

당귀(*Angelica gigas*) 중 Decursin 및 Decursinol Angelate 추출 방법과 HPLC 분석

姜永求* · 李長勳¹ · 蔡熙政² · 金東鉉³ · 李相賢⁴ · 朴相勇⁵

호서대학교 안전시스템공학, ¹호서대학교 환경공학, ²호서대학교 자연과학부,
³단국대학교부속병원 산업의학과, ⁴서울대학교 천연물과학연구소, ⁵식품의약품안전청 생약규격과

HPLC Analysis and Extraction Methods of Decursin and Decursinol Angelate in *Angelica gigas* Roots

Young Goo Kang*, Jang Hoon Lee¹, Hee Jeong Chae², Dong Hyun Kim³,
Sanghyun Lee⁴, and Sang Yong Park⁵

Dept. of Industrial Safety Engineering, Hoseo University, ¹Dept. of Environmental Engineering, Hoseo University,

²College of Natural Science, Hoseo University, Cheonan 336-795, Korea

³Dept. of Occupational Medicine, Dankook University Hospital, Cheonan 330-715, Korea

⁴Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

⁵Dept. of Natural Medicines Evaluation, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract – This paper is intended as an investigation of the analysis of high-performance liquid chromatography and the method of extraction of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* roots. There are three kinds of extraction methods: distilled water, 50% EtOH and 100% EtOH. The condition of HPLC was obtained on a reversed-phase column (Polarity dC₁₈, 4.6×250 mm, 5 μm) using a phosphate buffer-acetonitrile-sodium lauryl sulfate as the mobile phase. Under these chromatographic conditions, UV detector was 230 nm, column temperature 30°C and the speed of a current 1.0 ml/min, respectively. The results of extraction with distilled water, 50% EtOH and 100% EtOH in *Angelica gigas* roots were as follows. The concentrations of decursin and decursinol angelate were 182 and 153 ppm (distilled water), 3,142 and 2,547 ppm (50% EtOH) and 3,341 and 2,778 ppm (100% EtOH). There were high positive correlations between the concentrations of decursin and EtOH ($r=0.8928$, $p<0.01$) and decursinol angelate and EtOH ($r=0.9009$, $p<0.01$).

Key words – *Angelica gigas*, Umbelliferae, Decursin, Decursinol angelate, HPLC

자궁기능 조절, 진정, 진통, 이뇨, 비타민 E 결핍증 치료작용, 항균작용 등의 약리 작용이 있는 당귀는 그 뿌리에 decursin과 decursinol angelate가 다량 함유되어 있다. 최근 decursin은 백혈병치료와 신장독성 경감, 당뇨병 고혈압 치료 등에 효과가 있으며, 새로운 기작의 항암제로 확인되고 있다. 이러한 decursin에 대한 연구는 지 등¹⁾의 성분연구와 일반 약리작용, 성 등²⁾의 재배지역에 따른 참당귀의 decursin 함량변이, 육 등³⁾의 당귀 *Angelicae gigantis* Radix 및 산형과 Umbelliferae 식물 중 decursin 정량에 관한 연구, 이 등⁴⁾과 류 등⁵⁾의 당귀의 마이크로웨이브 공정을 이용한 당귀 유

용성분의 추출조건 설정연구, decursin의 구조이성체 decursinol angelate의 분리 및 정량에 관한 연구들이 있었으며, 최근에는 배양⁶⁾ 및 합성⁷⁾에 대한 연구와 약리 작용에 대한 연구가 진행되고 있다.

그러나 이러한 연구에서 물성이 거의 유사한 isomer인 decursin과 decursinol angelate의 분리 추출 분석은 대단히 중요한 핵심기술임에도 불구하고 그 동안의 연구에서는 정확한 정량 분석에 대한 분석방법이 확립되지 않은 상태이다. 또한 decursin이 물에 녹지 않는 성질이 있음에도 보통의 탕약에서는 물을 사용하고 있어 이에 대한 decursin 추출 연구가 없는 상태이다.

따라서 본 논문에서는 HPLC에 의한 decursin 및 decursinol angelate의 분석 시스템, 즉 검출기(detector)의 종류와 파장,

*교신저자(E-mail) : ygkang@office.hoseo.ac.kr
(FAX) : 041-540-5728

컬럼(column)의 선택 및 이동상(mobile phase) 조성 등의 분석조건과 당귀에서 decursin 및 decursinol angelate의 추출 시 물과 알콜에서의 추출 효율을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

검체 - 당귀는 시중에서 구입하여 항량 건조하였으며, 건조한 당귀 50 g을 각각 탈이온수, 50% 에탄올, 100% 에탄올을 추출기(PK-240L, Ohsung, Korea)에 넣고 탈이온수(100°C), 50% 에탄올과 100% 에탄올(60°C)에서 5시간동안 추출하였다. 분석시료로는 각각 5번 반복 추출하여 HPLC 분석시료로 사용하였다. 추출공정에서 온도가 각각 다른 이유는 증류수 추출 온도는 일반 탕약의 추출 온도인 물의 비등 온도(100°C)이며, 에탄올 추출의 경우는 화재폭발위험성을 고려하여 에탄올 비등점(78°C)보다 낮은 온도(60°C)에서 추출하였다.

시약 - 분석용 시약은 Sodium Lauryl Sulfate(Duksan Pure Chemical Co., Korea), Sodium Phosphate(Duksan Pure Chemical Co., Korea), acetonitrile solution(EM Science, USA)을 사용하였고, 분석 실시 전에 membrane filter로 여과하여 사용하였다.

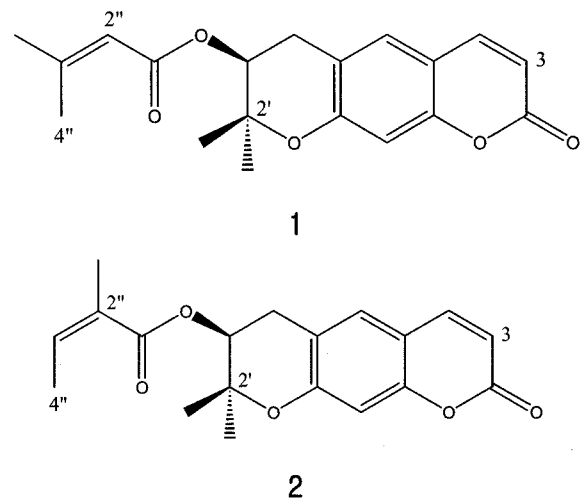
Decursin 및 decursinol angelate의 분리 - 당귀(*A. gigas*)근을 MeOH로 환류추출하고 농축하였다. 농축된 MeOH 추출물을 Et₂O과 *n*-BuOH로 각각 분획하였다. 그 중 Et₂O 분획을 *n*-hexane-EtOAc를 전개용매로 하여 표준물질 decursin과 decursinol angelate를 분리하였다.⁸⁾

Decursin (1); EI-MS *m/z* (rel. int. %): 328 [M]⁺ (4.6), 228 (33.8), 213 (100), 147 (1.8), 83 (38.3), 55 (11.5); IR (KBr) cm⁻¹: 1726 (α-pyrone ring), 1626, 1563, 1494 (aromatic C=C), 1226, 1135 (C-O); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δH (ppm): 7.58 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.15 (1H, s, H-5), 6.77 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 5.65 (1H, s, H-2''), 5.07 (1H, t, *J*=4.8 Hz, H-3'), 3.18 (1H, dd, *J*=17.1, 4.7 Hz, H-4'_a), 2.90 (1H, dd, *J*=17.1, 4.7 Hz, H-4'_b), 2.13 (3H, s, 3''-CH₃), 1.86 (3H, s, H-4''), 1.37 (3H, s, gem-CH₃), 1.35 (3H, s, gem-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δC (ppm): 165.7 (C-1''), 161.2 (C-2), 158.4 (C-3''), 156.4 (C-7), 154.1 (C-9), 143.1 (C-4), 128.6 (C-5), 115.9 (C-6), 115.5 (C-2''), 113.1 (C-3), 112.7 (C-10), 104.6 (C-8), 76.7 (C-2'), 69.0 (C-3'), 27.8 (C-4'), 27.4 (C-4''), 24.9 (gem-CH₃), 23.1 (gem-CH₃), 20.3 (3''-CH₃).

Decursinol angelate (2); EI-MS *m/z* (rel. int. %): 328 [M]⁺ (5.1), 228 (32.7), 213 (100), 147 (1.8), 83 (21.8), 55 (21.5); IR max (KBr) cm⁻¹: 1732 (α-pyrone ring), 1626,

1561, 1494 (aromatic C=C), 1229, 1134 (C-O); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δH (ppm): 7.59 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.17 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, s, H-8), 6.23 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 6.11 (1H, q, *J*=7.2 Hz, H-3''), 5.14 (1H, t, *J*=4.9 Hz, H-3'), 3.24 (1H, dd, *J*=17.0, 4.9 Hz, H-4'_a), 2.90 (1H, dd, *J*=17.0, 4.9 Hz, H-4'_b), 1.89 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-4''), 1.85 (3H, s, 2''-CH₃), 1.41 (3H, s, gem-CH₃), 1.39 (3H, s, gem-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δC (ppm): 167.0 (C-1''), 161.2 (C-2), 156.4 (C-7), 154.2 (C-9), 143.1 (C-4), 139.4 (C-3''), 128.6 (C-5), 127.3 (C-2''), 115.8 (C-6), 113.2 (C-3), 112.8 (C-10), 104.6 (C-8), 76.6 (C-2'), 70.0 (C-3'), 27.8 (C-4'), 25.0 (gem-CH₃), 23.2 (gem-CH₃), 20.5 (2''-CH₃), 15.7 (C-4'').

분석 기기 - 본 실험에서 decursin 및 decursinol angelate를 정량하기 위해 사용한 분석기기는 HPLC(Waters, U.S.A), UV/Visible Spectrophotometer(UV-1601 PC, SHIMADZU, Japan)을 사용하였다.



HPLC 분석조건 - 각 군의 시료를 원심분리와 여과로 불순물을 제거한 후 20 μl를 HPLC에 사용하였으며, 컬럼의 온도는 30°C, 컬럼은 Polarity dC₁₈(5 μm, 4.6 × 250 mm, waters), 이동상의 속도는 1.0 ml/min, 이동상의 조성은 sodium lauryl sulfate 2.88 g/l, sodium phosphate 3.9 g/l, acetonitrile solution 50%를 사용하였다.

분석방법 - 각 측정항목과 분석 자료의 통계적 검정은 SPSS와 SAS를 이용하였고, 유의성 검정을 위해 *t*-test, 분산분석(ANOVA) 및 correlation을 실시하였다.⁹⁾

표준검량선 작성 - 표준물질은 MeOH로 희석하였으며, decursin 0.385 mg/ml, decursinol angelate 0.460 mg/ml액을 기준으로 3단계로 희석한 액과 각각 1:1로 혼합한 다음에 이액 20 μl를 column에 주입하여 HPLC를 실시하고, 표준

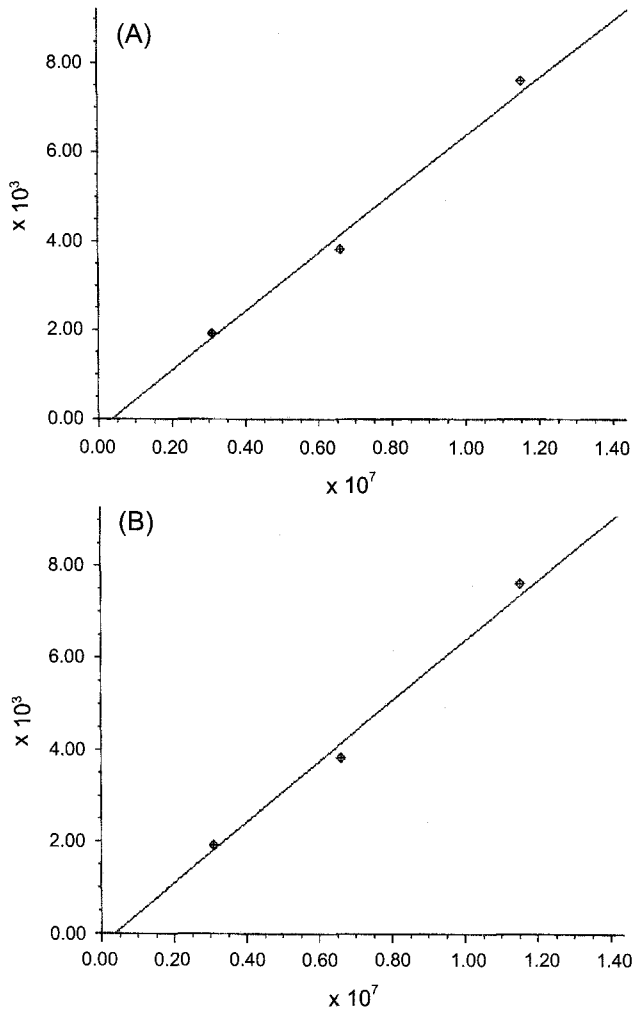


Fig. 1. Calibration curve for decursin (A) and decursinol angelate (B).

검량선을 plot한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같으며, decursin의 회귀직선 방정식은 $K_{\text{equation}}: \text{Conc} * (\text{Inj Vol}) = -2.356271\text{E}+02 + 6.693210\text{E}-04 * R$ ($r=0.9888261$), decursinol angelate의 회귀직선 방정식은 $K_{\text{equation}}: \text{Conc} * (\text{Inj Vol}) = -1.528609\text{E}+02 + 1.326676\text{E}-03 * R$ ($r=0.9902038$)로서 직선성이 인정되었다.

결과 및 고찰

Decursin과 decursinol angelate의 HPLC 분석 - 류 등⁵⁾의 선행연구에서는 $\mu\text{Bondapak } C_{18}$ column을 사용한 분석에서는 decursin과 decursinol angelate의 피크 분리가 되지 않았고, $\mu\text{Porasil}$ column을 사용한 분석에서 분리가 되었다. 그러나 본 실험에서는 $\mu\text{Bondapak } C_{18}$ column과 $\mu\text{Porasil}$ column 모두에서 선행연구와는 달리 decursin과 decursinol

Table I. Extraction of decursin (1) and decursinol angelate (2) in *A. gigas* roots with H₂O and EtOH

Groups	Concentrations (ppm)		Contents (%)	
	1	2	1	2
EtOH (100%)	3341**	2778**	3.341	2.778
EtOH (50%)	3142**	2547**	3.142	2.547
H ₂ O	182	153	0.182	0.153

**p<0.01

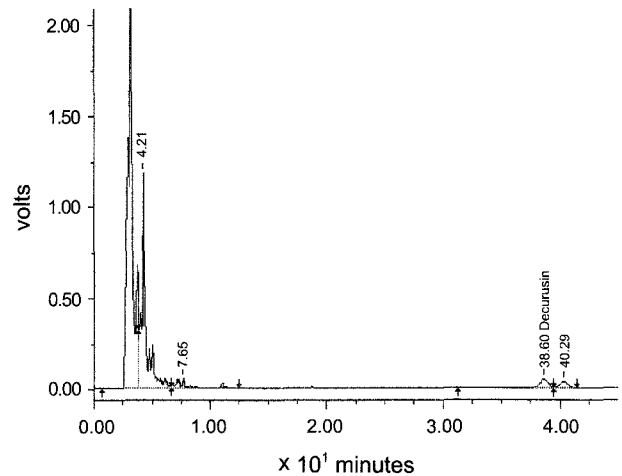


Fig. 2. HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate extracted with H₂O.

angelate의 피크 분리가 되지 않아 decursin을 정량할 수 없었다. 이와 같은 결과는 분석기기, column 및 mobile phase에 의한 변수인지 그 밖의 어떤 이유였는지는 확인할 수 없었다. 본 실험에서는 Polarity dC_{18} 을 사용하여 여러 mobile phase를 사용하여 분석한 결과 sodium lauryl sulfate, sodium phosphate 및 acetonitrile mixing mobile phase에서 가장 좋은 분리 피크를 얻을 수 있었다.

탈이온수 추출시 decursin 및 decursinol angelate 농도 - 탈이온수 추출시 decursin standard의 농도는 Table I과 Fig. 2와 같다. Decursin의 피크는 38.60분이었으며 decursinol angelate는 40.29분이었다. Decursin의 농도는 182 ppm으로 매우 작은 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 0.182%의 함량을 보였다. Decursinol angelate의 농도는 153 ppm으로 매우 작은 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 0.153%의 함량을 보였다. 따라서 물에서는 추출이 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다.

50% 에틸알콜 추출시 decursin 및 decursinol angelate 농도 - 50% 에틸알콜 추출시 decursin의 농도는 Table I과 Fig. 3과 같다. Decursin의 피크는 38.63분이었으며 decursinol angelate는 40.33분이었다. Decursin의 농도는 3,142 ppm으로 매우 큰 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 3.142%의

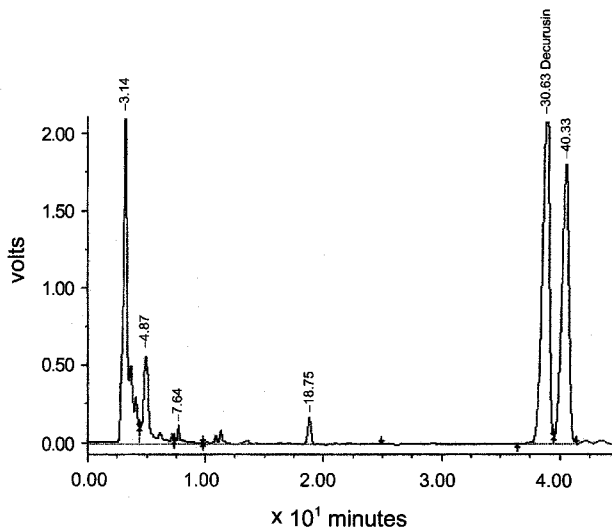


Fig. 3. HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate extracted with 50% EtOH.

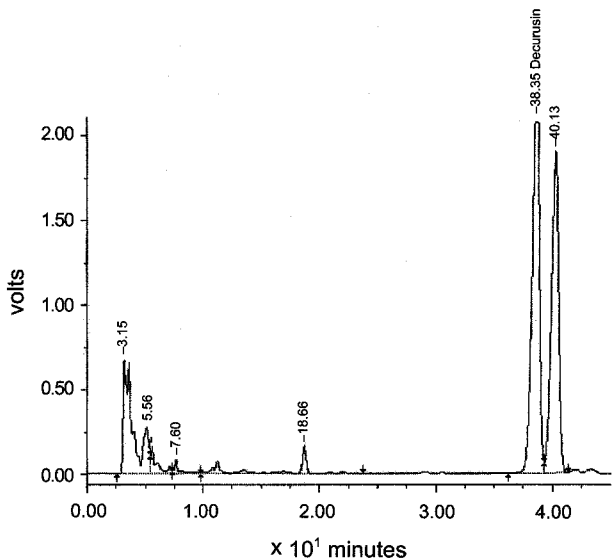


Fig. 4. HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate extracted with 100% EtOH.

함량을 보였다. Decursinol angelate의 농도는 2,547 ppm으로 매우 큰 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 2.547%의 함량을 보였다. 탈이온수 추출과 비교 할 때에는 큰 차이가 있음을 알 수 있었으며, 통계적으로도 매우 유의하였다 ($p < 0.01$). 따라서 물 보다는 물과 에틸알콜 혼합물에서 추출이 매우 잘 되는 것을 알 수 있다.

100% 에틸알콜 추출시 decursin 및 decursinol angelate 농도 - 100% 에틸알콜 추출시 decursin의 농도는 Table I과 Fig. 4와 같다. Decursin의 피크는 38.35분이었으며 decursinol angelate는 40.13분이었다. Decursin의 농도는 3,341ppm으로 매우 큰 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 3.341%의

함량을 보였다. Decursinol angelate의 농도는 2,778 ppm으로 매우 큰 피크를 보였으며, 당귀의 건조중량 대비 2.778%의 함량을 보였다. 따라서 순수 알콜 혼합물에서 추출이 가장 잘 되는 것을 알 수 있다. 탈이온수 추출과 비교 할 때에는 큰 차이가 있음을 알 수 있었으며, 통계적으로도 매우 유의하였다 ($p < 0.01$). 그러나 50% 에틸알콜 추출과 비교할 때에는 큰 차이가 없었으며 통계적으로도 유의한 차이가 없었다.

이와 같은 결과는 류 등⁵⁾의 GC법에 의한 정량치 2.36% 보다 높았으며, 성 등²⁾의 재배지역에 따른 참당귀의 decursin 함량변이에서 봉화산 4.86%, 영천산 4.75% 보다는 낮았으나 수원산 2.33%보다는 높았다. 성 등²⁾의 연구에서는 일교차, 일사량, 일조시수 등이 decursin의 함량과 정의 상관을 나타낸다고 하여, 재배지역의 이러한 특성들에 의해 당귀중 decursin의 함량에 변화가 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 보통의 당귀 중에서 보통 탕약에 제조시 사용하는 물과 유기용매인 알콜을 사용하여 추출방법에 따른 decursin의 함량 변화를 보았다.

에틸알콜농도와 decursin 및 decursinol angelate 농도 간의 상관관계 - 에틸알콜 농도 증가와 추출되는 decursin 농도와는 양의 상관관계($r=0.8928, p < 0.01$)을 나타냈으며, decursinol angelate 농도도 양의 상관관계($r=0.9009, p < 0.01$)을 나타냈다. 이는 알콜농도가 증가할수록 추출되는 decursin과 decursinol angelate의 농도가 증가함을 나타내는 것으로, 이것은 decursin과 decursinol angelate의 고유특성에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서 물을 사용한 탕약으로 당귀중 decursin 추출 함량보다는 에틸알콜과 같은 유기용매에 의한 추출 함량이 월등히 높음을 알 수 있었다. 또한 에틸알콜과 같은 유기용매에 의한 추출 방법이 decursin의 효율적인 대량 추출 공정으로 적합할 것으로 사료된다.

결론

본 논문에서는 HPLC에 의한 decursin 및 decursinol angelate 분석 시스템 즉 검출기(detector)의 종류와 파장, 컬럼(column)의 선택 및 이동상(mobile phase) 조성 등의 분석 조건과 당귀에서 decursin 및 decursinol angelate의 추출시 물과 알콜에서의 추출 효율 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

HPLC에 의한 decursin 및 decursinol angelate 분석 방법은 검출기(detector)는 UV로 230 nm 파장, 컬럼(column)의 온도는 30°C, 컬럼(column)은 Polarity dC₁₈(waters), 이동상(mobile phase)의 속도는 1.0 ml/min, 이동상(mobile phase)의 조성은 sodium lauryl sulfate 2.88 g/l, sodium phosphate 3.9 g/l, 50% acetonitrile solution를 사용한다.

100% 에틸알콜 추출시 당귀의 건조중량 대비 decursin 3.341%, decursinol angelate 2.778%이었고, 다음은 50% 에틸알콜이 decursin 3.142%, decursinol angelate 2.547%순이었으며, 각각 탈이온수 추출과 비교할 때에는 추출 함량에 큰 차이가 있었으며, 통계적으로도 매우 유의한 차이를 보였다($p<0.01$). 따라서 순수 알콜 혼합물에서 추출이 가장 잘 되는 것을 알 수 있다. 그러나 50% 에틸알콜 추출함량과 비교 할 때에는 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

따라서 대량추출시 안전공학적인 측면에서 순 에틸알콜 추출공정보다 에틸알콜농도 50%로 추출공정을 설계하는 것이 작업환경오염 및 화재폭발위험성을 대폭 줄일 수 있을 것으로 기대된다. 에틸알콜농도 증가와 추출되는 decursin 및 decursinol angelate 농도는 양의 상관관계를 보였다($r=0.8928, p<0.01$; $r=0.9009, p<0.01$). 또한 에틸알콜과 같은 유기용매에 의한 추출 방법이 decursin 및 decursinol angelate의 효율적인 대량 추출 공정으로 적합할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Chi, H.-J. and Kim, H. S. (1970) Studies on the components Umbelliferae plants in Korea pharmacological study of decursin, decursinol and nodakenin. *Kor. J. Pharmacogn.* **1**: 25-32.
2. Seong, N. S., Lee, S. W., Kim, K. S., and Lee, S. T. (1993) Environmental variation of decursin content in *Angelicae gigas*. *Korean J. Crop. Sci.* **38**(1): 60-65.
3. Yook, C. S. and Kim, T. H. (1990) Studies on the determination of decursin in *Angelicae gigantis* Radix and some *Umbelliferae* plants. *Bull. K. H. Pharm. Sci.* **18**: 133-140.
4. Lee, S. Y., Shin, S. R., Kim, K. S., and Kwon, J. H. (2000) Establishment of extraction conditions for effective components from *Angelica gigas* Nakai using microwave. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**(3): 442-447.
5. Ryu, K. S., Hong, N. D., Kim, N. J., and Kong, Y. Y. (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 64-68.
6. Kim, D. I., Kim, M.-H., Cho, J.-S., and Kim, I.-H. (2000) Production of decursin derivatives using root cultures of *Angelica gigas*. The 5th China-Korea/Korea-China Regional Biotechnology Symposium, June 29-July 1, East China University of Science and Technology (ECUST), Shanghai, China.
7. Lim, J., Kim, L. H., Kim, H. H., Ahn, K. S., and Han, H. (2001) Enantioselective syntheses of decursinol angelate and decursin. *Tetrahedron Lett.* **42**: 4001-4003.
8. Lee, S., Kang, S. S., and Shin, K. H. (2002) Coumarins and a pyrimidine from *Angelica gigas* roots. *Nat. Prod. Sci.* **8**: 58-61.
9. Ronald P. C. and Jeffrey K. S., (1991) Applied Statistics and the SAS Programming Language. Third Edition, Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, 80-202.

(2003년 4월 3일 접수)