

발간등록번호

11-1543000-000140-01

인진쑥 활용 산업화 연구사업단

(The Research Group of Functional Food with *Artemisia capillaris*)

(주)알앤엘바이오

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인진쑥활용 산업화 연구사업단” 과제(세부과제 “인진쑥을 주원료로 한 뽕 건강기능식품 개발, 인진쑥의 뽕 건강 기능성분의 표준화 및 효능 평가”)의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 30일

주관연구기관명 : (주)알앤엘바이오

주관연구책임자 : 라 정 찬

세부연구책임자 : 배 형 석

연 구 원 : 허 재 욱

연 구 원 : 김 수 현

연 구 원 : 김 수 연

연 구 원 : 신 은 혜

협동연구기관명 : 바이셀

협동연구책임자 : 주 영 철

협동연구기관명 : 충남대학교 약학대학

협동연구책임자 : 김 영 호

협동연구기관명 : 한남대학교 식품영양학과

협동연구책임자 : 장 해 동

요 약 문

I. 제 목 : 인진쑥 활용 산업화 연구사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 인진쑥으로부터 뼈 건강 활성을 나타내는 기능성분을 밝혀내고 원료 표준화를 확립하며 그 원료물질에 대한 안전성 및 임상시험을 거쳐 개별인정형 소재로 등록하고 뼈 건강에 도움이 되는 건강기능식품의 제품화를 추진하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- ▶인진쑥 원료 표준화
- ▶인진쑥의 뼈 건강 관련 기능 물질 분리·정제 및 구조 동정.
- ▶인진쑥의 뼈 건강 관련 기능(지표)성분의 설정 및 분석법 확립.
- ▶뼈 건강 관련 기능 물질의 효능 확인 및 작용기전 규명.
- ▶인진쑥 원료의 제조공정 기술 확립.
- ▶인진쑥 원료의 안전성 평가 및 임상시험 실시.
- ▶인진쑥 원료의 개별인정형 소재 등록.
- ▶뼈 건강에 도움을 주는 건강기능식품의 개발 및 출시.

IV. 연구개발 결과

- ▶사철쑥 원료 표준화 수립
- ▶사철쑥 원료의 제조공정기술 확립
- ▶사철쑥 원료의 안전성 입증자료 확보
- ▶사철쑥 원료의 기준/규격 설정 및 안정성(유통기한설정) 평가 완료
- ▶사철쑥 원료의 지표성분 결정, 구조 동정 및 분석법 확립
- ▶사철쑥 원료의 뼈 건강효능 확인 및 작용기전 규명
- ▶뼈 건강에 도움이 되는 건강기능식품 개발 및 제형 다양화

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

- ▶논문투고(SCI) : 4
- ▶특허등록(조성물) : 1
- ▶천연물로부터 유효성분 분리·정제 및 구조동정 기술 확산
- ▶뼈 건강 유효성분 확인 및 작용기전 규명 기술 확산
- ▶뼈 건강에 도움이 되는 사철쑥 원료의 특허출원 및 건강기능식품 상품화

SUMMARY

(영문요약문)

I. The Title of the Study

The Research Group of Functional Food with *Artemisia capillaris*

II. The purpose of the Study

The objectives of this study is to identify active compounds of *Artemisia capillaris* showing a biological function for bone health, to find the standardization method of raw *Artemisia capillaris*, to register *Artemisia capillaris* extract as a health functional food through safety test and human study and finally to develop commercial products of health functional food claimed for bone health

III. The Content and the Scope of the Study

1. Standardization of raw *Artemisia capillaris*
2. Isolation and identification of active compounds showing a biological function for bone health
3. Development of standard method for analysis of active compounds
4. Evaluation of efficacy of active compound and elucidation of their working mechanisms
5. Development of processing method of *Artemisia capillaris* extret
6. Safety test and human study of *Artemisia capillaris* extract
7. Registration of *Artemisia capillaris* extract as a material of health functional foods
8. Development of health functional foods claimed for bone health

VI. The Results

1. Standardization of raw *Artemisia capillaris*
2. Preparation method of *Artemisia capillaris* extract
3. Documents of safety of *Artemisia capillaris* extract
4. Standardized formula and stability of *Artemisia capillaris* extract
5. Isolation and identification of active compounds and standard method of their analysis
6. Efficacy of *Artemisia capillaris* extract and its working mechanism
7. Development of several types of health functional foods for bone health

V. The Outcome of the Study and Further plans

1. Papers (SCI) : 4
2. Patents (formular) : 1
3. Application of isolation and identification technology of active compounds from natural resources
4. Technology development of efficacy evaluation and working mechanism of active compounds
5. Patent application and commercialization of health functional foods for bone health

CONTENTS
(영 문 목 차)

Charter 1. Introduction of the study6p.

Charter 2. The status of technology development at home and
abroad10p.

Charter 3. The results12p.

Charter 4. Rate of goal achievement and contribution in related
areas201p.

Charter 5. Plan to practical use202p.

Charter 6. International science and technology information
collected in the process of the study204p.

Charter 7. List of facilities and instruments205p.

Charter 8. References206p.

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	6p.
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10p.
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12p.
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	201p.
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	202p.
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	204p.
제 7 장	연구시설·장비 현황	205p.
제 8 장	참고문헌	206p.

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등

1. 목적

본 연구는 인진쑈로부터 뼈 건강 활성을 나타내는 기능성분을 밝혀내고 원료 표준화를 확립하며 그 원료물질에 대한 안전성 및 임상시험을 거쳐 개별인정형 소재로 등록하고 뼈 건강에 도움이 되는 건강기능식품의 제품화를 추진하는데 있다.

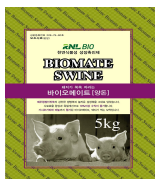
2. 필요성

- ▶ 근래 정부에서는 국민보건향상과 소비자 보호 및 식품산업의 발전을 도모한다는 취지로 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 공포함. 최근 기능성 식품의 수요가 크게 증가하면서 새로운 기능소재의 효능을 입증하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발하고자 하는 많은 연구들이 진행되고 있음.
- ▶ 기능성 소재 등급 세분화의 제도적 변화에 따라 개별인정형 소재 허가 활성화에 힘입어 최근 건강기능식품시장에서 개별인정형 제품들의 판매량은 2008년 416억에서 2009년 800억으로 급증하는 추세이다.
- ▶ 2009년 우리나라 여성 골다공증 인구는 68만7,524명으로 남성의 5만여 명보다 13배 정도 많았다. 하지만 최근 남성 노인 인구가 늘면서 남성 골다공증 환자도 급증하고 있으며, 2009년에는 5만 2천여 명으로 2005년 2만 5천여 명에 비해 2배 이상 늘어났다. 또한 60세 이상의 노인인구 53만 명이 우리나라 전체 골다공증 인구의 72%를 차지하였으며, 특히 60~70대에서 골다공증 인구가 급격히 증가한 것으로 나타났다(국민건강 보 험관리공단 자료). 골다공증에 의한 골절은 사망률 증가와 밀접한 관계가 있고 전체 의료 비 상승 등 사회·경제적인 문제를 유발하므로 골다공증에 대한 의학적 관심이 점점 증가하고 있는 추세이다.
- ▶ 골 대사질환 중 하나인 골다공증은 조골세포 활성의 감소 혹은 파골세포의 상대적 활성증가로 인해 야기된다. 흔히 골다공증은 노화, 호르몬 이상 (여성의 경우 estrogen 분비 감소), 염증성 류마티스 관절염, 대사성 질환, 골 전이성 암 (유방암, 전립선암)과 같은 다양한 질환으로 발병하며, 이로 인해서 심각한 통증과 보행의 어려움으로 질 높은 삶을 유지하기 어렵다.
- ▶ 현재 골다공증의 치료로는 호르몬 요법 (hormone therapy)과 비스포스포네이트 제제가 주로 사용되고 있으나 호르몬 요법의 경우 유방암, 뇌졸중 등의 부작용이 보고 되고 있으며, 비스포스포네이트 제제의 경우 과도한 골재형성 억제로 인한 턱뼈괴사 (Osteonecrosis of the jaw) 등의 문제점이 지속적으로 제기되고 있다.
- ▶ 최근 식약청에서는 “어린이 키성장 촉진”을 건강기능식품의 기능성내용으로 적합하지 않은 항목으로 분류를 추진하고 있어, 본 과제의 내용이 인진쑈를 원재료로 하는

성장촉진 관련 건강기능식품개발에서 인진쑥을 원재료로 하는 연골과 골밀도 개선 관련 건강기능식품 개발로 변경하여 진행하는 것으로 전환하였다.

- ▶ 국내 시판되고 있는 성장보조식품은 뼈 건강과 밀접한 관련이 있는 것으로서 홍화씨, 녹각, 백복령 등 한방제재와 칼슘을 비롯한 미네랄을 배합한 제품들이 있음.
- ▶ 식약청에 “뼈 건강” 기능성내용으로 등록된 개별인정형 건강기능식품 원료로는 흑효모 배양액분말, 피토쏘야, 대두발효추출물, 대두이소플라본, 바이오이소플라본 등이 원료로 등록되어 있으며 인진쑥 유래의 뼈 건강 관련 개별인정형 원료는 개발되어 있지 않음
- ▶ 인진쑥의 경우 더위지기(*Artemisia iwayomogi*)와 사철쑥 (*Artemisia capillaris*)이 유통되고 있는데 사철쑥의 경우는 식용으로 사용가능한 원료이나 더위지기는 비록 오래 사용되어져 왔으나 식용 가능한 원료로 등재되어 있지 않기 때문에 건강기능식품 개발을 위해서는 사철쑥을 선택하여 사용하는 것이 바람직함.
- ▶ 사철쑥 추출물로부터 뼈 건강에 도움이 되는 우수한 효능 물질이 확인되고 개별인정형 기능성 소재로 등록될 경우 인진쑥을 이용한 건강기능성식품의 상품화로 국민들의 건강 증진, 국내농가의 소득증대에 크게 기여할 것임.
- ▶주관기관인 (주)알앤엘바이오는 제주도 산 인진쑥 추출물의 성장촉진 효능에 대해서 지난 3년간('01. 7. - '04. 6.) 연구하여 인진쑥의 유효물질에 대한 많은 노하우를 가지고 있다. 천연 성장호르몬 분비촉진인자를 단기간에 스크리닝할 수 있는 in vitro assay system을 확립하였으며 1,000여종의 식물체를 선별하여 8가지의 후보물질을 선별하였다. 8가지 후보물질을 어류를 이용한 효능검정을 한 결과 성장 호르몬 분비촉진 활성이 가장 높은 시료로 인진쑥을 선정한 바 있다.

- ▶(주)알앤엘바이오는 인진쑥, 섬오가피 및 마늘 추출물들을 포함하는 사료 조성물을 제조하여 동물에게 투여하였을 때 우수한 성장호르몬 촉진효과를 나타내어 동물의 성장을 촉진시키는 효과를 확인한 바 있으며 또한 이 사료 조성물을 가축에게 급여하였을 때도 우수한 증체, 육질개선 및 산유량 증가 효과를 직접 경험하고 있다. 당사는 인진쑥 추출물을 주요성분으로 하는 사료보조제 『바이오메이트』를 '07년 상품화 하여 판매하고 있다.



- ▶사료보조제 『바이오메이트』 성분을 예비실험 선행연구에서 SD레트에 8주간 섭취시킨 후 실험동물의 대퇴부 뼈를 적출하여 길이성장 변화를 측정 한 결과 바이오메이트 투여군의 대퇴부 뼈가 대조군에 비하여 6% 더 성장되었음이 확인되었다.



- ▶주관기관인 (주)알앤엘바이오 CEO는 2010년 삼미식품을 자회사로 인수하여 식품사업에

본격적으로 뛰어들었으며 또한 건강식품 사업화 의지가 매우 강력하다.

- ▶ 후발 제품으로서 성공적인 시장진입을 위해서는 시판 성장보조 식품들과 차별화된 제품을 개발할 필요가 있다. 그러기 위해서 성장효능이 확인된 인진쑥 생약으로부터 성장촉진 효능을 나타내는 원료를 개발하여 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 인정받고 그 원료를 활용한 건강기능식품을 개발해야 한다.
- ▶ 인진쑥 추출물로부터 성장촉진 활성이 우수한 효능 물질이 확인되고 개별인정형 기능성 소재로 등록될 경우 인진쑥을 이용한 건강기능성식품의 상품화로 국민들의 건강증진, 국내농가의 소득증대에 크게 기여할 것이다.

3. 범위

구분	연구 범위	구체적인 내용
1차년도 (2011)	인진쑥 원재료 표준화	원재료 종류, 원산지, 채취 부위 및 시기, 건조방법 결정
	뼈 성장 관련 제품 시장 조사	어린이용 성장촉진 건강기능식품들의 시장현황 조사
	성장촉진 제품 설계	인진쑥 추출물과 보조원료의 최적 배합비 결정
	인진쑥 원료 가공기술 개발	원재료의 추출수율이 높은 추출/농축 기술 개발
	기능(지표)성분 추출, 분획	인진쑥(더위지기)을 유기용매로 추출 후 극성에 따른 용매 분리
	기능(지표)성분 분리, 정제	HPLC 등 각종 컬럼크로마토그래피를 활용하여 단일물질을 분리, 정제함
	기능(지표)성분 분석법 확립	인진쑥의 지표성분에 대한 HPLC분석법 확립
	연골세포를 이용한 in vitro 성장 촉진 활성 측정	Rat growth hormone kit를 사용하여 뇌하수체 세포의 성장 호르몬 생성능, MTT assay로 연골세포 증식촉진 활성능을 측정
	골아세포를 이용한 in vitro 성장 촉진 활성 측정	MTT assay, alkaline phosphatase 활성능 bone nodule 형성능을 측정하여 골아세포의 증식촉진 활성 분석
2차년도 (2012)	원료 표준화 설정	인진쑥 원재료를 추출, 농축 후 지표물질 함량 추출수율을 비교분석하여 인진쑥원료 추출방법 결정
	기능성 원료 안전성 평가	랫드를 이용한 사철쑥의 단회 경구투여 독성반응 시험.
	기능성 원료 규격 검사	건강기능식품 개별인정 규정에 따른 규격 검사 실시
	뼈 건강관련 제품 시장현황 조사	뼈 건강 관련 기능성 원료, 제품, 시장규모 및 판매현황 조사
	건강기능식품 제품설계	기능성 원료 및 시장현황을 기초로 한 뼈 건강 관련 차별화된 시제품 설계
	인진쑥추출물의 제조공정 확립	파이롯트 제조를 5만복 이상 실시하여 사철쑥의 추출 조건 및 건조방법에 대한 최적 제조공정을 확립함
	뼈 건강에 유익한 보조원료 평가	사철쑥 추출물에 칼슘원료를 농도별로 조골세포에 투여 하면서 조골세포 활성화에 미치는 효과를 확인
	기능(지표)성분의 추출 및 분획	사철쑥을 메탄올로 추출 후 EtOAc로 분획함
	기능(지표)성분의 분리정제	실리카겔, RP-18, Prep HPLC 등을 활용하여 인진쑥의 성분의 단일물질을 분리, 정제함
	기능(지표)성분의 구조분석	NMR, MS 등을 통하여 인진쑥 성분들의 구조 동정
	기능(지표)성분의 분석방법 확립	지표성분(scoparone)의 HPLC 분석방법 확립 및 분석방법 validation을 수행함
	인진쑥 추출물의 In vivo 뼈 성장 활성 분석	인진쑥 원료를 SD랫에 경구투여, 대퇴부 골의 길이와 혈중 GH, IGF-1, IGFBP-3, ALP, osteocalcin, PICP, P3NP, ICTP의 뼈 성장 관련 biomarker를 분석
	인진쑥 추출물의 In vivo 뼈 건강 활성 분석	인진쑥 원료를 SD랫에 경구투여, 대퇴부 골밀도와 혈중 미네랄함량, ALP, TRAP, RANKL, OPG, osteocalcin, PICP, ICTP의 뼈 건강 관련 biomarker를 분석함

3차년도 (2013)	인체적용시험 준비, 착수	IRB 승인, 피험자 모집 및 인체적용시험 수행
	인체적용시험용 원료시제품 준비	원료의 성분분석 및 기준 /규격을 설정하고 원료시제품의 안정성(유통기한설정) 평가 완료
	건강기능식품 제형 다양화	과립, 캡슐, 정제 또는 환으로 3가지 제형 개발,
	인진쑥의 성분 분석	건조방법 별로 제조한 인진쑥 원료들의 지표성분 분석
	지표성분 대량 분리 정제	지표성분의 대량 분리 정제, 원료 제조공정 모니터링
	사철쑥 원료의 뼈건강 활성기전 규명	조골세포와 파골세포 분화에 미치는 지표성분 (Scoparone)의 작용 기전 규명
	개별인정형 원료 등록	등록에 필요한 구비서류 작성, 식약청에 등록서류 제출
	기능성 원료 특허 출원	인진쑥 추출물을 주 원료로 한 뼈 건강영 조성물 특허 출원
	건강기능식품 허가, 출시	뼈 건강에 도움이 되는 건강기능식품 품목허가, 출시

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

- ▶ 성장 호르몬의 치료는 1958년 Raben이 17세 소년에 성장 호르몬을 처음 주사하여 성장 촉진 효과가 있음을 보고한 이후 50년 동안 사용되어 왔다. 현재 성장호르몬은 소아연령에서 왜소증 어린이의 성장촉진을 목적으로 주로 사용되고 있으며 성인연령에서는 근육, 뼈 및 연골조직 등의 단백질 손실을 억제하고 생리적인 노화현상을 지연시키기 위한 대사장애 교정 목적으로 사용되고 있다.
- ▶ 초기에는 인체에서 추출한 사람 성장 호르몬으로 공급이 제한되었으나 현재는 유전공학 기술의 발달에 힘입어 비교적 저렴한 가격으로 성장 호르몬이 사용되고 있다. 그러나 현재까지 이러한 성장 호르몬을 매일 피하 주사하는 방법으로 사용되고 있기 때문에 사용상 불편할 뿐만 아니라 소양감, 발적, 동통, 당 불내성, 전신 알레르기 반응, 갑상선 기능저하 등의 부작용들이 문제점으로 지적되어 왔다. 그래서 기존 성장 호르몬제와 비교했을 때 효과는 조금 떨어지더라도 투여방법이 편리한 경구투여 제품 개발에 대한 요구가 커지고 있는 실정이다.
- ▶ 경구 투여용 성장 호르몬제 개발의 기본 요건은 체내에서 흡수율이 높아야 하고 선택적으로 성장 호르몬 분비를 촉진할 수 있는 활성도와 안전성을 지니고 있어야 한다.
- ▶ 1980년 미국 바우어 교수(C.Y. Bowers) 등이 새로운 성장호르몬 분비 촉진제인 GHRP-6 (Growth hormone releasing peptide-6; His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys)를 개발, 생체 내 및 외에서 성장호르몬을 분비시키는 활성이 있음을 확인하였다. 그 후 유사 펩타이드들이 개발되었으나 경구투여 시 소화효소의 작용으로 인해 흡수율이 낮은 것이 문제였다.
- ▶ 경구 흡수율을 높인 새로운 화합물인 L-163, 191이 미국 머크사에 의해 개발되었다. 이 물질은 개(Beagle dog)에 경구투여 시 60% 이상의 흡수율을 나타내는 것으로 보고되었으며 임상시험 중이다.
- ▶ 일반적으로 성장호르몬 secretagogue라 불리는 다양한 물질들이 뇌하수체에서의 성장 호르몬 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이러한 성장호르몬 secretagogue으로는 아미노산류, inositol hexanicotinate와 같은 비타민들이 있으며 1996년 인디안 약초인 *Coleus forskohlii*의 뿌리에서 추출된 forskolin과 같은 천연 식물체에 존재하는 물질들도 알려져 있다. 천연 식물체에 존재하는 성장호르몬 secretagogue들은 성장호르몬 제제와는 다르게 경구투여가 가능하며 자연에 존재하는 것이라 합성 제제와는 다르게 내성이 생기지 않는다는 장점이 있다. 또한 일상생활에서 식이로 자연스럽게 섭취하므로 특별한 부작용이 없어 현재 일반인을 대상으로 한 건강식품으로 다양한 제품들이 개발

되고 있는 상황이다.

- ▶국내에서는 LG생명과학과 한국한의학연구원이 주로 천연물을 대상으로 스크리닝하여 성장 호르몬 분비촉진 소재를 발굴하고 있으며 그밖에 제약기업에서도 비슷한 개념의 소재 개발이 진행 중이다. 한국한의학연구원은 삼칠근, 디오신, 등글레, 가시오가피 등 생약 추출물로부터 성장촉진 효능 물질을 탐색하였으며, LG생명과학은 원지, 사상자, 백합, 길경 추출물로부터 성장 호르몬 분비촉진 효과가 높은 물질을 분리했다고 하였다. (주)알앤엘바이오도 인진쑥과 가시오가피 추출물에서 성장 호르몬 분비촉진 물질이 있음을 확인하였다.
- ▶국내 시판되고 있는 성장보조식품은 홍화씨, 녹각, 백복령 등 한방제재와 칼슘을 비롯한 미네랄을 배합한 제품들이다. 이들 제품들은 편식, 인스턴트 식품의 과다섭취, 학업 스트레스로 인한 성장 호르몬 분비나 영양공급이 어려운 어린이, 청소년에게 칼슘 등 부족한 영양소를 공급하고 신체조화를 통해 성장을 도와준다는 게 주요 컨셉이다. 내용물들은 비슷하고 단지 배합비율이 조금 다를 뿐이다. 그러나, 아직 천연물로부터 성장 호르몬 분비 촉진 활성능이 있는 개별인정형 기능성 소재와 성장촉진 건강기능식품은 없는 실정이다. 현재 시판 중인 어린이용 성장보조 식품들은 대부분 키 성장에 도움이 되는 간접적인 영양보조제로서 의미는 있을 수 있으나 실제로 성장에 도움이 되는 과학적 근거를 갖지 못하고 있다.
- ▶후발 제품으로서 성공적인 시장진입을 위해서는 시판 성장보조 식품들과 차별화된 제품을 개발할 필요가 있다. 그러기 위해서 성장효능이 확인된 인진쑥 생약으로부터 성장촉진 효능을 나타내는 원료를 개발하여 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 인정받고 그 원료를 활용한 건강기능식품을 개발해야 한다.
- ▶인진쑥은 식품공전에 주원료로 사용가능한 동·식물로 등재되어 있으며 대한약전외생약(한약)규격집에도 등재되어 있으며, 또한 동의보감에서 인진쑥을 이용한 처방예가 있다. 이러한 자료들은 인진쑥이 식용·약용 모두로 이용가능하다는 근거를 제시한다.
- ▶최근 정부에서도 국민보건향상과 소비자 보호 및 식품산업의 발전을 도모한다는 취지로 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 공포하였다. 최근 기능성 식품의 수요가 크게 증가하면서 새로운 기능소재의 효능을 입증하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발하고자 하는 많은 연구들이 진행해지고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

[제1-1 세부 : 인진쑥 원료성분의 임상시험 및 산업화]

1절. 인진쑥 원료 표준화

1. 인진쑥의 기원.

인진쑥은 대한약전외한약(생약)규격집 [개정 2007. 11. 2. 식품의약품안전청고시 제2007-72호]에 의하면 인진호(茵陳蒿)와 한인진(韓茵陳)으로 구별되어 있다(그림1). 인진호는 사철쑥(*Artemisia capillaris*)이며, 한인진은 더위지기(*Artemisia iwayomogi*)로서 각각 구별된다.

사철쑥의 경우 식용으로 가능하나 더위지기의 경우 식용가능으로 분류되지 않고 있어 건강기능식품으로 개발하기 위해서는 사철쑥을 활용하는 것이 바람직하다고 생각된다.



그림 1. 인진쑥 모양

사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg)은 국화과(Composita) 쑥 속(*Artemisia*)에 속하는 다년생 초본으로 냇가나 강가의 모래땅에서 자라며 높이가 약 30~100 cm 정도로 곧게 자란다. 인진쑥은 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 등에 분포하고, 겨울철에도 죽지 않고 이듬해 줄기에서 다시 싹이 나온다 하여서 사철쑥 또는 애탕쑥이라 불리며 생약명으로는 인진, 인진호 또는 추호라고 불린다. 주요 성분으로는 수분 81.4%, 단백질 5.2%, 지질 0.8%, 당질 4.0%, 섬유질 3.7%, 회분 2.7%와 특수 성분으로 정유성분 등이 있으며 scoparone, scopoletin 및 fusic acid을 함유하고 있다. 또한 녹엽단백질 원인으로서는 필수지방산을 많이 함유하고 있어서, 영양학적으로 매우 우수하며 무기질 중 칼슘과 칼륨의 함량이 높아 알칼리성 식품으로, vitamin A와 C의 함량은 일반 야채류를 포함한 산야채류 중에서 가장 높은 것으로 알려져 있다.

한방에서 인진쑥은 지혈, 해열, 변비 소화불량, 천식, 부인병, 소염, 진통, 이뇨, 혈압강화, 신경통, 급만성 간염, 황달, 지방간 및 간 기능 개선의 목적으로 많이 이용되어 왔으며 간보호 효과, 항균작용, 항암효과, 항산화효과, 항돌연변이 효과, 과산화지질에 대한 효과, 혈압강화작용, 당뇨증상완화 및 고혈당증의 치료효과, 충치 억제효과, 당대사 개선효과 등이 보고되고 있다.

더위지기(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생의 목본식물로서, 낙엽활엽관목으로 잎은 2회 우상심열이고 열편은 선형이고 끝은 뾰족하고 잎사귀는 전연 또는 얇은 톱니를 지니고 있으며, 잎 뒷면은 녹색이고 잔털이 많다. 꽃은 두상화서이고 반

구형이며 노랑색이고 7-8월에 피며 9-10월에 성숙한다. 우리나라 전역에 분포하며 일본의 북해도, 소련의 사할린, 시베리아, 동북 중국, 몽고 등 아시아 지역 특히 북부에 광범위하게 분포한다. 줄기와 잎새는 한인진(韓茵蔴)이라 해서 고려시대서부터 약용되어 왔다. 더위지기의 성분으로는 esculetin-6-methylether 와 esculetin-7-methylether이 많이 알려져 있고 주로 함량이 많은 것은 전자의 물질이다. 이들 성분은 이담작용이 강하기 때문에 예로부터 담석증, 감염 및 황달의 요약(要藥)으로 쓰여져 왔다. 그 외에 소염이뇨(消炎利尿)의 효과가 있으며, 인진오령산의 주약이 되기도 한다. 기타 20여종의 정유성분이 함유되어 있는데 camphor가 주류를 이루고 있고 기타 isovaleric acid도 함유되어 있어 진정효과를 나타낼 것이 예측된다. 동양 삼국 중에서 한인진을 인진으로 약용하고 있는 것은 유독 우리나라뿐이고 일본, 중국, 대만에서는 사철썩을 인진으로 하여 약용되고 있다. 한인진은 우리나라 향약(鄉藥)의 발전에 있어서 하나의 지표가 되는 생약이라고 생각된다.

2. 원재료 표준화

가. 채취 지역에 따른 인진썩 내 지표물질(scopolin) 함량 측정.

- 인진썩의 채취 지역에 따른 지표물질의 함량을 측정하고자 제천, 청송, 영천, 제주 그리고 중국에서 채취한 구입하였다. 구입한 인진썩은 50% 에탄올을 인진썩 건물대비 10배의 양에서 추출하였다. 상온에서 5 시간 동안 추출한 후 농축기로 40℃에서 3시간 동안 농축 하였다. 농축한 고형물은 메탄올을 이용하여 고농도로 stock제조하여 냉장 보관하였다. 제조한 추출물 stock은 분석에 적합한 농도(100 µg/mL)로 희석하고 filtration(0.2 µm)한 후 UPLC(Waters)로 분석하였다. 분석한 결과는 지표물질 표준품의 분석 결과에 대비하여 함량을 계산하였다.

분석 결과, 충북 제천과 제주도에서 채취한 인진썩 추출물에서 10 mg/g 이상의 높은 scopolin 함량을 보였다(그림 2). 제천과 제주도의 두 지역에서 채취한 인진썩에서 scopolin의 함량이 높았지만 제천에서 채취한 인진썩은 원재료의 공급이 원활하지 못한 문제점이 있어서 본 연구의 원재료는 제주도에서 재배하고 채취한 인진썩을 사용하기로 결정하였다.

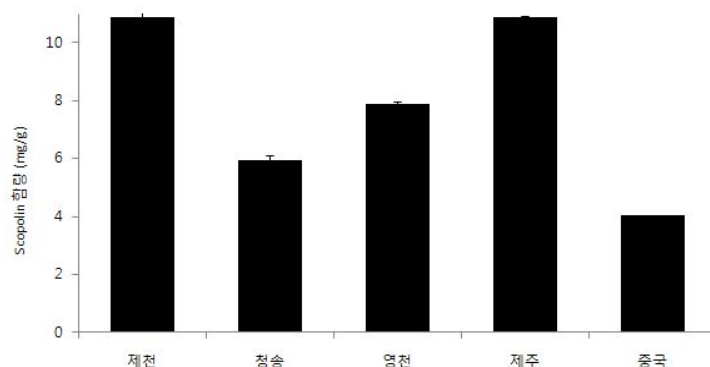


그림 2. 채취지역에 따른 인진썩 내 지표물질 함량.

나. 인진썩 부위별 지표물질(scopolin) 함량 및 고형분 수율 측정.

- 인진썩의 부위에 따른 지표물질 함량 및 고형분 수율을 측정하고자 인진썩의 줄기와 잎을

따로 분리한 뒤 뿌리, 잎 그리고 뿌리+잎(1:1) 각각 10 g씩 준비하였다. 준비된 부위별 인진쑥을 상온℃에서 50% 에탄올을 원재료 대비 10배 중량비로 첨가하여 추출한 뒤 농축기로 농축 후 위의 실험과 같은 조건으로 전처리하여 분석하였다.

함량을 분석한 결과, 줄기에서 scopolin의 함량이 가장 높고, 수율은 잎에서 가장 높게 나타났다(그림 3). 잎과 줄기를 혼합하여 추출하였을 때 scopolin의 함량과 고형분의 수율 결과는 잎과 줄기를 따로 분리하여 실험한 결과의 중간치를 보였다. 따라서 잎과 줄기를 혼합한 원재료를 사용하기로 결정하였다.

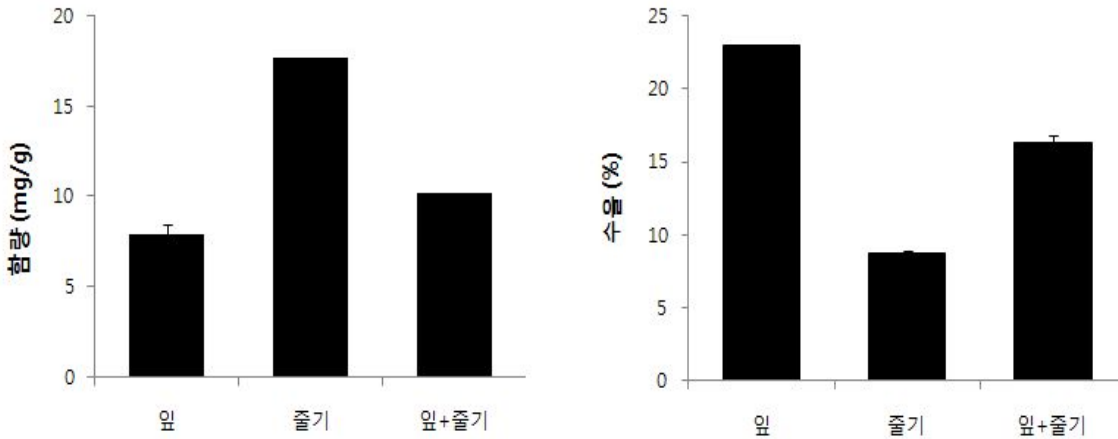


그림 3. 인진쑥 부위별 지표물질 함량 및 고형분 수율.

다. 추출온도에 따른 인진쑥 내 지표물질(scopolin) 함량 및 고형분 수율 측정.

제주도산 인진쑥의 잎과 줄기를 1:1로 혼합한 원재료를 추출온도를 달리하여 추출, 농축 한 후 분석하였다. 40, 50, 60℃ 조건에서 추출한 결과 지표물질의 함량은 40℃ 추출조건에서 가장 높게 나타났고, 고형분의 수율은 50℃ 조건에서 제일 높게 나타났다(그림 4). 적정 추출온도 조건은 지표물질 함량 및 고형분의 수율이 고루 높은 60℃로 정하였다.

상온과 고온(80℃) 조건에서도 인진쑥을 추출하여 함량 및 수율을 측정하였다(결과 미제시). 두 조건 모두 지표물질 함량 및 수율이 높았으나 상온은 실험실 내 온도가 일정치 않아 triplicate로 실험 시 오차범위 큰 문제점이 있고, 고온에서는 장시간 추출 시 에탄올이 증발하는 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 추출 시 장비들을 따로 설치해야 하는

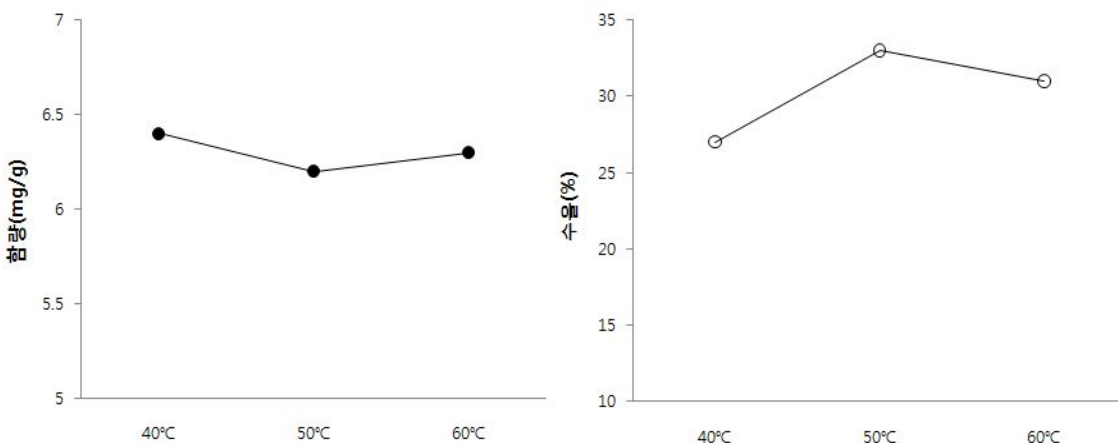


그림 4. 추출온도에 따른 인진쑥 내 지표물질 함량 및 고형분 수율.

데, 앞으로 인진쑥의 건강기능식품개발을 위해 원재료 추출 시 추가되는 비용을 절약하고자 상온과 고온에서의 추출조건은 제하기로 결정하였다.

라. 추출용매 조성에 따른 인진쑥 내 지표물질(scopolin) 함량 및 고형분 수율 측정.

잎과 줄기를 1:1로 혼합한 제주도산 인진쑥을 60℃ 조건에서 추출용매인 ethanol의 조성을 40, 50, 60, 80%로 달리하여 추출, 농축 한 후 분석하였다. 분석 결과, 지표물질의 함량이 가장 높은 용매 조성은 80%이고, 고형분의 수율이 제일 높은 조성은 40%이다(그림 5). 40%와 80% 조성은 지표물질 함량과 수율이 거의 반비례적인 결과를 보이기 때문에 지표물질 함량 및 고형분의 수율이 고루 높은 조건인 ethanol 50% 조건으로 결정하였다.

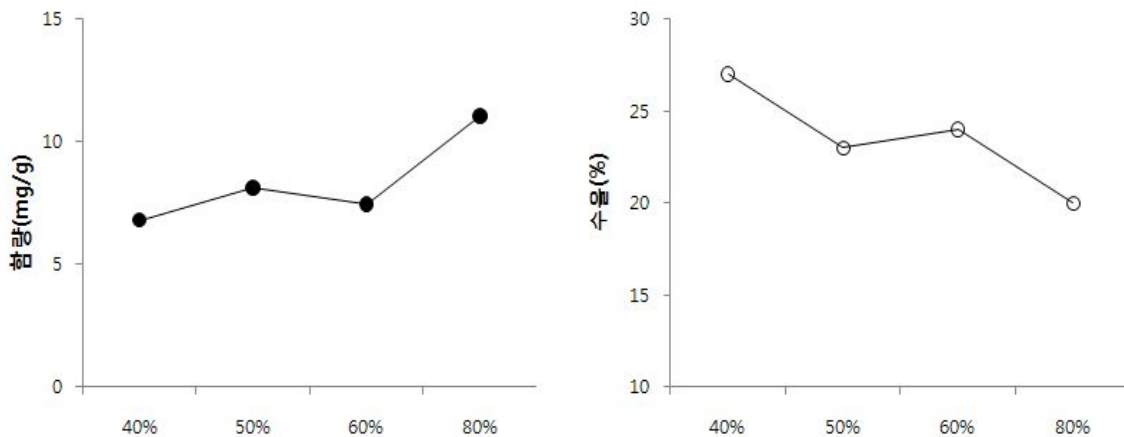


그림 5. 추출용매 조성에 따른 인진쑥 내 지표물질 함량 및 고형분 수율 측정.

마. 추출방법에 따른 인진쑥 내 지표물질(scopolin) 함량 및 고형분 수율 측정.

- 인진쑥의 추출방법을 달리하여 추출하였다. 추출조건은 잎과 줄기를 1:1로 혼합한 제주도산 인진쑥 대비 50% 에탄올 10배 중량비를 첨가하여 60℃ 온도 조건에서 추출, 농축 한 후 분석하였다. 용매와 원재료를 추출시간동안 꾸준히 섞어서 추출하였을 때 sonication 및 정치상태의 추출조건보다 함량이 높고 수율도 높게 검출되어서(그림 6) 이 조건으로 원재료를 추출하고자 한다.

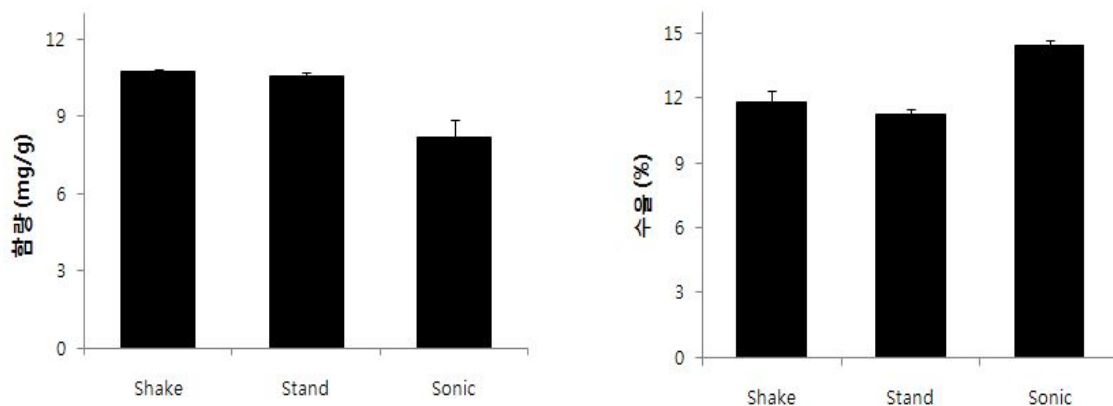


그림 6. 추출방법에 따른 인진쑥 내 지표물질 함량 및 고형분 수율 측정.

바. 추출시간에 따른 인진쑥 내 지표물질(scopolin) 함량 및 고형분 수율 측정.

- 잎과 줄기를 1:1로 혼합한 제주도산 인진쑥 대비 50% 에탄올 10배 중량비를 첨가하여 60℃ 온도 조건으로 30분에서 72시간까지 추출시간을 달리하여 추출, 농축 한 후 분석하였다. 30분에서 12시간까지 꾸준히 함량이 증가하는 결과를 보이며, 12시간 이후 함량이 일정하게 검출되었다. 이 실험은 실험실에서 진행한 소규모의 실험이고 공정과정에서 대용량 추출 시 결과치가 달라지기 때문에 참고자료로만 사용하고자 한다.

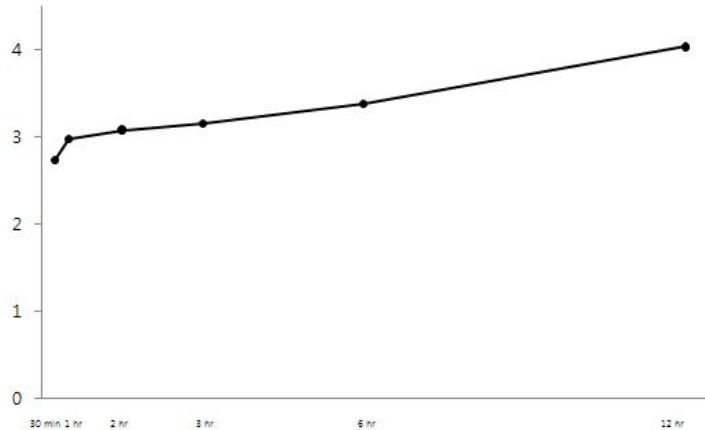


그림 7. 추출시간에 따른 인진쑥 내 지표물질 함량 및 고형분 수율 측정.

3. 원료 표준화

가. 인진쑥 원재료 구매

본 연구에서 건강기능식품의 기능성 원료로 사용할 인진쑥을 대량 구매를 하여 관리하고자 하였다. 온라인을 통해 인진쑥을 판매하는 곳을 조사하여 문의하거나, 경동시장 등과 같이 한약 재료를 판매하는 도매점을 직접 방문하여 원료 구매를 조사하였다. 하지만 인진쑥을 판매하는 곳 중 인진호와 한인진을 구별하여 판매하는 곳은 거의 드물었다. 구분하여 판매하는 도매점 중에서도 인진쑥을 생산하여 대량 판매하는 곳은 없었고, 모두 채취를 통해 수확한 인진쑥을 유통하였다. 따라서 인진호와 한인진을 구별하여 판매하며 연 10톤 정도 구매가 가능한 도매점 중 원료 가격이 가장 저렴한 곳을 선택하여 시제품에 사용할 인진쑥을 구매하였다. 현재 시장에 유통 중인 인진쑥 원료는 모두 경북 영천, 봉화 등에서 채취하여 열풍건조(50℃ 한, 24시간)한 것으로서 우선 원료를 100 kg 구매하여 실험에 사용하여 원료의 품질 및 효능을 확인 하였다. 도매를 통한 원료 구매보다는 원료 공급자들과가 직접 거래하는 것이 원료의 단가를 낮출 수 있고 원료 표준화를 유지 할 수 있을 것이라 판단되어 경북 지역의 관련 영농조합 등을 조사하고 있는 중이다. 그리고 인진쑥을 채취하는 것 보다 일정한 장소에서 원료를 재배하여 관리하는 것이 제품 개발 시 원료의 품질 및 표준화에 더 좋을 것이라 판단하여 알앤엘바이오에서 보유 중인 부지에 인진쑥을 직접 재배하는 방안을 검토하고 있다.

나. 추출시간에 따른 인진쑥 추출물의 지표물질(Scoparone) 함량 및 고형분 수율 측정

인진쑥 원료의 추출 효율이 높은 조건을 설정하고자 원료 표준화 실험을 진행하였다. 표준화실험은 지표물질인 scoparone의 함량분석 및 고형분 수율 측정 두 가지로 진행하였다. Scoparone의 함량은 HPLC를 통해 분석을 하였으며, 분석방법은 충남대(제2-1세부)에서 설정한 방법을 사용하였다. 고형분 수율은

원재료 무게 대비 원료 추출, 농축액의 고형분 무게의 값(%)을 측정하였다. 이 원료 표준화 실험은 실험실에서 소규모로 진행한 것이기 때문에, 실험 결과를 기초로 하여 생산시설 조건과 생산비용을 고려하여 최종적으로 추출조건을 결정하였다.

먼저 생산 효율을 높일 수 있는 추출 시간을 설정하고자 원료 추출의 시간에 따른 지표물질의 함량 변화 및 고형분 수율 변화를 측정하였다. 잎과 줄기를 1:1로 혼합한 인진쑥 10g에 50% 에탄올을 10배 중량비로 첨가하여 30분에서 24시간까지 시간을 달리하여 추출, 농축 한 후 분석하였고, 추출은 60°C 진탕배양기에서 진행하였다. 현재 1회 실험하였으며, 같은 조건으로 2회 더 반복실험을 진행하여 결과 값의 평균을 보고자 하였다. 추출결과, 지표물질(스코파론)의 함량은 30분간 추출 시 4.5 mg/g의 가장 높고 추출 6시간 까지는 함량이 급격히 감소하였다. 그리고 6시간부터 24시간 까지는 1.3 ~ 1.5 mg/g 정도의 함량을 보였다(그림 8). 추출 30분 이후에 지표물질 함량 값이 급격히 감소하는데, 반복실험을 통해 재현성을 확인하고 원인을 밝혀보고자 한다. 지금까지의 실험결과, 30분 추출 시 원료 내 지표물질 함량 값이 제일 높지만 원료 제조 공정에서는 한 번에 최소 4 kg이상의 원료와 40 L의 추출용매가 사용되기 때문에 30 분의 추출조건은 공정과정에 적합하지 않다고 판단되었다. 따라서 원료 추출시간은 공정과정을 고려하여 6시간 2회 반복 추출하는 것으로 결정하였다.

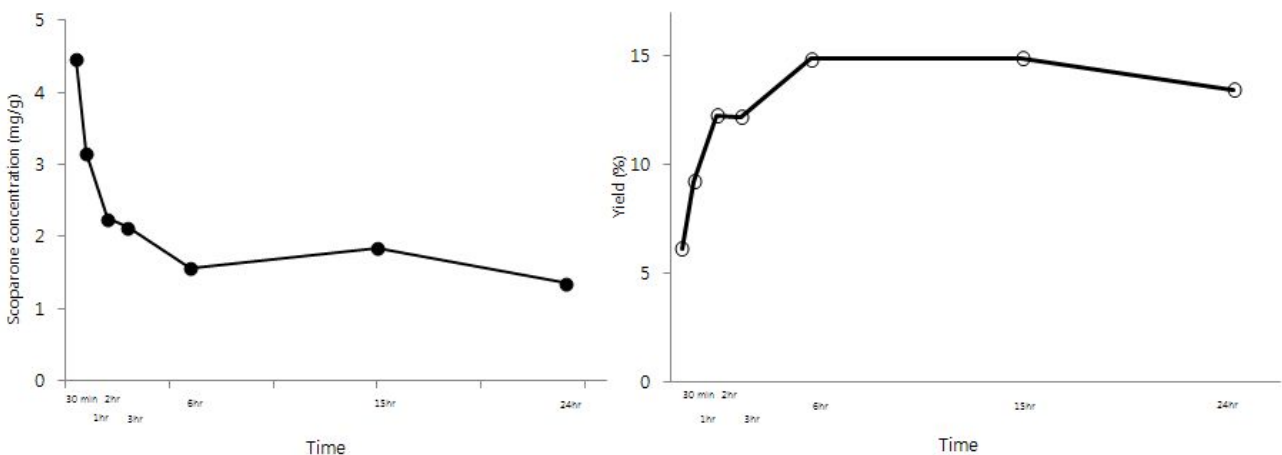


그림 8. 추출시간에 따른 인진쑥 추출물의 지표물질 함량 및 고형분 수율.

다. 추출용매 조성에 따른 인진쑥 추출물의 지표물질(Scoparone) 함량 및 고형분 수율

추출용매의 조성에 따른 인진쑥 추출물의 지표물질 함량 및 고형분 수율 차이를 측정하고자 추출용매인 ethanol 농도를 40, 50, 60, 70, 100%로 달리하여 추출하였다. 추출용매는 각 각 인진쑥 원료 대비 10배의 중량비를 첨가하였고, 60°C 온도조건에서 3시간 동안 추출, 농축하여 실험하였다. 지표물질 함량은 ethanol 100% 조건에서 8.9 mg/g로 가장 높고, 나머지 조성에서는 평균 2.3 mg/g로 유사하게 나타났다. 하지만 반대로 고형분 수율은 ethanol 100%에서 0.48%로 가장 낮고 나머지 조성에서는 평균 1.1%의 결과를 보인다. Ethanol 40 ~ 70% 용매 조성에서는 함량 및 수율의 결과 값이 유사하지만, ethanol 100% 용매 조성은 지표물질 두 배 이상 높고, 고형분 수율이 반 이상 낮다. 만일 현재 기능물질로 원료 표준화를 진행하고 있다면 기능성 원료의 효능을 위해 가장 높은 함량의 조성을 선택하겠지만, 현재 지표물질을 기준으로 측정한 것이기 때문에 실험 결과를 기초로 하여 원료 수율 및 원료 생산 비용을 고려한 ethanol 50% 조성으로 결정하였다.

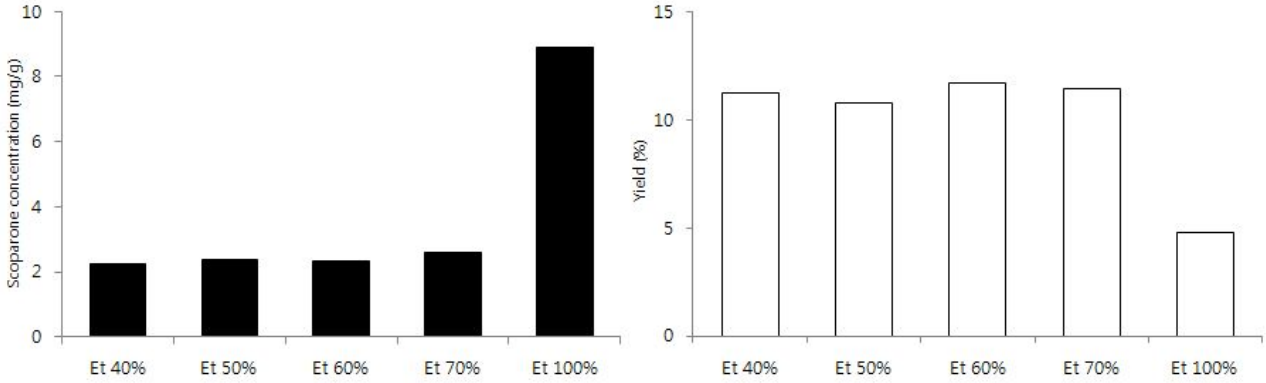
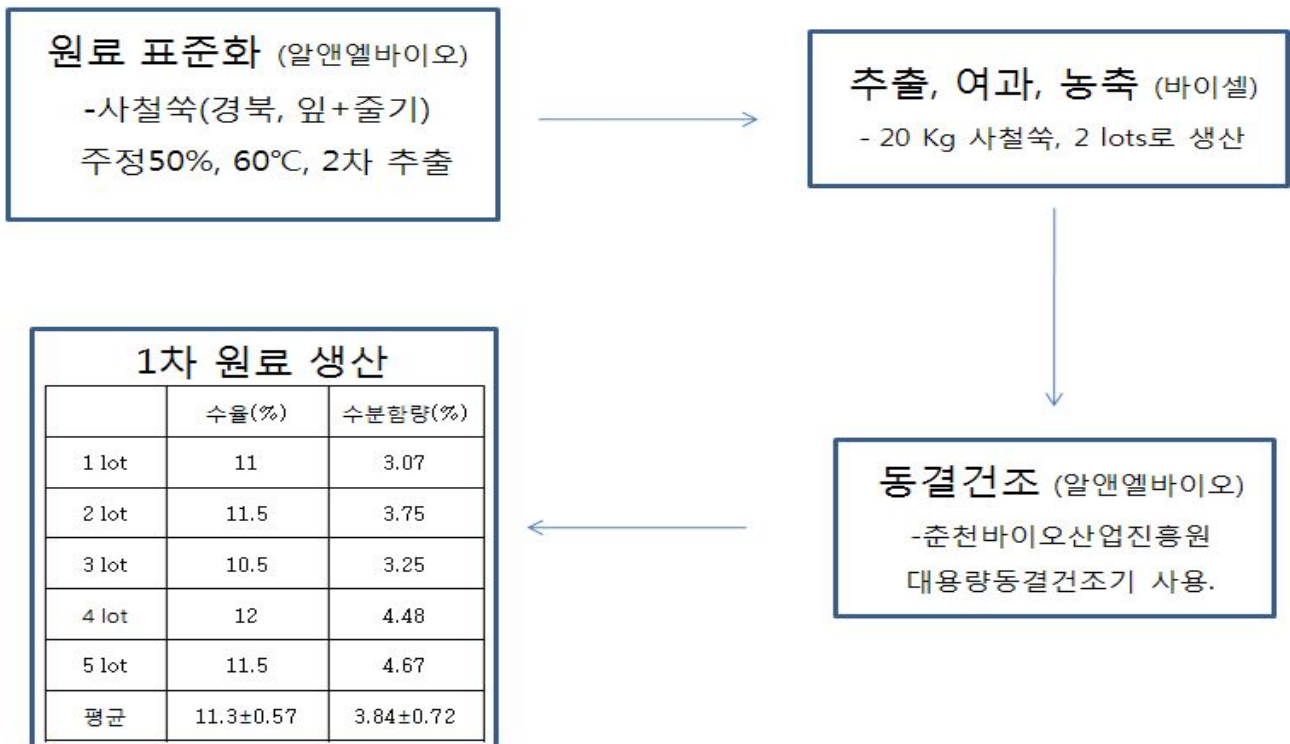


그림 9. 추출용매 조성에 따른 인진쑥 추출물의 지표물질 함량 및 고형분 수율.

라. 인진쑥 추출분말 생산

원료 표준화를 통해 설정한 제조 공정대로 인진쑥 원료를 생산하였다. 원료는 경북에서 채취한 사철쑥 20 Kg을 5 Lots로 나눠서 생산하였으며, 원료 구입은 주관기관인 알앤엘바이오에서 하였고, 추출 및 여과는 제1-2 세부 기관인 바이셀에서 진행하였다. 그 후 원료 농축 단계는 알앤엘바이오에서 진행하였다. 추출 및 여과는 바이셀에서 보유중인 장비를 사용하여 진행하였으며, 농축은 대용량 동결건조기를 보유 중인 춘천바이오산업진흥원과 충북테크노파크에 의뢰하여 진행하였다. 농축시설에 따른 수율 및 수분함량의 변화를 비교하기 위해 Lots 1, 2, 3는 춘천바이오산업진흥원, Lots 4, 5는 충북테크노파크에 의뢰하였는데 그림 10에서와 같이 원료의 수율 및 수분함량의 차이가 없었다. 또한 제2-1 세부기관(충남대)의 원료 분석 결과에서도 농축기 시설에 의한 지표물질 함량 차가 없음을 확인하였다. 원료 추출 수율은 평균 11.3%이고 수분 함량은 3.84%로 확인되었다.

그림 10. 인진쑥 원료 생산 과정



마. 인진쑥 원료의 분무건조공정 개선

동결건조한 인진쑥 원료는 보존성(유통기한설정) 실험에서 2개월부터 경화 및 갈변현상이 발생하였기 때문에 보존성이 양호한 것으로 알려진 분무건조 방법을 확립하였다(그림 11). 분무 건조 시 최종 부형제 혼합에서 작업성과 원료



그림 11. 인진쑥 원료 제조공정 개선(동결건조 →분무건조).

안정성을 고려하여 말토덱스트린 10%를 첨가하는 것이 바람직하였다. 그리고 원료 제조원가를 낮추기 위해 추출공정을 단순화(4시간, 2회 추출)하였으며 개선된 방법의 추출 수율은 기존 추출공정(6시간, 16시간, 2회 추출)에 비해 1% 높게 나타났다.

바. 인진쑥 원재료 및 제조공정 표준화 결과

인진쑥의 지표물질인 scoparone 함량, 고형분의 수율 값 그리고 경제성 등을 기준으로 원재료 및 제조공정의 표준화를 다음 표1과 같이 결정하였다.

표 1. 인진쑥 원재료 및 원료 제조공정 표준화

구분	표준화 항목	표준화	성상
원재료 표준화	종(種)	<i>Artemisia capillaris</i>	
	부위	잎, 줄기	
	원산지	경북 영천시	
	채취시기(계절)	6월~7월	
	채취시기(년생)	1년 생	
	건조 방법	50℃, 48hr.	
	절편 크기	3~5 cm	
제조공정 표준화	추출용매	50% 주정	
	추출온도	60℃	
	용매비율	원재료중량×8Vol(1차)/5Vol.(2차)	
	추출시간	4시간/4시간	
	추출횟수	2회	
	감압 농축	6 시간, 45°Bx	
	건조방법	분무건조(4시간)	

2절. 인진쑥 원료 독성시험

생산한 인진쑥 원료의 안전성 평가를 위해 독성시험 의뢰를 진행하였다. 독성시험을 통해 우리가 생산한 원료의 안전성을 입증한 후 3차 년도에 인체적용시험에 착수할 예정이다. 국가공인 독성시험 기관인 바이오독스텍에 독성시험을 의뢰하여 실험을 진행하였다.

1. 실험실시 개요

가. 시험 목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 "사철쑥 추출물"을 단회 경구 투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시한다.

나. 시험 기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시한다.

- "의약품등의독성시험기준"

식품의약품안전청 고시 제2009-116호 (2009년 8월 24일)

다. 시험 일정

- | | |
|-----------|----------------|
| (1)시험 개시일 | 2012년 05월 18일. |
| (2)동물 입수일 | 2012년 05월 24일 |
| (3)군 분리일 | 2012년 05월 30일 |
| (4)시험 개시일 | 2012년 05월 31일 |
| (5)투여일 | 2012년 05월 31일. |
| (6)부검일 | 2012년 06월 14일 |
| (7)실험종료일 | 2012년 06월 21일 |

- (8)최종보고서 (안) 제출일 2012년 07월 05일
 (9)시험종료일 2012년 07월 12일

2. 시험재료 및 방법

가. 시험 물질

- (1)물질명 : 인진쑥 추출물
 (2)성상 : 고체(분말)
 (3)성분 : Scoparone 등

나. 시험계

(1)종 및 계통

랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

(2)종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안정성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택한다.

(3)입수 시 성별, 동물 수, 주령 및 체중 범위.

수컷, 12마리, 5주령, 90.0 ~ 150.0g / 암컷, 12마리, 5주령, 80.0 ~140.0g

(4)투여 시 주령 및 동물 수

6주령, 암수 각 10마리

(5)투여경로 : 경구 투여

(6)투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용 예정 경로가 경구이므로 경구투여를 선택한다.

(7)투여방법 및 투여 횟수

투여액량은 10ml/kg으로 하고, 개체별 투여액량은 절실 후 (투여당일)의 체중의 기준으로 산출한다. 경구투여용 존테를 부착한 일회용 주사기(3ml)를 이용하여 위내에 단회 강제투여한다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여한다.

(8) 군 구성 및 투여용량

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질 투여군	500	10	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

(9)투여용량 설정

본 시험의 예비시험(Biotoxtech Study No.: B12458P)으로 5,000 mg/10mL/Kg을 암수 각 1마리 에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험의 투여용량은 5,000 mg/Kg의 단일 시험물질 투여군을 설정한다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여한다.

(10)일반증상 관찰(SOP/SGE/160)

투여당일 (0일)에 투여 후 30분까지는 적어도 1회 이상, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰한다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰한다.

(11)통계처리 (SOP/DSC/002)

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한다.

(유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인한다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 시험 결과 요약

본 시험은 시험물질인 인진쑥 추출물을 Sprague-Dawley 계 암수 6 주령 랫드에 단회 경구 투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 5,000 mg/kg 의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2 군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사 시켜 부검하였다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 일반증상에서는 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 약물혼입변 또는 점액변이 관찰되었고, 투여 후 2 일에 약물혼입변이 관찰되었으나, 투여 후 3 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 인진쑥 추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

가. 체중변화 (Figure1, Figure2)

관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

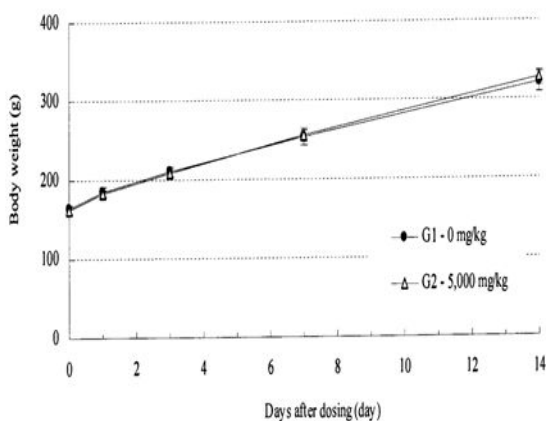


Fig. 1. Body weights in male SD rats

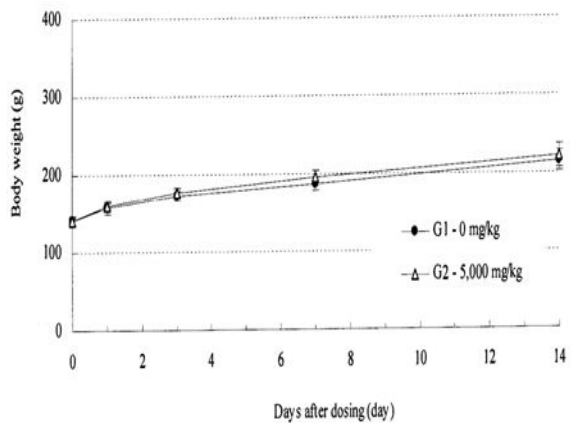


Fig. 2. Body weights in female SD rats

나. 사망유무 (Table 2)

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 인진쑥 추출물 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다.

Table 2. Mortality

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality (dead/total)		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)

다. 일반증상 (Tables 3)

인진쑥 추출물 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 약물혼입변 (compound-colored stool)이 암수전례, 점액변 (mucous stool)이 수컷 1 례에서 관찰되었고, 투여 후 2 일에 약물혼입변이 수컷 4 례, 암컷 1 례에서 관찰되었으나, 투여 후 3 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이러한 증상은 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단된다.

Table 3. Clinical signal

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5	4													
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			G2 5,000	5	NOA	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
				Compound-colored stool	5	1												

NOA: No Observable Abnormality

라. 육안적 부검소견

부검 시, 암수 대조군 및 인진쑥 추출물 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

4. 인진쑥(사철쑥) 안전성 정보 자료(Table 4)

사철쑥에 대한 독성 자료를 조사하기 위해 3종 DB(FDA poisonous plant data base, National Toxicology program, Tradamed)를 활용하였다. Key word를 Artemisia capillaris, toxic, risk로 입력하여 사철쑥 관련 독성 자료를 검색하였다. 사철쑥은 독성과 심각한 부작용 관련 자료가 검색되지 않았다.

Table 4. 사철쑥 안전성 정보자료

DB	FDA poisonous plant database	National Toxicology program	TRADIMED
Search Date	June 01, 2012	June 01, 2012	June 01, 2012
Search Terms (해당자료/검색 수)	Title - <i>Artemisia capillaris</i> -toxic:(0/3) OR adverse:(0/0) -OR risk:(0/0) -OR clinical trial:(0/0) Title - Scoparone -toxic: (0/0)	Title - <i>Artemisia capillaris</i> -toxic: (0/1) -OR adverse: (0/1) -OR risk: (0/1)	Title - <i>Artemisia capillaris</i> -toxic: (0/3)
관련 검색 수	0	0	0

3절. 건강기능식품(관절/뼈 건강) 시장 조사

인진쑥을 원재료로 한 뼈 건강에 도움을 주는 건강기능식품을 개발하고자 관련된 제품들을 조사하여 정리하였다. 조사 방법은 식품의약품안전청에 등록된 뼈 건강 관련 기능성 원료들을 조사한 후 각각의 원료들을 원재료로 하는 건강기능식품들을 조사하였다. 단 제품이 개발되어 식약청에 등록되었다더라도 현재 판매되지 않은 것은 제외하고 시판되고 있는 것들만 정리하였다. 또한 우리 사업단에서 뼈 건강에 관한 기능성 확인 실험으로 골밀도 실험을 진행하고 있기 때문에 뼈 건강에 도움을 주는 기능성 원료 외에도 관절 건강에 도움을 주는 기능성 원료 및 제품도 함께 조사하였다.

1. 뼈 건강기능식품 조사

가. 뼈 건강 관련 기능성 원료 및 제품

뼈 건강에 관한 기능성 원료는 흑효모배양액분말, 피토쏘야, 대두발효추출물 그리고 대두이소플라본 네 가지로 모두 고시형 원료가 아닌 개별인정형 원료이다(표 2). 뼈 건강에 관련된 건강기능식품의 대부분 대두이소플라본을 원료로 하는 제품들이었다. 하지만 뼈 건강에 관련된 제품은 다른 건강기능식품에 비해 제품수가 적고, 그나마 시판되는 제품들은 등록된 제품에 비해 현저히 더 적었다. 현대인의 생활 습관이나 고령화로 인해 골다공증 등 뼈에 관한 질병이 증가하고 있는 것에 비해 뼈 건강에 관련된 제품들의 수가 적은 편이다. 그리고 본 보고서에 제시하지는 않았지만 제품의 성분을 조사한 결과에 따르면 다른 건강기능식품들과는 달리 제품의 성분이 100% 기능성 원료로 구성된 제품이 조사되지 않았다.

표 2. 뼈 건강 관련 기능성 원료

기능성원료	신고번호	비고
흑효모배양액분말	제2011-2호	인체적용시험이 미흡함
피토쏘야	제2008-29호	
대두발효추출물	제2008-25, 28, 80호	
대두이소플라본	제2008-27, 72, 73, 77호 제2009-11, 13, 26, 27, 44호	
바이오이소플라본	제2008-20호	

표 3. 뼈 건강 관련 건강기능식품

기능성원료	제품명	제조회사	비고
* 개별인정형			
대두이소플라본	락보인이소플라본	렉스진바이오텍	일본산
	미소원맵시901	녹십초알로에	미국산
	이브플라본	네추럴에프앤피	
	닥터뉴트리Y	서흥캡셀	일본산
	에버플라본프리미엄		
N-아세틸글루코사민	트리조인스타	아미코젠	
N-아세틸글루코사민 + 바이오-이소플라본	미소진정	풍림무약	국산

나. 관절 건강 관련 기능성 원료 및 제품

관절 건강에 도움을 주는 기능성 원료로 가시오갈피 등 복합추출물, 리프리놀-초록입홍합추출오일, 호프추출물, dimethylsulfone 그리고 초록입홍합추출오일복합물 등 총 10 가지를 조사하였다(표 4). 관절 건강에 도움을 주는 건강기능식품은 뼈 건강에 도움을 주는 건강기능식품과는 달리 글루코사민, 글루코사민 염산염 그리고 글루코사민 황산염 등의 고시형 원료를 주원료로 하는 제품들도 조사되었다(표 5). 그리고 뼈 건강 관련 제품들보다도 많은 수의 제품들이 시판되고 있었다.

표 4. 관절 건강 관련 기능성 원료

기능성원료	신고번호	비고
가시오갈피 등 복합추출물	제2011-28호	
전칠삼추출물	제2010-47호	
리프리놀-초록입홍합추출오일	제2008-25, 28, 80호	
호프추출물	제2009-25호	
지방산복합물	제2009-2호	
차조기등 복합 추출물	제2007-13호	
로즈힙분말	제2006-7호, 제2008-81호	관절및연골건강
Dimethylsulfone	제2006-8호, 제2008-12호, 제2009-70호, 제2010-45호, 제2011-24호	관절건강유지
유니베스틴케이황금등복합물	제2006-3호	
초록입홍합추출오일복합물	제2005-8호	

표 5. 관절 건강 관련 건강기능식품

기능성원료	제품명	제조회사	비고
* 고시형			
글루코사민	조이글루코사민골드	종근당건강	
	포세이돈포맨	리크리FNB	
	조인트A-글루코사민	조아제약	
	조은탑	상일제약	
	아주웰조인트글루코사민	네추럴에프앤피	
글루코사민엽산염	글루코사민스텝바이스텝	유관씨네이처	
	오스콜골드글루코사민	한미	
	글루코사민100	종근당	
글루코사민황산염	스마타민글루코사민황산염	일진제약	
	글루코사민콘사골드포르테	보령	
	유한m N-아세틸글루코사민1200	뉴트리바이오텍	
	관절튼튼 N-아세틸글루코사민	상아제약	
* 개별인정형			
MSM	건국MSM	건국대	
	관절백세조인트틱	신도바이오	
	사포르테본	한국푸드팜	
	이노케어옵티엠에스엠	이노케어	
리프리놀-초록입홍합추출오일	관절건강에 도움을 줄 수 있는 초록입홍합추출오일	천호쇼핑	
	루마큐골드	한국인삼공사	
	관절팔팔	씨스팜	
유니베스틴케이 황금등복합물	콘트라케어	동국제약	
차조기등복합추출물	케이디-28	일진제약	

2. 뼈 건강 관련 건강기능식품 시장 현황.

뼈 건강에 관한 시장조사를 통해 현재 국내·외의 시장현황을 파악하고, 앞으로 우리가 개발할 건강기능식품을 설계하고자 한다. 온라인이나 오프라인을 통해 관련 제품들의 성분, 제형, 가격 등의 기초적인 자료 조사는 가능하였지만, 제품의 판매액 등의 시장 조사는 자료의 조사 및 접근이 매우 어려웠다. 뼈 건강에 관한 질병, 의약품, 건강기능식품 등에 관해 보고된 문헌이나 신문기사를 통해서도 조사해 보려고 시도하였지만, 대부분 2~3년 정도 지난 통계 자료들이기 때문에 앞으로 개발할 제품의 기초자료로 사용하기는 다소 부족한 점이 있다. 따라서 시장조사 전문 기관인 라이프웰의 도움을 받아 뼈 건강 관련 기능식품의 시장을 조사하였다.

건강기능식품 시장동향

(관절 / 뼈 건강)

1. 국내 · 외 관련 기술개발현황

1). 뼈 건강 관련 소재

(1) 칼슘

칼슘은 인체에서 가장 많은 미네랄이다. 체중의 약 2%가 칼슘이며 이중 99%는 뼈와 치아에 인회석(hydroxyapatite) 형태로 존재하고 나머지는 혈액응고, 근육수축, 심장박동, 신경전달물질의 분비, 소화효소의 분비, 호르몬의 분비, 생체막 투과성, 간에서의 글리코겐 대사 및 효소활성화 등에 생리적으로 중요한 역할을 한다. 정상인의 혈장 칼슘농도는 9~10.5 mg/dL이며 8.5mg/dL이 이하일 때를 생리적으로 저칼슘증이라고 한다. 저칼슘증이 되면 무기질이 골격으로부터 유리되어 혈액내의 칼슘 농도를 일정하게 유지할 수 있도록 하여 세포내액과 신경근육계의 칼슘농도의 감소를 방지한다. 충분한 칼슘섭취는 골형성과 근육수축이나 혈액 응고 등 생명을 유지하기 위한 기능을 가진 필수적인 영양분이다.

칼슘은 소화기장에서 능동적 과정과 수동적 과정에 의해 흡수된다. 능동적인 과정인 흡수는 십이지장과 공장 위부분에서 일어나고 포화가 될 수 있으며, 세포막을 통해서 이동되고 비타민 D에 의해서 조절이 되는데, 특히 비타민 D에 의존하는 칼슘 결합 단백질이나 calbindin의 영향을 받는다. 수동적인 과정의 흡수는 소화기장 전체를 통해서 일어나며, 포화되지 않고, 체내의 비타민 D 보유량에 영향을 받지 않으며, 혈액으로 이동되지 않고 세포와 세포 사이로 이동되는 부세포적(paracellular) 경로에 의해서 이루어진다.

식품첨가물로 사용되는 칼슘에는 탄산칼슘, 구연산칼슘, 글루콘산칼슘, 젖산칼슘, 인산칼슘, 염화칼슘, 황산칼슘 등이 있으며(표 6), 건강기능식품에 이용되는 천연칼슘 소재로는 해조칼슘, 우골(牛骨)칼슘, 어골(魚骨)칼슘, 난각칼슘, 패각칼슘, 유청칼슘, 발효생성유기산칼슘, 산호칼슘, 섬계껍질칼슘, 상어연골분말, 오징어연골분말 등이 있다.

표 6. 제조기준 및 기능성 내용

원료명	기능성 내용
구연산칼슘(calcium salts of citric acid) 글루콘산칼슘(calcium gluconate) 글리세로인산칼슘(calcium glycerophosphate) 산화칼슘(calcium oxide) 수산화칼슘(calcium hydroxide) 염화칼슘(calcium chloride) 젖산칼슘(calcium lactate) 제3인산칼슘(calcium phosphate, tribasic) 제2인산칼슘(calcium phosphate, dibasic) 제1인산칼슘(calcium phosphate, monobasic) 탄산칼슘(calcium carbonate) 황산칼슘(calcium sulfate) 식품원료를 사용한 칼슘을 보충할 수 있도록 제조가공한 것	① 뼈와 치아 형성에 필요 ② 신경과 근육 기능 유지에 필요 ③ 정상적인 혈액응고에 필요 ④ 골다공증 발생 위험 감소에 도움을 줌 (2011. 11. 1 시행) * 일일섭취량 : 210~800 mg

이러한 천연칼슘 소재의 칼슘 함량은 제조사 별로 약간의 차이를 보이지만 일반적으로 우골분은 32%, 산화칼슘 35%, 폐각칼슘 38%, 해조칼슘 34%, 유청칼슘 26% 정도인 것으로 알려진다. 칼슘은 흡수되기 어려운 미네랄이라서 칼슘 흡수율을 도와주는 어떤 유효 성분의 함유가 중요하다. 현재 건강기능식품의 원료로 판매되고 있는 칼슘 소재 중 해조칼슘과 유청칼슘이 수요가 높은 것으로 알려진다.

(2) 비타민 D

비타민 D는 항구루병(rickets) 비타민으로 잘 알려져 있으며 비타민 D₂ ~ D₇ 등 적어도 10개의 자연물질의 활성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있는데 이 중 비타민 D₂ 및 D₃가 생리적으로 중요하다(표 7). 체내에서 합성되나 제한 조건하에서는 필수성이 인정된다. 비타민 D는 일상적인 일광량으로 체내 요구량이 충분히 생성된다. 그러나 노인들의 경우 실외활동이 줄고 음식 섭취도 줄기 때문에 부족 현상이 생길 수 있다. 나이가 들어감에 따라 비타민 D를 생성하는 피부의 능력은 감소되어 70세가 넘으면 4배 이상 감소한다. 게다가 부족 시 인슐린이 정상적으로 분비되지 않아 당대사를 적절히 수행할 수 없어서 노인에게서 당뇨의 위험이 더 커지게 된다.

표 7. 제조기준 및 기능성 내용

원료명	기능성 내용
비타민 D ₂ (ergocalciferol) 비타민 D ₃ (cholecalciferol) 식품원료를 사용하여 비타민 D를 보충할 수 있도록 제조가공한 것	① 칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 ② 뼈의 형성과 유지에 필요 ③ 골다공증 발생 위험 감소에 도움을 줌 * 일일섭취량 : 1.5 ~ 10 µg

비타민 D의 주요 기능은 혈중 칼슘과 인의 수준을 정상범위로 조절하고 유지하는 것이다. 혈중 칼슘과 인의 농도는 신경근육 기능이나 뼈의 무기질화를 적절히 할 수 있는 범위 내에서 조절된다. 이러한 조절은 일차적으로 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 가 소장에서 칼슘과 인의 흡수를 증가시켜서 나타난다. 비타민 D의 섭취가 부족하거나, 지방 흡수의 방해 요인이 있거나, 겨울철과 같은 때 생성이 부족하면 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 수준이 낮아지고, 혈액 내 칼슘과 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 수준이 낮아지게 된다. 이 때 부갑상선호르몬의 농도가 증가하게 되고 부갑상선호르몬의 증가는 뼈내 무기질의 용출을 증가시켜서 뼈 무기질의 상실을 초래하게 되는 현상이 나타난다.

(3) 칼슘흡수 증진 소재

액상프락토올리고당과 폴리감마글루탐산은 칼슘흡수에 도움을 주는 기능성을 인정받은 개별인정형 원료이다. 보통 프락토올리고당은 칼슘의 흡수를 선택적으로 증진시키는 작용이 있다. 식품으로 섭취된 칼슘은 주로 십이지장에서 흡수되는 것으로 알려져 있으나, 프락토올리고당을 섭취하는 경우에는 대장을 통한 칼슘 흡수가 증가하는 것으로 보고되었다. Van Den Heuvel 등(1999)은 건강한 12명의 남자 청소년에게 9일 동안 15g의 프락토올리고당을 제공하여, 프락토올리고당의 섭취는 칼슘의 흡수를 증가시키고 이러한 칼슘 흡수의 증가는 뇨를 통한 칼슘 배출과는 관련이 없다는 것을 밝혔다. Uenishi 등(2002)과 Fukushima (2002)는 20대 여성에게 하루에 약 3g의 프락토올리고당을 섭취시킨 결과 칼슘의 흡수가 증가함을 보고하였으며, Ohta 등(1999)은 건강한 남자 10명에게 프락토올리고당을 하루 3g씩 공급한 후, 뇨를 통한 칼슘의 배설량이 증가하나 뼈의 칼슘 용출은 변화가 없음을 관찰하였다.

난소화성 올리고당이 대장에서 칼슘 흡수를 증가시키는 기전을 살펴보면, 첫째, 발효에 의해 생산되는 단쇄지방산에 의해 대장의 pH가 낮아지며, 그로 인해 장내 무기질의 용해도가 증가한다. 둘째, 단쇄지방산 중에서 butyrate가 장세포의 건강을 증진하며 세포 증식에 의해 전반적인 무기질의 흡수 면적을 증가시키고, 또한 장 점막에서는 칼슘결합단백질 합성을 촉진시킨다. 셋째, polyamine의 생산에 의해 장점막 세포에서 칼슘결합단백 합성을 촉진시켜 칼슘의 흡수를 증진시킨다는 이론들이 있다.

폴리감마글루탐산(Poly- γ -glutamic Acid, γ -PGA)은 우리 전통 콩 발효식품인 청국장 등의 끈적끈적한 점액성의 성분으로, 글루탐산의 γ -카르복실기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합된 γ -폴리펩타이드로 미생물에 의해 생산되는 아미노산계 폴리머이다. 폴리감마글루탐산의 보고된 효능으로는 면역기능 증강, 세포내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제효능 및 암세포 사멸효과, 세포벽 보호 및 항산화 효과 등이 있으며, 최근 칼슘흡수에 도움을 주는 기능성을 인정받은 소재이기도 하다.

(4) 기타 소재

뼈 건강에 도움을 주는 것으로 알려져 개별인정형 원료로 등재된 원료로는 대두이소플라본과 흑호모배양액분말이 있다. 식물에는 여성 호르몬인 에스트로겐 구조와 유사한 물질을 함유되어 있는데 이를 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라는 한다(그림 12). 대표적인 식물성 에스트로겐 함유 식물에는 대두류, 알팔파, 아마씨(flaxseed), 석류, 칩 등이다. 특히 대두 이소플라본(isoflavone)은 콩에 포함되어 있는 폴리페놀(polyphenol)의 일종으로 특히 배아부분에 많이 함유되어 있다. 구조가 비슷한 여성호르몬 에스트로겐과 유사한 작용을 하는 것으로 알려진다. 한국이나 일본여성에게 갱년기장애가 비교적 적은 것은 두부나 된장 등 대두제품을 많이 먹기 때문인 것으로 알려지고 있다. 대두 이소플라본(isoflavon)은 질환의 위험요인을 감소시키고, 건강이 향상되도록 돕는 식품 선택에 대한 소비자의 관심이 높아지면서, 식물성 에스트로겐인 이소플라본의 건강 기능성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 실제 대두 이소플라본에는 갱년기 장애 증상완화 및 골다공증의 예방효과를 발휘하는 것으로 연구 결과 밝혀지고 있다. 또 최근에는 심혈관 기능의 위험 요인을 감소시켜 뇌졸중 및 심근경색 등 혈관계의 생활습관병 예방에도 도움이 된다고 하여 주목을 모으고 있다.

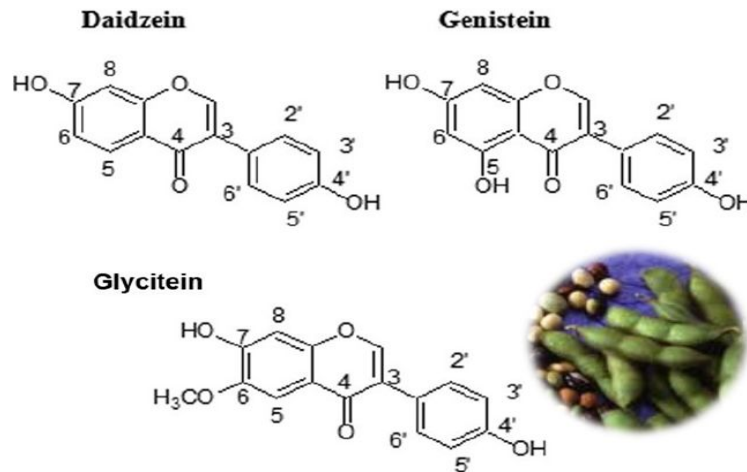


그림 12. 주요 이소플라본의 구조

흑효모배양액 분말의 기능(지표)성분으로 알려진 β -글루칸은 효모, 사상균, 버섯 등에서 확인되는 다당류로 면역기능 증진 소재로도 알려진다. 흑효모(아우레오바사지움) 배양액에는 양질의 β -글루칸이 함유되어 있으며, β -1,3과 β -1,6의 구조를 나타내는 것으로 확인된다.

2). 관절 건강 관련 소재

(1) 글루코사민

게, 새우 등의 갑각류 껍질에 다량 함유되어 있는 키틴, 키토산의 구성 당인 글루코사민은 유리의 일급 아미노기를 가지는 glucosamine 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose(GlcN)과 아미노기가 아세틸화된 N-acetyl glucosamine 2-deoxy-D-glucopyranose(GlcNAc)의 2종류가 있다(그림 13). 안정적인 염산염으로 결합되어 있는 글루코사민염산염(D-glucosamine · HCl)을 그 구조적 특성을 규명하기 위해 HPLC로 분획한 단일 분획분을 FT-IR, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR로 표준품과 비교하여 확인한 결과, 유리의 일급 아미노기를 가지는 glucosamine 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose(GlcN)의 구조로 이루어져 있음을 알 수 있다.

천연 물질인 아미노산과 당의 결합체인 아미노당의 일종인 글루코사민은 황산염의 형태로 유럽 등지에서 변형성 관절염의 치료약으로 사용되고 있으며, 또한 미국에서는 5 ~ 6년 전부터 영양보조식품으로 판매되어 큰 시장이 형성되어 있다. 분자식은 C₆H₁₃NO₆로 탄소가 6개 있으므로 갈락토사민과 함께 헥소사민으로 총칭된다. 무색의 침상결정으로 110℃에서 분해하며, 물에 녹는 강염기성 물질이다. 천연으로는 키틴을 비롯하여 세균의 세포벽, 동물의 연골이나 피부를 구성하는 뮤코다당 등 다당류의 성분으로 널리 분포한다. 또, 사람의 혈액이나 점액 속에 이 당과 결합하는 단백질이 다량 함유되어 있으며, 적혈구의 세포막에는 이 당을 결합한 당지질이 존재하고 키틴을 염산 분해하여 제조한다.

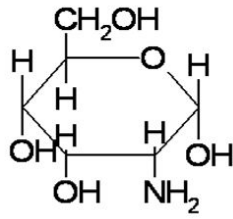


그림 13. 글루코사민 구조와 원재료들

표 6. 제조기준 및 기능성 내용

제조기준	기능성 내용
① 원재료 : 갑각류(게, 새우 등)의 껍데기, 연체류(오징어, 갑오징어 등)의 뼈, <i>Aspergillus niger</i> ② 제조방법 -. 글루코사민 염산염 : 키틴 또는 키토산에 염산 또는 키토사나아제로 가수분해 -. 글루코사민 황산염 : 키틴 또는 키토산에 염산을 가수분해한 후 황산으로 치환 ③ 기능성분(지표성분) 함량 : 글루코사민 황산염 또는 염산염이 980 mg/g 이상 함유되어 있어야 함.	관절 및 연골건강에 도움 * 일일섭취량 : 글루코사민 염산염 또는 황산염으로서 1.2~1.5 g

일본에서는 이미 오래 전에 식품 첨가물로 등재되어 사용되고 있으며, 관절을 혹사하는 운동선수, 노인 및 노약자, 관절염을 앓고 있는 환자 등에 여러 식품 및 의약품으로 많이 이용되고 있다. 글루코사민은 당단백질, 당지질 및 뮤코다당류 등의 중요한 생체 성분으로써 넓게 분포되어 있는 대표적인 천연 아미노당이다.

글루코사민은 생체 내에서 글루코오스의 대사에 의해 만들어지거나 복합 당질에서 분리, 절단되어 만들어진다고 여겨진다. 자연계의 게나 새우 등의 갑각류의 외피를 형성하는 키틴질에 대량으로 함유되어 있다는 것을 알고, 공업적으로 키틴을 산 또는 효소로써 가수분해하고 분리·정제하여 얻을 수 있다.

글루코사민황산염의 변형성 관절염에 대한 개선 효과에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있다. 변형성 관절염 환자 30명을 2군으로 나누고 시험군에는 글루코사민황산염을 1일 400 mg 씩 7일간 주사에 의해 투여하고, 그 후 2주간 1일 1.5 g 씩 경구 투여하였다. 그 결과 주사 투여 기간 중에는 대조군과 함께 개선되지만, 시험군에서 특히 관절의 회복이 현저하였다. 기능 투여 기간에서도 시험군에서 증상의 개선이 현저하였으나, 대조군은 치료전의 상태로 돌아갔다. 글루코사민황산염의 투여는 부작용이 없는 변형성 관절염이 치료제로써 적당하였다. 또한 80인의 변형성 관절염 환자에 대하여 1일에 1.5 g의 글루코사민황산염을 30일간 경구 투여하고, 1주일마다 관절의 통증, 유연성, 부종 및 동작제한 등을 평점화하여 기록한 결과 글루코사민황산염 투여군은 대조군에 비하여 증상의 경감도가 거의 2배가 되었고, 확실한 개선 효과를 나타내었다. 또한 전자현미경으로 환부를 관찰한 결과 관절이

회복됨을 알 수 있었다.

(2) 뮤코다당·단백(황산콘드로이친)

황산콘드로이친은 점액성 다당류의 일종으로 예부터 알려진 물질이다. 황산콘드로이친은 척추동물의 연골과 여러 종류의 결합조직의 기질성분으로 뼈 등의 지지조직에 널리 분포되어 있으며, 단백질과 결합되어 수분의 함량을 유지하는 거대 분자로 존재한다(표 7). 황산콘드로이친의 뮤코다당은 단백질과 결합된 PG(proteoglycan)의 구조를 가지고 있으며, 핵단백에 길고 불균일하게 다당이 결합되어 있다. 이 불균일성 다당은 두 종류가 반복된 단위로 구성되어 있는데, 하나는 항상 헥소아민의 N-아세틸화합물로 되어 있고, 다른 하나는 질소기를 함유하지 않은 당으로 시작부터 황산기를 가지고 있다. 즉, 반복 단위(2당)로 구성된 글리코사미노글리칸이며 연골의 주성분이다. 또한 피부, 땀줄, 육아 등의 결합조직에도 함유되어 있다. 예를 들면 돼지 코의 연골 건조무게 가운데 약 40%는 콘드로이친황산이다. 또한 상어 지느러미와 어린 소의 코 언저리 물렁뼈에 많이 함유되어 있는 생체 결합조직의 조성물질이다.

콘드로이친황산은 우론산의 종류와 황산기의 결합 위치에 따라 A, B, C, D, E, K 등의 형으로 분류된다. 이들 가운데 콘드로이친 A, B, C의 구조는 반복 단위가 100 개 정도 결합되어 이루어진 것으로 추정되었으며, 이 구조에는 반복단위 이외의 성분도 일부 있음이 밝혀졌다. 콘드로이친황산은 조직 속에서는 프로테오글리칸(단백질에 글리코사미노글리칸 결사슬이 공유결합된 화합물)이라는 넓은 뜻의 당단백질과 결합한 형태로 존재한다. 실제로는 프로테오글리칸의 한 가닥 사슬에 수십 가닥의 콘드로이친황산 사슬이 결합되어 있다. 그리고 이런 상태의 프로테오글리칸은 히알루론산, 콜라겐 등과 더불어 거대한 분자집합체를 형성하여 고등동물의 세포 물질을 구성하고 있다.

표 7. 제조기준 및 기능성 내용

제조기준	기능성 내용
① 원재료 : 소, 돼지, 양, 사슴, 상어, 가금류, 오징어, 게, 어패류의 연골조직 ② 제조방법 : 원재료의 연골조직을 열수 추출 또는 효소분해한 후 정제하여 건조함 ③ 기능성분(지표성분) 함량 : 뮤코다당·단백이 770 mg/g 이상 함유되어 있어야 하며, 단백질과 콘드로이친황산의 비율이 1.0 : 9.0이어야 함.	관절 및 연골건강에 도움 * 일일섭취량 : 뮤코다당·단백으로서 1.2~1.5 g

실험적 연구에서 실험동물 쥐에 관절염을 브라디키닌으로 이용하여 유도하고, 14일간 콘드로이친을 먹인 결과, 브라디키닌이 연골에서 프로테오글리칸을 저하시키는 것을 막는다는 사실을 발견했다. 이러한 결과는 콘드로이친을 먹으면 골관절염에서 보이는 프로테오글리칸의 감소를 예방할 수 있다는 것을 의미한다. 다른 연구에서는 콘드로이친이 관절연골을 보호한다는 사실을 보여주었다. 또한 콘드로이친이 연골의 퇴행성변화에 관여하는 효소를 억제한다는 사실을 밝히고 있다.

이 밖에 뼈 건강과 관련한 국내·외 특허 조사 결과는 아래 표 8과 같다. 대부분의 특허들이 조골세포의 증식과 분화, 골석회화 촉진 그리고 파골세포의 분화 억제에 대한 효과를 나타내는 소재의 연구 성과들로 확인되었다.

표 8. 뼈 건강 관련 국내 주요 특허

출원인	출원번호	발명의 명칭
경희대학교 산학협력단	2008-0009540	황기 생약추출물 또는 이로부터 분리된 에틸아세테이트 분획물을 함유하는 골 길이 성장 장애 치료 및 예방용약학조성물
서울대학교 산학협력단 외	2009-0031993	조골세포 증식 및 분화 촉진, 골석회화 촉진 및 파골세포의 분화 억제 효과를 갖는 황금 추출물
(주)아모레퍼시픽	2009-0009842	성장 촉진용 식품 조성물
(주)바이오토피아 외	2008-0065050	바실러스 서브틸리스 SE-4 및 이의 발효대사물을 함유하는 칼슘 보충용 조성물
경희대학교 산학협력단	2006-0124743	생약복합재 추출물을 함유하는 골길이 성장 촉진용 조성물
김영호 외 2인	2006-0020790	골성장 촉진활성을 갖는 엘루테로사이드 E를 함유하는 약학 조성물
한국화학연구원	2008-0049090	피지온 글루코피라노사이드 또는 피지온을 포함하는 조골세포 활성 촉진용 약학 조성물
(주)삼양사	2002-0040975	약물 전달체용 양이온기-함유 양친성 블록 공중합체 및 그의 음이온성 약물과의 복합체
오스템임플란트(주)	2008-0054730	골 유착 및 골 형성을 증진시키는 올리고 펩타이드

표 9. 뼈 건강 관련 국외 주요 특허

출원인	출원번호	발명의 명칭	특허국가
Akita Prefecture	2001-0088658	Bone growth accelerator and bone growth accelerating food	일본
Snow Brand Prod Co. Ltd.	1995-0219582	Bone formation promoter	"
Depuy Spine Inc.	2009-0030095	Method for promoting bone growth by using hyaluronic acid and growth factor	"
Yung Shin Pharmaceutical Industry Co. Ltd.	2004-0250198	Pharmaceutical composition for promoting bone growth or inhibiting bone resorption	"
The Procter & Gamble Company	1995-0369555	Combined calcium and vitamin supplements for bone growth	미국
Societe Des Produits Nestle S. A.	2001-0204839	Food or pet food composition containing plant extracts for maintenance of bone health and prevention or treatment of bone diseases	유럽

2. 국내·외 관련 시장현황

1). 뼈 건강 관련 제품

현재의 건강기능식품에서 뼈(골)와 관련된 기능성 원료들은 표(Table 7)와 같다. 뼈의 형성 및 성장과 관련하여 대표적 기능성 원료인 칼슘은 인체에 가장 많이 존재하는 영양소로서 성인 체중의 약 1~2%를 차지한다. 체내 칼슘의 99% 이상이 치아와 뼈에 존재하고 나머지 1%는 혈액, 세포외액, 근육, 다른 조직에 존재하면서 혈관의 수축과 이완, 근육수축, 신경전달, 내분비를 조절하는 기능을 한다. 뼈에서 칼슘은 대부분 수산화인회석의 형태로 존재한다. 일생 동안 뼈는 생성과 용해를 반복하며, 성장기에는 뼈 형성이 용해를 능가하고 최대 골 질량에 달한다. 특히 사춘기 전반에 칼슘의 축적 속도는 최대가 되고, 이때 2년간에 성인기의 최대 골 질량의 25%가 축적된다. 성인기에서는 뼈 생성량과 용해량이 평형상태를 이루지만 골 질량은 연령에 따라 서서히 감소한다. 특히 폐경 이후 및 노년기에는 뼈 용해가 뼈 생성량을 상회하여 골 질량은 상당히 감소한다.

조골세포에서는 콜라겐을 분비하여 뼈의 지지 구조물을 형성하고, 조골세포가 골세포(osteocyte)로 성숙된 후 뼈의 석회화를 일으킨다. 따라서 칼슘의 섭취가 많을수록 혈중 칼슘 농도가 유지되어 칼슘이 뼈의 형성에 사용될 수 있다. 이와는 달리 파골세포는 부갑상선 호르몬에 의해 자극되고 칼슘이 부족한 식사를 했을 때, 크게 활성화된다. 활성화된 파골세포에 의해 뼈에서 칼슘을 방출하여 혈액으로 들어가게 한다. 혈중 칼슘농도가 낮아지면 파골세포의 활성화가 촉진된다. 이러한 조골세포와 파골세포의 골회전에 의해 뼈가 형성되고 분해되고 있다. 따라서 칼슘의 섭취는 뼈의 생성 및 유지에 중요하다. 한편 칼슘의 체내 흡수를 돕는 소재들 역시 뼈 건강에 도움을 줄 수 있는 소재라 할 수 있다.

표 10. 뼈 건강 관련 기능성 원료

구분	기능성원료	기능성분 (일일섭취량)	기능성 내용
고시형	칼슘	칼슘 (210~800 mg)	뼈와 치아를 형성에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요 정상적인 혈액응고에 필요 골다공증 발생위험감소에 도움을 줌
	마그네슘	마그네슘 (66~250 mg)	에너지 이용에 필요 신경과 근육의 기능 유지에 필요
	비타민 D	비타민 D (1.5~10 µg)	칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 뼈의 형성과 유지에 필요 골다공증 발생위험감소에 도움을 줌

구분	기능성원료	기능성분 (일일섭취량)	기능성 내용
개별 인정형	액상프락토 올리고당	프락토올리고당 (3~8 g)	유익균 증식, 유해균 억제 배변활동 원활 칼슘흡수에 도움
	폴리감마 글루탐산	폴리감마글루탐산 (60~70 mg)	체내 칼슘흡수촉진에 도움을 줌
	흑효모배양액 분말	베타글루칸 (150 mg)	뼈 건강에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함
	대두이소플라본	이소플라본 (비배당체로서 25 mg)	뼈 건강에 도움을 줌

현재 시중에서 판매되고 있는 성장기 어린이 관련 제품들은(Table 4) 대부분이 칼슘 및 미네랄 보충을 목적으로 한다. 칼슘 및 미네랄 함량을 기준 규격 이상 함유하도록 한 후 여기에 칼슘흡수에 도움을 주는 소재 및 성장호르몬 및 성장인자의 분비를 자극하거나 촉진하는 식물성 혹은 동물성 소재들을 첨가하고 있는 실정이다. 주요 제품으로 “보령월드라키즈”는 칼슘을 포함한 7종의 무기질과 10종의 비타민, 14종의 필수 아미노산외에도 가시오가피추출물을 비롯한 21종의 식품혼합추출물, 자일리톨, 클로렐라추출물, 로얄젤리, 미강발효추출물분말 등을 함유하여 성장기 어린이의 면역기능 향상에 도움을 준다고 광고하고 있다. 또한 “광동키즈본”은 성장기 어린이 및 청소년의 뼈 성장에 필수적인 영양소인 칼슘 등의 영양소 공급을 위한 제품으로 체내 이용률이 높은 것으로 알려진 해조 분말(CA 30% 이상)을 주성분으로 하여 식물혼합 분말A[맥아, 복분자딸기, 눈꽃동충하초, 마, 두충, 흰들버섯], 홍화씨추출분말, 가시오가피추출분말 등의 식물성 성분과 클로렐라 원말, 유단백가수분해물, 초유분말, 상어연골분말, DHA 혼합분말, 콜라겐펩타이드(돈피), 키토산 등의 원료 및 각종비타민과 미네랄을 배합한 제품이다. 이 밖에 조골세포 증식 및 분화 촉진, 골석회화를 촉진하는 기능을 나타내는 특허소재(식물성 및 동물성)를 활용하여 상품한 후 마케팅 하는 제품들이 다수 있다.

표 11. 성장 관련 주요제품

제품이미지	제품특징	판매가격	비고
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 칼슘 및 종합비타민 (비타민 A, B1, C, D, E)보충용제품 ○ 면역 및 성장촉진인자 함유 	198,000원 (3개월)	(주)월드라 판매
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 6년근 홍삼농축액, 녹용, 칼슘, 비타민, CPP함유 ○ 한국인삼공사 (정관장) 어린이전용제품 	120,000원 (1개월)	800억원 (2010년)
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조분말(Ca 30% 이상), 식물혼합분말에이, 홍화씨추출분말, 가시오가피추출물분말, 클로렐라원말, 유단백가수분해물(우유) 등 	420,000원	광동제약
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조칼슘분말, 이소말트, 두유분말, 자일리톨, 발효우유분말, 단백질가수분해물, 초유분말, 생선콜라겐, 소맥분, 미네랄믹스, 비타민믹스, 아미노산믹스 등 	99,000원 (3개월)	중근당 건강
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유청칼슘, 비타민C, 비타민E 혼합제제, 산화아연, 비타민 D3 혼합제제, 비타민B2, 비타민B6염산염, 비타민 B1 염산염, D-소르비톨, 식물성크립분말, 복합식물추출분말 	75,000원 (1개월)	일동제약

제품이미지	제품특징	판매가격	비고
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 성장촉진물질 CBP (초유 및 여러 가지 몸에 좋은성분 재조합한 물질) ○ 성장에 필요한 유청 칼슘, 비타민 등 성장에 필요한 36 가지 인자 함유 	<p>400,000원 (3개월)</p>	<p>(주)일동 생활건강</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비타민A, B1,B6, C, 나이아신, 12종 유기농과일, 채소혼합분말, 홍삼플러스, 클로렐라, 자일리톨, 타우린 	<p>100,000원 (3개월)</p>	<p>(주)일양 약품</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 홍삼농축액(고형분60%, 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합 5mg/g), 혼합제제 비타민D3분말, 아가베시럽, 배농축액, 대추, 블루베리, 포도, 팔라티노스, 식물혼합추출분말(19종) 	<p>230,000원 (3개월)</p>	<p>한미약품</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유기농 홍삼 농축액을 주 원료로 하였으며 면역력과 건강증진에 도움을 주는 홍삼 외 식약청에서 면역기능성 인정을 받은 클로렐라 추출물과 대추, 감초, 당귀, 녹용 	<p>150,000원 (2개월)</p>	<p>대상 웰라이프</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ EZ-523(홍삼, 가시오가피, 숙단), 해조갈슘, 각종 비타민, 무기질 	<p>98,000원 (45일)</p>	<p>이지바이오 메드</p>

표 12. 뼈 건강 관련 주요제품

제품이미지	제품특징	판매가격	비고
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대두이소플라본 함유. 뼈 건강 관련 개별인정형 제품 ○ 면역 및 성장촉진인자 함유 	<p>198,000원 (3개월)</p>	<p>CJ 뉴트라</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대두이소플라본 0.408% ○ 대두이소플라본 함유 건강기능성 표시 음료 	<p>2,500원 (1EA)</p>	<p>폴무원</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조칼슘분말60%, 회화나무 열매 추출물25% ○ 갱년기 증상 및 뼈 건강에 도움 (개별인정형) 	<p>66,000원 (2개월)</p>	<p>CJ 뉴트라</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조칼슘과 마그네슘, 아연, 망간, 비타민D, 난황펩타이드, 카제인포스포펩타이드(CPP), 폴리감마글루탐산, 흑효모배양액분말 등 함유 	<p>100,000원 (2개월)</p>	<p>(주)LG 생활건강</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우유칼슘, 산호칼슘, 비타민D, 카제인 포스포펩타이드, 마그네슘, 폴리감마글루탐산, 흑효모배양분말, 클로렐라 등 함유 	<p>35,000원 (1개월)</p>	<p>(주)아모레 퍼시픽</p>

한편 뼈 건강 관련 주요 제품(Table 9)을 보면, 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)으로 알려진 이소플라본을 함유한 식물성 소재(대두배아, 회화나무 열매 등)를 활용하여 상품화하고 있다. 갱년기 전후 여성을 대상으로 한 골다공증 예방 관점의 제품이 다수 확인된다. 대두이소플라본의 기능성분은 이소플라본 비배당체로 다이드제인, 제니스테인, 글리시테인 등의 합을 1일 25 ~ 27 mg 섭취하도록 권장하고 있다. 또한 칼슘 흡수를 높이기 위해 폴리감마글루탐산 및 흑효모배양액 분말 등을 사용하고 있는 것으로 확인되었다.

2). 관절 건강 관련 제품

글루코사민은 연골과 관절의 구성성분인 뮤코다당류, 프로테오글리칸, 당단백질들의 생합성에 사용되는 전구물질로서 이들 생체고분자들은 젊을 때에는 체내에서 다른 영양성분으로부터의 대사 작용을 통하여 충분히 합성이 되나 나이가 들면서 이러한 합성능력이 떨어지게 된다. 그런데 글루코사민을 외부로부터 섭취하게 되면 이러한 대사 작용이 다시 촉진되어 기존 연골의 마모를 억제하고 새로운 연골물질의 생성을 촉진하는 등의 유익한 작용을 하게 된다. 그 결과 골관절염의 통증이 완화되고 연골이 재생되어 건강한 관절로 회복되는 것이다. 글루코사민의 골관절염 통증 완화 및 연골 재생 효과에 대해서는 세계적으로 수많은 연구논문에 의해서 잘 밝혀져 있다.

관절 건강 관련 제품 시장에서 글루코사민은 독보적인 존재였다. 하지만 2010년 2월 한국보건 의료 연구원이 공개한 글루코사민과 콘드로이틴 제제 사용현황 조사와 평가 보고서가 글루코사민과 건강기능식품시장에 치명타를 던졌다. 공개된 보고서에서 글루코사민 제제를 복용중인 이들 가운데 77% 가량이 의사로부터 골관절염 진단을 받지 않은 상태에서 제품을 복용하고 있으며, 상당수가 골관절염 치료목적이 아닌 건강증진과 골관절염 예방목적으로 복용하고 있다고 설명했다. 또, 문헌 고찰 결과 골관절염 예방효과나 이외 질환에 대한 치료에 효과가 있다는 근거가 없는 것으로 조사됐다면서 대부분을 차지하는 염산염 글루코사민 제제는 위약과 비교해 효과가 있다는 근거가 없다고 설명했다. 하지만 건강기능식품을 의약품과 동등한 수준에서 비교하는 것은 무리이며, 보고서가 정확한 임상이나 시험 절차를 거친 것도 아니고 단지 그동안의 보고된 문헌에 대한 고찰 결과와 섭취현황 조사를 반영한 것으로 신뢰성에서 문제 있는 것으로 받아드려진다.

효능 논란을 빚은 글루코사민 관련 관절 건강기능식품 제품들이 최근 잇따라 발매되면서 소비자들의 관심을 끌고 있다. 특히 제약사들이 앞 다퉈 ‘글루코사민 대체 관절 건강기능식품’시장에 뛰어들면서 경쟁이 뜨거워지고 있다. 동국제약, 영진약품, 경남제약, 풍림무약 등이 대표적인 제약사들이다.

동국제약은 지난해 황금 등 복합물을 원료로 한 ‘콘트라케어’를 선보였다. 황금 등 복합물은 황금(뿌리)물 추출 분말과 아선약(가지)물 추출 분말을 각각 혼합해 만들었으며, 퇴행성 관절로 약간 불편한 사람들을 대상으로 시험한 결과 관절의 뻣뻣함 정도가 개선돼 기능성이 인정됐다. 동국제약 관계자는 “글루코사민 효능 논란이 있지만, 개별인정형 원료인 황금 등 복합물의 경쟁력이 기대돼 제품화했다”며 “콘트라케어에 대한 시장 반응은 좋은 편”이라고 밝혔다.

영진약품도 전칠삼추출물 등 복합물을 함유한 ‘관절엔 파낙스’를 시판했다. 이 복합물은 전칠삼 외에 숙지황, 가시오가피를 추출물로 하여 섞어 제조된다. 전칠삼 제품은 경남제약의 ‘관절엔 전칠삼’도 시장에 출시되어 판매 중이다.

현재 관절 건강과 관련하여 건강기능식품에서 가장 많이 개별인정된 원료로는 ‘MSM’과 ‘초록잎홍합추출오일복합물’이 있다. MSM은 소나무로 펄프를 만들 때 생기는 디메틸설폭사이드를 분리해 제조된 것으로, 노화 등 관절이 나빠진 성인들을 대상으로 한 MSM 보충 결과 불편함을 개선하는 데 도움을 준 것으로 식약청에 보고됐다. 이런 MSM을 원료로 한 제품으로는 풍림무약의 ‘썬민관절행복 MSM’, 인성제약의 ‘MSM3080’ 등이 있다. 초록잎홍합추출오일복합물과 관련해서는 한미양행의 ‘초록잎홍합플러스’, 씨스팜의 ‘관절팔팔’, 한삼인의 ‘홍센마루그린’ 등이 판매 중이다.

표 13. 관절 건강 관련 기능성 원료

구분	기능성 원료	기능성분 (일일섭취량)	기능성 내용
고시형	글루코사민	글루코사민 (1.5~2 g)	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있음
	N-아세틸 글루코사민	N-아세틸 글루코사민 (0.5~1 g)	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있음
	뮤코다당· 단백	뮤코다당·단백 (1.5~2 g)	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있음
	디메틸설폰 (Methyl sulfonyl methane, MSM)	디메틸설폰 (1.5~2 g)	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있음
개별 인정형	초록입홍합 추출오일	EPA+DHA+DPA (200 mg)	관절건강에 도움이 될 수 있음
	황금추출물등 복합물	Baicalin, Catechin (1100 mg)	관절건강에 도움이 될 수 있음
	로즈힙분말	Galactolipid Hyperoside (5 g)	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있음
	차조기등 복합추출물	Puerarin Scopoletin Apigenin (2.4 g)	관절건강에 도움이 될 수 있음
	지방산복합물	Myristoleic acid (1,248 mg)	관절건강에 도움이 될 수 있음
	호프추출물	alpha acids, iso-alpha acids (1~2 g)	호프추출물은 관절건강에 도움을 줄 수 있음
	전철삼추출물등 복합물	Ginsenoside Rb1 Stachyose Eleutheroside E (800 mg)	관절건강에 도움이 될 수 있음
	가시오갈피등 복합추출물	Eleutheroside E Ligustilide Baicalin (1.5 g)	관절건강에 도움이 될 수 있음

한편 글루코사민제품의 유통현황을 살펴보면, 수입제품은 2009년 10,283천 달러에서 2010년 7,749천 달러로 감소하였으며, 국내 제품 현황 역시 2009년 166억 원에서 80억 원으로 대폭 감소하였다.

뮤코다당·단백 함유제품은 수입에서 2009년 275천 달러에서 2010년 347천 달러로 증가했으나 국내 제품은 8억 원에서 6억 원으로 소폭 감소하였다. N-아세틸글루코신의 유통량도 2009년 27천 달러에서 2010년 624천 달러로 급격한 증가세를 보였고, 국내시장에서도 2009년 10억 원에서 2010년 70억 원으로 큰 증가를 나타냈다. 이는 글루코사민 소재를 대체하기 위한 시장의 변화로 보인다(Table 11).

국내 시장에서 개별인정형 제품의 유통량은 꾸준한 증가세를 나타내고 있다. 특히 뼈 / 관절 건강 관련 제품의 유통량을 보면 2011년도 기준 153억 원의 판매액을 보였는데 이는 2010년 개별인정형 판매액 1,126억 원의 14% 에 해당되는 수준으로 해당 품목이 개별인정형 제품의 주요 품목임을 알 수 있다.

표 14. 뼈/관절 건강 관련 수입제품 현황 ('09 ~ '10)

구 분		유통 현황			
		2009년		2010년	
		품목 (건)	금액 (천 달러)	품목 (건)	금액 (천 달러)
1	영양소 (비타민 및 무기질)	1,813	61,763	2,952	117,333
2	글루코사민 및 함유 제품	407	10,283	287	7,749
3	뮤코다당·단백 함유 제품	20	275	16	347
4	N-아세틸글루코사민	5	27	14	624

표 15. 뼈/관절 건강 관련제품 국내제품 현황 ('09 ~ '10)

구 분		유통 현황			
		2009년		2010년	
		품목 (건)	금액 (천 원)	품목 (건)	금액 (천 원)
1	비타민 및 무기질	2,857	77,055,899	2,454	99,121,593
2	글루코사민 및 함유 제품	672	16,601,119	359	8,009,629
3	N-아세틸글루코사민	30	1,007,005	68	7,062,126
4	뮤코다당·단백 함유 제품	22	835,337	18	578,031
5	개별인정형 (뼈건강 관련)	1,030	79,970,808	981	112,853,104



* 자료 : 2010년, 2011년도 식품의약품통계연보(식품의약품안전청)


표 16 관절 건강 관련 주요제품


제품이미지	제품특징	판매가격	비고
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 글루코사민염산염분말(글루코사민염산염 100%, 미국산, 게, 새우)과 녹색입홍합분말(뉴질랜드산) 혼합제품 	138,000원 (8개월)	CJ 뉴트라
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 씨스팜초록입홍합추출오일 (뉴질랜드산) 복합물 100% ○ 개별인정형 제품 	270,000원 (3개월)	(주)씨스팜
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전철삼추출물등 복합물, 상어연골분말, 유카추출물분말, 해조분말 (칼슘 285, 마그네슘 7%) 등 ○ 개별인정형 제품 	-	영진약품
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복합 식물소재 유니베스틴케이 황금 등 복합물을 주원료로 사용 ○ 개별인정형 제품 	55,000원 (1개월)	(주)동국 제약
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 디메틸설펜[MSM(Methyl sulfonyl methane)], 상어연골분말 등 함유 	40,000원 (1개월)	(주)풍림 무약


3. 뼈 / 관절 관련 건강 제품


표 17. 뼈/관절 관련 건강 제품 상세정보.


	제품명	롱키윈	제조/판매	렉스진바이오텍/ 일동생활건강	
	성상	연한 황갈색 내용물 함유 연질캡슐			
	섭취량 방법				
	규격	3개월분	가격	400,000원	
원료	<ul style="list-style-type: none"> ○ 성장촉진물질 CBP(초유 및 여러 가지 몸에 좋은 성분 재조합한 물질) ○ 성장에 필요한 유청 칼슘, 비타민 등 성장에 필요한 36가지 인자함유 				
기능성내용	CBP물질특히 획득-특허청 성장촉진용 식품조성물질특허-특허청 혈중성장호르몬 IGF-1증가-CBP물질 뼈의길이, 골밀도, 조골세포증가-CBP물질				
비고	12개월(160만원)신청 시 성장점자극운동기 증정, TM판매				
	제품명	월드라키즈	제조/판매	보령제약	
	성상	씹어먹는 타블렛 형태			
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 4정(하루 총 8정)			
	규격	500mg x 180정x3EA	가격	90,000원	
원료	유청분말(우유,칼슘24%이상,호주산)24%, 헤조분말(아일랜드산,칼슘30%이상),비타민C,비타민E혼합제제,분말비타민A(망고),비타민D3,비타민B1,질산염,D-소르비톨,말기맛분말[말기엑기스분말(말기엑기스(국산),텍스트린),백설탕,텍스트린,구연산,스테비오사이드,산탄검],가시오가피추출물분말(텍스트린,가시오가피추출물)10%,초유분말4%,D-말티톨,무수구연산,혼합탈지분유,자일리톨,클로렐라추출물분말,두충외17종식물혼합추출물분말(두충,황기,대추,진피,결명자,갈근,복분자,당귀,마(산약)솔잎,속단,맥아,오디,하수오,등굴레,더덕,구기자,건강),말기향분말(합성착향료),효소치리스테비아,B-시클로덱스트린,스테아린산마그네슘,프락토올리고당,타우린,동결건조로얄젤리,DHA(정제어유분말,인진속외3종식물혼합추출물분말(가시오가피추출분말,인진속추출분말,홍삼분말,건조효모),유단백가수분해물,버섯혼합추출물분말(운지버섯,표고버섯,양송이버섯,노루궁뎅이버섯),니코틴산아미드,14종아미노산혼합제제(알라티노스,L-페닐알라닌,로이신,메티오닌,라이신,염산염,글루타민,아르기닌,이소로이신,발린,히스티딘,염산염,트레오닌,프롤린,시스틴,세린,트립토판)누에고치단백분해분말,홍화씨추출물분말,히드록시프로필메틸셀룰로오스,코코아색소500,산화아연,피로인산제이철혼합제제,산화마그네슘,마리골드추출물분말,미강발효추출물분말,파라다이스너트추출물분말,3종혼합유산균,비타민B6염산염,판토텐산칼슘(비타민B6),비타민B2(Riboflavin),엽산				
섭취대상	- 유아, 어린이, 청소년의 건강한 성장 및 영양공급에 도움을 원하시는 분, 규칙한 식사, 잘못된 식습관으로 영양섭취가 불균형하신 분, 허약하신 분들의 영양공급				
비고	어린이 칼슘 및 종합비타민				



	제품명	롱큐본	제조/판매	렉스진바이오텍/ 종근당건강
	성상	아이보리빛 타블렛		
	섭취량 • 방법	1일 2회, 아침, 저녁으로 나누어 씹어서 섭취 (4~6세:1회 3정/7세 이상 1회 4정)		
	규격	450mg X 180T X 3통	가격	46,000원
원료	<p>원재료및함량: 해조칼슘(아일렌드산), 비타민E분말, 니코틴산아미드, 판토텐산칼슘, 분말비타민A, 비타민B1질산염, 비타민B2, 비타민B6염산염, 이소말트, 자일리톨, 두유분말(대두,미국산) 발효우유분말(농후발효유, 백설탕, 텍스트린, 정제가공유지, 글리세린지방산에스테르), 프락토올리고당, 오렌지분말(오렌지착즙액, 텍스트린), 오렌지향분말(합성착향료), 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 식물혼합추출물분말, 스테아린산마그네슘, DI-사과산, 타우린, 유단백 가수분해물(우유), 야채혼합분말, 과일혼합분말, 이노시톨, 계피농축액분말, 소맥분(밀), 생선콜라겐, L-라이신염산염, 푸마르산제일철, 초유분말, 도라지농축액분말, 푸른농축액분말, 파라다이스넛추출물분말, 산화마그네슘, 산화아연, 요구르트향분말(합성착향료), 녹차추출물분말, 하수오농축액분말, 홍화씨농축액분말, L-메티오닌, L-트레오닌, L-트립토판, 비오틴분말, 현미베아추출물분말, 비타민D3분말, 클로렐라추출물분말, 글리세린지방산에스테르, 황산망간, 수크랄로스(합성감미료), 홍삼농축액분말, 요오드칼륨, 엽산</p>			
섭취대상	<p>-활동량이 많은 어린이 -균형적인 영양보충이 필요한 어린이 -자녀의 고른 성장발육에 고민이신 분 -눈의 영양공급이 필요한 청소년, 성장기 어린이</p>			
비고	어린이 칼슘 및 종합비타민			


	제품명	마시젤로	제조/판매	일진제약/ 대상웰라이프
	성상	짜먹는 젤리형태		
	섭취량 • 방법	1일1회 1회1포(10g)		
	규격		가격	
원료	<p>유기농홍삼농축액(고형분60%, 진세노사이드Rg1과Rb1의합0.7%, 홍삼(국내산)), 정제수, 싸이클로덱스트린시럽, 액상과당, 백포도농축액(아르헨티나산), 오렌지농축과즙액, 벌꿀, 열대과일농축액, 배농축액, 홍삼복합농축액(홍삼, 대추, 감초, 건장, 홍화씨, 차조기, 참마, 당귀, 녹용), 클로렐라추출물, 혼합제제(카라기난, 로커스트콩검, 염화칼륨, 포도당, 산도조절제), 오렌지향(천연착향료), 산탄검, 연잎혼합추출물, 혼합제제(말토덱스트린, 토마틴), 합수구연산</p> <p>*원료삼 배합비율:홍삼근50%, 홍미삼50%</p>			
섭취대상	<p>1. 유치원, 학교, 학원 아빠심부름으로 피로한 어린이 2. 나쁜 병균들과 싸워야하는 면역증진 어린이 3. 뛰어놀기가 부족해 조금 허약한 어린이</p>			
비고				


	제품명	아이키키	제조/판매	정관장	
	성상	일반음료와 같은 액상			
	섭취량 • 방법	-			
	규격	10팩	가격	9,000원	
원료	아이키키(사과맛)-홍삼농축액(6년근,고형분60%, 홍삼성분 70 mg/g 이상 국산)0.2%, 정제수, 액상과당, 사과농축액(사과(국산)과즙으로 20%), 녹각추출액, 홍화씨농축액, 백봉령추출액, 산사자농축액, 백출농축액, 두충농축액, 폐각발효칼슘, 비타민B ₂ 인산에스터나트륨, 비타민B ₆ 염산염, 니코틴산아미드, 비타민C, 비타민D ₃ , 구연산, 아라비아검, 시클로덱스터림시럽, 천연사과향				
기능성내용	성장기 어린이들에게 꼭 필요한 비타민B ₂ , B ₆ , C, D ₃ 등 필수 영양소와 6년근 홍삼농축액, 녹각추출액, 홍화씨농축액, 산사자농축액, 백출농축액, 두충농축액 등 한방재료 농축액들이 밸런스 있게 함유된 제품입니다.				
비고	無합성보존료, 無합성감미료				


	제품명	코코몽 홍삼동이	제조/판매	천지양/일양약품	
	성상	액상			
	섭취량 • 방법				
	규격	20ml X 30포	가격	70,000원	
원료	홍삼농축액(진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합 70 mg/g, 고형분 60% 이상 국산)3% *원료삼배합비율(홍삼근70%, 홍미삼30%), 정제수, 말티톨시럽, 시클로덱스트린, 대보농축액[당귀(국산), 황기(국산), 계피(베트남산), 감초(우즈베크산), 작약(국산), 백출, 지황, 천궁, 복령], 프락토올리고당, 벌꿀, 폴리덱스트로스, 녹용추출분말(뉴질랜드산)1.3%, 타우린, 사과농축액, 젖산칼슘, 오렌지향(천연착향료), 산탄검, 비타민C, 비타민B ₆ 염산염, 비타민B ₁ 염산염				
기능성내용	면역력증진, 홍삼함유, 피로회복, 혈소판응집 억제를 통한 혈액 흐름에 도움, 기억력 개선에 도움				
비고	주요 섭취 대상 : 3 ~ 7세				


	제품명	닥터키올레	제조/판매	이지바이오메드
	성상	연한 연갈색 분말형태		
	섭취량 • 방법	1일 1~2회 1포		
	규격	3500mg X 60포(210g)	가격	60,000원
원료	EZ-523(6년근 홍삼, 가시오가피, 속단)추출물, 각종비타민, 미네랄, 해조 칼슘, 아연, 미강분말, 폴리감마글루탐산, 프로폴리스, 클로렐라			
기능성내용 or 섭취대상	-국내산6년근홍삼, 가시오가피, 속단이 함유된 식물복합추출물 EZ-523이 210mg 들어있습니다. -성장기 어린이 영양소인 칼슘, 비타민D, 아연, 각종 비타민, 셀레늄 등의 영양소가 이상적인 배합비로 구성되어 있습니다. -어린이 건강을 위협하는 인공적인 합성첨가물은 일체 첨가하지 않았습니다.			
비고				


	제품명	키즈플러스	제조/판매	광동제약
	성상	약갈색 타블렛		
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 3정씩(2개월분)		
	규격	460mg X 360정 (165.6g)	가격	35,800원
원료	 <p>필라티노스, 혼합유당(우유) 코코아분말, 합성착향료(코코아향), 결정셀룰로오스, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스(HPMC), 홍삼등혼합분말(홍삼, 진피, 복분자말기, 당귀, 황기, 맥아, 마, 결명자, 감초, 흰들버섯, 눈꽃동충하초, 안진쑈, 오미자, 운지버섯) 스테아린산마그네슘, 옥수수전분, 우초) 유분말, 건조효모, 유단백 가수분해물(우유), 포도씨추출물분말, 혼합제제(L-페닐알라닌, L-로아신, L-메티오닌, L-라이신연산염, 필라티노스, L-아스코아신, L-발린, L-히스티딘염산염, L-트레오닌, L-트리토퐀), 영지버섯자실체추출분말, 니코틴산아미드, 산화아연, 클로렐라원말, 타우린, 비타민D분말, 가시오가피 엑기스분말, 녹차추출물분말, 상어연골분말, 손바닥선인장열매분말, 스피루리나원말, 레반DHA혼합분말(대두, 우유) 홍화씨 추출분말, 효소처리스테비아, 분말비타민A(당공), 푸룬과즙분말, 아세로라추출분말, 석류추출물분말, 클루코사민염산염분말(게), 콜라겐펩타이드, 대두추출물분말, L-아르기닌, 비타민C, 비타민D3, 비타민B6염산염, 비타민B12질산염, 비타민B2, 젯산철, 판토텐산 칼슘, 비타민B12, 엽산</p>			
기능성내용	성장기 어린이 및 청소년의 뼈 성장에 필수 영양소인 칼슘을 포함하여 칼슘의 체내 흡수율을 촉진시키는 비타민D3, 비타민, 눈꽃동충하초 분말, 홍화씨추출분말, 흰들버섯 분말, 운지버섯분말, 등 총 67가지 성분이 들어 있는 코코아 맛을 가진 정제로 섭취하기 좋게 만든 어린이와 청소년의 성장발육에 도움을 줍니다.			
비고				


	제품명	하이키즈	제조/판매	엠에스바이오텍/한미메디케어
	성상	진갈색 액상		
	섭취량 • 방법	1일 1회 1포 물60ml와 함께		
	규격	15ml X 30포	가격	120,000원
원료	<p>홍삼농축액(고형분60%, 진제노사이드Rg1과RB1의합5mg/g이상, 국내산)11%, 혼합계제비타민D3분말(비타민D0.25% 함유) 0.015%, 정제수, 아가베시럽(오기농), 배농축액(고형분70%이상, 국내산), 시클로덱스트린시럽, 아가베선인장[아가베이눌린(유기농)], 대추농축액, 블루베리농축액, 포도농축액, 팔라티노스, 기타가공식품[식품혼합추출분말(식물혼합추출분말(오가피, 산약, 진피, 나복자, 탕자, 오미자, 복분자, 용안육, 당귀, 두충, 모과, 속단, 백강잠(누에), 갈근, 도라지(질경), 대추, 감초, 박하, 건강)텍스트린]해조분말, 클로렐라추출분말, 초유분말(우유), 보리추출분말, 젯산칼슘, 천연착향료(포도향), 구연산, 아미노산혼합(L-로이신, L-페닐알라닌, L-메티오닌, L-라이신염산염, 팔라티노스, L-이소로이신, L-발린, L-히스티딘, L-트레오닌, L-트립토판), 비타민C혼합계제(비타민C, 혼합계제비타민E분말, 나이아신, 분말비타민A(땅콩), 판토텐산칼슘, 혼합계제비타민D3분말, 비타민B6염산염, 비타민B2, 비타민B1염산염, 혼합계제비타민K1, 엽산, 비오틴, 비타민B12), 수크랄로스(합성감미료), 비타민B1혼합계제분말</p>			
기능성내용	성장발육, 면역력증진, 피로회복, 혈소판 응집을 통한 혈액 흐름에 도움			
섭취 시 주의사항	<ol style="list-style-type: none"> 1. 알레르기 체질인 경우 성분을 확인한 후 섭취하시기 바랍니다. 2. 제품을 개봉할 때 또는 섭취시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있습니다. 3. 의약품(당뇨치료제, 혈액응고제) 복용 시 섭취에 주의하십시오. 4. 밀봉상태로 전자레인지에 데우지 마십시오. 5. 장기 복용시에는 전문 한의사와 상의하시기 바랍니다. 			



	제품명	프리미엄복합글루코사민	제조/판매	서흥캡셀/대상웰라이프
	성상	아이보리색 타블렛		
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 2정(3개월분)		
	규격	800mg X 120정(3EA)	가격	56,000원
원료	<p>글루코사민염산염(글루코사민염산염 함량980mg/g이상,계,새우,미국산), 해조분말(비소성, 칼슘함량32.0%, 아일랜드산), 비타민E분말, 베타카로틴분말(카로틴10.05%대두), 분말비타민A(비타민A로서105ug/mg,땅콩), 니코틴산아미드, 비타민D3(비타민D3로서2.5ug/mg), 비타민B2(Riboflavin), 비타민B6염산염(비타민B6로서82.2%), 결정셀룰로오스, 상어연골분말, 녹색입홍합분말, 젤라틴, 비타민C, 식용건조효모, 클로렐라추출물분말, L-글루타민히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 정제어유분물(우유), 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 프락토올리고당분말, OptiMSM산화아연, 젯산, 철, 비타민B1염산염(비타민B1으로서 78.7%)</p>			
기능성내용	<p>-글루코사민 : 관절 및 연골 건강에 도움/ 관절 및 연골을 튼튼히 하는데 도움 -비타민A : 어두운 곳에서 시각 적응을 위해 필요/ 피부와 점막을 형성하고 기능을 유지하는데 필요/ 상피세포의 성장과 발달에 필요 -비타민D : 칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요/ 뼈의 형성과 유지에 필요 -비타민E : 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요 -나이아신 : 체내 에너지 생성에 필요 -칼슘 : 뼈와 치아 형성에 필요/ 신경과 근육 기능 유지에 필요/ 정상적인 혈액응고에 필요/ 청년기 이전에 적절한 운동과 건강한 식습관을 유지하면서 충분한 칼슘을 섭취하면 향후 골다공증 발생의 위험을 감소시킬 수 있음</p>			


	제품명	글루코사민플러스	제조/판매	CJ뉴트라
	성상	백색 캡셀 형태		
	섭취량 • 방법	1일 3회, 1회 2정		
	규격	500mg X 360정(2병)	가격	55,000원
원료	글루코사민염산염분말(글루코사민염산염 100%, 미국산, 게, 새우)63.5%, 결정셀룰로오스, 해조분말(아일랜드산), 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 이산화규소, 젤라틴(돼지), 스테아린산마그네슘, 이산화티타늄(합성착향료), 녹색입홍합분말, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 글리세린지방산에스테르			
기능성내용	-관절 및 연골의 구성성분으로 관절 및 연골을 튼튼히 하는데 도움을 주는 제품 -1일 섭취량 3,000mg으로 관절 및 연골의 구성성분인 글루코사민 1500mg함유			
비고	유통기한 2년			


	제품명	V=B연조인트	제조/판매	아모레퍼시픽
	성상	검은색 캡슐형태		
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 2캡슐		
	규격	600mg X 120캡슐	가격	40,000원
원료	N-아세틸글루코사민(게), 해바라기유, 상어연골추출혼합분말(상어연골추출물, 텍스트린, 레시틴), 식물추출혼합분말(생강, 버드나무가지), 황남, MSM(Dimethylsulfone), 레시틴(대두), 흡스추출혼합분말, D-a-토코페롤 * 캡슐기제: 젤라틴(돈피), 폴리글리시럽, 그리세린, 치자색소 혼합제제			
기능성내용 or 섭취대상	<p>1)기능성 : N-아세틸글루코사민은 게의 껍질에서 추출한 천연원료로서, 글루코사민을 만들 때에 천연 방법인 효소분해법을 이용하여 체내 흡수력을 높여주는 원료로서 관절, 연골 건강에 도움을 줍니다. 또한 관절의 연골 및 혈액의 구성 성분인 히알루론산의 전구체로 관절의 움직임을 부드럽게 해줌으로써, 일상생활은 물론 스포츠 야외 기타 활동 시에도 도움이 됩니다.</p> <p>2)섭취대상 -관절 및 연골이 약하신 분 -관절 및 연골을 튼튼히 하고자 하시는 분 -스포츠 및 야외활동을 하시는 분</p>			

	제품명	트리조인스타	제조/판매	유한양행
	성상	연한 연두색 타블렛 형태		
	섭취량 • 방법	1일 1회, 1회 2정		
	규격	800mg X 120정(96g)	가격	
원료	N-아세틸글루코사민 분말(계)(N-아세틸글루코사민함량95%이상), 헤조분말(칼슘32%), 비타민 D3, 결정셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 녹색입홍합분말, 상어연골분말, 스테아린산마그네슘, Opti-MSM, 피쉬콜라겐 펩타이드, 보스웰리아추출물분말, 비타민C, 이산화티타늄, 자당지방산에스테르, 푸마르산제일철, 산화아연, 치자그린색소, 혼합제제 치자황 천연분말, 황산망간			
기능성내용 or 섭취대상	<p>1)기능성내용 N-아세틸글루코사민, 칼슘, 비타민D3 3가지 성분이 들어있는 뼈와 관절을 위한 업그레이드된 제품으로 관절 연골 건강에 도움을 주는 N-아세틸글루코사민과 뼈의 형성 및 골다공 예방에 도움을 주는 칼슘, 비타민D₃가 복합적으로 함유되어 관절, 뼈 건강에 도움을 줍니다.</p> <p>2)섭취대상 -계단을 오르내릴 때 무릎이 불편하신 분 -하루 종일 서서 일하시는 분 -관절과 연골에 영양공급이 필요하신 분 -등산, 조깅, 헬스 등으로 관절을 자주 사용하시는 분 -골다공증 발생 위험 감소에 도움을 받고자 하시는 분</p>			


	제품명	관절엔파낙스	제조/판매	영진약품
	성상			
	섭취량 • 방법			
	규격		가격	120,000원
원료	전칠삼추출물, 숙지황, 가시오가피 성분 등 복합물을 주원료로 하였으며, 성어연골분말, 헤조분말, 초록입홍합추출물분말, 히알루론산			
기능성내용 or 섭취대상	<p>관절엔파낙스는 나이가 들면서 호르몬 분비 이상을 겪고 있는 중년기 이후 여성에게 도움이 될 것으로 기대되고 있으며</p> <p>또한 업무와 잦은 운동으로 관절을 많이 사용하는 남성의 관절 건강에 도움을 줄 것으로 평가되고 있습니다.</p> <p>항염증 효과와 관절연골의 손상을 억제</p>			
비고	최근 효능 논란이 되고 있는 글루코사민 대체제로 홍보 약국용 판매			


	제품명	글루코사민 황산염500	제조/판매	GNC(미국)	
	성상	백색 캡셀 형태			
	섭취량 • 방법	1일 3회, 1회 1캡셀			
	규격	500mg X 90캡셀	가격	60,000원	
원료	글루코사민황산염(계, 새우), 결정셀룰로오스, 스테아린산				
기능성내용 or 섭취대상	좋은 원료 및 OTP(over the counter)수준 제조 강조				
섭취 시 주의사항	게나 새우에 알레르기가 있는 분은 섭취에 주의				
	제품명	식물성글루 코사민1000	제조/판매	블랙모어스(호주)	
	성상	연갈색 캡슐 형태			
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 1정			
	규격	1,227mg X 120정	가격	54,000원	
원료	글루코사민황산염, 결정셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 이산화규소(고결방지제), 천연 바닐라향, 자일리톨				
기능성내용 or 섭취대상	<p>-식물성 글루코사민 1,000이 건강한 관절 및 연골 유지로 활기찬 생활을 도와 드립니다.</p> <p>-관절 및 연골 건강에 도움</p> <p>-옥수수를 배지로 한 <i>Aspergillus niger</i>로부터 추출한 식물성 글루코사민을 사용하여, 갑각류 알레르기로 인해 글루코사민 섭취가 어려우셨던 분들은 물론 채식주의자까지 안전한 섭취가 가능합니다.</p>				
비고	유통기한: 제조일로부터 2년				


	제품명	프리미엄그린글루코사민	제조/판매	벨리모어코리아
	성상			
	섭취량 • 방법	1일 3회, 1회 1캡슐		
	규격	880mg X 180캡슐 (158.4g)	가격	54,000원
원료	글루코사민황산염(게, 새우) 520mg(59%), 녹색입홍합분말 250mg(28.4%), 상어연골분말 100mg(11.4%), 스테아린산마그네슘			
기능성내용 or 섭취대상	<ul style="list-style-type: none"> -관절 및 연골에 도움을 줍니다. -관절, 연골 관리가 필요한 출산 후 여성, 및 중장년층 -활력있고 건강한 노후를 원하시는 분 -무거운 짐을 자주 들거나 오래 서 있는 일이 많으신 분 -계단을 많이 오르내리거나 무릎관절을 많이 사용하시는 분 -운동선수 이거나 운동 및 등산을 즐기시는 분 -가사노동이 많은 주부 및 갱년기 여성 			
섭취 시 주의사항	게 또는 새우에 알레르기가 있는 사람은 섭취에 주의 하십시오			

	제품명	소스오브라이프 칼슘/마그네슘	제조/판매	네이처스플러스 (미국)
	성상	타블렛		
	섭취량 • 방법	1일 1회 2정		
	규격	1,300mg X 60정(78g)	가격	40,000원
원료	탄산칼슘, 산화마그네슘, 결정셀룰로오스, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 셀락, 무화과농축물, 대추야자농축물, 헤이즐넛추출물, 참깨추출물, 해바라기씨추출물, 브로콜리추출물, 참깨추출물, 해바라기씨추출물, 브로콜리추출물, 시금치추출물, 이산화규소(고결방지제)			
제품특징	-칼슘과 마그네슘 이외에도 부원료로 7가지 식물 농축물인 무화과, 대추야자, 헤이즐넛, 참깨, 해바라기씨, 브로콜리, 시금치 등 함유			
비고	식물성추출물로 다른 비타민에 비해 흡수 등 좋음			


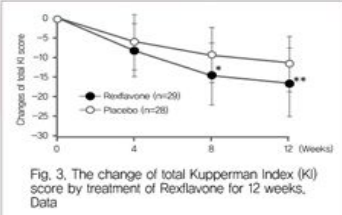
	제품명	산호칼슘	제조/ 판매	오로니아 (캐나다)																																										
	성상	백색 타원형 타블렛																																												
	섭취량 • 방법																																													
	규격	1,200mg X 90정(91.8g)	가격	33,500원																																										
영양소기준치	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>합량</th> <th>%영양소기준치</th> <th></th> <th>합량</th> <th>%영양소기준치</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>열량</td> <td>0Kcal</td> <td></td> <td>단백질</td> <td>0g</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>탄수화물</td> <td>1g미만</td> <td>0%</td> <td>나트륨</td> <td>0g</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>지방</td> <td>0g</td> <td>0%</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>칼슘</td> <td>230mg</td> <td>33%</td> <td>마그네슘</td> <td>101mg</td> <td>46%</td> </tr> <tr> <td>아연</td> <td>5.7mg</td> <td>48%</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>비타민D</td> <td>3.8µg</td> <td>76%</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>					합량	%영양소기준치		합량	%영양소기준치	열량	0Kcal		단백질	0g	0%	탄수화물	1g미만	0%	나트륨	0g	0%	지방	0g	0%				칼슘	230mg	33%	마그네슘	101mg	46%	아연	5.7mg	48%				비타민D	3.8µg	76%			
	합량	%영양소기준치		합량	%영양소기준치																																									
열량	0Kcal		단백질	0g	0%																																									
탄수화물	1g미만	0%	나트륨	0g	0%																																									
지방	0g	0%																																												
칼슘	230mg	33%	마그네슘	101mg	46%																																									
아연	5.7mg	48%																																												
비타민D	3.8µg	76%																																												
기능성내용	<ul style="list-style-type: none"> -칼슘은 뼈와 치아 형성에 필요 -칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 -신경과 근육 기능 유지에 필요 -에너지 이용에 필요 -정상적인 면역기능에 필요 																																													
비고																																														


	제품명	내추럴칼슘프리 미어큐	제조/ 판매	종근당건강
	성상			
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 1정		
	규격	700mg X 180정 2EA (6개월)	가격	44,000원
원료	해조분말(칼슘함량 28%이상, 캐나다산)65%, 옥수수전분, 결정셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 산화마그네슘, 스테아린산마그네슘, 유단백가수분해물(CPP함량 12%이상, 우유), 무수구연산, 분말비타민D3			
기능성내용 or 섭취대상	<ul style="list-style-type: none"> -뼈와 치아 형성에 필요 -신경과 근육 기능유지에 필요 -정상적인 혈액응고에 필요 -청년기 이전에 적절한 운동과 건강한 식습관을 유지하면서, 충분한 칼슘을 섭취하면 향후 골다공증발생의 위험을 감소 시킬 수 있음 			
비고				

	제품명	스마트칼 초유엔칼슘	제조/판매	메가맥스(뉴질랜드)
	성상			
	섭취량 • 방법	하루 2~3정 물과 함께 섭취		
	규격	120캡셀	가격	35,000원
원료	<p>-밀크칼슘 : 세계에서 우유는 가장 완전해 가까운 식품으로 인정되고 있습니다. 이는 우유의 영양학적 및 건강 증진상의 가치가 다른 어느 식품보다 뛰어나기 때문이며, 이들 영양소의 흡수율이 높다는 의미입니다.(칼슘은 여러 공급원을 통해 얻어질 수 있으나, 가장 효과적인 방법은 바로 유제품입니다)</p> <p>-비타민D3 : 스마트칼은 칼슘 흡수에 중요한 비타민D3를 1정당 200iu를 함유해 칼슘이 잘 흡수되도록 도와줍니다.</p> <p>-초유 : 콜로스트럼(IgG20%)이 함유되어 있습니다.</p> <p>-DHA : 오메가-3 필수 지방산 DHA 함유</p>			
특징	밀크칼슘으로 흡수율 높다는 점 강조			
비고				

	제품명	칼슘아연M	제조/판매	천호식품
	성상	진한고동색의 환 형태		
	섭취량 • 방법	식전, 식후 관계없이 1회 30 ~ 40환씩 수시로 드셔도 좋습니다.		
	규격	3g X 60포 (180g)	가격	42,000원
원료	<p>해조분말(비소성칼슘32%이상, 아일랜드), 산화아연(아연함량80.3%, 독일), 식물성 원료혼합추출액 36.0%[고형분 30%이상, 구기자(국내산), 헛개나무(중국산), 복분자(중국산), 두충, 황기, 대추, 당귀], 마분말, 복분자딸기분말, 발아현미, 홍삼농축액(고형분 60%이상, 홍삼성분 70mg/g이상, 원료삼배합비율:홍삼근 20%, 홍미삼 80%), 매실농축액(고형분 60%이상), L-아르기닌, 글분말, 헴철, 건조효모, 유단백 가수분해물, 비타민D3(2,500 ug/g)</p>			
기능성내용	<p>“칼슘, 아연M”은 뼈 건강에 필수적인 영양소인 해조칼슘과 아연 외에 칼슘의 흡수를 도와주는 CPP II와 건조효모, 헴철, 비타민D3 등이 함유되어 골격과 치아의 칼슘부족을 예방하여 건강한 뼈를 유지하도록 도와 드립니다.</p>			
섭취대상	<ol style="list-style-type: none"> 1. 신체의 생리조절 기능 조절의 도움이 필요하신 분 2. 칼슘의 부족 및 예방이 필요하신 분 3. 향후 골다공증 발생의 위험을 감소시키고 싶으신 분 4. 활동이 많은 현대인 및 청소년 5. 간편하게 영양 보충을 원하시는 분 6. 정상적인 면역기능을 원하시는 분 			

	제품명	뉴트리베이스 셀틱해조칼슘	제조/판매	CJ뉴트라				
	성상	타블렛 형태						
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 2정						
	규격	900mg X 120정(2개월)	가격	40,000원				
원료	해조분말(아일랜드산, 칼슘함량32%)30%, 탄산칼슘, 탄산칼슘혼합제(탄산칼슘, 구연산, DL-사과산, 텍스트린, 정제수), 산화마그네슘, 비타민C, 분말비타민A(팜콩), 비타민D3, 비타민B6염산염, 비타민B1, 염산염, 비타민B2, 결정셀룰로오스, 유당(우유, 미국산), 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘							
기능성내용	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>칼슘</p> <p>뼈의 차이 형성에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요 정상적인 혈액응고에 필요 정년기 이전에 적절한 운동과 건강한 식습관을 유지하면서 충분한 칼슘을 섭취하면 향후 골다공증 발생의 위험을 감소시킬수 있음 급원(식품) 우유, 유제품, 뼈째먹는 생선, 참깨, 채소, 해조류, 두류.</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>비타민D</p> <p>칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 뼈의 형성과 유지에 필요 급원(식품) 생선의 간유, 기름진 생선, 난황</p> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="vertical-align: top;"> <p>마그네슘</p> <p>에너지 이용에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요</p> </td> </tr> </table>				<p>칼슘</p> <p>뼈의 차이 형성에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요 정상적인 혈액응고에 필요 정년기 이전에 적절한 운동과 건강한 식습관을 유지하면서 충분한 칼슘을 섭취하면 향후 골다공증 발생의 위험을 감소시킬수 있음 급원(식품) 우유, 유제품, 뼈째먹는 생선, 참깨, 채소, 해조류, 두류.</p>	<p>비타민D</p> <p>칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 뼈의 형성과 유지에 필요 급원(식품) 생선의 간유, 기름진 생선, 난황</p>	<p>마그네슘</p> <p>에너지 이용에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요</p>	
<p>칼슘</p> <p>뼈의 차이 형성에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요 정상적인 혈액응고에 필요 정년기 이전에 적절한 운동과 건강한 식습관을 유지하면서 충분한 칼슘을 섭취하면 향후 골다공증 발생의 위험을 감소시킬수 있음 급원(식품) 우유, 유제품, 뼈째먹는 생선, 참깨, 채소, 해조류, 두류.</p>	<p>비타민D</p> <p>칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 뼈의 형성과 유지에 필요 급원(식품) 생선의 간유, 기름진 생선, 난황</p>							
<p>마그네슘</p> <p>에너지 이용에 필요 신경과 근육 기능 유지에 필요</p>								
	제품명	뉴트라젠	제조/판매	Mylife Inc(미국) /비타메딕스				
	성상	갈색의 캡슐 형태						
	섭취량 • 방법	하루 2캡슐 한 번에 혹은 두 번에 나누어서						
	규격	750mg X 60캡슐	가격	60,000원				
원료	구성성분 (1일 섭취분 1,500mg / 2캡슐)- Antioxidant (항산화영양소)tocopherol (d-alpha tocopherol) ----- 100mg selenium ----- 60mcg pyridoxine hydrochloride ----- 10mg propolis powder ----- 90mg- Phytoestrogen (식물추출물)isoflavone (soy ext. powder) ----- 200mg isofraxidin (siberian ginseng ext.) ----- 300mg isoliquiritigenin (licorice ext.) ----- 300mg dongquai ext (angelica gigas Nakai) ----- 200mg gamma linolenic acid (evening prime rose) ----- 100mg st.john's wort (hypericum perforatum L) ----- 100mg damiana leaf ext-----100mg							
기능성내용 or 섭취대상	항산화영양소(Antioxidant)와 식물성에스트로겐(Phytoestrogen)의 이상적 조합 여성의 갱년기는, 난소기능의 저하로 여성호르몬이 급격히 감소하는 어려운 시기. 여성호르몬의 불균형으로, 정상적 생리활성에 문제가 발생하고, 여러 신체적, 정신적 불편한 갱년기증상을 맞이하게 됩니다. 이때 처방되는 합성호르몬약제는 유방암 등 부작용으로 점차 회피되고, 대안으로 항산화제와 안전한 식물성호르몬 성분이 추천됩니다.							

	제품명	에버퀸	제조/판매	렉스진바이오텍 / CJ뉴트라	
	성상	아이보리색 타원형 타블렛			
	섭취량 • 방법	1일 1회, 1회 2정			
	규격	700mg X 60정(42g)	가격	99,000원	
원료	해조칼슘분말(칼슘함량32%,아일랜드)60%, 회화나무열매추출물25%(중국산), 결정셀룰로오스, 유단백가수분해물(우유, 뉴질랜드), 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 비타민D3				
기능성내용	<p>40~60세 한국인 갱년기 여성대상 12주간 인체시험결과 KI(쿠퍼만 인덱스)개선됨이 확인</p> <p>*모든 분들에게 해당되는 것은 아닙니다. *출처 : The Effect of Reditlavone on Menopausal Symptoms in Postmenopausal Women : A Randomized Double-blind Placebo Controlled Arch Pharm Res Vol 33, No 4, 523~530, 2010</p>  <p>KI(쿠퍼만 인덱스)란? 학계에서 널리 사용되는 갱년기 지수로서 갱년기 여성에게서 나타나는 II가지(홍조/얼굴 화끈거림, 발한, 불면증, 신경질, 우울증, 어지럼증, 피로감, 관절통/근육통, 두통, 가슴두근거림, 질 건조/분비물 감소)의 다양한 갱년기 상태를 점수화한 것을 말합니다.</p>				
특장점	-식물성 소재인 회화나무열매추출물 함유로 믿을 수 있음 -생리활성이 강한 소포리코사이드 성분이 갱년기 여성 건강에 도움을 줌 -갱년기에 꼭 필요한 뼈 건강에 도움을 주는 칼슘과 그 외에 비타민D가 함유				

	제품명	백수오514	제조/판매	닥터엘리자베스	
	성상				
	섭취량 • 방법	1일 2회, 1회 2정			
	규격	500mg X 60정	가격	48,000원	
원료	백수오 등 복합추출물(개별인정 2010-20호/백수오, 속단, 당귀), 옥수수전분, 식용해조분(칼슘32%), L-아르기닌, 결정셀룰로오스, L-라이신염산염, 비타민C, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 비타민E분말혼합제(어류), 젯산철, 니코틴산아미드, 분말비타민A혼합제(어류, 땅콩), 비타민D3혼합제, 비타민B6염산염, 비타민B12염산염, 비오틴, 비타민B12				
기능성내용 or 섭취대상	-갱년기 지수(KI)와 각 개별항목 개선(인체시험 확인) -대퇴부 골밀도 개선, 에스트로겐 유사효과 확인(동물시험 확인) -세계가 인정한 기술력(미국 및 국내 특허 획득) -여성호르몬의 불균형에 의한 건강상태 개선 -국내최초 대한민국 식약청이 인정한 백수오 등 복합추출물을 함유한 갱년기/폐경기 여성 건강을 위한 제품				
비고					

3. 뼈 건강기능식품 설계

뼈 건강에 관한 제품조사 및 시장조사를 통해 3차 년도에 우리사업단이 개발하고자하는 제품을 설계하였다(표 18). 특히, 현재 뼈에 관한 질병이 증가하는 것에 비해 관련된 제품들이 많이 유통되지 않고 있기 때문에 앞으로 뼈 건강 관련 시장의 규모가 매우 커지고 여기에 투자하려는 기업이나 단체가 많아질 것이라고 예상된다. 따라서 우리 사업단은 인진쑥의 우수한 기능성을 입증하고, 보조 성분 등의 첨가물을 잘 설계하여 뼈 건강에 대한 효능을 더욱 증가시킨 차별화된 건강기능식품 출시함으로써 뼈 건강 관련 시장에 선두주자가 되고자 한다.

가. 제품 형태



나. 제품 설계

표 18. 사철쑥 추출물을 이용한 뼈 건강기능식품 기본 설계

항목	내용	비고
제품명	사철쑥 골원	
제품의 유형	건강기능식품	개별인정형
제형	캡슐 또는 정제	
주요성분	인진쑥 추출성분(기능성분), 기타 보조성분	450mg/캡슐
기능성 정보	뼈 건강에 도움을 줌	
포장단위	180캡슐/박스, 450 mg/캡슐	
섭취방법	1일 2회, 1회 2~4 캡슐	
섭취대상	갱년기 여성, 노인	
판매가격	55,000원	1개월 분
제품구성	180캡슐 × 3 박스	1개월 분

4절. 사철쭉 원료의 인체적용시험

1. 기능성 원료의 인체적용시험

건강기능식품의 기능성원료로서 식품의약품안전청으로부터 허가를 받기 위해서는 인체적용시험을 거쳐야 하고 이 시험을 통해 인체에서의 목적한 바 기능성 및 안전성을 입증하여야 한다. 건강기능식품의 기능성원료는 생리활성 기능의 과학적 근거에 따라 3등급으로 분류되는데 1등급이 ‘○○에 도움을 주는 것’으로 가장 높은 등급이고 관련 인체적용시험이 미흡한 경우에 3등급으로 판정받게 된다. 따라서 인체적용시험을 통하여 확고한 기능성 및 인체 안전성을 입증하여 1등급으로 허가를 받는 것이 중요하다. 인체적용시험은 실험동물을 사용하여 안전성 및 생리활성을 입증하고 인체적용시험에서의 투여량을 산정하고 또한 섭취근거자료와 안전성 정보자료 등의 문헌조사를 통해 안전성 및 활성을 입증한 뒤 시험을 진행할 프로토콜을 작성하여 IRB 승인 후 시작해야 한다. 그리고 인체적용시험용 시험 때 피험자들에게 투여할 원료(사철쭉) 시제품은 사전에 설정된 원료의 기준 규격에 따라 안정성(유실정) 시험과 인체적용시험을 수행할 수 있도록 충분한 량이 준비되어야 한다. 인체적용시험은 양산베데스타 병원에서 진행할 예정이다. 현재 인체적용시험계획서는 완료되었으며 인체적용시험 프로토콜(요약)은 표23과 같이 설정하였다. 양산베데스타 병원에 IRB 심의를 신청하였으며 사철쭉 원료의 안정성 평가도 양호한 것으로 확인되었다. 본 인체적용시험은 향후 수행완료 소요기간이 1년 정도 됨으로 농림수산물식품기술기획평가원에 연기신청을 하였으나 거절된 상태며 자체적으로 계속 진행할 예정이다.

가. 인체적용시험 추진 일정

3차년도 인체적용시험 추진 일정은 표 19와 같았다.

표 19 인체적용시험 추진 일정표(→ : 계획, → : 실행)

주요 내용	세부 내용	추진 일정												비고 (실적)		
		2012년						2013년								
		7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			
IRB(인체적용시험윤리위원회) 승인	연구계획 심의의뢰서 제출	→														베데스타병원 (양산) 검토/협의 완료
	임상시험심사 위원회 승인 준비	→														
	인체적용시험 계획서 및 증례 기록서 준비	→														
	임상연구계약 체결 서류 준비		→													
			→													
시험용 시제품 생산	사철쭉 추출분말원료 대량 생산			→											원재료 300kg 원료분말 42kg	
	원료 기준규격 설정				→	→									기준규격 설정	
	지표물질 분석법 확인				→	→									한국기능식품 연구원 확인	
	원료의 안정성(유통기한설정) 시험							→	→	→	→	→	→	→	제조공정 개선	
인체적용 시험	임상시험 착수												→	→	미착수	

나. IRB(인체적용시험윤리위원회) 승인 검토 자료

인진쑈의 인체적용시험에 대한 IRB 승인을 위한 검토 자료로서 임상시험신청서, 임상시험계획 요약서, 임상시험계획서, 증례기록서, 피험자 동의서, 피험자 모집 문건, 피험자 보상규약, 연구비 사용 계획서를 준비하였다.

(1) 임상시험심사신청서

[서식 1호] 연구계획 심의의뢰서(양식)

다음과 같이 연구계획서에 대하여 위원회의 심사를 요청합니다.

연구과제명	골감소증에서 인진쑈 추출분말의 뼈건강 개선 효과에 관한 연구			
연구대상	○ 기구 ○ 시술, 수술, 진단방법 ● 식품		○ 유전자관련 ○ 배아관련 ○ 줄기세포관련 ○ 기타	
	일반명	인진쑈 추출분말	상품명	
연구구분	● Clinical Trial		○ Non-Clinical Trial	
전체 피험자 증례수	72명(시험군: 35명, 대조군: 35명) (본 기관배정) 70명			
피험자 동의	● 필요		○ 불필요(사유서 첨부)	
목적	○ 학술용 ● 국내허가용(KFDA)		○ 해외허가용(국가명:)	
기관구분	● 단일기관 ○ 국내다기관		○ 다국가 다기관	
Phase	○ I ○ II ○ III ○ VI		○ PMS ● 기타	
연구예정기간	20120715 ~ 20130714 (YYYYMMDD ~ YYYYMMDD)			
연구담당자	이름		소속	베데스다병원 정형외과
연구주체	○ 연구자 주도		● 의뢰자 주도	
지원(의뢰)기관	(주)알앤엘바이오			
지원(의뢰)기관	이름	강 성 근	대표직위	대표이사 강 성 근
연구비	총 원(연구간접비 포함)		지원사항	
심사비제공자	● 의뢰(지원)기관 ○ 연구책임자		○ 심사비면제	

위와 같이 연구과제 계획서를 제출합니다. 본인은 본 연구계획서(계약서)에 의거하여 성실히 연구를 수행하겠으며 위원회에서 지정한 시기에 중간보고를 제출하겠습니다. 또한 연구종료 후에는 1개월 이내에 종료보고를 하겠습니다.

	소속	부서	이름	신청일/의뢰일
연구책임자	베데스다병원	정형외과	박신철	
공동연구자	베데스다병원	정형외과	김이철	
	베데스다병원	신경외과	박권병	
모니터	베데스다병원		김수연	
연구담당자				

베데스다병원장 귀하

(2)인체적용시험계획 요약서

사철쭉 원료의 인체적용시험 계획서는 양산베데스다 병원 정형외과팀과 함께 작성하였으며 임상시험 제목은 "골감소증에서 인진쭉 추출분말의 골대사 개선 효과에 관한 연구"였다. 본 연구계획서 요약은 표 20과 같았다.

표 20 인진쭉 추출물의 인체적용시험계획서(요약)

시험제목	골감소증에서 인진쭉 추출분말의 골대사 개선 효과에 관한 연구
시험목적	골감소증의 소견이 있는 대상자들에게 인진쭉 추출분말을 경구 투여한 후 골대사 개선 효과와 안전성을 확인하고자 한다.
시험 설계디자인	인진쭉 추출분말의 골대사 개선효과를 이중맹검, 무작위배정, 위약-대조군, 평행군 방법으로 검증한다.
시험기관	베데스다 병원
시험책임자	박신철 과장
공동시험책임자	김이철 과장 박권병 과장
시험의뢰자	(주)알앤엘바이오
시험 건강기능식품	인진쭉 추출분말이 함유된 건강기능식품
투여방법	1. 인진쭉 추출분말 1캡슐(400mg) 혹은 placebo 1캡슐(400mg) 2. 1일 2회(2400mg) 복용 3. 1회 3캡슐(1200mg) 복용 4. 12주 간 복용
피험자 수	1. 시험군 35명, 대조군 35명 2. 본 건강기능식품의 기능성 시험에서는 통계적인 유의성을 확인할 목적으로 시험을 진행하려는 것으로 골밀도검사 상 골감소증 소견이 있는 피험자들을 대상으로 시험 건강기능식품군 35명, 대조 건강기능 식품군 35명을 합하여 모두 70명의 피험자를 모으는 것을 목표로 한다. 3. 유효성 평가에서 제외되는 피험자의 비율을 16.7%로 가정한 상황이다.
시험기간	2012년 7월 15일부터 2013년 7월 14일까지
선정기준	1. BMD검사결과 골감소증의 소견이 있는 모든 연령의 환자 (QCT 결과 $-2.5 < \text{lumbar spine의 T-score} < -1.0$) 2. 인체적용시험 참여동의서에 서면 동의한 자

<p>제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 동의서에 서면 동의하지 않은 자 2. 중증 간질환자(간경변, 간암), GOT, GPT 수치가 모두 50보다 큰 자 3. 중증의 신질환자(급성, 만성 신부전) 4. 혈청 칼슘이 12 mg/dl 이상인 자 5. 본 연구 3개월 전에 골관계 질환에 대한 estrogen, corticosteroids, bisphosphonate, 또는 다른 의약품의 치료를 받은 자 6. 갑상선과 부갑상선 기능에 영향을 주는 질환이 있는 자 7. 암으로 진단받고 치료를 요하는 자 8. 소화흡수기능에 영향을 주는 질환이 있는 자 9. 인지기능장애가 있거나 복약순응도에 영향을 줄 수 있는 자 10. 현재 항경련제를 복용하고 있는 자 11. 최근 3개월 이내 뇌경색, 뇌출혈 진단 받은 자 12. 심근경색, 협심증, 심부전, 부정맥으로 약물을 복용 중인 자 13. BMI가 30kg/m² 이상인 자 14. 임신 중이거나 모유를 수유 중인 피험자 15. 본 연구에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자 																
<p>진행</p>	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>Visit 1</td> <td>Visit 2</td> <td>Visit 3</td> <td>Visit 4</td> </tr> <tr> <td>-2주</td> <td>0주</td> <td>6주</td> <td>12주</td> </tr> <tr> <td>screening</td> <td>무작위 배정</td> <td>1차방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td>관찰기</td> <td colspan="3">시험 건강기능식품과 placebo 복용기간</td> </tr> </table>	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	-2주	0주	6주	12주	screening	무작위 배정	1차방문	종료방문	관찰기	시험 건강기능식품과 placebo 복용기간		
Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4														
-2주	0주	6주	12주														
screening	무작위 배정	1차방문	종료방문														
관찰기	시험 건강기능식품과 placebo 복용기간																
<p>유효성 평가항목</p>	<p>건강기능식품 복용 전의 기초상태와 건강기능식품 복용 12주 후의 DPD(deoxy pyridinoline), Osteocalcin, BSALP, Ca, Mg수치를 측정하여 혈중 농도변화를 비교하고 골밀도검사를 시행하여 골감소증의 정도 변화를 비교한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1차 유효성 평가변수 DPD(deoxy pyridinoline)의 개선도 2. 2차 유효성 평가변수 Osteocalcin, BALP, Ca, Mg, BMD의 개선도 																
<p>안전성 평가항목</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응 2. 활력징후 3. 실험실적 검사(일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사) 																

(3) 임상시험계획서

인체적용시험계획서
골감소증에서 인진쑥 추출분말의
골대사 개선 효과에 관한 연구
(이중맹검, 무작위배정, 위약-대조군, 평행군 연구)

*Effects of Artemisia capollaris herba
on bone metabolism in osteopenia
(double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel study)*

Protocol No. 1.0

연구책임자

양산 베데스다병원 정형외과

연구기간: 2012.07.15-2013.07.14

서 명

저는 본 인체적용시험용 건강기능식품에 대한 정보를 읽고 검토한 후, 모두 이해하였으므로 아래 서명을 합니다. 또한 본 임상시험계획서를 읽고 검토하였으며, 이에 따라 임상시험을 진행하는데 동의합니다. 저는 본 임상시험을 ICH Good Clinical Practice (GCP) 지침서와 적용되는 모든 관련규정에 따라 진행할 것입니다. 저는 Helsinki 선언과 임상시험심사위원회(IRB) 동의서에 있는 연구자로서의 주요 의무를 다하겠습니다.

인체적용시험 기관명: 베데스다병원

연구책임인서명

Date

인체적용시험 의뢰기관명: (주) 알앤엘바이오

대표자서명

Date

목 차

I. 인체적용시험의 목적 및 배경-----	7
1. 목적	
2. 배경	
II. 시험약제-----	9
1. 시험용 건강기능식품의 정보	
2. 시험용 건강기능식품의 포장	
3. 시험용 건강기능식품의 라벨링	
III. 피험자-----	10
1. 선정기준	
2. 제외기준	
3. 목표한 피험자의 수 및 그 근거	
4. 중지 및 탈락기준	
IV. 시험기간-----	12
V. 시험방법-----	12
1. 개요	
2. 무작위배정	
3. 시험용 건강기능식품의 투여방법, 투여기간	
4. 피험자 순응도(compliance) 확인방법	
5. 관찰항목 및 관찰검사 방법	
6. 유효성 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)	
VI. 예측 이상약물반응 및 사용 상의 주의사항-----	16
1. 예측 이상약물반응	
2. 사용 상의 주의사항	
VII. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법-----	17
1. 안전성 평가항목	
2. 평가기준	
3. 안전성 평가대상 및 평가방법	
4. 이상반응의 분류 및 정의	
5. 시험물질과의 인과관계	
6. 피험자에 대한 보호대책	
VIII. 연구참여자 편성표 -----	20
IX. 인체적용시험 수행일정표-----	20
X. 인체적용시험 방문과정 일정표-----	21
XI. 참고문헌-----	22
(첨부서류)	
피험자 동의서 설명문, 피험자 동의서, 피해자 보상에 대한 규약	
(별도첨부서류)	
증례 기록서	

I. 인체적용시험의 목적 및 배경

1. 목적

최근 산업화와 과학의 발달로 경제수준이 높아지면서 생활양식의 편의성을 강조하는 자동화 시스템의 증가로 신체활동량이 많이 감소되었다. 또한 부적절한 식생활로 인하여 골격 건강에 좋지 않은 영향을 끼쳐서 골다공증 발생이 증가하게 되었으며⁽¹⁾, 또한 사회가 점차 고령화되면서 골다공증이 노인들의 대표적인 질환으로 손꼽힐 만큼 많이 발생하게 되어 점차 중요한 임상적 문제로 인식되고 있는 추세이다⁽²⁾.

이러한 이유로 골다공증의 전단계인 골감소증 소견이 있는 사람들을 대상으로 시험 건강기능식품군과 대조 건강기능식품군으로 나누어 시험 건강기능식품군에게는 인진썩 추출분말을 1회 1200mg씩 하루 2회 12주 동안 경구 투여하고 대조 건강기능식품군에게는 Placebo물질을 동일용량, 동일 횟수로 경구 투여하여 두 군의 경구 투여 전과 경구 투여 12주 후의 DPD수치를 1차 유효성 평가변수로 비교하고 Osteocalcin, BALP, Ca, Mg, BMD의 개선도를 2차 유효성 평가변수로 비교하여 인진썩 추출분말의 골대사 개선에 대한 효능을 평가하고자 한다.

2. 배경

골다공증(osteoporosis)은 골격대사의 변화로 인한 대표적인 대사성 골질환으로 신체 골량이 소실되어 골질에 대한 감수성이 높아진 질환으로 정의되어 왔으나, 최근 골질량의 소실 뿐 아니라 골강도의 손상도 함께 골질의 위험이 증가된다고 새롭게 정의되고 있다⁽³⁾. 골다공증은 그 자체가 문제가 되기보다는 골다공증에 의한 골질의 위험이 높아지면서 골질에 의하여 일상생활이 불편해지고, 생명까지 위태로워질 수도 있기 때문에 문제가 되고 있다.

골다공증 질환의 건강보험 진료인구는 2005년 45만 명에서 2009년에는 74만 명으로 1.6배 증가한 것으로 나타났는데 이는 최근 4년 동안 한 해 평균 13%씩 늘어난 것이다. 2009년 우리나라 여성 골다공증 인구는 68만7,524명으로 남성의 5만여 명보다 13배 정도 많았다. 하지만 최근 남성 노인 인구가 늘면서 남성 골다공증 환자도 급증하고 있으며, 2009년에는 5만 2천여 명으로 2005년 2만 5천여 명에 비해 2배 이상 늘어났다.

또한 60세 이상의 노인인구 53만 명이 우리나라 전체 골다공증 인구의 72%를 차지하였으며, 특히 60~70대에서 골다공증 인구가 급격히 증가한 것으로 나타났다(국민건강보험공단 자료). 골다공증에 의한 골절은 사망률 증가와 밀접한 관계가 있고 전체 의료비 상승 등 사회·경제적인 문제를 유발하므로 골다공증에 대한 의학적 관심이 점점 증가하고 있는 추세이다.

1994년 WHO는 골격 건강상태에 대한 임상적 기준(7)을 적용하여 평가하였다. 폐경 전 여성은 젊고 건강한 백인 여성을 기준으로 평균(mean)에서 표준편차(S.D) 보다 낮지 않을 때(T-score가 -1보다 크거나 같을 때)를 정상(normal)이라고 하였고, 골밀도가 평균에서 표준편차 1과 2.5사이(T-score가 -2.5~-1)는 골소공증 또는 골감소증(osteopenia), 골밀도가 평균에서 표준편차 2.5보다 크지 않을 때(T-score가 -2.5보다 작거나 같을 때)를 골다공증(osteoporosis)라고 구분하였다. T-score란, (측정값-젊은 연령층 집단의 평균값)/표준편차'로 골질에 대한 절대적인 위험도를 나타내기 위해 골질량이 가장 높은 젊은 연령층의 골밀

도와 비교한 값이다. 따라서 골밀도 측정기에 따라 측정단위나 절대 수치가 달라도 비교 가능하다. 골밀도를 기준으로 골다공증, 골감소증, 정상인으로 분류한 WHO 진단기준은 골절에 대한 위험 정도를 고위험, 중등도 위험, 저위험군으로 분류하고자 한 것으로 골 밀도 검사결과 표준편차가 1만큼 감소하면 골절 위험도가 1.5 ~ 2.5배 증가한다(4).

QCT는 주로 척추뼈몸통의 해면골을 측정하는데 이용된다⁽⁸⁾. 또한 DEXA와 비교해서 QCT는 퇴행성 척추 변화에 덜 영향을 받는 장점이 있다. 그리고 DEXA와는 다르게 피질과 해면골을 선택적으로 분석할 수 있다. 해면골은 피질골보다 회전률이 빠르므로 더 쉽게 대사성 변화를 관찰할 수 있다. 이런 장점은 어떤 약으로 치료하는 것이 골격계에 어떠한 영향을 주는지 평가하는데 의미가 있다. QCT는 뼈의 모양에 대한 정확한 정보를 제공할 수 있다. 뼈모양을 측정하는 것은 특히 폐경부에서 중요한데 QCT 상은 뼈의 탄력률, 관성의 단면률과 뼈 세기와 관련 있는 다양한 부분을 측정하는데 분석요소를 한정 지을 수 있는 정보를 제공할 수 있다. DEXA는 2차원적인 면적밀도를 측정하는데 반해서 QCT는 3차원적인 용적 밀도(units: mg/cm³)를 측정한다는 장점이 있다.⁽⁹⁾ 또한 QCT의 장 점으로는 압박골절에 따른 추체 내 가골형성이나 골경화에 따른 변형, 관절돌 기의 비대, 모서리의 골돌기체 등을 QCT는 3차 구조에 의해 선택적으로 해면골만을 정량화함으로써 이중 양자 흡수법의 한계를 극복할 수 있다.⁽¹⁰⁾

인진쑥(*Artemisiacapillaris*)은 국화과(Composita) 쑥속(*Artemisia*)에 속하는 다년생 초본으로 냇가나 강가의 모래땅에서 자라며 높이가 약 30~100cm 정도로 곧게 자란다. 인진쑥은 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 등에 분포하고, 겨울철에도 죽지 않고 이듬해 줄기에서 다시 싹이 나온다고 하여 사철쑥 또는 애탕쑥이라 불리며 생약명으로는 인진, 인진호 또는 추호라 불린다. 주요 성분으로는 수분 81.4%, 단백질 5.2%, 지질 0.8%, 당질 4.0%, 섬유질 3.7%, 회분 2.7%와 특수 성분으로 정유성분 등이 있으며 scoparone, scopoletin 및 ficosic acid을 함유하고 있다. 또한 녹엽단백질 源으로서 필수지방산을 많이 함유하고 있어서, 영양학적으로 매우 우수하며 무기질 중 칼슘과 칼륨의 함량이 높은 알칼리성 식품으로, vitamin A와 C의 함량은 일반야채류를 포함한 산야채류 중에서 가장 높은 것으로 알려져 있다.

한방에서 인진쑥은 지혈, 해열, 변비 소화불량, 천식, 부인병, 소염, 진통, 이뇨, 혈압강화, 신경통, 급만성 간염, 황달, 지방간 및 간 기능 개선의 목적으로 많이 이용되어 왔으며 간보호효과, 항균작용, 항암효과, 항산화효과, 항돌연변이효과, 과산화지질에 대한 효과, 혈압강화작용, 당뇨 증상완화 및 고혈당증의 치료효과, 충치 억제효과, 당대사 개선효과 등이 보고되고 있다.

약용 및 식용으로 많이 사용되어 온 인진쑥으로 인체적용시험을 실시하여 골대사 개선 효과에 대한 과학적인 근거자료 및 안전성에 관한 자료를 확보하고 이를 바탕으로 뼈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품을 개발하고자 한다. 뼈건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품은 골감소증이나 골다공증이 점차 많이 발생하는 우리나라의 현실에 비추어 볼 때 국민건강증진과 현대인의 삶의 질 향상에 큰 기여를 할 것이다.

II. 시험약제

1. 시험용 건강기능식품의 정보

시험 건강기능식품		대조 건강기능 식품 (placebo)
의뢰기관, 성분, 용량, 제형	1회 복용량과 용법, 복용횟수	
I (주)알앤엘바이오	3 capsule	시험 건강기능식품과 외관상 구별이 안 되는 동일한 성상의 capsule
I 인진쑥 추출분말	1200mg	
I 400mg/capsule	b.i.d.	

2. 시험용 건강기능식품의 포장

인체적용시험에 사용되는 건강기능식품은 시험의뢰자인 (주)알앤엘바이오에서 공급하되 1일 복용 분량인 6capsules(1회 3capsules, 1일 2회)을 7주 분{6주 분+7일 분(각 Visit별 방문범위의 용량)}인 294capsules씩 2회 포장하여 공급하고 대조 건강기능식품 또한 1일 복용 분량인 6capsules(1회 3capsules, 1일 2회)을 7주 분{6주 분+7일 분(각 Visit별 방문범위의 용량)}인 294capsules씩 2회 포장하여 공급한다.

3. 시험용 건강기능식품의 라벨링

인체적용시험에 사용되는 건강기능식품은 시험의뢰자가 인체적용시험기관의 연구약사에게 공급한다. 시험 건강기능식품 또는 대조 건강기능식품으로 생산되는 제제는 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 동일한 라벨을 부착함으로써 피험자 및 연구자에 대하여 이중맹검(double blind)이 유지되도록 한다.

시험용 건강기능식품 라벨의 기재는 시험군별 차이가 노출되지 않도록 주성분, 일반명 및 제조번호(Lot no.)는 기입하지 않는다. 맹검을 위한 샘플의 라벨링 방법은 다음과 같다.

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. “인체적용시험용”이라는 표시 2. 제품의 코드명: 3. 사용기간 4. 저장방법 5. 제조업자의 상호 6. “인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음”이라는 표시 7. 고유코드: 무작위 배정표에 따라 기록 8. 배분시기: |
|---|

포장 및 라벨링: 시험 건강기능식품과 대조 건강기능식품은 각각 투약 분으로 포장하여 라벨링한다.

III. 피험자

본 인체적용시험에 참여한 피험자 수는 총 70명이며 참여 피험자의 조건은 다음과 같다.

1. 선정기준

- (1) BMD검사결과 골감소증의 소견이 있는 모든 연령의 피험자
(QCT 결과 $-2.5 < \text{lumbar spine의 T-score} < -1.0$)
- (2) 인체적용시험 참여동의서에 서면 동의한 자

2. 제외기준

- (1) 동의서에 서면 동의하지 않은 자
- (2) 중증 간질환자(간경변, 간암), GOT, GPT 수치가 모두 50보다 큰 자
- (3) 중증의 신질환자(급성, 만성 신부전)
- (4) 혈청 칼슘이 12 mg/dl 이상인 자
- (5) 본 연구 3개월 이내에 골관계 질환에 대한 estrogen, corticosteroids, bisphosphonate 또는 다른 의약품의 치료를 받은 자
- (6) 갑상선과 부갑상선 기능에 영향을 주는 질환이 있는 자
- (7) 암으로 진단받고 치료를 요하는 자
- (8) 소화흡수기능에 영향을 주는 질환이 있는 자
- (9) 인지기능장애가 있거나 복약순응도에 영향을 줄 수 있는 자
- (10) 현재 항경련제를 복용하고 있는 자
- (11) 최근 3개월 이내 뇌경색, 뇌출혈 진단 받은 자
- (12) 심근경색, 협심증, 심부전, 부정맥으로 약물을 복용 중인 자
- (13) BMI가 30kg/m^2 이상인 자
- (14) 임신 중이거나 모유를 수유 중인 피험자
- (15) 본 연구에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

3. 목표한 피험자의 수 및 그 근거

본 건강기능식품의 인체적용시험은 통계적인 유효성과 안전성을 확인할 목적으로 진행하며 골밀도검사 상 골감소증 소견이 있는 피험자들을 대상으로 시험 건강기능식품군 35명, 대조 건강기능식품군 35명으로 나누어 총 70명의 피험자를 모으는 것을 목표로 한다. 이는 유효성평가에서 제외되는 피험자의 비율을 16.7%로 가정한 상황이다.

4. 중지 및 탈락기준

시험참가에 동의한 후 본 인체적용시험에 참가하였으나 다음에 해당하는 피험자는 인체적용시험 참여를 중지시킬 수 있다.

- (1) 선정/제외기준 위반
- (2) 피험자의 시험 중지요구
- (3) 이상반응 발생(중대한 이상반응 포함)
- (4) 피험자의 불순응
- (5) 추적관찰 불가
- (6) 건강기능식품의 인체적용시험 연구계획서의 규정위반

(7) 병발질환

(8) 기타 연구자의 판단

중도 탈락한 모든 경우에 있어서 그 원인이 증례기록서와 피험자 진료차트에 자세하게 기록되어야 한다. 중도 탈락하여 시험을 완결하지 못한 피험자들에게도 가능한 평가를 위하여 실험실적 검사 등 유효성 및 안전성을 판단할 수 있는 검사를 실시한다. 또한 이상반응이 발생한 경우에는 그 이상반응의 원인이 밝혀질 때까지 추후 추적관찰이 진행되어야 하며, 이때 결과는 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법에 의거하여 보고되어야 한다. 중대한 이상반응(이상반응 페이지 참조)이 발생하여 중도 탈락하는 경우에는 임상연구심의위원회(IRB)와 시험용 건강기능식품의 인체적용시험 의뢰자에게 즉시 통보한다.

IV. 시험기간

건강기능식품 인체적용시험을 시작한 날로부터 1년이 소요된다.

V. 시험방법

1. 개요

이번 인체적용시험은 double blind, randomized, placebo-controlled, parallel study의 방법으로 시행한다. 서면 동의 후 Visit1(screening)에서 실험실적 검사(일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사), 골밀도검사를 실시하고 무작위 배정(randomized assignment)을 하되, 단순 무작위배정법(simple randomization)을 실시한다.

인체적용시험기간 중에는 시험 건강기능식품 400mg 3캡슐을 하루 두 번씩 경구 투여 하고 대조 건강기능식품을 같은 용량으로 하루 두 번씩 경구 투여한다. 이 기간 동안 피험자들에게 기존의 골대사 기능 개선을 위한 다른 약제의 사용을 금지한다.

투여기간은 12주로 하고 투여 전과 투여 12주 완료 후에 실험실적 검사와 골밀도검사를 각각 실시하여 유효성과 안전성을 평가한다. 또한 매방문(visit3, visit4) 시 피험자가 복용한 시험용 건강기능식품의 캡슐 수로 피험자 복용 순응도를 평가하여 전체 경구 투여량의 80% 미만을 복용한 환자는 PP분석에서 제외시킨다.

2. 무작위배정

(1) 배정비

시험 건강기능식품군과 대조 건강기능식품군 간의 배정비는 1:1로 한다.

(2) 단순 무작위배정법(simple randomization) 실시

(3) 무작위 배정의 시행

SPSS 프로그램(PASW Statistics 17.0)에서 난수생성기와 변수계산의 난수생성을 통해 작성한 난수표를 사용하여 무작위로 배정한다.

(4) 눈가림 해제

인체적용시험 개시 시점에 시험기관은 눈가림 해제방법에 대해 교육받는다. 눈가림코드는 환자의 안전성 사유로 응급상황에서만 해제되어야 한다. 시험자는 눈가림해제 전에 의뢰자에게 연락을 취해야만 한다. 눈가림코드가 해제되면 그 사유를 상세히 문서화하고 증례기록서에 기록해야 한다. 모든 다른 시점에서는 치료와 무작위배정 정보가 기밀 유지되어야 하며 인체적용시험

종료 시까지 시험자/인체적용시험 연구진에게 공개되지 않는다.

3. 시험용 건강기능식품의 투여방법, 투여기간

(1) 투여방법

시험 건강기능식품 400mg 3캡슐을 하루 2번씩 경구 투여한다.

대조 건강기능식품을 같은 용량으로 하루 2번씩 경구 투여한다.

(2) 투여기간

인체적용시험 시작일로부터 12주 간 경구 투여한다.

(3) 배분방법

시험용 건강기능식품은 인체적용시험 연구계획서에서 제시된 과정에 따라 본 인체적용시험에 참여한 피험자에게만 경구 투여된다.

Visit1(screening 방문) 시 피험자 선정/제외기준을 확인하여 Visit2에서 시험 건강기능식품군과 대조 건강기능식품군을 무작위 배정하고 각 군에 해당하는 시험용 건강기능식품을 배분하되 마지막 방문(Visit4)을 제외한 매 방문(Visit2, Visit3) 시에 각각 7주 분{6주 분+7일 분(각 Visit별 방문범위의 용량)}인 294capsules/통을 배분한다.

4. 피험자 복약 순응도(compliance) 확인방법

방문시점 별 피험자 복약 순응도는 경구 투여 캡슐 수를 건강기능식품을 배분 받은 날부터 다음 방문 전날까지 복용해야 할 캡슐 수로 나누어 결정한다.

마지막 방문(Visit4)를 제외한 매 방문(Visit2, Visit3) 시마다 일정량의 시험용 건강기능식품을 배분 받게 되며 그때 배분받은 시험용 건강기능식품의 양은 방문당일부터 다음 방문예정일까지인 6주분의 용량에 방문범위 7일 분의 용량을 추가한 7주 분의 용량이며 Visit2부터 매 방문(Visit3, Visit4) 시 피험자 복약 순응도를 확인한다.

피험자 복약 순응도를 확인하기 위해 매 방문 시마다 피험자는 경구 투여한 캡슐 수를 연구자에게 알려주어야 하며 복용하지 않은 시험용 건강기능식품과 약병은 연구자에게 반납하여야 한다.

5. 관찰항목 및 관찰검사 방법

(1) 피험자 기초정보

Visit1에서 피험자의 성별, 연령, 생년월일 및 병력(현병력, 과거력(수술력 포함)), 생활습관 등 피험자의 기초정보를 자세하게 기록한다.

(2) 신체계측

Visit1, Visit4에서 피험자의 신장, 체중, 비만도(BMI) 등 피험자의 신체정보를 자세하게 기록한다.

(3) 신체검진

Visit1, Visit4에서 일반상태, 피부/점막, 눈, 두부와 이비인후계, 심혈관계, 호흡기계, 소화기계, 간담관계, 비뇨기계, 생식기계, 신경정신계, 근골격계, 혈액립관계, 면역기계, 내분비계, 기타 신체기관 검진을 실시하여 정상 여부를 기록한다.

(4) 활력징후

(5) 실험실적 검사

1) 일반혈액검사

Hemoglobin, Hematocrit, RBC, WBC, Platelet, differential Count(Neutrophil, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Lymphocyte)

2) 혈청생화학검사

Osteocalcin, BALP, ALP, AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP, Glucose, BUN, Creatinine, Total protein, Albumin, Total bilirubin, Total cholesterol, Triglyceride, Sodium(Na), Potassium(K), Calcium(Ca), Phosphate(P), Magnesium(Mg), HBs Ag, Anti-HBs, Anti-HCV

3) 소변검사

DPD/cr ratio, APP. Color, PH, Protein, Glucose, Urobilinogen, Occult Blood, Microscopic Epithelial cell, Ketone, Nitrite, S.G, Microscopic WBC, Microscopic RBC, Bilirubin, Cast, Microscopic Crystal, Bacteria

(6) 임신반응검사(가임기 여성에 한함)

HCG(Screening 시에만 검사)

(7) 골밀도검사(QCT)

(8) 일정 별 관찰항목

1) Visit1 (스크리닝 방문)

- ① 피험자 서면 동의서 작성 및 취득
- ② 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 측정
- ③ 피험자 기초정보 수집
- ④ 흡연/음주 여부 조사
- ⑤ 폐경 여부 설문조사
- ⑥ 병력(현병력/과거력<수술력 포함>) 조사
- ⑦ 신체검진(문진)
- ⑧ 신체계측(신장, 체중, 체성분분석)
- ⑨ 실험실적 검사(일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사)
- ⑩ 임신반응검사
- ⑪ 골밀도검사
- ⑫ 병용약물 확인
- ⑬ 피험자 선정/제외기준 확인

2) Visit2 (0주±7일)

- ① 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 측정
- ② 신체검진(문진)
- ③ 병용약물 확인
- ④ 시험 건강기능식품 및 대조 건강기능식품 배분

3) Visit3 (6주±7일)

- ① 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 측정
- ② 신체검진(문진)
- ③ 피험자 순응도 확인
- ④ 병용약물 확인
- ⑤ 이상반응 여부 조사

⑥ 시험 건강기능식품 및 대조 건강기능식품 배분

4) Visit4 (12주±7일)

- ① 활력징후(혈압, 맥박, 체온) 측정
- ② 피험자 복약 순응도 확인
- ③ 병용약물 확인
- ④ 이상반응 여부 조사
- ⑤ 신체검진(문진)
- ⑥ 신체계측(신장, 체중, BMI)
- ⑦ 실험실적 검사(일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사)
- ⑧ 골밀도검사

6. 유효성 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)

(1) 유효성 평가기준 및 평가방법

1) 평가대상

유효성 평가대상 피험자는 ITT(Intention-To-Treat)분석을 위해 다음의 요건을 충족시켜야 한다.

- ① 시험용 건강기능식품을 한번이라도 투여 받은 모든 피험자
- ② 1회 이상의 유효성 평가변수자료가 확보된 모든 피험자 추가적으로 PP(Per-Protocol)분석을 위해 다음의 요건을 충족시켜야 한다.
 - ① 선정/제외기준에 따른 피험자 선택기준에 적합한 피험자
 - ② 인체적용시험용 건강기능식품을 연속하여 3일분을 초과하여 거르지 않아야 하고, 전체 투여량의 80%이상을 경구 투여한 피험자

2) 1차 유효성 평가변수

1차 유효성 평가변수는 시험용 건강기능식품 투여 전의 기초상태와 투여 12주 후 최종평가지점의 DPD수치를 측정하여 혈중 농도변화를 비교한다.

3) 2차 유효성 평가변수

시험용 건강기능식품 투여 전의 기초상태와 투여 12주 후 최종평가지점의 Osteocalcin, BALP, Ca, Mg수치의 혈중 농도변화와 골밀도검사 결과를 비교한다.

(2) 유효성 및 안전성 자료 평가방법

ITT분석을 주분석으로 하고 PP분석을 보조분석으로 한다. 통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하며 양측검정을 한다. 연속성 자료, 실험실적 검사 결과치, 활력징후 변수들에 대하여는 시험용 건강기능식품 투여 전의 기초상태와 투여 12주 후 최종평가지점의 관측치에 대하여 기술통계량(평균, 표준편차, 최소치, 최대치)을 제시하고 필요 시 T-검정(또는 Wilcoxon's 순위합 검정)을 실시한다. 범주형 자료에 대하여는 분할표를 제공하며 필요 시 카이제곱검정 또는 Fisher's exact test을 실시한다.

필요한 경우 95% 신뢰구간이 계산될 것이다. ITT분석을 위해 최종 유효성 평가자료가 결측된 경우에는 우도근거방법(Likelihood-based Analysis)에 의하여 분석될 것이다.

(3) 피험자 기초자료 분석방법

Visit 1시점에서 측정된 인구통계학적 변수들에 대하여 시험 건강기능식품군과 대조 건강기능식품군 별로 요약하고, 시험군과 대조군의 비교를 위한 검정을 실시한다. 연속형 자료에 대하여는 T-검정(또는 Wilcoxon's 순위합 검정)을 이용하여 검정하고, 범주형 자료에 대하여는 카이제곱검정 또는 Fisher's exact test를 실시한다. 통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하며 양측검정을 한다.

VI. 예측 이상약물반응 및 사용상의 주의사항

1. 예측 이상약물반응

현재까지 보고된 유의한 이상반응 없음

2. 사용상의 주의사항

(1) 다음 환자에게는 투여하지 말 것

현재까지 보고된 유의한 이상반응은 없으나 복용 중 발생한 이상반응과 시험물질의 인과관계가 다음과 같이 평가된 경우는 투여를 중단한다.

‘시험물질과 명확히 관련이 있음’

‘시험물질과 관련이 있다고 생각됨’

(2) 다음 환자에게는 신중히 투여할 것

복용 중 발생한 이상반응과 시험물질의 인과관계가 ‘시험물질과 관련이 있을 가능성이 있음’으로 평가된 경우에는 신중히 투여한다.

(3) 부작용

시험 제재로 사용될 건강기능식품은 천연생약의 추출물로 특별한 부작용은 없을 것으로 예상된다.

(단, 복용 중 이상반응이 생기면 일단 복용을 중지하고 이상반응보고하고 ‘시험물질과 관련이 있음’으로 평가된 경우에는 완전히 복용중지)

(4) 임부에 대한 투여

해당사항 없음

(5) 수유부에 대한 투여

해당사항 없음

(6) 과량투여시의 처치

없음

VII. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법

1. 안전성 평가항목

(1) 이상반응

(2) 활력징후

(3) 실험실적 검사

2. 평가기준

이상반응은 아래와 같이 3단계로 분류하여 평가한다.

- (1) 경증(Mild) - 일상적인 활동을 저해 받지 않음
- (2) 중등증(Moderate)-일상적인 활동을 저해하며, 간단한 처치가 요구됨
- (3) 중증(Severe)-일상적인 활동을 수행할 수 없으며, 고도의 처치가 요구됨

3. 안전성 평가대상 및 평가방법

건강기능식품의 인체적용시험에 사용되는 시험용 건강기능식품을 한번이라도 투여 받은 이후 적어도 한번 이상 방문하여 이상반응 확인, 활력징후 또는 실험실적 검사를 받은 피험자로 그 결과치의 변화 등, 안전성 자료를 평가할 수 있는 피험자를 안전성 평가대상으로 한다.

4. 이상반응의 분류 및 정의

이상반응이란 건강기능식품의 인체적용시험 관찰기간 중에 발생한 질환 및 사고를 비롯하여 피험자의 복지를 저해하는 모든 사건을 일컫는다. 또한 임상적으로 유의하다고 여겨지는 실험실적 검사 결과치나 대상 질환 외의 다른 진단결과도 포함된다. (예를 들어, 계획하지 않은 진단과정이나 치료가 필요하게 되거나 중도탈락을 야기하는 사건 등.)

(1) 이상반응

건강기능식품의 인체적용시험에 사용되는 시험용 건강기능식품을 투여한 후 바람직하지 않고 의도하지 않은 징후, 증상 또는 질병을 말한다. 반드시 해당 건강기능식품과 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

(2) 이상약물반응

- 1) 해당 건강기능식품과의 인과관계를 완전히 배제할 수 없는 이상반응
- 2) 중대한 이상반응/이상약물반응
- 3) 다음에 해당하는 이상반응/이상약물반응을 말한다.
 - ① 사망
 - ② 생명을 위협하는 경우
 - ③ 입원을 요하거나 입원기간을 연장시키는 경우
 - ④ 영구적 불구 또는 기능저하를 초래하는 경우
 - ⑤ 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
 - ⑥ 기타 의학적으로 중요한 경우

5. 시험물질과의 인과관계

시험물질과의 인과관계는 아래와 같이 분류하여 평가한다.

- (1) 명확히 관련이 있음
- (2) 관련이 있다고 생각됨
- (3) 관련이 있을 가능성이 있음
- (4) 관련이 없다고 생각됨
- (5) 명확히 관련이 없다고 생각됨
- (6) 불명

6. 피험자에 대한 보호대책

- (1) 피험자의 시험 참가 시점은 인체적용시험에 대한 설명을 듣고 동의를 받은 때를 기준으로 한다.
- (2) 매 추적방문 때마다 의사에 의한 이학적 검진이 시행되고 본 시험의 시작 이후에 발생하는 이상반응은 기록되어야 한다.
- (3) 시험 참가 동의 이후에 발생하는 모든 이상반응은 약물 투여 여부나 시험약물 과의 관련성 유무에 상관없이 보고하여야 한다.
- (4) 증례기록서에는 이상 반응의 증상 및 징후, 시험약과 관련해서 취해진 조치, 발현 날짜 및 시간, 최대 강도, 경과, 이상반응의 심각성 또는 경중, 결과, 시험약과의 인과관계를 기재하여야 한다.
- (5) 실험실적 검사(일반혈액검사, 혈청생화학검사 및 소변검사)를 시험시작 전과 후에 실시한다. 시험과정 중 심한 부작용을 호소하거나 임상적인 이상을 나타내는 경우 즉시 투여를 중지한다.

VIII. 연구참여자 편성표

성명	소속	연락처
박신철	베데스다병원 정형외과	055-384-9901
김이철	베데스다병원 정형외과	055-384-9901
박권병	베데스다병원 신경외과	055-384-9901

IX. 인체적용시험 수행일정표

항목별	개월											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
피험자모집												
추적관찰												
최종보고서 작성												

X. 인체적용시험 방문과정 일정표

과정		screening	start	Follow up	
		Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
		-2주	0주 (±7)	6주 (±7)	12주 (±7)
항목	세부항목				
정보조사	동의서 작성	V			
	선정/제외기준 확인	V			
	피험자 기초정보	V			
	흡연 및 음주 여부	V			
	폐경 여부	V			
	병력 (현병력/과거력<수술력 포함>)	V			
	병용약물확인		V	V	V
	시험 건강기능식품 및 대조 건강기능식품 배분		V	V	
	피험자 복용 순응도 확인			V	V
	이상반응 여부		V	V	V
기본검사	활력징후	V	V	V	V
	신체검진(문진)	V			V
	신체계측	V			V
	실험실적 검사 (혈액검사, 소변검사)	V			V
	임신반응검사	V			
	골밀도검사	V			V
∅ 각 방문범위는 ±7일로 한다.					

XI. 참고문헌

1. Ahn HS, Kim SH, Lee SS. A Study of Factors Affecting Bone Mineral Density in Korean Adolescents: Anthropometric measurements, Life Style, and Other Environmental Factors. Korean J Nutr. 38(3):242-250.2005
2. Lee MS. Change in bone mineral density and fracture threshold. The Korean Society of Endocrinology. 5(3):232-233.1990
3. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA.285: 785-795.2001
4. Kim DY. Clinical Application of Bone Mineral Density Measurement. Korean J Nucl Med. 38(4):275-281.2004
5. Min-Gul Kim, et al. Effects of Polycan on bone Metabolism in healthy Perimenopausal Women: a 12-week Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study. Kor. J. Clin. Pharm., Vol. 21, No. 4. 2011
6. EunJeong, Effect of soy isoflavone supplementation on bone mineral density in Young women with osteopenia.
7. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series, 843. Geneva: WHO; 1994
8. Cann CE. Quantitative CT for determination of bone mineral density : a review. Radiology . 1988;166:509-22.
9. Young-Lim Shin, Assessment of Bone Mineral Density. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal. Vol.11,No.1.2006.
10. 최웅환 외. Quantitative Computed Tomography(QCT)를 이용한 골밀도 측정법. 대한골대사학회지. Vol. 1, No.1, 1994.

피험자 동의서 설명문

귀하는 골대사 개선효과에 대한 인체적용시험에 참여하시도록 제안을 받았을 겁니다. 이 설명문은 귀하가 이 연구에 참여할 것인지를 결정하는 데 도움이 되도록 정보를 제공하기 위한 것으로서 본 인체적용시험에 대한 전반적인 정보를 포함하고 있습니다. 만일 본 내용 이외에도 궁금한 점이 있거나 혹은 본 내용에 대해 의문이 있을 때에는 담당의사에게 질문하고 의논할 수 있는 기회를 갖게 될 것입니다. 본 인체적용시험에 대한 참여 여부는 귀하가 자발적으로 결정하는 것이며, 만일 참여에 동의하신다면 첨부된 피험자 동의서에 서명하시면 됩니다. 서명한 후에는 본 동의서설명문과 서명한 동의서 사본을 1부씩 가지게 될 것입니다.

1. 인체적용시험의 제목

골감소증에서 인진속 추출분말의 골대사 개선 효과에 관한 연구

2. 인체적용시험의 배경과 목적

본 인체적용시험의 목적은 골밀도검사 상 골감소증 소견이 있는 사람을 대상으로 인진속 추출분말의 경구 투여가 골대사 개선에 효과적인지 여부를 판단하고 평가하는 인체적용시험입니다.

인진속은 한방에서 지혈, 해열, 변비 소화불량, 천식, 부인병, 소염, 진통, 이뇨, 혈압강화, 신경통, 급만성 간염, 황달, 지방간 및 간기능 개선의 목적으로 많이 이용되어 왔으며 간보호효과, 항균작용, 항암효과, 항산화효과, 항돌연변이효과, 과산화지질에 대한 효과, 혈압강화작용, 당뇨증 상완화 및 고혈당증의 치료효과, 충치 억제효과, 당대사 개선효과 등이 보고되고 있습니다.

약용 및 식용으로 많이 사용되어 온 인진속으로 인체적용시험을 실시하여 골대사 개선 효과에 대한 과학적인 근거자료 및 안전성에 관한 자료를 확보하고 이를 바탕으로 뼈 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품을 개발하고자 합니다.

3. 연구방법

이번 인체적용시험은 골밀도검사 상 골감소증 소견이 있으며 이 시험에서 정한 적합한 조건에 맞는 사람을 대상으로 합니다. 또한 귀하의 자발적인 참여의사로 인체적용시험을 시작하게 됩니다.

인체적용시험기간은 약 12주 동안이며 대략 4회 병원을 방문하셔야 합니다. 인체적용시험 시작 전에 의사의 진찰과 문진, 검사, 현재 복용 중인 약물 등에 대한 질문을 받게 되며 인체적용시험 피험자 선정 기준에 적합하면 인체적용시험에 등록이 됩니다.

본 인체적용시험에는 모두 70명의 피험자가 참여할 것입니다. 인체적용시험기간 동안 일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사와 골밀도검사를 첫 방문 시, 마지막 12주 방문 시 시행할 것입니다. 또한 방문 시마다 시행되는 검사는 모두 병원에서 일반적으로 하는 검사이며 귀하에게 어떠한 위험도 없습니다.

세 번째 6주 방문 시와 마지막 12주 방문 시에는 병원에서 배분해드린 시험용 건강기능식품의 경구 투여량을 알려주셔야 하며 복용하지 못하고 남은 건강기능식품은 지난 방문 시 함께 드렸던 약병에 담아 오셔야 합니다.

또한 귀하께서 느끼거나 발생하는 증상이 있을 때에는 즉시 담당 의사에게 알려 주셔야 그에 대한 즉각적인 검사와 치료를 받을 수 있습니다. 인체적용시험 기간 중에 시험용 건강기능식품 외에 다른 약은 복용을 중단하는 것이 좋으며 복용 시에는 반드시 인체적용시험 담당의사와 상의를 하셔야 합니다.

4. 인체적용시험 참여에 따른 혜택

본 인체적용시험에 참여하게 되면 일반혈액검사, 혈청생화학검사, 소변검사와 골밀도검사를 통해 귀하의 기본적인 건강상태를 알 수 있게 됩니다. 그리고 시험용 건강기능식품을 복용함으로써 뼈건강 개선효과를 기대할 수 있습니다. 본 인체적용시험의 일부로 요구되는 시험용 건강기능식품, 검사 등에 대하여 여러분께 비용을 요구하지 않을 것입니다. 또한 인체적용시험에 참여 시 소정의 사례금(교통비) 십 만원을 방문3와 방문4에 오 만원씩 나누어 드립니다.

5. 인체적용시험의 중도 탈락

본 인체적용시험의 참여 결정은 귀하의 의사에 달려 있습니다. 모든 사항은 귀하의 자유의사에 따라서 이루어지며 귀하가 직접 참여를 결정하거나 포기를 결정할 수 있습니다. 또한 인체적용시험 도중에 언제라도 중단을 결정할 수 있으며, 이로 인하여 어떠한 불이익도 받지 않을 것입니다.

다음과 같은 경우에는 여러분이 인체적용시험의 계속 참여를 원하셔도 의료진이 인체적용시험에서 탈락시킬 수 있습니다.

- (1) 인체적용시험에서 허락하지 않은 다른 치료가 추가로 필요할 경우
- (2) 피험자가 담당의사나 연구간호사의 지시를 따르지 않는 경우
- (3) 임신과 수유 중인 경우
- (4) 인체적용시험이 취소되는 경우

6. 주의사항

- (1) 인진쑥 추출분말은 여러 가지 효과가 많고 부작용이 거의 없을 것으로 판단되나 태어나 수유부에 영향이 있을 수 있으므로, 임신 및 수유 중인 여성께서는 이번 인체적용시험에 참여하실 수 없습니다. 또한 인체적용시험 기간 중 임신이 의심되면 담당의사에게 즉시 알려 주셔야 합니다.
- (2) 정해진 방문 일정과 필요한 처치 및 검사가 누락되지 않도록 합니다. 귀하의 치료 반응은 물론 안전성을 확인하기 위해서 중요합니다.
- (3) 의사의 지시에 따라야 하며, 자신의 판단에 따라 마음대로 다른 약물을 복용하거나 발라서는 안됩니다. 부득이하게 약물을 복용하거나 사용하게 될 때에는 복용 전 의사 및 연구간호사에게 복용에 대해 확인을 하셔야 합니다. 또한 사용한 약물에 대해서는 처방전 등 약물에 대한 정보를 제출하셔야 합니다.
- (4) 의사가 처방한 건강기능식품 복용 중에 귀하께서 느끼는 모든 증상에 대해서는 반드시 의사 및 연구간호사에게 알려주셔야 합니다.

7. 피해발생 시 보상대책

인체적용시험 기간 중에 베테스다병원은 여러분의 안전을 지키고자 최선의 노력을 다할 것입니다. 만일 귀하가 본 인체적용시험에 참여하다가 신체적 질병이나 상해를 입게 되었다면 의뢰사인 ㈜알앤엘바이오는 이를 치료하기 위한 적절한 의료비용을 지불할 것입니다. 그러나 이 때 그 질병이나 상해의 원인은 명백하게 연구용 건강기능식품의 복용에 의한 것임이 확인되어야 할 것입니다. 또한 일시적 통증 혹은 쉽게 치료될 수 있는 정도의 손상이 아니라 지속적인 장애 등이 남는 보다 심각한 손상에 대해서만 보상될 것입니다. 보상의 수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수로, 대한민국의 법정에서 유사 손상에 대해 일반적으로 지급하는 것과 동일할 것입니다.

그러나 귀하가 인체적용시험계획서의 내용에서 이탈함으로써 발생하는 손상이나 본인의 부주의에

의해 생긴 손상에 대해서는 보상하지 않습니다. 본 인체적용시험 외에 다른 질병으로 인한 치료에 소요되는 비용은 귀하께서 직접 지불하셔야 합니다.

8. 비밀보장

인체적용시험의 일부로 귀하의 개인기록, 의료기록, 검사결과, 건강정보 등을 수집하게 됩니다. 이러한 정보는 인체적용시험 담당의사와 담당 직원이 사용하며 인체적용시험을 수행하기 위하여 본 시험연구를 감독하는 정부기관과 병원 내 인체적용시험 심사위원회도 여러분의 정보를 볼 수 있습니다. 동의서에 여러분이 동의를 한다는 것이 이러한 정보의 사용을 허락한다는 뜻입니다.

하지만 여러분의 신원을 파악할 수 있는 기록은 비밀로 보장될 것이며 건강 정보는 귀하의 성명을 가린 채로 제공되기 때문에 자료 상으로 귀하가 어디에 사는 누구인지, 어떤 사람인지 알 수 없습니다. 또한 인체적용시험의 결과가 출판될 경우에도 귀하의 신상정보는 비밀상태로 유지될 것입니다.

귀하께서 언제라도 인체적용시험 담당자에게 통보하여 동의를 철회할 수 있습니다. 여러분이 동의하신 것을 철회하면 인체적용시험 담당자는 귀하의 의학 정보를 더 이상 사용할 수 없습니다. 하지만 동의 철회와 더불어 인체적용시험 참여 자격을 상실하며 더 이상 본 인체적용시험에서 제공하는 시험용 건강기능식품을 받으실 수 없습니다.

9. 인체적용시험 관련 직원 및 책임자

인체적용시험에 관한 질문에 인체적용시험 담당의사 또는 인체적용시험 담당 직원이 답변을 할 것입니다. 인체적용시험 기간 중 본인이나 법정대리인이 언제라도 질문을 하실 수 있으며 모든 의문점에 대하여 연락을 주시기 바랍니다. 부작용이 발생하였을 경우에도 즉시 연락을 주십시오.

인체적용시험 연구담당자 연락처:

1. 담당의사: 박신철 과장
소속: 양산 베데스다병원 정형외과
(626-130) 경남 양산시 신기동 396-2)
전화번호: 055-384-9901

(5) 피험자 보상 규약

피험자 보상에 대한 규약

1. 보상 원칙

- ① 연구책임자는 피험자의 신체적인 손상(사망 포함)에 대해 보상한다.
- ② 손상의 원인이 인체적용시험 참여로 인해 발생하였을 때 피험자에게 보상한다.
- ③ 인체적용시험용 건강기능식품의 사용으로 이상반응이 발생하였을 때에는 피험자에게 보상한다.

2. 비보상 원칙

- ① 연구책임자의 후원 하에 집행되지 않았거나 인체적용시험용 건강기능식품이 아닌 제공하지 않은 의약품이나 식품으로 발생한 이상반응에 의한 손상
- ② 인체적용시험용 건강기능식품 적응증에 대한 효과 또는 혜택을 제공하지 않은데 대한 보상
- ③ 서로 합의한 인체적용시험 연구계획서에서 이탈함으로써 야기된 손상
- ④ 피험자의 부주의로 초래된 손상

3. 보상평가 기준

보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야 하며, 한국의 법정에 의해 유사 손상들에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다. 보상수준에 대해서 피험자와 연구책임자 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 통해 보상수준을 결정하고 이에 따라 보상한다.

(주)알앤엘바이오

CRF Version 1.0	건강기능식품	Page 1
-----------------	--------	-----------

증례기록서

(Case Report Form)

골감소증에서 인진쑥 추출분말의
골대사 개선 효과에 관한 연구
(이중맹검, 무작위배정, 위약-대조군, 평행군 연구)

*Effects of Artemisia capollaris herba
On bone metabolism in osteopenia
(double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel study)*

증례기록서 기입 시 주의사항

- 검정색 볼펜을 사용하여 읽기 쉽도록 명확하게 한 칸에 한 자씩 쓰십시오.
- 만약 어떤 검사가 시행되지 않았거나, 적절치 않은 경우에는 이러한 내용을 주어진 칸에 알맞게 표기하십시오.(예. 시행되지 않음=ND(Not Done), 적절치 않거나 해당사항이 없는 경우 =NA(Not Applicable), 모름=UK(Unknown), 샘플관이 깨졌거나 샘플이 용혈되었다는 등의 설명이 필요한 경우에는 그 사항을 기록하십시오.
- 생년월일이 1968년 3월 10일이라면, 다음과 같이 기록되어야 합니다.
생년월일:

1	9	6	8	/	0	3	/	1	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(yyyy/mm/dd)

- 기재사항을 수정할 경우에는 한 줄을 긋고 가능한 한 가까운 곳에 수정내용을 기입한 후, 수정한 사람의 initial을 쓰고, 수정일을 기록한 다음 서명하여 주십시오. 수정액은 사용하지 않아야 합니다.

예) X Y Z

A	B	C
---	---	---

사유: error

KSY 00/11/23 서명

기록되었던 이전 정보를 지우지 마십시오. 이전 기록은 읽을 수 있어야 합니다.

- 문구나 문장이 필요한 경우에는 철자가 분명하게 또박또박 기록하여 주십시오. 특히 이상 반응을 기술하는 경우 등에 있어서 잘 알려진 의학용어를 사용하여야 합니다.
- 약품명은 상품명으로 명확하게 기록하여 주십시오. 상품명은 모를 경우 정확한 일반명(성 분명)을 기록하여야 합니다.
- 인체적용시험이 중단되거나 종료된 경우 시험종결 sheet 항목에 대한 기록이 완료되어야 합니다.
- 선행/병용약물 및 이상반응 페이지는 기재할 내용이 없을 시에도 꼭 첫 페이지를 작성하여 없음을 표시합니다.
- 중대한 이상반응이 발생할 경우 중대한 이상반응 보고서를 작성하여 모니터에게 24시간 이내 (이상반응을 안 시점)에 전화나 Fax를 사용하여 보고합니다. 증례기록서(CRF)의 이상 반응 양식에 기록된 정보와 중대한 이상반응 보고서 양식의 기록이 일치하여야 합니다.

인체적용시험 방문과정 일정표

과정		screening	start	Follow up	
		Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
		-2주	0주 (±7)	6주 (±7)	12주 (±7)
항목	세부항목				
정보조사	동의서 작성	V			
	선정/제외기준 확인	V			
	피험자 기초정보	V			
	흡연 및 음주 여부	V			
	폐경 여부	V			
	병력 (현병력/과거력<수술력 포함>)	V			
	비용약물확인	V	V	V	V
	시험 건강기능식품 및 대조 건강기능식품 배분		V	V	
	피험자 복약 순응도 확인			V	V
	이상반응 여부			V	V
기본검사	활력징후	V	V	V	V
	신체검진(문진)	V			V
	신체계측	V			V
	실험실적 검사 (혈액검사, 소변검사)	V			V
	임신반응검사	V			
	골밀도검사	V			V
∅ 각 방문범위는 ±7일로 한다.					

CRF Version 1.0 Visit1(screening)	Subject Initial	Scr-No.	Random-No.	Visit date	Page 9
	_____	S - _____	R - _____	____/____/____	

신체검진(Physical Examination)		" Not Done		
코드	신체기관/부위	검사결과		
		정상	비정상	검사안함
1	일반상태(General appearance)
2	피부/점막(Skin and Mucous membranes)
3	눈(Eyes)
4	두부/이비인후계(Head, Ears, Nose, Throat)
5	심혈관계(Cardiovascular system)
6	호흡기계(Respiratory system)
7	소화기계(Gastrointestinal system)
8	간담관계(Hepatobilliary system)
9	비뇨기계(Urinary system)
10	생식기계(Reproductive system)
11	신경정신계(Neuropsychiatry system)
12	근골격계(Musculo-skeletal system)
13	혈액림프계(Blood and Lymphatic system)
14	면역기계(Immune system)
15	내분비계(Endocrine system)
16	기타(Others)
비정상인 경우 소견을 구체적으로 기술해 주십시오.				
코드	내용			
※ 주의: 만일 비정상적인 상태가 관찰된다면, 의학적 병력과 상호 대조해 보고, 피험자 선정기준을 만족하는지 확인하십시오.				

CRF Version 1.0 Visit1(screening)	Subject Initial <input type="text"/>	Scr-No. S - <input type="text"/>	Random-No. R - <input type="text"/>	Visit date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Page 11
--------------------------------------	---	-------------------------------------	--	--	------------

혈청생화학검사					" Not Done		
항목	결과	단위	정상	비정상	임상적 유의 한 이상	비고	재검 결과
Total cholesterol		mg/dl		
ALP		IU/L		
AST(GOT)		IU/L		
ALT(GPT)		IU/L		
r-GTP		IU/L		
BUN		mg/dl		
Creatinine		mg/dl		
Sodium(Na)		meq/L		
Potassium(K)		meq/L		
Calcium(Ca)		mg/dl		
Phosphate(P)		mg/dl		
Magnesium(Mg)		mg/dl		
Albumin		g/dl		
HBs Ag				
Anti-HBs		mIU/ml		
Anti-HCV				

CRF Version 1.0 Visit1(screening)	Subject Initial □□□□□□	Scr-No. S - □□□□	Random-No. R - □□□□	Visit date □□□□□□ / □□□□ / □□□□	Page 12
--------------------------------------	---------------------------	---------------------	------------------------	------------------------------------	------------

소변검사		" Not Done					
항목	결과	단위	정상	비정상	임상적 유의한 이상	비고	재검결과
D P D / c r ratio		nMol/mMol creatinine		
APP. Color				
PH				
Protein				
Glucose				
Urobilinogen				
Occult Blood				
Microscopic Epithelial cell		HPF		
Ketone				
Nitrite				
S.G				
Microscopic WBC		HPF		
Microscopic RBC		HPF		
Bilirubin				
Cast		LPF		
Microscopic Crystal				
Bacteria				

(7) 연구비 사용 계획서

1. 임상시험 예상소요경비(안)				
연구제목 : 골감소증에서 인진쑥 추출분말의 뼈건강 개선효과에 관한 연구				
단위 : 원				
항 목	단 가	금 액	구 분	
총 계		3,578,318	68,787,906	
인건비 (원고료)	시험 책임자	1,000,000	6,000,000	6개월
	공동연구자	666,667	4,000,000	6개월
	전담 보조원	600,000	3,600,000	6개월(간호/행정/약제/검사 부문 직원의 제 수당)
검사비		511,651	35,815,570	세부내역 별도 첨부(스크리닝 대상자 30%추가한 금액)
실험비(별도산정)		0	0	제품 구입비 및 실험 재료비
지원 사례금		100,000	7,000,000	지원자에게 지급
회의비		100,000	800,000	다과, 식비, 프리젠테이션 준비 등
외부 자문비		100,000	500,000	통상 1인당 100,000원 내외로 산정
문헌 및 자료처리비		100,000	500,000	문헌 구입비(전산처리, 소프트웨어구입 포함)
인쇄비		100,000	500,000	신청서, 피험자 설문지, 보고서 등
출장비		100,000	500,000	임상시험 수행의 직접 경비만 산정
심사비		100,000	400,000	
기타 잡비		100,000	200,000	
소계1		3,578,318	59,815,570	
임상시험운영위원회 간접비		총액의 5%	2,990,779	총액의 5%를 임상시험운영위원 간접비로 산정
개발 보전비		총액의 10%	5,981,557	총액의 10%를 개발 보전비로 산정
소계2			8,972,336	
※산출근거:[베데스다병원 임상시험센터규정]-[별표3 임상시험비산정지침]				
※원무과,2012.6.30.				

(8)피험자 모집 문건

<골감소증 대상 인체적용시험 피험자 모집>

골감소증에서 인진쑥 추출분말의 골대사 개선 효과를 평가하려고 아래와 같이 피험자를 모집하고자 합니다.

◆ 칼슘과 칼륨의 함량이 높은 알칼리성 식품으로, vitamin A와 C의 함량이 일반야채류를 포함한 산야채류 중에서 가장 높은 것으로 알려져 있는 인진쑥 추출분말에 대하여 인체적용시험을 통해 뼈건강 개선 효과에 대한 과학적인 근거자료 및 안전성에 관한 자료를 확보함으로써 뼈건강 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품을 개발하고자 합니다.

연구제목: 골감소증에서 인진쑥 추출분말의 뼈건강 개선 효과에 관한 연구

1. 참여대상:

- 골밀도검사결과 골감소증의 소견이 있는 모든 연령의 피험자

※제외: 갑상선과 부갑상선 기능에 영향을 주는 질환이 있는 분, 간장질환, 신장질환이 있는 분, 인지기능장애가 있는 분, 임신 또는 모유수유 중인 분

2. 방문횟수: 12주 동안 4회 방문

3. 참여에 따른 혜택:

- 정형외과전문의의 진료 및 검진(혈액·뇨검사 및 골밀도검사)
- 인체적용시험용 건강기능식품 제공
- 소정의 교통비

4. 참여방법:

본 연구에 참여하고자 하시는 분은 아래의 번호로 연락주십시오.

- 연락처: 베데스다병원 소화기내과
- 책임연구자: 최병진 과장
- 담당자: 장희진 연구간호사(010-0000-0000)



베 데 스 다 병 원 장

다. 인체적용시험용 시제품(사철쭉 원료) 생산

사철쭉 원재료는 경동시장에서 경북 영천에서 2012년 6월에 생산된 300kg을 구입하였으며, 그 원재료 150kg을 사용하여 표준화된 제조공법에 따라 제조하여 추출분말 원료 44kg을 수득하였다. 그 원료를 기준/규격 시험용으로 3kg을, 시제품 안정성 시험용으로 9kg으로 사용하였으며 나머지는 인체적용시험용으로 냉장 보존하였다.

라. 지표성분 분석법 Validation(공인기관 의뢰)

건강기능식품용 기능성 원료를 개별인정형 원료로 신청 시 그 원료의 기능(지표)성분에 대한 분석방법을 설정하여 제출하여야 하며(건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정 제14조 제 5호, 식품의약품 안전청 고시 제2011-34호), 제품 생산 시 원료 품질 확인에도 사용하여야 한다. 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전, 대한약전에 제시된 공인된 시험방법이 있으면 해당 시험방법을 사용할 수도 있지만, 우리 사업단은 제 2-1 세부기관인 충남대에서 설정한 방법을 사용하고자 한다. 따라서 충남대에서는 설정한 시험법을 식품의약품안전청에서 제시한 항목에 맞춰 밸리데이션을 진행하였고, 주관기관인 알앤엘바이오는 이 시험방법을 식품의약품안전청에서 지정한 검사기관인 한국기능식품연구원에 제시하고 분석법 validation을 의뢰하였다. 한국기능식품연구원은 분석 확인한 결과 본 연구에서 정립한 시험방법은 인진쭉 추출분말 중 Scoparone의 정량에는 무리가 없다고 하였다.

(1)분석법 Vaidation 결과(한국기능식품연구원).

4. 검토

본 시험법검토는 인진쭉추출분말 중 scoparone의 정량 분석 가능여부를 확인하기 위해 진행되었다.

제공된 시험법에 따라 Shiseido Capcell PAK MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 실험을 진행하였으나 235nm에서 크로마토그램의 baseline이 안정하지 않아 스펙트럼 중 높은 파장값을 보이는 345nm에서의 추가 검토를 진행하였고 345nm에서 baseline이 안정함을 확인할 수 있었다. 그러나 실제 시험용액에서의 scoparone peak이 확실히 분리되지 않아 정확한 값을 정량하는데 무리가 있을 것으로 사료되어, 기존 (주)알앤엘 바이오에서 분석한 컬럼인 Sunfire C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)으로 추가 분석을 진행하였다. 그 결과 기존 Shiseido Capcell PAK MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 컬럼에서 분리되지 않았던 scoparone peak이 확연히 분리되어 시료의 반복성, 직선성, 재현성 시험법 검토를 진행하였다.

반복실험에 따른 정밀성을 확인하기 위하여 50 mg씩 3개의 샘플을 취하여 실험한 결과 235nm에서 시료 중 scoparone의 함량은 0.516±0.008 %, 345nm에서는 0.509±0.003 %로 정밀성을 확인할 수 있었다.

시료 채취량(40~60 mg)에 따른 편차는 나타나지 않았으며(235nm에서 0.515±0.006 %, 345nm에서는 0.517±0.008 %), 표준물질과 시료의 scoparone의 peak이 모두 약 31~32분대에서 동일하게 검출되었고, spectrum도 일치하여 시료 중 scoparone을 확인하였다.

또한, 일자간 재현성을 확인하기 위해 일자를 달리하여 반복성 실험과 다른 날짜에 세 번의 반복실험을 한 재현성 실험결과를 통하여 scoparone의 함량이 235nm에서 0.514±0.014 %, 345nm에서 0.517±0.011 % 이었으며, 반복성과 직선성 실험 결과와 비교하여 볼 때 재현성을 확인할 수 있었다.

위의 모든 실험결과를 종합하여 볼 때 retention time은 약 31~32분대 동일하게 분석이 되었으며, 분석값의 평균과 표준편차가 235nm에서 0.515±0.009 %, 345nm에서 0.514±0.008 %으로 일자간의 차이와 분석파장 간의 차이도 거의 없는 것으로 확인되어 실험의 정밀성이 확인되었다.

따라서 본 시험법으로 분말 상태인 인진쭉추출분말 중 scoparone의 정량에는 무리가 없을 것으로 판단된다.

마. 사철쑥 원료의 기준/규격 설정

(1) 시험 목적

사철쑥 추출분말의 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청(KFDA)을 목적으로 기준·규격 및 시험방법에 관하여 검토 하였다 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(2006.08.29) 개정고시」.

(2) 시험 물질 정보

(가) 명칭 : 인진쑥추출분말(학명:Artemisiae capillaris herba)

(나) 수량 : 3.0kg

(다) 순도 : 인진쑥추출분말 100%

(라)보관조건 : 실온(냉암소 보관), 사용 후 밀봉보관

(3) 사철쑥추출분말 원료의 기준·규격

(가) 원료. 성분 명 : 인진쑥추출분말(100%), 학명: Artemisiae capillaris herba)

(나) 정의 :

건조된 인진쑥의 잎, 줄기로부터 물과 주정을 혼합한 용매로 추출하여 여과한 가용성 인진쑥 성분을 농축하여 동결 건조한 분말을 말한다.

(다) 규격 :

- ① 색상: 녹색색의 분말로서 이미, 이취가 없어야 한다.
- ② 수분(%): 7.0 이하이어야 한다.
- ③ 세균수(CFU/g): 100 이하이어야 한다.
- ④ 대장균군: 음성이어야한다.
- ⑤ 납(mg/kg): 3 이하이어야 한다.
- ⑥ 비소(mg/kg): 5 이하이어야 한다.
- ⑦ 카드뮴(mg/kg): 2 이하이어야 한다.
- ⑧ 수은(mg/kg): 0.2 이하이어야 한다.
- ⑨ Scoparone(mg/g): 6.2 mg/g (80-120%) 이어야 한다.

(라) 시험방법

- ① 수분 : 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 1) 수분 (1) 건조 감량법 (상압 가열 건조법)에 따라 시험한다.
- ② 세균 수 : 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 7. 미생물시험법 2) 세균 수에 따라 시험한다.
- ③ 대장균군 : 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 7. 미생물시험법 5) 대장균군에 따라 시험한다.
- ④ 납 : 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 5. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP 법에 따라 시험한다.
- ⑤ 비소: 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 5. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP 법에 따라 시험한다.
- ⑥ 카드뮴: 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 5. 유해성금속시험법 2) 측정 (2)

ICP법에 따라 시험한다.

⑦ 수은 : 건강기능식품공전 제 5. 일반성분시험법 5. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP법에 따라 시험한다.

⑧ Scoparone함량 : 본 실험에서 정립한 HPLC 분석방법에 따라 분석하였다.

(마) 개별 기준·규격의 설정근거

① 성상

1) 설정기준: 인진쑥추출분말의 고유의 특성을 잘 나타낼 수 있도록 맛은 녹갈색의 약간 쓰고 향긋한 분말로 설정하였다.

2) 설정근거: 육안으로 확인할 수 있는 색 및 맛, 향으로 특징지을 수 있는 부분으로 설정하였다.

② 수분

1) 설정 기준: 7.0 이하이어야 한다. 로 설정하였다.

2) 설정근거:

인진쑥추출분말은 제조공정상 원료를 세척, 탈수한 후 추출, 여과, 농축, 건조, 멸균한 분말로서 수분은 건조분말의 품질유지를 위한 기본지표로 설정하였다.

시료 3롯트에 대한 수분 분석결과 5.73-6.35%의 범위로 전체평균±전체 표준편차 6.02±0.213%로서 5.88-6.16%에 해당되었으나, 표준편차의 신뢰성을 보정하기 위해 롯데별 평균과 표준편차를 이용한 95% 신뢰구간에서 평균상한치는 6.16%에 해당되었다.

규격은 최초 생산한 인진쑥추출분말의 수분함량을 7.0%이하로 관리하고 있으며, 시료 3롯트의 실제 분석결과 95% 신뢰구간에서 7.0%이하로 설정하는 것이 바람직하며, 현행 건강기능식품공전상 본 제품과 유사한 제조공정을 가진 인삼농축액분말에서는 8.0%이하로 관리하고 있는 점, 본 인진쑥추출분말의 유통기한을 24개월로 설정할 계획이기 때문에 흡습에 의한 유통과정 중 안정성을 고려하여 7.0이하로 설정하였다.

표 21. 인진쑥추출분말의 롯데 별 수분분석 결과 (단위: %)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	6.00	6.05	5.73	6.02±0.213
2	6.12	6.23	6.05	
3	5.96	5.69	6.35	
Mean±SD	6.027±0.083	5.990±0.275	6.043±0.310	

표 22. 95% 신뢰구간에서 롯데별 수분 함량 범위 분석 결과 (단위: %)

구분	N	평균	표준편차	상한치
Lot 1(120708)	3	6.027	0.083	6.121
Lot 2(120820)	3	5.990	0.275	6.301
Lot 3(121119)	3	6.043	0.310	6.394
Total	9	6.020	0.213	6.16

③ Scoparone 함량

- 1) 설정 기준: 6.2mg/g(80-120%) 이어야 한다.
- 2) 설정근거:

인진쑈추출분말은 제조공정상 원료를 세척, 탈수한 후 추출, 여과, 농축, 건조, 멸균한 분말로서 표준화를 통한 scoparone 성분이 일정하게 유지되도록 관리되고 있다. 시료 3롯트에 대한 Scoparone 분석 결과 5.1-7.2의 범위로 전체평균±전체표준편차 6.2±0.88로서 5.59-6.74에 해당되었으나(표 23), 표준편차의 신뢰성을 보정하기 위해 롯트 별 평균과 표준편차를 이용한 95% 신뢰구간에서 평균상한치는 6.74(mg/g)에 해당 되었다(표 24).

규격은 95% 신뢰구간의 전체평균±전체표준편차 6.2±0.88을 scoparone 함량을 기준함량으로 설정하였으며. 기준함량의 80-120%로서 4.96-7.4mg/g로 범위를 설정하였다. 또한 95% 신뢰구간의 평균 하한치 5.59mg/g, 평균 상한치 6.74mg/g보다 약간의 차이는 있지만 표준품 특성상 미량 칭량에 따른 측정오차 발생가능성 및 천연물 원료의 특성상 산지와 계절에 따른 기능성분 함량오차 발생가능성을 감안하여 6.2mg/g (80-120%)로 설정하였다.

표 23. 인진쑈추출분말의 롯트별 scoparone 함량 분석 결과, (단위: mg/g)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	5.25	7.2	6.29	6.163±0.88
2	5.09	7.16	6.12	
3	5.16	7.18	6.02	
Mean±SD	5.17±0.08	7.18±0.02	6.14±0.14	

표 24. 95% 신뢰구간에서 롯트별 scoparone함량 범위 분석 결과, (단위: mg/g)

구분	N	평균	표준편차	상한치
Lot 1(120708)	3	5.17	0.08	5.3
Lot 2(120820)	3	7.18	0.02	7.2
Lot 3(121119)	3	6.14	6.02	6.3
Total	9	6.16	0.88	6.74

④ 세균 수

- 1) 설정 기준: 100 CFU/g이하 이어야 한다. 로 설정하였다.
- 2) 설정근거:

제조공정상 인진쑈추출분말은 세척, 탈수한 후 주정 함유 용매를 사용하여 추출하며, 위생적으로 여과, 농축, 분말, 멸균한 분말로서 별도 기준 없이도 세균수 관리가 가능할 것으로 예상되며, 시료 3롯트에 대한 세균수 분석결과에서는 평균 20.9±12.7의 적은량이 검출되었다(표 25). 위생관리 및 제조공정 중 발생될 수 있는 2차 오염을 방지하기 위하여 건강기능식품공전상 유사한 인삼농축액분말의 100 CFU/g이하 기준을

참고하여 100 CFU/g이하로 설정 하였다.

표 25. 인진쑥추출분말의 롯데별 세균 수 분석 결과 (단위:g당)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	10	15	40	20.9±12.7
2	8	10	40	
3	15	20	30	
Mean±SD	11±3.6	15±5	36.7±5.8	

⑤ 대장균군

- 1) 설정근거: 음성이어야 한다. 로 설정하였다.
- 2) 설정근거:

대장균군은 위생관리 및 제조공정 중 발생될 수 있는 2차 오염을 방지하기 위하여 설정하였다. 규격은 식품위생을 관리하는 기본 품질지표로서 반드시 음성으로 관리되어야 하므로 음성이어야 한다. 로 설정하였다.

표 26. 인진쑥추출분말의 롯데별 대장균군 분석 결과

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	음성	음성	음성	음성
2	음성	음성	음성	
3	음성	음성	음성	
Mean±SD	음성	음성	음성	

⑥ 납

- 1) 설정 기준: 3이하이어야 한다. 로 설정하였다.
- 2) 설정근거

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(2007)의 중금속 규격을 참고로 인진쑥추출분말의 한국인 전체 평균체중 60kg 성인 1인 1일 섭취량에 따른 규격 상한선을 환산하였다.

납의 성인 일일 노출 허용량은 0.18ug/kg b.w/day×60kg b.w(성인 평균 체중)=10.8ug/day이며, 원료의 최대섭취량은 2.4g/day로서 환산값은 4.5mg/kg 이었으나, 시료 3롯데에 대한 분석결과 환산값은 2.5mg/g되었고, 납의 성인 일일 노출 허용량은 10.8ug/g 미만으로 허용되어야 하므로, 환산값 보다 낮은 3mg/kg 이하로 설정하였다.

표 27. 인진쑥추출분말의 롯데별 납 분석 결과 (단위:mg/kg)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	0.1	0.08	0.09	0.1±0.01

2	0.1	0.09	0.1	
3	0.09	0.08	0.1	
Mean±SD	0.1±0.006	0.1±0.006	0.1±0.006	

⑦ 총 비소

1) 설정 기준: 5 이하이어야 한다. 로 설정하였다.

2) 설정근거

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(2007)의 중금속 규격을 참고로 인진쑥추출분말의 한국인 전체 평균체중 60kg 성인 1인 1일 섭취량에 따른 규격 상한선을 환산하였다.

비소의 성인 일일 노출 허용량은 2.5 ug/kg b.w./day×60kg b.w.(성인평균체중)=150 ug/day이며, 원료의 최대 섭취량은 2.4g/day로서 환산 값은 62.5mg/kg 이었으나, 시료 3롯트에 대한 분석결과 환산 값은 2.5mg/g되었고, 총비소의 성인 일일 노출 허용량은 150ug/g 미만으로 허용되어야 하므로, 향 후 캡셀 제형 또는 음료의 형태로 판매될 가능성을 고려하여 현행 건강기능식품공전 상 캡셀제품 총 비소 규격인 1.5 mg/kg과 음료의 중금속 규격인 5mg/kg을 참고하여 기준을 환산값 보다 낮은 5 mg/kg으로 설정하였다.

표 28. 인진쑥추출분말의 롯데 별 총 비소 분석 결과 (단위: mg/kg)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	0.09	0.1	0.09	0.1±0.01
2	0.09	0.1	0.1	
3	0.1	0.1	0.09	
Mean±SD	0.09±0.01	0.1±0	0.09±0.01	

⑧ 카드뮴

1) 설정 기준: 2이하이어야 한다. 로 설정하였다.

2) 설정근거

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(2007)의 중금속 규격을 참고로 인진쑥추출분말의 한국인 전체 평균체중 60kg 성인 1인 1일 섭취량에 따른 규격 상한선을 환산하였다.

카드뮴의 성인 일일 노출 허용량은 0.05ug/kg b.w/day×60kg b.w(성인 평균체중)=3ug/day이며, 원료의 최대섭취량은 2.4g/day로서 환산값은 1.25mg/kg 이었으나, 시료 3 롯트에 대한 분석 결과 환산 값은 1mg/g되었고, 카드뮴의 성인 일일 노출 허용량은 3ug/g 미만으로 허용되어야 하므로, 환산 값 보다 낮은 2mg/kg 이하로 설정하였다.

표 29. 인진쑥추출분말의 롯데별 카드뮴 분석 결과 (단위:mg/kg)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	0.04	0.04	0.05	0.04±0.01
2	0.04	0.04	0.05	
3	0.04	0.04	0.05	
Mean±SD	0.04±0	0.04±0	0.05±0	

⑨ 총 수은

1) 설정 기준: 0.2이하이어야 한다. 로 설정하였다.

2) 설정근거

건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(2007)의 중금속 규격(표 32)을 참고로 인진쑥추출분말의 한국인 전체 평균체중 60kg 성인 1인 1일 섭취량에 따른 규격 상한선을 환산하였다.

수은의 성인 일일 노출 허용량은 $0.035\mu\text{g}/\text{kg b.w}/\text{day} \times 60\text{kg b.w}$ (성인 평균체중)= $2.1\mu\text{g}/\text{day}$ 이며, 원료의 최대섭취량은 $2.4\text{g}/\text{day}$ 로서 환산 값은 $0.875\text{mg}/\text{kg}$ 이었으나, 시료 3롯트에 대한 분석결과 환산 값은 $0.125\text{mg}/\text{g}$ 되었고, 총수은의 성인 일일 노출 허용량은 $2.1\mu\text{g}/\text{g}$ 미만으로 허용되어야 하므로, 환산 값보다 낮은 $0.2\text{mg}/\text{kg}$ 이하로 설정하였다.

표 30. 인진쑥추출분말의 롯트별 총 수은 분석 결과 (단위:mg/kg)

시험샘플 시험반복수	Lot No. 1 (120708)	Lot No. 2 (120820)	Lot No. 3 (121119)	Total Mean ± Total SD
1	0.002	0.007	0.006	0.005±0.002
2	0.002	0.005	0.006	
3	0.002	0.005	0.006	
Mean±SD	0.002±0	0.006±0.001	0.006±0	

표 31. 인진쑥추출분말의 중금속 종합 분석 결과 (단위:mg/kg)

시험 항목	회	업체자체결과			Total Mean±SD	공인기관 분석결과	규격 (mg/kg)	1일섭취 허용량 (ug/day)
		Lot1	Lot2	Lot3				
납 (mg/kg)	1회	0.1	0.08	0.09	0.1±0.01	0.08	3	10.8
	2회	0.1	0.09	0.1				
	3회	0.09	0.08	0.1				
	Mean	0.10	0.1	0.10				
	SD	0.006	0.006	0.006				
카드뮴 (mg/kg)	1회	0.04	0.04	0.05	0.04±0.01	0.04	2	3
	2회	0.04	0.04	0.05				
	3회	0.04	0.04	0.05				
	Mean	0.04	0.04	0.05				
	SD	0	0	0				
총비소 (mg/kg)	1회	0.09	0.1	0.09	0.1±0.01	0.09	5	150
	2회	0.09	0.1	0.1				
	3회	0.1	0.1	0.09				
	Mean	0.09	0.10	0.09				
	SD	0.01	0	0.01				
총수은 (mg/kg)	1회	0.002	0.007	0.006	0.005±0.002	0.002	0.2	2.1
	2회	0.002	0.005	0.006				
	3회	0.002	0.005	0.006				
	Mean	0.002	0.006	0.006				
	SD	0	0.001	0				

표 32.. 건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정(2007)의 중금속 규격

항 목	권장규격
납	< 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day
총비소	< 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day
카드뮴	< 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day
총수은	< 0.035 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day

표 33. 인진쑥 추출분말의 중금속 별 규격 상한 값 환산 결과

항목	잠정1일섭취허용량 및 체중(한국인 전체평균체중)에 의한 규격 상한값 환산
납	0.18($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) ¹⁾ × 60(kg) / 2.4(g) = 4.5($\mu\text{g}/\text{g}$) = 4.5(mg/kg)
	0.1($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 2.5($\mu\text{g}/\text{g}$) = 2.5(mg/kg)
총비소	2.5($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 62.5($\mu\text{g}/\text{g}$) = 62.5(mg/kg)
	0.1($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 2.5($\mu\text{g}/\text{g}$) = 2.5(mg/kg)
카드뮴	0.05($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 1.25($\mu\text{g}/\text{g}$)=1.25(mg/kg)
	0.04($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 1($\mu\text{g}/\text{g}$) = 1(mg/kg)
총수은	0.035($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) × 60(kg) / 2.4(g) = 0.875($\mu\text{g}/\text{g}$) = 0.875(mg/kg)
	0.005($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) ²⁾ × 60(kg) / 2.4(g) = 0.125($\mu\text{g}/\text{g}$)= 0.125(mg/kg)

$$^1) \text{잠정 1일 섭취 허용량}(\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}) = \frac{A(\mu\text{g}/\text{g}) \times 1\text{인1일섭취량}(\text{g})}{\text{적용기준체중}(\text{kg bw})}$$

$$^1) A(\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{\text{잠정1일섭취허용량}(\mu\text{g}/\text{kg b}/\text{day}) \times \text{적용기준체중}(\text{kg bw})}{1\text{인1일섭취량}(\text{g})}$$

- A : 규격 상한 값 또는 측정값($\mu\text{g}/\text{g}$)
- 인진쑥 추출분말 1인 1일 섭취량(g) : 2.4
- 적용기준체중(kg bw) : 60

바. 사철쑥 원료의 안정성(유통기한설정) 시험

(1) 시험 물질 정보

- (가) 원료 명칭 : 사철쑥 추출분말(순도 100%, 학명 : Artemisiae capillaris herba)
- (나) 원료 량 : 8.1kg
- (다) 보관 조건 : 실온(냉암소 보관), 사용 후 밀봉보관

(2) 유통기간 : 2년, 25°C(미정), 35°C(미정), 45°C(미정)

(3) 설정에 관한 자료



(가) 원료의 특성

건조된 인진쑥의 잎, 줄기로부터 물과 주정을 혼합한 용매로 추출하여 여과한 가용성 인진

쑥 성분을 추출, 농축하여 동결건조한 분말로서 수분 함량이 7%이하의 건조된 분말로서 보관 등에 따라 미생물 등의 발육이 어렵고 자체적으로 쉽게 부패되거나 또는 변질되지 않는 성분이다.

(나) 사철쑥 원료의 안정성(유통기한 설정) 시험 방법

표 34.. 사철쑥 원료의 안정성 시험조건 및 측정 항목

구분	내용	비고
원료 제품	1. 원료 : 사철쑥 추출분말 100%(동결건조) 2. 포장 : 알루미늄폴리에틸렌(AL+PE)	
실험 조건	1. 저장 온도 : 25°C, 35°C, 45°C. 2. 상대 습도 : 75 ± 5 % 3. 저장 기간 : 90일(3개월) 4. 시험 주기 : 0, 30, 60, 90일(3개월)	
측정 항목	1. 색상 : 녹갈색의 분말로서 이미. 이취가 없어야 한다. 2. 수분 : 7.0% 이하여야 한다. 3. 세균 수 : 100(CFU/g) 이하여야 한다. 4. 대장균군: 음성이여야 한다. 5. Scoparone: 6.2mg/g(80~120%)여야 한다.	기준, 규격

(다) 분석시험 방법

- 1) 수분, 세균 수, 대장균군은 건강기능식품공정 제 5. 일반성분시험법에 따라 실험하였다.
- 2) Scoparone 함량 : 본 실험에서 정립한 HPLC 분석방법에 따라 분석하였다.

(라) 실험 결과

1) 저장 중 원료의 품질변화

사철쑥 추출분말은 알루미늄박 폴리에틸렌(AL+PE) 포장된 상태로 25°C, 35°C, 45°C에서 3개월간 저장하면서 주요품질지표인 Scoparone함량, 수분, 일반세균, 대장균군의 함량변화를 측정하여 결과는 표 35, 표 36과 같이 모두 기준 규격 이하를 유지하였다.













표 35 사철쭉 추출분말의 안정성 시험(3개월 가속실험) 중 성분 및 미생물 변화 결과

시험 항목	저장기간 (개월)	저장 온도(°C), +습도75%			규격	상한 값 (95%신뢰구간)	기준함량의 80~120%	결과
		25	35	45				
수분 (%)	0	6.0	6.0	6.0	7.0이하	6.16	-	양호
	1	6.1	6.1	6.0				
	2	6.0	6.1	6.1				
	3	6.2	6.1	6.1				
Scoparone (mg/g)	0	7.20	7.20	7.20	6.2	6.74	4.96~7.4	양호
	1	7.19	7.21	7.18				
	2	7.20	7.21	7.19				
	3	7.21	7.18	7.19				
세균수 (CFU/g)	0	10	11	10	100이하	10	-	양호
	1	11	10	11				
	2	10	12	10				
	3	10	10	10				
대장균군 (음성)	0	음성	음성	음성	음성	음성	음성이어야 함	양호
	1	음성	음성	음성				
	2	음성	음성	음성				
	3	음성	음성	음성				

2)저장 중 원료의 성상 변화 :

사철쭉 추출분말은 45°C에서 보존 2개월 짜 갈변 및 경화 현상이 발생하였다(표 36).

표 36 사철쭉 추출분말의 안정성 시험(3개월 가속실험) 중 성상 변화 결과

시험 항목	저장기간 (개월)	저장 온도(°C, +습도 75%)			규격	기준함량의 80~120%	결과
		25	35	45			
성상	0				녹갈색 분말, 이미, 이취 없음.		양호
	1						양호
	2						갈변, 경화
	3						갈변, 경화

(4) 검토 및 결론

상기 실험결과를 종합해 볼 때, 원료의 특성, 제조공정 및 포장형태로부터 유통과정 중 품질 변화나 규격 부적합이 발생되지 않을 것을 예측하기 위하여 가속실험을 수행하였으며, 또한 현재까지 동일 원료가 제조된 사례가 없고, 천연물 특성에 따른 지표성분의 편차 등을 고려하여 유통기간 산출을 위한 가속실험을 수행하였다. 그러나 3개월 현재 유통기한을 예측할 수 있는 이화학적, 미생물학적, 관능적 지표 항목에서의 변화가 발생하지 않았으나, 원료의 성상에서 45℃에서 2개월 경과했을 때 갈변과 경화 현상이 발생하였다. 본 시제품 원료는 보존성이 취약한 특성을 가지고 있는 것으로 확인되었으며 안정성이 개선된 원료 제조방법을 모색할 필요가 있다.

사. 사철쭉 원료의 제조공정 개선

1) 목적 :

사철쭉 원료의 안정성 시험(유통기한설정 시험)에서 보존성이 취약한 것으로 나타났다. 그 원인은 흡수에 취약한 동결건조 방법때문일 것으로 추정되었다. 따라서, 사철쭉 추출액에 부형제를 첨가하여 분무건조한 분말을 제조하여 안정성 시험을 통하여 원료의 안정성이 양호한 분무건조 법을 확립하고자 한다.

2) 실험 방법:

사철쭉 원재료 50kg을 사용하여 2회 알콜 추출(그림 2, 1차 4시간, 2차 4시간) 후 진공농축한 농축액에 부형제(말토덱스트린)를 고형분 대비 0%, 10%, 20%, 30%, 50% 첨가하여 분무건조(4시간)하였다. 그 분말을 사용하여 안정성 시험(3개월 가속시험)을 실시하였다.

3) 실험 결과 :

3개월 간 가속시험에서 부형제를 10% 이상 첨가한 원료들은 모두 갈변과 경화 현상이 나타나지 않았다. 보존성과 사철쭉 순도를 감안할 때 부형제 10% 첨가가 적당한 것으로 사료되었다(표 37).

표 37. 부형제 첨가가 분무건조한 사철쭉 추출분말의 안정성에 미치는 영향

시험 항목	저장기간 (월)	덱스트린 함량(%)					규격	결과
		0	10	20	30	50		
성상	0						녹갈색 분말, 이미, 이취 없음.	양호
	1							양호
	2							양호
	3							양호

그리고, 사철쭉의 추출공정을 단순화(그림 11, 1차 4시간, 2차 4시간) 하였는데 고휘분 추출 수율이 16%였으며 기존 추출공정(1차 6시간, 2차 16시간)의 추출수율 15%보다 높게 나타났다. 개선된 분무건조 제조공정은 원료의 안정성과 생산원가를 고려할 때 동결건조 제조공정 보다 우수하다고 판단된다.

[제1-2세부 : 뼈 건강을 위한 건강기능식품 개발]

1절. 성장촉진과 뼈 건강 보조성분 스크리닝 및 제품 설계

본 과제에서 성장촉진용 주요 원료로서 사용코자 하는 인진쑥과 함께 사용하여 시너지를 낼 수 있는 보조 원료를 스크리닝을 하였다. 시장에 출시되어있는 성장관련 건강기능성식품을 국내외에서 수집하거나 인터넷 매체를 통하여 시장에서 유통 판매되고 있는 제품을 분석하였다. 제품의 성상과 맛, 주원료와 보조 원료, 중량, 판매가격, 소구점, 판매형태 등을 조사한 후 당 과제를 통해 상품화하려고 하는 건강기능식품을 구체적으로 설계하였다.

1. 칼슘 제품의 판매가격

국내 시판중인 칼슘제품 91종을 대상으로 판매가격을 조사하였는데, 1만 원대부터 시작하여 40만 원대까지 다양한 가격을 나타내었으며 가장 보편적인 가격은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 5만 원선을 중심으로 형성되고 있음을 알 수 있다.

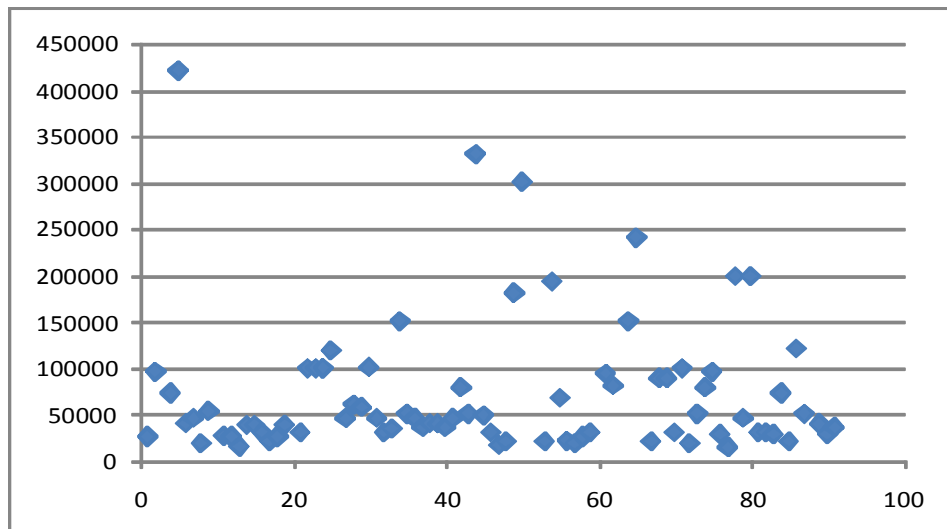


Fig. 1 시판중인 칼슘제품의 판매가격대
(X축은 칼슘 제품의 개수를 의미하고, Y축은 판매 가격(원)임)

2. 칼슘 원료의 종류

칼슘 원료로서 Fig. 2에서 보는 바와 같이 해조칼슘과 유청칼슘이 61% 를 차지하여 주종을 이루고 있었고, 그 외 판토텐산칼슘과 패각칼슘, 인산칼슘, 탄산칼슘 등을 사용하고 있었다.

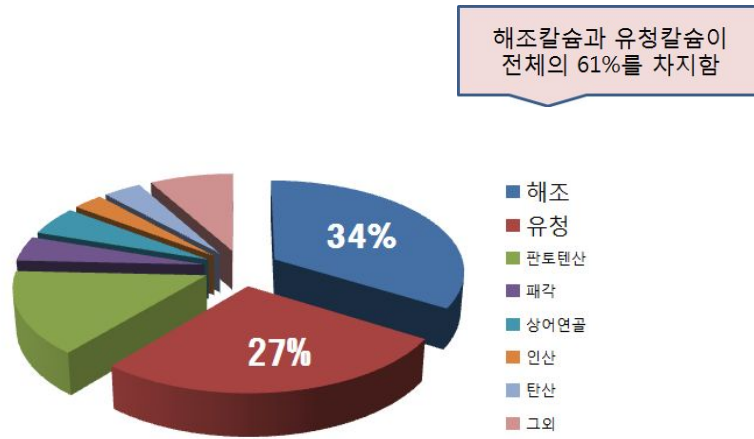


Fig. 2 시판 칼슘건강식품에 사용된 칼슘원료의 종류

3. 보조로 첨가한 비타민의 종류

Table 1 칼슘건강식품에 사용된 비타민의 종류

No.	건강기능식품	A	B	B ₁	B ₂	B ₅	B ₆	B ₁₂	C	D	D ₃	E	K
1	유한m키드원골드칼슘			○	○		○				○		
2	통앤키즈												
3	이지하이키즈									○			
4	보령월드라키즈칼슘및종합비타민	○			○	○	○		○		○	○	
5	키즈플러스칼슘,아연	○		○	○		○		○		○		
6	지에프주니어칼슘비타민			○	○		○		○		○		
7	주니어칼슘	○		○	○		○				○	○	
8	키즈본칼슘엔종합비타민철아연	○		○	○		○	○	○		○		
9	대웅키드원칼슘플러스	○		○	○		○		○		○	○	
10	키즈프랜즈멀티비타민앤미네랄	○		○	○		○	○	○		○	○	
11	키즈본칼슘엔종합비타민철아연망간	○		○	○		○	○	○		○		
12	로얄멀티비타민무기질 통앤키	○					○	○	○		○		○
13	통키즈	○		○	○		○	○	○		○	○	
14	클로본칼슘,멀티비타민												
15	광동루키쥬이칼슘	○		○	○		○				○	○	
16	광동슈퍼키즈칼슘	○		○	○		○				○		
17	키즈플러스칼슘골드	○		○	○		○	○	○		○	○	
18	광동키즈본												
19	유한m키즈골드칼슘탑												
20	유한m아이업키즈칼슘										○		
21	뉴키즈어린이종합비타민	○		○	○				○		○	○	
22	츄어블멀티비타민앤미네랄포키즈	○		○	○		○	○	○		○	○	
23	키즈프랜즈밀크칼슘								○		○		
24	키키스텝1	○		○	○		○	○	○		○	○	
25	토마스와친구들프리미엄칼슘멀티비 타민&미네랄	○		○	○		○	○	○		○		○
26	맘앤몸키즈멀티비타민플러스								○			○	
27	원한방성장발육에도움을주는칼슘	○		○			○	○	○		○		

28	키드프렌즈	○		○		○		○		○
29	키드프렌즈칼슘아연멀티비타민	○		○		○		○		○
30	키드짱칼슘비타민골드	○	○							
31	키드앤유니어칼슘									
32	우리아이쑥쑥칼슘비타민&미네랄	○		○	○		○	○		○
33	키키칼슘							○		
34	키즈몽	○		○	○		○			○
35	휴럼멀티비타민미네랄 포키즈	○		○	○		○	○	○	○
36	엔트리키드종합비타민무기질	○		○	○		○	○	○	○
37	본앤드키드칼슘아연멀티비타민	○		○	○		○	○	○	
38	유니어키즈칼슘&멀티비타민미네랄	○		○				○	○	
39	하이키즈칼슘플러스멀티비타민앤미네랄	○					○	○		
40	알키드칼슘비타민보충용제품			○	○		○	○	○	
41	쑥쑥하이키즈칼슘멀티비타민			○			○	○		
42	유한M키드맘비타민칼슘			○	○					
43	유한m키드사랑칼슘비타민			○			○	○		
44	유한m키드비타칼슘골드			○			○	○		
45	플러스키즈칼슘			○	○			○		
46	키즈본 칼슘, 비타민	○	○	○	○				○	○
47	대상웰라이프 닥터 클로렐라 키즈									
48	하이키즈칼슘멀티비타민			○			○	○	○	
49	대웅키즈짱칼슘비타	○		○			○	○		○
50	튼튼키즈칼슘							○		○
51	성장발육도움칼슘환	○		○	○			○		○
52	양팡아시아사랑키즈본칼슘	○		○	○		○	○		○
53	대웅키로왕	○		○			○	○		○
54	상아키드웰칼슘			○	○		○	○		○
55	클로본추잉칼슘, 멀티비타민	○	○		○		○	○		○
56	알키드	○		○	○		○	○		○
57	키드본칼슘골드			○	○			○		
58	키드큐비타민칼슘	○		○	○		○	○		○
59	키드웰칼슘	○		○	○		○	○		○
60	지에프칼슘비타민			○	○			○		○
61	양팡우리아이밀크칼슘									
62	키키스텝2	○		○	○		○	○		○
63	키드케어칼슘 레몬맛	○			○		○	○		○
64	올그린멀티비타민미네랄키즈			○	○		○	○		○
65	프리미엄롱키즈			○			○	○		○
66	브이푸드키즈멀티비타민미네랄									
67	키앤타민		○					○	○	○
68	광동키드짱칼슘			○	○			○		○
69	키드생츄어블정			○	○		○	○		○
70	대웅클레오키즈칼슘							○		
71	키즈본칼슘			○			○	○		○
72	아이칼슘-Q									
73	키즈종합비타프리미엄	○		○	○		○	○		○
74	우리아이당찬아이튼튼비타민	○		○	○		○	○		○
75	라파플러스 종합 비타민 키즈	○		○			○	○	○	○
76	멀티비타민무기질키즈	○		○	○		○	○		○

77	진키즈멀티플러스비타민앤미네랄		○	○		○	○	○		○			
78	진락멀티비타민키즈츄어블	○		○	○		○			○	○		
79	라이프앤진종합비타민미네랄키즈	○		○		○	○	○		○	○	○	
80	365츄어블밀키칼슘									○			
81	썬민키즈비타민칼슘			○				○		○			
82	헬스원드림키즈	○		○		○		○		○	○		
83	아이앤본츄잉칼슘멀티비타민	○		○	○					○			
84	보령뽀로로키즈종합비타민루피	○		○				○		○	○		
85	보령뽀로로키즈종합비타민포비	○		○				○		○	○		
86	보령뽀로로키즈종합비타민크롱	○		○				○		○	○		
87	우리아이튼튼아이V비타												
88	솔빛키즈멀티비타민			○	○		○			○			
89	내츄렉스 키즈멀티비타민												
90	내츄렉스 애니 비 키즈									○			
91	롱키즈멀티비타민&유산균												
합 계		49	4	59	51	1	54	24	59	3	64	39	8

비타민 종류 중에서 비타민 D₃가 가장 많이 사용되었고, 그 다음이 B₁과 C 이었다. 그리고 B₂와 B₆가 뒤를 이어 많이 사용된 것으로 나타났다.

4. 단백질의 종류

칼슘 흡수 촉진의 목적으로 다양한 단백질 원료가 사용되었는데, 많이 사용되고 있는 원료는 다음과 같다.

탈지분유, 전지분유, 유단백가수분해물(CPP), 타우린, 초유분말, 분리대두단백, 아미노산류, 콜라겐펩타이드

이중 많이 사용되고 있는 것은 유단백가수분해물로서 칼슘의 흡수 촉진이 밝혀진 펩타이드이다. 그러나 콜라겐펩타이드 역시 뼈의 성장에 효과가 있는 것으로 밝혀진 성분이어서 성장촉진제품에 활용되고 있는 것으로 보인다.

5. 기타 성장촉진 기능성 물질

천연추출물로서 성장촉진을 위한 기능성 물질로 많이 첨가된 원료는 다음과 같았으며, 이 중에서 가시오가피가 가장 많이 사용되고 있는 것으로 나타났다.

가시오가피, 생강, 홍화씨, 홍삼, 인진쑥, 스피루리나, 클로렐라, 당귀, 감초, 오미자, 구기자, 동충하초, 대추, 진피, 빌베리

6. 성장촉진 및 뼈 건강을 위한 건강기능성식품의 설계

가. 시중 뼈 건강 관련 제품의 분석

시중에 유통 중인 건강기능식품중 뼈 건강 관련 제품을 분석하여 사용되는 주요 성분을 정리하였다.

Table 2 뼈 건강 건강기능식품의 주요성분

제품명	주성분	부성분	Health Claim
락보인 이소플라본	대두이소플라본	해조칼슘	뼈건강
미소진정	글루코사민,이소플라본	석류, 해조분말	뼈건강, 관절및연골
미소원맵시 901	대두이소플라본	효모, 콜라겐, 비타민	뼈건강
이브플라본	보리지종자유,대두이소플라본	칼슘, 당귀,석류	뼈건강, 혈행개선
닥터뉴트리Y	칼슘,마그네슘,대두이소플라본	비타민	뼈건강
에버플라본프리미엄	달맞이꽃종자유,해조분말,대두이소플라본	콜라겐, 비타민,클로렐라	뼈와 관절
트리조인스타	글루코사민,해조분말	상어연골,콜라겐	뼈와 관절

나. 뼈 건강을 위한 건강기능성식품의 원료

뼈건강 관련 제품은 대부분 대두이소플라본을 함유하였고, 관절까지 생각한 제품은 글루코사민을, 혈행개선을 생각한 제품은 보리지종자유나 달맞이꽃종자유를 첨가하였다. 그리고 대두이소플라본과 함께 칼슘 성분을 첨가하여 효과를 상승시키려고 한 것으로 보인다. 이상을 종합하면 갱년기이후의 노년기의 뼈 건강을 위한 제품으로는 다음과 같은 성분으로 요약할 수 있다.

이상 조사한 것을 바탕으로 성장을 위한 건강기능성식품의 설계를 다음과 같이 완성하였다.

- * 미네랄 원료 : 해조칼슘 + 마그네슘
- * 비타민 원료 : 비타민 D₃
- * 단백질 원료 : 콜라겐펩타이드
- * 성장촉진 및 뼈건강 원료 : 인진쑤추출물
- * 기타 : 이소플라본
- * 제품의 제형 : 정제(Tablet) 또는 캡슐

2절. 인진쑥 추출물의 제조공정

인진쑥 건조 절단원료를 정수와 주정으로 추출하여 가공하는 제조 기술을 개발하였다. 인진쑥의 유효성분을 최대한 살려서 농축하는 공정의 조건을 개발하고, 유효성분의 확립을 위해서는 추출에 사용하는 주정과 물의 비율을 비교하고, 미생물 발효공정을 통하여 안전성과 유효성이 어떻게 달라지는지 파악하였다. 인진쑥의 가공기술 확립을 위한 유효성분 선정과 효능평가는 제 2핵심과제를 맡고 있는 팀에서 담당하므로 시료를 준비하여 이에 대한 비교 평가를 의뢰하였다.

미생물 발효공정의 개발을 위하여 인진쑥을 발효할 수 있는 유산균을 종류별로 스크리닝하여 발효능이 좋고, 풍미가 양호한 것을 선발하였다. 발효를 잘 이루기 위한 여러 가지 조건을 검토하여 발효한 인진쑥 원료와 발효하지 않은 인진쑥 원료의 성장촉진효과와 항산화효과를 세포실험으로 평가하였다.

1. 인진쑥추출물의 제조공정 확립

인진쑥 절단 원료를 가지고 아래와 같은 공정을 정립하여 실험실적으로 농축액을 제조하였다.

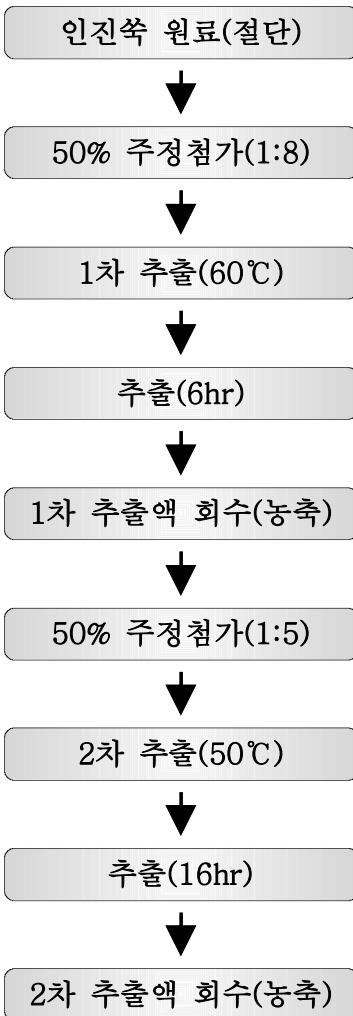


Fig. 3 인진쑥추출물 제조방법

위와 같은 인진쑥추출물 제조방법으로 8회 반복 시험한 결과는 다음 표와 같았다(Table 3).

Table 3 인진쑥의 추출 및 농축 결과

항목/ Lot	2011-1	2011-2	2011-3	2011-4	2011-5	비고
원료 量	4kg	4kg	4kg	4kg	4kg	건조, 절단품
1차 추출 용매	32L	32L	32L	32L	32L	50%주정(v/v)
1차 추출온도(℃)	58-62	58-62	58-62	58-62	58-62	
1차 추출시간	6hr	6	6	6	6	
2차 추출 용매	20L	20L	20L	20L	20L	1차농축 회수알콜
2차 추출 시간	16hr	16hr	16hr	16hr	16hr	50℃ 2시간후 정치
농축액 양(kg)	1.21	1.15	1.24	1.25	1.30	
Brix	45	46	46	46	45	
수분(%)	55.95	54.13	54.20	55.80	54.60	
고형분(%)	44.05	45.87	45.80	44.20	45.37	
무수물 수율(%)	13.32	13.18	14.20	13.81	14.70	

항목/ Lot	2012-6	2012-7	2012-8	비고
원료 量	4kg	4kg	4kg	건조, 절단품
1차 추출 용매	32L	32L	32L	50%주정(v/v)
1차 추출온도(℃)	58-62℃	58-62	58-62	
1차 추출시간	6hr	6hr	6hr	
2차 추출 용매	20L	20L	20L	50% 주정(회수)
2차 추출 시간	16hr	16hr	16hr	50℃ 2시간후 정치
농축액 양(kg)	1.59	1.60	1.61	
Brix	43	46	45	
수분(%)	58.19	54.20	58.20	
고형분(%)	41.81	45.80	41.80	
무수물 수율(%)	16.66	18.32	16.82	

인진쑥 건조 원료를 4kg을 추출하여 얻은 수율이 Lot별로 차이를 보이고 있는데, 이는 추출조건에 의한 차이도 있을 수 있겠지만, 농축액의 수분함량을 측정할 때의 기기적인 오차도 작용하는 것으로 예상된다. 그러므로 정확한 제조 수율은 동결건조한 원료로 평가하는 것이 옳다고 판단된다. 인진쑥 건조 원료로 분말화하는 평균 수율은 15%로 나타났다. 그리고 2차 추출은 1차추출한 후 농축 시 나오는 회수 주정을 50%로 보정하여 재활용하여 사용하는 것이 경제적이었다. 추출농축액은 알앤엘바이오로 보내어 동결건조한 다음 이를 2세부과제를 담당하고 있는 기관에서 동물시험과 성분분석 등에 사용하였다.

2. 파이롯트 제조시험

알앤엘바이오로부터 인진쑥(더위지기)를 150kg 공급받아 성장촉진 효과가 있는 추출 조건으로 추출액을 제조하였다. 즉, 주정 50%의 용매로 2회 추출하였으며, 추출 온도 및 시간 등 세부적인 사항은 다음 표와 같다(Table 4)..

Table 4 인진쑥의 추출 및 농축 결과

항목/ Lot	1	2	3	비고
건조 인진쑥 量	50kg	50kg	50kg	건조, 절단품
1차 추출 용매	400L	400L	400L	50% 주정
1차 추출 온도(℃)	58~62	58~62	58~65	
1차 추출 시간	6hr	6hr	6hr	
2차 추출 용매	250L	250L	250L	1차농축 회수알콜
2차 추출 시간	16hr	16hr	16hr	50℃ 2hr 후 14hr 정치
농축액 量(kg)	14.9	16.2	17.0	
Bx	45.0	44.0	45.5	
수분(%)	55.9	57.5	54.5	
고형분(%)	44.1	42.5	45.5	
무수물 상태 수율	13.14	13.77	15.47	평균수율 14.13%

농축액을 동결건조한 후 인진쑥 분말의 수분 함량은 3.45% 였으며, 인진쑥 건물 량 150kg로부터 추출 분말을 21.72 kg를 얻었으므로 수율은 14.48 %로 나타났다.

3. 현장 제조공정 조건 설정

인진쑈 추출 작업의 스케줄을 검토하여 다음과 같이 설정하였다.

Table 5 공정별 세부작업 내용

(인진쑈 50kg 작업 기준)

No.	공정명	예상 소요시간	세부내용	비고
1	인진쑈 계량	5분	건조인진쑈 절단품의 계량	
2	용매 준비	10분	주정 50% (v/v) 준비	1:8로 용매 준비
3	침지 및 가온	30분	상온 → 60℃로 가온	스팀으로 가온
4	1차 추출	6시간	60℃ 유지	
5	추출액 농축	2시간	진공감압농축	Bx 40~45
6	주정 회수	10분	주정 농도 50%로 보정	
7	침지 및 가온	20분	상온 → 50℃로 가온	1:5로 용매 준비
8	2차 추출	16시간	50℃ 2시간후 정치	Overnight 추출
9	추출액 농축	1시간20분	진공감압농축	Bx 40~45
10	주정 회수	10분	주정 농도 검사	
11	농축액 살균	1시간	농축액을 살균(80℃)	
12	농축액 충전포장	30분	Hot Filling	오염 방지
13	(냉각)	Overnight	냉장고에서 냉각	
14	(건조)	Overnight	동결건조 또는 진공건조, 분무건조	
합 계		28시간 15분	1~12번까지 (냉각 및 건조 제외)	

- 추출 농축과정에 2일 소요되며, 냉각 및 동결건조도 2일 소요되어 처음부터 끝까지 작업시간을 기준으로 총 4일 걸림

Table 6 공정별 작업 진도표

(단위 : 시간)

공정	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1.인진숙 계량	█									
2.용매 준비	█									
3.침지 및 가온	█									
4.1차 추출	█	█	█	█						
5.추출액 농축				█	█					
6.주정 회수					█					
7.침지 및 가온					█					
8.2차 추출					█	█	█	█	█	█
9.추출액 농축									█	█
10.주정 회수										█
11.농축액 살균										█
12.농축액 포장										█

공정	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
13. 냉각	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
14. 동결건조							█	█	█	█

작업 시작하여 마치는 시간까지 4일 걸리며, 이를 효율적으로 개선하려면, 추출과 농축을 연속작업으로 하여야 경제성을 살릴 수 있다. 건조 수율 15%는 추출을 2회 실시하여 얻은 결과이므로 만일 1회만 추출한다고 하면 수율은 떨어질 것으로 예상되나, 공정의 효율성은 크게 증대될 것이다. 그렇지만 작업시간을 고려하면 3교대 작업으로 24시간 작업하기 전에는 1회 추출하는 것의 효용성이 크지 않을 것으로 보인다. 위의 작업 사이클은 1교대 작업을 기준으로 검토한 것이다.

4. 발효공정을 이용한 제조공정 개발

가. 발효 미생물의 선발

인진쑥추출분말을 물에 환원하여 10% 용액으로 만들었고, 100℃에서 15분간 살균한 다음 다음과 같은 유산균을 접종하여 35℃에서 2일간 발효시켰다. 발효 후 pH를 재어 발효된 정도를 파악하였으며 그 결과는 다음 표와 같다.

Table 7 유산균의 종류별 인진쑥 10%의 pH 저하

유산균 종류	Control	<i>B. infantis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>
pH	5.36	5.14	5.24	4.32	5.22

인진쑥추출물 10% 용액에서는 다른 유산균들은 거의 발효시키지 못하였고, 오직 *L. plantarum* 만 발효가 이루어져서 이 발효액으로 향산화활성과 조골세포 성장 효과를 평가하였다.

나. 인진쑥추출물의 농도에 따른 발효

인진쑥의 농도가 높을수록 제조하는데 유리하므로 추출액의 농도를 낮은 농도부터 높은 농도까지 달리하여 배양을 실시하였다.

Table 8 인진쑥추출물의 발효 후 pH

농도(Brix)	5	10	15	20
0hr 배양후	6.5	6.5	6.5	6.5
16hr 배양후	5.8	6.1	6.3	6.4
24hr 배양후	5.4	5.8	6.2	6.4

인진쑥추출물의 농도가 10%를 초과하면 배양이 저해를 받아서 잘 되지 않는 것으로 보아 추출물의 농도는 최대 10% 이하를 유지하여야 하는 것으로 나타났다. 이는 인진쑥추출물이 50% 주정으로 추출되었기 때문에 이로 인하여 항균성분이 포함되어 있을 것으로 예상되어서 농도가 높아지면 유산균도 저해를 받는 것으로 보인다.

다. 올리고당과의 혼합에 의한 효과

인진쑥 단독 발효하는 것보다 당류를 혼합하면 배양이 일반적으로 잘되는 점에 착안하여 인진쑥추출물 10%에 이소말토올리고당을 첨가하여 발효를 실시하여 그 효과를 비교하였다.

Table 9 올리고당 첨가량별 인진쑥추출물의 발효 후 pH

올리고당 함량	0%	5%	10%
0hr 배양 후	6.5	6.5	6.5
16hr 배양 후	6.1	5.8	5.5
24hr 배양 후	5.8	5.4	5.0

이소말토올리고당은 당도가 낮고 설탕성분이 전혀 함유되어있지 않아 당뇨에도 영향을 주지 않으므로 당류중에서 이것을 선택하여 5%, 10% 첨가한 결과 무첨가군에 비하여 유산균의 발육이 촉진되었다. 10% 첨가의 경우 24시간 배양후 pH가 5.0까지 떨어져서 무첨가군의 pH 5.8 보다 현저히 낮아진 것을 알 수 있었다.

라. 인진쑥추출물의 발효공정 추가 검토

건강기능식품의 자가규격인증을 받는데 발효하지 않은 것은 안전성 검사를 최소화할 수 있는데 반하여 발효한 경우에는 실제로 안전성이 더 증가하는데도 불구하고 동물의 안전성 검사 항목이 증가되는 문제가 있다. 또한 인진쑥추출 후 농축을 10% 정도까지만 농축한 다음 당을 첨가하여 1일 이상 발효를 해야하는 등 생산이 복잡하고 시간이 많이 소요된다. 이러한 측면을 종합적으로 검토하여 본 과제에서 뼈성장에 유의한 개별인정형 건강기능식품을 개발하는데 발효공정을 추가하지 않고 농축액을 건조하여 원료를 제조하는 것으로 확정하였다.

마. 건조방법의 검토

인진쑥 농축액을 건조할 때 초기에는 동결건조로 하였으나, 상온에 노출 시 흡습성이 제기되었을 뿐만 아니라 건조비용이 가장 비싼 방법이어서 동결건조방법과 진공건조, 분무건조를 비교하여 지표성분인 Scoparone의 함량을 분석하였다.

(1) Sample Preparation

인진쑥 분말을 0.1g 정도를 정확하게 계량하고 70% MeOH 에 용해하여 농도가 10 mg/mL 이 되도록 하였다. 그리고 용액을 ultrasonicator 로 30 min in 50 °C 간 처리하였다. 최종적으로 0.45 um 필터로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

(2) Preparation of Standard solutions

Scoparone 1.0487 mg을 70% MeOH 5.2435 mL에 녹여 표준 용액(200 ug/mL)을 조제하였다. 이 용액을 70% MeOH로 4단계 희석하여 150 ug/mL, 100 ug/mL, 50 ug/mL, 25 ug/mL을 준비하였다. 이 용액들을 4 °C 냉암소에 보관하며 분석에 사용하였다.

(3) HPLC Conditions:

HPLC system: Gilson automated HPLC system

Detector: Gilson UV/VIS-151

Auto sampler: GX-271 Liquid Handler

Solvent mixing: Gilson 321 pump

Chromatographic column: Gemini C18 110A (250 x 6 mm, 5 μ m)

Injection volume: 10 μ L

Flow rate: 1.0 mL/min

Column temperature: Room temperature

UV wavelength: 235 nm

Mobile phase:

Time (min)	Acetonitrile (%)	0.1% Trifluoroacetic aqueous (%)
0	10	90
10	10	90
45	40	60
55	100	0

(4) 건조방법에 따른 scoparone 함량의 비교

동결건조 분말의 scoparone 함량이 8.1968 mg/g 으로 나타났으며, 진공건조 분말과 분무건조 분말은 각각 7.8750 mg/g, 7.8250 mg/g을 나타내었다. 이는 동결건조 분말과 진공건조 분말 또는 분무건조 분말과의 함량 차이가 4% 정도로서 미미하였으므로 애초 설정한 동결건조법 대신 진공건조법이나 분무건조법을 사용하여도 무방하다는 결론을 내렸다.

Sample	Scoparone		
	Average con. (μ g/mL)	RSD (%)	Content (mg/g)
동결건조	81.9678	0.12	8.1968 \pm 0.0099
진공건조	78.7503	0.17	7.8750 \pm 0.0133
분무건조	78.2499	0.24	7.8250 \pm 0.0190

3절. 인진쑥 추출물과 유산균 발효추출물의 항산화 활성

1. *In vitro* 항산화 활성

가. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 분석법을 이용한 peroxy radical 소거 활성

Peroxy radical 소거활성은 Kurihara 등의 방법을 변형한 ORAC 분석법을 이용하였다. ORAC 분석법은 차, 과일, 동물의 조직 및 혈액등과 같은 다양한 식품 및 생물소재들의 항산화 활성 분석에 널리 이용되고 있다. 분석에는 형광의 간섭을 최소화하기 위하여 96-well micro plate (black, flat bottom)를 사용하였다. 75 mM potassium phosphate buffer (PBS, pH 7.4)에 녹인 100 μ L의 40 nM fluorescein을 plate에 넣은 뒤 5 mM PBS (pH 7.4)에 희석한 각각의 농도별 샘플을 50 μ L의 시료를 넣었다. 그 후 바로 75 mM PBS (pH 7.4)에 녹인 50 μ L의 20 mM AAPH를 plate에 첨가하였다. 수용성 비타민 E 유도체인 Trolox와 AAPH는 분석시마다 새로 만들어 사용하였다. 측정은 GENios fluorescence plate reader (TECAN Trading AG, Switzerland)를 사용하였으며, 형광 분석기는 측정 전 10초간 shaking한 후 5초 동안 안정화 하도록 설정하였다. 96-well micro plate는 37°C에서 2분 간격으로 총 200분 동안 형광을 측정하도록 설정하였다. Fluorescein은 excitation wavelength 485nm, emission wavelength 535nm에서 측정하였다. 최종 결과는 측정시료의 형광값과 blank의 형광값 간의 넓이 차이로 계산하였으며 standard curve는 1, 5 그리고 10 μ M의 수용성 vitamin E 유도체인 Trolox를 이용하여 측정하였다. 모든 결과 TE (Trolox equivalents, μ M)로 환산하여 나타내었다.

Hyunil Ha (Exp. Cell. Res., 2004)를 비롯한 다른 연구자들은 reactive oxygen species (ROS)는 파골세포 생성의 신호전달에 관여하여 파골세포의 생성을 촉진하여 bone resorption을 활성화 한다는 연구 결과를 보고하였다. 이는 항산화 활성을 가진 성분은 골 형성과 흡수 기전에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 보인다.

인진쑥 ethanol 추출물과 발효 추출물의 peroxy radical 소거활성은 Fig. 4에 나타내었다. 1 μ g/mL 과 5 μ g/mL에서 1.34 (TE)에서 5.94 (TE)까지 peroxy radical 소거활성을 보였으며, ethanol 추출물에 비해 발효 추출물의 peroxy radical 소거활성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 이는 발효 과정 중 유산균에 의해서 인진쑥 생리활성 물질이 bioconversion되어 peroxy radical 소거활성이 높은 물질로 전환되었기 때문일 것으로 사료된다.

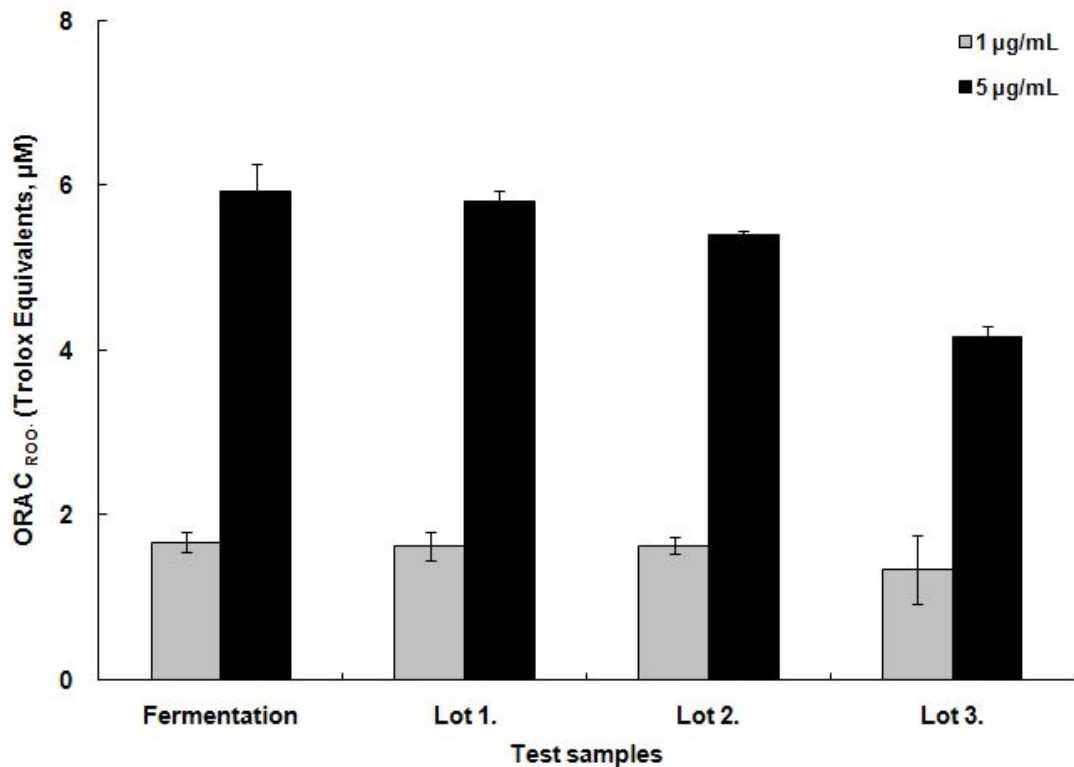


Fig. 4. Effect of fermentation on the peroxy radical-scavenging activity of *Artemisia iwayomogi* extracts.

나. Reducing capacity

시료의 reducing capacity는 Arouma 등의 방법 (Arouma I O *et al.* J. Agric. Food Chem. 1998)을 이용하여 분석하였다. 10 mM PBS (pH 7.4)에 용해시킨 100 μM CuCl₂용액 20 μL와 동일한 buffer에 용해시킨 250 μM neocuproine용액 80 μL를 혼합한 다음 측정시료 40 μL를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 반응액 200 μL를 96-well micro plate로 옮겨 454 nm에서 ELISA reader기를 이용해 흡광도를 측정한다. Sample blank로 CuCl₂용액 대신에 10 mM PBS를 사용하였으며, 시료의 reducing capacity는 Cu¹⁺/neocuproine의 extinction coefficient ($7.95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 사용하여 흡광도로부터 계산된 Cu¹⁺의 농도로서 표시하였다.

Ronald L. Prior (J. Argi. Food Chem., 2005)를 비롯한 다른 연구자들은 생리활성물질이 electron을 공여함으로써 reducing capacity가 증가한다고 보고하였다.

인진쑥 ethanol 추출물과 발효추출물의 reducing capacity는 Fig. 5에 나타내었다. 1 μg/mL과 5 μg/mL에서 reducing capacity를 측정한 결과 peroxy radical 소거활성과 유사한 결과를 보여 주었다. 발효과정 중에 인진쑥에 함유된 생리활성물질들이 유산균에 의해서 electron을 더 잘 공여할 수 있는 물질로 전환됨으로써 이러한 결과는 나타낸 것으로 사료된다.

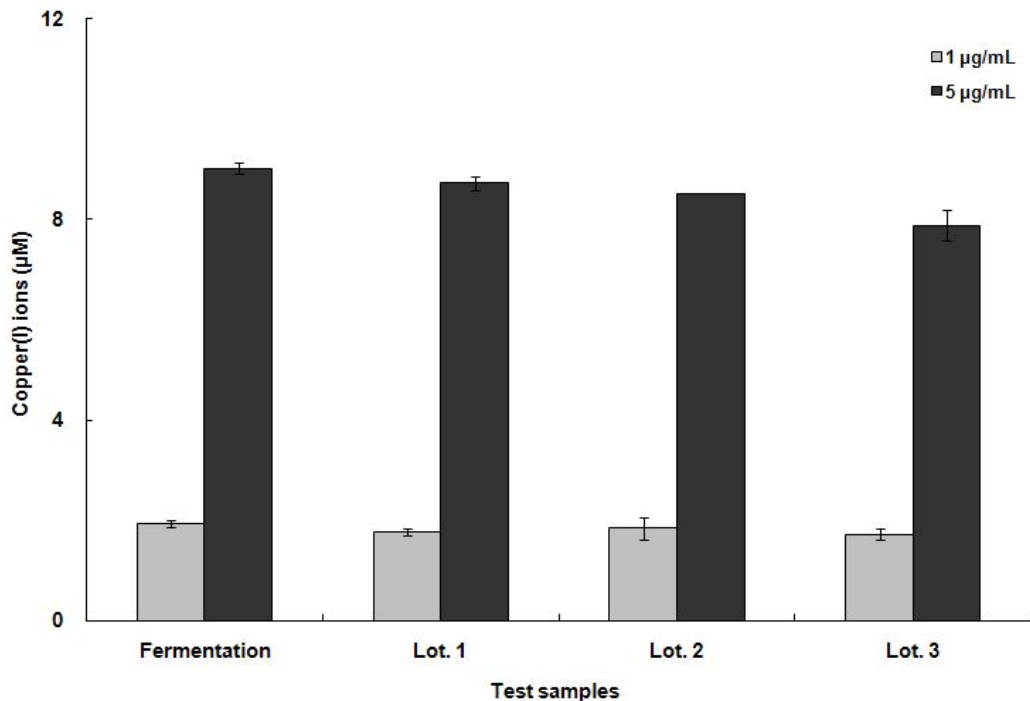


Fig. 5. Effect of fermentation on the reducing capacity of *Artemisia iwayomogi* extracts.

다. Metal chelating activity

Calcein은 metal ion과의 chelating activity를 측정하는데 널리 사용되는 형광 probe이다. Metal chelating activity는 Mariana 등의 방법 (Mariana DA *et al.* Arch. Biochem. Biophys., 2003)을 일부 변형하여 사용하였다. 측정 시료 100 µL에 0.1 µM CuSO₄용액 100 µL을 가하여 잘 혼합한 다음 100 µL를 취해 0.1 µM calcein용액 100 µL와 혼합하였다. 혼합한 용액 200 µL를 96-well black plate에 넣고 GENios fluorescence plate reader를 사용하여 fluorescence intensity를 측정하였다. (Excitation wavelength 485nm, Emission wavelength 535nm). CuSO₄를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 Fluorescence intensity (% of control)을 계산하였다.

DNA backbone은 (-) charge를 띠는 phosphate groups로 구성되어 있어 Fe²⁺나 Cu⁺같은 metal ions이 쉽게 결합할 수 있으며, 대사 중에 생성되는 H₂O₂에 의해 Fenton-like reaction (Fe²⁺ or Cu⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ or Cu²⁺ + OH· + H₂O)으로 DNA 손상을 야기할 수 있다 (Nathan R. Perron *et al.* Cell Biochem. Biophys., 2009). Fe²⁺ 또는 Cu⁺이온과 같은 transition metal 이온들을 chelating하여 Cu²⁺ + OH· + H₂O 생성을 억제시키는 것은 체내 산화적 스트레스를 억제하는데 중요한 의미를 가지게 된다.

인진쑥 ethanol 추출물과 발효추출물의 metal chelating activity는 Fig. 6에 나타내었다. 1 µg/mL 과 5 µg/mL에서 metal chelating activity를 측정한 결과 발효 추출물을 제외한 ethanol 추출물 대부분의 경우, 37.50 ~ 45.87 %사이의 metal chelating activity를 나타내었으나, 발효 추출물의 경우 51.68%까지 metal chelating activity이 증가하였다. 비교적 약한 metal chelating activity를 가진 인진쑥이 발효에 의해 metal chelating activity를 가진 물질들로 전환됨으로써

인진쑥 ethanol 추출물에 비해 발효 추출물이 높은 metal chelating activity를 나타낸 것으로 추정된다.

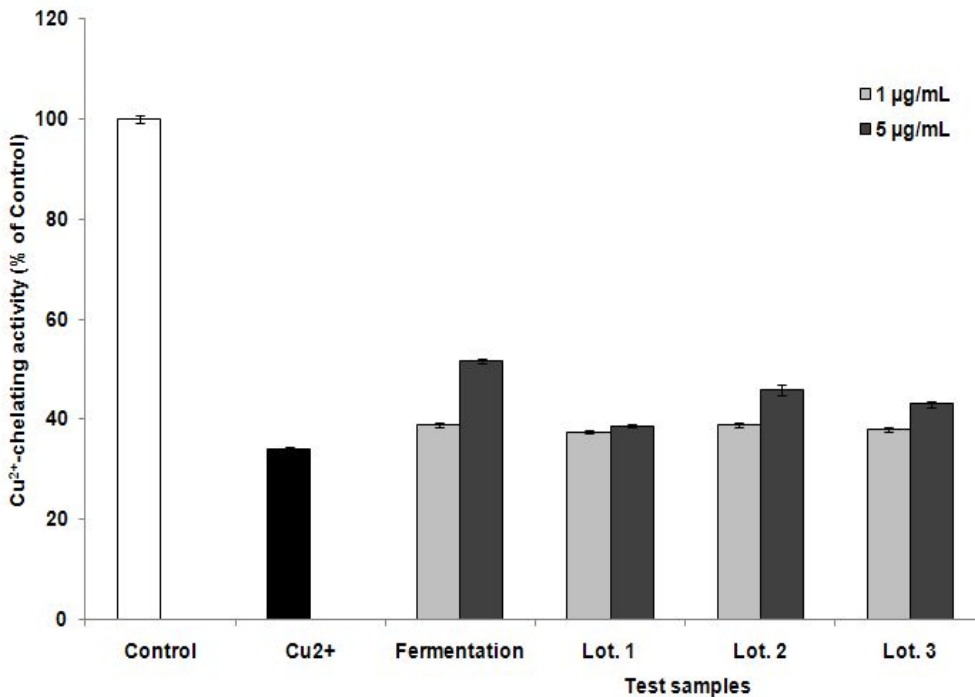


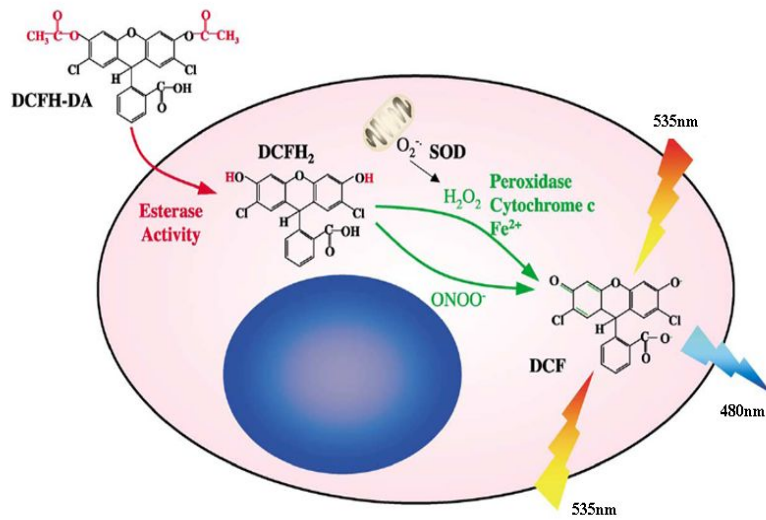
Fig. 6. Effect of fermentation on metal chelating activity of *Artemisia iuxayomogi* extract

2. *In vivo* 항산화 활성

가. 세포내 항산화 활성 (Cellular antioxidant capacity)

AAPH 또는 Cu^{2+} 로 유도시킨 ROS에 대한 시료의 세포내 항산화 활성은 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통해 세포로 유입되면 세포질에 존재하는 esterase에 의해 DCFH로 가수분해되고, 세포내에 ROS가 존재하게 되면 DCF로 산화되어 excitation 485nm, emission 535nm에서 green 색의 형광강도를 나타낸다. 측정시료를 세포에 처리한 뒤 AAPH 또는 Cu^{2+} 로 산화적 스트레스를 유발하면 항산화 능력의 정도에 따라 차이적인 DCF 형광강도를 나타내므로 이를 이용하여 측정시료의 세포내 항산화 활성을 측정할 수 있다 (Fig. 7).

Fig. 7. Chemical mechanism of DCFH-DA (Curtin *et al.* J. Immunological Methods., 2002)



나. 세포배양 (Cell culture)

Human유래 간암세포주인 HepG2 (KCLB, No. 88065)는 Korea Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 구입하였다. HepG2 세포는 10% heat-inactivated된 fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic-antimycotic agent를 포함한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) 으로 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. Culture medium은 1주에 3회 1:3 비율로 계대 배양 하였다.

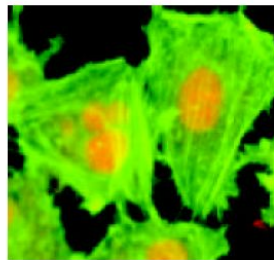


Fig. 8. Human hepatoma cell line HepG2

다. 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의해 유도된 산화 스트레스에 세포내 항산화 활성

HepG2세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 수로 배양하여 24시간 pre-incubation하고 test sample을 30분간 처리하였다. Media를 제거한 후 각 well에 50 μ L의 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 1회 씻어주었다. Media 대신 각 well에 형광의 간섭을 받지 않는 200 μ L의 HBSS으로 교체해 주고 60 μ M의 AAPH를 가한 다음 30분간 배양한 후 40 μ M의 DCFH-DA를 가하여 30분간 추가로 배양하였다. 측정은 GENios fluorescence plate

reader (TECAN Trading AG, Switzerland)를 사용하였다. Excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광을 측정하였다.

세포주를 이용한 항산화 활성 분석은 *in vitro*의 항산화 활성 분석법에 비해 세포내 환경을 반영한다는 점에서 매우 유용한 모델이라 할 수 있다. 그 중 HepG2 세포는 항산화 활성을 분석하기에 잘 분화되어 있으며 Caco-2나 RAW 264.7 세포에 비해 일관된 결과를 도출할 수 있다는 장점을 가지고 있다. (Liu *et al.* J. Argi. Food Chem., 2008)

인진쑥 ethanol 추출물과 발효추출물의 세포내 항산화 활성을 분석한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 1, 5 그리고 10 µg/mL에서 AAPH에 의해 유도된 산화 스트레스 (148.16%)에 비해 124.32 ~ 108.81%까지 모든 시료에서 산화 스트레스를 감소시켰으며, 인진쑥 발효 추출물의 경우 ethanol 추출물에 비해 AAPH에 의해 유도된 산화 스트레스를 더욱 효과적으로 감소시킨 (117.46 ~ 108.81%) 것으로 나타났다.

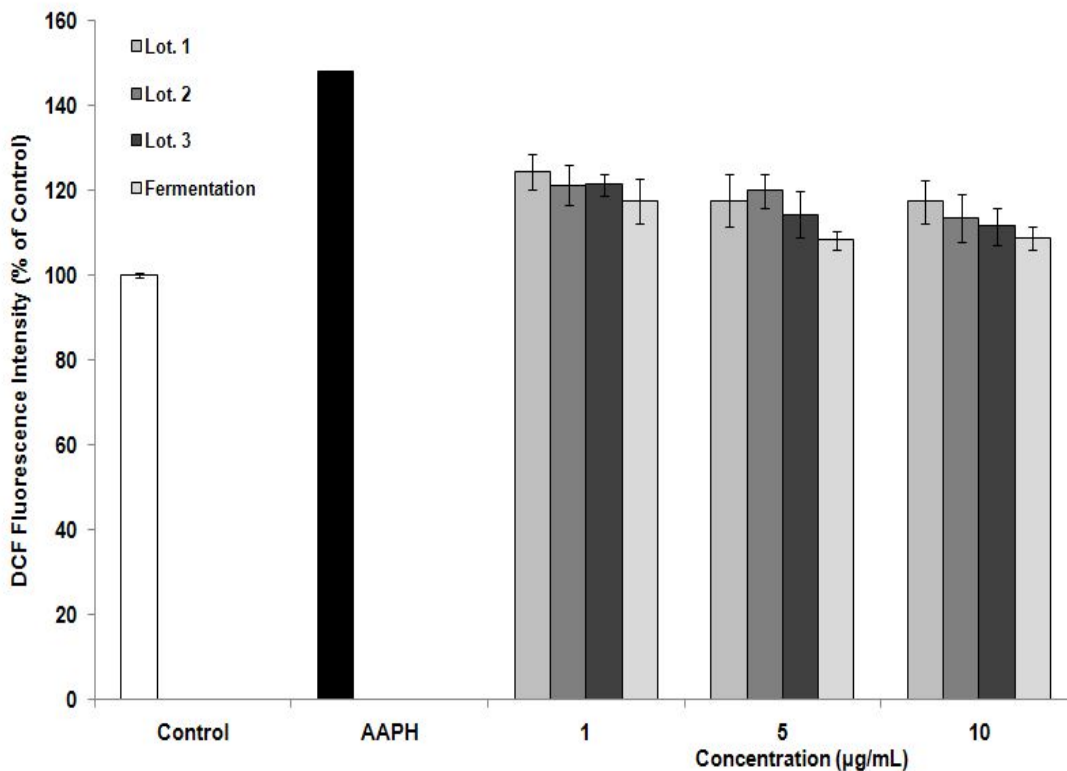


Fig. 9. Effect of fermentation on cellular antioxidant capacity of *Artemisia iuxayomogi* extracts against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells.

라. Cu^{2+} 에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포내 항산화 활성

HepG2세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 수로 배양하여 24시간 pre-incubation하고 test sample을 30분간 처리하였다. Media를 제거한 후 각 well에 50 μ L의 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 1회 씻어주었다. Media 대신 각 well에 형광의 간섭을 받지 않는 200 μ L의 HBSS으로 교체해 주었다. 10 μ M의 CuSO_4 를 가하고 30분간 배양한 후 40 μ M의 DCFH-DA를 가한 다음 30분간 추가로 배양하였다. 측정은 GENios fluorescence plate reader (TECAN Trading AG, Switzerland)를 사용하였으며, excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광을 측정하였다.

인진쑥 ethanol 추출물과 발효추출물의 세포내 항산화 활성을 분석한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 1, 5 그리고 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 AAPH에 의해 유도된 산화 스트레스 (173.68%)에 비해 149.96 ~ 125.74%까지 모든 시료에서 산화 스트레스를 감소시켰으며, 특히 인진쑥 발효 추출물이 1, 5 그리고 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각, 134.63, 130.73, 125.74 %까지 Cu^{2+} 에 의해 유도된 산화 스트레스를 농도 의존적으로 감소시켰다. 이는 인진쑥 ethanol 추출물 및 발효 추출물이 천연 항산화 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

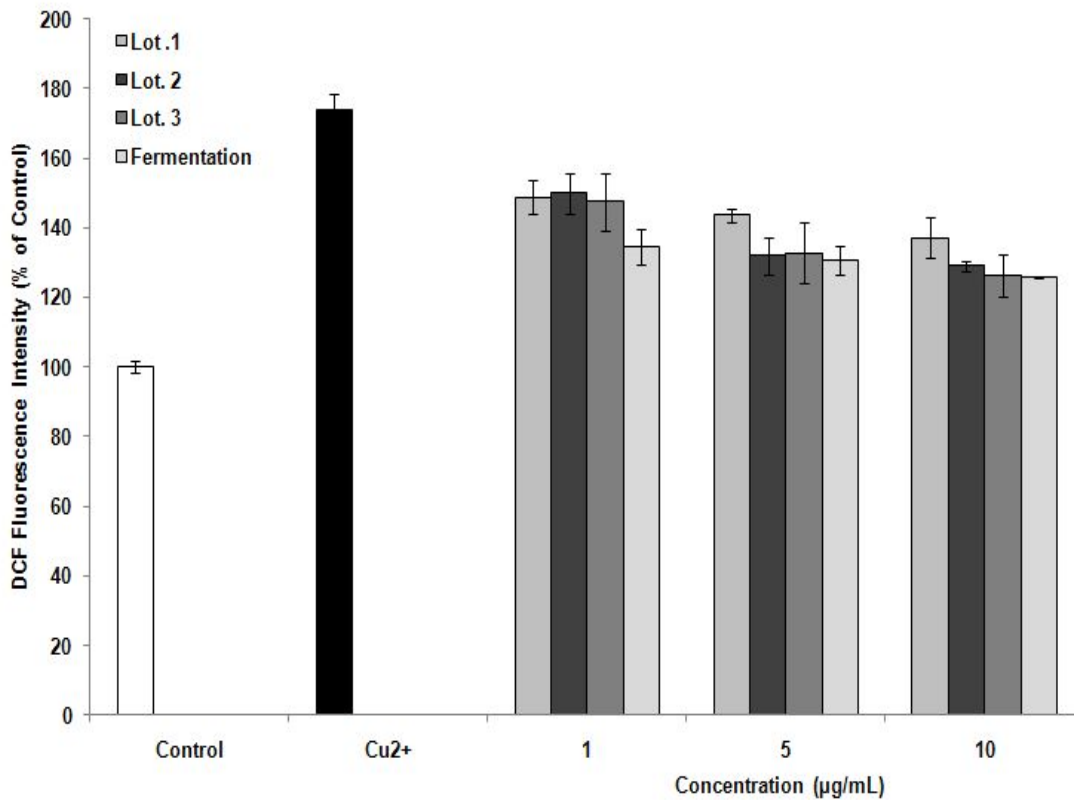


Fig. 10. Effect of fermentation of cellular antioxidant capacity of *Artemisia iwayomogi* extracts against Cu^{2+} -induced oxidative stress in HepG2 cells.

4절. 인진쑥 추출물과 유산균 발효 추출물의 조골세포 성장촉진 활성

1. 조골세포 배양 (Osteoblast culture)

MC3T3-E1 subclone 4 (ATCC, No. CRL-2593)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. MC3T3-E1 subclone 4 세포는 10% heat-inactivated 시킨 fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic-antimycotic agent를 포함한 Minimum Essential Media Eagle, Alpha Modification (α -MEM)으로 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. Culture medium은 1주에 2~3회 1:3 비율로 계대 배양하였다.

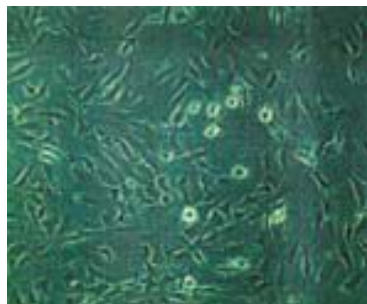


Fig. 11. Rat pre-osteoblast cell line MC3T3-E1 subclone 4.

2. 유산균에 발효에 의한 인진쑥 추출물 조골세포 증식촉진 활성의 증가

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well 24시간 pre-incubation하고 test sample을 48시간 처리한 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 4시간 처리하였다. Media를 제거한 후 세포를 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 씻어준 후 수용액에 용해되지 않는 formazan을 300 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가 하여 녹이고 그 중 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader (Tecan, Austria)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

인진쑥 ethanol 추출물과 발효 추출물의 osteoblast proliferation activity는 Fig. 12에 나타난 바와 같다. 0.1에서 10 μ g/mL의 농도에서 조골세포의 증식률이 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다. 인진쑥 유산균 발효 추출물의 경우 0.1, 0.5, 1, 5 그리고 10 μ g/mL에서 각각 118.19, 121.72, 129.70, 144.07 그리고 169.36% 까지 조골세포의 증식률을 증가시켰으며 인진쑥 ethanol 추출물에 비해 높은 증식률을 나타내었다. 이는 인진쑥의 유산균 발효과정에서 조골세포의 증식을 증가시키는 물질의 함량이 증가된 것으로 사료된다.

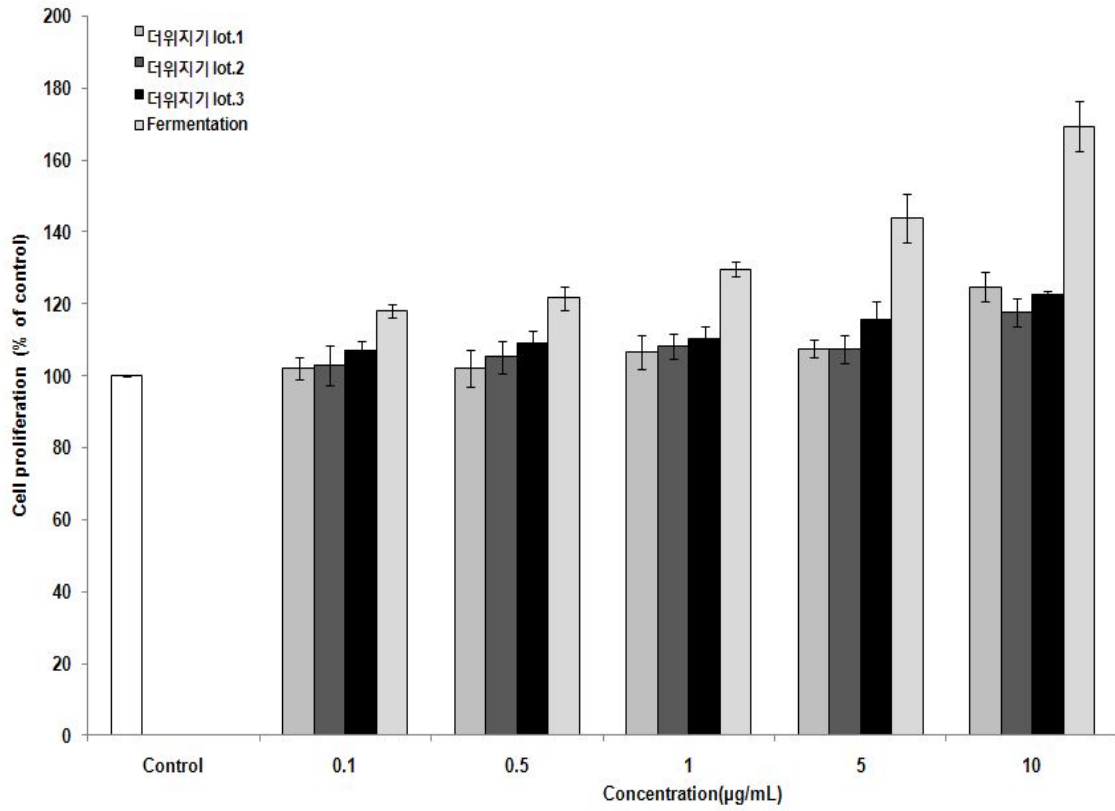


Fig. 12. Effect of fermentation on the osteoblast proliferation activity of *Artemisia iwayamogi* extracts.

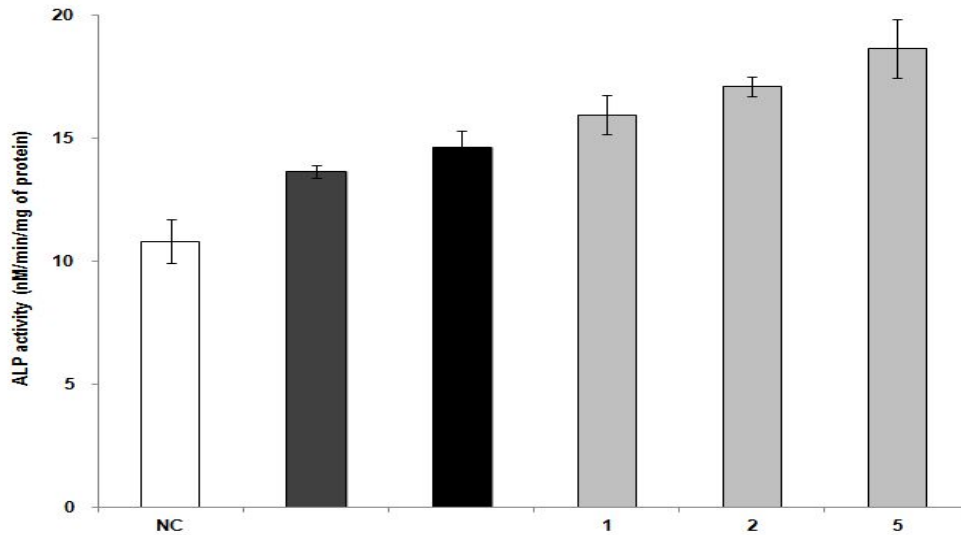
5절. 조골세포에 미치는 인진쑥추출물과 칼슘의 작용

1. 인진쑥 추출물에 의한 조골세포 ALP 활성증가에 미치는 calcium lactate의 효과

Alkaline phosphatase (ALP) 효소는 조골세포의 세포막에 존재하는 당단백 효소로 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며, 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정동안 무기인산의 운반과 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하여 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있다. (Newmark, H. L. Adv. Exp. Med. Biol., 1996)

MC3T3-E1 subclone 4세포를 12-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료(10 μ g/mL) 및 calcium lactate (1, 2 그리고 5 mM)를 넣어 총 6일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 100 μ L의 0.1% Triton X-100를 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis시켰다. Lysis된 세포를 원심분리하여 (14000rpm, 4°C, 10min) 상등액 5 μ L는 단백질 정량에 사용하였고, 상등액 30 μ L에 1 mM $MgCl_2$ 와 6 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 9.8)를 70 μ L 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 100 μ L의 0.1 N NaOH를 넣어 반응을 정지 시킨 다음 ELISA reader (Tecan, Austria)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 10, 50, 100, 200 그리고 500 nM의 4-nitrophenol을 이용하여 검정선 작성하였으며, alkaline phosphatase 활성은 세포 수에 따라 영향을 받을 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위 세포 수에 대한 alkaline phosphatase의 활성을 계산하였고 alkaline phosphatase 활성은 1 unit (nM PNPP/mg of protein/min)으로 표시하였다.

인진쑥 추출물과 calcium lactate 첨가에 따른 ALP 활성은 Fig. 13에 나타내었다. 6일간의 분화 기간동안 ALP 활성을 평가한 결과 분화유도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 13.66 unit까지 ALP 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 인진쑥 추출물만 처리하였을 경우 14.62 unit까지 ALP 활성이 증가하였으며, 인진쑥과 칼슘을 1, 2 그리고 5 mM의 농도로 처리하였을 경우 15.95 ~ 18.64 unit까지 ALP 활성을 증가시켰다. 이는 인진쑥 추출물과 calcium lactate를 함께 사용할 경우 조골세포의 분화과정에 상승효과를 가지며 조골세포의 석회화에 관여할 수 있을 것으로 판단된다.



OSM	-	+	+	+	+	+
ACE(10 µg/mL)	-	-	+	+	+	+
Calcium lactate (mM)	-	-	-	+	+	+

Fig. 13 Effect of calcium lactate on alkaline phosphatase activity of osteoblasts treated with ACE.

2. 인진쑥 추출물에 의한 조골세포 콜라겐 합성 (collagen synthesis)에 미치는 calcium lactate의 효과

뼈는 주로 콜라겐과 칼슘으로 구성되어 있으며, 계속 성장하며 살아있는 조직이다. 콜라겐은 뼈에서 부드러운 골격을 형성하는 단백질이고 인산칼슘이라는 미네랄이 뼈의 골격을 강하고 단단하게 만들어 준다. 또한 콜라겐은 골조직의 유기물의 대부분을 차지하며, 콜라겐이 적절하게 생성되지 못하는 조건에서는 골조직의 석회화가 일어나지 않을 뿐만 아니라 ALP 활성 저하 및 osteocalcin의 생성 또한 매우 감소하는 것으로 알려져 있다 (Owen, *et al.* J. Cell. Physiol., 1990).

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 µg/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료 (10 µg/mL) 및 calcium lactate (1, 2 그리고 5 mM)를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 8일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 µL PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 µL Bouin's fluid 용액으로 37°C에서 1시간동안 고정시킨 후 500 µL PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 뒤 0.1% Direct red 80 (Sirius red F3BA) 용액으로 1시간동안 염색하였다. Acidic water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 µL 0.1 N NaOH 용액을 가하여 녹인 다음 200 µL를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader (Tecan, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

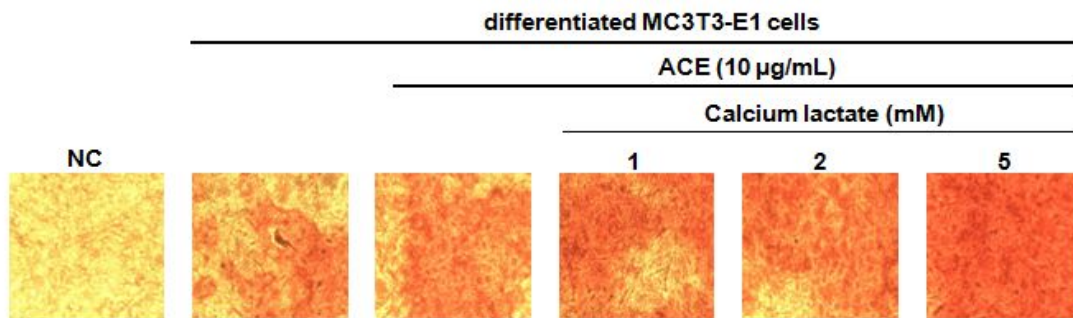
인진쑥 추출물과 calcium lactate 첨가에 따른 collagen synthesis 활성은 Fig. 14에 나타내었다. 분화

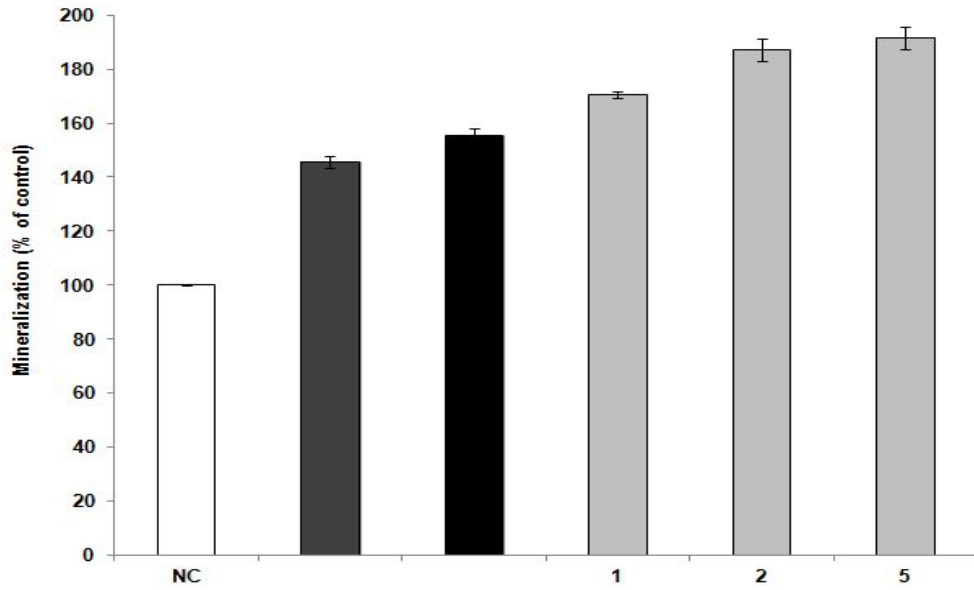
골의 생성은 기질의 증식, 성숙 및 석회화의 세 단계로 이루어진다. (Pittenger JJ. *et al.* Science., 1999). Bone nodule의 형성능은 조골세포 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 calcium에 특이적으로 흡착력이 높은 식물성 염료로서 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화된 양과 염색된 정도가 상호 비례하는 것으로 알려져 있다. (Schiller PC, *et al.* Bone., 2001)

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 (10 μ g/mL) 및 calcium lactate (1, 2 그리고 5 mM)를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 15일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 μ L 70% ethanol로 4°C에서 1시간동안 고정시킨 다음 500 μ L의 distilled water로 2회 씻었다. 40 mM Alizarin red S (pH 4.2) 용액으로 10분 동안 염색하였다. 500 μ L distilled water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 μ L 10% cetylpyridinium chloride 용액을 가하여 녹인 다음 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader (Tecan, Austria)로 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조골세포 bone nodule 형성에 미치는 인진숙 추출물의 효과에 대한 calcium lactate의 영향은 Fig. 15에 나타난 바와 같다. 분화유도배지로 분화를 유도한 MC3T3-E1 subclone 4 세포의 경우 분화유도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 145.52%까지 bone nodule 형성이 증가된 것으로 나타났다. Calcium lactate를 1, 2 그리고 5 μ M의 농도로 처리한 결과 155.56 ~ 191.67%까지 bone nodule 형성이 증가된 것으로 나타났다.

이는 calcium lactate 첨가는 인진숙 추출물에 의한 조골세포의 세포외 기질화를 촉진시켜 골 생성에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.





OSM	-	+	+	+	+	+
ACE(10 µg/mL)	-	-	+	+	+	+
Calcium lactate (mM)	-	-	-	+	+	+

Fig. 15. Effect of calcium lactate on the collagen synthesis of osteoblasts treated with ACE.

6절. 건강기능식품 및 음료 개발

1. 개발 환경

- 대한민국은 출산율은 낮아지고, 평균수명은 증가하여 고령화사회로 가속화되고 있음.
- 50대 폐경기 여성은 골다공증 또는 골소공증의 현상이 발생하여 뼈와 관절 계통에 문제가 되고 있으며 이에 대한 건강기능식품이 여러종류 출시되고 있음
- 천연물을 이용한 건강식품 또는 의약품을 연구하여 합성이 아닌 천연제품에 대한 관심이 높아지고 있어서 국내외에서 자연에 존재하는 식품 소재로 제품화하는 연구가 활발하게 진행되고 있음.
- 어린이용 키성장제품에 타겟을 맞추었으나, 이 용도로 식품의약청에서 건강기능식품을 제조하는 것이 허가받는 것이 불가능하게 됨에 따라 유사한 효능인 뼈건강으로 맞추었으며 타겟 층도 어린이에서 중장년층으로 변경하여 설정하였음.

2. 건강기능식품 제형 개발

인진쑈추출분말이 개별인증형으로 승인받으면 인진쑈추출분말을 주요 원료로 사용하여 Health Claim을 할 수 있으나, 지금은 아직 미승인 상태이므로 뼈 건강에 유익하고 인진쑈추출물과 상승 효과가 있는 칼

습을 혼합하여 고시형 제품으로 제형을 개발하였다(Fig. 15).

가. 과립형 제품

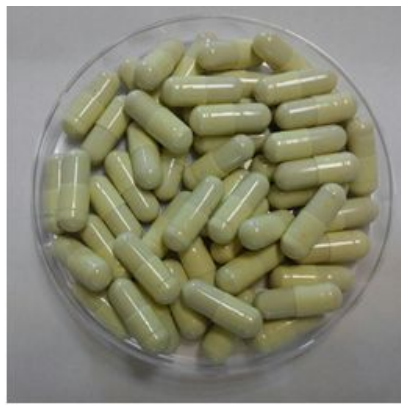
해조칼슘 75.4%와 인진쑥추출분말 8.4%, 기타 부형제를 반죽하여 혼합하고, 과립기로 과립을 성형한 다음 저온 열풍건조기로 건조하여 과립을 제조하였다. 이때 인진쑥추출분말이 동결건조된 것을 사용하여 흡습성이 강하였고 사용량을 올리는데 어려움이 있어서 최종 8.4%로 제조하였다.

나. 경질 캡슐형 제품

캡슐형 제품을 제조하는데는 맛과 조직감이 크게 영향을 주지 않기 때문에 제조하기가 다른 제형에 비하여 용이하였다. 해조칼슘 28%, 인진쑥추출분말 49%, 기타 부형제를 혼합하여 캡슐 충전기로 충전하였다. 캡슐당 500mg을 충전하기 위하여 0호 캡슐을 선택하였고, 하루 6알씩 섭취하도록 설계하였다.

다. 정제형 제품

해조칼슘 29%, 인진쑥추출분말 50%, 기타 부형제를 혼합하고, 과립기로 과립을 성형한 다음, 타정기로 타정하여 정제를 제조하였다. 인진쑥추출분말이 동결건조된 원료를 사용한 관계로 상온에 노출 시 흡습이 되는 경향이 강하였으며 상대적으로 분무건조된 원료가 흡습성에 대하여 훨씬 개선될 것으로 보여 추후 원료가 준비되는 대로 다시 제형을 만들 예정이다.



과립 제형

인진쑥추출분말 8.4%
해조칼슘 75.4%
기타 부형제 등 16.2%

경질 캡슐 제형

500mg (0호)

인진쑥추출분말 49%
해조칼슘 28%
기타 부형제 등 23%

정제 제형

600mg (타원형)

인진쑥추출분말 50%
해조칼슘 29%
기타 부형제 등 21%

Fig. 15 사철쑥 건강기능식품 개발 제형

3. 쑥 발효음료 개발

건강식품의 제형 외에 일반식품으로서 발효음료를 개발하였다(Fig. 16). 1차 년도와 2차 년도에 걸쳐서 개발한 발효방법을 사용하여 유산균으로 쑥 추출액을 발효하여 시제품을 만들었으며 이를 파우치로 멸균 포장하였다. 유산균을 접종하여 발효액을 만들었을 때의 증식된 유산균수는 ml 당 1억균 이상을 상회하였다. (성분 : 쑥추출액 90% + 프락토올리고당 10%)



Fig. 16 쑥 발효음료 제품

향후 쑥의 발효가 좀 더 잘 되는 조건을 개선하고 기호성을 향상시키고, 기술적 데이터를 만든 다음 상품화를 추진할 예정이다.

4. 인진쑥 발효 조성물 특허 등록

뼈 성장촉진 효능을 갖는 인진쑥 발효 추출물 조성물 특허 등록을 취득하였다.

[제2-1세부: 인진쑥의 뼈 건강에 도움을 주는 기능성분 설정 및 표준화]

1절. 인진쑥의 기원

인진쑥은 대한약전외한약(생약)규격집 [개정 2007. 11. 2. 식품의약품안전청고시 제 2007-72호]에 의하면 인진호와 한인진으로 구별되어 있다. 인진호는 사철쑥 *Artemisia capillaris* 이며, 한인진은 더위지기 *Artemisia iwayomogi*로서 각각 구별된다. 사철쑥의 경우 식용으로 가능하나 더위지기의 경우 식용가능으로 분류되지 않고 있어 건강기능식품으로 개발하기 위하여는 사철쑥을 활용하는 것이 바람직하다고 생각된다

인진호

(茵陳蒿)

ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA

인진(茵陳)

이 약은 사철쑥 *Artemisia capillaris* Thunberg (국화과 Compositae)의 지상부이다. 봄에 채취한 것을 ‘면인진(綿茵陳)’이라 하고, 가을에 채취한 것을 ‘인진호(茵陳蒿)’라 한다.

성상 면인진(綿茵陳) 이 약은 말린 덩어리 모양이고 회백색 ~ 회록색이며 전체에는 백색의 털이 덮여있고 섬유처럼 부드럽다. 줄기는 가늘고 길이 1.5 ~ 2.5 cm, 지름 0.1 ~ 0.2 cm이며 표면의 백색의 털을 제거하면 세로무늬를 선명하게 볼 수 있고 질은 부드럽다. 잎에는 잎자루가 있고 1 ~ 3 회 우상으로 갈라져 있으며 길이 1 ~ 3 cm, 지름 약 1 cm이다. 소엽편은 난형 또는 도피침형이고 조형이며 선단은 예첨두이다.

이 약은 맑은 향기가 있고 맛은 조금 쓰다.

인진호(茵陳蒿) 이 약의 줄기는 원주형이고 가지가 많으며 길이 30 ~ 100 cm, 지름 2 ~ 8 mm이다. 겉은 갈색 또는 자색이고 세로무늬가 있으며 짧은 유포로 덮여있다. 질은 약하며 가볍고 자른 면은 유백색이다. 잎은 밀집되어 있거나 탈락되어 있다. 아래쪽의 잎은 1 ~ 2 회 우상으로 갈라져 있잖로 부는 줄기를 싸고 있으며 열편은 가는 실 모양이다. 두상화서는 난형이고 여럿이 모여 원추상색이다루며 길이 1.2 ~ 1.5 mm, 지름 1 ~ 1.2 mm이며 짧은 잎자루가 있다. 총포편은 3 ~ 4 층이고 난형이며 포편은 셋으로 갈라진다. 바깥층의 암꽃은 6 ~ 10 개이고 많은 것은 15 개까지이며 안쪽의 양성화는 2 ~ 10 개이다. 수과는 타원형이고 황갈색이다.

이 약은 방향이 있고 맛은 조금 쓰다.

확인시험 이 약의 가루 0.1 g을 여지위에 놓고 그 위에 클로로포름 2 ~ 3 방울을 떨어뜨려 자연히 말린 다음 가루를 제거한 다음 여지에 자외선을 쬐일 때 청백색의 형광을 나타낸다.

순도시험 줄기 이 약은 지름 2 mm 이상의 줄기가 섞여 있어서는 안된다.

건조감량 12.0 % 이하 (6시간).

회분 9.0 % 이하.

산불용성회분 2.0 % 이하.

엑스함량 묽은에탄올엑스 15.0 % 이상.

등급 양품 이 약은 신선하고 지름 3 mm 이상의 줄기가 섞여 있지 않은 것이어야 한다.

한 인 진

(韓茵蔯)

ARTEMISIAE IWAYOMOGII HERBA

이 약은 더위지기 *Artemisia iwayomogi* Kitamura (국화과 Compositae)의 지상부이다.

성상 이 약은 기부(基部)가 목질화 되어 있고 위에는 갈라진 줄기와 경엽이 있다. 경엽은 2회 깃꼴(羽狀)로 깊게 갈라지고 열편(裂片)은 피침형이며 끝이 날카롭고 대개 톱니가 있으며 잎자루는 길이 2 ~ 3 cm이다. 잎의 윗면은 녹색으로서 잔털과 오목한 점이 있으며 뒷면은 황록색을 띠고 잔털과 선점(腺點)이 있다.

이 약은 특이한 냄새가 있고 맛은 조금 쓰다.

건조감량 11.0 % 이하.

회분 8.0 % 이하.

산불용성회분 1.0 % 이하.

정유함량 0.2 mL 이상 (100 g).

엑스함량 물엑스 18.0 % 이상,

물은에탄올엑스 12.0 % 이상

등급 양품 이 약은 짙은 녹색의 잎이 많은 것이어야 한다.



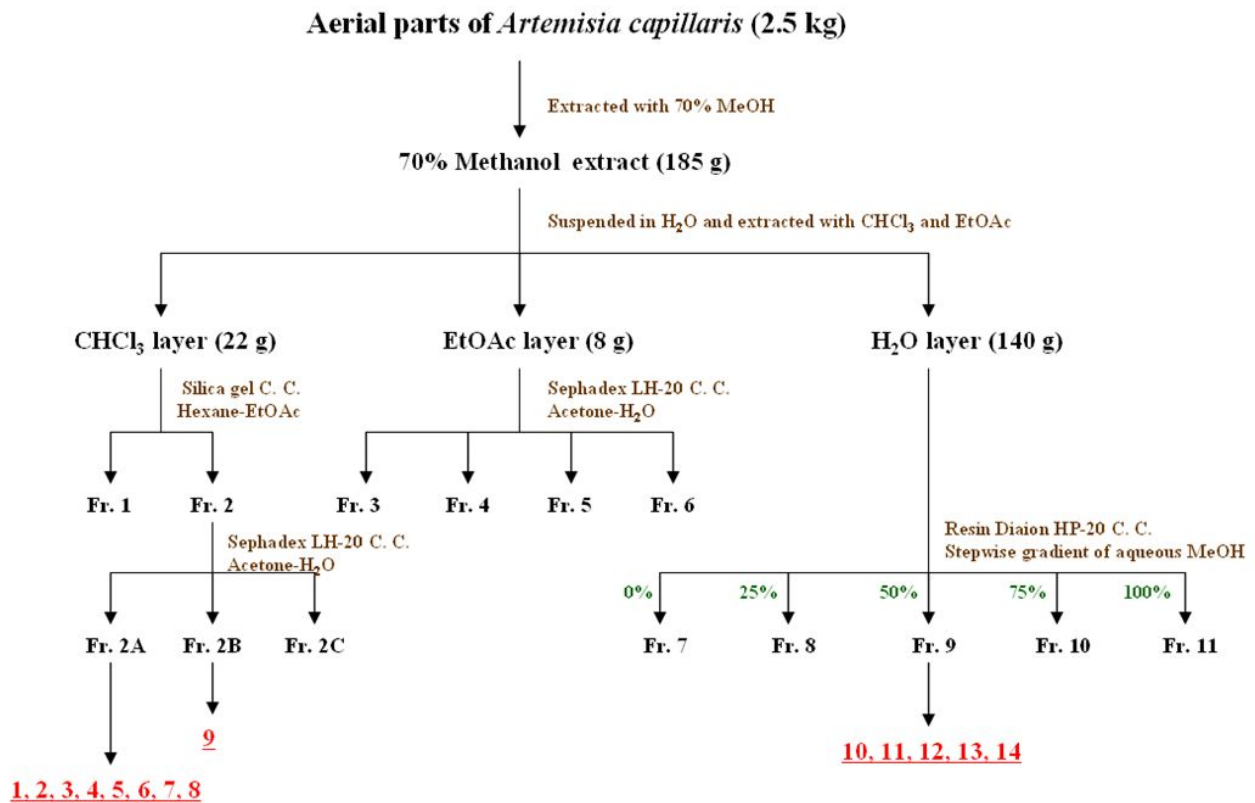
제주도에서 더위지기썩은 국화과에 속하는 다년생의 목본식물로서, 낙엽활엽관목으로 잎은 2회 우상삼열이고 열편은 선형이고 끝은 뾰족하고 잎사귀는 전연 또는 얇은 톱니를 지니고 있으며, 잎 뒷면은 녹색이고 잔털이 많다. 꽃은 두상화서이고 반구형이며 노랑색이고 7-8월에 피며 9-10월에 성숙한다. 우리나라 전역에 분포하며 일본의 북해도, 소련의 사할린, 시베리아, 동북 중국, 몽고 등 아시아 지역 특히 북부에 광범위하게 분포한다. 줄기와 잎새는 한인진(韓茵蔯)이라해서 고려시대서부터 약용되어 왔다. 더위지기의 성분으로는 esculetin-6-methylether와 esculetin-7-methylether이 많이 알려져 있고 주로 함량이 많은 것은 전자의 물질이다. 이들 성분은 이담작용이 강하기 때문에 예로부터 담석증, 감염 및 황달의 요약(要藥)으로 쓰여져 왔다. 그 외에 소염이뇨(消炎利尿)의 효과가 있으며, 인진오령산의 주약이 되기도 한다. 기타 20여종의 정유성분이 함유되어 있는데 camphor가 주류를 이루고 있고 기타 isovaleric acid도 함유되어 있어 진정효과를 나타낼 것이 예측된다. 동양 삼국 중에서 한인진을 인진으로 약용하고 있는 것은 유독 우리나라 뿐이고 일본, 중국, 대만에서는 사철썩을 인진으로 하여 약용되고 있다. 한인진은 우리나라 향약(鄕藥)의 발전에 있어서 하나의 지표가 되는 생약이라고 생각된다.

2절. 사철쭉의 성분 분석

1. 사철쭉 성분의 분리정제

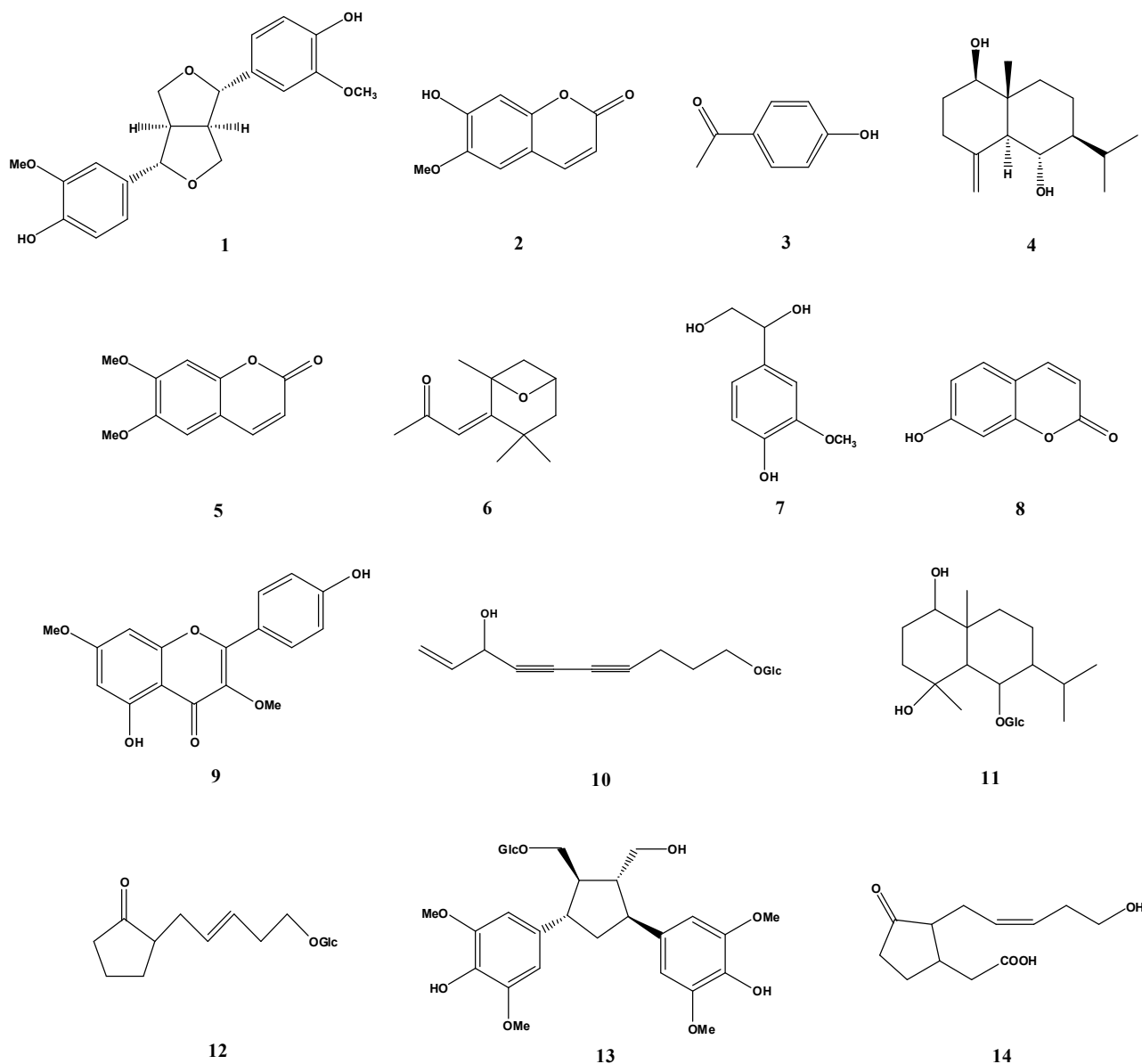
경북 울진에서 수집한 사철쭉 2.5 kg을 70% MeOH로 3회 열탕 추출하여 추출물 185 g을 얻었다. 얻어진 MeOH Ex를 H₂O에 현탁하여 CH₂Cl₂와 EtOAc를 이용하여 차례로 분획하여 CH₂Cl₂분획, EtOAc분획, H₂O 분획을 얻었다. CH₂Cl₂ 분획을 Hexane:EtOAc (1:0-0:1)의 gradient 용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 2개의 분획 (Fr. 1, Fr. 2)를 얻었으며, Fr. 2를 Acetone:H₂O의 전개용매로 Sephadex LH 20 column chromatography를 실시하여 3개의 분획 (Fr. 2A - Fr. 2C)를 얻었으며, 최종적으로 Fr. 2A분획에서 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 을 분리정제 하였으며, Fr. 2b 분획에서 화합물 9를 분리정제하였다.

H₂O 분획 (140 g)을 H₂O:MeOH gradient 용매로 Diaion HP 20 column chromatography를 수행하여 5개의 분획 (Fr. 7 - Fr. 11)를 얻었으며, Fr. 9에서 화합물 10, 11, 12, 13, 14를 분리정제하였다.



2. 사철쑥 성분의 구조 동정

사철쑥에서 순수분리한 화합물에 대하여 용점, 선광도 등의 물리화학적 성질을 측정하고, 또한 각종 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC, HMQC, NOESY, MS 등의 spectral data 를 종합하여 화합물의 구조를 동정하였다.

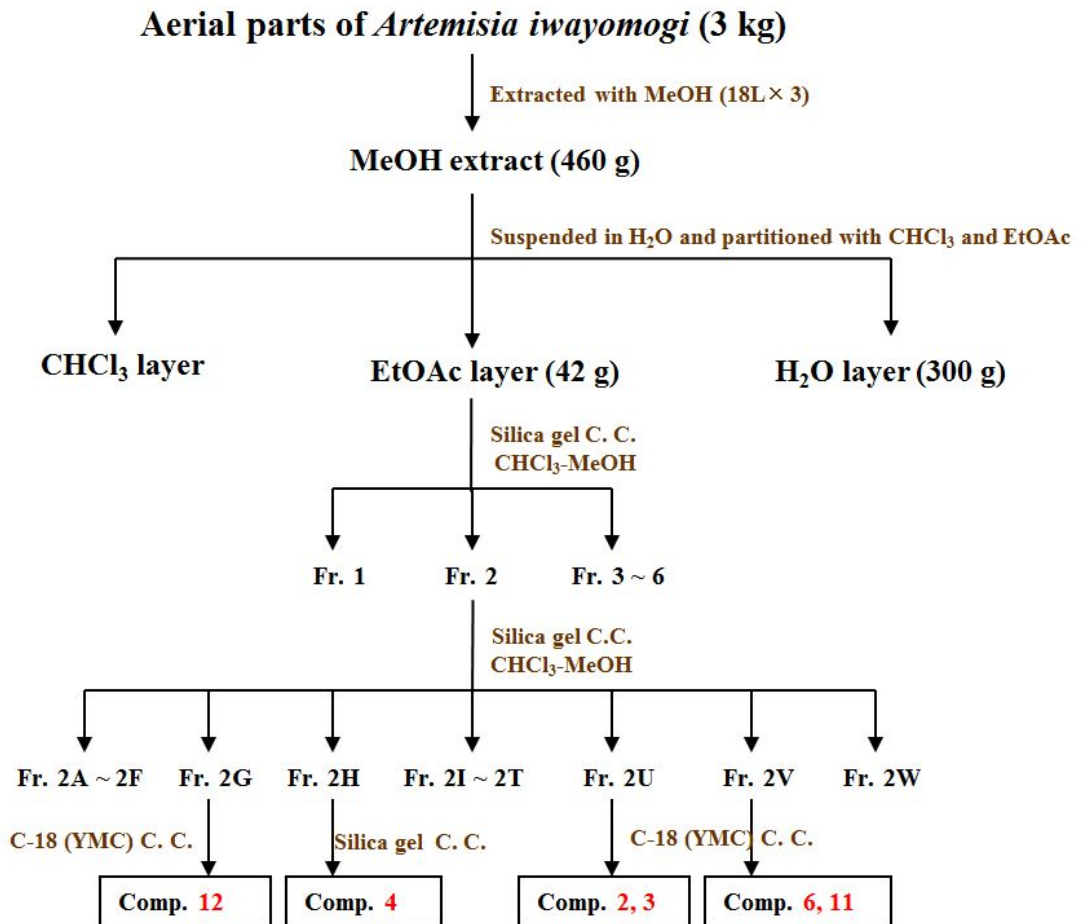


- 1 (+)-pinoresinol, 2 scopoletin, 3 ethanone, 4 5-epi-dudesma-4(15)-diol-1 β -6 β -diol
 5 scoparone, 6 fusic acid, 7 D-3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol, 8 umbelliferone
 9 5,4'-dihydroxy-3,7-dimethoxyflavone, 10 deca-9-en-4,6-diyne-1,8-diol 1-O- β -D-glucopyranoside,
 11 pumiraside, 12 cyclopentanone, 13 7S,7'S, 8R, 8'R-icariol A2-9-O- β -D-glucopyranoside
 14 tuberonic acid

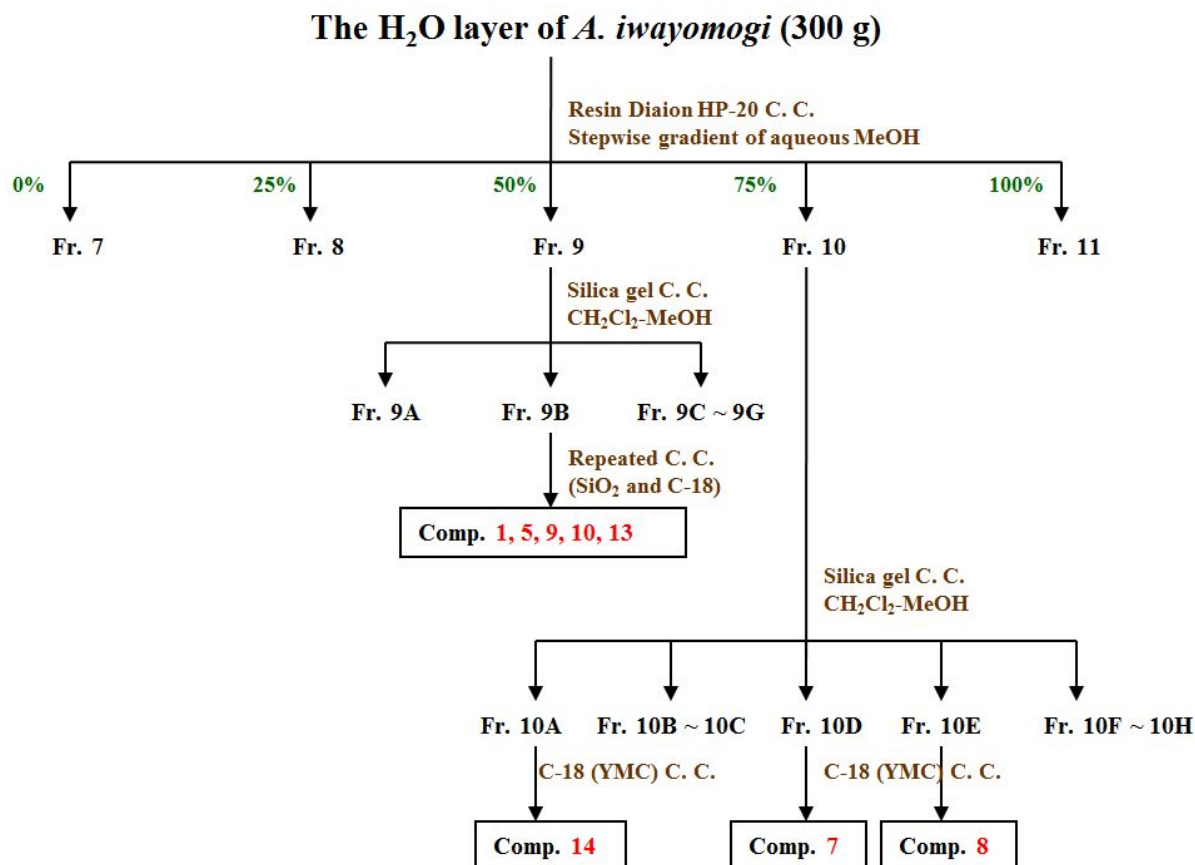
3절. 더위지기의 성분 분석

1. 더위지기 성분의 분리정제

경동시장에서 수집한 더위지기 3.0 kg을 MeOH로 3회 열탕 추출하여 추출물 460 g을 얻었다. 얻어진 MeOH Ex를 H₂O에 현탁하여 CH₂Cl₂와 EtOAc를 이용하여 차례로 분획하여 CH₂Cl₂분획, EtOAc분획, H₂O 분획을 얻었다. EtOAc 분획을 CH₃Cl-MeOH gradient 용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 6개의 분획 (Fr. 1 - Fr. 6)를 얻었으며, Fr. 2를 CH₃Cl-MeOH의 전개용매로 Silicagel column chromatography를 실시하여 25개의 분획 (Fr. 2A - Fr. 2W)를 얻었으며, 각각의 분획을 재컬럼을 수행하여 6개의 화합물을 분리정제하였다.

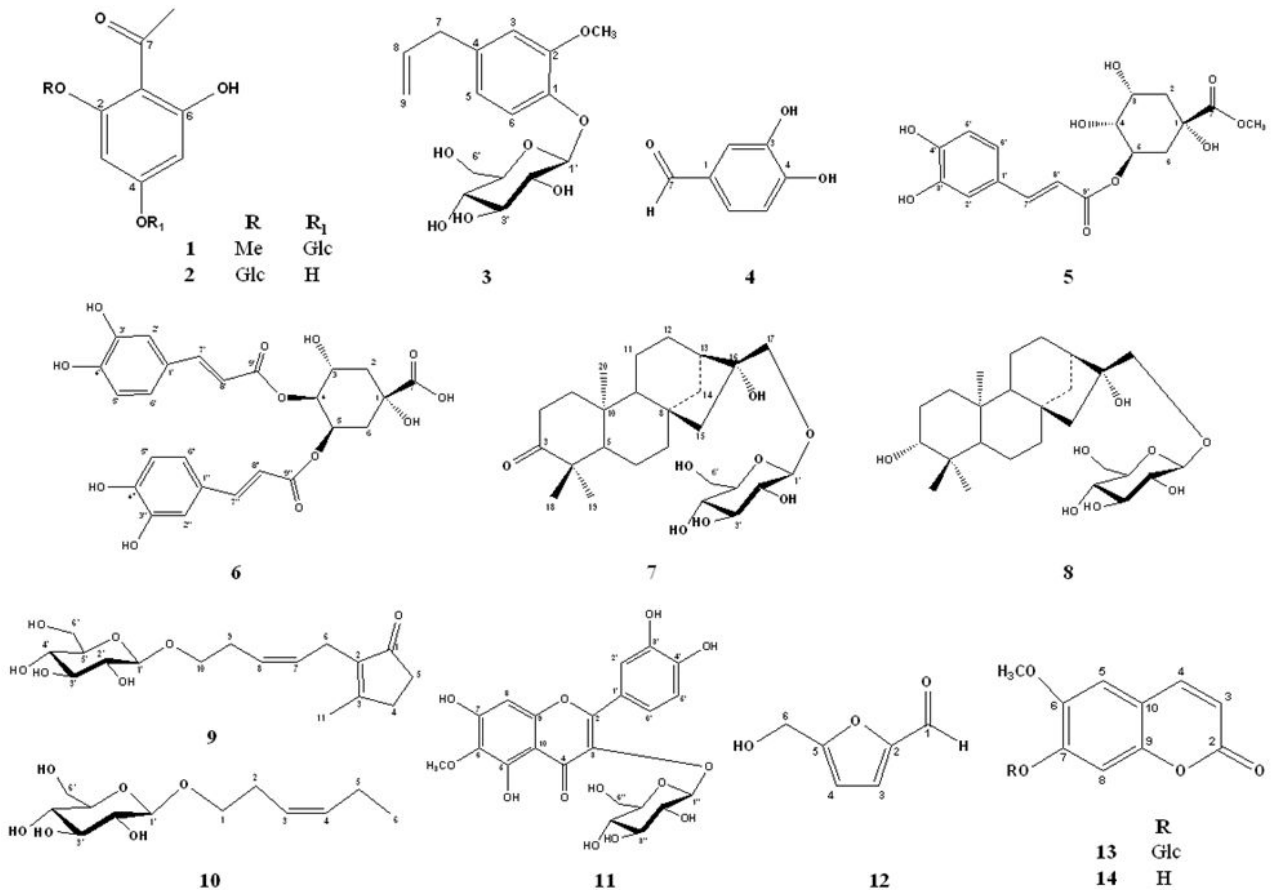


H₂O 분획 (300 g)을 H₂O:MeOH gradient 용매로 Diaion HP 20 column chromatography를 수행하여 5개의 분획 (Fr. 7 - Fr. 11)를 얻었으며, Fr. 9에서 5개의 화합물을 얻었고, Fr. 10에서 3개의 화합물을 분리정제하였다.



2. 더위지기 성분의 구조 동정

더위지기에서 순수분리한 화합물에 대하여 용점, 선광도 등의 물리화학적 성질을 측정하고, 또한 각종 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC, HMQC, NOESY, MS 등의 spectral data를 종합하여 화합물의 구조를 동정하였다.



Amphenone (1), myrciaphenone A (2), citrusin C (3), protocatechualdehyde (4), chlorogenic acid methyl ester (5), 3,4-di-O-caffeoyl isoquinic acid (6), abbeokutone 17-O-β-D-glucopyranoside (7), ent-kaurane-3β,16β,17-triol 17-O-β-D-glucoside (iwayoside A) (8), (Z)-10-hydroxyjasmane 10-O-β-D-glucopyranoside (9), (Z)-3-hexanyl 1-O-β-D-glucopyranoside (10), patuletin 3-O-β-D-glucopyranoside (11), hydroxymethylfurfural (12), scopolin (13), and scopoletin (14).

4절. 사철쭉의 지표성분의 분석

1. 의약품등 기준 및 시험방법의 인진호와 한인진의 지표성분 기준

의약품등 기준 및 시험방법에 의하면 인진호(사철쭉)는 지표성분을 디메칠에스쿠레틴(스코파론)으로 정하고 그 함량을 0.1% 이상으로, 한인진은 지표성분을 스코폴린으로 정하고 그 함량 기준을 0.3%로 하였다.

의약품 등 기준 및 시험방법 심사의뢰서 심사규정
2007. 07. 02. 식품의약품안전청고시 제2007- 47호

[별표 6] 한약제제에서의 지표성분 설정 가능한 한약

생약명	지표성분명	분자식 : 분자량	함량기준	정량법	적용대상	
					가	나
인진호 (사철쭉)	디메칠에스쿠레틴 (스코파론)	C ₁₁ H ₁₀ O ₄ : 206.2	0.1%	HPLC	○	○
한인진 (더위지기)	스코폴린	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ : 354.31	0.3%	HPLC	○	×

○ : 원칙적으로 설정하되 설정이 불가능한 이유가 명백할 때는 생략할 수 있음.

× : 설정할 필요 없음.

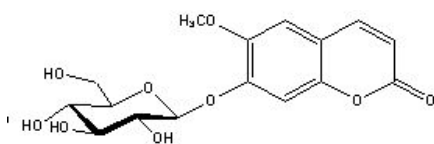
※ 적용대상

가. 생약(한약) 원료 및 그 완제의약품의 경우.

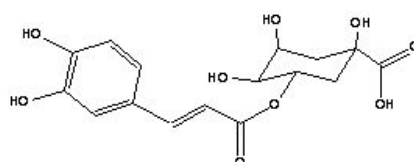
나. 생약(한약)을 정제수로 추출하여 제조한 원료 및 그 완제의약품의 경우.

2. 시험에 사용한 표준물질의 설정

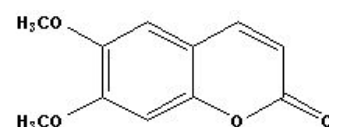
사철쭉의 생리활성 성분에 대한 정량법을 개발하기 위해 사철쭉의 주요성분인 coumarin 화합물인 scoparone을 사용하였다. 인진호의 주요성분은 coumarin, phenolic compound 및 flavonoid성분 및 그들의 glucoside계 화합물이며, 이들 화합물의 생리활성으로 소염성이노, 이담약으로 황달, 전염성간염, 담낭염 등에 사용한다. 1차년도에서는 더위지기의 주요성분인 scopolin을 분석하였으나, 2차 년도에서는 사철쭉의 주요성분인 scoparone을 사용하여 분석을 시도하였다.



1. Scopolin



2. Chlorogenic acid



3. Scoparone

3. 사철쭉 시료의 제조

경북 울진에서 구입한 사철쭉 시료를 잘게 세절한후 각각을 정확하게 1.0 g을 달아 세개의 시료를 제조하였다. (AC-223a, AC-223b, AC-223c). 각각의 시료은 70 % MeOH 100 mL로 초음파 방법으로 추출하고 0.45 um filter membrane으로 여과하였다. 최종적으로 농도를 10 mg/mL으로 조정하고 여액 10 uL를 취하여 HPLC 분석에 사용하였다.

AC-223a: the extraction solution a

AC-223b: the extraction solution b

AC-223c: the extraction solution c

4. 사철쭉 추출물의 제조

경북 울진에서 구입한 사철쭉 시료를 제 1-2 세부과제인 바이셀에서 추출하여 얻은 5종의 50% 주정추출물에 대하여 scoparone의 함량을 분석하였다. 각각의 시료는 70 % MeOH로 녹인후 0.45 um filter membrane으로 여과하고, 최종적으로 농도를 10 mg/mL으로 조정하고 HPLC 분석에 사용하였다.

AC-01: the extract of lot 1 (lot1)

AC-02: the extract of lot 2 (lot2)

AC-03: the extract of lot 3 (lot3)

AC-04: the extract of lot 4 (lot4),

AC-05: the extract of lot 5 (lot5)

5. 사철쭉의 지표성분 scoparone 화합물의 HPLC 분석조건 설정

사철쭉의 정량법에 사용되는 HPLC 조건은 다음과 같다.

HPLC Conditions:

HPLC system: Gilson automated HPLC system

Detector: Gilson UV/VIS-151

Auto sampler: GX-271 Liquid Handler

Solvent mixing: Gilson 321 pump

Chromatographic column: Gemini C18 110A (250×4.6 mm, 5µm)

Injection volume: 10 µL

Flow rate: 1.0 mL/min

Column temperature: Room temperature

UV wavelength: 235 nm

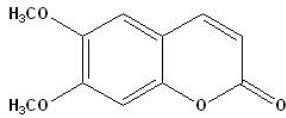
Mobile phase:

Time (min)	Acetonitrile (%)	0.1% trifluoroacetic aqueous (%)
0	10	90
10	10	90
40	40	60

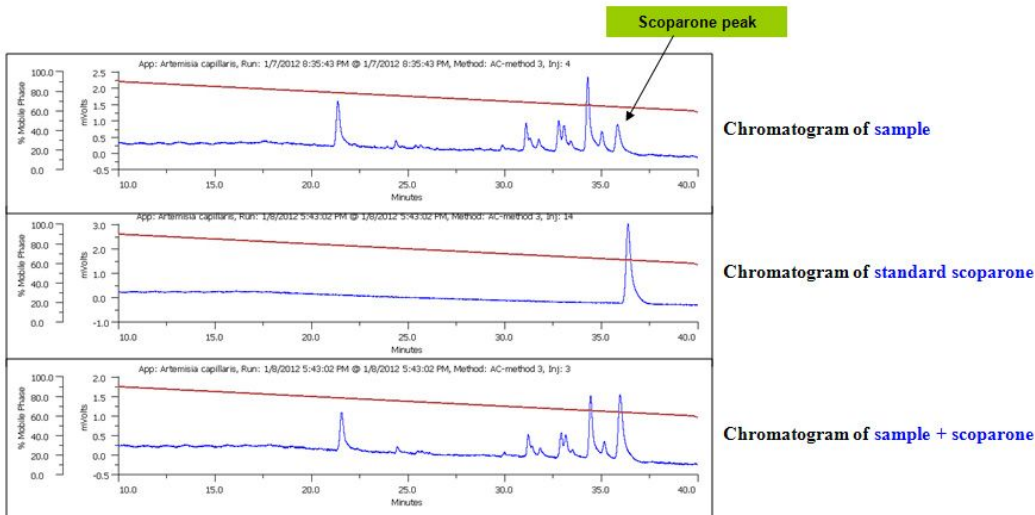
6. 표준품과 시료의 혼합 chromatogram

이상의 조건으로 사철쭉 시료와 표준품의 HPLC chromatogram을 얻었고, 사철쭉시료와 표준품을 혼합하여 HPLC chromatogram을 측정한 결과 양호한 결과를 얻었다.

Scoparone Peak



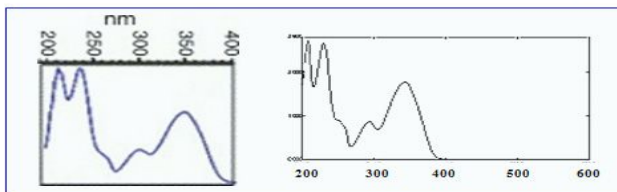
Compound
Scoparone



7. UV 파장의 결정

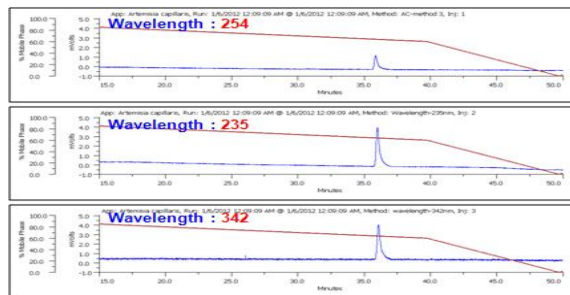
사철쭉의 지표성분인 scoparone을 정량하기 위하여 UV 235, 254, 342 nm에 대하여 광도를 조사한 결과 UV 235 nm가 가장 우수하였으므로 scoparone을 정량하기 위한 UV 파장은 235nm로 설정하였다.

The Wavelength for Scoparone

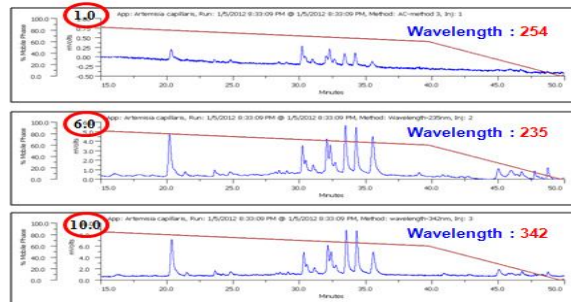


UV spectra of scoparone (see references 1 and 2)

- [1] Zhang G, Zhang F, Yang L, Zhu E, Wang Z, Xu L, Hu Z. *Anal Chim Acta*. 2006 Jun 30; 571(1):17-24.
- [2] Ma, C. H. Ke, W. Sun, Z. L. Peng, J. Y. Li, Z. X. Zhou, X. Fan, C. R. Huang, C. G. *Chromatographia* 2006, 64, 83-7.



HPLC chromatograms of scoparone



HPLC chromatograms of Sample

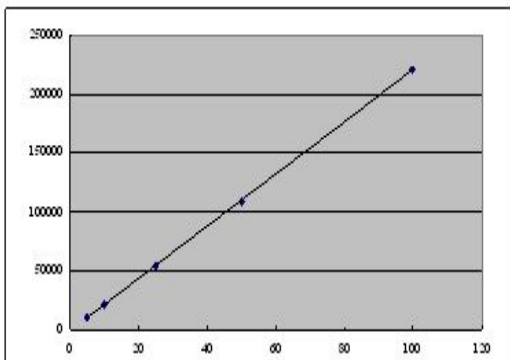
The wavelength 235 was chosen.

5절. 분석법 Validation

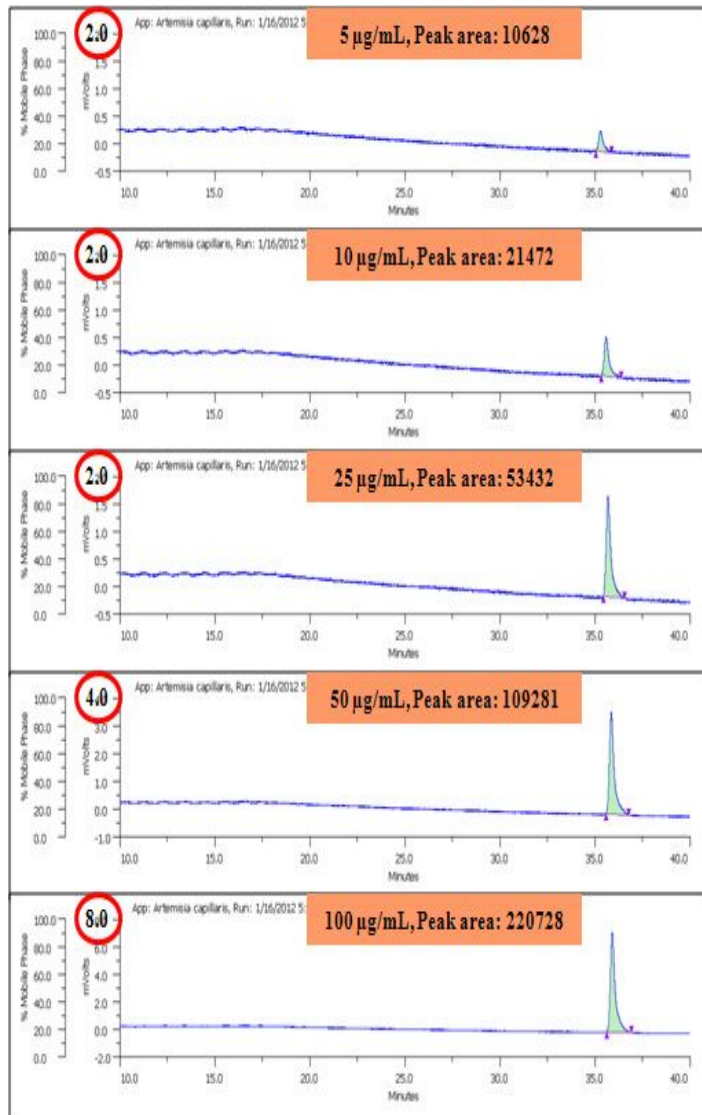
1. 직선성, 검출한계, 정량한계 (Linearity, LOD, LOQ)

사철쭉의 지표성분인 scoparone의 직선성 농도범위를 5.0~100.0 ug/mL의 범위에서 분석하였다. 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 면적비를 이용한 검량선으로 상관관계수 r^2 를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N) = 3을 기준으로 정하였으며, 정량한계(LOQ)는 S/N = 10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

Calibration curve



Regression equation: $y = 2213.9x - 1020.9$
 $R^2 = 0.9999$



2. 회수율

균질한 검체 분말을 추출, 원심분리, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물첨가법에 의한 분석결과로부터 회수율을 구하였다. 최종검액중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분 에 대하여 5.804 19.390, 40.046 ug/ml 첨가한 검액 (n=3)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과 98.90 - 101.13 %로 우수하게 나타났다.

Recovery test

Added (µg/mL)	Times	Peak area	Concentration (µg/mL)	Mean of Concentration (µg/mL)	RSD (%)
0	1	28782	14.01	13.86	1.15
	2	28109	13.69		
	3	28523	13.88		

Added (µg/mL)	Times	Peak area	Concentration (µg/mL)	Increment (µg/mL)	Recovery (%)	Mean of recovery (%)	RSD (%)
5.804	1	40601	19.60	5.74	98.90	99.36	1.12
	2	40814	19.70	5.84	100.62		
	3	40561	19.58	5.72	98.55		

Added (µg/mL)	Times	Peak area	Concentration (µg/mL)	Increment (µg/mL)	Recovery (%)	Mean of recovery (%)	RSD (%)
19.390	1	69841	33.44	19.58	100.98	100.76	0.27
	2	69627	33.34	19.48	100.46		
	3	69771	33.41	19.55	100.83		

Added (µg/mL)	Times	Peak area	Concentration (µg/mL)	Increment (µg/mL)	Recovery (%)	Mean of recovery (%)	RSD (%)
40.046	1	113495	54.11	40.25	100.51	100.90	0.34
	2	113952	54.33	40.47	101.06		
	3	114014	54.36	40.50	101.13		

3. 정밀성 및 정확성

사철쭉의 유효성분 분석의 일내 정밀성(precision)과 정확성(accuracy)을 확인하기 위하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정밀성과 정확성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다. 정밀성은 일내, 일간 실험에서 모두 0.06~0.40% 범위 내에서 나타났으며, 정확성은 일내, 일간 모두 99.70~100.44% 범위 내에서 나타났다.

Result of intra-day precision and accuracy (n = 3)

Regression equation	R ²		Times	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
y = 2224.2x + 276	0.9997	Concentration (µg/mL)	1 st	10.03	50.004	99.75
			2 nd	9.99	50.24	99.80
			3 rd	10.01	50.05	99.62
Average con. (µg/mL)				10.01	50.10	99.72
SD				0.02	0.13	0.09
Observed (µg/mL)				10.01 ± 0.02	50.10 ± 0.13	99.72 ± 0.09
RSD (%)				0.20	0.26	0.09
Accuracy (%)				100.10	100.20	99.72

Result of inter-day precision and accuracy (n = 3)

		Regression equation	R ²	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Concentration (µg/mL)	The 1 st day	y = 2090.7x + 1041.8	0.9993	9.95	50.16	100.30
	The 2 nd day	y = 2275.1x - 310.63	0.9999	9.95	50.14	100.24
	The 3 rd day	y = 2120.5x + 859.59	0.9992	10.02	50.35	100.36
Average con. (µg/mL)				9.97	50.22	100.30
SD				0.04	0.12	0.06
Observed (µg/mL)				9.97 ± 0.04	50.22 ± 0.12	100.30 ± 0.06
RSD (%)				0.40	0.24	0.06
Accuracy (%)				99.70	100.44	100.30

4. 반복성

피크면적의 반복성은 standard 화합물로 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화되는 정도를 보기 위하여 연속 5회 injection하여 retention time과 면적의 변화되는 정도를 확인하였다. 피크면적비와 상대표준편차는 2.73% 이내로 우수하였다.

Reproducibility (n = 5)

Compound	Concentration (µg/mL)	Peak area			Retention time (min)		
		Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
Scoparone	10	21160	578.18	2.73	35.30	0.11	0.31
	50	112417	784.89	0.70	36.06	0.28	0.78
	100	221227	604.56	0.27	35.14	0.21	0.60

5. 완건성

피크면적의 완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건변화, 검출과장, 유기첨가제의 영향, pH 변화, 완충액의 이온강도, 컬럼온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을때 분리인자의 변화정도를 나타내는데 본 실험에선 column의 종류에 대하여 검토한 결과 column에 따른 영향은 거의 받지 않는 것으로 나타났다.

Robustness of column types

Compound	Columns	Theoretical (µg/mL)	Observed (µg/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)
Scoparone	Gemini C18 110A (250 × 4.6 mm, 5 µm)	10	10.01 ± 0.02	0.20	100.10
		50	50.10 ± 0.13	0.26	100.20
		100	99.72 ± 0.09	0.09	99.72
	Hector C18-M (250 × 4.6 mm, 5 µm)	10	9.96 ± 0.04	0.40	99.60
		50	50.21 ± 0.40	0.80	100.42
		100	99.38 ± 2.89	2.91	99.38
	Shodex ODS F-511 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	10	9.93 ± 0.16	1.61	99.30
		50	49.80 ± 0.29	0.58	99.60
		100	99.57 ± 0.67	0.67	99.57

6절. Scoparone의 함량분석

1. 사철쭉 원물의 함량분석

사철쭉 원물(AC-223a, AC-223b, AC-223c)의 함량분석 결과는 다음과 같다. 건조한 사철쭉에는 약 0.12 %의 scoparone이 포함되어 있음을 알 수 있었다.

Sample	Scoparone			
	Concentration (n=3, µg/mL)	Average con. (µg/mL)	RSD (%)	Content (mg/g)
AC-223a	12.1593	12.1362	0.23	1.2136 ± 0.0028
	12.1444			
	12.1049			
AC-223b	12.1064	12.0824	0.75	1.2082 ± 0.0091
	12.1593			
	11.9816			
AC-223c	12.1420	12.0434	0.74	1.2043 ± 0.0089
	12.0177			
	11.9705			

2. 사철쭉 추출물의 scoparone 함량분석

바이셀에서 추출한 5종의 50% 주정추출물에 포함된 scoparone의 함량을 분석하였다. 결과 각각의 lot에는 평균 0.54-0.67%의 scoparone 함량을 나타내었다.

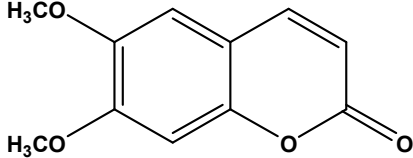
Sample	Scoparone			
	Concentration (n=3, µg/mL)	Average con. (µg/mL)	RSD (%)	Content (mg/g)
AC-01	62.6324	61.8824	1.31	6.1882 ± 0.0811
	61.9928			
	61.0221			
AC-02	59.5085	59.7107	0.40	5.9711 ± 0.0237
	59.6517			
	59.9719			
AC-03	53.8737	54.4300	0.91	5.4430 ± 0.0498
	54.5837			
	54.8326			
AC-04	62.5010	61.9421	1.36	6.1942 ± 0.0841
	62.3501			
	60.9752			
AC-05	68.4954	67.8892	1.70	6.7889 ± 0.1151
	68.6101			
	66.5621			

7절. 사철쭉 건조방법에 따른 scoparone 함량 변화

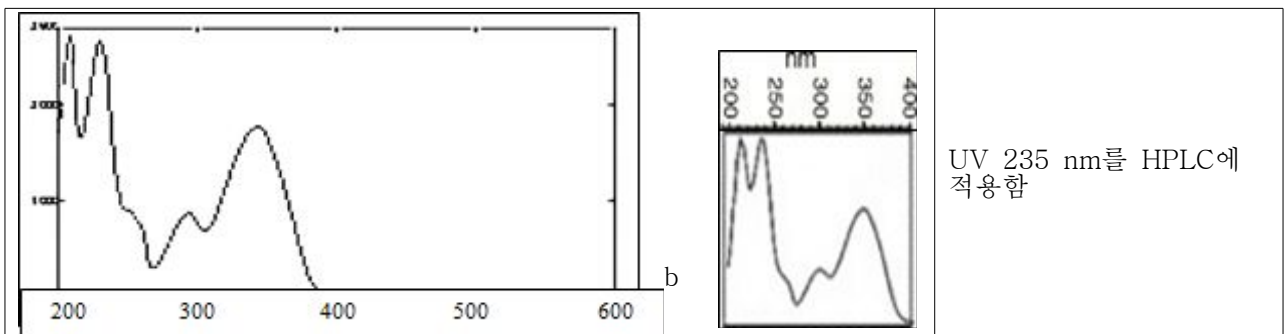
사철쭉 추출물을 동결건조하는 것이 온도의 영향이 없어 가장 바람직하다고 생각되나, 흡습의 문제가 발생하여 분무건조하는 것을 검토하였다. 실제 대량건조에 앞서서 동결건조, 감압건조, 분무건조에 따른 scoparone의 함량 변화를 분석하였다.

1. scoparone의 특성

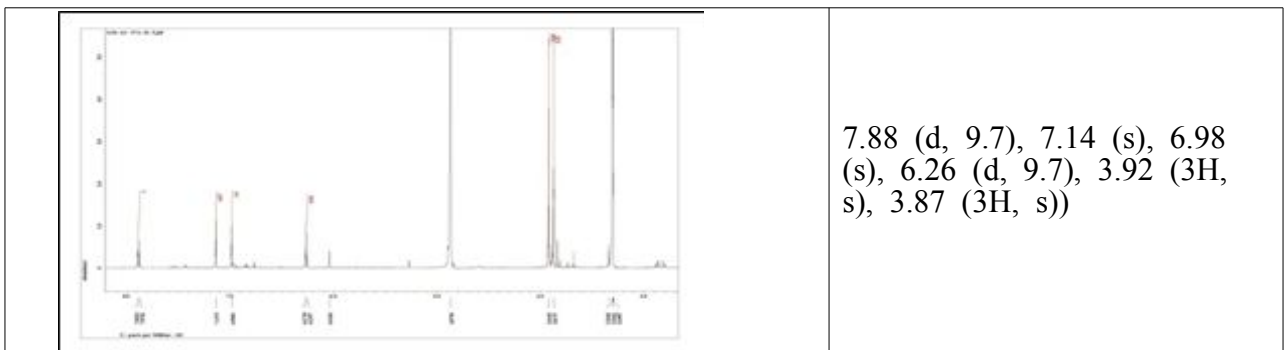
가. 물리화학적 특성

	<p>Comp. Name: Scoparone Other Name: 6, 7-Dimethoxycoumarin MF: C₁₁H₁₀O₄ MW: 206.19</p>
---	---

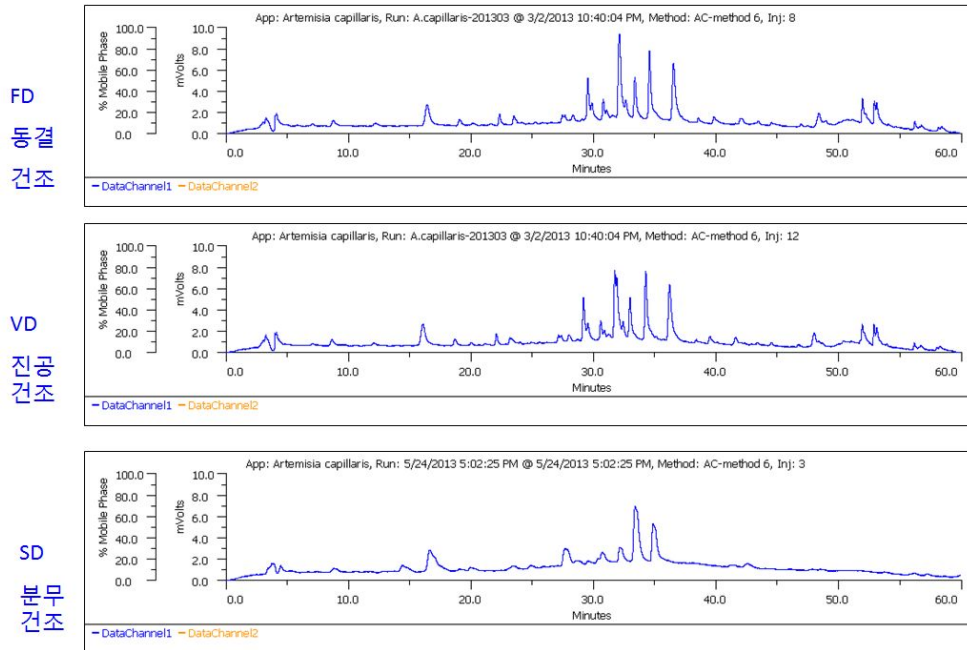
나. UV spectrum



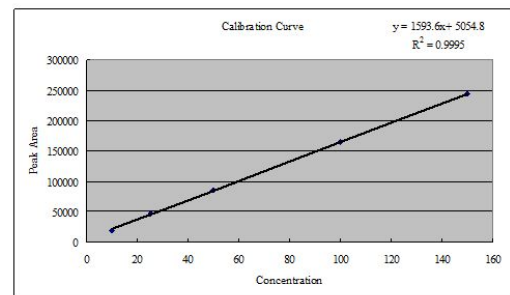
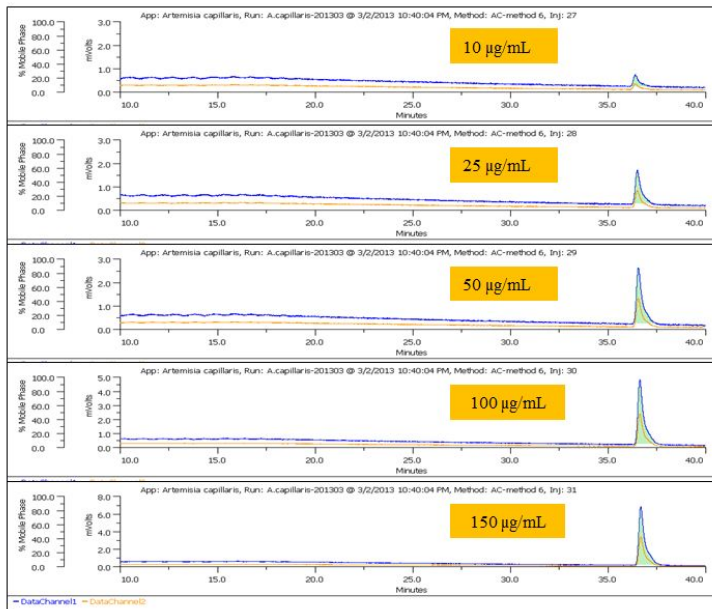
다. NMR spectrum



2. 건조방법에 따른 HPLC pattern



3. Calibration의 작성



Con.	10	25	50	100	150
P. A.	18098	47407	85304	165088	243224

Regression Equation: $y = 1593.6x + 5054.8$
 $R^2 = 0.9995$

4. 건조방법에 따른 HPLC 분석 결과

건조방법에 따른 scoparone의 함량변화를 분석한 결과 추출물 1 g당 7.82-8.19 mg을 함유하고 있었으며, 동결건조의 경우가 상대적으로 scoparone의 함량이 높은 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 시료의 흡습성을 고려할 때 분무건조를 하여도 scoparone의 함량에는 큰 차이가 없는 것으로 판단되어 사철썩을 추출할 때 분무건조를 하는 것으로 결정하였다.

Sample*	Scoparone			
	Concentration (n=3, µg/mL)	Average con. (µg/mL)	RSD (%)	Content# (mg/g)
FD	81.9059	81.9678	0.12	8.1968 ± 0.0099
	81.9159			
	82.0816			
VD	78.6880	78.7503	0.17	7.8750 ± 0.0133
	78.6604			
	78.9026			
SD	78.2786	78.2781	0.10	7.8278 ± 0.0079
	78.1990			
	78.3566			

* FD: freeze drying, VD: vacuum drying, SD: spray drying

Content (mg/g) = the weight of scoparone (mg) / the weight of *Artemisia capillaris* extract (g)

5. 분석법의 Validation

가. 정밀도 및 정확도

일간 정밀도와 일내 정밀도를 측정한 결과 모두 양호한 결과를 나타내었다.

Compound	Theoretical (µg/mL)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Observed (µg/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)	Observed (µg/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)
Scoparone	10	10.01 ± 0.02	0.20	100.10	9.97 ± 0.04	0.40	99.70
	50	50.10 ± 0.13	0.26	100.20	50.22 ± 0.12	0.24	100.44
	100	99.72 ± 0.09	0.09	99.72	100.30 ± 0.06	0.06	100.30

나. 회수율 : 회수율을 측정한 결과 양호한 결과를 나타내었다.

Compound	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Determined ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Scoparone	0.000	13.86	-----	-----
	5.804	19.63	99.36 \pm 1.11	1.12
	19.390	33.40	100.76 \pm 0.27	0.27
	40.046	54.27	100.90 \pm 0.34	0.34

다. 재현성 : 재현성을 측정한 결과 양호한 결과를 나타내었다.

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area			Retention time (min)		
		Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
Scoparone	10	18184	88.07	0.48	36.27	0.44	1.21
	50	84416	771.45	0.91	36.30	0.24	0.66
	100	167171	1908.86	1.14	36.30	0.33	0.91

라. 완전성 : 완전성을 측정한 결과 양호한 결과를 나타내었다.

Compound	Columns	Theoretical ($\mu\text{g/mL}$)	Observed ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Accuracy (%)
Scoparone	Gemini C18 110A (250 \times 4.6 mm, 5 μm)	10	10.01 \pm 0.02	0.20	100.10
		50	50.10 \pm 0.13	0.26	100.20
		100	99.72 \pm 0.09	0.09	99.72
	Hector C18-M (250 \times 4.6 mm, 5 μm)	10	9.96 \pm 0.04	0.40	99.60
		50	50.21 \pm 0.40	0.80	100.42
		100	99.38 \pm 2.89	2.91	99.38
	Shodex ODS F-511 (250 \times 4.6 mm, 5 μm)	10	9.93 \pm 0.16	1.61	99.30
		50	49.80 \pm 0.29	0.58	99.60
		100	99.57 \pm 0.67	0.67	99.57

[제2-2 세부 : 사철쭉 추출물의 뼈 성장 및 뼈 건강 효능 평가]

1절. 더위지기과 사철쭉 추출물의 조골세포와 파골세포 활성화에 미치는 효과

1. 조골세포 활성화에 미치는 더위지기과 사철쭉 추출물의 효과

가. 더위지기 (AIE)과 사철쭉 추출물 (ACE)의 조골세포 증식촉진 및 세포독성 분석

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well 24시간 pre-incubation하고 test sample을 6, 15일간 처리한 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 4시간 처리하였다. Media를 제거한 후 세포를 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 씻어준 후 수용액에 용해되지 않는 formazan을 300 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 녹여주고 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨준 다음 ELISA reader (Tecan, Austria)로 570 nm에서 측정하였다.

더위지기 및 사철쭉 추출물의 조골세포 증식 및 독성 평가는 Fig. 1에 나타내었다. 더위지기과 사철쭉 추출물을 1, 10, 20 그리고 50 μ g/mL의 농도에서 6일 그리고 15일간 배양하여 세포 증식 및 세포독성을 확인한 결과 더위지기과 사철쭉 추출물 모두 약간의 세포증식률을 보였으며, 15일의 배양기간 동안 세포독성은 관찰되지 않았다. 이후 진행될 활성화평가에서 1에서 50 μ g/mL의 농도를 설정하여 사용하였다.

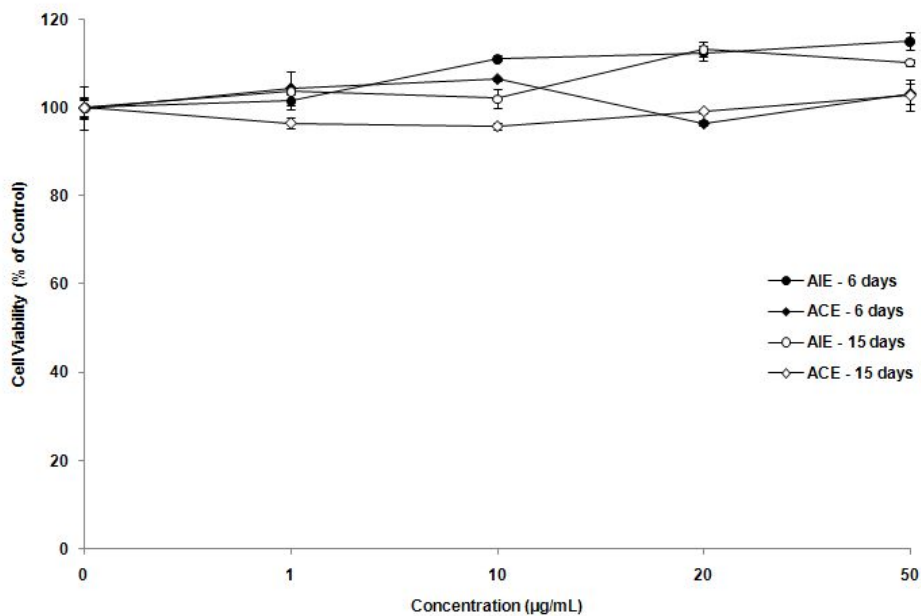


Fig. 1. Osteoblast proliferation and cytotoxicity of AIE and ACE

나. 조골세포 alkaline phosphatase (ALP) 활성화에 미치는 더위지기과 사철쭉 추출물의 효과

Alkaline phosphatase (ALP) 효소는 조골세포의 세포막에 존재하는 당단백 효소로 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며, 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정동안 무기인산의 운반과 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하여 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있다. (Newmark. H. L. Adv. Exp. Med. Biol., 1996)

MC3T3-E1 subclone 4세포를 12-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 3, 6 그리고 9일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 100 μ L의 0.1% Triton X-100를 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis시켰다. Lysis된 세포를 원심분리한 (14000 rpm, 4°C, 10 min)후, 상등액 5 μ L는 단백질 정량에 사용하였고 상등액 30 μ L에 1 mM $MgCl_2$ 와 6 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 9.8)를 70 μ L 첨가하고 37°C에서 1시간동안 반응 시킨 후 100 μ L의 0.1 N NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 10, 50, 100, 200 그리고 500 nM의 4-nitrophenol을 이용하여 검정선 작성하였으며, alkaline phosphatase 활성은 세포 수에 따라 영향을 받을 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위세포 수에 대한 alkaline phosphatase의 활성을 계산하였고 alkaline phosphatase 활성은 1 unit (nM PNPP/mg of protein/min)으로 표시하였다.

조골세포 ALP 활성화에 미치는 더위지기 및 사철쭉 추출물의 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 3, 6 그리고 9일의 분화기간동안 ALP 활성을 평가한 결과 양성대조군으로 사용한 17 β -estradiol은 분화유도배지를 처리한 세포에 비해 6일에서 15.41 unit까지 활성이 증가 되었으며, 1과 10 μ g/mL에서 더위지기과 사철쭉 추출물의 ALP 활성은 큰 차이를 보이지 않았으나, 6일 그리고 9일차 50 μ g/mL에서 더위지기 추출물 (6일: 12.41 Unit, 9일: 18.35)에 비해 사철쭉 추출물 (6일: 18.39 unit, 9일: 20.78 unit)의 ALP 활성이 증가하였다. 더위지기 추출물에 비해 사철쭉 추출물이 ALP 활성을 더 증가시켰음을 볼 때 조골세포의 분화를 유도하여 조골세포의 석회화를 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

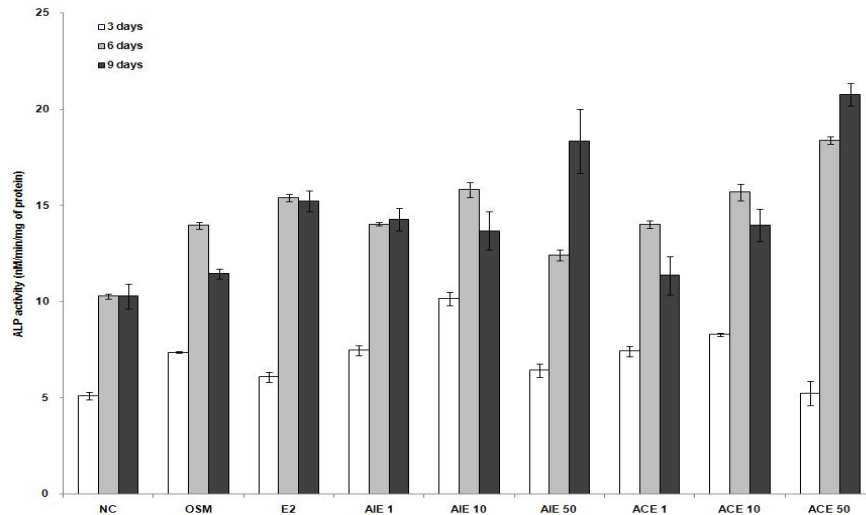


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity of osteoblast treated with AIE and ACE

다. 조골세포의 콜라겐 합성 (collagen synthesis)에 미치는 더위지기과 사철쭉 추출물의 효과

뼈는 주로 콜라겐과 칼슘으로 구성되어 있으며, 계속 성장하며 살아있는 조직이다. 콜라겐은 뼈에서 부드러운 골격을 형성하는 단백질이고 인산칼슘이라는 미네랄이 뼈의 골격을 강하고 단단하게 만들어 준다. 또한 콜라겐은 골조직의 유기물의 대부분을 차지하며, 콜라겐이 적절하게 생성되지 못하는 조건에서는 골조직의 석회화가 일어나지 않을 뿐만 아니라 ALP 활성 저하 및 osteocalcin의 생성 또한 매우 감소하는 것으로 알려져 있다 (Owen. *et al.* J. Cell. Physiol., 1990).

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 8일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 μ L Bouin's fluid 용액으로 37°C에서 1시간동안 고정시킨 후 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 뒤 0.1% Direct red 80 (Sirius red F3BA) 용액으로 1시간동안 염색하였다. Acidic water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 μ L 0.1 N NaOH 용액을 가하여 녹인 다음 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조골세포 collagen 합성에 미치는 더위지기 및 사철쭉 추출물의 영향은 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 분화유도배지로 분화를 유도한 MC3T3-E1 subclone 4 세포의 경우 분화유도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 177.74%까지 collagen 합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 양성대조군으로 사용된 E2의 경우 189.62% 까지 collagen 합성을 증가시켰다. 더위지기 및 사철쭉 추출물을 1, 10 그리고 50 μ g/mL의 농도로 처리한 결과 1과 10 μ g/mL에서는 대조군과 차이가 없으나 50 μ g/mL 농도에서 69.78%까지 collagen 합성이 감소되는 것으로 나타났다.

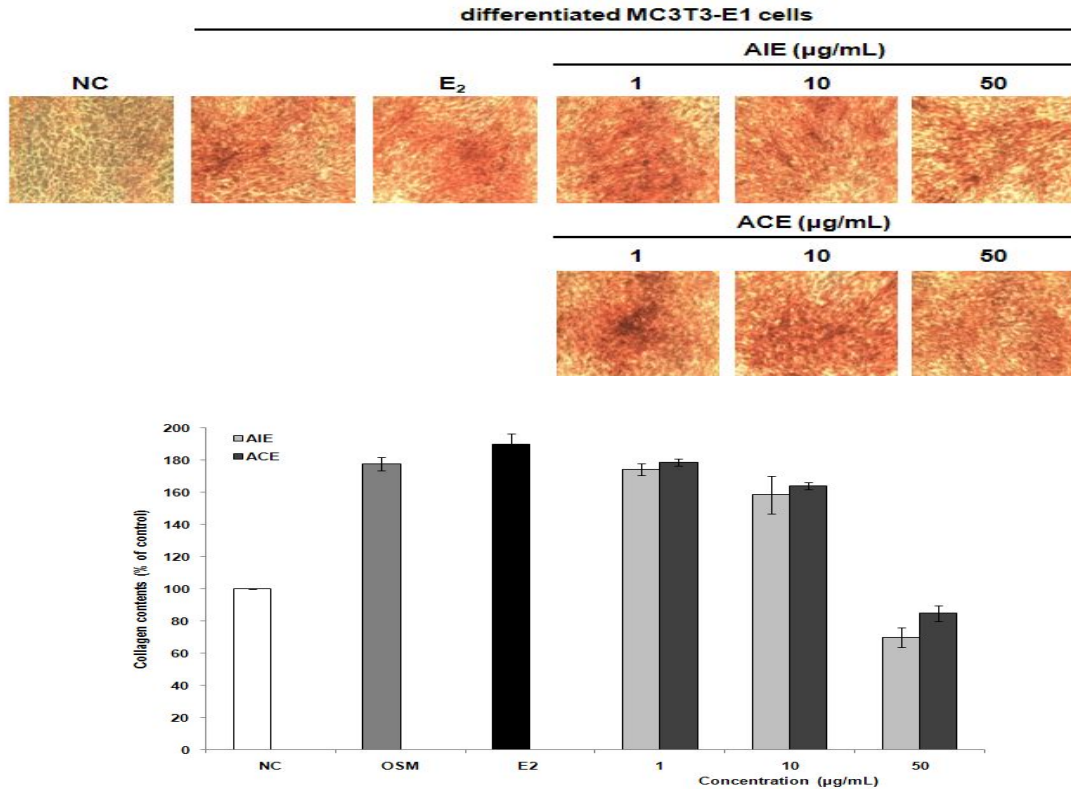


Fig. 3. Collagen synthesis staining and activity of osteoblast treated with AIE and ACE

라. 조골세포 bone nodule 형성 (mineralization)에 미치는 더위지기과 사철쭉 추출물의 효과

골의 생성은 기질의 증식, 성숙 및 석회화의 세 단계로 이루어진다. (Pittenger JJ. *et al.* Science., 1999). Bone nodule의 형성능은 조골세포 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 calcium에 특이적으로 흡착력이 높은 식물성 염료로서 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화된 양과 염색된 정도가 상호 비례하는 것으로 알려져 있다. (Schiller PC, *et al.* Bone., 2001)

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 15일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 μ L 70% ethanol로 4°C에서 1시간동안 고정시킨 다음 500 μ L의 distilled water로 2회 씻었다. 40 mM Alizarin red S (pH 4.2) 용액으로 10분 동안 염색한 후 500 μ L distilled water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 μ L 10% cetylpyridinium chloride 용액을 가하여 녹인 다음 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader로 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

더위지기 및 사철쭉 추출물에 의해 조골세포 bone nodule 형성능에 미치는 효과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 분화유도배지로 분화를 유도한 MC3T3-E1 subclone 4 세포의 경우 분화유

도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 165.72%까지 bone nodule의 형성을 증가시키는 것으로 나타났다. 양성대조군으로 사용된 E2의 경우 241.32% 까지 bone nodule의 형성을 증가시켰다. 더위지기 및 사철쭉 추출물을 1, 10 그리고 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 결과 159.11 ~ 236.54% 까지 bone nodule의 형성을 증가시켰다. 더위지기 추출물에 비해 사철쭉 추출물의 bone nodule 형성에 미치는 효과가 더 큰 것으로 보아 조골세포의 세포외 기질화를 촉진시켜 골 생성에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

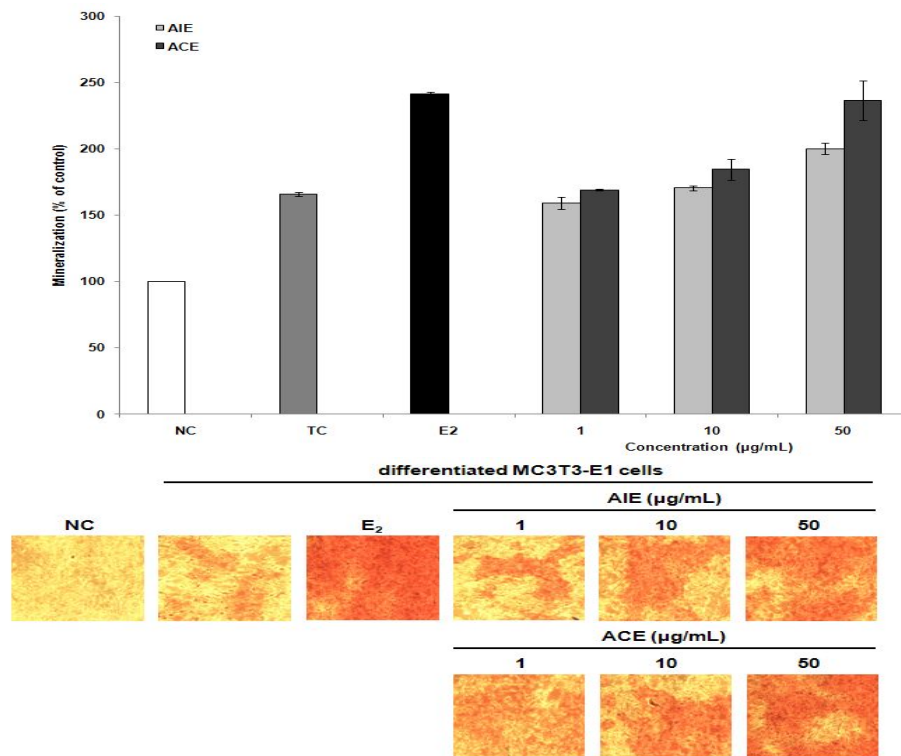


Fig. 4. Bone nodule formation activity of osteoblast treated with AIE and ACE

2. 파골세포 활성화에 미치는 더위지기와 사철쭉 추출물의 효과

가. 더위지기와 사철쭉 추출물의 파골세포 세포독성 분석

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well 24시간 pre-incubation하고 test sample 을 5일간 처리한 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 1시간 처리하였다. Media를 제거한 후 세포를 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 씻어준 후 수용액에 용해되지 않는 formazan을 300 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 녹여주고 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨준 다음 ELISA reader로 570 nm에서 측정 하였다.

더위지기와 사철쭉 추출물의 파골세포에 미치는 세포독성을 Fig. 5에 나타내었다. 더위지기와 사철쭉 추출물을 1, 10, 20 그리고 50 μ g/mL의 농도에서 5일간 배양하여 세포독성을 확인한 결과 더위지기와 사철쭉 추출물 모두 5일의 배양기간 동안 세포독성은 관찰되지 않았다. 이후 진행될 활성평가에서 1에서 50 μ g/mL의 농도를 설정하여 진행하였다.

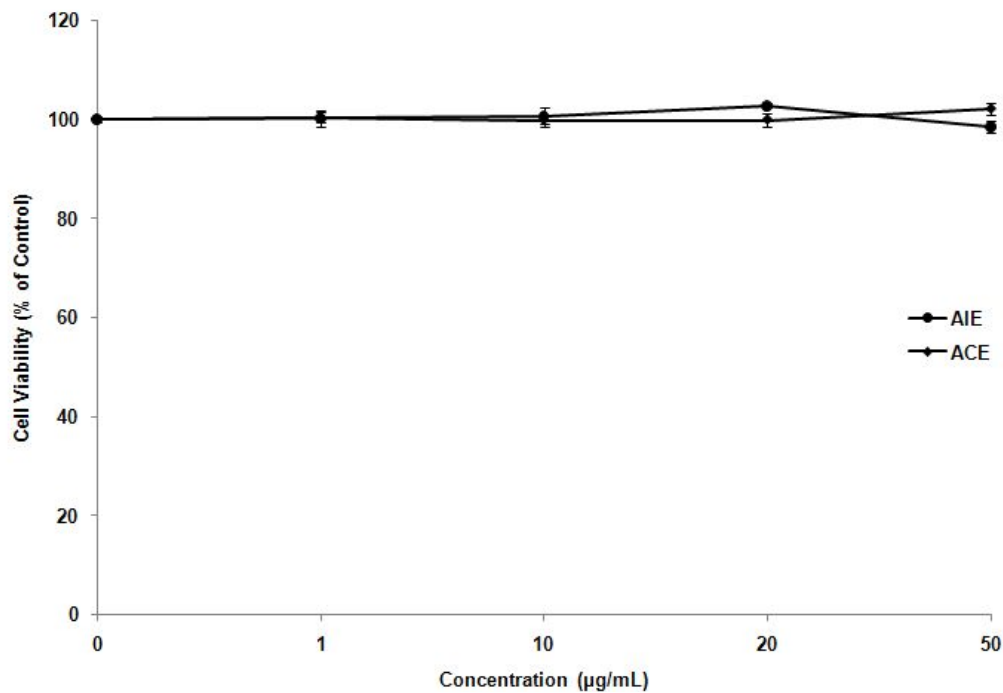


Fig. 5. Osteoclast cytotoxicity of AIE and ACE

나. 파골세포 TRAP 염색 및 파골세포 counting에 미치는 더위지기과 사철쭉 추출물의 효과

파골세포는 분화가 진행되면서 단핵의 전파골세포를 형성하지만 세포가 융합되면 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고 이는 골 표면에 부착하여, 골을 흡수하는 작용을 한다. 또한 파골세포는 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)와 칼시토닌 수용체 (CR)를 가지며, 산 생성이 활발한 특징을 가져 TRAP은 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다. (Vaananen HK. *et al.* J Cell Sci., 1995).

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하였다. 매 2일마다 배지 교환시에 시료를 넣고 총 5일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 1회 세척하고, 4% formaldehyde로 10분간 고정한 후 ethanol/acetone (1:1)로 1분간 고정하였다. 증류수를 이용하여 2회 세척 후 leukocyte acid phosphatase kit 387-A (Sigma)를 이용하여 TRAP 염색을 하였다. 염색이 끝난 후 광학 현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성 지표로 사용하였다.

TRAP 양성인 다핵성 파골세포를 확인한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. TRAP staining으로 파골세포를 확인한 결과 더위지기과 사철쭉 추출물 모두 농도 의존적으로 파골세포 형성을 감소시켰으며, TRAP-양성 다핵세포를 계수한 결과 50 μ g/mL의 농도에서 더위지기 추출물 (49.24%)에 비해 사철쭉 추출물 (42.05%)의 파골세포 형성 억제활성이 강한 것으로 확인되었다.

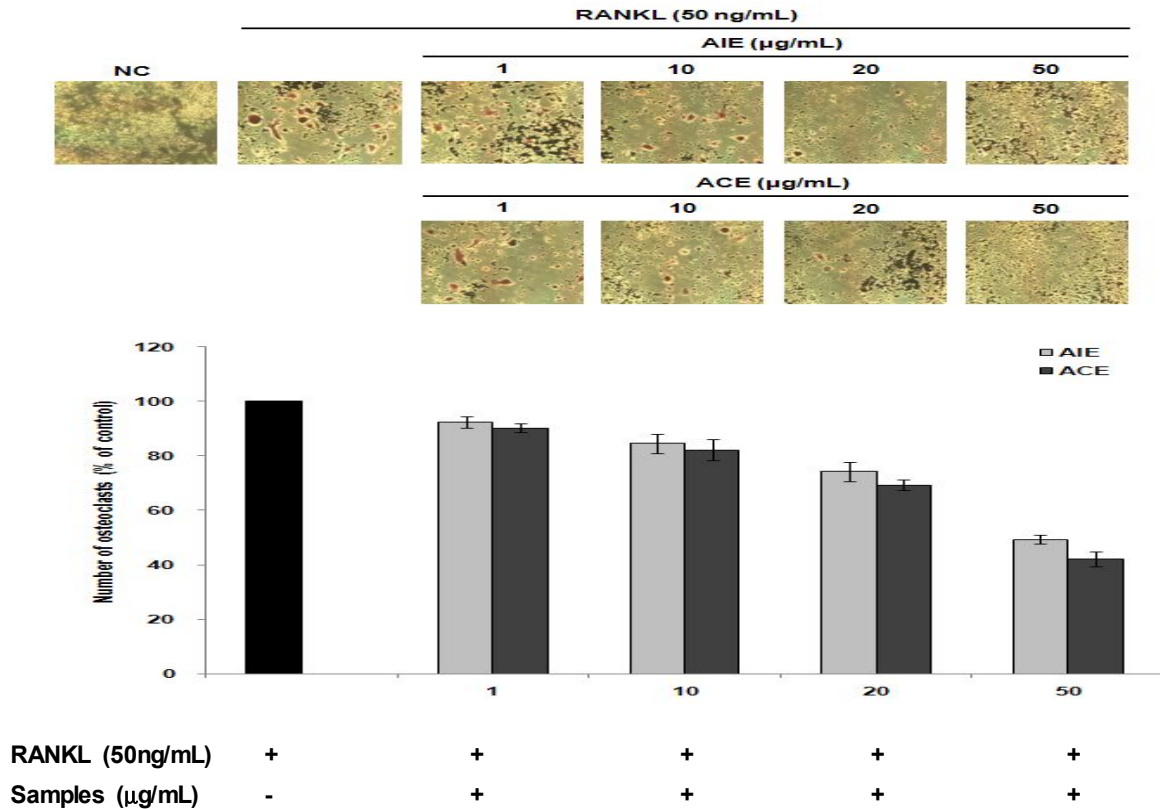


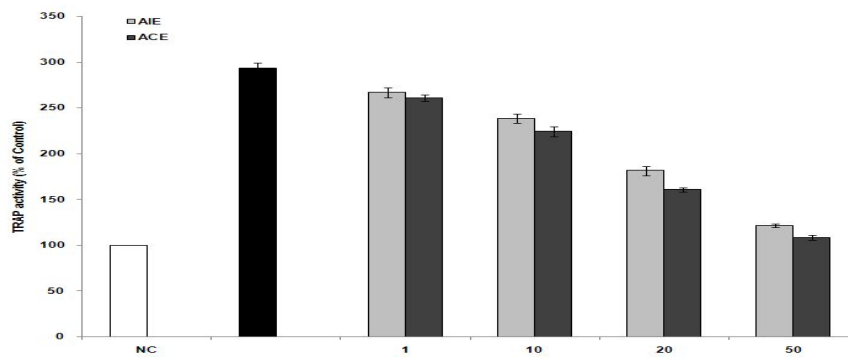
Fig. 6. TRAP staining and counting of osteoclasts treated with AIE and ACE

다. 파골세포 TRAP 활성화에 미치는 더위지기와 사철쭉 추출물의 효과

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하였다. 매 2일마다 배지 교환시에 시료를 넣고 총 5일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μL 의 PBS (pH 7.4)로 1회 세척하고, 4% formaldehyde로 10분간 고정한 후 ethanol/acetone (1:1)로 1분간 고정하였다. 증류수를 이용하여 2회 세척 후 10 mM sodium tartrate와 5 mM p-nitrophenylphosphate가 포함된 50 mM citrate buffer를 500 μL 씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응하였다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 100 μL 씩 분주하고, 0.1N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

파골세포의 분화 marker인 TRAP activity에 미치는 더위지기와 사철쭉 추출물의 효과를 Fig. 7에 나타내었다. 더위지기 추출물과 사철쭉 추출물 모두 1 - 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 TRAP 활성을 억제하였으며, 더위지기 추출물 (266.85 ~ 121.71%)에 비해 사철쭉 추출물 (260.90 ~ 108.57%)이 TRAP 활성화에 대한 억제작용이 더 강한 것으로 확인되었다.

이상의 결과는 사철쭉 추출물이 더위지기 추출물에 비해 파골세포의 형성과 TRAP activity 활성을 효과적으로 억제시켜 뼈의 재흡수를 방해함으로써 뼈 건강에 긍정적인 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.



RANKL (50ng/mL)	-	+	+	+	+	+
Samples (µg/mL)	-	-	+	+	+	+

Fig. 7. TRAP activity of osteoclasts treated with AIE and ACE

인진쑈에 속하는 더위지기(*Artemisia iwayomogi*)와 사철쑈(*Artemisia capillaris*)에 대한 조골세포에 파골세포에 대한 연구결과로부터 더위지고 사철쑈 모두 조골세포의 활성을 증가시키고 파골세포의 활성을 억제시킴을 확인하였으나, 더위지기는 식품원료로서 식품안전청으로부터 허락을 받지 못하였기 때문에 이후 연구는 사철쑈 추출물을 활성 분석에 사용하였다.

2절. 동물실험을 이용한 사철쭉 추출물의 뼈 성장 및 뼈 건강 활성

1. 사철쭉 추출물의 뼈 성장 활성

가. 실험동물의 사육 및 식이

생후 3주령의 수컷 Sprague-Dawley (SD) rat을 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 고형사료 (삼양사료)를 먹이면서 7일간 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 난피법으로 총 4군으로 분리하였다 (n = 8 per group). 실험동물에게 일반고형사료를 총 28일간 공급하였으며 양성대조군으로 초유 (foremilk) 1g/kg와 사철쭉 추출물을 250 mg/kg 그리고 500 mg/kg을 매일 경구투여로 정해진 양을 4주간 공급하였다. 식이 섭취량은 매일 9~10시 정해진 시간에 측정하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 조명시간을 아침 9시부터 저녁 9시까지 12시간으로 조절하였으며 실내온도 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 로 유지하였다. 급수는 정수된 일반 식수를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았으며 매일 오전 9~10시 정해진 시간에 공급해 주었다.

I 군: control 군

II 군: 양성대조군 - foremilk (1 g/kg)

III 군: 사철쭉 추출물 - 1 (250 mg/kg)

IV 군: 사철쭉 추출물 - 2 (500 mg/kg)

나. 실험동물의 체중 및 식이효율에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

사철쭉 추출물이 실험동물의 체중 및 식이효율에 미치는 영향은 Table 1. 및 Fig. 8과 같다. 실험 시작시와 종료시에 대조군과 실험군간의 유의적인 체중변화는 없었으며, 평균 식이 섭취량은 대조군에 비해 실험군에서 유의적인 차이를 보였다. 식이효율에서도 대조군 (0.31 ± 0.01)과 실험군 (III: 0.29 ± 0.01 , IV: 0.26 ± 0.01)사이에 유의적인 차이가 나타났다. 이러한 결과는 실험군에 투여한 사철쭉 추출물이 독성 및 섭취거부가 없으며 영양대사에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 1. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio in rats fed experimental diets

Parameters	I	II	III	IV
Body weight gain (g/day)	6.47±0.36a	6.66 ± 0.63a	6.57 ± 0.31a	6.62 ± 0.3a
Food intake (g/day)	20.71 ± 1.09b	21.71 ± 1.02a,b	22.35 ± 1.01a	22.61 ± 0.73a
FER	0.31 ± 0.01a	0.31 ± 0.02a	0.29 ± 0.01b	0.26 ± 0.01b

The results represent mean ± S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

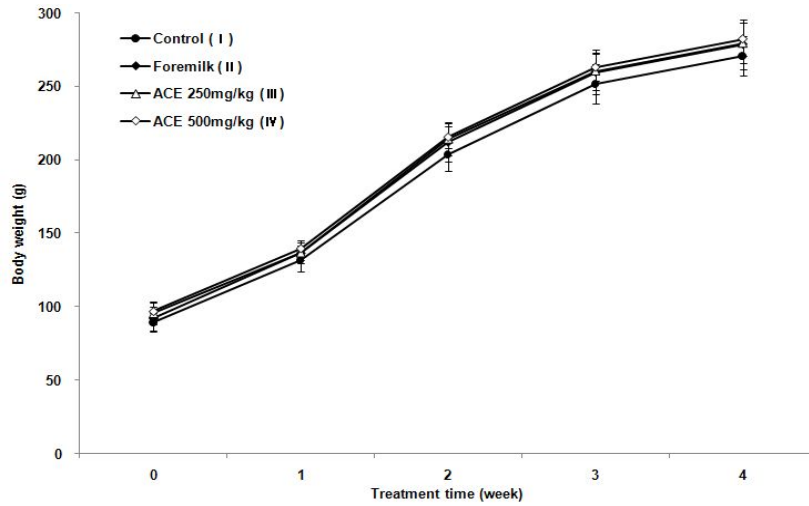


Fig. 8. Change of body weight in experimental groups.

The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained.

다. 실험동물의 신장, 간 및 대퇴부 골에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

사철쭉 추출물이 실험동물의 신장, 간 및 대퇴부 골에 미치는 영향은 Table 2와 Fig. 9에 나타난 바와 같다. Table 2에 나타난 신장과 간 무게에서 유의적인 차이가 보이지 않았으며, 대퇴부 길이, 무게 및 두께에서는 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg)간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 그러나 Table 2와 Fig. 2에서 알 수 있듯이 실험군 III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)에서 대조군에 비해 대퇴부의 길이와 무게가 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

이는 사철쭉 추출물을 섭취시키면 뼈 조직의 성장에 도움을 줄 수 있는 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다.

Table 2. Kidney, liver and left femur weight in rats fed experimental diets

Parameters	I	II	III	IV
Left femur				
Weight (g)	0.55 \pm 0.06 ^b	0.57 \pm 0.06 ^{a,b}	0.61 \pm 0.03 ^{a,b}	0.61 \pm 0.07 ^a
Length (mm)	29.68 \pm 0.57 ^b	29.66 \pm 0.52 ^b	30.31 \pm 0.40 ^a	30.18 \pm 0.46 ^{a,b}
Thickness (mm)	3.99 \pm 0.20 ^a	4.15 \pm 0.17 ^a	4.04 \pm 0.18 ^a	4.10 \pm 0.12 ^a
Organs				
Liver (g)	8.09 \pm 0.42 ^a	7.96 \pm 0.40 ^a	8.18 \pm 0.47 ^a	8.04 \pm 0.33 ^a
Kidney (g)	1.93 \pm 0.08 ^a	1.93 \pm 0.13 ^a	2.03 \pm 0.11 ^a	2.04 \pm 0.10 ^a

The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.



Fig. 9. Change of left femur length in experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained.

라. 실험동물의 혈중 growth hormone (GH) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 Growth hormone은 Invitrogen 의 Rat growth hormone kit (KRC5311)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat growth hormone coated 96-well plate에 chromogen blank well을 제외한 모든 well에 혈장을 standard diluent buffer로 10배 희석하여 20 μL 를 가하고 80 μL 의 standard diluent buffer를 넣어준 후 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Sample 제거한 후 50 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 4회씩 씻어 주었다. Chromogen blank well을 제외한 모든 well에 100 μL 의 biotin conjugate solution을 가하고 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 50 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 4회씩 씻었다. 다시 chromogen blank well을 제외한 모든 well에 100 μL 의 streptavidin-HRP working solution을 가하여 준 후 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 30분 동안 상온에서 반응 시켰다. 50 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 4회씩 세척한 후 100 μL 의 stabilized chromogen을 모든 well에 가하고 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 그리고 20 ng/mL의 recombinant rat GH를 이용하여 검정선을 작성하였다.

실험동물의 혈중 growth hormone 수준은 Fig. 10과 같다. 대조군과 실험군간의 growth hormone 수준은 III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg) 에서 대조군과 양성대조군에 비해 증가하는 경향은 나타났으나, 통계적인 유의성은 없었다. 이것은 비록 통계적인 유의성은 없으나 사철쭉 추출물을 섭취시키면 growth hormone의 분비를 촉진하여 뼈 성장에 긍정적인 영향을 보여주는 결과라 할 수 있다.

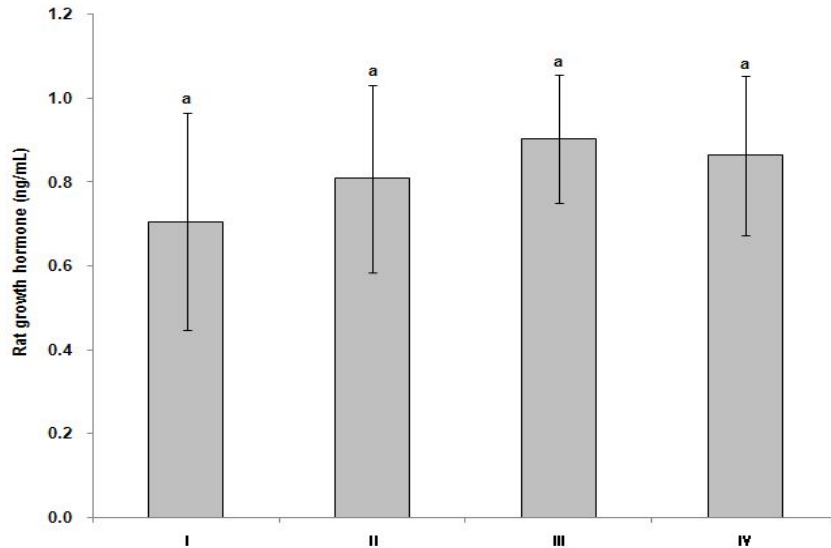


Fig. 10. Growth hormone level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

마. 실험동물의 혈중 insulin-like growth factor- I (IGF- I) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 IGF-1은 R&D system 의 Mouse/Rat IGF-1 kit (MG100)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat IGF-1 coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 Calibrator Diluent RD5-38을 50 μL 씩 가하고, Calibrator Diluent RD5-38로 1000배 희석한 혈장을 50 μL 씩 넣어준 후 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Sample 제거한 후 400 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 conjugate solution 을 가하고 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 400 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 100 μL 의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 그리고 2000 pg/mL의 mouse/Rat IGF-1 standard 을 이용하여 검정선을 작성하였다.

실험동물의 혈중 IGF-1 수준은 Fig. 11과 같다. II군 (foremilk 1 g/kg), III군 (ACE 250 mg/kg) 그리고 IV군 (ACE 500 mg/kg)의 IGF-1 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였음을 알 수 있다.

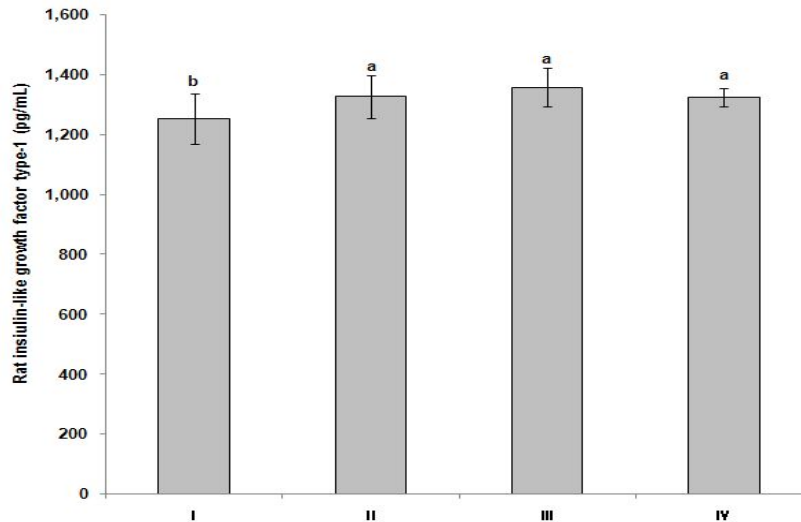


Fig. 11. IGF-1 level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

바. 실험동물의 혈중 insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 IGFBP-3은 R&D system 의 Mouse IGFBP-3 kit (MGB300)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat IGFBP-3 coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 Calibrator Diluent RD1-40을 50 μL 씩 가하고, Calibrator Diluent RD5-38로 300배 희석시킨 혈장을 50 μL 씩 넣어준 후 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Sample 제거한 후 400 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 Conjugate solution 을 가하고 orbital shaker (400 rpm)를 이용하여 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 400 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 100 μL 의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500 그리고 5000 pg/mL의 mouse IGFBP-3 standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

실험동물의 혈중 IGFBP-3 수준은 Fig. 12와 같다. 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg)간의 IGFBP-3 수준이 통계적인 유의성은 보이지 않았으나, III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)의 IGFBP-3 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였음을 알 수 있다.

이러한 결과는 사철쭉 추출물이 growth hormone axis (GH/IGF-1/IGFBP-3)를 자극하여 뼈 성장에 도움이 됨을 보여주는 결과라 할 수 있다.

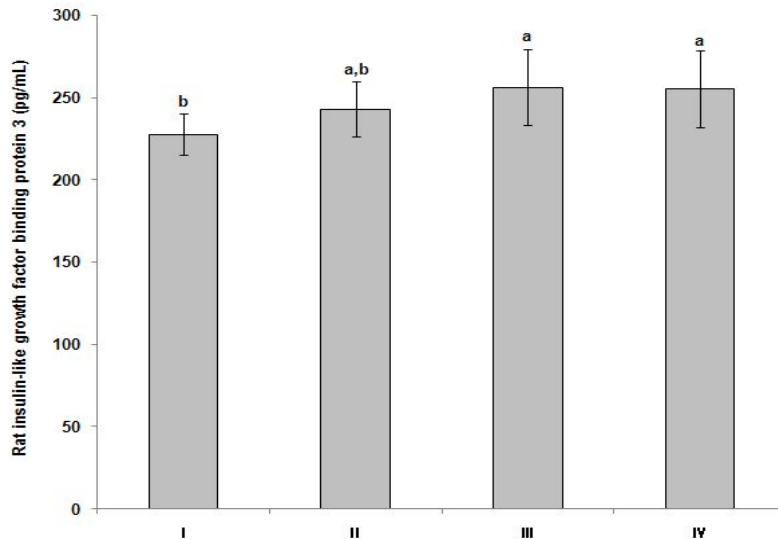


Fig. 12. IGFBP-3 level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

사. 실험동물의 혈중 alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 ALP은 비색법을 이용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. 혈장 10 μL 에 1 mM MgCl_2 와 6 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 9.8)를 90 μL 첨가하고 37°C 에서 1시간동안 반응시킨 후 100 μL 의 0.1 N NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 10, 50, 100, 200 그리고 500 nM의 4-nitrophenol을 이용하여 검정선 작성하였으며, alkaline phosphatase 활성은 세포 수에 따라 영향을 받을 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위세포 수에 대한 alkaline phosphatase의 활성을 계산하였고 alkaline phosphatase 활성은 1 unit (nM PNPP/mg of protein/min)으로 표시하였다.

실험동물의 혈중 ALP 활성은 Fig. 13과 같다. 대조군과 II군 (foremilk 1 g/kg)에 비해 III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)에서 약간 감소하나 통계적인 유의성은 없었다.

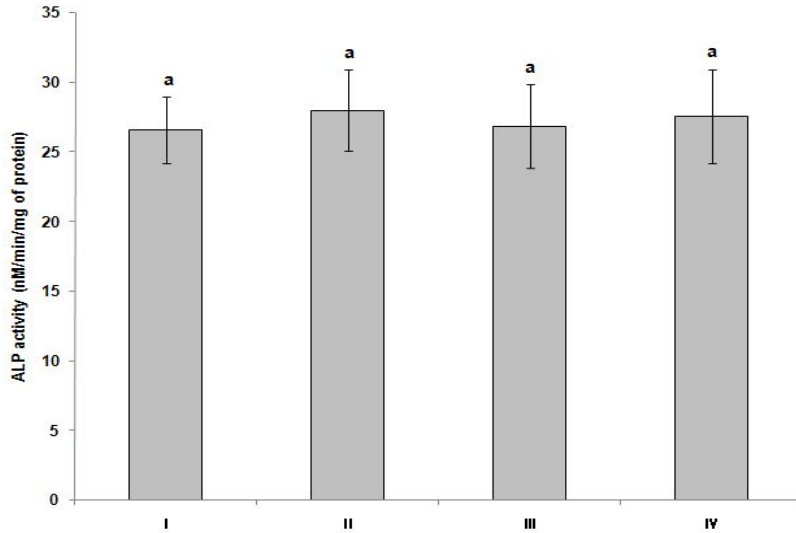


Fig. 13. ALP activity of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

아. 실험동물의 혈중 osteocalcin (OC)함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 osteocalcin은 Biomedical Technologies Inc의 rat osteocalcin kit (BT-490)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat osteocalcin coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 working sample buffer BT-471R로 10배 희석된 혈장을 25 μL 씩 가하고, 100 μL 의 osteocalcin antiserum을 넣어준 후 2시간 30분 동안 37°C 에서 반응시켰다. Sample 제거한 후 300 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 donkey anti-goat IgG peroxidase를 가하고 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 300 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 100 μL 의 TMB solution BT-497/hydrogen peroxide solution BT-498 (1:1 mix)을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 그리고 20 ng/mL의 rat osteocalcin standard BT-493을 이용하여 검정선을 작성하였다.

Osteocalcin은 조골세포에서 형성된 후 골기질속에 침착되며 새로이 형성되는 것의 일부는 혈액으로 방출되어 골 형성 정도를 알 수 있으며 뼈의 무기질화에 관여하는 것으로 알려져 있다. (Calvo, MS. *et al.* Endocr Rev., 1996)

실험동물의 혈중 Osteocalcin 수준은 Fig. 14와 같다. 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg) 간의 통계적인 유의성은 보이지 않았으나 III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)의 osteocalcin 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였음을 알 수 있다.

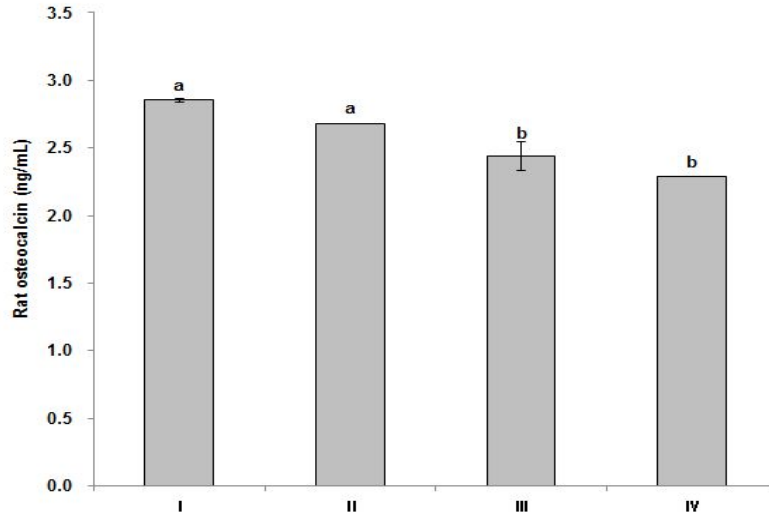


Fig. 14. Osteocalcin level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

자. 실험동물의 혈중 procollagen type I C-terminal peptide (PICP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 PICP은 USCN의 Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit for PICP (E90570Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat PICP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 10배 희석한 혈장을 100 μL 씩 가하고, 2시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Sample을 제거한 후 100 μL 의 detection reagent A를 가하고 1시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 μL washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C 에서 반응시킨 후 350 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 μL 의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C 에서 반응시켰다. 50 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 그리고 80 ng/mL의 Rat PICP standard을 이용하여 검정선을 작성하였다. PICP는 조골세포에서 전구물질인 procollagen으로 분비된 후 collagen이 되기 위해 단백질 분해 효소에 의해 말단부가 절단되면서 생성되기 때문에 골 형성을 반영하는 표지자로 사용할 수 있다. (Calvo, MS. *et al.* Endocr Rev., 1996).

실험동물의 혈중 PICP 수준은 Fig. 15와 같다. 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg)간의 통계적인 유의성은 보이지 않았으나, III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)의 PICP 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가된 것으로 보아 사철쭉 추출물을 섭취시키면 type 1 collagen 형성을 통해서 뼈 성장에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

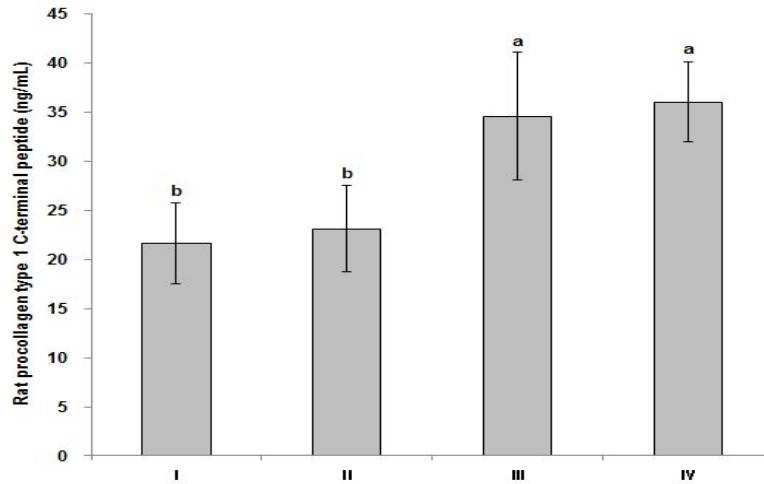


Fig. 15. PICP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

차. 실험동물의 혈중 procollagen type III N-terminal peptide (P3NP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 P3NP는 USCN의 enzyme-linked immunosorbent assay kit (E90573Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat P3NP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 10배 희석된 혈장을 100 μL 씩 가하고, 2시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Sample을 제거한 후 100 μL 의 detection reagent A를 가하고 1시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 μL washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C 에서 반응시킨 후 350 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 μL 의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C 에서 반응시켰다. 50 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 그리고 80 ng/mL의 rat P3NP standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

Type III collagen은 bone matrix에는 거의 존재하지 않고 soft connective tissue에 존재하며, procollagen type III N-terminal peptide (P3NP)는 성장 시에 type III procollagen으로부터 생성되어 혈액으로 방출된다. 따라서 P3NP는 type III collagen의 합성과 분비를 반영할 수 있다. (Price JS. *et al.* Res Vet Sci. 2001)

실험동물의 혈중 P3NP 수준은 Fig. 16과 같다. 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg) 또는 III군 (ACE 250 mg/kg)간의 통계적인 유의성은 보이지 않았으나, IV군 (ACE 500 mg/kg)의 P3NP 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가된 것으로 보아 사철쭉 추출물 투여는 type III collagen의 생성에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

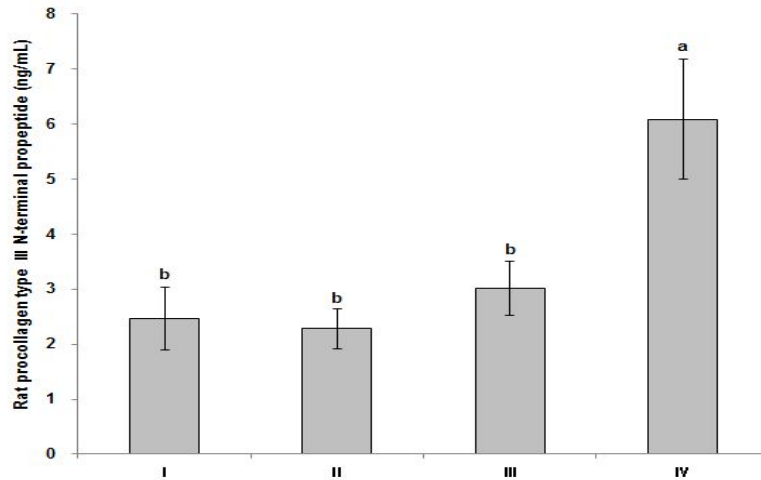


Fig. 16. P3NP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

타. 실험동물의 혈중 cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 ICTP은 USCN의 enzyme-linked immunosorbent assay kit (E90665Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat ICTP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 10배 희석된 혈장을 50 μL 씩 가하고, 50 μL 의 detection reagent A를 가하여 1 시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 μL washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C 에서 반응시킨 후 350 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 μL 의 substrate solution 을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C 에서 반응시켰다. 50 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 123.5, 370.4, 1111.1, 3333.3 그리고 10000 pg/mL 의 rat ICTP standard 을 이용하여 검정선을 작성하였다.

ICTP는 골 흡수 중에 collagen N말단부와 C말단부의 짧은 부분이 파골세포에 의해 분해되어 혈액내로 방출되는 것으로 골 흡수율을 반영하며 성장기에 최고 활성치를 나타낸다.. (Mora S. *et al.* Calcif Tissue Int., 1998)

실험동물의 혈중 ICTP 수준은 Fig. 17과 같다. 대조군과 양성대조군 (foremilk 1 g/kg) 간의 통계적인 유의성은 보이지 않았으나 III군 (ACE 250 mg/kg)과 IV군 (ACE 500 mg/kg)의 ICTP 수준이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다.

이는 사철쭉 추출물을 섭취시키면 bone turnover를 증가시켜 새로운 뼈의 형성과 함께 골 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 판단된다.

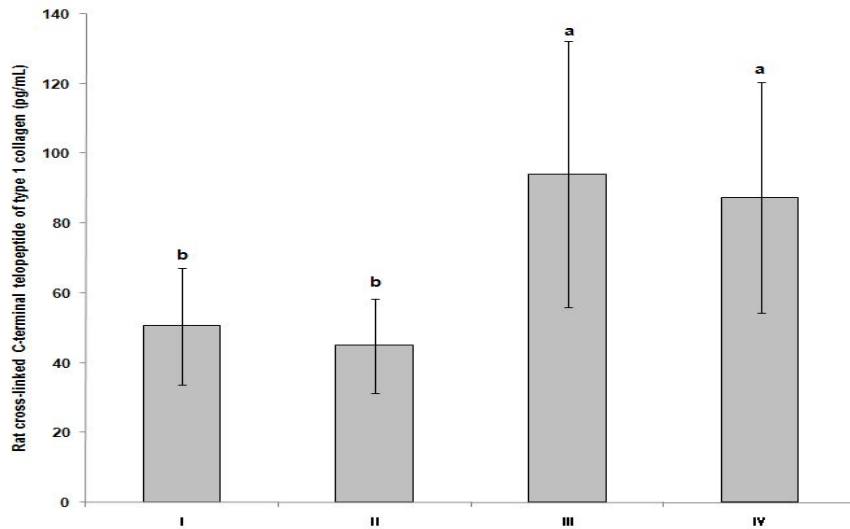


Fig. 17. ICTP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 8 per group) of values obtained. $p < 0.05$ by Duncan's test.

2. 사철쭉 추출물의 뼈 건강 활성

가. 실험동물의 사육 및 식이

난소 절제 (ovariectomized)와 가짜수술 (sham operation)를 실행한 생후 8주령의 암컷 Sprague-Dawley (SD) rat을 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 고형사료 (삼양사료)를 먹이면서 14일간 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법으로 총 5군으로 분리하였다 (n=12 per group). 실험동물에게 칼슘결핍식을 총 84일간 공급하였으며 양성대조군으로 17 β -estradiol (E₂) 50 μ g/kg을 그리고 사철쭉 추출물 125 mg/kg와 250 mg/kg을 매일 경구투여로서 정해진 양을 12주간 공급하였다. 식이 섭취량은 매일 9~10시 정해진 시간에 측정하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 조명시간을 아침 9시부터 저녁 9시까지 12시간으로 조절하였으며 실내온도 25 \pm 3 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 10%로 유지하였다. 급수는 정수된 일반 식수를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았으며 매일 오전 9~10시 정해진 시간에 공급하였다.

I 군: Sham

II 군: OVA

III 군: OVA + E₂ (50 μ g/kg)

IV 군: OVA + 사철쭉 추출물-1 (125 mg/kg)

V 군: OVA + 사철쭉 추출물-2 (250 mg/kg)

나. 실험동물의 체중 및 식이효율에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

사철쭉 추출물이 실험동물의 체중 및 식이효율에 미치는 영향은 Table 3과 Fig. 18에 나타난 바와 같다. 12주간의 실험기간동안 평균 식이섭취량은 I군과 II군 간에 유의적인 차이가 있었으며, II군 (OVA)과 III군 (OVA+E2 50 µg/kg), IV군(OVA+ACE 125 mg/kg), V군 (OVA+ACE 250 mg/kg) 간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 체중 증가는 II군 (OVA)과 IV군 (Ova+ACE 125 mg/kg)간에 유의적인 차이가 나타났다. 이는 난소절제에 의해 지방 축적률이 증가하여 체중증가가 나타났으며, 사철쭉 추출물은 독성 및 섭취거부가 없으며 영양대사에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 3. Body weight gain, food intake and the food efficiency ratio in rats fed experimental diets

Parameters	I	II	III	IV	V
Initial body weight (g)	196.60 ± 12.35	213.11 ± 8.24 [#]	212.89 ± 7.27	214.55 ± 8.64	214.20 ± 8.53
Final body weight (g)	253.60 ± 19.55	312.44 ± 28.68 ^{###}	309.33 ± 27.28	332.91 ± 16.22	314.40 ± 20.78
Body weight gain (g/day)	0.68 ± 0.22	1.18 ± 0.29 ^{###}	1.15 ± 0.33	1.41 ± 0.17 [*]	1.19 ± 0.20
Food intake (g/day)	11.91 ± 0.82	13.34 ± 1.04 ^{###}	14.49 ± 1.48	14.10 ± 0.90	13.71 ± 0.77
FER	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.02 ^{###}	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01

The results represent mean ± S.D. (n = 12 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group.

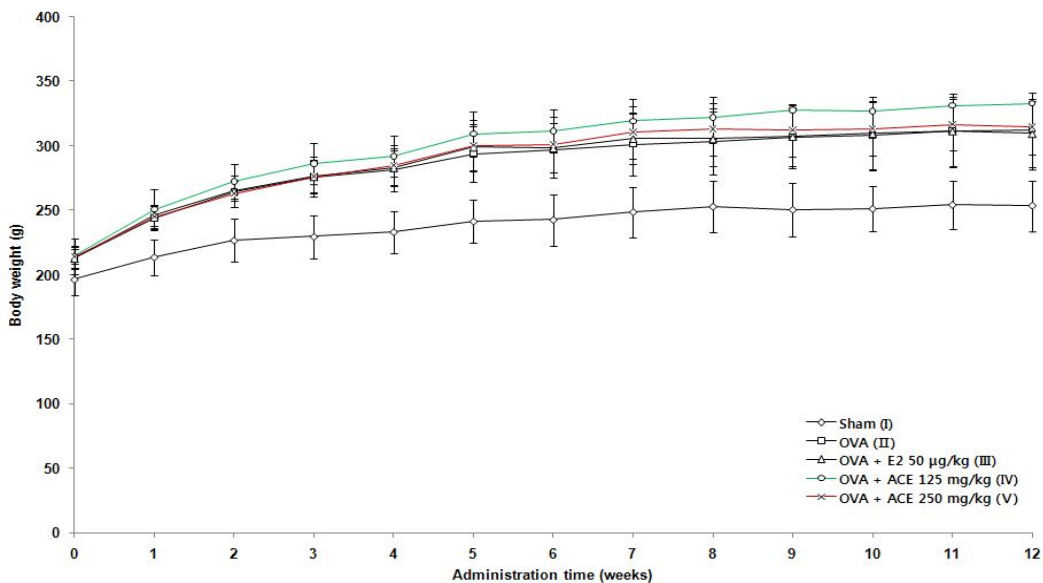


Fig. 18. Change of body weight in experimental groups. The results represent mean ± S.D. (n = 12 per group) of values obtained.

다. 실험동물의 신장, 간, 자궁 및 대퇴부 뼈 (BMC, BMD)에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험이 종료되는 시점 (12주)에서 실험동물을 희생시켜 신장, 간 및 자궁을 적출하여 분석하였으며, 좌측 및 우측 대퇴부 뼈를 적출하여 -70°C 에서 보관하여 분석에 사용하였다. 대퇴부 뼈의 골밀도(bone mineral density, BMD)와 뼈 무기질 함량(bone mineral content, BMC)은 PIXImus (GE medical systems Lunar, USA)를 이용하여 측정하였다. 대퇴부 뼈 조직의 BMD는 cm^2 당 g 단위로 표시하였으며, BMC는 g단위로 표시하였다.

사철쭉 추출물이 실험동물의 신장, 간, 자궁 및 대퇴부 뼈 (BMC, BMD)에 미치는 영향은 Table 4, Fig. 19와 20에 나타난 바와 같다. Table 5에 나타난 신장과 간 무게에서 유의적인 차이가 보이지 않았으나 자궁 무게에서는 II군(OVA)에 비해 III군(OVA+E2 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에 유의적인 차이를 보였으며, IV군(OVA+ACE 125 mg/kg), V군(OVA+ACE 250 mg/kg)에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 대퇴부 뼈의 무게, 길이 및 두께를 측정한 결과 I군 (Sham) 군과 II군(OVA)간 유의적인 차이를 나타내었으며, 처리군 과의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 대퇴부 뼈의 골밀도와 무기질 함량은 II군(OVA)이 I군(Sham)에 비해 감소하였으나 양성대조군(OVA+E2 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)과 사철쭉 추출물 투여군 (IV: OVA+ACE 125 mg/kg , V: OVA+ACE 250 mg/kg)에서는 유의적으로 증가된 것으로 나타났다.

이는 사철쭉 추출물이 간 및 신장에 독성을 나타내지 않으며, 자궁무게 결과 양성대조군(III: Ova+E2 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)으로 사용한 17β -estradiol의 경우 난소절제에 의한 자궁의 퇴화를 감소시켜 주며, 사철쭉 추출물 투여군 (IV: OVA+ACE 125 mg/kg , V: OVA+ACE 250 mg/kg)의 경우 자궁 무게가 유의적 차이가 없는 것으로 보아 호르몬으로서의 효과는 없는 것으로 판단된다. 또한 사철쭉 추출물을 난소 절제한 쥐에 12주간 경구 투여하였을 때 대퇴부 골밀도와 무기질 함량이 난소 절제하지 않은 쥐의 수준으로 회복된 것으로 보아 사철쭉 추출물은 갱년기 여성의 뼈 건강에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Kidney, liver, uterus and right femur weight in rats experimental diets

Parameters	I	II	III	IV	V
Right femur					
Weight (g)	0.66 ± 0.04	0.74 ± 0.05 ^{##}	0.71 ± 0.03	0.73 ± 0.04	0.72 ± 0.05
Length (mm)	35.00 ± 0.90	36.29 ± 0.92 ^{##}	36.12 ± 1.05	37.16 ± 0.47*	36.40 ± 0.56
Thickness (mm)	3.04 ± 0.13	3.17 ± 0.08 [#]	3.18 ± 0.10	3.23 ± 0.09	3.18 ± 0.08
Organs					
Liver (g)	7.68 ± 0.98	8.89 ± 1.49	8.44 ± 1.16	9.01 ± 0.76	8.09 ± 0.56
Kidney (g)	1.72 ± 0.13	1.81 ± 0.25	1.95 ± 0.20	1.89 ± 0.15	1.85 ± 0.17
Uterus (g)	0.54 ± 0.13	0.11 ± 0.01 ^{###}	0.16 ± 0.03 ^{**}	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02

The results represent mean ± S.D. (n = 12 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group.

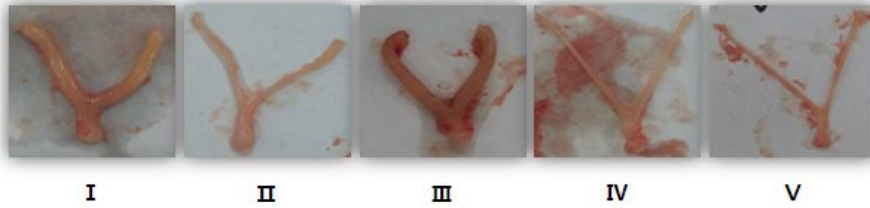


Fig. 19. Appearance of uterus in experimental groups.

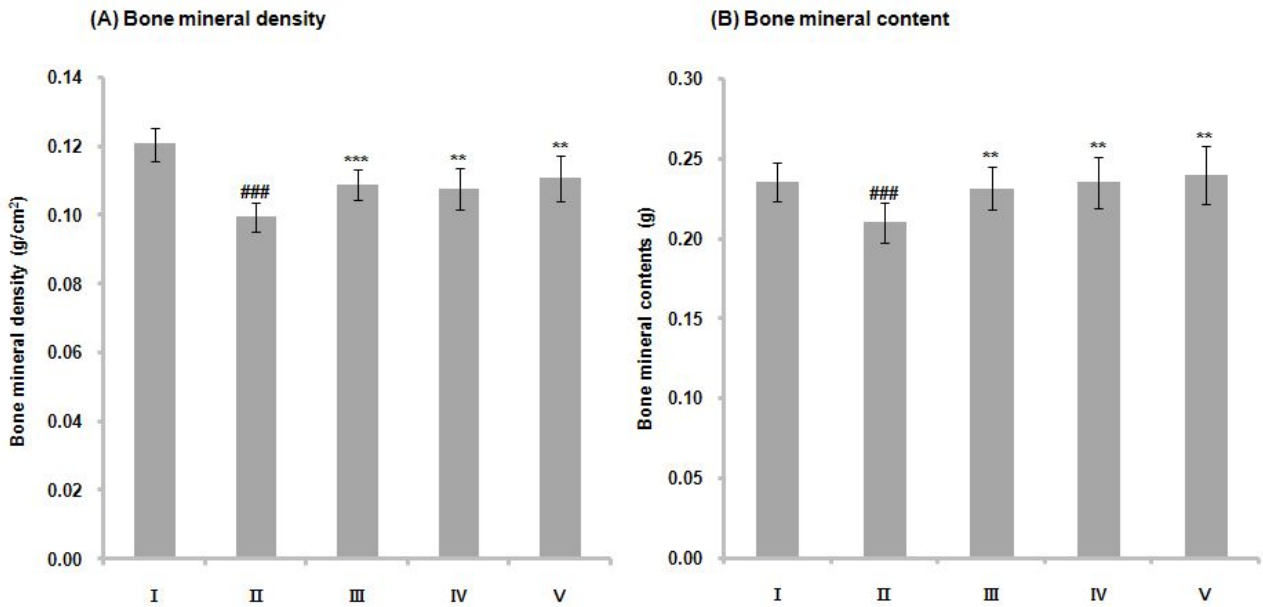


Fig. 20. Change of bone mineral density and content in experimental groups.

The results represent mean \pm S.D. (n = 12 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

라. 실험동물의 혈중 procollagen type I C-terminal peptide (PICP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 PICP은 USCN의 enzyme-linked immunosorbent assay (E90570Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat PICP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 10배 희석한 혈장을 100 μ L씩 가하고, 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. Sample을 제거한 후 100 μ L의 detection reagent A를 가하고 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 μ L washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든

well에 100 μ L의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후 350 μ L의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 μ L의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C에서 반응시켰다. 50 μ L의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 그리고 80 ng/mL의 rat PICP standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

PICP는 조골세포에서 전구물질인 procollagen으로 분비된 후 collagen이 되기 위해 단백분해 효소에 의해 말단부가 절단되면서 생성되기 때문에 뼈 형성을 반영하는 표지자로 사용할 수 있다. (Calvo, MS. *et al.* Endocr Rev., 1996)

실험동물의 혈중 PICP 수준은 Fig. 21과 같다. II군(OVA)에 비해 양성대조군인 III군(OVA+E2 50 μ g/kg)과 사철쭉 추출물 투여군인 V군(OVA+ACE 250 mg/kg)의 PICP 수준이 유의적으로 증가된 것으로 나타났다. 이는 사철쭉 추출물 투여가 type 1 collagen 형성을 증가시킴으로써 뼈 형성에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

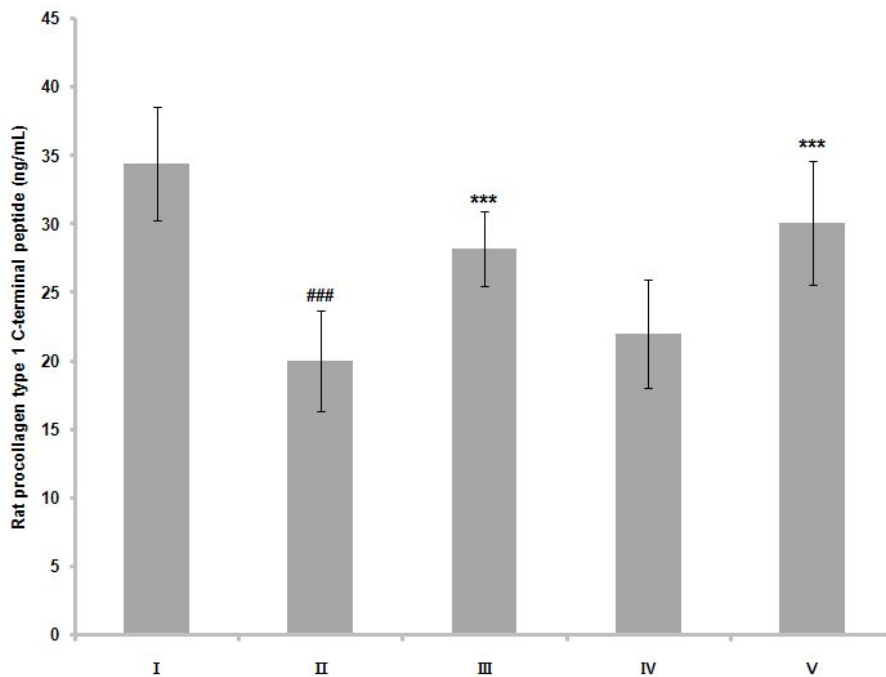


Fig. 21. PICP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 12 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

마. 실험동물의 혈중 Bone alkaline phosphatase (BALP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 BALP은 MBS의 Bone Alkaline Phosphatase (MBS731429)을 이용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보관하며 분석에

이용하였다. BALP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 2배 희석한 혈장을 100 μ L와, conjugate solution을 50 μ L씩 가하고, mixing 해준 후 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응액을 제거하여 준 후, 350 μ L washing buffer를 이용하여 각 well을 5회씩 씻어 주었다. Substrate A와 substrate B 용액을 1:1 비율로 섞은 용액을 각 well에 50 μ L씩 가하고, 15분 동안 37°C 압조건에서 반응시켰다. 50 μ L의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 0.5, 1, 2.5, 5 그리고 10 ng/mL의 BALP standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

실험동물의 혈중 BALP 함량은 Fig. 22과 같다. II군(OVA)에 비해 III군(OVA+E2 50 μ g/kg), IV군(OVA+ACE 125 mg/kg) 및 V군(OVA+ACE 250 mg/kg)에서 ALP 활성이 유의적으로 증가된 것으로 나타났다. BALP는 뼈에 specific한 효소로 조골세포 분화 고정 중 분비되며, 뼈의 재형성에 관여한다. 사철쭉 추출물에 의한 BALP분비 증가는 뼈의 재형성을 촉진하여 뼈 건강에 기여할 것으로 판단된다.

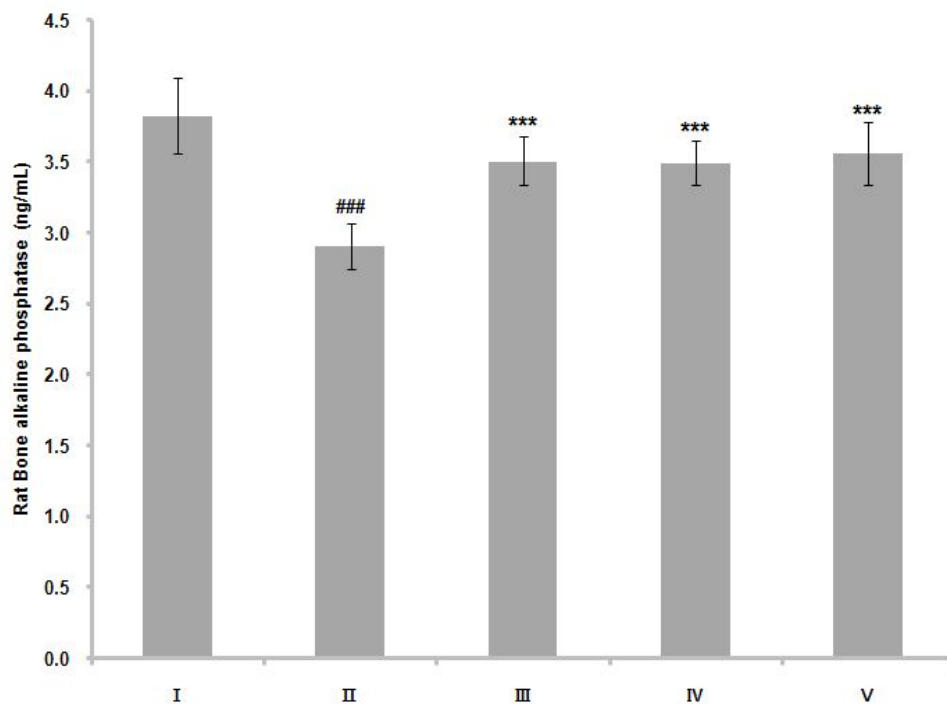


Fig. 22. BALP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 12 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

바. 실험동물의 혈중 osteocalcin (OC) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 osteocalcin은 Biomedical Technologies Inc의 rat osteocalcin kit (BT-490)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보

관하며 분석에 이용하였다. Rat osteocalcin coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 working sample buffer BT-471R로 10배 희석된 혈장을 25 μ L씩 가하고 100 μ L의 osteocalcin antiserum을 넣어준 후 2시간 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. Sample 제거한 후 300 μ L의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μ L의 donkey anti-Goat IgG peroxidase를 가하고 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 300 μ L의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 100 μ L의 TMB solution BT-497/hydrogen peroxide solution BT-498 (1:1 mix)을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μ L의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 그리고 20 ng/mL의 rat osteocalcin standard BT-493을 이용하여 검정선을 작성하였다.

Osteocalcin은 조골세포에서 형성된 후 골기질 속에 침착되며 파골세포의 뼈 흡수 signal로 작용한다. 뼈의 무기질화에 관여하는 것으로 알려진 osteocalcin은 새로 형성되는 것의 일부가 혈액으로 방출되기 때문에 뼈 형성 정도를 알 수 있다. (Calvo. MS. *et al.* Endocr Rev., 1996)

실험동물의 혈중 osteocalcin 수준은 Fig. 23과 같다. 12주간의 실험에서 난소절제군인 II군(OVA)에서 증가된 osteocalcin 수준이 사철쭉 추출물 투여군인 IV군(OVA+ACE 125 mg/kg)과 V군(OVA+ACE 250 mg/kg)에서 유의적인 감소가 관찰되었다. 이는 난소절제로 인해 유발되는 bone turnover를 감소시켜 주어 뼈 건강에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

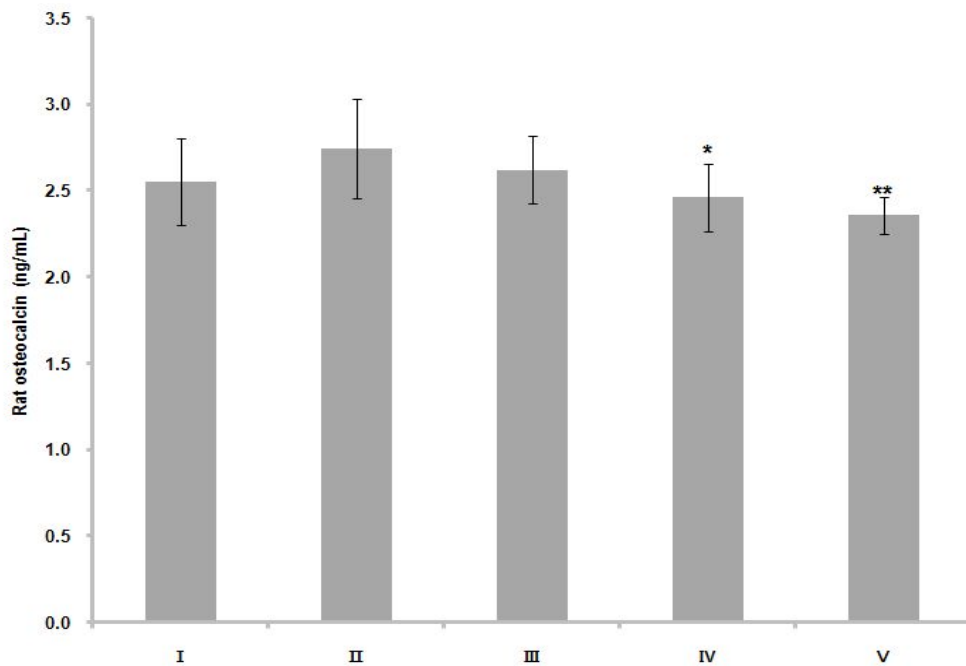


Fig. 23. Osteocalcin level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 6 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

사. 실험동물의 혈중 osteoprotegerin (OPG) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 OPG은 R&D system의 mouse OPG kit (MOP00)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70℃에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat OPG coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 assay diluent RD1-21을 50 µL씩 가하고, calibrator diluent RD5-3로 5배 희석된 혈장을 50 µL씩 넣어준 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Sample을 제거한 후 400 µL의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 µL의 conjugate solution을 가하고 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 400 µL의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 100 µL의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 µL의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 그리고 2,000 pg/mL의 mouse OPG standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

OPG는 RANKL에 결합하는 soluble decoy receptor로서 RANKL signal을 차단하는 효과를 가지며 따라서 성숙한 파골세포로의 분화를 저해할 수 있다. 실험동물의 혈중 OPG 수준은 Fig. 24과 같다. 12주간 실험에서 난소절제군인 II군(OVA)에 비해 양성대조군인 III군(OVA+E2 50 µg/kg)과 사철쭉 추출물 투여군인 V군(OVA+ACE 500 mg/kg)에서는 유의적인 차이가 나타났다.

따라서 사철쭉 추출물은 OPG의 분비를 증가시켜 RANK/RANKL signal을 차단시켜 성숙한 파골세포로의 분화를 억제시킴으로써 파골세포에 의한 뼈 흡수를 감소시켜 뼈의 손실을 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

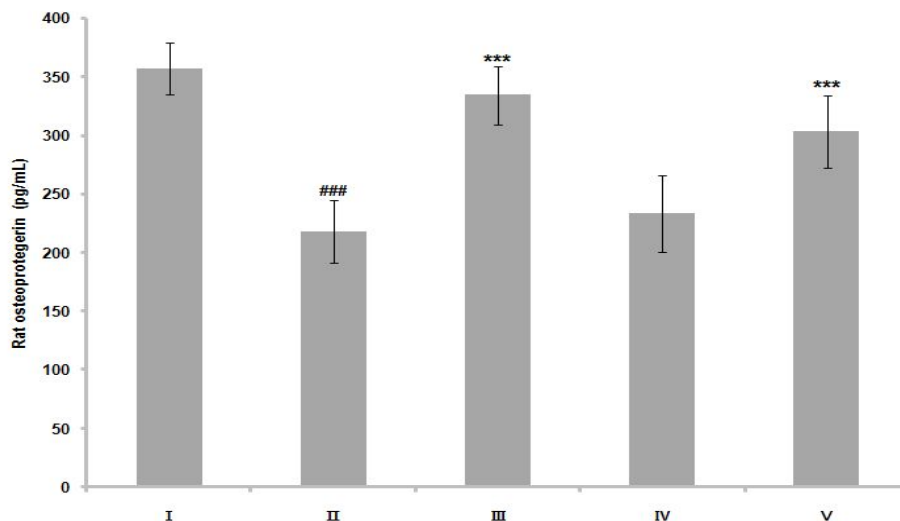


Fig. 24. OPG level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 6 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

아. 실험동물의 혈중 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 RANKL은 R&D system 의 mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 kit (MTR00)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat TRANCE coated 96-well plate에 blank well을 제외한 모든 well에 assay diluent RD1W을 50 μ L씩 가하고 calibrator diluent RD6-12로 2배 희석된 혈장을 50 μ L씩 넣어준 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Sample을 제거한 후 400 μ L의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μ L의 conjugate solution을 가하고 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 400 μ L의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 100 μ L의 substrate solution을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 100 μ L의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 그리고 2,000 pg/mL의 mouse TRANCE standard을 이용하여 검정선을 작성하였다. RANKL는 RANK와 결합하여 조혈모세포에서 성숙한 파골세포로의 분화를 유도하며 성숙한 파골세포의 생존기간을 증가시킨다.

실험동물의 혈중 RANKL 수준은 Fig. 25와 같다. 난소절제군인 II군(OVA)에 비해 양성대조군인 III군(OVA+E2 50 μ g/kg)과 사철쭉 투여군인 IV군(OVA+ACE 125 mg/kg)과 V군(OVA+ACE 250 mg/kg)에서 통계적으로 유의적인 감소가 관찰되었다. 이는 사철쭉 추출물 투여에 의해 RANKL 생성이 감소됨으로써 RANK/RANKL signal이 차단되어 성숙한 파골세포로의 분화가 억제되며, 결국 파골세포에 의한 뼈 흡수를 감소시켜 뼈 건강에 긍정적인 효과를 줄 것으로 판단된다.

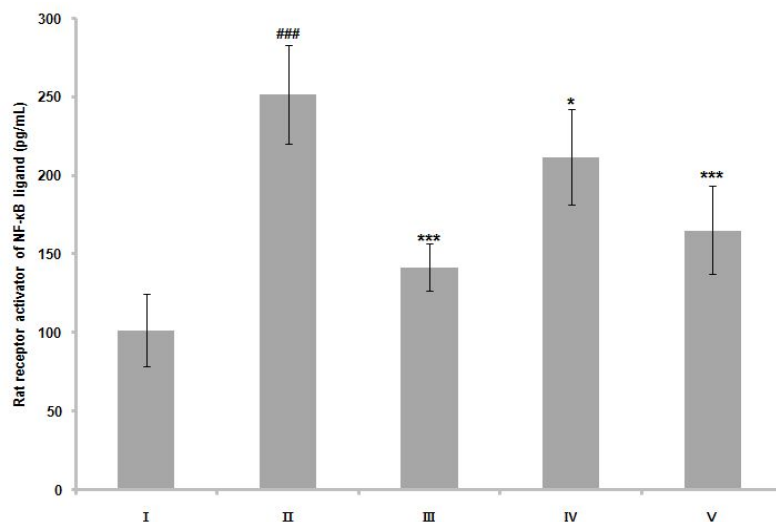


Fig. 25. RANKL level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 6 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

자. 실험동물의 혈중 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 ICTP은 USCN의 enzyme-linked immunosorbent assay kit (E90902Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C 에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat TRAP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 5배 희석한 혈장을 100 μL 씩 가하고, 2시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. 이 후, 100 μL 의 detection reagent A를 가하여 1시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 μL washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 μL 의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C 에서 반응시킨 후 350 μL 의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 μL 의 substrate solution 을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C 에서 반응시켰다. 50 μL 의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 그리고 50 ng/mL의 rat TRAP standard을 이용하여 검정선을 작성하였다.

실험동물의 혈중 TRAP 함량은 Fig. 26과 같다. 난소절제군인 II군(OVA)에서 증가된 TRAP 함량은 양성대조군인 III군(OVA+E2 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)과 사철쭉 추출물 투여군인 VI군(OVA+ACE 125 mg/kg)과 V군(OVA+ACE 250 mg/kg)에서 유의적으로 감소된 것으로 나타났다.

이 같은 결과는 사철쭉 추출물을 섭취시키면 난소절제로 인해 유발되는 파골세포의 TRAP 분비를 감소시켜 뼈 건강에 긍정적인 효과를 초래할 것으로 판단된다.

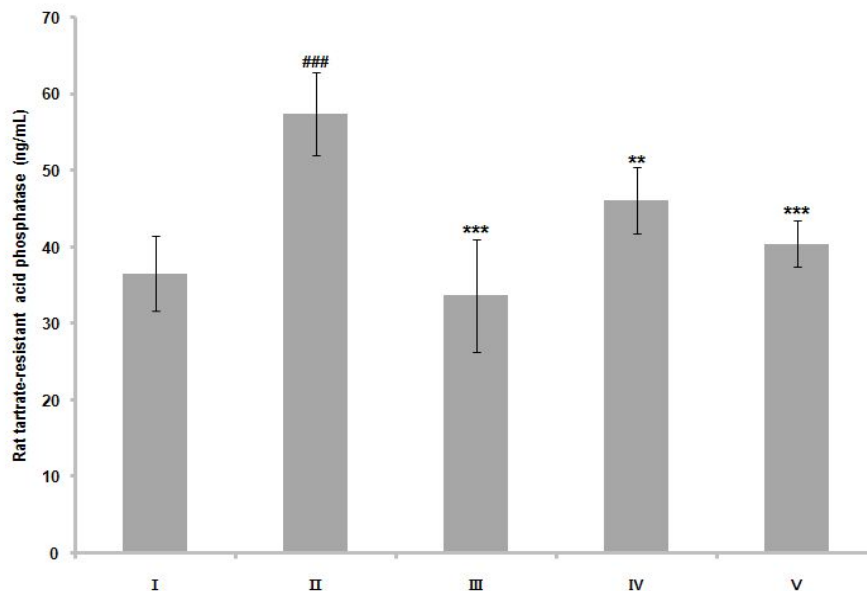


Fig. 26. TRAP activity of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 6 per group) of values obtained. #, $p < 0.05$ vs. the Sham group; ##, $p < 0.01$ vs. the Sham group; ###, $p < 0.001$ vs. the Sham group; *, $p < 0.05$ vs. the OVA group; **, $p < 0.01$ vs. the OVA group; ***, $p < 0.001$ vs. the OVA group

차. 실험동물의 혈중 cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) 함량에 미치는 사철쭉 추출물의 효과

실험동물의 혈중 ICTP은 USCN의 enzyme-linked immunosorbent assay kit (E90665Ra)를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 개복한 후 심장에서 재빨리 혈액을 채취하여 centrifuge로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 전혈에서 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -70°C에 보관하며 분석에 이용하였다. Rat ICTP coated 96-well strip plate에 blank well을 제외한 모든 well에 PBS로 10배 희석한 혈장을 50 µL씩 가하고, 50 µL의 detection reagent A를 가하여 1 시간 동안 37°C에서 반응시켰다. Detection reagent A를 제거하고 350 µL washing buffer를 이용하여 각 well을 3회씩 씻어 주었다. 모든 well에 100 µL의 detection reagent B를 가하고 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후 350 µL의 washing buffer를 이용하여 각 well을 5 회씩 씻었다. 90 µL의 substrate solution 을 모든 well에 가하고 빛을 차단시키면서 20분 동안 37°C에서 반응시켰다. 50 µL의 stop solution을 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. ICTP는 뼈 흡수 중에 collagen N말단부와 C말단부의 짧은 부분이 파골세포에 의해 분해되어 혈액내로 방출되는 것으로 파골세포에 의한 뼈 흡수율을 반영한다. (Mora S. *et al.* Calcif Tissue Int., 1998)

실험동물의 혈중 ICTP 수준은 Fig. 27과 같다. I군(Sham)에 비해 난소절제군인 II군(OVA)의 혈중 ICTP 농도가 유의적으로 증가되었으며, II군(OVA)에 비해 사철쭉 추출물 투여군인 V군 OVA+ACE 250 mg/kg의 ICTP 수준이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다.

이는 난소절제로 야기되는 파골세포에 의한 뼈 흡수의 증가를 사철쭉 추출물이 효과적으로 감소시킴으로서 뼈 건강에 긍정적으로 기여할 수 있음을 말해준다.

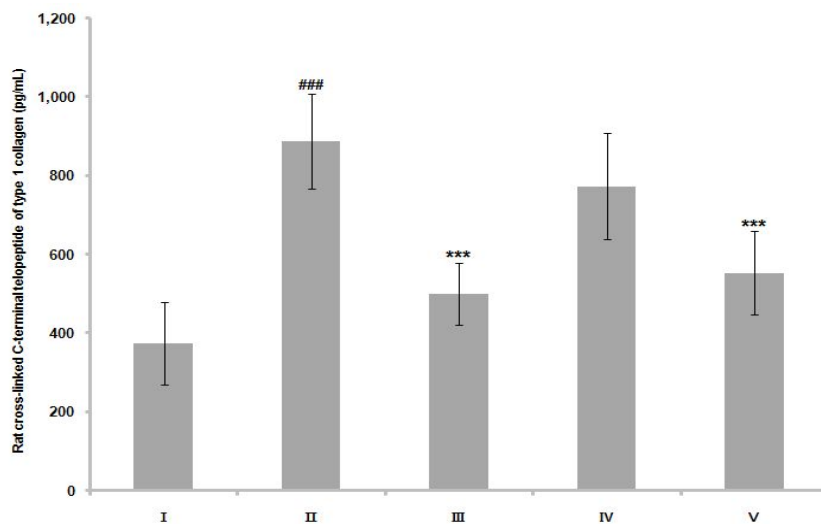


Fig. 27. ICTP level of experimental groups. The results represent mean \pm S.D. (n = 6 per group) of values obtained. #, p < 0.05 vs. the Sham group; ##, p < 0.01 vs. the Sham group; ###, p < 0.001 vs. the Sham group; *, p < 0.05 vs. the OVA group; **, p < 0.01 vs. the OVA group; ***, p < 0.001 vs. the OVA group

3절. 조골세포와 파골세포 분화에 미치는 scoparone의 작용과 기전

1. 조골세포 분화 활성에 미치는 scoparone의 효과

가. Scoparone의 조골세포 증식촉진 및 세포독성 분석

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well 24시간 pre-incubation하고 test sample을 6, 15일간 처리 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 4시간 처리하였다. Media를 제거한 후 세포를 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 씻어준 후 수용액에 용해되지 않는 formazan을 300 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 녹이고 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨준 다음 ELISA reader로 570 nm에서 측정하였다.

조골세포 증식 및 독성에 미치는 scoparone의 영향을 Fig. 28에 나타내었다. Scoparone을 1, 5, 10 그리고 20 μ M의 농도에서 6일 그리고 15일간 배양하여 세포증식 및 세포독성을 확인한 결과 약간의 세포증식활성을 보였으나 15일의 배양기간 동안 세포독성은 관찰되지 않았다. 이후 진행될 활성평가에서 1에서 20 μ M의 농도를 설정하여 진행하였다.

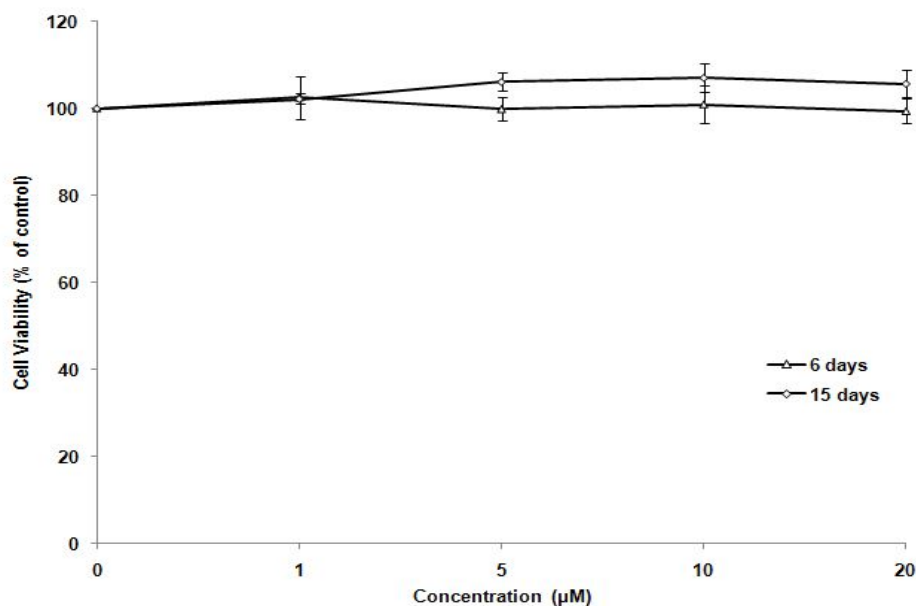


Fig. 28. Osteoblast proliferation and cytotoxicity of scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

나. 조골세포 alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 scoparone의 효과

MC3T3-E1 subclone 4세포를 12-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로

교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 3, 6 그리고 9일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 100 μ L의 0.1% Triton X-100를 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis시켰다. Lysis된 세포를 원심분리한 (14000 rpm, 4°C, 10 min) 후 상등액 5 μ L는 단백질 정량에 사용하였으며, 상등액 30 μ L에 1 mM MgCl₂와 6 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 9.8)를 70 μ L 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 100 μ L의 0.1 N NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0, 10, 50, 100, 200 그리고 500 nM의 4-nitrophenol을 이용하여 검정선 작성하였으며, alkaline phosphatase 활성은 세포 수에 따라 영향을 받을 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위 세포 수에 대한 alkaline phosphatase의 활성을 계산하였고 alkaline phosphatase 활성은 1 unit (nM PNPP/mg of protein/min)으로 표시하였다.

ALP 활성에 미치는 scoparone의 영향을 Fig. 29에 나타내었다. 3, 6 그리고 9일의 분화기간 동안 ALP 활성을 평가한 결과 양성대조군으로 사용한 17 β -estradiol은 분화유도배지를 처리한 세포에 비해 6일에서 15.60 unit까지 활성을 증가시켰으며, 1, 10 그리고 20 μ M scoparone은 ALP 활성을 15.62, 16.44 그리고 18.19 unit로 농도 의존적인 증가를 보여 주었다. 분화 9일차에서 ALP 활성은 6일차에 비해 각 군 모두 감소하는 경향을 보였는데, 이는 bone nodule의 형성으로 인한 것으로 판단된다. 이는 scoparone이 조골세포의 분화를 유도하여 조골세포의 석회화에 관여할 수 있을 것으로 판단된다.

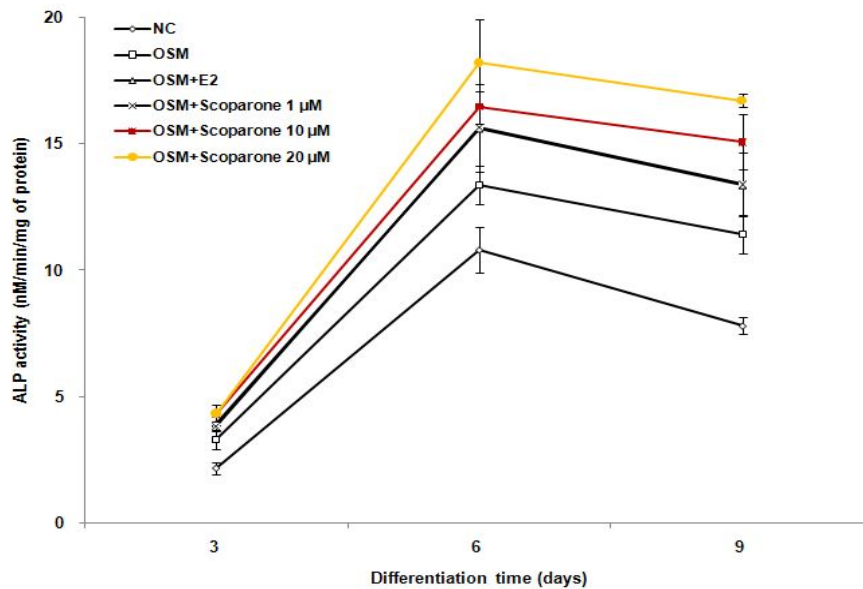


Fig. 29. ALP activity of osteoblast treated with scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

다. 조골세포 콜라겐 합성 (collagen synthesis)에 미치는 scoparone의 효과

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 8일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 μ L Bouin's fluid 용액으로 37°C에서 1시간 동안 고정시킨 후 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 뒤 0.1% Direct red 80 (Sirius red F3BA) 용액으로 1시간동안 염색하였다. Acidic water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 μ L 0.1 N NaOH 용액을 가하여 녹인 다음 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조골세포 collagen 합성에 미치는 scoparone의 영향을 Fig. 30에 나타내었다. 분화유도배지로 분화를 유도한 MC3T3-E1 subclone 4 세포의 경우 분화유도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 154.45%까지 collagen 합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 양성대조군으로 사용된 E2의 경우 173.04% 까지 collagen 합성을 증가시켰다. Scoparone을 1, 10 그리고 20 μ M의 농도로 처리한 결과 163.43 ~ 181.85%까지 collagen 합성의 증가되었다. 기존의 여러 연구들에 따르면 조골세포에서 생성되는 I형 콜라겐은 전체 골 단백질의 85~90%를 차지하는 것으로 알려졌는데 (Noriyoshi K. Endocrinology. 1986), 이는 scoparone이 콜라겐 합성을 촉진하여 골 생성에 영향을 줄 수 있는 것으로 사료된다.

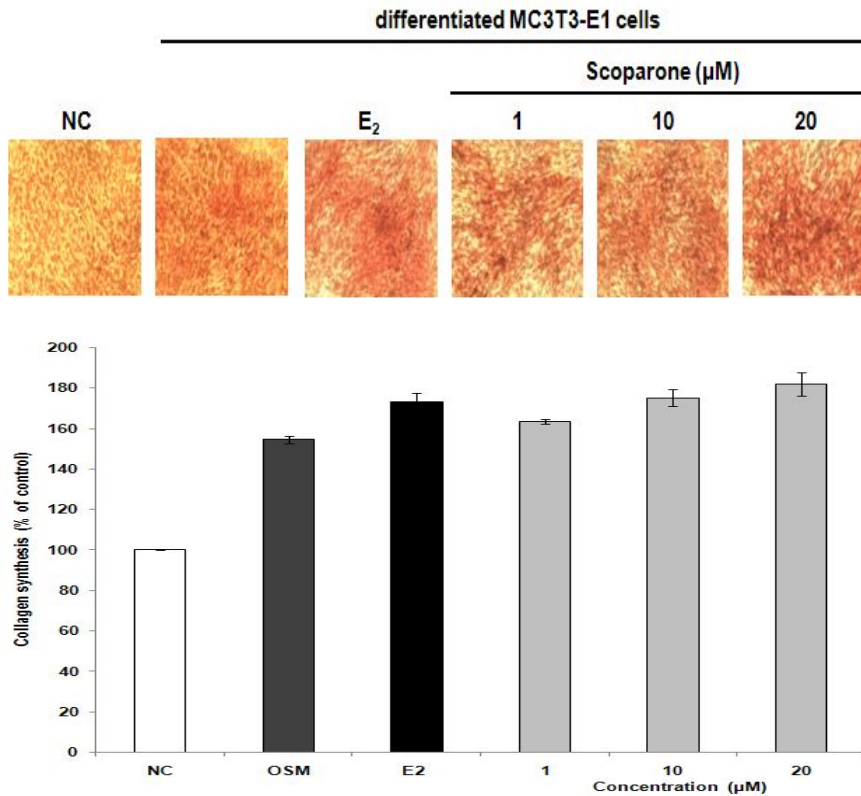


Fig. 30. Collagen synthesis staining and activity of osteoblast treated with scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

라. 조골세포 bone nodule 형성 (mineralization)에 미치는 scoparone의 효과

MC3T3-E1 subclone 4세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고 분화유도배지 (10 mM β -glycerolphosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid)로 교환하여 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 매 3일마다 배지 교환 시에 시료를 넣어 총 15일간 배양하였다. Media를 제거한 다음 500 μ L PBS (pH 7.4)로 2회 씻고 500 μ L 70% ethanol로 4°C에서 1시간 동안 고정시킨 다음 500 μ L의 distilled water로 2회 씻었다. 40 mM Alizarin red S (pH 4.2) 용액으로 10분 동안 염색한 후 500 μ L distilled water를 이용하여 염색되지 않은 dye를 제거하고 500 μ L 10% cetylpyridinium chloride 용액을 가하여 녹인 다음 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨 ELISA reader로 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

골의 생성은 기질의 증식, 성숙 및 석회화의 세 단계로 이루어진다. (Pittenger JJ. *et al.* Science., 1999). Bone nodule의 형성능은 조골세포 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 calcium에 특이적으로 흡착력이 높은 식물성 염료로서 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화된 양과 염색된 정도가 상호 비례하는 것으로 알려져 있다. (Schiller PC, *et al.* Bone., 2001)

조골세포 bone nodule 형성에 미치는 scoparone의 영향은 Fig. 31에 나타난 바와 같다. 분화유도배지로 분화를 유도한 MC3T3-E1 subclone 4 세포의 경우 분화유도배지를 처리하지 않은 세포에 비해 121.74%까지 bone nodule 형성이 증가된 것으로 나타났다. 양성대조군으로 사용된 E2의 경우 157.84% 까지 bone nodule 형성이 증가되었다. Scoparone을 1, 10 그리고 20 μ M의 농도로 처리한 결과 141.56 ~ 154.01%까지 bone nodule 형성이 증가된 것으로 나타났다.

이는 scoparone이 조골세포의 세포외 기질화를 촉진시켜 골 생성에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

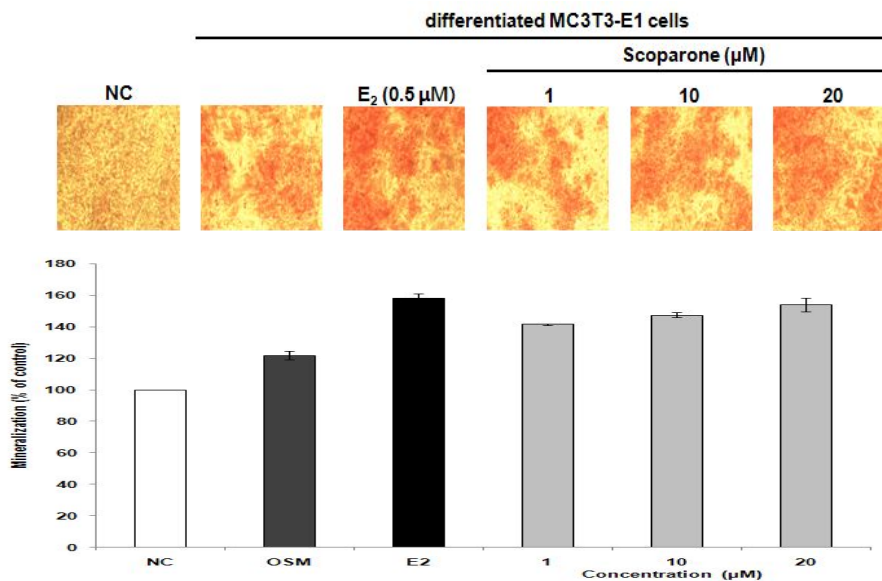


Fig. 31. Bone nodule formation activity of osteoblast treated with scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

2. 파골세포 분화 활성화에 미치는 scoparone의 효과 및 작용기전

가. Scoparone 추출물의 파골세포 세포독성 분석

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well 24시간 pre-incubation하고 test sample 을 5일간 처리한 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 1시간 처리하였다. Media를 제거한 후 세포를 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 2회 씻어준 후 수용액에 용해되지 않는 formazan을 300 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 녹이고 200 μ L를 96-well micro plate로 옮겨준 다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Scoparone에 의한 파골세포 독성은 Fig. 32에 나타난 바와 같다. Scoparone을 1, 2, 5, 10 그리고 20 μ M의 농도에서 5일간 배양하여 세포독성을 확인한 결과 scoparone은 5일의 배양기간 동안 세포독성을 나타내지 않았다. 이후 진행될 활성화평가에서 1에서 20 μ M의 농도를 설정하여 진행하였다

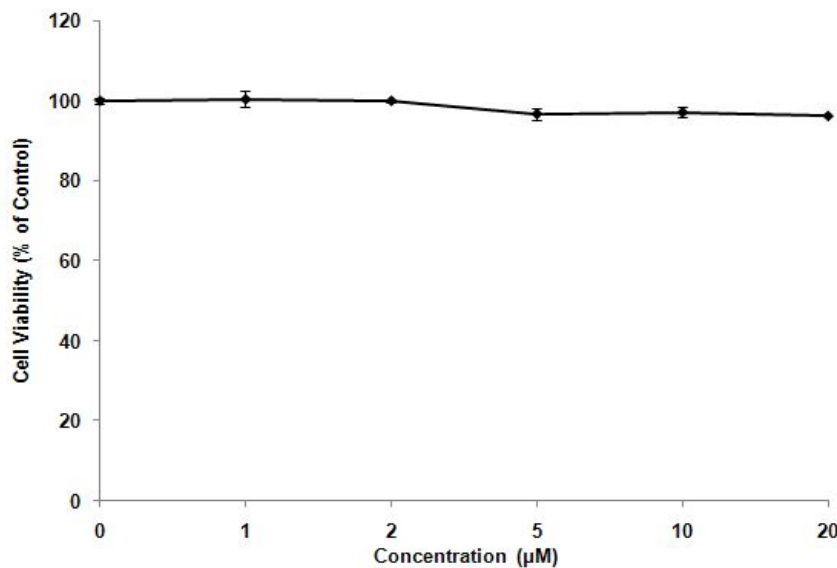


Fig. 32. Osteoclast cytotoxicity of scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

나. 파골세포 TRAP 염색과 파골세포 counting에 미치는 scoparone의 효과

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하였다. 매 2일마다 배지 교환 시에 시료를 넣고 총 5일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μ L의 PBS (pH 7.4)로 1회 세척하고, 4% formaldehyde로 10분간 고정한 후 ethanol/acetone (1:1)로 1분간 고정하였다. 증류수를 이용하여 2회 세척 후 Leukocyte Acid

Phosphatase Kit 387-A (Sigma)를 이용하여 TRAP 염색을 하였다. 염색이 끝난 후 광학 현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성 지표로 사용하였다.

TRAP 양성인 다핵성 파골세포를 확인한 결과를 Fig. 33에 나타내었다. TRAP staining으로 파골세포를 확인한 결과 scoparone은 1 - 20 μM 의 농도에서 농도 의존적으로 파골세포 형성을 감소시켰으며, TRAP-양성 다핵세포를 계수한 결과 파골세포로의 분화를 효과적으로 (93.15 ~ 61.69%) 억제시키는 것으로 나타났다.

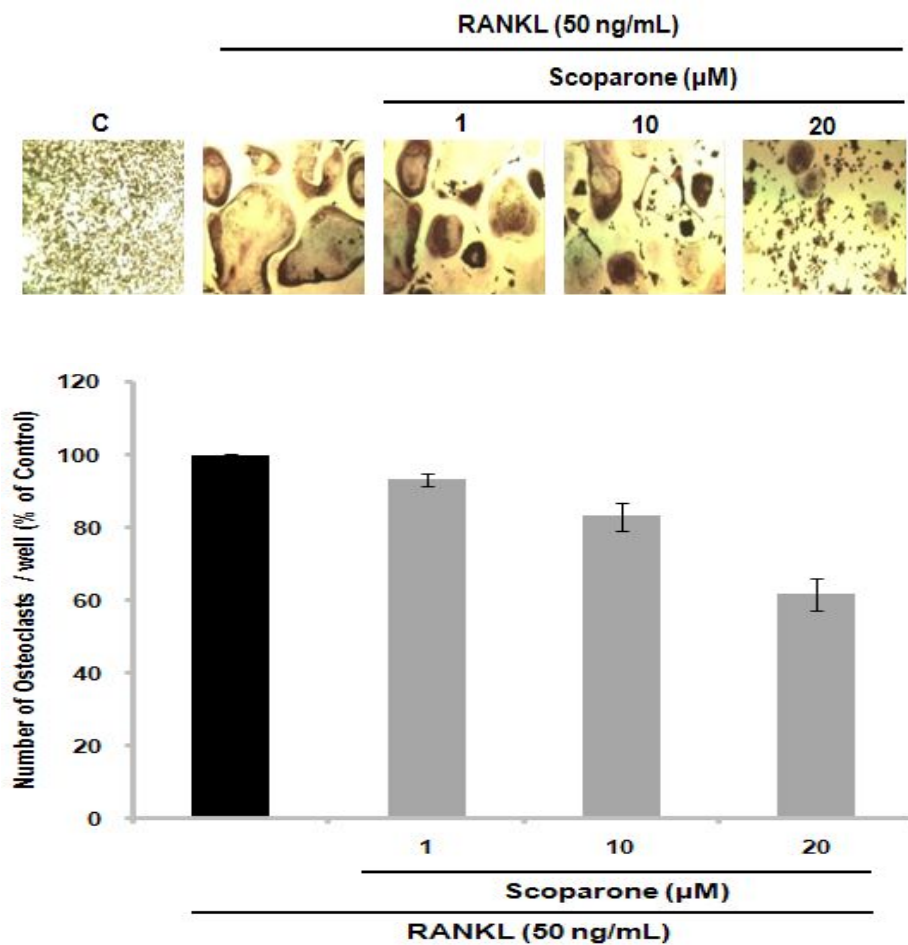


Fig. 33. TRAP staining and counting of osteoclasts treated with scoparone. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

다. 파골세포 TRAP 활성화에 미치는 scoparone의 효과

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κB ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하였다. 매 2일마다 배지 교환 시에 시료를 넣고 총 5일간 배양하였다. Media를 제거한 후 500 μL 의 PBS (pH 7.4)로 1회 세척하고, 4% formaldehyde로 10분간 고정한 후

ethanol/acetone (1:1)로 1분간 고정하였다. 증류수로 2회 세척 후 10 mM sodium tartrate와 5 mM p-nitrophenylphosphate가 포함된 50 mM citrate buffer (pH 4.5)를 500 µL씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응하였다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 100 µL씩 분주하고 0.1N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

파골세포의 분화 marker인 TRAP activity를 측정한 결과는 Fig. 34에 나타난 바와 같다. Scoparone은 1 - 20 µM에서 농도 의존적으로 TRAP 활성 (254.70 ~ 196.70%)을 감소시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과는 scoparone이 파골세포 형성과 파골세포 TRAP activity 활성을 억제시켜 뼈의 재흡수를 억제함으로써 뼈 건강에 긍정적인 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

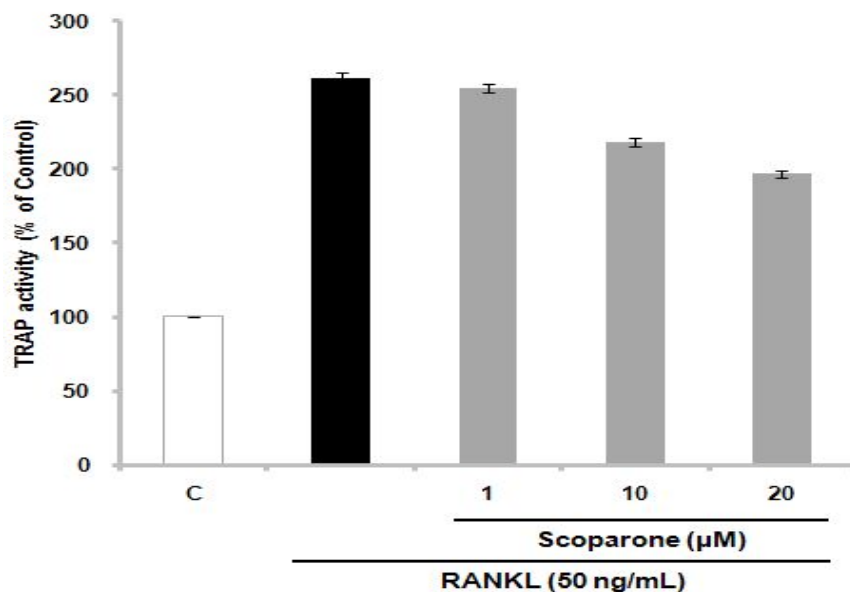


Fig. 34. TRAP activity of osteoclasts treated with scoparone. The results represent mean ± S.D. of values obtained from 3 experiments

라. 파골세포에 의한 골 흡수 활성화에 미치는 scoparone의 효과

파골세포에 의한 bone resorption 활성은 Cosmobio의 bone resorption assay kit를 이용하였다. CaP-coated plate (48-well)에 FACS를 250 µL씩 가하고 2시간 동안 37°C에서 labeling 해준다. FACS 용액을 제거한 후, PBS (pH 7.4)로 2회 세척해주고, RAW 264.7세포를 배양하기 전 까지 phenol red free 배지를 1 mL 가하여 주고 보관한다. RAW 264.7 세포를 FACS labeled CaP-coated plate에 5×10^3 cells/well의 수로 phenol red free 배지를 이용하여 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [100 ng/mL receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)]와 함께 시료를 처리하였다. 매 2일마다 배지 교환 시에 시료를 넣고 총 6일간 배양하였다. 100 µL의 배양액을 96-well black plate로 옮겨주고, 50 µL의 bone resorption assay buffer를 각 well에 넣어준 후, Ex 485 nm/Em 535 nm에서 측정하였다.

파골세포 분화에 의한 골 흡수 활성을 측정된 결과는 Fig. 35에 나타난 바와 같다. Scoparone은 1 - 20 μM 에서 농도 의존적으로 골 흡수 활성 (228.64 ~ 192.76%)을 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 scoparone이 파골세포 분화를 억제 시켜 골 흡수 활성을 억제함으로써 bone metabolism을 조절하는 것으로 사료된다.

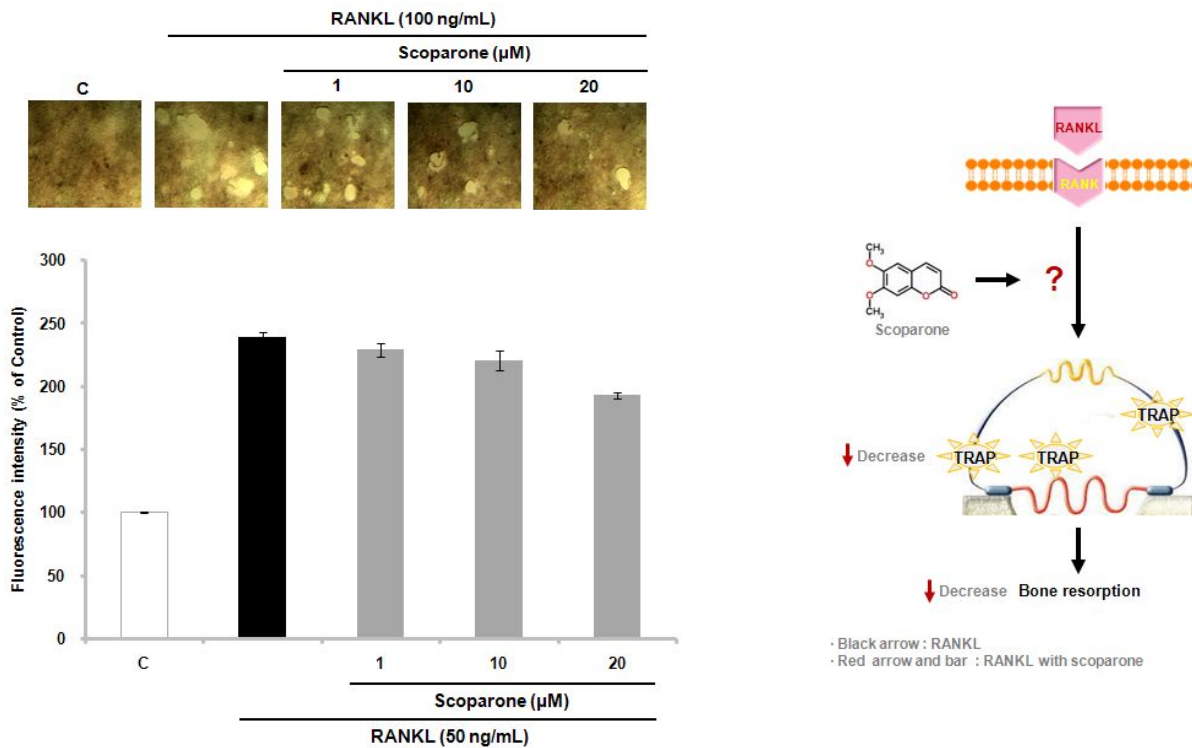


Fig. 35. Inhibitory effect of scoparone on bone resorption during RANKL-induced osteoclast differentiation. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

마. 파골세포 분화 중 ROS 및 GSH level의 변화

파골세포 분화 과정 중 세포내 ROS 및 GSH level의 변화는 DCFH-DA 및 mBCL 형광 probe를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7을 96-well clear plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]를 처리하였다. 총 5일간 배양하며, 매일 ROS 및 GSH level을 측정하였다. Media를 제거한 후, 각 well을 200 μL 의 HBSS으로 교체해 주고, 40 μM 의 DCFH-DA와 50 μM 의 mBCL을 30분간 추가로 배양한 후, GENios fluorescence plate reader (TECAN trading AG, Switzerland)를 이용하여 DCFH-DA (Ex 485 nm/ Em 535 nm) 그리고 mBCL (Ex 380 nm/ Em 465 nm)에서 형광을 측정하였다.

파골세포 분화 기간 중 ROS 및 GSH의 변화는 Fig. 36에 나타내었다. 총 5일간의 분화기간 동안 ROS level은 2일차에 가장 높은 수치 (177.676%) 를 나타내고, 분화 3일차부터 감소하는 것으로 나타났으며,

같은 기간 동안 GSH level은 계속 적으로 감소 (83.73 ~ 41.31%)하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 파골세포 분화과정에 있어 ROS가 세포내 2차 신호전달자로 중요한 역할을 하는 것으로 보여지며, 세포내 ROS발생의 조절은 파골세포 분화과정에 있어 중요하게 작용할 것으로 판단된다.

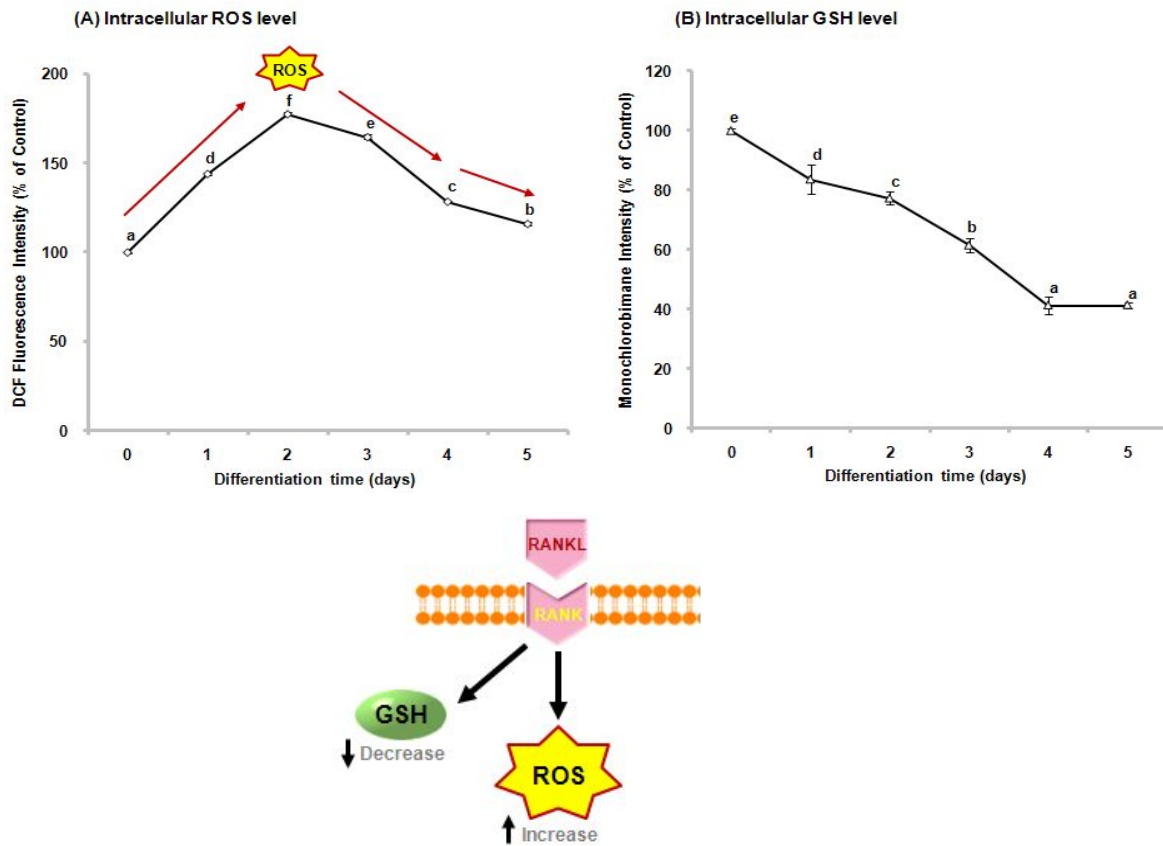


Fig. 36. Change of intracellular ROs and GSH level during RANKL-induced osteoclast differentiation. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

마. 파골세포 분화 중 ROS, O₂·, H₂O₂ 및 GSH level에 대한 scoparone의 효과

Scoparone에 의한 파골세포 내 ROS, O₂·, H₂O₂ 및 GSH level의 변화는 DCFH-DA, DHE, DHR123 그리고 mBCL 형광 probe를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7을 96-well clear plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 시료를 함께 처리하였다. 총 2일간 배양 후, 배지를 제거하고 각 well을 200 μ L의 HBSS으로 교체해 주었다. 각 각의 probe [DCFH-DA (40 μ M), DHE (50 μ M), DHR123 (20 μ M), mBCL (50 μ M)]를 30분간 추가로 배양한 후, GENios fluorescence plate reader (TECAN trading AG, Switzerland)를 이용하여 형광을 측정하였다. [DCFH-DA (Ex 485 nm/ Em 535 nm), DHE (Ex 485 nm/ Em 590 nm), DHR123 (Ex 485 nm/ Em 535 nm), mBCL (Ex 380 nm/ Em 465 nm)]

파골세포 내 ROS (O₂·, H₂O₂) 및 GSH level에 대한 scoparone의 효과는 Fig. 37에 나타내었다. 총 2일 간 분화한 파골세포 내 ROS 와 O₂· level은 RANKL 처리에 의해 증가 하였으며, 1, 10 그리고 20 μ

M 에서 농도 의존적으로 감소하였다. 그러나 H_2O_2 와 GSH level에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 파골세포 분화 과정 중 ROS 특히, O_2^- 발생은 파골세포 분화에 중요한 신호전달자로 작용하며, scoparone은 이러한 ROS (O_2^-) 발생을 조절하여 파골세포 분화를 억제하는 것으로 판단된다.

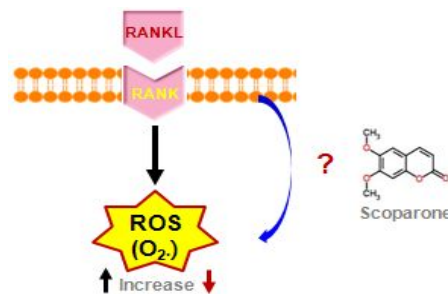
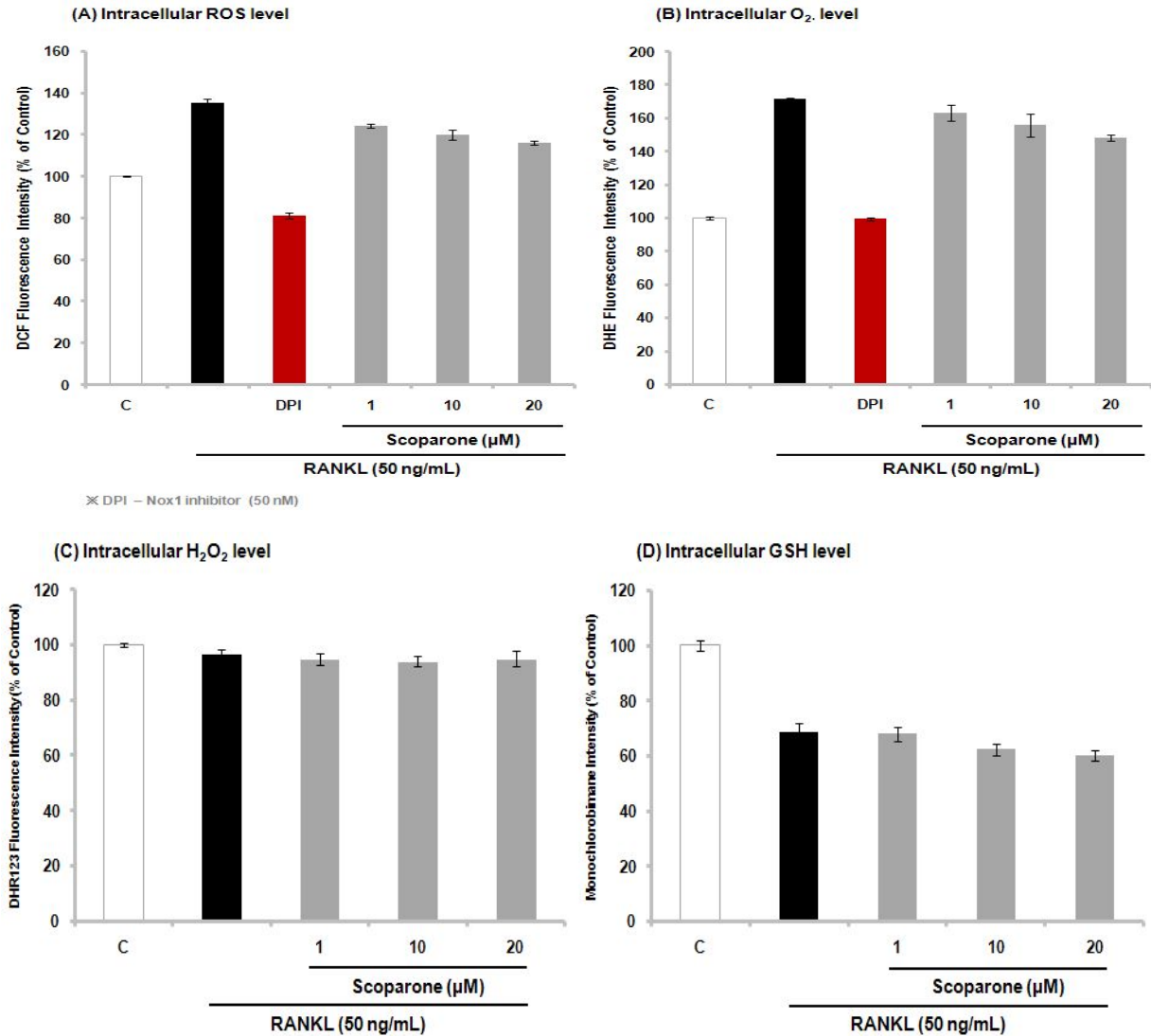


Fig. 37 Change of Intracellular ROS, O_2^- , H_2O_2 and GSH level by treatment of scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

사. 파골세포 분화 중 Mitochondrial membrane potential (MMP)에 대한 scoparone의 효과

Scoparone에 의한 파골세포 내 mitochondrial membrane potential의 변화는 rhodamine123 형광 probe를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7을 96-well clear plate에 1×10^5 cells/well의 수로 24시간 pre-incubation하고, 분화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 시료를 함께 처리하였다. 총 2일간 배양 후, 배지를 제거하고 각 well을 200 μ L의 HBSS으로 교체해 주었다. 5 μ M의 rhodamine 123을 30분간 추가로 배양한 후 HBSS를 제거하고 50 μ L HBSS로 세척해주었다. 다시 200 μ L의 HBSS를 넣어준 후 GENios fluorescence plate reader (TECAN trading AG, Switzerland)를 이용하여 Ex 485 nm/ Em 535 nm에서 형광을 측정하였다.

파골세포 내 mitochondrial membrane potential 에 대한 scoparone의 효과는 Fig. 38에 나타내었다. 총 2일 간 분화한 파골세포 내 MMP는 RANKL 처리에 의해 감소 (34.94%) 하였으며, 1, 10 그리고 20 μ M 에서 농도 의존적으로 증가 (35.59 ~ 54.47%)하였다. 위의 결과를 종합하여 볼 때, RANKL에 의한 파골세포 분화과정에서 ROS 발생은 mitochondria에서 이루어지며, scoparone 은 RANKL 처리에 의한 MMP의 감소를 막아줌으로써 ROS 발생을 조절하여 파골세포 분화를 억제하는 것으로 판단된다.

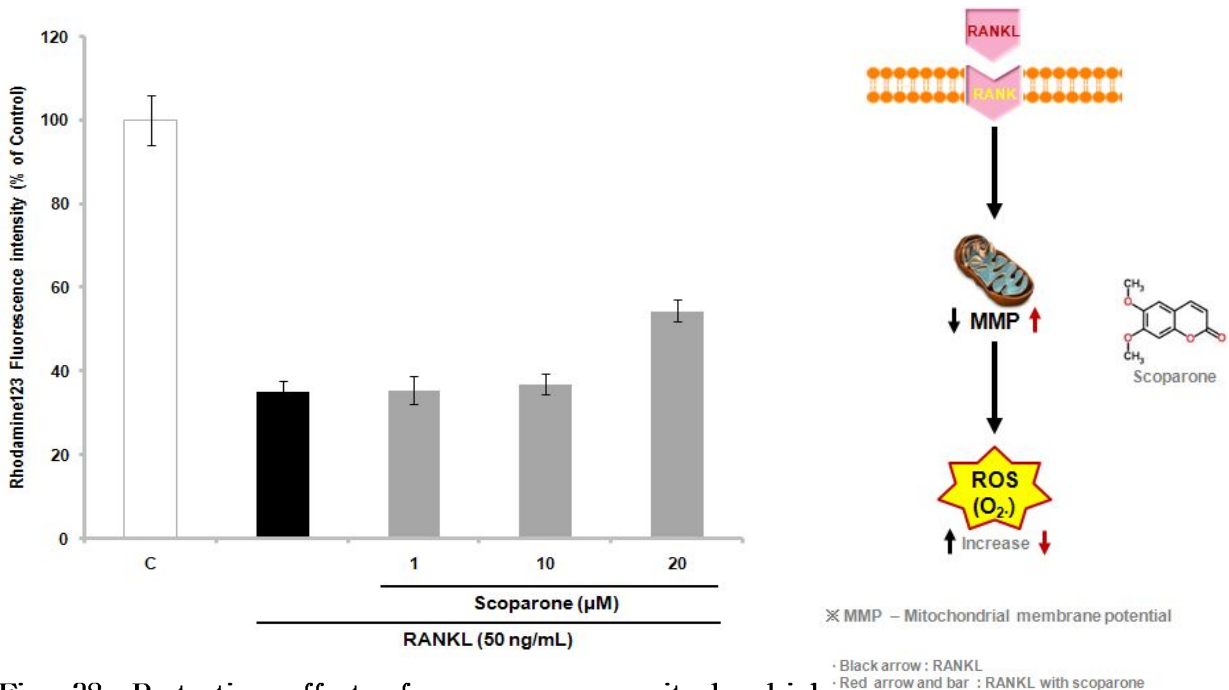


Fig. 38. Protective effect of scoparone on mitochondrial membrane potential during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days. The results represent mean \pm S.D. of values obtained from 3 experiments

아. 파골세포 분화 signaling pathway 관련 protein의 발현 및 활성화에 대한 scoparone의 효과

(1) TRAF6/Rac1/Nox1/ROS 신호전달 경로에 대한 scoparone의 효과

파골세포 분화 과정에서 RANKL의 처리는 TRAF6와 NADPH oxidase을 경유하는 신호전달 체계를 통해 세포내 ROS 발생량을 증가시키고, 이는 파골세포의 분화에 2차적인 중요한 신호전달자로 작용한다고 보고되었으며. TRAF6의 결여나 dominant mutant form의 발현은 NADPH oxidase의 component중 하나인 Rac1의 활성을 억제하고, 이는 Rac1이 TRAF6의 하위기전에서 기능을 하는 파골세포 분화를 조절하는 중요한 매개체임이 보고되었다. (Lee NK. *et al.* Blood., 2005).

따라서 본 연구에서는 RANKL로 유도된 파골세포 분화 과정에서 scoparone을 농도별로 처리 하였을 때 TRAF6/Rac1/Nox1와 관련된 ROS 발생 신호 분자 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 39에 나타난 바와 같이 scoparone은 RANKL/RANK signaling pathway의 최상위 조절자인 TRAF6의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, TRAF6의 하위기전 매개체인 Rac1의 활성이 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 scoparone은 TRAF6의 발현을 조절하여, NADPH oxidase의 cytoplasmic subunit인 Rac1의 활성형태인 GTP-Rac1의 발현을 감소시키고, 이는 Rac1이 membrane으로의 translocation을 방해하여 NADPH oxidase complex를 억제하는 것으로 ROS의 발생을 조절하는 것으로 보여진다.

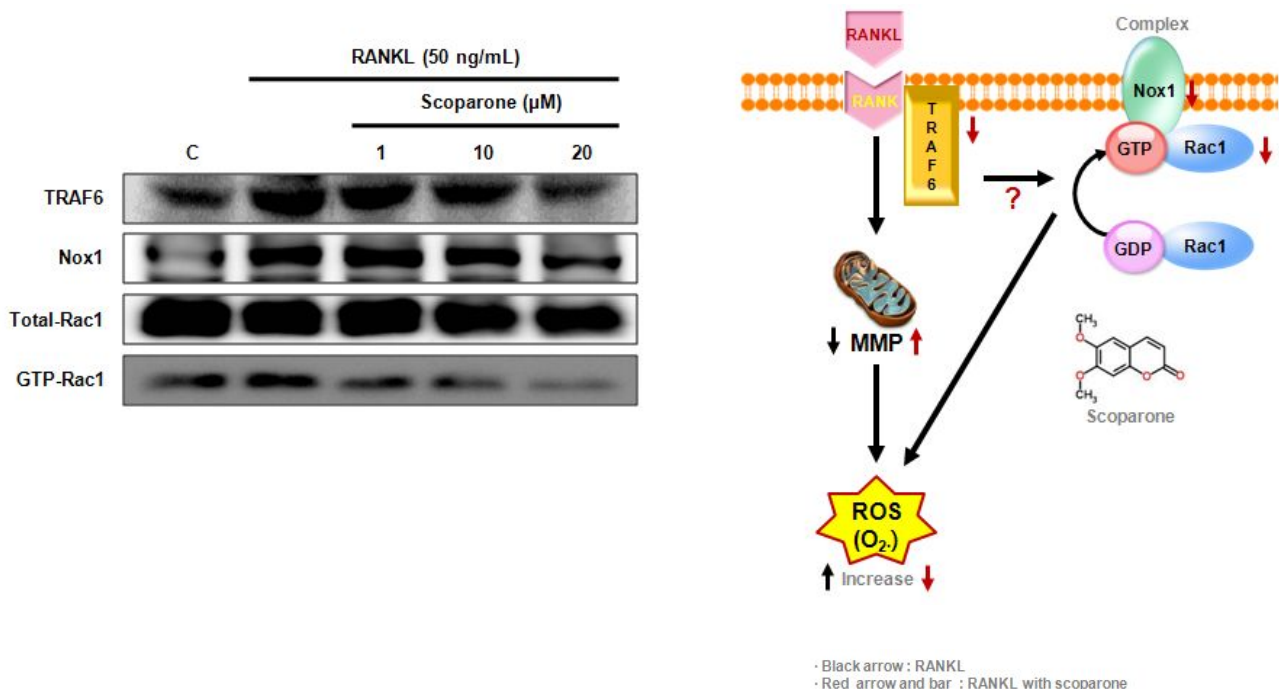


Fig. 39. The expression of TRAF6, Nox1, Total Rac1 and GTP-Rac1 proteins by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days.

(2) Rac1의 상위조절 매개체인 c-Src 및 PI3K 발현 및 활성화에 대한 scoparone의 효과

Src family중 하나인 c-Src는 NADPH oxidase의 cytoplasmic subunit 중 하나인 p47^{phox}를 인산화 시키며, p47^{phox}의 인산화는 membrane oxidases componenets에 결합을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 또한 PI3K와 Rac1의 활성화에 관여한다고 보고되어져 있다. (Cai H. *et al.* Trends in Pharm, 2003). 또한, 파골세포 내 TRAF6/c-Src/PI3K를 경유하는 신호 전달체계는 cytoskeletal reorganiztion 및 anti-apoptosis를 통해 파골세포의 생존 기간을 조절하는 것으로 보고 되어져 있다. (Steven L, *et al.* Nat. Rev. Genet, 2003)

이는 c-Src와 PI3K 신호전달 체계는 파골세포의 생존 조절뿐 아니라, TRAF6/Rac1/Nox1와 관련된 ROS 발생 신호 분자 조절에서 Rac1의 활성화에 관여하는 중요한 매개체인 것으로 보이며, scoparone을 농도별로 처리하였을 때 c-Src 및 PI3K의 발현 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 40에 나타난 바와 같이 scoparone은 c-Src의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, c-Src의 하위기전으로 알려진 PI3K의 인산화를 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 scoparone이 c-Src의 발현을 감소시켜 PI3K의 인산화를 억제하여 Rac1의 활성을 조절하는 것으로 보여진다.

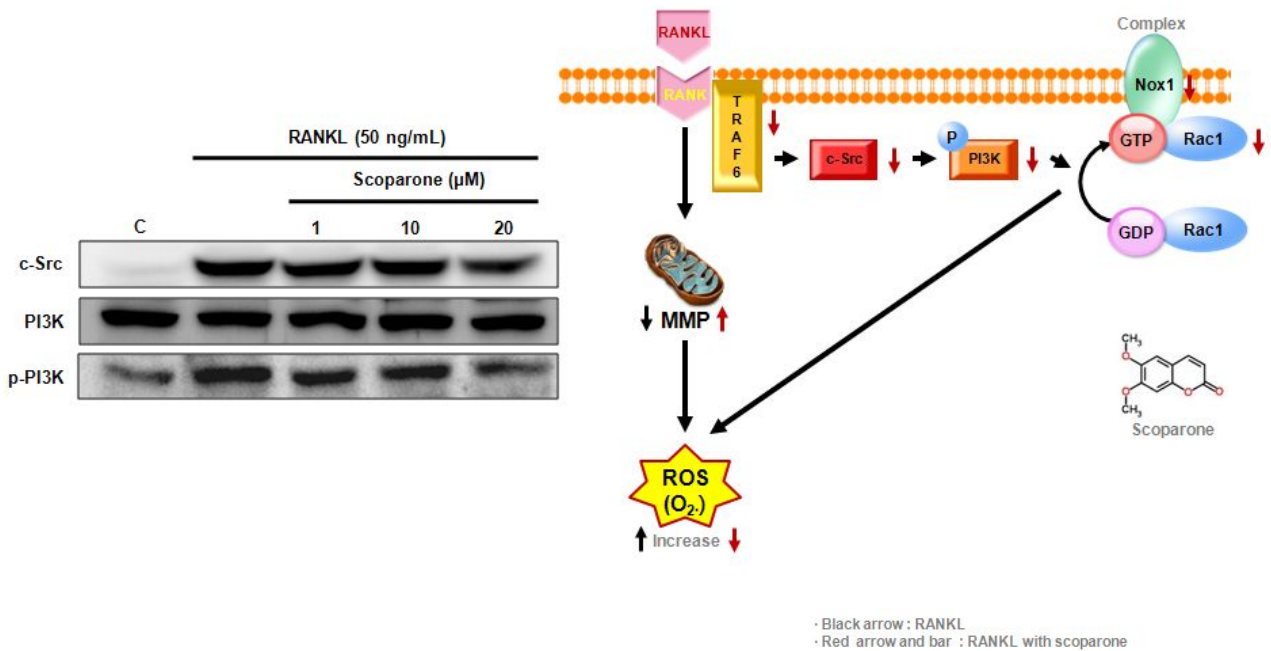


Fig. 40. The expression of c-Src, PI3K and p-PI3K proteins by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days.

(3) Antioxidant enzyme (Catalase and SOD1) 발현에 대한 scoparone의 효과

생체 내 과도한 ROS 발생에 의한 oxidative stress는 세포 또는 조직내 항산화제 (antioxidant)와 산화제 (oxidant)의 균형이 깨짐으로써 일어나는 생체현상으로 정의할 수 있다. Catalase, GSH, GPx 그리고 SOD1 등 체내 존재하는 antioxidant enzyme들은 체내 defence system을 맡고 있다.

본 연구에서는 scoparone이 RANKL/RANK 신호 전달 체계를 통해 발생하는 ROS와 관련하여 파골세포 내 antioxidant enzyme (catalase 및 SOD1)의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blotting

을 실시하였다. Fig. 41에 나타난 바와 같이 scoparone은 RANKL 처리에 의해 감소된 catalase와 SOD1의 발현을 증가 시키는 것으로 나타났다. 위의 결과와 종합하여 볼 때 scoparone은 TRAF6/Rac1/Nox1 신호 전달 경로를 조절하여 ROS 발생을 억제하는 것으로 보여지며, antioxidant enzymes (catalase와 SOD1)의 발현을 증가시켜 발생된 ROS를 소거하는 두 가지 신호 전달 경로를 통해 파골세포 내 ROS 발생을 조절하는 것으로 보여진다.

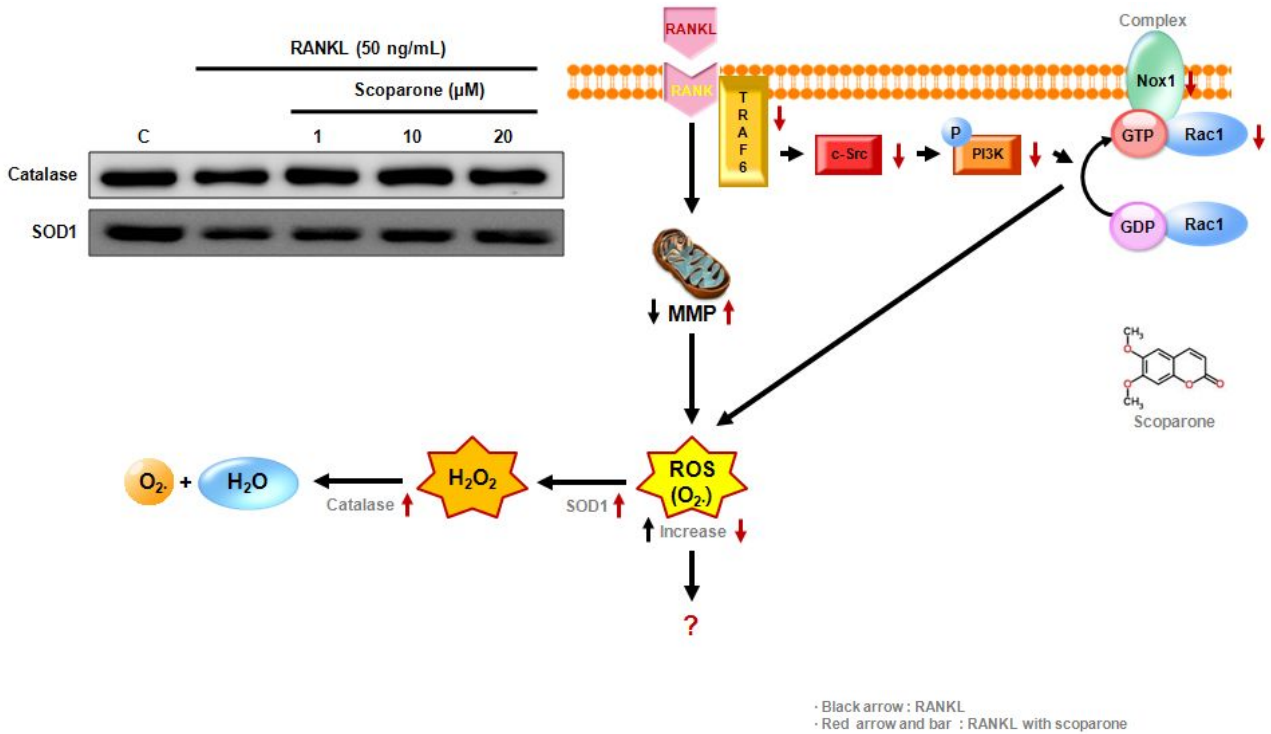


Fig. 41. The expression of catalase and SOD1 proteins by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days.

(4) MAPKs (JNK, ERK, p38) 신호경로에 대한 scoparone의 효과

MAPKs pathway는 stress, heat shock, radiation등 과 같은 일련의 자극 (ROS)에 의해 활성화 되어 염증반응, apoptosis, 세포 분화 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다고 알려져 있다, (Ono K, *et al.* Cell signal, 2000)

파골세포 내에서는 RANKL과 RANK의 결합으로 TRAF계열 단백질 결합이 촉진되고, RANKL signal이 전달되어 MAPKs인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 단백질이 활성화 되며, 이들은 파골세포 분화에 필수적인 NF-κB, NFATc1, c-Fos를 유도하여 파골전구세포에서 파골세포의 분화 및 유지를 조절한다고 알려져 있다. (Galibert L, *et al.* J Biol Chem. 1998)

따라서, 본 연구에서는 scoparone이 RANKL/RANK 신호 전달 체계를 통해 활성화 되는 MAPKs (JNK, ERK, p38)의 발현 및 하위 신호분자 (c-Fos, NFATc1)에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다.

Fig. 42와 43에 나타난 바와 같이 scoparone은 RANKL/TRAF6/Rac1/Nox 신호전달 경로를 통해 발생된 oxidative stress를 통해 활성화된 MAPKs (JNK, ERK, p38)의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다. 또한, Fig. 43에 나타난 바와 같이 JNK와 ERK의 활성화에 의해 조절되는 c-Fos의 발현을 감소시켜, 이들에 의해 조절되는 NFATc1의 발현을 조절하는 것으로 나타났다.

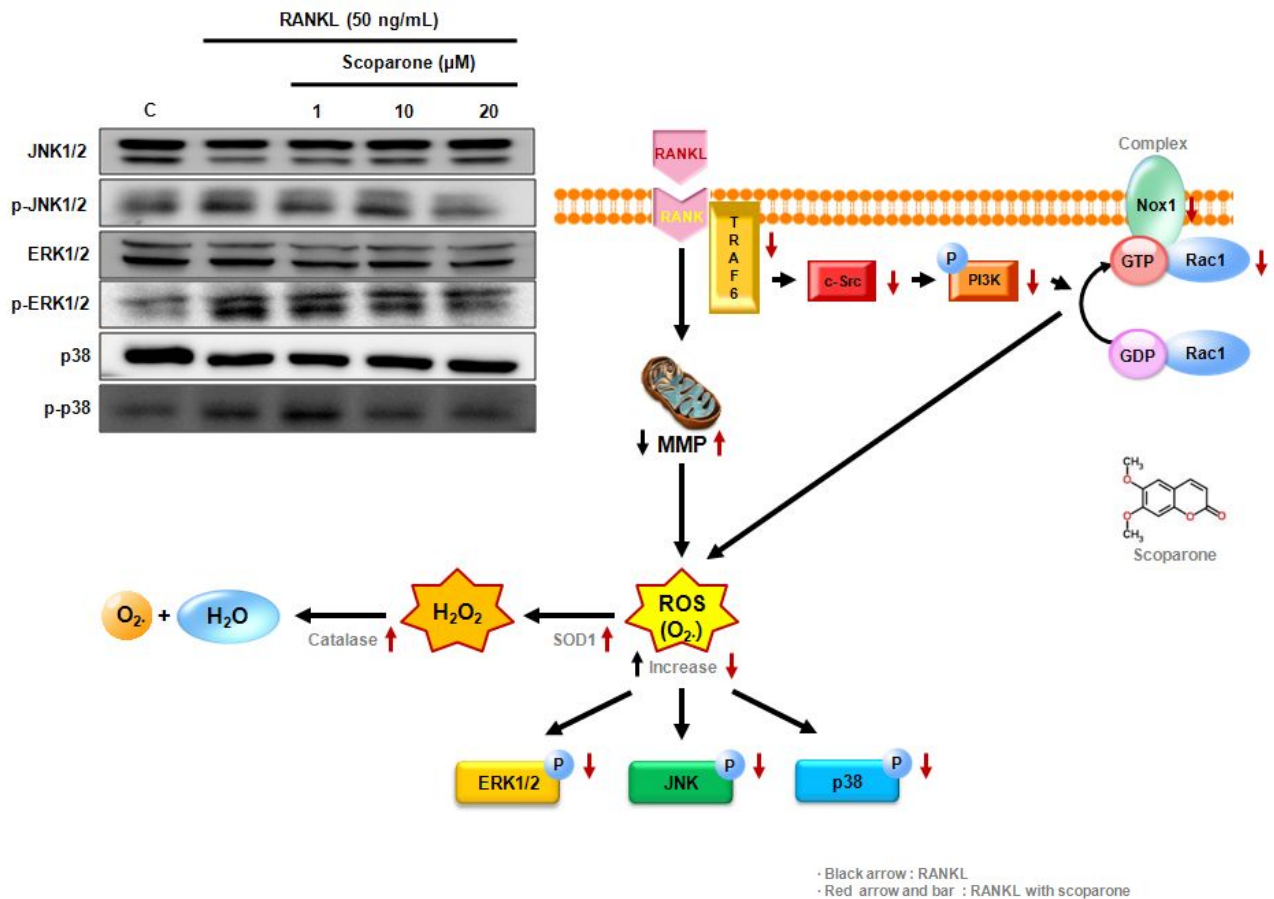


Fig. 42. The expression and phosphorylation of MAPKs pathway proteins (JNK, ERK, p38) by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days

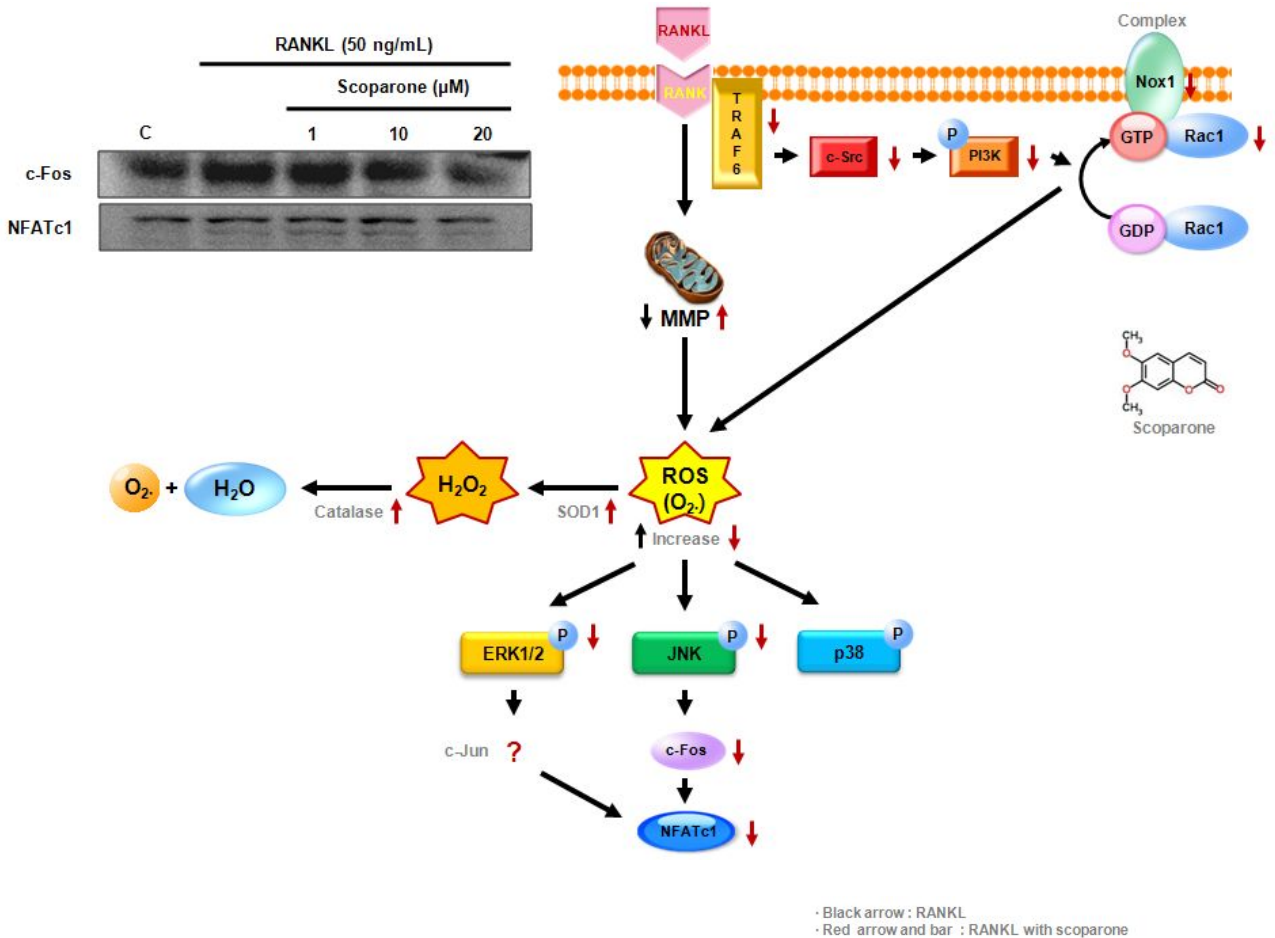


Fig. 43. The expression c-Fos, c-Jun and NFATc1 proteins by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days

(5) 파골세포 biomarker (Cathepsin K and TRAP) 발현에 대한 scoparone의 효과

뼈의 항상성은 뼈를 구성하는 단백질을 생성하고, 미네랄 축적을 유도하는 조골세포 (osteoblast)와 뼈의 표면에 단백질 분해 효소 분비 및 뼈 구성성분을 파괴하는 파골세포 (osteoclast)에 의해 유지된다. (Boisvert CA. *et al*, Nature, 2005).

파골세포에서 분비 되는 TRAP과 cathepsin K은 파골세포에서 분비되는 단백질 분해 효소로 알려져 있다. 특히, cathepsin K는 파골세포에서만 선택적으로 발현되는 중요한 시스테인 단백질 분해 효소로 뼈의 구성성분이 단백질과 미네랄을 분해하여 뼈를 파괴하는 역할을 한다. (Kim JM *et al*, Int J Mol Med, 2007).

따라서, 본 연구에서는 scoparone이 뼈의 흡수에 직접적으로 작용하는 효소들인 Cathepsin K와 TRAP에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. Fig. 44에 나타난 바와 같이 scoparone은 파골세포에서 분비되는 effector gene들 중 하나인 cathepsin K와 TRAP의 발현을 감소시키는 것으로 나타났으며, 이로 인해 뼈 흡수 작용을 조절하는 것으로 보여진다.

결론적으로, scoparone의 뼈 흡수 억제작용은 TRAF6/Rac1/Nox1으로 이어지는 signaling pathway 조절

을 통해 파골세포 분화 과정 중 발생하는 ROS를 감소시키고, stress, heat shock, radiation 등 과 같은 일련의 자극 (ROS)에 sensitive한 MAPKs pathway 활성을 억제하여, 파골세포에 의한 뼈 흡수 작용을 억제하는 것으로 판단된다.

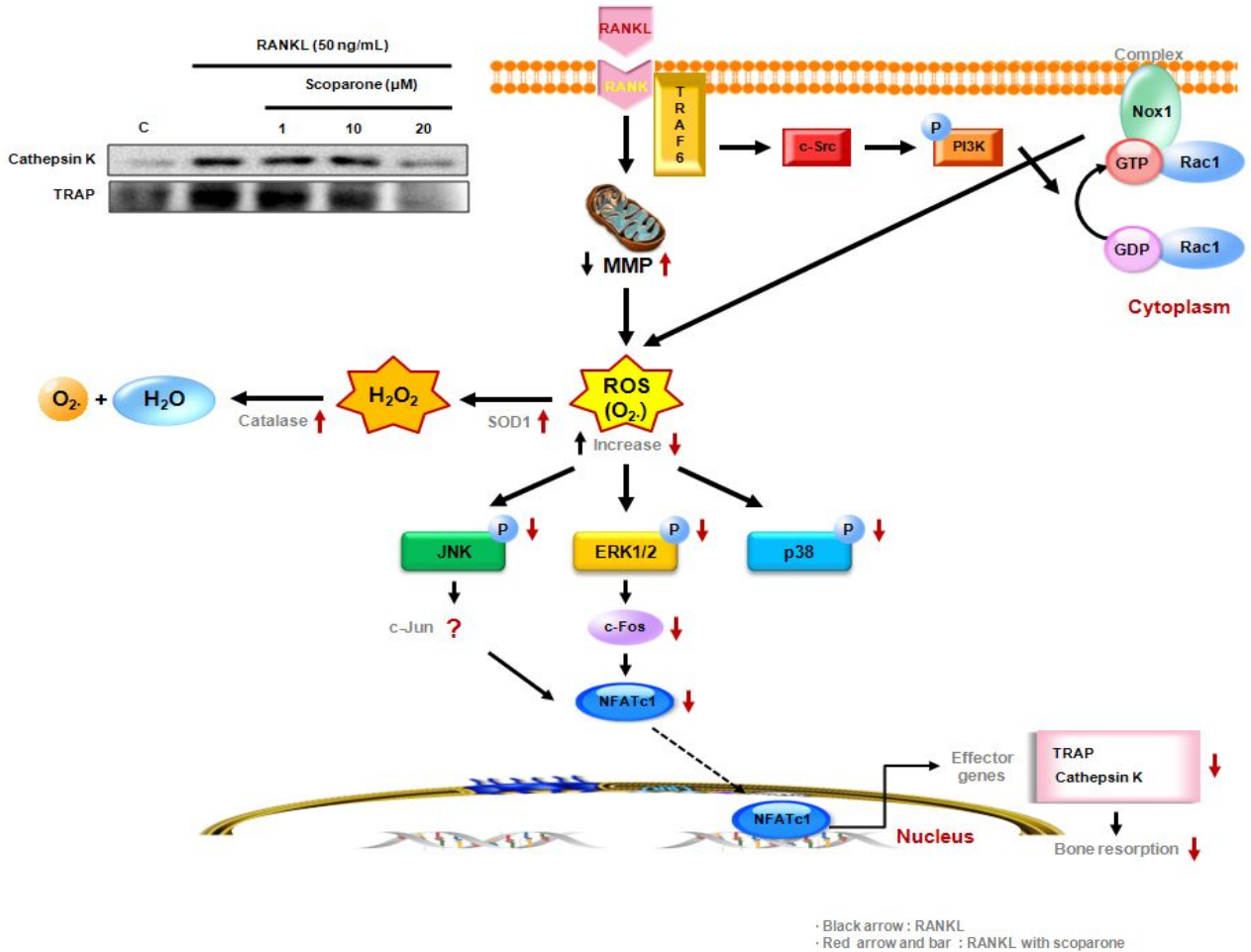


Fig. 44. The expression of osteoclast biomarker proteins (Cathepsin K and TRAP) by scoparone during RANKL-induced osteoclast differentiation for 2 days

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 목표 달성도

구분	연도	연구개발 목표	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2010	인진쑥 원재료 표준화 수립	100	건초 원재료 표준화 기술 확립
		뼈 건강제품 시장현황 분석	100	제품설계 방안 수립
		건강기능제품 가공기술 개발	100	뼈 건강기능제품 배합비 제시
		인진쑥의 성장촉진 기능(지표)물질 설정	100	기능(지표)물질 설정근거 자료 제시
		기능(지표)물질 분석법 설정	100	분석법 validation 자료 확보
		사철쑥의 성장촉진 in vitro 효능 평가	100	성장촉진 효능 평가법 확립, 정확도
		논문투고 1편	100	SCI 논문투고 1편
2차 연도	2011	사철쑥 원료 표준화	100	원료(추출분말) 제조기술, 기준/규격
		사철쑥 원료 안전성 확보	100	사철쑥 원료 안전성 입증자료 확보
		사철쑥 원료의 임상시험 IRB 승인	90	인체적용시험 IRB 승인 취득
		사철쑥 원료의 제조공정 확립	100	원료(추출분말) 생산기술 구축
		사철쑥 기능(지표)물질의 설정	100	사철쑥 기능(지표)물질의 결정
		기능(지표)물질의 분석법 확립	100	기능(지표)물질의 분석법 확립
		사철쑥의 뼈건강 In vivo 효능평가	100	뼈건강 효능 평가법 확립, 효능 평가
3차 연도	2012	사철쑥 원료의 인체적용시험 완료	50	사철쑥 원료의 인체적용시험 수행완료
		사철쑥 원료의 안정성 확보	100	사철쑥 원료 안정성 평가 완료
		사철쑥 원료의 기준, 규격 설정 완료	100	사철쑥 원료의 기준, 규격 정립
		개별인정형 원료 등록	50	원료 등록 취득
		건강기능식품 허가, 출시	50	제품 허가 취득
		제품제형 다양화(3종류)	100	사철쑥 원료로 3가지 제형 개발 여부
		지표성분 대량분리 정제, 활성 측정	100	사철쑥 지표성분 대량 분리·정제
		지표성분 분석법 모니터링	100	지표성분 분석법 모니터링 여부
원료의 뼈 건강 활성 작용기전 규명	100	사철쑥의 뼈 건강 작용기전 규명 여부		
최종 평가	2013	기능성분의 개별인정 원료 등록	60	원료 등록 취득
		성장촉진 인체 임상시험 완료	-	성장촉진 인체적용효능 입증, 논문투고
		건강기능식품 허가, 출시	-	건강기능식품 제품 허가, 출시

2절. 관련 분야의 기여도

1. 기술적 및 경제·산업적 분야

- 가. 천연물로부터 유효성분 분리·정제 및 구조동정 기술 확산.
- 나. 뼈건강 유효성분의 생리활성 작용기전 규명 기술 확산
- 다. 뼈 건강에 도움을 주는 신규 기능성원료(Scoparone)를 활용한 상품화

2. 농업인 및 소비자 측면

- 가. 사철쑥이 국내 농업분야에 수익성이 높은 새로운 대체작물로 부각
- 나. 사철쑥이 대체작물로 사용될 경우 국내 농가 소득증대 가능
- 다. 사철쑥 원료가 노약자들의 뼈건강 증진에 기여하는 식품소재로 활용

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 : 연구개발 성과

1. 연차별 연구성과

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	신제품 명칭등록	신제품 생산 판매신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	1						1		2	
	달성							2			
2차년도	목표			3				1	1	2	
	달성	1						1		1	
3차년도	목표	1						2		2	
	달성		1	1				1		1	
계	목표	2		3				4	1	6	
	달성	1	1	1				4	-	2	

2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Phenolic Compounds from <i>Artemisia iwayomogi</i> and Their Effects on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells.	당안	김영호	량춘 양서영 라정찬 최은미 김정아	Biol. Pharm Bull.	33(8), 1448-1453	국외	SCI
2010	Iwayoside, a new diterpene glycoside from <i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura that enhances IL-2 secretion	당안	김영호	량춘 양서영 김준호 이영미	Bull. Kor. Chem. Soc.	31(8), 2422-2423	국내	SCI
2011	Antioxidative Sesquiterpenes from <i>Artemisia iwayomogi</i> .	당안	김영호	김정아 양서영 김원기 이상현 장해동	Bull. Kor. Chem. Soc.	32(9), 3493-3496	국내	SCI
2011	Isolation of Chemical Constituents from <i>Artemisia capillaries</i> and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Scoparone	염희도	김영호	당안	2012 대한약학 회 학술대회		국내	
2013	Scopoletin and Scopolin Isolated from <i>Artemisia iwayomogi</i> Suppress Differentiation of Osteoclastic Macrophage RAW 264.7 Cells by Scavenging Reactive Oxygen Species	이상현	장해동 김영호	당안 량춘	Journal of Natural Products	76 (4)	국외	SCI
2013	Two new phenolic compounds from <i>Artemisia iwayomogi</i>	염희도	김영호	당안, 이위, 손아남 등	Helv Chim Acta	In press	국외	SCI

3. 특허 성과 :

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	뼈성장촉진을 갖는 인진쑥 발효추출물 조성물	주영철	대한민국	2011-0062625	2013	뼈성장촉진을 갖는 인진쑥 발효추출물 조성물	주영철	대한민국	10-1246143

2절 : 성과 활용계획

1. 산업적 활용계획 :

- 가. 사철쑥 유래 스킵라론 함유 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 치료용 조성물 특허 1건을 2013년 12월까지 출원한다.
- 나. 인체적용시험을 2014년 12월까지 수행 후 사철쑥 추출물의 개별인정형 원료 등록을 2015년 말까지 완료할 계획이다.
- 다. 사철쑥 원료를 활용하여 뼈 건강에 도움이 되는 고시형 건강기능식품을 개발하고 계열회사인 네이처셀(음료사업 전문)에 본 기술을 이전하여 사철쑥 건강음료를 출시할 계획이다.
- 라. 타 제약회사와 공동으로 기능성분(Scoparone)을 이용한 골다공증 치료용 의약품 개발에도 적극적으로 노력할 예정이다.

2. 과학기술적 활용계획 :

- 가. 천연물로부터 뼈 건강 성분의 스크리닝 기술 확산
- 나. 유효생리활성물질의 분리·정제 및 구조동정 기술 확산.
- 다. 뼈 건강에 도움을 주는 기능성식품 개발을 위한 핵심기술 확산.
- 라. 기능성분(Scoparone)의 대량 분리정제 기술 및 표준품 제공
- 마. 천연물을 기반으로 한 건강기능식품 전문 인력의 양성
- 바. 뼈 건강에 도움을 주는 건강기능식품의 분석법 확산.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

1. Ahn HS, Kim SH, Lee SS. A Study of Factors Affecting Bone Mineral Density in Korean Adolescents: Anthropometric measurements, Life Style, and Other Environmental Factors. *Korean J Nutr.* 38(3):242-250.2005
2. Lee MS. Change in bone mineral density and fracture threshold. *The Korean Society of Endocrinology.* 5(3):232-233.1990
3. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.*285: 785-795.2001
4. Kim DY. Clinical Application of Bone Mineral Density Measurement. *Korean J Nucl Med.* 38(4):275-281.2004
5. Min-Gul Kim, et al. Effects of Polycan on bone Metabolism in healthy Perimenopausal Women: a 12-week Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study. *Kor. J. Clin. Pharm.,* Vol. 21, No. 4. 2011
6. EunJeong, Effect of soy isoflavone supplementation on bone mineral density in Young women with osteopenia.
7. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series, 843. Geneva: WHO; 1994
8. Cann CE. Quantitative CT for determination of bone mineral density : a review. *Radiology .* 1988;166:509-22.
9. Young-Lim Shin, Assessment of Bone Mineral Density. *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal.* Vol.11, No.1.2006.
10. 최웅환 외. Quantitative Computed Tomography(QCT)를 이용한 골밀도 측정법. *대한골대사학회지.* Vol. 1, No.1, 1994.
11. Hyunil Ha, *Exp. Cell. Res.,* 2004.
12. Arouma I O *et al., J. Agric. Food Chem.* 1998
13. Ronald L. Prior, *J. Agric. Food Chem.,* 2005
14. Mariana DA *et al., Arch. Biochem. Biophys.,* 2003
15. Liu *et al., J. Agric. Food Chem.,* 2008
16. Newmark. H. L., *Adv. Exp. Med. Biol.,* 1996
17. Owen. *et al., J. Cell. Physiol.,* 1990
18. Pittenger JJ. *et al., Science.,* 1999
19. Schiller PC, *et al., Bone.,* 2001
20. Vaananen HK. *et al., J Cell Sci.,* 1995
21. Calvo. MS. *et al., Endocr Rev.,* 1996
22. Price JS. *et al., Res Vet Sci.* 2001
23. Mora S. *et al., Calcif Tissue Int.,* 1998
24. Lee NK. *et al. Blood.,* 2005

25. Cai H. *et al.*, Trends in Pharm, 2003
26. Steven L, *et al.*, Nat. Rev. Genet, 2003
27. Ono K, *et al.*, Cell signal, 2000
28. Galibert L, *et al.*, J Biol Chem. 1998
29. Boisvert CA. *et al.*, Nature, 2005
30. Boisvert CA. *et al.*, Nature, 2005
31. Kim JM *et al.*, Int. J. Mol. Med, 2007

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 "인진쑥 활용 연구사업단"의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 인진쑥 활용 연구사업단의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.