



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월01일
(11) 등록번호 10-2494244
(24) 등록일자 2023년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9794 (2017.01) A61K 36/90 (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 8/9794 (2017.08)
A61K 36/90 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0166391
(22) 출원일자 2020년12월02일
심사청구일자 2020년12월02일
(65) 공개번호 10-2022-0077963
(43) 공개일자 2022년06월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110076043 A*
KR1020150104916 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
호서대학교 산학협력단
충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20 (호서대학교)

(72) 발명자
이환명
충청남도 천안시 서북구 늘푸른1길 19, 102동 513호(두정동, 부경아파트)
리아리
충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 8-13, 303호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

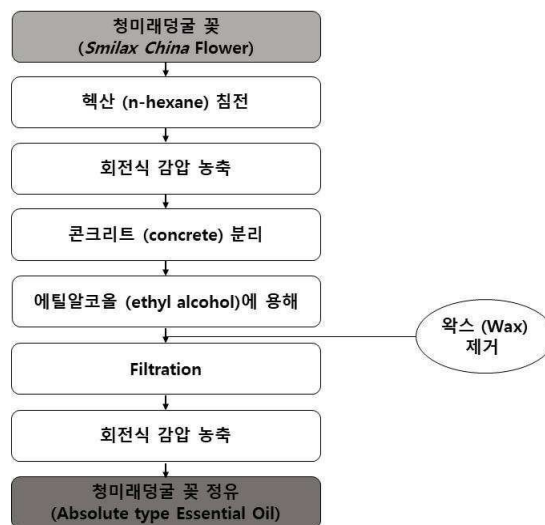
심사관 : 조미선

(54) 발명의 명칭 **청미래덩굴 꽃 유래의 앵술루트 타입형 정유를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 및 상처 치 료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 청미래덩굴 꽃(*Smilax china* Flower) 유래 앵술루트 정유를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 및 상처 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는, 청미래덩굴 꽃으로부터 앵술루트 타입(Absolute type)의 정유를 추출하는 방법을 제공하며, 상기 방법을 통해 제조된 정유는 피부세포 수준에서 세포 증식과 이동 및 콜라겐 합성 유도 효과를 통하여 우수한 피부 재생, 피부 탄력 증진 및 상처 치유 효과를 확인하였으므로, 이는 화장품 조성물 또는 피부 외용제 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
A61K 8/922 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
A61P 17/02 (2018.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

이수연

경기도 수원시 권선구 매실로 70, 106동 1504호(호매실동, 호매실GS아파트)

원유림

경상북도 경산시 진량읍 일연로 747, 105동 1706호(이안 경산진량 아파트)

- (72) 발명자
김미정
 경상북도 경주시 충효2길 32, 201동 104호(충효동, 삼보마을1차)
- 김도윤**
 경기도 화성시 영통로27번길 35, 207동 1802호(반월동, 신영통현대아파트)
- 강혜민**
 서울특별시 동작구 양녕로25사길 33, 301호 (상도동, 강남빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405003870
과제번호	2017032B10-1919-BA01
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림생명자원 소재 발굴 연구(R&D)
연구과제명	자생 초본식물 유래 에센셜오일의 발굴과 피부 생리활성 규명을 통한 항노화 화장품 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	호서대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.31 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405004240
과제번호	2020190B10-2022-BA01
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림생명자원 소재 발굴 연구(R&D)
연구과제명	산림자원 Terpenoids 기반 보툴리눔독신 기능개선 소재 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	호서대학교 산학협력단
연구기간	2020.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부외용제 조성물에
서,

상기 정유는, 헥산에 의해 추출된 콘크리트를 알코올에 용해하여 불용성 왁스를 제거한 앵솔루트인 것인, 조성
물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 정유는 노나날 (Nonanal) , 테트라데카날 (Tetradecanal) , 노나데칸 (Nonadecane) , n-헥사데카노익산 (n-Hexadecanoic acid) , 에틸 팔미테이트 (Ethyl palmitate) , n-에이코산 (n-Eicosan) , 1-노나데센 (1-Nonadecene) , 1-헵타데센 (1-Heptadecene) , n-헤네이코산 (n-Heneicosane) , 9,12,15-옥타데카트리노산염, 메틸에스터 (9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester,(Z,Z,Z)) , 도코산 (Docosane) , 무스칼루어 (Muscalure) , 트리코산 (Tricosane) , 테트라코산 (Tetracosane) , 1-도코산 (1-Docosane) , 펜타코산 (Pentacosane) , 헥사코산 (Hexacosane) , 1-옥타데카놀 (1-Octadecanol) , 헵타코산 (Heptacosane) 및 β -시토스테롤 (β -Sitosterol) 의 휘발성 유기 화합물을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 정유는 1 ~ 250 μ g/mL의 범위로 포함되는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 정유는 표피 각질형성세포의 증식 및 이동을 유도하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 정유는 표피 각질형성세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt) 또는 표피 각질형성세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화 과정 및 신호전달 과정을 유도하는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 정유는 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV의 합성을 유도하는 것인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 정유는 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV 맹아(sprouting)의 성장(out growth) 촉진 효과를 유도하는 것인, 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 청미래덩굴 꽃(*Smilax china* Flower) 유래의 앵솔루트 타입형 정유를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 및 상처 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, 청미래덩굴 꽃으로부터 앵솔루트 타입형(Absolute type)의 정유를 추출하는 방법 및 이로부터 제조된 정유를 포함하는 화장품 조성물 또는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부(Skin)는 신체의 수분 손실을 최소화하고 외부 환경으로부터 유해한 물질(병원체 및 알레르겐)의 유입과 물리적인 스트레스로부터 인체를 보호하는 장벽이며, 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하지방(subcutis) 3개의 층으로 구성되어있다. 피부(Skin)는 편평상피로 구성된 얇은 층이며, 각질형성세포(keratinocyte)가 피부 표피의 95%를 차지한다. 표피의 각질형성세포는 기저층으로부터 증식, 이동 및 분화 과정을 통해 각질을 형성하여 피부를 보호하고, 다양한 사이토카인을 생산하여 염증반응과 면역반응에 관여한다. 또한, 콜라겐(collagen) 합성을 유도하여, 피부의 탄력 증진과 기저막 형성을 향상시켜 피부 세포들의 부착과 증식이 조절되고, 유해물질을 선택적으로 투과하는 장벽기능의 향상과 표피와 진피의 상호작용 등을 제공한다. 사람의 피부에는 type I, III, IV, V, VI 및 VII 콜라겐이 분포하고 있다. type I 콜라겐은 피부 진피층의 85% 이상을 구성하고, type IV 콜라겐은 기저막(basement membrane)의 주요 구조 단백질이다. type I 및 IV 콜라겐의 합성은 피부의 탄력을 증진시키고, 기저막 형성을 향상시켜 피부 세포들의 부착과 증식이 조절된다. 이로 인해, 피부 표피 각질형성세포의 이동과 증식, 그리고 콜라겐 합성의 유도는 피부 재생과 상처치유뿐만 아니라 피부 탄력을 증진시키고 건강한 피부가 유지되도록 도와준다.

[0003] 천연물 유래 "정유"란 방향유(식물의 잎, 줄기, 열매, 꽃, 뿌리 따위에서 채취한 향기로운 휘발성의 물질)을 통칭하는 용어로서, 추출물, 추출법, 용도 및 목적에 따라 다양하게 분류된다. 천연물 유래 정유는 추출법에 따라 에센셜오일(essential oil), 앵솔루트(absolute), 콘크리트(concrete) 등으로 분류된다. 이러한 천연물 유래 정유의 방향성 성분이 피부, 순환계, 후각계를 통해 진정, 긴장완화 등의 효과를 나타내고 항균작용, 면역증진, 항알러지 작용 등의 치료효과를 나타내어 오래전부터 질병의 치료와 예방에 활용되어왔을 뿐만 아니라, 식품 향료와 화장품 원료로 사용되고 있다.

[0004] 한편, 청미래덩굴(*Smilax China*)은 백합과(Smilacaceae)에 속하는 덩굴성 관목이다. 우리나라 황해도이남 각처에서 흔히 나는 가시덩굴나무이며, 뿌리는 굵고 구불구불하게 뻗는다. 잎은 어긋나고 둥글고 윤채가 나는 녹색이며 가장자리는 밋밋하다. 꽃은 늦은 봄에 암수가 딴 나무에 노랗게 핀다. 청미래덩굴은 2 m 길이로 자라며 꽃은 5월에 핀다. 약성은 평하고 감하며 거풍습, 이뇨, 해독의 효능이 있어 관절동통, 마목, 수종, 염, 이질, 임파선염, 매독, 암종 등에 치료제로 쓰인다.

[0005] 그러나 현재까지 청미래덩굴을 활용한 피부생리활성연구 진행이 미흡하며, 특히 청미래덩굴에 다량 함유되어있는 정유를 활용한 연구는 전무하다. 본 발명자들은 청미래덩굴의 꽃으로부터 정유를 추출하여 *in vitro* 피부 복원효과에 대해 연구하던 중 청미래덩굴 꽃 유래의 정유가 세포 증식과 이동 및 콜라겐 합성 유도효과를 통하여 우수한 피부 재생, 피부 탄력 증진 및 상처 치유 효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR10-2014-0072126

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제를 해소하기 위해, 본 발명은 청미래덩굴 꽃에서 정유를 추출하여 이의 구성 성분을 규명하고, 피부 탄력증진, 피부 재생 및 상처 치유 효능을 확인하여, 본 발명을 완성하였다. 아울러, 본 발명은 청미래덩굴 꽃 정유의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 정유는, 휘발성 용제를 이용하여 유기용매 추출법에 의해 추출된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃은 건조되지 않은 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 정유는, 유기 용매 추출법에 의해 추출된 콘크리트를 알코올로 추출하여 불용성 왁스를 제거한 앵솔루트인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 노나날 (Nonanal), 테트라데카날 (Tetradecanal), 노나데칸 (Nonadecane), n-헥사데카노익산 (n-Hexadecanoic acid), 에틸 팔미테이트 (Ethyl palmitate), n-에이코산 (n-Eicosan), 1-노나데센 (1-Nonadecene), 1-헵타데센 (1-Heptadecene), n-헤네이코산 (n-Heneicosane), 9,12,15-옥타데카트리노산염, 메틸에스터 (9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)), 도코산 (Docosane), 무스칼루어 (Muscalure), 트리코산 (Tricosane), 테트라코산 (Tetracosane), 1-도코산 (1-Docosane), 펜타코산 (Pentacosane), 헥사코산 (Hexacosane), 1-옥타데카놀 (1-Octadecanol), 헵타코산 (Heptacosane) 및 β-시토스테롤 (β-Sitosterol) 의 휘발성 유기 화합물을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 정유는 1 ~ 250 μg/mL의 범위로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 표피 각질형성세포의 증식 및 이동을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt) 또는 표피 각질형성세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화 과정 및 신호전달 과정을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV의 합성을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV 맹아 (sprouting)의 성장(out growth) 촉진 효과를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 또한, 본 발명은 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부 외용제 조성물에서, 상기 정유는, 유기 용매 추출법에 의해 추출된 콘크리트를 알코올로 추출하여 불용성 왁스를 제거한 앵솔루트인 것을 특징으로 하고, 상기 정유는 1 ~ 250 μg/mL의 범위로 포함되는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 표피 각질형성세포의 증식 및 이동을 유도하는 것을 특징으로 하고, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt) 또는 표피 각질형성세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화 과정 또는 신호전달 과정을 유도하는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV의 합성을 유도하는 것을 특징으로 하고, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV 맹아(sprouting)의 성장(out growth) 촉진 효과를 유도하는 것을 특징으로 하는,

상처 치료용 피부외용제 조성물을 제공한다.

[0019] 아울러, 본 발명은 청미래덩굴 꽃이 피기 직전의 꽃망울을 세척하는 1단계; 상기 청미래덩굴 꽃망울을 헥산(n-hexane)에 침전하는 2단계; 상기 침전물을 회전식 증발기(rotary evaporation)에서 증발시켜 농축시킴으로써 고형의 콘크리트(concrete)를 획득하는 3단계; 상기 콘크리트를 에틸알코올(ethyl alcohol)을 넣어 용해시키고, 영하 20℃에서 보관한 후, 진공 냉각 필터(vacuum cooling filtration)를 거쳐 불용성 왁스(wax)를 제거하는 4단계; 및 회전식 증발기(rotary evaporation)를 이용하여 농축, 분리 및 정제함으로써 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하는 5단계를 포함하는, 피부 재생 또는 주름 개선효과를 가지는 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 청미래덩굴 꽃으로부터 추출된 Absolute type 정유의 성분을 규명하고, 이의 피부 탄력증진, 피부재생 및 상처 치유 효능을 입증한 것으로, 피부세포 수준에서 세포 증식 및 이동을 유도하여 피부 재생 및 상처 치유에 우수한 효과를 갖는다. 또한, 본 발명에 따른 청미래덩굴 꽃으로부터 추출된 정유는 뛰어난 피부 재생 및 상처 치유 효과를 나타내고 있어, 화장품 또는 피부외용제 등으로서 다양하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃으로부터 Absolute type 정유를 추출하는 과정을 나타내는 흐름도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃으로부터 추출한 Absolute type 정유의 표피 각질형성세포에 대한 독성을 나타내는 그래프이다.

도 3은 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 표피 각질형성세포의 증식 및 이동 효과에 대한 것이다. (A)는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 표피 각질형성세포의 증식에 미치는 효과를 나타낸 그래프이고, (B)는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 표피 각질형성세포의 이동에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 콜라겐 합성에 미치는 효과를 나타낸 도이다. (A)는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 콜라겐 type I 합성에 미치는 효과를 정량화하여 나타낸 그래프이고, (B)는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 콜라겐 type IV 합성에 미치는 효과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포에서 콜라겐 맹아(sprouting) 자연성장(out growth)에 미치는 효과를 나타낸 이미지이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포에서 콜라겐 맹아(sprouting) 자연성장(out growth)에 미치는 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 6a는 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성 세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt) 및 세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화에 미치는 영향을 나타낸 이미지이다.

도 6b는 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성 세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt)의 인산화에 미치는 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 6c는 일 실시예에 있어서 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화에 미치는 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0023] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사

용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [0024] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0025] 일 측면에서, 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 일 구현예에서, 정유는 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃을 유기용매 추출법으로 추출하여 콘크리트를 얻고, 이를 유기용매에 용해 및 여과하여 불용성 왁스를 제거하여 앵솔루트를 얻음으로써 제조될 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 본 발명의 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃이 피기 직전의 꽃망울을 세척하는 1단계; 상기 청미래덩굴 꽃망울을 헥산(n-hexane)에 침전하는 2단계; 상기 침전물을 회전식 증발기(rotary evaporation)에서 증발시켜 농축시킴으로써 고형의 콘크리트(concrete)를 획득하는 3단계; 상기 콘크리트를 에틸알코올(ethyl alcohol)을 넣어 용해시키고, 영하 20℃에서 보관한 후, 진공 냉각 필터(vacuum cooling filtration)를 거쳐 불용성 왁스(wax)를 제거하는 4단계; 및 회전식 증발기(rotary evaporation)를 이용하여 농축, 분리 및 정제함으로써 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하는 5단계를 포함하는, 피부 재생 또는 주름 개선효과를 가지는 청미래덩굴 꽃 정유를 제조할 수 있다.
- [0028] 상기 유기용매 추출법과 추출물로부터 앵솔루트를 분리하는 방법은 이 기술 분야에서 보통의 지식을 가진 자가 변형할 수 있는 모든 방법을 포함하는 것이 가능하다.
- [0029] 일 구현예에서, 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃에서 추출한 정유는 노나날 (Nonanal), 테트라데카날 (Tetradecanal), 노나데칸 (Nonadecane), n-헥사데카노익산 (n-Hexadecanoic acid), 에틸 팔미테이트 (Ethyl palmitate), n-에이코산 (n-Eicosan), 1-노나데센 (1-Nonadecene), 1-헵타데센 (1-Heptadecene), n-헥네이코산 (n-Heneicosane), 9,12,15-옥타데카트리노산염, 메틸에스터 (9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)), 도코산 (Docosane), 무스칼루어 (Muscalure), 트리코산 (Tricosane), 테트라코산 (Tetracosane), 1-도코산 (1-Docosane), 펜타코산 (Pentacosane), 헥사코산 (Hexacosane), 1-옥타데카놀 (1-Octadecanol), 헵타코산 (Heptacosane) 및 β-시토스테롤 (β-Sitosterol) 의 휘발성 유기 화합물 성분을 포함할 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃은 꽃이 피기 직전의 꽃봉오리일 수 있으며, 건조되지 않은 꽃일 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명의 화장료 조성물은 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃에서 추출한 정유를 1 내지 250 μg/mL의 농도로 사용할 수 있으며, 50 내지 250 μg/mL의 농도로 포함하는 것이 가장 우수한 피부 재생 및 상처 치유 효과를 가지기 때문에 더욱 바람직하다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 용어 “정유(精油)”란 식물(식물의 잎, 줄기, 열매, 꽃, 뿌리 등)로부터 추출 분리한 방향유(휘발성 물질)를 통칭하는 용어로서, 추출물, 추출법, 용도 및 목적에 따라 다양하게 분류된다. 천연물 유래 정유는 추출법에 따라 에센셜오일(essential oil), 앵솔루트(absolute), 콘크리트(concrete) 등으로 분류된다.
- [0033] 본 발명에서 사용된 용어 “추출물(extract)”이란 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며, 추출물 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출 과정을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다. 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반 추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C₁-C₄의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있다.
- [0034] 본 발명의 화장료 조성물은 상술한 본 발명의 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃에서 추출한 정유의 화장품학적 유효량(cosmetically effective amount) 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “화장품학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 표피 각질형성세포의 증식을 통한 피부

재생 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

- [0036] 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기체를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 또한 폼(foam)의 형태로 또는 압축된 추진체를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 및 바디에센스 등의 화장품으로 제형화될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 화장료 조성물은 스킨, 로션, 크림, 에센스, 팩, 파운데이션, 색조화장품, 선크림, 투웨이케이크, 페이스파우더, 콤팩트, 메이크업베이스, 스킨커버, 아이쉐도우, 립스틱, 립글로스, 립픽스, 아이브로우 펜슬, 화장수 등의 화장품 및 샴푸, 비누 등의 세정제에 적용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 화장료 조성물에는 상기 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃에서 추출한 정유 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 화장료 조성물에는 또한, 상기 기능성 첨가물과 더불어 필요에 따라 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분을 배합해도 된다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서의 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0047] 일 측면에서, 본 발명은 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부외용제 조성물에서, 상기 정유는, 유기 용매 추출법에 의해 추출된 콘크리트를 알코올로 추출하여 불용성 왁스를 제거한 앵솔루트인 것을 특징으로 하고, 상기 정유는 1 ~ 250 μg/mL의 범위로 포함되는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 표피 각질형성세포의 증식 및 이동을 유도하는 것을 특징으로 하고, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt) 또는 표피 각질형성세포 외 신호조절 키나아제

(Erk1/2)의 인산화 과정 또는 신호전달 과정을 유도하는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV의 합성을 유도하는 것을 특징으로 하고, 상기 조성물은 표피 각질형성세포 콜라겐 type I 또는 콜라겐 type IV 맹아(sprouting)의 성장(out growth) 촉진 효과를 유도하는 것을 특징으로 하는, 상처 치료용 피부외용제 조성물에 관한 것이다.

[0048] 일 구현예에서, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 표피 각질형성세포 증식, 재생 및 콜라겐 형성용일 수 있으며, 이는 노화와 주름, 상처 및 피부 병변으로 인하여 생리활성이 저하된 피부의 탄력, 재생, 및/또는 상처치유 등에 유용할 수 있다.

[0049] 일 구현예에서, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 청미래덩굴(*Smilax China*) 꽃에서 추출한 정유를 1 내지 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 사용할 수 있으며, 50 내지 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함하는 것이 가장 우수한 피부 재생 및 상처 치유 효과를 가지기 때문에 더욱 바람직하다.

[0051] 일 측면에서, 본 발명은 청미래덩굴 꽃이 피기 직전의 꽃망울을 세척하는 1단계; 상기 청미래덩굴 꽃망울을 헥산(n-hexane)에 침전하는 2단계; 상기 침전물을 회전식 증발기(rotary evaporation)에서 증발시켜 농축시킴으로써 고품질의 콘크리트(concrete)를 획득하는 3단계; 상기 콘크리트를 에틸알코올(ethyl alcohol)을 넣어 용해시키고, 영하 20°C에서 보관한 후, 진공 냉각 필터(vacuum cooling filtration)를 거쳐 불용성 왁스(wax)를 제거하는 4단계; 및 회전식 증발기(rotary evaporation)를 이용하여 농축, 분리 및 정제함으로써 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하는 5단계를 포함하는, 피부 재생 또는 주름 개선효과를 가지는 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예 또는 실험예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예 또는 실험예들에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예 또는 실험예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 제조**

[0056] 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 청미래덩굴 꽃으로부터 정유를 추출하는 과정을 나타내는 흐름도이고, 여기에 나타난 바와 같은 방법으로 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하였다. 본 실시예에서 청미래덩굴 꽃은 호서대학교(아산, 한국)에서 자생하고 있는 청미래덩굴 꽃을 5월에 채취하여 사용하였다. 청미래덩굴 꽃이 피기 직전 꽃망울 전체를 채취하여 세척 후, 생초 3 kg씩 유기용매 추출법을 이용하여 추출하였다. 즉, 건조하지 않은 청미래덩굴 꽃을 헥산(n-hexane)에 침전시켰고, 이렇게 얻은 침전물을 회전식 증발기(rotary evaporation)에서 증발시켜서 농축시킴으로써 고품질의 콘크리트(concrete)를 획득하였다. 그 다음, 상기 콘크리트를 에틸알코올(ethyl alcohol)을 넣어서 용해시키고 영하 20°C에서 보관한 후, 진공 냉각 필터(vacuum cooling filtration)를 거쳐서 불용성 왁스(wax)를 제거하였으며, 다시 회전식 증발기를 활용하여 농축 및 분리/정제함으로써 청미래덩굴 꽃 정유를 제조하였다. 그리고 상기 제조한 청미래덩굴 꽃 정유는 영하 80°C의 냉동고에서 보관하였다.

[0058] **실시예 2. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유의 성분 분석**

[0059] 청미래덩굴 꽃 정유의 성분 분석은 KBSI(Korea Basic Science Institute, Seoul Center)에 의뢰하였다. 가스 크로마토그래피/질량분석계(6890N GC/5975i MS, Agilent, USA)를 사용하였고, GC/MS의 컬럼(column)은 DB5-MS(30 m×50 μm , 0.25 μm)를 사용하였으며, 캐리어 가스(carrier gas)는 헬륨을 사용하여 1 mL/분으로 흐르게 하여 분석하였다. 오븐의 온도는 40°C-2°C/분-230°C-5°C/분-300°C(5분)으로 유지하였으며, injection의 온도는 280°C에서 분석하였다. 또한 Interface의 온도는 300°C, ion source의 온도는 230°C, analyzer의 온도는 150°C에서 분석하였으며, Mass range는 40~800 m/z에서 분석하였다.

[0060] 청미래덩굴 꽃 정유 성분의 확인은 휘발성분의 지체시간(retention indices, RI)과 표준물질의 지체시간과 일치하거나 휘발물질의 질량 스펙트럼과 Wiley 7Nist 05 library의 질량 스펙트럼을 비교하여 물질을 확인하였다. RI는 C6 ~ C24(nalkane)를 이용하여 시료와 동일 조건에서 결정하였다. 그 결과, 하기 표 1과 같이 총 20개의 성분으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.

표 1

No	Compound name	RT	Area (%)
1	Nonanal	22.226	0.68
2	Tetradecanal	54.718	0.82
3	Nonadecane	70.010	4.94
4	n-Hexadecanoic acid	73.003	0.98
5	Ethyl palmitate	74.450	0.77
6	n-Eicosane	74.811	1.37
7	1-Nonadecene	78.347	2.37
8	1-Heptadecanol	78.544	0.68
9	n-Heneicosane	79.530	35.97
10	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)	80.912	0.75
11	Docosane	83.822	2.69
12	Muscalure	87.127	2.71
13	Tricosane	88.130	25.44
14	Tetracosane	92.109	0.55
15	1-Docosane	95.562	1.32
16	Pentacosane	95.973	4.42
17	Hexacosane	110.824	4.03
18	1-Octadecanol	101.153	2.09
19	Heptacosane	101.317	5.08
20	β-Sitosterol	110.953	2.34
Total Identified (%)			100.00

[0062]

[0064]

실험예 1. 청미래덩굴 Absolute type 정유가 각질형성세포에 미치는 독성(세포 생존율) 측정

[0065]

상기 실시예 1에서 얻은 청미래덩굴 정유를 이용하여 각질형성세포에 미치는 독성(세포생존율)을 조사하였다. 각질형성세포를 0.1 mg/mL의 콜라겐(collagen, type I) 코팅된 96 well-plate에 5×10^3 cells/100 μ L/well의 농도로 넣은 다음, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 12시간 배양하였다. 배양 12시간 후, 청미래덩굴 정유를 1 ~ 250 μ g/mL 농도로 처리하고 24시간 배양하였으며, EZ-cytox를 처리한 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0066]

도 2에 나타난 바와 같이, 청미래덩굴 정유는 1 ~ 250 μ g/mL의 농도에서는 각질형성세포의 세포독성이 관찰되지 않았고, 특히 50 ~ 150 μ g/mL의 농도에서는 오히려 세포생존율이 증가함을 나타내었다. 따라서 본 발명에 사용되는 청미래덩굴 정유 성분의 농도는 250 μ g/mL 이하의 농도가 바람직한 것으로 확인하여 이후 실험에 적용하였다.

[0068]

실험예 2. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포의 증식에 미치는 효과

[0069]

상기 실시예 1에서 얻은 청미래덩굴 꽃 정유가 피부 표피 각질형성세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같이 실험을 진행하였다.

[0070]

사람 피부 유래 각질형성세포(HaCat)를 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 배양하고 본 발명의 실험 예에 활용하였다. 표피 각질형성세포를 96 well microtiter plate에 각 well 당 세포 수 3×10^3 cells/100 μ L/well이 되도록 주입하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0071]

청미래덩굴 꽃 정유 1 ~ 250 μ g/mL 농도로 각 well에 100 μ L씩 처리하여 48시간 동안 배양시켰다. EZ-cytox와 DMEM를 1:2로 혼합하여 각 well 당 30 μ L씩 처리한 후 인큐베이터에서 30분간 반응시켰다. ELISA plate reader(Synerge2, BioTek, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도 측정 후, 백분율로 환산하여 청미래덩굴 꽃 정유의 피부 표피각질형성세포 증식에 대한 결과를 확보하였다.

[0072]

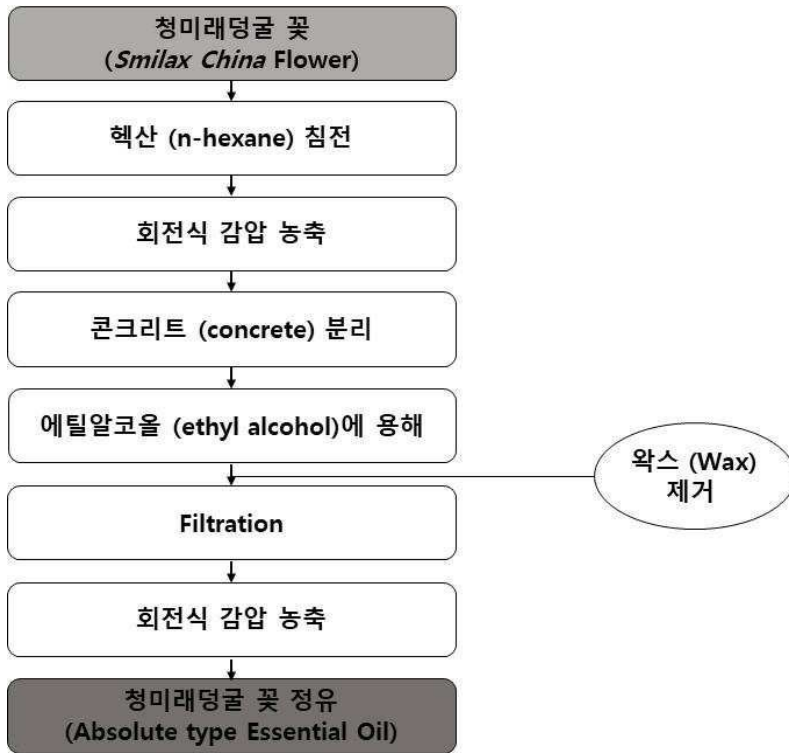
도 3(A)는 본 발명의 실시예 1에 의해 추출된 청미래덩굴 꽃 정유의 표피 각질형성세포의 증식 효과를 나타낸 그래프이다. 여기서, 음성 대조군은 청미래덩굴 꽃 정유를 이용하지 않은 것이고, 양성 대조군은 종래에 상처치유 및 피부 재생에 활용되고 있는 표피성장인자(epithermal growth factor, EGF 50 ng/mL)를 이용한 것이다.

- [0073] 그 결과, 도 3(A)에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 청미래덩굴 꽃 정유는 표피 각질형성세포의 증식을 농도 의존적으로 유도하는 것으로 나타났다.
- [0074] 즉, 표피성장인자(50 ng/mL)에 의한 표피 각질형성세포의 증식은 $137.08 \pm 10.99\%$ 유도가 되었으며, 양성 대조군과 비교하여 청미래덩굴 꽃 정유 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $144.91 \pm 9.38\%$ 의 증식 유도율을 나타내었고, 특히 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $183.34 \pm 9.60\%$ 의 증식 유도율을 나타내어, 각질형성세포의 증식을 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다.
- [0076] **실험예 3. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포 이동에 미치는 효과**
- [0077] 상기 실시예 1에서 얻은 청미래덩굴 꽃 정유가 피부 표피 각질형성세포 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같이 실험을 진행하였다.
- [0078] 사람 피부 유래 표피 각질형성세포(HaCat)를 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 배양하고 본 발명의 실험 예에 활용하였다. 48 well Boyden microchemotaxis chamber를 사용하여 표피 각질형성세포의 이동률을 조사하였으며, 먼저 lower chamber에 청미래덩굴 꽃 정유를 각각 1 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고, type I 콜라겐 코팅이 된 8 μm pore의 polycarbonate membrane을 올려 주었다. 이후, upper chamber에 표피 각질형성세포를 well당 1×10^6 cells/50 μL 씩 처리하였다. Chamber를 37°C 인큐베이터에서 3시간 30분 배양시킨 후, membrane을 Diff-Quick solution으로 고정 및 염색하였다.
- [0079] Membrane을 통과하여 이동한 세포의 수를 세어, 백분율로 환산하여 청미래덩굴 꽃 정유의 피부 표피 각질형성세포 이동에 대한 결과를 확보하였다.
- [0080] 도 3(B)는 본 발명의 실시예 1에 의해 추출된 청미래덩굴 꽃 정유의 피부각질형성세포의 이동효과를 나타내는 그래프이다. 음성 대조군은 청미래덩굴 꽃 정유를 이용하지 않은 것이고, 양성 대조군은 종래에 상처치유 및 피부 재생에 활용되는 있는 표피성장인자(epithermal growth factor, EGF 1 ng/mL)를 이용한 것이다.
- [0081] 그 결과, 도 3(B)에 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예 1에 따른 청미래덩굴 꽃 정유는 표피 각질형성세포의 이동을 농도 의존적으로 유도하였으며, 특히, 청미래덩굴 꽃 정유 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $208.57 \pm 11.92\%$ 의 이동 유도율 나타내었고, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $257.30 \pm 8.93\%$ 의 최대 이동률을 나타내어, 청미래덩굴 꽃 정유가 각질형성세포의 이동을 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다.
- [0083] **실험예 4. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포 콜라겐 type I과 콜라겐 type IV 합성에 미치는 영향**
- [0084] 상기 실시예 1에 의해 얻은 청미래덩굴 꽃 정유가 표피 각질형성세포의 증식과 이동에 필요한 ECM 구성 성분인 콜라겐 type I, IV 합성에 미치는 효과를 측정하기 위해서, 하기와 같이 실험을 진행 하였다.
- [0085] 96 well microtiter plate에 monoclonal anti-collagen I 또는 IV Anti-body(2 $\mu\text{g/well/PBS}$)를 주입 후 12시간 동안 상온에서 코팅하였다. Blocking buffer로 상온에서 1시간 동안 blocking 후, 샘플을 well당 100 μL 씩 처리하여 상온에서 90분 동안 반응시켰다. 샘플은 청미래덩굴 꽃 정유를 처리하지 않은 표피 각질형성세포의 배양액(CM)과 청미래덩굴 꽃 정유 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리된 표피 각질형성세포의 배양액(CM)을 처리하였다. 그 후, polyclonal anti-collagen I 또는 IV Anti-body를 각 well에 처리하여 상온에서 90분 동안 반응시킨 다음, avidin-HRP를 각 well에 처리하여 상온에서 60분 동안 반응시켰다. Supersignal ELISA pico chemiluminescent substrate를 각 well 당 100 μL 씩 주입하여 10분 동안 반응시킨 후, ELISA plate reader를 이용하여 luminescence 정도를 측정하였고, 청미래덩굴 꽃 정유의 표피 각질형성세포의 type I 또는 IV 콜라겐 합성과 분비에 대한 결과를 도 4에 나타내었다. 특히, 도 4(A)에 나타난 바와 같이 청미래덩굴 꽃 정유 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 콜라겐 type I의 합성은 $169.47 \pm 1.89\%$ 가 유도되었으며, 도 4(B)에 나타난 바와 같이 청미래덩굴 꽃 정유 150 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 콜라겐 type IV의 합성은 $163.56 \pm 1.52\%$ 가 유도되었다.
- [0087] **실험예 5. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포 콜라겐 맹아(sprouting)의 성장(out growth)에 미치는 영향**
- [0088] 상기 실시예 1에 의해 얻은 청미래덩굴 꽃 정유가 표피 각질형성세포 콜라겐 맹아(sprouting)의 성장(out growth)에 미치는 영향을 측정하기 위해서, 하기와 같이 실험을 진행 하였다.

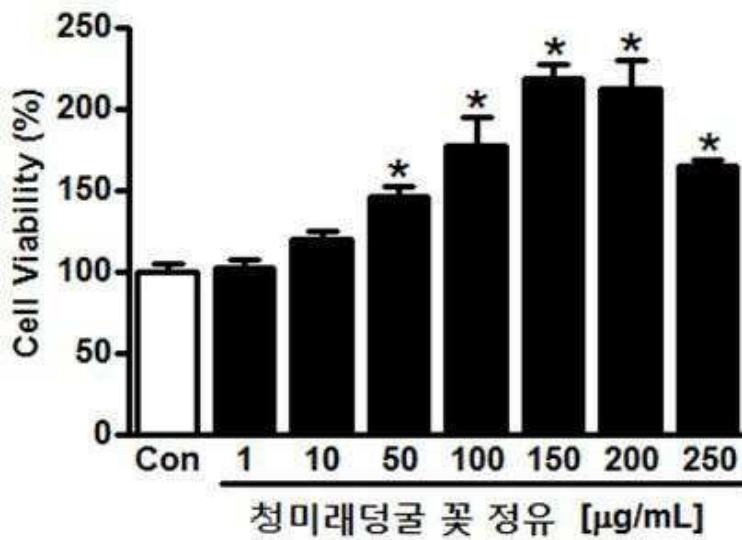
- [0089] Type I 콜라겐과 표피 각질형성세포를 2.5×10^7 cells/mL이 되도록 섞은 후, NaOH(1 N)용액을 처리하여 중화한 후, 24 well plate에 5 μ L씩 spotting하고, 10분간 상온에서 건조하여 인공피부조직을 형성하였다. 샘플을 농도 별로 처리하고, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액을 제거하고, Diff-Quik solution을 이용하여 세포와 조직을 고정 및 염색하였으며, 염색된 세포와 조직을 촬영하여 결과를 확보하였다.
- [0090] 도 5는 본 발명의 실시예 1에 의해 추출된 청미래덩굴 꽃 정유의 표피 각질형성세포 콜라겐 sprouting의 out growth에 미치는 영향을 나타낸 결과이며, 음성 대조군은 청미래덩굴 꽃 정유를 이용하지 않은 것이고, 양성 대조군은 종래의 상처치유 및 피부 재생에 활용되는 있는 표피성장인자(epithermal growth factor, EGF 50 ng/mL)를 이용한 것이다.
- [0091] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 청미래덩굴 꽃 정유는 표피 각질형성세포 콜라겐 sprouting의 out growth를 농도 의존적으로 유도하는 것으로 나타났다. 즉, 양성 대조군과 비교하여 청미래덩굴 꽃 정유 150 μ g/mL 농도에서 각질형성세포 콜라겐 sprouting의 out growth를 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다. 특히, 도 5b에 나타난 바와 같이 청미래덩굴 꽃 정유 100 μ g/mL 농도에서 $215.40 \pm 14.37\%$ 가 유도되었으며, 특히 150 μ g/mL 농도에서 $265.03 \pm 14.37\%$ 가 유도되었다.
- [0093] **실험예 6. 청미래덩굴 꽃 Absolute type 정유가 표피 각질형성세포 내 신호전달 과정에 미치는 영향 조사**
- [0094] 상기 실시예 1에 의해 얻은 청미래덩굴 꽃 정유가 표피 각질형성세포의 증식과 이동을 조절하는 주요 신호전달 과정인 세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt)와 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화 과정에 미치는 효과를 측정하기 위해서, 상기 실시예 3에서 제시된 청미래덩굴 꽃 정유의 농도를 처리하고, 각각의 특이항체(P-Akt, Akt, P-Erk1/2, Erk1/2)를 이용하여 면역블롯(Immuno Blot)법을 활용하였다.
- [0095] 도 6a는 본 발명의 일 실시예 1에 의해 추출된 청미래덩굴 꽃 정유의 표피 각질형성세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt)와 세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화 과정에 미치는 영향을 나타낸 결과이며, 음성 대조군은 청미래덩굴 꽃 정유를 이용하지 않은 것이고, 양성 대조군은 종래의 상처치유 및 피부 재생에 활용되는 있는 표피성장인자(epithermal growth factor, EGF 50 ng/mL)를 이용한 것이다.
- [0096] 그 결과, 도 6b, 및 6c에 나타난 바와 같이, 청미래덩굴 꽃 정유는 농도 의존적으로 표피세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt)와 세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화를 유도하였으며, 특히, 청미래덩굴 꽃 정유 150 μ g/mL 농도에서 세포 내 세린/트레오닌 단백질 키나아제(Akt)의 인산화가 $141.76 \pm 7.51\%$ 유도되었으며, 세포 외 신호조절 키나아제(Erk1/2)의 인산화는 $163.09 \pm 8.41\%$ 가 유도되는 것으로 나타났다.
- [0098] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

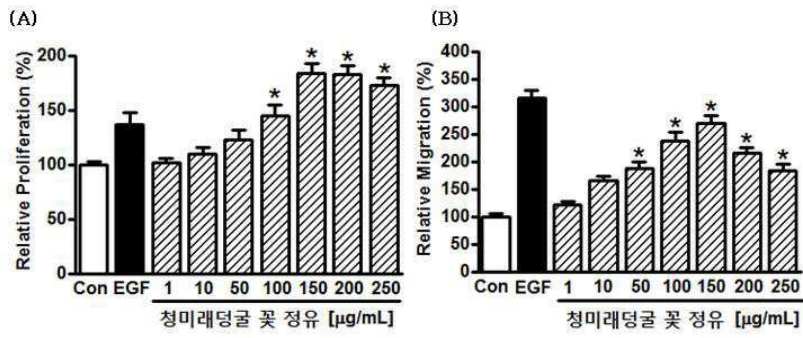
도면1



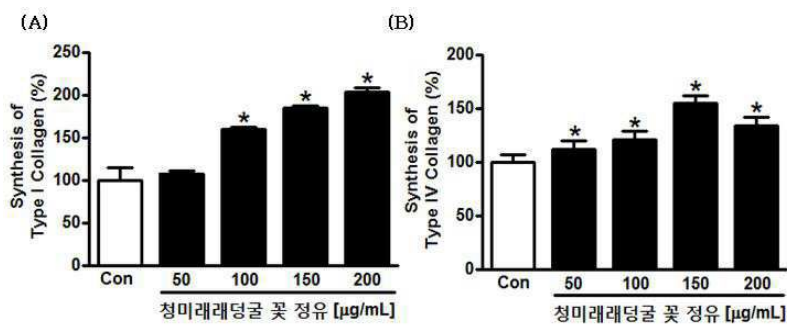
도면2



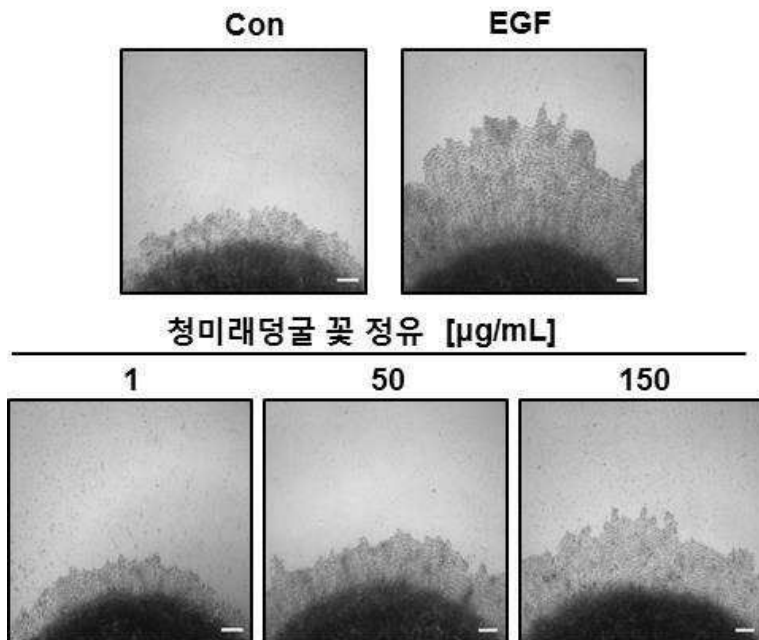
도면3



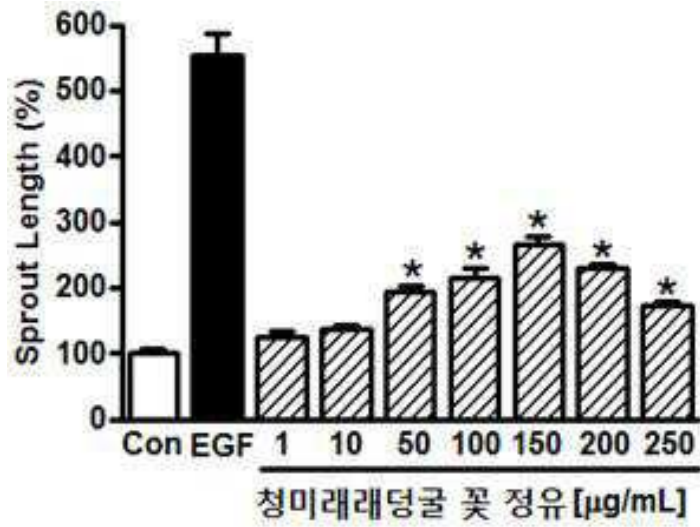
도면4



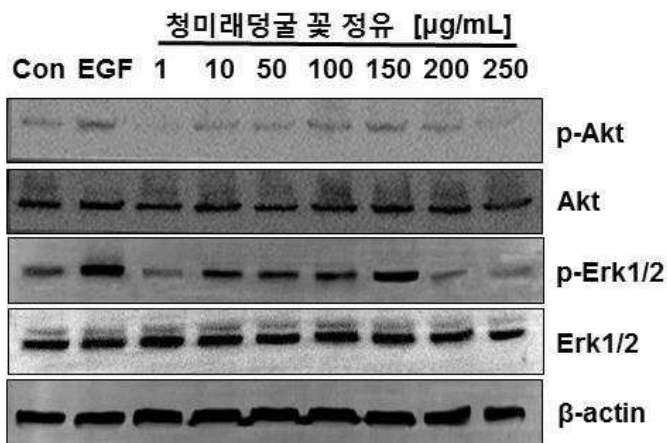
도면5a



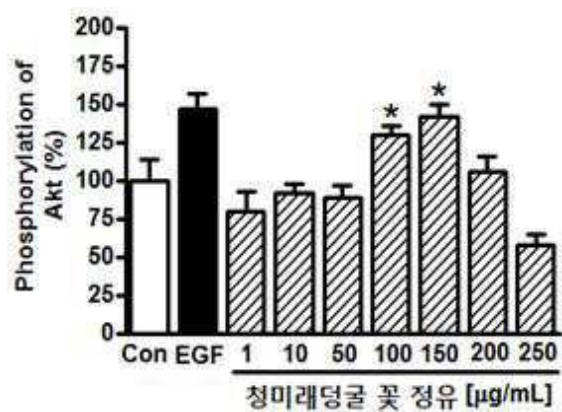
도면5b



도면6a



도면6b



도면6c

