지의 농도별(250~2000 ppm)로 조제하여 각각의 compound의 DPPH radical<sup>o</sup> 대한 scavenging activity를 실험한 결과 모든 compound에서 양성 대조약물로 사용한 L-ascorbic acid와 유사한 radical scavenging activity를 나타내었다(Table I, Fig. 6).

Table I – IC<sub>50</sub> Values of compound against the DPPH radical

Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Comp. I	21.7±1.09
Comp. II	19.3±1.85
Comp. III	4.2±0.47
Comp. IV	18.7±1.23
Comp. V	25.9±3.70
Comp. VI	21.8±1.95
Comp. VII	34.6±0.79*
Comp. VIII	17.3±2.53
Comp. IX	30.3±1.69
L-Ascorbic acid	9.7±0.02**

LDL 산화에 대한 억제효과 측정 – 30% MeOH 분획물, 60% MeOH 분획물에서 분리한 각 compound를 농도별로(125~1000

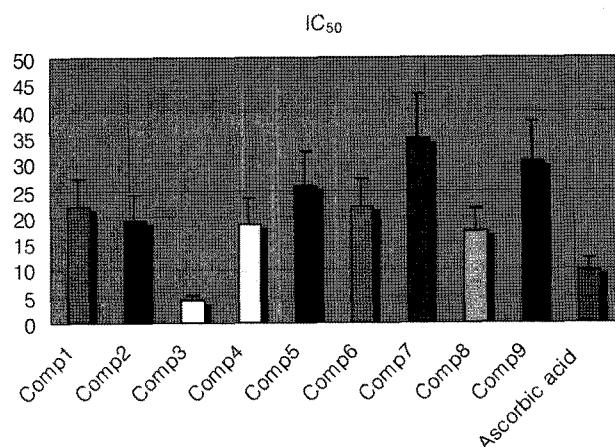


Fig. 6 – IC<sub>50</sub> values of compound I~IX on DPPH method.

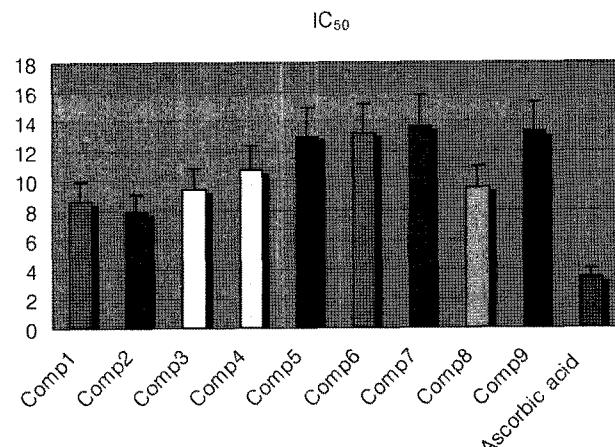


Fig. 7 – IC<sub>50</sub> value of compound from carthami flos on Cu<sup>2+</sup>-induced LDL lipid peroxidation.

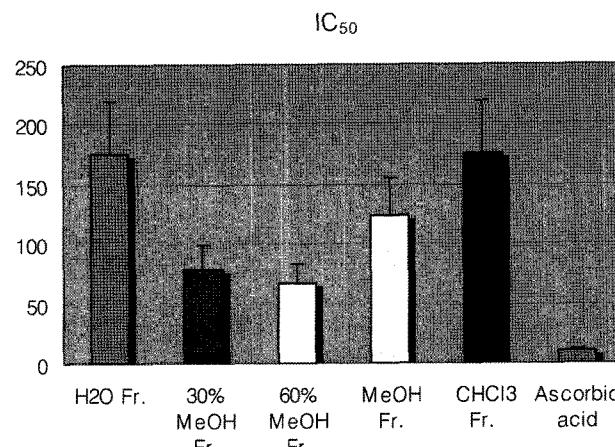


Fig. 8 – IC<sub>50</sub> values of fractions from carthami flos on SOD like activity.

ppm) LDL 지질과산화에 대한 억제활성을 실험한 결과 대조약물인 ascorbic acid와 비교하였을 때 모든 compound가 ascorbic acid와 유사한 과산화지질억제작용을 나타내었다(Fig. 7).

**Pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 측정** – 홍화의 30% MeOH과 60% MeOH 분획에서 분리한 각 compound를 각 125, 250, 500, 1000 ppm의 4가지 농도로 조제하고 양성 대조군인 Ascorbic acid는 125, 250, 500, 1000 ppm의 4가지 농도로 조제하여 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성을 실시한 결과 모든 compound가 양성 대조군인 ascorbic acid와 거의 유사한 활성을 나타내었다(Fig. 8).

## 결  론

홍화의 MeOH 액스를  $\text{CHCl}_3$ 을 이용하여 탈지한 후  $\text{CHCl}_3$  분획을 얻고 남은  $\text{H}_2\text{O}$  분획을 amberlite XAD-2를 이용,  $\text{H}_2\text{O}$ , 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH 분획을 얻었고 이들 5가지 분획물에 대해서 activity guided fractionation 방법에 따라 DPPH radical에 대한 scavenging activity와 LDL의 lipid peroxidation을 이용한 TBARS assay와 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성으로 항산화 활성을 실험하였다. 그 결과 30% MeOH( $\text{IC}_{50}$  27.88  $\mu\text{g/mL}$ ), 60% MeOH 분획(32.76  $\mu\text{g/mL}$ )에서 항산화효과가 있었으며 이는 양성 대조군인 ascorbic acid( $\text{IC}_{50}$  2.56  $\mu\text{g/mL}$ )보다는 약하지만 우수한 radical scavenging activity를 보였다. [ $\text{H}_2\text{O}$  분획 <  $\text{CHCl}_3$  분획 < MeOH 분획 < 60% MeOH 분획 < 30% MeOH 분획]. 또한 과산화지질 실험에 있어서도 ascorbic acid ( $\text{IC}_{50}$  5.02  $\mu\text{g/mL}$ )보다는 약하지만 우수한 수준의 활성 [ $\text{H}_2\text{O}$  분획 < MeOH 분획 <  $\text{CHCl}_3$  분획 < 30% MeOH 분획( $\text{IC}_{50}$  18.08  $\mu\text{g/mL}$ ) < 60% MeOH 분획( $\text{IC}_{50}$  12.31  $\mu\text{g/mL}$ )]을 관찰할 수 있었다. Pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 실험에는 앞의 두가지 항산화 활성 결과와 마찬가지로 양성 대조군인 ascorbic acid( $\text{IC}_{50}$  9.76  $\mu\text{g/mL}$ )보다는 낮지만 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획에서 우수한 활성을 보였다. [ $\text{H}_2\text{O}$  분획 =  $\text{CHCl}_3$  분획 < MeOH 분획 < 30% MeOH 분획( $\text{IC}_{50}$  78.78  $\mu\text{g/mL}$ ) < 60% MeOH 분획 ( $\text{IC}_{50}$  66.65  $\mu\text{g/mL}$ )].

우수한 항산화 활성이 관찰된 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획을 gel column chromatography를 실시하여 9개의 화합물을 분리하였다.

30% MeOH Fr.에서 compound I, II, III, IV, V를 60% MeOH Fr.에서 compound VI, VII, VIII, IX를 각각 분리하였으며 이들의 물리화학적 성상과 각종 기기분석(Negative FAB-MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) 결과를 통해 compound I은 kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1→6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, compound II는 quercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, compound III은 quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1→2) $\beta$ -D-glucopyranoside

(rutin), compound IV는 6-hydroxykaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, compound V는 kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1→2) $\beta$ -D-glucopyranoside, compound VI은 kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, compound VII은 luteolin, compound VIII은 quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, compound IX은 apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside로 확인 동정하였다.

각각의 성분에 대한 항산화 활성 실험 결과 9가지의 compound에서 모두 양성 대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때 DPPH radical에 대한 scavenging activity와 LDL의 lipid peroxidation을 이용한 TBARS assay와 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성에서 모두 유사한 항산화 활성을 보였으며 전반적으로 OH기가 많은 compound일수록 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 이는 홍화의 항산화제 개발에 충분한 가능성을 보여준다 할 수 있겠다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문  헌

- 1) 대한 약전 제 8개정 대한 약전외 한약(생약) 규격집.
- 2) 배기환 : 한국의 약용식물, 교학사, p. 446 (2000).
- 3) 한국약용식물학 연구회 : 종합 약용식물학, 학창사, p. 278 (2005).
- 4) Sevim, K. : Moisture sorption and thermodynamic properties of safflower petals and tarragon. *Journal of Food Engineering* **78**, 413 (2007).
- 5) 손성연 : 신농본초경, 의도한국사영인 2, 서울, p. 13.
- 6) 이상인, 안덕균 : 본초학, 영림사, 서울, p. 178 (1992).
- 7) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 8) Chun, S. and Shetty, K. : Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* **40**, 809 (2005).
- 9) Hiroshi, O., Nobuko, O. and Kunio, Y. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
- 10) 김라민 : 수종 천연 약물과 계피의 항 알리지 작용 연구 (1995).
- 11) Agrawal, P. : Carbon-13 NMR of flavonoids. *Elsevier* 332 (1989).
- 12) Harbone, J. and Marbry, T. : The Flavonoids : Advance in Research., Campman and Hall (1993).

- 13) Tang, W. and Eisenbrand, G. : Chinese Drugs of Plant Origin, Springer-Verlag, 919-26 (1992).
- 14) Spyridon, D. K., Despo, K. P. and Alexandros, D. : Cultivar and seasonal effects on the contribution of pre-anthesis assimilates to safflower yield. *Field Crops Research* **90**, 263 (2004).
- 15) Shimokoriyama, M. : On the formation of carthamin in the flowers of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Biochem.* **54**, 93 (1955).
- 16) Goda, Y., Suzuki, J. and Yoshihira, K. : Studies on high-performance liquid chromatographic analysis of safflomin A and B in safflower yellow and commercial safflower yellows. *Eisei Shikenjo Hokoku* **106**, 101 (1988).
- 17) Nakato, K., Sekino, Y. and Yomo, N. : High-performance liquid chromatography of carthamin, safflor yellow A and a precursor of carthamin. *J. Chromatogr.* **438**, 61 (1988).
- 18) Watanabe, T. and Hasegawa, N. : Separation and determination of yellow and red safflower pigments in food by capillary electrophoresis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1179 (1997).
- 19) Liu, Y. and Zhou, H. : Study on distribution of safflor yellow A in tissues of mice. *Yao Xue Xue Bao* **39**, 217 (2004).
- 20) Cho, M. and Hahn, T. : Purification and characterization of precarthamin decarboxylase from the yellow petals of *Carthamus tinctorius* L. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 238 (2000).
- 21) Kazuma, K., Takahashi, T. and Sato, K. : Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars at *Carthamus tinctorius* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1588 (2000).
- 22) Shingo, S. and Toshikatsu, N. : Studies on the synthesis of safflomin-A, a yellow pigment in safflower petals : oxidation of 3-C- $\beta$ -d-glucopyranosyl-5-methylphloroacetophenone. *Carbohydrate Research* **340**, 389 (2005).
- 23) Shingo, S., Takashi, K. and Tohru, S. : Efficient synthesis of analogs of safflower yellow B, carthamin, and its precursor: two yellow and one red dimeric pigments in safflower petals. *Tetrahedron* **61**, 9630 (2005).
- 24) Ligang, C. and Lan, D. : Dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line spectrophotometric determination of safflower yellow in *Flos Carthami*. *Analytical Chimica Acta* **580**, 75 (2006).
- 25) Tsimidou, M. and Tsatsaroni, E. : Stability of saffron pigments in aqueous extracts. *J. Food Sci.* **58**, 1073 (1993).
- 26) Saito, K. and Murata, T. : The influence of thermal treatments on the stability of safflor yellow B. *Food Chem.* **51**, 307 (1994).
- 27) Kim, J. and Park, Y. : Stability of carthamin from *Carthamus tinctorius* in aqueous solution; pH and temperature effects. *Arch. Pharm. Bull.* **41**, 1796 (1997).
- 28) Yoon, J. and Cho, M. : Thermal stability of the pigments hydroxysafflor yellow A, safflor yellow B, and precarthmin from safflower. *Journal of Food Science* **68**, 839 (2003).
- 29) Jiang, T. and Lv, Z. : Separation and determination of chalcones from *Carthamus tinctorius* L. and its medicinal preparation by capillary zone electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **28**, 1244 (2005).
- 30) Zhang, H. and Nagatsu, A. : Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **45**, 1910 (1997).
- 31) Li, Y. and Che, Q. : Studies on chemical components of *Carthamus tinctorius* petals. *Yao Xue Xue Bao* **33**, 626 (1998).
- 32) Srinivas, C. and Praveena, B. : Safflower petals: a source of gamma linolenic acid. *Plant Foods Hum Nutr.* **54**, 89 (1999).
- 33) Lee, J., Chang, E. and Kim, H. : Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 313 (2002).
- 34) Tsutomu, K., Susumu, T. and Hidetaka, N. : A novel and potent biological antioxidant, Kinobeon A, from cell culture of safflower. *Life Science* **74**, 87 (2003).
- 35) Zhou, Y. and Ma, H. : New acetylenic glucosides from *Carthamus tinctorius*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **54**, 1455 (2006).
- 36) Wang, B., Yang, M. and Pang, L. : Effect of Hong-Hua (*Flos Carthami*) on the extent of myocardial ischemia in the different infarct zones following coronary occlusion in the dog. *Yao Xue Xue Bao* **14**, 474 (1979).
- 37) Gong, C. and Yu, P. : Effects of *Flos Carthami* Co injection in the treatment of scleroma neonatorum. *J. Tradit. Chin. Med.* **3**, 141 (1983).
- 38) Liu, Y. and Murong, S. : Effects of *flos Carthami* on beta-endorphin levels in brain regions of rats with cerebral ischemia. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* **17**, 169 (1997).
- 39) Nobakht, M. and Fattahi, M. : A study on teratogenic and cytotoxic effects of safflower extract. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 453 (2000).
- 40) Siow, Y. and Choy, P. : Effect of *Flos carthami* on stress-activated protein kinase activity in the isolated reperfused rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **207**, 41 (2000).
- 41) Bie, X. : Clinical observation on treatment of traumatic intracranial hematoma by *flos Carthami* combined with radix Acanthopanacis senticosi injection. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* **23**, 296 (2003).
- 42) Akiko, S. and Takako, Y. : Antioxidative effects related to the potential anti-aging properties of the Chinese prescription Kangen-karyu and *Carthami Flos* in senescence-accelerated mice. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **39**, 69 (2004).
- 43) Hanania, M. and Duarte, R. : Folk medicine/herbal remedies: Topical safflower plant extract for chronic pain: An open-label prospective study. *The Journal of Pain* **5**, S52 (2004).
- 44) Roh, J. and Han, J. : Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1976 (2004).
- 45) Jin, M., Li, J. and Wu, W. : Study on the antioxidative effect of

- safflower yellow. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **29**, 447 (2004).
- 46) Fenghua, F. and Chunfang, S. : Effect of safflower yellow a on the blood pressure in dog and man. *American Journal of Hypertension* **18**, A59 (2005).
- 47) He, C. and Jin, Z. : Enhancement of thrombolytic activities of *Carthamus tinctorius* processed with fermentation with a *Bacillus* sp. C2-13. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **30**, 340 (2005).
- 48) Zhang, Q. and Peng, J. : A clinical study of safflower yellow injection in treating coronary heart disease angina pectoris with Xin-blood stagnation syndrome. *Chin. J. Integr. Med.* **11**, 222 (2005).
- 49) Hsu, S. and Huang, C. : Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changed in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes. *J. Nutr.* **136**, 1779 (2006).