

참당귀(*Angelica gigas*) 뿌리 추출물로부터 (+)-Decursinol의 대량 제조 방법

이지현 · 최용석* · 김주환** · 정혜광*** · 김동희**** · 윤미영***** · 김진숙*****
이상한***** · 조수현 · 신귀남 · 김의겸 · 김문일 · 송규용#

충남대학교 약학대학, *호서대학교 식품생물공학과, **대전대학교 생명과학부, ***조선대학교 약학대학,
****대전대학교 한의과대학, *****한국한의학연구원 한약재제연구부, *****경북대학교 농과대학
(Received February 23, 2006; Revised June 23, 2006)

A Mass Preparation Method of (+)-Decursinol from the Roots of *Angelica gigas*

Jee-Hyun Lee, Yong-Seok Choi*, Joo-Hwan Kim**, Hye-Gwang Jeong***, Dong-Hee Kim****,
Mi-Yong Yun****, Jin-Sook Kim*****, Sang-Han Lee******, Soo-Hyun Cho, Gui-Nan Shen,
Eui-Geom Kim, Wen-Yi Jin and Gyu-Yong Song#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejon Korea

*Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan Korea

**Department of Life Science, Daejon University, Daejon Korea

***College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju, Korea

****College of Oriental Medicine, Daejon University, Daejon Korea

*****Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejon Korea

*****Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu Korea

Abstract — The purpose of this study is to develop a mass preparation method of (+)-decursinol from *Angelica gigas* roots. Recently, it has been shown that (+)-decursin, (+)-decursinol angelate and its analogues, isolated from *Angelica gigas* roots, exhibit various biological activities such as antitumor, antibacterial and neuroprotective activities. The contents of these compounds, ester form of (+)-decursinol, is very high in the *Angelica gigas* roots, whereas the content of (+)-decursinol itself is very low. Therefore, (+)-decursinol which can be used as starting material to synthesize various its analogues was easily prepared from decursin analogues in the *Angelica gigas* roots. In order to achieve such aim, the Ether-Fr. of the ethanol extract of *Angelica gigas* roots was hydrolysed with various alkalis and solvents. As a result, the order of (+)-decursinol preparation was 1) NaOH, 2) KOH, 2) K₂CO₃, and 3) NaHCO₃ as alkali. Also, the yield of (+)-decursinol was higher in diethyl ether than any other solvent conditions. From 1 kg of dried *Angelica gigas* roots, we could obtain 27.4 g of (+)-decursinol as a pure white solid.

Keywords □ *Angelica gigas*, (+)-decursinol, (+)-decursin, alkali hydrolysis

당귀는 미나리과(Umbelliferae)의 식물로써 중국산을 중국당귀(*Angelica sinensis*), 일본산을 왜당귀(*Angelica acutiloba*), 한국산을 참당귀(*Angelica gigas*)라고 한다. 예로부터 당귀는 어린순을 나물로 식용하고, 뿌리를 진통효과, 신장독성 경감효과, 당뇨성 고혈압 치료 등 여러 질환에 대한 약제로 사용하고 있다.¹⁻⁴⁾ 이

러한 약물학적 활성을 나타내는 주요 성분은 dihydropyranocoumarin 계열의 물질로 최근에는 이 계열에서 항암효과⁵⁻⁸⁾를 나타낸다는 보고가 있다.

참당귀 뿌리에서 분리된 쿠마린 계열의 물질에는 대표적으로 (+)-decursin과 (+)-decursinol angelate가 있으며, 이의 함량은 각각 3.30% 및 2.44%로 당귀 내 다량 존재한다.⁹⁾ 이들의 구조는 (+)-decursinol(7-hydroxy-8,8-dimethyl-7,8-dihydro-6H-pyran-3,2-g]chromen-2-one)의 이차 알콜기가 각각 3,3-dimethyl acryloyl 그룹, angeloyl 그룹과 에스터화되어 있으며, 이는 구조

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5926 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) gysong@cnu.ac.kr

이성질체로서 물성이 거의 유사하며 HPLC 조작으로도 분리하기 어려운 것으로 알려져 있다.

또한 강¹⁰⁾ 등은 참당귀 뿌리로부터 쿠마린 계열의 새로운 물질 4종(4"-hydroxy tigloyldecursinol, 4"-hydroxydecursin, (2"S,3"S)-epoxyangeloyldecursinol, (2"R,3"R)-epoxyangeloyldecursinol)을 미량으로 분리하였으며, 이로부터 뇌신경 보호효과를 보고한 바 있다.

저자들은 참당귀 뿌리에서 분리된 쿠마린 계열 물질의 다양한 약리학적 활성을 바탕으로 (+)-decursinol의 대량 확보를 통해 이미 보고된 쿠마린 계열의 물질 뿐 아니라 더욱 다양한 에스터 및 에테르 구조의 물질을 선택적으로 합성하고자 하였으며, 이의 구조-활성간의 관계를 연구함으로서 최적의 활성을 나타내는 물질을 도출하고자 하였다.

그러나 합성을 위한 출발 물질인 (+)-decursinol은 참당귀 뿌리 내에 극히 소량 존재하며, 이의 합성법¹¹⁻¹³⁾도 알려져 있기는 하지만 매우 복잡하여 (+)-decursinol을 확보하는 것에 어려움이 있다. 따라서 저자들은 (+)-decursinol을 대량 생산할 수 있는 효율적이고 경제적인 다른 방법을 찾던 중, 참당귀 뿌리에 다량으로 존재하는 쿠마린들을 알칼리로 가수분해하여 (+)-decursinol을 확보할 수 있을 것에 착안하였다.

따라서, 본 연구에서는 (+)-decursin과 (+)-decursinol angelate 뿐 아니라 다양한 유도체들을 선택적으로 합성할 수 있는 출발 물질인 (+)-decursinol을 대량으로 제조하는 방법에 대해서 기술하고자 한다.

실험재료 및 방법

검체

본 실험에서 사용한 참당귀(*Angelica gigas*, 국내산, 강원도)는 대전 소재 한약 전재상에서 구입하였다.

분석기기

분석기기로는 ¹H-NMR(400 MHz) & ¹³C-NMR(100 MHz) spectrometer(JNM-AL 400, JEOL Ltd., Japan), Melting pointer (Yamako, MD-S3, Japan), MS(PE SCIX API 2000 MS/MS, Canada), polarimeter(JASCO DIP-370, Japan)를 사용하였다.

시약

물질 추출을 위한 시약으로는 EtOH(Samchun, Korea), diethyl ether(Samchun, Korea), ethyl acetate(Duksan, Korea), KOH, NaOH, K₂CO₃, NaHCO₃(Aldrich, USA)를 사용하였다.

실험방법

추출 – 건조된 참당귀 뿌리 1 kg을 분쇄 후, 5리터 라운드 플

라스크에 넣고 2.5리터의 에탄올을 넣어 9시간 동안 끓이면서 3회 추출 후 여과하고, 감압 농축하여 추출물 343 g을 얻었다. 이 에탄올 추출물을 2리터의 물에 혼탁시킨 후 1리터의 에테르를 넣어 추출하고 분액깔때기에서 분획하여 에테르층(Ether-Fr.)을 모았다.

알칼리 가수분해 – Ether-Fr.에 과량의 알칼리를 넣어 상온에서 24시간 동안 교반하였으며, 가수분해의 최적 알칼리를 선정하기 위해 NaOH, KOH, K₂CO₃ 및 NaHCO₃의 4종의 알칼리를 실험하였다. 또한 반응의 최적 용매를 선정하기 위해 NaOH 존재 하에서 에테르, 메탄올, 10% NaOH 수용액의 용매로 실험하였다. 실험은 아래의 세가지 방법으로 수행되었다.

방법 1) Ether-Fr.에 각각 25 g의 NaOH, KOH, K₂CO₃ 및 NaHCO₃를 넣어 상온에서 24시간 동안 교반하였다.

방법 2) Ether-Fr.의 에테르 용매를 감압농축한 뒤 잔사(78 g)를 1리터의 메탄올로 용해한 후 25 g의 NaOH를 넣고 상온에서 24시간 교반하였다.

방법 3) Ether-Fr.에 250밀리리터의 10% NaOH 수용액을 넣고 상온에서 24시간 교반하였다.

산 추출 – 알칼리로 가수분해한 반응액에 3 N 염산수용액을 가하여 산성(pH 2)이 되게 하고, 1리터의 에틸 아세테이트로 추출한 후 분액깔때기에서 분획하여 에틸 아세테이트층을 얻었다. 500밀리리터의 에틸 아세테이트로 1회 더 추출하여 분획한 후 1차 분획한 에틸 아세테이트층과 합하였다. 여기에 무수망초를 넣은 뒤 여과 후, 여액을 감압건조 하였다.

정제 – 감압농축하여 얻은 31 g의 갈색 잔시를 메탄올로 녹여 활성탄 처리 후, 재결정하였다.

구조분석

재결정하여 얻은 (+)-decursinol을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, 용점 데이터, polarimeter로 구조 분석하였으며, 이를 기준의 논문에 기재되어 있는 데이터와 비교 분석하여 확인하였다.^{12,14)}

결과 및 고찰

(+)-decursin과 (+)-decursinol angelate(Fig. 1B)는 참당귀 뿌리에 다량으로 존재하며 다양한 생리활성을 나타내는 쿠마린 계열의 물질이다. 그러나 이들의 구조는 (+)-decursinol(Fig. 1A)의 이차 알콜기가 3,3-dimethylacrylic acid와 angelic acid의 작용기로 각각 에스터 형태로 결합되어 있는 구조 이성질체로, 이 중결합 말단에 존재하는 메틸기의 결합위치만 달라 물성이 유사하여 분리하기가 상당히 까다롭다. 한편, 4"-hydroxy tigloyl-decursinol, 4"-hydroxydecursin, (2"S,3"S)-epoxyangeloyldecursinol, (2"R,3"R)-epoxyangeloyldecursinol(Fig. 1C)도 참당귀 내에 존재하는 미량의 쿠마린 계열의 물질¹⁰⁾들로, 이들 구조 역시

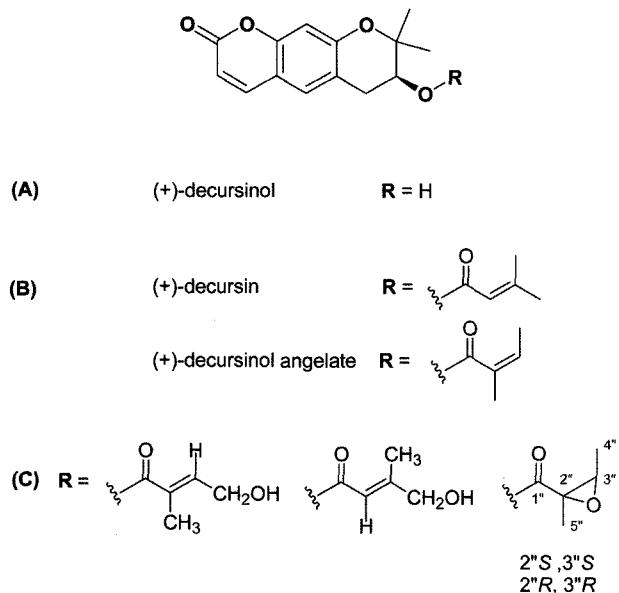


Fig. 1 – Structure of decursinol and its analogues in the *Angelica gigas* roots.



Scheme 1 – Hydrolysis of decursin analogues.

(+)-decursinol(Fig. 1A)의 이차 알칼리에 다양한 구조의 작용기가 에스터 형태로 결합되어 있다.

본 연구에서는 참당귀 뿌리에 다양으로 들어있는 이들 쿠마린 계열의 물질을 추출하여 적합한 알칼리와 용매를 사용하여 가수분해함으로써 대량으로 (+)-decursinol을 제조하고자 실험을 실시하였다(Scheme 1).

참당귀 뿌리의 효과적 추출을 위해서 에탄올¹⁾을 사용하였으며, 이를 에테르로 추출하여 에테르층(Ether-Fr.)을 얻었다. Ether-Fr의 TLC 양상은 $R_f=0.70(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 에서 주된 spot이 나타났으며, 이외에 두드러지게 나타나는 spots은 없었다. $R_f=0.20(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 에서도 희미한 spot이 나타났으며 이 물질은 얻고자 하는 (+)-decursinol이었다. 따라서 저자들은 $R_f=0.70(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 에서 나타난 spot이 (+)-decursin과 (+)-decursinol angelate(Fig. 1B)가 섞여 있는 TLC spot이라 예측하고, Ether-Fr.를 실험방법에 따라 가수분해하였다. 가수분해 경향은 $R_f=0.70(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 에서 두드러졌던 spot의 크기가 반응시간이 경과함에 따라 점차 줄어들었으며, 희미하게 존재했던 $R_f=0.20(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 의 spot은 점차 커졌다. 또한 24시간 경과 후엔 $R_f=0.70(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 위치의 spot이 완전히 사라짐을 확인할 수 있었고, 이 시점에서 반응을 종결하였다. 반응물은 정제 후, 구

조를 분석하였다.

Decursinol 구조확인

위의 실험방법에서 얻은 (+)-decursinol의 구조를 확인하기 위하여 기존의 문헌^{12,14)}에 보고된 물리 화학적 성질을 비교해 본 결과 다음과 같은 모든 데이터가 동일하였다.

색상 및 결정형; 백색 결정; $R_f=0.20(n\text{-HX : EA}=1:1)$; 용점: 177.6°C, ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.57(d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.17(s, 1H), 6.77(s, 1H), 6.21(d, $J=9.6$ Hz, 1H), 3.87(td, $J=5.6$, 5.6 Hz, 1H), 3.11(dd, $J=5.6$, 17.2 Hz, 1H), 2.84(dd, $J=6.0$, 17.2 Hz, 1H), 1.93(d, $J=6.8$ Hz, OH), 1.40(s, 3H), 1.37(s, 3H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 22.1, 25.0, 30.7, 69.2, 78.2, 104.8, 113.0, 113.3, 116.4, 129.0, 143.1, 154.2, 156.5, 161.3; MS(m/z) 247.1 [$\text{M}+\text{H}]^+$, $[\alpha]_D^{25}+18(c=5, \text{CHCl}_3)$.

본 실험에서는 가수분해 시 가장 효과적인 알칼리와 용매를 알아보기 위해 방법 1, 2, 3의 실험을 수행하였으며 다음의 결과를 얻었다.

Ether-Fr의 가수분해에 미치는 알칼리의 효과

가수분해를 위해 사용된 4종의 알칼리 영향을 실험한 결과(방법 1), 건조된 참당귀 1 kg으로부터 NaOH, KOH 및 K_2CO_3 에 의해서 생성되는 (+)-decursinol의 양은 각각 27.42, 27.33 및 26.78 g으로 비슷한 경향을 나타내었다. 반면에 NaHCO_3 에 의해서 생성되는 (+)-decursinol의 양은 16.54 g으로 다른 알칼리에 비해 수율이 떨어짐을 알 수 있다(Table I).

Ether-Fr의 가수분해에 미치는 용매의 효과

실험에 사용한 알칼리 중 가장 수율이 높았던 NaOH를 선정

Table I – Effect of alkali on the hydrolysis of Ether-Fr.

Base	Yield (g)
NaOH	27.42
KOH	27.33
K_2CO_3	26.78
NaHCO_3	16.54

Each value represents the amount of (+)-decursinol which was obtained from 1 kg of dried *Angelica gigas* roots.

Table II – Effect of solvent on the hydrolysis of Ether-Fr.

Solvent	Yield (g)
Diethyl Ether	27.42
MeOH	24.18
10% NaOH	20.44

Each value represents the amount of (+)-decursinol which was obtained from 1 kg of dried *Angelica gigas* roots.

한 후 가수분해를 위해 사용된 용매의 영향을 실험한 결과(방법 1, 2, 3), 건조된 참당귀 1 kg으로부터 생성되는 (+)-decurcisinol의 양은 에테르, 메탄올, 10% NaOH 수용액의 경우 각각 27.42, 24.18, 20.44 g^o]었다(Table II). 이 결과로 볼 때 가수분해 시 사용되는 최적의 용매는 에테르로, Ether-Fr를 감압 건고하는 과정 없이 그대로 가수분해에 사용하여 실험 조작을 단순화할 수 있다.

저자들은 실제로 본 실험에서 제조한 (+)-decurcisinol을 출발물질로 하여 (+)-decurcisin과 (+)-decurcisinol angelate를 선택적으로 합성¹³⁾하였으며, 이들의 TLC 양상이 $R_f=0.70(n\text{-HX : EA}=1:1)$ 로 (+)-decurcisinol이 가수분해되기 전 양상과 동일함을 확인하였다. 한편, 또 다른 쿠마린 계열 물질인 4"-hydroxytigloyldecurcisinol, 4"-hydroxydecurcisin, (2"^S,3"^S)-epoxyangeloyl-decurcisinol, (2"^R,3"^R)-epoxyangeloyldecurcisinol(Fig. 1C)도 일부 가수분해되어 (+)-decurcisinol로 변환되었으리라 예측되나, 이들 물질의 함량은 건조한 참당귀 뿌리 2 kg에 각각 10, 12, 3, 6 mg의 극미량¹⁰⁾으로 수율에는 큰 영향을 주지 못할 것으로 본다. 결국 (+)-decurcisinol은 거의가 (+)-decurcisin과 (+)-decurcisinol angelate 두 물질로부터 가수분해 되어 생성된 것으로 추정할 수 있다. 앞서 언급했듯이 (+)-decurcisin과 (+)-decurcisinol angelate의 함량은 건조한 참당귀 뿌리에 각각 3.30%, 2.44%라 보고⁵⁾된 바 있으며, (+)-decurcisin과 (+)-decurcisinol angelate가 참당귀 뿌리 1 kg당 약 57 g(각각 33 g, 24 g)이 존재함을 알 수 있다. 또한 이 두 물질이 (+)-decurcisinol로 가수분해 된다면 이의 이론치 수율은 43 g^o이 된다. 본 실험에서는 참당귀 뿌리 1 kg당 평균 27 g의 (+)-decurcisinol을 얻었으며, 앞서 계산된 이론치 수율과 차이를 보인다. 이는 실험 조작의 오차 및 참당귀 뿌리의 산지와 재배년수에 따른 차이에 의한 것으로 사료된다.

본 연구는 참당귀 뿌리로부터 효과적으로 (+)-decurcisinol을 대량 제조하는 것으로, 복잡한 컬럼분리 조작 없이 재결정만으로 순수한 목표물질을 얻는 방법을 설립한 것이다. 또한 가수분해 시 사용되는 알칼리 및 용매의 종류에 따라 수율을 비교분석 하였는데, 값싼 여러 가지 알칼리를 사용하여 경제적으로 (+)-decurcisinol을 대량 제조할 수 있었고, 특히 NaOH를 사용한 경우 참당귀 뿌리 1 kg당 27.42 g의 (+)-decurcisinol을 가장 높은 수율로 얻을 수 있었다. 가수분해 시 최적의 용매를 알아본 실험에서는 에테르가 가장 효과적이었다.

결 론

이상의 결과로 볼 때, 본 연구의 (+)-decurcisinol 제조 방법은 낮은 원가와 간단한 공정의 대량 생산이 수월한 방법으로, 일반적으로 행하여지는 (+)-decurcisinol 추출 및 합성법의 단점을 극

복하였다고 판단된다. 또한 본 방법에 의해 얻어진 (+)-decurcisinol은 다양한 질병에 광범위하게 이용될 수 있는 (+)-decurcisin 유도체를 선택적으로 합성할 수 있는 출발 물질로, 이 분야에 커다란 기여를 할 수 있으리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 산업기술평가원에서 지원하는 지역혁신연구센터 과제인 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC, RRC04722, RRC04720, RRC04721, RRC04710, RRC04730, RRC04733, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

문 헌

- 1) Kang, Y. G., Lee, J. H., Chae, H. J., Kim, D. H., Lee, S. H. and Park, S. Y. : HPLC analysis and extraction methods of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* roots. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 201 (2003).
- 2) Chi, H. J and Kim H. S. : Studies on the components of *Umbelliferae* plants in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **1**, 25 (1970).
- 3) Bae, E. A., Han, M. J., Kim, N. J. and Kim, D. H. : Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 990. (1998).
- 4) Lee, Y. Y., Lee, S., Jin, J. L. and Yun-Choi, H. S. : Platelet aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 723 (2003).
- 5) Ryu, K. S., Hong, N. D., Kim, N. J. and Kong, Y. Y. : Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas Nakai*. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 64 (1990).
- 6) Kim, H. H., Ahn, K. S., Han, H., Choung, S. Y., Choi, S. Y. and Kim, I. H. : Decursin and PDBu: Two PKC activators distinctively acting in the megakaryocytic differentiation of K562 human erythroleukemia cells. *Leuk. Res.* **29**, 1407 (2005).
- 7) Yim, D., Singh, R. P., Agarwal, C., Lee, S., Chi, H. and Agarwal, R. : A novel anticancer agent, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* **65**, 1035 (2005).
- 8) Kim, H. H., Bang, S. S., Seok, J. S., Han, H. and Kim, I. H. : Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. *Cancer Lett.* **223**, 191 (2005).
- 9) Lee, S., Lee, Y. S., Jung, S. H., Shin, K. H., Kim, B. K. and Kang, S. S. : Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 727 (2003).

- 10) Kang, S. Y., Lee, K. Y., Sung S. H. and Kim, Y. C. : Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. *J. Nat. Prod.* **68**, 56 (2005).
- 11) Nemoto, T. and Oshima, T. : Enantioselective total syntheses of novel PKC activator (+)-decursin and its derivatives using catalytic asymmetric epoxidation of an enone. *Tetrahedron Lett.* **41**, 9569 (2000).
- 12) Nemoto, T., Oshima, T. and Shibasaki, M. : Enantioselective total syntheses of (+)-decursin and related natural compounds using catalytic asymmetric epoxidation of an enone. *Tetrahedron* **59**, 6889 (2003).
- 13) Lim, J. D., Kim, I. H., Kim, H. H., Ahn, K. S. and Han, H. G. : Enantioselective synthesis of decursinol angelate and decursin. *Tetrahedron Lett.* **42**, 4001 (2001).
- 14) Konoshima, M., Chi, H. J. and Hata, K. : Coumarins from the roots of *Angelica gigas* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 1139 (1968).