J. Appl. Biol. Chem. **52**(4), 188-194 (2009)

Article

참당귀(*Angelica gigas*)에서 분리한 pyranocurmarin 성분의 ACAT 저해활성 및 참당귀 부위별 pyranocurmarin 성분의 함량 분석

김금숙[1]* · 박춘근[1] · 정태숙[2] · 차선우[1] · 백남인[3] · 송경식[4]

[1]농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, [2]한국생명공학연구원, [3]경희대학교 생명공학원, [4]경북대학교 농업생명과학대학

ACAT (Acyl-CoA:cholesterol Acyltransferase) Inhibitory Effect and Quantification of Pyranocurmarin in Different Parts of *Angelica gigas* Nakai

Geum-Soog Kim[1]*, Chun-Geun Park[1], Tae-Sook Jeong[2], Seon-Woo Cha[1], Nam-In Baek[3], and Kyung-Sik Song[4]

[1]*Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873, Korea*
[2]*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea*
[3]*Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Youngin 446-701, Korea*
[4]*College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

Received November 11, 2009; Accepted December 11, 2009

Two pyranocoumarin constituents have been isolated from *Angelica gigas* and were identified as decursinol angelate (1) and decursin (2) by means of NMR analysis, respectively. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (hACAT) inhibitory activity of decursinol angelate (1) and decursin (2) was evaluated. Decursin (2) showed significantly inhibitory activity against hACAT1 and hACAT2 with IC_{50} value of 137 and 168 μM, respectively, whereas decursinol angelate (1) exhibited weak ACAT inhibitory activity. These results suggested that decusin from *A. gigas* might be effective for the prevention and the treatment of hypercholesterolemia or atherosclerosis by inhibitory effect on hACAT. The contents of decursinol angelate (1) and decursin (2) were analyzed in various parts of *A. gigas* including flower, seed, leaf and root using LC/MS/MS (ESI, positive ion mode, MRM mode). The content of decursinol angelate was increased in order of flower, seed, leaf, and root and decursin content was increased in order of flower, seed, leaf, and root. It was expected that unused parts including leaf and flower of *A. gigas* might be useful as new functional sources by their high contents of decursin and decursinol angelate.

Key words: *ACAT* (*Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*), Angelica gigas, *decursin, decursinol angelate, LC/MS/MS*

서 론

참당귀(*Angelica gigas*)는 미나리과에 속하는 2~3년생 초본식물로서 국내 재배지는 주로 강원 평창, 태백, 인제, 경북 봉화 등이 유명하다. 현재 한국, 중국, 일본 3국에서 사용하는 당귀는 그 기원식물이 각각 달라 한국에서는 *Angelica gigas*(참당귀), 중국에서는 *A. sinensis*(중국당귀), 일본에서는 *A. acutiloba*(일당귀, 왜당귀)를 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다[Lee, 1994]. 중국당귀를 비롯한 당귀는 한방에서 빈혈치료와 혈액순환 장해로 인한 어혈증과 혈전증 등의 개선을 위한 처방에 주로 사용하는 것으로 알려져 있다[Song 등, 2004]. 특히 당귀는 예로부터 부인병 치료에 주로 사용되어왔기 때문에 본초학자들에 의해 "female Ginseng"이라고도 불리운다[Sarker 등, 2004]. 참당귀의 기능성 성분으로는 nodakentin, umbelliferon, β-sitosterol 등과 decursin, decursinol angelate를 비롯한 많은 pyranocoumarin계 화합물이 알려져 있다[Konoshima 등, 1968; Chi와 Kim, 1970; Kang 등, 2007]. 참당귀의 주요 효능연구로는 면역효과[Han 등, 1998], 항산화효과[Lee 등, 2003b; Kang 등, 2004]를 비롯하여 항암효과[Yim 등, 2005; Park 등, 2007a; 2007b; Song 등, 2007; Son 등, 2009], 항미생물 효과

*Corresponding author
Phone: 82-43-871-5582; Fax: 82-43-871-5589
E-mail: kimgs0725@korea.kr

doi:10.3839/jabc.2009.032

[Lee 등, 2003a], 항염증효과[Kim 등, 2006; Seo 등, 2009; Shin 등, 2009], 항당뇨효과[Kim 등, 2008] 등이 보고되었고 그 외 최근에는 파골세포 형성 저해효과[Kil 등, 2008]와 베타아밀로이드에 의한 기억력 장애에 대한 보호효과[Yan 등, 2004]를 비롯한 뇌경세포보호효과[Kang 등, 2007; Epifano 등, 2008] 등 다양한 효능들이 보고되었다.

Aacyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT)는 free cholestreol를 cholesteryl ester(CE)로 전환시키는 효소로서 ACAT1, ACAT2 두 개의 isoform으로 존재한다. ACAT1은 대식세포에서 foam cell을 형성하는데 주로 작용하고 ACAT2는 소장에서 cholesterol의 흡수를 조절하는 것으로 알려져 있다[Rudel 등, 2001]. 즉, ACAT에 의해 대식세포에 CE가 축적되어 foam cell이 형성되면 궁극적으로 동맥경화가 유발된다. 사람의 hACAT 효소에는 hACAT1, hACAT2 두 종류가 있는데, hACAT 효소의 활성을 억제하는 물질은 장내 콜레스테롤의 흡수를 억제하여 체내로 유입되는 콜레스테롤의 양을 감소시킬 수 있고 간에서 혈관내로 콜레스테롤이 방출되는 것을 억제하여 혈중 콜레스테롤 농도를 떨어뜨릴 수 있다. 또 혈관벽 세포에 콜레스테롤이 축적되는 것을 방지하여 직접적으로 동맥경화를 예방할 수 있을 것으로 기대되기 때문에 ACAT 저해제 개발은 비교적 부작용이 없는 고지혈증이나 동맥경화증 등 심혈관질환 치료제 개발의 주요한 표적으로 활용되고 있다[Lawrence와 Gregory, 2000].

최근, 참당귀는 재배면적이 점차 확대되고 다양한 기능성이 보고되면서 새로운 건강기능식품 소재로 부각되고 있다. 반면에, 참당귀의 지질대사 관련 효능에 대한 보고는 미흡한 편이다. 따라서 본 연구에서는 참당귀로부터 주요 pyranocoumarin 성분을 분리하고 고지혈증이나 동맥경화증 등 심혈관질환 치료제 개발의 주요한 표적인 ACAT 저해활성을 평가하여 새로운 건강기능성 소재로서 참당귀의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

식물시료. 대량시료 추출을 위한 참당귀(*Angelica gigas*) 뿌리는 수원의 농촌진흥청 국립식량과학원 포장에서 재배된 2년근 시료를 2006년 10월에 수확하여 상온에 건조한 후 분쇄한 것을 사용하였다. 참당귀 꽃 등 부위별 성분분석을 위한 시료는 2007년 10월에 위와 동일한 포장에서 재배된 2년근 참당귀를 수확하여 부위별로 동결건조한 후 분쇄한 것을 시료로 사용하였다.

시약 및 기기. 식물시료로부터 유효성분의 분리와 정제를 위해 silica gel column chromatography(silica gel 60, Merck, 70~230 mesh)를 실시하였다. TLC 분석에는 Silica gel 60 F254(precoated, Merck)를 사용하고 이때 detection reagent로는 10% H_2SO_4 용액을 사용하였다. 식물시료로부터 분리한 화합물들의 구조 동정을 위한 NMR 측정에는 JEOL JNM-LA400 FT-NMR spectrometer(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)가 사용되었다. 기능성 성분의 LC/MS/MS 분석에는 Agilent 1200 HPLC system(Agilent Technolgies, Santa Clara, CA)과 TurboIonSpray source를 가지고 있는 3200 QTrap mass spectrometer(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 사용하였다. hACAT1/hACAT2 저해활성 분석을 위해 10% triton WR-1339와 TNM-FH insect medium은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였고 50% Grace's insect medium은 Gibco-BRL(Grand Islands, NY)에서 구입하였으며 fetal bovine serum과 HyQSFX-Insect MP medium은 Hyclone(Lofan, UT)에서 구입하였다. DNA 제한효소는 New England Biolab(Beverly, MA)와 Invitrogen (Carlsbad, CA)으로부터 구입하였으며 형질전환 virus 생산과 insect cells(Sf9 & Hi5)를 위한 Bac-to-Bac system은 Gibco-BRL에서 구입하였다. 그 외 기타 시약들은 모두 특급을 사용하였다. 방사선량은 1450 Microbeta liquid scintillation counter (Wallacoy, Finland)로 측정하였다.

추출 및 분리. 참당귀 뿌리의 분말 시료 3 kg에 80% MeOH을 6 L를 넣고 7일 동안 상온에 방치하여 총 6회 동일 방법으로 추출하고, 여과한 후 진공 농축하였다. 총 6회에 거쳐 추출, 농축한 MeOH 농축액(MeOH ext., 729 g)은 CH_2Cl_2:H_2O(1:1, 1.4 L) 혼합용매로 총 6회 용매 분배한 후 CH_2Cl_2층을 얻었다. CH_2Cl_2 농축액 30 g을 대상으로 silica gel이 충진된 column (5×40 cm)에서 open column chromatography를 실시하였다. 용출용매로 Hexane:EtOAc(30:1→1:10) 혼합용매를 사용하여 기울기 용리로 500 mL씩 용출한 분획으로부터 최종 compound **1** (857 mg), **2**(1250 mg)를 각각 분리정제하였다.

Compound 1: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.59 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.16 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, s, H-8), 6.23 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 6.10 (1H, q, *J*=7.3 Hz, H-3"), 5.13 (1H, t, *J*=4.8 Hz, H-3'), 3.23 (1H, dd, *J*=17.8, 4.8 Hz, H-4'a), 2.90 (1H, dd, *J*=17.3, 4.9 Hz, H-4'b), 1.89 (3H, *J*=7.1 Hz, H-4"), 1.84 (3H, s, 2"-CH_3), 1.40 (3H, s, gem-CH_3), 1.39 (3H, s, gem-CH_3); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 166.99 (C-1"), 161.22 (C-2), 156.41 (C-7), 154.15 (C-9), 143.11 (C-4), 139.39 (C-3"), 128.59 (C-5), 127.26 (C-2"), 115.80 (C-6), 113.25 (C-3), 112.76 (C-10), 104.57 (C-8), 76.62 (C-2'), 69.97 (C-3'), 27.84 (C-4'), 25.04 (gem-CH_3), 23.19 (gem-CH_3) 20.48 (2"-CH_3), 15.71 (C-4").

Compound 2: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.53 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.10 (1H, s, H-5), 6.72 (1H, s, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 5.60 (1H, s, H-2"), 5.03 (1H, t, *J*=4.9 Hz, H-3'), 3.14 (1H, dd, *J*=17.0, 4.6 Hz, H-4'a), 2.81 (1H, dd, *J*=17.3, 4.9 Hz, H-4'b), 2.08 (3H, s, 3"-CH_3), 1.82 (3H, s, H-4"), 1.32 (3H, s, gem-CH_3), 1.31 (3H, s, gem-CH_3); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 165.60 (C-1"), 161.13 (C-2), 158.31 (C-3"), 156.34 (C-7), 154.03 (C-9), 143.10 (C-4), 128.61 (C-5), 115.87 (C-6), 115.41 (C-2"), 113.06 (C-3), 112.68 (C-10), 104.49 (C-8), 76.63 (C-2'), 68.90 (C-3'), 27.77 (C-4'), 27.36 (C-4"), 24.89 (gem-CH_3), 23.02 (gem-CH_3) 20.21 (3"-CH_3).

참당귀 부위별 기능성 성분의 LC/MS/MS 분석. 참당귀 부위별 분말시료 20 mg에 80% MeOH 1 mL를 넣고 ultrasonic bath에서 20분 동안 초음파 추출을 하였다. 추출액은 원심분리하여 상등액을 옮기고 잔류물에 80% MeOH 1 mL를 넣고 다

시 동일 과정으로 추출, 원심분리하였다. 2차에 거쳐 추출한 상등액은 합쳐서 최종 2 mL로 부피를 맞추어 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 LC/MS/MS 분석용 시료로 사용하였다. 참당귀 부위별 시료의 성분 정량은 LC/MS/MS로 실시하였는데, LC 컬럼은 Zorbax eclipse XDB-C18(4.6×150 mm, 5 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 사용하고, LC 이동상 조건은 water(A), 90% ACN(0.1% formic acid, 2 mM acetic acid)(B)를 혼합하여 기울기 용리로 용출하였는데(0-30분: 50% B→70% B, 30-31분: 100% B, 31-37분: 50% B), 이때 이동상의 유속 및 컬럼의 온도는 각각 0.8 mL/min, 20°C로 하였다. MS spectrometer의 Electrospray ionization(ESI)은 positive ion mode로 하여 collision gas를 질소로 사용하였고, spray voltage와 source 온도는 각각 3,000 V, 750°C로 하였다. 또한 declustering potential(DP), collision cell entrance potential (CEP), collision cell exit potential(CXP) 조건은 각각 51, 14, 4 eV였으며, collision activated dissociation(CAD) gas는 medium, curtain gas는 35 psi였다. Collision energy(CE)는 decursin, decursinol angelate 각각 7.5, 6 eV, entrance potential (EP)는 decursin, decursinol angelate 각각 39, 91 eV로 하였다. 성분의 정량분석은 multiple reaction monitoring(MRM) mode로 unit resolution에서 실시하였다. MRM 분석을 위한 deurcinol angelate와 decursin에 해당하는 ion pair(protonated molecular ion/product ion)은 각각 *m/z* 329.2/115.1, *m/z* 329.2/83.0으로 하였다. 장비의 작동과 데이터 수행에는 Applied Biosystems Analyst version 1.4.2 software를 사용하였다.

한편, 참당귀 꽃 추출물의 HPLC-UV 분석에서 컬럼은 Zorbax SB-C18(4.6 250 mm, 5 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 사용하였고, LC 이동상 조건은 acetonitrile (A), water(B)를 혼합하여 기울기 용리로 용출하였으며(0-20분: 60% A→100% A, 20-29분: 100% A, 29-35분: 60% A), UV 검출기 파장, 이동상의 유속 및 컬럼의 온도는 각각 280 nm, 0.8 mL/min, 35°C로 하였다.

hACAT1/hACAT2 저해활성 측정. ACAT 저해 활성 측정은 Brecher과 Chan의 방법[Brecher 등, 1980; Lee 등, 2001]과 이를 약간 변형한 Cho 등[2003]의 방법으로 하였다. 즉, 아세톤에 1 mg/mL의 농도로 용해된 콜레스테롤 용액 6.67 μL를 아세톤 중의 10% triton WR-1339 6 μL와 혼합하고, 질소가스를 이용하여 아세톤을 증발시켜 제거하였다. 얻어진 혼합물에 증류수를 가하여 콜레스테롤의 농도가 30 mg/mL가 되도록 조절하면서 콜레스테롤 수용액을 제조하였다. 10 μL의 콜레스테롤 수용액에 10 μL의 0.5 M KH_2PO_4 buffer(0.5 M KH_2PO_4, 10 mM dithiothreitol pH 7.4), 5 μL의 0.6 mM bovine serum albumin(BSA, essentially fattyl acid free), hACAT1과 hACAT2가 각각 과량 발현된 Hi5 세포들로부터 분리한 microsomal fraction 10 μL, 활성검정용 시료액 10 μL 및 45 μL의 증류수를 가하여 총 90 μL인 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 37°C 수욕에서 30분 동안 예비 반응시켰다. 10 μL의 [1-^{14}C] oleoyl-CoA 용액(0.05 μCi, 최종 농도: 10 μM)을 예비 반응된 혼합물에 가하고, 생성된 혼합물을 37°C 수욕에서 다시 30분 동안 반응시켰다. 혼합물에 500 μL의 isopropanol:heptane 혼합물(4:1, v/v), 300 μL의 heptane 및 200 μL의 0.1 M KH_2PO_4(pH 7.4)을 가하고, 혼합물을 vortex로 격렬하게 혼합한 후, 상온에서 2분 동안 방치하였다. 200 μL의 생성된 상층액을 scintillation vial에 넣고, scintillation 용액(Lumac Co., Ballston Spa, NY) 4 mL를 첨가하였다. 이 혼합물의 방사선량을 1450 Microbeta liquid scintillation counter(Wallac Oy, Finland)로 측정하였다. 양성 대조군으로는 oleic acid anilide를 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 저해율을 계산하였다.

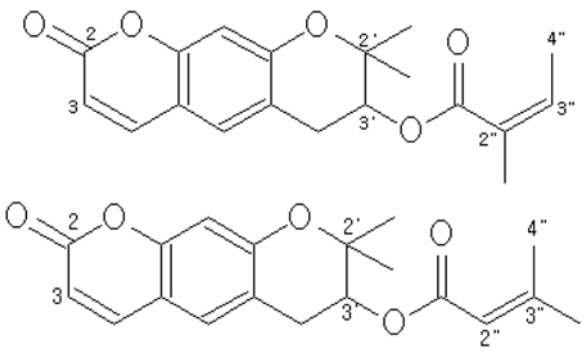

Fig. 1. The structures of compound 1 and 2.

$$\text{ACAT inhibition(\%)} = [1 - \text{CPM(T)} - \text{CPM(C2)}/\text{CPM(C1)} - \text{CPM(B)}] \times 100$$

CPM(T): 시료와 효소를 넣었을 때의 CPM 값
CPM(C1): 시료를 넣지 않고, 효소는 넣었을 때의 CPM 값
CPM(C2): 시료는 넣고, 효소는 넣지 않았을 때의 CPM 값
CPM(B): 효소와 시료를 넣지 않았을 때의 CPM 값
*CPM: Count per minute

결과 및 고찰

참당귀 뿌리의 MeOH 추출액을 용매분배하여 얻은 CH_2Cl_2 분획으로부터 분리정제한 compound **1**, **2**는 구조확인을 위해 ^{1}H, ^{13}C-NMR를 측정하였다. Compound **1**, **2**의 NMR spectra data를 면밀히 분석하고, 기보고된 여러 연구논문[Ryu 등, 1990; Lee 등, 2003b; Park 등, 2007b]의 NMR data와 비교한 결과, 각각 참당귀의 주요 pyranocoumarin 성분인 decursinol angelate(**1**), decursin(**2**)인 것으로 동정되었다(Fig. 1).

참당귀 뿌리에서 분리한 decursinol angelate(**1**), decursin(**2**) 화합물에 대하여 지질대사 관련 기능성을 검토하기 위해 hACAT 저해활성을 평가하였다. 시료의 농도를 100 μg/mL로 하여 hACAT1, hACAT2에 대한 저해도를 측정한 결과, decursinol angelate(**1**)는 각각 39, 54%의 비교적 낮은 저해도를 나타내는 반면, decursin(**2**)은 각각 68, 75%의 우수한 저해도를 나타내었다. 두 화합물이 isoform인 것을 고려하면 활성과 구조상관성에 대한 검토가 향후에 필요할 것으로 사료되었다. 활성이 높은 decursin에 대해서는 다양한 농도구간에서 저해도를 측정하여 IC_{50}을 구해본 결과(Table 2), hACAT1과 hACAT2에 대하여 IC_{50} 값이 각각 137, 168 μM을 나타내었다. 즉, hACAT1과 hACAT2에 대한 선택적 저해활성은 보이지 않았으

Table 1. ACAT inhibitory activities of compounds from *Angelica gigas*

Compounds	hACAT1 inhibition (%)	hACAT2 inhibition (%)
Decursinol angelate†	39	54
Decursin	68	75
Oleic acid anilide‡	57	65

†Treatment concentration: 100 μg/mL.
‡Positive control: 300 nM.

Table 2. IC_{50} (μM) for ACAT inhibition of compounds from *A. gigas*

Compounds	hACAT1 inhibition	hACAT2 inhibition
Decursin	137	168

며 양성 대조군으로 사용된 oleic acid anilide가 300 nM 처리 농도에서 hACAT1, hACAT2에 대한 저해도가 각각 57, 65%인 것과 비교하면(Table 1), decursin의 hACAT 저해활성이 아주 강력하지는 않았다. 그러나 쑥갓에서 분리한 hACAT 저해성분으로 보고된 5,5'-dibuthoxy-2,2'-bifuran의 hACAT1, hACAT2 저해활성이 각각 IC_{50} 값으로 160, 190 μM인 것과 비교하면 약간 높은 경향이었다[Song 등 2008]. 또 decursin의 hACAT1과 hACAT2에 대한 저해활성은 처음으로 보고되는 것으로서 그 동안 참당귀의 지질대사 관련 활성에 대한 보고가 미흡하였던 것을 고려할 때, 향후 참당귀에 대하여 지질대사 관련 표적을 이용한 다각도의 활성 검토는 의미가 있을 것으로 평가되었다. 한편, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 원인물질인 베타아밀로이드(Aβ)에 의한 인지능 손상에 대하여 참당귀 decursinol

Table 3. Calibration plots and sensitivity for the determination of two Pyranocurmarins using LC/MS/MS

Compounds	Calibration plot†	Correlation coefficient
Decusin	$y=6.18e10^5x+5.73e10^4$	0.9987
Decursinol angelate	$y=2.95e10^5x+2.71e10^4$	0.9988

†y=peak area, x=concentration (μg/mL).

성분이 보호효과를 가지는 것이 보고된 바 있고[Yan 등, 2004], 또한 hACAT 작용에 의해 생성되는 cholesteryl ester 농도수준이 직접적으로 Aβ의 생성과 연관이 있음이 밝혀짐으로해서 최근 동맥경화 치료를 위한 ACAT 저해제가 강력한 Aβ 생성 조절제로서 AD의 치료에 사용될 수 있음이 보고되었다[Puglielli 등, 2001, 2003; Runz 등, 2002; Hua 등, 2003; Hutter-Paier 등, 2004]. 또 $A\beta:Cu^{2+}$ complex는 cholesterol를 산화시켜 4-cholesten-3-one을 생성하게 되는데 이것은 cholesterol oxidase의 기능과 유사한 것이다. 뇌에 Aβ가 축적되면서 4-cholesten-3-one의 농도도 함께 높아지므로 이러한 Cu^{2+} 매개형 cholesterol 산화가 고혈압과 AD에 일반적인 병리적 기전이 될 수 있음이 보고되었다[Pappolla 등, 2002]. 특히 AD를 유발하는 형질전환 모델 쥐에서 cholesterol 식이가 대뇌 Aβ 침착을 증가시키고 [Refolo 등, 2000; Li 등, 2003], AD에서 amyloid plaque에 $A\beta:Cu^{2+}$ complex가 풍부한 것으로 보고되었다[Dong 등, 2003; Lovell 등, 1998]. 이러한 사실로부터 decursin의 우수한 ACAT 저해활성이 참당귀 추출물의 Aβ 저해활성[Yan 등, 2004]과 상당히 연관성이 있을 수 있음을 추정할 수 있었다.

한편, 참당귀는 뿌리를 약재로 사용하고 있고 주로 decursin, decrusinol angelate 성분연구도 주로 뿌리에서만 보고되어 있어,

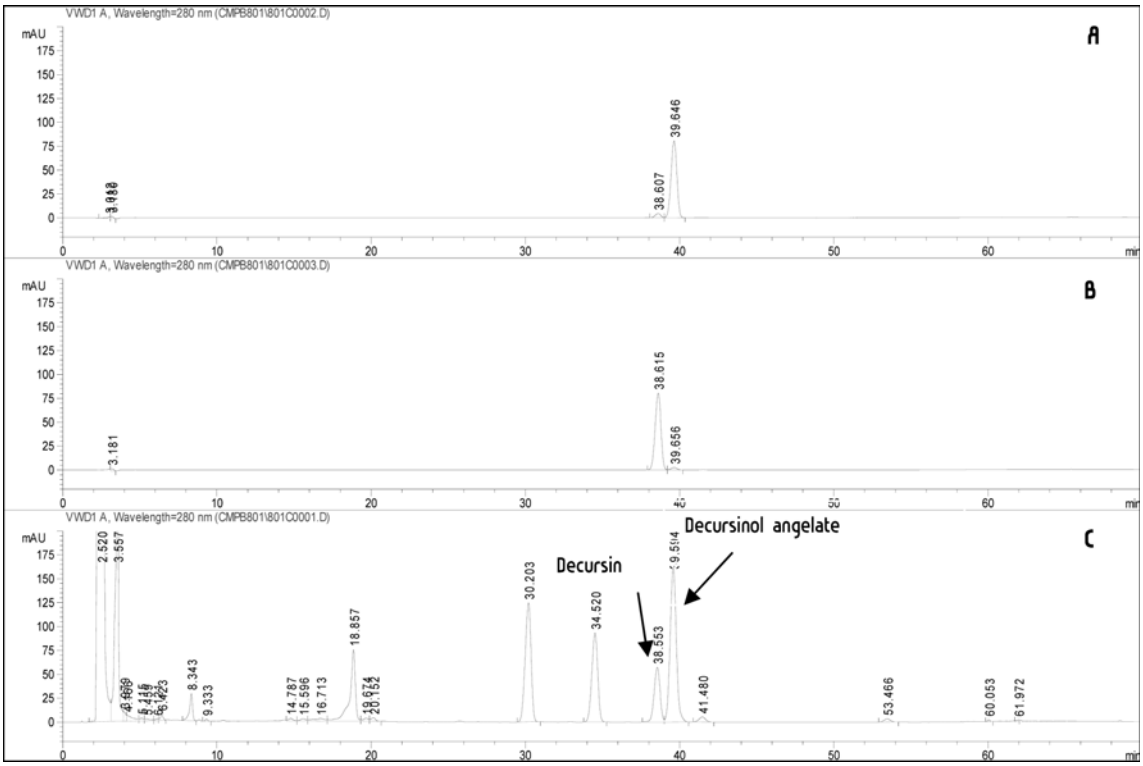

Fig. 2. HPLC profiles of decursinol angelate (A) and decursin (B) standards, and 80% MeOH extract of flower (C) from *A. gigas*.

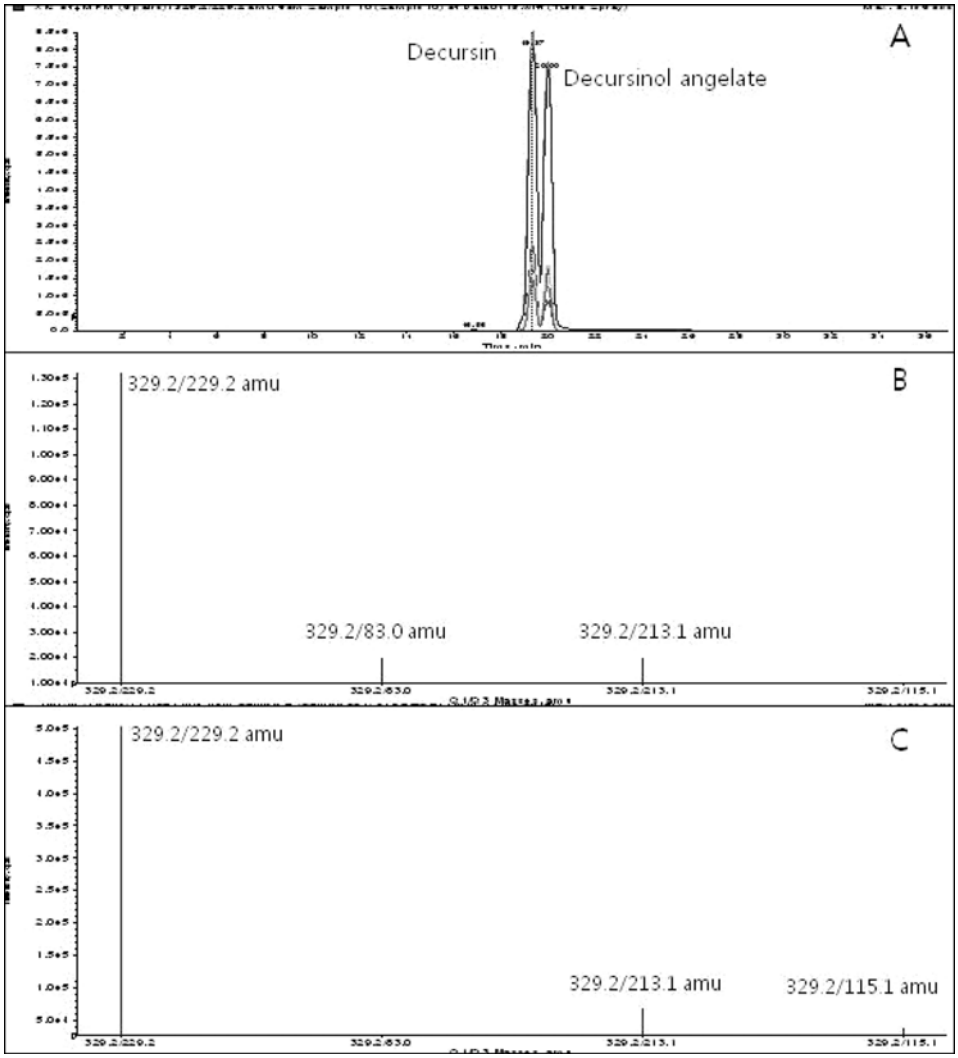

Fig. 3. Chromatogram of the mother/daughter ion pairs (Q1/Q3 masses) for decursin (B) and decursinol angelate (C) from *A. gigas* extract using LC/MS/MS method, flow rate 0.8 mL/min, positive ESI mode, MRM.

다른 부위의 성분에 대한 연구보고는 미흡한 실정이다. 따라서 참당귀 부위별 주요 pyranocoumarin계 성분의 함량을 정량분석함으로써 이용하지 않고 버려지는 참당귀 부산물의 이용도 증진을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다. 먼저, 참당귀 꽃을 시료로 하여 분리한 decrusinol angelate(**1**), decursin(**2**)을 표준품으로 사용하고 HPLC-UV법으로 정성분석을 하였을 때(Fig. 2), HPLC 역상 컬럼에서 두 성분을 분리하여 검출할 수 있을 것으로 추정되었다. 그러나 보다 정확하게 참당귀 각 부위 추출물에서 두 성분을 확인하고 정량하기 위하여 LC/MS/MS 분석을 실시하였다. 참당귀의 꽃, 종자, 잎, 뿌리는 80% MeOH로 추출한 후 decrusinol angelate(**1**), decursin(**2**)의 함량을 LC/MS/MS의 positive ion mode, MRM mode를 사용하여 측정하였다. 그 결과, LC/MS/MS의 MRM mode에서 참당귀의 꽃을 비롯한 모든 부위에서 decrusinol angelate(**1**), decursin(**2**) 성분이 모두 존재하고 있음은 두 성분의 protonated molecular ion/product ion 이온쌍으로 확인할 수 있었다. 즉, MRM mode 에서 두 성분 모두 공통적으로 *m/z* 329.2/229.2, 329.2/213.1 (protonated molecular ion/product ion) 이온쌍을 가지고 있었으며 각 성분의 특이 이온쌍으로는 decrusinol angelate(**1**)가 *m/z* 329.2/115.1 이온쌍, decusin(**2**)이 *m/z* 329.2/83.0 이온쌍을 가지고 있음을 확인하였으며(Fig. 3) 이 각각의 이온쌍을 이용하여 함량을 정량하였다(Fig. 4).

Decursinol angelate의 함량은 뿌리>잎>종자>꽃 순으로 높았으며, decusin 함량은 뿌리>종자>꽃>잎 순으로 높았다(Fig. 5). 뿌리에서는 decusin, decursinol angelate 두 성분이 각각 0.839, 0.924%로 유사한 반면에 특히 잎에서는 각각 0.204, 0.839%로서 decursinol angelate 함량이 decursin 함량보다 약 4배 정도 높은 것이 특징이었다. 참당귀 종자에서는 decusin, decursinol angelate 성분이 각각 0.338, 0.645% 함유되어 있었고, 참당귀 꽃에서도 decusin, decursinol angelate 두 성분이 각각 0.262, 0.562% 함유되어 있었다. 특히, 참당귀 꽃은 꽃대가 크고 추출물은 적색소를 함유하고 있을 뿐 아니라 본 연구결과와 같이 참당귀 고유의 pyranocoumarin 성분도 다량 함유하고 있어서 향후 천연 기능성 소재로서 개발 가치가 높을 것으로 기대되었다. 향후, 참당귀 뿌리 뿐 아니라 꽃 또는 잎을 기능성 소재로 개발하기 위해서는 개화기 이후 생육시기별로 참당귀 부위에

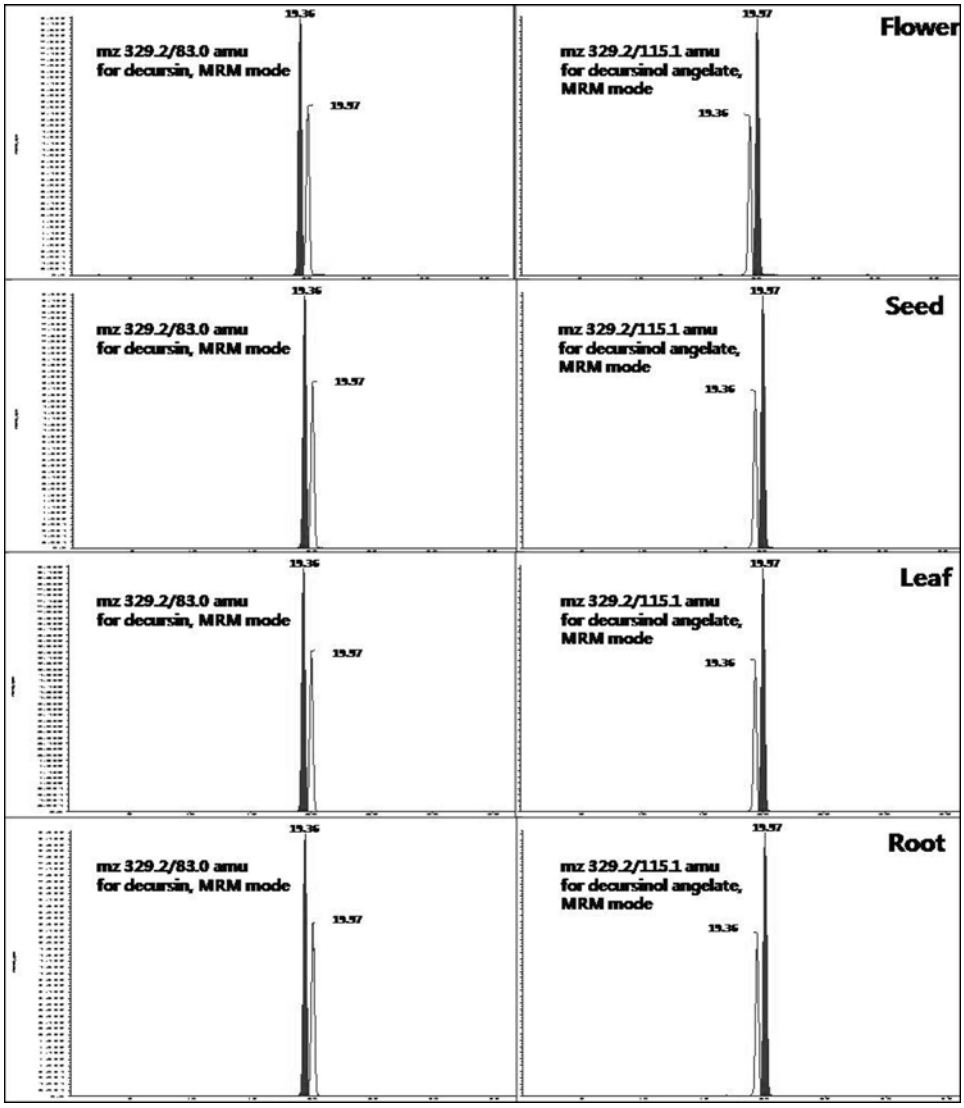

Fig. 4. Representative Chromatogram of decursin and decursinol angelate in different darts of *A. gigas* using LC/MS/MS method, flow rate 0.8 mL/min, positive ESI mode, MRM.

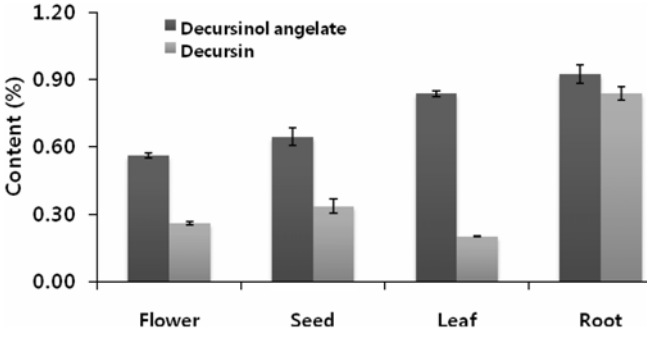

Fig. 5. The contents of decursinol angelate and decursin in 80% MeOH extracts from different parts of *A. gigas*.

따른 pyranocoumarin 성분변이를 면밀히 검토해 볼 필요성이 있다.

결론적으로, 참당귀에서 분리한 decursin 성분은 ACAT 저해활성이 높아 고지혈증, 동맥경화와 같은 심혈관 질환을 개선할 수 있는 기능성 소재로의 개발 가능성을 보여주었으며, 또한 참당귀 잎과 꽃 등과 같은 비상용 부위에서도 decursin과 decursinol angelate 성분이 일정량 함유되어 있어 버려지는 참당귀 비상용 부위를 이용한 새로운 기능성 소재 개발이 가능할 것으로 기대되었다.

초 록

참당귀 뿌리로부터 2종의 pyranocoumarin 성분을 분리하고 그들의 구조는 NMR 분석에 의해 각각 decursinol angelate(**1**), decursin(**2**)로 결정하였다. 이들 화합물에 대하여 hACAT 저해활성을 검정해본 결과, decursinol angelate(**1**)가 약한 저해활성을 나타낸 반면 decursin(**2**)은 hACAT1와 hACAT2에 대하여 IC_{50} 값이 각각 137, 168 μM로서 우수한 저해활성을 나타내었다. 한편, 참당귀의 뿌리를 비롯한 꽃, 종자, 잎 등 여러부위에서 decursinol angelate(**1**), decursin(**2**)를 정량분석하였는데, 이때 LC/MS/MS(ESI, positive ion mode, MRM mode) 분석을 이

용하였다. Decursinol angelate의 함량은 뿌리>잎>종자>꽃 순으로 높았으며, decursin의 함량은 뿌리>종자>꽃>잎 순으로 높게 측정되었다. 이상의 결과들은, 참당귀의 decursin이 동맥경화와 같은 심혈관 질환의 개선과 치료를 위해 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다. 또한 뿌리 이외에 그 동안 이용되지 않고 있던 참당귀 꽃, 잎과 같은 비상용부위에도 기능성물질인 decursin, decursinol angelate이 상당량 함유되어 있음이 구명되어 이러한 부위도 새로운 천연 기능성 소재로서 활용될 수 있음을 기대할 수 있었다.

Key words: *ACAT (Acyl-CoA:cholesterol Acyltransferase)*, Angelica gigas, *decursin, decursinol angelate, LC/MS/MS*

참고문헌

Brecher P and Chan CT (1980) Properties of Acyl-coA:cholesterol O-acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbits. *BBA-Lipid Lipid Met* **617**, 458-471.

Chi HJ and Kim HS (1970) Studies on the components of Umbelliferae plants in Korea: pharmacological study of decursin, decursinol and nodakenin. *Kor J Pharmacogn* **1**, 25-32.

Cho KH, An S, Lee WS, Paik YK, Kim YK, and Jeong TS (2003) Mass-production of human ACAT-1 and ACAT-2 to screen isoform-specific inhibitor: a different substrate specificity and inhibitory regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 864-872.

Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, Perry G, and Carey PR (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-â within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* **42**, 2768-2773.

Epifano F, Molinaro G, Genovese S, Ngomba RT, Nicoletti F, and Curini M (2008) Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables. *Neurosci Lett* **443**, 57-60.

Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, and Kim HM (1998) Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology* **40**, 39-48.

Hua DH, Huang XD, Tamura M, Chen Y, Woltkamp M, Jin LW, Perchellet EM, Perchellet JP, Chiang PK, Namatame I, and Tomoda H (2003) Syntheses and bioactivities of tricyclic pyrones. *Tetrahedron* **59**, 4795-4803.

Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, Eckman CB, Kim DY, Hofmeister A, Moir RD, Domnitz SB, Frosch MP, Windisch M, and Kovacs DM (2004) The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **44**, 227-238.

Kang SA, Han JA, Jang KH, and Choue RW (2004) DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angilica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* **33**, 1112-1118.

Kang SY and Kim YC (2007) Neuroprotective coumarins from the root of *Angelica gigas:* Structure-activity relationships. *Arch Pharm Res* **30**, 1368-1373.

Kil JS, Kim MG, Choi HM, Lim JP, Boo YM, Kim EH, Kim JB, Kim HK, and Leem KH (2008) Inhibitory effects of Angelicae Gigantis Radix on osteoclast formation. *Phytother Res* **22**, 472-476.

Kim HM, Kang JS, Park SK, Lee K, Kim JY, Kim YJ, Hong JT, Kim Y, and Han SB (2008) Antidiabetic activity of angelan Isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Arch Pharm Res* **31**, 1489-1496.

Kim JH, Jeong JH, Jeon ST, Kim H, Ock J, Suk K, Kim SI, Song KS, and Lee WH (2006) Decursin inhibits induction of inflammatory mediators by blocking nuclear factor-kappa B activation in macrophages. *Mol Pharmacol* **69**, 1783-1790.

Konoshima M, Chi HJ, and Hata K (1968) Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chem Pharm Bull* **16**, 1139-1140.

Lawrence LR and Gregory SS (2000) Cholesterol esters and atherosclerosisa game of ACAT and mouse. *Nat Med* **6**, 1341-1347.

Lee CH, Jeong TS, Choi YK, Hyun BW, Oh GT, Kim EH, Kim JR, Han JI, and Bok SH (2001) Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 681-688.

Lee S, Shin DS, Kim JS, Oh KB, and Kang SS (2003a) Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch Pharm Res* **26**, 449-452

Lee SH, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, and Kang SS (2003b) Antioxidant Activities of Decursinol Angelate and Decursin from *Angelica gigas* Roots, *Nat Prod Sci* **9**, 170-173.

Lee SL (1994) In *Phytology*, pp.578-580. Young Lim Pubishing Co., Seoul, Korea.

Li L, Cao D, Garber DW, Kim H, and Fukuchi KI (2003) Association of Aortic Atherosclerosis with Cerebral -Amyloidosis and Learning Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* **163**, 2155-2164.

Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, and Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* **158**, 47-52.

Pappolla MA, Smith MA, Bryant-Thomas T, Bazan N, Petanceska S, Perry G, Thal LJ, Sano M, and Refolo LM (2002) Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis. *Free Radic Biol Med* **33**, 173-181.

Park KW, Choi SR, Hong HR, Kim JY, Shon MY, and Seo KI (2007a) Biological activities of methanol extract of *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Food Preserv* **14**, 655-661.

Park KW, Choi SR, Shon MY, Jeong IY, Kang KS, Lee ST, Shim KH, and Seo KI (2007b) Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**, 1385-139.

Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LAM, Berezovska O, Hyman BT, Chang TY, Tanzi RE, and Kovacs DM (2001) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid -peptide. *Nat Cell Biol* **3**, 905-912.

Puglielli L, Tanzi RE, and Kovacs DM (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* **6**, 345-351.

Refolo LM, Pappolla MA, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, and Duff K

(2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* **7**, 321-331.

Rudel LL, Lee RG, and Cockman TL (2001) Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **12**, 121-127.

Runz H, Rietdorf J, Tomic I, de Bernard M, Beyreuther K, Pepperkok R, and Hartmann T (2002) Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci* **22**, 1679-1689.

Ryu KS, Hong ND, Kim NJ, and Kong YY (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.

Sarker SD and Nahar L (2004) Natural medicine: the genus Angelica. *Curr Med Chem* **11**, 1479-1500.

Seo YJ, Kwon MS, Park SH, Sim YB, Choi SM, Huh GH, Lee JK, and Suh HW (2009) The analgesic effect of decursinol. *Arch Pharm Res* **32**, 937-943.

Shin S, Jeon JH, Park D, Jang JY, Joo SS, Hwang BY, Choe SY, and Kim YB (2009) Anti-Inflammatory effects of an ethanol extract of *Angelica gigas* in a carrageenan-airp pouch inflammation model. *Exp Anim* **58**, 431-436.

Son SH, Kim MJ, Chung WY, Son JA, Kim YS, Kim YC, Kang SS, Lee SK, and Park KK (2009) Decursin and decursinol inhibit VEGF-induced angiogenesis by blocking the activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Cancer Lett* **280**, 86-92.

Song GY, Lee JH, Cho M, Park BS, Kim DE, and Oh S (2007) Decursin suppresses human androgen-independent PC3 prostate cancer cell proliferation by promoting the degradation of beta-catenin. *Mol Pharmacol* **72**, 1599-1606.

Song MC, Yang HJ, Jeong TS, Kim KT, and Baek NI (2008) Heterocyclic compounds from *Chrysanthemum coronarium* L. and their inhibitory activity on hACAT-1, hACAT-2, and LDL-oxidation. *Arch Pharm Res* **31**, 573-578.

Song SH, Seo BI, Kim HK, and Park JH (2004) The effects of angelicae gigantis radix extract on hydrocortisone acetate induced model of blood stasis. *Kor J Herbol* **19**, 13-21.

Yan JJ, Kim DH, Moon YS, Jung JS, Ahn EM, Baek NI, and Song DK (2004) Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* **28**, 25-30.

Yim D, Singh RP, Agarwal C, Lee S, Chi H, and Agarwal R (2005) A novel anticancer agent, decursin, induces G(1) arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* **65**, 1035-1044.