보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개( ), 비공개(O), 발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003044-01

간 건강 개선 기능의 개똥쑥 추출물을 이용한 신규 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상용화

최종보고서

2020. 03. 30.

주관연구기관 / ㈜성균바이오텍
협동연구기관 / ㈜지앤피바이오사이언스
위탁연구기관 / 성균관대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'간 건강 개선 기능의 개똥쑥 추출물을 이용한 신규 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상용화'(연구개발 기간 : 2017. 06. 15. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2020. 03. 18.

주관연구기관명 : ㈜성균바이오텍 (대표자) 김현석 (인)

협동연구기관명 : ㈜지앤피바이오사이언스 (대표자) 박수진, 호성현 (인)

참 여 기 관 명 : ㈜성균바이오텍 (대표자) 김현석 (인)

㈜지앤피바이오사이언스 (대표자) 박수진, 호성현 (인)

주관연구기관책임자: 김선희

협동연구기관책임자: 박수진

참 여 기 관 책임자: 김현석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117053-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.06.15. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	1/1
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	간 건강 개선 기능의 개똥쑥 추출물을 이용한 신규 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상용화			
연 구 책 임 자	김선희	해당단계 참여연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 750,000천원 민간: 252,000천원 계: 1,002,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 750,000천원 민간: 252,000천원 계: 1,002,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	㈜성균바이오텍 기업부설연구소			참여기업명	㈜성균바이오텍 ㈜지앤피바이오사이언스
국제공동연구	해당사항 없음			해당사항 없음	
위 탁 연 구	연구기관명: 성균관대학교 산학협력단			연구책임자: 박기문	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁 번호		3									

요약

- 개똥쑥열수추출분말의 *in vitro, in vivo* 시험을 통해 AST, ALT 및 간 조직학적 검사 등 다양한 간 기능 개선 지표의 우수성 확인
- 개똥쑥열수추출물의 생산공정 확립 및 대량생산 완료
- 개똥쑥열수추출물의 주요성분 규명을 통한 지표물질 선정 및 규격 설정 완료
- 개똥쑥열수추출물의 유해요소(중금속, 잔류농약) 분석 및 기준규격 설정
- GLP 기관에서 설치류 단회투여독성, 설치류 반복투여독성, 비설치류 단회투여독성 시험을 통해 개똥쑥열수추출물의 안전성 확인
- 인체적용시험을 통한 개똥쑥열수추출물의 간기능 유효성 확인
- 개별인정 신청 자료 신청 자료 작성
- 상기 안전성 연구, 전임상연구 및 인체적용시험 연구에서 우수한 간기능 개선 유효성을 확인하였으며 상기 결과를 통해 개별인정 획득 가능성이 매우 높은 우수한 결과를 얻었음.

보고서 면수

153면

<요약문>

연구의 목적 및 내용	특허기술을 토대로 개똥쑥 추출물의 간 건강 개선 기능을 검증하기 위한 전임상연구 및 인체적용시험을 실시하고 식약처의 개별인정을 신청함으로써 신규 개별인정형 건강기능식품 상용화의 기반을 마련하고자 함. - 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 원료 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구 - 개똥쑥 추출물의 제형연구 및 인체적용시험용 제품의 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 생물학적 활성 및 작용기전 연구 - 개똥쑥 추출물의 전임상 기능성 연구(동물모델 효력시험): 경쟁원료 대비 동등 이상의 효과 입증 - 개똥쑥 추출물의 전임상 안전성 연구(단회 및 반복투여 독성시험) - 개똥쑥 추출물의 인체적용시험: 대조식품(placebo) 대비 주평가변수에서 통계적으로 유의성 확인 - 신규 건강기능식품 기능성 원료 개별인정
연구개발 성과	- 개똥쑥열수추출분말의 생산공정을 확립하고, 개똥쑥 열수추출분말의 특이적인 6가지 주요성분(1,3-O-dicafferoylquinic acid, scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-dI-O-caffeoy lquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5- di-O-caffeoylquinic acid)을 규명하였으며, 지표성분 및 규격은 scopoletin 1.0 ~ 1.6 mg/g으로 설정하였음. - 개똥쑥열수추출분말의 다양한 *In vitro* 효능평가를 실시한 결과 Raw264.7 세포주에서 nitrite 생성 억제 효과, TNFα 억제 활성, IL-1β 억제 활성, IL-6 억제 활성이 ELISA 및 mRNA발현 및 Real-time PCR에서 확인되었으며, HepG2 세포주에서 지방 축적에 따른 TG, TC 증가를 억제시키고. 주요 성분 5종 의 TG 억제 효과와, 항산화 활성 확인 등이 확인되었음. - 개똥숙열수추출분말의 *In vitro* 효능평가를 실시한 결과 급성 간 손상 동물실험에서 대표적인 간 수치인 AST, ALT 및 간 조직학적 검사, 사망률 확인 결과 대조군 대비 유의적으로 우수한 효과가 확인되었음. 고지방식이 지방간 유도 동물효력시험에서도 AST, ALT, 간 조직학적 평가 등 간 손상 주요지표에서 고지방 식이 급이 마우스대비 유의한 효능이 확인되었음. - GLP 기관에서 설치류 단회투여독성, 설치류 반복투여독성, 비설치류 단회투여독성 시험을 실시한 결과 설치류 단회투여독성시험과 비설치류 단회독성 시험에서 개똥쑥열수추출물의 개략의 치사량은 모두 5g/10.5mL/kg 초과인 것으로 확인되었으며, 설치류 13주 반복투여독성 시험을 통해 확인된 개똥쑥 열수추출물의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두에서 1000mg/5mL/kg 이상으로 확인되었음. 개똥쑥열수추출물의 섭취량은 고형분 기준 480 mg으로 안전성시험결과 매우 안전한 섭취량임을 확인하였음. - 개똥쑥열수추출물의 유해물질 분석결과 잔류농약 58종 대부분 불검출이거나 영향이 없는 수준의 매우 미량이 검출되었으며, 중금속 4종 분석결과 모두 1 mg/kg 이하로 검출되었고, 대장균군 또한 불검출 되어 유해물질 규격에 적합한 것으로 확인되었음. - 간 기능 개선에 미치는 개똥쑥 열수추출분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험을 실시하였음. 분당제생병원 및 삼육서울병원 양기관에서 실시하였으며, 각 기관의 생명윤리위원회(IRB) 승인을 받아 인체적용시험을 진행하였음. 그 결과 개똥쑥열수추출분말을 섭취한 시험군에서 AST와 ALT가 섭취 4주 후와 8주 후 대조군 대비 뚜렷하게 감소하며 전체 피로도가 감소하는 것으로 나타나, 개똥쑥열수추출분말의 섭취가 간 기능을 개선하는 효과가 있음을 확인하였으며, 상기 결과의 최종보고서는 IRB 승인 후 개별인정 신청 제출자료로 사용하여 진행. - 건강기능식품 개별인정 신청 자료로서, 신청원료의 원재료에 관한 자료, 제조공정도, 제조공정에 사용된 물질의 규격서, 신청원료의 제조사 규격서, 기능(지표)성분에 대한 설정근거, 기능(지표)성분의 시험방법, 신청원료의 공인시험기관 성적서 및 raw data, 안전성 자료, 기능성 자료, 국내외 인정 및 사용현황 등의 자료에 관해 CRO와 함께 검토 및 확인을 완료함. 인체적용시험 최종보고서 IRB 승인 후 개별인정 신청을 진행함. - 현 과제의 종료시점에서 개똥쑥열수추출(SPB-201)의 간 건강 개선 기능을 세포와 동물에서의 전임상연구 및 인체적용시험에서 뛰어난 간 기능 개선의 유효성을 확인하였고, 개똥쑥 관련 제품으로는 최초로 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로서 제품화 달성이 확실시 됨.

연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)	- 국내 자생원료인 개똥쑥을 원재료로 사용함으로써 재배 농가를 육성하고 영농조합 또는 재배사업단 조성을 통해 농가의 소득 증대에 기여함. - 일차원적인 수준에 머무르던 쑥 제품을 고부가가치 기능성 제품으로 재탄생시킴으로써 과학적으로 검증되지 않은 제품이 난립하던 시장을 정비하고 재배농가부터 원료업체, 완제업체, 유통업체에 이르기까지 관련 업체의 동반 성장 유도함. - 간 기능 개선 기능성 소재는 고시형 원료인 밀크씨슬과 같이 해외 원료인 경우가 대부분인 문제점을 갖고 있으나, 본 개발을 통해 국내 자생원료인 개똥쑥을 활용한 제품 개발을 통해 수입을 대체할 수 있음. - 개똥쑥열수추출(SPB-201) 제품을 중국 등 해외 시장에 수출함으로써 외화 소득을 증대할 수 있음.

국문핵심어 (5개 이내)	개똥쑥	간 건강	인체적용시험	건강기능식품	개별인정
영문핵심어 (5개 이내)	*Artemisia annua*	Liver health	Human clinical study	Health functional food	MFDS approval

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 6
가. 연구개발 목적 ····· 6
나. 연구개발 필요성 ····· 7
다. 연구개발 범위 ····· 19
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 21
가. 연차별 연구개발 목표 및 결과 ····· 21
나. 연구 결과 ····· 25
1) 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 및 대량생산 ····· 25
2) 전임상 기능성 연구 1 (동물효력시험) ····· 26
3) 개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구(기준 규격 및 시험법 확립과 밸리데이션) ·· 29
4) 추출조건별 활성 비교 ····· 51
5) 원료의 유해물질, 영양성분 분석 및 기준 규격 확립 ····· 57
6) 원료의 작용기전 연구 ····· 70
7) 전임상 안전성 연구 (GLP 설치류 단회투여독성시험) ····· 76
8) 동물효력 시험모델 확립(위탁 : 성균관대학교 산학협력단) ····· 77
9) 전임상 기능성 연구 2 (동물효력시험) ····· 84
10) 인체적용시험 시제품 생산 ····· 90
11) 인체적용시험 개시 ····· 93
12) 주요 성분의 작용기전 연구 ····· 97
13) 전임상 안전성 연구(GLP 비설치류 단회투여독성시험) ····· 109
14) 전임상 안전성 연구(GLP 설치류 13주 반복투여독성시험) ····· 111
15) 인체적용시험계획 수립, CRO 선정 및 인체적용시험 개시 준비 ····· 113
16) 인체적용시험 종료 ····· 120
17) 시제품 생산 및 사업화 ····· 134
18) 원료 및 제품의 안정성 시험 ····· 137
19) CRO 업무관리 ····· 139
20) 개별인정 신청을 위한 자료 검토 ····· 143
21) 개별인정 신청 및 식약처 대응 ····· 147
다. 종합 결론 ····· 147
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 149
4. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 152
붙임. 참고 문헌 ····· 153

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

1) 연구개발 목표

본 연구개발의 목표는 연구기관이 보유한 특허기술(개똥쑥 추출물을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물)을 토대로 개똥쑥 추출물의 전임상 연구 및 임상(인체적용시험) 개발을 진행하여 “간 건강” 개선 기능의 신규 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료를 개발하고 이를 상용화하는 것임.

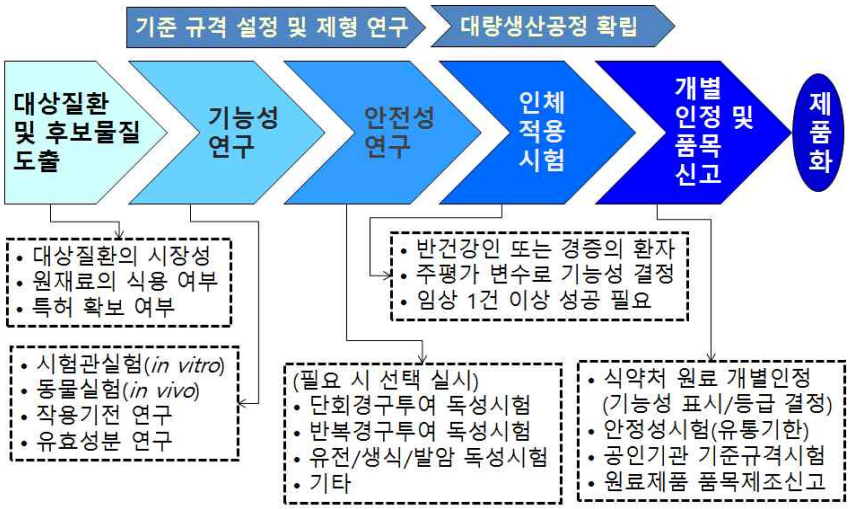
구분	내용
최종목표	“간 건강” 개선 기능을 갖는 개똥쑥 추출물의 전임상 연구, 인체적용시험 및 식약처 개별인정 신청을 완료함으로써 상용화를 위한 제품 개발 달성 - 통상 전임상연구에 18개월 이상, 인체적용시험에 12개월 이상, 개별인정에 9개월 이상 소요됨을 고려할 때 본 과제 기간(31개월) 동안 개별인정을 획득하는 것은 물리적으로 어렵다고 판단되어 본 과제에서는 식약처 개별인정 신청을 목표로 설정함.
세부목표	- 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 원료 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구 - 개똥쑥 추출물의 제형연구 및 인체적용시험용 제품의 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 생물학적 활성 및 작용기전 연구 - 개똥쑥 추출물의 전임상 기능성 연구(동물모델 효력시험): 경쟁 원료 대비 동등 이상의 효과 입증 - 개똥쑥 추출물의 전임상 안전성 연구(단회 및 반복투여 독성시험) - 개똥쑥 추출물의 인체적용시험: 대조식품(placebo) 대비 주평가변수에서 통계적으로 유의성 확인 - 신규 건강기능식품 기능성 원료 개별인정

2) 연구개발 개요

- 본 연구개발은 특허기술인 개똥쑥 추출물을 이용하여 간 건강 개선 기능의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료를 개발함에 있어 핵심적인 과정인 전임상연구와 인체적용시험 실시 및 개별인정 신청에 관한 것임.
- 전임상 연구는 기능성시험, 안전성시험, 생산 및 품질관리연구 등으로 구성되며, 인체적용시험은 간기능지표가 정상치를 상회하는 반건강인을 대상으로 개똥쑥 추출물이 간 기능 개선에 미치는 영향을 확인하기 위한 것임.
- 구체적으로는 개똥쑥 추출물의 최적의 추출공정을 확립하고, 이를 대량생산 한 후 지표성분, 유해물질 등을 분석하고 밸리데이션 과정을 거쳐 기준규격을 확립하고자 함.
- 또한 개똥쑥 추출물을 비알콜성 지방간 및 간 손상 실험동물모델에 경구투여하여 기능성을 평가하고 다양한 *in vitro* 실험을 통해 생물학적 활성 및 작용기전을 연구함과 동시에 GLP 기관에서 단회 및 반복투여를 통해 원료의 안전성(독성)을 평가하고자 함.

- 원료의 기능성 및 안전성 평가 후 제형연구를 거쳐 인체적용시험용 시제품을 제작하고, 임상시험실시기관에서 인체적용시험을 수행하여 개똥쑥 추출물의 인체에서의 기능성과 안전성을 검증하고자 함.
- 인체적용시험 성공 시 간 건강 개선에 건강기능식품 기능성 원료로서 식약처에 개별인정을 신청하고자 함.

<참고: 신규 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료의 개발과정 흐름도>



나. 연구개발의 필요성

1) 연구개발 대상의 국내·외 현황

가) 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황 (출처: 2016 건강기능식품 기능성 원료 인정현황, 식품의약품안전처)

- 건강기능식품 기능성 원료는 고시형과 개별인정형으로 구분됨.
- 고시형 원료/성분은 영양소 28종, 기능성 원료 67종을 포함하여 총 95종이며, 2017년 7월 1일부터 라피노스, 분말한천, 크레아틴, 유단백가수분해물, 상황버섯추출물, 토마토추출물, 곤약감자추출물이 개별인정형에서 고시형으로 추가 전환될 예정임.
- 식약처장이 별도로 인정한 개별인정형 원료는 현재까지 총 263종이며 기능별로는 체지방감소(27종), 혈당조절(22종), 관절/뼈건강(21), 장건강(20), 피부건강(19)의 순임.
- 현재까지 개발된 간 건강 개선용 기능성 원료는 총 10종으로 그 현황은 다음과 같음.

기능성	분류	원료명	보유기업	일일섭취량	섭취시 주의사항	인정등급
간 건강에 도움	고시형	밀크씨슬 추출물	공용	실리마린으로서 130 mg/일	-알레르기 반응이 나타나는 경우에는 섭취 중단 -설사, 위통, 복부팽만 등의 위장관계 장애가 나타나는 경우에는 섭취에 주의	생리활성 2등급

	개별인정형	표고버섯균사체 추출물	마그나스 후디스	1.8 g/일	-확인된 바 없음	생리활성 2등급
		브로콜리 스프라우트분말	풀무원생활 건강	-	-확인된 바 없음	생리활성 3등급
		복분자추출분말	리즈바이오텍	3.15 g/일	-확인된 바 없음	생리활성 2등급
		도라지추출물	(주)비엔씨바이오팜	3 g/일	-임산부, 수유부 섭취 주의 -알레르기 체질이거나 특정 질환이 있는 경우 의사와 상담	생리활성 2등급
		발효울금	한국인스팜(주)	3 g/일	-어린이, 임산부 및 수유부 섭취 주의 -항응고제 복용시 섭취 주의	생리활성 3등급
		표고버섯균사체	(주)HK바이오텍	350 mg/일	-임산부, 수유부 섭취 주의	생리활성 2등급
		유산균발효마늘 추출물	에스케이바이오랜드(주)	1.5 g/일	-확인된 바 없음	생리활성 2등급
알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움		헛개나무 과병추출분말	생명의 나무, 뉴메드	2.46 g/일	-임산부, 수유부는 섭취에 주의	생리활성 2등급
		유산균발효다시마추출물	한국야쿠르트, 마린바이오프로세스	1.5 g/일	-요오드 함량이 높은 식품(해조류, 어패류 등)섭취 시 주의 -갑상선질환 등을 보유하고 있는 사람은 섭취 시 주의 -임산부 및 수유부는 섭취 시 주의	생리활성 2등급

(2) 시장현황(출처: 2015년 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품 안전관리인증원)

- 상용화 제품의 목표시장은 간 건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 시장임.
- 2015년 국내 건강기능식품 시장규모(생산+수입-수출)는 2조 3,291억원으로 가짜 백수오 사건에도 불구하고 일상적인 건강관리에 대한 관심으로 인해 면역제품이나 비타민 등의 소비가 들면서 2014년(2조 52억원)에 비해 16.2%가 증가하였으며, 2011년 이후 지속적으로 성장하는 추세임.

※ 국내 시장규모(억원): 16,855(’ 11)→17,039(’ 12)→17,920(’ 13)→20,052(’ 14)→23,291(’ 15)

※ 국내 생산실적(억원): 13,682(’ 11)→14,091(’ 12)→14,820(’ 13)→16,310(’ 14)→18,230(’ 15)

- 품목별로는 홍삼제품의 생산실적이 6,943억원으로 전체 생산실적(1조 8,230억원)의 38.1%를 차지하여 가장 높은 점유율을 보였으나 2011년 이래 점유율이 점차 감소하고 있으며, 홍삼제품 다음으로는 개별인정형 17.5%(3,195억원), 비타민·무기질 11.4%(2,079억원), 프로바이오틱스 8.7% (1,579억원), 밀크씨슬추출물 3.9%(705억원) 제품 순으로 나타남.
- 개별인정형 건강기능식품의 2015년 생산실적은 3,195억원으로 백수오제품의 실적 급감으로 인해 2014년(3,177억원) 대비 0.6% 증가에 그침.

※ 개별인정형 생산액(%는 전년대비 증가율): (’ 11)1,433억원→(’ 12)1,807억원(26%)→(’ 13)2,324억원(29%)→(’ 14)3,177억원(37%)→(’ 15) 3,195억원(0.6%)

- 개별인정형 건강기능식품의 생산실적을 순위별로 살펴보면 당귀혼합추출물(면역기능)이 714억원으로 1위(22.3%)를 차지하였으며, 백수오등복합추출물(갱년기 여성건강) 380억

(11.9%), 황기추출물등복합물(키 성장) 266억원(8.3%), 헛개나무과병추출분말(간 건강) 255억원(8.0%), 미역 등 복합추출물(체지방 감소) 183억(5.7%) 등의 순으로 나타남.

- 이들 중 “간 건강” 소재(밀크씨슬추출물, 헛개나무과병추출분말)는 전체 건강기능식품의 품목별 순위 및 개별인정형 건강기능식품 생산 순위에서 모두 5위 안에 포함되어 시장을 주도하는 주요 소재임을 알 수 있음.

(3) 경쟁기관현황

- 최근 몇 년간 국내 기업 또는 대학 등 연구기관에 의해 진행되었거나 현재 진행 중인 간 건강 개선용 개별인정형 기능성 원료 개발을 위한 인체적용시험 현황은 질병관리본부에 보고된 시험 기준으로 다음과 같음.

번호	원료명	개발기관	시험기관	인체적용시험 제목	섭취기간 (방문시기)	피험자수
1	NMED-01, NMED-02	(주)뉴메드	세명대학교 제천한방병원	NMED-01과 NMED-02의 간기능 개선에 대한 인체 효능 평가	12주 (0, 6, 12)	120명
2	자색고구마 추출물	이화여자대학교	차의과대학교 분당차병원	간 기능 개선 및 항산화 효과 평가를 위한 자색고구마추출물의 유효섭취용량 설정 인체적용시험	16주 (0, 8, 16)	40명
3	미나리 농축분말	(주)엠에스씨	한림대학교 성심병원	간기능 개선에 미치는 미나리농축분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 6, 12)	38명
4	깻잎추출물	(주)바이오버드	차의과대학교 분당차병원	깻잎추출물의 섭취가 간 건강 및 항산화 능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험	10주 (0, 5, 10)	30명
5	섬오갈피 주정추출물	재단법인 제주테크노파크	아주대학교 병원	섬오갈피주정추출물의 알코올성 간 손상 개선효과와 안전성 확인을 위한 인체적용시험	16주 (0, 8, 16)	69명
6	백년초 열매추출물	㈜엘컴 사이언스	인제대학교 서울백병원, 카톨릭대학교 성빈센트병원	간기능 개선에 미치는 백년초 열매추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 12)	80명
7	지각추출물	(주)뉴트라팜텍	카톨릭대학교 서울성모병원, 성빈센트병원	간기능 개선에 미치는 지각추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험	12주 (-2, 0, 6, 12)	100명
8	피니톨	이화여자대학교	차의과대학교 분당차병원	피니톨의 간 기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용시험	12주 (0, 6, 12)	90명
9	흑미강(표고균사)발효분말	㈜에스티알 바이오텍	고려대학교안산병원	간기능 개선에 미치는 흑미강(표고균사)발효분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 6, 12)	80명

(4) 지식재산권현황

- 본 과제에서 목표로 하는 천연물(개똥쑥) 유래 간 건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발과 관련하여 기반이 되는 기술 특허는 다음과 같음.

번호	특허명	특허권자	출원일/등록일	등록번호	비고
1	개똥쑥 추출물을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물	한국국제대학교 산학협력단	2013년08월16일 2015년07월20일	10-1539289	(주)지앤피바이오사이언스가 전용실시권 확보
2	스코파론의 농도가 일정하게 유지되는 지방간 개선용 인진쑥 음료 조성물의 제조 방법	한국식품연구원	2010년06월17일 2012년07월23일	10-1169217	청구범위가 스코파론을 고농도로 함유한 인진쑥 에탄올추출물로 제조된 음료 조성물로 한정되어 본 과제기술과는 분쟁의 소지가 없음
3	항염증 활성 증진을 위한 인진쑥의 추출방법	한국식품연구원	2012년03월29일 2014년02월25일	10-1369445	청구범위가 항염증 활성을 증진시키기 위한 인진쑥 (*Artemisia capillaris*) 에탄올 추출방법으로 한정되어 본 과제기술과는 분쟁의 소지가 없음
4	항염증 활성을 갖는 쑥으로부터 분리한 수용성 분획물	인제대학교 산학협력단	2005년10월18일 2007년09월19일	10-0761705	쑥의 범위에 *Artemisia iwayomogi, Artemisia selengesis, Artemisia vulgaris, Artemisia argyi, Artemisia asiatica, Artemisia princepsaks* 포함되어 본 과제기술 (*Artemisia annua*)과는 분쟁의 소지가 없음
5	한인진으로부터 추출한 항염증 조성물	덕성여자대학교 산학협력단	2010년04월05일 2012년10월31일	10-1198129	청구범위가 한인진(Artemisia iwayomogi)로부터 분리된 vulgarone B를 유효성분으로 함유하는 항염증 조성물로 한정되어 본 과제기술과는 분쟁의 소지가 없음

- 본 과제의 기반기술인 1번 특허의 전용실시권을 확보함으로서 향후 제품화 달성 시 시장에서 독점적 지위를 확보할 수 있음.
- 개똥쑥의 간 건강 예방 및 간 질환 치료에 관한 특허는 본 과제의 연구기관이 확보한 1번 특허가 유일하므로 본 기술의 상용화로 인해 발생할 수 있는 다른 특허와의 침해나 분쟁의 소지는 거의 없다고 할 수 있음.
- 본 과제에서 개발될 기능성 원료의 경쟁제품으로서 식품원료로 사용 가능한 농산물, 임산물 및 약용작물 등의 추출물 중 간 질환의 예방 및 치료용 조성물로 등록된 국내 특허 현황은 아래와 같음.

번호	특허명	특허권자	출원일/등록일	등록번호	제품화
1	발효마늘추출물을 유효성분으로 포함하는 간 기능 개선용 조성물	㈜에스케이 바이오랜드	2014년03월20일 2015년10월06일	10-1559888	O
2	율피 추출물을 포함하는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	한국생명공학 연구원	2009년01월29일 2012년11월23일	10-1206543	X
3	콩잎 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만, 고지혈증, 동맥경화, 지방간, 당뇨 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 조성물	한국생명공학 연구원	2009년05월12일 2012년06월15일	10-1158856	X

4	괴각 추출물을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 지방간의 예방 및 치료용 조성물	㈜렉스진 바이오텍	2004년03월04일 2005년12월22일	10-0539457	X
5	다래순 추출물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	2014년07월10일20 16년09월28일	10-1662887	X
6	부지깽이 추출물을 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 조성물	경상북도	2014년01월14일20 15년10월27일	10-1565232	X
7	연근 추출물을 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물	인하대학교 산학협력단	2010년02월22일 2012년06월12일	10-1157508	X
8	두충 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 보호 및 간 질환의 예방 및 치료용 조성물	전북대학교 산학협력단	2012년11월26일 2014년08월18일	10-1433471	X
9	헛개나무로부터 분리된 간독성 및 숙취 해소 활성을 갖는 저급알콜 불용성 추출 분획 및 다당체 물질 및 이를 함유한 조성물	(주)생명의나무	2002년01월17일20 03년10월23일	10-0403721	O
10	비파엽 추출물을 함유한 알코올성 간질환의 치료 및 예방용 조성물	한국인스팜(주)	2009년12월11일20 11년08월18일	10-1059075	X
11	발효울금 추출물을 함유한 알코올성 간질환의 치료 및 예방용 조성물	한국인스팜(주)	2009년11월16일20 12년02월09일	10-1117301	O

(5) 표준화현황

- 현재까지 식약처장으로부터 개별인정을 받은 간 건강 개선용 기능성 원료 중 다양한 시판 제품에 사용되고 있는 원료의 표준화 현황은 다음과 같음.

번호	원료명	인정번호	인정등급	일일섭취량	기능(지표)성분	기준규격(표준화)
1	밀크씨슬추출물	제2009-24호, 37호, 63호, 89호 등	생리활성 2등급	Silymarin으로 130 mg/일	Silymarin	표시량(130 mg/0.9 g)의 80~120%
2	표고버섯균사체	제2010-35호	생리활성 2등급	350 mg/일	β-glucan	표시량(58.4 mg/3000 mg)의 80~120%
3	복분자추출분말	제2010-62호	생리활성 2등급	3.15 g/일	Ellagic acid	15-25 mg/g
4	발효울금	제2013-4호	생리활성 3등급	3 g/일	Curcumin	표시량(0.8 mg/g)의 80~120%
5	유산균발효 마늘추출물	제2016-16호	생리활성 2등급	1.5 g/일	Cycloalliin	표시량(3.3 mg/g)의 80~120%
6	헛개나무과병 추출분말	제2008-55호, 제2009-86호, 제2014-1호, 제2016-10호	생리활성 2등급	2.46 g/일	Quercetin	표시량(7.4 ㎍/g)의 80~120%
7	유산균발효 다시마추출물	제2011-22호, 23호	생리활성 2등급	1.5 g/일	γ-aminobutyric acid	40-60 mg/g

(6) 기타현황

- 현재까지 출시된 간 건강 개선 기능의 건강기능식품 품목 수는 약 300개 이상임.
- 이들 중 밀크씨슬추출물을 함유한 건강기능식품으로 제품명에 “밀크씨슬”이 포함된 품목 수만도 119개에 달함.

- 현재 전임상 연구 또는 인체적용시험 중인 소재들까지 고려하면 앞으로 “간 건강” 개선 기능에 관한 개별인정형 기능성 원료 및 이를 함유한 제품 수는 더욱 늘어날 전망임.

나) 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 본 과제의 특허기술 관련하여 국외에서 개똥쑥을 이용한 비알콜성 지방간 등 간 질환 관련 연구는 이루어지고 있지 않음
- 개똥쑥은 항말라리아제인 아르테미신의 공급원으로 널리 알려져 있으며 중국의 투유유 교수는 이를 발견해 2015년 노벨 생리·의학상을 수상하였음. 또한 개똥쑥은 높은 항산화 작용을 하며, 암세포 사멸에 높은 효과를 보여 다양한 연구가 활발하게 연구되어지고 있는 추세임.
- 서구에서는 특별한 간질환의 원인이 없는 정상 성인의 20~30% 정도에서 비알콜성 지방간이 있는 것으로 알려지고 있음. 비만인 경우에 유병률이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이는 비만으로 인한 인슐린저항성이 간내 지방침착을 일으키는 것이 중요한 원인으로 지목됨(Korean J Fam Pract. 2014;4:109-115).
- 일반적으로 비알콜성 지방간 환자에게 사용되고 있는 치료제는 위험인자를 억제하는 비만치료제, 인슐린저항성 치료제, 고지혈증 치료제가 있으며, 간세포를 회복시키는 간세포보호제, 항산화제 등이 있고, 건강기능식품으로는 밀크씨슬이 주를 이루고 있음.
- 전 세계적으로 비알콜성 지방간 질환에 대한 직접적 효과를 보이는 약물치료는 없으며, 식이요법을 통한 체중감량 등 기번적인 치료법이 권고되고 있기 때문에 효과적인 비알콜성 간질환 예방 및 치료를 위한 건강기능식품 및 천연물 의약품 연구가 필요한 실정임.

(2) 시장현황

- 세계 건강기능식품 시장 규모는 1,179억 달러(약 131조원, 2014년 기준) 규모로 추산되며 연평균 7.3% 성장하여 1,677억 달러(약 187조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨.
- 미국 건강기능식품 시장은 약 404억 달러(2015년) 규모로 연평균 7.1% 성장하여 약 568억 달러(2020년)에 이를 것으로 전망됨.
- 중국 건강기능식품 시장은 약 163억 달러(2015년)규모로 연평균 13.8% 성장하여 약 267억 달러(2020년)에 이를 것으로 전망됨.
- 일본 건강기능 식품 시장은 약 109억 달러(2015년) 규모로 연평균 2.3% 성장하여 약 122억 달러(2020년)에 이를 것으로 전망됨.

<건강기능식품 세계 시장 규모>

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

- 비알콜성 지방간 또한 대사성 질환의 일종으로 볼 수 있으며, 대사성 질환 치료제 세계 시장은 2014년 2,732억 달러에서 연평균 7% 성장하여 2020년 4,129억 달러에 이를 것으로 전망되고 있음.

<대사성 질환 치료제의 국내·외 시장 전망>

(출처: Datamonitor 2008 sales data 재가공, Datamonitor, 2009)

(3) 경쟁기관현황

- 국외에서 개똥쑥을 이용한 간 건강 연구 관련 경쟁기관은 없음.
- 비알콜성 지방간에 대해서는 명확한 적응증을 받은 약물이 없기 때문에 글리타존류, 스타틴 계열 들이 비알콜성 지방간과 함께 나타나는 질환, 당뇨 또는 고지혈증, 비만에 따라 처방되고 있는 실정임.

- 2011년에 Pfizer의 고지혈증 치료제인 Lipitor(atorvastatin calcium)가 96억 달러로 statin 계열 약물로는 가장 많은 매출을 기록하였고 그 뒤를 역시 고지혈증 치료제인 AstraZeneca의 Crestor(rosuvastatin calcium)와 지질저하제인 Merck의 Vytorin(ezetimibe and atorvastatin simvastatin)이 따르고 있음.

(4) 지식재산권현황

지식재산권명	출원인	등록여부	출원국/출원(등록)번호
Traditional Chinese medicine preparation for treating fatty liver and preparation method	LI YIXIANG	출원	중국/201610562724.4
Pills for effectively treating fatty liver	GE WENNONG	출원	중국/201610335760.7

- 개똥쑥 단일원료가 아닌 다양한 한약제의 복합적인 사용을 통해 지방간 치료목적의 조성물 특허임. 개똥쑥 단일 원료를 통한 지방간 치료제 및 건강기능식품이 아니기 때문에 본 연구의 진행에는 문제가 없을 것으로 사료됨.

2) 연구개발의 중요성

가) 연구개발의 중요성

- 국내 건강기능식품 시장은 매년 지속적인 성장을 거듭하고 있으며, 특히 개별인정형 건강기능식품이 건강기능식품 시장의 성장을 견인하고 있음.
- 개별인정형 건강기능식품 시장에서 가장 각광받는 기능성 분야는 면역 증진, 간 건강, 비만, 갱년기 여성/남성 건강 등으로 압축할 수 있음.
- 우리나라의 경우 과도한 음주와 스트레스, 서구화된 식생활의 변화로 인해 비알콜성 및 알콜성 간질환의 유병률이 OECD 국가들 중에서도 수위를 다투고 있음.
- 특히 비알콜성 지방간의 경우 하루에 40g(4잔)이하의 음주를 하는 사람에서 지방간이 생기는 경우를 말하며, 대부분 과체중이나 비만(복부비만), 당뇨병, 고지혈증 등의 위험요인을 동반하고 있어 평상 시의 지속적인 관리가 무엇보다 중요함.
- 간질환 치료제(의약품)의 세계 시장규모는 2022년 121억 달러로 예상됨(그랜드 뷰 리서치, 2015. 10)
- 국내에서 대표적인 간 건강 개선용 건강기능식품인 쿠퍼스 프리미엄(한국야쿠르트)의 경우 2015년 기준 연매출이 1000억 원에 달할 정도로 대중적인 제품이 됨.
- 이러한 보건의료적 수요와 시장의 동향 및 소비자의 건강관리 트렌드를 고려할 때, 간 건강 관련 시장을 확대하고 해외 진출을 촉진하기 위해서는 기존의 간 건강 개선 원료 외에 신규 기능성 원료의 개발이 중요하다고 할 수 있음.

- 간 건강 개선 기능의 대표적인 원료인 밀크씨슬추출물의 경우 고시형 전환 이후 생산 및 판매가 급증하고 있어 시장 확대에 일부 기여하는 부분이 있으나, 전량 수입에 의존하는 원료라는 문제가 있음.
- 따라서 수입에 의존하는 기존 원료의 수요를 대체함과 동시에 국내 농가 소득 및 관련 업체의 매출 증대에 기여하기 위해서는 국내 농가의 소득원이 될 수 있는 재배작물을 순수 국내 기술로 연구하여 신규 기능성 원료를 개발, 상용화하는 것이 중요함.

나) 연구개발의 필요성

- 국화과에 속하는 쑥(Artemisia sp.)은 우리나라는 물론 동남아시아, 유럽 및 아메리카 지역의 임야 등지에 전 세계적으로 약 400여종이 분포하고 있으며, 국내에만도 약 300여종의 품종이 자생하고 있음.
- 참쑥, 산쑥, 개똥쑥, 약쑥, 물쑥, 황해쑥, 사자발쑥, 인진쑥 등 다양한 품종 중에서도 국내에서 가장 많이 재배, 유통되는 쑥은 약쑥(애엽, Artemisiae asiaticae), 개똥쑥(Artemisia annua), 인진쑥(사철쑥, Artemisia capillaris) 등이 있으나, 이들 중 단순 가공식품이나 건강보조식품이 아닌 과학적으로 효능, 효과를 검증하고 임상, 인허가 과정까지 거쳐 고부가가치 제품으로 개발된 사례는 국내에서 약쑥(애엽)이 유일함.
- 애엽의 경우 2005년 동아제약에 의해 위염 치료용의 천연물신약인 “스티렌”으로 개발, 판매된 이후, 지엘팜텍에 의해 “지소렌” 등의 개량신약이 개발되면서 위염치료제로서만 연간 총 1000억 원대 시장을 형성하고 있으며, 천연 농산물 또는 특용작물의 고부가가치 제품 개발의 대표적인 사례로 자리매김 함과 동시에 약쑥 재배농가의 매출 증대에 기여하고 있음.
- 인진쑥의 경우, 인제대학교에서 기업과 함께 전임상연구를 완료하고 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 인체적용시험을 준비 중에 있음.
- 반면, 개똥쑥의 경우 골관절염, 류마티스 관절염, 비만, 고혈당, 고지혈증 및 심혈관계 질환에 대한 효과, 항위염, 항궤양 효과, 항염증, 항산화 및 항균활성 등 매우 광범위한 질환에 걸쳐 우수한 약리학적 효능을 지니고 있음에도 불구하고 현재까지 그 기능에 대한 임상 개발이나 식약처의 인허가과정을 거쳐 천연물신약이나 개별인정형 건강기능식품 등과 같은 고부가가치 제품으로 개발된 사례가 없음.
- 이에 본 과제에서는 참여기관이 보유한 특허기술(개똥쑥 추출물을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물)을 토대로 “간 건강” 개선 기능의 신규 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발하고자 함.
- 본 과제를 통해 이러한 개발에 성공할 경우, 민간요법 또는 한의학적으로 널리 알려진

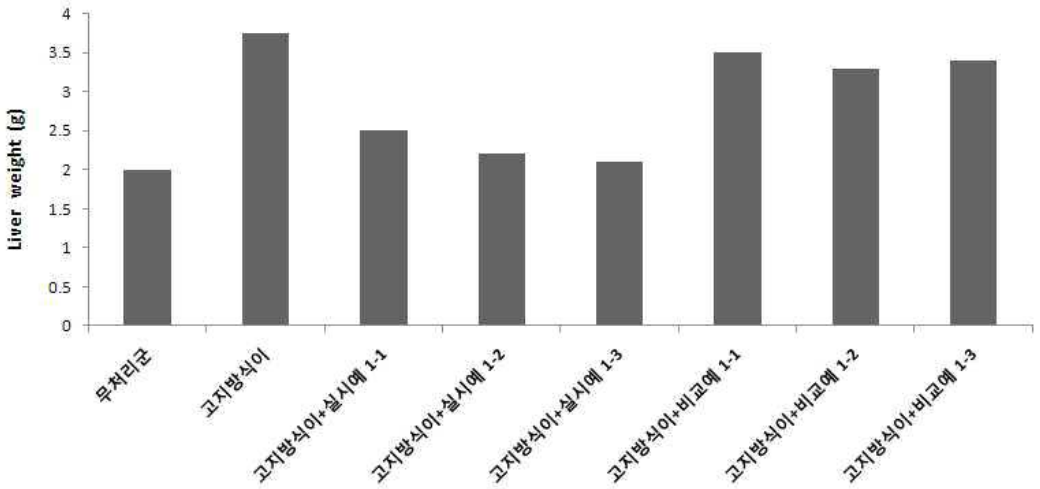
효능과 인지도에 더하여 과학적으로 검증된 제품을 제조할 수 있으며, 애엽 외에는 이렇다 할 고부가가치 제품이 없던 국내 자생 쑥 시장에서 개똥쑥의 상업적 가치를 발굴함으로써 관련 농가를 육성하고 “간 건강” 관련 제품의 시장 확대에 기여할 수 있음.

3) 선행 연구내용 및 결과

가) 고지방식이(High fat diet) 마우스에서 개똥쑥 추출물의 지방간 개선 효과

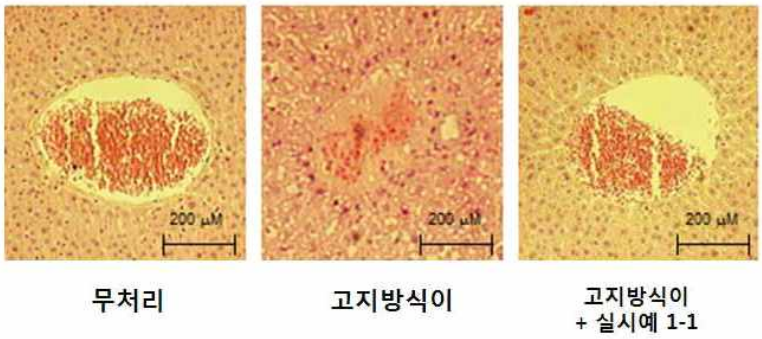
- 4주령의 수컷 ICR 마우스에 고지방식이를 4주간(28일) 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하고, 선별된 마우스를 무처리군(음성대조군, 일반식이), 고지방식이군(양성대조군), 실험군(고지방식이+개똥쑥 추출물 50 ㎎/㎏)로 나누어 다시 4주간(28일) 시험물질(개똥쑥 추출물; 실시예1-1, 1-2, 1-3)과 대조물질(생리식염수)을 경구투여한 후, 간 무게, 간조직 검사, 간기능 지표인 AST, ALT 효소 활성, 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 등을 분석하고 지질대사 조절에 관한 작용기전 연구를 수행함.
- 실험 결과, 고지방식식이에 의해 간 무게가 정상 마우스의 2배 가까이 증가한 양성대조군에 비해 개똥쑥을 투여한 시험군의 경우 모두 정상과 유사한 간 무게를 보였음

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 간 무게 변화>



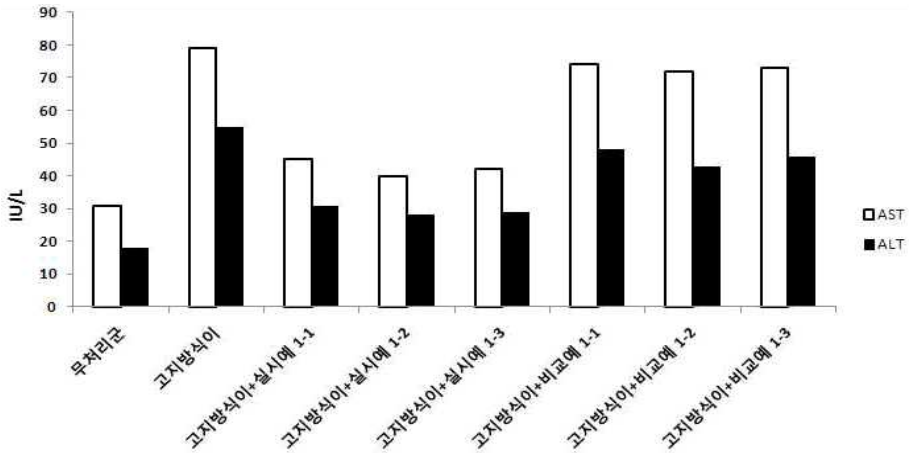
- 또한 간조직 검사 결과, 고지방식이군(양성대조군)의 경우 간 조직에서 다량의 지방구가 증가한 데 반해, 개똥쑥 추출물을 투여한 군의 경우 무처리군과 유사한 간 조직 소견이 나타나 개똥쑥 추출물에 의한 지방간 개선 효과를 확인함.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 지방간 개선 효과>



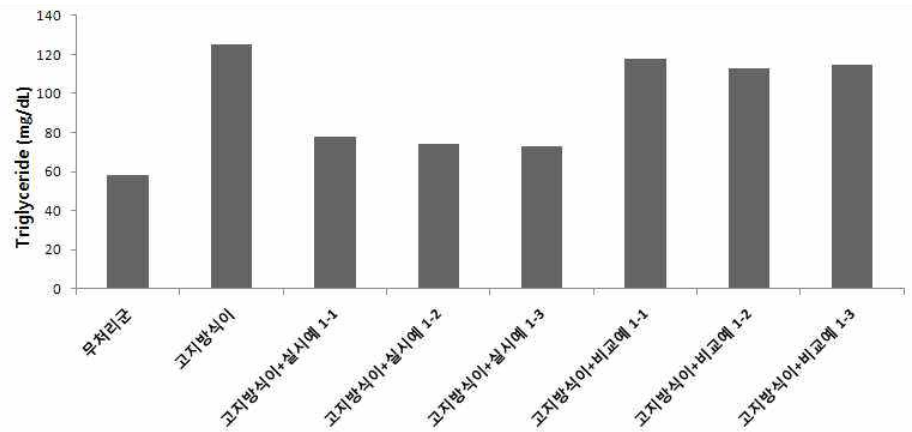
- 개똥쑥 추출물은 간기능 지표인 혈중 AST, ALT 효소 활성 검사에서도 40% 이상의 뚜렷한 개선효과를 보임.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 간 기능 지표 개선 효과>



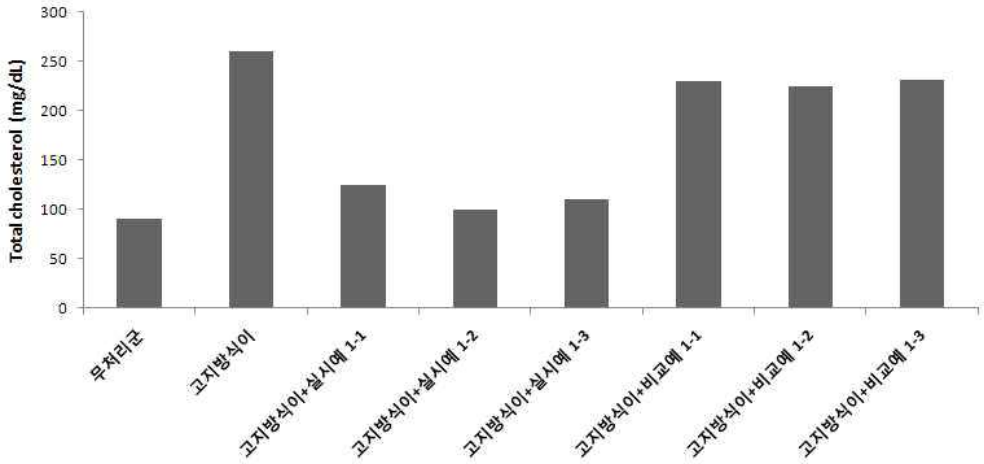
- 혈중 중성지방 분석에서도 고지방식이군의 경우 정상보다 중성지방 수치가 2배 이상 증가된 데 비해, 개똥쑥 추출물을 투여한 경우 약 40% 정도 감소된 경향을 보임.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 혈중 중성지방 개선 효과>



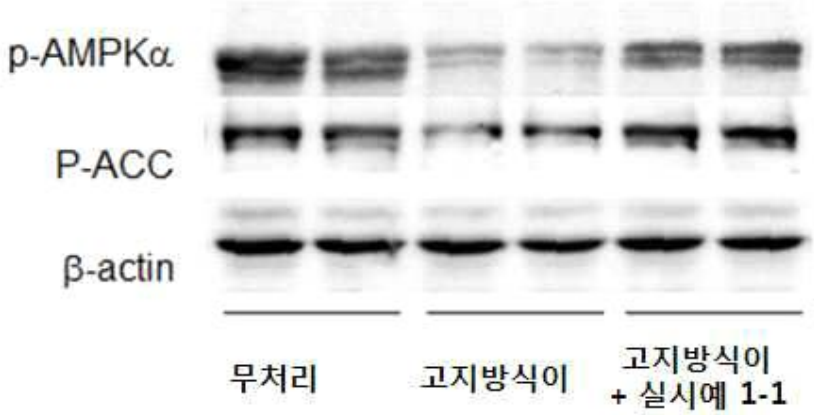
- 혈중 총 콜레스테롤의 경우에도 고지방식이로 인해 양성대조군의 경우 2.5배 이상 수치가 상승한 반면, 개똥쑥 추출물을 28일간 경구투여한 경우에는 정상 수치에 가깝게 감소되는 결과를 보임.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 혈중 총 콜레스테롤 개선 효과>



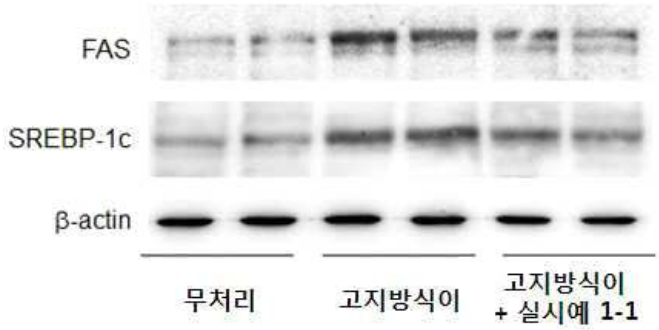
- 지질대사 조절에 관한 작용기전 연구를 위해 마우스의 복부지방으로부터 시료를 추출하여 p-AMPK, p-ACC, FAS 및 SREBP-1c 등의 단백질 발현을 western blot으로 측정한 결과, 고지방식이를 먹지 않은 무처리군에 비해 고지방식이군에서는 p-AMPK, p-ACC 발현이 현저하게 감소되어 있는 반면, 개똥쑥 추출물을 투여한 마우스의 경우 이들 단백질의 발현이 정상에 가깝게 증가한 것을 확인함.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 지질대사 조절인자 증가 효과>



- 또, 고지방식이군에서 무처리군에 비해 증가되었던 FAS와 SREBP-1c 단백질 발현은 개똥쑥 추출물에 의해 다시 감소되는 것으로 관찰됨.

<고지방식이 마우스에서 개똥쑥 추출물 투여에 의한 지질대사 조절인자 감소 효과>



다. 연구개발 범위

1) 연구개발 주요 내용

가) 제조공정 연구

- 생물학적 활성과 수율 등을 고려한 최적의 개똥쑥 추출 조건 설정
- 최적의 추출조건을 바탕으로 추출공정 확립 및 대량생산

나) 품질관리 연구

- 개똥쑥 추출물의 영양성분 분석
- 개똥쑥 추출물의 유해물질 기준 규격 설정
- 개똥쑥 추출물의 지표성분 함량시험 연구
- 지표성분 함량시험법의 밸리데이션

다) 기능성 연구

- 간 손상 동물모델 실험을 통한 개똥쑥 추출물의 간 손상 억제 효과 확인
- 지방간 동물모델 실험을 통한 개똥쑥 추출물의 지방간 억제 효과 확인
- 외부전문기관 시험을 통한 경쟁원료 대비 객관적 효능 평가

라) 생물학적 활성 및 작용기전 연구

- 다양한 세포주 실험을 통한 개똥쑥 추출물 시험생산, 대량생산 원료 및 주요성분의 생물학적 활성 평가
- 항염증, 항산화, 간 손상 및 지방간 개선 효과에 관한 작용기전 확인

마) 제형연구 및 시제품 생산

- 개똥쑥 추출물 액상 및 분말원료의 물성 및 제형 연구
- 인체적용시험용 시제품(시험식품 및 대조식품) 생산

바) 안전성 연구(GLP 기관)

- 설치류 및 비설치류 단회투여 독성시험을 통한 급성 독성 평가
- 설치류 반복투여 독성시험을 통한 만성 독성 평가

사) 인체적용시험

- CRO 및 인체적용시험기관 선정
- 인체적용시험 계획서 작성 및 IRB 승인
- 피험자 모집 및 인체적용시험 실시
- 통계 분석 및 최종 결과 보고서 작성 및 IRB 승인

아) 개별인정

- 개별인정 관련 자료 검토 및 식약처 사전상담을 통한 보완자료 구비
- 개별인정 신청서 작성, 제출 및 식약처 대응
- 개별인정 신청서의 제출자료는 전체의 총괄 요약본, 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 자료, 제조방법 및 그에 관한 자료, 원료의 특성에 관한 자료, 기능(지표)성분에 대한 규격 및 시험방법 자료, 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 자료, 안전성에 관한 자료, 기능성 내용 및 그에 관한 자료, 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정 자료, 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료로 구성됨. 이러한 구성요건을 충족하기 위해서는 본 과제에서 실시하는 실험내용이 모두 포함되어야하기 때문에 임상시험 후 과제 종료 직전 개별인정 신청서 제출이 가능함.
- 개별인정 신청 후 처리기간은 근로일 기준 120일이지만 일반적으로 근로일 기준 90일 이내에 1차 심의결과가 확인됨. 본 과제의 최종보고서 작성시에는 식약처의 1차 심의결과를 수령하기에 시기적으로 어려움이 있지만, 최종보고서 제출 후 최종성과발표 전 식약처의 1차 심의결과를 받는다면 해당내용을 확인 및 보완하여, 성과 발표시 구체적인 개별인정 획득의 전략과 추진일정을 제시할 것임.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 연차별 연구개발 목표 및 결과

구분(연도)	세부과제명	세부연구목표	결과
1차 년도 (2017)	<주관연구기관> 개똥쑥 추출물 대량생산 공정 확립 및 전임상 기능성 연구	개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 및 대량생산	- pilot 생산을 통해 개똥쑥 추출물 추출공정 확립 - 개똥쑥 열수추출 분말 생산시 사용될 부형제 덱스트린 30% 선정. - 우수건강기능식품 제조기준(GMP)인증 업체 생산 완료
		전임상 기능성 연구1 (동물효력시험)	- 위탁기관에서 셋업된 동물실험 조건을 적용하여 시험 진행. AST, ALT, 간 조직학적 검사 및 사망률 확인결과 대조군에 비해 우수한 효과가 나타남.
		개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구(기준 규격 및 시험법 확립과 밸리데이션)	- 개똥쑥열수추출물에 특이적인 6가지 주요성분 규명(1,3-O-dicafferoylquinic acid, scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-dI-O- caffeoy lquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5- di-O-caffeoylquinic acid) - 고온안전성 확인 및 저장시험을 결과를 바탕으로 개똥쑥열수추출물 최종 지표물질은 scopoletin으로 선정함. - 특이성, 선형성, 검량한계, 검출한계, 일내정밀성, 일간정밀성, 정확성 분석을 통해 시험법 밸리데이션을 완료함 - 공인분석기관 분석기관 분석을 통해 개똥쑥열수추출분말 규격을 scopoletin 1.0 ~ 1.6 mg/g으로 설정함.
	<협동연구기관> 개똥쑥 추출물의 생리활성 평가 및 작용기전 연구	추출조건별 활성 비교	- 수확시기 및 추출조건별 생물학적 활성 비교: 가을 개똥쑥 열수추출물, 25% 에탄올 추출물, 여름 개똥쑥 25% 에탄올 추출물 이상 3종의 생물학적 활성 비교 실험에서 가장 우수한 활성을 보인 가을 개똥쑥의 25% 에탄올 추출물과 선행연구 및 LPS/D-GalN을 이용한 간손상 마우스 모델 예비실험에서 우수한 효능을 보인 가을 개똥쑥 열수추출물을 대상으로 GMP 업소에서 각각 대량생산을 실시한 후 이들의 생물학적 활성을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험으로 다시 비교함으로써 기능성 원료의 최종 추출공정을 확립함.
		원료의 유해물질, 영양성분 분석 및 기준 규격 확립	- 농축액의 잔류농약 58종 분석을 실시한 결과, 대부분 불검출로 확인됨. 중금속 4종 분석 결과 4종 모두 1 mg/kg 이하로 검출되었으며, 대장균군 모두 불검출되었음. 영양성분 26종 검사를 완료하였음. - 분말원료의 중금속 4종의 분석 결과, 4종 모두 1

			mg/kg 이하로 검출되었으며, 대장균군은 음성으로 확인됨. 잔류농약 58종 분석 결과, 미량 검출된 5종을 제외하고 모두 불검출로 확인됨. 분말원료의 영양성분 19종 검사를 완료하였음.
		원료의 작용기전 연구	- Raw264.7 세포주에서의 항염증 활성 기전: 개똥쑥 추출물은 Raw264.7 세포주에서 nitrite 생성 억제 효과, TNFα 억제 활성, IL-1β 억제 활성, IL-6 억제 활성이 ELISA 및 mRNA발현 및 Real-time PCR에서 확인됨. - HepG2 세포주에서의 간세포 보호 활성 기전: 개똥쑥 추출물은 HepG2 세포주에서 간 세포에 대한 독성이 전혀 없는 것으로 확인됨. LPS에 의한 염증반응이 뚜렷하게 유도되지 않아 개똥쑥 추출물의 효과를 관찰하지 못함. - 3T3-L1 세포주에서의 지질대사 조절 활성 기전: 지방전구세포에 분화 시험법 확립을 위해 Dexamethasone/IBMX /insulin를 처리하여 배양기간에 따른 분화 정도를 TG 농도 측정을 통해 확인하고 이를 통해 시험법을 확립함.
		전임상 안전성 연구 (GLP 설치류 단회투여독성시험)	- SD 랫드를 대상으로 GLP 설치류 단회투여독성시험을 실시한 결과, 본 시험조건 하에서 개똥쑥열수추출물의 개략의 치사량은 5g/10.5mL/kg 초과일 것으로 사료됨.
	<위탁연구기관> 동물효력 시험모델 확립	동물효력 시험모델 확립	- LPS/D-GalN 농도별 투여 급성 간손상 확인 및 개똥쑥 추출물 효능 확인 조건 확립. - 고지방식이 지방함량에 따라 개똥쑥 추출물의 효능을 확인하여 동밍효력 시험모델을 확립함.
2차 년도 (2018)	<주관연구기관> 전임상 기능성 연구 및 인체적용 시험용 시제품 생산	전임상 기능성연구 2 (동물효력시험)	- AST, ALT 등 간 손상 주요지표에서 고지방식이 급이 마우스 대비 유의한 효능 확인
		인체적용시험 시제품 생산	- 유효성평가, 독성시험, 전통적 섭취 방법을 종합하여 최종적으로 개똥쑥 열수추출물의 섭취량은 1일 686 mg으로 설정 완료 - 1정당 600 mg 정제로 개똥쑥 열수추출분말을 343 mg을 포함하여 1일 2정 섭취 가능한 인체적용시험 식품 및 대조식품 생산 완료
		인체적용시험 개시	- 간 기능 개선에 미치는 개똥쑥 열수추출분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험 - 분당제생병원 및 삼육서울병원의 생명윤리위원회 승인을 받아 인체적용시험을 개시함

	<협동연구기관> 개똥쑥 추출물의 전임상 안전성 연구	주요 성분의 작용기전 연구	- Raw264.7 세포주를 이용한 항염증 및 항산화 활성 및 작용기전 연구: 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 주요 성분 5종을 대상으로 LPS- stimulated Raw264.7 세포주에서 nitrite, TNFa 생성에 대한 효과를 관찰한 결과, artemisinin의 항염증 효과가 가장 큰 것으로 확인됨. - HepG2 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구: AAWE는 FFA-treated HepG2에서 지방축적에 따른 TG, TC 증가를 억제시킴. 주요 성분 5종 중 artemisinin과 cynarin의 TG 억제 효과과 확인됨. - 3T3-L1 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구: 현재 AAWE 및 주요성분 5종 중 artemisinin과 cynarin의 지방세포 분화 억제 및 TG 감소효과를 확인함. 항산화활성: 개똥쑥열수추출물 및 주요 성분 5종의 항산화활성을 DPPH, ASTS 시험으로 측정한 결과, 개똥쑥열수추출물의 항산화활성과 함께 eupatilin, scopoletin, cynarin의 항산화활성이 높은 것으로 확인됨.
		전임상 안전성 연구 (GLP 비설치류 단회투여독성시험)	- 비글견을 대상으로 시험물질인 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 경구 단회 용량 증가 독성시험을 실시한 결과, 본 시험 조건 하에서 AAWE의 개략의 치사량은 5g/10.5mL/kg 초과일 것으로 사료됨.
		전임상 안전성 연구 (GLP 설치류 13주 반복투여독성시험)	- 7주령의 암수 랫드 각 10마리씩을 이용하여 개똥쑥 열수추출물의 13주 반복투여독성시험을 실시한 결과, 본 시험 조건하에서 개똥쑥열수추출물의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두에서 1000mg/5mL/kg 이상으로 판단됨.
		인체적용시험계획 수립, CRO 선정 및 인체적용시험 개시 준비	- 관련 문헌 조사: SPB-201의 간 건강 개선에 관한 인체적용시험 계획 수립을 위해 현재까지 국내에서 시행된 간 건강 개선 관련 인체적용시험 사례를 조사한 결과, 간 건강 이상의 지표로 가장 많이 사용된 것은 AST, ALT 였으며, 범위는 정상치 초과 ~ 정상 상한치의 3배 이내가 가장 일반적인 것으로 확인되어 이를 토대로 시험 계획을 수립함. - 인체적용시험 계획 수립: 선정기준, 제외기준 및 대상 피험자수 산출 근거 설정, 섭취량 및 섭취방법에 관한 설정 및 근거 확인, 기능성 및 안전성 평가변수의 설정 및 타당성 확인, 전임상과 인체적용시험 간

			의 기능성 및 작용기전의 일관성 등을 고려하여 시험 계획을 수립함. - CRO 선정: 인체적용시험의 효율적인 관리를 위해 해당 분야의 인체적용시험 경험이 가장 풍부한 네오뉴트라를 CRO로 선정함. - 인체적용시험 개시 준비: CRO와 함께 연구계획서, CRF 등을 개발하고 IRB 심의, 개시 미팅을 거쳐 인체적용시험 개시 준비를 완료함.
3차 년도 (2019)	<주관연구기관> 인체적용시험을 통한 효능확인 및 사업화	인체적용시험 종료	- 개똥쑥열수추출물을 섭취한 시험군에서 AST와 ALT가 섭취 4주 후와 8주 후 대조군 대비 뚜렷하게 감소하며 전체 피로도가 해소되는 나타나, 개똥쑥열수추출물의 섭취가 간 기능을 개선하는 효과가 있음을 확인하였음. - 최종보고서 IRB 승인 후 개별인정 신청에 사용
		시제품 생산 및 사업화	- 개똥쑥 추출물의 인식을 넓히기 위한 시작품으로 선식조성물을 개발하였으며, ‘지방간 개선효과를 가지는 개똥쑥추출물을 포함하는 선식 조성물’ 특허를 출원함 - 개똥쑥의 특성과, 간 기능 개선에 초점을맞춘 포장 패키지 디자인을 진행하였으며, 품목보고 후 건강기능식품 형태의 최종 시제품을 개발하였음.
		원료 및 제품의 안정성 시험	- 개똥쑥 열수추출물의 안정성을 확인하기 위해 2년간 저장시험을 진행하였으며, 그 결과 scopoletin 함량, 성상, 미생물 등 품질이 일정하게 유지되는 것을 확인함.
	<협동연구기관> 인체적용시험 CRO 업무관리 및 건강기능식품 개별인정 신청	CRO 업무관리	- IRB 진행, 대상자 모집 및 모집 관련 광고, 인체적용시험용 식품 관리, 시험기관 모니터링 등에 관한 CRO의 업무 일체를 관리, 감독함.
		개별인정 신청을 위한 자료 검토	- 개별인정 신청 시 필요한 자료로서, 신청원료의 원재료에 관한 자료, 제조공정도, 제조공정에 사용된 물질의 규격서, 신청원료의 제조사 규격서, 기능(지표)성분에 대한 설정근거, 기능(지표)성분의 시험방법, 신청원료의 공인시험기관 성적서 및 raw data, 안전성 자료, 기능성 자료, 국내외 인정 및 사용현황 등의 자료에 관해 CRO와 함께 검토 및 확인을 완료함.
		개별인정 신청 및 식약처 대응	- 개별인정 신청서 작성을 완료 및 제출자료(자료, 표준품, 원료, 컬럼 등) 준비를 완료함. - 인체적용시험 최종보고서 IRB 승인 후 개별인정 신청

나. 연구결과

<1차년도 주관연구기관 : 개똥숙 추출물 대량생산 공정 확립 및 전임상 기능성 연구>

1) 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 및 대량생산

가) 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립

협동연구기관에서 확인된 추출조건별 활성 비교 연구를 바탕으로 선정된 개똥쑥 열수추출물의 대량생산을 진행하기에 앞서 pilot test를 진행함. pilot test 장비는 주관연구기관에서 보유하고 있는 50L 규모의 설비를 사용하였음. 실험실 조건과 동일하게 20배수 열수, 추출온도 85℃, 농축온도 60℃ 이하, 추출시간 4시간을 적용하여 건조 개똥쑥 전초 2 kg을 이용해 50brix 농축액 400 g을 제조하였음. 농축액 제조과정인 세척, 추출, 여과, 농축 작업에 있어 특이사항은 발견되지 않았으며 안정적 생산이 가능하였음. 이에 따라 본 생산 공정을 확립하고 대량생산에 적용하기로 결정함.

나) 부형제 설정

일반적인 추출분말은 성상을 유지하고 분말화 작업이 용이하도록 일정량의 부형제를 첨가함. 주관연구기관은 다년간의 건강기능식품 연구와 천연물 추출에 관한 연구 노하우를 바탕으로 부형제를 덱스트린으로 결정하고 그 첨가량을 설정하였음. 앞서 추출공정 확립을 위해 제조한 개똥쑥 추출물에 각각 고형분 기준 덱스트린 30%와 50%를 혼합하여 일정량의 증류수를 첨가, 용해 후 동결건조를 실시함. 동결건조 전 용해액의 물성과 동결건조 후 분말화 상태를 육안을 통해 확인한 결과 두 가지 모두 분말화가 문제없이 이루어 졌으며, 최종적으로 부형제 사용을 줄이고 효능을 높이기 위해 개똥쑥 추출분말 제조시 사용되는 덱스트린 함량은 30%로 결정하였음.

개똥쑥 추출농축액의 경우 50 brix의 높은 고형분 함량설정 및 냉장유통을 이용해 부형제 첨가 없이 순수 농축액으로 원료를 제조하기로 결정하였음.

다) 개똥쑥 추출물 대량생산 진행

개똥쑥 추출물 대량생산은 우수건강기능식품 제조기준(GMP)이 갖춰진 삼영식품원료공업주식회사와 알파비앤에이치에서 생산을 진행하였음. 1차 대량생산 및 2차 대량생산을 완료하였으며, 그 결과를 바탕으로 생산규모를 늘려 3차 생산을 완료하였음. 1, 2차 생산 추출물을 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였으며, 3차 생산 추출물로 인체적용시험 시제품을 제조하여 인체적용시험에 사용하였음.

2) 전임상 기능성 연구 1 (동물효력시험)

가) LPS/D-GalN으로 유도한 간손상 마우스 모델에서 개똥쑥 추출물의 약효평가 연구

(1) 시험 목적

본시험은 C57BL/6 마우스를 이용하여 시험물질을 14일간 1일 1회 경구투여하고, 마지막 경구투여 1시간 뒤에 lipopolysaccharide (LPS, 4 μg/kg)과 D-galactosamine (D-GalN, 400 mg/kg)을 복강주사하여 최종 얻어진 혈액과 간 조직 샘플을 대상으로, 혈중 간지표와 간조직 소견 평가하여 시험물질이 LPS/D-GalN에 의한 간손상에 미치는 기능적 보호효과를 종합적으로 평가하고자함.

(2) 시험 방법

시험에 사용된 C57BL/6 마우스는 간손상 모델연구에 있어 시험물질의 항산화적 활성과 간기능 지표물질의 변화 검색에 널리 사용되는 실험동물로서 비교할만한 기초자료가 풍부하고 시험결과의 해석 및 평가에 용이할 수 있기에 선정됨. 시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 항온, 항습이 유지되는 동물 사육실에서 1주간의 순화기간을 두며 순화기간동안 polycarbonate cage에 3마리씩 사육함. 개체식별은 tail marking법을 사용하며, 검역 및 순화기간 중에는 적색 유성펜으로 표식하고 케이지당 3수 사육밀도로 관리하며, 군분리 및 8주 투여기간동안 검정색 유성펜으로 표식하여 케이지당 3수 또는 2수 사육밀도로 수용하여 관리함. 검역상 이상이 없는 동물만을 대상으로 순화 종료 후 체중을 기준으로 Z배열법에 따라 분리하며, 군 분리 완료 후 각각의 사육상자에 개체 식별카드(시험명, 시험군, 개체번호, 성별, 시험개시일 등 기재)를 부착함. 시험물질 투여는 군분리 익일부터 개시함(표 1).

표 1. LPS/D-GalN으로 유도한 간손상 마우스 모델에서 개똥쑥 추출물의 약효평가 연구 실험요약

Group	시험물질	Dose[c] (mg/kg)	Liver damage	투여볼륨 (mL/kg)	투여 빈도	투여 기간	N 수
G1	Vehicle control (VC)	vehicle	-	10	QD	2주	10
G2	LPS/D-GalN	vehicle	LPS/D-GalN				10
G3	LPS/D-GalN + 밀크씨슬 추출물	100	LPS/D-GalN				10
G4	LPS/D-GalN + 개똥쑥 열수추출물	100	LPS/D-GalN				10
G5	LPS/D-GalN + 개똥쑥 에탄올추출물	100	LPS/D-GalN				10

시험물질 또는 대조물질을 각각 100 mg의 용량으로 체중 kg당 10mL 투여볼륨으로 14일간 1일1회 일정시간에 투여하고, 마지막 경구투여(day 14일차) 1시간 후에 간손상을 유발하기 위하여 G2군~G5군 개체를 대상으로 PBS에 조제된 LPS (4 μg/kg; Escherichia coli055:B5,

L6529, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 D-GalN (400 mg/kg; G0500, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 복강 주사함. 음성 대조군 (VC군)은 동량의 vehicle만을 경구투여함. 모든 동물에 대하여 LPS/D-GalN 투여 후6시간 경과 후에 isoflurane 흡입마취 하에 개복 하여 복대정맥에서 혈액을 최대한 채혈함. 채취된 혈액은 0.6mL SST tube (Microtainer, BD, USA) 넣어 혈액을 완전히 굳힌 다음5,000 rpm 으로10 분간 원심분리한 후 혈청을 취함. 혈액생화학분석기(Accute TBA-40FR, Toshiba Medical System Co., Japan)를 이용하여 AST (GOT, Glutamate Oxaloacetate Transaminase), ALT (GPT, Glutamate Pyruvate Transaminase), r-GTP (Gamma Glutamyl Transpeptidase)를 측정함. 모든 시험 개체에 대하여 비장과 간을 적출하여 표면의 이물질을 제거하고 0.9% saline으로 세척함. 채취된 간조직 소엽 일부와 비장조직은 따로 분리하여 간내 항산화 지표분석, 간 및 비장조직내 cytokine 분석 검사를 위하여 -70℃ 이하의 deep freezer에 급속동결하여 보관한 후 분석에 사용함. 일부 간조직은 10% neutral buffered formalin액에 고정한 후 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 Paraffin Block을 제작하여 4㎛로 박절한 후, hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색을 실시한다. 제작된 조직슬라이드는 봉입과정을 거친 후 광학현미경 (OlympusMVX10 microscope, equipped with a DC71camera, Center Valley, PA).Olympus, Japan) 하에 조직학적 평가를 실시함.

(3) 시험 결과

7주령 C57BL/6 mouse에 개똥쑥 추출물 및 밀크씨슬추출물을 각각 100 mg/kg/day로 2주간 경구투여한 후 LPS/D-GalN(4 ㎍/kg, 400 mg/kg)를 복강투여함. 6시간 경과 후 희생하여 혈액학적 분석 및 조직학적분석을 실시함.

혈청 내 AST, ALT 분석 결과 개똥쑥 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 LPS/D-GalN 투여군에 비해 효과적인 것으로 나타났으며, 개똥쑥 물추출물은 밀크씨슬 추출물과 비슷한 수준의 효능을 보임(그림 1).

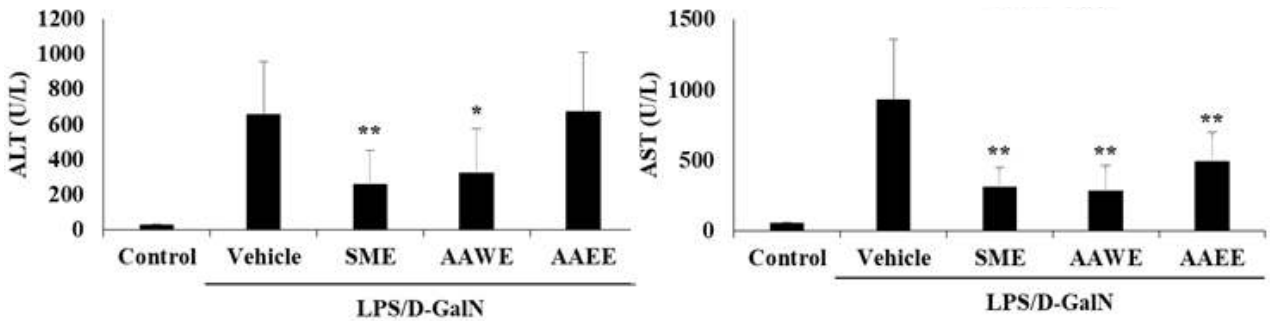


그림 1. LPS/D-GalN으로 유도한 간 손상 마우스 모델에서 개똥쑥 추출물 섭취에 따른 C57BL/6 마우스의 ALT 및 AST 효과 확인. SME ; 밀크씨슬 추출물, AAWE ; 개똥쑥 열수추출물, AAEE ; 개똥쑥 에탄올 추출물

간 조직학적 평가 결과 LPS/D-GalN군의 간조직은 심한 울혈과 함께 간세포는 팽윤되고 변성과 공포현상을 보였으며, 중심정맥 주변으로 세포괴사가 관찰되었고 동모양 혈관의 구조가 소실된 손상성 변화가 매우 뚜렷이 확인되었으나, 개똥쑥 열수추출물 섭취군에서는 이와 같은 간 조직 손상이 뚜렷하게 감소함(그림 2).

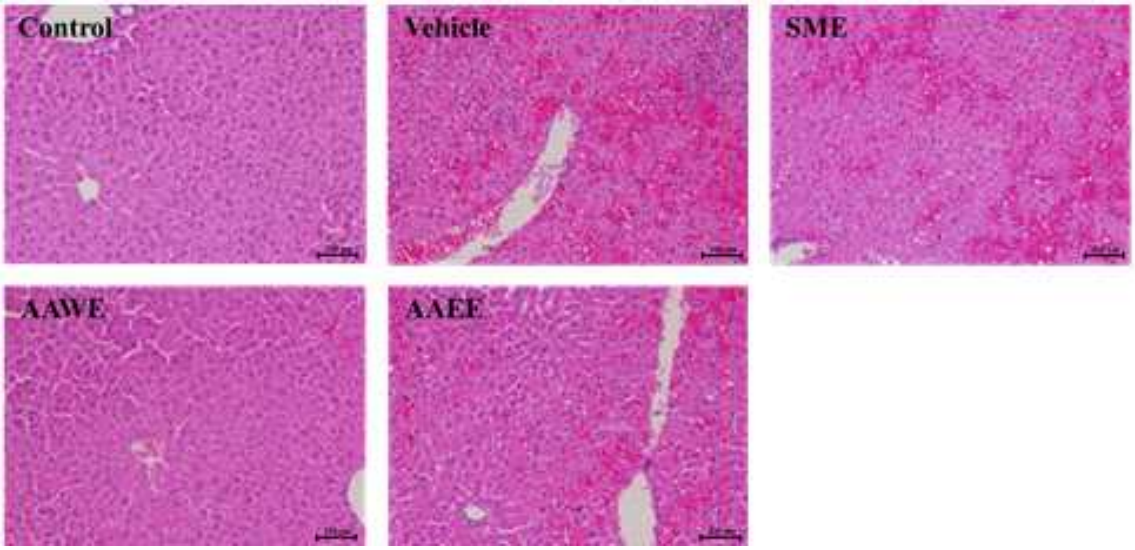


그림 2. LPS/D-GalN으로 유도한 간 손상 마우스 모델에서 개똥쑥 추출물 섭취에 따른 C57BL/6 마우스의 간 보호효과 확인. SME ; 밀크씨슬 추출물, AAWE ; 개똥쑥 열수추출물, AAEE ; 개똥쑥 에탄올 추출물

LPS/D-GalN(4 μg/kg, 400 mg/kg) 투여 후 6시간 동안 생존율을 확인한 결과 밀크씨슬 추출물의 경우 60%의 생존률을 보인 반면, 개똥쑥 물추출물과 에탄올추출물에서는 90%의 높은 생존율을 보임(표 2).

본 실험에 사용한 밀크씨슬 추출물은 실리마린 함량이 50%인 추출물을 사용하였으며, 밀크씨슬 추출물의 섭취량은 실리마린으로 1일 130 mg임. 개똥쑥 추출물 또한 낮은 섭취량으로 효과가 나타날 것이 기대됨.

표 2. C57BL/6 마우스의 2주간 개똥쑥 추출물 섭취 후 LPS/D-GalN에 의한 급성 간손상에 따른 사망률 확인

	개체수(마리)	사망 개체수(마리)	생존율 (%)
Vehicle control (VC)	10	0	100
LPS/D-GalN	10	7	30
LPS/D-GalN + 밀크씨슬	10	4	60
LPS/D-GalN + 개똥쑥 물 추출물	10	1	90
LPS/D-GalN + 개똥쑥 에탄올 추출물	10	1	90

3) 개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구 (기준 규격 및 시험법 확립과 밸리데이션)

가) 개똥쑥 추출물 지표물질 선정

(1) 개똥쑥 추출물 주요성분 규명

선행특허인 '개똥쑥 추출물을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물 (등록번호 10-1539289)' 연구팀의 지표성분인 *p*-coumaric acid의 분석을 진행하였음. HPLC(Agilent 1200 series, Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 YMC-pack pro C18(4.6 mm x 250 mm, 5 μm) 검출기는 UV detector (325 nm)를 사용하였음. 이동상은 A (0.1% Formic acid in water)와 B (MeOH)로 각각 제조하여 사용하였고 gradient조건은 표 3의 조건으로 설정하였으며 유속은 1 mL/min으로 하였음. 주입량은 20 μL, 컬럼 온도는 37℃를 유지하며 분석을 진행함.

표 3. *p*-Coumaric acid HPLC분석을 위한 gradient 조건

시간(min)	이동상 A (%)[z]	이동상 B (%)
0	70	30
8	70	30
20	40	60
25	30	70
30	0	100
36	0	100
38	70	30
43	70	30

[z]이동상 A(0.1% Formic acid in water), 이동상 B(MeOH)

분석 결과 개똥쑥 추출물에서 *p*-coumaric acid 함량은 0.525 mg/g으로 낮은 함량이 나타났으며, chromatogram의 다른 메인 peak에 비해 작은 peak가 형성되었음. 또한 개똥쑥 추출물의 주요 peak 대부분이 15분에서 35분 사이에 검출되며 이들 peak의 분리가 필요함(그림 3).

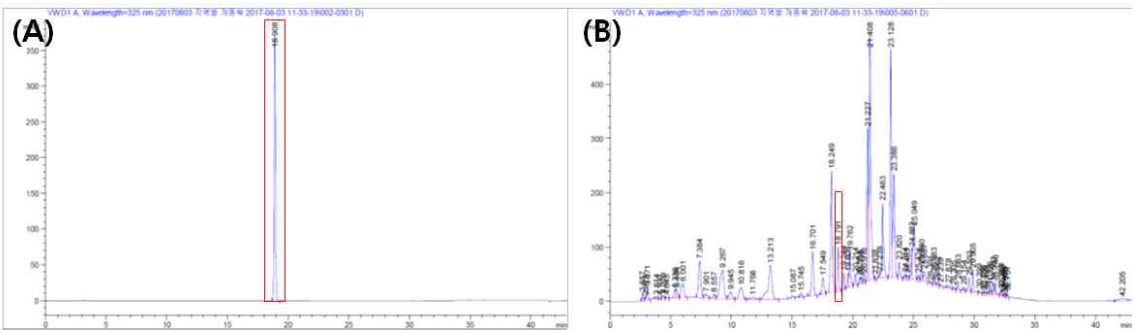


그림 3. HPLC를 통해 분석된 *p*-coumaric acid 표준품 chromatogram(A)과 개똥쑥 추출물 chromatogram(B).

다양한 gradient 조건, 이동상 조건 및 컬럼조건을 조절하며 개똥쑥 추출물의 주요 peak를 분리하였음. 컬럼은 YMC-pack pro C18(4.6 mm x 250 mm, 5 μm), 검출기는 UV detector (325 nm)를 사용하였으며, 이동상은 A (0.1% TFA in water)와 B (0.1% TFA in MeOH)로 각각 제조하여 사용하였음. gradient조건은 표 4의 조건으로 설정하였으며 유속은 1 mL/min으로 하였음. 주입량은 20 μL, 컬럼 온도는 37℃를 유지하며 분석을 진행함.

표 4. 개똥쑥 추출물 주요성분 분리를 위한 HPLC gradient 조건

시간(min)	이동상 A (%) [z]	이동상 B (%)
0	70	30
8	70	30
20	40	60
25	30	70
36	0	100
38	70	30
43	70	30

[z]이동상 A(0.1% Formic acid in water), 이동상 B(MeOH)

분석 결과 개똥쑥 추출물에서 5개의 주요 성분이 있음을 확인하였음(그림 3). 이를 분리, 규명하고자 하였으며 개똥쑥 물추출물을 탈이온수 100mL를 가해 현탁하였음. 제조한 물현탁액에 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 가하여 순차적으로 분획하였으며 클로로포름 가용액 908mg, 에틸아세테이트 가용물 1.3g, 부탄올 가용물 2.2g, 그리고 물가용물 4.75g을 확보하였음.

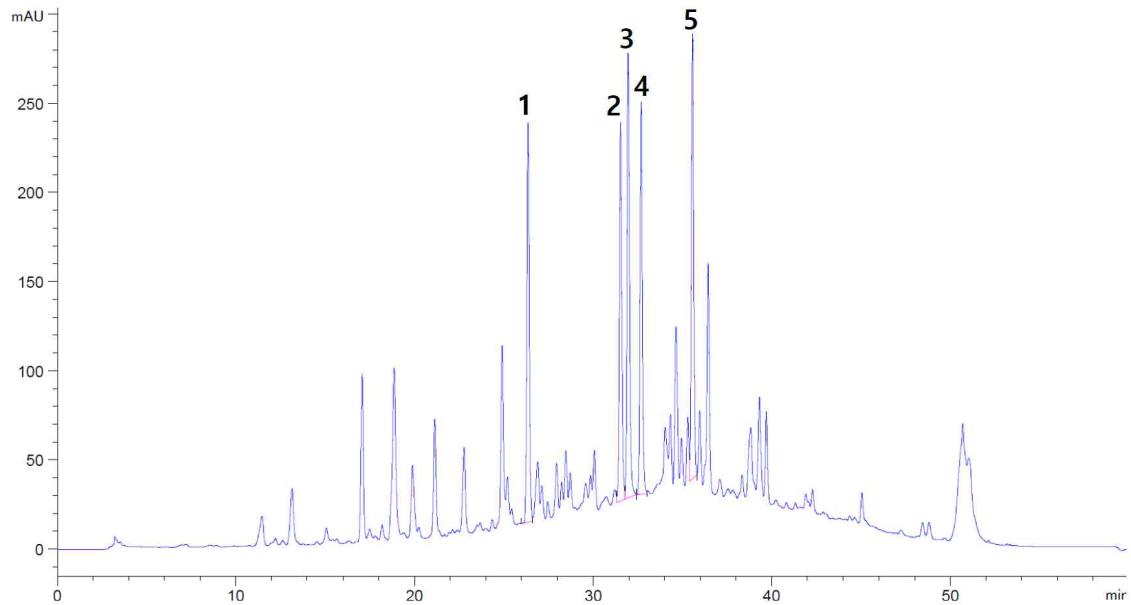


그림 4. 개똥쑥 물 추출물의 HPLC 분석을 통해 분리된 다섯가지 화합물

추가적인 HPLC분석을 통해 다섯가지 화합물이 에틸아세테이트 가용물에 농축되어 있음을 확인하였으며, 에틸아세테이트 가용물에 대하여 Sephadex-LH20 컬럼크로마토그래피를 실시하였으며, ES1(462mg), ES2(391mg) 그리고 ES3 (182 mg), ES4 (247mg)의 세 개의 하위분획으로 나누었음. 다시 HPLC분석을 통해 다섯가지 화합물이 하위분획 ES3에 검출이 되어, ES3분획에 대한 분취용 HPLC를 수행하였음. 분취용 HPLC 조건은 water:methanol (30:70 →60:40, v/v, flow rate: 5 mL/min, runtime: 50 min) 혼합액을 용출용매로 사용하였으며 컬럼은 Luna C18 컬럼(250 x 21.2 mm ID, 5 mm, Phenomenex, USA)을 사용하였음. 상기 HPLC 용매조건에서 다섯가지 화합물은 각각 32.5, 41.2, 42.7, 44.3, 49.4분에 용출되었음. 분취용 HPLC를 90회 반복적으로 수행하였으며 최종적으로 화합물 1(3.0 mg), 2(1.5 mg), 3(7.5 mg), 4(3.5 mg), 5(2.2 mg)을 확보하였음. 분리한 다섯가지 화합물은 1H-NMR 및 참고문헌 (*Arch Pharm Res*, 2010, 33, 1317-1323; Plants 2017, 6, 10; doi:10.3390/plants6010010; *J Appl Pharm Sci,* 2013, 3, 16-19)을 바탕으로 규명하였으며, 각각 scopoletin(1), 3,4-di-O-caffeoylqunic acid(2), 3,5-di-O-caffeoylqunic acid(3), 1,5-di-O-caffeoylqunic acid(4) 그리고 4,5-di-O-caffeoylqunic acid(5)로 구조를 확정하였음 (그림 5).

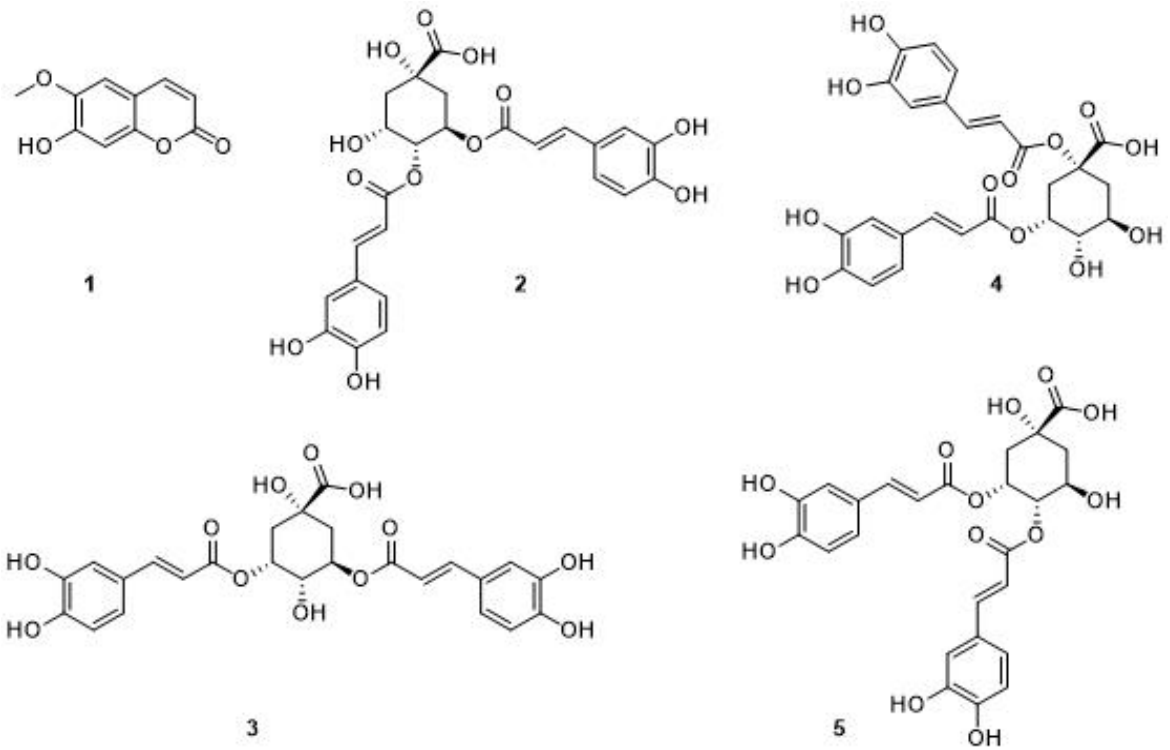


그림 5. 개똥쑥 추출물에서 분리된 다섯가지 화합물의 화학구조 (1: scopoletin, 2: 3,4-di-O-caffeoylqunic acid, 3: 3,5-di-O-caffeoylqunic acid, 4: 1,5-di-O-caffeoylqunic acid, 5: 4,5-di-O-caffeoylqunic acid)

(2) 개똥쑥 추출물 주요성분의 고온 안정성 확인

개똥쑥 추출물은 85℃의 온도에서 추출 후 고온의 분무건조를 통해 생산을 진행 함. 이처럼 생산공정 요소요소에 높은 온도에 노출되는 상황이 빈번하게 발생하게 됨. 앞서 규명된 개똥쑥열수추출분말의 특이적인 6가지의 성분인 1,3-O-dicafferoylquinic acid, scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid가 높은 온도에 노출될 시 어떻게 변화하는지 알아보고자 실험을 계획하였음. 높은 온도에 대한 주요 성분 함량변화를 단적으로 확인 하기 위해 개똥쑥 추출 조건인 85℃에서 추출 시간을 달리하여 주요성분 변화를 관찰하였음.

(가) 시간별 개똥쑥 추출물 제조

동일한 원재료를 사용하기 위해 개똥쑥 8kg을 분쇄하여 균질화 시킨 후 50g씩 소분하여 추출물 제조에 사용하였음. 추출온도는 85℃로 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 4.5시간, 5시간, 5.5시간, 6시간 추출 후 분말을 제조하였음. 추출 수율은 2시간이 가장 낮았으며, 그 이상 추출 시 수율 차이가 나타나지는 않았음. 본 생산조건인 4시간 추출의 경우 수율적인 측면에서 손실이 발생하지 않는 것을 확인 할 수 있었음(그림 6).

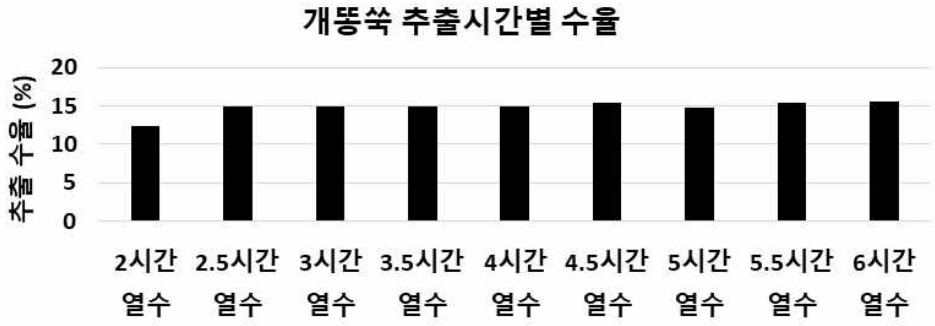


그림 6. 개똥쑥 열수 추출시간에 따른 추출 수율 변화

(나) 분석 방법

추출시간을 달리한 개똥쑥열수추출물을 각각 100 mL 부피플라스크에 1g 취한 후 50% 메탄올을 이용해 100 mL로 정용하였음. 30분간 초음파 추출 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과해 10 mg/mL 농도로 제조였음.

HPLC 분석은 binary pump, online degasser, autosampler, PDA (photodiode array detector)로 구성된 Agilent 1260 Infinity HPLC system을 이용하였음. 분석 컬럼은 YMC-pack pro C18(4.6 mm x 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 유기 이동상(A)은 메탄올

(0.1 % TFA)이고, 수성 이동상 (B)은 탈이온수 (0.1% TFA)를 사용하였음. 검출파장은 325 nm 였고, 유속은 1.0 mL/min로 유지하였음. 이동상의 농도구배는 15 - 60% A (0-40 min), 60 % A (40 - 45 min), 60 - 100% A (45 - 46 min), 100% A (46-54 min), 100 - 15% A (54 - 55 min), 15% A (55 - 60 min) 이었으며, 시험용액은 20㎕를 주입하였음.

(다) 분석 결과

분석 chromatogram은 아래 그림과 같이 분석되었으며, 특이적인 6가지 주요성분의 표준품을 모두 준비할 수 없기 때문에 시간별 개똥쑥열수추출물의 비교는 peak의 면적 값으로 상호 비교를 진행하였음(그림 7).

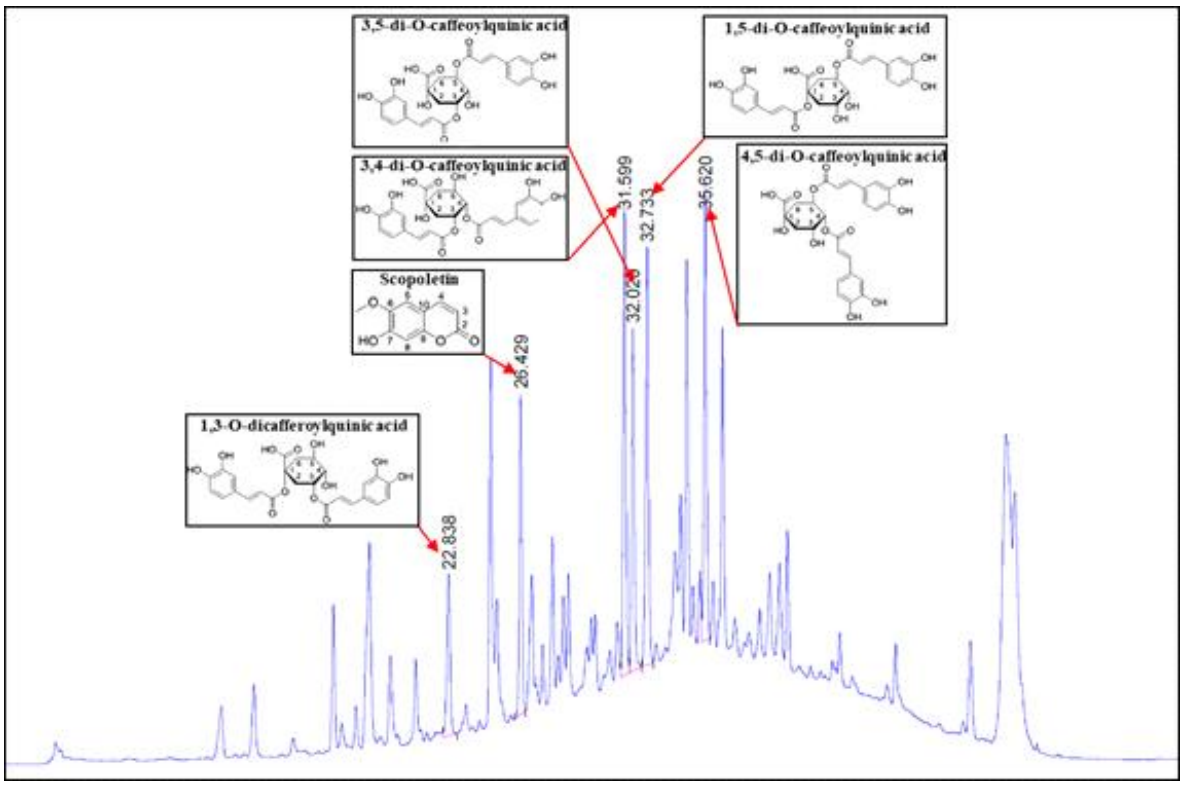


그림 7. 개똥쑥 열수추출물 주요성분 6종 동시 분석 chromatogram

개똥쑥 열수추출물 주요성분 6종의 peak 면적 값을 그림 8에 막대그래프로 작성하였고, 추출 시간경과에 따른 변화를 추세선을 표기하였음. 1,3-O-dicafferoylquinic acid는 추출 시간이 경과할수록 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid는 모두 추출 시간이 경과할수록 함량이 감소하는 경향이 나타났음. 그러나 Scopoletin과 3,4-di-O-caffeoylquinic acid는 추출시간에 따라 함량변화가 거의 없어 고온 노출에 안정적인 것으로 확인되었음. 상기 결과에 따라 개똥쑥열수추출물의 특이적인 6가지 성분 중, 온도에 안정적이지

않은 1,3-O-dicafferoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid는 제외하고 scopoletin과 3,4-di-O-caffeoylquinic acid를 지표 후보물질로 선정하였음.

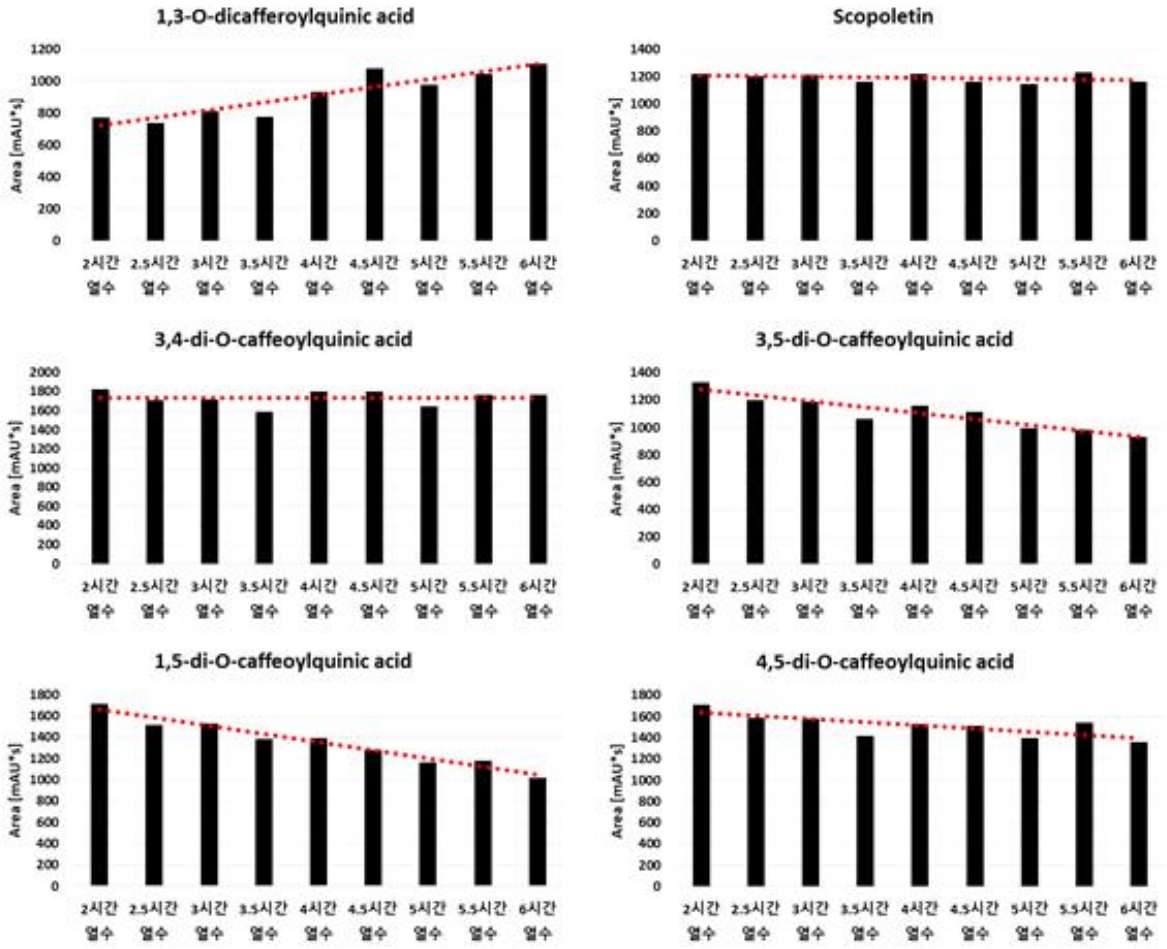


그림 8. 개똥쑥 열수추출물 추출시간에 따른 주요성분 6종의 함량 변화

(3) 지표 후보물질 scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid 안정성 시험

저장기간에 따른 scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid(이하 isochlorogenic acid B, ICAB)의 함량 변화를 확인하기 위해 개똥쑥열수추출분말 안정성 시험을 실시하였음. 개똥쑥 열수추출분말을 100g씩 포장하여 50℃에 6개월 저장하며 0, 2, 4, 6개월 시점에 지표후보물질 scopoletin, isochlorogenic acid B를 분석하였음.

(가) 분석 방법

개똥쑥 열수추출분말을 각각 100 mL 부피플라스크에 1g 취한 후 50% 메탄올을 이용해 100 mL로 정용하였음. 30분간 초음파 추출 후 0.45 mm 멤브레인 필터로 여과해 10

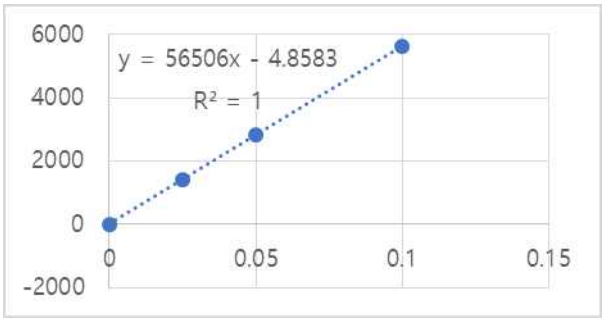
mg/mL 농도로 제조하여 시험용액으로 사용하였음. Scopoletin, isochlorogenic acid B를 각각 5 mg 취한 후 50% 메탄올 5 mL를 넣어 완전 용해 후 1 mg/mL 농도의 표준원액을 제조하였음. Scopoletin 1 mg/mL과 isochlorogenic acid B 1 mg/mL를 1:1로 혼합하여 제조한 scopoletin과 isochlorogenic acid B 0.5 mg/mL 농도의 혼합액을 적정량 희석하여 표준용액으로 하였음.

HPLC 분석은 binary pump, online degasser, autosampler, PDA (photodiode array detector)로 구성된 Agilent 1260 Infinity HPLC system을 이용하였음. 분석 컬럼은 YMC-pack pro C18(4.6 mm x 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 유기 이동상(A)은 메탄올(0.1 % TFA)이고, 수성 이동상 (B)은 탈이온수 (0.1% TFA)를 사용하였음. 검출파장은 325 nm 였고, 유속은 1.0 mL/min로 유지하였음. 이동상의 농도구배는 15 - 60% A (0-40 min), 60 % A (40 - 45 min), 60 - 100% A (45 - 46 min), 100% A (46-54 min), 100 - 15% A (54 - 55 min), 15% A (55 - 60 min) 이었으며, 시험용액은 20 μL를 주입하였음.

(나) 분석 결과

① 개똥쑥 추출분말 저장 0개월 scopoletin 함량 : 1.74 ± 0.01 mg/g

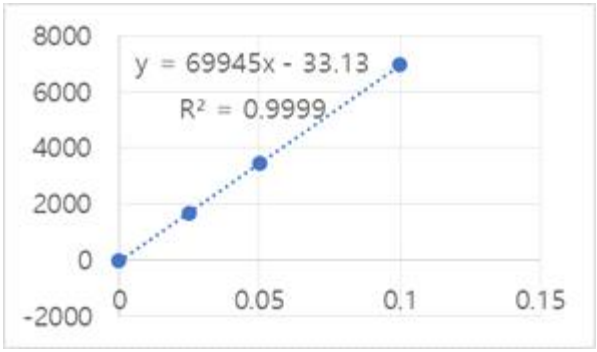
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0	0
scopoletin	0.025	1408.15
scopoletin	0.05	2810.22
scopoletin	0.1	5650.82



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Scopoletin 함량 (mg/g)	Scopoletin 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	994.29	0.01768	1.75	1.74 ± 0.01
개똥쑥열수추출분말 2	10	979.79	0.01743	1.73	
개똥쑥열수추출분말 3	10	989.20	0.01759	1.74	

② 개똥쑥 추출분말 저장 0개월 isochlorogenic acid B 함량 : 1.24 ± 0.01 mg/g

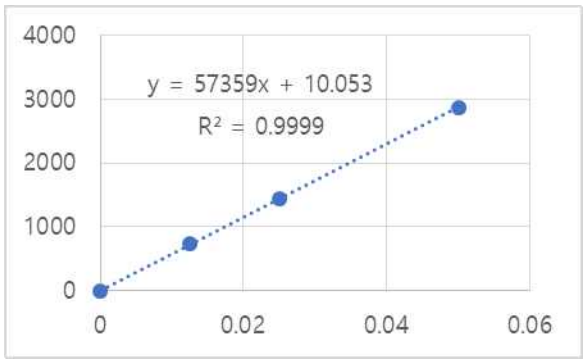
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
Isochlorogenic acid B	0	0
Isochlorogenic acid B	0.025	1687.81
Isochlorogenic acid B	0.05	3439.38
Isochlorogenic acid B	0.1	6980.64



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Isochlorogenic acid B 함량 (mg/g)	Isochlorogenic acid B 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	857.12	0.01273	1.25	1.24 ± 0.01
개똥쑥열수추출분말 2	10	834.26	0.011240	1.23	
개똥쑥열수추출분말 3	10	839.48	0.01248	1.24	

③ 개똥쑥 추출분말 저장 2개월 scopoletin 함량 : 1.72 ± 0.05 mg/g

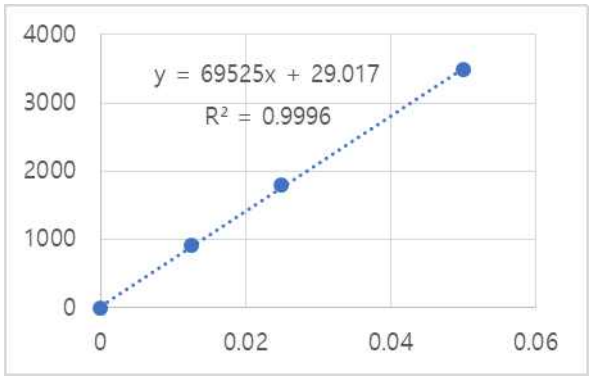
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0	0
scopoletin	0.0125	739.97
scopoletin	0.025	1444.73
scopoletin	0.05	2874.40



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Scopoletin 함량 (mg/g)	Scopoletin 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	997.38	0.01721	1.70	1.72 ± 0.05
개똥쑥열수추출분말 2	10	1036.44	0.01789	1.77	
개똥쑥열수추출분말 3	10	979.09	0.01689	1.67	

④ 개똥쑥 추출분말 저장 2개월 isochlorogenic acid B 함량 : 1.10 ± 0.04 mg/g

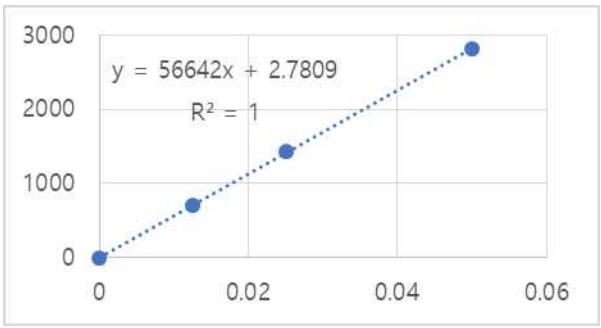
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
Isochlorogenic acid B	0	0
Isochlorogenic acid B	0.0125	917.24
Isochlorogenic acid B	0.025	1796.43
Isochlorogenic acid B	0.05	3485.82



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Isochlorogenic acid B 함량 (mg/g)	Isochlorogenic acid B 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	821.84	0.01140	1.12	1.10 ± 0.04
개똥쑥열수추출분말 2	10	813.84	0.01129	1.12	
개똥쑥열수추출분말 3	10	770.92	0.01067	1.06	

⑤ 개똥쑥 추출분말 저장 4개월 scopoletin 함량 : 1.69 ± 0.02 mg/g

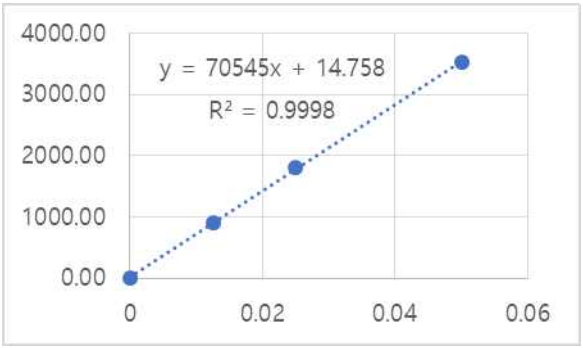
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0	0
scopoletin	0.0125	706.61
scopoletin	0.025	1430.68
scopoletin	0.05	2830.00



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Scopoletin 함량 (mg/g)	Scopoletin 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	970.97	0.01709	1.69	1.69 ± 0.02
개똥쑥열수추출분말 2	10	979.30	0.01724	1.71	
개똥쑥열수추출분말 3	10	961.79	0.01693	1.68	

⑥ 개똥쑥 추출분말 저장 4개월 isochlorogenic acid B 함량 : 1.04 ± 0.05 mg/g

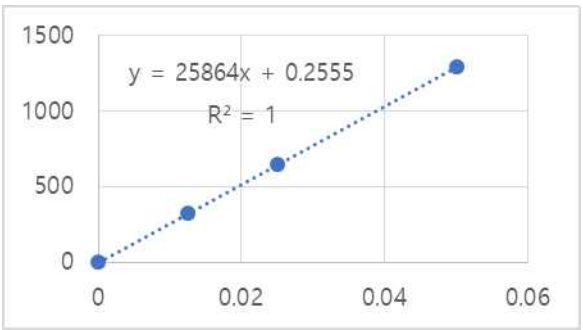
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
Isochlorogenic acid B	0	0
Isochlorogenic acid B	0.0125	898.31
Isochlorogenic acid B	0.025	1805.31
Isochlorogenic acid B	0.05	3528.14



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Isochlorogenic acid B 함량 (mg/g)	Isochlorogenic acid B 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	804.64	0.01120	1.10	1.04 ± 0.05
개똥쑥열수추출분말 2	10	736.78	0.01023	1.01	
개똥쑥열수추출분말 3	10	733.53	0.01019	1.01	

⑦ 개똥쑥 추출분말 저장 6개월 scopoletin 함량 : 1.70 ± 0.10 mg/g

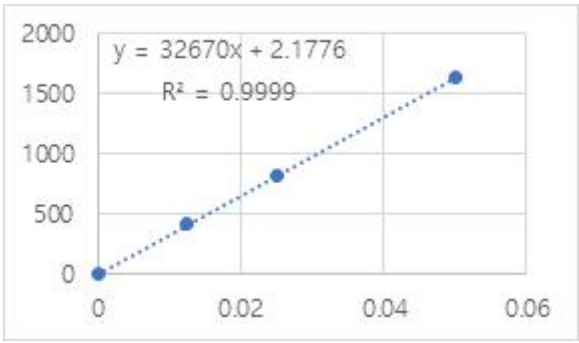
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0	0
scopoletin	0.0125	324.67
scopoletin	0.025	645.71
scopoletin	0.05	1293.78



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Scopoletin 함량 (mg/g)	Scopoletin 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	469.62	0.01815	1.80	1.70 ± 0.10
개똥쑥열수추출분말 2	10	445.03	0.01720	1.70	
개똥쑥열수추출분말 3	10	419.91	0.01623	1.61	

⑧ 개똥쑥 추출분말 저장 6개월 isochlorogenic acid B 함량 : 1.10 ± 0.21 mg/g

표준시료	농도 (mg/ml)	면적
Isochlorogenic acid B	0	0
Isochlorogenic acid B	0.0125	418.2226
Isochlorogenic acid B	0.025	811.7675
Isochlorogenic acid B	0.05	1637.325



시험시료	농도 (mg/ml)	면적	시험용액 농도 (mg/ml)	Isochlorogenic acid B 함량 (mg/g)	Isochlorogenic acid B 평균 (mg/g)
개똥쑥열수추출분말 1	10	349.95	0.01065	1.04	1.10 ± 0.21
개똥쑥열수추출분말 2	10	440.14	0.01341	1.33	
개똥쑥열수추출분말 3	10	307.96	0.00936	0.93	

⑨ 분석결과 종합

개똥쑥 열수추출분말의 6개월간 안정성 시험 결과 2가지 지표후보물질 중 scopoletin은 저장기간동안 안정적으로 함량이 유지되었지만, isochlorogenic acid B는 저장기간이 경과함에 따라 감소하는 경향이 나타났음. 개똥쑥 열수추출물의 6가지 주요 성분 중 최종적으로 안정성이 뛰어난 scopoletin을 지표성분으로 선정하였음(그림 9).

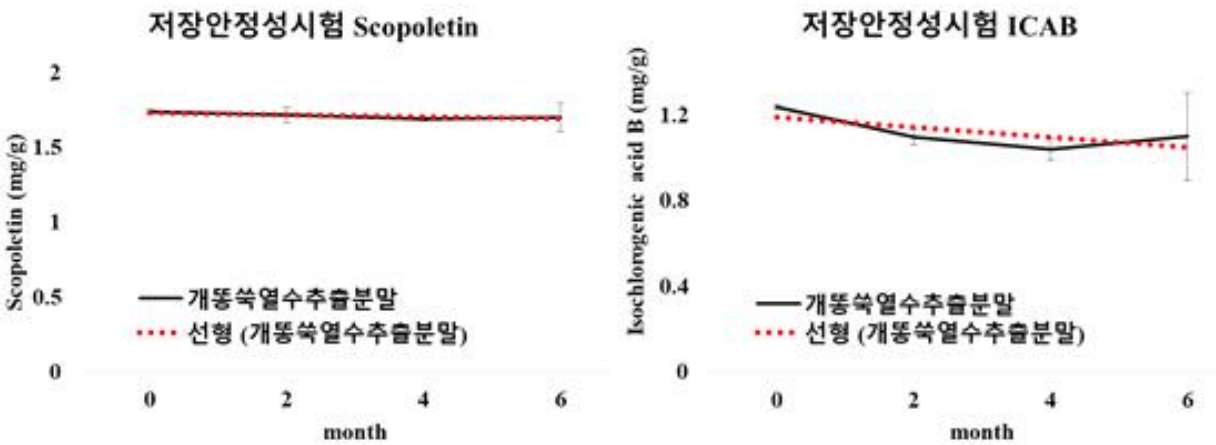


그림 9. 개똥쑥 열수추출분말 지표후보물질 안정성시험

나) 시험법 개발 및 밸리데이션

(1) 시험법 개발

개똥쑥 추출분말에서 최종 지표성분으로 선정된 scopoletin의 최적의 정량시험법을 다음과 같이 확립하였음.

Scopoletin 표준물질을 약 10 mg 정밀하게 달아 50% 수성 메탄올 10 mL에 녹여 농도가 1 mg/mL인 표준원액을 제조하고, 이 용액을 50% 수성 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였음. 검체 일정량을 정확히 칭량하여 부피플라스크에 넣은 후 50% 메탄올을 가하여 용해함. 용해액을 초음파진탕기에서 초음파 추출한 후 멤브레인필터로 여과하여 시험용액으로 하였음.

HPLC 분석은 binary pump, online degasser, autosampler, PDA (photodiode array detector)로 구성된 Agilent 1260 Infinity HPLC system을 이용하였음. 컬럼은 Luna C18(2) 컬럼 (4.6 x 250 mm I.D., 5 μm, Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 유기 이동상(A)은 메탄올 (0.1 % TFA)이고, 수성 이동상 (B)은 탈이온수 (0.1% TFA)를 사용하였음. 검출파장은 345 nm 였고, 유속은 1.0 mL/min, 샘플의 온도는 25℃로 유지하였음. 이동상의 농도구배는 20 - 40% A (0-30 min), 40-100 % A (30 - 31 min), 100% A (31 - 35 min), 100-20% A (35-35.5 min), 20% A (35.5 - 45 min) 이었으며, 표준용액 및 시험용액은 20μL를 주입하여 분석을 진행하는 것으로 시험법을 개발하였음.

(2) 시험법 밸리데이션

(가) 밸리데이션 방법

① 특이성

표준용액 (scopoletin 2.5 μg/mL)과 시험용액 (개똥쑥 열수추출분말 2.5 g)의 HPLC 크로마토그램을 통해 scopoletin 피크 및 인근 물질 피크의 머무름 시간 및 scopoletin의 UV 스펙트럼 비교를 통해 시험법의 특이성을 측정하였음.

② 정확도

개똥쑥 열수추출분말 1.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출하였음. 해당 용액을 1 mL 취해 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9 mL를 첨가하여 10배 희석하였다. 10 배 희석한 개똥쑥 열수추출분말 시료 900 μl에 각각 50% 메탄올 용액 및 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL에 해당하는 scopoletin 용액을 100 μl 첨가하여, 첨가한 scopoletin 최종농도가 0 μg/mL, 1 μg/mL, 2 μg/mL, 3 μg/mL이 되도록 회수율 시험용액을 제조하였음. 정확도는 50%메탄올 첨가한 대조군(0 μg/mL)과

scopoletin을 첨가한 실험군 (1 μg/mL, 2 μg/mL, 3 μg/mL) 간의 농도차이를 계산하여 확인하였으며, 해당 정확도 시험은 3회 반복하여 수행되었음.

③ 일내정밀도 (반복성)

개똥쑥 열수추출분말 1.0, 2.0 3.0 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출 하였음. 각 해당 용액을 1 mL 취해 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9 mL를 첨가하여 각각 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL의 농도가 되도록 10배 희석하였음. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 함유된 scopoletin의 함량을 μg/mL 단위로 계산한 뒤 이를 다시 μg/g의 단위로 환산하였음. 일내 정밀도 시험은 5회 반복하였음.

④ 일간정밀도 (재현성)

개똥쑥 열수추출분말 1.5, 2.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출 하였음. 각 해당 용액을 1 mL 해 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9 mL를 첨가하여 각각 1.5, 2.5 mg/mL의 농도가 되도록 10배 희석하였음. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 함유된 scopoletin의 함량을 μg/mL 단위로 계산한 뒤 이를 다시 μg/g의 단위로 환산하였음. 일간정밀도 시험은 1일 2개의 시료에 대해 5회 반복 측정하였고 이를 5일간 반복하였음.

⑤ 정량한계

농도가 1 mg/mL의 scopoletin 표준원액을 50% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 10, 50, 100 μg/mL의 총 7개 농도로 제조하였음. 희석한 scopoletin 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였으며 농도별 면적을 구하여 검량선을 구하였음. 상기과정을 3회 반복하였으며 정량한계는 검량선 기울기 평균(S) 및 y 절편의 표준편차(σ)를 이용하였으며 아래의 계산식을 사용하여 정량한계를 계산하였음.

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma / S$$

⑥ 직선성

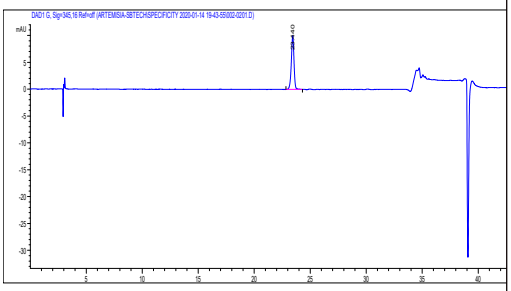
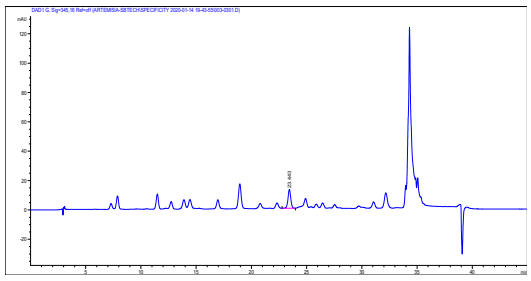
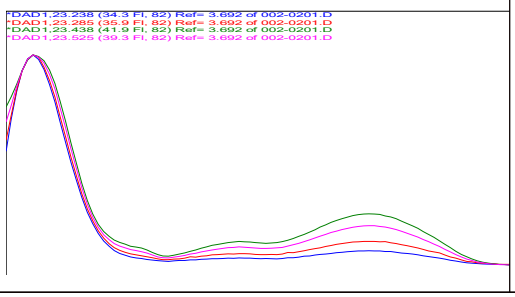
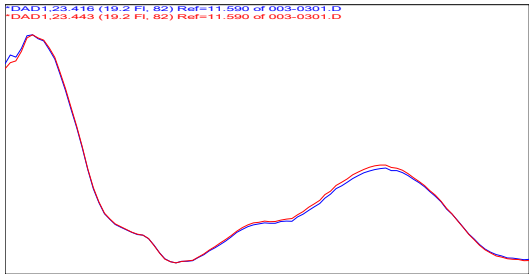
농도가 1 mg/mL의 scopoletin 표준원액을 50% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 0.25, 0.5, 2.5, 10, 25 μg/mL의 총 5개 농도로 제조하였음. 희석한 scopoletin 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였으며 농도별 면적을 구하여 검량선을 구하였음. 상기과정을 3회 반복하였으며 결정계수(r^2) 값이 0.990 이상인지의 여부를 확인하였음.

(나) 시험법 밸리데이션 결과

① 특이성

Scopoletin 표준용액과 개똥쑥 열수추출분말 시험용액의 크로마토그램을 통해 본 분석조건에서 간섭물질의 영향이 없음을 확인하였음. 또한, scopoletin 표준용액과 개똥쑥 열수추출분말 시험용액의 해당 성분에 대한 머무름 시간 및 UV 스펙트럼이 일치함을 확인하였음.

HPLC 크로마토그램 및 UV 스펙트럼

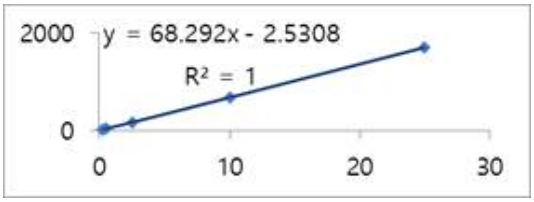
	표준용액	시험용액
크로마토그램		
UV 스펙트럼		

② 정확도 (회수율 시험)

표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 확인하였고, 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였음. 시험결과 전체 회수율 평균은 100.58%였고, 회수율 구간은 95.33 - 102.55% 였음. 이는 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인의 회수율시험 기준인 지표물질 0.1-1% 농도에 해당하는 회수율(90-108%)에 부합되는 결과이며 따라서 본 시험법의 정확도를 확인하였음.

회수율시험 1

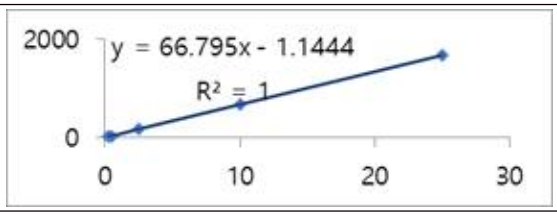
표준시료	농도 (μg/ml)	면적
scopoletin	0.25	16.9
scopoletin	0.5	33.6
scopoletin	2.5	169.3
scopoletin	10	671.6
scopoletin	25	1708.1



시험시료	첨가값 (μg/ml)	면적	측정값 (μg/ml)	회수값 (μg/ml)	정확성 (%)
S+B	0	127	1.90		
S+1	1	192.1	2.85	0.95	95.33
S+2	2	262.8	3.89	1.99	99.43
S+3	3	332.8	4.91	3.01	100.45

회수율시험 2

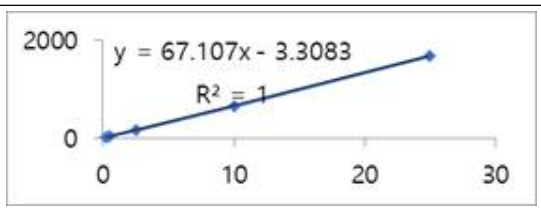
표준시료	농도 (μg/ml)	면적
scopoletin	0.25	16.2
scopoletin	0.5	33.3
scopoletin	2.5	165.4
scopoletin	10	664.7
scopoletin	25	1669.6



시험시료	첨가값 (μg/ml)	면적	측정값 (μg/ml)	회수값 (μg/ml)	정확성 (%)
S+B	0	124.7	1.88		
S+1	1	193.2	2.91	1.03	102.55
S+2	2	261.6	3.93	2.05	102.48
S+3	3	329.4	4.95	3.06	102.15

회수율시험 3

표준시료	농도 (μg/ml)	면적
scopoletin	0.25	16.2
scopoletin	0.5	32.2
scopoletin	2.5	163.7
scopoletin	10	661.2
scopoletin	25	1677



시험시료	첨가값 (μg/ml)	면적	측정값 (μg/ml)	회수값 (μg/ml)	정확성 (%)
S+B	0	124.4	1.90		
S+1	1	192.5	2.92	1.01	101.48
S+2	2	259.5	3.92	2.01	100.66
S+3	3	327.2	4.93	3.02	100.73

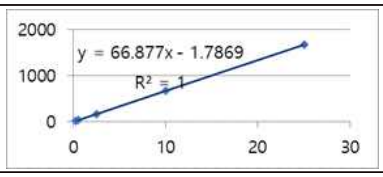
정확도(회수율) 시험 결과 요약

반복수	첨가농도 (μg/ml)		
	1.0	2.0	3.0
1	95.33	99.43	100.45
2	102.55	102.48	102.15
3	101.48	100.66	100.73
함량별 평균 회수율 (%)	99.79	100.86	101.11
전체 평균회수율 (%)	100.58		
회수율 구간 (%)	95.33 - 102.55		

③ 일내정밀도 (반복성)

시료량의 변화에 따른 반복 정밀도를 확인하기 위해 개똥쑥 열수추출분말 1.0, 2.0, 3.0 g을 취하여 5회 반복 측정하였으며 상대표준편차(RSD%) 구간은 1.71 - 2.15% 이었으며, 이는 지표물질 1% 농도범위의 반복성(RSD%) 3% 이내인 식품의약품안전처 건강기능식품 지표성분 밸리데이션 가이드라인에 부합하여 본 시험법의 일내정밀도를 확인하였음.

표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	17
scopoletin	0.5	32.8
scopoletin	2.5	164.4
scopoletin	10	663.2
scopoletin	25	1671.7



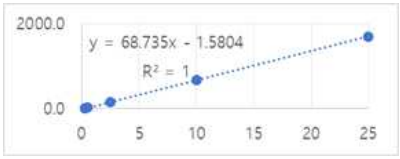
	검체량								
	1g			2g			3g		
#	면적	분석값 (μg/ml)	분석값 (μg/g)	면적	분석값 (μg/ml)	분석값 (μg/g)	면적	분석값 (μg/ml)	분석값 (μg/g)
1	94.3	1.44	1436.77	189.1	2.85	1427.15	284.4	4.28	1426.43
2	94.8	1.44	1444.25	185.9	2.81	1403.22	281.8	4.24	1413.47
3	97.4	1.48	1483.12	193.4	2.90	1448.83	281.6	4.22	1406.00
4	99	1.50	1498.08	191.4	2.83	1414.44	285.9	4.30	1433.91
5	99.1	1.51	1507.05	194.7	2.94	1469.02	293.5	4.41	1468.80
		평균	1473.85		평균	1440.61		평균	1429.72
		표준편차	31.73		표준편차	26.22		표준편차	24.40
		RSD(%)	2.15		RSD (%)	1.82		RSD (%)	1.71
RSD 구간 (%) 1.71 - 2.15									

④ 일간정밀도(재현성)

실험일 간 반복정밀도를 확인하기 위해 개똥쑥 열수추출분말 1.5, 2.5 g을 취하여 1일 5회 반복하여 총 5일 반복 측정하였으며 총 50개 시료에 대한 상대표준편차(RSD)는 1.89%로, 이는 1% 지표성분 농도범위의 재현성(RSD%) 6% 이내인 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인에 부합하여 본 시험법의 일간정밀도를 확인하였다.

Day 1

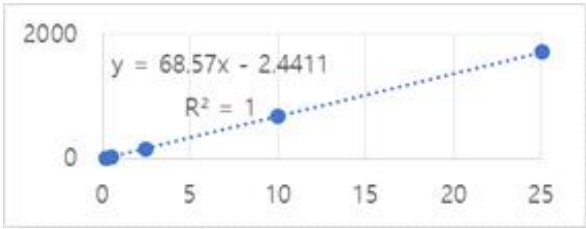
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	14.9
scopoletin	0.5	35.1
scopoletin	2.5	171.3
scopoletin	10	683.6
scopoletin	25	1696.5



	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
반복수	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	140.8	2.06	1373.21	233.7	3.43	1371.34
2	139.8	2.05	1363.39	237.4	3.48	1393.14
3	144.9	2.12	1413.47	230.9	3.39	1354.84
4	143.2	2.10	1396.78	239.5	3.51	1405.51
5	144.7	2.12	1411.51	231.4	3.39	1357.78
		평균	1391.67		평균	1376.52
		표준편차	22.56		표준편차	22.16
		RSD (%)	1.62		RSD (%)	1.61
RSD 1.06%						

Day 2

표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	18.5
scopoletin	0.5	35.1
scopoletin	2.5	164.3
scopoletin	10	678.7
scopoletin	25	1714



	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
반복수	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	135.6	2.01	1342.09	234.9	3.46	1384.52
2	143.2	2.12	1415.98	236.2	3.48	1392.10
3	137.4	2.04	1359.59	239.2	3.52	1409.60
4	142.1	2.11	1405.29	239.5	3.53	1411.35
5	142.1	2.11	1405.29	232.2	3.42	1368.77
		평균	1385.65		평균	1393.27
		표준편차	32.66		표준편차	17.83
		RSD (%)	2.36		RSD (%)	1.28
RSD(n = 10) 1.81%						

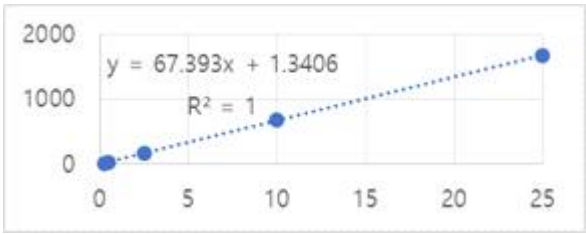
Day 3

표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	15.5
scopoletin	0.5	36.2
scopoletin	2.5	168.7
scopoletin	10	680.6
scopoletin	25	1703.8

	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
반복수	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	140.2	2.06	1375.72	232.5	3.42	1367.12
2	138.3	2.04	1357.14	222.6	3.27	1309.01
3	137.5	2.02	1349.31	233.7	3.44	1374.16
4	143.1	2.11	1404.09	229.5	3.37	1349.51
5	143.2	2.11	1405.06	225.9	3.32	1328.38
		평균	1378.26		평균	1345.64
		표준편차	25.87		표준편차	27.06
		RSD (%)	1.88		RSD (%)	2.01
RSD(n = 10) 2.23%						

Day 4

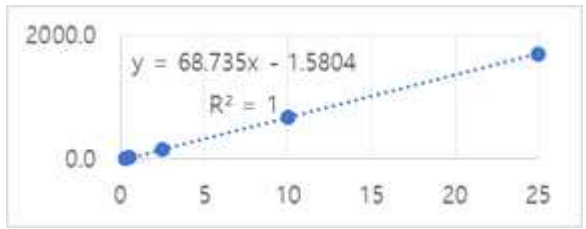
표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	17.2
scopoletin	0.5	33.9
scopoletin	2.5	168.8
scopoletin	10	680.3
scopoletin	25	1684.3



	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
반복수	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	140.1	2.06	1372.64	226.7	3.34	1337.58
2	140.6	2.07	1377.59	234.2	3.46	1382.10
3	140	2.06	1371.65	234.4	3.46	1383.29
4	144.3	2.12	1414.19	233.2	3.44	1376.16
5	146.1	2.15	1431.99	236.3	3.49	1394.56
		평균	1391.67		평균	1376.52
		표준편차	22.56		표준편차	22.16
		RSD (%)	1.62		RSD (%)	1.61
RSD(n = 10) 1.84%						

Day 5

표준시료	농도 (mg/ml)	면적
scopoletin	0.25	14.9
scopoletin	0.5	34.6
scopoletin	2.5	169.3
scopoletin	10	685.4
scopoletin	25	1717



	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
반복수	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	면적	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	137.4	2.02	1347.98	230.7	3.38	1351.74
2	137.1	2.02	1345.07	235.3	3.45	1378.51
3	137.8	2.03	1351.86	231.9	3.40	1358.73
4	138.2	2.03	1355.74	233.9	3.43	1370.37
5	139.4	2.05	1367.38	237.2	3.47	1389.57
		평균	1353.61		평균	1369.78
		표준편차	8.69		표준편차	15.13
		RSD (%)	0.64		RSD (%)	1.10
RSD (n = 10) 1.06%						

DAY 1 ~ 5 일간정밀성

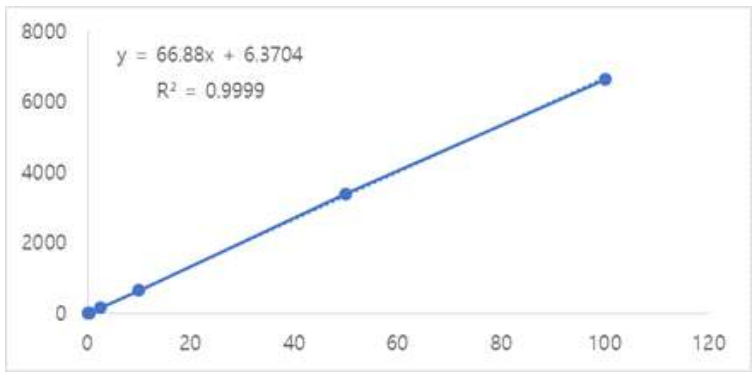
	검체량					
	1.5 g			2.5 g		
Day	반복수	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)	반복수	분석값(μg/ml)	분석값(μg/g)
1	1	2.06	1373.21	1	3.43	1371.34
	2	2.05	1363.39	2	3.48	1393.14
	3	2.12	1413.47	3	3.39	1354.84
	4	2.10	1396.78	4	3.51	1405.51
	5	2.12	1411.51	5	3.39	1357.78
2	1	2.01	1342.09	1	3.46	1384.52
	2	2.12	1415.98	2	3.48	1392.10
	3	2.04	1359.59	3	3.52	1409.60
	4	2.11	1405.29	4	3.53	1411.35
	5	2.11	1405.29	5	3.42	1368.77
3	1	2.06	1375.72	1	3.42	1367.12
	2	2.04	1357.14	2	3.27	1309.01
	3	2.02	1349.31	3	3.44	1374.16
	4	2.11	1404.09	4	3.37	1349.51
	5	2.11	1405.06	5	3.32	1328.38
4	1	2.06	1372.64	1	3.34	1337.58
	2	2.07	1377.59	2	3.46	1382.10
	3	2.06	1371.65	3	3.46	1383.29
	4	2.12	1414.19	4	3.44	1376.16
	5	2.15	1431.99	5	3.49	1394.56
5	1	2.02	1347.98	1	3.38	1351.74
	2	2.02	1345.07	2	3.45	1378.51
	3	2.03	1351.86	3	3.40	1358.73
	4	2.03	1355.74	4	3.43	1370.37
	5	2.05	1367.38	5	3.47	1389.57
		평균	1380.56		평균	1371.99
		표준편차	27.09		표준편차	24.90
		RSD (%)	1.96		RSD (%)	1.82
RSD(n=50) 1.89%						

⑤ 정량한계

표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y 절편 값을 이용하여 정량한계를 구하였음. 기울기 평균은 66.76이며 y 절편의 표준편차는 0.257로 이를 통해 정량한계는 0.038 μg/mL로 계산하였음.

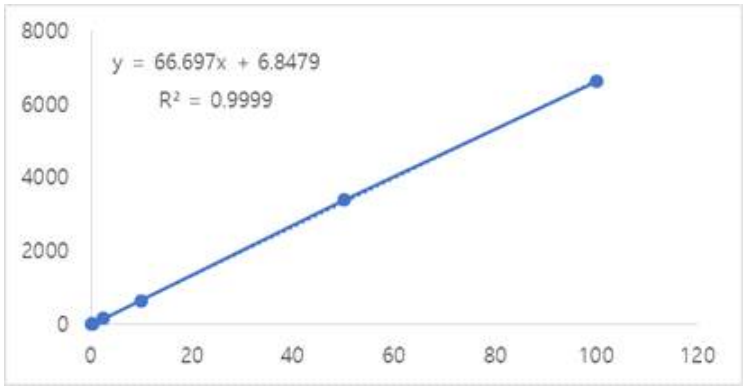
Test 1

함량 (μg/ml)	면적
0.1	9
0.25	17.7
0.5	34.9
2.5	165.3
10	662.9
50	3417.2
100	6662.4
기울기	66.88
y 절편	6.3704



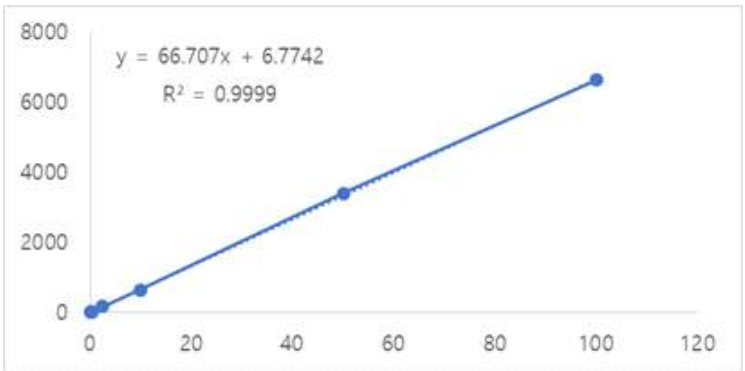
Test 2

함량 (μg/ml)	면적
0.1	9.8
0.25	19.4
0.5	33.7
2.5	166.1
10	662.2
50	3405.8
100	6645.9
기울기	66.697
y 절편	6.8479



Test 3

함량 (μg/ml)	면적
0.1	9.1
0.25	17.2
0.5	35.8
2.5	170.2
10	658.9
50	3405.3
100	6647.5
기울기	66.707
y 절편	6.7742



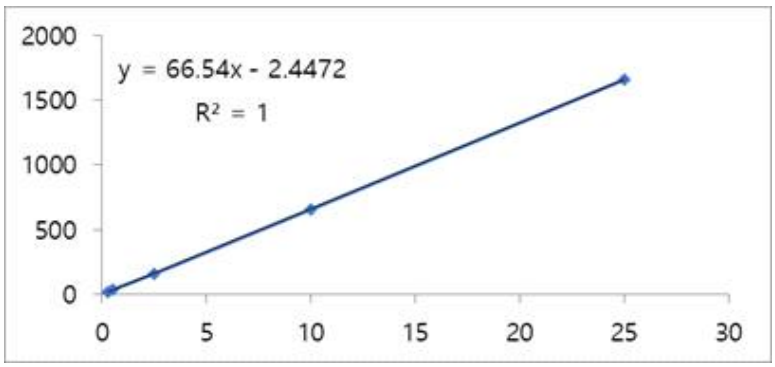
기울기 평균	66.76	y 절편의 표준편차	0.257
정량한계 (μg/ml)	0.038		

⑥ 직선성

표준용액을 5개 농도로 지정하여 0.25 - 25.0 μg/mL 범위에서 직선성을 확인하였음. 시험 시 발생할 수 있는 오차범위를 확인하기 위해 3회 반복 측정하였고 3개의 시험 모두 검량선의 상관계수 (r2) 값이 1로 5개의 농도범위에서 매우 우수한 직선성을 나타내었음.

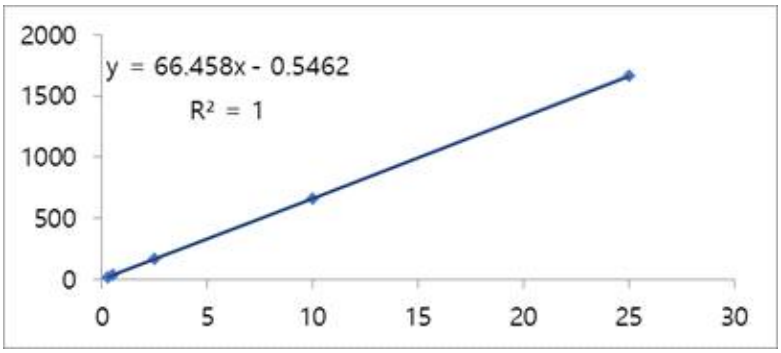
Test 1

함량 (μg/ml)	면적
0.25	15.6
0.5	34.6
2.5	162.2
10	657
25	1663.5
기울기	66.54
y 절편	-2.4472
r^2	1



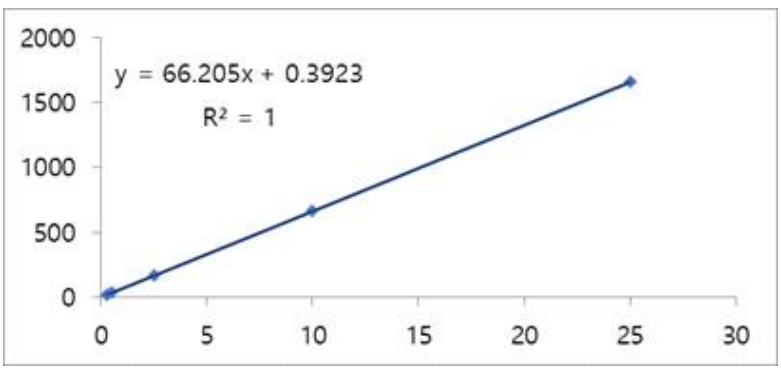
Test 2

함량 (μg/ml)	면적
0.25	16.9
0.5	34.1
2.5	164.1
10	662.6
25	1661.6
기울기	66.458
y 절편	-0.5462
r^2	1



Test 3

함량 (μg/ml)	면적
0.25	16
0.5	34.6
2.5	166.3
10	661.6
25	1655.8
기울기	66.205
y 절편	0.3923
r^2	1



다) 기준 규격 설정

시험법 밸리데이션이 완료된 개똥쑥 추출분말 내 scopoletin 정량분석 시험법을 공인분석기관인 한국식품과학연구원에 의뢰하여 3lot, 3반복 시험을 진행하였음. 그 결과 scopoletin 함량은 각각 1.26, 1.16, 1.39 mg/g으로 평균 1.27 mg/g의 함량으로 검출되었으며, 평균함량은 약 1.27 mg/g이었음. 이에 개똥쑥 열수추출분말의 scopoletin 규격을 평균함량의 약 80 ~ 120% 범위로 설정하여 1.0 ~ 1.6 mg/g으로 설정하였음(표 5, 그림 10)

표 5. 개똥쑥 열수추출분말 공인기관 분석 결과

Lot No. / 반복수	1 (Lot 1)	2 (Lot 2)	3 (Lot 3)	평균
1반복	1.26	1.13	1.24	
2반복	1.29	1.16	1.43	
3반복	1.24	1.19	1.49	
평균	1.26	1.16	1.39	1.27

그림 10. 개똥쑥 열수추출분말 공인기관 분석 성적서

<1차년도 협동연구기관 : 개똥쑥 추출물의 생리활성 평가 및 작용기전 연구>

4) 추출조건별 활성 비교

가) 수확시기 및 추출조건별 생물학적 활성 비교

(1) 시험 목적

개똥쑥은 채취시기에 따라 개화기인 6-8월 이전에 수확되는 봄쑥, 개화기에 수확되는 여름쑥, 꽃이 진 다음 수확되는 가을쑥으로 구분되며, 채취시기에 따라 건조수율, 효능 차이가 있다고 알려져 있어 수확시기 및 추출조건별로 모두 생물학적 활성을 비교할 필요가 있음.이에 수확시기별로 개똥쑥을 구입하고, 추출조건(용매, 시간, 온도)을 달리하여 시험 생산한 후, 시험 생산된 원료의 생물학적 활성을 비교함으로써 생산수율, 원가 및 생물학적 활성을 고려한 최적의 추출조건을 선정하여 주관기관에 제공하고자 함.

(2) 시험 방법

다양한 조건으로 시험 생산된 개똥쑥 추출물의 생물학적 활성을 비교하기 위한 *in vitro* bioassay system으로 Raw264.7 세포주를 이용하여 아래와 같은 방법으로 시험을 실시함.마우스 대식세포 Raw264.7는 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 25mM HEPES를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO2조건의 배양기에서 배양하였음. LPS로 자극 받은 마우스 대식세포에서 개똥쑥 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 24-well plate에 Raw264.7 세포를 5×105cells/well로 분주하여 12시간 이상 안정화시킨 다음, 다양하게 시험생산된 개똥쑥 추출물 시료를 250 μg/mL로 처리한 직후 LPS(100ng/mL)로 자극을 가하여 24시간 동안 배양하였음. 배양이 끝난 후 각각의 배양액을 모아 원심분리하여 상층액만을 수집한 다음, 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β는 ELISA kit(고마바이오텍)를, Nitrite는 NO assay kit(Cell Biolabs)를 이용하여 분석한 후 각각 450nm와 540nm에서 흡광도를 측정함.

(3) 시험 결과

(가) 수확시기별, 추출조건별 개똥쑥 추출물 시험생산

시중에서 유통되는 봄쑥, 가을쑥을 대상으로 추출조건별 시험생산 원료를 제조한 결과, 아래 표와 같은 추출수율을 획득함. 수율의 경우 가을쑥을 열수로 60℃에서 4시간 또는 24시간 동안 추출한 시료 3번, 7번이 약 7% 정도로 가장 낮은 수율을 나타냄. 반면, 봄쑥의 경우 추출조건별로 차이는 있으나 대략 18~29% 정도의 추출수율을 보임(표 6).

표 6. 수확시기 및 추출조건에 따른 개똥쑥 추출물 정보

번호	수확시기	산지	추출용매	추출온도	추출시간	수율
1	봄	대전	열수	60℃	4시간	18.67 %
2	봄	대전	50% 에탄올	60℃	4시간	24.37 %
3	가을	대전	열수	60℃	4시간	6.95 %
4	가을	대전	50% 에탄올	60℃	4시간	10.14 %
5	봄	대전	열수	60℃	24시간	25.24 %
6	봄	대전	50% 에탄올	60℃	24시간	29.93 %
7	가을	대전	열수	60℃	24시간	7.84 %
8	가을	대전	50% 에탄올	60℃	24시간	10.16 %
9	가을	대전	열수	85℃	4시간	12.33 %
10	가을	대전	25% 에탄올	85℃	4시간	10.68 %

(나) Raw264.7 세포주에서의 Nitrite 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 nitrite 생성 억제 활성을 배양액으로부터 Griess reagent를 포함하는 assay kit으로 측정한 결과, 봄 개똥쑥 열수추출물(시료 1, 5)의 경우 LPS로 유도된 대식세포의 nitrite 생성 억제 효과가 미약한 것으로 확인됨. 그러나 봄 개똥쑥 열수추출물을 제외한 나머지 추출물의 효과는 거의 동일하게 나타났으며 NC(LPS를 처리하지 않은 음성대조군)와 유사한 수준으로 nitrite 생성을 억제함. 동일한 열수 추출 조건에서는 가을쑥이 봄쑥보다 뛰어난 활성을 가진 것으로 확인되었으나, 50% 에탄올 추출물에서는 추출 온도나 시간에 관계없이 가을쑥과 봄쑥의 활성이 거의 동일하게 나타남(그림 11).

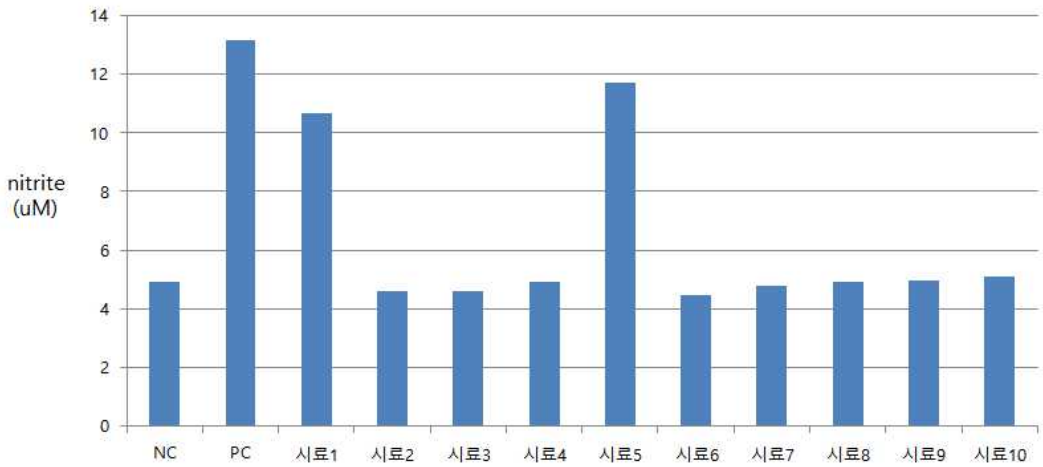


그림 11. 대식세포주에서 나타난 다양한 개똥쑥 추출물의 nitrite 억제 활성

(다) Raw264.7 세포주에서의 TNF α 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 TNF α 생성 억제 활성을 배양액으로부터 ELISA로 측정한 결과, 동일 추출조건에서는 봄쑥보다 가을쑥 추출물의 항염증 효과가 조금 더 우수하였으며, 동일 쑥 종류에서는 열수추출물보다 50% 에탄올추출물의 효과가 더 우수하였으나, 추출시간에 따른 차이는 거의 나타나지 않았음. 활성별 추출물의 순위는 가을쑥 50% 에탄올추출물>봄쑥 50% 에탄올추출물> 가을쑥 25% 에탄올추출물 순임 (그림 12).

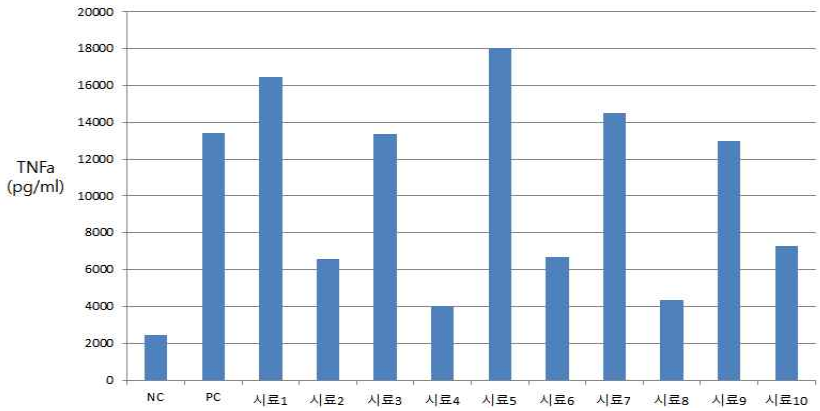


그림 12. 대식세포주에서 나타난 다양한 개똥쑥 추출물의 TNF α 억제 활성

(라) Raw264.7 세포주에서의 IL-1 β 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 IL-1 β 생성 억제 활성을 배양액으로부터 ELISA로 측정한 결과, 동일 추출조건에서는 봄쑥보다 가을쑥 추출물의 IL-1 β 감소 효과가 더 뛰어났으며, 동일 쑥 종류에서는 열수추출물보다 50% 에탄올추출물의 효과가 더 뚜렷하였으나, 추출시간에 따른 차이는 거의 나타나지 않았음. 활성별 추출물의 순위는 가을쑥 50% 에탄올추출물>봄쑥 50% 에탄올추출물> 가을쑥 25% 에탄올추출물 순임 (그림 13).

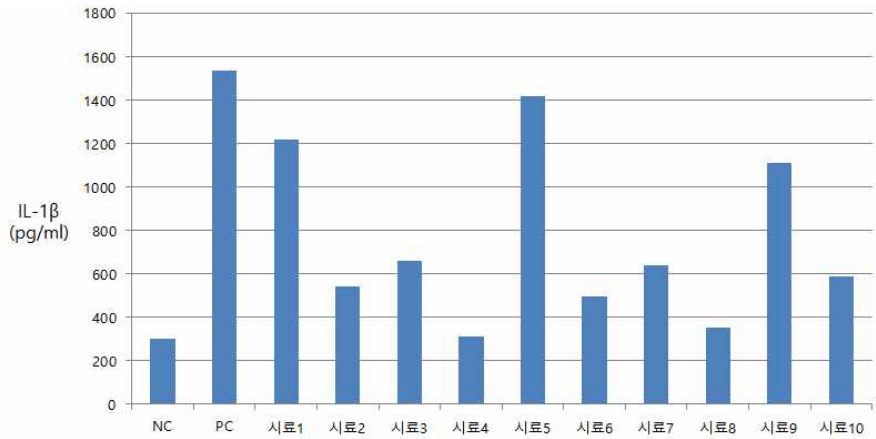


그림 13. 대식세포주에서 나타난 다양한 개똥쑥 추출물의 IL-1 β 억제 활성

나) 후보 추출물 3종의 생물학적 활성 비교

(1) 시험 목적

수확시기 및 추출조건에 따른 각 추출물의 1차 활성 비교 실험 결과, 생물학적인 항염증 활성에 있어서는 전반적으로 가을 개똥쑥 또는 봄 개똥쑥의 50% 에탄올 추출물의 효과가 가장 우수하였으나, 추출수율면에서는 봄 개똥쑥의 열수 또는 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 추출수율을 기록하였음. 이를 종합할 때, 봄 개똥쑥의 50% 에탄올 추출물로 생산공정을 확립하는 것이 바람직해 보이나, 봄보다 가을 개똥쑥의 원재료 수급이 더 원활한 점, 특허 및 논문 상의 기존 선행 연구가 모두 가을쑥의 열수추출물로 이루어진 점, 50% 에탄올 추출물을 장기간 섭취할 경우 섭취자에게 안전성 우려가 있을 수 있는 점, 에탄올 추출 시 제조원가가 높은 점 등을 고려하여 가을쑥의 열수추출물과 25% 에탄올 추출물을 후보물질로 선정하였으며, 여기에 여름 개똥쑥의 25% 에탄올 추출물을 추가하여 총 3종의 생물학적 활성을 다시 비교하였음.

(2) 시험 방법

개똥쑥 추출물 후보물질 3종의 생물학적 활성을 비교하기 위한 *in vitro* bioassay system으로 Raw264.7 세포주를 이용하여 기존과 동일한 방법으로 시험을 실시함. LPS로 자극 받은 마우스 대식세포에서 개똥쑥 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 24-well plate에 Raw264.7 세포를 5×105cells/well로 분주하여 12시간 이상 안정화시킨 다음, 후보 추출물 3종을 500, 250, 125 μg/mL로 처리한 직후 LPS(100ng/mL)로 자극을 가하여 24시간 동안 배양하였음. 배양이 끝난 후 MTT assay를 실시하여 세포독성 유무를 확인하고, 각각의 배양액을 모아 원심분리하여 상층액만을 수집한 다음, 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β는 ELISA kit(고마바이오텍)를, Nitrite는 NO assay kit(Cell Biolabs)를 이용하여 분석한 후 각각 450nm와 540nm에서 흡광도를 측정함.

(3) 시험 결과

(가) 후보 추출물 3종의 추출 결과

시험 생산 결과, 후보물질 3종의 수율은 여름 25% 에탄올추출물>가을 열수추출물>가을 25% 에탄올추출물 순으로 나타났음(표 7).

표 7. 후보 추출물 3종의 시험생산 정보

번호	수확시기	산지	추출용매	추출온도	추출시간	수율
9	가을	대전	열수	85℃	4시간	12.33 %
10	가을	대전	25% 에탄올	85℃	4시간	10.68 %
11	여름	대구	25% 에탄올	85℃	4시간	19.00 %

(나) Raw264.7 세포주에서의 개똥쑥 추출물의 세포독성 관찰

MTT assay를 통한 세포독성 시험 결과, 개똥쑥 추출물 3종을 농도별로 처리한 후 배양기간 동안 시료에 의한 cytotoxic effect나 cell viability의 변화는 거의 관찰되지 않았음(그림 14).

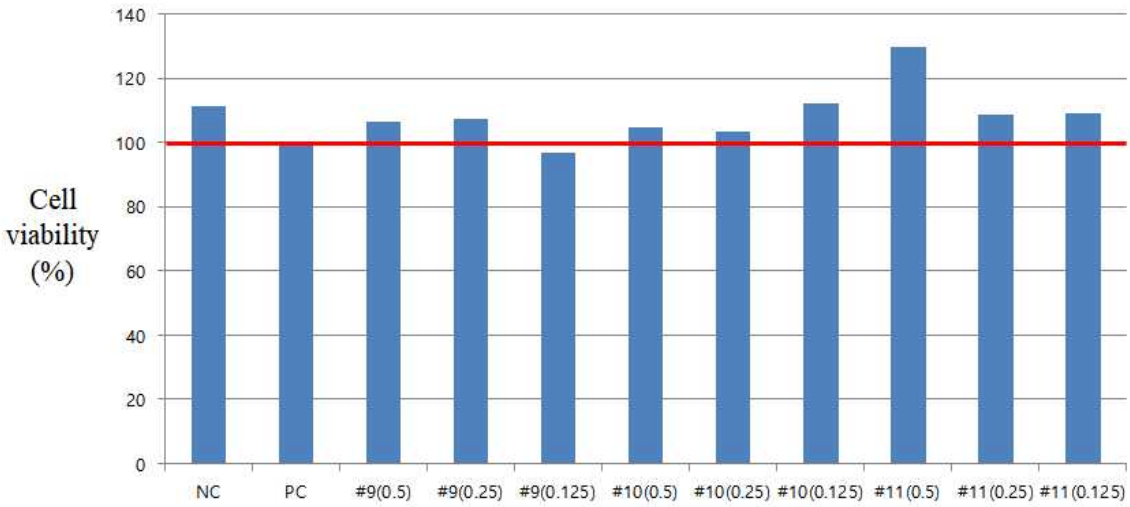


그림 14. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 세포독성

(다) Raw264.7 세포주에서의 Nitrite 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 nitrite 생성 억제 활성을 배양액으로부터 Griess reagent를 포함하는 assay kit으로 측정한 결과, 시료 11인 여름쑥의 25% 에탄올 추출물에서만 농도의존적인 nitrite 저해효과를 확인함(IC50=0.188mg/mL). 가을쑥 열수추출물인 시료 9와 가을쑥 25% 에탄올 추출물인 시료11은 동일농도에서 비록 농도의존적으로 nitrite를 억제하지는 않았으나, 모든 농도에서 최소 50% 이상, 최대 100%의 억제효과를 보임. 특히 동일 농도별 nitrite 감소효과를 비교한 결과, 모든 농도에서 시료 10의 효과가 가장 우수한 것으로 확인됨(그림 15).

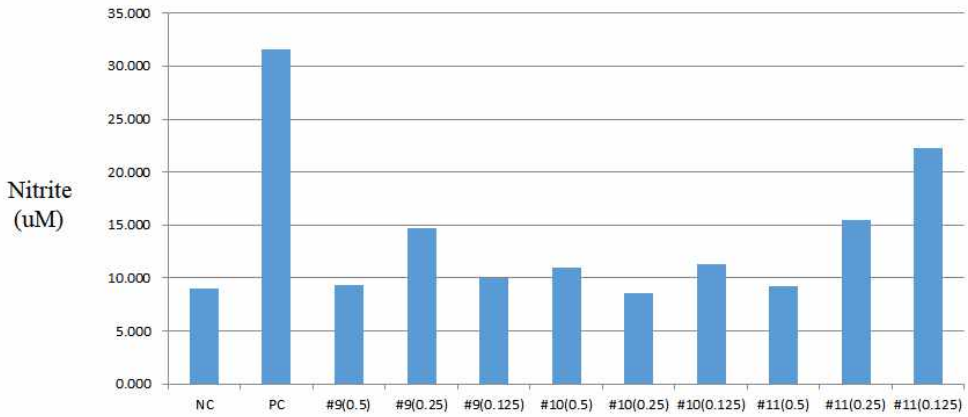


그림 15. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 nitrite 억제 활성

(라) Raw264.7 세포주에서의 TNF α 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 TNF α 생성 억제 활성을 배양액으로부터 ELISA로 측정한 결과, 동일 농도 조건에서는 가을 개똥쑥의 25% 에탄올 추출물인 시료 10의 TNF α 억제 활성이 가장 높은 것으로 나타났음(그림 16).

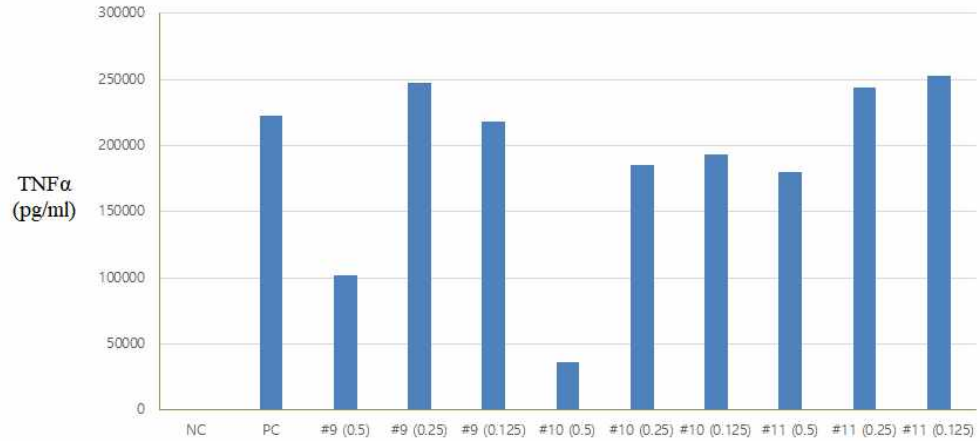


그림 16. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 TNF α 억제 활성

(마) Raw264.7 세포주에서의 IL-1 β 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 IL-1 β 생성 억제 활성을 배양액으로부터 ELISA로 측정한 결과, 시료 10, 11의 경우 농도의존적으로 LPS에 의한 대식세포의 IL-1 β 생성을 억제하는 경향을 보였으나, 시료 9의 경우 용량반응성이 뚜렷하게 나타나지 않음. 동일 농도별로 각 시료의 효과를 비교한 결과, 시료 10이 가장 우수한 것으로 나타남(IC50=0.297mg/mL). 또 동일 추출조건(25% 에탄올, 85℃, 4h)에서는 여름쑥(시료 11)보다 가을쑥(시료 10)의 항염증 효과가 더 뛰어난 것으로 확인됨(그림 17).

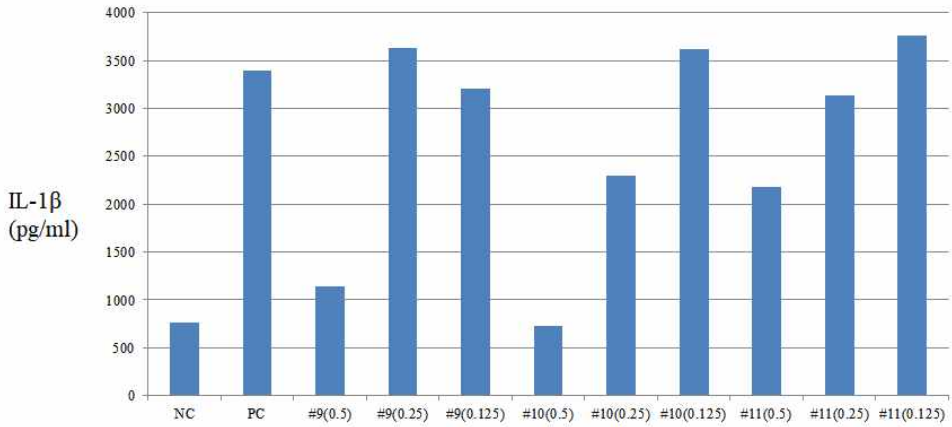


그림 17. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 IL-1β 억제 활성

(4) 결론

후보 추출물 3종의 생물학적 활성 비교 실험에서 가장 우수한 활성을 보인 가을 개똥쑥의 25% 에탄올 추출물과 선행연구 및 LPS/D-GalN을 이용한 간손상 마우스 모델 예비실험에서 우수한 효능을 보인 가을 개똥쑥 열수추출물을 대상으로 GMP 업소에서 각각 대량생산을 실시한 후 이들의 생물학적 활성을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험으로 다시 비교함으로써 기능성 원료의 최종 추출공정을 확립하고자 함.

5) 원료의 유해물질, 영양성분 분석 및 기준 규격 확립

가) 원료의 잔류농약 분석

(1) 시험 목적

개똥쑥의 경우 토양이나 지형, 기후를 가리지 않고 어느 곳에서나 생육이 용이하여 성장을 촉진하거나 수확량을 늘리기 위해 화학적 비료나 농약을 사용하는 경우는 거의 없으나, 주변 경작지로부터 비의도적 혼입 우려가 있을 수 있어 유해물질에 대한 원료의 안전성 확보 차원에서 공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 개똥쑥 추출물의 잔류농약 분석을 실시하고자 하며, 개똥쑥 추출물의 잔류농약 검출 시 원재료인 개똥쑥에 대해서도 추가적으로 잔류농약 검출 여부를 확인하고자 함.

(2) 시험 방법

개똥쑥 추출물에 대하여 식품공전의 일반시험법 중 채소류의 농약잔류시험법으로서 다종농약다성분 분석법(Multi class pesticide multiresidue methods)을 사용하여 BHC, Bifenthrin, Carbofuran, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin 등의 58 종의 잔류농약 성분을 분석함.

(3) 시험 결과

개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 잔류농약 58종의 검사 결과, 모두 불검출로 확인되었으며, 그 시험성적서는 영양성분 시험성적서와 함께 첨부하였음.

나) 원료의 중금속 분석

(1) 시험 목적

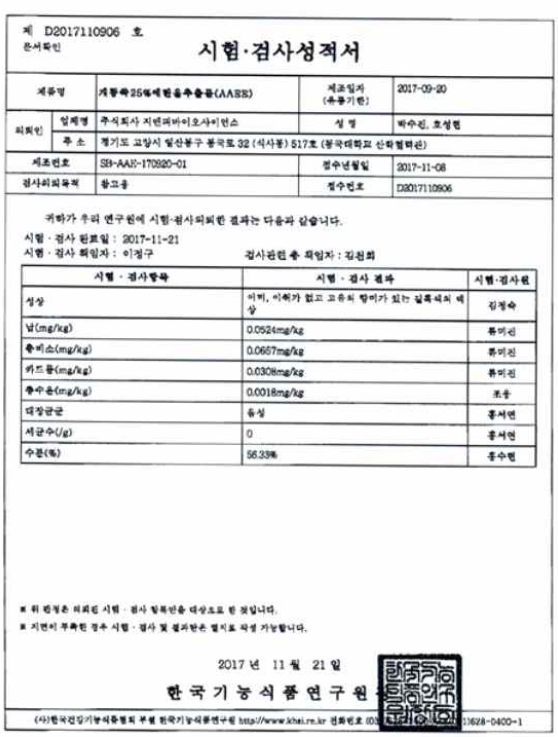
어느 곳에서나 생육이 용이한 개똥쑥의 특성 상 도로 등으로부터 비의도적인 중금속 혼입 우려가 있을 수 있어 유해물질에 대한 원료의 안전성 확보 차원에서 공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 개똥쑥 추출물의 중금속 분석을 실시하고자 하며, 추출물에서 중금속이 검출될 경우, 원재료인 개똥쑥에 대해서도 추가적으로 중금속 검출 여부를 확인하고자 함.

(2) 시험 방법

납, 총비소, 카드뮴은 식품공전의 일반시험법 중 금속별 유해물질시험법에 따라 시험용액을 조제한 후 ICP법에 따라 함량을 분석하고, 총수은은 식품공전의 일반시험법 중 금속별 유해물질시험법에 따라 시험용액을 조제한 후 중금속 시험법 중 수은(Hg) 시험법에 따라 함량을 분석함.

(3) 시험 결과

개똥쑥 25% 에탄올추출물(AAEE)의 중금속 4종 분석 결과는 아래 첨부된 시험성적서와 같이 납, 카드뮴, 총수은, 총비소 모두 일반 식품 상의 기준인 1mg/kg에 훨씬 못 미치는 값으로 나와 중금속 일반 기준 규격에 적합한 것으로 확인됨. 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 중금속 4종 분석 결과 역시 유사한 수준으로 확인됨(그림 18).



제 D2017110906 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	개똥쑥25%에탄올추출물(AAEE)	제조일자 (유통기한)	2017-09-20
의뢰인	업체명	주식회사 지앤피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호	SB-AAE-170920-01	접수년월일	2017-11-08
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2017110906

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2017-11-21
시험 · 검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희

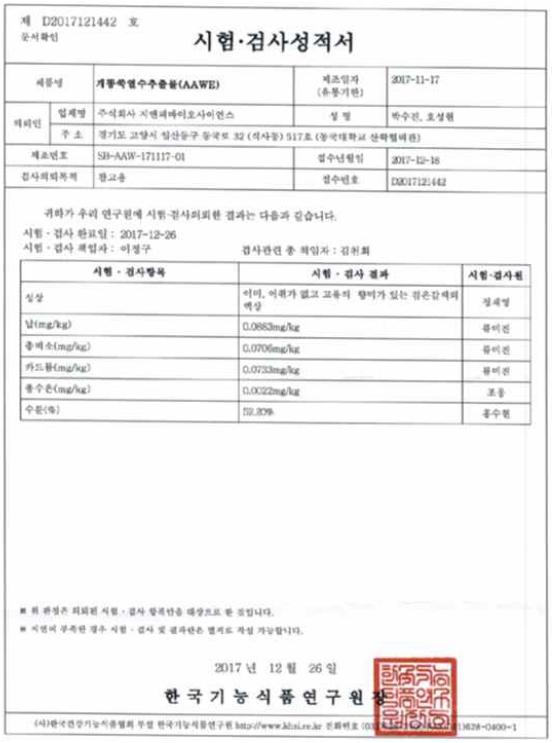
시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈록색의 액상	김정숙
납(mg/kg)	0.0524mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	0.0657mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0308mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.0018mg/kg	조용
대장균군	음성	홍서연
세균수(/g)	0	홍서연
수분(%)	56.33%	홍수현

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과만은 별지로 작성 가능합니다.

2017 년 11 월 21 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (03 1)628-0400-1



제 D2017121442 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	개똥쑥열수추출물(AAWE)	제조일자 (유통기한)	2017-11-17
의뢰인	업체명	주식회사 지앤피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호	SB-AAW-171117-01	접수년월일	2017-12-18
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2017121442

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2017-12-26
시험 · 검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 검은갈색의 액상	정재영
납(mg/kg)	0.0883mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	0.0706mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0733mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.0022mg/kg	조용
수분(%)	52.30%	홍수현

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과만은 별지로 작성 가능합니다.

2017 년 12 월 26 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (03 1)628-0400-1

그림 18. 개똥쑥 25% 에탄올추출물(AAEE)과 열수추출물(AAWE)의 중금속 및 미생물 시험 성적서

다) 원료의 미생물 분석

(1) 시험 목적

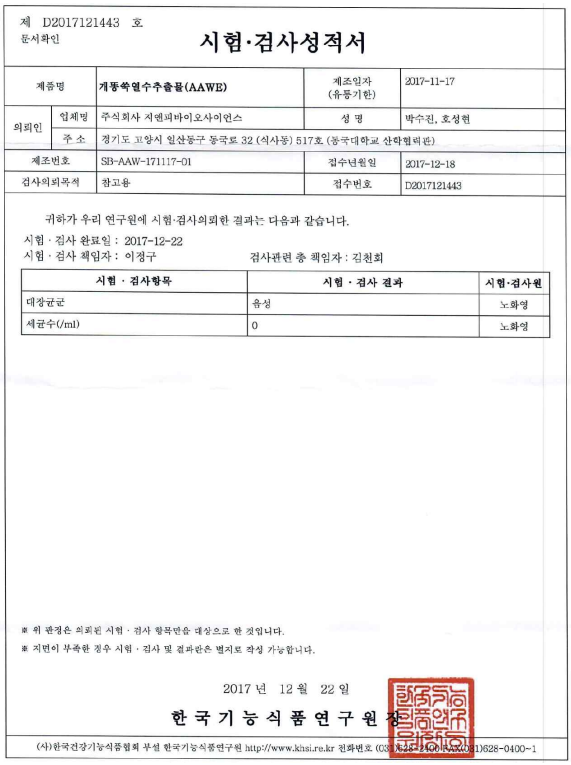
개똥쑥 추출물이 원재료 세척, 여과, 살균 등 이물질 혼입이나 미생물 오염을 막기 위한 제조공정을 거치기는 하나, 탄수화물, 단백질 등 미생물이 생육하기에 좋은 다양한 영양소를 함유하고 있어 포장과정 등에서 유입된 미생물이나 내용물 살균 시 미처 사멸되지 못한 포자 등으로 인해 보관 유통기간 중 미생물이 증식할 가능성이 충분히 있으므로 공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 대장균군과 세균 검출 여부를 확인함으로서 원료의 유통 안전성을 확보하고자 함.

(2) 시험 방법

대장균군은 액상 및 분말원료 모두를 대상으로 식품공전 일반시험법 중 미생물시험법 상의 대장균군 정성시험 유당배지법에 따라 검출 유무를 시험하고, 세균수는 액상 원료를 대상으로 식품공전 일반시험법 중 미생물시험법 상의 일반세균수 표준평판법에 따라 정량적으로 세균수를 분석함.

(3) 시험 결과

개똥쑥 25% 에탄올추출물(AAEE)의 대장균군 및 세균수 분석 결과는 위에 첨부된 시험성적서와 같이 대장균군 음성, 세균수 g당 0(기준: 100/g 이하)으로 확인되어 미생물 기준 규격에 적합한 것으로 확인됨. 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 분석 결과 역시 동일하게 나타남(그림 19).



제 D2017121443 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	개똥쑥열수추출물(AAWE)	제조일자 (유통기한)	2017-11-17
의뢰인 업체명	주식회사 지엔피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
의뢰인 주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호	SB-AAW-171117-01	접수년월일	2017-12-18
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2017121443

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2017-12-22
시험 · 검사 책임자 : 이정구　　검사관련 총 책임자 : 김천회

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
대장균군	음성	노화영
세균수(/ml)	0	노화영

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지번이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2017 년 12 월 22 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1

그림 19. 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 미생물 시험성적서

라) 원료의 영양성분 분석

(1) 시험 목적

일반적으로 천연 개똥쑥에는 수분 76.0~81.4%, 단백질 4.7~5.2%, 당질 2.9~6.9%, 지질 0.8~1.9%, 섬유질 3.7~14.5% 및 비타민, 엽록소 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있음. 이러한 개똥쑥으로부터 제조된 열수추출물(AAWE)에 대해 열량, 탄수화물, 조단백, 조지방, 수분, 회분, 포화지방산, 불포화지방산, 콜레스테롤, 비타민A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, 엽산, 나이아신, 판토텐산, 철, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 아연, 셀레늄을 포함하여 총 26종의 영양성분을 분석함으로써 개똥쑥 추출물의 영양학적 가치를 확인하고자 함.

(2) 시험 방법

공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 분석할 영양 성분은 열량, 탄수화물, 조단백, 조지방, 수분, 회분, 포화지방산, 불포화지방산, 콜레스테롤, 비타민A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, 엽산, 나이아신, 판토텐산, 철, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 아연, 셀레늄을 포함하여 총 26종임. 개똥쑥 열수추출물의 영양성분 분석은 식품공전 상의 일반시험법에 따라 수분은 건조감량법, 회분은 회화법, 조단백질은 세미마이크로 킬달법, 조지방은 에테르추출법, 콜레스테롤은 기체크로마토그래프/불꽃이온화검출기(GC-FID)법 등을 이용하며, 미량영양성분인 비타민 중 B1은 티오크롬형광법, B2는 루미플라빈 형광법 등을 이용하고, 미네랄인 셀레늄은 ICP법 등으로 분석함.

(3) 시험 결과

개똥쑥 추출물의 영양성분 26종의 검사 결과, 비타민 B, 엽산, 칼륨, 마그네슘, 셀레늄 등의 성분이 검출됨(그림 20).

제 D2017112400 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명		개똥쑥열수추출물(AAWE)	제조일자 (유통기한)	2017-09-20
의뢰인	업체명	주식회사 지앤피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호		SB-AAW-170920-01	접수년월일	2017-11-21
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2017112400

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2017-12-07
시험 · 검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천회

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)	151.32 Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	28.49 %	한아름
조단백질(%)	6.82%	김정숙
조지방(%)	1.12%	이수경
불포화지방산(g/100g)	0.04g/100g	홍수현
포화지방산(g/100g)	0.07g/100g	홍수현
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	김은지
비타민A(㎍ RE/100g)	불검출	김영옥
비타민B1(mg/100g)	0.23mg/100g	이현아

비타민B2(mg/100g)	0.96mg/100g	박상진
비타민B6(mg/100g)	0.19mg/100g	박상진
비타민B12(㎍/100g)	불검출	김영옥
비타민C(mg/100g)	3.91mg/100g	이아림
비타민D(㎍/100g)	불검출	윤효선
비타민E(mg α-TE/100g)	불검출	최지원
엽산(㎍/100g)	7348.31㎍/100g	최지원
나이아신(mgNE/100g)	불검출	이현아
판토텐산(mg/100g)	불검출	이아림
철(mg/100g)	4.04mg/100g	김세미
칼슘(mg/100g)	328.06mg/100g	김세미
칼륨(mg/100g)	4208.02mg/100g	김세미
마그네슘(mg/100g)	231.32mg/100g	김세미
아연(mg/100g)	2.17mg/100g	김세미
셀레늄(㎍/100g)	6.83㎍/100g	김세미
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captan(mg/kg)	불검출	김용수
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수

Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Tolclofos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenarimol(mg/kg)	불검출	김용수
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	김용수
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2017 년 12 월 7 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400~1

그림 20. 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 영양성분 및 잔류농약 시험성적서

마) 개똥쑥 열수추출분말의 유해물질 분석

(1) 목적 및 실험방법

최종 원료인 개똥쑥 열수추출분말(SPB-201)의 안전성 확보를 위하여 공인시험기관인 한국기능식품연구원에 중금속 4종, 미생물(대장균군) 및 잔류농약에 대한 분석을 의뢰함. 납, 총비소, 카드뮴은 식품공전의 일반시험법 중 금속별 유해물질시험법에 따라 시험용액을 조제한 후 ICP법에 따라 함량을 분석하고, 총수은은 식품공전의 일반시험법 중 금속별 유해물질시험법에 따라 시험용액을 조제한 후 중금속 시험법 중 수은(Hg) 시험법에 따라 함량을 분석함. 대장균군은 액상 및 분말원료 모두를 대상으로 식품공전 일반시험법 중 미생물시험법 상의 대장균군 정성시험 유당배지법에 따라 검출 유무를 시험함. 잔류농약은 식품공전의 일반시험법 중 채소류의 농약잔류시험법으로서 다종농약다성분 분석법(Multi class pesticide multiresidue methods)을 사용하여 BHC, Bifenthrin, Carbofuran, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin 등 총 58종의 성분을 분석함.

(2) 실험결과

SPB-201 대량생산 배치의 중금속 및 미생물 검사 결과, 중금속 4종은 모두 0.1 mg/kg 미만으로 검출이 되었으며, 대장균군은 음성으로 확인됨(그림 21).

또, 잔류농약 58종에 대한 검사 결과, 5개 성분을 제외한 대부분의 농약성분은 검출되지 않았으며, 검출된 일부 성분 역시 미량인 것으로 확인되었음(그림 22).

제 D2018081721 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명		개똥쑥열수추출분말(SPB-201)	제조일자 (유통기한)	2017-12-21
의뢰인	업체명	주식회사 지앤피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호		SB-AAWP-171221-01	접수년월일	2018-08-17
검사의뢰목적		제출용	접수번호	D2018081721

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2018-08-22

시험 · 검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천회

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색의 분말	정재영
납(mg/kg)	0.0766mg/kg	류미진
총비소(mg/kg)	0.0802mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0902mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.0084mg/kg	조용
대장균군	음성	송세정

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 8 월 22 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400~1

그림 21. 개똥쑥 열수추출분말의 중금속, 미생물 시험성적서

제 D2018091410 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명		개똥쑥열수추출분말(SPB-201)	제조일자 (유통기한)	2017-12-12
의뢰인	업체명	주식회사 지앤피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호		SB-AAWP-171221-01	접수년월일	2018-09-13
검사의뢰목적		제출용	접수번호	D2018091410

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2018-09-27

시험 · 검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천회

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)	0.0026mg/kg	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	강태식
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
BHC(mg/kg)	불검출	강태식
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	강태식
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	강태식
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	강태식
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	강태식
Acetamiprid(mg/kg)	0.0259mg/kg	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	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)	0.0079mg/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
Triflumuron(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)	불검출	강태식
Prochloraz(mg/kg)	불검출	강태식
Profenofos(mg/kg)	불검출	강태식
Flubendiamide(mg/kg)	0.0013mg/kg	이선미
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	0.0001mg/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)	불검출	강태식
Dimethoate(mg/kg)	불검출	강태식

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018 년 9 월 27 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

그림 22. 개똥쑥 열수추출분말의 잔류농약 시험성적서

바) 개똥쑥 열수추출분말의 영양성분 분석

(1) 목적 및 실험방법

1차년도에 실시한 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 영양성분 분석에 이어 인체적용시험용 제품의 최종 원료인 개똥쑥 열수추출분말(SPB-201)의 영양성분을 확인하기 위해 열량, 탄수화물, 조단백, 조지방, 비타민, 미네랄 등 총 19종의 성분(액상원료에서 불검출된 항목 제외)을 분석함으로써 SPB-201의 영양학적 가치를 확인하고자 함. 해당 분석은 공인시험기관인 한국기능식품연구원에서 실시하였으며, 시험법은 식품공전 상의 일반시험법에 따라 수분은 건조감량법, 회분은 회화법, 조단백질은 세미마이크로 킬달법, 조지방은 에테르추출법, 콜레스테롤은 기체크로마토그래프/불꽃이온화검출기(GC-FID)법 등을 이용하며, 미량영양성분인 비타민 중 B1은 티오크롬형광법, B2는 루미플라빈 형광법 등을 이용하고, 미네랄인 셀레늄은 ICP법 등으로 분석함.

(2) 실험결과

개똥쑥 열수추출분말(SPB-201)의 영양성분 검사 결과는 아래 성적서와 같음(그림 23).

제 D2018091409 호
분석확인

시험·검사성적서

제품명		개똥쑥열수추출분말(SPB-201)	제조일자 (유통기한)	2017-12-12
의뢰인	업체명	주식회사 지엔피바이오사이언스	성 명	박수진, 호성현
	주 소	경기도 고양시 일산동구 동국로 32 (식사동) 517호 (동국대학교 산학협력관)		
제조번호		SB-AAWP-171221-01	접수년월일	2018-09-13
검사의뢰목적		제출용	접수번호	D2018091409

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험 · 검사 완료일 : 2018-10-05
시험 · 검사 책임자 : 이정구
검사관련 총 책임자 : 김철희

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)	316.01Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	67.26%	한아름
조단백질(%)	9.92%	김정숙
조지방(%)	0.81%	이수정
수분(%)	5.83%	이선정
회분(%)	16.18%	이선정
포화지방산(g/100g)	0.03g/100g	장혜진
비타민B1(mg/100g)	0.32mg/100g	이현아
비타민B2(mg/100g)	1.19mg/100g	박상진
비타민B6(mg/100g)	0.21mg/100g	박상진
비타민C(mg/100g)	불검출	이아림
엽산(μg/100g)	282.28μg/100g	최지원
철(mg/100g)	6.10mg/100g	김수희
칼슘(mg/100g)	353.77mg/100g	김수희
칼륨(mg/100g)	7248.17mg/100g	김수희
마그네슘(mg/100g)	252.11mg/100g	김수희
아연(mg/100g)	0.83mg/100g	김수희
셀레늄(μg/100g)	17.49μg/100g	김수희
불포화지방산(g/100g)	0.03g/100g	장혜진

그림 23. 개똥쑥열수추출분말의 영양성분 시험성적서

6) 원료의 작용기전 연구

가) Raw264.7 세포주에서의 항염증 활성 기전

(1) 시험 목적

다양한 염증반응으로 인한 간 건강 악화를 예방하는 데 있어 개똥쑥 추출물의 항염증 활성이 얼마나 우수한지 확인하고 그 작용기전을 규명하기 위해 마우스 대식세포주인 Raw264,7을 이용하여 아래의 시험을 진행하고자 함.

(2) 시험 방법

Raw264.7에 LPS와 개똥쑥 추출물을 처리한 후, MTT 또는 LDH assay 를 통해 세포독성을 평가하고, TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 사이토카인과 NO 등의 염증매개인자 및 GSH, SOD 등의 항산화지표를 ELISA 등의 assay kit과 RT-Q-PCR 등으로 측정하는 한편, iNOS, COX-2 등의 염증 관련 효소와 NF-κB 등의 transcription factor 발현 분석 등을 통해 작용기전을 규명하고자 함.

(3) 시험 결과

(가) 대량생산 시료 2종의 생산 결과

작용기전 연구에 사용할 GMP 업소에서의 대량생산 시료 2종은 모두 50 BRIX 내외의 농축액 상태로 제조되었으며, 원료의 수율은 개똥쑥 열수추출물(AAWE)이 19.3%, 25% 에탄올추출물(AAEE)이 18.0%로 비슷하게 나타났고, 두 원료 모두 실험실 수준에서 시험생산한 추출물보다 50% 이상 추출 수율이 향상되는 것으로 확인됨.

표 8. 대량생산 시료 2종의 생산 정보

코드	수확시기	산지	추출용매	추출온도	추출시간	수율
AAWE	가을	대전	열수	85℃	4시간	19.3 %
AAEE	가을	대전	25% 에탄올	85℃	4시간	18.0 %

(나) Raw264.7 세포주에서의 Nitrite 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 nitrite 억제 활성을 NO assay kit으로 측정한 후 양성대조군의 값을 기준으로 상대적인 억제율을 산출한 결과, AAWE와 AAEE 모두 농도의존적인 감소경향은 뚜렷하게 나타나지 않았으나, 모든 농도에서 최소 80% 이상의 nitrite 생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인됨(그림 24).

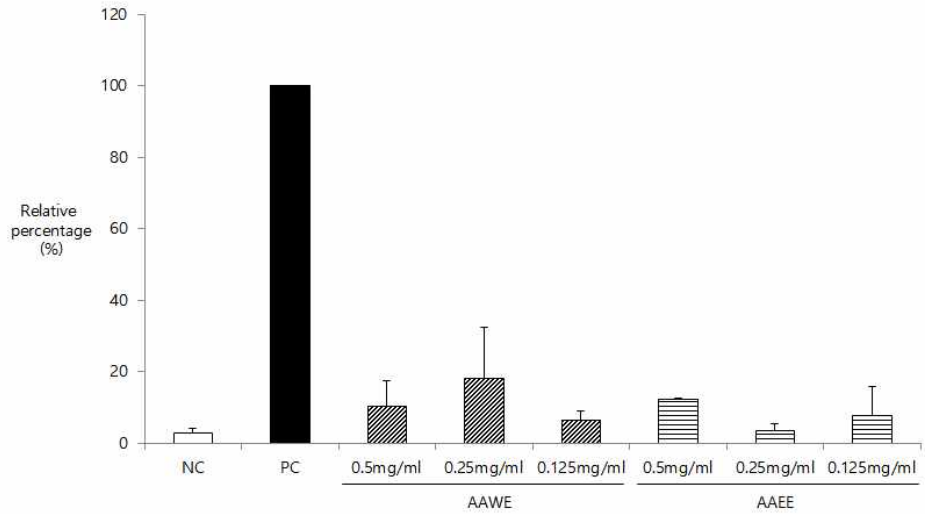


그림 24. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 nitrite 억제 활성

(다) Raw264.7 세포주에서의 TNFα 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 TNFα 억제 활성을 ELISA로 측정한 결과, 모든 농도에서 AAEE가 AAWE 보다 더 우수한 효과를 보였으나, 농도의존적인 반응성은 두 가지 시료 모두 뚜렷하게 나타나지 않았음(그림 25).

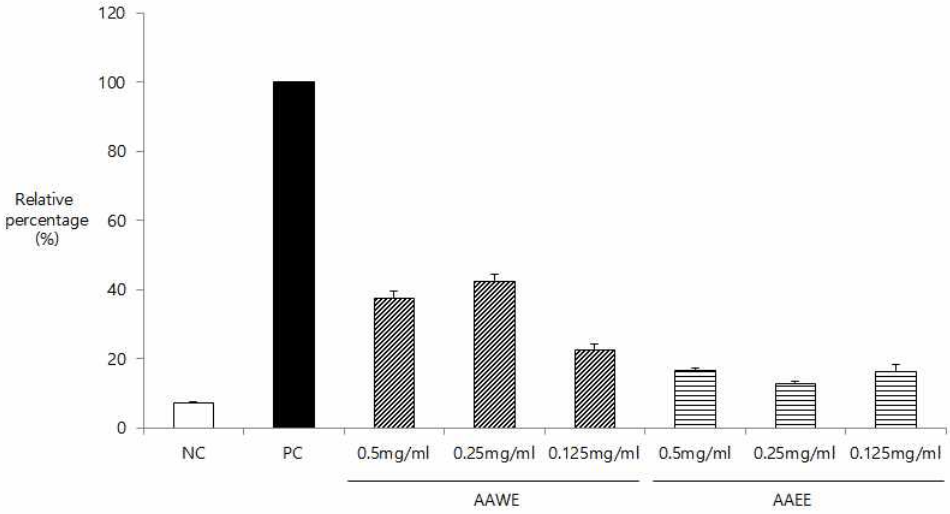


그림 25. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 TNFα 억제 활성

(라) Raw264.7 세포주에서의 IL-1β 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 IL-1β 억제 활성을 ELISA로 측정한 결과, AAWE와 AAEE 모두 모든 농도에서 IL-1β를 NC 수준까지 100% 억제하는 것으로 확인됨(그림 26).

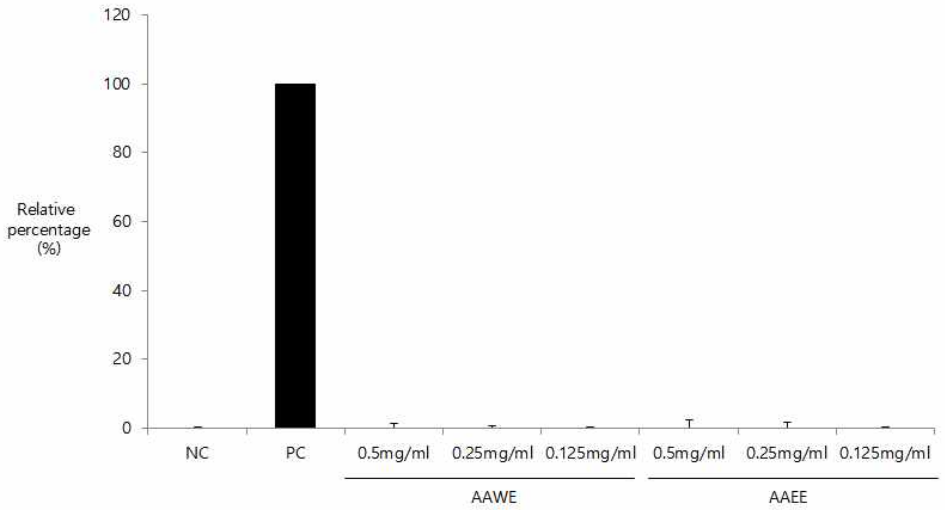


그림 26. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 IL-1β 억제 활성

(마) Raw264.7 세포주에서의 IL-6 억제 활성

Raw264.7 세포주에서 LPS 자극에 의한 IL-6 억제 활성을 ELISA로 측정한 결과, AAWE와 AAEE 모두 농도의존적인 반응성은 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 고농도에서의 효과는 AAEE가 AAWE 보다 더 좋은 것으로 판단됨(그림 27).

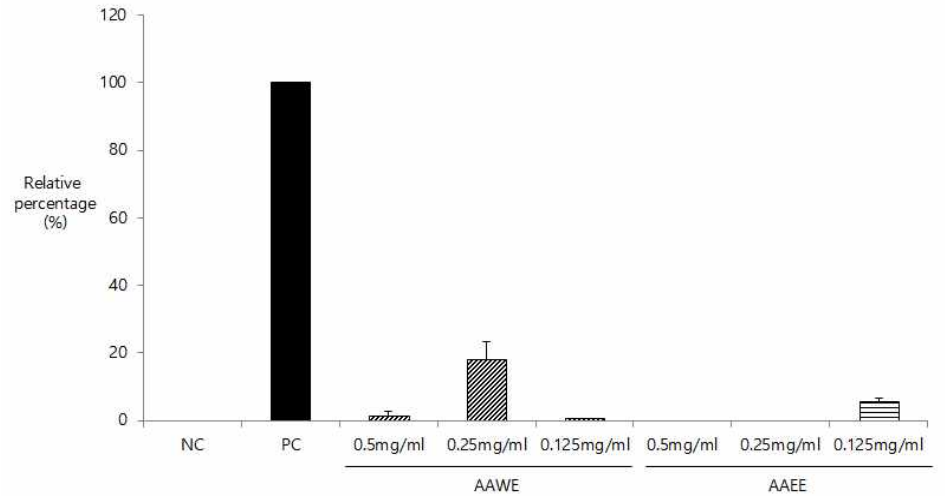


그림 27. 대식세포주에서 나타난 개똥쑥 추출물의 IL-6 억제 활성

(바) 항염증 지표 관련 유전자의 Real-time PCR 분석

LPS에 의한 대식세포의 염증반응을 억제하는 개똥쑥 추출물의 작용기전을 확인하기 위해 현재 세포로부터 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하였으며, Real-time PCR에 앞서 mouse IL-6, TNFα, iNOS 및 β-actin의 발현량을 PCR로 먼저 확인하였음. PCR 결과, 단백질 발현에 관한 ELISA 결과 및 nitrite assay 결과와 유사하게 개똥쑥 추출물(AAWE, AAEE)이 해당 유전자들의 mRNA 발현을 감소시키는 것으로 관찰됨(그림 28).

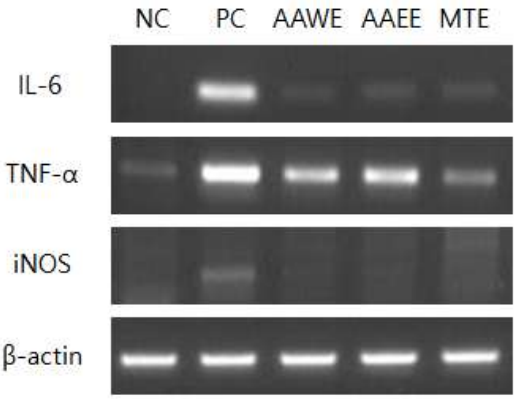


그림 28. 대식세포주에서 개똥쑥 추출물의 IL-6, TNF α, iNOS의 mRNA 발현 억제 효과

상기 결과를 토대로 Mouse TNF α, IL-1 β, IL-6, iNOS의 mRNA 발현을 β-actin 대비하여 정량 분석한 Real-time PCR 결과, 개똥쑥 추출물 2종(AAWE, AAEE) 모두 해당 유전자들의 발현을 PC 대비 최소 약 85%에서 최대 약 99%까지 감소시키는 것으로 나타났으며, 이들의 효과는 대부분 밀크씨슬추출물(SME)보다 동등 이상인 것으로 확인됨(그림 29)

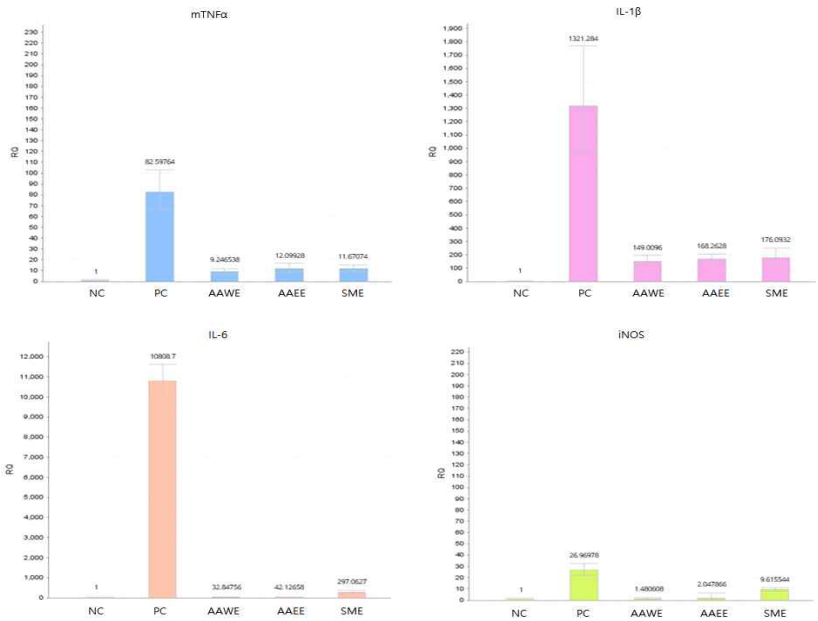


그림 29. Real-time PCR을 이용한 개똥쑥 추출물의 염증 관련 유전자 발현 억제 효과

나) HepG2 세포주에서의 간세포 보호 활성 기전

(1) 시험 목적

개똥쑥 추출물의 간 건강 개선 기능성 확보에 필수적인 요소인 간세포 보호 활성 및 그 작용기전을 규명하기 위해 인간 간암세포주인 HepG2를 이용하여 아래의 시험을 진행하고자 함.

(2) 시험 방법

Human hepatoma cell line인 HepG2에 LPS, glucose, 아세트아미노펜(APAP) 또는 개똥쑥 추출물을 처리한 후, MTT 또는 LDH assay 를 통해 세포독성을 평가하고, TNF-α, IL-1β 등의 사이토카인과 NO 등의 염증매개인자 및 GSH, SOD 등의 항산화지표를 ELISA 등의 assay kit로 측정하는 한편, 각 사이토카인 및 염증매개인자와 관련된 iNOS, COX-2, NF-κB 등과 산화적 스트레스 억제에 관여하는 유전자들의 발현 분석 등을 통해 작용기전을 규명하고자 함.

(3) 시험 결과

(가) HepG2 세포주에서 개똥쑥 추출물의 세포독성

개똥쑥 열수추출물(AAWE)를 농도별로 HepG2에 처리하고 48시간 동안 배양한 후 MTT assay를 실시한 결과, 모든 농도에서 media만 처리한 음성대조군(NC)과 유사한 수준의 cell viability를 나타내 간세포에 대한 독성이 전혀 없는 것으로 확인되었음(그림 30).

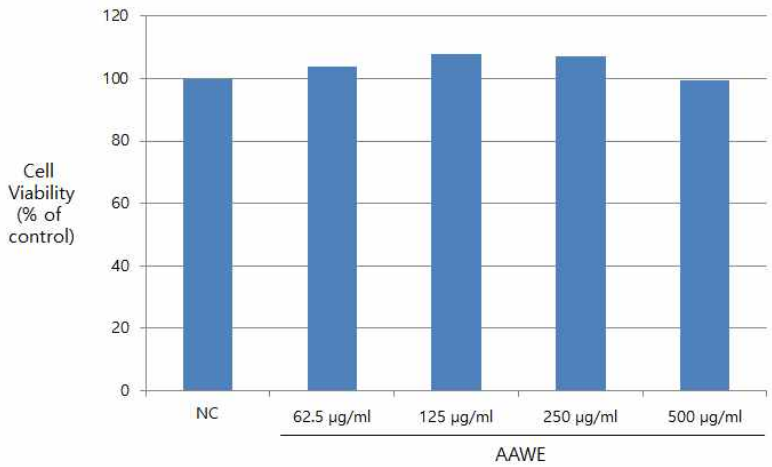


그림 30. HepG2에서의 cell viability에 대한 개똥쑥 추출물의 효과

(나) LPS-stimulated HepG2 세포주에서 개똥쑥 추출물의 항염증 효과

간세포에서 개똥쑥 추출물의 항염증 효과를 관찰하기 위해 HepG2 세포주에 LPS를 1μg/mL로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 배양액에서 human TNFα, IL-1β ELISA 및 Nitrite assay를 실시한 결과, LPS에 의한 염증반응이 뚜렷하게 유도되지 않아 개똥쑥 추출물의 효과를 관찰하지 못함(data not shown).

(다) APAP-stimulated HepG2 세포주에서 개똥쑥 추출물의 간세포 보호 효과

해당 실험은 현재 APAP의 농도별 처리에 따른 간세포 독성 정도 및 개똥쑥 추출물이 간세포 보호 효과를 확인한 결과, 일부 농도에서는 효과가 있었으나, 대부분의 농도에서

APAP에 의한 간독성을 억제하지 유의하게 억제하지 못하는 것으로 확인됨(data not shown). 이에 APAP 대신 free fatty acid(FFA)를 이용하여 간세포에 지질 축적을 유도하면서 개똥쑥 추출물이 지질 축적과 염증반응을 억제하는지 여부를 확인하는 형태로 시험법을 확립하고자 함.

다) 3T3-L1 세포주에서의 지질대사 조절 활성 기전

(1) 시험 목적

개똥쑥 추출물의 간 건강 개선 기능성 확보에 있어 필수적인 요소인 지질대사 조절 활성 및 그 작용기전을 규명하기 위해 마우스의 지방전구세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방세포 분화 유도 모델에 관한 시험법을 확립하고자 하였음.

(2) 시험 방법

Murine preadipocyte cell line인 3T3-L1에 Dexamethasone/IBMX/insulin(MDI cocktail)을 처리하여 분화를 유도한 다음, 이후 insulin 처리기간을 달리하면서 cell lysate 내 TG 농도를 측정함으로써 지방세포의 분화 정도를 확인하였음.

(3) 시험 결과

MDI cocktail을 처리하여 분화를 유도한 후 분화된 지방세포의 성숙을 유도하기 위한 insulin 처리기간을 달리하면서 세포 내 지질 축적의 지표로써 TG 농도를 측정한 결과, 아래와 같이 insulin을 4일 이상 처리했을 때 세포 내 TG 농도가 가장 높아지는 것을 확인함. 이를 토대로 개똥쑥 추출물의 지방 분화 억제 효과를 확인하기 위한 시험조건은 MDI 분화 유도 후 4일간 insulin을 처리하는 조건으로 확정하였음(그림 31).

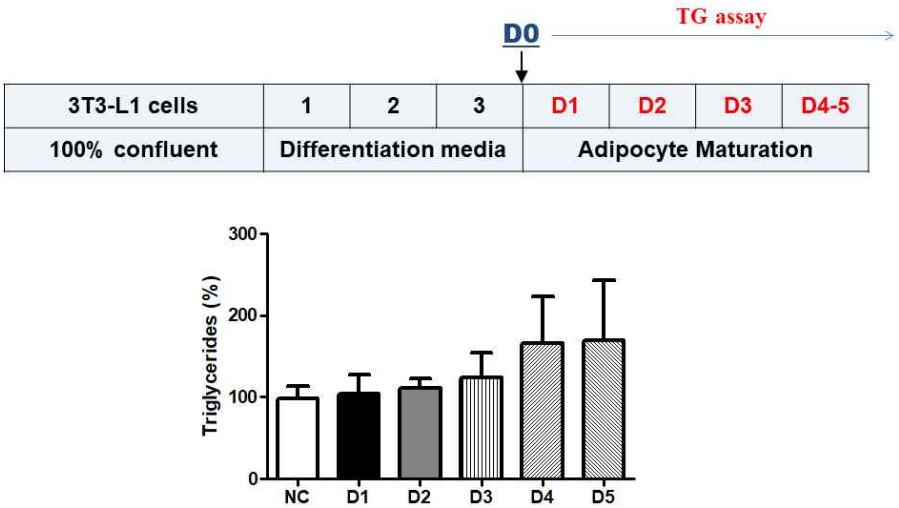


그림 31. 3T3-L1의 분화 및 성숙 유도 기간에 따른 세포 내 TG 생성량

7) 전임상 안전성 연구 (GLP 설치류 단회투여독성시험)

가) GLP 설치류 단회투여독성시험

(1) 시험 목적

개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 경구 투여에 따른 급성 독성 평가 및 치사량 확인을 위해 GLP 시험기관인 서울대학교병원 의생명연구원에 의뢰하여 설치류에서의 단회투여독성시험을 실시하고자 함.

(2) 시험 방법

군당 10마리(암수 각 5마리)의 SD 랫드에 AAWE를 0(부형제 대조군) 및 5 g/kg의 용량으로 단회 경구투여한 후 2주간 사망률, 일반증상, 체중 및 부검 소견을 관찰함.

(3) 시험 결과

(가) 사망개체 및 일반 임상증상

시험물질을 투여한 모든 동물에서 시험 전 기간을 통해 사망한 동물은 없었으며, 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았음(표9).

표 9. 설치류 단회투여독성시험에서 시험군과 대조군의 사망율

GROUP SUMMARY OF SURVIVAL DATA									
		Dosage in (g/10.5mL/kg B.W.)							
		0 (Control)				5 (Test)			
	STUDY DAY	Survival	Sacrificed In Extremis	Scheduled Sacrifice	Other*	Survival	Sacrificed In Extremis	Scheduled Sacrifice	Other*
Male	0	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	1	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	2	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	3	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	4	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	6	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	7	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	8	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	9	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	10	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	11	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	12	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	13	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	14	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
Female	0	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	1	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	2	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	3	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	4	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	6	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	7	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	8	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	9	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	10	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	11	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	12	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	13	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	14	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5

(나)체중변화

암수 모두에서 전 기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 체중 증감은 관찰되지 않았음.

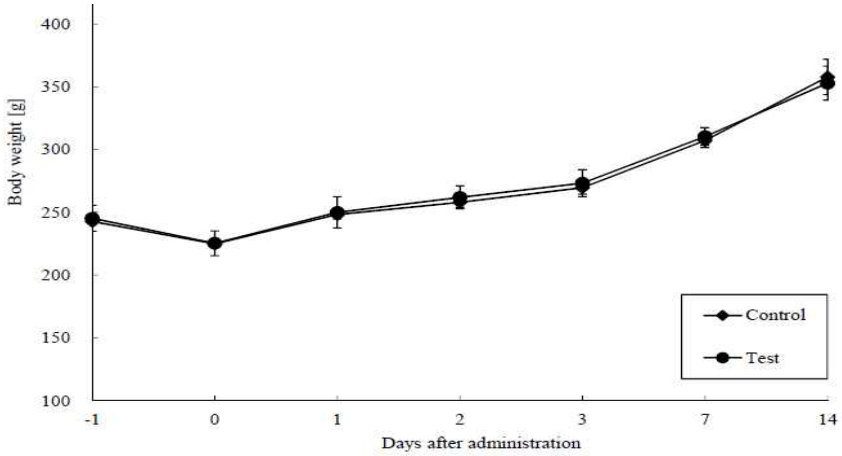


그림 32. 설치류 단회투여독성시험에서 시험군과 대조군의 체중 변화

(다) 병리학적 검사

시험종료 시 생존한 모든 개체에 대하여 부검을 실시한 결과, 시험물질에 의한 것이라고 사료되는 이상 병변은 관찰되지 않았음.

(라) 결론

SD 랫드에서 시험물질인 개똥쑥 열수추출물의 경구 단회투여독성시험을 실시한 결과, 본 시험 조건하에서 시험물질의 개략의 치사량은 5g/10.5mL/kg 초과일 것으로 사료됨.

<1차년도 위탁연구기관 : 동물효력 시험모델 확립>

8) 동물효력 시험모델 확립

가) LPS/D-GalN투여 급성 간손상 모델 확립

(1) 재료 및 방법

(가) LPS/D-GalN 투여 농도 별 간 손상 확인

6주령 C57BL/6 mouse를 구입하여 1주 순화기간 후 LPS와 D-GalN 용량을 달리하여 단회 복강주사법으로 간 손상을 유도시킴. LPS와 D-GalN 농도에 따라 각군당 4마리씩 5가지 군으로 하여 LPS/D-GalN 투여 6시간 후 희생하여 혈액 및 조직을 분리하였음. AST, ALT를 분석하여 적합한 LPS 및 D-GalN 농도를 설정함(표 10).

표 10. LPS/D-GalN 투여 농도 별 간 손상 확인을 위한 실험군 분리

	n	Group name
Group 1	4	LPS(0 μg/kg), D-galN(0 mg/kg)
Group 2	4	LPS(1 μg/kg), D-galN(700 mg/kg)
Group 3	4	LPS(4 μg/kg), D-galN(400 mg/kg)
Group 4	4	LPS(4 μg/kg), D-galN(700 mg/kg)
Group 5	4	LPS(10 μg/kg), D-galN(700 mg/kg)

(나) 개똥쑥 추출물 섭취 마우스에서 LPS/D-GalN로 유도한 간 손상 억제효과 확인

4주령 C57BL/6 mouse를 구입하여 1주 순화기간 후 동물을 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 5마리씩 4개군으로 구분하여 2주 동안 한 마리씩 cage내에서 사육함. 대조군, 양성대조군, 개똥쑥 추출물 섭취군, 밀크씨슬 추출물 섭취군으로 하여 각각 100 mg/kg의 추출물을 1일 1회 2주간 경구투여함. 2주간 경구투여 종료 후 앞서 선정된 LPS/D-GalN 농도를 복강내 투여함. 6시간 경과 후 희생하여 혈액 및 조직을 분리하였음. AST, ALT를 분석하여 개똥쑥 추출물의 간 손상 보호 효과를 확인함(표 11).

표 11. 개똥쑥 추출물 섭취 마우스에서 LPS/D-GalN로 유도한 간 손상 억제효과 확인을 위한 실험군 분리

	n	Group name	LPS/D-GalN 투여
Group 6	5	대조군	X
Group 7	5	양성대조군	O
Group 8	5	개똥쑥 추출물 투여군(100 mg/kg)	O
Group 9	5	밀크씨슬 추출물 투여군(100 mg/kg)	O

(다) 동물실험윤리위원회

본 실험은 성균관대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 진행함(그림 33).

성균관대학교 동물실험윤리위원회
심의결과서

심의번호	17-7-2-1		
승인번호	SKKUIACUC-17-7-2-1		
책임연구자	박기문	개인번호	197023
소 속	식품생명공학과	직 위	교수
연구과제명	간 건강 개선을 위한 개똥쑥 추출물의 동물효력 시험모델 확립		
연구기간	2017.08.01~2017.10.31		
심의일자	2017.07.28		
심의결과	■ 원안승인 수정 후 재심 □ 불승인		
승인일자	2017.07.28	승인기간	2017.08.01~2017.10.31
심의의견	1. Ⅲ-1 ether는 인화성의 유해한 물질로 사용시 후드밴치에서 실험을 해야 하며, 가급적 사람과 동물에 더 안전한 호흡마취약물(isofluoran)로 마취를 유도하거나 주사마취를 권장. 2. Ⅲ-5 인도적 처리기준에 작성하신 내용 중 스트레스를 최소화하기 위해 독립케이지를 사용하신다고 되어 있는데 설치류는 군집생활을 하는 동물로 단독사육시 스트레스를 더 많이 받기에 참고바람. 3. Ⅲ-1 안락사는 경추탈골이 아닌 마취제와 이산화탄소로 진행한다면 좋을 것 같음.		

성균관대학교 동물실험윤리위원회규정 제9조에 따라 심의결과를 통보합니다.

2017년 7월 31일

성균관대학교 동물실험윤리위원회 위원장

그림 33. 성균관대학교 동물실험윤리위원회 급성 간손상 동물실험 승인 심의 결과서

(2) 실험 결과

(가) LPS/D-GalN 투여 농도 별 간 손상 확인

6주령의 수컷 C57BL/6 mice 20마리를 1주 순화기간 후 4마리씩 다섯 그룹으로 나눠 LPS/D-GalN을 복강투여 하였음. 그룹 1은 LPS 0 μg/kg, D-GalN 0 mg/kg, 그룹 2는 LPS 1 μg/kg, D-GalN 700 mg/kg, 그룹 3은 LPS 4 μg/kg, D-GalN 400 mg/kg, 그룹 4는 LPS 4 μg/kg, D-GalN 700 mg/kg, 그룹 5는LPS 10 μg/kg, D-GalN 700 mg/kg 농도로 투여하였으며, 6시간 경과 후 혈액 채취 및 부검을 실시하였음.

혈액채취 과정 중 시험군의 LPS/D-GalN 농도가 높아질수록 혈액이 굳어져 채취에 어려움이 있었으며 이는 높은 간 손상 정도를 나타냄. 특히 그룹 5는 혈액을 채취할 수 없을 정도로 높은 간 손상이 나타났음. 채취된 혈액의 ALT 및 AST 분석결과를 살펴보면 농도 의존적으로 증가하는 경향이 나타났으나, 그룹 2가 그룹 3보다 큰 편차를 보이며 개체간의 간 손상 정도의 차이가 큰 것으로 나타났음. 이에 적당량의 혈액채취가 가능하며 군내 편차가 적은 그룹 3(LPS 4 μg/kg, D-GalN 400 mg/kg)의 농도로 효력시험시 적용하기로 결정함(그림 34).

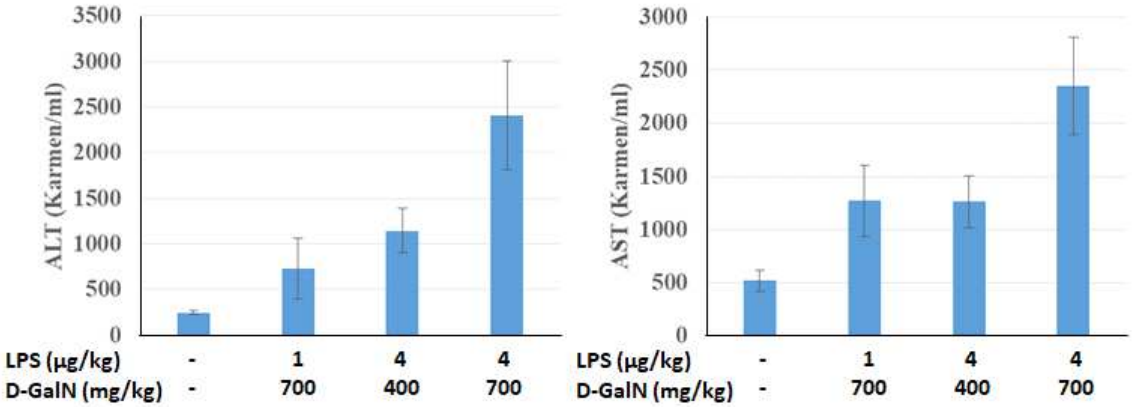


그림 34. lipopolysaccharide(LPS) 및 D-galactosamine(D-GalN) 투여 농도에 따른 C57BL/6 마우스의 혈중 alanine transferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST)

(나) 개똥쑥 추출물 섭취 마우스에서 LPS/D-GalN로 유도한 간 손상 억제효과 확인

5주령 C57BL/6 마우스에 대조군, 양성대조군, 밀크씨슬 추출물 섭취군, 개똥쑥 추출물 섭취군으로 하여, 각각 100 mg/kg의 추출물을 1일 1회 2주간 경구투여함. 경구투여 종료 후 앞선 실험에서 선정한 농도인 LPS 4 μg/kg, D-GalN 400 mg/kg을 복강내 투여하였으며, 6시간 경과 후 혈액 채취 및 부검을 실시하였음.

마우스 간을 육안으로 확인한 결과 양성대조군에 비해 개똥쑥 추출물 및 밀크시슬 추출물의 가시적 효과가 나타남(그림 35).

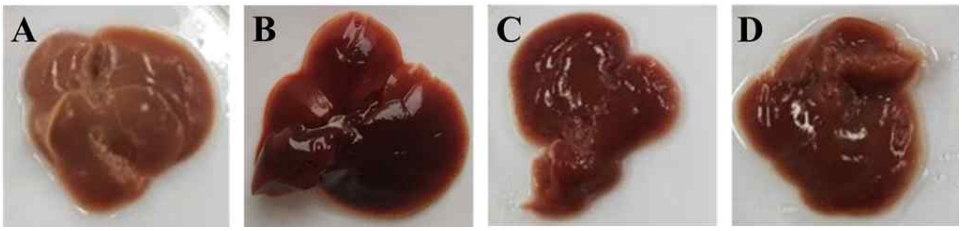


그림 35. 개똥쑥 추출물의 간 보호효과 확인. A ; normal control, B ; positive control, C ; milk thistle extract, D ; Artemisia annua L. water extract - treated group

채취된 혈액의 ALT 및 AST 분석결과 또한 간조직 결과와 같이 양성대조군에 비해 밀크씨슬 추출물 및 개똥쑥 추출물이 효과적인 것으로 나타났으며, 효력시험군인 밀크씨슬 추출물에 비해 개똥쑥 추출물이 더 효과적인 것을 알 수 있었음(그림 36).

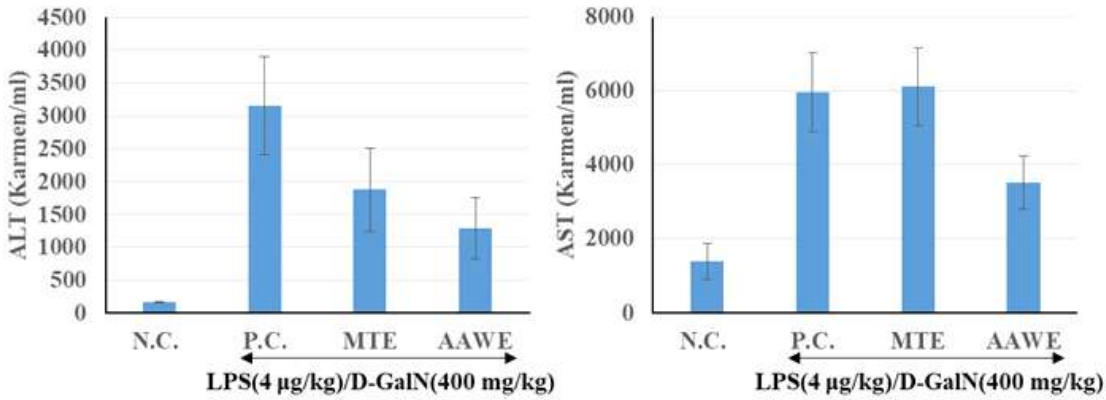


그림 36. 개똥쑥 추출물 섭취에따른 C57BL/6 마우스의 ALT 및 AST 효과 확인. N.C. ; normal control, P.C. ; positive control, MTE ; milk thistle extract, AAWE ; Artemisia annua L. water extract

나) 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 항 지방간 효능 평가 동물모델 확립

(1) 재료 및 방법

고지방 식이 급여를 통한 비알콜성 지방간 유병을 위해서는 고지방 식이의 지방함량을 전택해야 하는 과정이 필수적으로 필요함. 5주령 C57BL/6 mouse를 구입하여 1주 순화기간 후 동물을 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 5마리씩 7개군으로 구분하여 사육함. 대조군, 45% 고지방식이 섭취군, 45% 고지방식이와 개똥쑥 열수 추출물(100 mg/kg/day) 섭취군, 45% 고지방식이와 개똥쑥 에탄올 추출물(100 mg/kg/day) 섭취군, 60% 고지방식이 섭취군, 60% 고지방식이와 개똥쑥 열수 추출물(100 mg/kg/day) 섭취군, 60% 고지방식이와 개똥쑥 에탄올 추출물(100 mg/kg/day) 섭취군으로 하여 경구투여를 진행함. 투여 종료 후 희생하여 혈액 및 조직을 분리하였음. AST, ALT를 분석하여 개똥쑥 추출물의 간 손상 보호 효과를 확인함(표 10).

표 12. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 항 지방간 효능 평가 동물모델 확립을 위한 실험군 분리

	n	시험물질	용량 (mg/kg)
Group 1	5	ND (normal diet)	vehicle
Group 2	5	HFD (45% Fat)	vehicle
Group 3	5	HFD (45% Fat) + 개똥쑥 열수 추출물	100
Group 4	5	HFD (45% Fat) + 개똥쑥 에탄올 추출물	100
Group 5	5	HFD (60% Fat)	vehicle
Group 6	5	HFD (60% Fat) + 개똥쑥 열수 추출물	100
Group 7	5	HFD (60% Fat) + 개똥쑥 에탄올 추출물	100

(2) 동물실험윤리위원회

본 실험은 성균관대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 진행함.

성균관대학교 동물실험윤리위원회

심의결과서

심의번호	17-9-6-1		
승인번호	SKKUIACUC-17-9-6-1		
책임연구자	박기문	개인번호	197023
소 속	식품생명공학과	직 위	교수
연구과제명	고지방식이 지방간 개선을 위한 개똥쑥추출물의 동물효력 시험모델 확립		
연구기간	2017.10.16~2017.12.15		
심의일자	2017.10.20		
심의결과	■ 원안승인 □ 수정 후 재심 □ 불승인		
승인일자	2017.10.20	승인기간	2017.10.20~2017.12.15
심의의견	1. Ⅲ-3 마취제로 ether를 사용한다고 되어 있습니다. ether은 휘발성과 폭발성이 있는 물질이기에 실험시 후드벤치에서 안전하게 사용, 보관시에는 방폭냉장고에 보관 하시길 권장드립니다. 2. Ⅲ-6 경추탈골이 아닌 이산화탄소를 이용한 안락사를 권장합니다.		

성균관대학교 동물실험윤리위원회규정 제9조에 따라 심의결과를 통보합니다.

2017년 10월 20일

성균관대학교 동물실험윤리위원회 위원장

그림 37. 성균관대학교 동물실험윤리위원회 고지방식이 지방간 동물실험 승인 심의 결과서

(3) 실험 결과

(가) 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 체중변화 확인

고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 항 지방간 효능을 평가하기 위한 8주간 의실험기간 동안 체중 변화를 관찰하였음. 45% Fat 고지방식이 섭취군과 60% Fat 고지방식이 섭취군 모두 개똥쑥 추출물 섭취군에서 전반적으로 체중증가가 더디게 나타나는 것을 볼 수 있었음(그림 38).

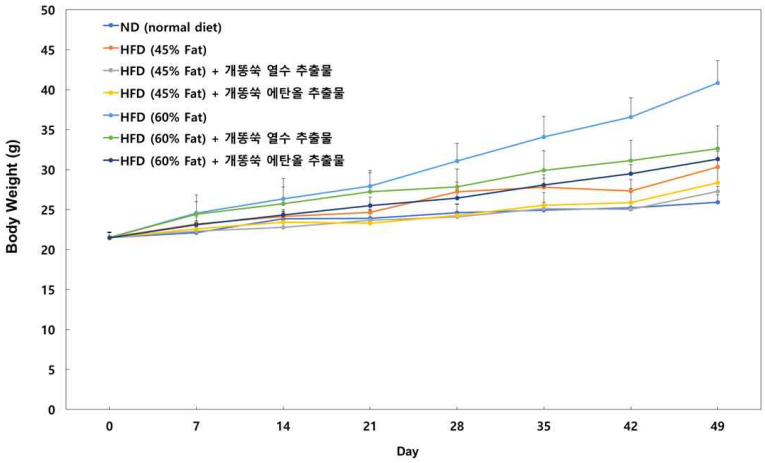


그림 38. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물 섭취 마우스의 체중 변화

(나) 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 지방간 억제효과 확인

개똥쑥 추출물의 지방간 억제효과를 확인하기위해 간조직 절편을 H&E staining하여 관찰하였음. 45% Fat 고지방식이 섭취군과(B) 60% Fat 고지방식이 섭취군(E)보다 개똥쑥 추출물 섭취군 모두가 지방간 억제 효과를 나타냈음. 45% 지방 섭취군에 비해 60% 지방 섭취군에서 더 높은 지방간이 형성되었으며, 이로인해 개똥쑥 추출물의 억제효과 더 분명하게 나타남(그림 39).

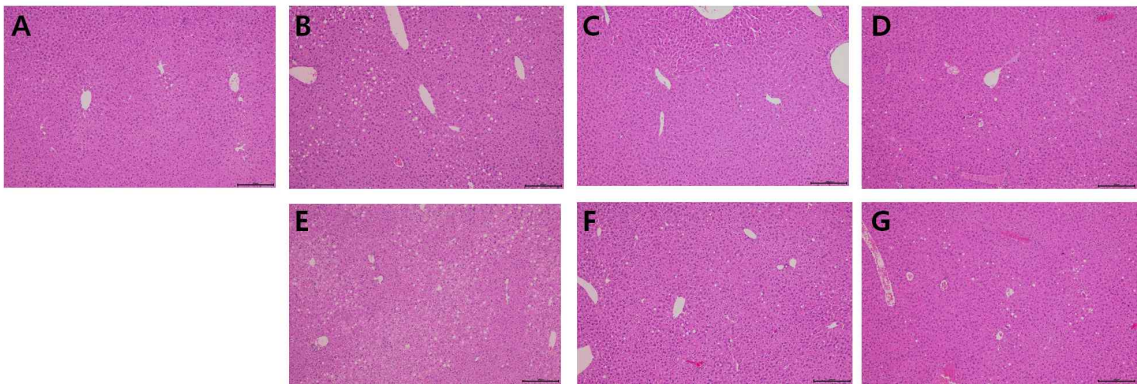


그림 39. 개똥쑥 추출물의 지방간 억제효과 확인. A ; normal diet, B ; HFD(45% Fat), C ; HFD(45% Fat) + 개똥쑥 열수 추출물 , D ; HFD(45% Fat) + 개똥쑥 에탄올 추출물, E ; HFD(60% Fat), F ; HFD(60% Fat) + 개똥쑥 열수 추출물 , G ; HFD(6% Fat) + 개똥쑥 에탄올 추출물

채취된 혈액의 ALT 및 AST 분석결과 또한 간조직 결과와 같이 고지방식이 섭취군에 비해 개똥쑥 추출물이 효과적인 것으로 나타났으며, 45% 지방 섭취군에 비해 60% 지방 섭취군에서 더 극명한 효과가 나타났음. 이와 같은 결과를 종합해볼 때 차후 본 실험에서는 60% 지방 섭취군을 이용해 실험을 진행하는 것이 바람직할 것으로 사료됨(그림 40).

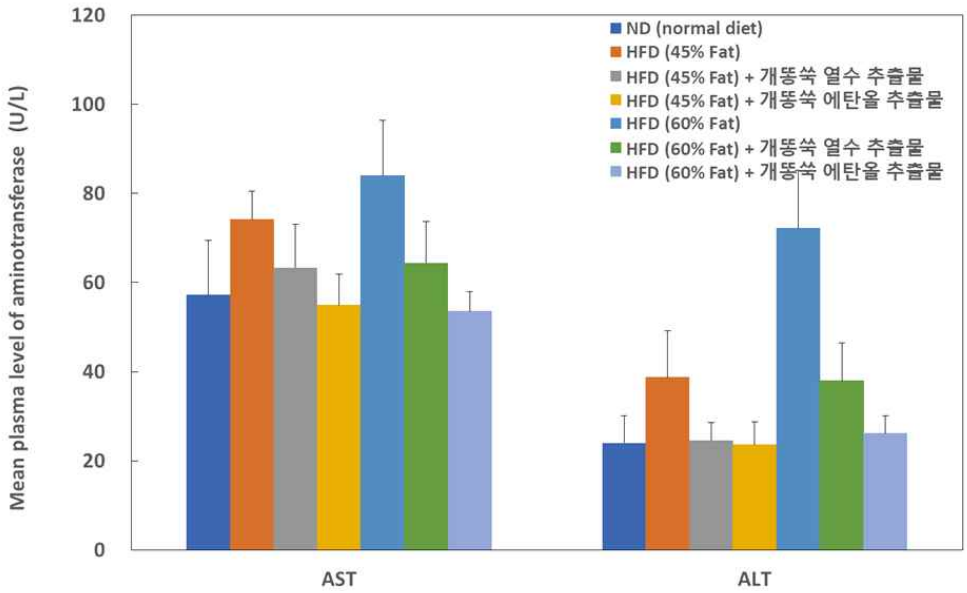


그림 40. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물 섭취 마우스의 ALT 및 AST 효과 확인

<2차년도 주관연구기관 : 전임상 기능성 연구 및 인체적용시험용 시제품 생산>

9) 전임상 기능성 연구 2 (동물효력시험)

가) 고지방식이 급이 마우스에서 시험물질의 항 지방간 효능 평가 시험

(1) 시험 목적

본 시험은 C57BL/6 마우스를 대상으로 고지방식이를 8주간 급이 하고, 동시에 시험물질을 8주간 1일 1회 경구 투여한 후 부검하여 최종 얻어진 혈액과 간 조직 샘플을 대상으로, 혈중 간 지표와 간 조직 소견을 평가하여 시험물질이 지방간 형성에 미치는 영향을 평가하고자 함.

(2) 시험 방법

다수의 연구에서 고지방식이를 통한 비만 모델이 체중조절이나 지방간 형성 기전연구에 적합한 모델이라고 알려져 있으며, C57BL/6J mouse는 다른 stain에 비해 고지방식이 섭취 시 비만이나 지방간의 유도가 쉽고 대사성 질환 연구를 위해 비교할 만한 기초자료가 많이 축적되어 있기에 선정됨.

시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 항온 항습이 유지되는 동물 사육실에서 1주간의 순화기간을 두며 순화기간동안 polycarbonate cage에 3마리씩 사육함. 개체식별은 tail marking법을 사용하며, 검역 및 순화기간 중에는 적색 유성펜으로 표식하고 케이지 당 3수 사육밀도로 관리하며, 군 분리 및 8주 투여기간동안 검정색 유성펜으로 표식하여 케이지당 3수 또는 2수 사육밀도로 수용하여 관리함. 검역상 이상이 없는 동물만을 대상으로 순화 종료 후 체중을 기준으로 Z배열법에 따라 분리하며, 군 분리 완료 후 각각의 사육상자에 개체 식별카드 (시험명, 시험군, 개체번호, 성별, 시험 개시일 등 기재)를 부착함. 시험물질 투여는 군 분리 익일부터 개시함(표 13).

표 13. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 항 지방간 효능평가 실험 조건

Group	시험물질	Dose (mg/kg)	고지방식이	투여볼륨 (mL/kg)	투여 빈도	투여 기간	N 수
G1	Sham (normal diet)	vehicle	-	10	QD	8주	10
G2	HFD (60% Fat)	vehicle	60% Fat				10
G3	HFD (60% Fat) + 밀크씨슬 추출물 100	100	60% Fat				10
G4	HFD (60% Fat) + 개똥쑥 열수추출물 50	50	60% Fat				10
G5	HFD (60% Fat) + 개똥쑥 열수추출물 100	100	60% Fat				10

시험물질과 대조물질을 각각 50, 100 mg을 체중 kg/10mL 정제수에 녹여 8주간 1일 1회 일정시간에 투여함. 부검일에 16시간 절식 체중을 측정한 후 부검을 진행하였음. 실험종료일 (day 56)에 절식된 모든 개체는 isoflurane으로 흡입 마취한 후 개복 하에 복대정맥을 통해 전혈액을 채취하고, 채취한 혈액은 0.6mL SST tube (Microtainer, BD, USA) 넣어 실온하에 30분~1시간 정도 응고과정을 거친 후 4℃, 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -70℃ 이하의 deep freezer(Model 706, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)에 분석 시까지 보관하였음. 분리된 혈청은 AST (GOT, Glutamate Oxaloacetate Transaminase), ALT (GPT, Glutamate Pyruvate Transaminase), GGT (Gamma Glutamyl Transpeptidase)를 자동 혈액생화학분석기 (Accute TBA-40FR, Toshiba Medical System Co., Japan)를 이용하여 측정하였음.

모든 시험 개체에 대하여 비장과 간을 적출하여 표면의 이물질을 제거하고 0.9% saline으로 세척함. 채취된 간 조직 소엽 일부와 비장조직은 따로 분리하여 간 내 항산화 지표분석, 간 및 비장조직 내 cytokine 분석 검사를 위하여 -70℃ 이하의 deep freezer에 급속 동결하여 보관한 후 분석에 사용함. 일부 간 조직은 10% neutral buffered formalin액에 고정한 후

삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 paraffin block을 제작하여 4㎛로 박절한 후, hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색을 실시함. 제작된 조직슬라이드는 봉입과정을 거친 후 광학현미경 (Olympus MVX10 microscope, equipped with a DC71camera, Olympus, Japan) 하에 조직학적 평가를 실시함.

(3) 시험 결과

Transaminase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상에서 가장 많이 이용되고 있으며 간 건강의 가장 중요한 지표인 AST와 ALT가 있음. 손상된 간으로부터 혈액에 시험물질 투여는 군 분리 익일부터 개시함(표 1).방출된 간의 효소 활성은 간독성을 측정하는 매우 유용한 방법 중의 하나로서, 혈청 중 AST 및 ALT 등의 효소 활성도의 상승은 간독성으로 인한 간세포의 변성 및 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 아미노기 전이효소(transaminase)가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내게 됨.

본 연구의 혈중 AST 및 ALT 활성도를 측정한 결과에서 정상군의 혈중 AST 수치는 97.20 ± 43.88 U/L로 확인된 반면 고지방식이군은 160.40 ± 38.02 U/L로 가장 높은 활성을 보임. 이에 반하여 밀크씨슬추출물 투여군, 개똥쑥 추출물 저농도 투여군, 개똥쑥 추출물 고농도 투여군은 각각 128.10 ± 55.45 U/L, 80.30 ± 16.81 U/L, 66.40 ± 15.55 U/L를 나타내었고, 이 중 개똥쑥 추출물 투여군에서는 저농도와 고농도에서 유의적인 활성감소를 나타냄($p<0.01$, 그림 41).

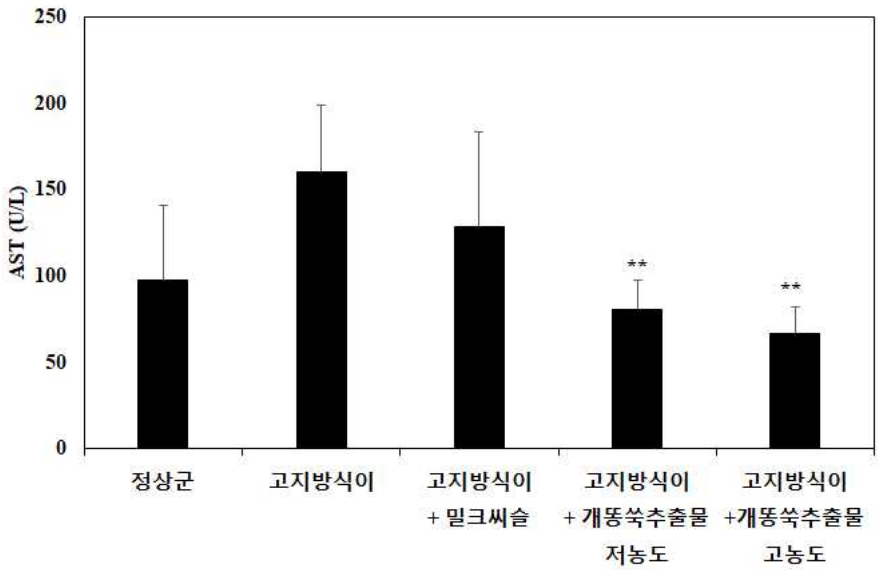


그림 41. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 AST에 미치는 영향

혈중 ALT 수치결과에도 AST 결과와 비슷한 경향으로 정상군의 30.80 ± 11.65 U/L 대비 고지방 식이군에서 87.30 ± 63.35 U/L로 가장 높은 활성을 나타내었고, 밀크씨슬 투여군,

개똥쑥 추출물 저농도 투여군, 개똥쑥 추출물 고농도 투여군은 각각 39.50 ± 10.56 U/L, 38.00 ± 10.28 U/L, 39.00 ± 16.06 U/L로 나타내었음. 고지방식이군과 비교 시 모든 군에서 유의하게 ALT 활성이 낮아진 것으로 측정되었음($p<0.05$, 그림 42).

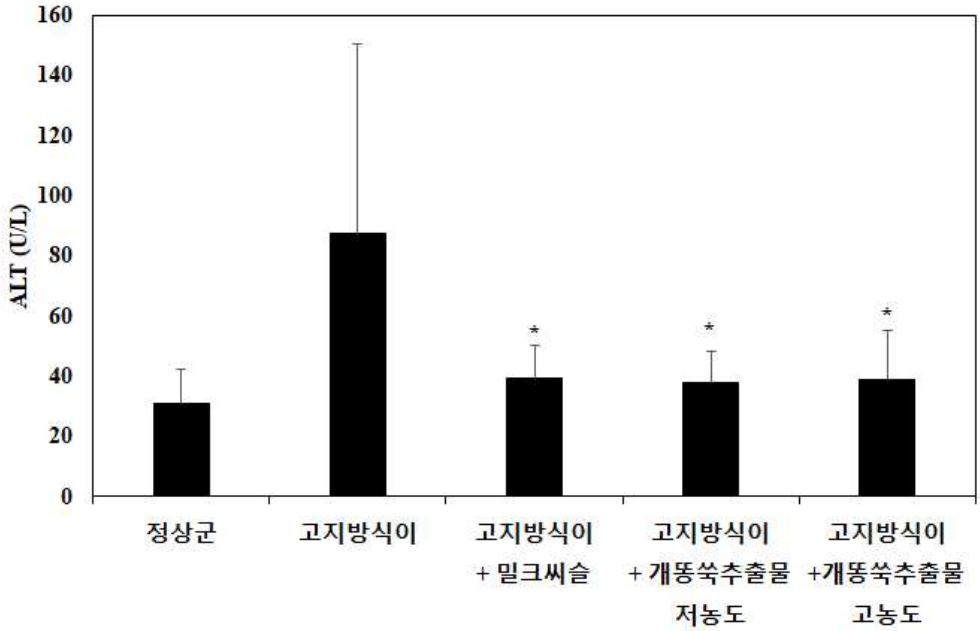


그림 42. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 ALT에 미치는 영향

GGT는 간세포 세포막의 일부인 소관막(canalicular membrane)과 담도상피세포에 존재하며, 그 외에도 신장, 심장, 뇌, 췌장, 대장 등 다른 조직에도 존재함. 일반적으로 GGT는 간내 또는 간 외 담즙정체(cholestasis), 담관폐쇄 또는 간질 환자의 선별과 진단에 이용되며, 사람에서 증상이 없는 환자에서 ALP가 상승한 경우 GGT는 간질환 원인인지 다른 원인인지 감별하는데 도움을 주는 지표에 해당됨.

본 연구의 혈중 GGT 수치결과에서 정상군은 0.20 ± 0.45 U/L로 확인되었고 고지방식이군은 0.50 ± 0.85 U/L로 가장 높은 활성치를 나타낸 반면, 밀크씨슬 투여군, 개똥쑥 추출물 저농도 투여군, 개똥쑥 추출물 고농도 투여군은 각각 0.20 ± 0.42 U/L, 0.20 ± 0.42 U/L, 0.00 ± 0.00 U/L 를 나타냄. 고지방식이군과 비교 시 유의적 차이는 나타나지 않았으나, 모든 군에서 GGT 활성증가가 낮아진 결과를 확인할 수 있었음(그림 43).

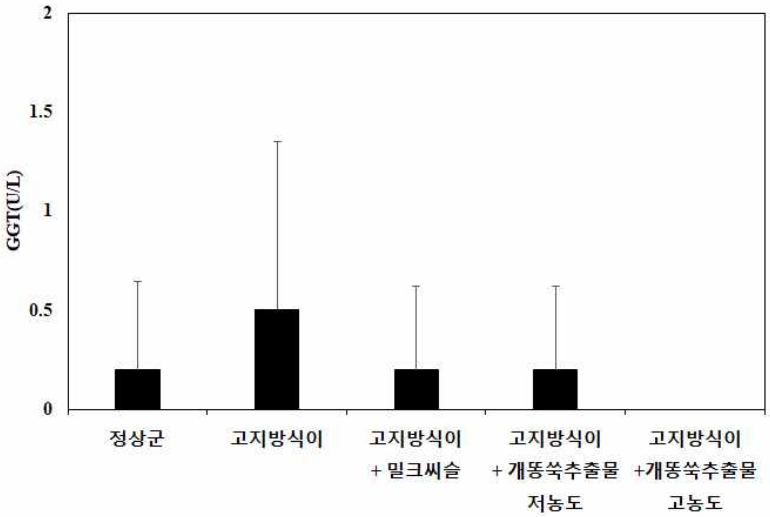


그림 43. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 GGT에 미치는 영향

혈중 지질 수치 중 중성지질의 결과에서도 정상군은 97.20 ± 27.23 mg/dL로 확인되었고 고지방식이군은 113.30 ± 18.38 mg/dL로 가장 높은 활성치를 나타낸 반면, 밀크씨슬 투여군, 개똥쑥 추출물 저농도투여군, 개똥쑥 추출물 고농도투여군은 각각 110.10 ± 19.95 mg/dL, 86.20 ± 18.65 mg/dL, 83.30 ± 19.13 mg/dL를 나타내었으며, 이 중 시험물질 처치군인 개똥쑥 추출물 저농도와 고농도 투여군에 한하여 유의한 효과가 나타남($p<0.01$, 그림 44-A).

실험동물의 콜레스테롤 분석 결과, 정상군은 98.40 ± 19.39 mg/dL로 측정되었고 고지방식이군은 165.90 ± 57.01 mg/dL로 가장 높은 수치를 나타낸 반면, 밀크씨슬 추출물 투여군, 개똥쑥 추출물 저농도 투여군, 개똥쑥 추출물 고농도 투여군은 각각 165.20 ± 24.34 mg/dL, 157.70 ± 19.91 mg/dL, 155.20 ± 35.57 mg/dL로 측정됨. 군 간의 유의한 차이는 나타나지 않았으나 고지방식이군과 비교 시 개똥쑥 추출물 투여군에서는 콜레스테롤의 함량이 다소 낮아진 것으로 관찰됨(그림 44-B).

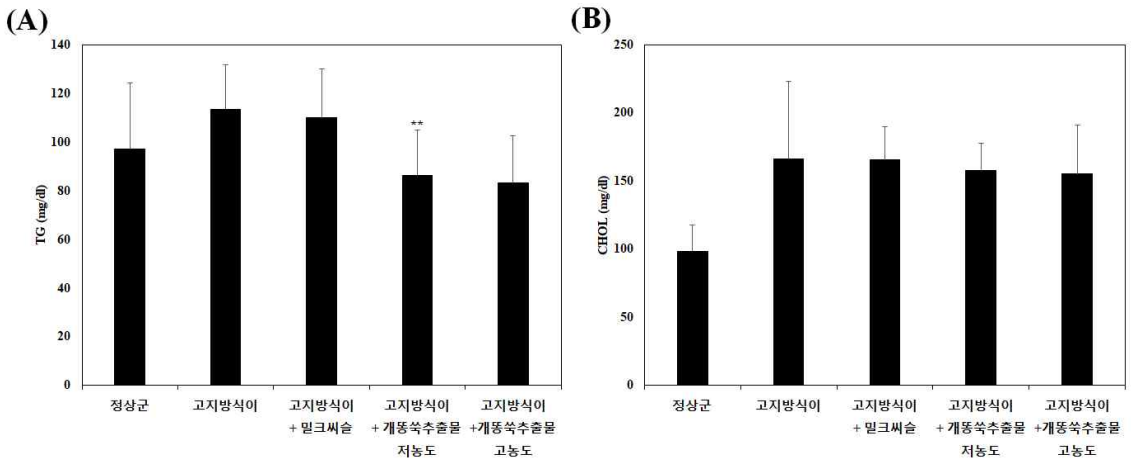


그림 44. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 혈액 중 중성지질(A) 및 콜레스테롤(B)에 미치는 영향

일반 사료를 섭취한 정상군의 모든 개체의 간 조직은 정상적인 소엽구조를 유지하면서 간세포의 변형과 지방성 공포 변성이 관찰되지 않은 반면, 고지방식이군 내에서는 간세포 내 크고 작은 공포모양의 지방구가 침착되어 간 손상과 지방간 소견이 관찰됨. 대조물질인 밀크씨슬추출물 섭취군의 경우 간 조직 내 지방구 형성정도는 경도에서 중등도 수준으로 지방입자의 수와 크기가 증가되어 잔존해 있는 것으로 확인되어 지방간 개선효과는 유의한 차이가 확인되지 않은데 비해, 개똥쑥 열수추출물 저농도, 고농도 투여군 모두 고지방식이군에 비교하여 간 손상의 정도가 감소되어 있으며 간세포 내 크고 작은 공포 모양의 지방구가 현저히 감소되었음을 확인함(그림 45).

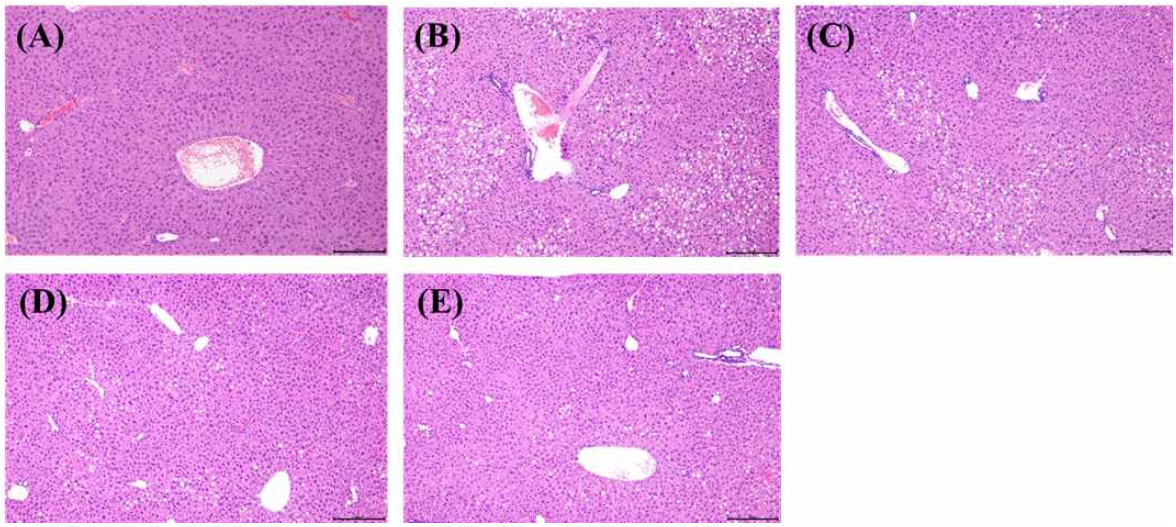


그림 45. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 간 조직에 미치는 영향
(A)정상군 (B)고지방식이 대조군 (C)밀크씨슬투여군
(D)개똥쑥 추출물 저농도 투여군 (E)개똥숙 추출물고농도 투여군

지방성 변화 정도에 대한 scoring을 실시한 결과, hepatocellular steatosis score는 정상군 0.0 ± 0.0, 고지방식이군 2.6 ± 0.70, 밀크씨슬 추출물 섭취군 1.7 ± 0.82, 개똥쑥 추출물 저농도 섭취군군과 개똥쑥 추출물 고농도 섭취군은 1.2 ± 0.42, 1.2 ± 0.42로, 시험물질 투약군인 개똥쑥 추출물 저농도 고농도 투여군이 고지방식이군에 비교하여 비알콜성 지방간염의 점수가 유의적으로 낮게 확인됨($p<0.01$, 그림 46).

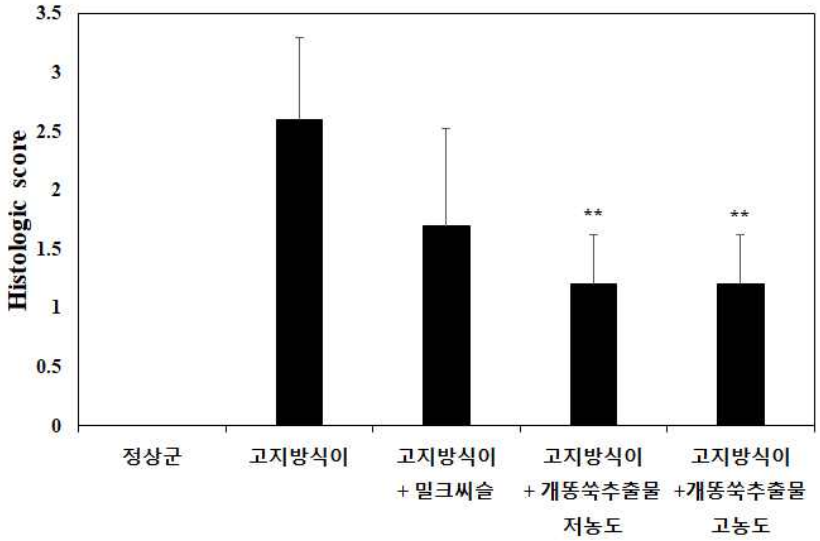


그림 46. 고지방식이 급이 마우스에서 개똥쑥 추출물의 섭취가 간 조직의 지방성 변화에 미치는 영향

10) 인체적용시험 시제품 생산

가) 개똥쑥 추출물 섭취량 설정

(1) 유효성 평가를 통한 유효농도 확인

개똥쑥 열수추출물의 기능성 평가를 위한 질환 동물모델 시험 결과에서의 최적의 유효용량은 100 mg/kg/day로 확인됨. 이 유효용량에 성인의 평균체중 60kg을 대입한 후 동물환산계수(마우스) 0.08을 반영하고 부형제(덱스트린 30%) 첨가량을 환산하면 개똥쑥 열수추출물로서 1일 686 mg/60 kg/day의 섭취량이 유효한 것으로 나타남.

(2) 독성시험을 통한 섭취량 안전성 확인

독성시험 자료를 바탕으로 최대 무작용량(NOEL ; No Observed Effect Level) 값과 안전계수(safety factor)를 이용해 섭취량을 설정하였음.

본 연구팀에서 개발한 개똥쑥 열수추출물 13주 반복투여 독성실험을 통해 최대무작용량 1,000 mg/kg/day의 농도에서 무독한 것으로 나타났으므로 실제 최대무작용량은 1,000 mg/kg/day 범위를 훨씬 우회할 것으로 사료됨. 최대 무작용량을 사람에게 적용하기 위해 안전계수 값을 도입하는데, 보통 실험동물과 사람과의 차이를 감안한 factor 10과 사람과 사람 사이의 차이를 감안한 factor 10을 곱하여 안전계수 값으로 100을 적용함. 이 때 60 kg의 표준 체중과 개똥쑥 추출물의 부형제(덱스트린 30%) 첨가량 환산 시 857.14 mg의 섭취량은 안전한 것으로 산출됨.

(3) 전통적 섭취 방법을 통한 섭취량 안전성 확인

개똥쑥의 일반식품으로서의 섭취량 자료는 별도로 정해진 바가 없으며, 제한 없이 섭취하도록 하고 있음. 개똥쑥(청호, 황화호)는 한방에서 널리 사용되어 온 원료이며 다양한 한의서에서의 섭취 사례가 있음.

- 일화자제가초본에 따르면 과로로 인한 피로를 치료하고 기가 위로 치밀어 오르는 것을 내리며 식욕을 돋우고 도한을 멈추는 효능이 있다고 하였으며, 하루 3.75~12 g을 물로 달여서 복용한다 하였음.
- 상용중초약수책에서는 결핵의 조열, 도한, 소화불량에 효과가 있다 하였으며, 개똥쑥 7.5 ~ 15 g을 물로 달여서 복용한다 하였음.
- 상해상용중초약에서는 서열발사, 흉민복통에 효과가 있다 하였으며, 개똥쑥 19~37.5 g을 물로 달여서 복용한다 하였음. 또한 학질(말라리아), 간헐열에도 효과가 있다 하였으며, 개똥쑥 11~19 g을 물로 달여 복용한다 하였음.
- 강서초약에서는 소아 열사에 효과가 있다 하였으며, 개똥쑥, 봉미초, 쇠비름을 각각 75 g 물로 달여서 복용한다 하였음. 또한 유수(림프관염)에도 효과가 있다 하였으며, 개똥쑥 모형엽 각 75 g, 위령선 19 g을 물로 달여 복용한다 하였음.

전통적으로 식용 또는 약용으로 사용되어온 개똥쑥 추출물의 일일섭취량인 3.75~75 g 은 개똥쑥 열수추출분말(평균 추출수율 10%, 덱스트린 함량 30%)로 환산시 536~10,714 mg에 해당하는 것으로 확인됨.

(4) 섭취량 선정

유효성 평가를 바탕으로 최종 개똥쑥 열수추출분말의 섭취량은 1일 686 mg의 농도는 기능적으로 유효한 것으로 나타났으며, 이는 독성시험 결과로 확인된 안전한 섭취량인 857.14 mg 보다 낮은 용량의 섭취량임. 또한, 전통적 섭취 방법에 의해 사용되어진 일상적 섭취량보다 낮은 것으로 확인되었음.

본 연구팀에서는 유효성평가, 독성시험, 전통적 섭취 방법을 종합하여 최종적으로 개똥쑥 열수추출물의 섭취량은 1일 686 mg으로 설정하였음.

나) 인체적용 시험용 식품 생산

(1) 인체적용 시험용 식품 제형 연구

인체적용 시험용 식품 생산은 건강기능식품의 제조가 허가된 GMP 시설이 갖춰진 ㈜팜크로스의 시설과 기술을 제공받아 개발을 진행함. 인체적용시험용 시험식품과 대조식품의 제

형 형태는 먼저 정제(tablet)와 캡슐(soft capsule)로 시제품 테스트를 거쳐 가장 적합한 형태의 제형을 선택하기로 함. 인체적용시험 수행을 위한 시험군과 대조군은 임상시험의 이중 맹검을 유지할 수 있도록 두 식품간의 크기, 색상, 무게 등 성상이 동일하게 제조되어야 하기 때문에 현재 개똥쑥 열수추출분말의 성상이 나타나지 않도록 다양한 색소 첨가 및 코팅 등의 과정을 반복하여 제작 테스트를 진행함(그림 47).

그림 47. 인체적용 시험용 식품 제조를 위한 다양한 형태의 제형 제작

다양한 형태의 제작 테스트 후, 인체적용시험에 사용될 형태는 정제로 결정함. 개똥쑥 열수추출분말의 1일 섭취량인 686 mg을 하나의 정제로 제작할 시, 그 크기가 커져 복용할 때 목에 걸리는 등의 문제가 나타날 수 있기에 2정에 나누어 섭취할 수 있게 하였음. 1정당 개똥쑥 열수추출분말을 343 mg을 포함하며 타정성을 높이기 위해 일부 부형제를 첨가하고 내부 색상 및 외부 코팅을 통해 시험식품과 대조식품을 같은 형태로 제작하였음(표 9).

표 9. 인체적용 시험을 위한 시험용 및 대조용 식품의 전성분

No.	원료명	인체적용시험 시험용 식품			인체적용시험 대조용 식품		
		배합 비율(%)	함량 (mg)	1일 총섭취량(mg)	배합 비율(%)	함량 (mg)	1일 총섭취량 (mg)
1	개똥쑥 열수추출분말	57.1667	343	686	0	0	0
2	결정셀룰로오스	36.4128	218.477	436.954	83.0795	498.477	996.954
3	이산화규소	1.8	10.8	21.6	1.8	10.8	21.6
4	스테아린산마그네슘	1	6	12	1	6	12
5	카라멜색소	1.5	9	18	12	72	144
6	HPMC	1.5	9	18	1.5	9	18
7	식용색소 적색40호알루미늄레이크	0.4375	2.625	5.25	0.4375	2.625	5.25
8	이산화티타늄	0.1615	0.969	1.938	0.1615	0.969	1.938
9	식용색소혼합제제(갈색)	0.0215	0.129	0.258	0.0215	0.129	0.258
합계		100	600	1,200	100	600	1,200

(2) 인체적용시험용 식품의 포장 및 라벨

인체적용시험용 식품의 포장은 외부 환경에 대한 보호효과가 뛰어나며 휴대성 및 섭취가 용이한 PTP(press through package)포장으로 진행하였음. 인체적용시험용 식품은 외형 및 성상뿐만 아니라 포장 또한 동일하게 사용하며, 동일한 라벨을 부착함으로써 연구 대상자 및 연구자에 대하여 비밀이 유지되도록 해야함. 시험식품과 대조식품을 각각 1차 불출용(28일 + 7일 = 70정), 2차 불출용(28일 + 12일 = 80정)으로 나누어 포장하였음. 포장 후 무작위 배정표에 따라 고유코드번호를 라벨지에 작성하여 인체적용시험에 활용하였음(그림 48).

그림 48. 인체적용시험용 식품 포장(좌) 및 인체적용 시험용 라벨 정보(우)

11) 인체적용시험 개시

가) 인체적용시험 요약

(1) 인체적용시험 제목

간 기능 개선에 미치는 SPB-201(개똥쑥 열수추출분말)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

(2) 인체적용시험 실시기관 및 책임자

- 분당제생병원, 임상영양내과 백현욱 교수
- 삼육서울병원, 가정의학과 한병덕 주임과장

(3) 인체적용시험 목적

본 인체적용시험은 경계역 및 경도의 간기능 손상자를 대상으로 SPB-201(개똥쑥 열수추출분말)을 섭취했을 때 간기능 개선에 있어 대조군(Placebo)과 비교하여 유의한 차이를 보이

는지 검증하기 위하여 계획됨.

(4) 시험 단계 및 디자인

- 시험 단계 : 기타 (건강기능식품)
- 디자인 : 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조

(5) 인체적용시험 대상자 수

	시험군	대조군	총 시험대상자 수
최종 평가 례수(PP Set)	37	37	74
Drop-out(25%) 고려예수	50	50	100

(6) 인체적용시험 방법

인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준에 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정함. 배정된 인체적용시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품, 대조식품)을 섭취함(그림 11).

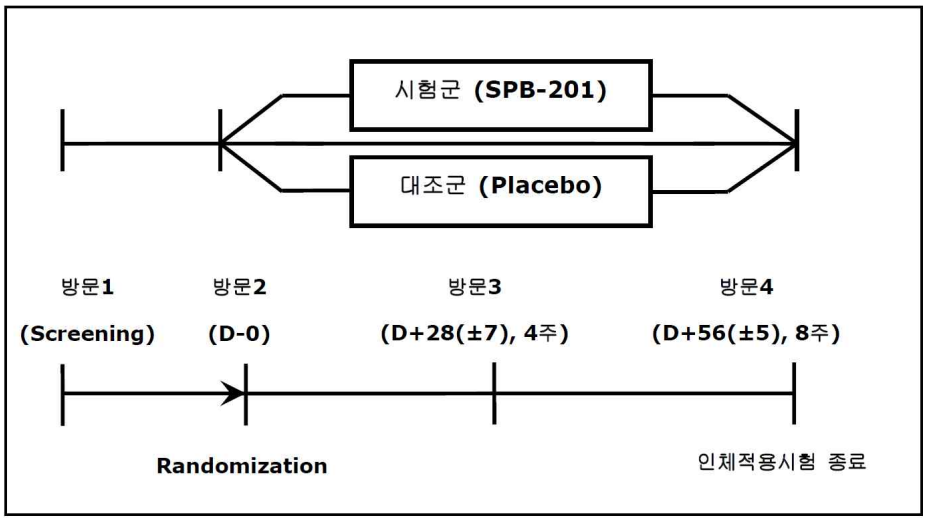


그림 49. 인체적용시험 방법 및 방문일정

(7) 선정기준

- 만 19세 이상, 만 75세 이하의 남, 여
- 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 45-120 U/L 범위에 있는 자
- 인체적용시험 시작 전 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면동의서에 서명한 자

(8) 제외기준

- 알콜 사용·유발 장애, 심장질환, 중추 신경 장애 등으로 입원 및 약물 치료, 재활 치료 중인자
- 복부 초음파 검사상 간경변증 또는 간암 환자
- 혈액검사에서 γ-GTP가 180 U/L 초과인 자
- ALP가 시험기관 정상상한치의 3배 이상인 자 또는 Platelet $10^5/\mu L$ 이하 또는 AFP가10 ng/mL 초과인자
- 현재 바이러스성 간염을 진단받은 자
- 스크리닝 검사에서 HBs Ag 또는 HCV Ab 검사상 양성인 자
- Albumin 3 g/dL 이하 또는 Total bilirubin 3 mg/dL 이상인 자
- Creatinine이 시험기관 정상상한치의 1.5배 이상인 자
- 조정되지 않는 갑상선 질환자
- 시험 시작 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물(항결핵제, 항경련제, 통풍치료제, 항우울제, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물)을 복용한 자
- 시험시작 2주 이내 NSAIDs, 항바이러스제, 항생제를 복용한 자
- 시험시작 4주 이내에 이담제, 담석용해제, 간보호제, 해독제, 약물의존성치료제를 복용한 자
- 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHG 이상)
- 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우 또는 인슐린을 투여받는 경우)
- 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자
- 임신 중이거나 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자
- 본 인체적용시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 자
- 본 인체적용시험 시작 1개월 이내 다른 임상시험에 참여했던 자
- 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 자

(9) 1차 유효성 평가 변수

- 섭취 후 8주 시점의 AST, ALT 변화량

(10) 2차 유효성 평가 변수

- 섭취 후 4주 시점의 AST, ALT 변화량
- AST, ALT 변화율

- γ-GTP
- AST/ALT ratio
- 다차원 피로 척도(MFS)
- 혈중지질(TC, TG, HDL-c, LDL-c)
- Bio-impedance 기기를 통한 체지방량, 체지방률

(11) 안전성 평가 변수
- 이상반응
- 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사)
- 활력징후(혈압, 맥박), 체중
- 심전도 검사

나) 생명윤리위원회(IRB) 승인 및 시험 개시

인체적용시험을 수행하기 위해 분당제생병원과 삼육서울병원의 생명윤리위원회에 본 인체적용시험을 승인받아 시험을 개시하였음(그림 50).

심의결과 통지서

접수일 2018 년 8 월 2 일
심의일 2018 년 8 월 17 일
시험책임자/의뢰자 백현욱 귀하

귀하가 신청한 심사의뢰 건에 대하여 본원 기관생명윤리위원회에서 심의 검토하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

과제번호	IMCN18-04		
연구과제명	간기능 개선에 미치는 SPB-201의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		
심의 방법	○ 정규심의	● 신속심의	
심의 위원	하영록, 장동숙, 김태명		
심의 내용	1. 심의신청서/ 신속심의 요청서/2. 연구계획서/ 연구계획서 요약 3. 피해자보상에 대한 규약/4. 시험대상자모집 공고안/ 포스터 시안/ 식이조사지/음주습관설문지/MFS 5. ICF/ CRF/ 6. 연구자 및 담당자 관련 해당서류(이력서/이해상충서약서/생명윤리준수서약서/GCP관련 교육 이수증)/7. 연구비내역서/8. 보험증권 미 첨부 사유서		
과제 종류	● 신규과제 ○ 변경계획 ○ 중간보고 ○ 종료보고 ○ 이상반응보고 ○ 기타( )		
심의 결과	● 승인 ○ 조건부 승인 ○ 보완 후 재심의 ○ 부결 ○ 승인된 연구의 중지 또는 보류		
심의결과의 사유 또는 의견	연구진행을 승인합니다.		
승인 날짜	2018 년 8 월 17 일	승인 유효기간	2019 년 8 월 16 일
중간보고서 제출 필요 여부	● 예 ○ 아니오	제출 기한	2019 년 8 월 16 일

* 심사결과에 대한 이의의 제기가 필요한 경우에는 통보 후 1주 이내에 근거자료를 첨부하여 심사위원회에 재심을 청구할 수 있습니다.
* '조건부 승인'시에는 보완서류를 2주 이내에 제출해주시기 바랍니다.
* 본 위원회에서 지정한 중간보고 제출 기한내에 중간보고서를, 연구종료 시에는 종료보고서를, 종료 1년 이내에 결과보고서를 작성하여 제출해 주시기 바랍니다.
* 본 위원회는 KGCP및 ICF-GCP 규정을 준수하며 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법규를 준수합니다.

분당제생병원 기관생명윤리위원회(IRB)위원장 김 용현

(의) 대진의료재단 분당제생병원장 채병국

DMC IRB FORM Version 2.4 (15 OCT 2012)

SF 15-003

임상시험심의결과 통보서

삼육서울병원 임상시험심의위원회(서울시 동대문구 망우로 82)는 ICH/GCP 및 임상시험관리 기준(KGCP)을 준수합니다.

IRB No	SYMC IRB 1808-01				
수신	책임연구자	한병덕	소속	삼육서울병원 가정의학과	직위	주임교수
	의뢰자관	(주)성균바이오텍			
연구과제명	(국문)간기능 개선에 미치는 SPB-201 의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8 주, □다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험 (영문)A 8week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for the evaluation of the efficacy and safety of SPB-201 on improving liver function				
	Protocol No.	SKBT_SPB-201	Version No.	1.0	
연구대상	□임상시험 외 연구	□증례보고 □조사,설문,인터뷰 연구 □등록(레지스트리) 연구 □전향적 코호트 연구	□생태학적 연구 □환자군 연구(case series) □시판후조사(PMS) □후향적 코호트 연구	□단면조사 연구 □환자-대조군 연구 □챔돔관찰 □기타( )	
	■임상시험	□의약품 □시약 □진단 및 치료법 ■간강식품			
		일 반 명	개발약물수추출분말 (SPB-201)	상 품 명	NA
연구목적	■의뢰자주도임상	□연구자주도임상	□학술용	□기타	
연구계획서 승인일	2018.08.08		승인유효일자	2019.08.07	
심의종류	정규		심의대상	초기심의	
접수일자	2018.07.26		심의일자	2018.08.08	
정기보고주기	12 개월		심의결과	조건승인	
심의 서류	■연구계획서(수정된) ■설명문 및 동의서 ■대상자 보상에 관한 문서 ■연구자 준수 서약서 ■대상자 모집안 □연구 진행 중간 보고서 □연구 결과 보고서 □연구 위반/변동 사례보고서 □심의면제 신청서		■증례 기록지 ■임상시험 자료집 ■경제적 이해상충 점검표 □연구계획서 심의 통과 확인서(학위논문) □중대한 이상 반응 발생보고서 □임상시험 조기종료보고서 □연구 중지 보고서 □동의서 면제 신청서 ■기타(음주습관설문지, MFS 설문지, 식이조사지)		
심의의견 (변경사항)	1. 모집공고문의 IRB연락처가 부재합니다. 2. 설명서 및 동의서가 총12page로 심의의원서 연구대상자 동의와 관련된 부분에서 설명부터 동의까지 15분+10분 총25분으로, 불가하다고 판단되어 수정 요청합니다.				

2018 년 08 월 16 일

삼육서울병원 임상시험심의위원회 위원장 (인)

그림 50. 분당제생병원(좌) 및 삼육서울병원(우)의 생명윤리위원회(IRB)의 인체적용시험 승인

<2차년도 협동연구기관 : 개똥쑥 추출물의 전임상 안전성 연구>

12) 주요 성분의 작용기전 연구

가) Raw264.7 세포주를 이용한 항염증 및 항산화 활성 및 작용기전 연구

(1) 목적 및 실험 방법

Raw264.7에 LPS로 자극을 가하면서 개똥쑥 열수추출물(AAWE) 대량생산 원료 또는 주요 성분(6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin, eupatilin, scopoletin, 1,3-dicaffeoylquinic acid)을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, 배양액에서 TNF-α 등의 사이토카인과 nitrite 등의 염증매개인자를 assay kit과 RT-Q-PCR 등으로 측정하는 한편, 세포에서 분리한 mRNA를 이용하여 COX-2, NF-κB 등의 발현 분석 등을 통해 작용기전을 규명하고자 함.

(2) 실험결과

(가) Nitrite assay

LPS-stimulated Raw264.7 세포에 AAWE(0.125, 0.25, 0.5 mg/mL)와 주요 성분 5종(12.5, 25, 50 μM)을 농도별로 처리한 후 배양액에서 nitrite 생성에 대한 영향을 분석한 결과, 5종의 성분 모두 LPS에 의한 nitrite 생성 증가를 최소 40% 이상 억제하였으며, 특히 2번 화합물인 artemisinin의 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었음(그림 51).

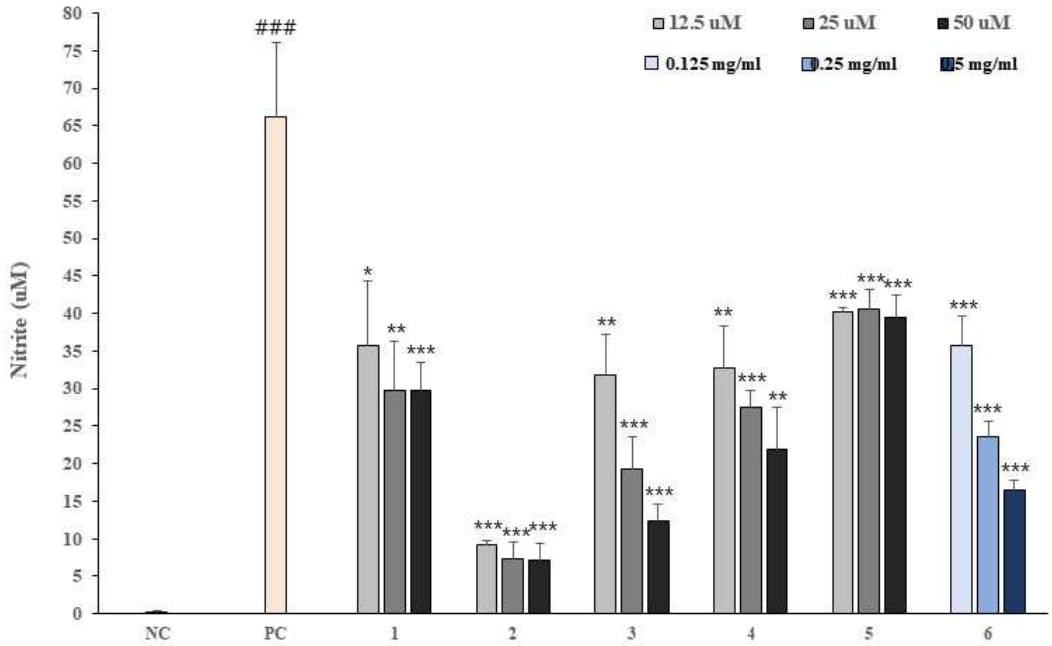


그림 51. LPS-stimulated Raw264.7 세포주에서 AAWE 및 주요 성분 5종의 nitrite 생성 억제 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid / #6, AAWE, ###, $p<0.001$, compared with negative control(NC), *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, compared with positive control(PC) stimulated by LPS

(나) TNF α ELISA

대표적인 염증성 사이토카인인 TNF α ELISA 결과에서도 5종의 성분 모두 LPS에 의한 TNF α 생성 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였으며, nitrite 결과와 동일하게 2번 화합물인 artemisinin의 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었음(그림 52).

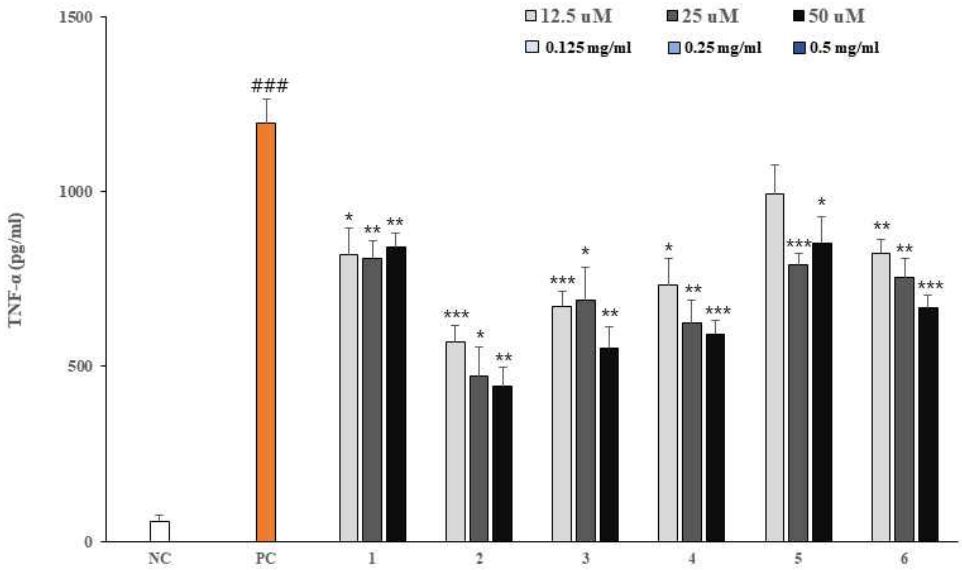


그림 52. LPS-stimulated Raw264.7 세포주에서 AAWE 및 주요 성분 5종의 TNF-α 생성 억제 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid / #6, AAWE, ###, p<0.001, compared with negative control(NC), *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001, compared with positive control(PC) stimulated by LPS

(다) RT-Q-PCR

상기 결과에서 nitrite 및 TNF α 감소효과가 가장 우수하게 나타난 artemisinin 성분의 COX-2, NF κB 감소효과를 확인하기 위해 RT-Q-PCR을 실시한 결과, 아래 그림에서와 같이 COX-2, NF κB의 mRNA 발현이 각각 80%, 60% 이상 감소된 것을 확인하였음(그림 53).

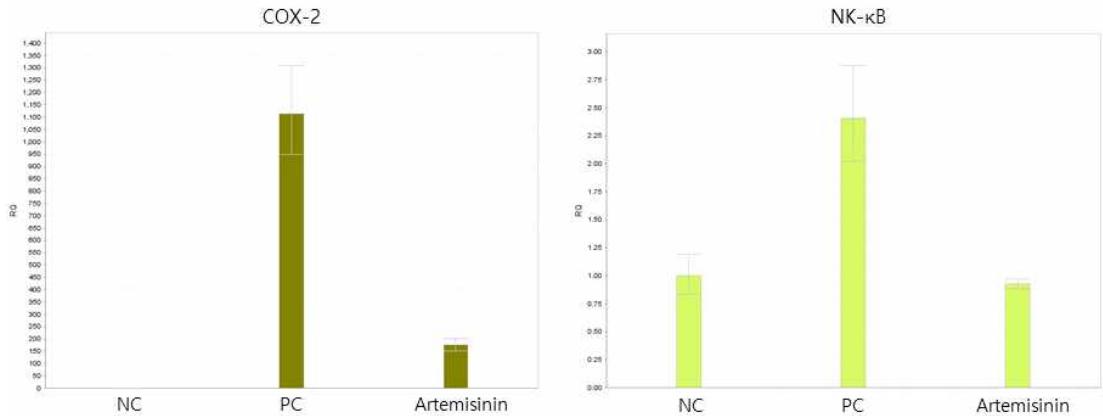


그림 53. LPS-stimulated Raw264.7 세포주에서 Artemisinin의 COX-2, NF κB 발현 억제 효과

나) HepG2 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구

(1) 목적 및 실험방법

HepG2에 1mM FFA(PA:OA=2:1)를 24시간 동안 처리하여 지방축적을 유도한 후 개똥쑥 열수추출물(AAWE) 대량생산 원료 또는 주요 성분(6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin, eupatilin, scopoletin, 1,3-dicaffeoylquinic acid)을 세포독성이 없는 범위 내에서 농도별로 가하여 24시간 동안 배양하고 이후 oil-red O staining, cell lysate에서의 TG, TC 측정을 통해 간세포에서 개똥쑥 열수추출물과 주요 성분이 나타내는 지질대사 조절 및 항염증 작용에 관한 기전을 확인하고자 함.

(2) 실험결과

(가) Cell viability

HepG2에 AAWE를 0~400 μg/mL까지 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 통해 세포 독성 유무를 평가한 결과, 아래 그림에서와 같이 모든 농도 범위에서 세포 독성이 없는 것으로 확인됨(그림 54).

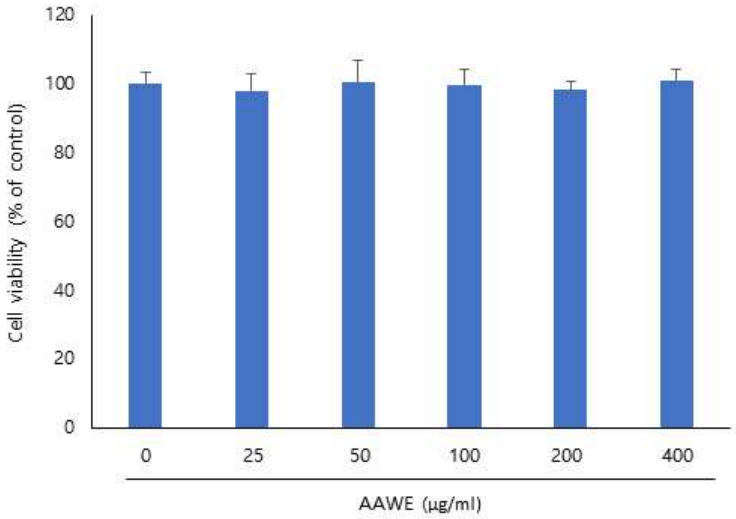


그림 54. AAWE의 HepG2 세포주에 대한 세포 독성

HepG2에 AAWE의 주요 성분 5종을 0~100 μM까지 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 통해 세포 독성 유무를 평가한 결과, 아래 그림에서와 같이 Compound 1의 100 μM를 제외한 모든 성분들의 모든 농도 범위에서 세포 독성이 없는 것으로 확인됨(그림 55).

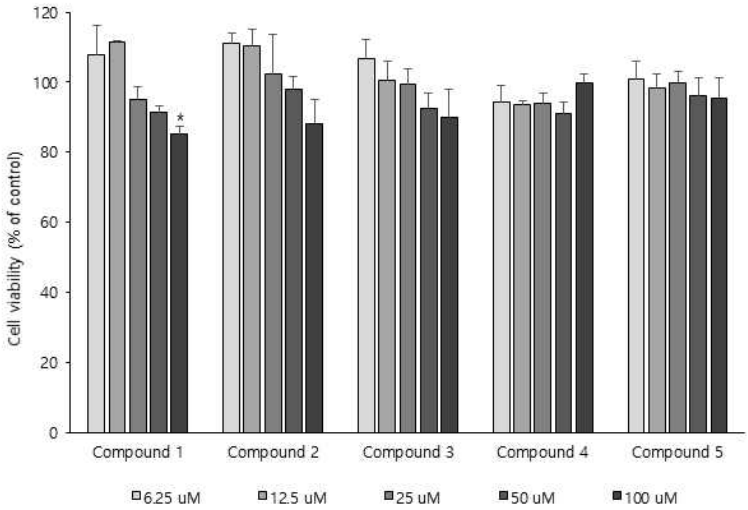


그림 55. AAWE의 주요 성분 5종의 HepG2 세포주에 대한 세포 독성

(나) ORO staining

HepG2에 FFA를 가하여 지방 축적을 유도하면서 AAWE 50㎍g/mL를 처리하였을 때, 세포 내 지방 축적을 감소시킬 수 있는지 oil red-O staining으로 측정한 결과, 그림에서와 같이 붉은 색으로 염색된 세포 내 지방량의 감소가 확인되었음(그림 56).

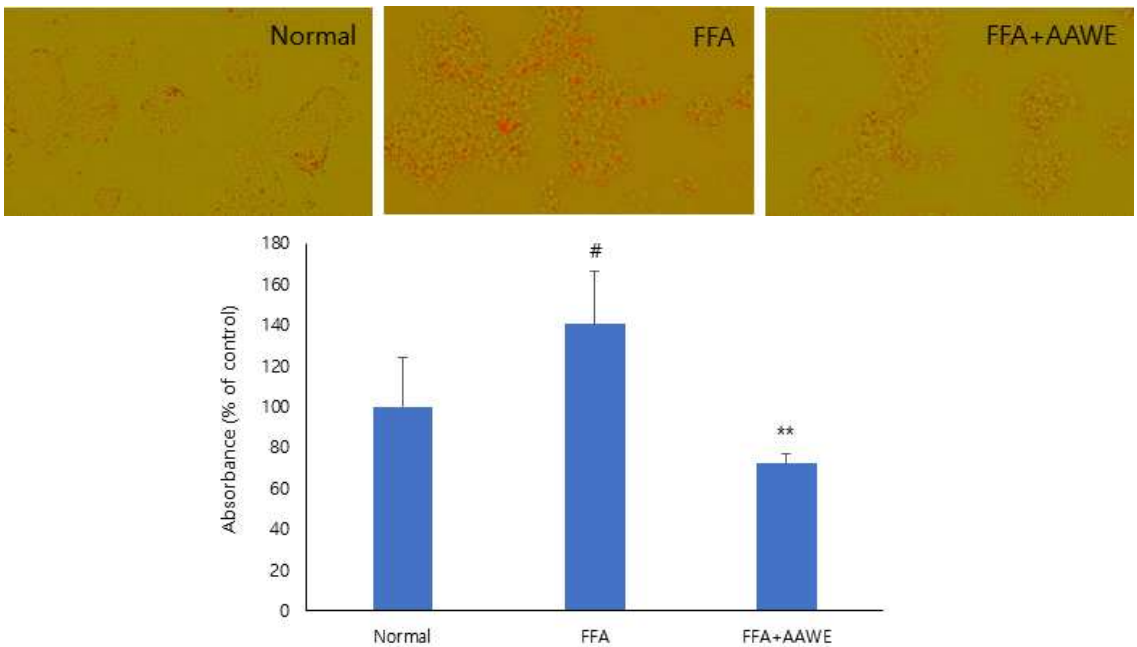


그림 56. FFA로 유도한 HepG2 세포주의 지방 축적에 대한 AAWE의 효과. #, $p<0.05$, compared with normal control, **, $p<0.01$, compared with positive control induced by FFA

HepG2 세포에 FFA를 처리하여 지방축적을 유도한 후 주요성분 5종 (50 μM)을 처리하여 간세포 내 지방축적 감소 효과를 확인하기 위하여 ORO staining을 실시한 결과, 주요성분 2, 5번인 artemisinin, cynarin은 약 11.9, 28.3 % 지방축적을 유의하게 감소 효과를 나타냈음. 그 외의 주요성분에서는 유의성이 나타나지 않음(그림 57).

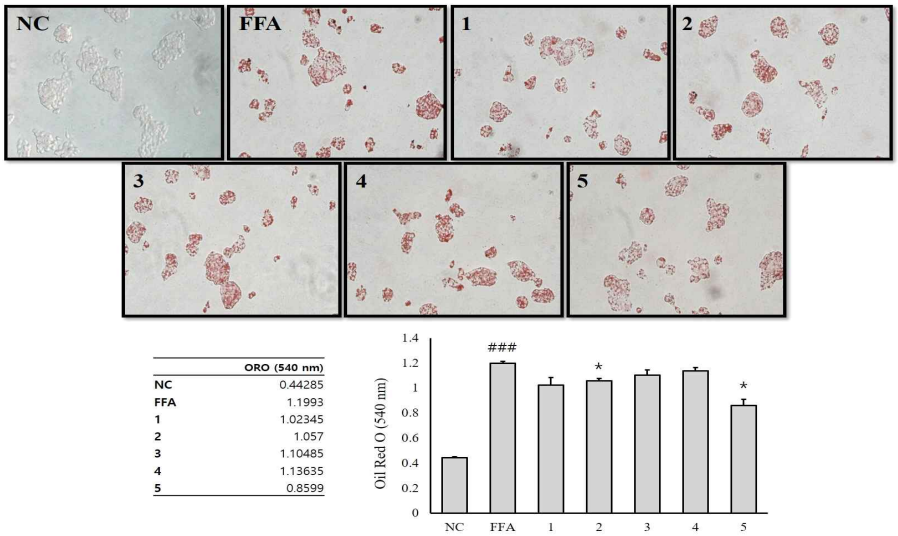


그림 57. FFA로 유도한 HepG2 세포주의 지방축적에 대한 주요 성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid, ### $p<0.001$ compared with normal control, * $p<0.05$ compared with positive control induced by FFA.

(다) TG, TC assay

상기 실험에서 HepG2 세포에 RIPA buffer를 가하여 lysate를 만든 후 단백질 정량을 한 다음, TG, TC assay kit를 이용하여 AAWE가 FFA에 의해 증가된 세포 내의 TG, TC 양을 감소시키는지 확인한 결과, 아래 그림에서와 같이 통계적으로 유의한 TG, TC 감소 효과가 관찰되었음(그림 58).

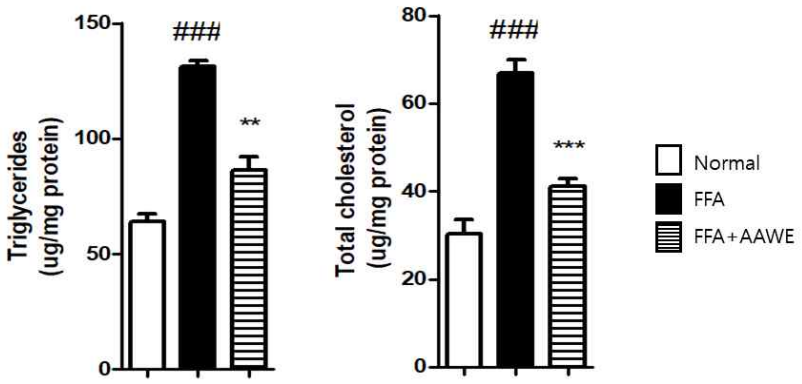


그림 58. FFA로 유도한 HepG2 세포주의 TG 및 TC 생성에 대한 AAWE의 효과. ###, $p<0.001$, compared with normal control, **, $p<0.01$, compared with positive control induced by FFA, ***, $p<0.001$, compared with positive control induced by FFA

FFA-stimulated HepG2 세포에서 주요성분 5종 (50 μM)의 지질 축적 억제 효과를 확인하기 위해 간세포 내 Trigyceride 농도를 측정한 결과, 위 ORO 결과와 비슷하게 성분 2, 5번인 artemisinin, cynarin에서 유의하게 64.2, 41.6 % 지방축적을 감소 효과를 나타냈음(그림 59).

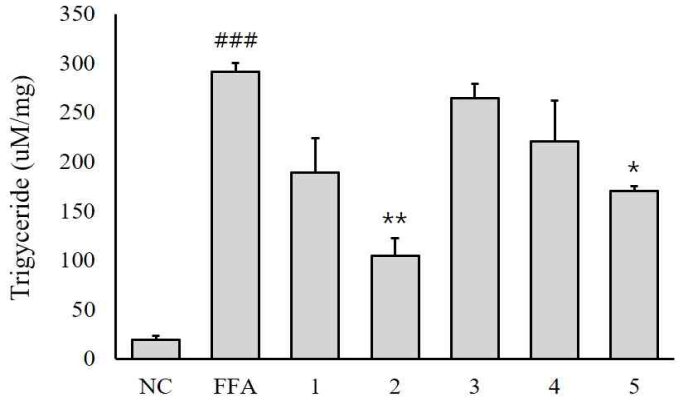


그림 59. FFA로 유도한 HepG2 세포주에서 Trigyceride에 대한 AAWE와 주요성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid, ### p<0.001 compared with normal control, *, ** p<0.05, 0.01 compared with positive control induced by FFA.

(라) RT-Q-PCR

간세포에 주로 분포하는 PPAR α 는 SREBP-1c의 기능을 저해하여 지방합성을 감소시키고, 지방산의 베타산화를 촉진하는 간 지방 대사 조절 핵심 인자로서, 주요 성분 5종이 PPAR α mRNA 발현에 관여하는지 RT-Q-PCR을 실시한 결과, FFA군 대비 성분 2, 5번에서 각각 PPAR α mRNA 발현량이 177, 172 % 증가하였음. 또, 지방전구세포에서 adipokine 분비와 관련 유전자의 발현을 증가시키는 대표적 활성인자로 알려져 있는 PPAR γ 의 mRNA 발현에 대한 분석 결과, 성분 2, 3, 5에서 각각 49.3, 35.7, 57.2 % 발현이 감소 되었음. 끝으로 개똥쑥 추출물의 주요 성분들이 지방합성 효소의 발현을 조절하는 전사인자인 SREBP-1c mRNA 발현에 관여하는지 측정한 결과, FFA군 대비 성분 2, 5번이 각각 42.3, 34.1 %의 비율로 SREBP-1c의 mRNA 발현량을 감소시키는 것으로 확인되었음. 이를 종합할 때, 주요 성분들 중 artemisinin과 cynarin이 간세포에서 지방합성 관련 유전자들의 발현 조절을 통해 지질대사를 조절하는 것으로 사료됨(그림 60).

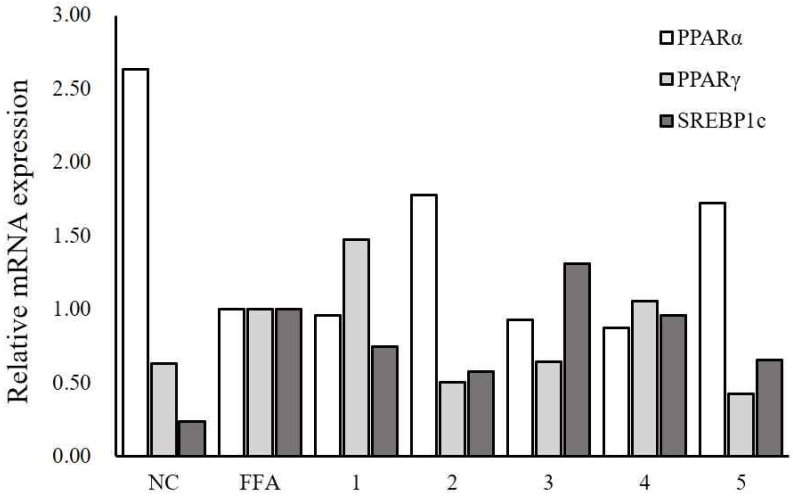


그림 60. FFA로 유도한 HepG2 세포주에서 PPAR α, PPAR γ 및 SREBP1c mRNA 발현에 대한 주요 성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid

다) 3T3-L1 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구

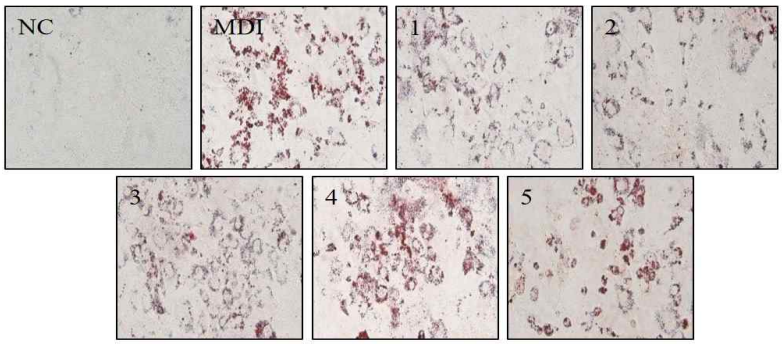
(1) 목적 및 실험방법

3T3-L1에 MDI cocktail(dexamethasone/MIX/insulin)과 함께 개똥쑥 추출물의 주요 성분 5종(6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin, eupatilin, scopoletin, 1,3-dicaffeoylquinic acid)을 처리한 후, 지방세포 분화에 대한 영향과 함께 ORO staining을 실시하고 TG양을 측정함으로써 개똥쑥 열수추출물 및 주요 성분 5종의 지방 축적 억제 효과를 확인하고자 함.

(2) 실험결과

(가) Oil red O staining

3T3-L1 세포에 MDI를 처리하여 지방세포 분화를 유도한 후 주요 성분 5종 (50 μM)을 처리한 다음, 지방세포 내 지방 축적 감소 효과를 확인하기 위하여 ORO staining을 실시한 결과, 주요 성분 2번인 artemisinin에서 약 15.7 % 지방축적을 유의하게 감소 효과를 나타냈음. 그러나 성분 2번을 제외한 1 - 4번은 각 4.1, 8.5, 2.1 % 감소하였으며, 주요성분 5번은 감소 효과를 나타내지 못함(그림 61).



	ORO (540 nm)
NC	0.34725
MDI	1.06885
1	1.02435
2	0.90095
3	0.9776
4	1.0468
5	1.24

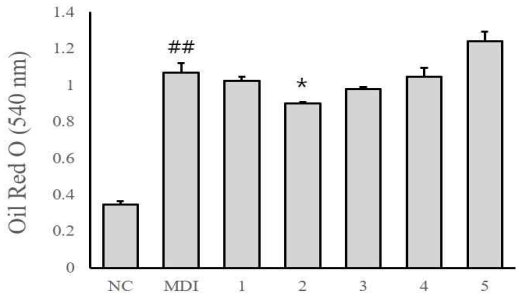


그림 61. MDI로 유도한 3T3-L1 세포주의 지방축적에 대한 주요 성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid / #AAWE, ## $p<0.01$ compared with normal control, * $p<0.05$ compared with positive control induced by MDI.

(나) TG assay

주요 성분 5종의 지방세포 내 Trigyceride 농도에 대한 영향을 확인한 결과, NC군 대비 MDI군에서 TG가 약 145.6 % 증가한 반면, MDI군 대비 성분 5번인 cynarin 처리군에서 TG 농도가 약 19.8 % 유의하게 감소함(그림 62).

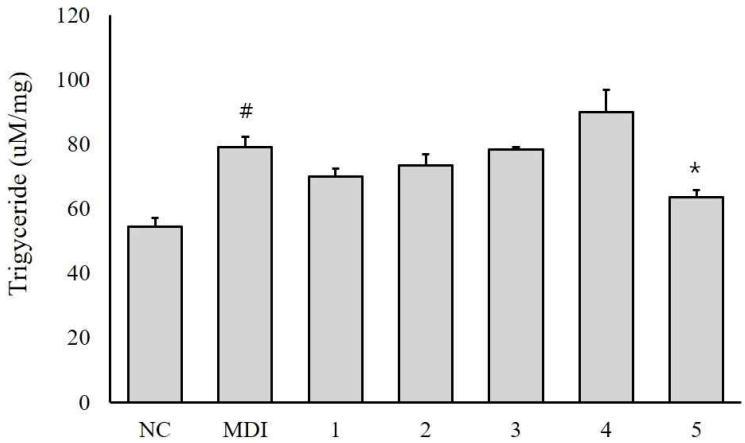


그림 62. MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 세포의 Trigyceride 축적에 대한 주요 성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid, # $p<0.05$ compared with normal control, * $p<0.05$ compared with positive control induced by MDI.

라) 개똥쑥 추출물 및 compound 5종의 항산화활성

(1) DPPH 라디칼소거능을 이용한 항산화 활성 측정

(가) 목적 및 실험방법

항산화 활성 측정에 사용된 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 자유라디칼 물질로 유기용매에 용해되어 520-540 nm에서 최대 흡광도를 가지는 보라색 화합물임. 이러한 DPPH 화합물은 용해되어 보라색의 DPPH 라디칼(DPPH・)로 존재하게 되며, 항산화제로부터 전자를 공여 받아 DPPH로 환원되어 탈색됨. 따라서 항산화 활성을 DPPH radical이 탈색되는 비율로 산출하여 비교할 수 있음.

DPPH 실험은 에탄올에 용해된 0.36 mM의 DPPH 용액 50 μL과 시험물질을 50 μL를 1:1로 혼합하여 암소에서 30분 동안 상온에서 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도를 이용하여 항산화 활성은 아래와 같이 계산하였음.

$$DPPH\ radical\ \ scavenging\ \ effect\ \ (\%) = \frac{S - SB}{C - CB} \times 100$$

C: control absorbance, CB: control blank absorbance, S: sample absorbance SB: sample blank absorbance

(나) 실험결과

DPPH 0.36 mM과 개똥쑥 열수추출물(AAW)와 주요 성분 5종을 250 μg/mL의 농도로 처리하여 반응 시킨 결과, 주요성분 중 1, 2번인 6,7-dimethoxycoumarin과 artemisinin은 DPPH 라디칼소거능이 각각 1.8, 0.7% 미만으로 매우 낮게 나타났음. 반면에 3, 4, 5번 1,3-dicaffeoylquinic acid 성분은 각각 13.5, 9.1, 28.0%으로 높은 항산화활성을 나타냈으며, 그 중 AAW와 5번 성분인 1,3-dicaffeoylquinic acid(cynarin)의 항산화 활성이 각각 27.9, 28.0%로 매우 유사하게 나타냈음(그림 63).

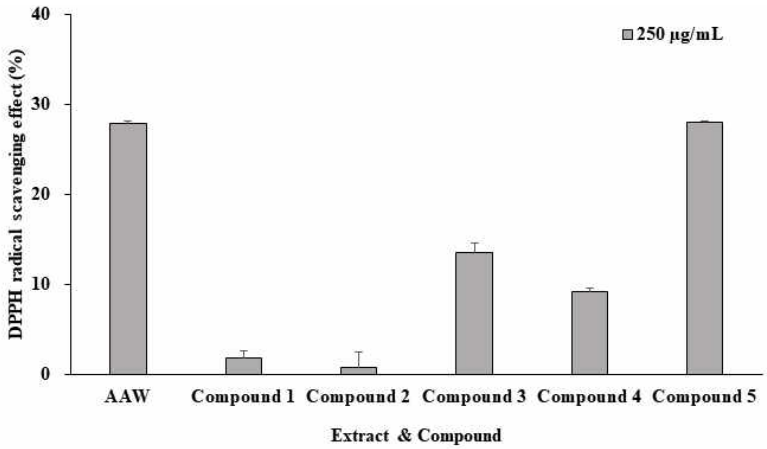


그림 63. AAW 및 주요성분 5종의 DPPH 라디칼소거능 항산화 활성. #AAW, 개똥쑥 열수추출물 / #Compoud 1, 6,7-dimethoxycoumarin / #Compoud 2, artemisinin / #Compoud 3, eupatilin / #Compoud 4, scopoletin / #Compoud 5, 1,3-dicaffeoylquinic acid

(2) ABTS 라디칼소거능을 이용한 항산화 활성 측정

(가) 목적 및 실험방법

2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS의 양이온 라디칼을 소거하는 항산화제의 능력을 평가하는 항목임. ABTS는 증류수에 용해되어 연한 청록색을 띄며 potassium persulfate와 1:1혼합 시 산화에 의해 진한 청록색으로 732 nm에서 최대 흡광도를 나타냄.

ABTS 실험은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 각각 증류수에 용해하여 1:1로 혼합한 후 실온인 암소에서 24시간 동안 ABTS+을 형성시킴. 24 시간이 지난 후 ABTS의 용액을 정제수로 희석하여 732 nm에서 흡광도가 0.7가 되도록 맞춘 뒤 ABTS 용액 190 μL에 시험물질 10 μL를 가하여 10분 동안 암소에서 반응시켜 732 nm에서 흡광도를 측정하였음.

측정된 흡광도를 이용하여 항산화 활성은 아래와 같이 계산하였으며, 계산된 ABTS 라디칼소거능을 이용하여 Half-maximal inhibitory concentration (IC50)를 산출하였음

$$ABTS\ radical\ scavenging\ effect\ (\%) = \frac{S}{C} \times 100$$

C: control absorbance, S: sample absorbance

(나) 실험결과

AAW와 주요 성분 5종을 농도별(125-1000 μg/mL) 처리하여 ABTS 라디칼소거능을 측정해본 결과, 주요성분 1, 2번인 6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin은 농도 증가에 따른 활성이 증가되는 경향을 나타내지 못하였으며 최대 농도인 1000 μg/mL에서도 활성을 측정할 수 없었음. 반면에 AAW와 주요성분 3-5번은 처리농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하는 경향을 확인할 수 있었으며, 그 중 5번 성분인 cynarin이 125 μg/mL에서 60%의 라디컬소거능으로 매우 높은 활성을 나타냈음.또한 50%의 라디컬소거능 활성을 나타내는 IC_{50} 값을 ABTS 라디칼소거능의 표준물질인 trolox와 비교했을 때, trolox는 1008 μg/mL이고 AAW와 주요성분 3-5번은 각각 782.9, 269.7, 173.8, 82.1 μg/mL으로 trolox보다 낮은 수치를 나타내어 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였음(그림 64, 표 14).

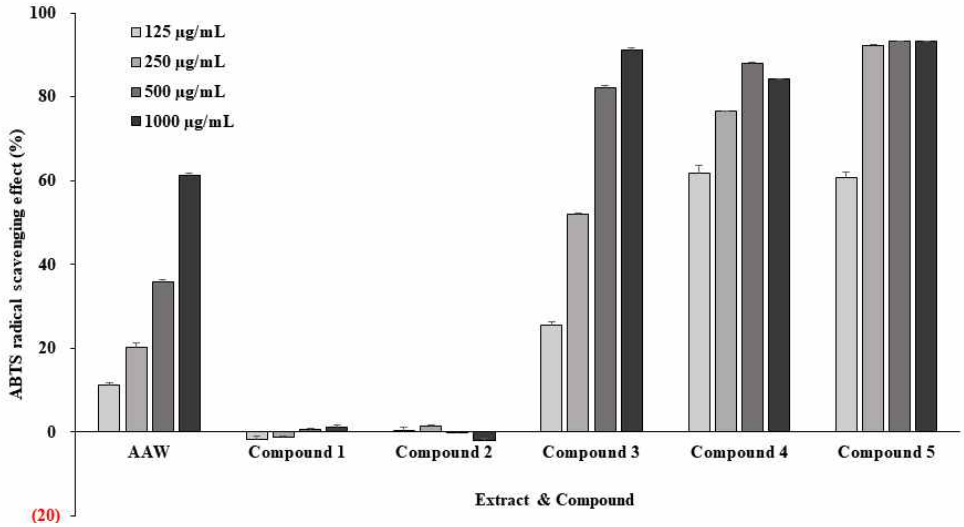


그림 64. AAW 및 주요성분 5종의 ABTS 라디칼소거능 항산화 활성 # AAW, 개똥쑥열수추출물 / #Compoud 1, 6,7-dimethoxycoumarin / #Compoud 2, artemisinin / #Compoud 3, eupatilin / #Compoud 4, scopoletin / #Compoud 5, 1,3-dicaffeoylquinic acid

표 14. AAW 및 주요성분 3종의 ABTS 라디칼소거능의 IC_{50}

Sample	IC_{50}±SD (μg/mL)
Trolox	1008.1 ± 0.6
AAW	782.9 ± 5.7
Compound 3	269.7 ± 1.0
Compound 4	173.8 ± 16.9
Compound 5	82.1 ± 5.8

마) HepG2 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구

(1) 목적 및 실험방법

HepG2에 1mM FFA(PA:OA=2:1)를 24시간 동안 처리하여 지방 축적을 유도한 후 주요 성분(6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin, eupatilin, scopoletin, 1,3-dicaffeoylquinic acid)을 세포 독성이 없는 범위 내에서 농도별로 가하여 24시간 동안 배양하고 이후 cell lysate에서 지질 축적에 따른 염증반응에 대한 주요 성분 5종의 효과를 IL-6, IL-8 ELISA로 분석함.

(2) 실험결과

(가) IL-8 및 IL-6 ELISA

FFA-stimulated HepG2 세포에서 주요 성분 5종이 지질 축적에 따른 염증반응을 억제하는지 확인하기 위해 염증성 cytokine인 IL-6와 IL-8의 분비를 측정한 결과, IL-6와 IL-8 모두 성분 2번과 5번에서 감소되는 경향을 보임(그림 65).

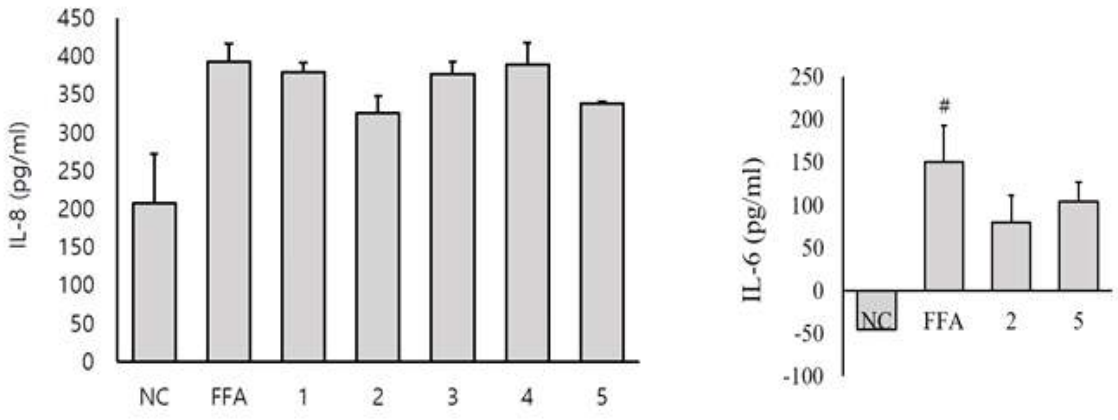


그림 65. FFA로 유도한 HepG2 세포주에서 IL-8, IL-6에 대한 주요 성분 5종의 효과.
#1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid, # $p<0.05$ compared with normal control.

바) 3T3-L1 세포주를 이용한 지질대사 조절 활성 및 작용기전 연구

(1) 목적 및 실험방법

3T3-L1에 지방세포 분화 유도물질인 MDI cocktail(dexamethasone/IBMX/insulin)과 함께 주요 성분(6,7-dimethoxycoumarin, artemisinin, eupatilin, scopoletin, 1,3-dicaffeoylquinic acid) 5종을 25㎛M 농도로 처리하여 48시간 배양한 후, 그 후 매 2일마다 1 ㎛g/mL insulin이 포함된 DMEM으로 교환하면서 분화를 유도하였음. 분화 8일 후 adiponectin 농도를 측정하였음.

(2) 실험결과

(가) Adiponectin ELISA

주요 성분 5종이 3T3-L1 세포에서 adipogenesis를 조절하는 지방세포 특이적 유전자에 영향을 미치는지 알아보기 위해 adiponectin ELISA를 실시한 결과, 화되지 않은 지방전구세포에 비해 분화된 지방세포에서 adiponetin의 단백질 발현수준이 크게 증가된 반면, 성분 2번인 artemisinin에 의해서 adiponectin의 발현이 약 34.4 % 유의하게 감소함(그림 66).

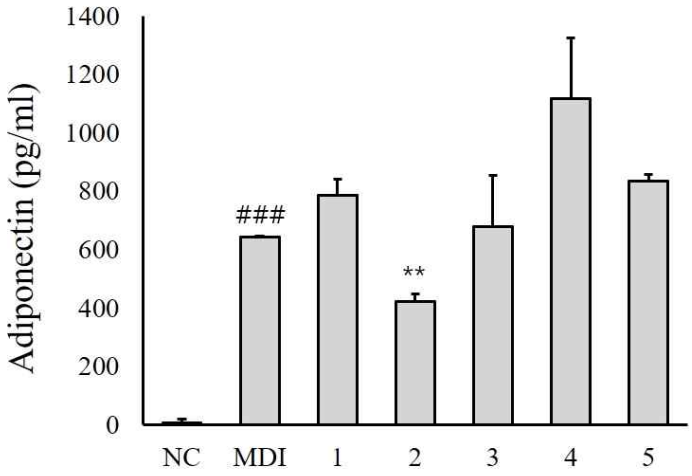


그림 66. MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 세포의 adiponectin 발현에 대한 주요 성분 5종의 효과. #1, 6,7-dimethoxycoumarin / #2, artemisinin / #3, eupatilin / #4, scopoletin / #5, 1,3-dicaffeoylquinic acid, ### $p<0.001$ compared with normal control, ** $p<0.01$ compared with positive control induced by MDI.

13) 전임상 안전성 연구(GLP 비설치류 단회투여독성시험)

가) 목적 및 실험방법

GLP 시험기관인 서울대학교 의생명연구원 안전성연구센터에서 군당 4마리(암수 각 2마리)의 비글견을 대상으로 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 한계용량을 5 g/kg으로 설정한 후, 경구 단회 용량 증가 시험법을 사용하여 3~4일 간격으로 용량을 증가시켜(1 → 2 → 5 g/kg) 총 3회 투여한 후 최종 투여일로부터 2주간 사망률, 일반증상, 체중 및 체온과 심전도 검사, 부검 소견 등을 관찰함으로써 개똥쑥 열수추출물의 경구투여에 따른 급성 독성을 평가하고 대략의 치사량을 구하고자 하였음(투여 시 투여량의 부담을 줄이기 위해 1일 2회로 분할하여 투여하였음).

나) 실험결과

사망개체 및 일반 임상 증상: 시험물질을 투여한 모든 동물에서 시험 전 기간을 통해 사망한 동물은 없었으며(하기 Table 1 참조), 2.5 g/kg 투여용량군 암·수 모두에서 일시적인 구토 증상이 관찰되었으나, 구토증상 외에 시험물질 투여에 의한 것이라고 인정되는 임상 증상 및 행동이상은 관찰되지 않았음. 구토 증상의 경우, 일반적으로 비글견에서는 구토가 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있으며, 절식 상태에서 과량의 시험물질이 적용되어 물리적인 자극에 의해 발생한 것으로 사료되어 시험물질에 의한 독성반응은 아닌 것으로 판단되었음. 이외 용량군에서는 어떠한 임상 증상 및 행동이상도 관찰된 바가 없었음(표 15).

표 15. 비설치류 단회투여독성시험에서 시험군 및 대조군의 사망률

GROUP SUMMARY OF SURVIVAL DATA								
	Test (1→2→5g/10.5mL/kg B.W.)							
	Male				*Female*			
STUDY DAY	Survival	Sacrificed In Extremis	Scheduled Sacrifice	Other*	Survival	Sacrificed In Extremis	Scheduled Sacrifice	Other*
0	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
1	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
3	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
4	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
5	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
6	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
7	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
8	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
9	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
10	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
11	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
12	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
13	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
14	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
15	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
16	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
17	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
18	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
19	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
20	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
21	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
22	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
23	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2

아래 그림에서와 같이 암·수 모두에서 시험 기간 중 체중의 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 시험 종료 시 생존한 모든 개체에 대하여 부검을 실시한 결과, 육안적 이상 병변은 관찰되지 않아 부검 및 병리학적으로 안전한 것으로 사료됨.

결론적으로 비글견을 대상으로 시험물질인 개똥쑥 열수추출물(AAWE)의 경구 단회 용량 증가 독성시험을 실시한 결과, 본 시험 조건하에서 AAWE의 개략의 치사량은 5g/10.5mL/kg 초과일 것으로 사료됨(그림 67).

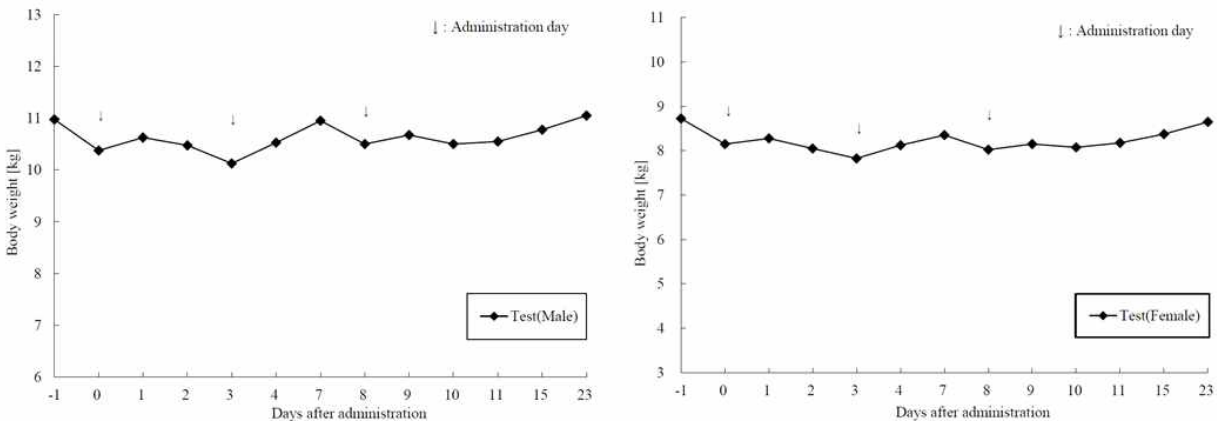


그림 67. 암·수 비글견에서 AAWE의 경구 단회 용량 증가 투여에 따른 체중 변화

14) 전임상 안전성 연구(GLP 설치류 13주 반복투여독성시험)

가) 목적 및 실험방법

GLP 시험기관인 서울대학교 의생명연구원 안전성연구센터에서 시험물질인 개똥쑥 열수추출물의 반복 경구 투여에 따른 만성 독성을 평가하고 무독성량((No observed adverse effect level, NOAEL)) 및 표적장기를 확인하기 위해 설치류 13주 반복투여 독성시험을 실시하고자 함. 군당 10마리(암수 각 5마리)의 SD 랫드에 개똥쑥 열수추출물 대량생산 원료를 0(부형제 대조군), 5000 mg/kg/day의 용량으로 13주간 반복 투여한 후 사망률, 일반증상 임상관찰, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안과 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 소견 및 조직병리학적 검사를 실시하여 시험물질의 유해 여부 및 안전성을 평가함.

나) 실험 결과

(1) 사망개체 및 일반 임상증상

시험물질을 투요한 모든 동물에서 시험 전 기간을 통해 사망한 동물은 없었으며, 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행도잉상 등은 관찰되지 않았음.

(2) 체중변화

암수 모두에서 전 기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았음(그림 68).

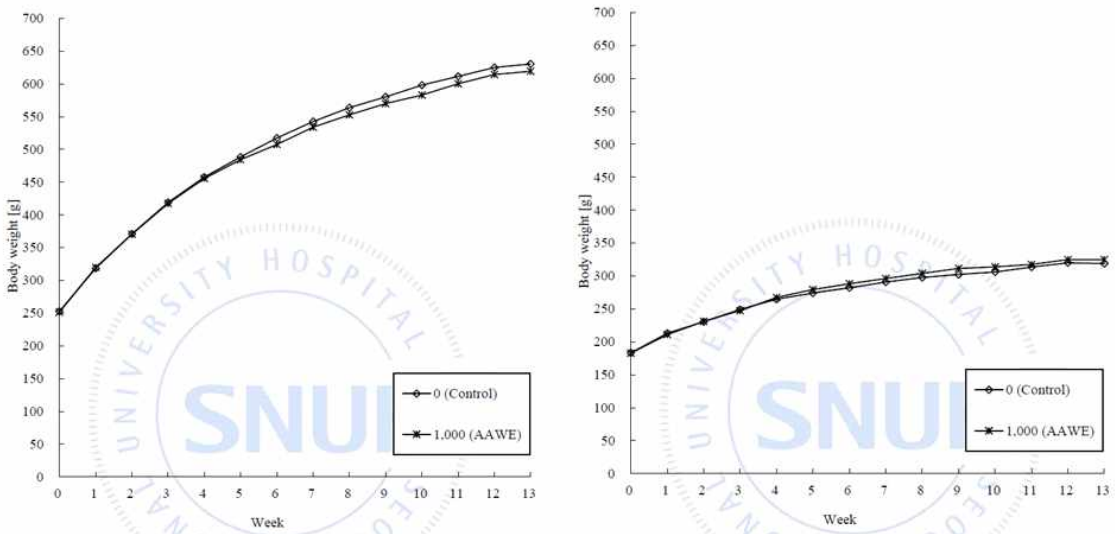


그림 68. 설치류 13주 반복투여독성시험에서 시험군과 대조군의 체중 변화(좌:우컷, 우:암컷)

(3) 사료 및 음수섭취량

사료섭취량, 사료효율, 사료요구율 및 음수섭취량 비교 결과, 암수 모두에서 전 기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았음.

(4) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사 결과, 수컷에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, 암컷 erythrocyte, neutrophil 항목에서 대조군과 비교하여 유의한 변화가 관찰되었으나 모두 정상 범위 이내의 변화였음. 또, 혈액응고시간 검사 결과 및 혈액생화학적 검사 결과, 암수 전 동물에서 유의한 증감이 관찰된 항목은 없었음.

(5) 뇨 검사 및 안 검사

시험물질 투여 후 13주째 실시된 뇨검사 및 안검사에서는 시험물질과 관련된 특징적인 변화는 관찰되지 않았음.

(6) 장기중량

부검 후 장기에 대한 절대중량 및 체중 대비 상대중량을 비교한 결과, 암수 모두에서 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았음.

(7) 병리학적 검사

부검 시 육안적 이상병변으로 경부림프절, 간, 흉선, 폐, 신장, 공장 및 회장 등에서 국소 염증 등 육안병변이 관찰되었으나, 이는 랫드 배경병변와 유사한 수준으로 시험물질에 의한 특이한 병변은 관찰되지 않았음. 또, 모든 동물의전 장기에 대하여 조직병리학적 검경 결과, 대부분의 조직학적 소견은 시험물질과 관련이 없는 비특이적 소견으로 시험물질에 의한 독성병변 및 표적장기는 관찰되지 않았음.

다) 결론

시험물질인 개똥쑥 열수추출물을 SD 랫드에 경구로 13주간 반복 적용한 결과, 본 시험 조건 하에서 시험물질의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두에서 1,000mg/5mL/kg 이상으로 판단됨.

15) 인체적용시험계획 수립, CRO 선정 및 인체적용시험 개시 준비

가) 관련 문헌 조사

개똥쑥 열수추출물의 간 건강 개선에 관한 인체적용시험 계획 수립을 위해 현재까지 국내에서 시행된 간 건강 개선 관련 인체적용시험 사례를 조사하여 아래 표와 같이 정리하였음.

번호	원료명	개발 기관	시험 기관	시험명	섭취기간 (방문시기)	피험자 수	선정기준	기능성 평가변수
1	NMED-01, NMED-02	(주)뉴메드	세명대학교 제천한방병원	NMED-01과 NMED-02의 간기능 개선에 대한 인체 효능 평가	12주 (0, 6, 12)	120명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상 75세 미만의 성인, 알코올 섭취로 인하여 γ-GT가 60 이상 350 U/L 이하인 자	주평가: γ-GT 부평가: ALT, AST, TG의 변화
2	자색 고구마 추출물	이화여자대학교	차의과대학교 분당차병원	간 기능 개선 및 항산화 효과 평가를 위한 자색 고구마추출물의 유효섭취용량 설정 인체적용시험	16주 (0, 8, 16)	40명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상의 성인, 지방간이 확인된 사람(간 초음파)	주평가: 간기능지표, 항산화지표 부평가: 지질대사 지표
3	미나리 농축분말	(주)엠에스씨	한림대학교 성심병원	간기능 개선에 미치는 미나리 농축분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 6, 12)	38명	혈액검사에서 AST, ALT 또는 γ-GT가 정상치를 초과하면서 정상 상한치의 3배 이내인 자(AST: 39-114, ALT:44-129, γ-GT:76-225)	주평가: AST, ALT, γ-GT /부평가: AST/ALT ratio, 다차원 피로척도(MFS), 혈중지질 변화(TC, TG, HDL, LDL)
4	깻잎 추출물	(주)바이오버드	차의과대학교 분당차병원	깻잎추출물의 섭취가 간 건강 및 항산화능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험	10주 (0, 5, 10)	30명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상의 성인, BMI 25 이상 35 이하, ALT 또는 AST가 정상 상한치의 1.5배 이상 5배 미만인 자	주평가: 간기능지표 부평가: 항산화지표
5	섬오갈피 주정 추출물	재단법인 제주테크노파크	아주대학교 병원	섬오갈피주정추출물의 알코올성 간 손상 개선효과와 안전성 확인을 위한 인체적용시험	16주 (0, 8, 16)	69명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상의 성인, 중등도 음주자(남성: 210g/주, 여성: 140g/주 이상), 지방간이 확인된 사람(간 초음파)	주평가: γ-GT, 이상반응 부평가: ALT, AST, LDH, 간지방도(CT)
6	백년초 열매 추출물	(주)엘컴사이언스	인제대학교 서울백병원, 가톨릭대학교 성빈센트병원	간기능 개선에 미치는 백년초 열매추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 12)	80명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상 75세 이하의 성인, 음주습관 설문에서 최근 1개월 간 남성 14unit/주, 여성 7unit/주 이상인 자, AST, ALT 또는 γ-GT가 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이내인 자	주평가: AST 부평가: ALT, γ-GT, AST/ALT ratio, 다차원피로척도(MFS), 혈중지질 변화(TC, TG, HDL, LDL)
7	발효마늘	(주)바이오랜드	카톨릭대학교	간기능 개선에 미치는 발효마늘의	12주 (0, 12)	34명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상 75세 이하의 성인,	주평가: γ-GT 부평가: AST, ALT,

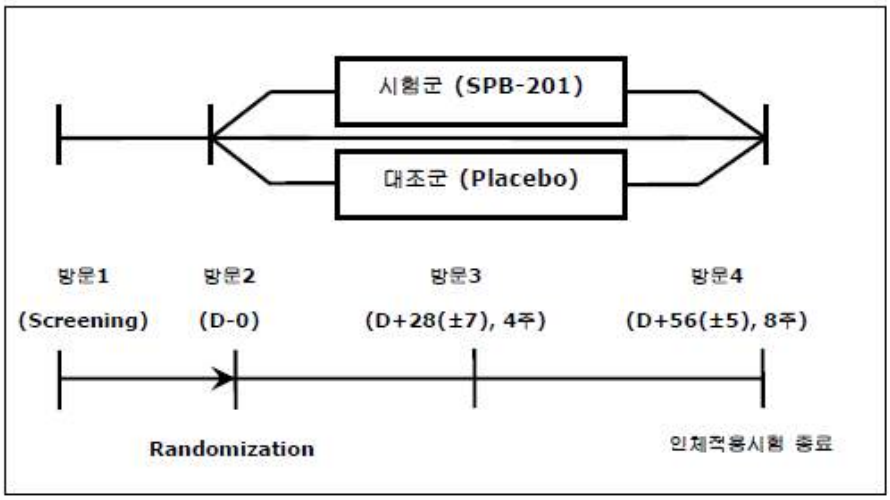
			성빈센트 병원	유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험			γ-GT가 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이내인 자	AST/ALT ratio, 다차원피로척도(MFS), 혈중지질 변화(TC, TG, HDL, LDL)
8	지각 추출물	(주)뉴트라팜텍	가톨릭 대학교 서울 성모병원 사톨릭 대학교 성빈센트 병원	간기능 개선에 미치는 지각 추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라시보 대조 인체적용시험	12주 (-2, 0, 6, 12)	100명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상 75세 이하의 성인, AST 또는 ALT가 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이하인 자	주평가: AST 부평가: ALT, γ-GT, AST/ALT ratio, 다차원피로척도(MFS), 혈중지질 변화 (TC, TG, HDL, LDL), 지방간 측정(CT), 항산화 지표(MDA, TAS)
9	피니톨	이화여자 대학교	차의과 대학교 분당 차병원	피니톨의 간 기능 개선 효과 평가를 위한 인체적용시험	12주 (0, 6, 12)	90명	동의서에 서명한 자, 만 20세 이상의 성인, 지방간이 확인된 사람, ALT, AST 또는 γ-GT가 정상 상한치의 1.5배 이상 3배 미만인 자	주평가: 간기능지표 부평가: 간기능 관련 대사 지표
10	헛개나무 과병 추출물	(주)생명의나무에프앤비	전북 대학교 병원 이화여자 대학교	헛개나무과병추출물의 섭취가 체내 알코올 대사 및 숙취 개선에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험	1주 (0, 1)	26명	동의서에 서명한 자, 만 20-40세의 건강한 남성, BMI 18-25, 음주 후 숙취경험이 있었던 자, ALDH2 heterozygote를 가지는 자	주평가: 숙취증상 (설문지), 알코올 대사지표,시간대별 내독소, 지질 다당류결합단백질, CD14 부평가: 기타 내독소, 지질다당류결합단백질, CD14
11	흑미강 (표고균사) 발효분말	(주)에스티알바이오텍	고려 대학교 안산병원	간기능 개선에 미치는 흑미강 (표고균사)발효 분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험	12주 (0, 6, 12)	80명	만 20세 이상 만 75세 이하의 남•녀, 음주 습관 설문에서 지난 1개월 동안 1주일에 평균 남성 14unit, 여성 7 unit 이상의 알코올섭취습관을 가진 자, 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 γ-GTP 가 연구기관 정상치를 초과하고 AST, ALT는 정상상한치의 3배 이내, γ-GTP 는 정상 상한치의 4배 이내의 범위, 서면동의서를 작성한 자	주평가: AST 부평가: ALT, γ-GT, AST/ALT ratio, 다차원피로척도(MFS), 혈중지질 변화 (TC, TG, HDL, LDL, FFA)

위와 같이, 인체적용시험 사례 조사 결과, 간 건강 이상의 지표로 가장 많이 사용된 것은 AST, ALT 였으며, 범위는 정상치 초과 ~ 정상 상한치의 3배 이내가 가장 일반적인 것으로 확인되어 이를 시험 계획 수립에 반영하였음.

나) 인체적용 시험계획 수립

선정기준, 제외기준 및 대상 피험자수 산출 근거 설정, 섭취량 및 섭취방법에 관한 설정 및 근거 확인, 기능성 및 안전성 평가변수의 설정 및 타당성 확인, 전임상과 인체적용시험 사이의 기능성 및 작용기전의 일관성 등을 고려하여 다음과 같이 시험 계획을 수립함.

인체적용시험 제목	간기능 개선에 미치는 SPB-201의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	㈜성균바이오텍 경기도 수원시 권선구 산업로 156번길 142-10
인체적용시험 책임자	백현욱 교수 (분당제생병원 임상영양내과) 한병덕 주임과장 (삼육서울병원 가정의학과)
인체적용시험 실시기관	분당제생병원 (경기도 성남시 분당구 서현로 180번길 20) 삼육서울병원 (서울시 동대문구 망우로 82)
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	경계역 및 경도의 간기능 손상자
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 경계역 및 경도의 간기능 손상자를 대상으로 SPB-201(개똥쑥열수추출분말)를 섭취했을 때 간기능 개선에 있어 대조군(Placebo)과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 계획되었다.
시험 단계 및 디자인	단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품 : SPB-201(개똥쑥열수추출분말)
	대조식품 : Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험군(SPB-201) : 1일 2회, 1회 1정을 아침, 저녁에 섭취{개똥쑥열수추출분말로서 686mg/day(고형분 기준 480/day)}
	대조군(Placebo) : 시험군과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취기간	8주

<table>
<tr><td>인체적용시험 방법</td><td> 

인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 한다. 배정된 인체적용시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품, 대조식품)을 섭취한다.</td></tr>
<tr><td>인체적용
시험대상자 수</td><td><table>
<tr><th></th><th>시험군</th><th>대조군</th><th>총 시험대상자 수</th></tr>
<tr><td>최종 평가 례수(PP Set)</td><td>37</td><td>37</td><td>74</td></tr>
<tr><td>Drop-out(25%) 고려예수</td><td>50</td><td>50</td><td>100</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>선정기준</td><td>1) 만 19세 이상, 만 75세 이하의 남·녀
2) 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 45-120U/L 범위에 있는 자
3) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자</td></tr>
<tr><td>제외기준</td><td>1) 알콜 사용·유발 장애, 심장질환, 중추 신경 장애 등으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 자
2) 복부초음파 검사상 간경변증 또는 간암 환자
3) 혈액검사에서 γ-GTP가 180U/L 초과인 자
4) ALP가 시험기관 정상상한치의 3배 이상인 자 또는 Platelet 10^5/μL 이하 또는 AFP가 10ng/mL 초과인 자
5) 현재 바이러스성 간염을 진단받은 자</td></tr>
</table>

	6) 스크리닝 검사에서 HBs Ag 또는 HCV Ab 검사상 양성인 자 7) Albumin 3g/dl 이하 또는 Total Bilirubin 3mg/dl 이상인 자 8) Creatinine이 시험기관 정상상한치의 1.5배 이상인 자 9) 조절되지 않는 갑상선 질환자 10) 시험 시작 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물(항결핵제, 항경련제, 통풍치료제, 항우울제, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물)을 복용한 자 11) 시험 시작 2주 이내에 NSAIDs, 항바이러스제, 항생제를 복용한 자 12) 시험 시작 4주 이내에 이담제, 담석용해제, 간보호제(Cholagogues, Cholelitholytics & Hepatic Protectors), 해독제, 약물 의존성 치료제(Antidotes, Detoxifying Agents & Drugs Used in Substance Dependence)를 복용한 자 13) 시험 시작 2주 이내에 한약, Vit. E 보충용 또는 간기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자 14) 시험 시작 4주 이내에 부신피질호르몬 또는 성호르몬을 복용한 자 15) 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100mmHg 이상, 인체적용시험대상자 10분 안정 후 측정기준) 16) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dl 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우 또는 인슐린을 투여받는 경우) 17) 3개월 이내에 항지질 계열의 약물을 새로 투여 받은 자(3개월 이전부터 투여 중인 경우 참여 가능) 18) 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자 19) 임신 중이거나 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자 20) 본 인체적용시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 자 21) 본 인체적용시험 시작 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여했던 자 22) 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 자
유효성 평가 변수	• **1차 유효성 평가 변수** 1) AST, ALT 변화량 • **2차 유효성 평가 변수**

	1) AST, ALT 변화율 2) γ-GTP 3) AST/ALT ratio 4) 다차원 피로 척도(MFS) 5) 혈중지질(TC, TG, HDL-c, LDL-c) 6) Bio-impedance 기기를 통한 체지방량, 체지방률
안전성 평가 변수	1) 이상반응 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사) 3) 활력징후(혈압, 맥박), 체중 4) 심전도검사
통계분석	**1. 유효성 평가 변수** 1) 1차 유효성 평가 변수 1차 유효성 평가 변수인 AST, ALT의 섭취 전후 변화량은 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 2) 2차 유효성 평가 변수 2차 유효성 평가변수인 γ-GTP, AST/ALT ratio, 다차원 피로 척도(MFS), 혈중지질(TC, TG, HDL-c, LDL-c), Bio-impedance 기기를 통한 체지방량, 체지방률의 섭취 전후 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. AST, ALT 변화율에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. **2. 안전성 평가 변수**

다) CRO 선정

지방간 개선 관련 인체적용시험 대행 관리 경험이 풍부한 CRO 업체들을 대상으로 업무수행능력 및 견적 등을 비교 검토한 후, 인체적용시험 계획서 및 IB 자료집의 작성부터 인체적용시험 결과의 IRB 최종 보고까지의 시험 관련 업무 전반을 대행할 CRO 업체로서 네오뉴트라㈜를 위탁기관으로 선정하고 2018년 4월 계약을 체결함.

네오뉴트라가 담당한 업무 범위는 하기와 같음.

번호	항목	예상 기간(m)	예상 일정	내용
1	Contract for CRO			인체적용시험 CRO 계약 체결
2	Project Setup	1	-	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발
3	IRB Submission/Approval (Protocol)	2	-	다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요
4	Initiation Activities	1	-	대상자 모집 방안 등 제반 준비 인체적용시험식품 제조 인체적용시험기관 계약 인체적용시험 study material 제작 등 인체적용시험 개시 모임
5	Study Stage	14		등록기간 : 12 개월 섭취기간 : 8주 모니터링
6	Data Management	1	-	DB 구축, Data Entry, medical coding, validation, quality check 등
7	Statistical Analysis	1	-	통계분석 및 표/그림 제작
8	Clinical Study Report	1	-	결과보고서 작성 및 연구자 고찰 삽입
9	IRB Submission (CSR)	1		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요

라) 인체적용시험 개시 준비

CRO인 네오뉴트라와 함께 연구계획서, 증례기록서(CRF)를 개발하고 CRF 등 인체적용시험 관련 서류의 적합성을 검토하였음. 동시에 IB 자료집 작성하여 IRB 초심의 신청, 변경심의 신청을 거쳐 10월 최종 승인을 획득하였음. 이후 CRO에서는 인체적용시험기관 교육, 인체적용시험 개시미팅을 실시한 후 피험자 모집을 개시함.

<3차년도 주관연구기관 : 인체적용시험을 통한 효능확인 및 사업화>

16) 인체적용시험 종료

가) 인제적용시험 시험방법 요약

(1) 인제적용시험 제목

간 기능 개선에 미치는 SPB-201의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조인체적용시험

(2) 인제적용시험 목적

본 인체적용시험은 경계역 및 경도의 간기능 손상자를 대상으로 SPB-201(개똥쑥 열수추출 분말)를 섭취했을 때 간기능 개선에 있어 대조군(Placebo)과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 계획되었음.

(3) 인체적용시험 방법

인체적용시험대상자는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외 기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 하였음. 배정된 인체적용시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품, 대조식품)을 섭취하였음.

(4) 유효성 평가 변수

(가) 1차 유효성 평가 변수

① 섭취 후 8주 시점의 AST, ALT 변화량

(나) 2차 유효성 평가 변수

① 섭취 후 4주 시점의 AST, ALT 변화량

② AST, ALT 변화율

③ γ-GTP

④ AST/ALT ratio

⑤ 다차원 피로 척도(MFS)

⑥ 혈중지질(TC, TG, HDL-c, LDL-c)

⑦ Bio-impedance 기기를 통한 체지방량, 체지방률

(4) 안전성 평가

(가) 이상반응

(나) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사)

(다) 활력징후(혈압, 맥박), 체중

(라) 심전도 검사

(5) 통계분석 방법

(가) 1차 유효성 평가 변수

1차 유효성 평가 변수인 8주 시점의 AST, ALT의 섭취 전후 변화량은 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.

(나) 2차 유효성 평가 변수

2차 유효성 평가 변수인 4주 시점의 AST, ALT 섭취 전후 변화량과 γ-GTP, AST/ALT ratio, 다차원 피로 척도(MFS), 혈중지질(TC, TG, HDL-c, LDL-c), Bio-impedance 기기를 통한 체지방량, 체지방률의 섭취 전후 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.

AST, ALT 변화율에 대한 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.

나) 인제적용시험 결과

본 인체적용시험은 2018년 10월 31일 첫 시험대상자가 스크리닝 되었고, 2019년 10월 25일 마지막 시험대상자의 마지막 방문이 완료되었음. 적합한 시험대상자를 선정하기 위해 총 170명에 대해서 Screening 평가를 실시하였으며, Screening 탈락은 총 74명으로, 총 96명(시험군 48명, 대조군 48명)이 무작위배정되었음. 이중 시험군에서 선정/제외기준 위반으로 4명, 동의철회로 1명 중도탈락 하였으며, 대조군에서 동의철회로 3명, 추적실패로 1명 중도탈락하여 인체적용시험을 완료한 시험대상자는 총 87명이었음(시험군 43명, 대조군 44명).

본 인체적용시험의 유효성은 PP Set을 주 분석으로 하고, FA Set을 추가적으로 분석하는 것으로 계획하였으며, Safety Set은 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 시험대상자로 총 96명(시험군 48명, 대조군 48명)이 Safety Set에 포함되었음. FA Set은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고, 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌음. 따라서 방문2 이후 중도탈락하여 유효성 평가를 실시하지 않은 6명(시험군 3명, 대조군 3명), 방문3 이후 선정/제외기준 위반으로 중도탈락 처리된 시험군 1명을 제외하여 총 89명(시험군 43명, 대조군 46명)이 FA Set에 포함되었음. PP Set은 FA Set 분석에 포함된 시험대상자 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험 결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정/제외기준 위반 등)이 없는 인체적용시험대상자로서 방문3 이후 동의철회로 중도탈락한 대조군 1명, 방문3 이후 추적실패로 중도탈락한 대조군 1명이 제외되었으며, 분석군 판정을 통해 ALT 120 초과한 3명(시험군 1명, 대조군 2명), 순응도 70% 미만 4명(시험군 3명, 대조군 1명), 방문별 순응도 160% 이상인 시험군 1명이 제외됨에 따라 총 79명(시험군 38명, 대조군 41명)이 PP Set에 포함되었음(그림 69).

본 인체적용시험에 참여한 인체적용시험대상자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전의 모든 특성을 섭취 군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였음. 성별에서는 시험군은 남성이 26명(68.42%), 여성이 12명(31.58%) 포함되었고, 대조군은 남성이 32명(78.05%), 여성이 9명(21.95%) 포함되어 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 연령은 시험군이 평균 48.00±12.63세, 대조군은 평균 49.20±12.94세로 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(p=0.6794). 그 밖에 직업, 운동여부, 흡연여부, 흡연량, 흡연기간, 고지방식 섭취여부에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않아 섭취 군간 비교성(Comparability)을 가정할 수 있었음(표 16).

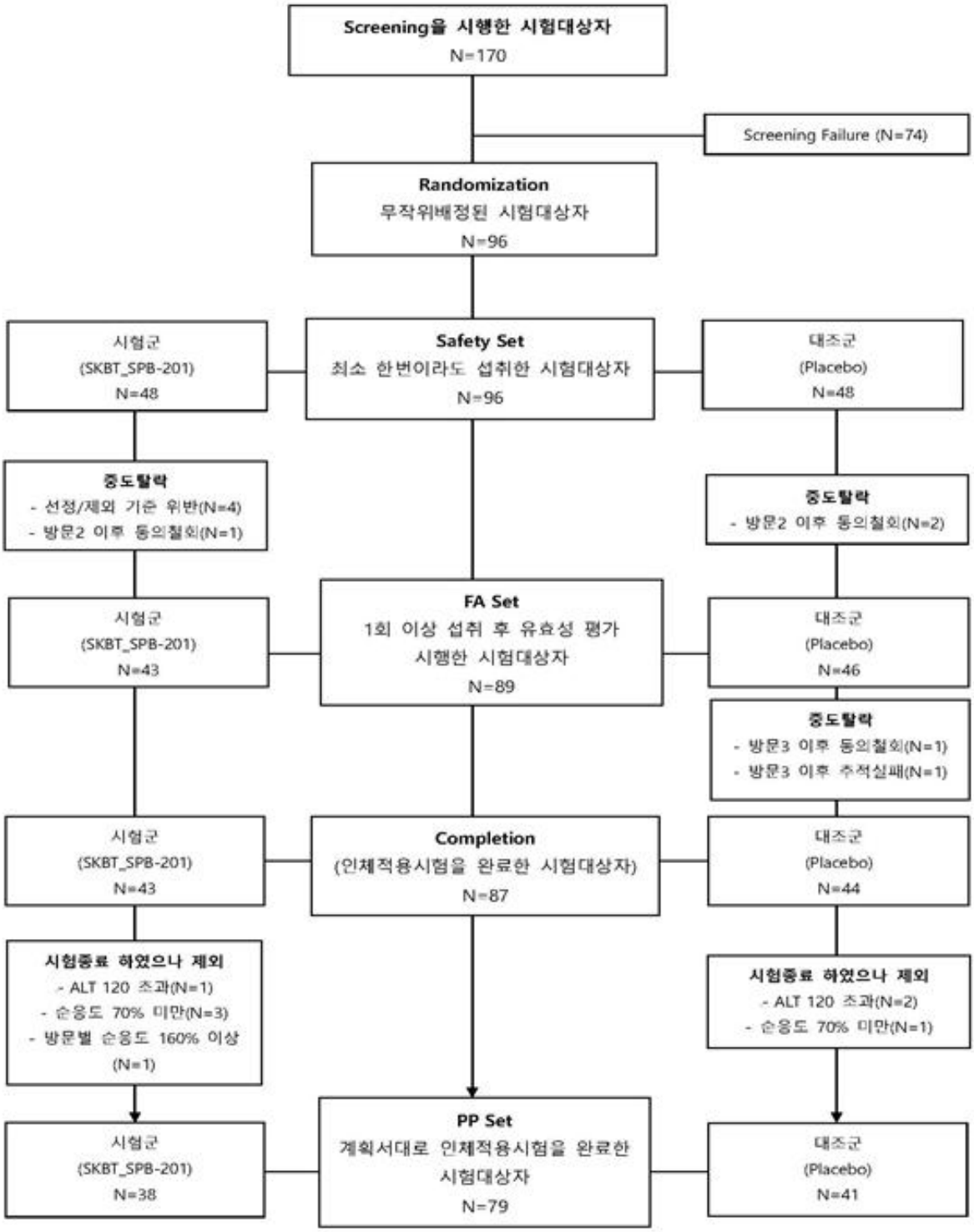


그림 69. 인체적용시험대상자의 인체적용시험 참여상태 및 분석군

표 16. 인체적용시험 대상자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성

		시험군 N=38	대조군 N=41	합계 N=79	p-value
성별 n(%)	남	26 (68.42)	32 (78.05)	58 (73.42)	0.3331†
	여	12 (31.58)	9 (21.95)	21 (26.58)	
연령 (세)	Mean±SD	48.00±12.63	49.20±12.94	48.62±12.73	0.6794*
	Min, Max	20.00, 67.00	19.00, 73.00	19.00, 73.00	
직업 n(%)	사무/행정직	10 (26.32)	14 (34.15)	24 (30.38)	0.7645‡
	자영업	8 (21.05)	6 (14.63)	14 (17.72)	
	전문직	5 (13.16)	6 (14.63)	11 (13.92)	
	생산/기능직	4 (10.53)	1 (2.44)	5 (6.33)	
	판매/영업직	2 (5.26)	3 (7.32)	5 (6.33)	
	농업, 수산, 산림, 수렵업	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	주부	3 (7.89)	7 (17.07)	10 (12.66)	
	학생	2 (5.26)	2 (4.88)	4 (5.06)	
	군인	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	무직	2 (5.26)	1 (2.44)	3 (3.80)	
	기타	2 (5.26)	1 (2.44)	3 (3.80)	
운동여부 n(%)	아니오	14 (36.84)	18 (43.90)	32 (40.51)	0.8229‡
	1~2회/주	9 (23.68)	12 (29.27)	21 (26.58)	
	3~4회/주	10 (26.32)	8 (19.51)	18 (22.78)	
	5~6회/주	3 (7.89)	2 (4.88)	5 (6.33)	
	매일	2 (5.26)	1 (2.44)	3 (3.80)	
흡연여부 n(%)	아니오	22 (57.89)	20 (48.78)	42 (53.16)	0.2203†
	Ex-Smoker(1년 이상 금연)	3 (7.89)	9 (21.95)	12 (15.19)	
	Smoker	13 (34.21)	12 (29.27)	25 (31.65)	
흡연량	흡연하는 대상자 중, (___)개비/1일				
	Mean±SD	9.08±6.09	14.33±7.29	11.60±7.08	0.0619*
	Min, Max	1.00, 20.00	3.00, 25.00	1.00, 25.00	
흡연기간	흡연하는 대상자 중, (___)년				
	Mean±SD	17.00±8.86	21.75±8.68	19.28±8.92	0.1734&
	Min, Max	4.00, 33.00	2.00, 30.00	2.00, 33.00	
고지방식 섭취여부 n(%)	아니오	4 (10.53)	6 (14.63)	10 (12.66)	0.8381†
	1회~2회/주	27 (71.05)	27 (65.85)	54 (68.35)	
	3회 이상/주	7 (18.42)	8 (19.51)	15 (18.99)	

*: p-value by Two sample t-test
&: p-value by Wilcoxon rank sum test
†: p-value by Chi-square test
‡: p-value by Fisher's exact test

(1) 1차 유효성 평가 변수

(가) 섭취 후 8주 시점의 AST, ALT 변화량

섭취 후 8주 시점의 AST 변화량 분석에서 시험군은 11.39±13.58U/L 감소하였고(p<.0001), 대조군은 5.73±12.71U/L 감소하였으며(p=0.0017), 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 시험군의 AST 변화량은 대조군의 AST 변화량의 199% 상회하는 뚜렷한 간기능 개선 효과를 나타내었음.

섭취 후 8주 시점의 ALT 변화량 분석에서 시험군은 15.97±18.82U/L 감소하였고(p<.0001), 대조군은 7.41±15.90U/L 감소하여(p=0.0048) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며(p=0.0317*), 시험군의 ALT 변화량은 대조군의 ALT 변화량의 215% 상회하는 뚜렷한 간기능 개선 효과를 나타내었음(표 17, 그림 70, 71).

표 17. 방문별 AST, ALT 변화량

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value	p-value$
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
AST (U/L)	Baseline (방문1)	38	45.92±16.21	41	39.95±9.60	0.1603&	
	4주 (방문3)	38	33.76±11.58	41	35.46±12.61		
	Change from baseline	38	-12.16±12.41	41	-4.49±11.27	0.0045&	0.0421
	p-value		<.0001∫		0.0147**		
	8주 (방문4)	38	34.53±11.08	41	34.22±12.27		
	Change from baseline	38	-11.39±13.58	41	-5.73±12.71	0.0626&	0.3975
	p-value∫		<.0001		0.0017		
ALT (U/L)	Baseline (방문1)	38	65.92±22.01	41	57.83±17.48	0.0961&	
	4주 (방문3)	38	48.87±24.04	41	52.73±24.43		
	Change from baseline	38	-17.05±16.89	41	-5.10±15.22	0.0014*	0.0030
	p-value**		<.0001		0.0381		
	8주 (방문4)	38	49.95±24.78	41	50.41±24.14		
	Change from baseline	38	-15.97±18.82	41	-7.41±15.90	**0.0317***	0.0609
	p-value**		<.0001		0.0048		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

&: Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test

**: Compared within groups; p-value by Paired t-test

∫ : Compared within groups; p-value by Wilcoxon signed rank test

$: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

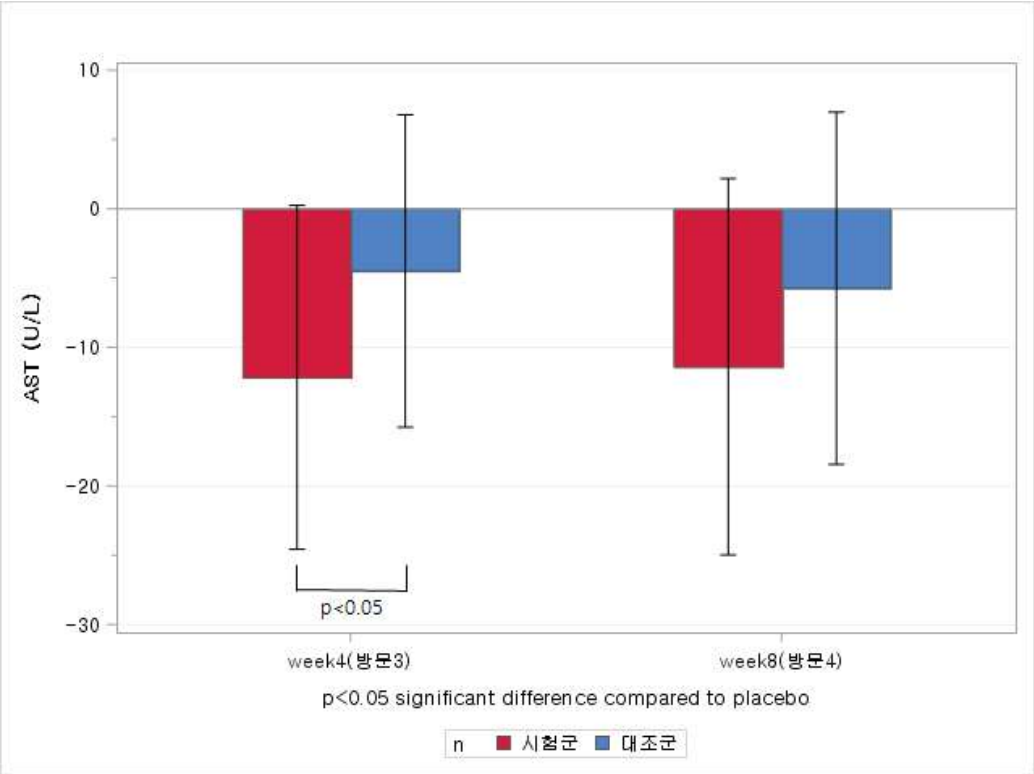


그림 70. 방문별 AST 변화량

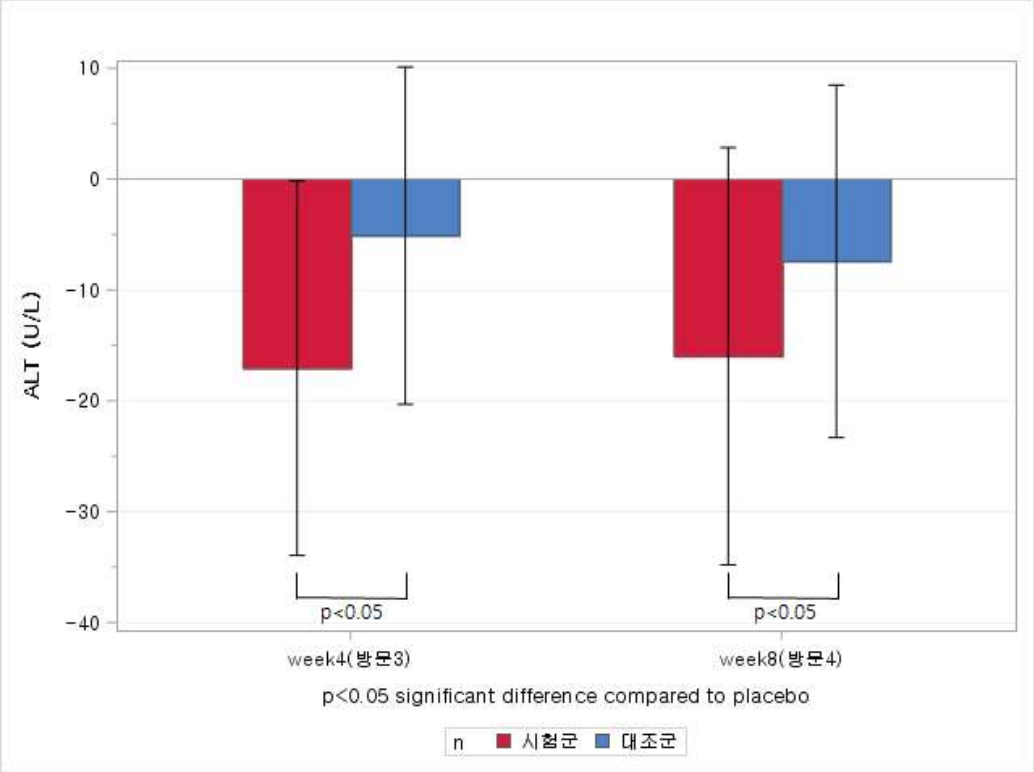


그림 71.방문별 ALT 변화량

(2) 2차 유효성 평가 변수

(가) 섭취 후 4주 시점의 AST, ALT 변화량

섭취 후 4주 시점의 AST 변화량 분석에서 시험군은 12.16±12.41U/L 감소하였고(p<.0001ʕ), 대조군은 4.49±11.27U/L 감소하여(p=0.0147**) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나는(p=0.0045&, 0.0421$) 시험군의 간 기능 개선효과를 확인함.

섭취 후 4주 시점의 ALT 변화량 분석에서 시험군은 17.05±16.89U/L 감소하였고(p<.0001), 대조군은 5.10±15.22U/L 감소하여(p=0.0381) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나는(p=0.0014*, 0.0030$) 시험군의 간 기능 개선 효과를 확인함

(나) AST, ALT 변화율

AST 변화율 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 0.23±0.21 감소하였고, 대조군은 0.11±0.25 감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며(p=0.0144*) 섭취 8주 후 시험군은 0.21±0.22 감소하였고, 대조군은 0.13±0.26 감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 시험군에서의 개선 경향이 뚜렷하게 나타남.

ALT 변화율 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 0.26±0.24 감소하였고, 대조군은 0.09±0.28 감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며(p=0.0063*). 섭취 8주 후 시험군은 0.24±0.26 감소하였고, 대조군은 0.14±0.30 감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 시험군에서의 개선 경향이 뚜렷하게 나타남(표 18).

표 18. AST, ALT 변화율

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	
AST 변화율※	4주 (방문3)	38	-0.23±0.21	41	-0.11±0.25	0.0144
	8주 (방문4)	38	-0.21±0.22	41	-0.13±0.26	0.1455
ALT 변화율※	4주 (방문3)	38	-0.26±0.24	41	-0.09±0.28	0.0063
	8주 (방문4)	38	-0.24±0.26	41	-0.14±0.30	0.1034

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

※: (방문3,4의 AST(ALT) - 방문1의 AST(ALT)) / 방문1의 AST(ALT)

(다) γ-GTP 변화량

γ-GTP 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 8.32±17.83 감소하였고(p=0.0006), 대조군은 11.07±22.30 감소하였으나(p=0.0005) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 3.47±17.41 감소하였고(p=0.0496), 대조군은 12.07±19.91 감소하여(p<.0001) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음(p=0.0137[&])(표 19).

표 19. 방문별 γ-GTP 변화량

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value[&]	p-value[$]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
γ-GTP (U/L)	Baseline (방문1)	38	63.92±48.76	41	73.32±42.15	0.0650	
	4주 (방문3)	38	55.61±40.82	41	62.24±33.07		
	Change from baseline	38	-8.32±17.83	41	-11.07±22.30	0.5960	0.9488
	p-value[∫]		0.0006		0.0005		
	8주 (방문4)	38	60.45±44.60	41	61.24±33.46		
	Change from baseline	38	-3.47±17.41	41	-12.07±19.91	0.0137	0.0754
	p-value[∫]		0.0496		<.0001		

&: Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test
∫: Compared within groups; p-value by Wilcoxon signed rank test
$: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

(라) AST/ALT ratio

AST/ALT ratio 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 0.06±0.21 증가하였고(p=0.1737), 대조군은 0.02±0.20 감소하였으나(p=0.9746) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 0.07±0.21 증가하였고(p=0.1035), 대조군은 0.01±0.24 감소하였으나(p=0.5533) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(표 20).

표 20. 방문별 AST/ALT ratio 변화량

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value[&]	p-value[$]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
AST/ALT ratio	Baseline (방문1)	38	0.75±0.41	41	0.76±0.38	0.7498	
	4주 (방문3)	38	0.82±0.44	41	0.75±0.28		
	Change from baseline	38	0.06±0.21	41	-0.02±0.20	0.2871	0.0693
	p-value[∫]		0.1737		0.9746		
	8주 (방문4)	38	0.82±0.46	41	0.76±0.25		
	Change from baseline	38	0.07±0.21	41	-0.01±0.24	0.4182	0.1184
	p-value[∫]		0.1035		0.5533		

&: Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test
∫: Compared within groups; p-value by Wilcoxon signed rank test
$: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

(마) 다차원 피로 척도(MFS: Multidimensional Fatigue Scale)

다차원 피로 척도(MFS)의 총점 변화량 분석에서 섭취 4주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 섭취 4주 후 시험군은 0.63±12.21점 감소하였고(p=0.7517), 대조군은 2.05±11.92점 증가하여(p=0.2777) 시험군에서 뚜렷한 전체 피로감의 감소 경향이 나타났음. 섭취 8주후에도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 시험군은 0.71±15.40점 감소하였고(p=0.7776), 대조군은 2.12±11.99점 증가하여(p=0.2640) 시험군에서 뚜렷한 전체 피로감의 감소 경향이 나타났음.

그 밖에 일상생활 기능장애, 상황적 피로, 전반적 피로도에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(표 21).

표 21. 방문별 다차원 피로 척도(MFS) 변화량

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value	p-value$
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
TOTAL (점)	Baseline (방문2)	38	75.68±24.99	41	73.41±17.45	0.6437*	
	4주 (방문3)	38	75.05±24.17	41	75.46±18.24		
	Change from baseline	38	-0.63±12.21	41	2.05±11.92	0.3268*	0.3810
	p-value**		0.7517		0.2777		
	8주 (방문4)	38	74.97±24.52	41	75.54±19.29		
	Change from baseline	38	-0.71±15.40	41	2.12±11.99	0.3626*	0.4203
	p-value**		0.7776		0.2640		
일상생활 기능장애 (점)	Baseline (방문2)	38	24.97±8.89	41	24.61±6.37	0.8360*	
	4주 (방문3)	38	24.53±8.67	41	24.85±6.85		
	Change from baseline	38	-0.45±5.59	41	0.24±5.90	0.4664&	0.6275
	p-value		0.6249**		0.9399∫		
	8주 (방문4)	38	23.74±8.45	41	25.05±6.48		
	Change from baseline	38	-1.24±5.63	41	0.44±5.77	0.1957*	0.1890
	p-value**		0.1835		0.6288		
상황적 피로 (점)	Baseline (방문2)	38	20.08±6.40	41	20.20±5.26	0.9298*	
	4주 (방문3)	38	20.71±6.41	41	21.37±4.78		
	Change from baseline	38	0.63±3.60	41	1.17±3.92	0.5273*	0.4755
	p-value**		0.2871		0.0628		
	8주 (방문4)	38	20.84±6.16	41	21.07±4.88		
	Change from baseline	38	0.76±5.16	41	0.88±4.07	0.5380&	0.8662
	p-value		0.6178∫		0.1748**		
전반적 피로도 (점)	Baseline (방문2)	38	30.63±11.19	41	28.61±9.30	0.3839*	
	4주 (방문3)	38	29.82±11.04	41	29.24±9.29		
	Change from baseline	38	-0.82±6.66	41	0.63±6.15	0.3175*	0.4532
	p-value**		0.4548		0.5130		
	8주 (방문4)	38	30.39±11.22	41	29.41±10.13		
	Change from baseline	38	-0.24±7.87	41	0.80±6.06	0.5100*	0.6694
	p-value**		0.8538		0.4004		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test
&: Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test
**: Compared within groups; p-value by Paired t-test
∫: Compared within groups; p-value by Wilcoxon signed rank test
$: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

(바) 혈중지질(Total-cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol)

Total Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 11.37±22.90mg/dl로 시험 전후 통계적으로 유의성있게 감소하였고(p=0.0026ʃ), 대조군은 5.02±22.37mg/dl 감소하였으나(p=0.1762**) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 5.26±22.37mg/dl 감소하였고(p=0.1553**), 대조군은 4.37±21.98mg/dl 감소하였으나(p=0.5974ʃ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

Triglyceride 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 9.53±89.91mg/dl 감소하였고(p=0.5177**), 대조군은 27.46±113.47mg/dl 감소하였으나(p=0.0732ʃ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 4.66±93.33mg/dl 감소하였고(p=0.7601**), 대조군은 43.71±103.15mg/dl 감소하였으나(p=0.0101ʃ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

HDL-Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 1.00±8.95mg/dl 감소하였고(p=0.3083), 대조군은 0.17±6.45mg/dl 감소하였으나(p=0.8745) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 0.29±7.05mg/dl 감소하였고(p=0.8015), 대조군은 1.41±6.10mg/dl 증가하였으나(p=0.1453) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

LDL-Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 4주 후 시험군은 9.63±20.45mg/dl로 시험 전후 통계적으로 유의성 있게 감소하였고(p=0.0054ʃ), 대조군은 2.00±21.35mg/dl 감소하였으나(p=0.5520**) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 8주 후 시험군은 6.03±23.14mg/dl 감소하였고(p=0.1170), 대조군은 0.02±21.08mg/dl 증가하였으나(p=0.9941) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(표 22).

표 22. 방문별 혈중지질(Total-cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol) 변화량

		시험군 N=38		대조군 N=41		p-value*&	p-value$
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Total-cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	38	203.95±35.19	41	183.17±40.14	0.0171*	
	4주 (방문3)	38	192.58±32.44	41	178.15±34.74		
	Change from baseline	38	-11.37±22.90	41	-5.02±23.37	0.2199&	0.9525
	p-value		0.0026ʃ		0.1762**		
	8주 (방문4)	38	198.68±37.60	41	178.80±33.48		
	Change from baseline	38	-5.26±22.37	41	-4.37±21.98	0.4468&	0.4178
	p-value		0.1553**		0.5974ʃ		

Triglyceride (mg/dl)	Baseline (방문1)	38	165.47±100.15	41	223.85±157.62	0.1246[&]	
	4주 (방문3)	38	155.95±86.76	41	196.39±128.55		
	Change from baseline	38	-9.53±89.91	41	-27.46±113.47	0.3387[&]	0.6584
	p-value		0.5177[**]		0.0732[∫]		
	8주 (방문4)	38	160.82±93.04	41	180.15±90.89		
	Change from baseline	38	-4.66±93.33	41	-43.71±103.15	0.1108[&]	0.6237
	p-value		0.7601[**]		0.0101[∫]		
HDL-cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	38	53.87±14.26	41	46.66±11.83	0.0126[&]	
	4주 (방문3)	38	52.87±12.50	41	46.49±11.75		
	Change from baseline	38	-1.00±8.95	41	-0.17±6.45	0.3896[&]	0.5721
	p-value[∫]		0.3083		0.8745		
	8주 (방문4)	38	53.58±12.93	41	48.07±11.85		
	Change from baseline	38	-0.29±7.05	41	1.41±6.10	0.2531[*]	0.7678
	p-value[**]		0.8015		0.1453		
LDL-cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	38	135.32±36.50	41	113.78±35.93	0.0100[*]	
	4주 (방문3)	38	125.68±29.83	41	111.78±34.81		
	Change from baseline	38	-9.63±20.45	41	-2.00±21.35	0.1409[&]	0.6595
	p-value		0.0054[∫]		0.5520[**]		
	8주 (방문4)	38	129.29±35.39	41	113.80±34.02		
	Change from baseline	38	-6.03±23.14	41	0.02±21.08	0.2277[*]	0.8129
	p-value[**]		0.1170		0.9941		

*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test
&: Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test
**: Compared within groups; p-value by Paired t-test
∫ : Compared within groups; p-value by Wilcoxon signed rank test
$: Compared between groups; p-value for ANCOVA adjusted baseline

다) 안전성 평가 결과

(1) 안전성 평가는 무작위배정되어 인체적용시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 인체적용시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 96명(시험군 48명, 대조군 48명)의 인체적용시험대상자가 Safety Set에 포함되었음.

(2) 시험군에서는 총 7명의 인체적용시험대상자에게서 9건의 이상반응이 있었고, 대조군에서는 총 11명의 인체적용시험대상자에게서 14건의 이상반응이 있었으며 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(p=0.4335). 주된 이상반응은 시험군과 대조군 모두 소

화기계 장애였음.

(3) 중대한 이상반응은 시험군과 대조군 모두 나타나지 않았음.
(4) 본 인체적용시험 기간 동안에 발생한 이상반응의 증상정도 조사에서 시험군은 경도(mild) 이상반응이 9건, 대조군은 경도(mild) 이상반응이 14건 발생하였음.

(5) 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군은 '관련 있을 가능성 있음' 2건, '관련이 없다고 생각됨'이 4건, '명확히 관련이 없음' 3건으로 시험자에 의해 판단되었고, 대조군은 '관련 있을 가능성 있음' 4건, '관련이 없다고 생각됨' 6건, '명확히 관련이 없음' 4건으로 시험자에 의해 판단되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(p=1.0000).

(6) 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 시험군에서 2건, 대조군에서 4건 발생하였고, 소화기계 장애, 신경정신계 장애였으며, 시험군의 02-R025 대상자와 대조군의 01-R016, 01-R047 대상자는 발생한 이상반응이 관련 조치 없이 완전 치유되었고 시험군의 01-R021 대상자는 발생한 이상반응이 관련 조치 없이 치유되었으며, 대조군의 02-R031, 02-R034 대상자는 발생한 이상반응이 관련 조치 없이 진행중임을 확인하였음.

(7) 본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 방문 1, 4에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 뇨 검사로 나누어 평가되었음. Hct 변화량을 Safety Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 8주 후 1.33±2.11% 감소하였고(p=0.0002), 대조군은 섭취 8주 후 0.47±1.85% 감소하여(p=0.1011) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음.(p=0.0462*). Platelet 변화량을 Safety Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 8주 후 16.88±29.75 103/㎕ 감소하였고(p=0.0006), 대조군은 섭취 8주 후 1.45±27.54 103/㎕ 증가하여(p=0.7278) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음.(p=0.0037*). 이는 정상범위 이내의 범위였으며, 그 외 혈액학적검사의 항목 및 혈액화학적 검사에서는 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(8) 뇨 검사에서 시험군, 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(9) 활력징후(맥박, 혈압) 및 체중 분석 결과에서 섭취 4주, 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(10) 심전도검사의 분석결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타났다.

라) 인체적용시험 종합 결론

본 인체적용시험의 1차 유효성 평가 변수는 섭취 후 8주 시점의 AST, ALT 변화량으로 시험군, 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.

- 섭취 후 8주 시점의 AST 변화량 분석에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 시험군의 AST 변화량은 대조군의 AST 변화량의 199% 상회하는 뚜렷한 간기능 개선 효과를 나타내었음.
- 섭취 후 8주 시점의 ALT 변화량 분석에서 시험군의 ALT 변화량은 대조군의 ALT 변화량의 215% 상회하는 뚜렷한 간기능 개선 효과를 나타내었음.

2차 유효성 평가 변수는 섭취 후 4주 시점의 AST, ALT 변화량, AST, ALT 변화율, γ-GTP, AST/ALT ratio, 다차원 피로 척도(MFS), 등으로 시험군, 대조군의 개선 정도를 비교분석하여 평가하였음.

- 섭취 후 4주 시점의 AST 변화량 분석에서 시험군의 AST 변화량은 대조군의 AST 변화량의 271% 상회하는 통계적으로 유의성있는 시험군의 간 기능 개선효과를 확인함.
- 섭취 후 4주 시점의 ALT 변화량 분석에서 시험군의 ALT 변화량은 대조군의 ALT 변화량의 334% 상회하는 통계적으로 유의성있는 시험군의 간 기능 개선효과를 확인함.
- AST와 ALT 변화율 분석에서 섭취 4주 후에는 시험군의 개선이 대조군의 개선량에 비하여 통계적으로 유의성있게 나타났으며, 섭취 8주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 시험군에서의 간기능 개선 효과가 뚜렷하게 나타남.
- 다차원 피로 척도(MFS)의 총점 변화량 분석에서 섭취 4주 후와 8주 후 시험군에서의 피로도는 감소하고 대조군의 피로도는 증가하여, 시험군에서 뚜렷한 전체 피로감의 감소 경향이 나타났음.
- **결론적으로 개똥쑥 열수추출물(SPB-201)을 섭취한 시험군에서 AST와 ALT가 섭취 4주 후와 8주 후 대조군 대비 뚜렷하게 감소하며 전체 피로도가 해소되는 나타나, 본 인체적용시험을 통해 개똥쑥 열수추출물(SPB-201)의 섭취가 지방간 발병 가능성이 큰 고위험군에서 간 기능을 회복시키고 간 기능을 개선하는 효과가 있음을 확인하였음.**

17) 시제품 생산 및 사업화

가) 개똥쑥 열수추출분말 시작품 제작

(1) 일반식품 제형 개발

(가) 일반식품 연구 배경

식품의약품안전처의 승인을 받아야하는 건강기는식품 개별인정의 경우 기능성, 안전성, 인체적용시험 등의 다양한 연구결과를 필요로 하여 총 연구기간만 3~5년 이상의 시간이 필요함. 자료 구비 후 개별인정 심사기간 또한 1년 이상의 시간이 필요하기 때문에 완제품의 생산, 마케팅을 통한 시장 개척 등의 과정을 거쳐 실제 판매 까지는 상당히 긴 시간이 필요로 한 실정임. 이와 같은 과정 중 개똥쑥 추출물에 대한 일반식품 개발을 통해 인지도를 높일 수 있다면, 차후 건강기능식품 개발시 빠른 속도로 판매에 나설 수 있음. 이와 같은 이유로 개똥쑥 추출물을 이용한 일반식품을 개발하고 특허를 출원하여 사업화의 발판을 마련하고자 함.

(나) 지방간 개선효과를 가지는 개똥쑥 추출물을 포함하는 선식 조성물 개발

선식용 베이스는 현미 분말 25중량%, 검은콩 분말 20중량%, 흑미 분말 13중량%, 찰현미 분말 12중량%, 단호박 분말 7중량%, 시금치 분말 5중량%, 사과 분말 4중량%, 율무 분말 3중량%, 당근 분말 3중량%, 마 분말 3중량%, 호두 분말 2중량%, 곤드레 분말 1중량%, 깨 분말 1중량% 및 표고버섯 분말 1중량%를 혼합하여 제조하였음

제조한 선식용 베이스에 개똥쑥 열수추출분말을 각각 0% 0.1%, 1%, 3% 를 충분하게 혼합한 후, 개똥쑥추출물을 포함하는 선식용 조성물을 제조하여 관능평가를 실시하였음(그림 9). 관능평가를 실시하기 위해 건강한 20~60대 남, 여 30명을 대상으로 실시예 및 비교예에 따라 제조된 선식용 조성물을 섭취한 후 관능 평가를 실시하였으며, 색, 향, 맛, 전반적 기호도 등의 특성을 5점 척도법(5=매우 좋음; 4=좋음; 3=보통; 2=나쁨; 1=매우 나쁨)에 준하여 기호도 검사를 실시하였음(그림 72).

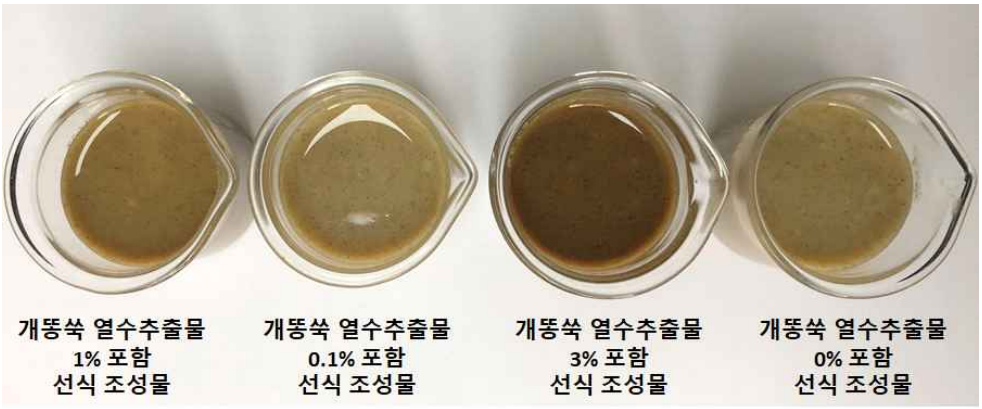


그림 72. 개똥쑥 열수추출물을 포함하는 선식조성물

개똥쑥 열수추출물을 0.1%, 1% 포함하는 선식 조성물은 기본 선식조성물에 비하여 색, 향, 맛, 전반적 기호도 모두 비슷한 수준의 결과가 나타났음. 개똥쑥 열수추출물을 3% 포함하는 선식 조성물의 경우에는 대체적으로 낮은 점수가 나타났으며, 이는 개똥쑥 추출물 특유의 향과 쓴맛 때문인 것으로 보여짐. 그러나 개똥쑥 열수추출물 1%를 포함하는 경우에는 특유의 향과 쓴맛이 선식조성물과 어우러져 향 및 맛에 대한 만족도가 더욱 높은 것으로 확인됨(표 23).

표 23. 개똥쑥 추출물을 포함하는 선식용 조성물의 관능평가

구분	개똥쑥 열수추출물 0.1% 포함 선식 조성물	개똥쑥 열수추출물 1% 포함 선식 조성물	개똥쑥 열수추출물 3% 포함 선식 조성물	개똥쑥 열수추출물 0% 포함 선식 조성물
색	3.83	3.77	3.53	3.80
향	3.80	3.93	3.40	3.77
맛	3.93	4.13	3.13	3.87
전반적 기호도	3.90	3.97	3.23	3.93

(다) 선식조성물 특허 출원

위와 같은 방법으로 개발된 '지방간 개선 효과를 가지는 개똥쑥추출물을 포함하는 선식조성물'의 특허를 출원하였으며, 차후 사업화에 활용할 계획임(그림 10).

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2018.10.24
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2018-0127795 (접수번호 1-1-2018-1053115-21)
출 원 인 명 칭 주식회사 성균바이오텍(1-2008-007111-4) 외 1명
발 명 자 성 명 김현석 박기문 김선희 박찬영 박수진
발 명 의 명 칭 지방간 개선 효과를 가지는 개똥쑥추출물을 포함하는 선식 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr>특허마당>PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허 실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8.기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

그림 73. '지방간 개선 효과를 가지는 개똥쑥 추출물을 포함하는 선식조성물' 특허 출원

(2) 건강기능식품 시제품 개발

(가) 건강기능식품 제형 선정

인체적용 시험용 식품 제조를 위한 연구를 진행하는 동시에 건강기능식품 제형연구를 진행하였음. 정제(tablet)와 캡슐(soft capsule)로 시제품 테스트를 거쳐 가장 적합한 형태의 제형을 선택하기로 하였으며, 다양한 형태의 제작 테스트 후 최종적 정제로 결정하였음.

(나) 시제품 개발

제형연구를 통해 선정된 제형을 바탕으로 개발을 진행하였으며 아래 표의 배합비율로 최종 시제품 개똥쑥정을 개발하였음. 개똥쑥의 특성과, 간기능 개선에 초점을 맞춰 포장 패키지 디자인을 진행하였으며 품목보고 후 생산을 진행하였음(표 24, 그림 74).

표 24. 인체적용 시험을 위한 시험용 및 대조용 식품의 전성분

No.	원료명	개똥쑥 정 전성분		
		배합 비율(%)	함량 (mg)	1일 총섭취량(mg)
1	개똥쑥 열수추출분말	28.590	171.54	686.16
2	치커리뿌리추출분말	20.000	120	480
3	비타민 B1 염산염	0.200	1.2	4.8
4	비타민B2	0.180	1.08	4.32
5	비타민 B6 염산염	0.240	1.44	5.76
6	결정셀룰로오스	45.240	271.44	1085.76
7	CMC 칼슘	3.000	18	72
8	이산화규소	1.000	6	24
9	스테아린산마그네슘	1.000	6	24
10	HPMC	0.500	3	12
11	글리세린지방산에스테르	0.050	0.3	1.2
합계		100	600	2,400

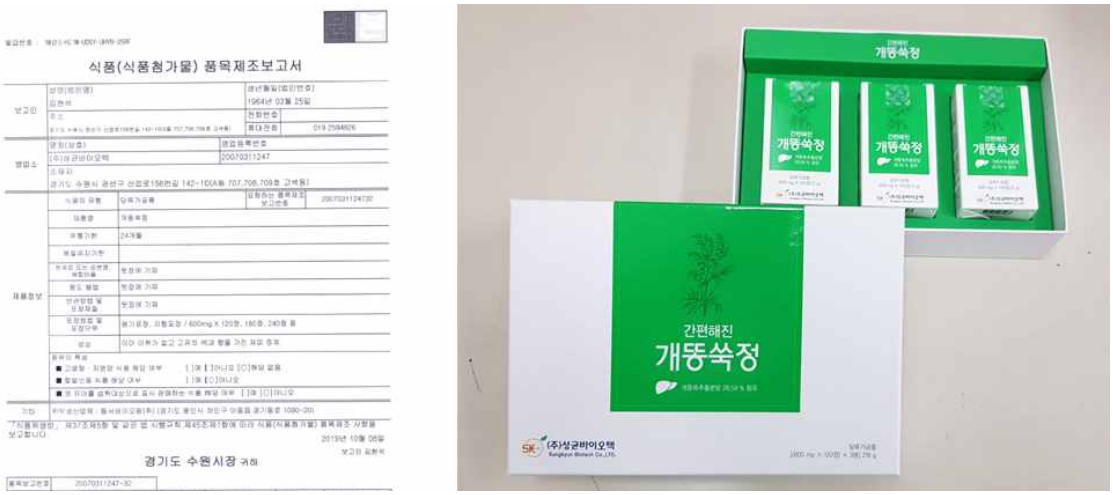


그림 74 . 개똥쑥 추출분말을 활용한 시제품의 품목제조보고서(좌) 및 생산된 시제품(우)

18) 원료 및 제품의 안정성 시험

가) 개똥쑥 열수추출물 안정성 시험

(1) 연구 방법

본 연구팀에서 개발된 개똥쑥 열수추출물의 지표안정성을 확인하기 위해 분말 및 액상의 형태로 제조된 개똥쑥 열수추출물을 50 mL 튜브에 담아 가속 및 장기보존시험을 진행하였음. 가속시험으로는 분말 및 추출농축액을 50℃ incubator에서 저장하면서 실험을 진행하였으며 최초시험을 포함하여 2개월 간격으로 6개월간 시험을 실시하였음. 시험 항목으로는 지표성분으로 선정된 scopoletin을 포함해 성상, 확인시험, 대장균군 등을 분석하였음. 장기보존시험으로는 개똥쑥 열수추출분말을 상온에 저장하며 실험을 진행하였으며, 최초시험을 포함하여 3, 6, 9, 12, 18, 24 개월마다 시험을 실시하고 있음. 시험 항목으로는 가속시험과 동일하게 지표성분으로 선정된 scopoletin을 포함해 성상, 확인시험, 대장균군 등을 분석하였음.

(2) 시험 결과

개똥쑥 열수추출물의 가속시험 6개월 저장 결과 분말시료의 경우 저장 당시 scopoletin의 함량이 1739.09 mg/kg에서 가속저장 6개월 경과시 1701.79 mg/kg으로 저장당시에 비해 scopoletin 함량이 약 97.85%로 높은 안정성을 보이는 것으로 나타남. 액상시료의 경우 제조 당시 지표성분 함량이 1277.27 mg/kg에서 가속저장 6개월 경과시 736.34 mg/kg로 저장기간동안 약 43%이상의 감소가 나타났음. 개똥쑥 열수추출농축액의 경우 지표성분 안정성이 낮은 것으로 나타났음(표 25).

표 25. 개똥쑥 열수추출물의 가속시험 중 저장기간에 따른 안정성 및 안전성 비교

포장형태	시험항목	저장 기간(개월)			
		0	2	4	6
개똥쑥 열수추출 분말	Scopoletin (mg/kg)	1739.09±12.89	1716.05±50.56	1691.72±15.31	1701.79±95.14
	성상	적합	적합	적합	적합
	확인시험	적합	적합	적합	적합
	대장균군	음성	음성	음성	음성
개똥쑥 열수추출 농축액	Scopoletin (mg/kg)	1277.26±18.68	927.19±18.72	807.11±24.56	736.34±70.05
	성상	적합	적합	적합	적합
	확인시험	적합	적합	적합	적합
	대장균군	음성	음성	음성	음성

개똥쑥 열수추출분말 장기보존시험 18개월 저장 결과, 저장 당시 scopoletin의 함량이 1739.09 mg/kg에서 장기보존시험 18개월 경과시 1755.20 mg/kg으로 저장당시에 비해 scopoletin 함량이 약 101%로 높은 안정성을 보이는 것으로 나타남. 또한, 개똥쑥 열수추출 농축액의 냉장저장 시험에서도 저장 당시 scopoletin 함량이 1277 mg/kg에서 장기보존시험 18개월 경과시 1249 mg/kg으로 약 98%로 유지되어 높은 안정성을 보이는 것으로 나타남 (표 26). 과제 종료 후에도 장기보존시험은 2020년 3월 24개월 까지 진행 할 예정임(그림 75).

표 26. 개똥쑥 열수추출분말의 장기보존시험 중 저장기간에 따른 안정성 및 안전성 비교

포장형태	시험항목	저장 기간(개월)						
		0	3	6	9	12	18	24
개똥쑥 열수 추출분말	Scopoletin (mg/kg)	1739.09	1798.41	1797.16	1707.59	1806.15	1755.20	시험 예정
	성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	시험 예정
	확인시험	적합	적합	적합	적합	적합	적합	시험 예정
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	시험 예정
개똥쑥 열수 추출 농축액	Scopoletin (mg/kg)	1277.26	1242.06	1230.61	1219.17	1285.21	1248.97	
	성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	시험 예정
	확인시험	적합	적합	적합	적합	적합	적합	시험 예정
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	시험 예정

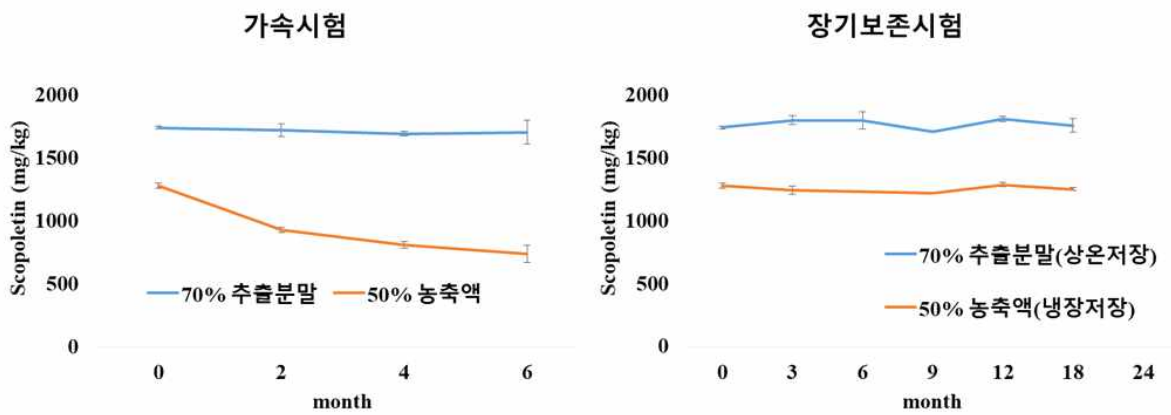


그림 75. 개똥쑥열수추출분말 및 열수추출농축액의 안정성시험.

<3차년도 협동연구기관 : 인체적용시험 CRO 업무관리 및 건강기능식품 개별인정 신청>

19) CRO 업무관리

가) 인체적용시험 대상자 모집 현황

(1) 대상자 모집 현황

실시기관	Planned Enrollment	Screened	Screening Failure	Randomized n (%)	Active	Dropped out	Completed
분당제생병원	50+3*	118	63	55 (103.8%)	0	5	50
삼육서울병원	50+1*	52	11	41 (80.4%)	0	4	37
합계	**100+3***	**170**	**74**	**96** (93.2%)	**0**	**9**	**87**

* 선정/제외기준 위반등록으로 추가등록 필요

(2) 2019년 9월 3일 screening cut off 시행

(3) 대상자 방문 현황

진행내용 \ 실시기관	분당제생병원	삼육서울병원
FPI (First Patient In)	2018.12.06	2018.11.23
LPI (Last Patient In)	2019.08.28	2019.08.30
LPO (Last Patient Out)	2019.10.24	2019.10.25

나) IRB 진행 현황

(1) 초심의

실시기관	심의유형	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
분당제생병원	초심의	2018.08.02	2018.08.17	승인	1.0	1.0	1.0	1.0	2018.08.17 ~2019.08.16
삼육서울병원	초심의	2018.07.26	2018.08.08	권고 승인	1.0	1.0	1.0	1.0	2018.08.08 ~2019.08.07
	권고승인	2018.08.30	NA	승인	-	-	-	-	-

(2) 종료보고

실시기관	접수일	심의일	결과	비고
분당제생병원	2020.01.02	2020.01.06	승인	-
삼육서울병원	2019.11.22	2019.12.06	승인	-

(3) 이상반응 보고

실시기관	접수일	심의일	결과	보고내용
삼육서울병원	2019.07.30	2019.08.05	승인	02-S035, 02-S043 시험대상자의 이상반응 보고
	2019.11.22	2019.12.06	승인	02-S009, 02-S039, 02-S051 시험대상자의 이상반응 보고

다) 인체적용시험용 식품 관리

(1) 인체적용시험용 식품 입고

실시기관	입고일	세부내역	
		1차분(V2)	2차분(V3)
분당제생병원	2018.10.12	25 bottles (01-R001-1~01-R025-1)	25 bottles (01-R001-2~01-R025-2)
	2019.01.13	25 bottles (01-R026-1~01-R050-1)	25 bottles (01-R026-2~01-R050-2)
	2019.07.12	10 bottles (01-R051-1~01-R060-1)	10 bottles (01-R051-2~01-R060-2)
삼육서울병원	2018.10.10	20 bottles (02-R001-1~02-R020-1)	-
	2018.12.17	-	20 bottles (02-R001-2~02-R020-2)
	2019.02.20	20 bottles (02-R021-1~02-R040-1)	20 bottles (02-R021-2~02-R040-2)
	2019.07.09	10 bottles (02-R041-1~02-R050-1)	10 bottles (02-R041-2~02-R050-2)

(2) 인체적용시험용 식품 반납

실시기관	반납일	세부내역	
		1차분(V2)	2차분(V3)
분당제생병원	2020.01.02	01-R001-1~01-R060-1	01-R001-2~01-R060-2
삼육서울병원	2019.12.12	02-R001-1, 02-R003-1~02-R050-1	02-R001-2, 02-R003-2~02-R050-2

라) 시험 대상자 모집 향상에 관한 회의

구분 / 차수	분당제생병원	삼육서울병원	목적	비고
1차	2018.12.27	2019.02.20	시험대상자 모집 향상에 대한 방안 논의 등	-
2차	2019.02.15	2019.04.09		-
3차	2019.04.04	2019.05.09		-
4차	-	2019.06.12		-

마) CRA의 시험기관 모니터링

실시기관 / 차수	분당제생병원	삼육서울병원
1차 모니터링	2018.12.27	2018.12.18
2차 모니터링	2019.01.15	2019.01.23
3차 모니터링	2019.04.18	2019.02.27
4차 모니터링	2019.04.19	2019.06.19
5차 모니터링	2019.05.16	2019.07.16
6차 모니터링	2019.05.30	2019.07.17
7차 모니터링	2019.08.08	2019.09.03
8차 모니터링	2019.08.09	2019.09.19
9차 모니터링	2019.09.04	2019.10.30
10차 모니터링	2019.09.20	2019.10.31
11차, 12차 모니터링	2019.09.30, 10.01	-
13차, 14차 모니터링	2019.10.17, 18	-

바) 대상자 모집을 위한 광고 진행 내역

(1) 원내 포스터 및 배너 광고

(가) 분당제생병원

- 2018년 10월 25일부터 원내 게시판, 외래 게시판 및 검진센터 내에 포스터 게시

2018년 12우러 10일부터 홍보용 배너 게시

(나) 삼육서울병원

2018년 10월 12일부터 원내 게시판, 외래 게시판에 포스터 게시

2018년 12월 31일부터 홍보용 배너 게시

(2) 인근 아파트 광고

(가) 분당제생병원

- 2019년 1월 16일부터 2019년 2월 6일까지 병원 인근 아파트 21개 단지 총 23,000여 세대를 대상으로 대상자 모집 광고 시행

(나) 삼육서울병원

2019sus 1월 10일부터 2019년 2월 2일까지 병원 인근 아파트 21개 단지 총 11,500여 세대를 대상으로 대상자 모집 광고 시행

(3) 인터넷 모집 광고

(가) 메디25 1차 광고

- 2018년 12월 31일부터 2019년 2월 26일까지

(나) 메디25 2차 광고

- 2019년 4월 9일부터 2019년 7월 15일까지

(4) 교차로 지면 광고

(가) 삼육서울병원

2019년 6월 19일부터 2019년 7월 16일까지 교차로 지면 광고 시행

(5) 마을버스 광고

(가) 분당제생병원

- 2019년 7월 15일부터 2019년 8월 30일까지 병원 인근 마을버스를 대상으로 대상자 모집 광고 시행

(나) 삼육서울병원

2019년 6월 25일부터 2019년 8월 24일까지 병원 인근 마을버스를 대상으로 대상자 모집 광고 시행

(6) 광고 시안 (A : 원내 포스터 / B: 교차로 광고 / C: 마을버스 광고)

20) 개별인정 신청을 위한 자료 검토

가) 신청 시 필요한 자료

(1) 신청원료의 원재료에 관한 자료

(가) 원재료에 포함되어 있는 주요 성분(5 개 이상) 및 함량 정보

(나) 유사원재료가 있는 경우 신청원료의 원재료와의 구별방법: 형태학적인 감별법, 유전자 분석, 성상 및 지표성분 등

(2) 신청하고자 하는 원료의 제조공정도

(가) 제조 책임자 서명이 되어 있는 자료(제조사 문서 양식)

(나) 단계별 제조공정이 상세히 기재되어 있어야 함: 원재료(기원(국내 또는 국외) 및 학명 등), 추출용매 및 이의 첨가량, 수율(%), 주요 제조 단계별(추출, 여과 및 농축 등) 기능(또는 지표)성분 함량(식이섬유 등), 각 제조단계별 조건(온도, 시간 및 압력 등)

(다) 제조공정에 사용되는 물질, 용매(완충용액 등) 및 용질의 종류 및 투입량(kg 또는 L) 등을 상세히 기재하여야 함.

(3) 제조공정에 사용된 물질의 규격서(CoA)

(가) 제조공정에 사용된 물질, 용매 및 용질(덱스트린 등) 등이 국내 식품 규격에 적합함을 입증할 수 있는 규격서(책임자 서명 필)

(나) 원 제조사(Original manufactures)의 문서 필요

(4) 신청하고자 하는 원료 제조사 규격서(CoA; 책임자 서명 필)

(가) 제조사 문서양식으로 제공해야 함.

(5) 기능(또는 지표)성분에 대한 설정근거

(가) 기능(또는 지표)성분이 신청원료 및 신청원료의 원재료에서 특이성을 나타낼 수 있다는 자료

(나) 상기 “1.” 에 대한 과학적인 근거자료(표준화 또는 기능성 등)

(6) 신청하고자 하는 원료의 기능(또는 지표)성분의 시험방법

(가) 공인된 시험법 또는 제조사 시험법(책임자 서명 필)

(나) 제조사 시험법은 밸리데이션(시험법에 대한 타당성을 입증하는 자료) 자료 필요(밸리데이션 자료에는 책임자 서명이 있어야 함)

(다) 밸리데이션 항목으로는 특이성, 직선성, 정확도, 정밀도, 정량한계에 대한 자료가 필수적으로 기재되어야 하며, Raw data(HPLC 크로마토그램, PDA 스펙트럼 또는 Mass 데이터 등)가 제공되어야 함.

(라) 분석에 사용되는 표준품에 대한 정보가 필요하며, 시판 표준품 또는 자사 표준품이 사용 가능하나, 시판 표준품의 경우 CoA(카달로그 No, 순도 등 포함되어야 함)를 제공하여야 하며, 자사 표준품인 경우 구조, 순도 등을 확인하기 위해서 NMR, HPLC/RI 등 분석자료 필요하며 유통기한 확인을 위한 시험분석 자료도 필요함.

(7) 공인시험성적서(신청하고자 하는 원료로 시험된 공인시험 성적서)

(가) 국내외 공인시험기관에서 발행한 성적서(제출용 원본 필요)

(나) 공인시험성적서를 의뢰하는 검체는 건강기능식품 GMP 업체에서 생산된 신청원료여야 함.

(다) 기능(또는 지표)성분 함량(3 Lot 3 반복; raw data 필요)

(라) 중금속(납, 카드뮴, 총비소 및 총수은; 3 Lot; raw data 필요)

(마) 대장균군 (3 Lot; raw data 필요)

(바) 잔류농약 58종 (1 Lot; raw data 필요)

(사) 영양성분 (성상, 조단백질, 탄수화물, 조지방, 회분, 수분, 열량, 나트륨)

(아) 곰팡이독소; 총 아플라톡신(B1,B2,G1및 G2의 합)(3 Lot, raw data 필요)

(8) 안전성에 관한 자료

(가) 섭취근거 정보 (일상적(25 년 이상), 전통적 사용이 기록된 과학적 자료 및 역사적 사용기록)

(나) 섭취량 평가 정보 (최근 5 년간의 자료, 국민건강영양조사결과 및 섭취량 실태조사 결과)

(다) 기본독성 시험자료 (단회경구투여독성, 13 주 반복투여독성시험, 유전독성 등)

(9) 기능성에 관한 자료

(가) 세포시험(*in vitro*) 자료 (논문 또는 게재 예정된 논문) - 논문(SCI, SCIE 또는 KCI 등) 또는 게재 예정서가 포함된 논문.

(나) 동물시험(*in vivo*) 자료 (논문 또는 게재 예정된 논문) - 논문(SCI, SCIE 또는 KCI 등) 또는 게재 예정서가 포함된 논문.

(다) 신청하고자 하는 원료로 시험된 인체적용시험(논문 또는 IRB 승인된 계획서 및 최

종보고서); 논문은 게재 또는 게재 예정된 논문으로서 SCI, SCIE 또는 KCI 등의 논문이어야 하며, 인체적용시험보고서는 IRB 승인된 계획서 및 최종보고서이어야 함(서명 필 및 IRB 통보서 필요).

(10) 신청하고자 하는 원료의 국내·외에서 식품으로 인정된 현황 및 유통현황(최근 5년간).

(가) 신청하고자 하는 원료가 국내·외에서 식품으로 인정되었다면, 이에 대한 근거자료

(나) 신청하고자 하는 원료를 이용하여(주원료 및 부원료 등) 국내·외에서 식품(Food) 또는 건강기능식품(Dietary supplement)을 제조하였다면 그 근거자료(품목제조신고증; 책임자 서명 필요)

(다) 신청하고자 하는 원료를 국내·외에서 이용하여 식품(Food) 또는 건강기능식품(Dietary supplement)으로 판매되었다면, 최근 5년간 국내 생산량, 판매량, 수출국, 수출량, 제품현황 등에 관한 자료

(11) 건강기능식품기능성원료 신청 시 표준품, 원료(공인시험성적서, 제출 시 시제품) 및 분석칼럼을 제공 필요

(가) 신청원료는 건강기능식품 GMP 업체에서 생산된 신청원료여야 함.

(12) 건강기능식품기능성원료 신청 시 필요한 별지서식 1호

(13) 건강기능식품 영업신고증(건강기능식품 제조업 또는 수입식품 등의 수입・판매업)

(14) 건강기능식품기능성원료 신청 시 필요한 수입 신청 행정수수료(1,901,000원)

나) 신청 자료 구비 현황

기능성 원료 개별인정을 위한 제출 자료		구비 현황
1. 신청원료의 원재료에 관한 자료	1) 원재료에 포함되어 있는 주요 성분 (5개 이상) 및 함량 2) 유사원재료가 있는 경우 신청원료의 원재료와의 구별방법 (형태학적인 감별법 또는 유전자 분석, 성상 및 지표성분등)	생약학회지 2018, 49(2) 219-224 / 개똥쑥과 유사종의 종별 구별법 자료 확보
2. 신청원료의 제조공정도	1) 제조사 문서 양식, 책임자 서명 필 2) 단계별 제조공정이 상세히 기재 : 원재료 기원(국내 또는 국외) 및 학명 등, 추출용매 및 이의 첨가량, 수율(%), 주요 제조 단계별(추출, 여과 및 농축 등) 기능(또는 지표)성분 함량, 각 제조단계별 조건(온도, 시간 및 압력 등) 3) 제조공정에 사용되는 물질, 용매(완충용액 등) 및 용질의 종류 및 투입량(kg 또는 L) 등을 상세히 기재	개똥쑥 열수추출분말의 제조공정도 확보

3. 제조공정에 사용된 물질의 규격서	1) 제조공정에서 사용된 물질, 용매 및 용질(덱스트린 등) 등이 국내 식품 규격에 적합함을 입증할 수 있는 규격서 2) 원 제조사(Original manufactures) 문서 양식, 책임자 서명필	덱스트린 규격서 확보
4. 신청원료의 제조사 규격서	1) 제조사 문서 양식, 책임자 서명필	개똥쑥 열수추출분말 시험성적서 확보
5. 신청원료의 기능(또는 지표)성분에 대한 설정 근거	1) 기능(또는 지표)성분이 신청원료 및 신청원료의 원재료에서 특이성을 나타낼 수 있다는 자료 2) 1)에 대한 과학적인 근거자료(표준화 또는 기능성 등)	지표성분 설정 근거 자료 확보
6. 신청원료의 기능(또는 지표)성분의 시험방법	1) 공인된 시험법 또는 제조사 시험법(책임자 서명 필) 2) 분석에 사용되는 표준품에 대한 정보가 필요하며, 자사 표준품인 경우 구조, 순도 등을 확인하기 위해서 NMR, HPLC /RI 등 분석자료 필요하며 유통기한 확인을 위한 시험분석 자료도 필요	신청원료의 지표성분 정량시험법, 시험법 밸리데이션 및 raw data 확보
7. 공인기관 시험성적서	1) 기능(또는 지표)성분 함량(3 Lot 3 반복; Raw data 포함) 2) 중금속(납, 카드뮴, 총 비소 및 총 수은; 3 Lot; Raw data 포함) 3) 대장균군(3 Lot; Raw data 포함) 4) 잔류농약 58종(1 Lot; Raw data 포함) 5) 영양성분(성상, 조단백질, 탄수화물, 조지방, 회분, 수분, 열량. 나트륨; 1 Lot 1 반복) 6) 아플라톡신(3 Lot; Raw data 포함)	개똥쑥 열수추출분말의 공인기관 지표성분, 중금속, 대장균군, 잔류농약, 아플라톡신, 영양성분 시험성적서 확보
8. 안전성에 관한 자료	1) 섭취근거 정보(일상적(25년 이상) 및 전통적 사용이 기록된 과학적 및 역사적 사용 기록) 2) 섭취량 평가 정보(최근 5년간 자료; 국민건강영양조사 결과 및 섭취량 실태조사 결과) 3) 기본독성 시험자료 - 단회경구투여독성 - 90일 반복투여독성시험 - 유전독성(염색체이상시험,복귀돌연변이시험,소핵시험)	섭취근거, 섭취량평가정보, 국내외사용현황 및 단회/반복투여독성시험 자료 확보
9. 기능성에 관한 자료	1) 세포시험 (논문, 또는 게재 예정서) 2) 동물시험 (논문, 또는 게재 예정서) 3) 인체적용시험 (논문, 또는 IRB 승인된 계획서 및 최종보고서; 책임자 서명 필)	현재 논문 2편 revision 중, 인체적용시험 최종보고서 IRB 심의 중
10. 신청원료의 국내·외 식품 인정 현황 및 유통현황 (최근 5년간)	1) 신청하고자 하는 원료가 국내・외에서 식품으로 인정된 근거자료 제공 2) 신청하고자 하는 원료를 이용하여(주원료 및 부원료 등으로) 국내・외에서 식품(Food) 또는 건강기능식품(Dietary supplement)을 제조하였다면, 근거자료(품목제조신고증; 책임자 서명 필) 제공 3) 신청하고자 하는 원료를 국내・외에서 식품 또는 건강기능식품을 판매되었다면, 최근 5년간 국내 생산량, 판매량, 수출국, 수출량, 제품 현황 등에 관한 자료를 제공	국내외 제품 현황 및 사용례(중약대사전) 자료 확보

21) 개별인정 신청 및 식약처 대응

가) 개별인정 신청 일정

(1) 2019년 10월: 네오뉴트라와 개별인정 대행 계약 체결

(2) 2019년 11월~ 현재: 개별인정 신청 자료 준비

(3) 2020년 2월: 개별인정 신청 관련 식품의약품안전처 사전 미팅

(4) 2020년 3월: 개별인정 신청 (개별인정 신청용 제출자료 2부 (원본 1부 포함), 제출자료 수록 CD 1개, 원료(시제품) 및 기능성분(또는 지표성분) 표준품, 컬럼, 국내 공인기관 시험성적서 원본 등)

다. 종합 결론

- 본 과제는 개똥쑥 추출물의 간 건강 개선 기능을 검증하기 위한 전임상연구 및 인체적용시험을 실시하고 식약처의 개별인정을 신청함으로써 신규 개별인정형 건강기능식품 상용화의 기반을 마련하는 것을 목표로 착수되었음.
- 개똥쑥 열수추출분말의 생산공정을 확립하고, 개똥쑥 열수추출분말의 특이적인 6가지 주요성분(1,3-O-dicafferoylquinic acid, scopoletin, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-dI-O-caffeoylquinic acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5- di-O-caffeoylquinic acid)을 규명하였으며, 지표성분 및 규격은 scopoletin 1.0 ~ 1.6 mg/g으로 설정하였음.
- 개똥쑥 열수추출분말의 다양한 *In vitro* 효능평가를 실시한 결과 Raw264.7 세포주에서 nitrite 생성 억제 효과, TNFα 억제 활성, IL-1β 억제 활성, IL-6 억제 활성이 ELISA 및 mRNA발현 및 Real-time PCR에서 확인되었으며, HepG2 세포주에서 지방 축적에 따른 TG, TC 증가를 억제시키고. 주요 성분 5종 의 TG 억제 효과와, 항산화 활성 확인 등이 확인되었음.
- 개똥숙열수추출분말의 *In vitro* 효능평가를 실시한 결과 급성 간 손상 동물실험에서 대표적인 간수치인 AST, ALT 및 간 조직학적 검사, 사망률 확인 결과 대조군 대비 유의적으로 우수한 효과가 확인되었음. 고지방식이 지방간 유도 동물효력시험에서도 AST, ALT, 간 조직학적 평가 등 간 손상 주요지표에서 고지방 식이 급이 마우스대비 유의한 효능이 확인되었음.
- GLP 기관에서 설치류 단회투여독성, 설치류 반복투여독성, 비설치류 단회투여독성 시험을 실시한 결과 설치류 단회투여독성시험과 비설치류 단회독성 시험에서 개똥쑥 열수추출물의 개략의 치사량은 모두 5g/10.5mL/kg 초과인 것으로 확인되었으며, 설치류 13주 반복투여독성 시험을 통해 확인된 개똥쑥 열수추출물의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두에서 1000mg/5mL/kg 이상으로 확인되었음. 개똥쑥 열수추출물의 섭취량은 고형분 기준 480 mg으로 안전성시험결과 매우 안전한 섭취량임을 확인하였음.

- 개똥쑥 열수추출물의 유해물질 분석결과 잔류농약 58종 대부분 불검출이거나 영향이 없는 수준의 매우 미량이 검출되었으며, 중금속 4종 분석결과 모두 1 mg/kg 이하로 검출되었고, 대장균군 또한 불검출 되어 유해물질 규격에 적합한 것으로 확인되었음.
- 간 기능 개선에 미치는 개똥쑥 열수추출분말의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험을 실시하였음. 분당제생병원 및 삼육서울병원 양기관에서 실시하였으며, 각 기관의 생명윤리위원회(IRB) 승인을 받아 인체적용시험을 진행하였음. 그 결과 개똥쑥 열수추출분말을 섭취한 시험군에서 AST와 ALT가 섭취 4주 후와 8주 후 대조군 대비 뚜렷하게 감소하며 전체 피로도가 감소하는 것으로 나타나, 개똥쑥 열수추출분말의 섭취가 간 기능을 개선하는 효과가 있음을 확인하였으며, 상기 결과의 최종보고서는 IRB 승인 후 개별인정 신청 제출자료로 사용하여 진행.
- 건강기능식품 개별인정 신청 자료로서, 신청원료의 원재료에 관한 자료, 제조공정도, 제조공정에 사용된 물질의 규격서, 신청원료의 제조사 규격서, 기능(지표)성분에 대한 설정근거, 기능(지표)성분의 시험방법, 신청원료의 공인시험기관 성적서 및 raw data, 안전성 자료, 기능성 자료, 국내외 인정 및 사용현황 등의 자료에 관해 CRO와 함께 검토 및 확인을 완료함. 인체적용시험 최종보고서 IRB 승인 후 개별인정 신청을 진행함.
- 현 과제의 종료시점에서 개똥쑥 열수추출물(SPB-201)의 간 건강 개선 기능을 세포와 동물에서의 전임상연구 및 인체적용시험에서 뛰어난 간 기능 개선의 유효성을 확인하였고, 개똥쑥 관련 제품으로는 최초로 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로서 제품화 달성이 확실시 됨.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표

구분	내용
최종 목표	**“간 건강” 개선 기능을 갖는 개똥쑥 추출물의 전임상 연구, 인체적용시험 및 식약처 개별인정 신청을 완료함으로써 상용화를 위한 제품 개발 달성** - 통상 전임상연구에 18개월 이상, 인체적용시험에 12개월 이상, 개별인정에 9개월 이상 소요됨을 고려할 때 본 과제 기간(31개월) 동안 개별인정을 획득하는 것은 물리적으로 어렵다고 판단되어 본 과제에서는 식약처 개별인정 신청을 목표로 설정함.
세부 목표	- 개똥쑥 추출물의 추출공정 확립 원료 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 품질관리법 연구 - 개똥쑥 추출물의 제형연구 및 인체적용시험용 제품의 대량생산 - 개똥쑥 추출물의 생물학적 활성 및 작용기전 연구 - 개똥쑥 추출물의 전임상 기능성 연구(동물모델 효력시험): 경쟁 원료 대비 동등 이상의 효과 입증 - 개똥쑥 추출물의 전임상 안전성 연구(단회 및 반복투여 독성시험) - 개똥쑥 추출물의 인체적용시험: 대조식품(placebo) 대비 주평가변수에서 통계적으로 유의성 확인 - 신규 건강기능식품 기능성 원료 개별인정

나. 연구개발 성과의 정량적 목표 설정 및 평가방법

성과 항목	단위	비중 (%)	경쟁제품 성능수준	연구개발 전 국내수준	성과물의 목표치	평가 방법
1.간 손상 억제 전임상 동물 실험에서의 비교 활성	%	15	복분자추출분말 간 손상 동물실험 모델에서의 효과 확인	확인된 바 없음	경쟁원료 대비 간 손상 억제 효능의 비교우위 확인	전문시험기관 평가 (결과보고서)
2.지방간 억제 전임상 동물 실험에서의 비교 활성	%	15	복분자추출분말 지방간 동물실험 모델에서의 효과 확인	확인된 바 없음	경쟁원료 대비 간 손상 억제 효능의 비교우위 확인	전문시험기관 평가 (결과보고서)
3.원료 제조공정 표준화	수율 (%)	10	-	표준화 안 됨	공정단계별로 일정한 수율 유지	자체평가 (제조공정도)
4.원료의 지표 성분 품질 관리	지표성분 함량 (mg/g)	10	-	확인된 바 없음	배치별로 지표성분 함량 평균 표시량의 80-120% 유지	공인시험기관 평가 (시험성적서)
5.원료의 유해물질 품질관리	ppm, CFU	10	-	확인된 바 없음	유해물질 규격에 모두 적합	공인시험기관 평가 (시험성적서)
6.원료의 안전성(치사량 또는 무해용량)	mg/Kg	10	-	확인된 바 없음	단회투여 시 치사량은 암, 수 모두 5,000 mg/kg 이상, 반복투여 시 무해용량은 암수 모두 1000 mg/kg/ day 이상	GLP 시험기관 평가 (결과보고서)
7.인체적용시험 시제품 제작	-	5	-	제작한 적 없음	시험식품 및 대조식품 제작	자체평가 (제조기록서 및 성적서)
8.인체적용시험	P value	15	-	확인된 바 없음	대조군 대비 통계적으로 유의한 기능성 평가변수 개선량 ($p< 0.05$)	인체적용시험 기관 평가 (결과보고서)
9.개별인정	-	10	-	인정된 바 없음	식약처에 개별인정신청서 제출	자체 평가 (접수증)
합계		100				

다. 목표달성 여부

성과 항목	단위	비중 (%)	달성도 (%)	성과물의 목표치	평가 방법	내용
1.간 손상 억제 전임상 동물 실험에서의 비교 활성	%	15	15	경쟁원료 대비 간 손상 억제 효능의 비교우위 확인	전문시험기관 평가 (결과보고서)	경쟁원료(밀크씨슬) 대비 간 손상 억제 효능 비교 우위 확인. 전문시험기관 평가 완료(KPC)
2.지방간 억제 전임상 동물 실험에서의 비교 활성	%	15	15	경쟁원료 대비 간 손상 억제 효능의 비교우위 확인	전문시험기관 평가 (결과보고서)	경쟁원료(밀크씨슬) 대비 간 손상 억제 효능 비교 우위 확인. 전문시험기관 평가 완료(KPC)
3.원료 제조공정 표준화	수율 (%)	10	10	공정단계별로 일정한 수율 유지	자체평가 (제조공정도)	제조공정 확립, 제조공정도 작성
4.원료의 지표 성분 품질 관리	지표성분 함량 (mg/g)	10	10	배치별로 지표성분 함량 평균 표시량의 80-120% 유지	공인시험기관 평가 (시험성적서)	지표성분 선정 및 규격설정 완료. 공인시험기관 평가 완료(한국식품과학연구원)
5.원료의 유해물질 품질관리	ppm, CFU	10	10	유해물질 규격에 모두 적합	공인시험기관 평가 (시험성적서)	유해물질 규격에 모두 적합. 공인시험기관 평가 완료(한국기능식품연구원)
6.원료의 안전성(치사량 또는 무해용량)	mg/Kg	10	10	단회투여 시 치사량은 암, 수 모두 5,000 mg/kg 이상, 반복투여 시 무해용량은 암수 모두 1000 mg/kg/ day 이상	GLP 시험기관 평가 (결과보고서)	단회투여 시 치사량은 암, 수 모두 5,000 mg/kg 이상, 반복투여 시 무해용량은 암수 모두 1000 mg/kg/ day 이상으로 안전성 확인 GLP 시험기관 평가 완료 (서울대학교 의생명연구원 안전성연구센터)
7.인체적용시험 시제품 제작	-	5	5	시험식품 및 대조식품 제작	자체평가 (제조기록서 및 성적서)	시험식품 및 대조식품 제작은 우수건강기능식품제조기준 적용업소에서 생산을 완료하여 인체적용시험에 사용 됨.
8.인체적용시험	P value	15	15	대조군 대비 통계적으로 유의한 기능성 평가변수 개선량 ($p< 0.05$)	인체적용시험기관 평가 (결과보고서)	간 기능의 대표적인 평가 지표인 AST, ALT에서 대조군 대비 시험군에서 통계적으로 유의한 기능성 확인. (분당제생병원, 삼육서울병원)
9.개별인정	-	10	8	식약처에 개별인정신청서 제출	자체 평가 (접수증)	개별인정 신청서류 작성 및 자료준비를 완료하였음, 인체적용시험 일정 지연으로 인하여 최종보고서 IRB 승인이 늦어진 상황임. 2020년 3월 중 IRB 승인 후 개별인정 신청 예정.
합계		**100**	**98**			

라. 사업화 등의 성과목표 및 평가방법

- 지식재산권 : 연구개발 기간 내 국내출원 3건 이상, 연구개발 종료 후 특허 등록 1건 이상
- 기술실시 : 연구개발 기간 내 기술실시 1건, 연구개발 종료 후 기술실시 1건 이상
- 사업화 : 연구개발 기간 내 고용 창출 3명 이상, 연구개발 기간 내 제품화 1건 및 연구개발 종료 후 제품화 2건 이상, 연구개발 종료 후 매출액 5년 평균 연간 10억 원 이상
- 기술인증 : 연구개발 종료 후 1건 이상
- 학술성과 : 연구개발 기간 내 SCI 논문 2편 이상, 연구개발 완료 후 SCI 논문 1편 이상, 연구기간 내 학술발표 4건 예정

- 홍보전시 : 연구개발 기간 내 1회 및 연구개발 완료 후 5회 이상
- 기타(타연구 활용) : 연구개발 완료 후 1회 이상

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표		지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	연구기반지표								기타(타연구활용 등)
													학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		
													논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		20					30	20		10						10				10	
최종목표		3			1		1	30		3			2			4				1	
소계	실적	3			1	6.86	1	30		13			0	1		4				1	
	달성률	100			100	+	100	100		100			0	+		100				100	

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨
** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성
*** 가중치 총합 100을 기준으로 성과목표지표별 중요도, 난이도에 따라 배분하되 가중치 총합이 100이 되도록 배분(사업화지표에 60 이상 배분)

마. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1) 성과항목

- 9. 개별인정 : 간 건강 개선 기능을 갖는 개똥쑥 추출물의 전임상 연구, 인체적용시험 및 식약처 개별인정 신청을 완료하는 것이 당초 목표임. 건강기능식품 인체적용시험은 의약품 임상시험과 달리 특정질환의 환자가 아닌, 정상인 범주의 반 건강인을 대상으로 시험을 실시해야 하기 때문에 정상치에서 약간 벗어난 대상자 모집에 어려움이 있었음. 인체적용 시험은 건강기능식품 연구에서 가장 중요한 단계이기 때문에, 모집인원이 다수 미달 된 상태에서 조기종료 할 수 없었음. 상기 원인으로 모집인원이 늦어졌지만 시험 종료 후 통계분석에서 매우 유의미한 결론을 얻을 수 있었으며, IRB 최종보고서 승인 완료 후 2020년 3월중 개별인정 신청을 진행할 예정이며, 당초 목표였던 2021년 중 개별인정 획득이 가능할 것으로 판단되어, 이후 사업화 일정은 차질 없이 진행될 것으로 사료됨. 농림기술기획평가원에서 관리하는 추적평가를 통해 경과보고 할 예정임.

2) 성과지표

- 논문 : SCI급 논문 2건을 게재하는 것이 당초 목표임. 논문 작성 및 투고 완료하였으며, 현재 심사 진행 중임. 심사기간이 길어지고 있는 상황이라 당초 목표했던 기간보다 논문 게제가 늦어지고 있지만, 최대한 빠르게 대응하여 신속하게 게재되도록 할 예정임. 농림기술기획평가원에서 관리하는 추적평가를 통해 지속적으로 경과보고 할 예정임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구개발 결과 활용 방안

- 인체적용시험 결과 개똥쑥 열수추출분말의 우수한 효과가 확인되어 현재 진행 중인 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 가능할 것으로 판단되며, 기능성 인정 후 다양한 형태의 제품으로 상용화 진행 예정.
- 국내 건강기능식품 개별인정과 동시에 본 과제를 통해 출원된 특허의 국제 PCT 출원을 진행하여 해외시장 진출의 발판을 마련할 계획임.
- 최근 사회적으로 반려동물의 건강에 대한 시장이 커져가고 있으며, 특히 개와 고양이의 급성 간부전의 문제가 빈번하게 발생하고 있는 상황임. 이러한 시장상황에 맞춰 본 과제를 통해 개발한 개똥쑥 열수추출분말을 주성분 또는 첨가원료로 활용하는 건강지향성 동물사료 개발을 진행 할 예정.
- 본 과제를 통해 간 건강 기능성 외 추가적으로 확인된 체지방 감소 효과를 갖는 기능성 소재로의 사업화를 위한 후속 연구를 진행할 예정임.
- 본 과제에서 확립된 간 건강 개선용 기능성 원료 연구개발시스템을 토대로 동일 또는 유사 기능의 추가 원료 개발에도 활용 가능함.
- 나아가 본 과제에서 확인된 개똥쑥 추출물의 효능을 기반으로 지방간 또는 간염 치료를 위한 지방간질환 치료용 천연물신약 개발을 진행 할 계획임.

나. 연구개발 결과의 파급 효과

- 국내 자생원료인 개똥쑥을 원재료로 사용함으로써 재배 농가를 육성하고 영농조합 또는 재배사업단 조성을 통해 농가의 소득 증대에 기여함.
- 일차원적인 수준에 머무르던 쑥 제품을 고부가가치 기능성 제품으로 재탄생시킴으로써 과학적으로 검증되지 않은 제품이 난립하던 시장을 정비하고 재배농가부터 원료업체, 완제업체, 유통업체에 이르기까지 관련 업체의 동반 성장 유도함.

- 간 기능 개선 기능성 소재는 고시형 원료인 밀크씨슬과 같이 해외 원료인 경우가 대부분인 문제점을 갖고 있으나, 본 개발을 통해 국내 자생원료인 개똥쑥을 활용한 제품 개발을 통해 수입을 대체할 수 있음.
- 개똥쑥 열수추출(SPB-201) 제품을 중국 등 해외 시장에 수출함으로써 외화 소득을 증대할 수 있음.

붙임. 참고문헌

1. Hee Bok Chae et al. “알코올 및 비알코올 지방간질환” 2013 대한간학회 추계학술대회
2. 임수. “비알코올성 지방간의 역학 및 질병 발생 관련 유전자” Insulin, 2010
3. 세계 약용식물 백과사전 - 개똥쑥 (Artemisia annua L.)
4. 국립수목원 국가생물종지식정보 - 개똥쑥 (Artemisia annua L.)
5. 식품안전나라 식품원료목록 - 개똥쑥 (Artemisia annua L.)
6. 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (식품의약품안전평가원)
7. 국내・외 인정・허가 현황 (UDSA)
8. 국내・외 인정・허가 현황 (WFO)
9. 국내・외 인정・허가 현황 (Tropicos)
10. 국내・외 인정・허가 현황 (PFAF)
11. 국내・외 인정・허가 현황 (중국약전)
12. ‘개똥쑥’의 종별 구별법 (국립생물자원관)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.