

(옆면)

(앞면)

117050-3

병풀로부터 눈 및 간건강 개별인정형 건강기능식품 개발 최종보고서

2020

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O) 발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003047-01

병풀로부터 눈 및 간건강 개별인정형 건강기능식품 개발

최종보고서

2020. 03. 27.

주관연구기관 / (주)제넨셀
협동연구기관 / (주)에이온엘에스
(주)트리즈바이오텍

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘병풀로부터 눈 및 간건강 개별인정형 건강기능식품 개발’(연구개발 기간 : 2017. 06. 15. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2020. 03. 27.

주관연구기관명 : (주)제넨셀 (대표자) 정 용 준

협동연구기관명 : (주)에이온엘에스 (대표자) 오제임스섭 (인)

(주)트리즈바이오텍 (대표자) 이 경 후

참여기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이 범 석 (인)

코스맥스바이오(주) (대표자) 김 경 수 (인)

주관연구기관책임자: 정용준

협동연구기관책임자: 오제임스섭

이경후

참여기관책임자: 강세찬

정현묵

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117050-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 06. 15 ~ 2019. 12. 31 (31개월)	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	병풀로부터 눈 및 간건강 개별인정형 건강기능식품 개발			
연구책임자	정용준	해당단계 참여연구원 수	총: 71명 내부: 58명 외부: 13명	해당단계 연구개발비	정부: 860,000천원 민간: 287,000천원 계: 1,147,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 71명 내부: 58명 외부: 13명	총 연구개발비	정부: 860,000천원 민간: 287,000천원 계: 1,147,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)제넨셀 (주)에이온엘에스 농업법인(주)트리즈바이오텍			참여기업명: (주)제넨셀 (주)에이온엘에스 농업법인(주)트리즈바이오텍	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 경희대학교 산학협력단 코스맥스바이오(주)			연구책임자: 강 세 찬 정 현 목	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

1. 국내산 병풀의 최적추출공정 개발 및 기능/지표성분 설정
2. 병풀 50% EtOH 추출물의 눈 및 간 기능 개선 in vitro 효능 검증
3. 병풀주정추출분말 GMP grade 3 batch 대량 생산
4. 지표성분 asiaticoside 시험법 밸리데이션 및 3 batch 원료 함량 분석
5. 병풀주정추출분말의 영양성분 및 유해성분 검증
6. 망막손상 동물모델에서 병풀주정추출분말의 기능성 검증
7. 간손상 및 비알코올성 지방간 동물모델에서 병풀주정추출분말의 기능성 검증
8. 전임상 안전성 (설치류 단회, 2주 DRF, 유전독성) 검증
9. 국내산 병풀의 원재료 표준화 확립
10. 국내산 병풀의 재배법 확립 및 재배단지 구축
11. 눈/간 건강 이중기능성 고시형 건강기능식품 생산 및 판매
12. 병풀주정추출분말 300 mg/정 함유 인체적용시험약 제조
13. 병풀주정추출분말 함유 전 제형의 안정성 평가
14. 눈 건강 인체적용시험을 통한 안전성 및 유효성 검증
15. 간 건강 인체적용시험을 통한 안전성 및 유효성 검증
16. 눈 건강 기능성 원료 신청
17. 간 건강 기능성 원료 신청

보고서 면수

257

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>□ 연구목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀로부터 눈 및 간 건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발 및 사업화 기반구축 <p>□ 연구내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내산 병풀의 활용성 증대를 위한 재배법 확립 및 재배단지 구축 1건 ▪ 국내산 병풀주정추출분말의 표준화 (지표성분 함량 기준규격 범위 내, 유해성분 함량 기준치 이하) ▪ 눈/간 건강 기능성 자료 확보에 따른 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청 (기능성 자료 2부, 안전성 자료 1부, 작용기전 확보 자료 2부, 원료 표준화 자료 1부, 인체적용시험 자료 통합 1부 제출) 및 보완대응에 따른 결과물 제시 ▪ 국내산 병풀추출물을 활용한 고부가가치 기능성 전략 상품 개발 및 산업화
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 국내산 병풀의 재배법 확립 및 재배단지 구축 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀의 최적 재배법 확립 ▪ 병풀재배 교육지도 2건을 통한 재배단지 구축 진행 2) 병풀주정추출분말 원료 자료 구축 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 최적추출공정 개발 및 지표성분 1종 확보 (기능성분 4종 분석) ▪ GMP grade 원료 3 batch 대량생산 ▪ 지표성분 시험법 밸리데이션 1건 및 지표성분 함량분석 총 4 batch 진행 ▪ 영양성분 및 유해성분 함량 검증 ▪ 공정별 수율 및 지표성분 함량 분석 3) 기능성/안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 망막색소상피세포 및 망막손상 유도 동물모델에서의 눈 건강 기능성 검증 (논문 1편 게재 예정, 특허 3건 출원) ▪ 간 손상 및 비알코올성 지방간 모델에서의 간 건강 기능성 검증 ▪ 설치류 단회, 2주 DRF, 유전독성 3종 검증 (GLP 기관 보고서 5건) 4) 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀주정추출분말 300 mg/day 시험약 제조 ▪ 눈 건강 6개월 인체적용시험 (시험보고서 1건) ▪ 간 기능 개선 3개월 인체적용시험 (시험보고서 1건) 5) 기능성 원료 사전 접수 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 눈 건강 개선 기능성 원료 사전 접수 ▪ 간 건강 개선 기능성 원료 사전 접수 6) 제품화 연구 및 사업화

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 밀크씨슬, 루테인 병풀주정추출분말 함유 이중기능성 고시형 제품 생산 및 판매 (제품화 1건) ▪ 국내 약국 전문 유통물 “휴베이스”를 통한 제품 판매 ▪ 병풀주정추출분말 함유 전 제형 제품의 안정성 평가 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>1) 건강기능식품 제품화/산업화 활용방안: 약 200억원/년 이상 매출 기대</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 눈/간 건강 개별인정형 건강기능식품 제품군: 100억원/년 매출 예상 ▪ 기능성 원료(원료분말 형태) : 각 50억원/년 매출 예상 ▪ 병풀 원재료 : 약 10억원/년 이상 매출 예상 ▪ 국내 및 해외 기술이전 및 수출 : 동남아 등 해외 수출 (100억원/년 매출 기대) <p>2) 병풀은 의약품과 화장품에서 다양하게 활용되는 소재이나, 단가 문제 및 생산량 부족으로 거의 대부분 수입산이 활용되나, 본 연구를 통해 2중 기능성 소재로 인증을 받을 경우 고부가가치 소재로 국내산 병풀의 활용도 및 생산이 증가할 것으로 기대됨</p> <p>3) 기존 기능성 원료의 경우 눈과 간의 효능을 동시에 나타내는 원료는 본 연구의 병풀주정추출분말이 처음이며, 본 연구를 통한 기능성 원료 등재에 성공할 경우 성공적인 사례로 홍보될 수 있음</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	고부가가치 식품	병풀	눈 건강	간 건강	기능성 원료
영문핵심어 (5개 이내)	High value added food	<i>Centella asiatica</i>	Eye health	Liver health	Functional materials

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구수행 내용 및 결과	31
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	242
4. 연구결과의 활용 계획 등	249
붙임. 참고 문헌	255

나. 최종 사업화 시기 및 형태

- (1) 2차년도: 2중 기능성 (눈/간건강)의 고시형 건강기능식품 생산 및 사업화
 - (가) 주원료: 밀크씨슬 (실리마린 130 mg/day), 루테인 (10 mg)
 - (나) 부원료: 병풀주정추출분말 (국내산), 은행잎추출물 (국내산) 등
 - (2) 과제종료 후 1차년도: 원재료, 기능성 원료 (2건), 개별인정형 건강기능식품 (2건) 사업화
 - (가) 병풀 원재료 사업화 (건조물 형태: 5~7만원/kg)
 - (나) 눈 및 간 건강 기능성 원료 사업화 (각각 추출분말 형태: 20~30만원/kg)
 - (다) 눈 및 간 건강 개별인정형 건강기능식품 사업화 (제품 1달분: 5~8만원/세트)
- ※ 눈 건강 및 간 건강 2건에 대하여 기능성 원료 인증 시 복합기능성 제시 가능

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 연구의 차별성 및 중요성

가. 간질환 개선을 위한 제품개발의 필요성

- (1) 간 질환의 개요 및 건강기능식품 개발의 필요성
 - (가) 간은 인체의 신진대사에 있어 매우 중요한 역할을 하는 기관으로 정상적인 간기능을 유지하기 위해서는 최소한 20% 이상의 간세포가 생존하여야 하며, 독성물질, 염증, 산화작용 등에 의해 세포사멸이 일어나도 20% 이상만 생존하면 특별한 자각 증상이 나타나지 않으므로 조기 진단 또는 건강기능식품 섭취를 통한 간질환 예방이 매우 중요하다 할 수 있음
 - ① 간질환은 바이러스, 알코올, 대사성 질환 (비알코올성) 등에 의해 주로 발생하나 어떤 원인이든지 만성 간염이 지속되면, 약 10~20%는 간경화로 발전하게 되며, 3~10%는 간암으로 발전하게 되므로 초기 예방이 매우 중요함
 - (나) 통계청 자료 (2018)에 따르면, 2017년 10대 사망원인 중 간질환은 7위를 차지하고 있으며 (사망률 13.3%), 특히 40대에서는 사망원인 3위 (사망률 12.2%), 50대에서는 사망원인 4위 (사망률 25.4%)로 간질환의 경우 중장년층에서는 필수적으로 관리해야 하는 질환임
 - ① KASL 2014에서 정완교 교수는 국내 간질환 환자들의 사회경제적 비용 추계는 6~8조원 수준으로 이 중 80%가 생산성 손실이라고 하였으며, 2012년 건강보험통계연보에서는 간질환 환자는 170만명으로 진료비는 1조 1,358억원 수준이라 보고하였음
- (2) 비알코올성 간질환의 개요 및 건강기능식품 개발의 필요성
 - (가) 비알코올성 간질환 (비알코올성 지방간 포함)은 그 원인이 알코올에 기인되지 않는 간질환을 말하며, 수년간 계속 증가추세를 나타내면서 이에 따른 만성 간질환도 매년 증가되고 있음
 - ① 세계적으로 비알코올성 간질환의 유병률은 다양하게 보고되어 있는데 해외에서는

특별한 간질환의 원인이 없는 정상 성인의 20 - 30% 정도에서 비알코올성 간질환이 있는 것으로 알려져 있음

② 우리나라 성인에서의 비알코올성 간질환의 유병률은 약 16 - 50%로 보고되어 있음

(나) 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)은 수십 년간 간과되었는데, 그 주된 이유는 의사들이 NASH를 알코올성 지방간염 (ASH: alcoholic steatohepatitis)과 혼동했기 때문이며, 1980년도에 이르러 술을 마시지 않는 사람에게서 나타나는 지방성 간 손상으로 정의되면서 특히, 소아들의 NASH 진단이 많이 이루어지고 있음

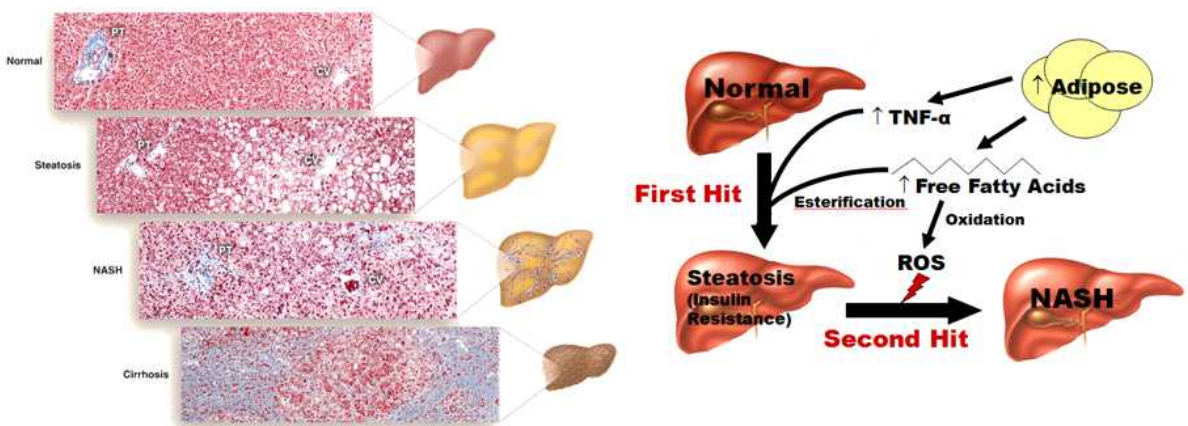
(다) 비알코올성 간질환은 비만인 경우에 더 유병률이 증가하는 것으로 알려져 있는데 이는 비만으로 인한 인슐린저항성이 간 내 지방침착을 일으키기 때문이라고 알려져 있음

① 인슐린저항성이 생기면 지방조직에서의 지질분해가 증가하고 이로 인해 많은 양의 유리지방산이 간으로 유입되게 되며, 간으로 유입된 유리지방산은 β -oxidation 과정을 통해 중성지방이나 VLDL 콜레스테롤(very low density lipoprotein)로 변하여 배출되는데, 인슐린저항성으로 발생된 고인슐린혈증은 유리지방산의 β -oxidation을 억제시켜 유리지방산의 배출이 감소하므로 간내 지질의 축적이 일어나게 됨

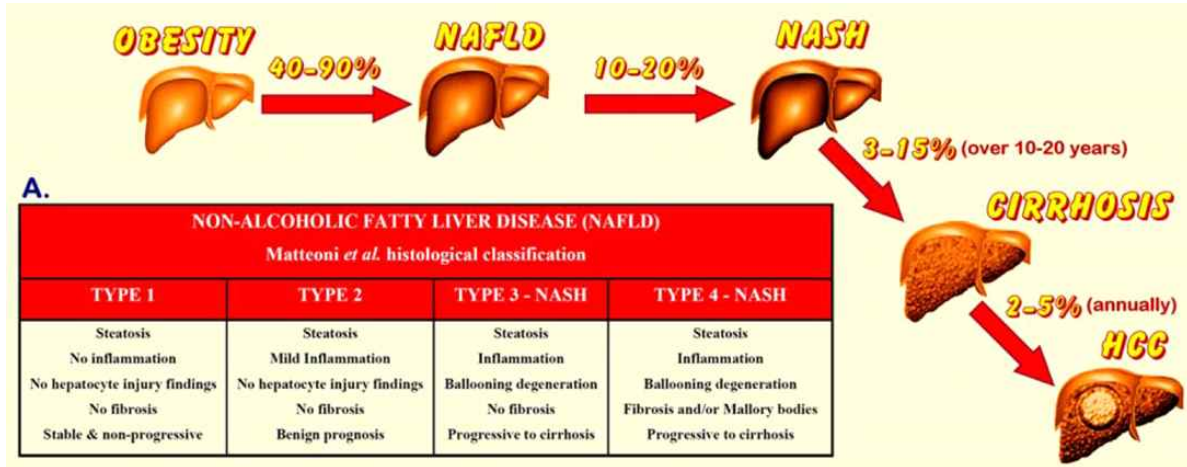
② 비알코올성 지방간염의 병태생리는 '2-hit hypothesis'라 불리는 가설에 따르는데, 첫 번째 hit는 간 내 지방 축적을 말하며, 인슐린저항성과 탄수화물 섭취에 의한 간의 신생지방생성 으로 인한 지방축적이 중요한 원인으로 지목되고 있음

③ 지방이 간 조직 내에 침착하게 되면 이어서 염증반응이 일어나는데 이를 두 번째 hit라 부르며, 염증반응이 일어나면 지방의 과산화가 일어나고 이로 인한 산화스트레스는 간 조직 내 섬유화 반응을 촉진함

④ 이에 따라 Tumor necrosis factor- α , interleukin 6와 같은 염증성 cytokine이 증가하고, 간 조직 내 NF- κ B의 활성이 증가하며, 쿠퍼세포(Kupffer cell)의 활성이 증가하여 활발한 염증반응이 일어나게 됨



(라) 비알코올성 간질환은 단순히 간에 중성지방이 축적되는 지방간, 염증으로 발전한 지방간염과 간경화에 이르는 증상으로 조기에 치료가 이루어지지 않으면 간경화로 발전한 이후 간암까지 발전할 가능성이 높으므로 초기 가역적인 상태에서의 치료가 매우 중요함



(마) 또한 비알코올성 간질환의 경우 알코올성과는 다르게 성인뿐만이 아니라 사춘기 전 후 소아에게서도 발생하며 (비만아 중 약 15.2% 발병), 아시아인이 서구인에 비해 더 높은 유병률을 나타낸다고 보고되어 있음

(바) 비알코올성 간질환의 진단을 받으면 특별한 치료제가 없기 때문에 우선적으로 체중 감량과 식사요법, 운동요법을 병행하며, 그 원인이 당뇨병일 경우 Thiazolidinediones (TZDs)와 Metformin을 처방함

① 그러나 TZDs의 경우 심혈관계 질환 등의 안전성 문제로 사용되고 있지 않으며, Metformin의 경우 염증 및 조직소견의 개선효과가 없는 것으로 보고되면서 단독적으로 사용되지 않고 있음

(사) 비알코올성 간질환 진행에 산화적 스트레스가 관여하므로 항산화제인 비타민 E의 사용이 진행되었으나, 여러 연구를 통해 비알코올성 간질환에 효과가 없는 것으로 나타났으며, 오히려 장기간 사용 시 사망률을 증가시킨다고 보고되어 있음

① 이 외에도 간세포 보호제 (UDCA, pentoxifylline), 고지혈증 치료제, 당뇨 치료제, 이들의 복합제 등이 사용되고 있으나, 아직 뚜렷한 개선 효과는 관찰되고 있지 않음

(아) 특히 비알코올성 간질환의 경우 초기 상태의 치료가 중요하며, 의약품의 경우 대부분이 간 독성을 동반하고 있어 안전한 천연물 유래의 간 건강 개선 건강기능식품의 섭취가 중요시 되고 있음

① 직접적인 비알코올성 간질환을 타겟으로 한 건강기능식품은 아직 없음

② 본 연구개발을 통해 개발되어질 병풀추출물의 비알코올성 지방간 개선 제품은 선행 연구를 통해 세포수준에서 대조군에 비해 약 50%의 개선 효능을 나타내었으며, 특히 기능성 보다 안전성에 중점을 두고 있는 건강기능식품의 꾸준한 섭취가 이루어질 경우 직접적인 치료제나 식품이 없는 해당 질환에서 독보적인 존재로 자리매김할 수 있음

나. 눈 건강 개선을 위한 제품개발의 필요성

(1) 망막 질환의 개요 및 건강기능식품 개발의 필요성

(가) 시력손상을 유발하는 녹내장, 노인성 황반변성, 망막 혈관폐쇄 같은 주요 망막질환들은 나이가 들어감에 따라 유병률이 증가하며, 시신경이 연결되어 있는 망막은 한 번 손상되면 원래대로 재생되기 어려운 조직이기 때문에 건강기능식품 섭취를 통한 망막

질환의 예방은 삶의 질 개선을 위해 매우 중요하다 할 수 있음

- ① 국민건강보험공단 자료 (2017)에 따르면 망막질환 환자는 매년 약 8.5%의 증가율을 보이고 있으며, 연령에 비례하여 환자수가 증가함
- ② 망막질환 환자 (2015년 기준) 중 70대 이상이 약 27.6%로 가장 많으며, 60대 27.5%, 50대 22.3%, 40대 10.8%, 30대 5.3%로 연령에 비례한 발병률을 보임
- ③ 망막질환으로 인한 전체 진료비는 2015년 기준 약 3,476억원으로 연평균 11.7% 증가하고 있는 추세임

(2) 녹내장의 개요 및 건강기능식품 개발의 필요성

(가) 녹내장은 안압 상승 또는 시신경 혈액순환 이상으로 인해 시신경이 손상되는 질환으로 안압이 지속적으로 높게 유지되면 시신경의 손상이 일어나며, 점점 시력이 떨어지고, 치료하지 않는 경우 영구적으로 실명에 이르게 되는 질환으로 알려져 있음

- ① 안압상승의 경우 눈의 anterior chamber에서 안구방수의 흐름에 장애가 생기기 때문인데, 40대 이상의 연령대가 되면 방수배출구가 점점 좁아져 방수 생성량이 배출량보다 증가하게 되므로 안압이 높아지게 되며, 이로 인해 시신경의 손상을 야기함



(나) 안압은 정상이지만 녹내장이 발병되는 경우도 있는데, 특히 한국과 일본에서는 안압 상승에 의한 녹내장 환자보다 더 많으며 (녹내장 환자 중 70~80%), 그 원인으로는 시신경 혈액순환 장애로 알려져 있음

- ① 정상 안압의 녹내장 환자들의 경우 수족냉증과 편두통, 그리고 혈압이 불안정한 증상 등의 혈액순환에 문제가 있는 경우가 많으며, 실제적으로도 정상 안압의 범위에 있는 환자들에게서 말초 혈액순환 장애의 증상이 나타난 경우가 많이 있는 것으로 알려져 있음
- ② 이러한 이유로 대사성 질환인 당뇨병 환자에서 녹내장이 자주 발견됨

(다) 건강보험심사평가원에 따르면, 녹내장 환자수는 2011년 52만 5,337명에서 2015년 76만 6,923명까지 증가하였으며 (총 46% 증가), 특히, 연령대가 높을수록 발병 환자수도 많은 것으로 알려져 있는데, 50대 이상 환자가 전체 진료 환자의 66.1%를 차지하고 있음

- ① 그러나 최근 누네안과병원 조사 결과를 보면, 20~30대 녹내장 환자 수가 5년 사이에 급증한 것으로 나타났으며, 2010년 330명이었던 20~30대 녹내장 환자수는 2014년 797명으로 2배 이상 증가하였음
- ② 이처럼 대표적인 노인성 안질환으로 여겼던 녹내장의 발병 연령대가 낮아지고 있는 추세는 젊은층에게 새로운 경각심을 주기에 충분함



(라) 녹내장을 치료하기 위하여 대부분 수술요법이나 안압을 감소시키는 안약을 사용하게 되지만, 그 약물의 종류에 따라 안구작열감, 가려움, 입마름, 졸림, 충혈, 속눈썹 길어짐 등의 증상이 발생할 수 있음

(마) 시신경이 손상되는 질환인 녹내장은 급성 폐쇄각 녹내장을 제외하고는 대부분 초기 자각증상이 없으며, 환자가 눈에 이상을 느껴 병원을 찾을 때는 실명 직전인 경우가 많음

- ① 녹내장은 고안압 상태를 개선하거나 시신경 혈액순환을 촉진시켜 더 이상 병증이 진행되지 않도록 하는 것이 치료 목적이나 한번 손상된 시신경은 회복이 불가능하므로 녹내장을 사전에 예방하는 것이 무엇보다 중요하다 할 수 있음
- ② 또한, 고안압에 의한 녹내장이 아닌 시신경 혈액순환 장애에 의한 녹내장의 경우 그 치료제가 적절치 않으며, 대부분 대사질환을 병행하므로 간 독성이 적은 안전한 천연물 유래의 건강기능식품으로 예방하는 것이 중요하다 할 수 있음

다. 병풀의 중요성 및 눈/간 건강 제품개발의 필요성

(1) 병풀의 개요

(가) 병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 산형과에 속하는 다년생 포복성 초본으로 주로 고온 다습한 지역에서 자생함

- ① 주로 아프리카의 마다가스카 (madagascar)와 남아프리카, 인도양의 해안지역, 인도 남방부, 말레이시아 지역에 분포하고 있으며, 국내에서는 제주도와 남부 도서지방 (완도, 보길도, 경남 합천 등) 의 저습지에 군생함

(나) 병풀의 알려진 주요성분은 triterpenic acid sugar esters(=saponins or pseudosaponins)로 asiaticoside ($C_{48}H_{78}O_{19}$, AA), madecassoside ($C_{48}H_{98}O_{20}$, MA), brahmoside ($C_{47}H_{78}O_{19}$), brahminoside ($C_{53}H_{88}O_{24}$) 등을 함유하고 있으며, 가수분해 시 asiatic acid ($C_{30}H_{48}O_6$), madecassic acid, thankunic acid ($C_{30}H_{48}O_8$), isothankunic acid 등이 생산되는 것으로 알려져 있음

- ① 병풀의 주요성분으로서 α -amyrin-ursolic acid group에 속하는 pentacyclic triterpene glycoside인 asiaticoside와 madecassoside는 오래 전부터 피부 상처나 만성 궤양 등의 치료에 사용되어져 왔음
- ② Asiaticoside와 madecassoside는 나병균 (*Mycobacterium leprae*)의 waxy capsule을 용해하여 나병 치료에도 사용되었는데, 특히 asiaticoside는 항균 및 항곰팡이 성질을 가지고 있으며, 상처, 위궤양, 다양한 피부질환, 정신질환, 결핵, 정맥질환, 치매 등에

대해 치료효과가 있는 것으로 조사되었음

- ③ 최근에는 병풀의 asiaticoside에서 유도된 유도체들이 β -amyloid로 유도되는 세포 죽음으로부터 세포를 보호한다는 연구가 보고되어 있으며, 이로 인해 병풀은 식용, 피부치료제, 상처치료제, 기억력 증강제 및 강장제 등 다양한 용도에 이용되고 있고, 국내에서도 의약품, 화장품, 기능성 식품 등의 분야에서 병풀을 사용하고 있음

(2) 국내산 병풀로부터 제품 개발의 필요성

(가) 병풀의 주요 서식은 열대에서 아열대 지방으로 국한되어 있고, 국내에서는 남부지방에 소량 자생하고 있어 상업용 원료를 해외로부터 전량 수입하는 실정이며, 병풀에 있어 주요성분의 중요성은 널리 인식되어 왔음에도 불구하고, 자생지나 재배 관련 연구는 물론 함량 및 활성 기작 등에 대한 연구 또한 매우 미흡한 실정임

- ① 특히 화장료 관련 연구 (피부재생 등), 상처치료에 관련된 연구는 활발하나 그 외 기능성에 관련된 연구는 미비한 실정임

(나) 병풀의 국내 재배단지 현황

- ① 최근 약용식물에 대한 인식이 높아지면서 기존 식량자원에서 약용식물로 변경한 재배농가가 증가하고는 있으나 그 수요를 충족하기엔 매우 미흡한 실정이며, 특히 대부분 수입하는 병풀의 경우 경남 합천에서 병풀의 재배에 성공하여 그 활로를 개척하였으나 아직 국내산 병풀로 원료를 공급하기엔 턱없이 부족한 실정임

- ② 현재 합천에서 재배되고 있는 병풀은 약 3,300 m² (약 1,000평)에서 50 kg 정도를 생산하고 있으며, 판매되는 병풀은 대량생산 목적이 아닌 화분 모종 형태 (13,000원/개)로 판매되고 있어 원료로 활용하기 부족함

- ③ 병풀의 제품화를 위해서는 1,000 kg 이상의 생산이 이루어져야 하며, 최소 2만평 이상의 토지에서 생산되어야 하므로 영농조합법인의 참여로 대량생산을 위한 재배단지 구축이 이루어져야 함

(다) 본 연구개발 사업을 위한 예비실험에서 본 연구팀은 병풀의 비알코올성 간질환 개선 효과와 녹내장 예방 효과 (시신경세포 보호 효과)를 규명하였음

- ① 이를 근거로하여 간질환 및 망막질환 동물모델과 개선 효과 작용기전 규명, 인체 내 효능 검증을 통해 국내산 병풀의 우수성을 입증하고자 함
- ② 특히, 사업기간 내 병풀의 재배단지 구축 및 육성을 통하여 국내산 병풀의 산업화를 하기 위한 기반 확보를 동시에 진행하여 6차산업 발전에 기여하고자 함

라. 병풀추출물 함유 눈 및 간 건강 2중 기능의 건강기능식품 개발의 필요성

(1) 제품화 및 사업화 계획

(가) 사업기간 내 눈/간 건강 2중 기능성 고시형 건강기능식품 제품화 및 사업화

(나) 사업종료 후 눈 및 간 건강 기능성 원료 인정에 따른 복합기능성 제시 가능한 기능성 원료 및 개별인정형 건강기능식품 제품화 및 사업화

(2) 병풀추출물 함유 눈 및 간 건강 2중 기능의 고시형 건강기능식품 개발 전략

(가) 본 연구개발 사업 기간 중 2차년도에 눈 및 간 건강의 2중 기능성을 동시에 나타내는 고시형 건강기능식품을 사업화 할 계획임

- ① 주원료: 루테인 (10~20 mg/day), 밀크씨슬 (실리마린 130 mg/day)

② 부원료: 은행잎추출물 (50~100 mg/day), 병풀추출물 (50~100 mg/day, 전체용량의 50% 이내로 설정)

③ 기능성 내용:

- 노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줌
- 간 건강에 도움을 줄 수 있음



(나) 복합기능성 고시형 제품 생산 후 병풀추출물의 인체 내 효능을 사전 검증할 것이며, 추후 개발될 개별인정형 건강기능식품과의 시장성 및 기능성 부분을 면밀히 검토할 계획임

- ① 눈 건강 및 간 건강 이중기능성 제품의 시장성 검토
- ② 병풀추출물의 눈 및 간 건강 효능 검토 및 섭취근거 확보

(3) 은행잎추출물 함유 제품 개발의 당위성

(가) 녹내장은 우리나라 40대 이상 성인 50명 중 1명꼴로 걸리며, 전체 실명 원인의 11%를 차지할 정도로 흔하고 치명적인 질환으로, 특히 만성녹내장은 시신경이 서서히 파괴되기 때문에 증상이 거의 없어서 말기가 되어서야 병을 발견하는 경우가 많으므로 안전한 건강기능식품으로 예방하는 것이 매우 중요함

- ① 만성 녹내장 중에서도 가장 흔한 것은 ‘정상 안압 녹내장’이므로 안압이 정상 범위 (10~21 mmHg) 내에 있는 상태에서 매우 천천히 시신경이 손상되는 병이며, 안구 뒤쪽의 혈류장애나 유전적 요인 등이 영향을 줄 것이라고 알려져 있음
- ② 정상 안압 녹내장은 우리나라 전체 녹내장의 70~80%의 비중을 차지한다고 알려져 있을 정도로 심각한 질병이나 대부분의 녹내장 치료제는 고안압을 낮춰주는 약물이 대부분이며, 실질적인 정상 안압 녹내장에 대한 치료기준은 없는 실정임

(나) 은행나무 잎은 Flavonoid계, Terpene계 화합물이 다량 포함되어 기억력 개선, 혈소판

응집 억제 작용 등의 효능이 보고되어 있으며, 특히 1965년 Dr. Willmar Schwaberk가 은행잎 추출물을 이용하여 순환장애, 뇌혈관 질환 등의 치료에 효과가 있다고 발표한 이후 주목을 받고 있음

(다) 국내에서 은행잎추출물은 혈행 개선 및 기억력 개선을 위한 고시형 원료로 등재되어 있으며, 특히 은행잎추출물은 혈류장애 개선이 뛰어난 것으로 알려져 있음

- ① 시험관시험에서 혈소판 응집 억제, 혈소판 활성화인자 억제, 혈관이완 등의 효능이 확인되었고, 동물실험에서 혈관 확장, 혈소판 혈전 형성을 감소시킴
- ② 인체적용시험에서 TXA₂, TXB₂ 및 PGI₂의 대사물질의 대조군 대비 유의적 감소, 혈소판 응집 및 혈액 점성이 섭취전후 대비 유의적 감소, 혈관 확장이 개선됨을 확인함

(라) 이러한 연구결과로 볼 때 은행잎추출물은 정상 안압 녹내장의 원인인 혈류장애 개선에 도움을 줄 것으로 사료되어 본 연구개발 사업의 고시형 건강기능식품 개발 원료로 이용하고자 함

(4) 루테인 함유 제품 개발의 당위성

(가) 녹내장과 유사하게 황반변성 역시 초기 자각증상이 거의 없어 질환이 진행된 후에야 발견돼 시력을 잃는 경우가 많은 질환으로 황반변성이 진행되면 물체가 찌그러져 보이고 시력이 떨어지며, 사물 중심에 검은 점이나 희미한 부분이 생기는 증상이 나타남

- ① 황반변성, 녹내장, 백내장은 그간 대표적인 노인성 질환으로 인식되어 왔으나, 최근 40대 젊은 황반변성, 젊은 녹내장, 젊은 백내장 환자가 급증하고 있으므로 이에 대한 예방법이 필요함

(나) 루테인 (lutein)은 carotenoids의 일종으로, 시력에 중요한 역할을 담당하는 망막의 작은 부위인 황반에 많은 양이 집중 존재하는 성분이며, 여러 관찰시험에서 루테인의 섭취가 적은 경우와 혈장과 망막 황반에서 루테인의 농도가 낮은 경우 노인성 황반변성 및 백내장의 발생 위험이 높은 것으로 나타남

- ① 또한, 루테인의 섭취가 황반색소(MP, Macular Pigment)면적을 유의적으로 증가시키고, 시력, glare sensitivity을 개선시켜 황반변성 및 백내장에 유의한 것으로 보고되었으며, 루테인의 보충은 정상인의 시력 개선 및 식별력을 유의적으로 개선하는 것으로 알려져 있음

(다) 이러한 연구결과로 볼 때 루테인은 노인성 시력저하 개선에 도움을 줄 것으로 사료되어 본 연구개발 사업의 고시형 건강기능식품 개발을 위한 주원료로 이용하고자 함

(5) 밀크씨슬 함유 제품 개발의 당위성

(가) 밀크씨슬은 간과 담낭 질환 치료제로 사용되어 왔으며, 실리마린 등의 플라보노이드 성분이 주를 이루고 있음 (65~80%)

- ① 간세포의 세포막을 안정화시켜 간세포를 보호하고, 손상된 간세포를 재생시켜 간기능을 보조하며, 담낭(담즙분비 촉진), 췌장(인슐린기전 방해 역이용)에도 작용
- ② 다양한 간독소로부터 간세포 보호를 보호하는데, 특히 팔로이딘(phalloidine)이라는 버섯독 중화에 유용하며, 아세트아미노펜중독, 항생제나 스테로이드제에 의한 간손상 개선 효과가 보고되어 있음
- ③ 세포내 SOD(Superoxide dismutase)를 증가시켜 글루타티온(Glutathione, GSH) 고

갈을 방지하여 항산화 효과를 나타냄

④ 염증효소를 억제해 간의 염증이나 부종 완화에 효과가 있다고 알려져 있음

작용질환	특성
간경화	5년간의 연구를 통해 간기능을 개선해주고, 간경화 환자의 사망자수를 감소시킴
만성 간질환	바이러스 및 알코올에 의한 간염에서 간 수치를 개선시킴
고콜레스테롤	콜레스테롤 감소 작용을 하였으나 인체적용시험이 미흡함
당뇨병 (간경화 환자)	일부 밀크씨슬이 당뇨병이 있는 간경화 환자의 혈당 수치를 증진시킬 수 있음을 보고함
약물로 인한 간 손상	약물이나 화학물질에 의한 간 손상을 개선한다고 보고되어 있으나, 연구 결과가 미흡함

(나) 밀크씨슬에 대한 간 기능 개선효과는 식품원료 기준으로 우수하다고 평가되고 있으나, 이는 알코올성이나 바이러스성에 대한 효능으로 대사질환에 의해 발병 가능한 비알코올성 간질환에 대한 효능은 미비함

① 또한, 실리마린은 FDA 안전성 평가나 제조기준, 복용기준 규정이 마련되어 있지 않고, 다른 허브보조제와 마찬가지로 주요성분 외의 요소를 표기할 의무가 없어 해외에서 수입되어 지는 밀크씨슬의 경우 안전성에 문제를 일으킬 수 있음

② 따라서, 국내 규격에 맞는 제품 개발이 필요함

(다) 본 연구개발 소재인 병풀추출물과 밀크씨슬 원료의 혼합제조 시 알코올성 간질환 뿐만 아니라 비알코올성 간질환에 대한 보완 효과를 줄 것으로 사료되어 본 연구개발 사업의 고시형 건강기능식품 개발을 위한 주원료로 이용하고자 함

(6) 병풀추출물 첨가에 따른 상승효과

(가) 선행연구를 통해 병풀추출물은 대사질환 원인의 비알코올성 지방간 및 정상안압 녹내장 개선 효과를 밝혔으며, 밀크씨슬과 루테인을 주원료로 한 제품개발에서 은행잎추출물과 상승효과를 나타내어 넓은 범위의 간 건강과 눈 건강의 개선효과를 기대할 수 있음

① 밀크씨슬은 간경화 및 간손상에 대한 개선 효과는 밝혀져 있으나 대사질환이 원인인 간 질환에서는 효과를 기대할 수 없으며, 특히 당뇨질환을 앓고 있는 환자에서는 혈당이 상승한다고 알려져 있음

② 루테인은 시력에 중요한 역할을 담당하는 망막의 작은 부위인 황반에 많은 양이 집중 존재하는 성분으로 시력개선에 효능을 나타내나 녹내장의 원인인 신경세포 손상에 대한 효능은 없음

③ 이에 본 연구개발에서는 이러한 효능을 보완할 수 있는 대사질환 기반의 간 기능 및 눈 기능 개선 효능으로 병풀추출물을 50~100 mg 첨가하고자 하며, 혈액순환을 촉진시키고자 은행잎 추출물을 동시 첨가할 예정임

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장현황

(1) 병풀의 연구 및 제품개발 현황

(가) 아시아지역의 병풀은 제주도 기원식물 (*Centella asiatica*)로, 제주도, 완도, 보길도 외에 해남의 남부지역에서만 자생하는 다년생 식물이며, 재배환경을 조성하기가 쉽지 않아 재배에 어려움을 겪었으나 전창욱 등은 경남 합천에서 병풀재배에 성공하여 모종 및 재배법 등을 인근 농가에 보급하고 있음

(나) 농진청 김옥태 등은 뿌리혹균의 유전자를 병풀에 도입하여 병풀의 조직배양에 성공하였으며, 성장 속도가 빠른 배양근의 개발을 통해 대량재배가 가능하다고 보고함

(다) 병풀의 연구현황

- ① 국내에서 병풀의 연구는 화장품 연구개발 관련 연구가 주를 이루며, 면역활성이나 항염증에 대한 연구가 진행되었으나, 눈 및 간 건강 관련 연구는 아직 없음

연구제목	저자	발행기관	발행연도/권/호
병풀 잎에서 triterpene glycosides의 시기별 함량 변화	김옥태 등	한국약용작물학회지	2002/10/5
병풀의 초음파 추출 시 용매에 따른 면역활성 증진 효과	권민철 등	한국약용작물학회지	2008/16/5
병풀추출물 및 숯가루, 진주가루 함유 세안제의 안면피부 개선효과	권구정 등	아시안뷰티 화장품 학술지	2012/10/3
병풀 추출물의 식용 나노입자화를 통한 면역 활성 증진	하지혜 등	한국약용작물학회지	2009/17/4
초음파 병행을 통한 병풀의 미백 및 자외선 차단 활성 증진 효과	하지혜 등	한국약용작물학회지	2010/18/2
병풀(<i>Centella asiatica</i> L. Urban) 식물체 배양을 이용한 Triterpene Glycoside 생산	김옥태 등	식물생명 공학회지	2002/29/4
인간진피섬유아세포에서 병풀(<i>Centella asiatica</i>)과 엽산(Folic acid)을 주성분으로 하는 복합발효추출물과 Phytosphingosine-1-phosphate의 복합처리의 산화적 스트레스 보호 시너지효과	이강태 등	아시안뷰티 화장품 학술지	2014/12/6
병풀(<i>Centella asiatica</i>) 추출물을 이용한 20~50대 여성의 두피 홍반 개선 효과	조춘희 등	아시안뷰티 화장품 학술지	2014/12/6
바다제비집과 병풀 복합발효추출물의 피부진정 효과	김하나 등	아시안뷰티 화장품 학술지	2013/11/4
LPS 매개 염증 유발 모델인 RAW 264.7 세포를 이용한 병풀 (<i>Centella asiatica</i>)의 항염 효과 규명과 기전연구	조백건	경희대학교 박사학위 논문	2009

(라) 병풀의 마데카식산 (madecassic acid) 성분이 상처 치유, 혈액 순환 촉진, 주름 개선 등에 탁월한 효능이 있다고 알려지면서 연고를 비롯한 클렌징팩, 핸드크림, 염색약 등에 병풀이 포함된 제품들이 출시되고 있음



(2) 눈 및 간 건강 건강기능식품의 기술 및 제품개발 현황

(가) 식품의약품안전처에 등재된 눈 건강 개선 원료는 총 9가지로 눈의 피로도 개선에 도움을 주는 원료 2종, 눈 건강에 도움을 주는 원료 7종이 등재되어 있으며, 이 중 헤마토코쿠스추출물, 빌베리추출물, 루테인의 3종은 고시원료로 전환됨 (EPA 및 DHA 함유 유지는 2015년도에 눈 건강 기능성원료로 등재되었으며, 2017년 7월 1일 고시원료로 전환)

번호	원료명	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	헤마토코쿠스추출물	2	Astaxanthin 60~140 mg/g	성분 4~12 mg
2	빌베리추출물	2	Total anthocyanosides 300~450 mg/g	추출물 240 mg or 성분 72~108 mg
3	루테인 (마리골드 꽃)	1	Lutein 700 mg/g 이상	성분 10~20 mg
4	지아잔틴추출물	1	Zeaxanthin 80~120 mg/g	지아잔틴 10~20 mg
5	루테인/지아잔틴 복합추출물	1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lutein 12.4~18.6 mg/g ▪ Zeaxanthin 3.6~5.4 mg/g 	루테인+지아잔틴 10~20 mg
6	루테인/지아잔틴 복합추출물 20%	1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lutein 24.8~37.2 mg/g ▪ Zeaxanthin 7.2~10.8 mg/g 	루테인+지아잔틴 10~20 mg
7	마리골드추출물 (루테인 에스테르)	2	Lutein esters	성분 18.5~20 mg (루테인 10~10.8 mg)
8	들쭉열매추출물	3	Total polyphenol	추출물 1 g
9	EPA 및 DHA 함유 유지	2	DHA+EPA	EPA+DHA=0.6~1 g

※ 1~2: 눈의 피로도 개선에 도움, 3~8: 눈 건강에 도움

① 루테인, 지아잔틴추출물, 마리골드추출물: 노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소밀도 유지

② EPA 및 DHA 함유 유지: 건조한 눈을 개선

(나) 눈 건강 건강기능식품 제품 현황

① 눈 건강 관련 제품 중 루테인 함유 제품이 가장 널리 판매되고 있으며, 2015년도 눈 건강 기능성 원료로 등재된 EPA 및 DHA 함유 유지 제품은 다중기능성 (중성지방 개선, 혈행개선, 눈건강)을 표기할 수 있고, 2017년 7월 1일부터 고시 원료로 전환됨에 따라 그 생산량이 증가할 것으로 예측됨

② 특히 2016년도에 기능성 원료로 등재된 원료 총 21건 중 17건이 EPA 및 DHA 함유 유지 원료로 그 활용성이 증대될 것으로 예상됨



(다) 식품의약품안전처에 등재된 간 건강 개선 원료는 총 10가지로 간 건강에 도움을 주는 원료 8종, 알코올성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 주는 원료 2종이 등재되어 있으며, 이 중 밀크씨슬 추출물 1종만이 고시원료로 전환됨

번호	원료명	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	브로콜리 스프라우트 분말	3	Sulforaphane 500 mg/g	-
2	표고버섯균사체 추출물	2	β -glucan 35~100 mg/g	추출물 1.8 g
3	표고버섯균사체	2	β -glucan 110~200 mg/g	균사체 350 mg
4	밀크씨슬 추출물	2	Silymarin 320~660 mg/g	성분 130 mg
5	복분자추출분말	2	Ellagic acid 15~25 mg/g	추출분말 3,150 mg
6	발효울금	3	Curcumin 0.8~1.2 mg/g	발효울금 3 g
7	도라지추출물	2	Platycodin D	추출물 3 g
8	유산균 발효 마늘 추출물	2	Cycloalliin	추출물 1.5 g
9	헛개나무과병추출물	2	Quercetin 5.9~8.9 μ g/g	추출분말 2,460 mg
10	유산균 발효 다시마 추출물	2	γ -aminobutyric acid 40~60 mg/g	추출물 1.5 g

※ 1~8: 간 건강에 도움, 9~10: 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움

(라) 간 건강 건강기능식품 제품 현황

- ① 간 건강 관련 제품 중 고시원료인 밀크씨슬 함유 제품이 가장 널리 판매되고 있으며, 유산균 발효 마늘 추출물을 제외한 나머지 기능성 원료 제품들이 꾸준히 생산되고 있음



(3) 눈 및 간 건강 건강기능식품의 시장현황 (참조: 한국식품안전관리인증원, 2016)

(가) 2016년 발표된 ‘2015 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석’ (한국식품안전관리인증원)에 따르면 2015년 건강기능식품의 총 생산액은 1조 1,332억원으로 2014년 대비 1.1% 증가하였으며, 총 매출액은 1조 8,230억원, 총 매출량은 3만 4,568톤으로 10% 이상 증가하였음

구 분	업체수	생산액 (억원)	생산량 (톤)	총 매출액 (억원)	총 매출량 (톤)	내수용		수출용	
						판매액 (억원)	판매량 (톤)	판매액 (억원)	판매량 (톤)
2014	460	11,208	32,494	16,310	30,545	15,640	29,500	670	1,045
2015	487	11,332	36,083	18,230	34,568	17,326	33,016	904	1,551
전년대비 성장률(%)	5.9	1.1	11.1	11.8	13.2	10.8	11.9	34.9	48.4

(나) 품목별 매출 현황을 보면 눈 건강 건강기능식품 (2중 기능성 포함)은 2015년 727.7억 원의 매출을 기록하였으며, 간 건강 건강기능식품은 990.6억원의 매출을 기록함

구 분		항목	매출 순위	총 매출액 (억원)	비율 (%)	
고시형	밀크씨슬 추출물		간건강	4	705.2	4.7
	EPA 및 DHA 함유 유지		눈건강	6	484.7	3.2
	루테인		눈건강	9	203.5	1.4
	헤마토코쿠스 추출물		눈건강	39	8.3	0.1
개별인정형	헛개나무과병추출분말		간건강	4	255.2	8.0
	루테인지아잔틴복합추출물		눈건강	21	31.2	1.0
	표고버섯균사체		간건강	25	22.8	0.7
	유산균발효다시마추출물		간건강	42	6.9	0.2
	도라지추출물		간건강	80	0.4	0.0
	발효울금		간건강	88	0.1	0.0

(다) 건강기능식품 원료 및 제품의 수입은 2015년 5,965억원으로 2014년 (4,412억원) 대비 35.2% 증가하였으며, 수출 904억원에 비해 매우 높은 수입의존도를 나타내고 있음

- ① 대부분의 건강기능식품은 수출용이 아닌 내수판매용으로 판매되고 있으며, 눈 및 간 건강 건강기능식품 또한 대부분 내수용으로 판매되고 있음
- ② 수출을 동반하여 부가가치를 창출할 수 있는 해외 친밀도가 높은 원료 개발이 필요함

구 분		항목	총 매출액 (억원)	내수용 (억원)	수출용 (억원)
고시형	밀크씨슬 추출물	간건강	705.2	697.7	7.5
	EPA 및 DHA 함유 유지	눈건강	484.7	474.2	10.4
	루테인	눈건강	203.5	203.5	-
	헤마토코쿠스 추출물	눈건강	8.3	8.3	-
개별인정형	헛개나무과병추출분말	간건강	255.2	251.6	3.6
	루테인지아잔틴복합추출물	눈건강	31.2	31.2	-
	표고버섯균사체	간건강	22.8	22.8	-
	유산균발효다시마추출물	간건강	6.9	6.8	0.1
	도라지추출물	간건강	0.4	0.4	-
	발효울금	간건강	0.1	0.1	-

(4) 눈 및 간 건강 건강기능식품 생산기관 현황 (참조: 한국식품안전관리인증원, 2016)

(가) 눈 건강 고시형 원료 및 건강기능식품은 (주)서흥이 131.1억원으로 가장 많은 매출을 달성했으며, 간 건강 고시형 원료 및 건강기능식품은 (주)한국야쿠르트가 503.7억원으로 가장 높은 매출을 달성했으나, 모두 내수용 매출로 수출에 대한 매출은 없음

품목유형	순위	업체명	매출액 (억원)		
			총 매출액	내수용	수출용
눈 건강	1	(주)서흥	100.1	100.1	-
	2	종근당건강(주)	94.4	93.7	0.7
	3	(주)노바렉스	49.3	49.3	-
	4	코스맥스바이오(주)	46.5	46.5	-
	5	콜마비엔에이치(주)	36.8	36.8	-
	1	(주)서흥	29.9	29.9	-
	2	콜마비엔에이치(주)	29.2	29.2	-
	3	안국건강(주)	23.3	23.3	-
	4	(주)한국씨엔에스팜	15.0	15.0	-
	5	(주)뉴트리바이오텍	14.7	14.7	-
헤마토코쿠스 추출물	1	(주)아이기스	5.6	5.6	-
	2	(주)서흥	1.1	1.1	-

		3	(주)뉴트리바이오텍	0.6	0.6	-
		4	(주)한국씨엔에스팜	0.4	0.4	-
		5	(주)한국제약	0.2	0.2	-
간 건 장	밀크씨슬 추출물	1	(주)한국야쿠르트	503.7	503.7	-
		2	(주)네이처텍	25.9	25.9	-
		3	코스맥스바이오(주)	25.8	25.8	-
		4	콜마비엔에이치(주)	20.2	20.2	-
		5	(주)에스트라	19.1	19.1	-

(나) 눈 건강 기능성 원료 및 개별인정형 건강기능식품은 (주)노바렉스가 18억원으로 가장 많은 매출을 달성했으나, 고시형 원료가 많은 눈 건강에 비해 매우 적은 매출액이며, 간 건강 기능성 원료 및 건강기능식품은 (주)한국야쿠르트가 168억원으로 가장 높은 매출을 달성했으나, 모두 내수용 매출로 수출에 대한 매출은 없으며, 밀크씨슬 추출물에 비해 낮은 매출액을 달성함

품목유형	순위	업체명	매출액 (억원)			
			총 매출액	내수용	수출용	
눈 건 장	루테인지아잔틴 복합추출물	1	(주)노바렉스	18.0	18.0	-
		2	풀무원건강생활(주)	10.0	10.0	-
		3	(주)노바렉스2공장	0.9	0.9	-
		4	코스맥스바이오(주)	0.7	0.7	-
		5	(주)한국인삼공사	0.6	0.6	-
간 건 장	헛개나무과병 추출분말	1	(주)한국야쿠르트	168.0	168.0	-
		2	(주)뉴메드	33.7	32.6	1.2
		3	코스맥스바이오(주)	29.6	29.6	-
		4	(주)생명의나무	18.1	18.1	-
		5	(주)아리바이오	2.7	0.3	2.4
	표고버섯균사체	1	(주)케이지엔에프	8.2	8.2	-
		2	(주)한풍네이처팜	3.7	3.7	-
		3	(주)서흥 오창공장	2.1	2.1	-
		4	(주)HK바이오텍	1.9	1.9	-
		5	(주)서흥	1.9	1.9	-
	유산균발효 다시마추출물	1	동아제약(주)	3.8	3.8	-
		2	천호식품(주)	2.1	2.1	-
		3	(주)마린바이오프로세스	1.0	1.0	-
	도라지추출물	1	(주)네추럴웨이	0.4	0.4	-
	발효율금	1	한국인스팜(주)	0.1	0.1	-

(5) 병풀의 지식재산권 현황

(가) 본 연구개발 소재인 병풀을 대상으로 국내 지식재산권 현황을 조사한 결과, 대부분 화장료 조성물만이 검색되었으며, 본 연구개발 대상인 눈 건강 및 간 건강과 관련된 특허는 없는 것으로 조사되었음

명 칭	출원/등록번호	출원인	출원/등록일
피부 탄력 증가와 피부노화 억제 효과를 갖는 원지, 길경, 병풀을 함유한 화장료 조성물 및 그 추출물 제조 방법	10-0451387	주식회사 나우코스	2004.09.22
병풀 및 목련 추출물을 포함하는 피부보호 조성물	10-0795512	바이오스펙트럼 주식회사	2008.01.10
독일붓꽃, 병풀, 캐모마일, 달맞이꽃 및 어성초 추출물을함유하는 여드름 피부 개선을 위한 피부 외용제 조성물	10-0795225	주식회사 에스티씨나라	2008.01.09
디팔미토일 하이드록시프롤린을 함유하는 튜브 완화용 화장료 조성물	10-0901340	(주)아모레퍼시픽	2009.06.01
아임계수를 이용한 병풀로부터의 아시아틱산과아시아티코사이드의 추출 및 분리 방법	10-0984531	한국과학기술연구원	2010.09.24
키토산을 이용한 병풀의 면역 증진용 성분의 식용 나노입자 및 그 제조방법, 그 나노입자를 함유한 식품	10-1143363	강원대학교산학협력단	2012.04.30
병풀 유래의 담마레네디올 합성효소 유전자 및 이의 용도	10-1174490	대한민국(농촌진흥청장)	2012.08.09
동맥경화증과 같은 심혈관 장애의 치료용 피크노제놀 또는 포도씨와 같은 프로안토시아니딘 및 병풀의 조합	10-1678254	호르파그 리서치 아이피 (피와이씨) 리미티드	2016.11.15
바다제비집 및 병풀의 복합발효추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 자극 완화용 조성물	10-1418825	건국대학교 산학협력단	2014.07.07
청호, 님 잎, 병풀 및 녹차의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 함유하는 피부 상태 개선용 조성물 및 이를 이용한 피부 상태 개선 방법	10-2009-0120496	주식회사 엘지생활건강	2014.03.12
각질제거 및 피부 장벽 기능 개선용 천연 성분 화장료 조성물	10-2009-0125173	헤네스 주식회사	2015.01.23
생약 추출물을 포함하는 가려움증 억제 및 완화를 위한 화장품 조성물	10-2015-0011477	바이허브 주식회사	2015.03.13
생약 추출물을 포함하는 피부 각질 제거용 화장품 조성물	10-2015-0035276	바이허브 주식회사	2015.03.13

병풀추출물, 목련수피 추출물, 나한백가지 추출물, 유칼립투스잎오일, 보리지씨오일을 유효성분으로 하는 피부진정 및 아토피 개선용 화장품 조성물	10-2015-0035274	주식회사 아미코스메틱	2015.06.11
병풀 추출물, 티모사포닌, 히아루론산 및 콜라겐을 포함하는 주름 개선용 화장품 조성물	101700903	신형석	2017.01.23

나. 국외 기술 수준 및 시장현황

(1) 병풀의 연구 및 제품개발 현황

(가) 병풀은 아열대성 식물로 동남아시아의 스리랑카(Sri Lanka), 중국의 일부(in parts of China), 남서부지역 해안지역인 마다가스카르(Madagascar)와 남아프리카(South Africa), 미국의 남동지역, 멕시코(Mexico), 베네주엘라(Venezuela), 콜롬비아(Columbia), 남아메리카의 동부지역에 주로 분포하고 있음

(나) 병풀은 AD 500년경 인도(India) 산스크리트 의학(Sanskrit medicine) 교재 문헌에 처음으로 기록되어 있으며, 고온다습한 섬지역 주민들이 민간요법으로 나병(leprosy)의 치료제로 주로 사용하여 왔는데, 1945년 이후 체계적인 연구 결과, 유효성분인 아시아티코사이드(asiaticoside), 마테카소사이드(madecassoside), 아시아틱산(asiatic acid), 마테카식산(madecasic acid)과 미량의 알칼로이드(alkaloid) 등이 풍부하다고 알려짐

(다) 근래에는 피부상처치료, 나병(leprosy), 낭창(lupus), 습진(eczema), 건선(psoriasis), 만성정맥질환, 항치매 및 위장병, 해열제, 해독제(detoxicant), 이뇨제(diuretic), 혈압강하, 심장박동 하강 등 질병 치료제의 원료, 화장품 첨가물의 원료, 건강보조식품 등 그 활용도가 매우 다양함

(라) 병풀의 연구현황

① 국내에 비해 국외에서 병풀의 연구는 다양한 형태로 많이 진행되고 있으며, 상처치유, 피부세포 재생 등의 화장품 관련 연구이외에도 뇌 질환 관련 연구, 항암, 간보호, 고지혈 개선, 위보호 등 다양한 연구가 지속되고 있음 (2017년 3개월 이내에 발표논문 건수만 9건)

② 특히 추출물의 유효성 및 안전성에 대한 연구뿐만이 아니라 유효성분들의 연구도 같이 진행됨

연구제목	저자	발행기관	발행연도
Centella asiatica attenuates Aβ-induced neurodegenerative spine loss and dendritic simplification	Gray et al.	Neurosci Lett	2017

Neurotrophic Effect of Asiatic acid, a Triterpene of <i>Centella asiatica</i> Against Chronic 1-Methyl 4-Phenyl 1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine Hydrochloride/Probenecid Mouse Model of Parkinson's disease: The Role of MAPK, PI3K-Akt-GSK3 β and mTOR Signalling Pathways	Nataraj et al.	Neurochem Res	2017
Asiaticoside: Attenuation of rotenone induced oxidative burden in a rat model of hemiparkinsonism by maintaining the phosphoinositide-mediated synaptic integrity	Gopi et al.	Pharmacol Biochem Behav	2017
Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria	Wu et al.	Acta Pharm Sin B	2017
Asiatic acid enhances Nrf2 signaling to protect HepG2 cells from oxidative damage through Akt and ERK activation	Qi et al.	Biomed Pharmacother	2017
Asiatic acid attenuates pre-neoplastic lesions, oxidative stress, biotransforming enzymes and histopathological alterations in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis	Siddique et al.	Toxicol Mech Methods	2017
Comparative pharmacokinetics between madecassoside and asiaticoside presented in a standardised extract of <i>Centella asiatica</i> , ECa 233 and their respective pure compound given separately in rats	Hengjumarut et al.	Xenobiotica	2017
Synergistic combinations of five single drugs from <i>Centella asiatica</i> for neuronal differentiation	Lin et al.	Neuroreport	2017
The ameliorating effect of <i>Centella asiatica</i> ethanolic extract on albino rats treated with isoniazid	Ghosh et al.	J Basic Clin Physiol Pharmacol	2017
In vitro and In vivo Antioxidant, Anti-hyperlipidemic Properties and Chemical Characterization of <i>Centella asiatica</i> (L.) Extract	Kumari et al.	Front Pharmacol	2016
Pharmacokinetics of a Standardized Extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233 in Rats	Anukunwithaya et al.	Planta Med	2016
In vitro and In vivo Anti- <i>Helicobacter pylori</i> Activities of <i>Centella asiatica</i> Leaf Extract	Zheng et al.	Prev Nutr Food Sci	2016
Madecassic Acid protects against hypoxia-induced oxidative stress in retinal microvascular endothelial cells via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress	Yang et al.	Biomed Pharmacother	2016
Protective effects of <i>Centella asiatica</i> leaf extract on dimethylnitrosamine induced liver injury in rats	Choi et al.	Mol Med Rep	2016

Asiatic Acid Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Akt/GSK-3β/HIF-1α Signaling in Rat H9c2 Cardiomyocytes	Huang et al.	Molecules	2016
Burn wound healing properties of asiaticoside and madecassoside	Hou et al.	Exp Ther Med	2016
Asiatic acid inhibits pulmonary inflammation induced by cigarette smoke	Lee et al.	Int Immunopharmacol	2016
Preclinical Safety Assessment of Standardized Extract of Centella asiatica (L.) Urban Leaves	Deshpande et al.	Toxicol Int	2015

(마) 병풀의 제품 개발 현황을 보면 국내와 유사하게 화장품 계열의 제품들이 많이 출시되어 있으나, 국내와는 다르게 식이보충제 (dietary supplements) 제품 형태로 많이 유통되고 있음

① 미국, 캐나다, 인도 등에서 식품으로의 판매가 활발히 이루어지고 있음



(2) 건강기능식품의 제품개발 및 시장현황

(가) 세계건강기능식품 시장 규모는 2015년 기준 1,179억 달러 (약 131조원)로 연평균 7.3%의 성장을 이루고 있으며, 2020년도에는 약 1,677억 달러 (약 187조원)에 이를 전망임 [참조: 건강기능식품 시장 동향 (연구성과실용화진흥원, 2016)]



(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

(나) 세계 시장에서 미국이 약 404억 달러 (약 45조원, 점유율 34.3%)로 가장 큰 규모의 시장을 형성하고 있으며, 중국이 약 163억 달러 (약 18조원, 점유율 13.8%), 일본이 약 109억 달러 (약 12조원, 점유율 9.2%)의 시장을 형성하고 있음

① 한국은 21억 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며, 점유율은 1.78%를 차지함

(단위 : 억 달러 또는 %)

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

(다) 주요 국가별 시장규모 및 주요 연구분야

구분	미국	중국	일본
시장 규모	· 404억 달러(45조 원) · 연평균 성장률 : 7.1%	· 163억 달러(18조 원) · 연평균 성장률 : 13.8%	· 109억 달러(12조 원) · 연평균 성장률 : 2.3%
주요 소비 분야	· 멀티 비타민 · 천연물/전통 식품보충제	· 비타민 및 무기질	· 비타민 및 무기질
성장 분야	· 비타민 B, D · 프로바이오틱스	· 칼슘제	· 시력 보호 · 수면 보조
기업 동향	· 대형 기업이 시장 선점 · 대규모 유통망을 통해 판매	· 점유율 10위 기업 중 외국 기업 3개 포함 · 직소판매형식 ³⁾	· 드럭 스토어, 통신 판매 등 다양한 판매 · 자체 브랜드 제품의 성장

(3) 병풀의 해외 지식재산권 현황

(가) 병풀의 해외 특허 (미국, 유럽, 일본, 중국, PCT)를 조사한 결과 화장료 조성물 및 기능성, 유효성분 분리 방법 및 추출방법 등을 포함하여 3,558건이 검색되었으며, 이 중 해당 연구개발과 관련된 눈 및 간 건강과 관련된 특허를 조사함

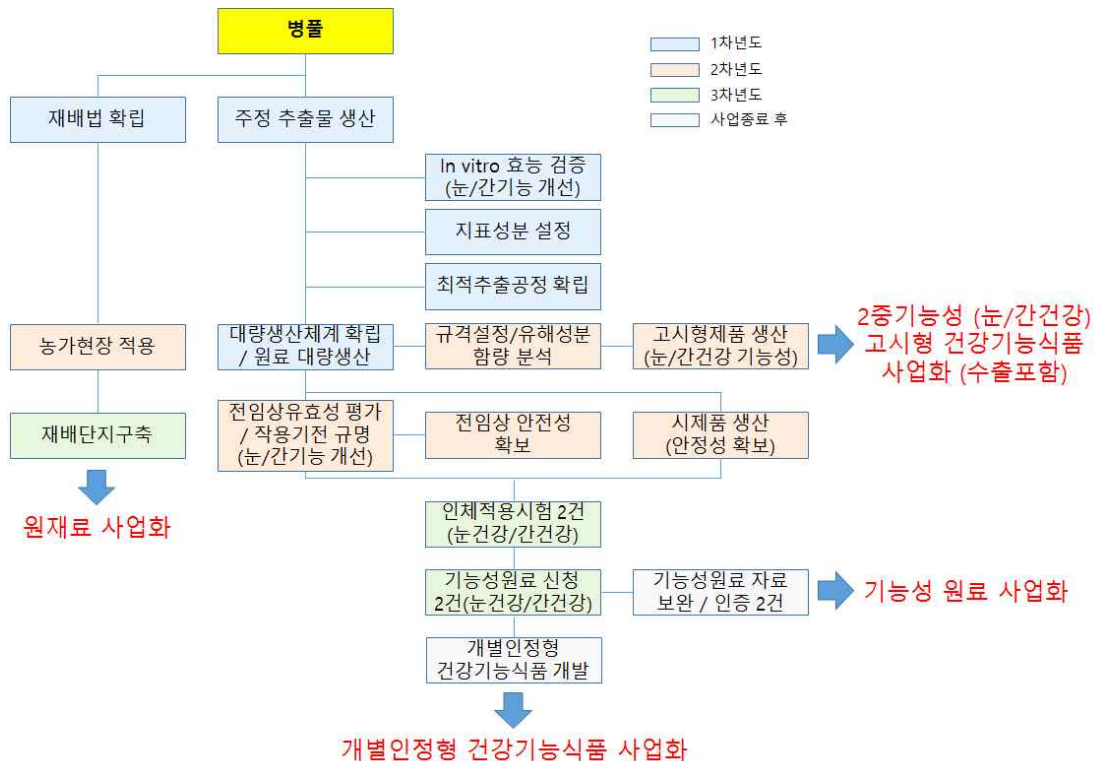
① 병풀의 간 섬유화 개선과 관련된 특허는 4건 검색되었으며, 특히 중국에서 병풀의 주요성분으로 알려진 asiatic acid, madecassoside, madecassic acid의 특허를 출원했으나 아직 등록은 되지 않았음

② 병풀의 눈 건강과 관련된 특허는 검색되지 않았음

명 칭	출원/등록번호	출원인/국가	출원/등록일
Use of asiatic acid of centella asiatica in preparing medicaments for treating liver fibrosis	2011-10263301	Hangzhou Sharply Pharmaceutical Research and Development Institute Co., Ltd. Hainan Poly Pharm Co., Ltd. Zhejiang Ruida Pharm Co., Ltd./중국	2011.09.07
Use of madecassoside of centella asiatica in preparing medicaments for treating liver fibrosis	2011-10263302	Hangzhou Sharply Pharmaceutical Research and Development Institute Co., Ltd. Hainan Poly Pharm Co., Ltd. Zhejiang Ruida Pharm Co., Ltd./중국	2011.09.07
Use of madecassic acid of centella asiatica in preparing medicaments for treating liver fibrosis	2011-10263274	Hangzhou Sharply Pharmaceutical Research and Development Institute Co., Ltd. Hainan Poly Pharm Co., Ltd. Zhejiang Ruida Pharm Co., Ltd./중국	2011.09.07
Centella asiatica oral liquid for soothing liver and removing dampness and preparation method of oral liquid	2015-10757185	QINGDAO ANBEIKANG BIOLOGICAL MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD./중국	2015.11.09

제 3 절. 연구개발 범위

1. 연구개발 전략



2. 컨소시엄 구성 및 역할

가. 주관기관: (주)제넨셀

- (1) 병풀추출물의 유효성분 규명 및 지표성분 설정, 최적추출공정 개발
- (2) 병풀추출물의 원료표준화 및 유해성분 함량 분석
- (3) 섭취근거 확보를 위한 전임상 안전성 검증
- (4) 눈 및 간 기능 개선 인체적용시험 프로토콜 개발 및 인체적용시험 관리
- (5) 병풀추출물의 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청 및 1차 보완대응
- (6) 눈 건강 개별인정형 건강기능식품 제품화 (사업종료 후 인증 및 제품 생산)

나. 주관위탁기관: 경희대학교

- (1) 병풀추출물의 간질환 개선 전임상 유효성 검증
- (2) 병풀추출물의 망막질환 예방 전임상 유효성 검증
- (3) 병풀추출물의 간 / 눈 건강에 대한 작용기전 규명
- (4) 기능성 원료 신청을 위한 자료 수입 및 보완 지원

다. 제1협동기관: (주)에이온엘에스

- (1) 병풀추출물의 제조공정 및 대량생산체계 확립, 표준화 원료 3 batch 대량생산
- (2) 2중 기능성 (눈/간건강) 고시형 건강기능식품 제품화 및 사업화 (주관기관 연계)
- (3) 인체적용시험용 시제품 생산 (위탁기관 연계)
- (4) 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청 지원
- (5) 눈 건강 및 간 건강 개별인정형 건강기능식품 제품화 (사업종료 후 인증 및 제품 생산)

라. 제1협동기관 위탁: 코스맥스바이오(주)

- (1) 제조공정 확립에 따른 생산라인 적용
- (2) 대량생산 원료의 동등성 자료 확보 및 안정성 확립
- (3) 고시형 및 인체적용시험용 시제품 생산 지원
- (4) 고시형 제품 생산 지원, 개별인정형 제품 제형 개발 및 안정성 지원

마. 제2협동기관: 농업회사법인 (주)트리즈바이오텍

- (1) 병풀 원재료 공급 및 표준화
- (2) 병풀의 재배법 확립을 통한 재배농가 확보 및 농가 현장 적용 관리
- (3) 병풀의 재배단지 구축 및 계약재배 등의 원재료 대량생산 시스템 활성화를 통한 원재료 공급 관리

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발 추진전략·방법

가. 병풀 원재료 확보 및 추출물 제조

- (1) 제2협동기관에서 연구개발을 위한 원재료 공급
- (2) 주관기관에서 연구개발을 위한 추출물 제조 및 주관 위탁기관에 추출물 공급
- (3) 제1협동기관에서는 사업화를 위한 원재료 구입 및 추출물 대량을 위한 제조공정 확립
 - (가) 대량생산체계 구축을 통한 사업화 기반 마련 (1차 고시형 제품 제조)
- (4) 제1협동기관에서 3 batch 대량생산을 위한 시스템 구축 및 추출물 대량 지원

나. 병풀 추출물의 유효성분 규명 및 지표성분 설정

- (1) 주관기관에서 기존 문헌 검색 또는 activity-guided fractionation을 통한 유효성분 규명
 - (가) 주관 위탁기관에서 각 유효 분획물 또는 성분의 눈 및 간 기능 효능 검토
- (2) 주관기관에서 기능성을 특정 지을 수 있는 지표성분 설정 및 분석법 개발, 규격설정, 유효성분 함량 분석
 - (가) 한국건강기능식품협회 등의 공인기관에서 표준화 실시

다. 병풀 추출물의 기능성 자료 구축

- (1) 눈 건강 관련 기능성 자료 확보 (주관 위탁기관)
 - (가) 제1협동기관 (위탁포함)에서 제조한 병풀 추출물을 이용한 전임상 유효성 검증
 - (나) 추출물, 유효/지표성분의 바이오마커 분석 및 작용기전 규명
- (2) 간 건강 관련 기능성 자료 확보 (주관 위탁기관)
 - (가) 제1협동기관 (위탁포함)에서 제조한 병풀 추출물을 이용한 전임상 유효성 검증
 - (나) 추출물, 유효/지표성분의 바이오마커 분석 및 작용기전 규명

라. 병풀 추출물의 안전성 자료 구축 (주관기관)

- (1) 병풀 추출물의 전임상 안전성 자료 확보 (주관기관)
 - (가) 제1협동기관에서 제조한 병풀 추출물을 이용한 전임상 안전성 검증
 - (나) 섭취근거 확보 등의 안전성 검증을 위한 GLP 인증기관 의뢰 및 검증

마. 병풀 추출물의 인체적용시험 (주관기관)

- (1) 주관 위탁기관에서의 눈/간 건강 전임상 유효성 자료 확보
- (2) 확보된 자료를 통한 주관기관에서의 인체적용시험 프로토콜 개발 (CRO 연계)
- (3) IRB 승인 및 시험대상자 모집, 임상기관 선정
- (4) 눈/간 기능 인체적용시험 시행 및 전체/개별 통계 분석

바. 병풀의 재배법 확립에 따른 재배단지 구축 (제2협동기관)

- (1) 병풀의 재배법 확립
 - (가) 표준재배 매뉴얼 구축 (농가 교육 포함)

(2) 재배단지 구축

(가) 주변농가 활용 재배단지 확보 및 안정적 원재료 생산체계 구축

사. 간 건강 및 눈 건강 기능성 원료 신청 (인체적용시험 완료 후 기능성 원료 인허가 신청)

(1) 참여기관간의 연구/사업화 네트워크 구축

(가) 원료 관리기관인 주관기관과 기능성 평가 기관 (주관 위탁기관), 제품 생산 및 판매 기업인 1협동 기관 (위탁기관 포함), 원재료 생산 및 판매 기업인 2협동기관과의 네트워크 구축을 위한 꾸준한 연구활동 및 미팅 추진

(2) 주관기관에서의 눈 건강 기능성 원료 신청

(가) 간 건강 대비 수요가 높은 눈건강을 1차로 기능성 원료 신청, 추후 2차 간건강 기능성 원료 신청 진행

(나) 주관기관 및 제1협동기관 (위탁포함) 자료 취합 및 기능성 원료 신청

(다) 1협동 위탁기관인 코스맥스바이오(주)에서 해당 원료를 대상으로 제품화 및 마케팅 진행 (사업을 위한 원료 독점 공급 계약 추진)

(3) 주관기관에서의 간 건강 기능성 원료 신청

(가) 주관기관 (위탁포함) 자료 취합 및 기능성 원료 신청

(4) 개별인정형 건강기능식품 제품화 및 사업화

(가) 사업종료 후 1차년도에 제1협동기관에서 복합 또는 단일 품목의 개별인정형 건강기능식품 제품화 및 사업화 진행 (제1협동 위탁기관 연계)

(나) 기능성 원료 인허가 후 주관기관에서 병풀추출물 원료 사업화 진행

아. 간/눈 건강 이중기능성의 고시형 건강기능식품 사업화

(1) 제1협동에서의 대량생산체계 구축에 따른 원료 대량 생산

(가) 주관기관에서의 표준화 자료 확보 및 식품 첨가물 등재

(2) 제1협동 위탁기관에서의 이중 기능성 고시형 건강기능식품 제품화

(가) 주원료 밀크씨슬 및 루테인, 부원료 병풀추출분말 등 눈/간건강 원료

(나) 2차년도 5천 세트, 3차년도 이후 1만 세트 제작

(3) 주관기관에서의 이중기능성 고시형 건강기능식품 생산 및 사업화

(가) 제1협동 위탁기관에서의 제품 생산 지원

(나) 2차년도 초기 생산 후 3차년도 본격 사업화

자. 기능성 원료 및 제품의 사업화 계획

(1) 눈 및 간건강 이중 기능성 고시형 건강기능식품 사업화 (주관기관)

(가) 목적: 병풀의 소비자 반응, 2중 기능성 제품의 사업성, 병풀의 기능성 확보

(나) 상품명: “간을보다 hepatobion” 출시에 따른 홍보물 제작 및 매체를 통한 홍보

(다) 2차년도 5천 set (1달) 생산 (1협동 및 위탁기관 연계) 완료

(라) 약국 유통 및 인터넷 쇼핑몰에서 판매 진행 (판매 기업 확보 완료)

(마) 3차년도 이후 1만 set 생산에 따른 본격적인 사업화 추진 (컨셉 위주의 고시형 제품의 경우 그 수명이 3년 정도인 것을 감안하여 개별인정형 건강기능식품이 출시되기 전까지 본격적인 사업화 진행)

※ 추후 식약처로부터 병풀주정추출분말에 대한 기능성 원료 인증이 지연될 경우 그 전까지 고시형 제품에 대한 본격적인 사업화 추진을 진행하여 해당 과제의 실적 달성 추진

(2) 병풀주정추출분말의 기능성 원료 사업화 (주관기관, 사업종료 후 추진)

(가) 1협동 위탁기관이자 건강기능식품 전문 생산 기업인 코스맥스바이오(주) (대기업)와 원료 공급계약 추진

(나) 코스맥스바이오(주)에서 본 연구개발의 병풀주정추출분말 홍보 및 제품화 추진

(다) 주관기관에서 꾸준한 국산 병풀의 우수성 홍보 (전시회, 홍보 매체 등 활용)

(3) 개별인정형 건강기능식품 사업화 (1협동기관 또는 원료 수요기업, 사업종료 후 추진)

(가) 1차 주관기관 또는 1협동 기관에서 개별인정형 건강기능식품 사업화 추진

(나) 2차 코스맥스바이오(주)의 의뢰사를 통한 제품 생산 및 사업화 추진

차. 해외 마케팅 전략 수립

(1) 본 사업팀은 동남아 최대 편집샵인 Watsons와 GNC 아시아 공급기업인 ONI Global과 전략적 제휴를 맺고 있음

(가) 이를 통하여 동남아, 대만, 중국 등에 수출 전략 수립

(나) 인도 인체적용시험 진행에 따른 인도 시장 진출 모색

(2) 전략적 제휴를 맺은 해외 파트너사

Our Partners

Watsons

PARTNERS

Oni Global

01 Global Partner

A.S. Watson: 1841 설립 Hutchison Whampoa 그룹의 일원 홍콩 본사, 전세계 25개 시장에 13,300 매장 보유, 직원 수 13만명

Watson 말레이시아와 검토의향서 체결.

Watson 말레이시아 - Health and Beauty 매장 수 350개

02 Global Partner

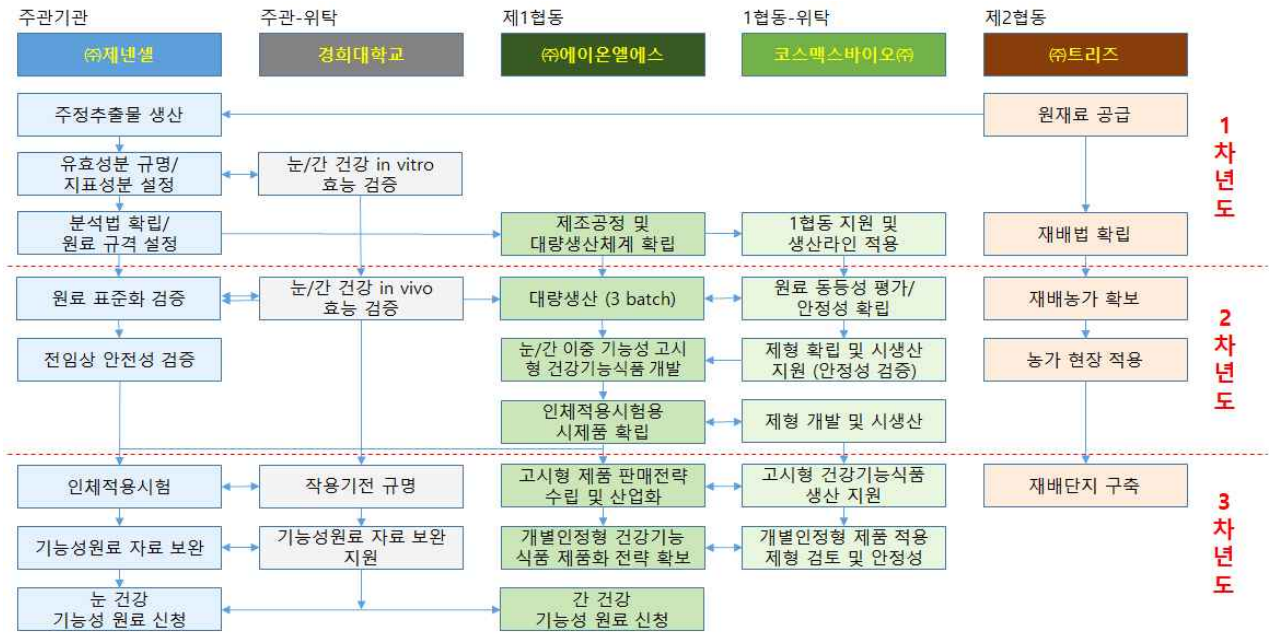
1995년 설립 후 GNC 아시아 독점 대리점 및 GNC 제품의 LAC 등 30여개의 브랜드 제품 판매증100여종의 자체 제품군 보유

싱가폴 말레이시아 타이완에 진출 지역 매장 200개 보유

건강기능식품 전문 유통 및 제조 업체

2. 연구개발 추진 체계

가. 협력추진 체계도

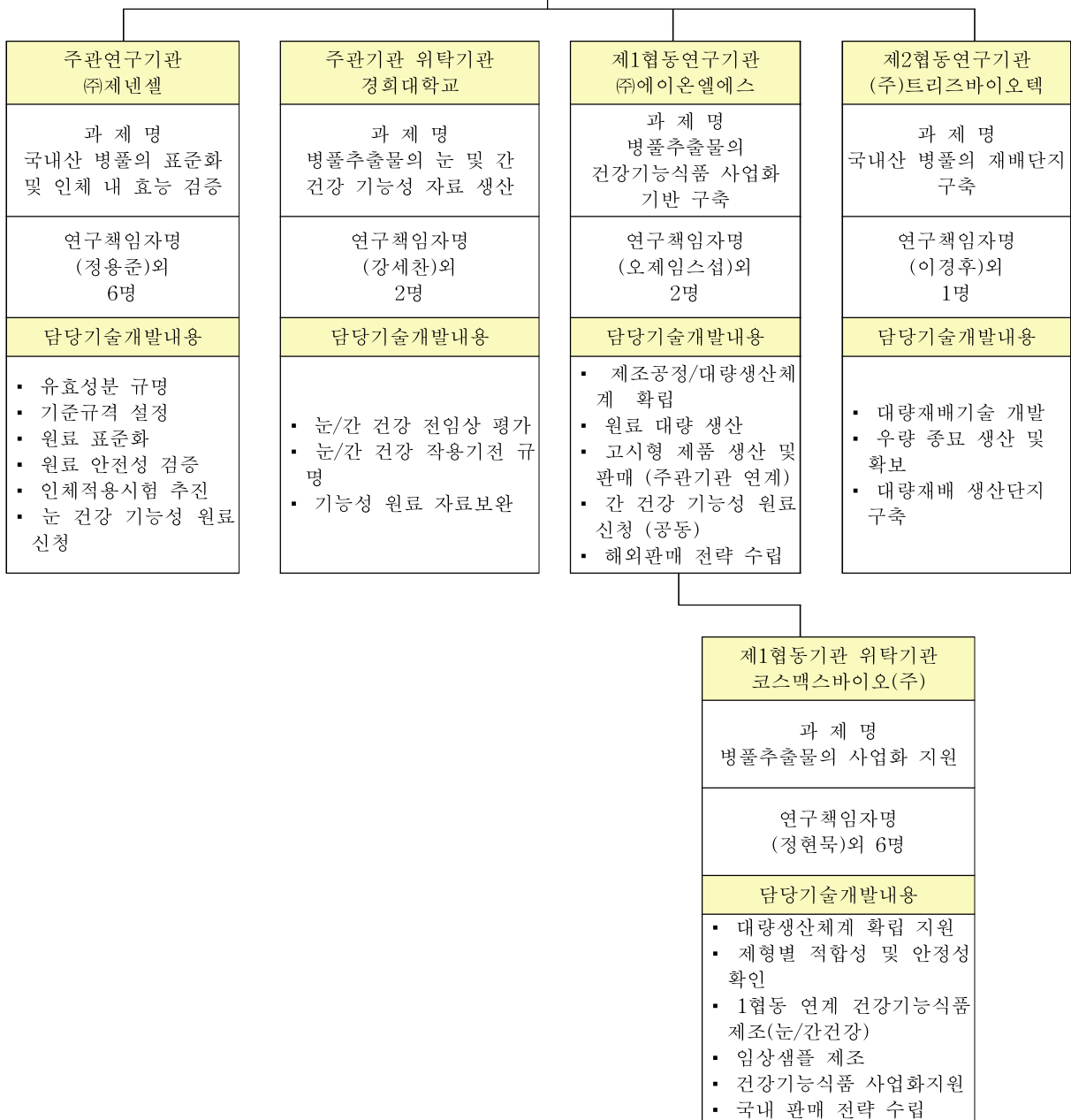


- 사업종료 후 1차년도: 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 인증 (각각 1건)
- 원재료 사업화: (주)트리즈
- 원료 사업화: (주)제넬셀
- 건강기능식품 사업화: (주)에이온엘에스 (코스맥스바이오 제품 생산 지원)

나. 연구개발의 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	병풀로부터 눈 및 간건강 개별인정형 건강기능식품 개발	주관연구책임자 (정용준) 외 총 22명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	3	12
대기업	1	7
대학	1	3
기타	0	0



3. 연구개발 추진 일정

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	생/건조 병풀추출물 제조						■	■						20,000	정용준 (제넨셀)
2	유효성분 규명 및 지표성분 설정							■	■	■	■			30,000	정용준 (제넨셀)
3	분석법 확립											■	■	20,000	정용준 (제넨셀)
4	원료 표준화												■	20,000	정용준 (제넨셀)
5	눈/간 건강 in vitro 평가						■	■	■	■	■			32,000	강세찬 (경희대)
6	눈/간 건강 in vivo 평가												■	25,000	강세찬 (경희대)
7	제조공정 확립 및 대량생산						■	■	■	■				33,000	전혜린 (에이온엘에스)
8	고시형 시제품 생산											■	■	20,000	전혜린 (에이온엘에스)
9	생산라인 적용						■	■	■	■				20,000	정현목 (코스맥스바이오)
10	원료 3 batch 대량생산 지원											■	■	10,000	정현목 (코스맥스바이오)
11	원재료 공급						■	■						10,000	이경후 (트리즈바이오텍)
12	재배법 확립						■	■	■	■	■	■		20,000	이경후 (트리즈바이오텍)
2차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원료 표준화 및 유해물질 함량 분석	■	■	■										5,000	정용준 (제넨셀)
2	영양성분 분석			■	■									15,000	정용준 (제넨셀)
3	눈/간 건강 in vivo 평가	■	■	■	■	■	■	■						30,000	강세찬 (경희대)
4	눈/간 건강 바이오마커 분석									■	■	■	■	25,000	강세찬 (경희대)
5	고시형 건강기능식품 제품화 및 사업화	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	오제임스랩 (에이온엘에스)

																	스)	
6	인체적용시험용 시제품 생산																25,000	오제임스섭 (에이온엘에스)
7	생산 지원																20,000	정현목 (코스맥스바이오)
8	원료 동등성 평가 및 안정성 확립																20,000	정현목 (코스맥스바이오)
9	병풀 재배법 확립에 따른 현장적용																30,000	이경후 (트리즈바이오텍)
10	원재료 공급체계 구축																10,000	이경후 (트리즈바이오텍)
11	전임상 안전성 평가																30,000	정용준 (제넨셀)
12	인체적용시험 기반 구축																50,000	정용준 (제넨셀)

3차년도

일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	인체적용시험													150,000	정용준 (제넨셀)
2	눈/간 건강 작용기전 규명													40,000	강세찬 (경희대)
3	기능성 원료 자료 수집/보완													5,000	정용준 (제넨셀)
4	눈 건강 기능성 원료 신청													5,000	정용준 (제넨셀)
5	간 건강 기능성 원료 신청													5,000	오제임스섭 (에이온엘에스)
6	고시형 건강기능식품 사업화													5,000	오제임스섭 (에이온엘에스)
7	건강기능식품 생산 및 사업화 지원													30,000	정현목 (코스맥스바이오)
8	국내외 마케팅 전략 수립													20,000	오제임스섭 (에이온엘에스)/ 정현목 (코스맥스바이오)
9	재배단지 구축 및 육성													35,000	이경후 (트리즈바이오텍)
10	원재료 사업화 기반 구축													5,000	이경후 (트리즈바이오텍)

제 2 절. 연구수행 내용 및 결과

1. 병풀의 수집 및 개체 검증

가. 산지별 병풀 수집에 따른 개체 검증

(1) 연구방법

- (가) 본 연구에 사용되어질 병풀의 소재 연구를 위해 국내산 (합천, 제주) 병풀과 수입산 (인도, 마다가스카) 병풀을 수집 및 구입하였음
- (나) 그 중 본 연구에 사용될 국내산 병풀과 병풀 대량 수입지인 마다가스카 병풀의 DNA 동정을 통해 개체검증을 실시함

(2) 재료 및 방법

(가) 실험 재료

시료명	원산지	코드명
병풀	제주	BP-1
병풀	합천	BP-2
병풀	마다가스카	BP-3

(나) 실험방법

① DNA 추출

- Exgene Plant SV Mini kit(GeneAll, Korea)를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 DNA를 추출함

② ITS sequencing (전문업체에 의뢰)

- 추출된 DNA는 ITS 유전자를 증폭한 후 염기서열 전문 분석 기업에 의뢰하여 분석 수행

③ BlastN 검색 (세계유전자은행에 등록된 서열과의 비교)

- 확보된 염기서열 정보를 GenBank에 등록된 기존 정보들과 비교를 통해 가장 유사도가 높은 서열에 해당하는 종을 확인함
- 염기서열 유사도에 따라 확인된 학명은 ‘국가생물종지식정보시스템’에서 검색하여 국명을 확인 하였음

(3) 실험결과

(가) BP-1 sequencing 결과

```
GAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAACCTGCACCGCAGAACGACCCGCGAACACGTAAAGCAACACGGGGC
GAGCGGCTCCCGGGGCGCAAGCCCCTCGGGCCGCGAACCGACGGACGGGGTCCCTCCCTCGGGCGTCCCCCGT
CCGGCTAACCAACCCCGGCGCGGCAAGCGCAAGGAATTA AAAACCGAACGAGGCCGTCTCTCCCCGTTTCG
CGGGCGGCGGAGGCGTCTTGTCCTAAAAACAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA
GTTGCGCCCGAAGCCACTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCCCCACCCG
TCGGCTCGAAAGGGGTCGGGGCGGAGGGCGGAGAAATGGCCTCCCGTGCTCGGGGCGCGGTTGGCCAAA
CGTCAGCCCGCGGCGACGGACGTCACGACAAGTGGTGGTTTGACAAAGGCCCTCGCATGTTGTCGTGCGGTG
ATCCGTGCTCGGCGTGAGCTCGTGCGACCCTGTTGCCACGCCGTGCTCGGGCGCGGCTCCGACCGCGACCC
AGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAG
```

(나) BP-2 sequencing 결과

```
CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCACCGCAGAACGACCCGCGAACACGTAAAG
CAACACGGGGCGAGCGGCTCCCGGGGCGCAAGCCCCTCGGGCCGCGAACCGACGGACGGGGTCCCTCCCTCGG
GCGTCCCCCGTCCGGCTAACCAACCCCGGCGCGGCAAGCGCCAAGGAATAAAAACCGAACGAGGCCGTCTC
TCCCCCGTTCGCGGGGCGGCGGAGGCGTCTTGTCTTAAAAACAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCT
CTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTC
TTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCACTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
CCCCCACCCGTCGGCCTCGAAAGGGGTGCGGGGCGGAGGGGCGGAGAATGGCCTCCCGTGCCTCGGGGCGCG
GTTGGCCCAAACGTCAGCCCGGCGACGACGTCACGACAAGTGGTGGTTTGACAAAGGCCCTCGCATGTT
GTCGTGCGGTGATCCGTCGTGCGGCTGAGCTCGTGCACCCCTGTTGCCACGCCGTGCTCGGCGCGCGCTCCG
ACCGCGACCCAGGTCAAGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAAT
```

(다) BP-3 sequencing 결과

```
AAGGATCATTGTGCGAAACCTGCGCCGCGAGAACGACCCGCGAACACGTAAAGCAACACGGGGCGAGCGGCTCC
CGGGGCGGAGCCCCCTCGGGCCGCGAACCCACGGACGGGGTCCCTCCCTCGGGCGTCCCCCGTCCGGCTAACCC
AACCCCGGCGCGGCAAGCGCCAAGGAATAAAAACCGAACGAGGCCGTCTCTCCCCCGTTCGCGGGGCGGCGG
AGGCGTCTTGCCCTAAAAACAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTA
GCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCG
AAGCCACTCGGCGGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCCCCACCCGTCGGCCTCGAA
AGGGGTCGGGGCGGAGGGGCGGAGAATGGCCTCCCGTGCCTAGGGGCGCGGTTGGCCCAAACGTCAGCCCCG
GGCGACGGACGTCACGACAAGTGGTGGTTTGTCAAAGGCCCTCGCATGTTGTGCGTGGGTGATCCGTCGTGCG
GCGCGAGCTCGTGCACCCCTGTTGCCACGCCGTGCTCGGCGCGCGCTCCGACCGCGACCCAGGTCAAGCGG
GACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAG
```

(라) BlastN 검색 결과

코드명	BlastN 검색 결과			
	학명	국명	GenBank Num.	일치도(%)
BP-1	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KM887373	99
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KR215628	99
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KX277730	99
BP-2	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KM887373	99
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KR215628	99
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KX277730	99
BP-3	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KM887373	99
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	KR215628	98
	<i>Centella asiatica</i>	병풀	AF272352	98

(4) 결론

(가) BP-1~3 시료의 ITS 염기서열 분석 결과 분석된 샘플 모두 ‘병풀’로 명명되고 있는 식물(*Centella asiatica*)의 염기서열과 98~99% 일치하는 결과를 보였음

(나) 분석된 3개의 시료 모두 병풀(*Centella asiatica*)로 판정됨

나. 제주산 병풀의 수집

(1) 수집 방법

(가) 연구개발을 위하여 국내산 중 제주산 야생 병풀 원재료를 6월~8월까지 3개월간 채집 확보하였음 (기능성 비교를 위해 주관기관에 일부 공급)

(나) 제주도내 병풀 자생지 2곳을 확인하였으며, 이곳으로부터 병풀 원재료를 채취하여 재배에 적용

자생지	확보 수량	비 고
제주시 한경면 일대	20 kg	<ul style="list-style-type: none"> 주변 숲을 이루고 있는 반양지(반음지) 환경에서 성장하고 있음 병풀의 줄기가 길며, 잎의 크기가 큼
서귀포시 남원읍 일대	30 kg	<ul style="list-style-type: none"> 숲이 없는 노지(양지) 환경에서 성장하고 있음 병풀의 줄기가 매우 짧고, 잎의 크기가 작음

2. 수집된 병풀의 추출물 제조

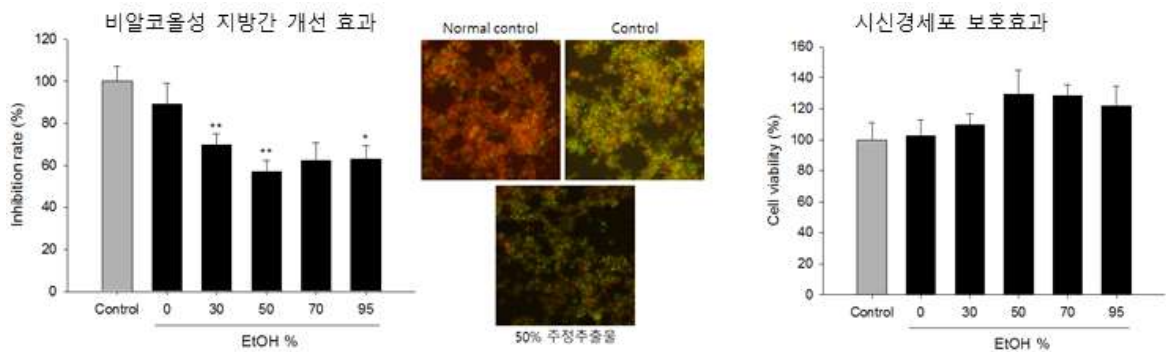
가. 산지별 병풀 수집에 따른 연구용 추출물 제조

(1) 연구방법

(가) 국내산 병풀과 수입산 병풀의 차별성을 확보하기 위해 국내산 (합천, 제주) 병풀과 수입산 (인도, 마다가스카) 병풀을 수집하고, 각 원재료의 추출물을 제조함



(나) 선행연구에서 비알코올성 지방간 억제 효과와 시신경세포 보호효과를 나타낸 50% 및 70% EtOH 병풀추출물을 제조



(2) 실험방법

(가) 각각의 산지별 병풀 100 g을 50%와 70% EtOH로 5시간 (80~90℃) 추출

※ 마다가스카 병풀은 수집량 부족으로 50% EtOH 추출에 87 g 사용

(3) 실험결과

(가) 건조 병풀의 경우 마다가스카산 병풀의 수율이 가장 높았으며, 인도산 병풀의 수율이 가장 낮게 나타남

(나) 제주도 및 합천 건조병풀 또한 적정량의 수율을 나타냄

(다) 생병풀의 경우 약 5%의 수율이 나타나며, 약 10%의 건조수율이 있는 것으로 확인됨

원산지	추출 조건	수율 (%)
합천 (생병풀)	50% EtOH 가열추출 100g	4.7
	70% EtOH 가열추출 100g	5.0
합천 (건조병풀)	50% EtOH 가열추출 100g	13.5
	70% EtOH 가열추출 100g	15.8
제주도	50% EtOH 가열추출 100g	15.4
	70% EtOH 가열추출 100g	18.2
인도	50% EtOH 가열추출 100g	9.2
	70% EtOH 가열추출 100g	9.9
마다가스카	50% EtOH 가열추출 87g	19.1
	70% EtOH 가열추출 100g	19.4

3. 간 질환 개선 in vitro 기능성 평가

가. 알코올성 간손상 시험법 확립에 따른 산지별 병풀추출물의 보호효과

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 알코올 유도 간세포 손상에 대한 각 산지별 병풀추출물의 보호효과를 측정하고자 독성을 나타내는 알코올 농도를 설정하여 시험법을 확립함

(나) 확립된 시험법에 산지별 병풀추출물을 처리하여 보호효과를 확인하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) HepG2 (Human hepatocellular carcinoma) cell line을 96 well plate에 seeding 후 EtOH을 농도별 (500, 750, 1,000 mM)로 처리하였으며, 24시간 후 MTT assay를 이용하여 세포독성을 측정함

(나) HepG2 cell seeding 후 가장 높은 세포독성을 나타낸 750 mM의 EtOH를 처리하고, 제조된 각각의 산지별 병풀추출물을 단일농도 (100 µg/mL)로 처리하여 알코올에 의한 세포보호 효과를 측정함

① H50 / H70: 합천산 건조병풀 50% / 70% EtOH 추출물

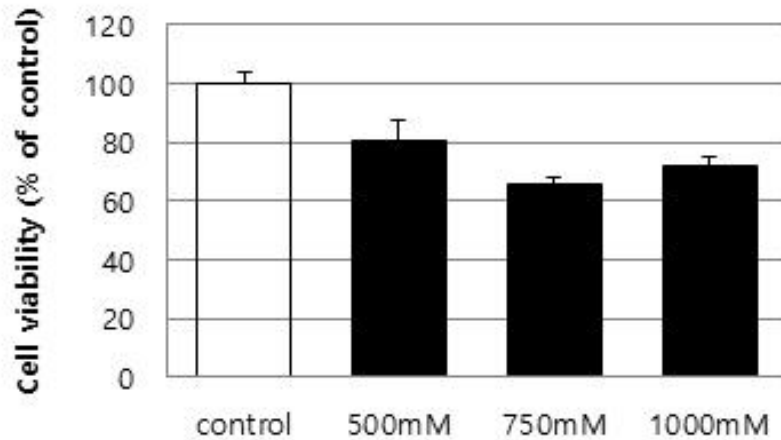
② J50 / J70: 제주산 건조병풀 50% / 70% EtOH 추출물

③ M50 / M70: 마다가스카산 건조병풀 50% / 70% EtOH 추출물

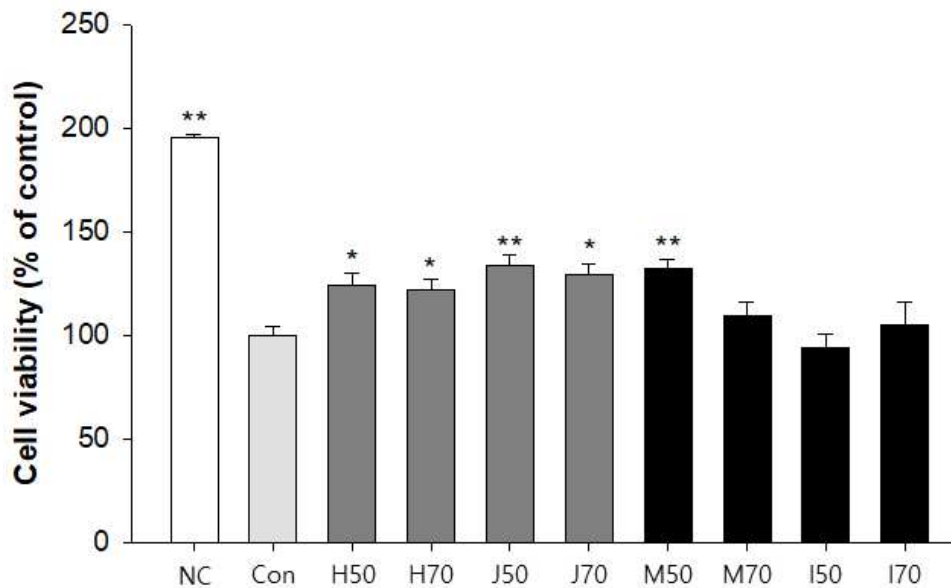
④ I50 / I70: 인도산 건조병풀 50% / 70% EtOH 추출물

(3) 실험결과

(가) 알코올에 의한 유의한 세포독성 농도를 설정하고자 HepG2 세포에 세포독성을 측정 한 결과 EtOH 750 mM에서 가장 우수한 독성결과가 측정되었음



(나) 상기 결과를 근거로 산지별 병풀추출물의 세포보호 효과를 측정한 결과, 제주 50%, 마다가스카 50% EtOH 추출물에서 가장 우수한 보호효과가 관찰되었으며, 합천산 50%와 제주산 70% EtOH 추출물에서도 우수한 효과가 관찰되었음



나. 독성물질 유도 간손상 시험법 확립에 따른 산지별 병풀추출물의 보호효과

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 독성물질 유도 간세포 손상에 대한 각 산지별 병풀추출물의 보호효과를 측정하고자 독성을 나타내는 galactosamine 농도를 설정하여 시험법을 확립함

(나) 상기 알코올성 간손상 보호효과 연구에서 50% EtOH 추출물의 효능이 70% EtOH 추출물보다 높을 것을 확인하여 본 연구에서는 50% EtOH 추출물을 2 농도로 처리하여 보호효과를 확인함

(2) 재료 및 방법

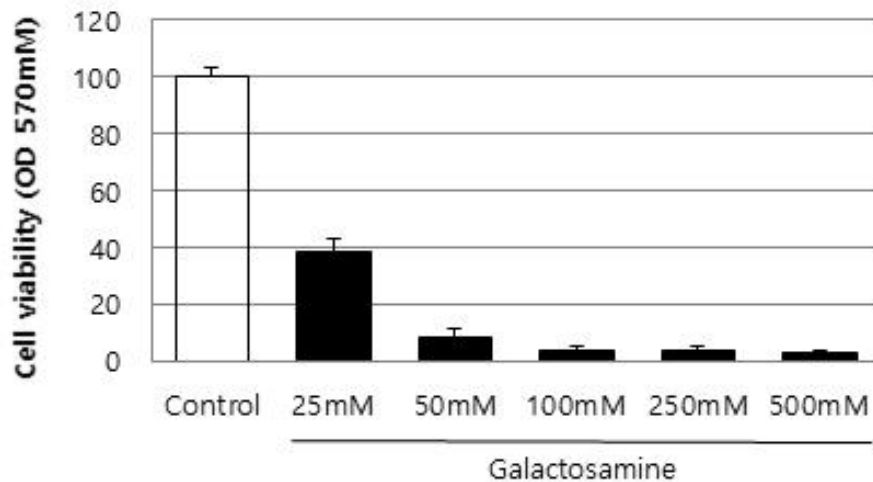
(가) HepG2 (Human hepatocellular carcinoma) cell line을 96 well plate에 seeding 후 galactosamine을 농도별 (25~500 mM)로 처리하였으며, 24시간 후 MTT assay를 이용하여 세포독성을 측정함

(나) HepG2 cell seeding 후 약 60% 세포독성을 나타낸 25 mM의 galactosamine을 처리하고, 제조된 각각의 산지별 병풀 50% EtOH 추출물을 50, 100 µg/mL로 처리하여 galactosamine에 의한 세포보호 효과를 측정함

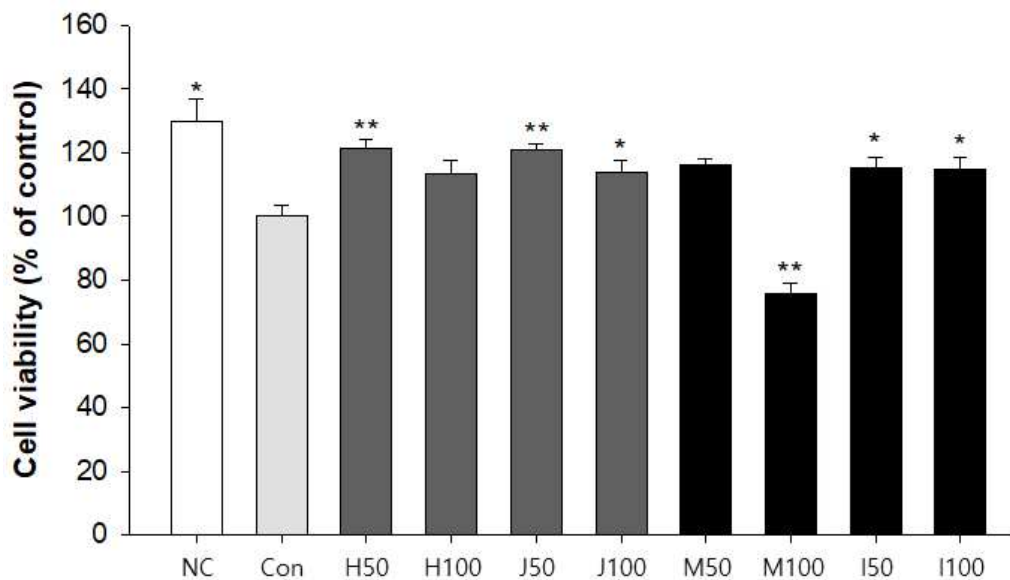
- ① H50 / H100: 합천산 건조병풀 50% EtOH 추출물 50 / 100 µg/mL 처리
- ② J50 / J100: 제주산 건조병풀 50% EtOH 추출물 50 / 100 µg/mL 처리
- ③ M50 / M100: 마다가스카산 건조병풀 50% EtOH 추출물 50 / 100 µg/mL 처리
- ④ I50 / I100: 인도산 건조병풀 50% EtOH 추출물 50 / 100 µg/mL 처리

(3) 실험결과

(가) Galatosamine에 의한 유의한 세포독성 농도를 설정하고자 HepG2 세포에 세포독성을 측정한 결과 최저 농도 25 mM에서 약 60%의 세포독성을 나타냄



(나) 상기 결과를 근거로 산지별 병풀 50% EtOH 추출물의 galactosamine에 의한 세포보호 효과를 측정한 결과, 합천산과 제주산 병풀 50% EtOH 추출물 50 µg/mL 처리군에서 가장 우수한 보호효과가 관찰되었으며, 국내산 병풀의 경우 기능성 측면에서 원재료의 특성이 유사하다고 판단하였음



다. 병풀 주요성분의 간 손상 보호 효과

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀에는 약 12% 정도의 폴리페놀이 함유되어 있다고 보고되어 있으며, 중요한 생리 활성 성분으로 트리터펜 계열의 asiaticoside (7.84 mg/g), asiatic acid (4.62 mg/g), madecassoside (2.84 mg/g), madecassic acid (1.44 mg/g) 등이 알려져 있음 (Hashim 등, 2011)
- (나) 병풀 트리터펜 계열의 주요성분 4종에 대한 간 손상 보호 효과를 측정하기 위해 galactosamine 유도 간 세포 손상 모델에서 보호 효능을 측정하고, 유효성분을 선정하고자 하였음

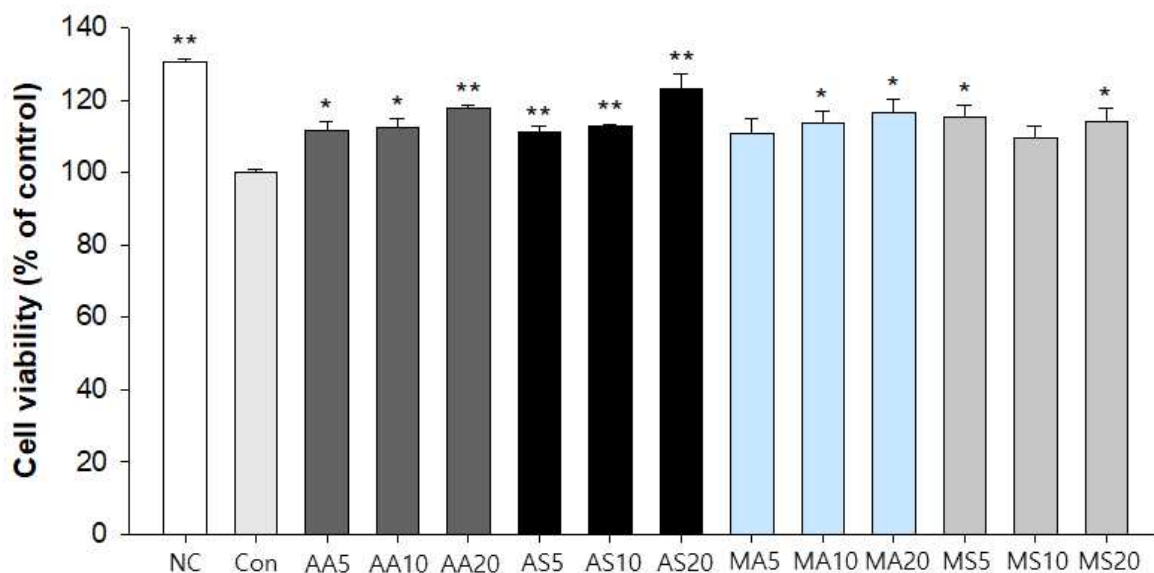
(2) 재료 및 방법

- (가) HepG2 cell seeding 후 25 mM의 galactosamine을 처리하고, 트리터펜 계열의 성분 4종을 5, 10, 20 µg/mL로 처리하여 galactosamine에 의한 세포보호 효과를 측정함
- (나) 주요성분 4종

소재	기능 성분
병풀 (4종)	Asiatic acid (AA)
	Asiaticoside (AS)
	Madecassic acid (MA)
	Madecassoside (MS)

(3) 실험결과

- (가) 병풀 주요성분 4종 (AA, AS, MA, MS)의 galactosamine에 의한 세포보호 효과를 측정한 결과, asiaticoside 20 µg/mL에서 가장 우수한 보호 효과를 나타내었으며, 해당 결과를 바탕으로 유효성분을 asiaticoside로 설정하였음



라. 비알코올성 지방간 개선 시험법 확립에 따른 국내산 병풀추출물의 개선효과

(1) 연구 목적 및 방법

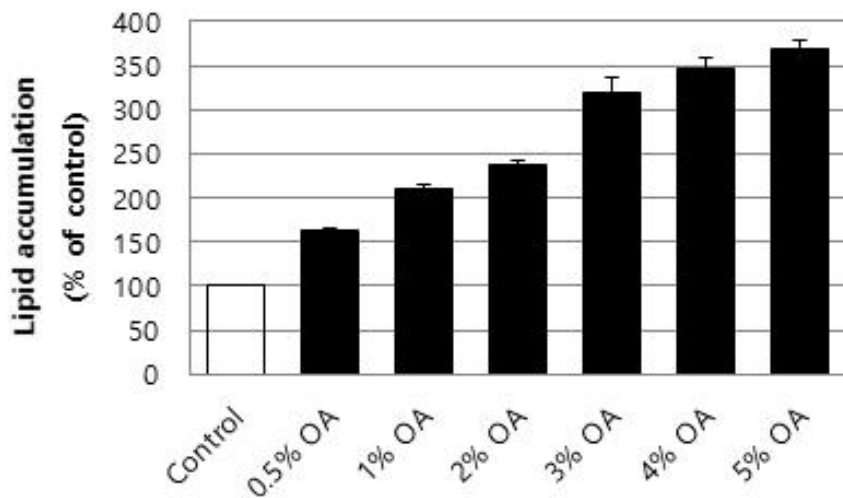
- (가) 비알코올성 지방간에 대한 국내산 병풀추출물의 개선효과를 측정하고자 Oleic acid를 이용하여 시험법을 확립하고자 하였음
- (나) 상기 알코올성 및 독성물질에 의한 간손상 보호효과 연구에서 국내산 병풀추출물의 효능이 수입산 병풀추출물보다 높을 것을 감안하여 본 연구에서는 국내산 (제주산) 병풀 30, 50, 70% EtOH 추출물을 제조하고 개선효과를 확인함
- (다) 병풀 50% EtOH 추출물의 비알코올성 지방간 개선 효능과 염증 개선 효능을 검증하고자 mRNA와 cytokine을 활용하여 마커를 분석함

(2) 재료 및 방법

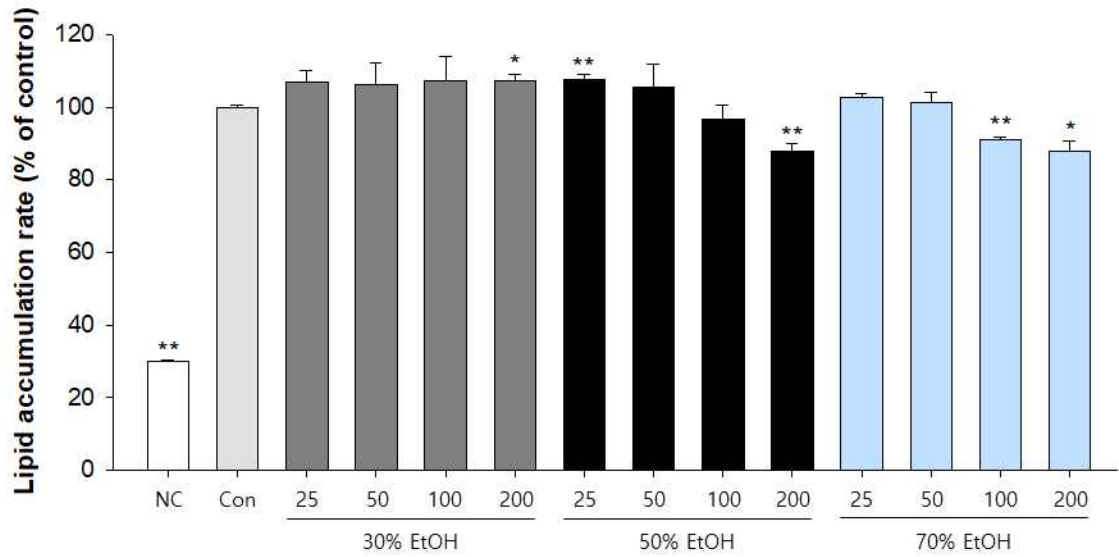
- (가) HepG2 (Human hepatocellular carcinoma) cell line을 96 well plate에 seeding 후 Oleic acid (OA)를 농도별 (0.5~5%)로 처리하였으며, 24시간 후 Nile-red staining (AdipoRed assay reagent, Lonza)을 이용하여 세포 내 지질축적량을 fluorometer (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 조사함
- (나) HepG2 cell seeding 후 적절한 지질축적량을 나타낸 3%의 OA를 처리하고, 제조된 국내산 병풀추출물을 농도별로 처리하여 OA에 의한 간세포내 지질축적 억제효과를 측정함
- (다) HepG2 cell에 3% OA와 병풀 50% EtOH 추출물을 농도별 (50, 100, 200 µg/mL)로 처리하여 PPARα와 γ의 mRNA 발현양상을 qRT-PCR을 통해 분석하였으며, LPS로 유도된 Raw264.7 cell에 병풀 50% EtOH 추출물을 농도별 (50, 100, 200 µg/mL)로 처리하여 NO 분비 양상, ELISA kit을 활용한 TNFα와 IL-6 생성량을 분석함

(3) 실험결과

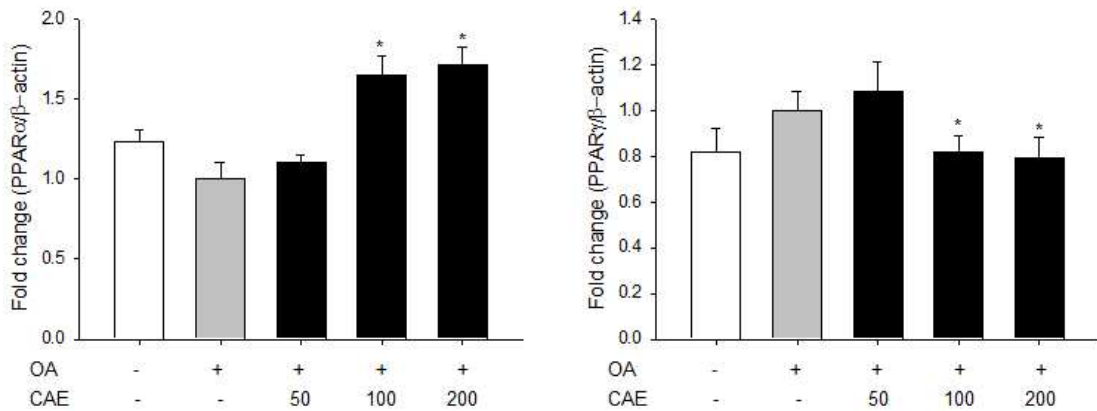
- (가) HepG2 세포에 1% 이상의 OA 처리 시 지방축적이 유의하게 증가함을 확인하였으며, 3% OA에서 적절한 지방축적량을 확인함
※ 그 이상의 OA 처리 시 지방축적량은 처리양에 비해 적게 증가함을 확인



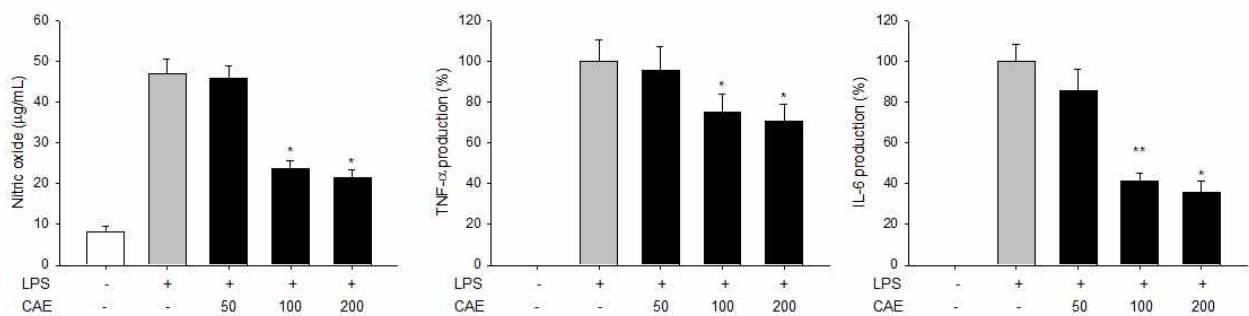
- (나) 상기 결과를 근거로 국내산 (제주산) 병풀 30, 50, 70% EtOH 추출물의 OA에 의한 지질축적 억제효과를 측정한 결과, 세포독성에 비해 50%와 70%의 병풀 EtOH 추출물에서 우수한 효과가 관찰됨



(다) 병풀 50% EtOH 추출물(CAE)의 세포 내 지방합성 (PPAR γ)과 지방산화 (PPAR α)에 작용하는 유전자의 조절 효능을 측정한 결과, 유의적으로 PPAR α 의 발현을 증가시키고, PPAR γ 의 발현을 억제하였음



(라) Raw264.7 세포에서 병풀 50% EtOH 추출물(CAE)의 NO 생성억제, TNF- α 및 IL-6 단백질 생성 억제 효과를 확인함



마. 간 건강 최종 원료 도출

(1) 간 손상 보호효과 및 간 세포 내 지질축적 억제 효과를 근거로 국내산 병풀 50% EtOH 추출물이 간 기능 개선 원료로 적정하다 판단하였음

(2) 간 기능 개선 기능성 원료 후보원료로 최종 병풀 50% EtOH 추출물을 선정하고, 세포 보호 효과가 우수한 asiaticoside를 유효/지표성분으로 하여 최적추출공정 확립과 대량 생산을 추진함

4. 망막질환 개선 in vitro 기능성 평가

가. EtOH % 농도별 병풀추출물의 시신경세포 및 망막세포 보호 효과

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 국내산 병풀추출물의 망막질환 개선 효능을 확인하기 위하여 시신경세포와 망막색소 상피세포에서의 세포 증식능을 측정함

(나) 제조된 EtOH %별 병풀추출물과 주용성분의 세포 증식능을 측정함으로써 최종 원료와 유효성분을 선정하고자 하였음

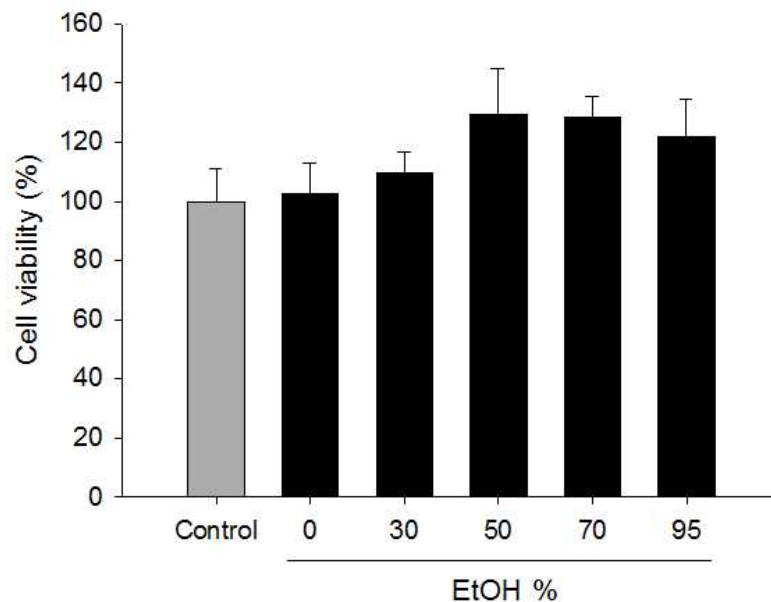
(2) 재료 및 방법

(가) RGC-5 (retinal ganglion cell 5)와 ARPE-19 (adult retinal pigment epithelium 19) cell line을 96 well plate에 seeding 후 EtOH을 농도별 병풀추출물을 단일농도 (100 μ g/mL) 또는 농도별 (6.25~200 μ g/mL)로 처리하였으며, 48시간 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식능을 측정함

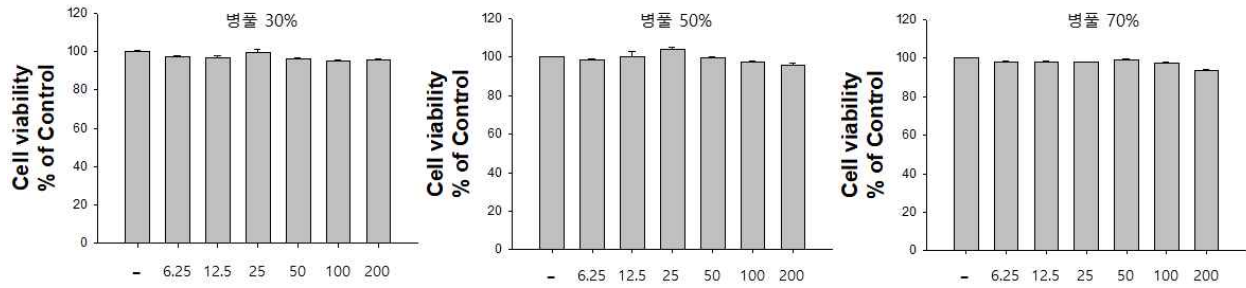
(나) 상기 동일한 방법으로 병풀 주요성분 4종 (asiaticoside, asiatic acid, madecassoside, madecassic acid)의 ARPE-19 세포 증식능을 측정함

(3) 실험결과

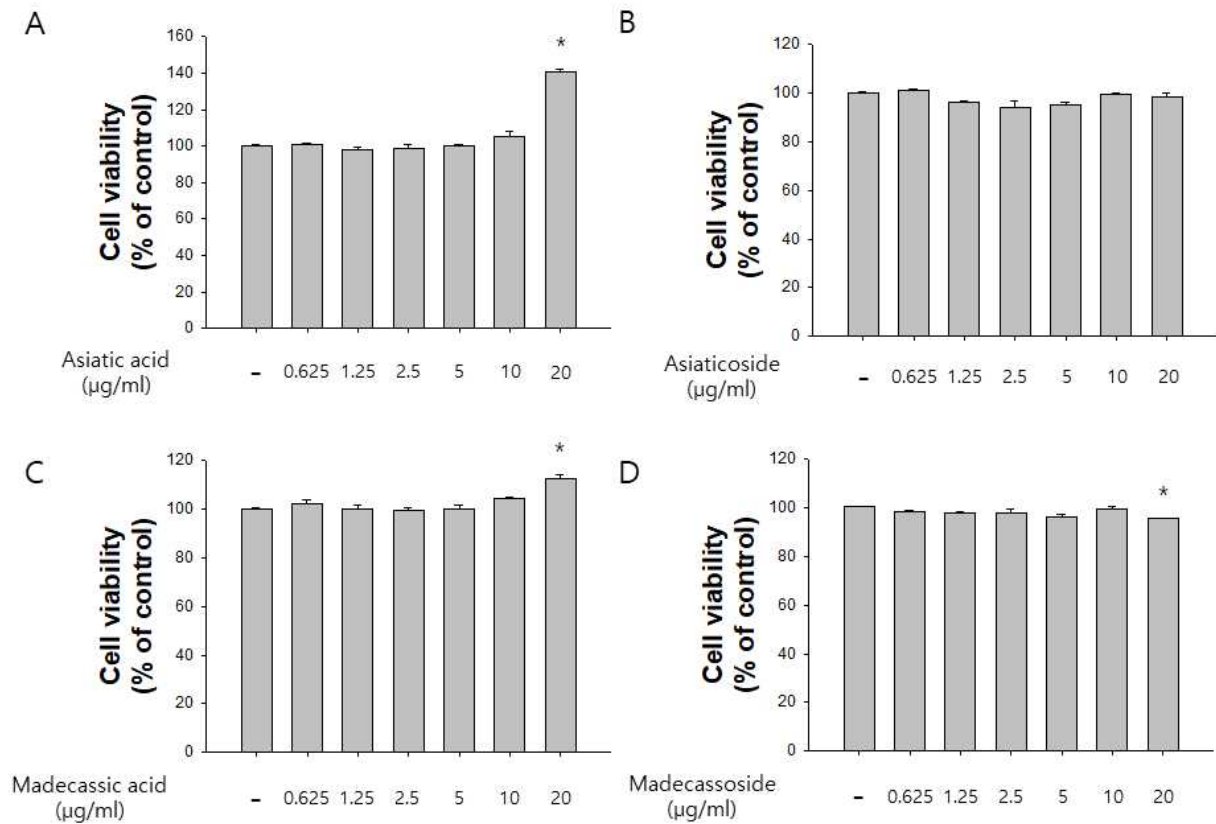
(가) RGC-5 cell에서의 병풀 EtOH %별 추출물의 세포 증식능을 측정한 결과 50% EtOH 추출물에서 매우 우수한 증식효과가 관찰됨



(나) ARPE-19 cell에서 병풀 30, 50, 70% EtOH 추출물의 세포 증식능을 측정한 결과, 병풀 30% 및 50% EtOH 추출물 25 μ g/mL 농도에서 증식효과가 관찰됨



(다) 병풀 주요성분의 ARPE-19 cell의 세포증식능을 측정된 결과, asiatic acid와 madecassic acid에서 우수한 세포 증식 효능이 관찰되었음



나. 망막세포의 산화적 손상 유도에 따른 병풀주정추출분말 및 주요성분의 보호 효과 검증

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 과량의 염화코발트 (CoCl_2)는 저산소증과 비슷한 상황을 유도하여 미숙아 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령관련 황반변성 및 녹내장 등과 같은 병증을 유도한다고 알려져 있으며 (Grimm and Willmann, 2012), 이러한 산화적 손상에 대한 보호효능을 검증하기 위하여 먼저 최적의 CoCl_2 농도를 설정하고자 하였음

(나) 상기 구축된 시험법을 이용하여 기능성 원료 후보원료로 제조된 병풀주정추출분말 (병풀 50% 주정추출물)과 주요성분의 망막색소상피세포 저산소증에 의한 보호효과를 검증하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

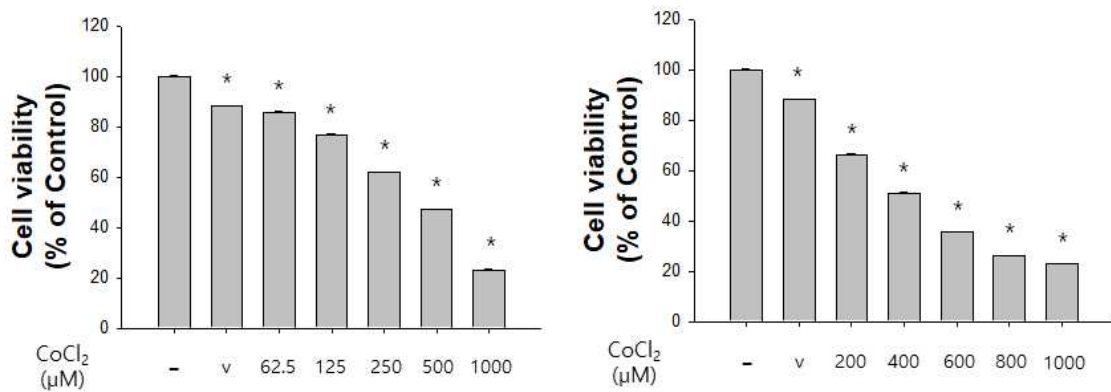
(가) ARPE-19 cell line을 96 well plate에 seeding 후 CoCl_2 을 62.5~1,000 μM 농도로 24

시간 처리하였으며, MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정함

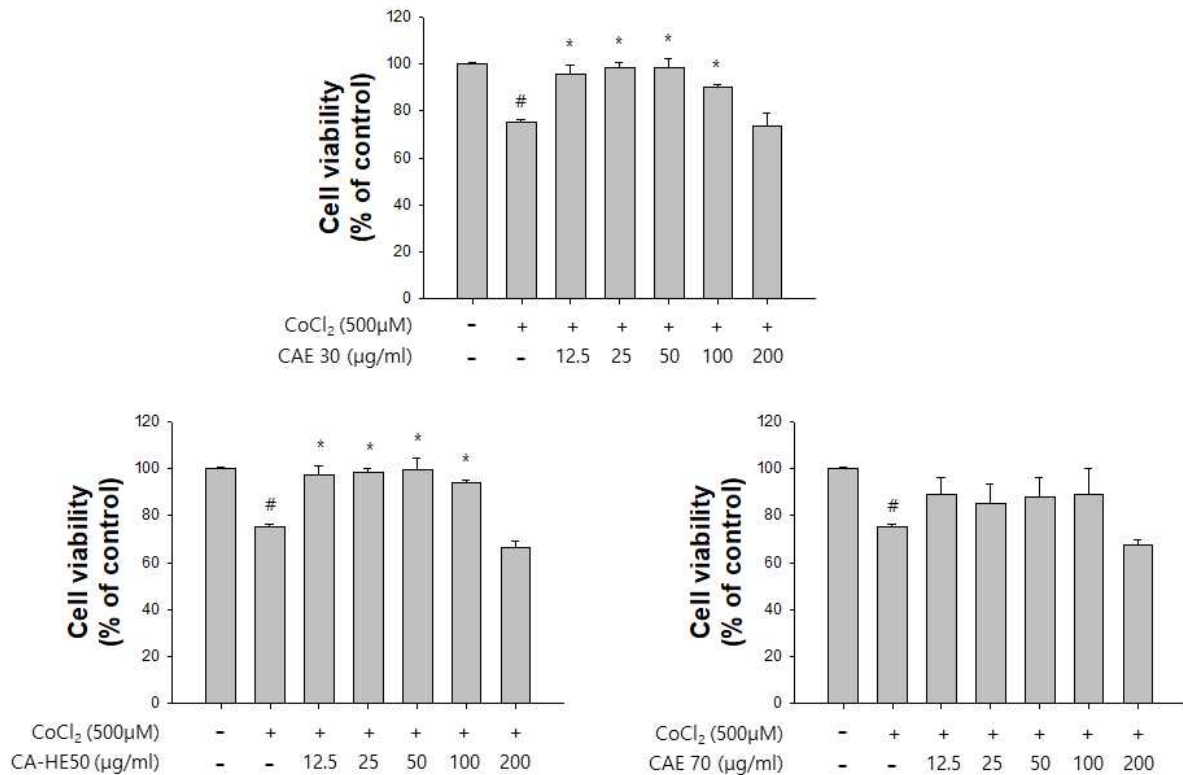
(나) 상기 시험으로 설정된 CoCl_2 500 μM 을 seeding된 ARPE-19 cell에 처리하고, 병풀주정추출분말과 비교용 병풀 30%, 70% EtOH 추출물, 주요성분 3종 (asiaticoside, asiatic acid, madecassic acid)의 ARPE-19 세포 보호 효과를 MTT assay를 이용하여 측정함

(3) 실험결과

(가) ARPE-19 cell에서 CoCl_2 의 독성농도를 측정한 결과, CoCl_2 의 IC_{50} 값은 1차 441.4 μM , 2차 426.5 μM 로 나타났으며, 최종 시험에서는 1~2차 값의 유사치인 500 μM 을 처리하여 시험을 진행함



(나) 상기 구축된 시험법을 바탕으로 병풀주정추출분말 (CA-HE50)과 병풀 30%, 70% EtOH (CAE30, 70)추출물의 망막색소상피세포 보호효과를 측정한 결과, 본 개발원료인 병풀주정추출분말에서 매우 우수한 산화적 손상에 따른 세포보호 효과가 관찰되었으며, 30% EtOH 추출물에서도 우수한 효과가 관찰되었음



(다) 기능/지표성분의 설정을 위해 병풀 주요성분 3종(asiaticoside, asiatic acid, madecassic acid)의 망막색소상피세포 보호효과를 측정된 결과, 모두 유의한 보호 효능이 관찰되었으며, 그 중 asiatic acid와 asiaticoside에서 우수한 보호 효능이 관찰되었음

다. 망막세포의 광산화에 따른 병풀주정추출분말의 보호 효과 검증

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 산화된 A2E (N-retinyl-N-retinylidene ethanolamide)는 망막색소상피 및 관련 광수용기의 변성을 유도한다고 알려져 있으며 (Holz et al, 2001; Sparrow et al., 2003), 이러한 광산화에 따른 보호효능을 검증하기 위하여 먼저 시험법을 구축하고자 하였음

(나) 상기 구축된 시험법을 이용하여 기능성 원료 후보원료로 제조된 병풀주정추출분말 (병풀 50% 주정추출물)의 A2E 산화 억제 효능과 산화된 A2E에 의한 망막색소상피세포의 보호효과를 측정하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

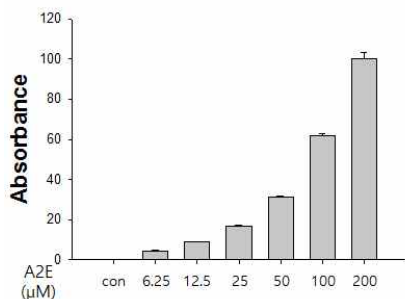
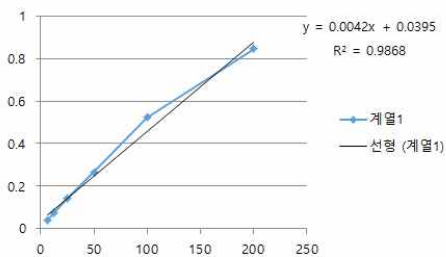
(가) 기존 문헌을 참고하여 A2E 100 μM 처리 후 430 nm에서 광산화를 유도하였으며, 시험법 확립을 위해 자외선 조사 시간 (10분~45분)에 따른 A2E 광산화 정도를 평가함

(나) 상기 시험을 기반으로 430 nm에서 30분간 A2E를 조사하였으며, 병풀추출분말 처리에 따른 A2E의 산화 정도를 평가함

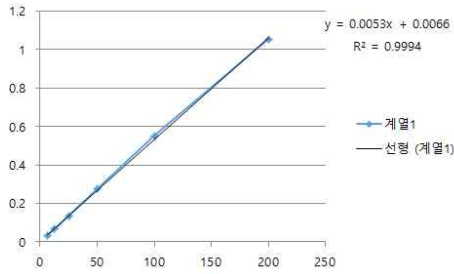
(다) A2E 산화적 손상에 따른 병풀주정추출분말의 망막색소상피세포 보호효과를 측정하기 위해 ARPE-19 cell을 96 well plate에 seeding 한 후 병풀주정추출분말과 양성대조군 루테인을 2시간 동안 전처리하였으며, 30분간 UV를 조사한 후 세포생존율을 측정함

(3) 실험결과

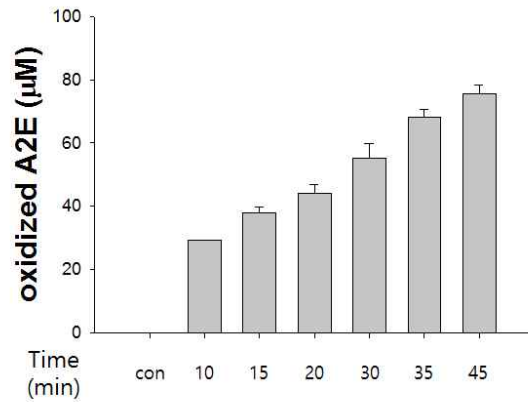
(가) Cell free system에서 산화된 A2E의 측정방법, 시간에 따른 A2E의 산화량을 측정한 결과, 430 nm에서 30분간 UV 조사 시 50%의 산화가 이루어지는 것을 확인함



A2E (100 μM)		
UV irradiation time (min)	0	10
Absorbance Mean	0.60±0.002	0.39±0.012
Standard Curve Assignment Value Mean	120.4±0.45	70.4±2.86



UV irradiation time (min)	Oxidized A2E (μM)
10 min	29.2±0.20
15 min	38.0±1.93
20 min	44.1±2.82
30 min	55.3±4.62
35 min	68.2±2.30
45 min	75.6±2.69



(나) 상기의 구축된 방법으로 병풀주정추출분말 처리에 따른 A2E 산화량을 조사한 결과, 병풀주정추출분말은 농도의존적으로 A2E의 산화를 억제하였음

Groups		Oxidized A2E (μM)
NC		11.8±0.67
Control		70.2±0.90
Lutein (μg/mL)	30	55.2±0.38
병풀주정추출분말 (μg/mL)	25	63.2±0.91
	50	61.2±0.62
	100	60.0±0.56

(다) 망막색소상피세포에서 산화된 A2E에 의한 병풀주정추출분말의 세포보호 효과

- ① A2E는 세포내에서 대사 후 생성되는 부산물로 망막색소상피세포내에서 배출되지 않고 축적되며, 광자극이나 여러 산화적 스트레스에 노출되면 산화형태의 A2E로 전환되어 망막색소상피세포의 사멸을 유도함
- ② A2E 광산화에 의한 망막색소상피세포 (ARPE-19) 보호 효과를 측정하기 위해, 병풀주정추출분말을 처리하여 망막색소상피세포의 보호 효능을 측정한 결과, 농도의존적으로 세포 손상을 억제하였으며, 양성대조군인 루테인과 비슷한 수준의 효능을 나타냄

Groups		Cell viability (% of NC)
NC		100.0 ± 7.86
Control		61.4 ± 8.00
Lutein (μg/mL)	30	71.5 ± 8.22
병풀주정추출분말	25	68.7 ± 4.45

(μg/mL)	50	70.6 ± 0.96
	100	71.5 ± 1.87

5. 병풀주정추출분말 및 주요성분의 항염증 및 당이용성 증대 효과

가. 병풀주정추출분말 및 주요성분의 항염증 효과

(1) 연구 목적 및 방법

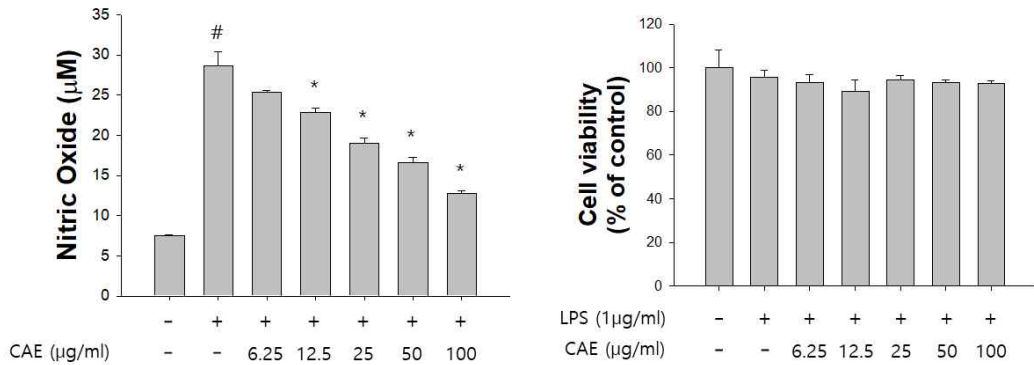
- (가) 간 질환 및 눈 질환의 경우 염증의 발생은 중증으로의 발전을 유도하며, 특히 간 질환의 경우 지방간에서 간염으로 발달하는 주요 원인이 됨
- (나) 따라서 병풀주정추출분말 및 주요성분의 항염증 효능을 조사하기 위해 Raw264.7 cell에서 주요 마커를 분석하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

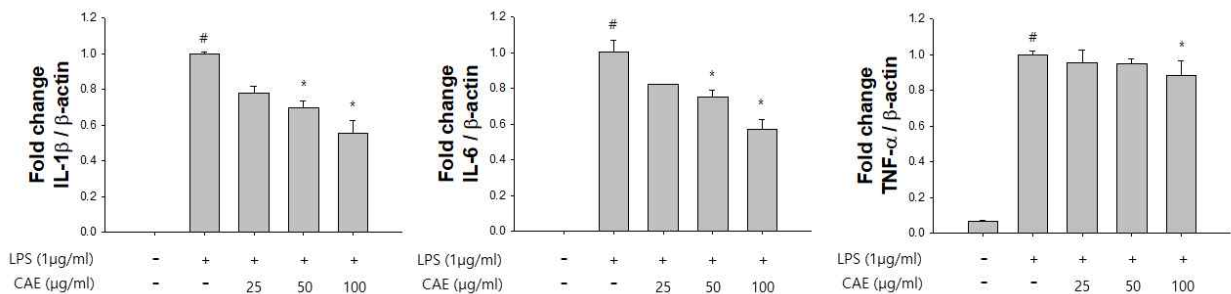
- (가) LPS 1 μg/mL로 유도된 Raw264.7 cell에서 병풀주정추출분말 및 주요성분 4종 (asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid, madecassoside)의 NO 생성량을 조사하였음
- (나) 또한, LPS 1 μg/mL로 유도된 Raw264.7 cell에서 병풀주정추출분말의 염증성 사이토카인 발현양상을 mRNA와 단백질 수준에서 조사하였음

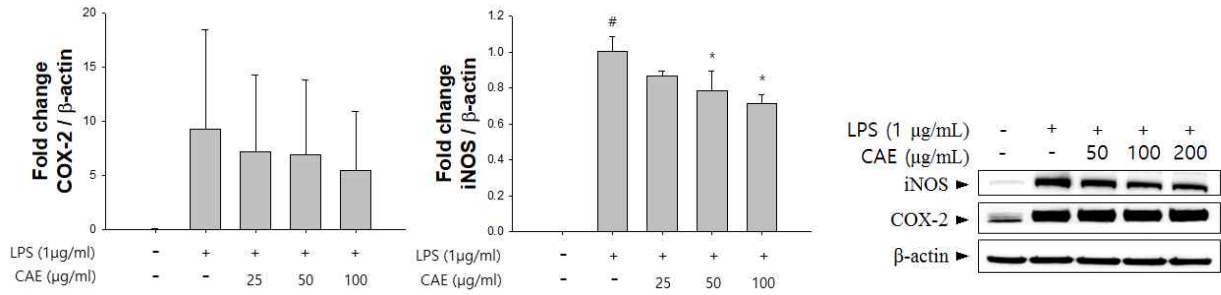
(3) 실험결과

- (가) 병풀주정추출분말을 처리하였을 때 NO 생성량이 농도의존적으로 억제됨을 확인

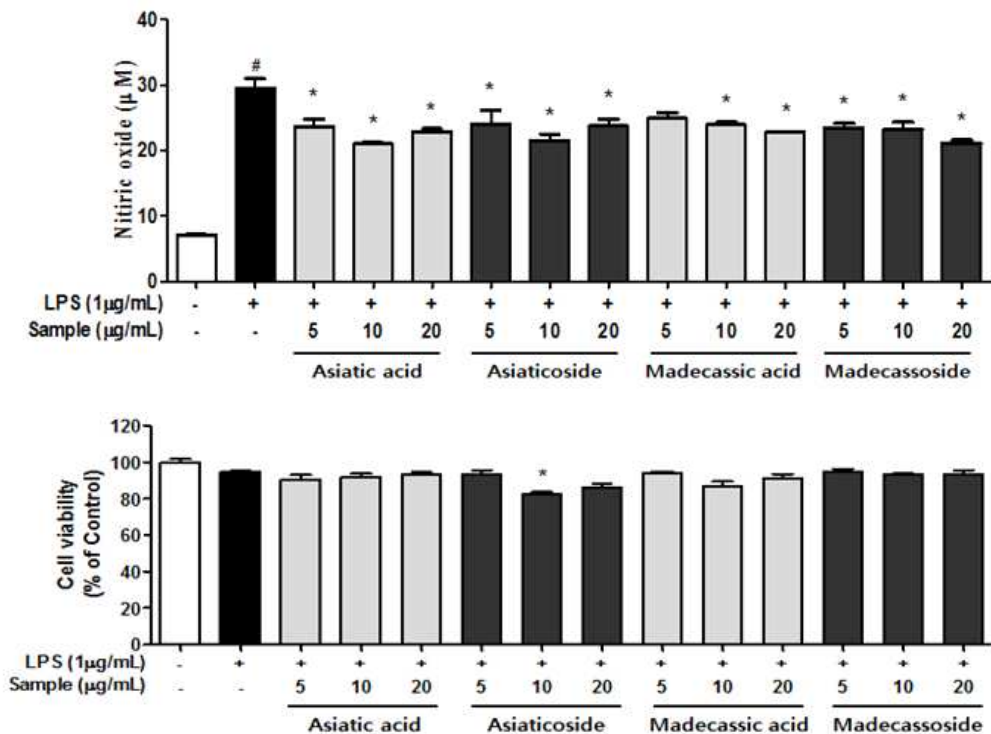


- (나) 병풀주정추출분말을 처리하였을 때 염증성 사이토카인 (IL-1β, IL-6, TNFα, COX-2, iNOS)을 효과적으로 억제하였음





(다) 또한, 병풀의 주요성분에 대한 NO 생성 억제 효과를 측정 한 결과, 큰 폭은 아니지만, 4성분 모두 NO의 생성을 억제하였음



나. 근육 세포 및 간 세포에서 병풀주정추출분말의 기전 연구

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 기존 문헌과 세포 회복력 증가 효능을 기반으로 병풀주정추출분말의 당이용성 (glucose uptake) 효능을 인슐린과 비교하여 근육세포에서 1차 평가하였음
- (나) 근육세포에서 당이용성 증대 효능을 확인하여 간 세포에서도 같은 효능이 나오는지 확인함

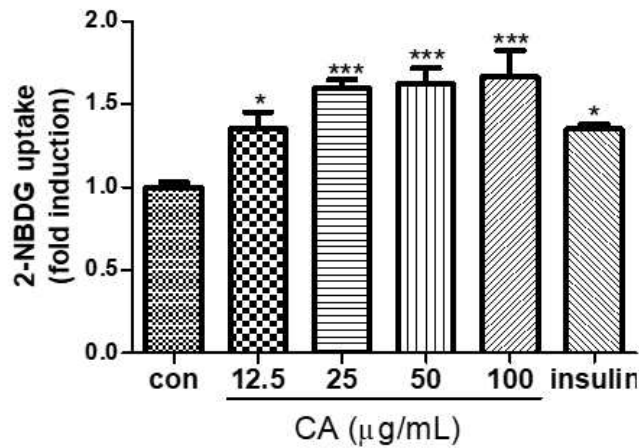
(2) 재료 및 방법

- (가) C2C12 (mouse myoblast)를 96 well plate에 seeding한 후 horse serum으로 분화시키고, 병풀주정추출분말을 농도별로 처리한 다음 24시간 후 100 µM의 2-NBDG을 30분간 처리하여 glucose uptake 효과를 fluorometer (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 측정하였음
- (나) 또한, HepG2 (Human hepatocellular carcinoma) cell을 96 well plate에 seeding한 후

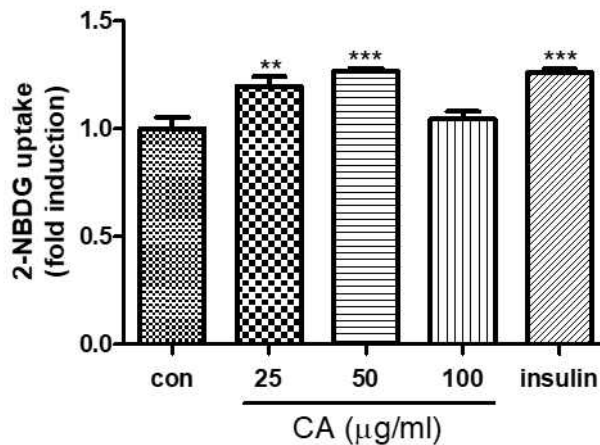
상기와 같은 방법으로 병풀주정추출분말의 glucose uptake 효과를 측정하였음

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말을 처리하였을 때 근육세포 (C2C12 cell)에서 당이용성 증대 효능 (glucose uptake)이 매우 우수하게 관찰되었으며, 양성대조군인 인슐린 (100 nM)보다 증가하였음



(나) 병풀주정추출분말을 처리하였을 때 HepG2 세포에서 당이용성 증대 효능 (glucose uptake)이 우수하게 관찰되었으며, 농도의존적이지는 않지만 50 µg/mL 농도에서 유의적으로 양성대조군인 인슐린 (100 nM)과 비슷한 효능을 나타내었음



다. 망막색소상피세포에서 병풀주정추출분말과 주요성분의 기전 연구

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 상기 근육세포와 간세포에서 관찰된 당이용성 증대 효능을 기반으로 병풀주정추출분말과 주요성분의 당이용성 (glucose uptake) 효능을 인슐린과 비교하여 망막색소상피세포에서 측정함

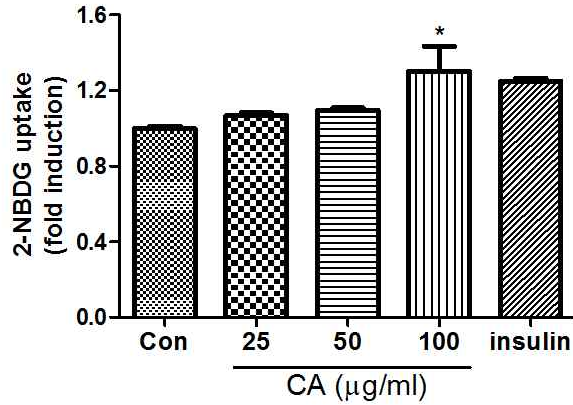
(2) 재료 및 방법

(가) ARPE-19 cell line을 96 well plate에 seeding한 후 병풀주정추출분말과 주요성분 (asiaticoside, asiatic acid, madecassoside, madecassic acid)을 농도별로 처리한 다음 24시간 후 100 µM의 2-NBDG을 30분간 처리하여 glucose uptake 효과를 fluorometer

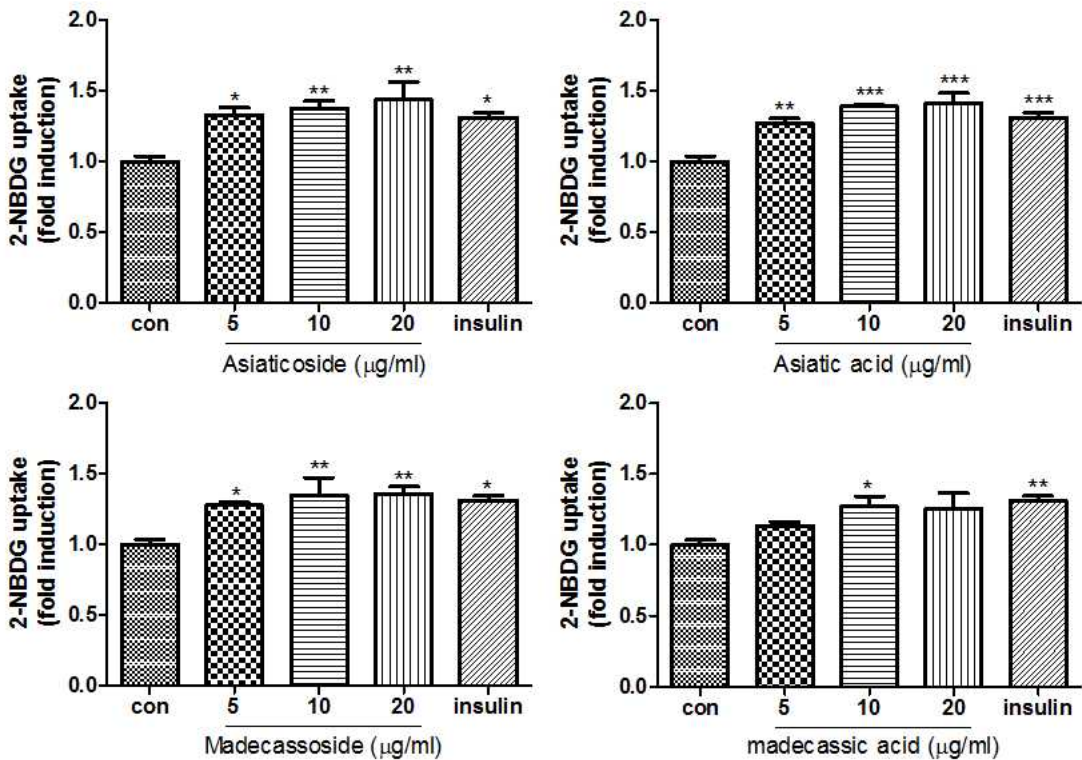
(excitation 485 nm, emission 535 nm)로 측정하였음

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말 100 µg/mL 농도로 ARPE-19 cell에 처리하였을 때 유의적으로 인슐린과 유사한 당이용성 증대 효능이 관찰됨



(나) 주요성분 4종의 당이용성 증대 효능을 측정한 결과, 모든 성분에서 유의적인 당이용성 증대 효능이 관찰되었으며, 특히 asiaticoside와 asiatic acid는 양성대조군인 인슐린 (100 nM) 보다 증가된 당이용성 증대 효능을 나타냄



다. 결론

- (1) 포도당 대사와 에너지 생산은 세포를 보호하는 주요한 요소이며 (Zhao et al., 2008; Huang et al., 2017) 병풀주정추출분말과 주요성분들은 간세포와 망막색소상피세포에서 당이용성을 증대시키므로 세포의 보호 및 회복력을 증가시킬 수 있음
- (2) 따라서, 본 연구개발 원료인 병풀주정추출분말과 주요성분은 세포재생 효과 측면에서

당이용성 증대를 통해 세포의 손상에 대한 보호 및 회복 효과를 나타낼 수 있음

6. 병풀 50% 주정추출물의 지표성분 설정

가. 유효(기능)성분의 분석법 확립 및 함량 분석 연구

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀의 특이성분 중 *in vitro* 기능성 평가에서 도출된 기능성분의 함량 분석을 위해 병풀 50% 주정추출물에서 asiaticoside와 asiatic acid의 분석법을 확립하고자 하였음

(나) 확립된 분석법을 기반으로 1차 asiaticoside와 asiatic acid의 함량 분석을 진행함

(2) 재료 및 방법

(가) Lab scale로 제조된 국내산 병풀 50% 주정추출물과 비교용 70% 주정추출물, 수입산 (마다가스카) 병풀 50% 주정추출물을 대상으로 asiaticoside와 asiatic acid의 함량을 분석함

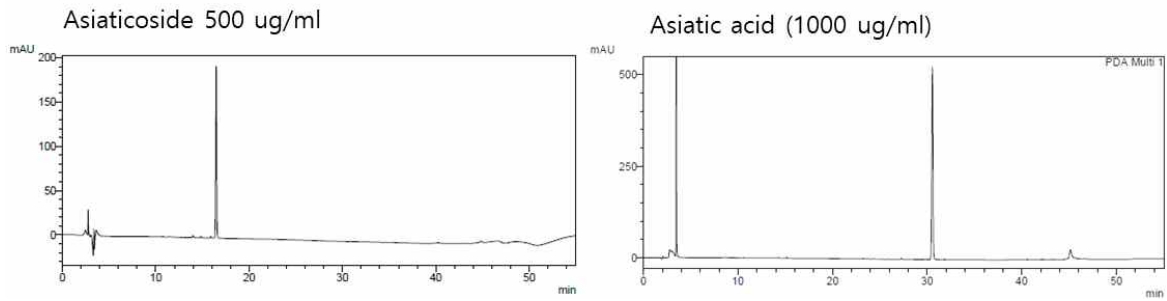
(나) HPLC 분석조건

Detector	PDA detector	
Column	Skypak C18 (4*250 mm, 5 μm)	
Mobile phase	(A) Water, (B) Acetonitrile	
Time (min)	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0	80	20
15	65	35
30	35	65
35	20	80
40	20	80
45	80	20
55	80	20
Flow rate	1 mL/min	
UV Wavelength	206 nm	
Injection volume	10 μL	
Column Temp.	40°C	

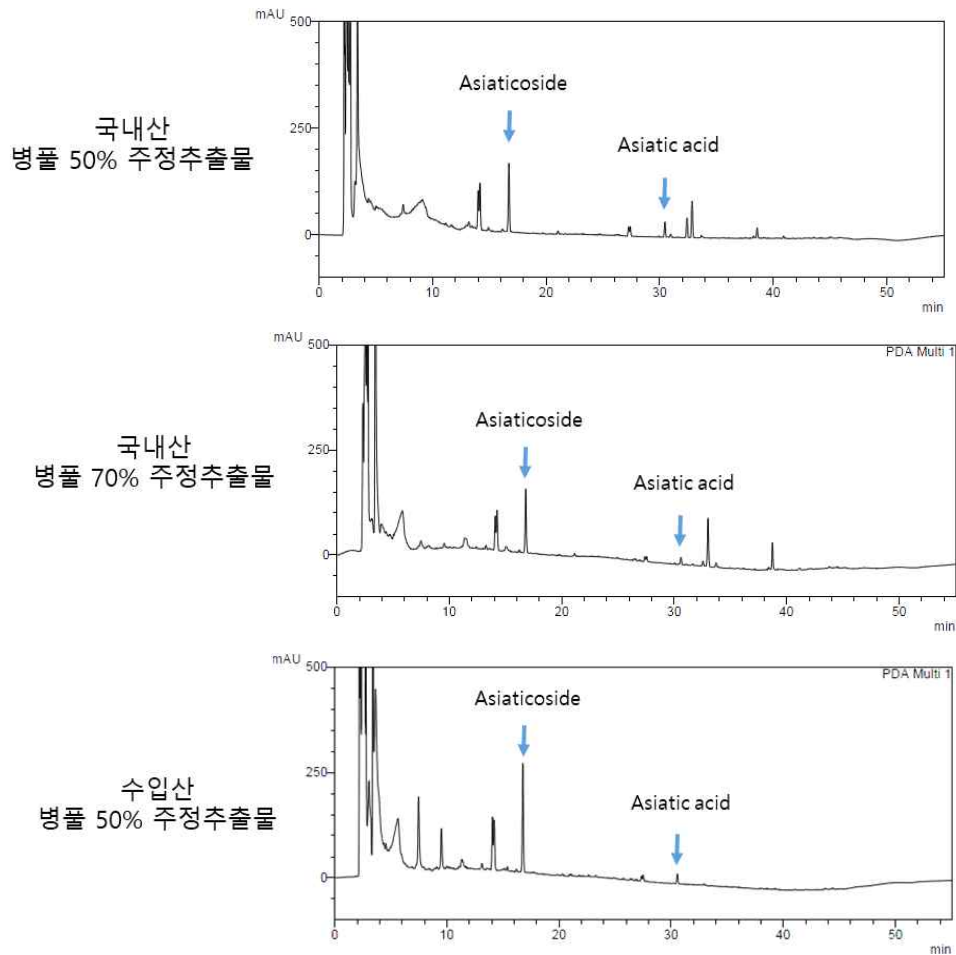
(3) 실험결과

(가) 국내산 병풀 50% 주정추출물과 비교용 70% 주정추출물, 수입산 (마다가스카) 병풀 50% 주정추출물을 대상으로 asiaticoside와 asiatic acid의 함량을 분석한 결과 국내산 병풀은 asiatic acid의 함량이 높았으며, 70% 주정추출물 보다는 50% 주정추출물에서 더 높은 함량을 나타내었고, asiaticoside의 함량은 수입산 병풀에서 많이 검출되었음

① 표준품 분석



② 국내산 병풀 50% 및 70% 주정추출물, 수입산 병풀 50% 주정추출물의 asiaticoside와 asiatic acid의 함량 분석



시료	Asiaticoside (mg/g)	Asiatic acid (mg/g)
국내산 50% EtOH추출물	77.40±19.92	5.23±0.13
국내산 70% EtOH추출물	53.88±6.40	2.75±0.10
수입산 50% EtOH추출물	181.48±13.36	3.47±0.11

(4) 결론

(가) 기능성 원료 후보원료인 병풀 50% 주정추출물의 asiaticoside와 asiatic acid의 함량을

분석한 결과 asiaticoside의 함량이 약 15배 높은 것으로 확인되어, 최종 연구개발 원료의 지표성분을 asiaticoside로 설정하고, 공인인증기관에서 분석법 밸리데이션을 추진함

7. 병풀주정추출분말 3 batch 제조 (GMP grade)

가. 국내산 병풀 구입


(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말의 GMP grade 대량생산을 위하여 제주산과 동등성이 확인된 합천산 병풀을 구입하여 1차 대량생산을 진행하고자 하였음
- (나) 과제 종료 후 제주도에 재배단지가 구축되면 제주산 병풀으로 산업화 진행

(2) 재료 및 방법

- (가) 합천산 병풀 100 kg 구입

원산지증명원	
원재료명	건조병풀잎 Dried Centella asiatica Leaves
원산지	국내산
납품자	전창욱 [인]
생산지	[인]
<p>원재료납품에 관한 원산지표기가 사실임을 증명함. 2017년 11월 08일</p> <p style="text-align: right;">전창욱 (인)</p> <p>납품처 : 에이온엘에스</p>	



(3) 결과

- (가) 형태학적 구별법을 통해 병풀임을 확인함

- ① 뿌리가 내리는 마디 근처에 2개의 비늘 같은 퇴화엽이 있으며, 정상엽은 비늘 같은 잎에서 액생하고 엽병의 길이는 4~20cm 임.
- ② 엽신은 신원형이고, 지름 2~5cm로서 표면은 광택이 나며, 가장자리에 둔한 톱니가 있음

- (나) 국내산 (합천) 병풀을 구입하여 형태적 특징을 조사한 결과, 수입산 병풀과 다르게

잎자루의 길이가 길었으며, 잎과 잎자루의 비율은 약 6:4 인 것으로 확인함

(다) 하우스 재배에 따른 물 공급과 차광 설정 시 잎자루의 길이가 길어지고, 노지에서 재배될 경우 잎자루의 길이가 짧아짐을 농업법인(주)트리즈바이오텍을 통해 확인

나. GMP grade 병풀주정추출분말 3 batch 대량생산

(1) 연구 목적 및 방법

(가) Pilot scale 병풀주정추출분말 제조를 통해 제조공정도를 확립함

(나) 기능성 연구 및 성분 분석 연구, 고시형 제품 및 인체적용시험약 제조를 위해 대량생산을 진행하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 동결건조 제조 시 인습의 문제가 발생하여 원료 제조 시 덱스트린이 포함된 분무건조 공정을 추가함

(나) 병풀주정추출분말 (50% 주정추출분말) 공정도 확립



(3) 연구결과

(가) 제조공정도를 기반으로 GMP grade 병풀주정추출분말을 대량생산 (3 batch) 하였음

① 제조번호: 20171123, 20171123-01, 20171123-02

(나) 병풀 50% 주정추출물 (덱스트린 미포함)의 수율은 26.9%이었으며, 병풀주정추출분말 (덱스트린 포함 원료)의 최종 수율은 38.4%이었음

① Lot No. 20171123의 제조지시기록서 (대표 페이지)

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 (병 풀 주 정 추 출 분 말)			문서번호	DHP-201-207	
				보존	3년	Page

제 품 명	병풀주정추출분말				
-------	----------	--	--	--	--

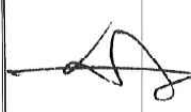

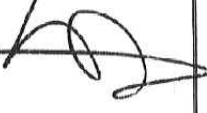
Lot No.	20171123	유통기한	2019.11.22	제조단위	20kg
제조지시일	2017.11.20	제조시작일	2017.11.20	제조완료일	2017. 11. 22
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김상준

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			병풀추출물 (고형분100%로서)	70	70	26.8	Rtu	☞
2	2017.09.27		덱스트린 (DE10/3)	30	30	11.5	Rtu	☞
합계				100		38.3	Rtu	☞

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	확 인	
	칭량실 온습도 확인	온도 : 27 °C	습도 : 20 %

특기사항	
------	--

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)/완포장	기 타
제조일자	2017.11.20 ~ 11.21	2017. 11. 22	2017. 11. 22	
공정투입량	100	38.3	38.3	
실제생산량	(실 32.76) 26.8	38.3	29.0	
수 율(%)	(32.76%) 26.8%	100%	25.7%	

비 고 * 농축액 - 20kg FD 용도로 keeping.	결 재		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자
			

제조지시기록서(기타공품-건조분말)

② Lot No. 20171123-01의 제조지시기록서 (대표 페이지)

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 (병 풀 주 정 추 출 분 말)			문서번호	DHP-201~207	
				보존	3년	Page

제 품 명	병풀주정추출분말				
-------	----------	--	--	--	--

Lot No.	20171123-01	유통기한	2019.11.22	제조단위	10kg
제조지시일	2017.11.20	제조시작일	2017.11.20	제조완료일	2017.11.23
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김삼준

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			병풀추출물 (고형분100%로서)	70	70	9.40	[Signature]	최원재
2	2017.07.27		덱스트린 (DE1013)	30	30	4.03	[Signature]	최원재
합계				100			[Signature]	최원재

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	확인	
	칭량실 온·습도 확인	온도 : 20 °C	습도 : 20 %

특기사항

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)/완포장	기 타
제조일자	2017.11.20 ~ 11.21	11.23	11.23	
공정투입량	35	13.43	13.43	
실제생산량	9.4	13.43	10.00	
수 율(%)	26.86%	100%	74.46%	

비 고	결 재		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자
	[Signature]	[Signature]	[Signature]

③ Lot No. 20171123-02의 제조지시기록서 (대표 페이지)

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 (병 폴 주 정 추 출 분 말)		문서번호		DHP-201-207	
			보존	3년	Page	1/6

제 품 명	병폴주정추출분말				
-------	----------	--	--	--	--



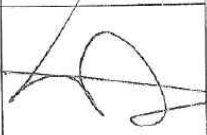
Lot No.	20171123-02	유통기한	2019.11.22	제조단위	10kg
제조지시일	2017.11.20	제조시작일	2017.11.20	제조완료일	2017.11.23
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김상준

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			병폴추출물 (고형분100%로서)	70	70	9.50	김상준	김세균
2	2017.09.27		덱스트린 (DE1013)	30	30	4.07	김상준	김세균
합계				100			김상준	김세균

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	확 인	
	칭량실 온-습도 확인	온도 : 22 °C	습도 : 20 %



특기사항

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)/완포장	기 타
제조일자	2017.11.21 ~ 11.22	11.23	11.23	
공정투입량	31.0	13.57	13.57	
실제생산량	9.50	13.57	10.0	
수 율(%)	27.14%	100%	73.69%	

비 고	결 제		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자
			

④ Lot No. 20171123의 성적서 (3 batch 중 대표원료만 제시)

제 품 시 험 성 적 서

결 제	담당자	인구 소장
		

제품명 : 병풀주정추출분말

시 험 항 목	규 격 기 준	시 험 결 과	비 고
성 상	미황색의고유의 색채과 향미를 가지고, 이머 . 이취가 없다.	적합	
이 물 타르색소 대장균군(/g) 일반세균(cfu/g)	적합 불검출 n=5, c=1, m=0, M=10 1,000이하	적합 불검출 음성 적합	
제조연월일 Lot No. 판 정	2017년11월23일 20171123 적 합		

상기와 같이 제품시험성적서를 제출합니다.

2017년 11월 27일

주식회사 대 호 양 행 품 질 관 리 과

대표이사: 오영석 | 품질관리: 김민준 | 연락처: 02-2600-1234
 품질관리팀 | 서울특별시 강남구 테헤란로 123 | FAX: 02-2600-5678



(다) 고시형 건강기능식품 제조를 위한 식품 품목제조 보고

① 병풀주정추출분말 함유 눈/간건강 (주원료: 루테인/밀크씨슬, 부원료: 병풀주정추출분말) 고시형 건강기능식품 제조를 위한 식품(식품첨가물) 품목제조 신고

발급번호 : 02WC-JHNT-B2QH-4CS9-3CQ8



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호		(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호	
	(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호		(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호	
영업소	명칭(상호)	영입등록번호		
	(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호		(주)비엔에스 서울특별시 강남구 테헤란로 123 1212호	
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	19980364325612
	제품명	병풀주정추출분말		
	유통기한	제조일로부터 24개월 까지		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뿔장애 기재		
	용도 용법	뿔장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	뿔장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	5kg, 10kg, 20kg, 25kg 등 폴리에틸렌 내장 지대 또는 박스포장		
	성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이며, 이취가 없다.		
	품목의 특성 ■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []예 []아니오 [O]해당 없음 ■ 할랄인증 식품 해당 여부 []예 [O]아니오			
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2017년 11월 23일

보고인 임준환

경기도 화성시장 귀하

품목보고번호	19980364325-612				
처리부서	복지국 위생과	처리자성명	염지성	처리일자	2017년 11월 27일

8. 병풀주정추출분말 중 기능/지표성분의 시험법 설정 및 검증

가. 시험법 설정

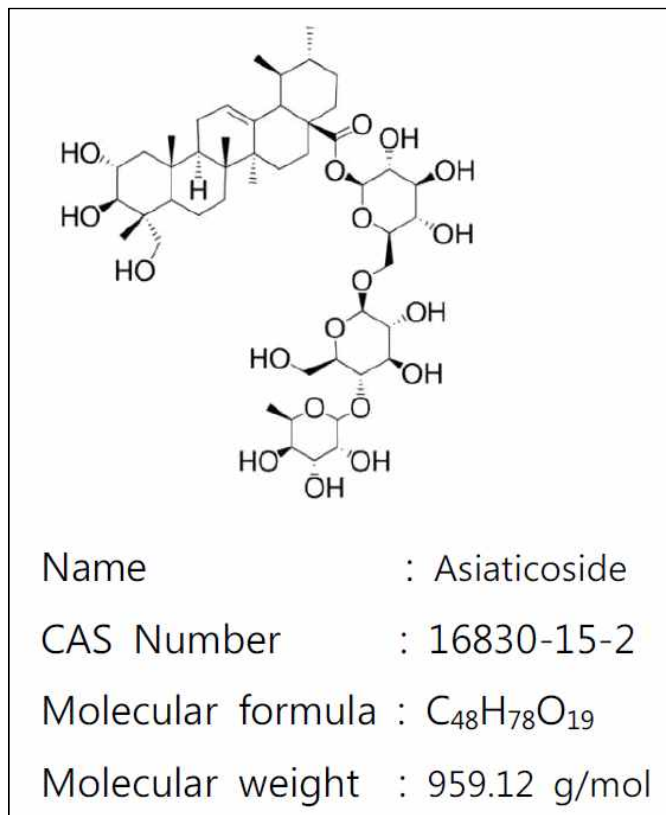
(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀의 특이성분이자 본 연구개발 원료에서 지표성분으로 설정한 asiaticoside 분석 시험법을 설정하고자 1차 설정한 분석법의 적절성을 판단하고자 하였음
- (나) 본 시험법의 검토는 HPLC를 이용하여 병풀주정추출분말 중 asiaticoside의 함량을 정량하는 것을 목적으로 하며, 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시험법 설정 및 검토, 밸리데이션을 진행함

(2) 재료 및 방법

(가) 분석물질 정보

- ① 시료: 병풀주정추출분말 (Lot No. 20171123)
- ② 성상: 흐린 녹갈색의 분말
- ③ 기능/지표성분



(나) 표준용액 및 시험용액 제조

- ① Asiaticoside 일정량을 50% 메탄올에 녹여 준비하였으며, 500, 100, 20, 4, 0.8 µg/mL로 희석하여 사용함
- ② 시료는 50% 메탄올에 녹여 준비하였으며, 1, 10 mg/mL로 제조하고, 이를 상온에서 식힌 후 50% 메탄올로 정용함
- ③ Syringe filter (0.2 µm)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용함

(다) 기기분석 조건

Instrument	Agilent 1260 Infinity																								
Detector	DAD detector																								
Wavelength	206 nm																								
Column	Skypack C18 (5 μ m, 4 \times 250 mm)																								
	A : DW B : ACN																								
Mobile Phase	<table border="1"><thead><tr><th>Time(min)</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>15</td><td>65</td><td>35</td></tr><tr><td>30</td><td>35</td><td>65</td></tr><tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>40</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>45</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>55</td><td>80</td><td>20</td></tr></tbody></table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0.0	80	20	15	65	35	30	35	65	35	20	80	40	20	80	45	80	20	55	80	20
Time(min)	A(%)	B(%)																							
0.0	80	20																							
15	65	35																							
30	35	65																							
35	20	80																							
40	20	80																							
45	80	20																							
55	80	20																							
Flow rate	1.0 mL/min																								
Injection volume	10 μ l																								
Oven Temperature	40°C																								

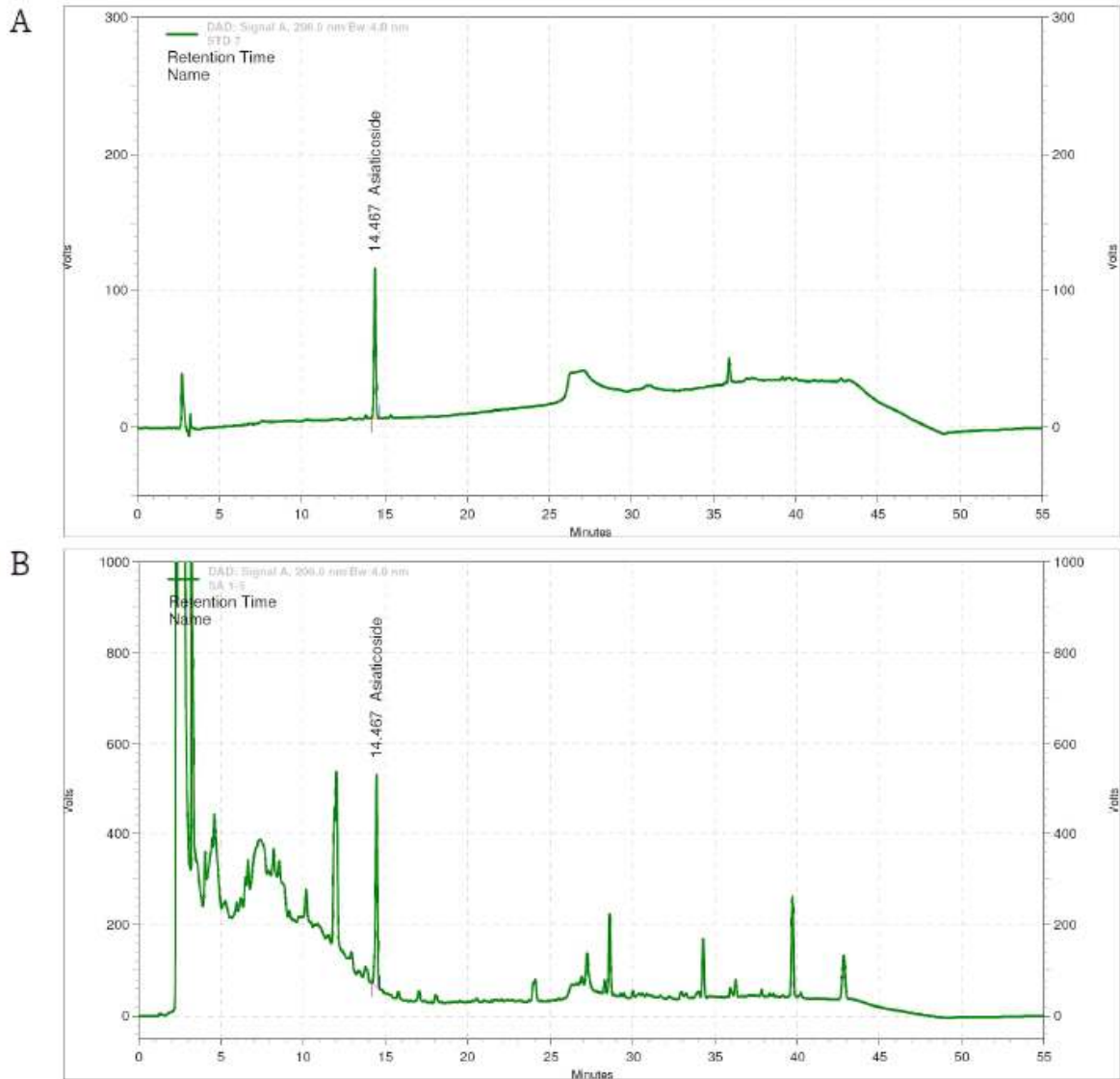
(라) 계산식

$$\text{Asiaticoside (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종량(mL)} \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

(3) 실험결과

(가) 1차 분석법을 기반으로 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 분석여부 확인

- ① 표준용액과 시험용액에서 Asiaticoside peak가 모두 약 14분대에 검출되었으나, 시험용액에서의 baseline이 들떠있는 현상이 생겨 컬럼 변경이나 이동상 변경을 통한 개선이 필요하였음 (A: 표준용액, B: 시험용액)



나. 1차 시험법 변경

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 1차 시험법 검토 중 발견된 시험용액의 baseline이 들떠있는 현상을 개선하기 위하여 컬럼, 이동상의 gradient 변경, 시험용액 농도 변경을 진행하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 분석물질 정보

① 상기 시험법 설정 정보와 동일

(나) 표준용액 및 시험용액 제조

① 표준용액은 상기 시험법 설정에서의 방법과 동일함

② 시료 약 200 mg을 50 mL 정용플라스크에 칭량하여 50% 메탄올을 가하고, 이를 30 분 초음파 추출하여 식힌 후 50% 메탄올로 50 mL 정용함

③ 13,500 rpm에서 5분 원심분리 후 상등액을 syringe filter (0.45 μ m, PTFE)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용함

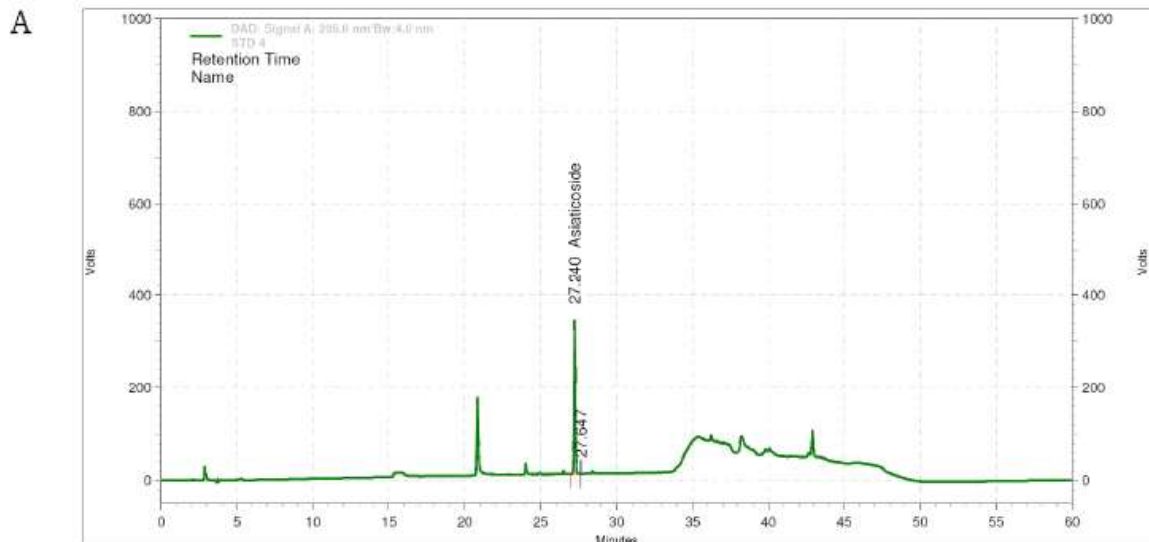
(다) 기기분석 조건

Instrument	Agilent 1260 Infinity																											
Detector	UV(DAD)																											
Wavelength	206 nm																											
Column	Cadenza-CD18 C18 (3 μm, 4.6 \times 250 mm)																											
A : DW																												
B : ACN																												
Mobile Phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0	80	20	10	65	35	30	35	65	32	20	80	35	20	80	40	80	20	45	90	10	55	90	10
	Time(min)	A(%)	B(%)																									
	0	80	20																									
	10	65	35																									
	30	35	65																									
	32	20	80																									
	35	20	80																									
	40	80	20																									
	45	90	10																									
55	90	10																										
Flow rate	1.0 mL/min																											
Injection volume	10 μ l																											
Oven Temperature	40°C																											

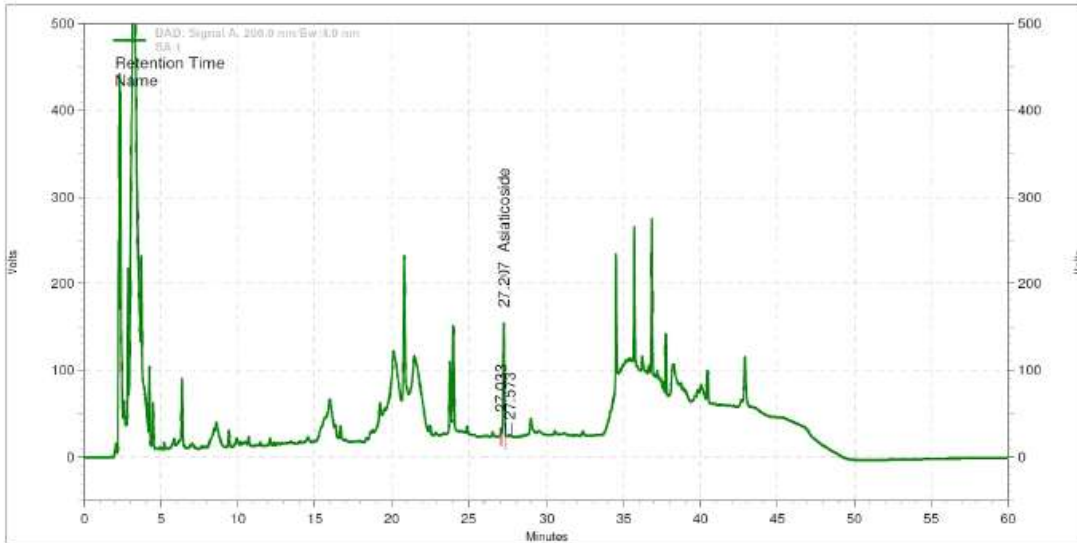
(3) 실험결과

(가) 변경된 시험법을 기반으로 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 분석여부 확인

- ① 기존 시험용액에서의 baseline 들뜸 현상은 개선할 수 있었지만, 시험용액 중 Asiaticoside peak의 분리도가 좋지 않아 peak 분리도 개선이 필요하였음 (A: 표준용액, B: 시험용액)



B



다. 2차 시험법 변경

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 1차 변경 시험법 검토에서 문제가 되었던 Asiaticoside peak의 분리도 개선을 위하여 이동상의 gradient 조건을 변경하여 진행하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 분석물질 정보

① 상기 시험법 설정 정보와 동일

(나) 표준용액 및 시험용액 제조

① 표준용액은 상기 시험법 설정에서의 방법과 동일하며, 시험용액은 1차 변경 시험법 방법과 동일함

(다) 변경된 기기분석 조건

A : DW

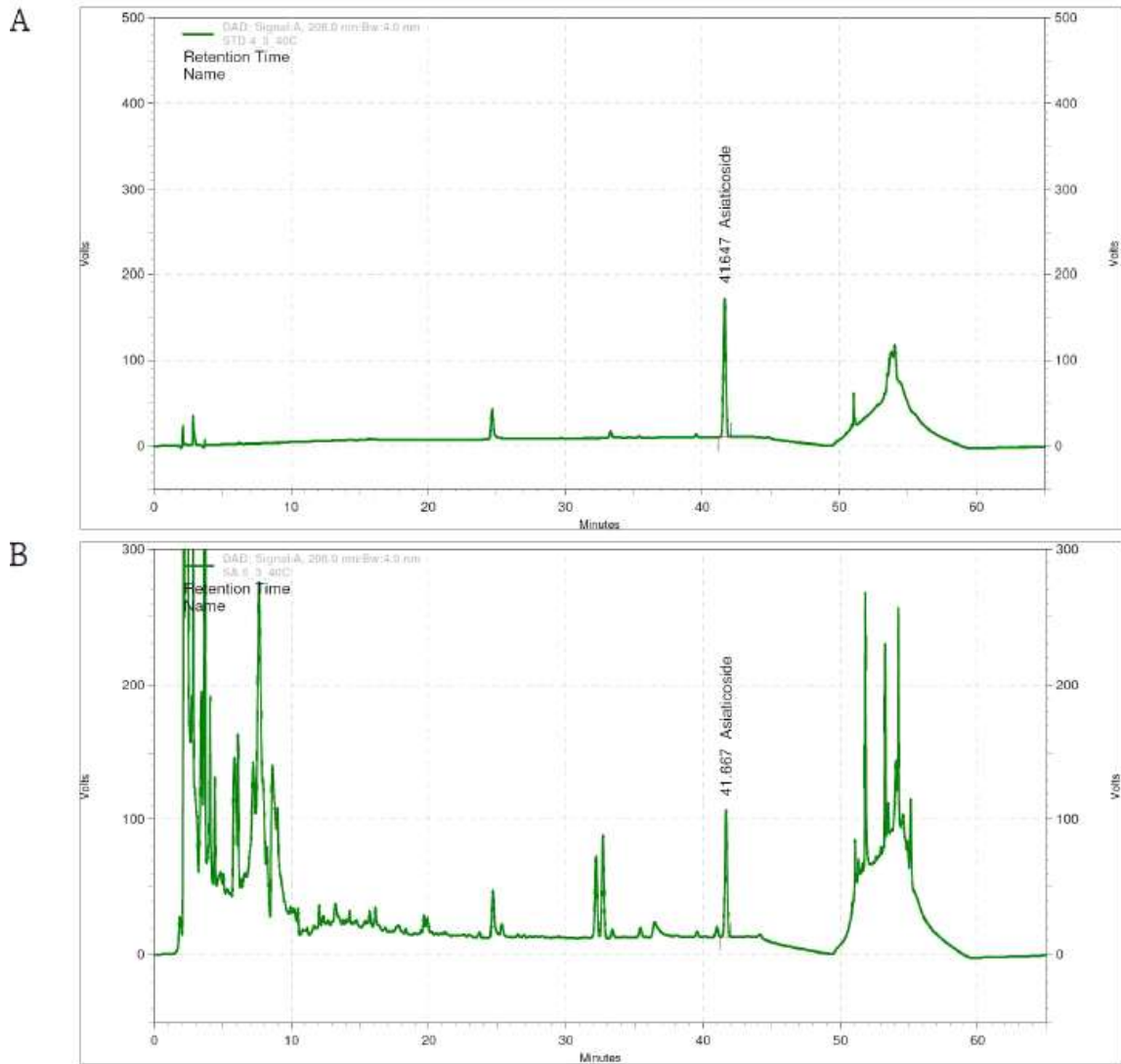
B : ACN

Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	90	10
	10	80	20
	40	73	27
	45	90	10
	51	20	80
	55	90	10
	65	90	10

(3) 실험결과

(가) 2차 변경된 시험법을 기반으로 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 분석여부 확인

① 기존 시험용액에서의 Asiaticoside peak 분리도를 개선할 수 있어서 이 시험법을 최종 시험법으로 설정하여 시험법검토를 진행함 (A: 표준용액, B: 시험용액)



라. 최종 설정된 방법의 시험법 검토

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말 중에 함유된 Asiaticoside 함량을 최종 설정된 시험법 (2차 변경 시험법)에 준하여 실험하고 그 결과를 도출하여 함량을 측정함에 있어서 시험법 적절성 여부를 확인하는 것을 목적으로 함 (한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 인증)

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 시액

- ① 시료: 병풀주정추출분말 (Lot No. 20171123)
- ② 표준품: Asiaticoside (ChemFaces, Cat. # CFN99912, Lot # CFS201701, purity: 98%)

(나) 표준용액 및 시험용액 제조

- ① Asiaticoside 일정량을 50% 메탄올에 소량 녹여 정용 후 50% 메탄올로 순차적으로 희석하여 사용

- ② 시료 약 200 mg을 50 mL 정용플라스크에 칭량하여 50% 메탄올을 가하고, 이를 30 분 초음파 추출하여 식힌 후 50% 메탄올로 50 mL 정용함
- ③ 13,500 rpm에서 5분 원심분리 후 상등액을 syringe filter (0.45 μm , PTFE)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용함

(다) 기기분석 조건

Instrument	①Agilent 1260 Infinity, ②Shimadzu																								
Detector	DAD detector																								
Wavelength	206 nm																								
Column	Cadenza-CD18 C18 (3 μm , 4.6 × 250 mm)																								
Mobile Phase	A : DW																								
	B : Acetonitrile																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>73</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>51</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>65</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0.0	90	10	10	80	20	40	73	27	45	80	20	51	20	80	55	90	10	65	90	10
	Time(min)	A(%)	B(%)																						
	0.0	90	10																						
	10	80	20																						
	40	73	27																						
	45	80	20																						
51	20	80																							
55	90	10																							
65	90	10																							
Flow rate	1.0 ml/min																								
Injection volume	10 μl																								
Oven Temperature	40°C																								

(라) 계산

$$\text{Asiaticoside (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종량}(\text{mL}) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(\text{mg})}$$

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 분석여부 확인

- ① Asiaticoside의 표준용액은 19.000~304.000 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였음 ($R^2=0.9999$)

STD Level	Concentration (μg/mL)	Area	검량선
1	19.000	33063449	
2	38.000	65912188	
3	76.000	131197743	
4	152.000	259942191	
5	304.000	515433822	

(나) 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 반복성 실험 결과

① 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 함량분석을 위한 같은 시료량 (200 mg) 반복성 실험에서, asiaticoside는 평균 13.3115 mg/g으로 측정되었음

No.	검체량 (mg)	시험용액농도 (μg/mL)	Asiaticoside 함량 (mg/g)	평균	SD
1	217.9	59.3060	13.3364	13.3115	0.04
2	210.8	57.0660	13.2649		
3	204.7	55.7000	13.3332		

(다) 병풀주정추출분말 중 asiaticoside 직선성 실험 결과

① 병풀주정추출분말의 시료량에 대한 asiaticoside 함량을 확인하기 위하여 100, 200, 300 mg씩 시료를 취하여 시료량에 대한 지표성분 함량을 측정한 결과 평균 13.3276 mg/g으로 지표성분의 함량 편차는 거의 없는 것으로 확인됨 ($R^2=0.9997$)

	검체량 (mg)	시험용액농도 (μg/ml)	Asiaticoside 함량 (mg/g)	평균	SD
50%	108.8	29.0160	13.0679	13.3276	0.23
100%	217.9	59.6700	13.4182		
200%	314.0	86.4890	13.4967		

	검체량 (mg)	area
	108.8	50942595
	217.9	102174402
	314.0	148150735
	R^2	0.9997

(4) 결론

- (가) 해당 시험법으로 반복성과, 직선성 test를 진행한 결과, 반복성 실험에서는 병풀주정추출분말의 표준용액과 시험용액 중 각각의 Asiaticoside peak가 단일물질로 검출되었고, 같은 시료량으로 3반복 측정된 결과 13.3115 ± 0.04 mg/g으로 측정되었음
- (나) 또한 시료량에 따른 직선성을 확인하기 위하여 시료량을 100, 200, 300mg으로 다르게 취하여 실험한 결과 Asiaticoside 함량은 13.3276 ± 0.23 mg/g로 편차가 거의 없이 나타났음
- (다) 위의 모든 실험결과를 종합하여 볼 때, 본 시험법으로 분말 상태인 병풀주정추출분말 중 Asiaticoside의 정량에는 무리가 없는 것으로 판단되어 시험법 검증을 진행하였음

마. 병풀주정추출분말 중 Asiaticoside 시험법 검증 (Method validation)

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말 중 Asiaticoside를 정해진 방법으로 처리하여 분리, 정량하는 분석법의 유효성을 검증하는데 그 목적이 있으며, 분석법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성 (Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision) 등의 항목을 검토하고자 하였음 (한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 인증)

(2) 재료 및 방법

(가) 분석물질

- ① 시료: 병풀주정추출분말 (Lot No. 20171123)
- ② 표준품: Asiaticoside (ChemFaces, Cat. # CFN99912, Lot # CFS201701, purity: 98%)

(나) 분석장비

HPLC system	Agilent 1260 Infinity, USA G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1200 ALS G1316A 1260 TCC, G4212B 1260 DAD
	Shimadzu series, Shimadzu, USA Pump LC-20AD, Autosampler SIL-20AC Column oven CTO-20A PDA SPD-M20A detector
Analytical Column	Cadenza-CD18 (3 μ m, 4.6 \times 250 mm)

(나) 표준용액 및 시험용액 제조

- ① Asiaticoside 일정량을 50% 메탄올에 소량 녹여 정용 후 50% 메탄올로 순차적으로 희석하여 사용
- ② 시료 약 200 mg을 50 mL 정용플라스크에 칭량하여 50% 메탄올을 가하고, 이를 30분 초음파 추출하여 식힌 후 50% 메탄올로 50 mL 정용함
- ③ 13,500 rpm에서 5분 원심분리 후 상등액을 syringe filter (0.45 μ m, PTFE)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용함

(다) 기기분석 조건

Instrument	①Agilent 1260 Infinity, ②Shimadzu																								
Detector	DAD detector																								
Wavelength	206 nm																								
Column	Cadenza-CD18 C18 (3 μm, 4.6 × 250 mm)																								
Mobile Phase	A : DW																								
	B : Acetonitrile																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>73</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>51</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>65</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0.0	90	10	10	80	20	40	73	27	45	80	20	51	20	80	55	90	10	65	90	10
	Time(min)	A(%)	B(%)																						
	0.0	90	10																						
	10	80	20																						
	40	73	27																						
	45	80	20																						
51	20	80																							
55	90	10																							
65	90	10																							
Flow rate	1.0 ml/min																								
Injection volume	10 μℓ																								
Oven Temperature	40°C																								

(라) 계산

$$\text{Asiaticoside (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종량}(\text{mL}) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(\text{mg})}$$

(3) 실험결과

(가) 시험법 검증 요약

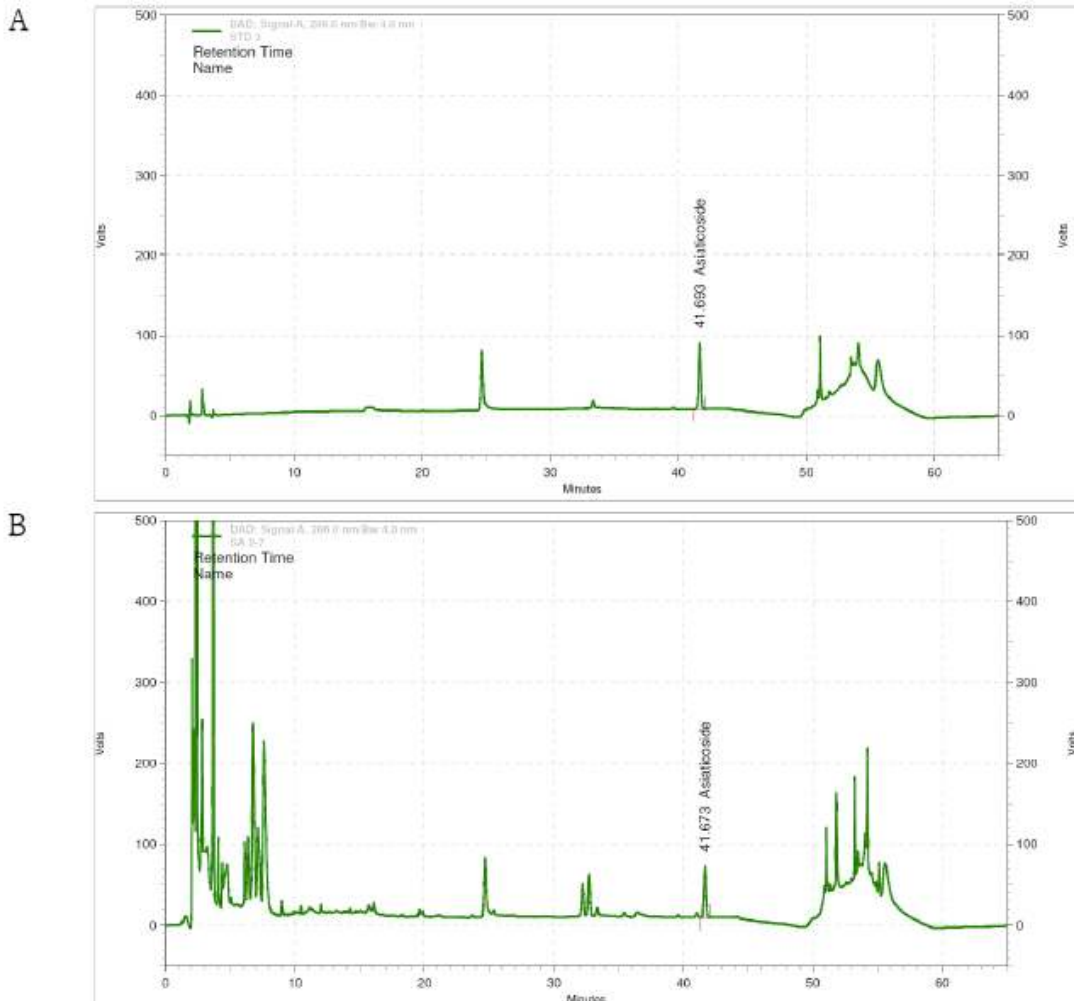
항목	평가방법	설정값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간 (Retention time으로 검토), spectrum 검토	<ul style="list-style-type: none"> 검출시간: 약 41분대에 peak 검출 Spectrum : λ_{max} 약 206 nm에서 표준용액과 시험용액 일치
직선성 (Linearity)	표준용액을 6개의 농도로 3반복 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> 약 18.813~321.000 μg/mL R²=0.9997~1.0000

정확성 (Accuracy)	3개 농도로 표준용액을 첨가하여 회수율 검토	<ul style="list-style-type: none"> 첨가한 농도: 6.420~24.080 $\mu\text{g/mL}$ 회수율: 101.21~101.93% RSD(%) : 0.07~0.69
정밀도 (Precision)	4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일자간, 기기간, 시험자간, 검체량간 정밀성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 검체량에 따른 반복성 <ul style="list-style-type: none"> 함량 평균: 13.963 ± 0.236 mg/g, RSD(%) : 1.687 재현성 <ul style="list-style-type: none"> 함량: 14.376 ± 0.453 mg/g, RSD(%) : 3.152

(나) 특이성 (Specificity)

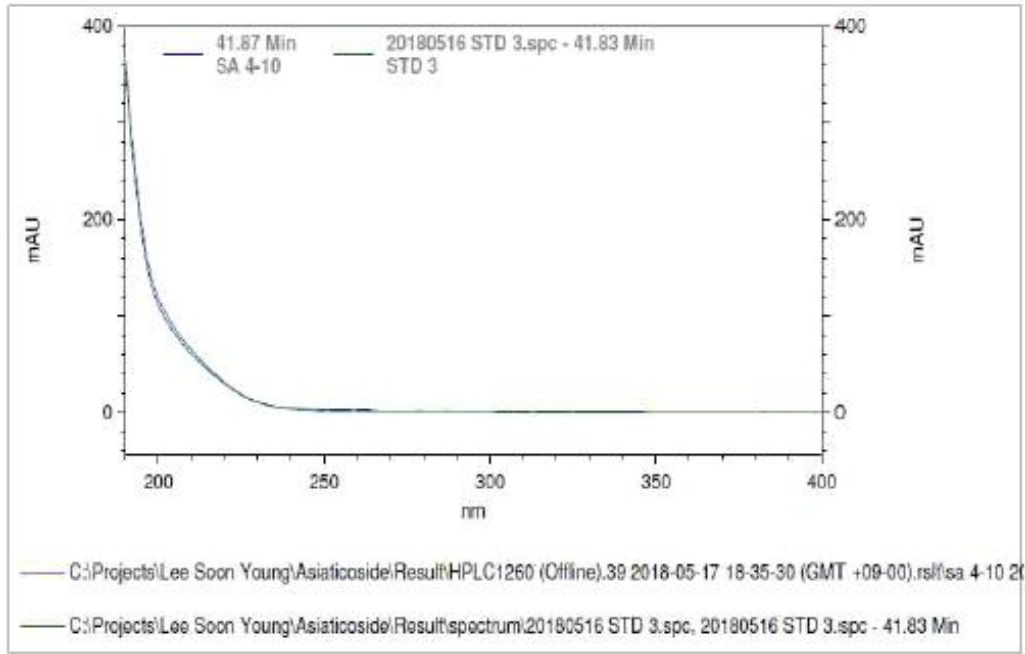
① 병풀주정추출분말 중 asiaticoside의 chromatogram

- 시험용액과 표준용액 모두 약 41분대 peak 검출 확인 (A: 표준용액, B: 시험용액)



② 병풀주정추출분말 중 asiaticoside의 spectrum 확인

- 약 41분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 표준용액과 시험용액의 동일한 패턴 확인



(다) 직선성 (Linearity)

① Asiaticoside는 약 18.813~321.000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 직선성이 확인되었고, 직선의 상관계수는 해당농도 범위에서 $R^2=0.9997\sim 1.000$ 으로 확인됨

STD level	농도($\mu\text{g/mL}$)	면적(Area)	검량선	STD level	농도($\mu\text{g/mL}$)	면적(Area)	검량선
1	20.063	33268796		1	19.250	31266690	
2	40.125	66078106		2	38.500	62059532	
3	80.250	131039532		3	77.000	123597407	
4	160.500	260711761		4	154.000	244678287	
5	321.000	508025096		5	308.000	473278065	
기울기	1577434			기울기	1530301		
y절편	3611560			y절편	4334544		
R^2	0.9998			R^2	0.9997		
STD level	농도($\mu\text{g/mL}$)	면적(Area)	검량선	STD level	농도($\mu\text{g/mL}$)	면적(Area)	검량선
1	18.813	29096198		1	19.313	39440	
2	37.625	57239508		2	38.625	78443	
3	75.250	114489844		3	77.250	154872	
4	150.500	225100150		4	154.500	307971	
5	301.000	442300838		5	309.000	612022	
기울기	1463274			기울기	1975		
y절편	2972613			y절편	2012		
R^2	0.9999			R^2	1.0000		

(라) 정확성 (Accuracy) 및 회수율 (Recovery)

① 원료에 이미 농도를 알고 있는 표준용액 6.420, 12.320, 24.080 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 가하여 전처리 한 후 회수율을 측정 한 결과, asiaticoside는 72.1529~91.7880 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 회수율이 100.73~102.69%이며, RSD는 0.07~0.69로 나타남

표준물질 ($\mu\text{g/mL}$)	원료 + 표준물질 ($\mu\text{g/mL}$)	시료 채취량 (mg)	검출농도 ($\mu\text{g/mL}$)	100mg당 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	평균농도 (100mg당)			
0	-	217.4	66.5091	30.59	30.67			
		218.5	67.3782	30.84				
		217.5	66.5063	30.58				
원료 + 표준물질 ($\mu\text{g/mL}$)	시료 채취량 (mg)	채취량 대비 계산농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론농도 ($\mu\text{g/mL}$)	검출농도 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)	회수율 평균(%)	SD	RSD
SA+6.42	214.7	65.85	72.27	73.2661	101.38	101.43	0.07	0.07
	212.3	65.11	71.53	72.6087	101.51			
	211.1	64.74	71.16	72.1529	101.39			
SA+12.32	211.8	64.96	77.28	78.2900	101.31	101.93	0.70	0.69
	214.6	65.82	78.14	80.2364	102.69			
	214.4	65.75	78.07	79.4622	101.78			
SA+24.08	215.7	66.15	90.23	91.7880	101.72	101.21	0.50	0.49
	215.9	66.21	90.29	91.3664	101.19			
	210.9	64.68	88.76	89.4088	100.73			

(마) 정밀성 (Precision)

① 실험실 내 정밀성

- 병풀주정추출분말 중 asiaticoside의 재현성 시험을 위하여 분석일자, 시험자 및 분석장비를 달리하여 분석을 진행한 결과, 평균 14.376 mg/g으로 분석됨
- 표준편차(SD)는 0.453, 상대표준편차(RSD)는 3.152로 나타났으며, asiaticoside peak 검출시간은 모두 약 41분대에서 검출됨

	실험일자	실험자	분석기기	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD
1차	2018-05-11	A	Agilent	14.054	14.376	0.453	3.152
2차	2018-05-15	B	Agilent	14.233			
3차	2018-05-16	A	Agilent	15.046			
4차	2018-05-21	A	Shimadzu	14.170			

② 반복 정밀성

- 각 일자별 반복성은 13.966~15.113 mg/g (평균 14.054~15.046 mg/g), 표준편차

0.058~0.097, 상대표준편차는 0.38~0.68로 나타남

1차, Agilent HPLC 1260 (실험일자: 2018-05-11, 실험자: A)

	Area	Concentration (µg/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD
1	98660692	60.2661	210.8	14.009	14.054	0.076	0.54
2	101614239	62.1381	216.5	14.064			
3	101394402	61.9988	215.0	14.130			
4	101389045	61.9954	217.0	13.999			
5	100302245	61.3065	215.1	13.966			
6	101665768	62.1708	215.2	14.156			

2차, Agilent HPLC 1260 (실험일자: 2018-05-15, 실험자: A)

	Area	Concentration (µg/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD
1	98212703	61.3630	212.2	14.170	14.233	0.097	0.68
2	96790803	60.4341	210.2	14.088			
3	100013954	62.5397	215.4	14.227			
4	102550510	64.1968	218.9	14.370			
5	97966136	61.2019	210.1	14.274			
6	97858994	61.1319	209.9	14.271			

3차, Agilent HPLC 1260 (실험일자: 2018-05-16, 실험자: B)

	Area	Concentration (µg/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD
1	100287531	66.5091	217.4	14.991	15.046	0.058	0.38
2	101559456	67.3782	218.5	15.110			
3	100283394	66.5063	217.5	14.983			
4	99773925	66.1581	214.5	15.113			
5	100944709	66.9582	217.8	15.064			
6	97368771	64.5146	210.5	15.018			

4차, Shimadzu HPLC(실험일자: 2018-05-21, 실험자: A)

	Area	Concentration (µg/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD
1	124583	62.0470	212.4	14.314	14.170	0.082	0.58
2	124340	61.9240	214.5	14.146			
3	121030	60.2480	208.1	14.186			
4	121056	60.2610	209.5	14.094			
5	122692	61.0890	211.0	14.187			
6	127569	63.5580	221.0	14.092			

③ 검체량 변화에 대한 반복 정밀성

- 병풀주정추출분말 3개의 검체량 (100, 200, 300 mg)에 대하여 각각 6회 반복하여 asiaticoside의 함량을 분석한 결과, 상대표준편차는 각각 0.25, 0.54, 0.54로 확인됨

Treatment	Asiaticoside Contents(mg/g)		
	100 mg	200 mg	300 mg
1	13.689	14.009	14.100
2	13.626	14.064	14.282
3	13.607	14.130	14.171
4	13.688	13.999	14.081
5	13.681	13.966	14.234
6	13.663	14.156	14.195
Average (mg/g)	13.659	14.054	14.177
SD	0.035	0.076	0.077
RSD	0.25	0.54	0.54

9. 병풀주정추출분말의 기준규격 검증

가. 정상 및 미생물 검사

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말의 정상 및 미생물 검사를 통하여 제조된 3 batch 원료의 기준규격을 검증하고자 하였음
- (나) 해당시험은 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시험을 진행하여 근거자료를 확보함

(2) 재료 및 방법

(가) 성상

① 식품공전 제 7. 일반시험법 1. 식품일반시험법 1.1 성상(관능시험)에 따라 시험진행

(나) 대장균군

① 식품공전 제 7. 일반시험법 4. 미생물 시험법 4.7 대장균군 4.7.1 정성시험 나. BGLB 배지법에 따라 시험진행

(다) 세균수

① 식품공전 제 7. 일반시험법 4. 미생물 시험법 4.5 세균수 4.5.1 일반세균수 가. 표준 평판법에 따라 시험진행

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말의 성상

① 성상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 녹색색의 분말 (3 batch 원료 모두 동일)


성상	항목	채점 기준	점수
	색깔	1. 색깔이 양호한 것은 5점 2. 색깔이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점 3. 색깔이 나쁜것은 2점 4. 색깔이 현저히 나쁜 것은 1점	5
	풍미	1. 풍미가 양호한 것은 5점 2. 풍미가 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점 3. 풍미가 나쁜것은 2점 4. 풍미가 현저히 나쁜거나 이미, 이취가 있는 것은 1점	5
	조직감	1. 조직감이 양호한 것은 5점 2. 조직감이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점 3. 조직감이 나쁜것은 2점 4. 조직감이 현저히 나쁜것은 1점	5
	외관	1. 병충해를 입은 흔적 및 불가식부분 제거, 제품의 균질 및 성형상태와 포장 상태 등 외형이 양호한 것은 5점으로 한다. 2. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 비교적 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다. 3. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 나쁜 것은 2점으로 한다. 4. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 현저히 나쁜 것은 1점으로 한다.	5
	결과	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 녹색색의 분말	평균

(나) 병풀주정추출분말의 대장균군 및 세균수

① 대장균군: 음성 (3 batch 원료 모두 동일)

추정시험		확정시험		확인시험	
BGLB 배지가스발생 양성관수		EMB 한천 배지		유당배지가스발생	그람염색
0	0
결과		음성			

② 세균수(/g): 0

제 L2018040024 호 문서확인		시험·검사성적서														
제품명	병풀주정추출분말		제조일자 (유통기한)													
의뢰인	업체명	주식회사 제넨셀	성명	장선필												
	주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)														
제조번호	20171123	접수년월일	2018-04-12													
검사의뢰목적	참고용	접수번호	L2018040024													
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-04-19</p> <p>시험·검사 책임자 : 이정구</p> <p>검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 30%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성상</td> <td>이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 녹갈색의 분말</td> <td>이선정</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음성</td> <td>김용수</td> </tr> <tr> <td>세균수(/g)</td> <td>0</td> <td>김용수</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 4월 19일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400~1</p>					시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 녹갈색의 분말	이선정	대장균군	음성	김용수	세균수(/g)	0	김용수
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원														
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 녹갈색의 분말	이선정														
대장균군	음성	김용수														
세균수(/g)	0	김용수														

나. 영양성분 분석

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말의 영양성분 분석을 통하여 제조된 원료의 기준규격을 검증하고자 하였음
- (나) 해당시험은 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시

험을 진행하여 근거자료를 확보함


(2) 재료 및 방법

(가) 분석항목

① 열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말의 영양성분 분석 결과

제 L2018040026 호 문서확인				시험·검사성적서	
제품명		병풀주정추출분말	제조일자 (유통기한)		
의뢰인	업체명	주식회사 제넨셀	성명	장선필	
	주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)			
제조번호		20171123	접수년월일	2018-04-12	
검사의뢰목적		참고용	접수번호	L2018040026	
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-05-01</p> <p>시험·검사 책임자 : 이정구</p> <p>검사관련 총 책임자 : 김천희</p>					
시험·검사항목		시험·검사 결과		시험·검사원	
열량(Kcal/100g)		329.63 Kcal/100g		한아름	
탄수화물(%)		73.99 %		한아름	
조단백질(%)		5.02%		김정숙	
조지방(%)		1.51%		이수경	
수분(%)		4.94%		홍수현	
회분(%)		14.54%		홍수현	
나트륨(mg/100g)		1020.44 mg/100g		김세미	
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.</p> <p>※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.</p>					
2018 년 5 월 1 일					
한국기능식품연구원 					
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1					

다. 중금속 함량 분석

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말 3 batch 원료의 중금속 함량 분석을 통하여 제조된 원료의 안전성과 기준규격을 검증하고자 하였음

(나) 해당시험은 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시험을 진행하여 근거자료를 확보함

(2) 재료 및 방법

(가) 총비소, 카드뮴, 납

① 식품공전 제7. 일반시험법 9. 식품중 유해물질 9.1 중금속 9.1.2 납 나) 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법 다) 측정 2) 유도결합플라즈마법 (ICP-MS)에 따라 시험진행


(나) 총수은

① 식품공전 제7. 일반시험법 9. 식품중 유해물질 9.1 중금속 9.1.6 수은에 따라 시험진행

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말의 중금속 함량 분석 결과, 3 batch 원료 모두 1 ppm 이하로써 기준치 이하임을 확인함

항목		1 batch	2 batch	3 batch
중금속 (mg/kg)	납	0.0237	0.0250	0.0286
	총수은	0.0007	0.0060	0.0061
	카드뮴	0.1192	0.1043	0.1136
	총비소	0.0595	0.0774	0.0608

제 L2018040023 호 문서확인				시험·검사성적서																
제품명		병풀주정추출분말		제조일자 (유통기한)																
의뢰인	업체명	주식회사 제넨셀		성명	장선필															
	주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)																		
제조번호		20171123		접수년월일	2018-04-12															
검사의뢰목적		참고용		접수번호	L2018040023															
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-05-01 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.0237mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> <tr> <td>총수은(mg/kg)</td> <td>0.0007mg/kg</td> <td>조웅</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.1192mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> <tr> <td>총비소(mg/kg)</td> <td>0.0595mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별도로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 5월 1일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원장</p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400~1</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	0.0237mg/kg	류미진	총수은(mg/kg)	0.0007mg/kg	조웅	카드뮴(mg/kg)	0.1192mg/kg	류미진	총비소(mg/kg)	0.0595mg/kg	류미진
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																		
납(mg/kg)	0.0237mg/kg	류미진																		
총수은(mg/kg)	0.0007mg/kg	조웅																		
카드뮴(mg/kg)	0.1192mg/kg	류미진																		
총비소(mg/kg)	0.0595mg/kg	류미진																		

라. 잔류농약 분석

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀은 「식품공전」에서 농약의 잔류허용 기준이 설정되어 있지는 않지만, 식용으로 사용되던 원료이므로 「수입식품등 검사에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시 제2017-22호, 2017.4.7) 별표 3. 정밀검사대상 잔류농약 검사항목 58종에 대하여 분석하고자 하였음

(나) 병풀주정추출분말 3 batch 원료의 잔류농약 분석을 통하여 제조된 원료의 안전성과 기준규격을 검증하고자 하였음

(다) 해당시험은 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시험을 진행하여 근거자료를 확보함

(2) 재료 및 방법

(가) 시험법

① 식품공전 제7. 일반시험법 7. 식품 중 잔류농약 분석법 7.1 식품일반 7.1.2 다중농약 다성분분석법 7.1.2.2 다중농약다성분 분석법-제2법에 따라 시험진행

(3) 실험결과

(가) 병풀주정추출분말의 잔류농약 검사에서 50종은 불검출 되었으며, 8종은 검출되었으나 규격 이하로 나타남

정밀검사대상 잔류농약 검사항목 (총 58종)	검사결과
<p>다이아지논(Diazinon), 디디티(DDT), 디코폴(Dicofol), 디크로보스(Dichlorvos), 말라치온(Malathion), 메소밀(Methomyl), 메톡시페노자이드(Methoxyfenozide), 메티다치온(Methidathion), 보스칼리드(Boscalid), 비에치씨(BHC), 비펜스린(Bifenthrin), 싸이퍼메쓰린(Cypermethrin), 싸이프로디닐(Cyprodinil), 싸이할로쓰린(Cyhalothrin), 아세타미프리트(Acetamiprid), 아зок시스트로빈(Azoxystrobin), 아트라진(Atrazine), 에치온(Ethion), 엔도설판(Endosulfan), 이마자릴(Imazalil), 이소프로치오란(Isoprothiolane), 이프로디온(Iprodione), 카바릴(Carbaryl), 카보후란(Carbofuran), 캡탄(Captan), 퀸토젠(Quintozene), 클로로타로닐(Chlorothalonil), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl), 클로르헨나피르(Chlorfenapyr), 톨크로포스-메칠(Tolclofos-methyl), 트리아디메폰(Triadimefon), 트리아조포스(Triazophos), 트리플루미졸(Triflumizole), 트리플루무론(Triflumuron), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 파라치온(Parathion), 파라티온-메틸(Parathion-Methyl), 파클로부트라졸(Paclobutrazol), 페메쓰린(Permethrin), 페나리몰(Fenarimol), 페니트로치온(Fenitrothion), 펜발러레이트(Fenvalerate), 펜토에이트(Phenthoate),</p>	<p>1. 비펜스린(Bifenthrin) : 0.0035mg/kg 2. 싸이퍼메쓰린(Cypermethrin): 0.0382mg/kg 3. 아зок시스트로빈(Azoxystrobin): 0.0006mg/kg 4. 클로르피리포스(Chlorpyrifos); 0.0044mg/kg 5. 프로시미돈(Procymidone): 0.0034mg/kg 6. 플루벤디아마이드(Flubendiamide): 0.0010mg/kg 7. 피라크로스트로빈(Pyraclostrobin) : 2.9669mg/kg 8. 후루디옥소닐(Fludioxonil): 0.0089mg/kg</p>

펜프로파스린(Fenpropathrin), 펜헥사미드(Fenhexamid),
 포스메트(Phosmet), 프로시미돈(Procymidone),
 프로클로라즈(Prochloraz), 프로페노포스(Profenofos),
 플루벤디아마이드(Flubendiamide),
 플루페녹수론(Flufenoxuron),
 피라크로스트로빈(Pyraclostrobin),
 피리메타닐(Pyrimethanil), 피리미카브(Pirimicarb),
 피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl),
 후루디옥소닐(Fludioxonil), 디메토에이트(Dimethoate)

의 50종 불검출

제 L2018040025 호
 문서확인

시험·검사성적서

제품명	병풀주정추출분말		제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	주식회사 세넨켄	성명	장선필
	주소	경기도 용인시 기흥구 용덕중로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)		
제조번호	20171123	접수년월일	2018-04-12	
검사의뢰목적	원고용	접수번호	L2018040025	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2018-05-03
 시험·검사 책임자: 이경구
 검사관련 총 책임자: 김철희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	강태식
DDT(mg/kg)	불검출	강태식
Dicofol(mg/kg)	불검출	강태식
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	강태식
Malathion(mg/kg)	불검출	강태식
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	강태식
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
BIFC(mg/kg)	불검출	강태식
Bifenthrin(mg/kg)	0.0035mg/kg	강태식
Cypermethrin(mg/kg)	0.0382mg/kg	강태식
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	강태식
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	강태식
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Aoxystrobin(mg/kg)	0.0006mg/kg	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	강태식
Ethion(mg/kg)	불검출	강태식
Endosulfan(mg/kg)	불검출	강태식
Imazalil(mg/kg)	불검출	강태식

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	강태식
Iprodione(mg/kg)	불검출	강태식
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captan(mg/kg)	불검출	강태식
Quintozene(mg/kg)	불검출	강태식
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	강태식
Chlorpyrifos(mg/kg)	0.0044mg/kg	강태식
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	강태식
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	강태식
Tolclofos-methyl(mg/kg)	불검출	강태식
Triadimefon(mg/kg)	불검출	강태식
Triazophos(mg/kg)	불검출	강태식
Triflumizole(mg/kg)	불검출	강태식
Triflurothion(mg/kg)	불검출	강태식
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion(mg/kg)	불검출	강태식
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	강태식
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	강태식
Permethrin(mg/kg)	불검출	강태식
Fenarimol(mg/kg)	불검출	강태식
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	강태식
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	강태식
Phenthoate(mg/kg)	불검출	강태식
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	강태식
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	강태식
Procymidone(mg/kg)	0.0034mg/kg	강태식
Prochloraz(mg/kg)	불검출	강태식
Profenofos(mg/kg)	불검출	강태식
Flubendiamide(mg/kg)	0.0010mg/kg	이선미
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	2.9669mg/kg	이선미

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	강태식
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	강태식
Fludioxonil(mg/kg)	0.0089mg/kg	강태식
Dimethoate(mg/kg)	불검출	강태식

마. 기능/지표성분 함량 분석

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말 3 batch 원료의 지표성분 분석을 검증된 시험법을 통하여 제조된 원료의 기준규격을 검증하고자 하였음
- (나) 해당시험은 공인인증기관인 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서 시험을 진행하여 근거자료를 확보함

(2) 재료 및 방법

(가) 재료 및 시험법

- ① 제조된 병풀주정추출분말 3 batch 원료의 지표성분 asiaticoside 함량 분석은 상기 시험방법 밸리데이션 시험방법과 동일하게 수행함
- ② 분석조건

분석(측정)조건			
Column	Cadenza C18 (250 mm × 4.6 mm, 3 μm)		
Oven Temperature	40 °C		
Injection volume	10 μL		
Mobile phase	A : DW B : Acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	90	10
	10	80	20
	40	73	27
	45	80	20
	51	20	80
	55	90	10
	65	90	10
Detector(PDA)	UV detector (signal : 206 nm, BW : 4 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		

(3) 실험결과

- (가) 병풀주정추출분말 3 batch 원료의 기능/지표성분 asiaticoside의 함량을 분석한 결과, 평균 14.1 mg/g으로 분석되었음

Lot No.	1 (20171123)	2 (20171123-1)	3 (20171123-2)	평균
반복수				
1반복	14.11	14.10	14.13	
2반복	14.08	14.13	14.13	
3반복	14.13	14.04	14.05	
평균	14.11	14.09	14.10	14.10

① 시험검사 성적서 (대표 원료 Lot No. 20171123만 제시)

제 L2018050116 호 문서확인		시험·검사성적서		
제품명	병풀주정추출분말		제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	주식회사 제넨셀	성명	장선필
	주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)		
제조번호	20171123	접수년월일	2018-05-28	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	L2018050116	
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일: 2018-06-01 시험·검사 책임자: 이정구 검사관련 총 책임자: 김천희				
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원	
Asiaticoside(mg/g)		14.11mg/g(14.11, 14.08, 14.13)	이순영	
※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.				
2018년 6월 1일				
한국기능식품연구원				
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)528-2400 FAX(031)628-0400~1				

바. 제조방법 확립에 따른 공정별 수율 및 지표성분 분석

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말의 기능성 원료 인정을 위한 자료를 위해 해당 공정별 수율 및 지표성분 함량을 분석하고자 하였음

(나) 해당시험은 GMP 원료 생산기업에서 진행함

(2) 재료 및 방법

(가) 제조방법

① 건조된 병풀 전잎에 50% 주정을 15배 가하여 80℃에서 12시간 추출한 다음 여과 후 2차 추출 및 여과함

② 1-2차 추출물을 혼합한 후 농축한 다음 30% 텍스트린이 포함되게 배합하고 살균한 후 분무건조로 분말을 제조

(나) 지표성분 분석

① 한국기능식품연구원에서 인증 받은 지표성분 분석법을 활용

(3) 실험결과

(가) 공정별 수율 및 지표성분 asiaticoside 함량을 분석한 결과 최종 14.4 mg/g으로 확인되었음

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
원재료	건조병풀 1kg, 주정 50% (20L)		1
↓			
1차추출	50% 주정 15L, 80℃, 12시간 유지		
↓			
여과	여과	21.67	0.24
↓			
2차추출	50%주정 5L ,80℃, 6시간유지		
↓			
여과	여과	18.86	0.06
↓			
혼합(1차+2차)		20.06	0.28
↓			
농축	저온(65-70℃) 감압농축 20-25brix	20.28	0.29
↓			
배합/균질화	추출물 (고형분100%): 70% 텍스트린 30%	14.11	0.42
↓			
살균	65-80℃ 30분간	13.69	0.42
↓			
분무건조(SD)	Inlet 180℃, outlet 80℃	14.97	0.38
↓			
포장	포장	14.40	0.35

사. 2차 GMP grade 병풀주정추출분말 대량생산

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 1차 구입한 2017년도 재배 병풀과 2018년도 재배 병풀의 동등성 확보를 위해 2차 대량생산을 진행하고자 하였음

(나) 2차 대량생산 원료는 성분 분석 연구 및 제품 개발 연구에 활용하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 1차 대량생산과 동일한 합천농가에서 2018년도에 재배한 병풀 원재료 200 kg을 구입함

(나) 1차 대량생산과 동일한 GMP 제조 시설에서 동일 공정으로 병풀주정추출분말 생산

(다) 생산된 병풀주정추출분말의 지표성분 함량 분석을 위해 공인기관인 한국기능식품연구원에 분석 의뢰

(3) 연구결과

(가) 1차 대량생산과 동일하게 GMP grade 병풀주정추출분말을 대량생산 하였음

① 제조번호: 20181010

(나) 병풀 50% 주정추출물 (텍스트린 미포함)의 수율은 27.4%이었으며, 병풀주정추출분말 (텍스트린 포함 원료)의 최종 수율은 39.2%이었음

(다) 한국기능식품연구원에 생산된 원료의 지표성분 asiaticoside를 분석 의뢰한 결과 제조번호 20181010 원료의 asiaticoside 함량은 평균 19.36 mg/g (19.39, 19.45, 19.25)로 분석되었음

(4) 결론

(가) 1차 대량생산 원료와 재배농가, 생산기관이 모두 동일하였으나, 1차 생산 원료와 2차 생산원료의 지표성분 함량이 약 37% 높게 측정되어 병풀 원재료에 대한 표준화가 필요하다 사료되었음

① Lot No. 20181010의 제조지시기록서 (대표 페이지)

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 (병 풀 주 정 추 출 분 말)			문서번호		DHP-201~207	
				보존	3년	Page	1/6

제 품 명	병풀주정추출분말
-------	----------

Lot No.	20181010	유통기한	2020.10.09까지	제조단위	kg
제조지시일	2018.10.05	제조시작일	2018.10.05	제조완료일	2018.10.10
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김성준

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			병풀추출물 (고형분100%로서)	70		196 (44.8)	HA	HA
2		2018.7.22	덱스트린	30		23.49	HA	HA
합계				100			HA	HA

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	확 인	
	칭량실 온습도 확인	온도 : 23.4°C	습도 : 48 %



특기사항

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)/완포장	기 타
제조일자	2018.10.05~10.09	2018.10.10	2018.10.10	
공정투입량	200	78.3	78.3	
실제생산량	44.8	78.3	76.0	
수 율(%)	22.40%	100%	97.08%	

비 고	결 제		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자
	HA	CA	HA

② Lot No. 20181010의 제품성적서

제 품 시 험 성 적 서

	담당자	연구 소장
결 재		

제품명 : 병풀주정추출분말

시 험 항 목	규 격 기 준	시 험 결 과	비 고
성 상	미황색의고유의 색택과 향 미를 가지고, 이미 . 이취 가 없다	적합	
이물 수분(%)	적합 8.0이하	적합	
대장균군(/g)	n=5, c=1, m=0, M=10	적합	
일반세균(cfu/g)	3,000이하	적합 0,0,0,0,0	
제조연월일	2018년10월10일		
Lot No.	20181010		
판 정	적 합		

상기와 같이 제품시험성적서를 제출합니다.


2018 년 10 월 12 일

주식회사 대 호 양 행 품 질 관 리 과




DAEHO CORPORATION

③ Lot No. 20181010의 지표성분 시험성적서

제 L2019110092 호 문서확인 40Q3-SUS7-LO48				시험·검사성적서							
제품명	병풀주정추출분말	제조일자 (유통기한)	2018-10-05 (2020-10-09)								
의뢰인	업체명	주식회사 제넨셀	성명	정영준							
	주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 2201호 (영덕동, UTOWER)									
제조번호	1	접수년월일	2019-11-28								
검사의뢰목적	제출용	접수번호	L2019110092								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-12-19 시험·검사 책임자 : 김영경 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Asiaticoside(mg/g)</td> <td>19.36 mg/g(19.39, 19.45, 19.25)</td> <td>정은숙</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-업체제공</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	Asiaticoside(mg/g)	19.36 mg/g(19.39, 19.45, 19.25)	정은숙
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
Asiaticoside(mg/g)	19.36 mg/g(19.39, 19.45, 19.25)	정은숙									
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 12월 19일</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">한국기능식품연구원</p> <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">  </div> <p style="font-size: 0.8em;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400~1</p>											

아. 병풀 원재료와 병풀주정추출분말 간의 지표성분 규격 설정 연구

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 1차 구입한 2017년도 재배 병풀과 2018년도 재배 병풀, 2019년도 재배 병풀로부터 원료 생산 시 이에 대한 동등성이 확보되지 않아 병풀 원재료와 병풀주정추출분말 사이의 규격 설정 연구를 진행함
- (나) 병풀의 경우 잎에 asiaticoside의 함량이 주를 이루지만, 잎자루에는 asiaticoside는 거의 존재하지 않으며, asiatic acid 등의 트리터펜 성분이 주를 이루고 있음
 - ① 하우스 재배 시 물과 차광이 적절하게 이루어질 경우 잎자루의 길이가 길어져 asiaticoside의 함량이 상대적으로 적어지며, 노지에서 자란 병풀은 강수량과 햇빛에 노출되어 있어 대부분 잎자루가 짧은 현상이 나타남



- ② 특히 합천산의 경우 2017년도와 다르게 2018년부터 물공급을 줄였다는 보고를 받아 이에 대한 상관성을 조사하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

- (가) 2019년도 생산한 병풀을 동일한 합천농가에서 구입하여 동일한 조건으로 원료를 생산하였음
- (나) 2차로 일부 공정을 변경하여 지표성분 분석을 진행함
- (다) 3차로 계절별 병풀을 수집하여 지표성분 함량을 분석함
- (라) 4차로 잎과 잎자루를 분리하여 지표성분 함량을 분석함

(3) 공정에 따른 상관관계 분석 결과

- (가) (실험1) 1-2차 대량생산한 제조지시기록서를 기반으로 2019년도 재배된 병풀 원료의 지표성분 함량을 분석한 결과 24.4 mg/g으로 나타남
- (나) (실험2) 병풀주정추출분말의 추출조건 및 농축 온도를 높여서 원료를 생산한 결과, 오히려 지표성분의 함량이 26.0 mg/g으로 증가되었음
- (다) (실험3) 추출 및 농축에 불용물 형성에 따른 여과 공정을 추가 진행한 결과 지표성분의 함량은 17.2 mg/g으로 불용물 형성이 지표성분과 연관되어 있음을 확인함

공정	대호양행 제지서	실험1 (S.D실험)	실험2	실험3
원료	200kg	1kg	100g	100g
<1차 추출> 50% 알콜 15배수 물:주정(V/V)	80°C, 8hr Brix 3	80°C, 8hr 교반 고형분 2.56% 수율 24.28% Brix 18.0 함량 36.80mg/g	80°C, 8hr 고형분 2.33% 수율 27.32% Brix 17.5 함량 36.79mg/g	80°C, 8hr 고형분 2.56% 수율 28.79% Brix 17.5 함량 28.2mg/g
<2차 잔사 추출> 50% 알콜 5배수 물:주정(V/V)	80°C, 6hr Brix 1	80°C, 6hr 교반 고형분 1.55% 수율 8.07% Brix 16.5 함량 30.08mg/g	80°C, 6hr 고형분 1.13% 수율 6.23% Brix 16.0 함량 27.56mg/g	80°C, 6hr 고형분 1.24% 수율 6.54% Brix 16.5 함량 20.80mg/g
<1차+잔사 혼합> 1차, 잔사 추출물 각 여과하여 혼합	-	고형분 2.23% 수율 32.84% Brix 17.0 함량 34.28mg/g	고형분 1.94% 수율 33.59% Brix 17.0 함량 37.61mg/g	고형분 2.09% 수율 34.25% Brix 17.2 함량 27.89mg/g
<여과(규조토)>	-	-	-	고형분 1.97% 수율 31.58% Brix 17.0 함량 28.82mg/g
<농축> 25~30Brix까지 농축	농축 온도 67°C 고형분 28.00% 수율 27.40% Brix 27.96	농축 온도 45°C 고형분 23.52% 수율 32.96% Brix 24.9 함량 33.96mg/g	농축 온도 65°C 고형분 23.99% 수율 34.45% Brix 24.0 함량 36.32mg/g	농축 온도 65°C 고형분 28.42% 수율 33.65% Brix 30.0 함량 25.97mg/g
<농축액 여과> (규조토)	-	-	-	고형분 19.79% 수율 28.18% Brix 21 함량 24.42mg/g
<덱스트린 혼합> 말토덱스트린 사용	투입량 23.5kg 전체 건조물 양 78.3kg 수율 39.15%	투입량 140g 고형분 31.57% 수율 48.21% Brix 31.5 함량 22.67mg/g	투입량 14.67g 고형분 32.43% 수율 49.12% Brix 31.5 함량 24.07mg/g	투입량 12.08g 고형분 26.84% 수율 40.34% Brix 27.5 함량 16.30mg/g
<살균>	80°C, 40min	80°C, 40min 고형분 31.62% 수율 47.43% Brix 31.5 함량 23.11mg/g	80°C, 40min 고형분 32.43% 수율 46.80% Brix 32.0 함량 24.09mg/g	80°C, 40min 고형분 27.12% 수율 39.54% Brix 27.5 함량 16.10mg/g
<살균 후 여과> (규조토)	-	-	-	고형분 22.88% 수율 38.21% Brix 23.0 함량 16.20mg/g
<건조>	S.D 건조 진행 수분함량 4.2% 건조물 76.0kg 수율 38.0% 건조수율 97.1% 함량 13.80mg/g	S.D 건조 진행 건조물 429.7g 수율 42.97% 함량 24.43mg/g	감압농축기 건조 함량 26.09mg/g	감압농축기 건조 함량 17.23mg/g

※ 함량 분석결과의 경우 고형분 차이에 따라 소폭의 차이가 있을 수 있음.

(4) 계절 및 부위에 따른 상관관계 분석 결과

(가) 2019년도 봄, 여름, 가을에 수집된 병풀의 잎과 잎자루의 비율을 측정하고, 이에 대한 지표성분 함량을 분석한 결과, 잎과 잎자루의 비율이 지표성분 함량에 영향을 미치는 것으로 확인하였음

① 특히 수분이 많이 공급될 수 있는 여름에 잎자루의 비율이 높았으며, 지표성분은 함량은 낮게 측정되었음

구분	잎:잎자루 비율 (%)	수분 (%)	수율 (%)	지표성분 함량 (mg/g)
봄	80:20	91.56	34.1	39.7
여름	67:33	95.43	39.0	25.2
가을	73:27	90.94	42.1	46.7

(나) 잎과 잎자루 비율에 따른 지표성분 함량의 변화를 분석하기 위해 가을에 수집된 병풀을 잎과 잎자루로 분리하여 지표성분의 함량을 측정한 결과, 추출수율은 유사하였으나, 지표성분의 함량은 약 15.3배의 차이가 나는 것을 확인함

(다) 최종 병풀 원재료의 표준화를 위해 잎과 잎자루의 비율에 따른 지표성분의 함량을 분석한 결과 잎과 잎자루의 비율이 55:45 일 때 1차 생산한 원료의 범위내에 속하는 것으로 확인됨

구분	수율 (%)	지표성분 함량 (mg/g)
잎	49.8	53.6
잎자루	49.4	3.5
잎:잎자루=55:45	43.3	14.9

(5) 결론

(가) 병풀 원재료의 재배관리는 규격화된 본 연구의 병풀주정추출분말을 제조하는데 매우 중요하며, 수분 공급 및 차광 연구를 통해 적절한 원재료의 재배가 이루어져야 함

① 본 연구에 사용된 합천산 병풀 농가를 방문하여 이러한 연구결과를 전달할 예정이며, 재배관리가 될 수 있도록 협의할 예정임

(나) 또한, 재배단지를 구축하고 있는 농업법인(주)트리즈바이오텍에서는 해당 연구를 진행하여 표준화된 병풀 재배를 위한 재배단지를 구축하고 있어 본 연구에 따른 사업화 기반에 활용될 예정임

10. 병풀주정추출분말의 함유 성분 분석

가. 병풀주정추출분말의 신규 기능성분 분석을 위한 LC/MS 분석

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀의 주요성분 4종 (asiaticoside, asiatic acid, madecassoside, madecassic acid) 이외의 기능성분 확보를 위한 성분 분석
- (나) 간 보호 특허의 경우 중국에서 병풀추출물과 주요성분 4종의 특허가 출원되어 있어, 간 건강 특허 확보를 위해 추가 기능성분 확보를 진행하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 측정장비

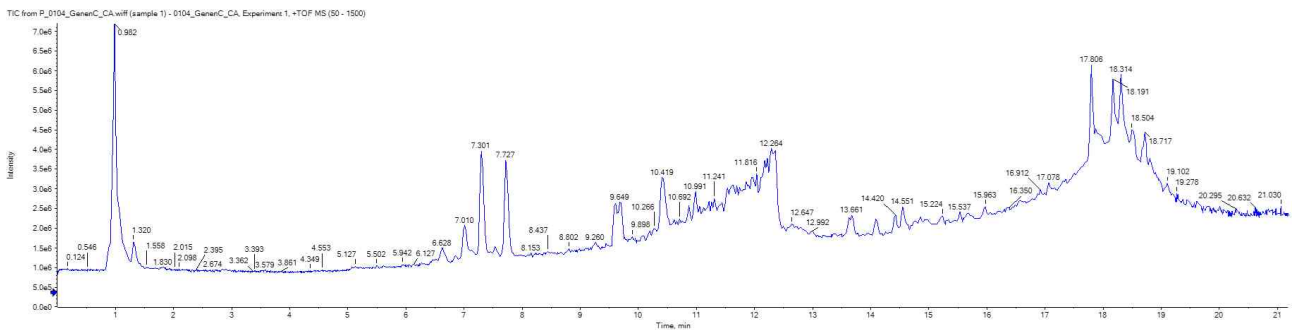
- ① 액체크로마토그래프/질량분석기

(나) 분석방법

- ① Triterpenoid 계열의 성분분석을 위한 asiaticoside 분석법 활용 (서울대학교 나이섬 분석실에서 진행)

(3) 실험결과

- (가) 약 88개의 성분이 검출되었으며, 성분 연구 진행 예정



NO.	Metabolite Name	Retention Time(min)	병풀주정추출분말
1	Stachyose	0.98	6.34
2	D-Gln	0.98	5.09
3	BMS-253653-MA omapatrilat metabolite, methyl acrylate derivative	0.98	4.62
4	Gentianose	0.99	6.39
5	Lansoprazole	0.99	4.6
6	Sucrose	1	5.79
7	D-Fructose	1	5.4
8	Muramate	1.02	5.5
9	Betaine	1.04	4.92
10	Pipecolate	1.08	4.44
11	L-5-Oxoproline	1.31	5.63
12	Adenosine	1.33	5.56
13	b-Leucine	1.33	4.8
14	Phe_RT1	1.82	5.22
15	MLS000515793-01!	3.58	4.84
16	Chlorogenate	5.1	5.12
17	Caffeate_RT1	5.11	4.94
18	Quercetin-3-Glucuronide	6.62	5.86

19	Spiraeoside	6.62	3.93
20	Quercetin_RT1	6.63	4.64
21	Azelaate_RT1	6.84	3.49
22	Quercetin 3-O-malonylglucoside	6.87	2.92
23	Luteolin 7-glucoside	6.99	3.62
24	Scutellarin	7.01	6.92
25	MLS000697730-01!_RT2	7.01	5.1
26	4,5-Dicaffeoylquinic acid	7.03	5.92
27	Caffeate_RT2	7.03	6.83
28	Astemizole_RT1	7.26	3.17
29	Madecassoside_RT1	7.3	6.16
30	Neohesperidose_RT1	7.3	5.36
31	Madecassic acid_RT1	7.3	6.31
32	Caffeate_RT3	7.44	5.24
33	Asiaticoside	7.72	5.93
34	3-Oxoursan (28-13)Olide_RT1	7.72	6.4
35	Rutinose_RT2	7.72	4.73
36	NCGC00380457-01!_RT1	7.72	3.65
37	Quercetin_RT2	8.46	4.6
38	5,6-Dihydroprostaglandin E3	8.81	3.17
39	MLS000697730-01!_RT3	9.25	5.4
40	Madecassic acid_RT2	9.61	6.42
41	3-Oxoursan (28-13)Olide_RT3	10.41	6.48
42	Asiatic acid_RT3	10.41	6.62
43	Propanedinitrile	10.76	4.64
44	Isoalantolactone	10.86	4.61
45	NCGC00385811-01!6-[3-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl)butyl]-4-methoxy-1,3-benzodioxole	11.11	5.16
46	13-KODE_RT2	11.52	5.29
47	1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	11.54	4.83
48	Diethyl sulfosuccinate_RT1	11.63	5.62
49	1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	11.82	5.46
50	9,10-EODE_RT1	11.97	5.55
51	Phosphatidylcholine 14:0-16:0	12.26	4.93
52	Glutathione	12.32	8
53	13-KODE_RT3	12.42	5.3
54	Sorbitan monopalmitate_RT1	12.49	5.11
55	Phosphatidylethanolamine 16:0-20:4	12.52	4.92
56	3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde	12.54	5.04
57	Monolinolenin (9c,12c,15c)_RT1	12.89	4.88
58	Dibutyl phthalate	12.99	5.54
59	Phthalate	12.99	4.84
60	Monoisobutyl phthalate	12.99	5.14
61	2-Linoleoylglycerol_RT1	13.37	4.99
62	9(10)-Epoxy-12Z-octadecenoic acid_RT2	13.63	5.78
63	2-Palmitoyl-rac-glycerol_RT2	13.68	5.91
64	Linoelaidic acid	14.09	5.65
65	Palmitic acid_RT3	14.43	4.88
66	1-Stearoyl-rac-glycerol_RT1	14.55	6.09
67	Isostearic acid_RT1	14.55	4.63

68	beta-Sitosterol_RT1	14.6	4.94
69	Dilinolenin (9c,12c,15c)	14.76	5.18
70	Phosphatidylcholine 16:1-18:3	14.95	4.64
71	Phosphatidylinositol 18:0-22:4	15.36	4.73
72	9Z,11E,13E-Octadecatrienoic acid ethyl ester	15.44	5.09
73	Erucamide	15.54	6.28
74	Pheophorbide a_RT1	15.65	5.56
75	Linoleic acid ethyl ester	15.86	4.68
76	Diocetyl phthalate	15.97	6.45
77	Pheophorbide a_RT2	15.97	4.36
78	Glycerol tricaprilate	16.58	5
79	Di(5-nonyl) phthalate	16.6	6.02
80	Cholesterol 3-sulfate	16.92	5.56
81	Fucosterol	17.04	4.8
82	Dodecamethylcyclohexasiloxane	17.11	4.59
83	beta-Sitosterol_RT3	17.23	4.89
84	Cyclopropanecarboxamide	17.8	5.32
85	1-Stearoyl-rac-glycerol_RT2	18.83	4.11
86	Sphingomyelin d18:0-C16:0	19.63	5.48
87	1,2-Ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)_RT2	22.65	4.61
88	Fluticasone propionate (Flonase, Veramyst)	22.69	4.89

11. 동물모델에서 병폴주정추출분말의 효능 검증

가. 망막손상 동물모델에서 병폴주정추출분말의 망막질환 예방 및 회복 효과

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병폴주정추출분말로부터 눈 건강 기능성 원료 개발을 위하여 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 유도 망막손상 동물모델에서의 망막질환 예방 및 회복 효과를 검증하고자 하였음

① 일반적으로 MNU 유도 동물모델은 망막퇴화 유도 동물모델로서 photoreceptor cell의 손실 등의 작용을 하여 망막손상을 일으킴

(나) 본 연구에서는 MNU로 망막손상을 유발한 후 약 4주간의 병폴주정추출분말과 양성 대조군으로 루테인을 투여하고 이에 따른 망막손상에 대한 개선효과를 확인하고자 함

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

① C57BL/6 mice (21±3 g, 7주령 Male)

② N-methyl-N-nitrosourea (Spectrum Chemical, USA)

(나) 실험방법

① C57BL/6 마우스에 병폴주정추출분말을 50, 100, 200 mg/kg로 7일 동안 경구 투여하고, 투여 완료 후 MNU(망막퇴행성유도물질)을 50 mg/kg 농도로 1회 복강투여

② 24시간 후 혈액과 안구조직을 수집함

(다) 실험군 (n=6)

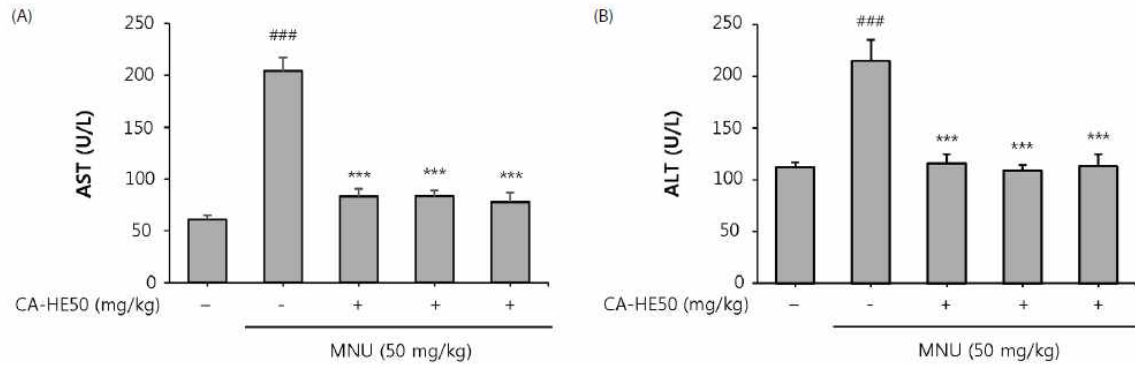
① NC: MNU 미처리+생리식염수 경구투여

② MNU: MNU 50 mg/kg+생리식염수 경구투여

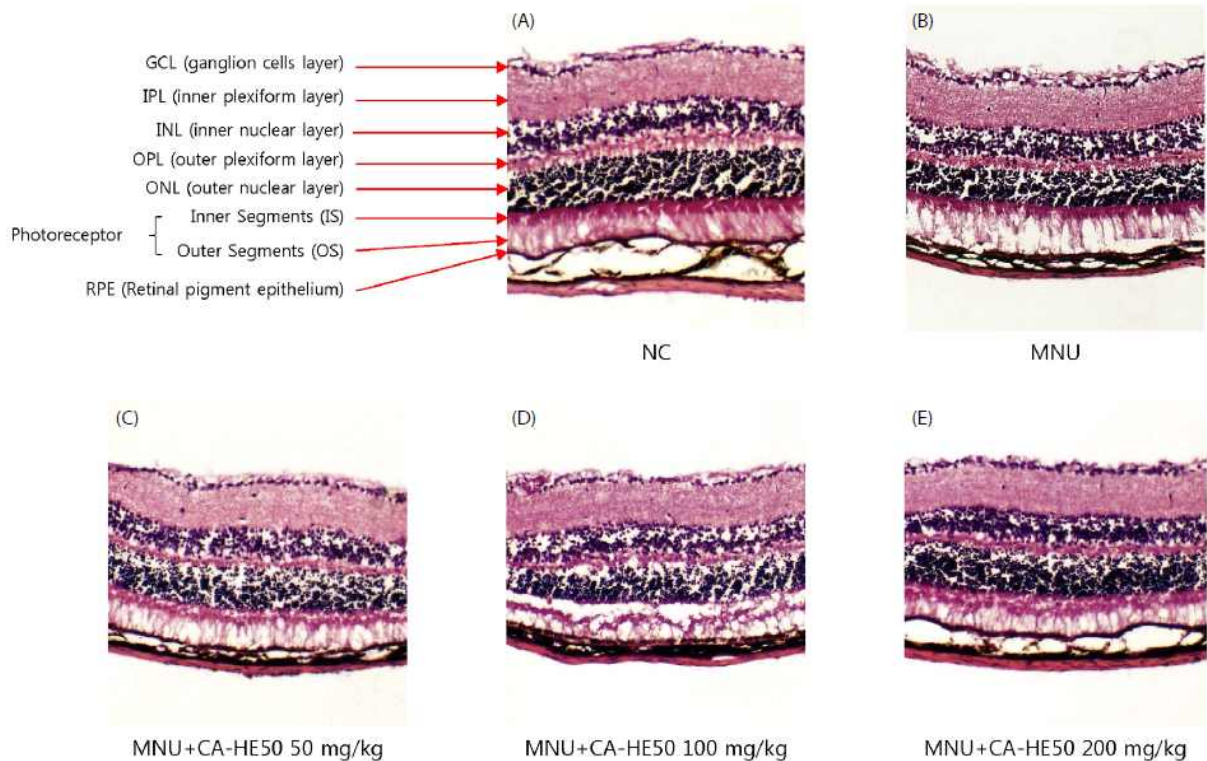
- ③ MNU+CA-HE50 50 mg/kg: MNU 50 mg/kg+병풀주정추출분말 50 mg/kg 투여
- ④ MNU+CA-HE50 100 mg/kg: MNU 50 mg/kg+병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여
- ⑤ MNU+CA-HE50 200 mg/kg: MNU 50 mg/kg+병풀주정추출분말 200 mg/kg 투여

(3) 실험결과

(가) MNU에 의하여 혈중 AST와 ALT의 수치는 약 2배 이상 증가하였으며, 병풀주정추출분말 투여에 의해 혈중 AST와 ALT 수치가 정상적으로 회복되는 것을 확인함



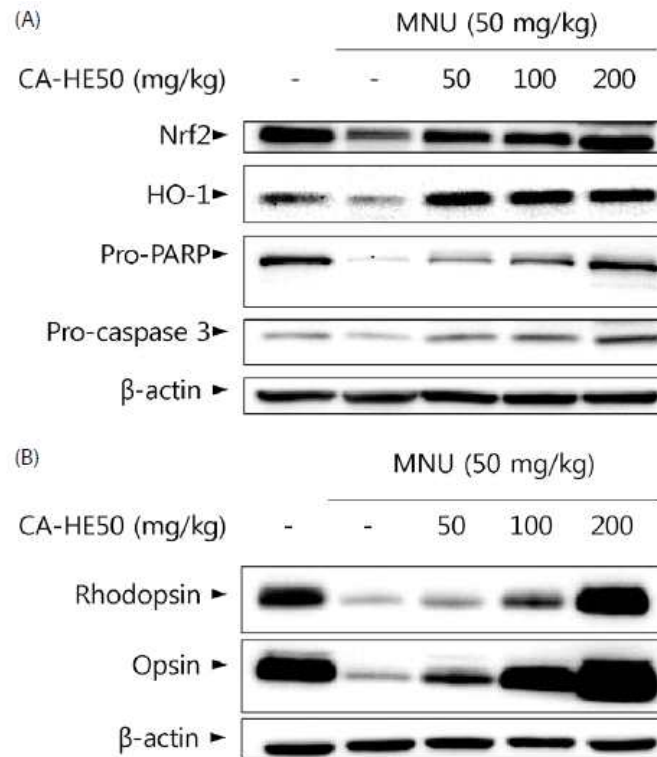
(나) MNU는 세포사멸을 통해 빠르게 망막 손상을 유도하는 독성물질로 (Nakajima et al., 1996), 병풀주정추출분말은 MNU에 의해 감소된 OPL과 photoreceptor의 두께를 회복시켰음



(다) 안구조직에서의 단백질 발현양상 분석

- ① 병풀주정추출분말 투여군은 안구조직에서 항산화 마커인 NRF2와 HO-1의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 세포사멸과 관련된 마커인 PARP와 caspase-3의 비활성 형태의 발현을 증가시켰음
- ② 또한, 광수용체에서 빛을 받아들여 뇌로 전달하는데 사용되는 로돕신과 옵신의 발현

(Palczewski, 2006; Mannu, 2014)도 MNU 처리 시 크게 감소되었다가 신장물질 투여에 의해 증가하는 것을 확인하였음



(라) 추측 가능한 작용기전

- ① 병풀주정추출분말은 망막세포 사멸과 관련된 단백질의 발현을 억제하고, 항산화 단백질의 발현을 증가시킴과 동시에 세포의 포도당 흡수를 증가시켜 망막세포의 사멸을 보호하는 것으로 사료됨

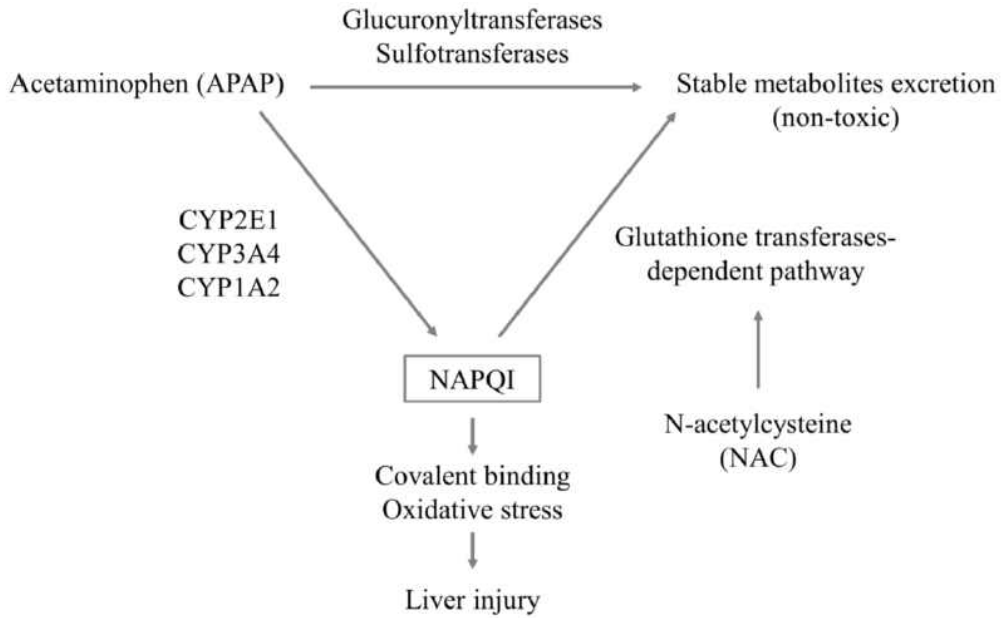
나. 간손상 동물모델에서 병풀주정추출분말의 간 질환 개선 효과 검증

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 아세트아미노펜 (Acetaminophen, APAP) 유도 간 손상 동물모델을 활용하여 병풀주정추출분말의 간 손상 개선 효과를 검증하고자 하였음

- ① 과량의 아세트아미노펜은 간 내에서 glucuronidation (글루쿠론산화) 또는 sulfation (황산화) 을 통해 무독성의 안정적인 물질로 전환되거나, cytochrome p450 system (CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2)에 의해 반응성 대사산물인 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI)으로 전환됨
- ② 아세트아미노펜은 NAPQI는 Glutathione transferase-dependent pathway (글루타티온 전이효소-의존적 경로)를 통해 무독성의 대사산물로 빠르게 전환되나 과량의 아세트아미노펜을 복용했을 경우 NAPQI의 수준이 크게 증가하게 되는데, 글루타티온 전이효소-의존적 경로를 겪지 못한 잉여 NAPQI는 간 내 단백질과 공유 결합하거나 산화적 스트레스를 유발함으로써 간 손상을 유도하게 됨 (Lancaster et al., 2015; Kane et al., 2016)
- ③ 또한, 과량의 아세트아미노펜 복용은 면역 세포의 활성화와 급성 염증반응을 유도함으로써 급성 간 부전으로 발전하게 함 (Woolbright and Jaeschke, 2017)

(나) 아세트아미노펜의 metabolism



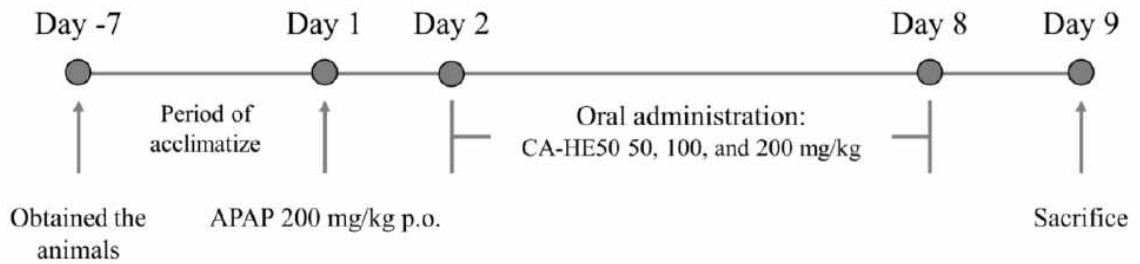
(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

- ① BALB/c mice (22±3 g, 5주령 Male)

(나) 실험방법

- ① BALB/c 마우스에 먼저 아세트아미노펜을 200 mg/kg의 농도로 1회 경구 투여한 다음, 24시간 후 병풀주정추출분말을 50, 100, 200 mg/kg로 7일 동안 경구 투여하고, 실험을 시작한 지 9일째 되는 날 혈액과 간 조직을 수집함

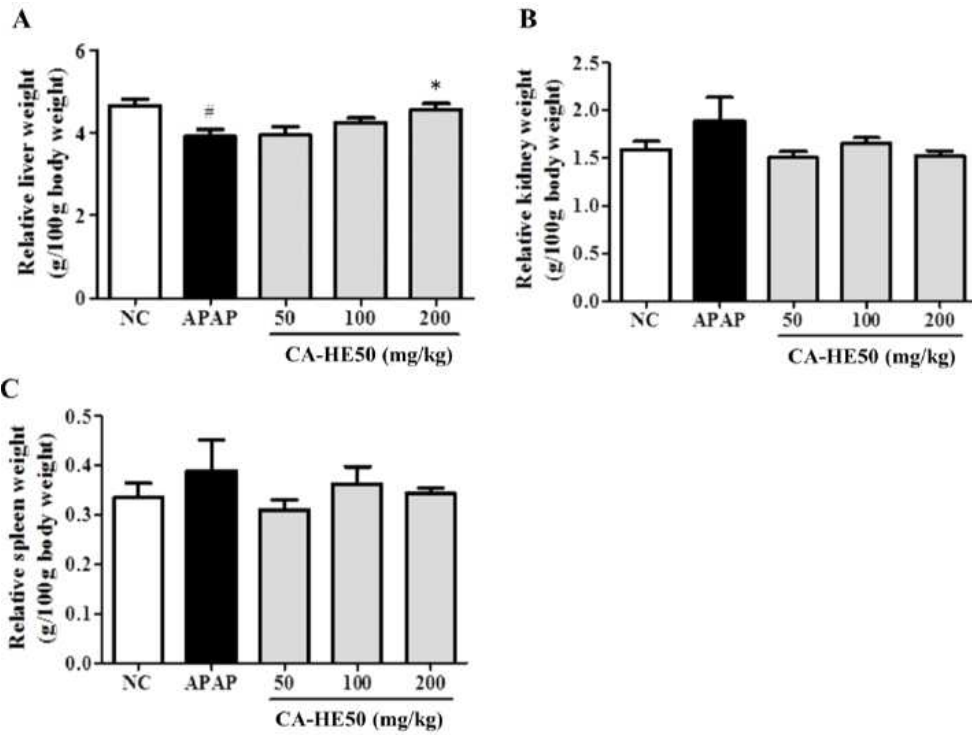


(다) 실험군 (n=10)

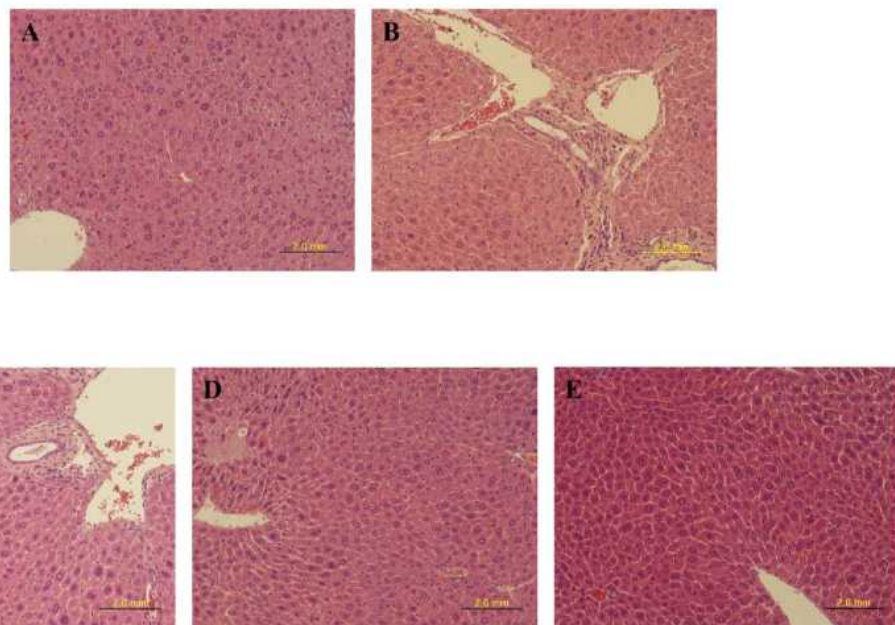
- ① NC: APAP 미처리+생리식염수 경구투여
- ② APAP: APAP 200 mg/kg+생리식염수 경구투여
- ③ CA-HE50 50: APAP 200 mg/kg+병풀주정추출분말 50 mg/kg 투여
- ④ CA-HE50 100: APAP 200 mg/kg+병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여
- ⑤ CA-HE50 200: APAP 200 mg/kg+병풀주정추출분말 200 mg/kg 투여

(3) 실험결과

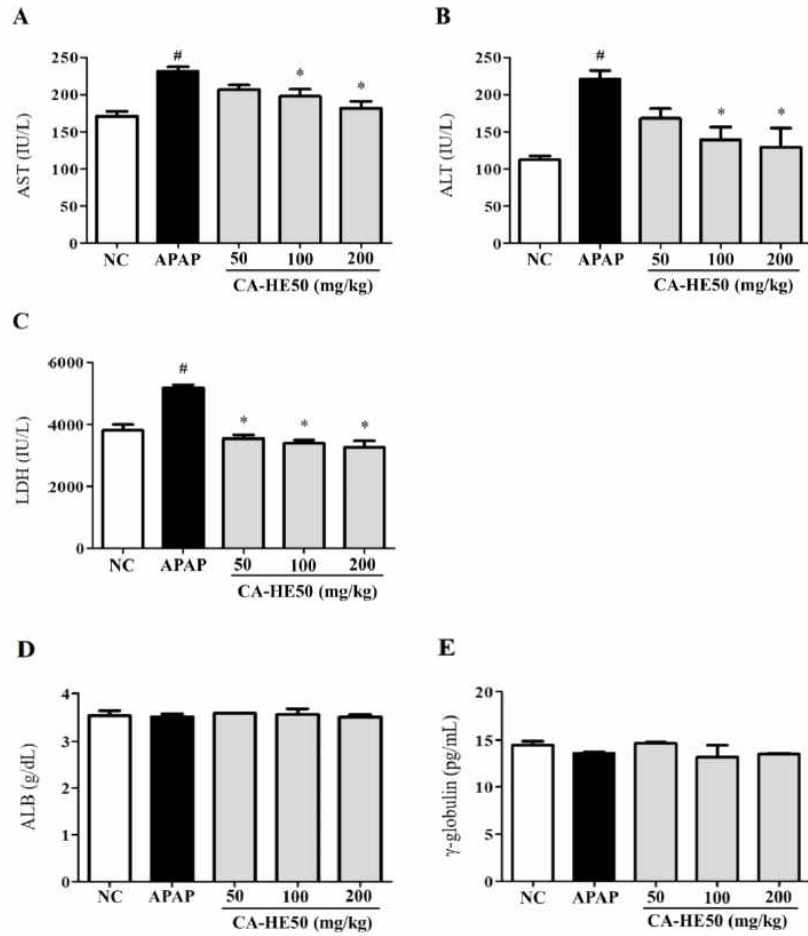
- (가) 간, 신장, 비장의 조직무게를 측정된 결과 유의미한 변화는 관찰되지 않았음



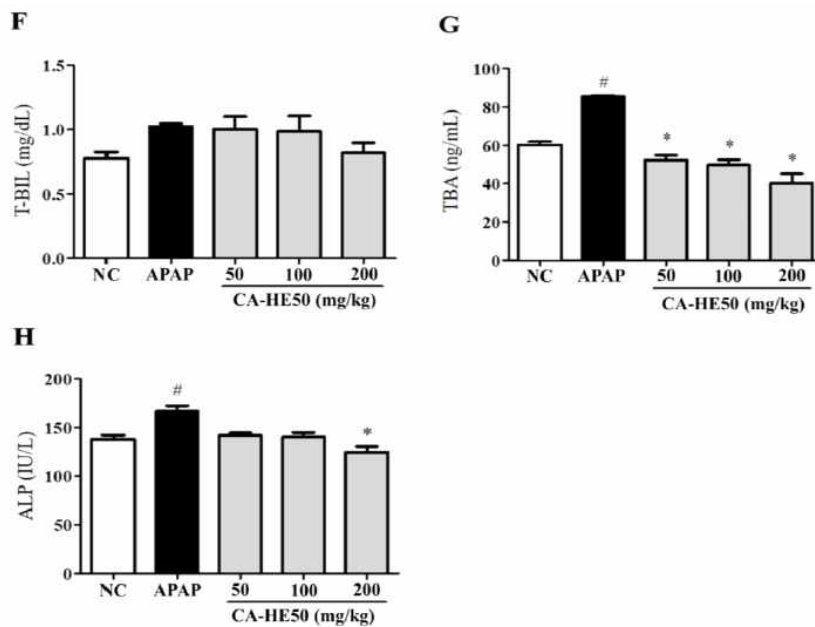
(나) 아세트아미노펜을 처리한 간 조직(대조군)에서는 간세포의 괴사와 세포 위축이 관찰되었으나, 병풀주정추출분말 투여군에서는 정상적인 배열을 확인하였음 (A, normal control (0.9% saline); B, vehicle control (200 mg/kg APAP p.o. + 0.9% saline); C, APAP + CA-HE50 50 mg/kg; D, APAP + CA-HE-50 100 mg/kg; E, APAP + 200 mg/kg, ×100)



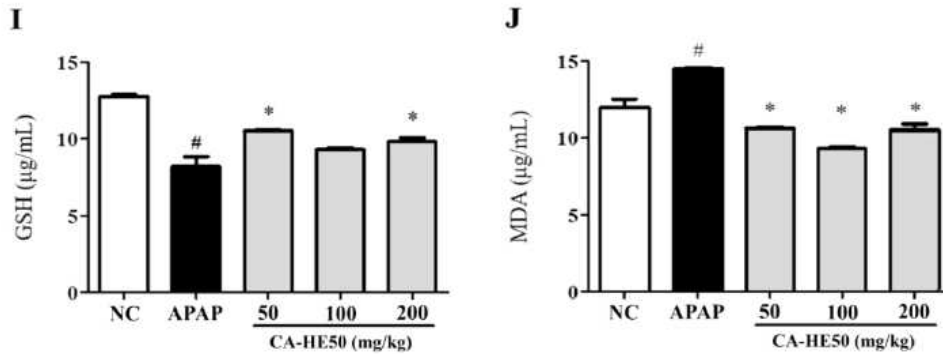
(다) 간 기능을 유추할 수 있는 생화학지표 중, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH)의 혈중 방출을 감소시켰으며, 이의 결과로 간 손상에 대한 개선효과가 있음을 확인함



(라) Alkaline phosphatase (ALP)는 간세포 내 담관에 존재하는 효소로, 담즙배설 장애 상태일 때 혈중에서 빠르게 상승하는 지표이며, total bile acid (TBA)는 담즙배설 또는 재흡수의 수준을 알 수 있는 지표로 간 손상이 발생할 경우 이 두 지표 또한 크게 증가하는데 (Thapa and Walia, 2007), 병풀추출분말 투여군은 혈중 ALP와 TBA의 수준이 의미 있게 감소하였음

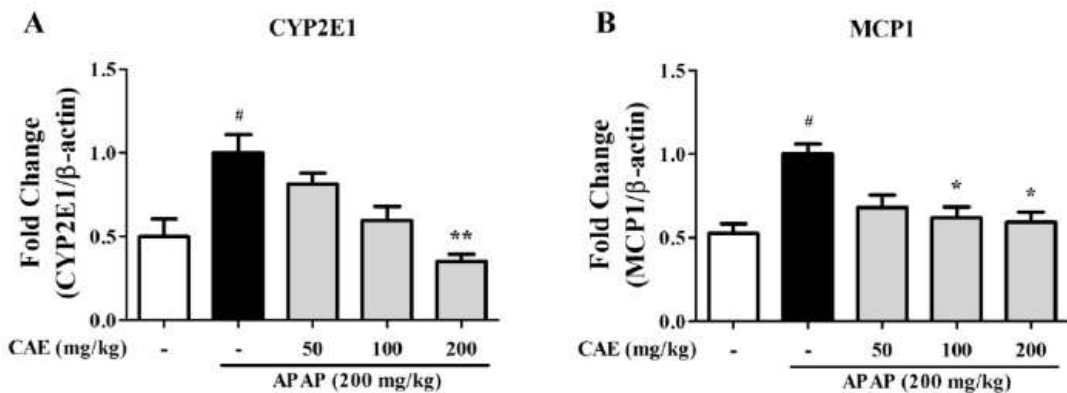


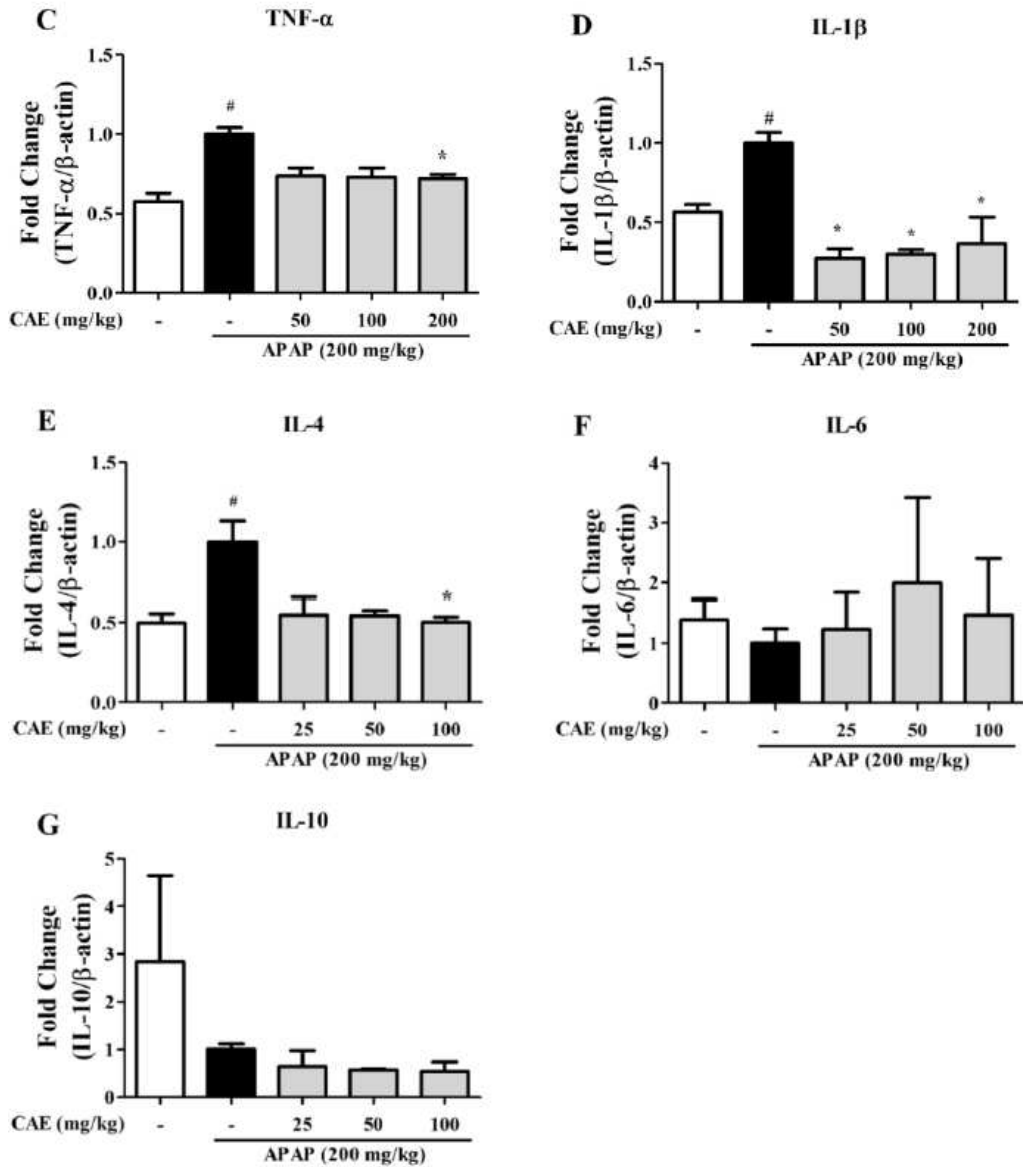
(마) 과량의 아세트아미노펜은 간 내 항산화제인 glutathione (GSH)의 고갈과 산화 스트레스 지표인 malondialdehyde (MDA)의 생성을 촉진시키며 (Li et al., 2015), 병풀주정추출분말 투여군은 두 지표의 유의미한 변화를 발생시킴으로써 간 손상 회복에 도움을 줄 수 있음을 확인함



(바) 과량의 아세트아미노펜에 대한 병풀주정추출분말의 간 보호 효과: 간 조직내 유전자 발현 분석

- ① 과량의 아세트아미노펜을 복용할 경우, 독성물질인 NAPQI로 전환시키는 CYP2E1의 발현이 유의적으로 증가되며, NAPQ와 미토콘드리아와의 공유결합이 증가하고 산화적 스트레스 또한 증가하게 됨으로써 DNA 분열과 간세포 손상을 유도함 (Hinson et al., 2010)
- ② 아세트아미노펜은 IL-4, IL-6, IL-10의 발현을 유도하며, CYP2E1은 염증유도성 사이토카인인 IL-1 β 및 TNF- α 와 관계가 있고, 또한 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)은 단핵구/대식세포의 이동 및 침윤을 조절하는 핵심 케모카인으로, 백혈구의 운동을 유도하는 것 외에도 Th2 세포 반응의 발달과 관련이 있으며 T 세포에 의한 IL-4의 분비를 향상시키는 지표임 (Deshmane et al., 2009)
- ③ 병풀주정추출분말 섭취에 따른 간 조직의 CYP2E1, MCP1, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 유전자 발현 양상을 측정된 결과, 과량의 아세트아미노펜에 의해 크게 증가한 CYP2E1, MCP1, TNF- α , IL-1 β , IL-4의 발현은 병풀주정추출분말 섭취에 의해 유의미한 발현 억제가 관찰됨으로써 병풀주정추출분말은 간세포 보호효과가 있음이 확인됨





다. 비알코올성 지방간 동물모델에서 병풀주정추출분말의 개선 효과 검증

(1) 연구 목적 및 방법

(가) Oleic acid 유도 비알코올성 지방간 in vitro 연구에서 병풀주정추출분말의 개선 효과가 관찰됨에 따라 이에 MCD diet 유도 동물모델에서 비알코올성 지방간 개선 효과를 검증하고자 하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

① C57BL/6 mice (20.0±0.4 g, 5주령 Male)

(나) 실험방법

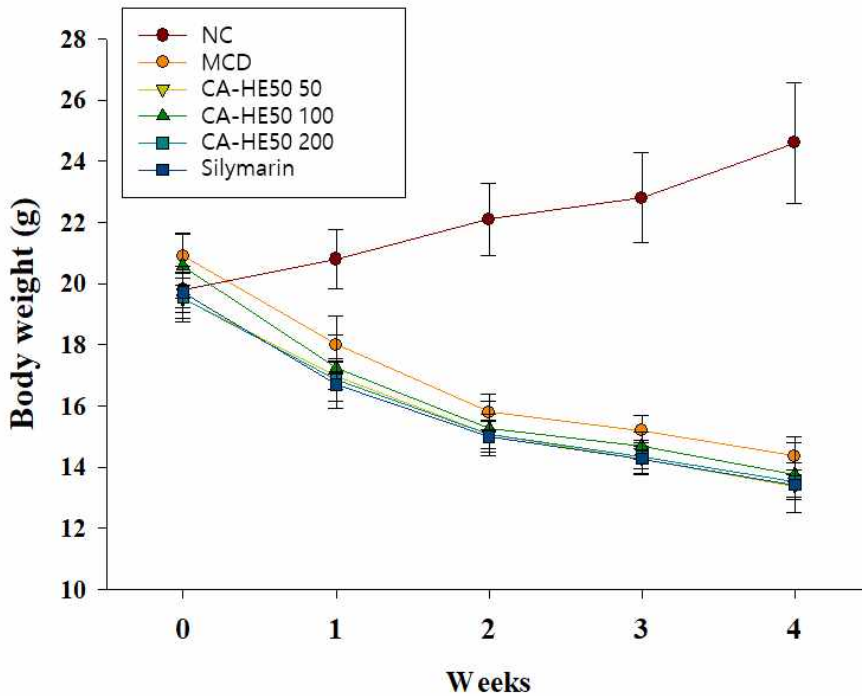
① MCD diet를 4주간 자율적으로 섭취시키면서 병풀주정추출분말 50, 100, 200 mg/kg 과 양성대조군 silymarin을 100 mg/kg로 4주간 경구 투여하고, 24시간 후 혈액과 조직을 수집함

(다) 실험군 (n=6)

- ① NC: Normal diet+생리식염수 경구투여
- ② MCD: MCD diet+생리식염수 경구투여
- ③ CA-HE50 50: MCD diet+병풀주정추출분말 50 mg/kg 투여
- ④ CA-HE50 100: MCD diet+병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여
- ⑤ CA-HE50 200: MCD diet+병풀주정추출분말 200 mg/kg 투여
- ⑥ Silymarin: MCD diet+silymarin 100 mg/kg 투여

(3) 실험결과

(가) MCD diet의 섭취는 전체적으로 체중 감소를 유발하였으며, MCD diet 섭취군 간의 차이는 발생하지 않았음



(나) 시험 종료 후 신장, 비장, 간을 회수하여 이에 대한 무게를 측정된 결과, 각 조직별 큰 변화는 관찰되지 않았으나, 간의 무게가 병풀주정추출분말에 의해 회복되는 것을 확인하였음

Group	Kidney (g/100 g)	Spleen (g/100 g)	Liver (g/100 g)
NC	1.16 ± 0.033	0.27 ± 0.012	4.66 ± 0.034
MCD	1.16 ± 0.014	0.23 ± 0.014	4.50 ± 0.114
CA-HE50 50	1.19 ± 0.035	0.18 ± 0.009	4.21 ± 0.329
CA-HE50 100	1.21 ± 0.005	0.24 ± 0.008	4.56 ± 0.134
CA-HE50 200	1.19 ± 0.017	0.19 ± 0.002	4.99 ± 0.127
Silymarin	1.22 ± 0.039	0.22 ± 0.008	5.08 ± 0.345

(다) MCD diet는 메티오닌과 콜린이 결핍되어 있는 식이로 VLDL을 생성하지 못하게 하여 간에 지질이 축적시키므로 혈중 콜레스테롤의 함량이 급격히 감소함

① 시험 종료 후 혈액을 채취하여 혈중 지질 관련 바이오마커를 측정된 결과, 병풀주정

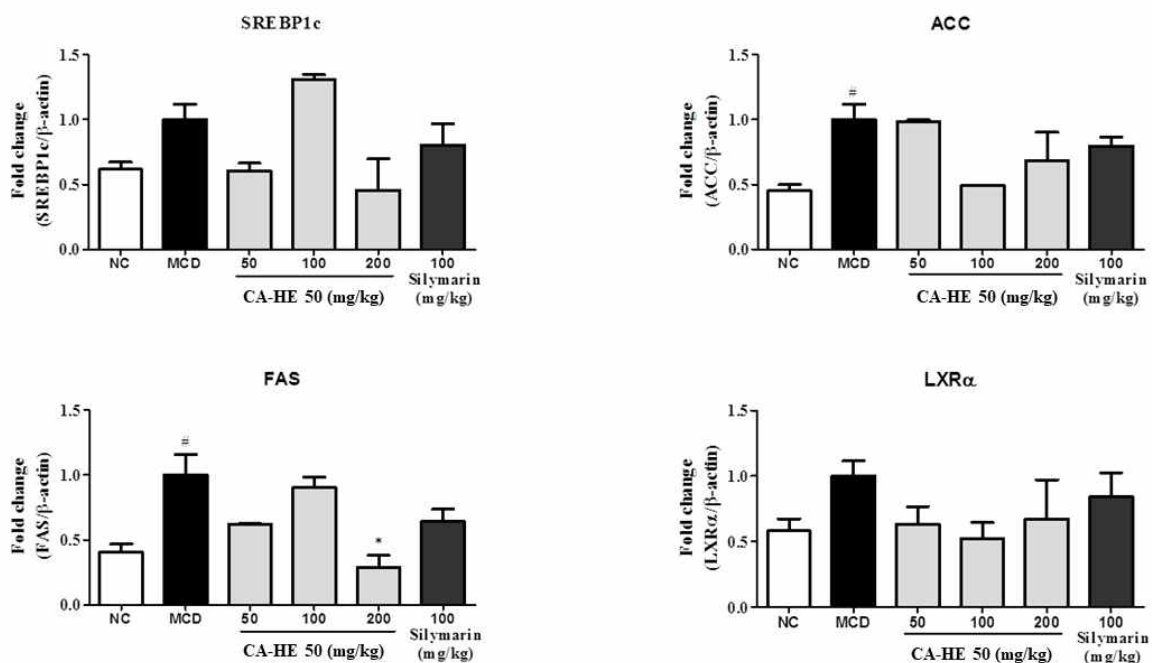
추출분말 투여군은 혈중 TG 농도를 감소시켰으며 혈중 콜레스테롤은 증가시켰음

Group	TG (ng/dL)	Total-Chol (ng/dL)	HDL-Chol (ng/dL)	LDL-Chol (ng/dL)
NC	66.0 ± 3.06	111.3 ± 2.40	94.0 ± 1.15	14.67 ± 1.15
MCD	76.6 ± 3.53	22 ± 1.15#	27.3 ± 2.67#	11.3 ± 0.67
CA-HE50 50	69.3 ± 1.76	27.3 ± 4.37	33.3 ± 1.76	9.3 ± 0.67
CA-HE50 100	68.6 ± 4.67	31.3 ± 4.81	38.6 ± 2.40*	11.3 ± 3.71
CA-HE50 200	64.0 ± 4.16	31.3 ± 1.76	39.3 ± 0.67*	10.0 ± 1.15
Silymarin	66.3 ± 3.53	22.0 ± 4.00	34.0 ± 2.00	8.6 ± 0.67

(라) 또한, 병풀주정추출분말은 간기능과 직접적으로 관련이 있는 AST와 ALT의 혈중 농도를 효과적으로 조절하였음

Group	AST (U/I)	ALT (U/I)
NC	138.0 ± 16.04	70.0 ± 8.00
MCD	442.6 ± 42.21#	352.0 ± 11.02#
CA-HE50 50	274.0 ± 19.08*	263.3 ± 51.35
CA-HE50 100	393.3 ± 15.10*	263.3 ± 10.48
CA-HE50 200	222.6 ± 19.88*	173.3 ± 15.93*
Silymarin	225.3 ± 5.33	274.0 ± 12.22

(마) 비알코올성 지방간이 유도되면 간에서 SREBP1c 등의 전사인자와 ACC, FAS, LXRα 등의 유전자의 발현이 증가되는데, 병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여군에서 이상 데이터가 발생하였지만, 일반적으로 해당 유전자의 조절 효과가 관찰되었음



12. 병풀주정추출분말의 안전성 검증

가. SD 랫드를 이용한 병풀주정추출분말의 단회 경구투여 독성시험

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 시험물질 병풀주정추출분말을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성증상과 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)을 조사하기 위해 실시함

(나) GLP 기관인 한국건설생활환경시험연구원에서 안전성 검증 (GT18-00019)

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

① 특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 랫드[CrI:CD(Sprague Dawley)]. 암컷의 경우, 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용함

(나) 투여방법

① 투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존테를 이용하여 강제 경구투여 하였고, 약 3~4 시간 후 사료를 재공급하였으며 절식중이라도 음수는 공급함

(다) 실험군

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg bw)	투여용량 (mg/kg bw)
G1	Male	5	G1-1~G1-5	5	0
	Female	5	G1-21~G1-25		
G2	Male	5	G2-6~G2-10	5	500
	Female	5	G2-26~G2-30		
G3	Male	5	G3-11~G3-15	5	1,000
	Female	5	G3-31~G3-35		
G4	Male	5	G4-16~G4-20	5	2,000
	Female	5	G4-36~G4-40		

G1 : 부형제 대조군, G2~G4 : 시험물질 투여군

(3) 실험결과

(가) 사망동물

① 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았음

SUMMARY OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS					
STUDY : GT18-00019		SEX : MALE			
		GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
MORTALITIES	No. of dead animals	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	No abnormalities detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

		SEX : FEMALE			
		GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
MORTALITIES	No. of dead animals	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	No abnormalities detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

(나) 일반증상

① 실험기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았음

(다) 체중변화

① 체중측정결과, 암컷 부형제 대조군의 1 레(G1-24 번), 1,000 mg/kg 투여군의 3 레(G3-31, G3-32, G3-34 번), 그리고 2,000 mg/kg 투여군의 2 레(G4-36, G4-37 번)에서 시험물질 투여 후 3 일째 체중이 투여 후 1 일째에 비하여 감소하였음

② 그 외 기간 및 시험동물에서는 정상적인 체중 증가가 관찰되었으며, 통계학적 검정 결과, 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았음

SUMMARY OF BODY WEIGHTS(g)

STUDY : GT18-00019

SEX : MALE

Day	GROUP(mg/kg)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	243.22 ± 9.49 (5)	241.88 ± 6.07 (5)	244.86 ± 6.02 (5)	245.85 ± 7.78 (5)
1	274.92 ± 14.46 (5)	276.27 ± 11.21 (5)	278.34 ± 9.92 (5)	278.05 ± 9.15 (5)
3	288.99 ± 17.19 (5)	287.44 ± 9.84 (5)	291.72 ± 11.45 (5)	291.67 ± 10.65 (5)
7	319.36 ± 27.93 (5)	324.99 ± 15.04 (5)	328.89 ± 15.94 (5)	321.57 ± 13.69 (5)
14	356.73 ± 43.63 (5)	353.35 ± 31.86 (5)	366.49 ± 20.19 (5)	359.19 ± 21.15 (5)

SEX : FEMALE

Day	GROUP(mg/kg)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	171.87 ± 7.97 (5)	176.14 ± 7.00 (5)	176.18 ± 5.97 (5)	175.85 ± 4.56 (5)
1	194.20 ± 9.44 (5)	196.45 ± 7.66 (5)	199.18 ± 5.28 (5)	198.99 ± 8.38 (5)
3	200.29 ± 7.57 (5)	204.21 ± 12.58 (5)	201.26 ± 10.56 (5)	202.42 ± 10.02 (5)
7	214.01 ± 9.63 (5)	219.87 ± 11.59 (5)	217.93 ± 14.39 (5)	218.17 ± 11.18 (5)
14	230.31 ± 16.84 (5)	242.92 ± 13.80 (5)	241.72 ± 15.87 (5)	241.05 ± 13.00 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

(라) 부검소견

① 실험종료 시 부검결과, 모든 시험동물에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았음

SUMMARY OF GROSS FINDINGS					
STUDY : GT18-00019			SEX : MALE		
ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

			SEX : FEMALE		
ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

(4) 고찰 및 결론

(가) 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 병폴주정추출분말에 의한 독성증상은 관찰되지 않았으며, 개략의 치사량은 >2,000 mg/kg로 판단됨

나. SD 랫드를 이용한 병폴주정추출분말의 2주 반복 경구투여 독성시험

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 시험물질 병폴주정추출분말을 Sprague-Dawley 랫드에 2주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위함

(나) GLP 기관인 한국건설생활환경시험연구원에서 안전성 검증 (NT18-00019)

(2) 재료 및 방법

(가) 실험동물

① 특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 랫드[Crl:CD(Sprague Dawley)]. 암컷의 경우, 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용함

(나) 투여경로 및 방법

① 경구투여, 시험동물의 두경배부 피부를 잡아 보정한 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였음

② 1 회/일, 7 일/주, 2 주간 매일 오전 중에 투여하였음

(다) 실험군

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg/day)	투여용량 (mg/kg/day)
G1	Male	5	G1-1~G1-5	5	0
	Female	5	G1-21~G1-25		
G2	Male	5	G2-6~G2-10	5	500
	Female	5	G2-26~G2-30		
G3	Male	5	G3-11~G3-15	5	1,000
	Female	5	G3-31~G3-35		
G4	Male	5	G4-16~G4-20	5	2,000
	Female	5	G4-36~G4-40		

G1 : 부형제 대조군, G2~G4 : 시험물질 투여군

(3) 실험결과

(가) 일반증상 및 사망동물

- ① 실험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음

SUMMARY OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS					
STUDY : NT18-00019				SEX : MALE	
DAY	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
1	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
3	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
4	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
5	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
6	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
7	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
8	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
9	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
10	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
11	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
12	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
13	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
14	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined

STUDY : NT18-00019

SEX : FEMALE

DAY	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
1	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
3	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
4	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
5	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
6	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
7	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
8	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
9	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
10	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
11	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
12	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
13	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
14	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined

(나) 체중변화

- ① 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF BODY WEIGHTS(g)

STUDY : NT18-00019

SEX : MALE

WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	208.79 ± 8.11 (5)	209.38 ± 6.63 (5)	209.17 ± 6.21 (5)	211.20 ± 5.17 (5)
1	274.16 ± 12.68 (5)	274.04 ± 10.78 (5)	266.42 ± 7.79 (5)	273.66 ± 9.01 (5)
2	323.54 ± 17.70 (5)	320.14 ± 16.83 (5)	311.78 ± 13.83 (5)	323.69 ± 12.24 (5)

SEX : FEMALE

WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	159.31 ± 8.04 (5)	158.60 ± 5.14 (5)	160.41 ± 5.61 (5)	158.87 ± 6.76 (5)
1	189.24 ± 7.77 (5)	182.15 ± 8.28 (5)	183.71 ± 9.53 (5)	180.21 ± 9.59 (5)
2	207.28 ± 16.84 (5)	202.23 ± 6.26 (5)	204.29 ± 15.33 (5)	200.91 ± 12.64 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

(다) 사료섭취량

- ① 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF DAILY MEAN FOOD CONSUMPTION(g)				
STUDY : NT18-00019		SEX : MALE		
WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	27.12 ± 2.21 (5)	26.01 ± 0.72 (5)	26.31 ± 2.97 (5)	27.55 ± 2.09 (5)
1	31.50 ± 0.29 (5)	29.03 ± 0.62 (5)	27.63 ± 1.00 (5)	30.68 ± 1.35 (5)
2	33.03 ± 0.09 (5)	30.27 ± 2.33 (5)	31.13 ± 1.24 (5)	31.72 ± 0.10 (5)
		SEX : FEMALE		
WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	18.37 ± 0.77 (5)	18.46 ± 0.19 (5)	20.26 ± 1.46 (5)	20.26 ± 2.86 (5)
1	19.55 ± 1.52 (5)	18.18 ± 1.61 (5)	20.22 ± 0.37 (5)	20.60 ± 2.64 (5)
2	20.16 ± 2.41 (5)	21.07 ± 1.20 (5)	21.09 ± 5.23 (5)	21.67 ± 0.97 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

(라) 음수섭취량

- ① 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF DAILY MEAN WATER CONSUMPTION(g)				
STUDY : NT18-00019		SEX : MALE		
WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	28.25 ± 2.15 (5)	31.11 ± 3.81 (5)	29.35 ± 0.51 (5)	34.94 ± 7.19 (5)
1	32.14 ± 4.10 (5)	32.56 ± 3.21 (5)	33.77 ± 8.30 (5)	44.30 ± 8.19 (5)
2	35.28 ± 2.13 (5)	34.79 ± 3.65 (5)	35.36 ± 6.01 (5)	48.76 ± 5.10 (5)
		SEX : FEMALE		
WEEK	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	23.21 ± 2.35 (5)	27.47 ± 2.22 (5)	31.55 ± 2.83 (5)	24.63 ± 1.02 (5)
1	21.97 ± 1.14 (5)	28.18 ± 3.50 (5)	29.46 ± 3.11 (5)	26.52 ± 2.75 (5)
2	23.59 ± 4.23 (5)	36.01 ± 0.12 (5)	35.51 ± 14.92 (5)	26.57 ± 2.30 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

(마) 안검사

① 안검사 결과, 안검사를 실시한 암·수 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았음

SUMMARY OF EYE EXAMINATION					
STUDY : NT18-00019			SEX : MALE		
ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Right eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Left eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
			SEX : FEMALE		
ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Right eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Left eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined

(바) 요검사

- ① 요검사 결과, 암·수 모든 시험군에서 군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF URINALYSIS					
STUDY : NT18-00019		SEX : MALE			
TEST ITEM		GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Glucose	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Bilirubin	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Negative	1 / 5	0 / 5	2 / 5	1 / 5
Ketone body	Trace	3 / 5	5 / 5	2 / 5	3 / 5
	1+	1 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5
	≤1.005	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5
	1.010	1 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5
Specific gravity	1.015	3 / 5	3 / 5	1 / 5	3 / 5
	1.020	0 / 5	2 / 5	2 / 5	0 / 5
	1.025	1 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
Occult blood	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	8.0	1 / 5	2 / 5	1 / 5	2 / 5
pH	8.5	4 / 5	3 / 5	3 / 5	3 / 5
	9.0	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5
	Negative	0 / 5	0 / 5	2 / 5	2 / 5
Protein	Trace	4 / 5	5 / 5	3 / 5	2 / 5
	1+	1 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
Urobilinogen	0.2	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Nitrite	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Negative	0 / 5	3 / 5	2 / 5	0 / 5
Leukocyte	Trace	5 / 5	2 / 5	3 / 5	5 / 5
Color	Straw	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

STUDY : NT18-00019

SEX : FEMALE

TEST ITEM		GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Glucose	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Bilirubin	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Ketone body	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5
	Trace	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
Specific gravity	≤1.005	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
	1.010	4 / 5	2 / 5	0 / 5	1 / 5
	1.015	0 / 5	2 / 5	3 / 5	1 / 5
	1.020	0 / 5	0 / 5	2 / 5	3 / 5
Occult blood	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
pH	6.5	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
	7.0	1 / 5	2 / 5	3 / 5	1 / 5
	7.5	1 / 5	1 / 5	1 / 5	2 / 5
	8.0	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	8.5	1 / 5	1 / 5	1 / 5	2 / 5
Protein	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	3 / 5
	Trace	0 / 5	0 / 5	0 / 5	2 / 5
Urobilinogen	0.2	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Nitrite	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Leukocyte	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5
	1+	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
Color	Colorless	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Straw	4 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5
	Yellow	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined

(사) 혈액학적 검사

- ① 혈액학적 검사결과, 수컷 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군의 MPV(mean platelet volume) 수치가 용량-반응 상관성을 보이며 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였음
- ② 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL TESTS				
STUDY : NT18-00019		SEX : MALE		
TEST ITEM	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
WBC ¹ (K/ μ L)	7.34 ± 1.96 (5)	7.42 ± 1.87 (5)	7.80 ± 1.63 (5)	8.24 ± 3.21 (5)
NE ² (K/ μ L)	0.99 ± 0.27 (5)	0.89 ± 0.43 (5)	0.93 ± 0.40 (5)	1.16 ± 0.58 (5)
EO ³ (K/ μ L)	0.07 ± 0.03 (5)	0.06 ± 0.01 (5)	0.06 ± 0.01 (5)	0.06 ± 0.03 (5)
BA ⁴ (K/ μ L)	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.01 (5)	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.00 (5)
LY ⁵ (K/ μ L)	6.09 ± 1.88 (5)	6.29 ± 1.45 (5)	6.66 ± 1.27 (5)	6.73 ± 2.51 (5)
MO ⁶ (K/ μ L)	0.15 ± 0.05 (5)	0.15 ± 0.05 (5)	0.12 ± 0.04 (5)	0.23 ± 0.14 (5)
LUC ⁷ (K/ μ L)	0.04 ± 0.02 (5)	0.03 ± 0.02 (5)	0.04 ± 0.02 (5)	0.05 ± 0.04 (5)
NEP ⁸ (%)	14.2 ± 4.6 (5)	11.6 ± 3.1 (5)	11.7 ± 3.5 (5)	14.0 ± 2.5 (5)
EOP ⁹ (%)	0.9 ± 0.2 (5)	0.8 ± 0.2 (5)	0.7 ± 0.2 (5)	0.8 ± 0.2 (5)
BAP ¹⁰ (%)	0.0 ± 0.0 (5)	0.1 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.1 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
LYP ¹¹ (%)	82.3 ± 4.8 (5)	85.1 ± 3.0 (5)	85.6 ± 3.9 (5)	82.0 ± 2.4 (5)
MOP ¹² (%)	2.1 ± 0.7 (5)	2.0 ± 0.7 (5)	1.5 ± 0.3 (5)	2.7 ± 0.8 (5)
LUP ¹³ (%)	0.5 ± 0.2 (5)	0.5 ± 0.1 (5)	0.5 ± 0.1 (5)	0.6 ± 0.3 (5)
RBC ¹⁴ (M/ μ L)	7.17 ± 0.28 (5)	7.19 ± 0.32 (5)	7.02 ± 0.36 (5)	7.13 ± 0.40 (5)
Hb ¹⁵ (g/dℓ)	14.0 ± 0.3 (5)	14.2 ± 0.5 (5)	13.9 ± 0.7 (5)	13.8 ± 0.6 (5)
RDW ¹⁶ (%)	11.9 ± 0.4 (5)	11.7 ± 0.4 (5)	11.8 ± 0.3 (5)	11.4 ± 0.2 (5)
HCT ¹⁷ (%)	43.6 ± 0.6 (5)	44.3 ± 1.6 (5)	43.5 ± 1.5 (5)	43.3 ± 1.7 (5)
MCV ¹⁸ (fL)	60.9 ± 1.9 (5)	61.6 ± 1.1 (5)	62.0 ± 1.9 (5)	60.8 ± 2.0 (5)
MCH ¹⁹ (pg)	19.5 ± 0.7 (5)	19.8 ± 0.3 (5)	19.9 ± 0.7 (5)	19.4 ± 0.4 (5)
MCHC ²⁰ (g/dℓ)	32.0 ± 0.3 (5)	32.1 ± 0.3 (5)	32.0 ± 0.5 (5)	31.9 ± 0.8 (5)
Reti ²¹ (%)	4.78 ± 0.61 (5)	4.74 ± 0.34 (5)	4.53 ± 0.45 (5)	4.50 ± 0.60 (5)
PLT ²² (K/ μ L)	1184 ± 43 (5)	1246 ± 124 (5)	1294 ± 133 (5)	1160 ± 118 (5)
MPV ²³ (fL)	5.1 ± 0.2 (5)	5.3 ± 0.1 (5)	5.8** ± 0.2 (5)	6.1** ± 0.2 (5)

TEST ITEM	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
WBC ¹ (K/ μ L)	6.84 ± 2.99 (5)	4.97 ± 0.98 (5)	4.47 ± 1.21 (5)	5.67 ± 1.45 (5)
NE ² (K/ μ L)	0.76 ± 0.39 (5)	0.68 ± 0.34 (5)	0.55 ± 0.32 (5)	0.60 ± 0.17 (5)
EO ³ (K/ μ L)	0.09 ± 0.11 (5)	0.06 ± 0.04 (5)	0.06 ± 0.03 (5)	0.07 ± 0.04 (5)
BA ⁴ (K/ μ L)	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.00 (5)
LY ⁵ (K/ μ L)	5.76 ± 2.48 (5)	4.10 ± 0.87 (5)	3.76 ± 0.88 (5)	4.86 ± 1.33 (5)
MO ⁶ (K/ μ L)	0.17 ± 0.10 (5)	0.11 ± 0.08 (5)	0.08 ± 0.03 (5)	0.12 ± 0.04 (5)
LUC ⁷ (K/ μ L)	0.04 ± 0.03 (5)	0.02 ± 0.01 (5)	0.02 ± 0.01 (5)	0.02 ± 0.02 (5)
NEP ⁸ (%)	11.4 ± 3.5 (5)	13.8 ± 6.2 (5)	11.6 ± 4.0 (5)	10.9 ± 3.0 (5)
EOP ⁹ (%)	1.1 ± 0.8 (5)	1.1 ± 0.5 (5)	1.3 ± 0.5 (5)	1.2 ± 0.4 (5)
BAP ¹⁰ (%)	0.0 ± 0.1 (5)	0.0 ± 0.1 (5)	0.1 ± 0.1 (5)	0.1 ± 0.1 (5)
LYP ¹¹ (%)	84.3 ± 3.5 (5)	82.5 ± 5.7 (5)	84.8 ± 4.2 (5)	85.3 ± 3.4 (5)
MOP ¹² (%)	2.5 ± 0.9 (5)	2.1 ± 1.1 (5)	1.9 ± 0.3 (5)	2.1 ± 0.7 (5)
LUP ¹³ (%)	0.6 ± 0.2 (5)	0.4 ± 0.1 (5)	0.4 ± 0.2 (5)	0.5 ± 0.2 (5)
RBC ¹⁴ (M/ μ L)	7.25 ± 0.24 (5)	7.37 ± 0.25 (5)	7.22 ± 0.18 (5)	7.50 ± 0.18 (5)
Hb ¹⁵ (g/dl)	14.3 ± 0.5 (5)	14.4 ± 0.6 (5)	14.3 ± 0.4 (5)	14.6 ± 0.3 (5)
RDW ¹⁶ (%)	10.9 ± 0.5 (5)	10.6 ± 0.4 (5)	11.0 ± 0.2 (5)	10.7 ± 0.2 (5)
HCT ¹⁷ (%)	42.5 ± 1.5 (5)	43.3 ± 2.0 (5)	43.2 ± 1.4 (5)	43.3 ± 1.0 (5)
MCV ¹⁸ (fL)	58.7 ± 1.5 (5)	58.7 ± 2.5 (5)	59.8 ± 2.1 (5)	57.7 ± 0.7 (5)
MCH ¹⁹ (pg)	19.7 ± 0.6 (5)	19.5 ± 0.6 (5)	19.8 ± 0.6 (5)	19.4 ± 0.2 (5)
MCHC ²⁰ (g/dl)	33.6 ± 0.5 (5)	33.2 ± 0.4 (5)	33.1 ± 0.4 (5)	33.7 ± 0.4 (5)
Reti ²¹ (%)	3.08 ± 0.84 (5)	2.89 ± 0.31 (5)	3.23 ± 0.28 (5)	3.14 ± 0.16 (5)
PLT ²² (K/ μ L)	1243 ± 150 (5)	1310 ± 207 (5)	1152 ± 205 (5)	1198 ± 67 (5)
MPV ²³ (fL)	5.5 ± 0.5 (5)	5.5 ± 0.7 (5)	5.6 ± 0.8 (5)	5.5 ± 0.7 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

1: White blood cell, 2: Neutrophil, 3: Eosinophil, 4: Basophil, 5: Lymphocyte, 6: Monocyte, 7: Large unstained cell, 8: Percent of neutrophil, 9: Percent of eosinophil, 10: Percent of basophil, 11: Percent of lymphocyte, 12: Percent of monocyte, 13: Percent of large unstained cell, 14: Red blood cell, 15: Hemoglobin, 16: Red cell distribution width, 17: Hematocrit, 18: Mean corpuscular volume, 19: Mean corpuscular hemoglobin, 20: Mean corpuscular hemoglobin concentration, 21: Reticulocyte, 22: Platelet, 23: Mean platelet volume

(아) 혈액생화학적 검사

- ① 혈액생화학적 검사결과, 수컷 500 mg/kg/day 투여군에서 Na(sodium) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였고, Cl(chloride) 수치는 유의하게 증가하였음
- ② 또한 암컷 500 mg/kg/day 투여군의 CHO(total cholesterol) 수치가 유의하게 감소하였음
- ③ 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF SERUM BIOCHEMICAL TESTS

STUDY : NT18-00019

SEX : MALE

TEST ITEM	GROUP(mg/kg/day)															
	G1(0)				G2(500)				G3(1,000)				G4(2,000)			
AST ¹ (IU/L)	169	±	39	(5)	165	±	22	(5)	159	±	13	(5)	163	±	21	(5)
ALT ² (IU/L)	37	±	3	(5)	37	±	4	(5)	41	±	4	(5)	36	±	7	(5)
ALP ³ (IU/L)	586	±	30	(5)	553	±	111	(5)	672	±	129	(5)	602	±	247	(5)
BIL ⁴ (mg/dℓ)	0.04	±	0.02	(5)	0.04	±	0.01	(5)	0.04	±	0.01	(5)	0.03	±	0.01	(5)
BUN ⁵ (mg/dℓ)	15.0	±	2.0	(5)	15.3	±	2.1	(5)	14.7	±	1.5	(5)	15.3	±	0.4	(5)
CRE ⁶ (mg/dℓ)	0.43	±	0.02	(5)	0.45	±	0.02	(5)	0.44	±	0.03	(5)	0.44	±	0.02	(5)
UA ⁷ (mg/dℓ)	1.2	±	0.3	(5)	1.3	±	0.2	(5)	1.4	±	0.2	(5)	1.4	±	0.3	(5)
GLU ⁸ (mg/dℓ)	99	±	8	(5)	106	±	17	(5)	99	±	13	(5)	104	±	15	(5)
CHO ⁹ (mg/dℓ)	70	±	4	(5)	74	±	17	(5)	77	±	11	(5)	80	±	17	(5)
TG ¹⁰ (mg/dℓ)	32	±	10	(5)	35	±	9	(5)	40	±	13	(5)	40	±	11	(5)
PRO ¹¹ (g/dℓ)	5.7	±	0.2	(5)	5.8	±	0.2	(5)	5.9	±	0.2	(5)	5.9	±	0.2	(5)
ALB ¹² (g/dℓ)	2.5	±	0.0	(5)	2.5	±	0.1	(5)	2.6	±	0.1	(5)	2.5	±	0.2	(5)
A/G ratio ¹³	0.77	±	0.07	(5)	0.74	±	0.06	(5)	0.75	±	0.07	(5)	0.72	±	0.06	(5)
LDH ¹⁴ (IU/L)	1763	±	689	(5)	1746	±	580	(5)	1740	±	360	(5)	1849	±	433	(5)
CPK ¹⁵ (U/L)	922	±	253	(5)	924	±	308	(5)	957	±	290	(5)	999	±	238	(5)
Ca ¹⁶ (mg/dℓ)	9.3	±	0.3	(5)	9.4	±	0.2	(5)	9.1	±	0.6	(5)	9.6	±	0.2	(5)
IP ¹⁷ (mg/dℓ)	9.5	±	0.8	(5)	9.2	±	0.5	(5)	9.2	±	0.4	(5)	9.0	±	1.2	(5)
Mg ¹⁸ (mg/dℓ)	2.4	±	0.1	(5)	2.5	±	0.1	(5)	2.5	±	0.1	(5)	2.6	±	0.1	(5)
Na ¹⁹ (mmol/L)	144	±	1	(5)	140**	±	1	(5)	142	±	1	(5)	143	±	2	(5)
K ²⁰ (mmol/L)	5.0	±	0.3	(5)	4.9	±	0.2	(5)	5.1	±	0.2	(5)	4.9	±	0.3	(5)
Cl ²¹ (mmol/L)	108	±	1	(5)	113*	±	2	(5)	110	±	1	(5)	110	±	3	(5)

TEST ITEM	GROUP(mg/kg/day)											
	G1(0)			G2(500)			G3(1,000)			G4(2,000)		
AST ¹ (IU/L)	145	±	24 (5)	160	±	46 (5)	139	±	19 (5)	144	±	26 (5)
ALT ² (IU/L)	27	±	2 (5)	32	±	6 (5)	26	±	5 (5)	26	±	4 (5)
ALP ³ (IU/L)	366	±	123 (5)	457	±	174 (5)	382	±	75 (5)	397	±	119 (5)
BIL ⁴ (mg/dℓ)	0.03	±	0.01 (5)	0.03	±	0.01 (5)	0.04	±	0.02 (5)	0.03	±	0.02 (5)
BUN ⁵ (mg/dℓ)	16.2	±	2.4 (5)	18.2	±	5.1 (5)	16.1	±	1.5 (5)	17.0	±	1.9 (5)
CRE ⁶ (mg/dℓ)	0.48	±	0.01 (5)	0.51	±	0.09 (5)	0.47	±	0.02 (5)	0.49	±	0.05 (5)
UA ⁷ (mg/dℓ)	1.3	±	0.1 (5)	1.3	±	0.3 (5)	1.3	±	0.1 (5)	1.3	±	0.3 (5)
GLU ⁸ (mg/dℓ)	104	±	3 (5)	103	±	13 (5)	108	±	11 (5)	116	±	14 (5)
CHO ⁹ (mg/dℓ)	88	±	13 (5)	68*	±	7 (5)	91	±	13 (5)	88	±	15 (5)
TG ¹⁰ (mg/dℓ)	22	±	3 (5)	22	±	8 (5)	22	±	9 (5)	21	±	5 (5)
PRO ¹¹ (g/dℓ)	6.3	±	0.1 (5)	6.1	±	0.3 (5)	6.2	±	0.2 (5)	6.2	±	0.3 (5)
ALB ¹² (g/dℓ)	2.9	±	0.1 (5)	2.7	±	0.2 (5)	2.8	±	0.2 (5)	2.8	±	0.2 (5)
A/G ratio ¹³	0.86	±	0.05 (5)	0.81	±	0.05 (5)	0.83	±	0.07 (5)	0.81	±	0.04 (5)
LDH ¹⁴ (IU/L)	1525	±	605 (5)	1761	±	1063 (5)	1396	±	419 (5)	1557	±	372 (5)
CPK ¹⁵ (U/L)	697	±	110 (5)	824	±	367 (5)	764	±	247 (5)	891	±	179 (5)
Ca ¹⁶ (mg/dℓ)	9.9	±	0.4 (5)	9.5	±	0.4 (5)	9.6	±	0.3 (5)	9.6	±	0.3 (5)
IP ¹⁷ (mg/dℓ)	8.1	±	0.3 (5)	8.3	±	0.9 (5)	8.0	±	0.6 (5)	8.4	±	1.2 (5)
Mg ¹⁸ (mg/dℓ)	2.7	±	0.2 (5)	2.6	±	0.2 (5)	2.6	±	0.1 (5)	2.7	±	0.2 (5)
Na ¹⁹ (mmol/L)	141	±	1 (5)	141	±	3 (5)	143	±	3 (5)	143	±	4 (5)
K ²⁰ (mmol/L)	4.6	±	0.1 (5)	4.6	±	0.0 (5)	4.7	±	0.2 (5)	4.6	±	0.2 (5)
Cl ²¹ (mmol/L)	111	±	2 (5)	110	±	3 (5)	109	±	5 (5)	106	±	1 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

1: Aspartate aminotransferase, 2: Alanine aminotransferase, 3: Alkaline phosphatase, 4: Total bilirubin, 5: Blood urea nitrogen, 6: Creatinine, 7: Uric acid, 8: Glucose, 9: Total cholesterol, 10: Triglyceride, 11: Total protein, 12: Albumin, 13: Albumin/Globulin ratio, 14: Lactate dehydrogenase, 15: Creatine phosphokinase, 16: Calcium, 17: Inorganic phosphorus, 18: Magnesium, 19: Sodium, 20: Potassium, 21: Chloride

*: Significant difference compared with control group value, $p < 0.05$

(자) 부검소견

① 계획부검 결과, 암·수 모든 시험동물에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음

SUMMARY OF GROSS FINDINGS

STUDY : NT18-00019

SEX : MALE

ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	No gross findings detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

SEX : FEMALE

ORGANS	SIGNS	GROUP(mg/kg/day)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	No gross findings detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined

(차) 장기중량

- ① 절대장기중량 측정결과, 수컷 1,000 mg/kg/day 투여군의 양측 고환 중량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였고, 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 우측 신장 중량이 유의하게 감소하였음
- ② 상대장기중량 측정결과, 수컷 1,000 mg/kg/day 투여군의 양측 고환 중량이 유의하게 증가하였음
- ③ 그 외 절대 및 상대장기중량에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학 적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음

SUMMARY OF ABSOLUTE ORGAN WEIGHTS(g)

STUDY : NT18-00019

SEX : MALE

ORGANS	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Body weight	294.30 ± 15.22 (5)	289.87 ± 16.47 (5)	284.32 ± 12.14 (5)	296.43 ± 10.29 (5)
Testis(Lt.)	1.3698 ± 0.0601 (5)	1.4038 ± 0.0643 (5)	1.5618** ± 0.1254 (5)	1.4370 ± 0.0430 (5)
Testis(Rt.)	1.3686 ± 0.0699 (5)	1.4454 ± 0.0962 (5)	1.5415* ± 0.0906 (5)	1.4355 ± 0.0722 (5)
Prostate	0.3537 ± 0.0633 (5)	0.3564 ± 0.0608 (5)	0.3707 ± 0.0711 (5)	0.3575 ± 0.1149 (5)
Spleen	0.6829 ± 0.1054 (5)	0.6575 ± 0.0571 (5)	0.5904 ± 0.0621 (5)	0.6443 ± 0.0843 (5)
Liver	9.0059 ± 1.0393 (5)	8.9230 ± 0.4917 (5)	8.6922 ± 0.6357 (5)	9.0388 ± 0.5295 (5)
Adrenal gland(Lt.)	0.0249 ± 0.0021 (5)	0.0255 ± 0.0074 (5)	0.0276 ± 0.0036 (5)	0.0254 ± 0.0022 (5)
Adrenal gland(Rt.)	0.0252 ± 0.0034 (5)	0.0247 ± 0.0059 (5)	0.0269 ± 0.0069 (5)	0.0248 ± 0.0043 (5)
Kidney(Lt.)	1.3146 ± 0.0892 (5)	1.2348 ± 0.1073 (5)	1.2050 ± 0.1301 (5)	1.2871 ± 0.0339 (5)
Kidney(Rt.)	1.3230 ± 0.1300 (5)	1.2510 ± 0.1207 (5)	1.2510 ± 0.1131 (5)	1.2781 ± 0.0460 (5)
Heart	1.1701 ± 0.1195 (5)	1.1594 ± 0.1116 (5)	1.0913 ± 0.0798 (5)	1.1622 ± 0.0718 (5)
Lung	1.3355 ± 0.1945 (5)	1.3062 ± 0.0361 (5)	1.3204 ± 0.0621 (5)	1.3012 ± 0.1044 (5)
Brain	2.0381 ± 0.0796 (5)	1.9787 ± 0.0465 (5)	2.0413 ± 0.0611 (5)	2.0160 ± 0.0630 (5)
Pituitary	0.0133 ± 0.0034 (5)	0.0116 ± 0.0034 (5)	0.0140 ± 0.0025 (5)	0.0110 ± 0.0031 (5)
Thymus	0.5947 ± 0.1841 (5)	0.5561 ± 0.0795 (5)	0.5367 ± 0.0537 (5)	0.5414 ± 0.0729 (5)

STUDY : NT18-00019

SEX : FEMALE

ORGANS	GROUP(mg/kg/day)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Body weight	191.80 ± 12.10 (5)	187.12 ± 7.03 (5)	186.42 ± 11.17 (5)	183.75 ± 10.66 (5)
Ovary(Lt.)	0.0455 ± 0.0091 (5)	0.0393 ± 0.0067 (5)	0.0449 ± 0.0114 (5)	0.0454 ± 0.0065 (5)
Ovary(Rt.)	0.0432 ± 0.0096 (5)	0.0517 ± 0.0151 (5)	0.0431 ± 0.0058 (5)	0.0400 ± 0.0062 (5)
Uterus	0.5003 ± 0.1813 (5)	0.5935 ± 0.2355 (5)	0.5269 ± 0.1599 (5)	0.4777 ± 0.1516 (5)
Spleen	0.4809 ± 0.0834 (5)	0.4517 ± 0.0507 (5)	0.4714 ± 0.1011 (5)	0.4347 ± 0.0502 (5)
Liver	6.2584 ± 0.5281 (5)	5.7261 ± 0.2557 (5)	6.0773 ± 0.3088 (5)	5.8387 ± 0.3702 (5)
Adrenal gland(Rt.)	0.0338 ± 0.0074 (5)	0.0339 ± 0.0044 (5)	0.0348 ± 0.0067 (5)	0.0331 ± 0.0038 (5)
Adrenal gland(Lt.)	0.0299 ± 0.0060 (5)	0.0301 ± 0.0057 (5)	0.0334 ± 0.0054 (5)	0.0318 ± 0.0044 (5)
Kidney(Lt.)	0.9030 ± 0.0546 (5)	0.8445 ± 0.0700 (5)	0.8762 ± 0.0446 (5)	0.8275 ± 0.0368 (5)
Kidney(Rt.)	0.9140 ± 0.0437 (5)	0.8937 ± 0.0514 (5)	0.9169 ± 0.0677 (5)	0.8104* ± 0.0522 (5)
Heart	0.8616 ± 0.0956 (5)	0.7776 ± 0.0412 (5)	0.8464 ± 0.0500 (5)	0.7420 ± 0.0463 (5)
Lung	1.1389 ± 0.0870 (5)	1.1233 ± 0.0921 (5)	1.1094 ± 0.0736 (5)	1.0705 ± 0.0138 (5)
Brain	1.9608 ± 0.0330 (5)	1.8703 ± 0.0837 (5)	1.8931 ± 0.0755 (5)	1.9111 ± 0.0501 (5)
Pituitary	0.0134 ± 0.0021 (5)	0.0110 ± 0.0007 (5)	0.0154 ± 0.0021 (5)	0.0120 ± 0.0023 (5)
Thymus	0.4628 ± 0.1267 (5)	0.3641 ± 0.0586 (5)	0.4644 ± 0.0559 (5)	0.4429 ± 0.0355 (5)

Mean±S.D (Number of animals)

Lt.: Left, Rt.: Right

*: Significant difference compared with control group value, $p < 0.05$ **: Significant difference compared with control group value, $p < 0.01$

(4) 고찰 및 결론

- (가) 혈액학적 검사결과, 수컷 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군의 MPV 수치가 용량-반응 상관성을 보이며 증가하였으나 그 변화의 정도가 생물학적 변동 범위에 속하고 암·수 상관성 및 관련 검사항목과의 연관성이 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없는 것으로 판단됨
- (나) 혈액생화학적 검사결과, 수컷 500 mg/kg/day 투여군의 Na 수치 감소 및 Cl 수치 증가, 암컷 500 mg/kg/day 투여군의 CHO 수치 감소가 관찰되었으나 상기 변화는 모두 용량-반응 상관성이 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단됨

- (다) 장기중량 측정결과, 수컷 1,000 mg/kg/day 투여군에서 양측 고환의 절대 및 상대 장기중량이 증가하였으나 용량-반응 상관성을 보이지 않아 시험물질의 영향은 아닌 것으로 판단됨
- (라) 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 우측 신장의 절대장기중량 감소는 생물학적 변동범위에 속하고, 상대장기중량과의 연관성이 없어 독성학적 의미는 없는 것으로 사료됨
- (마) 이상의 결과로 보아 본 시험 조건에서 시험물질 병풀주정추출분말을 설치류인 SD 랫드에 2 주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았으며, 시험물질 병풀주정추출분말의 무독성량은 2,000 mg/kg/day으로 판단됨

다. 병풀주정추출분말의 미생물복귀돌연변이시험

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 시험물질 병풀주정추출분말의 복귀돌연변이원성 유·무를 살모넬라균 (*Salmonella*)과 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 직접법과 대사활성법으로 확인하고자 함
- (나) GLP 기관인 한국건설생활환경시험연구원에서 시험 (GT17-00238)

(2) 재료 및 방법

(가) 시험균주

- ① *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA의 5 균주를 이용함

(나) 시험방법

- ① 식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 08 월 30 일) ‘의약품등의 독성시험 기준 , OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 471 ‘Bacterial Reverse Mutation Test’ (Adopted 21st July, 1997) 및 한국건설생활환경시험연구원 표준작업지침서(KCL/MIC)에 따라 시험을 실시하였으며, Preincubation법을 이용하여 대사활성계를 적용하는 방법과 적용하지 않는 방법을 병행하여 진행하였음

② 시험조건

조 성	균현탁액	0.1 ml
	시험물질용액	0.05 ml
	0.1 M Phosphate buffered saline (직접법의 경우)	0.5 ml
	S9 mix(대사활성법의 경우)	0.5 ml
	Top agar	2.0 ml
Preincubation	온 도	37 ℃
	시 간	20 분
Incubation	온 도	37 ℃
	시 간	48 시간

(다) 시험구성

구 분	사용 plate 수	농도단계	양성대조, 용매대조 사용 plate 수
직접법 (S9 mix (-))	3 매	5 단계 62, 185, 556, 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	3 매
대사활성법 (S9 mix (+))	3 매	5 단계 62, 185, 556, 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	3 매

(라) 판정범위

대사활성 효소의 유무	시험물질 농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	복 귀 돌 연 변 이 수(colony수/plate)					
		염 기 치 환 형			frameshift 형		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix(-)	음성대조	57-210	2-24	16-83	1-53	1-20	
S9 Mix(+)	음성대조	61-204	3-29	11-76	7-68	2-27	
양 성 대 조	S9 명칭	AF-2	NaN3	4-NQO	AF-2	9-AA	
	Mix를 필요로 하지 않는 경우	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.25	0.1	80.0
		colony수/plate	198-832	101-504	101-692	155-682	424-4530
	S9 명칭	2-AA	2-AA	2-AA	BP	2-AA	
	Mix를 필요로 하는 경우	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1.0	2.0	10.0	10.0	2.0
		colony수/plate	129-3218	101-427	174-836	150-889	102-477

(3) 실험결과

- (가) 병풀주정추출분말의 시험결과, 대사활성법과 직접법의 경우, TA100, TA1535, WP2uvrA에서 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가를 관찰할 수 없었음
- (나) TA98은 직접법의 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서, 대사활성법의 경우에는 556, 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가가 관찰되었음
- (다) TA1537은 직접법의 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서, 대사활성법의 경우 1667, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가가 관찰되었음

Metabolic activation	Dose (µg/plate)	Number of colony / plate					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix(-)	0	94 91 90	10 9 9	24 25 29	13 12 13	4 4 7	
	Mean±SD	92 ± 2.1	9 ± 0.6	26 ± 2.6	13 ± 0.6	5 ± 1.7	
	62	90 85 86	10 11 13	31 34 35	16 18 19	6 7 5	
	Mean±SD	87 ± 2.6	11 ± 1.5	33 ± 2.1	18 ± 1.5	6 ± 1.0	
	185	94 98 97	12 12 10	35 34 33	19 16 15	6 7 4	
	Mean±SD	96 ± 2.1	11 ± 1.2	34 ± 1.0	17 ± 2.1	6 ± 1.5	
	556	97 96 93	11 13 9	33 32 34	14 13 17	8 11 6	
	Mean±SD	95 ± 2.1	11 ± 2.0	33 ± 1.0	15 ± 2.1	8 ± 2.5	
	1667	104 106 105	10 8 9	32 37 33	20 19 22	12 14 12	
	Mean±SD	105 ± 1.0	9 ± 1.0	34 ± 2.6	20 ± 1.5	13 ± 1.2	
	5000	124 121 120	7 8 8	39 36 35	59 62 60	18 19 17	
	Mean±SD	122 ± 2.1	8 ± 0.6	37 ± 2.1	60 ± 1.5	18 ± 1.0	
S9Mix(+)	0	105 107 104	9 12 9	31 30 32	21 22 23	10 11 14	
	Mean±SD	105 ± 1.5	10 ± 1.7	31 ± 1.0	22 ± 1.0	12 ± 2.1	
	62	100 104 101	13 12 13	38 34 39	25 23 27	13 12 15	
	Mean±SD	102 ± 2.1	13 ± 0.6	37 ± 2.6	25 ± 2.0	13 ± 1.5	
	185	112 115 111	11 8 10	36 39 41	28 26 30	10 14 11	
	Mean±SD	113 ± 2.1	10 ± 1.5	39 ± 2.5	28 ± 2.0	12 ± 2.1	
	556	119 120 117	9 7 8	41 41 40	46 45 46	21 22 25	
	Mean±SD	119 ± 1.5	8 ± 1.0	41 ± 0.6	46 ± 0.6	23 ± 2.1	
	1667	120 121 123	14 12 11	49 48 50	106 102 105	38 40 37	
	Mean±SD	121 ± 1.5	12 ± 1.5	49 ± 1.0	104 ± 2.1	38 ± 1.5	
	5000	115 119 118	13 12 15	52 49 48	125 129 130	77 75 73	
	Mean±SD	117 ± 2.1	13 ± 1.5	50 ± 2.1	128 ± 2.6	75 ± 2.0	
Positive controls	S9Mix(-)	Positive	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		Dose	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of colony	544 548 480	405 380 341	366 364 302	594 560 502	1456 1272 1288
		Mean±SD	524 ± 38.2	375 ± 32.3	344 ± 36.4	552 ± 46.5	1339 ± 101.9
	S9Mix(+)	Positive	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		Dose	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		Number of colony	260 214 220	201 192 199	180 193 193	608 584 552	267 270 258
		Mean±SD	231 ± 25.0	197 ± 4.7	189 ± 7.5	581 ± 28.1	265 ± 6.2

(4) 고찰 및 결론

(가) 염색체이상 및 소핵시험에서 음성 판정을 받았으므로 병풀주정추출분말은 유전독성을 발생시키지 않는 것으로 판단되며, 미생물복귀돌연변이 시험결과에 병풀주정추출물이 미치는 영향을 조사중에 있음

(나) 특히 병풀의 히스티딘 함유로 인해 해당 균주의 집락수가 증가되었을 것으로 판단되어 현재 양성으로 판단된 균주를 분양받아 이에 대한 연구를 진행중에 있음

라. 포유류 배양세포를 이용한 병폴주정추출분말의 염색체이상시험

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병폴주정추출분말의 염색체이상 유발성의 유무를 Chinese hamster 배양세포 CHO-k1을 이용하여 확인하고자 하였음

(나) GLP 기관인 한국건설생활환경시험연구원에서 시험 (GT17-00239)

(2) 재료 및 방법

(가) 시험계

① 본 시험에 사용한 세포는 Chinese hamster 유래의 난소유아세포 (CHO-k1)를 이용

(나) 시험방법

① 식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 08 월 30 일) ‘의약품등의 독성시험 기준’, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 473 In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (Adopted : 29th July 2016) 및 한국건설 생활환경시험연구원 표준작업지침서 (KCL/CRO)에 준하여 실시함

② 세포증식억제시험 (예비시험) 결과를 고려해 최고농도를 결정하여 공비 3의 3 단계 로 본시험의 농도를 다음과 같이 설정함

- 직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리군) : 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$

- 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$

- 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$

(3) 실험결과

(가) 100 개의 중기세포 당 이상중기상 (aberrant metaphase, gap-)의 빈도를 분석한 결과, 직접법의 24 시간 연속처리군에서는 음성대조군, 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 양성대조군에서 각각 0.33, 0.67, 0.67, 1.00, 23.33의 빈도를 나타내었으며, 음성대조군 과 이상중기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 통계적 으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었음

(나) 직접법의 6 시간 처리 18 시간 회복군에서는 음성대조군, 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 양성대조군에서 각각 0.33, 0.33, 0.67, 0.67, 20.67의 빈도를 나타내었으며, 음성 대조군과 이상중기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었음

Exposure ^{a)}	S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	No. of total chromosome aberrations (Mean)		No. of cells with chromosome aberrations (Mean)		PP+ER (Mean)
			(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap	
			24-0	-	Negative control	0.33	
	-	185.19	0.67	0.67	0.67	0.67	0.00
	-	555.56	0.67	1.00	0.67	1.00	0.00
	-	1666.67	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	-	MMC (0.04)	23.33	23.33	23.33*	23.33	0.00
6-18	-	Negative control	0.33	0.33	0.33	0.33	0.00
	-	185.19	0.33	0.33	0.33	0.33	0.00
	-	555.56	0.67	1.00	0.67	1.00	0.00
	-	1666.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.00
	-	MMC (0.04)	20.67	21.00	20.67*	21.00	0.00

* Significantly different from the negative control at $p < 0.05$

Test substance : 병풀주정추출분말

a) Treatment time-recovery time

MMC : Mitomycin C (0.04 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)

PP : Polyploidy

ER : Endoreduplication

(다) 대사활성화법의 6 시간 처리 18 시간 회복군에서는 음성대조군, 185.19, 555.56, 1666.67 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 및 양성대조군에서 각각 0.33, 0.33, 1.00, 0.67, 23.00의 빈도를 나타내었으며, 음성대조군과 이상증기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도 단계에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었음

(라) 직접법 및 대사활성법에 있어서 배수성(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았음

Exposure ^{a)}	S9 mix	Dose (µg/ml)	No. of total chromosome aberrations (Mean)		No. of cells with chromosome aberrations (Mean)		PP+ER (Mean)
			(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap	
			6-18	+	Negative control	0.33	
	+	185.19	0.33	0.33	0.33	0.33	0.00
	+	555.56	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	+	1666.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.00
	+	CPA (10)	23.00	23.00	23.00*	23.00	0.00

* Significantly different from the negative control at $p < 0.05$

Test substance : 병풀주정추출분말

a) Treatment time-recovery time

CPA : Cyclophosphamide · H₂O (10 µg/ml)

PP : Polyploidy

ER : Endoreduplication

(4) 고찰 및 결론

(가) 이상의 결과를 종합해 볼 때 시험물질인 병풀주정추출분말은 본 시험의 조건하에서 CHO-k1 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨

마. ICR 마우스 골수세포를 이용한 병풀주정추출분말의 소핵시험

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말을 경구투여하였을 때 ICR 마우스 골수의 다염성 적혈구에 대한 소핵의 유발성을 알아보고자 하였음

(나) GLP 기관인 한국건설생활환경시험연구원에서 시험 (GT17-00240)

(2) 재료 및 방법

(가) 시험계

① 특정병원균 부재(SPF) CrljOri:CD1(ICR)마우스

(나) 시험방법

① 시험물질은 24시간 간격으로 1 회/일, 2 일 동안 투여하였으며, 동물은 투여 전 약 3~4 시간 절식시켰고, 양성대조군은 투여 마지막 날 1 회/일 투여하였음

② 예비시험 후 본 시험 진행

(다) 시험군 설정

① 예비시험의 결과를 토대로 하여, 최고농도를 2000 mg/kg bw/day으로 하여, 부형제 대조군 1군, 투여군 3 군 (2000 mg/kg bw/day, 1000 mg/kg bw/day, 500 mg/kg bw/day 투여군) 및 양성대조군(Mitomycin C (MMC) 2.0 mg/kg bw/day)으로 구성함

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)
G1	Male	5	1~5	20
G2	Male	5	6~10	20
G3	Male	5	11~15	20
G4	Male	5	16~20	20
G5	Male	5	21~25	10

G1 : Vehicle Control, G2~G4: 시험물질 투여군, G5(P.C) : Positive Control

(3) 실험결과

(가) 소핵 유발빈도 및 세포독성

- ① 개체 당 약 4000 개의 PCE에서 관찰된 MNPCE의 유발빈도는 부형제 대조군, 500, 1000, 2000 mg/kg bw/day 및 양성대조군의 순으로 평균 0.15 %, 0.19 %, 0.19 %, 0.22 % 및 10.51 %를 나타내었음
 - 즉 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 부형제 대조군에 비해 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음
 - 양성대조군인 Mitomycin C 투여군의 소핵유발빈도는 부형제 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었음
- ② 세포독성의 지표인 개체 당 약 500 개의 전적혈구(PCE+NCE)에서 관찰된 다염성 적혈구(PCE)의 비율은 부형제 대조군, 500, 1000, 2000 mg/kg bw/day 및 양성대조군의 순으로 평균 0.49, 0.53, 0.53, 0.53 및 0.44로 시험물질 투여군에서 부형제 대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았음

Groups		Dose (mg/kg bw/day)	Animal No.	MNPCE/4000 (Mean±SD, %)	PCEs (Mean±SD)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±SD)
Vehicle control	Vehicle	0	1	0.18		0.46
			2	0.08		0.51
			3	0.15		0.51
			4	0.20		0.47
			5	0.15	(0.15 ± 0.05)	0.51
Test substance	병풀주정추출분말	500	6	0.15		0.60
			7	0.15		0.43
			8	0.23		0.47
			9	0.28		0.54
			10	0.15	(0.19 ± 0.06)	0.59
		1000	11	0.13		0.59
			12	0.50		0.49
			13	0.08		0.50
			14	0.05		0.52
			15	0.20	(0.19 ± 0.18)	0.54
2000	16	0.20		0.54		
	17	0.13		0.52		
	18	0.38		0.53		
	19	0.28		0.54		
	20	0.13	(0.22 ± 0.11)	0.52	(0.53 ± 0.01)	
Positive control	MMC	2.0	21	8.38		0.51
			22	10.70		0.38
			23	8.15		0.43
			24	12.75		0.48
			25	12.55	(10.51 ± 2.20)**	0.40

Vehicle : Distilled water

** Significantly different from the control at $p < 0.01$ (One-way ANOVA)

Abbreviations

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MMC : Mitomycin C

(나) 일반증상

- ① 예비시험과 본시험의 경우, 부형제 대조군과 비교하여 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음

Groups	Dose (mg/kg bw/day)	Route	Animal No.	Clinical signs	Days post dosing				1	
					1st administration		2nd administration			
					post dosing	3 hrs post dosing	post dosing	3 hrs post dosing		
Vehicle control	Vehicle	0	P.O.	5	NAD	5	5	5	5	5
Test substance	병풀주정추출분말	500	P.O.	5	NAD	5	5	5	5	5
		1000	P.O.	5	NAD	5	5	5	5	5
		2000	P.O.	5	NAD	5	5	5	5	5
Positive control	MMC	2.0	I.P.	5	NAD	5	5	5	5	5

P.O. : Per Os
 I.P. : Intraperitoneal
 MMC : Mitomycin C
 Vehicle : Distilled water
 NAD : No Abnormalities Detected

(다) 체중

- ① 각 군의 투여후의 체중을 비교한 결과 부형제 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았음

Groups	Dose (mg/kg bw/day)	Animal No.	Body weights (gram, Mean±S.D)		
			Administration	Sacrifice	
Vehicle control	Vehicle	0	5	33.92 ± 1.31	34.78 ± 1.40
Test substance	병풀주정추출분말	500	5	34.11 ± 1.77	34.98 ± 2.20
		1000	5	35.03 ± 1.39	35.86 ± 0.85
		2000	5	34.23 ± 1.83	35.40 ± 1.93
Positive control	MMC	2.0	5	34.34 ± 1.09	35.14 ± 1.27

Vehicle : Distilled water
 MMC : Mitomycin C

(4) 고찰 및 결론

- (가) 이상의 결과를 종합해 볼 때 시험물질인 병풀주정추출분말은 본 시험의 조건하에서 마우스의 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨

13. 눈 및 간 건강 인체적용시험

가. 인체적용시험용 시험약 (시험식품) 제조

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병풀주정추출분말의 섭취량을 기존 문헌 및 제품, 본 연구의 전임상 유효성 평가를 통해 설정하고, 섭취량에 적합한 제형 및 용법을 결정하고자 하였음
- (나) 본 과제의 1협동 위탁기관이자 GMP 생산기관인 코스맥스바이오(주)에서 인체적용시험용 시험약 제조하여 눈 건강과 간 건강 인체적용시험에 적용하고자 하였음

(2) 제조방법

(가) 섭취량 설정


- ① 병풀 및 asiaticoside의 안전성 DB 검색결과, 중대한 독성 및 부작용 보고된바 없음

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부
Pubmed	(Centella asiatica or asiaticoside) And (safety or adverse or toxic)	35	7
WHO monographs on selected medicinal plant	(Centella asiatica or asiaticoside) And (safety or adverse or toxic)	1	1
European Medicines Agency	(Centella asiatica or asiaticoside) And (safety or adverse or toxic)	1	1




- Asiaticoside의 경구투여에 따른 마우스에서의 급성 독성 및 90일 반복투여 독성을 측정함 (Uvarajan Sampath et al., 2012)
 - Asiaticoside를 300~5,000 mg/kg 용량으로 단회 투여한 결과, LD₅₀는 2,000 mg/kg 이상이었으며, 4,000~5,000 mg/kg 투여 군에서 체중감소, 간 무게 증가, 신장 무게 감소 등의 부작용이 발생함.
 - Asiaticoside를 250, 500, 1,000 mg/kg 용량으로 90일 반복 투여한 결과, 무독성량은 500 mg/kg/day 이었으며, 1,000 mg/kg/day 투여 군에서 체중감소, 간 무게 증가, 혈액 내 생화학적 지표 감소 등의 현상이 나타남.
- 불안장애 임상시험을 위하여 총 33명을 대상으로 60일 동안 병풀 지상부 70% EtOH 추출분말을 500 mg/day 용량으로 섭취함. (Jana et al., 2010)
 - 부작용 및 이상반응 보고되지 않음.
- 알비노 랫드에서의 병풀의 안전성을 평가하기 위하여 30일 동안 병풀 지상부 추출물을 250, 500, 1,000 mg/kg로 투여함. (Orugantl et al., 2010)
 - 시험물질의 제조방법이 명확하지는 않음
 - 병풀 지상부 추출물 1,000 mg/kg/day 투여 시 ALT, AST, BUN, CREA가 증가하였으며, 간 조직에서의 apoptosis를 유도하였고, 신장조직의 증가 현상이 나타남.
- 병풀의 식품 적용을 위한 mini review 논문으로 알려진 부작용이 없다고 보고함. (Hashim, 2011)
- 병풀 아세톤 추출물의 급성 독성 및 15일 반복투여 독성을 측정함 . (Chauhan and Singh, 2012)
 - 병풀 아세톤 추출물을 100, 500, 1,000, 2,000, 4,000 mg/kg로 투여한 결과 독성학적인 반응은 나타나지 않았으며, LD₅₀는 4,000 mg/kg 이상임
 - 병풀 아세톤 추출물을 500, 1,000, 2,000, 4,000 mg/kg/day 용량으로 15일 투여한 결과, 생화학적 결과를 포함한 독성학적 변화는 없었으나, 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군에서 간 조직의 무게가 감소함.
- Asiaticoside가 45.74% 함유된 병풀 표준추출물의 급성 및 90일 반복투여 독성평가, 유전독성 평가를 수행함. (Deshpande et al., 2015)
 - 급성독성 평가 시 14일 동안 사망동물은 없었으며, 중대한 독성 관찰되지 않음. (LD₅₀=

- 2,000 mg/kg 이상)
- 병풀추출물 250, 500, 1,000 mg/kg/day 용량으로 90일 반복투여 독성 평가를 진행한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았으며, 독성학적 변화는 관찰되지 않음. (NOAEL=1,000 mg/kg/day)
 - 유전독성 중 복귀돌연변이 시험을 진행한 결과 복귀돌연변이를 유도하지 않았음.
- 병풀의 인지기능 개선 효능 검증을 위해 2,419개의 자료를 분석하여 리뷰함. (Puttarak et al., 2017)
- 전체적으로 중대한 부작용은 보고되지 않았으며, 약하게 일부 사람에게서 소화불량, 두통, 식욕감소, 진정 및 발진 등의 부작용 발생.
- 병풀 지상부 추출물의 권장 경구 복용량 0.33-0.68 g 섭취 시 중대한 부작용은 보고되지 않았으며, 알레르기성 피부염이 국소적으로 발생할 수 있으나 추가 테스트 시 명확하지 않았음. (WHO Monographs)
- 병풀에 대한 전반적 내용 정리 (European Medicines Agency)
- 항돌연변이 활성을 나타내며, 병풀추출물은 유전독성을 나타내지 않음.
 - 병풀 중 트리터펜 분획은 알레르기성 피부염의 원인이 될 수 있음.
 - 병풀 50% EtOH 추출물 1 g/kg 투여는 급성 경구투여 독성에 영향 없음.
 - 병풀추출물 투여 시 암컷 생쥐의 생식력을 유의하게 감소시켰으나, 토끼 실험에서 최기성에는 음성으로 나타남.
 - 병풀추출물의 임상시험에서 메스꺼움 등이 간혹 보고되었으나, 유의하지 않았으며, 아주 적은 환자에서 간독성이 발견됨.
 - 약물 상호작용은 보고되지 않으나 진정 효과가 있는 약물을 복용하고 있는 환자는 주의해야 함.
 - 병풀추출물 제제의 내약성은 매우 우수하다고 보고됨.

② 해외 판매 제품의 병풀추출물 일일섭취량은 약 400 mg~2,400 mg/day로 파악됨

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	기타
미국		Centella Asiatica	Nutraceutical	병풀추출물 로써 500 mg (10% triterpenes)	병풀추출물 캡슐 250 mg (1일 2캡슐 섭취)	임산부, 알레르기 및 특이 체질 또는 특정 질환 보유자 및 특정약품섭취시 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있음	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물 (triterpene의 함량으로 보아 신청원료와 매우 유사함)
미국		Gotu Kola	Nature's Way	병풀추출물 로써 950 mg	병풀추출물 캡슐 475 mg (1일 2캡슐 섭취)	어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로써 신청원료와 매우 유사함
인도		Gotu Kola	Emmos Overseas Lifestyle Pvt. Ltd.	병풀추출물 로써 1,000 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 2캡슐 섭취)	-	건강보조 식품	병풀추출물로써 신청원료와 유사함

인도		Organic Gotu Kola Tablet	Geo-Fresh Neutraceuticals	병풀추출물 로써 2.400 mg (600 mg 타블렛 4정)	뇌혈관 순환 및 신경계 영양공급, 수면 및 기억력 개선, 스트레스와 불안 개선	어린이의 손이 닿지 않고, 서늘한 곳에 보관	Ayurvedic medicine	병풀추출물로서 신청원료와 유사하며, 타블렛 제형의 인도 전통의약품임
미국 캐나다		Organic Traditions gotu kola powder	Health matters america Inc.	1티스푼/1회 (약 2 g)	오가닉 고투콜라 파우더 100%	-	식품	병풀잎 파우더
미국		Gotu Kola	Nature's Answer	병풀추출물 로써 950 mg	병풀추출물 캡슐 475 mg (1일 2회 2캡슐 섭취)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu Kola	Eclectic Institute	병풀 600 mg	병풀추출물캡슐 200 mg (1일 3캡슐)	어린이의 손이 닿지 않고, 서늘한 곳에 보관	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu Kola	Nature's Answer	병풀추출물 로써 660 mg	병풀추출물 캡슐 330 mg (1일 2회 1캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
캐나다		Gotu Kola	Organika	병풀추출물 로써 1,500 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 3회)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu kola	anastore	병풀추출물 로써 400 mg	병풀추출물 캡슐 200 mg (1일 1회 2캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu kola	amalth	병풀추출물 로써 1,000 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 1회 2캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		brahmi	banyan	병풀추출물 로써 1,000 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 1회 2캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함

인도		Gotu kola	Organic India	병풀추출물 로써 1,400mg	병풀추출물 캡슐 700 mg (1일 1회 2캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu kola	Garden Organics	병풀추출물 로써 500 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 1회 1캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함
미국		Gotu kola	Nature Restore	병풀추출물 로써 1,000 mg	병풀추출물 캡슐 500 mg (1일 1회 2캡슐)	-	건강보조 식품	병풀 지상부 추출물로서 신청원료와 매우 유사함

③ 본 연구의 눈 및 간 기능 개선 마우스시험에서 유효 농도는 50 mg/kg 이상이었으며, 이는 사람에게 적용 시 240 mg/day 이상으로 본 연구에서는 병풀의 원재료 단가 (6만원/kg) 등 시장경쟁력을 고려하여 일일섭취량을 300 mg으로 설정함

(나) 제형, 용법 및 용량 결정

- ① 병풀주정추출분말 300 mg/day을 섭취 용이하도록 타블렛 형태의 제형을 계획하였으며, 정제 외부에 코팅을 하여 추출분말의 고유의 향과 색이 구별되지 않도록 함
- ② 섭취는 1정/1일을 목표로 하였으며, 병풀주정추출분말이 300 mg 함유하도록 총 중량 900 mg의 타블렛을 제조함

- 주약

SAP Code	원료명	배합비	단위중량
-	병풀주정추출분말	33.3334 %	300.0000 mg
100001586	결정셀룰로오스(102D)	35.7401 %	321.6609 mg
100000577	유당	25.0000 %	225.0000 mg
100000595	이산화규소	1.5000 %	13.5000 mg
100001395	스테아린산마그네슘 [코팅] -	1.0000 %	9.0000 mg
100000645	HPMC	2.4000 %	21.6000 mg
100001270	글리세린지방산에스테르	0.2400 %	2.1600 mg
100000761	이산화티타늄	0.5200 %	4.6800 mg
100001096	치자황색600(#M4015)	0.1950 %	1.7550 mg
100000122	치자블루에스비(#M1637, 치자청색소)	0.0715 %	0.6435 mg
100000563	주정 코팅주정	30.0800 %	270.7200 mg

합계 100.0000 % 900.0000 mg

- 위약

SAP Code	원료명	배합비		단위중량	
100001446	말토덱스트린(제네덱스)	30.0000	%	270.0000	mg
100001586	결정셀룰로오스(102D)	50.0000	%	450.0000	mg
100000577	유당	14.0735	%	126.6615	mg
100000595	이산화규소	1.5000	%	13.5000	mg
100001395	스테아린산마그네슘 [코팅] -	1.0000	%	9.0000	mg
100000645	HPMC	2.4000	%	21.6000	mg
100001270	글리세린지방산에스테르	0.2400	%	2.1600	mg
100000761	이산화티타늄	0.5200	%	4.6800	mg
100001096	치자황색600(#M4015)	0.1950	%	1.7550	mg
100000122	치자블루에스비(#M1637, 치자청색소)	0.0715	%	0.6435	mg
100000563	주정 코팅주정	30.0800	%	270.7200	mg
합계		100.0000	%	900.0000	mg

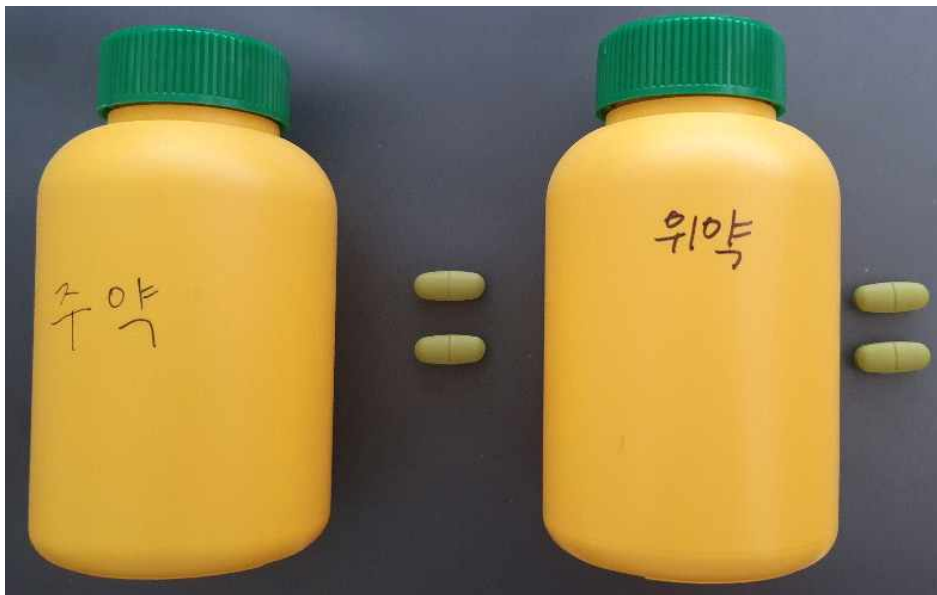
(다) 주약 및 위약 제조

- ① 눈 건강과 간 건강 2건의 인체적용시험을 위해 병당 6개월 섭취가 가능하도록 180정/병을 제조하였으며, 주약과 위약 각각 120병씩 제조하였음

(3) 제조결과

(가) 주약 (병풀주정추출분말 300 mg/정 함유)과 위약 비교

- ① 외형적으로 주약과 위약이 구별되지 않도록 제조하였음



(나) 주약 (병풀주정추출분말 300 mg/정 함유)의 제조지시기록서

번호 : 2019-039

담당자 : 김소연

의뢰일 :

2019-02-25

고객사	제넨셀	M/P.R&I	- / 김소연
제품명	병풀주정추출분말(주약)	제품유형	임상용
제형	제피정제	생산일자	2019-03-05(타정)/2019-03-26(코팅)/2019-03-27(포장)
단위중량	900.00 mg	생산량	24.00 kg
색상	연두색의 제피정제	형태	절선장방형(LOB-D-02)
이론량	26,667 T	생산수량	- T
목적	임상시험용		

* 성분배합비율

No.	원료 Code	원료명	배합비율	단위중량	투입량	비고
1		샘플생산요청서와 동일	100.0000 %	900.0000 mg	24,000.000 g	
		합계	100.0000 %	900.0000 mg	24,000.00 g	

* 제조내용 및 품질 체크사항

No.	공정내용								
1	혼합, 타정 타정실 : 타정 1실 레일(셋팅/실제) : 18mm / 10.7mm								
2	결과 <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;"> 경도(kp=kgf) 측정 : 24.8 ~ 26 kgf </td> <td style="width: 33%;"> 단경(mm) 측정 : 6.12 ~ 6.16 mm </td> <td style="width: 33%;"> 중량(mg) - 3% 범위 기준 : 869mg ± 3% 측정 : 860 ~ 874mg </td> </tr> <tr> <td> 마손도(%) 측정 : 적합 </td> <td> 붕해(분) 측정 : 20분 </td> <td> 코팅 후 중량(20정평균) 측정 : 903 mg </td> </tr> </table>			경도(kp=kgf) 측정 : 24.8 ~ 26 kgf	단경(mm) 측정 : 6.12 ~ 6.16 mm	중량(mg) - 3% 범위 기준 : 869mg ± 3% 측정 : 860 ~ 874mg	마손도(%) 측정 : 적합	붕해(분) 측정 : 20분	코팅 후 중량(20정평균) 측정 : 903 mg
경도(kp=kgf) 측정 : 24.8 ~ 26 kgf	단경(mm) 측정 : 6.12 ~ 6.16 mm	중량(mg) - 3% 범위 기준 : 869mg ± 3% 측정 : 860 ~ 874mg							
마손도(%) 측정 : 적합	붕해(분) 측정 : 20분	코팅 후 중량(20정평균) 측정 : 903 mg							

* 공정 중 문제점 및 조치사항 & 대책

1. 이상없음

* 의견 및 기타

1. 3/27 병포장 완료(실리카겔, 완충용비닐, 캡씰링, 하단날인 진행)

(다) 위약의 제조지시기록서

번호 : 2019-041

담당자 : 김소연

의뢰일 :

2019-02-25

고객사	제넨셀	M/P.R&I	- / 김소연
제품명	병풀주정추출분말(위약)	제품유형	임상용
제형	제피정제	생산일자	2019-03-05(타정)/2019-03-26(코팅)/2019-03-27(포장)
단위중량	900.00 mg	생산량	24.00 kg
색상	연두색의 제피정제	형태	절선장방형(LOB-D-02)
이론량	26,667 T	생산수량	- T
목적	임상시험용		

* 성분배합비율

No.	원료 Code	원료명	배합비율	단위중량	투입량	비고
1		샘플생산요청서와 동일	100.0000 %	900.0000 mg	24,000.000 g	
		합계	100.0000 %	900.0000 mg	24,000.00 g	

* 제조내용 및 품질 체크사항

No.	공정내용																	
1	혼합, 타정 타정실 : 타정 1실 레일(셋팅/실제) : 18mm / 10.69mm																	
2	결과 <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td>경도(kp=kgf)</td> <td>단경(mm)</td> <td>중량(mg) - 3% 범위</td> </tr> <tr> <td>측정 : 21 ~ 24.6 kgf</td> <td>측정 : 6.14 ~ 6.18 mm</td> <td>기준 : 869mg ± 3%</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>측정 : 813 ~ 826mg</td> </tr> <tr> <td>마손도(%)</td> <td>붕해(분)</td> <td>코팅 후 중량(20정평균)</td> </tr> <tr> <td>측정 : 적합</td> <td>측정 : 40분</td> <td>측정 : 861 mg</td> </tr> </table>			경도(kp=kgf)	단경(mm)	중량(mg) - 3% 범위	측정 : 21 ~ 24.6 kgf	측정 : 6.14 ~ 6.18 mm	기준 : 869mg ± 3%			측정 : 813 ~ 826mg	마손도(%)	붕해(분)	코팅 후 중량(20정평균)	측정 : 적합	측정 : 40분	측정 : 861 mg
경도(kp=kgf)	단경(mm)	중량(mg) - 3% 범위																
측정 : 21 ~ 24.6 kgf	측정 : 6.14 ~ 6.18 mm	기준 : 869mg ± 3%																
		측정 : 813 ~ 826mg																
마손도(%)	붕해(분)	코팅 후 중량(20정평균)																
측정 : 적합	측정 : 40분	측정 : 861 mg																

* 공정 중 문제점 및 조치사항 & 대책

1. 주약과 동일한 두께 맞추기 위해 타정중량 낮게 타정진행, 코팅은 단위중량 기준 35mg 이상 진행

* 의견 및 기타

1. 3/27 병포장 완료(실리카겔, 완충용비닐, 캡씰링, 하단날인 진행)

나. 눈 건강 인체적용시험

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 중장년 참여자의 병풀주정추출분말(CA-HE50) 섭취가 MPOD 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 전향적, 이중눈가림, 무작위배정, 위약 대조 인체적용시험 진행

(나) 본 인체적용시험은 리서치멘토 (CRO)를 통해 인도 눈 건강 시험기관에서 진행함

(2) 시험방법

(가) 요약

연구제목	중장년 참여자의 병풀주정추출분말(CA-HE50) 섭취가 MPOD 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 전향적, 이중눈가림, 무작위배정, 위약 대조 인체적용시험 A prospective, double blind, randomized, placebo controlled interventional study to evaluate the safety and efficacy of Centella asiatica extract tablets (CA-HE50) in improving MPOD levels in elderly volunteers.
의뢰자	GENENCELL CO, LTD #301,U Tower, 120 Heungdeokjungang-ro, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
연구책임자 및 연구기관	윤리위원회 승인은 1개의 연구기관(인도의 1개 도시)에서 이루어졌다. - 연구책임자: Dr. Thirumalesh MB - 연구기관: Narayana Nethralaya, Bangalore
연구설계	무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조, 2개 군, 평행설계
대상자 수	80명
연구의 상	중재연구
군배정 및 시험식품의 용량	각 군별로 40명씩 두 군으로 나누었다. 80명의 대상자는 180일(6개월) / 24주(6개월)의 기간동안 1:1의 비율로 대조식품이나 시험식품을 하루 1회, 식사 후 30분에 섭취하였다.
연구기간	첫 시험대상자 등록일: 2019년 5월30일 마지막 시험대상자 방문완료일: 2019년 12월 09일
연구목적	본 연구의 목적은 중장년 대상자에서 병풀주정추출분말(CA-HE50)의 MPOD 개선 유효성 및 안전성 평가하기 위함이다.
시험식품	병풀주정추출분말 (CA-HE50) 및 대조식품 (위약)
선정조건	a. 45-65세 성인 . b. MPOD 수치가 0.2 - 0.4인 자. c. 임상적으로 심각한 안구 질환이 없지만, 눈의 조절에 심각하지 않은 문제가 있는 자. d. 연구계획서에 있는 식습관을 준수할 수 있는 자. e. 정기적인 follow-up 방문에 올 의향이 있는 자. f. 서명 동의가 가능한 자.
제외조건	a. 식물 추출물이나 식이보충제에 대한 과민성이 있는 자. b. 녹내장, 백내장, 망막변성이 있는 자. c. 고콜레스테롤혈증, 신장질환, 간질환, 당뇨병, 및 기타 쇠약하게 하는 질병이 있는 자. d. 한약이나 대증약물을 이용한 치료를 받고 있는 자.

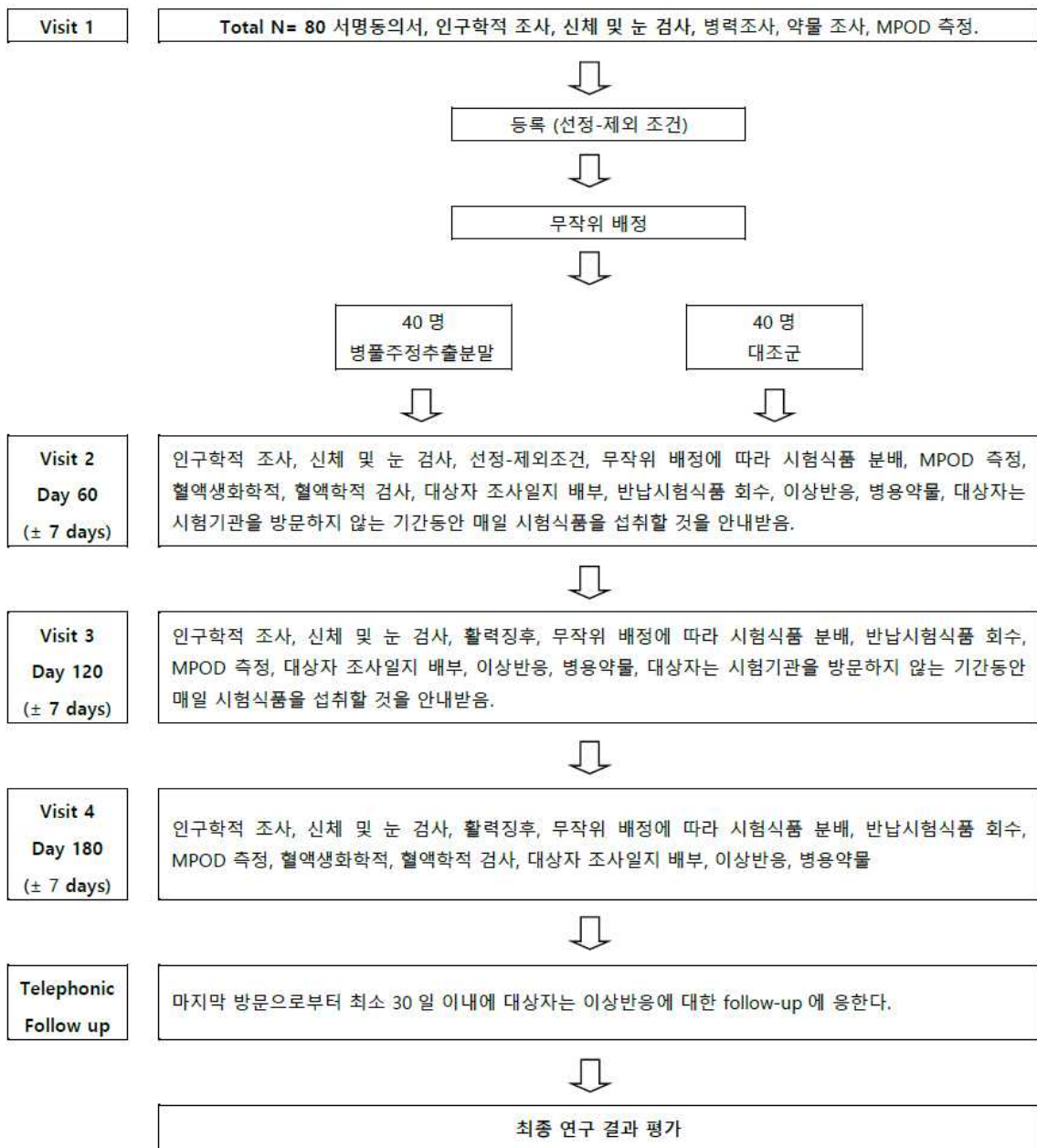
	e. 3개월 이내 또는 현재 진행 중인 다른 임상 실험에 참여한 자. f. 연구자가 연구에 적합하지 않다고 판단한 자.																
평가항목	유효성: 황반색소의 광학밀도(MPOD) 안전성: 활력징후, 이상반응, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사.																
대상자 수	총 80명의 대상자가 무작위배정되었다. 위약군, 시험식품군, 총 2개의 군이다.																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>No. of Patients</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>계획된 대상자 수</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 대상자 수</td> <td>127</td> </tr> <tr> <td>등록 대상자 수</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 탈락한 대상자 수</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>연구완료한 대상자 수</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>Safety set의 대상자 수</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>유효성 평가의 대상자 수</td> <td>75</td> </tr> </tbody> </table>	Description	No. of Patients	계획된 대상자 수	80	스크리닝 대상자 수	127	등록 대상자 수	80	스크리닝 탈락한 대상자 수	47	연구완료한 대상자 수	75	Safety set의 대상자 수	75	유효성 평가의 대상자 수	75
	Description	No. of Patients															
	계획된 대상자 수	80															
	스크리닝 대상자 수	127															
	등록 대상자 수	80															
	스크리닝 탈락한 대상자 수	47															
	연구완료한 대상자 수	75															
Safety set의 대상자 수	75																
유효성 평가의 대상자 수	75																
연구절차	기관 윤리위원회가 서면으로 정보 동의서를 승인한 후 MPOD가 0.2에서 0.4 사이에 해당하는 중장년 대상자들이 연구에 등록되었다. 80명의 대상자는 180일(6개월) 동안 1:1의 비율로 대조식품이나 시험식품을 1일 1정, 식후 30분 에 섭취하였다. 0일차, 60일차, 120일차 및 180일차 각각의 MPOD 값을 측정하고 분석하였다. 대상자의 하루 섭취 비타민 A와 카로티노이드(있는 경우)는 대상자 조사일기에 기록되었다.																
통계분석:	CRF에 기록된 데이터는 0일차부터 180일차까지 실험군과 대조군 간에 비교되었다. SAS 버전 9.4를 사용하여 통계 분석을 수행했다. 군간 비교는 독립t-검정을 사용하여 수행되었고 군내 비교는 대응t-검정을 사용하여 수행되었으며, 'p' 값 0.05보다 작을 때 통계적 유의하다고 평가하였다.																

(나) 연구일정

Activity	Screening (-5day)	Day 0	Day 60	Day 120	Day 180	Follow Up for 15 days
연구참여동의	X					
인구학적 조사	X	X	X	X	X	
신체검사	X					
눈 검사	X	X	X	X	X	
병력 및 약물 조사	X					
비용 치료	X					
활력징후		X			X	
선정제외조건		X				
무작위배정		X				
시험식품 배포		X	X	X		

반납시험식품 회수			X	X	X	
MPOD 측정	X	X	X	X	X	
혈액생화학적, 혈액학적 검사		X			X	
대상자 조사일지 배포		X	X	X	X	
대상자 조사일지 확인			X	X	X	
이상반응		X	X	X	X	X
병용약물 확인		X	X	X	X	X

(다) 연구진행의 흐름도



(라) 인체적용시험 승인문서



Clinical Trial Details (PDF Generation Date :- Tue, 04 Feb 2020 07:45:48 GMT)

CTRI Number	CTRI/2019/05/019392 [Registered on: 28/05/2019] - Trial Registered Prospectively	
Last Modified On	04/02/2020	
Post Graduate Thesis	No	
Type of Trial	Interventional	
Type of Study	Ayurveda	
Study Design	Randomized, Parallel Group, Placebo Controlled Trial	
Public Title of Study	Clinical trial on eye health in healthy elderly volunteers.	
Scientific Title of Study	A Prospective, Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Interventional Study, to evaluate Safety and Efficacy of Centella Asiatica Extract tablets in Improving MPOD Levels in Elderly Volunteers.	
Secondary IDs if Any	Secondary ID	Identifier
	RM/MPOD/2019 (Version 2 6th May 2019)	Protocol Number
Details of Principal Investigator or overall Trial Coordinator (multi-center study)	Details of Principal Investigator	
	Name	Dr Ashok Godavarthi
	Designation	Director
	Affiliation	Radiant Research Services Pvt. Ltd
	Address	[Redacted Address]
	Phone	[Redacted Phone]
	Fax	[Redacted Fax]
	Email	[Redacted Email]
Details Contact Person (Scientific Query)	Details Contact Person (Scientific Query)	
	Name	Dr Ashok Godavarthi
	Designation	Director
	Affiliation	Radiant Research Services Pvt. Ltd
	Address	[Redacted Address]
	Phone	[Redacted Phone]
	Fax	[Redacted Fax]
	Email	[Redacted Email]
Details Contact Person (Public Query)	Details Contact Person (Public Query)	
	Name	Dr Ashok Godavarthi
	Designation	Director
	Affiliation	Radiant Research Services Pvt. Ltd
	Address	[Redacted Address]

(마) MPOD 측정 방법 및 절차

- ① 황반색소광학밀도(MPOD)는 단일 망막 위치(retinal eccentricity의 0.50°)에서 MPOD를 측정하는 heterochromatic flicker photometry (HFP) 기기인 Tinsley macular pigment densitometer (MPODTM) (Tinsley Ophthalmic, Surrey, UK)를 사용하여 측정하였으며, 기기는 1° 직경의 디스크(retinal eccentricity 0.5°에 위치한 가장자리)의 foveal target과 retinal eccentricity 8°에서 기준점을 사용하였음
- ② 처음에 대상자는 중심 표적(1° 직경 디스크)을 보고 빛이 깜박이는 것을 볼 때 순간적으로 버튼을 눌러야 하며, 동일한 빛 지점은 파란색(465nm)과 녹색(530nm) 조명을 일련의 다른 강도비로 표시하여 나타내었음
- ③ 깜박임 주파수는 깜박임을 감지할 수 없는 높은 속도로 시작되고, 각 파란색-녹색 강도 비율에 대해 대상자가 응답 버튼을 누르는 지점에서 깜박임을 볼 때까지 서서히 감소되었음
- ④ 이 과정은 피사체가 retinal eccentricity의 8° 기준점에 빨간색 디스크를 고정하고 peripheral target에 대해 반복되었으며, 주파수 대 파란색-녹색 비율의 두 개의 그래프를 얻을 수 있었음
- ⑤ 각 곡선은 파란색/녹색 표적의 동일한 빛 지점에 해당하는 최소값을 가지고 있었으며, Tinsley Macular Pigment Densitometer™ 내장 소프트웨어는 이러한 minima 사이의 차이를 계산하고 시색소의 광학 밀도를 계산하였음

(3) 인구학적 정보 및 기저점 수치 결과

(가) 시험대상자 및 탈락율

- ① 총 127명의 대상자들이 윤리위원회가 승인한 동의서 작성 후 스크리닝을 받았으며, 47명이 스크리닝 탈락하고 80명이 등록되었음
- ② 80명의 대상자는 1:1 비율로 시험군과 대조군으로 무작위배정되었으며, 대조식품에서 3명, 병풀주정추출분말 섭취군에서 2명 탈락하여 총 75명의 대상자가 연구를 완료하였음

(나) 병력 조사

- ① 조사된 병력은 머리, 귀, 코, 목, 눈, 심혈관계, 호흡계, 내분비계, 위장관, 간담관, 비뇨생식기, 근골격, 신경계, 정신과, 혈액학, 면역, 피부, 알레르기 반응, 그 외 기타였으며, 모든 병력 카테고리에서 병력을 나타낸 대상자는 없었음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
Head, Ears, Nose and Throat			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Eyes			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Cardiovascular			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Respiratory			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Endocrine			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Gastro-intestinal			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Hepato-biliary			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Genito-Urinary			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Musculo Skeletal			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Neurological			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Psychological			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Hematological			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Immunological			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Dermatological			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Allergies			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Other			
Yes	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
No	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)

(다) 신체검사 결과

- ① 신체검사에서는 전반적인 외모, 머리, 귀, 코, 목, 심장, 폐, 복부, 손발, 신경이 검사 되었으며, 신체검사에서 비정상(abnormal)로 판단된 대상자는 없었음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
General Appearance				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Head, Ears, Nose and Throat				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Heart				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Lungs				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
Abdomen				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Extremities				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Neurological				
Normal	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
Abnormal	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Normal	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
Abnormal	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

(라) 안과검사 결과

- ① 안과검사에서는 당뇨로 인한 눈병, 백내장, 노인황반변성(AMD, age-related macular degeneration), 황반원공, 망막 박리/열상, 약시, 활동적인 눈의 감염, 백내장 수술이 검사되었으며, 스크리닝 방문에서 수행된 안과검사에서 안과적 증상을 나타낸 대상자는 없었음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
Diabetic Eye Disease			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Cataract			

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	80(0.0)
AMD			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Macular Hole			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Retinal Detach / Tear			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Amblyopia			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Active Eye Infection			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Cataract Surgery			
YES	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NO	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
UNKNOWN	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

(마) Snellen Visual Acuity scores 결과

- ① Snellen Visual Acuity scores는 일정한 거리에서 글자를 분별하는가를 확인하여 시력을 측정하는 검사이며, 스크리닝 방문에서 우안/좌안 별로 근거리, 원거리 시력검사를 수행하였고, 모든 시력검사에서 이상이 나타나지 않았음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
RIGHT EYE				
FAR	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
NEAR	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
FAR	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
NEAR	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
FAR	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
NEAR	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
FAR	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
NEAR	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
LEFT EYE				
FAR	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
NEAR	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
FAR	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
NEAR	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
FAR	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
NEAR	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
FAR	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
NEAR	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)

(바) 인구학적 특성

- ① 등록된 대상자들의 연령은 평균 만 53.6±7.40세였으며, 남녀비율은 두 군간 유사하였음
- ② 신장의 경우, Group A 162.2±7.8 cm, Group B 161.6±8.79 cm로 두 군간 유사하였으며, 체중은 Group A 65.48±10.189 kg, Group B 65.13±18.375 kg이었고, BMI는 Group A 24.84±3.115 kg/m², Group B 24.01±3.207 kg/m²로 두 군간 유사하였음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
Age (Years)			
N	40	40	80
Mean (SD)	52.9(6.73)	54.2(8.05)	53.6(7.40)
Median	53.0	54.5	53.5
Min, Max	38,65	41,69	38,69
Sex, n (%)			
Female	21(52.5)	22(55.0)	43(53.8)
Male	19(47.5)	18(45.0)	37(46.3)
Height (centimeters)			
N	40	40	80
Mean (SD)	162.2(7.80)	161.6(8.79)	161.9(8.26)
Median	161.5	160.5	161.0
Min, Max	145,178	149,177	145,178
Weight (kilograms)			
N	40	40	80
Mean (SD)	65.48(10.189)	65.13(18.375)	65.30(14.764)
Median	65.00	62.00	64.75
Min, Max	45.0,87.0	40.0,153.5	40.0,153.5
BMI (Kg/m²)			
N	40	40	80

Parameter/Statistics	Group A	Group B	Total
Mean (SD)	24.84(3.115)	24.01(3.207)	24.43(3.169)
Median	24.60	24.25	24.60
Min, Max	19.6,34.1	17.5,32.3	17.5,34.1

(4) 안전성 평가 결과

(가) 확장안저검사

- ① 각 방문에서 수행된 확장안저검사에서 비정상(abnormal)으로 판단된 대상자는 없었음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
NORMAL	Visit_1	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
ABNORMAL	Visit_1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NORMAL	Visit_2	40(100.0)	40(100.0)	80(100.0)
ABNORMAL	Visit_2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NORMAL	Visit_3	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
ABNORMAL	Visit_3	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
NORMAL	Visit_4	37(100.0)	38(100.0)	75(100.0)
ABNORMAL	Visit_4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

(나) 활력징후

- ① 각 방문에서 수행된 활력징후 측정에서 심박수, 맥박수, 호흡수, 체온, 수축기 혈압, 이완기 혈압을 측정하였으며, 심박수, 체온, 이완기 혈압은 군간, 군내 섭취전후 비교 시 유의적인 차이가 없었음
- ② 맥박수, 호흡수, 수축기 혈압은 군간 비교 시 유의적인 차이가 없었으며, 군내 섭취 전후 비교에서 유의적인 차이가 있었으나 임상적으로 유의미한 변화는 아니었음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
Heart rate(beats/min)					
N	Visit_1	40	40	80	0.300
Mean (SD)	Visit_1	72.4(3.42)	73.2(3.22)	72.8(3.33)	
Median	Visit_1	71.5	74.0	72.0	
Min, Max	Visit_1	66,79	66,79	66,79	
N	Visit_2	40	40	80	0.969
Mean (SD)	Visit_2	73.5(2.94)	73.5(2.70)	73.5(2.81)	
Median	Visit_2	74.0	73.5	74.0	
Min, Max	Visit_2	68,79	70,78	68,79	
N	Visit_3	37	38	75	0.567
Mean (SD)	Visit_3	72.4(2.26)	72.6(1.95)	72.5(2.10)	
Median	Visit_3	72.0	72.0	72.0	
Min, Max	Visit_3	70,79	69,77	69,79	

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_4	37	38	75	0.089
Mean (SD)	Visit_4	73.0(2.46)	72.0(2.71)	72.5(2.63)	
Median	Visit_4	72.0	72.0	72.0	
Min, Max	Visit_4	70,78	66,78	66,78	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.204	0.101		
Pulse rate(beats/min)					
N	Visit_1	40	40	80	0.296
Mean (SD)	Visit_1	71.6(3.16)	72.3(2.78)	72.0(2.98)	
Median	Visit_1	72.0	72.0	72.0	
Min, Max	Visit_1	62,78	66,79	62,79	
N	Visit_2	40	40	80	0.455
Mean (SD)	Visit_2	71.2(2.77)	71.7(3.18)	71.5(2.97)	
Median	Visit_2	70.5	71.0	71.0	
Min, Max	Visit_2	65,78	68,80	65,80	
N	Visit_3	37	38	75	0.316
Mean (SD)	Visit_3	71.0(2.94)	71.7(3.36)	71.4(3.16)	
Median	Visit_3	70.0	71.0	70.0	
Min, Max	Visit_3	68,78	68,78	68,78	
N	Visit_4	37	38	75	0.584
Mean (SD)	Visit_4	71.1(2.77)	70.7(2.56)	70.9(2.65)	
Median	Visit_4	70.0	70.0	70.0	
Min, Max	Visit_4	68,76	68,76	68,76	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.475	0.023*		
Respiratory rate(breaths/min)					
N	Visit_1	40	40	80	0.634
Mean (SD)	Visit_1	19.3(2.45)	19.0(2.22)	19.2(2.33)	
Median	Visit_1	18.0	18.0	18.0	
Min, Max	Visit_1	16,26	16,24	16,26	
N	Visit_2	40	40	80	0.819
Mean (SD)	Visit_2	19.4(2.07)	19.3(1.82)	19.4(1.94)	
Median	Visit_2	20.0	20.0	20.0	
Min, Max	Visit_2	16,25	16,24	16,25	
N	Visit_3	37	38	75	0.852
Mean (SD)	Visit_3	20.4(1.98)	20.3(2.09)	20.3(2.02)	
Median	Visit_3	20.0	20.0	20.0	
Min, Max	Visit_3	17,24	17,24	17,24	
N	Visit_4	37	38	75	0.333
Mean (SD)	Visit_4	20.1(2.08)	20.6(2.21)	20.4(2.15)	
Median	Visit_4	20.0	20.0	20.0	
Min, Max	Visit_4	18,24	18,26	18,26	

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
P-value (Visit1 vs Visit4)		.008**	.001**		
Temperature (°F)					
N	Visit_1	40	40	80	0.315
Mean (SD)	Visit_1	98.55(0.101)	98.45(0.602)	98.50(0.432)	
Median	Visit_1	98.60	98.60	98.60	
Min, Max	Visit_1	98.2,98.7	94.8,98.7	94.8,98.7	
N	Visit_2	40	40	80	0.523
Mean (SD)	Visit_2	98.52(0.100)	98.50(0.109)	98.51(0.104)	
Median	Visit_2	98.60	98.50	98.60	
Min, Max	Visit_2	98.4,98.6	98.3,98.7	98.3,98.7	
N	Visit_3	37	38	75	0.828
Mean (SD)	Visit_3	98.51(0.101)	98.51(0.099)	98.51(0.099)	
Median	Visit_3	98.60	98.60	98.60	
Min, Max	Visit_3	98.4,98.6	98.4,98.6	98.4,98.6	
N	Visit_4	37	38	75	0.300
Mean (SD)	Visit_4	98.52(0.099)	98.49(0.101)	98.50(0.100)	
Median	Visit_4	98.60	98.40	98.60	
Min, Max	Visit_4	98.4,98.6	98.4,98.6	98.4,98.6	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.177	0.651		
Systolic Blood Pressure (mmHg)					
N	Visit_1	40	40	80	0.511
Mean (SD)	Visit_1	121.9(4.89)	122.6(3.85)	122.2(4.39)	
Median	Visit_1	121.5	120.5	121.0	
Min, Max	Visit_1	110,130	118,135	110,135	
N	Visit_2	40	40	80	0.118
Mean (SD)	Visit_2	121.2(1.70)	122.2(3.38)	121.7(2.70)	
Median	Visit_2	120.0	120.5	120.0	
Min, Max	Visit_2	120,128	118,135	118,135	
N	Visit_3	37	38	75	0.750
Mean (SD)	Visit_3	121.1(2.90)	121.3(2.70)	121.2(2.78)	
Median	Visit_3	120.0	120.0	120.0	
Min, Max	Visit_3	118,130	118,130	118,130	
N	Visit_4	37	38	75	0.376
Mean (SD)	Visit_4	120.9(2.29)	120.5(1.62)	120.7(1.97)	
Median	Visit_4	120.0	120.0	120.0	
Min, Max	Visit_4	118,128	118,126	118,128	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.192	0.001**		
Diastolic Blood Pressure (mmHg)					

Parameter/ Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.537
Mean (SD)	Visit_1	74.2(5.56)	73.5(5.25)	73.9(5.39)	
Median	Visit_1	73.0	70.0	72.0	
Min, Max	Visit_1	70,90	70,90	70,90	
N	Visit_2	40	40	80	0.336
Mean (SD)	Visit_2	72.7(2.26)	73.3(3.00)	73.0(2.66)	
Median	Visit_2	72.5	74.0	73.5	
Min, Max	Visit_2	70,78	70,80	70,80	
N	Visit_3	37	38	75	0.818
Mean (SD)	Visit_3	74.0(3.22)	73.8(3.65)	73.9(3.42)	
Median	Visit_3	74.0	73.0	74.0	
Min, Max	Visit_3	70,80	70,80	70,80	
N	Visit_4	37	38	75	0.196
Mean (SD)	Visit_4	73.3(3.58)	74.5(4.63)	73.9(4.17)	
Median	Visit_4	72.0	74.0	74.0	
Min, Max	Visit_4	70,80	60,80	60,80	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.382	0.359		

(다) 혈액학적/혈액생화학적 검사

- ① SGOT(AST)는 Visit 4에서 군간 비교 결과, group B(병풀주정추출분말 (CA-HE50)에서 대조군에 대비해 유의적으로 감소하였으며, 그 외 다른 지표에서는 군간 유의적 차이는 나타나지 않았음
- ② 일부 지표에서 군내 섭취전후 비교 시 유의적인 차이가 있었으나 모두 정상범위 내에서의 변화이며 임상적으로 유의미하지 않았음 (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
Hemoglobin mg/dl					
N	Visit_1	40	39	79	0.439
Mean (SD)	Visit_1	12.46(1.246)	12.21(1.619)	12.34(1.439)	
Median	Visit_1	12.90	12.80	12.90	
Min, Max	Visit_1	9.6,14.2	7.9,14.8	7.9,14.8	
N	Visit_4	37	38	75	0.494
Mean (SD)	Visit_4	14.90(0.970)	14.21(1.768)	14.55(1.463)	
Median	Visit_4	14.60	14.10	14.50	
Min, Max	Visit_4	13.4,16.7	11.1,18.2	11.1,18.2	
p-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.001**		
Total WBC Count cells/cumm					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.186
Mean (SD)	Visit_1	7350.0(1291.79)	6955.0(1357.97)	7152.5(1331.79)	
Median	Visit_1	7200.0	6850.0	7150.0	
Min, Max	Visit_1	5200,9400	4200,9200	4200,9400	
N	Visit_4	37	38	75	0.898
Mean (SD)	Visit_4	7095.0(1566.21)	7297.4(917.84)	7197.6(1274.73)	
Median	Visit_4	7100.0	7200.0	7200.0	
Min, Max	Visit_4	7,9400	5300,9200	7,9400	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.000***		
Neutrophils %					
N	Visit_1	40	40	80	0.533
Mean (SD)	Visit_1	61.9(5.69)	62.1(4.19)	62.0(4.97)	
Median	Visit_1	62.0	64.0	62.5	
Min, Max	Visit_1	50,70	52,70	50,70	
N	Visit_4	37	38	75	0.393
Mean (SD)	Visit_4	66.1(5.45)	65.1(4.39)	65.6(4.94)	
Median	Visit_4	66.0	65.0	65.0	
Min, Max	Visit_4	54,74	55,74	54,74	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.495	0.288		
Lymphocytes %					
N	Visit_1	40	40	80	0.600
Mean (SD)	Visit_1	30.35(4.173)	29.53(4.107)	29.94(4.135)	
Median	Visit_1	30.00	28.50	30.00	
Min, Max	Visit_1	20.0,38.0	23.0,38.0	20.0,38.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.352
Mean (SD)	Visit_4	33.73(4.221)	33.29(4.046)	33.51(4.111)	
Median	Visit_4	34.00	34.00	34.00	
Min, Max	Visit_4	24.0,40.0	28.0,40.0	24.0,40.0	
P-value (Visit_1 vs. Visit_4)		0.925	0.129		
Monocytes %					
N	Visit_1	40	40	80	1.000
Mean (SD)	Visit_1	4.8(1.84)	4.5(2.63)	4.6(2.26)	
Median	Visit_1	5.0	3.0	4.0	
Min, Max	Visit_1	2,9	2,10	2,10	
N	Visit_4	37	39	76	0.894
Mean (SD)	Visit_4	5.6(1.83)	5.1(2.60)	5.4(2.26)	
Median	Visit_4	6.0	4.0	5.0	
Min, Max	Visit_4	3,10	2,11	2,11	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.012*	0.001**		
Eosinophils %					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.438
Mean (SD)	Visit_1	2.5(1.18)	3.1(1.53)	2.8(1.39)	
Median	Visit_1	2.0	3.0	2.0	
Min, Max	Visit_1	1,5	1,7	1,7	
N	Visit_4	37	38	75	0.814
Mean (SD)	Visit_4	3.4(1.14)	4.0(1.43)	3.7(1.32)	
Median	Visit_4	3.0	4.0	3.0	
Min, Max	Visit_4	2,6	2,6	2,6	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.844	0.234		
RBC mill/cumm					
N	Visit_1	40	40	80	0.321
Mean (SD)	Visit_1	4.61(0.368)	4.45(0.413)	4.53(0.397)	
Median	Visit_1	4.60	4.30	4.50	
Min, Max	Visit_1	3.9,5.3	3.9,5.4	3.9,5.4	
N	Visit_4	37	38	75	0.202
Mean (SD)	Visit_4	4.96(0.414)	4.76(0.362)	4.86(0.399)	
Median	Visit_4	4.90	4.80	4.80	
Min, Max	Visit_4	4.2,5.9	4.0,5.3	4.0,5.9	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.001**	0.338		
Platelet Count lakhs/cu.mm					
n	Visit_1	40	40	80	0.904
Mean (SD)	Visit_1	3.24(2.563)	3.67(3.155)	3.46(2.864)	
Median	Visit_1	2.64	2.86	2.74	
Min, Max	Visit_1	1.5,15.4	1.6,13.9	1.5,15.4	
n	Visit_4	37	38	75	0.951
Mean (SD)	Visit_4	3.11(1.709)	4.06(3.275)	3.59(2.649)	
Median	Visit_4	2.89	3.00	2.90	
Min, Max	Visit_4	1.5,12.8	1.5,13.5	1.5,13.5	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.515	0.626		
PCV %					
N	Visit_1	40	40	80	0.238
Mean (SD)	Visit_1	37.89(8.119)	39.45(1.751)	38.67(5.888)	
Median	Visit_1	39.20	39.20	39.20	
Min, Max	Visit_1	4.2,44.2	35.1,42.6	4.2,44.2	
N	Visit_4	37	38	75	0.943
Mean (SD)	Visit_4	42.06(5.319)	42.16(6.282)	42.11(5.788)	
Median	Visit_4	41.40	41.50	41.40	
Min, Max	Visit_4	31.8,63.6	31.5,69.6	31.5,69.6	
P-value (Visit_1 vs. Visit_4)		0.014*	0.009**		
MCV FI					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.093
Mean (SD)	Visit_1	91.53(5.449)	89.39(5.813)	90.46(5.701)	
Median	Visit_1	93.00	90.10	92.00	
Min, Max	Visit_1	79.8,101.0	79.8,101.0	79.8,101.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.242
Mean (SD)	Visit_4	90.34(4.344)	89.09(4.755)	89.71(4.569)	
Median	Visit_4	91.00	87.90	89.80	
Min, Max	Visit_4	83.0,99.5	81.0,99.0	81.0,99.5	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.161	0.646		
MCH pg					
N	Visit_1	40	40	80	0.424
Mean (SD)	Visit_1	32.14(4.353)	32.96(4.706)	32.55(4.523)	
Median	Visit_1	31.00	31.60	31.20	
Min, Max	Visit_1	28.4,49.0	28.4,49.0	28.4,49.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.279
Mean (SD)	Visit_4	31.94(3.889)	33.12(5.394)	32.54(4.718)	
Median	Visit_4	31.00	31.50	31.40	
Min, Max	Visit_4	27.1,47.9	27.1,51.4	27.1,51.4	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.730	0.985		
MCHC g/dl					
N	Visit_1	40	40	80	0.114
Mean (SD)	Visit_1	35.94(3.658)	37.78(6.256)	36.86(5.175)	
Median	Visit_1	35.05	34.90	34.95	
Min, Max	Visit_1	32.6,49.0	33.2,54.0	32.6,54.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.126
Mean (SD)	Visit_4	34.96(3.757)	36.72(5.858)	35.85(4.981)	
Median	Visit_4	33.60	34.25	33.80	
Min, Max	Visit_4	30.5,51.0	31.8,54.2	30.5,54.2	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.121	0.167		
Total Bilirubin mg/dl					
N	Visit_1	40	40	80	0.933
Mean (SD)	Visit_1	0.87(0.128)	0.87(0.138)	0.87(0.132)	
Median	Visit_1	0.90	0.90	0.90	
Min, Max	Visit_1	0.7,1.2	0.7,1.2	0.7,1.2	
N	Visit_4	37	36	73	0.866
Mean (SD)	Visit_4	0.60(0.184)	0.59(0.209)	0.59(0.196)	
Median	Visit_4	0.58	0.66	0.60	
Min, Max	Visit_4	0.2,0.9	0.2,0.9	0.2,0.9	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.000***		
SGOT u/l					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.884
Mean (SD)	Visit_1	31.73(9.592)	31.63(9.303)	31.68(9.389)	
Median	Visit_1	32.50	33.00	33.00	
Min, Max	Visit_1	13.0,55.0	16.0,62.0	13.0,62.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.021*
Mean (SD)	Visit_4	33.84(6.978)	35.32(6.363)	34.59(6.670)	
Median	Visit_4	35.00	37.00	36.00	
Min, Max	Visit_4	21.0,45.0	20.0,45.0	20.0,45.0	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.000***		
SGPT u/l					
N	Visit_1	40	40	80	0.880
Mean (SD)	Visit_1	30.18(9.193)	29.08(10.835)	29.63(9.999)	
Median	Visit_1	30.00	29.00	29.50	
Min, Max	Visit_1	12.0,55.0	16.0,70.0	12.0,70.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.669
Mean (SD)	Visit_4	32.32(8.762)	28.82(8.016)	30.55(8.521)	
Median	Visit_4	30.00	27.50	29.00	
Min, Max	Visit_4	12.0,49.0	15.0,45.0	12.0,49.0	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.000***		
Alkaline Phosphatase u/l					
N	Visit_1	40	40	80	0.366
Mean (SD)	Visit_1	160.9(27.35)	155.0(26.75)	157.9(27.04)	
Median	Visit_1	163.0	155.5	160.0	
Min, Max	Visit_1	99,200	99,199	99,200	
N	Visit_4	37	38	75	0.511
Mean (SD)	Visit_4	167.2(24.36)	159.7(27.76)	163.4(26.23)	
Median	Visit_4	168.0	160.0	165.0	
Min, Max	Visit_4	105,215	103,210	103,215	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.000***		
Total Protein mg/dl					
N	Visit_1	40	40	80	0.107
Mean (SD)	Visit_1	7.58(0.441)	7.42(0.437)	7.49(0.444)	
Median	Visit_1	7.80	7.40	7.45	
Min, Max	Visit_1	6.8,8.2	6.8,8.2	6.8,8.2	
N	Visit_4	37	38	75	0.558
Mean (SD)	Visit_4	7.47(0.689)	7.37(0.672)	7.42(0.677)	
Median	Visit_4	7.53	7.49	7.50	
Min, Max	Visit_4	5.5,8.5	6.0,8.4	5.5,8.5	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.404	0.786		
Sodium mmol/L					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	40	40	80	0.580
Mean (SD)	Visit_1	141.80(3.671)	142.28(4.044)	142.04(3.845)	
Median	Visit_1	141.55	141.80	141.60	
Min, Max	Visit_1	136.5,154.0	136.5,154.0	136.5,154.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.482
Mean (SD)	Visit_4	135.08(4.554)	132.74(21.607)	133.89(15.649)	
Median	Visit_4	136.00	135.50	136.00	
Min, Max	Visit_4	122.0,142.0	6.1,148.0	6.1,148.0	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.000***	0.011*		
Potassium mmol/l					
N	Visit_1	40	40	80	0.912
Mean (SD)	Visit_1	4.46(0.444)	4.47(0.478)	4.47(0.459)	
Median	Visit_1	4.50	4.60	4.55	
Min, Max	Visit_1	3.6,5.8	3.6,5.8	3.6,5.8	
N	Visit_4	37	38	75	0.323
Mean (SD)	Visit_4	5.08(5.246)	4.20(0.447)	4.64(3.700)	
Median	Visit_4	4.30	4.05	4.20	
Min, Max	Visit_4	3.0,36.0	3.5,5.3	3.0,36.0	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.334	0.026*		
Chloride mmol/L					
N	Visit_1	40	38	78	0.688
Mean (SD)	Visit_1	98.04(4.008)	99.12(2.890)	98.57(3.527)	
Median	Visit_1	98.65	99.42	99.20	
Min, Max	Visit_1	91.2,108.0	92.8,104.0	91.2,108.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.352
Mean (SD)	Visit_4	102.00(2.612)	102.04(2.735)	102.02(2.657)	
Median	Visit_4	102.60	102.00	102.60	
Min, Max	Visit_4	97.0,108.2	97.0,108.2	97.0,108.2	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.418	0.000***		
S.Creatinine mg/dl					
N	Visit_1	39	40	79	0.401
Mean (SD)	Visit_1	1.02(0.127)	0.99(0.140)	1.01(0.134)	
Median	Visit_1	1.00	1.00	1.00	
Min, Max	Visit_1	0.7,1.3	0.7,1.3	0.7,1.3	
N	Visit_4	37	38	75	0.578
Mean (SD)	Visit_4	1.06(0.569)	0.99(0.414)	1.02(0.494)	
Median	Visit_4	0.88	0.88	0.88	
Min, Max	Visit_4	0.6,3.7	0.6,2.7	0.6,3.7	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.708	0.940		
Blood Urea mg/dl					

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total	P-value
N	Visit_1	39	40	79	0.534
Mean (SD)	Visit_1	32.33(5.677)	33.15(5.934)	32.75(5.786)	
Median	Visit_1	34.00	32.00	32.00	
Min, Max	Visit_1	22.0,42.0	22.0,43.0	22.0,43.0	
N	Visit_4	37	38	75	0.927
Mean (SD)	Visit_4	31.11(7.695)	31.26(6.978)	31.19(7.291)	
Median	Visit_4	31.00	31.50	31.00	
Min, Max	Visit_4	13.0,46.0	14.0,43.0	13.0,46.0	
P-value (Visit1 vs Visit4)		0.400	0.237		

(5) 유효성 평가 결과

(가) MPOD 측정 결과

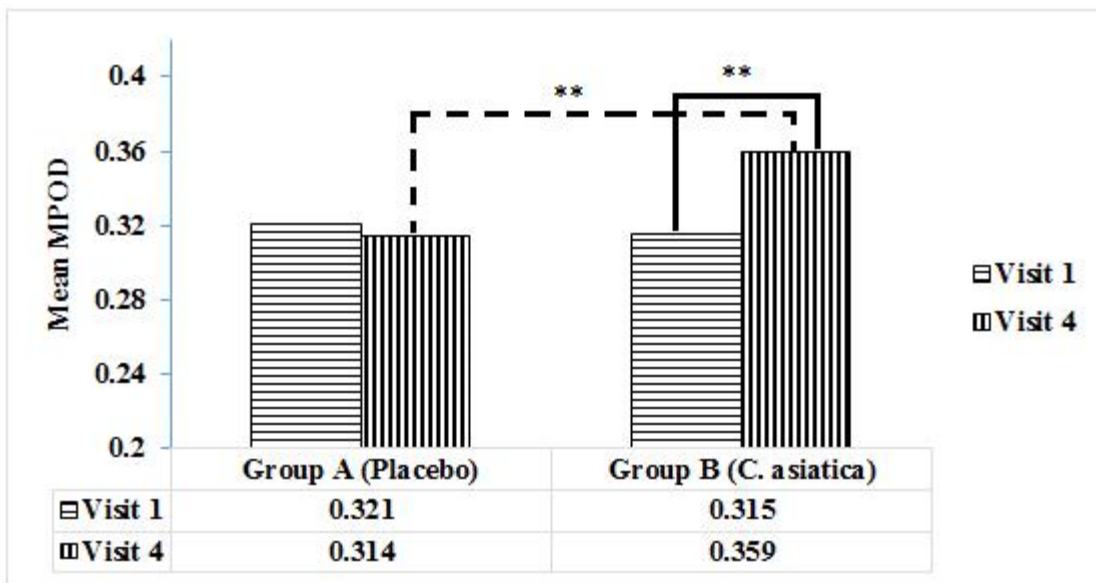
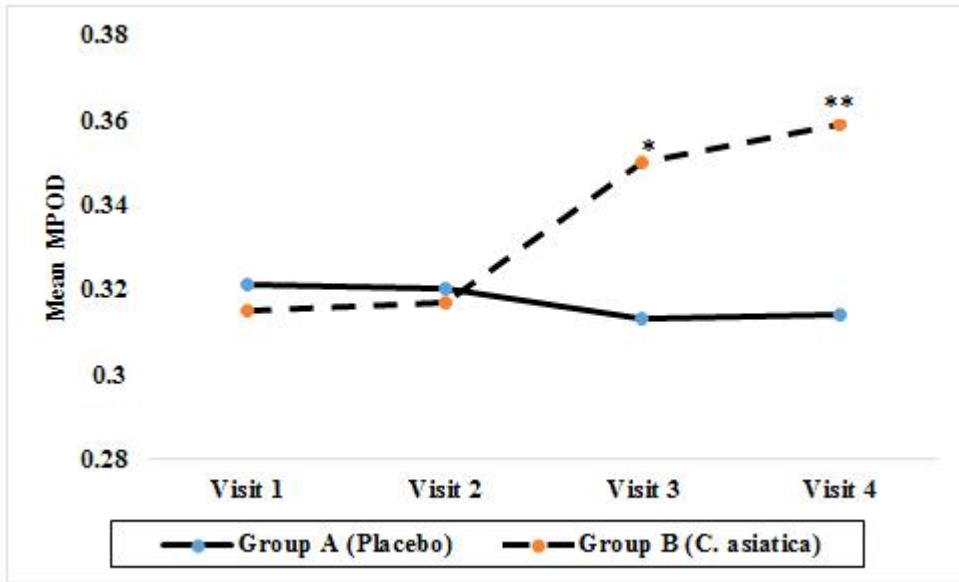
- ① Visit 4에서 Visit 1의 값을 뺀 섭취전후 변화량을 그룹간 비교한 결과, 대조군 대비 병풀주정추출분말 (CA-HE50)에서 평균 MPOD 값이 증가하였으며, 이러한 증가는 좌안, 우안, 좌우평균 MPOD에서 $p < 0.0001$ 수준으로 나타났음
- ② 군내 섭취전후 비교 결과, 대조군은 좌안, 우안, 좌우평균 MPOD값이 섭취 전후 변화가 유의하지 않았으나, 병풀주정추출분말 (CA-HE50)은 유의적으로 증가하였음 ($p < 0.01$) (Group A: 대조식품, Group B: 시험식품)

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
Left Eye MPOD (왼쪽눈)				
N	visit_1	40	40	80
Mean (SD)	visit_1	0.330(0.0499)	0.334(0.0486)	0.332(0.0490)
Median	visit_1	0.330	0.330	0.330
Min, Max	visit_1	0.21,0.41	0.26,0.41	0.21,0.41
N	visit_2	40	40	80
Mean (SD)	visit_2	0.324(0.0488)	0.330(0.0475)	0.327(0.0480)
Median	visit_2	0.320	0.325	0.320
Min, Max	visit_2	0.20,0.40	0.24,0.40	0.20,0.40
N	visit_3	37	38	75
Mean (SD)	visit_3	0.314(0.0500)	0.344(0.0473)	0.329(0.0507)
Median	visit_3	0.320	0.340	0.320
Min, Max	visit_3	0.22,0.46	0.26,0.44	0.22,0.46
N	visit_4	37	38	75
Mean (SD)	visit_4	0.312(0.0480)	0.351(0.0451)	0.332(0.0502)
Median	visit_4	0.320	0.360	0.340
Min, Max	visit_4	0.22,0.39	0.26,0.42	0.22,0.42

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
Right Eye MPOD (오른쪽눈)				
N	visit_1	40	40	80
Mean (SD)	visit_1	0.318(0.0647)	0.303(0.0598)	0.310(0.0623)
Median	visit_1	0.315	0.300	0.310
Min, Max	visit_1	0.20,0.41	0.20,0.40	0.20,0.41
N	visit_2	40	40	80
Mean (SD)	visit_2	0.315(0.0584)	0.304(0.0585)	0.309(0.0583)
Median	visit_2	0.315	0.300	0.310
Min, Max	visit_2	0.22,0.42	0.20,0.40	0.20,0.42
N	visit_3	37	38	75
Mean (SD)	visit_3	0.313(0.0556)	0.356(0.0782)	0.334(0.0709)
Median	visit_3	0.320	0.340	0.340
Min, Max	visit_3	0.21,0.41	0.24,0.62	0.21,0.62
N	visit_4	37	38	75
Mean (SD)	visit_4	0.315(0.0483)	0.367(0.0756)	0.342(0.0685)
Median	visit_4	0.320	0.355	0.330
Min, Max	visit_4	0.22,0.42	0.20,0.56	0.20,0.56

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
Average MPOD (왼쪽눈 오른쪽눈 평균)				
N	visit_1	40	40	80
Mean (SD)	visit_1	0.321(0.0482)	0.315(0.0436)	0.318(0.0458)
Median	visit_1	0.330	0.315	0.320
Min, Max	visit_1	0.24,0.40	0.23,0.39	0.23,0.40
N	visit_2	40	40	80
Mean (SD)	visit_2	0.320(0.0473)	0.317(0.0435)	0.318(0.0452)
Median	visit_2	0.330	0.320	0.320
Min, Max	visit_2	0.23,0.40	0.23,0.39	0.23,0.40
N	visit_3	37	38	75
Mean (SD)	visit_3	0.313(0.0480)	0.350(0.0531)	0.332(0.0536)
Median	visit_3	0.310	0.355	0.330
Min, Max	visit_3	0.23,0.43	0.25,0.50	0.23,0.50
N	visit_4	37	38	75
Mean (SD)	visit_4	0.314(0.0444)	0.359(0.0504)	0.337(0.0525)
Median	visit_4	0.310	0.360	0.340

Parameter/Statistics	Visit	Group A	Group B	Total
Min, Max	visit_4	0.22,0.39	0.23,0.47	0.22,0.47



(6) 눈 건강 인체적용시험 고찰 및 결론

- (가) 본 연구는 단일기관, 무작위 배정 인체적용시험으로 인도, Karnataka, Bangalore에 위치한 Narayana Nethralaya에서 수행되었으며, Dr Thirumalesh M B 가 연구책임자였음
- (나) 2019년 5월 16일에 본 인체적용시험 시험계획서에 대한 기관윤리위원회의 승인받았고, 그 후에 인도 임상시험 레지스트리(Clinical Trial Registry India, CTRI)에 본 연구를 등록하였음
- (다) 총 47명의 스크리닝 탈락이 있었고, 80명의 대상자 모두 두 집단에 균등하게 배정되었으며, 신체검사에서 비정상적인 병력과 임상적으로 심각한 문제가 없는 대상자를 선별하였음

- (라) 스크리닝 방문에서 시력 검사를 자세히 실시했으며, 연구참여과정에서 임상적으로 비정상적인 변화가 관찰되었는지 확인한 결과, 오른쪽과 왼쪽 눈에서 모두 발견되지 않았음
- (마) 연구종료시에 통계학자는 군 배정의 눈가림을 해제했으며, 그룹 A는 플라시보 대조군, 그룹 B는 병폴주정추출분말(CA-HE50)을 받았음
- (바) 연구에 등록된 대상자의 평균 연령은 53.67세로, 스크리닝 시점에서 그룹 A와 B 사이에 거의 동일했으며, 총 43명의 여성(53.75%)과 37명의 남성(46.25%)이 이번 연구에 참여했음
- (사) 확장안저검사(Dilated fundus exam)는 4번의 방문 동안 모두 80명의 등록 과목을 대상으로 실시되었고, 이상이 없는 것으로 판명되었으며, 즉 시험식품(병폴주정추출분말:CA-HE50)을 받은 대상자가 대조식품을 섭취한 대상자와 비교했을 때 임상적으로 유의미한 이상을 보이지 않았음
- (아) 4회의 모든 방문에서 측정 및 기록된 체온, 수축기 및 이완기 혈압, 맥박수, 심박수 및 호흡수와 같은 활력징후는 시험식품 및 대조식품군 대상자에서 유의미한 차이가 없으므로 병폴주정추출분말(CA-HE50)이 섭취에 안전하다는 것을 명확히 보여주었음
- (자) A그룹(대조군)의 순응도는 95.0%(방문2), 96.66%(방문3), 90.0%(방문4)이었으며, 평균으로는 93.88%이었고, B그룹(시험군, 병폴주정추출분말)의 순응도는 96.66%(방문2), 94.3%(방문3), 88.3%(방문4), 평균93.09%(방문)로 나타났음
- (차) 본 연구에서는, 등록된 75명의 대상자가 연구를 완료했으며 Intention-To-Treat (ITT) population와 Per-Protocol (PP) population에 포함되었음에 따라 유효성 분석에서 ITT 인구와 PP 인구 모두 80개 과목으로 구성되었음
- (카) 각 군당 대상자에서 기저점 방문(0일)에서 마지막 방문까지의 대한 MPOD 값을 측정하였음
 - ① 오른쪽 눈의 MPOD 변화를 분석하기 위하여 기저점에서 Visit 4 사이의 변화량을 두 군간 비교한 결과, 통계적으로 유의하게 차이가 났음 ($P < 0.0001$)
 - ② 왼쪽 눈에서 MPOD 변화를 분석하기 위하여 기저점에서 Visit 4 간의 MPOD변화량을 두 군간 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이가 나타났음 ($P < 0.005$)
 - ③ 또한 왼쪽과 오른쪽 눈의 MPOD 평균의 변화량을 군간 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이가 나타났음 ($P < 0.0001$)
 - ④ MPOD가 높을수록 황반 색소의 상태는 더 좋아지고 따라서 시력은 더 좋아지므로 병폴주정추출분말(CA-HE50)은 MPOD 수준을 향상시키는데 효과적이라고 결론 내릴 수 있음

다. 간 건강 인체적용시험

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 병폴주정추출분말(CA-HE50)의 섭취가 시험대상자의 간 기능 개선에 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 평행설계 인체적용시험진행
- (나) 본 인체적용시험은 리서치멘토 (CRO)를 통해 인도 간 전문 시험기관에서 진행함

(2) 시험방법

(가) 요약

<p>연구제목</p>	<p>병풀주정추출분말(CA-HE50)의 섭취가 시험대상자의 간 기능 개선에 미치는 유효성 및 안전성 평가를 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 평행설계 인체적용시험</p> <p>A randomized, double blind, placebo controlled, parallel study to evaluate the comparative efficacy and safety of centella asiatica extract (CA-HE50) tablets with that of a placebo tablet in improving ALT levels in subjects with elevated ALT</p>
<p>의뢰자</p>	<p>(주) 제넨셀 경기도 용인시 기흥구 흥덕중안로 120, 유타워 301호</p>
<p>연구자</p>	<p>1. Principal investigator - Dr. GK Prakash (Vagus Hospital) - Dr. Giriraj KV (Rajalakshmi Hospital)</p> <p>2. Co-investigator - Dr. Meghana Murthy (Vagus Hospital) - Dr. Suman Govind Raj (Rajalakshmi Hospital)</p>
<p>시험기관</p>	<p>1. Vagus Hospital Address: No 6,7,8, 18th cross, 4th main road, Chitrashilpi Venkatappa Road, Malleshwaram, Bangalore- 560003</p> <p>2. Rajalakshmi Hospital Address: 21/1, Lakshmipura Main Road, Vidyaranyapura Post, Bengaluru, Karnataka 560097</p>
<p>연구의 상</p>	<p>인체적용시험</p>
<p>시험설계</p>	<p>12주, 무작위배정, 이중맹검, 대조식품 비교실험, 평행설계</p>
<p>연구목적</p>	<p>1차 목적: ALT 수치가 높은 실험 대상자의 ALT 수준을 개선하는데 있어 위약과 비교하여 병풀주정추출분말(CA-HE50)의 유효성을 평가한다.</p> <p>2차 목적: ALT수치가 높은 실험 대상자의 ALT 수준을 개선하는데 있어 위약과 비교하여 병풀주정추출분말(CA-HE50)의 안전성을 평가한다.</p>
<p>시험절차</p>	<p>본 인체적용시험은 스크리닝 검사와 최종방문을 포함하여 총 4회의 방문으로 계획되어 있으며, 이상반응 추적 관찰 등의 사유로 연구대상자 요청 또는 연구자가 필요하다고 판단하는 경우 추가 방문이 이루어질 수 있다.</p> <p>각 방문마다 다음의 항목이 실시되었다.</p> <p>방문1 (-2주차, -14 ~ -1일)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험대상자에게 연구 과정을 설명하고 서면 동의를 취득한다. 2. 시험대상자의 인구학적 특성을 조사한다. 3. 시험대상자의 키, 몸무게, BMI를 측정한다. 4. 시험대상자의 활력징후를 측정한다. 5. 시험대상자의 과거병력을 조사한다. 6. 필요한 경우 시험대상자의 병용약물을 조사한다. 7. 시험대상자의 임신여부를 확인한다.

	<p>8. 시험대상자의 선정/제외기준을 평가한다. 9. 다음 방문일을 지정한다.</p> <p>방문 2 (0주차, 0±5일)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험대상자의 활력징후를 측정한다. 2. 필요한 경우 시험대상자의 병용약물을 조사한다. 3. 시험대상자의 임신여부를 확인한다. 4. 시험대상자를 무작위 배정번호를 부여한다. 5. 시험대상자의 유효성지표를 측정한다. 6. 시험대상자의 안전성지표를 측정한다. 7. 시험식품 또는 대조식품을 배부한다. 8. 다음 방문일을 지정한다. <p>방문3 (6주차, 42±5일)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험대상자의 활력징후를 측정한다. 2. 필요한 경우 시험대상자의 병용약물을 조사한다. 3. 시험대상자의 임신여부를 확인한다. 4. 시험식품 또는 대조식품의 잔량을 확인하여 순응도를 기록한다. 5. 이상반응을 확인한다. 6. 다음 방문일을 지정한다. <p>방문4 (12주차, 845일)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험대상자의 활력징후를 측정한다. 2. 필요한 경우 시험대상자의 병용약물을 조사한다. 3. 시험대상자의 임신여부를 확인한다. 4. 시험대상자의 유효성지표를 측정한다. 5. 시험대상자의 안전성지표를 측정한다. 6. 시험식품 또는 대조식품의 잔량을 확인하여 순응도를 기록한다. 7. 이상반응을 확인한다. 8. 다음 방문일을 지정한다. <p>추가방문 (12~14주차)</p> <p>필요한 경우, 모든 시험대상자에 대해 전화로 추가방문을 수행한다.</p>
대상자 수	계획된 시험대상자 등록인원: 80명 분석한 시험대상자 인원: 79명
선정조건	본 연구에 참여한 대상자는 20-70세에 해당하는 남녀로, ALT가 45U/L-135U/L, AST가 지난 2주간 25U/L 이상인 자이다. 연구자는 대상자가 이해할 수 있는 언어로 본 연구에 대해 설명한 후, 모든 대상자에게 서명된 동의서를 취득했다.
시험식품 섭취량 시험식품 섭취방법	시험식품: 병폴주정추출분말(CA-HE50) 섭취용량: 900 mg/day (병폴주정추출분말 300 mg 함유) 섭취방법: 1일 1회, 1회 1정 섭취
섭취기간	3개월 (12주)
선정조건	(다음에 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정하였다.) 1 만 20세 이상 70세 미만의 성인 남녀. 2 ALT 수치가 45이상 135U/L미만인 자

	<p>3 지난 2주간 AST 수치가 25U/L 이상인 자.</p> <p>4 임상적으로는 간과 관련된 심각한 질환은 없으나, 간의 기능에 임상적으로 심각하지 않은 문제가 있는 자.</p> <p>5 참여기간 중 시험계획서의 식이지침을 준수할 수 있는 자.</p> <p>6 참여기간 중 시험계획서의 방문일정을 준수할 수 있는 자.</p> <p>7 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자</p>
<p>제외조건</p>	<p>(다음에 기술된 조건에 해당되는 사람을 제외시켰다.)</p> <p>1 시험/대조식품이나 시험/대조식품에 함유된 성분에 대한 과민증이나 알러지 반응 경험이 있는자.</p> <p>2 시험대상자가 간과 관련된 질병(간염, 간경변, 알코올성 간질환, 약물유도 간질환 등)을 가진 자.</p> <p>3 시험대상자의 ALT/AST/r-GT 수치가 정상 범위의 3배를 초과한 자.</p> <p>4 만성 알코올성 질환을 가진 자. - 하루 30g 이상 (120g/주)인 자.</p> <p>5 전신 질환(고콜레스테롤혈증, 신장질환, 당뇨병, COPD 등)을 가진 시험대상자</p> <p>6 스크리닝 방문 전 최근 5년 이내에 암과 관련된 치료 경력이 있는 자.</p> <p>7 스크리닝 방문 전 최근 5년 이내에 간담도 질환이나 황달 병력이 있었던자.</p> <p>8 임신부 또는 수유부.</p> <p>9 스크리닝 방문 전 최근 4주 이내에 체중 또는 식욕과 관련된 처방약을 섭취했던 자.</p> <p>10 스크리닝 방문 전 최근 6개월 이내에 임상적으로 중대한 심혈관 질환의 병력이 있었던 자.</p> <p>11 알코올이나 약물 남용이 있는 자.</p> <p>12 스크리닝 방문 전 최근 4주 이내에 한약, 보충제 등 간기능에 영향을 미칠 수 있는 약품을 지속적으로 섭취한 자.</p> <p>13 최근 3개월 이내 또는 현재 진행 중인 다른 임상 실험에 참여하고 있는자.</p> <p>14 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 경우</p>
<p>평가항목</p>	<p>유효성 평가항목</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alanine Aminotransferase(ALT)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 2. Aspartate transaminase(AST)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 3. Gamma-glutamyl transferase(감마- GT)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 4. Triglyceride의 기저점과 Visit 4간의 변화량 5. 총 콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 6. LDL-콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 7. HDL-콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 <p>안전성 평가 항목</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 활력징후: 체온, 혈압(수축기/이완기), 맥박.

	<ol style="list-style-type: none"> 2. 혈액생화학적 검사: Total bilirubin, Alkaline phosphatase (ALP), Total Protein, Albumin, AST, ALT, gamma GT, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL. 3. 혈액학적 검사: Haemoglobin, Haematocrit, RBC, Platelets. 4. 소변검사: Colour, Appearance, Sugar, Protein, Ph, Specific Gravity, Ketone Bodies, Urobilinogen, Bile Salts, Bile Pigments, Microscopic Examination (Pus Cells, Epithelial Cells, RBCs, Crystals, Casts, Bacteria) 5. 이상반응 및 심각한 이상반응.
통계분석	<p>모든 데이터는 군 별로 나타낸다. 연속형 평가변수는 변수 범위, 중위수, 최소 및 최대값에 적합하게 산술평균(표준편차) /기하평균(변동 계수)으로 나타낸다. 또한 범주형 변수는 숫자(N)와 백분율(%)으로 나타낸다. 인구통계학적 변수 및 기저점 수치는 full analysis set(FAS) 및 safety set에서 계산된다. 유효성 변수는 FAS를 사용하여 분석한다. 안전성 평가변수는 safety set에서 계산된다. 유효성 평가변수는 아래와 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alanine Aminotransferase(ALT)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 2. Aspartate transaminase(AST)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 3. Gamma-glutamyl transferase(감마- GT)의 기저점과 Visit 4간의 변화량 4. Triglyceride의 기저점과 Visit 4간의 변화량 5. 총 콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 6. LDL-콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 7. HDL-콜레스테롤의 기저점과 Visit 4간의 변화량 <p>유효성 변수는 Visit 2의 값, Visit 4의 값, Visit 2와 4간의 변화량으로 나타낸다. 그룹 간 비교는 독립 T검정을 사용하여 수행된다. 그룹 내에서 Visit 2와 4의 비교는 대응T검정을 사용하여 수행된다. T검정의 p값이 유의한 것으로 확인될 때, 정규성 검정을 수행한다. 각 군에서 정규성이 만족되는 경우, T검정 시험 결과가 유의미한 것으로 간주된다. 적어도 하나의 군에서 정규성을 만족하지 않는 경우, 대응T검정은 Mann-whitney U 검정을 수행하고, 독립T검정은 Wilcoxon's rank sum 검정을 수행한다. 기저점에서 군간 유의한 차이가 발생하는 경우, 기저점 수치를 공변량으로 하여 ANCOVA를 수행한다. 통계분석은SAS 9.3 version을 사용하였다.</p>

(나) 연구일정

시험항목		Visit 1	Visit 2	Visit3	Visit 4	Safety F/U
		-2 weeks day-14~ -1	0 weeks Day 0±5	6 weeks Day 42±5	12 weeks Day 84±5	12~14 weeks (해당 시)
대상자 동의		●				
인구학적 조사		●				
신체검사		●				
활력 징후		●	●	●	●	
병력 및 약물 조사		●				
비용 치료 조사		●	●	●	●	
임신검사(해당 시)		●	●	●	●	
적합성 평가		●				
무작위배정			●			
유효성 평가	ALT		●		●	
	AST		●		●	
	gamma- GT		●		●	
	Triglyceride		●		●	
	Total cholesterol		●		●	
	LDL-cholesterol		●		●	
	HDL-cholesterol		●		●	
안전성 평가	활력징후		●		●	
	생화학적 검사		●		●	
	혈액학적 검사		●		●	
	소변 검사		●		●	
인체적용시험용 식품 처방			●	●		
반납제품 회수				●	●	
이상반응 조사				●	●	●

(다) 인체적용시험 승인문서



Clinical Trial Details (PDF Generation Date :- Fri, 23 Aug 2019 10:39:59 GMT)

CTRI Number	CTRI/2019/08/020878 [Registered on: 23/08/2019] - Trial Registered Prospectively	
Last Modified On	22/08/2019	
Post Graduate Thesis	No	
Type of Trial	Interventional	
Type of Study	Ayurveda	
Study Design	Randomized, Parallel Group, Placebo Controlled Trial	
Public Title of Study	A clinical study to evaluate the safety and efficacy of test drug in improving liver health disease.	
Scientific Title of Study	A randomized, double blind, placebo controlled, parallel study to evaluate the comparative efficacy and safety of centella asiatica extract tablet with that of a placebo tablet in improving ALT levels in subjects with elevated ALT	
Secondary IDs if Any	Secondary ID	Identifier
	NIL	NIL
Details of Principal Investigator or overall Trial Coordinator (multi-center study)	Details of Principal Investigator	
	Name	Dr Giriraj KV
	Designation	Consultant Physician
	Affiliation	Rajalakshmi Hospital
	Address	[Redacted Address]
	Phone	[Redacted Phone]
	Fax	[Redacted Fax]
	Email	[Redacted Email]
Details Contact Person (Scientific Query)	Details Contact Person (Scientific Query)	
	Name	Dr Anam Khan
	Designation	Medical Writer
	Affiliation	Syncorp Clinicare Technologies Pvt. Ltd.
	Address	[Redacted Address]
	Phone	[Redacted Phone]
	Fax	[Redacted Fax]
	Email	[Redacted Email]
Details Contact Person (Public Query)	Details Contact Person (Public Query)	
	Name	Subham Dutta
	Designation	Director
	Affiliation	Syncorp Clinicare Technologies Pvt. Ltd.
	Address	[Redacted Address]

(3) 인구학적 정보 및 기저점 수치 결과

(가) 시험대상자 및 탈락율

- ① 등록된 80명의 시험대상자 중 79명이 연구를 완료하였으며, 1명 (대조식품군)은 추적관찰이 되지 않아 중도탈락 되었음

(나) 시험대상자의 기저점 특성

- ① 각 그룹간의 인구학적 특성 및 활력징후에 대한 차이는 크게 나타나지 않음

Statistics	CA-HE50	Placebo
Age (Years)		
N	40	40
Mean	37.7	36.2
SD	12.2	10.7
Median	37.0	34.0
Range (Min, Max)	(20.0,70.0)	(20.0,59.0)
Height (CM)		
N	40	40
Mean	166.9	164.3
SD	11.1	11.8
Median	165.0	165.0
Range (Min, Max)	(145.0,185.0)	(134.0,185.0)
Weight (Kg)		
N	40	40
Mean	66.4	63.8
SD	10.8	12.3
Median	65.0	62.5
Range (Min, Max)	(48.0,96.0)	(40.0,94.0)
BMI (kg/m²)		
N	40	40
Mean	23.8	23.6
SD	2.8	3.8
Median	23.5	23.7
Range (Min, Max)	(19.5,32.1)	(15.0,36.7)
Temperature(Celsius)		
N	40	40
Mean	36.9	36.9
SD	0.1	0.1
Median	37.0	37.0
Range (Min, Max)	(36.5,37.0)	(36.5,37.0)
SBP(mmHg)		
N	40	40
Mean	116.2	117.3
SD	5.8	5.5
Median	118.0	120.0
Range (Min, Max)	(110.0,130.0)	(110.0,130.0)
DBP(mmHg)		
N	40	40
Mean	76.4	77.8
SD	6.4	5.4
Median	78.0	80.0
Range (Min, Max)	(60.0,90.0)	(70.0,90.0)
Pulse(BPM)		
N	40	40
Mean	70.2	71.2
SD	9.1	8.9
Median	70.0	72.0
Range (Min, Max)	(56.0,88.0)	(58.0,100.0)

② 각 그룹간 남녀비율, 기혼자, 음주자, 흡연자 등의 비율을 적정히 배분하였음

Parameter	Statistics	CA-HE50	Placebo
Sex	Female	12 (30.0)	14 (35.0)
	Male	28 (70.0)	26 (65.0)
Marital status	Married	29 (72.5)	28 (70.0)
	Unmarried	11 (27.5)	12 (30.0)
Alcohol	N/A	26 (65.0)	27 (67.5)
	No	3 (7.5)	3 (7.5)
	Yes	11 (27.5)	10 (25.0)
Smoking	N/A	29 (72.5)	28 (70.0)
	No	3 (7.5)	5 (12.5)
	Yes	8 (20.0)	7 (17.5)

(4) 안전성 결과

(가) 혈액생화학적 검사에서 특이한 이상반응은 나타나지 않았음

- Total bilirubin

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	1.0	0.3	1 (1,2)	0.9	0.3	1 (1,2)	-0.2	0.2	-0 (-1,0)
Placebo	39	1.1	0.4	1 (1,2)	0.9	0.4	1 (0,2)	-0.2	0.2	-0 (-1,0)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter TotalBil at baseline and at Visit 4 visit are considered

- ALP

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	147.0	32.1	155 (72,194)	173.8	57.6	164 (82,299)	26.9	69.6	5 (-85,200)
Placebo	39	146.2	35.7	155 (46,199)	189.1	59.1	172 (67,312)	42.8	71.7	11 (-89,193)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter ALP at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Total protein

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	6.4	0.4	6 (6,7)	7.0	0.5	7 (6,8)	0.6	0.6	1 (-1,2)
Placebo	39	6.5	0.7	7 (4,8)	7.1	0.5	7 (6,8)	0.6	0.9	1 (-1,4)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Totalprot at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Albumin

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	3.9	0.5	4 (3,6)	4.1	0.4	4 (4,5)	0.2	0.5	0 (-2,1)
Placebo	39	3.9	0.4	4 (3,5)	4.2	0.4	4 (4,5)	0.3	0.5	0 (-1,1)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Albumin at baseline and at Visit 4 visit are considered

- BUN

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	12.4	2.9	12 (7,18)	12.2	2.5	12 (8,18)	-0.2	3.4	-1 (-7,7)
Placebo	39	11.7	3.5	11 (7,19)	12.1	2.7	13 (8,17)	0.5	3.6	0 (-12,9)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter BUN at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Creatinine

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	0.9	0.1	1 (1,1)	1.0	0.1	1 (1,1)	0.1	0.2	0 (-0,1)
Placebo	39	0.9	0.1	1 (1,1)	1.0	0.1	1 (1,1)	0.1	0.1	0 (-0,0)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Creatinine at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Uric acid

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	5.2	1.0	5 (3,8)	5.2	0.8	5 (4,8)	-0.0	0.8	-0 (-2,2)
Placebo	39	5.0	1.1	5 (3,7)	5.0	1.0	5 (3,7)	0.0	0.7	0 (-2,2)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter UricAcid at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Blood sugar

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	100.6	16.4	100 (73,139)	112.1	13.3	110 (89,162)	11.6	19.5	12 (-26,55)
Placebo	39	105.1	23.5	102 (75,215)	120.5	34.4	114 (86,289)	15.5	26.5	5 (-22,118)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter RandomBS at baseline and at Visit 4 visit are considered

(나) 혈액학적 검사에서 특이한 이상반응은 나타나지 않았음

- Haemoglobin

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	13.4	1.3	13.7 (11,16)	13.6	1.5	13.8 (11,17)	0.2	1.1	0.2 (-3,3)
Placebo	39	13.7	1.7	13.4 (9,17)	13.4	1.5	13.6 (10,16)	-0.3	1.2	-0.1 (-4,2)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Hb at baseline and at Visit 4 visit are considered

- PCV

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	39.2	6.7	41.0 (3,45)	40.8	4.7	41.3 (33,51)	1.7	6.5	0.6 (-9,36)
Placebo	39	41.0	5.2	40.4 (26,50)	40.2	4.5	40.8 (31,49)	-0.9	3.5	-0.3 (-11,6)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter PCV at baseline and at Visit 4 visit are considered

- Platelets

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	2.6	0.5	2.6 (2,4)	2.6	0.5	2.6 (1,4)	0.1	0.6	0.2 (-2,2)
Placebo	39	2.6	0.5	2.6 (2,4)	2.7	0.4	2.6 (2,4)	0.1	0.5	0.1 (-1,1)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Platelets at baseline and at Visit 4 visit are considered

- RBC

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline		
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)
CA-HE50	40	4.5	0.5	4.6 (4,6)	4.5	0.6	4.6 (4,6)	0.0	0.4	0.1 (-1,1)
Placebo	39	4.6	0.6	4.5 (3,6)	4.5	0.5	4.5 (3,5)	-0.1	0.4	-0.0 (-1,1)

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter RBCCount at baseline and at Visit 4 visit are considered

(다) 소변검사는 변화가 관찰되지 않아 데이터를 첨부하지 않음

(5) 유효성 결과

(가) ALT

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 ALT의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	54.3	9.5	50 (45,91)	34.4	13.2	35 (12,69)	-19.9	9.9	-21 (-42,1)	<.0001	<.0001	<.0001
Placebo	39	55.9	9.9	53 (45,85)	54.2	14.7	55 (17,90)	-1.8	11.3	1 (-39,8)	0.3323	0.2891	

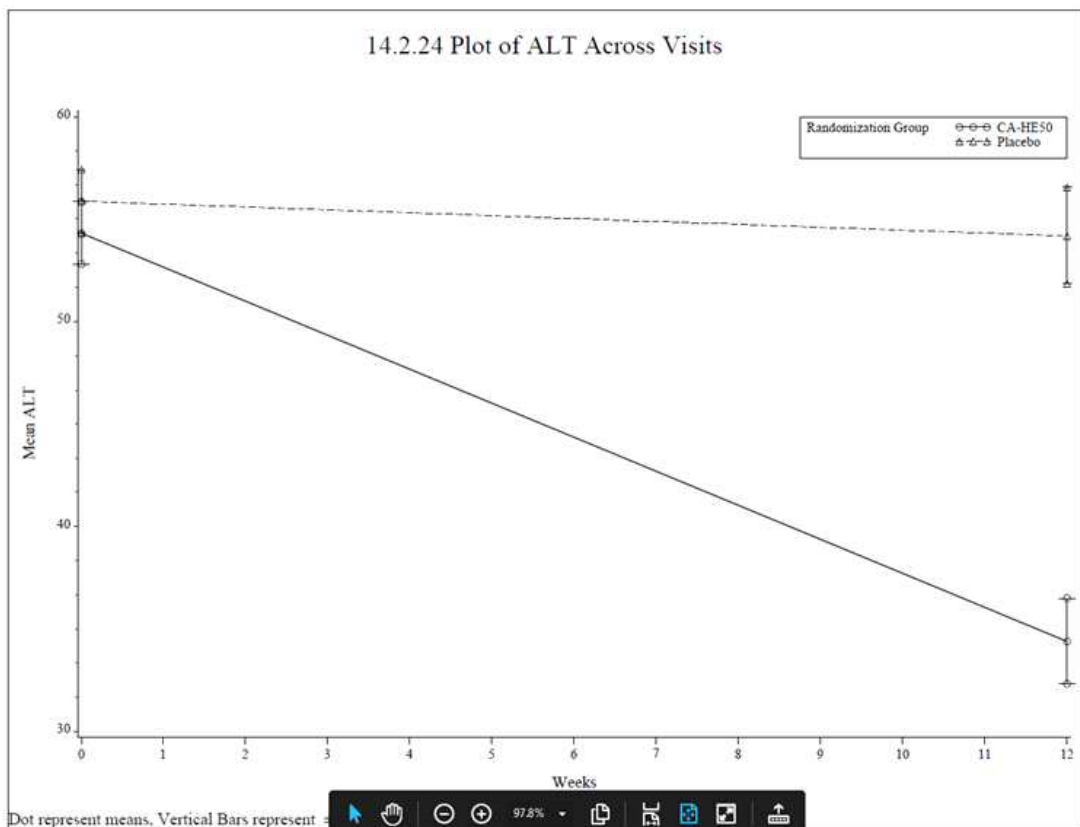
*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter ALT at baseline and at Visit 4 visit are considered

\$Within group comparison done using paired t-test

&Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)

^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo

#Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)

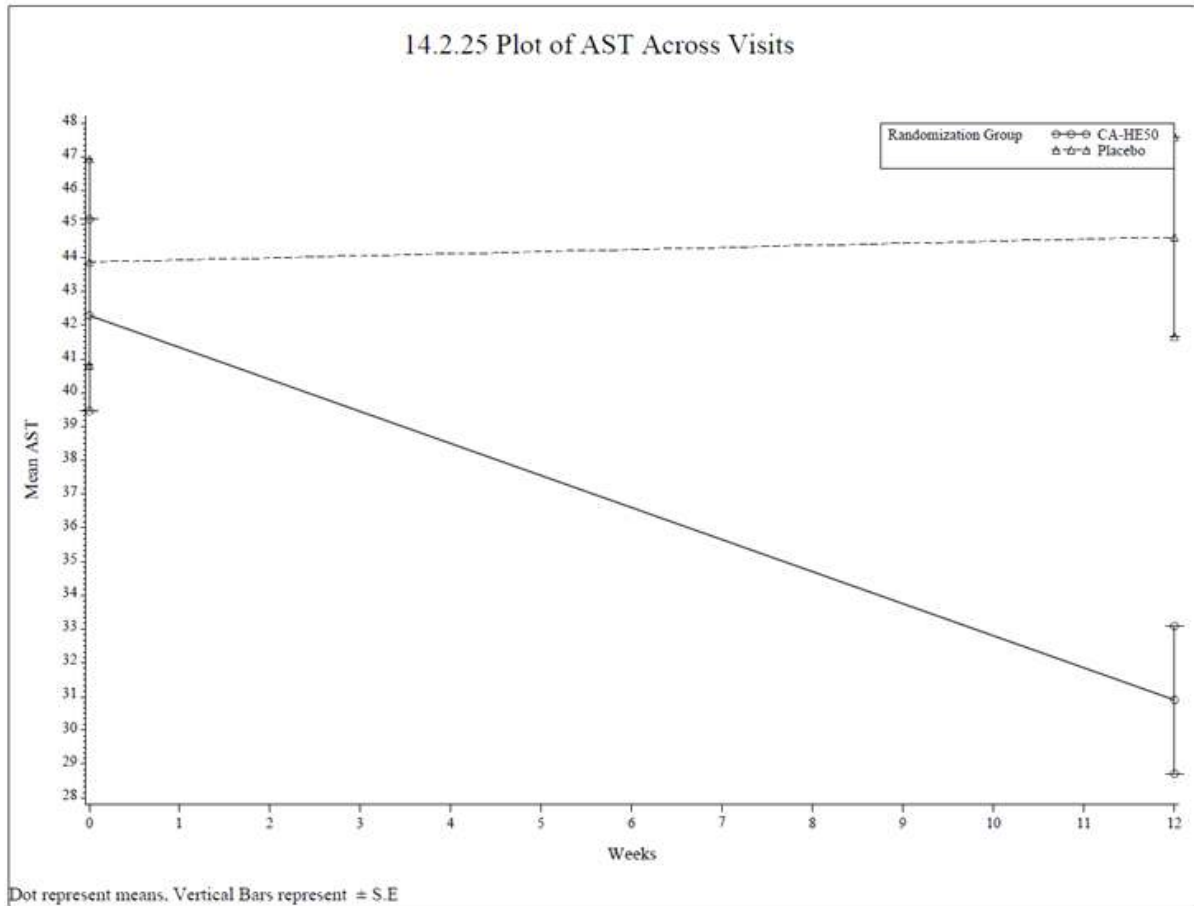


(나) AST

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 AST의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	42.3	17.9	35 (26,91)	30.9	13.8	27 (14,77)	-11.4	9.8	-11 (-32,9)	<.0001	<.0001	<.0001
Placebo	39	44.2	19.4	36 (25,99)	44.6	18.4	39 (14,95)	0.4	5.1	0 (-17,12)	0.6388	0.3940	

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter AST at baseline and at Visit 4 visit are considered
 \$Within group comparison done using paired t-test
 &Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)
 ^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo
 #Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)

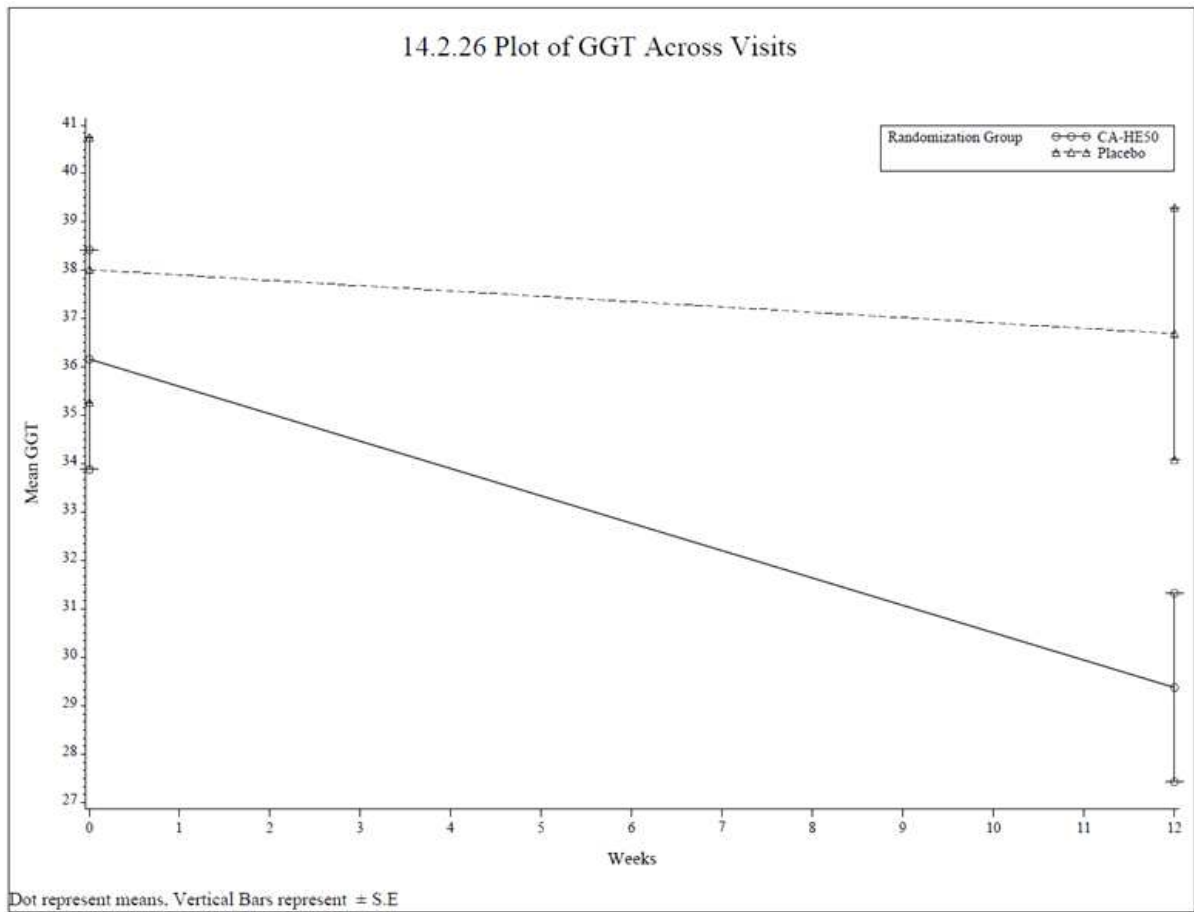


(다) gamma-GT

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 GGT의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	36.2	14.4	34 (15,65)	29.4	12.3	27 (14,62)	-6.8	6.3	-5 (-25,1)	<.0001	<.0001	<.0001
Placebo	39	38.2	17.5	33 (11,72)	36.7	16.3	30 (14,70)	-1.5	4.2	-2 (-12,9)	0.0271	0.0202	

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter GGT at baseline and at Visit 4 visit are considered
 \$Within group comparison done using paired t-test
 &Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)
 ^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo
 #Between group comparison done using non parameteric method (Wilcoxon two sample test)

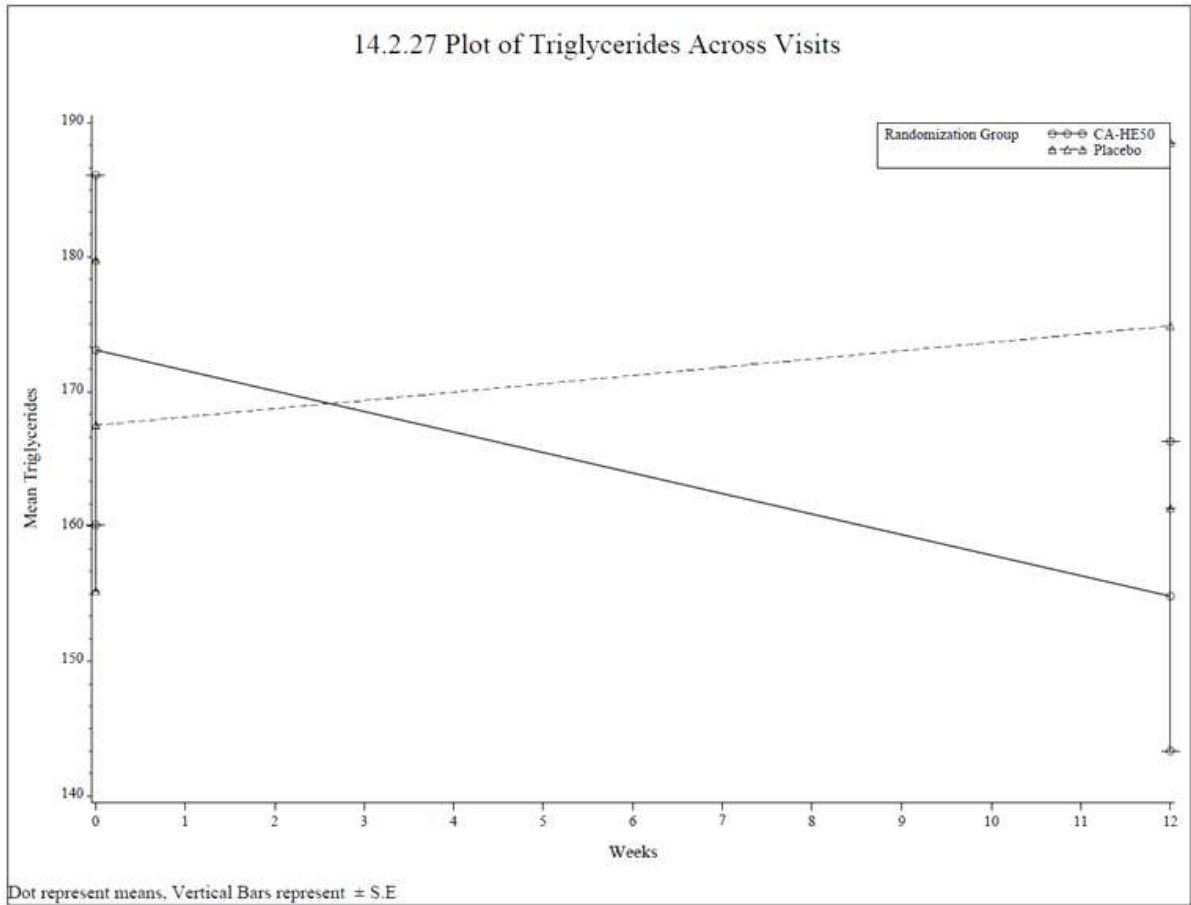


(라) Triglycerides

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 TG의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	173.1	82.1	153 (70,496)	154.9	72.6	136 (60,399)	-18.3	31.5	-6 (-108,52)	0.0007	0.0004	0.0008
Placebo	39	169.2	78.0	146 (86,452)	174.9	84.7	150 (93,503)	5.7	29.7	2 (-56,90)	0.2362	0.3221	

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Triglycerides at baseline and at Visit 4 visit are considered
 \$Within group comparison done using paired t-test
 &Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)
 ^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo
 #Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)



(마) Total-Cholesterol

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 Total-cholesterol의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	169.4	22.7	168 (106,225)	160.5	29.6	164 (104,226)	-8.9	19.2	-6 (-62,29)	0.0055	0.0028	<.0001
Placebo	39	165.7	20.9	170 (123,204)	182.1	29.8	177 (130,251)	16.3	25.5	9 (-40,97)	0.0003	0.0001	

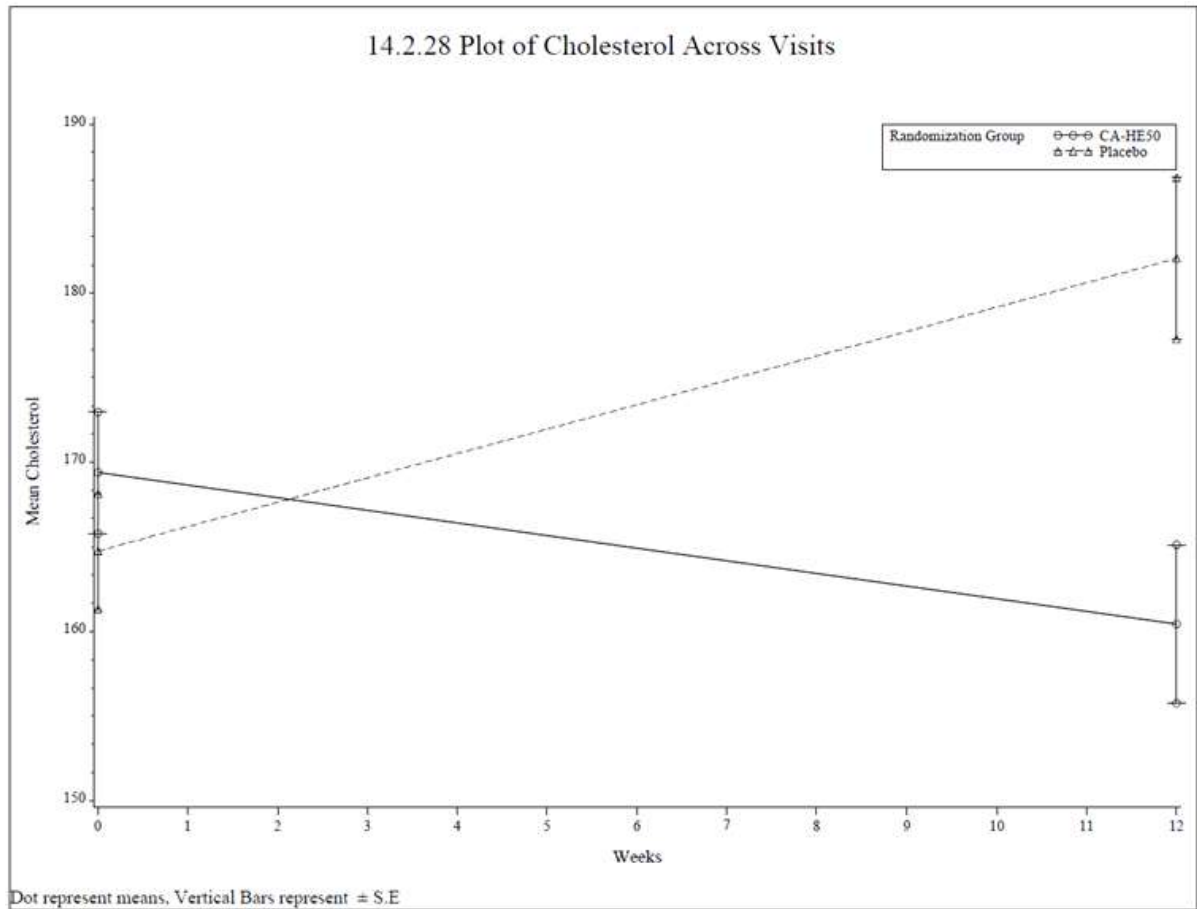
*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter Cholesterol at baseline and at Visit 4 visit are considered

\$Within group comparison done using paired t-test

&Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)

^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo

#Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)



(바) LDL-Cholesterol

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적인 LDL-Cholesterol의 감소 효과를 나타내었음

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	88.6	23.9	96 (20,119)	92.2	26.3	96 (15,145)	3.6	25.1	-3 (-44,75)	0.3738	0.5692	0.0100
Placebo	39	87.1	23.7	91 (29,126)	106.8	25.8	105 (65,180)	19.7	29.1	13 (-40,105)	0.0001	0.0001	

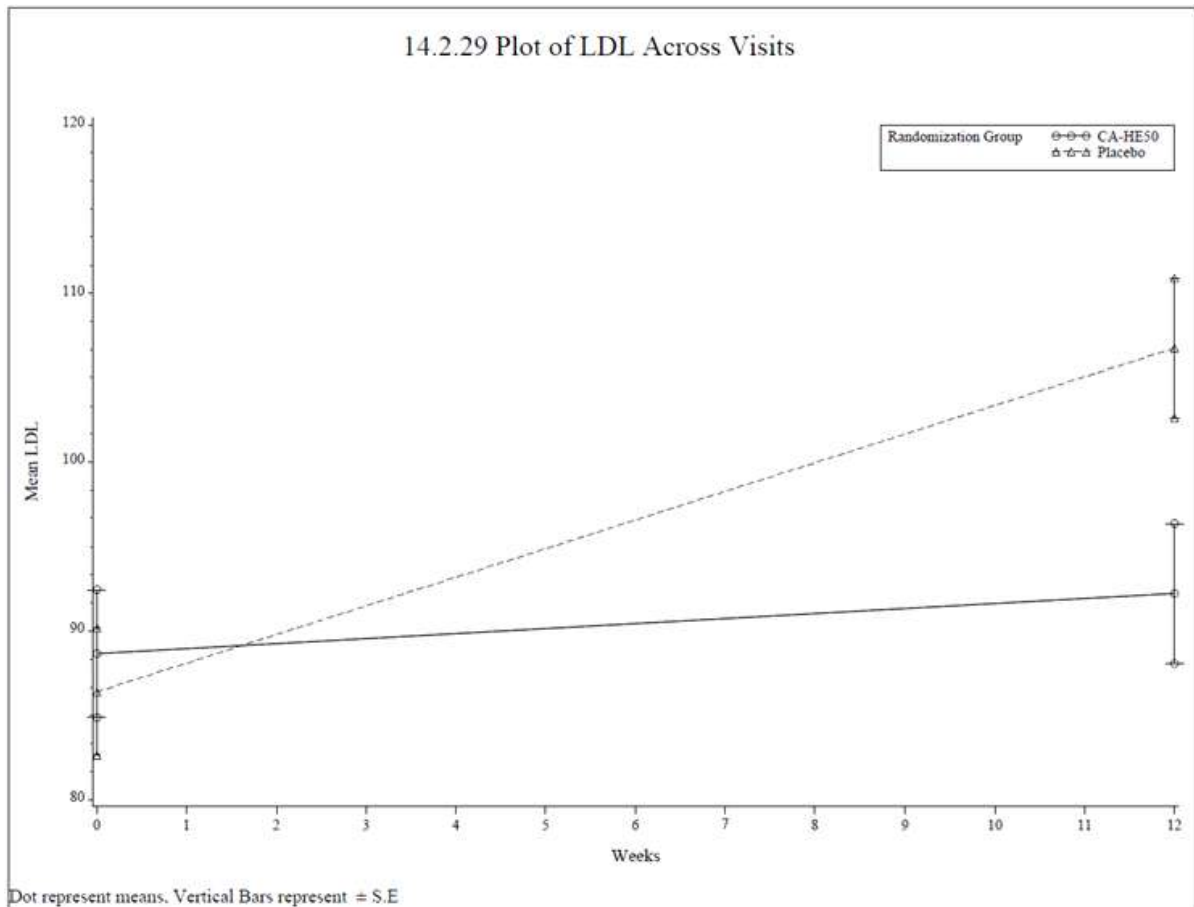
*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter LDL at baseline and at Visit 4 visit are considered

\$Within group comparison done using paired t-test

&Within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)

^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo

#Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)

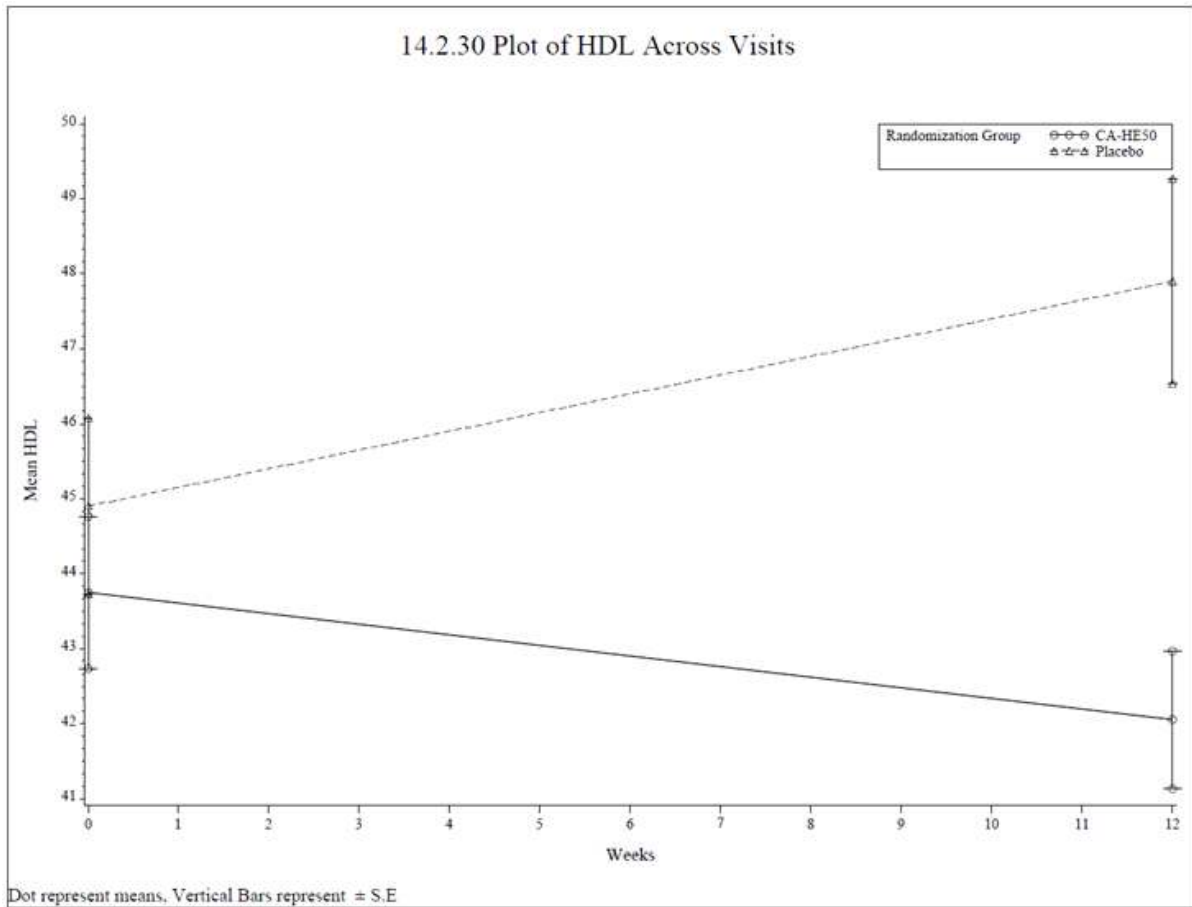


(사) HDL-Cholesterol

- ① 병풀주정추출분말 (CA-HE50) 섭취군은 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 유의적으로 HDL-Cholesterol이 약간 감소하였으나, 이는 total-cholesterol의 분비 감소로 나타나는 현상인 것으로 사료됨

Arm	N*	Baseline			Visit 4			Change from Baseline			Within group\$	Within group&	Between group^
		Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min,Max)	Mean	SD	Median (Min, Max)			
CA-HE50	40	43.8	6.4	42 (25,58)	42.1	5.8	42 (24,51)	-1.7	3.8	-1 (-11,3)	0.0075	0.0290	<.0001
Placebo	39	44.9	7.5	43 (29,73)	47.9	8.5	48 (32,86)	3.0	6.1	2 (-9,20)	0.0038	0.0032	

*Only SUBJECTS with non missing value of the parameter HDL at baseline and at Visit 4 visit are considered
 \$within group comparison done using paired t-test
 &within group comparison done non parametric method (Wilcoxon signed rank test)
 ^Between group comparison done using two sample t-test comparing active and placebo
 #Between group comparison done using non parametric method (Wilcoxon two sample test)



(아) 유효성 평가변수 결과 요약

No	Parameters	Arms	Change from base line				
			Mean	SD	Median	Min	Max
1	ALT	CA-HE50	-19.9	9.9	-21	-42	1
		Placebo	-1.8	11.3	1	-39	8

2	AST	CA-HE50	-11.4	9.8	-11	-32	9
		Placebo	0.4	5.1	0	-17	12
3	GGT	CA-HE50	-6.8	6.3	-5	-25	1
		Placebo	-1.5	4.2	-2	-12	9
4	Triglycerides	CA-HE50	-18.3	31.5	-6	-108	52
		Placebo	5.7	29.7	2	-56	90
5	Total Cholesterol	CA-HE50	-8.9	19.2	-6	-62	29
		Placebo	16.3	25.5	9	-40	97
6	LDL	CA-HE50	3.6	25.1	-3	-44	75
		Placebo	19.7	29.1	13	-40	105
7	HDL	CA-HE50	-1.7	3.8	-1	-11	3
		Placebo	3	6.1	2	-9	20

(6) 고찰 및 결론

- (가) 본 연구는 ALT수치가 상승된 대상자에서 병풀주정추출분말(CA-HE50)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조, 병행설계 인체적용시험이었으며, 총 섭취기간은 12주였고, 인도, Karnataka, Bangalore 에 위치한 2개의 인체적용시험실시기관에서 총 80명의 대상자가 등록되었음
- (나) 등록된 시험대상자는 1:1 비율로 2개의 군으로 무작위 배정되었으며, 등록한 80명의 시험대상자 중 79명이 연구를 완료하였고, 1명은 추적관찰이 되지 않아 중도탈락 되었음
- (다) 유효성 평가항목은 ALT, AST, GGT, Triglycerides, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤이며, 유효성 평가항목은 기저점과 시험식품 섭취종료에서 측정되었음
- ① 각 군별로 기저점에서 섭취종료시점(방문4)간의 차이를 비교하였고, 기저점에서 섭취종료(방문4)간의 차이를 군간 비교하였으며, 안전성 평가는 활력징후, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사를 기저점과 섭취종료시점(방문4)에서 수행되었음
- (라) 시험식품군(병풀주정추출분말, CA-HE50)은 대조식품군에 비교하여 모든 유효성 변수에 대해 식품섭취 종료 시점에서 임상적으로 유의미한 변화를 나타냈음
- ① 시험식품군(병풀주정추출분말, CA-HE50)은 기저점과 식품섭취 종료 간의 변화량이 ALT(-19.9), AST(-11.4), GGT(-6.8), Triglycerides(-18.3), Cholesterol(-8.9), LDL(3.6) and HDL(-1.7)으로 개선된 변화가 나타났으며, 대조식품군은 기저점과 식품섭취 종료 간의 변화량이 ALT(1.8), AST(0.4), GGT(-1.5), Triglycerides(5.7), Cholesterol(16.3), LDL(19.7) and HDL(3.0)이었음

14. 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청

가. 눈 건강 기능성 원료 신청

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말의 눈 건강 기능성 원료 등재를 위해 식약처 기능성 원료 신청 접수

(나) 신청기능성: 노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소 밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음

(2) 전체내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	병풀주정추출분말	
2. 원재료	병풀 (학명: <i>Centella asiatica</i> (L) Urban, 사용부위 : 전잎 (잎과 잎자루)	
3.기능 (지표)성분	기능/지표 성분 : 아시아티코사이드 Asiaticoside	
4. 제조 공정	건조병풀 → 1차 추출 → 여과 → 2차 추출 → 여과 → 농축 → 살균 → 배합/균질화 → SD → 포장	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 이미, 이취가 없고, 고유의 향미가 있는 흐린 녹갈색의 분말 2) 기능(지표)성분 : 아시아티코사이드(Asiaticoside) 10.8~20.1 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	한국건강기능식품협회 한국기능식품연구원 공인 시험법 HPLC, DAD, 206 nm, C18 column
	규격 외 (잔류농약)	식품공전 제 7. 일반시험법 7 식품 중 잔류농약 분석법에 의해 잔류농약 58종을 분석한 결과 주요 잔류농약 50종 불검출, 검출 8종은 규격 이하임을 확인
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 병풀(<i>Centella asiatica</i>)의 전잎을 주정으로 추출한 것으로 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 원재료인 병풀은 식품공전에 “식품에 사용할 수 있는 원료의 목록 (1. 식물성)”로 등재되어 오랜 기간 섭취되고 있음. (식약처 고시 제 2017-102호, 식품원재료데이터베이스) 1. ▷ 병풀추출물은 기능성 식품으로 판매되고 있으며, 현재까지 해당 제품 섭취에 대한 부작용이 보고된 바 없음. 2. ▷ 국내 3. - 「식품공전」 : ‘병풀’로 등재 4. - 「대한약전외한약(생약)규격집」 : ‘병풀’로 등재 5. - 「국가생물종지식정보시스템」 : ‘병풀’로 등재 6. ▷ 국외 7. - WHO monographs on selected medicinal plants / FAO/WHO food standards CODEX alimentarius에 등재 8. - EU Novel food에 등재

		<p>9. - 인도 Ayurvedic Pharmacopoeia에 등재</p> <p>10. - 캐나다 Health Canada 등재</p> <p>11. <사용현황></p> <p>12. - 국내: 신청원료가 식품첨가물로 사용</p> <p>13. - 미국, 인도, 캐나다 등: 병풀주정추출물이 대량 유통</p>
	안전성 정보	안전성 정보 DB : 경미한 소화불량 및 메스꺼움, 두통, 식욕감소, 진정작용 등 보고 1건
	섭취량 평가	<p>▷ 제안섭취량: 신청원료로서 300 mg/일</p> <p>- 병풀 복용량: 10 g/일 (신농본초경)</p> <p>- 병풀 복용량: 9~15 g/일 (국가생물종지식정보시스템)</p> <p>⇒ 추출수율 35% 적용 시 최소 3.15 g/일 섭취 (신청원료의 제안섭취량 기준 원재료 857 mg)</p> <p>- 판매되고 있는 병풀추출물 일일섭취량: 400~2,400 mg/일</p> <p>⇒ 제안된 섭취량은 통상섭취량보다 낮으며, 일일허용섭취량 이내임</p>
	인체적용시험	신청원료를 300mg/d 2주간 섭취시킨 인체적용시험에서 활력징후, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사, 이상반응 검사를 수행한 결과 유의미한 부작용 및 이상반응 보고는 없었음.
	독성 시험	▷ 단회투여독성시험에서 이상반응 및 독성은 나타나지 않음 LD ₅₀ > 2,000 mg/kg 이상
	기타 사항	해당사항없음
	섭취 시 주의사항	해당사항없음
7. 기능성	신청 기능성	노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소 밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	병풀주정추출분말로서 300 mg/일
	시험관시험	<p>[신청원료]</p> <p>▷ A2E 산화 억제</p> <p>- 산화된 A2E 생성량 농도의존적 감소 (대조군 대비, p<0.05)</p> <p>▷ ARPE-19 (인간망막색소상피세포) 세포 보호효과</p> <p>- CoCl₂에 의한 세포사멸 보호 (대조군 대비, p<0.05)</p> <p>- 산화된 A2E에 의한 세포사멸 보호 (대조군 대비, p<0.05)</p> <p>▷ ARPE-19 (인간망막색소상피세포) 세포 당이용성 증대 효과</p> <p>- 포도당 흡수율 유의적 상승 (대조군 대비, p<0.05)</p>
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <p>▷ C57BL/6 mice, 50, 100, 200 mg/kg, 7일, 경구투여</p> <p>- OPL, ONL 및 광수용체층 보호효과 증가</p> <p>- NRF2, HO-1, pro-PARP, pro-caspase3의 발현량 감소</p> <p>- 로돕신과 옵신 발현 증가</p>
	인체적용시험	<p>[신청원료]</p> <p>▷ MPOD level 0.2~0.4인 성인(n=80), 300 mg/일, 24주(DB, RCT, Parallel)</p> <p>- MPOD level이 유의적으로 증가 (대조군 대비, p<0.01)</p> <p>※ 인체적용시험기관 : Narayana Nethralaya ('19), 시험책임자 : Dr. Thirumalesh MB</p>
	기타 사항	

나. 간 건강 기능성 원료 신청

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀주정추출분말의 간 건강 기능성 원료 등재를 위해 식약처 기능성 원료 신청 접수

(나) 신청기능성: 간 건강에 도움을 줄 수 있음

(2) 전체내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	병풀주정추출분말	
2. 원재료	병풀 (학명: <i>Centella asiatica</i> (L) Urban, 사용부위 : 전잎 (잎자루를 포함한 잎))	
3.기능 (지표)성분	기능/지표 성분 : 아시아티코사이드 Asiaticoside	
4. 제조 공정	건조병풀 → 1차 추출 → 여과 → 2차 추출 → 여과 → 농축 → 살균 → 배합/균질화 → SD → 포장	
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 이미, 이취가 없고, 고유의 향미가 있는 흐린 녹색의 분말 2) 기능(지표)성분 : 아시아티코사이드(Asiaticoside) 10.8~20.1 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	한국건강기능식품협회 한국기능식품연구원 공인 시험법 HPLC, DAD, 206 nm, C18 column
	규격 외 (잔류농약)	식품공전 제 7. 일반시험법 7 식품 중 잔류농약 분석법에 의해 잔류농약 58종을 분석한 결과 주요 잔류농약 50종 불검출, 검출 8종은 규격 이하임을 확인
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 병풀(<i>Centella asiatica</i>)의 전잎을 주정으로 추출한 것으로 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 원재료인 병풀은 식품공전에 “식품에 사용할 수 있는 원료의 목록 (1. 식물성)”로 등재되어 오랜 기간 섭취되고 있음. (식약처 고시 제 2017-102호, 식품원재료데이터베이스) 14. ▷ 병풀추출물은 기능성 식품으로 판매되고 있으며, 현재까지 해당 제품 섭취에 대한 부작용이 보고된 바 없음. 15. ▷ 국내 16. - 「식품공전」 : ‘병풀’로 등재 17. - 「대한약전외한약(생약)규격집」 : ‘병풀’로 등재 18. - 「국가생가생물종지식정보시스템」 : ‘병풀’로 등재 19. ▷ 국외 20. - WHO monographs on selected medicinal plants / FAO/WHO food standards CODEX alimentarius에 등재 21. - EU Novel food에 등재 22. - 인도 Ayurvedic Pharmacopoeia에 등재 23. - 캐나다 Health Canada 등재 24. <사용현황>

		<p>25. - 국내: 신청원료가 식품첨가물로 사용</p> <p>26. - 미국, 인도, 캐나다 등: 병풀주정추출물이 대량 유통</p>
	안전성 정보	안전성 정보 DB : 경미한 소화불량 및 메스꺼움, 두통, 식욕감소, 진정작용 등 보고 1건
	섭취량 평가	<p>▷ 제안섭취량: 신청원료로서 300 mg/일</p> <p>- 병풀 복용량: 10 g/일 (신농본초경)</p> <p>- 병풀 복용량: 9~15 g/일 (국가생물종지식정보시스템)</p> <p>⇒ 추출수율 35% 적용 시 최소 3.15 g/일 섭취 (신청원료의 제안섭취량 기준 원재료 857 mg)</p> <p>- 판매되고 있는 병풀추출물 일일섭취량: 400~2,400 mg/일</p> <p>⇒ 제안된 섭취량은 통상섭취량보다 낮으며, 일일허용섭취량 이내임</p>
	인체적용시험	신청원료를 300mg/d 12주간 섭취시킨 인체적용시험에서 활력징후, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사, 뇨검사, 이상반응 검사를 수행한 결과 유의미한 부작용 및 이상반응 보고는 없었음.
	독성 시험	▷ 단회투여독성시험에서 이상반응 및 독성은 나타나지 않음 LD ₅₀ > 2,000 mg/kg 이상
	기타 사항	해당없음
	섭취 시 주의사항	해당없음
7. 기능성	신청 기능성	간 건강에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	병풀주정추출분말로서 300 mg/일
	시험관시험	[신청원료] 관련자료 없음
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <p>▷ BALB/c mice, 50, 100, 200 mg/kg, 7일, 경구투여</p> <p>- 혈중 간 기능 지표 (ALT, AST, LDH, TBA, ALP) 수준이 유의적 감소</p> <p>- 간 조직 내 염증 지표 (MCP-1, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-10) 발현 감소</p> <p>- 간 조직 내 CYP2E1 발현 유의적 감소</p> <p>- 간 조직 내 산화지표 총글루타치온 증가, 과산화지질 수준 감소</p> <p>- 간 세포 괴사 및 세포 위축 보호</p> <p>[유사원료 (병풀 50% 에탄올 추출물, 신청원료와 추출용매 동일)]</p> <p>▷ Wistar albino rats, 100, 200 mg/kg, 14일, 경구투여</p> <p>- 혈중 간기능 지표 (SGPT, SGOT, ALP, SBL, LDH) 유의적 감소, total protein 유의적 증가</p> <p>- 간 조직 내 항산화 지표 (SOD, CAT) 유의적 증가, LOP 유의적 감소</p> <p>- 간 조직 손상 보호</p> <p>[유사원료 (병풀 75% 에탄올 추출물)]</p> <p>▷ SD rats, 100, 200 mg/kg, 5일, 경구투여</p> <p>- 혈중 간기능 지표 (AST, ALT, ALP, T-biliubin) 유의적 감소</p> <p>- 혈중 염증 지표 (TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-γ, IL-10, IL-12, IL-2, GM-CSF) 유의적 감소</p> <p>- 간 조직 내 항산화 지표 (SOD, GPx, CAT) 유의적 증가, MDA 유의적 감소</p> <p>- 간 조직 손상 보호</p> <p>[유사원료 (병풀 98% 에탄올 추출물)]</p> <p>▷ Cyprinus carpio, 50, 100, 150, 300 mg/kg, 15일, 경구투여</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - 간 조직 내 SOD level 유의적 증가 <p>[유사원료 (병풀 crude extract)]</p> <ul style="list-style-type: none"> ▷ SD rats, 200 mg/kg, 7일, 경구투여 - 혈중 간기능 지표 (AST, ALT, ALP) 유의적 감소, albumin, total protein 유의적 증가 - 간 조직 손상 보호 <p>[유사원료 (병풀 80% 메탄올 추출물)]</p> <ul style="list-style-type: none"> ▷ SD rats, 20, 40 mg/kg, 3개월, 경구투여 - 혈중 간기능 지표 (AST, ALT, ALP) 유의적 감소, albumin, total protein 유의적 증가 - 간 조직 손상 보호
인체적용시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ▷ 20-70세 성인(n=80), 300 mg/일, 12주(DB, RCT, Parallel) - 간 기능 지표 (ALT, AST, GGT) 유의적 감소 (대조군 대비, p<0.01) - TG, Total-, LDL-, HDL-cholesterol 유의적 감소 (대조군 대비, p<0.01) <p>※ 인체적용시험기관</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vagus Hospital ('19), 시험책임자 : Dr. GK Prakash 2. Rajalakshmi Hospital ('19), 시험책임자 : Dr. Giriraj KV
기타 사항	

15. 병풀의 재배단지 구축을 위한 재배 연구

가. 병풀의 재배법 개발

(1) 연구 목적

(가) 재배관리 매뉴얼 제작을 위하여 제주산 병풀을 확보하고, 이식 및 재배를 통하여 생육 상태를 지속적으로 모니터링 함으로써 재배법을 확립하고자 하였음

(2) 연구 방법

(가) 제주산 야생 병풀 원재료를 6월~8월까지 3개월간 채집 확보하였으며, 이를 시설 내 1차 이식을 통하여 생육을 지속시킴



(나) 하우스시설내에 병풀 재배환경 조성을 위하여 토양을 경운한 후 상토를 추가로 덮어

주어 통기성 및 배수를 확보하였으며, 관수를 위하여 스프링클러를 설치하였음
 (다) 또한, 광량에 따른 생육상태를 비교하기 위하여 차광막을 99%, 50%, 0% 로 구간 설치하였음



병풀 2차 이식을 위한 환경조성 - 스프링클러 설치 및 토양정비



광량에 따른 생육상태 비교를 위한 차광막 설치 (왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%)

(라) 정비된 토양위에 1차 이식으로 생육을 지속시킨 병풀을 2차 이식하여 생육상태를 모니터링 했으며, 병풀 이식은 재식거리 20cm×20cm 간격으로 기는 줄기의 뿌리 부분을 절취하여 이식하였고, 각 구간별 150 본씩 이식하였음

(3) 연구 결과

(가) 2017년 11월까지 생육상태는 초장은 차광률 99%가 약 15cm, 50%가 약 14cm로 비슷한 수준이었으며, 차광률 0%가 약 6cm 로 매우 짧았음

(나) 잎의 지름은 각 구간별 가장 큰 잎 10개를 측정하였을 때 차광률 99%가 평균 8cm, 차광률 50%가 평균 7.5cm, 차광률 0%가 평균 6cm로 초장과 비슷한 결과를 나타냄

(다) 병풀은 기는줄기를 통해 토양을 덮으면서 주위로 뻗어나는 식물로서 주뿌리로부터 줄기가 분지되는 정도 및 기는줄기의 성장속도를 토양 피복정도로 확인 할 수 있었음

며, 토양 피복정도는 차광률 50%가 가장 컸고, 차광률 0%에서는 매우 불량하여 잡초의 성장도 진행되고 있었음



병풀 2차 이식(왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%) - 2017.08.14



병풀 생육 사진(왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%) - 2017.09.11



병풀 생육 사진(왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%) - 2017.09.25



병풀 생육 사진(왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%) - 2017.11.07



병풀의 토지 피복 비교 사진(왼쪽부터 차광률 99%, 50%, 0%) - 2017.11.07

(라) 병풀 시험재배를 통한 재배법 확립 및 현장적용을 위한 전문가 평가 확인

① 시험재배 현장에서 자원식물 재배관련 전문가의 확인으로 본 사업의 가능성 자문



전문가 현장 방문 사진

전문가 주요 이력	
성 명	송 진 영
최종학력 및 전공	제주대학교 일반대학원 농학박사, 자원식물학
주요 경력	<ul style="list-style-type: none"> ○ 환경부 ‘전국자연환경조사’ 자연환경조사원 ○ 제주대학교 생명자원과학대학 식물자원환경전공 조교 ○ 제주대학교 생명자원과학대학 식물자원환경전공 시간강사 ○ 제주시민그린대학 주임교수 ○ 제주여성인력개발센터 농산물품질관리양성과정 강사 ○ 국립수의과학검역원 병해충예찰요원 ○ 제주특별자치도 농업기술원(친환경감귤) 기술전문위원 ○ 제주특별자치도 GAP민관 추진협의체 운영위원 ○ 농업회사법인 주식회사 제주천지 대표이사
주요 저서(논문)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 박사학위 : 한라산 고산식물의 생육특성 및 증식 연구 ○ ‘제주의 귀화식물’ 도감 공동저자

② 자문내용

- 병풀의 노지재배를 통한 생산 수량 증대를 위해서는 이식 초기 재식거리를 30~50cm로 이식하여 병풀의 분지를 유도한 후 밀식상태를 유지하면서 재배하는 방법을 제안함
- 또한 동절기 토양 보온유지 및 봄철 유아 출현 시 줄기의 생장을 길게하기 위하여 왕겨 피복 등의 방법을 제안함
- 병풀의 생육 특성을 고려하여 노지 재배 또한 차광이 필수일 것이라 사료됨
- 병풀의 수확작업요건 개선 및 수확량 증대를 위하여 노지재배와 시설재배의 비교 실험이 필요할 것으로 판단되며, 다양한 시설재배법을 적용한 연구를 진행할 것을 요청함
- 병풀의 지속적인 재배를 위하여 육묘는 토양에서, 수확용 원료 재배는 시설재배를 권장함

나. 병풀의 시설 내 재배에 따른 생산량 확인

(1) 연구 목적

- (가) 육묘 대량증식 조건 확립을 위한 이식거리 및 차광에 따른 생산량을 조사하고자 하였음



(2) 연구 방법

(가) 각각 차광 정도별 1평(3.3m²)면적으로부터 병풀을 수확함

(3) 연구 결과

(가) 수확 후 생육상태는 50% 차광을 하였을 때 뿌리 분포 밀도가 가장 양호하였고, 99% 차광일 때 뿌리 밀도가 가장 적은 것을 확인하였음

(나) 차광 정도별 생물 수확량 비교는 50% 차광일 때 4.00 kg으로 가장 많았으며, 99%(2.41kg)와 0%(2.56kg) 차광은 비슷한 수준으로 수확되었으나, 건조수율에서는 0% 차광(노지환경)에서 성장한 병풀이 가장 좋은 것으로 나타났음

① 이는 99% 차광 조건에서 성장한 개체는 영양체의 비대가 주로 이루어져 내부에 수분을 많이 함유한 상태로 건조 하였을 때에는 오히려 건물수량이 적게 나타나는 것으로 판단됨

차광율	생물량(g)	건조물량(g)	건조수율(%)
99%	2,410	240	9.96
50%	4,000	470	11.75
0%	2,560	330	12.89



차광별 수확량 (왼쪽부터 99%, 50%, 0%) 비교

(다) 시설 내 병풀 정식 후 개체 밀식 유도 결과

- ① 1차년도 연구수행 결과를 토대로 2차년도에는 차광막 50%를 설치하여 재배연구를 실시하였으며, 이후 약 10개월간 뿌리부위를 제거하지 않는 조건에서 지상부만 수확하면서 기는 줄기의 면적당 밀도를 계속하여 유도하였음
- ② 2018년 4월과 10월 2차에 걸쳐 수확 후 생산량을 조사하였으며, 1차 수확량보다 2차 수확량이 증대함을 확인하였음
- ③ 병풀의 수확량 증대를 위해서는 병풀 개체의 밀식을 유도하여 생장과정에서 개체간의 접촉 및 간섭을 조장함으로써 개체의 생육을 촉진하고 생산량 증대를 기대할 수 있을 것으로 예상됨

구분	생물량 (g/3.3m ²)	건조물량	건조수율
1차 수확 (2018. 04)	4,000	470	11.75
2차 수확 (2018. 10)	5,200	620	11.92



시설내 병풀개체 밀식 유도(왼쪽부터 수확 전, 후, 건조물)

다. 병풀의 노지적용 연구

(1) 연구 목적

(가) 대량재배를 위한 재배단지구축을 위해 노지에서 재배 가능한 방법을 연구하고자 하였음

(2) 연구 방법

(가) 3천본의 묘종을 노지에 이식하였으며, 시설과 동일한 조건을 맞추주기 위하여 50% 차광막을 설치하여 성장정도를 확인하였음

(나) 5개월간 노지에서의 성장정도를 확인하였음

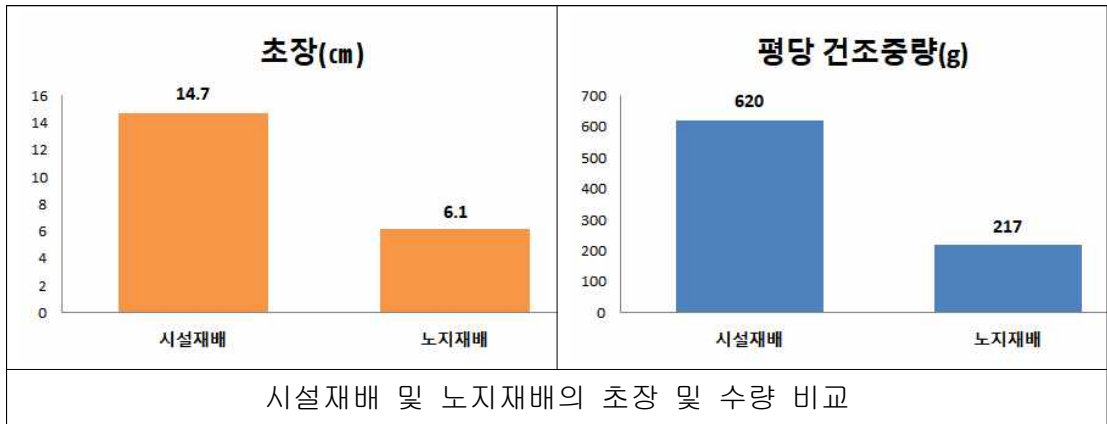


노지적용연구 - 스프링클러설치 및 노지 이식(2018년 5월)

(3) 연구 결과

(가) 성장정도는 시설재배와 비교하였을 때 모두 초장 및 수량에서 모두 작은 수치를 나타내었음

- ① 이는 병풀 묘종의 크기가 작고 밀식유도가 덜 되어있는 상태를 이식하여 노지 활착 이전에 잡초와의 경쟁에서 열세를 보인 것으로 판단되며, 노지 재배시 잡초관리 및 제초의 문제가 커질것으로 우려됨



라. 병풀의 시설 내 친환경 재배연구

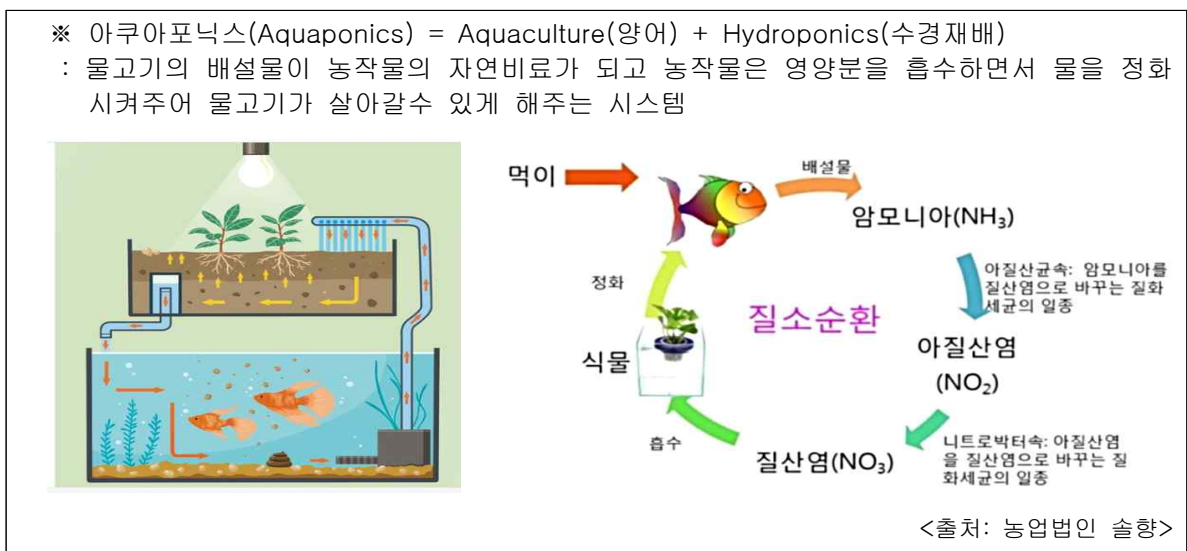
(1) 연구 목적

(가) 병풀의 시설내 재배시 수량증대 및 친환경농법 적용 방안 모색을 위하여 아쿠아포닉스 농법을 적용한 소규모 재배기를 제작하여 재배연구를 실시하였음

(2) 연구 방법

(가) 아래에 물고기가 생활할 수 있는 어장 환경을 만들어준 후 위로 병풀 개체를 이식할 수 있도록 포트 베드를 설치하였으며, 수조와 포트를 연결하는 관, 펌프 및 필터 등을 설치하여 물이 순환 할 수 있도록 하였음

(나) 각 포트(20개)에 병풀 모종을 이식하였으며, 약 3개월간 성장정도를 관찰하였음



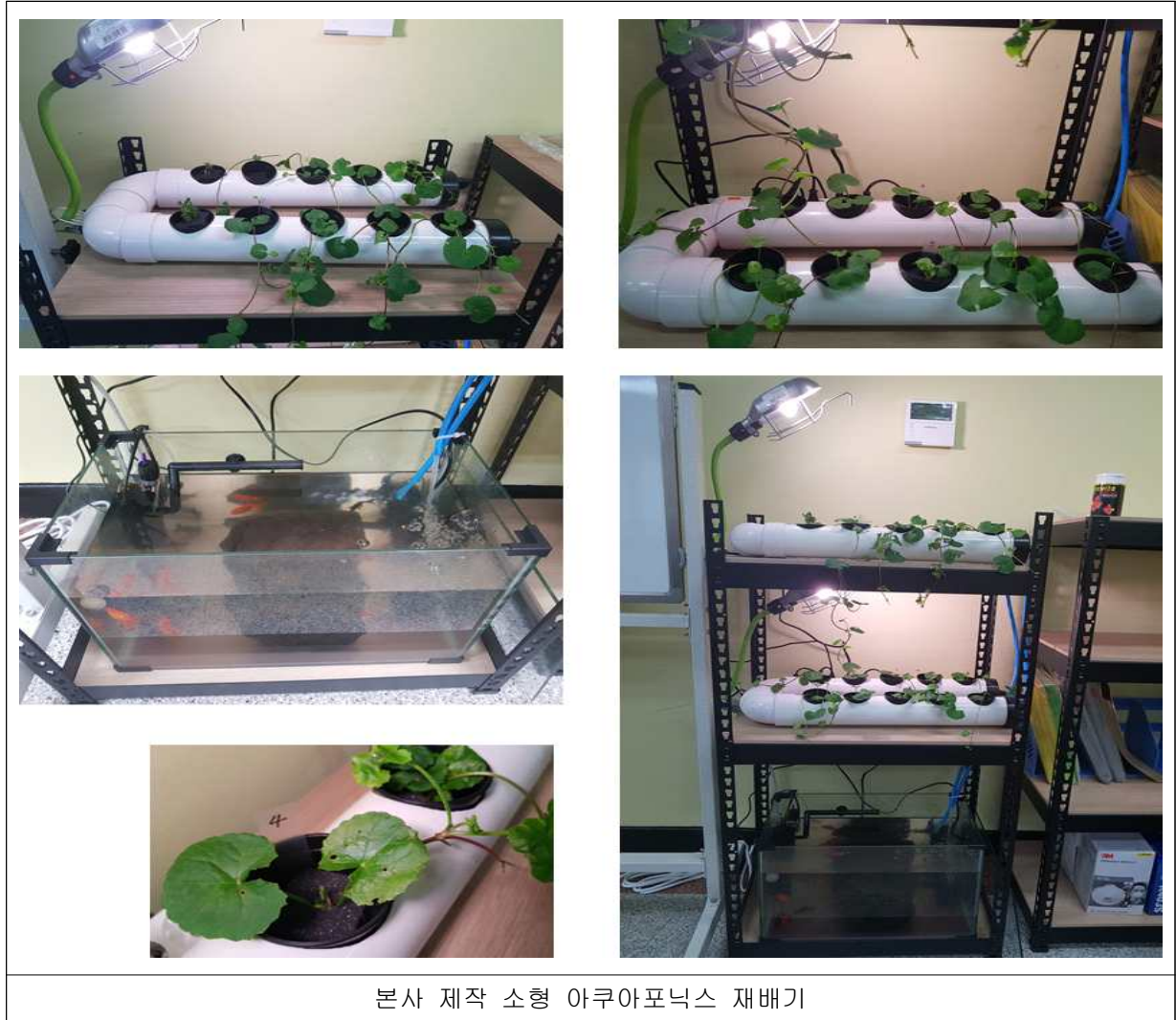
(3) 연구 결과

(가) 병풀은 이식 초기 30일 정도는 기는줄기의 분지정도 및 생장이 양호한 것처럼 보였으나, 이후 모종을 지탱하는 스펀지부분에서 흰색 곰팡이 균사가 관찰되기 시작하였으며 이후 병풀 개체의 생육상태가 불량해지면서 최종적으로 괴사하였음

(나) 병풀의 아쿠아포닉스 적용을 위해서는 1포트에 1개체를 이식하여 재배하도록 하는 시설로는 재배가 불리하며, 병풀의 기는줄기뿌리가 정착할 수 있는 수경재배 포트를 고안하여 제작하여야 할 것으로 판단됨

(다) 그리고 병풀의 재배(수경재배 포함)와 관련하여 병해충에 대한 정보가 거의 없는 실

정므로 지속적인 병풀의 연구를 통한 병해충 방제법 확립이 시급하다 판단하였음



마. 병풀의 시설재배 연구를 통한 충해 확인

(1) 연구 목적

- (가) 국내에서는 병풀 재배법 및 병충해 관리와 관련한 정보가 거의 없는 실정이며, 본 연구개발 과제를 통하여 병풀의 재배시에 발생할 수 있는 충해를 확인하게 되었음
- (나) 해당 충해의 방제효과를 갖는 친환경 방제제를 찾고자 하였음

(2) 연구 결과

- (가) 병풀의 시설재배 시 6~7월 초여름시기에 나방 2~3마리가 발견된 후 약 7~10일 사이에 나방의 마리수가 급속도로 증가하였으며, 성장 중인 병풀 개체가 완전히 괴사하는 등 충해의 확산속도 또한 매우 빠름을 확인하였음
- ① 발생나방은 점애기들명나방으로 동정되었으며, 시설재배 작물을 가해하는 해충의 일종으로 유충 또한 해충으로 알려져 있음
- ② 충해의 증상으로는 충해 발생초기 잎이 잘려진 상태로 줄기만 남아 있는 병풀 개체들이 확인되며, 이후 유충이 동시에 발생하게 되면 잎을 갉아먹었던 흔적도 발견됨

		<p>학명: <i>Diasemia accalis</i> 국명: 점애기들명나방 계: 동물 문: 절지동물 강: 곤충류 목: 나비목 과: 명나방과</p>
<p>점애기들명나방 성충</p>	<p>점애기들명나방 유충</p>	

- (나) 식물이 괴사한 토양에서는 유충의 분비물로 보이는 점액성 물질들이 확인되었으며, 이로 인하여 지하부에 남아있는 뿌리부분에 영향을 주어 최종적으로 병풀 개체 전체를 괴사시키는 것으로 판단됨



<유충의 병풀 가해 모습 (잎 및 잎자루)>



<총해의 진행 사진>

바. 병풀에 대한 신규 병해충의 확인 및 방제방법 연구

(1) 연구 목적

- (가) 2차년도 재배연구 당시 점애기들명나방의 유충 및 성충에 의한 병충해가 발생 하였으며, 이에 대한 방제로는 친환경 방제제를 3~5일 간격으로 5회 살포하였고, 방제적 차원에서 기온이 올라가기 시작하는 5월 중순 부터 5~7일 간격으로 2~3회 살포함으로써 예방적 효과를 얻을 수 있었음
- (나) 3차년도에는 2차년도에 발생하였던 점애기들명나방에 대한 예방적 처리를 실시하여 총해는 발생하지 않았으나, 6~8월 고온기의 장마로 인한 하우스 내 고온 과습 환경으로 인해 토양병의 일종이면서, Fungi 병원균인 흰비단병이 발생하였음

흰비단병은 백견경이라고도 불리우며 진균류의 일종으로 담자균아문에 속하는 Corticium rolfsii에 의한 작물병으로 알려져 있다. 이 균은 숙주범위가 대단히 넓고 특히 수박, 오이, 호박, 고구마, 무, 완두 등의 야채류, 담배, 곤약 등에 잘 발생하며, 통상 줄기의 지표에 발생하지만 지면에 접한 호박, 수박 등의 과실도 피해를 입힌다.

발병부위에 처음에는 흰색, 견사상의 특징적인 균사가 생기고 후에 진한 황갈색~갈색의 속립(粟粒)크기(통상 지름 1~2mm)의 균핵을 다수 형성한다. 피해부분은 마르면서 썩는 상태가 되고 경엽은 위축된다. 병원균인 Corticium rolfsii는 열대, 아열대에 널리 분포하며 고온 시에 작물을 침범한다. 따라서 온난지에서는 하기에, 한랭지에서는 거의 발생하지 않지만 동남아에서는 대부분의 발작물, 수목의 유묘를 침범하는 중요한 병해가 된다.

<출처: [네이버 지식백과] 백견병 [southern blight, 白絹病] (생명과학대사전, 초판 2008. 개정판 2014. 강영희)>

(2) 연구 방법

- (가) 방제로는 유효성분이 포함되어 있는 친환경 방제제를 5~7일 간격으로 2~3회 처리 하였음

(3) 연구 결과

- (가) 현재 국가에서 시행중인 PLS(농약허용기준강화제도)로 인하여 병풀에 등록된 화학적 방제약제가 없는 실정이며, 병풀 또한 작물로 등록되어 있지 않아 사용(허용)가능한 방제제가 없음. 향후 새로운 천연소재의 대량화(산업화)를 위하여는 천연소재의 재배 연구에 필요한 최소한의 규제 완화 또는 적절한 대책이 필요할 것으로 사료됨



병풀 재배지 병원균 발병 모습

사. 병풀의 생산비 절감을 위한 잡초제거 방법 연구

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 일반적인 재배법(줄맞춤 재배) 및 잡초 생육방지용 부직포를 줄맞춤 부위 위로 깔아 준 후 잡초의 생육 억제여부를 비교함

(2) 연구 결과

(가) 생육방지용 부직포를 설치한 재배포 역시 부직포 사이로 병풀과 혼재되어 잡초가 발생하였으나 두 재배 포장의 잡초 제거에 소요되는 시간적 및 경제적 금액을 비교하였을 때 부직포 설치 포장에서의 잡초 방제 효과는 시간적으로는 약 65%를, 경제적으로는 약 47%의 절감효과가 예상됨

구 분	1인기준 평당 잡초제거 소요 시간(min)	경제적 환산 ※100평기준 잡초방제에 소요되는 기간 및 예상금액	
		1인 기준 1일 작업시간 : 8시간, 인건비 : 85,000원	
일반줄맞춤 재배	45~50	1인 1일 평균 작업량: 9.6~10평	기간: 약 10일 금액 : 850,000원 (인건비)
잡초 생육방지용 부직포 설치 재배	15~20	1인 1일 평균 작업량: 24~32평	기간: 약 3.5일 금액 : 447,500원 (인건비 297,000원, 부직포 150,000원)



잡초방제효과 비교 좌: 일반줄맞춤재배 우: 잡초방제부직포설치재배 - 식재 초기



잡초방제효과 비교 좌: 일반줄맞춤재배 우: 잡초방제부직포설치재배 - 식재 후 10일경과

(나) 부직포 설치 재배포에서는 부직포 아래로 병풀의 새로운 런너(기는줄기)들이 잡초의 방해를 받지 않고 자라고 있었으며, 이들은 부직포 제거 후 토양 표면을 신속하게 피복하는 효과가 있었음

(다) 병풀의 새로운 런너들이 잡초의 방해없이 토양을 피복하게 되면, 향후 잡초방제에 소요되는 시간적, 경제적 이점 이외에 추가적으로 수확량 증대의 이점을 얻을 수 있으므로 잡초방제 부직포 설치 재배법은 병풀 재배초기에 매우 효과적인 방법이라 판단됨



잡초방제용 부직포 하부 새로운 런너(기느줄기) 성장모습

아. 병풀의 시설재배를 위한 적정 양액농도 확인

(1) 연구 목적 및 방법

(가) 병풀의 시설재배시 양액의 적정농도를 확인하기 위하여 묘종 생장 트레이에 양액 첨가 조건 및 광조건을 달리하여 병풀의 시간경과에 따른 변화를 관찰하였음

- ① 병풀은 뿌리길이 3~6cm, 잎은 완전히 전개하였으며, 각각 분리된 어린 개체 60개 및 분리하지 않은 개체 약 200 g을 관주액이 채워진 트레이위에 뿌리가 관주액에 닿도록 놓음

(나) 병풀의 양액 및 광유무에 따른 생장 및 생존 비교 실험군

	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
관주액	농업용수	농업용수+양액	농업용수	농업용수 + 양액
광조건	자연광	자연광	암	암

※ 잡초방제 연구방법의 결과에서 부직포 하부의 암 조건일때 런너(기느줄기)의 생성 및 성장이 양호하였기에 트레이 시험에 광조건을 추가하였음

(다) 양액은 친환경농자재로 등록되어 있는 ㈜대유의 물푸레양액(A,B)을 사용하였으며, 양액의 주요성분으로는

- ① A액 : 질소전량 2%, 수용성칼리 3.5%, 수용성석회 2%, 수용성철 0.05%
- ② B액 : 질소전량 1.3%, 수용성인산 1.5%, 수용성칼리 5.0%, 수용성고토 0.7%, 수용성 붕소 0.05%, 수용성망간 0.01%, 수용성아연 0.002%

이며, A, B 혼합액을 권장 최저농도인 1,500배로 희석하여 트레이에 관주하였음

(라) 묘종 생장 트레이에 병풀 이식 후 20일 경과한 시점에서 부패하여 고사한 병풀의 개체수를 조사하였음

(2) 연구 결과

(가) 4가지 조건 중 양액을 관주한 실험군 모두에서 병풀 개체의 고사율이 높았으며, 양액을 관주하지 않고 자연광 조건일 때 가장 낮은 고사율을 보임

- ① 이는 낮은 농도일지라도 병풀의 어린묘 뿌리에 직접적으로 양액이 닿게되어 약해의 일으킨 것으로 유추되며, 또 다른 원인으로 양액을 양분으로 사용하는 부생균의 감염 및 미생물이 번식함으로써 관주액의 부패로 인한 식물생장 불량으로 고사가 일어난 것으로 유추됨
- ② 또한, 수치화하지는 못하였으나, 분리되지 않은 개체의 상태 또한 양액을 관주하지 않은 조건에서 고사율이 낮았으며, 다른 점은 암조건에서 생육이 양호한 것으로 육안상 관찰하였음
- ③ 따라서, 양액재배시에는 병풀의 분리된 어린묘 개체를 사용하기보다는 런너가 분리되는 않은 원뿌리가 유지되어있는 개체를 사용하고, 이식초기 암조건에서 수경재배 환경에 순화시키는 과정이 필요할 것으로 판단됨

구분	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
관주액	농업용수	농업용수+양액	농업용수	농업용수 + 양액
광조건	자연광	자연광	암	암
고사한 개체 수	9/60	20/60	16/60	43/60
분리되지않은 개체의 생육상태	양호	매우불량	가장양호	불량



농업용수, 자연광 - 이식초기



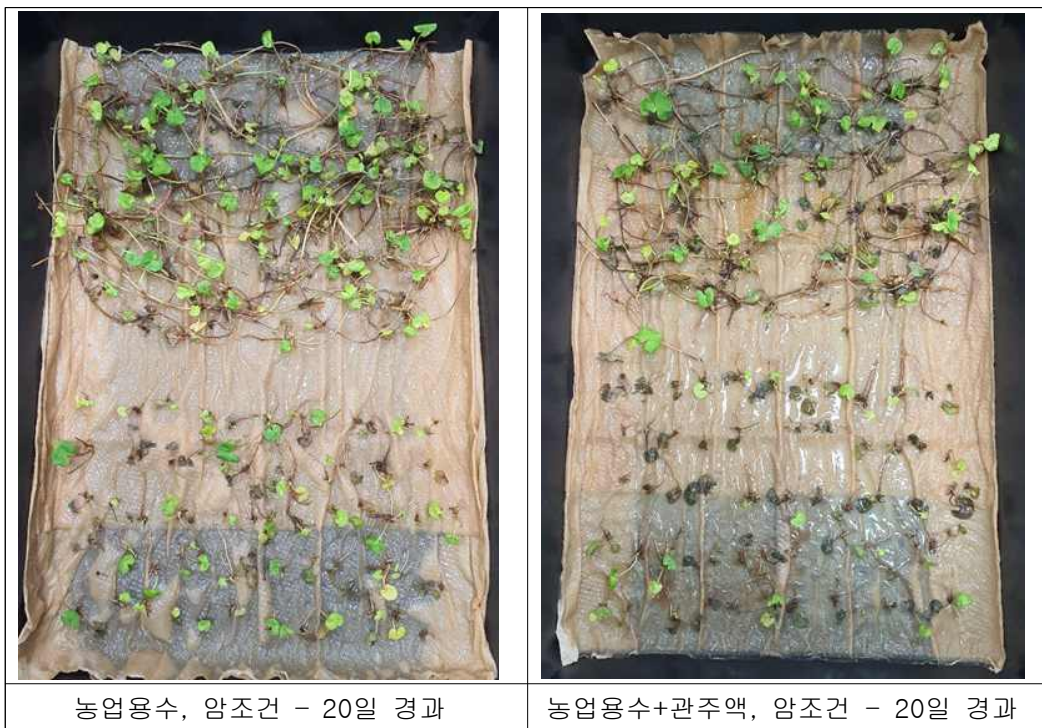
농업용수+관주액, 자연광 - 이식초기



농업용수, 암조건 - 이식초기



농업용수+관주액, 암조건 - 이식초기



자. 병풀 재배 및 관리 기술에 관한 교육 실시


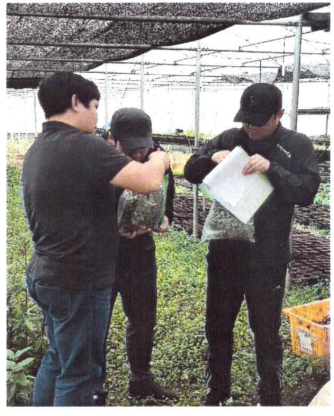
(1) 연구 목적 및 방법

(가) 본 연구과제에서의 재배연구를 통한 정보를 정리하여 주변 관심 농가들과 정보를 공유하고자 병풀의 재배 및 관리기술에 관한 교육을 실시하고자 하였음 (총 2회 실시)

(2) 연구 결과

(가) 제주도 내 관심 농가를 초대하여 병풀의 재배 및 관리 기술 교육 실시

병풀재배교육 보고서

교육일시	2018.10.16. 10:00~	교육장소	(주)트리즈바이오텍 연구용 시험포장	
교육명	제주산 병풀의 재배 및 관리기술에 관한 교육			
교육내용	1. 병풀의 주요특성 2. 병풀의 재배환경 3. 병풀의 재배방법 4. 병해충 방제 ※ <첨부 1.> 별첨 참조			
	세부내용	 <사진 1.>	 <사진 2.>	
	참석자	도내 지역 농민 4인 및 본사 관계자 포함 6인 최석철, 김영철, 이승준, 이용범, 이시택, 이경후 ※<첨부 2.> 참조		
확인	위와 같이 교육결과를 보고합니다. <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> 2018년 10월 16일 </div>			
	담 당	이 시 택 (인)	대 표	이 경 후 (인)

농업회사법인주식회사 트리즈바이오텍

2019년 병풍 재배 교육 보고서

교육일시	2019.11.15. 14:00~	교육장소	(주)트리즈바이오텍 연구용 시험포장
교육명	2019년 병풍 재배 교육		
세 부 내 용	<p>○ 2차년도(2018년)에 이어 병풍 재배에 관심을 갖고 있는 지역 농민에 대해 재배 교육을 실시하였는데, 기존 교육자료에 지속적으로 첨가한 내용을 선급로 받은 차의 교육자료를 작성하고 배포하였음. 보급된 내용으로는 김치재배와 새콤 달콤한 병풍에 대한 내용을 들었어, 교육시간외에 추가로 병풍의 수급상태, 시장과 관련한 기술적인 내용에 대해 토의하는 시간을 가짐</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 병풍의 재배관리 방법 <ul style="list-style-type: none"> - 김치 발효법을 이용한 김초 병재법 2. 병풍의 주요 병해충 및 방제법 <ul style="list-style-type: none"> - 2019년도 병풍 병해충 발생 및 방제법 3. 병풍의 시용 재배관련 토의 <ul style="list-style-type: none"> - 병풍의 수급상태, 작황을 위한 기술적 내용 토의 <p>* >첨부 1> 발표 자료</p>		
			
참석자	<p>도내 지역 농민 2인 및 농사 관계자 포함 5인 최익철, 송찬영, 김재훈, 이시택, 이금후 * >첨부 2> 참조</p>		
확인	<p>위와 같이 교육결과를 보고합니다. 2019년 11월 15일</p> <p>담당 이시택 (인) 대표 이경후 (인)</p>		

농업회사법인주식회사 트리즈바이오텍

3차년도 병풍 교육보고서

<첨부 1>

제주산 병풍의 재배 및 관리 기술 - II

2019년 11월 15일

농업회사법인(주)트리즈바이오텍

병 풍

병풍(*Centella asiatica* (L.) Urb.)은 아열대성 식물로 동남아시아 국가, 한국, 중국, 일본의 남부지방 일부, 남서부지역 해안지역인 마다가스카르와 남아프리카, 미국의 남동지역, 멕시코, 베네수엘라, 콜롬비아, 남아메리카의 동부지역에 주로 분포하고 있으며, 우리나라에서는 주로 남부지역에 서식하며, 특히 제주에서 많이 자생하는 식물이다.

병풍은 AD 500년경 인도(India) 찬스크리트 의학교재 문헌에 처음으로 기록되어 있으며, 고온다습한 성지역 주민들이 민간요법으로 나병(leprosy)의 치료제로 주로 사용하여 왔다.

1945년 이후 세계적인 연구가 이뤄졌으며,

- 아시아티코사이드(asiaticoside),
- 마데카소사이드(madecassoside),
- 아시아틱 엑시드(asiatic acid),

• 마데카식 엑시드(madecasic acid)의 유효성분이 확인되었으며, 미량의 알칼로이드(alkaloid)또한 풍부한 것으로 밝혀졌다.

근래에는 피부상처치료, 나병(leprosy), 낭창(lupus), 습진(eczema), 건선(psoriasis), 만성정맥질환, 황치매 및 위장병, 해열제, 해독제(detoxicant), 이뇨제(diuretic), 혈압강하, 심장박동 하강 등 질병 치료제가 원료, 화장품 첨가물의 원료, 건강보조식품 등 병풍을 이용한 산업화 연구가 다양하게 이루어지고 있다.

- 3 -

3차년도 병풍 교육자료-1

1. 병풀의 주요특성



학명: *Cichola asiatica* (L.) DC
 국명: 병풀
 계: 식물
 분: 속씨식물
 과: 장미목
 목: 장미목

병풀은 남쪽 알피 등이나 길가에서 흔히 자라는 신열대에 속하는 다년초로서 항줄기는 옆으로 뻗고 지대에서 뿌리가 내리며 아래 번잡한 곳에는 수개의 비늘 같은 퇴화엽이 있다. 보통잎은 비늘같은 잎에서 역생하고 잎자루는 길이 4-20cm 이며, 엽신(葉身)은 산형(扇形)이고 시골 2-5cm로서 가장자리에 둔한 톱니가 있다. 꽃은 7-8월에 피며 통사색이고 2-5개의 꽃이 길이 2-3mm의 꽃자루 끝에 달리며 초화경은 극히 짧거나 없다. 종포편(種皮片)은 2개이고 꽃차례를 둘러싸며 난형이고 겹겹이 남아있으며 꽃잎은 5개로서 넓은 난형이고, 수술도 5개로서 작으며 꽃밥은 흑자색이다. 씨방은 하위이고 양술대는 2개이며 열매는 길이 3mm정도로서 편원형(扁圓形)이고 분과(分果) 2개에 의하여 나뉘는 것이 없으며 처음에는 열이 있으나 점차 없어진다.



2. 재배환경

동남아시아 지역의 열대기후처럼 연중 기온이 높고, 갈수량이 많은 것이 좋으며, 이러한 환경에서 재배하여야 품질 또한 우수하게 생산된다. 우리나라 남부지방 특히 제주에서는 봄부터 가을까지 습하고 반양지의 환경에서 이상 병풀이 자주 확인이 된다. 병풀의 재배를 위해서는 노지보다는 시설재배가 유리하며, 제주에서 시설재배를 할 경우에는 병도의 기온을 하식 입더라도 생육이 가능하다. 모양은 사질토양보다는 보수력이 좋은 양질토양이 유리하며 50% 정도의 인차말 조건이 생육에 적합하다.

3. 재배방법

가. 번식방법

종자 및 열매를 번식 물다 가능하다. 종자 번식은 비추천하며, 열매를 번식을 추천한다. 병풀의 종자는 재분 또한 매우 까다로우며, 피종하여 생애까지 되는 시간 또한 오래 걸린다. 병풀은 줄기가 옆으로 뻗어지면서 뿌리를 내리고, 양적으로 발을 생장시키고, 다시 아래까지를 반복하며 번식한다. 따라서 모재 1개체에서 지속적으로 새로운 개체를 얻어낼수 있으므로, 가을철 마지막 수확 후에도 뿌리부분에서 새순이 생장되기 때문에 뿌리를 제거하지 않는 한 지속적으로 개체를 생장할 수 있다.



※종자 및 열매 의한 새로운 병풀생태※

3차년도 병풀 교육자료-2



※기초육간에 의한 새로운 병풀생태의 생장※

나. 재식간격

무성 병풀 모종을 초상 5-10cm거리 재배한 후 토양 식재를 하여야 한다. 병풀의 수확할 순대를 위해서는 평당 개체수를 많게 하여 밀도를 높여야 하는데, 병풀은 인접 개체간의 접촉 및 간섭이 많을수록 초상이 길어지는 특성이 있다. 따라서 식재초기에 표준을 15-20cm 간격으로 식재한 후 약 6개월-1년 정도는 수확을 하지 않고 최대한 많은 알피 개체를 유도하여, 개체간의 접촉 및 간섭이 없도록 해야한다.

다. 광 및 수분 관리

병풀은 직사광선을 피하고 반음차 조건에서 생장 및 번식이 용이하며 습지환경에서 번식이 잘되는 특성을 갖고 있다. 노지의 양지조건에서는 초장이 매우 짧아져서 수확과질이 여러중피 수확량 또한 매우 적어 생애성이 떨어진다. 따라서 시설재배시에는 50% 차광막을 설치하여 반음차 환경을 조성하여 주어야 한다. 모종 이식 초기에는 토양에 수분 미르시 않도록 관수를 해주어야 하며, 여름과 겨울철 고온 및 저온시기 하에는 수 1-2회 정도만 관수를 하여도 생육에는 지장이 없다.



※병풀 생육 시간-반음차의 차광율 80%, 50%, 0%※

라. 토양 및 시비관리

병풀은 배수가 너무 잘되는 토양일 경우 수분 보유력이 떨어져 생장에 불리할 수 있으므로, 수분을 유지 할 수 있는 양질 위주의 토양이 유리하다. 재배 토양의 초기 염비시에는 경운 후에 잘게 갈아주고 흩어 흩어 뜨지 않도록 해주어야 하며, 모종 이식후에는 충분한 물을 주어 흩어 단단해지도록 유도하여 준다. 모종 이식후 1년 동안은 병도의 시비가 필요치 않다.

3차년도 병풀 교육자료-3

다. 갑초 제거

병충은 초장이 낮은 식물로서 상대적으로 생장속도가 빠른 갑초와의 경쟁에 매우 불리한 식물이다. 이에 병충의 생장성 향상 및 생산성 제고효과를 위해서는 반드시 효율적인 갑초 방제 기술이 필요하다. 본사는 초기 병충 재배시의 갑초 방제 방법으로 갑초방제 방법을 적용하였다. 병충의 토양 식재시 15~20cm의 재식간격을 두며 이 공간을 갑초방제용으로 덮어 초기 발생하는 갑초의 생장을 방제·억제하였다. 갑초방제는 약 2달정도 유지시켜주며, 이후 병충을 제거하여 병충의 아래로 뻗어 있는 줄기가 외부 환경에 순화할 수 있도록 유도한다. 이 방법은 병충의 토양 식재 초기 갑초와의 경쟁에 유리하게 하여 토양재배시나·병충의 재배수 밀도를 높여주는데 효과적이다.



◀ 병충 식재시 갑초방제용 처리에 따른 갑초 방제 효과 비교 - 식재 직후 ▶



◀ 병충 식재시 갑초방제용 처리에 따른 갑초 방제 효과 비교 - 식재 후 3달 경과 ▶

비. 수확

병충은 여러해살이 식물로서 뿌리를 제거하지 않는 지속적인 재배 및 수확이 가능하다. 병충은 5~6월에 급속하게 생장을 하기 때문에 이시기에 수확을 해주어야 7~8월에 새순이 다시 자라게 되어 10~11월에 다시 수확을 할 수가 있다. 식재 후 1년 경과 시점에서 수확하였을 때 평당 (생물 기준) 약 5kg 정도 수확 할 수 있었으며, 1년 기준으로 약 3회 정도 수확이 가능하였고, 평당 약 15kg을 수확할 수 있었다. 수확시에 뿌리발 사할요는 뿌리가 뽑히지 않도록 지상부의 잎과 줄기를 뜯어 주어야 하며, 수확한 곳은 뿌리가 들리지 않도록 밟아주어야 한다.

3차년도 병충 교육자료-4

4. 병해충 방제

가. 총애(검게기둥말나방)

식재재배시 발생 해충은 나방류이며 이에 대한 적기방제가 필요하다. 나방의 유충은 병충의 줄기 및 잎을 직접적으로 가해하며, 유충의 분비물 등은 뿌리를 상하게 하는 것으로 예상된다. 이러한 이유로 병충 재배지에 나방이 발생하였을 때 최우선적으로는 병충 재배를 완전히 사멸시키며, 총애의 확산속도 또한 매우 빠르게 주의할 기술하여야 한다. 나방(검게기둥말나방)은 6~7월 초여름시기에 시설내에서 발생하며, 이를 발견시 초기에 친환경 방제제를 사용하여 주기적으로 방제를 실시하여 산란 및 유충의 발생을 차단하여야 한다.



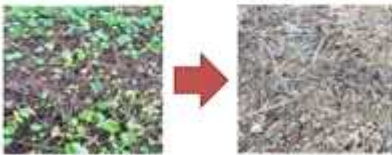
◀ 병충 주요해충-검게기둥말나방 ▶



◀ 검게기둥말나방 병충 ▶



◀ 유충의 먹물 기재 모습(말 및 풀기) ▶




◀ 해충 발생 초기 ▶

◀ 8월 후 ▶

▶ 해충 차단 효과 ▶

3차년도 병충 교육자료-5

<p>나. 병해(흰비단병) : 작물에 해를 입히는 원인으로는 바이러스, 세균, 진균 등의 유해병원균이 매우 큰 비중을 차지한다. 병물은 현재 작물로 등록되어 있지 않으며, 아직 국내에서는 재배농가가 많지 않아 재배연구에 대한 자료 또한 많지 않은 실정이다. 본 사에서 시설재배시 확인한 병해로는 육안병징 확인하였을 때, 흰비단병으로 의심되는 병이 발생하였으며, 추가로 유전학적 동정을 진행을 예정이다. 흰비단병은 병풀의 병해로는 알려지지 않지만, 작물 재배지에서 지표면과 가깝게 줄기가 생장하는 남줄식물 등에 주로 발생하는 균으로 알려져 있다.</p> <div data-bbox="300 555 699 891" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>흰비단병은 백건장이라고도 불리는 진균류의 일종으로 담자균 아문에 속하는 <i>Corticium rolsii</i>에 의한 작물병으로 알려져 있다. 이 균은 숙주범위가 대단히 넓고 특히 수박, 오이, 호박, 고구마, 무, 완두 등의 야채류, 담배, 곤약 등에 잘 발생하며, 통상 줄기의 지표에 발생하지만 지면에 접한 호박, 수박 등의 과실도 피해를 입힌다. 발병부위에 처음에는 흰색, 건조상의 특징적인 균사가 생기고 후에 진한 황갈색-갈색의 속입(菌孔)크기(통상 지름 1-2mm)의 균액을 다수 형성한다. 피해부분은 마르면서 짙은 상태가 되고 결별은 위축된다. 병원균인 <i>Corticium rolsii</i>는 열대, 아열대에 널리 분포하며 고온 시에 작물을 침범한다. 따라서 온난지에서는 하기에, 한랭지에서는 거의 발생하지 않지만 동남아에서는 대부분의 밭작물, 수목의 유묘를 침범하는 중요한 병해가 된다.</p> <p><small>*출처: [내이버 지식백과] 백건병 [Southern blight, 白乾病] (생명과학대사전, 호환 2008, 개정판 2014, 김명희)*</small></p> </div>	<p>병풀의 병해는 7월-8월 사이 고온기에 집중되며, 이시기에는 특히 물관리, 환기 및 광 관리에 신경을 써야 한다. 물관리는 주 1회 정도 토양이 촉촉 쫓을 정도로 충분히 관수해주며, 광 관리는 평소 반음직 사할 상태로 관리하며 밭이 좋은 일기에는 주 1-2회 정도 차광을 걸고 직사광선을 피해 하여 토양 및 작물에 부착되어 있는 유해균이 번식할 수 없도록 환경을 조성하여야 한다. 이러한 병균이 발생하였을 때에는 병균이 발생될 때까지 관수를 중단하고, 즉시 비닐부위 및 주변을 제거하여 더 이상 병균의 주변으로 전염되지 않도록 하여야 하며, 약제를 사용할 시에는 유황성분이 포함되어 있는 친환경 병해제를 병발병도에 따라 5-7일 간격으로 3-4회, 약 25%에 희석하여, 발병부위를 포함하여 주변부까지 넓게 살포하여야 한다.</p> <div data-bbox="890 600 1305 891" style="border: 1px solid black; padding: 5px;">  <p style="text-align: center;"><small>*병물 재배시 병원균 발생 모습*</small></p> </div>
<p>3차년도 병풀 교육자료-6</p>	

차. 병풀 재배 단지 구축 및 사업화 추진 전략

(1) 연구 목적 및 방법

- (가) 농업법인(주)트리즈바이오텍은 병풀의 재배단지 구축을 위하여 관심 농가 및 농민단체 기업과 지속적인 네트워크 활동을 하였음
- (나) 제주도 농업 특성상 하우스 시설은 굴 또는 만감류 등의 재배를 위하 시설이 대부분이며, 그 외에 딸기, 오이, 토마토 등의 채소류 재배시설이 주를 이룸
- (다) 또한 규모는 약 2,000평 이하의 영세 소규모 시설이 대부분으로 병풀의 재배를 위한 대규모 시설을 찾기가 어려운 실정임
- (라) 대량 재배에 따른 사업화 시스템 구축을 위하여 평당 생산되는 병풀의 양과 생산 단가를 정립하여 재배 농가 확충에 기여하고자 하였음

(2) 연구 결과

- (가) 농업회사법인(주)천지는 제주시 애월읍에 약 800평 규모의 연구 시설을 갖추고 있으며, 제주특산 자생식물의 산업화 연구를 추진하는 회사임. 스마트팜, 특히 수경재배법을 이용한 병풀재배 생산에 관심을 갖고 있으며, 본사와 지속적으로 병풀을 포함한 제주특산 자생식물의 산업화를 위한 연구를 공동으로 진행하기로 협의함



- (나) 지속적인 병풀 소재의 홍보를 통한 주변 농가 섭외(계약재배) 및 하우스 시설 장기임대를 통한 재배단지 구축을 실현할 것이며, 서귀포시 대정읍 소재 노지 3,000평을 소유한 농가의 자가 시설하우스 구축 후 병풀 재배를 희망함에 따라 병풀의 재배법 교육을 추가로 실시할 것임
- (다) 농가 및 원료 판매 기업이 상생할 수 있는 원재료 판매가 설정
- ① 3차년도까지 연구결과를 바탕으로 시설 농가의 병풀 재배에 따른 생산비용 분석은 아래의 표에 나타난 것처럼 1평당(3.3m²) 원재료 생산단가는 약 34,300원으로 예상됨
 - ② 연간 1평에 대한 수확량은 생병풀 기준 약 9~11 kg(건조병풀: 0.9~1.1 kg, 건조수율 약 10%)으로 병풀 1 kg당 생산단가는 약 28,580~31,180원/kg으로 예상되며, 이에 농가의 안정적인 병풀 생산을 지원하기 위한 구매단가를 고려하였을 때, 약 5.8~6.5만원이 적정할 것으로 판단됨
 - ④ 병풀재배 초기에는 평당 생산량이 적고 시설비가 투입되어 원재료 생산단가가 다소 높게 산출되나, 병풀의 평당 밀도가 높아지고 시설운영의 안정화가 되는 시점(이식 후 2.5년~3년)부터는 원재료 생산단가는 약 1~1.5만원이며, 구매단가는 약 4~5만원으로 형성할 수 있을 것으로 예상됨
 - ⑤ 사업화를 진행하는 원재료의 경우 단가가 약 1~2만원 수준인 것으로 볼 때 병풀 원재료의 단가는 매우 높은편이나 원료 생산 수율이 30%가 넘는 것을 가정할 때 고가의 원재료로 볼 수 없음
 - ⑥ 따라서, 이러한 병풀의 고부가가치를 장점으로 부각시켜 원재료 재배 농가 모집에 박차를 가할 예정임

구분	산출내역
인건비	▪ 3,500원*1인/1평*4회 = 14,000원
수도광열비	▪ 수도 및 전기요금 1개월/1평 = 300원
농자재비	▪ 친환경방제제 1,000원/1평/1회*10회 =10,000원
기타 잡비	▪ 초기 관수 및 차광시설 설치비 ▪ 평당 약 10,000원
합 계	▪ 34,300원
평당 생산량	▪ 생병풀기준 약 9kg~11kg (건조병풀 기준 0.9kg~1.1kg, 건조수율 약 10%)
병풀원재료 단가	▪ 약 28,580~31,180원/kg
병풀원재료 판매가	▪ 약 58,000~65,000원 (이식 후 3년: 4~5만원 가능)

16. 제품개발 연구

가. 고시형 건강기능식품 생산 적용을 위한 기능성 제품별 제제평가

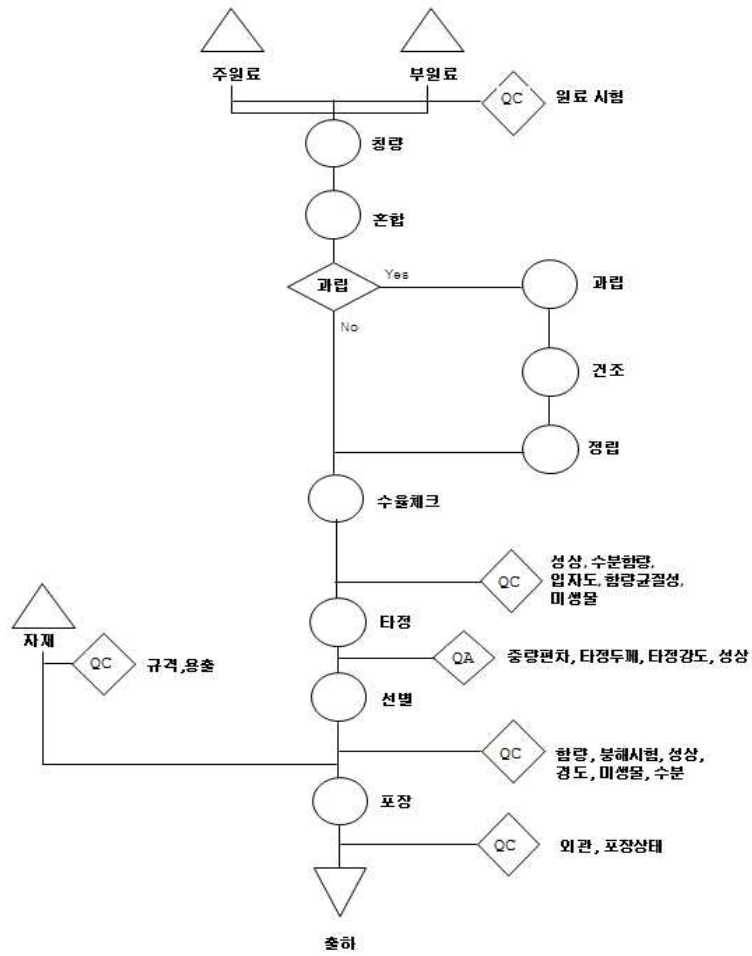
(1) 연구 목적

- (가) 눈 건강 및 간 건강 개선 이중 기능성 건강기능식품의 선호도 및 병풀주정추출분말의 기능성을 확인하기 위하여 전략적 고시형 건강기능식품을 개발하고자 하였음
- (나) 병풀주정추출분말을 활용한 고시형 건강기능식품의 시생산을 위하여 간기능 개선 및 눈 건강 2가지의 기능성별 제형 생산 적용테스트를 진행하고자 하였음

(2) 연구 방법

- (가) 고시형 건강기능식품에 병풀주정추출분말을 부원료로 함유하는 정제제형의 생산 가능성 검토 테스트를 진행함
- (나) 정제의 제조공정 및 각 공정에 사용되는 설비를 사용하여, 내용물의 혼합과 과립은 더블콘믹서 및 하이스피드 믹서를 사용하여 진행하였으며, 혼합이 완료된 내용물을 소분하여 타정기로 타정을 진행하고, 타정 완료 후 코팅기로 제피 진행하여 정제선별기를 통한 정밀 선별 진행함

제조공정도(정제)



(3) 간기능 개선 건강기능식품의 제품배합비 및 테스트 결과

(가) 주원료의 배합을 기준으로 병풀주정추출분말을 첨가하였으며, 1차로 저용량인 1.25 mg으로 테스트 진행

원료명	배합비	단위 중량
밀크씨슬추출물(실라마린50%)	26.0000 %	130.0000 mg
비타민C(Fine powder)	9.6000 %	48.0000 mg
키토올리고당(50%)	8.0000 %	40.0000 mg
결정셀룰로오스(102D)	35.6000 %	178.0000 mg
유당	17.0000 %	85.0000 mg
스테아린산마그네슘	1.0000 %	5.0000 mg
이산화 규소	2.0000 %	10.0000 mg
병풀주정추출분말	0.2500 %	1.2500 mg
[코팅]		
HPMC	0.5000 %	2.5000 mg
글리세린지방산에스테르혼합제제	0.0500 %	0.2500 mg
합계	100.0000 %	500.0000 mg

(나) 병풀주정추출분말을 적용한 간기능 개선제품의 제품화 테스트 결과, 타정과 코팅 공정 중 특별한 문제 보이지 않았으며, 97% 이상 수율의 생산성을 보이므로 제품화에 큰 문제가 없는 것으로 사료됨

〈타정조건〉		〈코팅조건〉	
항 목	작업조건		작업조건
편지 모양	 장형형	급기온도	70 ± 5°C
타정속도	30 ± 20 rpm	배기온도	40 ± 5°C
나정중량	500mg±3%(485~515)	분무거리	25 ± 5Cm
경 도	24~30 kg/cm ²	분무노즐	1.2 mm
단 경	4.9~5.3 mm	편회전속도	2 ~ 7 rpm
		코팅시간	120 ± 60분



(4) 눈 건강 개선 건강기능식품의 제품배합비 및 테스트 결과

(가) 주원료의 배합을 기준으로 병풀주정추출분말을 첨가하였으며, 1차로 저용량인 0.5 mg으로 테스트 진행

원료명	배합비	단위 중량
루테인	10.0000 %	20.0000 mg
엽산	0.2900 %	0.5800 mg
코엔자임 Q10(CoQ10. 가네까)	1.800 %	3.6000 mg
결정셀룰로오스(102D)	84.5100 %	169.0200 mg

스테아린산마그네슘	0.8000 %	1.6000 mg
이산화 규소	1.8000 %	3.6000 mg
병풀추출물	0.2500 %	0.5000 mg
[코팅]		
HPMC	0.5000 %	1.0000 mg
글리세린지방산에스테르혼합제	0.0500 %	0.1000 mg
합계	100.0000 %	200.0000 mg

(나) 1차 배합비 타정 테스트 결과 캡핑(capping) 현상 발생하였으며 (정제 윗면이 모자모 양으로 박리되는 현상으로 인하여 정제의 정상규격 부적합하며 생산성이 매우 떨어지는 결과 초래함), 이에 대한 제품화가 불가능하다고 사료되었음

<타정조건>

항 목	작 업 조 건
편지 모양	 원형(8Φ)
타정속도	30 ± 10 rpm
나정중량	194mg ± 3%(188~200)
두께	3.3~3.6 mm
경도	2~5 kg/Cm3
붕해	50분 이내

<테스트결과>



(다) 이는 원료배합 또는 원료 입도차이에 따른 결합도 저하 등이 주원인으로 보여졌으므로 2차 테스트에서는 배합비 개선, 타정조건 개선을 통해 위와 같은 부적합 현상을 줄이는 테스트 진행 완료함

원료명	배합비	단위 중량
루테인	10.0000 %	20.0000 mg
엽산	0.2900 %	0.5800 mg
코엔자임 Q10(CoQ10. 가네까)	1.8000 %	3.6000 mg
만티몰시럽분말	20.0000 %	40.0000 mg
결정셀룰로오스(102D)	64.5100 %	129.0200 mg
스테아린산마그네슘	0.8000 %	1.6000 mg
이산화 규소	1.8000 %	3.6000 mg
병풀추출물	0.2500 %	0.5000 mg

[코팅]		
HPMC	0.5000 %	1.0000 mg
글리세린지방산에스테르혼합제	0.0500 %	0.1000 mg
합계	100.0000 %	200.0000 mg

(라) 배합비 개선, 타정 조건 개선 등을 통해 캡핑(Capping)현상이 나타나지 않음을 확인하였으며, 코팅 공정까지 마치고 약 97% 이상의 수율을 나타내었으므로 병풀주정추출분말 원료를 이용한 눈 건강 정제 제품 생산의 가능성을 확인하였음

<타정조건>		<코팅조건>	
항 목	작업조건		작업조건
편지 모양	 원형(8Φ)	급기온도	70 ± 5°C
타정속도	15 ± 10 rpm	배기온도	40 ± 5°C
나정중량	194mg ± 3%(188~200)	분무거리	25 ± 5Cm
두께	3.1~3.4 mm	분무노즐	1.2 mm
경도	4~7 kg/Cm3	회전속도	2 ~ 7 rpm
붕해	50분 이내	코팅시간	120 ± 60분



나. 병풀주정추출분말 함유 고시형 건강기능식품 제조

(1) 연구 목적

- (가) 눈 건강 및 간 건강 개선 이중 기능성 건강기능식품의 선호도 및 병풀주정추출분말의 기능성을 확인하기 위하여 전략적 고시형 건강기능식품을 제조하고자 하였음
- (나) 주원료를 밀크씨슬, 루테인으로 하고, 부원료로 병풀주정추출분말 등의 원료를 사용하여 눈 및 간 건강 개선 이중 기능성 건강기능식품을 제조함
 - 본 연구개발의 원료인 병풀주정추출분말은 현재 식약처 기능성 원료로 등재되어 있지 않아 주원료로 사용할 수 없으며, 식품첨가물 신고 (63페이지 참조)를 통한 부원료로 사용하고자 하였음
 - 병풀주정추출분말은 총 중량의 5%를 넘지 않게 설정하였으며, 기능성 원료 신청 원료의 섭취근거를 확보하고자 하였음

(2) 연구 방법

- (가) 주원료 및 기능성: 루테인 및 밀크씨슬, 병풀주정추출분말 함유 눈 및 간건강 이중 기능성 연질 캡슐 개발 (루테인으로 인해 타블렛 형태의 제형 어려움)
- (나) 개발배경: 눈 및 간건강 건강기능식품의 사업성 검토 및 병풀주정추출분말의 기능성 검토
- (다) 시생산 샘플의 안정성 확인 (성상, 함량, 붕해 등) 및 건강기능식품 품목신고 완료
- (라) 고시형 건강기능식품 제조공정 확립

(3) 연구 결과

- (가) 이중 기능성 고시형 제품의 혼합원료 설정

(라) 병풀주정추출분말 함유 고시형 건강기능식품 완제품 생산

① “간을보다 헤파비전” 최종 제품 생산 (총 5,000 set (달)) 완료

② 전국 약국전문 유통몰 “휴베이스” 및 인터넷 쇼핑몰에서 판매 (소비자가 3만원)



다. 병풀주정추출분말 함유 완제품의 안정성 평가

(1) 연구 목적

(가) 병풀주정추출분말이 함유된 전 제형 완제품의 안정성을 조사하기 위하여 가혹조건에서의 지표성분 함량을 분석하고자 하였음

(나) 해당시험은 한국기능식품연구원에서 진행함

(2) 재료 및 방법

(가) 시험장비 및 시약

① HPLC (Waters e2695), Water (99.9%, Fisher), Acetonitrile (99.9%, Fisher),

② Asiaticoside (Sigma, 04560590), Asiatic acid (Sigma, A2612)

(나) 정량법

① 각각의 시료 200 mg을 50 ml 정용플라스크에 칭량하여 50%에탄올을 가한 후, 13,500 rpm에서 5분간 원심분리 하고 상등액을 0.45um syringe membrane filter로

여과하여 시험용액으로 사용함

- ② 표준물질을 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm 각각의 농도 별로 메탄올에 희석하여 준비하였으며, 검액 및 표준액 각 10 ul로 다음조건에 따라 시험하여 검액 중 주요성분의 함량을 구하였음

(다) 분석조건

Instrumnet	Agilent 1260 Infinity		
Detector	UV(DAD)		
Wavelength	206 nm		
Column	Cadenza-CD18 (250 x 4.6mm, 3um)		
Mobile Phase	A: DW		
	B: Acetonitrile		
	min	이동상 A	이동상 B
	0	90	10
	10	80	20
	40	73	27
	45	80	20
	51	20	80
	55	90	10
65	90	10	
Flow rate	1.0ml/min		
Injection volume	10 ul		
Oven Temperature	40°C		

(라) 시험방법

- ① 실험군: 병풀주정추출분말 함유 정제, 연질, 분말, 액상, 젤리 제형
- ② 가혹조건에서 (40°C, 습도 75%) 지표성분의 함량의 변화 여부를 측정
- ③ 측정기간: 0, 2, 4, 8, 12, 16주

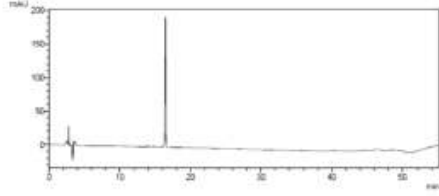
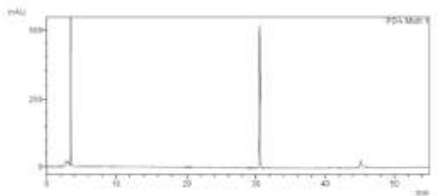
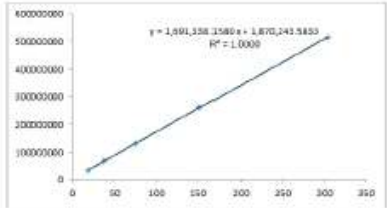
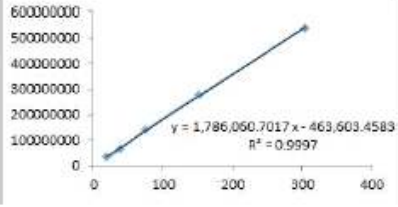
(3) 연구 결과

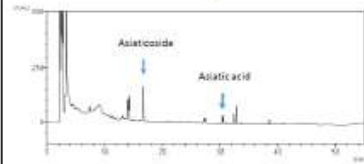
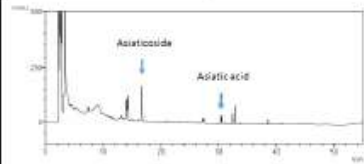
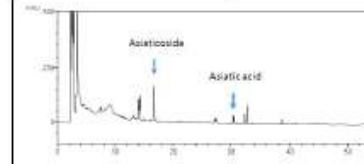
(가) 병풀의 표준물질인 Asiaticoside와 Asiatic acid의 안정성을 확인하기 위해 HPLC 분석을 진행하였으며, 16주간 온도 40°C, 습도 75% 조건에서 전 제형 표준물질의 함량은 16주차까지 안정적으로 유지하였음

① 0주차

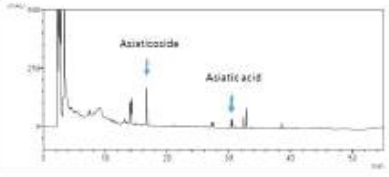
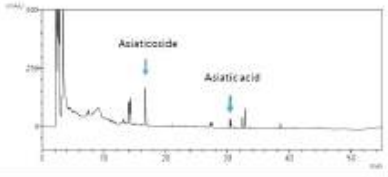
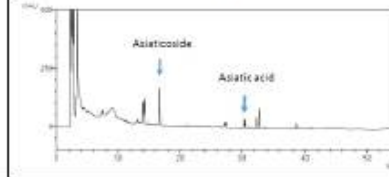
- 정제 0주차에서 Asiaticoside는 평균 함량 14.18 mg/g, Asiatic acid는 평균 함량 5.46 mg/g으로 나타났음

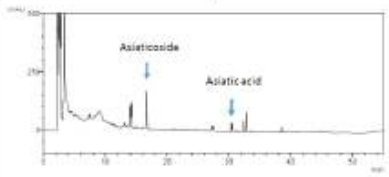
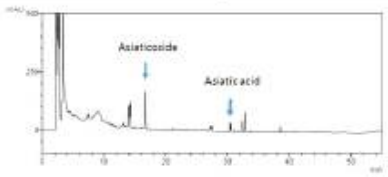
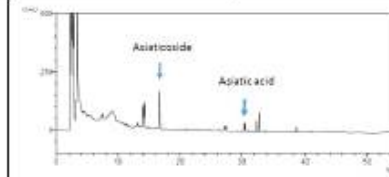
3.1. 0주차 분석결과

Chromatogram(152/304ppm)				
Asiaticoside			Asiatic acid	
				
표준품명	농도 (ppm)	검출농도 (ppm)	면적 (Area)	검량곡선
Asiaticoside	19	18.23	33145491	
	38	37.86	65881452	
	76	76.87	130814587	
	152	153.79	260489511	
	304	306.45	514412985	
	R ²	1.000		
Asiatic acid	19	18.17	31987459	
	38	35.81	63491804	
	76	77.80	138498012	
	152	154.69	275819864	
	304	302.53	539874597	
	R ²	0.999		

병풀추출물_정제								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	107552498	면적	Asiaticoside	106854263	면적	Asiaticoside	106055454
함량 (mg/g)		14.28	함량 (mg/g)		14.19	함량 (mg/g)		14.08
면적	Asiatic acid	42890981	면적	Asiatic acid	42807426	면적	Asiatic acid	40980875
함량 (mg/g)		5.54	함량 (mg/g)		5.53	함량 (mg/g)		5.30

- 분말 0주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.27 mg/g Asiatic acid 평균 5.29 mg/g, 젤리 0주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.05 mg/g Asiatic acid 평균 5.27 mg/g으로 분석되었음

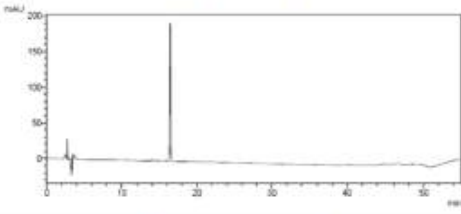
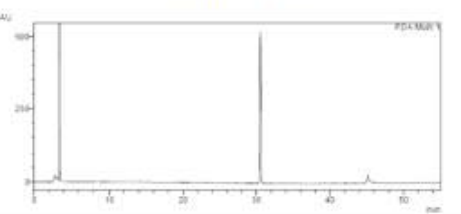
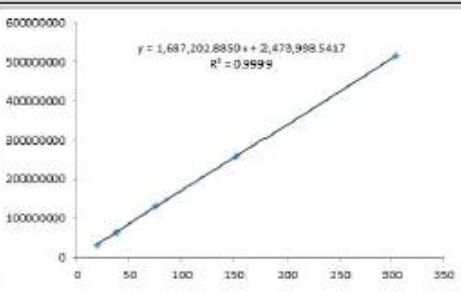
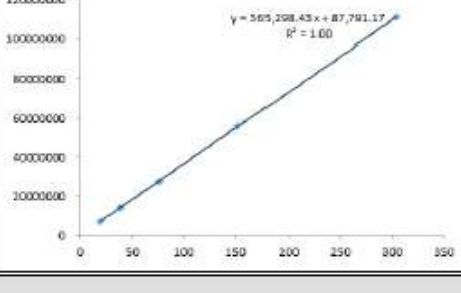
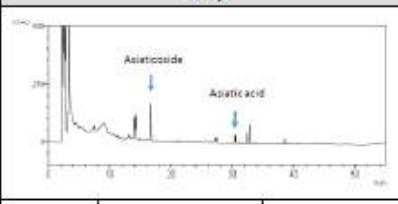
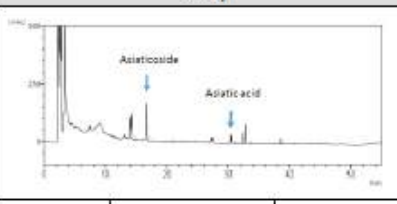
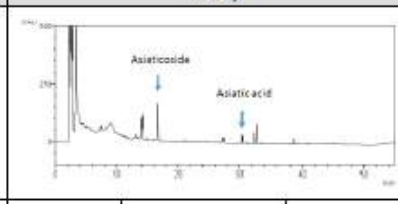
병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	107549440	면적	Asiaticoside	106019987	면적	Asiaticoside	108751604
함량 (mg/g)		14.28	함량 (mg/g)		14.08	함량 (mg/g)		14.44
면적	Asiatic acid	40198657	면적	Asiatic acid	42101781	면적	Asiatic acid	40393681
함량 (mg/g)		5.20	함량 (mg/g)		5.44	함량 (mg/g)		5.22

병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	106778546	면적	Asiaticoside	105662498	면적	Asiaticoside	106192410
함량 (mg/g)		14.042	함량 (mg/g)		14.027	함량 (mg/g)		14.098
면적	Asiatic acid	41099843	면적	Asiatic acid	40918567	면적	Asiatic acid	40268498
함량 (mg/g)		5.32	함량 (mg/g)		5.30	함량 (mg/g)		5.21

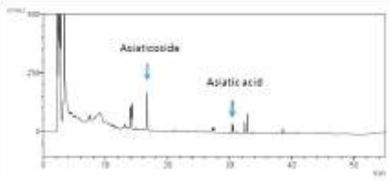
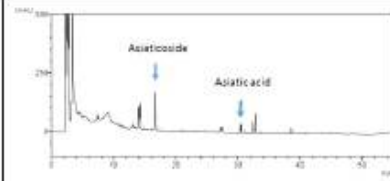
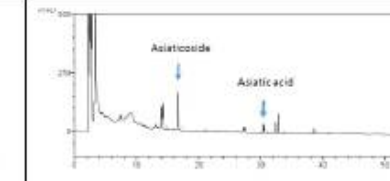
② 2주차

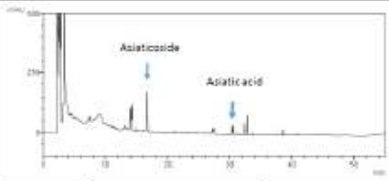
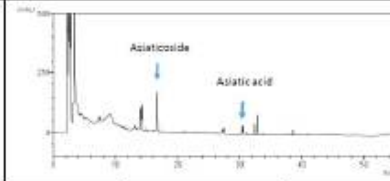
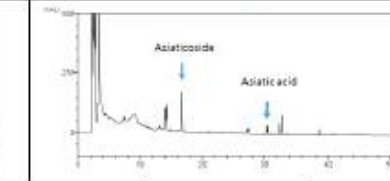
- 정제 2주차 분석결과 Asiaticoside는 평균 14.10 mg/g, Asiatic acid는 평균 5.31 mg/g으로 분석되었음

3.2. 2주차 분석결과

Chromatogram(152/304ppm)								
Asiaticoside			Asiatic acid					
								
표준품명	농도 (ppm)	검출농도 (ppm)	면적 (Area)	검량곡선				
Asiaticoside	19	18.18	33164125					
	38	37.57	65874561					
	76	77.56	133344684					
	152	151.90	258774561					
	304	303.75	514974561					
	R ²	0.999						
Asiatic acid	19	17.42	32094181					
	38	36.11	64852908					
	76	78.79	1396725125					
	152	155.41	273980849					
	304	307.72	540981461					
	R ²	1.000						
병풀추출물_정제								
1회		2회		3회				
								
면적		106044598	면적		106841124	면적		106742695
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.03	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.14	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.13
면적		42109751	면적		41080899	면적		41328984
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.39	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.26	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.29

- 연질 2주차 분석 결과 Asiaticoside 평균 14.39 mg/g, Asiatic acid 평균 5.20 mg/g, 액상 2주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.35 mg/g Asiatic acid 평균 5.36 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_연질								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	109641266	면적	Asiaticoside	108566244	면적	Asiaticoside	108047619
함량 (mg/g)		14.60	함량 (mg/g)		14.37	함량 (mg/g)		14.30
면적	Asiatic acid	40198720	면적	Asiatic acid	40306987	면적	Asiatic acid	41348730
함량 (mg/g)		5.16	함량 (mg/g)		5.16	함량 (mg/g)		5.29

병풀추출물_액상								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	109524687	면적	Asiaticoside	108146624	면적	Asiaticoside	107666100
함량 (mg/g)		14.60	함량 (mg/g)		14.32	함량 (mg/g)		14.24
면적	Asiatic acid	40987691	면적	Asiatic acid	42904860	면적	Asiatic acid	41874807
함량 (mg/g)		5.26	함량 (mg/g)		5.49	함량 (mg/g)		5.36

- 분말 2주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.37 mg/g Asiatic acid 평균 5.34 mg/g, 젤리 2주차 분석결과 Asiaticoside 평균 13.91 mg/g Asiatic acid 평균 5.32 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
면적	Asiaticoside	108542285	면적	Asiaticoside	109600142	면적	Asiaticoside	107461226
함량 (mg/g)		14.37	함량 (mg/g)		14.61	함량 (mg/g)		14.22
면적	Asiatic acid	41049203	면적	Asiatic acid	41526091	면적	Asiatic acid	42620941
함량 (mg/g)		5.26	함량 (mg/g)		5.82	함량 (mg/g)		5.46

병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
면적	Asiaticoside	104011687	면적	Asiaticoside	105732104	면적	Asiaticoside	105746214
함량 (mg/g)		13.766	함량 (mg/g)		13.989	함량 (mg/g)		13.991
면적	Asiatic acid	40298576	면적	Asiatic acid	41520987	면적	Asiatic acid	42795200
함량 (mg/g)		5.16	함량 (mg/g)		5.31	함량 (mg/g)		5.48

③ 4주차

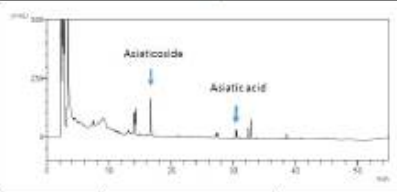
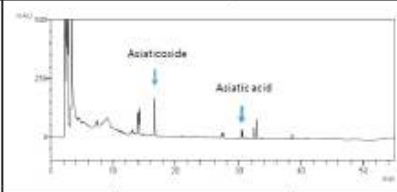
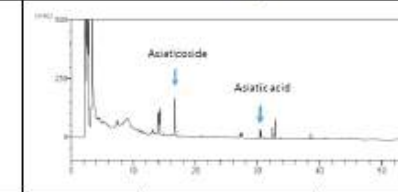
- 정제 4주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.05 mg/g, Asiatic acid 평균 5.15 mg/g으로 분석되었음

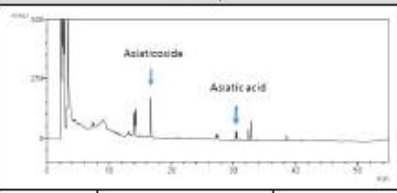
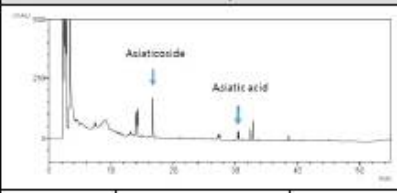
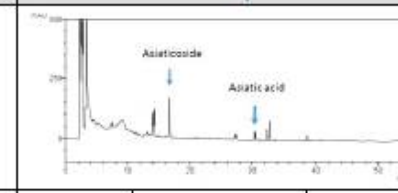
3.3. 4주차 분석결과

Chromatogram(152/304ppm)				
Asiaticoside			Asiatic acid	
표준품명	농도 (ppm)	검출농도 (ppm)	면적 (Area)	검량곡선
Asiaticoside	19	19.48	33145491	
	38	38.50	65881452	
	76	79.22	130814587	
	152	153.16	260489511	
	304	304.89	514412985	
	R ²	1.0000		
Asiatic acid	19	17.48	32187410	
	38	35.92	64512896	
	76	79.54	140985412	
	152	153.16	270043694	
	304	302.88	532489004	
	R ²	1.000		

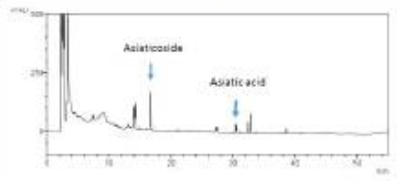
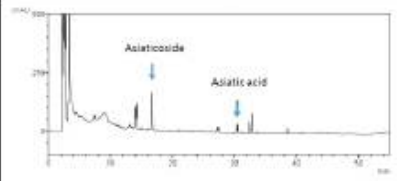
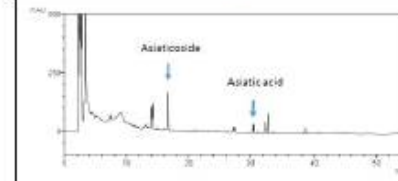
병풀추출물_정제								
1회			2회			3회		
면적		107650510	면적		106249910	면적		105412698
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.21	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.03	함량 (mg/g)	Asiaticoside	13.92
면적		41210809	면적		42008963	면적		40092665
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.17	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.27	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.02

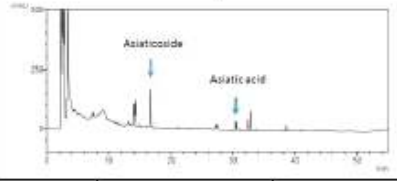
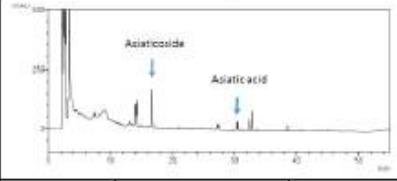
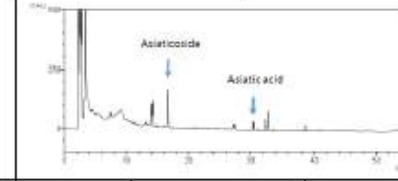
- 연질 4주차 분석 결과 Asiaticoside 평균 14.09 mg/g, Asiatic acid 평균 5.19 mg/g, 액상 4주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.17 mg/g Asiatic acid 평균 5.27 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_연질								
1회		2회		3회				
								
면적	Asiaticoside	108542775	면적	Asiaticoside	106572050	면적	Asiaticoside	104952418
함량 (mg/g)		14.34	함량 (mg/g)		14.08	함량 (mg/g)		13.86
면적	Asiatic acid	40984977	면적	Asiatic acid	41338951	면적	Asiatic acid	41822936
함량 (mg/g)		5.14	함량 (mg/g)		5.18	함량 (mg/g)		5.25

병풀추출물_액상								
1회		2회		3회				
								
면적	Asiaticoside	108422109	면적	Asiaticoside	104220190	면적	Asiaticoside	109242913
함량 (mg/g)		14.32	함량 (mg/g)		13.76	함량 (mg/g)		14.44
면적	Asiatic acid	42010985	면적	Asiatic acid	42109872	면적	Asiatic acid	41975685
함량 (mg/g)		5.27	함량 (mg/g)		5.28	함량 (mg/g)		5.27

- 분말 4주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.35 mg/g Asiatic acid 평균 5.23 mg/g,
젤리 4주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.08 mg/g Asiatic acid 평균 5.14 mg/g으로
분석되었음

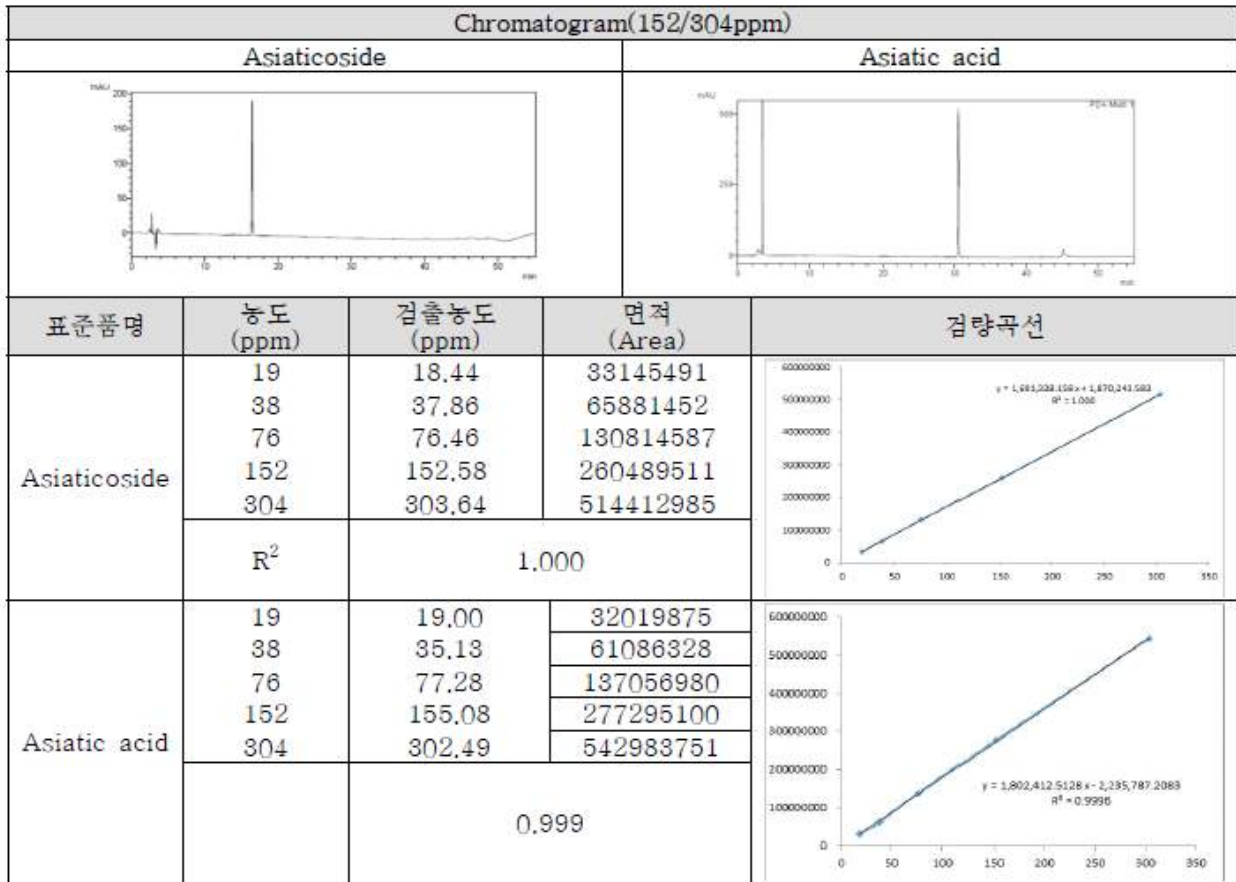
병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	109707655	면적	Asiaticoside	107456241	면적	Asiaticoside	108621098
함량 (mg/g)		14.60	함량 (mg/g)		14.19	함량 (mg/g)		14.35
면적	Asiatic acid	41183752	면적	Asiatic acid	41803759	면적	Asiatic acid	42010980
함량 (mg/g)		5.16	함량 (mg/g)		5.25	함량 (mg/g)		5.27

병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	105014973	면적	Asiaticoside	107520419	면적	Asiaticoside	107449241
함량 (mg/g)		13.866	함량 (mg/g)		14.203	함량 (mg/g)		14.194
면적	Asiatic acid	41826973	면적	Asiatic acid	40921037	면적	Asiatic acid	40195830
함량 (mg/g)		5.25	함량 (mg/g)		5.13	함량 (mg/g)		5.04

④ 8주차

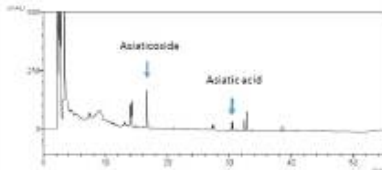
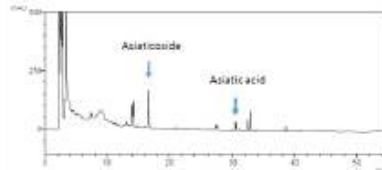
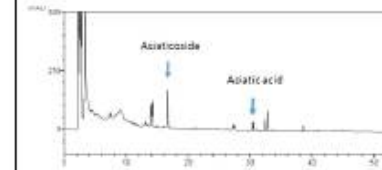
- 정제 8주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.30 mg/g, Asiatic acid 평균 5.36 mg/g으로 분석되었음

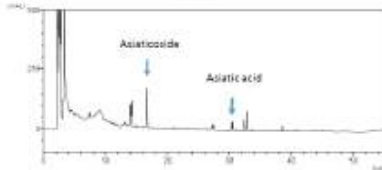
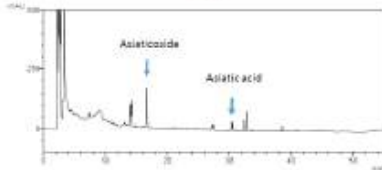
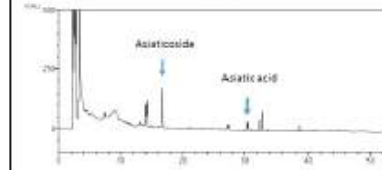
3.4. 8주차 분석결과



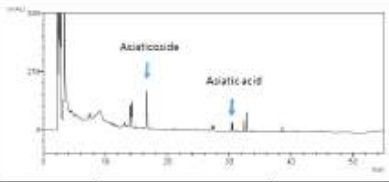
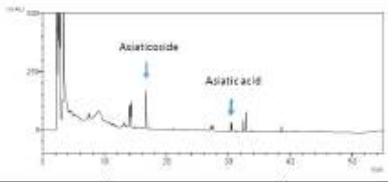
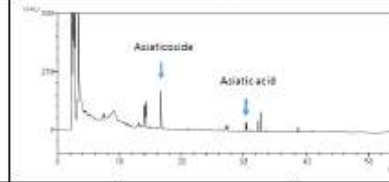
병플추출물_정제								
1회		2회		3회				
면적		107624954	면적		108204959	면적		107404990
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.28	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.37	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.26
면적		40198245	면적		39856928	면적		40201693
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.38	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.33	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.38

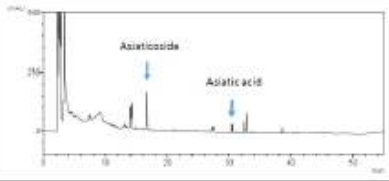
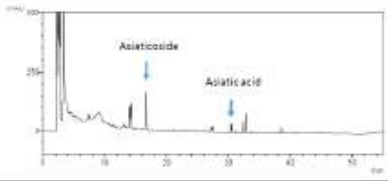
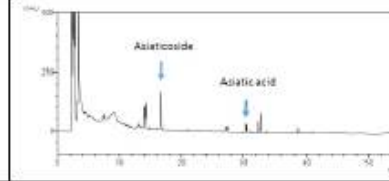
- 연질 8주차 분석 결과 Asiaticoside 평균 14.03 mg/g, Asiatic acid 평균 5.34 mg/g, 액상 8주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.29 mg/g Asiatic acid 평균 5.28 mg/g으로 분석되었음

병플추출물_연질								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	106874664	면적	Asiaticoside	104209719	면적	Asiaticoside	105997103
함량 (mg/g)		14.19	함량 (mg/g)		13.83	함량 (mg/g)		14.07
면적	Asiatic acid	39852412	면적	Asiatic acid	40010368	면적	Asiatic acid	39910879
함량 (mg/g)		5.93	함량 (mg/g)		5.95	함량 (mg/g)		5.94

병플추출물_액상								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	107109573	면적	Asiaticoside	105832107	면적	Asiaticoside	109876315
함량 (mg/g)		14.22	함량 (mg/g)		14.05	함량 (mg/g)		14.60
면적	Asiatic acid	38952100	면적	Asiatic acid	40184766	면적	Asiatic acid	39175620
함량 (mg/g)		5.22	함량 (mg/g)		5.98	함량 (mg/g)		5.25

- 분말 8주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.29 mg/g Asiatic acid 평균 5.38 mg/g,
젤리 8주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.16 mg/g Asiatic acid 평균 5.34 mg/g으로
분석되었음

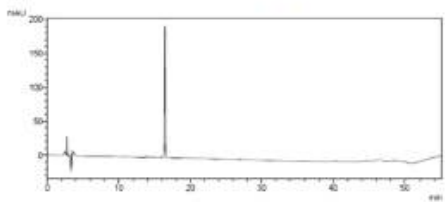
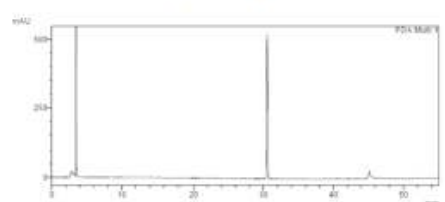
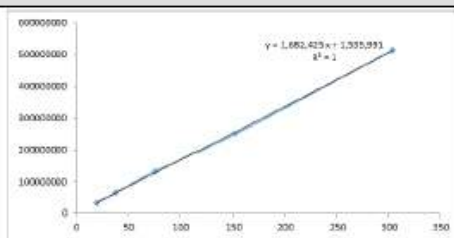
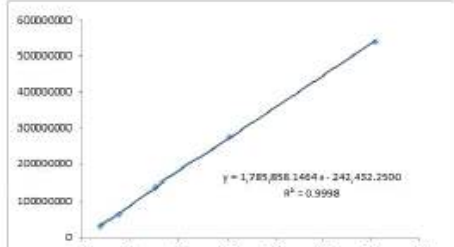
병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	105974562	면적	Asiaticoside	108109712	면적	Asiaticoside	108840890
함량 (mg/g)		14.07	함량 (mg/g)		14.36	함량 (mg/g)		14.46
면적	Asiatic acid	40382094	면적	Asiatic acid	40219876	면적	Asiatic acid	40019376
함량 (mg/g)		5.40	함량 (mg/g)		5.38	함량 (mg/g)		5.35

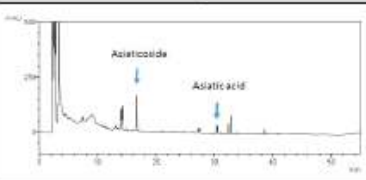
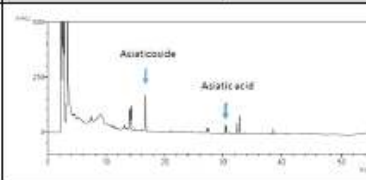
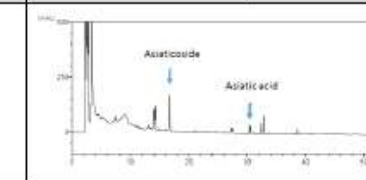
병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	107624412	면적	Asiaticoside	106279545	면적	Asiaticoside	106987454
함량 (mg/g)		14.292	함량 (mg/g)		13.975	함량 (mg/g)		14.206
면적	Asiatic acid	40019802	면적	Asiatic acid	39568209	면적	Asiatic acid	40102973
함량 (mg/g)		5.35	함량 (mg/g)		5.30	함량 (mg/g)		5.37

⑤ 12주차

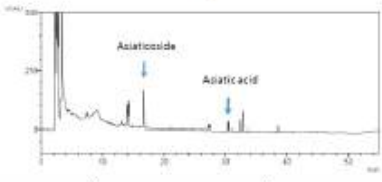
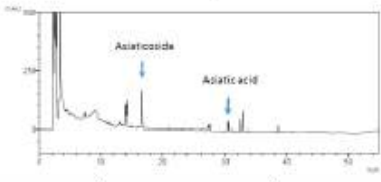
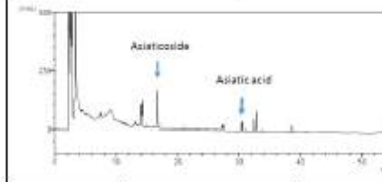
- 정제 12주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.36 mg/g, Asiatic acid 평균 5.29 mg/g으로 분석되었음

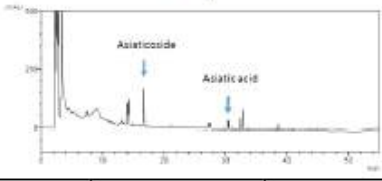
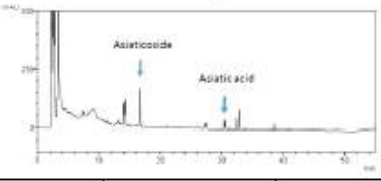
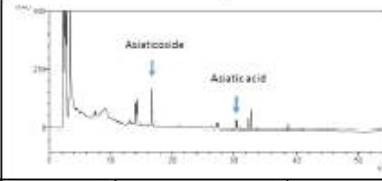
3.5. 12주차 분석결과

Chromatogram(152/304ppm)				
Asiaticoside			Asiatic acid	
				
표준품명	농도 (ppm)	검출농도 (ppm)	면적 (Area)	검량곡선
Asiaticoside	19	18.66	32944879	
	38	38.38	66122455	
	76	78.37	133398456	
	152	148.37	251166878	
	304	305.19	514995387	
	R ²	1.000		
Asiatic acid	19	18.17	32210985	
	38	36.08	64200709	
	76	78.44	139852674	
	152	153.23	273408284	
	304	303.06	540985635	
	R ²	0.999		

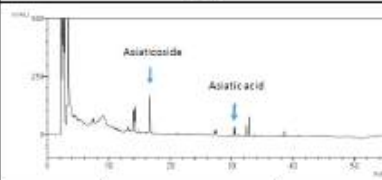
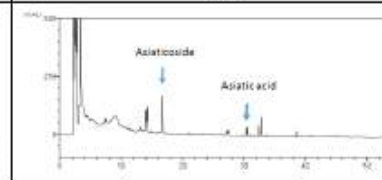
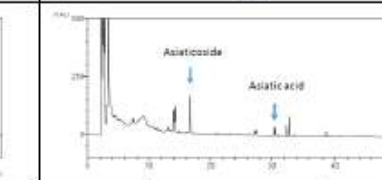
병풀추출물_정제								
1회		2회		3회				
								
면적		107459102	면적		105829040	면적		108910501
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.39	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.10	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.59
면적		41089575	면적		40985635	면적		41268977
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.29	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.27	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.31

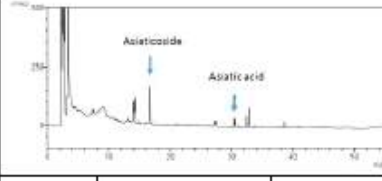
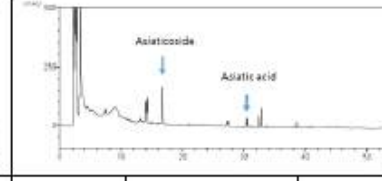
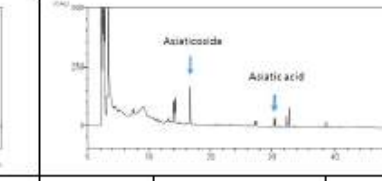
- 연질 12주차 분석 결과 Asiaticoside 평균 14.26 mg/g, Asiatic acid 평균 5.25 mg/g, 액상 12주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.32 mg/g Asiatic acid 평균 5.24 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_연질								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	106756240	면적	Asiaticoside	106708967	면적	Asiaticoside	107011268
함량 (mg/g)		14.16	함량 (mg/g)		14.29	함량 (mg/g)		14.83
면적	Asiatic acid	40198563	면적	Asiatic acid	41226853	면적	Asiatic acid	40985737
함량 (mg/g)		6.17	함량 (mg/g)		6.30	함량 (mg/g)		6.27

병풀추출물_액상								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	106179660	면적	Asiaticoside	107692060	면적	Asiaticoside	106987266
함량 (mg/g)		14.22	함량 (mg/g)		14.41	함량 (mg/g)		14.33
면적	Asiatic acid	40187632	면적	Asiatic acid	40764962	면적	Asiatic acid	41326971
함량 (mg/g)		6.17	함량 (mg/g)		6.24	함량 (mg/g)		6.32

- 분말 12주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.29 mg/g Asiatic acid 평균 5.38 mg/g, 젤리 12주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.16 mg/g Asiatic acid 평균 5.28 mg/g으로 분석되었음

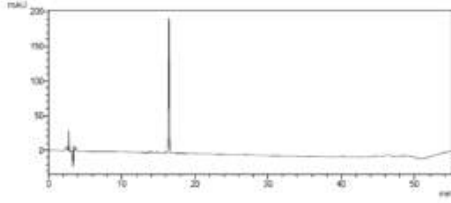
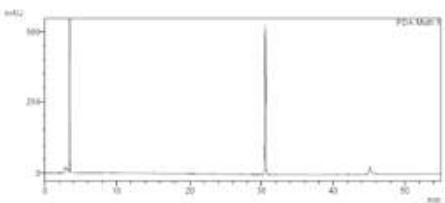
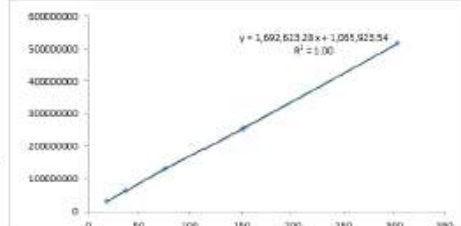
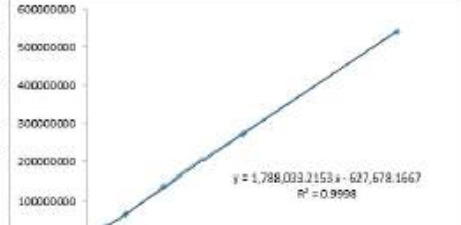
병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	107624952	면적	Asiaticoside	106987562	면적	Asiaticoside	108062591
함량 (mg/g)		14.41	함량 (mg/g)		14.33	함량 (mg/g)		14.47
면적	Asiatic acid	41204198	면적	Asiatic acid	41807096	면적	Asiatic acid	40714685
함량 (mg/g)		5.30	함량 (mg/g)		5.38	함량 (mg/g)		5.24

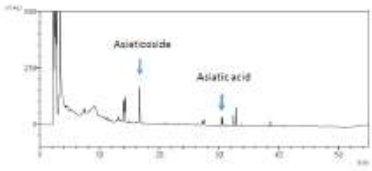
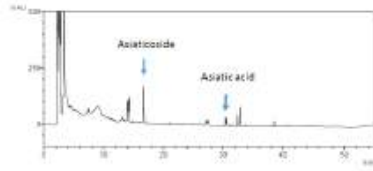
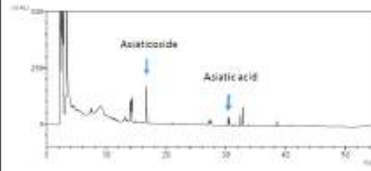
병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	106428095	면적	Asiaticoside	107562402	면적	Asiaticoside	107242010
함량 (mg/g)		14.25	함량 (mg/g)		14.40	함량 (mg/g)		14.36
면적	Asiatic acid	39987105	면적	Asiatic acid	42010620	면적	Asiatic acid	41052197
함량 (mg/g)		5.14	함량 (mg/g)		5.40	함량 (mg/g)		5.28

⑥ 16주차

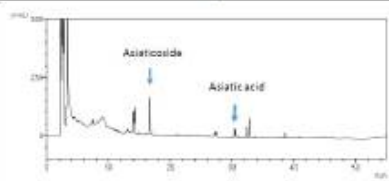
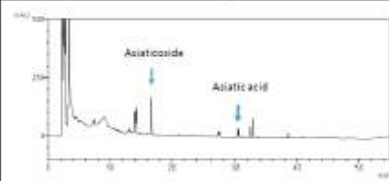
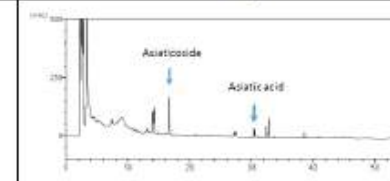
- 정제 16주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.24 mg/g, Asiatic acid 평균 5.38 mg/g으로 분석되었음

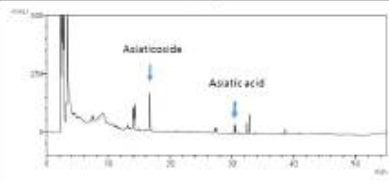
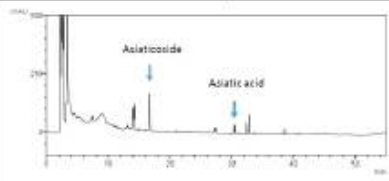
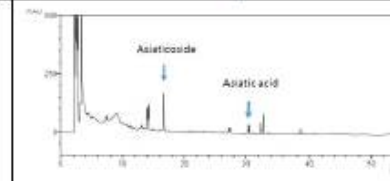
3.6. 16주차 분석결과

Chromatogram(152/304ppm)				
Asiaticoside			Asiatic acid	
				
표준품명	농도 (ppm)	검출농도 (ppm)	면적 (Area)	검량곡선
Asiaticoside	19	18.66	33139150	
	38	38.38	64789954	
	76	78.37	132879459	
	152	148.37	254788212	
	304	305.19	516687954	
	R ²	1.000		
Asiatic acid	19	18.17	31785627	
	38	36.08	64065812	
	76	78.44	138975610	
	152	153.23	274198562	
	304	303.06	540987562	
	R ²	0.999		

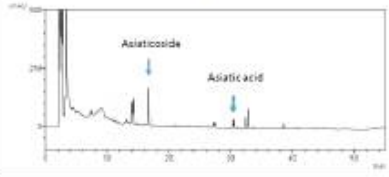
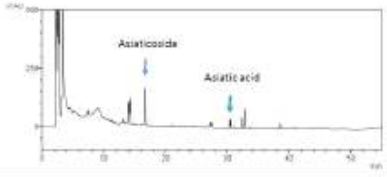
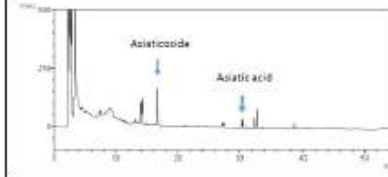
병풀추출물_정제								
1회		2회		3회				
								
면적	Asiaticoside	106750967	면적	Asiaticoside	106951261	면적	Asiaticoside	106861268
함량 (mg/g)		14.14	함량 (mg/g)		14.30	함량 (mg/g)		14.29
면적	Asiatic acid	41689610	면적	Asiatic acid	41624089	면적	Asiatic acid	41018684
함량 (mg/g)		5.40	함량 (mg/g)		5.38	함량 (mg/g)		5.32

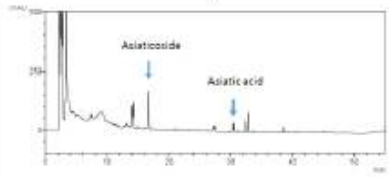
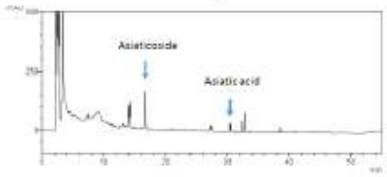
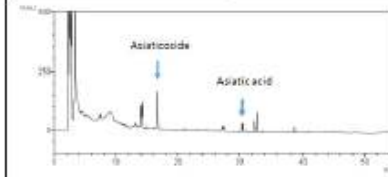
- 연질 16주차 분석 결과 Asiaticoside 평균 14.17 mg/g, Asiatic acid 평균 5.32 mg/g, 액상 16주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.12 mg/g Asiatic acid 평균 5.27 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_연질								
1회			2회			3회		
								
면적		106867129	면적		106562939	면적		106519208
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.16	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.11	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.24
면적		40987376	면적		41209876	면적		40892162
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.31	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.34	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.30

병풀추출물_액상								
1회			2회			3회		
								
면적		106298762	면적		106068621	면적		106696426
함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.08	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.04	함량 (mg/g)	Asiaticoside	14.26
면적		40786129	면적		40874698	면적		40108732
함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.29	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.30	함량 (mg/g)	Asiatic acid	5.20

- 분말 16주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.22 mg/g Asiatic acid 평균 5.32 mg/g, 젤리 16주차 분석결과 Asiaticoside 평균 14.09 mg/g Asiatic acid 평균 5.30 mg/g으로 분석되었음

병풀추출물_분말								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	105688746	면적	Asiaticoside	106081768	면적	Asiaticoside	107276864
함량 (mg/g)		14.12	함량 (mg/g)		14.18	함량 (mg/g)		14.34
면적	Asiatic acid	41028419	면적	Asiatic acid	40705692	면적	Asiatic acid	41268987
함량 (mg/g)		5.82	함량 (mg/g)		5.28	함량 (mg/g)		5.85

병풀추출물_젤리								
1회			2회			3회		
								
면적	Asiaticoside	105292416	면적	Asiaticoside	105924961	면적	Asiaticoside	105076984
함량 (mg/g)		14.076	함량 (mg/g)		14.14	함량 (mg/g)		14.04
면적	Asiatic acid	40842196	면적	Asiatic acid	41074626	면적	Asiatic acid	40756689
함량 (mg/g)		5.90	함량 (mg/g)		5.93	함량 (mg/g)		5.29

제 3 절. 연구개발 성과

1. 정량적 성과목표 대비 실적

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	5				20	20		20		10			5	2	3	2	2	3	3
최종목표	2	1				3	146 50	360 0	5		3	4	2	4	7	2	3	1	2	2
1차연도	목표								1											
	실적								1					2			1		1	
2차연도	목표	2				1	50		2		1	2	1	2	2	1	2		1	1
	실적	2				1	50		4		1			2	1	3		2	1	
3차연도	목표		1				100		2			2	1	2	3	1	1	1		1
	실적	2			1		42		3			1	0	1.71 4	2	1	0		2	2
소계	목표	2	1		0	1	150		5		1	4	2	4	7	2	3	1	1	2
	실적	4	0		1	1	92		8		1	1	0	1.71 4	6	2	4	0	5	3
종료 1차연도						2	50 0				2								1	
종료 2차연도							100 0	10 0												
종료 3차연도							300 0	50 0												
종료 4차연도							500 0	100 0												
종료 5차연도							500 0	200 0												
소계						2	145 00	360 0			2								1	
합계	2	1				3	146 50	360 0	5		3	4	2	4	7	2	3	1	2	2

(2) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	International conference on progressive pharmscience: technology, research and development	강세찬	2017. 06. 20	Barcelo valencia	Spain (국제학술대회)
2	ISNFF 2017 “The 10 th international conference and exhibition on nutraceuticals & functional foods	정용준	2017. 10. 24	군산 새만금컨벤션 센터	대한민국 (국제학술대회)
3	2018 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	정용준	2018. 06. 29	부산 벅스코	대한민국
4	2018년 한국식품영양과학회	정용준	2018. 10. 31	부산 벅스코	대한민국
5	2019 KoSFoST	정용준	2019. 06. 27	인천 송도 컨벤시아	대한민국
6	2019 KFN	정용준	2019. 10. 25	제주도 컨벤시아	대한민국

(3) 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	병풀 추출물을 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	주식회사 제넨셀	2018. 10.16	10-2018-0122947				1/1
2	간을보다 hepatobiliary 상표 출원	대한민국	주식회사 제넨셀	2018. 11.16	40-2018-0159298				1/1
3	병풀 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	주식회사 제넨셀	2019. 03.08	10-2019-0026779				1/1
4	병풀 추출물을 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	주식회사 제넨셀	2019. 09.03	PCT/KR2019/011310				1/1

(4) 전문 연구 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2017	1					1	1				
2	인력양성	2018	1	2			1	2	3				

(5) 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	기존 제품 개선	국내	눈 및 간건강 고시형 건강기능 식품 사업화	병풀주정 추출분말 함유중 이성형 기능성 고시형 제품의 사업화	주식회 사 제넨 셀	50백만	-	2018	3년
2	자기실시	기존 제품 개선	국내	눈 및 간건강 고시형 건강기능 식품 사업화	병풀주정 추출분말 함유중 이성형 기능성 고시형 제품의 사업화	주식회 사 제넨 셀	42백만	-	2019	2년

(6) 기타

(가) 고용창출: 주관기관 5명, 1협동 위탁기관 3명

(나) 교육 및 컨설팅: 병풀 재배법 교육 2건

(다) 타연구에 활용 1건

(라) 홍보실적 2건, 전시회 참가 3건

(마) 인증: 병풀주정추출분말 원료의 표준화 인증 1건

2. 연구결과

가. 기술적 성과

(1) 신규의 눈 및 간 건강 복합기능성 원료 개발

(가) 동일 규격 원료로 복합기능성을 나타내는 원료의 등재되어 있으나 (예, 헛개나무과병 추출물: 간 건강, 운동수행 능력, 피로개선의 3중 기능성 표시 가능), 눈 건강과 간 건강을 동시에 개선 효과를 나타내는 기능성 원료는 아직 등재된 바 없음

① 눈과 간은 한의학적으로 연결되어 있다 보고되어 있으며, 본 연구개발 원료인 병풀주정추출분말은 전임상 효능 뿐 아니라 인체적용시험에서 유의미한 눈 건강과 간 건강의 개선효과를 나타내었음

(나) 본 사업을 통해 눈 건강 및 간 건강에 대한 기능성 원료로 인정받을 경우 두 항목에 대한 기능성을 표시할 수 있어 고기능성 원료로 특화될 수 있음

① 기능성 원료 개발에 있어 대부분 실패 이유는 인체적용시험에서 유의미한 결과가 나오지 않거나 안전성이 확보되지 않을 때이나, 본 연구개발 원료인 병풀주정추출분말의 경우 눈 건강과 간 건강 개선 인체적용시험 모두 유의미한 결과를 확보하고 있어 기능성 원료 등재에 높은 가능성을 지니고 있음

② 본 연구팀은 눈 및 간 건강 이중기능성의 시장성을 파악하기 위해 2차년도에 고시형 원료 및 병풀주정추출분말 함유 고시형 건강기능식품을 출시한 바 있으며, 충분한 시장성이 파악되어 2중기능성의 고부가가치 상품으로 기대하고 있음

(2) 병풀의 재배 기술 확립

(가) 병풀의 경우 국내산과 수입산의 주요성분 함량이 확연히 달라 본 사업의 병풀주정추출분말의 경우 국내산 병풀만을 사용해야 하며, 추후 사업화를 위해서는 현재 2개 농가 (합천, 충주) 밖에 없는 병풀 농가의 확장이 필요함

① 본 사업의 협동기관인 농업법인(주)트리즈바이오텍은 재배법 확립을 통해 제주도에 서 재배단지 구축을 진행하고 있으며, 현재 고가의 병풀의 사업화를 위해 전략적으로 단가를 낮추는 방안을 고려하고 있음

나. 경제적 성과

(1) 신규의 눈 및 간 건강 복합기능성 원료 개발에 대한 시장 가치

(가) 본 과제의 구성은 주관위탁기관을 제외한 나머지가 모두 기업이며, 각각의 역할이 있어 해당 사업에 대한 전략을 구상하고 있음

① 주관기관: 눈 및 간 건강 기능성 원료 사업

② 1협동기관: 완제품 사업화 (해외 사업 위주)

③ 1협동위탁기관: 국내 최대의 GMP 완제 생산 기업으로 ODM을 통한 완제품 사업화

④ 2협동기관: 병풀 원재료 사업화

(나) 병풀은 의약품 및 화장품 원료로 많이 활용되는 원재료이나 대부분 단가의 문제로 수입되어 지며, 눈 및 간 건강 이중 기능성의 제품의 사업화가 성공적으로 이루어질 경우 6차산업의 발전을 기대할 수 있음 (눈 건강 및 간 건강 건강기능식품 시장: 각각 1,000억원/년)

① 국내산 병풀 원재료 사업화 (건조물 형태: 5~7만원/kg)

② 눈 및 간 건강 기능성 원료 사업화 (각각 추출분말 형태: 20~30만원/kg)

③ 눈 및 간 건강 개별인정형 건강기능식품 사업화 (제품 1달분: 5~8만원/세트)

※ 눈 건강 및 간 건강 2건에 대하여 기능성 원료 인증 시 복합기능성 제시 가능

3. 사업화 성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.92억원
			향후 3년간 매출	100억원
		관련제품	개발후 현재까지	1,000억원
			향후 3년간 매출	3,000억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 1%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 10% 국외 : 0.1%
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 0.1%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1~2		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	100	200
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	5	10
		국외	-	0.5	1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		눈 / 간 건강 이외에 동일규격의 원료의 추가 기능성 연구			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	20	50	
	수 출	-	20	50	

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 최종목표

- (1) 병풀로부터 눈 및 간 건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발 및 사업화 기반구축
 - (가) 국내산 병풀의 활용성 증대를 위한 재배법 확립 및 재배단지 구축 1건
 - (나) 국내산 병풀 추출물의 표준화 (지표성분 함량 기준규격 범위 내, 유해성분 함량 기준치 이하)
 - (다) 눈/간 건강 기능성 자료 확보에 따른 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청 (기능성 자료 2부, 안전성 자료 1부, 작용기전 확보 자료 2부, 원료 표준화 자료 1부, 인체적용 시험 자료 통합 1부 제출) 및 보완대응에 따른 결과물 제시
 - (라) 국내산 병풀추출물을 활용한 고부가가치 기능성 전략 상품 개발 및 산업화
 - ① 눈/간건강 2중 기능성 고시형 건강기능식품
 - ② 눈/간 건강 기능성 원료 및 개별인정형 건강기능식품 제품화
 - 사업 종료 후 개별인정형 건강기능식품 2건 또는 복합기능성 1건 사업화
 - 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 사업화 (1건: 복합기능성 제시 가능)
 - ③ 병풀 재배단지 구축에 따른 원재료 사업화 1건
 - 사업기간 내 재배단지를 구축하여 사업종료 후 사업화 개시
 - 2만평의 농지 확보에 따른 생산량 1톤 목표: 약 3만 세트의 제품 생산 가능

나. 세부목표

- (1) 주요 기능 및 규격
 - (가) 국내산 병풀 추출물 함유 눈/간건강 2중 기능성 고시형 건강기능식품
 - ① 눈건강: 루테인 10~20 mg 함유 (노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줌)
 - ② 간건강: 밀크씨슬 성분 실리마린 130 mg 함유 (간 건강에 도움을 줄 수 있음)
 - ③ 눈/간건강 기능성 보완 부원료 은행잎 추출물 50 mg, 병풀 추출물 50 mg 첨가
 - ※ 혈행개선, 비알코올성 지방간 개선, 시신경세포 및 망막세포 보호 효과 기대 (미적용 기능성)
- (2) 국내산 병풀 추출물로부터 눈 건강 및 간 건강 기능성 원료 신청
 - (가) 눈 건강 및 간 건강 복합 기능성 원료: 병풀주정추출분말 300 mg/day 이상
 - (나) 눈 건강: 황반변성 억제 또는 녹내장 예방 효과
 - (다) 간 건강: 간 기능 개선 또는 비알코올성 지방간 개선 효과 적용
 - (라) 과제기간 내 기능성 원료 신청에 따른 식약처 보완사항 대응 및 결과물 제시
 - (마) 과제 종료 1차년도 기능성 원료 인허가 완료 및 개별인정형 건강기능식품 사업화

2. 연도별 연구목표

가. 1차년도

- (1) 주관연구기관((주)제넨셀) : 병풀추출물의 유효성분 규명 및 지표성분 설정에 따른 분석법 확립
- (2) 주관기관 위탁 (경희대학교): 눈 및 간 건강 in vitro 효능 검증
- (3) 협동연구기관1((주)에이온엘에스) : 제조공정 및 대량생산체계 확립
- (4) 1협동기관 위탁 (코스맥스바이오(주)) : 제조공정 확립에 따른 생산라인 적용
- (5) 협동연구기관2((주)트리즈바이오텍) : 원재료 공급 및 재배법 확립

나. 2차년도

- (1) 주관연구기관((주)제넨셀) : 국내산 병풀추출물의 표준화 검증 (공인인증기관 인증)
- (2) 주관기관 위탁 (경희대학교): 동물모델에서의 눈 및 간 건강 전임상 효능 검증
- (3) 협동연구기관1((주)에이온엘에스) : 건강기능식품 시제품 생산 및 고시형 제품 산업화
- (4) 1협동기관 위탁 (코스맥스바이오(주)) : 건강기능식품 생산 지원
- (5) 협동연구기관2((주)트리즈바이오텍) : 재배농가 확보 및 농가 현장 적용

다. 3차년도

- (1) 주관연구기관((주)제넨셀) : 병풀추출물의 인체내 효능 검증 및 눈 건강 기능성 원료 신청
- (2) 주관기관 위탁 (경희대학교): 병풀추출물 및 유효성분의 눈 및 간 건강 작용기전 규명
- (3) 협동연구기관1((주)에이온엘에스) : 고시형 제품의 수출 전략 수립 및 간 건강 기능성 원료 신청
- (4) 1협동기관 위탁 (코스맥스바이오(주)) : 고시형 제품 및 개별인정형 제품 산업화 지원
- (5) 협동연구기관2((주)트리즈바이오텍) : 재배단지 구축에 따른 원재료 사업화 기반 구축

제 2 절. 목표 달성여부

1. 1차년도 연구개발목표의 달성도

연 차	평가의 착안점 및 기준	가중치 (%)	달성도 (%)
1차년도 (2017년)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀 추출물의 유효성분 규명 및 지표성분 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 눈 및 간 건강 개선 효능의 유효성분 규명 (2종 이상) - 기능성 기반의 지표성분 설정 (최종 1종 설정) - 각 기능성별 유효/지표성분 도출 또는 공동 도출 가능 - 고용창출 1명 	15	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 생병풀과 건조병풀의 지표성분 함량 및 기능성 비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 분석법 개발에 따른 함량 비교 (비교우위 증명) - 눈/간 건강 관련 유효성 비교 (비교우위 증명) - 학술발표 1건 	5	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 간 기능 개선 in vitro 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 간 기능, 지방축적/분해, 염증성 사이토카인 분석 - 학술발표 1건 	20	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 눈 기능 개선 in vitro 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 황반변성 억제 효능 및 시신경세포 보호 효과 검증 - 학술발표 1건 	20	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내산 병풀추출물의 대량생산체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 스케일업에 따른 지표성분 함량 분석 - Lab 스케일 비교 90% 이상 유지 - 최종 제조공정 확립 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 눈/간 건강 이중기능성의 고시형 건강기능식품 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 유통전문판매업 신고 1건 - 제품 생산 계약 및 제품 품목신고 1건 - 시제품 200~500 세트 생산 	20	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀의 표준재배 매뉴얼 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 표준재배 계획 수립 및 재배조건 검토 - 각종 위해요소 관리 	10	100
			100

2. 2차년도 연구개발목표의 달성도

연차	평가의 착안점 및 기준	가중치 (%)	달성도 (%)
2차년도 (2018년)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀 추출물의 표준화 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 분석법 개발에 따른 지표성분 범위 설정 및 원료 규격 설정 - 유해물질 함량 분석 - 한국건강기능식품협회 등의 공인기관 인증 1건 - 유효/지표성분 연구 포함 논문 1편 게재 (1차년도 연계) - 고용창출 1명 	20	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 간 기능 개선 in vivo 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 알코올/oleic acid 유도 알코올성/비알코올성 동물 모델 평가 - 간 기능, 지질 수준, 포도당 대사 관련 마커 분석 - 1차년도 전임상 유효성 연계 논문 1편 게재, 학술발표 1건 - 지식재산권 1건 출원 	10	95
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 눈 기능 개선 in vivo 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 황반변성 유도 / 시신경 손상 동물 모델에서의 개선 효능 검증 - 1차년도 전임상 유효성 연계 논문 1편 게재, 학술발표 1건 - 지식재산권 1건 출원 (3차년도 등록 1건) 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 전임상 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 유전독성 등의 안전성 평가 진행 - GLP 인증기관 시험보고서 1부 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이종기능성 고시형 건강기능식품 제품 생산 및 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 최초 5,000 세트 제작에 따른 사업화 진행 (제품화 1건) - 초기 매출액 5,000만원 예상, 홍보전시 1건 - 고용창출 1명 	20	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인체적용시험용 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용 시험용 시제품 4*50 세트씩 제작 (총 200세트) 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인체적용시험 진입 <ul style="list-style-type: none"> - 눈/간 건강 개선 기능성 검증 프로토콜 개발 - IRB 승인 및 시험대상자 모집, 임상기관 선정 	5	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀의 재배법 확립에 따른 현장 적용 <ul style="list-style-type: none"> - 병풀재배를 위한 지침서 작성 1건, 교육지도 1건 	15	100
			100

3. 3차년도 연구개발목표의 달성도

연차	평가의 착안점 및 기준	가중치 (%)	달성도 (%)
3차년도 (2019년)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 이중기능성 고시형 건강기능식품 제품 생산 및 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 3차년도 10,000 세트 제작에 따른 사업화 진행, 수출 검토 - 매출 1억원 예상 - 고용창출 2명 	20	90
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 간 기능 개선 과학적 근거 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 추출물 및 유효/지표성분의 작용기전 규명 - 식약처 가이드라인 바이오마커 분석 - 타겟 유전자 규명을 통한 작용기전 규명 - 논문 1편 게재, 학술발표 1건 	10	95
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 눈 기능 개선 과학적 근거 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 추출물 및 유효/지표성분의 작용기전 규명 - 식약처 가이드라인 바이오마커 분석 - 타겟 유전자 규명을 통한 작용기전 규명 - 논문 2편 게재, 학술발표 2건 	10	95
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인체적용시험 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 눈/간 건강 개선 결과 통계 분석 - 인체적용시험 결과 보고서 1건 	25	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 눈 건강 기능성 원료 신청 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 표준화 및 기능성 자료 수정보완에 따른 기능성 원료 신청 - 기능성 원료 신청 1건, 식약처 보완대응 결과물 제시 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀추출물의 간 건강 기능성 원료 신청 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 표준화 및 기능성 자료 수정보완에 따른 기능성 원료 신청 - 기능성 원료 신청 1건 	10	100
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 병풀의 재배단지 육성 <ul style="list-style-type: none"> - 주변 농가로의 교육자료 보급 및 재배단지 확보 - 병풀 최적재배를 위한 매뉴얼 제작 1건, 교육지도 1건 	15	100
			100

4. 관련분야 기술발전의 기여도

가. 국내산 병풀 활용

- (1) 병풀은 의약품과 화장품에서 다양하게 활용되는 소재이나, 단가 문제 및 생산량 부족으로 거의 대부분 수입산이 활용되므로, 본 연구를 통해 2중 기능성 소재로 인증을 받을 경우 고부가가치 소재로 국내산 병풀의 활용도 및 생산가치가 증대될 것으로 기대됨
- (2) 수입산 병풀의 경우 잎자루 길이가 작아 국내산 병풀과 다르게 asiaticoside의 함량이 높으나, 눈 건강과 간 건강의 효능을 증대시킬 수 있는 성분은 asiaticoside와 asiatic acid의 비율이 중요하므로 해당 기능성의 발전을 통해 국내산 소재의 우수성을 홍보할 수 있음

나. 신규의 눈 및 간 건강 이중기능성 기능성 원료

- (1) 한의학적으로 “간은 눈으로 통한다”하여 눈과 간의 연관성을 중시하고 있으며, 본 연구 개발 원료의 효능에서 나타난 바와 같이 동일규격으로 눈과 간의 기능을 개선시키는 효능을 나타내었음
- (2) 기존 기능성 원료의 경우 눈과 간의 효능을 동시에 나타내는 원료는 본 연구의 병풀주 정추출분말이 처음이며, 본 연구를 통한 기능성 원료 등재에 성공할 경우 성공적인 사례로 홍보될 수 있음

제 3 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

1. 미달성 목표

가. 정량적 성과 목표 미달성 원인 및 차후대책

(1) 연구팀 구성에 따른 논문 성과 부족 원인 및 해결방안

(가) 본 연구개발 과제는 총 3개의 세부/협동기관, 2개의 위탁기관으로 구성되어 있으며, 그 중 세부/협동기관은 전부 기업으로 구성되어 있고, 주관위탁기관만이 대학으로 기능성 연구를 수행하였음

(나) 본 과제는 사업화를 위한 과제로, 2개의 기능성에 대한 효능 및 기전을 밝혀야 하나, 위탁기관만의 연구로 심도있는 학술적인 연구를 수행하기엔 무리가 있었으며, 인허가 및 사업화를 위한 기능성 연구 위주로 과제를 수행하다보니 미진한 부분이 발생하였음 (투고저널의 문제로 검토 및 게재가 지연되는 부분도 많이 발생함)

- 논문을 통한 과학적 근거 확보는 신규 작용기전 규명보다는 현 시점에 밝혀진 기전을 활용하고자 하였으며, 식약처 기능성 평가 가이드라인을 기반으로 연구개발을 진행함

(다) 논문의 정량적 목표는 SCI 4편, 비SCI 2편으로 현재 망막질환 개선 효능으로 1편이 게재예정이며 (게재예정증명서 취득), 간 건강 전임상 효능으로 2편이 투고중에 있고, 간 기능 개선 인체적용시험 결과로 SCI 논문을 투고 준비하고 있음

(라) 또한, 병풀 지표성분의 함량 변화와 전임상 안전성 시험 결과로 비SCI 논문을 투고할 예정이므로 해당년 안에 설정한 목표치를 달성할 수 있음

(2) 특허 등록 성과 부족 원인 및 해결방안

(가) 현재 본 연구의 특허 출원 건수는 총 4건으로 그 중 망막질환 개선용 조성물의 경우 1년 4개월 정도 지났으며, 1차 보완 후 특이한 거절사유가 없으므로 곧 등록시킬 수 있을 것으로 판단됨

(나) 병풀 성분의 특허 또한 우선 심사로 신청하였으며, 병풀 조성물의 특허가 등록될 경우 추가 등록이 예상됨

(3) 매출 성과 부족 원인 및 해결방안

(가) 2차년도에 고시형 건강기능식품 생산에 따른 초기 매출의 영향으로 2차년도 매출 성과는 달성하였으나, 3차년도 누적 매출량이 적어 최종 성과달성에 미달되었음

(나) 고시형 제품의 경우 판매에 한계가 있어, 추후 개별인정형 기능성 원료 등재 시 해당 매출성과를 달성해야 할 것으로 사료됨

(다) 눈 건강 기능성 원료 등재 시 본 연구팀이자 국내 최대 건강기능식품 GMP 생산 기관인 코스맥스바이오(주)에서 제품 생산을 진행할 것이며, 주관기관과의 원료 독점 계약을 통해 충분히 매출을 달성할 것으로 사료됨

(라) 또한, 간 건강 원료 인증과 해외 판매 (말레이시아 및 인도) 준비를 통해 해당 매출 성과 달성에 만전을 기할 계획임

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 활용방안

1. 연구개발 성과의 활용방안

가. 건강기능식품 제품화/산업화 활용방안 : 약 200억원/년 이상 매출 기대

- (1) 눈/간 건강 개별인정형 건강기능식품의 제품군 : 100억원/년 매출 예상
- (2) 기능성 원료(원료분말 형태) : 각 50억원/년 매출 예상
- (3) 병풀 원재료 : 약 10억원/년 이상 매출 예상
- (4) 국내 및 해외 기술이전 및 수출 : 동남아 등 해외 수출 (100억원/년 매출 기대)

나. 건강기능식품 기능성 원료의 지속적인 사업화를 위해 병풀의 자원 수집, 자원평가 및 생산 체계확립은 환경변화에 대응한 약용자원 보존 및 확대방안에 활용함

- (1) 본 연구결과는 약용자원 분야 기초 및 응용학문 분야의 발전에 활용
- (2) 재배단지 조성에 따른 약용자원의 친환경 생산에 활용함으로써 약용자원 재배기술 발전 및 체계적인 대량 생산이 가능함
- (3) 약용자원 특성판별 및 기원정립을 위한 연구결과는 산업화 자원가치가 높은 약용자원의 기능성 식·의약 소재 개발 및 산업화에 활용할 수 있음

다. 국내에 자생하고 있는 기능성 약용자원들이 소비자들에게 잘 알려지면 기능성 식품으로 출시되었을 때 소비자들의 선호도를 높일 수 있을 것으로 기대

- (1) 특히 근래 급성장하고 있는 기능성 식·의약품 시장은 다양하고 새로운 천연소재의 개발을 필요로 하고 있다는 점에서 경제 산업적 활용성을 가지며, 병풀의 경우 화장품 및 의약품 소재로 활용되기는 하나 건강기능식품으로의 개발은 추진된 바 없으므로 신규 고부가가치 건강기능식품으로 충분한 발전을 이룰 수 있음
- (2) 천연물 자원 특히, 국내산 약용자원의 개발에 기여할 수 있으며, 신약 및 기능성 식품의 개발에 의한 유효물질의 개발로 원료 약품의 손질대체 효과를 기대할 수 있음
- (3) 특히, 신개념의 눈 및 간 건강 이중기능성 컨셉은 최초로 개발되어지는 개별인정형 원료로 소비자의 선호도를 높일 수 있을 것으로 사료됨

라. 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 건강기능식품 산업계의 신제품 개발 발향 등을 고려할 때 기능성 식·의약품의 수요, 특히 노화에 따른 눈 건강과 간 건강 제품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있음

마. 해외에서 수입되는 건강기능식품의 상품 및 원료 대체효과 및 재배농가 소득 증대

- (1) 국내 원료의 우수한 기능성을 인정받은 신소재 개발로 개별인정형 원료 개발, 수입대체 및 수출효과
- (2) 특히, 병풀의 경우 활용도가 높은 소재임에도 불구하고, 국내 여건상 재배가 어려운 소재이며, 이에 따라 거의 전량 수입에 의존하므로 국내 규격에 맞는 재배법 및 생산이 필요함

- (3) FTA 등으로 농·임업의 소득 감소에 대한 대책의 일환으로 지속적으로 정부에서 추진해 온 지역별 특용작물을 이용한 전략적 상품화로 신규 고부가가치 소득 자원 창출 및 재배 농가소득증대가 요구됨

제 2 절. 추가 연구의 필요성

1. 연구개발 완성도 확보를 위한 병풀주정추출분말의 추가 연구

가. 눈 건강 개별인정형 건강기능식품 사업화를 위한 추가 연구의 필요성

- (1) 식약처에 등재된 눈 건강 기능성 원료는 총 11건 (고시형 4건)이나 대부분의 눈 건강 건강기능식품은 루테인 원료를 이용하고 있음 (2017년 매출액 약 357억원)
 - 루테인은 단가가 매우 저렴하고 (10 원/일) 소비자에게 많이 알려져 있다는 장점이 있어 많은 판매업체들이 눈 건강 제품에 루테인을 주원료로 사용함
- (2) 루테인 대체 원료 개발의 필요성
 - 루테인은 90% 이상 수입되어지는 원료로 루테인을 섭취하고 녹황색 채소를 다량 섭취할 경우 오히려 황반변성을 유도하여 눈 건강에 악영향을 준다고 보고되어 있으며, 과량의 루테인 섭취는 폐암 발생을 증가시킨다고 알려져 있음
 - 따라서, 국산 원료의 개발과 루테인을 대체할 수 있는 원료, 또는 저용량의 루테인과 병용섭취 시 시너지 효과를 낼 수 있는 원료의 개발이 시급하다고 판단하였음
- (3) 눈 건강 기능성 원료의 경쟁력 확보를 위한 추가 연구 계획
 - 망막손상 유도 동물모델에서 병풀주정추출분말과 루테인 섭취에 따른 효능 비교 분석 진행 및 마케팅 자료 확보
 - 시험군 설정

시험군	시험물질
정상대조군	-
대조군	망막손상 유도
루테인 섭취군	망막손상 유도 + 루테인 5 mg/kg 투여 (루테인 일일섭취량 20 mg 환산)
병풀주정추출분말 섭취군	망막손상 유도 + 병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여
저용량 루테인+병풀 섭취군	망막손상 유도 + 루테인 2 mg/kg + 병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여

* 섭취 용량 및 시험군 수는 변경될 수 있음

나. 간 건강 개별인정형 건강기능식품 사업화를 위한 추가 연구의 필요성

- (1) 식약처에 등재된 간 건강 기능성 원료는 총 11건 (고시형 1건)이나 대부분의 간 건강 건강기능식품은 밀크씨슬 원료를 이용하고 있음 (2017년 매출액 약 1,042억원)
 - 밀크씨슬은 소비자에게 친숙한 원료로 많이 판매되고 있으나 동등성 이상의 효능을 가지고 있는 국산 원료 개발 시 간 건강 건강기능식품 시장을 잠식할 수 있다는 장점이 있음

(2) 밀크씨슬 대체 원료 개발의 필요성

- 밀크씨슬의 판매액은 전체 간 건강 건강기능식품 제품의 80% 이상을 차지하고 있으나, 밀크씨슬의 경우 알코올성 간 손상에 대한 개선 효능으로 비알코올성 간질환에 대한 효능은 미비하다고 알려져 있음
- 따라서, 국산 원료의 개발과 알코올 및 비알코올성 간질환에 대한 효능을 가지고 있는 원료의 개발은 간 건강 제품 시장에서 유리하게 작용될 수 있으며, 이에 대한 효능 비교 분석을 통해 밀크씨슬에 대한 우위성을 확보하고자 함

(3) 간 건강 기능성 원료의 경쟁력 확보를 위한 추가 연구 계획

- 급성 간손상 유도 동물모델에서 병풀주정추출분말과 등재된 기능성 원료, 간질환 치료제 섭취에 따른 효능 비교 분석 진행 및 마케팅 자료 확보
- 시험군 설정

시험군	시험물질
정상대조군	-
대조군	간 손상 유도
저용량 병풀주정추출분말 섭취군	간 손상 유도 + 병풀주정추출분말 100 mg/kg 투여
고용량 병풀주정추출분말 섭취군	간 손상 유도 + 병풀주정추출분말 200 mg/kg 투여
Silymarin 섭취군	간 손상 유도 + Silymarin 100 mg/kg 투여
표고버섯균사체 섭취군	간 손상 유도 + 표고버섯균사체 200 mg/kg 투여
UDCA 섭취군	간 손상 유도 + UDCA 25 mg/kg 투여
헛개나무과병추출물 섭취군	간 손상 유도 + 헛개나무과병추출물 500 mg/kg 투여

※ 섭취 용량 및 시험군 수는 변경될 수 있음

2. 식약처 보완사항에 대한 추가 시험

가. 총 아플라톡신 함량 분석

- (1) 눈 및 간건강 기능성 원료 인허가를 위하여 1차 식약처에 병풀주정추출분말에 대한 기능성 원료 신청을 진행하였으며, 1차 보완으로 2019년 5월에 신설된 총 아플라톡신의 함량 검증을 보완사항으로 전달받았음
- 1차 GMP grade 3 batch 원료 및 2차 GMP grade 대량 생산 원료의 총 아플라톡신 함량 검증을 한국기능식품연구원에 의뢰하여 “불검출” 됨을 확인하였으며, 식약처에 본 인증 결과를 제출함

3. 타질환 개선 기능성 규명

가. 동일규격의 타질환 개선 기능성 원료 개발의 필요성

- (1) 병풀은 그 효능이 다양하여 혈행개선, 체지방 조절, 혈중 중성지방 또는 혈중 콜레스테롤 개선 등의 추가 기능성 연구가 필요함
- (2) 특히, 본 연구의 간 기능 개선 인체적용시험에서 유의미하게 혈 중 콜레스테롤과 중성지방을 감소시켰으며, 이에 동일 규격의 추가 기능성 연구를 진행하여 추가 기능성을 확보할 계획임

제 3 절. 기업화 추진방안 및 기술이전 계획

1. 병풀주정추출분말의 기능성 원료 인정을 위한 계획

가. 눈 건강 기능성 원료 인정

- (1) 1차 식약처 사전접수를 통한 보완사항을 통보받아 이에 대한 추가 연구 (총 아플라톡신 함량 등)를 완료하여 재접수 하였음
- (2) 병풀주정추출분말의 인체 내 유효성 및 안전성 등의 중대한 문제가 발생하지 않아 추가 보완사항이 나오더라도 2020년 내 기능성 원료 인증이 가능할 것으로 사료됨

나. 간 건강 기능성 원료 인정

- (1) 눈 건강과 마찬가지로 1차 식약처 사전접수를 통한 보완사항을 통보받아 이에 대한 추가 연구 (총 아플라톡신 함량 등)를 완료하였음
- (2) 현재 간 건강의 경우 논문 게재 시점이 지연되는 문제로 유사원료에 대한 논문 (총 5건)을 기반으로 한 기능성 원료 신청 문서를 작성하였으나, 식약처 보완사항에 대한 대응을 원활히 진행하고자 눈 건강 기능성 원료 신청 후 보완사항 및 논문 게재 일정에 따라 간 건강 기능성 원료를 신청하고자 함
- (3) 병풀주정추출분말의 인체 내 유효성 및 안전성 등의 중대한 문제가 발생하지 않아 추가 보완사항이 나오더라도 2020년 내 기능성 원료 인증이 가능할 것으로 사료됨

2. 사업화 방안

가. 국산 원재료 사업화 방안

- (1) 병풀 재배단지 구축에 따른 물량 확보 및 원재료 가공을 통한 원재료 사업화
 - (가) 병풀원재료 단가 산출: 58,000원~65,000원/kg (안정화 시기 4~5만원/kg)
- (2) 6차 사업 연계 병풀의 사업화 모델 수립 및 추진



나. 국내 약국 유통물 휴베이스물을 통한 제품 유통 및 판매

- (1) 국내 약국 전문 오프라인 유통물인 휴베이스물은 약 500명 이상의 약사 회원을 보유하고 있으며, 개별적인 온라인 주문을 통해 직접 약국에서 판매할 수 있는 시스템을 구축하고 있음
- (2) 현재 본 연구개발을 통해 개발된 “간을보다 hepatobion” 또한 휴베이스물을 통해 판매되고 있으며, 약국에서 판매한다는 장점으로 제품의 신뢰성을 확보할 수 있음



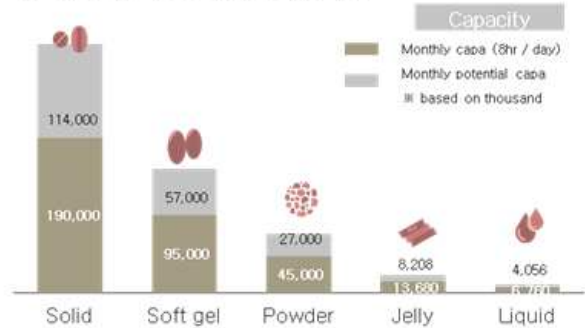
다. 참여기업인 코스맥스바이오(주)의 ODM 제품 생산

- (1) 주관기관에서 눈 건강 기능성 원료 인증을 받을 경우 코스맥스바이오에 독점적인 원료 공급을 하며, 이에 코스맥스바이오(주)는 ODM 제품 생산을 위한 영업 및 생산을 진행하여 고객사에 기능성 원료 및 제품 판매를 진행할 예정임

➢ 코스맥스바이오 매출액 ('15 ~ '19)



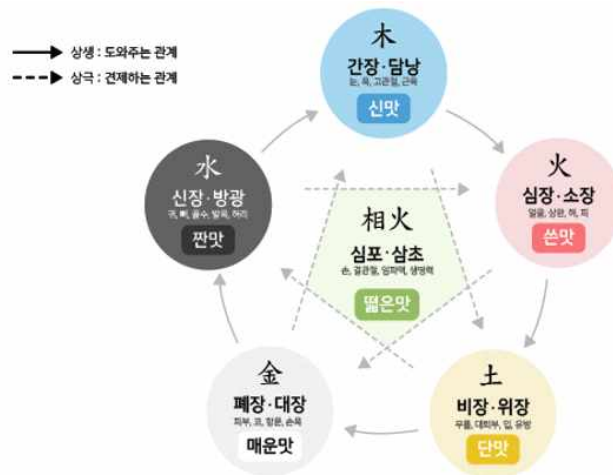
➢ 코스맥스바이오 제형 별 생산 능력



라. 본 과제 수행 중 얻어지는 핵심 특허를 관련 산업체에 라이선싱 아웃함으로써 국내 판매권과 원료 공급권을 확보한다면 국내 관련 산업의 획기적인 성장에 기여할 수 있음

- (1) 수입대체 및 수출 효과 측면에서는 기능성 식·의약품 원료 수입에 대한 대체 효과가 발생하며, 건강기능식품 원료 및 제품의 수입을 통한 해외 의존도를 낮출 수 있는 원료를 확보할 수 있으므로 국내 생산에 따른 수입대체 효과가 빠르게 이루어질 수 있을 전망이다
- (2) 특히 화장품, 의약품/의약외품에 사용되는 병풀은 거의 전량 수입되어지므로 비록 본 사업의 원재료 확보를 위한 재배단지 구축이라 해도 병풀의 수입대체 효과는 매우 클 것으로 예상됨
- (3) 국내 약용자원을 활용하여 대량 재배하므로 농업의 활성화는 물론, 크게는 한국 전통을 부각하는 해외 수출업의 활성화에도 영향을 줄 수 있을 것으로 기대됨
- (4) 본 연구개발 기술은 눈 건강과 간 건강의 이중기능성이므로 각각의 기능성에 대한 자체사업 또는 기술이전을 진행할 수 있으며, 이중기능성으로 제품 판매 및 기술이전 할 수 있음
 - (가) 주관기관 (주)제넨셀의 이중기능성 제품 자체 브랜드화를 통한 제품 판매
 - (나) 눈 및 간 건강 이중기능성 제품의 당위성을 통한 개발 제품 우위성 홍보 및 마케팅 전략 수립

- 간은 흡수된 비타민 A가 90% 저장되는 공간으로, 장기 중 제일 많이 저장되는 곳이며, 비타민 A는 눈의 건강에 아주 중요한 역할을 하므로, 눈이 잘 보이지 않거나 시력이 떨어진다는 것은 간 내 저장된 비타민A가 부족하다는 것을 의미함
- 간의 건강과 눈의 건강은 직결되어 있기에 간을 보면 눈을 알고, 눈을 보면 간을 알 수 있으며, 한의학(동의보감)에서는 ‘눈은 간에 속한다’ 하여 예로부터 ‘목속간(目屬肝)’이라고 표현해 왔음 (속(屬)은 엮다, 잇다, 돌보다, 보충하다 라는 뜻을 지녀 눈(目)의 활력을 보충해주고 돌보는 곳이 간(肝)이라는 의미함)
- 또한 현대의학에서도 눈은 간의 건강을 대변한다고 알려져 있으며, 서양에서 말하는 ‘간 건강에 대해 말하는 눈의 4가지 단서’로 황달, 눈꺼풀황색증 (안검황색증), 안구 건조, 충혈을 제시함



3. 해외 기술이전

가. 본 과제의 협동기관을 통한 해외 판매 또는 기술이전

- (1) 2협동기관 (주)에이온엘에스는 해외 현지법인 보유 및 GNC 아시아 공급기업인 ONI Global과 전략적 제휴를 맺고 있으며, 특히 말레이시아에 제품을 수출하고 있어 본 제품에 대한 전략적 판매가 가능함



나. 인도 해외 판매 또는 기술이전

- (1) 병풀은 인도에서 식품으로 섭취할 만큼 친숙한 소재이며, 본 연구개발을 통해 인도에서 눈/간 2건의 인체적용시험을 진행하였으므로 1차로 인도 식품 시장에 진입할 예정임
- (2) 또한, 해당 원료는 국내산으로 해외 수출이 가능해질 경우 국내 6차 산업의 활성화가 기대됨

붙임. 참고문헌

1. 2017년 사망원인통계, 통계청, 2018
2. 간 건강이란. 식품안전나라
3. 건강기능식품 국내시장 규모동향분석. 한국식품안전관리인증원 2016
4. 건강기능식품 기능성원료 인정현황 2016
5. 건강기능식품 시장 동향 연구성과실용화진흥원 2016
6. 고재성. 비알코올성 지방간질환 대한소화기학회지 2010. 56:6-14
7. 국민건강보험공단 보도자료, 2017
8. 권구정 등. 병풀추출물 및 숯가루, 진주가루 함유 세안제의 안면피부 개선효과 아시안뷰티화장품 학술지 2012. 10(3):581-586
9. 권민철 등. 병풀의 초음파 추출시 용매에 따른 면역활성 증진효과 한국약용작물학회지 2008. 16(5):294-300
10. 김옥태등. 병풀(*Centella asiatica* L. Urban) 식물체 배양을 이용한 Triterpene Glycoside 생산 식물생명공학회지 2002. 29(4):281-285
11. 김옥태 등. 병풀 잎에서 triterpene glycosides의 시기별 함량변화 한국약용작물학회지 2002. 10(5):375-378
12. 김정환. 비알코올성 지방간질환. Korean J Fam Pract 2014. 4:109-115
13. 김찬윤. 녹내장 센브란스병원
14. 김하나 등. 바다제비집과 병풀 복합발효추출물의 피부진정 효과 아시안뷰티화장품학술지 2013. 11(4):721-728
15. 김하윤. 녹내장, 조기발견 치료하면 실명 피할 수 있다. 헬스조선 2016
16. 노인성 황반변성 세브란스병원 안과 2019
17. 녹내장 삼성서울병원 안과 2014
18. 눈 및 간건강 건강기능식품 생산기관현황. 한국식품안전관리인증원 2016
19. 대한소화기학회 비알코올성 지방간 2012
20. 로하스피아 루테인
21. 식품의약품안전처 고시형원료 개정 2017
22. 심재역. 노인성 실명질환 녹내장 20~ 30대를 노린다. 서울신문 2015
23. 안압이상과 녹내장 가톨릭대학교 서울성모병원 평가증진센터
24. 암 치료에 도움이 되는 항암본초. 의약컬럼 2016
25. 양진진. 녹내장이란 2014
26. 양금덕(청년 의사). 망막질환진료비 매년 11.7% 증가 2017
27. 이강태 등. 인간진피섬유아세포에서 병풀(*Centella asiatica*)과 엽산(Folic acid)을 주성분으로 하는 복합발효추출물과 Phytosphingosine-1-phosphate의 복합처리의 산화적 스트레스 보호 시너지효과 아시안뷰티화장품학술지 2014. 12(6):853-858
28. 이영선, 정원일. 알코올성 갈질환의 새로운 치료타겟: 대한간학회추계 2014
29. 이해나. 실명 부르는 “망막질환”, 80%가 50대 이상 헬스조선 2017
30. 이현정. 3대 실명질환 젊다고 안심하면 안 된다. 헬스조선 2017
31. 임수. 비알코올성 지방간의 역학 및 질병 발생 관련 유전자 J Korean Diabetes. 2014. 15

(2):71-75

32. 정경인. 은행잎 추출물 어떻게 섭취할까? 헬스조선 2018
33. 정완교. 대한간학회: 간질환에서 의료 및 사회적 비용평가 2014
34. 조백건. LPS 매개 염증 유발 모델인 RAW 264.7 세포를 이용한 병풀 (*Centella asiatica*)의 항염 효과 규명과 기전연구 경희대학교박사학위논문 2009
35. 조춘희 등. 병풀(*Centella asiatica*) 추출물을 이용한 20~50대 여성의 두피 홍반 개선 효과 아시안뷰티화장품학술지 2014. 12(6):921-927
36. 최철수. 인슐린저항성의 발생기전 대한내과학회지 2009. 77(2):171-177
37. 하지혜 등. 병풀 추출물의 식용 나노입자화를 통한 면역 활성 증진. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2009. 17(4):257-265
38. 하지혜 등. 초음파 병행을 통한 병풀의 미백 및 자외선 차단 활성 증진 효과 한국약용작물학회지 2010. 18(2):79-85
39. 허원희. 비알콜성 지방간질환의 최신연구동향. 2018
40. 황영훈. 한국녹내장학회 2018
41. Antony et al. Hepatoprotective effect of *Centella asiatica* in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. Indian J Pharm Sci. 2006. 68(6):772-776
42. Anukunwithaya et al. Pharmacokinetics of a Standardized Extract of *Centella asiatica* E Ca 233 in Rats. Planta Med 2017. 83(8):710-717
43. Chauhan and Singh. Acute and Subacute Toxicity study of the Acetone Leaf extract of *Centella asiatica* in Experimental Animal Models. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012. S511-S513
44. Choi et al. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. Mol Med Rep. 2016. 14:4521-4528
45. Deshmane et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. J Interferon Cytokine Res. 2009. 29(6):313-326
46. Deshpande et al. Preclinical Safety Assessment of Standardized Extract of *Centella asiatica* (L.) Urban Leaves. Toxicol Int. 2015. 22(1):10-20
47. Ghosh et al. The ameliorating effect of *Centella asiatica* ethanolic extract on albino rats treated with isoniazid. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2017. 28(1):67-77
48. Gopi et al. Asiaticoside: Attenuation of rotenone induced oxidative burden in a rat model of hemiparkinsonism by maintaining the phosphoinositide-mediated synaptic integrity. Pharmacol Biochem Behav. 2017. 155:1-15
49. Gray et al. *Centella asiatica* attenuates A β -induced neurodegenerative spine loss and dendritic simplification. Neurosci Lett. 2017. 646:24-29
50. Grimm and Willmann. Hypoxia in the Eye: A Two-Sided Coin. High Altitude Medicine & Biology. 2012. 13(3):169-175
51. Hashim. *Centella asiatica* in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect. Int Food Res J. 2011. 18(4):1215-1222
52. Hashim et al. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. Molecules. 20

11. 16:1310–1322
53. Hengjumrut et al. Comparative pharmacokinetics between madecassoside and asiaticoside presented in a standardised extract of *Centella asiatica*, ECa 233 and their respective pure compound given separately in rats. *Xenobiotica* 2018. 48(1):18–27
54. Hinson et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2010. 196:369–405
55. Holz et al. Fundus Autofluorescence and Development of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001. 42(5): 1051–1056
56. Hou et al. Burn wound healing properties of asiaticoside and madecassoside. *Exp Ther Med*. 2016. 12(3):1269–1274
57. Huang et al. Asiatic Acid Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Akt/GSK-3 β /HIF-1 α Signaling in Rat H9c2 Cardiomyocytes. *Molecules*. 2016. 21(9):1248
58. Huang et al. Glucose-mediated cytoprotection in the gut epithelium under ischemic and hypoxic stress. *Histol Histopathol*. 2017. 32:543–550
59. Jana et al. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. *Nepal Med Coll J*. 2010. 12(1):8–11
60. Jatayu et al. Antioxidant Effect of *Centella asiatica* Ethanolic Extract to Superoxide Dismutase (SOD) Level on *Cyprinus carpio* Liver. *Res J Life Sci*. 2018. 5(3):163–172
61. Kane et al. Acetaminophen hepatotoxicity in mice: Effect of age, frailty and exposure type. *Exp Gerontol*. 2016. 73:95–106
62. Kumari et al. In vitro and In vivo Antioxidant, Anti-hyperlipidemic Properties and Chemical Characterization of *Centella asiatica* (L.) Extract. *Front Pharmacol*. 2016. 7:400
63. Lancaster et al. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Arch Toxicol*. 2015. 89(2):193–199
64. Lee et al. Asiatic acid inhibits pulmonary inflammation induced by cigarette smoke. *Int Immunopharmacol*. 2016. 39:208–217
65. Li et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015. 16(11):26087–26124
66. Lin et al. Synergistic combinations of five single drugs from *Centella asiatica* for neuronal differentiation. *Neuroreport*. 2017. 28(1):23–27
67. Mannu. Retinal phototransduction. *Neurosciences*. 2014. 19(4):275–280
68. Nakajima et al. Photoreceptor Apoptosis Induced by a Single Systemic Administration of N-Methyl-N-Nitrosourea in the Rat Retina. *Am J Pathol*. 1996. 148(2):631–641
69. Nataraj et al. Neurotrophic Effect of Asiatic acid, a Triterpene of *Centella asiatica* Against Chronic 1-Methyl 4-Phenyl 1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine Hydrochloride/Probenecid Mouse Model of Parkinson's disease: The Role of MAPK, PI3K-Akt-GSK3 β and mTOR Signalling Pathways. *Neurochem Res*. 2017. 42(5):1354–1365
70. NBJ'S global supplement & nutrition industry report, *Nutrition Business Journal*. 2014
71. Orugantl et al. Safety Assessment of *Centella asiatica* in albino rats. *Phcog J*. 2010. 2(16):5–13

72. Palczewski. G Protein - Coupled Receptor Rhodopsin. *Annu Rev Biochem.* 2006. 75:43-67
73. Puttarak et al. Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb. on cognitive function and mood related outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scientific Reports.* 2017. 7:10646
74. Qi et al. Asiatic acid enhances Nrf2 signaling to protect HepG2 cells from oxidative damage through Akt and ERK activation. *Biomed Pharmacother* 2017. 88:252-259
75. Siddique et al. Asiatic acid attenuates pre-neoplastic lesions, oxidative stress, biotransforming enzymes and histopathological alterations in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. *Toxicol Mech Methods.* 2017. 27(2):136-150
76. Sivakumar et al. Hepatoprotective activity of *Centella asiatica* linn. against paracetamol induced liver damage in experimental animals. *Emer Life Sci Res.* 2019. 4(1): 19-26.
77. Sparrow et al. DNA Is a Target of the Photodynamic Effects Elicited in A2E-Laden RPE by Blue-Light Illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003. 44(5):2245-2251
78. Thapa and Walia. Liver function tests and their interpretation. *Indian J Pediatr.* 2007. 74(7):663-671
79. WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 1: Herba Centellae.
80. Assessment report on *Centella asiatica* (L.) Urban, herba. European Medicines Agency. 2010
81. Woolbright and Jaeschke. Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *J Hepatol.* 2017. 66(4):836-848
82. Wu et al. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria. *Acta Pharm Sin B.* 2017. 7(1):65-72
83. Xavier and Umadevi. Antioxidant Effect of *Centella asiatica* Ethanolic Extract to Superoxide Dismutase (SOD) Level on *Cyprinus carpio* Liver. *Int Res J Pharm.* 2014. 5(12):929-931
84. Yang et al. Madecassic Acid protects against hypoxia-induced oxidative stress in retinal microvascular endothelial cells via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress. *Biomed Pharmacother.* 2016. 84:845-852
85. Zhao et al. Mechanisms and Methods in Glucose Metabolism and Cell Death. *Methods Enzymol.* 2008. 442:439-457
86. Zheng et al. In vitro and In vivo Anti-Helicobacter pylori Activities of *Centella asiatica* Leaf Extract. *Prev Nutr Food Sci.* 2016. 21(3):197-201.

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.