



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0105730
(43) 공개일자 2008년12월04일

(51) Int. Cl.

A61K 8/49 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0053700

(22) 출원일자 2007년06월01일

심사청구일자 2007년06월01일

(71) 출원인

(주)아모레퍼시픽

서울 용산구 한강로2가 181번지 태평양빌딩

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획탑

(72) 발명자

이찬우

경기도 수원시 영통구 영통동 삼익아파트 325동
706호

김한성

경기도 성남시 분당구 서현동 시범단지 삼성아파
트 132동 901호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권오식, 박창희, 김종관

전체 청구항 수 : 총 10 항

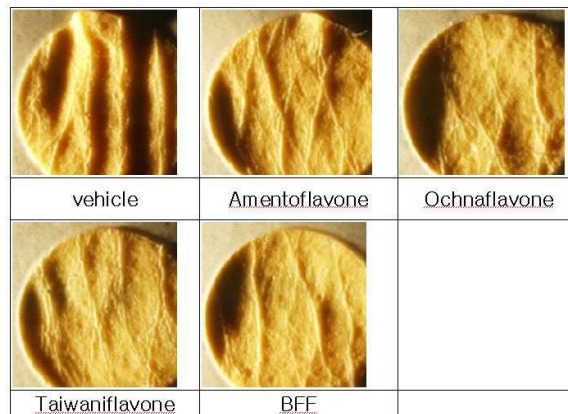
(54) 바이플라보노이드를 함유하는 피부 주름 개선 화장품

(57) 요약

본 발명은 피부 주름 개선용 화장품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 피부 주름 개선 화장품은 바이플라보노이드 유도체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 화장품은 피부에 대한 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 프로콜라겐 생성능, MMP-1 억제 및 UV에 의해 유도되는 주름을 개선시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최현정

경기도 수원시 영통구 영통동 청명마을 409동 100
1호

김덕희

서울 서초구 잠원 웨밀리 아파트 2동 902호

장이섭

경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 703 동보아파트
102동 1104호

우은란

광주광역시 동구 산수동 두암타운아파트 107동
1005호

특허청구의 범위

청구항 1

바이플라보노이드(Biflavonoid)유도체를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 화장품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체는 부처손(*Selaginella tamariscina*), 은행나무(*Ginkgo biloba*), 개비자나무(*Cephalotaxus koreana*), 남천(*Nandina domestica*) 및 인동덩굴(*Lonicera japonica*)의 생약자원으로부터 추출되는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장품 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

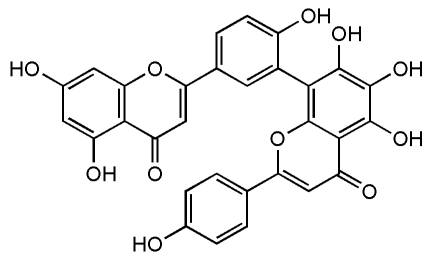
상기 바이플라보노이드 유도체는 상기 생약자원을 메탄올로 추출한 분획을 물과 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장품 조성물.

청구항 4

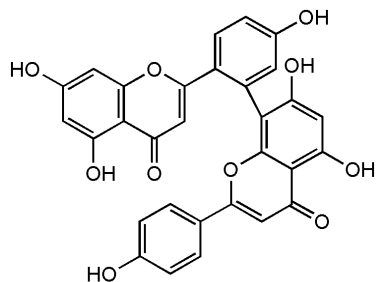
제 3항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체는 하기의 화학식 1 내지 7로 표시되는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장품 조성물.

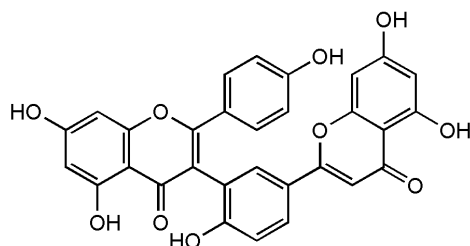
[화학식 1]



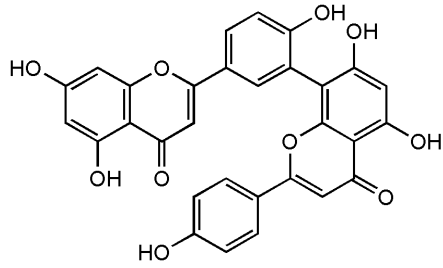
[화학식 2]



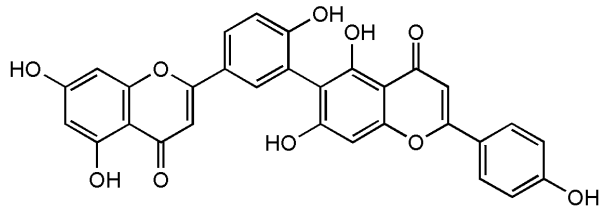
[화학식 3]



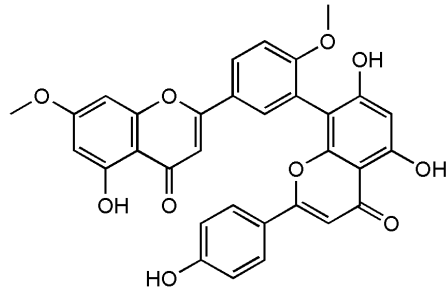
[화학식 4]



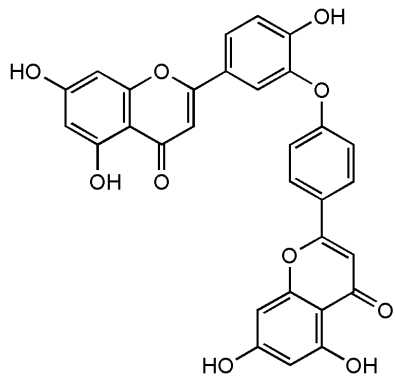
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체는 프로콜라겐의 생합성능을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체는 콜라게네이즈 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체는 UV 에 의해 유도되는 주름을 개선시키는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체의 함량이 전체 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 10중량%인 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

청구항 9

제 4항에 있어서,

상기 바이플라보노이드 유도체의 함량이 전체 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 5 중량%인 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 3항에서 선택되는 어느 한 항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일, 젤 및 보디에센스의 제형을 가짐을 특징으로 하는 피부 주름 개선 화장료 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 피부 주름 개선용 화장료에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 피부 주름 개선 화장료는 바이플라보노이드(Biflavonoid) 유도체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하고, 상기 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 화장료는 피부에 대한 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 프로콜라겐(Procollagen) 생성능, MMP-1 억제 및 자외선(UV)에 의해 유도되는 주름을 개선시키는 효과가 있다.
- <3> 모든 생명체는 나이를 먹으면서 노화되며 피부에서도 마찬가지로 노화의 과정을 거치게 된다. 이러한 노화를 지연하고자 하는 노력은 끊임없이 이어져 왔으며, 이에 따라 노화의 본질이 무엇이며 노화가 왜 일어나는지에 대한 의문은 끊임없이 제기되고 있다.
- <4> 피부의 노화는 그 요인에 따라 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 그 중 하나인 자연적인 노화(Intrinsic aging)는 피부의 구조와 생리적인 기능이 나이를 먹으면서 계속적인 감퇴를 일으키는 것이고, 다른 하나인 외적 노화(Extrinsic aging)는 태양광선 등 누적된 외부 스트레스로 인해 발생하는 것이다. 특히 태양광의 자외선은 잘 알려진 노화 원인의 하나로, 장시간 자외선에 노출된 피부는 각질층이 두꺼워지고 피부의 주요 구성요소인 콜라겐과 엘라스틴이 변성되어 피부의 탄력성을 잃어 주름이 생기게 된다.
- <5> 이처럼 피부의 노화현상은 여러 가지 기능적, 구조적 변화를 수반한다. 우선 노화에 따른 피부의 구조적 변화를 살펴보면, 피부의 구성성분인 표피, 진피 및 피하조직의 두께가 얇아진다. 또한, 피부의 탄력과 인장을 담당하는 진피 조직의 세포외 기질(ECM; extracellular matrix) 성분이 변화하게 된다. ECM은 크게 두 가지 성분으로 구성되어 있다. 하나는 ECM 전체의 약 2~4%를 차지하는 탄력섬유(elastic fiber)이며, 또 다른 하나는 ECM 전체의 약 70~80%를 차지하고 있는 콜라겐이다. 노화가 진행됨에 따라 피부의 탄력성이 크게 감소되는데 이는 콜라겐과 엘라스틴의 감소에 기인한다. 이러한 콜라겐과 엘라스틴은 여러 가지 요인에 의해서 조절되는데, 콜라게나아제(collagenase)와 엘라스테아제(elastase) 같은 기질 메탈로 프로테아제(matrix metallo protease)의 발

현으로 인하여 생성된 콜라겐과 엘라스틴이 분해되어 결과적으로 피부 내의 콜라겐 함량이 줄어드는 현상이 나타나게 된다. 진피에서 콜라겐과 엘라스틴이 줄어들면, 피부의 표피는 거칠어지며 노화현상인 탄력감소가 나타나고 이에 따라 주름이 늘어나게 된다. 이러한 탄력감소의 원인이 되는 콜라겐 및 엘라스틴의 감소를 효과적으로 억제하기 위한 방안에 대한 여러 가지 연구가 진행되어 오고 있다.

- <6> 현재까지 가장 효과적으로 알려져 있는 방안은 레티놀과 레티노익산을 이용한 방안이다. 이러한 레티놀과 레티노익산 등의 레티노이드의 주름개선 또는 탄력개선 효과는 문헌을 통하여 잘 알려져 있다.(Dermatology therapy, 1998, 16, 357~364). 하지만 이들 레티노이드는 주름개선 또는 탄력개선이라는 긍정적인 효과와 더불어, 소량만을 피부에 적용하여도 자극이 나타난다는 단점을 가지며, 또한 불안정성으로 인하여 공기 중에 노출되면 쉽게 산화 변질되기 때문에 사용하는데 많은 제약이 있다. 이에 레티노이드를 안정화하기 위한 연구는 계속해서 진행되고 있으나, 아직까지 피부에 대한 자극 즉 안전성의 문제는 해결되지 않고 있는 실정이다.
- <7> 이를 대신할 수 있는 방안으로 제시되고 있는 것이 콜라겐과 엘라스틴을 분해하는 효소인 콜라게나아제(Collagenase)와 엘라스테아제(elastase) 및 기질 메탈로프로테아제(matrix metallo protease)의 활성을 억제하는 것이며, 이러한 효소들의 활성을 억제할 수 있는 저해제들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 식물성 천연물들은 안전성이 뛰어날 뿐만 아니라 여러 가지 유익한 성분들을 가지고 있어 주름 물질의 좋은 검색 대상이 되며, 따라서 종래부터 우수한 주름 효과는 물론 인체 피부에 대한 안전성을 모두 갖춘 식물성 천연물을 찾기 위한 노력이 계속 되고 있다.
- <8> 최근 들어 콜라겐을 분해할 수 있는 효소인 콜라게나아제 및 기질 메탈로프로테아제의 활성도의 현격한 증가가 피부 주름 생성 요인 중의 하나로 밝혀짐에 따라 이에 대한 피부 주름 개선의 타겟으로서 관심이 높아지고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

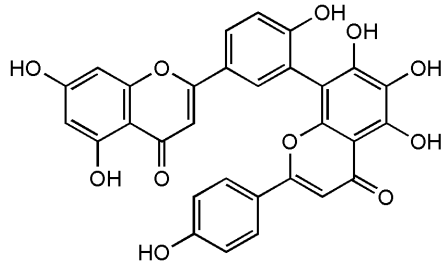
- <9> 본 발명자들은 식물성 천연물들을 대상으로 우수한 주름 개선효과를 나타내면서 동시에 인체 피부에 대한 안전성을 갖춘 새로운 항노화 소재를 연구한 결과, 천연 식물 유래의 바이플라보노이드 유도체가 높은 콜라게네이즈 저해 효과를 보일뿐만 아니라, 자외선에 의해 유도되는 주름의 개선 효과는 물론 인체 피부에 대해 우수한 안전성을 지니고 있음을 발견하였다. 이로부터 바이플라보노이드 유도체가 뛰어난 피부노화 예방 및 치료 효과를 보임을 관찰하였고, 더 나아가 본 발명자들은 피부 주름 개선용 화장품 조성물에서 조성물 총 중량에 대하여 0.001~10중량%, 보다 바람직하게는 0.01~5중량%의 양으로 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 경우 우수한 주름 개선 효과가 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- <10> 따라서, 본 발명의 목적은 유효성분으로서 바이플라보노이드 유도체를 함유하여 부작용 없이 우수한 주름 개선 효과가 있는 피부 주름 개선 및 예방용 소재 및化粧료를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 천연 식물로부터 물 또는 유기용매를 이용하여 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 추출물을 제조하는 단계, 분리 정제를 통하여 바이플라보노이드 유도체를 분리하는 단계, 프로콜라겐 생성능 및 콜라게네이즈 분해 억제를 측정하는 단계, 바이플라보노이드 유도체를 활용하여 자외선에 의해 유도되는 주름 억제를 확인하는 단계로 본 발명을 완성 하였다.
- <12> 또한 상기의 바이플라보노이드 유도체는 플라보노이드(Flavonoid) 두 분자가 C-C 또는 C-O-C 결합으로 다이머(Dimer) 형태를 이루고 있는 구조적 형태를 가지며, 부처손(*Selaginella tamariscina*), 은행나무(*Ginkgo biloba*), 개비자나무(*Cephalotaxus koreana*), 남천(*Nandina domestica*), 인동덩굴(*Lonicera japonica*)등과 같은 생약자원으로부터 추출될 수 있지만, 상기 생약자원이 이에 한정된 것은 아니다.
- <13> 또한 상기 바이플라보노이드 유도체는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 ~ 10 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 ~ 5 중량%로 함유하는 피부 주름 개선 및 예방용化粧료를 제공할 수 있음을 특징으로 한다.
- <14> 이하, 본 발명에 따른 주름 개선 및 예방에 대한 유효성분인 바이플라보노이드를 상세히 설명한다.
- <15> 본 발명에 따른 주름 개선용化粧료의 유효성분인 바이플라보노이드 유도체는 하기 화학식 1~7로 표시되는 화합물이다.

화학식 1

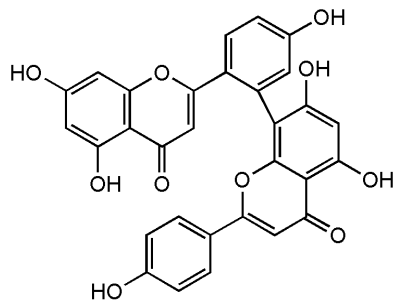
<16> 슈마플라본(Sumaf lavone)



<17>

화학식 2

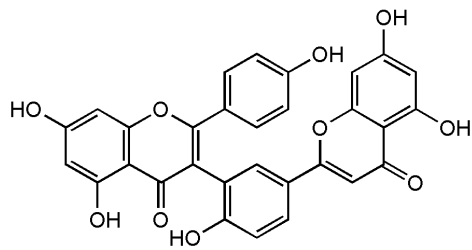
<18> 2', 8"-비아피게닌(2', 8"-biapigenin)



<19>

화학식 3

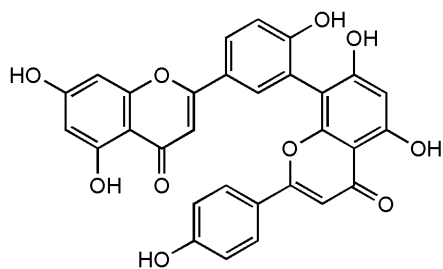
<20> 타이와니플라본(Taiwaniflavone)



<21>

화학식 4

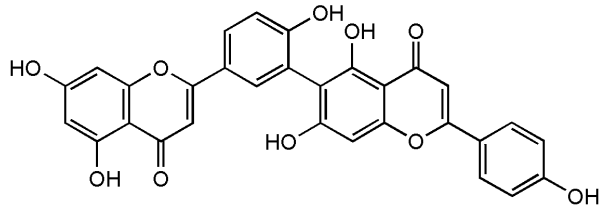
<22> 아멘토플라본(Amentof lavone)



<23>

화학식 5

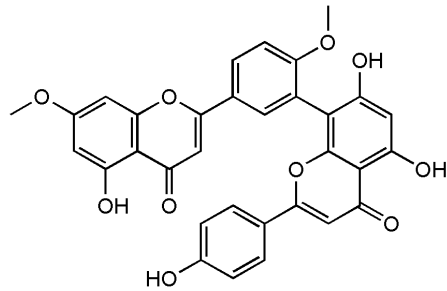
<24> 로버스타플라본(Robustaflavone)



<25>

화학식 6

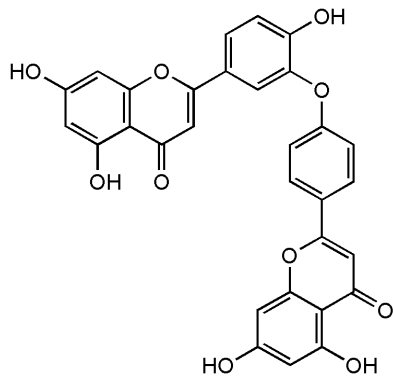
<26> 징게틴(Ginkgetin)



<27>

화학식 7

<28> 오키나플라본(Ochnaflavone)



<29>

<30> 상기의 화학식 1~7으로 표시되는 바이플라보노이드 유도체는 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등과 같은 생약자원식물 또는 식물의 일부로부터 수득될 수 있다. 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 줄기, 뿌리 및 잎을 적절히 탈수한 후 침연(macerated)하거나 단지 탈수하고, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제된다.

<31> 또한, 식물 유래 화학식 1~7으로 표시되는 바이플라보노이드 화합물에 상응하는 합성 화합물 또는 이들의 유도체는 일반적으로 구매 가능한 물질이거나, 공지의 합성 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 구체적으로는 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등의 생약 자원으로부터 추출될 수 있으며, 통상적인 화학 합성법에 의하여 합성하여 제조될 수 있다.

<32> 또한 본 발명의 바람직한 화합물로서 화학식 1~7으로 표시되는 판두라틴 유도체는 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등의 유기용매 추출물이나 압착하여 얻은 오일로부터 분리 정제할 수 있다.

<33> 바이플라보노이드 유도체는 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등과 같은 식물에서 추출할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

<34> 바이플라보노이드는 관다발 식물(관속식물)에 편재되어 자연적으로 발생하는 화합물이며 C-C 또는 C-O-C 결합으로 다이머 형태를 이루고 있다. 이러한 바이플라보노이드가 식물체 내의 산물로서 다이머 형태로 발생하는 이유는 외부자극으로부터 자신을 방어하고자 하는 생체 방호 시스템에 있어서 단분자인 폴리페놀 구조를 가지는 형

태를 더 발전시켜 바이플라보노이드를 발생시킨다고 볼 수 있다. 이런 바이플라보노이드의 구조적인 결합형태에 따라서 대표적으로 C-C 결합인 아멘토플라본(Amentoflavone)과 C-O-C결합인 오키나플라본(Ochnaflavone)으로 구분할 수 있으며 안티튜모(antitumor)(J Nat Prod, 1999, 1668-71.), 안티미크로비알(antimicrobial)(Phytochem, 2005, 1922-26), 안티파라시틱(antiparasitic), 뉴로프로텍티브(Neuroprotective)(Bioorg and Medi chem.Lett, 2005, 3588-91), 안티옥시단트(antioxidant)(Phytochem, 2005, 2238-47), 안티펀갈(antifungal)(Arch Pharm Res, 2006, 746-751) 및 안티인플라메이션(Antiinflammation)(Pharma Res, 2005, 539-546., Arch Biochem and Biophy, 2006, 136-146.) 등은 상기와 같이 다양한 생물학적(biological) 효능에 대한 연구가 보고되고 있다.

<35> 그러나 바이플라보노이드 유도체의 피부 주름 개선작용에 대해서는 지금까지 보고된 바가 없다.

<36> 본 발명의 바이플라보노이드 유도체는 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등 생약자원으로부터 유기용매 추출물이나 압착하여 얻은 오일로부터 분리 정제할 수 있다. 추출 용매로는 정제수(water), 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether) 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 천연 식물 추출물로부터 바이플라보노이드 유도체의 분리 및 정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 그러나 유효성분의 추출 및 분리정제 방법이 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

<37> 한편, 본 발명에 따른 바이플라보노이드 유도체를 피부 주름용 화장료에 사용할 경우 조성물 총 중량에 대하여 0.001~10 중량%인 것이 바람직하다. 이는 0.001중량% 미만에서는 그 효과를 기대할 수 없고, 10 중량%를 초과하면 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있기 때문이다. 또한 보다 효과적인 피부 주름 개선과 제형상 제조의 용이성 향상을 위해서는 조성물 총 중량에 대하여 0.01~5 중량%를 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 그러나 상기의 바이플라보노이드 유도체의 양은 특별히 한정되는 것은 아니다.

<38> 또한, 본 발명의 피부 주름 개선용 화장료는 바이플라보노이드 유도체 외에 본 발명이 목적으로 하는 주름 개선 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 상기 주름 개선 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 주름 개선 성분 등을 함유할 수 있다.

<39> 본 발명의 주름 개선 화장료는 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면 영양화장수, 유연화장수, 영양크림, 마사지크림, 팩, 젤, 수렴화장수, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일 및 보디에센스 등의 화장료로 제형화 될 수 있다.

<40> 바이플라보노이드 유도체를 추출하는 제조방법

<41> 본 발명에 의한 바이플라보노이드 유도체 추출 제조방법으로 슈마플라본(Sumaflavone)의 추출방법을 예를 들어 상세히 설명한다

<42> 바이플라보노이드 유도체는 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등의 천연 식물로부터 분리 할 수 있으나 대표적으로 부처손을 예로 들어 설명한다.

<43> 건조한 부처손을 분쇄한 후 알코올과 혼합하여 용출한 다음, 용매를 제거하고 추출성분을 농축한다. 농축된 추출물과 에틸아세테이트를 혼합하여 에틸아세테이트 용해성 성분을 추출한다. 상기 추출과정은 3회 이상 반복하여 실시하는 것이 바람직하다. 상기 추출 과정을 통하여 얻어진 에틸아세테이트 용해성 추출성분은 바이플라보노이드 유도체가 포함되어 있는 상태로 단일성분이 아닌 상태임에도 불구하고, 콜라게네이드 저해 효능을 나타낸다.

<44> 다음으로, 에틸아세테이트를 제거하여 에틸아세테이트 용해성 성분을 농축한 다음, 각 성분의 극성 차이에 따라 각 성분별로 분리한다. 예를 들어 클로로포름, 메탄올, 물을 각각 10 : 1 : 0.5(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 이용하여 열개의 분획물로 분리하고, 최종적으로 컬럼크로마토그래피를 이용하여 순수한 단일 주름 억제 활성 물질을 분리 할 수 있다.

<45> 상기의 추출 및 분리과정을 통하여 얻은 주름 개선 활성 성분은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아멘토플라본이다.

<46> 또한 부처손, 은행나무, 개비자나무, 남천 및 인동덩굴등으로부터 바이플라보노이드 유도체인 아멘토플라본

(Amentoflavone), 2',8"-비아피게닌 (2',8"-biapigenin), 타이와니플라본(Taiwaniflavone), 로버스타플라본(Robustaflavone), 깁게틴(Ginkgetin), 오키나플라본(Ochnaflavone) 추출 방법도 이와 유사하다.

<47> 이하, 실시예 및 시험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다.

<48> [실시예 1] 슈마플라본 추출예

<49> 먼저, 건조한 부처손 1.8 kg을 잘게 썰어 메탄올로 80℃에서 4시간씩3회 추출하였다. 그런 다음 상기 메탄올 추출물을 감압 농축하고 이 농축물 78.7g을 물에 녹인 후, 메틸렌 클로라이드를 추출용매로 선택하여 혼합한 후에 3회 추출하였다. 이를 수집하여 메틸렌 클로라이드 가용분획(21.7g)으로 하고 남은 잔사를 다시 에틸 아세테이트 또는 부탄올을 추출용매로 3회 추출하여 이들을 모아 각각 에틸 아세테이트(6.8g), 부탄올 가용분획(7.8g)으로 하였다. 그리고 남은 잔사를 물분획(16.2g)으로 얻었다.

<50> 상기 에틸 아세테이트 가용 분획물 6.8g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이 때 사용한 컬럼 용출액은 클로르포름, 메탄올 및 물의 혼합비율이 각각 10:1:0.1(v/v)의 부피 비율로 만든 혼합용매를 사용하였고 점진적으로 메탄올의 비율을 높여 혼합용매의 극성을 높이는 방법으로 컬럼크로마토그래피를 실시하여 여섯 개의 소분획(E1-E6)으로 나누었다. 여섯 개의 소분획 중에서, 세번째(E3) 소분획을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (클로르포름:메탄올:물=8:1 :0.1), RP-18 컬럼 크로마토그래피 (메탄올:물=2:1, 머크사 Lichroprep RP-18, 40-63 μm, L610400138), 세파텍스 LH-20 컬럼 크로마토그래피 (메탄올:물=4:1, Lipophilic Sephadex LH 20, 25-100 μm, 시그마사, Lot 81k1092)를 실시하여 화합물 1 (Sumaflavone)을 수득하였다.

<51> 아멘토플라본, 2',8"-비아피게닌, 타이와니플라본, 로버스타플라본, 깁게틴, 오키나플라본의 분리 과정도 이에 준한다.

<52> [실시예 2] 판두라틴 에이 화합물의 구조결정

<53> 실시예 1에서 분리된 단일물질의 구조결정을 위하여 ¹H-NMR 스펙트럼과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 각각 500MHz 와 125MHz(용매: DMSO)에서 측정한 결과는 하기와 같다.

<54> 이상의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR에 대한 결과와 기준에 발표된 연구보고를 비교 분석하여 동정하였고 그 참고문헌은 하기와 같다.

<55> Lin, L.-C., Kuo, Y.-C., and Chou, C.-J. (2000) Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. J. Nat. Prod., 63, 627-630.

<56> Markham, K.R., Sheppard, C., and Geiger, H. (1987) ¹³C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. *Phytochemistry*, 26, 3335-3337.

<57> Chen, S.-C., Liu, H.-K., and Kuo, Y.-H. (2004) Two new compounds from the leaves of *Calocedrus microlepis* var. *formosana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 762-763. Chari, V. M., Ilyas, M., Wagner, H., Neszmelyi, A., Chen, F.-C., Chen,

<58> L.-K., Lin, Y.-C., and Lin, Y.-M. (1977) ¹³C-NMR spectroscopy of biflavonoids. *Phytochemistry*, 16, 1273-1278.

<59> 또한 2',8"-비아피게닌, 타이와니플라본, 로버스타플라본, 아멘토플라본, 깁게틴, 오키나플라본도 동일한 방법으로 구조 결정을 하였고 각각 아래에 나타내었다.

<60> 화합물 1(슈마플라본)

<61> ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.25 (1H, s, H-3), 6.12 (2H, s, H-6, H-8), 8.23 (1H, s, H-2'), 7.08 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5'), 7.86 (1H, d, J=8.5 Hz, H-6'), 6.58 (1H, s, H-3"), 7.63(2H, d, J=8.0 Hz, H-2'''', H-6'''), 6.60 (2H, d, J=8.0 Hz, H-3''', H-5''').

<62> ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 162.34(C-2), 103.53(C-3), 183.70(C-4), 163.09(C-5), 100.94(C-6), 163.09(C-7), 95.74(C-8), 159.56(C-9), 104.75(C-10), 121.75(C-1'), 132.90(C-2'), 124.76(C-3'), 166.54(C-4'), 120.71(C-5'), 127.81(C-6'), 162.76(C-2"), 103.17(C-3"), 183.97(C-4"), 163.73(C-5", C-6", C-7"),

108.65(C-8"), 156.73(C-9"), 104.10(C-10"), 123.28(C-1'''), 129.44(C-2'''), 116.96(C-3'''), 165.58(C-4'''), 116.96(C-5'''), 129.44(C-6''').

<63> 화합물 2(2',8"-비아피게닌)

<64> $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.51 (1H, s, H-3), 6.13 (1H, s, H-6), 6.39 (1H, s, H-8), 7.92 (1H, s, H-3'), 7.04 (1H, d, J=7.0 Hz, H-5'), 7.76 (1H, d, J=7.0 Hz, H-6'), 6.51 (1H, s, H-3"), 6.32 (1H, s, H-6"), 7.44 (2H, d, J=8.0 Hz, H-2''', H-6'''), 6.68 (2H, d, J=8.0 Hz, H-3''', H-5''').

<65> $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 166.22(C-2), 103.43(C-3), 184.81(C-4), 163.24(C-5), 100.32(C-6), 166.02(C-7), 95.30(C-8), 159.38(C-9), 105.49^{*}(C-10), 121.60(C-1'), 121.60(C-2'), 132.91(C-3'), 161.00(C-4'), 117.42(C-5'), 129.05(C-6'), 162.57(C-2"), 104.07(C-3"), 184.23(C-4"), 163.59(C-5"), 100.11(C-6"), 163.59(C-7"), 105.32(C-8"), 156.53(C-9"), 105.39^{*}(C-10"), 123.29(C-1'''), 129.41(C-2'''), 116.94(C-3'''), 162.57(C-4'''), 116.94(C-5'''), 129.41(C-6''').

<66> 화합물 3(타이와니플라본)

<67> $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.53 (1H, s, H-3), 6.08 (1H, s, H-6), 7.64 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.57-6.59 (3H, s, H-3', H-5', H-3"), 6.53 (1H, s, H-6"), 6.08 (1H, s, H-8"), 8.26 (1H, br d, J=2.0 Hz, H-2"), 7.08 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5'''), 7.86 (1H, br dd, J=8.5, 2.0 Hz, H-6''').

<68> $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 166.05^a(C-2), 109.07(C-3), 183.89^b(C-4), 165.63^a(C-5), 102.93(C-6), 163.71^a(C-7), 96.72(C-8), 159.84^c(C-9), 103.84(C-10), 122.84(C-1'), 129.44(C-2'), 117.22(C-3'), 163.47^a(C-4'), 117.22(C-5'), 129.44(C-6'), 165.63^a(C-2"), 103.23(C-3"), 189.29^b(C-4"), 162.83^a(C-5"), 102.93(C-6"), 162.23^a(C-7"), 96.72(C-8"), 159.80^c(C-9"), 103.65(C-10"), 121.87(C-1'''), 132.76(C-2'''), 125.14(C-3'''), 156.71(C-4'''), 121.02(C-5'''), 127.50(C-6''').

<69> 화합물 4 (아멘토플라본)

<70> $^1\text{H-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 7.03 (1H, s, H-3), 6.84 (1H, s, H-6), 6.79 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 8.54 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.40 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 7.87 (1H, d, J=7.0 Hz, H-6'), 6.92 (1H, s, H-3"), 6.71 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6"), 7.89 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2''', H-6'''), 7.14 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3''', H-5''').

<71> $^{13}\text{C-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 165.01(C-2), 104.44(C-3), 183.41(C-4), 163.43(C-5), 100.34(C-6), 164.95(C-7), 95.19(C-8), 158.85(C-9), 105.38(C-10), 122.08(C-1'), 128.66(C-2'), 122.83(C-3'), 161.66(C-4'), 117.60(C-5'), 132.92(C-6'), 166.15(C-2"), 103.92(C-3"), 183.06(C-4"), 162.77(C-5"), 100.14(C-6"), 164.06(C-7"), 105.61(C-8"), 156.19(C-9"), 105.27(C-10"), 122.76(C-1'''), 129.16(C-2'''), 117.18(C-3'''), 162.98(C-4'''), 117.18(C-5'''), 129.16(C-6''').

<72> 화합물 5 (로버스타플라본)

<73> $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6 , 500 MHz) δ 6.81 (1H, s, H-3), 6.48 (2H, br d, J=2.0 Hz, H-6, H-8), 7.82 (1H, br s, H-2'), 7.02 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5'), 7.90 (1H, dd, J=8.5, 2.5 Hz, H-6'), 6.77 (1H, s, H-3"), 6.60 (1H, s, H-8"), 7.96 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2''', H-6'''), 6.95 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3''', H-5''').

<74> $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-D_6 , 125 MHz) δ 164.11^a(C-2), 102.81^b(C-3), 181.82^c(C-4), 159.09(C-5), 98.82(C-6), 163.54(C-7), 94.04^d(C-8), 157.37(C-9), 103.71(C-10), 121.28(C-1'), 127.41(C-2'), 120.54(C-3'), 161.47^e(C-4'), 116.42(C-5'), 130.92(C-6'), 164.01^a(C-2"), 102.75^b(C-3"), 181.73^c(C-4"), 161.17^e(C-5"), 103.29(C-6"), 163.54(C-7"), 93.73^d(C-8"), 156.42(C-9"), 103.71(C-10"), 121.21(C-1'''), 128.51(C-2'''),

116.02(C-3'''), 161.47^c(C-4'''), 116.02(C-5'''), 128.51(C-6''').

<75> 화합물 6 (강게틴)

<76> ¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz) δ 6.88 (1H, s, H-3), 6.36 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6), 6.79 (1H, s, H-8), 8.09 (1H, d, J=2.1 Hz, H-2'), 7.36 (1H, d, J=8.6 Hz, H-5'), 8.22 (1H, d, J=8.7 Hz, H-6'), 6.99 (1H, s, H-3''), 6.38(1H, s, H-6''), 7.49 (2H, d, J=8.8 Hz, H-2''', H-6'''), 6.78 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3''', H-5'''). 3.79(s, 3H, OCH₃), 3.88(s, 3H, OCH₃)

<77> ¹³C-NMR (DMSO-D₆, 125 MHz) δ 163.01(C-2), 103.7(C-3), 181.91(C-4), 161.09(C-5), 98.74(C-6), 165.22(C-7), 92.69(C-8), 157.42(C-9), 104.43(C-10), 122.38(C-1'), 128.24(C-2'), 121.83(C-3'), 160.66(C-4'), 117.60(C-5'), 130.92(C-6'), 163.15(C-2''), 102.92(C-3''), 181.06(C-4''), 160.07(C-5''), 98.84(C-6''), 162.06(C-7''), 103.61(C-8''), 154.19(C-9''), 103.27(C-10''), 121.76(C-1'''), 127.86(C-2'''), 115.38(C-3'''), 161.28(C-4'''), 115.59(C-5'''), 127.46(C-6'''). 55.76(OCH₃), 56.37(OCH₃)

<78> 화합물 7 (오키나플라본)

<79> ¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz) δ 6.41 (1H, s, H-3), 6.17 (1H, s, H-6), 6.37 (1H, s, H-8), 7.82 (1H, s, H-2'), 7.01 (1H, d, J=7.2 Hz, H-5'), 7.56 (1H, d, J=7.2 Hz, H-6'), 6.52 (1H, s, H-3''), 6.35(1H, s, H-6''), 6.75(1H, s, H-8''), 7.48 (2H, d, J=8.2 Hz, H-2''', H-6'''), 6.72 (2H, d, J=8.2 Hz, H-3''', H-5''').

<80> ¹³C-NMR (DMSO-D₆, 125 MHz) δ 164.02(C-2), 103.60(C-3), 182.21(C-4), 161.74(C-5), 98..32(C-6), 165.02(C-7), 94.30(C-8), 157.78(C-9), 103.59^{*}(C-10), 122.33(C-1'), 121.22(C-2'), 141.51(C-3'), 153.56(C-4'), 117.92(C-5'), 125.35(C-6'), 162.62(C-2''), 104.15(C-3''), 181.23(C-4''), 161.59(C-5''), 99.11(C-6''), 164.59(C-7''), 94.32(C-8''), 157.53(C-9''), 103.39^{*}(C-10''), 124.29(C-1'''), 127.91(C-2'''), 116.64(C-3'''), 160.57(C-4'''), 116.74(C-5'''), 128.41(C-6''').

<81> [시험예 1] 프로콜라겐 생합성능

<82> 사람피부에서 분리한 섬유아세포를 24공에 1공 당 10⁶개씩 과중하여 90% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 이를 24시간 동안 무혈청 배지로 배양한 후 상기 실시예 1 ~ 2로부터 얻은 3,4-메틸렌디옥시 또는 3,4-에티렌디옥시벤젠 모핵을 가지는 4-치환된 벤조산 유도체 화합물을 무혈청 배지에 녹여서 10⁻⁴몰 농도로 처리하고 24시간 동안 CO₂ 배양기에 배양하였다. 이들의 상층액을 떼내어 프로콜라겐 형(I) Elisa 키트(Procollagen type 1)을 이용하여 프로콜라겐의 증감 여부를 보았다. 그 결과를 표 1에 나타냈으며, 합성능은 비처리군을 100으로 하여 대비한 것이다.

표 1

화합물	합성능(%)
비처리군	100
Sumaflavone	127
2',8"-biapigenin	117
Taiwaniflavone	126
Amentoflavone	122
Robustaflavone	125
Ginkgetin	118
Ochnaflavone	126

<83>

<84>

상기 표 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 바이플라보노이드 유도체 화합물은 콜라겐 생합성을 증가시키는 효과를 나타내었다.

<85>

[시험예 2] 콜라게네이즈(MMP-1) 저해능

<86>

시험은 2.5 %의 우태아 혈청이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media) 배지가 함유된 96공 평판배양기(96-well microtiter plate)에 인간의 섬유아세포를 5,000 세포/공(well)이 되도록 넣고, 70~80% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 그리고 상기의 물질을 10^{-4} 몰농도로 24시간 동안 처리한 후, 세포배양액을 채워하였다. 채워한 세포배양액을 상업적으로 이용가능한 콜라게네이즈 측정기구 (미국 아머삼파마사 사. Catalog #: RPN 2610)를 이용하여 콜라게네이즈 생성 정도를 측정하였다. 먼저 1차 콜라게네이즈 항체가 균일하게 도포된 96-공 평판 (96-well plate)에 채워진 세포 배양액을 넣고 3시간 동안 항원-항체 반응을 항온조에서 실시하였다. 3시간 후 발색단이 결합된 2차 콜라겐 항체를 96-공 평판에 넣고 다시 15분간 반응시켰다. 15분 후 발색유발물질을 넣어 실온에서 15분간 발색을 유발시키고, 다시 1M 황산을 넣어 반응(발색)을 중지시키면 반응액의 색깔은 노란색을 띄며 반응 진행의 정도에 따라 노란색의 정도가 다르게 나타난다. 노란색을 띤 96-공 평판의 흡광도를 흡광계를 이용하여 405nm에서 측정하고, 하기 수학적 식 1에 의해 콜라게네이즈의 합성정도를 계산하였다. 이때 조성물을 처리하지 않은 군의 채워진 세포배양액의 반응 흡광도를 대조군으로 하였다.

수학적 식 1

<87>

콜라게네이즈 발현정도(%)=(물질처리세포군의 흡광도/대조군의 흡광도)X100

표 2

화합물	콜라게네이즈 발현정도(%)
비처리군	100
Sumaflavone	69
2',8"-biapigenin	86
Taiwaniflavone	72
Amentoflavone	81
Robustaflavone	79
Ginkgetin	85
Ochnaflavone	76

<88>

<89>

상기 표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 바이플라보노이드 유도체 화합물은 기질 메탈로 프로테아제(MMP-1)를

저해시키는 효과를 나타내었다.

<90> [시험예 3] UV로부터 유도된 주름의 개선 효과 측정

<91> 본 발명의 피부 주름 개선 물질의 자외선(UV)에 의해 나타나는 광노화효과를 확인하기 위해, 본 발명의 바이플라보노이드 유도체를 비이클(vehicle, 프로필렌 글라이콜(propylene glycol) : 에탄올 : 물=5:3:2(v/v))에 1%의 농도로 용해시켜 시료로 제조하였다. 다음, 6주령의 암컷 SKH-1 헤어리스 마우스를 준비하여 10 마리씩 4개의 시험군과 1개의 대조군으로 나누어 램프에서 일정거리(70cm)를 유지시킨 후 자외선(UV) 조사를 일주일에 3회 10 주동안 30회를 처리하여 주름을 형성 시켰으며, 시험물질 및 양성대조물질은 주름유발과 동시에 1일 2회(오전/오후), 주 5일(월~금), 10주간 연속으로 100 μ L씩 개방경피투여하였다. 주름 형성 억제 정도 평가를 위해 피부 레플리카(replica)를 채취하여 분석 하였다.

<92> 시험물질은 프로콜라겐 생합성능과 콜라게네이즈 발현 억제능이 좋은 3종 및 바이플라보노이드 분획(BFF)을 이용하여 시험하여 도 1에 나타내었다.

<93> 도 1에 나타난 바와 같이, 바이플라보노이드 유도체의 주름 개선 효과는 바이플라보노이드 유도체를 사용하지 않은 비이클에 대하여 현저한 주름 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

<94>

<95> 한편, 본 발명의 바이플라보노이드 유도체(슈마플라본, 2',8"-비아피게닌, 타이와니플라본, 아멘토플라본, 로버스타플라본, 강계틴 및 오키나플라본)를 함유하는 피부 주름 개선용 화장료의 제형은 임의로 선택할 수 있으며, 종래의 화장료 제형인 영양크림, 영양로션, 맛사지크림, 영양에센스, 유연화장수 등 여러 가지 형태로 제조할 수 있다.

<96> [제형예 1] 영양화장수(밀크로션)

<97> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 영양화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	2.0
스쿠알란	5.0
밀납	4.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
유동파라핀	0.5
카프릴릭/카프릭트리글리세라이	5.0
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시비닐폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.2
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

<98>

<99> [제형예 2] 유연화장수(스킨로션)

<100> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 유연화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	2.0
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	2.0
프로필렌글리콜	2.0
카르복시비닐 폴리머	0.1
PEG 12 노닐페닐에테르	0.2
폴리솔베이트 80	0.4
에탄올	10.0
트리에탄올아민	0.1
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

<101>

<102> [제형예 3] 영양크림

<103> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 영양크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
PEG60 경화피마자유	2.0
유동파라핀	10
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이	5.0
글리세린	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제	적량
색소	적량
향료	적량
정제수	to 100

<104>

<105> [제형예 4] 마사지크림

<106> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 마사지크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	1.0
밀납	10.0
폴리솔베이트 60	1.5
PEG 60 경화피마자유	2.0
솔비탄세스퀴올레이트	0.8
유동파라핀	40.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4.0
글리세린	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

<107>

<108> [제형예 5] 팩

<109> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 팩을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	1.0
폴리비닐알콜	13.0
소듐카르복시메틸셀룰로오스	0.2
글리세린	5.0
알란토인	0.1
에탄올	6.0
PEG 12 노닐페닐에테르	0.3
폴리솔베이트 60	0.3
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

<110>

<111> [제형예 6] 젤

<112> 하기의 표와 같이 바이플라보노이드 유도체를 함유하는 젤을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

배합성분	중량%
바이플라보노이드 유도체	0.5
에틸렌디아민 초산나트륨	0.05
글리세린	5.0
카르복시비닐 폴리머	0.3
에탄올	5.0
PEG 60 경화피마자유	0.5
트리에탄올아민	0.3
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

<113>

발명의 효과

<114> 상기에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 의한 바이플라보노이드 유도체들은 바이플라보노이드 수용체에 작용함으로 인하여 프로콜라겐 생합성을 증진시켜 피부의 주요 구성요소인 콜라겐의 변성으로 인한 피부탄력저하로 생성되는 주름을 억제 시키는 효과가 있으며, 콜라겐 분해 효소인 콜라게나아제의 발현을 억제하는 효과를 나타내고, 또한 상기의 효과에 의하여 자외선으로부터 유도된 주름의 개선 효과도 현저하게 상승했음을 나타내었으므로 바이플라보노이드를 유효성분으로 하는 화장품은 부작용 없이 우수한 주름 개선 효과가 있는 피부 주름 개선 및 예방용 소재 및 화장품으로서 유용하게 사용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 바이플라보노이드 유도체를 사용하여 자외선(UV)으로부터 유도된 주름의 개선 효과 측정 결과.

도면

도면1

