



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월10일  
(11) 등록번호 10-2777094  
(24) 등록일자 2025년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A61K 36/82 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)  
A61P 17/14 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)  
A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 8/9789 (2017.08)  
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0135300

(22) 출원일자 2023년10월11일  
심사청구일자 2023년10월11일

(56) 선행기술조사문헌  
Xu, Yuanyuan, et al., Nutrients 13.8 (2021):  
2665.  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
바이오스펙트럼 주식회사  
경기도 용인시 수지구 신수로 767, 1805호(동천동, 분당수지 유타워)

(72) 발명자  
유지영  
경기도 용인시 수지구 신수로 767 유타워 B-1909호

정은선  
경기도 수원시 영통구 권광로304번길 58-38

박덕훈  
경기도 성남시 분당구 정자일로232번길 25, B동 403호 (정자동, 두산위브제니스)

(74) 대리인  
정성중

전체 청구항 수 : 총 7 항

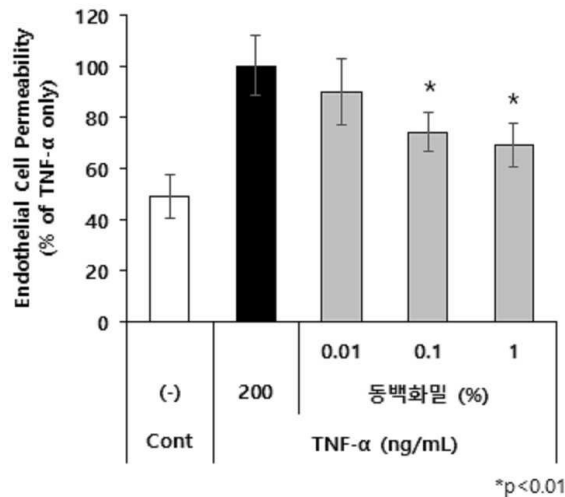
심사관 : 조한솔

(54) 발명의 명칭 동백화밀을 포함하는 혈행 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 동백화밀을 포함하는 혈행 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 동백화밀은 세포독성 사이토카인으로 유도되는 혈관 투과성의 감소 효과, 섬유아세포의 콜라겐 생성 효과, 일산화질소 생성 효과, 및 모유두세포의 혈관내피 성장인자 발현 증가 효과를 동시에 가져 혈행을 효과적으로 개선할 수 있으며, 이를 통해 탈모와 다크서클을 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 피부 자극이 없고 인체 안전성이 우수하여 화장품 등의 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*A61K 36/82* (2013.01)  
*A61P 17/00* (2018.01)  
*A61P 17/14* (2018.01)  
*A61P 9/00* (2018.01)  
*A61Q 19/00* (2013.01)  
*A61Q 7/00* (2019.01)  
*A23V 2002/00* (2023.08)  
*A23V 2200/30* (2013.01)  
*A61K 2800/74* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Chen, Xin-Lan, et al., Natural Product  
 Research 36.7 (2022): 1827-1833.  
 US20100323042 A1  
 KR1020150033040 A  
 KR1020070107360 A  
 KR1020110090803 A  
 CN102676348 A  
 KR1020160148174 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425172216
과제번호	S3275648
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	중소기업기술개발지원사업
연구과제명	국내자원을 활용한 글로벌 리딩 화장품 소재개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	바이오스펙트럼(주)
연구기간	2022.05.01 ~ 2026.04.30

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 탈모 예방 또는 개선용, 또는 다크서클 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포의 혈관 투과성 억제, 콜라겐 생성 증가, 일산화질소 생성 증가, 모유두세포의 증식, 및 모유두세포의 혈관내피 성장인자 발현 촉진인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 동백화밀은 전체 화장료 조성물의 총중량에 대하여 0.0001 내지 20 중량%로 포함된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 이루어진 군 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

**청구항 5**

동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 탈모 예방 또는 개선용, 또는 다크서클 예방 또는 개선용 외용제 조성물.

**청구항 6**

동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 또는 탈모 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 7**

동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 탈모 예방 또는 개선용, 또는 다크서클 예방 또는 개선용 식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 동백화밀을 포함하는 혈행 개선용 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 혈관 투과성 감소 효과, 일산화질소 증가 효과, 콜라겐 증가 효과 및 모유두세포의 혈관내피성장인자 발현 증가를 통해 혈류를 개선하는 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 혈류 개선 등에 의하여 탈모 또는 다크서클을 예방, 개선, 또는 치료하는 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 혈행은 혈액의 순환으로, 혈액이 각 기관에 산소와 영양분을 공급하고 노폐물을 제거하기 위해 신체의 각 부분으로 이동하는 것을 의미한다. 혈액을 구성하는 혈구 세포와 혈장 내 혈액응고인자들은 상호작용을 통해 혈행을 일정하게 유지하고 있으며, 이는 혈액 내 인자들에 의한 손상 부위의 치료와 지혈을 통해 이루어진다. 혈액의 구성 물질 뿐만 아니라 혈행에 영향을 주는 또 다른 부분은 혈관의 내벽을 구성하는 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)이다. 내피는 조직과 조직 사이의 장벽(barrier)이면서 내분비 기관으로, 혈관의 이완, 수축, 혈액세포의 증식을 조절하며, 혈관 긴장도(vascular tone)를 조절하여 국소적으로 혈류를 조절할 수 있다고 알려져 있다. 또한 염증반응의 조절 및 혈구의 부착과 전이, 활성화 등에 관여한다 (Kriger-Genge et al., Int J

Mol Sci. 2019 Sep, 10.3390/ijms20184411).

- [0003] 혈행 저하는 LDL 콜레스테롤의 혈관 내 축적이나 고혈당, 고혈압, 흡연, 약물, 스트레스에 의해 혈액 흐름이 방해받거나, 노화로 인해 혈관 탄력이 자연적으로 감소하면서 나타난다. 혈행 저하가 지속되면 기억력 감퇴, 만성 피로, 협심증, 수족냉증, 말초 혈행 장애와 같은 증상 등이 나타날 수 있으며 특히나 두피에서 모낭 주위 혈류량의 감소는 탈모를 유발할 수 있다 (Deng et al., J Invest Dermatol. 2022 Aug, 10.1016/j.jid.2022.01.003). 이를 개선하기 위해 혈행 개선제(혈액순환 개선제, blood circulating agent)가 시중에 판매되고 있는데, 혈전이나 지질의 생성을 억제하고 혈관 벽을 강화해 순환을 원활하게 하거나 혈관 벽의 탄력을 강화함으로써 혈액순환 장애를 낮추는 효과를 지닌다.
- [0004] 미세혈관의 장벽 기능은 국소 대사 물질 간의 생리적 상호 작용에 영향을 미친다. TNF- $\alpha$ 와 같은 세포독성 사이토카인은 불규칙한 혈관 확장을 통해 투과성을 증가시키거나(혈관 침투성, Vascular permeability) 혈관의 무결성(integrity)을 저하하는 등의 미세혈관 내피 기능 장애를 유도한다. 따라서 미세혈관의 과투과성 완화 효과는 혈류의 순환을 개선해 부종과 같은 혈관 질환 완화에 기여할 수 있다.
- [0005] 콜라겐(collagen)은 포유류에서 가장 풍부한 단백질로 다양한 조직의 구조를 유지하는데 중요한 역할을 하는 세포 외 기질 단백질 계열이다. 콜라겐은 피부와 혈관의 탄력성 및 운동성에 관여한다. 특히 혈액 내 영양분이 운반될 때, 혈관은 지속적인 손상과 회복을 반복하게 되는데, 이때 콜라겐이 혈소관 수용체에 결합하여 혈소관의 응집과 접착을 활성화하고 손상된 혈관 벽 회복에 관여한다고 알려져 있다. 노화가 진행됨에 혈관이 약해지는 이유도 콜라겐의 감소와 관련이 있다. 따라서 콜라겐 생성은 혈관 강화와 혈류 개선 연구에 많이 다뤄지고 있다.
- [0006] 일산화질소(NO)는 혈관 내피세포에서 생성되는 이원자 기체로, 혈관 긴장도, 골격근 수축, 신경전달 등과 같은 많은 생리학적 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 그중 혈관에서는 cGMP를 생성하여 혈관 벽을 이완시켜 혈행 개선에 도움을 주고, 혈소관의 활성을 억제하여 혈액 응고를 낮추는 역할을 한다고 알려져 있다. 혈관 노화에 따라 혈관 내피세포의 일산화질소 분비능이 감소하게 되는데, 이는 혈관 탄력의 감소와 함께 혈관 기능 장애를 일으킬 수 있다. (Jones et al., Med Sci Sports Exerc. Feb, 10.1249/MSS.0000000000002470) 따라서 혈관 내 일산화질소를 높이기 위한 연구가 혈행 개선을 위한 타겟이 되고 있다.
- [0007] 피부미용 측면에서의 혈행 개선은 탈모(alopecia)와 다크서클(dark circles) 완화와 관련이 있을 수 있다.
- [0008] 탈모는 노화에 따라 발병이 높아진다고 생각되었으나, 실제로 발병 연령대는 20, 30대가 50 %로, 남녀 각각 29.8세, 33.6세였다 (건강보험심사평가원). 탈모의 원인으로서는 염색과 펴 같은 화학제품의 사용, 약물 부작용, 호르몬 변화, 식습관의 불균형, 스트레스 등을 들 수 있다. 모발은 일정한 주기(hair cycle)를 통해 성장과 퇴행을 반복하는데, 모발이 성장하는 성장기(anagen)와 대사과정이 느려져 모구가 축소되는 퇴행기(catagen), 오래된 모발의 탈모가 일어나는 휴지기(telogen)를 거치며 이때 상대적으로 성장기가 단축되거나 퇴행기나 휴지기가 길어지면 탈모(alopecia)가 발생한다고 알려져 있다 (Marlon R Schneider et al., Curr Biol. 2009 Feb, 10.1016/j.cub.2008.12.005).
- [0009] 대표적인 탈모 방지제는 FDA 승인을 받은 피부 외용제인 미녹시딜(Minoxidil)이 있다. 미녹시딜은 말초동맥의 평활근에 위치한 칼륨 채널을 열어 세포막의 과분극을 유발하는 강력한 혈관 확장제로, 이는 두피에서 혈액순환을 높여 혈류량과 함께 영양 공급을 늘려줌으로써 탈모를 촉진한다고 알려져 있다. 또한 미녹시딜은 베타카테닌의 신호를 활성화하여 모낭 증식을 촉진함으로써 모유두세포(dermal papilla cell)의 성장기를 연장시키고, 혈관 내피 성장인자의 발현을 증가시켜 모낭 세포의 증식을 높일 것이라는 결과들이 있다 (Suchonwanit et al., Drug Des Devel Ther., 2019 Aug, 10.2147/DDDT.S214907. Mi Hee Kwack et al., J Dermatol Sci., 2011 Jun, 10.1016/j.jdermsci.2011.01.013). 하지만 미녹시딜은 사용 중에 발진, 가려움과 같은 피부 질환을 유발할 수 있으며, 두피가 아닌 부위의 발모 효과가 나타나는 부작용이 있을 수 있다.
- [0010] 다크서클(dark circles)은 눈 아래 부위가 상대적으로 어두워 보이는 것으로 탈모와 함께 주요한 심미적 관심사 중 하나이다. 다크서클은 그 원인에 따라 크게 세 종류로 나눌 수 있는데, 혈액 순환이 원활하지 않아 발생하는 혈관형 다크서클과 과도한 색소 침착으로 인한 색소 침착형 다크서클, 눈 밑이 깊게 패여 나타나는 구조형 다크서클로 구분할 수 있다(Huang et al., Int J Dermatol, 2014 Feb, 10.1111/j.1365-4632.2012.05701.x.). 특히나 혈액 순환이 원활하지 않아 눈 밑에 혈류가 정체되면 영양 공급이 부족해지면서 산소 결핍으로 인한 혈색 악화와 함께 혈액 내 헤모시테린(Hemosiderin)이라는 색소가 피부에 침착되면서 다크서클이 형성되거나, 노화와 자외선과 같은 자극 요인에 의한 모세혈관 내피세포 간의 부착 감소로 혈관 투과성(vascular permeability)이

높아져 혈행이 지연되고 다크서클이 생성되기도 한다.

- [0011] 다크서클의 치료 방법은 수술적인 방법을 통해 눈 밑 지방을 재배치하거나 레이저를 조사하여 눈 및 피하에 확장된 혈관을 수축시키는 방법들이 있으며, 멜라닌 색소 과다로 인한 다크서클의 경우 비타민C 침투 시술을 받기도 한다(Friedmann et al., Clin Plast Surg, 2015 Jan, 10.1016/j.cps.2014.08.007). 하지만 외과적 시술을 통한 치료 방법은 일상생활에 영향을 줄 수 있으며 비용이 많이 들기 때문에 선택하기에 어려움이 따른다.
- [0012] 한편, 화밀(nectar)은 꽃 속에 생기는 꿀로 기원은 체관부 수액으로 알려져 있다. 광합성 작용에 의해 당 화합물이 생성되면 이들은 밀선(nectary) 근처에 존재하는 유세포(parenchyma cell)에 집적하게 된다. 유세포는 삼투압이 높아짐에 따라 수분을 흡수하여 가수분해되면서 밀선으로 분비되는데 이를 화밀이라 한다. 화밀에는 수분과 당 성분이 주로 포함되어 있고 그 외에 아미노산, 유기산, 단백질, 지방, 비타민, 미네랄, 2차 대사산물이 일부 포함되어 있다. 꽃을 피우는 식물은 수분 및 수정을 위한 방안으로 곤충 화분 매개자들을 유혹하기 위해 화밀과 화분(花粉)이라는 영양분의 보상을 주게 된다. 식물들은 화분매개자를 유인하기 위해 꽃의 구조와 크기, 향기, 색깔을 다양한 형태로 발달시키며, 수중에 따라 화밀과 화분의 영양학적 성분 및 구성도 차이가 있다. 화분은 꽃에서 한번만 방출되지만 화밀은 재생 가능한 꽃 자원으로 오래 사는 꽃에서는 매일 분비되거나 보충이 된다. 분비되는 화밀의 양과 패턴, 유리당 함량과 구성은 채취 시기 및 수중에 따라 다르게 나타나므로, 화밀의 채취에 있어서 수종의 선택이 중요한 요소 중 하나이다. 최근의 연구 결과에 따르면, 동백나무의 꽃 하나당 화밀 분비량은 357.1 $\mu$ l로 밀원 평가에 있어 주요한 밀원수로 평가되었다.
- [0013] 꿀은 꽃에서 생성하는 화밀을 꿀벌이 수집하여 자기 효소로 전화하여 벌집에 저장한 것이다. 화밀은 이당류인 자당(sucrose)이 주성분으로 이들은 꿀벌의 꿀주머니에 저장된 뒤 전효소에 의해 단당류인 포도당(glucose)과 과당(fructose)으로 가수분해되어 저장된다. 화밀은 꿀벌에 의한 흡수 및 효소작용을 거치게 되므로 당 성분뿐만 아니라 그 외 성분에서도 차이를 보이게 되므로, 생리활성에 있어서 많은 차이를 나타내게 된다.
- [0014] 지금까지 벌꿀의 화장품 용도에 대한 다양한 연구가 있었으나, 화밀은 연구가 거의 없는 실정이다. 예를 들어, 프랑스 LVMH RECHERCHE가 토끼풀(Trifolium repens)로부터의 화밀이나 이 화밀의 추출물이 피부 내 섬유아세포의 증식에 유용함을 연구하였고(한국 등록 특허 제10-1844598호), ㈜대한뷰티산업진흥원이 꽃꿀, 울금 및 감귤꽃꿀의 혼합 추출물이 염증을 완화하고 여드름균인 *C. acnes*에 대한 항균 효과가 있음을 연구하였다(한국 등록 특허 제10-2228257호).
- [0015] 이에 본 발명자들은 화밀을 주요하게 함유하는 동백나무꽃을 선택하여 이들이 가진 생리활성에 대한 연구를 진행하였고, 본 연구를 통해 개발된 동백나무 화밀은 안정성 및 안전성이 높아 피부 부작용이 없으며, 혈관 투과성 감소, 일산화질소 증가, 콜라겐 증가, 모유두세포의 혈관내피성장인자 증가를 통해 혈류를 개선하는 효능을 동시에 나타낼 수 있다는 사실을 발견함으로써 혈행 개선에 유용한 성분임을 밝혀내고 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0016] 본 발명의 하나의 목적은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 하나의 목적은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 혈행 개선용, 또는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 화장품, 약학적, 피부 외용제, 또는 식품 조성물로 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 혈행 개선용 조성물을 개체에 투여하여 개체의 혈행을 개선하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 개체의 탈모 또는 다크서클을 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0021] 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 피부 자극 및 세포독성이 없어 인체 안전성이 우수하면서도 혈관 투과성 억제제를 통한 혈류 증가와 콜라겐의 증가, 일산화

질소 생성을 촉진하여 혈행을 조절하여 혈행을 개선 및 치료할 수 있는 동백화밀을 유효성분을 포함하는 혈행 개선용 조성물에 관한 것이다.

- [0022] 또한, 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 피부 자극 및 세포독성이 없어 인체 안전성이 우수하면서도 상술한 바와 같이 혈행을 개선하고, 모유두세포의 증식 및 모유두세포의 혈관내피 성장인자의 발현을 증가하여 탈모 또는 크서클의 예방, 개선, 또는 치료할 수 있는 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 용어 "동백화밀"은 동백유래 화밀을 말한다. 화밀(nectar)은 꿀벌, 벌, 나방 등의 곤충이나 동박새, 벌새 등의 동물을 유인하여 번식하기 위해 꿀샘에서 분비되는 액상의 물질을 말하며, 꿀벌이 다양한 식물로부터 화밀을 수집하여 자신의 효소로 전화하여 벌집에 저장한 꿀(벌꿀, honey)과는 상이한 물질이다.
- [0024] 상기 용어 "동백"은 차나뭇과에 속하는 동백나무(*Camellia japonica*)의 꽃이다.
- [0025] 본 발명자들은 동백화밀이 과도한 혈관 투과성을 감소시키고, 혈관 긴장도와 탄력성에 기여하는 일산화질소와 콜라겐의 생성을 증가시키며, 모유두세포에서 혈관 내피 성장인자의 발현을 증가시키고 모유두세포의 증식을 증가시키는 효과가 우수함을 발견하였다.
- [0026] 따라서, 동백화밀은 혈행 개선용 조성물의 유효 성분으로 매우 유용하다. 또한, 동백화밀은 혈행 개선 효과에 따른 탈모 예방 및 개선, 및 다크서클 예방 및 개선을 위한 조성물의 유효성분으로 매우 유용하다.
- [0027] 본 발명의 동백화밀은 상업적으로 생산되거나 동백으로부터 수집한 것일 수 있다. 상기 수집은, 예를 들어 동백이 완전히 개화된 후 2일 또는 3일째 이루어질 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 용어 "혈행 개선"은 LDL 콜레스테롤의 혈관 내 축적이나 고혈당, 고혈압, 흡연, 약물, 스트레스에 의해 혈액 흐름이 방해받거나, 노화로 인해 혈관 탄력의 감소로 나타나는 혈행 장애를, 혈관 내 지질 축적을 억제하거나 혈관의 장벽 기능 및 탄력을 증가시켜 개선하는 것을 의미한다. 따라서 본 발명의 "혈행 개선"은 혈관 내 혈전이나 콜레스테롤과 같은 지질의 생성 및 축적을 억제하고 혈관 벽의 구조 강화 또는 탄력을 강화해 순환을 원활하게 하거나 개선하는 의미로 고려될 수 있다. 또한, 상기 "혈행 개선"은 본 명세서에서 혈류 조절 또는 개선으로 사용할 수 있다.
- [0029] 상기의 혈행 개선은 본 발명의 유효성분인 동백화밀에 의하여 세포독성 사이토카인에 의해 유도된 혈관 투과성 억제 효과, 일산화질소 증가, 및 콜라겐 생성 증가를 야기하여 이루어질 수 있으며, 그에 따라 혈류를 개선할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 용어 "다크서클"은 안구 주위의 피부색이 얼굴의 다른 부위에 비하여 상대적으로 짙게 변색되는 안구 주위의 흑륜(periorbital dark circle)을 말한다.
- [0031] 상기의 다크서클은 본 발명의 유효성분인 동백화밀에 의하여 안구 주위의 혈관 투과성이 완화되고 혈류 순환이 원활하게 되어 과도한 색소 침착이 예방 및 개선될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 탈모는 정상적으로 모발이 존재해야 할 부위에 모발이 없는 상태를 말하며, 구체적으로 두피의 성모(굵고 검은 머리털)가 빠지는 것을 의미한다.
- [0033] 상기의 탈모는 본 발명의 유효성분인 동백화밀에 의하여 두피의 혈관 투과성이 완화되고 혈류가 개선될 뿐만 아니라 모유두세포가 증식되고 모유두세포의 혈관내피성장인자의 발현이 촉진되어 예방 및 개선될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 용어 "예방"은 다크서클 및/또는 탈모가 발생할 가능성을 감소하는 것을 말한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 용어 "개선"은 혈관 투과성 억제 및 혈관 탄력, 혈관 신생 등에 의하여 혈관 내 혈액이 원활히 흐를 수 있게 조절하고 혈행을 건강한 상태로 되돌리는 것, 탈모의 부위 또는 정도를 감소시키는 것, 및/또는 안구 주위의 혈액 순환을 원활하게 하고 색소 침착의 정도를 감소시키는 것을 말한다. 상기 "개선"은 또한 본 명세서에서 "치료"와 동일한 의미일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 개체 내(*in vivo*)에 존재하거나 또는 개체 외(*in vitro*)에서 배양되는 세포 모두를 포함한다. 상기 세포는 세포의 형태 및 위치 등에 의하여 다양하게 분류할 수 있으며, 예를 들어 피부 세포, 모발세포, 지방세포, 줄기세포, 혈관 세포, 면역세포 등을 들 수 있다.
- [0037] 하나의 구체적 실시예에서, 인간 모세혈관 내피세포에 세포독성 사이토카인으로 혈관 투과성을 높여 본 발명의

동백화밀의 농도에 따른 혈관 투과성 감소 정도를 살펴본 결과, 동백화밀에 의해 혈관 투과성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타나, 동백화밀은 세포독성 사이토카인에 의해 증가하는 혈관 투과성을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

- [0038] 다른 하나의 구체적 실시예에서, 인간 섬유아세포에서 동백화밀의 농도에 따른 콜라겐 합성 촉진 정도를 살펴본 결과, 콜라겐 합성이 높아지는 것으로 나타나, 동백화밀이 혈관 탄력이나 강화와 관련하여 콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.
- [0039] 다른 하나의 구체적 실시예에서는 면역 대식세포로부터의 일산화질소 생성 효과를 살펴본 결과, 동백화밀에 의해 일산화질소 생성이 증가하는 것으로 나타나, 동백화밀이 일산화질소의 생성을 촉진하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.
- [0040] 또 다른 하나의 구체적 실시예에서, 인간 모유두세포에서 동백화밀의 농도에 따른 세포증식과 혈관내피 성장인자 발현 정도를 확인한 결과, 모유두세포의 증식 및 혈관내피 성장인자 발현을 높이는 것으로 확인되었다.
- [0041] 상기 조성물에 포함되는 동백화밀은 특별히 이에 제한되지 않으나, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 20.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 10.0 중량%를 포함할 수 있다. 상기 동백화밀의 함량이 0.0001 중량% 미만인 경우 혈행 개선 효과, 탈모 예방 및 개선 효과, 다크서클 예방 및 개선 효과를 기대할 수 없고, 20.0 중량%를 초과하는 경우 함량 증가에 따른 혈행 개선 효과의 증가가 미미하며 제형을 제조하는데 어려움이 발생한다.
- [0042] 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 혈행 개선용 조성물은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 탈모 예방 및 개선용, 또는 다크서클의 예방 및 개선용 화장료 조성물로 제공될 수 있다.
- [0043] 상기 동백화밀, 이의 혈행 개선 효과, 이의 탈모 예방 및 개선 효과, 및 이의 다크서클의 예방 및 개선 효과는 전술한 바와 같다.
- [0044] 본 발명의 화장료 조성물은 피부의 혈행 개선, 탈모 예방 및 개선, 및/또는 다크서클 예방 및 개선의 목적으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 피부 모세혈관의 혈행 저하로 인한 부종, 수족 저림, 수족 냉증, 어깨 및 목 결림, 탈모, 다크서클 등의 예방 및 개선이 있는 개체에 상기 조성물을 적용할 수 있다.
- [0045] 상기 화장료 조성물은 유효성분인 동백화밀 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 향산화제, 안정화제, 가용화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 화장료 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 등으로 제형화될 수 있다. 보다 상세하게는, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤 또는 마사지 크림 등의 제형으로 제조될 수 있다. 그러나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0048] 상기 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리이미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용될 수 있다. 예를 들어, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.
- [0050] 상기 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 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.
- [0051] 상기 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

- [0052] 상기 화장료 조성물에 포함되는 동백화밀은 특별히 이에 제한되지 않으나, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 20.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 10.0 중량%를 포함할 수 있다. 상기 동백화밀의 함량이 0.0001 중량% 미만인 경우 혈행 개선 효능, 탈모 예방 및 개선 효능, 다크서클 예방 및 개선 효능을 기대할 수 없고, 20.0 중량%를 초과하는 경우 함량 증가에 따른 상기 효과의 증가량이 미미하며 화장료 제형을 제조하는데 어려움이 발생한다.
- [0053] 또 하나의 구체적 양태로서, 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선 또는 치료용, 탈모 예방 및 치료용, 또는 다크서클의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0054] 상기 동백화밀, 이의 혈행 개선 효과, 이의 탈모 예방 및 치료 효과, 및 이의 다크서클의 예방 및 치료 효과는 진술한 바와 같다.
- [0055] 본 발명의 용어, "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 윤활제, 습윤제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한, 외용제, 좌제, 피부외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.
- [0056] 하나의 구체적 예로, 본 발명의 조성물은 경구형 제형으로 경구 투여 방식으로 사용될 수 있다. 또 하나의 구체적 예로, 본 발명의 조성물은 부종, 수족 저림, 수족 냉증, 어깨 및 목 결림 등이 발생한 피부 부위, 탈모가 발생한 모발이나 두피, 다크서클이 발생한 안구 주위에 직접 도포 또는 산포하는 등의 방법에 의해 사용될 수 있다.
- [0057] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제 등 당업계에서 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 유효성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체 (non-naturally occurring carrier)일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 구체적으로 투여 개체의 몸무게 1kg 당 일반적으로 1일 0.01mg 내지 5000mg이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 상기 조성물에 포함되는 동백화밀은 특별히 이에 제한되지 않으나, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 20.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 10.0 중량%를 포함할 수 있다. 상기 동백화밀의 함량이 0.0001 중량% 미만인 경우 혈행 개선 효능, 탈모 예방 및 치료 효능, 다크서클 예방 및 치료 효능을 기대할 수 없고, 20.0 중량%를 초과하는 경우 함량 증가에 따른 상기 효과의 증가량이 미미하며 제형을 제조하는데 어려움이 발생한다.
- [0061] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 혈행 개선, 탈모, 의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부

작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0063] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0067] 또 다른 하나의 구체적 양태로서, 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선 또는 치료용, 탈모 예방, 개선 또는 치료용, 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0068] 상기 동백화밀, 이의 혈행 개선 효과, 이의 탈모 예방 및 개선 효과, 및 이의 다크서클의 예방 및 개선 효과는 전술한 바와 같다.
- [0069] 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유하여 제형화될 수 있다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 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, 팩 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 포말(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.
- [0071] 상기 조성물에 포함되는 동백화밀은 특별히 이에 제한되지 않으나, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 20.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 10.0 중량%를 포함할 수 있다. 상기 동백화밀의 함량이 0.0001 중량% 미만인 경우 혈행 개선 효능, 탈모 예방 및 개선 효능, 다크서클 예방 및 개선 효능을 기대할 수 없고, 20.0 중량%를 초과하는 경우 함량 증가에 따른 상기 효과의 증가량이 미미하며 제형을 제조하는데 어려움이 발생한다.
- [0072] 또 다른 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 혈행 개선용 조성물은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용, 탈모 예방 및 개선용, 또는 다크서클의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0073] 상기 동백화밀, 이의 혈행 개선 효과, 이의 탈모 예방 및 개선 효과, 및 이의 다크서클의 예방 및 개선 효과는 전술한 바와 같다.
- [0074] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 동백화밀을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 개선 목적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 천연물로부터 유래한 물질을 유효성분으로 하므로 안정성 면에서 문제가 없으므로 혼합량에 큰 제한은 없다.
- [0075] 본 발명의 식품 조성물은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 기능성 식품, 건강기능식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다.
- [0076] 본 발명의 용어 "기능성 식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

- [0077] 또한, 본 발명의 용어 "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0078] 혈행 개선, 탈모 예방 및 개선, 또는 다크서클의 예방 및 개선을 위한 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 동백화밀을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물 및 이의 분획물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명에 적용될 수 있는 식품에는 예컨대, 특수영양식품(예: 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예: 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예: 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예: 스낵류), 유가공품(예: 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예: 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등) 등 모든 식품을 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 식품 조성물에 포함되는 동백화밀의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물의 총 중량에 대하여 0.00001 내지 100 중량%, 바람직하게 0.0001 내지 20 중량%, 보다 바람직하게 0.001 내지 15중량%, 보다 더 바람직하게 0.001 내지 10중량%로 포함될 수 있다.
- [0081] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 조성물을 개체에 투여하여 개체의 혈행을 개선하는 방법을 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료를 개체에 투여하여 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0083] 상기 혈행 개선용 조성물은 상술한 바와 같이, 동백화밀을 유효성분으로 하고, 유효성분인 동백화밀에 의하여 혈관 투과성 감소 효과, 콜라겐 합성 촉진 효과, 일산화질소 생성 효과, 및 모유두세포에서의 혈관내피 성장인자 발현 증가를 야기하여 피부 및 두피에서 혈행을 개선하는 조성물이다.
- [0084] 또한 상기 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물은 피부 및 두피에서 혈행을 개선하고 모유두세포의 증식 및 혈관내피 성장인자의 발현을 촉진하여 탈모 및 다크서클을 예방, 개선, 및 치료할 수 있는 조성물이다.
- [0085] 본 발명에서, 용어 "개체"는 본 발명의 혈행 개선용 조성물, 또는 탈모 또는 다크서클의 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 투여에 의하여 혈행 개선, 탈모와 다크서클의 예방, 개선 및 치료 목적을 달성할 수 있는 인간을 포함한 포유동물, 예를 들어, 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 래트, 마우스, 침팬지 등을 의미한다.
- [0086] 본 발명에서, 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 활성 물질이 표적 대상, 예를 들어, 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0087] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 제형, 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 혈행 개선용 조성물의 일일 투여량은 성인 기준으로 1.0 ml 내지 3.0 ml이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 5회 도포하여 투여할 수 있으나, 반드시 이로 제한되지 않는다.
- [0088] 한편, 본 발명에 따른 동백화밀은 천연물질로서 인체에 무해하며, 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있으므로, 이를 포함하는 화장료, 약학적, 피부 외용제, 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0089] 본 발명의 유효 성분인 동백화밀은 피부 자극이 없고 인체 안전성이 우수하면서도 세포독성 사이토카인으로 인해 증가하는 혈관 투과성의 억제 효과, 콜라겐 합성 증가 효과, 일산화질소 생성 촉진 효과, 모유두세포의 증식

효과, 및 모유두세포의 혈관내피 성장인자 발현 증가 효과를 동시에 가져 혈류를 효과적으로 개선하는 혈행 개선용 화장료, 약학적, 피부 외용제, 또는 식품 조성물로 유용하게 이용할 수 있다. 또한, 상기 혈행 개선용 조성물은 혈류의 개선, 모유두세포의 증식 및 혈관내피 성장인자의 발현 증가 효과로 인하여 탈모를 예방 및 개선할 수 있으며, 다크서클 또한 예방 및 개선할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0090] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 사람의 모세혈관 내피세포에서 동백화밀의 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 사람의 모세혈관 내피세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 높은 혈관 투과성을 동백화밀이 억제하는 효과를 보여주는 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 사람의 섬유아세포에서 동백화밀의 콜라겐 합성 촉진 효과를 보여주는 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 면역 대식세포에서 동백화밀의 일산화질소 생성 증가 효과를 보여주는 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 사람의 모유두세포에서 동백화밀의 혈관내피성장인자 발현 증가 효과를 보여주는 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 사람의 모유두세포에서 동백화밀의 세포증식 효과를 확인한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0091] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당 업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

**[0092] 실시예 1: 동백화밀의 제조**

[0093] 동백꽃이 개화하기 시작되어 완전히 개화되는 시기인 2일 또는 3일째 시점의 오전에 꽃을 수확하였다. 수확한 즉시 꽃을 반으로 갈라 꽃 안에 있는 밀선에서 피켓으로 화밀을 채취한 후 80℃에서 30분간 열처리한 다음 여과지(Advantec, No.2)로 여과하여 동백화밀을 제조하였다.

**[0094] 실시예 2: 동백화밀의 모세혈관 내피세포에 대한 세포 독성 평가 측정**

[0095] 동백화밀의 모세혈관 내피세포 증식 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다. 모세혈관 내피세포(Human dermal microvascular endothelial cell, HMEC-1)는 ATCC(American Tissue Culture Collection, USA)로부터 구입하여 준비하였으며, 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 글루타민(Glutamine), EGF, 하이드로코르티손(Hydrocortisone)을 첨가한 MCDB131 배지에서 배양하였다. 구체적으로, 24 well plate에  $2 \times 10^4$  세포/웰의 모세혈관 내피세포 HMEC-1을 넣고, 5% 농도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃, 24 시간 동안 배양하였다. 이후 동일한 배지에 상기 실시예 1의 동백화밀을 농도별(0.01 v/v%, 0.1 v/v%, 및 1 v/v%)로 처리한 배지로 교체해 준 뒤, 다음 24, 48, 72 시간 동안 다시 배양하였다. 이후 MTT (1  $\mu$ g/ml)가 포함된 MCDB131 배지로 교환해 준 뒤 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배지를 털어내고, 각 well에 DMSO 0.5 ml 씩 넣어 세포 내 형성된 포마잔을 용해시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 하기 실험식 1로 세포증식율을 계산하였다.

[0096] [실험식 1]

[0097] 세포증식율(Proliferation Pattern, %) = [(처리된 시료의 흡광값)/(대조군의 흡광값)  $\times$  100]

[0098] 도 1에서 보듯이, 본 발명에 따른 동백화밀은 모세혈관 내피세포에 독성이 없음을 확인하였다.

**[0099] 실시예 3: 동백화밀의 혈관 투과성 완화 효능 평가**

[0100] 동백화밀의 혈관 투과성 억제 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다. 혈관 투과성을 평가하기 위해  $2 \times 10^5$  세포/웰의 모세혈관 내피세포 HMEC-1를 24 well plate의 cell insert에 넣고 부착하였다. 72 시간 후 1% FBS를 첨가한 배지로 교체하며 혈관 투과성 증가를 유도하는 200 ng/ml TNF- $\alpha$  및 반응 정도를 확인

하기 위한 HRP를 넣고 동백화밀로 상기 실시예 2에서 세포 독성 효과가 없는 농도로 처리한 후 24 시간 배양하였다. 이후, insert 밖 plate well에서 배양액을 회수하였다. 수확한 배지에 TMB를 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다. 여기서, 양성대조군은 TNF- $\alpha$ 를 단독으로 처리한 군이다.

[0101] 도 2는 동백화밀에 의한 모세혈관 내피세포의 혈관 투과성을 보여주는 그래프이다. 여기에서 보듯이, 양성대조군인 TNF- $\alpha$ 를 처리한 군과 비교하였을 때, 동백화밀 0.1 % 및 1 %를 처리한 모세혈관 내피세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 높은 혈관 투과성을 현저히 완화시킨 것을 확인할 수 있었다.

[0102] **실시예 4: 동백화밀의 콜라겐 합성 촉진 효과**

[0103] 동백화밀의 콜라겐 합성 촉진 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다. 인간 섬유아세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지가 들어있는 24-웰 플레이트에 웰 당  $2 \times 10^4$  개로 접종한 후, 5% 농도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C 조건으로 24시간 배양하였다. 그 후, 시험 물질을 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 녹인 뒤 처리하였다. TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ )는 콜라겐 합성 촉진 양성대조군으로 사용되었다. 72시간 후 세포 배양 상등액을 수집하여 샘플을 제조하였다. 상기에서 제조한 샘플의 콜라겐 합성량은 TAKARA사의 콜라겐 측정 키트(MK101, Procollagen Type I C-peptide EIA kit)를 이용하여 프로콜라겐(procollagen) 타입I C-펩타이드(PICP, Type I C-peptide)의 양을 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0104] 도 3에서 보듯이, 동백화밀이 인간 섬유아세포 배양 상등액 내 콜라겐 합성을 촉진시킨 것을 확인하였다.

[0105] **실시예 5: 동백화밀의 일산화질소 생성 증가 효과**

[0106] 동백화밀에 의한 일산화질소의 생성 증가 효과를 측정하기 위해, 하기와 같은 실험을 실시하였다. 마우스 대식세포(Macrophage, Raw 264.7 cells, 한국세포주은행)를 DMEM 배지가 들어 있는 24-웰 마이크로 플레이트에 웰 당 약  $2 \times 10^5$  개의 세포가 되도록 접종시키고, 5% 농도의 CO<sub>2</sub> 배양기에 37°C로 24시간 동안 배양하였다. 그 후 동백화밀을 농도별로 처리한 다음 48시간 동안 배양 후 배양액을 수집하여 동일 양의 그리스 시약(Griess reagent: 5%(w/v) phosphoric acid, 1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/c) N-[1-naphthyl] ethylene diamine dihydrochloride)과 10분간 혼합하여 반응시켰고, 540nm에서 측정하였다. 대조군으로는 동백화밀을 처리하지 않은 대식세포를 사용하였다. 그 결과를 도4에 나타내었다.

[0107] 도 4에서 보듯이, 동백화밀이 0.1% 및 1%에서 일산화질소의 생성을 증가시킨 것을 확인하였다.

[0108] **실시예 6: 동백화밀의 혈관내피성장인자 발현 증가 효능**

[0109] 동백화밀의 모유두세포에서의 혈관내피성장인자 발현 증가 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다. 인간 모유두세포인 HFDPC(Hair follicle dermal papilla cell, PromoCell)를 supplementMix가 포함된 모유두세포 성장 배지에 배양한 후 24-웰 플레이트에 접종시키고( $2 \times 10^4$  세포/웰), 5% 농도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C, 24시간 동안 배양하였다. 동백화밀을 1% FBS 을 포함하는 DMEM 배지에 녹인 뒤, 배양한 각 웰에 처리하여 72시간 동안 다시 배양하였다. 72시간 후 세포 배양 상등액을 제거하고 Trizol 시약을 처리하여 튜브로 수집하였다. 클로로포름(Sigma-Aldrich)을 첨가한 후, 분리된 상층부를 100% 이소프로필 알코올(DAEJUNG, Siheung, Korea)과 혼합하였다. 상층액을 제거하고 RNA 펠렛을 70% 에탄올로 씻어낸 뒤, 정제된 Total RNA를 cDNA 합성에 이용하였다. 이 단계에서 TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch(TP350, TAKARA BIO INC)와 amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (GenDEPOT)를 사용하였으며, 최종적으로 유전자의 발현은 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)로 확인하여, 도 5에 나타내었다.

[0110] 도 5에서 보듯이, 동백화밀이 모유두세포에서 혈관내피성장인자의 발현을 대조군 대비 2배 정도 증가시킨 것을 확인하였다.

[0111] **실시예 7: 동백화밀의 인간 모유두세포의 증식 효과**

[0112] 동백화밀이 모발 성장의 주요 세포인 모유두세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 모유두세포 증식능을 측정하였다. 구체적으로, 인간 모유두세포인 HFDPC를 supplementMix가 포함된 모유두세포 성장 배지에 배양한 후 24-웰 플레이트에 접종시키고( $1.5 \times 10^4$  세포/웰), 5% 농도의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C, 24시간 동안 배양하였다. 동백화밀을 1% FBS 을 포함하는 DMEM 배지에 녹인 뒤, 배양한 각 웰에 처리하여 72시간 동안 다시 배양하였다. 72시간 후 세포 배양 상등액을 제거하고 PBS로 한 번 씻어낸 뒤, 1 mg/ml로 녹인 MTT 시약을 10배 희

석하여 배지에 섞은 뒤 처리하여 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 MTT 시약을 제거한 후 DMSO를 웰 당 200  $\mu$ L씩 넣고 formazan을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 값을 도 6에 나타내었다.

[0113] 도 6에서 보듯이, 동백화밀은 대조군 대비 20% 정도의 모유두세포 증식능을 나타내었다.

[0114] **실시예 8: 동백화밀의 인체 피부에 대한 안전성 확인 실험**

[0115] 본 발명에 따른 항노화 효과가 우수하다고 판명된 동백화밀이 인체피부에도 안전한지 확인하기 위하여, 동백화밀을 함유한 피부외용제를 제조하고 이에 의한 피부 안전성 검증 실험을 수행하였다.

[0116] 실시예 1의 동백화밀을 1% 함유한 피부외용제를 하기 표 1의 성분함량으로 제조하였다. 피부 외용제 제조를 위하여, 정제수, 글리세린, 부틸렌글리콜을 혼합하고 70°C에서 용해하였으며(수상파트), 상기 세 성분과 트리메탄올아민을 제외한 나머지 성분을 70°C에서 용해하였다(유상파트). 상기 오일 파트를 수상파트에 첨가하고 호모믹서(일본 Tokushu Kika사)로 교반하여 1차 유화하였고, 여기에 트리메탄올아민을 최종 첨가하였다. 혼합액에 생성된 기포를 제거한 후, 실온으로 냉각시켜 피부 외용제를 제조하였다.

**표 1**

성분	함량 (%)	
	대조군	시험군
정제수	72	71
글리세린	8.0	8.0
부틸렌글리콜	4.0	4.0
동백화밀	0	1.0
카프릴릭 카프리 트리글리세라이드	8.0	8.0
스쿠알란	5.0	5.0
세테아릴 글루쿠사이드	1.5	1.5
소르비탄 스테아레이트	0.4	0.4
세테아릴 알코올	1.0	1.0
트리메탄올아민	0.1	0.1
총 중량	100	100

[0118] 상기와 같이 제조한 각 피부 외용제를 사용하여 건강한 30명의 성인을 대상으로 등 부위에 24시간 폐쇄접포를 시행하는 것에 의하여 동백화밀이 피부에 자극을 주는지 여부를 측정하였다.

[0119] 첩포 방법은 Chemotechnique MB Diagnostics AB사의 챔버(IQ Ultimate™)를 이용하였다. 챔버에 상기 각 피부 외용제를 20  $\mu$ L씩 취하여 24시간 동안 폐쇄 첩포를 실시하였다. 첩포 제거 30분 후와 24시간 후에 피부 반응을 관찰하고 평가 기준에 따라 피부 자극의 유무와 정도를 육안평가 하였으며, Frosch&Kligman (1979), CTFA guideline (2007)에 근거하여 표 2의 판정기준에 따라 피부 자극성 평가 지수를 산출한 후, 하기 실험식 2를 이용하여 각 피부외용제의 평균 피부자극 지수를 계산하였으며, Draize 방법을 응용하여 분류한 표 3의 피부 자극 지수를 기준으로 피부 자극도를 평가하였다.

[0120] [실험식 2]

[0121] 평균 피부자극 지수 계산 공식

[0122]  $\sum [(Grade \times \text{반응이 나타난 피험자수}) / (4; \text{최고 grade} \times \text{전체 피험자수})] \div \text{평가횟수}$

**표 2**

기호	Grade	자극성평가
-	0	반응 없음
+	1	약하지만 뚜렷하게 보이는 홍반반응
++	2	뚜렷한 홍반이 보이며 구진 혹은 부종을 동반한 홍반반응
+++	3	부종 및 구진을 동반한 강한 홍반 반응
++++	4	부종과 수포를 동반한 강한 홍반 반응

표 3

[0124]

피부 자극 지수	피부 자극도 판정
0.00-0.25	비(무) 자극성
0.26-1.00	약한 자극성
1.01-2.50	중등도 자극성
2.51-4.00	강한 자극성

표 4

[0125]

시험 물질	반응이 나타난 피검자 수								평균 피부자극 지수
	30분 후				24시간 후				
	1	2	3	4	1	2	3	4	
대조군	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
시험군	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
피험자수	30	30	30	30	30	30	30	30	

[0126]

상기 표 4에서 볼 수 있듯이, 대조군 및 시험군 모두에서 자극 반응이 나타나지 않았다. 상기 기재된 식에 따라 계산하면 평균 반응도가 0.00이므로 동백화밀 (시험군)을 포함한 피부 외용제는 대조군 피부 외용제와 같이 비 자극성 물질로 인체 피부에 안전한 물질로 판정하였다.

[0127]

제조예 1: 화장료 제제

[0128]

제조예 1-1: 유연화장수

[0129]

하기의 표 5와 같이 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 유연화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 5

[0130]

성분	중량%
동백화밀	0.01
글리세린	3.0
부틸렌 글리콜	2.0
프로필렌 글리콜	2.0
카복시비닐폴리머	0.1
에탄올	10.0
트리에탄올아민	0.1
방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량 정제수	82.79
총계	100.0

[0131]

제조예 1-2: 영양화장수

[0132]

하기의 표 6과 같이 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 영양화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 6

[0133]

성분	중량%
동백화밀	0.01
밀납	4.0
폴리소르베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	0.5
유동과라핀	5.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	5.0
글리세린	3.0
부틸렌 글리콜	3.0
프로필렌 글리콜	3.0

카복시비닐폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.2
방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수	69.69
총계	100.0

[0134] 제조예 1-3: 영양크림

[0135] 하기의 표 7과 같이 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 영양크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 7

[0136]

성분	중량%
동백화밀	0.01
밀납	10.0
폴리소르베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	0.5
유동과라핀	10.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	5.0
글리세린	5.0
부틸렌 글리콜	3.0
프로필렌 글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수	56.79
총계	100.0

[0137] 제조예 1-4: 마사지 크림

[0138] 하기의 표 8과 같이 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 영양크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 8

[0139]

성분	중량%
동백화밀	0.01
밀납	10.0
폴리소르베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	0.8
유동과라핀	40.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	4.0
글리세린	5.0
부틸렌 글리콜	3.0
프로필렌 글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수	27.49
총계	100.0

[0140] 제조예 1-5: 팩

[0141] 하기의 표 9와 같이 동백화밀을 유효성분으로 포함하는 팩을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 9

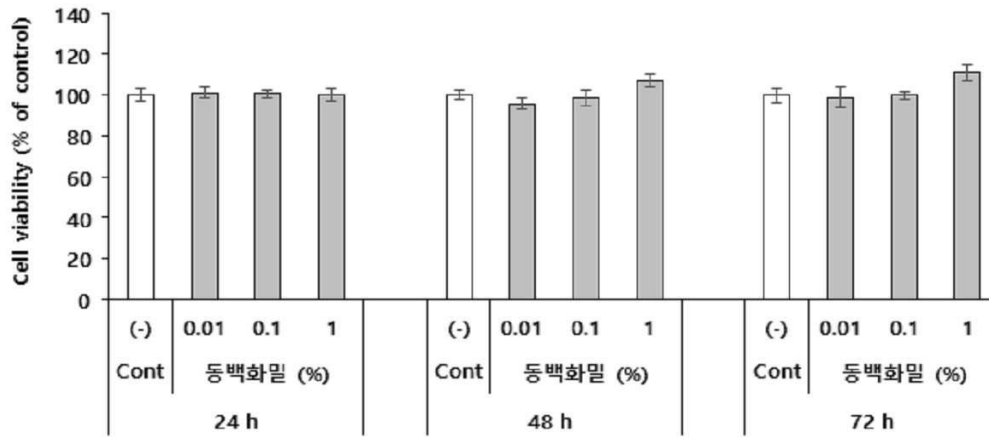
[0142]

성분	중량%
동백화밀	0.01
폴리비닐알콜	13.0
소듐카복시메틸셀룰로스	0.2
알란토인	0.1

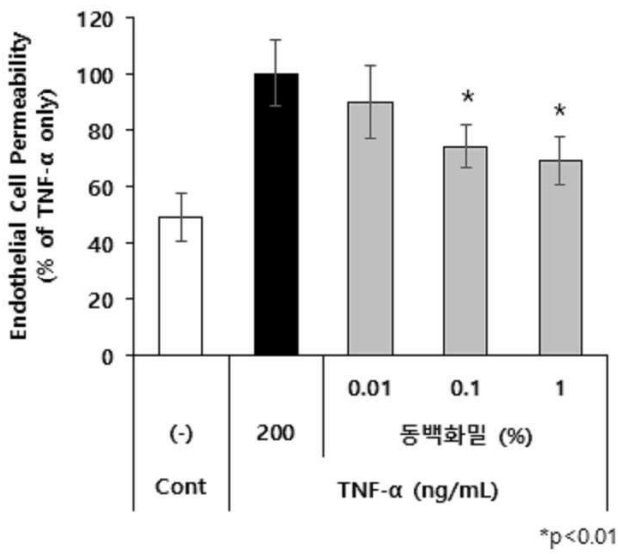
에탄올	5.0
노닐페닐에테르	0.3
방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수	81.39
총계	100.0

도면

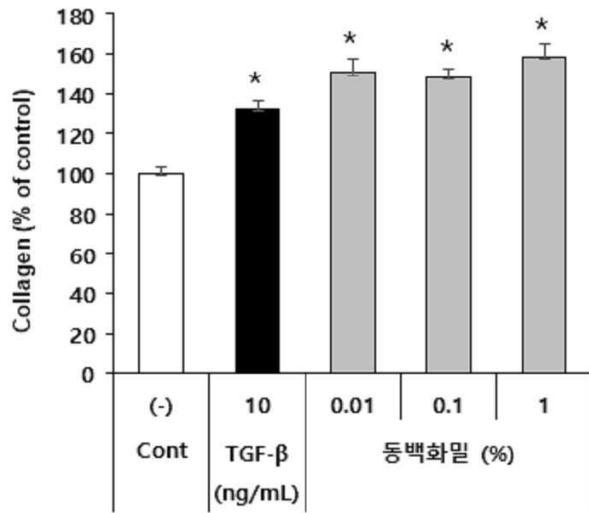
도면1



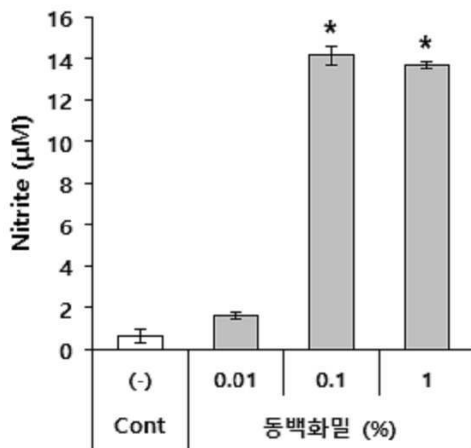
도면2



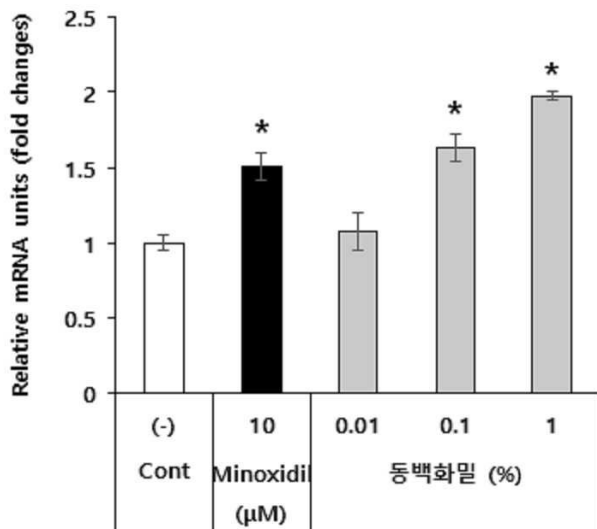
도면3



도면4



도면5



도면6

