



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월10일
(11) 등록번호 10-1715294
(24) 등록일자 2017년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/60 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) A61K 8/97 (2017.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/602 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0071737

(22) 출원일자 2016년06월09일
심사청구일자 2016년06월09일

(56) 선행기술조사문헌

JP2005518381 A
KR101162251 B1
KR100613825 B1
KR1019967001695 A

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박태선

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 101동 1103호
(내수동, 파크팰리스)

(74) 대리인

특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 8 항

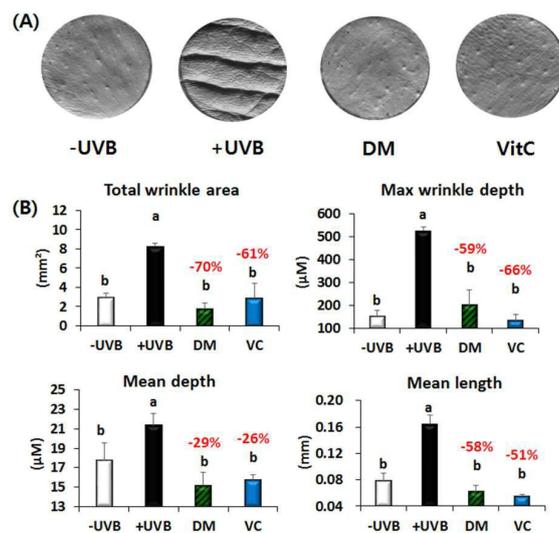
심사관 : 김범직

(54) 발명의 명칭 **디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선, 피부보습 개선, 피부각질제거, 피부탄력 증진, 피부주름 개선, 홍반 억제 및 피부광노화 개선 효과를 갖는 화장료 조성물, 건강기능식품 조성물, 의약품 및 의약외품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 디오스민 또는 이의 염은 피부수분 함유량 증진, 피부수분 증발량 감소, 프로콜라겐 분비량 증가, 콜라겐 생합성 촉진, 콜라겐 섬유 손상 억제, 콜라겐 섬유 분해 억제, 홍반 억제 및 피부 표피층의 비후 억제 활성을 나타내므로, 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 피부주름 개선, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 제공하는 기능성화장품, 건강기능식품, 의약품 또는 의약외품 등의 소재로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

- A61K 8/361 (2013.01)
- A61K 8/64 (2013.01)
- A61K 8/676 (2013.01)
- A61K 8/975 (2013.01)
- A61Q 19/08 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 1130373
- 부처명 농림축산식품부
- 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
- 연구사업명 기술사업화지원사업
- 연구과제명 한인진추출물을 활용한 체중조절 및 대사성질환 개선 용도의 개별인정형 건강기능식품 원료 및 제품 개발
- 기여율 1/2
- 주관기관 연세대학교 산학협력단
- 연구기간 2015.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 2015R1A5A6001906
 - 부처명 교육과학기술부
 - 연구관리전문기관 한국연구재단
 - 연구사업명 선도연구센터 육성사업 이공학분야(SRC)
 - 연구과제명 식품영양유전체연구센터
 - 기여율 1/2
 - 주관기관 경북대학교 산학협력단
 - 연구기간 2015.03.01 ~ 2018.02.28
-

명세서

청구범위

청구항 1

디오스민(diosmin) 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선 또는 피부주름 개선 효과를 갖는 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 20 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 각질제거제, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 비타민 C, 레티노산, TGF(transforming growth factor), 동물 태반 유래의 단백질, 베틀린산 및 클로렐라 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 피부주름 개선 성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

디오스민(diosmin) 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선 또는 피부주름 개선 효과를 갖는 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조된 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 조성물은 비타민 C, 레티노산, TGF(transforming growth factor), 동물 태반 유래의 단백질, 베틀린산 및 클로렐라 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 피부주름 개선 성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

디오스민(diosmin) 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 또는 피부주름 개선 효과를 갖는 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 피부수분 함유량 증진, 피부수분 증발량 감소, 프로콜라겐 분비량 증가, 콜라겐 생합성 촉진, 콜라겐 섬유 손상 억제, 콜라겐 섬유 분해 억제, 홍반 억제 및 피부 표피층의 비후 억제 활성을 나타내는 디오스민 또는 이의 염을 이용하여 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물, 의약품 및 의약외품 조성물을 제공할 수 있다.

배경 기술

[0002] 최근 의료기술의 발달로 평균수명이 연장되고 삶의 질 향상과 건강하고 아름다운 삶에 대한 욕구가 증가함에 따라 피부미용 및 건강에 대한 관심이 확대되고 있다. 이에 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 다양한 미용 기능성 화장품이 개발되었으며, 특히 피부 주름형성 예방, 완화와 개선을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아울러 최근 화장품의 성분이 피부진피에 도달하여 영양분을 공급하는데 한계가 있고, 식품으로 섭취하여 피부에 영양분 또는 기능성분을 공급하여 피부미용증진 효과를 나타낼 수 있다는 인식의 변화가 일어남에 따라 이너뷰티 식품소재들을 발굴하는 연구 또한 활발히 진행되고 있다(Chung, S. et al., γ -Linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. J Nutr, 132, 3090-3097, 2002; Tanno, O. et al., Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. Br J Derm, 143, 524-531, 2000).

[0003] 피부는 크게 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방(hypodermis)의 세층으로 구성되어 있다. 표피, 특히 표피의 가장 외층인 각질층은 피부장벽의 역할을 함으로써 피부로부터 수분과 전해질이 손실되는 것을 억제하는 한편, 진피층은 콜라겐과 엘라스틴 합성을 통하여 피부의 탄력을 유지하고 구조를 지지하는 역할을 한다. 즉, 콜라겐과 엘라스틴은 섬유아세포에서 생성되는 주요 단백질로서 피부의 기계적 견고성, 조직의 결합력 및 탄력성 등에 관여한다(Moskowitz, R. W. et al, Role of collagen hydrolysis in bone and joint disease, Semin Arthritis Rheu, 30: 87, 2000). 콜라겐은 형태와 구조적 특징에 따라 다양한 이소폼(isoform)을 구성하며, 사람의 조직에는 총 28가지 콜라겐 이소타입(isotype)이 존재하는데, 이중 피부조직에 존재하는 콜라겐은 타입 1, 3, 4, 6, 7, 13, 14, 17 등이 알려져 있다. 콜라겐 타입 1과 3은 진피층의 세포간질 구성성분을 이루고, 콜라겐 타입 7은 표피와 진피를 연결부위(dermal and epidermal junction)의 주요 구성물질이 된다(Pei, M. et al., Expression of collagen type I, II and III in loose body of osteoarthritis, J. Orthop. Sci., 5: 288, 2000).

[0004] 피부결합조직에는 세포외기질 단백질 중 타입 I 콜라겐이 가장 많은 양으로 존재하며, 그 밖에 엘라스틴, 피브로넥틴(fibronectin), 인테그린(integrin), 피브릴린(fibrillin), 프로테오글리칸 등의 단백질들이 존재한다. 새로이 합성된 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부세포의 세포외 공간으로 분비된 후 삼중나선구조(triple helix configuration)의 마이크로피브릴(microfibril)을 형성하고, 마이크로피브릴들은 류신-리치 스몰 프로테오글리칸(leucine-rich small proteoglycans)과 결합하여 피브릴(fibril)을 형성한다. 결과적으로 이렇게 만들어진 피브릴들이 모여 피부의 결합력과 탄력성을 제공하는 콜라겐 섬유를 형성하게 된다(Bateman, J.F. et al., Collagen superfamily. Extracellular matrix, Harwood, New York, 2, 22-26, 1996).

[0005] 피부노화는 피부 진피조직의 교원질 중 대부분을 차지하는 단백질인 콜라겐 함량이 감소하기 때문으로 알려져 있고, 콜라겐은 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 콜라겐의 감소는 피부노화 및 주름생성과 매우 깊은 관계를 가지고 있다. 피부노화는 크게 생리학적 노화에 의한 내인성 노화, 그리고 지속적인 자외선(ultraviolet radiation, UV) 노출에 의해 일어나는 광노화로 구분된다. 반복적인 자외선 노출은 콜라겐 분해효소를 증가시키고 콜라겐 섬유의 변성 및 파괴를 유발하여 피부의 탄력을 감소시키고 주름의 생성을 촉진하는 결과를 초래한다. 즉, 지속적으로 자외선에 노출된 피부조직에는 활성산소종(ROS)의 발생이 증가하고, 후자는 growth factor receptor (EGF-R), tumor necrosis factor (TNF)-receptor 등에 의해 매개되는 신호전달체계를 통해 염증성 사이토카인 생성을 촉진시키게 된다(Sachsenmaier, C. et al., Involvement of growth factor

receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, 78:963-972, 1994; Dy, L.C. et al., Augmentation of ultraviolet B radiation- induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor. *J. Biol.Chem.*: 274, 26917-2692, 1999). 이들 수용체의 활성화는 결과적으로 MAPK(mitogen-activated protein kinase)를 포함하는 다운스트림(downstream)의 신호전달을 매개하는 단백질들을 활성화시키는 연속적인 인산화로 이루어지고, 결과적으로 activator protein-1(AP-1)과 nuclear factor κ B(NF- κ B)와 같은 전사인자를 활성화시켜 염증반응을 유발하고 matrix metalloproteinase(MMPs)와 같은 콜라겐 분해효소(collagenase)의 활성을 촉진시킴으로써 피부탄력을 감소시키고 주름생성을 촉진시키게 된다(Kang, S. et al., Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor- κ B and activator protein-1 in Inflammatory acne lesions in vivo. *Am J. Pathol.*, 166: 1691-1699, 2005). AP-1은 세포의 성장과 분화에 관련되는 수많은 유전자의 발현을 조절하고 일부 MMPs의 발현을 강력히 조절한다. AP-1에 의해 발현이 조절되는 MMP 중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, 타입 1과 3 콜라겐을 기질로 한다.

[0006] 한편, 디오스민은 만성정맥부전(chronic venous insufficiency), 치질(hemorrhoids), 림프부종(lymphedema) 등의 질환 치료제로 상용화되어 판매되고 있는 약의 주성분이다. 이들 질환의 치료를 위해 일반적으로 하루에 500 mg 디오스민 정제를 두 번 복용하도록 권장되며, 급성질환 시에는 1,000 mg을 하루 세 번씩 나흘간 복용하고 다시 1,000 mg을 하루 두 번씩 사흘간 복용하며, 그 이후에 500 mg을 하루 두 번씩 두달 간 복용하도록 권장되고 있다.

[0007] 다국적 임상시험(23개국에서 2년에 걸쳐 시행됨)에서 5,052명의 만성정맥부전 증상이 있는 환자를 대상으로 매일 450 mg 디오스민을 6개월간 복용시킨 결과 증상이 호전되었음이 확인되었다. 또한 정맥 궤양(venous ulceration)을 동반하면서 치료가 어려운 심각한 만성정맥부전(chronic venous insufficiency) 환자를 대상으로 표준치료 프로토콜(cleaning, compression therapy, 인접한 부위의 피부관리) 외에 900 mg 디오스민을 복용시킨 임상연구에서 표준치료 프로토콜만 받은 환자의 28%만 궤양이 완전 치료된 한편 디오스민을 함께 복용한 환자의 경우 47%에서 궤양이 완전 치료되는 효과가 나타났다(Jantet G. Chronic venous insufficiency: worldwide results of the RELIEF study. Reflux assessment and quality of life improvement with micronized flavonoids. *Angiology*. 2002, 53:245-256; Ramelet AA. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency. *Angiology*. 2001, 52:S49-S56; Bergan JJ, et al. Therapeutic approach to chronic venous insufficiency and its complications: place of Daflon 500 mg. *Angiology*. 2001, 52:S43-S47).

[0008] 여러 건의 대규모 다국적 임상연구에서 디오스민이 급성 및 만성 치질증상을 완화하는 효과가 있음이 보고되었다. 120명의 치질환자를 대상으로 한 이중맹검, 위약대조군 연구에서 디오스민 90%와 헤스페리딘 10%로 구성된 flavonoid 믹스 500 mg을 하루에 두알 씩 두달 간 복용한 결과 통증, 출혈, 부종, 가려움증(pruritus) 증상이 완화되었음이 확인되었다. 디오스민은 또한 임신 시 동반되는 치질 증상의 완화에도 매우 효과적이며, 임신의 유지, 태아 발달, 출생시 체중, 신생아 성장률 및 섭취에 부정적인 영향을 주지 않았으며, 돌연변이를 일으키거나 생식기능에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Godeberge P. Daflon 500 mg in the treatment of hemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. *Angiology*. 1994, 45:574-578; Buckshee K, et al. Micronized flavonoid therapy in internal hemorrhoids of pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 1997, 57:145-151; Meyer OC. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. *Angiology*. 1994, 45:579-584).

[0009] 디오스민은 임파계에 작용하여 림프유량(lymph flow)을 증가시키는 효과가 있다. 전통적으로 사용되는 치료법에 디오스민을 상부사지 림프관부종(upper limb lymphedema) 치료에 사용한 결과 증상이 호전되었음이 관찰되었다. 화상, 또는 폐 좌상(lung cotusions) 등에서 나타나는 림프관부종(lymphedema) 동물모델에서도 디오스민이 유의한 증상완화를 나타냈다(Pecking AP, et al. Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema. *Angiology*. 1997, 48:93-98; Pecking AP. Evaluation by lymphoscintigraphy of the effect of a micronized flavonoid fraction (Daflon 500 mg) in the treatment of upper limb lymphedema. *International Angiology*. 1995, 14:39-43; Casley-Smith JR, et al. The effects of diosmin (a benzo-pyrone) upon some highprotein oedemas: lung contusion, and burn and lymphoedema of rat legs. *Agents Actions*. 1985, 17:14-20).

[0010] 디오스민은 그 외에도 월경전증후군, 바이러스 감염, 유방통(mastodynia), 대장염(colitis) 등에 효과가 있고 (Ramelet AA. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency. *Angiology*. 2001, 52:S49-S56; Bae EA, et al. In vitro inhibitory effect of some

flavonoids on rotavirus infectivity. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2000, 23:1122-1124; Crespo ME, et al. Antiinflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. Planta Medica. 1999, 65:651-653), 그 외에도 디오스민은 다양한 동물모델 및 세포주모델에서 항암효과 및 세포증식 억제효과가 있음이 확인되었다(Kuntz S, et al. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. European Journal of Nutrition. 1999, 38:133-142; Yang M, et al. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. International Journal of Cancer. 1997, 73:19-24; Tanaka T, et al. Modulation of N-methyl-N-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumorigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination. Carcinogenesis. 1997, 18:761-769). 그러나 디오스민의 주름 방지 또는 콜라겐 촉진 활성에 대한 보고는 전무한 상태이다.

[0011] 본 발명자들은 부작용이 적은 천연물에서 콜라겐 분해효소의 작용을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진시킴으로써 주름 개선에 효과가 있는 식품 또는 화장품 소재를 개발하는 연구를 진행한 결과, 디오스민(diosmin)이 피부보습 개선, 피부각질제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 화장료 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 의약품 또는 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 화장료 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 디오스민 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 각질제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염은 전체 화장료 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 20 중량%로 포함될 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 각질제거제, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 건강기능식품 조성물은 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물은 피부주름 개선 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 추가로 포함되는 피부주름 개선 성분은 비타민 C, 레티노산, TGF(transforming growth factor), 동물 태반 유래의 단백질, 베틀린산 및 클로렐라 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한, 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 각질제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 의약품 또는 의약외품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부수분 함유량 증진, 피부수분 증발량 감소, 프로콜라겐 분비량 증가, 콜라겐 생합성 촉진, 콜라겐 섬유 손상 억제, 콜라겐 섬유 분해 억제, 홍반 억제 및 피부 표피층의 비후 억제 활성이 우수하여 피부보습 개선, 피부각질제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 디오스민은 천연물이므로, 인체에 안전하고 부작용이 적어 화장품, 건강기능식품, 의약품 또는 의약외품 등의 소재로 다양하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 사람 피부섬유아세포에 20mJ/cm²로 UVB를 조사한 후, 100 μM의 비타민 C 또는 디오스민을 24시간 동안 처리한 다음 ELISA 분석으로 프로콜라겐 분비량을 측정하여 나타낸 그래프이다(-UVB: UVB를 처리하지 않은 정상군, +UVB: UVB를 처리한 대조군, DM: UVB를 조사한 후 디오스민을 처리한 실험군, VitC: UVB를 조사한 후 비타민 C를 처리한 대조군, DM+VitC: UVB를 조사한 후 디오스민과 비타민 C를 함께 처리한 실험군).

도 2는 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스의 체중증가량 및 식이섭취량을 나타낸 그래프이다(A: 체중, B: 체중증가량, C 및 D: 식이섭취량).

도 3은 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스의 피부조직의 수분함유량(A), 수분증발량(B), 탄력성(C) 및 홍반지수(D)를 나타낸 그래프이다.

도 4는 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스 각각의 등피부조직을 보여주는 사진이다.

도 5는 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스의 등 피부조직의 주름 형성 정도를 나타낸 사진(A) 및 그래프(B)이다.

도 6은 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스의 피부 두께를 측정하여 나타낸 그래프(A) 및 피부 표피층 사진(B)이다.

도 7은 표 1의 조성을 갖는 실험식이를 섭취한 마우스의 콜라겐 섬유의 양과 형태 변화를 관찰한 사진이다.

도 8은 디오스민을 처리한 무모 마우스 등조직에서 콜라겐 및 MMP 유전자들의 발현 변화를 RT-PCR로 측정하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0026] 상술한 바와 같이, 디오스민은 만성정맥부전, 치질, 림프부종 등의 질환 치료제, 월경전증후군, 바이러스 감염, 유방통, 대장염 등에 효과가 있는 것으로 공지되어 있었으나, 피부건강과 관련된 생리활성, 즉, 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0027] 본 발명자들은 피부건강과 관련된 디오스민의 신규 활성을 확인하고, 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물, 의약품 및 의약외품 조성물을 개발하였다.

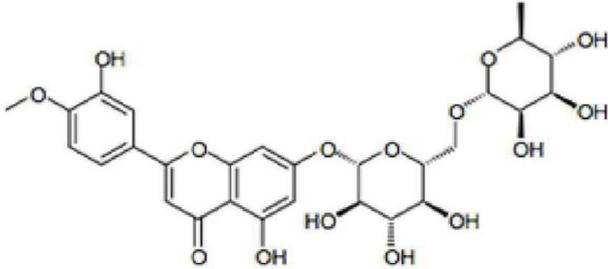
[0028] 본 발명에서 제공하는 조성물은 피부수분 함유량 증진, 피부수분 증발량 감소, 프로콜라겐 분비량 증가, 콜라겐 생합성 촉진, 콜라겐 섬유 손상 억제, 콜라겐 섬유 분해 억제, 홍반 억제 및 피부 표피층의 비후 억제 활성이 우수하여 피부주름 개선, 피부보습 개선, 피부각질제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

[0029] 따라서, 본 발명은 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 화장품 조성물을 제공한다.

[0030] 디오스민은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드 글리코시드(flavonoid glycoside, flavone)계 화합물로서,

국제 순수 및 응용 화학기구(IUPAC)에서 지정한 명칭은 5-히드록시-2-(3-히드록시-4-메톡시페닐)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-트리히드록시-6-메틸옥산-2-일]옥시메틸]옥산-2-일]옥시크로멘-4-one[5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methylloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one]이고, 디오스메틴 (diosmetin)이라고도 불리운다. 디오스민의 CAS 등록번호는 520-27-4, 구조식은 C28H32O15 이고, 분자량은 608.5 g/mol이다.

[0031] [화학식 1]



[0032]

[0033] 디오스민 화합물의 성상은 연노랑색 또는 회색빛이 도는 노랑색의 파우더이다. 디오스민은 물에 잘 용해되며, 디메틸 설폭사이드(50 mg/ml at 25° C)와 에탄올(<1 mg/ml at 25° C)에는 소량 용해된다. 디오스민의 용해점은 274° C, 비등점은 926.8° C(760 mmHg 조건에서), 밀도는 1.7 g/cm³, 굴절률은 n_{20D} 1.71, 그리고 pKa 값은: 6.1이다.

[0034] 디오스민은 다양한 식물에 존재하는 플라보노이드 글리코사이드 물질이며 식물로부터 추출하거나 플라보노이드 헤스페리딘(flavonoid hesperidin)으로부터 합성 가능하다. 시트러스 과일 중 특히 설익은 Meyer 레몬(3.06 g 디오스민/100 g of dry weight)과 Buddha's finger fruits(부처님손가락과일)(3.64 g/100 g of dry weight)은 가장 많은 양의 디오스민을 함유하는 식물로 알려져 있다(Del Rio JA, et al. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. Food Chemistry. 2004, 84:457-461). 그 외 북미, 유럽, 아프리카, 아시아 등에 자생하는 Vetches(Asian and Caucasian vetch species)도 디오스민을 다량 함유하는 대표적인 식물로서 앞에 약 2%의 디오스민이 함유되어 있다(Andreeva OA, et al. Diosmetin glycosides from caucasian vetch: Isolation and study of biological activity. Pharmaceutical Chemistry Journal. 1998, 32:595-597). 남유럽, 중아시아에 자생하는 herb hyssop(Hyssopus officinalis 또는 Hyssopus decumbens으로도 불리움) 또한 디오스민의 급원식물로서 특히 잎과 꽃에 다량 함유되어 있다(MMarin FR, et al. Distribution of flavone glycoside diosmin in Hyssopus officinalis Plants: Changes During Growth. Planta Medica. 1998, 64:181-182; Fathiiazad F, et al. A review on Hyssopus officinalis L.: Composition and biological activities. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011, 5:1959-1966).

[0035] 따라서, 본 발명의 디오스민의 수득 방법은 특별히 한정되지 않으며, 천연물에서 분리하거나, 공지된 제법을 사용하여 화학적으로 합성하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[0036] 디오스민의 LD₅₀ 값은 많이 밝히지 않지만 마우스에게 경구투여 시 3000 mg/kg 이상 투여해도 안전하다고 보고되었다(Meyer et al. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. Angiology. 1994, 45: 579-584). 디오스민은 또한 태반을 통한 이동 및 모유로의 이행이 매우 제한적인 것으로 보고되었다.

[0037] 따라서, 디오스민은 100 mg/kg 내지 3,000 mg/kg, 바람직하게는 500mg/kg 내지 2,000 mg/kg로 투여하는 것은 독성이 아주 미미하거나 없으므로, 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물, 의약품 또는 의약외품 조성물 등으로 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에서, 상기 디오스민은 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 디오스민 수화물, 디오스민 유도체 등을 포함할 수 있으며, 이의 용매화합물이나 입체 이성질체를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 용어 “피부주름 개선”은 피부의 주름 및 탄력과 관련된 능력을 유지 또는 강화시키는 것을 의미한다. 피부 진피층의 교원섬유인 콜라겐(collagen)과 탄력섬유인 엘라스틴(elastin)이 그러한 역할을 하는 주요 단백질로서 피부 탄력을 주관하는데, 콜라겐의 생합성은 피부의 내, 외적 영향을 받게 된다. 구체적으로, 피부 세포는 자연 노화로 인하여 세포 활성이 감소되면 콜라겐 섬유의 감소가 일어나거나, 또는 외적요인으로서 자외

선의 과량 조사되거나 스트레스 등에 의해 생성된 활성 산소가 단백질의 티올기(thiol: -SH)와 반응하여 효소 활성을 저해하거나, 콜라겐, 엘라스틴 등의 분해 효소의 발현을 증가시켜 피부의 주름을 증가시키고 탄력을 감소시켜 피부 노화가 진행된다.

[0040] 본 발명에서, 용어 “화장품학적으로 허용 가능한 염”, “식품학적으로 허용 가능한 염”, “약학적으로 허용 가능한 염” 또는 “이의 염”은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염일 수 있다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올 (예를 들어, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0041] 상기 유리산으로는 무기산 또는 유기산을 사용할 수 있다. 상기 무기산의 비제한적인 예로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 유기산의 비제한적인 예로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산 (galacturonic acid), 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로아이오딕산 등을 사용할 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 디오스민은 염기를 사용하여 화장품학적으로 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 상기 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 바람직하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예를 들어, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0043] 상기 디오스민의 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 디오스민의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 디오스민의 염으로는 하이드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 화장품학적으로 허용 가능한 염으로는 하드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트 (토실레이트)염 등을 들 수 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조 방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0044] 본 발명의 화장료 조성물에서 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염의 유효 함량은 특별히 제한되지 않으며, 조성물 전체 중량에 대하여 0.0001 내지 20 중량%로 포함되는 것일 수 있다. 화장료 내에 0.0001 중량% 미만의 디오스민 또는 이의 염은 그 용량이 소량이어서 주름 개선 효과가 없을 수 있으며, 20 중량% 이상의 디오스민 또는 이의 염은 기준에 알려진 독성을 나타낼 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실시예에서는 자외선을 조사한 사람 피부섬유아세포에 디오스민을 처리한 경우 자외선만을 조사한 대조세포와 비교하여 procollagen type I C-peptide(PIP) 분비량이 증가함을 확인하였다(도 1).

[0046] 본 발명의 다른 일실시예에서는 자외선 조사와 함께 디오스민을 함유하는 표 1의 실험식을 무모생쥐에게 10주간 공급하여, 실험동물의 피부 수분함유량, 수분증발량, 탄력성, 홍반지수, 등피부조직의 주름, 피부두께 변화, 교원섬유의 양과 형태 변화 및 피부조직의 콜라겐 타입 1 α 1, 1 α 2, 3 α 1의 발현과 MMP-1a, MMP-1b, MMP-3, MMP-9 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과, 디오스민은 피부 수분함유량과 탄력성을 유의하게 증가시키고, 수분증발량과 홍반지수를 유의하게 감소시킴을 확인하였다(도 3). 또한, 디오스민은 실험동물의 등피부조직 주름을 개선시키고(도 4), 피부주름 면적, 깊이 및 길이를 유의하게 감소시켜 주름생성을 현저하게 억제하는 효과가 있으며(도 5), 자외선 조사에 의해 비후해진 표피층의 두께 또한 현저하게 감소시키고(도 6), 교원섬유의 밀도를 조밀하게 하고 배열을 규칙적으로 유지시키는 효과를 가지며(도 7), 콜라겐 타입 1 α 1, 1 α 2 및 3 α 1의 발현을 유의하게 증가시키고, MMP-1a, MMP-1b, MMP-3, 및 MMP-9 유전자 발현을 유의하게 감소시킴으로써 콜라겐 단백질의 합성을 증가시키고 콜라겐 섬유의 분해를 저해하여 자외선 조사에 의한 주름형성을 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 8).

[0047] 따라서, 본 발명의 디오스민 또는 이의 염을 포함하는 조성물은 피부주름 개선, 피부보습 개선, 피부각질 제거,

피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 제공하는 기능성화장품, 건강기능식품, 의약품 또는 의약외품 등의 소재로 유용하게 활용될 수 있다.

- [0048] 본 발명에서 사용되는 용어, "화장료 조성물"은 상기 화합물을 포함하는 조성물로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다. 이러한 제형의 예를 들면 상기 조성물을 이용하여 제조된 화장료는 영양크림, 아이크림, 마사지크림, 클렌징 크림과 같은 크림류, 팩류, 영양로션과 같은 로션류, 에센스류, 유연화장수, 영양 화장수와 같은 화장수류, 파우더류, 파운데이션류 및 메이크업 베이스류 등이고, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이러한 제형 중 어떠한 형태로도 제조되어 상용화될 수 있으며, 상기 예들에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물에는 통상의 화장료 제조 방법으로 제형화할 수 있다.
- [0049] 구체적으로 본 발명의 화장료는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이새도로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 화장료 조성물은 디오스민 또는 이의 염에 더하여 부형제, 담체 등 기타 첨가제를 포함할 수 있으며, 일반 피부 화장료에 배합되는 보통의 성분을 필요한 만큼 적용 배합하는 것이 가능하다.
- [0051] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 경피 침투 강화제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, 경피 침투 강화제란 피부의 혈관세포 내로 원하는 성분이 높은 흡수율로 침투할 수 있게 해주는 조성물이다. 바람직하게는 레시틴 화장품에 사용되는 다른 인지질 성분, 리포솜 성분 등이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.
- [0052] 또한, 유상 성분으로서 주로 사용될 수 있는 오일로는 식물성 오일, 광물성 오일, 실리콘유 및 합성유 중에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 미네랄오일, 사이크로메치콘, 스쿠알란, 옥틸도데실 미리스테이트, 올리브오일, 비티스 비니페라 씨드 오일, 마카다미아너트오일, 글리세릴옥타노에이트, 캐스터오일, 에칠헥실 이소노나노에이트, 디메치콘, 사이크로펜타실록산 및 선폴라워씨드 오일 등을 사용할 수 있다.
- [0053] 또한, 유화 능력을 보강하기 위하여 계면활성제, 고급 알콜 등을 0.1 내지 5 중량% 첨가할 수 있다. 이러한 계면 활성제로는 비이온 계면활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제, 인지질 등과 같은 통상적인 계면활성제를 사용할 수 있으며, 구체적으로, 소르비탄세스퀴놀리에이트, 폴리솔베이트 60, 글리세릴 스테아레이트, 친유형 글리세릴스테아레이트, 소르비탄 올리에이트, 소르비탄 스테아레이트, 디이에이-세틸포스페이트, 소르비탄스테아레이트/ 슈크로스코코에이트, 글리세릴스테아레이트/폴리에틸렌글라이콜-100 스테아레이트, 세테아레스-6 올리에이트, 아라키딜알코올/ 베헤닐알코올/아라키딜 글루코사이드, 폴리프로필렌 글라이콜-26-부테스-26/ 폴리에틸렌글라이콜-40 하이드로제네이티드 캐스터오일 등을 사용할 수 있다. 고급 알콜로는 탄소수가 12 내지 20인 알코올, 예컨대 세틸알코올, 스테아릴 알코올, 옥틸도데칸올, 이소스테아릴 알코올 등을 단독으로 또는 1종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0054] 수상 성분은 수상의 점도 또는 경도를 조절하기 위하여 카보머, 잔탄검, 벤토나이트, 마그네슘알루미늄실리케이트, 셀룰로오스검, 텍스트린 팔미테이트 등과 같은 1종 이상의 점증제를 0.001 내지 5 중량% 더 첨가할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 필요에 따라 고급 지방산, 비타민 등의 약효 성분과 자외선 차단제, 산화방지제(부틸히드록시안니솔, 갈릭산프로필, 엘리소르빈산, 토코페릴아세테이트, 부틸레이티드하이드록시톨루엔 등), 방부제(메칠파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤, 페녹시에탄올, 이미다졸리디닐우레아, 클로르페네신 등), 착색제, pH 조절제(트리에탄올아민, 씨트릭에씨드, 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등), 보습제(글리세린, 솔비톨, 프로필렌 글라이콜, 부틸렌 글라이콜, 헥실렌 글라이콜, 디글리세린, 베타인, 글리세레스-26, 메칠글루세스-20 등), 윤활제 등의 성분을 더 첨가할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피부에 필수 영양소를 보조적으로 제공할 수 있는 물질을 추가로 포함하는데, 바람직하게는 천연향, 화장품향, 또는 한약재가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피부 주름개선 성분 또는 피부탄력 증진 성분을 추가로 포함할 수 있다. 그 구체적인 피부 주름 개선 성분 또는 피부탄력 증진 성분으로는 비타민 C, 레티노산, TGF, 동물 태반 유래의 단백질, 베툴린산 및 클로렐라 추출물로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 가장

바람직하게는 비타민 C일 수 있다.

- [0058] 본 발명의 일실시예에서는 자외선을 조사한 사람피부섬유아세포에 디오스민을 비타민 C와 함께 처리한 경우, 디오스민 또는 비타민 C를 단독으로 처리한 경우보다 콜라겐 양이 더 높은 수치로 측정되어 상승효과를 나타냄을 확인하였다(도 1).
- [0059] 본 발명은 또한, 디오스민 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0060] 상기 “디오스민”과 “이의 식품학적으로 허용 가능한 염”에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0061] 본 발명에서 용어 “건강기능식품”은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0062] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 제조된 것일 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 디오스민을 유효성분으로 포함시켜 분말제, 액제, 정제, 연질캡셀제, 과립제, 티백차, 인스턴트 차 또는 드링크제 등의 형태로 제형화될 수 있다. 유효 성분으로서의 디오스민의 함량은 그 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 조성물 중에 포함되는 디오스민의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량%로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생용 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 디오스민 이외에 본 발명이 목적으로 하는 주효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 주효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분 예를 들면, 비타민 C와 같은 주름 개선용 화합물 또는 녹차 추출물, 달나무 추출물, 감초추출물, 상백피 추출물, 빈랑자 추출물, 황금 추출물, 산삼 추출물 등의 천연물을 함유하는 것도 무방하다.
- [0064] 상기와 같은 형태로 제형화된 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품은 모두 포함한다.
- [0065] 본 발명의 건강기능식품 조성물이 드링크제인 경우는 지시된 비율로 필수성분으로서 디오스민을 함유하며, 그 밖의 드링크제 제조를 목적으로 사용되는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 및 합성 향미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0066] 또한 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에도 본 발명의 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 디오스민 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0067] 본 발명은 또한, 디오스민 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선 효과를 갖는 의약품 또는 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0068] 상기 “디오스민” 과 “이의 염” 에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0069] 본 발명의 디오스민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 예컨대, 공지의 피부 주름 개선 성분 또는 탄력 증진 성분을 포함할 수 있을 것이다. 추가적인 피부 주름 개선 성분 및 탄력 증진 성분을 포함하게 되면 본 발명의 조성물의 주름개선 및 탄력 증진 효과는 더욱 증진될 수 있다. 상기 성분 추가 시에는 복합 사용에 따른 피부 안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 의약품 조성물은 당업계에 공지된 주름 개선 성분으로서, 비타민 C, 레티노산, TGF, 동물 태반 유래의 단백질, 베타린산 및 클로렐라 추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 피부 주름 개선 성분을 추가로 포함할 수 있다. 추가의 피부주름 개선 성분은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%로 포함될 수 있을 것이며, 상기 함량 범위는 콜라겐 합성 촉진 활성, 피부 안전성, 상기 화학식 1의 화합물의 제형화 시의 용이성 등의 요건에 따라 조절될 수 있을 것이다.
- [0070] 또한, 본 발명의 피부 주름 개선 및 탄력 증진용 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0071] 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 일반 의약품 제제의 형태, 예를 들어, 임상 투여 시 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0073] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 슈크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.
- [0074] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0075] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 의약품 조성물은 유효량의 디오스민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 때 바람직한 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 또는 피부광노화 개선 효과를 제공할 수 있다. 본 발명에 있어서, '유효량'이라 함은 피부의 주름이 생성되는 것을 억제 또는 저해하거나, 이미 생성된 주름을 완화시킬 수 있는 화합물의 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 디오스민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태, 상기 화합물이 피부에 적용되는 방법 및 피부에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 조성물이 피부의 주름 생성, 탄력 감소, 기미 등에 따른 피부과적 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 일상적으로 피부에 적용하게 되는 화장품으로 제품화되는 경우에 비해 높은 농도로 디오스민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있을 것이다.
- [0077] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0078] 본 발명의 의약외품 조성물은 피부보습 개선, 피부각질 제거, 피부탄력 증진, 홍반 억제, 피부주름 개선 및/또는 피부광노화 개선을 목적으로 사용되는 것으로, 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 영양화장수, 마사지크림, 영양크림, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 젤 또는 피부 점착타입 화장료의 제형을 갖는 화장료 조성물일 수 있으며, 또한, 로션, 연고, 겔, 크림, 패취 또는 분무제와 같은 경피투여형 제

형일 수 있다.

- [0079] 또한, 각 제형에 있어서 의약외품 조성물은 다른 성분들을 기타 의약외품의 제형 또는 사용목적 등에 따라 임의로 선정하여 배합할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(억제 또는 완화)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 점증제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체 등을 포함할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 디오스민 또는 이의 염의 함량은 의약외품 조성물의 총 중량을 기준으로 각각 0.0001 내지 20 중량%인 것이 바람직하다. 20 중량%를 초과하는 경우에는 조성물 제조시 색상 및 안정성이 떨어지며, 0.0001% 미만의 경우에는 그 작용효과가 미미하다.
- [0081] 또한, 각 제형의 의약외품 조성물에 있어서, 상기한 필수 성분 이외의 다른 성분들은 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.
- [0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0083] **사람피부섬유아세포를 이용한 디오스민의 주름개선 효능**

[0084] 1-1. 실험방법

[0085] 1) 세포배양

[0086] 사람피부섬유아세포(primary dermal fibroblast, normal, human, neonatal, ATCC No. PCS-201-010)를 ATCC사(Manassas, VA, USA)로부터 구매하여 사용하였다. 구입한 세포를 fibroblast growth medium(Promo Cell, Heidelberg)을 이용하여 37, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하여 실험에 사용하였다.

[0087] 2) Procollagen Type I C-peptide(PIP) 농도 측정

[0088] 콜라겐 생합성능을 알아보기 위하여 사람섬유아세포를 12 웰-플레이트(well-plate)에 1.0×10⁶ cells/well 씩 분주하여 디오스민과 비타민 C를 각각 100 μM의 농도로 첨가하여 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 각 웰의 배지를 제거한 후 PBS로 1회 세척하고 다시 1 ml의 PBS를 넣은 후 20 mJ/cm² 조건으로 ultraviolet B(UVB)를 조사하였다. 각 웰의 PBS를 다시 배지로 교체하여 24시간동안 배양한 후, procollagen type C-peptide EIA kit(Takara Bio, Japan)를 이용하여 배지로 분비된 프로콜라겐 양을 측정하였다. 콜라겐 측정 키트에 포함된 표준용액을 농도별로 희석하고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준농도 곡선을 작성하고 콜라겐 생성량을 산정하였다.

[0089] 1-2. 실험결과

[0090] 1) 프로콜라겐 분비량 변화

[0091] 피부를 구성하는 주 단백질인 콜라겐은 피부진피에 존재하는 섬유아세포에서 프로콜라겐의 형태로 합성된 후 세포의 기질로 분비된다. 세포의 기질로 분비된 프로콜라겐은 세포표면에 존재하는 procollagen peptidase에 의해 C-말단이 분해되고 활성형 콜라겐으로 형성되므로 C-peptide 함량을 측정하면 활성화된 콜라겐 함량을 측정할 수 있다. 도 1의 각각의 값은 3개의 독립적인 웰로부터 3회 측정의 means ± SEM을 나타낸다. 다른 알파벳으로 표시된 평균값은 통계적으로 유의함을 나타낸다(p < 0.05). 사람피부섬유아세포에 자외선 조사와 함께 약물을 처리하여 세포의 기질로 분비된 프로콜라겐, procollagen type I C-peptide(PIP) 양을 측정한 결과, 자외선 조사한 대조세포(+UVB)에서는 정상세포(-UVB)에 비해 프로콜라겐 분비량이 현저히 감소하였고, 자외선 조사와 함께 디오스민을 처리한 세포(DM)에서는 자외선만 조사한 대조세포(+UVB)에 비해 콜라겐 양이 21% 유의하게 증가하였다. 한편 디오스민을 비타민 C와 함께 처리한 세포(VitC+DM)에서는 자외선 조사 대조세포(+UVB)에 비해 콜라겐 양이 45% 유의하게 증가하였고, 이는 비타민C(+27%) 또는 디오스민(+21%)을 단독으로 처리한 세포에서 관찰된 콜라겐 양보다 더 높은 수치이다(도 1). 이러한 결과를 콜비공식에 대입하여 보면, 디오스민과 비타민 C를 함께 처리할 때 상승효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다. 따라서 디오스민은 사람피부섬유아세포에서 활성화된 콜라겐 양을 증가시키고 이러한 콜라겐 증가효과는 비타민 C와 함께 사용 시 더 효과적으로 나타남을 알

수 있다.

실시예 2

[0092] **마우스를 이용한 디오스민의 피부주름 개선, 보습 및 탄력증진 효능평가**

[0093] **2-1. 실험방법**

[0094] 1) 실험식이 제조, 실험동물의 사육 및 자외선 조사

[0095] 본 실시예에 사용한 5주령 암컷 알비노 무모 생쥐(Skh-1)는 오리엔트바이오(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 고형사료로 1주일간 적응기간을 거쳤다. 실험동물은 4개 군으로 분류하여 군별로 5 마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 모든 실험군은 자외선을 조사하지 않은 정상 대조군(-UVB), 자외선 조사군(+UVB), 자외선조사와 함께 디오스민(CV) 또는 비타민 C(VitC)을 섭취시킨 군으로 나누었다. 사육 기간 동안 사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였으며, 온도는 22 ± 1, 습도는 60 ± 5%로 유지하고 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다.

[0096] -UVB군과 +UVB군은 AIN-93 rodent diet 구성(Reeves, PG et al., J Nutr, 123:1939-1951, 1993)에 준하여 조제된 정제식이를 섭취시켰고, DM군은 AIN-93 정제식이에 0.2% 디오스민 (Sigma-Aldrich)을, 그리고 VitC군은 AIN-93 정제식이에 0.2% 비타민 C(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 제조된 식이를 10주간 공급하였다. 자세한 실험식이의 조성은 하기 표 1과 같다. 식이는 매일 오전 10~11시 사이에 물과 함께 공급하였으며, 식이 섭취량은 매일 측정하였다.

표 1

실험식이 조성표

[0097]

성분	AIN-93G식이 (g/kg diet)	디오스민 보충식이(DM) (g/kg diet)	비타민 C 보충식이(VitC) (g/kg diet)
카제인	200	200	200
말토덱스트린	132	132	132
옥수수 전분	397.486	395.486	395.486
수크로오스	100	100	100
셀룰로오스	50	50	50
콩기름	70	70	70
비타민 복합물	10	10	10
미네랄 복합물	35	35	35
콜린 비타르트리이트	2.5	2.5	2.5
L-시스틴	3	3	3
Tert-부티하이드로퀴논	0.014	0.014	0.014
디오스민	-	2	-
비타민 C	-	-	2
총합(g)	1,000	1,000	1,000

[0098] 실험사육기간 동안 무모생쥐의 등 부분에 ultraviolet B (UVB)를 주 3회 조사하였으며 자외선 조사량은 처음 1주 동안은 73 mJ/cm², 2주째는 146 mJ/cm², 3주부터 10주까지는 219 mJ/cm²로 조사하였다. 사육하는 동안 매주 체중 및 피부두께를 측정하였고, 등 피부 부위의 사진촬영을 실시하였다. 피부두께는 디지털 마이크로 캘리퍼(Marathon Watch Company Ltd, Ontario, Canada)를 이용하여 무모생쥐의 엉덩이 부분에서 측정하였다. 측정할 때 사용된 캘리퍼는 0.01 mm 까지 측정 가능하며 두께에 일정한 힘을 가할 수 있는 조절기능을 갖추고 있어 같은 힘을 준 상태에서 피부의 두께 측정이 가능하였다.

[0099] 실험사육 마지막 날 실험동물을 6시간 공복시키고 마취한 상태에서 혈액과 등 피부조직을 채취하였다. 혈액시료는 주사기로 복부 하대정맥에서 채취하여 EDTA가 코팅된 튜브에 담고 2,000×g에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 분리하여 분석 시까지 -70에서 냉동보관하였다. 등 피부조직의 일부는 즉시 -70 냉동고에 보관한 후 분자생물학적 검사에 사용하였고, 일부는 10% 포르말린 용액에 고정하여 면역조직화학적 염색에 사용하였다.

- [0100] 2) 피부 보습, 탄력성 및 홍반지수 측정
- [0101] 실험동물의 피부 수분함유량, 수분증발량, 탄력성 및 홍반지수 측정은 각각 Corneometer®, Tewameter®, Cutometer®, Mexameter® (CK Electronics GmbH)을 이용하여 실험 종료일에 1회 측정하였다. 측정 시 실험동물 등의 일정한 부분을 가볍게 눌러서 나타나는 수치를 기록하였다.
- [0102] 3) 등피부조직의 주름 측정
- [0103] 10주 동안 자외선 조사를 실시한 무모 생쥐의 피부를 실리콘 고무로 모사판을 제작하여 주름의 형성 정도를 측정하였다. 무모 생쥐의 등 부분에 지름이 1 cm가 되는 원모양의 구멍이 있는 디스크를 부착하고 모사판 제작용 시약을 혼합하여 무모 생쥐의 등 부분에 얇게 펴 바르고 완전히 말린 다음 디스크를 조심스럽게 떼어내어 모사판을 제작하였다. 모사판의 제작 온도는 20 ~ 23 , 습도 45 ~ 50%의 항온항습 상태에서 실시하였으며, 모사판 제작용 실리콘 고무 인상재(Epigem, Seoul, Korea)를 사용하였다. 제작한 모사판의 분석은 컴퓨터 영상분석기 (Visioline VL650, CK electronic GmbH, Germany)을 사용하여 주름의 총면적(total wrinkle area), 최대 주름 깊이(max wrinkle depth), 주름 평균깊이(mean depth) 및 평균길이(mean length) 등의 4가지 주름지표 항목을 분석하였다.
- [0104] 4) 피부조직의 면역조직화학적 염색
- [0105] 무모생쥐의 등 피부 조직을 적출하고 10% 포르말린에 고정된 다음, 한국 CFC (경기도, 한국)에 의뢰하여 Hematoxylin and eosin(H&E)와 Masson's trichrome(M&T) 염색을 한 뒤 광학현미경 (IX71, Olympus, JPN)을 이용하여 관찰한 뒤, digital camera (DP71, Olympus, JPN)를 이용하여 사진을 촬영하였다.
- [0106] 5) RT-PCR 분석
- [0107] 등 피부조직 0.1 g 당 Trizol 용액 1 ml을 첨가하여 조직을 분쇄한 후, 4, 12,000 xg에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 chloroform 200 μ l을 첨가하고, vortex하였다. 이 과정을 두 번 반복한 다음, 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 isopropanol과 상층액을 1:1 비율로 첨가하였다. 10회 세계 흔든 다음 실온에서 15분 동안 방치한 후, 12,000 xg, 4에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거하고, 남은 침전물에 70% ethanol 1 ml을 가한 후 7,500 xg, 4에서 5분 동안 원심분리 하였다. 에탄올을 제거한 후 RNA 침전물이 담긴 튜브를 실온에서 15분 동안 건조시키고, nuclease free water를 사용하여 RNA pellet을 용해시켰다. UV/VIS spectrophotometer(Beckman coulter, DU730)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고, agarose gel electrophoresis를 실시하여 RNA 시료의 integrity를 확인하였다.
- [0108] 등 피부조직에서 추출된 RNA 시료를 대상으로 oligo dT primer와 superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 reverse transcription을 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. Reverse transcription을 통해 얻은 cDNA를 template로 하고 증폭하고자 하는 유전자 cDNA의 5 '과 3' flanking sequence를 primer로 사용하여 PCR을 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머 서열은 표 2에 제시된 바와 같다. 증폭된 PCR 산물 1 μ l를 1% agarose gel에 전기영동 하여 DNA band를 확인하였다.

표 2

RT-PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머	서열 (5' →3')	어닐링 온도 (°C)	PCR 산물 (bp)
Collagen type I alpha1(Col1a1)	F	ggcaacagtcgcttcaccta (서열번호 1)	55	164
	R	agtccgaattcctggtctgg (서열번호 2)		
Collagen type I alpha2(Col1a2)	F	cggttctgttggtcctgttg (서열번호 3)	55	103
	R	accctgtgcctttatcac (서열번호 4)		

Collagen type III alpha(Col3 a 1)	F	taaccaaggctgcaagatgg (서열번호 5)	55	104
	R	accagtgcttacgtgggaca (서열번호 6)		
Matrix metallopeptidase 1a(MMP-1a)	F	ccctgtgtttcacaacggag (서열번호 7)	55	133
	R	cctcagcttttcagccatca (서열번호 8)		
Matrix metallopeptidase 1b(MMP-1b)	F	tttgctcatgcttttctgcc (서열번호 9)	55	146
	R	gaatgggagagtccaagga (서열번호 10)		
Matrix metallopeptidase 3(MMP-3)	F	tgctggtatggagcttctgc (서열번호 11)	55	142
	R	catctccaacccgaggaact (서열번호 12)		
Matrix metallopeptidase 9(MMP-9)	F	gtggacatgaggtgaacca (서열번호 13)	55	102
	R	actgcacggttgaagcaaag (서열번호 14)		
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	F	ggagatgttgccatcaacg (서열번호 15)	55	122
	R	tgacaagcttccattctcg (서열번호 16)		

[0110] 2-2. 실험결과

[0111] 1) 무모 생쥐의 체중 및 식이섭취량

[0112] 자외선조사, 디오스민 및 비타민C 섭취는 무모 생쥐 마우스의 체중 및 식이섭취량에 유의한 영향을 미치지 않았다(도 2). 도 2의 값들은 5마리 마우스의 mean ± SEM이다.

[0113] 2) 자외선 조사 무모 생쥐 피부조직의 수분량, 탄력성 및 홍반지수 변화

[0114] 10주 동안 자외선을 조사받은 +UVB 대조군은 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 피부조직의 수분함유량 및 탄력성은 유의하게 감소한 한편, 수분증발량 및 홍반지수는 유의하게 증가하였다(도 3). 디오스민을 섭취시킨 군(DM)의 경우 같은 세기의 UV가 조사되었음에도 불구하고 +UVB 대조군에 비해 수분함유량 및 탄력성은 각기 69% 및 57% 유의하게 증가하였고, 수분증발량 및 홍반지수는 각각 53% 및 44% 유의하게 감소하였음이 확인되었다. 이와 같은 디오스민의 수분함유량 및 탄력성 증진효능은 비타민 C에 의한 효과와 유사하였다(도 3). 도 3의 값들은 5마리 마우스의 mean ± SEM이며, 바(bar) 위의 알파벳은 Duncan's multiple range test가 뒤따르는 one-way ANOVA에 의한 유의적 차이를 나타낸다(p < 0.05).

[0115] 3) 자외선 조사 무모 생쥐의 피부주름 생성변화

[0116] 디오스민 섭취가 피부주름의 형성정도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실험동물의 등피부 부위를 사진 촬영하였다. 10주 동안 UVB를 조사받은 +UVB 대조군은 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 다수의 굵고 깊게 패인 주름과 함께 잔주름이 형성된 것을 육안 상으로 관찰할 수 있었으며, 디오스민 섭취군의 경우 +UVB 대조군에 비해 주름의 굵기와 깊이가 현저히 감소하여 자외선을 조사받지 않은 -UVB군에서 관찰된 피부상태와 유사하게 개선된 것을 확인하였다(도 4).

[0117] 10주 동안 자외선을 조사받은 무모 생쥐의 등피부로부터 실리콘 고무로 모사판을 제작하여 주름의 형성 정도를 측정된 결과, +UVB 대조군은 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 굵고 깊게 패인 주름과 함께 잔주름이 형성된 것을 관찰할 수 있었으며, 디오스민 섭취군은 같은 세기의 UV가 조사되었음에도 불구하고 +UVB 대조군에 비해 깊은 주름이 거의 사라지는 등, 주름의 굵기와 깊이가 현저히 개선된 것을 확인하였다(도 5A). 컴퓨터 영상분석기를 이용하여 모사판에서 주름형성 정도를 수치화 한 결과에서도 DM군의 경우 +UVB군에 비해 총주름면적이 70%, 최대 주름깊이가 59%, 평균 주름깊이가 29%, 그리고 평균 주름길이가 58% 유의하게 감소하였고,

이와 같은 디오스민의 주름개선 효능은 비타민 C에서 관찰된 주름개선효능과 유사하였다(도 5B). 도 5B의 값들은 5마리 마우스의 mean ± SEM이며, 바(bar) 위의 알파벳은 Duncan's multiple range test가 뒤따르는 one-way ANOVA에 의한 유의적 차이를 나타낸다(p < 0.05). 따라서 디오스민의 섭취는 자외선조사에 의한 주름생성을 현저히 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0118]

4) 자외선 조사 무모 생쥐의 피부두께 변화

[0119]

자외선 등에 의한 광노화가 진행되면 피부 진피층을 보호하기 위해 각질층의 형성이 증가하여 피부가 두꺼워지고, 따라서 자외선 조사에 의해 피부 표피층의 두께가 두꺼워졌다는 것은 그만큼 광노화에 의한 피부손상이 크다는 것을 의미한다(Gail J Molecular mechanism of skin ageing Mech Ageing Dev 123: 801-810, 2002)

[0120]

실험사육 마지막 날 디지털 마이크로 캘리퍼를 이용하여 등피부의 두께를 측정한 결과, +UVB 대조군은 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 피부두께가 유의하게 증가하였고 디오스민을 섭취시킨 군은 +UVB 대조군에 비해 피부두께가 23% 유의하게 감소하였음이 확인되었다(도 6A). 도 6A의 값들은 5마리 마우스의 mean ± SEM이며, 바(bar) 위의 알파벳은 Duncan's multiple range test가 뒤따르는 one-way ANOVA에 의한 유의적 차이를 나타낸다(p < 0.05).

[0121]

피부조직의 H&E 염색을 통해 무모생쥐의 피부 표피층 두께를 관찰한 결과에서도 +UVB 대조군은 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 피부 표피층이 비후해진 것이 관찰되었고, DM군의 경우 자외선 조사에 의해 비후해진 표피층의 두께가 현저히 감소되었음이 확인되었다(도 6B).

[0122]

5) 자외선 조사 무모 생쥐의 진피층 내 교원섬유(collagen fiber)의 양과 형태 변화

[0123]

자외선 조사에 의해 광노화가 진행된 피부의 경우 표피-진피 결합부위의 교원섬유망이 손상되고, 따라서 교원섬유의 양과 형태는 피부의 광노화 지표로 사용된다(Varani et al. "Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro." The American journal of pathology 158: 931-942, 2001). 자외선을 조사받은 무모 생쥐의 피부조직을 Masson's trichrome 염색을 시행하여 교원섬유(collagen fibers) 염색 정도를 관찰한 결과, -UVB군의 표피 밑의 진피층에는 aniline blue에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었으나 UVB를 10주간 조사한 +UVB군의 교원섬유는 aniline blue에 의해 미약하게 염색되었다. UVB를 조사하면서 10주간 디오스민을 섭취시킨 군의 진피층에서는 대조군에 비하여 교원섬유의 밀도가 상대적으로 조밀하고 배열이 규칙적이었으며 aniline blue에 의한 염색정도도 더 강하여 정상군(-UVB)에 가까운 양상을 보였다(도 7).

[0124]

6) 자외선 조사 무모 생쥐 피부조직의 유전자발현 변화

[0125]

콜라겐 타입 1과 3은 진피층의 세포간질 구성성분을 이루는 단백질이고, 특히 타입 1 콜라겐은 피부결합조직에 존재하는 세포외기질 단백질 중에서 가장 많은 양으로 존재한다. 한편, 콜라겐 분해를 촉매하는 MMPs는 포유류에서 23개의 타입이 존재하며 이중 자외선에 의해 증가하는 MMP 타입은 1, 3 및 9번으로 알려져 있고 이들 세가지 타입의 MMPs는 콜라겐 타입 1과 3을 분해하는 효소이다. MMP-1의 경우 콜라겐섬유의 중간을 절단하는 한편, MMP-3, MMP-9는 절단된 콜라겐섬유를 세분해서 절단하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Quan T. et al. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. J Investigative Dermatology, 133: 1362, 2013; Kondo S. The roles of cytokines in photoaging. J Dermatological Science 23: S30-S36, 2000).

[0126]

피부조직을 대상으로 RT-PCR 분석에 의해 유전자발현 변화를 평가한 결과, +UVB 대조군의 경우 자외선을 조사받지 않은 정상군(-UVB)에 비해 피부조직의 콜라겐 타입 1α1과 α2, 그리고 콜라겐 타입 3α1의 발현은 유의하게 감소하였고, MMP-1a 및 -1b, MMP-3, 그리고 MMP-9 유전자 발현은 유의하게 증가하였다. 한편, 디오스민 섭취군의 경우 +UVB 대조군에 비해 콜라겐 타입 1α1과 α2, 그리고 콜라겐 타입 3α1의 발현은 유의하게 증가하였고, MMP-1a 및 -1b, MMP-3, 그리고 MMP-9 유전자 발현은 유의하게 감소하였다(도 8). 따라서 디오스민은 피부조직의 콜라겐 단백질 합성을 증가시키고 콜라겐 섬유의 분해를 저해함으로써 자외선조사에 의한 주름형성을 억제하는 것으로 판단된다.

[0127]

이상의 결과는 디오스민이 자외선에 의한 피부주름을 예방하거나 완화할 수 있는 효과가 있다는 것을 제시하는 것으로 향후 기능성화장품, 건강기능식품, 의약품 또는 의약외품의 소재로 유용하게 활용될 수 있음을 시사한다.

실시예 3

[0128] 피부주름 개선, 피부자극 및 피부각질 제거 관능시험

[0129] 3-1. 디오스민을 함유하는 영양 크림(실험예 1)과 디오스민을 함유하지 않는 영양 크림(비교예 1)의 제조

표 3

[0130]

번호	성분	실험예 1 (중량%)	비교예 1 (중량%)
1	세테아릴알코올	1.5	1.5
2	글리세틸스테아레이트	1	1
3	폴리소르베이트 60	1.2	1.2
4	소르비탄세스퀴올리에이트	0.3	0.3
5	세틸옥타노에이트	6	6
6	스쿠알란	8	8
7	아프리카드커넬오일	4	4
8	디메치콘	1	1
9	부틸렌글라이콜	5	5
10	글리세린	4	4
11	마그네슘알루미늄실리케이트	0.2	0.2
12	산탄검	0.05	0.05
13	방부제	미량	미량
14	정제수	잔량	잔량
15	디오스민	1	-

[0131] 상기 표 3의 각 성분번호로 구별된 성분 중에서, 먼저 성분 1 내지 8을 70의 온도에서 가열 용해시킨 다음, 성분 9 내지 13을 성분 14에 용해 분산시켜 70로 가열한 것에 유효한다. 이후, 상기 유효한 것을 56의 온도로 냉각한 후, 분취된 성분 9에 용해시킨 성분 15를 가하여 교반하고 실온에서 냉각하여 제조하였다.

[0132] 상기 실험예 1에 대한 그 비교예 1은 성분 15인 디오스민을 제외한 나머지 성분구성이나 제조방법은 동일하게 진행하여 제조한 것을 설정하였다.

[0133] 3-2. 주름개선효과 및 피부자극 관능시험

[0134] 본 발명에 따른 화장료 조성물의 피부 주름개선효과 및 피부자극을 평가하기 위하여, 상기 표 3의 실험예 1과 비교예 1에서 제조된 영양크림을 이용하여 관능시험을 실시하였다.

[0135] 구체적으로, 표 3에 기재된 실험예 1과 비교예 1 제형의 영양크림을 피부에 각각 도포했을 때 피부의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 20대 내지 50대 연령층의 여성 20명에게 안면 왼쪽 부분에는 표 3의 실험예 1 영양크림(시험군)을, 안면 오른쪽 부분에는 표 3의 비교예 1 영양크림(대조군)을 1일 1회 12주간 지속적으로 사용하게 하였다.

[0136] 관능시험에서 피부의 주름개선효과 항목에 대하여는 비교예의 영양크림을 기준으로 실험예 1의 영양크림이 나타내는 주름개선효과를 상대적으로 평가하게 하였고, 피부자극에 대한 관능평가는 피부의 가려움, 따가움 및 홍반 등의 현상을 평가하게 하였다. 평가는 매우 우수(5점), 우수(4점), 보통(3점), 나쁨(2점), 매우 나쁨(1점)의 오점법 기준에 의거하여 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 표 4에서 피부자극은 점수가 높을수록 피부자극이 적은 것을 나타낸다.

표 4

[0137]

번호	피부자극		주름개선	
	실험예 1	비교예 1	실험예 1	비교예 1
1	5	4	3	3
2	5	5	4	4
3	4	4	5	4
4	4	4	5	5
5	5	5	4	3
6	4	5	4	4

7	4	4	4	4
8	4	5	4	5
9	3	4	4	4
10	4	5	5	4
11	5	4	4	4
12	5	5	5	4
13	4	4	5	4
14	5	5	4	4
15	4	3	3	3
16	5	5	4	3
17	5	4	4	4
18	5	5	4	4
19	4	4	5	5
20	4	4	5	5
평균	4.4	4.4	4.25	4.0

[0138] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 디오스민을 함유하는 실험예 1의 영양 크림 제형에 대한 피부자극 평가점수는 4.4점으로 매우 양호하게 평가되어, 동일한 점수를 받은 비교예 1의 영양 크림 제형과 마찬가지로 피부자극 정도가 낮아 피부 안전성이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0139] 또한, 비교예 1의 영양 크림 제형과 비교하여 디오스민을 함유하는 실험예 1의 영양 크림 제형의 상대적인 피부 주름 개선효과는 평가점수 4.25점으로 주름개선 정도 또한 매우 우수함을 알 수 있었다.

[0140] 따라서, 본 발명의 디오스민 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 피부 부작용이 없으며, 피부주름 개선효과, 콜라겐 단백질의 합성 증가 및 콜라겐 섬유의 분해 저해 효과가 우수하여 피부 주름 개선에 탁월하다.

[0141] 3-3. 피부 보습력 증가 측정 시험

[0142] 상기 표 3에 기재된 실험예 1과 비교예 1 제형의 영양크림을 피부에 각각 도포했을 때 피부의 수분 보유능을 측정하기 위하여, 20대 내지 50대 연령층의 여성 20명에게 안면 왼쪽 부분에는 표 3의 실험예 1 영양크림(시험군)을, 안면 오른쪽 부분에는 표 3의 비교예 1 영양크림(대조군)을 충분한 양으로 부드럽게 마사지하여 도포하도록 하였다. 마사지는 골고루 약 1분간에 걸쳐서 실시하였다.

[0143] 피부 수분량의 측정은 도포 전 실내온도 25 및 상대습도 45%의 항온 항습실에서 코니오미터를 이용하여 피부 수분량을 측정하고, 상기 표 3의 실험예 1과 비교예 1 제형을 각각 안면 왼쪽 및 오른쪽에 도포 후 10분에 걸쳐 휴식을 취하고 도포 12시간 후 및 도포 24시간 후의 피부 수분량을 측정하였다. 측정 기기는 피부의 수분 함량에 따른 피부의 전기 용량을 측정하여 보습력을 측정하는 수분 함량측정기(coneometer; CM820, Courage Khazaka electronic GmbH, Germany)를 사용하여 피부 수분량을 측정하였다. 코니오미터는 피부의 표피내에 존재하는 수분의 양을 센서를 이용하여 수분의 이온 정도를 측정하고 이를 수치화하여 수분의 양을 계산함으로써 보습력을 측정하는 것이며, 측정방법은 하기와 같다.

[0144] 1) 측정하고자 하는 피부 부위에 코니오미터 프로브를 올려놓았다.

[0145] 2) 프로브를 피부에 누르면 센서를 통하여 피부의 전기전도도(capacitance)를 수치화하여 화면에 표시되었다.

[0146] 3) 측정부위를 달리하여, 측정을 반복하였다.

[0147] 4) 한번 측정 후, 김와이프 같은 휴지로 센서를 닦은 후, 다시 측정하였다.

[0148] 측정치는 평균값으로 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

시험 물질	피부 수분량(%)		
	도포 전	12시간 후	24시간 후
실험예 1	30.3	44.1	38.7
비교예 1	30.2	38.0	30.8

[0150] 상기의 결과에서 나타난 바와 같이, 비교예의 영양 크림을 도포한 경우 도포 12시간 경과 후에는 피부 수분량이 어느 정도 증가하였지만, 24시간 경과 후에는 도포 전의 상태와 유사한 수준으로 되돌아감을 알 수 있다. 반면, 디오스민을 함유하는 실험예 1의 영양 크림을 피부에 도포한 경우, 보습력이 24시간 이상 지속되고 피부 수분량 증가 효과 또한 비교예 1 보다 높음을 확인할 수 있었다.

[0151] 3-4. 피부각질 제거 효과 시험

[0152] 상기 표 3에 기재된 실험예 1과 비교예 1 제형의 영양크림을 피부에 각각 도포했을 때 피부각질 제거 효과를 측정하기 위하여, 20대 내지 50대 연령층의 여성 20명에게 안면 왼쪽 부분에는 표 3의 실험예 1 영양크림(시험군)을, 안면 오른쪽 부분에는 표 3의 비교예 1 영양크림(대조군)을 충분한 양으로 부드럽게 마사지하여 도포하도록 하였다. 마사지는 골고루 약 1분간에 걸쳐서 실시하였다.

[0153] 피부 각질량의 측정에는 도포 전 실내온도 25 및 상대습도 45%의 항온 항습실에서 Charm view(Moritex, Japan)를 이용하여 초기 피부 각질량을 측정하였으며, 상기 표 3의 실험예 1과 비교예 1 제형을 각각 안면 왼쪽 및 오른쪽에 도포한 다음 24시간 후의 피부 각질량을 측정하고 피부 각질 감소량을 계산하였다. 각각의 값은 평균값으로 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

시험 물질	피부 각질량(%)		
	도포 전	24시간 후	피부각질 감소량
실험예 1	20.4	9.6	10.8
비교예 1	20.2	15.9	4.3

[0155] 상기의 결과에서 나타난 바와 같이, 디오스민을 함유하는 실험예 1의 영양 크림은 디오스민을 함유하지 않는 비교예 1의 영양 크림보다 피부각질 감소 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 피부에 보습 효과가 부여될수록 각질량은 감소하게 되는데 실험예 1의 영양 크림은 상기 실시예 3-3에서 입증된 바와 같이 뛰어난 수분 보유능으로 인해 비교예 1의 영양 크림보다 월등한 피부각질 감소 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

[0156] [제조예 1] 화장품의 제조

[0157] 1-1. 유연 화장수의 제조

[0158] 하기 표 7의 조성으로, 디오스민을 함유하는 유연 화장수를 제조하였다.

표 7

조성	제조예 1-1(중량%)
디오스민	0.1
에탄올	10.0
폴리라우린산 폴리옥시에틸렌 소르비탄	1.0
과라옥시안식향산메칠	0.2
글리세린	5.0
1,3-부틸렌글리콜	6.0
향	적량
색소	적량

[0160] 1-2. 영양 화장수의 제조

[0161] 하기 표 8의 조성으로, 디오스민을 함유하는 영양 화장수를 제조하였다.

표 8

조성	제조예 1-2(중량%)
디오스민	0.05
와셀린	2.0
세스퀴올레인산소르비탄	0.8

폴리옥시에틸렌올레일에틸	1.2
파라옥시안식향산메칠	적량
프로필렌글리콜	5.0
에탄올	3.2
카르복시비닐폴리머	18.0
수산화칼륨	0.1
색소	적량
향	적량

[0163] 1-3. 영양 크림의 제조

[0164] 하기 표 9의 조성으로, 디오스민을 함유하는 영양 크림을 제조하였다.

표 9

[0165]

조성	제조예 1-3(중량%)
디오스민	0.2
스테아린산	15.0
세탄올	1.0
수산화칼륨	0.7
글리세린	5.0
프로필렌글리콜	3.0
방부제	적량
향	적량
정제수	to 100

[0166] 1-4. 팩의 제조

[0167] 하기 표 10의 조성으로, 디오스민을 함유하는 팩을 제조하였다.

표 10

[0168]

조성	제조예 1-4(중량%)
디오스민	0.05
글리세린	5.0
프로필렌글리콜	4.0
폴리비닐알코올	15.0
에탄올	8.0
폴리옥시에틸렌올레일에칠	1.0
파라옥시안식향산메칠	0.2
색소	적량
향	적량

[0169] 1-5. 에센스의 제조

[0170] 하기 표 11의 조성으로, 디오스민을 함유하는 에센스를 제조하였다.

표 11

[0171]

조성	제조예 1-5(중량%)
디오스민	0.2
프로필렌글리콜	10.0
글리세린	10.0
히아루론산나트륨수용액(1%)	5.0
에탄올	5.0
폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
파라옥시안식향산메칠	0.1
향	적량

정제수	to 100
-----	--------

[0172] [제조예 2] 건강기능식품의 제조

[0173] 2-1. 건강기능식품의 제조

[0174] 하기 표 12의 조성으로, 디오스민을 함유하는 건강기능식품을 제조하였다.

표 12

[0175]

조성	제조예 2-1
디오스민	1000 mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	1.0 mg
비타민 E	0.13 mg
비타민 B1	0.15 mg
비타민 B2	0.5 mg
비타민 B6	0.2 µg
비타민 B12	10 mg
비타민 C	10 µg
비오틴	1.7 mg
니코틴산아미드	50 µg
엽산	0.5 mg
판토텐산 칼슘	적량
무기질 혼합물	적량
황산제1철	1.75 mg
산화아연	0.82 mg
탄산마그네슘	25.3 mg
제1인산칼륨	15 mg
제2인산칼륨	55 mg
구연산칼륨	90 mg
탄산칼슘	100 mg
염화마그네슘	24.8 mg

[0176] 상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0177] 2-2. 건강 음료의 제조

[0178] 하기 표 13의 조성으로, 디오스민을 함유하는 건강 음료를 제조하였다.

표 13

[0179]

조성	제조예 2-2(mg)
디오스민	1000 mg
구연산	1000 mg
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수	적량

[0180] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 에서 교반 가열한 후 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 21 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 불 발명의 건강 음료 조성물의 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하

다.

[0181] 2-3. 정제의 제조

[0182] 하기 표 14의 조성으로, 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 디오스민을 함유하는 정제를 제조하였다.

표 14

[0183]

조성	제조예 2-3(mg)
디오스민	100 mg
옥수수 전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

[0184] 2-4. 캡슐제의 제조

[0185] 하기 표 15의 조성으로, 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 디오스민을 함유하는 캡슐제를 제조하였다.

표 15

[0186]

조성	제조예 2-4(mg)
디오스민	100 mg
옥수수 전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

[0187] 2-5. 환의 제조

[0188] 하기 표 16의 조성으로, 통상의 환 제조 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 환을 제조하였다.

표 16

[0189]

조성	제조예 2-5(mg)
디오스민	1 g
유당	1.5 g
글리세린	1 g
자일리톨	0.5 g

[0190] 2-6. 과립의 제조

[0191] 하기 표 17의 조성으로, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하여 과립을 제조하였다.

표 17

[0192]

조성	제조예 2-6(mg)
디오스민	150 mg
대두추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

[0193] [제조예 3]

[0194] 피부 외용 연고의 제조

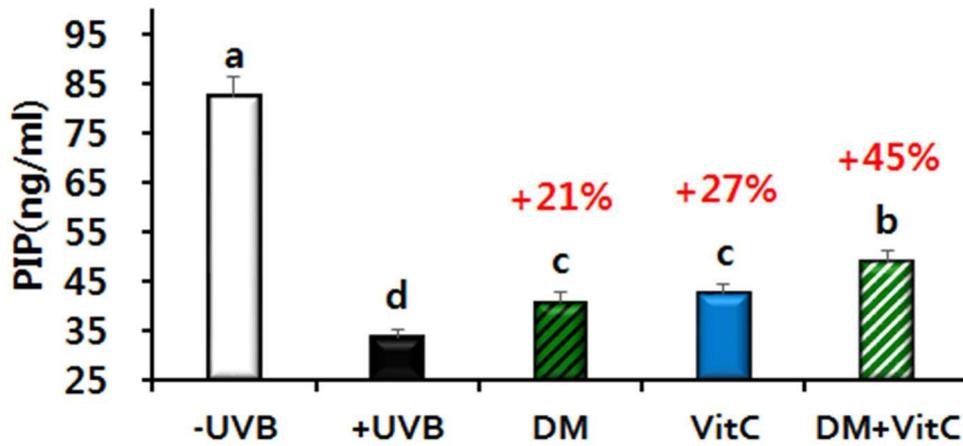
[0195] 하기 표 18의 조성으로, 디오스민을 함유하는 피부 외용 연고를 제조하였다.

표 18

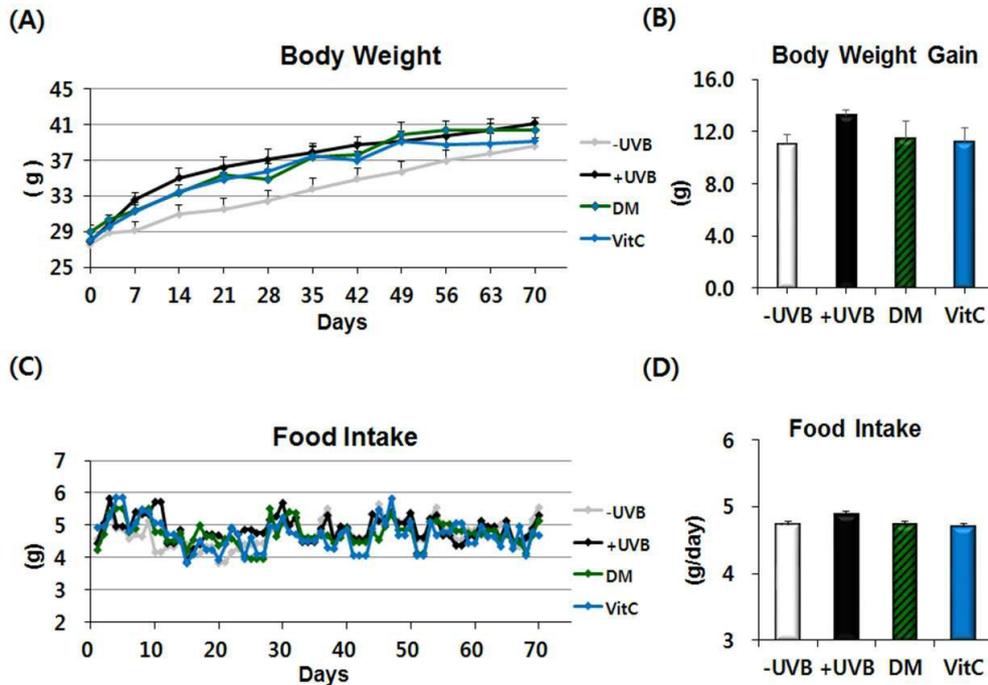
조성	제조예 3(중량%)
디오스민	0.5
디에틸 세바케이트	8.0
경납	5.0
폴리옥시에틸렌올레일테르 포스 페이트	6.0
벤조산 나트륨	적량

도면

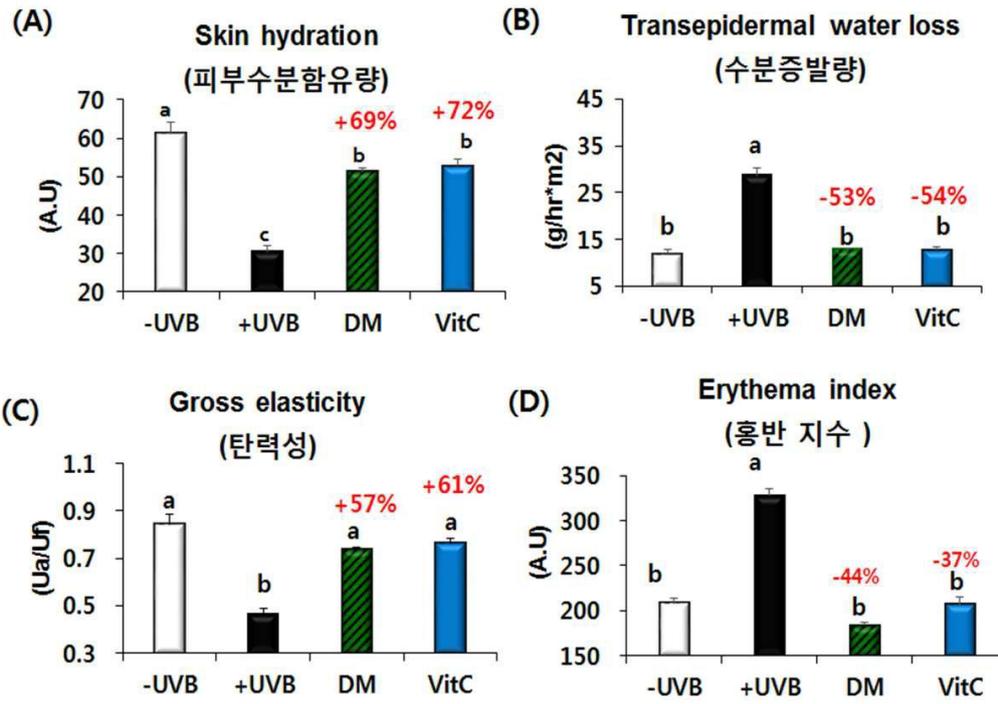
도면1



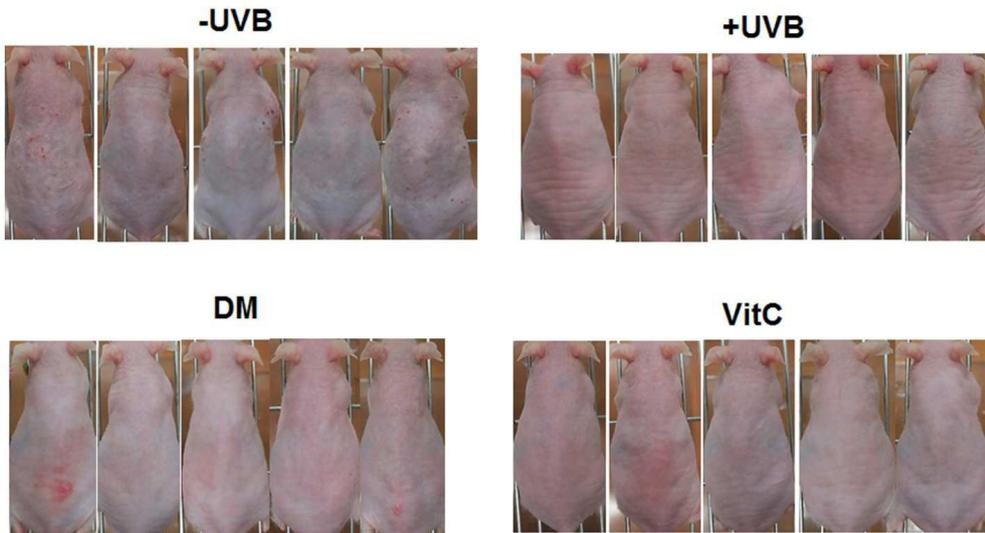
도면2



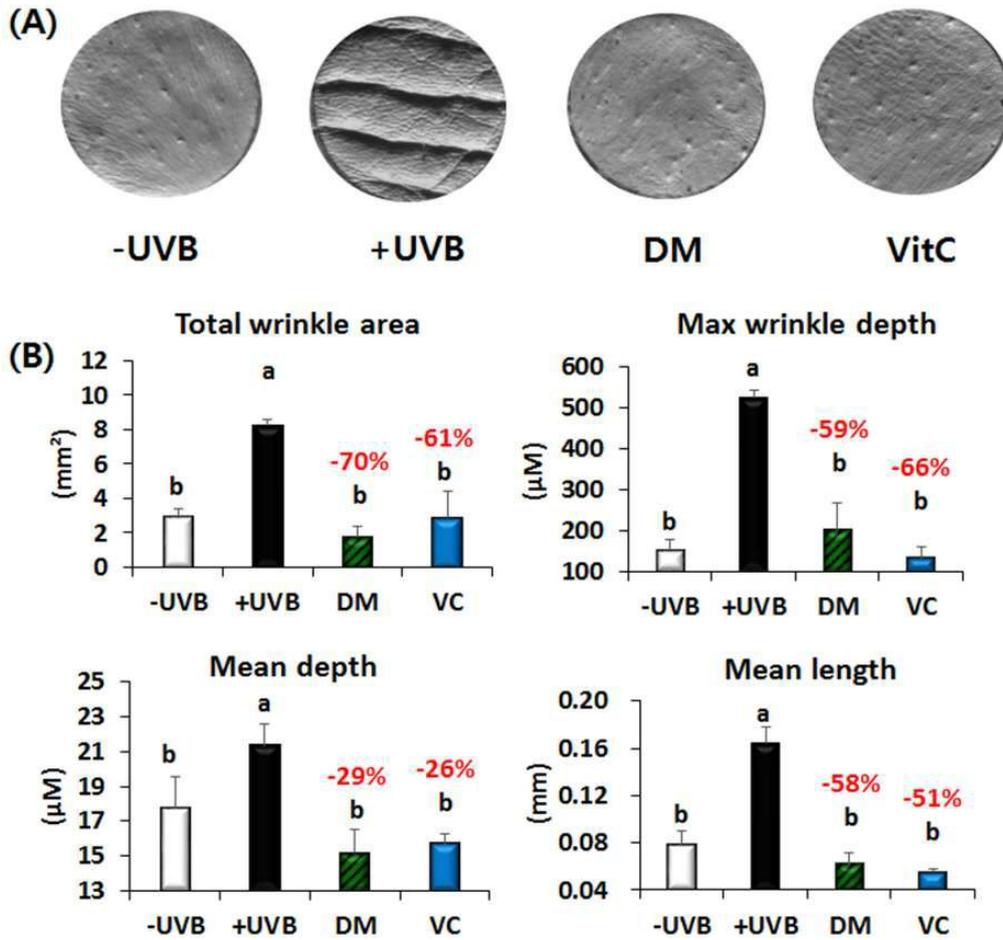
도면3



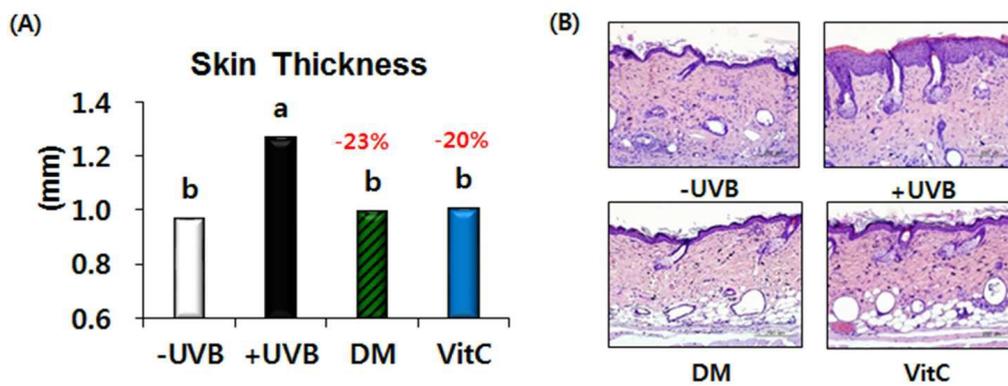
도면4



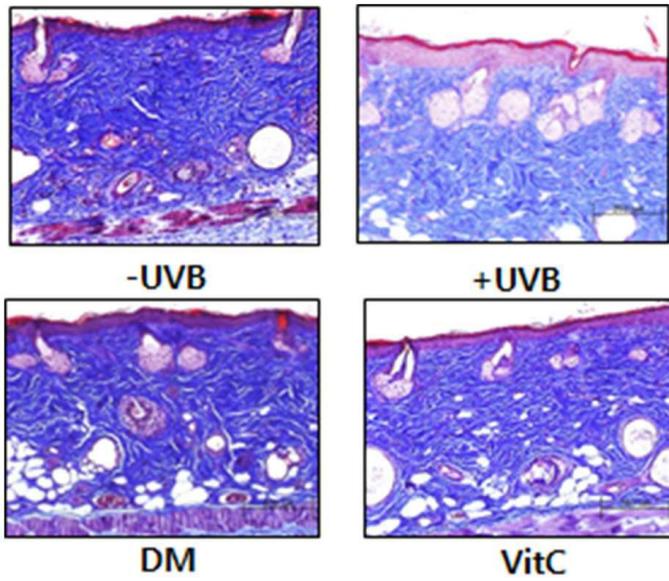
도면5



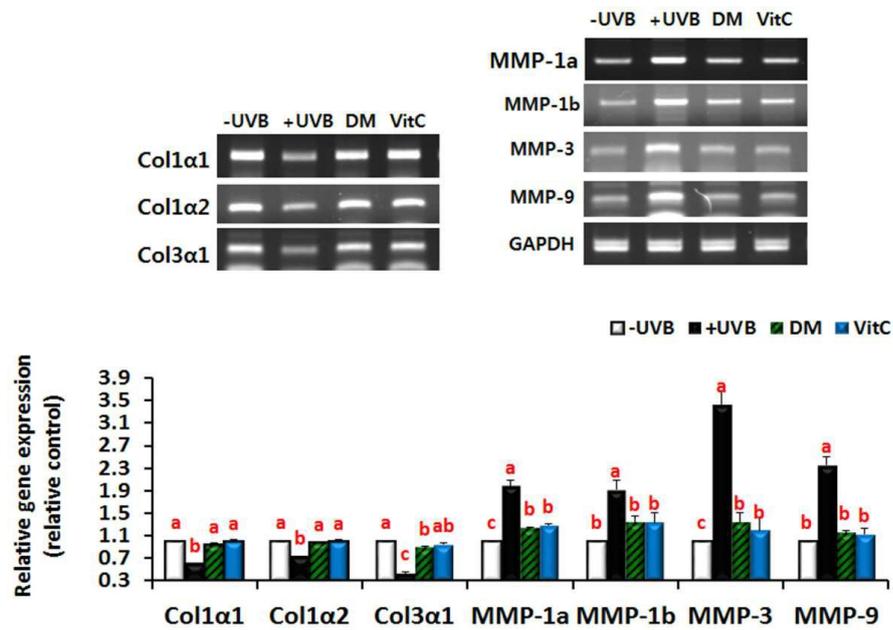
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition having effects of skin moisturizing, exfoliating, improving skin elasticity, inhibiting erythema, anti-wrinkle or improving skin photoaging comprising diosmin or salt thereof
- <130> 1060480
- <160> 16
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type 1 alpha 1 forward primer
 <400> 1
 ggcaacagtc gcttcaccta 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type 1 alpha 1 reverse primer
 <400> 2
 agtccgaatt cctggctctgg 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type 1 alpha 2 forward primer
 <400> 3
 cggttctggt ggtcctgttg 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type 1 alpha 2 reverse primer
 <400> 4
 acccctgtgc cctttatcac 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Collagen type 3 alpha 1 forward primer
 <400> 5

taaccaaggc tgcaagatgg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Collagen type 3 alpha 1 reverse primer

<400> 6

accagtgctt acgtgggaca 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1a forward primer

<400> 7

ccctgtgttt cacaacggag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1a reverse primer

<400> 8

cctcagcttt tcagccatca 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1b forward primer

<400> 9

tttgctcatg cttttctgcc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1b reverse primer
 <400> 10
 gaatgggaga gtccaaggga 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-3 forward primer
 <400> 11
 tgctggtatg gagcttctgc 20
 <210> 12

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-3 reverse primer
 <400> 12
 catctccaac ccgaggaact 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 forward primer
 <400> 13
 gtggaccatg aggtgaacca 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-9 reverse primer
 <400> 14

 actgcacggt tgaagcaaag 20
 <210> 15
 <211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GAPDH forward primer
<400> 15
ggagattggt gccatcaacg 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GAPDH reverse primer
<400> 16
tgacaagctt cccattctcg 20