

Angelica[®]의 피부 광노화에 대한 효과

진 무 현[†] · 정 민 환* · 임 영 희* · 이 상 화 · 강 상 진 · 조 완 구

LG생활건강 기반연구소, *LG화학 CRD연구소
(2005년 6월 30일 접수, 2005년 9월 8일 채택)

Effect of Angelica[®] against Skin Photo-aging

Mu Hyun Jin[†], Min-Hwan Jung*, Young-Hee Lim*, Sang Hwa Lee, Sangjin Kang, and Wan-Goo Cho

C.I. Center, LG Household & Health Care, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

*Corporate R&D, LG Chem./Research Park(E)

(Received June 30, 2005; Accepted September 8, 2005)

요약: 피부노화는 피부의 이상현상이나 질환은 아니며 나이가 들어감에 따라 시간의 진행에 따라 일어나는 퇴행성 변화로 의적 형태의 변화로는 피부 건조 및 주름 등이 있다. 주름을 생성하는 원인에는 자외선, 건조 및 물리적, 화학적 자극 등 환경요인에 기인하는 피부 스트레스와 각질층의 수분량 저하, 비후화, 진피의 교원섬유, 탄력섬유의 양적, 질적 변화 등이 유발하는 피부의 탄력성이나 신축성의 저하를 들 수 있다. 본 연구에서는 *Angelica dahurica* root에서 얻어진 3종의 주름개선 유효성분의 구조분석 및 피부 노화에 대한 효과를 살펴보았다.

Abstract: Skin aging is not a disease nor an abnormal phenomenon but a collection of degenerative changes with age, characterized by skin dryness, wrinkle formation, and loss of skin elasticity. The skin wrinkles are caused by either genetically predisposed factors or environmental factors such as UV irradiation or physical/chemical stimulus. The histological manifestations of wrinkles are changes in both amount and integrity of elastic and collagen fibers. Here we report the isolation and characterization of 3 active compounds, prangenidin, 8-hydroxybergapten, and xanthotoxol from *Angelica dahurica* root. The anti-wrinkle activities of these compounds were also investigated.

Keywords: *Angelica dahurica* root, photoaging, HAS gene expression, collagen synthesis

1. 서 론

세포 외 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 또한, 생체 단백질 총 중량의 약 30%를 차지하는 중요한 단백질로서 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. 콜라겐은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부(진피)에 그 포함량이 높다. 대부분의 다른 체 구조물에서는 섬유상 봉입체로서 존재한다. 콜라겐의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화(유기체의 성장 혹은 상처 치유)의 유도 등이 알려져 있다[1].

이러한 콜라겐은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다[2-5]. 또한 콜라겐은 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 담당하며, 손상된 상피에서 콜라겐의 합성을 촉진시켜서 상처를 신속하게 흉터 없이 회복시킬 수 있다.

현재까지 밝혀진 콜라겐 합성 촉진물질 중 가장 대표적인 것으로는 *Centella asiatica*의 주성분들인 asiaticoside, asiatic acid, madecasic acid 등을 들 수 있다[6].

본 연구에서는 human fibroblast를 이용하여 콜라겐 생합성 증가를 확인할 수 있는 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay를 이용하여 주름 개선에 효능이 있다고 언급된 120종의 생약을 대상으로 효능을 검색하였고, 이 중 백지 추출물이 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 백지는 미나리과(Umbelliferae)의 구릿

[†] 주 저자 (e-mail: mhjin@lgcare.co.kr)

대(*Angelica dahurica*)의 뿌리를 약재로 사용하며, 한방에서 감기, 두통, 치통 등에 사용하며 특히 하혈, 통경과 같은 부인과 질환에 사용되는 약재로써 20여 종의 coumarin 성분들이 알려져 있다[7,8].

분쇄한 백지의 80% methanol추출물을 n-hexane, chloroform, n-butanol을 이용하여 순차적으로 용매분획하고, 각각의 분획에 대해 collagen 합성 촉진능을 평가한 결과, chloroform분획에서 강한 활성을 관찰하였다. 따라서 chloroform분획을 각종 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 3종의 collagen 합성 촉진 물질들을 분리하였으며, 각종 spectral 데이터를 바탕으로 각각의 구조를 동정하여 이를 보고하고자 한다. 또한 이들 유효성분 3종의 혼합물인 Angelica[®]의 효능을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에서 사용된 백지는 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

칼럼크로마토그래피는 silica gel 60 (230 ~ 400 mesh, Merck)를 사용하였고, 박층크로마토그래피용 precoated plates는 silica gel 60F254와 RP-18 F254S를 사용하였다. HPLC분석은 combiHT SB-C18 column을 사용하였다. Mass spectra는 AutoSpec mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK)를, NMR spectra는 Bruker DMX-600 FT-NMR spectrometer를, IR spectra는 Shimadzu IR-435를 사용하여 얻었다. 세포배양을 위해 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (fetal bovine serum), antibiotics와 trypsin (2.5%)을 Gibco에서 구입하였고, collagen 정량은 enzyme-linked immunosorbent assay kit (TAKARA, Japan)를 사용하였다. 그의 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2.3. 추출 및 분리

세절한 백지 30 kg을 10배의 methanol을 이용하여 70 °C에서 3회 추출한 후 감압농축하여 백지 추출물 2.5 kg을 얻었다. 이 추출물에 정제수를 가하여 현탁시킨 후 n-hexane, chloroform, n-butanol을 순차적으로 가해 n-hexane, chloroform, n-butanol, water 분획을 얻어 감압농축하여 각각의 용매분획을 얻었다.

이중 효과가 우수한 chloroform 분획을 대상으로 용리액 chloroform:methanol (3:1)을 사용하는 silica column chromatography를 수행하여 분리에 방해가 되는, 효능이 없으며 다량인 극성 물질을 컬럼에 흡착시켜 제거하고,

용리된 분획을 다시 chloroform:methanol (20:1)을 사용하는 silica column chromatography를 수행하여 유효분획을 얻었다. 유효 분획은 combiHT SB-C18 column (2 × 25 cm)을 이용하여 Prep HPLC를 용리액 40% acetonitrile로 수행하여 성분 7종 및 10개의 분획을 제조하였다. 얻은 성분 및 분획의 효능을 평가하여 유효성분 3종을 확인하였다(Scheme 1).

2.4. Procollagen₁ Type I C-peptide Enzyme Immunoassay (PICP EIA)

2.4.1. 세포배양

실험에 사용된 human dermal fibroblast는 신생아 포피로부터 배양하였다. 1차 배양된 human fibroblast를 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.4.2. 시험물질 조제

0.2% DMSO를 음성대조군으로, 0.3 mM ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, 시험물질의 농도는 0.3 mM ascorbic acid와 유사한 정도의 콜라겐 합성 촉진 효과를 보이는 농도인 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL의 농도로 각각 조제하였다.

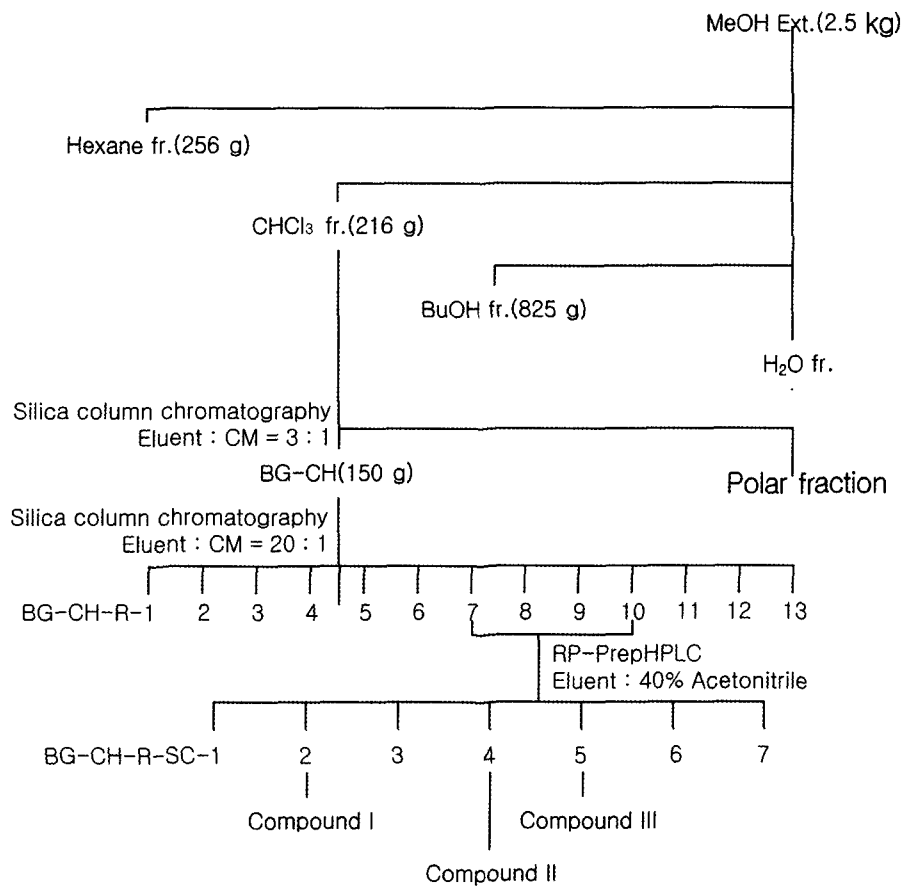
2.4.3. Enzyme Immunoassay

배양된 human fibroblast를 96-well plate에 10⁴ cells/well로 분주하여 배양하였다. 24 h 후 세포들을 serum-free DMEM으로 3회 세척하고, 시료를 농도별로 녹인 serum-free DMEM 용액으로 교환하고 24 h 배양하였다. 배양액으로부터 새로 생성된 procollagen type I C-peptide를 enzyme-linked immunosorbent assay kit (TAKARA, Japan)을 이용하여 정량하였다[9,10].

실험은 각 농도에 대하여 3회 반복 수행하였으며 얻어진 data값은 평균과 표준 편차를 구하여 student's t-test를 이용, 음성 대조군과의 통계적 유의성을 검증하였다. 한편 대조군에 대한 콜라겐 합성 증가율은 평균값을 이용하여 표기하였다

2.5. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis of HAS2 mRNA in NIH 3T3 Cells

시험물질인 Angelica[®]는 상기의 3종 유효성분의 혼합물로서 prangenidin (77%), 8-hydroxybergapten (21%), xanthoxol (2%)을 포함하고 있다. Mouse 유래의 섬유아세포 NIH 3T3를 10% 우혈청(fetal bovin serum)을 포함한 DMEM 배지에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포를



Scheme I. Extraction and isolation of compound I, II, III from *Angelica dahurica* root.

우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 2회 세척하고, 다시 12 h 동안 동일배지를 처리하여 우혈청의 영향을 완전히 제거하였다. 이렇게 배양된 세포의 배지를 다시 Angelica®을 1 ppb, 10 ppb의 농도로 우혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지에 첨가한 배양액으로 교체하고 12 h 처리하였다. 12 h 경과 후 세포를 회수하여 냉각된 인산 완충용액(PBS)으로 세척하고, RNA 분리 kit (Tri-reagent, Gibco BRL) 1 mL를 첨가하여 총 RNA를 추출하여 하기의 방법으로 정량적인 역전사 PCR을 수행하였다. HAS2 및 GAPDH의 PCR 수행을 위한 프라이머 서열은 sense primer : 5'-CTGTGAAAAGGCTGACCTAC-3', anti-sense primer : 5'-TCAGTAAGGCACTTGGACCG-3'이다. 1 µg의 total RNA를 reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 역전사하여 cDNA를 얻었다. 이후 역전사 반응 용액 2 µL를 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTP의 PCR 반응 완충액 50 µL에 섞고, 20 pmol의 프라이머와 1.25 U의 Taq DNA 중합효소를 첨가하여 94°C에서 60 sec, 60°C에서 120 sec, 72°C에서 120 sec의 30 사이클을 수행하였다.

PCR 결과를 아가로스 젤에 전기영동하고 이를 Fluoro-S MultiImager (BioRad)를 이용하여 분석하였다.

2.6. 자외선에 의한 DNA 손상 방어 효과(COMET Assay)

실험에 사용된 normal human keratinocytes (NHK)는 성인 포피로부터 배양하였다. NHK는 keratinocyte growth medium (KGM, Clonetics, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포는 각각 Angelica® 및 양성대조군으로써 토코페롤, EGCG를 포함한 KGM에서 12 시간 배양 후 PBS로 교체하고, Biotronin UV 조사 장비 (Vilber Lourmat, France)를 사용하여 UVB (peak emission 312 nm)를 60 mJ/cm²로 조사하였다. UVB 조사 후 세포를 분리하고 자외선에 의한 DNA의 손상정도를 알칼리 조건에서 Singh 등의 COMET assay 방법에 따라 평가하였다[11]. COMET assay는 color CCTV 카메라(Panasonic, Japan)가 장착된 250X 배율의 Metallux-3 fluorescence 현미경(Leitz, German)으로부터 영상을 얻어 컴퓨터로 전송한 후 Comet assay software project (CASP)

이미지 분석프로그램(Krzysztof Konca)을 사용하여 영상 분석하였다. 각각의 시료로부터 무작위로 50개의 영상을 선택하고 Konca 등의 방법에 따라 Comet tail moment를 측정하였다[12]. Comet tail moment는 DNA 손상 정도와 상관성을 갖으며, 이 값의 평균값을 각 시료의 자외선에 의한 DNA 손상 억제 효과로 나타내었으며, 시료 무처리군에 대한 효과를 백분율로 표시하였다.

2.7. 항주름 임상평가

2005년 1월 6일 부터 2005년 3월 5일까지 Angelica[®]에 대해 피시험자 20명에 대하여 임상연구를 수행하였다. 연구는 이중 맹검 대조-시험군 비교 연구를 이용하였으며, 시료는 Angelica[®] 0.02%를 함유한 크림 제형과 비교군으로써 무침가 크림 제형을 각각 사용하였다.

2.7.1. 피시험자의 선정

건강한 성인 20명을 선정하였다. 피시험자의 연령은 34세에서 56세 사이였으며 평균 연령은 42.7세 이었다. 성별은 모두 여성이었다. 피시험자 모두 편안하게 눈을 감은 상태에서 주름을 깊은 주름(deep wrinkle), 잔주름(fine wrinkle), 30 cm 정도 근접하여야 식별이 가능한 얇은 주름(very fine wrinkle)으로 구분하였을 때 잔주름이 중등도(moderate) 이상이었고 깊은 주름이 1~2개 있거나 그보다 더 많았다.

2.7.2. 시험화장품의 도포

플라세보(placebo) 및 Angelica[®] 함유 화장품을 정확히 얼굴 좌우 각각 1/2에 도포하였으며 플라세보 및 Angelica[®] 함유 화장품을 얼굴의 좌 우측 어느 편에 도포할지는 무작위로 할당하였다. 연구자 및 피시험자 모두 어느 제품이 플라세보인지 Angelica[®] 함유 제품인지 알 수 없었다. 피시험자는 시험 화장품을 8주간 매일 하루 2회 세안 후 도포하였다. 시험 화장품은 세면 후 적어도 30 min이 지나 바르게 하였으며 시험 제품 외에 주름 개선 효과 혹은 미백 효과가 있는 다른 화장품의 사용을 중단하게 하였다.

2.7.3. 피부과 전문의에 의한 주름 개선 효과의 육안 판정
카메라를 사용하여 얻은 이미지는 주름이 보다 잘 보이도록 Adobe사의 photoshop 7.0 프로그램을 이용하여 R, G, B 채널로 분리한 후 B 채널만 저장하여 비교하였다. 시험 화장품 도포 전과 도포 후 4주 및 8주의 주름 사진을 사용하여 시험 화장품의 어느 제품이 플라세보이고 Angelica[®] 함유 제품인지 모르는 상태에서 피부과 전문의가 화장품 도포 전과 도포 후 4주 및 8주 주름 개선 효과를 비교하였다. 시험 화장품 도포 전 사진과 도포 4

주 및 8주 이미지를 하나의 PC에 연결된 2대의 모니터에 비추어 주름 개선 효과를 13점 척도로 평가하였다.

2.7.4. 피부 주름 모사판(Replica) 획득

시험 화장품 도포 전, 도포 후 4주 및 8주에 피시험자의 각각 좌 우측 안구 외측 영역(crow's feet)에서 피부 주름 모사판을 얻었다. 비교적 일정한 위치에서 피부 주름 모사판을 얻도록 각각 안구의 외측 골 경계(orbital margin)를 기준으로 하여 모사판을 얻었다. 모사판의 재료는 치과용 압인 재료(impression material)인 Provil[®] novo (Heraeus Kulzer Inc., South Bend, USA)을 사용하였다.

2.7.5. 피부 주름 모사판의 3차원 피부형상 측정기를 이용한 분석

20명의 피시험자에서 얻어진 총 120개의 피부 주름 모사판을 3차원 피부형상측정기를 이용하여 주름 정보를 얻었다. 사용한 장비는 수평해상도가 8 μm 이며, 수직해상도는 1 μm 이었으며 측정 정확도 및 반복성은 모두 3% 이내였고 측정할 수 있는 수직 깊이는 2.5 mm이었다. 8.0 \times 8.0 mm²의 면적을 스캐닝 하였으며, 얻어진 3차원 주름 정보는 Microfocus (UBM, Germany)를 사용하여 분석하였으며, 3차원 profile에서 표면 거칠기 평균값 파라미터인 Sa 값을 계산하여 치료 전 후 주름 개선 효과를 비교하였다.

$$S_a = \iint |Z(x, y)| dx dy$$

[Z(x,y)]: 점 (x,y)에서 이동 평균 곡면으로 부터의 편차

2.7.6. 통계분석

피부과 전문의에 의한 주름 개선 효과의 임상 사진 육안 판정 및 피부 주름 모사판의 표면 거칠기 비교는 단변량 분산 분석(univariate ANOVA)을 이용하였다.

3. 결 과

Compound I pale yellow powder, MS m/z 270.28, m.p. 232°C, ¹H-NMR and ¹³C-NMR data (Table 1)

Compound II yellow powder, MS m/z 232.19, m.p. 223°C, ¹H-NMR and ¹³C-NMR data (Table 1)

Compound III white powder, MS m/z 202.16, m.p. 248°C, ¹H-NMR and ¹³C-NMR data (Table 1)

3.1. Compound I의 구조분석

미황색의 침상 또는 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization (ESI) mass spectrum에서 분자식

Table 1. ¹³C-NMR, ¹H-NMR Data of Prangenidin, 8-Hydroxybergapten, and Xanthotoxol

No	Prangenidin		8-Hydroxybergapten		Xanthotoxol	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	8.01 (d)	146.9 (CH)	8.02 (d)	146.2 (CH)	8.05 (d)	147.5 (CH)
2	7.03 (d)	106.1 (CH)	7.26 (d)	105.4 (CH)	7.00 (d)	107.1 (CH)
3		124.8 (C)		114.7 (C)		126.3 (C)
4		122.0 (C)		141.2 (C)	7.40 (s)	110.2 (CH)
5		113.6 (C)		107.0 (C)		116.9 (C)
6		140.5 (C)		139.6 (C)		139.8 (C)
7		128.5 (C)		126.4 (C)		130.1 (C)
8		146.0 (C)		147.1 (C)		145.4 (C)
1'	8.10 (d)	142.1 (CH)	8.19 (d)	139.9 (CH)	8.01 (d)	145.6 (CH)
2'	6.96 (d)	113.3 (CH)	6.28 (d)	112.3 (CH)	6.37 (d)	113.0 (CH)
3'		169.9 (C)		160.0 (C)		160.1 (C)
1"	9.64 (d)	27.1 (CH ₂)				
2"	6.06 (t)	123.1 (CH)	4.09 (s)	61.0 (CH ₃)		
3"		191.4 (C)				
4"	1.76 (s)	17.9 (CH ₃)				
5"	1.57 (s)	26.4 (CH ₃)				
OH	10.38 (bs)		10.10 (bs)		10.66 (bs)	

이 C₁₆H₁₄O₄ (MW 270.28)임을 확인하였다.

¹H-1D NMR spectrum에서 8.01 ppm과 7.03 ppm의 doublets (*J* = 2.2 Hz)은 benzofuran의 H-1, H-2에 각각 해당하고, 8.10 ppm과 6.36 ppm의 doublets (*J* ~ 10 Hz)은 각각 acrylic acid의 H-1'와 H-2'이다. Butenyl의 H-2"의 peak (5.06 ppm, *J* = 6.6 Hz)은 H-1" (3.64 ppm, *J* = 6.6 Hz)과 correlation하여 각각 triplet과 doublet으로 나타난다. 1.75 ppm과 1.57 ppm의 singlet은 butenyl의 3번 위치의 methyl peak이고 10.38 ppm의 singlet은 hydroxy peak에 해당한다. Butenyl과 acrylic acid의 결합 위치는 HMBC를 이용하여, butenyl의 methylene proton (H-1")과 benzofuran의 4번 carbon, 그리고 acryl의 double bond proton (H-1' and H-2')과 benzofuran의 5번 carbon peak 사이의 2J (C, H) 또는 3J couplings value로 각각 확인하였다. 이상의 결과로 Compound I을 7H-Furo[3,2-g]

benzopyran-7-one,9-hydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)-(8Cl,9Cl) (prangenidin)임을 확인하였다.

3.2. Compound II의 구조분석

황색 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization (ESI) mass spectrum에서 분자식이 C₁₂H₈O₅ (MW 232.19)임을 확인하였다.

¹H-1D NMR spectrum에서 8.02 ppm과 7.26 ppm의 doublets (*J* = 2.2 Hz)은 각각 benzofuran의 H-1, H-2이고, 8.13 ppm과 6.28 ppm의 doublets (*J* = 9.8 Hz)은 각각 acrylic acid의 H-1'와 H-2'이다. 4.09 ppm의 singlet은 methoxy peak이다. Methoxy의 결합 위치는 HMBC를 이용하여, methoxy proton(H-2")과 benzofuran의 4번 carbon peak 사이의 3J(C, H) couplings value로 확인하였다. 이상의 결과로 Compound II을 7H-Furo[3,2-g]ben-

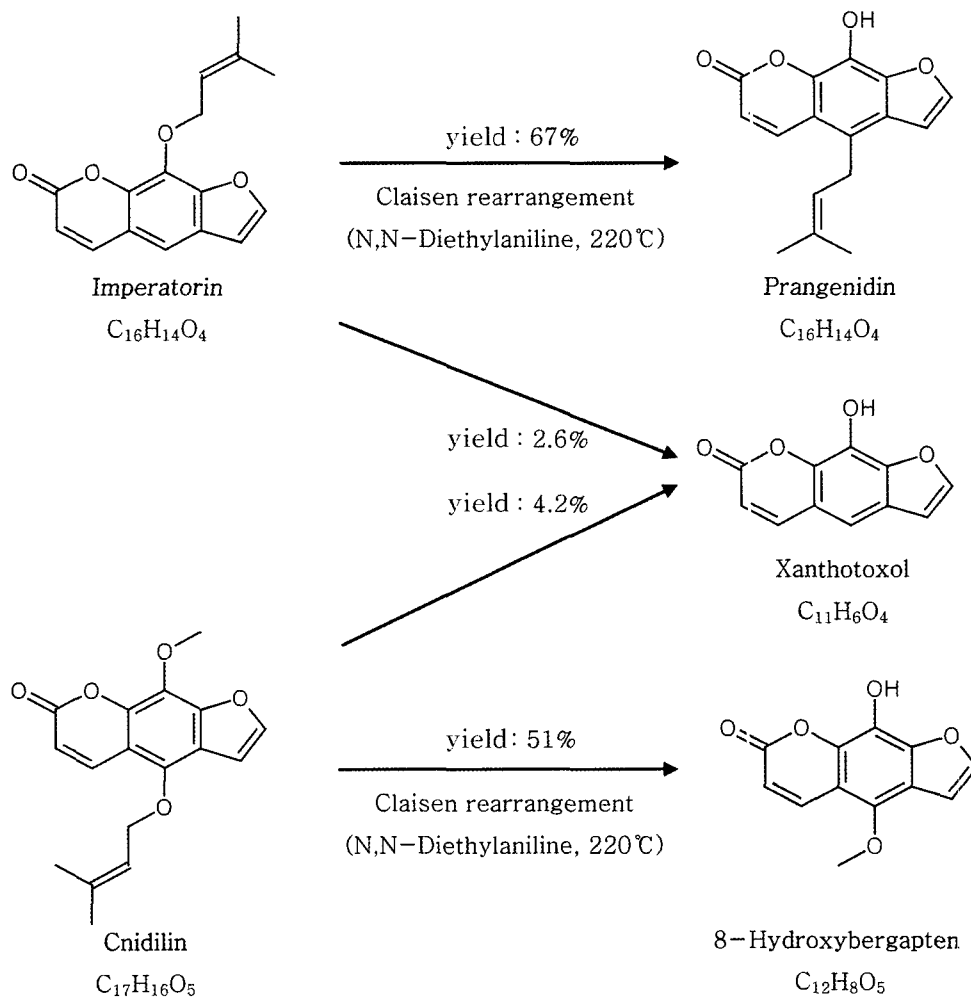


Figure 1. Synthesis change of prangenidin, 8-hydroxybergapten, and xanthotoxol.

zopyran-7-one, 9-hydroxy-4-methoxy-(8CI,9CI) (8-hydroxybergapten)임을 확인하였다.

3.3. Compound III의 구조분석

흰색 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization (ESI) mass spectrum에서 분자식이 $C_{11}H_6O_4$ (MW 202.16)임을 확인하였다.

1H -1D NMR spectrum에서 8.05 ppm과 7.00 ppm의 doublets ($J = 2.2$ Hz)은 각각 benzofuran의 H-1, H-2이고, 8.07 ppm과 6.37 ppm의 doublets ($J = 9.5$ Hz)은 각각 acrylic acid의 H-1'와 H-2'이다. 7.40 ppm의 singlet은 benzofuran의 4번 위치 proton peak이다. 이상의 결과로 Compound III을 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-(8CI,9CI) (xanthotoxol)임을 확인하였다.

위의 유효성분 3종 prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol은 백지의 coumarin계통의 물질로써 항진경,

항박테리아, 항염 효능이 알려져 있다[13,14].

3.4. 유효성분의 제조연구

유효성분인 prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol은 coumarin계통의 물질로써 백지 내 함량이 0.001% 이하로 낮아 상압화가 힘든 물질이다. 이에 백지에 다량 함유되어 있는 coumarin계통의 물질들로부터 유효성분을 제조할 수 있는 방법을 연구한 결과 백지 내 함량이 0.24%인 imperatorin과 0.15%인 cnidilin으로부터 N,N-diethylaniline을 이용한 Claisen rearrangement 반응을 통해 유효성분을 제조하였다(Figure 1).

각각 1 g의 imperatorin 및 cnidilin에 3배의 N,N-diethylaniline을 첨가하고 220°C에서 1 h 반응시킨 결과 imperatorin으로부터 670 mg의 prangenidin과 26 mg의 xanthotoxol을 얻었고, cnidilin으로부터 510 mg의 8-hydroxybergapten과 42 mg의 xanthotoxol을 얻었다.

Table 2. Stimulatory Effects of Compound I,II and III on Collagen Synthesis in Human Fibroblast (PICP Enzyme Immunoassay)

Concentration	Prangenidin	8-Hydroxy bergapten	Xanthotoxol	Ascorbic acid	Retinoic acid
0.5 µg/mL	120% ^{NS}	146%**	120% ^{NS}		
1.0 µg/mL	129%*	146%**	134%*		
2.0 µg/mL	142%**	150%**	151%**		
4.0 µg/mL					102% ^{NS}
10.0 µg/mL					105% ^{NS}
40.0 µg/mL					111% ^{NS}
52.8 µg/mL				150%**	

^{NS}: Not Significant, *: P < 0.05, **: P < 0.01, n = 3

Table 3. Protection Effect on UVB-induced DNA Damage Assessed of COMET Assay

Compound	Concentration (%)	DNA Protection (%)
Angelica®	0.001	32.78
α-Tocopherol	0.1	24.33
EGCG	0.01	30.71

Table 4. Objective Evaluation of Wrinkles

	Placebo	Angelica®	p-value
4 weeks	-0.1±1.02	0.85±0.49	0.00085
8 weeks	0.15±0.59	0.95±0.60	0.00013

이상의 연구결과를 적용하여 백지로부터 유효성분을 제조하였다.

백지 400 kg의 methanol 추출물을 용매분획하여 얻은 chloroform 건조 분획 10 kg에 대해 10배의 silica gel을 이용하여 chloroform, methanol 혼합용액(CHCl₃:MeOH = 100:1)으로 column chromatography를 수행하여 imperatorin, cnidilin 혼합 분획 2.3 kg을 얻었다. 얻은 분획의 imperatorin, cnidilin의 함량은 분획내 약 65%이다. Imperatorin, cnidilin분획을 감압농축하고 3배의 N,N-diethylanilin을 첨가하고 220°C에서 1 h reflux 후 실온으로 냉각하여 반응을 종료시킨다. 반응액으로부터 유효성분을 얻기 위해 chloroform을 가하고, 동량의 3 M 염산용액으로 3회 분획하여 세척한 chloroform 분획을 4°C에서 24 h 냉장방치하여 침전을 제조하고, 여과하여 얻은 침전을 n-hexane으로 세척하여 유효성분인 prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol의 혼합물을 얻었다. 제조한 혼합물의 prangenidin과 8-hydroxybergapten의 비율은 약 3:1이고 이들의 함량은 97% 이상이다. 또한, 2%의 xanthotoxol이 포함되어 있다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 콜라겐 생합성 유효성

Table 5. Changes in Roughness (Sa) of Skin Peplica (%)

	Placebo	Angelica®	Difference	p-value
4주	2.56±21.69	-14.92±20.51	17.48	0.01259
8주	0.18±25.42	-19.24±12.13	19.42	0.00380

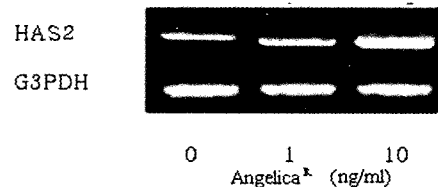


Figure 2. HAS2 (hyaluronic acid synthase 2) mRNA expression in 3T3 mouse fibroblasts.

분 7H-Furo[3,2-g] benzopyran-7-one,9-hydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)-(8Cl,9Cl) (prangenidin), 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-4-methoxy-(8Cl,9Cl) (8-hydroxybergapten) 및 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-(8Cl,9Cl) (xanthotoxol) 3종을 백지 major coumarin 성분인 imperatorin, cnidilin을 Claisen rearrangement 반응을 통해 제조하였으며 수율은 약제에 대해 0.25%로 비교적 높았다.

3.5. 콜라겐합성촉진 효과(Procollagen Type I C-peptide Enzyme Immunoassay)

Prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol의 농도가 각각 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL의 농도에서 positive control로 사용된 0.3 mM ascorbic acid와 비슷한 정도로 콜라겐 합성 촉진 효능을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이들 3종 compound의 human fibroblast에 대한 콜라겐 생합성 촉진 효능은 비타민 C의 20배, 기존에 콜라겐 합성능이 알려진 retinoic acid의 40배 이상의 우수한 효능을 보였다(Table 2). 분리된 화합물들이 어떠한 메커

니즘에 의하여 콜라겐 합성을 촉진시키는데 대해서는 향후 지속적인 연구를 통한 규명작업이 필요하다.

3.6. Hyaluronic Acid Synthase 2 mRNA 발현 증진 효과

Mouse 유래의 섬유아세포 NIH 3T3에 대하여 RT-PCR에 의해 HAS2 유전자 발현 변화를 측정된 결과, 유효성분 3종의 혼합물인 Angelica[®]는 농도 1 ppb, 10 ppb에서 시료를 처리하지 않은 비교군에 비해 HAS2 mRNA 발현증진 효과가 우수한 것으로 나타났다(Figure 2). 특히 Angelica[®]는 1 ppb의 매우 낮은 농도에서도 우수한 효과가 나타남을 확인할 수 있었다.

3.7. 자외선에 의한 DNA 손상방어 효과(COMET Assay)

Angelica[®]는 0.001% 농도에서 positive control로 사용된 0.1% 토코페롤보다 우수한 DNA 보호 효과를 나타내었으며 이는 0.01%의 EGCG와 유사한 효과로서 Angelica[®]는 매우 낮은 농도에서 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 3). 이와 같은 결과를 통해 Angelica[®]는 자외선에 의한 DNA 손상 방지 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

3.8. 항주름 임상연구

임상연구 결과 피부과 전문의에 의한 주름 개선 효과의 육안 판정에서 화장품 도포 후 4주 및 8주에 Angelica[®] 함유 화장품이 플라세보(placebo)에 비해 통계적으로 유의하게 주름 개선 효과가 있었다(p-value < 0.05) (Table 4). 또한 피부 주름 모사판(replica)의 기기 분석 결과 시험 화장품 도포 전에 얻어진 모사판 주름의 평균 표면 거칠기인 Sa를 기준으로 화장품 도포 후 4주 및 8주의 Sa의 % 변화를 계산하였을 때 Angelica[®] 함유 화장품이 플라세보에 비해 통계적으로 유의한 주름 감소 효과를 보여 주었다(p-value < 0.05) (Table 5).

4. 결 론

피부의 주름개선제를 개발하고자 한방에서 피부미용에 사용한 것으로 알려진 120종의 약재들을 대상으로 콜라겐 합성 증가를 확인할 수 있는 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay를 human fibroblast에 대해 실험한 결과, 백지 추출물이 콜라겐 합성 증가 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 이로부터 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)-(8Cl,9Cl)(prangenidin), 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-4-methoxy-(8Cl,9Cl) (8-hydroxybergap-

ten) 및 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one,9-hydroxy-(8Cl,9Cl) (xanthotoxol)이 콜라겐 생성 효능을 나타냄을 확인하였다. 또한 이들 유효성분을 백지로부터 높은 수율로 확보할 수 있는 반응 조건 및 정제방법을 선정하여 백지 약재로부터 0.25%의 수율로 제조할 수 있는 제조법을 확립하였다. 본 연구의 유효성분 prangenidin (77%), 8-hydroxybergapten (21%), xanthotoxol (2%)의 혼합물인 Angelica[®]에 대하여 유효성 연구를 수행하여, DNA 손상 방어 효과, HAS2 합성증진 효과가 우수함을 확인하였으며, 임상연구를 통해 주름 개선효과를 확인하였다.

참 고 문 헌

1. S. P. Jerome, L. Gabrielle, and F. Raul, Identification of collagen fibrils in scleroderma skin, *J. Invest. Dermatol.*, **90**(1), 48 (1998).
2. K. Balin and A. M. Kligman, Aging and skin, Raven press (1989).
3. El-Domyati M, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging, a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**(5), 398 (2002).
4. P. U. Giacomoni and G. Rein, Factors of skin ageing share common mechanisms, *Biogerontology*, **2**(4), 219 (2001).
5. M. Wlaschek, I. Tancheva-Poor, L. Naderi, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, J, Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem Photobiol. B*, **63**(1), 41 (2001)
6. F. Bonte, M. Dumas, C. Chaudagne, and A. Meybeck, Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis, *Planta Med.*, **60**(2), 133 (1994).
7. 중약대사전(中) 상해과학기술 출판사 (1977).
8. 장일무, 동양의 약과학대전 I. 학술편수관 (2003).
9. A. Oikarinen, P. Autio, U. Kiistala, L. Risteli, and J. Risteli, A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin *in vivo*: Demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment, *J. Invest. Dermatol.*, **98**(2), 220 (1992).
10. J. K. Jutley, E. J. Wood, and W. J. Cunliffe, Influence of retinoic acid and TGF- β on dermal fibroblast proliferation and collagen production in

- monolayer cultures and dermal equivalents, *Matrix*, **13**, 235 (1993).
11. N. P. Singh, Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis, *Mutat Res.*, **455**, 111 (2000).
 12. K. Konca, A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gozdz, Z. Koza, and A. Wojcik, A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay, *Mutat Res.*, **534**, 15 (2003).
 13. M. Junichi, I. Takeshi, M. Nakahara, and K. Hiroshi, Cosmetics containing xanthoxol-skin lightening, JP 99-316450 (1999).
 14. Y. I. Khadzhai, G. V. Obolentseva, and A. P. Prokopenko, Relation between structure and spasmodic activity in coumarin and furocoumarin derivatives, *Sci.-Res. Chem.-Pharm. Inst.*, **29**(2), 156 (1966).