

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 7일 (07.07.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/108522 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/48 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/014275

(22) 국제출원일: 2015년 12월 24일 (24.12.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2014-0193844 2014년 12월 30일 (30.12.2014) KR
10-2015-0185461 2015년 12월 23일 (23.12.2015) KR

(71) 출원인: 주식회사 휴온스 (HUONS CO., LTD.)
[KR/KR]; 13486 경기도 성남시 분당구 판교로 253, C
동 901호(삼평동, 판교이노밸리), Gyeonggi-do (KR). 한국
한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENT-
AL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성
대로 1672 (전민동), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 연성흠 (YEON, Sung Hum); 18601 경기도 화
성시 향남읍 행정동로 64, 1409동 1303호 (향남시범
살구꽃마을풍림아이원아파트), Gyeonggi-do (KR). 최강

인 (CHOE, Kang-In); 01855 서울시 노원구 성발로 17,
101동 304호 (공릉동, 삼익아파트), Seoul (KR). 박채리
(PARK, Chae Lee); 48053 부산시 해운대구 재반로 64
번길 74-1, 1312호 (재송동, 한보미도아파트), Busan
(KR). 엄기안 (UM, Key An); 16295 경기도 수원시 장
안구 경수대로 976번길 22, 138동 601호 (조원동, 한
일타운), Gyeonggi-do (KR). 채성욱 (CHAE, Sung-
Wook); 35230 대전시 서구 대덕대로 175번길 60, 524
호 (둔산동, 메르하우젠), Daejeon (KR). 임아랑 (IM, A-
Rang); 03055 서울시 종로구 북촌로 7길 15 (가회동),
Seoul (KR).

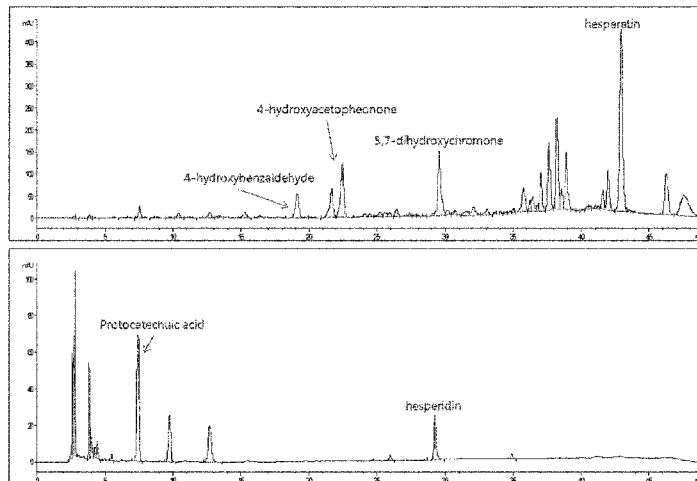
(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON IN-
TELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울
시 서초구 사평대로 108, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: FRACTION OF HONEYBUSH EXTRACT AND COMPOSITION FOR SKIN IMPROVEMENT CONTAINING COMPOUND DERIVED THEREFROM

(54) 발명의 명칭: 허니부쉬 추출물의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물을 함유하는 피부 개선용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for skin improvement, which contains, as an active ingredient, a solvent fraction of a honeybush extract, and prevents skin aging or alleviates skin wrinkles. The fraction or a compound derived from the fraction has an excellent alleviation effect on skin wrinkles resulting from an increase in skin damage caused by UV irradiation, and thus can be favorably used in a pharmaceutical, cosmetic, or health functional food composition for skin improvement.

(57) 요약서: 본 발명은 허니부쉬(honeybush) 추출물의 용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 피부 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 분획물 또는 분획물 유래 화합물이 자외선 조사에 의해 증가된 피부 손상으로부터 발생된 피부 주름에 대한 개선 효과가 우수하므로, 피부 개선용 약학, 화장품, 건강기능식품 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2016/108522 A1



SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 허니부쉬 추출물의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물을 함유하는 피부 개선용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 허니부쉬(honeybush) 추출물의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 피부 개선용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부의 노화는 나이가 들어감에 따라 자연적으로 발생하는 내인성(intrinsic) 자연노화와 자외선 노출에 의한 외인성 광노화 두가지 과정을 통해 일어난다. 자연노화와 광노화 모두 주름이 생성되고 피부 면역세포인 랑거한스 세포(Langerhans' cell)와 진피세포 성분이 줄어드는 등 많은 공통점이 있으나, 광노화의 경우에는 피부 두께가 두꺼워지고 탄력섬유가 증가하는 반면, 자연노화에서는 피부가 얇아지는 다른 특징이 있기도 하다. 최근 들어 자외선 등 노출과 관련한 광노화 예방/치료에 관심이 많아지고 있으며, 이는 연령과 직접적인 관계를 가지고 있는 자연노화와는 다르게 젊은 층부터 노년층에 이르기까지 전세대에 걸친 관심분야이기도 하다.
- [4] 내인성 자연노화의 주원인은 우리 몸의 신진대사과정에서 만들어진 반응성 활성 산소 라디칼에 의하여 우리 몸의 구성 성분에 생기는 손상이 누적되기 때문이다. 반면, 외인성 광노화는 자외선에 의해 생기는 피부 손상의 결과로서, 대표적인 증상 중 하나가 주름(wrinkle)이라고 할 수 있는데, 현대사회와 같이 각종 대기오염의 결과 발생하는 오존층 파괴 때문에 과다한 자외선 노출이 항시적으로 우려가 되고 있는 것이 현실이다. 이렇게 자외선 노출이 지속되면 산화적 스트레스(oxidative stress)가 발생하며 이는 곧 체내의 라디칼(radical)이 증가되고, 진피의 결합조직인 콜라겐(collagen), 엘라스틴 (elastin), 히아루론산(hyaluronic acid) 등을 파괴하여 피부의 일정 부위 침하현상(주름)을 일으킬 수 있는 것으로 설명된다. 또한 이러한 기작들은 세포막의 지질부분을 산화시켜 세포의 파괴 현상을 일으켜 피부염, 여드름 또는 피부암 등의 질병을 유발할 수 있다.
- [5] 한편, 현재 피부주름에 사용되고 있는 가장 우수한 화장품은 레티노이드 제품으로, 효과가 뛰어난 장점이 있지만 제품에 처방될 경우 변색, 변취 현상이 발생하고, 소량 사용시에도 피부 자극이 유발되는 부작용이 있으며, 경시적인 변화에 의한 역가 감소와 이에 따른 효과 감소 등이 큰 문제점으로 인식되고 있어 대체할 수 있는 안전한 제품개발이 시급하다. 즉, 레티노이드와 같은 화학적 합성물질은 기능적인 측면에서는 효과적이나 화학변화(산패)에 의해

피부 자극을 유발할 수도 있기 때문에, 이러한 피부 자극 없이 피부내 활성산소를 제거하여 피부 노화를 예방하기 위하여, 최근에는 부작용이 적으면서 안정성이 우수한 천연 식물성 원료를 이용한 기능성 화장품 또는 건강기능식품의 개발이 활발하다.

- [6] 허니부쉬(*Cyclopia intermedia*, honeybush)는 멜리안투스과(-科 Melianthaceae)에 속하는 상록관목으로, 남아프리카의 케이프지역(Cape region)의 서동쪽 해안의 산동성의 좁은 지역에서만 자라는 식물로, 루이보스와 같이 차로 많이 이용되고 있는 허브이다. '허니부쉬'라는 이름은 그 꽃에서 꿀 향기가 난다 해서 붙여진 이름으로 먹는 방법이나 효능은 루이보스와 비슷하지만 맛은 그보다 훨씬 더 달콤한 맛이 나는 식물이다. 허니부쉬는 탄닌이 적고 카페인이 전혀 없으며, 다양한 무기질(예: 철분, 포타시움, 칼슘, 동, 아연, 마그네슘 등)이 함유되어 있다.
- [7] 허니부쉬의 효능으로는 오래전부터 감기, 불면증, 배탈을 치료할 때 이용되어 왔으며, 그밖에 항당뇨 효과가 보고된 바 있다. 또한, 허니부쉬의 물 추출물 또는 이의 발효액을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선용 조성물에 대한 특허(한국등록특허 10-1295368)가 공개되어 있으나, 추출물을 특정 용매로 더욱 분획한 분획물 또는 이로부터 유래한 화합물에 대한 효과는 알려진 바 없다.
- [8] 즉, 허니부쉬의 물 추출물 또는 이의 발효액의 개시만으로는, 이들 중 어떠한 분획물이 피부 개선 효과가 뛰어난지를 용이하게 유추할 수 없고, 이러한 효과를 입증하기 위해서는 반드시 구체적인 실험 데이터가 구비되어야 한다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에, 본 발명자들은, 부작용 없이 피부 주름 개선 효과가 뛰어난 천연 약물을 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 허니부쉬 추출물의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물이 자외선 보호 효과 및 광노화 유발인자(MMP-1 및 MMP-9) 억제효과가 우수함을 발견하고, 자외선 등에 의한, 피부 노화를 방지하거나 피부 주름을 개선할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [11] 본 발명은, 허니부쉬 추출물의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [12] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 허니부쉬 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물을 제공한다.
- [15] 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출할 수

있다.

[16] 상기 분획물은 허니부쉬 추출물의 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 또는 물 분획물일 수 있다.

[17] 상기 분획물은 허니부쉬 추출물을 흡착제인 Diaion HP-20 레진으로 흡착시킨 후의 용출물일 수 있다.

[18] 상기 용출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 용출할 수 있다.

[19] 상기 분획물의 용량은 10 μ g/ml 내지 200 μ g/ml 일 수 있다.

[20] 본 발명의 일 구현예로, 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시크로몬, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논, 헤스페레틴 및 프로토키테큐익산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 개선용 조성물을 제공한다.

[21] 상기 화합물은 허니부쉬 추출물의 분획물로부터 분리될 수 있다.

[22] 상기 화합물의 용량은 10 μ g/ml 내지 200 μ g/ml 일 수 있다.

[23] 상기 조성물은 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선용일 수 있다.

[24] 상기 조성물은 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 및 MMP-9(matrix metalloproteinase-9) 억제제를 통한 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선용일 수 있다.

[25] 상기 조성물은 약학적 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품 조성물일 수 있다.

[26] 상기 조성물은 분말, 산제, 과립제, 음료, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 주사용액으로 제형화될 수 있다.

[27]

발명의 효과

[28] 본 발명의 허니부쉬 추출물의 특정 분획물은, 자외선 조사에 의해 증가된 피부 주름을 감소시키고, 콜라겐 조직의 파괴 반응을 억제하여 피부 주름 개선효과가 우수한 바, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 피부 개선용 조성물에 유용하게 사용될 수 있으므로, 기존의 천연 피부개선제를 뛰어넘는 새로운 치료제 및 치료법을 제공할 수 있다.

[29]

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 (a) 디클로로메탄 분획물 및 (b) Diaion HP-20 물분획물의 HPLC 패턴분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 2는 화합물 1 내지 화합물 6에 대한 세포독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 본 발명은 허니부쉬 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부 개선용 조성물을 제공한다.
- [34] 본 발명에 있어서, 허니부쉬는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용될 수 있으며, 잎, 종자, 열매, 뿌리 또는 지상부(aerial part)를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [35] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_6 의 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하고, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다.
- [36] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출방법으로는 진탕 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하고, 환류 냉각 추출을 이용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 구체적으로는, 상기 추출 용매를 허니부쉬 분량에 2 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 추출온도는 상온(25°C) 내지 100°C 인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 추출시간은 1 내지 3시간인 것이 바람직하고, 아울러, 추출 회수는 1 내지 3회인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [37] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출물의 유기용매 분획물은 추출액의 농축액에 추가적으로 유기용매를 가하여 분획물을 제조하는 방법으로 기존에 알려진 유기용매를 이용한 추출방법을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 유기용매는 물, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 수포화부탄올, 70~100% 에탄올, 헥산 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하고, 특히 물, 디클로로메탄, 에틸아세테이트인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [38] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출물의 유기용매 분획물은 허니부쉬 추출물을 다공성 흡착제로 흡착시킨 후의 용출물을 이용할 수 있다. 이때 다공성 흡착제에 제한은 없으나 이온교환수지(ion exchange resin)로서 Diaion HP-20 수지(레진)인 것이 바람직하다. Diaion HP 20은 스티렌(Styrene)과 디비닐벤젠(Divinyl benzene, DVB)의 공중합체의 High Porous Type 합성흡착제로서, 다수의 세공(細孔)이 분포하며 비표면적(Surface Area)이 높아 흡착 능력이 우수하고, 세공이 비교적 크기 때문에 큰 분자의 흡착에 적합하며(MW 1,500 이상) 흡착물질의 용출(elution)이 용이하다. 흡착된 물질의 용출은 산, 알칼리, 극성 용매 등이 사용될 수 있으며, 특히 물, C_1 내지 C_6 의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 용출하는 것이 바람직하다.
- [39] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출물의 분획물은 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시크로몬, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논, 헤스페레틴 및 프로토키테큐익산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 포함할 수 있으며, 구체적으로, 상기 허니부쉬 추출물의 분획물 100 중량부에 대하여, 헤스페리딘 0.001 내지 10.0 중량부, 5,7-디하이드록시크로몬 0.01 내지 5.0 중량부, 4-하이드록시벤잘데하이드 0.005 내지 2.0 중량부,

4-하이드록시아세토페논 0.01 내지 4.0 중량부, 헤스페리틴 0.005 내지 5.0 중량부 또는 프로토크아테큐익산 0.0005 내지 5.0 중량부를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[40] 본 발명에 있어서, 허니부쉬 추출물의 분획물의 용량은 $10\mu\text{g/ml}$ 내지 $200\mu\text{g/ml}$ 인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[41] 또한, 본 발명은 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시크로몬, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논, 헤스페레틴 및 프로토크아테큐익산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 개선용 조성물을 제공한다.

[42] 본 발명에 있어서, 화합물은 허니부쉬 추출물의 분획물로부터 분리된 것일 수 있다.

[43] 헤스페리딘(Hesperidin) 및 헤스페리틴(Hesperitin)은, 감귤류 과일에 많이 존재하는 플라보노이드계 색소 중의 플라바논(flavanone) 배당체로서, 지질과산화물 형성을 억제하며 노화지연 등의 항산화 효과, 항염증 효과, 모세혈관 보호 및 항암작용, 콜레스테롤을 낮추는 작용을 한다고 알려져 있다.

[44] 5,7-디하이드록시크로몬(5,7-dihydroxychromone)은, 땅콩 껍질에 많이 존재하는 화합물로서 항진균 효과가 있고, 혈당을 낮춰주는 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 뇌세포를 보호하는 효과가 알려져 있다.

[45] 4-하이드록시벤잘데하이드(4-hydroxybenzaldehyde)는, 천마에 많이 존재하는 페놀릭 화합물로서 항염증, 항혈관신생합성 효과가 있고, 통증억제 작용이 있다고 알려져 있다.

[46] 4-하이드록시아세토페논(4-hydroxyacetophenone)은, 피세올 (piceol)이라고도 하며 *Picea ebies*라는 식물, 즉 노르웨이 가문비나무(Norway spruces)에서 분리된 화합물로서 약효나 기전 등에 대해 보고된 바가 아직 없다.

[47] 프로토크아테큐익산(Protocatechuic acid)은, 녹차나 히비스커스 등에 많이 존재하는 페놀성 화합물로서 항산화 및 항염활성이 보고되어 있으며 간독성에 대한 보호효과와 세포증식 촉진, 세포사멸을 막는 작용이 알려져 있다.

[48] 본 발명에 있어서, 화합물의 용량은 $10\mu\text{g/ml}$ 내지 $200\mu\text{g/ml}$ 인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[49]

[50] 본 발명에서는, MTS assay를 통하여 본 발명의 분획물 및 이로부터 유래한 화합물이 자외선에 의한 피부사멸을 억제하는지 그 효과를 확인하였다. MTS assay는 MTT 분석법과 마찬가지로 세포생존률(독성)을 평가하는 데 널리 알려진 방법으로서, 살아있는 미토콘드리아의 탈수소효소(dehydrogenase)에 의해 노란색의 MTS 테트라졸륨(MTS tetrazolium)이 갈색빛을 띄는 보라색의 포마잔(formazan)으로 전환될 때의 흡광도를 측정하는 방법이다.

[51] 따라서, 세포생존률이 높을수록 주름 개선 등의 효과가 우수하다는 것을 의미하며, 실제 본원 실험예 1에서는 본 발명의 허니부쉬 용매 분획물이 단순한

추출물에 비하여 상기 세포생존률이 월등히 높다는 것을 확인하였다.

- [52] 또한, 본 발명에서는, MMP-1 및 MMP-9 assay를 통하여 본 발명의 분획물이 자외선에 의한 광노화(피부 주름)를 개선하는지 그 효과를 확인하였다.

아연-의존성 엔도프로테아제(endoprotease)계의 하나인 기저막 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase:MMP)는 광범위한 기질을 공유하고, 진피의 세포외기질 단백질 분해의 주된 효소이다. 특히, 자외선은 여러 종류의 MMP를 유도하는데, 이러한 여러 종류의 MMP로는 Type I, III 콜라겐을 분해시키는 MMP-1, 콜라겐 조각들을 분해시키는 MMP-9 등이 있다. 자외선 등에 의해서 자극된 세포, 즉 각질 세포, 진피의 섬유아세포 등에서 과다하게 MMP가 분비되어 세포외기질 단백질의 분해를 유발함으로써 피부 노화를 유발하고 임상적으로는 주름을 만들게 되는 것이다.

- [53] 따라서, MMP-1 및 MMP-9 억제활성이 높을수록 주름 개선 등의 효과가 우수하다는 것을 의미하며, 실제 본원 실험예 2 및 3에서는 본 발명의 허니부쉬 용매 분획물이 단순한 추출물에 비하여 상기 억제활성이 월등히 높다는 것을 확인하였다.

[54]

- [55] 본 발명의 약학 조성물은 기존 치료 활성 성분, 기타 보조제, 약제학적으로 허용가능한 담체 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 및 에탄올 등을 포함한다.

- [56] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 에센스, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

- [57] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 허니부쉬 추출물의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 카라멜, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [58] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다. 또한 본 발명에서 "약제학적 유효량"은 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학

분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[59] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 투여방법에는 제한이 없다. 예를 들면, 경구 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강 내 투여, 경기관지 투여 또는 근육 내 투여 등이 포함된다.

[60]

[61] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[62]

[63] **[비교예] 허니부쉬 추출물의 제조**

[64]

[65] **비교예 1. 허니부쉬 물 추출물**

[66] 허니부쉬 1kg을 정선하여 환류냉각 추출장치에 넣은 후 5~10배량의 정제수를 넣고 80~100°C에서 1~4시간 동안 환류냉각 추출법으로 2회 추출하여 추출액을 얻었다. 이를 여과하고 여액을 70°C 이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물을 얻었다(수득률 21%).

[67]

[68] **비교예 2. 허니부쉬 70% 에탄올 추출물**

[69] 허니부쉬 1kg을 정선하여 환류냉각 추출장치에 넣은 후 5~10배량의 70% 에탄올을 넣고 70~90°C에서 1~4시간 동안 환류냉각 추출법으로 2회 추출하여 추출액을 얻었다. 이를 여과하고 여액을 70°C 이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물을 얻었다(수득률 22%).

[70]

[71] **비교예 3. 허니부쉬 100% 에탄올 추출물**

[72] 허니부쉬 1kg을 정선하여 환류냉각 추출장치에 넣은 후 5~10배량의 100% 에탄올을 넣고 60~90°C에서 1~4시간 동안 환류냉각 추출법으로 2회 추출하여 추출액을 얻었다. 이를 여과하고 여액을 60°C 이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물을 얻었다(수득률 12%).

[73]

[74] **[실시예 1-15] 허니부쉬 추출물의 용매분획물 제조**

[75]

[76] **실시예 1. 물 추출물의 헥산 분획물의 제조**

[77] 상기 비교예 1의 물 추출물 20g을 증류수 800mL에 현탁시키고 동량의 n-헥산을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 헥산분획물을 얻었다(수득률 3.5%).

[78]

[79] **실시예 2. 디클로로메탄 분획물**

[80] 상기 실시예 1의 헥산 분획물을 얻은 후 남은 수층에 800mL의 디클로로메탄을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 디클로로메탄 분획물을 얻었다(수득률 1.7%).

[81]

[82] 실시예 3. 에틸아세테이트 분획물

[83] 상기 실시예 2의 디클로로메탄 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 에틸아세테이트를 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 50°C 이하에서 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다(수득률 2.9%).

[84]

[85] 실시예 4. 수포화 부탄올 분획물

[86] 상기 실시예 3의 에틸아세테이트 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 수포화부탄올을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 70°C 이하에서 감압농축하여 수포화 부탄올 분획물을 얻었다(수득률 13.5%).

[87]

[88] 실시예 5. 물 분획물

[89] 상기 실시예 4의 수포화 부탄올 분획물을 제조한 후 남은 수층을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 68.8%).

[90]

[91] 실시예 6. 70% 에탄올 추출물의 헥산 분획물의 제조

[92] 상기 비교예 2의 70% 에탄올 추출물 20g을 증류수 800mL에 현탁시키고 동량의 n-헥산을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 헥산 분획물을 얻었다(수득률 4.3%).

[93]

[94] 실시예 7. 디클로로메탄 분획물

[95] 상기 실시예 6의 헥산 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 디클로로메탄을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 디클로로메탄 분획물을 얻었다(수득률 3.5%).

[96] 디클로로메탄 분획물의 HPLC 패턴분석 결과는 도 1(a)와 같다.

[97] 구체적으로, 디클로로메탄 분획물 27.14g 을 이용하여 헥산:에틸아세테이트 = 3:1 초기조건으로 용리되는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 진행하였고, 7개의 분획을 얻었다. 분획 4번(2.35g)을 메탄올:디클로로메탄 = 1:1로 용리한 뒤, 원심분리(3000rpm, 3min)하여 상등액을 취해 감압농축하였다. 상등액 부분을 메탄올:디클로로메탄 = 1:1조건으로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 진행하였고, 총 7개의 분획을 얻었다. 이중 분획 5번을 메탄올로 필터링하여 용리되는 부분만을 취해 아세트나이트릴:0.1% TFA물 = 10:90-20:80 조건으로 prep-HPLC(Eurospher 100-10 C18, 250×20mm, 10ml/min)를 하여 화합물 1(8.6mg, 0.032%), 화합물 2(21.21mg, 0.078%), 화합물 3(29.13mg, 0.11%)을 얻었다. 이중 분획 6번은 아세트나이트릴:0.1% TFA물 = 23:77 조건으로 prep-HPLC(Eurospher

100-10 C18, 250×20mm, 10ml/min)를 하여 화합물 4(11.41mg, 0.04%)을 얻었다.

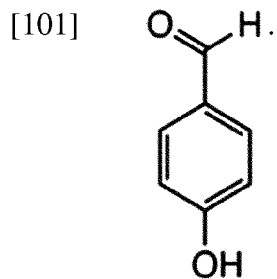
[98] 디클로메탄 분획물로부터 분리된 화합물은 NMR(Bruker model digital AVANCE III, 400MHz)와 UPLC-UV-MS(Waters, ESI, negative mode)를 이용하여 구조 동정하였다.

[99] 화합물1의 분광학적 데이터를 하기에 나타내었다 : $^1\text{H-NMR}$ (MeOH, 400MHz) : δ 6.95-6.88 (2H, m), 7.81-7.74 (2H, m), 9.77 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH, 100MHz) : δ 192.83, 165.18, 133.44, 130.30, 116.85, m/z 121[M+H] $^+$. 위의 분광학적 결과를 토대로 비교했을 때, 화합물 1은 하기 화학식 1로 표시되는

4-하이드록시벤잘데하이드(4-Hydroxybenzaldehyde)임을 확인할 수

있었다(Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre (2012), 4 (6):1817-1820):

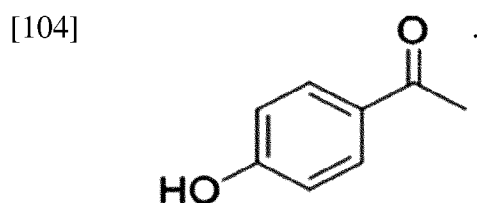
[100] [화학식 1]



[102] 화합물 2의 분광학적 데이터를 하기에 나타내었다. $^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400MHz) : δ 2.51 (1H, s), 6.87-6.80 (2H, m), 7.93-7.83 (2H, m); $^{13}\text{C NMR}$ (MeOD, 400MHz) : δ 199.49, 163.91, 132.12, 130.14, 116.19, 26.27, m/z 135[M+H] $^+$. 위의 분광학적 결과를 토대로 비교했을 때, 화합물 2는 하기 화학식 2로 표시되는

4-하이드록시아세토펜온(4-Hydroxyacetophenone)임을 확인할 수 있었다(Natural Product Sciences (2010) 16(4) : 203-206):

[103] [화학식 2]

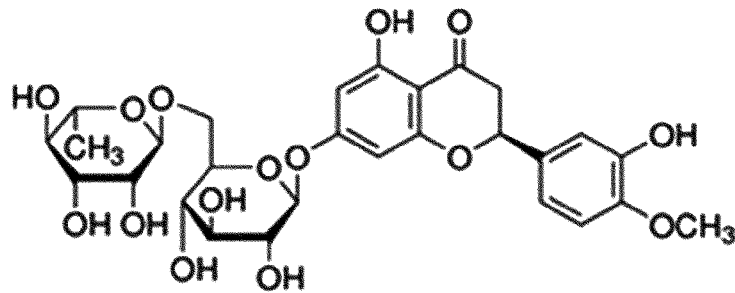


[105] 화합물3의 분광학적 데이터를 하기에 나타내었다. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ 1.88 (1H, dd, $J=17.1, 3.0\text{Hz}$), 2.24 (1H, dd, $J=17.1, 12.7\text{Hz}$), 3.04 (3H, s), 4.48 (1H, dd, $J=12.7, 2.9\text{Hz}$), 5.08 (2H, dd, $J=8.3, 2.1\text{Hz}$), 6.08 (2H, dd, $J=10.9, 2.5\text{Hz}$), 6.13 (1H, t, $J=2.9\text{Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (MeOD, 100MHz) : δ 188.11, 158.84, 155.94, 155.25, 139.82, 138.23, 123.59, 109.51, 105.01, 103.00, 93.86, 87.57, 86.69, 70.77, 46.89, 34.55. 이 화합물의 경우 표준품(Hesperetin, Sigma-Aldrich)을 구매하여 HPLC와 비교했을 때 같은 R_t 값을 나타내었으며, UV스펙트럼 또한 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 분광학적 분석자료와 선행 논문을 비교해봤을 때, 하기 화학식 3으로 표시되는 헤스페레틴(hesperetin)임을 확인할 수 있었다(Journal of

the Science of Food and Agriculture (2015)):

[106] [화학식 3]

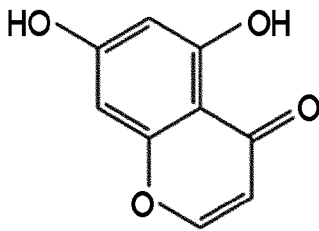
[107]



[108] 화합물 4의 분광학적 데이터를 하기에 나타내었다. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) : δ 6.20 (1H, s), 6.25 (1H, d, $J=5.7\text{Hz}$), 6.37 (1H, d, $J=1.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) : δ 181.33, 164.44, 161.62, 157.83, 157.54, 110.51, 104.91, 99.04, 94.01 m/z 177[M+H]. 위의 분광학적 결과를 토대로 비교했을 때, 화합물 4는 하기 화학식 4로 표시되는 5,7-디하이드록시크로몬(5,7-dihydroxychromone)임을 확인할 수 있었다(Phytochemistry (1994) Vol 36, No. 4, pp. 1043-1045):

[109] [화학식 4]

[110]



[111] 화합물 1 내지 4에 대한 세포독성을 평가해본 결과, 200ug/ml 농도까지 세포독성이 확인되지 않았다(참조 :도 2).

[112]

[113] **실시예 8. 에틸아세테이트 분획물**

[114] 상기 실시예 7의 디클로로메탄 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 에틸아세테이트를 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 50°C 이하에서 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다(수득률 4.9%).

[115]

[116] **실시예 9. 수포화 부탄올 분획물**

[117] 상기 실시예 8의 에틸아세테이트 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 수포화부탄올을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 70°C 이하에서 감압농축하여 수포화 부탄올 분획물을 얻었다(수득율 12.4%).

[118]

[119] **실시예 10. 물 분획물**

[120] 상기 실시예 9의 수포화 부탄올 분획물을 제조한 후 남은 수층을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득율 58.7%).

[121]

[122] 실시예 11. 100% 에탄올 추출물의 헥산 분획물의 제조

[123] 상기 비교예 3의 100% 에탄올 추출물 20g을 증류수 800mL에 현탁시키고 동량의 n-헥산을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 헥산 분획물을 얻었다(수득률 10.4%).

[124]

[125] 실시예 12. 디클로로메탄 분획물

[126] 상기 실시예 11의 헥산 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 디클로로메탄을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 40°C 이하에서 감압농축하여 디클로로메탄 분획물을 얻었다(수득률 9.9%).

[127]

[128] 실시예 13. 에틸아세테이트 분획물

[129] 상기 실시예 12의 디클로로메탄 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 에틸아세테이트를 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 50°C 이하에서 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다(수득률 8.6%).

[130]

[131] 실시예 14. 수포화 부탄올 분획물

[132] 상기 실시예 13의 에틸아세테이트 분획물을 제조한 후 남은 수층에 800mL의 수포화 부탄올을 이용하여 3회 용매분획을 실시하였고, 여기서 얻은 분획물을 70°C 이하에서 감압농축하여 수포화 부탄올 분획물을 얻었다(수득률 25.9%).

[133]

[134] 실시예 15. 물 분획물

[135] 상기 실시예 14의 수포화 부탄올 분획물을 제조한 후 남은 수층을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 48.7%).

[136]

[137] [실시예 16-30] 허니부쉬 추출물의 Diaion HP-20 분획물 제조

[138]

[139] 실시예 16. 물 추출물의 Diaion HP-20 물 분획물 제조

[140] 상기 비교예 1의 물 추출물 21g을 5~20배량의 증류수에 현탁시킨 후, 다공성 흡착제인 Diaion HP-20 resin을 이용하여 분획물을 제조하였다.

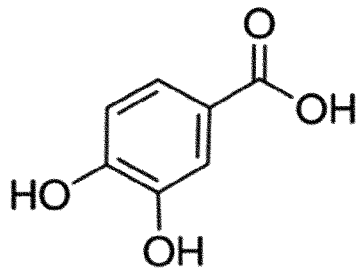
[141] 구체적으로, Diaion HP-20 resin 400~600mL에 대하여 그 부피의 3배량의 메탄올로 활성화시켜, 직경 7cm, 높이 60cm의 컬럼내에 충전한 후 레진이 완전하게 침전할 때까지 메탄올로 흘려주었다. 그 후에 증류수의 양을 순차적으로 늘려 최종 증류수로 치환되도록 한 후, 비교예 1의 물 추출물 현탁액을 로딩하였다.

[142] 이후, 로딩된 컬럼을 레진 부피의 5~10배량의 증류수를 이용하여 용출(elution)시키고, 이 용출액을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 51.7%).

- [143] Diaion HP-20 물분획물의 HPLC 패턴분석 결과는 도 1(b)와 같다.
- [144] 구체적으로, Diaion HP-20 물분획물로부터 화합물을 분리 정제하였다.
- [145] Diaion HP-20 물분획물 약 14g을 물 300ml에 녹인 후 노르말부탄올 240ml을 혼합하여 3회 분획하여 부탄올 층만을 따로 취한 후 감압농축하였다. 이 중 730mg를 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 클로로포름 : 메탄올 : 물 조건으로 10 : 3 : 1에서 순차별로 5 : 4 : 1까지 용리시켜 총 7개의 소분획을 얻었다. 이 중 소분획 3번 108mg을 Sephadex LH20 컬럼크로마토그래피를 이용하여 메탄올 용매 조건으로 실시하였다. 그 결과, 화합물 5(50mg, 0.36%)를 최종 분리하였으며 이 화합물의 분광학적 데이터를 하기에 나타내었다. ^1H NMR(CD_3OD , 600MHz) : δ 6.79 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$), 7.43 (1H, dd, $J=8.2\text{Hz}$, $J=1.4\text{Hz}$), 7.44 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(CD_3OD , 150MHz) : δ 170.63, 151.55, 146.08, 124.06, 123.34, 117.84, 115.88; m/z 153[M-H] $^-$, MS/MS m/z 109 [M-H-CO $_2$] $^-$. 위의 분광학적 결과를 토대로 비교했을 때, 화합물 5는 화학식 5로 표시되는 프로토타테쿠익산(protocatechuic acid)임을 확인할 수 있었다(Chromatographia (2007) Vol 65 (1/2), pp. 1-7):

[146] [화학식 5]

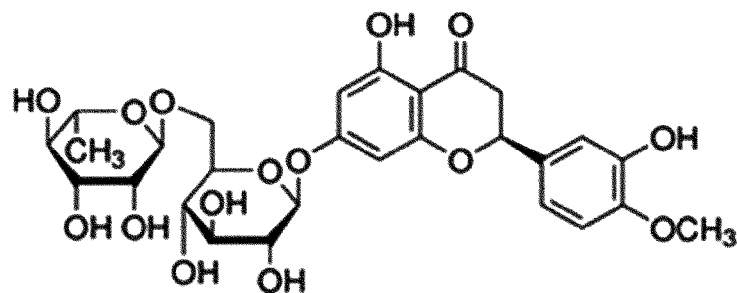
[147]



- [148] 이 중 화학식 6로 표시되는 헤스페리딘(Hesperidin)은 상용화된 표준품이 있기 때문에 별도로 정제하지 않고 표준품을 사용하였다:

[149] [화학식 6]

[150]



- [151] 화합물 5 및 화합물 6에 대한 세포독성을 평가해본 결과 200ug/ml 농도까지 세포 독성이 확인되지 않았다(참조 :도 2).

[152]

[153] 실시예 17. 20% 메탄올 분획물

- [154] 실시예 16의 용출을 완료한 후 20% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 20% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 9.2%).

[155]

[156] 실시예 18. 40% 메탄올 분획물

[157] 실시예 17의 용출을 완료한 후 40% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 40% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 23.4%)

[158]

[159] 실시예 19. 70% 메탄올 분획물

[160] 실시예 18의 용출을 완료한 후 70% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 70% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 13.2%).

[161]

[162] 실시예 20. 100% 메탄올 분획물

[163] 실시예 19의 용출을 완료한 후 100% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 100% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 1.1%)

[164]

[165] 실시예 21. 70% 에탄올 추출물의 Diaion HP-20 물 분획물 제조

[166] 상기 비교예 2의 70% 에탄올 추출물 19g을 5~20배량의 증류수에 현탁시킨 후, 다공성 흡착제인 Diaion HP-20 resin을 이용하여 분획물을 제조하였다.

[167] 구체적으로, Diaion HP-20 resin 400~600mL에 대하여 그 부피의 3배량의 메탄올로 활성화시켜, 직경 7cm, 높이 60cm의 컬럼내에 충전한 후 레진이 완전하게 침전할 때까지 메탄올로 흘려주었다. 그 후에 증류수의 양을 순차적으로 늘려 최종 증류수로 치환되도록 한 후, 비교예 2의 70% 에탄올 추출물 현탁액을 로딩하였다.

[168] 이후, 로딩된 컬럼을 레진 부피의 5~10배량의 증류수를 이용하여 용출(elution)시키고, 이 용출액을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 41.5%)

[169]

[170] 실시예 22. 20% 메탄올 분획물

[171] 실시예 21의 용출을 완료한 후 20% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 20% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 7.8%).

[172]

[173] 실시예 23. 40% 메탄올 분획물

[174] 실시예 22의 용출을 완료한 후 40% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 40% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 18.9%).

[175]

[176] 실시예 24. 70% 메탄올 분획물

[177] 실시예 23의 용출을 완료한 후 70% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 70% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 16.5%).

[178]

[179] 실시예 25. 100% 메탄올 분획물

[180] 실시예 24의 용출을 완료한 후 100% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 4.2%).

[181]

[182] 실시예 26. 100% 에탄올 추출물의 Diaion HP-20 물 분획물 제조

[183] 상기 비교예 3의 100% 에탄올 추출물 11g을 5~20배량의 증류수에 현탁시킨 후, 다공성 흡착제인 Diaion HP-20 resin을 이용하여 분획물을 제조하였다.

[184] 구체적으로, Diaion HP-20 resin 400~600mL에 대하여 그 부피의 3배량의 메탄올로 활성화시켜, 직경 7cm, 높이 60cm의 컬럼내에 충전한 후 레진이 완전하게 침전할 때까지 메탄올로 흘려주었다. 그 후에 증류수의 양을 순차적으로 늘려 최종 증류수로 치환되도록 한 후, 비교예 2의 70% 에탄올 추출물 현탁액을 로딩하였다.

[185] 이후, 로딩된 컬럼을 레진 부피의 5~10배량의 증류수를 이용하여 용출(elution)시키고, 이 용출액을 70°C 이하에서 감압농축하여 물 분획물을 얻었다(수득률 11.5%).

[186]

[187] 실시예 27. 20% 메탄올 분획물

[188] 실시예 26의 용출을 완료한 후 20% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 20% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 7.2%).

[189]

[190] 실시예 28. 40% 메탄올 분획물

[191] 실시예 27의 용출을 완료한 후 40% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 40% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 13.9%).

[192]

[193] 실시예 29. 70% 메탄올 분획물

[194] 실시예 28의 용출을 완료한 후 70% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 70% 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 10.3%).

[195]

[196] 실시예 30. 100% 메탄올 분획물

[197] 실시예 29의 용출을 완료한 후 100% 메탄올을 이용하여 다시 용출을 시킨 후 70°C 이하에서 감압농축하여 메탄올 분획물을 얻었다(수득률 7.4%).

[198]

[199] [실험예]

[200] 실험예 1: UV-B를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물의 보호효과

[201] 허니부쉬 추출물의 용매 분획물이 UV-B를 처리한 세포의 사멸을 억제하는지 확인하기 위하여, 공지의 MTS assay 방법으로 세포 생존율을 평가하였다.

[202] 우선, 각질형성세포인 HaCaT(human keratinocyte) 세포주를 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 37°C에서, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 배양된 세포는 96웰

플레이트에 5×10^4 cells/ well의 세포수로 분주하였다.

[203] 96웰 플레이트에 세포를 분주한 후, 세포가 완전히 붙어 세포의 모양을 갖추도록 24시간 배양 후에, 비교예 1-3의 추출물 및 실시예 1-30의 분획물을 10, 25, 50, 100 ug/ml 농도로 처리하고 다시 24시간 배양하였다.

[204] 이후, 세포를 serum free 배지로 교체한 후 UV-B를 20 mJ/cm^2 로 30분 처리하고 MTS((주) Promega) 시약을 넣은 배지로 바꾸고, 490nm (SpectraMax, Molecular Devices)에서 흡광도를 측정한 후, UV-B를 처리하지 않은 대조군(control)에 대한 상대적인 세포 생존률을 계산하여 그 결과를 하기 표 1 및 2에 나타내었다.

[205] 또한, UV-B를 조사하지 않은 세포주에 실시예 1에서 실시예 30의 허니부쉬 분획물을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 처리했을 때 세포독성이 발생하지 않았다.

[206] [표1]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 용매 분획물의 보호효과(단위: 세포생존율 %)

	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
비교예 1	26	30	52	59
비교예 2	40	43	34	45
비교예 3	38	41	39	35
실시예 1	32	40	51	53
실시예 2	22	32	32	60
실시예 3	40	44	57	86
실시예 4	37	35	38	57
실시예 5	29	33	31	44
실시예 6	32	35	41	39
실시예 7	60	61	72	88
실시예 8	49	54	56	77
실시예 9	41	41	56	63
실시예 10	32	33	39	39
실시예 11	43	46	38	49
실시예 12	69	72	78	65
실시예 13	77	77	75	80
실시예 14	56	56	60	65
실시예 15	42	42	52	47

[207]

[208] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 극성별 용매 분획물의 경우, 70% 에탄올 추출물(비교예 2)과 비교시, 디클로로메탄 분획물인 실시예 7에서 10~100ug/ml의 저농도 및 고농도 모두 우수한 세포보호효과를 나타내었다.

[209] 또한, 100% 에탄올 추출물(비교예 3)과 비교시 에틸아세테이트 분획물인 실시예 13에서도 10~100ug/ml의 저농도 및 고농도 모두 우수한 세포보호효과를 나타내었다.

[210]

[211] [표2]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 Diaion HP-20 분획물의 보호효과(단위: 세포생존율 %)

	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
비교예 1	26	30	52	59
비교예 2	40	43	34	45
비교예 3	38	41	39	35
실시예 16	73	68	65	64
실시예 17	68	63	70	82
실시예 18	22	24	26	35
실시예 19	34	46	64	72
실시예 20	34	40	34	39
실시예 21	33	38	32	29
실시예 22	31	35	33	28
실시예 23	26	24	27	41
실시예 24	61	59	68	92
실시예 25	30	33	35	52
실시예 26	26	35	41	55
실시예 27	37	47	51	52
실시예 28	39	61	52	59
실시예 29	42	48	51	52
실시예 30	40	34	41	47

[212]

[213] 또한, Diaion HP-20 레진을 이용한 분획물의 경우, 비교예 1의 물 추출물과 비교시, 물 용출 분획물인 실시예 16과 20% 메탄올 용출 분획물인 실시예 17이

우수한 세포보호효과를 가짐을 확인하였다.

[214] 또한, 비교예 2의 70% 에탄올 추출물과 비교시, 70% 메탄올 용출 분획물인 실시예 24 역시 우수한 세포보호효과가 있음을 확인하였다.

[215]

[216] **실험예 2: UV-B를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물의 MMP-1 억제활성**

[217] 허니부쉬 추출물의 용매 분획물이 UV-B를 처리한 피부세포의 주름생성을 억제하는지 확인하기 위하여, 공지된 MMP-1 assay 방법으로 MMP-1 활성억제를 평가하였다.

[218] 우선, 각질형성세포인 HaCaT(human keratinocyte) 세포주를 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 37°C에서, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 배양된 세포는 96웰 플레이트에 5×10⁴ cells/ well의 세포수로 분주하였다.

[219] 96웰 플레이트에 세포를 분주한 후, 세포가 완전히 붙어 세포의 모양을 갖추도록 24시간 배양 후에, 비교예 1-3의 추출물 및 실시예 1-30의 분획물을 10, 25, 50, 100 ug/ml 농도로 처리하고 다시 24시간 배양하였다.

[220] 이후, 세포를 serum free 배지로 교체한 후 UV-B를 20mJ/cm² 로 30분 처리하고 배지만 취하여, MMP-1 키트로 어세이를 진행하였다. 모든 반응이 끝난 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MMP-1의 활성억제율을 계산하여 그 결과를 하기 표 3 및 4에 나타내었다.

[221]

[222] [표3]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 용매 분획물의 MMP-1 활성억제율(%)

	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
비교예 1	60	44	56	67
비교예 2	54	57	68	42
비교예 3	54	23	43	26
실시예 1	35	32	45	49
실시예 2	30	39	77	105
실시예 3	76	66	73	80
실시예 4	58	63	86	103
실시예 5	107	119	95	126
실시예 6	5	14	-8	26
실시예 7	43	50	51	55
실시예 8	-76	-31	37	63
실시예 9	-68	-126	-105	-82
실시예 10	-42	16	39	100
실시예 11	-25	8	14	11
실시예 12	-96	12	4	35
실시예 13	-4	27	15	-42
실시예 14	4	-23	-19	19
실시예 15	41	78	119	81

[223]

[224] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 물 추출물인 비교예 1보다 용매 분획물 중 물 분획물인 실시예 5에서 MMP-1의 발현을 강하게 억제한다는 것을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물인 비교예 3과 비교시, 물 분획물인 실시예 15에서 강한 MMP-1 억제활성을 나타냄을 확인하였다.

[225]

[226] [표4]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 Diaion HP-20 분획물의 MMP-1
활성억제율(%)

	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
비교예 1	60	44	56	67
비교예 2	54	57	68	42
비교예 3	54	23	43	26
실시예 16	46	84	100	89
실시예 17	3	51	95	116
실시예 18	47	-15	51	76
실시예 19	91	89	105	95
실시예 20	55	71	11	-18
실시예 21	82	107	106	107
실시예 22	20	23	21	17
실시예 23	1	-6	39	13
실시예 24	46	86	120	126
실시예 25	66	74	104	116
실시예 26	16	28	51	52
실시예 27	41	43	59	54
실시예 28	15	-20	45	36
실시예 29	56	45	75	63
실시예 30	21	63	43	51

[227]

[228] 또한, Diaion HP-20 레진을 이용한 분획물의 경우, 비교예 1의 물 추출물과 비교시, 물 용출 분획물인 실시예 16, 20% 메탄올 용출 분획물인 실시예 17, 및 70% 메탄올 용출 분획물인 실시예 19에서 강한 MMP-1 억제활성이 있음을 확인하였다.

[229] 또한, 비교예 2의 70% 에탄올 추출물과 비교시, 물 용출 분획물인 실시예 21, 70% 메탄올 용출 분획물인 실시예 24, 및 100% 메탄올 용출 분획물인 실시예 25 역시 우수한 MMP-1 억제활성이 있음을 확인하였다.

[230]

[231] 실험예 3: UV-B를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물의 MMP-9 억제활성

[232] 상기 실험예 1의 세포보호효과와 실험예 2의 MMP-1 억제활성 결과를 토대로,

그 효과가 우수한 분획물(실시예 5, 7, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 24, 25)을 선별하여 최종 MMP-9 억제활성을 측정함으로써, 광노화(주름개선) 효과를 확실히 증명하였다.

[233] 우선, 각질형성세포인 HaCaT(human keratinocyte) 세포주를 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 37°C에서, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 배양된 세포는 96웰 플레이트에 5×10⁴ cells/ well의 세포수로 분주하였다.

[234] 96웰 플레이트에 세포를 분주한 후, 세포가 완전히 붙어 세포의 모양을 갖추도록 24시간 배양 후에, 실시예 5, 7, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 24 및 25의 분획물을 10, 50, 100 ug/ml 농도로 처리하고 다시 24시간 배양하였다.

[235] 이후, 세포를 serum free 배지로 교체한 후 UV-B를 20mJ/cm² 로 30분 처리하고 배지만 취하여, MMP-9 키트로 어세이를 진행하였다. 모든 반응이 끝난 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 MMP-9의 활성억제율을 계산하여 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[236]

[237] [표5]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 분획물의 MMP-9 활성억제율(%)

	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
실시예 5	14	122	100
실시예 7	109	90	107
실시예 13	106	106	95
실시예 15	103	89	107
실시예 16	59	91	125
실시예 17	53	100	86
실시예 19	70	124	103
실시예 21	56	67	90
실시예 24	115	84	101
실시예 25	79	87	95

[238]

[239] 실험예 4: UV-B 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물 유래 화합물의 세포보호효과

[240] UV를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물(실시예 7, 실시예 16) 유래 화합물의 세포보호효과를 표 6에 나타내었다.

[241]

[242] [표6]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 유래 화합물의 보호효과(단위: 세포생존율 %)

화합물	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml
헤스페리딘	77	89	92	99
5,7-디하이드록시크로몬	25	28	29	28
4-하이드록시벤잘데하이드	29	28	32	45
4-하이드록시아세토페논	28	33	31	35
헤스페레틴	38	53	59	87
프로토키테큐익산	45	55	56	73

[243]

[244] 상기에 나타난 바와 같이, 실시예 16 유래의 화합물인 헤스페리딘은 저농도 (10 ug/ml)부터 우수한 세포보호효과를 나타내었다. 또한 프로토키테큐익산의 경우 고농도로 처리했을 때 세포보호효과가 있는 것으로 확인되었다.

[245] 실시예 7 유래의 화합물인 헤스페리틴의 경우도 고농도에서 세포보호효과가 있는 것으로 확인되었다.

[246]

[247] 실험예 5: UV-B 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물 유래 화합물의 MMP-1 억제활성

[248] UV를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물 (실시예 7, 실시예 16) 유래 화합물의 MMP-1 억제효과를 표 7에 나타내었다.

[249]

[250] [표7]

자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 유래 화합물의 MMP-1 활성억제율(%)

화합물	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml
헤스페리딘	59	83	88	99
5,7-디하이드록시크로몬	-9	-7	6	30
4-하이드록시벤잘데하이드	21	27	25	39
4-하이드록시아세토페논	86	94	109	114
헤스페레틴	106	107	114	113
프로토키테큐익산	93	98	98	105

[251]

[252] 상기에 나타난 바와 같이, 실시예 16 유래의 화합물인 헤스페리딘은 50 ug/ml 농도부터 강한 MMP-1 억제활성을 나타내었다. 또한 프로토카테큐익산의 경우 저농도인 10 ug/ml 부터 고농도까지 강한 억제활성이 있는 것으로 확인되었다.

[253] 실시예 7 유래의 화합물인 4-하이드록시아세토페논과 헤스페리딘의 경우, 저농도에서 고농도까지 MMP-1 억제활성이 있는 것으로 확인되었다.

[254]

[255] 실험예 6: UV-B 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물 유래 화합물의 MMP-9 억제활성

[256] UV를 처리한 세포에서의 허니부쉬 분획물(실시예 7, 실시예 16) 유래 화합물의 MMP-9 억제효과를 표 8에 나타내었다.

[257]

[258] [표8]
자외선 처리한 피부세포에서의 허니부쉬 유래 화합물의 MMP-9 활성억제율(%)

화합물	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml
헤스페리딘	61	85	77	95
5,7-디하이드록시크로몬	93	103	104	105
4-하이드록시벤잘데하이드	80	99	103	111
4-하이드록시아세토페논	95	97	101	109
헤스페레틴	79	86	103	115
프로토카테큐익산	99	105	114	104

[259]

[260] 상기에 나타난 바와 같이, 실시예 16 유래의 화합물인 헤스페리딘은 50 ug/ml 농도부터 MMP-9에 대하여 80%를 상회하는 억제활성을 나타내었다. 이 외에도 프로토카테큐익산의 경우 저농도인 10 ug/ml 부터 고농도까지 강한 억제활성이 있는 것으로 확인되었다.

[261] 실시예 7 유래의 화합물인 5,7-디하이드록시크로몬, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논과 헤스페리딘의 경우, 저농도에서 고농도까지 MMP-9에 대한 강한 억제활성이 있는 것으로 확인되었다.

[262]

[263] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을

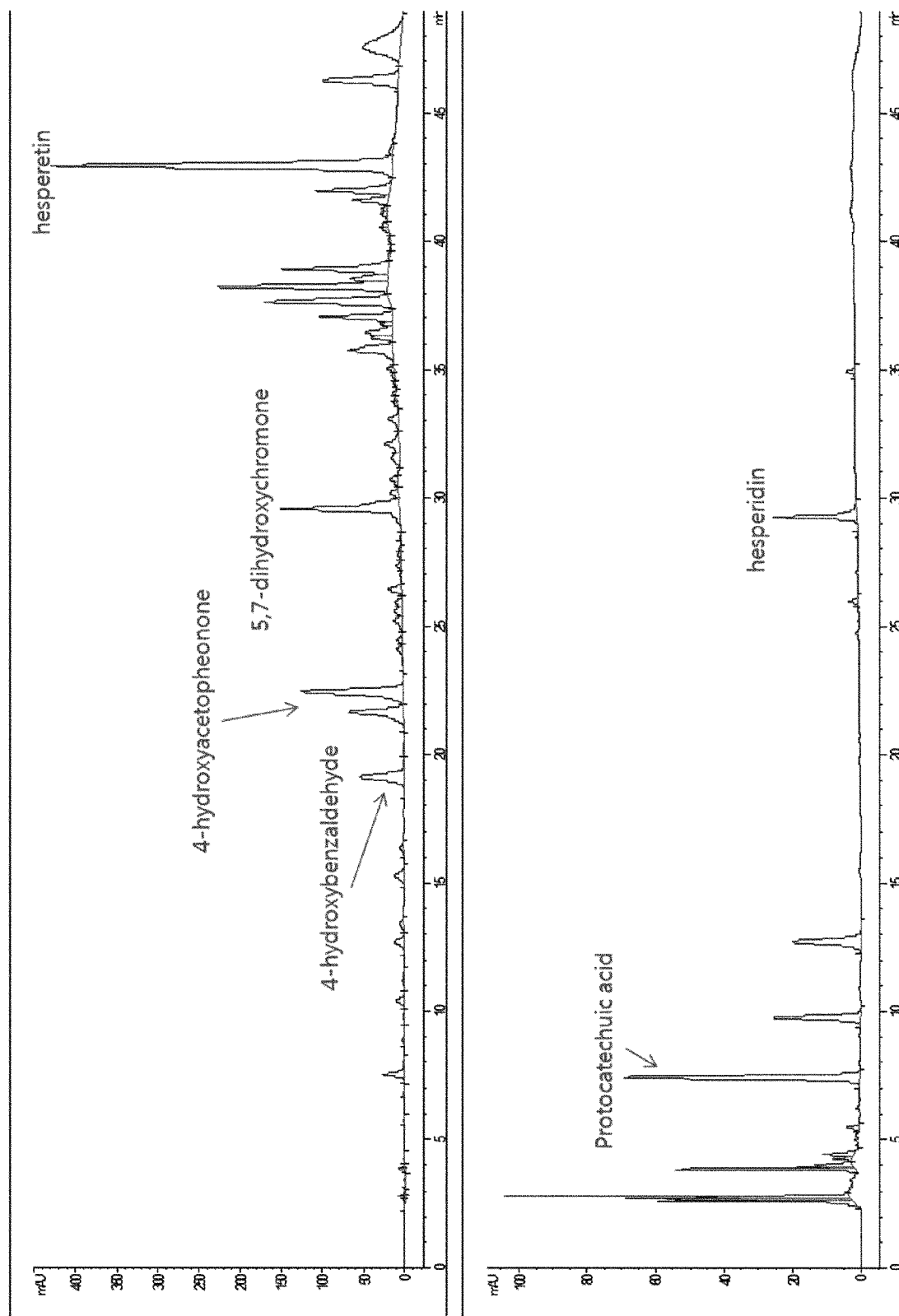
것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[264]

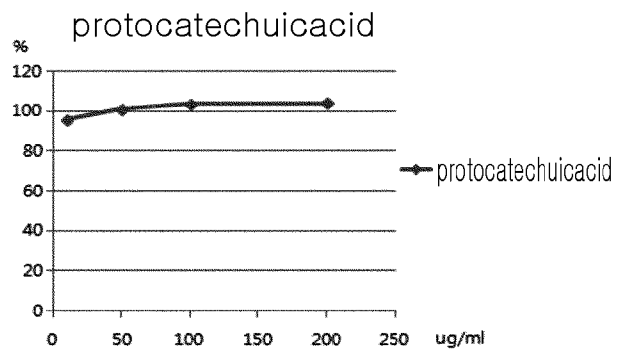
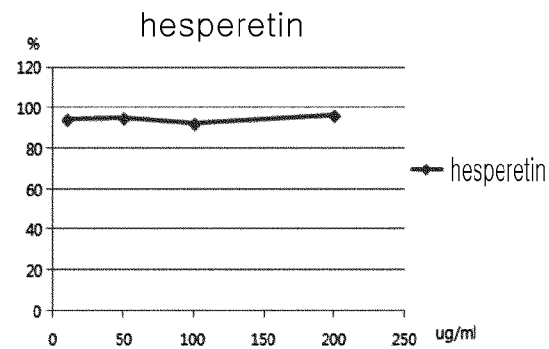
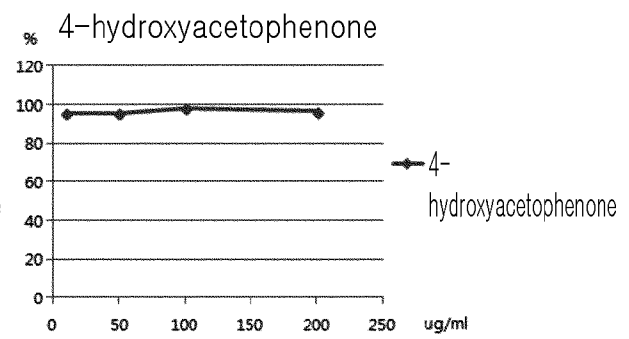
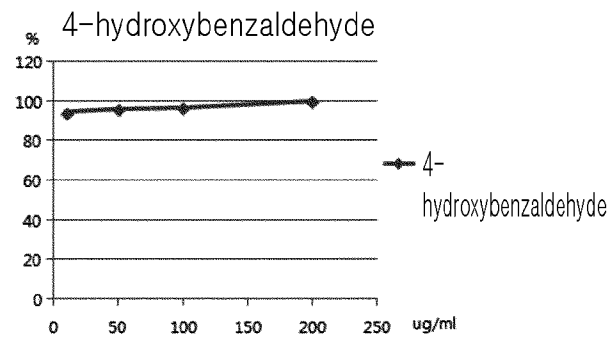
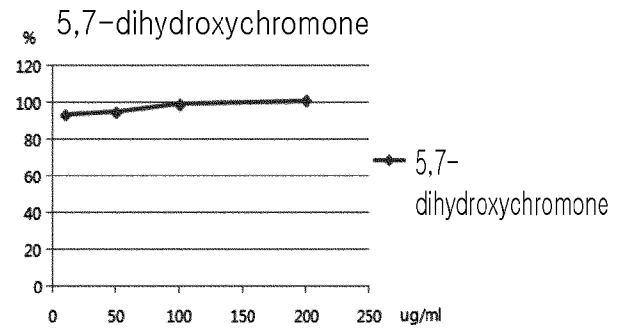
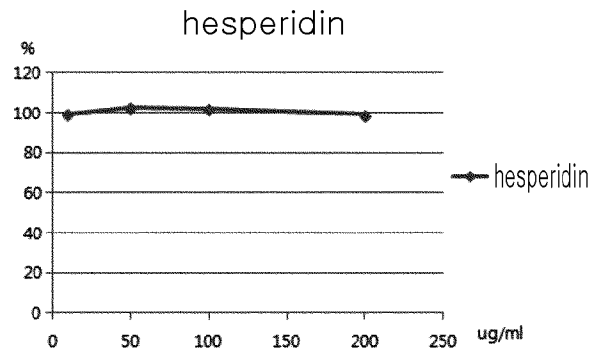
청구범위

- [청구항 1] 허니부쉬 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 분획물은 허니부쉬 추출물의 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 분획물은 허니부쉬 추출물을 흡착제인 Diaion HP-20 레진으로 흡착시킨 후의 용출물인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 용출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 용출한 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 분획물의 용량은 10 μ g/ml 내지 200 μ g/ml인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시크로몬, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토폰, 헤스페레틴 및 프로토카테큐익산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 개선용 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 화합물은 허니부쉬 추출물의 분획물로부터 분리된 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 화합물의 용량은 10 μ g/ml 내지 200 μ g/ml인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선용인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 조성물은 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 및 MMP-9(matrix metalloproteinase-9) 억제제를 통한 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선용인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 12] 제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품 조성물인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 13] 제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 산제, 과립제, 음료, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 주사용액으로 제형화된 것을 특징으로 하는, 조성물.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/014275**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 36/48(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/48; A61K 8/365; A61K 8/49; A61Q 19/00; A61Q 19/08; A61K 31/7048; A61K 8/97; C07D 311/22; A61K 8/60; A23L 33/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: honey bush, extract, fraction, skin anti-wrinkle, hesperidin, 5,7-dihydroxychromone, hesperidin, 4-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxyacetophenone, protocatechuic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0010250 A (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) 28 January 2013 See abstract; paragraphs [0041], [0049]-[0052], [0056]; and claims 1-3, 11, 12.	1-6,10-13
A		7-9
X	KR 10-2014-0121627 A (JEJULOVE CO., LTD.) 16 October 2014 See paragraphs [0016]-[0034] and claims 1-6.	7-13
X	KR 10-2008-0094635 A (BIO SPECTRUM, INC.) 23 October 2008 See abstract; paragraphs [0003], [0021], [0024]; example 2; and claims 1-5.	7-13
X	KR 10-2004-0065864 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 23 July 2004 See abstract and claims 1-4.	7-13
X	IM, A. et al., Anti-Wrinkle Effects of Fermented and Non-Fermented Cyclopia Intermedia in Hairless Mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, October 2014, vol. 14, paper no. 424, inner pages 1-6 See abstract and page 2.	1-6,10-13
A	KR 10-2002-0012681 A (PARK, Jeong Il) 20 February 2002 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 APRIL 2016 (07.04.2016)

Date of mailing of the international search report

07 APRIL 2016 (07.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/014275

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1: claims 1-6 and 10-13 (a part) pertain to a skin improvement composition containing a fraction of a honeybush extract as an active ingredient.

The invention of group 2: claims 7-9 and 10-13 (a part) pertain to a skin improvement composition containing, as active ingredients, one or more compounds selected from the group consisting of hesperidin, 5,7-dihydroxy chromone, and hesperetin.

The invention of group 3: claims 7-9 and 10-13 (a part) pertain to a skin improvement composition containing, as active ingredients, one or more compounds selected from the group consisting of 4-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxyacetophenone and protocatechuic acid.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

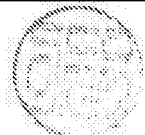
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/014275

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0010250 A	28/01/2013	EP 2735304 A2 KR 10-1295368 B1 US 2014-0127189 A1 WO 2013-012197 A2 WO 2013-012197 A3	28/05/2014 09/08/2013 08/05/2014 24/01/2013 11/04/2013
KR 10-2014-0121627 A	16/10/2014	NONE	
KR 10-2008-0094635 A	23/10/2008	KR 10-0863618 B1 KR 10-0921251 B1	15/10/2008 13/10/2009
KR 10-2004-0065864 A	23/07/2004	NONE	
KR 10-2002-0012681 A	20/02/2002	KR 10-0451813 B1	08/10/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/48(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/48; A61K 8/365; A61K 8/49; A61Q 19/00; A61Q 19/08; A61K 31/7048; A61K 8/97; C07D 311/22; A61K 8/60; A23L 33/10 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 허니부쉬, 추출물, 분획물, 피부 주름 개선, 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시시크로몬, 헤스페레틴, 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논, 프로토타데큐익산																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2013-0010250 A (한국 한의학 연구원) 2013.01.28. 요약; 단락 [0041], [0049]-[0052], [0056]; 및 청구항 1-3, 11, 12 참조.</td> <td>1-6, 10-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>7-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2014-0121627 A ((주)제주사랑농수산) 2014.10.16. 단락 [0016]-[0034] 및 청구항 1-6 참조.</td> <td>7-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2008-0094635 A (바이오스펙트럼 주식회사) 2008.10.23. 요약; 단락 [0003], [0021], [0024]; 실시예 2; 및 청구항 1-5 참조.</td> <td>7-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2004-0065864 A (주식회사 엘지생활건강) 2004.07.23. 요약 및 청구항 1-4 참조.</td> <td>7-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>IM, A. 등, Anti-wrinkle effects of fermented and non-fermented Cyclopia intermedia in hairless mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014년 10월, 14권, 논문 번호 424, 내부 페이지 1-6 요약 및 페이지 2 참조.</td> <td>1-6, 10-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2002-0012681 A (박정일) 2002.02.20. 문헌 전체 참조.</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2013-0010250 A (한국 한의학 연구원) 2013.01.28. 요약; 단락 [0041], [0049]-[0052], [0056]; 및 청구항 1-3, 11, 12 참조.	1-6, 10-13	A		7-9	X	KR 10-2014-0121627 A ((주)제주사랑농수산) 2014.10.16. 단락 [0016]-[0034] 및 청구항 1-6 참조.	7-13	X	KR 10-2008-0094635 A (바이오스펙트럼 주식회사) 2008.10.23. 요약; 단락 [0003], [0021], [0024]; 실시예 2; 및 청구항 1-5 참조.	7-13	X	KR 10-2004-0065864 A (주식회사 엘지생활건강) 2004.07.23. 요약 및 청구항 1-4 참조.	7-13	X	IM, A. 등, Anti-wrinkle effects of fermented and non-fermented Cyclopia intermedia in hairless mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014년 10월, 14권, 논문 번호 424, 내부 페이지 1-6 요약 및 페이지 2 참조.	1-6, 10-13	A	KR 10-2002-0012681 A (박정일) 2002.02.20. 문헌 전체 참조.	1-13
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
X	KR 10-2013-0010250 A (한국 한의학 연구원) 2013.01.28. 요약; 단락 [0041], [0049]-[0052], [0056]; 및 청구항 1-3, 11, 12 참조.	1-6, 10-13																								
A		7-9																								
X	KR 10-2014-0121627 A ((주)제주사랑농수산) 2014.10.16. 단락 [0016]-[0034] 및 청구항 1-6 참조.	7-13																								
X	KR 10-2008-0094635 A (바이오스펙트럼 주식회사) 2008.10.23. 요약; 단락 [0003], [0021], [0024]; 실시예 2; 및 청구항 1-5 참조.	7-13																								
X	KR 10-2004-0065864 A (주식회사 엘지생활건강) 2004.07.23. 요약 및 청구항 1-4 참조.	7-13																								
X	IM, A. 등, Anti-wrinkle effects of fermented and non-fermented Cyclopia intermedia in hairless mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014년 10월, 14권, 논문 번호 424, 내부 페이지 1-6 요약 및 페이지 2 참조.	1-6, 10-13																								
A	KR 10-2002-0012681 A (박정일) 2002.02.20. 문헌 전체 참조.	1-13																								
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																										
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																										
국제조사의 실제 완료일 2016년 04월 07일 (07.04.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 04월 07일 (07.04.2016)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 이동욱 전화번호 +82-42-481-8163 																								

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 제1항 내지 제6항; 및 제10항 내지 제13항(일부)는 허니부쉬 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물에 관한 것입니다.

제2군 발명: 청구항 제7항 내지 제9항 및 제10항 내지 제13항(일부)는 헤스페리딘, 5,7-디하이드록시크로몬 및 헤스페레틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물에 관한 것입니다.

제3군 발명: 청구항 제7항 내지 제9항 및 제10항 내지 제13항(일부)는 4-하이드록시벤잘데하이드, 4-하이드록시아세토페논 및 프로토키아데큐익산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는, 피부 개선용 조성물에 관한 것입니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☒ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2015/014275

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0010250 A	2013/01/28	EP 2735304 A2 KR 10-1295368 B1 US 2014-0127189 A1 WO 2013-012197 A2 WO 2013-012197 A3	2014/05/28 2013/08/09 2014/05/08 2013/01/24 2013/04/11
KR 10-2014-0121627 A	2014/10/16	없음	
KR 10-2008-0094635 A	2008/10/23	KR 10-0863618 B1 KR 10-0921251 B1	2008/10/15 2009/10/13
KR 10-2004-0065864 A	2004/07/23	없음	
KR 10-2002-0012681 A	2002/02/20	KR 10-0451813 B1	2004/10/08