

참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 중 Decursin 및 Decursinol Angelate의 분리 및 정제

- 연구노트 -

김강민¹ · 정재연¹ · 황성우¹ · 김묘정¹ · 강재선^{2*}

¹인제대학교 식의약생명공학과
²경성대학교 약학과

Isolation and Purification of Decursin and Decursinol Angelate in *Angelica gigas* Nakai

Kang Min Kim¹, Jae Yeon Jung¹, Sung Woo Hwang¹, Myo Jeong Kim¹, and Jae Seon Kang^{2*}

¹Dept. of Smart Foods and Drugs, Inje University, Gyeongnam 621-749, Korea

²Dept. of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract

This paper is intended as an investigation of the method of extraction and the analysis by high-performance liquid chromatography mass spectroscopy of decursin and decursinol angelate in the dried root of *Angelica gigas* Nakai. The extracted decursin and decursinol angelate were the purity of >95% using 60% ethanol at -20°C for 12 hours by HPLC analysis. Decursin and decursinol angelate were efficiently isolated using recycling HPLC. The purity of isolated decursin and decursinol angelate was identified as 99.97 and 99.40% by HPLC analysis, respectively. The molecular weights of Decursin and decursinol angelate were also identified as m/z=329 ([M+H]⁺) and m/z=351 ([M+Na]⁺) by mass spectroscopy.

Key words: decursin, decursinol angelate, *Angelica gigas* Nakai, recycling HPLC

서 론

당귀는 한국, 중국 그리고 일본에서 생산되는 대표적인 한방약재 중의 하나이다. 또한 미국이나 유럽에서는 기능성 식품으로 쓰이고 있다. 한국산 당귀는 참당귀, 즉 *Angelica gigas* Nakai이라 하며 중국이나 일본의 당귀와는 달리 꽃은 깊은 자줏빛의 색깔을 가지는 것이 특징이다(1). 참당귀는 다양한 약리학적 효과가 있는 것이 알려져 있는데 대표적으로는 빈혈치료, 진정작용, 진통효과, 강장제, 월경통치료, 폐경기증후치료, 복통치료, 상처치료, 편두통치료, 관절염치료, 당뇨병 고혈압치료의 작용이 있다는 것이 밝혀졌다(2-8). 참당귀의 뿌리, 줄기에는 쿠마린 계열의 다양한 물질이 존재한다는 것이 알려져 있고 대표적인 물질로는 dihydropyranocoumarin 계열의 decursin과 decursinol angelate가 다량 함유되어 있다는 것이 1967년에 처음으로 밝혀졌다(9). 또한 dihydropyranocoumarin 계열의 물질이 최근에는 항암효과가 있다는 것도 보고가 있다(10,11).

참당귀에서 분리된 decursin 및 decursinol angelate (C₁₉H₂₀O₅; molecular weight 328)는 이차 알콜기가 각각

3,3-dimethyl acryloyl 그룹과 angeloyl 그룹이 에스터화되어 있으며, 이는 구조이성질체로서 물성이 거의 유사하여 HPLC 조작으로도 분리하기가 매우 어려운 것으로 알려져 있다(12,13). 그러나 decursin 및 decursinol angelate의 합성에 관한 방법은 알려져 있지만 복잡한 공정방법과 수율이 낮아 확보하는 것에 어려움이 있다(14).

또한 여러 연구에서 물성이 거의 유사한 decursin과 decursinol angelate의 분리, 추출, 분석은 대단히 중요한 핵심 기술임에도 불구하고 정확한 정량 분석에 대한 분석방법이 확립되지 않은 상태이다. 따라서 본 논문에서는 추출된 decursin 및 decursinol angelate를 recycling HPLC에 의해 각각을 분리한 다음 HPLC/Mass를 통해 분리된 decursin 및 decursinol angelate를 확인하고 각각을 표준화 하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 연구에서 사용된 분석시약 및 HPLC급 시약들은 Sigma(USA)사 제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 당귀

*Corresponding author. E-mail: jskang8551002@ks.ac.kr
Phone: 82-51-663-4802, Fax: 82-51-663-4809

(*Angelica gigas* Nakai)는 2008년 경상남도 함양군에서 수확한 것을 구입하여 분쇄 후 실험에 사용하였다.

당귀로부터의 decursin 및 decursinol angelate의 추출

분쇄한 당귀(10 kg)은 95% ethanol 30 L와 혼합하여 12시간 동안 2회 반복한 후 여과하여 추출물을 얻었다. 이 추출물(1 kg)에 95% ethanol 1 L와 다시 혼합하여 -20°C에 10시간 동안 방치하고 5,000 rpm, 10분 동안 원심분리 후 상등액을 얻어 농축하였다. 다음, 농축물에 60% ethanol 50 L을 혼합하여 용출하여 최종 decursin 및 decursinol angelate의 330 g을 얻었다.

Decursin 및 decursinol angelate의 분리

추출한 decursin 및 decursinol angelate는 recycling HPLC(JAI, Japan)에 의해 각각 분리되었다. 칼럼은 JAIGEL ODS-AP(20φ×500 mm), 온도는 30°C, 이동상의 속도는 5 mL/min, UV 파장은 329 nm, 이동상의 조성은 70% acetonitrile에 0.01% formic acid를 첨가하여 만든 용액을 사용하였다.

분리한 decursin 및 decursinol angelate의 분석

Recycling HPLC에 의해 분리한 decursin 및 decursinol angelate의 분석조건은 Agilent Technologies(1100 series, USA), 칼럼은 Agilent Zorbax SB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm), UV 파장은 329 nm, 이동상의 속도는 1 mL/min, 온도는 30°C, 이동상의 조성은 100% ethanol 및 distilled water에 0.1% formic acid를 7:3으로 하였다. 분자량은 Agilent Technologies G2708DA electrospray mass spectrometer를 이용하여 Atmospheric pressure ionization 방법으로 분리된 decursin 및 decursinol angelate를 확인하였다.

표준검량선 작성

Recycling HPLC에 의해 분리한 decursin 및 decursinol angelate는 MeOH로 희석하였으며, decursin 및 decursinol angelate 0.05 mg/mL 액을 기준으로 3단계로 희석한 액과 각각 1:1로 혼합한 다음에 10 μL를 column에 주입하여 HPLC를 실시하고, 표준검량선을 plot한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같으며, decursin의 방정식은 $\text{Area} = 37018.798x + 6.25(x = \text{mg/mL})$, decursinol angelate의 방정식은 $\text{Area} = 34834.647x + 10.72(x = \text{mg/mL})$ 로 나타났다.

결과 및 고찰

추출한 decursin 및 decursinol angelate의 분석

60% ethanol에 의해 혼합한 추출물을 -20°C에 방치하였을 경우 분자의 특성차이에 의해 실온 적용 시보다 saccharide나 oil 같은 종류의 불순물들의 석출이 눈에 띄게 증가하였음을 알 수 있었다. 그리고 최종적으로 60% ethanol에 의해 추출한 decursin 및 decursinol angelate를 확인하기 위하

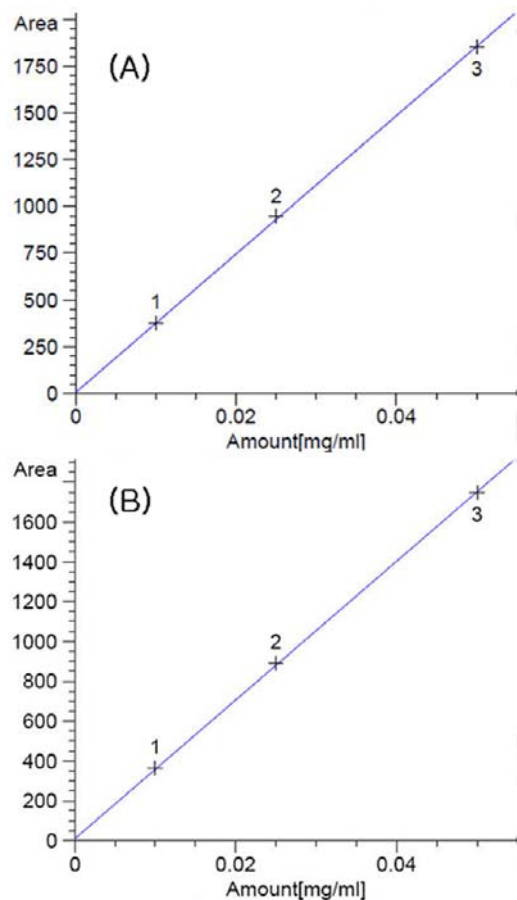


Fig. 1. Calibration curve of decursin (A) and decursinol angelate (B).

여 HPLC/MS에 의해 확인되었다. Decursin의 피크는 6.9분이었으며 decursinol angelate는 7.2분이었고 순도는 95%이었다. Mass에 의해 확인된 분자량은 $m/z = 329([M+H]^+)$ 및 $m/z = 351([M+Na]^+)$ 로 확인되었다(Fig. 2).

Recycling HPLC에 의한 분리

확인된 decursin 및 decursinol angelate는 Fig. 3과 같이 recycling HPLC에 의해 분리하여 decursin 및 decursinol angelate 각각을 얻었다. Fig. 3과 같이 10번 이상의 recycle을 통해 decursin 및 decursinol angelate가 분리되는 것을 확인하였다.

분리한 decursin 및 decursinol angelate의 HPLC/MS에 의한 확인

Recycling HPLC에 의해 분리한 decursin 및 decursinol angelate의 순도를 HPLC/MS를 통해 확인하였다(Fig. 4). Decursin 및 decursinol angelate의 순도가 각각 99.97 및 99.40%이었고 Mass에 의하여 각각의 분자량이 $m/z = 329([M+H]^+)$ 및 $m/z = 351([M+Na]^+)$ 임을 확인하였다(Fig. 4). 분리한 두 물질의 색깔은 decursin의 경우 흰색가루, decursinol angelate는 무색의 액체로 나타났다. 이것은

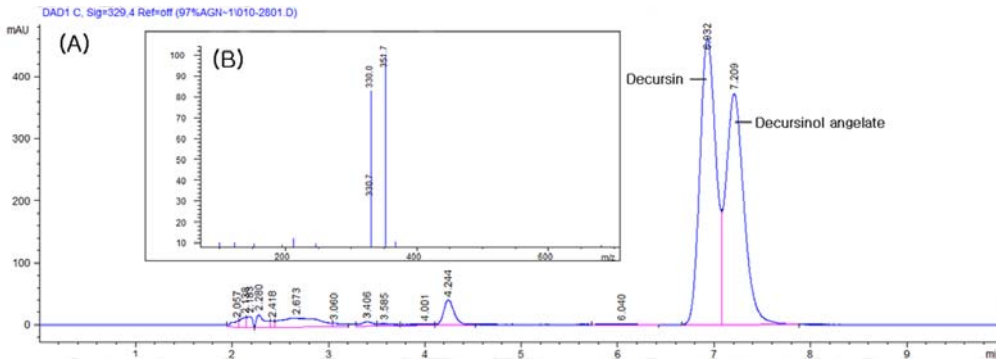


Fig. 2. HPLC (A) and mass (B) chromatogram of decursin and decursinol angelate.

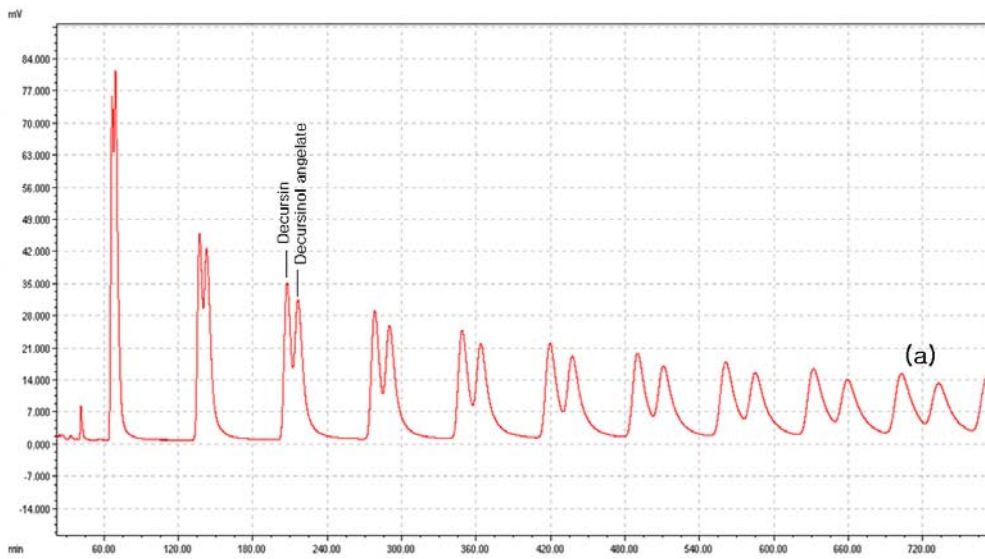


Fig. 3. Recycling HPLC chromatogram for isolation of decursin and decursinol angelate. (a), Peak for isolation of decursin and decursinol angelate.

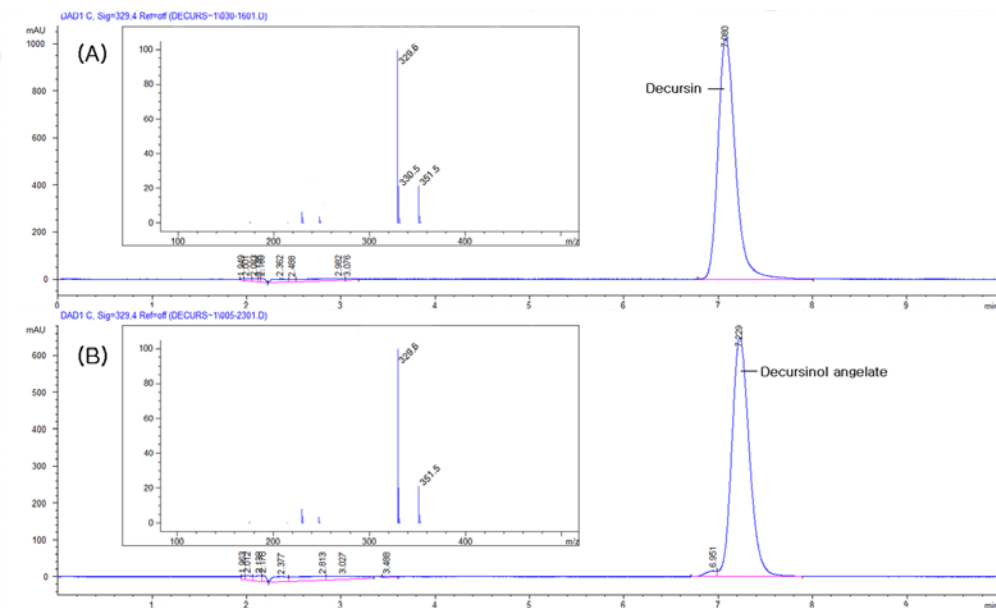


Fig. 4. HPLC chromatogram of isolated decursin (A) and decursinol angelate (B).

Angelica gigas Nakai 혹은 추출물인 decursin 및 decursinol angelate에 의한 의약품, 식품 등의 연구에 있어 decursin

및 decursinol angelate 각각의 약리학적 효과에 대한 실험을 제공할 수 있을 것이다.

요 약

생약재로 사용 중인 *Angelica gigas* Nakai의 decursin 및 decursinol angelate를 60% ethanol로 최종적으로 추출 후 recycling HPLC 및 HPLC/MS에 의해 각각을 분리하였다. 60% ethanol로 -20°C에서 추출하였을 경우 95% 순도의 decursin 및 decursinol angelate를 얻을 수 있었고 10번 이상의 recycle를 통해서 순수한 decursin 및 decursinol angelate를 분리할 수 있었다. 분리한 decursin 및 decursinol angelate를 HPLC/MS를 통해 분자량을 확인하였을 경우 $m/z=329$ ($[M+H]^+$) 및 $m/z=351$ ($[M+Na]^+$)과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이 분리 방법을 통해 decursin 및 decursinol angelate를 통한 의약품 및 식품 등에 관한 여러 연구에 있어 두 물질 각각에 대한 약리학적 효과를 도출하는데 기여할 것이며, 물질표준화에 기여할 것으로 사료된다.

문 헌

- Ahn MJ, Lee MK, Kim YC, Sung SH. 2008. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 46: 258-266.
- Yook CS. 1990. *Coloured medicinal plants of Korea*. Academy Book Co., Seoul. p 390.
- Lee SH, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. 2003. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch Pharm Res* 26: 727-730.
- Lee SH, Shin DS, Kim JS, Oh KB, Kang SS. 2003. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch Pharm Res* 26: 449-452.
- Yim DS, Singh RP, Agarwal C, Lee SY, Chi HJ. 2005. A novel anticancer agent, decursin, induces G₁ arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 65: 1035-1044.
- Kang SY, Lee KY, Sung SH, Park MJ, Kim YC. 2001. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase structure-activity relationships. *J Nat Prod* 64: 683-685.
- Ahn KS, Sim WS, Kim IH. 1996. Decursin: a cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med* 62: 7-9.
- Bae EA, Han MJ, Kim NJ, Kim DH. 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol Pharm Bull* 21: 990-992.
- Ryu KS, Yook CS. 1967. Studies on the coumarins of the root of *Angelica gigas* Nakai. *Yakhakhoeji* 11: 22-26.
- Kim HH, Ahn KS, Han H, Choung SY, Choi SY, Kim IH. 2005. Decursin and PDBu: two PKC activators distinctively acting in the megakaryocytic differentiation of K562 human erythroleukemia cells. *Leuk Res* 29: 1407-1413.
- Yim D, Singh RP, Agarwal C, Lee S, Chi H, Agarwal R. 2005. A novel anticancer agent, decursin, induces G₁ arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 65: 1035-1044.
- Lee JH, Choi YS, Kim JH, Jeong HG, Kim DH, Yun MY, Kim JS, Lee SH, Cho SH, Shen GN, Kim EG, Jin WY, Song GY. 2006. A mass preparation method of (+)-decursinol from the roots of *Angelica gigas*. *Yakhakhoeji* 50: 172-176.
- Park KW, Choi SR, Shon MY, Jeong IY, Kang KS, Lee ST, Shim KH, Seo KI. 2007. Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1385-1390.
- Lim JD, Kim IH, Kim HH, Ahn KS, Han HG. 2001. Enantioselective synthesis of decursinol angelate and decursin. *Tetrahedron Lett* 42: 4001-4003.

(2009년 4월 6일 접수; 2009년 4월 29일 채택)