

백지의 콜라겐 생성 촉진 물질

진무현* · 정민환¹ · 임영희¹ · 이상화 · 강상진 · 조완구
엘지생활건강 기반 연구소, ¹엘지화학 CRD연구소

Promoting Synthesis of Collagen from *Angelica dahurica* Root

Mu Hyun Jin*, Min-Hwan Jung¹, Young-Hee Lim¹, Sang Hwa Lee, Sangjin Kang, and Wan-Goo Cho

C.I. Center, LG Household & Health Care Daejeon 305-343, Korea
¹Corporate R&D, LG Chem./Research Park(E) Daejeon 305-380, Korea

Abstract – Three coumarin derivatives, which stimulate collagen biosynthesis in human fibroblasts were isolated from *Angelica dahurica* root which has been used in traditional medicine for cold, headache, discharging blood and women's diseases. Three coumarin derivatives were identified as 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)- δ -lactone (prangenidin), 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-methoxy- δ -lactone (8-hydroxybergapten) and 5-benzofuranacrylic acid, 8-hydroxy-psoralen(xanthotoxol) from their spectral data.

Key words – *Angelica dahurica* root; 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)- δ -lactone (prangenidin), 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-methoxy- δ -lactone (8-hydroxybergapten) and 5-benzofuranacrylic acid, 8-hydroxy-psoralen(xanthotoxol); human fibroblast; collagen synthesis

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 치유시)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 생성 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 구릿대(*Angelica dahurica*)의 뿌리를 약재로 사용하며, 한방에서 감기, 두통, 치통등에 사용하며 특히 하혈, 통경과 같은 부인과 질환에 사용되는 약재로서 20여종의 coumarin성분들이 알려져 있다.^{7,8)}

분쇄한 백지의 80% Methanol추출물을 *n*-hexane, chloroform, *n*-buthanol을 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.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용된 백지는 서울 경동시장에

*교신저자(E-mail) : mhjin@lgcare.co.kr
(FAX) : 042-863-207

서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기 - 칼럼크로마토그래피는 Silica gel 60(230 - 400 mesh, Merck)를 사용하였고, 박층크로마토그래피용 precoated plates는 silica gel 60F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄를 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.

세포배양 - 실험에 사용된 human dermal fibroblast는 피부과외원에서 포경수술 후 얻어지는 포피를 이용하여 배양하였다. 1차 배양된 human fibroblast를 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

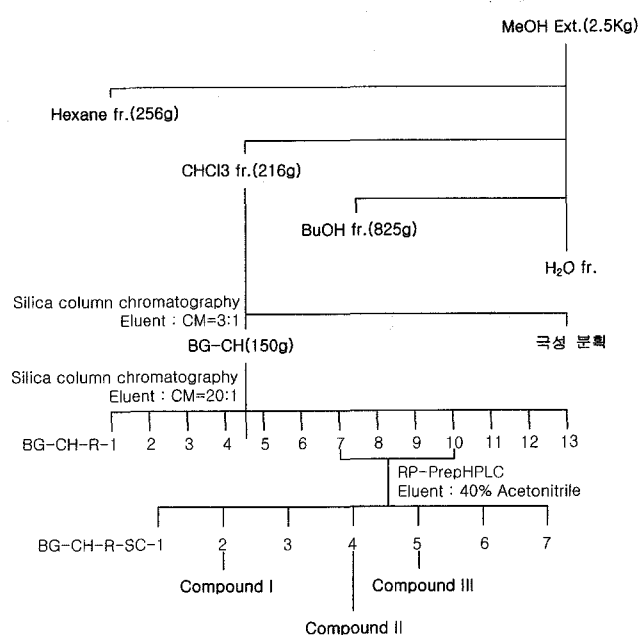
시험물질조제 - 0.2% DMSO를 음성대조군으로, 0.3 mM ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, 시험물질의 농도는 0.3 mM ascorbic acid와 유사한 정도의 콜라겐 합성 촉진 효과를 보이는 농도인 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml의 농도로 각각 조제하였다.

Procollagen type I C-peptide enzyme immunoassay (PICP EIA) - 배양된 human fibroblast를 96-well plate에 10⁴ cells/well로 분주하여 배양한다. 24시간 후 세포들을 serum-free DMEM으로 3회 세척하고, 시료를 농도별로 녹인 serum-free DMEM 용액으로 교환하고 24시간 배양한다. 배양액으로부터 새로 생성된 procollagen type I C-peptide를 enzyme-linked immunosorbent assay kit(TAKARA, Japan)을 이용하여 정량하였다.^{9,10)}

실험은 각 농도에 대하여 triplicate로 수행하였으며 얻어진 data값은 평균과 표준 편차를 구하여 student's *t*-test를 이용, 음성 대조군과의 통계적 유의성을 검증하였다. 한편 대조군에 대한 콜라겐 합성 증가 %는 평균값을 이용하여 표기하였다.

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*-buthanol을 순차적으로 가해 *n*-hexane, chloroform, *n*-buthanol, 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, 용리



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

된 분획을 다시 Chloroform : Methanol(20 : 1)을 사용하는 Silica column chromatography를 수행하여 유효분획 BG-CH-R-7,8,9,10을 얻었다. 유효 분획은 combiHT SB-C18 column(2×25 cm)을 이용하여 Prep HPLC를 용리액 40% Acetonitrile로 수행하여 BG-CH-R-SC-1~7의 성분 7종 및 BG-CH-R-P-1~10의 10개의 분획을 제조하였다. 얻은 성분 및 분획의 효능을 평가하여 유효성분 BG-CH-R-SC-2 (Compound I, 200 mg), BG-CH-R-SC-4(Compound II, 70 mg) 및 BG-CH-R-SC-5(Compound III, 12 mg)를 확인하였다(Scheme 1).

결과 및 고찰

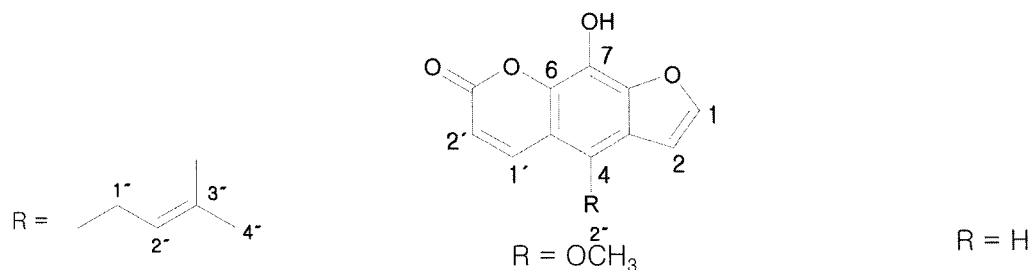
Compound I - pale yellow powder, MS *m/z* 270.28, m.p. 232°C, ¹H-NMR and ¹³C-NMR data, see Table I.

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

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

Compound I의 구조분석 - 미황색의 침상 또는 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization(ESI) mass spectrum에서 분자식이 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

Table I. ^{13}C -NMR, ^1H -NMR data of preangenidin, 8-gydroxybergapten and zanthotoxol

No	Prangenidin		8-Hydroxybergapten		Zanthotoxol	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{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)		125.3(C)
4		122.0(C)		141.2(C)	7.40(s)	110.2(CH)
5		113.6(C)		107.0(C)	8.05(d)	116.3(C)
6		140.5(C)		139.6(C)	8.05(d)	139.8(C)
7		128.5(C)		125.4(C)	8.05(d)	130.1(C)
8		145.0(C)		147.1(C)	8.05(d)	145.4(C)
1'	8.10(d)	142.1(CH)	8.13(d)	139.9(CH)	8.07(d)	145.6(CH)
2'	6.36(d)	113.3(CH)	6.28(d)	112.3(CH)	6.37(d)	113.8(CH)
3'		159.9(C)		160.(C)		160.1(C)
1'	3.64(d)	27.1(CH)				
2'	5.06(d)	123.1(CH)	4.09(s)	61.0(CH ₃)		
3'		131.4(CH)				
4'	1.75(d)	17.9(CH ₃)				
5'	1.57(d)	25.4(CH ₃)				
OH'	10.38(bs)					

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.

Compound II의 구조분석 - 황색 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization(ESI) mass spectrum에서 분자식이 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_5$ (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 ppm

과 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.

Compound III의 구조분석 - 흰색 무정형의 분말이며 high resolution electrospray ionization(ESI) mass spectrum에서 분자식이 $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_4$ (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.

위의 유효성분 3종 Prangenidin, 8-hydroxybergapten, Xanthotoxol은 백지의 coumarin계통의 물질로써 향진경, 향

Table II. Effects of Compound I, II, III on collagen synthesis in human fibroblast (PICP enzyme immunoassay)

	Prange-nidin	8-Hydroxy bergapten	Xanthoto-xol	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

박테리아, 항염 효능이 알려져 있다.^{11,12)}

콜라겐합성촉진 효과(Procollagen type I C-peptide enzyme immunoassay) – Compound I, II, III의 농도가 각각 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml에서 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 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay에 의한 콜라겐 생합성 촉진 효능은 비타민 C의 20배, 기존에 콜라겐 합성능이 알려진 retinoic acid의 40배 이상의 우수한 효능을 보였다(Table 2). 분리된 화합물들이 어떠한 메커니즘에 의하여 콜라겐 합성을 촉진시키는 지에 대해서는 향후 지속적인 연구를 통한 규명작업이 필요하다고 사료된다.

본 연구의 유효성분 3종은 HPLC를 통한 정량분석 결과 백지 내 함량이 0.001% 이하로 함유되어 있어 상업화가 힘든 것으로 확인되었다. 이에 이들 유효성분의 확보를 위한 유효성분의 상업화 연구를 수행하였다.

유효성분의 제조연구 – 유효성분인 prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol은 coumarin계통의 물질로써 백지 내 함량이 작아 상업화가 힘든 물질이다. 이에 백지에 다량 함유되어 있는 coumarin 계통의 물질들로부터 유효성분을 제조할 수 있는 방법을 연구한 결과 백지 내 함량이 0.24%인 imperatorin과 0.15%인 cnidilin으로부터 N,N-diethylanilin을 이용한 Claisen rearrangement 반응을 통해 유효성분을 제조하였다(Fig. 1).

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

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

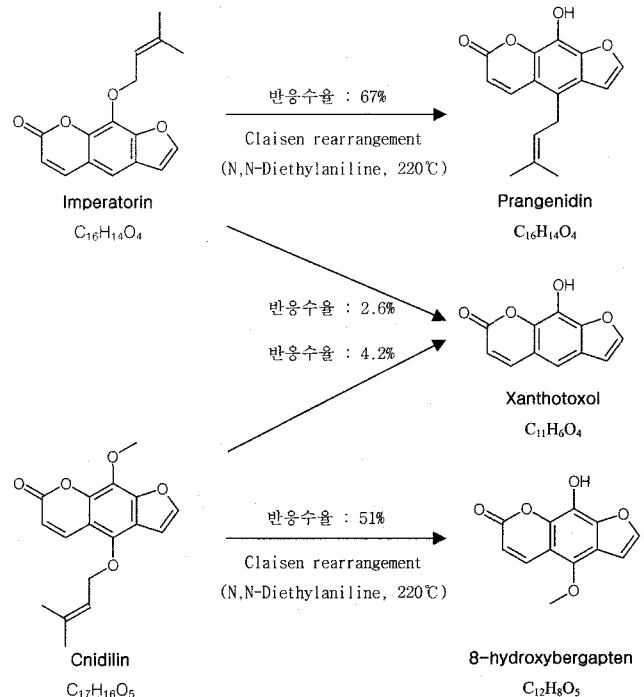


Fig. 1. prangenidin, 8-hydroxybergapten, xanthotoxol의 화학변형.

=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 1시간 reflux시킨 후 실온으로 냉각하여 반응을 종료시킨다. 반응액 으로부터 유효성분을 얻기위해 chloroform을 가하고, 동량의 3 M 염산용액으로 3회 분획하여 세척한 chloroform 분획을 4°C에서 24 시간 냉장방치하여 침전을 제조하고, 여과하여 얻은 침전을 n-hexanae으로 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 포

함되어 있다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 콜라겐 생합성 유효성분 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)- δ -lactone(prangenidin), 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-methoxy- δ -lactone (8-hydroxybergapten) and 5-benzofuranacrylic acid, 8-hydroxypsoralen(xanthotoxol) 3종을 백지 major coumarin 성분인 imperatorin, cnidilin을 claisen rearrangement 반응을 통해 제조하였으며 수율은 약제에 대해 0.25%로 비교적 높았다.

결 론

피부의 주름개선제를 개발하고자 한방에서 피부미용에 사용한 것으로 알려진 120종의 약제들을 대상으로 콜라겐 합성 증가를 확인할 수 있는 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay를 human fibroblast에 대해 실험한 결과, 백지 추출물이 콜라겐 합성 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 이로부터 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-(3-methyl-2-butenyl)- δ -lactone(prangenidin), 5-benzofuranacrylic acid, 6,7-dihydroxy-4-methoxy- δ -lactone (8-hydroxybergapten) and 5-benzofuranacrylic acid, 8-hydroxypsoralen(xanthotoxol)이 콜라겐 생성 효능을 나타냄을 확인하였다. 또한 이들 유효성분을 백지로부터 높은 수율로 확보할 수 있는 반응 조건 및 정제방법을 선정하여 백지 약제로부터 0.25%의 수율로 제조할 수 있는 제조법을 선정하였다.

인용문헌

1. Jerome S. P., Gabrielle L., and Raul F. (1998) Identification of Collagen Fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* **90**(1): 48-54.

2. Balin K. and Kligman A. M. (1989) Aging and Skin, Raven press.
3. El-Domyati M., Attia S., Saleh F., Brown D., Birk D. E., Gasparro F., Ahmad H., and Uitto J. (2002) Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* **11**(5): 398-405.
4. Giacomoni, P. U. and Rein, G. (2001) Factors of skin ageing share common mechanisms. *Biogerontology*, **2**(4): 219-229.
5. Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L. A., Razi-Wolf, Z., Schuller, J., and Scharffetter-Kochanek, K. (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem Photobiol. B.* **63**(1): 41-51.
6. Bonte, F., Dumas, M., Chaudagne, C., and Meybeck, A. (1994) Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.* **60**(2): 133-5.
7. 중약대사전(中) (1977), 상해과학기술 출판사.
8. 장일무 (2003) 동양의약과학대전 I. 학술편수관.
9. Oikarinen, A., Autio, P., Kiistala, U., Risteli, L., and Risteli, J. (1992) 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): 220-225.
10. Jutley, J. K., Wood, E. J., and Cunliffe, W. J. (1993) Influence of retinoic acid and TGF- β on dermal fibroblast proliferation and collagen production in monolayer cultures and dermal equivalents. *Matrix* **13**: 235-242.
11. Junichi M., Takeshi I., Nakahara M., and Hiroshi K. (1999) Cosmetics containing xanthoxol-skin lightening. JP99-316450.
12. Khadzhai Y. I., Obolentseva G. V., and Prokopenko A. P. (1966) Relation between structure and spasmolytic activity in coumarin and furocoumarin derivatives. *Sci.-Res. Chem.-Pharm. Inst.* **29**(2): 156-163.

(2004년 10월 21일 접수)